(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116096865 A
(43)申请公布日 2023.05.09

(21)申请号 202180031516.0

(22)申请日 2021.02.26

(30)优先权数据
62/983,416 2020.02.28 US
63/074,841 2020.09.04 US
63/144,853 2021.02.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.10.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/019861 2021.02.26

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/173964 EN 2021.09.02

(71)申请人 KSQ治疗公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 迈卡·本森 诺亚·雅各布·图博尼古拉斯·约翰·克莱蒂 罗伯特·安德鲁·拉莫特 格雷戈里·V·克留科夫 迈克尔·施拉巴赫 肖恩·菲利普·利里·阿劳卡斯

(74)专利代理机构 上海胜康律师事务所 31263
专利代理师 李献忠 张华

(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2010.01)
A61K 35/14(2015.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61K 38/18(2006.01)
A61K 38/19(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)

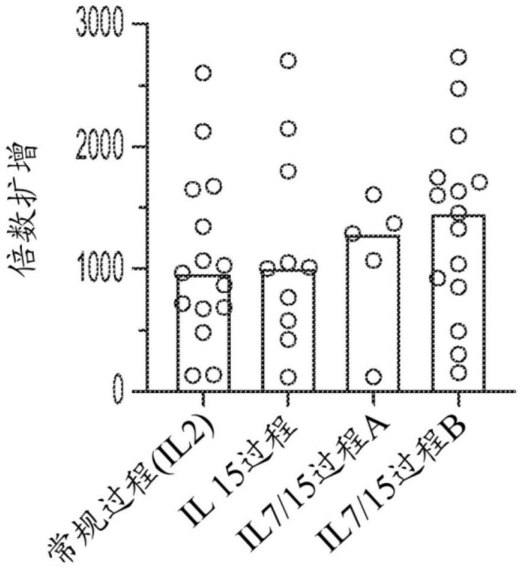
权利要求书2页 说明书233页
序列表（电子公布） 附图30页

(54)发明名称

用于激活和扩增肿瘤浸润淋巴细胞的方法

(57)摘要

提供了用于使用非常规细胞因子来激活并扩增TIL的方法。这些方法包括用于使用流线型的方法来激活并扩增TIL的技术，所述流线型的方法包括一步法、使用激动剂进行刺激的方法、更适合临床制造的方法和不需要饲养细胞的方法。除了富含中央记忆T细胞表型的扩增的TIL群之外，还提供了扩增的TIL群的组合物。



CN 116096865 A

1.一种产生扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法,所述方法包括在包含以下的培养基中培养解聚的肿瘤样品:(a)饲养细胞或T细胞共刺激分子的激动剂、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)白介素(IL)-15,从而产生扩增的TIL群。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述培养基包含浓度大于100ng/ml的IL-15。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述培养基包含浓度小于1000ng/ml的IL-15。

4.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述培养基不包含IL-2。

5.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述培养基不包含IL-21。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述培养基还包含IL-7,任选地浓度为10U/ml至7,000U/ml。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述TCR激动剂选自CD3激动剂、OKT3和UCHT1。

8.如权利要求7所述的方法,其中所述CD3激动剂是抗CD3抗体,任选地人源化抗CD3抗体、或包含连接在一起的两个抗CD3抗体的可溶性单特异性复合物。

9.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述T细胞共刺激分子的激动剂选自:CD28激动剂、CD137激动剂、CD2激动剂及其组合。

10.如权利要求9所述的方法,其中:

所述CD28激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD28抗体的可溶性单特异性复合物;或者

所述CD2激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD2抗体的可溶性单特异性复合物。

11.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述TCR激动剂和/或所述T细胞共刺激分子的激动剂与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质连接,其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm。

12.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中:

(a)所述解聚的肿瘤样品包括任选地通过解剖方法生成的大小为0.5mm^3至4mm^3的肿瘤碎片;或

(b)所述解聚的肿瘤样品包括任选地通过机械方法生成的大小为25mm^3至30mm^3的肿瘤碎片,

任选地其中(a)和(b)的所述肿瘤碎片包括消化的肿瘤碎片。

13.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中对所述扩增的TIL群的细胞进行遗传修饰,任选地进行表观遗传修饰。

14.如前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括使用基因调控系统对所述扩增的TIL群的细胞进行遗传修饰,所述基因调控系统任选地选自包含RNA干扰分子、类转录激活因子效应物核酸酶、锌指核酸酶和RNA指导的核酸酶的基因调控系统。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述基因调控系统包含Cas酶,任选地Cas9酶,和指导RNA。

16.如权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述TIL群的细胞在选自以下的一种或多种基因处包含修饰,任选地插入、缺失、插入缺失或取代:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、

PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A，任选地其中所述修饰导致所述一种或多种基因的表达的降低或抑制和/或由所述一种或多种基因编码的一种或多种蛋白质的功能的降低或抑制。

17.如权利要求16所述的方法，其中所述TIL群的细胞在SOCS1基因和ZC3H12A基因处包含修饰，任选地插入、缺失、插入缺失或取代。

18.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中在所述培养期间更换和/或用IL-15补充所述培养基的至少一部分。

19.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述培养发生在9天-25天、9天-21天或9天-14天的时间段内。

20.如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述扩增的TIL群的至少10％或至少15％具有中央记忆T细胞表型。

21.一种产生扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法，所述方法包括：

在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以产生TIL群；以及

在包含饲养细胞或T细胞共刺激分子的激动剂、T细胞受体(TCR)激动剂和白介素(IL)-15的第二培养基中培养所述TIL群的细胞，从而产生扩增的TIL群。

22.如权利要求21所述的方法，其还包括使用基因调控系统对来自所述第一培养基的所述TIL群的细胞进行修饰以产生修饰的TIL亚群，其中在所述第二培养基中培养的所述TIL群包括所述修饰的TIL亚群。

23.如权利要求21或22所述的方法，其中所述第一和/或第二培养基不包含IL-2。

24.一种用于扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法，其包括：在包含(a)IL-15和(b)包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质的培养基中培养所述TIL群，其中所述基质附接至TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂，每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm，并且任选地所述方法不包括在扩增所述TIL群期间使用饲养细胞。

25.一种用于扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法，其包括：在包含(a)IL-15、(b)包含抗CD3抗体或其片段的第一可溶性单特异性复合物、(c)包含抗CD28抗体或其片段的第二可溶性单特异性复合物和(d)包含抗CD2抗体或其片段的第三可溶性单特异性复合物的培养基中培养所述TIL群，其中所述可溶性单特异性复合物中的每一种包含连接在一起的两种抗体或其片段，并且所述可溶性单特异性复合物中的每一种的每种抗体或其片段与所述TIL群上的相同抗原特异性结合。

26.一种组合物，其包含通过如前述权利要求中任一项所述的方法产生的扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群。

27.一种组合物，其包含培养基中的解聚的肿瘤样品和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)，所述培养基包含(a)饲养细胞或T细胞共刺激分子的激动剂、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)任选地浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的白介素(IL)-15。

28.如权利要求27所述的组合物，其中所述组合物不包含IL-2。

用于激活和扩增肿瘤浸润淋巴细胞的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据美国专利法35第119条(e)款要求2020年2月28日提交的美国临时申请号62/983,416、2020年9月4日提交的美国临时申请号63/074,841和2021年2月2日提交的美国临时申请号63/144,853的权益,所述申请各自以引用方式整体并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于激活和/或扩增淋巴细胞群(例如肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))的方法和组合物。

背景技术

[0004] 肿瘤浸润淋巴细胞是已经离开血流并且向肿瘤迁移的白细胞,包括T细胞和B细胞。肿瘤中存在淋巴细胞经常与更好的临床结果相关,并且事实上,TIL已涉及杀伤肿瘤细胞。TIL常规地用作过继细胞转移疗法来治疗某些类型的癌症。TIL的过继转移是治疗大块难治性癌症的有效方法,例如尤其在预后不良的患者中。在过继转移疗法中,TIL由手术切除的已被切成小碎片的肿瘤或由从肿瘤碎片中分离出来的单细胞悬浮液离体扩增。TIL扩增的常见过程需要建立多种单独的培养物、使其分开生长、并测定其特异性肿瘤识别。使用高剂量IL-2在几周的过程中扩增TIL。然后在“快速扩增方案”(REP)中进一步扩增所选择的呈现出最佳肿瘤反应性的TIL系,所述方案使用抗CD3激活持续两周的典型时期。将最终的REP后的TIL群输注回患者体内。尽管被广泛使用,但这些冗长的TIL扩增方案对于扩增所有TIL群而言并不可靠。

发明内容

[0005] 在一些方面,本文提供了TIL激活和/或扩增方法,其不仅通过例如进行单步骤而不是多步骤培养过程来缩短扩增TIL群的时间段,而且还可用于扩增不同的TIL群。在一些实施方案中,本文所述的方法还通过证明饲养细胞的替代方案来提供临床制造优势。

[0006] 令人惊讶的是,在一些实施方案中,本文提供的流线型方法提供比当前的TIL扩增方案增加30%-50%倍数的TIL(例如,编辑的TIL)扩增,同时还支持效应T细胞的增殖和中央记忆T细胞表型的富集,即使在不存在IL-2的情况下也是如此。通过本公开的方法产生的TIL还表达高水平的CD25(一种IL-2受体),这表明所述TIL对患者的内源性IL-2存活信号高度敏感。本文所述的实验数据还出乎意料地显示,本公开的方法的优势适用于未修饰的和修饰的(例如,CRISPR/Cas基因或多基因编辑的)TIL群。

[0007] 本文提供的流线型方法产生高度富集的、不同的TIL群,并且因此可能产生更有效的过继TIL转移疗法。

[0008] 本公开的一些方面提供了一种产生扩增的TIL群的方法,所述方法包括在包含(a)饲养细胞或T细胞共刺激分子的激动剂、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)白介素(IL)-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而产生扩增的TIL群。

[0009] 在一些实施方案中,培养基包含浓度大于100ng/ml的IL-15。在一些实施方案中,培养基包含浓度小于1000ng/ml的IL-15。在一些实施方案中,培养基包含浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的IL-15。

[0010] 在一些实施方案中,培养基不包含IL-2。在一些实施方案中,培养基不包含IL-21。在一些实施方案中,培养基不包含IL-2或IL-21。

[0011] 在一些实施方案中,培养基还包含例如浓度为10U/ml至7,000U/ml的IL-7。

[0012] 在一些实施方案中,TCR激动剂选自CD3激动剂、OKT3和UCHT1。在一些实施方案中,TCR激动剂是CD3激动剂。在一些实施方案中,TCR激动剂是OKT3。在一些实施方案中,TCR激动剂是UCHT1。

[0013] 在一些实施方案中,CD3激动剂是抗CD3抗体。例如,抗CD3抗体可以是人源化抗CD3抗体。在一些实施方案中,CD3激动剂是包含连接在一起的两个抗CD3抗体的可溶性单特异性复合物。

[0014] 在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂选自:CD28激动剂、CD137激动剂、CD2激动剂以及它们的组合。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂和CD137激动剂。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂和CD2激动剂。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂和CD2激动剂。

[0015] 在一些实施方案中,CD28激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD28抗体的可溶性单特异性复合物。

[0016] 在一些实施方案中,CD2激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD2抗体的可溶性单特异性复合物。

[0017] 在一些实施方案中,TCR激动剂与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质连接,其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质连接,其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm。

[0018] 在一些实施方案中,解聚的肿瘤样品包括例如通过解剖方法生成的大小为0.5mm^3至4mm^3的肿瘤碎片。在一些实施方案中,解聚的肿瘤样品包括例如通过机械方法生成的大小为25mm^3至30mm^3的肿瘤碎片。在一些实施方案中,肿瘤碎片包括消化的肿瘤碎片。

[0019] 在一些实施方案中,扩增的TIL群的细胞是遗传修饰的。在一些实施方案中,扩增的TIL群的细胞是表观遗传修饰的。

[0020] 在一些实施方案中,产生扩增的TIL群的方法包括使用基因调控系统对扩增的TIL群的细胞进行遗传修饰,所述基因调控系统例如选自包含RNA干扰(RNAi)分子、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)和RNA指导的核酸酶的基因调控系统。在一些实施方案中,基因调控系统包含RNAi分子。在一些实施方案中,基因调控系统包含TALEN。在一些实施方案中,基因调控系统包含ZFN。在一些实施方案中,基因调控系统包含RNA指导的核酸酶。在一些实施方案中,基因调控系统包含Cas酶(例如Cas9酶)和指导RNA。

[0021] 在一些实施方案中,TIL群的细胞在选自以下的一种或多种基因处包含修饰,例如插入、缺失、插入缺失或取代:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、

DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。在一些实施方案中，修饰导致所述一种或多种基因的表达的降低或抑制和/或由所述一种或多种基因编码的一种或多种蛋白质的功能的降低或抑制。在一些实施方案中，TIL群的细胞包含SOCS1基因和ZC3H12A基因处的修饰，任选的插入、缺失、插入缺失或取代。

[0022] 在一些实施方案中，在培养期间更换培养基的至少一部分。在一些实施方案中，在培养期间用IL-15补充培养基的至少一部分。

[0023] 在一些实施方案中，培养发生在9天至25天的时间段内。在一些实施方案中，培养发生在9天至21天的时间段内。在一些实施方案中，培养发生在9天至14天的时间段内。

[0024] 在一些实施方案中，扩增的TIL群的至少10％具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增的TIL群的至少15％具有中央记忆T细胞表型。

[0025] 本公开的其他方面提供了一种产生扩增的TIL群的方法，所述方法包括：在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以产生TIL群；以及在包含饲养细胞或T细胞共刺激分子的激动剂、TCR激动剂和IL-15的第二培养基中培养TIL群的细胞，从而产生扩增的TIL群。在一些实施方案中，所述方法还包括使用基因调控系统对来自第一培养基的TIL群的细胞进行修饰以产生修饰的TIL亚群，其中在第二培养基中培养的TIL群包括修饰的TIL亚群。在一些实施方案中，第一培养基不包含IL-2。在一些实施方案中，第二培养基不包含IL-2。在一些实施方案中，第一培养基和第二培养基都不包含IL-2。

[0026] 本公开的又其他方面提供了一种用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含(a)IL-15和(b)包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质的培养基中培养TIL群，其中基质附接至TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂，每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm，并且任选地所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[0027] 本公开的仍其他方面提供了一种用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含(a)IL-15、(b)包含抗CD3抗体或其片段的第一可溶性单特异性复合物、(c)包含抗CD28抗体或其片段的第二可溶性单特异性复合物和(d)包含抗CD2抗体或其片段的第三可溶性单特异性复合物的培养基中培养TIL群，其中可溶性单特异性复合物中的每一种包含连接在一起的两种抗体或其片段，并且可溶性单特异性复合物中的每一种的每种抗体或其片段与TIL群上的相同抗原特异性结合。

[0028] 在一些方面，本文还提供了组合物，其包含通过前述段落中任一个所述的方法产生的扩增的TIL群。

[0029] 一些方面提供了包含培养基中的解聚的肿瘤样品的组合物，所述培养基包含(a)饲养细胞、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)例如浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的白介素(IL)-15。其他方面提供了包含培养基中的解聚的肿瘤样品的组合物，所述培养基包含(a)T细胞共刺激分子的激动剂、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)例如浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的白介素(IL)-15。又其他方面提供了包含培养基中的TIL的组合物，所述培养基包含(a)饲养细胞、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)例如浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的白介素(IL)-15。仍其他方面提供了包含培养基中的TIL的组合物，所述培养基

包含(a)T细胞共刺激分子的激动剂、(b)T细胞受体(TCR)激动剂和(c)例如浓度大于100ng/ml且小于1000ng/ml的白介素(IL)-15。在一些实施方案中,组合物不包含IL-2。

附图说明

[0030] 通过以下结合附图对说明性实施方案的详细描述,本发明的前述和其他特征以及优势将得到更充分的理解。

[0031] 图1A-1B呈现了图表,所述图表示出了在含有6000U/ml IL-2(常规过程)、1000ng/ml IL-15(IL15过程)、或10ng/ml IL-7和300ng/ml IL-15(IL7/15过程A)、或10ng/ml IL7和1000ng/ml IL15(IL7/15过程B)的REP的第14天收获的TIL的倍数扩增(图1A)和百分比活力(图1B)。

[0032] 图2A-2B呈现了图表,所述图表示出了在含有6000U/ml IL-2(常规过程)、1000ng/ml IL-15(IL15过程)、或10ng/ml IL-7和300ng/ml IL-15(IL7/15过程A)、或10ng/ml IL7和1000ng/ml IL15(IL7/15过程B)的REP的第14天收获的TIL中的为CD8+的TIL的百分比(图2A)和为CCR7+CD45RO+的TIL的百分比(图2B)。

[0033] 图3A-3D呈现了图表,所述图表示出了在含有IL-2(常规过程)、10ng/ml IL-7和300ng/ml IL-15(IL7/15过程A)、或10ng/ml IL7和1000ng/ml IL15(IL7/15过程B)的14天REP之后,在刺激时表达CD107a的CD8+TIL的百分比(图3A),以及另外地为IFNγ+IL-2+的CD107a+CD8+TIL的百分比(图3B)、为TNFα+IL-2+的CD107a+CD8+TIL的百分比(图3C)或为IFNγ+TNFα+的CD107a+CD8+TIL的百分比(图3D)。

[0034] 图4A-4C呈现了图表,所述图表示出了与在IL-2(常规过程)中生长的经相应基因编辑的TIL的倍数扩增相比,在含有1000ng/ml IL-15(IL15过程)、10ng/ml IL-7和300ng/ml IL-15(IL7/15过程A)、或10ng/ml IL-7和1000ng/ml IL-15(IL7/15过程B)的REP中扩增的经OR1A1基因编辑的TIL(图4A)、经SOCS1基因编辑的TIL(图4B)和经SOCS1/PTPN2双重基因编辑的TIL(图4C)的相对倍数扩增。

[0035] 图5A-5C呈现了图表,所述图表示出了在照射的PBMC(以1个T细胞与100个照射的PBMC的比率)和另外的30ng/ml OKT3的存在下(“PBMC REP(1:100)”)、在经遗传修饰以过表达CD86的照射的K562细胞和膜结合抗CD3 scFv(“CD86、抗CD3 K562”)的情况下、在经遗传修饰以过表达CD86、41BBL的照射的K562细胞和膜结合抗CD3 scFv(“41BBL、CD86、抗CD3 K562”)的情况下、或在未经遗传修饰的照射的K562细胞(“未修饰的K563”)的情况下,扩增14天之后外周血衍生的记忆T细胞的倍数扩增。

[0036] 图6表示经过OR1A1编辑并且然后在IL-15或IL-2中培养的TIL中的T细胞耗竭评分的图表。

[0037] 图7表示经过OR1A1编辑并且然后在IL-15或IL-2中培养的TIL中的细胞毒性评分的图表。

[0038] 图8表示经过OR1A1编辑并且然后在IL-15或IL-2中培养的TIL中的IFNγ表达的图表。

[0039] 图9描绘了柱状图,所述柱状图示出了第10天或第11天的可溶性四聚体和人工抗原呈递细胞(aAPC)的倍数扩增。

[0040] 图10描绘了柱状图,所述柱状图示出了第18天或第23天的可溶性四聚体和aAPC编

辑物的倍数扩增。

[0041] 图11描绘了柱状图,所述柱状图示出了第18天或第23天的中央记忆表型。

[0042] 图12描绘了第18天或第23天的编辑频率的表格。

[0043] 图13描绘了柱状图,所述柱状图示出了第14天或第20天的TIL肿瘤碎片外推细胞计数。

[0044] 图14描绘了柱状图,所述柱状图示出了第14天或第20天的中央记忆表型。

[0045] 图15描绘了第14天的编辑频率的表格。

[0046] 图16描绘了第14天的编辑频率的表格。

[0047] 图17描绘了柱状图,所述柱状图示出了来自不同供体的、由肿瘤碎片和消化物制备的TIL的活力。

[0048] 图18描绘了柱状图,所述柱状图示出了来自不同供体的、由肿瘤碎片和消化物制备的TIL的细胞数。

[0049] 图19描绘了使用可溶性激活因子由肿瘤碎片扩增TIL的工艺布局。

[0050] 图20描绘了柱状图,所述柱状图示出了来自不同碎片供体并在电穿孔阶段之前在IL-2或IL-15中培养的TIL的总细胞数(顶图)和活力(底图)。

[0051] 图21描绘了柱状图,所述柱状图示出了来自供体4375的、在电穿孔之后在IL2或IL15中培养的TIL的总细胞数(顶图)和活力(底图)。*指示样品中不存在细胞因子。

[0052] 图22描绘第17天的编辑频率的表格。

[0053] 图23描述了第17天的图24至图26的FACS门控策略。

[0054] 图24描绘了点图,所述点图示出了第17天的CD4/CD8群(左上);在CD45/CD3上门控的CD45RO/CCR7群(右上);在CD45/CD3/CD4上门控的CD45RO/CCR7群(左下)和在CD45/CD3/CD8上门控的CD45RO/CCR7群(右下)。

[0055] 图25描绘了半偏移直方图,所述半偏移直方图示出了第17天的在CD45/CD3上门控的CD28表达(左上)、CD27表达(中上)和KLRG1表达(右上);在CD45/CD3/CD4上门控的KLRG1表达(左下)和在CD45/CD3/CD8上门控的KLRG1表达(右下)。平均荧光强度在CD28和CD27图表中示出,而阳性群百分比在KLRG1图表中示出。

[0056] 图26描绘了半偏移直方图,所述半偏移直方图示出了第17天的在CD45/CD3上门控的ICOS(诱导型T细胞共刺激因子)表达(左图)、在CD45/CD3/CD4上门控的ICOS表达(中图)和在CD45/CD3/CD8上门控的ICOS表达(右图)。平均荧光强度在所有图表中示出。

具体实施方式

[0057] 提供了用于使用非常规细胞因子来激活并扩增TIL的改进方法。这些方法包括用于使用更流线型的方法来激活并扩增TIL的技术,所述更流线型的方法包括一步法、使用激动剂进行刺激的方法、更适合临床制造的方法和不需要饲养细胞的方法。除了富含中央记忆T细胞表型的扩增的TIL群之外,还提供了扩增的TIL群的组合物。

[0058] 在一个方面,本公开提供了利用非传统细胞因子(诸如IL-15和/或IL-7)的扩增TIL群的方法。所提供的扩增TIL群的方法包括以下步骤:在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群;以及在包含T细胞受体(TCR)激动剂;饲养细胞;和大于100ng/ml的IL-15的第二培养基中培养TIL群,其中第二培养基不包含IL-2,从而

扩增TIL群。

[0059] 在另一个方面，本公开提供了扩增TIL群的方法，其包括以下步骤：在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群；使用基因调控系统修饰TIL群的成员以获得修饰的TIL群；以及在包含TCR激动剂；饲养细胞；和IL-15的第二培养基中培养修饰的TIL群，从而扩增TIL群。

[0060] 一般来讲，与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交结合使用的命名法是本领域众所周知且普遍使用的。除非另有说明，否则本文提供的方法和技术通常根据本领域众所周知的常规方法执行，并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书执行，如本领域通常完成的或如本文所述。与本文所述的实验室程序、和分子和细胞生物学和生物化学的技术结合使用的命名法是本领域众所周知且普遍使用的。

[0061] 除非本文另有定义，否则本文使用的科学和技术术语具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义，本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求，否则单数术语应当包括复数并且复数术语应当包括单数。除非另有说明，否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及其他形式(诸如“包括(includes)”和“包括(included)”)的使用不是限制性的。

[0062] 如本文所用，术语“约”和“大约”是指给定值或范围的5％内的值。

[0063] 如本文所用，短语“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”是指已经离开受试者的血流并迁移到肿瘤中的淋巴细胞群。TIL包括但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$T细胞(包括Th1和Th17 $CD4^+$T细胞)、自然杀伤T细胞和自然杀伤(NK)细胞。TIL包括初级和次级TIL。“初级TIL”是从如本文概述的患者组织样品中获得的那些(有时称为“新鲜收获的”)，并且“次级TIL”是已经如本文所讨论扩增或增殖的任何TIL细胞群，包括但不限于本体TIL和扩增的TIL(“REP TIL”或“REP后的TIL”)。在一些实施方案中，初级TIL包括从患者外周血获得的肿瘤反应性T细胞。TIL细胞群可以包括遗传修饰的TIL。“TIL”还指代已经离开受试者的血流、已经迁移到肿瘤中、并且然后已经离开以再次进入血流的淋巴细胞群。

[0064] 如本文所用，短语“细胞群”或“TIL群”是指具有共同特征的许多细胞或TIL。一般来讲，群的数量通常在1×10^6个至1×10^{10}个的范围内，不同的TIL群包含不同的数量。例如，初级TIL在IL-2的存在下的初始生长可以导致大约1×10^7个细胞的本体TIL群。通常进行REP扩增以提供1.5×10^9个至1.5×10^{10}个细胞的群以进行输注。在一些实施方案中，细胞群是单克隆的。在其他实施方案中，细胞群是多克隆的。在一些实施方案中，当细胞群是多克隆的时，细胞仍具有一种或多种共同特征。单克隆T细胞群将导致单一TCR基因重排模式占优势。相反，多克隆T细胞群具有不同的TCR基因重排模式，这可以使它们在某些情况下更有效。

[0065] 如本文所用，短语“扩增TIL群”与“增殖TIL群”同义，并且是指增加TIL群中的细胞数量。

[0066] 如本文所用，短语“扩增过程”是指增加TIL群中的细胞数量的过程。仅分离或富集TIL而不显著增加TIL数量的过程不是扩增过程。

[0067] 如本文所用，术语“激动剂”是指结合细胞表面上的或呈可溶形式的靶标的化学物

质、分子、大分子、分子复合物或大分子复合物。在某些实施方案中，当激动剂结合细胞表面上的靶标时，激动剂激活靶标以产生生物反应。激动剂包括激素、神经递质、抗体和抗体片段。

[0068] 如本文所用，术语“受试者”是指患有肿瘤的人，已经离开人血流的淋巴细胞群已迁移到所述肿瘤中并且在所述肿瘤中转化为TIL。在一些实施方案中，此人可以是需要免疫疗法的患者，所述免疫疗法涉及扩增的患者自身的TIL群。在其他实施方案中，此人可以是需要免疫疗法的患者，所述免疫疗法涉及扩增的另一位患者自身的TIL群。

[0069] 如本文所用，术语“CD3”是指帮助激活细胞毒性T细胞(CD8+初试T细胞)和辅助T细胞(CD4+初试T细胞)的CD3(分化群3)T细胞共受体。CD3是由六条不同的多肽链(2条CD3ζ链、2条CD3ε链、1条CD3eγ链和1条CD3δ链)构成的蛋白质复合物。这些链与T细胞受体(TCR)α和β链(或γ和δ链)缔合以在T淋巴细胞中生成激活信号。TCRα和β链(或γ和δ链)和CD3分子共同构成TCR复合物。人CD3E基因由美国国家生物技术信息中心(NCBI)基因ID 916鉴定。人CD3E基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_007383.1。人CD3E多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:876。

[0070] 表1:人分化群多肽和细胞因子的序列

[0071]

NCBI参考序列编号	SEQ ID NO	序列
NG_007383.1	876	MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGIT QTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIG GDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPR GSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVI VDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGL NQRRI
NG_029618.1	877	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVV YGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQN LYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK

[0072]

NCBI参考序列编号	SEQ ID NO	序列
		GKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRS
NG_050908.1	878	MSFPCKFVASFLLIFNVSSKGAVSKEITNALETWG ALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSDKKKIAQ FRKEKETFKEKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDI YKVSIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCI NTTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITH KWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSVEPVSCPEKGL DIYLIIGICGGGSLLMVFVALLVFYITKRKKQRSRR NDEELETRAHRVATEERGRKPHQIPASTPQNPATS QHPPPPPGHRSQAPSHRPPPPGHRVQHQPQKRPPA PSGTQVHQQKGPPLPRPRVQPKPPHGAAENSLSPS SN
NG_016779.1	879	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPR DLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLN RWITFCQSIISTLT
NP_001552.2	880	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAG TFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCK GVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCE QDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGAS SVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLT LRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC SCRFPEEEEGGCEL
NP_003802.1	881	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVA GLLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAAS PRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLG LFRVTPEIPAGLPSPRSE
CAA71044.1	882	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRANWVNVISDLKKIE DLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLEL QVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTES GCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
AAH47698	883	MFHVSFRYIFGLPPLILVLLPVASSDCDIEGKDGKQ YESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHI CDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHL LKVSEGTTILLNCTGQVKGRKPAALGEAQPTKSL EENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILM GTKEH
BBA22643	884	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRH MIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVET

[0073]

NCBI参考序列编号	SEQ ID NO	序列
		NCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLK RKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLER FKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS

[0074] 在表1中,具有它们的蛋白质的假定前导序列示出为加下划线。

[0075] 如本文所用,术语“CD28”是指分化群28,它是在T细胞上表达的蛋白质之一,提供T细胞激活和存活所需的共刺激信号。除了T细胞受体(TCR)之外,通过CD28的T细胞刺激可以为各种细胞因子(诸如白介素)的产生提供有效信号。CD28是CD80和CD86蛋白的受体。当被Toll样受体配体激活时,CD80表达在抗原呈递细胞(APC)中上调。人CD28基因由NCBI基因ID 940鉴定。人CD28基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_029618.1。人CD28多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:877。

[0076] 如本文所用,术语“CD2”是指分化群2,它是在T细胞和自然杀伤(NK)细胞表面上发现的细胞粘附分子。CD2与其他粘附分子相互作用,并且充当T细胞和NK细胞上的共刺激分子。人CD2基因由NCBI基因ID 914鉴定。人CD2基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_050908.1。人CD2多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:878。

[0077] 如本文所用,术语“4-1BB”是指CD137,它是T细胞共刺激因子。人4-1BB基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_052834.1。人4-1BB的示例性氨基酸序列是NCBI参考序列:NP_001552.2。人4-1BB多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:880。

[0078] 如本文所用,术语“4-1BB配体”是指在激活的T淋巴细胞上表达并结合4-1BB的2型跨膜糖蛋白。人4-1BB基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NC_000019.10(6,531,026-6,535,924)。人4-1BB的示例性氨基酸序列是NCBI参考序列:AAA53134.1。人4-1BB配体多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:881。

[0079] 如本文所用,术语“细胞因子”是指在细胞信号传导中重要的广泛类别的小蛋白质(大小约为5kDa-20kDa)。细胞因子是肽,并且不能穿过细胞的脂质双层进入细胞质。已显示细胞因子作为免疫调节剂参与自分泌信号传导、旁分泌信号传导和内分泌信号传导。细胞因子包括趋化因子、干扰素、白介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子,但通常不包括激素或生长因子,尽管术语上有一些重叠。细胞因子由多种细胞产生,包括免疫细胞(如巨噬细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞和肥大细胞)以及内皮细胞、成纤维细胞和各种基质细胞。细胞因子通常通过结合细胞表面受体而发挥作用,并且在免疫应答中尤其重要,因为它们参与调控特定细胞群的成熟、生长和反应性。

[0080] 如本文所用,短语“T细胞刺激细胞因子”是指刺激和/或激活T细胞淋巴细胞的细胞因子。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15或IL-21。在某些实施方案中,T细胞刺激细胞因子在细胞中由病毒载体产生。

[0081] 如本文所用,术语“IL-2”(本文中也称为“IL2”)是指被称为白介素2的细胞因子和T细胞生长因子,并且包括所有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式、具有保守氨基酸取代的形式、糖型、生物仿制药及其变体。IL-2在例如Nelson,J.Immunol.2004,172,3983-88和Male k,Annu.Rev.Immunol.2008,26,453-79中有所描述,所述文献的公开内容以引用方式整体并入本文。术语IL-2涵盖人重组形式的IL-2,诸如阿地白介素(aldesleukin)

(PROLEUKIN,可从多个供应商处以每单次使用小瓶2200万IU商购获得),以及由CellGenix,Inc.,Po rtsmouth,N.H.,USA(CELLGRO GMP)或ProSpec-Tany TechnoGen e Ltd.,East Brunswick,N.J.,USA(目录号CYT-209-b)商业供应的重组IL-2形式、和来自其他销售商的商业等效物。阿地白介素(des-丙氨酰基-1,丝氨酸-125人IL-2)是非糖基化人重组形式的IL-2,分子量大约为15kDa。术语IL-2还涵盖聚乙二醇化形式的IL-2,包括可从Nektar Therapeutics,South San Francisco,Calif.,USA获得的聚乙二醇化IL-2前药NKTR-214。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化IL-2在美国专利申请公开号US 2014/0328791 A1和国际专利申请公开号WO 2012/065086 A1中有所描述,所述申请的公开内容以引用方式整体并入本文。适用于本发明的替代形式的缀合IL-2在美国专利号4,766,106、5,206,344、5,089,261和4,902,502中有所描述,所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。适用于本发明的IL-2制剂在美国专利号6,706,289中有所描述,所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。人IL2基因由NCBI基因ID 3558鉴定。人IL2基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_016779.1。人IL-2多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:879。

[0082] 白介素2(IL-2)是一种白介素,白介素是免疫系统中的一种类型的细胞因子信号传导分子。它是调控负责免疫力的白细胞(白血球,经常是淋巴细胞)的活性的15.5kDa-16kDa蛋白。IL-2是人体对微生物感染的自然反应的一部分。IL-2通过结合由淋巴细胞表达的IL-2受体来介导IL-2的作用。IL-2的主要来源是激活的CD4+T细胞和激活的CD8+T细胞。

[0083] IL-2主要经由其对T细胞的直接作用在免疫系统、耐药性和免疫力的关键功能中发挥重要作用。在T细胞成熟的胸腺中,它通过促进某些未成熟T细胞分化成调节性T细胞来预防自身免疫疾病,调节性T细胞抑制原本准备攻击体内正常健康细胞的其他T细胞。IL-2增强激活诱导的细胞死亡(AICD)。当初始T细胞也被抗原刺激时,IL-2还促进T细胞分化成效应T细胞和记忆T细胞,从而帮助身体抵抗感染。与其他极化细胞因子一起,IL-2刺激初试CD4+T细胞分化成Th1和Th2淋巴细胞,同时阻止分化成Th17和滤泡Th淋巴细胞。它的表达和分泌受到严格调控,并且在增加和抑制免疫应答中充当瞬时正反馈和负反馈回路的一部分。通过它在T细胞免疫记忆的发展(取决于抗原选择的T细胞克隆的扩增数量和功能)中的作用,它在持久的细胞介导的免疫力中发挥作用。

[0084] 如本公开中提供的用于扩增TIL群的方法利用IL-15。“IL-15”(本文中也称为“IL15”)是指被称为白介素15且在本发明中利用的细胞因子和T细胞生长因子,其包括所有形式的IL-15,包括人和其他哺乳动物形式、具有保守氨基酸取代的形式、糖型、生物仿制药及其变体。IL-15在例如Steel JC,Waldmann TA,Morris JC(January 2012)"Interleukin-15biology and its therapeutic implications in cancer,"Tren ds in Pharmacological Sciences,33(1):35-41和Waldmann TA,Ta gaya Y(1999)"The multifaceted regulation of interleukin-15expres sion and the role of this cytokine in NK cell differentiation and ho st response to intracellular pathogens,"Annual Review of Immunolog y,17:19-49中有所描述,所述文献的公开内容以引用方式整体并入本文。术语IL-15还涵盖重组形式的IL-15。如本文所用,术语IL-15还涵盖聚乙二醇化形式的IL-15。人IL15基因由NCBI基因ID 3600鉴定。人IL15基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:NG_029605.2。人IL-15多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:882。

[0085] IL-15可以以大于0.5ng/ml的最终浓度用于所提供的方法中。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于2ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于50ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于75ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于150ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于200ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml，任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度为约300ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度为约1000ng/ml。在另外的实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于1000ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在另外的实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度为大于100ng/ml至约1000ng/ml。在具体的实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度为约300ng/ml。

[0086] IL-15可以以大于1U/ml的最终浓度用于所提供的方法中。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于2U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于4U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于20U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于20,000U/ml，任选地小于18,000ng/ml、16,000ng/ml、14,000ng/ml、12,000ng/ml、10,000ng/ml、8000ng/ml、6000ng/ml、4000ng/ml或2000ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度为约600U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度为约2000U/ml。在另外的实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度大于2000U/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在另外的实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度为大于200U/ml至约2000U/ml。在具体的实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度为约600U/ml。

[0087] IL-7是由骨髓和胸腺中的基质细胞分泌的细胞因子。它也由角质细胞、树突状细胞、肝细胞、神经元和上皮细胞产生，但不由正常淋巴细胞产生。IL-7刺激多能(multipotent/pluripotent)造血干细胞分化成淋巴祖细胞(与其中分化由IL-3刺激的髓样祖细胞相反)。它还刺激淋巴谱系中所有细胞(B细胞、T细胞和NK细胞)的增殖。它对B细胞成熟、T细胞和NK细胞存活、发育和稳态的某些阶段期间的增殖很重要。人IL7基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:AH006906.2。人IL-7多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:883。

[0088] 如在本文提供的方法中所利用的，IL-7的最终浓度可以为约10U/ml至约7,000U/ml。在一些实施方案中，IL-7的最终浓度可以为约5ng/ml至约3,500ng/ml。

[0089] IL-21是对免疫系统的细胞具有有效调控作用的细胞因子，所述免疫系统的细胞包括可以破坏病毒感染的细胞或癌细胞的自然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T细胞。这种细胞因子在其靶细胞中诱导细胞分裂/增殖。IL-21在激活的人CD4+T细胞中表达，但在大多数其他组织中不表达。此外，IL-21表达在辅助T细胞的Th2和Th17亚群以及滤泡T细胞(T follicular cell)中上调。事实上，已显示IL-21可以用于鉴定外周滤泡辅助T细胞(T follicular helper cell)。此外，IL-21在调控这些细胞的功能的NK T细胞中表达。人IL21

基因的示例性核苷酸序列是NCBI参考序列:LC133256.1。人IL-21多肽的示例性氨基酸序列提供为SEQ ID NO:884。

[0090] 在一些实施方案中,用于本文的方法的T细胞刺激细胞因子选自由以下组成的组:IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。在一些实施方案中,用于第一培养基的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约10U/ml至约7,000U/ml。在一些实施方案中,用于第一培养基的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约5ng/ml至约3,500ng/ml。

[0091] 在某些实施方案中,用于本文的方法的第一培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在某些实施方案中,第二培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在具体的实施方案中,第一培养基不包含IL-2。在具体的实施方案中,第二培养基不包含IL-2。在具体的实施方案中,第一培养基不包含IL-21。在具体的实施方案中,第二培养基不包含IL-21。

[0092] 在一些实施方案中,第二培养基还包含IL-7。在一些实施方案中,第二培养基中的IL-7细胞因子的最终浓度为约10U/ml至约7,000U/ml。在一些实施方案中,第二培养基中的IL-7的最终浓度可以为约5ng/ml至约3,500ng/ml。

[0093] 在一些实施方案中,用于所述方法的第一培养基以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第一培养基。在一个实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第一培养基的30%至99%。

[0094] 在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换用于所述方法的第二培养基。在一个实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第二培养基的30%至99%。

[0095] 如本文所用,与激动剂或抗体关联使用的术语“片段”是指保留特异性结合抗原的能力的激动剂或抗体的片段。抗体片段的实例包括(i)Fab片段,这是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,这是包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)dAb片段,其包含单个可变结构域;和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由不同的基因编码,但可以通过使它们成为单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv))的合成接头、使用重组方法将它们连接起来,VL和VH区在所述单一蛋白质链中配对形成单价分子。此类单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。还涵盖其他形式的单链抗体,诸如双抗体。此外,单链抗体还包括包含一对串联Fv区段(VH-CH1-VH-CH1)的“线性抗体”,所述一对串联Fv区段与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。

[0096] 术语“抗体”是指保留了免疫球蛋白(Ig)分子的表位结合特征的Ig分子或其功能片段、突变体、变体或衍生物,其通常由四条多肽链(两条重(H)链和两条轻(L)链)构成。此类片段、突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的。在全长抗体的实施方案中,每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)构成。在本公开中,重链可变区(结构域)也命名为VDH。CH由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)构成。CL由单个CL结构域构成。在本公开中,轻链可变区(结构域)也命名为VDL。VH和VL可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其中散布着更保守的区域,称为框架区(FR)。

一般来讲，每个VH和VL由三个CDR和4个FR构成，从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0097] 如本文所用，短语“特异性结合”、“特异性地结合”、“选择性结合”或“选择性地结合”是可互换的，并且是指与蛋白质复合物(诸如激动剂、拮抗剂、抗体或可溶性单特异性复合物)以较低亲和力缔合的其他抗原相比，蛋白质复合物以高特异性与特定抗原相互作用。特异性结合相互作用可以通过离子键、氢键或其他类型的化学或物理缔合来介导。在某些实施方案中，当蛋白质复合物识别其在蛋白质和/或大分子的复合混合物中的靶抗原时，蛋白质复合物特异性地结合特定抗原。如果激动剂、拮抗剂、抗体或可溶性单特异性复合物交叉竞争(一种阻止另一种的结合或调节作用)，则两种或更多种激动剂、拮抗剂、抗体或可溶性单特异性复合物“结合相同表位”。通常，激动剂、拮抗剂、抗体或可溶性单特异性复合物以大约小于10^{-5}M(诸如大约小于10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更低)的亲和力(K_D)结合。

[0098] 如本文所用，术语“K_D”是指特定激动剂-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本文所述的激动剂以低于大约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更低的解离平衡常数(K_D)结合靶标，例如，如在Biacore仪器中使用表面等离子共振(SPR)技术、使用激动剂作为配体并使用靶标作为分析物确定的，并且以对应于K_D的亲和力结合靶蛋白，所述亲和力比其与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如，BSA、酪蛋白)结合的亲和力低至少10倍，诸如至少低100倍，例如至少低1000倍，诸如至少低10,000倍，例如至少低100,000倍。亲和力较低的量取决于激动剂的K_D，所以当激动剂的K_D非常低(即激动剂具有高特异性)时，对抗原的亲和力低于对非特异性抗原的亲和力的量可以是至少10,000倍。

[0099] 如本文所用，术语“k_{off}”(秒$^{-1}$)是指特定激动剂-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为k_d值。

[0100] 如本文所用，术语“k_{on}”($M^{-1}\times$秒$^{-1}$)是指特定激动剂-抗原相互作用的缔合速率常数。

[0101] 如本文所用，术语“KD”(M)是指特定激动剂-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0102] 如本文所用，术语“K_A”(M^{-1})是指特定激动剂-抗原相互作用的缔合平衡常数并且通过将k_{on}除以k_{off}获得。

[0103] 如本文所用，短语“抗CD3抗体”是指抗体或其变体，例如单克隆抗体，并且包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或鼠抗体。抗CD3抗体包括OKT-3，其也称为莫罗单抗(muromonab)。抗CD3抗体还包括UCHT1克隆，其也称为T3和CD3c。其他抗CD3抗体包括例如奥昔组单抗(otelixizumab)、替普利珠单抗(teplizumab)和维西珠单抗(visilizumab)。

[0104] 如本文所用，短语“抗CD28抗体”是指抗体或其变体，例如单克隆抗体，并且包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD28受体的人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或鼠抗体。

[0105] 在一些实施方案中，抗4-1BB抗体可以用作4-1BB配体。如本文所用，短语“抗4-1BB抗体”是指抗体或其变体，例如单克隆抗体，并且包括针对4-1BB的人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或鼠抗体。

[0106] 如本文所用，短语“抗CD2抗体”是指抗体或其变体，例如单克隆抗体，并且包括针

对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD2受体的人抗体、人源化抗体、嵌合抗体或鼠抗体。

[0107] 如本文所用，术语“OKT-3”(本文中也称为“OKT3”)是指由Milten yi Biotech, Inc.,San Diego,Calif.,USA生产的抗CD3抗体和/或其生物仿制药或变体(例如，人源化变体、嵌合变体或亲和力成熟的变体)。能够产生OKT-3的杂交瘤可在美国典型培养物保藏中心获得，并且被指定为ATCC登录号CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤可在欧洲细胞株/微生物保藏中心(European Collection of Authenticat ed Cell Cultures,ECACC)获得，并且被指定为目录号86022706。

[0108] 如本文所用，术语“UCHT1”是指描述于Beverley和Callard(1981) Eur.J.Immunol.11:329-334中的抗CD3抗体和/或其生物仿制药或变体(例如，人源化变体、嵌合变体或亲和力成熟的变体)。能够产生示例性UCHT1的杂交瘤可从Creative Diagnostics,Shirley,NY,USA获得，并且被指定为目录号CSC-H3068。

[0109] 如本文所用，短语“激活信号”是指一种或多种导致T细胞被激活的非内源性刺激。在内源性过程中，当T细胞被MHC II类分子呈递肽抗原时，它们就会被激活，所述MHC II类分子在抗原呈递细胞(APC)的表面上表达。一旦被激活，T细胞快速分裂并且分泌调控或协助免疫应答的细胞因子。内源性T细胞激活过程至少涉及(a)TCR复合物的激活，其涉及CD3、和(b)APC表面上的蛋白质对CD28或4-1BB的共刺激。本领域已知T细胞的内源性激活可以通过CD3、CD28或4-1BB激动剂(例如，抗体)刺激T细胞来模拟。因此，CD3、CD28和/或4-1BB可以一起向T细胞提供激活信号。

[0110] 如本文所用，短语“激活和诱导TIL群增殖”是指使TIL群经受激活信号，使得TIL数量增加或增殖并且开始产生细胞因子(激活的TIL)以增强免疫应答的过程。

[0111] 如本文所用，短语“肿瘤细胞”或“癌细胞”是指以不受控制的方式分裂、形成实体瘤或使血液充满异常细胞的细胞。当不再需要更多子细胞时，健康细胞停止分裂，但肿瘤细胞或癌细胞继续产生拷贝。它们还能够在称为转移的过程中从身体的一部分扩散到另一部分。肿瘤细胞可以从多种癌症类型中分离，所述癌症类型包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌、肾癌、唇癌和口腔癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肝癌、间皮瘤、肺癌(包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌、非黑色素瘤皮肤癌和黑色素瘤)、卵巢癌、葡萄膜癌、子宫癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。在一些实施方案中，癌细胞还从淋巴瘤分离。肿瘤细胞可以从原发性肿瘤和转移瘤分离。

[0112] 如本文所用，短语“肿瘤样品”是指从受试者分离的肿瘤细胞。在某些实施方案中，肿瘤样品是整体或部分从患有肿瘤的受试者或患者分离的实体瘤的至少一部分。肿瘤样品可以从多种癌症类型中分离，所述癌症类型包括膀胱癌、脑癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌、肾癌、唇癌和口腔癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肝癌、间皮瘤、肺癌(包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌、非黑色素瘤皮肤癌和黑色素瘤)、卵巢癌、葡萄膜癌、子宫癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。在一些实施方案中，癌细胞还从淋巴瘤分离。肿瘤样品可以从原发性肿瘤和转移瘤分离。

[0113] 如本文所用，短语“解聚的肿瘤样品”是指已经被破碎成“肿瘤碎片”的肿瘤样品。破碎可以是物理破碎、机械破碎、超声破碎、酶促破碎或它们的任何组合。最初可机械地(例如，通过解剖)进行破碎，并且任选地之后将肿瘤碎片酶消化成单细胞悬浮液。酶消化后，可解离肿瘤消化物。在一些实施方案中，机械解离肿瘤消化物。解离后，可使所得的细胞悬浮液经受另外的分离技术以去除污染细胞，诸如红细胞。在一些实施方案中，机械解聚方法可包括将肿瘤切碎或切片成较小的肿瘤碎片，而酶促解聚方法可包括用特定酶(诸如蛋白酶)处理肿瘤碎片。

[0114] 如本文所用，短语“T细胞受体激动剂”或“TCR激动剂”是指T细胞受体复合物的激动剂。在一些实施方案中，TCR激动剂是抗体。在一个实施方案中，抗体是人源化抗体。合适的TCR激动剂包括但不限于CD3激动剂(例如，抗CD3抗体)。

[0115] 如本文所用，术语“培养基”是指被设计用于支持细胞在人工环境中的存活、生长和/或增殖的液体或凝胶。培养基通常包含一组限定的组分。此类组分可包括能量来源、生长因子、激素、刺激剂、激活剂、糖、盐、维生素和/或氨基酸、和/或这些的组合。在许多实施方案中，培养基是细胞培养基。

[0116] 如本文所用，短语“维持培养基的组分”是指包含一组限定的组分(诸如特定的刺激剂和激活剂)的培养基，其中组分的身份保持不变，但组分中的一种或多种的浓度可变化。在某些实施方案中，当细胞在培养基中培养时，培养基中一种或多种组分的浓度随时间变化。然而，当更换培养基时，每次更换的新培养基都具有相同的组分。

[0117] 如本文所用，短语“饲养细胞”是指用于提供帮助另一种细胞类型增殖的细胞外分泌物的细胞。在某些实施方案中，本文所提及的饲养细胞是外周血单核细胞(PBMC)或抗原呈递细胞(APC)。

[0118] 如本文所用，短语“重组激动剂”是指由重组基因编码的激动剂蛋白，所述重组基因已被克隆到支持基因表达和mRNA翻译的系统中。重组基因被设计为受充分表征的启动子控制，并且在所选宿主细胞内表达靶激动剂蛋白以实现高水平的蛋白质表达。通过重组DNA技术对基因进行修饰可以导致突变蛋白质或大量蛋白质的表达。

[0119] 如本文所用，短语“中央记忆T细胞表型”是指在人中为CD45RO+并且表达CCR7($CCR7^{hi}$)和CD62L($CD62^{hi}$)的T细胞亚群。中央记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)，并且在一些情况下包括IL-15R。中央记忆细胞被定义为在功能上具有再循环到淋巴结和脾脏白髓的能力，并表现出干细胞特性，因为它们能够自我更新和分化成效应细胞。在TCR触发后，中央记忆T细胞主要分泌IL-2并且表达CD40L作为效应分子。中央记忆T细胞可以是CD4 T细胞和CD8 T细胞两者，并且在人中按比例富集在淋巴结和扁桃体中。

[0120] 如本文所用，术语“纳米基质”是指聚合物链的多于一种基质的胶体悬浮液。纳米基质是多相材料，其具有小于500nm的尺寸或具有在构成材料的不同相之间具有纳米级重复距离的结构。聚合物可包括聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、多糖、右旋糖酐和其他大分子，它们由许多重复的亚基构成。纳米基质还可具有嵌入的另外的功能化合物，诸如磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体。此外，功能部分(诸如配体或激动剂)可以共价附接或结合至聚合物链以用于特定应用。

[0121] 如本文所用，术语“基质”或“移动基质”是指离散的、可分离的三维晶格型结构，其中结构的骨架可以是柔性的或移动的并且可以由诸如聚合物和陶瓷的材料构成。作为三维

结构，基质可以具有最小尺寸和最大尺寸，诸如长度。移动基质可为胶原蛋白、纯化的蛋白质、纯化的肽、多糖、糖胺聚糖或细胞外基质组合物。多糖可包括例如纤维素醚、淀粉、阿拉伯树胶、琼脂糖、右旋糖酐、壳聚糖、透明质酸、果胶、黄原胶、瓜尔胶或藻酸盐。其他聚合物可包括聚酯、聚醚、聚丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚胺、聚乙烯亚胺、聚季铵聚合物、聚磷腈、聚乙烯醇、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯基吡咯烷酮、嵌段共聚物、或聚氨酯。移动基质可包含右旋糖酐聚合物。“基质(Matrices)”是指多于一种基质(matrix)的集合。

[0122] 如本文所用，基质的背景下的短语“最大尺寸”是指基质的最长长度。

[0123] 如本文所用，术语“右旋糖酐”是指复合支化葡聚糖，这是一种来源于葡萄糖缩合的多糖。右旋糖酐链具有从3千道尔顿至2000千道尔顿的不同长度。聚合物主链由葡萄糖单体之间的α-1,6糖苷键联组成，具有来自α-1,3键联的支链。

[0124] 如本文所用，短语“与纳米基质结合的激动剂”是指附接至构成纳米基质内的基质的聚合物链的激动剂。

[0125] 如本文所用，短语“胶体悬浮液”是指其中一种物质(诸如基质)悬浮在另一种物质(诸如液体)中的混合物。因此，胶体悬浮液具有分散相(即，悬浮物质)和连续相(即，悬浮的介质，诸如液体)。

[0126] 如本文所用，短语“使TIL群与纳米基质接触”是指使TIL和纳米基质在一起，使得TIL可以通过离子键合、氢键合或其他类型的物理或化学相互作用与结合纳米基质的功能部分(诸如配体或激动剂)或嵌入纳米基质的功能化合物(诸如纳米晶体)缔合。

[0127] 如本文所用，术语“纳米晶体”是指基于量子点并且由单晶或多晶排列的原子构成的、具有至少一个小于100nm的尺寸的材料颗粒。纳米晶体的大小将它们与较大的晶体区分开。

[0128] 如本文所用，短语“磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体”是指可以使用磁场来操纵的纳米晶体。此类纳米晶体通常由至少一种磁性材料(诸如铁、镍或钴)组分组成。

[0129] 如本文所用，短语“胶体聚合物链”是指当通过共价键或其他物理或化学相互作用彼此连接时可以形成胶体悬浮液的聚合物链。

[0130] 如本文所用，短语“可溶性单特异性复合物”是指包含两种结合蛋白的复合物，所述结合蛋白彼此直接或间接连接并结合相同抗原。两种结合蛋白是可溶的，并且不固定在表面、粒子或珠粒上。

[0131] 如本文所用，短语“四聚体抗体复合物”或“TAC”是指包含两种充当第一和第二激动剂的抗体的蛋白质复合物，所述第一和第二激动剂通过一个或两个接头抗体连接，所述接头抗体结合充当第一和第二激动剂的抗体。接头抗体可结合激动剂抗体的恒定区，并且在恒定区具有不同同种型的情况下，也可使用针对每种同种型具有一个结合区的双特异性抗体。对这些复合物的支持也可以见于美国专利号4,868,109，所述专利以引用方式整体并入本文。在其他实施方案中，充当第一和第二配体的抗体或其抗原结合片段可由一个或多个接头分子共价或非共价结合。此类接头分子的非限制性实例包括生物素或链霉亲和素，它们可用于接合生物素化的抗体，诸如在Fc区中具有生物素部分的抗体。在另外的实施方案中，四聚体抗体复合物可用作复合物的混合物。这包括在复合物的混合物中使用多于一种复合物，其中整个混合物的复合物可以接触多于两种不同的配体。

[0132] 如本文所用，短语“RNA指导的核酸酶”是指基于天然存在的II型CRISPR-Cas系统

的核酸/蛋白质复合物,它是可以用于执行靶向的基因组编辑的可编程核酸内切酶。RNA指导的核酸酶由两种组分组成:短的约100个核苷酸的指导RNA(gRNA),其在其5'末端使用20个可变核苷酸以与靶基因组DNA序列进行碱基配对;和切割靶DNA的核酸酶,例如Cas9核酸内切酶。RNA指导的核酸酶包括任何天然存在的CRISPR-Cas系统及其变体,包括天然存在的Cas DNA核酸内切酶及其变体。这些CRISPR-Cas系统和Cas DNA核酸内切酶中的许多在本文中被具体提及。

[0133] 如本文所用,术语"Cas9"是指CRISPR相关蛋白9,这是在某些细菌对DNA病毒的免疫防御中发挥重要作用,并且在遗传工程应用中大量利用的蛋白质。Cas9是与化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)中的CRISPR(成簇规律间隔短回文重复序列)适应性免疫系统相关的RNA指导的DNA核酸内切酶。Cas9可以通过检查与指导RNA(gRNA)互补的位点来查询DNA段。如果DNA底物与gRNA互补,则Cas9切割DNA。Cas9的靶特异性源于gRNA:DNA互补性,而不是对蛋白质本身的修饰(如TALEN和锌指)。结合但不切割同源DNA的Cas9版本可以用于将转录激活物或阻遏物定位至特定DNA序列,以便控制转录激活和阻遏。天然Cas9需要由缔合的两种不同的RNA(CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA))构成的指导RNA。Cas9靶向已经通过工程改造嵌合单指导RNA得到简化。

[0134] 如本文所用,短语"死Cas9"或"dCas9"是指Cas9核酸内切酶Dead,它是Cas9的突变形式,其核酸内切酶活性通过其核酸内切酶结构域中的点突变而被去除。与其未突变形式相似,dCas9与gRNA一起用于CRISPR系统以靶向与gRNA互补的、具有允许与Cas9结合的PAM序列的特定基因或核苷酸。Cas9通常具有2个核酸内切酶结构域,称为RuvC和HNH结构域。点突变D10A和H840A改变了针对核酸内切酶活性的两个重要残基,这最终导致其失活。尽管dCas9缺乏核酸内切酶活性,但它仍然能够结合其指导RNA和被靶向的DNA链,因为这种结合由其他结构域管理。如果gRNA以阻止转录因子和RNA聚合酶接近DNA的方式定位dCas9,仅此一项经常足以减弱(如果不是完全阻断)靶向的基因的转录。然而,这种结合DNA的能力也可以用于激活,因为dCas9具有可以用于附接转录激活物的可修饰的区域,通常是蛋白质的N和C末端。

[0135] 此外,根据本公开,可采用本领域技术内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。此类技术在文献中充分解释。参见例如Sa mbrook,Fritsch和Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manu al,Second Edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Co ld Spring Harbor,N.Y.(本文中为"Sambrook等人,1989");DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes I and II(D.N.Glover编辑1985);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑1984);Nucleic Acid Hybridization[B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985)];Tran scription And Translation[B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984)];Animal Cell Culture[R.I.Freshney编辑(1986)];Immobilized Cells And Enzymes[IRL Press,(1986)];B.Perbal,A Practical Gu ide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等人(编辑),Curre nt Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.(1994)。这些参考文献中的每一篇都以引用方式整体并入本文。

[0136] 除非另有说明,否则本文提供的序列同一性/相似性值是指用使用默认参数的BLAST 2.0程序套件获得的值(Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402,以

引用方式整体并入本文)。

[0137] 如本文所用,“核酸靶向序列”和“核酸结合序列”可互换使用,并且是指结合和/或靶向核酸的序列。

[0138] 如本文所用,两种核酸或多肽序列的背景下的“序列同一性”或“同一性”包括对这两种序列中的残基的提及,所述两个序列当在特定比较窗中比对最大对应时是相同的。当序列同一性百分比用于提及蛋白质时,认识到不相同的残基位置经常因保守氨基酸取代而不同,其中氨基酸残基被具有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)的其他氨基酸残基取代,并且因此不改变分子的功能性质。在序列在保守取代方面不同的情况下,可向上调整序列同一性百分比以校正取代的保守性质。因此类保守取代而不同的序列被称为具有“序列相似性”或“相似性”。用于进行这种调整的方式对于本领域技术人员来说是众所周知的。这通常涉及将保守取代评分为部分错配而不是完全错配,从而增加序列同一性百分比。因此,例如,在相同氨基酸的评分为1且非保守取代的评分为0的情况下,保守取代的评分为0至1之间。保守取代的评分例如根据Meyers和Miller,(1988)Computer Applic.Biol.Sci.4:11-17的算法进行计算,例如,如在程序PC/GENE(Intelligenetics,Mountain View,Calif.,USA)中进行。这些参考文献中的每一篇都以引用方式整体并入本文。

[0139] 如本文所用,“序列同一性百分比”意指通过在比较窗中比较两个最佳比对的序列而确定的值,其中与用于两个序列的最佳比对的参考序列(不包含添加或缺失)相比,比较窗中的多核苷酸序列部分可包含添加或缺失(即,间隔)。百分比通过以下方式计算:确定相同核酸碱基或氨基酸残基在两个序列中出现的位置的数量,以产生匹配位置的数量;将匹配位置的数量除以比较窗中的位置总数,并且将结果乘以100,以产生序列同一性百分比。

[0140] 在多核苷酸序列的背景下,术语“基本同一性”或“基本上同一”意指使用以标准参数描述的比对程序之一,多核苷酸包含与参考序列相比具有50%-100%之间的序列同一性、优选至少50%序列同一性、优选至少60%序列同一性、优选至少70%序列同一性、更优选至少80%序列同一性、更优选至少90%序列同一性且最优选至少95%序列同一性的序列。技术人员将认识到,可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等来适当地调整这些值以确定由两种核苷酸序列编码的蛋白质的对应身份。用于这些目的的氨基酸序列的基本同一性通常意指55%-100%之间,优选至少55%,优选至少60%,更优选至少70%、80%、90%,和最优选至少95%的序列同一性。

[0141] 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)

[0142] 肿瘤浸润淋巴细胞或TIL是最初作为白细胞获得的细胞群,它们已经离开受试者的血流并迁移到肿瘤中。TIL包括但不限于$CD8^+$细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17 $CD4^+$ T细胞和自然杀伤(NK)细胞。TIL包括初级和次级TIL。“初级TIL”是从如本文概述的患者组织样品中获得的那些(有时称为“新鲜收获的”),并且“次级TIL”是已经如本文所讨论扩增或增殖的任何TIL细胞群。

[0143] TIL通常可以使用细胞表面标志物在生化上进行定义,或可以通过其浸润肿瘤和影响治疗的能力在功能上进行定义。TIL通常可以归类为表达以下生物标志物中的一种或多种:CD4、CD8、TCRαβ、TCRγδ、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45RA、CD45RO、CD95、PD-1和CD25。另外和或者,TIL可以通过其在重新引入到患者中后浸润实体瘤的能力在功能上进行定义。TIL还可通过效力来表征;例如,如果例如干扰素γ(IFNγ)释放在TCR刺激后大于约50pg/

ml、大于约100pg/ml、大于约150pg/ml或大于约200pg/ml，则TIL可被认为有效。

[0144] 利用通过常规TIL制造工艺离体培养的TIL的过继细胞疗法涉及至少两个步骤，即在前REP步骤之后的至少一个快速扩增方案(REP)步骤。过继细胞疗法已导致在黑色素瘤患者的宿主免疫抑制之后的成功疗法。当前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如，CD28、CD8或CD4阳性)、和REP产物的扩增和活力的数值倍数。

[0145] 实验发现表明，肿瘤特异性T淋巴细胞的过继转移之前的淋巴细胞清除在通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争元件(“细胞因子库”)来增强治疗功效中发挥关键作用。因此，本发明的一些实施方案可在引入本发明的TIL之前对患者利用淋巴细胞清除步骤(有时也称为“免疫抑制调理”)。在一些实施方案中，不使用淋巴细胞清除步骤。因此，在一些实施方案中，受试者在施用TIL之前已经经历了淋巴细胞清除。在许多研究中，通过向受试者施用IL-2来支持TIL，以促进细胞的植入。因此，在一些实施方案中，受试者在施用TIL的同时或之后接受IL-2治疗。在一些实施方案中，受试者在施用TIL的同时或之后接受高剂量或低剂量IL-2治疗。在一些实施方案中，受试者在施用TIL之前，以及在施用TIL的同时或之后接受IL-2治疗之前，已经经历了淋巴细胞清除。IL-2可以是高剂量或低剂量。

[0146] 然而，本公开还引入了有利的制造方法，在一些实施方案中，所述方法去除了对先前的淋巴细胞清除和免疫抑制调理或IL-2施用的需要。在此类实施方案中，受试者在施用TIL之前未经历淋巴细胞清除。在一些实施方案中，受试者在施用TIL的同时或之后未接受高剂量IL-2治疗。在一些实施方案中，受试者在施用TIL的同时或之后未接受任何IL-2治疗。在一些实施方案中，受试者在施用TIL之前未经历淋巴细胞清除，并且在施用TIL的同时或之后未接受高剂量IL-2治疗。在一些实施方案中，受试者在施用TIL之前未经历淋巴细胞清除，并且在施用TIL的同时或之后未接受任何IL-2治疗。

[0147] TIL扩增

[0148] 如本文一般概述的，TIL通常从患者样品获取，并且在移植到患者体内之前对TIL进行操作以扩增其数量。在一些实施方案中，TIL可如下所述进行遗传操作。一般来讲，TIL最初从患者肿瘤样品(“初级TIL”)中获得，然后将其扩增成较大的群以进行如本文所述的进一步操作，任选地冷冻保存和再刺激，并且任选地评价表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

[0149] 患者肿瘤样品可使用本领域已知的方法获得，通常经由手术切除、穿刺活检或其他用于获得含有肿瘤和TIL细胞的混合物的样品的方式。一般来讲，肿瘤样品可来自任何实体瘤，包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移瘤。实体瘤可以是任何癌症类型，包括但不限于膀胱癌、脑癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌、肾癌、唇癌和口腔癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肝癌、间皮瘤、肺癌(包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌、非黑色素瘤皮肤癌和黑色素瘤)、卵巢癌、葡萄膜癌、子宫癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。在一些实施方案中，可用的TIL从恶性黑色素瘤肿瘤中获得，因为已经报道这些肿瘤具有特别高水平的TIL。原发性肺(包括非小细胞肺癌(NSCLC))、膀胱、宫颈和黑色素瘤肿瘤或其转移瘤可以用于获得TIL。

[0150] 实体瘤是组织的异常肿块，通常不含有囊肿或液体区域。实体瘤可能是良性的或恶性的。实体瘤癌症是指恶性、赘生性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于膀胱癌、脑

癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、宫颈癌、结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌、肾癌、唇癌和口腔癌、头颈癌(包括例如头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、肝癌、间皮瘤、肺癌(包括非小细胞肺癌(NSCLC)和小细胞肺癌)、皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌、非黑色素瘤皮肤癌和黑色素瘤)、卵巢癌、葡萄膜癌、子宫癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤和甲状腺癌。实体瘤的组织结构包括彼此相关的组织区室,包括实质(癌细胞)和癌细胞分散在其中的支持性基质细胞,并且所述支持性基质细胞可提供支持性微环境。

[0151] 一旦获得,通常使用锋利的解剖将肿瘤样品破碎成约1mm^{3}至约8mm^3、或约0.5mm^{3}至约4mm^{3}的小块,约2mm^{3}至约3mm^{3}特别有用。使用酶促肿瘤消化物由这些碎片培养TIL。此类肿瘤消化物可通过在酶培养基(例如,Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640缓冲液、2mM谷氨酸、10μg/ml庆大霉素(gentamicin)、30单位/ml脱氧核糖核酸酶和1.0mg/ml胶原酶)中孵育,之后机械解离(例如,使用组织解离器)来产生。肿瘤消化物可通过以下方式产生:将肿瘤放置在酶培养基中,并且机械解离肿瘤大约1分钟,之后在37℃下在5% CO_2中孵育30分钟,之后在前述条件下重复机械解离和孵育的循环,直到仅存在小组织块。在此过程结束时,如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞,则可执行使用FICOLL支化亲水多糖的密度梯度分离来去除这些细胞。可使用本领域已知的替代方法,诸如描述于美国专利申请公开号2012/0244133A1中的那些,所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。任何前述方法都可以在本文所述的任何实施方案中用于扩增TIL的方法或治疗癌症的方法。

[0152] 一般来讲,收获的细胞悬浮液被称为“原代细胞群”或“新鲜收获的”细胞群。在一些实施方案中,破碎包括物理破碎,包括例如解剖以及消化。在一些实施方案中,破碎是物理破碎。在一些实施方案中,破碎是解剖。在一些实施方案中,破碎通过消化进行。在一些实施方案中,TIL最初可以由从患者获得的酶促肿瘤消化物和肿瘤碎片培养。

[0153] 在一些实施方案中,在肿瘤是实体瘤的情况下,肿瘤在获得肿瘤样品后经历物理破碎。在一些实施方案中,破碎在冷冻保存之前发生。在一些实施方案中,破碎在冷冻保存之后发生。在一些实施方案中,破碎在获得肿瘤之后且不存在任何冷冻保存的情况下发生。在一些实施方案中,将肿瘤破碎,并且将10个、20个、30个、40个或更多个碎片或块放置在每个容器中用于第一次扩增。在一些实施方案中,将肿瘤破碎,并且将30个或40个碎片或块放置在每个容器中用于第一次扩增。在一些实施方案中,将肿瘤破碎,并且将40个碎片或块放置在每个容器中用于第一次扩增。在一些实施方案中,多个碎片包含约4个至约50个碎片,其中每个碎片具有约27mm^{3}的体积。在一些实施方案中,多个碎片包含约30个至约60个碎片,总体积为约1300mm^{3}至约1500mm^3。在一些实施方案中,多个碎片包含约50个碎片,总体积为约1350mm^3。在一些实施方案中,多个碎片包含约50个碎片,总质量为约1克至约1.5克。在一些实施方案中,多个碎片包含约4个碎片。

[0154] 在一些实施方案中,TIL从肿瘤碎片获得。在一些实施方案中,肿瘤碎片通过锋利的解剖获得。在一些实施方案中,肿瘤碎片在约1mm^{3}与10mm^{3}之间。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约1mm^{3}至8mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约0.5mm^{3}至4mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约1mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约2mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约3mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约4mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约5mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约6mm^3。在一些实施方案中,肿瘤碎片为约7mm^3。在一些实施方

案中，肿瘤碎片为约8mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片为约9mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片为约10mm^3。

[0155] 在一些实施方案中，TIL从肿瘤消化物获得。在一些实施方案中，肿瘤消化物通过以下方式生成：在酶培养基(例如但不限于RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/ml庆大霉素、30U/ml脱氧核糖核酸酶和1.0mg/ml胶原酶)中孵育机械解离的肿瘤，之后机械解离(GentleMACS,Miltenyi Biotec,Auburn,Calif.)。在一些实施方案中，机械分离的肿瘤将被破碎成大约1mm^{3}的块。将肿瘤放置在酶培养基中之后，可以将肿瘤机械解离大约1分钟。然后可以将溶液在37℃下在5% CO_2中孵育30分钟，并且然后可以再次机械破坏大约1分钟。在37℃下在5% CO_2中再次孵育30分钟后，可以将肿瘤第三次机械破坏大约1分钟。在一些实施方案中，在第三次机械破坏之后，如果存在大块的组织，则可以对样品施加一次或两次另外的机械解离，在37℃下在5% CO_2中另外孵育30分钟或不另外孵育30分钟。在一些实施方案中，在最终孵育结束时，如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞，则可执行使用FICOLL的密度梯度分离以去除这些细胞。

[0156] 在一些实施方案中，细胞可以任选地在样品收获后冷冻或冷冻保存，并在进入扩增阶段之前冷冻储存。

[0157] 在一些实施方案中，本文的方法可以从先前失败的前REP扩增中挽救TIL样品。在某些实施方案中，肿瘤样品从先前已经具有经受TIL扩增技术的样品的受试者分离。在一些实施方案中，先前的TIL扩增技术包括前REP扩增。在一些实施方案中，前REP扩增包括向来自受试者的解聚的肿瘤样品施用IL-2。在一些实施方案中，在前REP扩增中，向肿瘤样品或向由肿瘤样品扩增的TIL施用的唯一的T细胞刺激细胞因子是IL-2。在一些实施方案中，先前的TIL扩增技术失败了。在一些实施方案中，当TIL扩增技术未扩增足够数量的TIL时，它就失败了。在一些实施方案中，足够数量的TIL多于1000个、5000个、10,000个、20,000个、30,000个、40,000个、50,000个、60,000个、70,000个、80,000个、90,000个或100,000个TIL。在一些实施方案中，当TIL扩增技术未引起足够的TIL倍数扩增时，它就失败了。在一些实施方案中，足够的TIL倍数扩增为大于50倍、100倍、1000倍、2000倍、3000倍、4000倍、5000倍、6000倍、7000倍、8000倍、9000倍或10,000倍扩增。在一些实施方案中，相同肿瘤样品的一部分用于先前的TIL扩增技术和本文公开的TIL扩增方法。在一些实施方案中，两种不同的样品从相同受试者分离。在一些实施方案中，本文所述的方法能够提供比先前扩增技术更多数量或倍数扩增的TIL。在一些实施方案中，本文所述的方法能够提供临床可用数量的TIL，其中先前的扩增技术不能提供该数量的TIL。

