



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108024544 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 29

(21) 申请号 201680052559.6

(22) 申请日 2016.07.13

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108024544 A

(43) 申请公布日 2018.05.11

(30) 优先权数据  
62/191,918 2015.07.13 US  
62/247,469 2015.10.28 US  
62/315,438 2016.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.03.09

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/042024 2016.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/011519 EN 2017.01.19

(73) 专利权人 桑格摩生物治疗股份有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·K·李 B·E·赖利  
S·J·圣马丁 T·韦克斯勒

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陶家蓉 钱文字

(51) Int.Cl.  
A61K 48/00 (2006.01)  
A61K 38/37 (2006.01)  
A61K 38/48 (2006.01)  
A61K 38/46 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 7/04 (2006.01)  
C12N 15/864 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 1794995 A, 2006.06.28  
丛敏等.以腺相关病毒为载体的小干扰RNA对肝星状细胞中金属蛋白酶组织抑制因子的抑制作用.《中华微生物学和免疫学杂志》.2006,第26卷(第11期),第994-999页.  
朱成英.腺相关病毒载体与肿瘤免疫治疗的研究进展.《中国肿瘤生物治疗杂志》.2012,第19卷(第5期),第565-568页.

审查员 谭辉

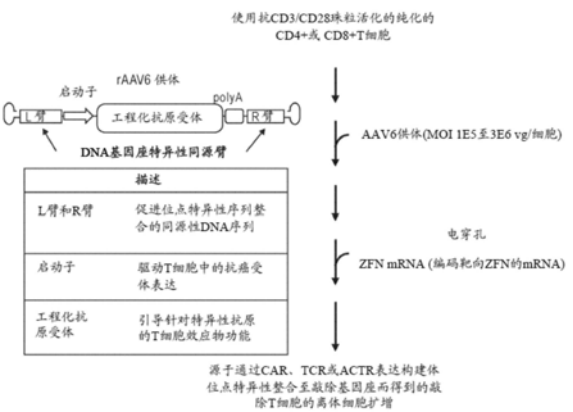
权利要求书1页 说明书44页 附图31页

(54) 发明名称

用于核酸酶介导的基因组工程化的递送方法及组合物

(57) 摘要

本公开处于基因组工程化领域,更具体地说处于细胞基因组的靶向修饰的领域。



1. 一种将核酸引入分离的细胞中的方法,所述方法包括:  
在选自CP-673451或Crenolanib的至少一种血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 抑制剂存在下向所述细胞施用至少一种包含供体核酸分子的重组腺相关载体 (rAAV),  
其中所述至少一种血小板衍生生长因子受体 (PDGFR) 抑制剂增强所述至少一种rAAV传递到细胞的效力,其中所述至少一种rAAV包括AAV6衣壳。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述供体核酸分子包含在所述细胞中表达的转基因。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述转基因编码嵌合抗原受体 (CAR)、因子VIII蛋白或因子IX蛋白。
4. 如权利要求2所述的方法,其中所述转基因被整合至所述细胞的基因组中。
5. 如权利要求2所述的方法,所述方法还包括将至少一种核酸酶引入所述细胞中,其中所述转基因在通过所述核酸酶裂解所述一种或多种基因之后整合至所述细胞的一种或多种基因中。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述核酸酶是锌指核酸酶 (ZFN)。
7. 如权利要求5所述的方法,所述方法还包括引入灭活所述细胞的一种或多种另外的基因的第二核酸酶。
8. 如权利要求5所述的方法,其中所述核酸酶裂解程序性细胞死亡1 (PD1) 基因、细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 基因、 $\beta$ 2微球蛋白 (B2M) 和/或T细胞受体 $\alpha$  (TRAC) 基因。
9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述细胞为造血干细胞、T细胞、B细胞或NK细胞。
10. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中施用是在血清存在下进行。
11. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述细胞是活体外细胞。
12. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中rAAV基因组包括AAV2末端反向重复序列 (ITR)。
13. 如权利要求2所述的方法,其中所述细胞是活体外造血干细胞、T细胞、B细胞或NK细胞且其中rAAV基因组包括AAV2末端反向重复序列 (ITR)。
14. 如权利要求13所述的方法,其中细胞是肝细胞,且转基因编码FVIII蛋白。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述FVIII蛋白具有缺失的B结构域的FVIII。
16. 一种药物组合物,其含有权利要求1-8和13-15的方法获得的细胞和药学上可接受的载体。
17. 根据如权利要求1至8和13-15中任一项所述的方法获得的细胞用于制备药物的用途,所述药物用于治疗受试者中的癌症。

## 用于核酸酶介导的基因组工程化的递送方法及组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年7月13日提交的美国临时申请号62/191,918;2015年10月28日提交的美国临时专利申请号62/247,469;以及2016年3月30日提交的美国临时专利申请号62/315,438的权益,所述申请的公开内容以引用方式整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开处于基因组工程化领域,更具体地说处于细胞基因组的靶向修饰领域。

[0004] 背景

[0005] 已描述用于靶向裂解基因组DNA的各种方法和组合物。这些靶向裂解事件可用于例如诱导靶向诱变、诱导细胞DNA序列的靶向缺失以及促进预定染色体基因座处的靶向重组。参见,例如,美国专利号255,250;9,200,266;9,045,763;9,005,973;9,150,847;8,956,828;8,945,868;8,703,489;8,586,526;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,067,317;7,262,054;7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;美国专利公布20030232410;20050208489;20050026157;20050064474;20060063231;20080159996;201000218264;20120017290;20110265198;20130137104;20130122591;20130177983;20130196373;20140120622;20150056705;20150335708;20160030477以及20160024474,所述专利的公开内容出于所有目的以引用方式整体并入。

[0006] 这些方法经常涉及使用工程化裂解系统来诱导双链断裂(DSB)或靶DNA序列中的切口,以使得通过产生误差的过程(诸如非同源末端连接(NHEJ))来修复断裂或使用修复模板进行修复(同源定向修复或HDR)可导致基因敲除或目标序列插入(靶向整合)。可通过使用特异性核酸酶诸如工程化锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN),使用具有指导特异性裂解的工程化crRNA/tracrRNA(‘单指导RNA’)的CRISPR/Cas系统(包括Cas和/或Cfp1)和/或使用基于Argonaute系统的核酸酶(例如,来自嗜热栖热菌(*T.thermophilus*),称为‘TtAgo’(Swarts等(2014)Nature 507(7491):258-261)进行裂解。

[0007] 可利用使用上述核酸酶系统之一进行的靶向裂解,以使用HDR或NHEJ介导的过程将核酸插入特定靶位置中。然而,向细胞递送核酸酶系统和供体可能存在问题。例如,通过将质粒转导至细胞中来递送供体或核酸酶可能对受体细胞有毒性,特别是对作为原代细胞并因此不如来自细胞系的细胞一样旺盛的细胞有毒性。

[0008] 经常用于将核酸递送至细胞的一种方法涉及使用病毒核酸递送载体。具体而言,腺相关病毒(AAV)由于其有效性和相对无毒性而广泛用于递送核酸。AAV基因组可几乎耗尽病毒核酸,并被编码供体转基因或工程化核酸酶的核酸替换以促进转基因整合至受体细胞的DNA中。

[0009] 哺乳动物细胞的AAV转导依赖于靶细胞上的主要和次要共受体。虽然主要受体对于病毒初始粘附至靶细胞(及其趋性)是重要的,但是次要受体介导AAV病毒内吞至细胞中。例如,对于血清型AAV6,已将主要受体鉴定为 $\alpha 2,3N$ 连接的唾液酸(Wu等,(2006)J.Virol.80(18):9093),并且将次要受体鉴定为EGFR。此外,还已提出使用另外的次要共受体(Weller

等, (2010) Nat Med 16 (6) :662)。

[0010] 体内细胞和/或组织的递送(移植)可经常受到抗体介导的应答的阻碍。例如,一些肾移植患者倾向于通过发展抗移植组织的宿主抗体来介导的急性排斥。因此,医师通常使用类固醇疗法抑制移植后的抗体应答(参见,例如Ku等(1973) Br. Med J 4:702),并且还可使用利妥昔单抗(抗CD20抗体)进行B细胞抑制(例如,Becker等(2004) Am J Transpl 4:996)。抗体介导的应答还是面临由于背景抗AAV抗体在人类群体中的盛行而使用AAV递送以及在用AAV介导的递送系统给药后重新发展这些抗体的挑战(参见,Kotterman等(2015) Gene Ther 22 (2) :116-126)。

[0011] 在体内,存在可调控免疫系统的细胞成员的活化或抑制的复杂机制。例如,已将树突状细胞(DC)确立为免疫活化与免疫耐受之间的平衡的重要参与者。它们是免疫系统中最强效的抗原呈递细胞,并且特异性捕获原初T细胞并向所述原初T细胞呈递抗原。未成熟DC通过特异性受体(诸如Toll样受体)与潜在抗原相互作用,其中所述抗原通过微胞饮作用进入细胞中。抗原然后被破碎成由主要组织相容性复合物呈递至T细胞的更小的肽。此外,成熟DC分泌进一步用于活化T细胞的炎性介质,诸如IL-1 $\beta$ 、IL-12、IL-6及TNF。在另一方面,DC还在使身体对一些抗原耐受方面发挥作用,以便维持中枢耐受和外周耐受。致耐受性DC(tolDC)在细胞表面上具有少量的共刺激信号,并且具有减少的上述炎性介质的表达。然而,这些tolDC表达大量的抗炎细胞因子(如IL-10),并且当这些细胞与原初T细胞相互作用时,驱使T细胞变成无变应性/调控性T细胞(CD8+Treg)。事实上,已显示,这个过程在用这些未成熟/致耐受性DC重复刺激T细胞时得到增强。还已鉴定与tolDC协同作用以诱导不同类型的Treg的若干种因子。例如,与tolDC和HGF、VIP肽、TSLP或维生素D3共暴露的原初T细胞能够诱导CD4+CD25+Foxp3+Treg,与TGF- $\beta$ 或IL-10共暴露产生Tr1 T reg,并且与皮质类固醇、雷帕霉素、视黄酸共暴露可产生CD4+/CD8+ Treg(Raker等(2015) Front Immunol 6:art 569以及Osorio等(2015) Front Immunol 6:art 535)。

[0012] CD34+干细胞或祖细胞是异质性细胞集合,其特征在于它们能够自我更新和/或分化成淋巴系细胞(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)和骨髓系细胞(例如,单核细胞、红细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞)。其异质性质起因于以下事实:在CD34+干细胞群体内,存在多个经常反映特定组的多能性的(是否为谱系定型的)亚组。例如,作为CD38-的CD34+细胞为更原始的未成熟CD34+祖细胞(也称为长期造血祖细胞),而作为CD34+CD38+ (短期造血祖细胞)的那些CD34+细胞为谱系定型的(参见,Stella等(1995) Hematologica 80:367-387)。当这个群体然后进一步向下进展到分化途径时,CD34标记丧失。CD34+干细胞在临床细胞疗法中具有巨大潜力。然而,部分由于其异质性质,对细胞进行遗传操作(诸如基因敲除、转基因插入以及类似操作)可能十分困难。具体地,这些细胞难以通过常规递送载体转导,最原始的干细胞对修饰敏感,在诱导的DNA DSB之后存在有限的HDR,并且在延长的标准培养条件下存在不足的HSC维持。另外,其他目标细胞(仅用于非限制性实例,心肌细胞、中等多刺神经元、原代肝细胞、胚胎干细胞、诱导多能干细胞和肌肉细胞)可能比其他细胞更难被转导用于基因组编辑。

[0013] 因此,需要用于基因组工程化以使用病毒载体将核酸有效地递送到CD34+细胞和其他目标细胞的另外组合物和方法。

[0014] 概述

[0015] 本发明描述用于基因疗法和基因组工程化的组合物和方法。具体地,所述方法和组合物涉及将核酸引入细胞中,所述细胞诸如原代细胞,包括造血干细胞/祖细胞(HSC/PC)和T细胞。此外,本发明的方法和组合物适用于将包含目标供体DNA的AAV颗粒(载体)递送至此类细胞。

[0016] 在一些方面,本发明包括将至少一种核酸酶递送至用于基因组工程化目的的细胞(例如,HSC/PC或其他造血谱系细胞,诸如T细胞、B细胞或NK细胞)。在一些实施方案中,将核酸酶作为肽来递送,而在其他实施方案中,将其作为编码核酸酶的核酸来递送。在一些实施方案中,使用多于一种核酸酶。在一些优选实施方案中,编码核酸酶的核酸为mRNA,并且在一些情况下,mRNA为受保护的。核酸酶可包括锌指核酸酶(ZFN)、TALE核酸酶(TALEN)或CRISPR/Cas(Cas和/或Cfp1)或TtAgo核酸酶系统或其组合。在一个优选实施方案中,编码核酸酶的核酸通过电穿孔来递送。

[0017] 在另一方面,本文描述一种将核酸引入分离的细胞(例如,造血干细胞、T细胞、B细胞或NK细胞)中的方法,所述方法包括:在至少一种生长因子受体结合抑制剂存在下向细胞施用至少一种包含供体分子(例如,在细胞中表达的转基因)的腺相关载体。在某些实施方案中,生长因子抑制剂抑制与表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、Met/肝细胞生长因子受体(HGFR)、脂阿拉伯甘露聚糖受体(LamR)、 $\alpha$ V $\beta$ 5整联蛋白受体、细胞间粘附分子1受体(Icam-1)和/或血小板衍生生长因子受体的结合。转基因可为附加型的或可整合至细胞的基因组中。在本文所述的任何方法中,转基因可编码嵌合抗原受体(CAR)。此外,如本文所述的任何方法还可包括将至少一种核酸酶引入细胞中,其中所述转基因在通过核酸酶裂解一种或多种基因之后整合至细胞的一种或多种基因中。另外的核酸酶可在靶向整合或未靶向整合的情况下用于灭活另外的基因(敲除)。在某些实施方案中,核酸酶裂解程序性细胞死亡1(PD1)基因、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)基因、B2微球蛋白(B2M)和/或T细胞受体 $\alpha$ (TRAC)基因。在某些实施方案中,细胞包含至少一种具有整合的转基因的基因,并且所述基因被灭活(KO);以及至少一种第二(不同的)基因,其中所述基因也被灭活(KO)。所述至少一种第二基因可在转基因整合或未整合的情况下灭活。

[0018] 因此,本发明提供用于将核酸引入细胞中的方法和组合物,包括用于增加将核酸递送至细胞的效率的方法和组合物。在某些实施方案中,至少50%至60%(或其间的任何值)、更优选至少60至70%(或其间的任何值)、甚至更优选至少70%至80%(或其间的任何值)或甚至更优选大于80%(80-100%之间的任何值)的细胞通过将核酸引入其中(例如,至细胞的基因组中)来修饰。在一些实施方案中,递送涵盖使用病毒载体。在优选实施方案中,载体为AAV载体。在一些方面,增加的病毒载体递送效率通过以下来完成:选择性地抑制细胞上的一种或多种病毒受体结合至病毒载体(例如AAV)的能力,从而通过一种或多种替代性受体增加由病毒载体携带的核酸向细胞的递送。在一些实施方案中,阻断或抑制病毒载体(例如AAV)与表皮生长因子受体(EGFR)的结合,而在其他实施方案中,阻断或抑制与成纤维细胞生长因子受体(FGFR)的结合。在其他实施方案中,与病毒载体(例如AAV)的结合可受到阻断或抑制的受体包括但不限于Met/肝细胞生长因子受体(HGFR)、脂阿拉伯甘露聚糖受体(LamR)、 $\alpha$ V $\beta$ 5整联蛋白受体、细胞间粘附分子1受体(Icam-1)和/或血小板衍生生长因子受体(PDGFR,包括PDGFR $\beta$ 和PDGFR $\alpha$ )。在优选实施方案中,对受体的抑制将病毒递送的效率增加2、3、4、5、6、7、8、9或10倍。抑制剂可在用AAV处理细胞之前(例如,4-5天、2-3天、1天、

12-24小时、6-11小时、1-5小时或少于1小时(或其间的任何时间))给予。抑制剂还可在向细胞递送病毒载体(例如, AAV)同时给予和/或在向细胞递送病毒载体(例如, AAV)之后(多达一天或甚至更长时间的任何时间)给予。在一些实施方案中,所用的抑制剂为用于抑制EGFR、FGFR、HGFR和/或PDGFR的吉非替尼、BGJ398、SU11274、CP-673451和/或克萊拉尼(Crenolanib)。PDGFR抑制剂CP-673451(也称为PDGFR1)和克萊拉尼(也称为PDGFR2)抑制PDGFR $\alpha$ 和 $\beta$ 两者,但是亲和力有所不同。在本文所述的任何方法中,病毒载体可携带编码一种或多种核酸酶和/或一种或多种供体的核酸(例如,编码治疗性蛋白质的序列)。

[0019] 在一个方面,病毒载体用于递送转基因,以使得所述转基因不会整合至基因组中。在一些实施方案中,转基因包含诱导型启动子。在其他实施方案中,转基因包含组成型启动子。还在其他实施方案中,病毒载体为AAV或慢病毒载体。病毒载体可在递送一种或多种抑制病毒载体与一种或多种细胞表面受体的结合的分子之前、期间或之后递送。

[0020] 在一个方面,本文提供一种将一种或多种转基因整合至分离的细胞的基因组中的方法,所述方法包括将转基因和至少一种核酸酶相继或同时引入细胞中,以使得核酸酶介导转基因的靶向整合。所述方法包括在至少一种生长因子受体结合抑制剂或B细胞抑制剂存在下向细胞施用至少一种包含供体分子的腺相关载体,并且还包括将至少一种核酸酶引入细胞中,其中转基因(例如,嵌合抗原受体)在通过核酸酶裂解(例如,通过靶核酸酶裂解PD1、CTLA-4和/或TRAC)之后整合至基因组中。因此,在某些方面,一种将一种或多种转基因整合至分离的细胞的基因组中的方法,所述方法包括:向细胞中引入(a)包含所述一种或多种转基因(例如,编码嵌合抗原受体(CAR)和/或工程化TCR)的供体载体以及(b)至少一种核酸酶,其中所述至少一种核酸酶裂解所述细胞的基因组,以使得所述一种或多种转基因整合至所述细胞的基因组中,并且进一步地其中(i)如果供体载体在所述至少一种核酸酶之前引入所述细胞中,则所述至少一种核酸酶在引入供体载体之后48小时内引入所述细胞中;(ii)如果所述至少一种核酸酶在所述供体载体之前引入,则所述供体载体在引入所述至少一种核酸酶之后4小时内引入所述细胞中。在某些实施方案中,方法可包括(a)将包含一种或多种转基因的供体载体引入细胞中;(b)将细胞培养少于48小时(例如数秒至48小时或其间的任何时间);以及(c)将至少一种核酸酶引入所述细胞中,其中所述至少一种核酸酶裂解所述细胞的基因组,以使得所述一种或多种转基因整合至所述细胞的基因组中。可替代地,所述方法可包括:(a)将至少一种核酸酶引入细胞中;(b)将细胞培养少于24小时(例如数秒至24小时或其间的任何时间);以及(c)将包含一种或多种转基因的供体载体引入所述细胞中,其中所述至少一种核酸酶裂解所述细胞的基因组,以使得所述一种或多种转基因整合至所述细胞的基因组中。可重复所述方法步骤以将另外的转基因整合至相同和/或不同的基因座中。在某些实施方案中,将细胞培养(步骤(b))少于24小时(例如,数秒至24小时或其间的任何时间)。还在其他实施方案中,例如,当在引入供体载体之前引入核酸酶时,将细胞培养少于4小时。任何这些方法还可包括在将核酸酶和/或供体载体引入细胞的步骤之前、同时和/或之后施用抑制病毒载体(例如,携带核酸酶和/或供体载体)与细胞受体的结合的分子的步骤。

[0021] 可使用任何细胞,例如造血干细胞(例如,CD34+细胞)或T细胞(例如,CD4+或CD8+细胞(包括Treg细胞))或B细胞或NK细胞。在一些实施方案中,T细胞为肿瘤浸润性T淋巴细胞(TIL)。供体载体可作为病毒或非病毒载体例如AAV载体(例如,AAV6或AAV6嵌合载体,诸

如AAV2/6等)引入。核酸酶(例如,ZFN、TALEN、TtAgo和/或CRISPR/Cas)也可使用病毒或非病毒载体(例如以mRNA形式)引入。在某些实施方案中,核酸酶靶向安全港基因(例如,CCR5基因、AAVS1基因、Rosa基因、白蛋白基因等)。转基因可编码蛋白质,例如患有病症(例如,溶酶体贮积病、血红蛋白病、血友病等)的受试者中缺乏或缺少的治疗性蛋白质。在某些实施方案中,描述了一种向有需要的受试者提供一种或多种蛋白质的方法,所述方法包括:根据本文所述的任何方法将编码一种或多种蛋白质的一种或多种转基因引入分离的细胞中,以及将细胞引入受试者中以使得一种或多种蛋白质提供给受试者。

[0022] 在其他方面,本发明包括将供体核酸递送至靶细胞。供体可在编码核酸酶的核酸和/或任选的病毒受体抑制剂之前、之后或连同其一起递送。在某些实施方案中,供体与核酸酶和/或任选的病毒受体抑制剂同时递送。在其他实施方案中,供体在核酸酶之前递送,包括之前的任何时间,例如之前立刻、之前1至60分钟(或其间的任何时间)、之前1至24小时(或其间的任何时间)、之前1至48小时(或其间的任何时间)或之前多于48小时。在某些实施方案中,供体在核酸酶之后,优选在4小时内递送。在某些实施方案中,本文提供一种将核酸引入细胞中的方法,所述方法包括:将包含所述核酸的供体分子施用至细胞中;向所述细胞施用核酸酶,其中所述核酸酶在供体分子之后1到48小时或在其之前4小时内施用,并且进一步地其中所述供体分子在通过所述核酸酶裂解之后整合至所述细胞的基因组中。在其他实施方案中,一种将一种或多种转基因引入细胞的基因组中的方法,所述方法包括:将至少一种核酸酶引入所述细胞中,其中所述至少一种核酸酶裂解所述细胞的基因组,以使得所述一种或多种转基因整合至所述细胞的基因组中,并且进一步地其中(i)如果供体载体在所述至少一种核酸酶之前引入所述细胞中,则所述至少一种核酸酶在引入供体载体之后48小时内引入所述细胞中;并且(ii)如果所述至少一种核酸酶在所述供体载体之前引入,则所述供体载体在引入所述至少一种核酸酶之后4小时内引入所述细胞中。供体核酸包含待整合至细胞的基因组(例如,内源基因座)中的外源序列(转基因)。转基因优选整合在核酸酶的裂解位点处或附近(例如,1-50个碱基对内)。在一些实施方案中,供体包含由具有靶向裂解位点的同源区侧接的全长基因或其片段。在一些实施方案中,供体缺乏同源区并且通过同源性非依赖性机制(即NHEJ)整合至靶基因座中。在其他实施方案中,供体包含由用于细胞(即,用于基因校正)的同源区侧接的核酸的较小片段。在一些实施方案中,供体包含编码功能或结构组分的基因,诸如shRNA、RNAi、miRNA或类似物。在其他实施方案中,供体包含编码调控元件的基因,所述调控元件结合至目标基因和/或调节所述目标基因的表达。

[0023] 在其他方面,供体通过病毒和/或非病毒基因转移法递送。在优选实施方案中,供体通过腺相关病毒(AAV)递送至细胞。可使用任何AAV载体,包括但不限于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8及其组合。在一些情况下,AAV包含与衣壳血清型(例如,具有AAV5、AAV6或AAV8衣壳的AAV2ITR)相比具有异源血清型的LTR。供体可使用与用于递送核酸酶的相同的基因转移系统(包括在相同载体上)来递送,或者可使用用于核酸酶的不同递送系统来递送。在某些实施方案中,供体使用病毒载体(例如,AAV)递送,并且核酸酶以mRNA形式递送。细胞还可在递送病毒载体(例如,携带核酸酶和/或供体)之前、同时和/或之后用一种或多种抑制病毒载体与细胞表面受体的结合的分子来处理。

[0024] 供体分子的目标序列可包含一种或多种编码功能性多肽(例如,cDNA)、具有或不具有启动子的序列。在一些情况下,供体包含仅在特定细胞类型中表达的启动子(例如,T细

胞或B细胞或NK细胞特异性启动子)。在某些实施方案中,核酸序列包含编码抗体、抗原、酶、生长因子、受体(细胞表面或细胞核)、激素、淋巴因子、细胞因子、报告分子、以上中任一种的功能性片段及以上的组合。核酸序列还可编码在患有疾病或病症(仅作为实例包括溶酶体贮积病或血友病)的受试者中缺乏和/或异常表达的一种或多种蛋白质。核酸序列还可编码一种或多种适用于癌症疗法的蛋白质,例如一种或多种嵌合抗原受体(CAR)和/或工程化T细胞受体(TCR)。在功能性多肽编码序列为无启动子的实施方案中,然后通过由目标区中的内源启动子或其他控制元件驱动的转录来确保整合序列的表达。在其他实施方案中,“串联”盒以这种方式整合至所选位点中,盒的第一组分包含如上所述的无启动子序列,随后为转录终止序列和编码自主表达盒的第二序列。可在供体分子中在同源臂之间包含其他序列(编码序列或非编码序列),包括但不限于编码2A肽、SA位点、IRES等的序列。

[0025] 在另一个方面,本文描述了通过同源性非依赖性机制将供体核酸整合至细胞的基因组中的方法。所述方法包括在细胞的基因组中产生双链断裂(DSB)并且使用核酸酶裂解供体分子,以使得供体核酸整合在DSB的位点处。在某些实施方案中,供体核酸通过非同源性依赖性方法(例如,NHEJ)来整合。如上所指出,在体内裂解后,供体序列可以靶向方式整合至细胞基因组中的DSB位置处。供体序列可包含用于产生DSB的一种或多种核酸酶的一个或多个相同靶位点。因此,供体序列可由用于裂解期望整合的内源基因的一种或多种相同核酸酶来裂解。在某些实施方案中,供体序列包括来自用于诱导DSB的核酸酶的不同核酸酶靶位点。靶细胞基因组中的DSB可通过任何机制来产生。在某些实施方案中,DSB通过一种或多种锌指核酸酶(ZFN)、包含锌指结合结构域的融合蛋白以及裂解结构域或裂解半结构域来产生,所述锌指结合结构域被工程化以结合目标区内的序列。在其他实施方案中,DSB通过一种或多种融合至核酸酶结构域(TALEN)的TALE DNA结合结构域(天然存在的或非天然存在的)来产生。还在其他实施方案中,DSB使用CRISPR/Cas(Cas和/或Cfp1)或TtAgo核酸酶系统来产生,其中工程化单指导RNA或其功能等效物根据需要用于将核酸酶指导至基因组中的靶向位点。

[0026] 在其他方面,核酸酶结合至哺乳动物细胞中的安全港基因和/或裂解裂解所述安全港基因,例如CCR5基因、PPP1R12C(也称为AAVS1)基因、Rosa基因或白蛋白基因。此外,为了帮助选择哺乳动物系统,可使用HPRT基因座。

[0027] 在一些方面,核酸酶结合至检查点抑制剂基因和/或裂解所述检查点抑制剂基因(例如,PD-1、CTLA4,其为B7抑制性配体家族的受体),或裂解参与通过LAG3、2B4、BTLA、TIM3、A2aR和杀伤性抑制剂受体(KIR和C型凝集素受体)进行信号传导的受体或配体基因,参见Pardoll(2012)Nat Rev Cancer 12(4):252。

[0028] 在其他方面,核酸酶结合至编码涉及排斥的因子的基因和/或裂解所述基因,例如编码HLA复合物的亚基(I类:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、 $\beta$ -2微球蛋白(B2M); II类:HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA1、HLA-DQA、HLA-DRA、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB、HLA-DRB)或TCR的基因。在一些实施方案中,核酸酶靶向编码参与HLA复合物(例如,TAP、tapasin、钙网蛋白、钙联接蛋白、LMP2、LMP7或Erp57)的肽加载过程和抗原加工的产物的基因。

