(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 3 月 26 日 (26.03.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/057486 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/106109

(22) 国际申请日: 2019 年 9 月 17 日 (17.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811080440.7 2018年9月17日 (17.09.2018) CN

(71) 申请人: 中国科学院动物研究所 **(INSTITUTE OF ZOOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES)** [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 王皓毅 **(WANG, Haoyi)**; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。 张兴颖 **(ZHANG, Xingying)**; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。 程晨 **(CHENG, Chen)**; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。 唐娜 **(TANG, Na)**; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。 李娜 **(LI, Na)**; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院5号, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 **(NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.)**; 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** MODIFIED T CELL, PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 经修饰的T细胞、其制备方法及用途

(57) **Abstract:** Provided are a method for preparing a modified T cell, such as CAR-T cell, by means of genetic editing, the modified T cell prepared by means of the method, and the use of the modified T cell.

(57) 摘要: 提供通过基因编辑制备经修饰的T细胞例如CAR-T细胞的方法，以及通过所述方法制备的经修饰的T细胞及其用途。

WO 2020/057486 A1

经修饰的T细胞、其制备方法及用途

技术领域

本发明涉及基因编辑和肿瘤免疫疗法领域。具体而言，本发明涉及通过基因编辑制备经修饰的T细胞例如CAR-T细胞的方法，以及通过所述方法制备的经修饰的T细胞及其用途。

背景技术

T细胞在抗肿瘤免疫中发挥重要作用。然而，在肿瘤患者体内，特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)含量很少，其获取和体外扩增比较困难，且CTL的亲和力低，限制了其在肿瘤的临床治疗中的应用。

T细胞过继转移是近年来获得较高关注的特异性、低毒性的抗肿瘤方法。例如用T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)对 T 细胞进行遗传修饰是最常用的生成肿瘤特异性T细胞的方法。

TCR基因转移技术是从肿瘤反应性T细胞中克隆TCR的α和β链，通过基因工程技术，以逆转录病毒或慢病毒等作为载体，对初始T细胞进行抗原特异性TCR修饰，从而赋予T细胞特异性识别和杀伤肿瘤细胞的能力，并提高T细胞与肿瘤的亲和力。利用TCR基因转移技术对患者自体来源的T细胞进行TCR基因修饰，经体外扩增，获取大量具有特异高效识别能力的T细胞，再过继回输给肿瘤患者，使之在体内发挥抗肿瘤作用。

CAR 由胞外结构域、铰链、跨膜结构域和胞内结构域组成，所述胞外结构域通常衍生自单链可变片段(scFv)，所述胞内结构域具有一个或多个共刺激结构域和/或信号传导结构域(Kakarla and Gottschalk, 2014)。尽管CAR-T细胞疗法在治疗CD19阳性的恶性血液肿瘤的早期临床研究中获得成功(Daviala et al, 2014; Lee et al, 2015; Maude et al, 2014)，然而用CAR-T细胞靶向实体瘤抗原的临床应答非常有限，原因包括实体肿瘤异质性大，肿瘤微环境复杂，CAR-T细胞不容易浸润等。

因此，仍然需要获得能够有效抑制或杀伤肿瘤尤其是实体瘤的T细胞。

发明简述

在一方面，本发明提供一种制备经修饰的T细胞的方法，包括减少或消除T细胞中至少一种抑制性蛋白表达的步骤，所述抑制性蛋白选自 T 细胞表面抑制性受体和/或 T 细胞衰竭相关蛋白，例如选自TGFβ受体(如TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL或其组合。

在一些实施方案中，所述 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞。

在一些实施方案中，通过反义 RNA、antagomir、siRNA、shRNA、大范围核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶或 CRISPR 系统实施所述减少或消除。

在一些实施方案中，所述 CRISPR 系统是 CRISPR/Cas9 系统。

在一些实施方案中，所述 CRISPR/Cas9 系统靶向所述 T 细胞内选自 SEQ ID NO:1-21 中一或多种的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述 TCR 或 CAR 包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域。

在一些实施方案中，所述肿瘤相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

在一些实施方案中，所述抗原结合结构域选自单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述 CAR 包含针对间皮素的 scFv、CD8 铰链区、CD28 跨膜结构域、CD28 共刺激结构域、和 CD3ζ 信号转导结构域。

在一些实施方案中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供一种通过本发明的方法制备的经修饰的 T 细胞。

在另一方面，本发明提供一种修饰的 T 细胞，其中与未修饰的 T 细胞相比，所述 T 细胞中的至少一种抑制性蛋白的表达被减少或消除，所述抑制性蛋白选自是 T 细胞表面抑制性受体和/或 T 细胞衰竭相关蛋白，例如选自 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、 LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL 或其组合。

在一些实施方案中，所述 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞。

在一些实施方案中，所述 TCR 或 CAR 包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域。

在一些实施方案中，所述肿瘤相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

在一些实施方案中，所述所述抗原结合结构域选自单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

在一些实施方案中，所述所述 CAR 包含针对间皮素的 scFv、CD8 铰链区、CD28 跨膜结构域、CD28 共刺激结构域、和 CD3ζ 信号转导结构域。

在一些实施方案中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列。

在另一方面，本发明提供本发明的经修饰的 T 细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

在另一方面，本发明提供一种用于治疗癌症的药物组合物，包含本发明的经修饰的 T 细胞和药学可接受的载体。

在本发明各方面的实施方案中，所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法或药物组合物治疗的其他癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户

癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。在一些优选实施方式中，所述癌症是实体瘤癌症。在一些具体实施方式中，所述癌症是肺癌如肺鳞癌。在一些具体实施方式中，所述癌症是卵巢癌。在一些具体实施方式中，所述癌症是结肠癌。

在另一方面，本发明还提供试剂盒，其用于通过本发明的方法制备经修饰的 T 细胞。

附图说明

图 1 显示不同 CAR 结构。

图 2 显示具有不同 CAR 结构的 CAR-T 细胞的作用。

图 3 显示不同效靶比和处理时间下 TIGIT 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 4 显示不同效靶比和处理时间下 TIGIT 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 5 显示不同效靶比和处理时间下 BTLA 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 6 显示不同效靶比和处理时间下 BTLA 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 7 显示不同效靶比和处理时间下 CD160 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 8 显示不同效靶比和处理时间下 CD160 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 9 显示不同效靶比和处理时间下 2B4 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 10 显示不同效靶比和处理时间下 2B4 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 11 显示不同效靶比和处理时间下 CD200R 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 12 显示不同效靶比和处理时间下 CD200R 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 13 显示不同效靶比和处理时间下 BATF 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 14 显示不同效靶比和处理时间下 BATF 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 15 显示不同效靶比和处理时间下 GATA3 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 16 显示不同效靶比和处理时间下 GATA3 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 17 显示不同效靶比和处理时间下 RARA 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 18 显示不同效靶比和处理时间下 A2aR 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 19 显示不同效靶比和处理时间下 A2aR 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 20 显示不同效靶比和处理时间下 IL10Ra 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 21 显示不同效靶比和处理时间下 ADRB2 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 22 显示不同效靶比和处理时间下 DNMT3A 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 23 显示不同效靶比和处理时间下 LAYN 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 和 CRL5826-PDL1-luci 的特异性裂解。

图 24 显示不同效靶比和处理时间下 LAYN 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 HCT116-luci 和 OVCAR3-luci 的作用。

图 25 显示不同效靶比和处理时间下 PHLDA1 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 26 显示不同效靶比和处理时间下 RGS1 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 27 显示不同效靶比和处理时间下 RGS2 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 28 显示不同效靶比和处理时间下 MYO7A 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 29 显示不同效靶比和处理时间下 Fas 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 30 显示不同效靶比和处理时间下 FasL 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 31 显示不同效靶比和处理时间下 SHP1 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 32 显示不同效靶比和处理时间下 DGKA 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826-luci 的特异性裂解。

图 33 显示 TGFβ1 对 P4-CAR-T 细胞功能产生负面影响。A：在培养基中添加或不添加 5ng/ml TGFβ1 的 P4-CAR-T 细胞的 CRL5826 肿瘤细胞特异性裂解能力。B-C：在与 CRL5826 细胞温育 24 小时后，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1 时，P4-CAR-T 细胞释放的 IL-2 (B)和 IFN-γ(C)的浓度。T: T 细胞；P4：P4-CAR-T 细胞；CRL：CRL5826。

图 34 显示 TGFβ1 可诱导 P4-CAR-T 细胞向有功能的 Treg 转化。A：在与 OVCAR3 肿瘤细胞温育 3 天后，在培养基中加入或不加入 5ng /ml TGFβ1，在 P4-CAR-T 细胞上的 FOXP3 表达情况。B：TGFβ1 对 P4-CAR-T 细胞的增殖抑制能力，P4-CAR-T 细胞与 OVCAR3 肿瘤细胞一起培养 3 天，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。在进行增殖抑制测定之前，通过 FACS 分选 GFP 阳性 P4-CAR-T 细胞。C：P4-CAR-T 细胞的细胞裂解能力，其与 OVCAR3 肿瘤细胞一起培养 3 天，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。在进行细胞裂解能力测定之前，通过 FACS 分选 GFP 阳性 P4-CAR-T 细胞。

图 35 显示 TGFβ1 影响 P4-CAR-T 细胞抗原诱导的增殖能力和细胞的状态。A：在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1 时，肿瘤细胞诱导 P4-CAR-T 细胞的增殖。B：在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1 后，与 CRL5826 温育后 4 天的 P4-CAR-T 细胞的典型图像。P4：P4-CAR-T 细胞。

图 36 显示 TGFBR II sgRNA 选择。A：通过流式细胞术(FCM)和 TIDE 检测用 sgRNA-1/4/5/8 电穿孔的 HepG2 上的 TGFBR II 敲除(KO)效率。B：在条件优化后通过 FCM 和 TIDE 检测用 sgRNA-8 电穿孔的 HepG2 上的 TGFBR II 的 KO 效率。

图 37 显示敲除 TGFBR II 或 FOXP3 改善 P4-CAR-T 细胞的功能。A：P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞的肿瘤细胞特异性裂解能力，在培养基中添加 0、2.5、5 和 10ng/ml TGFβ1。效靶比(E:T)为 0.25:1。B-C：与肿瘤细胞一起培养 24 小时后，P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞释放的 IL-2 (B)和 IFN-γ(C)的浓度，在培养基中加入或不加入 5ng /ml TGFβ1。

图 38 显示敲除 TGFBR II 或 FOXP3 改善 P4-CAR-T 细胞的功能。A：在与肿瘤细胞温育 3 天后，在培养基中加入或不加入 5ng /ml TGFβ1，P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞的 FOXP3 表达。B：P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞的细胞裂解能力，其与 CRL5826 肿瘤细胞一起培养 3 天，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。在进行细胞裂解测定之前，通过 FACS 分选 GFP 阳性 P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞。

图 39 显示 TGFBR II 敲除明显改善在 TGFβ1 存在下 P4-CAR-T 细胞抗原诱导的增殖能力和细胞的状态。A：在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1 时，肿瘤细胞诱导 P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II / FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞的增殖。B：与培养基中添加或

不添加 5ng /ml TGFβ1，与肿瘤细胞孵育 4 天后，P4-CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO P4-CAR-T 细胞的典型图像。FKO：FOXP3 敲除；TKO：TGFBR II 敲除。

图 40 显示经基因编辑的 P4 CAR-T 细胞的生长曲线、GFP 阳性细胞比例和 T 细胞亚群分析。A：体外培养后 P4 CAR-T 细胞和 TGFBR II KO / FOXP3 KO P4 CAR-T 细胞的生长曲线。B：体外培养后 P4 CAR-T 细胞和 TGFBR II KO / FOXP3 KO CAR-T 细胞中 GFP 阳性细胞的比例。C：电穿孔后 6 天和 15 天 $CD4^+$和 $CD8^+$ CAR-T 细胞和 TGFBRII KO / FOXP3 KO CAR-T 细胞中的 T 细胞亚群分析。P4：P4-CAR-T 细胞；FKO：FOXP3 敲除；TKO：TGFBR II 敲除。

图 41 显示 TGBR II 或 FOXP3 敲除改善 $CD4^+$ CAR-T 细胞的功能。A：在培养基中添加 0、1.25、5 和 10ng /ml TGFβ1 的 $CD4^+$ CAR-T 细胞的肿瘤细胞特异性裂解能力。效靶比(E:T)为 1:1。B：$CD4^+$ CAR-T 细胞和 TGFBR II / FOXP3 KO $CD4^+$ CAR-T 细胞的肿瘤细胞特异性裂解能力，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。效靶比(E:T)为 1:1。C-F：与肿瘤细胞孵育 3 天后，$CD4^+$ CAR-T 细胞和 TGFBR II / FOXP3 KO $CD4^+$ CAR-T 细胞的 FOXP3 (C)、IL-2 (D)、IFN-γ (E)和 GZMB (F)的相对 mRNA 表达水平，在培养基中加入或不加入 5ng /ml TGFβ1。在 mRNA 提取之前通过 FACS 分选 GFP 阳性 CAR-T 细胞。ctrl：对照；FKO：FOXP3 KO；TKO：TGFBR II KO；CRL：CRL5826；w/o：不添加。

图 42 显示 TGBR II 或 FOXP3 敲除改善 $CD4^+$ CAR-T 细胞的功能。A：与肿瘤细胞孵育 48 小时后 $CD4^+$ CAR-T 细胞和 TGTBR II / FOXP3 KO $CD4^+$ CAR-T 细胞释放的 IL-2 (左)和 IFN- γ (右)浓度，在培养基中添加或不添加 5 ng /ml TGFβ1。B：肿瘤细胞诱导 CD4 + CAR-T 细胞和 TGTBR II / FOXP3 KO CD4 + CAR-T 细胞的增殖，在培养基中添加或不添加 5ng/ml TGFβ1。C：与肿瘤细胞孵育第 8 天，$CD4^+$ CAR-T 细胞和 TGTBR II /FOXP3 KO $CD4^+$ CAR-T 细胞的特异性裂解能力，培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。ctrl：对照；FKO：FOXP3 KO；TKO：TGFBR II KO；CRL：CRL5826。

图 43 显示 TGBR II 或 FOXP3 敲除改善 $CD8^+$ CAR-T 细胞的功能。A：在培养基中添加 0、1.25、5 和 10ng /ml TGFβ1 的 $CD8^+$ CAR-T 细胞的肿瘤细胞特异性裂解能力。效靶比(E:T)为 1:1。B：$CD8^+$ CAR-T 细胞和 TGFBR II / FOXP3 KO $CD8^+$ CAR-T 细胞的肿瘤细胞特异性裂解能力，在培养基中添加或不添加 5ng /ml TGFβ1。效靶比(E:T)为 1:1。C-F：与肿瘤细胞孵育 3 天后，$CD8^+$ CAR-T 细胞和 TGFBR II / FOXP3 KO $CD8^+$ CAR-T 细胞的 IL-2 (C)、IFN-γ (D)、GZMA (E)和 GZMB (F)的相对 mRNA 表达水平，在培养基中加入或不加入 5ng /ml TGFβ1。在 mRNA 提取之前通过 FACS 分选 GFP 阳性 CAR-T 细胞。ctrl：对照；FKO：FOXP3 KO；TKO：TGFBR II KO；CRL：CRL5826；w/o：不添加。

图 44 显示 TGBR II 或 FOXP3 敲除改善 $CD8^+$ CAR-T 细胞的功能。A：与肿瘤细胞孵育 48 小时后 $CD8^+$CAR-T 细胞和 TGTBR II/FOXP3 KO $CD8^+$CAR-T 细胞释放的 IL-2 (左)和 IFN-γ (右)浓度，在培养基中添加或不添加 5ng/ml TGFβ1。B：肿瘤细胞诱导

$CD8^+$CAR-T 细胞和 TGTBR II / FOXP3 KO $CD8^+$CAR-T 细胞的增殖，在培养基中添加或不添加 5ng/ml TGFβ1。C：与肿瘤细胞孵育第 8 天，$CD8^+$ CAR-T 细胞和 TGTBR II /FOXP3 KO $CD8^+$CAR-T 细胞的特异性裂解能力，培养基中添加或不添加 5ng/ml TGFβ1。ctrl：对照；FKO：FOXP3 KO；TKO：TGFBR II KO；CRL：CRL5826。

图 45 显示不同效靶比和处理时间下 IRF4 基因敲除的 P4 CAR-T 细胞对靶细胞 CRL5826- PDL1-luci 的特异性裂解。

图 46 示出添加 TGFβ1 后 M28z 中 PD1 mRNA 表达显著增加。

图 47 示出 TGFβ1 通过上调 PD1 加速 CAR-T 细胞耗竭，同时阻断 TGFβ 和 PD1 信号传导可以进一步改善 CAR-T 对抑制性 TME 的抗性。

图 48 示出 TGFBR II/PD1 双重编辑的 CAR-T 细胞对 PDL1 过表达的 CDX 模型具有更好的肿瘤消除作用

发明详述

一、定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。例如，本发明中使用的标准重组 DNA 和分子克隆技术为本领域技术人员熟知，并且在如下文献中有更全面的描述：Sambrook，J.，Fritsch，E.F.和 Maniatis，T.，Molecular Cloning：A Laboratory Manual；Cold Spring Harbor Laboratory Press：Cold Spring Harbor，1989(下文称为“Sambrook”)。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

“基因组”在用于真核细胞时不仅涵盖存在于细胞核中的染色体 DNA，而且还包括存在于细胞的亚细胞组分(如线粒体、质体)中的细胞器 DNA。

针对序列而言的“外源”意指来自外来物种的序列，或者如果来自相同物种，则指通过蓄意的人为干预而从其天然形式发生了组成和/或基因座的显著改变的序列。

“多核苷酸”、“核酸序列”、“核苷酸序列”或“核酸片段”可互换使用并且是单链或双链 RNA 或 DNA 聚合物，任选地可含有合成的、非天然的或改变的核苷酸碱基。核苷酸通过如下它们的单个字母名称来指代：“A”为腺苷或脱氧腺苷(分别对应 RNA 或 DNA)，“C”表示胞苷或脱氧胞苷，“G”表示鸟苷或脱氧鸟苷，“U”表示尿苷，“T”表示脱氧胸苷，“R”表示嘌呤(A 或 G)，“Y”表示嘧啶(C 或 T)，“K”表示 G 或 T，“H”表示 A 或 C 或 T，“I”表示肌苷，并且“N”表示任何核苷酸。

“多肽”、“肽”、和“蛋白质”在本发明中可互换使用，指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物，以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。术语“多肽”、“肽”、“氨基酸序列”和“蛋白质”还可包括修饰形式，包括但不限于糖基化、脂质连接、硫酸盐化、

谷氨酸残基的γ羧化、羟化和ADP-核糖基化。

如本发明所用，“表达构建体”是指适于感兴趣的核苷酸序列在细胞中表达的载体如重组载体。“表达”指功能产物的产生。例如，核苷酸序列的表达可指核苷酸序列的转录(如转录生成mRNA或功能RNA)和/或RNA翻译成前体或成熟蛋白质。

本发明的“表达构建体”可以是线性的核酸片段、环状质粒、病毒载体，或者，在一些实施方式中，可以是能够翻译的RNA(如mRNA)。

本发明的“表达构建体”可包含不同来源的调控序列和感兴趣的核苷酸序列，或相同来源但以不同于通常天然存在的方式排列的调控序列和感兴趣的核苷酸序列。

“调控序列”和“调控元件”可互换使用，指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、中间或下游(3'非编码序列)，并且影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。表达调控元件指的是能够控制感兴趣的核苷酸序列转录、RNA加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。

调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子、增强子和多腺苷酸化识别序列。

“启动子”指能够控制另一核酸片段转录的核酸片段。在本发明的一些实施方式中，启动子是能够控制细胞中基因转录的启动子，无论其是否来源于所述细胞。

如本文中所用，术语“可操作地连接”指调控元件(例如但不限于，启动子序列、转录终止序列等)与核酸序列(例如，编码序列或开放读码框)连接，使得核苷酸序列的转录被所述转录调控元件控制和调节。用于将调控元件区域可操作地连接于核酸分子的技术为本领域已知的。

“基因编辑”，也称为基因组编辑，其使用工程化的核酸酶或“分子剪刀”在生物体基因组中进行DNA插入、缺失或取代。基因编辑通过在基因组中期望的位置导致位点特异性双链断裂(DSB)，然后在修复DSB的过程中引入期望的DNA插入、缺失或取代。基因编辑通常使用大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR系统。

“大范围核酸酶”是一类具有巨大的识别位点(12-40bp的双链DNA序列)的脱氧核糖核酸内切酶，其识别位点在任何给定的基因组中通常只出现一次。例如，I-SceI大范围核酸酶所识别的18bp序列平均需要在比人基因组大20倍的基因组中才会偶然出现一次。

“锌指核酸酶”是通过将锌指DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而制备的人工限制性酶。单个ZFN的锌指DNA结合结构域通常含有3-6个单独的锌指重复序列，每个锌指重复序列可以识别例如3bp。

“转录激活因子样效应物核酸酶”是可以经工程化而可以切割特定DNA序列的限制性酶，通常通过将转录激活因子样效应物(TALE)的DNA结合结构域与DNA切割结构域融合而制备。TALE经工程化后可以结合几乎任何想要的DNA序列。

“成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)”是含有短的重复序列的原核DNA

区段。CRISPR 系统是原核免疫系统，其赋予对外来遗传元件如存在于质粒和噬菌体的元件的抗性，这种抗性提供后天免疫。在此系统中 Cas 蛋白或类似蛋白在 RNA 的指导下切割外来核酸。

如本文所用，术语“CRISPR 核酸酶”通常指在天然存在的 CRISPR 系统中存在的核酸酶，以及其修饰形式、其变体(包括切口酶突变体)、或其催化活性片段。CRISPR 核酸酶可以通过与向导 RNA(如 crRNA 和任选的 tracrRNA 或人工 gRNA(如 sgRNA))一起相互作用来识别、结合和/或切割靶核酸结构。该术语涵盖基于 CRISPR 系统的能够在细胞内实现基因编辑的任何核酸酶或其功能性变体。本领域已知多种 CRISPR 核酸酶的功能性变体，例如高特异性变体或切口酶变体。本领域技术人员知晓如何选择合适的 CRISPR 核酸酶功能性变体以实现本发明的目的。

“Cas9 核酸酶”和“Cas9”在本文中可互换使用，指的是包括 Cas9 蛋白或其片段(例如包含 Cas9 的活性 DNA 切割结构域和/或 Cas9 的 gRNA 结合结构域的蛋白)的 RNA 指导的核酸酶。Cas9 是 CRISPR/Cas(成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关系统)基因组编辑系统的组分，能在向导 RNA 的指导下靶向并切割 DNA 靶序列形成 DNA 双链断裂(DSB)。

“向导 RNA”和“gRNA”在本文中可互换使用，通常由部分互补形成复合物的 crRNA 和 tracrRNA 分子构成，其中 crRNA 包含与靶序列具有足够相似性以便指导 CRISPR 复合物(Cas9+crRNA+tracrRNA)与该靶序列序列特异性结合的序列。然而，本领域已知可以设计单向导 RNA(sgRNA)，其同时包含 crRNA 和 tracrRNA 的特征。然而，基于其他 CRISPR 核酸酶如 Cpf1 的 gRNA 的设计也在本领域技术人员的能力范围内。

“T 细胞受体(TCR)”又称 T 细胞抗原受体，是 T 细胞特异性识别和结合抗原肽-MHC 分子的分子结构，通常与 CD3 分子呈复合物形式存在于 T 细胞表面。大多数 T 细胞的 TCR 由 α 和 β 肽链组成，少数 T 细胞的 TCR 由 γ 和 δ 肽链组成。

“嵌合型抗原受体(CAR)”又称人工 T 细胞受体、嵌合型 T 细胞受体、嵌合型免疫受体，是一种人工设计的受体，可以赋予免疫效应细胞某一种特异性。普遍来讲，这一技术被用于赋予 T 细胞特异性识别肿瘤表面抗原的特性。通过这种方法，可以产生大量的靶向杀伤肿瘤细胞。

如本文所用“对象”是指患有或者易于患有可以通过本发明的方法、或药物组合物治疗的疾病(如癌症)的生物体。非限制性例子包括人、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、母牛、鹿，及其它非哺乳动物。在优选实施方案中，对象是人。

二、制备经修饰 T 细胞的方法

在第一方面，本发明提供一种制备经修饰的 T 细胞的方法，包括减少(敲低)或消除(敲除)T 细胞中至少一种抑制性蛋白表达的步骤。

如本发明所用，T 细胞“抑制性蛋白”是指与 T 细胞活性抑制相关的蛋白质。在一些实施方案中，所述抑制性蛋白选自 T 细胞表面抑制性受体或 T 细胞衰竭相关蛋白。

在一些实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体可以是识别表达于肿瘤细胞或其周围的基质细胞表面的配体的 T 细胞表面受体。此类受体的实例包括但不限于 TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、RARA或它们的组合。

在另一些实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体可以是识别肿瘤微环境中存在的分泌物例如腺苷、肾上腺素等或细胞因子如IL-10、TGFβ等的受体。此类分泌物或细胞因子可能影响T细胞的肿瘤杀伤功能。此类受体的实例包括但不限于A2aR、IL10RA、ADRB2、TGFBRII或它们的组合。

本发明人特别令人惊奇地发现，通过抑制TGFβ信号通路可以增强治疗性T细胞如CAR-T 细胞的肿瘤杀伤能力。因此，在一些优选实施方案中，所述 T 细胞表面抑制性受体是TGFβ受体。在一些优选实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体是识别抑制性细胞因子TGFβ1的T细胞受体，如TGFBRII。此外，本发明还涵盖减少(敲低)或消除(敲除)T细胞中的TGFβ信号通路相关蛋白如FOXP3的表达。在本发明一些实施方案中，减少(敲低)或消除(敲除)T细胞中TGFβ受体(如TGFBRII)和/或FOXP3的表达。

在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白是T细胞衰竭相关转录因子，例如，在衰竭的T细胞中表达显著上调的转录因子。此类转录因子的实例包括但不限于BATF、GATA3、IRF4或其组合。

据报道，衰竭的T细胞较没有衰竭的T细胞，表观遗传发生很大的变化。因此，在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白是表观遗传相关蛋白，例如甲基转移酶。在一些实施方案中，所述甲基转移酶是DNMT3A。

近年来兴起的单细胞测序技术，获得了一些在衰竭的T细胞中高表达，但是具体如何影响T细胞功能还不清楚的一类新的蛋白。此类在衰竭的T细胞中高表达的蛋白也涵盖在本发明的范围内。例如，在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白选自LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2或其组合。

在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白是与T细胞衰竭内源机制相关的蛋白，例如 T 细胞凋亡相关蛋白。此类 T 细胞衰竭内源机制相关的蛋白的实例包括但不限于SHP1、DGKa、Fas、FasL或其组合。

在一些实施方案中，本发明的方法包括减少或消除T细胞中至少1种、至少2种、至少 3 种、至少 4 种或更多种上文所述抑制性蛋白的表达，所述抑制性蛋白例如选自TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL。

在一些实施方案中，本发明的方法还包括减少或消除 T 细胞中 PD1 的表达。在一些实施方案中，本发明的方法包括减少或消除T细胞中TGFβ受体(如TGFBRII)和PD1的表达。

本发明的 T 细胞可以是通过扩增抗原特异性 T 细胞或通过遗传工程化重定向 T 细胞而产生的用于过继性免疫疗法的 T 细胞。所述 T 细胞还可以是分离自对象的原代 T

细胞。在一些实施方式中，所述T细胞是包含外源T细胞受体(TCR)的T细胞。在另一些实施方式中，所述T细胞是包含嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。在一些实施方式中，所述T细胞是$CD4^{+}$T细胞。在一些实施方式中，所述T细胞是$CD8^{+}$T细胞。

在一些实施方式中，所述方法还包括提供分离自对象的未经修饰的T细胞的步骤，以及向所述未经修饰的T细胞导入TCR或CAR的步骤。在一些实施方式中，向所述未经修饰的T细胞导入TCR或CAR的步骤在减少或消除T细胞中的抑制性蛋白表达的步骤之前或之后或同时进行。

在一些实施方式中，所述TCR或CAR包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域，例如胞外抗原结合结构域。

所述肿瘤相关抗原包括但不限于CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR变体III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域A(EDA)和额外结构域B (EDB)、腱生蛋白-C的A1结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。在一优选实施方式中，所述抗原是间皮素。

本发明中，所述抗原结合结构域例如可以是单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的单克隆抗体。在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的scFv。在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的scFv P4，例如，其氨基酸序列示于SEQ ID NO：22。

在一些实施方式中，所述CAR包含跨膜结构域，例如CD8跨膜结构域或CD28跨膜结构域，优选CD28跨膜结构域，例如氨基酸序列示于SEQ ID NO：23的CD28跨膜结构域。

在一些实施方式中，所述CAR进一步包括位于胞外抗原结合结构域和所述跨膜结

构域之间的铰链区域，例如，所述铰链区域为CD8铰链区，例如氨基酸序列示于SEQ ID NO：24的CD8铰链区。

在一些实施方式中，所述CAR包含可用于T细胞活化的信号转导结构域，例如选自TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的信号转导结构域。在一些优选实施方式中，所述CAR包含CD3ζ信号转导结构域，例如氨基酸序列示于SEQ ID NO：25的CD3ζ信号转导结构域。

在一些实施方式中，所述CAR还包含一或多个选自CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB和4-1BBL的共刺激结构域。在一些实施方案中，所述CAR包含CD28共刺激结构域，例如氨基酸序列示于SEQ ID NO：26的CD28共刺激结构域。

在一些实施方式中，所述CAR还可以包含用于显示或追踪CAR表达的报道分子，如GFP蛋白。

在本发明一些优选实施方式中，所述CAR包含针对间皮素的scFv P4、CD8铰链区、CD28跨膜结构域、CD28共刺激结构域、CD3ζ信号转导结构域和任选的GFP蛋白。在本发明一些优选实施方式中，所述CAR包含SEQ ID NO：27所示氨基酸序列。

本领域已知若干在细胞中减少或消除蛋白质表达的方法。在一些实施方式中，通过导入反义RNA、antagomir、siRNA、shRNA减少或消除T细胞中抑制性蛋白的表达。在另一些实施方式中，通过基因编辑的方法，例如通过导入大范围核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶或CRISPR系统减少或消除T细胞中抑制性蛋白的表达。在本发明方法优选的实施方式中，使用CRISPR系统减少或消除T细胞中抑制性蛋白的表达。

在一些实施方式中，CRISPR 系统使用的核酸酶(CRISPR 核酸酶)例如可以选自Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csf1、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3或C2c2蛋白，或这些核酸酶的功能性变体。

在一些具体实施方式中，所述CRISPR系统是CRISPR/Cas9系统。在一些具体实施方式中，所述CRISPR系统例如CRISPR/Cas9系统靶向所述细胞中选自SEQ ID NO:1-21和28-31中的一或多个核苷酸序列。

在一些实施方式中，所述CRISPR系统在体外组装，并转入T细胞。在一些实施方式中，将编码所述CRIPSR系统的所有元件的表达构建体转入T细胞。在一些实施方式中，将编码所述CRIPSR系统的部分元件的表达构建体以及其它已转录或已翻译的元件转入T细胞。

