



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113395973 A

(43) 申请公布日 2021.09.14

(21) 申请号 201980089769.6

(22) 申请日 2019.12.09

(30) 优先权数据

10-2018-0158428 2018.12.10 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/065227 2019.12.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/123377 EN 2020.06.18

(71) 申请人 新免疫技术有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 洪昌万 李秉河 崔东勋

(74) 专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263

代理人 李献忠 张静

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

权利要求书4页 说明书38页

序列表11页 附图23页

(54) 发明名称

NRF-2缺陷型细胞及其用途

(57) 摘要

本公开涉及基于Nrf2表达的调节的T细胞抗癌免疫疗法,即,涉及一种靶向Nrf2的免疫细胞例如T细胞的抗癌疗法。癌细胞可以逃避免疫系统的监控,并且其主要机制之一是让T细胞进入无反应状态。本公开允许深度干扰T细胞中的Nrf2表达,由此解决癌细胞对T细胞表现出的免疫耐受性的问题;换言之,通过靶向Nrf2可以改善抗癌免疫疗法的效果,并且这是本公开最大的特征。本公开可以提供靶向Nrf2的新型T细胞抗癌免疫疗法和用于第二代抗癌免疫疗法的T细胞。这种技术适用于CAR-T细胞、工程化T细胞和TIL T细胞的制备,以及包括淋巴瘤的多种实体癌的治疗。可以说这是一种有效改善治疗功效的新型抗癌疗法。

1. 一种治疗有需要的受试者的肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的修饰的细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中与参考肿瘤体积(例如,所述施用前所述受试者的肿瘤体积和/或未接受所述施用的受试者的肿瘤体积)相比,所述施用减小所述受试者的肿瘤体积。

4. 如权利要求3所述的方法,与所述参考肿瘤体积相比,所述施用后肿瘤体积减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,与参考肿瘤重量(例如,所述施用前所述受试者的肿瘤重量和/或未接受所述施用的受试者的肿瘤重量)相比,所述施用减小所述受试者的肿瘤重量。

6. 如权利要求5所述的方法,与所述参考肿瘤重量相比,所述施用后肿瘤重量减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述施用改善所述受试者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的一种或多种特性。

8. 如权利要求7所述的方法,其中与参考TIL(例如,来自未接受所述施用的受试者的TIL)相比,当用同源抗原刺激时,所述TIL产生增加量的IFN- γ 。

9. 如权利要求8所述的方法,其中与所述参考TIL相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

10. 如权利要求7至9中任一项所述的方法,其中所述TIL是CD8+TIL。

11. 如权利要求7至9中任一项所述的方法,其中所述TIL是CD4+TIL。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的Nrf2蛋白的对应细胞)相比,所述修饰的细胞表现出增加的对氧化应激的抗性。

13. 如权利要求12所述的方法,其中与所述参考细胞相比,对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

14. 如权利要求12或13所述的方法,其中所述增加的对氧化应激的抗性包括在升高浓度的自由基氧物质的存在下增殖、产生IFN- γ 和/或表达颗粒酶B的能力。

15. 如权利要求14所述的方法,其中所述自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞是免疫细胞。

17. 如权利要求16所述的方法,其中所述免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或其组合。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞

(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其任何组合。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述淋巴细胞是T细胞。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化TCR。

21. 如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述肿瘤来源于癌症,所述癌症包括乳腺癌、头颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、甲状腺癌、食道癌、眼癌、胃癌、胃肠癌、卵巢癌、恶性上皮癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或其组合。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述癌症是结直肠癌、皮肤癌、淋巴瘤、肺癌或其组合。

23. 如权利要求1至22中任一项所述的方法,其包括向所述受试者施用另外的治疗剂。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述另外的治疗剂包括化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术规程、放射规程、共刺激分子的激活剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或其任何组合。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述另外的治疗剂是免疫检查点抑制剂。

26. 如权利要求24或25所述的方法,其中所述免疫检查点抑制剂包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗TIM3抗体或其任何组合。

27. 如权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述另外的治疗剂和所述修饰的细胞同时施用。

28. 如权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述另外的治疗剂和所述修饰的细胞依序施用。

29. 如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞经肠胃外、肌肉内、皮下、眼、静脉内、腹膜内、皮内、眶内、脑内、颅内、脊柱内、脑室内、鞘内、脑池内、囊内、瘤内或其任何组合进行施用。

30. 一种改善表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞的抗肿瘤免疫反应的方法,其包括修饰所述细胞以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白,其中所述NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的较低表达改善所述细胞的所述抗肿瘤免疫反应。

31. 如权利要求30所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,所述修饰的细胞中所述NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

32. 如权利要求30或31所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的所述NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,当用同源抗原刺激时,所述修饰的细胞产生增加量的IFN- γ 。

33. 如权利要求32所述的方法,其中与所述参考细胞相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

34. 如权利要求30至33中任一项所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的Nrf2蛋白的对应细胞)相比,所述修饰的细胞表现出增加的对氧化应激的抗性。

35. 如权利要求34所述的方法,其中与所述参考细胞相比,对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

36. 如权利要求34或35所述的方法,其中所述增加的对氧化应激的抗性包括在升高浓度的自由基氧物质的存在下增殖、产生IFN- γ 和/或表达颗粒酶B的能力。

37. 如权利要求36所述的方法,其中所述自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。

38. 如权利要求30至37中任一项所述的方法,其中修饰所述细胞包括使所述细胞与能够降低所述细胞中的所述NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平的基因编辑工具接触。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述基因编辑工具包括shRNA、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、CRISPR、锌指核酸酶、TALEN、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶或其任何组合。

40. 如权利要求38或39所述的方法,其中所述基因编辑工具是shRNA。

41. 如权利要求30至40中任一项所述的方法,其中所述修饰的细胞是免疫细胞。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或其组合。

43. 如权利要求42所述的方法,其中所述淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其组合。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述淋巴细胞是T细胞。

45. 一种制备用于嵌合抗原受体工程的免疫细胞的方法,其包括使所述免疫细胞与基因编辑工具接触以降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平。

46. 如权利要求45所述的方法,其中与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

47. 如权利要求45或46所述的方法,其中所述免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或其任何组合。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其任何组合。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述淋巴细胞是T细胞。

50. 如权利要求45至49中任一项所述的方法,其中所述基因编辑工具包括shRNA、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、CRISPR、锌指核酸酶、TALEN、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶或其任何组合。

51. 如权利要求50所述的方法,其中所述基因编辑工具是shRNA。

52. 如权利要求45至51中任一项所述的方法,其中编码所述基因编辑工具的核酸由表达载体表达。

53. 如权利要求45至52中任一项所述的方法,其还包括修饰所述免疫细胞以表达嵌合抗原受体(CAR)。

54. 如权利要求53所述的方法,其中修饰所述免疫细胞以表达所述CAR包括使所述免疫细胞与编码所述CAR的核酸序列接触。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述编码所述CAR的核酸序列由表达载体表达。

56. 如权利要求55所述的方法,其中所述基因编辑工具和所述CAR在单独的表达载体上编码。

57. 如权利要求55所述的方法,其中所述基因编辑工具和所述CAR在同一表达载体上编码。

58. 一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含具有降低的Nrf2表达的T细胞。

59. 如权利要求58所述的药物组合物,其中所述T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化TCR。

60. 一种通过权利要求30至57中任一项所述的方法制备的细胞。

61. 如权利要求60所述的细胞,其还包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化TCR。

62. 如权利要求60或61所述的细胞,所述细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、NK细胞或其任何组合。

NRF-2缺陷型细胞及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年12月10日提交的韩国专利申请号10-2018-0158428的优先权,所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 对以经由EFS-WEB电子方式提交的序列表的引用

[0004] 与本申请一起提交的ASCII文本文件(名称:4241_010PC01_Seqlisting_ST25.txt;大小:26,683字节;以及创建日期:2019年12月9日)中的以电子方式提交的序列表的内容以引用的方式整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及基于Nrf2表达的基于细胞(例如,T细胞)的抗癌免疫疗法。具体地,修饰本文提供的细胞以表达降低水平的Nrf2。

背景技术

[0006] 实体瘤中的髓源性抑制细胞(MDSC)可以产生免疫抑制性肿瘤微环境(TME),然后通过大量产生活性氧物质(ROS)和/或活性氮物质(RNS)来抑制效应T细胞的抗肿瘤反应。这种环境使肿瘤细胞能够逃避抗癌免疫反应,并由此促进癌细胞的生长和转移,这是肿瘤发生的特征之一。已知这种环境会影响肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的活性,但尚未对T细胞进行关于反应因子的相关研究。核因子E2因子相关因子2(Nrf2)是导致氧化应激(OS)的典型因子之一。尽管Nrf2对癌细胞的作用已得到积极评价和积累,但尚未研究OS的影响和OS负责的Nrf2在TIL(特别是细胞毒性CD8+T细胞)的抗肿瘤反应中的作用。

[0007] Nrf2在肿瘤发生中的作用是有争议的;许多先前研究表明,当Nrf2被激活时,可以预防癌变,但其他研究表明,体内Nrf2的异常或持续激活可以诱发癌变。事实上,Nrf2的过表达会导致五年存活率下降,并可能诱发对抗癌剂的抗性。目前的问题是尚未对TIL中的Nrf2进行研究,并且急需进行相关研究。尤其有必要开发一种涉及细胞毒性CD8+T细胞中Nrf2表达的调节的抗癌免疫疗法。

[0008] 尽管在癌症免疫疗法中取得了进展,但是具有某些恶性肿瘤(例如,转移性或难治性实体瘤)的患者的预后仍然很差。此类患者中只有一小部分确实经历了长期的癌症缓解,而许多患者要么没有反应,要么开始有反应但最终发展出对抗体的抗性。Sharma,P.,等,Ce11168(4):707-723(2017)。因此,仍然需要在癌症患者中具有可接受的安全性和高功效的新型治疗选择。

发明内容

[0009] 本公开的发明人已经确定了在细胞毒性CD8+T细胞中调节核因子E2因子相关因子2(Nrf2)的机制,并且已经开发出抑制Nrf2表达并且其细胞毒性功能在免疫抑制性TME中持续的T细胞。此外,Nrf2缺陷型人CAR-T细胞在抗肿瘤细胞因子、IFN γ 和颗粒酶B的产生方面优于传统T细胞。

[0010] 本公开的一个目的是提供一种用于预防和治疗癌症的药物组分。在一些方面,本公开提供具有降低或抑制的Nrf2表达的T细胞。

[0011] 本公开可以解决上述问题,即通过提供一种用于预防和治疗癌变的药物组分,涉及降低或抑制T细胞中的Nrf2表达等。

[0012] 本公开涉及一种基于靶向细胞(例如,T细胞)中的Nrf2表达的抗癌免疫疗法。癌细胞可以逃避免疫系统的监控,并且其主要机制之一是让T细胞进入耗竭状态。本公开允许深度干扰T细胞中的Nrf2表达(即,降低细胞中的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达),由此解决癌细胞表现出的T细胞耗竭问题。换言之,本公开提供了通过靶向细胞中的Nrf2表达(例如,降低或抑制NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达)可以改善抗肿瘤免疫疗法针对实体瘤的效果,并且这是本公开最大的特征。本公开可以提供基于调节细胞中的Nrf2表达的新型T细胞抗癌免疫疗法和用于第二代抗癌免疫疗法的T细胞。这种技术适用于CAR-T细胞、工程化T细胞和TIL T细胞的制备,以及包括白血病的多种实体瘤的治疗。可以说这是一种有效改善治疗功效的新型抗癌疗法。

[0013] 本文提供了一种治疗有需要的受试者的肿瘤的方法,其包括向所述受试者施用表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的修饰的细胞。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0014] 在一些方面,与参考肿瘤体积(例如,所述施用前受试者的肿瘤体积和/或未接受所述施用的受试者的肿瘤体积)相比,施用本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)减小受试者的肿瘤体积。在某些方面,与参考肿瘤体积相比,所述施用后肿瘤体积减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0015] 在一些方面,与参考肿瘤重量(例如,所述施用前受试者的肿瘤重量和/或未接受所述施用的受试者的肿瘤重量)相比,施用本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)减小受试者的肿瘤重量。在某些方面,与参考肿瘤重量相比,所述施用后肿瘤重量减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0016] 在一些方面,施用本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)改善受试者的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的一种或多种特性。在某些方面,与参考TIL(例如,来自未接受所述施用的受试者的TIL)相比,当用同源抗原刺激时,TIL产生增加量的IFN- γ 。在一些方面,与参考TIL相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。在一些方面,TIL是CD8+TIL。在一些方面,TIL是CD4+TIL。

[0017] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的Nrf2蛋白的对应细胞)相比,修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)表现出增加的对氧化应激的抗性。在某些方面,与参考细胞相比,对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约

80%、至少约90%或至少约100%或更多。在一些方面,增加的对氧化应激的抗性包括在升高浓度的自由基氧物质的存在下增殖、产生IFN- γ 和/或表达颗粒酶B的能力。在一些方面,自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。

[0018] 在一些方面,可以在本文公开的方法中施用的修饰的细胞是免疫细胞。在某些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其组合。在一些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其组合。在某些方面,淋巴细胞是T细胞。在其他方面,T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化的TCR。

[0019] 在一些方面,可以用本文公开的方法治疗的肿瘤来源于癌症,所述癌症包括乳腺癌、头颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、甲状腺癌、食道癌、眼癌、胃(stomach(gastric))癌、胃肠癌、卵巢癌、恶性上皮癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或其组合。在某些方面,癌症是结直肠癌、皮肤癌、淋巴瘤、肺癌或其组合。

[0020] 在一些方面,本文公开的治疗肿瘤的方法包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些方面,另外的治疗剂包括化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术规程、放射规程、共刺激分子的激活剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或其任何组合。

[0021] 在一些方面,另外的治疗剂是免疫检查点抑制剂。在某些方面,免疫检查点抑制剂包括抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗LAG-3抗体、抗CTLA-4抗体、抗GITR抗体、抗TIM3抗体或其任何组合。

[0022] 在一些方面,另外的治疗剂和修饰的细胞同时施用。在其他方面,另外的治疗剂和修饰的细胞依序施用。

[0023] 在一些方面,可用于在本文公开的方法中治疗肿瘤的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)经肠胃外、肌肉内、皮下、眼、静脉内、腹膜内、皮内、眶内、脑内、颅内、脊柱内、脑室内、鞘内、脑池内、囊内、瘤内或其任何组合进行施用。

[0024] 本公开还提供了一种改善表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞的抗肿瘤免疫反应的方法,其包括修饰细胞以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白,其中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的较低表达改善细胞的抗肿瘤免疫反应。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,修饰的细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0025] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,当用同源抗原刺激时,修饰的细胞产生增加量的IFN- γ 。在某些方面,与参考细胞相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

[0026] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的Nrf2蛋白的对应细胞)相比,修饰的细胞表现出增加的对氧化应激的抗性。在某些方面,与参考细胞相比,对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少

约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。在一些方面,增加的对氧化应激的抗性包括在升高浓度的自由基氧物质的存在下增殖、产生IFN- γ 和/或表达颗粒酶B的能力。在某些方面,自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。

[0027] 在一些方面,在本文公开的方法中修饰细胞包括使细胞与能够降低细胞中的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平的基因编辑工具接触。在某些方面,基因编辑工具包括shRNA、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、CRISPR、锌指核酸酶、TALEN、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶或其任何组合。在一些方面,基因编辑工具是shRNA。

[0028] 在一些方面,修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)是免疫细胞。在某些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其组合。在一些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其组合。在某些方面,淋巴细胞是T细胞。

[0029] 本文还提供了一种制备用于嵌合抗原受体工程的免疫细胞的方法,其包括使免疫细胞与基因编辑工具接触以降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0030] 在一些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其任何组合。在某些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其任何组合。在一些方面,淋巴细胞是T细胞。

[0031] 在一些方面,可用于制备用于嵌合抗原受体工程的免疫细胞的方法的基因编辑工具包括shRNA、siRNA、miRNA、反义寡核苷酸、CRISPR、锌指核酸酶、TALEN、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶或其任何组合。在某些方面,基因编辑工具是shRNA。

[0032] 在一些方面,本文公开的制备用于嵌合抗原受体工程的免疫细胞的方法还包括修饰免疫细胞以表达嵌合抗原受体(CAR)。在某些方面,修饰免疫细胞以表达CAR包括使免疫细胞与编码CAR的核酸序列接触。

[0033] 在一些方面,由表达载体表达编码基因编辑工具的核酸。在某些方面,由表达载体表达编码CAR的核酸序列。在一些方面,基因编辑工具和CAR在单独的表达载体上编码。在其他方面,基因编辑工具和CAR在同一表达载体上编码。

[0034] 本文提供了一种用于预防或治疗癌症的药物组合物,其包含具有降低的Nrf2表达的T细胞。在一些方面,T细胞包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化的TCR。

[0035] 本文还提供了通过本文公开的方法制备的细胞。在某些方面,细胞包含嵌合抗原受体(CAR)和/或T细胞受体(TCR),例如,工程化的TCR。在一些方面,细胞是T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、NK细胞或其任何组合。

附图说明

[0036] 图1示出了细胞毒性CD8+T细胞中Nrf2 mRNA表达随着氧化应激的增加(由增加的H₂O₂浓度表示)的变化。

[0037] 图2示出了从荷瘤小鼠和无瘤小鼠的组织中分离的不同细胞群中Nrf2 mRNA的表达。示出的不同细胞包括(从左到右):(i)肿瘤浸润T细胞(来自荷瘤小鼠);(ii)肿瘤浸润B细胞(来自荷瘤小鼠);(iii)非T和非B TIL(DN)(来自荷瘤小鼠);(iv)来自引流淋巴结(“dLN”)的T细胞(来自荷瘤小鼠);(v)来自非引流淋巴结的T细胞(来自荷瘤小鼠);(vi)来自非引流淋巴结的T细胞(来自无瘤小鼠)。

[0038] 图3示出了Nrf2缺陷型小鼠和WT小鼠中的黑素瘤生长速率。具体地,图3提供了对在肿瘤(即,黑素瘤)接种后的不同时间点Nrf2^{-/-}小鼠和野生型小鼠(即,表达正常水平的Nrf2)中的肿瘤生长的比较。

[0039] 图4示出了随着Nrf2表达而变化的黑素瘤增殖(即,生长)的图像。具体地,图4提供了从野生型(左)和Nrf2^{-/-}(右)小鼠中分离的黑素瘤肿瘤的图像。

[0040] 图5示出了随着Nrf2表达而变化的淋巴瘤增殖。具体地,图5提供了对在肿瘤(即,淋巴瘤)接种后的不同时间点Nrf2^{-/-}小鼠和野生型小鼠(即,表达正常水平的Nrf2)中的肿瘤体积的比较。

[0041] 图6示出了随着Nrf2表达而变化的淋巴瘤增殖(即,生长)的图像。具体地,图6提供了从野生型(左)和Nrf2^{-/-}(右)小鼠中分离的淋巴瘤肿瘤的图像。

[0042] 图7示出了随着Nrf2表达而变化的野生型和Nrf2^{-/-}小鼠的肺中癌细胞转移的图像。左图示出了从代表性野生型(上)和Nrf2^{-/-}(下)动物中分离的肺组织的照片描述。右图提供了来自野生型(上)和Nrf2^{-/-}(下)动物的肺组织的免疫组织化学图像。肿瘤在图像中用箭头指示。

[0043] 图8A和8B示出了随着Nrf2表达而变化的T细胞介导的抗肿瘤免疫反应。具体地,图8A和8B示出了在Nrf2^{-/-}动物中观察到的改善的抗肿瘤免疫反应是T细胞介导的。提供了以下组的肿瘤生长(图8A)和肿瘤重量(图8B)的比较:(i)接受对照IgG抗体的荷瘤野生型动物(“WT+IgG”或“空心圆圈”);(ii)接受T细胞消耗型抗CD3抗体的施用的荷瘤野生型动物(“WT+ α -CD3”或“实心圆圈”);(iii)接受对照IgG抗体的荷瘤Nrf2^{-/-}动物(“Nrf2^{-/-}+IgG”或“空心方块”);以及(iv)接受T细胞消耗型抗CD3抗体的施用的荷瘤Nrf2^{-/-}动物(“Nrf2^{-/-}+ α -CD3”或“实心方块”)。

[0044] 图9A和9B提供了在Nrf2^{-/-}动物中观察到的改善的抗肿瘤免疫反应是不依赖B细胞。提供了以下组的肿瘤生长(图9A)和肿瘤重量(图9B)的比较:(i)接受对照IgG抗体的荷瘤野生型动物(“WT+IgG”或“空心圆圈”);(ii)接受B细胞消耗型抗B220抗体的施用的荷瘤野生型动物(“WT+ α -B220”或“实心圆圈”);(iii)接受对照IgG抗体的荷瘤Nrf2^{-/-}动物(“Nrf2^{-/-}+IgG”或“空心方块”);以及(iv)接受B细胞消耗型抗B220抗体的施用的荷瘤Nrf2^{-/-}动物(“Nrf2^{-/-}+ α -B220”或“实心方块”)。

[0045] 图10示出了随着Nrf2表达而变化的T细胞活性。具体地,图10提供了对从荷瘤野生型(上)和Nrf2^{-/-}(下)动物中分离的引流淋巴结T细胞(“引流LNT”)和TIL产生的IL-17(y轴)和IFN- γ (x轴)的比较。两种不同类别的T细胞基于它们的CD4和CD8表达进一步划分。

[0046] 图11示出了Nrf2缺失的毒性CD8⁺T细胞在过继转移模型中的抗癌功效。具体地,分离来自野生型、Nrf2^{+/-}或Nrf2^{-/-}小鼠的OVA特异性CD8⁺T细胞,并将其过继转移到接种有EG7-OVA肿瘤细胞的野生型动物中。不同的治疗组如下:(1)WT细胞到WT小鼠中;(2)Nrf2^{+/-}细胞到WT小鼠中;以及(3)Nrf2^{-/-}细胞到WT小鼠中。图11提供了在肿瘤接种后的不同时间

点不同动物中的肿瘤体积的比较。

[0047] 图12为本公开的流程的示意图,即,涉及细胞毒性CD8+T细胞中Nrf2表达的调节的肿瘤免疫疗法。

[0048] 图13A和13B提供了对接种有MC38(结直肠)肿瘤细胞的野生型(空心圆圈)、Nrf2-/- (实心方块)和Nrf2-转基因(实心三角)小鼠的抗肿瘤免疫反应的比较。图13A示出了在肿瘤接种后的不同时间点不同治疗组中的肿瘤体积。图13B提供了对肿瘤接种后第28天的肿瘤体积的比较。

[0049] 图14A、14B、14C和14D示出了从野生型(左列,“WT”)、Nrf2-转基因(中列,“Nrf2Tg”)和Nrf2-/- (右列,“Nrf2KO”)动物中分离的T细胞抵抗由过氧化氢(H₂O₂)的存在提供的氧化应激(OS)的功能。在图14A中,OS抗性通过在有或没有H₂O₂的TCR刺激时来自不同动物的T细胞产生的IFN- γ 的量来测量。图14B提供了图14A中提供的流式细胞术数据的图形描述。在图14C中,OS抗性通过颗粒酶B的表达来测量。图14D提供了图14C中提供的流式细胞术数据的图形描述。在图14A和14C二者中,(i)上排示出的细胞既未受TCR刺激也未暴露于H₂O₂; (ii)中排示出的细胞受TCR刺激但未暴露于H₂O₂;并且(iii)下排示出的细胞既受TCR刺激又暴露于H₂O₂。在所述流程图中的每一个中,左侧的方框区域代表激活的T细胞(即,在TCR刺激时增殖),并且右侧的方框区域代表那些在TCR刺激时未增殖的T细胞。增殖基于CFSE谱示出。

[0050] 图15A、15B和15C示出了缺乏Nrf2表达的CD19特异性CAR T细胞的产生。图15A提供了CD19 CAR构建体的示意图。图15B示出了使用对Nrf2 mRNA具有特异性的shRNA在转导的CD19 CAR T细胞中对Nrf2 mRNA表达的敲低。图15C示出了CD19特异性Nrf2缺陷型CAR T细胞抵抗OS的活性,如通过在H₂O₂的存在下在抗CD3刺激后产生的IFN- γ 的量所测量的。上图示出的数据用于对照CAR T细胞(即,表达正常水平的Nrf2)。

[0051] 图16A、16B和16C示出了使用CRISPR/Cas9系统在人T细胞中的Nrf2蛋白表达的结果。图16A、16B和16C提供了使用三种不同的指导RNA(gRNA)以Cas9蛋白靶向Nrf2基因的结果。T7E1分析用于检测Nrf2基因上的在靶CRISPR/Cas9编辑事件。示出的百分比代表在用Cas9/gRNA复合物修饰后Nrf2基因上各个gRNA的插入缺失突变率。

具体实施方式

[0052] 癌细胞可以逃避免疫系统的监控,并且其主要机制之一是让T细胞进入耗竭状态。本公开允许深度干扰T细胞中的Nrf2表达,由此解决TME诱导的TIL的免疫衰竭的问题;换言之,通过靶向Nrf2可以改善抗癌免疫疗法的效果,并且这是本公开最大的特征。因此,本公开涉及治疗有需要的受试者的肿瘤的方法,其包括施用具有降低的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白表达的修饰的细胞。在一些方面,本公开涉及改善CAR或TCR工程细胞的抗肿瘤功效的方法。在一些方面,本公开涉及一种预防或抑制免疫细胞针对肿瘤的免疫耐受性的方法。

[0053] I. 定义

[0054] 为使本公开可更易于被理解,首先定义某些术语。如本申请中所用,除非本文另外明确提供,否则以下术语中的每一个应具有下文列出的含义。额外定义遍及本申请加以阐述。

[0055] 在整个本公开中,术语“一个/种(a/an)”实体是指该实体中的一个或多个;例如,

“抗体”被理解为代表一种(个)或多种(个)抗体。因此,术语“一个(种)”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。

[0056] 此外,当在本文中使用时,“和/或”应视为特定公开两个指定特征或组分中的每一者,伴有或不伴有另一者。因此,如本文在诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)和“B”(单独)。同样,如诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下方面中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0057] 应了解,每当在本文中以措辞“包含”描述各个方面的情况下,还提供了以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的另外类似方面。

[0058] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本公开所相关领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第2版, 2002, CRC Press; Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press; 和 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修订板, 2000, Oxford University Press, 给普通技术人员提供本公开中使用的许多术语的通用字典。

[0059] 单位、前缀和符号以它们的国际单位制(SI)接受形式表示。数值范围包括界定范围的数值。除非另有说明,否则氨基酸序列以氨基到羧基的方向从左到右书写。本文提供的标题并非是对本公开的各个方面的限制,所述各个方面可通过参考说明书整体而得到。因此,通过参考说明书整体,下文紧接着定义的术语得到更充分阐释。

[0060] 术语“约”在本文中用于意指近似、大致、大约或在……左右。当术语“约”与数值范围联合使用时,它通过使边界延伸高于和低于阐述的数值来修饰那个范围。一般来说,术语“约”可通过向上或向下(增高或降低)变化例如10%来将数值修饰为高于和低于陈述值。

[0061] 如本文所用,“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任一者,将治疗剂或包含治疗剂的组合物物理引入到受试者中。本文所述的治疗剂的不同施用途径包括静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径,例如通过注射或输注。如本文所用,短语“肠胃外施用”意指通常通过注射而不是肠内和局部施用的施用方式,并且包括但不限于静脉内、腹膜内、肌肉内、动脉内、鞘内、淋巴内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、气管内、肺、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脑室内、玻璃体内、硬膜外和胸骨内注射和输注,以及体内电穿孔。可替代地,本文所述的治疗剂可经由非肠胃外途径,诸如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、口服、阴道、直肠、舌下或局部来施用。还可以例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时间段内进行施用。