[0029] 在一个方面,供体为结合至目标基因和/或调节目标基因的表达式的目标调控蛋白(例如,ZFP TF、TALE TF或CRISPR/Cas TF)。在一个实施方案中,调控蛋白结合至DNA序列并



阻止其他调控因子的结合。在另一个实施方案中,调控蛋白的结合可调节(即诱导或抑制)靶DNA的表达。

[0030] 在其他方面,供体编码能够重新引导T细胞的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质为工程化抗原受体。在其他实施方案中,工程化受体为嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR),其中TCR在一些实施方案中为亲和力增强的工程化TCR或天然存在的TCR。在其他方面,工程蛋白质为抗体偶联的T细胞受体(ACTR)。

[0031] 在其他方面,本文提供一种已如本文所述例如使用核酸酶进行遗传修饰(例如,转基因)以引入遗传修饰的细胞。细胞的一种或多种基因可例如通过以下来修饰:靶向整合至一种或多种基因和/或部分或完全灭活(KO)一种或多种基因,包括涉及一种或多种基因的靶向整合(在或不在靶基因灭活的情况下)或一种或多种基因的KO(在靶向整合或未靶向整合的情况下)(例如,一种基因的靶向整合和灭活(KO)以及第二不同基因的KO)的遗传修饰。在某些实施方案中,细胞通过本文所述的方法来制备。在某些实施方案中,细胞包含整合至安全港基因座(诸如,CCR5、AAVS1、ALB、Rosa26和/或HPRT)中的转基因。对细胞的遗传修饰(例如,核酸整合)可例如处于包含在核酸酶的DNA结合分子所结合的基因中的靶位点的12个或更多个(例如12-35个或其间的任何值)邻接核苷酸的位点内、其处或其附近。包含整合的转基因的细胞可从内源启动子表达转基因,或者可替代地,转基因可包含调控元件和控制元件,诸如驱动转基因表达(例如,在整合至安全港基因座中时)的外源启动子。在某些实施方案中,包含转基因的细胞不包含整合至基因组中的任何病毒载体序列。细胞可为任何真核细胞,例如CD34+干细胞(例如,在患者中通过粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或其他动员剂施用从骨髓移动至外周血中或直接收获自骨髓或脐带的患者来源的干细胞)。可将细胞收获,纯化,培养,并且通过任何合适的方法将核酸酶和/或供体引入细胞中。

[0032] 还提供包含如本文所述的遗传修饰细胞的组合物,诸如药物组合物。在一些实施方案中,组合物包含CD34+ HSC/PC或HSC/PC细胞群体。在其他实施方案中,组合物包含T细胞(例如,CD4+和/或CD8+ T细胞或TIL)。还在其他实施方案中,T细胞组合物仅包含CD4+或仅包含CD8+细胞。

[0033] 在另一个方面,提供了使用如本文所述的遗传修饰细胞的方法。在某些实施方案中,在骨髓移植中给予遗传修饰的血细胞前体(“HSC/PC”),并且HSC/PC在体内分化并成熟。在一些实施方案中,HSC/PC在G-CSF诱导的动员之后分离,并且在其他实施方案中,细胞分离自人骨髓或脐带。在一些方面,HSC/PC通过使用设计用于敲除特定基因或调控序列的核酸酶进行处理来编辑。在其他方面,HSC/PC用工程化核酸酶和供体核酸来修饰,以使得野生型基因或其他目标基因得以插入并表达并且/或者内源异常基因得到校正。在一些实施方案中,在轻度骨髓细胞清除性预调理之后向患者施用修饰的HSC/PC。在其他方面,HSC/PC在全骨髓细胞清除之后施用,以使得在植入之后,100%的造血细胞来源于修饰的HSC/PC。

[0034] 本发明的方法和组合物还可包括对受试者(例如,动物)进行的另外治疗,以增加病毒载体(例如,AAV)在体内递送至靶组织中的细胞的效率。在一些实施方案中,在递送AAV之前、期间和/或之后提供治疗。在一些实施方案中,治疗包括向受试者提供类固醇以抑制体液抗体应答。合适类固醇的非限制性实例包括甲基泼尼松龙(例如 **Medrol®**、**Solu Medrol®**)和泼尼松龙。在其他实施方案中,治疗包括使用体液应答抑制剂,包括B细胞抑制剂,诸如利妥昔单抗(例如, **Rituxan®**)。还在其他实施方案中,治疗方法将增加递送效

率的方案组合,诸如用至少类固醇和B细胞抑制剂治疗动物。这些治疗方案可在用AAV治疗动物之前、期间或之后使用。

[0035] 在一些实施方案中,本文所述的本发明方法和组合物可用于诱导哺乳动物对治疗性蛋白质的耐受性,以使得在抗治疗性蛋白质抗体瞬时升高之后,由转基因编码的治疗性蛋白质的水平保持在治疗相关水平。因此,本文提供一种在受试者中诱导对治疗性蛋白质的耐受性的方法,所述方法包括使用如本文所述的方法对受试者中的细胞进行遗传修饰(例如,以使得细胞产生治疗性蛋白质),任选地用另外的组合物(例如,类固醇和/或B细胞抑制剂)治疗受试者,以使得动物变得对治疗性蛋白质耐受。在一些实施方案中,将治疗性蛋白质插入受体细胞中,在此同时用免疫抑制性类固醇或B细胞抑制剂进行治疗,而在其他情况下,不使用免疫调节剂。在一些情况下,只要产生抗治疗性蛋白质抗体就施用免疫调节剂。在其他情况下,免疫调节剂在一个时间段之后停止使用。因此,提供一种将核酸引入受试者(例如,患有诸如血友病的病症的受试者)的细胞中的方法,所述方法包括:向所述受试者施用至少一种包含供体分子(例如,编码治疗性蛋白的转基因,所述蛋白质诸如凝血因子,任选地为因子VIII和/或因子IX)的腺相关载体(AAV)和至少一种类固醇和/或至少一种B细胞抑制剂。在某些实施方案中,受试者为哺乳动物,并且转基因编码治疗性蛋白质,并且哺乳动物变得对治疗性蛋白质耐受。

[0036] 在本文所述的任何方法和组合物中,所用的治疗性转基因编码凝血因子。在优选实施方案中,转基因编码FVIII蛋白或F.IX蛋白。在特别优选的实施方案中,编码FVIII蛋白的转基因编码缺乏B结构域(B结构域缺失或BDD)的FVIII。

[0037] 在其他实施方案中,提供了使用如本文所述的遗传修饰的T细胞的方法。在一些情况下,使用自体T细胞(来源于患者),而在其他实施方案中,使用同种异体T细胞(来源于供体)。在一些情况下,T细胞通过单采血液成分术来从供体或患者中分离,然后在体外进行处理以获得所需遗传修饰。然后扩增修饰的T细胞以获得更大数目的细胞以输注至患者中。在一些实施方案中,首先扩增分离的T细胞,并且然后将其修饰以获得所需遗传修饰。在一些方面,T细胞通过使用设计用于敲除特定基因或调控序列的核酸酶进行处理来编辑。在其他方面,T细胞用工程化核酸酶和供体核酸修饰,以使得野生型基因或其他目标基因得以插入并表达并且/或者内源异常基因得到校正。在一些实施方案中,TIL通过已知方法(例如,仅参见,例如Ellebaek等(2012) *J. Transl Med* 10:169)来从切下的肿瘤组织中分离,并且在其他实施方案中,患者可在切下肿瘤组织之后但在输注修饰的TIL之前进行淋巴缺失性疗法(lymphodepletive therapy)。还在其他实施方案中,T细胞为调控性T细胞(Treg)。此外,细胞可在细胞周期的G2期停滞。

[0038] 在一些方面,本发明包括用于治疗或预防哺乳动物中的特定疾病的方法和组合物。在一些实施方案中,所述方法和组合物用于治疗癌症,例如滤泡性淋巴瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、淋巴瘤、成胶质细胞瘤、慢性淋巴细胞白血病或CLL和急性淋巴细胞白血病或ALL、卵巢癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肾细胞癌(参见,例如Kershaw等(2014) *Clin Transl Immunol* 3,e16,doi:10.1038/cti.2014.7)。在其他实施方案中,所述方法和组合物用于治疗感染性疾病,例如HIV、HCV、HBV(参见Sautto等(2015) *Gut* 0:1-12)、埃博拉病毒、CMV、EBV以及腺病毒。还在其他方面,本发明的方法和组合物包括治疗自身免疫疾病,例如类风湿性关节炎、多发性硬化症、炎性肠病、银屑病、狼疮以及硬皮病。

[0039] 在另一方面,提供一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括:通过所述的任何方法将核酸引入分离的细胞中,其中供体分子包含编码CAR的序列,以使得细胞表达CAR;以及向受试者施用表达CAR的细胞。在某些实施方案中,在通过核酸酶裂解基因之后,将CAR编码序列整合至PD1、CTLA-4和/或TRAC基因中。在某些实施方案中,在通过核酸酶裂解基因之后,在裂解之后,将CAR编码序列整合至第一基因(例如,PD1、CTLA-4和/或TRAC基因),并且第二(不同的)基因(例如,PD1、CTLA-4和/或TRAC基因)通过第二核酸酶灭活。

[0040] 在一些实施方案中,转基因HSC/PC细胞或T细胞和/或动物包含编码人泪基因的转基因。在一些情况下,转基因动物包含内源基因座处对应于外源转基因的敲除,从而允许发展可研究分离的人类蛋白质的体内系统。此类转基因模型可用于筛选目的,以鉴定可与目标人类蛋白质相互作用或修饰所述人类蛋白质的小分子或大生物分子或其他实体。在一些方面,将转基因整合至所选基因座(例如,安全港)中,整合至通过本文所述的任何方法获得的干细胞(例如,胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、造血干细胞或前体细胞等)、T细胞(例如,CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>(包括Treg)或TIL)或动物胚胎中,并且然后植入胚胎,以使得活动物得以出生。然后将动物饲养至性成熟并使其产生后代,其中至少一些后代包含编辑的内源基因序列或整合的转基因。

[0041] 还提供一种包含本发明的AAV和核酸的试剂盒。试剂盒可包含编码核酸酶的核酸(例如,合适的表达载体中所含有的RNA分子或ZFN、TALEN、TtAgo或CRISPR/Cas系统编码基因)或核酸酶蛋白的等分试样、供体分子、合适的干性质(stemness)改性剂、用于进行本发明方法的说明书以及类似物。试剂盒还可包含目标供体分子,诸如选择标记或筛选标记。

[0042] 鉴于总体公开内容,这些方面和其他方面对本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0043] 附图简述

[0044] 图1描绘T细胞转基因供体载体的设计。供体包含与侧接裂解位点的基因组序列同源的右(R)同源臂和左(L)同源臂。供体还包含连接至目标转基因的启动子序列。转基因编码工程化抗原受体,诸如CAR、TCR或ACTR。poly A信号传导序列也处于供体中以实现有效的转基因表达。还描绘用于转导T细胞的方法。

[0045] 图2为描绘培养基中存在的血清对将供体靶向整合到CD3<sup>+</sup> T细胞中的影响的图。供体的整合通过在包含RFLP供体的AAV2/6的逐渐增加剂量下检测到的整合的RFLP的百分比来测量。CCR5特异性ZFN通过mRNA电穿孔来递送。

[0046] 图3为描绘AAV 2/6转导的细胞中的核酸酶活性的图。在所指示抑制剂(抑制AAV与病毒受体的结合)存在下,用MOI(感染复数)为3e4vg/细胞的包含一对人类白蛋白特异性ZFN的AAV2/6来转导Hep3B细胞。在转导后三天,将基因组DNA从细胞中分离,并以ZFN裂解位点周围的小插入和缺失形式(插入缺失%)分析核酸酶活性。以所示浓度使用抑制剂,并且数据显示PDGFR抑制剂增加观察到的活性的量。

[0047] 图4为描绘通过由Lipofectamine RNAiMAX进行的mRNA转导递送的核酸酶的核酸酶活性的图。数据证实,与图3所示的使用AAV2/6递送的结果不同,增加PDGFR抑制剂的浓度对检测到的插入缺失数目没有影响。因此,在PDGFR抑制剂存在下观察到的插入缺失频率的增加不是因为抑制剂直接作用于DNA断裂修复途径。

[0048] 图5为描绘在用包含白蛋白特异性ZFN的AAV以及PDGFR和EGFR抑制剂的组合处理

Hep3B细胞之后的核酸酶活性的图,其中每种条件重复进行两次。结果证实,在两种抑制剂类型存在下,插入缺失形成未增加。

[0049] 图6为描绘在HepG2细胞中使用抑制剂时的核酸酶活性的图。不同抑制剂的浓度示出于以下数据,并且证实在包含ZFN的AAV2/6 (MOI为 $3 \times 10^4$ vg/细胞)的此剂量下,PDGFR抑制剂导致可检测到的核酸酶活性增加。

[0050] 图7为描绘血清和所指示病毒受体抑制剂存在或不存在下在Hep3B细胞中的核酸酶活性的图。每个数据集均显示结果加或减血清,其中所有抑制剂使用包含ZFN的AAV2/6进行检查。每个组左侧的条对应于在血清不存在下测量的数据,而每个组右侧的条为在具有血清的情况下进行的那些实验的结果。数据证实,在Hep3B中,总体AAV2/6转导在血清存在下降低约40倍。然而,在PDGFR抑制剂存在下,AAV转导是稳健的,可检测到20%插入缺失。

[0051] 图8为示出在PDGFR抑制剂存在下在血清存在或不存在下的插入缺失检测的倍数增加的图。将数据绘制为与单独ZFN相比对于两种条件检测到的插入缺失形成的倍数变化。此数据证实,与在血清中单独的ZFN相比,当在血清中进行实验时,在PDGFR抑制剂存在下检测到的插入缺失增加了70倍。

[0052] 图9为描绘PDGFR抑制剂2(克莱拉尼)对原代肝细胞中的AAV吸收的影响的图。数据证实,与无抑制剂相比,9 $\mu$ M的PDGFR抑制剂引起检测到的插入缺失大量增加。

[0053] 图10A和图10B示出非人灵长类动物研究的给药示意图。图10A反映在测试物品施用后的Rituxan®和Solu-Medrol®给药。图10B反映在测试物品施用前的Rituxan®和Solu-Medrol®给药。

[0054] 图11A至图11D为描绘在用携带因子IX(F.IX)的AAV供体处理NHP之后以总AAV-F.IX剂量计的峰值人类F.IX水平的图。图11A和图11B反映在测试物品施用后用Rituxan®/Solu-Medrol®进行的NHP研究的剂量曲线。图11A描绘以下组的剂量曲线:第3组(参见,实施例; $1.5 \times 10^{15}$ vg/kg;1:1:8;高剂量ZFN+hF9供体);第4组( $9 \times 10^{13}$ vg/kg;1:1:4;高剂量ZFN+hF9供体);第5组( $6 \times 10^{13}$ vg/kg;1:1:2;高剂量ZFN+hF9供体);第6组( $5 \times 10^{13}$ vg/kg;1:1:8;中间剂量ZFN+hF9供体);第7组(中间剂量ZFN+hF9供体;1:1:2; $2 \times 10^{13}$ vg/kg)以及第8组(低剂量ZFN+hF9供体;1:1:8; $1.5 \times 10^{13}$ vg/kg)。图11B概括1:1:8比率的ZFN:ZFN:hF9供体的ZFN+hF9供体剂量水平的峰值循环hF.IX水平。图11C反映在测试物品施用前用Rituxan®/Solu-Medrol®进行的NHP研究的剂量曲线。图11D描绘Rituxan®/Solu-Medrol®给药后(灰色符号)和给药前(黑色符号)的汇集数据。

[0055] 图12A至图12C为描绘1:1:8剂量比率组在NHP处理后的基因修饰水平(插入缺失%)的图。图12A示出在测试物品施用后用Rituxan®/Solu-Medrol®进行的NHP研究在第28天时的插入缺失%。第3组( $1.5 \times 10^{15}$ vg/kg;高剂量ZFN+hF9)、第6组( $5 \times 10^{13}$ vg/kg;1:1:8;中间剂量ZFN+hF9供体);以及第8组(低剂量ZFN+hF9供体;1:1:8; $1.5 \times 10^{13}$ vg/kg)。图12B反映在测试物品施用前用Rituxan®/Solu-Medrol®进行的NHP研究在第61天时的插入缺失%。图12C示出Rituxan®/Solu-Medrol®给药后(灰色符号)和给药前(黑色符号)的汇集数据。

[0056] 图13A至图13D为描绘使用携带因子VIII(F8)B-结构域缺失(FVIII-BDD)蛋白的AAV供体进行的NHP研究的人类FVIII血浆水平概述的图。图13A示出第2组动物(AAV2/6,2E+

12vg/kg)的结果;图13B示出第3组动物(AAV2/6,6E+12vg/kg)的结果;图13C示出第4组动物(AAV2/8,6E+12vg/kg)的结果;并且图13D示出第5组动物(AAV2/8,6E+12vg/kg)的结果。1U/mL人类因子VIII被认为是生理上正常的,并且因此等于100%的正常生理循环人类因子VIII。

[0057] 图14示出包括在第103天时去除所有免疫抑制的人类FVIII-BDD非人灵长类动物(NHP)研究的给药方案。Rituxan和Solu-Medrol给药的概况。Rituxan(10mg/kg;IV)给药是在测试物品施用前,而甲基泼尼松龙(Solu-Medrol)(10mg/kg;IM)给药是每日,直至第103天。

[0058] 图15为描绘在研究中非人灵长类动物(NHP)在处理后的峰值人类FVIII抗原水平的图。在2E+12vg/kg的剂量水平下( $n=3$ ),获得人类正常hFVIII血浆水平的峰值111.0%、493.9%和840.0%(如通过hFVIII ELISA所测量的总体平均值481.6%)。在表示6E+12vg/kg的较高剂量下( $n=3$ ),获得hFVIII血浆水平的峰值450.0%、625.6%和886.7%[总体平均值654.1%]。

[0059] 图16A至图16C为描绘在给药后168天的时间段内用低剂量(2E+12vg/kg,第2组)的AAV2/6-FVIII-BDD cDNA给药的个体食蟹猴( $n=3$ )的结果的图。在所有三张图中,如通过ELISA所测量的血浆中的FVIII-BDD浓度以黑色示出。另外,血浆中的中和抗FVIII抗体(示出为Bethesda单位)的浓度以灰色示出。水平虚线表示Bethesda单位截止点,低于所述值将不被认为是对抗FVIII中和抗体呈阳性的。Solu-Medrol在第103天时停止—由垂直虚线指示。每张图均示出单个猴子(动物2101、2102和2103)的结果。

[0060] 图17A至图17C为描绘给药后180天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,第3组)的AAV2/6-FVIII-BDD cDNA给药的个体食蟹猴( $n=3$ )的结果的图。在所有三张图中,如通过ELISA所测量的血浆中的FVIII-BDD浓度以黑色示出。另外,血浆中的中和抗FVIII抗体(示出为Bethesda单位)的浓度以灰色示出。水平虚线表示Bethesda单位截止点,低于所述值将不被认为是对抗FVIII中和抗体呈阳性的。Solu-Medrol在第103天时停止—由垂直虚线指示。每张图均示出单个猴子(动物3101、3102和3103)的结果。

[0061] 图18A至图18D为描绘给药后168天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,第4组)的AAV2/8-FVIII-BDD cDNA给药的个体食蟹猴( $n=3$ )的结果的图。在图18A-图18C中,如通过ELISA所测量的血浆中的FVIII-BDD浓度以黑色示出。另外,血浆中的中和抗FVIII抗体(示出为Bethesda单位)的浓度以灰色示出。图18D为图中动物4103的较低值的‘放大’(注意,18A-18C中的y轴为0-5U/mL的FVIII抗原,而18D为0-1U/mL的FVIII抗原。水平虚线表示Bethesda单位截止点,低于所述值将不被认为是对抗FVIII中和抗体呈阳性的。Solu-Medrol在第103天时停止—由垂直虚线指示。每张图均示出单个猴子(动物4101、4102和4103)的结果。

[0062] 图19A至图19E为描绘给药后168天的时间段内用高剂量(6E+12vg/kg,第5组)的AAV2/8-FVIII-BDD cDNA给药的个体食蟹猴( $n=3$ )的结果的图。在图19A-图19C中,如通过ELISA所测量的血浆中的FVIII-BDD浓度以黑色示出。另外,血浆中的中和抗FVIII抗体(示出为Bethesda单位)的浓度以灰色示出。图19D和19E为图中较低值的‘放大’(注意,19A-19C中的y轴为0-5U/mL的FVIII抗原,而19D和19E的轴为0-1U/mL的FVIII抗原。水平虚线表示Bethesda单位截止点,低于所述值将不被认为是对抗FVIII中和抗体呈阳性的。Solu-

Medrol在第103天时停止—由垂直虚线指示。每张图均示出单个猴子(动物5101、5102和5103)的结果。

[0063] 图20A至图20D示出TRAC和B2M单敲除和双敲除(KO)以及靶向整合(TI)的FAC分析。图20A示出88%的TRAC-核酸酶/AAV GFP供体处理的细胞具有灭活的TRAC基因(左小图),并且71%的细胞具有整合至TRAC基因中的AAV递送的GFP供体(右小图)。图20B示出93%的B2M-核酸酶/AAV GFP供体处理的细胞具有灭活的B2M基因(左小图),并且72%的细胞具有整合至B2M基因中的AAV递送的GFP供体(右小图)。图20C和图20D示出将TRAC和B2M靶向于同一细胞(双KO/修饰的细胞)中的细胞的分析。

[0064] 详述

[0065] 本文公开了用于转导用于基因疗法或基因组工程化的细胞的组合物和方法。具体而言,通过靶向裂解随后非同源末端连接对外源序列进行的核酸酶介导的(即ZFN、TALEN、TtAgo或CRISPR/Cas(Cas和/或Cfp1)系统)靶向整合或基因组改变在细胞中得到有效实现。这对于HSC/PC和原代T细胞的转导和工程化特别有用,然而所述方法和组合物还可用于其他细胞类型。

[0066] ZFN和供体模板DNA的递送如本文所详述使用病毒载体和/或抑制病毒载体与细胞表面受体的结合的分子来优化。本文所述的方法和组合物可用于任何细胞类型,包括任何造血干细胞或前体细胞,诸如CD34<sup>+</sup>细胞。CD34<sup>+</sup>细胞可包括原始细胞(CD133<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>,或CD90<sup>-</sup>)、早期细胞(CD34<sup>+</sup>,CD133<sup>+</sup>)和定型细胞(CD34<sup>+</sup>CD133<sup>-</sup>)CD34<sup>+</sup>子集以及T细胞。T细胞可包含CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup>细胞或TIL。本申请中含有的方法和组合物还可涉及用于通过AAV将核酸递送至原代细胞的体内用途。本文所述的方法在用修饰的细胞处理的动物中引起长期多谱系移植。

[0067] 总则

[0068] 除非另外指示,否则方法的实施以及本文公开的组合物的制备和用途采用分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、计算化学、细胞培养、重组DNA以及本领域技术内的相关领域中的常规技术。这些技术在文献中得到充分说明。参见,例如Sambrook等MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989以及2001第三版;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley & Sons,New York,1987和定期更新版;丛书METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,第三版,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,第304卷,“Chromatin”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编),Academic Press,San Diego,1999;以及METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,第119卷,“Chromatin Protocols”(P.B.Becker编)Humana Press,Totowa,1999。

[0069] 定义

[0070] 术语“核酸”、“多核苷酸”以及“寡核苷酸”可互换使用,并且是指呈线性或环状构象并且呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物。出于本公开的目的,这些术语不应被解释为相对于聚合物的长度是限制性的。所述术语可涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫代磷酸主链)中被修饰的核苷酸。一般而言,特定核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性;即A的类似物将会与T碱基配对。

[0071] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物。所述术语

还适用于一种或多种氨基酸是对应的天然存在的氨基酸的化学类似物或修饰衍生物的氨基酸聚合物。

[0072] “结合”是指大分子之间(例如,蛋白质与核酸之间)的序列特异、非共价相互作用。并非结合相互作用的所有组分都需要是序列特异性的(例如,与DNA主链中磷酸盐残基接触),只要相互作用总体上是序列特异性的即可。此类相互作用的特征通常在于 $10^{-6}\text{M}^{-1}$ 或更低的解离常数( $K_d$ )。“亲和力”是指结合的强度:增加的结合亲和性与较低的 $K_d$ 相关。

[0073] “结合蛋白”是能够结合至另一种分子的蛋白质。结合蛋白可结合至例如DNA分子(DNA结合蛋白)、RNA分子(RNA结合蛋白)和/或蛋白质分子(蛋白质结合蛋白)。就蛋白质结合蛋白来说,它可结合至其自身(以形成同源二聚体、同源三聚体等),并且/或者它可结合至一种或多种不同蛋白质的一个或多个分子。结合蛋白可具有多于一种类型的结合活性。例如,锌指蛋白具有DNA结合活性、RNA结合活性和蛋白质结合活性。

[0074] “锌指DNA结合蛋白”(或结合结构域)是通过一种或多种锌指以序列特异性方式结合DNA的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,所述一种或多种锌指是结构通过锌离子配位稳定的结合结构域内的氨基酸序列区。术语锌指DNA结合蛋白经常缩写为锌指蛋白或ZFP。

[0075] “TALE DNA结合结构域”或“TALE”是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单一“重复单元”(也称为“重复序列”)通常为33-35个氨基酸长度,并且展现出至少一些与天然存在的TALE蛋白质内的其他TALE重复序列的序列同源性。

[0076] 锌指和TALE结合结构域可被“工程化”以结合至预定核苷酸序列,例如通过对天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区进行工程化(改变一个或多个氨基酸)。因此,工程化DNA结合蛋白(锌指或TALE)为非天然存在的蛋白质。用于将DNA结合蛋白工程化的方法的非限制性实例为设计和选择。设计的DNA结合蛋白为自然界中不存在的蛋白质,其设计/组成主要是合理标准的结果。用于设计的合理标准包括取代规则以及用于处理数据库中的信息的计算机化算法的应用,所述数据库存储了现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的信息。参见,例如,美国专利8,586,526;6,140,081;6,453,242;以及6,534,261;还参见WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496。

[0077] “选择的”锌指蛋白或TALE为自然界中未找到的蛋白质,所述蛋白质的产生主要是经验过程诸如噬菌体展示、相互作用陷阱或杂种选择的结果。参见,例如,美国专利号8,586,526;5,789,538;US 5,925,523;US 6,007,988;US 6,013,453;US 6,200,759;WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970WO 01/88197、WO 02/099084。

[0078] “TtAgo”是被认为参与基因沉默的原核Argonaute蛋白。TtAgo来源于细菌嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)。(参见,例如Swarts等,ibid,G.Sheng等,(2013) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.111,652)。“TtAgo系统”是所需的所有组分,包括例如TtAgo酶所裂解的指导DNA。

[0079] “重组”是指两种多核苷酸之间基因信息的交换过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)和同源重组进行的供体捕获。出于本公开的目的,“同源重组(HR)”是指此类交换的特化形式,所述交换在例如双链断裂修复期间在细胞中通过同源定向修复机制发生。这个过程需要核苷酸序列同源性,使用“供体”分子将“靶”分子(即,经历双链断裂的那

个分子)的修复作为模板,并且这个过程分别被称为“无交叉基因转换”或“短序列基因转换(short tract gene conversion)”,因为其引起基因信息从供体转移至所述靶。在不希望受任何具体理论约束的情况下,此类转移可涉及在断裂的靶与供体之间形成的异源双链体DNA的错配校正;和/或“合成依赖性链退火”,其中供体用于重新合成将成为靶的一部分的基因信息;和/或相关的过程。此类特化的HR经常导致靶分子序列改变,这样使得供体多核苷酸的部分或所有序列并入靶多核苷酸中。

[0080] 在本公开的方法中,如本文所述的一种或多种靶向核酸酶可在靶序列(例如,细胞染色质)的预先确定的位点中产生双链断裂,并且与断裂区中的核苷酸序列具有同源性的“供体”多核苷酸可引入细胞中。已显示存在双链断裂可促进供体序列的整合。供体序列可以物理整合,或者可替代地,供体多核苷酸用作通过同源组合修复断裂的模板,这将导致供体中的全部或部分核酸序列引入细胞染色质中。因此,可改变细胞染色质中的第一序列,并且在某些实施方案中,可转换成供体多核苷酸中存在的序列。因此,使用的术语“替换(replace)”或“替换(replacement)”可理解为表示用另一核苷酸序列替换一个核苷酸序列,(即,在信息意义上替换序列),并且不一定需要用另一多核苷酸来物理或化学地替换一个多核苷酸。