本发明还提供一种用于制备经修饰的T细胞的CRISPR基因编辑系统，其包含以下i)至v)中至少一项：

i) CRISPR核酸酶，和至少一种向导RNA；

ii) 包含编码CRISPR核酸酶的核苷酸序列的表达构建体，和至少一种向导RNA；

iii) CRISPR核酸酶，和包含编码至少一种向导RNA的核苷酸序列的表达构建体；

iv) 包含编码 CRISPR 核酸酶的核苷酸序列的表达构建体，和包含编码至少一种向导 RNA 的核苷酸序列的表达构建体；

v) 包含编码 CRISPR 核酸酶的核苷酸序列和编码至少一种向导 RNA 的核苷酸序列的表达构建体；

其中所述至少一种向导 RNA 靶向 T 细胞中的抑制性蛋白编码基因，所述抑制性蛋白选自 T 细胞表面抑制性受体和/或 T 细胞衰竭相关蛋白，例如选自 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL 或其组合。在一些实施方案中，其中所述至少一种向导 RNA 还包括靶向 T 细胞中的 PD1 编码基因的向导 RNA。在一些实施方案中，其中所述至少一种向导 RNA 包括靶向 T 细胞中的 TGFβ 受体(如 TGFBRII)和 PD1 编码基因的向导 RNA。

在一些具体实施方案中，所述至少一种向导 RNA 靶向 T 细胞中选自 SEQ ID NO:1-21 和 28-31 中的一或多个核苷酸序列。

在一些实施方式中，所述 CRISPR 核酸酶例如可以选自 Cas3、Cas8a、Cas5、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1、Cse2、Csy1、Csy2、Csy3、GSU0054、Cas10、Csm2、Cmr5、Cas10、Csx11、Csx10、Csf1、Cas9、Csn2、Cas4、Cpf1、C2c1、C2c3 或 C2c2 蛋白，或这些核酸酶的功能性变体。在一些具体实施方式中，所述 CRISPR 核酸酶是 Cas9 核酸酶或其功能性变体。

在本发明的方法的一些实施方案中，包括将本发明的 CRISPR 基因编辑系统导入所述 T 细胞。在一些实施方案中，本发明的 CRISPR 基因编辑系统在导入所述 T 细胞后，导致减少或消除所靶向的蛋白的表达(敲低或敲除)。

本发明的 CRISPR 系统可以通过本领域已知的方法转入 T 细胞，例如：磷酸钙转染、原生质融合、电穿孔、脂质体转染、微注射、病毒感染(如杆状病毒、痘苗病毒、腺病毒和其他病毒)等。

本发明的经修饰的 T 细胞可以在任何修饰步骤之前或之后被活化和扩增。T 细胞可以在体外或体内扩增。通常，本发明的 T 细胞可以例如通过与刺激 CD3 TCR 复合物和 T 细胞表面上的共刺激分子以产生 T 细胞活化信号的试剂接触来扩增。例如，可以使用诸如钙离子载体 A23187、佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(PMA)、或有丝分裂凝集素如植物血凝素(PHA)的化学品来产生 T 细胞的活化信号。在一些实施方案中，T 细胞群体可以通过在体外与例如抗 CD3 抗体或其抗原结合片段、或固定在表面上的抗 CD2 抗体接触被活化，或通过与蛋白激酶 C 激活剂(例如，苔藓抑素)连同钙离子载体的接触来活化。例如，在适合于刺激 T 细胞增殖的条件下，T 细胞群可与抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体接触。适用于 T 细胞培养的条件包括可能含有增殖和活力所必需的因子的合适培养基(例如 Minimal Essential Media 或 RPMI Media 1640、或 X-vivo 5、(Lonza))，其中必需的因子包括血清(例如胎牛或人类血清)、白介素-2(IL-2)、胰岛素、IFN-γ、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGFβ 和 TNF，或本领域技术人员已知的用于细胞生长

的添加剂。其它用于细胞生长的添加剂包括但不限于表面活性剂、人血浆蛋白粉、和还原剂如N-乙酰-半胱氨酸和2-巯基乙酸。培养基可以包括RPMI 1640、A1M-V、DMEM、MEM、a-MEM、F-12、X-Vivo 1和X-Vivo 20、Optimizer、氨基酸、丙酮酸钠和维生素、无血清或适量补充的血清(或血浆)或一组明确的激素、和/或一定量的足以使T细胞生长和扩增的细胞因子。靶细胞可以保持在支持生长所必需的条件下，例如适当的温度(例如37℃)和环境(例如，空气加5%CO2)。

三、经修饰的T细胞

在本发明的另一方面，提供了经修饰的T细胞，其中与未修饰的T细胞相比，所述经修饰的T细胞中的抑制性蛋白的表达被减少或消除。在一些实施方式中，所述经修饰的T细胞通过本发明的方法制备。

在一些实施方案中，所述抑制性蛋白选自T细胞表面抑制性受体或T细胞衰竭相关蛋白

在一些实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体可以是识别表达于肿瘤细胞或其周围的基质细胞表面的配体的 T 细胞表面受体。此类受体的实例包括但不限于 TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、RARA或它们的组合。

在另一些实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体可以是识别肿瘤微环境中存在的分泌物例如腺苷、肾上腺素等或细胞因子如IL-10、TGFβ等的受体。此类分泌物或细胞因子可能影响T细胞的肿瘤杀伤功能。此类受体的实例包括但不限于A2aR、IL10RA、ADRB2、TGFBRII或它们的组合。

本发明人特别令人惊奇地发现，通过抑制TGFβ信号通路可以增强治疗性T细胞如CAR-T细胞的肿瘤杀伤能力。因此，在一些优选实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体是TGFβ受体。在一些优选实施方案中，所述T细胞表面抑制性受体是识别抑制性细胞因子TGFβ1的T细胞受体，如TGFBRII。此外，本发明还涵盖TGFβ信号通路相关蛋白如FOXP3的表达被减少(敲低)或消除(敲除) 的T细胞。在本发明一些实施方案中，T细胞中TGFβ受体(如TGFBRII)和/或FOXP3的表达被减少(敲低)或消除(敲除)。在本发明一些实施方案中，T细胞中TGFβ受体(如TGFBRII)和/或PD1的表达被减少(敲低)或消除(敲除)。

在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白是T细胞衰竭相关转录因子，例如，在衰竭的T细胞中表达显著上调的转录因子。此类转录因子的实例包括但不限于BATF、GATA3、IRF4或其组合。

据报道，衰竭的T细胞较没有衰竭的T细胞，表观遗传发生很大的变化。因此，在一些实施方案中，所述T细胞衰竭相关蛋白是表观遗传相关蛋白，例如甲基转移酶。在一些实施方案中，所述甲基转移酶是DNMT3A。

近年来兴起的单细胞测序技术，获得了一些在衰竭的T细胞中高表达，但是具体如何影响T细胞功能还不清楚的一类新的蛋白。此类在衰竭的T细胞中高表达的蛋白也涵

盖在本发明的范围内。例如，在一些实施方案中，所述 T 细胞衰竭相关蛋白选自 LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2 或其组合。

在一些实施方案中，所述 T 细胞衰竭相关蛋白是与 T 细胞衰竭内源机制相关的蛋白，例如 T 细胞凋亡相关蛋白。此类 T 细胞衰竭内源机制相关的蛋白的实例包括但不限于 SHP1、DGKA、Fas、FasL 或其组合。

在一些实施方案中，与未修饰的 T 细胞相比，本发明的经修饰的 T 细胞中至少 1 种、至少 2 种、至少 3 种、至少 4 种或更多种上文所述抑制性蛋白的表达被减少或消除，所述抑制性蛋白例如选自 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL。在一些进一步的实施方案中，与未修饰的 T 细胞相比，本发明的经修饰的 T 细胞中 PD1 的表达被减少或消除。在一些实施方案中，与未修饰的 T 细胞相比，本发明的经修饰的 T 细胞中 TGFβ 受体(如 TGFBRII)和 PD1 的表达被减少或消除。

在一些实施方式中，所述 T 细胞中编码所述抑制性蛋白的基因被敲除，例如通过导入本发明的基因编辑系统而敲除。

在本发明中，所述经修饰的 T 细胞具有与未修饰的 T 细胞相当的扩增能力和类似的免疫特性，并且由于免疫抑制被解除而具有增强的生物学活性，例如抗肿瘤活性，尤其是抑制或杀伤实体瘤细胞的活性。

本发明中，所述 T 细胞可以是包含外源 T 细胞受体(TCR)的 T 细胞，或者所述 T 细胞可以是包含嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞(CAR-T 细胞)。在本发明一些优选实施方式中，所述经修饰的 T 细胞是 CAR-T 细胞。

在一些实施方式中，所述 TCR 或 CAR 包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域，例如胞外抗原结合结构域。

所述肿瘤相关抗原包括但不限于 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、 CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223) 、 SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25) 、 GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1) 、 FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。在一优选实施方式中，所述抗原是间皮素。

本发明中，所述抗原结合结构域例如可以是单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的单克隆抗体。在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的 scFv。在一优选实施方式中，所述抗原结合结构域是针对间皮素的 scFv P4，其氨基酸序列示于 SEQ ID NO：22。

在一些实施方式中，所述 CAR 包含跨膜结构域，例如 CD8 跨膜结构域或 CD28 跨膜结构域，优选 CD28 跨膜结构域，例如氨基酸序列示于 SEQ ID NO：23 的 CD28 跨膜结构域。

在一些实施方式中，所述 CAR 进一步包括位于胞外抗原结合结构域和所述跨膜结构域之间的铰链区域，例如，所述铰链区域为 CD8 铰链区，例如氨基酸序列示于 SEQ ID NO：24 的 CD8 铰链区。

在一些实施方式中，所述 CAR 包含可用于 T 细胞活化的信号转导结构域，例如选自 TCRζ、FcRγ、FcRβ、FcRε、CD3γ、CD3δ、CD3ε、CD3ζ、CD5、CD22、CD79a、CD79b 和 CD66d 的信号转导结构域。在一些优选实施方式中，所述 CAR 包含 CD3ζ 信号转导结构域，例如氨基酸序列示于 SEQ ID NO：25 的 CD3ζ 信号转导结构域。

在一些实施方式中，所述 CAR 还包含一或多个选自 CD3、CD27、CD28、CD83、CD86、CD127、4-1BB 和 4-1BBL 的共刺激结构域。在一些实施方案中，所述 CAR 包含 CD28 共刺激结构域，例如氨基酸序列示于 SEQ ID NO：26 的 CD28 共刺激结构域。

在一些实施方式中，所述 CAR 还可以包含用于显示或追踪 CAR 表达的报道分子，如 GFP 蛋白。

在本发明一些优选实施方式中，所述 CAR 包含针对间皮素的 scFv P4、CD8 铰链区、CD28 跨膜结构域、CD28 共刺激结构域、CD3ζ 信号转导结构域和任选的 GFP 蛋白。在本发明一些优选实施方式中，所述 CAR 包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列。

在本发明一具体实施方式中，所述经修饰的 T 细胞是包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列的 CAR 的 CAR-T 细胞，其中至少一种选自以下的抑制蛋白或抑制蛋白的组合的表达被减少或消除 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL 或其任意组合。

本发明的 T 细胞可以通过各种非限制性方法从许多非限制性来源获得，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中，细胞可以衍生自健康供体或来自诊断为癌症的患者。在一些实施方

案中，细胞可以是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的一部分。在一些实施方式中，所述 T 细胞是 $CD4^{+}$T 细胞。在一些实施方式中，所述 T 细胞是 $CD8^{+}$T 细胞。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自对象的自体细胞。如本文所用，“自体”是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞，并根据需要进行复制，从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

本发明的 CAR T 细胞或 TCR T 细胞可以通过本领域已知的多种手段制备。例如，可以用包含 CAR 或 TCR 编码序列的表达构建体转导 T 细胞来获得 CAR-T 细胞或 TCR-T 细胞。本领域技术人员能够容易地构建适合于蛋白表达的表达构建体例如病毒载体。

四、药物组合物和应用

在本发明的另一方面，还提供一种用于治疗癌症的药物组合物，其包含本发明的经修饰的 T 细胞和药学可接受的载体。此外，本发明还提供本发明的经修饰的 T 细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。

在本发明的另一方面，还提供一种用于治疗癌症的方法，包括给有需要的对象施用治疗有效量的本发明的经修饰的 T 细胞或本发明的药物组合物。

在一些实施方式中，所述方法还进一步包括给所述对象施用放疗和/或化疗和/或另外的肿瘤靶向药物(例如靶向其它抗原的单克隆抗体或小分子化合物)。

如本文所用，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”或“有效量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或细胞的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

例如，“有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如，对于肿瘤的治疗，相对于未接受治疗的对象，“有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地将肿瘤细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查抑制肿瘤细胞生长的能力来评价，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。

实际应用中，本发明药物组合物中细胞的剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本发明特定组合

物的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

令人惊奇的是，本发明的经修饰的 T 细胞，相对于对照 T 细胞(抑制蛋白的表达未被减少或消除)，能够以更低的剂量实现更优的治疗效果。例如，本发明的经修饰的 T 细胞能够在低效靶比和/或更长的时间上获得比对照 T 细胞更优的肿瘤杀伤效果。这特别有利于减少制备时间和成本，同时能够减少高剂量施用时带来的副作用。

例如，本发明的经修饰的 T 细胞的施用剂量比所述抑制蛋白的表达未被减少或消除的对照 T 细胞的施用剂量低约 2 倍、低约 3 倍、低约 4 倍、低约 5 倍、低约 6 倍、低约 7 倍、低约 8 倍、低约 9 倍、低约 10 倍、低约 15 倍、低约 20 倍、低约 30 倍、低约 40 倍、低约 50 倍、低约 100 倍、低约 150 倍、低约 200 倍或更低。

可通过本发明的细胞或药物组合物治疗的癌症的非限制性的例子包括肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法或药物组合物治疗的其他癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。优选地，所述癌症是实体瘤癌症。在一些具体实施方式中，所述癌症是肺癌如肺鳞癌。在一些具体实施方式中，所述癌症是卵巢癌。在一些具体实施方式中，所述癌症是结肠癌。

五、试剂盒

本发明还提供一种试剂盒，其用于本发明的制备经修饰 T 细胞的方法，所述试剂盒包含本文所述的用于制备经修饰的 T 细胞的 CRISPR 基因编辑系统，以及合适的将所述基因编辑系统导入细胞中的试剂。

在一些实施方案中，所述试剂盒包含 CRISPR 核酸酶例如 Cas9 蛋白。在一些实施方案中，所述试剂盒包含一或多种 sgRNA，例如，所述 sgRNA 靶向 SEQ ID NO：1-21 和 28-31 中任意一或多种靶序列。在另一些实施方式中，所述试剂盒包含用于体外转录 sgRNA 的试剂。

所述试剂盒还可以包含用于检测 T 细胞、分离 T 细胞、活化 T 细胞和/或扩增 T 细

胞的试剂。所述试剂盒还可以包含用于将 CAR 或 TCR 导入 T 细胞的试剂、检测和/分离表达所述 CAR 或 TCR 的细胞的试剂。所述试剂盒还可以包含实施本发明方法的说明。

实施例

通过参考在此给出的一些具体实施例可获得对本发明的进一步的理解，这些实施例仅用于说明本发明，其无意于对本发明的范围做出任何限制。显然，可以对本发明作出多种改动和变化而不脱离本发明的实质，因此，这些改动和变化同样在本申请要求保护的范围内。

实验材料与方法

1. sgRNA 的体外转录

首先由生物公司合成包含 T7 启动子和 20bp 靶序列(sgRNA)的正向引物，然后以 pX330 质粒(Addgene plasmid #4223)为 PCR 模板体外扩增 T7-sgRNA PCR 产物并利用 PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物。再以纯化的 T7-sgRNA PCR 产物为模板，利用 MEGAshortscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific)体外转录 sgRNA，并用 MEGAclear columns (Thermo Fisher Scientific)回收 sgRNA，用无 RNA 酶的去离子水溶解 sgRNA，分装冻存或备用。

待敲除基因名称	Genbank Gene ID	sgRNA 靶序列	SEQ ID NO:
TIGIT	201633	tcctcctgatctgggcccag	1
BTLA	151888	aagacattgcctgccatgct	2
CD160	11126	tgcaggatgctgttggaacc	3
2B4(CD244)	51744	gatacaccttgaggagcagg	4
CD200R(CD200R1)	131450	cctaggttagcagttctcca	5
BATF	10538	gctgtcggagctgtgaggca	6
GATA3	2625	ttccgtagtagggcgggacg	7
IRF4	3662	ctgatcgaccagatcgacag	8
RARA	5914	ccattgaggtgcccgccccc	9
A2aR	135	ctcctcggtgtacatcacgg	10
IL10RA	3587	gcgccgccagcagcactacg	11
ADRB2	154	caagaaggcgctgccgttcc	12
LAYN	143903	tagcgcggttcccggcctca	13
MYO7A	4647	agcttcaccaccgccccgat	14
PHLDA1	22822	ggcgcacgcctcattaactt	15
RGS1	5996	gtcgtctagaagtgaatgag	16

RGS2	5997	agacccatggacaagagcgc	17
SHP1	5777	tcggcccagtcgcaagaacc	18
DGKA	1606	gttgcttggacctcttcaga	19
Fas	355	gagggtccagatgcccagca	20
FasL	356	gtaattgaagggctgctgca	21

2. Cas9 蛋白与 sgRNA 的复合

首先在无 RNA 酶的 EP 管中加入适量的相应的 sgRNA，然后缓慢加入 Cas9 蛋白，轻混匀，室温孵育 15 分钟，形成核糖核蛋白(RNP)备用。

3. 电穿孔转化方法

1) 使用 P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit；
2) 向 12 孔板中加入 1.5ml/孔完全培养基 37 摄氏度预热 30min 以上；同时用 15ml 离心管预热一支培养基；预热 50ml PBS
3) 向 RNase-free EP 管中分别加入相应的 sgRNA，然后缓慢加入相应量的 Cas9 蛋白，轻轻混匀，室温孵育 20min，形成 RNP 复合物；
4) 配置电转缓冲液: 100ul 体系： nuclepfector 溶液 82μl + 18μl supplement；
5) 在 sgRNA 和 cas9 蛋白孵育的期间，准备电转所需的细胞：
6) 收集活化 3 天的 T 细胞，并计数，取出所需要的细胞量(3e6 细胞/样品)；
7) 200g，室温离心 5min；
8) 弃上清，用预热好的 PBS 将细胞洗一次，200g，室温离心 5min；
9) 弃上清，尽量去除残留液体；
10) 用配好的电转缓冲液重悬细胞，轻柔混匀；
11) 从重悬好的细胞中取出 200μl /样品(包括复孔)加入孵育好的 RNP 中，轻柔混匀，然后将混合物 100μl/样品 加入电转杯；
12) 电转，程序为 stimulated T cells(EO-115)；
13) 迅速向电转后的电转杯中加入预热好的培养基 500μl，用移液管轻混匀，吸出细胞，加入预热好的 12 孔板中，将细胞放回培养箱培养，37℃，5%CO2；
14) 电转 6 小时后半量换液，小心从培养箱取出细胞，不要晃动，沿着孔壁小心吸出 1ml/孔培养基，然后向培养孔中补充 1ml 预热好的 T 细胞培养基；
15) 之后根据细胞生长状态，按时传代，维持细胞密度在 1e6 细胞/ml。

4. CD3+细胞的分离及 CAR-T 细胞的制备

将外周血或者脐带血用淋巴细胞分离液(Histopaque-1077)分选成单个核细胞(PBMC)后，再将 PBMC 用 EasySeq human T cell Enrichment 的试剂盒将 CD3+细胞分离出来。

得到 CD3+细胞后，进行 CAR 慢病毒侵染，得到 CAR-T 细胞。

随后如上所述，将各 RNP 电穿孔进入 CAR-T 细胞中，将靶基因敲除，得到基因编辑后的 CAR-T 细胞。

5. 肿瘤细胞系

肿瘤细胞 CRL5826(NCI-H226 人肺鳞癌细胞系)、OVCAR3(人卵巢癌细胞)和 HCT116(人结肠癌细胞)购买于 ATCC，全部表达抗原 Mesothelin。将细胞系用用于表达 luciferase 的病毒进行侵染，得到稳定表达 luciferase 的细胞系(CRL5826-luci、OVCAR3-luci、HCT116-luci)。在此基础上再转染表达 PDL1 的病毒，得到高表达 PDL1 的细胞系(CRL5826-PDL1-luci)。

6. CAR-T 细胞的体外杀伤

将肿瘤细胞以 10^4/100ul 的密度放到 micro-assay-plate 的 96 孔板中(greiner bio-one)。将 CAR-T 细胞精确计数，按不同的效应细胞:靶细胞比例进行稀释，加入到相应的孔中 100ul，对照组是加入 100ul 的培养基。到达时间后，所有的孔加入 Steady-Glo® Luciferase Assay System 10ul，5 分钟后，在酶标仪下读数。得到读数后，计算杀伤的百分比：杀伤(%) = 100-(实验组读数/对照组读数)*100

实施例 1、具有不同 CAR 结构的 CAR-T 细胞的作用

设计了 4 种结构的 CAR (P4-z、P4-BBz、P4-28z 和 P4-28BBz，结构如图 1 所示，其中 P4 是抗间皮素 scFv)，并制备 CAR-T 细胞。

以 1:1 的效应细胞:靶细胞比例，将所得到的 CAR-T 细胞与 H226 细胞共培养 20h，测量 IFN-γ 和 IL-2 的释放。

以 2:1 的效应细胞:靶细胞比例，将所得到的 CAR-T 细胞与表达荧光素酶的 H226 细胞(H226-luci)共培养 3 天，通过测量剩余肿瘤细胞的荧光素酶活性计算靶细胞裂解的百分比。

如图 2 所示，与 P4-z、P4-BBz 和 P4-28BBz 相比，P4-28z 显示更高的 IFN-γ 和 IL-2 的释放(图 2A)，以及更高的特异性细胞裂解(图 2B，*表示 $P<0.05$，****表示 $P<0.0001$)。

以下实验均使用包含 P4-28z 的 CAR-T 细胞，简称 P4-CAR-T 细胞。

实施例 2、CAR-T 细胞中抑制性受体的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了 CAR-T 细胞中抑制性受体 TIGIT、BTLA、CD160、2B4 和 CD200R 通过基因编辑被敲除后对肿瘤杀伤的影响。

TIGIT 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 3)

TIGIT 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1”1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中

表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 4)

BTLA 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 5)

BTLA 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 6)

CD160 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤效果。(图 7)

CD160 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 8)

2B4 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果。(图 9)

2B4 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 10)

CD200R 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤效果。(图 11)

CD200R 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 12)

实施例 3、CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭相关转录因子的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了 CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭相关转录因子 BATF、GATA3、IRF4、RARA 通过基因编辑被敲除后对肿瘤杀伤的影响。

BATF 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中比对照 CAR-T 细胞非常明显的杀伤优势。(图 13)

BATF 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞非常明显的杀伤优势。(图 14)

GATA3 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时

间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果。(图 15)

GATA3 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果。(图 16)

RARA 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2：1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天 RARA 敲除组均表现出很强的杀伤优势。(图 17)

IRF4 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci-PDL1 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，敲除组表现出比对照 CAR-T 组杀伤很强的优势，当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 IRF4 敲除组比对照 CAR-T 组较强的杀伤优势。(图 45)

实施例 4、CAR-T 细胞中肿瘤微环境相关受体的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了 CAR-T 细胞中肿瘤微环境相关受体 A2aR、IL10RA、ADRB2 通过基因编辑被敲除后对肿瘤杀伤的影响。

A2aR 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中比对照 CAR-T 细胞非常明显的杀伤优势。(图 18)

A2aR 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 19)

IL10RA 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 IL10RA 敲除组较强的杀伤优势。(图 20)

ADRB2 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 ADRB2 敲除组较强的杀伤优势。(图 21)

实施例 5、CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭相关表观遗传基因的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了 CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭相关表观遗传基因如甲基转移酶 DNMT3A 通过基因编辑被敲除后对肿瘤杀伤的影响。

DNMT3A 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀

伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 DNMT3A 敲除组比对照 CAR-T 组相对微弱的杀伤优势。(图 22)

实施例 6、CAR-T 细胞中衰竭 T 细胞高表达基因的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了在衰竭 T 细胞中高表达的一些功能未知基因通过基因编辑在 CAR-T 细胞中被敲除后对肿瘤杀伤的影响。这些基因包括：LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2。

LAYN 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci、CRL5826-PDL1-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤能力。(图 23)

LAYN 敲除组在靶细胞为 OVCAR3-luci、HCT116-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在低效靶比长时间的杀伤中表现出比对照 CAR-T 细胞较强的杀伤优势。(图 24)

PHLDA1 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 PHLDA1 敲除组比对照 CAR-T 组较强的杀伤优势，尤其在第七天。(图 25)

RGS1 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 RGS1 敲除组比对照的 CAR-T 组较强的杀伤优势。(图 26)

RGS2 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 RGS2 敲除组较对照 CAR-T 组很强的杀伤优势，尤其在第七天。(图 27)

MYO7A 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 MYO7A 敲除组比对照 CAR-T 组相对微弱的杀伤优势。(图 28)

实施例 7、CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭内源机制相关基因的基因编辑对肿瘤杀伤的作用

本实施例研究了 CAR-T 细胞中 T 细胞衰竭内源机制相关基因 SHP1、DGKa、Fas、FasL 通过基因编辑被敲除后对肿瘤杀伤的影响。

Fas 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 Fas 敲除组比对照 CAR-T 组较强的杀伤优势。(图 29)

FasL 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 FasL 敲除组比对照 CAR-T 组较强的杀伤优势。(图 30)

SHP1 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 SHP1 敲除组比对照 CAR-T 组很强的杀伤优势。(图 31)

DGKa 敲除组在靶细胞为 CRL5826-luci 的高效靶比(1:1)短时间(24h、48h)的杀伤中表现出不低于对照 CAR-T 细胞的杀伤效果，在较低效靶比 0.2:1 下，第四天和第七天杀伤均到 70%以上，敲除组表现出不低于对照 CAR-T 的杀伤作用，而当效靶比降为 0.1:1 时，第四天和第七天均表现出 DGKa 敲除组比对照 CAR-T 组较强的杀伤优势。(图 32)

实施例 8、通过抑制 TGFβ 信号通路改善 CAR-T 细胞治疗实体瘤的效果

1. TGFβ1 负调 P4-CAR-T 细胞功能，并可诱导 P4-CAR-T 细胞向有功能的调节性 T 细胞(Treg)转化。

为验证 TGFβ1 是否会影响 CAR-T 细胞的杀伤功能，发明人将靶向间皮素的 P4-CAR-T 细胞与 CRL5826 间皮瘤细胞以 1:1 的效靶比共孵育，并在培养体系中添加或不添加 5ng/ml 的 TGFβ1。结果显示，在共孵育 24 小时后，添加有 TGFβ1 组的 P4-CAR-T 细胞的靶向杀伤能力明显低于未添加组(图 33 A)。为初步探究添加 TGFβ1 组的 P4-CAR-T 细胞杀伤能力下降的原因，检测了培养液中 IL-2 和 IFN-γ 的释放情况。发现当 P4-CAR-T 细胞与 CRL5826 共孵育后,产生大量的 IL-2 和 IFN-γ。然而，当添加 TGFβ1 后，IL-2 和 IFN-γ 的释放量下降了约 50%(图 33 B 和 C)。

据报道，在 TCR 激活和有 TGFβ1 存在的条件下，T 细胞可转化为诱导型 Treg。发明人在 P4-CAR-T 与间皮素强表达的 OVCAR-3 细胞共孵育体系中添加 5ng/ml 的 TGFβ1，以观察是否能诱导 Treg 的产生。共孵育 3 天后，将 P4-CAR-T 细胞分选出来，发现在添加 TGFβ1 组，P4-CAR-T 细胞 FOXP3 的表达水平明显升高(图 34A)。将这些 P4-CAR-T 细胞以 2:1 和 1:1 的比例与 violet 标记的 CD4+CD25-responder 细胞共孵育，发现添加 TGFβ1 组的 P4-CAR-T 细胞能明显抑制 responder 细胞的增殖(图 34B)。此实验说明在有 TGFβ1 存在的情况下，CAR-T 细胞可转化为有功能的 Treg，Treg 具有增殖

抑制能力。将这些 P4-CAR-T 细胞再次与 OVCAR-3 进行孵育，发现添加 TGFβ1 组的 P4-CAR-T 细胞杀伤能力明显低于未添加 TGFβ1 组(图 34C)。

此外，观察了 TGFβ1 对 P4-CAR-T 细胞抗原诱导的增殖能力的影响。在 P4-CAR-T 细胞无 IL-2 培养体系中，通过每 2 天添加一次 CRL5826 肿瘤细胞，以诱导 P4-CAR-T 细胞增殖，同时添加或不添加 TGFβ1。可以看到 CRL5826 可诱导 P4-CAR-T 细胞的大量增殖，然而在添加 TGFβ1 组，P4-CAR-T 细胞基本无增殖(图 35A)。同时，观察到在添加 TGFβ1 组，P4-CAR-T 细胞的状态也明显差于未添加 TGFβ1 组(图 35B)。

2. 敲除 TGFBR II 或 FOXP3 可改善 P4-CAR-T 细胞的功能

如上所述，已观察到 TGFβ1 确实能负向调控 P4-CAR-T 细胞的功能，本实验将 P4-CAR-T 细胞上的 TGFβ1 结合受体 TGFBR II 或 Treg 产生的重要转录因子 FOXP3 敲除对有 TGFβ1 存在下 P4-CAR-T 细胞功能的影响。发明人利用 CRISPR/Cas9 技术，将 P4-CAR-T 细胞的 TGFBR II 或 FOXP3 进行了敲除。

如图 36 所示，测试了针对 TGFBR II 四种不同靶序列的 sgRNA：sgRNA-1(靶序列：TGCTGGCGATACGCGTCCAC，SEQ ID NO：28)、sgRNA-4(靶序列：CCATGGGTCGGGGGCTGCTC，SEQ ID NO：29)、sgRNA-5(靶序列：CGAGCAGCGGGGTCTGCCAT，SEQ ID NO：30)、sgRNA-8(靶序列：CCTGAGCAGCCCCCGACCCA，SEQ ID NO：31)。这四种 sgRNA 均能实现 TGFBR II 敲除(图 36A)，其中 sgRNA-8 效率最高，在优化后敲除效率能达到 80%以上。类似地敲除了 FOXP3。