[0158] 用于TIL扩增的两步法的概述

[0159] 在某些激活和扩增TIL的方法中，除了使用饲养细胞之外，还采用了多步骤过程。此多步骤过程包括至少一个快速扩增方案(REP)步骤，之前是单独的前REP步骤。

[0160] 多步骤TIL制造中的第一次扩增步骤：前REP

[0161] 多步骤TIL制造过程从前REP或第一次扩增开始。一般来讲，前REP使用已被破碎和/或酶消化的肿瘤样品开始，并且向肿瘤样品中添加一种或多种选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合的T细胞刺激细胞因子以减缓肿瘤样品内的TIL的细胞因子驱动的生长。前REP或第一次扩增步骤可能需要2周与几个月之间的任何时间。前REP可以从获得年轻TIL开始，年轻TIL在向受试者/患者施用后能够增加复制周期，并且因此可相对于老TIL

(即,在向受试者/患者施用之前进一步经历了更多轮复制的TIL)提供另外的治疗益处。

[0162] 在一些实施方案中,在前REP期间,肿瘤组织或来自肿瘤组织的细胞在标准实验室培养基(包括但不限于RPMI)中生长,并且用试剂(诸如照射的饲养细胞和抗CD3抗体)处理以实现期望效果,诸如增加TIL的数量和/或富集含有期望细胞表面标志物或其他结构特征、生化特征或功能特征的细胞群。前REP可利用实验室级试剂(假设实验室级试剂在随后的REP阶段期间被稀释),使得更容易采用替代策略来改进TIL生产。因此,在一些实施方案中,所公开的TLR激动剂和/或肽或肽模拟物可以在前REP阶段期间包含在培养基中。在一些实施方案中,前REP培养物可以包含IL-2。

[0163] 在一些情况下,在解剖或消化肿瘤碎片之后,在有利于肿瘤中TIL和其他细胞生长的条件下,将所得细胞在含有一种或多种选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合的T细胞刺激细胞因子的培养基中培养。在本领域的标准方法中,将肿瘤消化物在包含灭活人AB血清的、含6000U/ml的IL-2但不含IL-7、IL-15或IL-21的培养基中的2ml孔中孵育。在本发明的一些实施方案中,添加300U/ml-6000U/ml的IL-2。在本发明的一些实施方案中,添加100ng/ml-5000ng/ml的IL-15。在本发明的一些实施方案中,添加10U/ml至7,000U/ml的IL-7和/或IL-21。在本发明的一些实施方案中,添加100ng/ml-5000ng/ml的IL-15并且添加10U/ml至7,000U/ml的IL-7或IL-21。在本发明的一些实施方案中,添加100ng/ml-5000ng/ml的IL-15,添加300U/ml-6000U/ml的IL-2,并且添加10U/ml至7,000U/ml的IL-7和/或IL-21。在前REP期间,将此原代细胞群培养数天至数月的时间段,从而产生本体TIL群,通常为约1×10^8个本体TIL细胞。

[0164] 在一个方面,本公开提供了在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法,其包括在包含IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而扩增TIL群。在一些实施方案中,培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于0.5ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中,所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml,任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0165] 在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于1U/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于2U/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于20U/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在一些实施方案中,所利用的IL-15的最终浓度小于20,000U/ml,任选地小于18,000U/ml、16,000U/ml、14,000U/ml、12,000U/ml、10,000U/ml、8000U/ml、6000U/ml、4000U/ml或2000U/ml。

[0166] 在一些情况下,在前REP或第一次扩增步骤期间,TIL培养物由移植小(约$2mm^3$)肿瘤碎片开始,或由将酶消化的肿瘤组织的单细胞悬浮液的$1x10^6$个活细胞铺种到含有一种或多种T细胞刺激细胞因子的2ml完全培养基(基于RPMI1640的补充有10%人血清的培养基)中开始。将培养物维持在每毫升$5x10^5$个至$2x10^6$个细胞的细胞浓度下,直到可获得数百万个TIL细胞,通常需要2周-4周。通过细胞因子分泌测定筛选多种独立培养物,以识别自体肿瘤细胞(如果可获得)和HLA-A2+肿瘤细胞系。然后将表现出最高细胞因子分泌的两种至六种独立TIL培养物在具有每毫升6000U的IL-2的完全培养基中进一步扩增,直到细胞数超

过$5x10^7$个细胞(此细胞数通常在肿瘤切除后3周-6周达到)。

[0167] 在一些情况下,前REP期间的第一次扩增在封闭系统生物反应器(诸如G-REX-10或G-REX-100)中执行。

[0168] 在将要将遗传修饰的TIL用于疗法的情况下,可以在REP步骤中的第二次扩增之前使第一TIL群(也称为本体TIL群)经受遗传修饰。

[0169] 在采用前REP步骤的常规方法中,一旦TIL已经在IL-2的存在下经历扩增、并且已经达到开始REP所需的适当细胞数或已经经历持续预定时间段的前REP,就会出现前REP与REP之间的分界。在各种实施方案中,根据所使用的制造方案,当获得的TIL的数量是$1x10^6$个、$10x10^6$个、$4x10^6$个或$40x10^6$个细胞时,可完成前REP。在另一个实施方案中,当达成的培养持续时间距破碎发生的时间为3天至14天、或至多9天至14天时,可完成前REP。然后,可将TIL直接冷冻保存以用于进一步使用,或者过渡至REP。

[0170] 在一些情况下,从前REP或第一次扩增步骤中获得的TIL被储存,直到被分型以供选择。在一些情况下,不储存从第一次扩增获得的TIL,并且直接进行第二次扩增或REP步骤。在一些情况下,在第一次扩增之后且在第二次扩增或REP步骤之前不冷冻保存从前REP步骤获得的TIL。

[0171] 多步骤TIL制造中的第二个和随后的扩增步骤:REP

[0172] 在多步骤TIL制造中,在一些情况下,在收获和初始本体加工(即,前REP)之后扩增TIL细胞群的数量。这种进一步的扩增被称为第二次扩增,其可以包括在本领域中通常被称为快速扩增方案(REP)的扩增过程。第二次扩增或REP通常使用包含透气容器中的多种组分的培养基完成,所述组分包括饲养细胞、细胞因子来源和抗CD3抗体。在一些情况下,可以使用本领域技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器执行第二次扩增或REP,并且可以进行7天-14天或更长时间。在一些实施方案中,第二个步骤和随后的步骤不含饲养细胞。

[0173] 在一些情况下,可以使用本领域已知的方法在透气容器中执行第二次扩增或REP。例如,在一种或多种选自IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合的T细胞刺激细胞因子的存在下,可以使用非特异性T细胞受体刺激快速扩增TIL。非特异性T细胞受体刺激物可以包括例如抗CD3抗体,诸如约30ng/ml的OKT3、小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,N.J.或Miltenyi Biotech,Auburn,Calif.商购获得)或UCHT-1(可从BioLegend,San Diego,Calif.,USA商购获得)。任选地在T细胞生长因子(诸如300U/ml IL-2)的存在下,可以通过在第二次扩增期间包括一种或多种抗原(包括其抗原性部分,诸如癌症的表位),在体外扩增TIL以诱导TIL的进一步刺激,所述抗原可以任选地从载体表达,诸如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3μM MART-1:26-35(27L)或gpl 00:209-217(210M)。其他合适的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌症抗原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2、或其抗原性部分。TIL还可通过使用脉冲到MHC单倍型匹配的抗原呈递细胞上的相同癌症抗原的再刺激来快速扩增。或者,TIL可以使用例如照射的自体淋巴细胞或使用照射的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激。在一些实施方案中,再刺激作为第二次扩增的一部分发生。在一些实施方案中,第二次扩增在照射的自体淋巴细胞的存在下或在照射的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2的情况下发生。

[0174] 在一些情况下,第二次扩增或REP可以在补充的细胞培养基中进行,所述补充的细胞培养基包含一种或多种T细胞刺激细胞因子IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合、

OKT-3、和抗原呈递饲养细胞。在一些情况下，抗原呈递饲养细胞(APC)是PBMC(外周血单核细胞)。在一些情况下，快速扩增和/或第二次扩增中的TIL与PBMC和/或抗原呈递细胞的比率为1比25和1比500。在一些情况下，REP和/或第二次扩增在具有本体TIL的烧瓶中执行，其中将本体TIL与100倍或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/ml OKT3抗CD3抗体和3000U/ml IL-2混合在150ml培养基中。进行培养基更换(通常经由呼吸用新鲜培养基更换1/2或2/3培养基)，直到细胞转移到替代生长室。替代生长室包括G-REX烧瓶和其他透气容器。

[0175] 在一个方面，第二次扩增或REP可以在包含IL-15的补充的细胞培养基中进行，从而扩增TIL群。在一些实施方案中，培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于0.5ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml，任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0176] 在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于2U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于20U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于20,000U/ml，任选地小于18,000U/ml、16,000U/ml、14,000U/ml、12,000U/ml、10,000U/ml、8000U/ml、6000U/ml、4000U/ml或2000U/ml。

[0177] 在一些情况下，执行第二次扩增或REP，并且其还包括针对优异肿瘤反应性选择TIL的步骤。可使用本领域已知的任何选择方法。例如，描述于美国专利申请公开号2016/0010058A1中的方法可用于针对优异肿瘤反应性选择TIL，所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。任选地，可以在第二次扩增(包括被称为REP扩增的扩增)之后使用本领域已知的标准测定来执行细胞活力测定。例如，可以对本体TIL的样品进行台盼蓝排除测定，所述台盼蓝排除测定选择性地标记死细胞并允许活力评估。在一些情况下，可以使用Cellometer K2自动细胞计数器(Nexcelom Bioscience,Lawrence,Mass.)对TIL样品进行计数和活力测定。

[0178] 在一些情况下，除了第二次扩增之外，还可以执行另外的扩增步骤。

[0179] 在一些实施方案中，用于本文所述的方法的一种或多种T细胞刺激细胞因子选自由以下组成的组：IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。在一些实施方案中，用于第一培养基的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约10U/ml至约7,000U/ml。

[0180] 在某些实施方案中，用于本文所述的前REP方法的培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在某些实施方案中，用于REP方法的培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在具体的实施方案中，用于前REP方法的培养基不包含IL-2。在具体的实施方案中，用于REP方法的培养基不包含IL-2。在具体的实施方案中，用于前REP方法的培养基不包含IL-21。在具体的实施方案中，用于REP方法的培养基不包含IL-21。

[0181] 在一些实施方案中，用于REP方法的培养基还包含IL-7。在一些实施方案中，用于REP方法的培养基中的IL-7细胞因子的最终浓度为约10U/ml至约7,000U/ml。

[0182] 在一些实施方案中，用于前REP方法的培养基以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6

天组成的组的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中，用于前REP方法的培养基以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换。在一个实施方案中，用于前REP方法的培养基的30％至99％以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换。

[0183] 在一些实施方案中，用于REP方法的培养基以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换。在一个实施方案中，用于REP方法的培养基的30％至99％以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换。

[0184] 饲养细胞

[0185] 在许多情况下，在基于饲养细胞的多步骤TIL扩增方法中使用的饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。PBMC使用标准方法(诸如FICOLL-Paque梯度分离)获得。一般来讲，同种异体PBMC经由照射或热处理被灭活，并且用于REP程序。在一些情况下，如果培养14天后的活细胞总数少于第0天投入培养物的初始活细胞数，则PBMC被认为是复制缺陷的并被接受用于TIL扩增程序。

[0186] 在一些情况下，如果在OKT3和IL-2的存在下培养的活细胞在第7天和第14天的总数相比于在REP第0天和/或第二次扩增第0天(即，第二次扩增的开始日)投入培养物的初始活细胞数未增加，则PBMC被认为是复制缺陷的并被接受用于本文所述的TIL扩增程序。在一些情况下，PBMC在30ng/ml OKT3抗体和3000U/ml IL-2的存在下培养。

[0187] 在一些情况下，第二次扩增或REP程序需要约2.5×10^{9}个饲养细胞与12.5×10^{6}个TIL至100×10^{6}个TIL的比率。

[0188] 在第二次扩增步骤或REP之后，可以收获细胞。在一些实施方案中，在一个、两个、三个、四个或更多个扩增步骤之后收获TIL。TIL可以以任何适当且无菌的方式收获，包括例如通过离心。用于TIL收获的方法是本领域众所周知的，并且任何此类已知的方法都可以用于本过程。

[0189] 在一些实施方案中，饲养细胞表达TCR激动剂。在一些实施方案中，饲养细胞表达T细胞共刺激分子的激动剂。在一些实施方案中，TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂在饲养细胞的表面上表达。

[0190] 在一个实施方案中，T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。在一个实施方案中，T细胞共刺激分子的激动剂是CD137(即，4-1BB)激动剂。在一个实施方案中，T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。

[0191] 在一些实施方案中，4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[0192] 在一些实施方案中，对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[0193] 用于扩增和激活TIL的一步法

[0194] 在本文公开的一步过程的一个方面，多步TIL扩增方案的前REP步骤被完全跳过。在不使用前REP步骤的这种单一扩增步骤期间(即，在一步TIL激活和扩增过程中)，可以在21天或更短的时间内获得大量TIL。在一些实施方案中，使用根据饲养细胞的一步REP样过程扩增TIL。在一些实施方案中，使用不含饲养细胞的一步REP样过程扩增TIL。在一些实施方案中，在使用粒子(诸如Dynabead)的一步过程中扩增TIL。在一些实施方案中，在使用四聚体抗体复合物(TAC)(诸如来自Stemcell Technologies的Immunocult人T细胞激活物)的

一步过程中扩增TIL。在一些实施方案中，在使用纳米基质(诸如来自Miltenyi Biotec的T细胞Transact)的一步过程中扩增TIL。在一些实施方案中，在一步TIL扩增过程期间对TIL进行工程改造或遗传修饰。

[0195] 在一些实施方案中，TIL来自使用上述前REP的先前失败。在某些实施方案中，前REP失败是未能在23天内使用前REP方案将分离自人受试者的TIL扩增至4×10^7个细胞。在其他实施方案中，前REP失败是未能将分离自人受试者的TIL扩增至超过原始数量的100倍。在其他实施方案中，前REP失败是未能使用前REP方案将分离自人受试者的TIL扩增至$1x10^6$个或$1x10^7$个细胞。在某些实施方案中，本文提供的方法能够挽救前REP失败，即，由已经历前REP失败的样品扩增细胞。

[0196] 在本文公开的方法的一个方面，在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法包括在培养基中培养解聚的肿瘤样品，其中使TIL与T细胞受体(TCR)激动剂、CD28激动剂和T细胞刺激细胞因子接触。在一些实施方案中，使TIL与4-1BB激动剂接触。

[0197] 在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^{3}至4mm^{3}的肿瘤碎片(例如，通过机械方法生成的那些)。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为0.5mm^{3}至1mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为1mm^{3}至1.5mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为1.5mm^{3}至2mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为2mm^{3}至2.5mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为2.5mm^{3}至3mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为3mm^{3}至3.5mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为3.5mm^{3}至4mm^3。在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[0198] 在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含大小为25mm^{3}至30mm^{3}的肿瘤碎片(例如，通过解剖方法生成的那些)。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^{3}至26mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^{3}至27mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^{3}至28mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^{3}至29mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^{3}至30mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为26mm^{3}至28mm^3。在一些实施方案中，肿瘤碎片的大小为25mm^3、26mm^3、27mm^3、28mm^3、29mm^{3}或30mm^3。在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[0199] 在一些实施方案中，培养基以1天至2天、2天至3天、3天至4天、4天至5天、或5天至6天的范围内的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中，时间间隔是1天。在一些实施方案中，时间间隔是2天。在一些实施方案中，时间间隔是3天。在一些实施方案中，时间间隔是4天。在一些实施方案中，时间间隔是5天。在一些实施方案中，时间间隔是6天。

[0200] 在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为100U/ml至200U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为200U/ml至300U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为300U/ml至400U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为400U/ml至500U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为500U/ml至600U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为600U/ml至700U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为700U/ml至800U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为800U/ml至900U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为900U/ml至1000U/ml。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子的最终浓度为1，

000U/ml至1,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为1,500U/ml至2,000U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为2,000U/ml至2,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为2,500U/ml至3,000U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为3,000U/ml至3,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为3,500U/ml至4,000U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为4,000U/ml至4,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为4,500U/ml至5,000U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为5,000U/ml至5,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为5,500U/ml至6,000U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为6,000U/ml至6,500U/ml。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为6,500U/ml至7,000U/ml。

[0201] 在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子的最终浓度为100ng/ml-10,000ng/ml。在一些实施方案中,所利用的T细胞刺激细胞因子的最终浓度小于10,000ng/ml,任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。在一些实施方案中,所利用的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约300ng/ml。在一些实施方案中,所利用的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约1000ng/ml。在另外的实施方案中,所利用的T细胞刺激细胞因子的最终浓度大于1000ng/ml。在一些实施方案中,第二培养基中的T细胞刺激细胞因子的最终浓度大于100ng/ml。在另外的实施方案中,第二培养基中的T细胞刺激细胞因子的最终浓度大于100ng/ml至约1000ng/ml。在具体的实施方案中,第二培养基中的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约300ng/ml。

[0202] T细胞刺激细胞因子可以是任何有效刺激T细胞的细胞因子。在一些实施方案中,T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。

[0203] 在另一个方面,本公开提供了在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法,其包括在包含饲养细胞;TCR激动剂;和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而扩增TIL群。在一些实施方案中,培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于0.5ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中,培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中,所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml,任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0204] 在一些实施方案中,维持培养基的组分。在一些实施方案中,以1天至2天、2天至3天、3天至4天、4天至5天、或5天至6天的范围内的时间间隔更换培养基的30%至99%。在一些实施方案中,时间间隔是1天。在一些实施方案中,时间间隔是2天。在一些实施方案中,时间间隔是3天。在一些实施方案中,时间间隔是4天。在一些实施方案中,时间间隔是5天。在一些实施方案中,时间间隔是6天。

[0205] 此外,根据一步法,可以在不存在饲养细胞的情况下,使用T细胞受体(TCR)激动剂(例如,CD3激动剂)和T细胞共刺激分子的激动剂(例如,CD28激动剂)的组合来激活和扩增TIL。例如,TCR激动剂和CD28激动剂可以是彼此连接、或彼此复合、或连接纳米基质的抗体。

[0206] 在一个方面,本公开提供了在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法,其包括在包含TCR激动剂;T细胞共刺激分子的激动剂;和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而扩

增TIL群。在一些实施方案中，培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于0.5ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml，任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0207] 在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于2U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于20U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于20,000U/ml，任选地小于18,000U/ml、16,000U/ml、14,000U/ml、12,000U/ml、10,000U/ml、8000U/ml、6000U/ml、4000U/ml或2000U/ml。

[0208] 在一些实施方案中，培养基包含饲养细胞。在一些实施方案中，饲养细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中，饲养细胞是抗原呈递细胞(APC)。在一些实施方案中，饲养细胞表达T细胞受体(TCR)激动剂和/或CD28激动剂。在一些实施方案中，饲养细胞表达T细胞受体(TCR)激动剂和/或4-1BB激动剂，如Bartkowiak和Curran，Front Oncol，5:117(2015)中所述，所述文献以引用方式整体并入本文。在一些实施方案中，41BB激动剂是41BB配体。在一些实施方案中，T细胞受体(TCR)激动剂和/或CD28在饲养细胞的表面上表达。在一些实施方案中，对饲养细胞进行遗传修饰以表达T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中，T细胞激动剂是CD3激动剂。在一些实施方案中，CD3激动剂是OKT3或UCHT。在一些实施方案中，饲养细胞被遗传修饰以表达的T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。在一些实施方案中，对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。在一些实施方案中，培养基不包含饲养细胞。

[0209] 在一些实施方案中，CD28激动剂可溶于培养基。在一些实施方案中，TCR激动剂是CD3激动剂。在一些实施方案中，T细胞激动剂是CD3激动剂。在一些实施方案中，CD-3激动剂是OKT3或UCHT。

[0210] 在一些实施方案中，TCR激动剂包含有包含两个连接在一起的抗CD3抗体的可溶性单特异性复合物。在一些实施方案中，CD28激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD28抗体的可溶性单特异性复合物。

[0211] 在一些实施方案中，培养基包含CD2激动剂。在一些实施方案中，CD2激动剂包含有包含连接在一起的两个抗CD2抗体的可溶性单特异性复合物。

[0212] 在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μl/ml-25μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μl/ml-1μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为1μl/ml-2μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为2μl/ml-5μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为5μl/ml-10μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为10μl/ml-15μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为15μl/ml-20μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为20μl/ml-25μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物是四聚体抗体复合物(TAC)。在一些实施方案中，每种TAC包含来自第一动物物种的两种抗体，所述两种抗体被来自第二物种的两种抗体分子结合，所述两种抗体分子与来自第一动物物种的

抗体的Fc部分特异性结合。在一些实施方案中，抗CD3抗体是OKT3抗体或UCHT1抗体。

[0213] 在另一个方面，本公开提供了用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含IL-15和包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质的培养基中培养TIL群，其中基质附接至TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂，其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm，并且其中所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[0214] 在一些实施方案中，TCR激动剂和/或CD28激动剂与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质连接，其中每种纳米基质的最大尺寸长度为1nm至500nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为1nm至50nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为50nm至100nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为100nm至150nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为150nm至200nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为200nm至250nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为250nm至300nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为300nm至350nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为350nm至400nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为400nm至450nm。在一些实施方案中，纳米基质的最大尺寸长度为450nm至500nm。

[0215] 在一些实施方案中，用于所述方法的TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至相同的聚合物链。在一些实施方案中，TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至不同的聚合物链。在一些实施方案中，TCR激动剂以25μg/mg基质附接至基质。在一些实施方案中，T细胞共刺激分子的激动剂以25μg/mg基质附接至基质。通常，激动剂共价附接至包含纳米基质内的基质的聚合物链。

[0216] 在一些实施方案中，TCR激动剂和CD28激动剂附接至相同的聚合物链。在一些实施方案中，TCR激动剂和CD28激动剂附接至不同的聚合物链。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约5μg/mg纳米基质至约10μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约10μg/mg纳米基质至约15μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约15μg/mg纳米基质至约20μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约20μg/mg纳米基质至约25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约25μg/mg纳米基质至约30μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约30μg/mg纳米基质至约35μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约35μg/mg纳米基质至约40μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约40μg/mg纳米基质至约45μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂或其片段以约45μg/mg纳米基质至约50μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，TCR激动剂是CD3激动剂。

[0217] 在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约5μg/mg纳米基质至约10μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约10μg/mg纳米基质至约15μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约15μg/mg纳米基质至约20μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约20μg/mg纳米基质至约25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片

段以约25μg/mg纳米基质至约30μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中,CD28激动剂或其片段以约30μg/mg纳米基质至约35μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中,CD28激动剂或其片段以约35μg/mg纳米基质至约40μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中,CD28激动剂或其片段以约40μg/mg纳米基质至约45μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中,CD28激动剂或其片段以约45μg/mg纳米基质至约50μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[0218] 在一些实施方案中,纳米基质还包含嵌入在聚合物链的基质之中或之内的磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体。在一些实施方案中,聚合物链的基质包含右旋糖酐的聚合物。在一些实施方案中,聚合物链是胶体聚合物链。

[0219] 在一些实施方案中,解聚的肿瘤样品中的纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:5。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:10。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:25。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:50。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:100。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:200。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:300。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:400。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:500。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:600。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:700。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:800。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:900。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:1,000。

[0220] 在一些实施方案中,解聚的肿瘤样品中的基质与TIL的数量比大于或等于1:500。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:500至1:750。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:750至1:1,000。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:1,000至1:1,250。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:1,250至1:1,500。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:1,500至1:1,750。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:1,750至1:2,000。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:2,000至1:2,250。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:2,250至1:2,500。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:2,500至1:2,750。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:2,750至1:3,000。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:3,000至1:3,500。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:3,500至1:4,000。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比为1:4,000至1:5,000。

[0221] 在一些实施方案中,激动剂是重组激动剂。在一些实施方案中,激动剂是抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,CD3激动剂是OKT3抗体或UCHT1抗体。

[0222] 在本文公开的方法的另一个方面,用于扩增TIL群的方法包括使TIL群与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质接触,其中基质附接至CD3激动剂和CD28激动剂,其中纳米基质向TIL群提供激活信号,从而激活并诱导TIL群增殖,其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm,并且其中所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[0223] 在一些实施方案中,与纳米基质接触的TIL群还包含肿瘤细胞。在一些实施方案

中，，将TIL群从受试者分离并且使其与纳米基质接触，而不需要在使TIL群与纳米基质接触之前进行另外的TIL群扩增过程。

[0224] 在一些实施方案中，使CD3激动剂和CD28激动剂附接至相同的聚合物链。在一些实施方案中，使CD3激动剂和CD28激动剂附接至不同的聚合物链。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约5μg/mg纳米基质至约10μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约10μg/mg纳米基质至约15μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约15μg/mg纳米基质至约20μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约20μg/mg纳米基质至约25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约25μg/mg纳米基质至约30μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约30μg/mg纳米基质至约35μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约35μg/mg纳米基质至约40μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约40μg/mg纳米基质至约45μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD3激动剂或其片段以约45μg/mg纳米基质至约50μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[0225] 在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约5μg/mg纳米基质至约10μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约10μg/mg纳米基质至约15μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约15μg/mg纳米基质至约20μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约20μg/mg纳米基质至约25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约25μg/mg纳米基质至约30μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约30μg/mg纳米基质至约35μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约35μg/mg纳米基质至约40μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约40μg/mg纳米基质至约45μg/mg纳米基质附接至纳米基质。在一些实施方案中，CD28激动剂或其片段以约45μg/mg纳米基质至约50μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[0226] 在一些实施方案中，纳米基质还包含嵌入在聚合物链的基质之中或之内的磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体。在一些实施方案中，聚合物链的基质包含右旋糖酐的聚合物。在一些实施方案中，聚合物链是胶体聚合物链。

[0227] 在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:5。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:10。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:25。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:50。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:100。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:200。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:300。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:400。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:500。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:600。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:700。在

一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:800。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:900。在一些实施方案中，纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:1,000。

[0228] 在一些实施方案中，基质与TIL的数量比大于或等于1:500。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:500至1:750。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:750至1:1,000。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:1,000至1:1,250。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:1,250至1:1,500。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:1,500至1:1,750。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:1,750至1:2,000。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:2,000至1:2,250。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:2,250至1:2,500。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:2,500至1:2,750。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:2,750至1:3,000。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:3,000至1:3,500。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:3,500至1:4,000。在一些实施方案中，基质与TIL的数量比为1:4,000至1:5,000。

[0229] 在一些实施方案中，激动剂是重组激动剂。在一些实施方案中，激动剂是抗体。在一些实施方案中，抗体是人源化抗体。在一些实施方案中，CD3激动剂是OKT3抗体或UCHT1抗体。

[0230] 在另一个方面，本公开提供了用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含IL-15；和包含抗CD3抗体或其片段的第一可溶性单特异性复合物、包含抗CD28抗体或其片段的第二可溶性单特异性复合物和包含抗CD2抗体或其片段的第三可溶性单特异性复合物的培养基中培养TIL群，其中每种可溶性单特异性复合物包含连接在一起的两种抗体或其片段，并且每种可溶性单特异性复合物的每种抗体或其片段与TIL群上的相同抗原特异性结合。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μL/ml-25μL/ml。在一些实施方案中，避免了对饲养细胞的需要。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于0.5ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于10ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml，任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0231] 在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于1U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于2U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于20U/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于200U/ml。在一些实施方案中，所利用的IL-15的最终浓度小于20,000U/ml，任选地小于18,000U/ml、16,000U/ml、14,000U/ml、12,000U/ml、10,000U/ml、8000U/ml、6000U/ml、4000U/ml或2000U/ml。

[0232] 在本文公开的方法的另一个方面，用于扩增TIL群的方法包括使TIL群与包含第一、第二和第三可溶性单特异性复合物的组合物接触，其中每种可溶性单特异性复合物包含连接在一起的两种抗体或其片段，其中每种可溶性单特异性复合物的每种抗体或其片段与TIL群上的相同抗原特异性结合，其中第一可溶性单特异性复合物包含抗CD3抗体，其中第二可溶性单特异性复合物包含抗CD28抗体，并且其中第三可溶性单特异性复合物包含抗CD2抗体，并且所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[0233] 在一些实施方案中，与组合物接触的TIL群还包含肿瘤细胞。在一些实施方案中，将TIL群从受试者分离并且使其与组合物接触，而不需要在使TIL群与组合物接触之前进行另外的TIL群扩增过程。

[0234] 在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μl/ml-25μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μl/ml-1μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为1μl/ml-2μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为2μl/ml-5μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为5μl/ml-10μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为10μl/ml-15μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为15μl/ml-20μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物的浓度为20μl/ml-25μl/ml。在一些实施方案中，可溶性单特异性复合物是四聚体抗体复合物(TAC)。在一些实施方案中，每种TAC包含来自第一动物物种的两种抗体，所述两种抗体被来自第二物种的两种抗体分子结合，所述两种抗体分子与来自第一动物物种的抗体的Fc部分特异性结合。在一些实施方案中，抗CD3抗体是OKT3抗体或UCHT1抗体。

[0235] 在一些实施方案中，从初始肿瘤破碎或解聚开始，将TIL扩增总共至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天或28天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共9天至25天、9天至21天、或9天至14天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多9天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多10天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多11天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多12天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多13天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多14天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多15天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多16天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多17天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多18天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多19天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多20天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多21天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多22天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多23天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多24天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多25天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多26天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多27天。在一些实施方案中，将TIL扩增总共至多28天。

[0236] 在一些实施方案中，将TIL群扩增500倍至500,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增500倍至1,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增500倍至4,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增1,000倍至2,500倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增2,500倍至5,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增5,000倍至10,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增10,000倍至20,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增20,000倍至30,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增30,000倍至40,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增40,000倍至50,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增50,000倍至100,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增100,000倍至150,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增150,000倍至200,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增200,000倍至250,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增250,000倍至300,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增300,000倍至350,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增350,000倍至400,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增400,000倍至450,000倍。在一些实施方案中，将TIL群扩增450,000倍至500,000倍。

[0237] 在一些实施方案中，将TIL群从100个至5x10^7个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从100个至1,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从1,000个至2,500个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从2,500个至5,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从5,000个至7,500个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从7,500个至10,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从10,000个至20,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从20,000个至30,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从30,000个至40,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从40,000个至50,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从50,000个至60,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从60,000个至70,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从70,000个至80,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从80,000个至90,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从90,000个至100,000个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从1x10^6个至2x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从2x10^6个至3x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从3x10^6个至4x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从4x10^6个至5x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从5x10^6个至6x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从6x10^6个至7x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从7x10^6个至8x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从8x10^6个至9x10^6个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从9x10^6个至1x10^7个TIL的初始TIL群扩增。在一些实施方案中，将TIL群从1x10^7个至5x10^7个TIL的初始TIL群扩增。

[0238] 在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少5,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少7,500倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少10,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少15,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少20,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少25,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少30,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少40,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少50,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少60,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少70,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少80,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少90,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少100,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少110,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少120,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少130,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少140,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少1,000倍至5,000倍。在一些实施方案中，第14天的这些倍数扩增发生在来自前REP失败的TIL中。

[0239] 在一些实施方案中，TIL群在扩增的第10天扩增至少150倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第10天扩增至少500倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第10天扩增至少750倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第10天扩增至少1000倍。在一些实施方案中，TIL

群在扩增的第10天扩增至少1500倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少2000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少2500倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少3000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少4000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少5000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少6000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少7000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少8000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少9000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第10天扩增至少10,000倍。在一些实施方案中,第10天的这些倍数扩增发生在来自前REP失败的TIL中。

[0240] 在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多150,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多5,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多7,500倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多10,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多15,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多20,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多25,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多30,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多40,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多50,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多60,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多70,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多80,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多90,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多110,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多120,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多130,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第14天扩增至多140,000倍。在一些实施方案中,第14天的这些倍数扩增发生在来自前REP失败的TIL中。

[0241] 在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少10,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少20,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少25,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少30,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少40,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少50,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少60,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少70,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少80,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少90,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少100,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少110,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少120,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少130,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少140,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少150,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少200,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少300,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至少400,000倍。在一些实施方案中,第21天的这些倍数扩增发生在来自前REP失败的TIL中。

[0242] 在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。在一些实施方案

中,TIL群在扩增的第21天扩增至多20,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多25,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多30,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多40,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多50,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多60,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多70,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多80,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多90,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多100,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多110,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多120,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多130,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多140,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多150,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多200,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多300,000倍。在一些实施方案中,TIL群在扩增的第21天扩增至多400,000倍。在一些实施方案中,第21天的这些倍数扩增发生在来自前REP失败的TIL中。

[0243] 在一些实施方案中,对TIL群的成员进行遗传修饰。在一些实施方案中,使用RNA指导的核酸酶对TIL群进行遗传修饰。在一些实施方案中,使用Cas9和至少一种指导RNA对TIL群进行遗传修饰。在一些实施方案中,对TIL群的成员进行表观遗传修饰。下文提供了遗传修饰的TIL的各种实施方案。

[0244] 在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少2%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少3%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少4%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少5%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少6%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少7%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少8%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少9%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少10%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少11%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少12%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少13%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少14%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少15%具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的少于10%具有中央记忆T细胞表型。

[0245] 在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的5%至50%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中,扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的10%至25%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案

中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的5％至10％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的10％至15％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的15％至20％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的20％至25％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的25％至30％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的30％至35％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的35％至40％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的40％至45％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的45％至50％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[0246] 在一些实施方案中，扩增TIL群以产生CD8+细胞丰度增加的扩增的TIL群。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了10％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了20％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了30％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了40％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了50％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了60％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了70％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了80％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了90％。在一些实施方案中，与TIL的起始群相比，TIL群在扩增后富集了100％。

[0247] 在另一个方面，本文公开的发明涉及一种组合物，其包含通过本文公开的任何方法产生的扩增的TIL群。

[0248] 扩增的TIL的表型特性

[0249] 在一些情况下，分析扩增的TIL的许多表型标志物的表达，包括本文所述的那些。在一些情况下，标志物选自：TCRα/β、CD57、CD28、CD4、CD27、CD56、CD8a、CD45RA、CD45RO、CD8a、CCR7、CD4、CD3、CD38和HLA-DR。在一些情况下，测量一种或多种调节性标志物的表达，即来自以下组：CD137、CD8a、Lag3、CD4、CD3、PD-1、TIM-3、CD69、CD8a、TIGIT、CD4、CD3、KLRG1和CD154。

[0250] 在一些情况下，记忆标志物是CCR7或CD62L。在一些情况下，还可以使用细胞因子释放测定来评价再刺激的TIL的细胞因子释放。在一些情况下，可以评估TIL响应用OKT3刺激或与自体肿瘤消化物共培养的干扰素-γ（IFN-γ）分泌。

[0251] 在一些情况下，评价TIL的各种调节性标志物，诸如TCRα/β、CD56、CD27、CD28、CD57、CD45RA、CD45RO、CD25、CD127、CD95、IL-2R、CCR7、CD62L、KLRG1和CD122。

[0252] T细胞刺激细胞因子

[0253] T细胞刺激细胞因子可以是任何有效刺激T细胞的细胞因子。在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。

[0254] 在一些实施方案中，本文公开的方法包括使解聚的肿瘤样品和/或TIL群与细胞因

子IL-15接触。在一些实施方案中，每隔一天使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以2天、3天、4天、5天或6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以2天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以3天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以4天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以5天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。在一些实施方案中，以6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-15接触。

[0255] T细胞刺激细胞因子的浓度在本文中表示为ng/ml或U(“单位”)/ml。术语国际单位(IU)和单位在本文中可互换使用。ng/ml与U/ml之间的单位转换可以基于所使用的细胞因子或甚至给定细胞因子的来源而变化。在一些实施方案中，2U/ml的T细胞刺激细胞因子等同于1ng/ml的T细胞刺激细胞因子。因此，20U/ml的T细胞刺激细胞因子等同于10ng/ml的T细胞刺激细胞因子等。在一些实施方案中，约2U/ml的T细胞刺激细胞因子等同于约1ng/ml的T细胞刺激细胞因子。如上所述，在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子是IL-2、IL-7、IL-15和/或IL-21。在一些实施方案中，本文提供的转化率可以上下浮动至多20％。例如，在一些实施方案中，1单位/ml等同于1.6mg/ml-2.4mg/ml。在一些实施方案中，本文提供的转化率可以上下浮动至多10％。例如，在一些实施方案中，1单位/ml等同于1.8mg/ml-2.2mg/ml。

[0256] 在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为0.5ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为0.5ng/ml至10ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为10ng/ml至25ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为25ng/ml至50ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为50ng/ml至75ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为75ng/ml至100ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为100ng/ml至200ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为200ng/ml至300ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为300ng/ml至400ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为400ng/ml至500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为500ng/ml至600ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为600ng/ml至700ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为700ng/ml至800ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为800ng/ml至900ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为900ng/ml至1000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1,000ng/ml至1,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1,500ng/ml至2,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为2,000ng/ml至2,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为2,500ng/ml至3,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为3,000ng/ml至3,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为3,500ng/ml至4,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终

浓度为4,000ng/ml至4,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为4,500ng/ml至5,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为5,000ng/ml至5,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为5,500ng/ml至6,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为6,000ng/ml至6,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为6,500ng/ml至7,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为7,000ng/ml至7,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为7,500ng/ml至8,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为8,000ng/ml至8,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为8,500ng/ml至9,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为9,000ng/ml至9,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为9,500ng/ml至10,000ng/ml。

[0257] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为2U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为20U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为2U/ml至20U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为20U/ml至50U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为50U/ml至100U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为100U/ml至150U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为150U/ml至200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为200U/ml至400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为400U/ml至600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为600U/ml至800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为800U/ml至1000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1000U/ml至1200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1200U/ml至1400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1400U/ml至1600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1600U/ml至1800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为1800U/ml至2000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为2000U/ml至3000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为3000U/ml至4000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为4000U/ml至5000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为5000U/ml至6000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为6000U/ml至7000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为7000U/ml至8000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为8000U/ml至9000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为9000U/ml至10,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为10,000U/ml至11,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为11,000U/ml至12,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞

因子IL-15的最终浓度为12,000U/ml至13,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为13,000U/ml至14,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为14,000U/ml至15,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为15,000U/ml至16,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为16,000U/ml至17,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为17,000U/ml至18,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为18,000U/ml至19,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-15的最终浓度为19,000U/ml至20,000U/ml。

[0258] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括使解聚的肿瘤样品和/或TIL群与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,每隔一天使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以2天、3天、4天、5天或6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以2天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以3天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以4天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以5天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。在一些实施方案中,以6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-7接触。

[0259] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为0.5ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为0.5ng/ml至10ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为10ng/ml至25ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为25ng/ml至50ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为50ng/ml至75ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为75ng/ml至100ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为100ng/ml至200ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为200ng/ml至300ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为300ng/ml至400ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为400ng/ml至500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为500ng/ml至600ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为600ng/ml至700ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为700ng/ml至800ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为800ng/ml至900ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为900ng/ml至1000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1,000ng/ml至1,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1,500ng/ml至2,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为2,000ng/ml至2,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为2,500ng/ml至3,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为3,000ng/ml至3,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为3,500ng/ml至4,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为4,000ng/ml至4,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为4,500ng/ml至5,000ng/ml。在一些实施方

案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为5,000ng/ml至5,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为5,500ng/ml至6,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为6,000ng/ml至6,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为6,500ng/ml至7,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为7,000ng/ml至7,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为7,500ng/ml至8,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为8,000ng/ml至8,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为8,500ng/ml至9,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为9,000ng/ml至9,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为9,500ng/ml至10,000ng/ml。

[0260] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为2U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为20U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为2U/ml至20U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为20U/ml至50U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为50U/ml至100U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为100U/ml至150U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为150U/ml至200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为200U/ml至400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为400U/ml至600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为600U/ml至800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为800U/ml至1000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1000U/ml至1200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1200U/ml至1400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1400U/ml至1600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1600U/ml至1800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为1800U/ml至2000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为2000U/ml至3000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为3000U/ml至4000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为4000U/ml至5000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为5000U/ml至6000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为6000U/ml至7000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为7000U/ml至8000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为8000U/ml至9000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为9000U/ml至10,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为10,000U/ml至11,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为11,000U/ml至12,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为12,000U/ml至13,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终

浓度为13,000U/ml至14,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为14,000U/ml至15,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为15,000U/ml至16,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为16,000U/ml至17,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为17,000U/ml至18,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为18,000U/ml至19,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-7的最终浓度为19,000U/ml至20,000U/ml。

[0261] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括使解聚的肿瘤样品和/或TIL群与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,每隔一天使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以2天、3天、4天、5天或6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以2天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以3天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以4天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以5天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。在一些实施方案中,以6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-21接触。

[0262] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为0.5ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为0.5ng/ml至10ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为10ng/ml至25ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为25ng/ml至50ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为50ng/ml至75ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为75ng/ml至100ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为100ng/ml至200ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为200ng/ml至300ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为300ng/ml至400ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为400ng/ml至500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为500ng/ml至600ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为600ng/ml至700ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为700ng/ml至800ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为800ng/ml至900ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为900ng/ml至1000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1,000ng/ml至1,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1,500ng/ml至2,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为2,000ng/ml至2,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为2,500ng/ml至3,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为3,000ng/ml至3,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为3,500ng/ml至4,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为4,000ng/ml至4,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为4,500ng/ml至5,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的

最终浓度为5,000ng/ml至5,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为5,500ng/ml至6,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为6,000ng/ml至6,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为6,500ng/ml至7,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为7,000ng/ml至7,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为7,500ng/ml至8,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为8,000ng/ml至8,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为8,500ng/ml至9,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为9,000ng/ml至9,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为9,500ng/ml至10,000ng/ml。

[0263] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为2U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为20U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为2U/ml至20U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为20U/ml至50U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为50U/ml至100U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为100U/ml至150U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为150U/ml至200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为200U/ml至400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为400U/ml至600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为600U/ml至800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为800U/ml至1000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1000U/ml至1200U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1200U/ml至1400U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1400U/ml至1600U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1600U/ml至1800U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为1800U/ml至2000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为2000U/ml至3000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为3000U/ml至4000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为4000U/ml至5000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为5000U/ml至6000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为6000U/ml至7000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为7000U/ml至8000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为8000U/ml至9000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为9000U/ml至10,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为10,000U/ml至11,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为11,000U/ml至12,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为12,000U/ml至13,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为13,000U/ml至14,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的

细胞因子IL-21的最终浓度为14,000U/ml至15,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为15,000U/ml至16,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为16,000U/ml至17,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为17,000U/ml至18,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为18,000U/ml至19,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-21的最终浓度为19,000U/ml至20,000U/ml。

[0264] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括使解聚的肿瘤样品和/或TIL群与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,每隔一天使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以2天、3天、4天、5天或6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以2天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以3天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以4天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以5天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。在一些实施方案中,以6天的时间间隔使TIL与细胞因子IL-2接触。

[0265] 在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为0.51ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为0.5ng/ml至10ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为10ng/ml至25ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为25ng/ml至50ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为50ng/ml至75ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为75ng/ml至100ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为100ng/ml至200ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为200ng/ml至300ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为300ng/ml至400ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为400ng/ml至500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为500ng/ml至600ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为600ng/ml至700ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为700ng/ml至800ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为800ng/ml至900ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为900ng/ml至1000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1,000ng/ml至1,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1,500ng/ml至2,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为2,000ng/ml至2,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为2,500ng/ml至3,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为3,000ng/ml至3,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为3,500ng/ml至4,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为4,000ng/ml至4,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为4,500ng/ml至5,000ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为5,000ng/ml至5,500ng/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为5,500ng/ml至6,000ng/ml。在一些实

施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为6,000ng/ml至6,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为6,500ng/ml至7,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为7,000ng/ml至7,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为7,500ng/ml至8,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为8,000ng/ml至8,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为8,500ng/ml至9,000ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为9,000ng/ml至9,500ng/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为9,500ng/ml至10,000ng/ml。

[0266] 在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为2U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为20U/ml至20,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为2U/ml至20U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为20U/ml至50U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为50U/ml至100U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为100U/ml至150U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为150U/ml至200U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为200U/ml至400U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为400U/ml至600U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为600U/ml至800U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为800U/ml至1000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1000U/ml至1200U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1200U/ml至1400U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1400U/ml至1600U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1600U/ml至1800U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为1800U/ml至2000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为2000U/ml至3000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为3000U/ml至4000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为4000U/ml至5000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为5000U/ml至6000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为6000U/ml至7000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为7000U/ml至8000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为8000U/ml至9000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为9000U/ml至10,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为10,000U/ml至11,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为11,000U/ml至12,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为12,000U/ml至13,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为13,000U/ml至14,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为14,000U/ml至15,000U/ml。在一些实施方案中，细胞培养基中的细胞因子IL-2的

最终浓度为15,000U/ml至16,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为16,000U/ml至17,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为17,000U/ml至18,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为18,000U/ml至19,000U/ml。在一些实施方案中,细胞培养基中的细胞因子IL-2的最终浓度为19,000U/ml至20,000U/ml。

[0267] TIL的遗传修饰

[0268] 在一些情况下,对TIL进行遗传工程改造以包括另外的功能,包括但不限于高亲和力T细胞受体(TCR),例如靶向肿瘤相关抗原(诸如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)的TCR,或结合肿瘤相关细胞表面分子(例如,间皮素)或谱系限制性细胞表面分子(例如,EGFR、CD19或HER2)的嵌合抗原受体(CAR)。

[0269] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含一种或多种内源基因的表达和/或功能降低。在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含能够降低一种或多种内源靶基因的表达和/或功能的基因调控系统。在一些实施方案中,这些内源基因包括ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)在一些实施方案中,这些基因包括SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1、NFKBIA。在一些实施方案中,这些基因包括SOCS1和至少一种、两种或更多种选自PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的基因。在一些实施方案中,这些基因包括SOCS1和ZC3H12A。

[0270] 本文中,术语“修饰的TIL”涵盖包含导致一种或多种内源靶基因的表达和/或功能降低的、通过非天然方式实现的一种或多种基因组修饰的TIL,以及包含能够降低一种或多种内源靶基因的表达和/或功能的非天然存在的基因调控系统的TIL。术语“修饰的TIL”可与术语“工程化TIL”或“eTIL™”互换使用。本文中,“未修饰的TIL”或“对照TIL”是指其中基因组未通过非天然存在的方式进行修饰,并且不包含非天然存在的基因调控系统或包含对照基因调控系统(例如,空载体对照、非靶向gRNA、加扰siRNA等)的TIL或TIL群。天然存在的、一种或多种内源基因的表达和/或功能降低的TIL包括在术语未修饰的TIL或对照TIL下。

[0271] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含内源靶基因的基因组DNA序列中的一个或多个修饰(例如,一个或多个核酸的插入、缺失或突变),从而导致内源基因的表达和/或功能降低。在此类实施方案中,修饰的TIL包含“修饰的内源靶基因”。在一些实施方案中,基因组DNA序列中的修饰降低或抑制mRNA转录,从而降低编码的mRNA转录物和蛋白质的表达水平。在一些实施方案中,基因组DNA序列中的修饰降低或抑制mRNA翻译,从而降低编码的蛋白质的表达水平。在一些实施方案中,基因组DNA序列中的修饰编码与内源蛋白的未修饰(即野生型)型式(例如,下文所述的显性负突变体)相比功能降低或改变的修饰的内源蛋白。在一些实施方案中,修饰的TIL包含至少一种、两种或更多种选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的修饰的内源靶基因。在一些实施方案中,修

饰的TIL包含修饰的内源靶基因SOCS1和至少一种、两种或更多种选自PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的修饰的内源靶基因。在一些实施方案中，修饰的TIL包含修饰的内源靶基因SOCS1和ZC3H12A。

[0272] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含内源靶基因以外的基因组位置处的一种或多种基因组修饰，所述修饰导致内源靶基因的表达和/或功能降低或导致内源蛋白的修饰型式的表达。例如，在一些实施方案中，将编码基因调控系统的多核苷酸序列插入到基因组中的一个或多个位置中，从而在表达基因调控系统时降低内源靶基因的表达和/或功能。在一些实施方案中，将编码内源蛋白的修饰型式的多核苷酸序列插入到基因组中的一个或多个位置处，其中与蛋白质的未修饰或野生型型式(例如，下文所述的显性负突变体)相比，蛋白质的修饰型式的功能降低。

[0273] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含一种或多种修饰的内源靶基因，其中与未修饰的TIL相比，所述一种或多种修饰导致由内源靶基因编码的基因产物(即，mRNA转录物或蛋白质)的表达和/或功能降低。例如，在一些实施方案中，修饰的TIL表现出mRNA转录物表达降低和/或蛋白质表达降低。在一些实施方案中，与未修饰的TIL中的基因产物的表达相比，修饰的TIL中的基因产物的表达降低至少5％。在一些实施方案中，与未修饰的TIL中的基因产物的表达相比，修饰的TIL中的基因产物的表达降低至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多。在一些实施方案中，与未修饰的TIL中的基因产物的表达相比，本文所述的修饰的TIL表现出由多种(例如，两种或更多种)内源靶基因编码的基因产物的表达和/或功能降低。例如，在一些实施方案中，与未修饰的TIL中的基因产物的表达相比，修饰的TIL表现出2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种内源靶基因的基因产物的表达和/或功能降低。

[0274] 在一些实施方案中，本公开提供了通过本文所述的方法制造的修饰的TIL，其中一种或多种内源靶基因或其部分被缺失(即，“敲除”)，使得修饰的TIL不表达mRNA转录物或蛋白质。在一些实施方案中，修饰的TIL包含多种内源靶基因或其部分的缺失。在一些实施方案中，修饰的TIL包含2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种内源靶基因的缺失。

[0275] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含一种或多种修饰的内源靶基因，其中与在未修饰的TIL中表达的对应蛋白(例如，“未修饰的内源蛋白”)的功能相比，对靶DNA序列的一种或多种修饰导致表达功能降低或改变的蛋白质(例如，“修饰的内源蛋白”)。在一些实施方案中，本文所述的修饰的TIL包含编码2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种修饰的内源蛋白的2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种修饰的内源靶基因。在一些实施方案中，修饰的内源蛋白表现出对由修饰的TIL表达或由另一种细胞表达的另一种蛋白质的降低或改变的结合亲和力；降低或改变的信号传导能力；降低或改变的酶活性；降低或改变的DNA结合活性；或者降低或改变的充当支架蛋白的能力。

[0276] 在一些实施方案中，修饰的内源靶基因包含一个或多个显性负突变。如本文所用，“显性负突变”是指靶基因的一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，使得编码的蛋白质对由未修饰的靶基因编码的蛋白质起拮抗作用。突变是显性负突变，因为负表型相对于对应的未修饰基因的正表型赋予基因优势。包含一个或多个显性负突变的基因和由其编码的蛋

白质被称为“显性负突变体”,例如,显性负基因和显性负蛋白质。在一些实施方案中,显性负突变体蛋白质由插入在TIL的基因组中一个或多个位置处的外源转基因编码。

[0277] 显性负性的各种机制是已知的。通常,显性负突变体的基因产物保留未修饰基因产物的某些功能,但缺乏未修饰基因产物的一种或多种关键的其他功能。这导致显性负突变体拮抗未修饰的基因产物。例如,作为说明性的实施方案,转录因子的显性负突变体可能缺少功能性激活结构域,但是保留功能性DNA结合结构域。在此实例中,显性负转录因子不能像未修饰的转录因子那样激活DNA的转录,但是显性负转录因子可以通过阻止未修饰的转录因子与转录因子结合位点的结合来间接抑制基因表达。作为另一个说明性的实施方案,充当二聚体的蛋白质的显性负突变是已知的。此类二聚体蛋白的显性负突变体可保留与未修饰的蛋白质二聚的能力,但是不能发挥其他功能。显性负单体通过与未修饰的单体二聚而形成异二聚体,阻止未修饰的单体形成功能性同二聚体。SOCS1基因的显性负突变是本领域已知的并且包括通过人和鼠SOCS1氨基酸序列的序列比对鉴定的鼠F59D突变体(参见例如Hanada等人,J Biol Chem,276:44:2(2001),40746-40754;和Suzuki等人,J Exp Med,193:4(2001),471-482)和人F58D突变体。

[0278] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低选自以下的一种或多种内源靶基因的表达和/或功能:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因的表达和/或功能。在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低选自SOCS1的一种或多种内源靶基因和选自PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种、两种或更多种修饰的内源靶基因的表达和/或功能。在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能。在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低选自以下的两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能。在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含基因调控系统,所述基因调控系统能够降低SOCS1和选自PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种、两种或更多种修饰的内源靶基因的表达和/或功能。在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含

基因调控系统，所述基因调控系统能够降低SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能。基因调控系统可以通过多种机制降低内源靶基因修饰的表达和/或功能，所述机制包括通过修饰内源靶基因的基因组DNA序列(例如，通过在基因组DNA序列中插入、缺失或突变一个或多个核酸)；通过调控内源靶基因的转录(例如，抑制或阻遏mRNA转录)；和/或通过调控内源靶基因的翻译(例如，通过mRNA降解)。

[0279] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统，所述基因调控系统包含：

[0280] (a)一种或多种核酸分子，其能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能。

[0281] (b)一种或多种多核苷酸，其编码能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能的一种或多种核酸分子。

[0282] (c)一种或多种蛋白质，其能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能；

[0283] (d)一种或多种多核苷酸，其编码能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能的一种或多种蛋白质；

[0284] (e)一种或多种指导RNA(gRNA)，其能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源基因中的靶DNA序列；

[0285] (f)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源基因中的靶DNA序列的一种或多种gRNA；

[0286] (g)一种或多种定点修饰多肽，其能够与gRNA相互作用并修饰选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因中的靶DNA序列；

[0287] (h)一种或多种多核苷酸，其编码能够与gRNA相互作用并修饰选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因中的靶DNA序列的定点修饰多肽；

[0288] (i)一种或多种指导DNA(gDNA)，其能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列；

[0289] (j)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列的一种或多种gDNA；

[0290] (k)一种或多种定点修饰多肽，其能够与gDNA相互作用并修饰选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因中的靶DNA序列；

[0291] (l)一种或多种多核苷酸，其编码能够与gDNA相互作用并修饰选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因中的靶DNA序列的定点修饰多肽；

[0292] (m)一种或多种gRNA，其能够结合由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源基因编码的靶mRNA序列；

[0293] (n)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因编码的靶mRNA序列的一种或多种gRNA；

[0294] (o)一种或多种定点修饰多肽，其能够与gRNA相互作用并修饰由选自SOCS1、

PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因编码的靶mRNA序列；

[0295] (p)一种或多种多核苷酸，其编码能够与gRNA相互作用并修饰由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的内源基因编码的靶mRNA序列的定点修饰多肽；或

[0296] (q)以上的任何组合。

[0297] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含基因调控系统，所述基因调控系统包含：

[0298] (a)两种或更多种核酸分子，其能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能。

[0299] (b)一种或多种多核苷酸，其编码能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能的两种或更多种核酸分子。

[0300] (c)两种或更多种蛋白质，其能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能；

[0301] (d)一种或多种多核苷酸，其编码能够降低由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源靶基因编码的基因产物的表达和/或改变所述基因产物的功能的两种或更多种蛋白质；

[0302] (e)两种或更多种指导RNA(gRNA)，其能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列；

[0303] (f)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列的两种或更多种gRNA；

[0304] (g)两种或更多种指导DNA(gDNA)，其能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列；

[0305] (h)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因中的靶DNA序列的两种或更多种gDNA；

[0306] (i)两种或更多种gRNA，其能够结合由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因编码的靶mRNA序列；

[0307] (j)一种或多种多核苷酸，其编码能够结合由选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的两种或更多种内源基因编码的靶mRNA序列的两种或更多种gRNA；

[0308] (k)以上的任何组合。

[0309] 在一些实施方案中，将编码基因调控系统的一种、两种或更多种多核苷酸插入到TIL的基因组中。在一些实施方案中，编码基因调控系统的一种、两种或更多种多核苷酸是附加型表达的，并且不插入到TIL的基因组中。

[0310] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含一种、两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含插入在一种或多种基因组基因座处的一种或多种外源转基因(例如，遗传“敲入”)。在一些实施方案中，一种、两种或更多种外源转基因编码可检测标记、安全转换系统、嵌合转换受体和/或工程化抗原特异性受体。

[0311] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL还包含编码可检测标

记的外源转基因。可检测标记的实例包括但不限于FLAG标记、聚组氨酸标记(例如,6xHis)、SNAP标记、Halo标记、cMyc标记、谷胱甘肽-S-转移酶标记、抗生物素蛋白、酶、荧光蛋白、发光蛋白、化学发光蛋白、生物发光蛋白和磷光蛋白。在一些实施方案中,荧光蛋白选自由以下组成的组:蓝色/UV蛋白(诸如BFP、TagBFP、mTagBFP2、Azurite、EBFP2、mKalama1、Sirius、Sapphire和T-Sapphire);青色蛋白(诸如CFP、eCFP、Cerulean、SCFP3A、mTurquoise、mTurquoise2、单体Midoriishi-Cyan、TagCFP和mTFP1);绿色蛋白(诸如:GFP、eGFP、meGFP(A208K突变)、Emerald、Superfolder GFP、单体Azami Green、TagGFP2、mUKG、mWasabi、Clover和mNeonGreen);黄色蛋白(诸如YFP、eYFP、Citrine、Venus、SYFP2和TagYFP);橙色蛋白(诸如单体Kusabira-Orange、mKOκ、mKO2、mOrange和mOrange2);红色蛋白(诸如RFP、mRaspberry、mCherry、mStrawberry、mTangerine、tdTomato、TagRFP、TagRFP-T、mApple、mRuby和mRuby2);远红外蛋白(诸如mPlum、HcRed-Tandem、mKate2、mNeptune和NirFP);近红外蛋白(诸如TagRFP657、IFP1.4和iRFP);长斯托克斯位移蛋白(诸如mKeima Red、LSS-mKate1、LSS-mKate2和mBeRFP);光激活蛋白(诸如PA-GFP、PAmCherry1和PATagRFP);光转化蛋白(诸如Kaede(绿色)、Kaede(红色)、KikGR1(绿色)、KikGR1(红色)、PS-CFP2、PS-CFP2、mEos2(绿色)、mEos2(红色)、mEos3.2(绿色)、mEos3.2(红色)、PSmOrange和PSmOrange);和光转换蛋白(诸如Dronpa)。在一些实施方案中,可检测标记可以选自AmCyan、AsRed、DsRed2、DsRed Express、E2-Crimson、HcRed、ZsGreen、ZsYellow、mCherry、mStrawberry、mOrange、mBanana、mPlum、mRasberry、tdTomato、DsRed单体和/或AcGFP,所有这些均可从Clontech获得。

[0312] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL还包含编码安全转换系统的外源转基因。安全转换系统(本领域中也称为自杀基因系统)包含编码一种或多种蛋白质的外源转基因,所述蛋白质能够在向受试者施用TIL后消除修饰的TIL。安全转换系统的实例是本领域已知的。例如,安全转换系统包括编码将无毒性前药转化为毒性化合物的蛋白质的基因,诸如单纯疱疹胸苷激酶(Herpes simplexthymidine kinase,Hsv-tk)和更昔洛韦(ganciclovir,GCV)系统(Hsv-tk/GCV)。Hsv-tk将无毒性GCV转化为导致细胞凋亡的细胞毒性化合物。因此,向已经用包含编码Hsv-tk蛋白的转基因的修饰的TIL治疗的受试者施用GCV可以选择性地消除修饰的TIL,同时保留内源TIL。(参见例如,Bonini等人,Science,1997,276(5319):1719-1724;Ciceri等人,Blood,2007,109(11):1828-1836;Bondanza等人,Blood2006,107(5):1828-1836,所述文献以引用方式整体并入本文)。

[0313] 另外的安全转换系统包括编码细胞表面标志物的基因,使得能够通过经由ADCC施用对细胞表面标志物具有特异性的单克隆抗体来消除修饰的TIL。在一些实施方案中,细胞表面标志物是CD20,并且修饰的TIL可以通过施用抗CD20单克隆抗体(诸如利妥昔单抗(Rituximab))来消除(参见例如,Introna等人,Hum Gene Ther,2000,11(4):611-620;Serafini等人,Hum Gene Ther,2004,14,63-76;vanMeerten等人,Gene Ther,2006,13,789-797,所述文献以引用方式整体并入本文)。使用EGF-R和西妥昔单抗(Cetuximab)或帕尼单抗(Panitumumab)的相似系统在国际PCT公开号WO 2018006880中有所描述,所述专利以引用方式整体并入本文。另外的安全转换系统包括编码促凋亡分子的转基因,所述促凋亡分子包含一个或多个用于二聚化的化学诱导剂(CID)的结合位点,使得能够通过施用CID来消除修饰的TIL,所述CID诱导促凋亡分子的寡聚化和凋亡途径的激活。在一些实施方案

中,促凋亡分子是Fas(也称为CD95)(Thomis等人,Blood,2001,97(5),1249-1257,所述文献以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,促凋亡分子是胱天蛋白酶9(Straathof等人,Blood,2005,105(11),4247-4254,所述文献以引用方式整体并入本文)。

[0314] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL还包含编码嵌合转换受体的外源转基因。嵌合转换受体是工程化细胞表面受体,其包含来自内源细胞表面受体的细胞外结构域和异源细胞内信号传导结构域,使得细胞外结构域对配体的识别导致信号级联的激活,所述信号级联与野生型形式的细胞表面受体所激活的信号级联不同。在一些实施方案中,嵌合转换受体包含与细胞内结构域融合的抑制性细胞表面受体的细胞外结构域,所述细胞内结构域导致传递激活信号而不是通常由抑制性细胞表面受体转导的抑制性信号。在特定的实施方案中,来源于已知抑制免疫效应细胞激活的细胞表面受体的细胞外结构域可以与激活细胞内结构域融合。然后,对应配体的衔接将激活信号级联,所述信号级联增加而不是抑制免疫效应细胞的激活。例如,在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含编码PD1-CD28转换受体的转基因,其中PD1的细胞外结构域与CD28的细胞内信号传导结构域融合(参见例如,Liu等人,Cancer Res 76:6(2016),1578-1590和Moon等人,Molecular Therapy 22(2014),S201,所述文献以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL包含编码CD200R的细胞外结构域和CD28的细胞内信号传导结构域的转基因(参见Oda等人,Blood 130:22(2017),2410-2419,所述文献以引用方式整体并入本文)。

[0315] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL还包含识别由靶细胞(诸如肿瘤细胞或抗原呈递细胞(APC))表达的蛋白质靶标的工程化抗原特异性受体,本文中称为“修饰的受体工程化细胞”或“修饰的RE细胞”。术语“工程化抗原受体”是指非天然存在的抗原特异性受体,诸如嵌合抗原受体(CAR)或重组T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,工程化抗原受体是CAR,其包含经由铰链和跨膜结构域与包含信号传导结构域的细胞质结构域融合的细胞外抗原结合结构域。在一些实施方案中,CAR细胞外结构域以MHC非依赖性方式与由靶细胞表达的抗原结合,从而导致RE细胞的激活和增殖。在一些实施方案中,CAR的细胞外结构域识别与抗体或其抗原结合片段融合的标记。在此类实施方案中,CAR的抗原特异性取决于标记的抗体的抗原特异性,使得单个CAR构建体可以用于通过用一种抗体取代另一种抗体来靶向多种不同的抗原(参见例如,美国专利号9,233,125和9,624,279;美国专利申请公开号20150238631和20180104354,所述专利以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中,CAR的细胞外结构域可包含来源于抗体的抗原结合片段。可用于本公开的抗原结合结构域包括例如scFv;抗体;抗体的抗原结合区;重链/轻链的可变区;和单链抗体。

[0316] 在一些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域可来源于TCR复合物ζ链(诸如CD3ξ信号传导结构域)、FcγRIII、FcεRI或T淋巴细胞激活结构域。在一些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域还包含共刺激结构域,例如4-1BB、CD28、CD40、MyD88或CD70结构域。在一些实施方案中,CAR的细胞内信号传导结构域包含两个共刺激结构域,例如4-1BB、CD28、CD40、MyD88或CD70结构域中的任意两个。示例性CAR结构和细胞内信号传导结构域是本领域已知的(参见例如,WO 2009/091826;US 20130287748;WO 2015/142675;WO 2014/055657;和WO 2015/090229,所述专利以引用方式并入本文)。

[0317] 对多种肿瘤抗原具有特异性的CAR是本领域已知的，例如CD171特异性CAR(Park等人,Mol Ther(2007)15(4):825-833)、EGFRvIII特异性CAR(Morgan等人,Hum Gene Ther(2012)23(10):1043-1053)、EGF-R特异性CAR(Kobold等人,J Natl Cancer Inst(2014)107(1):364)、碳酸酐酶K特异性CAR(Lamers等人,Biochem Soc Trans(2016)44(3):951-959)、FR-α特异性CAR(Kershaw等人,Clin Cancer Res(2006)12(20):6106-6015)、HER2特异性CAR(Ahmed等人,J Clin Oncol(2015)33(15)1688-1696;Nakazawa等人,Mol Ther(2011)19(12):2133-2143;Ahmed等人,Mol Ther(2009)17(10):1779-1787;Luo等人,Cell Res(2016)26(7):850-853;Morgan等人,Mol Ther(2010)18(4):843-851;Grada等人,Mol Ther Nucleic Acids(2013)9(2):32)、CEA特异性CAR(Katz等人,Clin Cancer Res(2015)21(14):3149-3159)、IL13Rα2特异性CAR(Brown等人,Clin Cancer Res(2015)21(18):4062-4072)、GD2特异性CAR(Louis等人,Blood(2011)118(23):6050-6056;Caruana等人,Nat Med(2015)21(5):524-529)、ErbB2特异性CAR(Wilkie等人,J Clin Immunol(2012)32(5):1059-1070)、VEGF-R特异性CAR(Chinnasamy等人,Cancer Res(2016)22(2):436-447)、FAP特异性CAR(Wang等人,Cancer Immunol Res(2014)2(2):154-166)、MSLN特异性CAR(Moon等人,Clin Cancer Res(2011)17(14):4719-30)、NKG2D特异性CAR(VanSeggelen等人,Mol Ther(2015)23(10):1600-1610)、CD19特异性CAR(Axicabtagene ciloleucel(Yescarta®)和Tisagenlecleucel(Kymriah®)。还参见Li等人,J Hematol和Oncol(2018)11(22)，其综述了肿瘤特异性CAR的临床试验。适合根据本公开使用的示例性CAR描述于下表2中。

[0318] 表2:示例性CAR构建体

[0319]

CAR 参考 ID	靶标	Ag 结合结构域	细胞内结构域	跨膜结构域	AA SEQ ID	NA SEQ ID
KSQCAR017	人 EGFR	西妥昔单抗 H225 scFv	CD3 ζ	CD8a 铰链	906	907
KSQCAR1909	人 CD19	FMC63 scFv	CD3 ζ	CD8a 铰链	908	909

[0320]

KSQCAR010	人 HER2	赫塞汀 (Herceptin) scFv	CD3 ζ	CD8a 铰链	910	911

[0321] 在一些实施方案中，工程化抗原受体是重组TCR。重组TCR包含已经从识别特定靶抗原的T细胞群分离并克隆的TCRα和/或TCRβ链。例如，TCRα和/或TCRβ基因(即，TRAC和TRBC)可以从分离自患有特定恶性肿瘤的个体的T细胞群或已经分离自用特异性肿瘤抗原或肿瘤细胞免疫的人源化小鼠的T细胞群中克隆而来。重组TCR通过与其内源对应物相同的机制识别抗原(例如，通过识别在靶细胞表面上表达的主要组织相容性复合物(MHC)蛋白的背景下呈递的其同源抗原)。这种抗原衔接刺激内源信号转导途径，从而导致TCR工程化细胞的激活和增殖。

[0322] 对肿瘤抗原具有特异性的重组TCR是本领域已知的，例如WT1特异性TCR(JTCR016,Juno Therapeutics;WT1-TCRc4，描述于美国专利申请公开号20160083449)、MART-1特异性TCR(包括DMF 4T克隆，描述于Morgan等人,Science 314(2006)126-129);DMF5T克隆，描述于Johnson等人,Blood 114(2009)535-546);和ID3T克隆，描述于van den Berg等人,

Mol.Ther.23(2015)1541-1550)、gp100特异性TCR(Johnson等人,Blood 114(2009)535-546)、CEA特异性TCR(Parkhurst等人,Mol Ther.19(2011)620-626)、NY-ESO和LAGE-1特异性TCR(1G4T克隆,描述于Robbins等人,J ClinOncol 26(2011)917-924;Robbins等人,Clin Cancer Res 21(2015)1019-1027;和Rapoport等人,Nature Medicine 21(2015)914-921)、和MAGE-A3特异性TCR(Morgan等人,J Immunother 36(2013)133-151)和Linette等人,Blood 122(2013)227-242)。(还参见,Debets等人,Seminars in Immunology 23(2016)10-21)。

[0323] 为了生成重组TCR,使天然TRAC(SEQ ID NO:885)和TRBC(SEQ ID NO:886)蛋白序列与对感兴趣的蛋白质或肽具有特异性的TCR-α和TCR-β链可变区的C末端融合。例如,工程化TCR可以识别NY-ESO肽(SLLMWITQC,SEQ ID NO:887),诸如1G4 TCR或95:LY TCR(Robbins等人,Journal of Immunology 2008 180:6116-6131)。在此类说明性实施方案中,配对的1G4-TCRα/β链分别包含SEQ ID NO:888和889,并且配对的95:LY-TCRα/β链分别包含SEQ ID NO:890和891。重组TCR可以识别MART-1肽(AAGIGILTV,SEQ ID NO:892),诸如DMF4和DMF5 TCR(Robbins等人,Journal of Immunology 2008 180:6116-6131)。在此类说明性实施方案中,配对的DMF4-TCRα/β链分别包含SEQ ID NO:893和894,并且配对的DMF5-TCRα/β链分别包含SEQ ID NO:895和896。重组TCR可以识别WT-1肽(RMFPNAPYL,SEQ ID NO:897),诸如DLT TCR(Robbins等人,Journal of Immunology 2008 180:6116-6131)。在此类说明性实施方案中,配对的高亲和力DLT-TCRα/β链分别包含SEQ ID NO:898和899。

[0324] 可以生成编码重组TCRα和TCRβ链蛋白的密码子优化的DNA序列,使得两条TCR链的表达以化学计量的方式从单个启动子驱动。在这种实施方案中,可以将P2A序列(SEQ ID NO:900)插入到编码TCRβ和TCRα链的DNA序列之间,使得编码重组TCR链的表达盒包含以下格式:TCRβ-P2A-TCRα。作为说明性实施方案,由这种盒表达的1G4 NY-ESO特异性TCR的蛋白质序列将包含SEQ ID NO:901,由这种盒表达的95:LY NY-ESO特异性TCR的蛋白质序列将包含SEQ ID NO:902,由这种盒表达的DMF4 MART1特异性TCR的蛋白质序列将包含SEQ ID NO:903,由这种盒表达的DMF5 MART1特异性TCR的蛋白质序列将包含SEQ ID NO:904,并且由这种盒表达的DLT WT1特异性TCR的蛋白质序列将包含SEQ ID NO:905。