[0062] 如本文所用,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,诸如蛋白质、肽或半抗原。如本文所用,术语“同源抗原”是指免疫细胞(例如,T细胞)识别并由此诱导免疫细胞的激活(例如,触发诱导效应功能(诸如细胞因子的产生)和/或细胞增殖的细胞内信号)的抗原。

[0063] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链,所述链的长度没有上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可包含修饰,诸如但不限于糖基化、磷酸化或二硫键形成。“蛋白质”可以包含一个或多个多肽。除非另外说明,否则术语“蛋白质”和“多肽”可以互换使用。

[0064] 如本文所用,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,并且可以是cDNA。

[0065] 如本文所用,术语“载体”旨在指能够转运已与其连接的另一种核酸的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”,其是指其中可连接额外DNA区段的环状双链DNA环。载体的另一种类型是病毒载体,其中可将额外DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)可在引入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中,并且由此随宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引导与其可操作地连接的基因表达。此类载体在本文中被称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般来说,在重组DNA技术中有用的表达载体常常呈质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,还包括其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们具有等效的功能。

[0066] “癌症”是指广泛的各种疾病,其特征在于体内异常细胞的不受控制的生长。不受调控的细胞分裂和生长导致恶性肿瘤的形成,其侵入邻近组织,并且还可以通过淋巴系统或血液转移到身体的远端部位。如本文所用,“癌症”是指原发性、转移性和复发性癌症。

[0067] 如本文所用,术语“免疫反应”是指脊椎动物内针对外来药剂的生物反应,所述反应保护生物体免受这些药剂和由它们引起的疾病的影响。免疫反应是由免疫系统的细胞(例如T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突状细胞或嗜中性粒细胞)以及这些细胞中的任一种或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用介导的,所述免疫反应导致在脊椎动物的体内选择性靶向、结合、损害、破坏和/或消除侵入的病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞或其他异常细胞、或者(在自身免疫或病理性炎症的情况下)正常的人细胞或组织。免疫反应包括例如活化或抑制T细胞,例如效应T细胞或Th细胞,诸如CD4⁺或CD8⁺T细胞,或抑制Treg细胞。如本文所用,术语“T细胞”和“T淋巴细胞”可互换,并且是指由胸腺产生或加工的任何淋巴细胞。在一些方面,T细胞是CD4⁺T细胞。在一些方面,T细胞是CD8⁺T细胞。在一些方面,T细胞是NKT细胞。

[0068] 如本文所用,术语“抗肿瘤免疫反应”是指针对肿瘤抗原的免疫反应。

[0069] 如本文所用,术语“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”是指已经从外周(例如,从血液)迁移到肿瘤中的淋巴细胞(例如,效应T细胞)。在一些方面,肿瘤浸润淋巴细胞是CD4⁺TIL。在其他方面,肿瘤浸润淋巴细胞是CD8⁺TIL。

[0070] 刺激免疫反应或免疫系统的能力增强可能由T细胞共刺激受体的激动活性增强和/或抑制性受体的拮抗活性增强引起。刺激免疫反应或免疫系统的能力增强可以通过在测量免疫反应的测定(例如,测量细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性(直接在靶细胞上确定,或经由检测CD107a或颗粒酶间接确定)和增殖方面的变化的测定)中EC50或最大活性水平的倍数增加来反映。刺激免疫反应或免疫系统活性的能力可以至少增强10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多倍。

[0071] “受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括但不限于脊椎动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗和啮齿动物,诸如小鼠、大鼠和豚鼠。在一些方面,受试者是人。术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用。

[0072] 术语“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指提供所需的生物、治疗和/或预防结果

的药剂的量。该结果可以是疾病的一种或多种体征、症状或病因的减少、改善、缓和、减轻、延迟和/或缓解,或者生物系统的任何其他所需改变。关于实体瘤,有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤的生长速率(诸如抑制肿瘤生长)或者防止或延迟其他不需要的细胞增殖的量。在一些方面,有效量是足以延迟肿瘤发展的量。在一些方面,有效量是足以防止或延迟肿瘤复发的量。有效量可以一次或多次施用来施用。有效量的药物或组合物可以:(i)减少癌细胞的数量;(ii)减小肿瘤大小;(iii)在一定程度上抑制、减缓、减慢并可阻止癌细胞浸润到外周器官;(iv)抑制(即,在一定程度上减慢并可以阻止肿瘤转移);(v)抑制肿瘤生长;(vi)防止或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上缓解一种或多种与癌症相关的症状。在一些方面,“治疗有效量”是本文的修饰的细胞的量,其经临床证实会影响癌症的显著减少或减慢诸如晚期实体瘤的癌症的进展(消退)。治疗剂促进疾病消退的能力可使用熟练从业者已知的多种方法来评估,诸如在临床试验期间在人受试者中,在预测在人中的功效的动物模型系统中,或通过测定药剂在体外测定中的活性。

[0073] 如本文所用,术语“护理标准”是指被医学专家接受为对某种类型的疾病的适当治疗并且被医疗保健专业人员广泛使用的治疗。所述术语可以与以下术语中的任一者互换使用:“最佳实践”、“标准医疗护理”和“标准疗法”。

[0074] 例如,“抗癌剂”促进受试者的癌症消退或防止进一步的肿瘤生长。在某些方面,治疗有效量的药物促进癌症消退至消除癌症的程度。“促进癌症消退”意指单独或与抗肿瘤剂组合施用有效量的药物导致肿瘤生长或大小减少、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重性降低、疾病无症状时期的频率和持续时间增加,或预防由于疾病折磨而引起的损害或残疾。此外,关于治疗的术语“有效”和“有效性”包括药理有效性和生理安全性。药理有效性是指药物促进患者中的癌症消退的能力。生理安全性是指由于药物施用而引起在细胞、器官和/或生物体水平上的毒性或其他不良生理反应(不良反应)的水平。

[0075] 如本文所用,术语“免疫检查点抑制剂”是指完全或部分减少、抑制、干扰或调节一种或多种检查点蛋白的分子。检查点蛋白调控T细胞的活化或功能。检查点蛋白调控T细胞的活化或功能。许多检查点蛋白是已知的,诸如CTLA-4及其配体CD80和CD86;以及PD-1及其配体PD-L1和PD-L2。Pardoll, D.M., Nat Rev Cancer 12(4):252-64(2012)。这些蛋白质负责T细胞反应的共刺激或抑制性相互作用。免疫检查点蛋白调控并保持自我耐受性以及生理免疫反应的持续时间和幅度。免疫检查点抑制剂包括抗体或来源于抗体。

[0076] 如本文所用,术语“氧化应激”是指以氧化剂过量和/或抗氧化剂水平降低为特征的状况。细胞氧化剂可包括但不限于氧的自由基(超氧阴离子、羟基自由基和/或过氧自由基);活性非自由基氧物质例如像过氧化氢和单线态氧;碳自由基;氮自由基;硫自由基;及其组合。在一些方面,氧化应激状况可导致例如细胞损伤、细胞性能受损和/或细胞死亡。

[0077] 如本文所用,术语“修饰的细胞”是指与未经修饰的对应细胞不同的细胞。从本公开显而易见的是,与参考细胞(例如,未经修饰的对应细胞)相比,本文公开的修饰的细胞表达降低水平NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在一些方面,修饰的细胞通过将外来或外源核酸引入细胞来产生。在某些方面,外来或外源核酸可以编码本文公开的基因编辑工具。在其他方面,外来或外源核酸可以编码嵌合抗原受体(诸如本文所述的那些)。可以通过本领域已知的方法将核酸引入细胞,例如像,电穿孔(参见例如,Heiser W.C. Transcription Factor Protocols: Methods in Molecular BiologyTM2000;130:117-134)、化学(例如,磷酸钙或脂

质) 转染(参见例如, Lewis W.H.等, Somatic Cell Genet.1980年5月;6(3):333-47; Chen C.等, Mol Cell Biol.1987年8月;7(8):2745-2752)、与含有重组质粒的细菌原生质体融合(参见例如, Schaffner W.Proc Natl Acad Sci USA.1980年4月;77(4):2163-7) 或将纯化的DNA直接显微注射到细胞核中(参见例如, Capecchi M.R.Cell.1980年11月;22(2 Pt 2):479-88)。

[0078] 如本文所用,术语“升高的浓度”是指与适当对照(例如,健康组织或细胞)相比,物质(例如,活性氧物质)高于正常的水平。

[0079] 如本文所用,术语“活性氧物质”是指含有氧的高活性化学物质,其容易与其他分子反应,从而导致潜在的破坏性修饰。活性氧物质包括例如氧离子、无机和有机的自由基和过氧化物(诸如过氧化氢)、超氧化物、羟基自由基、脂质氢过氧化物酶和单线态氧。它们一般是非常小的分子,并且由于存在不成对的价壳电子而具有高反应性。几乎所有癌症都与活性氧物质的浓度升高有关。Liou,G.等, Free Radic Res44(5):1-31(2010)。

[0080] 如本文所用,术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指具有偶联至胞内结构域的抗原特异性胞外结构域的重组融合蛋白,所述胞内结构域在抗原与胞外结构域结合时指导细胞执行特定的功能。术语“人工T细胞受体”、“嵌合T细胞受体”和“嵌合免疫受体”在本文中均可与术语“嵌合抗原受体”互换使用。嵌合抗原受体与其他抗原结合剂的区别在于它们能够结合MHC非依赖性抗原并通过其胞内结构域转导激活信号。

[0081] 嵌合抗原受体的抗原特异性胞外结构域识别并特异性结合抗原,通常是恶性肿瘤的表面表达抗原。例如,当抗原特异性胞外结构域以约0.1pM至约10 μ M,例如约0.1pM至约1 μ M或约0.1pM至约100nM之间的亲和常数或相互作用亲和力(K_D)结合抗原时,所述抗原特异性胞外结构域特异性结合所述抗原。用于确定相互作用亲和力的方法是本领域已知的。适用于本公开的CAR中的抗原特异性胞外结构域可以是任何抗原结合多肽,其中多种是本领域已知的。在一些方面,抗原结合结构域是单链Fv(scFv)。适合使用其他基于抗体的识别结构域(cAb VHH(骆驼抗体可变结构域)及其人源化形式、IgNAR VH(鲨鱼抗体可变结构域)及其人源化形式、sdAb VH(单结构域抗体可变结构域)和“骆驼化”抗体可变结构域。在一些方面,也适合使用基于T细胞受体(TCR)的识别结构域,诸如单链TCR(scTv,含有V. α .V. β 的单链双结构域TCR)。

[0082] 本文公开的嵌合抗原受体还可以包括胞内结构域,其在抗原与抗原特异性胞外结构域结合时向细胞提供胞内信号(表达CAR)。在一些方面,CAR的胞内信号传导结构域负责激活表达嵌合受体的T细胞的效应功能中的至少一种。

[0083] 术语“胞内结构域”是指在抗原与胞外结构域结合时转导效应功能信号并指导T细胞执行特定功能的CAR部分。合适的胞内结构域的非限制性实例包括T细胞受体的 ζ 链或其任何同源物(例如, η 、 δ 、 γ 或 ϵ)、MB 1链、829、Fc RIII、Fc RI和信号分子的组合,诸如CD3 ζ 和CD28、CD27、4-1BB、DAP-10、OX40及其组合,以及其他类似的分子和片段。可以使用激活蛋白家族的其他成员的胞内信号传导部分,诸如Fc γ RIII和Fc ϵ RI。虽然通常会采用整个胞内结构域,但是在许多情况下,不需要使用整个胞内多肽。就可以使用胞内信号传导结构域的截短部分而言,可以使用这种截短部分代替完整的链,只要其仍然转导效应功能信号即可。因此,术语胞内结构域意在包含胞内结构域的足以转导效应功能信号的任何截短部分。通常,抗原特异性胞外结构域通过跨膜结构域与嵌合抗原受体的胞内结构域连接。跨膜结构

域横贯细胞膜,将CAR锚定到T细胞表面,并将胞外结构域连接到胞内信号传导结构域,从而影响CAR在T细胞表面上的表达。嵌合抗原受体还可包含一个或多个共刺激结构域和/或一个或多个间隔区。共刺激域来源于共刺激蛋白的胞内信号传导结构域,其在体内增强细胞因子的产生、增殖、细胞毒性和/或持久性。“肽铰链”将抗原特异性胞外结构域连接到跨膜结构域。跨膜结构域与共刺激结构域融合,可选地,共刺激结构域与第二共刺激结构域融合,并且共刺激结构域与信号传导结构域融合,不限于CD3 ζ 。例如,在抗原特异性胞外结构域与跨膜结构域之间以及在串联CAR的情况下在多个scFv之间包含间隔结构域会影响抗原结合结构域的灵活性,并由此影响CAR功能。合适的跨膜结构域、共刺激结构域和间隔区是本领域已知的。

[0084] 如本文所用,术语“基因编辑”是指改变细胞基因组中存在的遗传信息的过程。这种基因编辑可以通过操纵基因组DNA来执行,从而导致遗传信息的修改。在一些方面,这种基因编辑可以影响已编辑的DNA的表达。在其他方面,这种基因编辑不会影响已编辑的DNA的表达。在一些方面,本文公开的修饰的细胞的基因编辑可以使用本文所述的基因编辑工具进行。基因编辑工具的非限制性实例包括RNA干扰分子(例如,shRNA、siRNA、miRNA)、反义寡核苷酸、CRISPR、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶或其任何组合。

[0085] 如本文所用,术语“ μg ”和“ μM ”可分别与“ μg ”和“ μM ”互换使用。

[0086] 本文所述的各个方面在以下小节中进一步详细描述。

[0087] II. 本公开的方法

[0088] IIa. 治疗方法

[0089] 本公开涉及一种治疗有需要的受试者的肿瘤(或癌症)的方法,其包括向所述受试者施用表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的修饰的细胞。在一些方面,“降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白”包括不表达NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。

[0090] 术语“Nrf2”或“核因子红细胞2相关因子2”是指属于碱性亮氨酸拉链蛋白转录因子家族的蛋白质。Nrf2也被称为“核因子,红细胞2样2”、“核因子红细胞衍生2样2”、“HEBP1”和“IMDDHH”。

[0091] 在人类中,Nrf2由位于2号染色体上的NFE2L2基因编码。存在三种已知的人Nrf2同工型。同工型1(UniProt:Q16236-1)由605个氨基酸组成,并且已被选为规范序列。同工型2(UniProt:Q16236-2)由589个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:氨基酸1-16:缺失。同工型3(UniProt:Q16236-3)由582个氨基酸组成,并且与规范序列的区别如下:氨基酸1-16:缺失;并且氨基酸135-141:缺失。表1(如下)提供了三种已知Nrf2同工型的氨基酸序列。

[0092] 表1.Nrf2蛋白同工型

[0093]

<p>同工型 1 (UniProt : Q16236-1)</p>	<p>MMDLELPPPGLPSQQDMDLIDILWRQDIDLGVSREVDFDSQRRKEYELEKQKKLEKERQE QLQKEQEKAFFAQLQLDEETGEFLPIQPAQHIQSETSGSANYSQVAHIPKSDALYFDDCM QLLAQTFFVDDNEVSSATFQSLVPDIPGHIESPVFIATNQAQSPETSVAQVAPVDLDGM QQDIEQVWEELLSIPELQCLNIENDKLVETTMVPSPEAKLTEVDNYHFYSSIPSMKEVEG NCSPHFLNAFEDSFSSILSTEDPNQLTVNSLNSDATVNTDFGDEFYSAFIAEPSISNSMP SPATLSHSLSELLNGPIDVSDLSLCKAFNQNHPESTAEFNDSDSGISLNTSPSVASPEHS VESSSYGDTLLGLSDSEVEELDSAPGSVKQNGPKTPVHSSGDMVQPLSPSQGQSTHVHDA QCENTPEKELPVSPGHRKTPFTKDKHSSRLEAHLTRDELRAKALHIPFPVEKIINLPVVD FNEMMSKEQFNEAQLALIRDIRRRGKNKVAAQNCRRKLENIVELEQDLHLKDEKEKLL KEKGENDKSLHLLKKQLSTLYLEVFSMLRDEDEGPKYSPSEYSLQQTRDGNVFLVPKSKKP DVKKN (SEQ ID NO: 1)</p>
<p>同工型 2 (UniProt : Q16236-2)</p>	<p>MDLIDILWRQDIDLGVSREVDFDSQRRKEYELEKQKKLEKERQEQLQKEQEKAFFAQLQL DEETGEFLPIQPAQHIQSETSGSANYSQVAHIPKSDALYFDDCMQLLAQTFFVDDNEVS SATFQSLVPDIPGHIESPVFIATNQAQSPETSVAQVAPVDLDGMQQDIEQVWEELLSIPE LQCLNIENDKLVETTMVPSPEAKLTEVDNYHFYSSIPSMKEVEGNCSPHFLNAFEDSFSS ILSTEDPNQLTVNSLNSDATVNTDFGDEFYSAFIAEPSISNSMPSPATLSHSLSELLNGP IDVSDLSLCKAFNQNHPESTAEFNDSDSGISLNTSPSVASPEHSVESSSYGDTLLGLSDS EVEELDSAPGSVKQNGPKTPVHSSGDMVQPLSPSQGQSTHVHDAQCENTPEKELPVSPGHR RKTPTFTKDKHSSRLEAHLTRDELRAKALHIPFPVEKIINLPVVDVFNEMMSKEQFNEAQLA LIRDIRRRGKNKVAAQNCRRKLENIVELEQDLHLKDEKEKLLKEKGENDKSLHLLKKQ LSTLYLEVFSMLRDEDEGPKYSPSEYSLQQTRDGNVFLVPKSKKPDVKKN (SEQ ID NO: 2)</p>
<p>同工型 3 (UniProt : Q16236-3)</p>	<p>MDLIDILWRQDIDLGVSREVDFDSQRRKEYELEKQKKLEKERQEQLQKEQEKAFFAQLQL DEETGEFLPIQPAQHIQSETSGSANYSQVAHIPKSDALYFDDCMQLLAQTFFVDDNESL VPDIPGHIESPVFIATNQAQSPETSVAQVAPVDLDGMQQDIEQVWEELLSIPELQCLNIE NDKLVETTMVPSPEAKLTEVDNYHFYSSIPSMKEVEGNCSPHFLNAFEDSFSSILSTEDP NQLTVNSLNSDATVNTDFGDEFYSAFIAEPSISNSMPSPATLSHSLSELLNGPIDVSDLS LCKAFNQNHPESTAEFNDSDSGISLNTSPSVASPEHSVESSSYGDTLLGLSDSEVEELDS APGSVKQNGPKTPVHSSGDMVQPLSPSQGQSTHVHDAQCENTPEKELPVSPGHRKTPFTK DKHSSRLEAHLTRDELRAKALHIPFPVEKIINLPVVDVFNEMMSKEQFNEAQLALIRDIRR RGKNKVAAQNCRRKLENIVELEQDLHLKDEKEKLLKEKGENDKSLHLLKKQLSTLYLE VFSMLRDEDEGPKYSPSEYSLQQTRDGNVFLVPKSKKPDVKKN (SEQ ID NO: 3)</p>

[0094] 如本文所用,术语“Nrf2”包括由细胞天然表达的Nrf2的任何变体或同工型。Nrf2的以下天然变体是本领域已知的:(i)氨基酸位置31:G→R;(ii)氨基酸位置43:R→Q;(iii)氨基酸位置79:E→K;(iv)氨基酸位置80:T→K;(v)氨基酸位置81:G→S;(vi)氨基酸位置99:S→P;以及(vii)氨基酸位置268:V→M。因此,在一些方面,本文公开的修饰的细胞表达降低水平的与同工型1相关的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在某些方面,本文公开的修饰的细胞表达降低水平的与同工型2相关的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在其他方面,本文公开的修饰的细胞表达降低水平的与同工型3相关的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在再其他方面,本文公开的修饰的细胞表达降低水平的与所有同工型相关的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。

[0095] 在一些方面,Nrf2或其任何变体和同工型可以从天然表达它们的细胞或组织中分离或重组产生。编码上述人Nrf2同工型的多核苷酸的核酸序列在表2(以下)中提供。

[0096] 表2.Nrf2核酸

<p>同工型 1 (GenBank 登录号 NM_00616 4.5)</p>	<p>GATTACCGAGTGC CGGGAGCCCGGAGGAGCCGCGACGCGCCACCGCCGCGCCGCGCCACCG AGCCGCCCTGTCCGCGCCGCGCCTCGGCAGCCGGAACAGGGCCGCGTCCGGGAGCCCAACACACGGTC CACAGCTCATCATGATGGACTTGGAGCTGCCGCCCGGGACTCCCGTCCAGCAGGACATGGATTTGAT TGACATACTTTGGAGGCAAGATATAGATCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTATTTGACTTCAGTCAGCGACGG AAAGAGTATGAGCTGGAAAAACAGAAAAACTTGAAAAGGAAAGCAAGAACAACCTCCAAAAGGAGCAAG AGAAAGCCTTTTTCGCTCAGTTACAAC TAGATGAAGAGACAGGTGAATTTCTCCCAATTCAGCCAGCCCA GCACATCCAGTCAGAAACCAGTGGATCTGCCAACTACTCCAGGTTGCCACATTCCCAAATCAGATGCT TTGTACTTTGATGACTGCATGCAGCTTTTGGCGCAGACATTCCTGTTGTAGATGACAATGAGGTTTCTT CGGCTACGTTTCAGTCACTTGTTCCTGATATTCCTGGTACATCGAGAGCCAGTCTTCATTGCTACTAA TCAGGCTCAGTCACCTGAAACTTCTGTGCTCAGGTAGCCCTGTGATTTAGACGGTATGCAACAGGAC ATTGAGCAAGTTGGGAGGAGCTATTATCCATTCTGAGTTACAGTGTCTTAATATTGAAAATGACAAGC TGGTTGAGACTACCATGGTTCCAAGTCCAGAAGCCAAACTGACAGAAGTTGACAATATCATTTTTACTC ATCTATAACCCTCAATGAAAAAGAAGTAGGTAAGTGTAGTCCACATTTTCTTAATGCTTTTGAGGATTC TTCAGCAGCATCCTCTCCACAGAAGACCCCAACCAGTTGACAGTGAACCTATTAATTCAGATGCCACAG TCAACACAGATTTTGGTGATGAATTTTATTCTGCTTTCATAGCTGAGCCAGTATCAGCAACAGCATGCC CTCACCTGCTACTTTAAGCCATTCACTCTCTGAACCTCTAAATGGGCCCATTTGATGTTTCTGATCTATCA CTTTGCAAAGCTTTCAACCAAAACCACCTGAAAGCACAGCAGAATTCATGATTCGACTCCGGCATT CACTAAACACAAGTCCCAGTGTGGCATCACAGAACA CTAGTGAATCTCCAGCTATGGAGACACACT ACTTGGCCTCAGTGATTTCTGAAGTGAAGAGCTAGATAGTGCCCTGGAAAGTGTCAAACAGAATGGTCT AAAACACCAGTACATTTCTCTGGGATATGGTACAACCCTTGTACCATCTCAGGGGCAGAGCACTCACG TGCATGATGCCCAATGTGAGAACACACAGAGAAAGAATTGCCTGTAAGTCTGGTATCGGAAAACCCC ATTCACAAAAGACAACATTCAGCCGCTTGGAGGCTCATCTACAAGAGATGAACCTAGGGCAAAGCT CTCCATATCCATTCCTGTAGAAAAATCATTAACCTCCCTGTTGTTGACTTCAACGAAATGATGTCCA AAGAGCAGTTCAATGAAGCTCAACTTGCAATTAATTCGGGATATACGTAGGAGGGTAAGAATAAAGTGGC TGCTCAGAATTGCAGAAAAAGAAAAGTGGAAAATATAGTAGAACTAGAGCAAGATTTAGATCATTGAAA GATGAAAAAGAAAAATTGCTCAAAGAAAAAGGAGAAAATGACAAAAGCCTTCACTACTGAAAAACAAC TCAGCACCTTATATCTCGAAGTTTTCAGCATGCTACGTGATGAAGATGGAAAACCTTATTCTCCTAGTGA ATACTCCCTGCAGCAACAAGAGATGGCAATGTTTCTTGTTCCTCCAAAAGTAAGAAGCCAGATGTTAAG AAAACTAGATTTAGGAGGATTTGACCTTTTCTGAGCTAGTTTTTTGTAATACTATACTAAAAGCTCCT ACTGTGATGTGAAATGCTCATACTTTATAAGTAATCTATGCAAAATCATAGCCAAAAC TAGTATAGAAA ATAATACGAACTTTAAAAAGCATTTGGAGTGTGAGTATGTTGAATCAGTAGTTTCACTTTAACTGTAAC AATTTCTTAGGACACCATTGGGCTAGTTTCTGTGTAAGTGTAAATACTACAAAAACTTATTTATACTGT TCTTATGTCATTTGTATATTCATAGATTTATATGATGATATGACATCTGGCTAAAAAGAAATTTATGCA AAACTAACCATATGTACTTTTTATAAATACTGTATGGACAAAAATGGCATTTTTTATATTAATTTGT TTAGCTCTGGCAAAAAAAAAAATTTTAAGAGCTGGTACTAATAAAGGATTATATGACTGTTAAA (SEQ ID NO: 4)</p>
---	--

[0097]