[0081] 在本文所述的任何方法中,另外的锌指蛋白或TALEN对可用于对细胞内另外的靶位点进行另外的双链裂解。

[0082] 本文所述的任何方法可通过破坏目标基因表达的供体序列靶向整合来用于任何大小的供体的插入和/或细胞中一种或多种靶序列的部分或完全灭活。还提供了具有部分或完全灭活的基因的细胞系。

[0083] 此外,如本文所述的靶向整合方法也可用于整合一种或多种外源序列。外源核酸序列可包括例如一种或多种基因或cDNA分子,或任何类型的编码序列或非编码序列,以及一种或多种控制元件(例如,启动子)。此外,外源核酸序列可产生一种或多种RNA分子(例如,小发夹RNA(shRNA)、抑制性RNA(RNAi)、微小RNA(miRNA)等)。

[0084] 在用于靶向重组和/或替换和/或改变细胞染色质的目标区中的序列的方法的某些实施方案中,染色体序列通过与外源“供体”核苷酸序列同源重组来改变。如果存在与断裂区同源的序列,则可通过双链断裂在细胞染色质中的存在来刺激此类同源重组。

[0085] 在本文所述的任何方法中,外源核苷酸序列(“供体序列”或“转基因”)可包含与目标区中的基因组序列同源但不同的序列,因此刺激同源重组以在目标区插入不相同序列。因此,在某些实施方案中,与目标区中的序列同源的供体序列部分展现出与所替换的基因组序列约80%至99%之间(或其间的任何整数)的序列同一性。在其他实施方案中,例如如果具有超过100个连续碱基对的供体与基因组序列之间仅有1个核苷酸不同,供体与基因组序列之间的同源性高于99%。在某些情况下,供体序列的非同源部分可包含目标区中不存在的序列,这样使得新的序列引入目标区中。在这些情况下,非同源序列通常侧接具有50-1,000个碱基对(或其间的任何整数值)或大于1,000个碱基对的任何数目的序列,这些序列与目标区中的序列同源或相同。在其他实施方案中,供体序列与第一序列是非同源的,并且供体序列通过非同源重组机制插入基因组中。

[0086] “裂解”是指DNA分子共价主链的断裂。裂解可通过各种各样的方法来引发,所述方法包括但不限于磷酸二酯键的酶水解或化学水解。单链裂解和双链裂解均有可能,并且双



链裂解可由于两个独特单链裂解事件而发生。DNA裂解可导致产生钝圆末端或交错末端。在某些实施方案中,融合多肽用于靶向双链DNA裂解。

[0087] “裂解半结构域”是与第二多肽(相同的或不同的)结合形成具有裂解活性(优选地是双链裂解活性)的复合物的多肽序列。术语“第一裂解半结构域和第二裂解半结构域”;“+裂解半结构域和-裂解半结构域”以及“右裂解半结构域和左裂解半结构域”可交换使用,是指二聚化的裂解半结构域对。

[0088] “工程化裂解半结构域”是已被修饰来与另一种裂解半结构域(例如,另一种工程化裂解半结构域)形成专性异源二聚体的裂解半结构域。还参见美国专利公布号2005/0064474、20070218528、2008/0131962以及2011/0201055,所述专利以引用方式整体并入本文。

[0089] 术语“序列”是指具有任何长度的核苷酸序列,所述核苷酸序列可为DNA或RNA;可为线性、环状或分支的,并且可为单链或双链。术语“供体序列”是指插入基因组中的核苷酸序列。供体序列可具有任何长度,例如2与100,000,000之间个核苷酸的长度(或其间的任何整数值)、优选地约100与100,000之间个核苷酸的长度(或其间的任何整数)、更优选地约100与5,000之间个核苷酸的长度(或其间的任何值)以及甚至更优选地约100与2,000之间个碱基对(或其间的任何值)。

[0090] “同源、不相同的序列”是指与第二序列共有一定程度的序列同一性,但是其序列不同于第二序列的第一序列。例如,包含突变基因的野生型序列的多核苷酸与突变基因的序列是同源的,并且是不同的。在某些实施方案中,两个序列之间的同源程度足以利用标准细胞机制在其间产生同源重组。两个同源不相同的序列可为任何长度,并且它们的非同源程度可小至单个核苷酸(例如,通过靶向同源重组用于校正基因组点突变)或大至10或更多千碱基(例如,在染色体中的预先确定的异位位点处插入基因)。两个包含同源不相同序列的多核苷酸不需要是相同的长度。例如,可使用具有20与10,000个核苷酸或核苷酸对之间的外源多核苷酸(即供体多核苷酸)。

[0091] 用于测定核酸和氨基酸序列同一性的技术是本领域中已知的。通常,此类技术包括测定基因的mRNA的核苷酸序列和/或测定由其编码的氨基酸序列,以及将这些序列与第二核苷酸或氨基酸序列进行比较。还可以这种方式测定和比较基因组序列。一般而言,同一性是指两个多核苷酸或多肽序列分别的核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸的精确对应。两个或更多个序列(聚核苷酸或氨基酸)可通过使用标准技术确定它们的同一性百分比来进行比较。通常,序列之间的同一性百分比为至少70%-75%、优选地80%-82%、更优选地85%-90%、甚至更优选地92%、还更优选地95%以及最优选地98%序列同一性。

[0092] 可替代地,多核苷酸之间的序列相似程度可通过以下步骤来测定:在允许同源区之间形成稳定双链体的条件下使多核苷酸杂交,随后用单链特异核酸酶进行消化,并且测定消化的片段的大小。如使用本领域已知的方法所测定,当序列在所定义的分子长度上展现出至少约70%至75%、优选地80%至82%、更优选地85%至90%、甚至更优选地92%、再更优选地95%以及最优选地98%序列同一性时,两个核酸或两个多核苷酸序列为彼此基本上同源的。杂交条件为本领域技术人员所熟知的。杂交严格性是指杂交条件不利于形成含有错配核苷酸的杂交物的程度,其中更高严格性与错配杂交物的较低容差相关。影响杂交严格性的因素为本领域技术人员所熟知的,并且包括但不限于温度、pH、离子强度和有机溶

剂(例如像甲酰胺和二甲亚砷)的浓度。如本领域技术人员所已知的,杂交严格性随着较高的温度、较低的离子强度和较低的溶剂浓度而增加。

[0093] “染色质”是包括细胞基因组的核蛋白结构。细胞染色质包含核酸(主要为DNA)以及蛋白质,所述蛋白质包括组蛋白和非组蛋白染色体蛋白。大多数真核细胞染色质以核小体的形式存在,其中核小体核心包含大约150个与八聚体缔合的DNA碱基对,所述八聚体包含组蛋白H2A、H2B、H3以及H4中的各两个;并且接头DNA(根据生物体而具有可变的长度)在核小体核心之间延伸。组蛋白H1分子一般与接头DNA缔合。出于本公开的目的,术语“染色质”意在涵盖所有类型的原核和真核的细胞核蛋白。细胞染色质包括染色体染色质和附加型染色质。

[0094] “染色体”是包含细胞所有或部分基因组的染色质复合物。细胞基因组的特征经常在于它的核型,所述核型是包含细胞基因组的所有染色体集合。细胞基因组可构成一种或多种染色体。

[0095] “附加体”是包含并非细胞染色体核型的一部分的核酸的复制型核酸、核蛋白复合物或其他结构。附加体的实例包括质粒和某些病毒基因组。

[0096] “可接近区”是细胞染色质中的位点,其中核酸中存在的靶位点可被识别靶位点的外源分子结合。在不希望受任何具体理论约束的情况下,据信可接近区是未被包装成核小体结构的区。可接近区的独特结构经常可通过其对化学和酶探针(例如核酸酶)的敏感性来检测。

[0097] “靶位点”或“靶序列”是定义结合分子将结合(条件是存在用于结合的充分条件)的核酸部分的核酸序列。

[0098] “外源”分子是细胞中通常不存在,但可通过一种或多种基因方法、生物化学方法或其他方法引入细胞中的分子。“通常存在于细胞中”是相对于细胞的具体发育阶段和环境条件而确定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子相对于成年肌肉细胞是外源分子。类似地,通过热激诱导的分子相对于非热激的细胞是外源分子。外源分子可包括例如功能失常的内源分子的功能形式或功能正常的内源分子的功能失常形式。

[0099] 在其他情况中,外源分子可为小分子诸如通过组合化学过程产生的小分子,或大分子诸如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子的任何修饰的衍生物或包含一种或多种上述分子的任何复合物。核酸包括DNA和RNA,可为单链或双链的;可为线性、分支或环状的;并且可具有任何长度。核酸包括能够形成双链体的那些核酸以及形成三链体的核酸。参见例如美国专利号5,176,996和5,422,251。蛋白质包括但不限于DNA结合蛋白、转录因子、染色质重塑因子、甲基化DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、脱甲基化酶、乙酰基转移酶、脱乙酰酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、促旋酶以及解旋酶。

[0100] 外源分子可为与内源分子相同类型的分子,例如外源蛋白质或核酸。例如,外源核酸可以包括感染性病毒基因组、引入细胞中的质粒或附加体或细胞中通常不存在的染色体。用于将外源分子引入细胞中的方法是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于脂质介导的转移(即,脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电穿孔、直接注入、细胞融合、粒子轰击、生物聚合物纳米颗粒递送(参见,Nitta和Numata(2013) Int J Mol Sci 14:1629)、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移以及病毒载体介导的转移。外源分子也可为与内源分子相

同类型的分子,但是来源于与细胞所来源的物种不同的物种。例如,人类核酸序列可引入到最初来源于小鼠或仓鼠的细胞系。

[0101] 相反,“内源”分子是在具体环境条件下在处于具体发育阶段的具体细胞中通常存在的分子。例如,内源核酸可包括染色体、线粒体或其他细胞器的基因组或天然存在的附加型核酸。另外的内源分子可包括蛋白质,例如转录因子和酶。

[0102] 如本文所用,术语“外源核酸的产物”包括多核苷酸和多肽产物,例如转录产物(多核苷酸,诸如RNA)和翻译产物(多肽)。

[0103] “融合”分子是两个或更多个亚基分子得以连接(优选共价地)的分子。亚基分子可为相同化学类型的分子,或者可为不同化学类型的分子。第一种类型的融合分子的实例包括但不限于融合蛋白(例如,在ZFP或TALE DNA结合结构域与一个或多个活化结构域之间融合)以及融合核酸(例如,编码上文所述的融合蛋白的核酸)。第二种类型的融合分子的实例包括但不限于形成三链体的核酸与多肽之间的融合以及小沟结合剂与核酸之间的融合。

[0104] 细胞中融合蛋白的表达可以通过将融合蛋白递送至细胞或通过将编码融合蛋白的多核苷酸递送至细胞而引起,其中所述多核苷酸得到转录并且转录物得以翻译以产生融合蛋白。反式剪接、多肽裂解以及多肽连接也可涉及细胞中蛋白质的表达。在本公开的其他位置处呈现了用于向细胞递送多核苷酸和多肽的方法。

[0105] 出于本公开的目的,“基因”包括编码基因产物(参见下文)的DNA区,以及调控基因产物产生的所有DNA区,无论此类调控序列是否相邻于编码序列和/或转录序列。因此,基因包括但不限于启动子序列、终止子、翻译调控序列(诸如核糖体结合位点和内核糖体进入位点)、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质附着位点以及基因座控制区。

[0106] “基因表达”是指将包含在基因中的信息转换成基因产物。基因产物可为基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核酶、结构RNA或任何其他类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括通过诸如加帽、聚腺苷酸化、甲基化以及编辑的方法来修饰的RNA以及通过例如甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP核糖基化、肉豆蔻基化以及糖基化来修饰的蛋白质。

[0107] 基因表达的“调节”是指基因活性的变化。表达调节可包括但不限于基因活化和基因抑制。基因编辑(例如,裂解、改变、灭活、随机突变)可用于调节表达。基因灭活是指与不包含如本文所述的ZFP、TALE或CRISPR/Cas系统的细胞相比的基因表达的任何减少。因此,基因灭活可以是部分的或完全的。

[0108] “目标区”是任何细胞染色质区,例如像基因或基因内部或与基因相邻的非编码序列,在所述基因中希望结合外源分子。结合可以是出于靶向DNA裂解和/或靶向重组的目的。目标区可以存在于例如染色体、附加体、细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体)或感染性病毒基因组中。目标区可处于基因编码区内、处于转录的非编码区(例如像前导序列、尾随序列或内含子)内或者处于编码区上游或下游内的非转录区内。目标区的长度可小至单个核苷酸对,或高达2,000个核苷酸对,或任何整数值个核苷酸对。

[0109] “真核”细胞包括但不限于真菌细胞(诸如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞以及人类细胞(例如,T-细胞)。

[0110] “分泌组织”是动物中将产物从单独细胞中分泌至一些类型的腔中的那些组织,所述组织通常来源于上皮。定位于胃肠道的分泌组织的实例包括来自肠道、胰腺和胆囊的细

胞。其他分泌组织包括肝、与眼睛和粘膜相关的组织(诸如唾液腺、乳腺、前列腺、脑垂体)和内分泌系统的其他成员。另外,分泌组织包括能够分泌的组织类型的单独细胞。

[0111] 关于并列的两种或更多种组分(诸如序列元件),术语“可操作连接”或“可操作地连接”(或“操作性地连接”)可互换使用,其中所述组分被布置成使得组分正常发挥作用并且允许以下可能性:至少一种组分可介导施加在至少一种其他组分上的功能。作为说明,如果转录调控序列响应于一种或多种转录调控因子的存在或不存在而控制编码序列的转录水平,则转录调控序列(诸如启动子)可操作地连接至编码序列。转录调控序列一般以顺式形式与编码序列可操作地连接,但无需与编码序列直接相邻。例如,增强子为可操作地连接至编码序列的转录调控序列,虽然它们不是邻接的。

[0112] 关于融合多肽,术语“可操作地连接”可以是指以下事实:每种组分在与其他组分连接的情况下进行与其未如此连接时将进行的功能相同的功能。例如,关于ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域融合至活化结构域的融合多肽,如果在融合多肽中ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,同时活化结构域能够上调基因表达,则ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域和活化结构域是处于可操作连接中的。关于ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域融合至裂解结构域的融合多肽,如果在融合多肽中ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,同时裂解结构域能够在靶位点附近(例如,靶位点任一侧上的1至500个碱基对或其间的任何值)裂解DNA,则ZFP、TALE或Cas DNA结合结构域和裂解结构域是处于可操作连接中的。

[0113] 蛋白质、多肽或核酸的“功能片段”是序列不同于全长蛋白质、多肽或核酸但保留与全长蛋白质、多肽或核酸相同的功能的蛋白质、多肽或核酸。功能片段可以具有比相应天然分子更多、更少或相同数量的残基,和/或可以包含一种或多种氨基酸或核酸取代。用于测定核酸功能(例如,编码功能、与另一核酸杂交的能力)的方法是本领域中熟知的。类似地,测定蛋白质功能的方法是熟知的。例如,多肽的DNA结合功能可以例如通过过滤结合、电泳迁移移动或免疫沉淀测定来测定。DNA裂解可通过凝胶电泳来测定。参见Ausubel等,上文。蛋白质与另一种蛋白质相互作用的能力可以通过例如免疫共沉淀、双杂交测定或基因和生物化学的互补作用来测定。参见,例如,Fields等(1989)Nature 340:245-246;美国专利号5,585,245以及PCT WO 98/44350。

[0114] “载体”能够将基因序列转移至靶细胞。通常,“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”意指能够引导目标基因表达并且可将基因序列转移至靶细胞的任何核酸构建体。因此,所述术语包括克隆媒介物和表达媒介物以及整合载体。

[0115] “报告基因”或“报告序列”是指产生易于在常规测定中测量(优选地,尽管不一定)的蛋白质产物的任何序列。合适的报告基因包括但不限于序列编码介导抗生素抗性(例如,氨苄青霉素抗性、新霉素抗性、G418抗性、嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列、编码彩色或荧光或发光蛋白(例如,绿色荧光蛋白、增强型绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、荧光素酶)和介导增强的细胞生长和/或基因扩增的蛋白质(例如,二氢叶酸还原酶)的序列。表位标签包括例如FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测氨基酸序列的一种或多种拷贝。“表达标签”包括编码报告分子的序列,其可以操作性地连接至所需基因序列以便监测目标基因的表达。

[0116] “安全港”基因座是基因组内的基因座,其中基因可插入而对于宿主细胞没有任何有害效应。最有利的是所插入基因序列的表达不受来自相邻基因的任何通读表达干扰的安

全港基因座。哺乳动物细胞中安全港基因座的非限制性实例为AAVS1基因(美国专利号8,110,379)、CCR5基因(美国公布号20080159996)、Rosa基因座(WO 2010/065123)和/或白蛋白基因座(美国公布号20130177960和20130177983)。植物细胞中的安全港为ZP15基因座(美国专利公布20100199389)。

[0117] 术语“受试者”和“患者”可互换使用,并且是指哺乳动物诸如人类患者和非人灵长类动物以及实验动物诸如兔、狗、猫、大鼠、小鼠和其他动物。因此,如本文所用的术语“受试者”或“患者”意指可施用本发明的干细胞的任何哺乳动物患者或受试者。本发明的受试者包括已暴露于一种或多种化学毒素(包括例如神经毒素)的那些受试者。

[0118] “干性质”是指任何细胞以干细胞样方式起作用的相对能力,即任何具体干细胞可具有的全能性、多能性或寡能性以及扩增的或无限的自我更新的程度。

[0119] 核酸酶

[0120] 本文描述了适用于在体内裂解携带转基因的供体分子的组合物(特别是核酸酶,诸如ZFN、TALE、归巢核酸内切酶、Ttango和/或CRISPR/Cas系统)以及用于裂解细胞基因组以使得转基因以靶向方式整合至基因组中的核酸酶。在某些实施方案中,一种或多种核酸酶为天然存在的。在其他实施方案中,一种或多种核酸酶为非天然存在的,即在DNA结合结构域和/或裂解结构域方面进行工程化。例如,可改变天然存在的核酸酶的DNA结合结构域以结合至所选靶位点(例如,已工程化来结合至不同于同源结合位点的大范围核酸酶)。在其他实施方案中,核酸酶包含异源DNA结合结构域和裂解结构域(例如,锌指核酸酶; TAL效应物结构域DNA结合蛋白;具有异源裂解结构域的大范围核酸酶DNA结合结构域)。在其他实施方案中,核酸酶包含诸如CRISPR/Cas或Ttango系统的系统。

[0121] A.DNA结合结构域

[0122] 在某些实施方案中,本文所述的组合物和方法采用大范围核酸酶(归巢核酸内切酶)DNA结合结构域,以结合至供体分子和/或结合至细胞基因组中的目标区。天然存在的大范围核酸酶识别15-40个碱基对裂解位点,并且通常分组为四个家族:LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst盒家族和HNH家族。示例性归巢核酸内切酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。其识别序列是已知的。还参见,美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等(1989)Gene 82:115-118;Perler等(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等(1998)J.Mol.Biol.280:345-353以及New England Biolabs目录。

[0123] 在某些实施方案中,本文所述的方法和组合物使用包括工程化(非天然存在的)归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)在内的核酸酶。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶诸如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII以及I-TevIII的识别序列是已知的。还参见,美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等(1989)Gene 82:115-118;Perler等(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等(1998)J.Mol.Biol.280:345-353以及New England Biolabs目录。此外,归巢核酸内切酶和

大范围核酸酶的DNA结合特异性可被工程化以结合非天然靶位点。参见,例如,Chevalier等(2002) *Molec. Cell* 10:895-905;Epinat等(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962;Ashworth等(2006) *Nature* 441:656-659;Paques等(2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66;美国专利公布号20070117128。归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的DNA结合结构域可在核酸酶的总体情况下改变(即,使得核酸酶包含同源裂解结构域)或可融合至异源裂解结构域。

[0124] 在其他实施方案中,本文所述的方法和组合物中使用的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含天然存在的或工程化的(非天然存在的)TAL效应物DNA结合结构域。参见,例如,美国专利号8,586,526,所述专利以引用方式整体并入本文。已知黄单孢菌属(*Xanthomonas*)的植物病原菌在重要农作物中引起许多疾病。黄单孢菌属的病原性取决于将超过25种不同效应蛋白质注入植物细胞中的保守性III型分泌(T3S)系统。在这些注入的蛋白质中是模拟植物转录活化因子并且操纵植物转录组的转录活化因子样(TAL)效应物(参见Kay等(2007) *Science* 318:648-651)。这些蛋白质含有DNA结合结构域和转录活化结构域。最良好表征的TAL效应物之一为来自野油菜黄单孢菌疱病致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*)的AvrBs3(参见,Bonas等(1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136,以及W02010079430)。TAL效应物含有串联重复的集中结构域,每个重复含有大约34个氨基酸,所述重复对于这些蛋白质的DNA结合特异性而言至关重要。此外,它们含有核定位序列和酸性转录活化结构域(关于综述,参见Schornack S,等(2006) *J Plant Physiol* 163(3):256-272)。此外,在植物病原菌茄科雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)中,已发现指定为brg11和hpx17的两种基因与茄科雷尔氏菌生物变种1菌株GMI1000和生物变种4菌株RS1000中的黄单孢菌属的AvrBs3家族同源(参见Heuer等(2007) *Appl and Envir Micro* 73(13):4379-4384)。这些基因的核苷酸序列彼此98.9%相同,但是不同之处在于在hpx17的重复结构域中缺失1,575bp。然而,两种基因产物与黄单孢菌属的AvrBs3家族蛋白质具有小于40%序列同一性。参见,例如,美国专利公布号8,586,526,所述专利以引用方式整体并入本文。

[0125] 这些TAL效应物的特异性取决于串联重复序列中发现的序列。重复序列包含大约102bp,并且重复序列通常彼此91%-100%同源(Bonas等,同上)。重复序列的多态性通常位于位置12和13并且在位置12和13处的高变双残基的同一性与TAL效应物的靶序列中的邻接核苷酸的同一性之间似乎存在一一对应的关系(参见Moscou和Bogdanove,(2009) *Science* 326:1501和Boch等(2009) *Science* 326:1509-1512)。在实验上,已确定了这些TAL效应物的DNA识别的天然密码,以使得位置12和13处的HD序列导致与胞嘧啶(C)结合,NG与T结合,NI与A、C、G或T结合,NN与A或G结合,并且ING与T结合。这些DNA结合重复序列已组装成具有新的组合和重复数量的蛋白质,以产生能够与新序列相互作用并且活化植物细胞中的非内源性报告基因的表达的人工转录因子(Boch等,同上)。工程化TAL蛋白已连接至FokI裂解半结构域,以产生在酵母报告基因测定(基于质粒的靶标)中展现出活性的TAL效应物结构域核酸酶融合体(TALEN)。参见,例如,美国专利号8,586,526;Christian等((2010) <Genetics epub 10.1534/genetics.110.120717)。

[0126] 在某些实施方案中,用于在体内裂解和/或靶向裂解细胞基因组的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含锌指蛋白。优选地,锌指蛋白为非天然存在的,因为其被工程化

以结合至所选靶位点。参见,例如,参见,例如,Beerli等(2002) *Nature Biotechnol.* 20: 135-141; Pabo等(2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70: 313-340; Isalan等(2001) *Nature Biotechnol.* 19: 656-660; Segal等(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 632-637; Choo等(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 411-416; 美国专利号6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; 以及美国专利公布号2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, 所有文献均以引用方式整体并入本文。

[0127] 与天然存在的锌指蛋白相比,工程化的锌指结合结构域可具有新型结合特异性。工程化方法包括但不限于合理的设计和类型的选择。合理的设计包括例如使用包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单独锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的一个或多个锌指氨基酸序列缔合。参见,例如共同拥有的美国专利6,453,242和6,534,261,所述专利以引用方式整体并入本文。

[0128] 包括噬菌体展示和双杂交系统的示例性选择方法公开于美国专利5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759和6,242,568; 以及WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; 以及WO 01/88197中。此外,锌指结合结构域的结合特异性增强已在例如共同拥有的WO 02/077227中有所描述。

[0129] 此外,如这些和其他参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。关于示例性接头序列,还参见美国专利号8,772,453; 6,479,626; 6,903,185; 以及7,153,949。本文所述的蛋白质可包含蛋白质的单个锌指之间的合适接头的任何组合。

[0130] 靶位点的选择; ZFP以及设计并构建融合蛋白(和编码所述蛋白质的多核苷酸)的方法为本领域技术人员已知的并且详细描述于美国专利号6,140,815; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536以及WO 03/016496中。

[0131] 此外,如这些和其他参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指锌指蛋白可使用任何合适的接头序列(包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。关于6个或更多个氨基酸长度的示例性接头序列,还参见美国专利号6,479,626; 6,903,185; 以及7,153,949。本文所述的蛋白质可包含蛋白质的单个锌指之间的合适接头的任何组合。

[0132] 在某些实施方案中,DNA结合结构域为CRISPR/Cas核酸酶系统的一部分。参见,例如,美国专利号8,697,359和美国专利申请号14/278,903。编码所述系统的RNA组分的CRISPR(规律成簇间隔短回文重复序列)基因座和编码蛋白质的cas(CRISPR相关)基因座(Jansen等,2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova等,2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova等., 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft等, 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60)组成CRISPR/Cas核酸酶系统的基因序列。微生物宿主中的CRISPR基因座含有CRISPR相关(Cas)基因的组合以及能够编程CRISPR介导的核酸裂解的特异性的非编码RNA元件。

[0133] II型CRISPR为最良好表征的系统之一,并且在四个相继步骤中进行靶向DNA双链断裂。首先,两个非编码RNA前crRNA阵列和tracrRNA从CRISPR基因座转录。其次,tracrRNA



杂交至前crRNA的重复序列区,并且介导前crRNA加工成含有单独间隔区序列的成熟crRNA。第三,通过crRNA上的间隔区与靶DNA上相邻于原型间隔区相邻基序(PAM)的原型间隔区之间的沃森-克里克碱基配对,成熟crRNA:tracrRNA复合物将Cas9引导至靶DNA,这是靶识别的另外要求。最后,Cas9介导靶DNA裂解以在原型间隔区内产生双链断裂。CRISPR/Cas系统的活动包括三个步骤:(i)将外来DNA序列插入CRISPR阵列以阻止未来的攻击,这是称为‘适应’的过程,(ii)表达相关蛋白质,以及表达并处理所述阵列,随后(iii)RNA介导干扰外来核酸。因此,在细菌细胞中,多个所谓‘Cas’蛋白质参与CRISPR/Cas系统的天然功能并且在诸如插入外来DNA等的功能中发挥作用。

[0134] 在一些实施方案中,使用CRISPR-Cpf1系统。在弗朗西斯氏菌属某些种(*Francisella* spp)中鉴定出的CRISPR-Cpf1系统为一种2类CRISPR-Cas系统,其在人细胞中介导稳健的DNA干扰。虽然功能上保守,但是Cpf1和Cas9在许多方面有所不同,包括其指导RNA和底物特异性(参见Fagerlund等,(2015) *Genom Bio* 16:251)。Cas9与Cpf1蛋白之间的主要差异在于Cpf1并不利用tracrRNA,并因此仅需要crRNA。FnCpf1 crRNA为42-44个核苷酸长(19个核苷酸重复序列和23-25个核苷酸间隔区)并且含有单个茎环,所述茎环容许保留二级结构的序列变化。此外,Cpf1 crRNA比Cas9所需要的约100个核苷酸工程化sgRNA显著更短,并且对于FnCpf1的PAM要求为置换链上的5'-TTN-3'和5'-CTA-3'。虽然Cas9和Cpf1均在靶DNA中进行双链断裂,但是Cas9使用其RuvC样结构域和HNH样结构域以在指导RNA的种子序列内进行钝圆末端切割,而Cpf1使用RuvC样结构域以在种子外部产生交错切割。由于Cpf1远离关键种子区进行交错切割,所以NHEJ将不会破坏靶位点,因此确保Cpf1可继续切割同一位点,直至发生所需的HDR重组事件。因此,在本文所述的方法和组合物中,应当理解,术语“Cas”包括Cas9和Cpf1蛋白。因此,如本文所用,“CRISPR/Cas系统”是指CRISPR/Cas和/或CRISPR/Cpf1系统,包括核酸酶和/或转录因子系统。