[0325] 在一些实施方案中,工程化抗原受体针对选自以下的靶抗原:分化分子簇,诸如CD3、CD4、CD8、CD16、CD24、CD25、CD33、CD34、CD45、CD64、CD71、CD78、CD80(也称为B7-1)、CD86(也称为B7-2)、CD96、CD116、CD117、CD123、CD133和CD138、CD371(也称为CLL1);肿瘤相关表面抗原,诸如5T4、BCMA(也称为CD269和TNFRSF17,UniProt#Q02223)、癌胚抗原(CEA)、碳酸酐酶9(CAIX或MN/CAIX)、CD19、CD20、CD22、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂诸如GD2、ELF2M、导管上皮粘蛋白、肝配蛋白B2、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、ErbB2(HER2/neu)、FCRL5(UniProt#Q68SN8)、FKBP11(UniProt#Q9NYL4)、神经胶质瘤相关抗原、糖鞘脂、gp36、GPRC5D(UniProt#Q9NZD1)、mut hsp70-2、肠羧基酯酶、IGF-I受体、ITGA8(UniProt#P53708)、KAMP3、LAGE-1a、MAGE、间皮素、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、NKG2D、Nkp30、NY-ESO-1、PAP、前列腺酶、前列腺癌肿瘤抗原-1(PCTA-1)、前列腺特异性抗原(PSA)、PSMA、前列腺素(prostein)、RAGE-1、ROR1、RU1(SFMBT1)、RU2(DCDC2)、SLAMF7(UniProt#Q9NQ25)、存活素、TAG-72和端粒酶;呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合物(MHC)分子;肿瘤基质抗原,诸如纤连蛋白的额外结构域A(EDA)和额外结构域B(EDB);腱生蛋白C的A1结构域(TnC

A1)和成纤维细胞相关蛋白(FAP);细胞因子受体,诸如表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR变体III(EGFRvIII)、TFGβ-R或其组分(诸如内皮糖蛋白);主要组织相容性复合物(MHC)分子;病毒特异性表面抗原,诸如HIV特异性抗原(诸如HIV gp120);EBV特异性抗原、CMV特异性抗原、HPV特异性抗原、Lassa病毒特异性抗原、流感病毒特异性抗原以及这些表面抗原的任何衍生物或变体。

[0326] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含一种、两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能降低。在一些实施方案中,这些内源基因包括ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)

[0327] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中,修饰的TIL包含SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0328] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含SOCS1和PTPN2的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和PTPN2的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中,修饰的TIL包含SOCS1和PTPN2的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和PTPN2的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0329] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中,修饰的TIL包含SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0330] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中,修饰的TIL包含PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0331] 在一些实施方案中,本公开提供了制造修饰的TIL的方法,所述修饰的TIL包含PTPN2和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统,并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中,修饰的TIL包含PTPN2和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和CBLB的表达和/或功能的

基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0332] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0333] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含SOCS1和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0334] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含PTPN2和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0335] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0336] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含SOCS1和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0337] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含CBLB和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含CBLB和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0338] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0339] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修

饰的TIL包含ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0340] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0341] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含CBLB和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含CBLB和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0342] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含在细胞表面上表达的CAR或重组TCR。在一些实施方案中，修饰的TIL包含RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统，并且还包含编码CAR或重组TCR的重组表达载体。

[0343] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含能够降低一种或多种内源靶基因的表达和/或功能的基因调控系统。在一些实施方案中，这些内源基因包括ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421，其以引用方式整体并入本文。)

[0344] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和PTPN2的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和PTPN2的表达和/或功能的基因调控系统。

[0345] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统。

[0346] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和ZC3H12A的表达和/或功能的基因调控系统。

[0347] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统。

[0348] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和CBLB的表达和/或功能的

基因调控系统。

[0349] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和CBLB的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和CBLB的表达和/或功能的基因调控系统。

[0350] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统。

[0351] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统。

[0352] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统。

[0353] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含CBLB和RC3H1的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和RC3H1的表达和/或功能的基因调控系统。

[0354] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低PTPN2和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统。

[0355] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低ZC3H12A和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统。

[0356] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低SOCS1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统。

[0357] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含CBLB和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低CBLB和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统。

[0358] 在一些实施方案中，本公开提供了制造修饰的TIL的方法，所述修饰的TIL包含RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能降低或包含能够降低RC3H1和NFKBIA的表达和/或功能的基因调控系统。

[0359] 效应子功能

[0360] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含选自以下的一种或多种内源靶基因的表达和/或功能降低(或能够降低其表达和/或功能的基因调控系统)：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A(参见国际公开号WO2019/178422、WO 2019/178420和WO

2019/178421,所述专利以引用方式整体并入本文),并且表现出一种或多种免疫细胞效应子功能的增加。在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL包含选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种或多种内源靶基因的表达和/或功能降低(或能够降低其表达和/或功能的基因调控系统),并且表现出一种或多种免疫细胞效应子功能的增加。在本文中,术语"效应子功能"是指与针对靶细胞或靶抗原的免疫应答的生成、维持和/或增强相关的免疫细胞的功能。在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出以下特性中的一种或多种:向肿瘤的浸润或迁移增加,增殖增加,细胞活力增加或延长,对周围微环境中抑制因子的抗性增加使得细胞的激活状态延长或增加,促炎免疫因子(例如,促炎细胞因子、趋化因子和/或酶)的产量增加,细胞毒性增加,对耗竭的抗性增加和/或T_{cm}百分比增加。

[0361] 在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出向肿瘤的浸润增加。在一些实施方案中,修饰的TIL对肿瘤的浸润增加是指与在相同的时间段期间浸润到肿瘤中的未修饰的TIL的数量相比,在给定的时间段期间浸润到肿瘤中的修饰的TIL的数量增加。在一些实施方案中,与未修饰的免疫细胞相比,修饰的TIL表现出1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍的肿瘤浸润增加。可以通过从受试者中分离一个或多个肿瘤并通过流式细胞术、免疫组织化学和/或免疫荧光评估样品中修饰的免疫细胞的数量来测量肿瘤浸润。

[0362] 在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出细胞增殖增加。在这些实施方案中,结果是在给定的时间段之后,与未修饰的TIL相比,存在的修饰的TIL的数量增加。例如,在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,修饰的TIL表现出增殖速率增加,其中修饰的TIL以比未修饰的TIL更快的速率分裂。在一些实施方案中,与未修饰的免疫细胞相比,修饰的TIL表现出1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍的增殖速率增加。在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,修饰的TIL表现出增殖时间延长,其中修饰的TIL和未修饰的TIL以相似的速率分裂,但是其中修饰的TIL维持更长一段时间的增殖状态。在一些实施方案中,修饰的TIL维持增殖状态的时间比未修饰的免疫细胞长1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍。

[0363] 在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出细胞活力增加或延长。在此类实施方案中,结果是在给定的时间段之后,与未修饰的TIL相比,存在的修饰的TIL的数量增加。例如,在一些实施方案中,本文所述的修饰的TIL保持活力并且持续的时间比未修饰的免疫细胞长1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍。

[0364] 在一些实施方案中,与未修饰的TIL相比,通过本文所述的方法制造的修饰的TIL

表现出对抑制因子的抗性增加。示例性抑制因子包括免疫检查点分子(例如,PD1、PDL1、CTLA4、LAG3、IDO)和/或抑制性细胞因子(例如,IL-10、TGFβ)的信号传导。

[0365] 在一些实施方案中,与未修饰的T细胞相比,通过本文所述的方法制造的修饰的T细胞表现出对T细胞耗竭的抗性增加。T细胞耗竭是抗原特异性T细胞功能障碍的一种状态,其特征在于效应子功能降低并导致随后的抗原特异性T细胞的缺失。在一些实施方案中,耗竭的T细胞缺乏响应于抗原而增殖的能力,表现出细胞因子产量降低,和/或表现出针对靶细胞(诸如肿瘤细胞)的细胞毒性降低。在一些实施方案中,耗竭的T细胞通过细胞表面标志物和转录因子的改变的表达来鉴定,诸如通过降低的CD122和CD127的细胞表面表达;增加的抑制性细胞表面标志物(诸如PD1、LAG3、CD244、CD160、TIM3和/或CTLA4)的表达;和/或增加的转录因子(诸如Blimp1、NFAT和/或BATF)的表达。在一些实施方案中,耗竭的T细胞表现出改变的敏感性细胞因子信号传导,诸如对TGFβ信号传导的敏感性增加和/或对IL-7和IL-15信号传导的敏感性降低。T细胞耗竭可以例如通过将T细胞与靶细胞群共培养并测量T细胞增殖、细胞因子产量和/或靶细胞的裂解来确定。在一些实施方案中,将本文所述的修饰的TIL与靶细胞群(例如,自体肿瘤细胞或已经被工程化以表达靶肿瘤抗原的细胞系)共培养,并测量效应细胞增殖、细胞因子产量和/或靶细胞裂解。然后将这些结果与从靶细胞和对照免疫细胞群(诸如未修饰的TIL或具有对照修饰的免疫效应细胞)的共培养获得的结果进行比较。

[0366] 在一些实施方案中,通过与从对照免疫细胞群观察到的细胞因子产量相比,修饰的TIL的一种或多种细胞因子(例如,IFNγ、TNFα或IL-2)的产量增加证明了对T细胞耗竭的抗性。在一些实施方案中,与来自对照免疫细胞群的细胞因子产量相比,修饰的TIL的细胞因子产量增加了1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍(或更多倍),这表明对T细胞耗竭的抗性增加。在一些实施方案中,通过与从对照免疫细胞群观察到的增殖相比,修饰的TIL的增殖增加证明了对T细胞耗竭的抗性。在一些实施方案中,与对照免疫细胞群的增殖相比,修饰的TIL的增殖增加了1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍(或更多倍),这表明对T细胞耗竭的抗性增加。在一些实施方案中,通过与从对照免疫细胞群观察到的靶细胞裂解相比,修饰的TIL的靶细胞裂解增加证明了对T细胞耗竭的抗性。在一些实施方案中,与对照免疫细胞群的靶细胞裂解相比,修饰的TIL的靶细胞裂解增加了1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍(或更多倍),这表明对T细胞耗竭的抗性增加。

[0367] 在一些实施方案中,在体外或离体制造过程期间,测量了与对照免疫细胞群相比的修饰的TIL的耗竭。例如,在一些实施方案中,根据本文所述的方法修饰从肿瘤碎片分离的TIL,然后将其在一轮或多轮扩增中扩增以产生修饰的TIL群。在此类实施方案中,可以在收获之后并且在第一轮扩增之前,在第一轮扩增之后但是在第二轮扩增之前和/或在第一轮和第二轮扩增之后立即确定修饰的TIL的耗竭。在一些实施方案中,在将修饰的TIL转移

到受试者之后的一个或多个时间点测量与对照免疫细胞群相比的修饰的TIL的耗竭。例如，在一些实施方案中，修饰的细胞根据本文所述的方法产生，并且被施用于受试者。然后可以在转移之后的多个时间点从受试者获取样品，以确定修饰的TIL在体内随时间推移的耗竭。

[0368] 在一些实施方案中，与未修饰的TIL相比，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出促炎免疫因子的表达或产量增加。促炎免疫因子的实例包括溶细胞因子，诸如粒酶B、穿孔素(perforin)和颗粒溶素(granulysin)；和促炎细胞因子，诸如干扰素(IFNα、IFNβ、IFNγ)、TNFα、IL-1β、IL-12、IL-2、IL-17、CXCL8和/或IL-6。

[0369] 在一些实施方案中，与未修饰的TIL相比，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出针对靶细胞的细胞毒性增加。在一些实施方案中，与未修饰的免疫细胞相比，修饰的TIL表现出1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多倍的针对靶细胞的细胞毒性的增加。

[0370] 用于测量免疫效应子功能的测定是本领域已知的。例如，肿瘤浸润可以通过以下方式测量：从受试者分离肿瘤，并且通过流式细胞术、免疫组织化学和/或免疫荧光来确定存在于肿瘤中的淋巴细胞的总数和/或表型。细胞表面受体表达可以通过流式细胞术、免疫组织化学、免疫荧光、蛋白质印迹和/或qPCR来确定。细胞因子和趋化因子的表达和产量可以通过流式细胞术、免疫组织化学、免疫荧光、蛋白质印迹、ELISA和/或qPCR来确定。对细胞外刺激(例如，细胞因子、抑制性配体或抗原)的应答性或敏感性可以通过测定响应于所述刺激的细胞增殖和/或下游信号传导途径的激活(例如下游信号传导中间体的磷酸化)来测量。细胞毒性可以通过本领域已知的靶细胞裂解测定来测量，包括修饰的TIL与靶细胞的体外或离体共培养以及体内鼠肿瘤模型，诸如整个实施例中所述的那些。

[0371] 内源途径和基因的调控

[0372] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的TIL表现出选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的一种、两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能降低。关于内源靶基因的更多细节提供于下表3中。在此类实施方案中，一种、两种或更多种内源靶基因的表达或功能降低增强了免疫细胞的一种或多种效应子功能。

[0373] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含细胞因子信号传导抑制因子SOCS1(SOCS1)基因的表达和/或功能降低。SOCS1蛋白包含C末端SOCS盒基序、SH2结构域、ESS结构域和N末端KIR结构域。已发现称为激酶抑制区(KIR)的12个氨基酸残基在SOCS1负调控JAK1、TYK2和JAK2酪氨酸激酶功能的能力中至关重要。

[0374] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含PTPN2基因的表达和/或功能降低。蛋白酪氨酸磷酸酶家族(PTP)通过其磷酸酶催化结构域使磷酸酪氨酸残基去磷酸化。PTPN2充当TCR和细胞因子两者的制动因子，它们通过JAK/STAT信号传导复合物发信号，并且因此充当信号1和信号3两者上的检查点。T细胞与抗原衔接并激活TCR之后，激酶Lck和Fyn通过酪氨酸残基的磷酸化在下游扩增阳性信号。PTPN2用于使Lck和Fyn两者去磷酸化，从而减弱TCR信号传导。此外，在T细胞遭遇细胞因子和通过共同γ链受体复合物(其通过JAK/STAT信号传导来传递阳性信号)进行信号传导后，PTPN2也由STAT1和STAT3的去磷酸化而减弱。PTPN2损失对T细胞功能的总功能影响是通过TCR降低暴发性T细胞激活所需的激活阈值，以及对增强生长和分化的细胞因子的超敏反应。

[0375] 此外，整只小鼠中的PTPN2的缺失增加细胞因子水平、非淋巴组织中的淋巴细胞浸

润和类风湿性关节炎样症状的早期迹象;这些小鼠不能存活超过5周龄。因此,PTPN2已被鉴定为对小鼠的出生后发育至关重要。与这种自身免疫表型一致,T细胞谱系中的Ptpn2从出生起的缺失也导致非淋巴组织中淋巴细胞浸润的增加。重要的是,成年小鼠T细胞中的Ptpn2的诱导型敲除不导致任何自身免疫表现。除了其在自身免疫中的作用之外,Ptpn2缺失还被鉴定为与小百分比的人T细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)相关联;并且在两阶段化学诱导的致癌性中增强皮肤肿瘤发展。

[0376] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含ZC3H12A基因的表达和/或功能降低。ZC3H12A基因编码Zc3h12,Zc3h12也称为MCPIP1和Regnase-1,它是一种恰好在CCCH型锌指基序的上游具有RNA酶结构域的RNA酶。通过其核酸酶活性,Zc3h12a通过结合这些基因的3'UTR内的保守茎环结构来靶向并破坏转录物(诸如IL-6)的mRNA。在T细胞中,Zc3h12a控制许多促炎基因(包括c-Rel、Ox40和IL-2)的转录物水平。Regnase-1激活是瞬时的并且经受负反馈机制的影响,所述机制包括蛋白酶体介导的降解或粘膜相关的淋巴组织1(MALT1)介导的切割。Regnase-1的脱泛素化活性促进聚泛素链的切割,从而稳定了原本被靶向降解的蛋白质靶标。TNF受体相关因子(TRAF)成员的Regnase-1脱泛素化调控JNK和NF-κB信号传导途径,并且能够在细胞应激条件下稳定缺氧诱导因子1A。Regnase-1的主要功能是通过特异性靶向不同细胞类型中的基因亚群,经由Regnase-1的核糖核酸酶活性促进mRNA衰变。在单核细胞中,Regnase-1下调IL-6和IL-12B mRNA,从而减轻炎症,而在T细胞中,它通过靶向c-Rel、Ox40和IL-2转录物来限制T细胞激活。在癌细胞中,Regnase-1通过抑制抗凋亡基因(包括Bcl2L1、Bcl2A1、RelB和Bcl3)来促进细胞凋亡。

[0377] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含CBLB基因的表达和/或功能降低。这种基因编码CBL-B,CBL-B也称为RNF56、Nbla00127和Cbl原癌基因B。CBL-B是一种E3泛素蛋白连接酶并且是CBL基因家族的成员。CBL-B充当T细胞激活的负调节因子。T细胞中的CBL-B的表达导致配体诱导的T细胞受体下调,从而控制抗原呈递期间的T细胞的激活程度。CBLB基因的突变与自身免疫病状(诸如1型糖尿病)相关。

[0378] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含RC3H1基因的表达和/或功能降低。这种基因编码环指和CCCH型结构域1,其也称为Roquin-1。Roquin-1识别并结合mRNA的3'UTR中的组成性衰变元件(CDE),从而导致mRNA脱腺苷酸化和降解。可变剪接导致多种转录变体。

[0379] 在一些实施方案中,通过本文所述的方法制造的修饰的效应细胞包含NFKBIA基因的表达和/或功能降低。这种基因编码IκBα,其也称为NFKB抑制剂α、MAD-3、NFKBI和EDAID2。IκBα是发挥抑制NF-κB转录因子的作用的细胞蛋白家族的一个成员。IκBα通过掩盖NF-κB蛋白的核定位信号(NLS)并且将NF-κB蛋白在细胞质中以失活状态保持隔离来抑制NF-κB。此外,IκBα阻断NF-κB转录因子结合DNA的能力,所述能力是NF-κB正常发挥作用所需的。NFKBIA基因在一些霍奇金淋巴瘤细胞(Hodgkin's lymphoma cell)中发生突变;此类突变使IκBα蛋白失活,从而导致NF-κB在淋巴瘤肿瘤细胞中长期具有活性,并且这种活性促进这些肿瘤细胞的恶性状态。

[0380] 表3:内源靶基因

[0381]

基因符号	基因名称	人 UniProt 参考号	人 NCBI 参考号	鼠 UniProt 参考号	鼠 NCBI 参考号
SOCS1	细胞因子信号传导抑制因子 1	O15524	8651 (SEQ ID NO: 1)	O35716	12703 (SEQ ID NO: 2)
PTPN2	蛋白酪氨酸磷酸酶，非受体 2 型	P17706	5771 (SEQ ID NO: 3)	Q06180	19255 (SEQ ID NO: 4)
ZC3H12A	核糖核酸内切酶 ZC3H12A	Q5D1E8	80149 (SEQ ID NO: 5)	Q5D1E7	230738 (SEQ ID NO: 6)
CBLB	Cbl 原癌基因 B	Q13191	868 (SEQ ID NO:7)	Q3TTA7	208650 (SEQ ID NO:8)
RC3H1	环指和 CCCH 型结构域 1	Q5TC82	149041 (SEQ ID NO:9)	Q4VGL6	381305 (SEQ ID NO:10)
NFKBIA	NFKB 抑制剂 α	P25963	4792 (SEQ ID NO:11)	Q9Z1E3	18035 (SEQ ID NO:12)

[0382] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1或NFKBIA中的任何一种、两种或更多种的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含CBLB的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含CBLB的表达和/或功能降低。

[0383] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含SOCS1的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含SOCS1的表达和/或功能降低。

[0384] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含PTPN2的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含PTPN2的表达和/或功能降低。

[0385] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、RC3H1和NFKBIA的至少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含ZC3H12A的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、RC3H1和NFKBIA的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含ZC3H12A的表达和/或功能降低。

[0386] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、ZC3H12A和NFKBIA的至少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含RC3H1的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、ZC3H12A和NFKBIA的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含RC3H1的表达和/或功能降低。

[0387] 在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、ZC3H12A和RC3H1的至

少一种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含NFKBIA的表达和/或功能降低。在一些实施方案中，修饰的TIL包含选自CBLB、SOCS1、PTPN2、ZC3H12A和RC3H1的至少两种内源靶基因的表达和/或功能降低，并且还包含NFKBIA的表达和/或功能降低。

[0388] 基因调控系统

[0389] 本文中，术语“基因调控系统”是指在引入细胞中时能够修饰内源靶DNA序列从而调控编码的基因产物的表达或功能的蛋白质、核酸或它们的组合。适用于本公开的方法的多种基因调控系统是本领域已知的，包括但不限于shRNA、siRNA、锌指核酸酶系统、TALEN系统和CRISPR/Cas系统。基因调控系统包括基因编辑系统，包括锌指核酸酶系统、TALEN系统和CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中，基因调控系统是基因编辑系统。适用于本公开的方法的基因编辑系统是本领域已知的，包括但不限于锌指核酸酶系统、TALEN系统和CRISPR/Cas系统。

[0390] 如本文所用，“调控”在提及基因调控系统对内源靶基因的作用时涵盖内源靶基因序列的任何变化、内源靶基因的表观遗传状态的任何变化、和/或由内源靶基因编码的蛋白质的表达或功能的任何变化。

[0391] 在一些实施方案中，基因调控系统可介导内源靶基因序列的变化，例如，通过将一个或多个突变引入内源靶序列中，诸如通过在内源靶序列中插入或缺失一个或多个核酸。可以介导内源靶序列的改变的示例性机制包括但不限于非同源末端连接(NHEJ)(例如，经典或替代)、微同源性介导的末端连接(MMEJ)、同源性定向修复(例如，内源供体模板介导的)、SDSA(合成依赖性链退火)、单链退火或单链入侵。

[0392] 在一些实施方案中，基因调控系统可介导内源靶序列的表观遗传状态的变化。例如，在一些实施方案中，基因调控系统可介导内源靶基因DNA的共价修饰(例如，胞嘧啶甲基化和羟甲基化)或相关组蛋白的共价修饰(例如，赖氨酸乙酰化、赖氨酸和精氨酸甲基化、丝氨酸和苏氨酸磷酸化以及赖氨酸泛素化和类泛素化)。

[0393] 在一些实施方案中，基因调控系统可介导由内源靶基因编码的蛋白质的表达的变化。在此类实施方案中，基因调控系统可通过修饰内源靶DNA序列或通过作用于由DNA序列编码的mRNA产物来调控编码的蛋白质的表达。在一些实施方案中，基因调控系统可以导致修饰的内源蛋白的表达。在此类实施方案中，由基因调控系统介导的对内源DNA序列的修饰导致内源蛋白的表达，所述内源蛋白与未修饰的TIL中的对应内源蛋白相比，表现出降低的功能。在此类实施方案中，与未修饰的免疫细胞中对应的内源蛋白的表达水平相比，修饰的内源蛋白的表达水平可增加、降低或者可以相同或基本上相似。

[0394] 基于核酸的基因调控系统

[0395] 在一些实施方案中，本公开提供了核酸基因调控系统，其包含能够降低选自以下的至少一种、两种或更多种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种核酸：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421，其以引用方式整体并入本文。)在一些实施方案中，本公开提供了核酸基

因调控系统，其包含能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种核酸。在一些实施方案中，本公开提供了核酸基因调控系统，其包含能够降低SOCS1和选自PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种、两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能的核酸。在一些实施方案中，本公开提供了通过本文所述的方法制造的修饰的TIL，其包含此类基因调控系统。如本文所用，基于核酸的基因调控系统是包含一种或多种核酸分子的系统，所述核酸分子能够调控内源靶基因的表达而无需外源蛋白。在一些实施方案中，基因调控系统包含与靶核酸序列互补的RNA干扰分子或反义RNA分子。

[0396] “反义RNA分子”是指与mRNA转录物互补的RNA分子，无论长度如何。反义RNA分子是指可以引入细胞、组织或受试者中并通过不依赖于内源基因沉默途径而是依赖于RNA酶H介导的靶mRNA转录物的降解的机制导致内源靶基因产物表达降低的单链RNA分子。在一些实施方案中，反义核酸包含修饰的骨架，例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或本领域已知的其他骨架，或可包含非天然的核苷间键联。在一些实施方案中，反义核酸可以包含锁核酸(LNA)。

[0397] 如本文所用，“RNA干扰分子”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降低的表达的RNA多核苷酸。示例性RNA干扰剂包括微小RNA(在本文中也称为“miRNA”)、短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、RNA适体和吗啉代。

[0398] 在一些实施方案中，基因调控系统包含一种或多种miRNA。miRNA是天然存在的，长度约21-25个核苷酸的小非编码RNA分子。miRNA与一种或多种靶mRNA分子至少部分互补。miRNA可以通过翻译抑制、mRNA的切割和/或脱腺苷酸化来下调(例如，降低)内源靶基因产物的表达。

[0399] 在一些实施方案中，基因调控系统包含一种或多种shRNA。shRNA是长度约50个-70个核苷酸的单链RNA分子，其形成茎环结构并导致互补mRNA序列的降解。shRNA可以被克隆到质粒或非复制型重组病毒载体中以引入细胞内，并且导致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翻译和表达的稳定且一致的抑制。

[0400] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含一种或多种siRNA。siRNA是指长度通常约21个-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)的多蛋白复合物缔合，在此期间，“过客”有义链被酶切割。然后，由于序列同源性，包含在激活的RISC中的反义“指导”链将RISC指导至对应的mRNA，并且相同的核酸酶切割靶mRNA，从而导致特异性基因沉默。siRNA的长度最佳为18个、19个、20个、21个、22个、23个或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序列的降解。siRNA和shRNA在Fire等人，Nature，391:19，1998和美国专利号7，732，417；8，202，846和8，383，599中进一步描述。

[0401] 在一些实施方案中，基因调控系统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联连接。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。

[0402] 在一些实施方案中，基因调控系统包含核酸分子，所述核酸分子结合与表4、5、9-12和17-22中所示的一组基因组坐标所限定的DN A序列编码的RNA序列具有至少90％同一

性的靶RNA序列。在整个本申请中,参考的基因组坐标基于来自可在国家生物技术信息中心网站获得的基因组参考联盟(Genome Reference Consortium)的人类基因组的GRCh38(也称为hg38)装配体中的基因组注释。用于在一个装配体与另一个装配体之间转换基因组坐标的工具和方法是本领域已知的,并且可以用于将本文提供的基因组坐标转换为人类基因组的另一个装配体中的对应坐标,包括转换为由相同机构或使用相同算法生成的较早期的装配体(例如,从GRCh38到GRCh37),以及转换为由不同机构或算法生成的装配体(例如,从GRCh38到NCBI33,由国际人类基因组测序联盟(International Human Genome Sequencing Consortium)生成)。本领域已知的可用方法和工具包括但不限于,NC BI基因组重映射服务(可从国家生物技术信息中心网站获得)、UCSC LiftOver(可从UCSC Genome Brower网站获得)和Assembly Conver ter(可从Ensembl.org网站获得)。

[0403] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0404] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4(人类基因组)或表5(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-35和56-187中的一种编码的人RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-35和56-187中的一种编码的人RNA序列具有100%同一性的靶人RNA序列。

[0405] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的核酸分子是靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:

23-55或23-200中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:23-35和56-187中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶人RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:23-55或23-200中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:23-35和56-187中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的靶人RNA序列。

[0406] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少一种选自本领域已知的那些的靶向SOCS1的siRNA分子或shRNA分子。例如，在一些实施方案中，靶向SOCS1的核酸分子是靶向SOCS1的siRNA，其包含选自SEQ ID NO:13-22的核酸序列。(参见国际PCT公开号WO 2017120996;WO 2018137295;WO 2017120998;和WO 2018137293，所述专利以引用方式整体并入本文)(表6)。在一些实施方案中，靶向SOCS1的siRNA分子或shRNA分子由选自SEQ ID NO:13-200的核酸序列编码。在一些实施方案中，靶向SOCS1的siRNA分子或shRNA分子由选自23-35和56-187的人核酸序列编码。在一些实施方案中，靶向SOCS1的核酸分子是靶向SOCS1的shRNA分子或siRNA分子，其结合选自SEQ ID NO:23-35的人靶序列(参见美国专利号8,324,369，其以引用方式整体并入本文)(表7)。在一些实施方案中，靶向SOCS1的核酸分子是靶向SOCS1的shRNA分子或siRNA分子，其结合选自SEQ ID NO:36-55的小鼠靶序列(参见美国专利号9,944,931，其以引用方式整体并入本文)(表8)。

[0407] 表4:SOCS1人类基因组坐标

[0408]

靶标	坐标	靶标	坐标
SOCS1	chr16:11255187-11255206	*SOCS1*	chr16:11254923-11254942
SOCS1	chr16:11255238-11255257	*SOCS1*	chr16:11255431-11255450
SOCS1	chr16:11255058-11255077	*SOCS1*	chr16:11255463-11255482
SOCS1	chr16:11255158-11255177	*SOCS1*	chr16:11255343-11255362
SOCS1	chr16:11255239-11255258	*SOCS1*	chr16:11255088-11255107
SOCS1	chr16:11255237-11255256	*SOCS1*	chr16:11254834-11254853
SOCS1	chr16:11255019-11255038	*SOCS1*	chr16:11254922-11254941
SOCS1	chr16:11255066-11255085	*SOCS1*	chr16:11255098-11255117
SOCS1	chr16:11255238-11255257	*SOCS1*	chr16:11254993-11255012
SOCS1	chr16:11255168-11255187	*SOCS1*	chr16:11254840-11254859
SOCS1	chr16:11255079-11255098	*SOCS1*	chr16:11255400-11255419
SOCS1	chr16:11255287-11255306	*SOCS1*	chr16:11254920-11254939
SOCS1	chr16:11255249-11255268	*SOCS1*	chr16:11254966-11254985
SOCS1	chr16:11255186-11255205	*SOCS1*	chr16:11254860-11254879
SOCS1	chr16:11255236-11255255	*SOCS1*	chr16:11254980-11254999
SOCS1	chr16:11255116-11255135	*SOCS1*	chr16:11254857-11254876
SOCS1	chr16:11255070-11255089	*SOCS1*	chr16:11254874-11254893
SOCS1	chr16:11255117-11255136	*SOCS1*	chr16:11255028-11255047
SOCS1	chr16:11255283-11255302	*SOCS1*	chr16:11254956-11254975
SOCS1	chr16:11255442-11255461	*SOCS1*	chr16:11254908-11254927
SOCS1	chr16:11255209-11255228	*SOCS1*	chr16:11255337-11255356
SOCS1	chr16:11254932-11254951	*SOCS1*	chr16:11254836-11254855
SOCS1	chr16:11254966-11254985	*SOCS1*	chr16:11254842-11254861
SOCS1	chr16:11254950-11254969	*SOCS1*	chr16:11254865-11254884
SOCS1	chr16:11255049-11255068	*SOCS1*	chr16:11254830-11254849
SOCS1	chr16:11255155-11255174	*SOCS1*	chr16:11255401-11255420
SOCS1	chr16:11255460-11255479	*SOCS1*	chr16:11254864-11254883
SOCS1	chr16:11255037-11255056	*SOCS1*	chr16:11255311-11255330
SOCS1	chr16:11255154-11255173	*SOCS1*	chr16:11255343-11255362

[0409]

靶标	坐标	靶标	坐标
SOCS1	chr16:11255115-11255134	*SOCS1*	chr16:11255342-11255361
SOCS1	chr16:11254985-11255004	*SOCS1*	chr16:11255272-11255291
SOCS1	chr16:11255013-11255032	*SOCS1*	chr16:11254866-11254885
SOCS1	chr16:11255016-11255035	*SOCS1*	chr16:11255310-11255329
SOCS1	chr16:11255139-11255158	*SOCS1*	chr16:11255336-11255355
SOCS1	chr16:11255248-11255267	*SOCS1*	chr16:11255416-11255435
SOCS1	chr16:11255217-11255236	*SOCS1*	chr16:11255402-11255421
SOCS1	chr16:11254994-11255013	*SOCS1*	chr16:11255467-11255486
SOCS1	chr16:11254965-11254984	*SOCS1*	chr16:11254873-11254892
SOCS1	chr16:11255219-11255238	*SOCS1*	chr16:11255265-11255284
SOCS1	chr16:11255173-11255192	*SOCS1*	chr16:11254820-11254839
SOCS1	chr16:11255210-11255229	*SOCS1*	chr16:11254848-11254867
SOCS1	chr16:11255062-11255081	*SOCS1*	chr16:11255317-11255336
SOCS1	chr16:11255259-11255278	*SOCS1*	chr16:11255351-11255370
SOCS1	chr16:11255230-11255249	*SOCS1*	chr16:11254811-11254830
SOCS1	chr16:11255084-11255103	*SOCS1*	chr16:11255353-11255372
SOCS1	chr16:11255175-11255194	*SOCS1*	chr16:11255350-11255369
SOCS1	chr16:11255419-11255438	*SOCS1*	chr16:11255309-11255328
SOCS1	chr16:11254903-11254922	*SOCS1*	chr16:11255390-11255409
SOCS1	chr16:11255089-11255108	*SOCS1*	chr16:11255478-11255497
SOCS1	chr16:11255379-11255398	*SOCS1*	chr16:11255330-11255349
SOCS1	chr16:11255206-11255225	*SOCS1*	chr16:11254875-11254894
SOCS1	chr16:11255090-11255109	*SOCS1*	chr16:11255124-11255143
SOCS1	chr16:11255208-11255227	*SOCS1*	chr16:11255352-11255371
SOCS1	chr16:11254956-11254975	*SOCS1*	chr16:11254872-11254891
SOCS1	chr16:11255118-11255137	*SOCS1*	chr16:11255331-11255350
SOCS1	chr16:11254906-11254925	*SOCS1*	chr16:11255315-11255334
SOCS1	chr16:11255167-11255186	*SOCS1*	chr16:11255482-11255501
SOCS1	chr16:11254835-11254854	*SOCS1*	chr16:11254995-11255014
SOCS1	chr16:11255292-11255311	*SOCS1*	chr16:11255316-11255335
SOCS1	chr16:11255416-11255435	*SOCS1*	chr16:11255308-11255327
SOCS1	chr16:11255136-11255155	*SOCS1*	chr16:11255321-11255340
SOCS1	chr16:11254964-11254983	*SOCS1*	chr16:11255322-11255341
SOCS1	chr16:11254896-11254915	*SOCS1*	chr16:11255330-11255349
SOCS1	chr16:11254940-11254959	*SOCS1*	chr16:11255368-11255387
SOCS1	chr16:11255349-11255368	*SOCS1*	chr16:11255377-11255396
SOCS1	chr16:11254992-11255011	*SOCS1*	chr16:11255380-11255399

[0410] 表5:Socs1鼠基因组坐标

[0411]

靶标	坐标
Socs1	chr16:10784479-10784498
Socs1	chr16:10784409-10784428
Socs1	chr16:10784456-10784475
Socs1	chr16:10784322-10784341
Socs1	chr16:10784548-10784567

[0412]

靶标	坐标
Socs1	chr16:10784596-10784615
Socs1	chr16:10784264-10784283
Socs1	chr16:10784628-10784647
Socs1	chr16:10784526-10784545
Socs1	chr16:10784508-10784527
Socs1	chr16:10784565-10784584
Socs1	chr16:10784474-10784493
Socs1	chr16:10784293-10784312

[0413] 表6:示例性人SOCS1 siRNA

[0414]

靶标	序列	SEQ ID
SOCS1_siRNA_1	CGCACUUCCGCACAUUCCGUUCG	13
SOCS1_siRNA_2	GGGGAGGGUCUCUGGCUUUAUUU	14
SOCS1_siRNA_3	CAGCAUUAACUGGGAUGCCGUGU	15
SOCS1_siRNA_4	CCAGGACCUGAACUCGCACCUCC	16
SOCS1_siRNA_5	UACAUAUACCCAGUAUCUUUGCA	17
SOCS1_siRNA_6	GCCGACAAUGCAGUCUCCACAGC	18
SOCS1_siRNA_7	CCCCUGGUUGUUGUAGCAGCUUA	19
SOCS1_siRNA_8	CUGCUGUGCAGAAUCCUAUUUUA	20
SOCS1_siRNA_9	UGGGAUGCCGUGUUAUUUUGUUA	21
SOCS1_siRNA_10	UCGCACCUCCUACCUCUUCAUGU	22

[0415] 表7:示例性人SOCS1 shRNA和siRNA靶序列

[0416]

靶标	序列	SEQ ID
SOCS1_shRNA_1	CACGCACTTCCGCACATTC	23
SOCS1_shRNA_2	TTCCGTTCGCACGCCGATT	24
SOCS1_shRNA_3	GAGCTTCGACTGCCTCTTC	25
SOCS1_siRNA_1	CGCACTTCCGCACATTCCGTTCG	26
SOCS1_siRNA_2	GGGGAGGGTCTCTGGCTTTATTT	27
SOCS1_siRNA_3	CAGCATTAACTGGGATGCCGTGT	28
SOCS1_siRNA_4	CCAGGACCTGAACTCGCACCTCC	29
SOCS1_siRNA_5	TACATATACCCAGTATCTTTGCA	30
SOCS1_siRNA_6	GCCGACAATGCAGTCTCCACAGC	31
SOCS1_siRNA_7	CCCCTGGTTGTTGTAGCAGCTTA	32
SOCS1_siRNA_8	CTGCTGTGCAGAATCCTATTTTA	33
SOCS1_siRNA_9	TGGGATGCCGTGTTATTTTGTTA	34
SOCS1_siRNA_10	TCGCACCTCCTACCTCTTCATGT	35

[0417] 表8:示例性鼠Socs1 shRNA和siRNA靶序列

[0418]

靶标	序列	SEQ ID
ND000214	TTTCGAGCTGCTGGAGCACTA	36
ND000219	TCGAGCTGCTGGAGCACTACG	37

[0419]

靶标	序列	SEQ ID
TRCN0000231240	TCGCCAACGGAACTGCTTCTT	38
ND000218	ACTTCTGGCTGGAGACCTCAT	39
TRCN0000067420	GCGAGACCTTCGACTGCCTTT	40
TRCN0000067418	CGACACTCACTTCCGCACCTT	41
ND000220	CTACCTGAGTTCCTTCCCCTT	42
TRCN0000231238	TTCCGCTCCCACTCCGATTAC	43
TRCN0000231241	TAACCCGGTACTCCGTGACTA	44
ND000216	TACTCCGTGACTACCTGAGTT	45
ND000211	CTTCCGCTCCCACTCCGATTA	46
TRCN0000067422	GCGCGACAGTCGCCAACGGAA	47
TRCN0000231239	TGGACGCCTGCGGCTTCTATT	48
TRCN0000067419	CGCATCCCTCTTAACCCGGTA	49
ND000212	TACATATTCCCAGTATCTTTG	50
TRCN0000231242	GCGCCTTATTATTTCTTATTA	51
TRCN0000067421	CCGTGACTACCTGAGTTCCTT	52
ND000215	GGAGGGTCTCTGGCTTCATTT	53
ND000213	TTCGCGCTCAGCGTGAAGATG	54
ND000217	ATCCCTCTTAACCCGGTACTC	55

[0420] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0421] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9(人类基因组)或表10(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-314中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-314中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。

[0422] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子是靶向SOCS1的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:201-314中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:201-314中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0423] 表9:PTPN2人类基因组坐标

[0424]

靶标	坐标
PTPN2	Chr18:12859218-12859237
PTPN2	Chr18:12884109-12884128
PTPN2	Chr18:12817227-12817246
PTPN2	Chr18:12817234-12817253
PTPN2	Chr18:12884091-12884110
PTPN2	Chr18:12884121-12884140
PTPN2	Chr18:12831010-12831029
PTPN2	Chr18:12817208-12817227
PTPN2	Chr18:12817158-12817177
PTPN2	Chr18:12831016-12831035
PTPN2	Chr18:12817228-12817247
PTPN2	Chr18:12830964-12830983
PTPN2	Chr18:12801972-12801991
PTPN2	Chr18:12836818-12836837
PTPN2	Chr18:12817215-12817234
PTPN2	Chr18:12802018-12802037
PTPN2	Chr18:12884116-12884135
PTPN2	Chr18:12840739-12840758
PTPN2	Chr18:12802004-12802023
PTPN2	Chr18:12840767-12840786
PTPN2	Chr18:12817197-12817216
PTPN2	Chr18:12884108-12884127
PTPN2	Chr18:12817221-12817240
PTPN2	Chr18:12836820-12836839
PTPN2	Chr18:12884124-12884143
PTPN2	Chr18:12830996-12831015
PTPN2	Chr18:12830942-12830961
PTPN2	Chr18:12884112-12884131
PTPN2	Chr18:12817193-12817212
PTPN2	Chr18:12859205-12859224
PTPN2	Chr18:12817202-12817221
PTPN2	Chr18:12859216-12859235
PTPN2	Chr18:12859215-12859234
PTPN2	Chr18:12817201-12817220
PTPN2	Chr18:12802134-12802153
PTPN2	Chr18:12884075-12884094
PTPN2	Chr18:12884115-12884134
PTPN2	Chr18:12840757-12840776
PTPN2	Chr18:12814205-12814224

[0425]

靶标	坐标
PTPN2	Chr18:12840777-12840796
PTPN2	Chr18:12814277-12814296
PTPN2	Chr18:12840746-12840765
PTPN2	Chr18:12801989-12802008
PTPN2	Chr18:12819237-12819256
PTPN2	Chr18:12814348-12814367
PTPN2	Chr18:12794428-12794447
PTPN2	Chr18:12831005-12831024
PTPN2	Chr18:12825890-12825909
PTPN2	Chr18:12840723-12840742
PTPN2	Chr18:12840747-12840766
PTPN2	Chr18:12802068-12802087
PTPN2	Chr18:12840716-12840735
PTPN2	Chr18:12840773-12840792
PTPN2	Chr18:12831012-12831031
PTPN2	Chr18:12814240-12814259
PTPN2	Chr18:12802130-12802149
PTPN2	Chr18:12794454-12794473
PTPN2	Chr18:12817208-12817227
PTPN2	Chr18:12819226-12819245
PTPN2	Chr18:12825889-12825908
PTPN2	Chr18:12840782-12840801
PTPN2	Chr18:12836812-12836831
PTPN2	Chr18:12817298-12817317
PTPN2	Chr18:12817324-12817343
PTPN2	Chr18:12819268-12819287
PTPN2	Chr18:12817303-12817322
PTPN2	Chr18:12825927-12825946
PTPN2	Chr18:12817220-12817239
PTPN2	Chr18:12825901-12825920
PTPN2	Chr18:12814222-12814241
PTPN2	Chr18:12831000-12831019
PTPN2	Chr18:12840738-12840757
PTPN2	Chr18:12802057-12802076
PTPN2	Chr18:12802069-12802088
PTPN2	Chr18:12884123-12884142
PTPN2	Chr18:12814294-12814313
PTPN2	Chr18:12817283-12817302
PTPN2	Chr18:12830945-12830964
PTPN2	Chr18:12817284-12817303
PTPN2	Chr18:12817256-12817275
PTPN2	Chr18:12884062-12884081
PTPN2	Chr18:12814295-12814314
PTPN2	Chr18:12817313-12817332
PTPN2	Chr18:12814255-12814274
PTPN2	Chr18:12814253-12814272
PTPN2	Chr18:12814257-12814276

[0426]

靶标	坐标
PTPN2	Chr18:12814256-12814275
PTPN2	Chr18:12840753-12840772
PTPN2	Chr18:12830957-12830976
PTPN2	Chr18:12802093-12802112
PTPN2	Chr18:12817333-12817352
PTPN2	Chr18:12794479-12794498
PTPN2	Chr18:12814223-12814242
PTPN2	Chr18:12802089-12802108
PTPN2	Chr18:12794463-12794482
PTPN2	Chr18:12794436-12794455
PTPN2	Chr18:12794416-12794435
PTPN2	Chr18:12817235-12817254
PTPN2	Chr18:12836793-12836812
PTPN2	Chr18:12801986-12802005
PTPN2	Chr18:12817165-12817184
PTPN2	Chr18:12817179-12817198
PTPN2	Chr18:12794425-12794444
PTPN2	Chr18:12802146-12802165

[0427] 表10:Ptpn2鼠基因组坐标

[0428]

靶标	坐标
Ptpn2	Chr18:67680998-67681017
Ptpn2	Chr18:67677801-67677820
Ptpn2	Chr18:67680904-67680923
Ptpn2	Chr18:67681553-67681572
Ptpn2	Chr18:67688965-67688984
Ptpn2	Chr18:67680958-67680977
Ptpn2	Chr18:67688944-67688963
Ptpn2	Chr18:67677855-67677874
Ptpn2	Chr18:67677734-67677753
Ptpn2	Chr18:67680967-67680986
Ptpn2	Chr18:67688912-67688931
Ptpn2	Chr18:67680881-67680900
Ptpn2	Chr18:67681529-67681548

[0429] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一

性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0430] 在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11(人类基因组)或表12(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-337或331-797中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-337或331-797中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0431] 在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，靶向ZC3H12A的核酸分子是靶向ZC3H12A的siRNA，其包含选自SEQ ID NO:328-330或329和330(人)的核酸序列(参见Liu等人，Scientific Reports(2016),6,Article#24073和Mino等人，Cell(2015)161(5),1058-1073，所述文献以引用方式整体并入本文)。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:336-789中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:336-789中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，靶向ZC3H12A的核酸分子是由选自SEQ ID NO:331-337的核酸序列编码的靶向ZC3H12A的shRNA分子(参见Huang等人，J Biol Chem(2015)290(34),20782-20792，其以引用方式整体并入本文)。

[0432] 表11:ZC3H12A人类基因组坐标

[0433]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37481708-37481727
ZC3H12A	Chr1:37475808-37475827
ZC3H12A	Chr1:37475809-37475828
ZC3H12A	Chr1:37475684-37475703
ZC3H12A	Chr1:37481823-37481842
ZC3H12A	Chr1:37480415-37480434
ZC3H12A	Chr1:37475756-37475775
ZC3H12A	Chr1:37481692-37481711
ZC3H12A	Chr1:37481648-37481667
ZC3H12A	Chr1:37480284-37480303
ZC3H12A	Chr1:37481779-37481798
ZC3H12A	Chr1:37475827-37475846
ZC3H12A	Chr1:37481747-37481766
ZC3H12A	Chr1:37482445-37482464
ZC3H12A	Chr1:37475631-37475650

[0434]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37480274-37480293
ZC3H12A	Chr1:37482967-37482986
ZC3H12A	Chr1:37482922-37482941
ZC3H12A	Chr1:37480273-37480292
ZC3H12A	Chr1:37482886-37482905
ZC3H12A	Chr1:37483185-37483204
ZC3H12A	Chr1:37475817-37475836
ZC3H12A	Chr1:37483033-37483052
ZC3H12A	Chr1:37480408-37480427
ZC3H12A	Chr1:37483026-37483045
ZC3H12A	Chr1:37483463-37483482
ZC3H12A	Chr1:37480362-37480381
ZC3H12A	Chr1:37482962-37482981
ZC3H12A	Chr1:37475775-37475794
ZC3H12A	Chr1:37475509-37475528
ZC3H12A	Chr1:37475722-37475741
ZC3H12A	Chr1:37475818-37475837
ZC3H12A	Chr1:37482966-37482985
ZC3H12A	Chr1:37480388-37480407
ZC3H12A	Chr1:37483142-37483161
ZC3H12A	Chr1:37482448-37482467
ZC3H12A	Chr1:37483049-37483068
ZC3H12A	Chr1:37482905-37482924
ZC3H12A	Chr1:37482733-37482752
ZC3H12A	Chr1:37480423-37480442
ZC3H12A	Chr1:37482456-37482475
ZC3H12A	Chr1:37483551-37483570
ZC3H12A	Chr1:37481767-37481786
ZC3H12A	Chr1:37475715-37475734
ZC3H12A	Chr1:37483377-37483396
ZC3H12A	Chr1:37475593-37475612
ZC3H12A	Chr1:37475875-37475894
ZC3H12A	Chr1:37475534-37475553
ZC3H12A	Chr1:37482764-37482783
ZC3H12A	Chr1:37475869-37475888
ZC3H12A	Chr1:37483437-37483456
ZC3H12A	Chr1:37475598-37475617
ZC3H12A	Chr1:37482438-37482457
ZC3H12A	Chr1:37483257-37483276
ZC3H12A	Chr1:37483263-37483282
ZC3H12A	Chr1:37482545-37482564
ZC3H12A	Chr1:37483015-37483034
ZC3H12A	Chr1:37481595-37481614
ZC3H12A	Chr1:37482923-37482942
ZC3H12A	Chr1:37483143-37483162
ZC3H12A	Chr1:37482348-37482367
ZC3H12A	Chr1:37483018-37483037

[0435]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37482612-37482631
ZC3H12A	Chr1:37475613-37475632
ZC3H12A	Chr1:37475563-37475582
ZC3H12A	Chr1:37475535-37475554
ZC3H12A	Chr1:37482843-37482862
ZC3H12A	Chr1:37480424-37480443
ZC3H12A	Chr1:37482606-37482625
ZC3H12A	Chr1:37483098-37483117
ZC3H12A	Chr1:37483508-37483527
ZC3H12A	Chr1:37483559-37483578
ZC3H12A	Chr1:37483256-37483275
ZC3H12A	Chr1:37475936-37475955
ZC3H12A	Chr1:37475607-37475626
ZC3H12A	Chr1:37475809-37475828
ZC3H12A	Chr1:37483186-37483205
ZC3H12A	Chr1:37481747-37481766
ZC3H12A	Chr1:37482734-37482753
ZC3H12A	Chr1:37483278-37483297
ZC3H12A	Chr1:37482332-37482351
ZC3H12A	Chr1:37483109-37483128
ZC3H12A	Chr1:37475633-37475652
ZC3H12A	Chr1:37482591-37482610
ZC3H12A	Chr1:37483271-37483290
ZC3H12A	Chr1:37483603-37483622
ZC3H12A	Chr1:37482504-37482523
ZC3H12A	Chr1:37483252-37483271
ZC3H12A	Chr1:37483119-37483138
ZC3H12A	Chr1:37482343-37482362
ZC3H12A	Chr1:37483144-37483163
ZC3H12A	Chr1:37483213-37483232
ZC3H12A	Chr1:37482981-37483000
ZC3H12A	Chr1:37482789-37482808
ZC3H12A	Chr1:37483159-37483178
ZC3H12A	Chr1:37482349-37482368
ZC3H12A	Chr1:37483602-37483621
ZC3H12A	Chr1:37481596-37481615
ZC3H12A	Chr1:37482537-37482556
ZC3H12A	Chr1:37482370-37482389
ZC3H12A	Chr1:37475546-37475565
ZC3H12A	Chr1:37482598-37482617
ZC3H12A	Chr1:37483146-37483165
ZC3H12A	Chr1:37475812-37475831
ZC3H12A	Chr1:37483400-37483419
ZC3H12A	Chr1:37475703-37475722
ZC3H12A	Chr1:37483418-37483437
ZC3H12A	Chr1:37480284-37480303
ZC3H12A	Chr1:37482800-37482819

[0436]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37475721-37475740
ZC3H12A	Chr1:37482715-37482734
ZC3H12A	Chr1:37480281-37480300
ZC3H12A	Chr1:37482491-37482510
ZC3H12A	Chr1:37483497-37483516
ZC3H12A	Chr1:37475899-37475918
ZC3H12A	Chr1:37475889-37475908
ZC3H12A	Chr1:37482375-37482394
ZC3H12A	Chr1:37475741-37475760
ZC3H12A	Chr1:37482900-37482919
ZC3H12A	Chr1:37482442-37482461
ZC3H12A	Chr1:37481644-37481663
ZC3H12A	Chr1:37482464-37482483
ZC3H12A	Chr1:37482994-37483013
ZC3H12A	Chr1:37483437-37483456
ZC3H12A	Chr1:37482736-37482755
ZC3H12A	Chr1:37482538-37482557
ZC3H12A	Chr1:37483515-37483534
ZC3H12A	Chr1:37475874-37475893
ZC3H12A	Chr1:37483145-37483164
ZC3H12A	Chr1:37482587-37482606
ZC3H12A	Chr1:37475482-37475501
ZC3H12A	Chr1:37475844-37475863
ZC3H12A	Chr1:37480415-37480434
ZC3H12A	Chr1:37481709-37481728
ZC3H12A	Chr1:37483366-37483385
ZC3H12A	Chr1:37475627-37475646
ZC3H12A	Chr1:37482447-37482466
ZC3H12A	Chr1:37481758-37481777
ZC3H12A	Chr1:37483560-37483579
ZC3H12A	Chr1:37475869-37475888
ZC3H12A	Chr1:37481655-37481674
ZC3H12A	Chr1:37481645-37481664
ZC3H12A	Chr1:37483016-37483035
ZC3H12A	Chr1:37475838-37475857
ZC3H12A	Chr1:37482850-37482869
ZC3H12A	Chr1:37475510-37475529
ZC3H12A	Chr1:37483510-37483529
ZC3H12A	Chr1:37483064-37483083
ZC3H12A	Chr1:37483149-37483168
ZC3H12A	Chr1:37483449-37483468
ZC3H12A	Chr1:37483264-37483283
ZC3H12A	Chr1:37475508-37475527
ZC3H12A	Chr1:37480415-37480434
ZC3H12A	Chr1:37482918-37482937
ZC3H12A	Chr1:37482474-37482493
ZC3H12A	Chr1:37483232-37483251

[0437]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37475732-37475751
ZC3H12A	Chr1:37481602-37481621
ZC3H12A	Chr1:37480289-37480308
ZC3H12A	Chr1:37483165-37483184
ZC3H12A	Chr1:37483248-37483267
ZC3H12A	Chr1:37483078-37483097
ZC3H12A	Chr1:37483017-37483036
ZC3H12A	Chr1:37483174-37483193
ZC3H12A	Chr1:37482857-37482876
ZC3H12A	Chr1:37475578-37475597
ZC3H12A	Chr1:37480329-37480348
ZC3H12A	Chr1:37480288-37480307
ZC3H12A	Chr1:37481600-37481619
ZC3H12A	Chr1:37483212-37483231
ZC3H12A	Chr1:37483337-37483356
ZC3H12A	Chr1:37475542-37475561
ZC3H12A	Chr1:37483197-37483216
ZC3H12A	Chr1:37482730-37482749
ZC3H12A	Chr1:37475599-37475618
ZC3H12A	Chr1:37483262-37483281
ZC3H12A	Chr1:37482790-37482809
ZC3H12A	Chr1:37482719-37482738
ZC3H12A	Chr1:37482860-37482879
ZC3H12A	Chr1:37483443-37483462
ZC3H12A	Chr1:37483558-37483577
ZC3H12A	Chr1:37481599-37481618
ZC3H12A	Chr1:37475845-37475864
ZC3H12A	Chr1:37475730-37475749
ZC3H12A	Chr1:37482524-37482543
ZC3H12A	Chr1:37482849-37482868
ZC3H12A	Chr1:37475529-37475548
ZC3H12A	Chr1:37475664-37475683
ZC3H12A	Chr1:37482972-37482991
ZC3H12A	Chr1:37483321-37483340
ZC3H12A	Chr1:37482984-37483003
ZC3H12A	Chr1:37475807-37475826
ZC3H12A	Chr1:37483213-37483232
ZC3H12A	Chr1:37482427-37482446
ZC3H12A	Chr1:37483104-37483123
ZC3H12A	Chr1:37482879-37482898
ZC3H12A	Chr1:37483409-37483428
ZC3H12A	Chr1:37482752-37482771
ZC3H12A	Chr1:37480391-37480410
ZC3H12A	Chr1:37475694-37475713
ZC3H12A	Chr1:37482458-37482477
ZC3H12A	Chr1:37475774-37475793
ZC3H12A	Chr1:37475574-37475593

[0438]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37475803-37475822
ZC3H12A	Chr1:37481605-37481624
ZC3H12A	Chr1:37482437-37482456
ZC3H12A	Chr1:37482825-37482844
ZC3H12A	Chr1:37483595-37483614
ZC3H12A	Chr1:37483510-37483529
ZC3H12A	Chr1:37483283-37483302
ZC3H12A	Chr1:37482446-37482465
ZC3H12A	Chr1:37475700-37475719
ZC3H12A	Chr1:37475721-37475740
ZC3H12A	Chr1:37475628-37475647
ZC3H12A	Chr1:37482848-37482867
ZC3H12A	Chr1:37483134-37483153
ZC3H12A	Chr1:37475543-37475562
ZC3H12A	Chr1:37482799-37482818
ZC3H12A	Chr1:37483296-37483315
ZC3H12A	Chr1:37483332-37483351
ZC3H12A	Chr1:37483600-37483619
ZC3H12A	Chr1:37482410-37482429
ZC3H12A	Chr1:37481718-37481737
ZC3H12A	Chr1:37483395-37483414
ZC3H12A	Chr1:37482428-37482447
ZC3H12A	Chr1:37475562-37475581
ZC3H12A	Chr1:37483500-37483519
ZC3H12A	Chr1:37475827-37475846
ZC3H12A	Chr1:37483586-37483605
ZC3H12A	Chr1:37483089-37483108
ZC3H12A	Chr1:37483419-37483438
ZC3H12A	Chr1:37480285-37480304
ZC3H12A	Chr1:37483256-37483275
ZC3H12A	Chr1:37483420-37483439
ZC3H12A	Chr1:37475691-37475710
ZC3H12A	Chr1:37483419-37483438
ZC3H12A	Chr1:37475918-37475937
ZC3H12A	Chr1:37475589-37475608
ZC3H12A	Chr1:37482362-37482381
ZC3H12A	Chr1:37482566-37482585
ZC3H12A	Chr1:37482963-37482982
ZC3H12A	Chr1:37483420-37483439
ZC3H12A	Chr1:37483139-37483158
ZC3H12A	Chr1:37483619-37483638
ZC3H12A	Chr1:37481764-37481783
ZC3H12A	Chr1:37475650-37475669
ZC3H12A	Chr1:37483405-37483424
ZC3H12A	Chr1:37483037-37483056
ZC3H12A	Chr1:37483211-37483230
ZC3H12A	Chr1:37475537-37475556

[0439]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37475756-37475775
ZC3H12A	Chr1:37482403-37482422
ZC3H12A	Chr1:37482455-37482474
ZC3H12A	Chr1:37480311-37480330
ZC3H12A	Chr1:37482586-37482605
ZC3H12A	Chr1:37483099-37483118
ZC3H12A	Chr1:37483342-37483361
ZC3H12A	Chr1:37481823-37481842
ZC3H12A	Chr1:37482777-37482796
ZC3H12A	Chr1:37482412-37482431
ZC3H12A	Chr1:37483604-37483623
ZC3H12A	Chr1:37483438-37483457
ZC3H12A	Chr1:37482445-37482464
ZC3H12A	Chr1:37483331-37483350
ZC3H12A	Chr1:37483111-37483130
ZC3H12A	Chr1:37482847-37482866
ZC3H12A	Chr1:37483249-37483268
ZC3H12A	Chr1:37481754-37481773
ZC3H12A	Chr1:37475684-37475703
ZC3H12A	Chr1:37482519-37482538
ZC3H12A	Chr1:37482475-37482494
ZC3H12A	Chr1:37482613-37482632
ZC3H12A	Chr1:37482939-37482958
ZC3H12A	Chr1:37475541-37475560
ZC3H12A	Chr1:37481763-37481782
ZC3H12A	Chr1:37483231-37483250
ZC3H12A	Chr1:37482953-37482972
ZC3H12A	Chr1:37482407-37482426
ZC3H12A	Chr1:37475808-37475827
ZC3H12A	Chr1:37481620-37481639
ZC3H12A	Chr1:37475592-37475611
ZC3H12A	Chr1:37483156-37483175
ZC3H12A	Chr1:37480329-37480348
ZC3H12A	Chr1:37475573-37475592
ZC3H12A	Chr1:37483198-37483217
ZC3H12A	Chr1:37483557-37483576
ZC3H12A	Chr1:37482892-37482911
ZC3H12A	Chr1:37483334-37483353
ZC3H12A	Chr1:37481708-37481727
ZC3H12A	Chr1:37483063-37483082
ZC3H12A	Chr1:37482998-37483017
ZC3H12A	Chr1:37482942-37482961
ZC3H12A	Chr1:37475508-37475527
ZC3H12A	Chr1:37482371-37482390
ZC3H12A	Chr1:37483119-37483138
ZC3H12A	Chr1:37482798-37482817
ZC3H12A	Chr1:37475859-37475878

[0440]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37483401-37483420
ZC3H12A	Chr1:37482851-37482870
ZC3H12A	Chr1:37475524-37475543
ZC3H12A	Chr1:37475601-37475620
ZC3H12A	Chr1:37475815-37475834
ZC3H12A	Chr1:37482801-37482820
ZC3H12A	Chr1:37475544-37475563
ZC3H12A	Chr1:37483010-37483029
ZC3H12A	Chr1:37483077-37483096
ZC3H12A	Chr1:37482404-37482423
ZC3H12A	Chr1:37475692-37475711
ZC3H12A	Chr1:37483596-37483615
ZC3H12A	Chr1:37483372-37483391
ZC3H12A	Chr1:37481596-37481615
ZC3H12A	Chr1:37480370-37480389
ZC3H12A	Chr1:37480377-37480396
ZC3H12A	Chr1:37483381-37483400
ZC3H12A	Chr1:37482899-37482918
ZC3H12A	Chr1:37480373-37480392
ZC3H12A	Chr1:37481847-37481866
ZC3H12A	Chr1:37483330-37483349
ZC3H12A	Chr1:37483065-37483084
ZC3H12A	Chr1:37482499-37482518
ZC3H12A	Chr1:37483105-37483124
ZC3H12A	Chr1:37475631-37475650
ZC3H12A	Chr1:37483530-37483549
ZC3H12A	Chr1:37483407-37483426
ZC3H12A	Chr1:37483308-37483327
ZC3H12A	Chr1:37482853-37482872
ZC3H12A	Chr1:37482934-37482953
ZC3H12A	Chr1:37475591-37475610
ZC3H12A	Chr1:37475826-37475845
ZC3H12A	Chr1:37475865-37475884
ZC3H12A	Chr1:37481784-37481803
ZC3H12A	Chr1:37480322-37480341
ZC3H12A	Chr1:37475664-37475683
ZC3H12A	Chr1:37475757-37475776
ZC3H12A	Chr1:37483385-37483404
ZC3H12A	Chr1:37482933-37482952
ZC3H12A	Chr1:37475866-37475885
ZC3H12A	Chr1:37475843-37475862
ZC3H12A	Chr1:37475797-37475816
ZC3H12A	Chr1:37475642-37475661
ZC3H12A	Chr1:37483270-37483289
ZC3H12A	Chr1:37483024-37483043
ZC3H12A	Chr1:37483201-37483220
ZC3H12A	Chr1:37482447-37482466

[0441]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37483253-37483272
ZC3H12A	Chr1:37483429-37483448
ZC3H12A	Chr1:37483195-37483214
ZC3H12A	Chr1:37481648-37481667
ZC3H12A	Chr1:37483424-37483443
ZC3H12A	Chr1:37475580-37475599
ZC3H12A	Chr1:37482980-37482999
ZC3H12A	Chr1:37480408-37480427
ZC3H12A	Chr1:37483405-37483424
ZC3H12A	Chr1:37475740-37475759
ZC3H12A	Chr1:37480387-37480406
ZC3H12A	Chr1:37483507-37483526
ZC3H12A	Chr1:37483110-37483129
ZC3H12A	Chr1:37483325-37483344
ZC3H12A	Chr1:37481692-37481711
ZC3H12A	Chr1:37475826-37475845
ZC3H12A	Chr1:37483098-37483117
ZC3H12A	Chr1:37481758-37481777
ZC3H12A	Chr1:37480320-37480339
ZC3H12A	Chr1:37483380-37483399
ZC3H12A	Chr1:37483011-37483030
ZC3H12A	Chr1:37483509-37483528
ZC3H12A	Chr1:37483509-37483528
ZC3H12A	Chr1:37482768-37482787
ZC3H12A	Chr1:37475804-37475823
ZC3H12A	Chr1:37475808-37475827
ZC3H12A	Chr1:37475859-37475878
ZC3H12A	Chr1:37482973-37482992
ZC3H12A	Chr1:37475634-37475653
ZC3H12A	Chr1:37475854-37475873
ZC3H12A	Chr1:37480334-37480353
ZC3H12A	Chr1:37480414-37480433
ZC3H12A	Chr1:37480316-37480335
ZC3H12A	Chr1:37482971-37482990
ZC3H12A	Chr1:37482781-37482800
ZC3H12A	Chr1:37483173-37483192
ZC3H12A	Chr1:37482391-37482410
ZC3H12A	Chr1:37482392-37482411
ZC3H12A	Chr1:37482936-37482955
ZC3H12A	Chr1:37483408-37483427
ZC3H12A	Chr1:37481779-37481798
ZC3H12A	Chr1:37483206-37483225
ZC3H12A	Chr1:37482561-37482580
ZC3H12A	Chr1:37481745-37481764
ZC3H12A	Chr1:37475802-37475821
ZC3H12A	Chr1:37483494-37483513
ZC3H12A	Chr1:37483371-37483390

[0442]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37482552-37482571
ZC3H12A	Chr1:37475491-37475510
ZC3H12A	Chr1:37482479-37482498
ZC3H12A	Chr1:37483140-37483159
ZC3H12A	Chr1:37483313-37483332
ZC3H12A	Chr1:37483458-37483477
ZC3H12A	Chr1:37483320-37483339
ZC3H12A	Chr1:37483204-37483223
ZC3H12A	Chr1:37475792-37475811
ZC3H12A	Chr1:37483475-37483494
ZC3H12A	Chr1:37475577-37475596
ZC3H12A	Chr1:37475787-37475806
ZC3H12A	Chr1:37483574-37483593
ZC3H12A	Chr1:37480284-37480303
ZC3H12A	Chr1:37482369-37482388
ZC3H12A	Chr1:37483384-37483403
ZC3H12A	Chr1:37483425-37483444
ZC3H12A	Chr1:37482582-37482601
ZC3H12A	Chr1:37483153-37483172
ZC3H12A	Chr1:37482935-37482954
ZC3H12A	Chr1:37483378-37483397
ZC3H12A	Chr1:37482952-37482971
ZC3H12A	Chr1:37483399-37483418
ZC3H12A	Chr1:37483309-37483328
ZC3H12A	Chr1:37483200-37483219
ZC3H12A	Chr1:37481641-37481660
ZC3H12A	Chr1:37481656-37481675
ZC3H12A	Chr1:37483036-37483055
ZC3H12A	Chr1:37483474-37483493
ZC3H12A	Chr1:37483004-37483023
ZC3H12A	Chr1:37481846-37481865
ZC3H12A	Chr1:37483205-37483224
ZC3H12A	Chr1:37483406-37483425
ZC3H12A	Chr1:37480336-37480355
ZC3H12A	Chr1:37481716-37481735
ZC3H12A	Chr1:37480335-37480354
ZC3H12A	Chr1:37481659-37481678
ZC3H12A	Chr1:37475809-37475828
ZC3H12A	Chr1:37482565-37482584
ZC3H12A	Chr1:37482491-37482510
ZC3H12A	Chr1:37483379-37483398
ZC3H12A	Chr1:37481654-37481673
ZC3H12A	Chr1:37482567-37482586
ZC3H12A	Chr1:37481614-37481633
ZC3H12A	Chr1:37482562-37482581
ZC3H12A	Chr1:37475868-37475887
ZC3H12A	Chr1:37482557-37482576

[0443]

靶标	坐标
ZC3H12A	Chr1:37483511-37483530
ZC3H12A	Chr1:37475615-37475634
ZC3H12A	Chr1:37483333-37483352
ZC3H12A	Chr1:37482840-37482859
ZC3H12A	Chr1:37483545-37483564
ZC3H12A	Chr1:37482830-37482849
ZC3H12A	Chr1:37482444-37482463
ZC3H12A	Chr1:37482571-37482590
ZC3H12A	Chr1:37482553-37482572
ZC3H12A	Chr1:37483543-37483562
ZC3H12A	Chr1:37483542-37483561
ZC3H12A	Chr1:37482575-37482594
ZC3H12A	Chr1:37475855-37475874
ZC3H12A	Chr1:37482572-37482591

[0444] 表12:Zc3h12a鼠基因组坐标

[0445]

靶标	坐标
Zc3h12a	Chr1:125122335-125122354
Zc3h12a	Chr1:125121083-125121102
Zc3h12a	Chr1:125120961-125120980
Zc3h12a	Chr1:125122390-125122409
Zc3h12a	Chr1:125120373-125120392
Zc3h12a	Chr1:125122250-125122269
Zc3h12a	Chr1:125122375-125122394
Zc3h12a	Chr1:125120975-125120994

[0446] 表13:示例性鼠Zc3h12a siRNA序列

[0447]

靶标	序列	SEQ ID
Zc3h12a_siRNA_1	CCUGGACAACUUCCUUCGUAAGAAA	328

[0448] 表14:示例性人ZC3H12A siRNA序列

[0449]

靶标	序列	SEQ ID
ZC3H12A_siRNA_2	GUGUCCCUAUGGAAGGAAA	329
ZC3H12A_siRNA_3	CAACUUCCUUCGUAAGAAA	330

[0450] 表15:鼠Zc3h12a shRNA和siRNA靶序列

[0451]

*Zc3h12a*_shRNA_1	AGCGAGGCCACACAGATATTA	331
*Zc3h12a*_shRNA_2	GCTATGATGACCGCTTCATTG	332
*Zc3h12a*_shRNA_3	TGGTCTGAGCCGTACCCATTA	333
*Zc3h12a*_shRNA_4	CTGTGTACAGAGGCGAGATTT	334

[0452]

*Zc3h12a*_siRNA_1	CCTGGACAACTTCCTTCGTAAGAAA	335

[0453] 表16:人ZC3H12A shRNA和siRNA靶序列

[0454]

靶标	序列	SEQ ID
ZC3H12A_siRNA_2	GTGTCCCTATGGAAGGAAA	336

ZC3H12A_siRNA_3	CAACTTCCTTCGTAAGAAA	337

[0455] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0456] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17(人类基因组)或表18(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ IDNO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-808中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-808中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。

[0457] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子是靶向CBLB的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:798-808中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:798-808中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。

[0458] 表17:CBLB人类基因组坐标

[0459]

靶标	坐标
CBLB	chr3:105853475-105853494
CBLB	chr3:105853600-105853619

[0460]

靶标	坐标
CBLB	chr3:105720111-105720130
CBLB	chr3:105867412-105867431
CBLB	chr3:105867529-105867548
CBLB	chr3:105720160-105720179
CBLB	chr3:105853421-105853440
CBLB	chr3:105751453-105751472
CBLB	chr3:105693541-105693560
CBLB	chr3:105867449-105867468
CBLB	chr3:105853514-105853533

[0461] 表18:Cblb小鼠基因组坐标

[0462]

靶标	坐标
Cblb	chr16:52152499-52152518
Cblb	chr16:52139574-52139593
Cblb	chr16:52139603-52139622
Cblb	chr16:52112122-52112141
Cblb	chr16:52112134-52112153
Cblb	chr16:52152535-52152554
Cblb	chr16:52142891-52142910
Cblb	chr16:52135797-52135816
Cblb	chr16:52131105-52131124
Cblb	chr16:52112169-52112188
Cblb	chr16:52204542-52204561
Cblb	chr16:52131058-52131077
Cblb	chr16:52135876-52135895
Cblb	chr16:52135763-52135782
Cblb	chr16:52139509-52139528

[0463] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1

基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0464] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19(人类基因组)或表20(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-836中的一种编码的人RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-836中的一种编码的人RNA序列具有100%同一性的人靶RNA序列。

[0465] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子是靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:824-836中的一种编码的人RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:824-836中的一种编码的人RNA序列具有100%同一性的人靶RNA序列。

[0466] 表19:RC3H1人类基因组坐标

[0467]