<p>同工型 2 (GenBank 登录号 NM_00131 3900.1)</p>	<pre> GGCCCTTCCGGGGCTGCGCGGCTCCCCCGCCTCGGTGCCGCAAAAATGTGCCTAGTACAGGGGCCGCTC TCGGGGAACTGAGGTCGCCTTCGGGCTGGGACCCGGAGCCCTTCGCCGCGCCCCAAGACCTCCTTGAG TGCGGGCTGCGACGCGCTCACCCTGCGGCGCTCTGTGGGCGCGGCTTTGCGAAGTCATCCATCTCTCG GATCACTCTCTGGCAGCCTTGAGCTCTCTTGAAGCCAGCCCGGGACGAGGGAGGAGCGCCTTAAGTG CCCAGCGGGCTCAGAAGCCCCGACGTGTGGCGGCTGAGCCGGGCCCGCGCACTTTCTCGGCCGGGAGG GGTTCGGGCTCGGCACCCGGAGTTGGCCCTCGTAACGCCGCGGAAAGTGCGGGCGAGGGCAGTGGAC TCTGAGGCCGAGTCGGCGCACCCGGGCTTCTAGTTCGGACGCGGTGCCCTCGTGGCGCTCACCGC GCGCGTGGCCTTGGCTTCCGTGACAGCGCTCGGTTGGCCGTACAGCAGCCCTCGGTTGGCCCTTCTCTG CTTTATAGCGTGCAAACCTCGCCGCGCCAGGGCCAAGGGACAGGTTGGAGCTGTTGATCTGTTGCGCAAT TGCTATTTTCCCAGAGCGGCTTGTCTTTGGATTTAGCGTTTCAAGATTGCAATTCCAAAATGTGTAAG ACGGGATATTCTTCTGTGTCTCAAGGGACATGGATTTGATTGACATACTTGGAGGCAAGATATAGA TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTATTTGACTTCAGTCAGCGACGAAAGAGTATGAGCTGAAAAACAGAAA AAACTTGAAGGAAAGACAAGAACAACCTCCAAAAGGAGCAAGAGAAAGCCTTTTCGCTCAGTTACAAC TAGATGAAGAGACAGGTGAATTTCTCCAATTGAGCCAGCCAGCACATCCAGTCAGAAACAGTGGATC TGCCAACTACTCCCAGGTTGCCACATTTCCAAAATCAGATGCTTTGTACTTTGATGACTGCATGCAGCTT TTGGCGCAGACATTTCCGTTTGTAGATGACAATGAGGTTTCTTCGGCTACGTTTCAGTCACCTGTTCTCTG ATATTTCCCGTCCATCGAGAGCCAGTCTTCACTGCTACTAATCAGGCTCAGTCACCTGAAACTTCTGT TGCTCAGGTAGCCCTGTTGATTTAGACGATGCAACAGGACATGAGCAAGTTTGGGAGGAGCTATTA TCCATTCTGAGTTACAGTGTCTTAATATGAAAATGACAAGCTGGTTGAGACTACCATGGTTCCAAGTC CAGAAGCCAACTGACAGAAGTTGACAATTATCATTTTTACTCATCTATACCTCAATGAAAAAGAAGT AGGTAAGTGTAGTCCACATTTTCTTAATGCTTTTGAGGATTCCTTCAGCAGCATCCTCCACAGAAGAC CCCAACCAGTTGACAGTGAACCTATTAATTCAGATGCCACAGTCAACACAGATTTTGGTGATGAATTTT ATTCTGCTTTCATAGCTGAGCCAGTATCAGCAACAGCATGCCCTCACCTGCTACTTTAAGCCATTCACT CTCTGAACTTCTAATGGGCCATTGATGTTTCTGATCTATCACTTTGCAAAGCTTTCAACAAAACCAC CCTGAAAGCACAGCAGAATTCAATGATCTGACTCCGGCATTTCATAAACACAAGTCCCAGTGTGGCAT CACCAGAACACTCAGTGAATCTTCCAGCTATGGAGACACACTACTTGGCCTCAGTGATTTGAAAGTGA AGAGCTAGATAGTCCCTGGAAGTGTCAAACAGAATGGTCTTAAACACCAAGTACATTTCTTGGGGAT ATGGTACAACCCTTGTCACCATCTCAGGGGACAGCACTCACGTGCATGATGCCCAATGTGAGAACACAC CAGAGAAAAGAAATTGCTGTAAAGTCTGTCATCGGAAAACCCCATTCACAAAAGACAAAACATTCAAGCCG CTTGGAGGCTCATCTCACAAGAGATGAACTTAGGGCAAAAAGCTCTCCATATCCATTCCCTGTAGAAAA ATCATTAACTCCCTGTTGTTGACTTCAACGAAATGATGTCCAAGAGCAGTTCAATGAAGCTCAACTTG CATTAATTCGGGATATACGTAGGAGGGTAAGAATAAAGTGGCTGCTCAGAATGCAGAAAAAGAAAAC GGAAAATATAGTAGAACTAGAGCAAGATTTAGATCATTGAAAGATGAAAAAGAAAATTTGCTCAAAGAA AAAGGAGAAAATGACAAAAGCCTTACCTACTGAAAAACAACCTCAGCACCTTATATCTCGAAGTTTCA GCATGCTACGTGATGAAGATGGAAAACCTTATTCTCCTAGTGAATACTCCCTGAGCAAAACAGAGATGG CAATGTTTTCTTGTTCCTTCCAAAAGTAAGAAGCCAGATGTTAAGAAAACCTAGATTTAGGAGGATTGACC TTTTCTGAGCTAGTTTTTTTGTACTATTATACTAAAAGCTCCTACTGTGATGTGAAATGCTCATACTTTA TAAGTAATTCATGCAAAATCATAGCCAAAACCTAGTATAGAAAATAATACGAACTTTAAAAGCATTGG AGTGTGAGTATGTTGAATCAGTAGTTTCACTTAACTGTAACAATTTCTTAGGACACCATTTGGGCTAG TTTCTGTGTAAGTGTAAATACTACAAAACCTTATTATATCTGTTCTTATGTCATTTGTTATATTATAGA TTTATATGATGATATGACATCTGGCTAAAAAGAAATTATTGCAAAACTAACCACTATGTACTTTTTTATA AATACTGTATGGACAAAATGACATTTTTTATATTAATTTAGTCTGCAAAAAAAAATTTT AAGAGCTGGTACTAATAAAGGATTATTATGACTGTAAATTTATTAATA (SEQ ID NO: 5) </pre>
--	---

[0098]

<p>同工型 3 (GenBank 登录号 NM_00114 5413.3)</p>	<pre> GGCCCTTCCGGGGCTGCGCGGCTCCCCGCCTCGGTGCCGCAAAAATGTGCCTAGTCACGGGGCCGCTC TCGGGGGAACGTGAGGTCGCCTTCGGGCTGGGACCCGGAGCCCTTCGCCGCGCCCAAGACCTCCTTGAG TGCGGGCTGCGACGCGCTCACCCGCTGGGCCGTCTGTGGGCGCGGCTTTGCGAAGTCATCCATCTCTCG GATCACTCTCTGGCAGCCTTGAGCTCTCTTGAAGCCAGCCCGGGACGAGGGAGGAGCGCCTTAAGTG CCCAGCGGGCTCAGAAGCCCCGACGTGTGGCGGCTGAGCCGGGCCCGCGCAGCTTTCTCGGCCGGGAGG GGTTCGGGCTCGGGCACCCGGAGTTGGCCCTCGTAAACGCCGCGGAAAGTGCGGGCAGGGCAGTGGAC TCTGAGGCCGGAGTCGGCGCACCCGGGGCTTCTAGTTCGACGCGGTGCCCCCTGGTGGCGCTCACCCG GCGCGTGGCCTTGGCTTCCGTGACAGCGCTCGGTTGGCCGTACAGCAGCCCTCGGTTGGCCCTTTCTCG CTTTATAGCGTGCAACCTCGCCGCGCCAGGGCAAGGGACAGGTTGGAGCTGTTGATCTGTTGCGCAAT TGCTATTTTCCCAGAGCGGCTTTGTCTTTGGATTTAGCGTTTCAGAATTGCAATTCCAAAATGTGTAAG ACGGGATATTCTTTCTGTCTGTCAAGGGACATGGATTGATTGACATACTTTGAGGCAAGATATAGA TCTTGAGTAAGTCGAGAAGTATTGACTTCAGTCAGCGACGAAAGAGTATGAGCTGAAAAACAGAAA AAACTTGAAAAGGAAAGACAAGAACAACCTCCAAAAGGAGCAAGAGAAAGCCTTTTTCGCTCAGTTACAAC TAGATGAAGAGACAGGTGAATTTCTCCAATTCAGCCAGCCAGCACATCCAGTCAGAAACAGTGGATC TGCCAACACTCCCAGGTTGCCACATTTCCAAAATCAGATGCTTTGTACTTTGATGACTGCATGCAGCTT TTGGCGCAGACATTCCTGTTGTAGATGACAAATGAGTCACTTGTTCCTGATATTCCTGGTTCACATCGAGA GCCAGTCTTCATTGCTACTAATCAGGCTCAGTCACCTGAAACTTCTGTTGCTCAGGTAGCCCTGTTGA TTAGACGGTATGCAACAGGACATTGAGCAAGTTTGGGAGGAGCTATTATCCATTCTGAGTTACAGTGT CTTAATATTGAAAATGACAAGCTGGTTGAGACTACCATGGTTCCAAGTCCAGAAGCCAAAATGACAGAAG TTGACAATTATCATTTTTACTCATCTATACCCTCAATGAAAAAGAAGTAGGTAACCTGTAGTCCACATTT TCTAATGCTTTTGAGGATTCCTTCAGCAGCATCCTCTCCACAGAAGACCCCAACAGTTGACAGTGAAC TCATTAATTCAGATGCCACAGTCAACACAGATTTTGGTGATGAATTTTATTCTGCTTTCATAGCTGAGC CCAGTATCAGCAACAGCATGCCCTCACCTGCTACTTTAAGCCATTCACCTCTGAACTTCTAATGGGCC CATTGATGTTTCTGATCTATCATTGCAAAGCTTTCAACCAAAACCCACCTGAAAGCACAGCAGAATTC AATGATTCTGACTCCGGCATTTCACTAAAACAAGTCCAGTGTGGCATCACCAGAACACTCAGTGGAAAT CTTCCAGCTATGGAGACACTACTTGGCCTCAGTGATTCTGAAGTGAAGAGCTAGATAGTGCCCTGG AAGTGTCAAACAGAATGGTCTAAAACACCAGTACATTTCTCTGGGATATGGTACAACCTTGTCACCA TCTCAGGGCAGAGCACTCAGTGCATGATGCCAATGTGAGAACACACCAGAGAAAGAAATGCCTGTAA GTCTGGTTCATCGGAAAACCCATTCAAAAAGACAAAACATTCAGCCGCTTGGAGGCTCATCTCACAAAG AGATGAACTTAGGGCAAAAGCTCTCCATATCCCATTCCTGTAGAAAAATCATTAACTCCCTGTTGTT GACTTCAACGAAATGATGTCCAAGAGCAGTTCAATGAAGCTCAACTTGCAATTAATCGGGATATACGTA GGAGGGTAAGAATAAAGTGGCTGCTCAGAAATGCAGAAAAAGAAAACTGAAAAATATAGTAGAACTAGA GCAAGATTTAGATCATTGAAAGATGAAAAAGAAAAATTGCTCAAAGAAAAGGAGAAAATGACAAAAGC CTTCACCTACTGAAAAACAACACTCAGCACCTTATATCTCGAAGTTTTCAGCATGCTACGTGATGAAGATG GAAAACCTTATTCTCCTAGTGAATACTCCCTGCAGCAACAAGAGATGGCAATGTTTTCTGTTCCCAA AAGTAAGAAGCCAGATGTTAAGAAAACTAGATTTAGGAGGATTTGACCTTTTCTGAGCTAGTTTTTTTG TACTATTATACTAAAAGCTCCTACTGTGATGTGAAATGCTCATACTTTATAAGTAATTCTATGCAAAATC ATAGCCAAAACCTAGTATAGAAAATAATACGAACTTTAAAAGCATTGGAGTGTGATGTTGAATCAG TAGTTTCACTTTAACTGTAAACAATTTCTTAGGACACCATTGGGCTAGTTTCTGTGTAAGTGAATAAC TACAAAACCTTATTATATACTGTTCTTATGTCAATTTGTTATATTATAGATTTATATGATGATGACATC TGGCTAAAAAGAAATATTGCAAAACTAACCACTATGTACTTTTTATAAATACTGTATGGACAAAAAAT GGCATTTTTTATATTAATTTAGTCTGCGCAAAAAAATAATTTAAGAGCTGTTACTAATAAAGG ATTATTGACTGTTAAATTATTAATAA (SEQ ID NO: 6) </pre>
--	---

[0099]

[0100] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因的对应细胞)相比,NFE2L2基因的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因的

对应细胞)相比,NFE2L2基因和Nrf2蛋白二者的表达水平均降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0101] 在一些方面,治疗肿瘤包括减小受试者的肿瘤体积。因此,在某些方面,与参考肿瘤体积相比,向受试者施用本公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)减小了受试者的肿瘤体积。在一些方面,参考肿瘤体积是在施用修饰的细胞之前受试者的肿瘤体积。在其他方面,参考肿瘤体积是未接受所述施用的对应受试者的肿瘤体积。在一些方面,与参考肿瘤体积相比,所述施用后受试者的肿瘤体积减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。

[0102] 在一些方面,治疗肿瘤包括减小受试者的肿瘤重量。在某些方面,本文公开的修饰的细胞在向受试者施用时可以降低受试者的肿瘤重量。在一些方面,与参考肿瘤重量相比,所述施用后肿瘤重量减小了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。在一些方面,参考肿瘤重量是在施用修饰的细胞之前受试者的肿瘤重量。在其他方面,参考肿瘤重量是未接受所述施用的对应受试者的肿瘤重量。

[0103] 在一些方面,施用本公开的修饰的细胞可以增加受试者的肿瘤中TIL(例如,CD4⁺或CD8⁺)的数量和/或百分比。在某些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞的受试者的或在修饰的细胞施用之前同一受试者的对应值)相比,肿瘤中TIL的数量和/或百分比增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0104] 在一些方面,施用本公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)可以减少受试者的肿瘤中调节性T细胞(Treg)的数量和/或百分比。在一些方面,调节性T细胞是CD4⁺调节性T细胞。在一些方面,调节性T细胞是Foxp3⁺。在某些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞施用的受试者的对应数量和/或百分比)相比,肿瘤中调节性T细胞的数量和/或百分比减少至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。

[0105] 在一些方面,施用本文公开的修饰的细胞增加受试者的肿瘤中CD8⁺TIL与Treg的比率。在某些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞施用的受试者的肿瘤中TIL的数量和/或百分比)相比,所述施用后CD8⁺TIL与Treg的比率增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%。

[0106] 在一些方面,施用本文公开的修饰的细胞可以减少受试者的肿瘤中髓源性抑制细胞(MDSC)的数量和/或百分比。如本文所用,术语“髓源性抑制细胞”(MDSC)是指免疫细胞的异质群体,其由其髓样来源、未成熟状态和有效抑制T细胞反应的能力定义。已知它们会在某些病理状况(诸如慢性感染和癌症)下扩增。在某些方面,MDSC是单核MDSC(M-MDSC)。在其他方面,MDSC是多形核MDSC(PMN-MDSC)。在一些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞施用

的对应受试者的值)相比,肿瘤中MDSC的数量和/或百分比减少至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。

[0107] 在一些方面,施用本文公开的修饰的细胞增加受试者的肿瘤中CD8⁺TIL与MDSC的比率。在某些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞施用的对应受试者的值)相比,所述施用后CD8⁺TIL与MDSC的比率增加至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约125%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%。

[0108] 在一些方面,本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)包括免疫细胞。在某些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其组合。在其他方面,本文公开的修饰的免疫细胞是淋巴细胞。在一些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤(NK)细胞或其任何组合。在其他方面,修饰的免疫细胞还可包含嵌合抗原受体(CAR)。在一些方面,修饰的免疫细胞还可包含T细胞受体,例如,工程化TCR。因此,在某些方面,本文公开的修饰的细胞是T细胞。在一些方面,本文公开的修饰的细胞是TIL。在一些方面,本文公开的修饰的细胞是NK细胞。在一些方面,本文公开的修饰的细胞是淋巴因子激活的杀伤细胞。在一些方面,T细胞包含CAR。在其他方面,本文公开的修饰的细胞是NK细胞。在某些方面,NK细胞包含CAR。在其他方面,本公开的修饰的细胞包含T细胞和NK细胞二者。在某些方面,T细胞和NK细胞二者都包含CAR。

[0109] 在一些方面,本公开的方法可用于修饰任何免疫细胞类型。在其他方面,本公开的方法用于修饰细胞以用于任何过继性细胞转移(ACT)疗法(也称为过继性细胞疗法)。ACT方法可以是自体疗法或同种异体疗法。在一些方面,ACT疗法包括但不限于CAR T疗法、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)疗法、NK细胞疗法或其任何组合。

[0110] 在一些方面,本公开的方法可用于修饰TIL用于TIL疗法。使用TIL作为过继性细胞转移疗法治疗癌症已经使用TIL过继性细胞疗法治疗黑素瘤研究了超过二十年。Rosenberg SA等,(2011年7月).*Clinical Cancer Research* 17(13):4550-7(2011年7月)。在过继性T细胞转移疗法中,TIL从手术切除的肿瘤(已被切成小碎片)或从肿瘤碎片中分离的单细胞悬浮液中离体扩增。建立多个单独的培养物,分别培养并测定特异性肿瘤识别。TIL会在几周内扩增。然后在“快速扩增方案”(REP)中进一步扩增具有最佳肿瘤反应性的选定TIL系,所述方案使用抗CD3激活持续两周的典型时间段。在离体过程中,可以随时修饰培养物中生长的TIL,从而降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达。最后的REP后TIL被输回患者体内。所述过程还可能涉及初步化学疗法方案以消耗内源淋巴细胞,以便为过继性转移的TIL提供足够的通路以包围肿瘤部位。

[0111] 在一些方面,本公开的方法可用于用T细胞受体(例如,工程化TCR)修饰T细胞。如本文所用,术语“工程化TCR”或“工程化T细胞受体”是指被工程化来以所需亲和力与主要组织相容性复合物(MHC)/肽靶抗原特异性结合的T细胞受体(TCR),其被选择、克隆和/或随后引入到T细胞群体中。

[0112] 在一些方面,本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)可以具有一种或多种改善的特性。在某些方面,改善细胞(例如,免疫细胞,例如,肿瘤

浸润淋巴细胞)的一种或多种特性可以帮助治疗肿瘤(例如,减小肿瘤体积和/或肿瘤重量)。可用本公开改善的一种或多种特性包括可用于治疗癌症的细胞(例如,TIL)的任何特性。例如,在某些方面,此类特性包括:(i)增加的扩增和/或增殖;(ii)增加的持久性和/或存活(例如,较少的耗竭/无反应);(iii)增加的抗肿瘤活性(例如,靶向和杀伤肿瘤细胞的能力);以及(iv)其组合。

[0113] 在一些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞的受试者的或在修饰的细胞施用之前同一受试者的对应值)相比,本文公开的修饰的细胞的扩增和/或增殖增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。在一些方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞的受试者的或在修饰的细胞施用之前同一受试者的对应值)相比,本文公开的修饰的细胞的持久性和/或存活增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。在其他方面,与参考(例如,未接受修饰的细胞的受试者的或在修饰的细胞施用之前同一受试者的对应值)相比,本文公开的修饰的细胞的抗肿瘤活性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0114] 在一些方面,一种或多种特性可包括细胞(例如,TIL)产生可用于治疗肿瘤的效应分子的能力。在某些方面,效应分子包括细胞因子。效应分子的非限制性实例包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、颗粒酶B、穿孔素、MIP-1 β 、CD107a或其组合。因此,在一些方面,本文公开的修饰的细胞在用抗原刺激时可以产生增加量的IFN- γ ,所述抗原诸如同源抗原(例如,肿瘤抗原)。在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0115] 如本文所述,Nrf2在本领域中已被描述为在保护细胞免受氧化应激的影响方面十分重要,所述氧化应激可以由诸如活性氧物质和活性氮物质的药剂引起。申请人已经发现,与参考细胞相比,本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)表现出增加的对氧化应激的抗性。在一些方面,参考细胞是未经修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞。在某些方面,与参考细胞相比,本文公开的对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%或更多。

[0116] 在一些方面,本文公开的修饰的细胞可以使用基因编辑工具进行修饰。在一些方面,本文公开的修饰的细胞可以使用RNAi进行修饰。在一些方面,本文公开的修饰的细胞可以使用反义寡核苷酸进行修饰。可用于本公开的基因编辑工具的进一步描述在本文别处提供。

[0117] 在一些方面,本文所述的修饰的细胞可以进一步被修饰以表达嵌合抗原受体。在一些方面,修饰的CAR表达细胞可具有改善的抗癌特性。

[0118] 不受任何理论的束缚,本公开的修饰的细胞能够减少或防止T细胞耗竭。

[0119] 细胞是否表现出增加的对氧化应激的抗性可以通过本领域可用的任何方法进行测量。在一些方面,增加细胞对氧化应激的抗性可使得细胞表现出改善的功能。例如,在某些方面,本文公开的修饰的细胞甚至在升高浓度的自由基氧物质的存在下也可以增殖。在一些方面,本公开的修饰的细胞甚至在升高浓度的自由基氧物质的存在下也可以表达溶细胞分子。在某些方面,溶细胞分子包括颗粒酶B。在其他方面,本公开的修饰的细胞甚至在升高浓度的自由基氧物质的存在下也可以产生细胞因子。在一些方面,细胞因子包括IFN- γ 。在一些方面,自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。在某些方面,本文公开的修饰的细胞甚至在升高浓度的自由基氧物质的存在下也可以(i)增殖,(ii)表达溶细胞分子,以及(iii)产生细胞因子。

[0120] 如本文所述,本公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)可用于治疗多种癌症类型。可以用本文公开的方法治疗的癌症(或肿瘤)的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、胃肠癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌(例如肝细胞癌)、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、甲状腺癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌,以及头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤、黑素瘤(例如转移性恶性黑素瘤,诸如皮肤或眼内恶性黑素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区域癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌(例如胃食管接合癌)、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童期实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、肿瘤血管生成、垂体腺瘤、卡波西氏(Kaposi's)肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症(包括石棉诱导的癌症、病毒相关的癌症或病毒来源的癌症(例如人乳头瘤病毒(HPV)相关或HPV起源的肿瘤)),以及来源于两种主要血细胞谱系(即髓样细胞系(产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴样细胞系(产生B、T、NK和浆细胞))中的任一种的血液系统恶性肿瘤,诸如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤,例如急性、慢性、淋巴细胞和/或骨髓性白血病,诸如急性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)和慢性骨髓性白血病(CML)、未分化的AML(M0)、原始粒细胞性白血病(M1)、原始粒细胞性白血病(M2;伴有细胞成熟)、早幼粒细胞白血病(M3或M3变体[M3V])、骨髓单核细胞性白血病(M4或具有嗜酸性粒细胞增多症的M4变体[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红细胞白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、孤立性粒细胞肉瘤和绿色瘤;淋巴瘤,诸如霍奇金氏淋巴瘤(HL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、B细胞血液系统恶性肿瘤,例如B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如Ki1⁺)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、T淋巴母细胞;和淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴增生性病症、真性组织细胞性淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴样谱系造血肿瘤、急性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特氏(Burkitt's)淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞性淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(也称为蕈样肉芽肿或塞扎里(Sezary)综合征),以及淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL)伴华氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症;骨

髓瘤,诸如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、阴燃性骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤)、单发性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;髓样谱系造血肿瘤、间质来源的肿瘤,包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;精原细胞瘤、畸胎瘤、间质来源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;以及其他肿瘤,包括黑素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎瘤、淋巴样谱系造血肿瘤,例如T细胞和B细胞淋巴瘤,包括但不限于T细胞病症,诸如T前淋巴细胞白血病(T-PLL),包括小细胞和脑回状细胞类型;T细胞类型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性和免疫母细胞亚型);血管中心性(鼻)T细胞淋巴瘤;头或颈癌症、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性髓样淋巴瘤,及其任何组合。

[0121] 在一些方面,可以用本文公开的修饰的细胞治疗的癌症(或肿瘤)包括乳腺癌、头颈癌、子宫癌、脑癌、皮肤癌、肾癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、胰腺癌、甲状腺癌、食道癌、眼癌、胃癌、胃肠癌、恶性上皮癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或其组合。在某些方面,可以用本公开治疗的癌症(或肿瘤)是乳腺癌。在一些方面,乳腺癌是三阴性乳腺癌(TNBC)。在某些方面,可以治疗的癌症(或肿瘤)是脑癌。在某些方面,脑癌是胶质母细胞瘤。在某些方面,可以用本公开治疗的癌症(或肿瘤)是皮肤癌。在某些方面,皮肤癌是基底细胞癌(BCC)、皮肤鳞状细胞癌(cSCC)、黑素瘤、默克尔细胞癌(MCC)或其组合。在某些方面,头颈癌是头颈鳞状细胞癌。在其他方面,肺癌是小细胞肺癌(SCLC)。在某些方面,食道癌是胃食管接合癌。在某些方面,肾癌是肾细胞癌。在某些方面,肝癌是肝细胞癌。在某些方面,可以用本公开治疗的癌症包括结直肠癌、皮肤癌、淋巴瘤、肺癌或其组合。

[0122] 在一些方面,本文公开的修饰的细胞可以与其他治疗剂(例如,抗癌剂和/或免疫调节剂)组合使用。因此,在某些方面,本文公开的治疗肿瘤的方法包括将本公开的修饰的细胞与一种或多种另外的治疗剂组合施用。此类药剂可包括例如,化疗药物、靶向抗癌疗法、溶瘤药物、细胞毒性剂、基于免疫的疗法、细胞因子、手术规程、放射规程、共刺激分子的激活剂、免疫检查点抑制剂、疫苗、细胞免疫疗法或其任何组合。在某些方面,本文公开的修饰的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)可与护理治疗的标准(例如,手术、放射和化学疗法)组合使用。本文所述的方法还可以用作维持疗法,例如,旨在防止肿瘤发生或复发的疗法。

[0123] 在一些方面,本公开的修饰的细胞可以与一种或多种抗癌剂组合使用,使得可以靶向免疫途径的多个元件。非限制性的此类组合包括:增强肿瘤抗原呈递的疗法(例如,树突状细胞疫苗、分泌GM-CSF的细胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特(imiquimod));例如通过抑制CTLA-4和/或PD1/PD-L1/PD-L2途径和/或消耗或阻断Treg或其他免疫抑制细胞(例如,髓源性抑制细胞)来抑制负免疫调控的疗法;例如用刺激CD-137、OX-40和/或CD40或GITR途径和/或刺激T细胞效应功能的激动剂来刺激正免疫调控的疗法;全身性增加抗肿瘤T细胞频率的疗法;例如使用CD25的拮抗剂(例如,达利珠单抗(daclizumab))或通过离体抗CD25珠消耗来消耗或抑制Treg(诸如肿瘤中的Treg)的疗法;影响肿瘤中抑制性髓样细胞的功能的疗法;增强肿瘤细胞免疫原性的疗法(例如,葱环类药物);过继性T细胞或NK细胞转移,包括遗传修饰的细胞,例如由嵌合抗原受体修饰的细胞(CAR-T疗法);抑制代谢酶(诸如吡哆胺双加氧酶(IDO)、双加氧酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶)的疗法;逆转/预防T细胞无能或耗竭的疗法;在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的疗法;免疫刺激性细胞因子的施用;

免疫抑制性细胞因子的阻断;或其任何组合。

[0124] 在一些方面,抗癌剂包括免疫检查点抑制剂(即,阻断通过特定的免疫检查点途径的信号传导)。可用于本发明方法的免疫检查点抑制剂的非限制性实例包括CTLA-4拮抗剂(例如,抗CTLA-4抗体)、PD-1拮抗剂(例如,抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体)、TIM-3拮抗剂(例如,抗TIM-3抗体)或其组合。此类免疫检查点抑制剂的非限制性实例包括以下:抗PD1抗体(例如,纳武单抗(OPDIVO[®])、派姆单抗(KEYTRUDA[®];MK-3475)、匹利珠单抗(CT-011)、PDR001、MEDI0680 (AMP-514)、TSR-042、REGN2810、JS001、AMP-224 (GSK-2661380)、PF-06801591、BGB-A317、BI 754091、SHR-1210及其组合);抗PD-L1抗体(例如,阿特珠单抗(TECENTRIQ[®];RG7446;MPDL3280A;R05541267)、杜鲁伐单抗(MEDI4736、IMFINZI[®])、BMS-936559、阿维鲁单抗(BAVENCIO[®])、LY3300054、CX-072 (Proclaim-CX-072)、FAZ053、KN035、MDX-1105及其组合);以及抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗(YERVOY[®])、曲美木单抗(替西木单抗;CP-675,206)、AGEN-1884、ATOR-1015及其组合)。

[0125] 在一些方面,抗癌剂包括免疫检查点激活剂(即,促进通过特定的免疫检查点途径的信号传导)。在某些方面,免疫检查点激活剂包括OX40激动剂(例如,抗OX40抗体)、LAG-3激动剂(例如,抗LAG-3抗体)、4-1BB (CD137) 激动剂(例如,抗CD137抗体)、GITR激动剂(例如,抗GITR抗体)或其任何组合。

[0126] 在一些方面,本文公开的修饰的细胞在另外的治疗剂施用之前或之后向受试者施用。在其他方面,修饰的细胞与另外的治疗剂同时向受试者施用。在某些方面,修饰的细胞和另外的治疗剂可以作为在药学上可接受的载剂中的单一组合物同时施用。在其他方面,修饰的细胞和另外的治疗剂作为分开的组合物同时施用。

[0127] 在一些方面,可以用本公开治疗的受试者是非人动物,诸如大鼠或小鼠。在一些方面,可以治疗的受试者是人。

[0128] IIb. 改善免疫反应的方法

[0129] 在一些方面,本公开涉及改善受试者的免疫反应的方法。具体地,本文公开的方法可用于改善(例如,增加)免疫细胞疗法(例如,在受试者中表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞或表达工程化T细胞受体(TCR)的细胞)的免疫反应,例如,预防、降低或抑制免疫耐受性。在某些方面,免疫反应是抗肿瘤免疫反应。在某些方面,改善免疫反应包括预防、降低或抑制免疫耐受性。因此,本文提供了一种改善表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应的方法,所述方法包括修饰细胞以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在一些方面,降低的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白表达改善了表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应。在一些方面,降低的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白表达降低或抑制表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的免疫耐受性。