[0135] 在某些实施方案中,Cas蛋白质可为天然存在的Cas蛋白质的“功能衍生物”。原生序列多肽的“功能衍生物”是具有与原生序列多肽相同的定性生物特性的化合物。“功能衍生物”包括但不限于原生序列的片段和原生序列多肽及其片段的衍生物,只要它们具有与相应原生序列多肽相同的生物活性。在本文中涵盖的生物活性是功能衍生物将DNA底物水解成片段的能力。术语“衍生物”涵盖多肽的氨基酸序列变体、其共价修饰和融合体。Cas多肽或其片段的合适衍生物包括但不限于Cas蛋白质或其片段的突变体、融合体、共价修饰。Cas蛋白(其包括Cas蛋白或其片段以及Cas蛋白或其片段的衍生物)可从细胞获得或化学合成或通过这两种程序的组合获得。细胞可为天然产生Cas蛋白的细胞,或天然产生Cas蛋白并且遗传工程化以在较高表达水平下产生内源性Cas蛋白或由外源引入的核酸产生Cas蛋白的细胞,所述核酸编码与内源性Cas相同或不同的Cas。在一些情况下,细胞不天然产生Cas蛋白并且遗传工程化以产生Cas蛋白。

[0136] 在一些实施方案中,DNA结合结构域为TtAgo系统的一部分(参见,Swartz等,同上;Sheng等,同上)。在真核生物中,基因沉默由Argonaute(Ago)蛋白质家族介导。在这个范例中,Ago结合至小(19-31nt)RNA。这种蛋白质-RNA沉默复合物通过小RNA与靶标之间的沃森-克里克碱基配对来识别靶RNA,并且以核酸内切方式裂解靶RNA(Vogel(2014) *Science* 344:972-973)。相比之下,原核Ago蛋白结合至小单链DNA片段,并可能用于检测和去除外来的(通常为病毒性)DNA(Yuan等,(2005) *Mol. Cell* 19,405;Olovnikov等(2013) *Mol. Cell* 51,



594;Swarts等,同上)。示例性原核Ago蛋白包括来自超嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)和嗜热栖热菌的那些蛋白质。

[0137] 最良好表征的原核Ago蛋白之一是嗜热栖热菌(TtAgo;Swarts等,同上)。TtAgo与具有5'磷酸基团的15nt或13-25nt单链DNA片段缔合。TtAgo所结合的这种“指导DNA”用于引导蛋白质-DNA复合物结合第三方DNA分子中的沃森-克里克互补DNA序列。一旦这些指导DNA中的序列信息允许鉴定靶DNA,则TtAgo-指导DNA复合物裂解靶DNA。这种机制还受到TtAgo-指导DNA复合物在结合至其靶DNA时的结构的支持(G.Sheng等,同上)。来自类球红细菌的Ago(RsAgo)具有类似的特性(Olivnikov等,同上)。

[0138] 具有任意DNA序列的外源指导DNA可加载到TtAgo蛋白上(Swarts等,同上)。由于TtAgo裂解的特异性由指导DNA引导,与外源的、研究者指定的指导DNA形成的TtAgo-DNA复合物将因此将TtAgo靶DNA裂解引导至互补性、研究者指定的靶DNA。以此方式,可在DNA中产生靶向双链断裂。TtAgo指导DNA系统(或来自其他生物体的直系同源Ago-指导DNA系统)的使用允许靶向裂解细胞内的基因组DNA。此类裂解可以是单链或双链的。为了裂解哺乳动物基因组DNA,将优选使用进行密码子优化以在哺乳动物细胞中表达的TtAgo形式。此外,可优选使用体外形成的TtAgo-DNA复合物处理细胞,在所述TtAgo-DNA复合物中TtAgo蛋白融合至细胞穿透肽。此外,可优选使用已通过诱变改变以在37℃下具有改善的活性的TtAgo蛋白形式。Ago-RNA介导的DNA裂解可用于使用利用DNA断裂的本领域标准技术来实现一系列结果,包括基因敲除、靶向基因添加、基因校正、靶向基因缺失。

[0139] 因此,核酸酶包含DNA结合结构域,其特异性结合至需要插入供体(转基因)的任何基因中的靶位点。本文所述的DNA结合结构域通常结合至包含12至35个核苷酸(或其间的任何值)的靶位点。DNA结合结构域所结合的靶位点内的核苷酸可为邻接的或非邻接的(例如,DNA结合结构域可结合至少于构成靶位点的所有碱基对)。

#### [0140] B.裂解结构域

[0141] 任何合适的裂解结构域可以可操作地连接至DNA结合结构域以形成核酸酶。例如,ZFP DNA结合结构域已融合至核酸酶结构域以产生ZFN,其为能够通过其工程化(ZFP)DNA结合结构域识别其预期核酸靶标并且通过核酸酶活性引起在ZFP结合位点附近切割DNA的功能实体。参见例如,Kim等(1996)Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156-1160。最近,ZFN已用于多种生物体中的基因组修饰。参见,例如,美国专利公布20030232410;20050208489;20050026157;20050064474;20060188987;20060063231;以及国际公布WO 07/014275。同样地,TALE DNA结合结构域已融合至核酸酶结构域以产生TALEN。参见,例如,美国专利号8,586,526。

[0142] 如上所指出,裂解结构域可与DNA结合结构域异源,例如锌指DNA结合结构域和来自核酸酶的裂解结构域或者TALEN DNA结合结构域和裂解结构域,或者来自不同核酸酶的大范围核酸酶DNA结合结构域和裂解结构域。异源裂解结构域可获自任何核酸内切酶或核酸外切酶。裂解结构域可来源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,2002-2003目录,New England Biolabs,Beverly,MA;以及Belfort等(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388。裂解DNA的另外的酶是已知的(例如,S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母H0核酸内切酶;还参见Linn等(编)Nucleases,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1993)。这些酶(或其功能片段)中的

一种或多种可用作裂解结构域和裂解半结构域的来源。

[0143] 类似地,裂解半结构域可来源于如上所列出的对于裂解活性需要二聚化的任何核酸酶或其部分。一般而言,如果融合分子包含裂解半结构域,则裂解需要两个融合分子。可替代地,可使用包含两个裂解半结构域的单个蛋白质。所述两个裂解半结构域可来源于相同核酸内切酶(或其功能片段),或者每个裂解半结构域均可来源于不同的核酸内切酶(或其功能片段)。此外,两个融合蛋白的靶位点优选地相对于彼此布置,以使得两个融合蛋白与其相应靶位点的结合将裂解半结构域放置于彼此的空间定位中,所述空间定位使得裂解半结构域例如通过二聚作用形成功能裂解结构域。因此,在某些实施方案中,靶位点的近侧由5-8个核苷酸或由15-18个核苷酸隔开。然而,任何整数的核苷酸或核苷酸对可介于两个靶位点之间(例如,2至50个核苷酸对或更多)。一般而言,裂解的位点位于靶位点之间。

[0144] 限制性核酸内切酶(限制酶)存在于许多物种中,并且能够以序列特异性方式结合至DNA(在识别位点处),并且在结合位点处或附近裂解DNA。某些限制酶(例如IIS型)在远离识别位点的位点处裂解DNA,并且具有可分开的结合结构域和裂解结构域。例如,IIS型酶Fok I在距其一条链上的识别位点9个核苷酸处以及在距其另一条链上的识别位点13个核苷酸处催化DNA的双链裂解。参见,例如,美国专利5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279;Li等(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768;Kim等(1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887;Kim等(1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31,978-31,982。因此,在一个实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的裂解结构域(或裂解半结构域)以及一种或多种可以工程化或不工程化的锌指结合结构域。

[0145] 裂解结构域可与结合结构域分开的示例性IIS型限制酶为FokI。这种特定的酶作为二聚体是有活性的。Bitinaite等(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:10,570-10,575。因此,出于本公开的目的,认为用于所公开的融合蛋白中的Fok I酶的部分是裂解半结构域。因此,为了使用锌指-Fok I融合体进行细胞序列的靶向双链裂解和/或靶向替换,各自包含FokI裂解半结构域的两种融合蛋白可用来重建有催化活性的裂解结构域。可替代地,还可使用含有锌指结合结构域和两个Fok I裂解半结构域的单个多肽分子。在本公开的其他位置处提供了使用锌指Fok I融合体进行靶向裂解和靶向序列改变的参数。

[0146] 裂解结构域或裂解半结构域可为保留裂解活性或保留进行多聚化(例如,二聚化)以形成功能裂解结构域的能力的蛋白质的任何部分。

[0147] 示例性IIS型限制酶描述于美国专利7,888,121中,所述专利整体并入本文。另外的限制酶也包含可分开的结合结构域和裂解结构域,并且这些酶为本公开所涵盖。参见,例如,Roberts等(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420。

[0148] 在某些实施方案中,裂解结构域包含使同源二聚化最小化或防止同源二聚化的一个或多个工程化裂解半结构域(也称为二聚化结构域突变体),如例如美国专利号8,772,453;8,623,618;8,409,861;8,034,598;7,914,796;以及7,888,121中所述的,所有所述专利的公开内容均以引用方式整体并入本文。在Fok I的位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537以及538处的氨基酸残基全部是用于影响Fok I裂解半结构域的二聚化的靶标。

[0149] 形成专性异源二聚体的Fok I的示例性工程化裂解半结构域包括如下对,在所述

对中第一种裂解半结构域包含在Fok I的位置490和538处的氨基酸残基的突变,并且第二种裂解半结构域包括在氨基酸残基486和499处的突变。

[0150] 因此,在一个实施方案中,490处的突变用Lys (K) 替换Glu (E);在538处的突变用Lys (K) 替换Iso (I);486处的突变用Glu (E) 替换Gln (Q);并且位置499处的突变用Lys (K) 替换Iso (I)。具体地说,本文所述的工程化裂解半结构域通过使一个裂解半结构域中的位置490 (E→K) 和538 (I→K) 突变以产生指定为“E490K:I538K”的工程化裂解半结构域并且通过使另一个裂解半结构域中的位置486 (Q→E) 和499 (I→L) 突变以产生指定为“Q486E:I499L”的工程化裂解半结构域来制备。本文所述的工程化裂解半结构域是异常裂解被最小化或消除的专性异源二聚突变体。参见,例如,美国专利号7,914,796和8,034,598,所述专利的公开内容出于所有目的以引用方式整体并入。在某些实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置486、499以及496 (相对于野生型FokI编号) 处的突变,例如在位置486处用Glu (E) 残基替换野生型Gln (Q) 残基、在位置499处用Leu (L) 残基替换野生型Iso (I) 残基以及在位置496处用Asp (D) 或Glu (E) 残基 (也分别称为“ELD”和“ELE”结构域) 替换野生型Asn (N) 残基的突变。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置490、538以及537 (相对于野生型FokI编号) 处的突变,例如在位置490处用Lys (K) 残基替换野生型Glu (E) 残基、在位置538处用Lys (K) 残基替换野生型Iso (I) 残基以及在位置537处用Lys (K) 残基或Arg (R) 残基 (也分别称为“KKK”和“KKR”结构域) 替换野生型His (H) 残基的突变。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含在位置490和537 (相对于野生型FokI编号) 处的突变,例如在位置490处用Lys (K) 残基替换野生型Glu (E) 残基以及在位置537处用Lys (K) 或Arg (R) 残基 (也分别称为“KIK”和“KIR”结构域) 替换野生型His (H) 残基的突变。参见,例如,美国专利号8,772,453。在其他实施方案中,工程化裂解半结构域包含“Sharkey”和/或“Sharkey’”突变 (参见,Guo等, (2010) J.Mol.Biol.400 (1):96-107)。

[0151] 本文所述的工程化裂解半结构域可以使用任何合适的方法来制备,例如通过野生型裂解半结构域 (Fok I) 的定点诱变发生来制备,如美国专利号8,772,453;8,623,618;8,409,861;8,034,598;7,914,796以及7,888,121中所述的。

[0152] 可替代地,可在体内在核酸靶位点处使用所谓的“裂解酶”技术来组装核酸酶 (参见,例如,美国专利公布号20090068164)。此类裂解酶的组分可在单独的表达构建体上表达,或者可在单独组分由例如自裂解2A肽或IRES序列分开的一个开放阅读框中连接。组分可为单独的锌指结合结构域或具有大范围核酸酶核酸结合结构域的结构域。

[0153] 可在使用之前,例如在如美国专利号8,563,314中所述的基于酵母的染色体系统中筛选核酸酶的活性。

[0154] 核酸酶的表达可处于组成型启动子或诱导型启动子的控制之下,例如,在棉子糖和/或半乳糖存在下被活化 (去抑制) 并且在葡萄糖存在下被抑制的半乳糖激酶启动子。

[0155] Cas9相关性CRISPR/Cas系统包含两个RNA非编码组分:tracrRNA和含有由相同的正向重复序列 (DR) 间隔的核酸酶指导序列 (间隔区) 的前crRNA阵列。为了使用CRISPR/Cas系统来完成基因组工程化,这些RNA的两种功能均必须存在 (参见,Cong等, (2013) Sciencexpress 1/10.1126/science 1231143)。在一些实施方案中,tracrRNA和前crRNA通过单独的表达构建体或作为单独的RNA来供应。在其他实施方案中,构建嵌合RNA,其中工程化成熟crRNA (赋予靶特异性) 融合至tracrRNA (供应与Cas9的相互作用),以产生嵌合cr-

RNA-tracrRNA杂交体(也称为单指导RNA)。(参见,Jinek,同上以及Cong,同上)。

[0156] 靶位点

[0157] 如以上所详细描述,DNA结构域可被工程化以结合至任何所选序列。与天然存在的DNA结合结构域相比,工程化DNA结合结构域可具有新型结合特异性。工程化方法包括但不限于合理的设计和各種类型的选择。合理的设计包括例如使用包含三联体(或四联体)核苷酸序列和单独锌指氨基酸序列的数据库,其中每个三联体或四联体核苷酸序列与结合特定三联体或四联体序列的一个或多个锌指氨基酸序列缔合。参见,例如共同拥有的美国专利6,453,242和6,534,261,所述专利以引用方式整体并入本文。还可进行TAL效应物结构域的合理设计。参见,例如,美国专利号8,586,526。

[0158] 适用于DNA结合结构域的示例性选择方法(包括噬菌体展示和双杂交系统)公开于美国专利5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759以及6,242,568;以及WO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;WO 01/88197以及GB 2,338,237中。此外,锌指结合结构域的结合特异性增强已在例如共同拥有的WO 02/077227中有所描述。

[0159] 靶位点的选择;核酸酶和用于设计并构建融合蛋白(和编码所述蛋白质的多核苷酸)的方法为本领域技术人员已知的并且详细描述于美国专利申请公布号20050064474和20060188987中,所述公布以引用方式整体并入本文中。

[0160] 此外,如这些和其他参考文献中所公开的,DNA结合结构域(例如,多指锌指蛋白)可使用任何合适的接头序列(包括例如具有5个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。关于6个或更多个氨基酸长度的示例性接头序列,参见,例如美国专利号6,479,626;6,903,185;以及7,153,949。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的个别DNA结合结构域之间的合适接头的任何组合。还参见美国专利号8,586,526。

[0161] 合适靶基因的非限制性实例包括 $\beta$  ( $\beta$ ) 珠蛋白基因(HBB)、 $\gamma$  ( $\delta$ ) 珠蛋白基因(HBG1)、B细胞淋巴瘤/白血病11A(BCL11A)基因、Kruppel样因子1(KLF1)基因、CCR5基因、CXCR4基因、PPP1R12C(AAVS1)基因、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因、白蛋白基因、因子VIII基因、因子IX基因、富亮氨酸重复激酶2(LRRK2)基因、Huntingtin(Htt)基因、视紫红质(RHO)基因、囊性纤维化跨膜跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因、表面活性蛋白B基因(SFTPB)、T细胞受体 $\alpha$ (TRAC)基因、T细胞受体 $\beta$ (TRBC)基因、程序性细胞死亡1(PD1)基因、细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)基因、人类白细胞抗原(HLA)A基因、HLA B基因、HLA C基因、HLA-DPA基因、HLA-DQ基因、HLA-DRA基因、LMP7基因、与抗原加工相关的转运蛋白(TAP)1基因、TAP2基因、tapasin基因(TAPBP)、II类主要组织相容性复合物反式活化因子(CIITA)基因、肌营养不良蛋白基因(DMD)、糖皮质激素受体基因(GR)、IL2RG基因、Rag-1基因、RFX5基因、FAD2基因、FAD3基因、ZP15基因、KASII基因、MDH基因和/或EPSPS基因。在一些方面,核酸酶结合至检查点抑制剂基因和/或裂解所述检查点抑制剂基因(例如,PD-1、CTLA4,其为B7抑制性配体家族的受体),或裂解参与通过LAG3、2B4、BTLA、TIM3、A2aR和杀伤性抑制受体(KIR和C型凝集素受体)进行信号传导的受体或配体基因,参见Pardoll(2012) Nat Rev Cancer 12(4):252。还参见,美国专利号8,956,828和8,945,868以及美国专利公布号20140120622和20150056705。

[0162] 在其他方面,核酸酶结合至编码涉及排斥的因子的基因和/或裂解所述基因,例如

编码HLA复合物的亚基(I类:HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G、B2M;II类:HLA-DMA、HLA-DOA、HLA-DPA1、HLA-DQA、HLA-DRA、HLA-DMB、HLA-DOB、HLA-DPB1、HLA-DQB、HLA-DRB)或TCR的基因。在一些实施方案中,核酸酶靶向编码参与HLA复合物(例如,TAP、tapasin、钙网蛋白、钙联接蛋白、LMP2、LMP7或Erp57)的肽加载过程和抗原加工的产物的基因。参见,例如,美国专利号8,956,828和8,945,868。

[0163] 在某些实施方案中,核酸酶靶向“安全港”基因座,诸如人类细胞中的AAVS1、HPRT、白蛋白和CCR5基因,以及鼠类细胞中的Rosa26(参见,例如,美国专利号7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;8,586,526;美国专利公布20030232410;20050208489;20050026157;20060063231;20080159996;201000218264;20120017290;20110265198;20130137104;20130122591;20130177983和20130177960)以及植物中的Zp15基因座(参见,美国专利号8,329,986)。

[0164] 供体

[0165] 本公开涉及核酸酶介导的外源序列到HSC/PC的基因组中的靶向整合。如上所指出,插入外源序列(也称为“供体序列”或“供体”或“转基因”),例如用于校正突变基因或用于增加野生型基因的表达或用于表达转基因。将显而易见的是,供体序列通常与其所置于的基因组序列不同。供体序列可含有侧接两个同源区的非同源序列,以允许在目标位置处进行有效HDR。此外,供体序列可包含含有与细胞染色质中的目标区不同源的序列的载体分子。供体分子可含有与细胞染色质同源的若干不连续区域。例如,为了靶向插入目标区中通常不存在的序列,所述序列可存在于供体核酸分子中并且侧接目标区中的序列的同源区。

[0166] 本文描述了靶向插入任何多核苷酸以插入所选位置中的方法。用于插入的多核苷酸还可被称为“外源”多核苷酸、“供体”多核苷酸或分子或“转基因”。供体多核苷酸可为单链和/或双链的DNA,并且可以线性或环状形式引入细胞中。参见,例如,美国专利公布号20100047805和20110207221。供体序列还可以DNA MC形式引入,其可以环状或线性形式引入细胞中。如果以线性形式引入,则供体序列的末端可通过本领域技术人员所已知的方法来保护(例如,免于核酸外切降解)。例如,一种或多种双脱氧核苷酸残基添加至线性分子的3'端,并且/或者自补寡核苷酸连接至一个或两个末端。参见,例如,Chang等(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963;Nehls等(1996) Science 272:886-889。用于保护外源多核苷酸使其免于降解的另外方法包括但不限于添加末端氨基和使用修饰的核苷酸间键联,例如像硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和O-甲基核糖或脱氧核糖残基。如果以双链形式引入,则供体可包含一个或多个核酸酶靶位点,例如侧接待整合至细胞基因组中的转基因的核酸酶靶位点。参见,例如,美国专利公布号20130326645。

[0167] 多核苷酸可作为载体分子的一部分引入细胞中,所述载体分子具有另外的序列,例如像复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因。此外,供体多核苷酸可作为裸核酸、作为与诸如脂质体、纳米颗粒或泊洛沙姆的药剂复合的核酸来引入,或者可通过病毒(例如,腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷性慢病毒(IDLV))来递送。

[0168] 在某些实施方案中,双链供体包括长度大于1kb(例如在2kb与200kb之间,在2kb与10kb之间(或其间的任何值))的序列(例如,编码序列,也被称为转基因)。例如,双链供体还包含至少一个核酸酶靶位点。在某些实施方案中,例如对于一对ZFN或TALEN,供体包含至少2个靶位点。通常,核酸酶靶位点处于转基因序列之外(例如转基因序列的5'和/或3'),以裂

解所述转基因。核酸酶裂解位点可支持任何核酸酶。在某些实施方案中,对于相同核酸酶,双链供体中含有的核酸酶靶位点用于裂解内源性靶标,裂解的供体通过同源性非依赖性方法整合至所述内源性靶标中。

[0169] 通常插入供体,以使得其表达由整合位点处的内源启动子驱动,即驱动供体所插入的内源基因表达的启动子(例如,珠蛋白、AAVS1等)。然而,将显而易见的是,供体可包含启动子和/或增强子,例如组成型启动子或诱导型或组织特异性启动子。

[0170] 供体分子可插入内源基因中以使得所有、一些或没有内源基因得到表达。在其他实施方案中,转基因(例如,具有或没有肽编码序列)整合至任何内源基因座(例如安全港基因座)中。参见,例如,美国专利公布20080299580、20080159996以及201000218264。

[0171] 此外,虽然并非为表达所必需,但是外源序列还可包括转录或翻译调控序列,例如启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽的序列和/或多聚腺苷酸化信号。另外,可包括剪接受体序列。示例性剪接受体位点序列是本领域技术人员所已知的,并且仅以举例方式包括CTGACCTCTTCTCTTCCTCCACAG (SEQ ID NO:1) (来自人类HBB基因)和TTTCTCTCCACAG (SEQ ID NO:2) (来自人类免疫球蛋白- $\gamma$ 基因)。

[0172] 可使用本领域已知的标准技术诸如PCR从质粒、细胞或其他来源中分离本文所述的供体序列上携带的转基因。使用的供体可包含不同类型的拓扑结构,包括超螺旋环状、松弛环状、线性以及类似结构。可替代地,它们可使用标准寡核苷酸合成技术以化学方式合成。此外,供体可为甲基化的,或者缺乏甲基化。供体可呈细菌或酵母人工染色体(BAC或YAC)的形式。

[0173] 本文所述的双链供体多核苷酸可包含一个或多个非天然碱基和/或主链。具体而言,可使用本文所述的方法进行具有甲基化胞嘧啶的供体分子的插入,以在目标区内实现转录静止的状态。

[0174] 外源(供体)多核苷酸可包含任何目标序列(外源序列)。示例性外源序列包括但不限于任何多肽编码序列(例如,cDNA或其片段)、启动子序列、增强子序列、表位标签、标记基因、裂解酶识别位点以及各种类型的表达构建体。标记基因包括但不限于序列编码介导抗生素抗性(例如,氨苄青霉素抗性、新霉素抗性、G418抗性、嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列、编码彩色或荧光或发光蛋白(例如,绿色荧光蛋白、增强型绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、荧光素酶)和介导增强的细胞生长和/或基因扩增的蛋白质(例如,二氢叶酸还原酶)的序列。表位标签包括例如FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测氨基酸序列的一种或多种拷贝。

[0175] 在一个优选实施方案中,外源序列(转基因)包含编码在细胞中表达所需要的任何多肽的多核苷酸,所述多肽包括但不限于抗体、抗原、酶、受体(细胞表面或核)、激素、淋巴因子、细胞因子、报告多肽、生长因子及以上中任一种的功能性片段。编码序列可为例如cDNA。外源序列还可为用于与目标内源基因序列连接的转基因的片段。例如,包含目标基因3'端处的序列的转基因的片段可用于通过插入或替换编码内源基因序列3'端中的突变的序列来校正。类似地,片段可包含与内源基因的5'端类似的序列,以插入/替换内源序列,从而校正或修饰此类内源序列。另外,所述片段可编码用于原位连接至内源基因序列的目标功能结构域(催化、分泌或类似结构域)以产生融合蛋白。

[0176] 例如,外源序列可包含编码受试者中缺乏或无功能的多肽的序列,所述受试者患有遗传疾病,包括但不限于以下遗传疾病中的任一种:软骨发育不全、全色盲、酸性麦芽糖

酶缺乏症、腺苷脱氨酶缺乏症 (OMIM No.102700)、肾上腺脑白质营养不良、艾卡尔迪综合征、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、 $\alpha$ 地中海贫血、雄激素不敏感综合征、阿佩尔综合征 (apert syndrome)、致心律失常性右心室发育不良、共济失调毛细血管扩张 (ataxia telangiectasia)、巴斯综合征、 $\beta$ -地中海贫血、蓝橡皮疱痣综合征、卡纳万病、慢性肉芽肿病 (CGD)、猫叫综合征、囊性纤维化、德尔肯氏病 (dercum's disease)、外胚层发育不良、范科尼贫血 (fanconi anemia)、进行性骨化性纤维发育不良症 (fibrodysplasia ossificans progressive)、脆性X综合征、半乳糖血症 (galactosemia)、高雪氏病 (Gaucher's disease)、全身性神经节苷脂贮积症 (例如, GM1)、血色素沉着症、 $\beta$ -珠蛋白第6位密码子血红蛋白C突变 (HbC)、血友病、亨廷顿氏病 (Huntington's disease)、贺勒综合征 (Hurler Syndrome)、低磷酸酯酶症、克氏综合征 (Klinefelter syndrome)、克拉伯病 (Krabbes Disease)、兰格-吉戴恩综合征 (Langer-Giedion Syndrome)、白细胞黏附缺乏症 (LAD, OMIM No.116920)、脑白质营养不良、长QT综合征、马方综合征 (Marfan syndrome)、莫比乌斯综合征 (Moebius syndrome)、粘多糖贮积症 (MPS)、指甲髌骨综合征、肾源性尿崩症、神经纤维瘤、尼曼-匹克病 (Neimann-Pick disease)、成骨不全症 (osteogenesis imperfecta)、紫质症、普拉德-威利综合征 (Prader-Willi syndrome)、早衰症、普罗特斯综合征 (Proteus syndrome)、成视网膜细胞瘤、雷特综合征 (Rett syndrome)、鲁宾斯坦-泰必综合征 (Rubinstein-Taybi syndrome)、沙费利波综合征 (Sanfilippo syndrome)、严重联合免疫缺陷 (SCID)、舒瓦克曼综合征 (Shwachman syndrome)、镰状细胞病 (镰状细胞贫血)、史密斯-马吉利综合征 (Smith-Magenis syndrome)、史蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、泰-萨二氏病 (Tay-Sachs disease)、血小板减少伴桡骨缺失 (TAR) 综合征 (Thrombocytopenia Absent Radius (TAR) syndrome)、特雷彻柯林斯综合征 (Treacher Collins syndrome)、染色体三倍体症、结节性硬化症、特纳氏综合征 (Turner's syndrome)、尿素循环障碍、冯希普尔-林道综合征 (von Hippel-Landau disease)、瓦登伯格综合征 (Waardenburg syndrome)、威廉姆斯综合征 (Williams syndrome)、威尔逊氏病 (Wilson's disease)、维斯科特-奥尔德里奇综合征 (Wiskott-Aldrich syndrome)、X连锁淋巴组织增生综合征 (XLP, OMIM No.308240)。

[0177] 可由靶向整合治疗的另外示例性疾病包括获得性免疫缺陷症、溶酶体贮积病 (例如, 高雪氏病、GM1、法布里病 (Fabry disease) 和泰-萨二氏病)、粘多糖病 (例如, 亨特氏病 (Hunter's disease)、贺勒氏病)、血红蛋白病 (例如, 镰状细胞疾病、HbC、 $\alpha$ -地中海贫血、 $\beta$ -地中海贫血) 以及血友病。