发现在敲除 TGFBR II 后，即便添加 10ng/ml 的 TGFβ1，P4-CAR-T 细胞的杀伤功能也没有受到任何影响，FOXP3 敲除也能部分改善 CAR-T 细胞的杀伤功能(图 37A)。同时，发现 TGFBR II 敲除能明显增加在有 TGFβ1 存在情况下 P4-CAR-T 细胞 IL-2 和 IFN-γ 的释放。然而，FOXP3 敲除后并未增加 P4-CAR-T 细胞 IL-2 和 IFN-γ 的释放(图 37B 和 C)。此外，发现 TGFBR II 或 FOXP3 敲除，能够明显降低 TCR 激活和 TGFβ1 添加导致 P4-CAR-T 细胞中 FOXP3 表达(图 38A)，且能明显改善 P4-CAR-T 细胞对肿瘤细胞的杀伤能力(图 38B)。另外，TGFBR II 敲除能明显改善在有 TGFβ1 存在情况下抗原诱导的 P4-CAR-T 细胞的增殖和生存状态，然而，FOXP3 敲除没有明显改善(图 39A 和 B)。值得一提的是，TGFBR II 或 FOXP3 敲除并未影响 P4-CAR-T 细胞自身的增殖能力、CAR 的表达以及 T 细胞亚群的分布(图 40)。

3. TGBR II 或 FOXP3 敲除可改善 $CD4^+$ CAR-T 细胞的功能

本实验分别考察了 TGFβ1 对 P4-CAR-T 细胞中的 CD4 和 CD8 亚群的影响。在 $CD4^+$ CAR-T 细胞与 CRL5826 共孵育体系中，添加了不同浓度的 TGFβ1。发现添加 5 或 10ng/ml TGFβ1 时，可明显抑制 P4-CAR-T 细胞的靶向杀伤能力(图 41A)，而 TGFBR II 或 FOXP3 敲除后能明显改善 CD4+ CAR-T 细胞的杀伤能力(图 41B)。同时，发现 TGFβ1 可调控

CD4$^+$ CAR-T 细胞中诸多基因转录水平的表达，如上调 FOXP3，下调 IL-2 和 IFN-γ。TGBR II敲除后，能降低 FOXP3，上调 IL-2 和 IFN-γ(图 41C-E)。然而 GZMB 的表达受 TGFβ1 的影响不明显(图 41F)。也在蛋白水平也观察到 IL-2 和 IFN-γ 表达的类似变化(图 42A)。此外，也观察到 TGFβ1 能明显抑制 CD4+ CAR-T 细胞抗原诱导的增殖能力，TGFBR II敲除能明显改善这一现象，然而 FOXP3 敲除的作用却不明显(图 42B)。同时 TGBR II或 FOXP3 敲除的 CD4$^+$ CAR-T 细胞在多轮抗原刺激后的杀伤能力明显优于未编辑的 CD4$^+$ CAR-T 细胞(图 42C)。

4. TGBR II 或 FOXP3 敲除可改善 CD8$^+$ CAR-T 细胞的功能

在 CD8$^+$ CAR-T 细胞与 CRL5826 共孵育体系中，添加了不同浓度的 TGFβ1，发现随着添加浓度的升高，CD8$^+$ CAR-T 细胞的肿瘤杀伤能力被抑制得越明显(图 43A)，而 TGFBR II 或 FOXP3 敲除后能明显改善 CD8$^+$ CAR-T 细胞的杀伤能力(图 43B)。同时，发现 TGFβ1 可调控 CD8$^+$ CAR-T 细胞中诸多基因转录水平的表达，如下调 IL-2、IFN-γ、GZMA 和 GZMB。TGBR II敲除后，能上调这些基因的表达(图 43C-F)。我们也在蛋白水平也观察到 IFN-γ 的表达有类似变化(图 44A)，然而除在 TGBR II敲除的 CD8$^+$ CAR-T 细胞中有比较明显的 IL-2 表达外，其他各组中都没有明显的表达(图 44A)。此外，也观察到 TGFβ1 能明显抑制 CD8$^+$ CAR-T 细胞抗原诱导的增殖能力，TGFBR II敲除能明显改善这一现象，然而 FOXP3 敲除的作用却不明显(图 44B)。同时 TGBR II或 FOXP3 敲除的 CD8$^+$ CAR-T 细胞在多轮抗原刺激后的杀伤能力明显优于未编辑的 CD8$^+$ CAR-T 细胞(图 44C)。然而值得一提的是，CD8$^+$ CAR-T 细胞的抗原刺激增殖能力和多轮杀伤能力都明显弱于 CD4$^+$ CAR-T 细胞。

实施例 9、TGFBR II/PD1 双重编辑的 CAR-T 细胞具有改善的实体瘤治疗效果

9.1 TGFβ1 通过上调 PD1 加速 CAR-T 细胞耗竭

持续激活 T 细胞信号传导导致耗竭，并且耗竭的 T 细胞具有降低的增殖能力和效应子功能，并且具有免疫检查点基因(例如 PD1)过表达。观察到添加 TGFβ1 后 M28z 中 PD1 mRNA 表达显著增加(图 46)，进一步使用多轮抗原刺激测定研究了 TGFβ1 是否加速 CAR-T 细胞耗竭。发现 TGFβ1 在多次肿瘤细胞攻击后显著影响 CAR-T 细胞的增殖。在第四次攻击中，几乎所有 CAR-T 细胞在 TGFβ1 存在下死亡，而对照细胞存活良好。敲除 TGFBR II 使得 CAR-T 细胞对 TGFβ1 效应无反应，导致与对照组相似的存活(图 47A 和 47B)。在 TGFβ1 存在下，两次挑战后 CAR-T 细胞的肿瘤溶解活性降低至无，而 M28z-TKO(TGFBR II KO)细胞保持活性(图 47C)。因此，在三轮肿瘤挑战后，添加 TGFβ1 在 CAR-T 细胞中显著上调 PD-1 的表达，并且敲除 TGFBR II 降低了这种效果。相比之下，TIM3、LAG3 和 CTLA4 的表达对 TGFβ1 的反应较弱，进一步表明 PD1 是 TGFβ1 驱动的 CAR-T 耗竭所诱导的主要靶标(图 47D)。值得注意的是，在 M28z-TKO 中仍然存在显著数量的表达 PD1 的细胞，表明尽管它们对 TGFβ1 信号传导没有反应，但它们

仍然倾向于被 TME(肿瘤微环境)中的相应配体抑制。

为了评估 PD1 上调如何促成 TGFβ 的抑制作用，生成了 PD1 KO(M28z-PKO)和 PD1/TGFBR II 双 KO(M28z-DKO)CAR-T 细胞，并且也过表达 PDL1 来建模一个更具抑制性的 TME。与 TGFβ1 诱导的 M28z 中 PD1 的上调相比，在 M28z-PKO 和-DKO 细胞中 PD1 的表达降低至基础水平，表明该基因编辑有效。在多次肿瘤攻击时，敲除 PD1 确实改善了 CAR-T 增殖，但它仍然比 TKO 和 DKO 更差(图 47F)。在存在 TGFβ1 和 PDL1 过表达的情况下，M28z 的肿瘤裂解能力在第 2 轮减少并且在第 3 轮完全丧失。在第 3 轮时，M28z-PKO 能够实现超过 90％的肿瘤溶解，并且在第 4 轮时丧失功效。相反，M28z-TKO 在第 4 轮能够维持约 60％的肿瘤溶解能力(图 47G)。所有这些数据显示 PD1 上调部分地促成 TGFβ 的负调节作用。另一方面，TGFβ 信号传导仅是 PD1 表达的部分原因，因为部分 TKO 细胞仍然表达 PD1，因此受到 PDL1 抑制。DKO CAR-T 细胞具有最佳性能，在第 4 轮消除了约 90％的肿瘤(图 47G)，表明同时阻断 TGFβ 和 PD1 信号传导可以进一步改善 CAR-T 对抑制性 TME 的抗性。

9.2 TGFBR II/PD1 双重编辑的 CAR-T 细胞对 PDL1 过表达的 CDX 模型具有更好的肿瘤消除作用

在证实 TGFBR II 和 PD1 双 KO 对在体外针对 CAR-T 细胞的抗 TGFβ1 和 PDL1 双重免疫抑制的协同作用后，进一步探讨了 M28z-DKO 在 CRL5826-PDL1 CDX 模型中的体内肿瘤消除优势(图 48A 和 48B)。与 PBS 组的快速增加和 M28z 组的缓慢增加相比，肿瘤体积控制在基础水平，并且在 M28z-TKO 组中除去了 20％的肿瘤。然而，在该实验结束时，M28z-PKO 和-DKO 组中分别有 80％的肿瘤完全消失(图 48C)。在肿瘤大小和肿瘤重量中检测到相同的趋势(图 48D 和 48E)。值得注意的是，没有观察到 GvHD 症状的小鼠，并且所有小鼠体重保持良好(图 48F)。外周血分析显示 hCD3 和 GFP 阳性细胞的比例低，并且与 M28z 组相比，其在编辑的 CAR-T 细胞处理组中增加但不是显著地增加(图 48G)。

考虑到肿瘤负荷不足以呈现 M28z-DKO 的消除优势的可能性，在 M28z-PKO 和-DKO 组中对去除肿瘤的小鼠对侧重新接种相同的 CDX。与对照组的快速生长相比，在 M28z-PKO 和-DKO 组中重新接种后 28 天再次根除肿瘤(图 48I，左图)。同时，没有小鼠出现 GvHD 症状并且体重保持良好(图 48I，右图)，并且 hCD3 和 GFP 阳性细胞的比例仅为约 2％(图 48J)。然而，在消除对侧再接种的肿瘤后，在根除 10 周后在 M28z-PKO 组中有 50％的原发性肿瘤复发(图 48H)。这些数据表明 M28z-DKO 具有体内持久的肿瘤消除能力的优势，这与其体外更好的抗耗竭能力一致。

实验结果说明，本发明的一或多种抑制性蛋白被敲除的 CAR-T 细胞在高效靶比下与未敲除 CAR-T 细胞效果相当，出乎意料的是，本发明的被敲除的 CAR-T 细胞在低效靶比、较长作用时间下优于未敲除 CAR-T 细胞。这特别有利于降低成本，减少制备时间，减少高剂量施用时带来的副作用。

权 利 要 求 书

1. 一种制备经修饰的 T 细胞的方法，包括减少或消除 T 细胞中至少一种抑制性蛋白表达的步骤，其中所述表达被减少或消除的抑制性蛋白是 T 细胞表面抑制性受体和/或 T 细胞衰竭相关蛋白，例如选自 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL 或其任意组合。

2. 权利要求 1 的方法，其还包括减少或消除 T 细胞中 PD1 表达的步骤。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞。

4. 权利要求 1-3 任一项的方法，其中通过反义 RNA、antagomir、siRNA、shRNA、大范围核酸酶、锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶或 CRISPR 系统实施所述减少或消除。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述 CRISPR 系统是 CRISPR/Cas9 系统。

6 权利要求 5 的方法，其中所述 CRISPR/Cas9 系统靶向所述细胞内选自 SEQ ID NO:1-21 和 28-31 中一或多种的核苷酸序列。

7. 权利要求 3-6 任一项的方法，其中所述 TCR 或 CAR 包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述肿瘤相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

9. 权利要求 7-8 任一项的方法，其中所述抗原结合结构域选自单克隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

10. 权利要求 3-9 任一项的方法，其中所述 CAR 包含针对间皮素的 scFv、CD8 铰链区、CD28 跨膜结构域、CD28 共刺激结构域和 CD3ζ 信号转导结构域。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述 CAR 包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列。

12. 通过权利要求 1-11 任一项的方法制备的经修饰的 T 细胞。

13. 修饰的 T 细胞，其中与未修饰的 T 细胞相比，所述 T 细胞中的至少一种抑制性蛋白的表达被减少或消除，其中所述表达被减少或消除的抑制性蛋白是 T 细胞表面抑制性受体和/或 T 细胞衰竭相关蛋白，例如选自 TGFβ 受体(如 TGFBRII)、TIGIT、BTLA、2B4、CD160、CD200R、A2aR、IL10RA、ADRB2、BATF、GATA3、IRF4、RARA、LAYN、MYO7A、PHLDA1、RGS1、RGS2、SHP1、DGKa、Fas、FasL 或其任意组合。

14. 权利要求 13 的经修饰的 T 细胞，其中与未修饰的 T 细胞相比，所述 T 细胞中的 PD1 的表达被减少或消除。

15. 权利要求 13 或 14 的经修饰的 T 细胞，其中所述 T 细胞是包含外源 T 细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的 T 细胞。

16. 权利要求 15 的经修饰的 T 细胞，其中所述 TCR 或 CAR 包含针对肿瘤相关抗原的抗原结合结构域。

17. 权利要求 16 的经修饰的 T 细胞，其中所述肿瘤相关抗原选自 CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α 胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

18. 权利要求 16-17 任一项的经修饰的 T 细胞，其中所述抗原结合结构域选自单克

隆抗体、合成的抗体、人抗体、人源化抗体、单域抗体、抗体单链可变区，以及其抗原结合片段。

19. 权利要求 15-18 任一项的经修饰的 T 细胞，其中所述 CAR 包含针对间皮素的 scFv、CD8 铰链区、CD28 跨膜结构域、CD28 共刺激结构域和 CD3ζ 信号转导结构域。

20. 权利要求 19 的的经修饰的 T 细胞，其中所述 CAR 包含 SEQ ID NO：27 所示氨基酸序列。

21. 权利要求 13-20 任一项的经修饰的 T 细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

22. 用于治疗癌症的药物组合物，包含权利要求 13-20 任一项的经修饰的 T 细胞和药学可接受的载体。

23. 权利要求 21 的用途或权利要求 22 的药物组合物，其中所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤和骨肉瘤。可以用本发明的方法或药物组合物治疗的其他癌症的例子包括：骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、何杰金病、非何杰金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。

24. 一种试剂盒，其用于权利要求 1-12 中任一项的制备经修饰 T 细胞的方法。

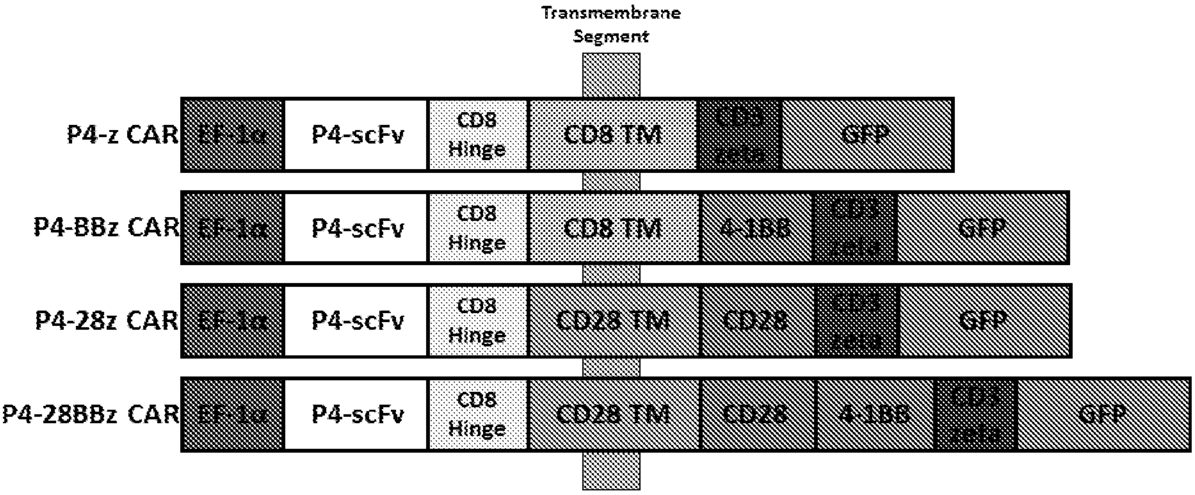

Transmembrane Segment
P4-z CAR
P4-BBz CAR
P4-28z CAR
P4-28BBz CAR
EF-1α
P4-scFv
CD8 Hinge
CD8 TM
CD28 TM
CD28
4-1BB
CD3 zeta
GFP

图 1

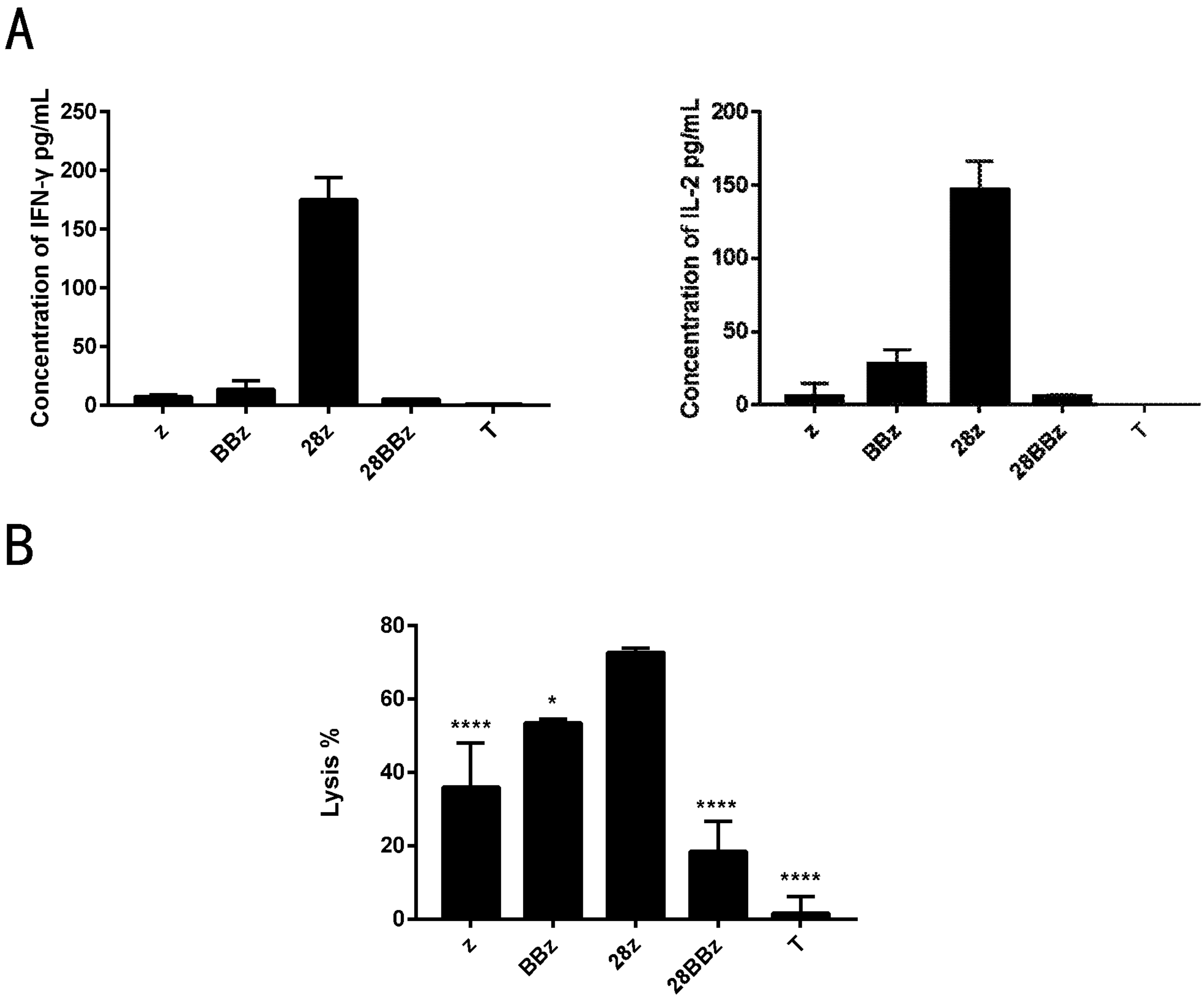

A
Concentration of IFN-γ pg/mL
250
200
150
100
50
0
z
BBz
28z
28BBz
T
Concentration of IL-2 pg/mL
200
150
100
50
0
B
Lysis %
80
60
40
20
0
****
*
****
****

图 2

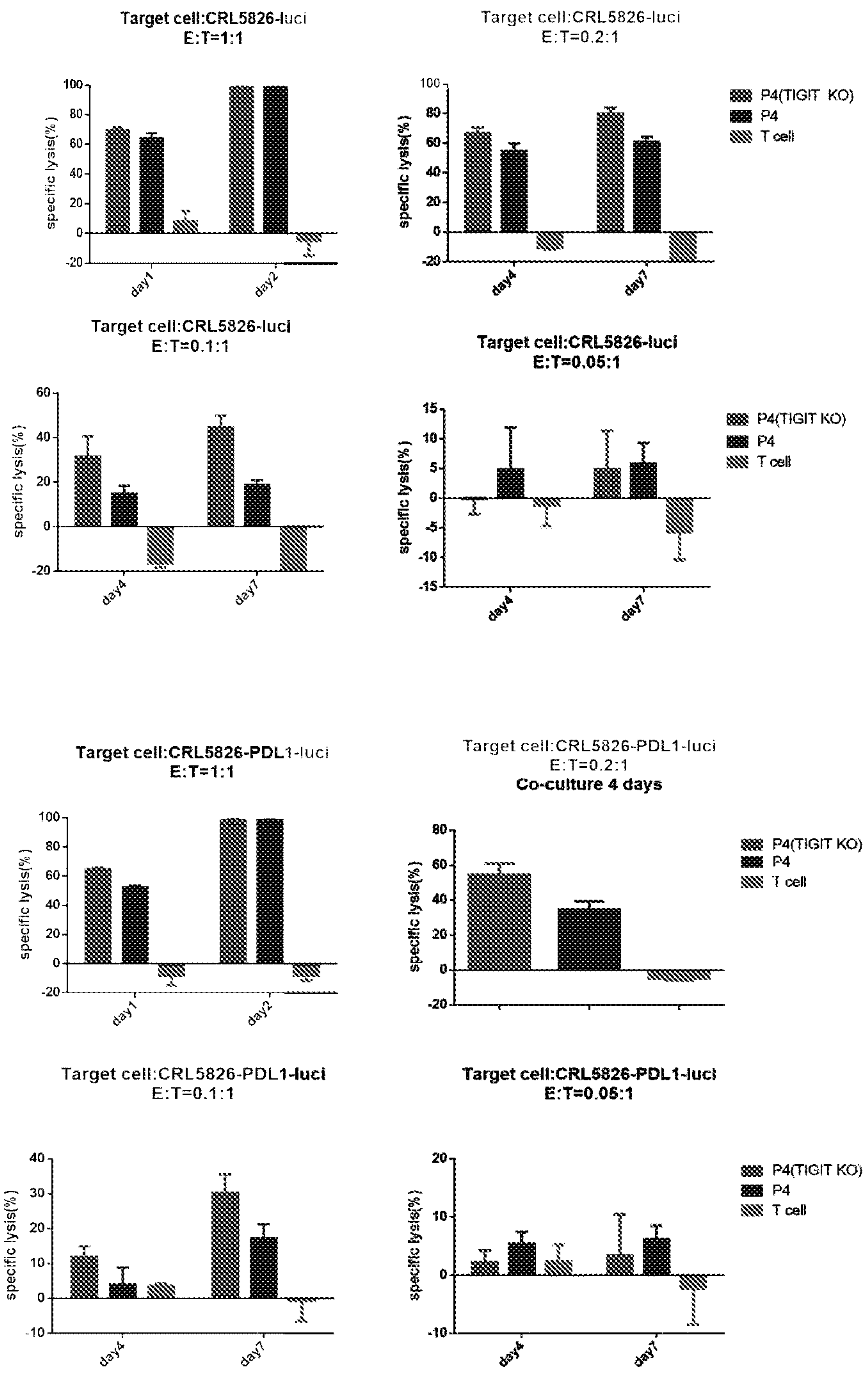
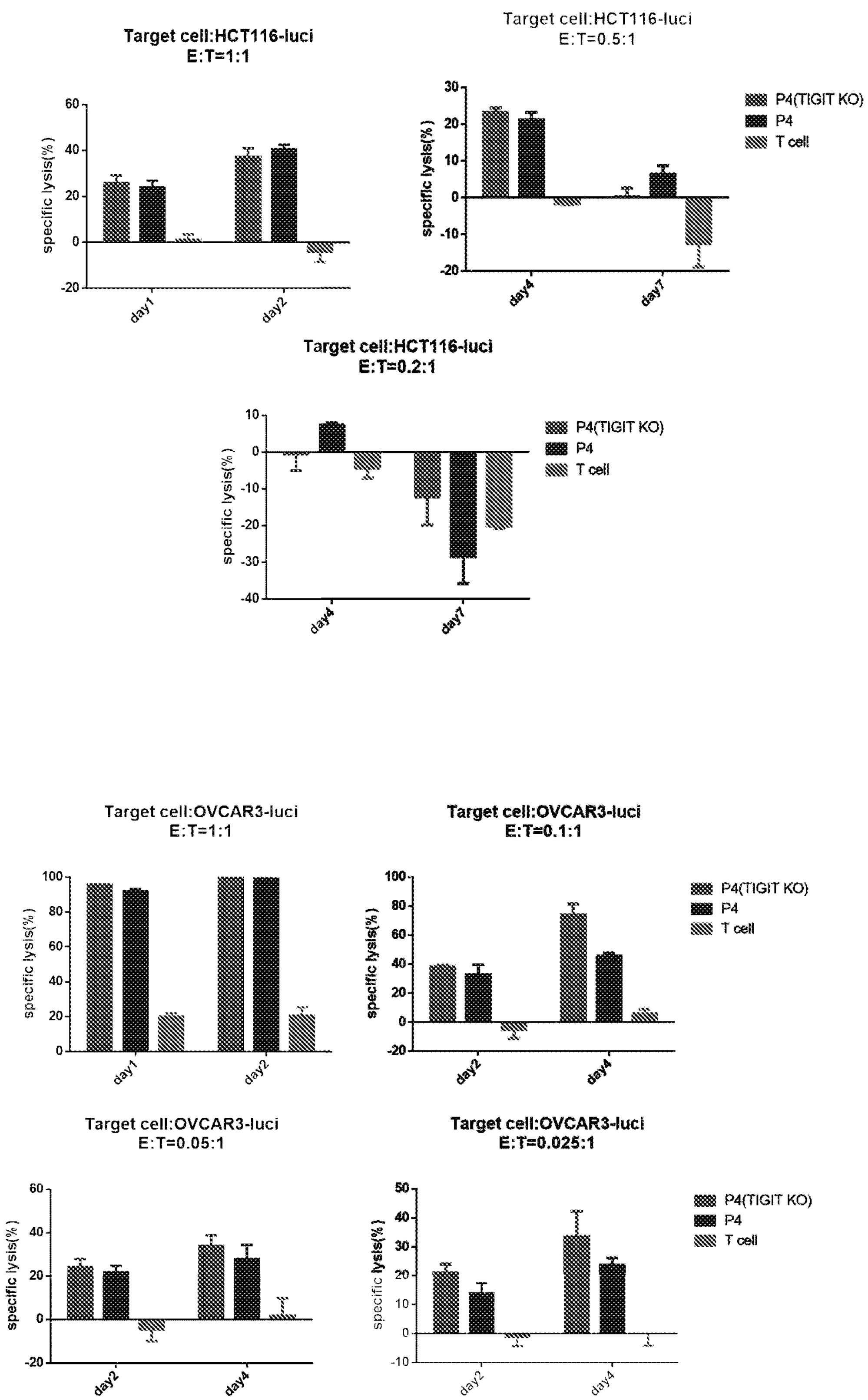

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
P4(TIGIT KO)
P4
T cell
specific lysis(%)
day1
day2
day4
day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1

图 3



Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(TIGIT KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(TIGIT KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(TIGIT KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(TIGIT KO)
P4
T cell

图 4

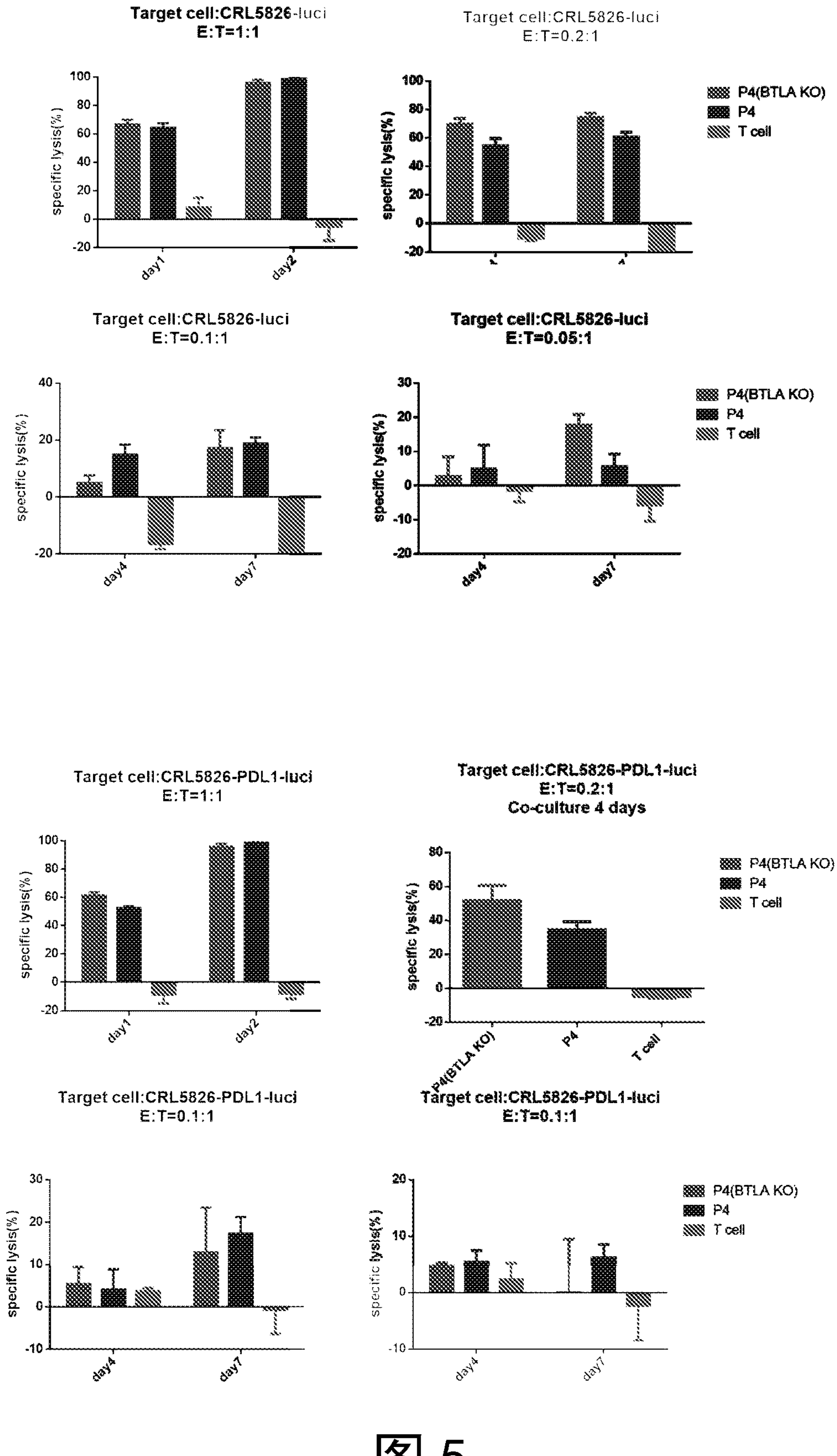

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
P4(BTLA KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(BTLA KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
specific lysis(%)
P4(BTLA KO)
P4
T cell
P4(BTLA KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(BTLA KO)
P4
T cell