靶标	坐标
RC3H1	chr1:173946812-173946831
RC3H1	chr1:173992926-173992945
RC3H1	chr1:173980872-173980891
RC3H1	chr1:173982779-173982798
RC3H1	chr1:173980941-173980960
RC3H1	chr1:173992844-173992863
RC3H1	chr1:173992895-173992914
RC3H1	chr1:173992882-173992901
RC3H1	chr1:173961717-173961736
RC3H1	chr1:173984495-173984514
RC3H1	chr1:173980811-173980830

RC3H1	chr1:173964926-173964945
RC3H1	chr1:173982894-173982913

[0468] 表20:Rc3h1小鼠基因组坐标

[0469]

靶标	坐标
Rc3h1	chr1:160930251-160930270
Rc3h1	chr1:160930280-160930299
Rc3h1	chr1:160930154-160930173
Rc3h1	chr1:160942614-160942633
Rc3h1	chr1:160930266-160930285
Rc3h1	chr1:160930185-160930204
Rc3h1	chr1:160938126-160938145
Rc3h1	chr1:160930198-160930217

[0470] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少一种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0471] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21(人类基因组)或表22(小鼠基因组)中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-856中的一种编码的人RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-856中的一种编码的人RNA序列具有100%同一性的人靶RNA序列。

[0472] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、

98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:845-856中的一种编码的人RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的人靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的shRNA或siRNA分子结合与SEQ ID NO:845-856中的一种编码的人RNA序列具有100％同一性的人靶RNA序列。

[0473] 表21:NFKBIA人类基因组坐标

[0474]

靶标	坐标
NFKBIA	chr14:35404635-35404654
NFKBIA	chr14:35402653-35402672
NFKBIA	chr14:35402494-35402513
NFKBIA	chr14:35404445-35404464
NFKBIA	chr14:35403152-35403171
NFKBIA	chr14:35403258-35403277
NFKBIA	chr14:35404463-35404482
NFKBIA	chr14:35403202-35403221
NFKBIA	chr14:35404411-35404430

[0475]

靶标	坐标
NFKBIA	chr14:35402666-35402685
NFKBIA	chr14:35403330-35403349
NFKBIA	chr14:35403695-35403714

[0476] 表22:Nfkbia小鼠基因组坐标

[0477]

靶标	坐标
Nfkbia	chr12:55491236-55491255
Nfkbia	chr12:55491172-55491191
Nfkbia	chr12:55491206-55491225
Nfkbia	chr12:55490633-55490652
Nfkbia	chr12:55491112-55491131
Nfkbia	chr12:55490800-55490819
Nfkbia	chr12:55490821-55490840
Nfkbia	chr12:55490526-55490545
Nfkbia	chr12:55491657-55491676
Nfkbia	chr12:55491177-55491196
Nfkbia	chr12:55491675-55491694
Nfkbia	chr12:55490773-55490792
Nfkbia	chr12:55490809-55490828

Nfkbia	chr12:55491735-55491754
Nfkbia	chr12:55490571-55490590
Nfkbia	chr12:55490588-55490607
Nfkbia	chr12:55491715-55491734
Nfkbia	chr12:55492316-55492335
Nfkbia	chr12:55491207-55491226

[0478] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1或NFKBIA的siRNA分子或shRNA分子从商业供应商，诸如Sigma Aldrich®、Dharmacon®、ThermoFisher®等获得。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1、PTPN2或ZC3H12A的siRNA分子是表23中所示的一种。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1、PTPN2或ZC3H12A的shRNA分子是表24中所示的一种。

[0479] 表23：示例性SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA siRNA

[0480]

靶基因	siRNA 构建体
SOCS1	靶向小鼠 Socs1 的 MISSION® esiRNA (SigmaAldrich# EMU203261)
	Rosetta 预测人 (SigmaAldrich# NM_003745)
	Rosetta 预测鼠 (SigmaAldrich# NM_009896)
PTPN2	MISSION® esiRNA 人 PTPN2 (esiRNA1) (SigmaAldrich#

[0481]

靶基因	siRNA 构建体
	EHU113971)
	人 Rosetta 预测 (SigmaAldrich# NM_002828)
	人 Rosetta 预测 (SigmaAldrich# NM_080422)
	人 Rosetta 预测 (SigmaAldrich# NM_080423)
	鼠 Rosetta 预测 (SigmaAldrich# NM_001127177)
ZC3H12A	靶向人 ZC3H12A 的 MISSION® esiRNA (esiRNA1) (SigmaAldrich# EHU009491)
	靶向小鼠 Zc3h12a 的 MISSION® esiRNA (esiRNA1) (SigmaAldrich# EMU048551)
	Rosetta 预测人 (SigmaAldrich# NM_025079)
	Rosetta 预测小鼠 (SigmaAldrich# NM_153159)
RC3H1	靶向小鼠 Cyth4 的 MISSION® esiRNA (SigmaAldrich# EHU032691)
NFKBIA	靶向小鼠 Ephb4 的 MISSION® esiRNA (SigmaAldrich# EMU043721)

[0482] 表24：示例性SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、RC3H1和NFKBIA shRNA

[0483]

靶基因	shRNA构建体
SOCS1	MISSION® shRNA 质粒 DNA 人 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_003745)
	MISSION® shRNA 质粒 DNA 鼠 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_009896)
PTPN2	MISSION® shRNA 质粒人 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_002827)
	MISSION® shRNA 质粒鼠 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_011201)
ZC3H12A	MISSION® shRNA 质粒 DNA 人 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_025079)
	MISSION® shRNA 质粒 DNA 小鼠 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_153159)
RC3H1	MISSION® shRNA 质粒 DNA 人 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_172071)
NFKBIA	MISSION® shRNA 质粒 DNA 人 (SigmaAldrich# SHCLND-NM_020529)

[0484] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0485] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0486] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的

一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0487] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0488] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0489] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0490] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0491] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0492] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0493] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0494] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0495] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或

331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0496] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0497] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0498] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0499] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或

Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0500] 在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0501] 在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0502] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或CBLB基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0503] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0504] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中

的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0505] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向CBLB的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0506] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0507] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0508] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少

95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0509] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0510] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0511] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向CBLB的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0512] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中

所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0513] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0514] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0515] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0516] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0517] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向CBLB的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:

1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0518] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0519] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0520] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0521] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列

编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0522] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0523] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0524] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0525] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0526] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有

至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0527] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0528] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0529] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0530] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、

98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0531] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0532] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0533] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0534] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0535] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，

其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0536] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0537] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0538] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0539] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因

组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0540] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0541] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向CBLB的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0542] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0543] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0544] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向PTPN2的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0545] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0546] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0547] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向PTPN2的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0548] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22

中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0549] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0550] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向ZC3H12A的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0551] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0552] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子结合与SEQ ID NO:331-

797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0553] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向ZC3H12A的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ IDNO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0554] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0555] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797或331-337中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0556] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向SOCS1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具

有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0557] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0558] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0559] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0560] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0561] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶

RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200或23-55中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0562] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如,siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代),其中至少一种核酸分子是靶向CBLB的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0563] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0564] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100%同一性的靶RNA序列。

[0565] 在一些实施方案中,基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子,其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向CBLB的siRNA或shRNA分子,并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的核酸分子是siRNA或shRNA分子,并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶RNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或

99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0566] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0567] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0568] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种核酸分子(例如，siRNA、shRNA、RNA适体或吗啉代)，其中至少一种核酸分子是靶向RC3H1的核酸分子并且至少一种核酸分子是靶向NFKBIA的核酸分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0569] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0570] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中

的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0571] 在一些实施方案中，基于核酸的基因调控系统包含至少两种siRNA或shRNA分子，其中至少一种siRNA或shRNA分子是靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子，并且至少一种siRNA或shRNA分子是靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的核酸分子是siRNA或shRNA分子，并且至少一种靶向NFKBIA的核酸分子是siRNA或shRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0572] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0573] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶RNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的siRNA或shRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875中的一种编码的RNA序列具有100％同一性的靶RNA序列。

[0574] 基于蛋白质的基因调控系统

[0575] 在一些实施方案中，本公开提供了蛋白质基因调控系统，其包含能够降低选自以下的至少一种、两种或更多种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种蛋白质：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、

GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)在一些实施方案中,本公开提供了蛋白质基因调控系统,其包含能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种、两种或更多种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种蛋白质。在一些实施方案中,本公开提供了通过本文所述的方法制造的修饰的TIL,其包含此类基因调控系统。在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统是包含一种或多种蛋白质的系统,所述蛋白质能够以序列特异性方式调控内源靶基因表达而无需核酸指导分子。在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含有包含一种或多种锌指结合结构域和酶结构域的蛋白质。在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含有包含类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)结构域和酶结构域的蛋白质。此类实施方案在本文中被称为“TALEN”。

[0576] 锌指系统

[0577] 在一些实施方案中,本公开提供了锌指基因调控系统,其包含能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少一种、两种或更多种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种锌指融合蛋白。在一些实施方案中,本公开提供了通过本文所述的方法制造的修饰的TIL,其包含此类基因调控系统。本文中,基于锌指的系统包含具有两个蛋白质结构域的融合蛋白: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序列结合,将酶结构域的活性导向序列的附近,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改造以实际上结合任何期望的序列。因此,在鉴定出含有期望切割或重组的靶DNA序列的靶遗传基因座(例如,表2或表3中提及的靶基因中的靶基因座)之后,可以对一种或多种锌指结合结构域进行工程改造以结合靶遗传基因座中的一种或多种靶DNA序列。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中的修饰。

[0578] 在一些实施方案中,锌指结合结构域包含一个或多个锌指。Miller等人(1985)EMBO J.4:1609-1614;Rhodes(1993)Scientific American Febuary: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改造以结合的序列(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,但可以被一个或若干个核苷酸隔开,这取决于多指结合结构域中锌指之间的氨基酸序列(即,指间接头)的长度和性质。在一些实施方案中,单个ZFP的DNA结合结构域包含三个与六个之间的单个锌指重复序列,并且每个可以识别9个与18个之间的碱基对。

[0579] 锌指结合结构域可以被工程改造以结合选择的序列。参见例如,Beerli等人

(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等人(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等人(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等人(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等人(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416。与天然存在的锌指蛋白相比,工程化锌指结合结构域可以具有新颖的结合特异性。工程改造方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。

[0580] 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以用于选择靶DNA序列。因此,用于靶DNA序列选择的任何方式均可以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指、8指、9指和更多指)与较长的靶位点的结合也是可以的。

[0581] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种锌指融合蛋白(ZFP),该至少一种锌指融合蛋白包含靶向SOCS1的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0582] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200中的一种具有至少90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0583] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种锌指融合蛋白(ZFP),该至少一种锌指融合蛋白包含靶向PTPN2的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0584] 在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0585] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种锌指融合蛋白

(ZFP),该至少一种锌指融合蛋白包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0586] 在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0587] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白,该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向CBLB的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0588] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0589] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白,该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向RC3H1的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0590] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0591] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的靶DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0592] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0593] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1或NFKBIA的ZFP从商业供应商，诸如Sigma Aldrich、Dharmacon、ThermoFisher等获得。例如，在一些实施方案中，至少一种SOCS1、PTPN2或ZC3H12A ZFP是表25中所示的一种。

[0594] 表25:示例性SOCS1、PTPN2和ZC3H12A锌指系统

[0595]

靶基因	锌指系统
SOCS1	CompoZr®敲除ZFN质粒人SOCS1 (NM_003745) (SigmaAldrich# CKOZFND20320)
	CompoZr®敲除ZFN质粒小鼠Socs1 (NM_009896.2) (SigmaAldrich# CKOZFND41801)
PTPN2	CompoZr®敲除ZFN人质粒PTPN1 (NM_002827) (SigmaAldrich# CKOZFND2121)
	CompoZr®敲除ZFN鼠质粒Ptpn1 (NM_011201.3) (SigmaAldrich# CKOZFND39626)
	CompoZr®敲除ZFN试剂盒，ZFN质粒人ZC3H12A

[0596]

靶基因	锌指系统
ZC3H12A	(NM_025079) (SigmaAldrich# CKOZFND23094)
	CompoZr®敲除ZFN试剂盒，ZFN质粒小鼠Zc3h12a (NM_153159.2) (SigmaAldrich# CKOZFND44851)

[0597] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向SOCS1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向PTPN2的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并

且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0598] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0599] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0600] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向SOCS1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0601] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0602] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性的

靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0603] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向PTPN2的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0604] 在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0605] 在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0606] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向CBLB的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向PTPN2的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0607] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA

序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0608] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0609] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向CBLB的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0610] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0611] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0612] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向SOCS1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向CBLB的锌指结合结构域。

在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0613] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0614] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0615] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向RC3H1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向PTPN2的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0616] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合

结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0617] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0618] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向RC3H1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0619] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0620] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0621] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向SOCS1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向RC3H1的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)

或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0622] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0623] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向CBLB的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向RC3H1的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0624] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0625] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0626] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种

ZFP包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向PTPN2的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0627] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0628] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0629] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向ZC3H12A的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或NFKBIA基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0630] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因

组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0631] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的锌指结合结构域结合与SEQ IDNO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0632] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向SOCS1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0633] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0634] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0635] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP，其中至少一种ZFP包含靶向CBLB的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶

DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0636] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0637] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0638] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种ZFP,其中至少一种ZFP包含靶向RC3H1的锌指结合结构域并且至少一种ZFP包含靶向NFKBIA的锌指结合结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0639] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0640] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的锌指结合结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0641] 锌指融合蛋白的酶结构域部分可以从任何核酸内切酶或核酸外切酶获得。可以衍生出酶结构域的示例性核酸内切酶包括但不限于限制性核酸内切酶和归巢核酸内切酶。参见例如，2002-2003Catalogue，New England Biolabs，Beverly，Mass.；和Belfort等人(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388。切割DNA的另外的酶是已知的(例如，51核酸酶；绿豆核酸酶；胰腺DNA酶I；微球菌核酸酶(micrococcal nuclease)；酵母HO核酸内切酶；还参见Linn等人(编辑)Nucleases，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1993)。这些酶(或其功能片段)中的一种或多种可以用作切割结构域的来源。

[0642] 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切割DNA。某些限制性酶(例如，IIS型)在从识别位点去除的位点处切割DNA，并具有可分离的结合和切割结构域。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的双链切割。参见例如，美国专利号5,356,802；5,436,150和5,487,994；以及Li等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279；Li等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768；Kim等人(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887；Kim等人(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。因此，在一个实施方案中，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。

[0643] 其切割结构域可与结合结构域分离的示例性IIS型限制性酶是FokI。这种特定的酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等人(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切割，可以使用两个融合蛋白(每个包含FokI酶结构域)来重构催化活性的切割结构域。或者，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。包含FokI酶结构域的示例性ZFP在美国专利号9,782,437中有所描述。

[0644] TALEN系统

[0645] 在一些实施方案中，本公开提供了TALEN基因调控系统，其包含能够降低选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA的至少两种内源基因的表达和/或功能的一种、两种或更多种TALEN融合蛋白。在一些实施方案中，本公开提供了通过本文所述的方法制造的修饰的TIL，其包含此类基因调控系统。基于TALEN的系统包含有包含TAL效应子DNA结合结构域和酶结构域的TALEN融合蛋白。它们是通过将TAL效应子DNA结合结构域与DNA切割结构域(切割DNA链的核酸酶)融合而制成的。上述的FokI限制性酶是适用于基于TALEN的基因调控系统的示例性酶结构域。

[0646] TAL效应子是黄单孢菌属(Xanthomonas)细菌在感染植物时经由其III型分泌系统

分泌的蛋白质。DNA结合结构域含有重复的高度保守的33个-34个氨基酸的序列，其中第12个和第13个氨基酸不同。这两个位置(称为重复可变二残基(RVD))是高度可变的并且与特异性核苷酸识别高度相关。因此，可以对TAL效应子结构域进行工程改造以通过选择含有适当RVD的重复区段的组合来结合特异性靶DNA序列。对RVD组合具有特异性的核酸如下：HD靶向胞嘧啶，NI靶向腺嘌呤，NG靶向胸腺嘧啶，并且NN靶向鸟嘌呤(尽管在一些实施方案中，NN也可以以较低的特异性结合腺嘌呤)。

[0647] 用于装配TAL效应子重复序列的方法和组合物是本领域已知的。参见例如，Cermak等人，Nucleic Acids Research，39:12，2011，e82。用于构建TAL效应子重复序列的质粒可从Addgene商购获得。

[0648] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的靶DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0649] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0650] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的靶DNA序列具有至少90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0651] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0652] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一

种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的靶DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0653] 在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0654] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的靶DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0655] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0656] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白，该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的靶DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的靶DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0657] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表7或表8中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同

一性的靶DNA序列。

[0658] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少一种TALEN融合蛋白,该至少一种TALEN融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的靶DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的靶DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0659] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0660] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白,其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域,并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0661] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0662] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性

的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0663] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白,其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域,并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ IDNO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0664] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0665] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0666] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白,其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域,并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0667] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0668] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0669] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0670] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0671] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同

一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0672] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0673] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0674] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0675] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0676] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0677] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0678] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白,其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域,并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0679] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0680] 在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100%同

一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0681] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0682] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0683] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0684] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0685] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0686] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0687] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0688] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0689] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向PTPN2的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的TAL

效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0690] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0691] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0692] 在一些实施方案中,基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白,其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域,并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0693] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%

同一性的靶DNA序列。

[0694] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:331-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0695] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向SOCS1的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0696] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0697] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:23-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0698] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向CBLB的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子

结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0699] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0700] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0701] 在一些实施方案中，基于蛋白质的基因调控系统包含至少两种Talen融合蛋白，其中至少一种Talen融合蛋白包含靶向RC3H1的TAL效应子结构域，并且至少一种Talen融合蛋白包含靶向NFKBIA的TAL效应子结构域。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0702] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性

的靶DNA序列。

[0703] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的TAL效应子结构域结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0704] 基于组合核酸/蛋白质的基因调控系统

[0705] 组合基因调控系统包含定点修饰多肽和核酸指导分子。本文中，“定点修饰多肽”是指结合核酸指导分子的多肽，通过其结合的核酸指导分子靶向靶核酸序列(例如，内源靶DNA或RNA序列)，并修饰靶核酸序列(例如，靶核酸序列的切割、突变或甲基化)。

[0706] 定点修饰多肽包含两个部分，与核酸指导物结合的部分和活性部分。在一些实施方案中，定点修饰多肽包含表现出定点酶活性(例如，DNA甲基化、DNA或RNA切割、组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化等)的活性部分，其中酶活性的位点由指导核酸确定。在一些情况下，定点修饰多肽包括具有修饰内源靶核酸序列的酶活性(例如，核酸酶活性、甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、DNA修复活性、DNA损伤活性、脱氨活性、歧化酶活性、烷基化活性、脱嘌呤活性、氧化活性、嘧啶二聚体形成活性、整合酶活性、转座酶活性、重组酶活性、聚合酶活性、连接酶活性、解旋酶活性、光解酶活性或糖基化酶活性)的活性部分。在其他情况下，定点修饰多肽包含具有修饰与内源靶核酸序列相关的多肽(例如，组蛋白)的酶活性(例如，甲基转移酶活性、脱甲基酶活性、乙酰转移酶活性、脱乙酰酶活性、激酶活性、磷酸酶活性、泛素连接酶活性、脱泛素化活性、腺苷酰化活性、脱腺苷酰化活性、SUMO化活性、脱SUMO化活性、核糖基化活性、脱核糖基化活性、豆蔻酰化活性或脱豆蔻酰化活性)的活性部分。在一些实施方案中，定点修饰多肽包含调节靶DNA序列的转录(例如，增加或减少转录)的活性部分。在一些实施方案中，定点修饰多肽包含调节靶RNA序列的表达或翻译(例如，增加或减少转录)的活性部分。

[0707] 核酸指导物包含两个部分：与内源靶核酸序列互补并能够与其结合的第一部分(本文中称为“核酸结合区段”)，以及能够与定点修饰多肽相互作用的第二部分(本文中称为“蛋白质结合区段”)。在一些实施方案中，核酸指导物的核酸结合区段和蛋白质结合区段包含在单个多核苷酸分子内。在一些实施方案中，核酸指导物的核酸结合区段和蛋白质结合区段各自包含在单独的多核苷酸分子内，使得核酸指导物包含两个彼此缔合以形成功能性指导物的多核苷酸分子。

[0708] 核酸指导物通过与靶核酸序列特异性杂交来介导组合的蛋白质/核酸基因调控系统的靶特异性。在一些实施方案中，靶核酸序列是RNA序列，诸如包含在靶基因的mRNA转录物中的RNA序列。在一些实施方案中，靶核酸序列是包含在靶基因的DNA序列中的DNA序列。本文提及靶基因涵盖该特定基因的全长DNA序列，其包含多个靶遗传基因座(即，特定靶基因序列的部分(例如，外显子或内含子))。在每个靶遗传基因座内的是本文中称为“靶DNA序列”的DNA序列的较短片段，其可以通过本文所述的基因调控系统进行修饰。此外，每个靶遗传基因座包含“靶修饰位点”，其是指由基因调控系统诱导的修饰的精确位置(例如，插入、

缺失或突变的位置,DNA断裂的位置或表观遗传修饰的位置)。本文所述的基因调控系统可包含2种或更多种核酸指导物(例如,2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种、10种或更多种核酸指导物)。

[0709] 在一些实施方案中,组合的蛋白质/核酸基因调控系统包含来源于Argonaute(Ago)蛋白(例如,T.thermophiles Ago或TtAgo)的定点修饰多肽。在此类实施方案中,定点修饰多肽是T.thermophiles Ago DNA核酸内切酶,并且核酸指导物是指导DNA(gDNA)(参见,Swarts等人,Nature 507(2014),258-261)。在一些实施方案中,本公开提供了编码gDNA的多核苷酸。在一些实施方案中,编码gDNA的核酸包含在表达载体中,例如重组表达载体中。在一些实施方案中,本公开提供了编码TtAgo定点修饰多肽或其变体的多核苷酸。在一些实施方案中,编码TtAgo定点修饰多肽的多核苷酸包含在表达载体中,例如重组表达载体中。

[0710] 在一些实施方案中,本文所述的基因编辑系统是CRISPR(成簇的规则间隔的短回文重复序列)/Cas(CRISPR相关)核酸酶系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是2类系统。2类CRISPR/Cas系统分为三种类型:II型、V型和VI型系统。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是利用Cas9蛋白的2类II型系统。在此类实施方案中,定点修饰多肽是Cas9 DNA核酸内切酶(或其变体),并且核酸指导分子是指导RNA(gRNA)。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是利用Cas12蛋白(例如,Cas12a(也称为Cpf1)、Cas12b(也称为C2c1)、Cas12c(也称为C2c3)、Cas12d(也称为CasY)和Cas12e(也称为CasX))的2类V型系统。在此类实施方案中,定点修饰多肽是Cas12DNA核酸内切酶(或其变体),并且核酸指导分子是gRNA。在一些实施方案中,CRISPR/Cas系统是利用Cas13蛋白(例如,Cas13a(也称为C2c2)、Cas13b和Cas13c)的2类VI型系统。(参见,Pyzocha等人,ACS Chemical Biology,13(2),347-356)。在此类实施方案中,定点修饰多肽是Cas13 RNA核糖核酸内切酶,并且核酸指导分子是gRNA。

[0711] Cas多肽是指可以与gRNA分子相互作用并且与gRNA分子一起归巢或定位于靶DNA或靶RNA序列的多肽。Cas多肽包括天然存在的Cas蛋白,以及与天然存在的Cas序列相差一个或多个氨基酸残基的工程化的、改变的或以其他方式修饰的Cas蛋白。

[0712] 指导RNA(gRNA)包含两个区段,DNA结合区段和蛋白质结合区段。在一些实施方案中,gRNA的蛋白质结合区段包含在一个RNA分子中,而DNA结合区段包含在另一个单独的RNA分子中。此类实施方案在本文中称为“双分子gRNA”或“两分子gRNA”或“双gRNA”。在一些实施方案中,gRNA是单个RNA分子,并且在本文中被称为“单指导RNA”或“sgRNA”。术语“指导RNA”或“gRNA”是包括性的,是指两分子指导RNA和sgRNA两者。

[0713] gRNA的蛋白质结合区段部分地包含两个互补的核苷酸片段,所述片段彼此杂交以形成双链RNA双链体(dsRNA双链体),所述双链体促进与Cas蛋白的结合。gRNA的核酸结合区段(或“核酸结合序列”)包含与特异性靶核酸序列互补并能够与其结合的核苷酸序列。gRNA的蛋白质结合区段与Cas多肽相互作用,并且gRNA分子与定点修饰多肽的相互作用导致Cas与内源核酸序列结合,并且在靶核酸序列内或周围产生一个或多个修饰。靶修饰位点的精确位置由以下两者确定:(i)gRNA与靶核酸序列之间的碱基配对互补性;和(ii)短基序(称为前间隔序列邻近基序(PAM))在靶DNA序列中的位置(在靶RNA序列中称为前间隔序列侧翼序列(PFS))。PAM/PFS序列是Cas与靶核酸序列结合所需的。多种PAM/PFS序列是本领域已知的并且适用于特定的Cas核酸内切酶(例如,Cas9核酸内切酶)。(参见例如,Nat

Methods.2013Nov;10(11):1116-1121和Sci Rep.2014;4:5405)。在一些实施方案中,PAM序列位于靶DNA序列中靶修饰位点的50个碱基对内。在一些实施方案中,PAM序列位于靶DNA序列中靶修饰位点的10个碱基对内。可以通过这种方法靶向的DNA序列仅受限于PAM序列与靶修饰位点的相对距离以及介导序列特异性的gRNA介导的Cas结合的独特20个碱基对序列的存在。在一些实施方案中,PFS序列位于靶RNA序列的3'末端。在一些实施方案中,靶修饰位点位于靶基因座的5'末端。在一些实施方案中,靶修饰位点位于靶基因座的3'末端。在一些实施方案中,靶修饰位点位于靶基因座的内含子或外显子内。

[0714] 在一些实施方案中,本公开提供了编码gRNA的多核苷酸。在一些实施方案中,编码gRNA的核酸包含在表达载体中,例如重组表达载体中。在一些实施方案中,本公开提供了编码定点修饰多肽的多核苷酸。在一些实施方案中,编码定点修饰多肽的多核苷酸包含在表达载体中,例如重组表达载体中。

[0715] Cas蛋白

[0716] 在一些实施方案中,定点修饰多肽是Cas蛋白。多种物种的Cas分子可以用于本文所述的方法和组合物中,包括来源于以下的Cas分子:酿脓链球菌(S.pyogenes)、金黄色葡萄球菌(S.aureus)、脑膜炎奈瑟氏菌(N.meningitidis)、嗜热链球菌(S.thermophiles)、燕麦嗜酸菌(Acidovorax avenae)、胸膜肺炎放线杆菌(Actinobacillus pleuropneumoniae)、琥珀酸放线杆菌(Actinobacillus succinogenes)、猪放线杆菌(Ac tinobacillus suis)、放线菌属物种(Actinomyces sp.)、Cycliphilus denit rificans、少食氨基单胞菌(Aminomonas paucivorans)、蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus)、史密斯芽孢杆菌(Bacillus smithii)、苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis)、拟杆菌属物种(Bacteroides sp)、海洋芽小梨形菌(Blastopirellula marina)、慢生根瘤菌属物种(Bradyrhizobium sp.)、侧孢短芽孢杆菌(Brevibacillus laterospoxus)、大肠弯曲杆菌(Campylo bacter coli)、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、拉里弯曲杆菌(Campylobacter lari)、Candidatus puniceispirillum、解纤梭菌(Clostridiu m cellulolyticum)、产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)、拥挤棒杆菌(Corynebacterium accolens)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium dipht heria)、马氏棒杆菌(Corynebacterium matruchotii)、恒雄芝氏沟鞭藻玫瑰杆菌(Dinoroseobacter shibae)、细长真杆菌(Eubacterium dolichu m)、伽马变形杆菌(Gammaproteobacterium)、重氮葡糖醋杆菌(Glucon acetobacter diazotrophicus)、流感嗜血菌(Haemophilus parainfluenza e)、唾液嗜血菌(Haemophilus sputomm)、加拿大螺杆菌(Helicobacter canadensis)、同性恋螺杆菌(Helicobacter cinaedi)、雪貂螺杆菌(Helic obacter mustelae)、多养型泥杆菌(Ilyobacter polytropus)、金氏金菌(Kingella kingae)、卷曲乳酸杆菌(Lactobacillus crispatus)、伊氏李斯特氏菌(Listeria ivanovii)、单增李斯特菌(Listeria monocytogenes)、李斯特菌科细菌(Listeriaceae bacterium)、甲基孢囊菌属物种(Methylocysti s sp.)、发孢甲基弯曲菌(Methylosinus trichosporium)、羞怯动弯杆菌(Mobiluncus mulieris)、杆状奈瑟氏菌(Neisseria bacilliformis)、灰色奈瑟氏菌(Neisseria cinerea)、浅黄奈瑟氏菌(Neisseria flavescens)、乳糖奈瑟氏菌(Neisseria lactamica)、脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseria meningi tidis)、奈瑟氏菌属物种(Neisseria sp.)、沃氏奈瑟氏菌(Neisseria wads worthii)、亚硝化单胞菌属物种

(Nitrosomonas sp.)、食清洁剂细小棒菌(Parvibaculum lavamentivorans)、多杀性巴氏杆菌(Pasteurella multoci da)、食琥珀酸考拉杆菌(Phascolarctobacterium succinatutens)、蒲桃雷尔氏菌(Ralstonia syzygii)、沼泽红假单胞菌(Rhodopseudomonas palus tris)、小红卵菌属物种(Rhodovulum sp.)、米氏西蒙斯氏菌(Simonsiell a muelleri)、鞘氨醇单胞菌属物种(Sphingomonas sp.)、葡萄园芽孢乳杆菌(Sporolactobacillus vineae)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aur eus)、路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)、链球菌属物种(Stre ptococcus sp.)、罕见小球菌属物种(Subdoligranulum sp.)、运动替斯崔纳菌(Tistrella mobilis)、密螺旋体属物种(Treponema sp.)或Vermin ephrobacter eiseniae。

[0717] 在一些实施方案中,Cas蛋白是天然存在的Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶选自由以下组成的组:C2C1、C2C3、Cpf1(也称为Cas12a)、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d、Casl、CaslB、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csnl和Csx12)、Cas10、Csyl、Csy2、Csy3、Csel、Cse2、Cscl、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmrl、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csbl、Csb2、Csb3、Csxl7、Csxl4、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csxl、Csxl5、Csfl、Csf2、Csf3和Csf4。

[0718] 在一些实施方案中,Cas蛋白是核糖核酸内切酶,诸如Cas13蛋白。在一些实施方案中,Cas13蛋白是Cas13a(Abudayyeh等人,Nature 550(2017),280-284)、Cas13b(Cox等人,Science(2017)358:6336,1019-1027)、Cas13c(Cox等人,Science(2017)358:6336,1019-1027)或Cas13d(Zhang等人,Cell 175(2018),212-223)蛋白。

[0719] 在一些实施方案中,Cas蛋白是野生型或天然存在的Cas9蛋白或Cas9直系同源物。野生型Cas9是一种多结构域酶,其使用HNH核酸酶结构域来切割DNA的靶链,并使用RuvC样结构域来切割非靶链。野生型Cas9与DNA的基于gRNA特异性的结合导致双链DNA断裂,所述破裂可通过非同源末端连接(NHEJ)或同源性定向修复(HDR)进行修复。示例性的天然存在的Cas9分子在Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中有所描述,并且另外的Cas9直系同源物在国际PCT公开号WO 2015/071474中有所描述。此类Cas9分子包括第1类群细菌科、第2类群细菌科、第3类群细菌科、第4类群细菌科、第5类群细菌科、第6类群细菌科、第7类群细菌科、第8类群细菌科、第9类群细菌科、第10类群细菌科、第11类群细菌科、第12类群细菌科、第13类群细菌科、第14类群细菌科、第15类群细菌科、第16类群细菌科、第17类群细菌科、第18类群细菌科、第19类群细菌科、第20类群细菌科、第21类群细菌科、第22类群细菌科、第23类群细菌科、第24类群细菌科、第25类群细菌科、第26类群细菌科、第27类群细菌科、第28类群细菌科、第29类群细菌科、第30类群细菌科、第31类群细菌科、第32类群细菌科、第33类群细菌科、第34类群细菌科、第35类群细菌科、第36类群细菌科、第37类群细菌科、第38类群细菌科、第39类群细菌科、第40类群细菌科、第41类群细菌科、第42类群细菌科、第43类群细菌科、第44类群细菌科、第45类群细菌科、第46类群细菌科、第47类群细菌科、第48类群细菌科、第49类群细菌科、第50类群细菌科、第51类群细菌科、第52类群细菌科、第53类群细菌科、第54类群细菌科、第55类群细菌科、第56类群细菌科、第57类群细菌科、第58类群细菌科、第59类群细菌科、第60类群细菌科、第61类群细菌科、第62类群细菌科、第63类群细菌科、第64类群细菌科、第65类群细菌科、第66类群细菌科、第67类群细菌科、第68类群细菌科、第69类群细菌科、第70类群细菌科、第71类群细菌科、第72类群细菌

科、第73类群细菌科、第74类群细菌科、第75类群细菌科、第76类群细菌科、第77类群细菌科或第78类群细菌科的Cas9分子。

[0720] 在一些实施方案中，天然存在的Cas9多肽选自由以下组成的组：SpCas9、SpCas9-HF1、SpCas9-HF2、SpCas9-HF3、SpCas9-HF4、SaCas9、FnCpf、FnCas9、eSpCas9和NmeCas9。在一些实施方案中，Cas9蛋白包含与描述于Chylinski等人，RNA Biology 2013 10:5,727-737；Hou等人，PNAS Early Edition 2013,1-6)中的Cas9氨基酸序列具有至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性的氨基酸序列。

[0721] 在一些实施方案中，Cas多肽包含以下活性中的一种或多种：

[0722] (a)切口酶活性，即切割核酸分子的单链(例如，非互补链或互补链)的能力；

[0723] (b)双链核酸酶活性，即切割双链核酸的两条链并产生双链断裂的能力，在一个实施方案中，这是存在两种切口酶活性；

[0724] (c)核酸内切酶活性；

[0725] (d)核酸外切酶活性；和/或

[0726] (e)解旋酶活性，即解旋双链核酸的螺旋结构的能力。

[0727] 在一些实施方案中，将Cas多肽与募集DNA损伤信号传导蛋白、核酸外切酶或磷酸酶的异源蛋白融合，以进一步增加通过一种或另一种修复机制修复靶序列的可能性或速率。在一些实施方案中，野生型Cas多肽与核酸修复模板共表达以促进外源核酸序列通过同源性定向修复的引入。

[0728] 在一些实施方案中，不同的Cas蛋白(即，来自各种物种的Cas9蛋白)可有利地用于各种所提供的方法中，以便利用不同Cas蛋白的各种酶特性(例如，用于不同的PAM序列偏好；用于增加或减小的酶活性；用于增加或减小的细胞毒性水平；改变NHEJ、同源性定向修复、单链断裂、双链断裂等之间的平衡)。

[0729] 在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于酿脓链球菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序NGG、NAG、NGA(Mali等人，Science 2013;339(6121):823-826)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于嗜热链球菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序NGGNG和/或NNAGAAW(W＝A或T)(参见例如，Horvath等人，Science,2010;327(5962):167-170和Deveau等人，J Bacteriol 2008;190(4):1390-1400)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于变形链球菌(S.mutans)的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序NGG和/或NAAR(R＝A或G)(参见例如，Deveau等人，J BACTERIOL 2008;190(4):1390-1400)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序NNGRR(R＝A或G)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序N GRRT(R＝A或G)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于金黄色葡萄球菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序N GRRV(R＝A或G)。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于脑膜炎奈瑟氏菌的Cas9蛋白，并识别PAM序列基序N GATT或N GCTT(R＝A或G，V＝A、G或C)(参见例如，Hou等人，PNAS 2013,1-6)。在上述实施方案中，N可以是任何核苷酸残基，例如，A、G、C或T中的任一种。在一些实施方案中，Cas蛋白是来源于沙氏纤毛菌(Leptotrichia shahii)的Cas13a蛋白，并识别单个3'A、U或C的PFS序列基序。

[0730] 在一些实施方案中，提供了编码Cas蛋白的多核苷酸。在一些实施方案中，多核苷

酸编码与描述于国际PCT公开号WO 2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中的Cas蛋白具有至少90%同一性的Cas蛋白。在一些实施方案中,多核苷酸编码与描述于国际PCT公开号2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中的Cas蛋白具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的Cas蛋白。在一些实施方案中,多核苷酸编码与描述于国际PCT公开号WO 2015/071474或Chylinski等人,RNA Biology 2013 10:5,727-737中的Cas蛋白具有100%同一性的Cas蛋白。

[0731] Cas突变体

[0732] 在一些实施方案中,对Cas多肽进行工程改造以改变Cas多肽的一种或多种性质。例如,在一些实施方案中,Cas多肽包含改变的酶特性,例如改变的核酸酶活性(与天然存在的或其他参考Cas分子相比)或改变的解旋酶活性。在一些实施方案中,工程化的Cas多肽可以具有改变其大小的改变,例如,减小序列大小,但对Cas多肽的另一种性质没有显著影响的氨基酸序列缺失。在一些实施方案中,工程化的Cas多肽包含影响PAM识别的改变。例如,可以改变工程化的Cas多肽以识别除了被对应的野生型Cas蛋白识别的PAM序列以外的PAM序列。

[0733] 具有期望性质的Cas多肽可以通过多种方式制备,包括改变天然存在的Cas多肽或亲本Cas多肽,以提供具有期望性质的突变体或改变的Cas多肽。例如,可以将一个或多个突变引入到亲本Cas多肽(例如,天然存在或工程化的Cas多肽)的序列中。此类突变和差异可以包括取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代);插入;或缺失。在一些实施方案中,相对于亲本Cas多肽,突变体Cas多肽包含一个或多个突变(例如,至少1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、30个、40个或50个突变)。

[0734] 在一个实施方案中,突变体Cas多肽包含与天然存在的Cas多肽不同的切割性质。在一些实施方案中,Cas是失活的Cas(dCas)突变体。在此类实施方案中,Cas多肽不包含任何内在的酶活性,并且不能介导靶核酸切割。在此类实施方案中,dCas可以与能够以基于非切割的方式修饰靶核酸的异源蛋白融合。例如,在一些实施方案中,dCas蛋白与转录激活物或转录阻遏物结构域(例如,Kruppel相关盒(KRAB或SKD);Mad mSIN3相互作用结构域(SID或SID4X);ERF阻遏物结构域(ERD);MAX相互作用蛋白1(MXI1);甲基CpG结合蛋白2(MECP2)等)融合。在一些此类情况下,dCas融合蛋白被sgRNA靶向靶核酸中的具体位置(即序列),并发挥基因座特异性调控,诸如阻断RNA聚合酶与启动子的结合(其选择性地抑制转录激活物功能),和/或修饰局部染色质状态(例如,当使用修饰靶DNA或修饰与靶DNA相关的多肽的融合序列时)。在一些情况下,变化是瞬时的(例如,转录抑制或激活)。在一些情况下,变化是可遗传的(例如,当对靶DNA或与靶DNA相关的蛋白质(例如,核小体组蛋白)进行表观遗传修饰时)。

[0735] 在一些实施方案中,dCas是dCas13突变体(Konermann等人,Cell 173(2018),665-676)。然后可以将这些dCas13突变体与修饰RNA的酶融合,所述酶包括腺苷脱氨酶(例如,ADAR1和ADAR2)。腺苷脱氨基酶将腺嘌呤转化为肌苷,翻译机制将其视为鸟嘌呤,从而在RNA序列中产生功能性A→G变化。在一些实施方案中,dCas是dCas9突变体。

[0736] 在一些实施方案中,突变体Cas9是Cas9切口酶突变体。Cas9切口酶突变体仅包含一个催化活性结构域(HNH结构域或RuvC结构域)。Cas9切口酶突变体保留基于gRNA特异性的DNA结合,但仅能够切割一条DNA链,从而导致单链断裂(例如,“切口”)。在一些实施方案

中,两个互补的Cas9切口酶突变体(例如,一个具有失活的RuvC结构域的Cas9切口酶突变体,以及一个具有失活的HNH结构域的Cas9切口酶突变体)在同一细胞中用对应于两个相应靶序列的两个gRNA表达;一个在有义DNA链上的靶序列,以及一个在反义DNA链上的靶序列。这种双切口酶系统导致交错的双链断裂,并且可以增加靶特异性,因为不太可能生成两个足够近的脱靶切口以生成双链断裂。在一些实施方案中,Cas9切口酶突变体与核酸修复模板共表达,以促进外源核酸序列通过同源性定向修复的引入。

[0737] 在一些实施方案中,可以对本文所述的Cas多肽进行工程改造以改变Cas多肽的PAM/PFS特异性。在一些实施方案中,突变体Cas多肽具有与亲本Cas多肽的PAM/PFS特异性不同的PAM/PFS特异性。例如,可以修饰天然存在的Cas蛋白以改变突变体Cas多肽识别的PAM/PFS序列,来减少脱靶位点、提高特异性或消除PAM/PFS识别需求。在一些实施方案中,可以修饰Cas蛋白以增加PAM/PFS识别序列的长度。在一些实施方案中,PAM识别序列的长度为至少4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或15个氨基酸。可以使用定向进化生成识别不同PAM/PFS序列且/或具有降低的脱靶活性的Cas多肽。可以用于Cas多肽的定向进化的示例性方法和系统在例如Esvelt等人Nature 2011,472(7344):499-503中有所描述。

[0738] 示例性Cas突变体在国际PCT公开号WO 2015/161276和Konermann等人,Cell 173(2018),665-676中有所描述,所述专利和文献以引用方式整体并入本文。

[0739] 指导RNA(gRNA)

[0740] 本公开提供了将定点修饰多肽定向至特定靶核酸序列的指导RNA(gRNA)。gRNA包含核酸靶向区段和蛋白质结合区段。gRNA的核酸靶向区段包含与靶核酸序列中的序列互补的核苷酸序列。因此,gRNA的核酸靶向区段经由杂交(即,碱基配对)以序列特异性方式与靶核酸相互作用,并且核酸靶向区段的核苷酸序列确定gRNA将结合的靶核酸内的位置。可以修饰gRNA的核酸靶向区段(例如,通过遗传工程)以与靶核酸序列内的任何期望序列杂交。

[0741] 指导RNA的蛋白结合区段与定点修饰多肽(例如,Cas蛋白)相互作用以形成复合物。指导RNA经由上述核酸靶向区段将结合的多肽指导至靶核酸内的特定核苷酸序列。指导RNA的蛋白结合区段包含两个核苷酸片段,它们彼此互补并形成双链RNA双链体。

[0742] 在一些实施方案中,gRNA包含两个单独的RNA分子。在此类实施方案中,两个RNA分子中的每一个都包含彼此互补的核苷酸片段,使得两个RNA分子的互补核苷酸杂交以形成蛋白质结合区段的双链RNA双链体。在一些实施方案中,gRNA包含单个RNA分子(sgRNA)。

[0743] (i)gRNA对靶基因座的特异性由核酸结合区段的序列介导,所述核酸结合区段包含与靶基因座内的靶核酸序列互补的约20个核苷酸。在一些实施方案中,对应的靶核酸序列的长度为大约20个核苷酸。在一些实施方案中,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列至少90%互补。在一些实施方案中,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列至少95%、96%、97%、98%或99%互补。在一些实施方案中,本公开的gRNA序列的核酸结合区段与靶基因座内的靶核酸序列100%互补。在一些实施方案中,靶核酸序列是RNA靶序列。在一些实施方案中,靶核酸序列是DNA靶序列。在一些实施方案中,靶核酸序列是来自内源基因的DNA靶序列,所述内源基因包括ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、

SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)_

[0744] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少一种gRNA分子,该至少一种gRNA分子包含靶向SOCS1的核酸结合区段(即,靶向SOCS1的gRNA)。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0745] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与表3或表4中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。示例性SOCS1靶DNA序列在表26和表27中示出。

[0746] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。编码靶向SOCS1的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表26和表27中示出。

[0747] 表26:示例性人SOCS1靶序列

[0748]

靶标	序列	SEQ ID
hSOCS1_gRNA_1	GCGGCTGCGCGCCGAGCCCG	56
hSOCS1_gRNA_2	GGACGCCTGCGGATTCTACT	57
hSOCS1_gRNA_3	GGCTGCCATCCAGGTGAAAG	58
hSOCS1_gRNA_4	GCGGCTGTCGCGCACCAGGA	59
hSOCS1_gRNA_5	TGGACGCCTGCGGATTCTAC	60
hSOCS1_gRNA_6	GACGCCTGCGGATTCTACTG	61
hSOCS1_gRNA_7	AGTGCTCCAGCAGCTCGAAG	62
hSOCS1_gRNA_8	GCCGGCCGCTTTCACCTGGA	63
hSOCS1_gRNA_9	AGTAGAATCCGCAGGCGTCC	64
hSOCS1_gRNA_10	CGCACCAGGAAGGTGCCCAC	65
hSOCS1_gRNA_11	GGCCGGCCTGAAAGTGCACG	66
hSOCS1_gRNA_12	TCCGTTCGCACGCCGATTAC	67

[0749]

靶标	序列	SEQ ID
hSOCS1_gRNA_13	AGCGCGCTCCTGGACGCCTG	68
hSOCS1_gRNA_14	CGGCTGCGCGCCGAGCCCGT	69
hSOCS1_gRNA_15	ACGCCTGCGGATTCTACTGG	70
hSOCS1_gRNA_16	CGAGGCCATCTTCACGCTAA	71
hSOCS1_gRNA_17	TCAGGCCGGCCGCTTTCACC	72
hSOCS1_gRNA_18	CTTAGCGTGAAGATGGCCTC	73
hSOCS1_gRNA_19	GCCGGTAATCGGCGTGCGAA	74
hSOCS1_gRNA_20	CTGCATTGTCGGCTGCCACC	75
hSOCS1_gRNA_21	GTGCGCCCCGTGCACGCTCA	76
hSOCS1_gRNA_22	GCTGTGCCGCCAGCGCATCG	77
hSOCS1_gRNA_23	CACGCGGCGCTGGCGCAGCG	78
hSOCS1_gRNA_24	GCTCCTGCAGCGGCCGCACG	79
hSOCS1_gRNA_25	AGCTCTCGCGGCTGCCATCC	80
hSOCS1_gRNA_26	TGGTGCGCGACAGCCGCCAG	81
hSOCS1_gRNA_27	GATGGTAGCACACAACCAGG	82
hSOCS1_gRNA_28	AGAGGCAGTCGAAGCTCTCG	83
hSOCS1_gRNA_29	GCTGGCGGCTGTCGCGCACC	84
hSOCS1_gRNA_30	CCGAGGCCATCTTCACGCTA	85
hSOCS1_gRNA_31	GGGGCCCCCAGCATGCGGCG	86
hSOCS1_gRNA_32	GCTGCTGGAGCACTACGTGG	87
hSOCS1_gRNA_33	CGAGCTGCTGGAGCACTACG	88
hSOCS1_gRNA_34	CGAAAAAGCAGTTCCGCTGG	89
hSOCS1_gRNA_35	GCAGGCGTCCAGGAGCGCGC	90
hSOCS1_gRNA_36	GGGGCCCCTGAGCGTGCACG	91
hSOCS1_gRNA_37	GCGGCGCCGCGCCGCATGCT	92
hSOCS1_gRNA_38	GCACGCGGCGCTGGCGCAGC	93
hSOCS1_gRNA_39	TGGGGGCCCCTGAGCGTGCA	94
hSOCS1_gRNA_40	CAGGAAGGTGCCCACGGGCT	95
hSOCS1_gRNA_41	TGCGCCCCGTGCACGCTCAG	96
hSOCS1_gRNA_42	GCCATCCAGGTGAAAGCGGC	97
hSOCS1_gRNA_43	CACGCGCGCCAGCGCGCTCC	98
hSOCS1_gRNA_44	GGGCCCCCAGTAGAATCCGC	99
hSOCS1_gRNA_45	ATCCGCGTGCACTTTCAGGC	100
hSOCS1_gRNA_46	CGAGCCCGTGGGCACCTTCC	101
hSOCS1_gRNA_47	CCACAGCAGCAGAGCCCCGA	102
hSOCS1_gRNA_48	AGCCAGGTTCTCGCGGCCCA	103
hSOCS1_gRNA_49	AAAGTGCACGCGGATGCTCG	104
hSOCS1_gRNA_50	CTCTTCCTCCTCCTCGCCCG	105
hSOCS1_gRNA_51	GCGTGCACGGGGCGCACGAG	106
hSOCS1_gRNA_52	AAGTGCACGCGGATGCTCGT	107
hSOCS1_gRNA_53	CGTGCGCCCCGTGCACGCTC	108
hSOCS1_gRNA_54	GCAGCGGCCGCACGCGGCGC	109
hSOCS1_gRNA_55	CCTTAGCGTGAAGATGGCCT	110
hSOCS1_gRNA_56	CAGGTTCTCGCGGCCCACGG	111
hSOCS1_gRNA_57	GCGCACCAGGAAGGTGCCCA	112
hSOCS1_gRNA_58	GCTGCCGGTCAAATCTGGAA	113
hSOCS1_gRNA_59	CGGCGTGCGAACGGAATGTG	114

[0750]

靶标	序列	SEQ ID
hSOCS1_gRNA_60	CAGCAGCAGAGCCCCGACGG	115
hSOCS1_gRNA_61	GGGCGAAAAAGCAGTTCCGC	116
hSOCS1_gRNA_62	CGCACGCGGCGCTGGCGCAG	117
hSOCS1_gRNA_63	GGATGCGAGCCAGGTTCTCG	118
hSOCS1_gRNA_64	TGGCGGCACAGCTCCTGCAG	119
hSOCS1_gRNA_65	GCGCCCGCGGCCGTGCCCCG	120
hSOCS1_gRNA_66	GGCGCCGCGCCGCATGCTGG	121
hSOCS1_gRNA_67	CGGTGGCCACGATGCGCTGG	122
hSOCS1_gRNA_68	TGCTGTGGAGACTGCATTGT	123
hSOCS1_gRNA_69	TAGGATGGTAGCACACAACC	124
hSOCS1_gRNA_70	GCGGCCGTGCCCCGCGGTCC	125
hSOCS1_gRNA_71	GAGCATCCGCGTGCACTTTC	126
hSOCS1_gRNA_72	CGCTGCCGGTCAAATCTGGA	127
hSOCS1_gRNA_73	CAGCGCATCGTGGCCACCGT	128
hSOCS1_gRNA_74	GCGGATGCTCGTGGGTCCCG	129
hSOCS1_gRNA_75	CGGCGCCGCGCCGCATGCTG	130
hSOCS1_gRNA_76	CGGTCAAATCTGGAAGGGGA	131
hSOCS1_gRNA_77	AGGAAGGTTCTGGCCGCCGT	132
hSOCS1_gRNA_78	CCACGGTGGCCACGATGCGC	133
hSOCS1_gRNA_79	CGCTGCGCCAGCGCCGCGTG	134
hSOCS1_gRNA_80	AGGAGCTCAGGTAGTCGCGG	135
hSOCS1_gRNA_81	GCAGCGGGGCCCCCAGCATG	136
hSOCS1_gRNA_82	GGAAGGAGCTCAGGTAGTCG	137
hSOCS1_gRNA_83	TCGCGGAGGACGGGGTTGAG	138
hSOCS1_gRNA_84	CGACTGCCTCTTCGAGCTGC	139
hSOCS1_gRNA_85	GCGCCGCGTGCGGCCGCTGC	140
hSOCS1_gRNA_86	CACCGTGGGCCGCGAGAACC	141
hSOCS1_gRNA_87	GTGCCCCGCGGTCCCGGCCC	142
hSOCS1_gRNA_88	CTGCCGGTCAAATCTGGAAG	143
hSOCS1_gRNA_89	CTTCCCCTTCCAGATTTGAC	144
hSOCS1_gRNA_90	CTCAGGTAGTCGCGGAGGAC	145
hSOCS1_gRNA_91	CGGGCGCTGCCGGTCAAATC	146
hSOCS1_gRNA_92	GGAAGGTTCTGGCCGCCGTC	147
hSOCS1_gRNA_93	GCTCAGGTAGTCGCGGAGGA	148
hSOCS1_gRNA_94	GCGGAAGTGCGTGTCGCCGG	149
hSOCS1_gRNA_95	GGACCGCGGGGCACGGCCGC	150
hSOCS1_gRNA_96	GGGACCGCGGGGCACGGCCG	151
hSOCS1_gRNA_97	GCGCGTGATGCGCCGGTAAT	152
hSOCS1_gRNA_98	TCAGGTAGTCGCGGAGGACG	153
hSOCS1_gRNA_99	TGCGGAAGTGCGTGTCGCCG	154
hSOCS1_gRNA_100	GGGGCCGGGACCGCGGGGCA	155
hSOCS1_gRNA_101	CCGTCGGGGCTCTGCTGCTG	156
hSOCS1_gRNA_102	GAAGGTTCTGGCCGCCGTCG	157
hSOCS1_gRNA_103	GTGTGCTACCATCCTACAGA	158
hSOCS1_gRNA_104	GTCGCGGAGGACGGGGTTGA	159
hSOCS1_gRNA_105	CGCTGGCGCGCGTGATGCGC	160
hSOCS1_gRNA_106	GCGTGCACGGCGGGCGCTGC	161

靶标	序列	SEQ ID
hSOCS1_gRNA_107	TCTGGAAGGGGAAGGAGCTC	162
hSOCS1_gRNA_108	GTGCGTGTCGCCGGGGGCCG	163
hSOCS1_gRNA_109	GGGCACGGCCGCGGGCGCGC	164
hSOCS1_gRNA_110	GTTAATGCTGCGTGCACGGC	165
hSOCS1_gRNA_111	GCACGGCCGCGGGCGCGCGG	166
hSOCS1_gRNA_112	GGGGCACGGCCGCGGGCGCG	167
hSOCS1_gRNA_113	GTGCGGAAGTGCGTGTCGCC	168
hSOCS1_gRNA_114	GAGGAAGAGGAGGAAGGTTC	169
hSOCS1_gRNA_115	GGCTGGCCCCTTCTGTAGGA	170
hSOCS1_gRNA_116	GGGGCCGGGGCCGGGACCGC	171
hSOCS1_gRNA_117	CGCGGAGGACGGGGTTGAGG	172
hSOCS1_gRNA_118	TTTCGCCCTTAGCGTGAAGA	173
hSOCS1_gRNA_119	GGCACGGCCGCGGGCGCGCG	174
hSOCS1_gRNA_120	AGTCGCGGAGGACGGGGTTG	175
hSOCS1_gRNA_121	GGGCCGGGGCCGGGACCGCG	176
hSOCS1_gRNA_122	AAGTGCGTGTCGCCGGGGGC	177
hSOCS1_gRNA_123	CTCCGGCTGGCCCCTTCTGT	178
hSOCS1_gRNA_124	GGCGGCGCCGCGCCGCATGC	179
hSOCS1_gRNA_125	AGTGCGTGTCGCCGGGGGCC	180
hSOCS1_gRNA_126	TGTGCGGAAGTGCGTGTCGC	181
hSOCS1_gRNA_127	GTGTCGCCGGGGGCCGGGGC	182
hSOCS1_gRNA_128	TGTCGCCGGGGGCCGGGGCC	183
hSOCS1_gRNA_129	GCGGTCCCGGCCCCGGCCCC	184
hSOCS1_gRNA_130	CGCGGGGGCCGCGGGCGAGG	185
hSOCS1_gRNA_131	CGCGGGCGAGGAGGAGGAAG	186
hSOCS1_gRNA_132	GGGCGAGGAGGAGGAAGAGG	187

[0751]

[0752] 表27:示例性鼠Socs1靶序列

[0753]

靶标	序列	SEQ ID
mSocs1_gRNA_1	GAAGTGCACGCGGATGCTCG	188
mSocs1_gRNA_2	AGTGCTCCAGCAGCTCGAAA	189
mSocs1_gRNA_3	GCCGGCCGCTTCCACTTGGA	190
mSocs1_gRNA_4	GCTGTGTCGCCAGCGCATCG	191
mSocs1_gRNA_5	GCGACTGTCGCGCACCAAGA	192
mSocs1_gRNA_6	GCGTGCACGGGGCGCACGAG	193
mSocs1_gRNA_7	TCACGGAGTACCGGGTTAAG	194
mSocs1_gRNA_8	GGACGCCTGCGGCTTCTATT	195
mSocs1_gRNA_9	GCGCGAAGAAGCAGTTCCGT	196
mSocs1_gRNA_10	GCTCAGCGTGAAGATGGCTT	197
mSocs1_gRNA_11	CGAGCCCGTGGGCACCTTCT	198
mSocs1_gRNA_12	ATCCGCGTGCACTTCCAGGC	199
mSocs1_gRNA_13	CGCCAGGTTCTCGCGACCCA	200

[0754] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少一种gRNA分子,该至少一种gRNA分子包含靶向PTPN2的核酸结合区段(即,靶向PTPN2的gRNA)。在一些实施方案中,至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID

NO:4)编码的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0755] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。示例性PTPN2/Ptpn2靶DNA序列在表28和表29中示出。

[0756] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。编码靶向PTPN2的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表28和表29中示出。

[0757] 表28:示例性人PTPN2 gRNA序列

[0758]

靶标	序列	SEQ ID
hPTPN2_gRNA_1	CCATGCCCACCACCATCGAG	201
hPTPN2_gRNA_2	TCTACGGAAACGTATTCGAG	202
hPTPN2_gRNA_3	TTTAGTATATTGAGAACTTG	203
hPTPN2_gRNA_4	GCACTACAGTGGATCACCGC	204
hPTPN2_gRNA_5	TGTCATGCTGAACCGCATTG	205
hPTPN2_gRNA_6	GGAAACTTGGCCACTCTATG	206
hPTPN2_gRNA_7	GTATTTGAAATTATTAATGC	207
hPTPN2_gRNA_8	CAGTTTAGTTGACATAGAAG	208
hPTPN2_gRNA_9	GGGTCTGAATAAGACCCATT	209
hPTPN2_gRNA_10	CCATGACTATCCTCATAGAG	210
hPTPN2_gRNA_11	CCATGACTATCCTCATAGAG	211
hPTPN2_gRNA_12	CTCTTCGAACTCCCGCTCGA	212
hPTPN2_gRNA_13	GAACCCTGACCATGGGCCTG	213
hPTPN2_gRNA_14	GCTCCTTGAACCCTGACCAT	214
hPTPN2_gRNA_15	AGTTGGATACTCAGCGTCGC	215
hPTPN2_gRNA_16	CCGCTCGATGGTGGTGGGCA	216
hPTPN2_gRNA_17	CAGAAATGGCAGCATGTGTT	217
hPTPN2_gRNA_18	GCACTACAGTGGATCACCGC	218
hPTPN2_gRNA_19	GGTAGACACTTGTCTTGTTT	219
hPTPN2_gRNA_20	TGGCAGCATGTGTTAGGAAG	220
hPTPN2_gRNA_21	AGGCCCATGGTCAGGGTTCA	221
hPTPN2_gRNA_22	GTTCAGCATGACAACTGCTT	222
hPTPN2_gRNA_23	CAATGGAGGAGAACAGTGAG	223
hPTPN2_gRNA_24	CTCTTCTATGTCAACTAAAC	224
hPTPN2_gRNA_25	AGTGGATCACCGCAGGCCCA	225
hPTPN2_gRNA_26	CTGACAGGTGACCGATGTAC	226
hPTPN2_gRNA_27	AACTCCCGCTCGATGGTGGT	227
hPTPN2_gRNA_28	GTCTCCCTGATCCATCCAGT	228
hPTPN2_gRNA_29	TAGAGGAAAGTCCTGTACAT	229
hPTPN2_gRNA_30	ATGTATGGAAAGGATGGTAA	230
hPTPN2_gRNA_31	GCCCAATGCCTGCACTACAG	231
hPTPN2_gRNA_32	CGAGCGGGAGTTCGAAGAGT	232
hPTPN2_gRNA_33	TCACCGCAGGCCCATGGTCA	233
hPTPN2_gRNA_34	CAGTTTAGTTGACATAGAAG	234
hPTPN2_gRNA_35	CCATGCCCACCACCATCGAG	235
hPTPN2_gRNA_36	GCCAAACCATAAGCCAGAAA	236
hPTPN2_gRNA_37	CCGATTCTTTCTCCACAATG	237
hPTPN2_gRNA_38	TTCGAACTCCCGCTCGATGG	238
hPTPN2_gRNA_39	AGTGCAGGCATTGGGCGCTC	239

[0759]

靶标	序列	SEQ ID
hPTPN2_gRNA_40	GGAAACTTGGCCACTCTATG	240
hPTPN2_gRNA_41	ATCCACTGTAGTGCAGGCAT	241
hPTPN2_gRNA_42	CACTCTATGAGGATAGTCAT	242
hPTPN2_gRNA_43	CCACTCTATGAGGATAGTCA	243
hPTPN2_gRNA_44	TCCACTGTAGTGCAGGCATT	244
hPTPN2_gRNA_45	AAGTTCTTTCCATCGTTTCT	245
hPTPN2_gRNA_46	TCGCTGGCAGCCGCTGTACT	246
hPTPN2_gRNA_47	GAACTCCCGCTCGATGGTGG	247
hPTPN2_gRNA_48	AGGATGGTAAAGGCACCAAC	248
hPTPN2_gRNA_49	AAAGGGAGATTCTAGTATAC	249
hPTPN2_gRNA_50	AGAATTTAGGATGTATGGAA	250
hPTPN2_gRNA_51	GGGTCTGAATAAGACCCATT	251
hPTPN2_gRNA_52	GGCACCAACTGGATGGATCA	252
hPTPN2_gRNA_53	CTCTAAAATGCAAGATACAA	253
hPTPN2_gRNA_54	GTATTTGAAATTATTAATGC	254
hPTPN2_gRNA_55	CCTTTCTTGCAGATGGAAAA	255
hPTPN2_gRNA_56	CTGCACCTTCTGAGCTGTGG	256
hPTPN2_gRNA_57	ATGCTGCCATTTCTGGCTTA	257
hPTPN2_gRNA_58	TTTCTTTAAACAGCATCTCT	258
hPTPN2_gRNA_59	AGACATGGAATGCAGAATGC	259
hPTPN2_gRNA_60	AGGCACCAACTGGATGGATC	260
hPTPN2_gRNA_61	TAATGACTGAAAAATACAAT	261
hPTPN2_gRNA_62	GAATGCAGAATGCAGGAAAT	262
hPTPN2_gRNA_63	TTTAGGATGTATGGAAAGGA	263
hPTPN2_gRNA_64	CTAACACATGCTGCCATTTC	264
hPTPN2_gRNA_65	TCATACATGGCTATAATAGA	265
hPTPN2_gRNA_66	ACGATGGAAAGAACTTTCTA	266
hPTPN2_gRNA_67	ACGTATTCGAGAGGACAGAA	267
hPTPN2_gRNA_68	GCGGTGATCCACTGTAGTGC	268
hPTPN2_gRNA_69	TATTAATGCTGGATGTTAAA	269
hPTPN2_gRNA_70	GAGATGCTGTTTAAAGAAAC	270
hPTPN2_gRNA_71	CAGCAAGAATTTAGGATGTA	271
hPTPN2_gRNA_72	TTGACATAGAAGAGGCACAA	272
hPTPN2_gRNA_73	GATTCAGGGACTCCAAAATC	273
hPTPN2_gRNA_74	CTCACTTTCATTATACTACC	274
hPTPN2_gRNA_75	TTTAGTATATTGAGAACTTG	275
hPTPN2_gRNA_76	AGGGACTCCAAAATCTGGCC	276
hPTPN2_gRNA_77	AGGTTAAATGTGCACAGTAC	277
hPTPN2_gRNA_78	ATCACCGCAGGCCCATGGTC	278
hPTPN2_gRNA_79	AGCATCTCTTGGTCATCTGT	279
hPTPN2_gRNA_80	GAAGGAGCAAAATGTATAAA	280
hPTPN2_gRNA_81	GCCATTTCTGGCTTATGGTT	281
hPTPN2_gRNA_82	CTGGATGGATCAGGGAGACA	282
hPTPN2_gRNA_83	AAATACAATGGGAACAGAAT	283
hPTPN2_gRNA_84	ATAATGACTGAAAAATACAA	284
hPTPN2_gRNA_85	CATGCCCACCACCATCGAGC	285
hPTPN2_gRNA_86	AACATGAGAAAATACCGAAT	286

靶标	序列	SEQ ID
hPTPN2_gRNA_87	AGAAATGAAGCTGGTGATTC	287
hPTPN2_gRNA_88	CCGCATTGTGGAGAAAGAAT	288
hPTPN2_gRNA_89	GAAATGAAGCTGGTGATTCA	289
hPTPN2_gRNA_90	TTGTTTAAAGTGAGAGAATC	290
hPTPN2_gRNA_91	CCGCGACTCACCAAGTACAG	291
hPTPN2_gRNA_92	GAACATGAGAAAATACCGAA	292
hPTPN2_gRNA_93	TATACTACCTGGCCAGATTT	293
hPTPN2_gRNA_94	TATGAGAATCTCAGTTGATC	294
hPTPN2_gRNA_95	TCAACTGAGATTCTCATACA	295
hPTPN2_gRNA_96	TGAGAATCTCAGTTGATCTG	296
hPTPN2_gRNA_97	ATGAGAATCTCAGTTGATCT	297
hPTPN2_gRNA_98	TGGTAAAGGCACCAACTGGA	298
hPTPN2_gRNA_99	TGTCATGCTGAACCGCATTG	299
hPTPN2_gRNA_100	TTTGGTGAATGATCAAAGGC	300
hPTPN2_gRNA_101	ATGAAAGTGAGATATTGTTC	301
hPTPN2_gRNA_102	TATTTCCTCATAGTGCTCTA	302
hPTPN2_gRNA_103	AGAAGGAGCAAAATGTATAA	303
hPTPN2_gRNA_104	TTTGTTTGGTGAATGATCAA	304
hPTPN2_gRNA_105	TCTACGGAAACGTATTCGAG	305
hPTPN2_gRNA_106	AAAGGCCACCACAGCTCAGA	306
hPTPN2_gRNA_107	AGGTGCAGCAGATGAAACAG	307
hPTPN2_gRNA_108	GGCTCCTTGAACCCTGACCA	308
hPTPN2_gRNA_109	AAGGAGTTACATCTTAACAC	309
hPTPN2_gRNA_110	TAAAATGCAAGATACAATGG	310
hPTPN2_gRNA_111	ACAAGTGTCTACCAGAGAGA	311
hPTPN2_gRNA_112	GCGCTCTGGCACCTTCTCTC	312
hPTPN2_gRNA_113	CTGCTGCACCTTCTGAGCTG	313
hPTPN2_gRNA_114	TCTTCCCTACCTAGAAACGA	314

[0760]

[0761] 表29:示例性鼠Ptpn2 gRNA序列

[0762]

靶标	序列	SEQ ID
mPTPN2_gRNA_1	AATCTGGCCAGGTGGTATAA	315
mPTPN2_gRNA_2	AATATGAGAAAGTATCGAAT	316
mPTPN2_gRNA_3	ATCACTGCAGGTCCATGGTC	317
mPTPN2_gRNA_4	ATGTGCACAGTACTGGCCAA	318
mPTPN2_gRNA_5	GGCAGCATGTGTTCGGAAGT	319
mPTPN2_gRNA_6	AAGAAGTTTAGAAATGAAGC	320
mPTPN2_gRNA_7	GCCACACCATGAGCCAGAAA	321
mPTPN2_gRNA_8	CCTTTCTTGCAGATGGAAAA	322
mPTPN2_gRNA_9	GTACTTTGCTCCTTCTATTA	323
mPTPN2_gRNA_10	AGAAATGAAGCTGGTGACTC	324
mPTPN2_gRNA_11	GTTTAGCATGACAACTGCTT	325
mPTPN2_gRNA_12	GCCCGATGCCCGCACTGCAA	326
mPTPN2_gRNA_13	TGACAGAGAAATGGTGTTTA	327

[0763] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少一种gRNA分子,该至少一种gRNA分子

包含靶向ZC3H12A的核酸结合区段(即,靶向ZC3H12A的gRNA)。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0764] 在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。示例性ZC3H12A靶DNA序列在表30和表31中示出。

[0765] 在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中,至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。编码靶向ZC3H12A/Zc3h12a的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表30和表31中示出。

[0766] 表30:示例性人ZC3H12A gRNA序列

[0767]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_1	AAGCTGGCCTACGAGTCTGA	338
hZC3H12A_gRNA_2	GCGGGACTAGAGGGAGCTGA	339
hZC3H12A_gRNA_3	CAGCTCCCTCTAGTCCCGCG	340
hZC3H12A_gRNA_4	CAGGACGCTGTGGATCTCCG	341
hZC3H12A_gRNA_5	AACATACTTGTCATTGACGA	342
hZC3H12A_gRNA_6	CTCACCTGTGATGGGCACGT	343
hZC3H12A_gRNA_7	AACACGGGACAGCCACCGAG	344
hZC3H12A_gRNA_8	CGACAGATTCATTGTGAAGC	345
hZC3H12A_gRNA_9	ACACCATCACGACGCGTGGG	346
hZC3H12A_gRNA_10	TCCCAGCCATGGGAACAAGG	347
hZC3H12A_gRNA_11	GGAGTGGAAGCGCTTCATCG	348
hZC3H12A_gRNA_12	TTAGGGGTGCCACCACCCCG	349
hZC3H12A_gRNA_13	GACACATACCGTGACCTCCA	350
hZC3H12A_gRNA_14	CCGGCCCAGTGGGTCATCAG	351
hZC3H12A_gRNA_15	CCTGGAACTGCAGATGAAGG	352
hZC3H12A_gRNA_16	GTCCTCTCCCTCCCAGCCAT	353
hZC3H12A_gRNA_17	TCCCCAGGGTCCCGCCAAGA	354
hZC3H12A_gRNA_18	AGTGAGCAGTGCAGCCTGGA	355
hZC3H12A_gRNA_19	TGTCCTCTCCCTCCCAGCCA	356
hZC3H12A_gRNA_20	CTGGACTGGGATGAAGGTGA	357
hZC3H12A_gRNA_21	GGGGTGGGCCCGGCTCACCA	358
hZC3H12A_gRNA_22	CACCACCCCGCGGGACTAGA	359
hZC3H12A_gRNA_23	CTGCTGCCACTGCCCCCGCT	360
hZC3H12A_gRNA_24	CGGCCCGACGTGCCCATCAC	361
hZC3H12A_gRNA_25	CACTGCCCCCGCTAGGTGCG	362
hZC3H12A_gRNA_26	ATACACGCTGGCCTGCTCCT	363
hZC3H12A_gRNA_27	CAAACACTGTGATGTCTGTG	364
hZC3H12A_gRNA_28	GCGGGACCCTGGGGATGCCT	365
hZC3H12A_gRNA_29	GCGGGAGCGCCAGACCTCAC	366
hZC3H12A_gRNA_30	AGGACAGGCTTCTCTCCACA	367
hZC3H12A_gRNA_31	GCAGACACCAACACGGTGCT	368
hZC3H12A_gRNA_32	CCACCACCCCGCGGGACTAG	369
hZC3H12A_gRNA_33	ATCCCCAGGGTCCCGCCAAG	370
hZC3H12A_gRNA_34	CCTGGAGGAAGGAGCAGCCT	371
hZC3H12A_gRNA_35	AGAGCCAGATGTCGGAACTT	372
hZC3H12A_gRNA_36	ATGACCCACTGGGCCGGCAC	373
hZC3H12A_gRNA_37	GCAGCTTTGGGCCCACAGAC	374
hZC3H12A_gRNA_38	ACTCTCTGTTAGCAGAGAGC	375
hZC3H12A_gRNA_39	CCAGGAAGGAAATGCACCTA	376
hZC3H12A_gRNA_40	AGGCACCACTCACCTGTGAT	377
hZC3H12A_gRNA_41	CTGGGCCCGTGCCGGCCCAG	378
hZC3H12A_gRNA_42	CAGCCAGCTGCTGGGGGTCC	379
hZC3H12A_gRNA_43	TCCACTCCTGCCGCTCGCCT	380
hZC3H12A_gRNA_44	CGTCCAGGCAGACACCAACA	381
hZC3H12A_gRNA_45	CCCACCCACATCAGTCCTTC	382