[0178] 在某些实施方案中, 外源序列可包含标记基因 (以上所述), 从而允许选择已经历靶向整合的细胞和编码另外功能性的连接序列。标记基因的非限制性实例包括GFP、药物选择标记以及类似基因。

[0179] 可插入的另外基因序列可包含例如野生型基因以替换突变序列。例如, 野生型因子IX基因序列可插入到干细胞的基因内源性拷贝突变的基因组中。野生型拷贝可在内源基因座处插入, 或者可以可替代地靶向至安全港基因座。

[0180] 在一些实施方案中, 供体序列编码用于引导T细胞功能的受体。嵌合抗原受体 (CAR) 为被设计以将免疫细胞靶向至细胞表面上表达的特异性分子靶标的分子。以其最基本的形式, 嵌合抗原受体为引入至细胞的受体, 所述受体将细胞外部表达的特异性结构域



偶联至细胞内部上的信号传导通路,使得当特异性结构域与其靶标相互作用时,细胞变得活化。经常,CAR由T细胞受体(TCR)的变体形成,在所述变体中特异性结构域(诸如scFv或某种类型的受体)融合至TCR的信号传导结构域。然后将这些构建体引入T细胞中,使T细胞在表达靶抗原的细胞存在下变得活化,从而导致活化的T细胞以非MHC依赖性方式攻击靶细胞(参见,Chicaybam等(2011) *Int Rev Immunol* 30:294-311)。可替代地,可将CAR表达盒引入HSC/PC中以进行稍后的移植,以使得CAR盒处于T细胞特异性启动子(例如,FOXP3启动子,参见Mantel等(2006) *J. Immunol* 176:3593-3602)的控制下。

[0181] 目前,正在临床上测试靶向多种肿瘤抗原的肿瘤特异性CAR,以治疗各多种不同的癌症。所靶向的这些癌症及其抗原的实例包括滤泡性淋巴瘤(CD20或GD2)、成神经细胞瘤(CD171)、非霍奇金淋巴瘤(CD20)、淋巴瘤(CD19)、成胶质细胞瘤(IL13R $\alpha$ 2)、慢性淋巴细胞白血病或CLL以及急性淋巴细胞白血病或ALL(两者均为CD19)。

[0182] 还已开发病毒特异性CAR以攻击带有病毒(诸如HIV)的细胞。例如,使用对Gp100有特异性的CAR来启动临床试验以治疗HIV(Chicaybam,同上)。可开发其他病毒特异性CAR来靶向埃博拉,以敲除带有埃博拉病毒的细胞,或者可在移植后使用含CAR的T细胞以使用包含对这些病毒有特异性的CAR的工程化T细胞靶向CMV、腺病毒和/或EBV。

[0183] 还正在开发CAR以用于治疗自身免疫疾病。调控性T细胞(Treg)为CD4<sup>+</sup>T细胞的子集,其组成型地表达IL-2受体 $\alpha$ 链和转录因子FoxP3。据信Treg例如通过抑制效应T细胞增殖和促炎细胞因子的产生以及阻碍先天免疫系统的组分来抑制结肠炎。由于针对特定抗原的Treg的缺乏,研究者正在探索过继性转移工程化抗原特异性Treg的可能性,其中T细胞已被修饰以表达针对与自身免疫相关的抗原的CAR(例如,用于结肠炎的CEA,参见Blat等(2014) *Mol Ther* 22(5):1018)。

[0184] T细胞受体(TCR)为T细胞的选择性活化的基本部分,并且通常由共组装以形成异源二聚体的两条链 $\alpha$ 和 $\beta$ 形成。编码TCR链的基因组基因座类似于抗体编码基因座之处在于,TCR $\alpha$ 基因包含V和J区段,而 $\beta$ 链基因座除了V和J区段之外还包含D区段。另外,TCR复合物构成T细胞上的CD3抗原复合物的一部分。在T细胞活化期间,TCR与抗原呈递细胞的主要组织相容性复合物(MHC)上显示的抗原相互作用。TCR对抗原-MHC复合物的识别导致T细胞刺激,这继而导致记忆淋巴细胞和效应淋巴细胞中的T辅助细胞(CD4<sup>+</sup>)和细胞毒性T淋巴细胞(CD8<sup>+</sup>)分化。因此,使用工程化TCR还可导致T细胞活性的方向改变(参见,美国专利号8,956,828),并且供体序列可包含编码TCR的工程化序列。在一些实施方案中,内源性TCR还可通过使用被设计以裂解编码内源性TCR亚基(即TRAC或TRBC)的基因的工程化核酸酶来破坏。参见,例如,美国专利号8,956,828和8,945,868。

[0185] 抗体偶联T细胞受体(ACTR)技术为使用包含与多种不同抗体组合以引导T细胞的ACTR分子的单一种T细胞。ACTR为由CD3 $\zeta$ 信号传导结构域、4-1BB共刺激结构域、CD8跨膜结构域和铰链结构域以及CD16 Fc受体结构域组成的跨膜蛋白。这种蛋白质在T细胞中表达,并且然后在体内与抗体组合,以使得抗体与表达ACTR的T细胞缔合,并且抗体-ACTR复合物用于将TCR靶向至表达抗体所结合的特异性抗原的特定细胞或组织。在一些实施方案中,待用ACTR修饰的T细胞来源于患者。在其他实施方案中,T细胞为特异性内源T细胞受体(例如,TCR、MHC)已灭活的“通用”T细胞。在一些情况下,用工程化核酸酶来灭活受体,从而产生在ACTR-抗体复合物不存在下将不与宿主抗原反应的T细胞库。



[0186] 按照本说明书的教义,此类表达盒的构建利用分子生物学领域中熟知的方法(参见,例如,Ausubel或Maniatis)。在使用表达盒产生转基因动物之前,表达盒对与所选控制元件相关的应激诱导物(stress-inducer)的响应性可通过将表达盒引入合适的细胞系(例如,原代细胞、转化细胞或永生化细胞系)中来测试。

[0187] 此外,虽然并非为表达所必需,但是外源序列还可包括转录或翻译调控序列,例如启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽的序列和/或多聚腺苷酸化信号。此外,目标基因的控制元件可以操作性地连接至报告基因以产生嵌合基因(例如,报告表达盒)。

[0188] 还可实现非编码核酸序列的靶向插入。编码反义RNA、RNAi、shRNA和微小RNA(miRNAs)的序列也可用于靶向插入。

[0189] 在另外的实施方案中,供体核酸可包含作为用于另外核酸酶设计的特异性靶位点的非编码序列。随后,另外的核酸酶可在细胞中表达,以使得初始供体分子被裂解并通过插入另一种目标供体分子来修饰。以此方式,可产生供体分子的反复整合,从而允许在具体目标基因座处或安全港基因座处的特性叠加。

[0190] 供体可在将核酸酶引入细胞之前、同时或之后递送。在某些实施方案中,供体与核酸酶同时递送。在其他实施方案中,供体在核酸酶之前递送,例如在供体之前数秒至数小时至数天,包括但不限于在核酸酶之前1至60分钟(或其间的任何时间)、核酸酶之前1至24小时(或其间的任何时间)或核酸酶之前多于24小时。在某些实施方案中,供体在核酸酶之后,优选在4小时内递送。

[0191] 供体可使用与核酸酶相同的递送系统来递送。当同时递送时,供体和核酸酶可处于同一载体上,例如AAV载体(例如AAV6)。在某些实施方案中,供体使用AAV载体来递送,并且核酸酶以mRNA形式来递送。

[0192] 细胞

[0193] 因此,本文提供遗传修饰的细胞,例如包含转基因的原代HSC/PC或T细胞,所述转基因包括在细胞中表达功能性蛋白质的转基因。还提供了通过本文所述的方法产生的细胞。使用一种或多种核酸酶将转基因以靶向方式整合至细胞的基因组中。在某些实施方案中,将转基因整合至安全港基因中。

[0194] 与随机整合不同,靶向整合确保转基因整合至特定基因或基因座中。转基因可整合在靶基因中的任何位置处。在某些实施方案中,转基因在核酸酶裂解位点处或附近整合,例如裂解位点上游或下游的1-300个(或其间的任何值)碱基对内,更优选地在裂解位点任一侧的1-100个碱基对(或其间的任何值)内,甚至更优选地在裂解位点任一侧的1至50个碱基对(或其间的任何值)内整合。在某些实施方案中,包含转基因的整合序列不包括任何载体序列(例如,病毒载体序列)。

[0195] 任何细胞类型均可如本文所述进行遗传修饰,所述任何细胞类型包括但不限于细胞和细胞系。如本文所述的细胞的其他非限制性实例包括T细胞(例如,CD4+、CD3+、CD8+ (包括Treg)等);树突状细胞;B细胞;自体(例如,患者来源的)或异源多能(pluripotent)干细胞、全能干细胞或多能(multipotent)干细胞(例如,CD34+细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞或类似细胞)。在某些实施方案中,如本文所述的细胞为来源于患有期望治疗的病症的患者的CD34+细胞。

[0196] 如本文所述的细胞适用于例如通过离体疗法治疗和/或预防病症。可将核酸酶修饰的细胞扩增,并且然后使用标准技术重新引入患者中。参见,例如,Tebas等(2014) *New Eng J Med* 370(10):901。在干细胞的情况下,在输注至受试者中之后,还发生这些前体在体内分化成表达功能性转基因的细胞。还提供了包含如本文所述的细胞的药物组合物。此外,细胞可在向患者施用之前冷冻保存。

[0197] 递送

[0198] 核酸酶、编码这些核酸酶的多核苷酸、供体多核苷酸和包含本文所述的蛋白质和/或多核苷酸的组合物可通过任何合适方式在体内或离体递送至任何细胞类型中。

[0199] 合适的细胞包括真核(例如动物)和原核细胞和/或细胞系。此类细胞或由此类细胞产生的细胞系的非限制性实例包括COS、CHO(例如,CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHO-K1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NS0、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例如,HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)以及perC6细胞,以及昆虫细胞诸如草地贪夜蛾(*Spodoptera fugiperda*) (Sf)或真菌细胞诸如酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母(*Pichia*)和裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)。在某些实施方案中,细胞系为CHO、MDCK或HEK293细胞系。合适的细胞还包括干细胞,例如像胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、造血干细胞、神经元干细胞以及间充质干细胞。

[0200] 如本文所述的递送核酸酶的方法描述于例如美国专利号6,453,242;6,503,717;6,534,261;6,599,692;6,607,882;6,689,558;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219;以及7,163,824中,所有所述专利的公开内容以引用方式整体并入本文。

[0201] 如本文所述的核酸酶和/或供体构建体还可使用含有编码ZFN、TALEN或CRISPR/Cas系统中的一种或多种的序列的载体来递送。可使用任何载体系统,包括但不限于质粒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体以及腺相关病毒载体等。还参见,美国专利号6,534,261;6,607,882;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219以及7,163,824,所述专利以引用方式整体并入本文。此外,将显而易见的是,这些载体中的任一种均可包含治疗所需要的一种或多种序列。因此,在将一种或多种核酸酶和供体构建体引入细胞中时,可在同一载体或不同载体(DNA MC)上携带核酸酶和/或供体多核苷酸。当使用多种载体时,每种载体均可包含编码一种或多种核酸酶和/或供体构建体的序列。

[0202] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于将编码核酸酶和供体构建体的核酸引入细胞(例如,哺乳动物细胞)和靶组织中。非病毒载体递送系统包括DNA或RNA质粒、DNA MC、裸核酸以及与递送媒介物(诸如脂质体、纳米颗粒或泊洛沙姆)复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加型或整合型基因组。关于体内递送工程化DNA结合蛋白和包含这些结合蛋白的融合蛋白的综述,参见例如Rebar(2004) *Expert Opinion Invest. Drugs* 13(7):829-839;Rossi等(2007) *Nature Biotech.* 25(12):1444-1454以及一般基因递送参考文献诸如Anderson, *Science* 256:808-813(1992); Nabel&Felgner, *TIBTECH* 11:211-217(1993);Mitani&Caskey, *TIBTECH* 11:162-166(1993);Dillon, *TIBTECH* 11:167-175(1993);Miller, *Nature* 357:455-460(1992);Van Brunt, *Biotechnology* 6(10):1149-1154(1988);Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36(1995);Kremer&Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):

31-44 (1995); Haddada等, 在Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler和Böhm (编) (1995) 中; 以及Yu等, Gene Therapy 1:13-26 (1994)。

[0203] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂转染、显微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、其他纳米颗粒、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒颗粒以及药剂增强的DNA吸收。使用例如Sonitron 2000系统 (Rich-Mar) 的声致穿孔也可用于核酸的递送。

[0204] 另外的示例性核酸输送系统包括由Amara Biosystems (Cologne, Germany)、Maxcyte, Inc. (Rockville, Maryland)、BTX Molecular Delivery Systems (Holliston, MA) 以及Copernicus Therapeutics Inc提供的那些核酸递送系统 (参见, 例如, US6008336)。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386; 4,946,787; 以及4,897,355中), 并且脂转染试剂为商业销售的 (例如, Transfectam™ 和Lipofectin™)。适用于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子和中性脂质包括Felgner、WO 91/17424、WO 91/16024的那些脂质。

[0205] 脂质:核酸复合物 (包括靶向脂质体, 诸如免疫脂质复合物) 的制备为本领域技术人员所熟知的 (参见, 例如, Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese等, Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr等, Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy等, Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao等, Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad等, Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 美国专利号4,186,183; 4,217,344; 4,235,871; 4,261,975; 4,485,054; 4,501,728; 4,774,085; 4,837,028以及4,946,787)。

[0206] 另外的递送方法包括使用将待递送的核酸包装至EnGeneIC递送媒介物 (EDV) 中。这些EDV使用双特异性抗体特异性地递送至靶组织, 其中所述抗体的一个臂对靶组织具有特异性, 并且另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV带入靶细胞表面, 并且然后通过胞吞作用将EDV带入细胞中。一旦处于细胞中, 就释放内含物 (参见, MacDiarmid等 (2009) Nature Biotechnology 27 (7):643)。

[0207] 使用基于RNA或DNA病毒的系统以递送编码工程化ZFP、TALE和/或CRISPR/Cas系统的核酸, 这利用了使病毒靶向体内的特定细胞并且将病毒有效载荷运输到核的高度进化过程。病毒载体可直接施用于患者 (体内) 或其可用于在体外处理细胞并且向患者 (活体外) 施用修饰的细胞。用于递送ZFP的常规基于病毒的系统包括但不限于逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关、牛痘和单纯性疱疹病毒载体用于基因转移。使用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因转移方法使得宿主基因组中的整合成为可能, 这常常导致插入的转基因长期表达。此外, 已在许多不同细胞类型和靶组织中观察到高转导效率。

[0208] 逆转录病毒的趋向性可通过并入外来包膜蛋白质、扩增靶细胞的潜在靶群体来改变。慢病毒载体为能够转导或感染非分裂细胞并且通常产生高病毒效价的逆转录病毒载体。逆转录病毒基因转移系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体包含包装能力为高达6-10kb外来序列的顺式作用长末端重复序列。最小顺式作用LTR足以用于复制和包装载体, 其接着用于将治疗基因整合至靶细胞中以提供持久的转基因表达。广泛使用的逆转录病毒载体包括基于鼠类白血病病毒 (MuLV)、长臂猿白血病病毒 (GaLV)、猿免疫缺陷病毒 (SIV)、人免疫缺陷病毒 (HIV) 及其组合的那些逆转录病毒载体 (参见, 例如, Buchscher等, J. Virol. 66:2731-2739 (1992); Johann等, J. Virol. 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt等, Virol. 176:58-59 (1990); Wilson等, J. Virol. 63:2374-2378 (1989); Miller等,

J.Virol.65:2220-2224 (1991);PCT/US94/05700)。

[0209] 在优选瞬时表达的应用中,可使用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体能够在许多细胞类型中具有极高的转导效率并且不需要细胞分裂。在此类载体的情况下,已获得高效价和高水平的表达。此载体可在相对简单的系统中大量产生。腺相关病毒(“AAV”)载体也用于例如在核酸和肽的体外产生中用靶核酸转导细胞,并且用于体内和活体外基因疗法规程(参见,例如,West等,Virology 160:38-47 (1987);美国专利号4,797,368;WO 93/24641;Kotin,Human Gene Therapy 5:793-801 (1994);Muzyczka,J.Clin.Invest.94:1351 (1994)。重组AAV载体的构建描述于许多出版物中,包括美国专利号5,173,414;Tratschin等,Mol.Cell.Biol.5:3251-3260 (1985);Tratschin等,Mol.Cell.Biol.4:2072-2081 (1984);Hermonat和Muzyczka,PNAS 81:6466-6470 (1984);以及Samulski等,J.Virol.63:03822-3828 (1989)。

[0210] 目前至少六种病毒载体方法在临床试验中可用于基因转移,其利用涉及通过插入到辅助细胞系中的基因来补充缺陷性载体以产生转导剂的方法。

[0211] pLASN和MFG-S为已被用于临床试验中的逆转录病毒载体的实例(Dunbar等,Blood 85:3048-305 (1995);Kohn等,Nat.Med.1:1017-102 (1995);Malech等,PNAS 94:22 12133-12138 (1997))。PA317/pLASN为用于基因治疗试验中的第一种治疗性载体。(Blaese等,Science 270:475-480 (1995))。已观察到MFG-S包装载体的50%或更大的转导效率。(Ellem等,Immunol Immunother.44(1):10-20 (1997);Dranoff等,Hum.Gene Ther.1:111-2 (1997)。

[0212] 重组腺相关病毒载体(rAAV)为基于缺陷性和非病原性细小病毒腺相关2型病毒的有前途的替代性基因递送系统。所有载体均来源于仅保留侧接转基因表达盒的AAV 145bp反向末端重复的质粒。由于整合到转导细胞基因组中所引起的有效基因转移和稳定转基因递送是这种载体系统的关键特征。(Wagner等,Lancet 351:9117 1702-3 (1998),Kearns等,Gene Ther.9:748-55 (1996))。还可根据本发明使用其他AAV血清型,包括AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9和AAVrh.10以及任何新型AAV血清型。在一些实施方案中,使用嵌合AAV,其中病毒核酸的LTR序列的病毒起点与衣壳序列的病毒起源是异源的。实例包括具有来源于AAV2的LTR和来源于AAV5、AAV6、AAV8或AAV9(即分别为AAV2/5、AAV2/6、AAV2/8和AAV2/9)的衣壳的嵌合病毒。

[0213] 复制缺陷性重组腺病毒载体(Ad)可以高效价产生并且容易感染许多不同细胞类型。大多数腺病毒载体被工程化以使转基因替换Ad E1a、E1b和E3基因;随后使复制缺陷性载体在以反式供应缺失的基因功能的人类293细胞中传播。Ad载体可在体内转导多种类型的组织,包括非分裂性分化细胞,诸如肝、肾和肌肉中发现的那些细胞。常规Ad载体具有大容纳量。在临床试验中使用Ad载体的实例涉及用肌内注射进行抗肿瘤免疫的多核苷酸疗法(Sterman等,Hum.Gene Ther.7:1083-9 (1998))。在临床试验中使用腺病毒载体进行基因转移的另外实例包括Rosenecker等,Infection 24:1 5-10 (1996);Sterman等,Hum.Gene Ther.9:7 1083-1089 (1998);Welsh等,Hum.Gene Ther.2:205-18 (1995);Alvarez等,Hum.Gene Ther.5:597-613 (1997);Topf等,Gene Ther.5:507-513 (1998);Sterman等,Hum.Gene Ther.7:1083-1089 (1998)。

[0214] 包装细胞用于形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。此类细胞包括293细胞,其包装

AAV和腺病毒,以及 $\phi$ 2细胞或PA317细胞,其包装逆转录病毒。用于基因疗法的病毒载体通常由生产细胞系产生,所述生产细胞系将核酸载体包装至病毒颗粒中。载体通常含有包装并随后整合至宿主中所需要的最少病毒序列(如果可适用),其他病毒序列由编码待表达的蛋白质的表达盒替换。缺失的病毒功能由包装细胞系以反式供应。例如,用于基因疗法的AAV载体通常仅具有包装并整合至宿主基因组中所需要的来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列。病毒DNA包装在细胞系中,所述细胞系含有编码其他AAV基因(即rep和cap)但缺乏ITR序列的辅助质粒。还使用腺病毒作为辅助病毒来感染细胞系。辅助病毒促进AAV载体的复制以及来自辅助质粒的AAV基因的表达。由于缺乏ITR序列,辅助质粒未大量地包装。可通过例如腺病毒比AAV更敏感的热处理来减少受腺病毒的污染。在一些实施方案中,AAV使用杆状病毒表达系统来产生。

[0215] 在许多基因治疗应用中,需要基因治疗载体以高度特异性递送至具体组织类型。因此,病毒载体通常可被修饰来通过在病毒外表面上表达作为具有病毒外壳蛋白的融合蛋白的配体来对给定细胞类型具有特异性。选择对已知存在于目标细胞类型上的受体具有亲和力的配体。例如,据Han等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:9747-9751(1995)报告,Moloney鼠白血病病毒可被修饰以表达融合至gp70的人类调蛋白,并且重组病毒感染表达人类表皮生长因子受体的某些人类乳腺癌细胞。此原理可扩展至其他病毒-靶细胞对,其中靶细胞表达受体并且病毒表达包含细胞表面受体的配体的融合蛋白。例如,丝状噬菌体可被工程化以展示对实际上任何选定细胞受体具有特异性结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。虽然以上描述主要适用于病毒载体,但是相同原则可应用于非病毒载体。此类载体可被工程化以含有利于被特定靶细胞摄取的特异性摄取序列。

[0216] 可通过向个体患者施用,通常通过如下所述的全身施用(例如,静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下或颅内输注)或局部施用来在体内递送基因疗法载体。可替代地,载体可递送至活体外细胞诸如从个体患者移植的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓穿刺液、组织活检物)或万能供血者造血干细胞,随后通常在选择已并入载体的细胞后将细胞再植入患者中。

[0217] 含有核酸酶和/或供体构建体的载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)也可直接施用至生物体以便在体内转导细胞。可替代地,可施用裸DNA。施用是通过通常用于将分子引入成与血液或组织细胞最终接触的任何途径,包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。施用此类核酸的合适方法是可用的并且为本领域技术人员所熟知的,并且虽然可使用一种以上途径来施用特定组合物,但是特定途径常常可提供比另一途径更直接且更有效的反应。

[0218] 本文所述的适用于引入多核苷酸(例如,核酸酶编码和/或双链供体)的载体包括非整合慢病毒载体(IDLV)。参见,例如,Ory等(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:11382-11388;Dull等(1998)J.Virol.72:8463-8471;Zuffery等(1998)J.Virol.72:9873-9880;Follenzi等(2000)Nature Genetics 25:217-222;美国专利公布号2009/054985。

[0219] 药学上可接受的载剂部分地通过所施用的具体组合物以及通过用于施用所述组合物的具体方法来决定。因此,如下所述,存在多种多样的可用的合适药物组合物制剂(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,第17版,1989)。

[0220] 显然核酸酶编码序列和供体构建体可使用相同或不同系统来递送。例如,核酸酶和供体可由同一DNA MC携带。可替代地,供体多核苷酸可由MC携带,而一种或多种核酸酶可

由标准质粒或AAV载体携带。此外,不同载体可通过相同或不同途径来施用(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉内注射、腹膜内施用和/或肌内注射。载体可同时或以任何相继顺序来递送。

[0221] 因此,本公开包括在体内或离体治疗适于插入编码治疗性蛋白质的转基因的疾病和病状,例如通过凝血因子(诸如因子VIII(F8))的核酸酶介导的整合来治疗血友病。组合物以有效于在血清或靶器官或细胞中获得所需治疗性多肽浓度的量来向人类患者施用。施用可通过多核苷酸递送至所需靶细胞的任何方式进行。例如,涵盖体内和离体方法。静脉内注射至门静脉是优选的施用方法。其他体内施用模式包括例如直接注入肝叶或胆管中以及静脉内注射到肝脏远端,包括通过肝动脉、直接注射到肝实质、通过肝动脉注射和/或通过胆管树的逆行注射。离体施用模式包括体外转导切下的肝细胞或其他肝脏细胞,随后将转导、切下的肝细胞输注回到人类患者的门脉管、肝实质或胆管树,参见,例如Grossman等,(1994) *Nature Genetics*, 6:335-341。

[0222] 待施用的核酸酶和供体的有效量将因患者而变化,并且根据目标治疗性多肽而变化。因此,有效量最好由施用组合物的医师确定并且适当剂量可由本领域普通技术人员容易地确定。在允许足够时间整合并表达(通常例如4-15天)之后,治疗性多肽的血清或其他组织水平的分析和与施用之前的初始水平的比较将确定施用量是否太低、在正确范围内或太高。初始和随后施用的合适方案也为可变的,但是如果有必要,典型地在初始施用之后进行后续施用。后续施用可以可变间隔施用,所述间隔范围为每天一次至每年一次至每隔几年一次。本领域技术人员将了解的是,可推荐适当免疫抑制技术以便通过对递送载体进行免疫抑制来避免转导的抑制或阻断,参见,例如Vilquin等,(1995) *Human Gene Ther.*, 6:1391-1401。

[0223] 用于离体和体内施用的制剂包括液体或乳化液体中的悬浮液。活性成分经常与药学上可接受的并与活性成分相容的赋形剂混合。合适的赋形剂包括例如水、盐水、右旋糖、甘油、乙醇或类似物及其组合。此外,组合物可含有少量辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂或增强药物组合物的有效性的其他试剂。

[0224] 以下实施例涉及本公开的示例性实施方案,在其中核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN)、TALEN或CRISPR/Cas核酸酶系统。应了解的是,这仅用于举例目的并且可使用其他核酸酶,例如Ttgo系统、具有工程化DNA结合结构域的归巢核酸内切酶(大范围核酸酶)和/或天然存在的工程化归巢核酸内切酶(大范围核酸酶) DNA结合结构域和异源裂解结构域的融合体和/或大范围核酸酶和TALE蛋白的融合体。

## 实施例

[0225] 实施例1:锌指核酸酶的组装

[0226] 将ZFN用人类PD1基因组装,并且通过ELISA和CEL1测定测试其活性,如Miller等(2007) *Nat. Biotechnol.* 25:778-785中所述的。对于TCR(例如,TRAC) -、B2M-、CTLA-4-和PD1特异性核酸酶,参见美国专利号8,956,828;8,945,868;8,563,314以及美国专利公布号20140120622和20150056705,所述专利以引用方式并入本文。

[0227] 实施例2:AAV转导和基因修饰TI

[0228] A.CD4+或CD8+ T-细胞

[0229] 在IL2 (20ng/ml) 和Dynabeads®人类T-活化因子CD3/CD28 (Life Technology) 存在下,用含有启动子(例如,EF1a或PGK) 驱动和工程化抗原受体转基因(例如,图1中所描绘的CAR、TCR或ACTR) 的AAV6载体以及编码PD1特异性ZFN或TRAC特异性ZFN的mRNA转导原代CD4<sup>+</sup>或CD8<sup>+</sup> T细胞。然后在感染后(dpi) 5天收集细胞,并分析工程化抗原受体的表达。结果证实,使用包含工程化抗原受体转基因的AAV6载体与对PD1检查点抑制剂有特异性的ZFN或TCR $\alpha$ 链TRAC的组合使得转基因整合至PD1或TRAC基因座中。

[0230] B.CD3<sup>+</sup> T-细胞

[0231] 为了用携带CCR5-RFLP供体的AAV2/6载体转导CD3<sup>+</sup> T细胞,在标准条件下(参见,PCT申请PCT/US2015/041807) 将CD3<sup>+</sup> T细胞暴露于AAV2/6-RFLP供体载体四小时。标准条件包括在培养基中使用血清。通过电穿孔将如先前所述的编码CCR5特异性ZFN的mRNA (DeKolver等(2010) Gen. Res. 20:1133-1142) 以60 $\mu$ g/mL引入细胞中。为了研究血清对转导效率的影响,在四小时转导期间在培养基中没有血清的情况下进行比较实验。在转导和电穿孔后,将细胞在含有血清的条件下扩增五天,并且然后收集。通过Illumina深度测序法通过标准程序分离基因组DNA,以测量含有RFLP的供体的靶向整合效率(“RFLP%”)。