[0130] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。在某些方面,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白在表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中的表达在修饰后被完全抑制。

[0131] 在一些方面,与参考抗肿瘤免疫反应(例如,未经修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的细胞的抗肿瘤免疫反应)相比,修饰的表达CAR的细胞或表达TCR的细胞(即,修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)的抗肿瘤免疫反应增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%、至少约250%或至少约300%或更多。

[0132] 表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应可使用本领域已知的各种方法测量。例如,在一些方面,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应可以通过测量(例如,用ELISA或流式细胞术)细胞在用同源抗原刺激时产生的效应分子的量来观察。在某些方面,效应分子包含细胞因子,例如像可用于治疗肿瘤的那些。效应分子的非限制性实例包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、颗粒酶B、穿孔素、MIP-1 β 、CD107a或其组合。在某些方面,细胞因子是IFN- γ 。因此,在一些方面,改善细胞的抗肿瘤反应包括增加细胞产生的IFN- γ 的量。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,当用同源抗原(例如,肿瘤抗原)刺激时,修饰的表达CAR的细胞或修饰的表达TCR的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)产生增加量的IFN- γ 。在某些方面,与参考细胞相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0133] 在一些方面,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应可通过评估细胞在用同源抗原(例如,肿瘤抗原)刺激时的增殖能力来测量。在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,修饰的表达CAR的细胞或修饰的表达TCR的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)在刺激时表现出增加的增殖。在一些方面,与参考细胞相比,修饰的表达CAR的细胞或修饰的表达TCR的细胞的增殖增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0134] 在一些方面,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应可通过观察细胞表面上不同表型标记物的表达来评估(例如,使用流式细胞术)。例如,在某些方面,改善表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应(即,通过降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达)包括降低细胞上的一种或多种免疫检查点抑制剂分子(例如,PD-1)的表达。因此,在一些方面,本文公开的修饰的表达CAR的细胞或修饰的表达TCR的细胞表达降低水平的一种或多种免疫检查点抑制剂。在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,一种或多种免疫检查点抑制剂分子的表达水平降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或约100%。

[0135] 在一些方面,改善表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的抗肿瘤免疫反应包括增加与效应活性(例如,抗肿瘤活性)相关的标记物的表达。与效应活性相关的标记物的非限制性实例包括Ki-67、颗粒酶B、T-bet、Eomes、CXCR3或其组合。如本领域技术人员显而易见的,在一些方面,与效应活性相关的标记物也可以是细胞因子,诸如上述那些(例如,IFN- γ 、TNF-

α 、IL-2)。在某些方面,与效应活性相关的标记物是颗粒酶B。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,本文公开的修饰的表达CAR的细胞或表达TCR的细胞表达更高水平的颗粒酶B。在某些方面,与参考细胞相比,修饰的表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中颗粒酶B的表达水平增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0136] 在一些方面,降低表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达可以增加表达CAR的细胞或表达TCR的细胞对氧化应激的抗性,诸如由活性氧物质(ROS)和/或活性氮物质(RNS)引起的那些氧化应激。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,对氧化应激的抗性增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0137] 如本文所述,细胞对氧化应激的抗性可以通过本领域已知的各种方法测量。在一些方面,可以通过评估细胞在氧化应激(例如,升高浓度的自由基氧物质)的存在下是否保持功能和/或存活来观察对氧化应激的抗性。在某些方面,本文公开的修饰的表达CAR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以增殖。在一些方面,本文公开的修饰的表达CAR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以表达溶细胞分子。在某些方面,溶细胞分子包括颗粒酶B。在其他方面,本公开的修饰的表达CAR的细胞或表达TCR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以产生细胞因子。在一些方面,细胞因子包括IFN- γ 。在一些方面,自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。在某些方面,本文公开的修饰的表达CAR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以(i)增殖,(ii)表达溶细胞分子,以及(iii)产生细胞因子。

[0138] 为了降低表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达,可以使用本领域已知的用于降低细胞中基因和/或蛋白质的表达的任何方法。例如,在一些方面,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞的NFE2L2基因及其编码的Nrf2蛋白的表达可以通过将细胞与能够降低NFE2L2基因及其编码的Nrf2蛋白的表达水平的基因编辑工具接触来降低。基因编辑工具的非限制性实例在本文别处示出。

[0139] 虽然上述用于降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达的方法是在表达CAR的细胞的背景下提供的,但本领域技术人员将认识到本文公开的方法可用于任何需要降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达的细胞。在一些方面,可被修饰(即,降低NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达)的细胞是免疫细胞。在某些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其组合。在一些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然(NK)细胞或其组合。在某些方面,淋巴细胞是T细胞,例如,CD4+T细胞或CD8+T细胞。在其他方面,淋巴细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在某些方面,TIL是CD8+TIL。在其他方面,TIL是CD4+TIL。因此,在一些方面,可被修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR的细胞是免疫细胞。在某些方面,可被修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR的细胞是T细胞(即,CAR T细胞)。在一些方面,可被修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR的细胞或表达

TCR的细胞是NK细胞(即,CAR NK细胞)。

[0140] 在一些方面,基因编辑工具与待修饰的细胞的接触可以在体内、体外、离体或其组合中发生。在某些方面,所述接触在体内发生(例如,基因疗法)。在其他方面,所述接触在体外发生。在其他方面,所述接触离体发生。

[0141] IIc. 具有降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的细胞

[0142] 在一些方面,本公开提供了细胞,例如免疫细胞,例如表达CAR或TCR的细胞,其中所述细胞表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白。在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的对应细胞)相比,本公开产生的免疫细胞(例如,表达CAR的细胞或表达TCR的细胞)的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达降低了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约100%。在一些方面,NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白在表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中的表达被完全抑制。

[0143] 在一些方面,本公开涉及制备用于嵌合抗原受体或T细胞受体工程的细胞的方法,其包括使所述细胞与基因编辑工具接触以降低所述细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平。如本文所公开,可使用各种方法来降低表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达水平。在某些方面,那些方法包括本文别处描述的一种或多种基因编辑工具。在一些方面,通过使细胞与shRNA(例如,对NFE2L2基因具有特异性)接触来降低表达CAR的细胞或表达TCR的细胞中NFE2L2基因及其编码的Nrf2蛋白的表达。在其他方面,通过将细胞与CRISPR(例如,CRISPR-Cas9系统)(例如,对NFE2L2基因具有特异性)接触来降低NFE2L2基因及其编码的Nrf2蛋白的表达。

[0144] 在一些方面,使细胞与基因编辑工具接触包括不同的递送途径。一般来讲,为了使本文公开的基因编辑工具降低细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达,基因编辑工具必须能够进入细胞并与感兴趣的基因结合。在一些方面,可以使用本领域已知的用于将感兴趣的分子递送到细胞的任何递送载体。参见例如,美国专利号10,047,355B2,其以引用的方式整体并入本文。另外的关于可以使用的载体的公开在本公开别处提供。

[0145] 在一些方面,制备用于嵌合抗原受体工程的细胞的方法还包括修饰细胞以表达CAR或TCR。在某些方面,修饰细胞以表达CAR或TCR包括使细胞与编码CAR的核酸序列接触。在一些方面,编码CAR的核酸序列由载体(例如,表达载体)表达。

[0146] 在一些方面,可在本文公开的修饰的细胞上表达的CAR或TCR靶向在肿瘤细胞(诸如恶性B细胞、恶性T细胞或恶性浆细胞)上表达的一种或多种抗原。在某些方面,CAR可以靶向选自CD2、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD7、CD19、TRAC、TCR β 、BCMA、CLL-1、CS1、CD38、APRIL蛋白的胞外部分或其组合的抗原。可与CAR结合的抗原的其他非限制性实例包括TSHR、CD123、CD22、CD30、CD171、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、Tn Ag、PSMA、ROR1、ROR2、GPC1、GPC2、FLT3、FAP、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-1 1Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR- β 、SSEA-4、CD20、叶酸受体 α 、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-abl、酪氨酸酶、EphA2、Fucosyl GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体 β 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多唾液酸、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、HPV E6,E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostain、存活蛋白和端粒酶、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、CYP1B1、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及其任何组合。

[0147] 在某些方面,本公开的修饰的细胞可以表达靶向肿瘤抗原的T细胞受体(TCR)。T细胞受体是一种异源二聚体,其由2条不同的跨膜多肽链组成:一条 α 链和一条 β 链,每条链都由一个恒定区和一个可变区组成,所述恒定区将所述链锚定在T细胞表面膜内部,所述可变区识别并结合由MHC呈递的抗原。TCR复合物与6个多肽结合,形成2个异源二聚体CD3 $\gamma\epsilon$ 和CD3 $\delta\epsilon$,以及1个同源二聚体CD3 ζ ,它们共同形成CD3复合体。T细胞受体工程化T细胞疗法利用保留这些复合物的T细胞的修饰来特异性靶向特定肿瘤细胞表达的抗原。

[0148] 在一些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向主要类型:共享肿瘤相关抗原(共享TAA)和独特肿瘤相关抗原(独特TAA)或肿瘤特异性抗原。前者可以包括但不限于癌症-睾丸(CT)抗原、过表达抗原和分化抗原,而后者可以包括但不限于新抗原和癌病毒抗原。人乳头瘤病毒(HPV)E6蛋白和HPV E7蛋白属于癌病毒抗原的范畴。

[0149] 在一些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向CT抗原,例如,黑素瘤相关抗原(MAGE),包括但不限于,MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9.23、MAGE-A10和MAGE-A12。在一些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向糖蛋白(gp100)、T细胞识别的黑素瘤抗原(MART-1)和/或酪氨酸酶,它们主要存在于黑素瘤和正常黑素细胞中。在某些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向Wilms肿瘤1(WT1),即,一种在大多数急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病、几乎所有类型的实体瘤和几种关键组织(诸如心脏组织)中高表达的过表达抗原。在一些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向间皮素,这是另一种在间皮瘤中高度表达但也存在于几种组织(包括气管)的间皮细胞上的过表达抗原。

[0150] 在一些方面,修饰的TCR工程化细胞可以靶向任何新抗原,这些新抗原可以由对单个肿瘤具有特异性的随机体细胞突变形形成。

[0151] 在一些方面,本公开的修饰的免疫细胞,例如CAR T或NK细胞或TCR工程化的T细胞,可以靶向所述肿瘤抗原中的任一种。修饰的TCR工程化细胞可以靶向的抗原的非限制性实例包括CD2、CD3 ϵ 、CD4、CD5、CD7、CD19、TRAC、TCR β 、BCMA、CLL-1、CS1、CD38、APRIL蛋白的胞外部分、TSHR、CD123、CD22、CD30、CD171、CD33、EGFRvIII、GD2、GD3、Tn Ag、PSMA、ROR1、ROR2、GPC1、GPC2、FLT3、FAP、TAG72、CD44v6、CEA、EPCAM、B7H3、KIT、IL-13Ra2、间皮素、IL-11Ra、PSCA、PRSS21、VEGFR2、LewisY、CD24、PDGFR- β 、SSEA-4、CD20、叶酸受体 α 、ERBB2 (Her2/neu)、MUC1、EGFR、NCAM、Prostate、PAP、ELF2M、Ephrin B2、IGF-I受体、CAIX、LMP2、gp100、bcr-ab1、酪氨酸酶、EphA2、Fucosyl GM1、sLe^x、GM3、TGS5、HMWMAA、邻乙酰基-GD2、叶酸受体 β 、TEM1/CD248、TEM7R、CLDN6、GPC5D、CXORF61、CD97、CD179a、ALK、多唾液酸、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、HPV E6,E7、MAGE A1、ETV6-AML、精子蛋白17、XAGE1、Tie 2、MAD-CT-1、

MAD-CT-2、Fos相关抗原1、p53、p53突变体、prostelin、存活蛋白和端粒酶、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、CYP1B1、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及其任何组合。

[0152] 在一些方面,可制备以表达CAR或TCR的细胞包括免疫细胞。在某些方面,免疫细胞包括淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或其组合。在一些方面,免疫细胞是淋巴细胞。在某些方面,淋巴细胞包括T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)、淋巴因子激活的杀伤细胞、自然杀伤 (NK) 细胞或其组合。在一些方面,可制备以表达CAR的免疫细胞是T细胞 (CAR T细胞),例如,CD8+T细胞或CD4+T细胞。在某些方面,T细胞是自然杀伤T细胞 (NKT细胞)。在其他方面,免疫细胞是NK细胞 (CAR NK细胞)。

[0153] 在一些方面,本文公开的表达CAR的细胞是CAR T细胞。在某些方面,CAR T细胞是单CAR T细胞。在其他方面,CAR T细胞是基因组编辑的CAR T细胞。在某些方面,CAR T细胞是双CAR T细胞。在一些方面,CAR T细胞是串联CAR T细胞。在一些方面,本文公开的表达CAR的细胞是CAR NKT细胞。在某些方面,CAR NKT细胞是单CAR NKT细胞。在其他方面,CAR NKT细胞是双CAR NKT细胞。在一些方面,CAR NKT细胞是串联CAR NKT细胞。此类CAR T细胞和CAR NKT细胞的实例在国际申请号PCT/US2019/044195中提供。

[0154] 在一些方面,本文公开的基因编辑工具由包含编码基因编辑工具的核酸序列的载体表达。在某些方面,编码基因编辑工具的核酸序列和编码CAR或TCR的核酸序列在分开的载体上。在其他方面,编码基因编辑工具的核酸序列和编码CAR或TCR的核酸序列在同一载体上。

[0155] 如本文所述,通过本文公开的方法产生的表达CAR或TCR的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)可表现出改善的特性。例如,在某些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR或TCR的细胞)相比,本文产生的表达CAR或TCR的细胞可表现出更大的效应活性。在一些方面,本文公开的表达CAR或TCR的细胞(即,表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白)在用抗原(诸如同源抗原(例如,肿瘤抗原))刺激时产生增加量的IFN- γ 。在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR和TCR的细胞)相比,产生的IFN- γ 的量增加了至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约100%、至少约150%、至少约200%或至少约300%或更多。

[0156] 在一些方面,与参考细胞(例如,未经修饰以表达较低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达CAR或TCR的细胞)相比,本公开的表达CAR或TCR的细胞表现出增加的对氧化应激的抗性。在某些方面,本文所述的表达CAR或TCR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以增殖。在其他方面,本文公开的表达CAR或TCR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以表达溶细胞分子。在某些方面,溶细胞分子包括颗粒酶B。在一些方面,通过本文所述的方法产生的表达CAR或TCR的细胞在升高浓度的自由基氧物质的存在下可以产生细胞因子(例如,IFN- γ)。在一些方面,自由基氧物质包括过氧化氢(H₂O₂)。

[0157] IIId. 基因编辑工具

[0158] 一种或多种基因编辑工具可用于修饰本公开的细胞。基因编辑工具的非限制性实例在下文公开：

[0159] CRISPR/Cas系统

[0160] 在一些方面,可用于本公开的基因编辑工具包括CRISPR/Cas系统。此类系统可采用,例如Cas9核酸酶,其在一些情况下针对其将在其中表达的所需细胞类型(例如,T细胞,例如,表达CAR的T细胞)进行密码子优化。此类系统还可以采用包含两个独立分子的指导RNA(gRNA)。在某些方面,双分子gRNA包含crRNA样(“CRISPR RNA”或“靶向RNA”或“crRNA”或“crRNA重复序列”)分子和对应的tracrRNA样(“反式作用CRISPR RNA”或“激活RNA”或“tracrRNA”或“支架”)分子。

[0161] crRNA包含gRNA的DNA靶向区段(单链)和形成gRNA的蛋白质结合区段的双链RNA(dsRNA)双链体的一半的一段核苷酸两者。对应的tracrRNA(激活RNA)包含形成gRNA的蛋白质结合区段的dsRNA双链体的另一半的一段核苷酸。因此,crRNA的一段核苷酸与tracrRNA的一段核苷酸互补并且杂交以形成gRNA的蛋白质结合结构域的dsRNA双链体。因而,每一个crRNA可以被说成具有对应的tracrRNA。crRNA额外地提供单链DNA靶向区段。因此,gRNA包含与靶序列(例如,Nrf2 mRNA)杂交的序列和tracrRNA。因此,crRNA和tracrRNA(作为对应的一对)杂交以形成gRNA。如果用于在细胞内修饰,则给定的crRNA或tracrRNA分子的确切序列和/或长度可以被设计成对其中将使用RNA分子的物种(例如,人)具有特异性。

[0162] 编码三种元件(Cas9、tracrRNA和crRNA)的天然存在的基因通常组织在操纵子中。天然存在的CRISPRRNA根据Cas9系统和生物体而不同,但是常常含有具有21至72个核苷酸之间的长度的靶向区段,所述靶向区段由具有21至46个核苷酸之间的长度的两个直接重复序列(DR)侧接(参见例如,WO2014/131833)。在化脓性链球菌(*S. pyogenes*)的情况下,DR具有36个核苷酸的长度并且靶向区段具有30个核苷酸的长度。位于3'的DR与对应的tracrRNA互补并且杂交,其进而与Cas9蛋白结合。

[0163] 可替代地,本文使用的CRISPR系统可以进一步采用融合的crRNA-tracrRNA构建体(即,单个转录物),其与密码子优化的Cas9一起发挥作用。这种单个的RNA通常被称为指导RNA或gRNA。在gRNA内,crRNA部分被确定为给定识别位点的“靶序列”,并且tracrRNA通常被称为“支架”。简而言之,将含有靶序列的短DNA片段插入指导RNA表达质粒中。gRNA表达质粒包含靶序列(在一些方面约20个核苷酸)、一种形式的tracrRNA序列(支架)以及在细胞中具有活性的合适的启动子和用于真核细胞中的适当加工的必需元件。所述系统许多依赖于定制的互补寡核苷酸,所述寡核苷酸经过退火形成双链DNA,然后克隆到gRNA表达质粒中。

[0164] 然后将gRNA表达盒和Cas9表达盒引入细胞。参见例如,Mali P等,(2013) Science 2013年2月15日;339(6121):823-6;Jinek M等,Science 2012年8月17日;337(6096):816-21;Hwang W Y等,Nat Biotechnol 2013年3月;31(3):227-9;Jiang W等,Nat Biotechnol 2013年3月;31(3):233-9;以及Cong L等,Science 2013年2月15日;339(6121):819-23,其各自以引用的方式整体并入本文。还参见例如,WO/2013/176772 A1、WO/2014/065596 A1、WO/2014/089290 A1、WO/2014/093622 A2、WO/2014/099750 A2和WO/2013142578 A1,其各自以引用的方式整体并入本文。

[0165] 在一些方面,Cas9核酸酶可以蛋白质的形式提供。在一些方面,Cas9蛋白可以与

gRNA的复合物的形式提供。在其他方面,Cas9核酸酶可以编码蛋白质的核酸的形式提供。编码Cas9核酸酶的核酸可以是RNA(例如,信使RNA(mRNA))或DNA。在一些方面,gRNA可以RNA的形式提供。在其他方面,gRNA可以编码RNA的DNA的形式提供。在一些方面,gRNA可以分开的crRNA和tracrRNA分子或分开的编码crRNA和tracrRNA的DNA分子的形式提供。

[0166] 在一些方面,gRNA包含编码成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)RNA(crRNA)和反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)的第三核酸序列。在某些方面,Cas蛋白是I型Cas蛋白。在其他方面,Cas蛋白是II型Cas蛋白。在某些方面,II型Cas蛋白是Cas9。在一些方面,II型Cas,例如Cas9,是人密码子优化的Cas。

[0167] 在一些方面,Cas蛋白是“切口酶”,其可以在靶核酸序列内产生单链断裂(即“切口”),而不切割双链DNA(dsDNA)的两条链。例如,Cas9包含两个核酸酶结构域—一个RuvC样核酸酶结构域和一个HNH样核酸酶结构域—它们负责裂解相对的DNA链。这些结构域中的任一个中的突变都可以产生切口酶。产生切口酶突变的实例可见于例如WO/2013/176772 A1和WO/2013/142578 A1中,其各自以引用的方式并入本文。

[0168] 在某些方面,对dsDNA的每条链上的靶位点具有特异性的两种不同的Cas蛋白(例如,切口酶)可以产生与另一核酸上的或同一核酸上的不同区域的突出序列互补的突出序列。通过将核酸与对dsDNA的两条链上的靶位点具有特异性的两种切口酶接触而产生的突出末端可以是5'或3'突出末端。例如,第一切口酶可以在dsDNA的第一链上产生单链断裂,并且第二切口酶可以在dsDNA的第二链上产生单链断裂,使得产生突出序列。可以选择产生单链断裂的每个切口酶的靶位点,使得产生的突出末端序列与不同核酸分子上的突出末端序列互补。两个不同核酸分子的互补突出末端可以通过本文公开的方法退火。在一些方面,第一链上的切口酶的靶位点与第二链上的切口酶的靶位点不同。

[0169] TALEN

[0170] 在一些方面,可用于编辑(例如,降低或抑制)NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达的基因编辑工具是核酸酶剂,诸如转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)。TAL效应核酸酶是可以用于在原核生物体或真核生物体的基因组中的特定靶序列处产生双链断裂的一类序列特异性核酸酶。TAL效应核酸酶是通过将天然或工程化的转录激活因子样(TAL)效应物或其功能部分与例如像FokI的内切核酸酶的催化结构域融合而产生的。

[0171] 独特的模块化TAL效应DNA结合结构域允许设计具有潜在的任何给定DNA识别特异性的蛋白质。因此,TAL效应核酸酶的DNA结合结构域可以被工程化以识别特定的DNA靶位点,并因此用于在所需的靶序列处产生双链断裂。参见,WO 2010/079430;Morbitzer等,(2010)PNAS 10.1073/pnas.1013133107;Scholze&Boch(2010)Virulence 1:428-432;Christian等,Genetics(2010)186:757-761;Li等,(2010)Nuc.Acids Res.(2010)doi:10.1093/nar/gkq704;以及Miller等,(2011)Nature Biotechnology 29:143-148;其全部以引用的方式整体并入本文。

[0172] 合适的TAL核酸酶的非限制性实例和制备合适的TAL核酸酶的方法公开于例如美国专利申请号2011/0239315 A1、2011/0269234 A1、2011/0145940 A1、2003/0232410 A1、2005/0208489 A1、2005/0026157A1、2005/0064474 A1、2006/0188987 A1和2006/0063231 A1中(各自以引用的方式并入本文)。

[0173] 在各个方面,TAL效应物核酸酶被工程化,其在例如感兴趣的基因组基因座中的靶

核酸序列中或附近切割,其中所述靶核酸序列处于待由靶向载体修饰的序列处或附近。适于与本文提供的各种方法和组合物一起使用的TAL核酸酶包括被专门设计成在待由如本文所述的靶向载体修饰的靶核酸序列处或附近结合的TAL核酸酶。

[0174] 在一些方面,TALEN的每个单体包含12-25个TAL重复序列,其中每个TAL重复序列结合1bp亚位点。在某些方面,核酸酶剂是嵌合蛋白,其包含可操作地连接到独立核酸酶的基于TAL重复序列的DNA结合结构域。在其他方面,独立核酸酶是FokI内切核酸酶。在一些方面,核酸酶剂包含第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域,其中所述第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和所述第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域中的每一个可操作地连接到FokI核酸酶,其中所述第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和所述第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域识别靶DNA序列的每一条链中由约6bp至约40bp裂解位点隔开的两个连续靶DNA序列,并且其中所述FokI核酸酶二聚化并在靶序列处产生双链断裂。

[0175] 在一些方面,核酸酶剂包含第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域,其中所述第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和所述第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域中的每一个可操作地连接到FokI核酸酶,其中所述第一基于TAL重复序列的DNA结合结构域和所述第二基于TAL重复序列的DNA结合结构域识别靶DNA序列的每一条链中由约5bp或6bp裂解位点隔开的两个连续靶DNA序列,并且其中所述FokI核酸酶二聚化并产生双链断裂。

[0176] 锌指核酸酶(ZFN)

[0177] 在一些方面,可用于本公开的基因编辑工具包括核酸酶剂,诸如锌指核酸酶(ZFN)系统。基于锌指的系统包含融合蛋白,所述融合蛋白包含两种蛋白结构域:锌指DNA结合结构域和酶结构域。“锌指DNA结合结构域”、“锌指蛋白”或“ZFP”是通过一种或多种锌指以序列特异性方式结合DNA的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,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。锌指结构域通过与靶DNA序列(例如,NFE2L2)结合,将酶结构域的活性导向所述序列的附近,并因此诱导靶序列附近的内源靶基因的修饰。锌指结构域可以被工程化以实际上与任何所需的序列结合。如本文所公开,在一些方面,锌指结构域结合编码Nrf2蛋白的DNA序列。因此,在鉴定出包含需要裂解或重组的靶DNA序列的靶遗传基因座(例如,表1中提及的靶基因中的靶基因座)之后,可将一种或多种锌指结合结构域工程化以与靶遗传基因座中的一种或多种靶DNA序列结合。包含锌指结合结构域和酶结构域的融合蛋白在细胞中的表达影响靶遗传基因座的修饰。

[0178] 在一些方面,锌指结合结构域包含一个或多个锌指。Miller等,(1985)EMBO J.4:1609-1614;Rhodes(1993)Scientific American February:56-65;美国专利号6,453,242。通常,单个锌指结构域的长度为约30个氨基酸。单个锌指与三核苷酸(即,三联体)序列(或可以与相邻锌指的四核苷酸结合位点重叠一个核苷酸的四核苷酸序列)结合。因此,锌指结合结构域被工程化以结合的序列(例如,靶序列)的长度将决定工程化锌指结合结构域中锌指的数量。例如,对于其中指基序不与重叠的亚位点结合的ZFP,六核苷酸靶序列被两指结合结构域结合;九核苷酸靶序列被三指结合结构域结合,诸如此类。靶位点中单个锌指的结合位点(即,亚位点)不必是连续的,而是可以被一个或几个核苷酸隔开,这取决于多指结合结构域中锌指之间氨基酸序列(即,指间接头)的长度和性质。在一些方面,单个ZFN的DNA结

合结构域包含三与六个之间的单个锌指重复序列,并且每个可识别9与18个之间的碱基对。

[0179] 锌指结合结构域可以被工程化以与选择的序列结合。参加例如,Beerli等,(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141;Pabo等,(2001) *Ann.Rev.Biochem.* 70:313-340;Isalan等,(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660;Segal等,(2001) *Curr.Opin.Biotechnol.* 12:632-637;Choo等,(2000) *Curr.Opin.Struct.Biol.* 10:411-416。与天然存在的锌指蛋白相比,工程化锌指结合结构域可具有新型结合特异性。工程化方法包括但不限于合理的设计和各種类型的选择。

[0180] 用于被锌指结构域结合的靶DNA序列的选择可以例如根据美国专利号6,453,242中公开的方法来完成。本领域技术人员将清楚,核苷酸序列的简单视觉检查也可用于选择靶DNA序列。因此,用于靶DNA序列选择的任何手段均可用于本文所述的方法。靶位点通常具有至少9个核苷酸的长度,并因此被包含至少三个锌指的锌指结合结构域结合。然而,例如4指结合结构域与12核苷酸靶位点的结合,5指结合结构域与15核苷酸靶位点的结合或6指结合结构域与18核苷酸靶位点的结合也是可以的。显而易见,较大的结合结构域(例如7、8、9指和更多指)与较长的靶位点的结合也是可以的。

[0181] 锌指融合蛋白的酶结构域部分可从任何内切核酸酶或外切核酸酶获得。可以衍生出酶结构域的示例性内切核酸酶包括但不限于限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。参见例如2002-2003 Catalogue, New England Biolabs, Beverly, Mass.;以及Belfort等,(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388。另外的裂解DNA的酶是已知的(例如,51核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母HO内切核酸酶;也参见Linn等(编) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993) 这些酶(或其功能性片段)的一个或多个可用作裂解结构域的来源。