[0768]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_46	GCCAGCTCTTGACCCGGCCT	383
hZC3H12A_gRNA_47	CTGCCCTCCTTTTCCTCTTC	384
hZC3H12A_gRNA_48	CCAGCCCCACCATGAGTCTG	385
hZC3H12A_gRNA_49	GCCGATTCTTCCACCCAGAG	386
hZC3H12A_gRNA_50	CTCCCAGAAGAGGAAAAGGA	387
hZC3H12A_gRNA_51	GTGGGGCAGGGCAGGCAGCC	388
hZC3H12A_gRNA_52	GGGTCAAGAGCTGGCCGCTG	389
hZC3H12A_gRNA_53	ATGCCCCCTGATGACCCACT	390
hZC3H12A_gRNA_54	AGCCTTCTCTGCCTTTGGCC	391
hZC3H12A_gRNA_55	CTCTGCCTTTGGCCGGGCCA	392
hZC3H12A_gRNA_56	GGAACCCAGCCTGCCCTCCC	393
hZC3H12A_gRNA_57	GGCAGGAGCCTCGCACCTAG	394
hZC3H12A_gRNA_58	TCCCAGACCAGCACATCCTG	395
hZC3H12A_gRNA_59	GTGAGCAGTGCAGCCTGGAT	396
hZC3H12A_gRNA_60	GAGCCAGATGTCGGAACTTT	397
hZC3H12A_gRNA_61	GGCCGATGGCAAGCCTTGCT	398
hZC3H12A_gRNA_62	AGGAGCCTCGCACCTAGCGG	399
hZC3H12A_gRNA_63	AGGTCCCCAAGAGGAAAACA	400
hZC3H12A_gRNA_64	CGCTGAGGAGGCCTCGGCCC	401
hZC3H12A_gRNA_65	GAGGACAGCCACAGCCGTCA	402
hZC3H12A_gRNA_66	CAGCCCCACCATGAGTCTGT	403
hZC3H12A_gRNA_67	ACCCCCCAGAGCCCCAAGCA	404
hZC3H12A_gRNA_68	GAGGCACCACTCACCTGTGA	405
hZC3H12A_gRNA_69	CCAAGAGGAAAACAGGGCAC	406
hZC3H12A_gRNA_70	GTACGTCTCCCAGGATTGCC	407
hZC3H12A_gRNA_71	CACAGCCTCCACCAGGTGCG	408
hZC3H12A_gRNA_72	GATCTCGGCAGCCAGCTGCT	409
hZC3H12A_gRNA_73	CAGCCTTCTCTGCCTTTGGC	410
hZC3H12A_gRNA_74	CAGAAGTGACACTTACCTCA	411
hZC3H12A_gRNA_75	GCTGGCCGCTGAGGAGGCCT	412
hZC3H12A_gRNA_76	CAGCTCCCTCTAGTCCCGCG	413
hZC3H12A_gRNA_77	CGGGGTGGGCCCGGCTCACC	414
hZC3H12A_gRNA_78	GACACATACCGTGACCTCCA	415
hZC3H12A_gRNA_79	CAGGAAGGAAATGCACCTAT	416
hZC3H12A_gRNA_80	AGTGGCCAGCACCCATGGCC	417
hZC3H12A_gRNA_81	CTCTCCTATTCTTCCCAGCA	418
hZC3H12A_gRNA_82	GCCCGAGTCCAGGCAATCCT	419
hZC3H12A_gRNA_83	CACCTTCATCTGCAGTTCCA	420
hZC3H12A_gRNA_84	GGCACAGGCAGACAGGTGAG	421
hZC3H12A_gRNA_85	AGCACCCATGGCCCGGCCAA	422
hZC3H12A_gRNA_86	CCACAGGCAGCTTACTCACT	423
hZC3H12A_gRNA_87	TTCCTGTGCTCCAAAGTGAG	424
hZC3H12A_gRNA_88	ACCGCAGCCTTCTCTGCCTT	425
hZC3H12A_gRNA_89	GGGAGCCAATGCCCGAGTCC	426
hZC3H12A_gRNA_90	TTCCCAGCAAGGCTTGCCAT	427
hZC3H12A_gRNA_91	AGCCAGATGTCGGAACTTTG	428
hZC3H12A_gRNA_92	TACACGGGCTACAGTCCCTA	429

[0769]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_93	TCTGTGTTAGACCCTCTTGG	430
hZC3H12A_gRNA_94	AAGCTGCCCCCAGCGCTCTG	431
hZC3H12A_gRNA_95	CTTTGGGGGGTTCGAGGAGG	432
hZC3H12A_gRNA_96	GGGCCGATGGCAAGCCTTGC	433
hZC3H12A_gRNA_97	CACAGGCAGCTTACTCACTG	434
hZC3H12A_gRNA_98	CCCAGACCAGCACATCCTGC	435
hZC3H12A_gRNA_99	AGGCTGGGTTCCATACCATA	436
hZC3H12A_gRNA_100	GGACTTCTAATTGCTGAGAA	437
hZC3H12A_gRNA_101	CTCAAATTCCCACAGACTCA	438
hZC3H12A_gRNA_102	AAAACAGGGCACAGGCAGAC	439
hZC3H12A_gRNA_103	CCAGATGTCGGAACTTTGGG	440
hZC3H12A_gRNA_104	CTCCCTCTAGTCCCGCGGGG	441
hZC3H12A_gRNA_105	AGCCCCCAGTGCAGAGCCCA	442
hZC3H12A_gRNA_106	CCTGGACGCCCAGCTTCTGC	443
hZC3H12A_gRNA_107	CAGGGGCTGGCAGGAGCCCG	444
hZC3H12A_gRNA_108	CCTTGTTCCCATGGCTGGGA	445
hZC3H12A_gRNA_109	CTCATCTGCCACAGAGCGCT	446
hZC3H12A_gRNA_110	GGCAGACACCAACACGGTGC	447
hZC3H12A_gRNA_111	TCCCTCTTGATTCCTCTTCC	448
hZC3H12A_gRNA_112	CCCTCCCAGCCATGGGAACA	449
hZC3H12A_gRNA_113	GCGTAAGAAGCCACTCACTT	450
hZC3H12A_gRNA_114	TGTGTTTCCCCCGCACCTGG	451
hZC3H12A_gRNA_115	CTGAGACCAGTGGTCATCGA	452
hZC3H12A_gRNA_116	GGGCAGCGACCTGAGACCAG	453
hZC3H12A_gRNA_117	AGCAATTAGAAGTCCCTGCA	454
hZC3H12A_gRNA_118	TGGGTGAGCTGGTGAAACAC	455
hZC3H12A_gRNA_119	CTGTTAGCAGAGAGCTGGAC	456
hZC3H12A_gRNA_120	CCCCTGATGACCCACTGGGC	457
hZC3H12A_gRNA_121	GTTCACACCATCACGACGCG	458
hZC3H12A_gRNA_122	TGTCCAGGCTGGGCCCGTGC	459
hZC3H12A_gRNA_123	ACACAGACCTATGCCCCATC	460
hZC3H12A_gRNA_124	GGCTGCCTGCCCTGCCCCAC	461
hZC3H12A_gRNA_125	CCATAGGTGCATTTCCTTCC	462
hZC3H12A_gRNA_126	CAGGCTGGGTTCCATACCAT	463
hZC3H12A_gRNA_127	GCCCCATCACAGCCTCCACC	464
hZC3H12A_gRNA_128	TGCCCTCCTTTTCCTCTTCT	465
hZC3H12A_gRNA_129	GCCAGATGTCGGAACTTTGG	466
hZC3H12A_gRNA_130	CAGGCAGACAGGTGAGAGGA	467
hZC3H12A_gRNA_131	CCAGGAGTCTGAGCTATGAG	468
hZC3H12A_gRNA_132	GCTCCAGGTTGGGAGCCTTA	469
hZC3H12A_gRNA_133	CTCACCTGTGATGGGCACGT	470
hZC3H12A_gRNA_134	AGCTGGCCTACGAGTCTGAC	471
hZC3H12A_gRNA_135	GTGGGTGGGGGCAGTGGGTA	472
hZC3H12A_gRNA_136	CATCTGCAGTTCCAGGGCCG	473
hZC3H12A_gRNA_137	GATGACCCACTGGGCCGGCA	474
hZC3H12A_gRNA_138	TGACCTCCAAGGCGAGCGGC	475
hZC3H12A_gRNA_139	GGATCTCGGCAGCCAGCTGC	476

[0770]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_140	TCCTTTTCCTCTTCTGGGAG	477
hZC3H12A_gRNA_141	CACGACGCGTGGGTGGCAAG	478
hZC3H12A_gRNA_142	TTCACACCATCACGACGCGT	479
hZC3H12A_gRNA_143	GCAGGAGCCTCGCACCTAGC	480
hZC3H12A_gRNA_144	CACCCCTAAGGCTCCCAACC	481
hZC3H12A_gRNA_145	TTGTCCTTGCTTGGGGCTCT	482
hZC3H12A_gRNA_146	CAGGACAGGCTTCTCTCCAC	483
hZC3H12A_gRNA_147	CACCTGGTGGAGGCTGTGAT	484
hZC3H12A_gRNA_148	CGTCTGTGGGAGCCAGTCTG	485
hZC3H12A_gRNA_149	CCCCCCAAAGTTCCGACATC	486
hZC3H12A_gRNA_150	AGGCAGCCTGGCCAAGGAGC	487
hZC3H12A_gRNA_151	TCTGCCTTTGGCCGGGCCAT	488
hZC3H12A_gRNA_152	GGACAGGCTTCTCTCCACAG	489
hZC3H12A_gRNA_153	ACGTGCCCATCACAGGTGAG	490
hZC3H12A_gRNA_154	AGAGAGTGAGCAGTGCAGCC	491
hZC3H12A_gRNA_155	CGCAGGAAGTTGTCCAGGCT	492
hZC3H12A_gRNA_156	GGCTGGGAGCTCAGATCCAT	493
hZC3H12A_gRNA_157	CAGCTCACCCAGCACCGTGT	494
hZC3H12A_gRNA_158	CCAGCACATCCTGCGGGAAC	495
hZC3H12A_gRNA_159	GACCTCCTTGTTCCCATGGC	496
hZC3H12A_gRNA_160	GGGGTTCGAGGAGGAGGCCC	497
hZC3H12A_gRNA_161	CAGAGAAGGCTGCGGTGGCT	498
hZC3H12A_gRNA_162	GGGAGTGAGTCCAGCGTCTG	499
hZC3H12A_gRNA_163	CAGGAGCCTCGCACCTAGCG	500
hZC3H12A_gRNA_164	GGAGGAGGCCCTGGTGAGCC	501
hZC3H12A_gRNA_165	CAAGCAAGGACAAAAATGGC	502
hZC3H12A_gRNA_166	CGTCAGGGCACCCCAAGGCC	503
hZC3H12A_gRNA_167	GCTGGCAGTGAACTGGTTTC	504
hZC3H12A_gRNA_168	ACCTCCTTGTTCCCATGGCT	505
hZC3H12A_gRNA_169	TCCCGCAGGATGTGCTGGTC	506
hZC3H12A_gRNA_170	AGGGACTGTAGCCCGTGTAA	507
hZC3H12A_gRNA_171	CCAGTACTCTCGAGGTGGAA	508
hZC3H12A_gRNA_172	AATTCCCACAGACTCATGGT	509
hZC3H12A_gRNA_173	CCCACCCCGAGCCCCTTACA	510
hZC3H12A_gRNA_174	GTGCATTTCCTTCCTGGAAG	511
hZC3H12A_gRNA_175	TCAGCGGCCAGCTCTTGACC	512
hZC3H12A_gRNA_176	GGCCCGGCCAAAGGCAGAGA	513
hZC3H12A_gRNA_177	ACAGAGCGCTGGGGGCAGCT	514
hZC3H12A_gRNA_178	TCTTGATTCCTCTTCCAGGA	515
hZC3H12A_gRNA_179	GCAAGGACAAAAATGGCCGG	516
hZC3H12A_gRNA_180	CAGGGCAGGCAGCCTGGCCA	517
hZC3H12A_gRNA_181	ATCTCGGCAGCCAGCTGCTG	518
hZC3H12A_gRNA_182	CCCGCAGGATGTGCTGGTCT	519
hZC3H12A_gRNA_183	GGCTCCAGGTTGGGAGCCTT	520
hZC3H12A_gRNA_184	CAACACGGTGCTGGGTGAGC	521
hZC3H12A_gRNA_185	GCAGCCGTGTCCCTATGGTA	522
hZC3H12A_gRNA_186	TGTCCTTGCTTGGGGCTCTG	523

[0771]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_187	TCATGGTGGGGCTGGCTTCC	524
hZC3H12A_gRNA_188	GAAGCTGGGCTATTCATCCA	525
hZC3H12A_gRNA_189	GACCCTCTTGGCGGGACCCT	526
hZC3H12A_gRNA_190	GGAAAGGCAGGGGGCGCGGG	527
hZC3H12A_gRNA_191	AGGTCTGTGTTAGACCCTCT	528
hZC3H12A_gRNA_192	CTCAGCTCCCTCTAGTCCCG	529
hZC3H12A_gRNA_193	TAGGGACTGTAGCCCGTGTA	530
hZC3H12A_gRNA_194	AGGGGGCATAAACCTGCAGA	531
hZC3H12A_gRNA_195	CTCCCAGGATTGCCTGGACT	532
hZC3H12A_gRNA_196	GGGATGAAGGTGAAGGCCGC	533
hZC3H12A_gRNA_197	TGCAGAGCCCAGGGGCTGGC	534
hZC3H12A_gRNA_198	GAATCGGCACTTGATCCCAT	535
hZC3H12A_gRNA_199	CCGAGGCTGCTCCTTCCTCC	536
hZC3H12A_gRNA_200	CCAGCTTCTGCAGGACGCTG	537
hZC3H12A_gRNA_201	GGGCCGGCACGGGCCCAGCC	538
hZC3H12A_gRNA_202	TGAGGTCTGGCGCTCCCGCT	539
hZC3H12A_gRNA_203	TTGGGGTGCCCTGACGGCTG	540
hZC3H12A_gRNA_204	ACTAGAGGGAGCTGAGGGCA	541
hZC3H12A_gRNA_205	CCAGTTCCCGCAGGATGTGC	542
hZC3H12A_gRNA_206	TATGCCCCCTGATGACCCAC	543
hZC3H12A_gRNA_207	GTGAGAGGAGAGCATTGGCA	544
hZC3H12A_gRNA_208	AGCTTACTCACTGGGGTGCT	545
hZC3H12A_gRNA_209	ATCACAGCCTCCACCAGGTG	546
hZC3H12A_gRNA_210	ACTGAAGTGGCCAGCACCCA	547
hZC3H12A_gRNA_211	GCCGGCCCAGTGGGTCATCA	548
hZC3H12A_gRNA_212	CCTGCAGAAGCTGGGCGTCC	549
hZC3H12A_gRNA_213	GCACCGTGTTGGTGTCTGCC	550
hZC3H12A_gRNA_214	GGCCCTGGAACTGCAGATGA	551
hZC3H12A_gRNA_215	GTCCTTGCTTGGGGCTCTGG	552
hZC3H12A_gRNA_216	CTCCCTGGAGAGCCAGATGT	553
hZC3H12A_gRNA_217	AAATTCCCACAGACTCATGG	554
hZC3H12A_gRNA_218	TCATCTGCCACAGAGCGCTG	555
hZC3H12A_gRNA_219	AGTCGGCAGGGACACTGAAG	556
hZC3H12A_gRNA_220	ACTCTCGAGGTGGAAAGGCA	557
hZC3H12A_gRNA_221	CCCAGTGAGTAAGCTGCCTG	558
hZC3H12A_gRNA_222	AGAGGGTGCAAAGAACTCTC	559
hZC3H12A_gRNA_223	CACGATCCCGTCAGACTCGT	560
hZC3H12A_gRNA_224	TCTGCACTGGGGGCTCCTGA	561
hZC3H12A_gRNA_225	CAGGGGGCATAAACCTGCAG	562
hZC3H12A_gRNA_226	TGAGGACAGCCACAGCCGTC	563
hZC3H12A_gRNA_227	GTTTCCCCCGCACCTGGTGG	564
hZC3H12A_gRNA_228	TTAGGGGTGCCACCACCCCG	565
hZC3H12A_gRNA_229	ACTGGGGTGCTGGGACTTGT	566
hZC3H12A_gRNA_230	CTCACTCCCGTACGTCTCCC	567
hZC3H12A_gRNA_231	AGGGGCTGGCAGGAGCCCGT	568
hZC3H12A_gRNA_232	TCCTTGTTCCCATGGCTGGG	569
hZC3H12A_gRNA_233	GCCAAAGGCAGAGAAGGCTG	570

[0772]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_234	CACGGGCTCCTGCCAGCCCC	571
hZC3H12A_gRNA_235	CCACAGCGTCCTGCAGAAGC	572
hZC3H12A_gRNA_236	ACGGGCTCCTGCCAGCCCCT	573
hZC3H12A_gRNA_237	ATGGGAGCAACGTGGCCATG	574
hZC3H12A_gRNA_238	CCCAAGGCCGGGTCAAGAGC	575
hZC3H12A_gRNA_239	AATTGCTGAGAAGGGGCCGA	576
hZC3H12A_gRNA_240	GGGCAGGAGTGAGGAGGGCC	577
hZC3H12A_gRNA_241	GGCGGGACCCTGGGGATGCC	578
hZC3H12A_gRNA_242	GGGGCTGGCAGGAGCCCGTG	579
hZC3H12A_gRNA_243	TTCCGACATCTGGCTCTCCA	580
hZC3H12A_gRNA_244	GTGCTGCCCTTGCCAGCCAC	581
hZC3H12A_gRNA_245	ACTCCTGCCGCTCGCCTTGG	582
hZC3H12A_gRNA_246	GTGGACTTCTTCCGGAAGCT	583
hZC3H12A_gRNA_247	CCAGTGCAGAGCCCAGGGGC	584
hZC3H12A_gRNA_248	GGGGCAGTGGCAGCAGCTTT	585
hZC3H12A_gRNA_249	GGGACTGTAGCCCGTGTAAG	586
hZC3H12A_gRNA_250	CCACAGACTCATGGTGGGGC	587
hZC3H12A_gRNA_251	AACACGGGACAGCCACCGAG	588
hZC3H12A_gRNA_252	GCAAAGAACTCTCTGGAGGT	589
hZC3H12A_gRNA_253	TGGGCCCGTGCCGGCCCAGT	590
hZC3H12A_gRNA_254	CTCCTGCCGGGGCATCCTGC	591
hZC3H12A_gRNA_255	AGGCAGACAGGTGAGAGGAA	592
hZC3H12A_gRNA_256	AGGCAATCCTGGGAGACGTA	593
hZC3H12A_gRNA_257	TCAGACCAGTACTCTCGAGG	594
hZC3H12A_gRNA_258	AACATACTTGTCATTGACGA	595
hZC3H12A_gRNA_259	GGCAGCTTGGCCGCTCTGGG	596
hZC3H12A_gRNA_260	GAGTTCTTTGCACCCTCTGC	597
hZC3H12A_gRNA_261	GCCACAGGCAGCTTACTCAC	598
hZC3H12A_gRNA_262	AGGCTGCCTGCCCTGCCCCA	599
hZC3H12A_gRNA_263	CCGGCCCAGTGGGTCATCAG	600
hZC3H12A_gRNA_264	CTCTCGAGGTGGAAAGGCAG	601
hZC3H12A_gRNA_265	GATTGCCTGGACTCGGGCAT	602
hZC3H12A_gRNA_266	TCCTTGCTTGGGGCTCTGGG	603
hZC3H12A_gRNA_267	GCAGAGAAGGCTGCGGTGGC	604
hZC3H12A_gRNA_268	ACCGTGACCTCCAAGGCGAG	605
hZC3H12A_gRNA_269	CAGGACGCTGTGGATCTCCG	606
hZC3H12A_gRNA_270	AGGAAGCAGCCGTGTCCCTA	607
hZC3H12A_gRNA_271	ACGCAGGAAGTTGTCCAGGC	608
hZC3H12A_gRNA_272	GAGGTCCCCAAGAGGAAAAC	609
hZC3H12A_gRNA_273	CCCCCAGCTTCTTCCCATCC	610
hZC3H12A_gRNA_274	ATTCCCACAGACTCATGGTG	611
hZC3H12A_gRNA_275	TCCAAGGCGAGCGGCAGGAG	612
hZC3H12A_gRNA_276	GCTGGGAGCTCAGATCCATA	613
hZC3H12A_gRNA_277	TGGGGGCCCAGGCATCCCCA	614
hZC3H12A_gRNA_278	GGGTGCAAAGAACTCTCTGG	615
hZC3H12A_gRNA_279	GCGGGACTAGAGGGAGCTGA	616
hZC3H12A_gRNA_280	ACTGGAGAAGAAGAAGATCC	617

[0773]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_281	CCAGCTCTTGACCCGGCCTT	618
hZC3H12A_gRNA_282	GAACTTTGGGGGGTTCGAGG	619
hZC3H12A_gRNA_283	GAAACCAGTTCACTGCCAGC	620
hZC3H12A_gRNA_284	ACAGCCGTCAGGGCACCCCA	621
hZC3H12A_gRNA_285	CCACCCCGAGCCCCTTACAC	622
hZC3H12A_gRNA_286	TCTCGGCAGCCAGCTGCTGG	623
hZC3H12A_gRNA_287	AGAGAGCTGGACTGGGATGA	624
hZC3H12A_gRNA_288	CCTTTCCACCTCGAGAGTAC	625
hZC3H12A_gRNA_289	AAGCTGGCCTACGAGTCTGA	626
hZC3H12A_gRNA_290	GTCTGTGGGAGCCAGTCTGT	627
hZC3H12A_gRNA_291	AGACCTATGCCCCATCAGGC	628
hZC3H12A_gRNA_292	TGGGAAGAAGCTGGGGGCCC	629
hZC3H12A_gRNA_293	CTGTGGAGAGAAGCCTGTCC	630
hZC3H12A_gRNA_294	GGGACTTCTAATTGCTGAGA	631
hZC3H12A_gRNA_295	GGACTCGGGCATTGGCTCCC	632
hZC3H12A_gRNA_296	CATCTGCCACAGAGCGCTGG	633
hZC3H12A_gRNA_297	CTTCTGGGAGTGGAGGCTCC	634
hZC3H12A_gRNA_298	GCCCCCAGTGCAGAGCCCAG	635
hZC3H12A_gRNA_299	TTTGTCCTTGCTTGGGGCTC	636
hZC3H12A_gRNA_300	GTGGGGCTGGCTTCCAGGAC	637
hZC3H12A_gRNA_301	TCAAGAGCTGGCCGCTGAGG	638
hZC3H12A_gRNA_302	CCTCTAGTCCCGCGGGGTGG	639
hZC3H12A_gRNA_303	GCTCATCTGCCACAGAGCGC	640
hZC3H12A_gRNA_304	CATGAGTCTGTGGGAATTTG	641
hZC3H12A_gRNA_305	TGCGAGGCTCCTGCCTGATG	642
hZC3H12A_gRNA_306	GGAGTGAGTCCAGCGTCTGT	643
hZC3H12A_gRNA_307	TGCAAAGAACTCTCTGGAGG	644
hZC3H12A_gRNA_308	CACAGCGTCCTGCAGAAGCT	645
hZC3H12A_gRNA_309	CAGCTTACTCACTGGGGTGC	646
hZC3H12A_gRNA_310	ACTGATGTGGGTGGGGGCAG	647
hZC3H12A_gRNA_311	GCAGGATGTGCTGGTCTGGG	648
hZC3H12A_gRNA_312	TCACAGTGTTTGTGCCATCC	649
hZC3H12A_gRNA_313	GTTTGTGCCATCCTGGAGGA	650
hZC3H12A_gRNA_314	TCCTGAAGGACTGATGTGGG	651
hZC3H12A_gRNA_315	TGTTAGCAGAGAGCTGGACT	652
hZC3H12A_gRNA_316	CAGTGTTTGTGCCATCCTGG	653
hZC3H12A_gRNA_317	AGTCTGTCAGGGCCTCTGGG	654
hZC3H12A_gRNA_318	TCTCGAGGTGGAAAGGCAGG	655
hZC3H12A_gRNA_319	AGACTGGCTCCCACAGACGC	656
hZC3H12A_gRNA_320	AGCCACTCACTTTGGAGCAC	657
hZC3H12A_gRNA_321	TCCCAGGATTGCCTGGACTC	658
hZC3H12A_gRNA_322	CCTGGAACTGCAGATGAAGG	659
hZC3H12A_gRNA_323	GGGGCGCTTCCCACAGCTCC	660
hZC3H12A_gRNA_324	CAGCCCCTGGGCTCTGCACT	661
hZC3H12A_gRNA_325	GCGCGGGTGGGTAGTCGGCA	662
hZC3H12A_gRNA_326	GCCCCAAGCAAGGACAAAAA	663
hZC3H12A_gRNA_327	AGCCTGGATGGGAAGAAGCT	664

[0774]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_328	CAGCTCTTGACCCGGCCTTG	665
hZC3H12A_gRNA_329	TAGGGGTGCCACCACCCCGC	666
hZC3H12A_gRNA_330	TCCACTCCCAGAAGAGGAAA	667
hZC3H12A_gRNA_331	GGAAGCGCTTCATCGAGGAG	668
hZC3H12A_gRNA_332	GCATCCTGCTGGCAGTGAAC	669
hZC3H12A_gRNA_333	TGGATGAATAGCCCAGCTTC	670
hZC3H12A_gRNA_334	ACACGGGACAGCCACCGAGC	671
hZC3H12A_gRNA_335	GGGCTCCTGAAGGACTGATG	672
hZC3H12A_gRNA_336	CAGCCTGGATGGGAAGAAGC	673
hZC3H12A_gRNA_337	TTTTCCTCTTCTGGGAGTGG	674
hZC3H12A_gRNA_338	CTCCAGGTTGGGAGCCTTAG	675
hZC3H12A_gRNA_339	GGGAGCTGAGGGCAGGGGTC	676
hZC3H12A_gRNA_340	AGATGAAGGTGGACTTCTTC	677
hZC3H12A_gRNA_341	TTTGGCCGGGCCATGGGTGC	678
hZC3H12A_gRNA_342	CTCGCACCTAGCGGGGGCAG	679
hZC3H12A_gRNA_343	CCCGTGTAAGGGGCTCGGGG	680
hZC3H12A_gRNA_344	TGCCGGCCCAGTGGGTCATC	681
hZC3H12A_gRNA_345	AAAGGCAGAGAAGGCTGCGG	682
hZC3H12A_gRNA_346	AGGAGCCCGTGGGGCAGGGC	683
hZC3H12A_gRNA_347	TAAGGGGCTCGGGGTGGGCC	684
hZC3H12A_gRNA_348	ACACCATCACGACGCGTGGG	685
hZC3H12A_gRNA_349	CTGGCAGGAGCCCGTGGGGC	686
hZC3H12A_gRNA_350	CCGGCCTTGGGGTGCCCTGA	687
hZC3H12A_gRNA_351	CTGTGTTAGACCCTCTTGGC	688
hZC3H12A_gRNA_352	GTGATGGGCACGTCGGGCCG	689
hZC3H12A_gRNA_353	GCCCCTGGGCTCTGCACTGG	690
hZC3H12A_gRNA_354	CTGGGTGAGCTGGTGAAACA	691
hZC3H12A_gRNA_355	GGCTGCTCCTTCCTCCAGGA	692
hZC3H12A_gRNA_356	ACAGCCTCCACCAGGTGCGG	693
hZC3H12A_gRNA_357	TGCCCGAGTCCAGGCAATCC	694
hZC3H12A_gRNA_358	AGGTGGAAAGGCAGGGGGCG	695
hZC3H12A_gRNA_359	CGACAGATTCATTGTGAAGC	696
hZC3H12A_gRNA_360	GCGGGGTGGTGGCACCCCTA	697
hZC3H12A_gRNA_361	GGCAATCCTGGGAGACGTAC	698
hZC3H12A_gRNA_362	GCCGCTCGCCTTGGAGGTCA	699
hZC3H12A_gRNA_363	TCACTGCCAGCAGGATGCCC	700
hZC3H12A_gRNA_364	CCTGAAGGACTGATGTGGGT	701
hZC3H12A_gRNA_365	GTGCGAGGCTCCTGCCTGAT	702
hZC3H12A_gRNA_366	GCACCTGGTGGAGGCTGTGA	703
hZC3H12A_gRNA_367	TCACAGCCTCCACCAGGTGC	704
hZC3H12A_gRNA_368	GCCGCTCTGGGTGGAAGAAT	705
hZC3H12A_gRNA_369	GACTAGAGGGAGCTGAGGGC	706
hZC3H12A_gRNA_370	TCAGCTCCCTCTAGTCCCGC	707
hZC3H12A_gRNA_371	GGAGCCTCCACTCCCAGAAG	708
hZC3H12A_gRNA_372	AGACCCTCTTGGCGGGACCC	709
hZC3H12A_gRNA_373	CCACCTTCATCTGCAGTTCC	710
hZC3H12A_gRNA_374	GGGAGTGGAGGCTCCAGGTT	711

[0775]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_375	CAGTGAACTGGTTTCTGGAG	712
hZC3H12A_gRNA_376	TCACCTGTGATGGGCACGTC	713
hZC3H12A_gRNA_377	TGCCAGCAGGATGCCCCGGC	714
hZC3H12A_gRNA_378	ACCCTCTTGGCGGGACCCTG	715
hZC3H12A_gRNA_379	TGGGGGCAGCTTGGCCGCTC	716
hZC3H12A_gRNA_380	AGGAGGAGGCCCTGGTGAGC	717
hZC3H12A_gRNA_381	CTGGAGGTGGGAGCCATGCA	718
hZC3H12A_gRNA_382	TCTGGAGGTGGGAGCCATGC	719
hZC3H12A_gRNA_383	CCTGGATGGGAAGAAGCTGG	720
hZC3H12A_gRNA_384	CCAGCCCCTGGGCTCTGCAC	721
hZC3H12A_gRNA_385	GGAGTGGAAGCGCTTCATCG	722
hZC3H12A_gRNA_386	TGTAGCCCGTGTAAGGGGCT	723
hZC3H12A_gRNA_387	GGAGTGAGGAGGGCCGGGGA	724
hZC3H12A_gRNA_388	GAGGTCACGGTATGTGTCGT	725
hZC3H12A_gRNA_389	CTAGAGGGAGCTGAGGGCAG	726
hZC3H12A_gRNA_390	TGGTGTGTTTCCCCCGCACC	727
hZC3H12A_gRNA_391	CTGATGTGGGTGGGGGCAGT	728
hZC3H12A_gRNA_392	AGGGCCGGGGAGGGCAGGCT	729
hZC3H12A_gRNA_393	TGAGCTATGAGTGGCCCCTG	730
hZC3H12A_gRNA_394	TCTTACGCAGGAAGTTGTCC	731
hZC3H12A_gRNA_395	GTTCCGACATCTGGCTCTCC	732
hZC3H12A_gRNA_396	AGGGGGCGCGGGTGGGTAGT	733
hZC3H12A_gRNA_397	CGCTGGCCTGCTCCTTGGCC	734
hZC3H12A_gRNA_398	GAAAGGCAGGGGGCGCGGGT	735
hZC3H12A_gRNA_399	TAGCCCGTGTAAGGGGCTCG	736
hZC3H12A_gRNA_400	CTGAGGGCAGGGGTCCGGTG	737
hZC3H12A_gRNA_401	ACACAGCTTAGTATACACGC	738
hZC3H12A_gRNA_402	CCGTCAGGGCACCCCAAGGC	739
hZC3H12A_gRNA_403	GGCAGGGGTCCGGTGAGGTC	740
hZC3H12A_gRNA_404	GGACTTGTAGGAGAGGATCT	741
hZC3H12A_gRNA_405	TCCCAGCCATGGGAACAAGG	742
hZC3H12A_gRNA_406	GACTTCTAATTGCTGAGAAG	743
hZC3H12A_gRNA_407	GGCTCCTGAAGGACTGATGT	744
hZC3H12A_gRNA_408	TGGCAGGAGCCCGTGGGGCA	745
hZC3H12A_gRNA_409	AGACAGGTGAGAGGAAGGGC	746
hZC3H12A_gRNA_410	TCGGAACTTTGGGGGGTTCG	747
hZC3H12A_gRNA_411	GCCTGGATGGGAAGAAGCTG	748
hZC3H12A_gRNA_412	TGAAGGACTGATGTGGGTGG	749
hZC3H12A_gRNA_413	CTGGGGGCCCAGGCATCCCC	750
hZC3H12A_gRNA_414	GAGCCCCCAGTGCAGAGCCC	751
hZC3H12A_gRNA_415	GGCGCGGGTGGGTAGTCGGC	752
hZC3H12A_gRNA_416	CCGTGTAAGGGGCTCGGGGT	753
hZC3H12A_gRNA_417	GTCGTGATGGTGTGAACACC	754
hZC3H12A_gRNA_418	ACGACGCGTGGGTGGCAAGC	755
hZC3H12A_gRNA_419	GGGGGCAGTGGCAGCAGCTT	756
hZC3H12A_gRNA_420	AGCGTGTATACTAAGCTGTG	757
hZC3H12A_gRNA_421	GCTCCTGCCTGATGGGGCAT	758

[0776]

靶标	序列	SEQ ID
hZC3H12A_gRNA_422	GTCTGTCAGGGCCTCTGGGA	759
hZC3H12A_gRNA_423	GTAGCCCGTGTAAGGGGCTC	760
hZC3H12A_gRNA_424	AGCCCCTGGGCTCTGCACTG	761
hZC3H12A_gRNA_425	GTGAACTGGTTTCTGGAGCG	762
hZC3H12A_gRNA_426	CTACGAGTCTGACGGGATCG	763
hZC3H12A_gRNA_427	AGTGAACTGGTTTCTGGAGC	764
hZC3H12A_gRNA_428	ACGCGTGGGTGGCAAGCGGG	765
hZC3H12A_gRNA_429	CGCGGGACTAGAGGGAGCTG	766
hZC3H12A_gRNA_430	GGCAGGAGTGAGGAGGGCCG	767
hZC3H12A_gRNA_431	AAGTGAGTGGCTTCTTACGC	768
hZC3H12A_gRNA_432	CTGAAGGACTGATGTGGGTG	769
hZC3H12A_gRNA_433	TTGCCACCCACGCGTCGTGA	770
hZC3H12A_gRNA_434	AGGGCAGGAGTGAGGAGGGC	771
hZC3H12A_gRNA_435	TCTTCTTCTCCAGTTCCCGC	772
hZC3H12A_gRNA_436	AGGAGTGAGGAGGGCCGGGG	773
hZC3H12A_gRNA_437	ACTCCCAGAAGAGGAAAAGG	774
hZC3H12A_gRNA_438	TGAGGAGGGCCGGGGAGGGC	775
hZC3H12A_gRNA_439	ACCTGGTGGAGGCTGTGATG	776
hZC3H12A_gRNA_440	CAGGGCCGAGGCCTCCTCAG	777
hZC3H12A_gRNA_441	TACTCTCGAGGTGGAAAGGC	778
hZC3H12A_gRNA_442	TTGGGGCTCTGGGGGGTGAG	779
hZC3H12A_gRNA_443	GCTCCTGGACCCCCAGCAGC	780
hZC3H12A_gRNA_444	GGGGGGTGAGAGGAGAGCAT	781
hZC3H12A_gRNA_445	CGGCCCAGTGGGTCATCAGG	782
hZC3H12A_gRNA_446	AGGAAGGGCAGGAGTGAGGA	783
hZC3H12A_gRNA_447	GAGGGCCGGGGAGGGCAGGC	784
hZC3H12A_gRNA_448	TGCTGGGGGTCCAGGAGCTG	785
hZC3H12A_gRNA_449	GCTGGGGGTCCAGGAGCTGT	786
hZC3H12A_gRNA_450	TGAGAGGAAGGGCAGGAGTG	787
hZC3H12A_gRNA_451	TGGGAGTGGAGGCTCCAGGT	788
hZC3H12A_gRNA_452	GAGGAAGGGCAGGAGTGAGG	789

[0777] 表31:示例性鼠Zc3h12a gRNA序列

[0778]

靶标	序列	SEQ ID
mZc3h12a_gRNA_1	GCTGGCTGTGAACTGGTTTC	790
mZc3h12a_gRNA_2	CTAGTTCCCGAAGGATGTGC	791
mZc3h12a_gRNA_3	ATTGGAGACCACCACTCCGT	792
mZc3h12a_gRNA_4	TTCCCTCCTCTGCCAGCCAT	793
mZc3h12a_gRNA_5	CGAAGGAAGTTGTCCAGGCT	794
mZc3h12a_gRNA_6	ATACCTGTGATAGGCACATC	795
mZc3h12a_gRNA_7	GACTTCCTTGTTCCCATGGC	796
mZc3h12a_gRNA_8	GGCCTTCGAATCCGACGGAG	797

[0779] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少一种gRNA分子,该至少一种gRNA分子包含靶向CBLB的核酸结合区段(即,靶向CBLB的gRNA)。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施

方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0780] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。示例性CBLB/Cblb靶DNA序列在表32和表33中示出。

[0781] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。编码靶向CBLB/Cblb的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表32和表33中示出。

[0782] 表32:示例性人CBLB gRNA序列

[0783]

靶标	序列	SEQ ID
hCBLB_gRNA_1	CCTTATGAAAAAGTCAAAAC	798
hCBLB_gRNA_2	AAAATATCAAGTATATATGG	799
hCBLB_gRNA_3	TCTAGCATCGGCATGCCAAA	800
hCBLB_gRNA_4	TTGGAAGCTCATGGACAAAG	801
hCBLB_gRNA_5	GATTTCCTCCTCGACCACCA	802
hCBLB_gRNA_6	CTTCATCTCTTGGATCAAAG	803
hCBLB_gRNA_7	AATGTATGAAGAACAGTCAC	804
hCBLB_gRNA_8	TAAACTTACCTGAAACAGCC	805
hCBLB_gRNA_9	AAGAATATGATGTTCCTCCC	806
hCBLB_gRNA_10	AGCAAGCTGCCGCAGATCGC	807
hCBLB_gRNA_11	AGTACTCATTCTCACTGAGT	808

[0784] 表33:示例性鼠Cblb gRNA序列

[0785]

靶标	序列	SEQ ID
mCblb_gRNA_1	TCTTTGTTGCAGGAGTCTGA	809
mCblb_gRNA_2	CAGGGGCTTGTTATGAGGTA	810
mCblb_gRNA_3	CTGATTGATGGTAGCAGGGA	811
mCblb_gRNA_4	CCTTATCTTCAGTCACATGC	812
mCblb_gRNA_5	TCACATGCTGGCAGAAATCA	813
mCblb_gRNA_6	TTCTGTCGCTGTGAGATAAA	814
mCblb_gRNA_7	ACAAGGCAGTACCTGCCACG	815
mCblb_gRNA_8	TGTGACTCACCCGGGATACA	816
mCblb_gRNA_9	GAGGTCCATCAGATCAGCTC	817

mCblb_gRNA_10	ATCTCCCTGGAACTGGCCAT	818
mCblb_gRNA_11	TGCAAAAATTGCAAAACTCA	819
mCblb_gRNA_12	TGCACAGAACTATTGTACCA	820
mCblb_gRNA_13	CAGATTAGTGCTTACCTTCC	821
mCblb_gRNA_14	ATTCCGTAAAATAGAGCCCC	822
mCblb_gRNA_15	CTGCACTCGGCTGGGACAAT	823

[0786] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少一种gRNA分子，该至少一种gRNA分子包含靶向RC3H1的核酸结合区段(即，靶向RC3H1的gRNA)。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0787] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。示例性RC3H1/Rc3h1靶DNA序列在表34和表35中示出。

[0788] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。编码靶向RC3H1/Rc3h1的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表34和表35中示出。

[0789] 表34:示例性人RC3H1 gRNA序列

[0790]

靶标	序列	SEQ ID
h RC3H1_gRNA_1	AGTCCATATGGAACCCACGG	824
h RC3H1_gRNA_2	AGTCTGAGTGCAAATTGGGC	825
h RC3H1_gRNA_3	TACGAATTGCACCGGACCAG	826
h RC3H1_gRNA_4	TTAGAGGCTTGAGGAAACCG	827
h RC3H1_gRNA_5	TTAGAACCTATGAAGCTCTG	828
h RC3H1_gRNA_6	CCTGAATAAACTCCACCGCA	829
h RC3H1_gRNA_7	AATTCGAAAGCCCATCAGTT	830
h RC3H1_gRNA_8	TGGCCACAACCCAAACTGAT	831
h RC3H1_gRNA_9	CAGCATACTCTGAGGTACGA	832
h RC3H1_gRNA_10	TTACCTCTAGCACTGCTGAG	833
h RC3H1_gRNA_11	TATGCAGTCCATTATTGACA	834
h RC3H1_gRNA_12	GTAACACAGCTTATTCCGCG	835

[0791]

h RC3H1_gRNA_13	ACTTTCCCTAGCAATGCAGG	836

[0792] 表35:示例性鼠Rc3h1 gRNA序列

[0793]

靶标	序列	SEQ ID
m Rc3h1_gRNA_1	CAAATGGGCAAGCCTTACGG	837
m Rc3h1_gRNA_2	CTCAATGTCCGTATTGATAG	838
m Rc3h1_gRNA_3	AGTCTGAGTGCAAATTGGGC	839
m Rc3h1_gRNA_4	CCAGATAGTGCAAATTGCTA	840
m Rc3h1_gRNA_5	TGATAGTGGTCTGGTCAAAT	841
m Rc3h1_gRNA_6	AATTCGAAAGCCCATCAGTT	842
m Rc3h1_gRNA_7	GCCCATTACTTTGTGTAGTG	843
m Rc3h1_gRNA_8	TGGCCACAGCCCAAACTGAT	844

[0794] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少一种gRNA分子,该至少一种gRNA分子包含靶向NFKBIA的核酸结合区段(即,靶向NFKBIA的gRNA)。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0795] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。示例性NFKBIA/Nfkbia靶DNA序列在表36和表37中示出。

[0796] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子的核酸结合区段由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。编码靶向NFKBIA/Nfkbia的gRNA的核酸结合区段的示例性DNA序列在表36和表37中示出。

[0797] 表36:示例性人NFKBIA gRNA序列

[0798]

靶标	序列	SEQ ID
hNFKBIA_gRNA_1	CGTCCGCGCCATGTTCCAGG	845
hNFKBIA_gRNA_2	TGGTTTCAGGAGCCCTGTAA	846
hNFKBIA_gRNA_3	ACCCGGATACAGCAGCAGCT	847
hNFKBIA_gRNA_4	TTCCAGGGCTCCGAGCCGCG	848
hNFKBIA_gRNA_5	CTGAAGGCTACCAACTACAA	849
hNFKBIA_gRNA_6	GGGTATTTCCTCGAAAGTCT	850

hNFKBIA_gRNA_7	GAGCCGCAGGAGGTGCCGCG	851
hNFKBIA_gRNA_8	CTGAGTCAGGACTCCCACGC	852
hNFKBIA_gRNA_9	CACTTACGAGTCCCCGTCCT	853
hNFKBIA_gRNA_10	CTCAAATTCCTTTTGGTTTC	854
hNFKBIA_gRNA_11	GGTTGGTGATCACAGCCAAG	855
hNFKBIA_gRNA_12	GCAGGTTGTTCTGGAAGTTG	856

[0799] 表37:示例性鼠Nfkbia gRNA序列

[0800]

靶标	序列	SEQ ID
mNfkbia_gRNA_1	CCTCGAAAGTCTCGGAGCTC	857
mNfkbia_gRNA_2	CTGCGTCAAGACTGCTACAC	858
mNfkbia_gRNA_3	TGCTCACAGGCAAGATGTAG	859
mNfkbia_gRNA_4	CCGGACAGCCCTCCACCTTG	860
mNfkbia_gRNA_5	AGACCTACCATTGTAGTTGG	861
mNfkbia_gRNA_6	CCAAGTGCTCCACGATGGCC	862
mNfkbia_gRNA_7	AGCCTCTATCCACGGCTACC	863
mNfkbia_gRNA_8	GCCCCAGGTAAGCTGGTAGG	864
mNfkbia_gRNA_9	GCAAGCAGCGCACCTGCTGC	865
mNfkbia_gRNA_10	TCAAGACTGCTACACTGGCC	866
mNfkbia_gRNA_11	GCAGGTTGTTCTGGAAGTTG	867
mNfkbia_gRNA_12	GGGTGCTGATGTCAACGCTC	868
mNfkbia_gRNA_13	CCACGATGGCCAGGTAGCCG	869

[0801]

mNfkbia_gRNA_14	TGGTCAGCGGCTTCTCTTCG	870
mNfkbia_gRNA_15	AATGTGGGGCTGATGTCAAC	871
mNfkbia_gRNA_16	ATTTCAACAAGAGCGAAACC	872
mNfkbia_gRNA_17	CACCTGACCAATGACTTCCA	873
mNfkbia_gRNA_18	GCCCTGGAAGCAGCAGCTCA	874
mNfkbia_gRNA_19	GCTCACAGGCAAGATGTAGA	875

[0802] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少两种gRNA分子,其中至少一种gRNA分子是靶向SOCS1的gRNA分子,并且至少一种gRNA分子是靶向PTPN2的gRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0803] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编

码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0804] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0805] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0806] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向SOCS1的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向ZC3H12A的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0807] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0808] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种

靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0809] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100%同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。

[0810] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向PTPN2的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向ZC3H12A的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0811] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0812] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100%同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0813] 在一些实施方案中，至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向

PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0814] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向CBLB的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向PTPN2的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或CBLB基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0815] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0816] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0817] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0818] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向CBLB的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向ZC3H12A的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一

种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0819] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0820] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0821] 在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中,至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100%同一性的DNA序列编码,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。

[0822] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少两种gRNA分子,其中至少一种gRNA分子是靶向SOCS1的gRNA分子,并且至少一种gRNA分子是靶向CBLB的gRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0823] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5所示的一组

基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0824] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0825] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0826] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向RC3H1的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向PTPN2的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0827] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0828] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0829] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0830] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向RC3H1的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向ZC3H12A的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0831] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0832] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0833] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0834] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向SOCS1的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向RC3H1的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0835] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0836] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0837] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0838] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向CBLB的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向RC3H1的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0839] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0840] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0841] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0842] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向NFKBIA的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向PTPN2的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因

(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与PTPN2基因(SEQ ID NO:3)或Ptpn2基因(SEQ ID NO:4)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0843] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与表9或表10中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0844] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子结合与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0845] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向PTPN2的gRNA分子由与SEQ ID NO:201-327或201-314中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0846] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向NFKBIA的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向ZC3H12A的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与ZC3H12A基因(SEQ ID NO:5)或Zc3h12a基因(SEQ ID NO:6)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0847] 在一些实施方案中，至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案

中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与表11或表12中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0848] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子结合与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的靶DNA序列。

[0849] 在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中,至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100%同一性的DNA序列编码,并且至少一种靶向ZC3H12A的gRNA分子由与SEQ ID NO:331-797、338-797或338-789中的一种具有100%同一性的DNA序列编码。

[0850] 在一些实施方案中,基因调控系统包含至少两种gRNA分子,其中至少一种gRNA分子是靶向SOCS1的gRNA分子,并且至少一种gRNA分子是靶向NFKBIA的gRNA分子。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SOCS1基因(SEQ ID NO:1)或Socs1基因(SEQ ID NO:2)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0851] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与表4或表5中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100%同一性的靶DNA序列。

[0852] 在一些实施方案中,至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的靶DNA序列,并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少

95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0853] 在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向SOCS1的gRNA分子由与SEQ ID NO:23-200、56-200或56-187中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0854] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向CBLB的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向NFKBIA的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与CBLB基因(SEQ ID NO:7)或Cblb基因(SEQ ID NO:8)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0855] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与表17或表18中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0856] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子结合与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0857] 在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、

96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向CBLB的gRNA分子由与SEQ ID NO:798-823或798-808中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0858] 在一些实施方案中，基因调控系统包含至少两种gRNA分子，其中至少一种gRNA分子是靶向RC3H1的gRNA分子，并且至少一种gRNA分子是靶向NFKBIA的gRNA分子。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与RC3H1基因(SEQ ID NO:9)或Rc3h1基因(SEQ ID NO:10)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与NFKBIA基因(SEQ ID NO:11)或Nfkbia基因(SEQ ID NO:12)中的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0859] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与表19或表20中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与表21或表22中所示的一组基因组坐标所限定的DNA序列编码的DNA序列具有100％同一性的靶DNA序列。

[0860] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的靶DNA序列。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子结合与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的靶DNA序列，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子结合与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的靶DNA序列。

[0861] 在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有至少95％、96％、97％、98％或99％同一性的DNA序列编码。在一些实施方案中，至少一种靶向RC3H1的gRNA分子由与SEQ ID NO:824-844或824-836中的一种具有100％同一性的DNA序列编码，并且至少一种靶向NFKBIA的gRNA分子由与SEQ ID NO:845-875或845-856中的一种具有100％同一性的DNA序列编码。

[0862] 在一些实施方案中，使用本领域已知的算法(例如，Cas-OFF finder)设计本文所述的gRNA序列的核酸结合区段以使脱靶结合最小化，来鉴定特定靶基因座或靶基因所特有的靶序列。

[0863] 在一些实施方案中，本文所述的gRNA可以包含一种或多种引入对核酸酶的稳定性的修饰的核苷或核苷酸。在此类实施方案中，与未修饰的gRNA相比，这些修饰的gRNA可引发降低的先天免疫。术语“先天免疫应答”包括对通常病毒或细菌来源的外源核酸(包括单链核酸)的细胞应答，其涉及诱导细胞因子(特别是干扰素)表达和释放以及细胞死亡。

[0864] 在一些实施方案中，本文所述的gRNA在5’末端处或附近(例如，在其5’末端的1个-10个、1个-5个或1个-2个核苷酸内)被修饰。在一些实施方案中，通过包括真核mRNA帽结构或帽类似物(例如，G(5’)ppp(5’)G帽类似物、m7G(5’)ppp(5’)G帽类似物或3’-O-Me-m7G(5’)ppp(5’)G抗反向帽类似物(ARCA))来修饰gRNA的5’末端。在一些实施方案中，通过用磷酸酶(例如，小牛肠碱性磷酸酶)处理以除去5’三磷酸基团来修饰体外转录的gRNA。在一些实施方案中，gRNA包含在其3’末端处或附近(例如，在其3’末端的1个-10个、1个-5个或1个-2个核苷酸内)的修饰。例如，在一些实施方案中，通过添加一个或多个(例如，25个-200个)腺嘌呤(A)残基来修饰gRNA的3’末端。

[0865] 在一些实施方案中，修饰的核苷和修饰的核苷酸可以存在于gRNA中，但是也可以存在于其他基因调控系统中，例如，基于mRNA、RNAi或siRNA的系统中。在一些实施方案中，修饰的核苷和核苷酸可以包括以下中的一种或多种：

[0866] (a)磷酸二酯骨架键联中非连接的磷酸氧中的一个或两个和/或连接的磷酸氧中的一个或多个的改变，例如替换；

[0867] (b)核糖组分(例如，核糖上的2’羟基)的改变，例如替换；

[0868] (c)用“脱磷”接头批量替换磷酸部分；

[0869] (d)天然存在的核碱基的修饰或替换；

[0870] (e)核糖磷酸骨架的替换或修饰；

[0871] (f)寡核苷酸的3’末端或5’末端的修饰，例如末端磷酸基团的去除、修饰或替换或部分的缀合；以及

[0872] (g)糖的修饰。

[0873] 在一些实施方案中，以上列出的修饰可以组合以提供可以具有两个、三个、四个或更多个修饰的修饰的核苷和核苷酸。例如，在一些实施方案中，修饰的核苷或核苷酸可以具有修饰的糖和修饰的核碱基。在一些实施方案中，gRNA的每个碱基均被修饰。在一些实施方案中，gRNA分子的磷酸基团中的每一个均被硫代磷酸酯基团替换。

[0874] 在一些实施方案中，可以使用软件工具来优化对用户靶序列内的gRNA的选择，例如以使整个基因组的总脱靶活性最小化。脱靶活性可能与切割不同。例如，对于使用酿脓链球菌Cas9进行的每种可能的gRNA选择，软件工具可以鉴定整个基因组中所有的包含多达一定数量(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)的错配碱基对的潜在脱靶序列(在NAG或NGG PAM之前)。可以例如使用实验得出的加权方案来预测在每个脱靶序列处的切割效率。然后可以根据每种可能的gRNA的总的预测的脱靶切割对每种可能的gRNA进行排序；排序最高的gRNA表示可能具有最大的在靶切割和最小的脱靶切割的那些gRNA。其他功能，例如用于gRNA载体构建的自动试剂设计、用于在靶Surveyor测定的引物设计以及用于经由下一代测序进行高通量检测和脱靶切割定量的引物设计，也可以包括在所述工具中。

[0875] 产生修饰的TIL的方法

[0876] 在一些实施方案中，本公开提供了用于产生修饰的TIL的改进方法。在一些实施方

案中,该方法包括将基因调控系统引入TIL群中,其中基因调控系统能够降低选自以下的一种、两种或更多种内源靶基因的表达和/或功能:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。(参见国际公开号WO 2019/178422、WO 2019/178420和WO 2019/178421,其以引用方式整体并入本文。)在一些实施方案中,一种、两种或更多种内源靶基因选自SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA。

[0877] 可以使用各种递送方法和制剂以各种形式将本文所述的基因调控系统(例如,基于核酸、蛋白质或核酸/蛋白质的系统)的组分引入靶细胞。在一些实施方案中,编码系统的一种或多种组分的多核苷酸通过重组载体(例如,病毒载体或质粒)递送。在一些实施方案中,在系统包含多于一种单一组分的情况下,载体可包含多个多核苷酸,每个多核苷酸都编码所述系统的组分。在一些实施方案中,在系统包含多于一种单一组分的情况下,可使用多个载体,其中每个载体包含编码所述系统的特定组分的多核苷酸。在一些实施方案中,载体还可包含编码信号肽的序列(例如,用于核定位、核仁定位、线粒体定位),所述序列与编码所述系统的一种或多种组分的多核苷酸融合。例如,载体可包含与编码所述系统的一种或多种组分的多核苷酸融合的核定位序列(例如,来自SV40)。在一些实施方案中,基因调控系统向细胞的引入在体外发生。在一些实施方案中,基因调控系统向细胞的引入在体内发生。在一些实施方案中,基因调控系统向细胞的引入离体发生。

[0878] 在一些实施方案中,包含编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸的重组载体是病毒载体。合适的病毒载体包括但不限于基于以下的病毒载体:痘苗病毒;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见例如,Li等人,Invest Opthalmol Vis Sci 35:2543 2549,1994;Borras等人,Gene Ther 6:515 524,1999;Li和Davidson,PNAS 92:7700 7704,1995;Sakamoto等人,H Gene Ther 5:1088 1097,1999;WO 94/12649、WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655);腺相关病毒(参见例如,美国专利号7,078,387;Ali等人,Hum Gene Ther 9:81 86,1998,Flannery等人,PNAS 94:6916 6921,1997;Bennett等人,Invest Opthalmol Vis Sci 38:2857 2863,1997;Jomary等人,Gene Ther 4:683 690,1997,Rolling等人,Hum Gene Ther 10:641 648,1999;Ali等人,Hum Mol Genet 5:591 594,1996;Srivastava的WO 93/09239,Samulski等人,J.Vir.(1989)63:3822-3828;Mendelson等人,Virol.(1988)166:154-165;和Flotte等人,PNAS(1993)90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人免疫缺陷病毒(参见例如,Miyoshi等人,PNAS 94:10319 23,1997;Takahashi等人,J Virol 73:7812 7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和衍生自逆转录病毒的载体,所述逆转录病毒诸如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒)等。

[0879] 在一些实施方案中,包含编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸的重组载体是质粒。许多合适的质粒表达载体是本领域技术人员已知的,并且许多是可商购获得的。以举例的方式提供以下载体;对于真核宿主细胞:pXT1、pSG5(Stratagene)、

pSVK3、pBPV、pMSG和pSVLSV40(Pharmacia)。然而,可使用任何其他质粒载体,只要它与宿主细胞相容即可。根据所利用的细胞类型和基因调控系统,许多合适的转录和翻译控制元件中的任一种(包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等)都可用于表达载体中(参见例如,Bitter等人(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

[0880] 在一些实施方案中,编码本文描述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸序列可操作地连接到控制元件,例如转录控制元件,诸如启动子。转录控制元件在真核细胞(例如,哺乳动物细胞)或原核细胞(例如,细菌或古细菌细胞)中可以是功能性的。在一些实施方案中,编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸序列可操作地连接到多个控制元件,其允许多核苷酸在原核和真核细胞中都表达。根据所利用的细胞类型和基因调控系统,许多合适的转录和翻译控制元件中的任一种(包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等)都可用于表达载体中(参见例如,Bitter等人(1987)Methods in Enzymology,153:516-544)。

[0881] 合适的真核启动子(在真核细胞中起作用的启动子)的非限制性实例包括来自巨细胞病毒(CMV)立即早期、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶、早期和晚期SV40、来自逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)和小鼠金属硫蛋白-1的那些。合适的载体和启动子的选择完全在本领域普通技术人员的能力范围内。表达载体还可含有用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体还可包括用于扩增表达的适当序列。表达载体还可包括编码与定点修饰多肽融合的蛋白质标记(例如,6xHis标记、血凝素标记、绿色荧光蛋白等)的核苷酸序列,从而产生嵌合多肽。

[0882] 在一些实施方案中,将编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸序列可操作地连接到诱导型启动子。在一些实施方案中,编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸序列可操作地连接到组成型启动子。

[0883] 将多核苷酸和重组载体引入宿主细胞的方法是本领域已知的,并且可以使用任何已知方法来将基因调控系统的组分引入细胞。合适的方法包括例如病毒或噬菌体感染、转染、缀合、原生质体融合、脂质转染、电穿孔、磷酸钙沉淀、聚乙烯亚胺(PEI)介导的转染、DEAE-右旋糖酐介导的转染、脂质体介导的转染、粒子枪技术、磷酸钙沉淀、直接显微注射、纳米粒子介导的核酸递送(参见例如,Panyam等人,Adv Drug Deliv Rev.2012年9月13日.pii:S0169-409X(12)00283-9)、微流体递送方法(参见例如,国际PCT公开号WO 2013/059343)等。在一些实施方案中,经由电穿孔的递送包括将细胞与基因调控系统的组分在盒、室或池中混合,并施加一个或多个限定持续时间和振幅的电脉冲。在一些实施方案中,将细胞与基因调控系统的组分在连接到装置(例如泵)的容器中混合,所述装置将混合物馈送到盒、室或池中,在其中施加一个或多个具有限定持续时间和振幅的电脉冲,之后将细胞递送到第二容器。

[0884] 在一些实施方案中,使用电穿孔将基因调控系统的组分引入细胞。在使用前REP和REP方案的一些实施方案中,使用电穿孔在前REP阶段之后但REP阶段之前将基因调控系统的组分引入细胞。

[0885] 在一些实施方案中,将基因调控系统的一种或多种组分或编码本文所述的基因调控系统的一种或多种组分的多核苷酸序列在非病毒递送媒介物中引入细胞,所述非病毒递送媒介物诸如转座子、纳米粒子(例如脂质纳米粒子)、脂质体、外来体、减毒细菌或病毒样

粒子。在一些实施方案中，媒介物是减毒细菌(例如，天然或人工工程改造成侵入性但减毒以防止致病性，包括单增李斯特菌、某些沙门氏菌属(Salmonella)菌株、长双歧杆菌(Bifidobacterium longum)和修饰的大肠杆菌(Escherichia coli))、对靶特异性细胞具有营养和组织特异性向性的细菌以及具有修饰的表面蛋白以改变靶细胞特异性的细菌。在一些实施方案中，媒介物是遗传修饰的噬菌体(例如，具有大包装能力、较低免疫原性、含有哺乳动物质粒维持序列并且掺入了靶向配体的工程化噬菌体)。在一些实施方案中，媒介物是哺乳动物病毒样粒子。例如，可以产生修饰的病毒粒子(例如，通过纯化“空”粒子，然后将病毒与期望物质离体装配)。也可以对媒介物进行工程改造以掺入靶向配体来改变靶组织特异性。在一些实施方案中，媒介物是生物脂质体。例如，生物脂质体是来源于人细胞的基于磷脂的粒子(例如，红细胞血影，其是分解成来源于受试者的球形结构的红细胞，并且其中组织靶向可以通过附着各种组织或细胞特异性配体来实现)、分泌性外来体、或内吞来源的受试者衍生膜结合的纳米囊泡(30nm-100nm)(例如，可以由各种细胞类型产生并且因此可以被细胞摄取而不需要靶向配体)。

[0886] 在一些实施方案中，本文所述的修饰的TIL的方法包括从样品获得TIL群。在一些实施方案中，样品包括组织样品、流体样品、细胞样品、蛋白质样品、或DNA或RNA样品。在一些实施方案中，组织样品可以来源于任何组织类型，包括但不限于皮肤、毛发(包括根)、骨髓、骨骼、肌肉、唾液腺、食道、胃、小肠(例如，来自十二指肠、空肠或回肠的组织)、大肠、肝脏、胆囊、胰腺、肺、肾、膀胱、子宫、卵巢、阴道、胎盘、睾丸、甲状腺、肾上腺、心脏组织、胸腺、脾脏、淋巴结、脊髓、大脑、眼、耳、舌、软骨、白色脂肪组织或棕色脂肪组织。在一些实施方案中，组织样品可以来源于癌性、癌前性或非癌性肿瘤。在一些实施方案中，流体样品包含口腔拭子、血液、血浆、口腔粘液、阴道粘液、外周血、脐带血、唾液、精子、尿液、腹水、胸膜液、脊髓液、肺灌洗液、眼泪、汗液、精子、精液、精浆、前列腺液、射精前液(Cowper液)、排泄物、脑脊液、淋巴液、包含一种或多种细胞群的细胞培养基、包含一种或多种细胞群体的缓冲溶液等。

[0887] 在一些实施方案中，处理样品以从样品的剩余部分富集或分离特定细胞类型，诸如免疫效应细胞。在某些实施方案中，样品是外周血样品，然后对其进行白细胞去除术以分离红细胞和血小板并分离淋巴细胞。在一些实施方案中，样品是leukopak，可以从中分离或富集免疫效应细胞。在一些实施方案中，样品是肿瘤样品，其被进一步处理以分离存在于肿瘤中的淋巴细胞(即，分离肿瘤浸润淋巴细胞)。

[0888] 在一些实施方案中，分离的免疫效应细胞在培养物中扩增以产生扩增的免疫效应细胞群。可在扩增过程期间向培养系统中添加一种或多种激活或生长因子。例如，在一些实施方案中，可以向培养系统中添加一种或多种细胞因子(诸如IL-2、IL-15和/或IL-7)以增强或促进细胞增殖和扩增。在一些实施方案中，可以向培养系统中添加一种或多种激活抗体，诸如抗-CD3抗体，以增强或促进细胞增殖和扩增。在一些实施方案中，免疫效应细胞可在扩增过程期间与饲养细胞共培养。在一些实施方案中，本文提供的方法包括一个或多个扩增阶段。例如，在一些实施方案中，免疫效应细胞可以在从样品分离后扩增，使其静置，然后再次扩增。在一些实施方案中，可以在一组扩增条件下扩增免疫效应细胞，之后在第二组不同的扩增条件下进行第二轮扩增。用于离体扩增免疫细胞的先前的方法是本领域已知的，例如，如美国专利申请公开号20180282694和20170152478以及美国专利号8,383,099和

8,034,334中所述。

[0889] 在培养和扩增过程期间的任何时间点，可以将本文所述的基因调控系统引入免疫效应细胞以产生修饰的TIL群。在一些实施方案中，在从样品中富集后立即将基因调控系统引入免疫效应细胞群。在一些实施方案中，在一个或多个扩增过程之前、期间或之后，将基因调控系统引入免疫效应细胞群。在一些实施方案中，在从样品中富集或从受试者中收获之后，并且在任何扩增回合之前，立即将基因调控系统引入免疫效应细胞群。在一些实施方案中，在第一轮扩增之后并且第二轮扩增之前，将基因调控系统引入免疫效应细胞群。在一些实施方案中，在第一轮和第二轮扩增之后，将基因调控系统引入免疫效应细胞群。

[0890] 在一些实施方案中，通过本文所述的方法产生的修饰的TIL可立即使用。或者，细胞可以在液氮温度下冷冻并长期储存，解冻并能够再次使用。在此类情况下，通常将细胞在10％二甲亚砜(DMSO)、50％血清、40％缓冲培养基或本领域中通常用于在此类冷冻温度下保存细胞的一些其他这种溶液中冷冻，并且以本领域众所周知的用于解冻冷冻的培养细胞的方式解冻。

[0891] 在一些实施方案中，可在不同的培养条件下对修饰的TIL进行体外培养。细胞可在培养物中扩增，即在促进其增殖的条件下生长。培养基可以是液体或半固体，例如含有琼脂、甲基纤维素等。细胞群可悬浮在适当的营养培养基中，诸如Iscove改良DMEM或RPMI 1640，通常补充有胎牛血清(约5％-10％)、L-谷氨酰胺、硫醇(特别是2-巯基乙醇)和抗生素，例如青霉素和链霉素。培养物可含有调节性T细胞对其具有应答性的生长因子。本文定义的生长因子是能够通过对跨膜受体的特异性作用促进培养物或完整组织中细胞的存活、生长和/或分化的分子。生长因子包括多肽和非多肽因子。

[0892] 使用CRISPR/Cas系统产生修饰的TIL

[0893] 在一些实施方案中，产生修饰的TIL的方法涉及使靶DNA序列与包含gRNA和Cas多肽的复合物接触。如上所述，gRNA和Cas多肽形成复合物，其中gRNA的DNA结合结构域将复合物靶向靶DNA序列，并且其中Cas蛋白(或与无酶活性的Cas蛋白融合的异源蛋白)修饰靶DNA序列。在一些实施方案中，在将gRNA和Cas蛋白(或编码gRNA和Cas蛋白的多核苷酸)引入细胞之后，在细胞内形成此复合物。在一些实施方案中，编码Cas蛋白的核酸是DNA核酸，并将其通过转导引入细胞。在一些实施方案中，CRISPR/Cas基因编辑系统的Cas和gRNA组分由单个多核苷酸分子编码。在一些实施方案中，编码Cas蛋白和gRNA组分的多核苷酸包含在病毒载体中，并通过病毒转导引入细胞。在一些实施方案中，CRISPR/Cas基因编辑系统的Cas9和gRNA组分由不同的多核苷酸分子编码。在一些实施方案中，编码Cas蛋白的多核苷酸包含在第一病毒载体中，而编码gRNA的多核苷酸包含在第二病毒载体中。在此实施方案的一些方面中，将第一病毒载体在第二病毒载体之前引入细胞。在此实施方案的一些方面中，将第二病毒载体在第一病毒载体之前引入细胞。在此类实施方案中，载体的整合导致Cas9和gRNA组分的持续表达。然而，Cas9的持续表达可能在一些细胞类型中导致增加的脱靶突变和切割。因此，在一些实施方案中，可通过转染将编码Cas蛋白的mRNA核酸序列引入细胞群。在此类实施方案中，Cas9的表达将随时间推移而降低，并且可减少脱靶突变或切割位点的数量。

[0894] 在一些实施方案中，通过将gRNA分子和Cas蛋白混合在一起并孵育足以允许复合物形成的一段时间，在无细胞系统中形成此复合物。然后可以将包含gRNA和Cas蛋白并且在本文中称为CRISPR-核糖核蛋白(CRISPR-RNP)的此预形成的复合物引入细胞，以便修饰靶

DNA序列。复合还可以在靶细胞中发生,其中分别引入Cas蛋白和gRNA。

[0895] 使用shRNA系统产生修饰的TIL

[0896] 在一些实施方案中,公开了一种通过将编码具有与靶基因的mRNA转录物互补的序列的一种或多种shRNA分子的一种或多种DNA多核苷酸引入细胞来产生修饰的TIL的方法。可以经由小基因盒将特定的DNA序列引入细胞核,从而修饰TIL以产生shRNA。逆转录病毒和慢病毒均可以用于将编码shRNA的DNA引入TIL。引入的DNA可以成为细胞自身DNA的一部分或保留在细胞核中,并指导细胞机制以产生shRNA。shRNA可通过细胞内部的Dicer或AGO2介导的切割活性进行处理,以诱导RNAi介导的基因敲低。

[0897] 使用siRNA系统产生修饰的TIL

[0898] 在一些实施方案中,公开了一种通过将编码具有与靶基因的mRNA转录物互补的序列的一种或多种siRNA分子的一种或多种DNA多核苷酸引入TIL来产生修饰的TIL的方法。可以经由小基因盒将特定的DNA序列引入细胞核,从而修饰TIL以产生siRNA。逆转录病毒、腺相关病毒、腺病毒和慢病毒可以用于将编码siRNA的DNA引入TIL。引入的DNA可以成为细胞自身DNA的一部分或留存在细胞核中,并指导细胞机制以产生siRNA。siRNA可以干扰基因表达。

[0899] 在培养的TIL中降低耗竭同时维持细胞毒性的方法

[0900] 在一个方面,本公开提供了在培养的TIL群中降低耗竭并维持细胞毒性的方法、或在维持细胞毒性的同时诱导TIL持续和扩增的方法,所述方法包括在包含T细胞刺激细胞因子IL-15的培养基中培养TIL群,其中TIL群在SOCS1基因处被修饰。在另一个方面,本公开提供了在培养的TIL群中降低耗竭并维持细胞毒性的方法、或在维持细胞毒性的同时诱导TIL持续和扩增的方法,所述方法包括在包含T细胞刺激细胞因子IL-15的培养基中培养TIL群,其中TIL群在SOCS1基因和ZC3H12A基因处被修饰。在一些实施方案中,SOCS1基因和/或ZC3H12A基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。在一些实施方案中,相对于在SOCS1基因处被修饰并且在不含IL-15的培养基中培养的TIL,TIL群包含选自以下的一种或多种耗竭相关基因的表达的降低:PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。在一些实施方案中,相对于在SOCS1基因处未被修饰并且在含有IL-15的培养基中培养的TIL,选自以下的一种或多种细胞毒性相关基因的表达水平增加:ITGB2、CSF2、TNF、FASLG、TNFRSF10B、LCK、IFNG、IFNB1、BID、GZMB、PRF1、KLRK1、ZAP70、FYN、GZMA、VAV3、GZMH、GZMM、KIR3DL1、IFNGR2、VAV1、SOS2、PTPN6、PTK2B、SH3BP2、LAT、KLRC2、IFNA1、CASP3、ICAM1、SH2D1A、ARAF、NFATC1、IFNAR1、NCR1、NCR3、IFNGR1、NCR2、TYROBP、FCGR3B、KLRD1、FAS、CD244、RAC2和CD247。