[0232] 结果描绘于图2中,并且证实在低AAV2/6供体浓度下,供体的靶向整合在血清存在下受到抑制,这在血清不存在下未观察到。

[0233] 实施例3: AAV转导和基因修饰

[0234] 还研究了细胞中的AAV供体表达,其中一种或多种内源基因使用本文所述的组合物和方法进行修饰(例如,用TI或不用TI灭活)。具体而言,基本上如上所述在原代T细胞(CD3<sup>+</sup>) 中修饰TRAC和/或B2M基因。简而言之,将核酸酶靶向的TRAC和/或B2M连同包含编码GFP的转基因的AAV供体一起施用至细胞(250 $\mu$ g/mL且AAV MOI为1e5vg/细胞,对于单独的TRAC1核酸酶;120 $\mu$ g/mL且AAV MOI为1e5vg/细胞,对于单独的B2M核酸酶;120 $\mu$ g/mL,对于B2M;以及60 $\mu$ g/mL且AAV MOI为1e5vg/细胞,对于TRAC1和B2M核酸酶)。将T细胞用抗CD3/CD28珠粒活化,并在具有血清替代物和IL-2的培养基中培养。在活化后两天,用1E5vg/细胞的AAV6 GFP供体载体(包含对TRAC或B2M ZFN切割位点有特异性的同源臂) 转导活化的细胞。第二天,通过电穿孔使用编码靶向TRAC或B2M的ZFN的mRNA在范围为60-250 $\mu$ g/mL的mRNA浓度下转染细胞。然后用标准T细胞培养基稀释T细胞,并且在30°C下孵育过夜。随后在标准T细胞扩增条件下将培养物扩增另外7-11天。

[0235] 如图20所示,大百分比的细胞(在所有情况下,大于70%) 展现出AAV供体靶向整合(TI) 至TRAC或B2M基因座中。此外,接受TRAC和B2M靶向核酸酶的相似百分比的细胞显示TRAC和B2M两者的灭活(KO),以及AAV GFP供体的靶向整合(当使用具有TRAC同源臂的供体时整合到TRAC中)。

[0236] 实施例4: 离体方法

[0237] 如先前所述(Aiuti等,同上),向受试者施用如先前所述(Aiuti等(2013) Science 341,1233151) 表达如本文所述的一种或多种CAR的遗传修饰的细胞(包括CD34<sup>+</sup> HSPC(例如,患者来源的CD34<sup>+</sup>细胞和/或修饰的CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup> T细胞)),从而在用修饰的细胞处理的受试者中引起长期多谱系移植。

[0238] 实施例5: 使用PDGFr抑制剂进行AAV转导

[0239] 为了测试共受体对AAV转导的相对贡献,在Hep3B(人肝癌细胞系) 细胞中使用靶

向人白蛋白基因座的锌指核酸酶 (ZFN) 进行体外AAV2/6转导实验之前,使用抗表皮生长因子受体 (EGFR)、肝细胞生长因子受体 (HGFR)、成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 和血小板衍生长因子受体 (PDGFR) 的抑制剂。在用AAV2/6转导前一天,将Hep3B细胞以1x 10<sup>5</sup>个细胞/孔的密度铺板于48孔组织培养板中的300μL完全生长培养基中。在转导的早晨,将细胞用无血清培养基洗涤三次,并在无血清培养基中孵育三小时。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。然后将递送靶向至白蛋白基因座的ZFN的AAV2/6颗粒添加至孔中。在三小时后,将血清添加至孔中,至最终浓度为10%。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序 (MiSeq) 来分析。所用的生长因子受体抑制剂示出于以下表1中,并且将其以图3中所指示的浓度用于实验中,其中每种抑制剂由其靶标记。例如,将吉非替尼 (EGFR抑制剂) 标记为“EGFRi”。

[0240] 如图3所示,与对照相比,仅EGFRi显示出轻度抑制 (如由于其作为AAV6共受体的作用而预期的),而HGFRi和FGFRi显示出对AAV转导的轻度刺激。相比之下,所用的两种PDGFR抑制剂CP-673451和克萊拉尼均显示出高达8倍 (浓度为9μM) 的插入缺失形成的显著剂量依赖性刺激。

[0241] 表1:生长因子受体抑制剂

[0242]

抑制剂的名称	靶标
吉非替尼	EGFR
BGJ398	FGFR
SU11274	HGFR
CP-673451	PDGFR (1)
Crenolanib	PDGFR (2)

[0243] 为了确保抑制剂自身不会以某种方式无意中刺激易错DSB修复 (并因此对AAV转导没有影响),比较通过AAV以及通过mRNA递送进行的ZFN递送。在用AAV2/6转导或用mRNA转染前一天,将Hep3B细胞以1x 10<sup>5</sup>个细胞/孔的密度铺板于48孔组织培养板中的300μL完全生长培养基中。在转导和转染的早晨,将细胞用无血清培养基洗涤三次,并在无血清培养基中孵育三小时。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。对于AAV2/6转导,然后将递送靶向至白蛋白基因座的ZFN的AAV2/6颗粒添加至孔中。对于mRNA转染,使用Opti-MEM和RNAiMax Lipofectamine试剂将每ZFN的5ng mRNA递送至细胞。在三小时后,将血清添加至孔中,至最终浓度为10%。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序 (MiSeq) 来分析。

[0244] 如图4所示,当ZFN作为RNA递送时,在使用增加剂量的抑制剂处理的细胞中检测到的核酸酶活性 (插入缺失%) 不存在明显的差异,这指示抑制剂对AAV转导有作用。

[0245] 为了研究AAV2/6转导的PDGFRi刺激机制,同时用PDGFRi和EGFRi处理Hep3B细胞。在用AAV2/6转导前一天,将Hep3B细胞以1x 10<sup>5</sup>个细胞/孔的密度铺板于48孔组织培养板中的300μL完全生长培养基中。在转导的早晨,将细胞用无血清培养基洗涤三次,并在无血清培养基中孵育三小时。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。然后将递送靶向至白蛋白基因座的ZFN的AAV2/6颗粒添加至孔中。在三小时后,将血清添加至孔中,至最终浓度为10%。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序 (MiSeq) 来分析。



[0246] 如图5所示,总体AAV转导在EGFRi存在时轻度降低(显示为插入缺失%),这表明在增加的AAV2/6转导期间至少部分使用EGFR。其他受体的贡献是可能的。

[0247] 虽然已描述表达大量的表面EGFR的Hep3B,但是其他细胞系(如HepG2)不表达高水平的EGFR。为了证实本文所述的方法和组合物独立于EGFR表达水平来起作用,在HepG2细胞中PDGFRi存在下测试AAV2/6转导。在用AAV2/6转导前一天,将HepG2/C3a细胞以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度铺板于48孔组织培养板中的300 $\mu$ L完全生长培养基中。在转导的早晨,将细胞用无血清培养基洗涤三次,并在无血清培养基中孵育三小时。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。然后将递送靶向至白蛋白基因座的ZFN的AAV2/6颗粒添加至孔中。在三小时后,将血清添加至孔中,至最终浓度为10%。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序(MiSeq)来分析。

[0248] 如图6所示,如在Hep3B细胞中,与HepG2细胞中的对照相比,与PDGFRi组合的AAV2/6转导率高达7倍高。这证实PDGFR抑制为可独立于EGFR表达状态而用于多种细胞类型的技术。

[0249] 虽然所有先前的实验均在血清不存在下进行以防止血清中存在的EGFR的干扰,但是还测试了PDGFR抑制在血清存在下是否还刺激AAV2/6转导。在用AAV2/6转导前一天,将Hep3B细胞以 $1 \times 10^5$ 个细胞/孔的密度铺板于48孔组织培养板中的300 $\mu$ L完全生长培养基中。在无血清孔的转导的早晨,将细胞用无血清培养基洗涤三次,并在无血清培养基中孵育三小时。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。然后将递送靶向至白蛋白基因座的ZFN的AAV2/6颗粒添加至孔中,并且孵育三小时。将血清添加至孔中,至最终浓度为10%。对于全血清孔,用完全生长培养基洗涤细胞,并将AAV2/6颗粒添加至孔中。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序(MiSeq)来分析。

[0250] 如图7所示,在HepG2细胞中,发现在血清存在下总体AAV2/6转导降低约40倍。然而,当添加PDGFRi时,即使在血清存在下AAV2/6转导也是非常稳健的(高达20%插入缺失)。当计算作为未处理的AAV2/6转导的倍数变化(参见图8)时,PDGFRi在血清不存在下以剂量依赖性方式使AAV转导增加4倍(高达50%插入缺失),并且在血清存在下使其增加高达70倍(高达20%插入缺失)。这证实PDGFR抑制可在血清蛋白存在下在体内使用,以增强使用病毒载体诸如AAV进行的核酸递送。

[0251] 接下来测试PDGFR抑制剂对人类患者来源的原代肝细胞的作用。对于人类肝细胞,购买预先用胶原蛋白涂覆的48孔细胞培养皿(Life Technologies)。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。通过将18mL InVitroGRO CP培养基(BioreclamationIVT)和400 $\mu$ L Torpedo抗生素混合物(Celsis In Vitro Technologies)组合来制备解冻/铺板培养基。一旦制备好板,就将可用可铺凹板的(female plate-able)人类肝细胞(批号AKB)从液氮汽相直接转移至37 $^{\circ}$ C水浴中并在轻微搅拌下解冻。将细胞直接转移至含有5mL预温热的解冻/铺板培养基的50ml锥形管中。为了检索所有细胞,将小瓶用1mL解冻/铺板培养基洗涤,将所述培养基添加至细胞中。在细胞重悬之后,移除小等分试样(20 $\mu$ L)以进行细胞计数并使用台盼蓝溶液(1:5; Corning,目录号25-900-C1)测定细胞活力。然后将细胞以75x g离心5分钟,去除上清液并将细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL重悬。将细胞以 $3 \times 10^5$ 个细胞/孔接种在涂覆的48孔板中。然后将细胞在37 $^{\circ}$ C/5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育。

[0252] 将细胞铺板之后一天,将细胞转换至HCM维持培养基(Lonza、HBM和HCM SingleQuots)。第二天,用新鲜的HCM培养基喂养细胞。将生长因子受体抑制剂添加至孔中,并孵育一小时。将AAV2/6颗粒以适当的MOI与HCM培养基(以300 $\mu$ L/孔计)混合,并添加至细胞中。在24h后,用新鲜HCM培养基替换培养基以确保原代肝细胞培养物的最大健康。在转导后第4天时收获细胞。提取基因组DNA,并通过在白蛋白基因座处进行深度测序(MiSeq)来分析。

[0253] 如图9所示,与DMSO处理的对照相比,在高剂量的PDGFRi (9 $\mu$ M) 处理的情况下观察到AAV2/6转导增加,但是在低剂量(3 $\mu$ M)下未观察到。这个5倍增加指示本文所述的方法在原代细胞中的有效性,以及因此在体内的有效性。重要的是,这些细胞在血清不存在下生长。

[0254] 实施例6:将AAV递送至非人灵长类动物体内

[0255] 为了研究将类固醇和抗B细胞方案组合对如通过核酸酶活性所测量的AAV递送效率的影响,进行以下研究。在这些研究中,AAV2/6为所使用的主要血清型(除非在别处指示),其中术语2/6意指AAV包含AAV2 ITR但具有AAV6衣壳。所述研究利用被设计以裂解食蟹猴白蛋白基因座的锌指核酸酶(SBS#37804“左ZFN”/SBS#43083“右ZFN”,参见PCT公布W02015/127439)。设计所使用的供体以通过核酸酶介导的转基因靶向整合来引入人类F.IX或人类FVIII转基因。供体构建体描述于W02015127439(人类F.IX)和W02015089077(人类FVIII)中。

[0256] 将食蟹猴(*Cynomolgus monkey*) (食蟹猴(*M.fascicularis*))圈养在装备有不锈钢网格地板和自动供水阀的不锈钢笼中。研究遵照动物福利法案法规(联邦法规法典,标题9)的最终规则的所有适用部分。

[0257] 在研究的第1天将对照物品(制剂缓冲液、PBS、35mM NaCl、1%蔗糖、0.05% pluronic 188,pH 7.1)和测试物品解冻并分配,其中测试物品和对照物品通过静脉内输注以1mL/分钟施用至外周静脉中。对于利妥昔单抗给药,动物通过静脉内给药接受浓度为10mg/mL、体积为1mL/kg的剂量10mg/kg/剂量。对于甲基泼尼松龙(**Solu-Medrol®**),将所述药剂以10mg/kg/剂量的剂量以20mg/mL的浓度以0.5mL/kg的剂量体积施用,以肌肉方式施用。

[0258] 图10中描绘了给药方案,其中图10A示出**Solu-Medrol®**和**Rituxan®**的组合延迟给药。将AAV6测试物品在第1天施用于动物,并且将**Solu-Medrol®**在第5天至第16天开始每日给予,并且将**Rituxan®**在第7天和第14天给予。第二方案示出于图10B中,其中**Rituxan®**在第8天以及在测试物品前一天给予,并且将**Solu-Medrol®**与测试物品在同一天给予,并且然后之后每日给予。

[0259] 给药组示出于以下表2和表3中。表2描绘了图10A中描绘的方案中使用的组,而表3示出了图10B的方案中使用的组。表2和表3中所示出的测试物品的特征在于表中的详情。

[0260] 表2:类固醇+B细胞抑制剂(所用的测试物品)的延迟治疗

[0261]

组编号	雄性编号 <sup>a</sup>	测试物品鉴定	AAV 转基因描述	比率 (ZFN:ZF N:hF9 供体)	组分剂量水平 (vg/kg)	总体 AAV 载体剂量水平 (vg/kg)
1	1	SGMO.01	制剂缓冲液	NA	NA	NA
2	2	SGMO.02	左 ZFN 右 ZFN	NA	1.5E+13 每种 ZFN	3E+13
3	3	SGMO.03	左 ZFN 右 ZFN hF9 供体	1:1:8 高剂量	1.5E+13 每种 ZFN 1.2E+14	1.5E+14
4	3	SGMO.04	左 ZFN 右 ZFN	1:1:4 高剂量	1.5E+13 每种 ZFN	9E+13

[0262]

组编号	雄性编号 <sup>a</sup>	测试物品鉴定	AAV 转基因描述	比率 (ZFN:ZF N:hF9 供体)	组分剂量水平 (vg/kg)	总体 AAV 载体剂量水平 (vg/kg)
			hF9 供体		6E+13	
5	3	SGMO.05	左 ZFN 右 ZFN hF9 供体	1:1:2 高剂量	1.5E+13 每种 ZFN 3E+13	6E+13
6	3	SGMO.06	左 ZFN 右 ZFN hF9 供体	1:1:8 中间剂量	5E+12 每种 ZFN 4E+13	5E+13
7	3	SGMO.07	左 ZFN 右 ZFN hF9 供体	1:1:2 中间剂量	5E+12 每种 ZFN 1E+13	2E+13
8	2	SGMO.08	左 ZFN 右 ZFN hF9 供体	1:1:8 低剂量	1.5E+12 每种 ZFN 1.2E+13	1.5E+13
9	1	SGMO.09	hF9 供体	NA	3E+13	3E+13

[0263] 表3:用B细胞抑制剂、组合的同时测试物品和类固醇处理(测试物品)进行的预处理

组编号	雄性编号 <sup>a</sup>	测试物品鉴定	AAV 转基因描述	比率 (ZFN:ZF N:hF9 供体)	组分剂量水平 (vg/kg)	总体 AAV 载体剂量水平 (vg/kg)
1	3	SGMO.01	制剂缓冲液	NA	NA	NA
2	4	SGMO.02	左 ZFN	1:1:8 中间剂量	2.25E+12	2.25E+13
			右 ZFN		每种 ZFN	
			hF9 供体		1.8E+13	
3	5	SGMO.03	左 ZFN	1:1:8 低剂量	1.2E+12	1.2E+13
			右 ZFN		每种 ZFN	
			hF9 供体		9E+12	

[0264] 采集样品以评估标准的血液学、凝血、临床化学参数,以检测人类FIX和抗FIX抗体并且进行尿分析。通过测量活化的部分促凝血酶原激酶时间 (aPTT) 和凝血酶原时间来分析凝血。此外,采集活检物来分析基因组DNA中的AAV6载体基因组拷贝数并测量核酸酶活性。

[0266] 延迟的 (测试物品后,图10A) 治疗方案的结果示出于图11中。所有剂量组显示出hFIX浓度的增加,在最高的总AAV2/6剂量组中观察到最高水平 (图11A)。在1:1:8剂量组 (AAV-ZFN1:AAV-ZFN2:AAV供体) 中,在最高的总AAV2/6剂量的情况下再次观察到最高的hFIX浓度 (图11B)。对于预处理方案 (图10B),在两种给药组中均可检测到FIX (图11C)。当汇集来自两种处理方案的数据 (图11D) 时,观察到随着可检测到的hFIX随着总AAV2/6剂量增加而增加。

[0267] 还分析动物的基因修饰水平 (在裂解位点处包含插入或缺失即“插入缺失”的基因%)。在第28天检测到的基因修饰水平 (图12) 指示,在免疫调节剂的测试物品施用后 (图10A),基因修饰随着总AAV2/6剂量增加而增加。当在测试物品之前给予利妥昔单抗并且然后与测试物品同时给予类固醇并且然后之后每日给予时,基因修饰随着总AAV2/6剂量增加而增加 (图12A)。当汇集来自两种方案的基因修饰水平 (图12B) 时,一般趋势为AAV2/6剂量增加与基因修饰增加有关 (图12C)。重要的是,与未用给药前类固醇处理进行的处理相比,在用测试物品处理之前使用类固醇处理允许使用较低剂量的测试物品来实现给定水平的基因修饰,同时仍实现治疗水平的蛋白质表达。

[0268] 在NHP中也使用FVIII-BDD转基因而非F.IX供体来进行类似的实验。在此实验中,评估AAV6和AAV8血清型。以下表4示出给药组的身份。第2-4组 (“cDNA1”) 与第5组 (“cDNA2”) 中的F8转基因表达盒之间的差异在于,第5组供体具有略微不同的启动子模块 (杂交肝启动子,参见McIntosh等 (2013) Blood 121 (17):3335),但F8-BDD转基因表达盒的其余部分 (包括编码区) 相同。在此实验中,未使用ZFN来引起靶向整合至基因组中。

[0269] 表4:具有FVIII转基因盒的NHP组

组编号	雄性编号 <sup>a</sup>	测试物品鉴定	AAV 转基因描述	比率 (ZFN:ZFN:hF9 供体)	血清型	组分剂量水平 (vg/kg)	总体 AAV 载体剂量水平 (vg/kg)
1	2	SGMO.01	制剂缓冲液	NA	NA	NA	NA
[0270] 2	3	SGMO.02	hF8-BDD cDNA 1	NA	AAV2/6	2E+12	2E+12
3	3	SGMO.03	hF8-BDD cDNA 1	NA	AAV2/6	6E+12	6E+12
4	3	SGMO.04	hF8-BDD cDNA 1	NA	AAV2/8	6E+12	6E+12
5	3	SGMO.05	hF8-BDD cDNA 2	NA	AAV2/8	6E+12	6E+12

[0271] 对于此实验,使用图10B中概述的给药方案(其中利妥昔单抗在测试物品前施用,并且类固醇与测试物品同时施用并且此后每日施用),并且将实验进行14天。

[0272] 数据呈现于图13-19中,其中每个组中的每只猴子给予一个数据点。数据指示,AAV6血清型背景中的较高剂量测试物品(将图13A与图13B比较)得到正常人类血浆中发现的水平的将近10倍的FVIII-BDD表达。AAV2/8血清型中的测试物品数据显示FVIII活性增加,但是其程度与对于AAV2/6所观察到的程度并不相同。

[0273] 继上述最初14天时间段之后,在单剂量的AAV-FVIII-BDD之后继续实验直至168天。在第103天停止类固醇的共给药(图14)。使用如下定制ELISA测定猴血浆中的hFVIII-BDD水平的测定。在4℃下使用pH 9.4的0.2M碳酸盐碳酸氢盐缓冲液(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)中的小鼠单克隆抗hFVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT)将96孔半区HB(高结合)聚苯乙烯微孔板(Corning)涂覆过夜。第二天,使用1X TBST(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)将板洗涤四次。然后在室温下将96孔板使用3% BSA/TBS封闭缓冲液封闭两小时,随后用1X TBST洗涤四次。将血浆添加至板中并在室温下在摇动下孵育两小时,随后用1X TBST洗涤四次。添加检测抗体,即生物素化单克隆小鼠抗FVIII抗体(Green Mountain,Burlington,VT),并且在室温下孵育一小时,随后用1X TBST洗涤四次。添加链霉抗生物素蛋白HRP(Jackson ImmunoResearch,West Grove PA),并且在室温下孵育一小时,随后用1X TBST洗涤四次。添加TMB Ultra(Thermo Fisher Scientific,Waltham MA)并使其显影十分钟,用停止溶液停止反应,并使用读板器读取在450nm处的吸光度。背景吸光度读数为可忽略的(通常为0)。使用Bethesda测定(例如,参见Kasper等(1975)Thromb Diath Haemorrh 34:869-72)来测定抑制性抗FVIII抗体的存在。图15示出在研究过程中在血浆中检测到的通过AAV2/6递送的FVIII-BDD的峰值浓度。

[0274] 对于包含以2E+12vg/kg给药的AAV2/6中的FVIII-BDD cDNA供体的低剂量动物(n=3),在检测到稳健的hFVIII抗原水平(Ag)之后,hFVIII-BDD水平随着Bethesda单位(BU)的伴随性增加而降低。BU随时间推移而降低,并且hFVIII Ag增加(图16)。结果证实,在免疫抑制疗法中止之后,人类FVIII抗原的水平下降。

[0275] 对于包含以6E+12vg/kg给药的AAV2/6中的FVIII-BDD cDNA供体的高剂量动物(n=3),观察到类似的模式(参见,图17)。然而,在一只动物3101中,在去除Solu-medrol之后,

尽管有可检测的和持续水平的FVIII抗原(表示正常hFVIII水平的200%),但未检测到抗FVIII抗体,这可能指示动物对人类FVIII抗原耐受。

[0276] 当以AAV2/8载体进行高剂量递送来进行实验时,观察到类似的结果,不同之处在于血浆中可检测的FVIII抗原的量比使用AAV2/6载体所观察到的量少(图18)。类似地,当在AAV2/8载体中测试不同的FVIII-BDD cDNA启动子组件(第5组,以上所述)时,FVIII-BDD血浆水平与第4组(图19)中所观察到的那些血浆水平类似。然而,如上所述,存在维持可检测量的FVIII-BDD表达的两个个体(5101和5102),并且在去除Solu-medrol之后没有明显抗体应答的第4组(4103,图18D)中的个体在实验的最初数天中观察到的稳健应答水平之后再次表明对抗原的耐受性。

[0277] 如图19D所示,动物编号5101似乎在去除甲基泼尼松龙之后对hFVIII-BDD耐受,hFVIII-BDD水平在约0.1U/mL(表示正常hFVIII水平的10%)下保持稳定8周。如图19E所示,动物编号5102似乎在去除甲基泼尼松龙之后对hFVIII-BDD耐受,hFVIII-BDD水平在约0.6U/mL(表示正常hFVIII水平的60%)下保持稳定8周。值得指出的是,人类血浆中的hFVIII正常水平为约1U/mL或200ng/mL,并且甚至正常(>0.001U/mL)的1%-5%的表达具有治疗功效(Llung RC (1999) Thromb Haemost 82 (2):525-530)。

[0278] 本文提到的所有专利、专利申请以及公布特此以引用方式整体并入本文。

[0279] 虽然出于清楚理解的目的,已通过说明和实施例详细地提供了公开内容,但是本领域技术人员将显而易见的是,可在没有背离本公开的精神或范围的情况下实施各种变化和修改。因此,前面的描述和实施例不应理解为限制性的。