图 5

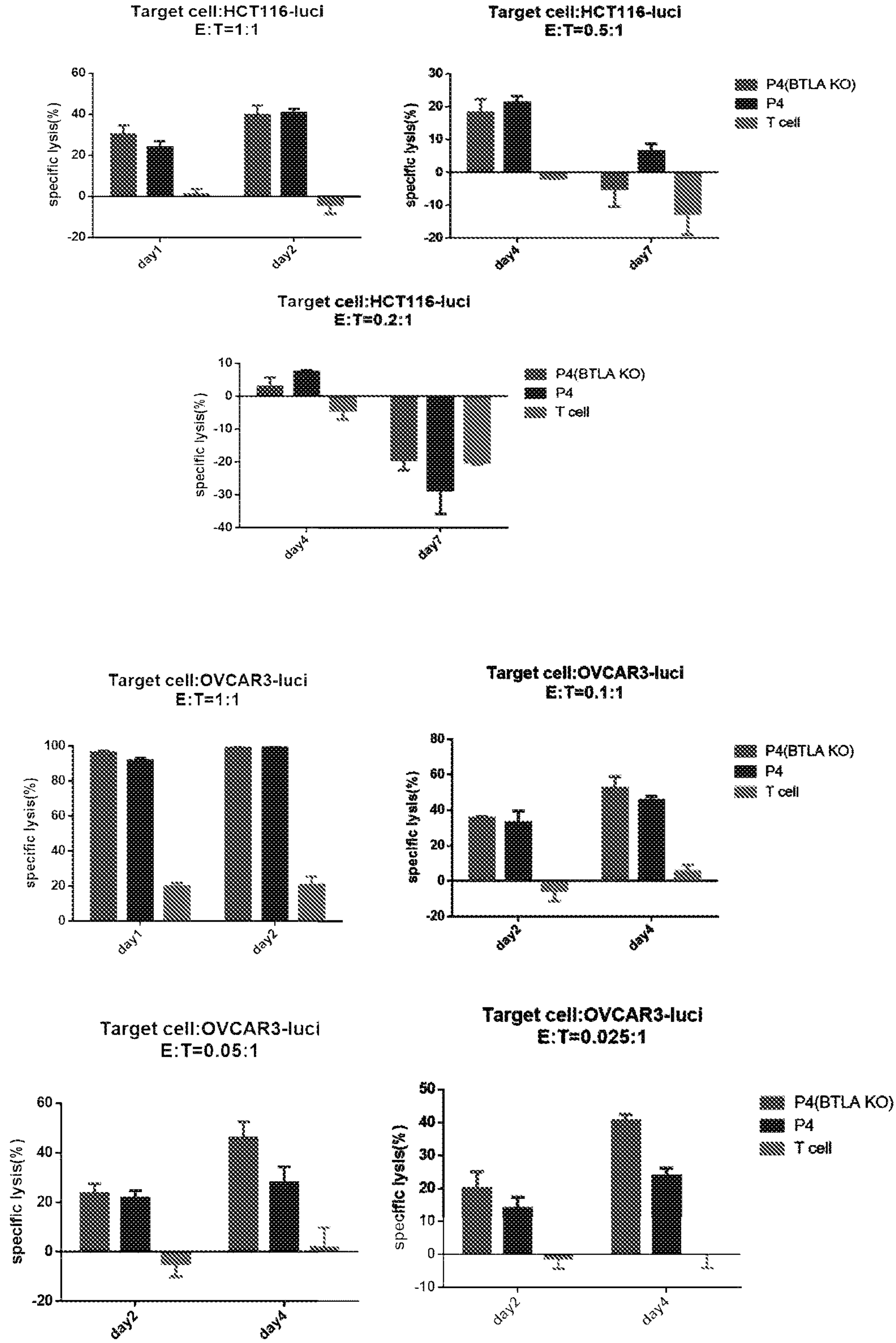
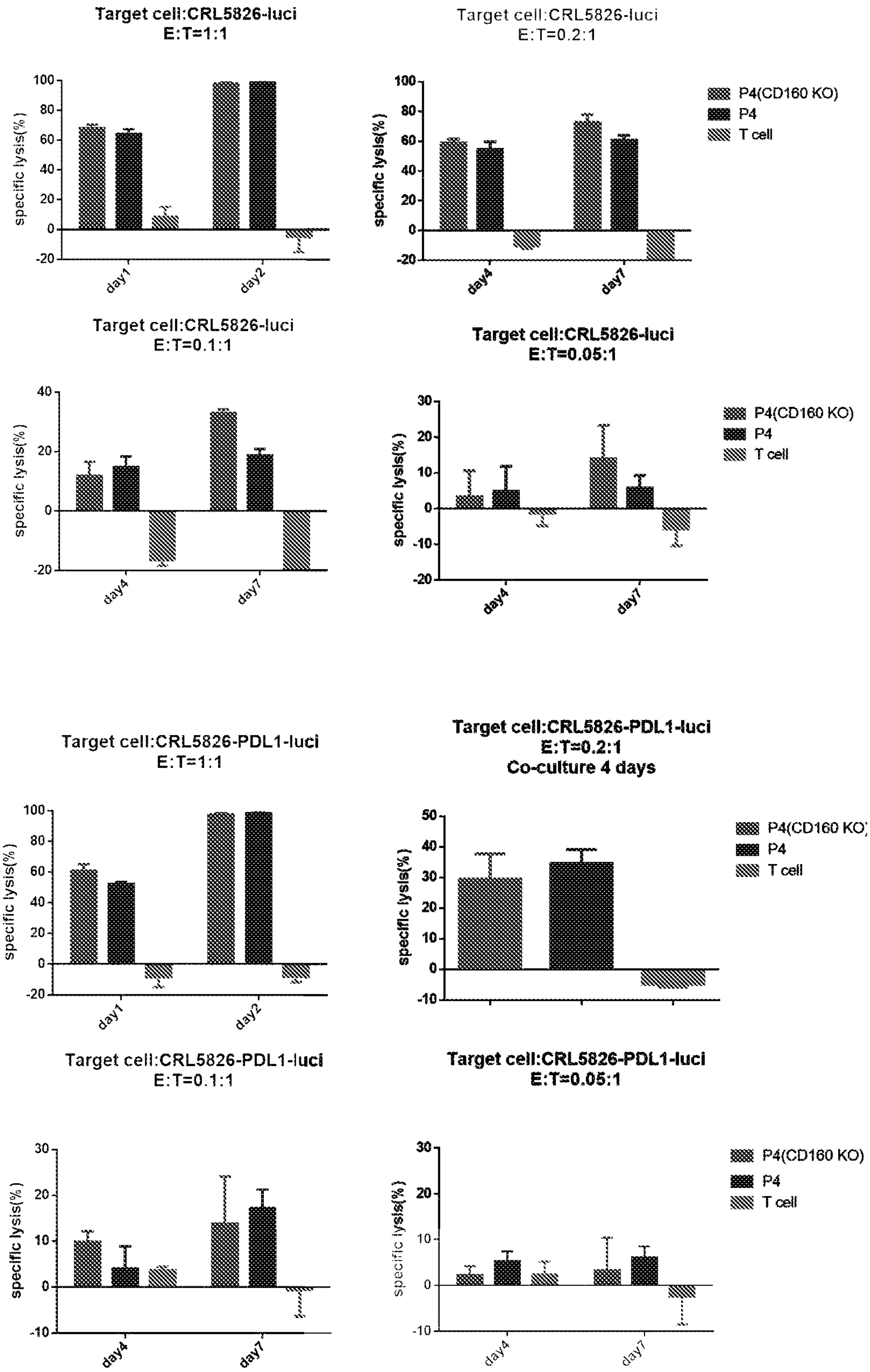

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
P4(BTLA KO)
P4
T cell
day1
day2
day4
day7

图 6



Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
specific lysis(%)
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD160 KO)
P4
T cell

图 7

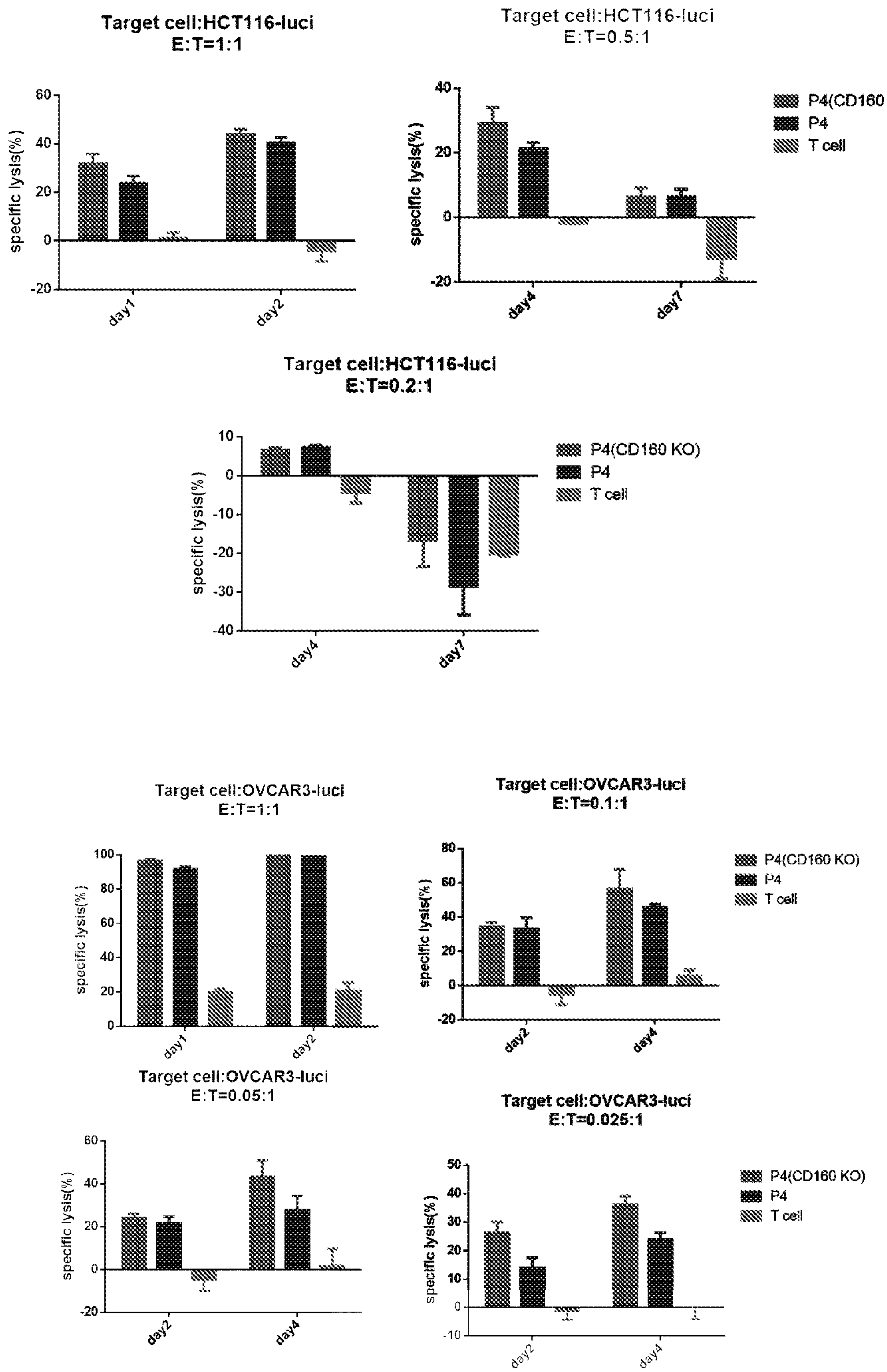

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(CD160 KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(CD160 KO)
P4
T cell

图 8

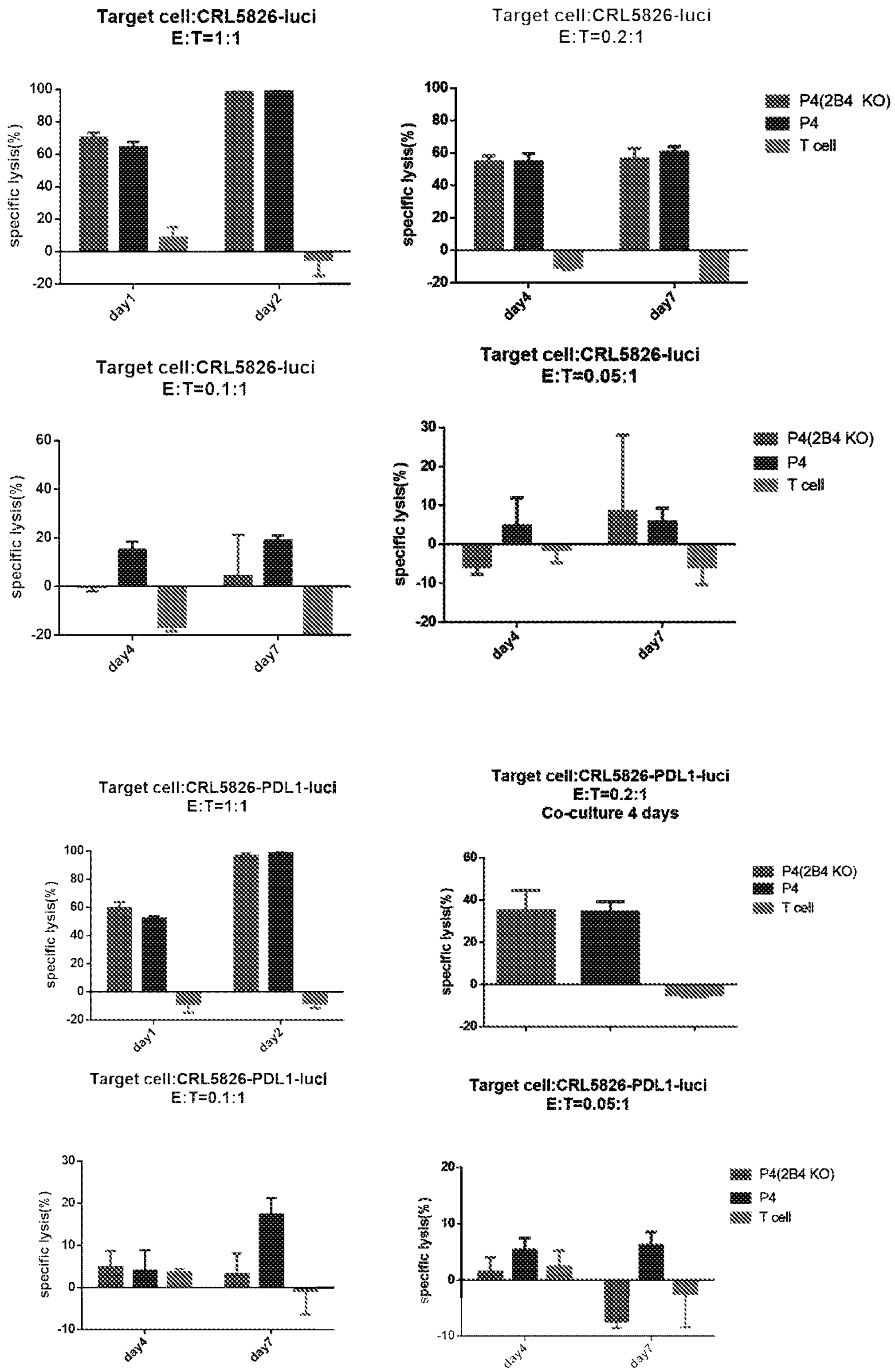

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(2B4 KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1

图 9

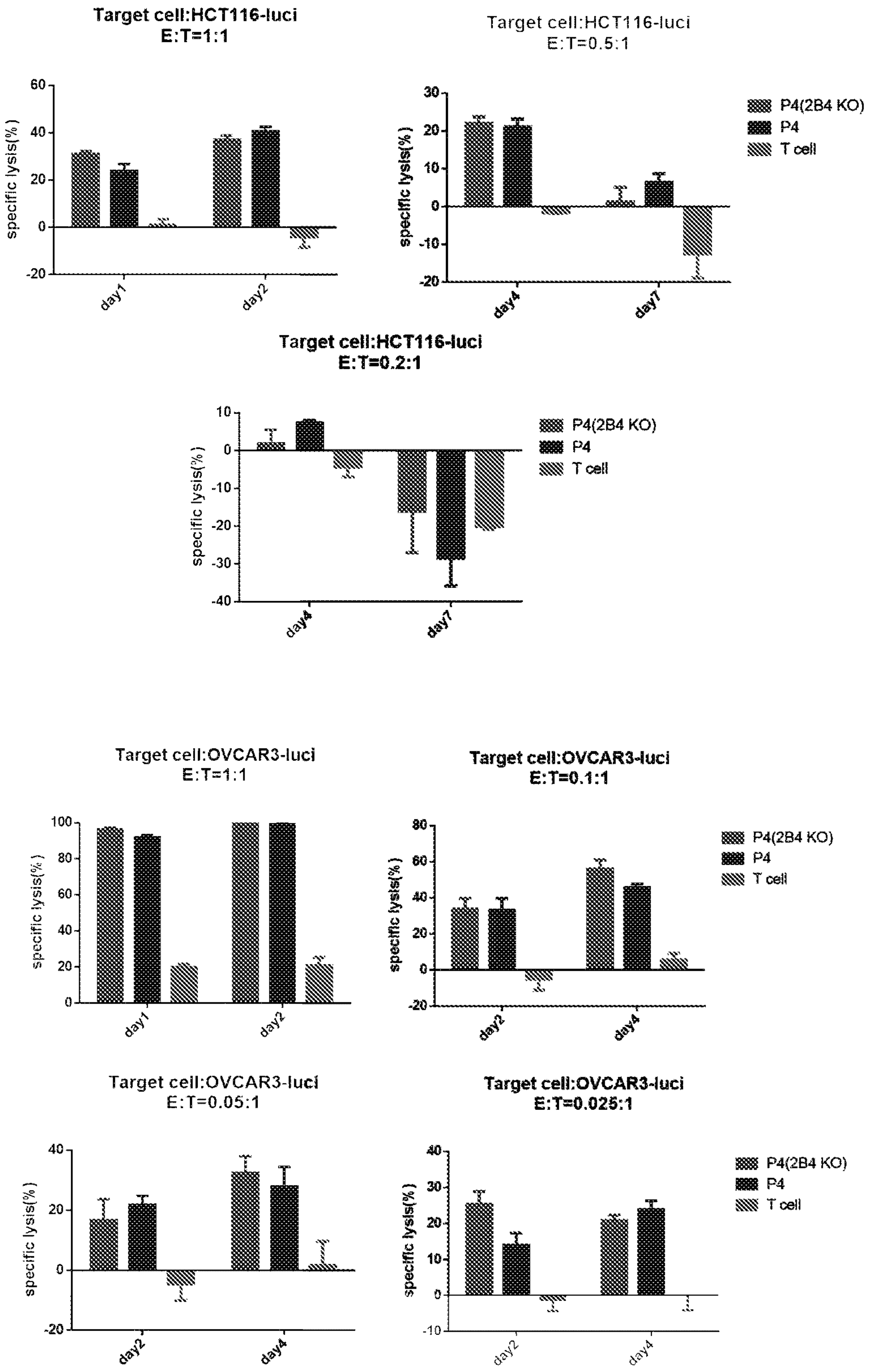

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(2B4 KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(2B4 KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(2B4 KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(2B4 KO)
P4
T cell

图 10

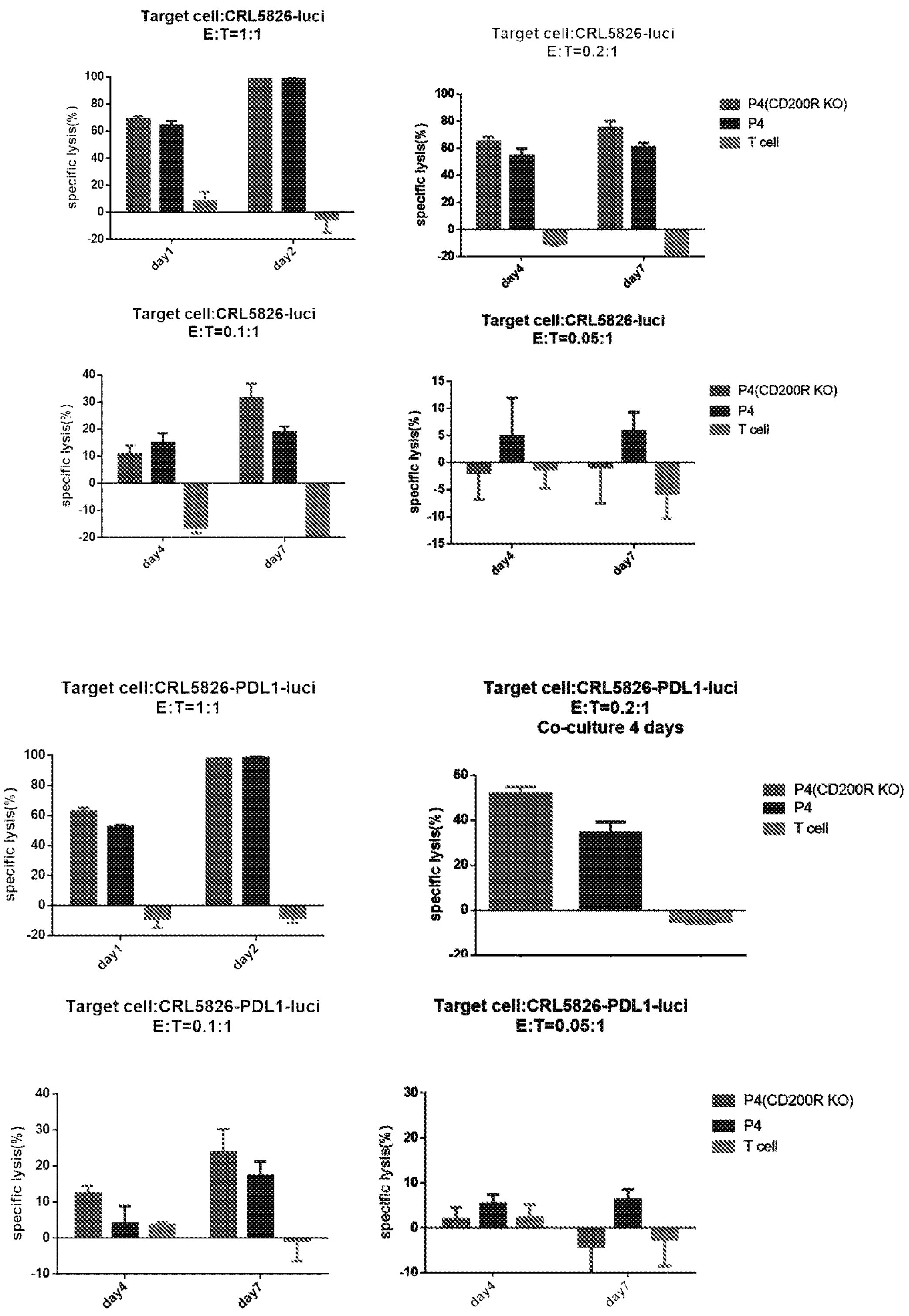

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
specific lysis(%)
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell

图 11

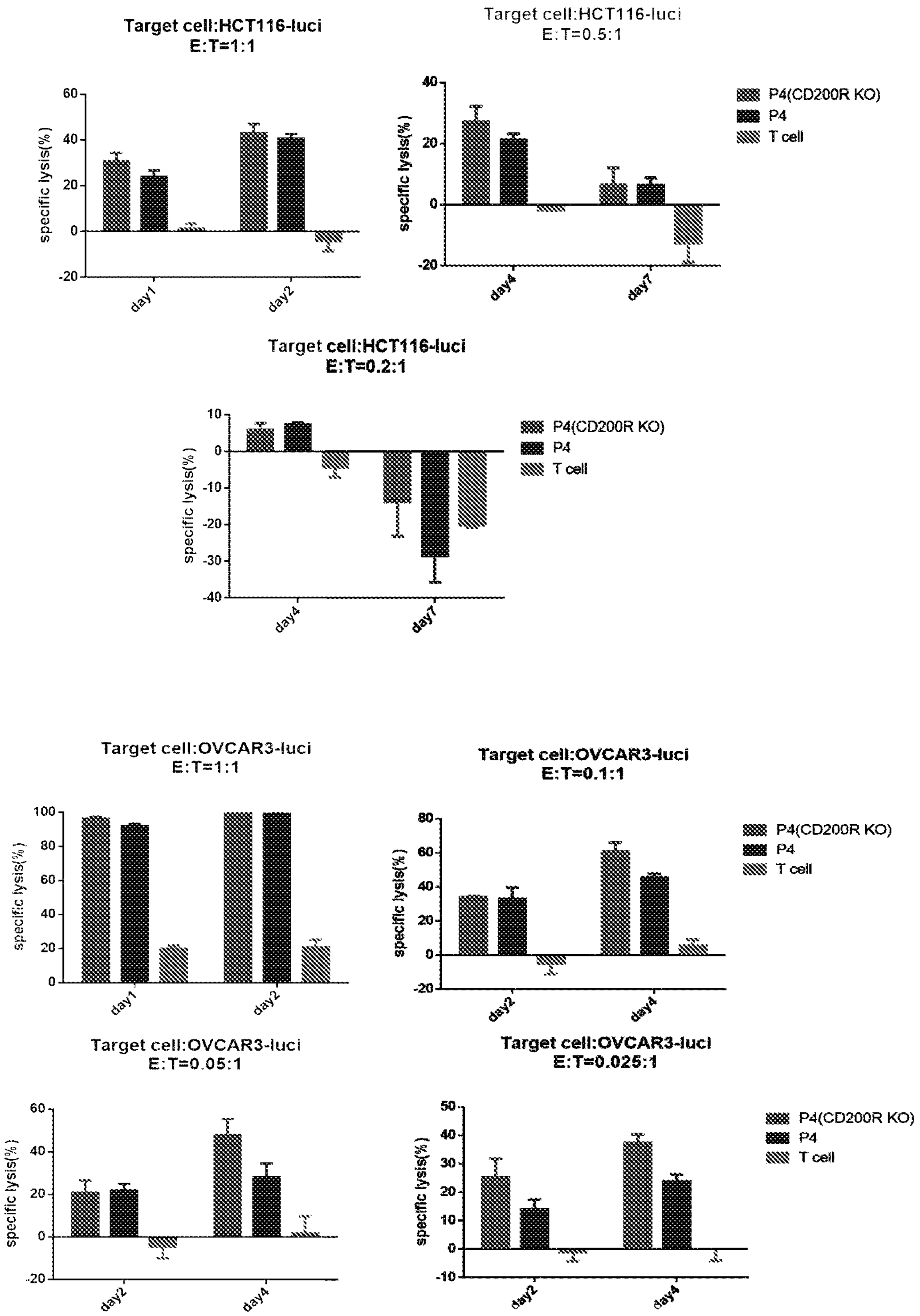

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(CD200R KO)
P4
T cell

图 12

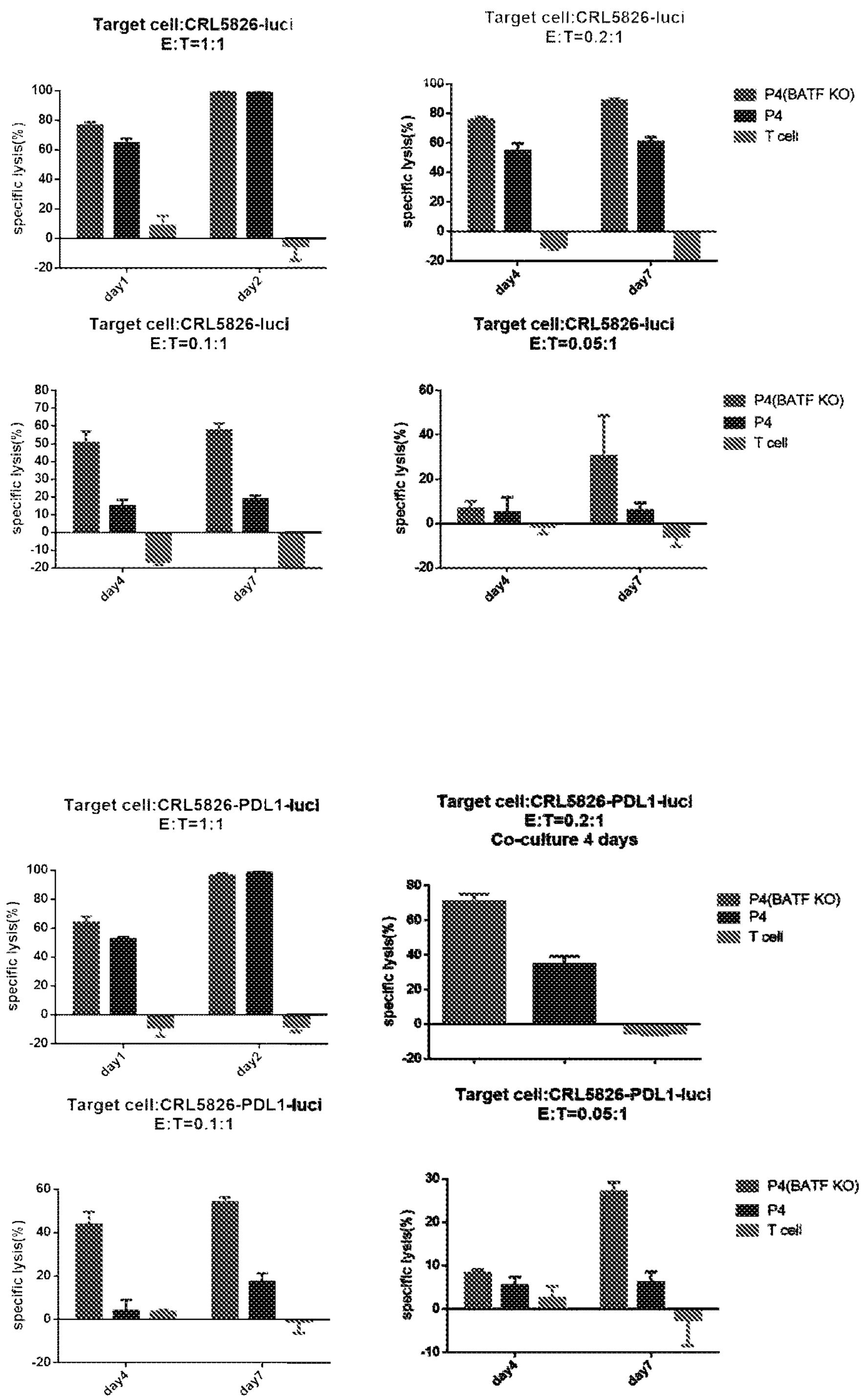

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
day4
day7
P4(BATF KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1