[0901] 在一些实施方案中,细胞毒性和/或耗竭测量基于评分系统。在一些实施方案中,细胞毒性通过细胞毒性评分来测量。在一些实施方案中,耗竭通过耗竭评分来测量。如本文所用,术语“细胞毒性评分”和“耗竭评分”是指描述于Tomfohr J,Lu J,Kepler TB,Pathway level analysis of gene expression using singular value decomposition,BMC Bioinformatics.2005;6:225中的评分算法,所述文献以引用方式整体并入。可以利用NanoString“nSolver”软件将算法应用于数据。术语“耗竭标志物”是指可以用于确定耗竭评分的一种基因或一组基因。术语“细胞毒性标志物”是指可以用于确定细胞毒性评分的一

种基因或一组基因。在一些实施方案中，根据下文提供的方法使用耗竭或细胞毒性标志物。耗竭标志物包括，例如，PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。细胞毒性标志物包括，例如，ITGB2、CSF2、TNF、FASLG、TNFRSF10B、LCK、IFNG、IFNB1、BID、GZMB、PRF1、KLRK1、ZAP70、FYN、GZMA、VAV3、GZMH、GZMM、KIR3DL1、IFNGR2、VAV1、SOS2、PTPN6、PTK2B、SH3BP2、LAT、KLRC2、IFNA1、CASP3、ICAM1、SH2D1A、ARAF、NFATC1、IFNAR1、NCR1、NCR3、IFNGR1、NCR2、TYROBP、FCGR3B、KLRD1、FAS、CD244、RAC2和CD247。

[0902] 为了计算相关的耗竭和细胞毒性评分，分析从在每个样本中量化每种途径的活性水平开始。给定样品中的途径的活性水平可以定义为该样品中某些元基因的表达水平。

[0903] 在一些实施方案中，计算从将基因表达水平归一化开始以在样品中具有零均值和单位方差。对于每种途径，形成含有来自所有样品的归一化表达水平但仅针对该途径中的基因的矩阵Y(行＝基因，列＝样品)。Y的奇异值分解表示为

[0904] $Y=WDC$。(1)

[0905] 这里矩阵W的列是Y的正交($W^{T}W=I$，单位矩阵)特征向量或元基因，D是含有相关特征值的对角矩阵，并且C的每一列是样品中的一种的系数向量，表示样品中每个元基因的水平。C的行也是正交的($CC^{T}=I$)。假设特征值沿D的对角线从最高到最低排序。与最大特征值相关的第一元基因w然后是W的第一列。特征值可以命名为λ，而相关系数(C的第一行)可以命名为c_j。取给定样品j中的途径的活性水平作为第一元基因的系数c_j。还从W的列和C的行的正交性得出：

[0906] $$c_j=\lambda^{-1}\sum_i w_i y_{ij}。 \quad (2)$$

[0907] 即，活性水平c_j也可以被视为(至多非必要的缩放因子)单个基因的归一化表达水平的加权和，权重由第一元基因w给出。在SVD中使用第一元基因的一个动机是，所得的活性水平和权重的组合指定了矩阵Y的最佳近似值(即，解释了数据中变化的主要组分)。具体来说，假设表达水平的以下统计模型

[0908] $y_{ij}=\alpha_i x_j+\varepsilon_{ij}$ (3)

[0909] 其中向量x被约束为具有单位范数，而ε_{ij}是独立的高斯随机变量。使平方误差总和最小化的α和x的估计值只是分别按其特征值λw和相关的活性水平向量c缩放的第一元基因。

[0910] 关于第一特征值的有用的事实是它的平方是第一元基因所解释的变化量的量度。具体而言，在n_g＝基因数并且n_s＝样品数的情况下，数据中的总变化量为$\sum_{ij}y_{ij}^2=n_g(n_s-1)$(回想一下，表达水平是归一化的，所以$\frac{1}{n_s-1}\sum_j y_{ij}^2=1$)并且减去第一元基因描述的曲线(profile)后剩余的变化是$\Sigma_{ij}(y_{ij}-\lambda w_i c_j)^2=n_g(n_s-1)-\lambda^2$。

[0911] 过继细胞转移

[0912] 过继细胞转移(ACT)是一种非常有效的免疫疗法形式，并且涉及将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移到癌症患者体内。在一些情况下，ACT是一种治疗方法，其涉及在体外鉴定具有抗肿瘤活性的淋巴细胞、将这些细胞在体外大量扩增、以及将它们输注到携带癌症

的宿主体内。用于过继转移的淋巴细胞可以来源于切除肿瘤的基质(肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)。可以如本文所述制备用于ACT的TIL。来源于待输注的携带癌症的宿主的淋巴细胞的ACT被称为自体ACT。ACT还可以涉及使用来自除罹患癌症的受试者之外的供体的淋巴细胞。在一些实施方案中,供体与待输注同种异体淋巴细胞的受试者患有相同类型的癌症。以引用方式整体并入本文的美国公开号2011/0052530涉及一种用于执行过继细胞疗法以促进癌症消退的方法,所述方法主要用于治疗罹患转移性黑色素瘤的患者,所述文献针对这些方法的内容以引用方式整体并入。在一些实施方案中,可以如本文所述施用TIL。在一些实施方案中,TIL可以以单剂量施用。这种施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方案中,TIL和/或细胞毒性淋巴细胞可以多剂量施用。

[0913] 在将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移到癌症患者体内之前,可对患者进行淋巴细胞清除步骤。淋巴细胞清除部分地或完全地消除了调节性T细胞和免疫系统的竞争成分。在一些实施方案中,利用淋巴细胞清除。在其他实施方案中,不利用淋巴细胞清除。

[0914] 药物组合物、剂量和给药方案

[0915] 在一个实施方案中,将使用本公开的方法扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方案中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬浮液。在一些实施方案中,TIL作为单次动脉内或静脉内输注施用。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内施用。使用本公开的PBMC扩增的TIL可以通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方案中,T细胞作为单次动脉内或静脉内输注施用,优选持续大约30分钟至60分钟。其他合适的施用途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内施用。

[0916] 可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施方案中,施用约1×10^{9}个至约2×10^{11}个TIL。在一些实施方案中,施用约2.3×10^{10}个至约13.7×10^{10}个TIL,平均约7.8×10^{10}个TIL,特别在癌症是黑色素瘤的情况下。在一个实施方案中,施用约1.2×10^{10}个至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,施用约3×10^{10}个至约12×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,施用约4×10^{10}个至约10×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,施用约5×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,施用约6×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,施用约7×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约2.3×10^{10}个至约13.7×10^{10}个。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约7.8×10^{10}个TIL,特别在癌症是黑色素瘤的情况下。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约1.2×10^{10}个至约4.3×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约3×10^{10}个至约12×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约4×10^{10}个至约10×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约5×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约6×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。在一些实施方案中,治疗有效剂量为约7×10^{10}个至约8×10^{10}个TIL。

[0917] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物中提供的TIL的数量是TIL的有效剂量。在一些实施方案中,TIL的有效剂量为约1×10^{6}个、2×10^{6}个、3×10^{6}个、4×10^{6}个、5×10^{6}个、6×10^{6}个、7×10^{6}个、8×10^{6}个、9×10^{6}个、1×10^{7}个、2×10^{7}个、3×10^{7}个、4×10^{7}个、5×10^{7}个、6×10^{7}个、7×10^{7}个、8×10^{7}个、9×10^{7}个、1×10^{8}个、2×10^{8}个、3×10^{8}个、4×10^{8}个、5×10^{8}个、6×10^{8}个、7×10^{8}个、8×10^{8}个、9×10^{8}个、1×10^{9}个、2×10^{9}个、3×10^{9}个、4×10^{9}个、5×10^{9}个、6×10^{9}个、7×10^{9}个、8×10^{9}个、9×10^{9}个、1×10^{10}个、2×10^{10}个、3×10^{10}个、4×10^{10}个、5×10^{10}个、6×10^{10}个、7×10^{10}个、8×10^{10}个、9×10^{10}个、1×10^{11}个、2×10^{11}个、3×10^{11}个

和4×10^{11}个。在一个实施方案中，TIL的有效剂量范围为1×10^{6}个至5×10^{6}个、5×10^{6}个至1×10^{7}个、1×10^{7}个至5×10^{7}个、5×10^{7}个至1×10^{8}个、1×10^{8}个至5×10^{8}个、5×10^{8}个至1×10^{9}个、1×10^{9}个至5×10^{9}个、5×10^{9}个至1×10^{10}个、1×10^{10}个至5×10^{10}个、和5×10^{10}个至4×10^{11}个。

[0918] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度小于例如药物组合物的100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%重量/重量、重量/体积或体积/体积。

[0919] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于药物组合物的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、125%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%重量/重量、重量/体积或体积/体积。

[0920] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度在药物组合物的约0.0001%至约50%、约0.001%至约40%、约0.01%至约30%、约0.02%至约29%、约0.03%至约28%、约0.04%至约27%、约0.05%至约26%、约0.06%至约25%、约0.07%至约24%、约0.08%至约23%、约0.09%至约22%、约0.1%至约21%、约0.2%至约20%、约0.3%至约19%、约0.4%至约18%、约0.5%至约17%、约0.6%至约16%、约0.7%至约15%、约0.8%至约14%、约0.9%至约12%或约1%至约10%重量/重量、重量/体积或体积/体积的范围内。

[0921] 在一些实施方案中，本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度在药物组合物的约0.001%至约10%、约0.01%至约5%、约0.02%至约4.5%、约0.03%至约4%、约0.04%至约3.5%、约0.05%至约3%、约0.06%至约2.5%、约0.07%至约2%、约0.08%至约1.5%、约0.09%至约1%、约0.1%至约0.9%重量/重量、重量/体积或体积/体积的范围内。

[0922] 本发明的药物组合物中提供的TIL在宽剂量范围内是有效的。确切的剂量将取决于施用途径、化合物的施用形式、待治疗受试者的性别和年龄、待治疗受试者的体重以及主治医师的偏好和经验。如果适当，也可以使用临床确定剂量的TIL。使用本文的方法施用的药物组合物的量(诸如TIL的剂量)将取决于被治疗的人或哺乳动物、病症或病状的严重程

度、施用速率、活性药物成分的分布以及开药医生的考量。

[0923] 在一些实施方案中,TIL可以单剂量施用。这种施用可通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方案中,TIL可以多剂量施用。只要有必要,TIL的施用就可继续进行。

[0924] 有效量的TIL可通过具有相似效用的剂的任何可接受的施用模式以单剂量或多剂量施用,包括鼻内和透皮途径,通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌内、皮下、局部、通过移植、或通过吸入。在某些实施方案中,静脉内施用TIL。

[0925] 细胞计数、细胞活力、流式细胞术

[0926] 在一些实施方案中,测量细胞计数和/或活力。诸如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56的标志物以及本文公开或描述的任何其他标志物的表达可以通过使用FACSCanto™流式细胞仪(BD Biosciences)的、使用抗体的流式细胞术测量,所述抗体例如但不限于可从BD Bio-sciences(BD Biosciences,San Jose,Calif.)商购获得的那些。可以使用一次性c芯片血细胞计数器(VWR,Batavia,Ill.)手动对细胞进行计数,并且可以使用本领域已知的任何方法(包括但不限于台盼蓝染色)评估活力。

[0927] 在一个实施方案中,用于扩增TIL的方法可包括使用不超过30,000ml的细胞培养基。在一些实施方案中,用于扩增TIL的方法可包括使用约5,000ml至约25,000ml的细胞培养基、约5,000ml至约10,000ml的细胞培养基或约5,800ml至约8,700ml的细胞培养基。在一个实施方案中,扩增TIL的数量使用不超过一种类型的细胞培养基。可使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(Invitrogen,Carlsbad Calif.)。上述REP阶段可能需要使用最多30,000ml的细胞培养基。上述前REP阶段可能仅需要使用至多100ml的细胞培养基。

[0928] 在一个实施方案中,在透气容器中扩增TIL。透气容器已用于使用本领域已知的方法、组合物和装置使用PBMC扩增TIL,所述方法、组合物和装置包括描述于美国专利申请公开号2005/0106717A1中的那些,所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。在一个实施方案中,在透气袋中扩增TIL。在一个实施方案中,使用在透气袋中扩增TIL的细胞扩增系统来扩增TIL,所述系统诸如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare)。在一个实施方案中,使用在透气袋中扩增TIL的细胞扩增系统来扩增TIL,所述系统诸如WAVE生物反应器系统,也称为Xuri细胞扩增系统W5(GE Healthcare)。在一个实施方案中,细胞扩增系统包括透气细胞袋,其体积选自由以下组成的组:约100ml、约200ml、约300ml、约400ml、约500ml、约600ml、约700ml、约800ml、约900ml、约1L、约2L、约3L、约4L、约5L、约6L、约7L、约8L、约9L和约10L。在一个实施方案中,TIL可以在G-Rex烧瓶(可从Wilson Wolf Manu facturing商购获得)中扩增。此类实施方案允许细胞群从约5×10^5个细胞/平方厘米扩增到10×10^6个细胞/平方厘米与30×10^6个细胞/平方厘米之间。在一个实施方案中,这种扩增在不向细胞中添加新鲜细胞培养基(也称为饲养细胞)的情况下进行。在一个实施方案中,无需饲养,只要培养基在G-Rex烧瓶中的高度约为10cm即可。在一个实施方案中,无需饲养,但添加一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞因子可以作为大丸剂添加,而无需将细胞因子与培养基混合。此类容器、装置和方法是本领域已知的并且已经用于扩增TIL,并且包括描述于以下中的那些:美国专利申请公开号US 2014/0377739A1、国际公开号WO 2014/210036 A1、美国专利申请公开号us 2013/0115617A1、国际公开号WO 2013/188427 A1、美国专利申请公开号US 2011/0136228 A1、美国专利号8,809,050 B2、国际公开号WO 2011/072088 A2、

美国专利申请公开号US 2016/0208216 A1、美国专利申请公开号US 2012/0244133 A1、国际公开号WO 2012/129201 A1、美国专利申请公开号US 2013/0102075 A1、美国专利号8,956,860B2、国际公开号WO 2013/173835 A1、美国专利申请公开号US 2015/0175966 A1。此类过程还在Jin等人,J.Immunotherapy,2012,35:283-292中有所描述。所有这些出版物以引用方式整体并入本文。

[0929] 本文引用的所有参考文献、文章、出版物、专利、专利公开和专利申请出于所有目的以引用方式整体并入本文。但是,本文中引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利公开和专利申请的提及均不是并且不应当被认为承认或以任何形式暗示它们构成了有效的现有技术或构成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0930] 附加实施方案

[0931] 本公开的附加实施方案涵盖在以下编号的段落1-388中:

[0932] 1.一种扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法,该方法包括以下步骤:

[0933] 在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群;和

[0934] 在包含T细胞受体(TCR)激动剂、饲养细胞和大于100ng/ml IL-15的第二培养基中培养TIL群,其中第二培养基不包含IL-2,从而扩增TIL群。

[0935] 2.如段落1所述的方法,其中第二培养基中的IL-15的最终浓度小于或等于10,000ng/ml,任选地小于或等于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。

[0936] 3.如段落1或2所述的方法,其中T细胞刺激细胞因子选自由以下组成的组:IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。

[0937] 4.如段落1或2所述的方法,其中第一培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[0938] 5.如段落1或2所述的方法,其中第一培养基不包含IL-2。

[0939] 6.如段落1或2所述的方法,其中第一培养基不包含IL-21。

[0940] 7.如前述段落中任一项所述的方法,其中第二培养基不包含IL-21。

[0941] 8.如前述段落中任一项所述的方法,其中第二培养基还包含IL-7。

[0942] 9.如前述段落中任一项所述的方法,其中第一培养基中的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[0943] 10.如段落8所述的方法,其中第二培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[0944] 11.如前述段落中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是CD3激动剂。

[0945] 12.如前述段落中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是抗体。

[0946] 13.如段落12所述的方法,其中抗体是人源化抗体。

[0947] 14.如前述段落中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是OKT3或UCHT1。

[0948] 15.如段落1至11中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达TCR激动剂。

[0949] 16.如前述段落中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达T细胞共刺激分子的激动剂。

[0950] 17.如段落16所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。

[0951] 18.如段落16所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂。

[0952] 19.如段落16所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。

[0953] 20.如段落15至19中任一项所述的方法,其中TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂在饲养细胞的表面上表达。

[0954] 21.如前述段落中任一项所述的方法,其中4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[0955] 22.如前述段落中任一项所述的方法,其中饲养细胞是外周血单核细胞或抗原呈递细胞。

[0956] 23.如前述段落中任一项所述的方法,其中对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[0957] 24.如前述段落中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^{3}至4mm^{3}的肿瘤碎片。

[0958] 25.如前述段落中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[0959] 26.如前述段落中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于产生少于100,000个TIL的前REP步骤。

[0960] 27.如前述段落中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于使存在于解聚的肿瘤样品中的TIL扩增小于5倍的前REP步骤。

[0961] 28.如前述段落中任一项所述的方法,其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[0962] 29.如段落28所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[0963] 30.如段落28所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[0964] 31.如段落28所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[0965] 32.如段落28所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[0966] 33.如段落32所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[0967] 34.如段落33所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[0968] 35.如段落28至34中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[0969] 36.如段落35所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。

[0970] 37.如段落35和36中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[0971] 38.如段落28所述的方法,其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[0972] 39.如段落38所述的方法,其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[0973] 40.如段落38所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、

FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[0974] 41.如段落40所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[0975] 42.如段落40和41中任一项所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[0976] 43.如段落35和40中任一项所述的方法，其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[0977] 44.如段落43所述的方法，其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[0978] 45.如段落28至34中任一项所述的方法，其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[0979] 46.如段落45所述的方法，其中在SOCS1基因和一种或多种另外的基因处修饰TIL群的成员。

[0980] 47.如段落45所述的方法，其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[0981] 48.如段落47所述的方法，其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[0982] 49.如前述段落中任一项所述的方法，其中第一培养基以选自由以下组成的组的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[0983] 50.如前述段落中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第一培养基:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[0984] 51.如前述段落中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第二培养基:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[0985] 52.如前述段落中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第一培养基的30％至99％:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[0986] 53.如前述段落中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第二培养基的30％至99％:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[0987] 54.如前述段落中任一项所述的方法，其中将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[0988] 55.如前述段落中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[0989] 56.如前述段落中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增500倍至500,000倍。

[0990] 57.如前述段落中任一项所述的方法，其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[0991] 58.如前述段落中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[0992] 59.如段落58所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[0993] 60.如前述段落中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000

倍。

[0994] 61.如段落60所述的方法,其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[0995] 62.如前述段落中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少10%具有中央记忆T细胞表型。

[0996] 63.如前述段落中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少15%具有中央记忆T细胞表型。

[0997] 64.如前述段落中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的5%至50%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[0998] 65.如前述段落中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的10%至25%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[0999] 66.一种组合物,其包含通过如前述段落中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1000] 67.一种扩增TIL群的方法,该方法包括以下步骤:

[1001] 在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群;

[1002] 使用基因调控系统修饰TIL群的成员以获得修饰的TIL群;以及

[1003] 在包含TCR激动剂;饲养细胞;和IL-15的第二培养基中培养修饰的TIL群,从而扩增TIL群。

[1004] 68.如段落67所述的方法,其中T细胞刺激细胞因子选自由以下组成的组:IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。

[1005] 69.如段落67所述的方法,其中第一培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[1006] 70.如段落67至69中任一项所述的方法,其中第一培养基不包含IL-2。

[1007] 71.如段落67至70中任一项所述的方法,其中第一培养基不包含IL-21。

[1008] 72.如段落67至71中任一项所述的方法,其中第二培养基不包含IL-21。

[1009] 73.如段落67至72中任一项所述的方法,其中第二培养基不包含IL-2。

[1010] 74.如段落67至73中任一项所述的方法,其中第二培养基还包含IL-7。

[1011] 75.如段落67至74中任一项所述的方法,其中第一培养基中的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为1U/ml至7,000U/ml。

[1012] 76.如段落74所述的方法,其中第二培养基中的IL-7的最终浓度为1U/ml至7,000U/ml。

[1013] 77.如段落67至76中任一项所述的方法,其中第二培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1014] 78.如段落67至77中任一项所述的方法,其中IL-15的最终浓度大于100ng/ml。

[1015] 79.如段落67至78中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是CD3激动剂。

[1016] 80.如段落67至79中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是抗体。

[1017] 81.如段落80所述的方法,其中抗体是人源化抗体。

[1018] 82.如段落67至81中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是OKT3或UCHT1。

[1019] 83.如段落67至82中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达TCR激动剂。

[1020] 84.如段落67至83中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达T细胞共刺激分子的激

动剂。

[1021] 85.如段落84所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。

[1022] 86.如段落84所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂。

[1023] 87.如段落84所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。

[1024] 88.如段落83至87中任一项所述的方法,其中TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂在饲养细胞的表面上表达。

[1025] 89.如段落67至88中任一项所述的方法,其中4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[1026] 90.如段落67至89中任一项所述的方法,其中饲养细胞是外周血单核细胞或抗原呈递细胞。

[1027] 91.如段落67至90中任一项所述的方法,其中对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[1028] 92.如段落67至91中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^3至4mm^3的肿瘤碎片。

[1029] 93.如段落67至92中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[1030] 94.如段落67至93中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于产生少于100,000个TIL的前REP步骤。

[1031] 95.如段落67至94中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于使存在于解聚的肿瘤样品中的TIL扩增小于5倍的前REP步骤。

[1032] 96.如段落67至95中任一项所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[1033] 97.如段落67至95中任一项所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[1034] 98.如段落67至95中任一项所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1035] 99.如段落67至95中任一项所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1036] 100.如段落99所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1037] 101.如段落100所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[1038] 102.如段落67至101中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1039] 103.如段落102所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。

[1040] 104.如段落102和103中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基

因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1041] 105.如段落67至95中任一项所述的方法,其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[1042] 106.如段落105所述的方法,其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[1043] 107.如段落105所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1044] 108.如段落107所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[1045] 109.如段落107和108中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1046] 110.如段落102和107中任一项所述的方法,其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1047] 111.如段落110所述的方法,其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1048] 112.如段落67至101和105至106中任一项所述的方法,其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[1049] 113.如段落112所述的方法,其中在SOCS1基因和一种或多种另外的基因处修饰TIL群的成员。

[1050] 114.如段落112所述的方法,其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[1051] 115.如段落114所述的方法,其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1052] 116.如段落67至115中任一项所述的方法,其中第一培养基以选自由以下组成的组的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1053] 117.如段落67至116中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第一培养基:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1054] 118.如段落67至117中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第二培养基:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1055] 119.如段落67至118中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第一培养基的30%至99%:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1056] 120.如段落67至119中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换第二培养基的30%至99%:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1057] 121.如段落67至120中任一项所述的方法,其中将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[1058] 122.如段落67至121中任一项所述的方法,其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[1059] 123.如段落67至122中任一项所述的方法,其中将TIL群扩增500倍至500,000倍。

[1060] 124.如段落67至123中任一项所述的方法,其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[1061] 125.如段落67至124中任一项所述的方法,其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[1062] 126.如段落125所述的方法,其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[1063] 127.如段落67至126中任一项所述的方法,其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。

[1064] 128.如段落127所述的方法,其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1065] 129.如段落67至128中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少10%具有中央记忆T细胞表型。

[1066] 130.如段落67至129中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少15%具有中央记忆T细胞表型。

[1067] 131.如段落67至130中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的5%至50%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1068] 132.如段落67至131中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的10%至25%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1069] 133.一种组合物,其包含通过如段落67至132中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1070] 134.一种在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法,该方法包括在包含饲养细胞;TCR激动剂;和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而扩增TIL群。

[1071] 135.如段落134所述的方法,其中培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[1072] 136.如段落134所述的方法,其中培养基不包含IL-21。

[1073] 137.如段落134所述的方法,其中培养基不包含IL-2。

[1074] 138.如段落134至137中任一项所述的方法,其中培养基还包含IL-7。

[1075] 139.如段落138所述的方法,其中培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[1076] 140.如段落134至139中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1077] 141.如段落134至140中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。

[1078] 142.如段落134至141中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是CD3激动剂。

[1079] 143.如段落134至142中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是抗体。

[1080] 144.如段落143所述的方法,其中抗体是人源化抗体。

[1081] 145.如段落143至144中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是OKT3或UCHT1。

[1082] 146.如段落134至142中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达TCR激动剂。

[1083] 147.如段落134至146中任一项所述的方法,其中饲养细胞表达T细胞共刺激分子的激动剂。

[1084] 148.如段落147所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。

[1085] 149.如段落147所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂。

[1086] 150.如段落147所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。

[1087] 151.如段落147至150中任一项所述的方法,其中TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂在饲养细胞的表面上表达。

[1088] 152.如段落134至151中任一项所述的方法,其中4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[1089] 153.如段落134至152中任一项所述的方法,其中饲养细胞是外周血单核细胞或抗原呈递细胞。

[1090] 154.如段落134至153中任一项所述的方法,其中对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[1091] 155.如段落134至154中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^{3}至4mm^{3}的肿瘤碎片。

[1092] 156.如段落134至155中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[1093] 157.如段落134至156中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于产生少于100,000个TIL的前REP步骤。

[1094] 158.如段落134至157中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于使存在于解聚的肿瘤样品中的TIL扩增小于5倍的前REP步骤。

[1095] 159.如段落134至158中任一项所述的方法,其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[1096] 160.如段落159所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[1097] 161.如段落159所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[1098] 162.如段落159所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1099] 163.如段落159所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1100] 164.如段落163所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1101] 165.如段落164所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[1102] 166.如段落159至165中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1103] 167.如段落166所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。

[1104] 168.如段落166和167中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1105] 169.如段落159中任一项所述的方法,其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[1106] 170.如段落169所述的方法,其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[1107] 171.如段落169所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1108] 172.如段落171所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[1109] 173.如段落171和172中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1110] 174.如段落166和171中任一项所述的方法,其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1111] 175.如段落174所述的方法,其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1112] 176.如段落160至165和169至170中任一项所述的方法,其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[1113] 177.如段落176所述的方法,其中在SOCS1基因和一种或多种另外的基因处修饰TIL群的成员。

[1114] 178.如段落176所述的方法,其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[1115] 179.如段落178所述的方法,其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1116] 180.如段落134至179中任一项所述的方法,其中培养基以选自由以下组成的组的时间间隔补充IL-15:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1117] 181.如段落134至180中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换培养基:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1118] 182.如段落134至181中任一项所述的方法,其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换培养基的30%至99%:1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1119] 183.如段落134至182中任一项所述的方法,其中将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[1120] 184.如段落134至183中任一项所述的方法,其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[1121] 185.如段落134至184中任一项所述的方法,其中将TIL群扩增500倍至500,000倍。

[1122] 186.如段落134至184中任一项所述的方法,其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[1123] 187.如段落134至186中任一项所述的方法,其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[1124] 188.如段落187所述的方法,其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[1125] 189.如段落134至188中任一项所述的方法,其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。

[1126] 190.如段落189所述的方法,其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1127] 191.如段落134至190中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少10%具有中央记忆T细胞表型。

[1128] 192.如段落134至191中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少15%具有中央记忆T细胞表型。

[1129] 193.如段落134至192中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的5%至50%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1130] 194.如段落134至193中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的10%至25%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1131] 195.一种组合物,其包含通过如段落134至194中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1132] 196.一种在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法,方法方法包括在包含TCR激动剂;T细胞共刺激分子的激动剂;和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品,从而扩增TIL群。

[1133] 197.如段落196所述的方法,其中培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[1134] 198.如段落196所述的方法,其中培养基不包含IL-21。

[1135] 199.如段落196所述的方法,其中培养基不包含IL-2。

[1136] 200.如段落196至199中任一项所述的方法,其中培养基还包含IL-7。

[1137] 201.如段落200所述的方法,其中培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[1138] 202.如段落196至201中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1139] 203.如段落196至202中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。

[1140] 204.如段落196至203中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是CD3激动剂。

[1141] 205.如段落196至204中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是抗体。

[1142] 206.如段落205所述的方法,其中抗体是人源化抗体。

[1143] 207.如段落205至206中任一项所述的方法,其中TCR激动剂是OKT3或UCHT1。

[1144] 208.如段落205至206中任一项所述的方法,其中TCR激动剂包含有包含两个连接在一起的抗CD3抗体的可溶性单特异性复合物。

[1145] 209.如段落196至208中任一项所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂选自由以下组成的组:CD28激动剂、CD137激动剂、CD2激动剂以及它们的组合。

[1146] 210.如段落196至209中任一项所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。

[1147] 211.如段落209至210中任一项所述的方法,其中CD28激动剂包含有包含两个连接在一起的抗CD28抗体的可溶性单特异性复合物。

[1148] 212.如段落209所述的方法,其中CD2激动剂包含有包含两个连接在一起的抗CD2抗体的可溶性单特异性复合物。

[1149] 213.如段落196至212中任一项所述的方法,其中TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂与包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质连接,其中每种基质的最大尺

寸长度为1nm至500nm。

[1150] 214.如段落213所述的方法,其中TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至相同的聚合物链。

[1151] 215.如段落213所述的方法,其中TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至不同的聚合物链。

[1152] 216.如段落213至215中任一项所述的方法,其中TCR激动剂以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[1153] 217.如段落196至216中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^3至4mm^3的肿瘤碎片。

[1154] 218.如段落196至217中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。

[1155] 219.如段落196至218中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于产生少于100,000个TIL的前REP步骤。

[1156] 220.如段落196至219中任一项所述的方法,其中解聚的肿瘤样品先前暴露于使存在于解聚的肿瘤样品中的TIL扩增小于5倍的前REP步骤。

[1157] 221.如段落196至220中任一项所述的方法,其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[1158] 222.如段落221所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[1159] 223.如段落221所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[1160] 224.如段落221所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1161] 225.如段落221所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1162] 226.如段落225所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1163] 227.如段落226所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[1164] 228.如段落221至227中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1165] 229.如段落228所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。

[1166] 230.如段落228和229中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1167] 231.如段落221所述的方法,其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[1168] 232.如段落231所述的方法,其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[1169] 233.如段落231所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、

EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1170] 234.如段落233所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[1171] 235.如段落233和234中任一项所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1172] 236.如段落228和233中任一项所述的方法，其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1173] 237.如段落236所述的方法，其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1174] 238.如段落222至227和231至232中任一项所述的方法，其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[1175] 239.如段落238所述的方法，其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[1176] 240.如段落239所述的方法，其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1177] 241.如段落196至240中任一项所述的方法，其中培养基以选自由以下组成的组的时间间隔补充IL-15：1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1178] 242.如段落196至241中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换培养基：1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1179] 243.如段落196至242中任一项所述的方法，其中以选自由以下组成的组的时间间隔更换培养基的30％至99％：1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1180] 244.如段落196至243中任一项所述的方法，其中将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[1181] 245.如段落196至244中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[1182] 246.如段落196至245中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增500倍至500,000倍。

[1183] 247.如段落196至245中任一项所述的方法，其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[1184] 248.如段落196至247中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[1185] 249.如段落248所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[1186] 250.如段落196至249中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。

[1187] 251.如段落250所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1188] 252.如段落196至251中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的至少10％具有中央记忆T细胞表型。

[1189] 253.如段落196至252中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，

其中扩增的群的至少15％具有中央记忆T细胞表型。

[1190] 254.如段落196至252中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的5％至50％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1191] 255.如段落196至253中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的10％至25％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1192] 256.如段落196至255中任一项所述的方法，其中培养基不包含饲养细胞。

[1193] 257.如段落196至255中任一项所述的方法，其中培养基还包含饲养细胞。

[1194] 258.如段落257所述的方法，其中4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[1195] 259.如段落257至258中任一项所述的方法，其中饲养细胞是外周血单核细胞或抗原呈递细胞。

[1196] 260.如段落257至259中任一项所述的方法，其中对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[1197] 261.一种组合物，其包含通过如段落196至260中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1198] 262.一种用于扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群的方法，其包括：在包含IL-15和包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质的培养基中培养TIL群，其中基质附接至TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂，其中每种基质的最大尺寸长度为1nm至500nm，并且其中所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[1199] 263.如段落262所述的方法，其中培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[1200] 264.如段落262所述的方法，其中培养基不包含IL-21。

[1201] 265.如段落262所述的方法，其中培养基不包含IL-2。

[1202] 266.如段落262至265中任一项所述的方法，其中培养基还包含IL-7。

[1203] 267.如段落266所述的方法，其中培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[1204] 268.如段落262至267中任一项所述的方法，其中培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1205] 269.如段落262至268中任一项所述的方法，其中培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。

[1206] 270.如段落262至269中任一项所述的方法，其中TCR激动剂是CD3激动剂。

[1207] 271.如段落262至270中任一项所述的方法，其中T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。

[1208] 272.如段落262至271中任一项所述的方法，其中激动剂是重组激动剂。

[1209] 273.如段落262至272中任一项所述的方法，其中激动剂是抗体。

[1210] 274.如段落273所述的方法，其中抗体是人源化抗体。

[1211] 275.如段落270所述的方法，其中CD3激动剂是OKT3或UCHT1。

[1212] 276.如段落262至275中任一项所述的方法，其中TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至相同的聚合物链。

[1213] 277.如段落262至275中任一项所述的方法，其中TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至不同的聚合物链。

[1214] 278.如段落262至277中任一项所述的方法,其中TCR激动剂以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[1215] 279.如段落213以及262至278中任一项所述的方法,其中T细胞共刺激分子的激动剂以25μg/mg纳米基质附接至纳米基质。

[1216] 280.如段落213以及262至279中任一项所述的方法,其中纳米基质还包含嵌入在聚合物链的基质之中或之内的磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体。

[1217] 281.如段落213以及262至280中任一项所述的方法,其中聚合物链的基质包含右旋糖酐的聚合物。

[1218] 282.如段落213以及262至281中任一项所述的方法,其中聚合物链是胶体聚合物链。

[1219] 283.如段落213以及262至282中任一项所述的方法,其中与纳米基质一起培养的TIL群还包含肿瘤细胞。

[1220] 284.如段落213以及262至283中任一项所述的方法,其中纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:5。

[1221] 285.如段落213以及262至284中任一项所述的方法,其中基质与TIL的数量比大于或等于1:500。

[1222] 286.如段落262至285中任一项所述的方法,其中待扩增的TIL来自先前已提交用于扩增的TIL样品的受试者,其中先前的TIL扩增包括前REP步骤并且其中从前REP步骤分离的TIL的数量小于100,000个TIL。

[1223] 287.如段落262至286中任一项所述的方法,其中待扩增的TIL来自先前已提交用于扩增的TIL样品的受试者,其中先前的TIL扩增包括前REP步骤并且其中从前REP步骤分离的TIL的倍数扩增小于5倍。

[1224] 288.如段落262至287中任一项所述的方法,其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[1225] 289.如段落288所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[1226] 290.如段落288所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[1227] 291.如段落288所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1228] 292.如段落288所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1229] 293.如段落292所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1230] 294.如段落293所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[1231] 295.如段落288至294中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1232] 296.如段落295所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的

插入、缺失或突变。

[1233] 297.如段落295和296中任一项所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1234] 298.如段落288所述的方法，其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[1235] 299.如段落298所述的方法，其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[1236] 300.如段落298所述的方法，其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1237] 301.如段落300所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[1238] 302.如段落300和301中任一项所述的方法，其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1239] 303.如段落295和300中任一项所述的方法，其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1240] 304.如段落303所述的方法，其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1241] 305.如段落289至294和298至299中任一项所述的方法，其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[1242] 306.如段落305所述的方法，其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[1243] 307.如段落306所述的方法，其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1244] 308.如段落262至307中任一项所述的方法，其中使TIL以选自由以下组成的组的时间间隔与IL-15接触：1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1245] 309.如段落262至308中任一项所述的方法，其中将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[1246] 310.如段落262至309中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[1247] 311.如段落262至309中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增500倍至500,000倍。

[1248] 312.如段落262至309中任一项所述的方法，其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[1249] 313.如段落262至312中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[1250] 314.如段落313所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[1251] 315.如段落262至314中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。

[1252] 316.如段落315所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1253] 317.如段落262至316中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少10%具有中央记忆T细胞表型。

[1254] 318.如段落262至317中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的至少15%具有中央记忆T细胞表型。

[1255] 319.如段落262至317中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的5%至50%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1256] 320.如段落262至319中任一项所述的方法,其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群,其中扩增的群的10%至25%在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1257] 321.如段落262至320中任一项所述的方法,其中TIL群还包含肿瘤细胞。

[1258] 322.一种组合物,其包含通过如段落262至321中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1259] 323.一种用于扩增TIL群的方法,其包括:在包含IL-15;和包含抗CD3抗体或其片段的第一可溶性单特异性复合物、包含抗CD28抗体或其片段的第二可溶性单特异性复合物和包含抗CD2抗体或其片段的第三可溶性单特异性复合物的培养基中培养TIL群,其中每种可溶性单特异性复合物包含连接在一起的两种抗体或其片段,并且每种可溶性单特异性复合物的每种抗体或其片段与TIL群上的相同抗原特异性结合。

[1260] 324.如段落323所述的方法,其中培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。

[1261] 325.如段落323所述的方法,其中培养基不包含IL-21。

[1262] 326.如段落323所述的方法,其中培养基不包含IL-2。

[1263] 327.如段落323至326中任一项所述的方法,其中培养基还包含IL-7。

[1264] 328.如段落327所述的方法,其中培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[1265] 329.如段落323至328中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1266] 330.如段落323至329中任一项所述的方法,其中培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。

[1267] 331.如段落323至330中任一项所述的方法,其中可溶性单特异性复合物是四聚体抗体复合物(TAC)。

[1268] 332.如段落331所述的方法,其中每种TAC包含来自第一动物物种的两种抗体,所述两种抗体被来自第二物种的两种抗体分子结合,所述两种抗体分子与来自第一动物物种的抗体的Fc部分特异性结合。

[1269] 333.如段落323至332中任一项所述的方法,其中抗CD3抗体是OKT3或UCHT1。

[1270] 334.如段落323至333中任一项所述的方法,其中与组合物接触的TIL群还包含肿瘤细胞。

[1271] 335.如段落323至334中任一项所述的方法,其中该方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[1272] 336.如段落323至335中任一项所述的方法,其中可溶性单特异性复合物的浓度为0.2μL/ml-25μL/ml。

[1273] 337.如段落323至336中任一项所述的方法,其中待扩增的TIL群来自先前已提交

用于扩增的TIL样品的受试者,其中先前的TIL扩增包括前REP步骤并且其中从前REP步骤分离的TIL的数量小于100,000个TIL。

[1274] 338.如段落323至336中任一项所述的方法,其中待扩增的TIL来自先前已提交用于扩增的TIL样品的受试者,其中先前的TIL扩增包括前REP步骤并且其中从前REP步骤分离的TIL的倍数扩增小于5倍。

[1275] 339.如段落323至338中任一项所述的方法,其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[1276] 340.如段落339所述的方法,其中使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。

[1277] 341.如段落339所述的方法,其中使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。

[1278] 342.如段落339所述的方法,其中使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1279] 343.如段落340所述的方法,其中使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。

[1280] 344.如段落339所述的方法,其中使用Cas酶和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1281] 345.如段落344所述的方法,其中Cas酶是Cas9。

[1282] 346.如段落339至345中任一项所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1283] 347.如段落346所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。

[1284] 348.如段落346和347中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1285] 349.如段落349所述的方法,其中对TIL群的成员进行表观遗传修饰。

[1286] 350.如段落349所述的方法,其中表观遗传修饰是组蛋白修饰。

[1287] 351.如段落349所述的方法,其中在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员:ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。

[1288] 352.如段落351所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。

[1289] 353.如段落351和352中任一项所述的方法,其中一种或多种基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1290] 354.如段落346和351中任一项所述的方法,其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1291] 355.如段落354所述的方法，其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1292] 356.如段落340至345和349至350中任一项所述的方法，其中在多于一种基因处修饰TIL群的成员。

[1293] 357.如段落356所述的方法，其中在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。

[1294] 358.如段落357所述的方法，其中SOCS1和PTPN2基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1295] 359.如段落323至358中任一项所述的方法，其中使TIL以选自由以下组成的组的时间间隔与IL-15接触：1天、2天、3天、4天、5天和6天。

[1296] 360.如段落323至359中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。

[1297] 361.如段落323至360中任一项所述的方法，其中将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。

[1298] 362.如段落323至361中任一项所述的方法，其中将TIL扩增500倍至500,000倍。

[1299] 363.如段落323至361中任一项所述的方法，其中将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。

[1300] 364.如段落323至363中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。

[1301] 365.如段落364所述的方法，其中TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。

[1302] 366.如段落323至365中任一项所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。

[1303] 367.如段落366所述的方法，其中TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1304] 368.如段落323至367中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的至少10％具有中央记忆T细胞表型。

[1305] 369.如段落323至368中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的至少15％具有中央记忆T细胞表型。

[1306] 370.如段落323至367中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的5％至50％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1307] 371.如段落323至370中任一项所述的方法，其中扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的10％至25％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1308] 372.如段落323至371中任一项所述的方法，将TIL群从受试者分离并且使其与培养基接触，而不需要在使TIL群与培养基接触之前进行另外的TIL群扩增过程。

[1309] 373.一种组合物，其包含通过如段落323至372中任一项所述的方法产生的扩增的TIL群。

[1310] 374.一种在一步或两步培养中、在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法，该方法包括在包含T细胞刺激细胞因子；饲养细胞；和TCR激动剂的培养基中培养解聚的肿瘤样品，其中T细胞刺激细胞因子由大于100ng/ml的IL-15组成，从而扩增TIL群。

[1311] 375.如段落374所述的方法，其中通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。

[1312] 376.如段落375所述的方法，其中在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。

[1313] 377.如段落35、40、102、107、166、171、228、233、295、300、346和351中任一项所述的方法，其中一种或多种基因选自由SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA组成的组。

[1314] 378.如段落377所述的方法，其中一种或多种基因选自由SOCS1和PTPN2组成的组。

[1315] 379.如段落377所述的方法，其中一种或多种基因选自由SOCS1和ZC3H12A组成的组。

[1316] 380.如段落43、46、110、113、174、177、236、303和354中任一项所述的方法，其中对一种或多种另外的基因进行修饰，并且其中一种或多种另外的基因选自由ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1和NFKBIA组成的组。

[1317] 381.如前述段落中任一项所述的方法，其中降低了培养的TIL群的耗竭且/或增加了培养的TIL群的细胞毒性。

[1318] 382.如段落381所述的方法，其中在SOCS1基因处修饰TIL群。

[1319] 383.如段落382所述的方法，其中SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1320] 384.如段落381至383中任一项所述的方法，其中相对于在SOCS1基因处被修饰并且在不含IL-15的培养基中培养的TIL，TIL群包含选自以下的一种或多种耗竭相关基因的表达的降低：PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。

[1321] 385.如段落381至383中任一项所述的方法，其中相对于在SOCS1基因处未被修饰并且在含有IL-15的培养基中培养的TIL，选自以下的一种或多种细胞毒性相关基因的表达水平增加：ITGB2、CSF2、TNF、FASLG、TNFRSF10B、LCK、IFNG、IFNB1、BID、GZMB、PRF1、KLRK1、ZAP70、FYN、GZMA、VAV3、GZMH、GZMM、KIR3DL1、IFNGR2、VAV1、SOS2、PTPN6、PTK2B、SH3BP2、LAT、KLRC2、IFNA1、CASP3、ICAM1、SH2D1A、ARAF、NFATC1、IFNAR1、NCR1、NCR3、IFNGR1、NCR2、TYROBP、FCGR3B、KLRD1、FAS、CD244、RAC2和CD247。

[1322] 386.如段落381至385中任一项所述的方法，其中耗竭评分降低。

[1323] 387.如段落381至386中任一项所述的方法，其中细胞毒性评分增加。

[1324] 388.如段落381至387中任一项所述的方法，其中耗竭评分降低，并且细胞毒性评分增加。

[1325] 在一个方面，本公开提供了扩增TIL群的方法，其包括以下步骤：在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群；以及在包含T细胞受体(TCR)激动剂；饲养细胞；和大于100ng/ml的IL-15的第二培养基中培养TIL群，其中第二培养基不包含IL-2，从而扩增TIL群。

[1326] 在另一个方面，本公开提供了扩增TIL群的方法，其包括以下步骤：在包含T细胞刺激细胞因子的第一培养基中培养解聚的肿瘤样品以获得TIL群；使用基因调控系统修饰TIL群的成员以获得修饰的TIL群；以及在包含TCR激动剂；饲养细胞；和IL-15的第二培养基中培养修饰的TIL群，从而扩增TIL群。

[1327] 在另一个方面，本公开提供了在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法，其包括在包含饲养细胞；TCR激动剂；和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品，从而扩增TIL群。

[1328] 在另一个方面，本公开提供了在一步或两步培养中、在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法，其包括在包含T细胞刺激细胞因子；饲养细胞；和TCR激动剂的培养基中培养解聚的肿瘤样品，其中T细胞刺激细胞因子由大于100ng/ml的IL-15组成，从而扩增TIL群。

[1329] 在另一个方面，本公开提供了在解聚的肿瘤样品中扩增TIL群的方法，其包括在包含TCR激动剂；T细胞共刺激分子的激动剂；和IL-15的培养基中培养解聚的肿瘤样品，从而扩增TIL群。

[1330] 在另一个方面，本公开提供了用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含IL-15和包含聚合物链的基质的胶体悬浮液的纳米基质的培养基中培养TIL群，其中基质附接至TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂，其中每种基质的最大尺寸长度为约1nm至约500nm，并且其中所述方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[1331] 在另一个方面，本公开提供了用于扩增TIL群的方法，其包括：在包含IL-15；和包含抗CD3抗体或其片段的第一可溶性单特异性复合物、包含抗CD28抗体或其片段的第二可溶性单特异性复合物和包含抗CD2抗体或其片段的第三可溶性单特异性复合物的培养基中培养TIL群，其中每种可溶性单特异性复合物包含连接在一起的两种抗体或其片段，并且每种可溶性单特异性复合物的每种抗体或其片段与TIL群上的相同抗原特异性结合。

[1332] 在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度为约10ng/ml至约10,000ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度为约10ng/ml至约50ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度为约10ng/ml至约75ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度小于10,000ng/ml，任选地小于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于150ng/ml。在一些实施方案中，培养基中的IL-15的最终浓度大于200ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于150ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于200ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度大于100ng/ml并且小于1000ng/ml，任选地小于900ng/ml、800ng/ml、700ng/ml、600ng/ml、500ng/ml、400ng/ml、300ng/ml或200ng/ml并且任选地大于150ng/ml或200ng/ml。在另外的实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度小于或等于10,000ng/ml，任选地小于或等于9000ng/ml、8000ng/ml、7000ng/ml、6000ng/ml、5000ng/ml、4000ng/ml、3000ng/ml、2000ng/ml或1000ng/ml。在一些实施方案中，第二培养基中的IL-15的最终浓度为10ng/ml至10,000ng/ml。

[1333] 在一些实施方案中，T细胞刺激细胞因子选自由以下组成的组：IL-2、IL-7、IL-15、IL-21以及它们的组合。在一些实施方案中，第一培养基的T细胞刺激细胞因子的最终浓度为约10U/ml至约7,000U/ml。

[1334] 在一些实施方案中，培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中，培养基不包含IL-2。在一些实施方案中，培养基不包含IL-21。在一些实施方案中，第一培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中，第二培养基不包含IL-2、IL-21、或IL-2和IL-21两者。在一些实施方案中，第一培养基不包含IL-2。在一些实施方案中，第二培养基不包含IL-2。在一些实施方案中，第一培养基不包含IL-21。在一些实

施方案中,第二培养基不包含IL-21。

[1335] 在一些实施方案中,培养基还包含IL-7。在一个实施方案中,培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。在一些实施方案中,第二培养基还包含IL-7。在某些实施方案中,第二培养基中的IL-7的最终浓度为10U/ml至7,000U/ml。

[1336] 在一些实施方案中,第一培养基以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔补充T细胞刺激细胞因子。在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第一培养基。在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第一培养基的30%至99%。

[1337] 在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第二培养基。在一些实施方案中,以选自由1天、2天、3天、4天、5天和6天组成的组的时间间隔更换第二培养基的30%至99%。

[1338] 在一些实施方案中,TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至相同的聚合物链。在一些实施方案中,TCR激动剂和T细胞共刺激分子的激动剂附接至不同的聚合物链。在一些实施方案中,TCR激动剂以约25μg/mg基质附接至基质。在一些实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂以约25μg/mg基质附接至基质。

[1339] 在一些实施方案中,纳米基质还包含嵌入在聚合物链的基质之中或之内的磁性、顺磁性或超顺磁性纳米晶体。在一些实施方案中,聚合物链的基质包含右旋糖酐的聚合物。在某些实施方案中,聚合物链是胶体聚合物链。

[1340] 在一些实施方案中,TIL群还包含肿瘤细胞。在一些实施方案中,与纳米基质一起培养的TIL群还包含肿瘤细胞。在一些实施方案中,纳米基质的体积与TIL的体积之比大于或等于1:5。在一些实施方案中,基质与TIL的数量比大于或等于1:500。

[1341] 在一些实施方案中,可溶性单特异性复合物是四聚体抗体复合物(TAC)。在一些实施方案中,每种TAC包含来自第一动物物种的两种抗体,所述两种抗体被来自第二物种的两种抗体分子结合,所述两种抗体分子与来自第一动物物种的抗体的Fc部分特异性结合。

[1342] 在一些实施方案中,激动剂是重组激动剂。在一些实施方案中,TCR激动剂是CD3激动剂。在一些实施方案中,TCR激动剂是抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,TCR激动剂是抗体,诸如像OKT3或UCHT1。

[1343] 在一些实施方案中,饲养细胞是外周血单核细胞。在一些实施方案中,饲养细胞是抗原呈递细胞。

[1344] 在一些实施方案中,饲养细胞表达TCR激动剂。在一些实施方案中,饲养细胞表达T细胞共刺激分子的激动剂。在具体的实施方案中,TCR激动剂和/或T细胞共刺激分子的激动剂在饲养细胞的表面上表达。在一个实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD28激动剂。在一个实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD137激动剂。在一个实施方案中,T细胞共刺激分子的激动剂是CD2激动剂。

[1345] 在一些实施方案中,4-1BB配体在饲养细胞的表面上表达。

[1346] 在一些实施方案中,对饲养细胞进行遗传修饰以表达IL-15、IL-7、或IL-15和IL-7两者。

[1347] 在一些实施方案中,本文所述的方法不包括在扩增TIL群期间使用饲养细胞。

[1348] 在一些实施方案中,可溶性单特异性复合物的浓度为约0.2μL/m至约25μL/ml。

[1349] 在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含消化的肿瘤碎片。在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品包含大小为0.5mm^{3}至4mm^{3}的肿瘤碎片。

[1350] 在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品先前暴露于产生少于100,000个TIL的前REP步骤。在一些实施方案中，解聚的肿瘤样品先前暴露于使存在于解聚的肿瘤样品中的TIL扩增小于5倍的前REP步骤。

[1351] 在一些实施方案中，通过基因调控系统来修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，使用RNA干扰来修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，使用类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)来修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，使用锌指核酸酶来修饰TIL群的成员。在一个实施方案中，使用RNA指导的核酸酶来修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，使用Cas酶(诸如像Cas9)和至少一种指导RNA来修饰TIL群的成员。

[1352] 在一些实施方案中，在选自由以下组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。在一些实施方案中，在选自由SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA组成的组的一种或多种基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，一种或多种基因处的修饰是一种或多种核酸的插入、缺失或突变。在一些实施方案中，单个基因处的修饰是表观遗传修饰，诸如像组蛋白修饰。在一些实施方案中，单个基因处的修饰是一种或多种核酸的甲基化。在一个实施方案中，单个基因处的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1353] 在一些实施方案中，在SOCS1基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，SOCS1基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1354] 在一些实施方案中，在SOCS1基因和ZC3H12A基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，SOCS1基因和ZC3H12A基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1355] 在一些实施方案中，在多于一种基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，两种或更多种基因选自由以下组成的组：ANKRD11、BCL2L11、BCL3、BCOR、CALM2、CBLB、CHIC2、CTLA4、DHODH、E2F8、EGR2、FLI1、FOXP3、GATA3、GNAS、HAVCR2、IKZF1、IKZF2、IKZF3、LAG3、MAP4K、NFKBIA、NR4A3、NRP1、PBRM1、PCBP1、PDCD1、PELI1、PIK3CD、PPP2R2D、PTPN1、PTPN2、PTPN22、PTPN6、RBM39、RC3H1、SEMA7A、SERPINA3、SETD5、SH2B3、SH2D1A、SMAD2、SOCS1、TANK、TGFBR1、TGFBR2、TIGIT、TNFAIP3、TNIP1、TRAF6、UMPS、WDR6和ZC3H12A。在一些实施方案中，在选自由SOCS1、PTPN2、ZC3H12A、CBLB、RC3H1和NFKBIA组成的组的两种或更多种基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，在SOCS1基因和一种或多种另外的基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，在SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA处修饰TIL群的成员。在具体的实施方案中，在SOCS1和PTPN2基因处修饰TIL群的成员。在具体的实施方案中，在SOCS1和ZC3H12A基因处修饰TIL群的成员。在一些实施方案中，SOCS1和ZC3H12A、PTPN2、CBLB、RC3H1或NFKBIA基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编

码的蛋白质的功能的降低或抑制。

[1356] 在一些实施方案中，将TIL扩增至多9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天或25天。在一些实施方案中，将TIL群扩增9天至25天、9天至21天、或9天至14天。在一些实施方案中，将TIL群扩增500倍至500,000倍。在一些实施方案中，将TIL群从100个TIL至100,000个TIL的初始群扩增。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至少1,500倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第14天扩增至多100,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第21天扩增至少15,000倍。在一些实施方案中，TIL群在扩增的第21天扩增至多500,000倍。

[1357] 在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的至少10％具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的至少15％具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的5％至50％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。在一些实施方案中，扩增TIL群以产生扩增的TIL群，其中扩增的群的10％至25％在扩增的第14天具有中央记忆T细胞表型。

[1358] 在一些实施方案中，将TIL群从受试者分离并且使其与第一培养基接触，而不需要在使TIL群与第一培养基接触之前进行另外的TIL群扩增过程。在一些实施方案中，将TIL群从受试者分离并且使其与培养基接触，而不需要在使TIL群与培养基接触之前进行另外的TIL群扩增过程。

[1359] 在一些实施方案中，降低了培养的TIL群的耗竭且/或增加了培养的TIL群的细胞毒性。在一些实施方案中，在SOCS1基因处修饰TIL群。在一些实施方案中，在SOCS1基因和ZC3H12A基因处修饰TIL群。在一些实施方案中，SOCS1和/或ZC3H12A基因的修饰导致基因的表达的降低或抑制和/或由所述基因编码的蛋白质的功能的降低或抑制。在一些实施方案中，相对于在SOCS1基因处被修饰并且在不含IL-15的培养基中培养的TIL，TIL群包含选自以下的一种或多种耗竭相关基因的表达的降低：PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。在一些实施方案中，相对于在SOCS1基因处未被修饰并且在含有IL-15的培养基中培养的TIL，选自以下的一种或多种细胞毒性相关基因的表达水平增加：ITGB2、CSF2、TNF、FASLG、TNFRSF10B、LCK、IFNG、IFNB1、BID、GZMB、PRF1、KLRK1、ZAP70、FYN、GZMA、VAV3、GZMH、GZMM、KIR3DL1、IFNGR2、VAV1、SOS2、PTPN6、PTK2B、SH3BP2、LAT、KLRC2、IFNA1、CASP3、ICAM1、SH2D1A、ARAF、NFATC1、IFNAR1、NCR1、NCR3、IFNGR1、NCR2、TYROBP、FCGR3B、KLRD1、FAS、CD244、RAC2和CD247。在一些实施方案中，耗竭评分降低。在一些实施方案中，细胞毒性评分增加。在一些实施方案中，耗竭评分降低，并且细胞毒性评分增加。

[1360] 在另一个方面，本公开提供了组合物，其包含通过本文公开的任何方法产生的扩增的TIL群。

[1361] 实施例

[1362] 提出以下实施例以便向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明中出现的方法和组合物的完整公开内容和描述，并且不旨在限制发明人视作其发明的内容的范围。

[1363] 实施例1:用于扩增TIL的两步法

[1364] 使用两步法扩增来自至少5名独立受试者的TIL。在第一步骤中,通过在6000U/ml重组人IL-2的存在下孵育细胞至多5周,由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增TIL。扩增的TIL称为前REP TIL。在此实施例中,随后在OR1A1基因座处用CRISPR/Cas9编辑前REP TIL,该OR1A1是一种不在T细胞中表达的基因。

[1365] 在第二步骤中,前REP TIL在REP中如下扩增。在REP的第0天,取100,000个活的前REP TIL并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,所述TIL培养基含有20M先前照射(6,000拉德)的汇集的PBMC饲养细胞(以1:1:1:1:1的比率来自五个健康供体),并且还补充有180ng OKT3(Biolegend目录号317326)。随后,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。向"IL7/15过程B"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1366] 在REP的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程B"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1367] 在REP的第5天,通过从孔中去除3ml培养基并且用3ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程B"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1368] 在REP的第7天,将细胞转移到6孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80660M)。向每个孔中添加90ml REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程B"孔中添加重组人

IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1369] 在REP的第9天,通过去除50ml培养基并且用50ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程B"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1370] 在REP的第12天,从孔中去除70ml培养基。将细胞重悬在剩余的30ml培养基中并且以1:3的比率分开,使得可以通过将10ml细胞悬浮液转移到新孔中来从单个孔接种6孔Grex板的3个独立孔。向每个孔中添加90ml新鲜的REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,向"常规过程"孔中添加重组人IL-2(CellGenix,目录号1020-1000),最终浓度为6000U/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL15过程"孔中添加重组人IL-15(Peprotech目录号200-15),最终浓度为1000ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程A"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和300ng/ml。假设消耗了先前添加的细胞因子,向"IL7/15过程B"孔中添加重组人IL-7(Peprotech,目录号200-07)和重组人IL-15(Peprotech,目录号200-15),最终浓度分别为10ng/ml和1000ng/ml。

[1371] 在REP的第14天,收获细胞并进行计数。细胞倍数扩增和活力在图1A-1B中表示。在与含有IL2的培养基中的REP比较时,含有IL-7和IL-15的培养基中的细胞的REP支持细胞扩增并且增加活力。

[1372] 实施例2:实施例1中生成的TIL的表型表征

[1373] 通过流式细胞术评估TIL扩增过程后TIL的细胞组成(图2A-2B)。如实施例1培养细胞,并且在REP开始后第14天使用抗体对细胞的等分试样进行染色,以检测表达CD45、CD3e、CD8、CCR7和CD45RO的细胞。与含有IL2的培养基中的REP相比,含有IL-15或IL7/IL15的培养基中的细胞的REP未显著影响CD8+的TIL的比例(图2A)。然而,与使用含有IL2的培养基进行的REP相比,当在含有IL15或IL7/15的培养基中进行REP时,观察到被命名为"中央记忆T细胞"(定义为CD45+CCR7+CD45RO+)的TIL的比例显著增加(图2B)。

[1374] 实施例3:使用IL7/IL15过程产生的TIL的多功能性

[1375] 细胞因子驱动的T细胞扩增可以导致终末分化,终末分化与T细胞功能性丧失有关,功能性丧失使得它们不再具有保护作用。特别地,已经观察到最有效、强力的抗肿瘤T细胞保持产生IFNγ、TNFα、IL-2以及响应刺激而脱粒的能力。为了确定在含有IL7/IL15 REP的方法中生成的TIL的多功能性,将实施例1中产生的TIL用PMA/离子霉素细胞刺激混合物(Invitrogen目录号LS00497003)刺激4小时。在刺激期间,将荧光抗CD107a抗体与细胞一起孵育,以鉴定响应刺激而积极脱粒的细胞。随后,固定细胞并在细胞内染色以产生IFNγ、IL-2和TNFα。值得注意的是,使用IL7/IL15过程生成的CD8+TIL表现出保持脱粒的能力(图

3A)并具有高度的多功能性。许多CD107a+细胞是IFNγ+IL-2+(图3B)、CD107a+TNFα+IL-2+(图3C)和CD107a+IFNγ+TNFα+(图3D)。用最高剂量的IL-15生成的细胞倾向于增加的多功能性。类似地,使用IL7/IL15 REP过程生成的TIL群内的CD4 T细胞还保持了与IL2 REP过程中生成的CD4 T细胞相当的多功能细胞因子分泌谱。

[1376] 实施例4:使用CRISPR-Cas9对TIL进行遗传工程改造并随后扩增TIL的方法

[1377] 使用CRISPR-Cas9对使用实施例1中所述的方案扩增的TIL进行遗传工程改造,以产生靶基因的功能性基因敲除。在前REP扩增之后,但在将细胞接种到REP中之前执行这种遗传工程改造。简而言之,将前REP TIL以300xg离心5分钟,并且在MaxCyte电穿孔缓冲液(HyClone目录号EPB1)中重悬至30M个细胞/毫升。随后,制备含有52pmol Cas9蛋白(Aldevron,目录号9212)和240pmol靶向OR1A1、SOCS1或PTPN2基因座的sgRNA的核糖核蛋白(RNP)主混合物,或制备120pmol SOCS1和120pmol PTPN2的组合。RNP主混合物如下制备:通过将冻干的sgRNA重悬在无核酸酶双链体缓冲液(IDT目录号1072570)中来制备100μM的sgRNA溶液。对于OR1A1或SOCS1,如表38中所示添加试剂:

[1378] 表38.用于OR1A1或SOCS1靶向的RNP主混合物。

[1379]

	体积(μL)
OR1A1 (指导序列 GCTGACCAGTAACTCCCAGG (SEQ ID NO:912)或 SOCS1 (指导序列 ACGCCTGCGGATTCTACTGG (SEQ ID NO: 70) sgRNA (100 μM)	**9.6**
Cas9 (61 μM)	**3.4**
DPBS (1X)	**7**

[1380]

[1381] 对于SOCS1和PTPN2的组合,如表39中所示添加试剂:

[1382] 表39.用于SOCS1和PTPN2靶向的RNP主混合物。

[1383]

	体积(μL)
SOCS1 (指导序列 ACGCCTGCGGATTCTACTGG (SEQ ID NO:70)) **sgRNA (100 μM)**	4.8
PTPN2 (指导序列 GGAAACTTGGCCACTCTATG (SEQ ID NO:206) **sgRNA (100 μM)**	4.8
Cas9 (61 μM)	3.4
DPBS (1X)	7

[1384] 向80μL的细胞悬浮液中添加全部20μL的RNP主混合物(以30M个细胞/毫升)。然后将完整的100μL反应物转移到OC100 X 2加工装配体(MaxCyte,目录号SOC-1X2)中。使用“Optimization#9”程序在MaxCyte ExPERT电穿孔仪上对细胞进行电穿孔。随后,向孔中添加100μL REP培养基,并且将细胞转移到含有100μL REP培养基的96孔板中,然后将所述96孔板在37℃下孵育20分钟。随后,对细胞进行计数,并且然后将100K活细胞接种到含有6ml TIL培养基的24孔Grex板中,所述TIL培养基补充有6,000U/ml IL-2(常规过程)、1000ng/ml IL15(IL15过程)、10ng/ml IL7和300ng/ml IL15(IL7/15过程A)、或10ng/ml IL-7和1000ng/ml IL15(IL7/IL15过程B)。然后如实施例1通过REP培养细胞。

[1385] 使用下一代扩增子测序在REP后评估所述过程编辑TIL的程度。平均而言,在至少5名受试者和多次重复中,OR1A1基因座处的编辑效率(单次编辑时)的范围为53%-87%,

SOCS1基因座处的编辑效率(单次编辑时)的范围为75%-93%,SOCS1基因座处的编辑效率的编辑效率(双重编辑时)的范围为91%-93%,并且PTPN2基因座处的编辑效率(双重编辑时)的范围为92%-94%。REP中的细胞因子条件不显著影响编辑效率。

[1386] REP期间存在的细胞因子确实影响了细胞中的一些的TIL产量。平均而言,含有IL15、或IL7和IL15的培养基中的OR1A1编辑的T细胞的REP至少产生与IL2中的那些相同细胞的REP一样多的TIL(图4A)。当针对SOCS1编辑TIL并随后扩增时,与在IL-2中扩增的细胞相比,含有IL15或含有IL7和IL15的培养基中的REP导致细胞产量增加大约1.5倍(图4B)。当针对SOCS1和PTPN2双重编辑细胞并随后扩增时,与常规过程相比,IL15过程导致细胞产量增加约1.5倍,IL7/15过程A导致细胞产量增加约2倍,并且IL7/15过程B导致细胞产量增加约3倍(图4C)。

[1387] 实施例5:用于使用人工抗原呈递细胞扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的两步法

[1388] 使用两步法扩增TIL。在第一步骤中,通过在6000U/ml重组人IL-2的存在下或在10ng/ml IL-7和1000ng/ml IL-15的存在下孵育细胞至多5周,由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增TIL。这些被称为前REP TIL。

[1389] 在第二步骤中,前REP TIL在改良的REP中如下扩增。在REP的第0天,取100,000个活的前REP TIL并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,所述TIL培养基含有100,000个至20M个先前照射(15,000拉德)的人工抗原呈递细胞。人工抗原呈递细胞是肿瘤细胞,诸如K562细胞,其先前已被修饰以另外表达OS8(膜结合OKT3),并且另外表达CD80、CD86、41BBL和/或IL-15受体α。培养基还补充有1ng/ml-50ng/ml IL-7和/或500ng/ml-2000ng/ml IL-15。培养基还可以补充有约10ng/ml IL-7和/或约1000ng/ml IL-15。

[1390] 在改良的REP的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1391] 在REP的第5天,通过从孔中去除3ml培养基并且用3ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1392] 在REP的第7天,将细胞转移到6孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80660M)。向每个孔中添加90ml REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1393] 在REP的第9天,通过去除50ml培养基并且用50ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1394] 在REP的第12天,从孔中去除70ml培养基。将细胞重悬在剩余的30ml培养基中并且以1:3的比率分开,使得可以通过将10ml细胞悬浮液转移到新孔中,从单个孔接种6孔Grex板的3个独立孔。向每个孔中添加90ml新鲜的REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1395] 在REP的第14天,收获细胞并进行计数。

[1396] 实施例6:在一步、无PBMC饲养细胞方法中使用IL7/IL15扩增TIL(K562)

[1397] 直接由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增TIL。在培养的第0天,取单

细胞悬浮液并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,并且补充1ng/ml-50ng/ml重组IL-7和500ng/ml-2000ng/ml IL-15。培养基还可以补充有约10ng/ml IL-7和/或约1000ng/ml IL-15。进一步添加到孔中的是人工抗原呈递细胞(aAPC),诸如K562细胞,其已被修饰以表达OS8(膜结合OKT3)、CD80、CD86和/或41BBL。接种细胞,使得存在1个T细胞:1个aAPC至1个T细胞:200个aAPC的比率。

[1398] 在扩增的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1399] 在扩增的第5天,通过从孔中去除3ml培养基并且用3ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1400] 在扩增的第7天,将细胞转移到6孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80660M)。向每个孔中添加90ml REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1401] 在扩增的第9天,通过去除50ml培养基并且用50ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1402] 在扩增的第12天,从孔中去除70ml培养基。将细胞重悬在剩余的30ml培养基中并且以1:3的比率分开,使得可以通过将10ml细胞悬浮液转移到新孔中,从单个孔接种6孔Grex板的3个独立孔。向每个孔中添加90ml新鲜的REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1403] 在扩增的第14天,可在一些情况下收获细胞。在其他情况下,可通过在10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15的存在下再继续培养至多2周来进一步扩增细胞。

[1404] 实施例7:在一步、无PBMC饲养细胞方法中使用IL2扩增TIL(K562)

[1405] 直接由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增TIL。在培养的第0天,取单细胞悬浮液并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,并且补充6000U/ml重组人IL-2。进一步添加到孔中的是人工抗原呈递细胞(aAPC),诸如K562细胞,其已被修饰以表达OS8(膜结合OKT3)、CD80、CD86和/或41BBL。接种细胞,使得存在1个T细胞:1个aAPC至1个T细胞:25个aAPC的比率。

[1406] 在扩增的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加6000U/ml重组人IL-2。

[1407] 在扩增的第5天,通过从孔中去除3ml培养基并且用3ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加6000U/ml重组人IL-2。

[1408] 在扩增的第7天,将细胞转移到6孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80660M)。向每个孔中添加90ml REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加6000U/ml重组人IL-2。

[1409] 在扩增的第9天,通过去除50ml培养基并且用50ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加6000U/ml重组人IL-2。

[1410] 在扩增的第12天,从孔中去除70ml培养基。将细胞重悬在剩余的30ml培养基中并且以1:3的比率分开,使得可以通过将10ml细胞悬浮液转移到新孔中,从单个孔接种6孔Grex板的3个独立孔。向每个孔中添加90ml新鲜的REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加6000U/ml重组人IL-2。

[1411] 在扩增的第14天,可在一些情况下收获细胞。在其他情况下,可通过在6000U/ml重组人IL-2的存在下再继续培养至多2周来进一步扩增细胞。

[1412] 实施例8:外周血衍生的记忆T细胞在无PBMC饲养细胞方法中的稳健快速扩增

[1413] 使用人工抗原呈递细胞扩增外周血衍生的人记忆T细胞。简而言之,使用磁性选择试剂盒(Stemcell technologies,目录号19157和19159)从3个独立供体中分离出记忆CD4和CD8 T细胞(从相同数量的PBMC中),并组合(通过供体)形成泛CD4和CD8记忆T细胞的池。在含有6000U/ml重组人IL-2的X-VIVO15(Lonza目录号04-418Q)培养基中,将每个供体500,000个记忆T细胞(2个重复份)与照射(15,000拉德)的亲本K562细胞、表达OS8和CD86的K562人工抗原呈递细胞,或与表达OS8、CD86和41BBL的人工抗原呈递细胞以1个T细胞:10个K562至1个T细胞:50个K562范围内的比率一起接种。作为比较物,在含有6000U/ml重组人IL-2和30ng/ml的可溶性OKT3的培养基中,将500,000个记忆T细胞以1个T细胞:100个PBMC的比率接种到照射的PBMC上(以1:1:1:1:1的比率从5个供体汇集)。将细胞以100ml最终体积全部接种到G-rex 6M孔板(Wilson Wolf目录号80660M)的各个孔中。

[1414] 在培养的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,向所有条件中添加IL2至6000U/ml。

[1415] 在培养的第4天,去除50%的培养基,并替换为新鲜培养基。假设消耗了先前添加的细胞因子,将IL2添加至6000U/ml的最终浓度。

[1416] 在培养的第7天,去除70%的培养基,并且将细胞重悬在剩余的30ml中。通过取10ml的这种细胞悬浮液并转移到G-rex 6M孔板的新孔中,以1:3的比率将细胞分开。假设消耗了先前添加的细胞因子,添加90ml X-VIVO 15新鲜培养基,并且添加6000U/ml重组人IL2。

[1417] 在培养的第9天,去除70%的培养基,并且将细胞重悬在剩余的30ml中。通过取5ml的这种细胞悬浮液并转移到G-rex 6M孔板的新孔中,以1:6的比率将细胞分开。假设消耗了先前添加的细胞因子,添加95ml X-VIVO 15新鲜培养基,并且添加6000U/ml重组人IL2。

[1418] 在培养的第12天,去除70%的培养基,并且将细胞重悬在剩余的30ml中。通过取10ml的这种细胞悬浮液并转移到G-rex 6M孔板的新孔中,以1:3的比率将细胞分开。假设消耗了先前添加的细胞因子,添加90ml X-VIVO 15新鲜培养基,并且添加6000U/ml重组人IL2。