[0182] 适合用作本文所述的ZFP的酶结构域的示例性限制性核酸内切酶(限制性酶)存在于许多物种中,并且能够与DNA进行序列特异性结合(在识别位点处),并能够在结合位点处或附近裂解DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在远离识别位点的位点处裂解DNA,并且具有可分开的结合结构域和裂解结构域。例如,IIS型酶FokI在一条链上距其识别位点9个核苷酸处和在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处催化DNA的双链裂解。参见例如,美国专利号5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等,(1992) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:4275-4279;Li等,(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:2764-2768;Kim等,(1994a) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:883-887;Kim等,(1994b) *J.Biol.Chem.* 269:31,978-31,982。因此,在一些方面,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制性酶的酶结构域和一种或多种锌指结合结构域。

[0183] 其裂解结构域可与结合结构域分开的示例性IIS型限制性酶是FokI。这种特定的酶作为二聚体是有活性的。Bitinaite等,(1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:10,570-10,575。因此,对于使用锌指-FokI融合物的靶向双链DNA裂解,可以使用两个融合蛋白(每个包含FokI酶结构域)来重构催化活性的裂解结构域。可替代地,也可以使用含有锌指结合结构域和两个FokI酶结构域的单个多肽分子。在美国专利号9,782,437中描述了包含FokI酶结构域的示例性ZFP。

[0184] 大范围核酸酶

[0185] 在一些方面,用于调节细胞中的Nrf2表达的基因编辑工具包括核酸酶剂,诸如大

范围核酸酶系统。大范围核酸酶已经基于保守序列基序被分为四个家族,所述家族为“LAGLIDADG”、“GIY-YIG”、“H-N-H”以及“His-Cys框”家族。这些基序参与金属离子的配位和磷酸二酯键的水解。

[0186] HEA酶因它们的长识别位点和耐受它们的DNA底物中的一些序列多态性而著名。大范围核酸酶结构域、结构和功能是已知,参见例如Guhan和Muniyappa (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:199-248;Lucas等, (2001) *Nucleic Acids Res* 29:960-9;Jurica和Stoddard, (1999) *Cell Mol Life Sci* 55:1304-26;Stoddard, (2006) *Q Rev Biophys* 38:49-95;以及Moure等, (2002) *Nat Struct Biol* 9:764。

[0187] 在一些实例中,使用天然存在的变体和/或工程化的衍生大范围核酸酶。已知用于改变动力学、辅因子相互作用、表达、最佳条件和/或识别位点特异性以及筛选活性的方法,参见例如,Epinat等, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952-62;Chevalier等, (2002) *Mol Cell* 10:895-905;Gimble等, (2003) *Mol Biol* 334:993-1008;Seligman等, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9;Sussman等, (2004) *J Mol Biol* 342:31-41;Rosen等, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800;Chames等, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178;Smith等, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149;Gruen等, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29;Chen和Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154;W02005105989;W02003078619;W02006097854;W02006097853;W02006097784;以及W02004031346;其各自以引用的方式整体并入本文。

[0188] 本文可以使用任何大范围核酸酶,包括但不限于I-SceI、I-SceII、I-SceIII、I-SceIV、I-SceV、I-SecVI、I-SceVII、I-CeuI、I-CeuAIIP、I-CreI、I-CrepsbIP、I-CrepsbIIP、I-CrepsbIIIP、I-CrepsbIVP、I-TliI、I-PpoI、PI-PspI、F-SceI、F-SceII、F-SuvI、F-TevI、F-TevII、I-AmaI、I-AniI、I-ChuI、I-CmoI、I-CpaI、I-CpaII、I-CsmI、I-CvuI、I-CvuAIP、I-DdiI、I-DdiII、I-DirI、I-DmoI、I-HmuI、I-HmuII、I-HsNIP、I-LlaI、I-MsoI、I-NaaI、I-NanI、I-NcIIP、I-NgrIP、I-NitI、I-NjaI、I-Nsp236IP、I-PakI、I-PboIP、I-PcuIP、I-PcuAI、I-PcuVI、I-PgrIP、I-PobIP、I-PorIIP、I-PbpIP、I-SpBetaIP、I-ScaI、I-SexIP、I-SneIP、I-SpomI、I-SpomCP、I-SpomIP、I-SpomIIP、I-SquIP、I-Ssp6803I、I-SthPhiJP、I-SthPhiST3P、I-SthPhiSTe3bP、I-TdeIP、I-TevI、I-TevII、I-TevIII、I-UarAP、I-UarHGPAIP、I-UarHGPA13P、I-VinIP、I-ZbiIP、PI-MtuI、PI-MtuHIP、PI-MtuHIIP、PI-PfuI、PI-PfuII、PI-PkoI、PI-PkoII、PI-Rma43812IP、PI-SpBetaIP、PI-SceI、PI-TfuI、PI-TfuII、PI-ThyI、PI-TliI、PI-TliII或其任何活性变体或片段。

[0189] 在一些方面,大范围核酸酶识别12至40个碱基对的双链DNA序列。在一些方面,大范围核酸酶识别基因组中的一个完全匹配的靶序列。在一些方面,大范围核酸酶是归巢核酸酶。在一些方面,归巢核酸酶是归巢核酸酶的“LAGLIDADG”家族。在一些方面,归巢核酸酶的“LAGLIDADG”家族选自I-SceI、I-CreI、I-DmoI或其组合。

[0190] 限制性内切核酸酶

[0191] 在一些方面,可用于本公开的基因编辑工具包括核酸酶剂,诸如限制性内切核酸酶,其包括I型、II型、III型和IV型内切核酸酶。I型和III型限制性内切核酸酶识别特异性识别位点,但是通常在距离核酸酶结合位点的可变位置处裂解,所述核酸酶结合位点可以与裂解位点(识别位点)相距数百个碱基对。在II型系统中,限制活性独立于任何甲基化酶活性,并且裂解通常在结合位点内或附近的特定位点处发生。大部分的II型酶切割回文序

列,然而,IIa型酶识别非回文识别位点并且在识别位点外部裂解,IIb型酶用识别序列外部的两个位点切割序列两次,并且IIc型酶识别不对称的识别位点并且在一侧上并且在距离识别位点约1-20个核苷酸的限定距离处裂解。IV型限制性酶靶向甲基化的DNA。限制性内切酶例如在REBASE数据库中被进一步描述和分类(rebase.neb.com上的网页;Roberts等,(2003)Nucleic Acids Res 31:418-20),Roberts等,(2003)Nucleic Acids Res31:1805-12,以及Belfort等,(2002)in Mobile DNA II,第761-783页,Craigie等编,(ASM Press, Washington,D.C.)。

[0192] 如本文所述,在一些方面,可以通过本领域已知的任何手段将基因编辑工具(例如,CRISPR、TALEN、大范围核酸酶、限制性内切核酸酶、RNAi、反义寡核苷酸)引入细胞。在某些方面,可以将编码特定基因编辑工具的多肽直接引入细胞。可替代地,可以将编码基因编辑工具的多核苷酸引入细胞。在一些方面,当将编码基因编辑工具的多核苷酸引入细胞时,基因编辑工具可以在细胞内瞬时、条件性或组成性地表达。因此,编码基因编辑工具的多核苷酸可以包含在表达盒中并且可操作地连接到条件型启动子、诱导型启动子、组成型启动子或组织特异性启动子。可替代地,将基因编辑工具作为编码或包含基因编辑工具的mRNA引入细胞。

[0193] RNAi

[0194] 在一些方面,可用于降低细胞中Nrf2的表达的基因编辑工具包括RNA干扰分子(“RNAi”)。如本文所用,RNAi是指通过内源基因沉默途径(例如,Dicer和RNA诱导的沉默复合物(RISC))降解靶mRNA来介导内源靶基因产物的减少的表达的RNA多核苷酸。RNAi剂的非限制性实例包括微小RNA(在本文中也称为“miRNA”)、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、RNA适体或其组合。

[0195] 在一些方面,可用于本公开的基因编辑工具包含一种或多种miRNA。“miRNA”是指长度为约21-25个核苷酸的天然存在的小非编码RNA分子。在一些方面,可用于本公开的miRNA与Nrf2 mRNA分子至少部分互补。miRNA可以通过翻译抑制、mRNA裂解和/或去腺苷酸化来下调(例如,减少)内源靶基因产物(即,Nrf2蛋白)的表达。

[0196] 在一些方面,可与本公开一起使用的基因编辑工具包含一种或多种shRNA。“shRNA”(或“短发夹RNA”分子)是指包含双链区和在一端形成发夹环的环区的RNA序列,其可用于降低和/或沉默基因表达。双链区在茎的每一侧的长度通常为约19个核苷酸至约29个核苷酸,并且环区的长度通常为约三至约十个核苷酸(并且3'-或5'-末端单链突出核苷酸是任选的)。shRNA可以克隆到质粒或非复制性重组病毒载体中,以导入细胞内,并使得shRNA编码序列整合到基因组中。因此,shRNA可以提供对内源靶基因(即,Nrf2)翻译和表达稳定且一致的抑制。

[0197] 在一些方面,本文公开的基因编辑工具包含一种或多种siRNA。“siRNA”是指长度通常为约21-23个核苷酸的双链RNA分子。siRNA与称为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的多蛋白复合物结合,在此过程中,“过客”有义链被酶促裂解。然后,由于序列同源性,激活的RISC中包含的反义“指导”链将RISC指导至对应的mRNA,并且相同的核酸酶切割靶mRNA(即,Nrf2 mRNA),从而导致指定基因沉默。在某些方面,siRNA的长度为18、19、20、21、22、23或24个核苷酸,并在其3'末端具有2个碱基的突出端。可以将siRNA引入单个细胞和/或培养系统,并导致靶mRNA序列(即,Nrf2 mRNA)的降解。siRNA和shRNA进一步描述于Fire等人,Nature,

391:19,1998和美国专利号7,732,417;8,202,846和8,383,599中,其各自以引用的方式整体并入本文。

[0198] 反义寡核苷酸

[0199] 在一些方面,可用于降低细胞中Nrf2的表达的基因编辑工具包括反义寡核苷酸。如本文所用,“反义寡核苷酸”或“ASO”是指能够通过与其靶核酸杂交、特别是与靶核酸上的连续序列杂交来调节靶基因(即,Nrf2)的表达的寡核苷酸。反义寡核苷酸基本上不是双链的,并因此不是siRNA或shRNA。

[0200] 在一些方面,可用于本公开的ASO是单链的。应当理解,本公开的单链寡核苷酸可以形成发夹或分子间双链体结构(相同寡核苷酸的两个分子之间的双链体),只要内部或内部自我互补的程度小于寡核苷酸全长的大约50%即可。在一些方面,可用于本公开的ASO可以包含一种或多种修饰的核苷或核苷酸,诸如2'糖修饰的核苷。可对ASO进行的其他修饰(例如像,可用于抑制或降低Nrf2表达的修饰)提供于例如,美国公开号2019/0275148 A1中。

[0201] 在一些方面,ASO可以通过核酸酶介导的Nrf2转录物(例如,mRNA)的降解来降低Nrf2蛋白的表达,其中ASO能够募集核酸酶,例如RNA酶H,诸如RNA酶H1。RNA酶H是一种普遍存在的酶,其水解RNA/DNA双链体的RNA链。因此,在某些方面,一旦与靶序列(例如,Nrf2 mRNA)结合,ASO可以诱导Nrf2 mRNA的降解,并由此降低Nrf2蛋白的表达。

[0202] 在一些方面,ASO包含一种或多种吗啉代。如本文所用,“吗啉代”是指修饰的核酸寡聚体,其中标准核酸碱基与吗啉环结合并通过二氨基磷酸酯键连接。类似于siRNA和shRNA,吗啉代与互补mRNA序列结合。然而,吗啉代通过空间抑制mRNA翻译和改变mRNA剪接而不是靶向互补mRNA序列进行降解来发挥作用。

[0203] 如本文所公开的,基因编辑工具的上述实例并非旨在限制并且本领域中可用的任何基因编辑工具可用于降低或抑制NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达。

[0204] III. 核酸和载体

[0205] 本文所述的另一方面涉及一种或多种核酸分子,其包含用于降低细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达的基因编辑工具,和/或编码可在本公开的修饰的细胞中表达的嵌合抗原受体或T细胞受体。核酸可以在完整细胞中、在细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术,包括碱性/SDS处理、CsCl1显带、柱色谱、限制酶、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域众所周知的方法,从其他细胞组分或其他污染物,例如其他细胞核酸(例如,其他染色体DNA,例如,连接到自然界中的分离的DNA的染色体DNA)或蛋白质中纯化出来时,核酸是“分离的”或“呈现为基本上纯的”。参见F. Ausubel等编,(1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing和Wiley Interscience, New York。本文所述的核酸可以是例如DNA或RNA,并且可以包含或不包含内含子序列。在某些方面,核酸是cDNA分子。本文所述的核酸可以使用本领域已知的标准分子生物学技术获得。

[0206] 在一些方面,本公开提供了包含分离的核酸分子的载体,所述核酸分子包含用于降低细胞中NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的表达的基因编辑工具,和/或编码可在本公开的修饰的细胞中表达的嵌合抗原受体或T细胞受体。如本文所述,此类载体可用于修饰细胞(例如,表达CAR的细胞)以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白,其中此类修饰的细胞可

用于治疗疾病或病症,诸如癌症。

[0207] 用于本公开的合适的载体包括表达载体、病毒载体和质粒载体。在一些方面,载体是病毒载体。

[0208] 如本文所用,表达载体是指任何核酸构建体,其包含用于插入的编码序列的转录和翻译所必需的元件,或者对于RNA病毒载体而言,被引入到适当的宿主细胞中时,用于复制和翻译所必需的元件。表达载体可以包括质粒、噬菌粒、病毒及其衍生物。

[0209] 如本文所用,病毒载体包括但不限于来自以下病毒的核酸序列:逆转录病毒,诸如莫洛尼(Moloney)鼠白血病病毒、哈维(Harvey)鼠肉瘤病毒、鼠乳腺肿瘤病毒和劳氏(Rous)肉瘤病毒;慢病毒;腺病毒;腺相关病毒;SV40型病毒;多瘤病毒;爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒;乳头瘤病毒;疱疹病毒;牛痘病毒;脊髓灰质炎病毒;以及RNA病毒,诸如逆转录病毒。人们可以容易地采用本领域众所周知的其他载体。某些病毒载体基于其中非必需基因已被感兴趣的基因置换的非致细胞病变真核病毒。非致细胞病变病毒包括逆转录病毒,其生命周期包括将基因组病毒RNA逆转录成DNA,随后将原病毒整合到宿主细胞DNA中。

[0210] 在一些方面,载体来源于腺相关病毒。在其他方面,载体来源于慢病毒。慢病毒载体的实例公开于W09931251、W09712622、W09817815、W09817816和W09818934中,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0211] 其他载体包括质粒载体。质粒载体已在本领域中广泛描述,并且是本领域技术人员众所周知的。参见例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。在最近几年中,已经发现质粒载体由于其不能在宿主基因组内复制并整合到宿主基因组中而特别有利于在体内将基因递送至细胞。然而,这些具有与宿主细胞相容的启动子的质粒可以表达来自可在质粒内操作编码的基因的肽。可从商业供应商处获得的一些常用质粒包括pBR322、pUC18、pUC19、各种pcDNA质粒、pRC/CMV、各种pCMV质粒、pSV40和pBlueScript。另外的特定质粒的实例包括pcDNA3.1,目录号V79020;pcDNA3.1/hygro,目录号V87020;pcDNA4/myc-His,目录号V86320;以及pBudCE4.1,目录号V53220,均来自Invitrogen(Carlsbad,CA.)。其他质粒是本领域普通技术人员众所周知的。另外,可以使用标准分子生物学技术来定制设计质粒,以去除和/或添加DNA的特定片段。

[0212] IV. 药物组合物

[0213] 本文还提供了组合物,其包含已被修饰以表达降低水平的NFE2L2基因和/或Nrf2蛋白的细胞(例如像,本文所述的那些细胞)和药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。如本文所述,此类药物组合物可用于预防和/或治疗癌症。如本文所述,在一些方面,本文公开的药物组合物中存在的修饰的细胞是免疫细胞,诸如T细胞(例如,表达CAR或TCR的T细胞)或NK细胞(例如,表达CAR或TCR的NK细胞)。

[0214] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲液诸如磷酸盐、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;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁基或苄基醇;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;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;蛋白质诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰

胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其他碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精)；螯合剂诸如EDTA；糖类诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子诸如钠离子；金属络合物(例如，Zn-蛋白质络合物)；和/或非离子型表面活性剂诸如TWEEN®、PLURONICS®或聚乙二醇(PEG)。

[0215] 药物组合物可以被配制用于以任何途径施用至受试者。施用途径的具体实例包括肌肉内、皮下、眼、静脉内、腹膜内、皮内、眶内、脑内、颅内、脊柱内、脑室内、鞘内、脑池内、囊内或瘤内。本文还考虑了以皮下、肌肉内或静脉内注射为特征的肠胃外施用。注射剂可以常规形式(液体溶液或悬浮液、注射前适用于液体中的溶液或悬浮液的固体形式或乳剂)制备。注射剂、溶液和乳剂还包含一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。此外，如果需要，待施用的药物组合物还可以包含少量的无毒辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂和其他此类剂，例如像乙酸钠、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。

[0216] 用于肠胃外制品的药理学上可接受的载剂包括水性媒介物、非水性媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲液、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、多价螯合剂或螯合剂以及其他药理学上可接受的物质。水性媒介物的实例包括氯化钠注射液、林格氏(Ringers)注射液、等渗右旋糖注射液、无菌水注射液、右旋糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外媒介物包括植物来源的固定油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可将抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂加入到以多剂量容器包装的肠胃外制品中，所述抗微生物剂包括苯酚或甲酚、汞、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苜蓿氯铵。等渗剂包括氯化钠和右旋糖。缓冲液包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因(procaine)。悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨酯80(TWEEN®80)。金属离子的多价螯合剂或螯合剂包括EDTA。药物载剂还包括用于水混溶性媒介物的乙醇、聚乙二醇和丙二醇；以及用于调节pH的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0217] 用于肠胃外施用的制品包括准备用于注射的无菌溶液；准备在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产物(诸如冻干粉末)，包括皮下注射片剂；准备用于注射的无菌悬浮液；准备在使用前与媒介物组合的无菌干燥不溶性产物以及无菌乳剂。溶液可以是水性或非水性的。

[0218] 如果静脉内施用，则合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)，以及含有增稠剂和增溶剂(诸如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物)的溶液。

[0219] 还可以将本文提供的药物组合物配制为靶向待治疗受试者的特定组织、受体或身体的其他区域。许多此类靶向方法是本领域技术人员众所周知的。本文考虑了用于本发明组合物的所有此类靶向方法。对于靶向方法的非限制性实例，参见例如，美国专利号6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874，其各自以引用的方式整体并入本文。

[0220] 待用于体内施用的组合物可以是无菌的。这易于通过穿过例如无菌过滤膜的过滤来实现。

[0221] 本申请中引用的所有参考文献、专利或申请(美国或美国以外的)均以引用的方式

并入本文,如同将其全部内容写入本文。在出现任何不一致的情况下,以本文字面上公开的内容为准。

[0222] 实施例

[0223] 下面将参考实施例对本公开进行详细描述。应当理解,所描述的实施例仅旨在举例说明而不是限制本公开。

[0224] 实施例1. 肿瘤浸润T细胞中Nrf2 mRNA表达水平的测定

[0225] 测定肿瘤浸润T细胞中核因子E2因子相关因子2 (Nrf2) mRNA表达的水平。Nrf2在保护细胞免受氧化应激介导的损伤方面发挥着重要作用。为了更好地理解Nrf2与氧化应激之间的关系,将T细胞用不同浓度的过氧化氢处理,过氧化氢是一种已知的氧化应激诱导剂。如图1所示,随着氧化应激的增加(即,更高浓度的H₂O₂),T细胞表达更高水平的Nrf2 mRNA。几乎所有癌症都与氧化应激的升高相关。为了更好地理解这种现象,从荷瘤小鼠中分离来自肿瘤和/或不同淋巴结的T细胞。作为对照,还分离了来自健康小鼠淋巴结的T细胞。如图2所示,与荷瘤小鼠的引流淋巴结(dLN)或任何其他淋巴结的T细胞相比,肿瘤浸润T细胞中Nrf2 mRNA表达的水平非常高。此结果证明了肿瘤浸润T淋巴细胞中Nrf2表达的选择性。

[0226] 实施例2. 随Nrf2表达的调节而变化的抗癌反应的测定

[0227] 为了开始了解调节Nrf2表达如何影响抗肿瘤免疫反应,制备了Nrf2缺失的小鼠,用于体内测定随Nrf2表达的调节而变化的T细胞介导的抗癌反应。

[0228] 2-1. 抑制癌细胞增殖能力的测定

[0229] 为了测定随着Nrf2表达的调节变化而抑制癌细胞增殖的能力,将癌细胞注射到Nrf2缺失的小鼠和野生型小鼠中,然后测量肿瘤体积。具体地,将黑素瘤(B16)细胞注射到Nrf2缺失的小鼠和野生型小鼠中;然后,通过测量肿瘤接种后不同时间点的肿瘤体积来观察癌细胞的增殖。结果示于图3和4中。

[0230] 如图3和4所示,在注射黑素瘤细胞后,在Nrf2缺失的小鼠中观察到了显著的抑制癌细胞增殖的作用。例如,到肿瘤接种后约第19天,野生型与Nrf2^{-/-}动物之间的肿瘤体积存在显著差异。

[0231] 为了确认观察到的抗肿瘤作用不是黑素瘤独有的,将淋巴瘤细胞注射到Nrf2缺失的小鼠和野生型小鼠中;然后,通过测量肿瘤接种后不同时间点的肿瘤体积来再次观察癌细胞的增殖。结果示于图5和6中。

[0232] 如图5和6所示,在注射淋巴瘤细胞后,在Nrf2缺失的小鼠中观察到了显著的抑制癌细胞增殖的作用,Nrf2缺失的小鼠中肿瘤体积大大减少。

[0233] 2-2. 抑制癌细胞转移能力的测定

[0234] 接下来,为了测定随着Nrf2表达的调节变化而抑制癌细胞转移的能力,将肺癌细胞(静脉内)注射到Nrf2缺失的小鼠和野生型小鼠中;然后,观察癌细胞转移。结果示于图7中。

[0235] 如图7所示,注射肺癌细胞后,在野生型动物的肺部观察到明显的肿瘤生长,这表明施用的肿瘤细胞已经扩散到肺组织。相比之下,在Nrf2缺失的小鼠中观察到抑制癌细胞转移的显著作用。

[0236] 上述结果表明降低Nrf2表达在治疗癌症中的潜在益处。

[0237] 实施例3. 随Nrf2表达的调节而变化的T细胞介导的抗癌反应的测定

[0238] 3-1. T细胞介导的抗癌反应的测定

[0239] Nrf2缺失的小鼠会对各种癌细胞产生强烈的抗癌反应,这在上述实施例2中得到证实。为了测定上述现象是否是T细胞介导的抗癌反应,进行处理使得Nrf2缺失的小鼠和野生型小鼠进入T细胞缺陷状态。具体地,施用抗CD3抗体以消耗T细胞。来自荷瘤野生型和Nrf2缺失的动物两者中的一些动物接受抗CD3抗体(对照动物接受IgG对照抗体);然后,通过测量肿瘤接种后不同时间点的肿瘤体积和肿瘤重量来观察癌细胞增殖。结果示于表8A和表8B中。

[0240] 如图8A和8B所示,当Nrf2缺失的小鼠处于T细胞缺陷状态时,抑制小鼠中的癌细胞增殖的作用已经消失。上述结果证实了Nrf2缺陷期间抗癌反应与T细胞之间的密切关系。

[0241] 为了进一步证实在Nrf2缺失的动物中观察到的增强的抗肿瘤免疫反应是T细胞介导的,使用抗B220抗体来消耗荷瘤野生型和Nrf2缺失的动物两者中的B细胞。如图9A和9B所示,B细胞的消耗对抗肿瘤免疫反应没有影响。在Nrf2缺失的动物中,接受抗B220抗体的动物和接受对照IgG抗体的动物两者中的肿瘤体积和肿瘤重量都相当。

[0242] 上述结果证实在Nrf2缺失的动物中观察到的抗肿瘤免疫反应主要由T细胞介导。

[0243] 3-2. 随着Nrf2表达的变化的癌症毒性CD8⁺ T细胞激活水平的测定

[0244] 为了了解Nrf2的缺失如何影响T细胞功能,观察随着Nrf2表达的变化而变化的癌症毒性CD8⁺ T细胞激活的水平,从而证实癌症毒性CD8⁺ T细胞激活水平与抗癌反应之间的关系。具体地,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞是从荷瘤野生型和Nrf2缺失的动物中分离出来的。所述细胞是从肿瘤(即,TIL)或引流淋巴结中分离出来的。然后,T细胞被TCR刺激并测量产生的IFN- γ 和IL-17的量。结果示于图10中。

[0245] 如图10所示,在Nrf2缺失的小鼠中观察到癌症细胞毒性CD8⁺ T细胞分泌的IFN- γ 量显著增加。CD4⁺T细胞中没有观察到显著差异。在从引流淋巴结和肿瘤两者中分离的CD8⁺T细胞中都观察到了IFN- γ 产量的增加。然而,CD8⁺TIL的差异要更显著。上述结果证实Nrf2具有反向和深度干扰T细胞反应性和活性的能力。

[0246] 3-3. 癌症毒性CD8⁺ T细胞对体内模型的抗癌功效的测定

[0247] 基于上述实施例中获得的3-1和3-2结果,测定癌症毒性CD8⁺ T细胞对体内小鼠模型的抗癌功效。具体地,将经受Nrf2表达缺陷处理的OVA抗原特异性CD8⁺ T细胞(OT-I细胞)注射到移植有癌细胞(用于表达OVA抗原)的小鼠体内,然后观察癌细胞抑制的效果。作为对照,将来自野生型和Nrf2^{+/+}-动物的T细胞分离并施用于野生型荷瘤动物。结果示于图11中。

[0248] 如图11所示,在注射有Nrf2缺失的特异性CD8⁺ T细胞(OT-I细胞)的小鼠中观察到癌细胞抑制的显著效果。当来自Nrf2^{+/+}-动物的T细胞用于过继性转移时,观察到中间效应。上述结果证实Nrf2表达能够降低CD8⁺ T细胞的反应性,从而在抑制癌细胞增殖方面起到反作用(逆向干扰)。

[0249] 实施例4:Nrf2表达与抗肿瘤免疫反应之间的关系的进一步分析

[0250] 为了进一步证实上述实施例中观察到的结果,将MC38(结直肠)肿瘤细胞施用于以下动物:(i)野生型;(ii)Nrf2-缺失;以及(iii)过表达Nrf2的转基因小鼠("Nrf2Tg")。然后,如之前实施例中所述,通过在肿瘤接种后的不同时间点测量肿瘤体积来观察不同组中的抗肿瘤免疫反应。

[0251] 如图13A和13B所示,Nrf2表达的缺失也改善了针对结直肠肿瘤细胞的抗肿瘤免疫

反应。这一结果进一步证实,降低Nrf2表达可以针对许多不同的癌症类型具有治疗益处。此外,上述数据表明T细胞治疗肿瘤的能力与Nrf2表达成反比。例如,在Nrf2转基因动物中,肿瘤体积甚至大于野生型动物。

[0252] 实施例5:Nrf2缺失的T细胞对氧化应激的抗性的分析

[0253] 为了确定来自Nrf2缺失的动物的T细胞可以产生更有效的抗肿瘤免疫反应的潜在机制,测量来自野生型、Nrf2转基因和Nrf2缺失的动物的T细胞在存在和不存在过氧化氢两种情况下在TCR刺激时产生IFN- γ 和颗粒酶B的能力。

[0254] 如图14A-14D所示,只有来自Nrf2缺失的动物的T细胞能够在过氧化氢存在下产生IFN- γ 和颗粒酶B。这一结果表明,Nrf2缺失的动物中的T细胞仍然具有功能,并且对许多癌症类型中诱导的氧化应激具有更强的抗性。

[0255] 实施例6:具有降低的Nrf2表达的CAR T细胞的构建

[0256] 上述结果证实了使用Nrf2缺失的T细胞治疗癌症的潜在益处。为了开发此类免疫疗法,构建了具有降低的Nrf2表达的CD19特异性CAR T细胞。图15A提供了用于产生CAR T细胞的构建体的示意图。图15B提供了使用图15A中提供的构建体,产生CD19特异性CAR T细胞,其中Nrf2 mRNA表达降低了约50%。即使仅减少50%,如图15C所示,CAR T细胞也表现出改善的对氧化应激的抗性。与表达正常水平的Nrf2的对照CAR T细胞相比,具有降低的Nrf2表达的CAR T细胞在过氧化氢存在下产生IFN- γ 的比例显著更高。

[0257] 接下来,为了确定降低T细胞(例如,CAR T细胞)中Nrf2表达的其他方法,使用了CRISPR/Cas9系统。图16A、16B和16C提供了使用靶向Nrf2的三种不同的指导RNA的结果。表3(如下)提供了使用不同的指导RNA观察到的突变、插入和缺失的数量。如所示,使用CRISPR/Cas9系统(特别是鉴定为“Sg3”的指导RNA)以83%的效率成功生成了Nrf2缺陷型人T细胞。

[0258] 表3.