图 13

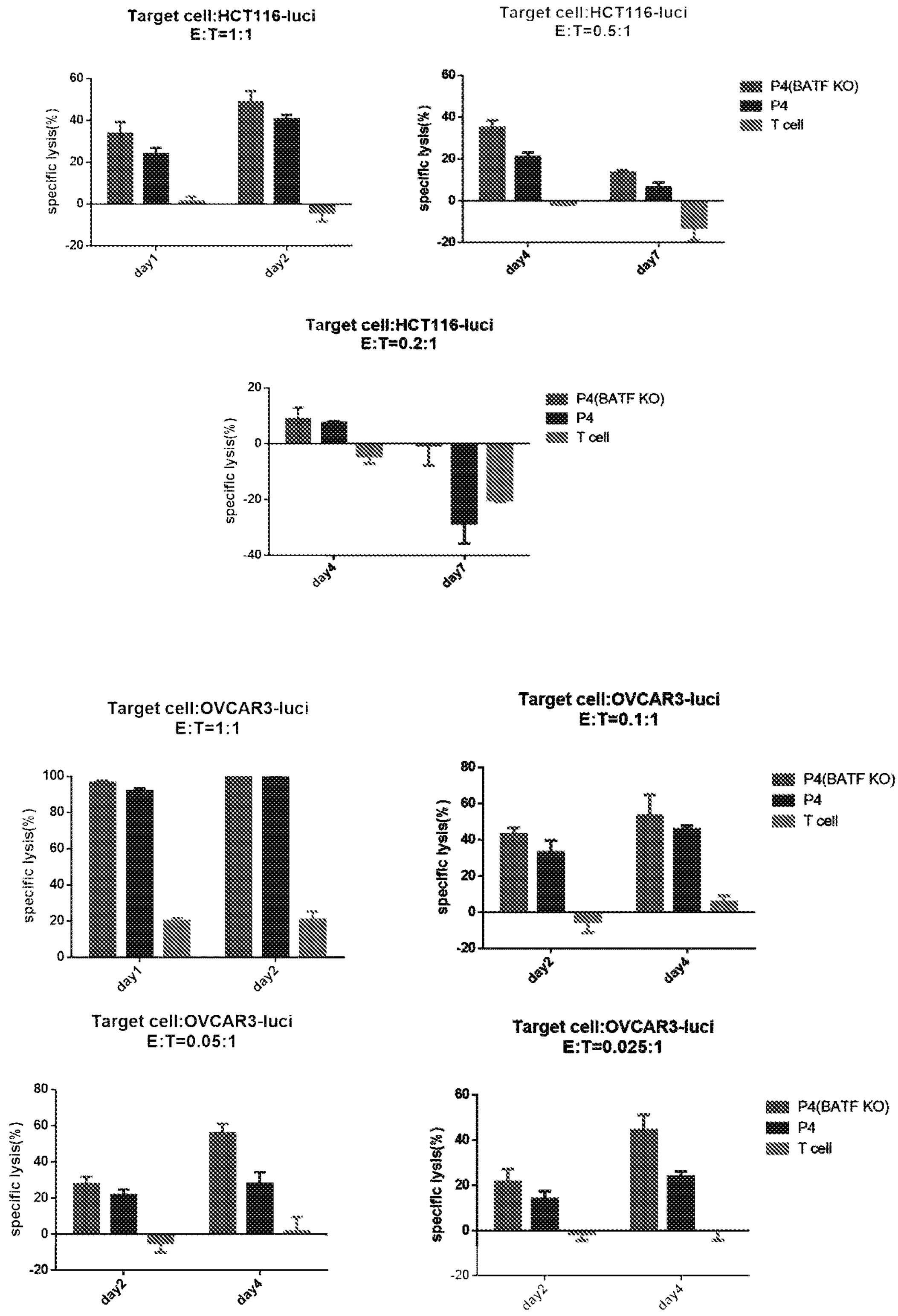

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(BATF KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)

图 14

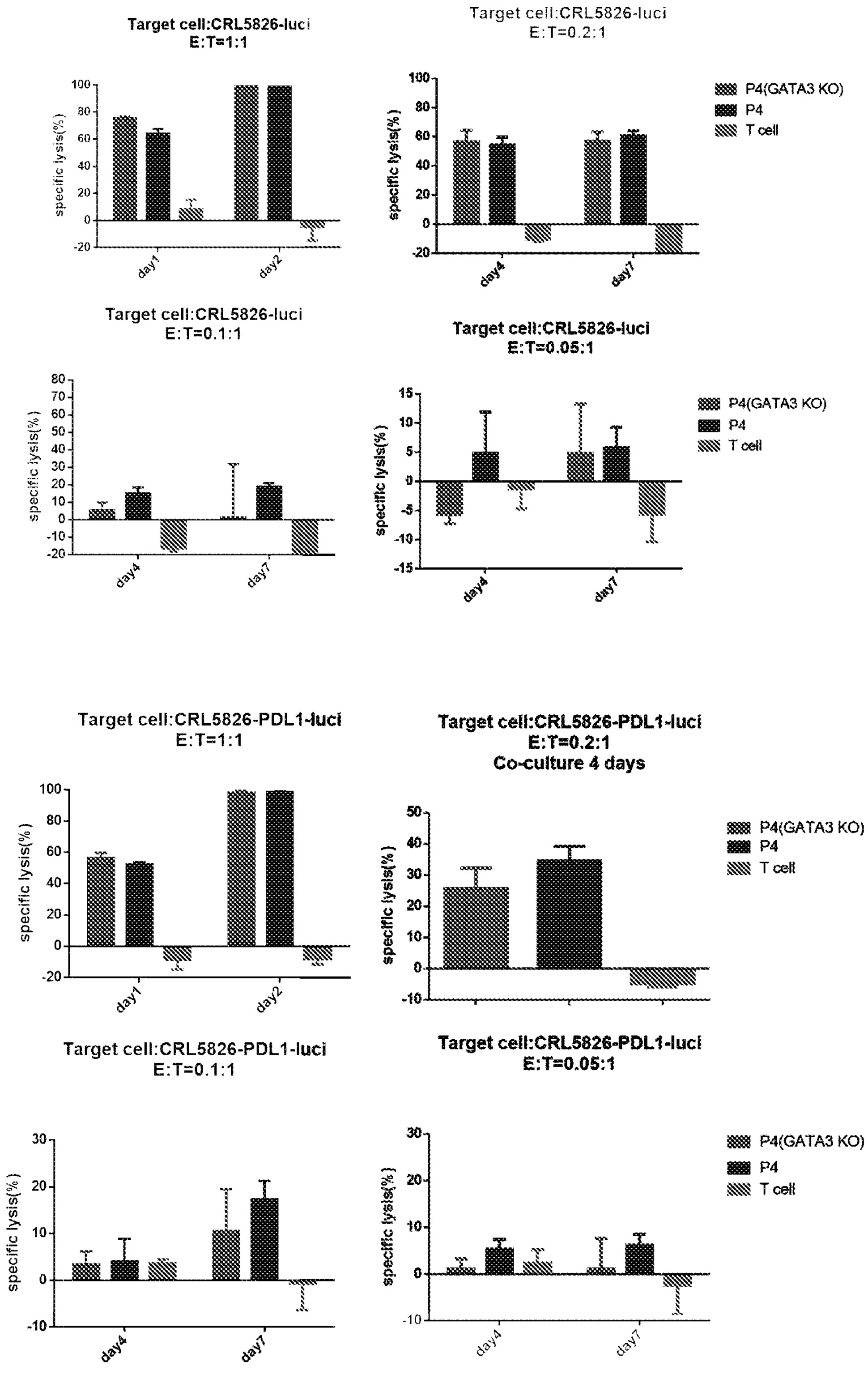

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
P4(GATA3 KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day1
day2
day4
day7

图 15

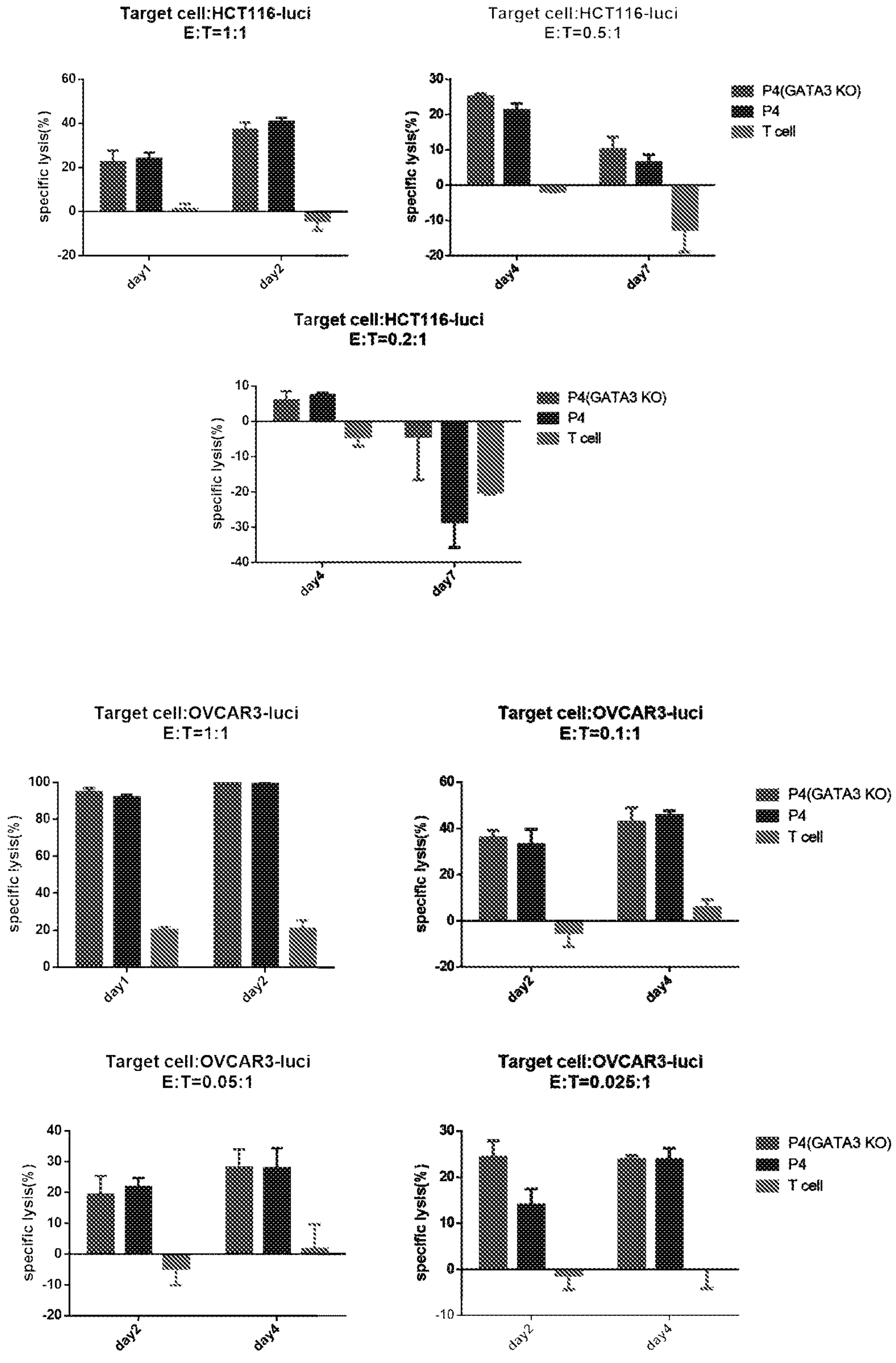

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
P4(GATA3 KO)
P4
T cell
specific lysis(%)
day1
day2
day4
day7
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1

图 16

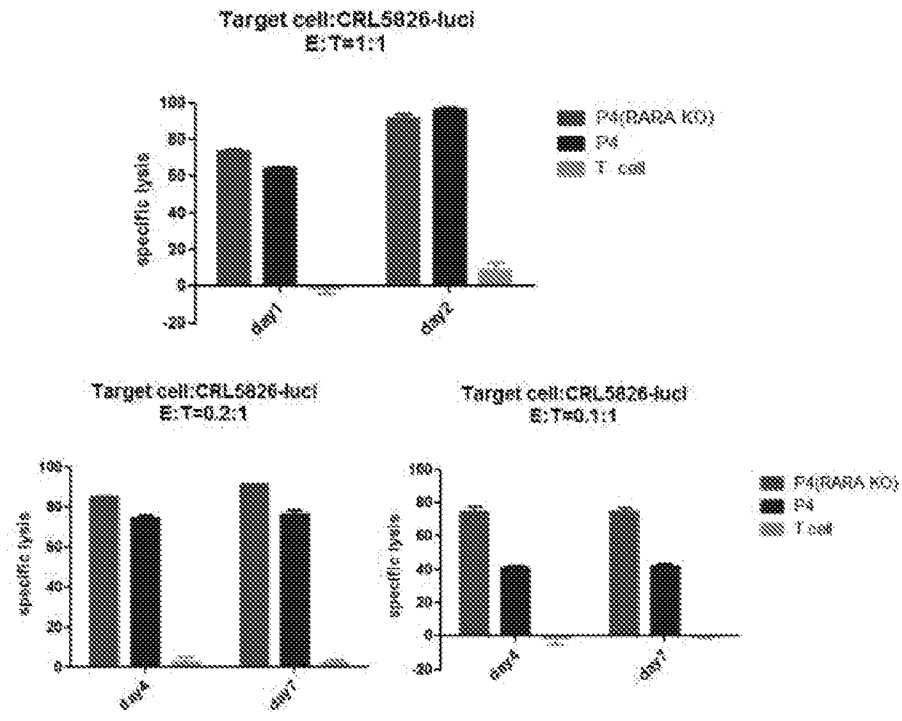

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis
day1
day2
P4(RARA KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
day4
day7
P4(RARA KO)
P4
T cell

图 17

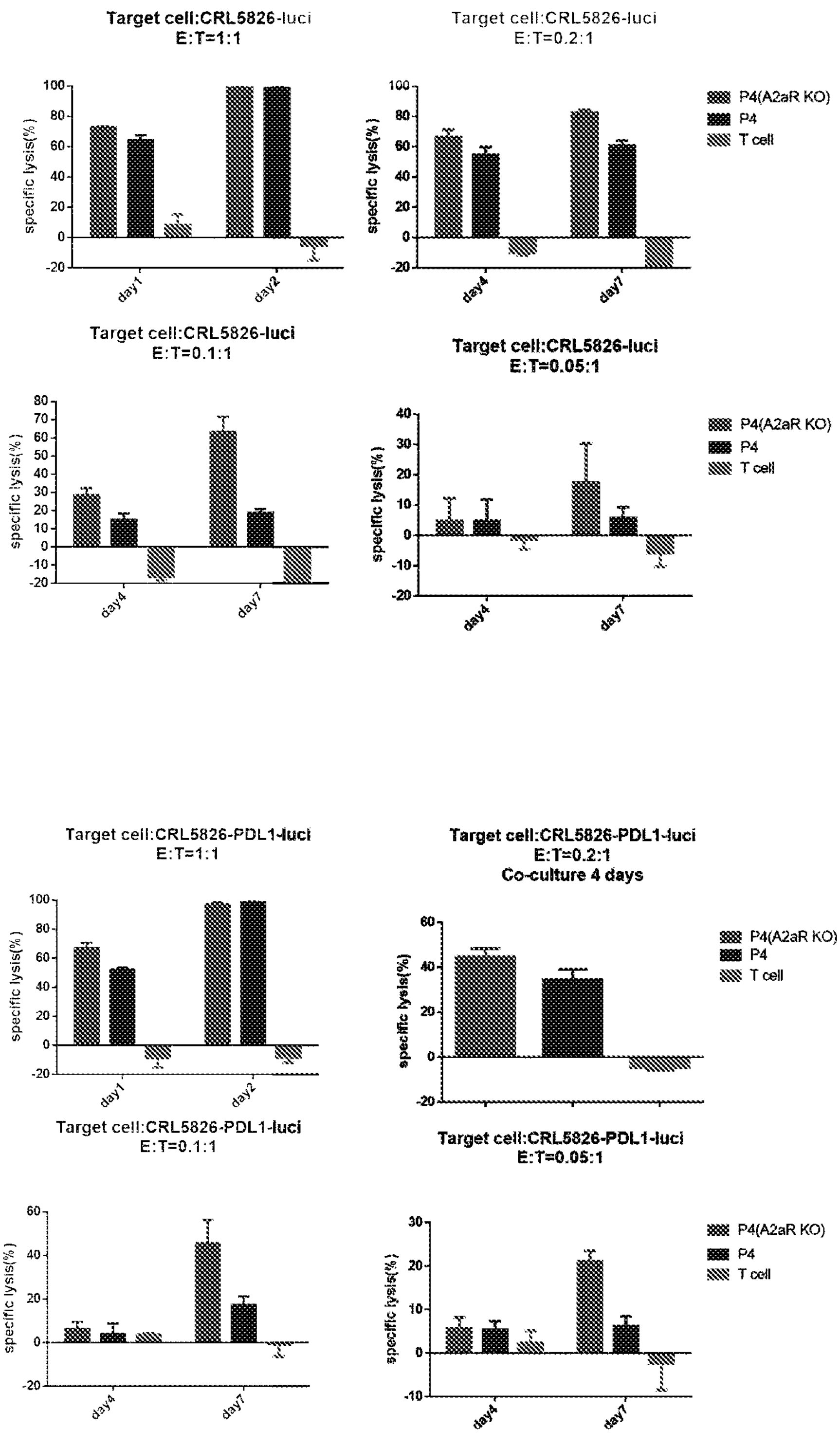

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
specific lysis(%)
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day4
day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(A2aR KO)
P4
T cell

图 18

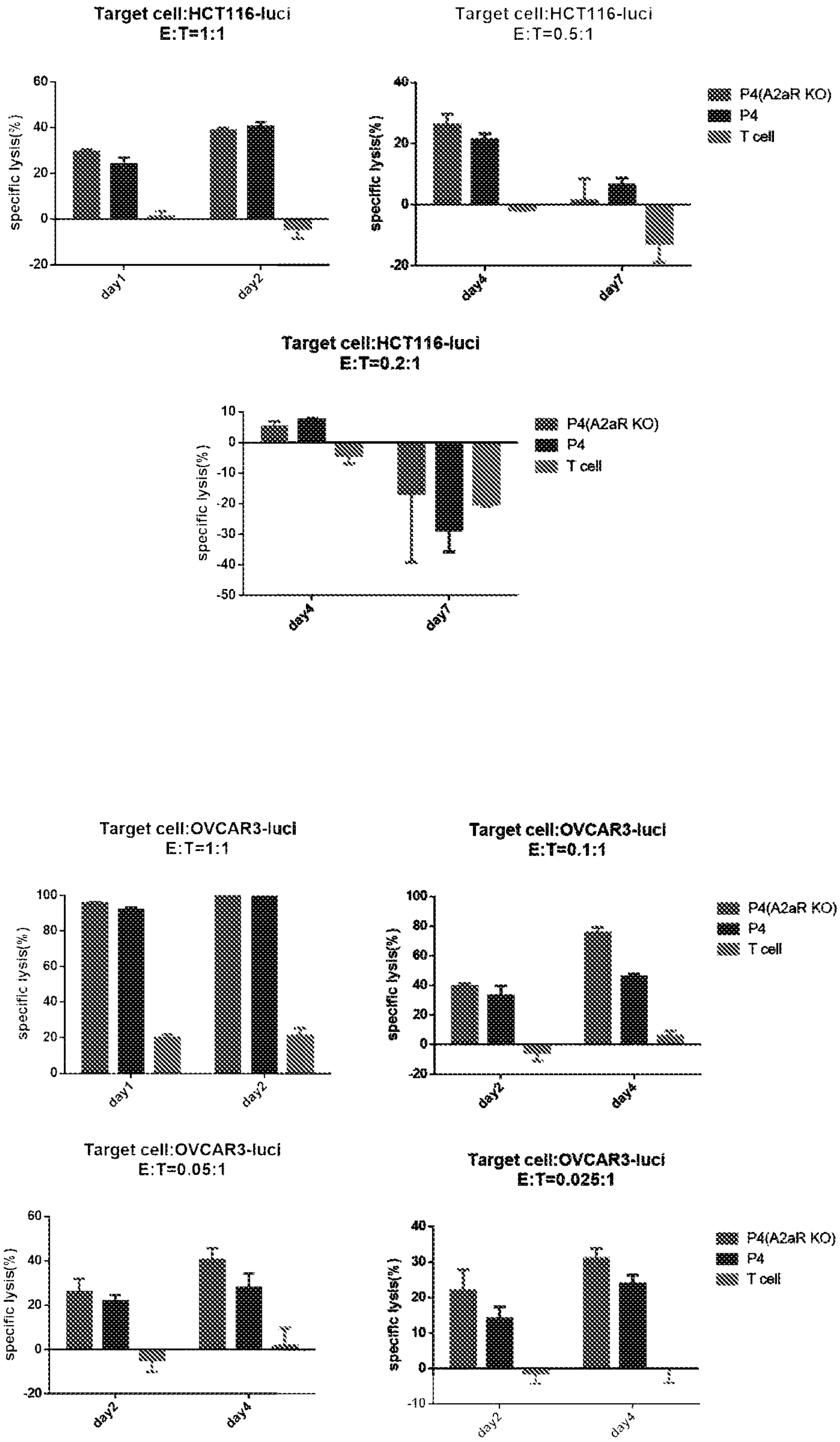

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(A2aR KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(A2aR KO)
P4
T cell

图 19

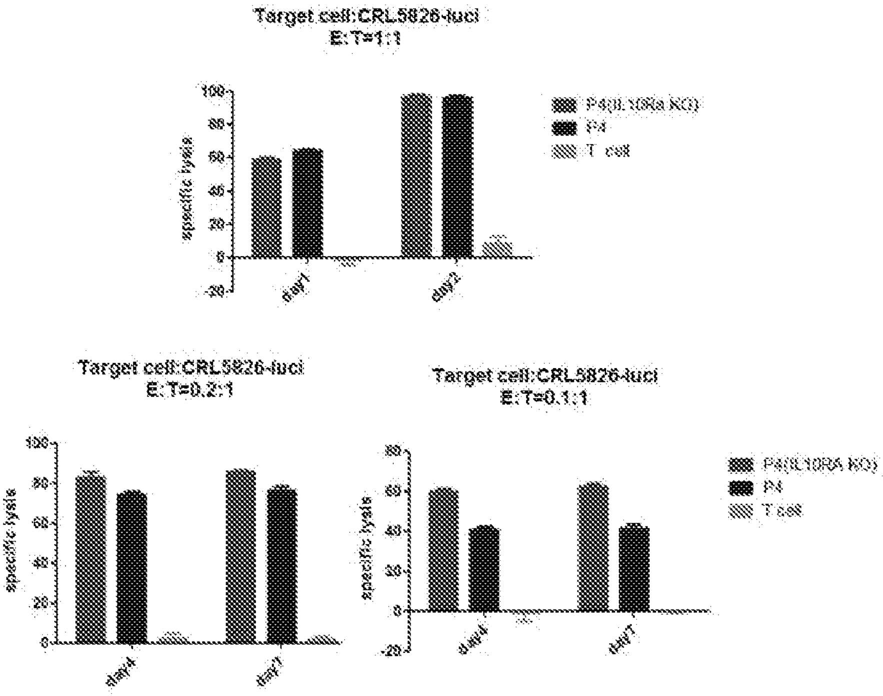

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(IL10Ra KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
P4(IL10RA KO)

图 20

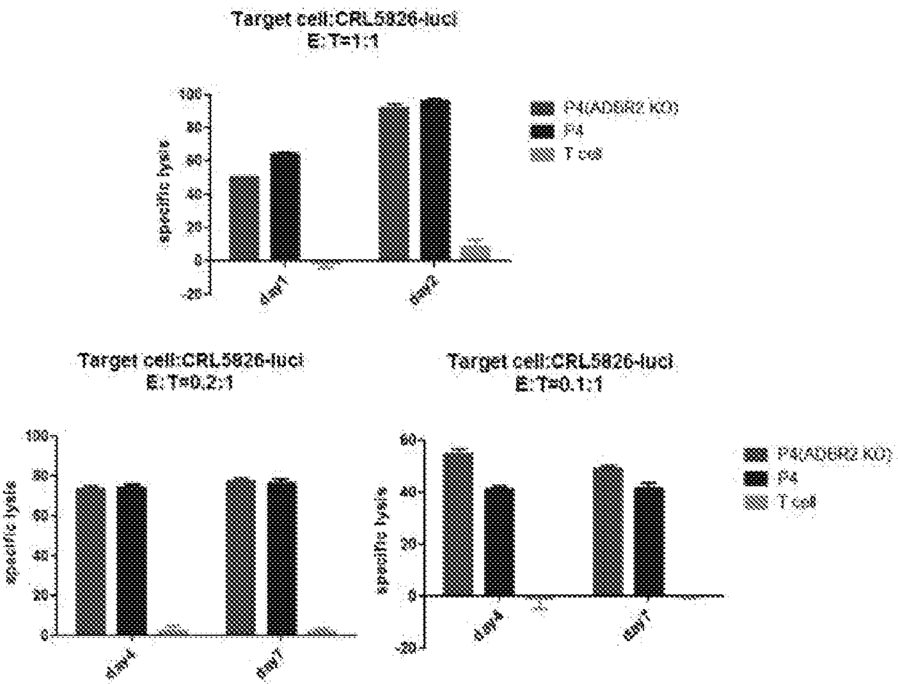
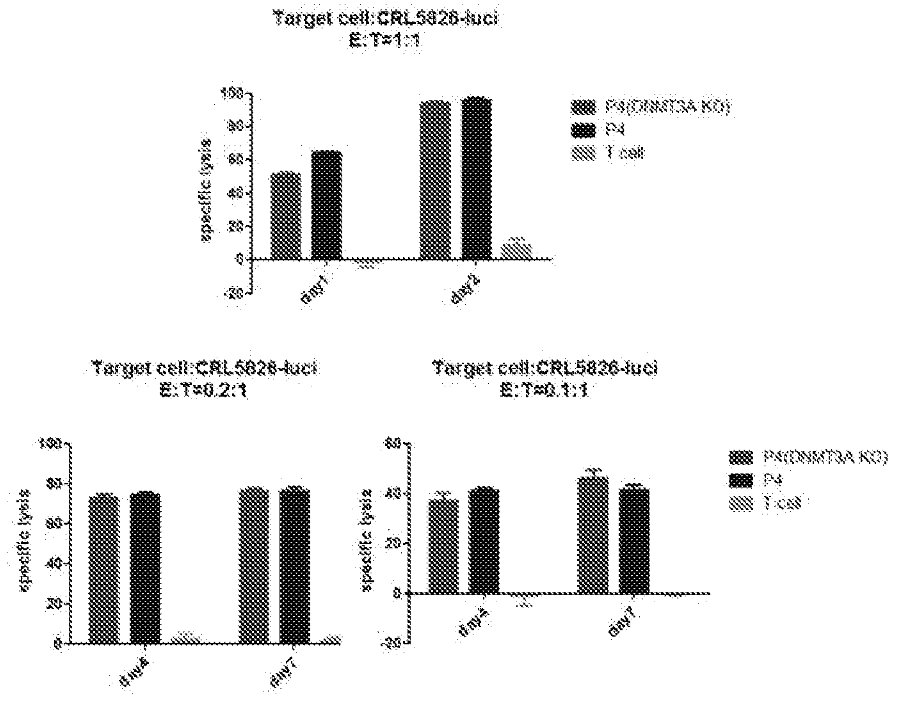

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(ADBR2 KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1

图 21



Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis
day1
day2
P4(DNMT3A KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis
day4
day7
P4(DNMT3A KO)
P4
T cell

图 22

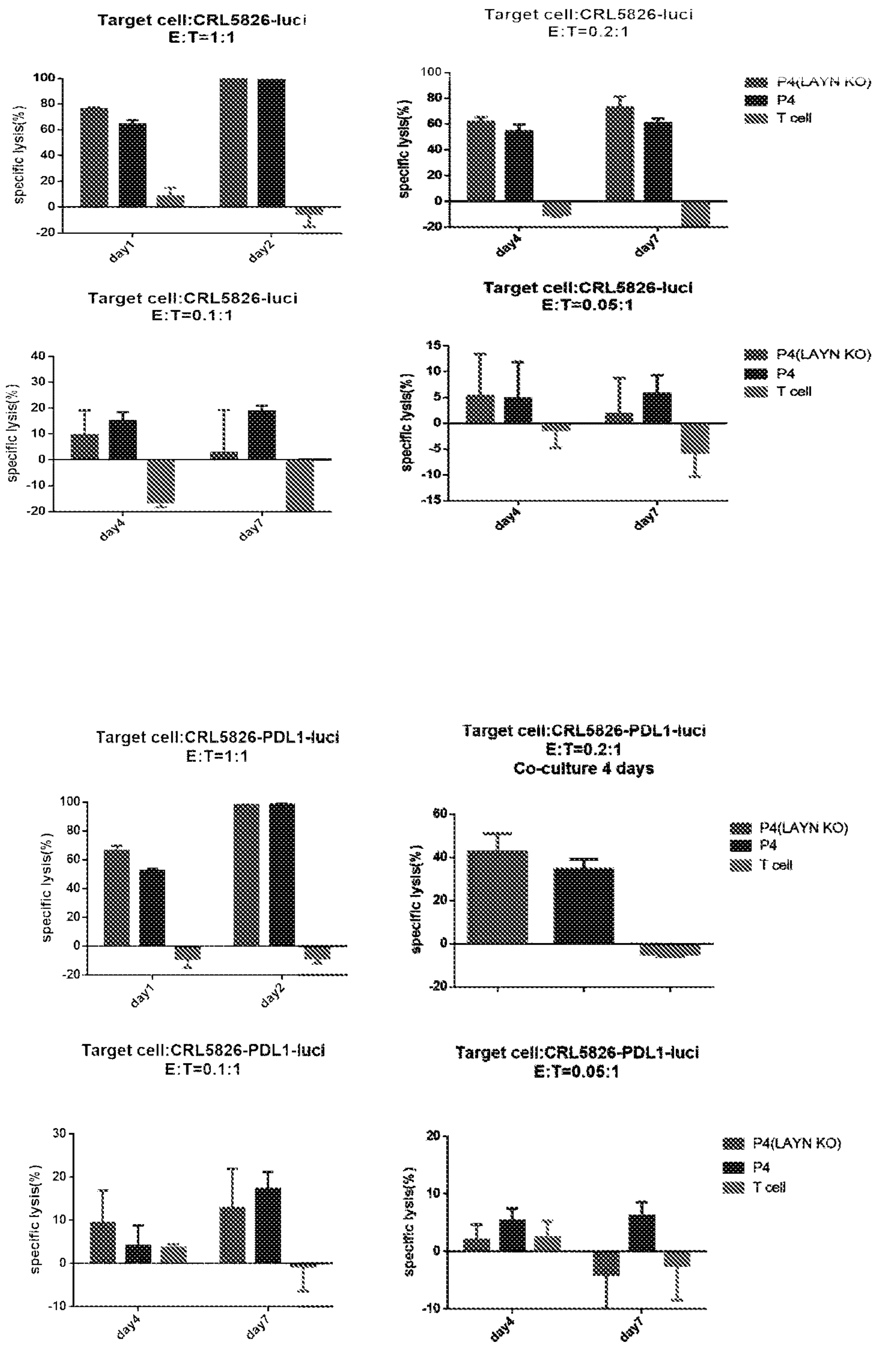

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(LAYN KO)
P4
T cell
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.05:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Co-culture 4 days
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.05:1