[1419] 在培养的第14天,收获细胞并计数。PBMC和aAPC条件下的细胞表现出大于91%的活力。在14天的扩增期间,与人工抗原呈递细胞一起培养的细胞稳健扩增。与表达CD86和膜结合抗CD3的K562细胞一起培养的记忆T细胞,以及与表达41BBL、CD86和膜结合抗CD3的K562细胞一起培养的那些扩增显著好于与亲本K562细胞一起培养的那些细胞(图5A-5C)。通过以1:10(图5A)、1:25(图5B)和1:50(图5C)的响应T细胞与K562的比率进行培养来稳健地支持扩增。此外,观察到的倍数扩增接近,并且在一些情况下超过了当细胞与照射的PBMC+可溶性OKT3(REP阳性对照)一起培养时观察到的倍数扩增。

[1420] 实施例9:使用无饲养细胞方法、使用IL7/IL15扩增TIL

[1421] 直接由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增TIL。在培养的第0天,取来源于原发性肿瘤样品的单细胞悬浮液并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,并且另外补充10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。随后向孔中添加以下:

[1422] •TIL扩增方法A(“Stemcell”)——将来自Stemcell Technologies(目录号10970)的抗CD3/抗CD2/抗CD28四聚体抗体复合物(TAC)添加到TIL中,最终浓度为0.01μL/ml-25μL/ml。

[1423] •TIL扩增方法B(“Transact”)——将来自Miltenyi Biotec(MACS GMP T Cell Transact,目录号130-019-011)的、共价附接至针对人CD3和CD28的人源化重组激动剂的胶体聚合物纳米基质添加到TIL中,最终浓度为0.01μL/ml-100μL/ml。

[1424] 对于上文概述的两种TIL扩增方法,以离散的时间间隔遵循通用方案,每种方法的变化如下所示:

[1425] 在扩增的第2天,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1426] 在扩增的第5天,通过从孔中去除3ml培养基并且用3ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1427] 在扩增的第7天,将细胞转移到6孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80660M)。向每个孔中添加90ml REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1428] 在扩增的第9天,通过去除50ml培养基并且用50ml新鲜REP培养基替换来执行50%培养基交换。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1429] 在扩增的第12天,从孔中去除70ml培养基。将细胞重悬在剩余的30ml培养基中并且以1:3的比率分开,使得可以通过将10ml细胞悬浮液转移到新孔中,从单个孔接种6孔Grex板的3个独立孔。向每个孔中添加90ml新鲜的REP培养基。随后,假设消耗了先前添加的细胞因子,添加10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15。

[1430] 在扩增的第14天,可在一些情况下收获细胞。在其他情况下,可通过在10ng/ml-1000ng/ml IL-7和/或10ng/ml-1000ng/ml IL-15的存在下再继续培养至多2周来进一步扩增细胞。

[1431] 实施例10:TIL的转录分析

[1432] NanoString nCounter CAR-T表征小组评估了上文示出的TIL扩增过程后TIL的细胞组成。将来自5个供体的、通过如实施例1中所述的“常规过程”或“IL-15过程”扩增的细胞的等分试样沉淀并冷冻,之后进行RNA分离。针对OR1A1编辑的TIL制备一份等分试样并且针对SOCS1编辑的TIL制备一份等分试样。针对一个供体,制备技术重复份以评估两个样品之间的一致性以进行质量控制。使用Arcturis PicoPure RNA分离试剂盒和柱上DNA酶处理来执行RNA分离。然后将归一化的RNA用于nCounter系统中的mRNA:探针杂交。使用nSolver分

析软件4.0对原始计数进行归一化、分组并分析途径富集。

[1433] 被OR1A1编辑并且然后在IL-15中培养的TIL的T细胞耗竭标志物的表达显著低于其IL-2培养的对应物(评分降低8+1%,p=0.002;图6)。根据Tomfohr J,Lu J,Kepler TB,Pathway level analysis of gene expression using singular value decomposition,BMC Bioinformatics.2005;6:225中的教导,使用NanoString nSolver软件计算耗竭和细胞毒性评分。耗竭评分由其表达是耗竭状态的指示物的预注释基因构成,所述基因例如PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。与激活程度较低的状态一致,这些IL-15扩增的TIL在构成细胞毒性评分的预注释基因中耗尽(降低120+30%,p=0.001;图7),所述基因包括PTGER2、FASLG、TNFRSF9、IRF4、CTLA4、EOMES、PDPN、LAG3、TNFSF9、CD86、TIGIT、HAVCR2、CASP3、PROCR、MDFIC、CCL3、CD160、BATF、TOX、CD244、B3GAT1、KLRG1、LILRB4和PDCD1。当将在IL-15中培养的SOCS1编辑的TIL与IL-2中的OR1A1编辑的TIL进行比较时,注意到耗竭评分降低4.6+0.8%(p=0.003),但未观察到细胞毒性评分显著下降(p>0.05)。因此,SOCS1编辑逆转了IL-15对细胞毒性评分的负面影响(图7),同时仍降低T细胞耗竭评分(图6),这可能是通过激活IFNG和II型干扰素信号传导(图8)。值代表平均值+SEM,并且统计学意义通过使用Dunnetts多重比较测试的单因素方差分析进行评估(*p<0.05)。

[1434] 实施例11:用于使用可溶性激活因子或人工抗原呈递细胞(aAPC)扩增前REP失败的TIL的方法

[1435] 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)直接由原发性人黑色素瘤转移瘤的单细胞悬浮液扩增。TIL获自三个不同的供体:供体3239、供体6752和供体6755。供体6752和供体6755先前被鉴定为前REP失败,在前REP中无法在23天内扩增到4×10^7个细胞。在培养的第0天,从单细胞悬浮液中取400,000个-800,000个活细胞并在6ml体积的TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)中接种到24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中,并且补充6,000U/ml重组人IL-2(Peprotech,目录号200-02)或1000ng/ml IL-15(Peprotech,目录号200-15)。如通过流式细胞术确定的,每种条件接种的活细胞含有22K至52K CD3+T细胞。使用五种不同的方法激活并扩增细胞,如下所述:

[1436] •TIL扩增方法1("REP样")——无需前REP的一步快速扩增方案。对来自五个健康供体的饲养细胞(PBMC)进行照射(6,000拉德)并以1:1:1:1:1的比率汇集。向每个孔中添加1×10^7个照射的PBMC,以及360ng OKT3(Biolegend,目录号317326),最终浓度为60ng/ml。

[1437] •TIL扩增方法3("Stemcell")——来自Stemcell的四聚体抗体复合物(TAC)。将37.5μl来自Stemcell Technologies(目录号10970)的抗CD3/抗CD2/抗CD28四聚体抗体复合物(TAC)添加到TIL中,最终浓度为6.25μl/ml。

[1438] •TIL扩增方法4("Transact")——来自Miltenyi Biotec的纳米基质。将85μl来自Miltenyi Biotec(MACS GMP T Cell Transact,目录号170-076-156)的、共价附接至针对人CD3和CD28的人源化重组激动剂的胶体聚合物纳米基质添加到TIL中,最终稀释度为70:1。

[1439] •TIL扩增方法5("aAPC-OKT3")-对被工程改造以表达OKT3的K562细胞进行照射(15,000拉德)。将1×10^6个照射的aAPC-OKT3细胞添加到每个孔中,最终细胞与面积比为5

×10^5个细胞/平方厘米。

[1440] • TIL扩增方法6(“aAPC-OKT3-CD86”)-对被工程改造以表达OKT3和CD86的K562细胞进行照射(15,000拉德)。将1×10^6个照射的aAPC-OKT3细胞添加到每个孔中,最终细胞与面积比为5×10^5个细胞/平方厘米。

[1441] 对于上文概述的所有五种TIL扩增方法,以离散的时间间隔遵循通用方案,每种方法的变化如下所示:

[1442] • 第2天:假设对应孔的消耗,将36,000U的重组人IL-2添加到每个孔中,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/ml的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1443] • 第4天和第6天:替换/交换50%的培养基。从每个孔中去除并丢弃3ml细胞上清液,注意不要扰乱孔底的细胞。随后,假设消耗,然后添加3ml新鲜TIL培养基和36,000U IL-2,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/ml的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1444] • 第7天:对于所有条件,对细胞进行计数。将全部体积(6ml)转移到含有100ml TIL培养基的6孔Grex(Wilson Wolf)中,所述培养基具有6000U/ml IL-2或1000ng/ml IL-15。

[1445] • 第10天或第11天:在第10天和第11天,使用如实施例4中所述的CRISPR-Cas9分别对所有aAPC样品和可溶性激活因子样品进行工程改造。电穿孔后,将2×10^5个细胞在含有6000U/ml IL-2或1000ng/ml IL-15的6ml TIL培养基中转移到24孔Grex(Wilson Wolf)中。

[1446] • 第13天:假设对应孔的消耗,将36,000U的重组人IL-2添加到每个孔中,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/ml的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1447] • 第15天:替换/交换50%的培养基。从每个孔中去除并丢弃50ml细胞上清液,注意不要扰乱孔底的细胞。随后,假设消耗,然后添加50ml新鲜TIL培养基和36,000U IL-2,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/ml的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1448] • 第18天:收获供体3339的样品。收获供体6755的样品,使在IL-2和IL-15中用aAPC-OKT3或aAPC-OKT3-CD86激活的样品嗅觉(O)、SOCS1(S)和SOCS1+PTPN2(S+P2)经历如第15天所述的50%培养基交换。供体6752的样品经历如第15天所述的50%培养基交换。

[1449] • 第21天:剩余的供体6755的样品和供体6752的样品经历如第15天所述的50%培养基交换。

[1450] • 第23天:收获剩余的供体6755的样品和供体6752的样品。

[1451] 实施例12:使用CRISPR-Cas9用可溶性激活因子或aAPC对前REP失败的TIL进行遗传工程改造的方法

[1452] 使用CRISPR-Cas9对使用实施例11中所述的方案扩增的TIL进行遗传工程改造,以产生靶基因的功能性基因敲除。此遗传工程改造在实施例11中所述的每种方法的第10天执行,并且也在第0天-第21天范围内的其他日子执行。简而言之,在第10天,将1.2x10^6个扩增的TIL以300xg离心5分钟,并用20μl的MaxCyte电穿孔缓冲液(HyClone目录号EPB1)重悬。制备了若干核糖核蛋白(RNP)主混合物,其含有52pmol Cas9蛋白(Aldevron,目录号9212)和120pmol的每种单独的sgRNA。主混合物1含有OR1A2基因(O)(IDT,AGATGA TGTCAACCAAGGAG SEQ ID NO:913)的sgRNA。主混合物2含有SOCS1基因(S)(IDT,GACGCCTGCGGATTCTACTG SEQ ID NO:61)的sgRNA。主混合物3含有SOCS1基因(SEQ ID NO:61)和PTPN2基因的sgRNA(IDT,

GGAAACTTGGCCACTCTATG SEQ ID NO:206)(S+P2)。通过用100μl无核酸酶双链体缓冲液(IDT目录号1072570)重悬10nmol冻干的sgRNA来制备100μM的OR1A2 sgRNA溶液。试剂如下添加：

[1453]

	体积(μL)
sgRNA (100 μM)	1.2
Cas9 (61 μM)	0.84
DPBS (1X)	1.76

[1454] 向20μl细胞悬浮液中添加全部5μl的RNP主混合物。然后将25μl的细胞悬浮液转移到OC25 X 3加工装配体(MaxCyte,目录号OC-25x3)中。使用“Optimization#9”程序在MaxCyte ExPERT电穿孔仪上对细胞进行电穿孔。随后,将25μl TIL转移到96孔板中,每个室用25μL TIL培养基洗涤两次并转移到96孔回收板中,然后在37℃下将所述96孔回收板孵育20分钟。随后,对细胞进行计数,并且然后将$2x10^5$个活细胞接种到含有6ml TIL培养基的24孔Grex板中,所述TIL培养基补充有6,000U/ml IL-2或1000ng/ml IL-15。如实施例11所述,从第13天开始进行进一步的细胞操作。在第18天和第23天,收获细胞并计数。将细胞沉淀冷冻,并且通过扩增子测序来确定编辑(图12)。

[1455] 实施例13:使用可溶性激活因子或aAPC的前REP失败TIL的表型表征

[1456] 评估了第18天或第23天产生的T细胞的表型。具体而言,通过流式细胞术确定被定义为中央记忆T细胞表型(T_{cm},具有标志物表型CD45RO+CCR7+CD45RA-)的细胞的比例。取如实施例11中培养的细胞,并在第18天或第23天用检测CD45RO、CCR7和CD45RA的荧光标记的抗体对细胞的等分试样进行染色。与前RNP(电穿孔之前的细胞)相比,方法3(Stemcell)和方法4(Transact)在第18天或第23天生成相似百分比的T_{cm}细胞(图11)。在第18天或第23天,与所有方法的前RNP细胞相比,CD8+T细胞的百分比显示出普遍富集(数据未示出)。

[1457] 对于通过添加实施例11中所述的五种方法的IL-2或IL-15扩增的TIL,评估了电穿孔之前、在第10天或第11天的TIL的倍数扩增(相对于第0天的细胞数)(图9)。在方法1、3、4、5和6中,包括两个前REP失败在内的所有供体都显示出超过2600倍的扩增。在第18天或第23天,在所有方法中,SOCS1编辑的TIL显示出比嗅觉和SOCS1+PTPN2编辑的TIL更大的平均倍数扩增(图10)。与第18天或第23天的方法5相比,方法6显示出SOCS1编辑的TIL的平均倍数扩增更大。

[1458] 实施例14:用于使用可溶性激活因子由肿瘤碎片扩增TIL的方法

[1459] 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)直接由来自原发性患者的冷冻黑色素瘤肿瘤碎片扩增。从2个供体获得肿瘤碎片:供体D4462和供体D7283。在第0天,将肿瘤碎片解冻并置于含有TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)的$10cm^2$培养皿中。将碎片称重,然后均匀地分成(按碎片数量)两个等分试样,并将每个等分试样置于24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中。将6mL的TIL培养基添加到每个孔中,每个孔中含有GMP TransAct试剂(MACS GMP T Cell Transact,目录号170-076-156)在6000U/mL IL-2(Peprotech,目录号200-02)或1000ng/mL IL-15(Peprotech,目录号200-15)中的1:70稀释液。在37℃下培养细胞。

[1460] 在扩增的第2天,假设对应孔的消耗,将36,000U的重组人IL-2添加到每个孔中,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1461] 在扩增的第6天,对于D7283,替换/交换了50%培养基。从每个孔中去除并丢弃3mL

细胞上清液，注意不要扰乱孔底的细胞。随后，假设消耗，然后向对应的孔中添加3mL新鲜TIL培养基和36,000U IL-2，最终浓度为6,000U/ml。假设消耗，向对应的孔中添加IL-15，最终浓度为1,000ng/mL。对于D4462，使用如实施例15中所述的CRISPR-Cas9对样品进行工程改造。电穿孔后，将4×10^5个细胞在含有6,000U/mL IL-2或1000ng/mL IL-15的6mL TIL培养基中转移到24孔Grex(Wilson Wolf)中。

[1462] 在扩增的第9天，替换/交换了50％培养基。从每个孔中去除并丢弃3mL细胞上清液，注意不要扰乱孔底的细胞。随后，假设消耗，然后添加3mL新鲜TIL培养基和36,000U IL-2，最终浓度为6,000U/ml。假设消耗，以1000ng/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1463] 在扩增的第10天，对于D4462，从24孔Grex的每个孔中吸出3mL培养基。向含有100mL TIL培养基的6孔Grex(Wilson Wolf)中添加剩余的3mL，所述TIL培养基具有6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15。对于D7283，使用如实施例15中所述的CRISPR-Cas9对样品进行工程改造。电穿孔后，将4×10^5个细胞在含有6,000U/mL IL-2或1000ng/ml IL-15的6mL TIL培养基中转移到24孔Grex(Wilson Wolf)中。

[1464] 在扩增的第14天，收获D4462孔。对于D7283，从24孔Grex的每个孔中吸出3mL培养基。向含有100mL TIL培养基的6孔Grex(Wilson Wolf)中添加剩余的3mL，所述TIL培养基具有6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15。

[1465] 在扩增的第17天，对于D7283，去除50mL TIL培养基并替换为50mL新鲜TIL培养基。对于消耗，添加6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15。

[1466] 在扩增的第20天，收获D7283孔。

[1467] 实施例15:使用CRISPR-Cas9用可溶性激活因子对碎片扩增的TIL进行遗传工程改造的方法

[1468] 使用CRISPR-Cas9对使用实施例14中所述的方案扩增的TIL进行遗传工程改造，以产生靶基因的功能性基因敲除。此遗传工程改造在第6天或第10天执行。简而言之，在第6天或第10天，将$1.2x10^6$个扩增的TIL以300xg离心5分钟，并用20μl的MaxCyte电穿孔缓冲液(HyClone目录号EPB1)重悬。制备了两种核糖核蛋白(RNP)主混合物，其含有52pmol Cas9蛋白(Aldevron，目录号9212)和120pmol的每种单独的sgRNA。主混合物1含有OR1A2基因(O)(ID T,AGATGATGTCAACCAAGGAG SEQ ID NO:913)的sgRNA。主混合物2含有SOCS1基因(S)(IDT,GACGCCTGCGGATTCTACTG SEQ ID NO:61)的sgRNA。通过用100μL无核酸酶双链体缓冲液(IDT目录号1072570)重悬10nmol冻干的sgRNA来制备100μM的OR1A2 sgRNA溶液。试剂如下添加：

[1469]

	体积(μL)
sgRNA (100 μM)	1.2
Cas9 (61 μM)	0.84
DPBS (1X)	1.76

[1470] 向20μL细胞悬浮液中添加全部5μL的RNP主混合物。然后将25μL的细胞悬浮液转移到OC25 X 3加工装配体(MaxCyte，目录号OC-25x3)中。使用“Optimization#9”程序在MaxCyte ExPERT电穿孔仪上对细胞进行电穿孔。随后，将25μL TIL转移到96孔板中，每个室用25μL TIL培养基洗涤两次并转移到96孔回收板中，然后在37℃下将所述96孔回收板孵育20分钟。随后，对细胞进行计数，并且然后将$4x10^5$个活细胞接种到含有6mL TIL培养基的24

孔Grex板中，所述TIL培养基补充有6,000U/ml IL-2或1000ng/mL IL-15。如实施例14所述进行进一步的细胞操作。在第14天和第20天，收获细胞并计数。将细胞沉淀冷冻，并且通过NGS测序来确定编辑(图15)。

[1471] 实施例16：使用可溶性激活因子或aAPC的肿瘤碎片扩增的TIL的表型表征

[1472] 评估了第14天或第20天产生的T细胞的表型。具体而言，通过流式细胞术确定被定义为中央记忆T细胞表型(Tcm，具有标志物表型CD45RO+CCR7+CD45RA-)或效应记忆T细胞表型(Teff，具有标志物表型CD45RO+CCR7-CD45RA-)的细胞的比例。取如实施例14中培养的细胞，并在第14天或第20天用检测CD45RO、CCR7和CD45RA的荧光标记的抗体对细胞的等分试样进行染色。所测试的所有条件主要显示出Teff记忆表型。SOCS1编辑适度增加了Tcm表型(图14)。

[1473] 针对通过添加IL-2或IL-15扩增的TIL，评估了在第14天或第20天通过可溶性激活因子肿瘤碎片扩增方法生成的理论TIL细胞数。假设一克肿瘤碎片样品来计算理论细胞计数。所测试的所有条件均显示20天后平均扩增大于$1x10^{10}$个TIL(图13)。

[1474] 实施例17：冷冻肿瘤消化物TIL扩增和冷冻肿瘤碎片TIL扩增

[1475] 使用TransACT激活因子、在IL-2或IL-15的存在下，将冷冻肿瘤消化物TIL扩增与冷冻肿瘤碎片TIL扩增进行比较。激活后，对嗅觉(O)和SOCS1(S)执行编辑，并且与无电穿孔(无EP)对照进行比较。

[1476] 用于此评估的材料如下：

[1477]

人 IL-2 (Lot 031912-1)	Peprotech	200-02
人 IL-15 (Lot 091924)	Peprotech	200-15
GMP T 细胞 TransAct (Lot 5200103426)	MACS	170-076-156
sNLS-SpCas9-sNLS 核酸酶(Lot MPM030-04)	Aldevron	9212-5MG
sg_Nh.SOCS1_u728 (custom A. Hohmann)	Biospring	28May19
sgOR1A2_axfc	IDT	145243571.
电穿孔缓冲液(Lot AD22541263, PD 10/2018)	Hyclone	EPB1
OC25x3 加工装配体(Lot LM236738)	MaxCyte	#OC-25x3
Grex 24 孔板	Wilson Wolf	80192M
Grex 6 孔板	Wilson Wolf	80660M
AccuCheck 计数珠粒	Life Technologies	PCB100
Cryostor CS10	Stemcell Inc	07930
RPMI1640 1X L-谷氨酰胺	Gibco	11875-093
AIM-V 培养基 1X.	Gibco	12055-091
人 AB 血清-无菌过滤加热灭活	Valley Biomedical	HP1022HI

[1478] *完全培养基：50/50RPMI/AIM-V，5％人血清

[1479] 黑色素瘤消化物接受自Conversant Bio，并且黑色素瘤肿瘤碎片接受自iSpecimen。供体信息和参考资料如下：

[1480] • D3239(消化物)

[1481] • D6138(消化物)

[1482] • D6755(消化物)

[1483] • D4462(碎片)黑色素瘤

[1484] • D7283(碎片)黑色素瘤

[1485] 对于两种TIL扩增,以离散的时间间隔遵循通用方案,如下所示:

[1486] 在扩增的第0天,根据Discovery Life Sciences Protocol(Thawing Viable Cell Products-1.pdf),使用每个供体三个小瓶来解冻细胞。将每个TIL供体管重悬在1mL完全培养基中,并且组合为总共3mL。按照制造商的建议,使用Nexelcom Cellometer对细胞进行计数。从每个供体中取出200μL用于FACS染色。按照WI-002ACT FACS Differentiation Panel.docx工作说明书进行染色。在最后的重悬步骤中,添加100uL Accucheck珠粒溶液(原液浓度200,000个珠粒/毫升)以获得总共20,000个珠粒。根据所获得的珠粒计算T细胞的总数。然后,将来自2X工作溶液(1:35)的TransAct试剂制备成1:70的最终浓度。向24孔Grex的孔中添加2x 10^6个细胞和3mL的2X TransAct试剂,并且向细胞中添加剩余的TIL培养基以使总体积达到6mL。以6,000U/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-2。向对应的孔中添加IL-15,最终浓度为1,000ng/mL。在37℃下孵育细胞。

[1487] 仍在扩增的第0天,在37℃水浴中解冻肿瘤碎片小瓶。然后将碎片倒入含有10mL TIL培养基的10cm^2培养皿中。将10cm^2培养皿置于测量垫上并对碎片进行拍照。将碎片分成两份相等的等分试样,并且将每份等分试样置于含有1mL TIL培养基的1.5mL Eppendorf管中。以200g离心碎片5分钟。吸出培养基,并且对汇集的碎片进行称重。向24孔Grex的孔中添加3mL 2X TransACT试剂和3mL TIL培养基。向24孔Grex的孔中添加碎片。对于D4462,将8个碎片与IL-2组合,并且将8个碎片与IL-15组合。对于D7283,将6个碎片与IL-2组合,并且将6个碎片与IL-15组合。向对应的孔中添加6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15。在37℃下孵育细胞。

[1488] 在扩增的第2天,向所有供体中添加IL-2或IL-15。在对应的孔中,对于消耗,添加IL-2至6,000U/mL或者对于消耗,添加IL-15至1,000ng/mL。

[1489] 在扩增的第4天,交换了所有供体的培养基。丢弃每个孔中的3mL培养基,并向每个孔中添加3mL TIL培养基。之后,在对应的孔中添加IL-2至6,000U/mL的最终浓度或添加IL-15至1,000ng/mL的最终浓度。

[1490] 在扩增的第6天,对D3239、D6138、D6755和D4462进行FACS染色和电穿孔。通过用100uL双链体缓冲液重悬10nmol小瓶,将嗅觉sgRNA的浓度调整至100μM。SOCS1指导物已经处于必要的浓度下。使用以下体积制备了用于总共15次测试的RNP溶液:

[1491]

	体积/测试 (μL)
sgRNA (100uM)	1.2
Cas9 (61uM)	0.84
DPBS (1X)	2.96
RNP 溶液	5
Maxcyte 溶液(细胞)	20

[1492] 已经准备好MaxCyte仪器并设置为“optimization#9”OC25X3。从每个孔中吸出3mL培养基,记录体积并对细胞进行计数。将100uL电穿孔前细胞转移到96孔v底板中,并根据WI-002ACT FACS Differentiation Panel.docx方案进行染色。对于每种条件,向1.5mL Eppendorf管中添加1.2x10^6个细胞。将管以300g离心5分钟并去除上清液。向1.5mL

Eppendorf管中添加20uL MaxCyte电穿孔缓冲液。向对应的Eppendorf管中添加5uL的嗅觉或SOCS1 RNP溶液。将至多25μL转移到OC25X3装配体中，并对细胞进行电穿孔。将25μL细胞从OC25X3的孔中转移到96孔回收板中。将OC25X3孔用25μL TIL培养基冲洗两次，回收板孔中的最终体积为75μL。在37℃下孵育细胞20分钟。通过以下方式对细胞进行计数：将5μL从回收板中添加到计数孔中的45μL TIL培养基中(10倍稀释)；添加50μL AOPI并混合；转移到计数室；以及对细胞进行计数。然后将4x10^5个细胞转移到24孔Grex的孔中。在37℃下孵育孔。

[1493] 在扩增的第9天，交换了所有供体的培养基。从每个孔中丢弃3mL培养基。在对应的孔中，向每个孔中添加3mL TIL培养基，并且添加IL-2至6,000U/mL的最终浓度或添加IL-15至1,000ng/mL的最终浓度。

[1494] 在扩增的第10天，对D7283进行FACS染色和电穿孔。如针对第6天的样品所述制备样品。对于5个样品制备足够量(Enough)。

[1495] 仍在扩增的第10天，将样品D3239、D6138、D6755和D4462转移到6孔Grex中。将100mL TIL培养基添加到含有6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15的6孔Grex中。丢弃每个供体孔中的3mL培养基。对细胞进行计数并记录体积。向6孔Grex中的对应孔中添加3mL供体细胞，所述6孔Grex中的对应孔含有100mL具有细胞因子的TIL培养基。

[1496] 在扩增的第14天，对D3239、D6183、D6755和D4462执行删除测定(takedown assay)。从6孔Grex的每个孔中吸出80mL，混合，并记录它们的体积。保存一个小瓶用于NGS处理：将100万个细胞转移到1.5mL Eppendorf管中，并且将管以300g离心5分钟。吸出上清液并将细胞在-80℃下储存。执行FACS分析：将每种条件下的100万个细胞分别转移到v底或u底96孔板中，用于分化和多功能小组。根据工作说明书“WI-002ACT FACS Differentiation Panel.docx”和“WI-008ACT FACS Polyfunctional Panel CD25 APC.docx”来处理细胞。将剩余的细胞冷冻：制备5000万个细胞沉淀；将细胞以300g离心5分钟；吸出上清液；添加冻存管盒(cryostore)；将细胞重悬至5000万个细胞/毫升；向冻存管(cryovial)中添加1mL并在-80℃的冷却器(coozie)中放置过夜，之后转移到LN2中。

[1497] 在扩增的第14天，将D7283转移到6孔Grex中。将100mL TIL培养基添加到含有6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15的6孔Grex中。从每个供体孔中丢弃3mL培养基。对细胞进行计数并记录体积。向6孔Grex中的对应孔中添加3mL供体细胞，所述6孔Grex中的对应孔含有100mL具有细胞因子的TIL培养基。

[1498] 在扩增的第17天，对来自样品D7283的细胞进行计数，并且执行50％培养基交换。去除50mL培养基，并且对细胞进行计数。添加50mL的TIL培养基以达到总共100mL。假设消耗，添加IL-2至6,000U/mL，并且添加IL-15至1,000ng/mL。

[1499] 在扩增的第20天，对D7283执行删除测定并继续扩增。从6孔Grex的每个孔中吸出70mL，混合，并记录它们的体积。去除500万个细胞以支持下文的删除测定。保存了一个用于NGS处理的小瓶：将100万个细胞转移到1.5mL Eppendorf管中，并且以300g离心5分钟；吸出上清液；并且在-80℃下储存。图16描绘了第14天的收获的编辑效率。执行了FACS分析：将每种条件下的100万个细胞转移到v底96孔板中用于分化；并且根据工作说明书“WI-002ACT FACS Differentiation Panel.docx”对细胞进行处理。将剩余的细胞冷冻：制备5000万个细胞沉淀；将细胞以300g离心5分钟；吸出上清液；添加冻存管盒并将细胞重悬至5000万个

细胞/毫升;并且向冻存管中添加1mL并在-80℃的冷却器中放置过夜,之后转移到LN2中。向孔中添加70mL的TIL培养基以达到总共100mL。假设消耗,添加IL-2至6,000U/mL,并且添加IL-15至1,000ng/mL。

[1500] 在扩增的第23天,对D7283执行删除测定并且将样品冷冻。从6孔Grex的每个孔中吸出70mL,混合,并记录它们的体积。去除100万个细胞以支持下文的删除测定。执行FACS分析:将每种条件下的100万个细胞转移到u底96孔板中用于多功能小组;并且根据工作说明书"WI-008ACT FACS Polyfunctional Panel CD25 APC.docx"对细胞进行处理。将剩余的细胞冷冻:制备5000万个细胞沉淀;将细胞以300g离心5分钟;吸出上清液;添加冻存管盒,并且将细胞重悬至5000万个细胞/毫升。向冻存管中添加1mL并在-80℃的冷却器中放置过夜,之后转移到LN2中TIL被确定为具有高度活力(图17),到所述过程的第14天,碎片和消化物样品的外推TIL产量均超过$1x10^9$个细胞(图18)。

[1501] 实施例18:用于使用可溶性激活因子由肿瘤碎片扩增TIL的方法

[1502] 肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)直接由来自原发性患者的冷冻黑色素瘤肿瘤碎片扩增。从2个供体获得肿瘤碎片:供体D4008和供体D4375。在第0天,将肿瘤碎片解冻并置于含有TIL培养基(RPMI 1640和AIM V的1:1混合物,补充有5%人AB血清)的10cm^2培养皿中。将碎片称重,然后均匀地分成(按碎片数量)两个等分试样,并将每个等分试样置于24孔Grex板(Wilson Wolf,目录号80192M)的孔中。将6mL的TIL培养基添加到每个孔中,每个孔中含有GMP TransAct试剂(MACS GMP T Cell Transact,目录号170-076-156)在6000U/mL IL-2(Peprotech,目录号200-02)或1000ng/mL IL-15(Peprotech,目录号200-15)中的1:70稀释液。在37℃下培养细胞。

[1503] 在扩增的第2天,假设对应孔的消耗,将36,000U的重组人IL-2添加到每个孔中,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1504] 在扩增的第4天,替换/交换了50%培养基。从每个孔中去除并丢弃3mL细胞上清液,注意不要扰乱孔底的细胞。随后,然后将含有6,000U/ml IL-2的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。然后将含有1000ng/ml IL-15的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。

[1505] 在扩增的第6天,在每个孔中使用用过的培养基来重悬细胞并对细胞进行计数。假设对应孔的消耗,将36,000U的重组人IL-2添加到每个孔中,最终浓度为6,000U/ml。假设消耗,以1000ng/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1506] 在扩增的第7天,在每个孔中使用用过的培养基来重悬细胞,对细胞进行计数,并均匀分到两个孔中,每孔约3mL。随后,然后将含有6,000U/ml IL-2的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。然后将含有1000ng/ml IL-15的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。

[1507] 在扩增的第9天,在每个孔中使用用过的培养基来重悬细胞,并均匀分到两个孔中,每孔约3mL。随后,然后将含有6,000U/ml IL-2的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。然后将含有1000ng/ml IL-15的3mL新鲜TIL培养基添加到对应的孔中。

[1508] 在扩增的第10天,将来自每个孔的相同条件组合,通过细胞过滤器过滤并计数;电穿孔前细胞数和活力如图20所示。将来自供体4008的3×10^6个细胞和来自供体4375的6×10^6个细胞转移到6孔Grex(Wilson Wolf目录号80660M)中的不含任何细胞因子的50mL TIL培养基中(监督)。使用如实施例19中所述的CRISPR-Cas9对剩余的样品进行工程改造。电穿孔后,将来自供体4008的所有细胞(3.9×10^6个至5.5×10^6个)在含有6,000U/mL IL-2或

1000ng/mL IL-15的50mL TIL培养基中转移到6孔Grex中。电穿孔后，将来自供体4375的8.6×10^6个细胞在含有6,000U/mL IL-2或1000ng/mL IL-15的50mL TIL培养基中转移到6孔Grex中。

[1509] 在扩增的第13天，由于培养污染，将来自供体4008的所有条件(IL2或IL15、无EP或编辑的TIL)丢弃。对于供体4375，假设对应孔的消耗，将300,000U的重组人IL-2添加到每个孔中，最终浓度为6,000U/ml。假设消耗，以1000ng/mL的最终浓度向对应的孔中添加IL-15。

[1510] 在扩增的第15天，去除30mL上清液；使用用过的培养基重悬细胞并对细胞进行计数。将所有无EP细胞(16×10^6个至35×10^6个)和所有编辑的细胞中的30×10^6个重新铺板到6孔Grex(Wilson Wolf)中。向每个孔中添加新鲜的TIL培养基至100mL。对于消耗，添加6,000U/mL IL-2或1,000ng/mL IL-15。

[1511] 在扩增的第17天，收获所有孔。电穿孔后细胞数和活力如图21所示。总之，这些数据表明IL-15出乎意料地支持CRISPR/Cas9工程化TIL的可行制造，包括可行的双重CRISPR/Cas9工程化TIL的制造。

[1512] 实施例19：使用CRISPR-Cas9用可溶性激活因子对碎片扩增的TIL进行遗传工程改造的方法

[1513] 使用CRISPR-Cas9对使用实施例18中所述的方案扩增的TIL进行遗传工程改造，以产生靶基因的功能性基因敲除，流线型方案在图19中示出。此遗传工程改造在第10天执行。简而言之，对于第10天的供体4008，将由IL-2或IL-15培养的TIL扩增的18x10^6个以300xg离心7分钟，并且用320μl MaxCyte电穿孔缓冲液(HyClone目录号EPB1)重悬；对于第10天的供体4375，将由IL-2或IL-15培养的TIL扩增的36x10^6个以300xg离心7分钟，并且用480μl MaxCyte电穿孔缓冲液重悬。将来自每种供体的细胞悬浮液均匀地分成两个等分试样，以考虑两种编辑条件。制备了十一种核糖核蛋白(RNP)主混合物，其含有2281pmol Cas9蛋白(Aldevron，目录号9212)和5280pmol的每种单独的sgRNA。主混合物1含有SOCS1基因(Biospring，GACGCCTGCGGATTCTACTG SEQ ID NO:61)和ZC3H12A基因(IDT，AGGCACCACTCACCTGTGAT SEQ ID NO:377)的sgRNA。主混合物2含有SOCS1基因(IDT，GACGCCTGCGGATTCTACTG SEQ ID NO:61)的sgRNA。通过用100μL无核酸酶双链体缓冲液(IDT目录号1072570)重悬10nmol冻干的sgRNA来制备100μM的ZC3H12AsgRNA溶液。试剂如下添加：

[1514]

主混合物1	体积(μL)
SOCS-1sgRNA(100μM)	52.8
ZC3H12A sgRNA(100μM)	52.8
Cas9(61μM)	37.4
DPBS(1X)	77.0

[1515]

主混合物2	体积(μL)
SOCS-1sgRNA(100μM)	52.8
Cas9(61μM)	37.4
DPBS(1X)	129.8

[1516] 对于供体4008，向160μL细胞悬浮液中添加40μL的RNP主混合物。对于供体4375，向240μL细胞悬浮液中添加60μL的RNP主混合物。然后将100μL/孔的细胞悬浮液转移到OC100

X 2加工装配体(MaxCyte,目录号OC-100x2)中。使用“Optimization#9”程序在MaxCyte ExPERT电穿孔仪上对细胞进行电穿孔。随后,将100μL TIL转移到96孔板中,每个室用100μL TIL培养基洗涤两次并转移到96孔回收板中,然后在37℃下将所述96孔回收板孵育20分钟。随后,对细胞进行计数,并且如实施例18中所述接种。如实施例18所述进行进一步的细胞操作。在第17天,收获细胞并计数。将细胞沉淀冷冻,并且通过NGS测序来确定编辑(图22)。这些数据表明,用IL-2或IL-15制造的CRISPR/Cas9工程化TIL表现出靶基因SOCS1、ZC3H12A或两者的编辑效率达到90%或更高的程度。

[1517] 实施例20:使用可溶性激活因子的肿瘤碎片扩增的TIL的表型表征

[1518] 评估了第17天由供体4375产生的T细胞的表型。门控策略在图23中示出。CD4/CD8群的点图和CD45RO/CCR7群的点图在图24中示出。通过流式细胞术确定被定义为中央记忆T细胞表型(Tcm,具有标志物表型CD45RO+CCR7+,右上象限)或效应记忆T细胞表型(Teff,具有标志物表型CD45RO+CCR7-,左上象限)的细胞的比例。取如实施例18中培养的细胞,并在第17天用检测感兴趣的标志物的荧光标记的抗体对细胞的等分试样进行染色。所测试的所有条件主要显示出Teff记忆表型。与SOCS1编辑的细胞相比,SOCS1和ZC3H12A编辑增加Tcm表型(图24)。与IL-2培养的TIL相比,IL-15培养的TIL具有增加的Tcm表型(图24)。在无EP细胞中观察到显著降低的Tcm表型,这可能是由于在第10天缺失细胞因子增强。这些数据表明,与IL-2支持的TIL制造相比,IL-15支持的CRISPR/Cas9工程化TIL的制造导致具有Tcm表型的TIL的优先增加。

[1519] CD28、CD27和KLRG1表达的半偏移直方图在图25中示出。所有条件(IL-2、IL-15、不同的编辑)具有相当的CD28和CD27表达。与IL-15培养的TIL相比,IL-2培养的TIL具有增加的KLRG1群。与编辑的TIL相比,无EP TIL具有明显更高的KLRG1群,这可能是由于无EP TIL在第10天缺失细胞因子增强。

[1520] 实施例21:编辑的TIL上的ICOS表达

[1521] ICOS mRNA是REGNASE-1(由ZC3H12A编码)RNA酶活性的靶标之一(Uehata等人)。ICOS表达的半偏移直方图在图26中示出。与SOCS1编辑的TIL相比,SOCS1和ZC3H12A编辑具有增加的ICOS表达。这些数据表明,在TIL中编码REGNASE-1蛋白的ZC3H12A、或编码REGNASE-1蛋白的ZC3H12A和编码SOCS1蛋白的SOCS1两者的失活导致ICOS蛋白的表达升高,ICOS蛋白的mRNA是REGNASE-1RNA酶活性的直接底物。

[1522] 本文提供的数据支持用于使用非常规细胞因子激活和扩增TIL的方法。这些方法包括用于使用更流线型的方法来激活并扩增TIL的技术,所述更流线型的方法包括一步法、使用激动剂进行刺激的方法、更适合临床制造的方法和不需要饲养细胞的方法。除了富含中央记忆T细胞表型的扩增的TIL群之外,还提供了扩增的TIL群的组合物。

[1523] 与用于TIL扩增的基于IL-2的常规REP方法相比,本文公开的方法具有许多优势。例如,如实施例中所示,本文公开的方法可以扩增先前未能使用基于IL-2的常规REP扩增的TIL群。此外,当包括在前REP或REP中时,IL-15支持效应T细胞的增殖。出乎意料的是,与IL-2相比,当在IL-15中生长时,单基因和双基因编辑的TIL的倍数扩增增加30%-50%。此外,从REP中显现,已经发现与在REP中使用IL-2生成的TIL的相比,使用IL-15生成的未修饰和修饰的TIL均表达更高水平的CD25(一种IL-2受体)。这表明与使用IL-2产生的TIL相比,使用IL-15产生的TIL在输注到患者体内后对内源IL-2存活信号具有更高的敏感性。本文公开

的基于IL-15的方法导致TIL群中效应T细胞的优先扩增。此外，申请人出乎意料地发现，相对于基于IL-2的常规REP方法，在已经使用CRISPR/Cas系统编辑TIL后使用IL-15扩增TIL导致TIL扩增得到改善。具体而言，申请人已经发现，相对于基于IL-2的常规REP方法，当TIL群经受同时编辑多个基因时，TIL群的恢复和扩增得到改善。此外，本文公开的方法产生的TIL在表型和功能上与使用基于IL-2的常规REP方法产生的TIL相似或比其更好。

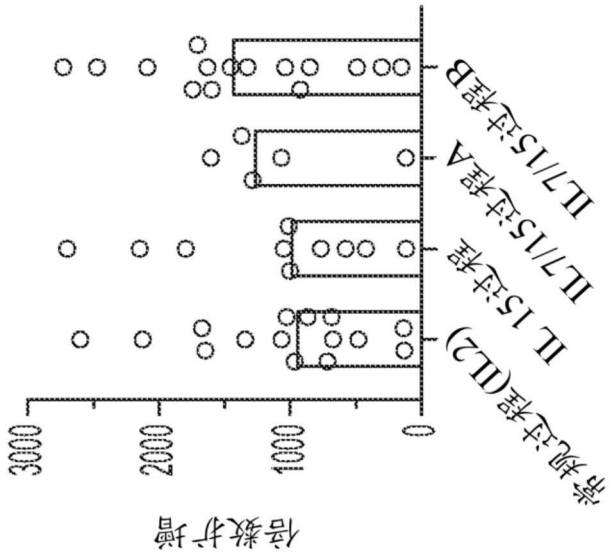

倍数扩增
0
1000
2000
3000
常规过程(IL2)
IL 15过程
IL7/15过程A
IL7/15过程B

图1A

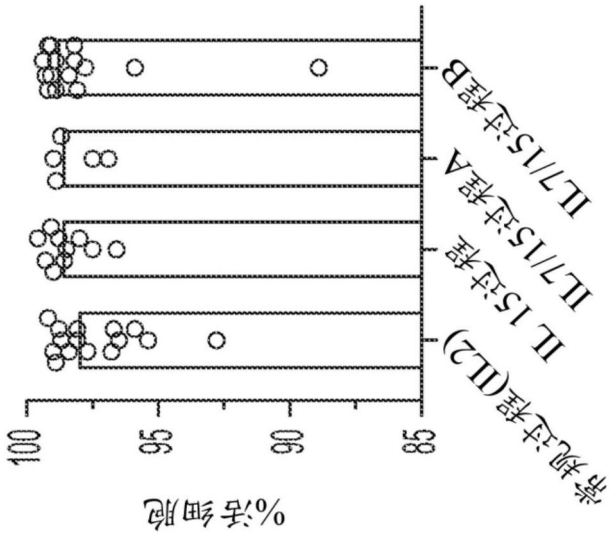

%活细胞
85
90
95
100
常规过程(IL2)
IL 15过程
IL7/15过程A
IL7/15过程B

图1B

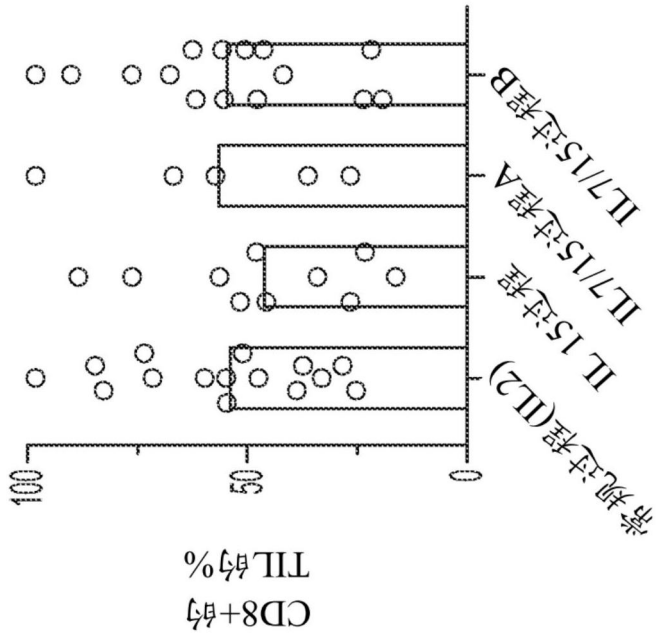

常规对照
IL-15对照
IL-7/15对照A
IL-7/15对照B
0
50
100
CD8+的
TIL的%

图2A

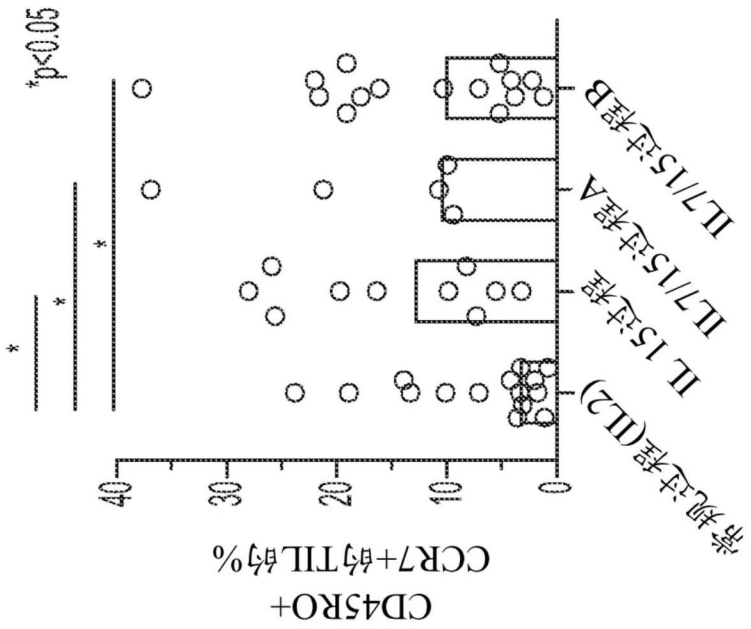

*p<0.05
常规对照
IL-15对照
IL-7/15对照A
IL-7/15对照B
0
10
20
30
40
CD45RO+
CCR7+的TIL的%

图2B

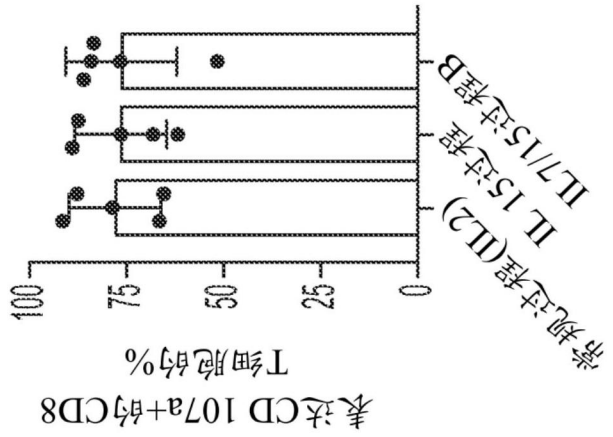

表达CD 107a+的CD8
T细胞的%
100
75
50
25
0
未规达程(IL2)
IL 15达程
IL7/15达程B

图3A

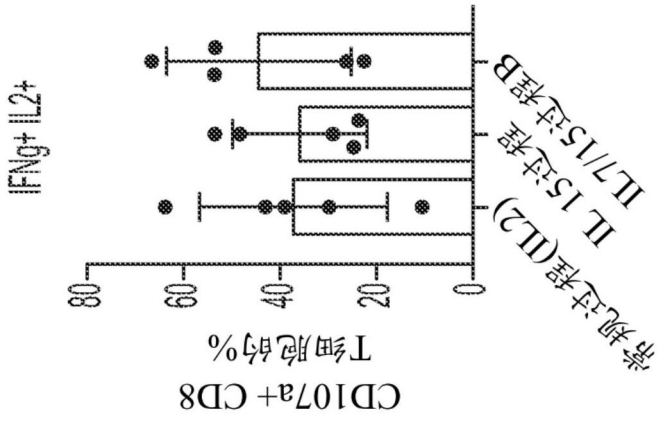

CD107a+ CD8
T细胞的%
80
60
40
20
0
IFNg+ IL2+
未规达程(IL2)
IL 15达程
IL7/15达程B

图3B

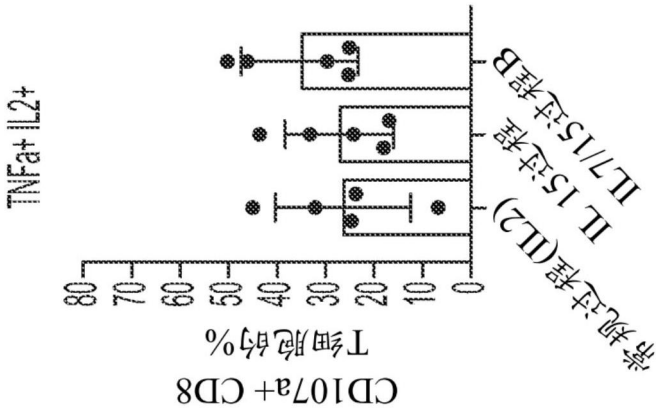

CD107a+ CD8
T细胞的%
80
70
60
50
40
30
20
10
0
TNFa+ IL2+
未规达程(IL2)
IL 15达程
IL7/15达程B

图3C

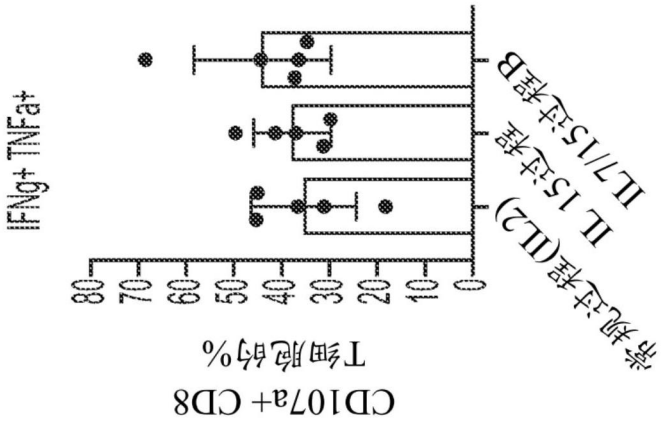

CD107a+ CD8
T细胞的%
IFNg+ TNFa+
0
10
20
30
40
50
60
70
80
未规定浓度(IL2)
IL 15浓度
IL7/15浓度B

图3D

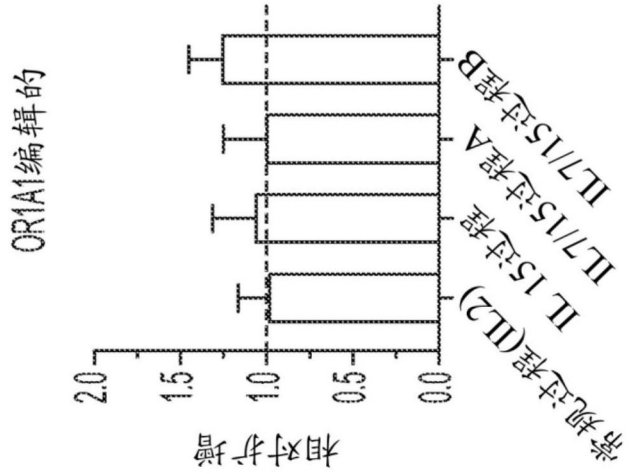

相对扩增
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
OR1A1编辑的
未规定浓度(IL2)
IL 15浓度
IL7/15浓度A
IL7/15浓度B

图4A

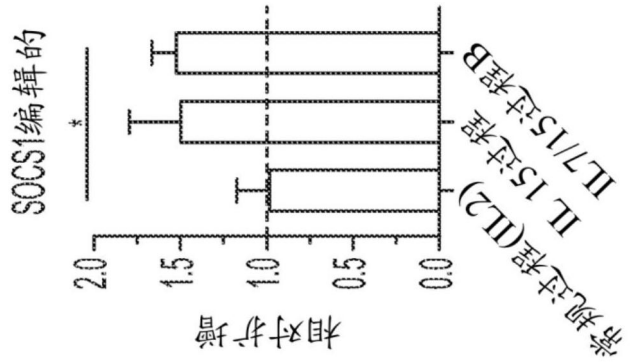

相对扩增
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
SOCS1编辑的
*
未规定浓度(IL2)
IL 15浓度
IL7/15浓度B

图4B

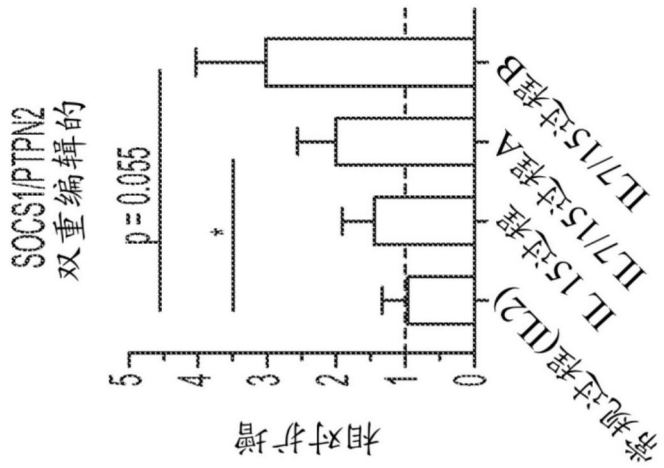

SOCS1/PTPN2
双重编辑的
p = 0.055
*
相对扩增
0
1
2
3
4
5
常规过程(IL2)
IL-15过程
IL7/15过程A
IL7/15过程B

图4C

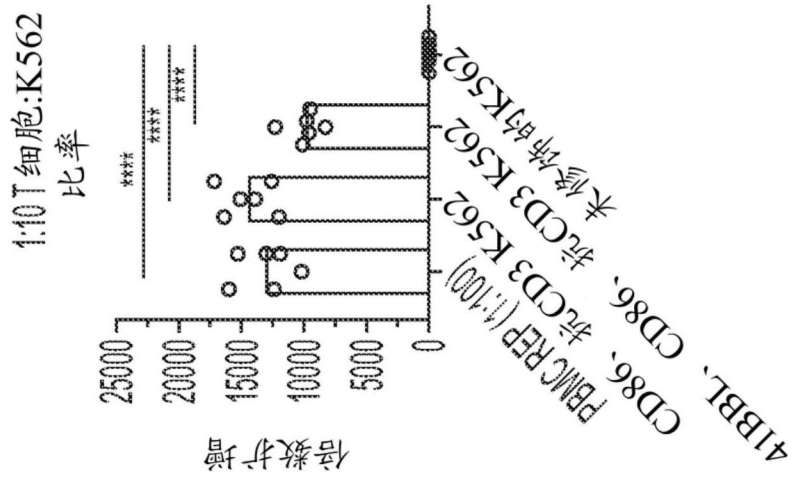

1:10 T细胞:K562
比率
****
****
****
倍数扩增
0
5000
10000
15000
20000
25000
PBMC REP (1:100)
抗CD3 K562
未感染的K562
4-1BBL、CD86、
CD86、

图5A

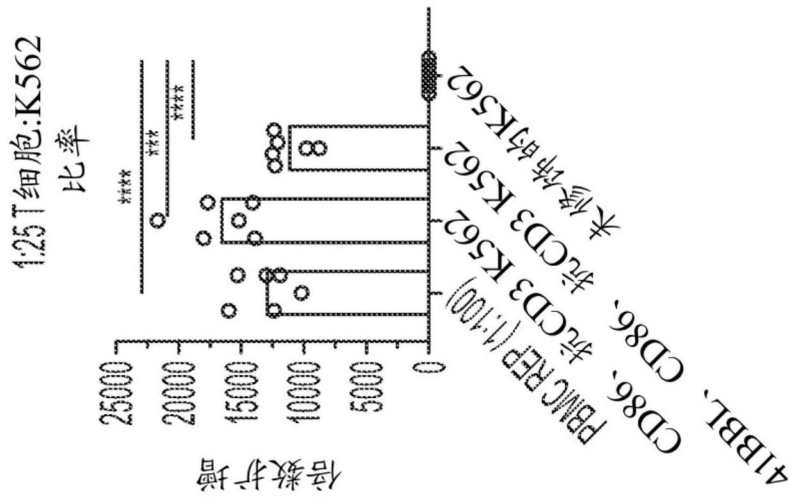

1:25 T细胞:K562
比率
倍数扩增
25000
20000
15000
10000
5000
0
****
***
****
4-1BBL、CD86-、抗CD3 K562
CD86-、抗CD3 K562
PBMC REP (1:100)
未感染的K562

图5B

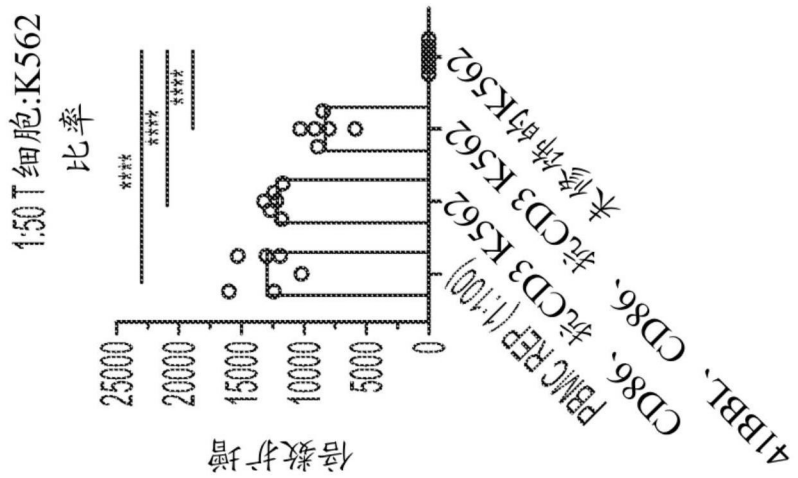

1:50 T细胞:K562
比率
倍数扩增
25000
20000
15000
10000
5000
0
****
****
****
4-1BBL、CD86-、抗CD3 K562
CD86-、抗CD3 K562
PBMC REP (1:100)
未感染的K562

图5C

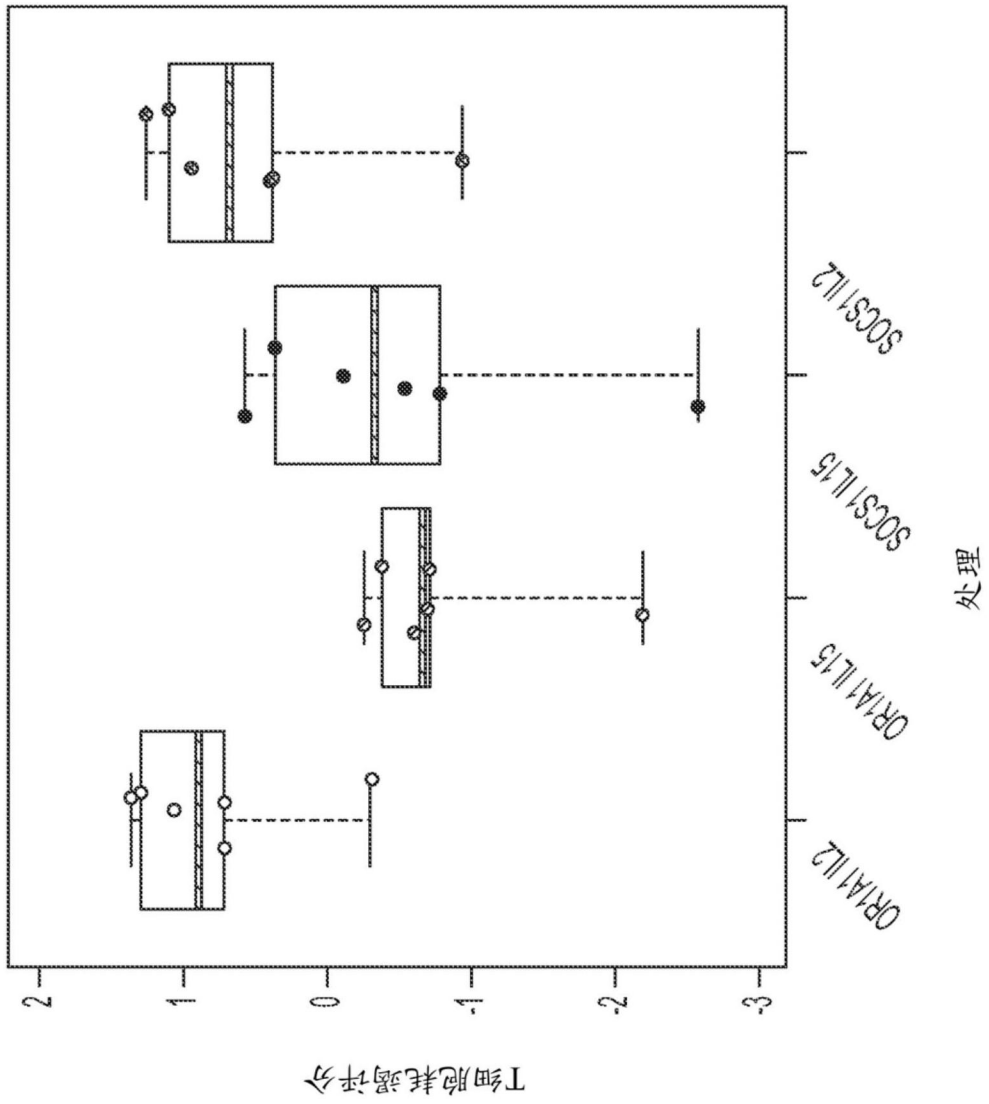

2
1
0
-1
-2
-3
T细胞耗竭评分
ORI4A1IL2
ORI4A1IL15
SOCS1IL15
SOCS1IL2
处理

图6

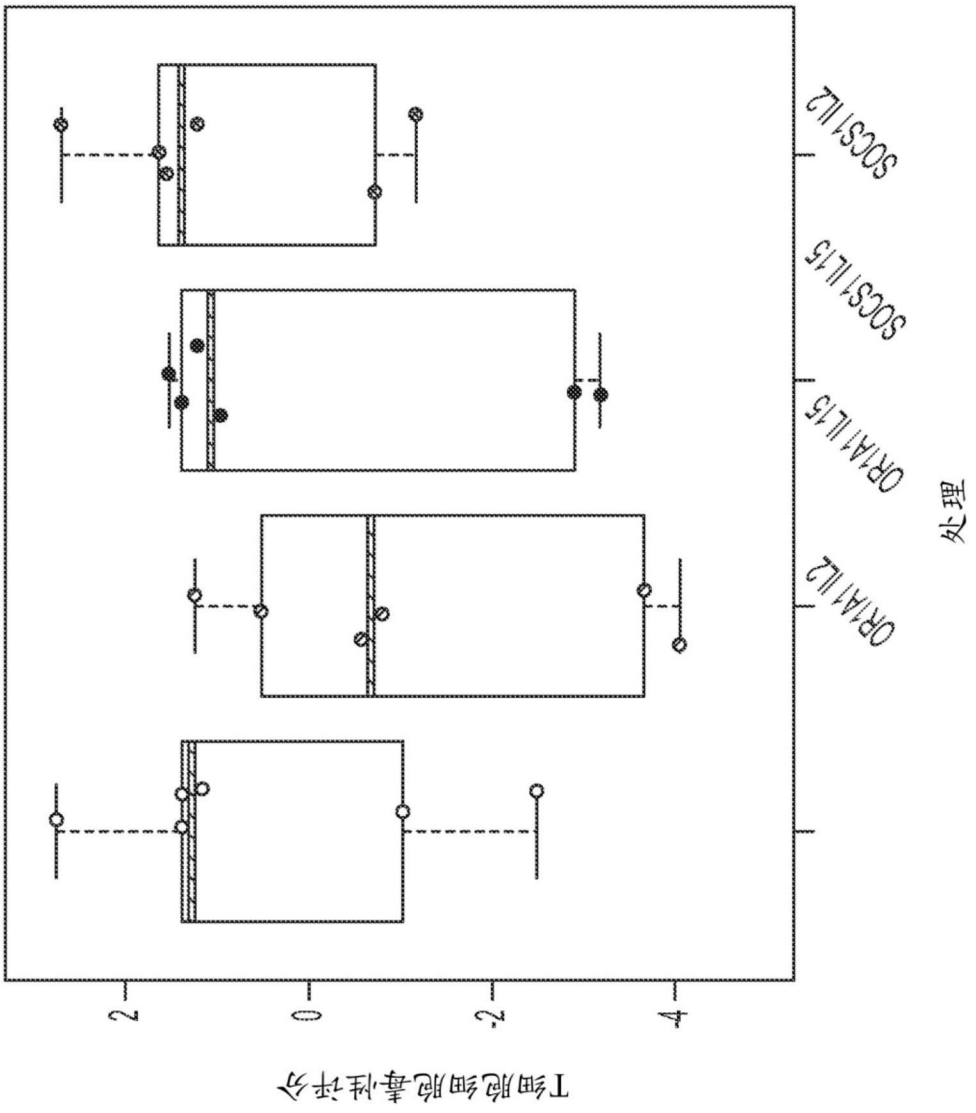


图7

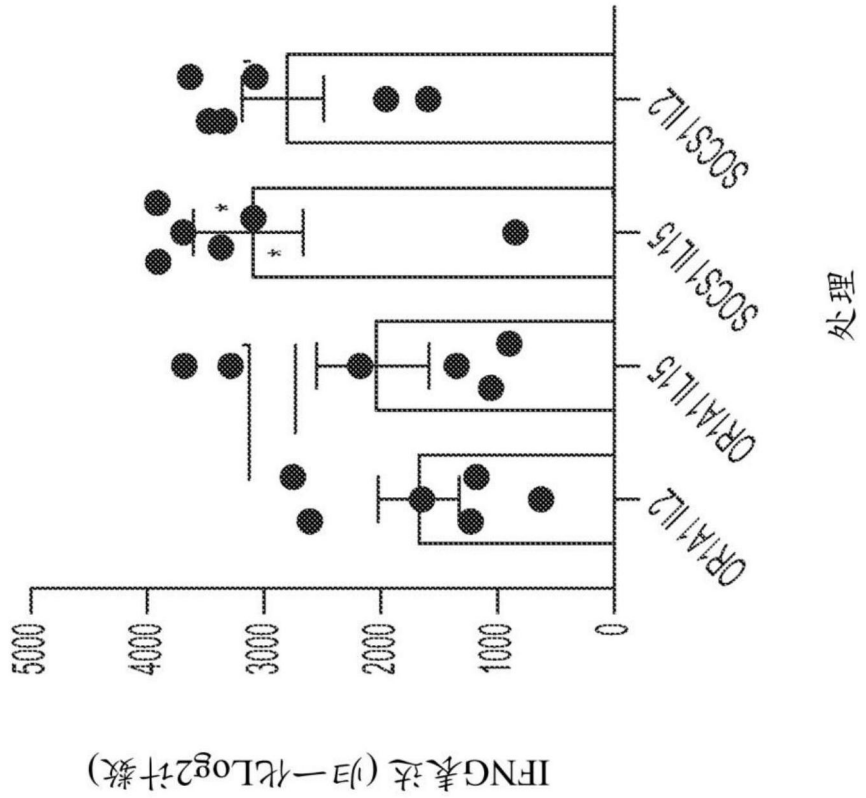

IFNG表达 (归一化Log2计数)
5000
4000
3000
2000
1000
0
OR14I1.2
OR14I1.15
SOCS1IL15
SOCS1IL2
处理

图8

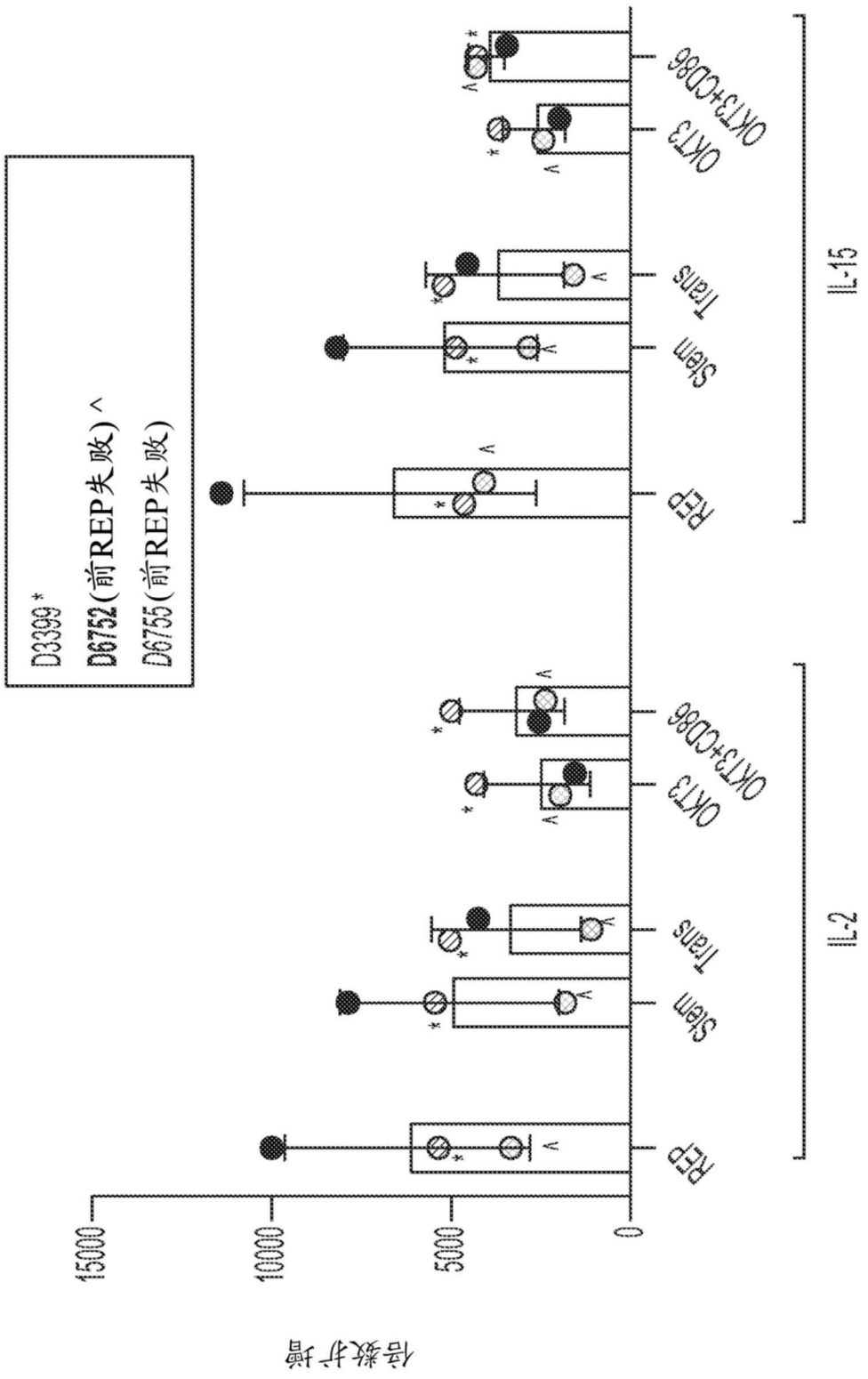

D3399*
D6752(前REP失败)^
D6755(前REP失败)
IL-15
IL-2
REP
Stem
Trans
OKT3
OKT3+CD86
15000
10000
5000
0
倍数扩增