靶标	总计数	突变的 计数	插入	缺失	插入/缺失频率
Sg1	25378	5	0	5	5 (0.0%)
	37365	24661	76	24585	24661 (66%)
Sg2	35691	2	0	2	2 (0.0%)
	29936	9000	335	8665	9000 (30.1%)
Sg3	47543	8	0	8	8 (0.0%)
	27186	22649	2879	19770	22649 (83.3%)

[0260] 总的来说,上述结果表明,具有降低的Nrf2表达的CAR T细胞(诸如CAR T细胞)可以是许多不同癌症的可行治疗选择。

195	200	205
Glu Thr Thr Met Val Pro Ser	Pro Glu Ala Lys Leu Thr Glu Val Asp	
210	215	220
Asn Tyr His Phe Tyr Ser Ser Ile Pro Ser Met Glu Lys Glu Val Gly		
225	230	235
240		
Asn Cys Ser Pro His Phe Leu Asn Ala Phe Glu Asp Ser Phe Ser Ser		
245	250	255
Ile Leu Ser Thr Glu Asp Pro Asn Gln Leu Thr Val Asn Ser Leu Asn		
260	265	270
Ser Asp Ala Thr Val Asn Thr Asp Phe Gly Asp Glu Phe Tyr Ser Ala		
275	280	285
Phe Ile Ala Glu Pro Ser Ile Ser Asn Ser Met Pro Ser Pro Ala Thr		
290	295	300
Leu Ser His Ser Leu Ser Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ile Asp Val Ser		
305	310	315
320		
Asp Leu Ser Leu Cys Lys Ala Phe Asn Gln Asn His Pro Glu Ser Thr		
325	330	335
Ala Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asn Thr Ser Pro		
340	345	350
Ser Val Ala Ser Pro Glu His Ser Val Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asp		
355	360	365
Thr Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ser Glu Val Glu Glu Leu Asp Ser Ala		
370	375	380
Pro Gly Ser Val Lys Gln Asn Gly Pro Lys Thr Pro Val His Ser Ser		
385	390	395
400		
Gly Asp Met Val Gln Pro Leu Ser Pro Ser Gln Gly Gln Ser Thr His		
405	410	415
Val His Asp Ala Gln Cys Glu Asn Thr Pro Glu Lys Glu Leu Pro Val		
420	425	430
Ser Pro Gly His Arg Lys Thr Pro Phe Thr Lys Asp Lys His Ser Ser		
435	440	445
Arg Leu Glu Ala His Leu Thr Arg Asp Glu Leu Arg Ala Lys Ala Leu		
450	455	460
His Ile Pro Phe Pro Val Glu Lys Ile Ile Asn Leu Pro Val Val Asp		
465	470	475
480		
Phe Asn Glu Met Met Ser Lys Glu Gln Phe Asn Glu Ala Gln Leu Ala		
485	490	495
Leu Ile Arg Asp Ile Arg Arg Arg Gly Lys Asn Lys Val Ala Ala Gln		
500	505	510

Asn Cys Arg Lys Arg Lys Leu Glu Asn Ile Val Glu Leu Glu Gln Asp
 515 520 525
 Leu Asp His Leu Lys Asp Glu Lys Glu Lys Leu Leu Lys Glu Lys Gly
 530 535 540
 Glu Asn Asp Lys Ser Leu His Leu Leu Lys Lys Gln Leu Ser Thr Leu
 545 550 555 560
 Tyr Leu Glu Val Phe Ser Met Leu Arg Asp Glu Asp Gly Lys Pro Tyr
 565 570 575
 Ser Pro Ser Glu Tyr Ser Leu Gln Gln Thr Arg Asp Gly Asn Val Phe
 580 585 590
 Leu Val Pro Lys Ser Lys Lys Pro Asp Val Lys Lys Asn
 595 600 605
 <210> 2
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 Met Asp Leu Ile Asp Ile Leu Trp Arg Gln Asp Ile Asp Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Arg Glu Val Phe Asp Phe Ser Gln Arg Arg Lys Glu Tyr Glu Leu
 20 25 30
 Glu Lys Gln Lys Lys Leu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln Leu Gln Lys
 35 40 45
 Glu Gln Glu Lys Ala Phe Phe Ala Gln Leu Gln Leu Asp Glu Glu Thr
 50 55 60
 Gly Glu Phe Leu Pro Ile Gln Pro Ala Gln His Ile Gln Ser Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Ser Gln Val Ala His Ile Pro Lys Ser Asp
 85 90 95
 Ala Leu Tyr Phe Asp Asp Cys Met Gln Leu Leu Ala Gln Thr Phe Pro
 100 105 110
 Phe Val Asp Asp Asn Glu Val Ser Ser Ala Thr Phe Gln Ser Leu Val
 115 120 125
 Pro Asp Ile Pro Gly His Ile Glu Ser Pro Val Phe Ile Ala Thr Asn
 130 135 140
 Gln Ala Gln Ser Pro Glu Thr Ser Val Ala Gln Val Ala Pro Val Asp
 145 150 155 160
 Leu Asp Gly Met Gln Gln Asp Ile Glu Gln Val Trp Glu Glu Leu Leu
 165 170 175

Ser Ile Pro Glu Leu Gln Cys Leu Asn Ile Glu Asn Asp Lys Leu Val
 180 185 190
 Glu Thr Thr Met Val Pro Ser Pro Glu Ala Lys Leu Thr Glu Val Asp
 195 200 205
 Asn Tyr His Phe Tyr Ser Ser Ile Pro Ser Met Glu Lys Glu Val Gly
 210 215 220
 Asn Cys Ser Pro His Phe Leu Asn Ala Phe Glu Asp Ser Phe Ser Ser
 225 230 235 240
 Ile Leu Ser Thr Glu Asp Pro Asn Gln Leu Thr Val Asn Ser Leu Asn
 245 250 255
 Ser Asp Ala Thr Val Asn Thr Asp Phe Gly Asp Glu Phe Tyr Ser Ala
 260 265 270
 Phe Ile Ala Glu Pro Ser Ile Ser Asn Ser Met Pro Ser Pro Ala Thr
 275 280 285
 Leu Ser His Ser Leu Ser Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ile Asp Val Ser
 290 295 300
 Asp Leu Ser Leu Cys Lys Ala Phe Asn Gln Asn His Pro Glu Ser Thr
 305 310 315 320
 Ala Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asn Thr Ser Pro
 325 330 335
 Ser Val Ala Ser Pro Glu His Ser Val Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asp
 340 345 350
 Thr Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ser Glu Val Glu Glu Leu Asp Ser Ala
 355 360 365
 Pro Gly Ser Val Lys Gln Asn Gly Pro Lys Thr Pro Val His Ser Ser
 370 375 380
 Gly Asp Met Val Gln Pro Leu Ser Pro Ser Gln Gly Gln Ser Thr His
 385 390 395 400
 Val His Asp Ala Gln Cys Glu Asn Thr Pro Glu Lys Glu Leu Pro Val
 405 410 415
 Ser Pro Gly His Arg Lys Thr Pro Phe Thr Lys Asp Lys His Ser Ser
 420 425 430
 Arg Leu Glu Ala His Leu Thr Arg Asp Glu Leu Arg Ala Lys Ala Leu
 435 440 445
 His Ile Pro Phe Pro Val Glu Lys Ile Ile Asn Leu Pro Val Val Asp
 450 455 460
 Phe Asn Glu Met Met Ser Lys Glu Gln Phe Asn Glu Ala Gln Leu Ala
 465 470 475 480
 Leu Ile Arg Asp Ile Arg Arg Arg Gly Lys Asn Lys Val Ala Ala Gln

	485	490	495
Asn Cys Arg Lys Arg Lys Leu Glu Asn Ile Val Glu Leu Glu Gln Asp			
	500	505	510
Leu Asp His Leu Lys Asp Glu Lys Glu Lys Leu Leu Lys Glu Lys Gly			
	515	520	525
Glu Asn Asp Lys Ser Leu His Leu Leu Lys Lys Gln Leu Ser Thr Leu			
	530	535	540
Tyr Leu Glu Val Phe Ser Met Leu Arg Asp Glu Asp Gly Lys Pro Tyr			
545	550	555	560
Ser Pro Ser Glu Tyr Ser Leu Gln Gln Thr Arg Asp Gly Asn Val Phe			
	565	570	575
Leu Val Pro Lys Ser Lys Lys Pro Asp Val Lys Lys Asn			
	580	585	
<210> 3			
<211> 582			
<212> PRT			
<213> 智人 (Homo sapiens)			
<400> 3			
Met Asp Leu Ile Asp Ile Leu Trp Arg Gln Asp Ile Asp Leu Gly Val			
1	5	10	15
Ser Arg Glu Val Phe Asp Phe Ser Gln Arg Arg Lys Glu Tyr Glu Leu			
	20	25	30
Glu Lys Gln Lys Lys Leu Glu Lys Glu Arg Gln Glu Gln Leu Gln Lys			
	35	40	45
Glu Gln Glu Lys Ala Phe Phe Ala Gln Leu Gln Leu Asp Glu Glu Thr			
	50	55	60
Gly Glu Phe Leu Pro Ile Gln Pro Ala Gln His Ile Gln Ser Glu Thr			
65	70	75	80
Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Ser Gln Val Ala His Ile Pro Lys Ser Asp			
	85	90	95
Ala Leu Tyr Phe Asp Asp Cys Met Gln Leu Leu Ala Gln Thr Phe Pro			
	100	105	110
Phe Val Asp Asp Asn Glu Ser Leu Val Pro Asp Ile Pro Gly His Ile			
	115	120	125
Glu Ser Pro Val Phe Ile Ala Thr Asn Gln Ala Gln Ser Pro Glu Thr			
	130	135	140
Ser Val Ala Gln Val Ala Pro Val Asp Leu Asp Gly Met Gln Gln Asp			
145	150	155	160
Ile Glu Gln Val Trp Glu Glu Leu Leu Ser Ile Pro Glu Leu Gln Cys			

	165		170		175
Leu Asn Ile Glu Asn Asp Lys Leu Val Glu Thr Thr Met Val Pro Ser					
	180		185		190
Pro Glu Ala Lys Leu Thr Glu Val Asp Asn Tyr His Phe Tyr Ser Ser					
	195		200		205
Ile Pro Ser Met Glu Lys Glu Val Gly Asn Cys Ser Pro His Phe Leu					
	210		215		220
Asn Ala Phe Glu Asp Ser Phe Ser Ser Ile Leu Ser Thr Glu Asp Pro					
225		230		235	240
Asn Gln Leu Thr Val Asn Ser Leu Asn Ser Asp Ala Thr Val Asn Thr					
	245		250		255
Asp Phe Gly Asp Glu Phe Tyr Ser Ala Phe Ile Ala Glu Pro Ser Ile					
	260		265		270
Ser Asn Ser Met Pro Ser Pro Ala Thr Leu Ser His Ser Leu Ser Glu					
	275		280		285
Leu Leu Asn Gly Pro Ile Asp Val Ser Asp Leu Ser Leu Cys Lys Ala					
	290		295		300
Phe Asn Gln Asn His Pro Glu Ser Thr Ala Glu Phe Asn Asp Ser Asp					
305		310		315	320
Ser Gly Ile Ser Leu Asn Thr Ser Pro Ser Val Ala Ser Pro Glu His					
	325		330		335
Ser Val Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asp Thr Leu Leu Gly Leu Ser Asp					
	340		345		350
Ser Glu Val Glu Glu Leu Asp Ser Ala Pro Gly Ser Val Lys Gln Asn					
	355		360		365
Gly Pro Lys Thr Pro Val His Ser Ser Gly Asp Met Val Gln Pro Leu					
	370		375		380
Ser Pro Ser Gln Gly Gln Ser Thr His Val His Asp Ala Gln Cys Glu					
385		390		395	400
Asn Thr Pro Glu Lys Glu Leu Pro Val Ser Pro Gly His Arg Lys Thr					
	405		410		415
Pro Phe Thr Lys Asp Lys His Ser Ser Arg Leu Glu Ala His Leu Thr					
	420		425		430
Arg Asp Glu Leu Arg Ala Lys Ala Leu His Ile Pro Phe Pro Val Glu					
	435		440		445
Lys Ile Ile Asn Leu Pro Val Val Asp Phe Asn Glu Met Met Ser Lys					
	450		455		460
Glu Gln Phe Asn Glu Ala Gln Leu Ala Leu Ile Arg Asp Ile Arg Arg					
465		470		475	480

Arg Gly Lys Asn Lys Val Ala Ala Gln Asn Cys Arg Lys Arg Lys Leu
485 490 495
Glu Asn Ile Val Glu Leu Glu Gln Asp Leu Asp His Leu Lys Asp Glu
500 505 510
Lys Glu Lys Leu Leu Lys Glu Lys Gly Glu Asn Asp Lys Ser Leu His
515 520 525
Leu Leu Lys Lys Gln Leu Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Val Phe Ser Met
530 535 540
Leu Arg Asp Glu Asp Gly Lys Pro Tyr Ser Pro Ser Glu Tyr Ser Leu
545 550 555 560
Gln Gln Thr Arg Asp Gly Asn Val Phe Leu Val Pro Lys Ser Lys Lys
565 570 575
Pro Asp Val Lys Lys Asn
580

<210> 4

<211> 2446

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

gattaccgag tgccggggag cccggaggag ccgcccacgc agccgccacc gccgccgccg 60
ccgccaccag agccgccctg tccgcgccgc gcctcggcag ccggaacagg gccgccgtcg 120
gggagcccca acacacggtc cacagctcat catgatggac ttggagctgc cgccgccggg 180
actcccgtcc cagcaggaca tggattgat tgacatactt tggaggcaag atatagatct 240
tggagtaagt cgagaagtat ttgacttcag tcagcgacgg aaagagtatg agctggaaaa 300
acagaaaaaa cttgaaaagg aaagacaaga acaactcaa aaggagcaag agaaagcctt 360
tttcgctcag ttacaactag atgaagagac aggtgaattt ctccaattc agccagccca 420
gcacatccag tcagaaacca gtggatctgc caactactcc caggttgccc acattcccaa 480
atcagatgct ttgtactttg atgactgcat gcagcttttg gcgagacat tcccgtttgt 540
agatgacaat gaggtttctt cggtactggt tcagtcactt gttcctgata ttcccgtca 600
catcgagagc ccagtcttca ttgctactaa tcaggctcag tcacctgaaa cttctgttgc 660
tcaggtagcc cctgttgatt tagacggtat gcaacaggac attgagcaag tttgggagga 720
gctattatcc attcctgagt tacagtgtct taatattgaa aatgacaagc tggttgagac 780
taccatggtt ccaagtccag aagccaaact gacagaagtt gacaattatc atttttactc 840
atctataccc tcaatggaaa aagaagtagg taactgtagt ccacatttcc ttaatgcttt 900
tgaggattcc ttcagcagca tcctctccac agaagacccc aaccagttga cagtgaactc 960
attaaattca gatgccacag tcaacacaga ttttggtgat gaattttatt ctgctttcat 1020
agctgagccc agtatcagca acagcatgcc ctcacctgct actttaagcc attcactctc 1080
tgaacttcta aatgggccc ttagatgtttc tgatctatca ctttgcaaag ctttcaacca 1140
aaaccaccct gaaagcacag cagaattcaa tgattctgac tccggcattt cactaaacac 1200

aagtcccagt gtggcatcac cagaacactc agtggaatct tccagctatg gagacacact 1260
acttggcctc agtgattctg aagtgggaaga gctagatagt gcccctggaa gtgtcaaaca 1320
gaatggtcct aaaacaccag tacattcttc tggggatatg gtacaaccct tgtcaccatc 1380
tcaggggcag agcactcacg tgcattgatgc ccaatgtgag aacacaccag agaaagaatt 1440
gcctgtaagt cctggatcac ggaaaacccc attcacaana gacaaacatt caagccgctt 1500
ggaggctcat ctcaacaagag atgaacttag ggcaaaagct ctccatatcc cattccctgt 1560
agaaaaaatc attaacctcc ctgttggtga cttcaacgaa atgatgtcca aagagcagtt 1620
caatgaagct caacttgcac taattcggga tatacgtagg aggggtaaga ataaagtggc 1680
tgctcagaat tgcagaaaaa gaaaactgga aatatagta gaactagagc aagatttaga 1740
tcatttgaaa gatgaaaaag aaaaattgct caaagaaaaa ggagaaaatg acaaaagcct 1800
tcacctactg aaaaaacaac tcagcacctt atatctcgaa gttttcagca tgctacgtga 1860
tgaagatgga aaaccttatt ctctagtaga atactcctg cagcaaaaaa gagatggcaa 1920
tgttttcctt gttcccaaaa gtaagaagcc agatgttaag aaaaactaga tttaggagga 1980
tttgacctt tctgagctag tttttttgta ctattatact aaaagctcct actgtgatgt 2040
gaaatgctca tactttataa gtaattctat gcaaaatcat agccaaaact agtatagaaa 2100
ataatacgaa actttaaaaa gcattggagt gtcagtatgt tgaatcagta gtttcacttt 2160
aactgtaaac aatttcttag gacaccattt gggctagttt ctgtgtaagt gtaaatacta 2220
caaaaactta tttatactgt tcttatgtca tttgttatat tcatagattt atatgatgat 2280
atgacatctg gctaaaaaga aattattgca aaactaacca ctatgtactt ttttataaat 2340
actgtatgga caaaaaatgg cattttttat attaaattgt ttagctctgg caaaaaaaaa 2400
aaattttaag agctggtact aataaaggat tattatgact gttaaa 2446

<210> 5

<211> 2862

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

ggcccttccg gggctgcgcg gctccccgc ctcggtgccg gcaaaaatgt gcctagtcac 60
ggggccgctc tcgggggaac tgaggctgcc ttcgggctgg gaccgagc cccttcgccg 120
cgccccaaaga cctccttgag tgcgggctgc gacgcctca ccccgctggg ccgtctgtgg 180
gcgcggtctt gcgaagtcac ccatctctcg gateactctc tggcagcctt gagctctctt 240
gaaagcccag ccccgggacg agggaggagc gccttaagtg cccagcgggc tcagaagccc 300
cgacgtgtgg cggtgagcc gggccccgc cactttctcg gccggggagg ggttcgggct 360
cgggcacccg gagttggccc ctcgtaacgc cgcgggaaag tgcgggcgag ggcagtggac 420
tctgaggccg gagtcggcgg caccgggggc ttctagttcg gacgcggtgc ccctggtgg 480
cgctcaccgc gcgctggccc ttggettccg tgacagcgtc cggttggccc tcacagcagc 540
cctcggttgg ccctttcctg ctttatagcg tgcaaacctc gccgcgccag ggccaaggga 600
caggacatgg atttgattga catactttgg aggcaagata tagatcttgg agtaagtcca 660
gaagtatttg acttcagtcg gcgacggaaa gagtatgagc tggaaaaaca gaaaaaactt 720
gaaaaggaaa gacaagaaca actccaaaag gagcaagaga aagccttttt cgctcagtta 780

caactagatg aagagacagg tgaatttctc ccaattcagc cagcccagca catccagtca 840
 gaaaccagtg gatctgccaa ctactcccag gttgccaca ttcccaaadc agatgctttg 900
 tactttgatg actgcatgca gcttttggcg cagacattcc cgtttgtaga tgacaatgag 960
 gtttcttcgg ctacgtttca gtcacttggt cctgatattc ccggtcacat cgagagccca 1020
 gtcttcattg ctactaatca ggctcagtca cctgaaactt ctgttgctca ggtagcccct 1080
 gttgatttag acggtatgca acaggacatt gagcaagttt gggaggagct attatccatt 1140
 cctgagttac agtgtcttaa tattgaaaat gacaagctgg ttgagactac catggttcca 1200
 agtccagaag ccaaactgac agaagttgac aattatcatt tttactcatc tataccctca 1260
 atggaaaaag aagtaggtaa ctgtagtcca cattttctta atgcttttga ggattccttc 1320
 agcagcatcc tctccacaga agacccaac cagttgacag tgaactcatt aaattcagat 1380
 gccacagtca acacagattt tggatgatgaa ttttattctg ctttcatagc tgagcccagt 1440
 atcagcaaca gcatgccctc acctgctact ttaagccatt cactctctga acttctaaat 1500
 gggcccattg atgtttctga tctatactt tgcaaagctt tcaacaaaa ccaccctgaa 1560
 agcacagcag aattcaatga ttctgactcc ggcatttcc taaacacaag tcccagtgtg 1620
 gcatcaccag aacactcagt ggaatcttcc agctatggag acacactact tggcctcagt 1680
 gattctgaag tggaaagagct agatagtgcc cctggaagtg tcaaacagaa tggctcctaaa 1740
 acaccagtac attcttctgg ggatattgta caaccctgt caccatctca ggggcagagc 1800
 actcacgtgc atgatgcca atgtgagaac acaccagaga aagaattgcc tgtaagtcct 1860
 ggtcatcgga aaaccccatt cacaaaagac aaacattcaa gccgcttga ggctcatctc 1920
 acaagagatg aacttagggc aaaagctctc catatccat tccctgtaga aaaaatcatt 1980
 aacctcctg ttgttgactt caacgaaatg atgtccaaag agcagttcaa tgaagctcaa 2040
 cttgcattaa ttcgggatat acgtaggagg ggtaagaata aagtggctgc tcagaattgc 2100
 agaaaaagaa aactggaaaa tatagtagaa ctagagcaag atttagatca tttgaaagat 2160
 gaaaaagaaa aattgctcaa agaaaaagga gaaaatgaca aaagccttca cctactgaaa 2220
 aaacaactca gcacctata tctcgaagtt ttcagcatgc tacgtgatga agatggaaaa 2280
 ccttattctc ctagtgaata ctccctgcag caacaagag atggcaatgt tttccttggt 2340
 cccaaaagta agaagccaga tgtaagaaa aactagattt aggaggattt gaccttttct 2400
 gagctagttt tttgtacta ttatactaaa agctcctact gtgatgtgaa atgctcatac 2460
 tttataagta attctatgca aatcatagc caaaactagt atagaaaata atacgaaact 2520
 ttaaaaagca ttggagtgtc agtatgttga atcagtagtt tcaactttaa tgtaaacaaat 2580
 ttcttaggac accatttggg ctagtttctg tgtaagtgtg aatactaca aaacttattt 2640
 atactgttct tatgtcattt gttatattca tagatttata tgatgatatg acatctggct 2700
 aaaaagaaaat tattgcaaaa ctaaccacta tgtacttttt tataaatact gtatggacaa 2760
 aaaatggcat tttttatatt aaattgttta gctctggcaa aaaaaaaaaa ttttaagagc 2820
 tggtaactaat aaaggattat tatgactggt aaattattaa aa 2862

<210> 6

<211> 2967

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

ggcccttccg gggctgcgcg gctccccgc ctcggtgcc gcaaaaatgt gcctagtcac 60
 ggggccgctc tcgggggaac tgaggtcgcc ttcgggctgg gaccgagc cccttcgccg 120
 cgccccaaaga cctccttgag tgcgggctgc gacgcgctca ccccgctggg ccgtctgtgg 180
 gcgcggcttt gcgaagtcac ccatctctcg gatcactctc tggcagcctt gagctctctt 240
 gaaagcccag ccccgggacg agggaggagc gccttaagt cccagcgggc tcagaagccc 300
 cgacgtgtgg cggctgagcc gggccccgc cactttctcg gccggggagg gtttcgggct 360
 cgggcacccg gaggttggcc ctcgtaacgc cgcgggaaag tgcgggcgag ggcagtggac 420
 tctgaggccg gaggctggcg caccggggc ttctagtctg gacgcggtgc cccttggtgg 480
 cgctcaccgc gcgctggcc ttggcttccg tgacagcgtc cggttggccg tcacagcagc 540
 cctcggttg ccctttctg ctttatagcg tgcaaacctc gccgcgccag ggccaagga 600
 caggttgag ctggtgatct gttgcgcaat tgctattttc cccagagcgg ctttctctt 660
 ggatttagcg tttcagaatt gcaattcaa aatgtgtaag acgggatatt ctctctctgtg 720
 ctgtcaaggg acatggattt gattgacata ctttgaggc aagatataga tcttgagta 780
 agtcgagaag tatttgactt cagtcagcga cggaaagagt atgagctgga aaaacagaa 840
 aaacttgaag aggaaagaca agaacaactc caaaaggagc aagagaaagc cttttctgct 900
 cagttacaac tagatgaaga gacaggtgaa tttctccaa ttcagccagc ccagcacatc 960
 cagtcagaaa ccagtgatc tgccaactac tcccaggtg cccacattcc caaatcagat 1020
 gctttgtact ttgatgactg catgcagctt ttggcgcaga cattcccgtt ttagatgac 1080
 aatgagtcac ttgttctga tattcccgtt cacatcgaga gccagctctt cattgctact 1140
 aatcaggctc agtcacctga aacttctgtt gtcaggtag cccctgttga ttagacggt 1200
 atgcaacagg acattgagca agtttgggag gagctattat ccattcctga gttacagtgt 1260
 cttaatattg aaaatgacaa gctggttgag actaccatgg ttccaagtcc agaagccaaa 1320
 ctgacagaag ttgacaatta tcatttttac tcactatac cctcaatgga aaaagaagta 1380
 ggtaactgta gtccacattt tcttaatgct tttgaggatt ccttcagcag catcctctcc 1440
 acagaagacc ccaaccagtt gacagtgaac tcattaaatt cagatgccac agtcaacaca 1500
 gattttgggtg atgaatttta ttctgcttc atagctgagc ccagtatcag caacagcatg 1560
 cctcacctg ctactttaag ccattcactc tctgaacttc taaatgggcc cattgatgtt 1620
 tctgatctat cactttgcaa agctttcaac caaaaccacc ctgaaagcac agcagaattc 1680
 aatgattctg actccggcat ttactaaac acaagtccca gtgtggcatc accagaacac 1740
 tcagtggaat cttccagcta tggagacaca ctacttgcc tcagtgattc tgaagtggaa 1800
 gagctagata gtgcccttg aagtgtcaaa cagaatggtc ctaaacacc agtacattct 1860
 tctggggata tggtaacaacc cttgtcacca tctcaggggc agagcactca cgtgcatgat 1920
 gcccaatgtg agaacacacc agagaaagaa ttgctgttaa gtctgtgta tcggaaaacc 1980
 ccattcaca aagacaaaca ttcaagccgc ttggaggctc atctcacaag agatgaactt 2040
 agggcaaaaag ctctccatat cccattccct gtagaaaaaa tcattaacct cctgttgtt 2100
 gacttcaacg aaatgatgtc caaagagcag ttcaatgaag ctcaacttgc attaattcgg 2160
 gatatacgta ggaggggtaa gaataaagtg gctgctcaga attgcagaaa aagaaaactg 2220
 gaaaatatag tagaactaga gcaagattta gatcatttga aagatgaaa agaaaaattg 2280

ctcaaagaaa aaggagaaaa tgacaaaagc cttcacctac tgaaaaaaca actcagcacc 2340
ttatatctcg aagttttcag catgctacgt gatgaagatg gaaaacctta ttctcctagt 2400
gaatactccc tgcagcaaac aagagatggc aatgttttcc ttgttcccaa aagtaagaag 2460
ccagatgtta agaaaaacta gatttaggag gatttgacct tttctgagct agtttttttg 2520
tactattata ctaaaagctc ctactgtgat gtgaaatgct catactttat aagtaattct 2580
atgcaaaatc atagccaaaa ctagtataga aaataatag aaactttaaa aagcattgga 2640
gtgtcagtat gttgaatcag tagtttact ttaactgtaa acaatttctt aggacacat 2700
ttgggctagt ttctgtgtaa gtgtaaatac tacaaaaact tatttatact gttcttatgt 2760
catttgttat attcatagat ttatatgatg atatgacatc tggctaaaaa gaaattattg 2820
caaaactaac cactatgtac tttttataa atactgtatg gacaaaaaat ggcatttttt 2880
atattaaatt gtttagctct ggcaaaaaaa aaaaatttta agagctggta ctaataaagg 2940
attattatga ctgttaaatt attaaaa 2967