图 23

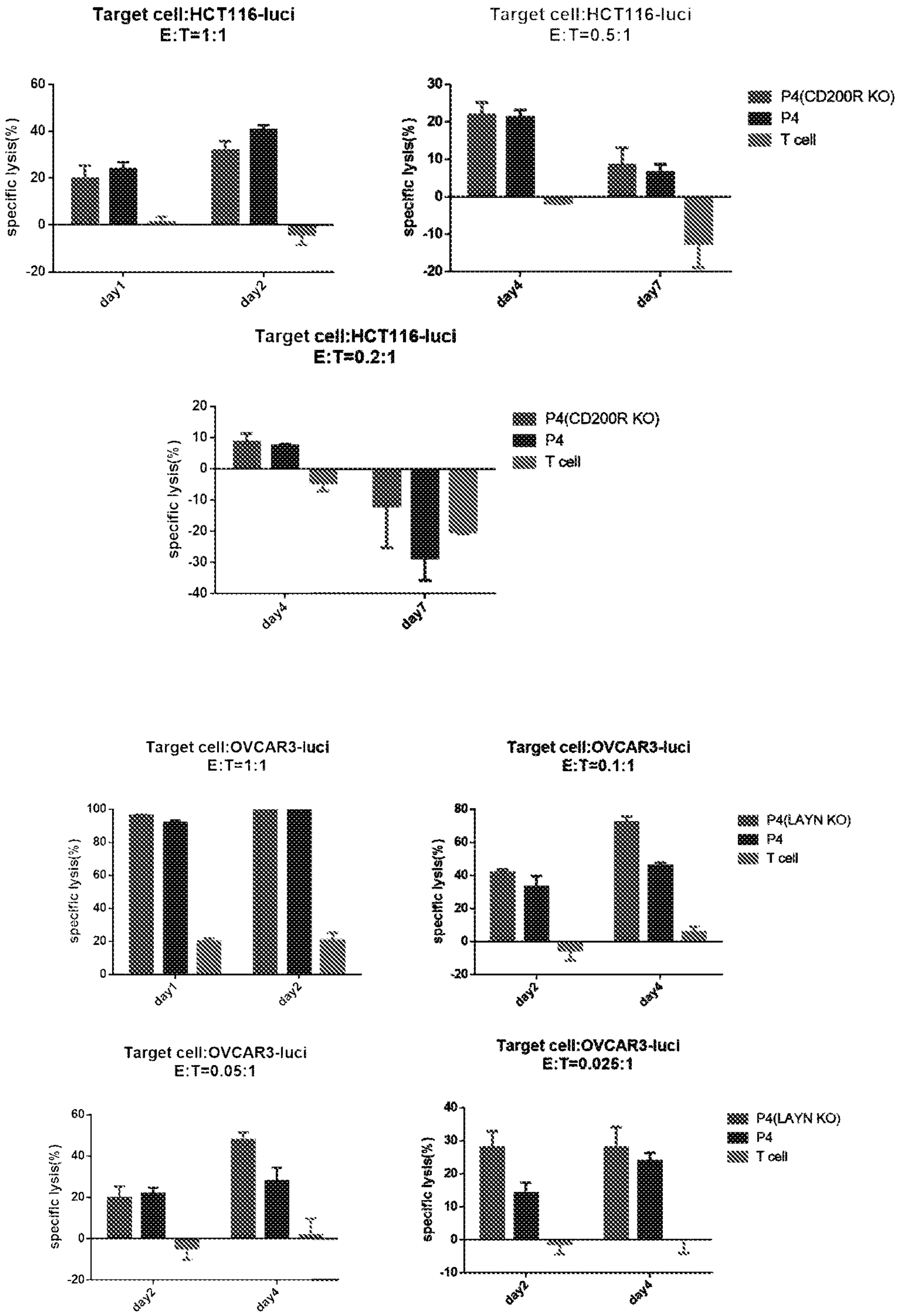

Target cell:HCT116-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.5:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:HCT116-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
day4
day7
P4(CD200R KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
day1
day2
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(LAYN KO)
P4
T cell
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.05:1
specific lysis(%)
day2
day4
Target cell:OVCAR3-luci
E:T=0.025:1
specific lysis(%)
day2
day4
P4(LAYN KO)
P4
T cell

图 24

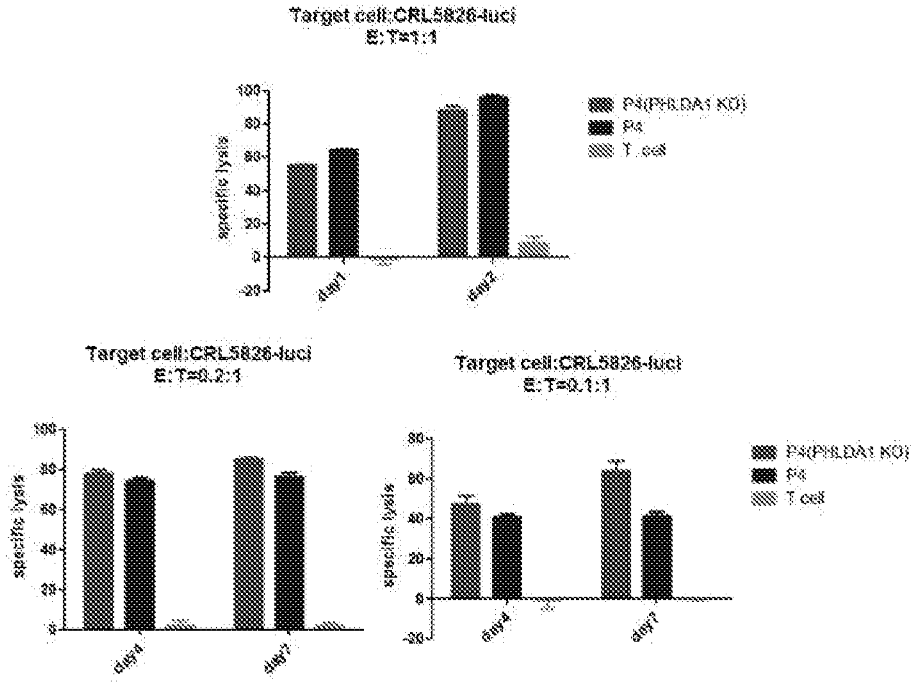

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis
P4(PHLDA1 KO)
P4
T cell
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1

图 25

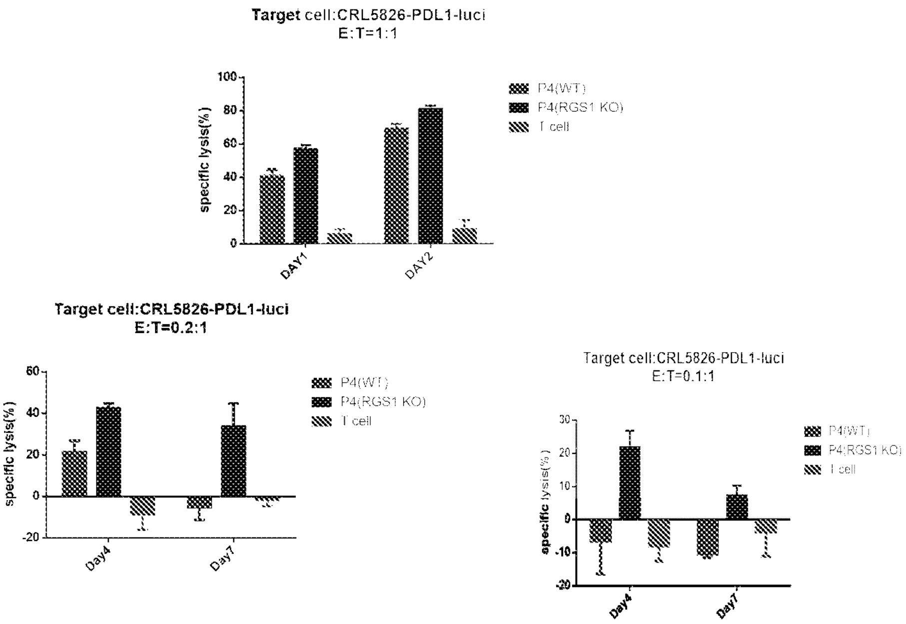

Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
P4(WT)
P4(RGS1 KO)
T cell
DAY1
DAY2
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
Day4
Day7
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1

图 26

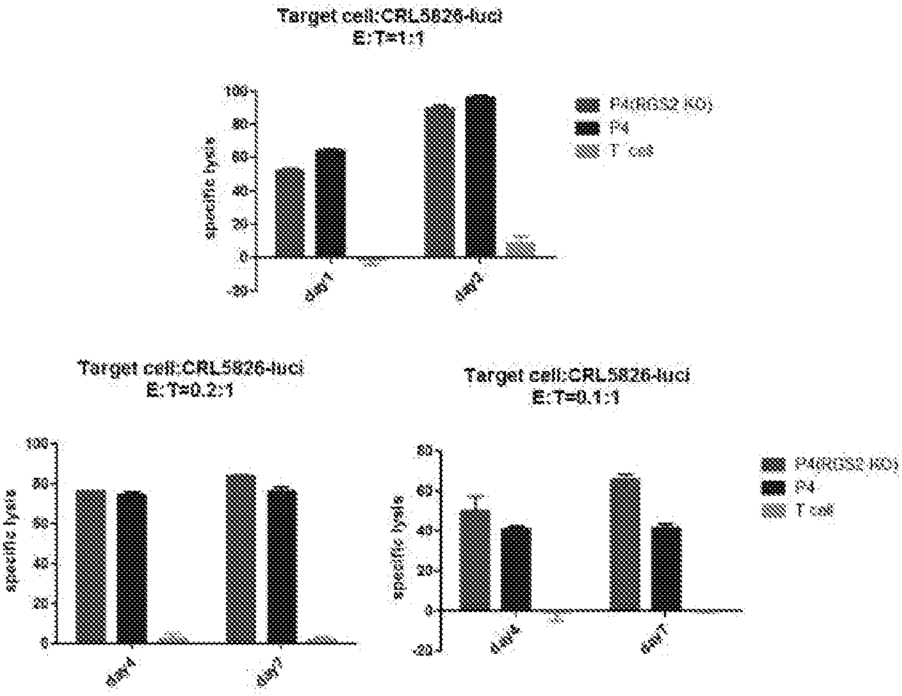

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(RGS2 KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
P4(RGS2 KO)
P4
T cell
specific lysis
day4
day7

图 27

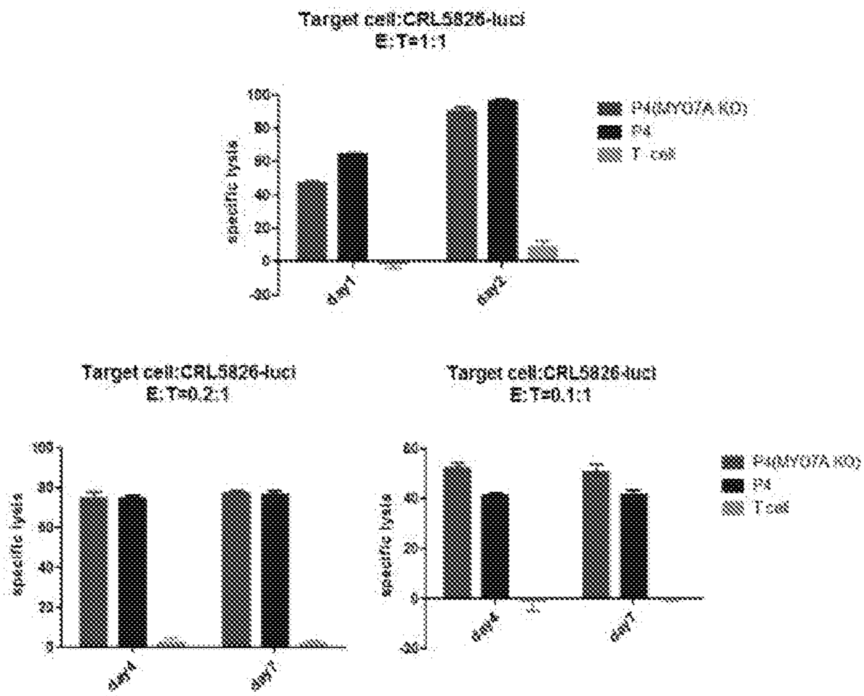

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(MYO7A KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
P4(MYO7A KO)
P4
T cell
specific lysis
day4
day7

图 28

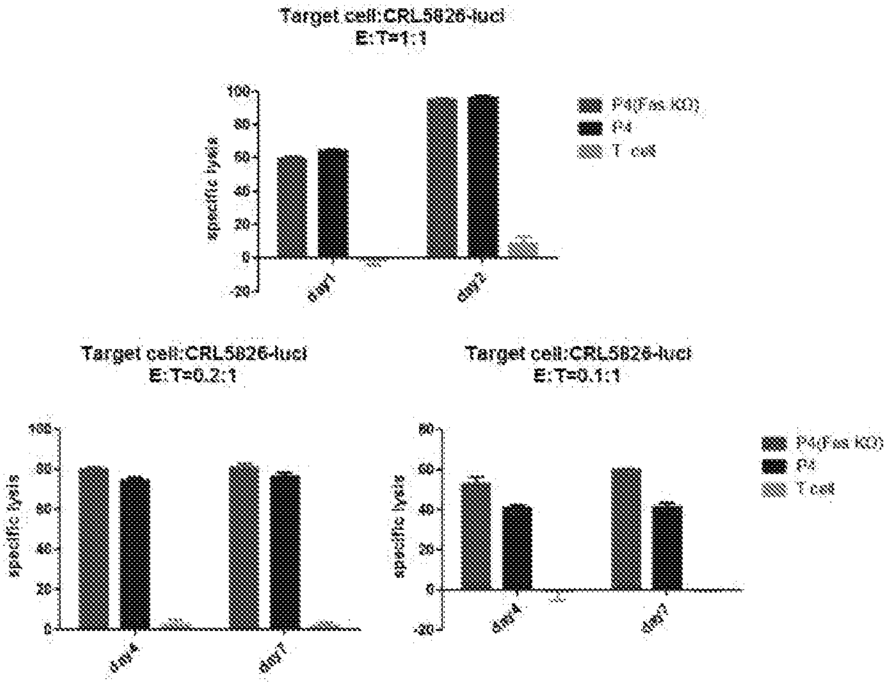

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis
P4(Fas KO)
P4
T cell
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis
P4(Fas KO)
P4
T cell
day4
day7

图 29

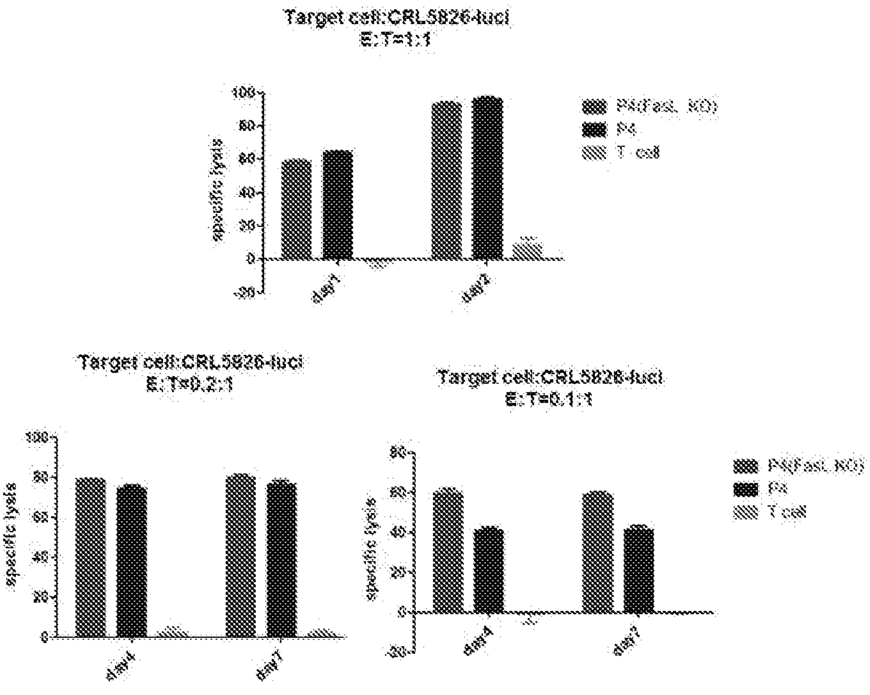

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
specific lysis
P4(FasL KO)
P4
T cell
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis
P4(FasL KO)
P4
T cell
day4
day7

图 30

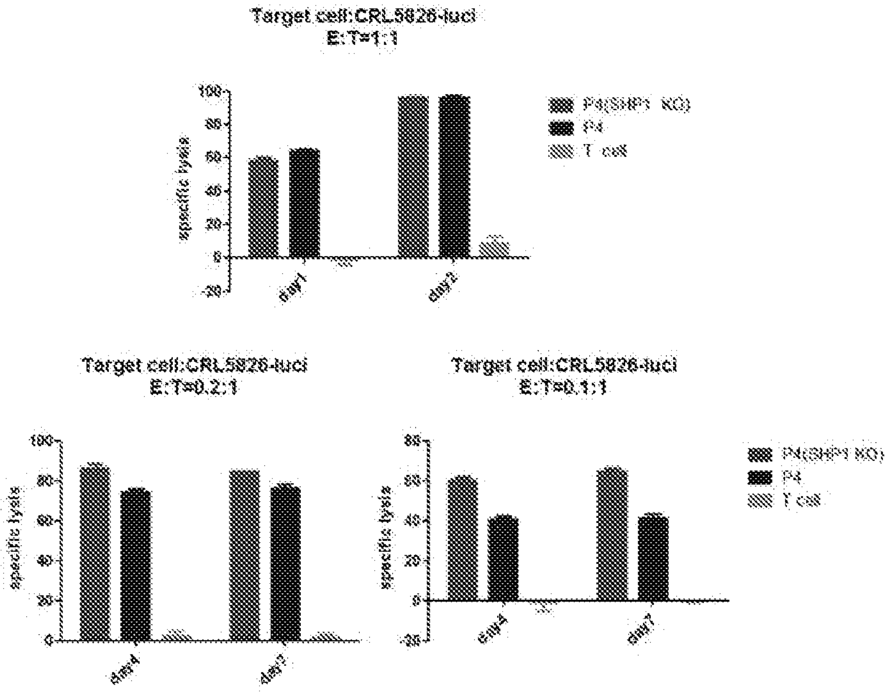

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(SHP1 KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis
day4
day7
P4(SHP1 KO)
P4
T cell

图 31

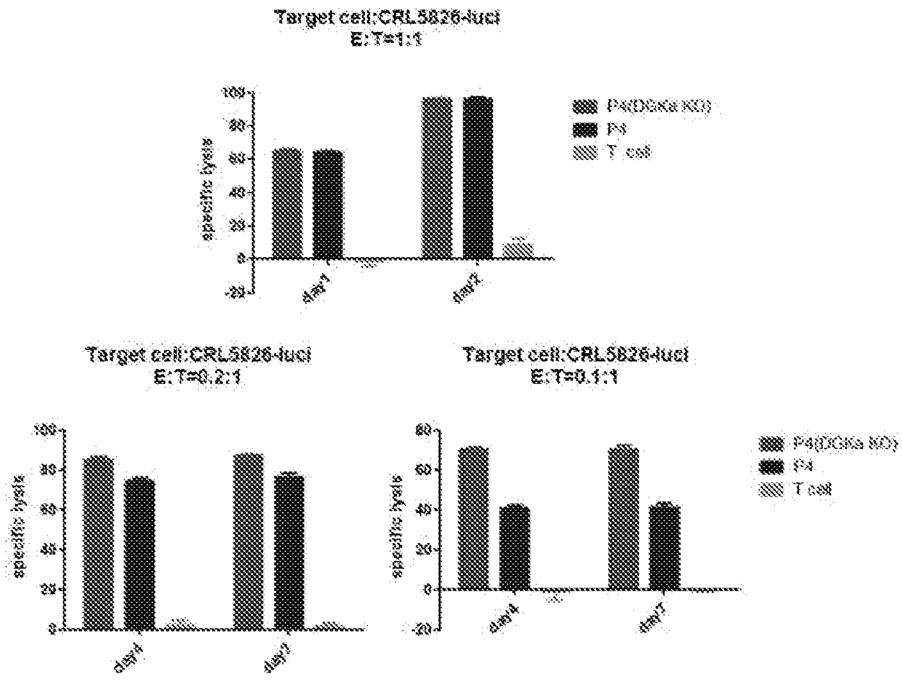

Target cell:CRL5826-luci
E:T=1:1
P4(DGKa KO)
P4
T cell
specific lysis
day1
day2
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.2:1
specific lysis
day4
day7
Target cell:CRL5826-luci
E:T=0.1:1
specific lysis
day4
day7
P4(DGKa KO)
P4
T cell

图 32

A

B

C

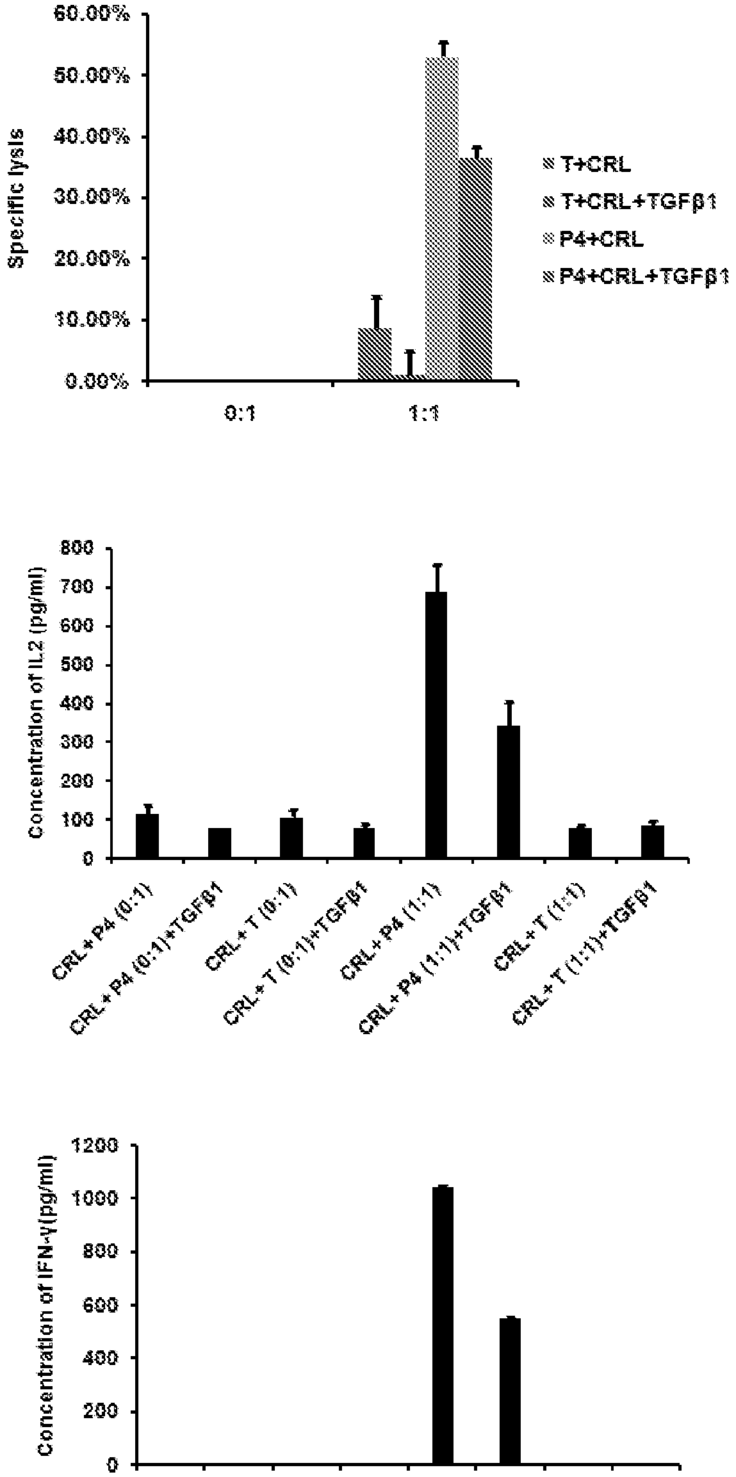

60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
Specific lysis
0:1
1:1
T+CRL
T+CRL+TGFβ1
P4+CRL
P4+CRL+TGFβ1
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Concentration of IL2 (pg/ml)
CRL+P4 (0:1)
CRL+P4 (0:1)+TGFβ1
CRL+T (0:1)
CRL+T (0:1)+TGFβ1
CRL+P4 (1:1)
CRL+P4 (1:1)+TGFβ1
CRL+T (1:1)
CRL+T (1:1)+TGFβ1
1200
1000
800
600
400
200
0
Concentration of IFN-γ(pg/ml)

图 33

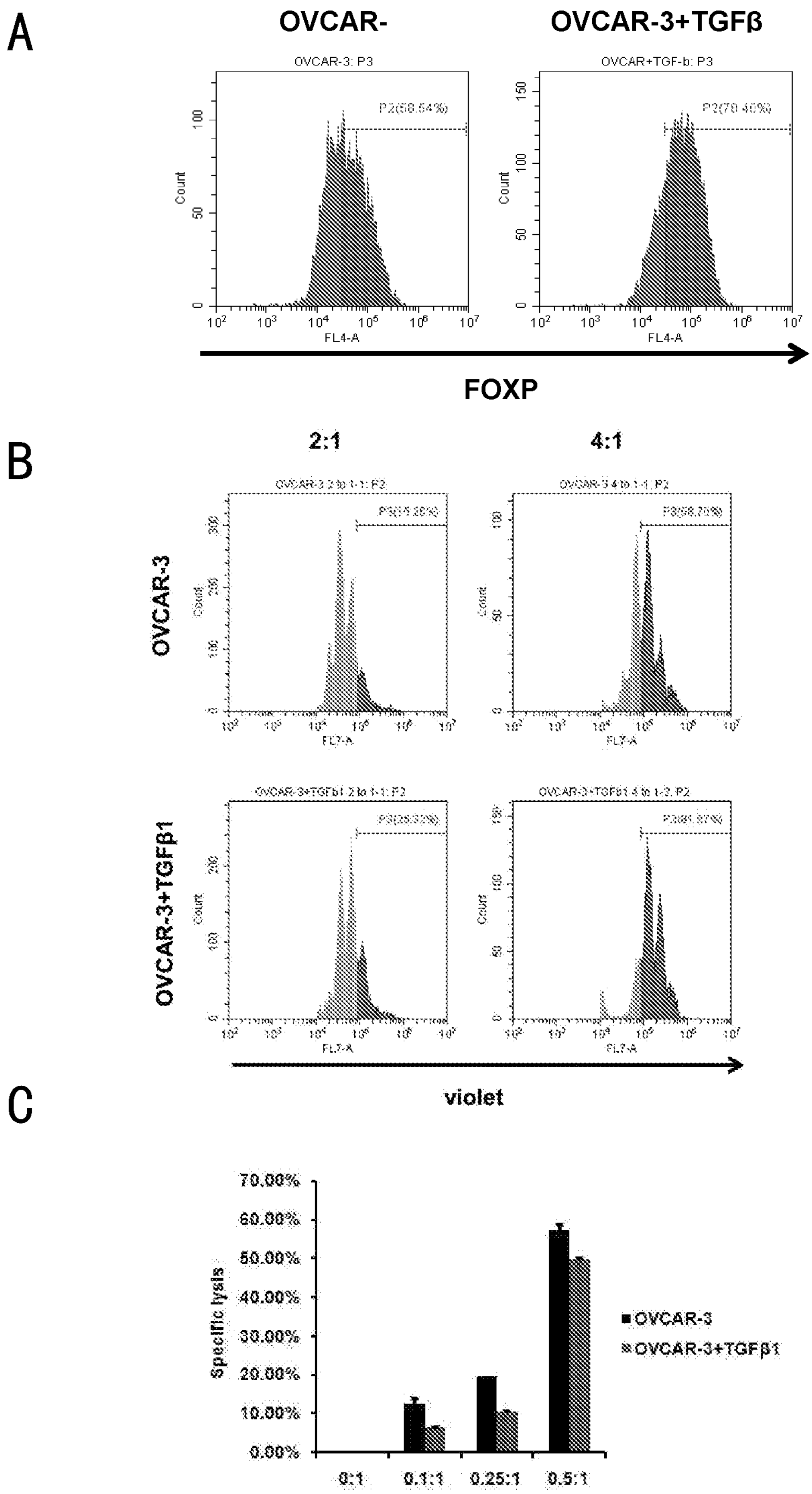
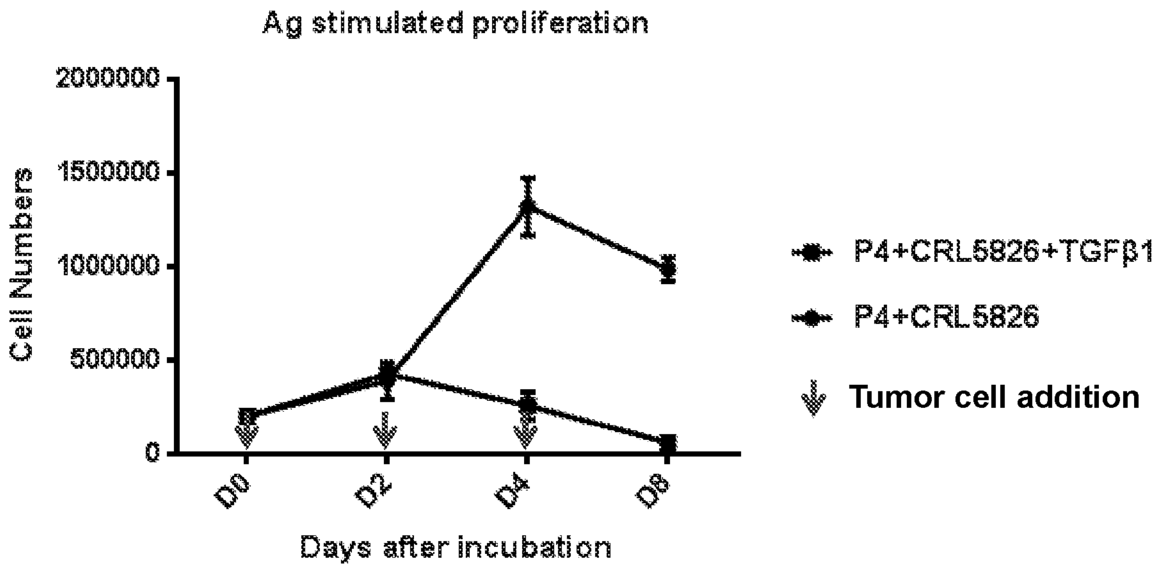