图9

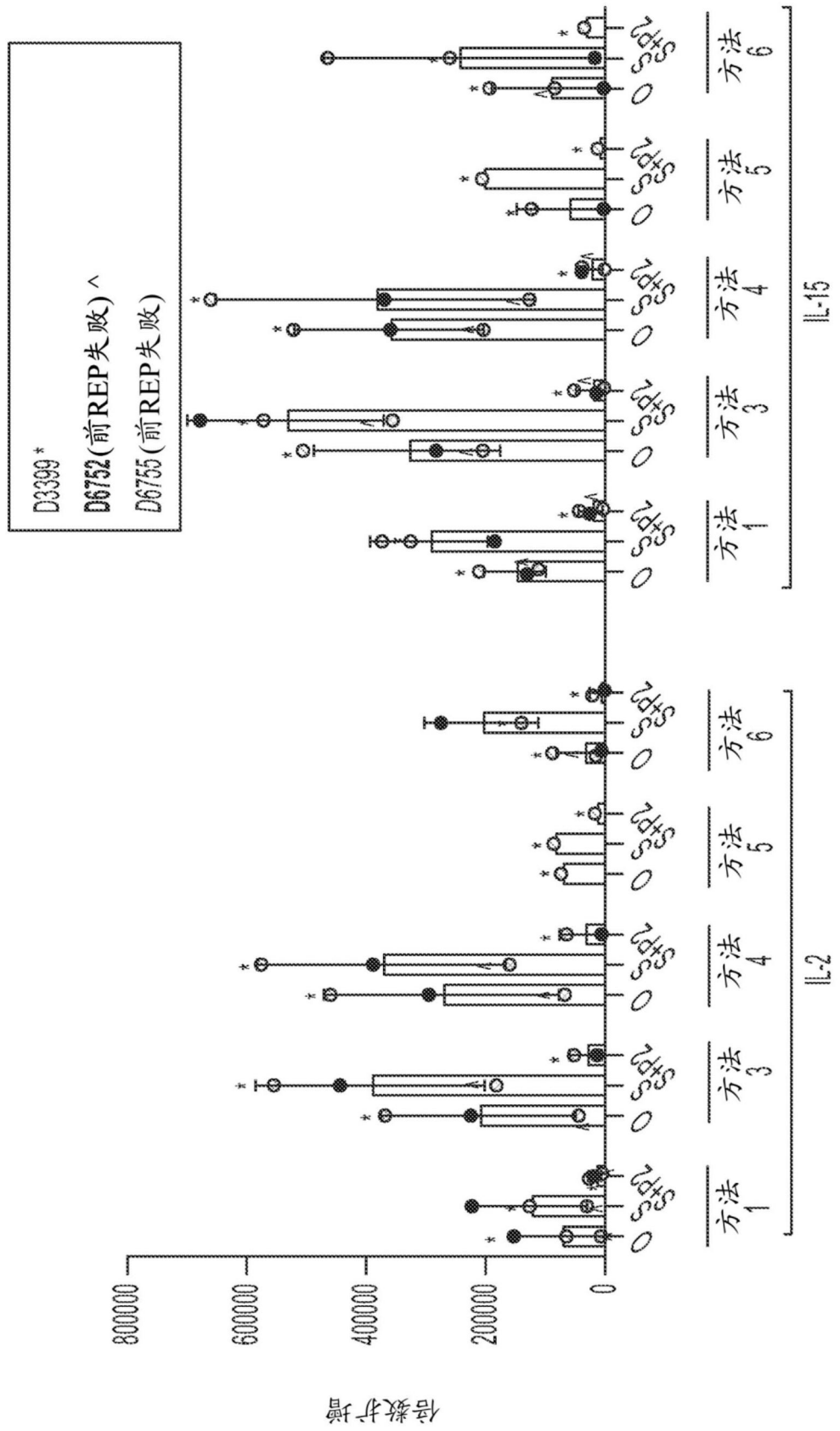

D3399*
D6752(前REP失败)^
D6755(前REP失败)
倍数扩增
800000
600000
400000
200000
0
IL-2
IL-15
方法 1
方法 3
方法 4
方法 5
方法 6

图10

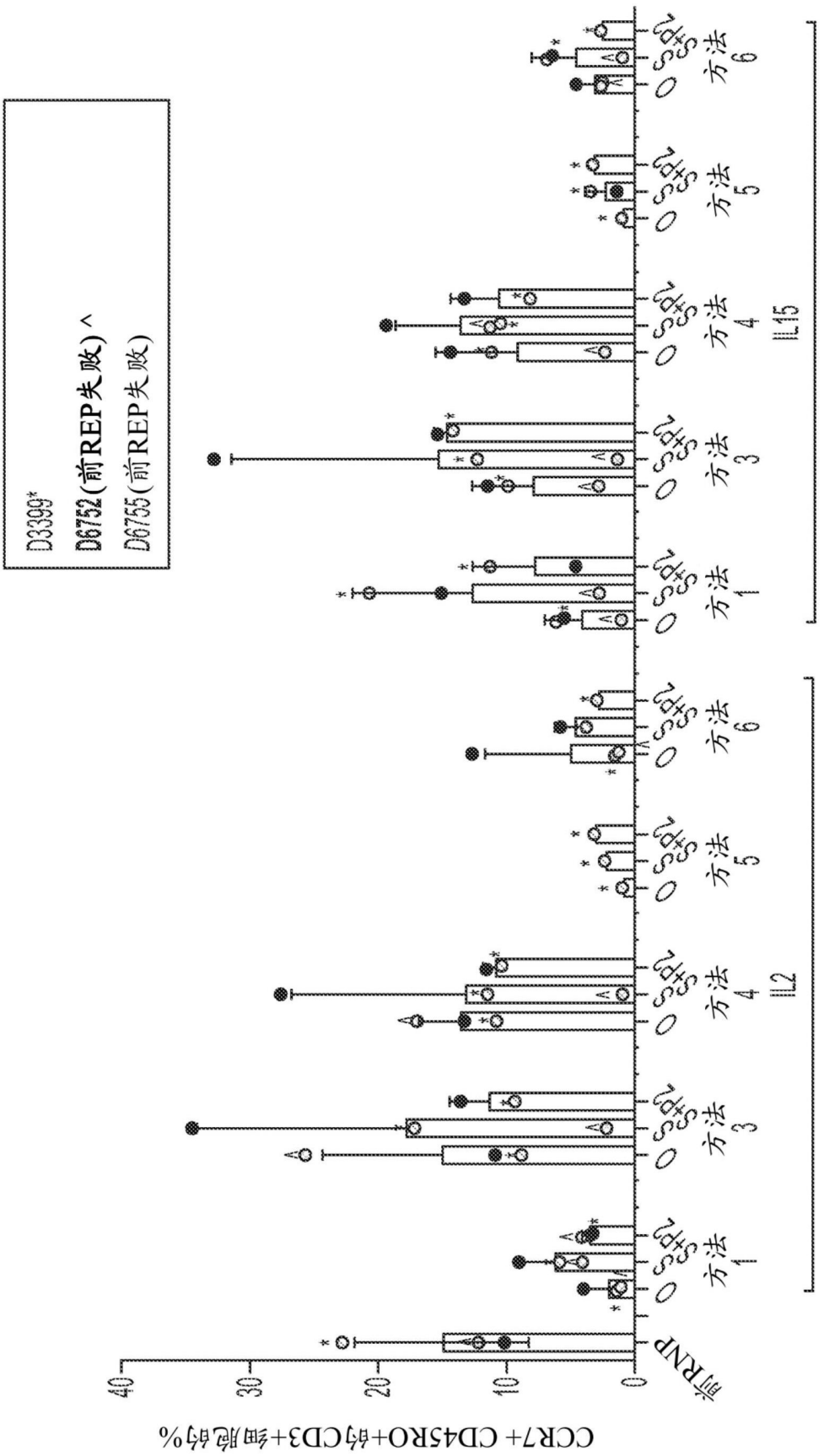

D3399*
D6752(前REP失败)^
D6755(前REP失败)
CCR7+ CD45RO+的CD3+细胞的%
0
10
20
30
40
PBMC
方法 1
方法 3
方法 4
方法 5
方法 6
IL2
IL15

图11

供体	细胞因子	编辑/s	方法1	方法3	方法4	方法5	方法6
D3399	IL2	OR1A2	0.88	0.61	0.95	0.02	0.02
D6752	IL2	OR1A2	0.48	0.82	0.78		0.02
D6755	IL2	OR1A2	0.89	0.95	0.74		
D3399	IL15	OR1A2	0.67	0.93	0.63	0.03	0.02
D6752	IL15	OR1A2	0.85	0.94	0.83		0.02
D6755	IL15	OR1A2	0.86	0.97	0.98		
D3399	IL2	SOCS1	0.97	0.72	0.95	0.99	0.97
D6752	IL2	SOCS1	0.99	0.98	0.99		
D6755	IL2	SOCS1	0.97	0.99	0.98		1.00
D3399	IL15	SOCS1	0.78	0.99	0.99	0.99	0.99
D6752	IL15	SOCS1	0.99	0.89	0.99		1.00
D6755	IL15	SOCS1	0.98	0.97	0.99		0.98
D3399	IL2	SOCS1;PTPN2	0.96;0.97	0.72;0.82	0.48;0.64	0.96;0.97	0.94;0.94
D6752	IL2	SOCS1;PTPN2	0.55;0.58				
D6755	IL2	SOCS1;PTPN2	0.97;0.97	0.91;0.95	0.92;0.93		
D3399	IL15	SOCS1;PTPN2	0.38;0.59	0.44;0.59	0.97;0.97	0.94;0.98	0.93;0.96
D6752	IL15	SOCS1;PTPN2					
D6755	IL15	SOCS1;PTPN2	0.94;0.96	0.89;0.94	0.86;0.92		

图12

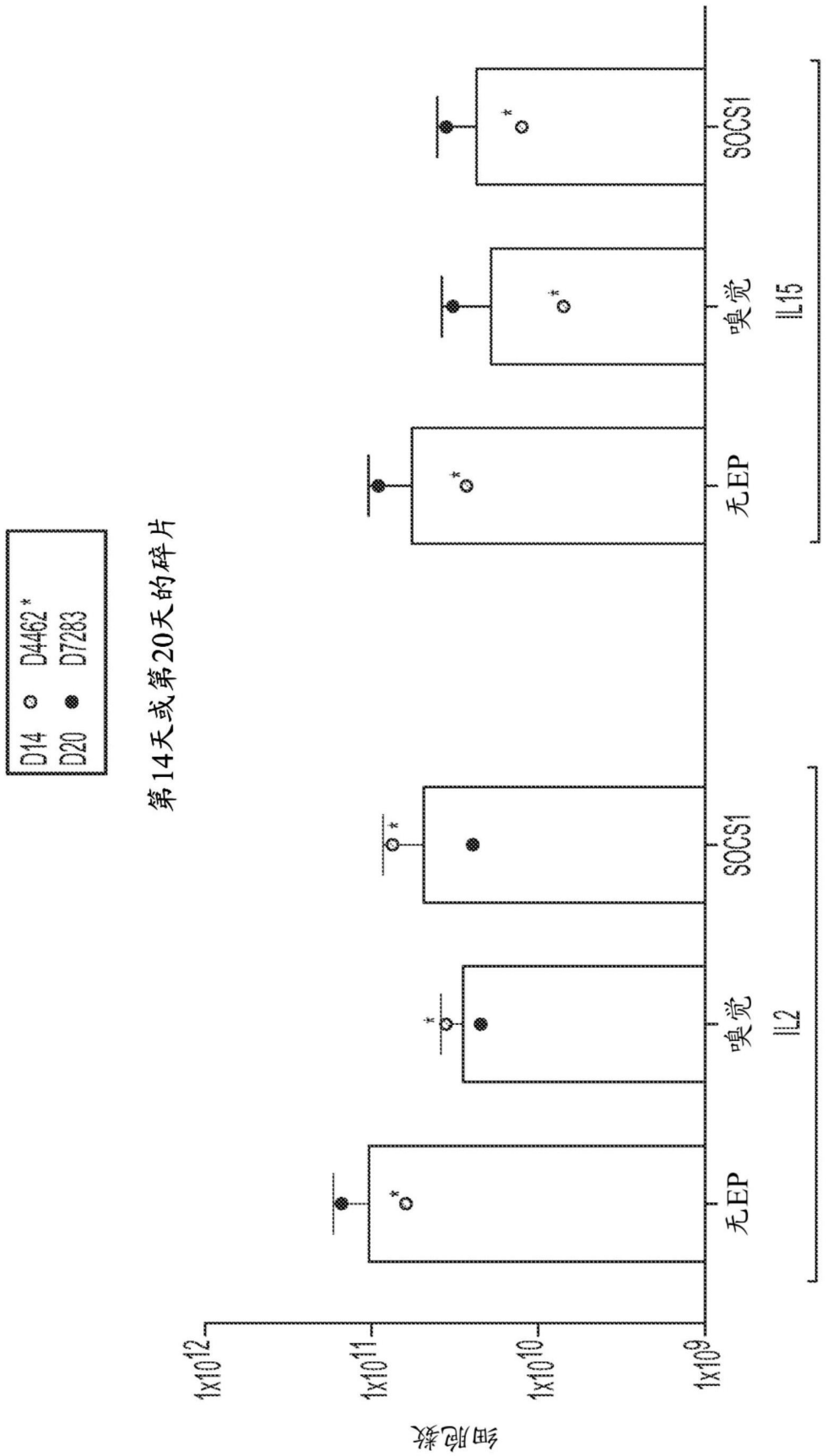

D14 ○ D4462*
D20 ● D7283
第14天或第20天的碎片
细胞数
1x10^12
1x10^11
1x10^10
1x10^9
无EP
嗅觉
SOCS1
无EP
嗅觉
SOCS1
IL2
IL15

图13

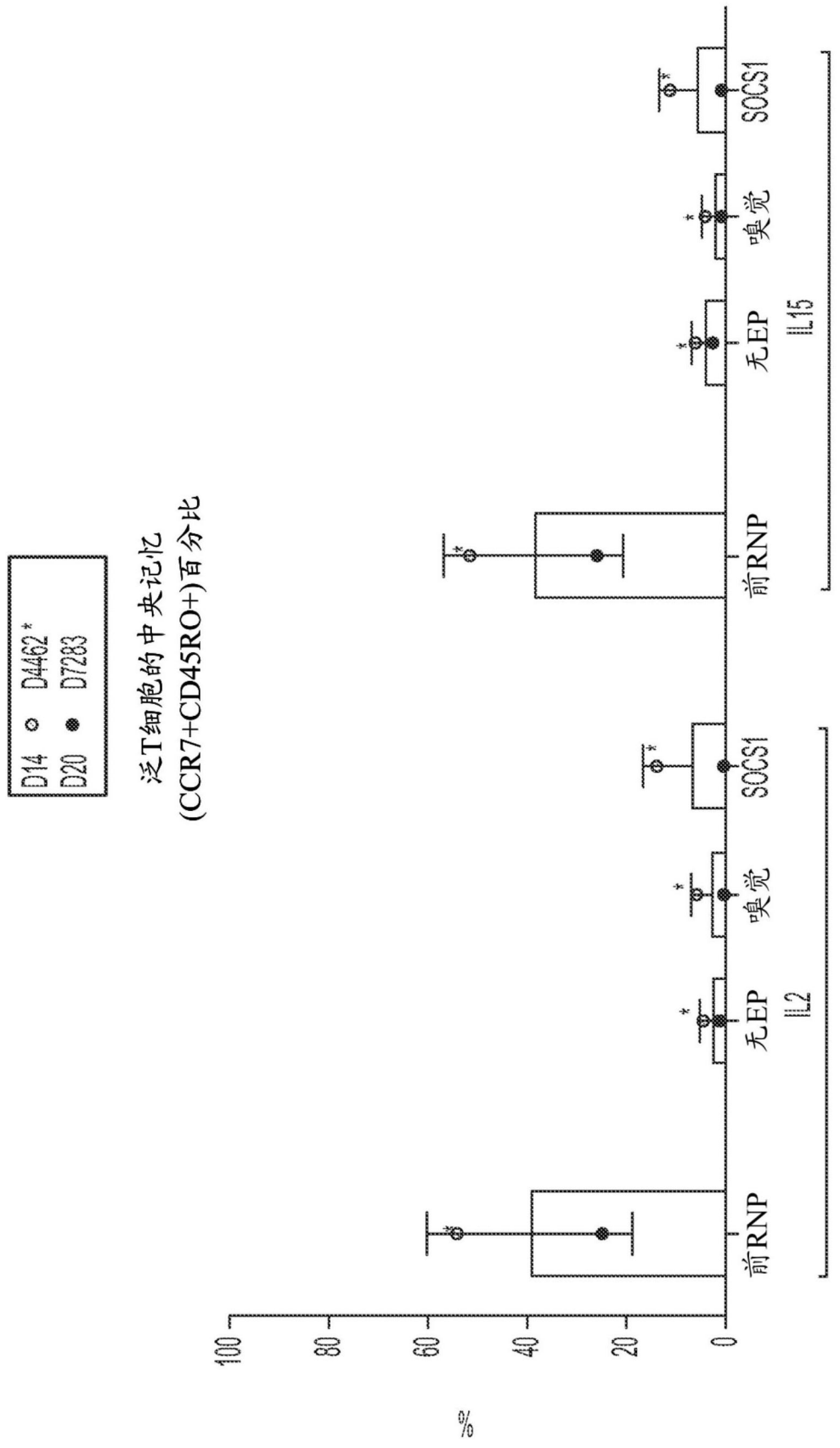
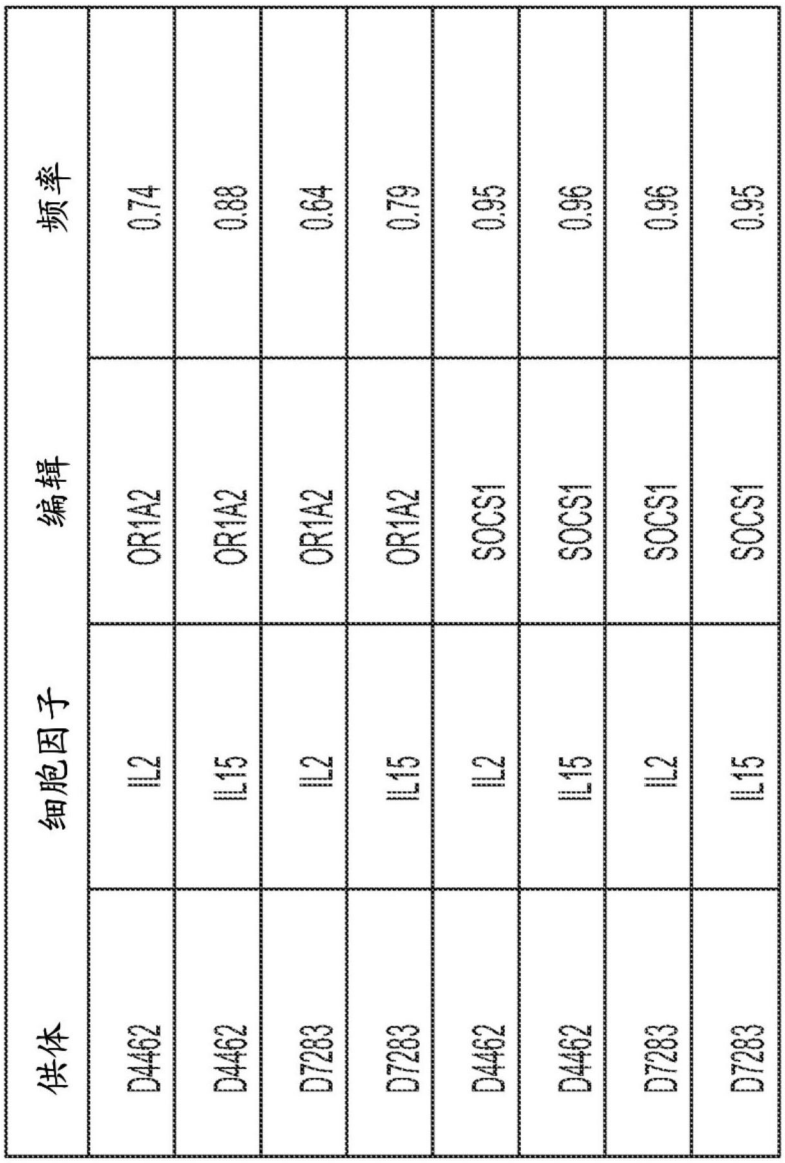

D14 ○ D4462*
D20 ● D7283
泛T细胞的中央记忆
(CCR7+CD45RO+)百分比
100
80
60
40
20
0
%
前RNP
无EP
嗅觉
SOCS1
IL2
前RNP
无EP
嗅觉
SOCS1
IL15

图14



供体	细胞因子	编辑	频率
D4462	IL2	OR1A2	0.74
D4462	IL15	OR1A2	0.88
D7283	IL2	OR1A2	0.64
D7283	IL15	OR1A2	0.79
D4462	IL2	SOCS1	0.95
D4462	IL15	SOCS1	0.96
D7283	IL2	SOCS1	0.96
D7283	IL15	SOCS1	0.95

图15

标记	SOCS1 (u728)
D3239 IL2 S	0.90
D6138 IL2 S	0.98
D6755 IL2 S	0.98
D4462 IL2 S	0.95
D7283 IL2 S	0.96
D3239 IL2 S 1000U IL2	0.93

标记	OR1A2 (axfc)
D3239 IL2 O	0.73
D6138 IL2 O	0.61
D6755 IL2 O	0.81
D4462 IL2 O	0.74
D7283 IL2 O	0.64
D3239 IL2 O 1000U IL2	0.86

图16

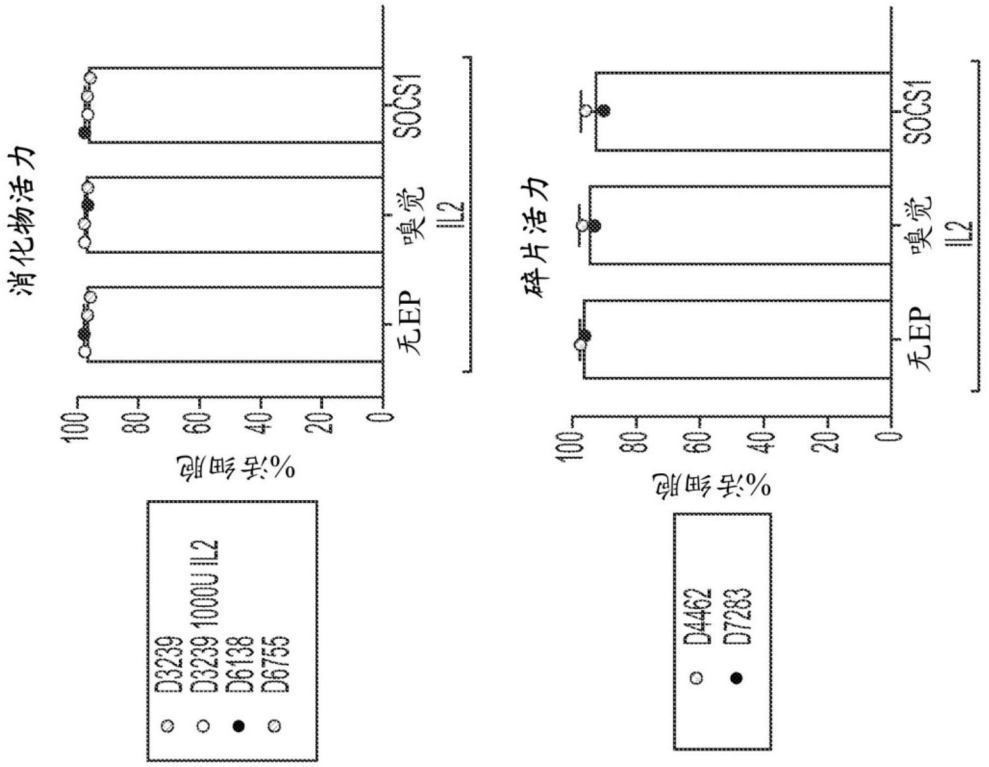

消化物活力
%活细胞
100
80
60
40
20
0
无EP
嗅觉
IL2
SOCS1
D3239
D3239 1000U IL2
D6138
D6755
碎片活力
%活细胞
100
80
60
40
20
0
无EP
嗅觉
IL2
SOCS1
D4462
D7283

图17

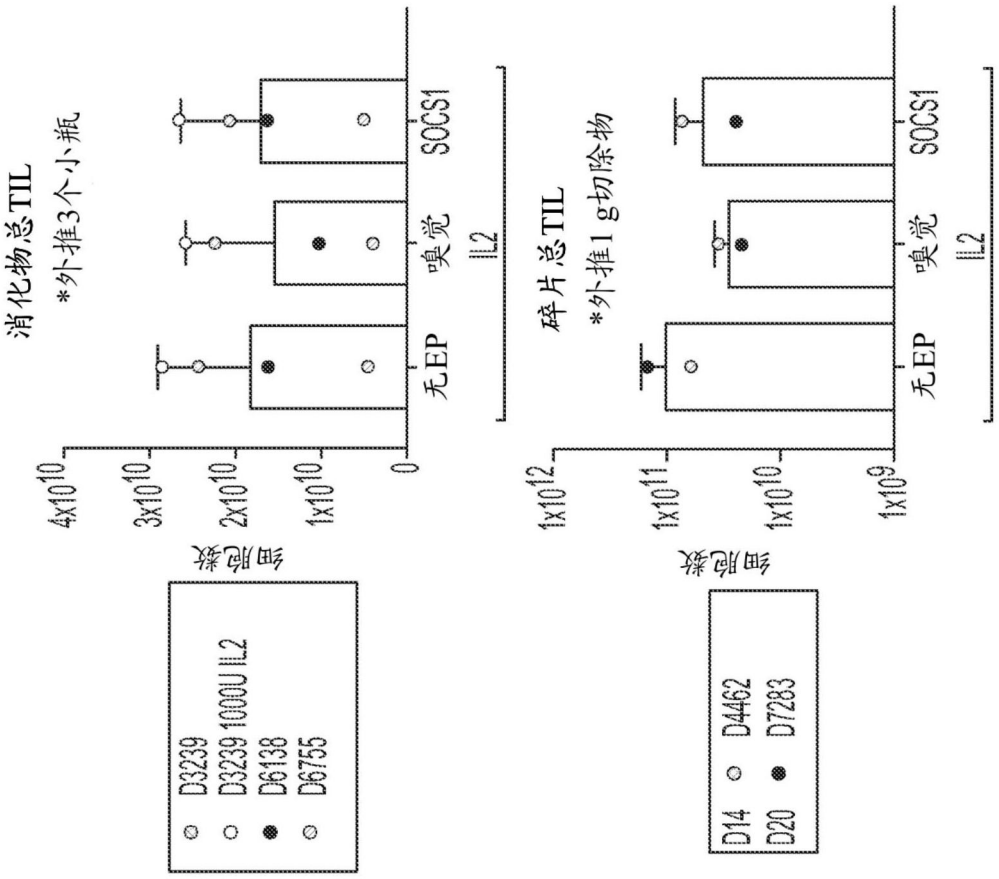

消化物总TIL
*外推3个小瓶
细胞数
4x10^10
3x10^10
2x10^10
1x10^10
0
无EP
嗅觉
SOCS1
IL2
D3239
D3239 1000U IL2
D6138
D6755
碎片总TIL
*外推1 g切除物
细胞数
1x10^12
1x10^11
1x10^10
1x10^9
无EP
嗅觉
SOCS1
IL2
D14
D20
D4462
D7283

图18

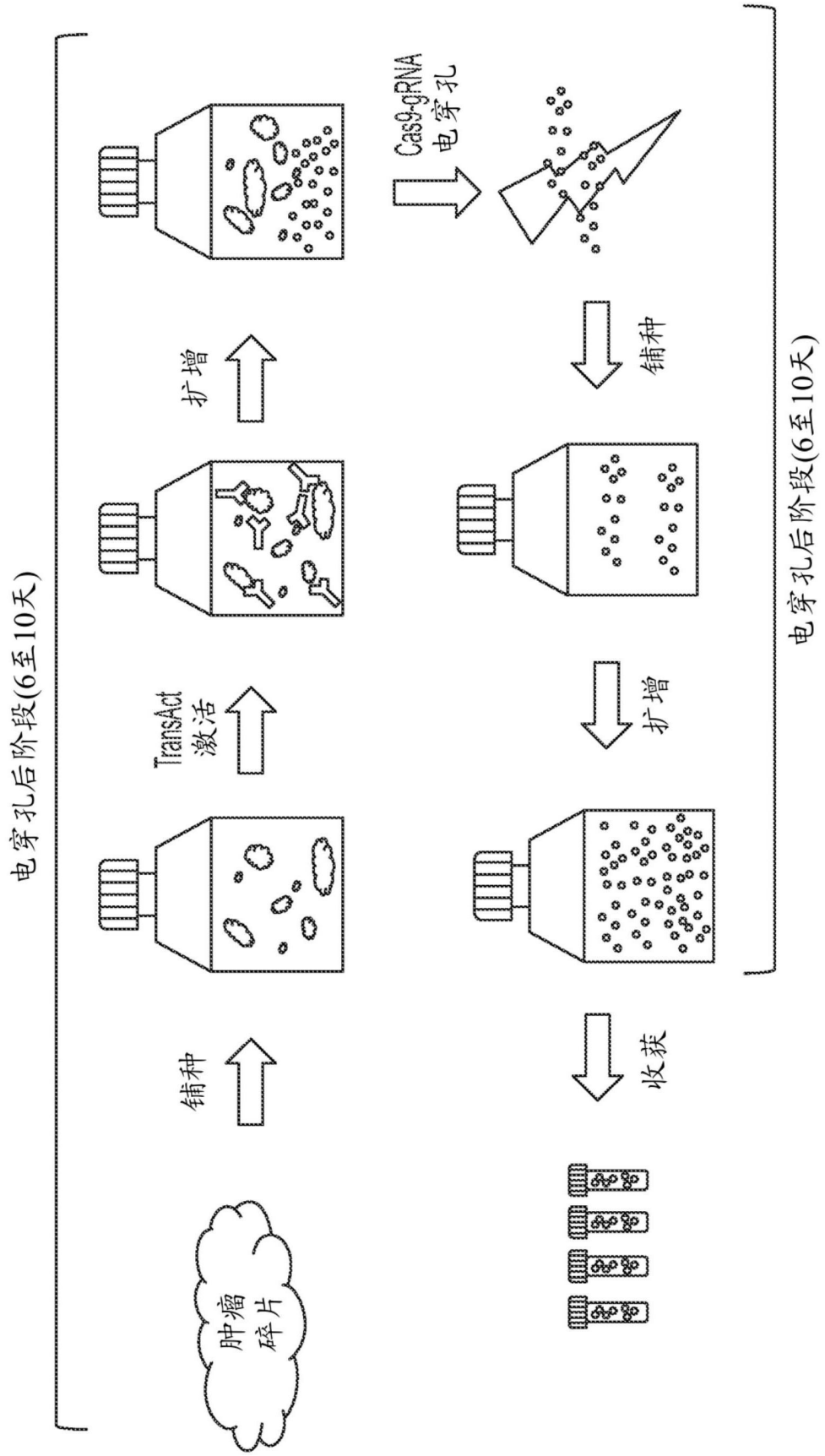

电穿孔后阶段(6至10天)
肿瘤碎片
铺种
TransAct激活
扩增
Cas9-gRNA电穿孔
铺种
扩增
收获
电穿孔后阶段(6至10天)

图19

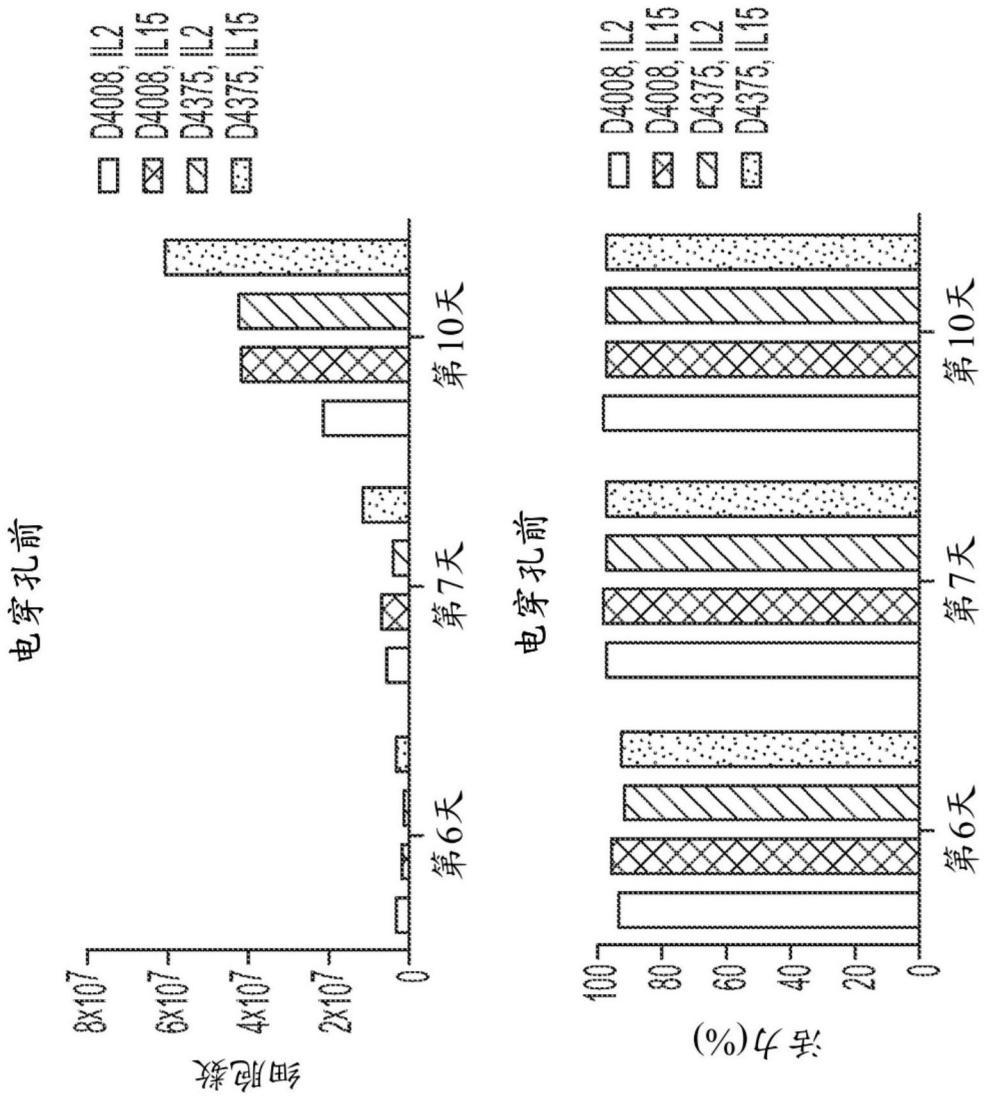

D4008, IL2
D4008, IL15
D4375, IL2
D4375, IL15
电穿孔前
第6天
第7天
第10天
细胞数
8x10^7
6x10^7
4x10^7
2x10^7
0
活力(%)
100
80
60
40
20
0

图20

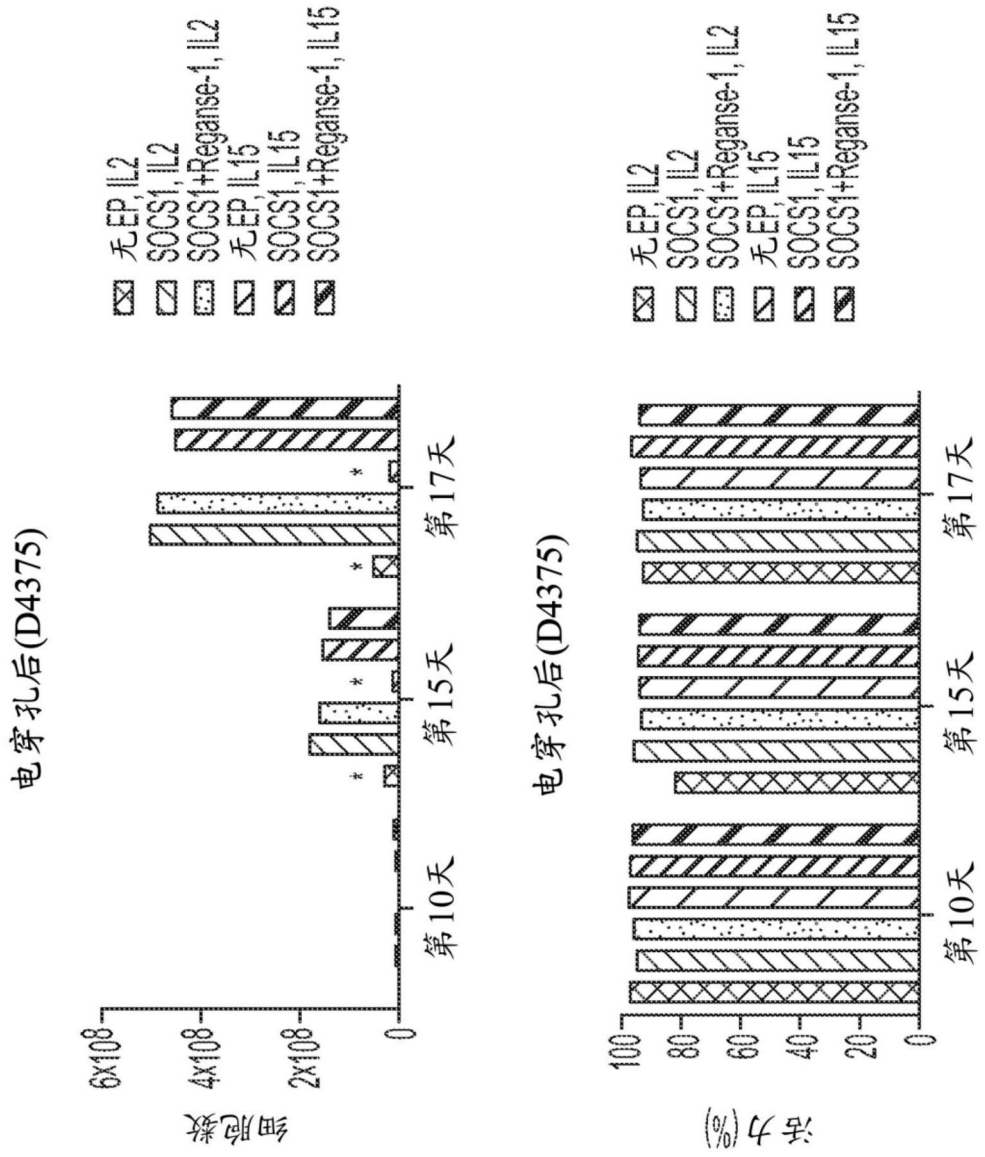
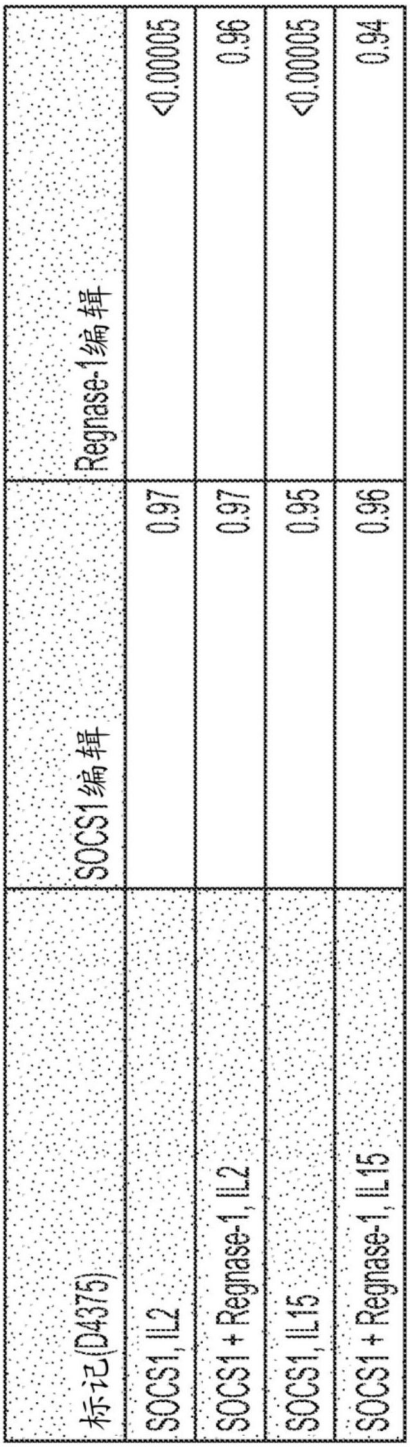

电穿孔后(D4375)
细胞数
6x10⁸
4x10⁸
2x10⁸
0
第10天
第15天
第17天
无EP, IL2
SOCS1, IL2
SOCS1+Reganse-1, IL2
无EP, IL15
SOCS1, IL15
SOCS1+Reganse-1, IL15
电穿孔后(D4375)
活力(%)
100
80
60
40
20
0
第10天
第15天
第17天
无EP, IL2
SOCS1, IL2
SOCS1+Reganse-1, IL2
无EP, IL15
SOCS1, IL15
SOCS1+Reganse-1, IL15

图21



标记(D4375)	SOCS1编辑	Regnase-1编辑
SOCS1, IL2	0.97	<0.00005
SOCS1 + Regnase-1, IL2	0.97	0.96
SOCS1, IL15	0.95	<0.00005
SOCS1 + Regnase-1, IL15	0.96	0.94

图22

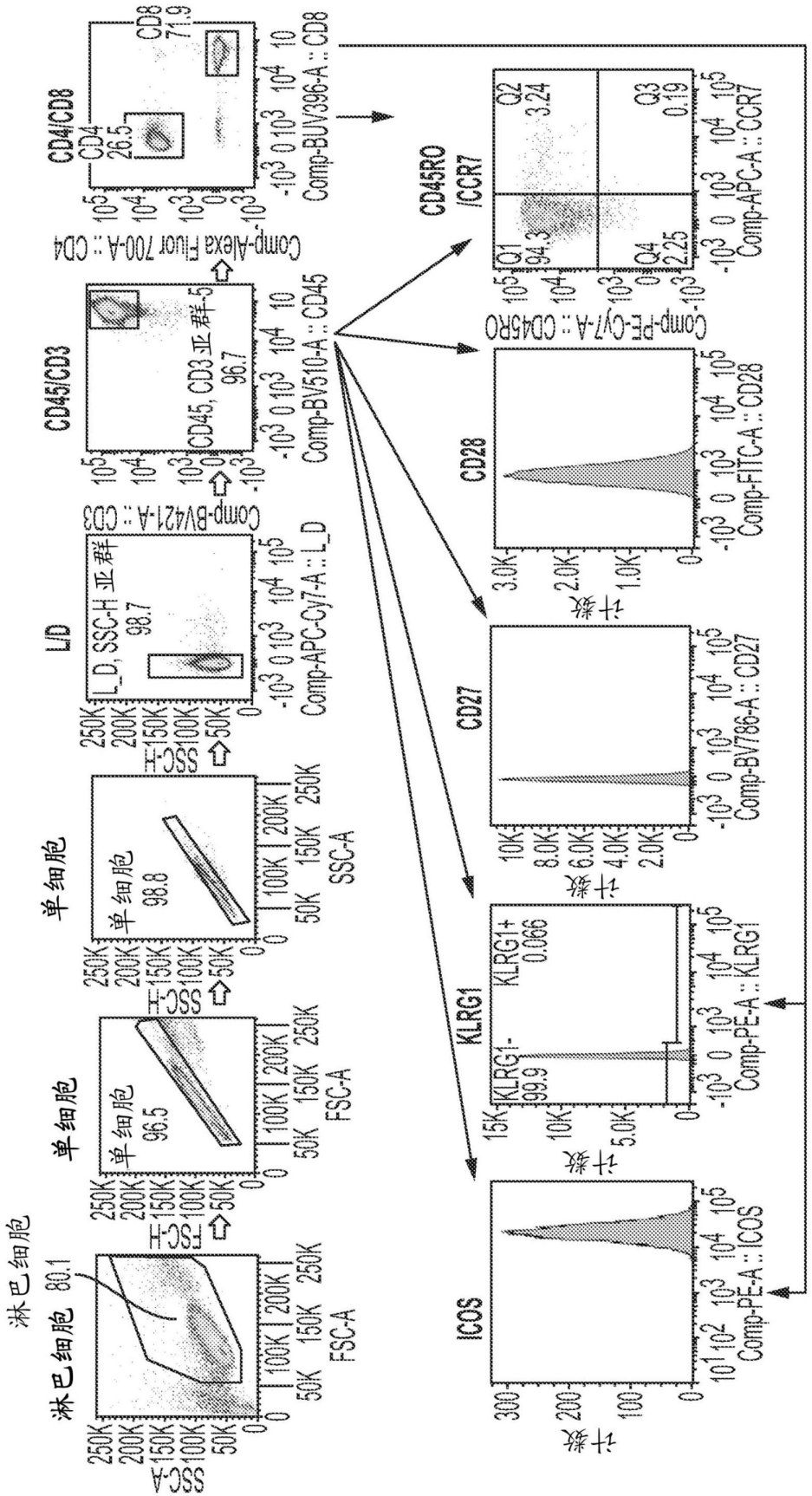

淋巴细胞
淋巴细胞 80.1
单细胞
单细胞 96.5
单细胞
单细胞 98.8
L/D
L_D, SSC-H 亚群 98.7
CD45/CD3
CD45, CD3 亚群-5 96.7
CD4/CD8
CD4 26.5
CD8 71.9
CD45RO /CCR7
Q1 94.3
Q2 3.24
Q3 0.19
Q4 2.25
CD28
CD27
KLRG1
KLRG1- 99.9
KLRG1+ 0.066
ICOS
计数
FSC-A
SSC-A
Comp-BUV396-A :: CD8
Comp-Alexa Fluor 700-A :: CD4
Comp-BV510-A :: CD45
Comp-BV421-A :: CD3
Comp-APC-Cy7-A :: L_D
Comp-PE-Cy7-A :: CD45RO
Comp-APC-A :: CCR7
Comp-FITC-A :: CD28
Comp-BV786-A :: CD27
Comp-PE-A :: KLRG1
Comp-PE-A :: ICOS

图23

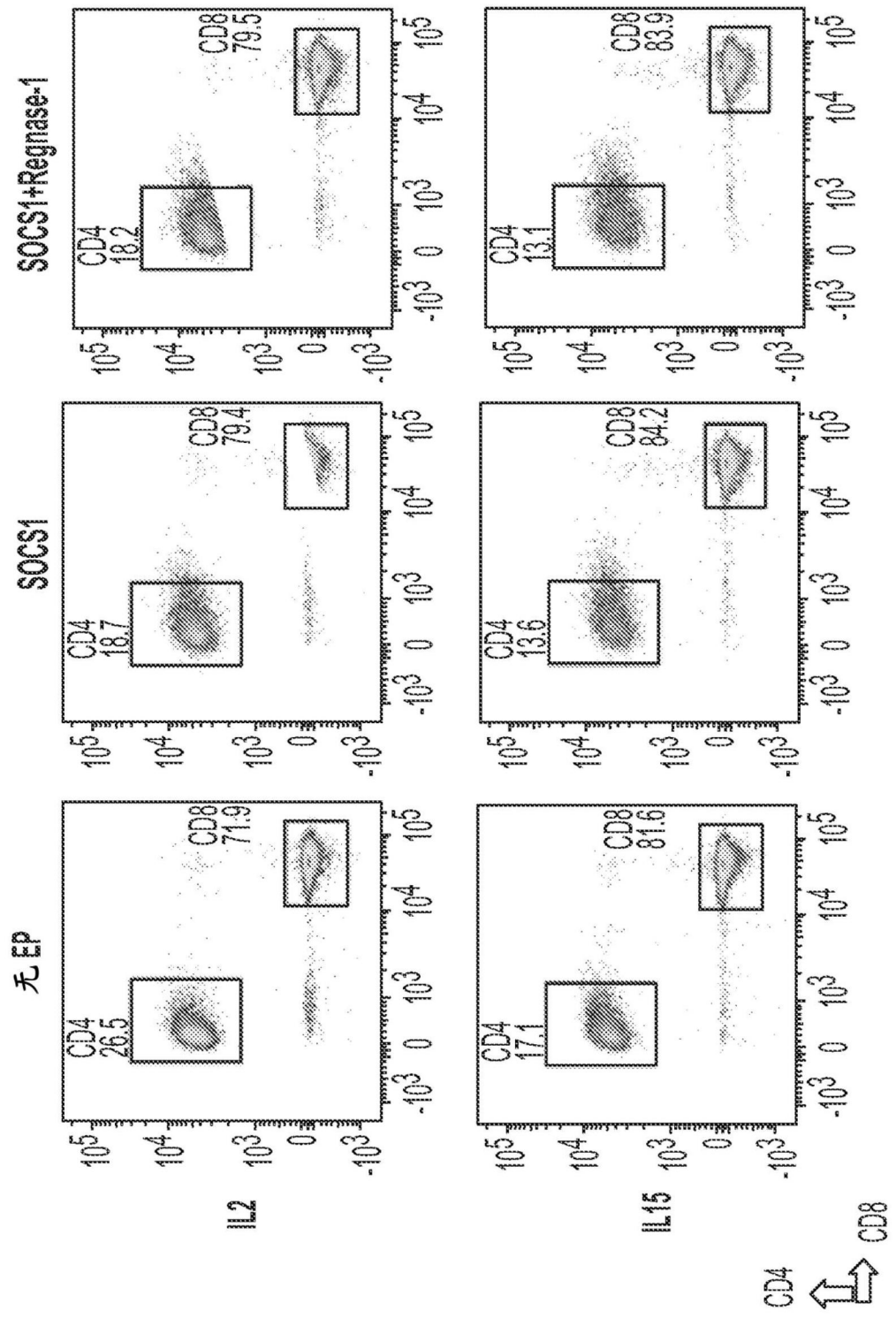

SOCS1+Regnase-1
SOCS1
无 EP
IL2
IL15
CD4
CD8
CD4 18.2
CD8 79.5
CD4 13.1
CD8 83.9
CD4 18.7
CD8 79.4
CD4 13.6
CD8 84.2
CD4 26.5
CD8 71.9
CD4 17.1
CD8 81.6

图24

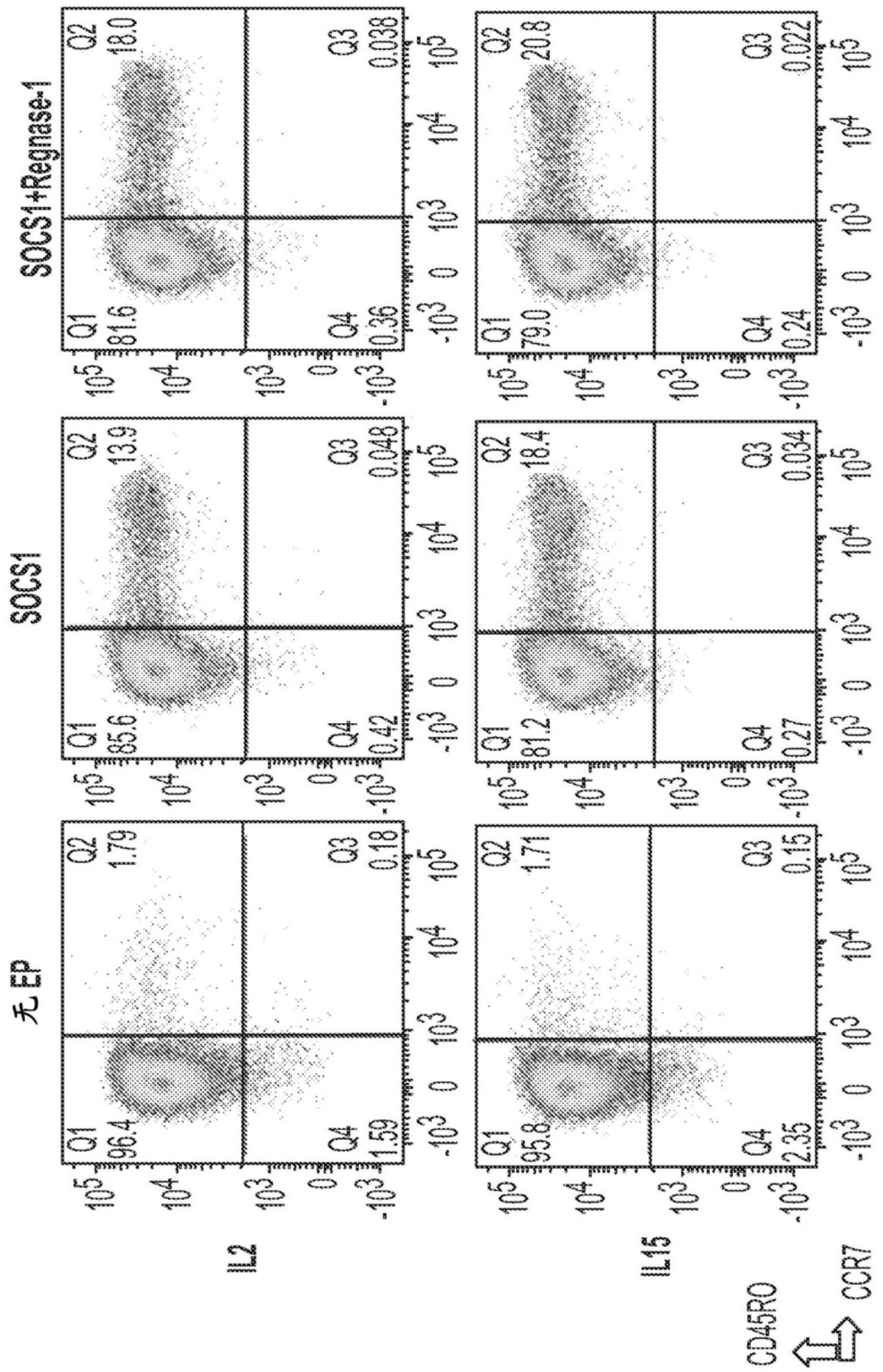

无 EP
SOCS1
SOCS1+Regnase-1
IL2
IL15
CD45RO
CCR7
Q1 96.4
Q2 1.79
Q3 0.18
Q4 1.59
Q1 85.6
Q2 13.9
Q3 0.048
Q4 0.42
Q1 81.6
Q2 18.0
Q3 0.038
Q4 0.36
Q1 95.8
Q2 1.71
Q3 0.15
Q4 2.35
Q1 81.2
Q2 18.4
Q3 0.034
Q4 0.27
Q1 79.0
Q2 20.8
Q3 0.022
Q4 0.24

图24续

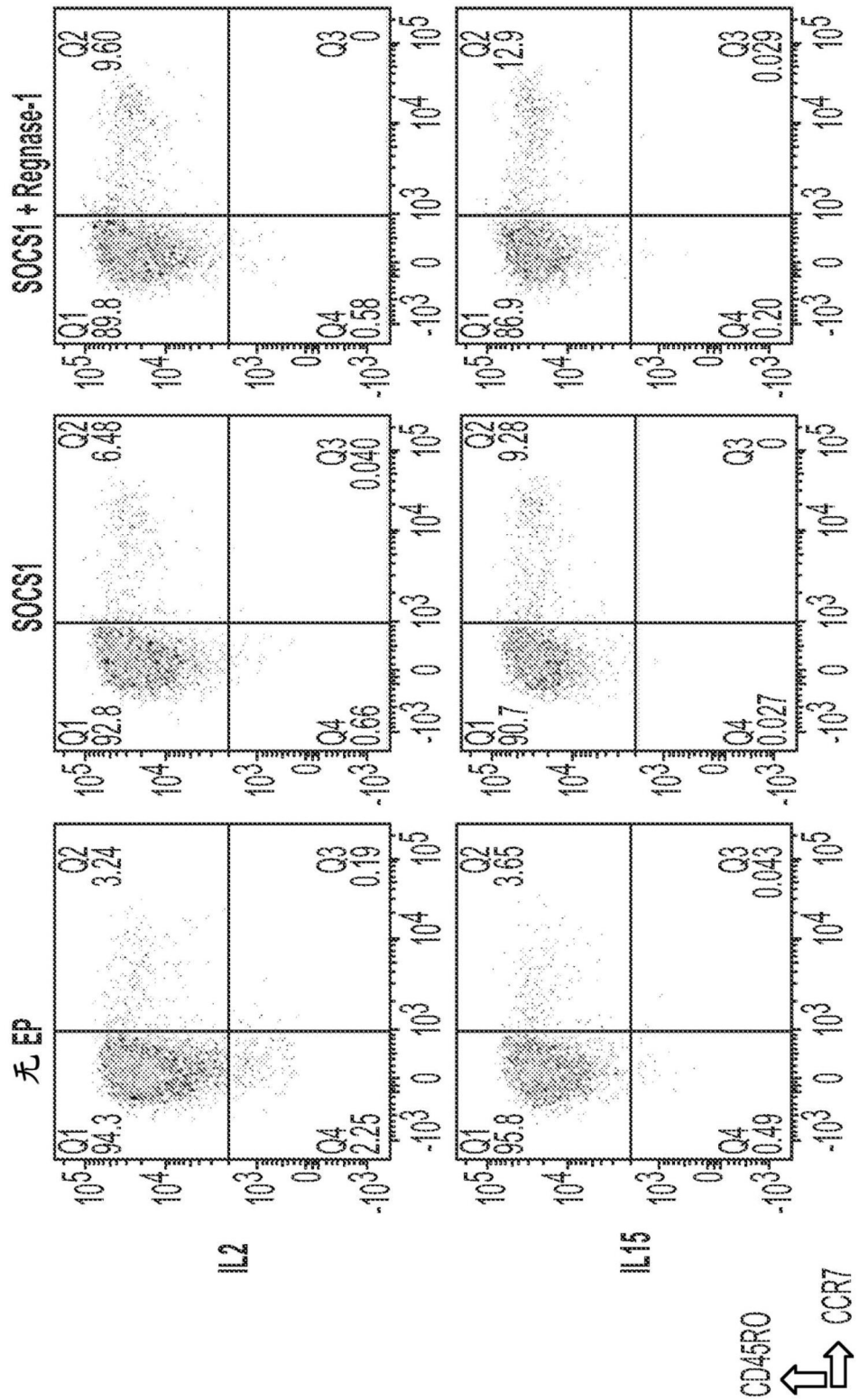

无 EP
SOCS1
SOCS1 + Regnase-1
IL2
IL15
CD45RO
CCR7
Q1 94.3
Q2 3.24
Q3 0.19
Q4 2.25
Q1 92.8
Q2 6.48
Q3 0.040
Q4 0.66
Q1 89.8
Q2 9.60
Q3 0
Q4 0.58
Q1 95.8
Q2 3.65
Q3 0.043
Q4 0.49
Q1 90.7
Q2 9.28
Q3 0
Q4 0.027
Q1 86.9
Q2 12.9
Q3 0.029
Q4 0.20

图24续

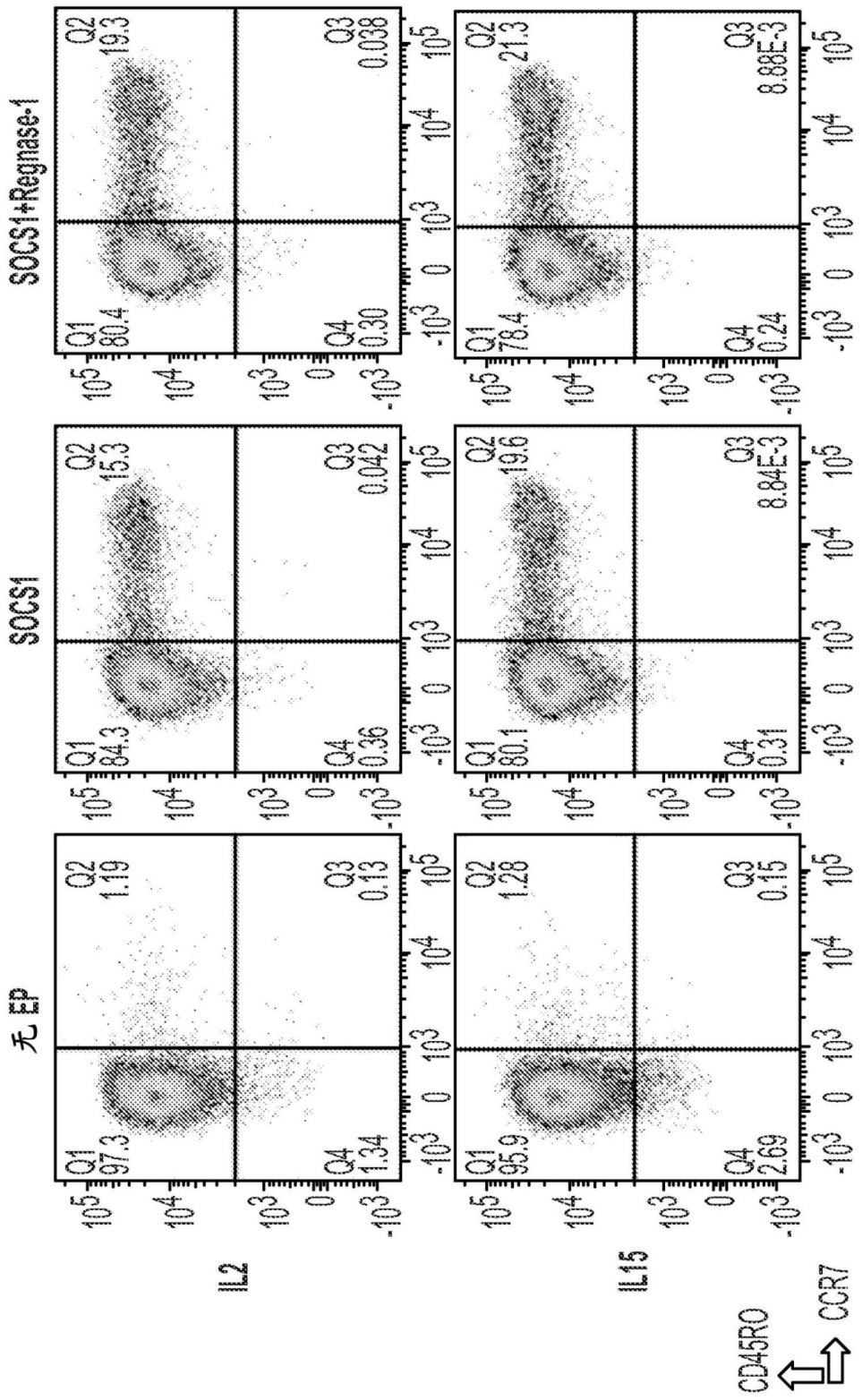

无 EP
SOCS1
SOCS1+Regnase-1
IL2
IL15
CD45RO
CCR7
Q1 97.3
Q2 1.19
Q3 0.13
Q4 1.34
Q1 95.9
Q2 1.28
Q3 0.15
Q4 2.69
Q1 84.3
Q2 15.3
Q3 0.042
Q4 0.36
Q1 80.1
Q2 19.6
Q3 8.84E-3
Q4 0.31
Q1 80.4
Q2 19.3
Q3 0.038
Q4 0.30
Q1 78.4
Q2 21.3
Q3 8.88E-3
Q4 0.24

图24续

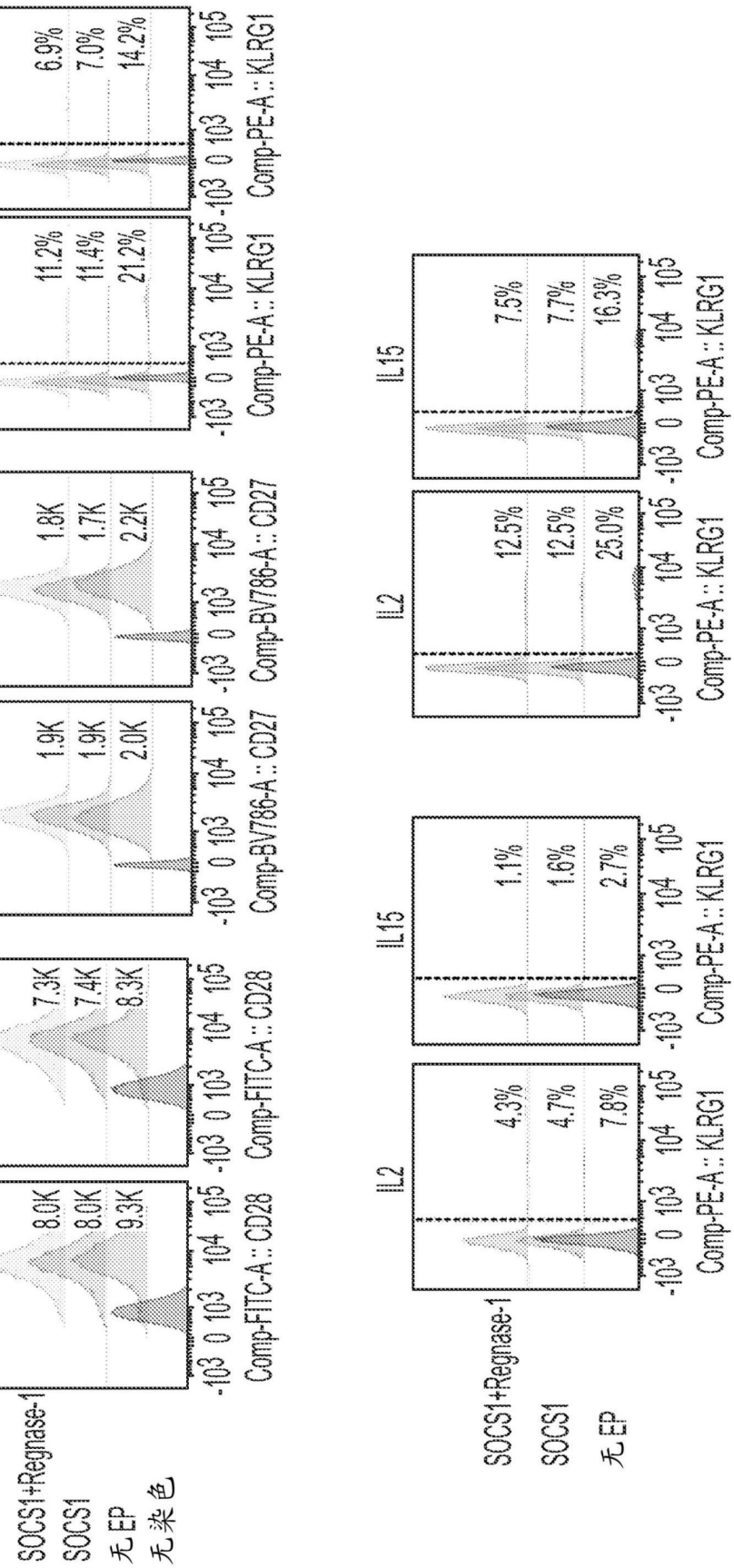

IL2
IL15
IL2
IL15
IL2
IL15
IL2
IL15
SOCS1+Regnase-1
SOCS1
无 EP
无染色
8.0K
8.0K
9.3K
7.3K
7.4K
8.3K
1.9K
1.9K
2.0K
1.8K
1.7K
2.2K
11.2%
11.4%
21.2%
6.9%
7.0%
14.2%
4.3%
4.7%
7.8%
1.1%
1.6%
2.7%
12.5%
12.5%
25.0%
7.5%
7.7%
16.3%
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
Comp-FITC-A :: CD28
Comp-BV786-A :: CD27
Comp-PE-A :: KLRG1

图25

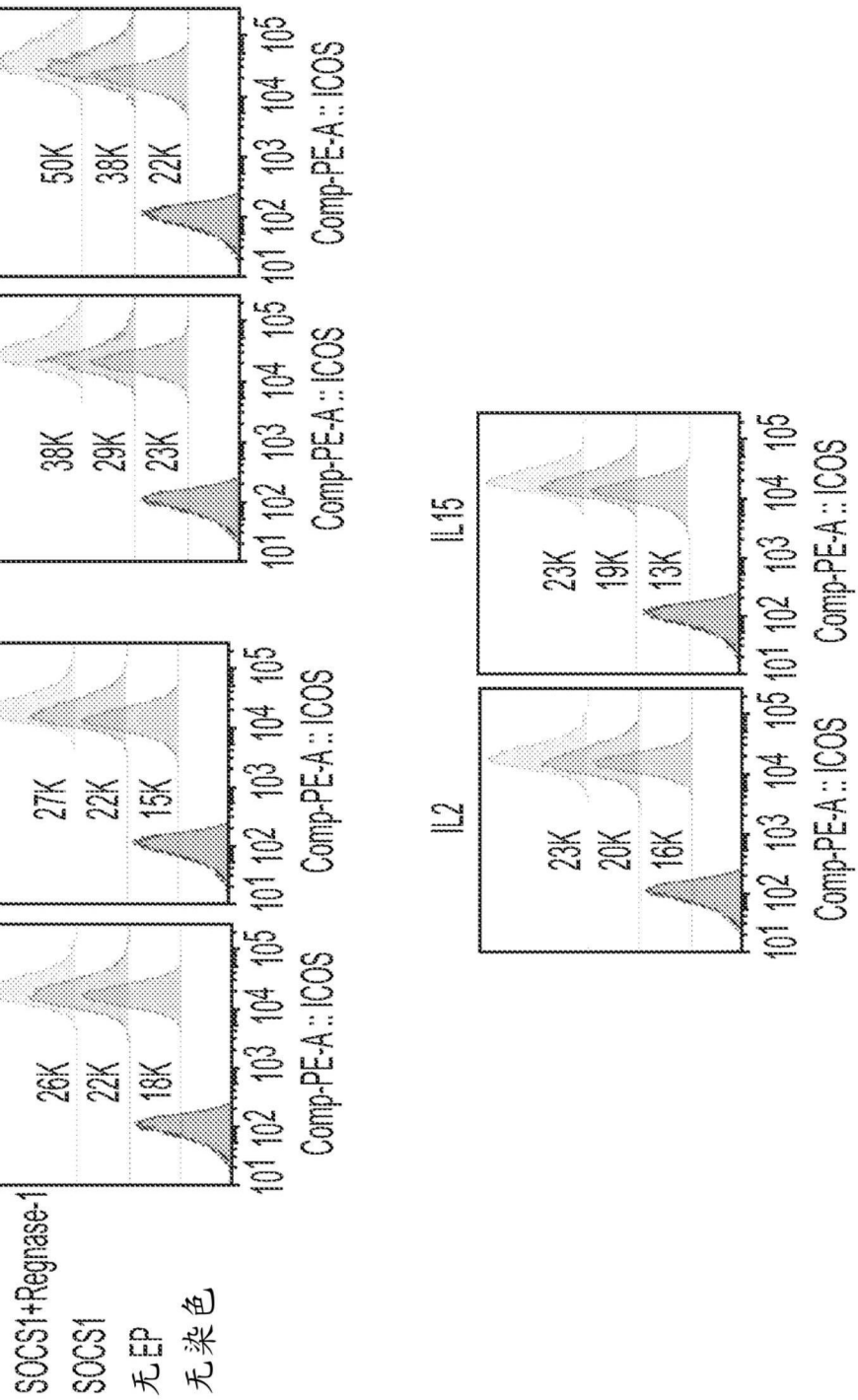

SOCS1+Regnase-1
SOCS1
无EP
无染色
IL2
IL15
IL2
IL15
26K
22K
18K
27K
22K
15K
38K
29K
23K
50K
38K
22K
23K
19K
13K
23K
20K
16K
101 102 103 104 105
Comp-PE-A :: ICOS

图26