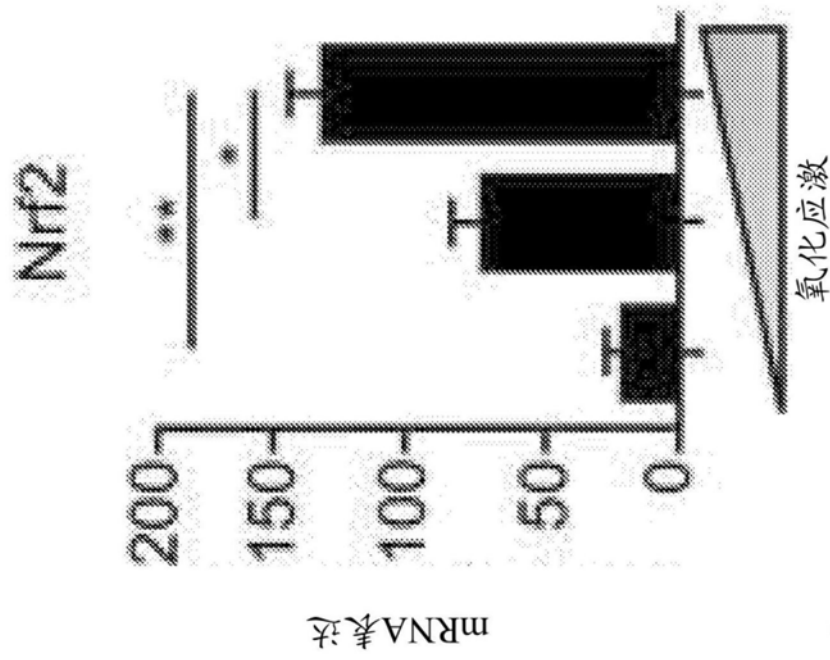


图1

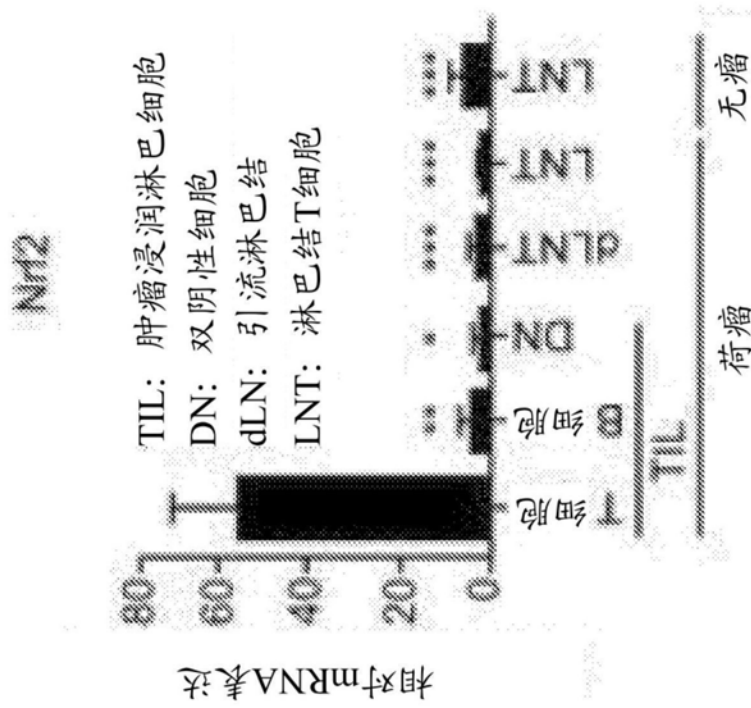


图2

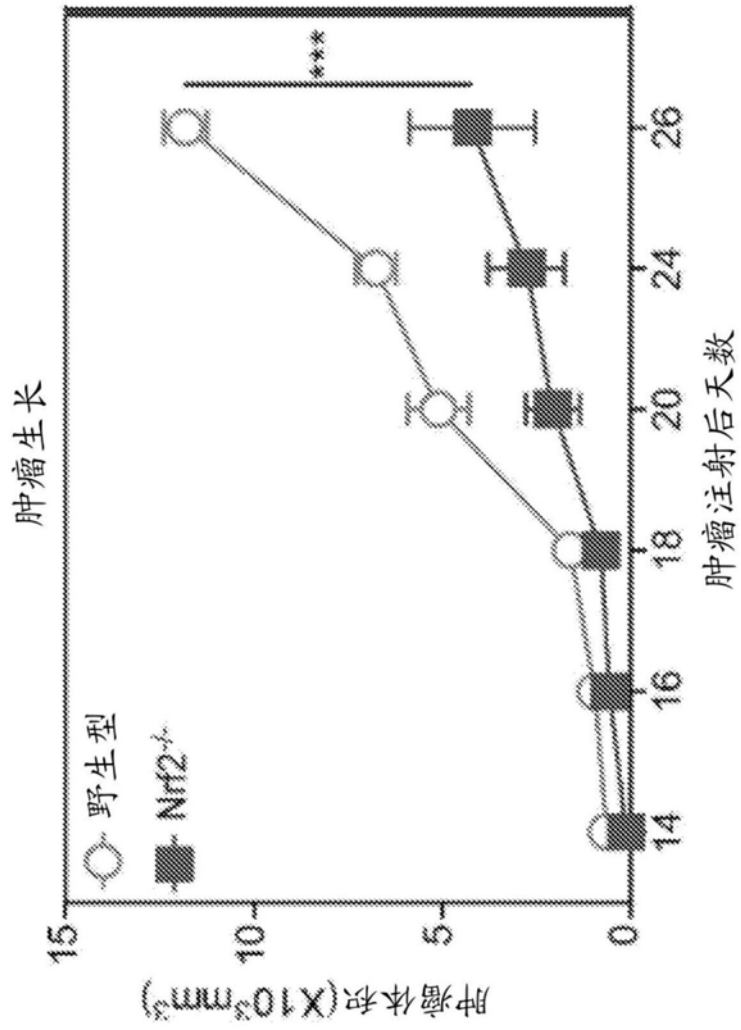


图3

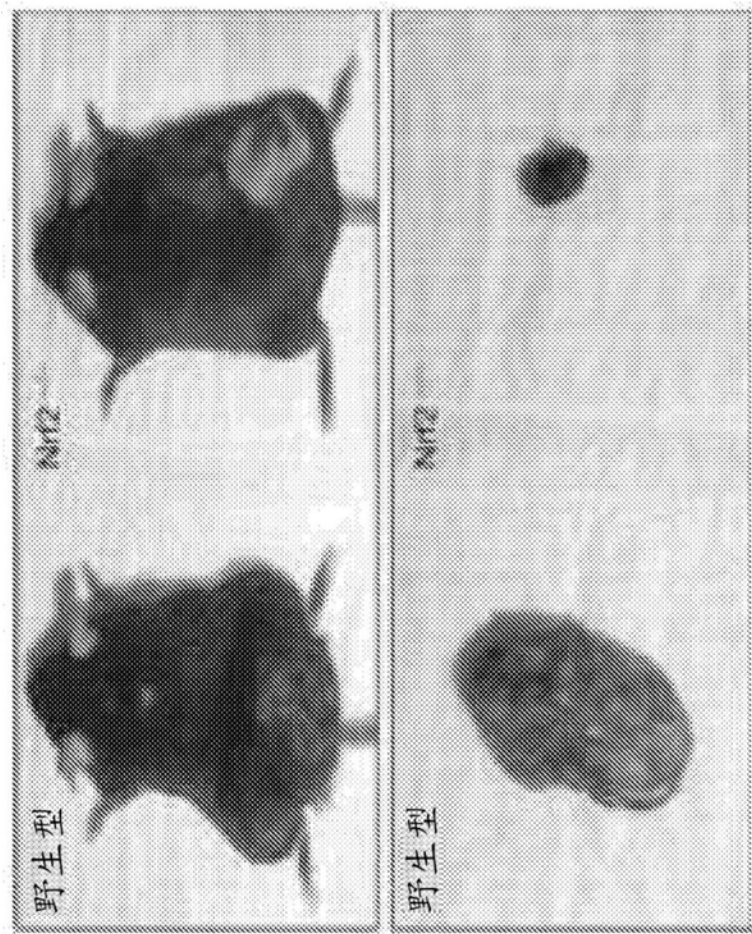


图4

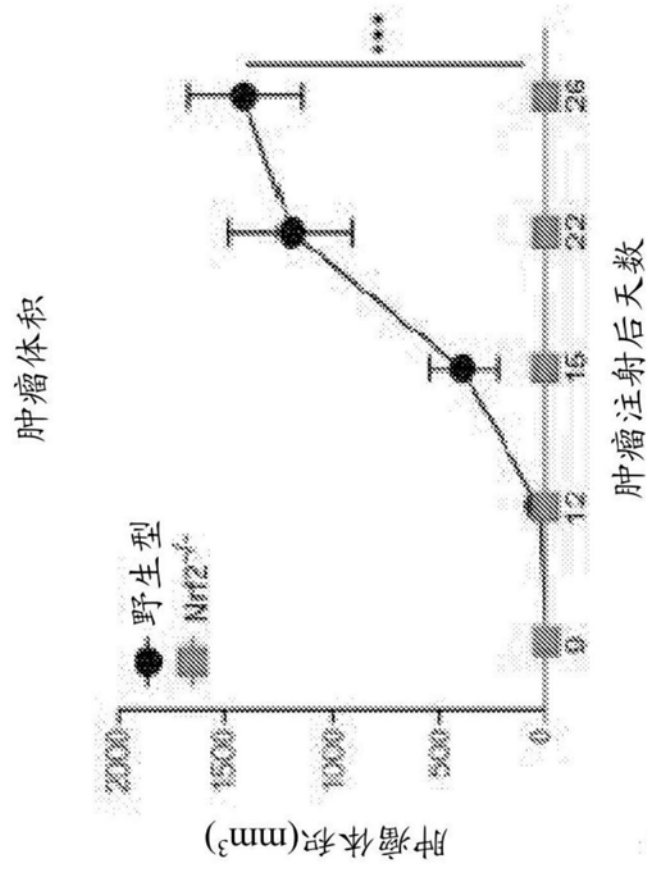


图5

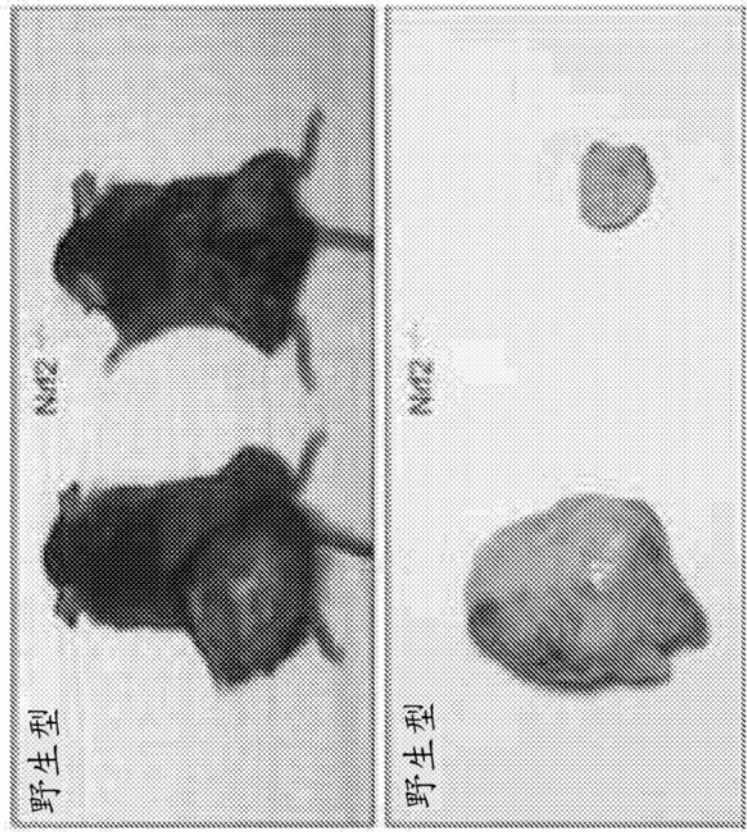


图6

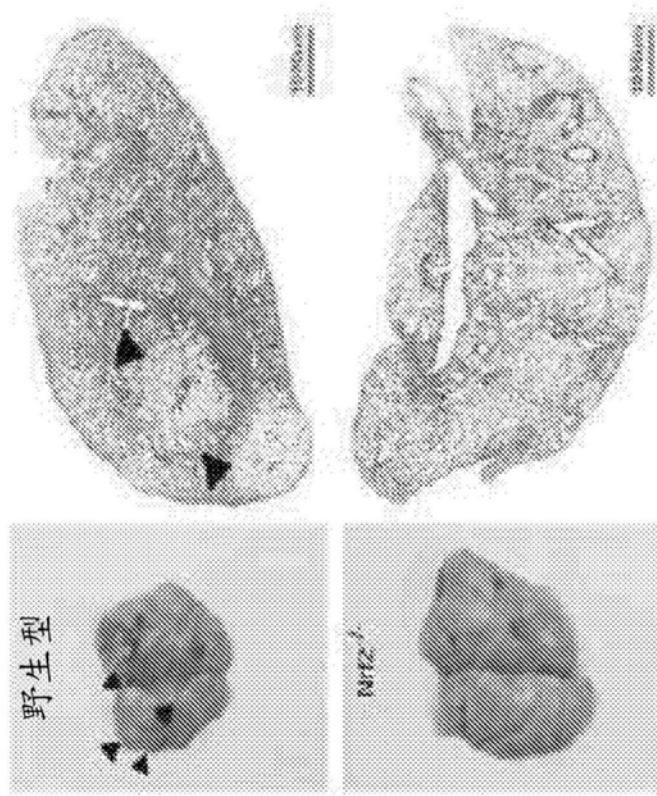


图7

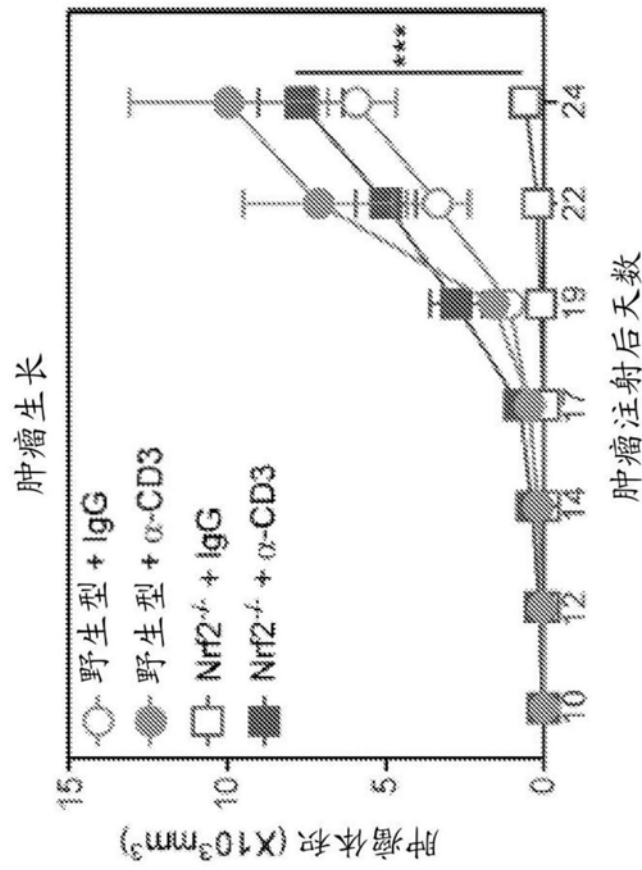


图8A

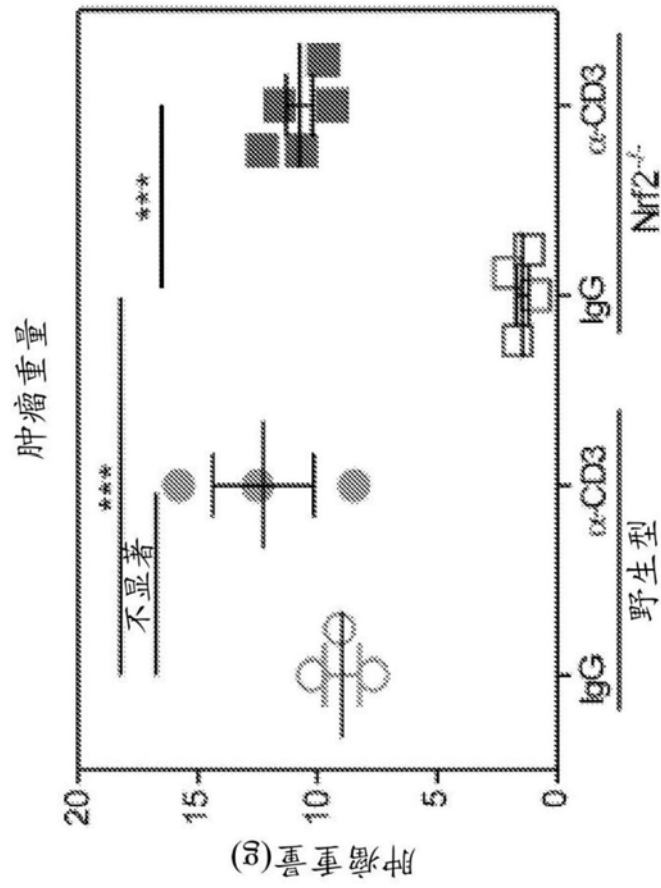


图8B

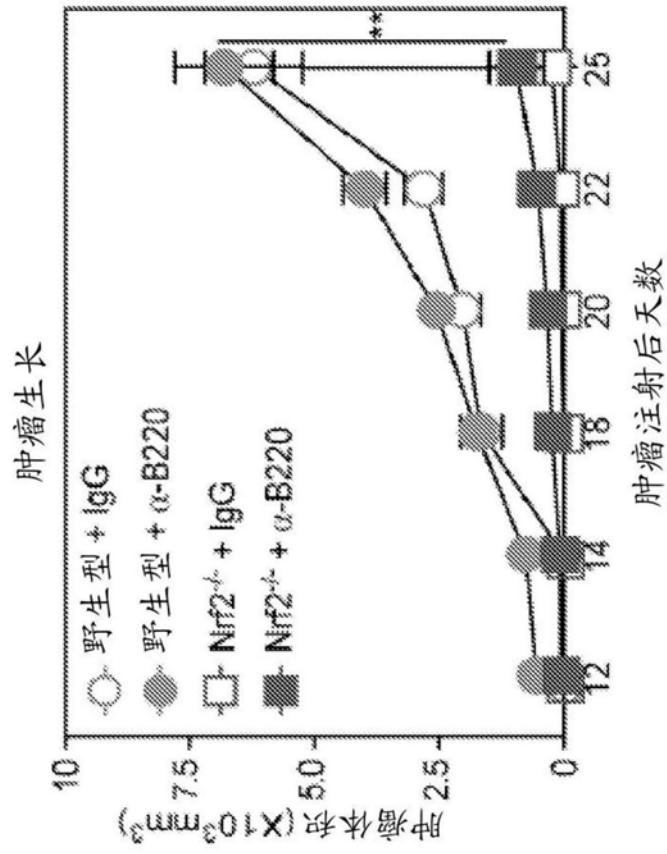


图9A

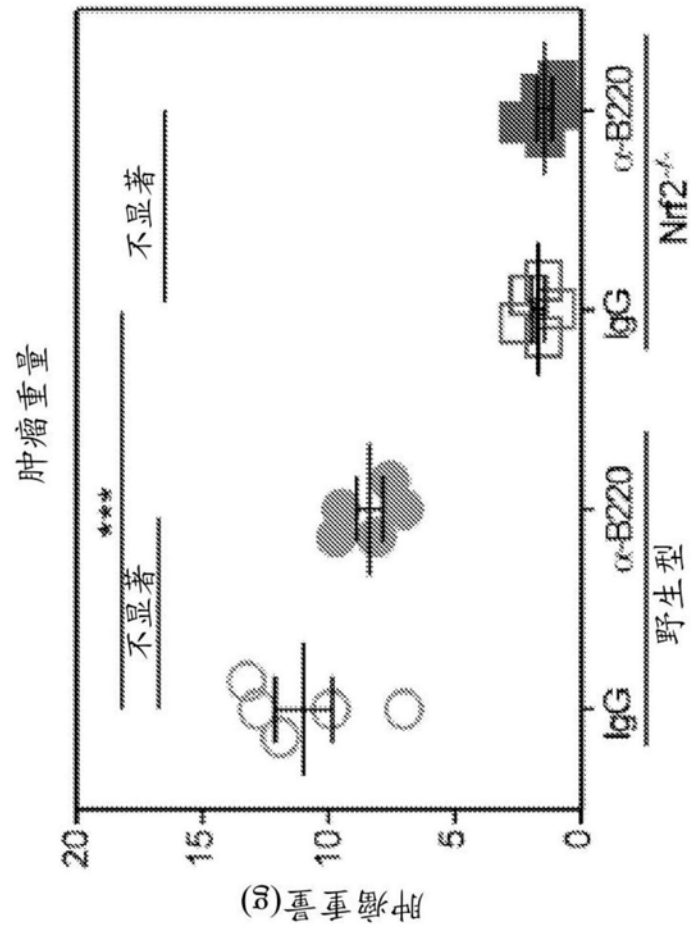


图9B

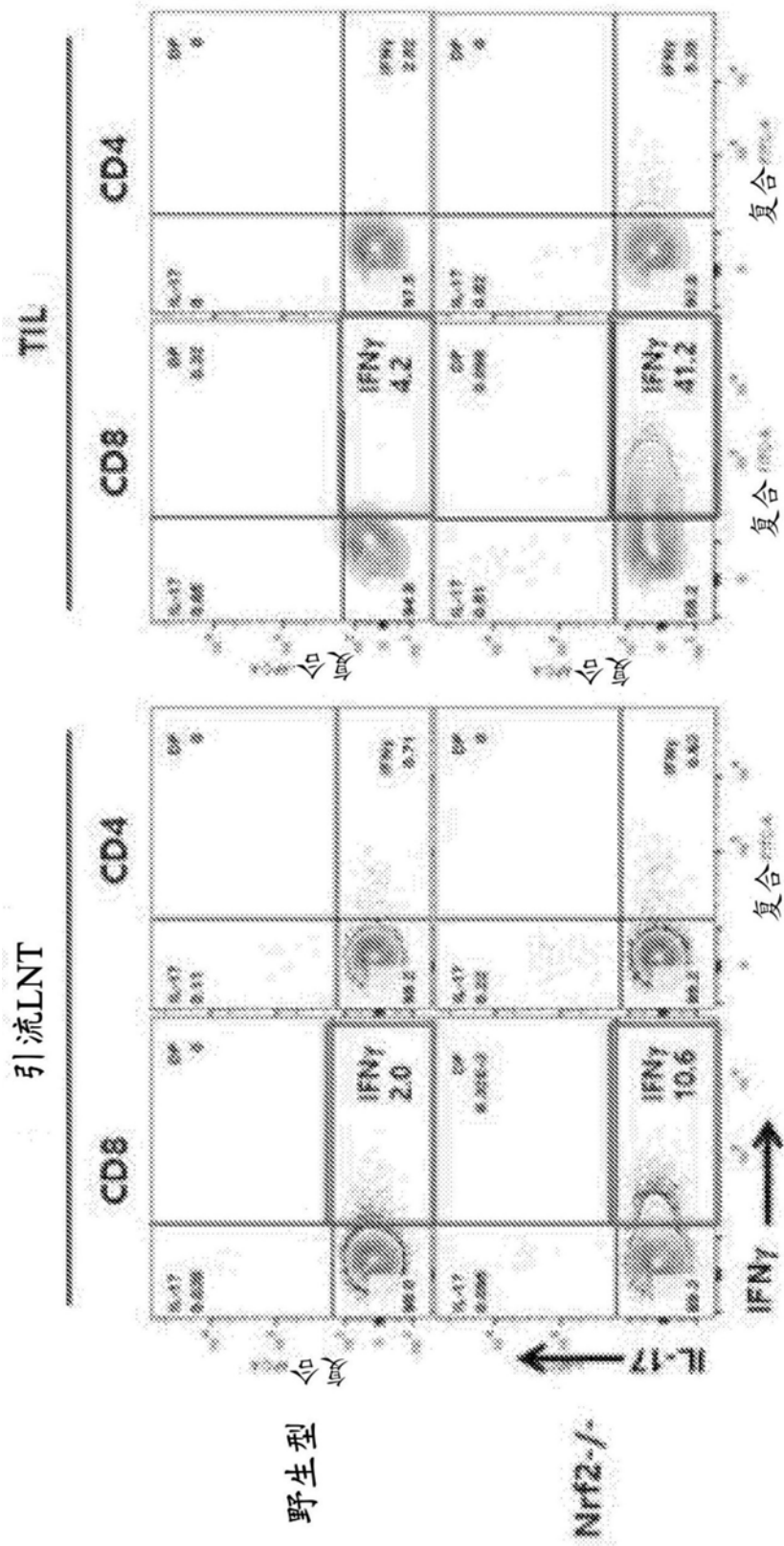


图10

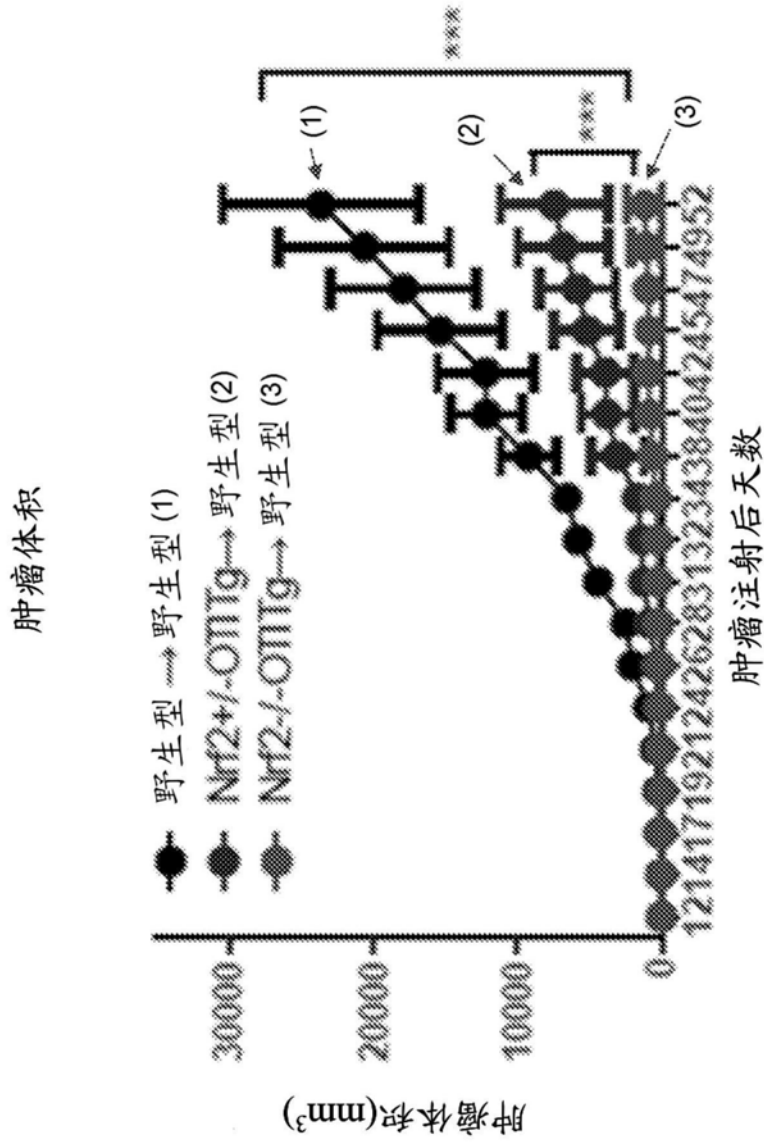