A
OVCAR-
OVCAR-3+TGFβ
OVCAR-3: P3
OVCAR+TGF-b: P3
Count
FL4-A
FOXP
B
2:1
4:1
OVCAR-3
OVCAR-3+TGFβ1
Count
FL7-A
violet
C
Specific lysis
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
0:1
0.1:1
0.25:1
0.5:1
OVCAR-3
OVCAR-3+TGFβ1

图 34

A


Ag stimulated proliferation
2000000
1500000
1000000
500000
0
Cell Numbers
D0
D2
D4
D8
Days after incubation
P4+CRL5826+TGFβ1
P4+CRL5826
Tumor cell addition

B

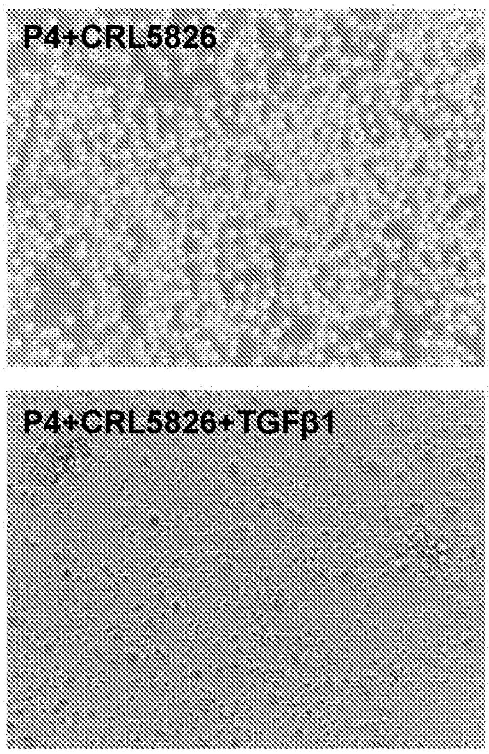
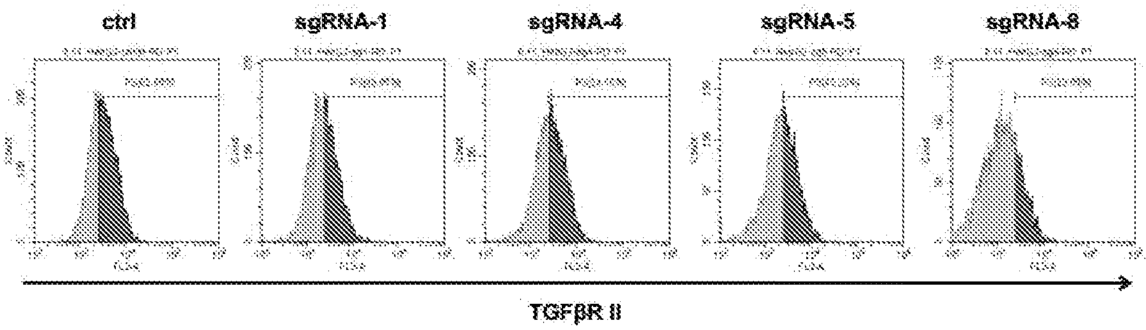

P4+CRL5826
P4+CRL5826+TGFβ1

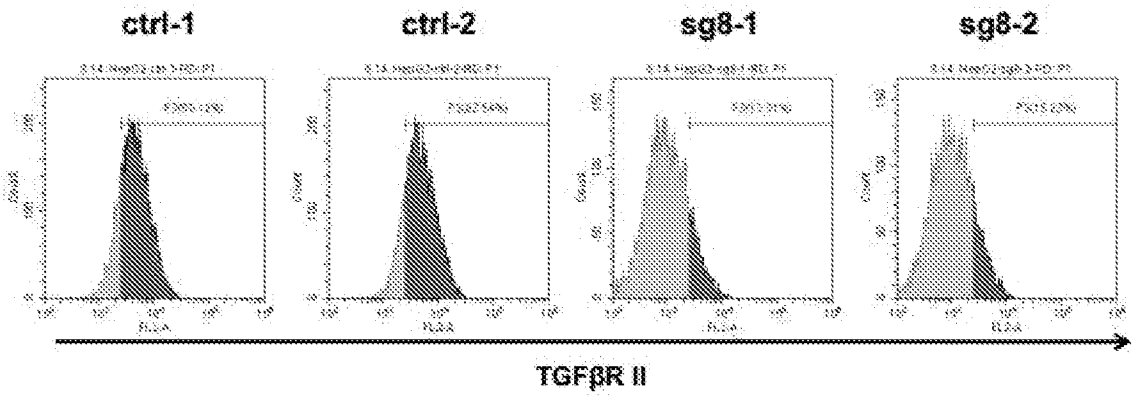
图 35

A



	sgRNA-1	sgRNA-4	sgRNA-5	sgRNA-8
Target sequence	TGCTGGCG ATACGCGT CCAC	CCATGGGTC GGGGGCTG CTC	CGAGCAGC GGGGTCTG CCAT	CCTGAGC AGCCCCC GACCCA
KO efficiency	27.0%	13.6%	28.0%	64.0%
TIDE (F/R)	11.0/10.6%	9.0/8.3%	19.0/21.0%	62.0/57.0%

B



	sg8-1	sg8-2
KO efficiency	83.39%	81.56%
TIDE (F/R)	91.7/94.6%	90.8/93.6%

图 36

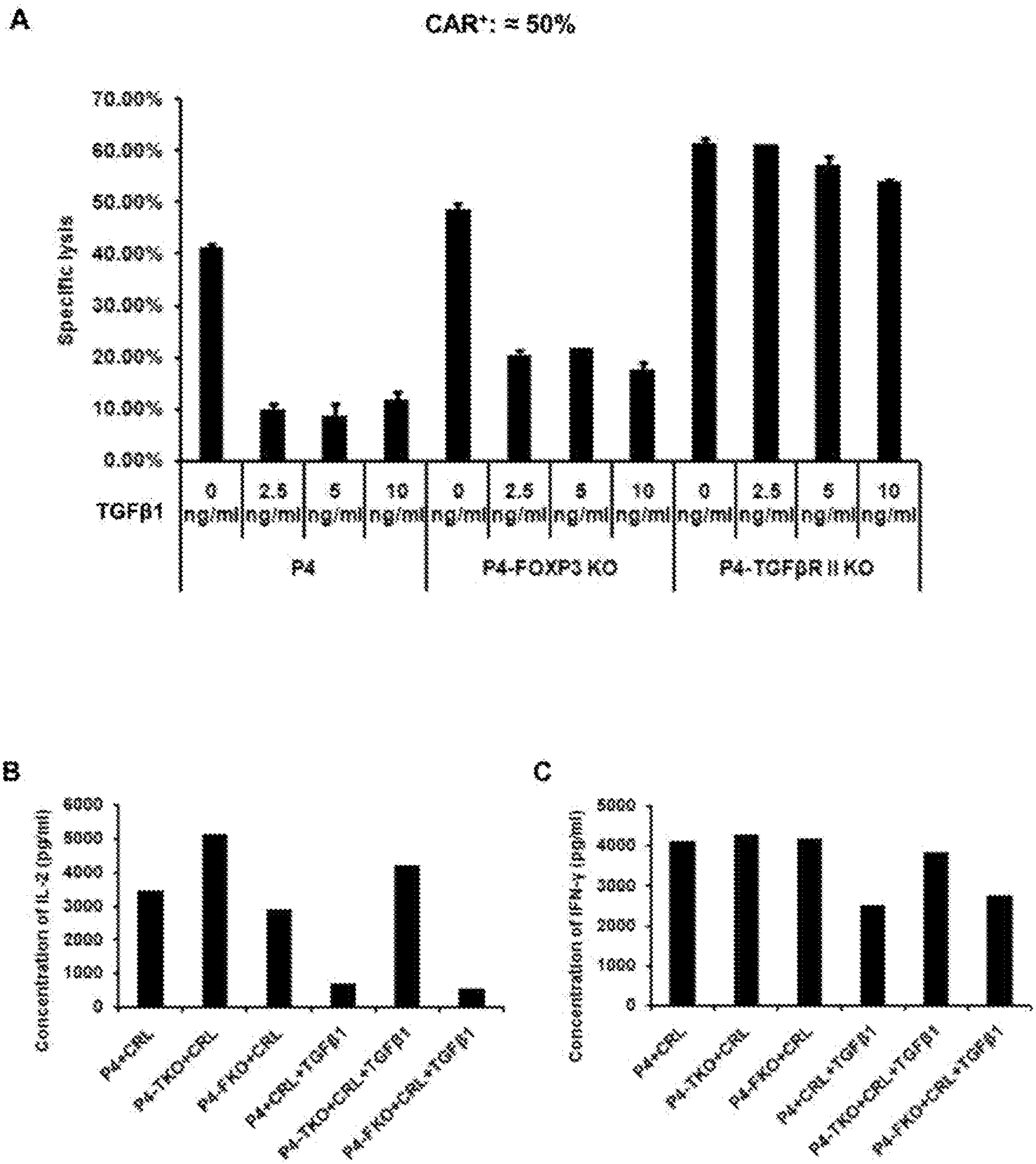

A
CAR+: ≈ 50%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
Specific lysis
TGFβ1
0 ng/ml
2.5 ng/ml
5 ng/ml
10 ng/ml
P4
P4-FOXP3 KO
P4-TGFβR II KO
B
Concentration of IL-2 (pg/ml)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
P4+CRL
P4-TKO+CRL
P4-FKO+CRL
P4+CRL+TGFβ1
P4-TKO+CRL+TGFβ1
P4-FKO+CRL+TGFβ1
C
Concentration of IFN-γ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
P4+CRL
P4-TKO+CRL
P4-FKO+CRL
P4+CRL+TGFβ1
P4-TKO+CRL+TGFβ1
P4-FKO+CRL+TGFβ1

图 37

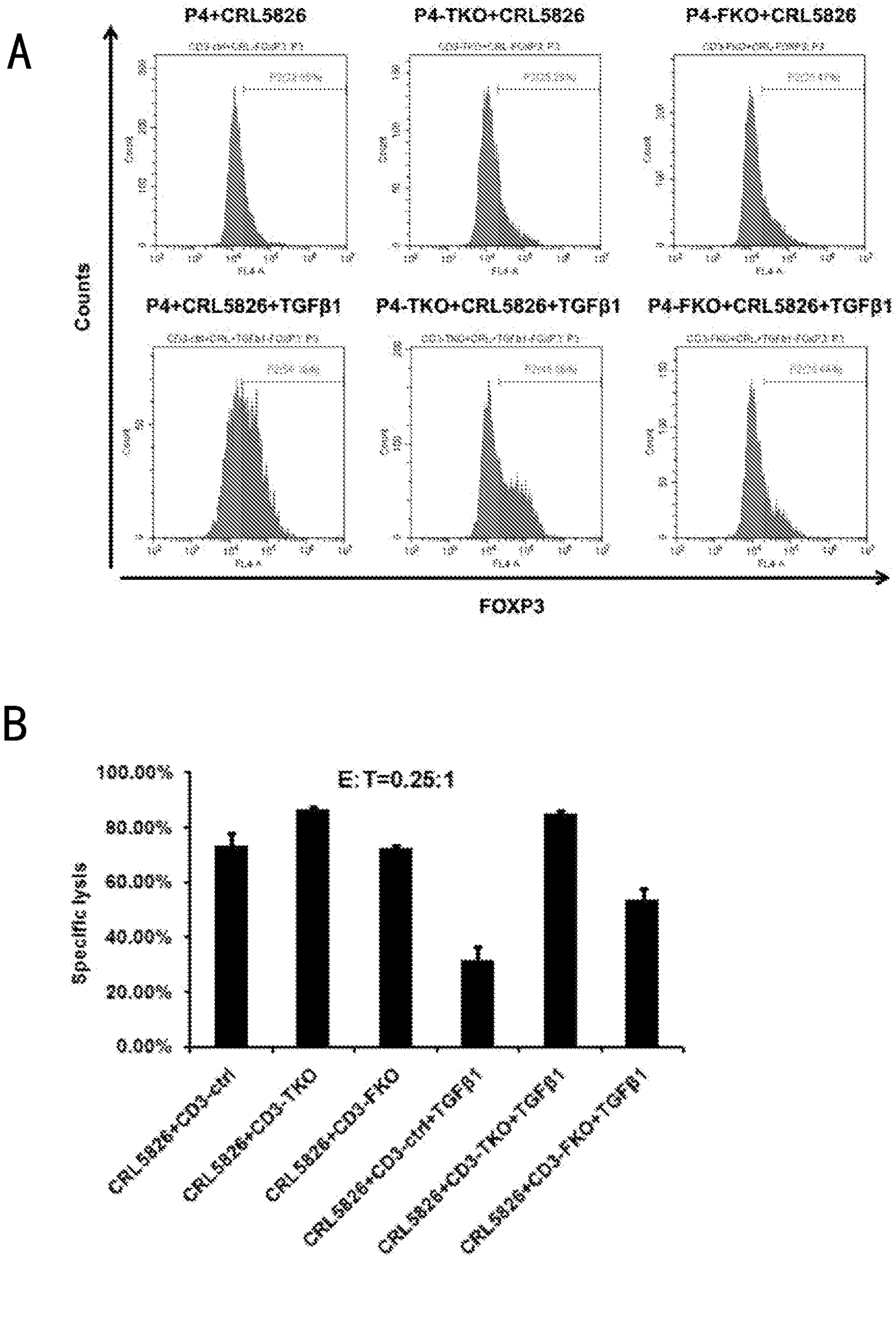
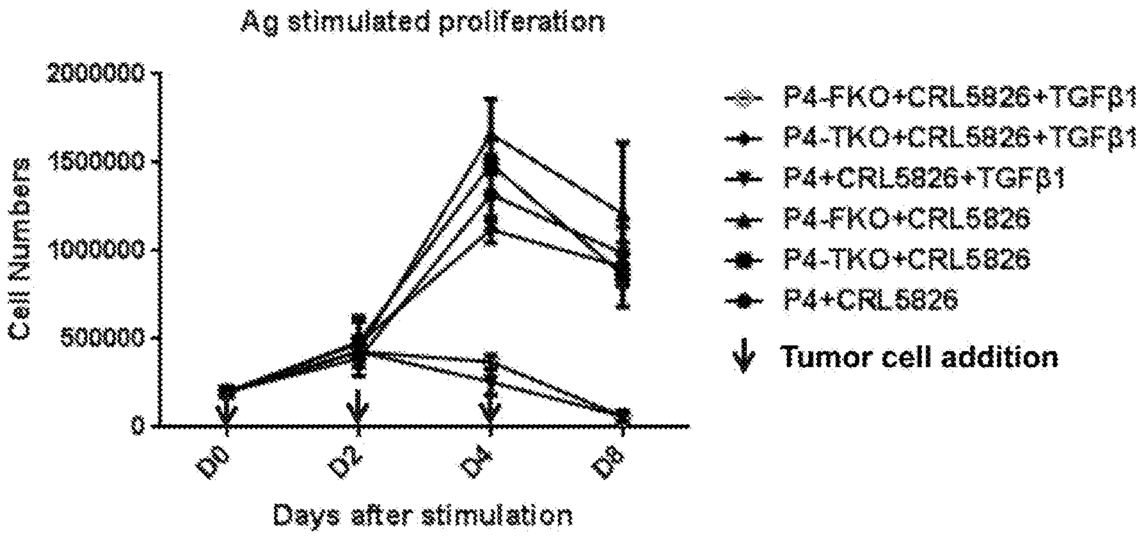

A
P4+CRL5826
P4-TKO+CRL5826
P4-FKO+CRL5826
P4+CRL5826+TGFβ1
P4-TKO+CRL5826+TGFβ1
P4-FKO+CRL5826+TGFβ1
Counts
FOXP3
B
E:T=0.25:1
Specific lysis
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
CRL5826+CD3-ctrl
CRL5826+CD3-TKO
CRL5826+CD3-FKO
CRL5826+CD3-ctrl+TGFβ1
CRL5826+CD3-TKO+TGFβ1
CRL5826+CD3-FKO+TGFβ1

图 38

A


Ag stimulated proliferation
Cell Numbers
2000000
1500000
1000000
500000
0
D0
D2
D4
D8
Days after stimulation
P4-FKO+CRL5826+TGFβ1
P4-TKO+CRL5826+TGFβ1
P4+CRL5826+TGFβ1
P4-FKO+CRL5826
P4-TKO+CRL5826
P4+CRL5826
Tumor cell addition

B

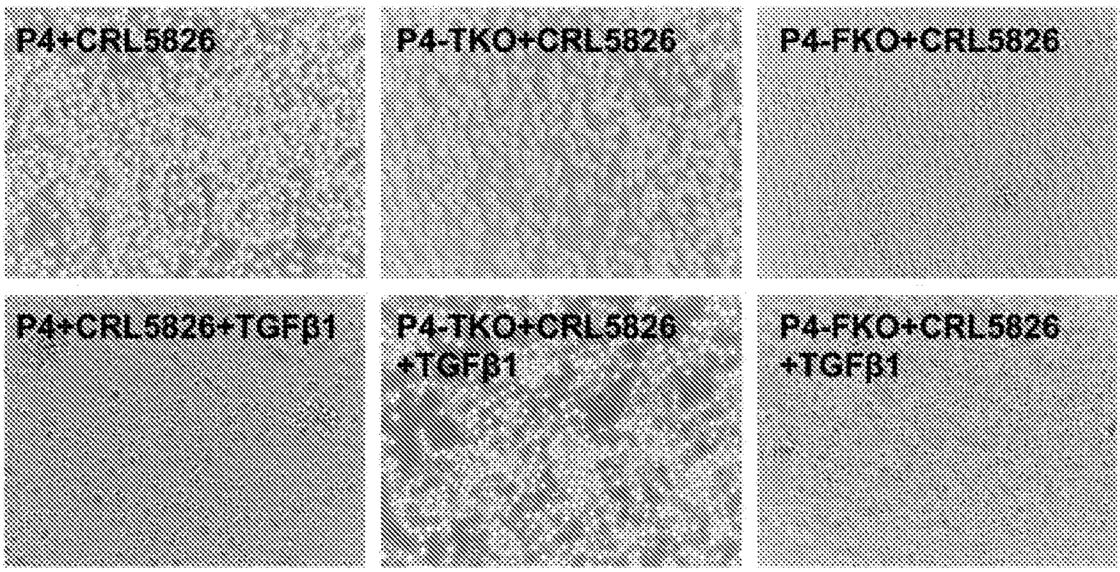

P4+CRL5826
P4-TKO+CRL5826
P4-FKO+CRL5826
P4+CRL5826+TGFβ1
P4-TKO+CRL5826
+TGFβ1
P4-FKO+CRL5826
+TGFβ1

图 39

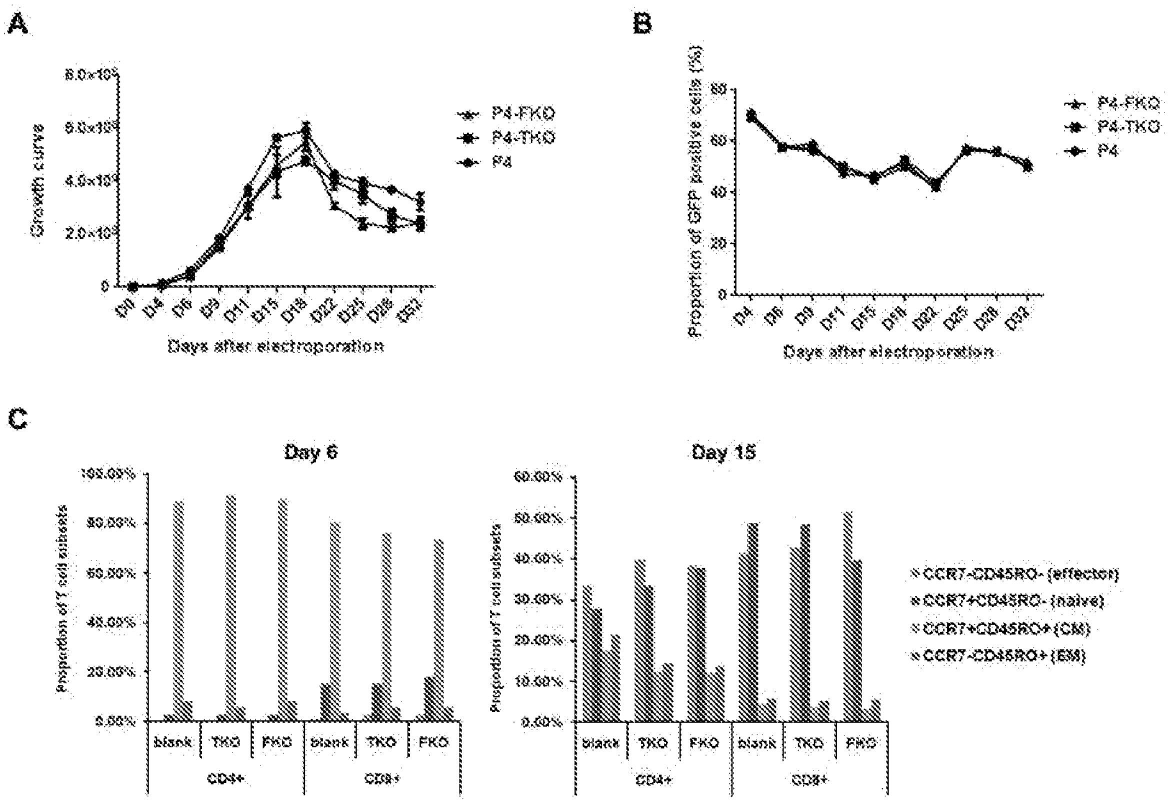

A
Growth curve
Days after electroporation
P4-FKO
P4-TKO
P4
B
Proportion of GFP positive cells (%)
Days after electroporation
P4-FKO
P4-TKO
P4
C
Day 6
Day 15
Proportion of T cell subsets
blank
TKO
FKO
CD4+
CD8+
CCR7-CD45RO- (effector)
CCR7+CD45RO- (naive)
CCR7+CD45RO+ (CM)
CCR7-CD45RO+ (EM)

图 40

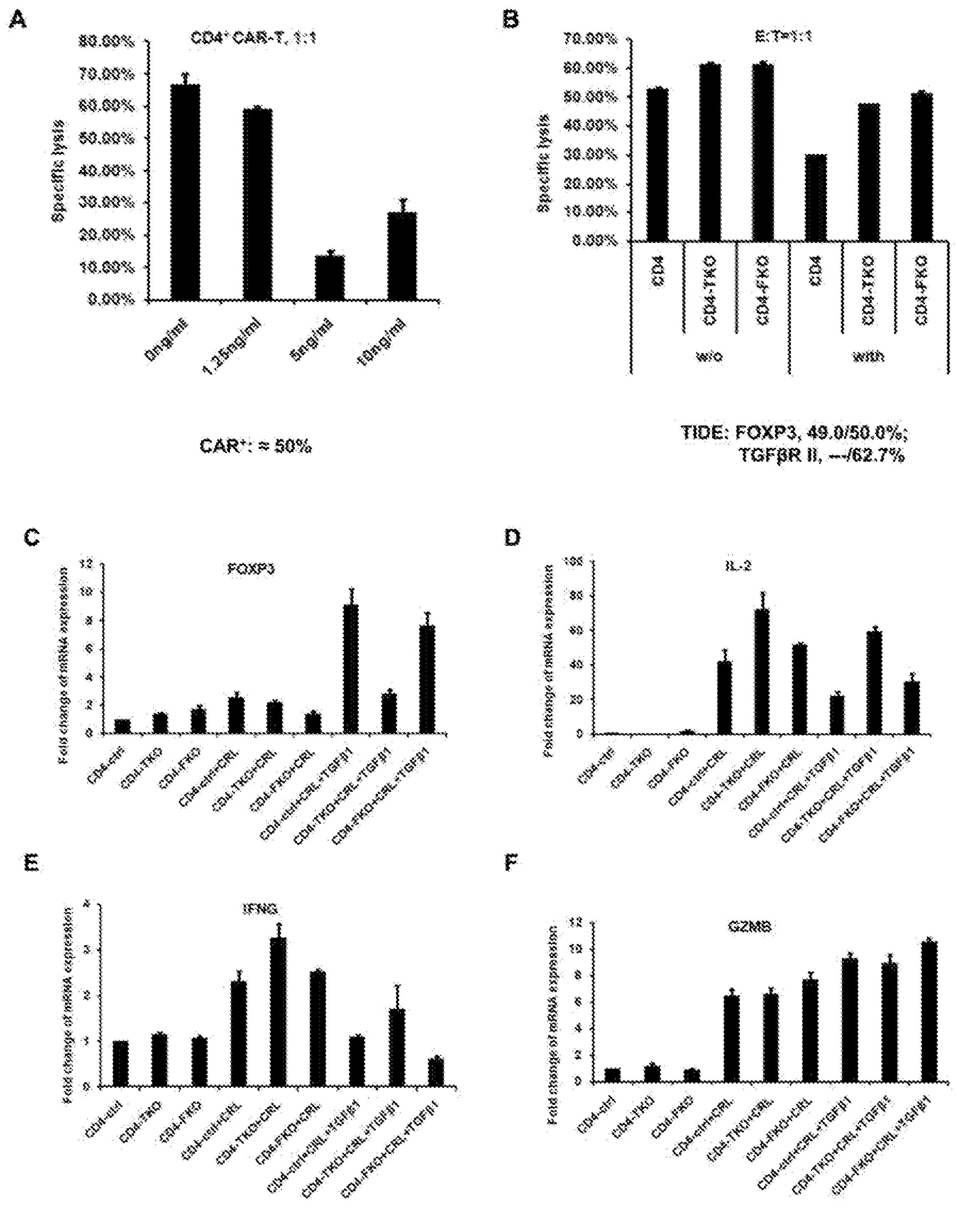

A
CD4+ CAR-T, 1:1
Specific lysis
80.00%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
0ng/ml
1.25ng/ml
5ng/ml
10ng/ml
CAR+: ≈ 50%
B
E:T=1:1
Specific lysis
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
CD4
CD4-TKO
CD4-FKO
CD4
CD4-TKO
CD4-FKO
w/o
with
TIDE: FOXP3, 49.0/50.0%;
TGFβR II, ---/62.7%
C
FOXP3
Fold change of mRNA expression
D
IL-2
Fold change of mRNA expression
E
IFNG
Fold change of mRNA expression
F
GZMB
Fold change of mRNA expression

图 41

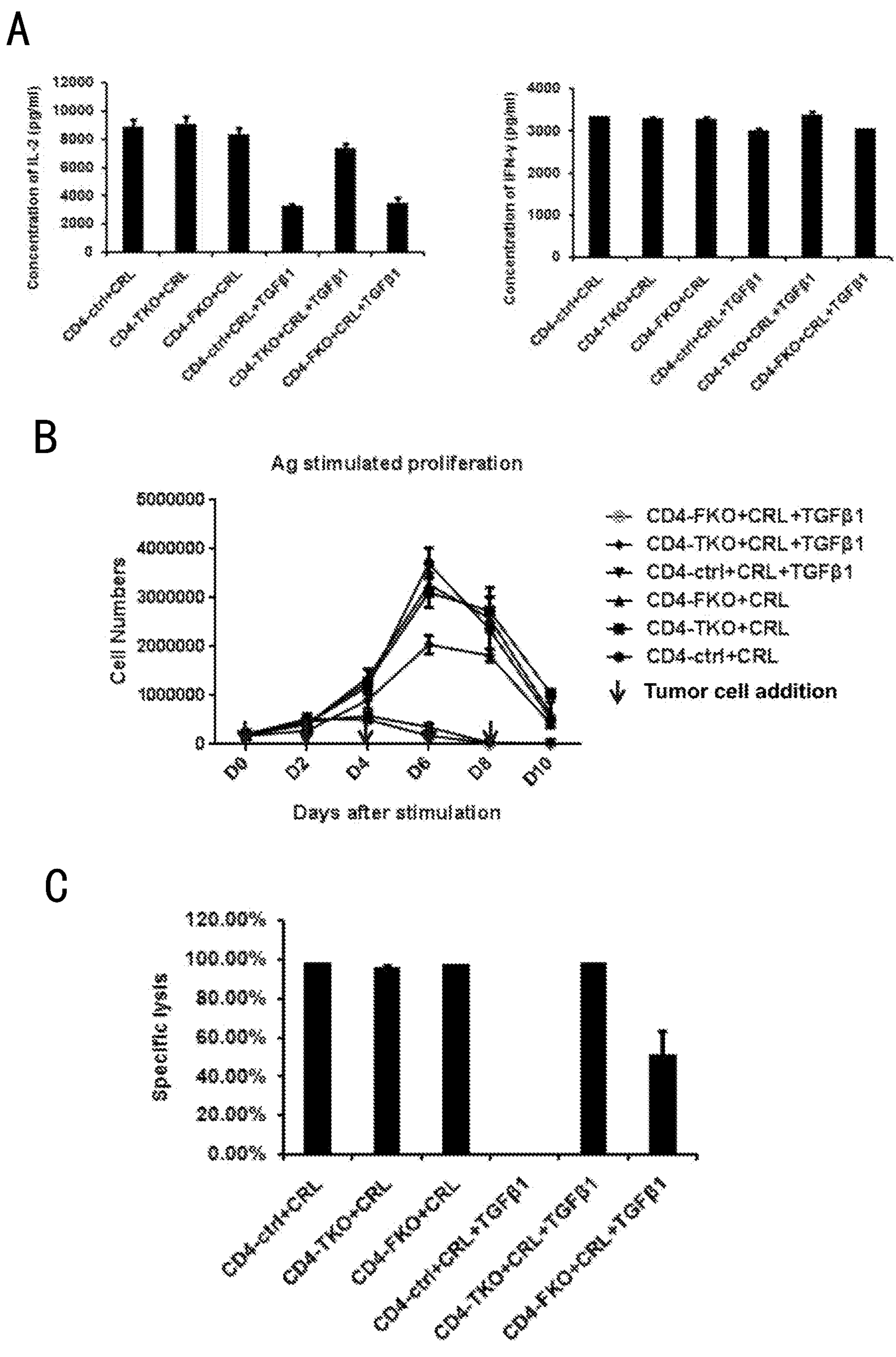

A
Concentration of IL-2 (pg/ml)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
CD4-ctrl+CRL
CD4-TKO+CRL
CD4-FKO+CRL
CD4-ctrl+CRL+TGFβ1
CD4-TKO+CRL+TGFβ1
CD4-FKO+CRL+TGFβ1
Concentration of IFN-γ (pg/ml)
4000
3000
2000
1000
0
B
Ag stimulated proliferation
Cell Numbers
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
D0
D2
D4
D6
D8
D10
Days after stimulation
CD4-FKO+CRL+TGFβ1
CD4-TKO+CRL+TGFβ1
CD4-ctrl+CRL+TGFβ1
CD4-FKO+CRL
CD4-TKO+CRL
CD4-ctrl+CRL
Tumor cell addition
C
Specific lysis
120.00%
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%