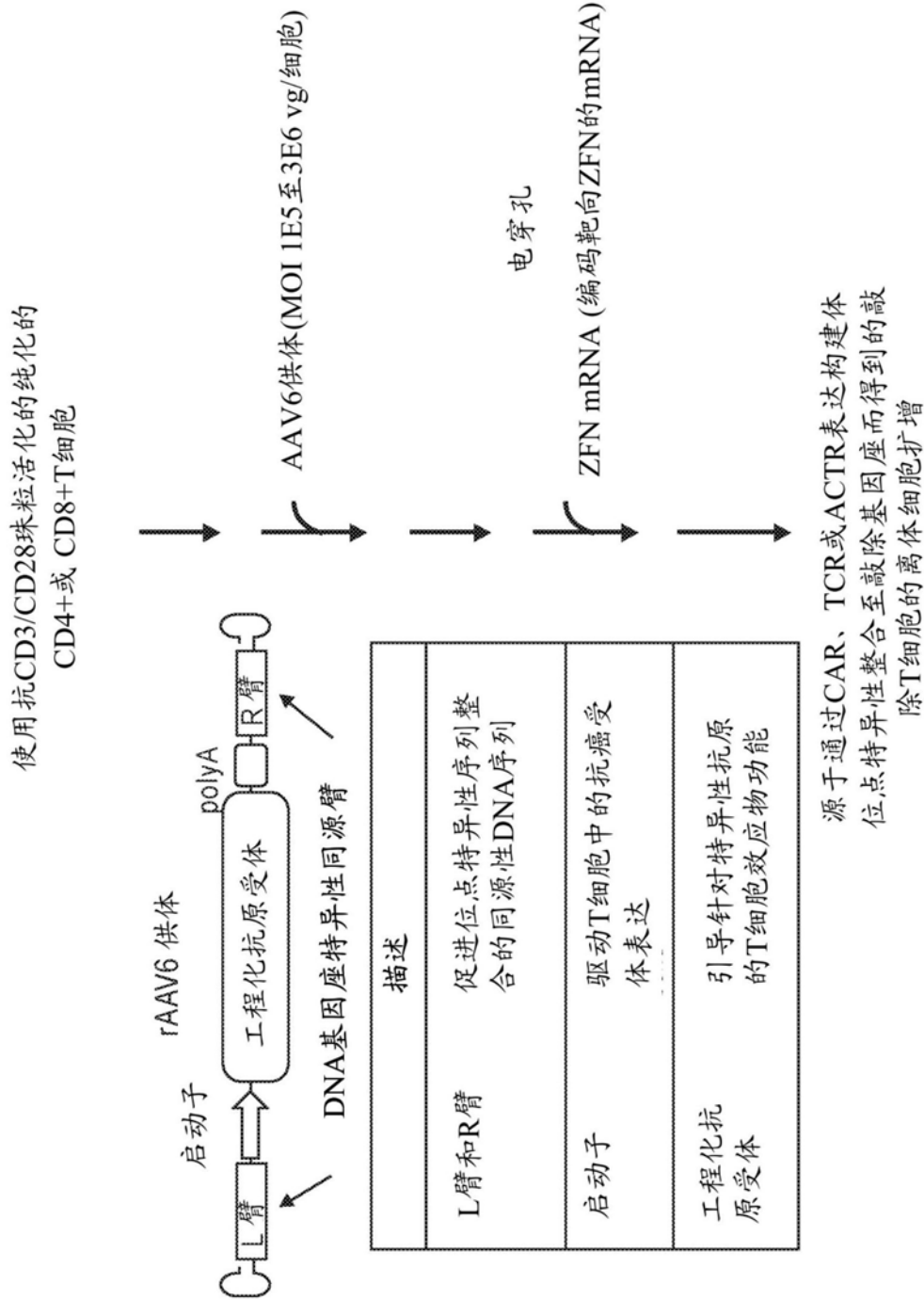


图1

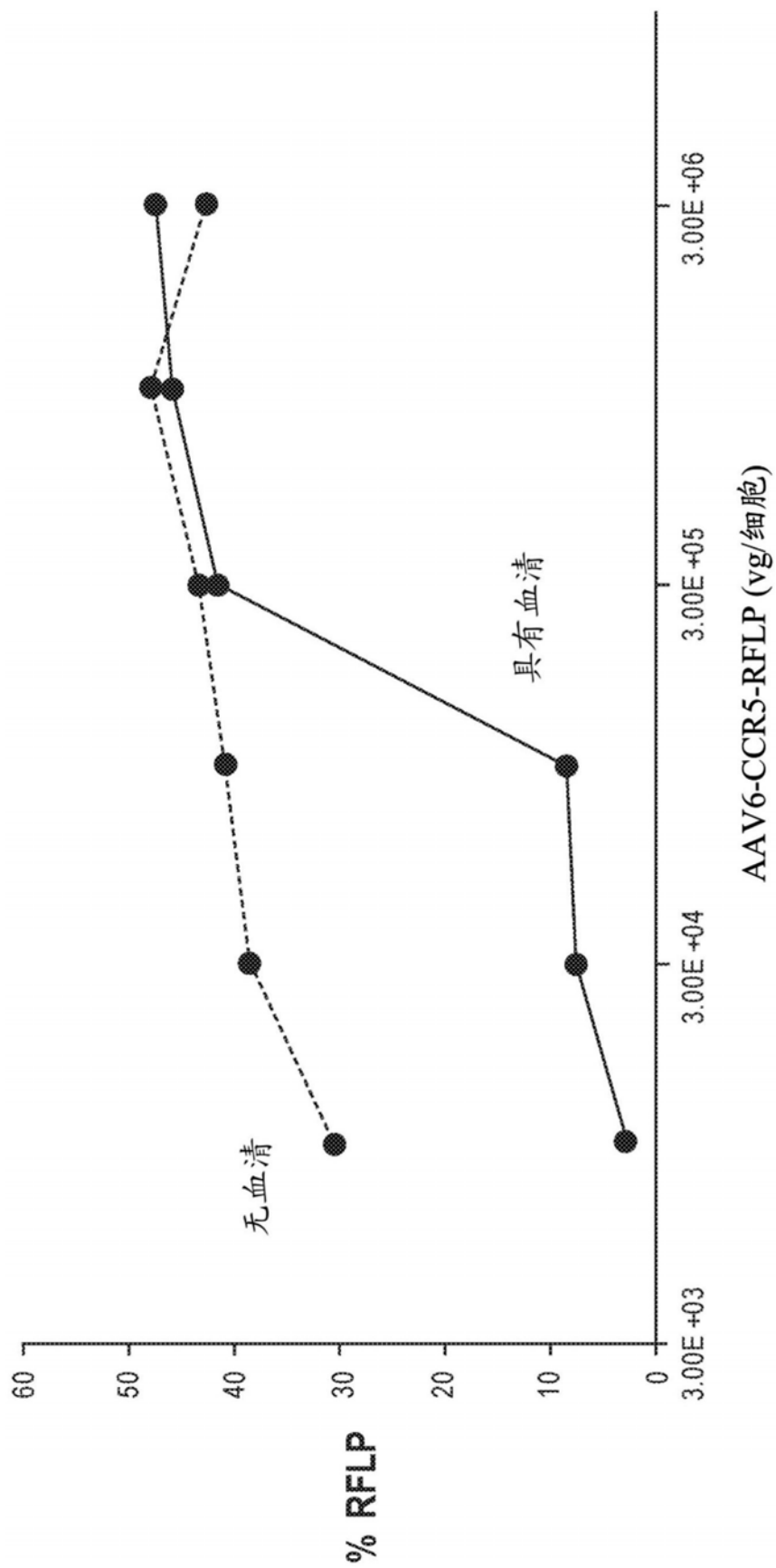


图2



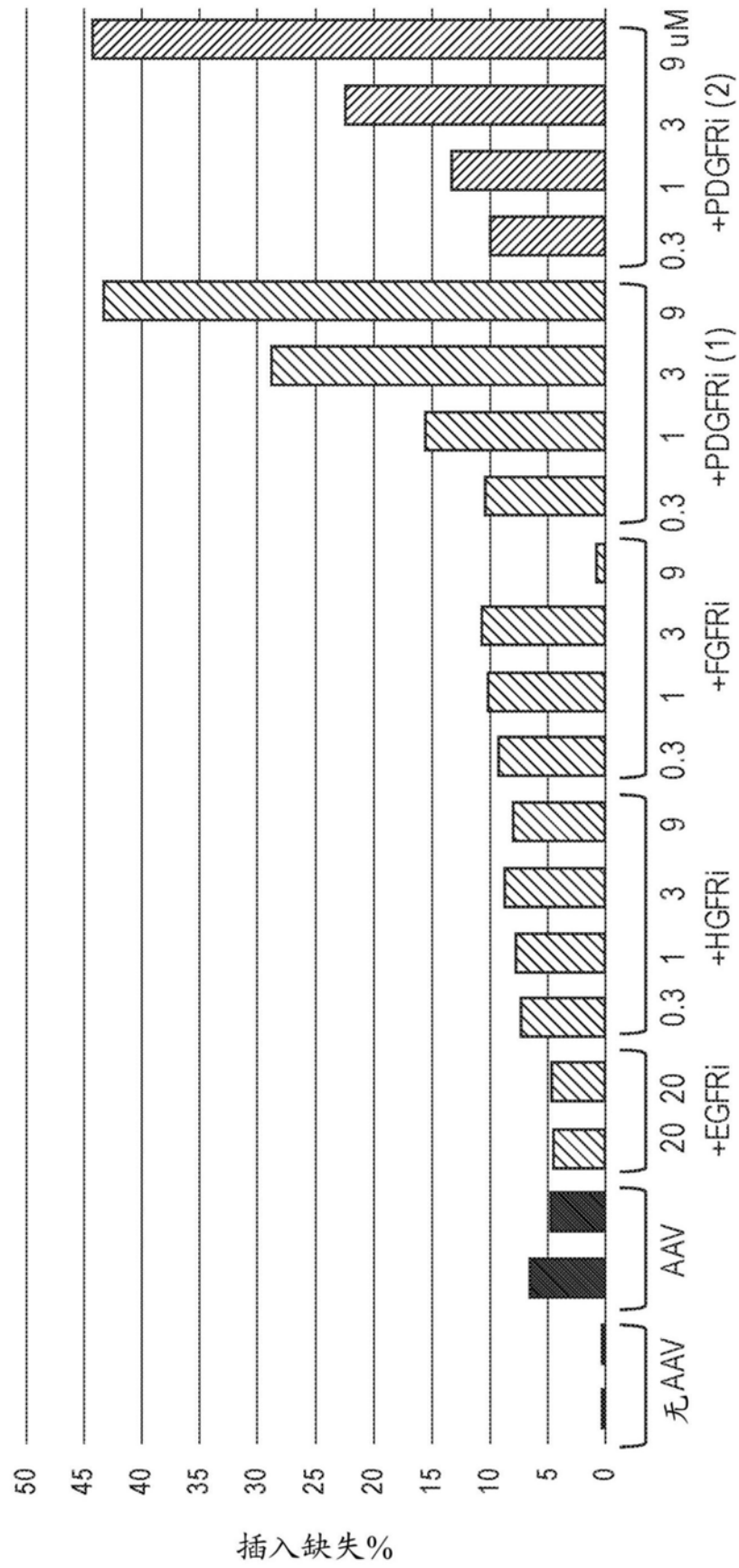


图3

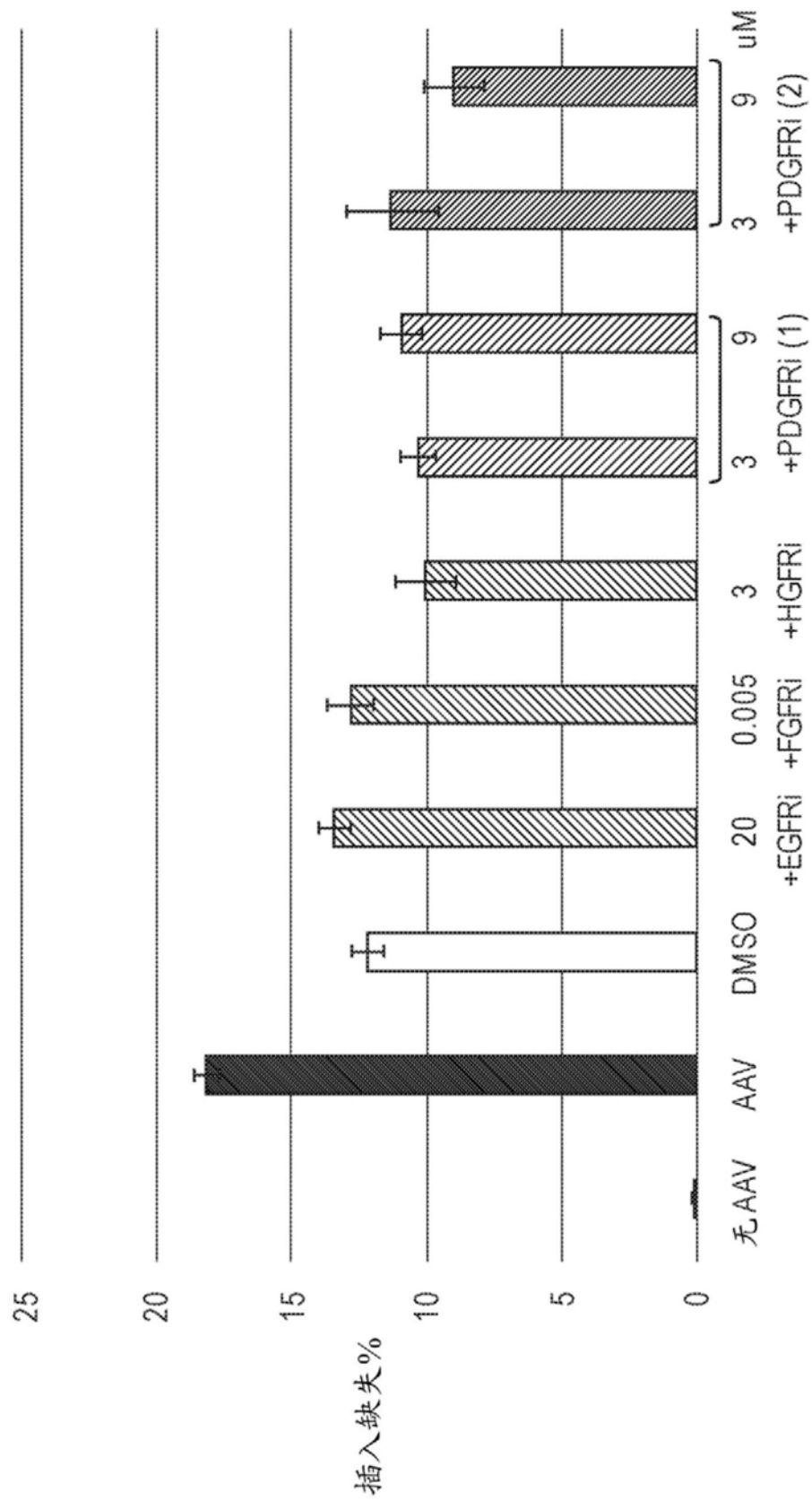


图4

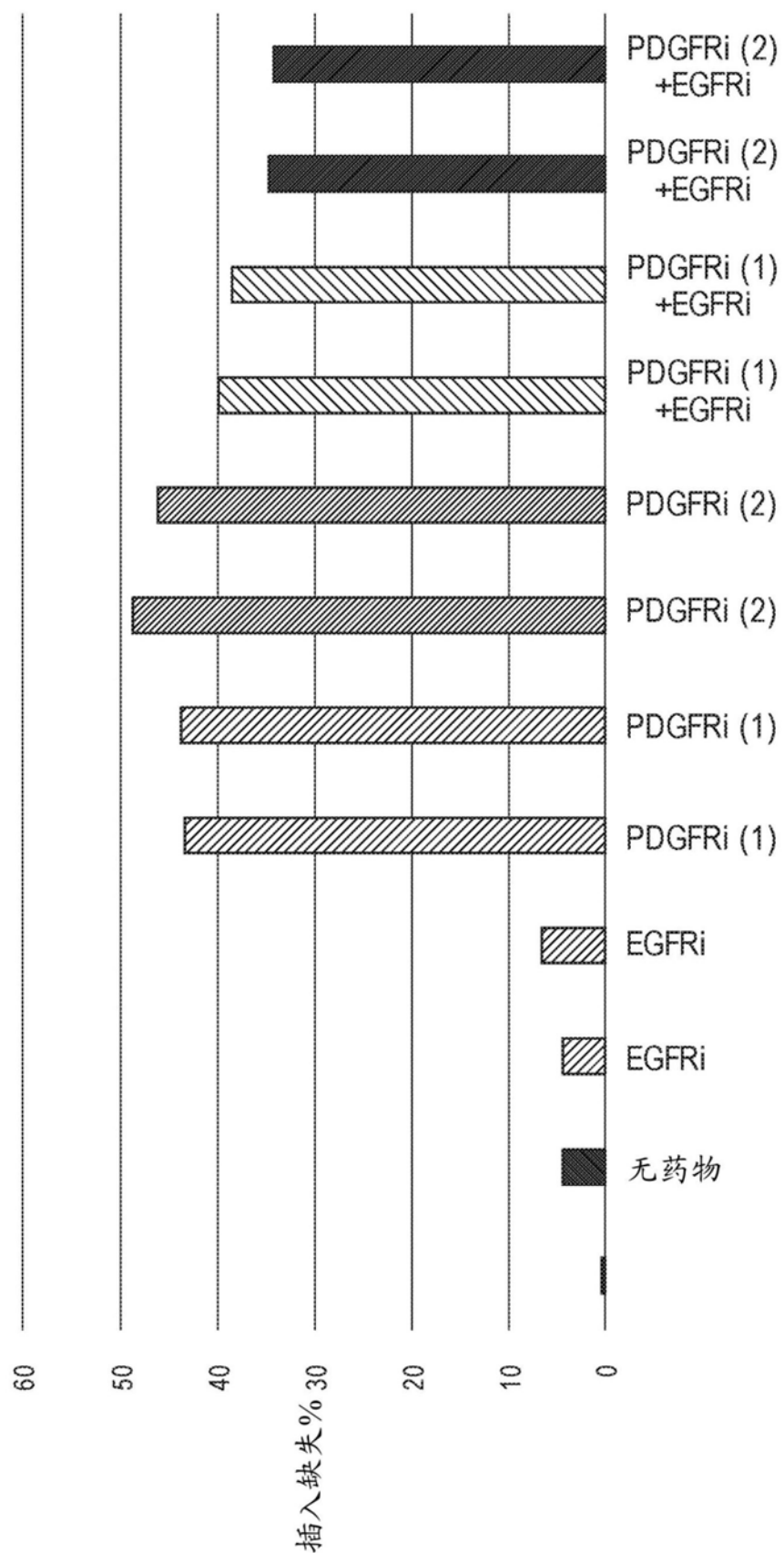


图5

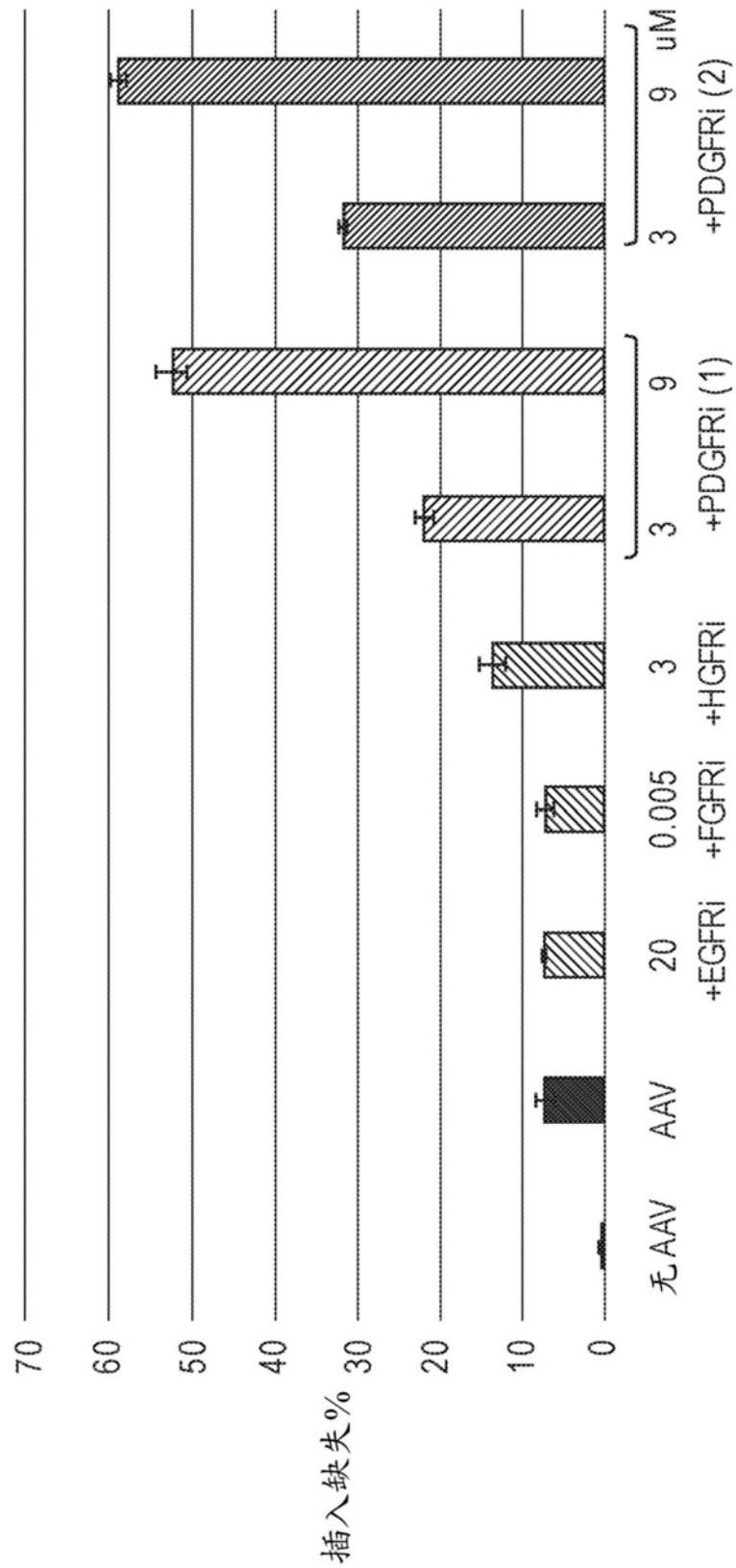


图6

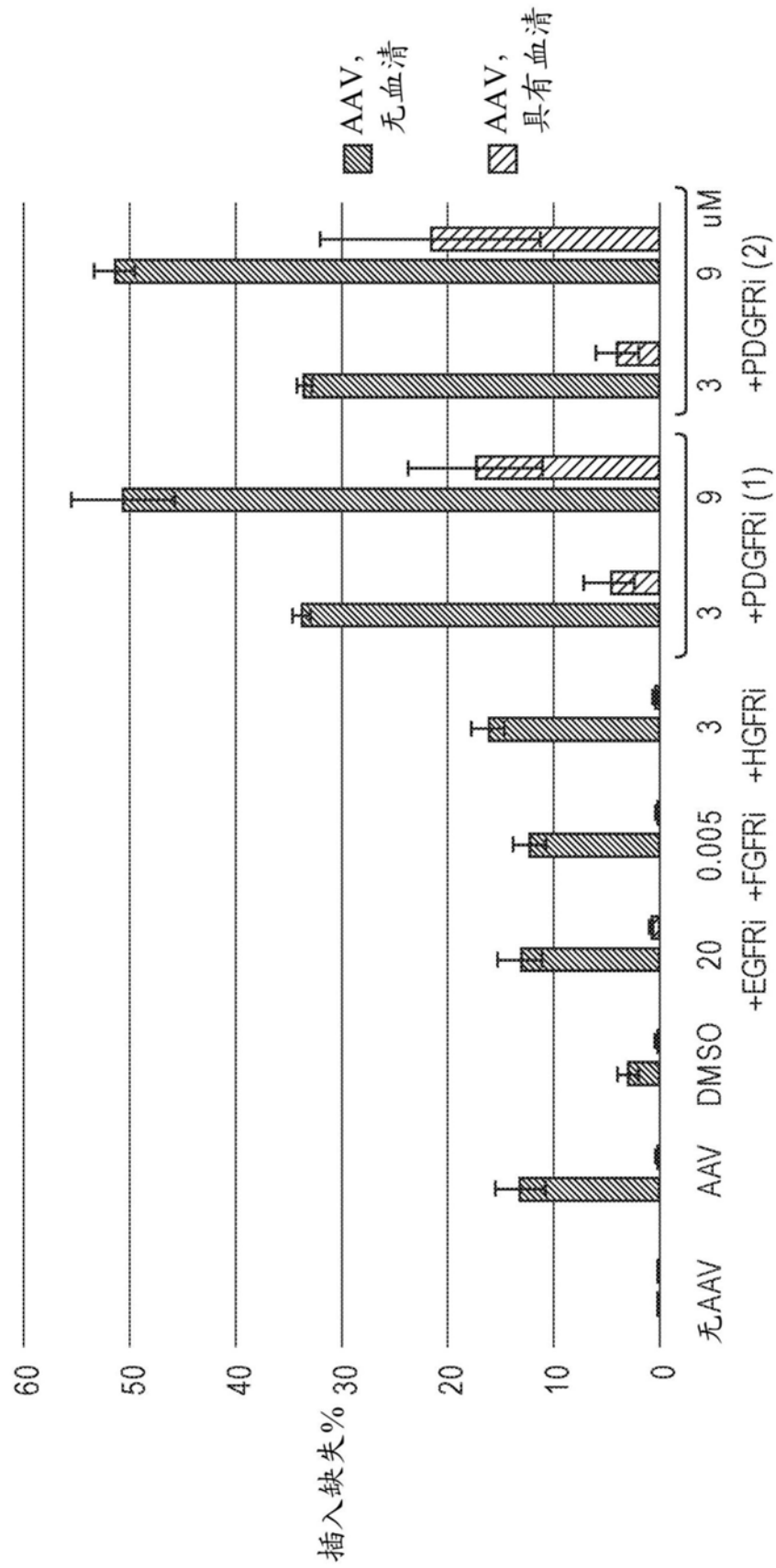


图7

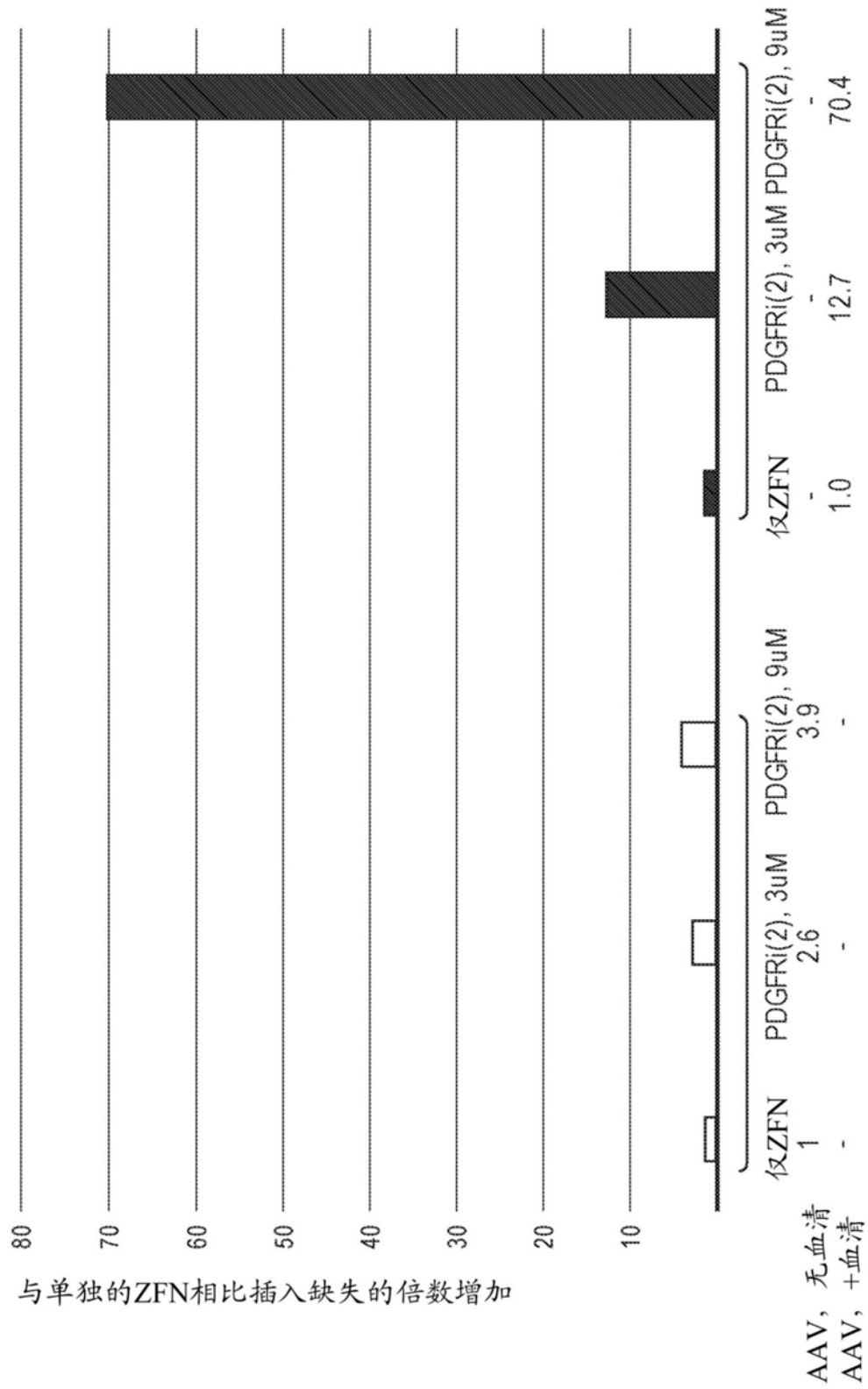


图8

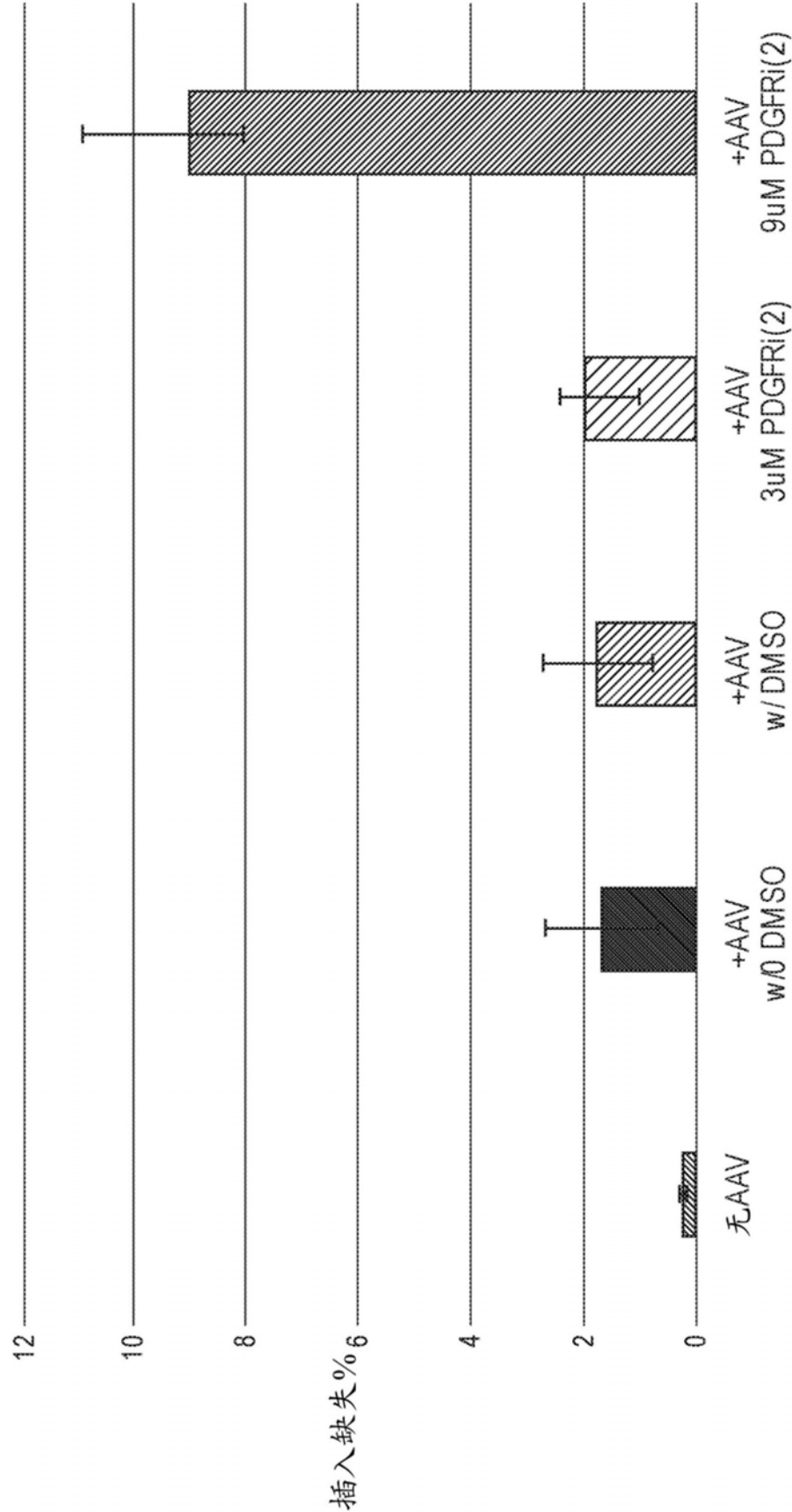


图9

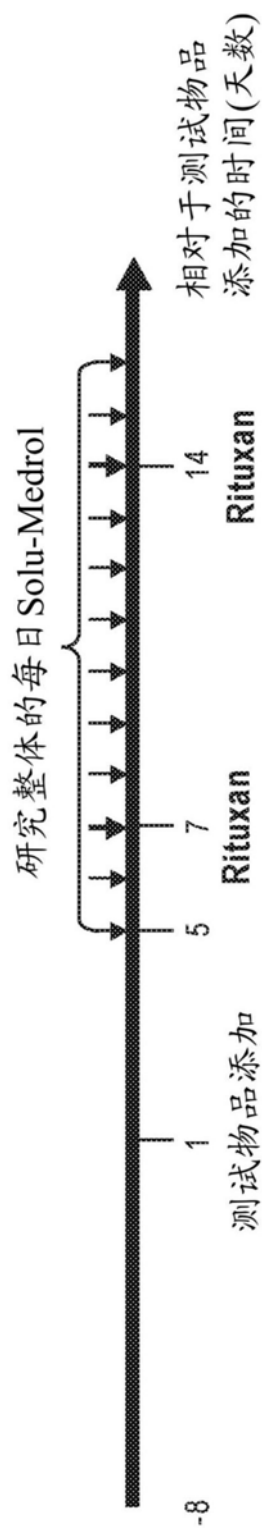


图10A



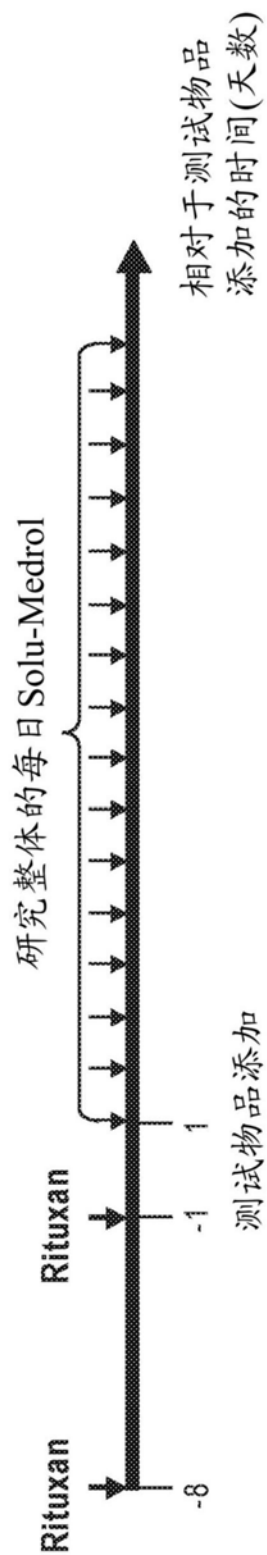


图10B

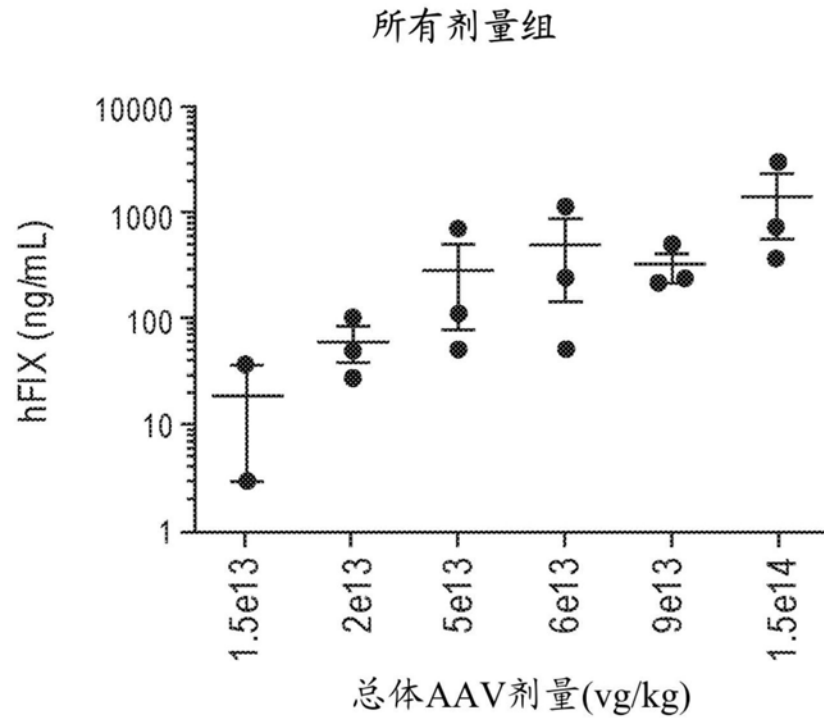


图11A