图11

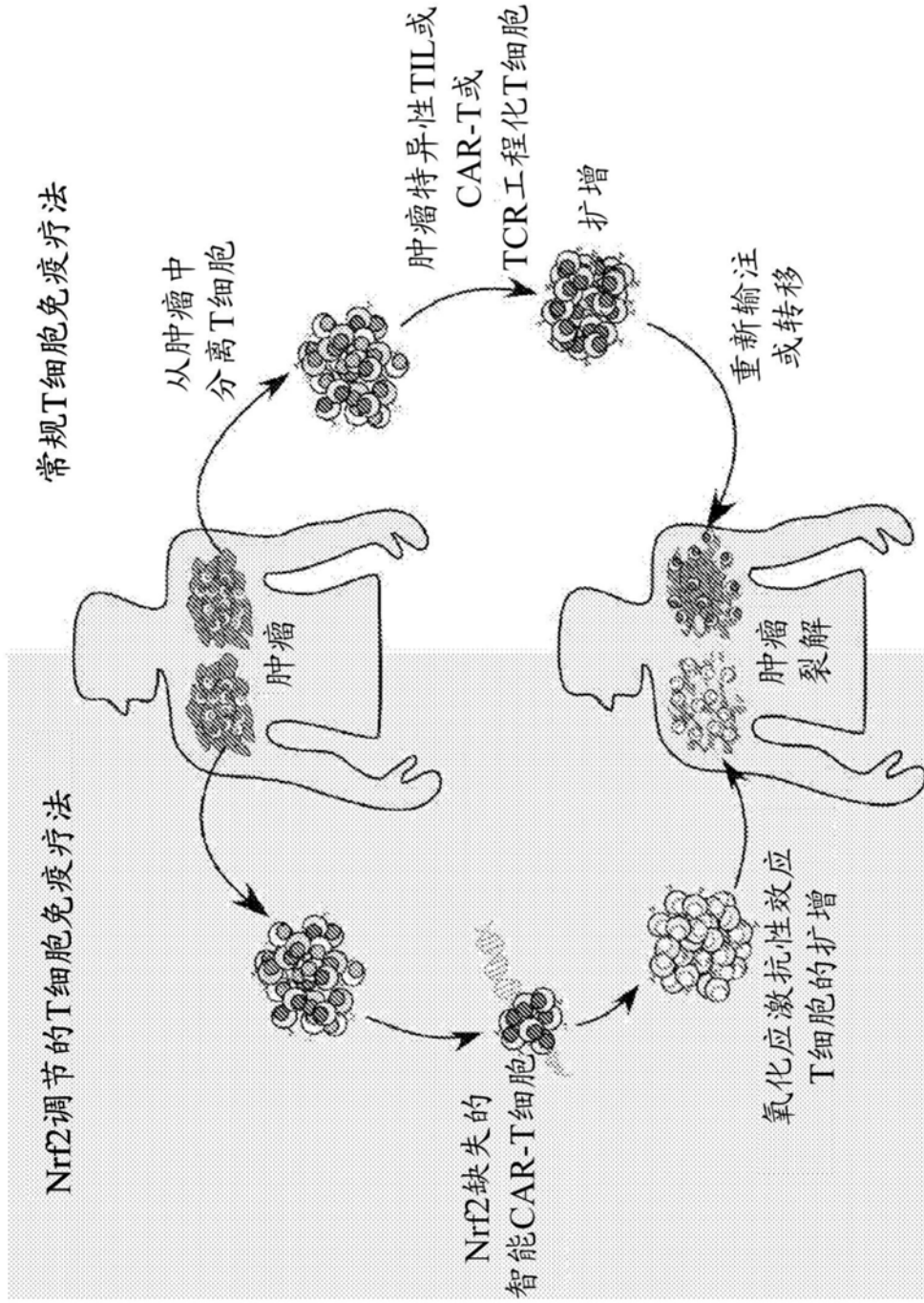


图12

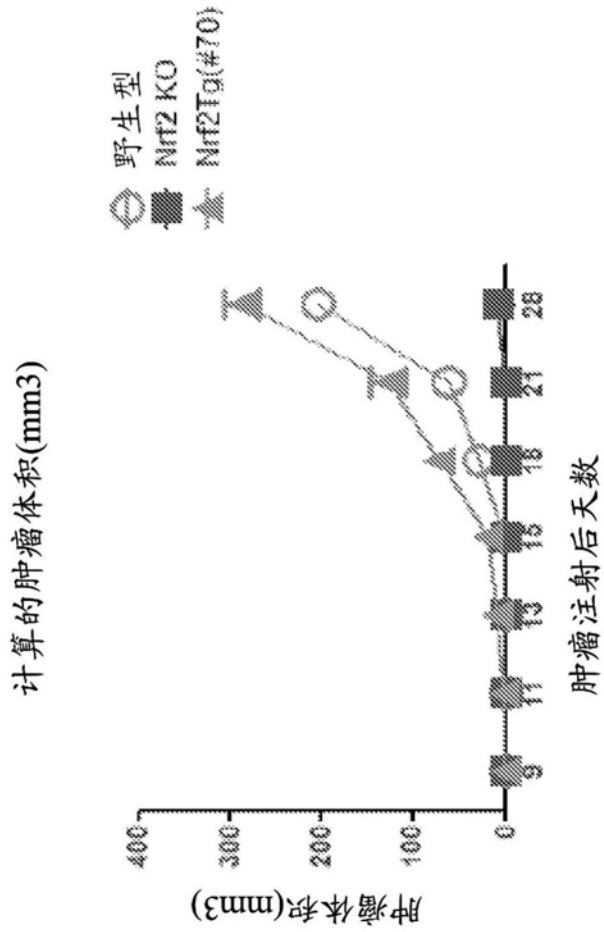


图13A

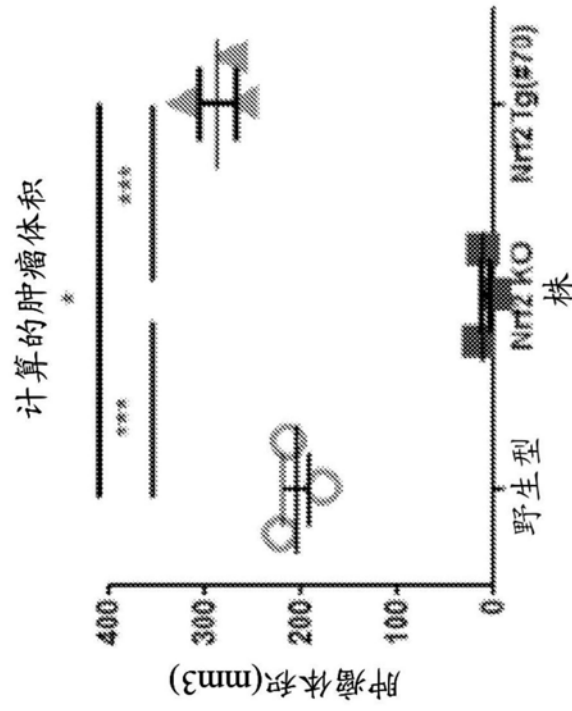


图13B

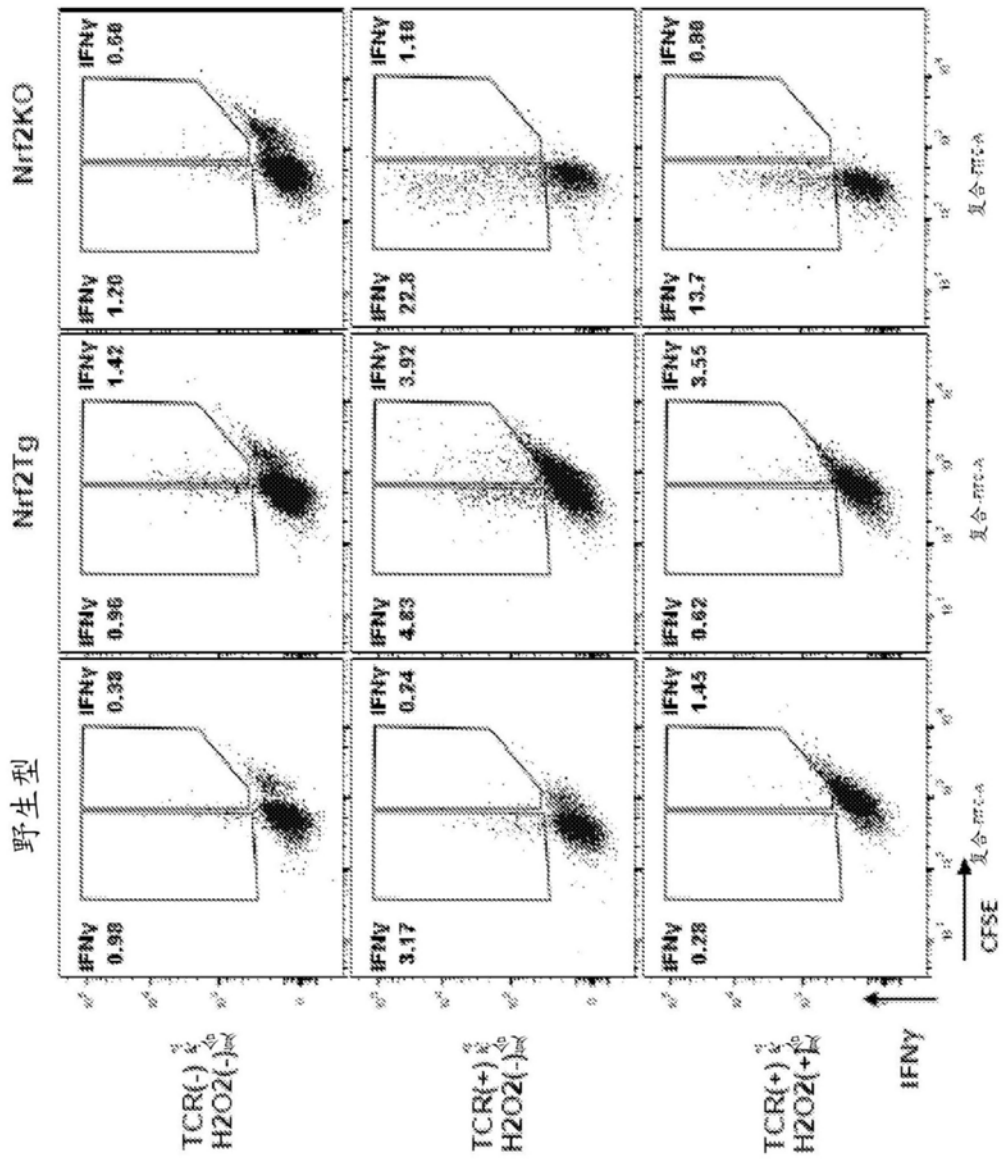


图14A

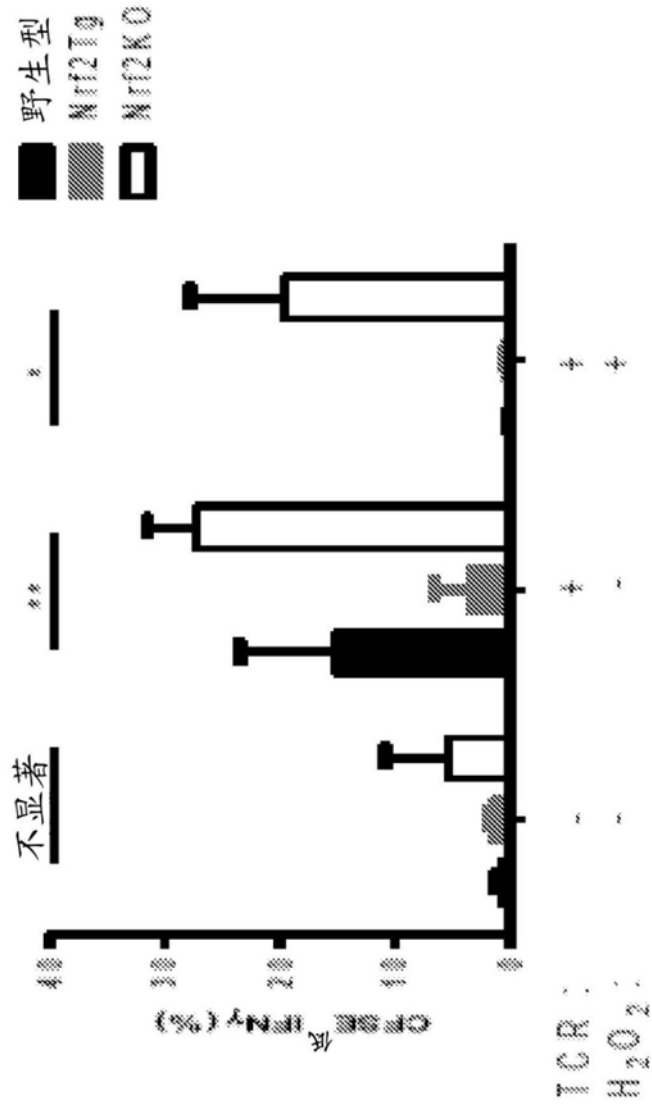


图14B

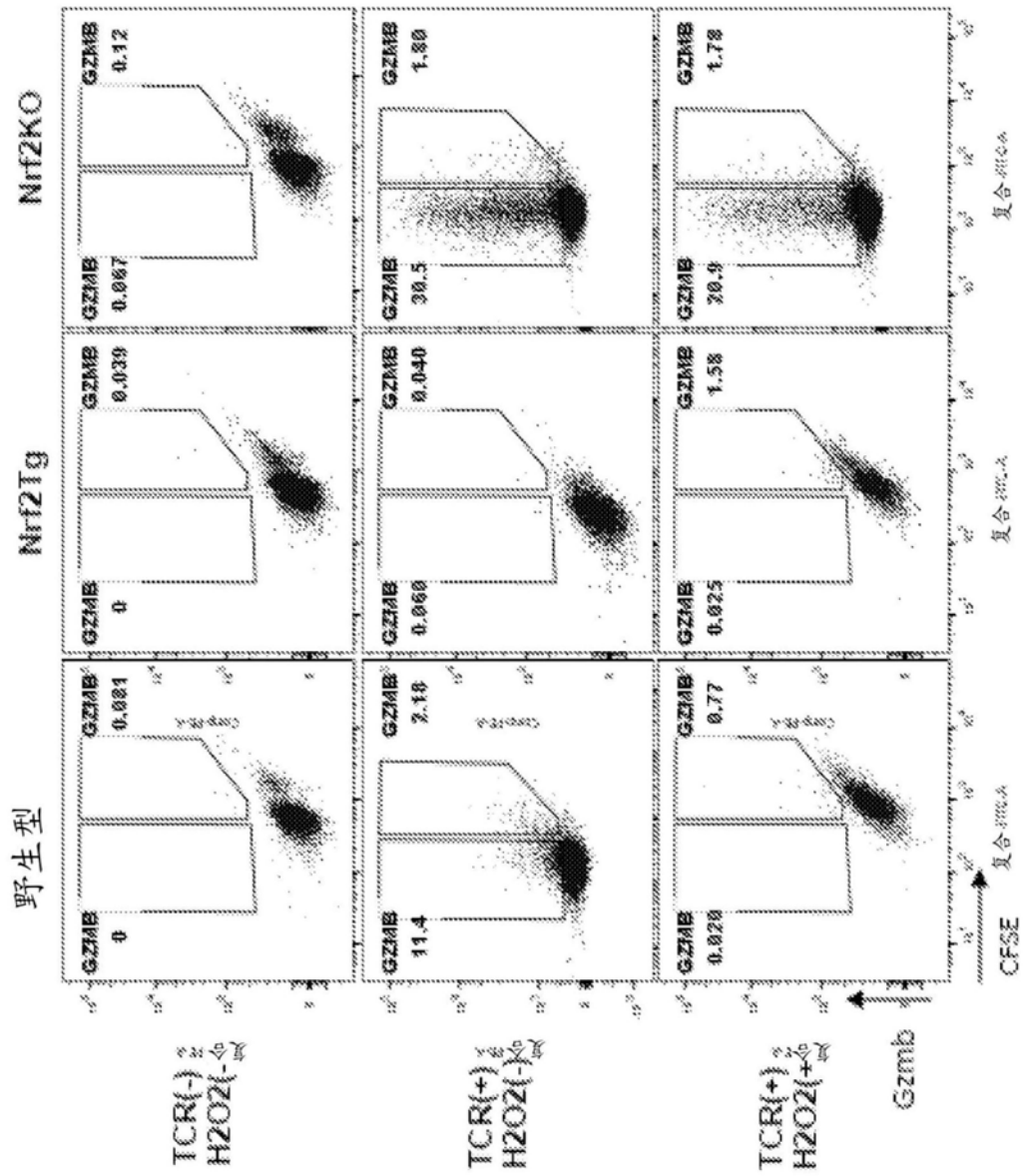


图14C

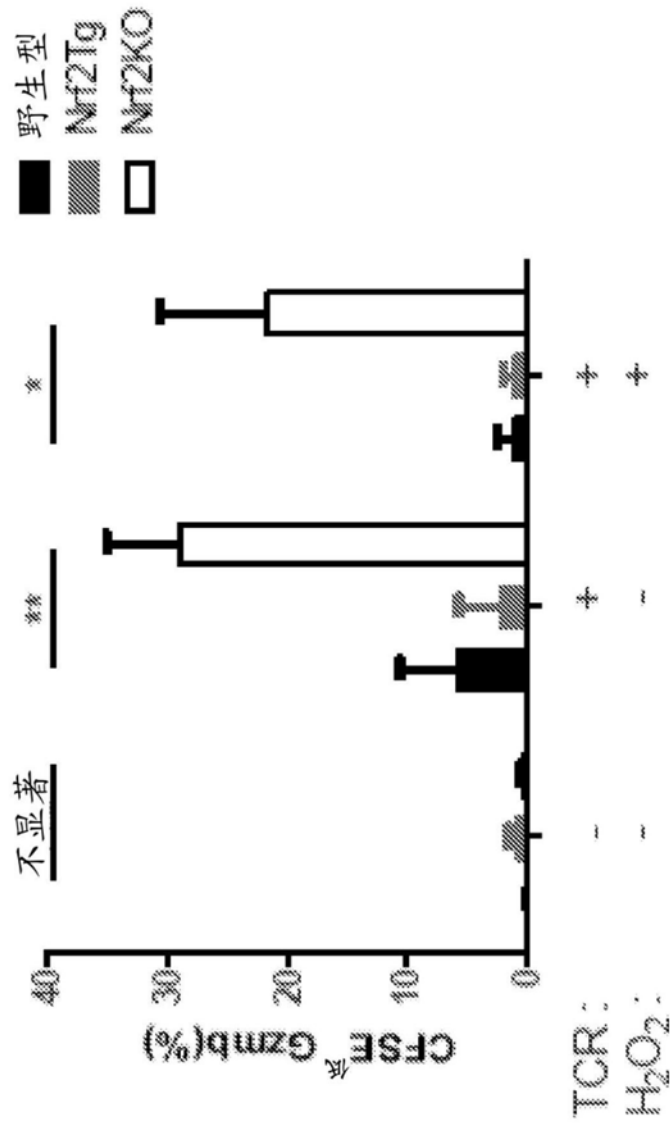


图14D

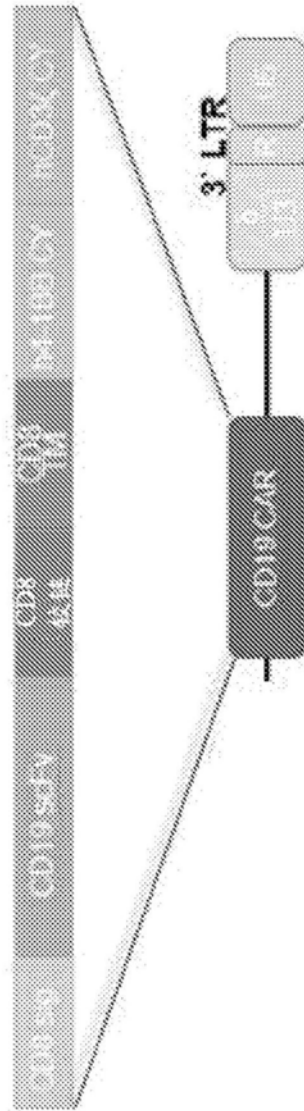


图15A

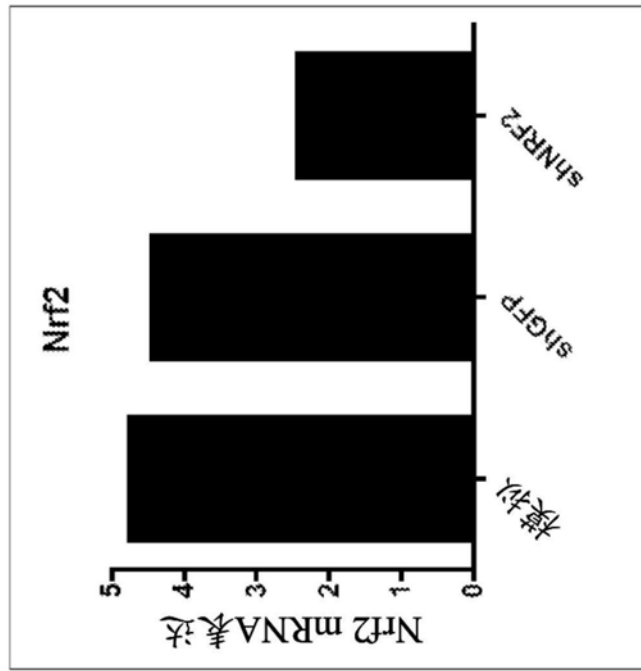


图15B

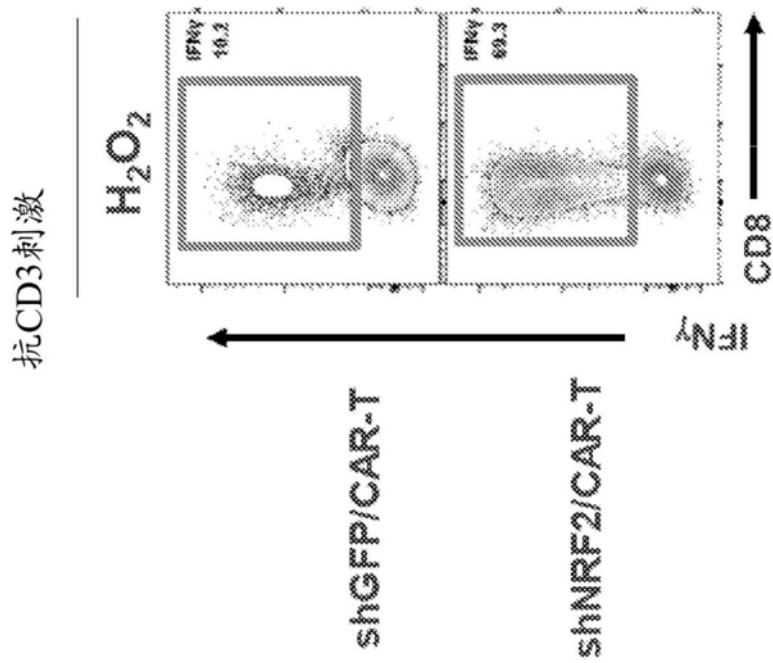


图15C

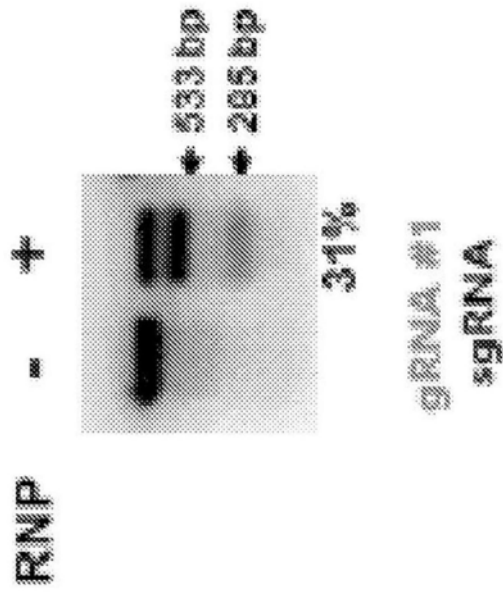


图16A

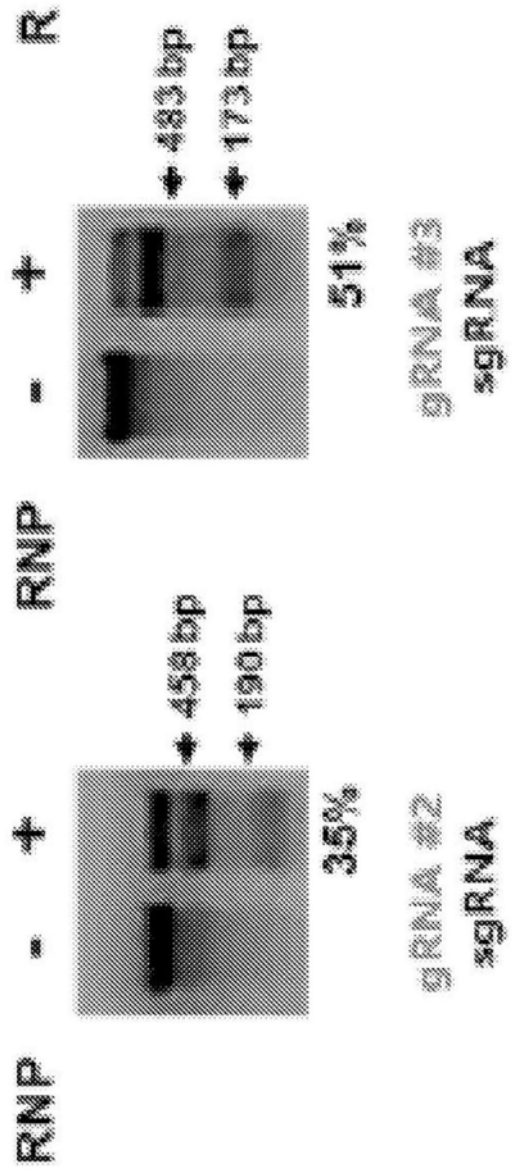


图 16B

图 16C