图 42

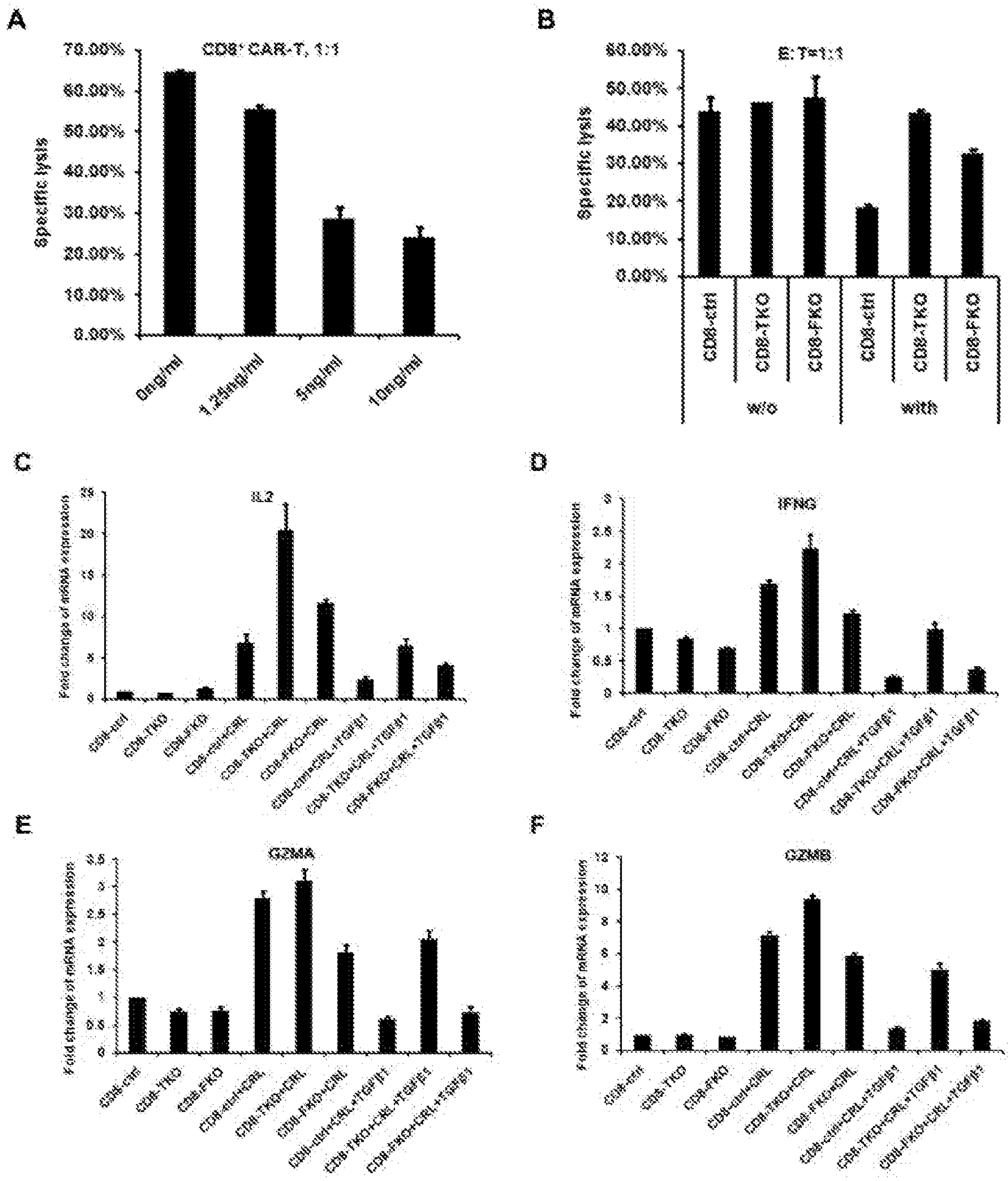
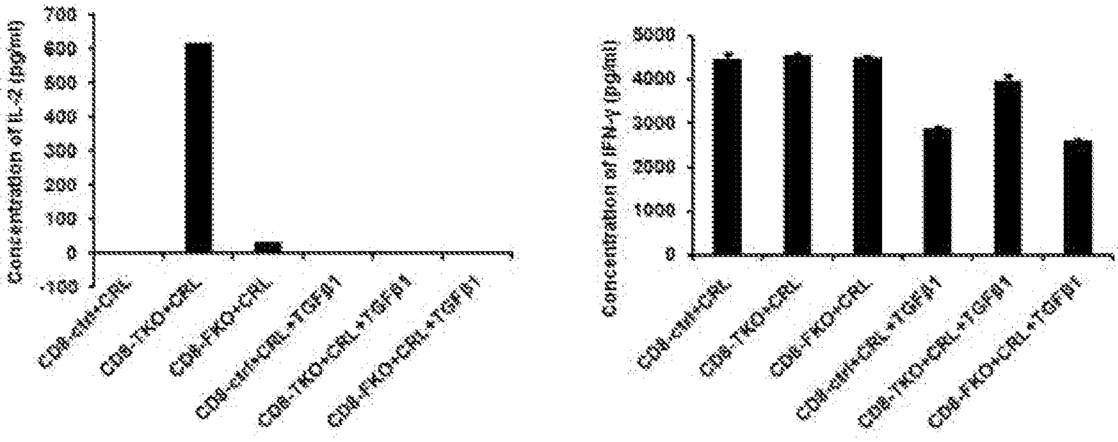
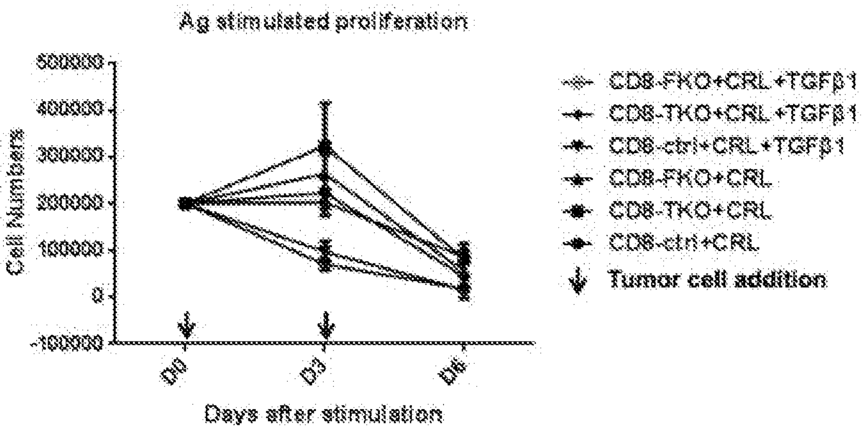

A
CD8⁺ CAR-T, 1:1
Specific lysis
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
0ng/ml
1.25ng/ml
5ng/ml
10ng/ml
B
E:T=1:1
Specific lysis
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
CD8-ctrl
CD8-TKO
CD8-FKO
w/o
with
C
IL2
Fold change of mRNA expression
D
IFNG
Fold change of mRNA expression
E
GZMA
Fold change of mRNA expression
F
GZMB
Fold change of mRNA expression

图 43

A


Concentration of IL-2 (pg/ml)
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
CD8-ctrl+CRL
CD8-TKO+CRL
CD8-FKO+CRL
CD8-ctrl+CRL+TGFβ1
CD8-TKO+CRL+TGFβ1
CD8-FKO+CRL+TGFβ1
Concentration of IFN-γ (pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0

B


Ag stimulated proliferation
Cell Numbers
500000
400000
300000
200000
100000
0
-100000
D0
D3
D6
Days after stimulation
CD8-FKO+CRL+TGFβ1
CD8-TKO+CRL+TGFβ1
CD8-ctrl+CRL+TGFβ1
CD8-FKO+CRL
CD8-TKO+CRL
CD8-ctrl+CRL
Tumor cell addition

C

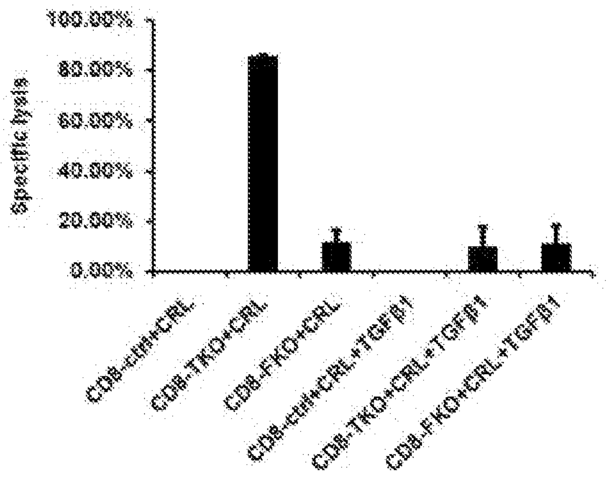

Specific lysis
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
CD8-ctrl+CRL
CD8-TKO+CRL
CD8-FKO+CRL
CD8-ctrl+CRL+TGFβ1
CD8-TKO+CRL+TGFβ1
CD8-FKO+CRL+TGFβ1

图 44

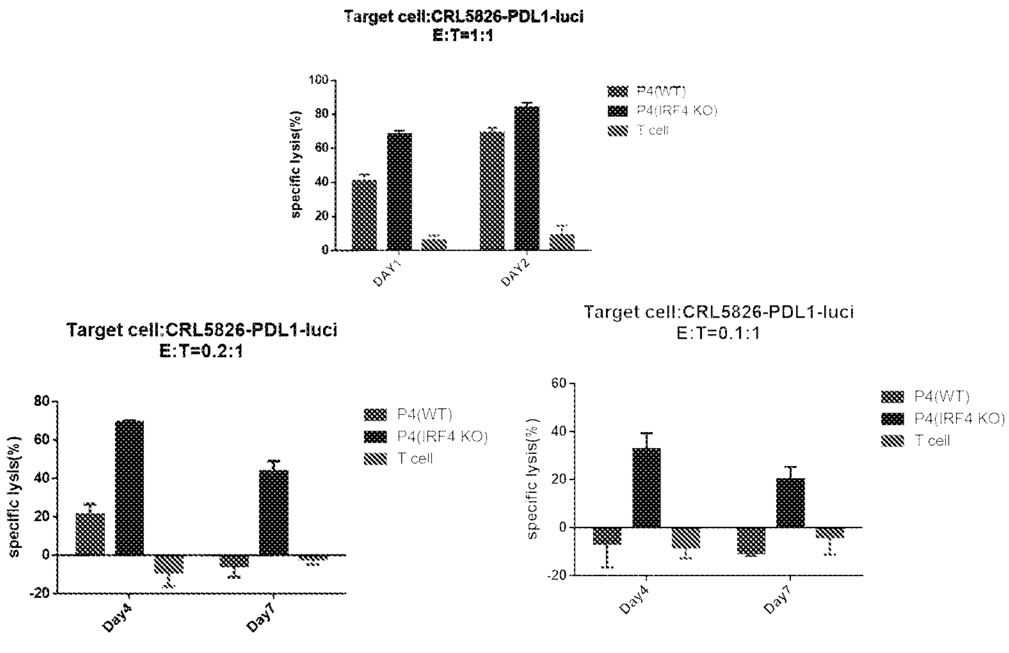

Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=1:1
specific lysis(%)
100
80
60
40
20
0
DAY1
DAY2
P4(WT)
P4(IRF4 KO)
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.2:1
specific lysis(%)
80
60
40
20
0
-20
Day4
Day7
P4(WT)
P4(IRF4 KO)
T cell
Target cell:CRL5826-PDL1-luci
E:T=0.1:1
specific lysis(%)
60
40
20
0
-20
Day4
Day7
P4(WT)
P4(IRF4 KO)
T cell

图 45

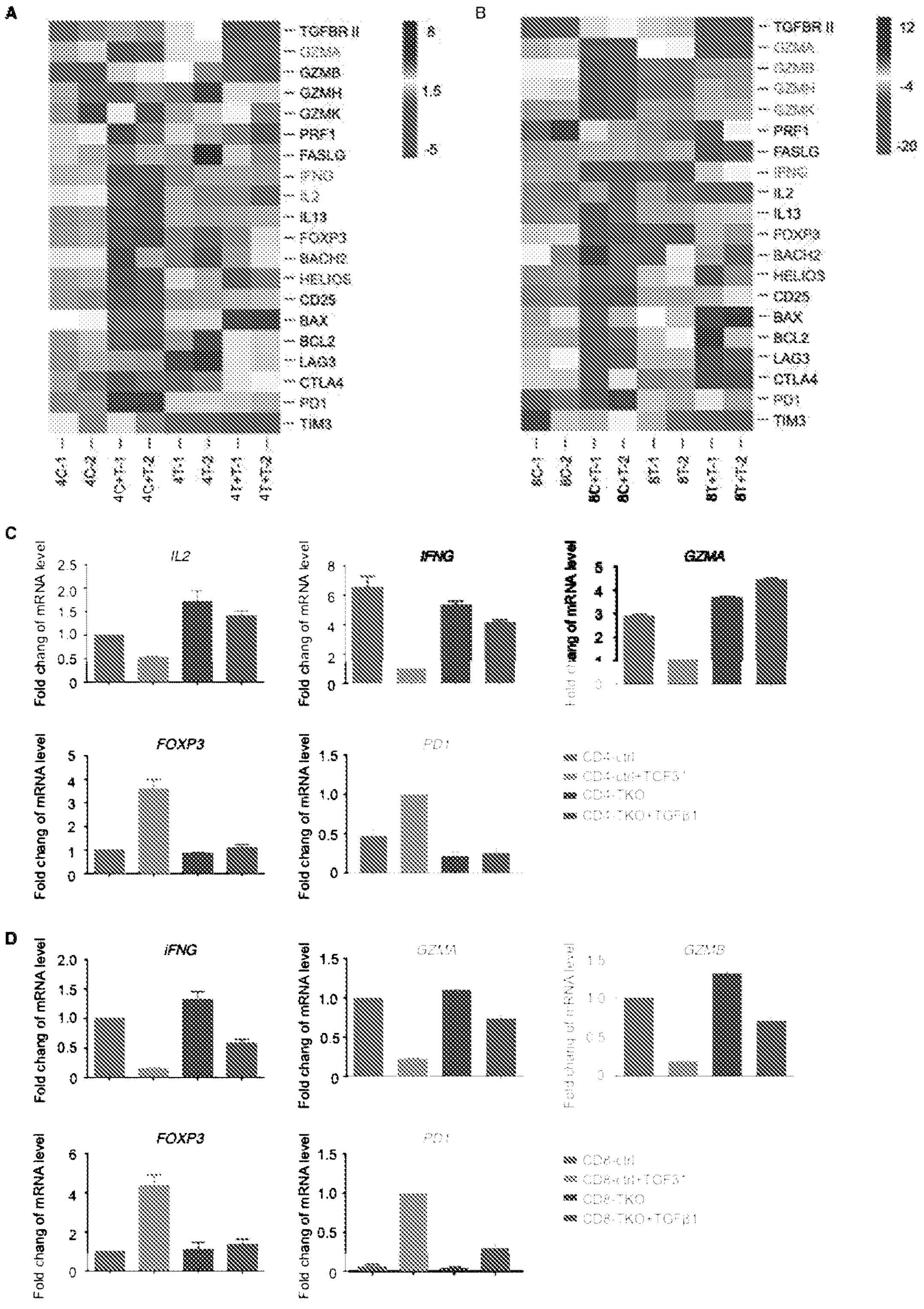

A
TGFBR II
GZMA
GZMB
GZMH
GZMK
PRF1
FASLG
IFNG
IL2
IL13
FOXP3
BACH2
HELIOS
CD25
BAX
BCL2
LAG3
CTLA4
PD1
TIM3
8
1.5
-5
4C-1
4C-2
4C+T-1
4C+T-2
4T-1
4T-2
4T+T-1
4T+T-2
B
12
-4
-20
8C-1
8C-2
8C+T-1
8C+T-2
8T-1
8T-2
8T+T-1
8T+T-2
C
IL2
IFNG
GZMA
FOXP3
PD1
Fold chang of mRNA level
CD4-ctrl
CD4-ctrl+TGFβ1
CD4-TKO
CD4-TKO+TGFβ1
D
IFNG
GZMA
GZMB
FOXP3
PD1
CD8-ctrl
CD8-ctrl+TGFβ1
CD8-TKO
CD8-TKO+TGFβ1

图 46

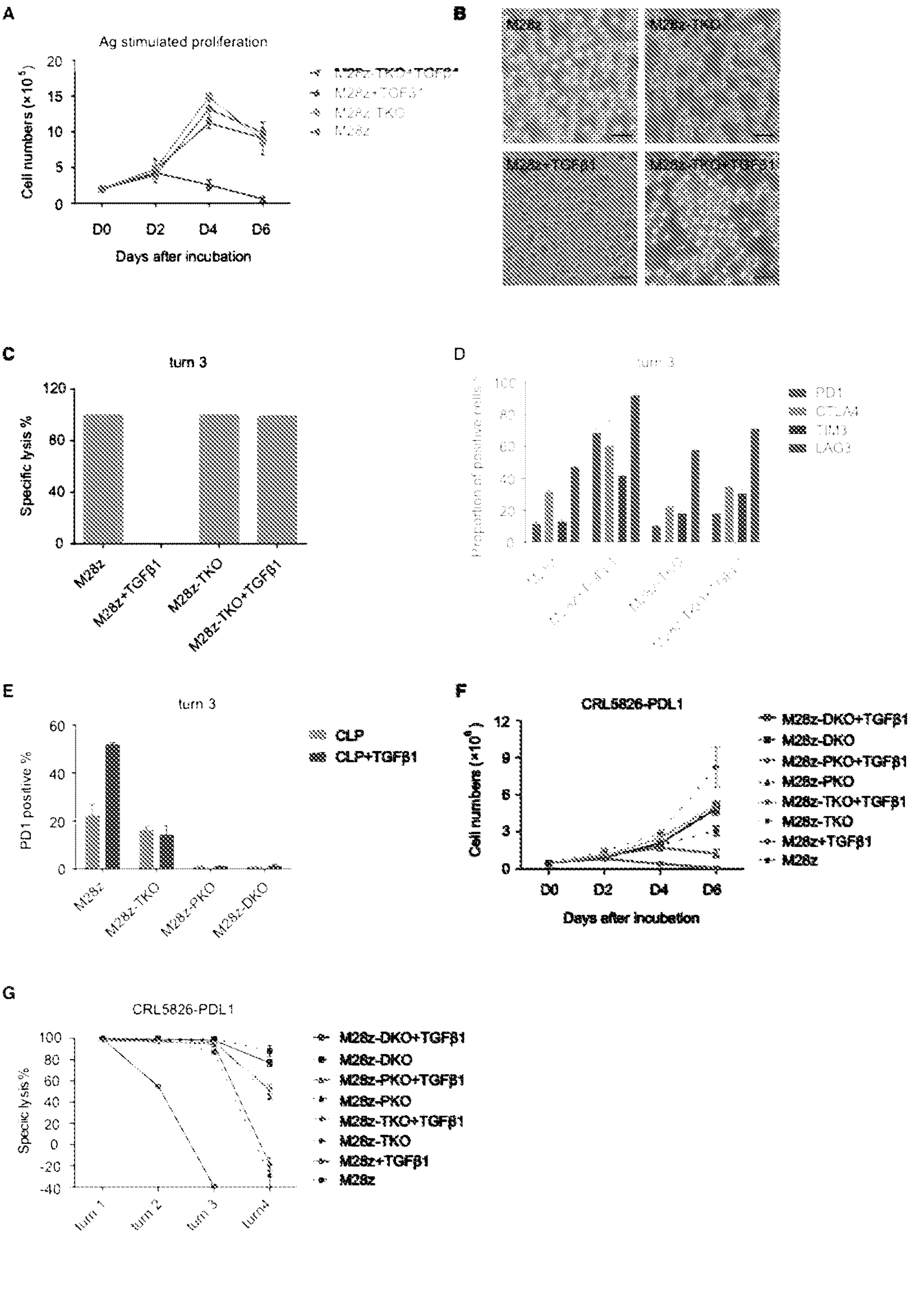

A
Ag stimulated proliferation
Cell numbers (×10^5)
Days after incubation
M28z-TKO+TGFβ1
M28z+TGFβ1
M28z-TKO
M28z
B
M28z
M28z-TKO
M28z+TGFβ1
M28z-TKO+TGFβ1
C
turn 3
Specific lysis %
D
turn 3
PD1
CTLA4
TIM3
LAG3
E
turn 3
PD1 positive %
CLP
CLP+TGFβ1
M28z
M28z-TKO
M28z-PKO
M28z-DKO
F
CRL5826-PDL1
Cell numbers (×10^6)
Days after incubation
M28z-DKO+TGFβ1
M28z-DKO
M28z-PKO+TGFβ1
M28z-PKO
M28z-TKO+TGFβ1
M28z-TKO
M28z+TGFβ1
M28z
G
CRL5826-PDL1
Specific lysis %
turn 1
turn 2
turn 3
turn4

图 47

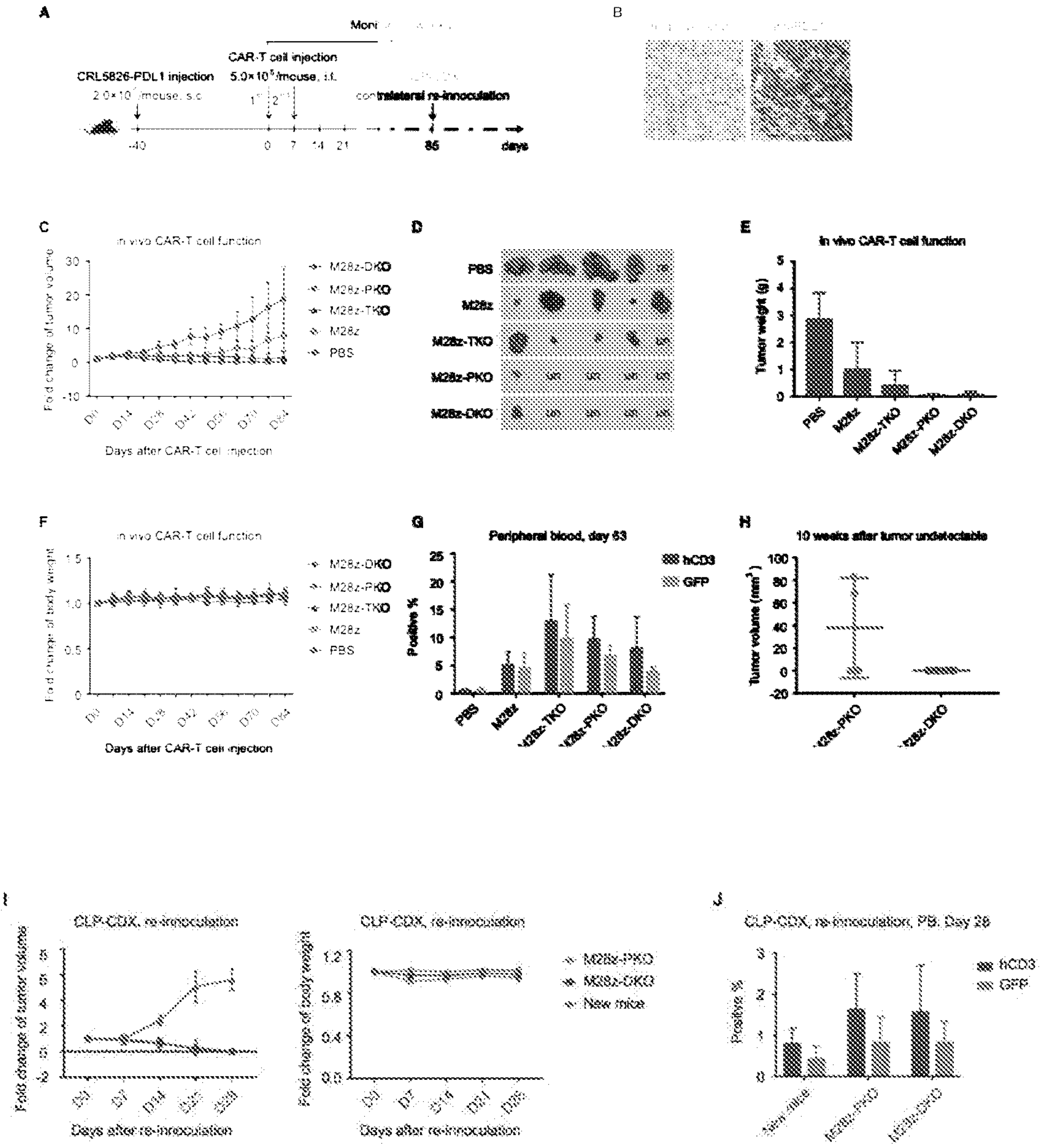

A
CAR-T cell injection
5.0×10^6/mouse, i.t.
CRL5826-PDL1 injection
contralateral re-innoculation
-40
0
7
14
21
85
days
B
C
in vivo CAR-T cell function
Fold change of tumor volume
M28z-DKO
M28z-PKO
M28z-TKO
M28z
PBS
Days after CAR-T cell injection
D
PBS
M28z
M28z-TKO
M28z-PKO
M28z-DKO
E
in vivo CAR-T cell function
Tumor weight (g)
F
in vivo CAR-T cell function
Fold change of body weight
Days after CAR-T cell injection
G
Peripheral blood, day 63
Positive %
hCD3
GFP
H
10 weeks after tumor undetectable
Tumor volume (mm^3)
I
CLP-CDX, re-innoculation
Fold change of tumor volume
Days after re-innoculation
Fold change of body weight
M28z-PKO
M28z-DKO
New mice
J
CLP-CDX, re-innoculation, PB, Day 28
Positive %
hCD3
GFP
New mice
M28z-PKO
M28z-DKO

图 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/106109

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i; C12N 15/90(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, PUBMED, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU XUESHU, NCBI: CAR-T, CAR, TCR, CRISPER, 基因编辑, TGFBRII, TIGIT, BTLA, 2B4, CD160, CD200R, A2aR, IL10RA, ADRB2, BATF, GATA3, IRF4, RARA, LAYN, MYO7A, PHLDA1, RGS1, RGS2, SHP1, DGKa, Fas, FasL, PD1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107523547 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.) 29 December 2017 (2017-12-29) the abstract, claims 1-11, and description, embodiments 6 and 7	1-24
X	CN 107523545 A (SHANGHAI CELL THERAPY RESEARCH INSTITUTE et al.) 29 December 2017 (2017-12-29) the abstract, claims 1-11, and description, paragraph [0010]	1-24
X	WO 2018107058 A1 (ALECTOR LLC) 14 June 2018 (2018-06-14) claims 1-99	1-24
A	CN 108276493 A (NANJING LEGEND BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 13 July 2018 (2018-07-13) entire document	1-24
A	EP 3338800 A1 (IDAC THERANOSTICS, INC. et al.) 27 June 2018 (2018-06-27) entire document	1-24
A	WO 2017068349 A1 (E-THERAPEUTICS PLC) 27 April 2017 (2017-04-27) entire document	1-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
03 December 2019	**18 December 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/106109

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107523547	A	29 December 2017	WO	2017219937	A1	28 December 2017
CN	107523545	A	29 December 2017	WO	2017219934	A1	28 December 2017
WO	2018107058	A1	14 June 2018	CN	110325549	A	11 October 2019
				US	2019275150	A1	12 September 2019
				AU	2017371070	A1	13 June 2019
				EP	3551661	A1	16 October 2019
				CA	3044684	A1	14 June 2018
				KR	20190091330	A	05 August 2019
CN	108276493	A	13 July 2018	US	2019321404	A1	24 October 2019
				EP	3564266	A1	06 November 2019
				WO	2018121712	A1	05 July 2018
EP	3338800	A1	27 June 2018	US	2017165364	A1	15 June 2017
				JP	6029160	B2	24 November 2016
				JP	6578604	B2	25 September 2019
				JP	2017014254	A	19 January 2017
				US	2019125867	A1	02 May 2019
				JP	2019070056	A	09 May 2019
				JP	WO2015125652	A1	30 March 2017
				EP	3132802	A4	18 April 2018
				EP	3338801	A1	27 June 2018
				EP	3132802	A1	22 February 2017
				WO	2015125652	A1	27 August 2015
WO	2017068349	A1	27 April 2017		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/106109

A. 主题的分类

C12N 15/85(2006.01)i；C12N 15/90(2006.01)i；C12N 5/10(2006.01)i；A61K 35/17(2015.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNABS,DWPI,SIPOABS,CNTXT,EPTXT,USTXT,WOTXT,PUBMED,CNKI,万方，百度学术,NCBI: CAR-T，CAR,TCR，CRISPER，基因编辑，TGFBRII,TIGIT,BTLA,2B4,CD160,CD200R, A2aR,IL10RA,ADRB2,BATF,GATA3,IRF4,RARA,LAYN,MYO7A,PHLDA1,RGS1,RGS2,SHP1,DGKa,Fas,FasL,PD1

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 107523547 A (上海细胞治疗研究院等) 2017年 12月 29日 (2017 - 12 - 29) 摘要，权利要求1-11，说明书实施例6，7	1-24
X	CN 107523545 A (上海细胞治疗研究院等) 2017年 12月 29日 (2017 - 12 - 29) 摘要，权利要求1-10，说明书第10段	1-24
X	WO 2018107058 A1 (ALECTOR LLC) 2018年 6月 14日 (2018 - 06 - 14) 权利要求1-99	1-24
A	CN 108276493 A (南京传奇生物科技有限公司) 2018年 7月 13日 (2018 - 07 - 13) 全文	1-24
A	EP 3338800 A1 (IDAC THERANOSTICS,INC.等) 2018年 6月 27日 (2018 - 06 - 27) 全文	1-24
A	WO 2017068349 A1 (E-THERAPEUTICS PLC) 2017年 4月 27日 (2017 - 04 - 27) 全文	1-24

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 12月 3日	2019年 12月 18日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	管冰
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)53961945

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

☑ 附件C/ST.25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：

☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）

☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/106109

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 107523547 A	2017年 12月 29日	WO 2017219937 A1	2017年 12月 28日
CN 107523545 A	2017年 12月 29日	WO 2017219934 A1	2017年 12月 28日
WO 2018107058 A1	2018年 6月 14日	CN 110325549 A	2019年 10月 11日
		US 2019275150 A1	2019年 9月 12日
		AU 2017371070 A1	2019年 6月 13日
		EP 3551661 A1	2019年 10月 16日
		CA 3044684 A1	2018年 6月 14日
		KR 20190091330 A	2019年 8月 5日
CN 108276493 A	2018年 7月 13日	US 2019321404 A1	2019年 10月 24日
		EP 3564266 A1	2019年 11月 6日
		WO 2018121712 A1	2018年 7月 5日
EP 3338800 A1	2018年 6月 27日	US 2017165364 A1	2017年 6月 15日
		JP 6029160 B2	2016年 11月 24日
		JP 6578604 B2	2019年 9月 25日
		JP 2017014254 A	2017年 1月 19日
		US 2019125867 A1	2019年 5月 2日
		JP 2019070056 A	2019年 5月 9日
		JP WO2015125652 A1	2017年 3月 30日
		EP 3132802 A4	2018年 4月 18日
		EP 3338801 A1	2018年 6月 27日
		EP 3132802 A1	2017年 2月 22日
		WO 2015125652 A1	2015年 8月 27日
WO 2017068349 A1	2017年 4月 27日	无	