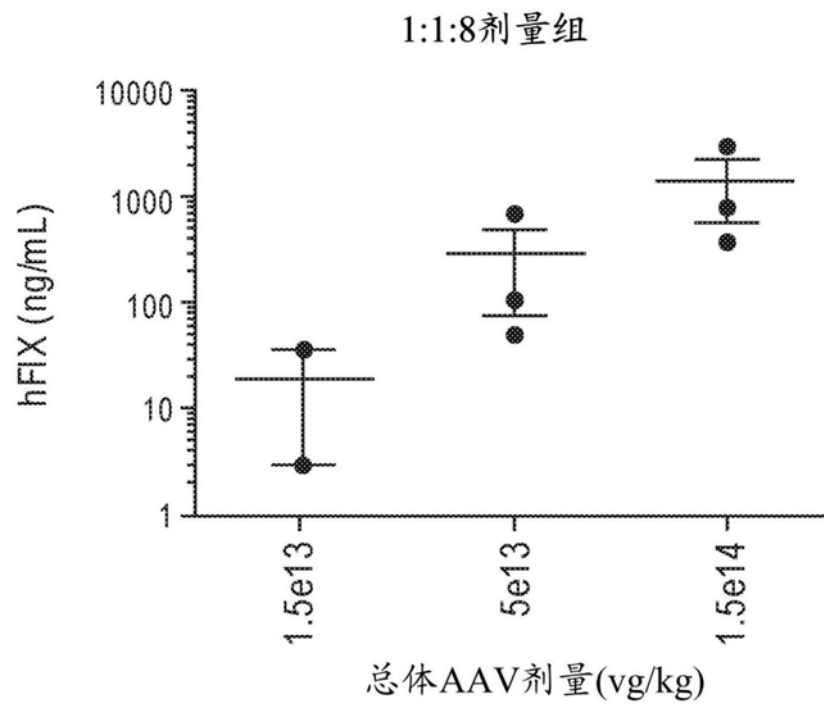


图11B

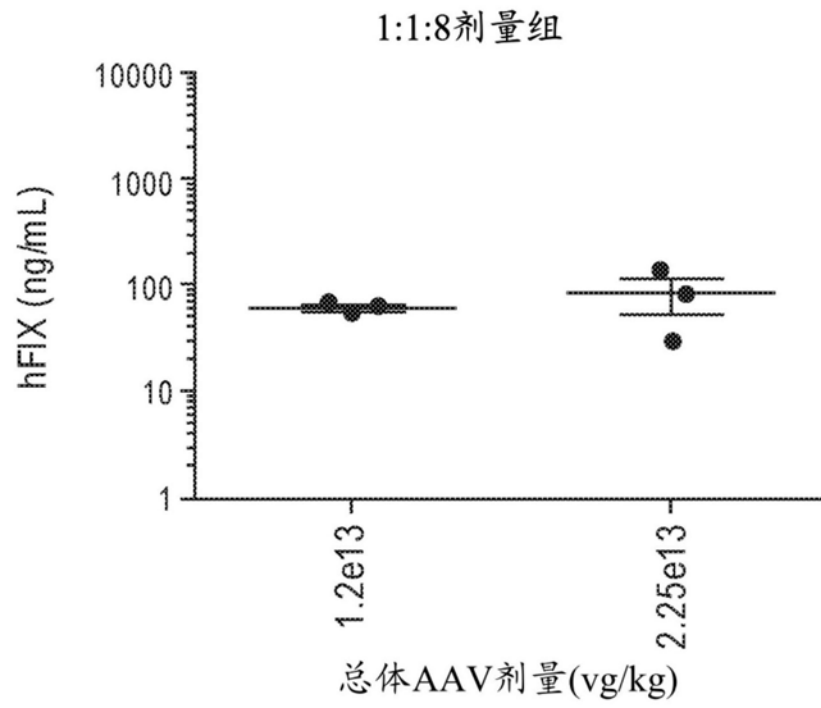


图11C

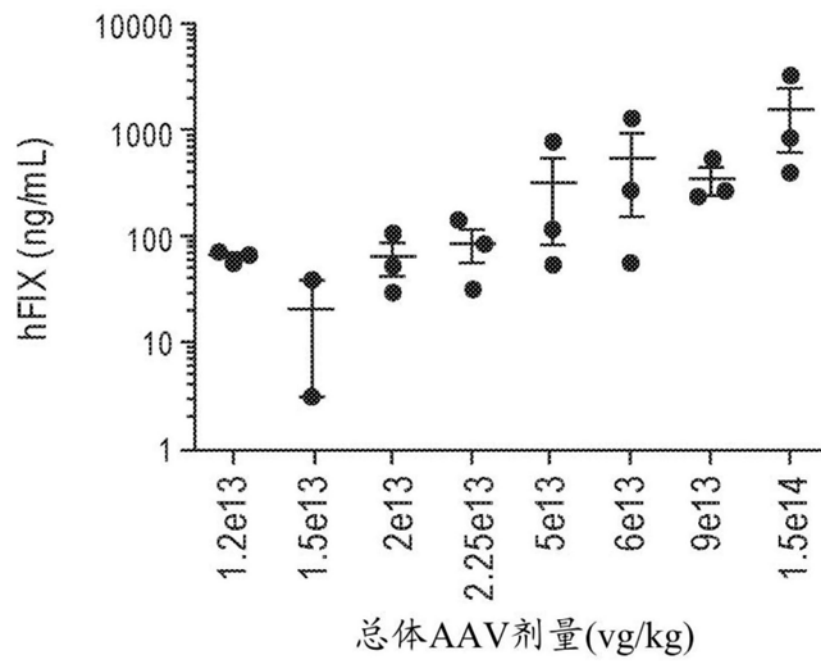


图11D

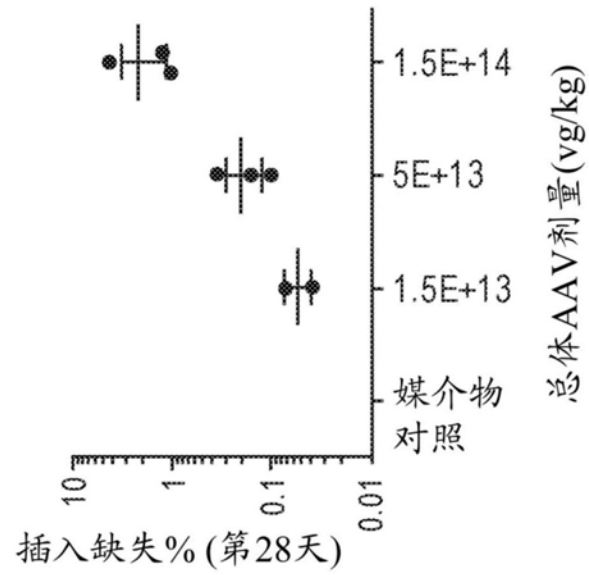


图12A

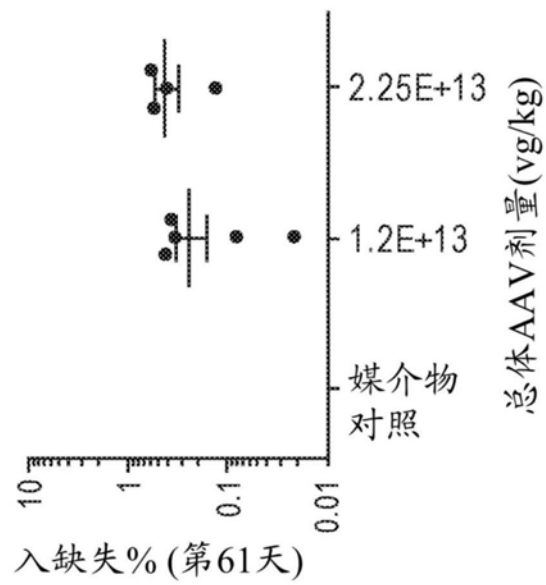


图12B

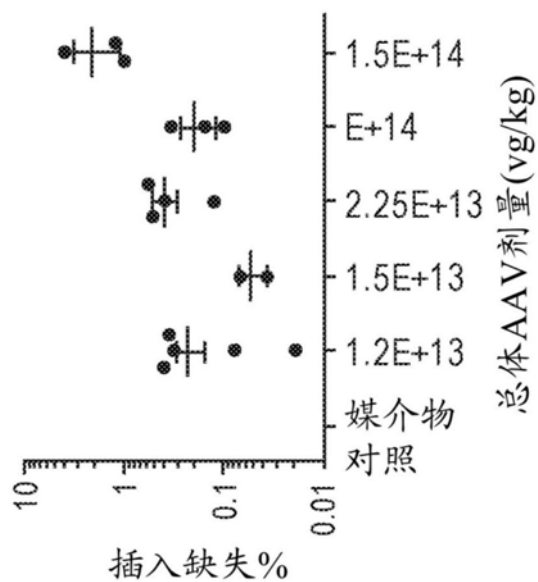


图12C

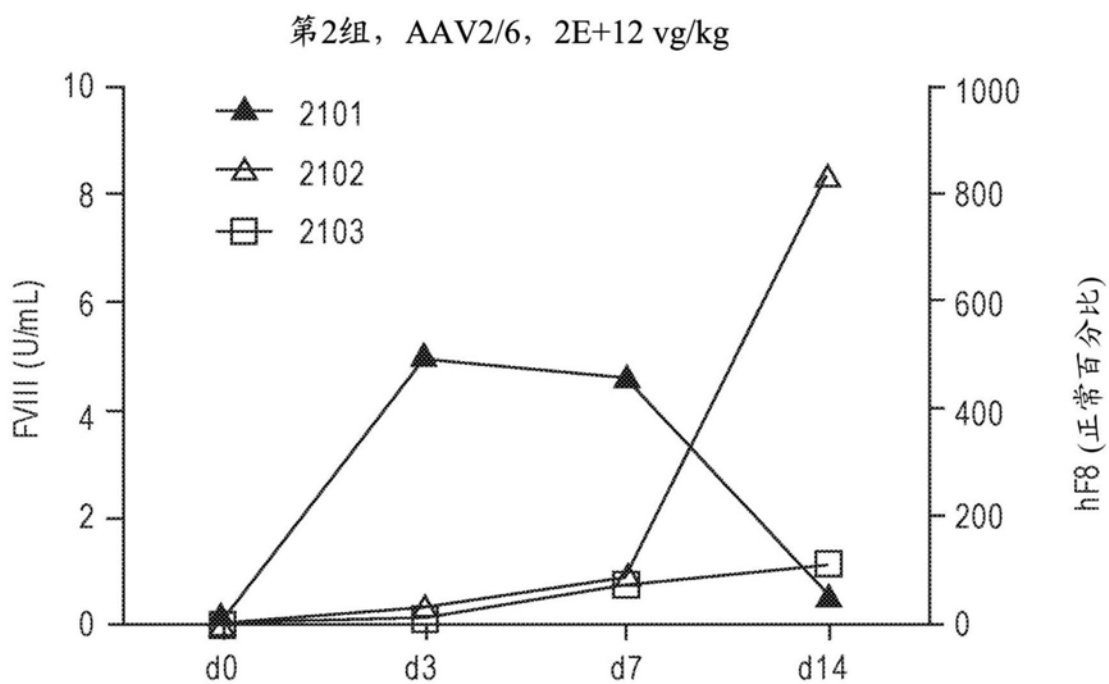


图13A

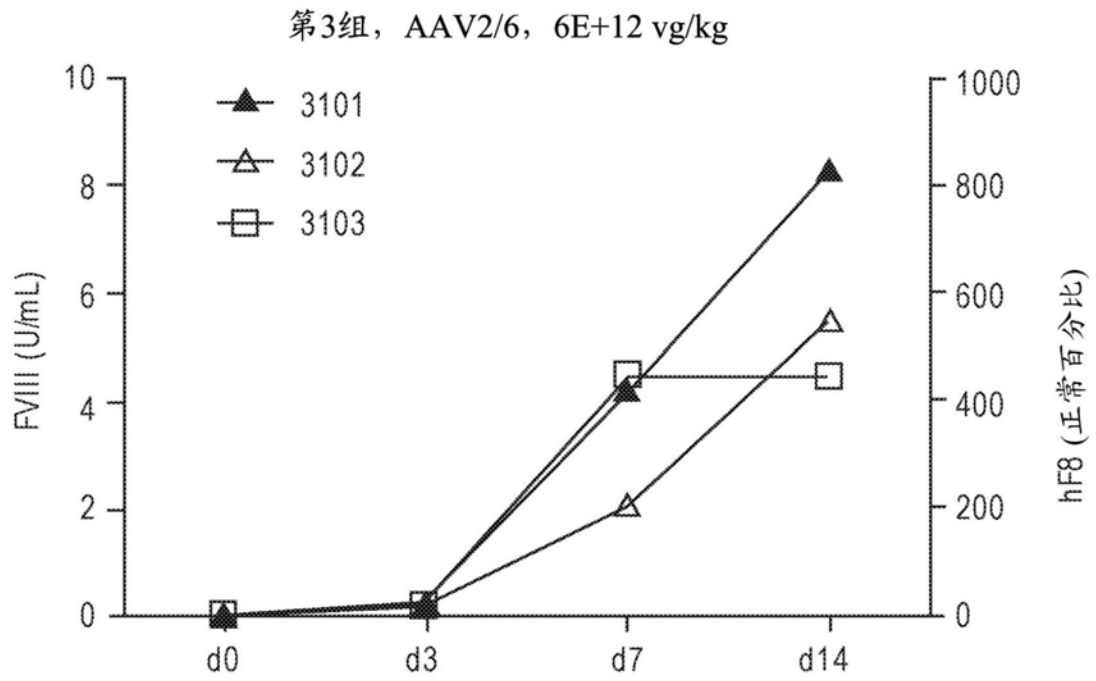


图13B

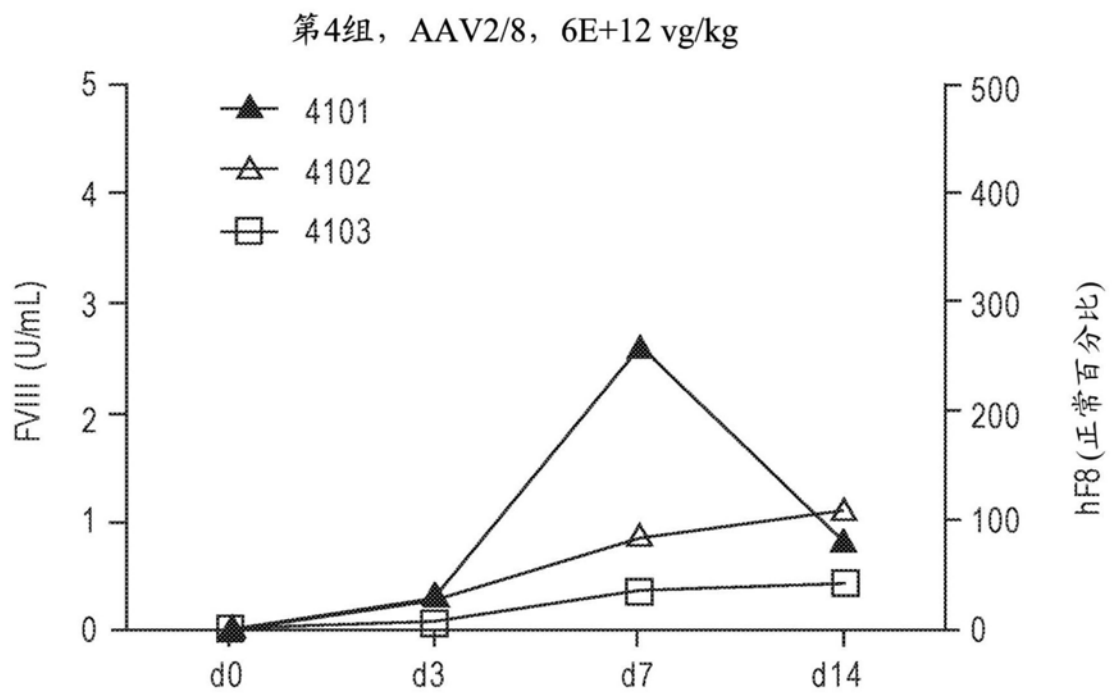


图13C

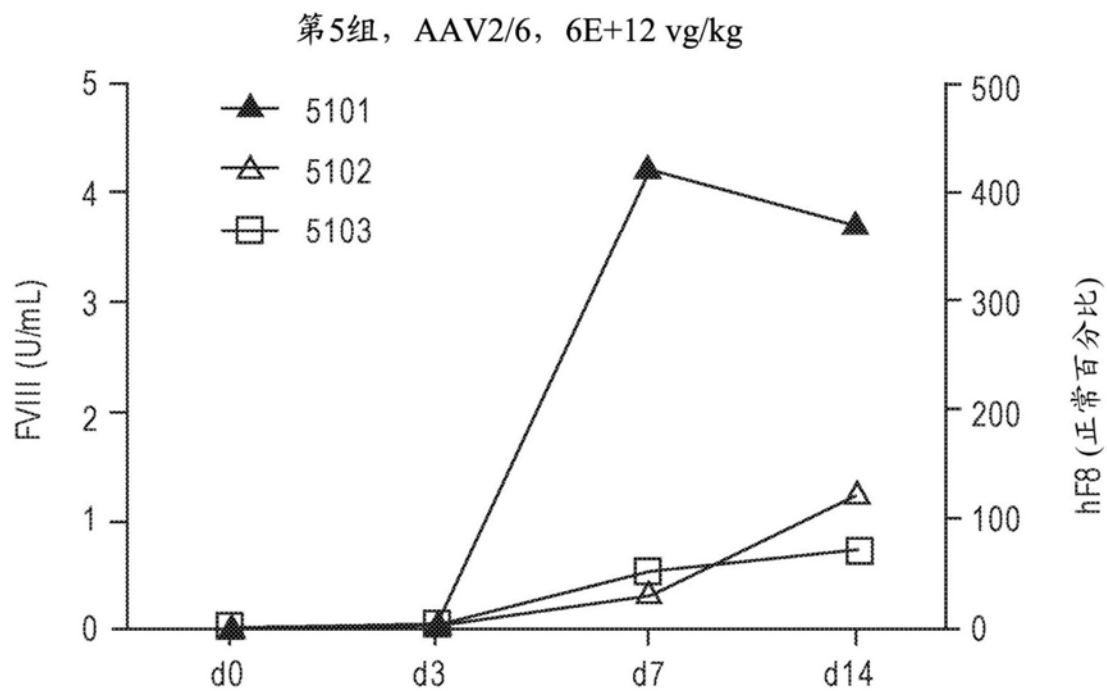


图13D

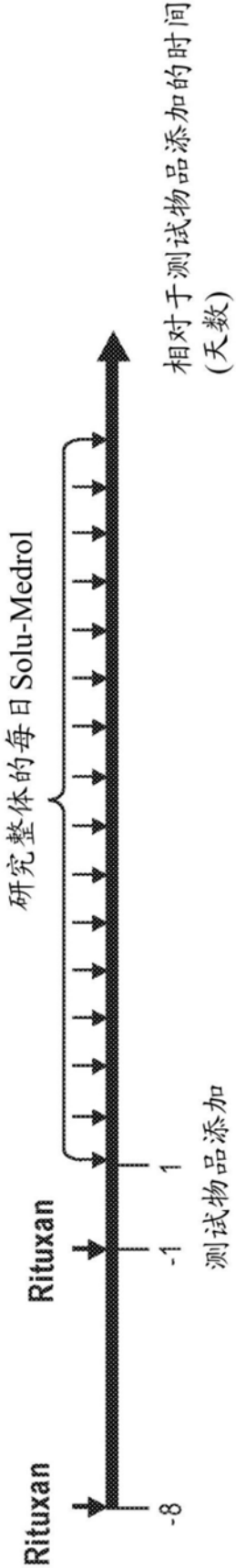


图14



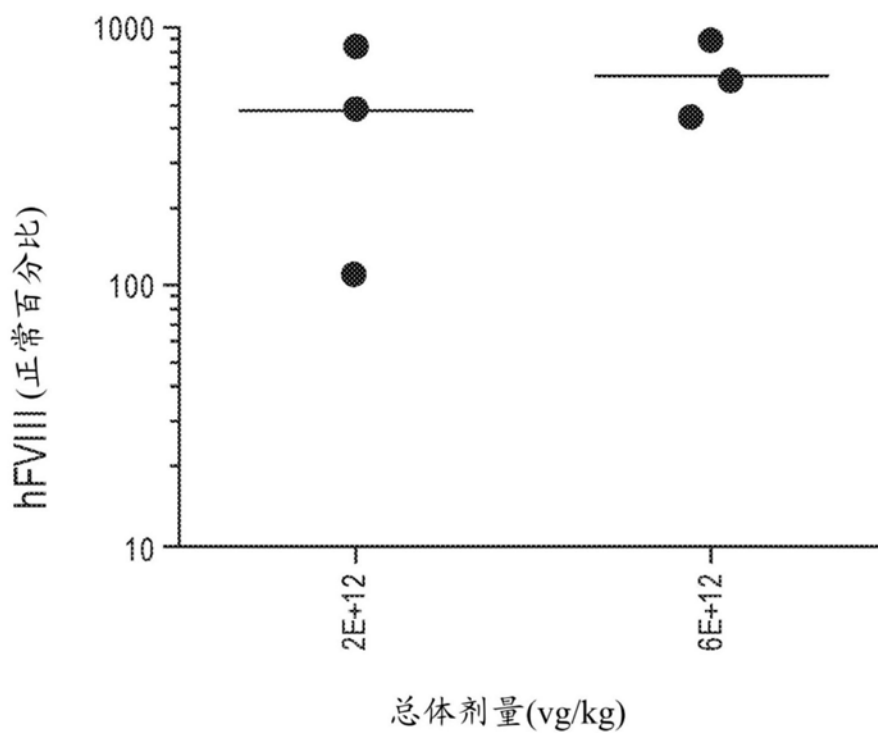


图15

第2组, AAV2/6, 2E+12 vg/kg

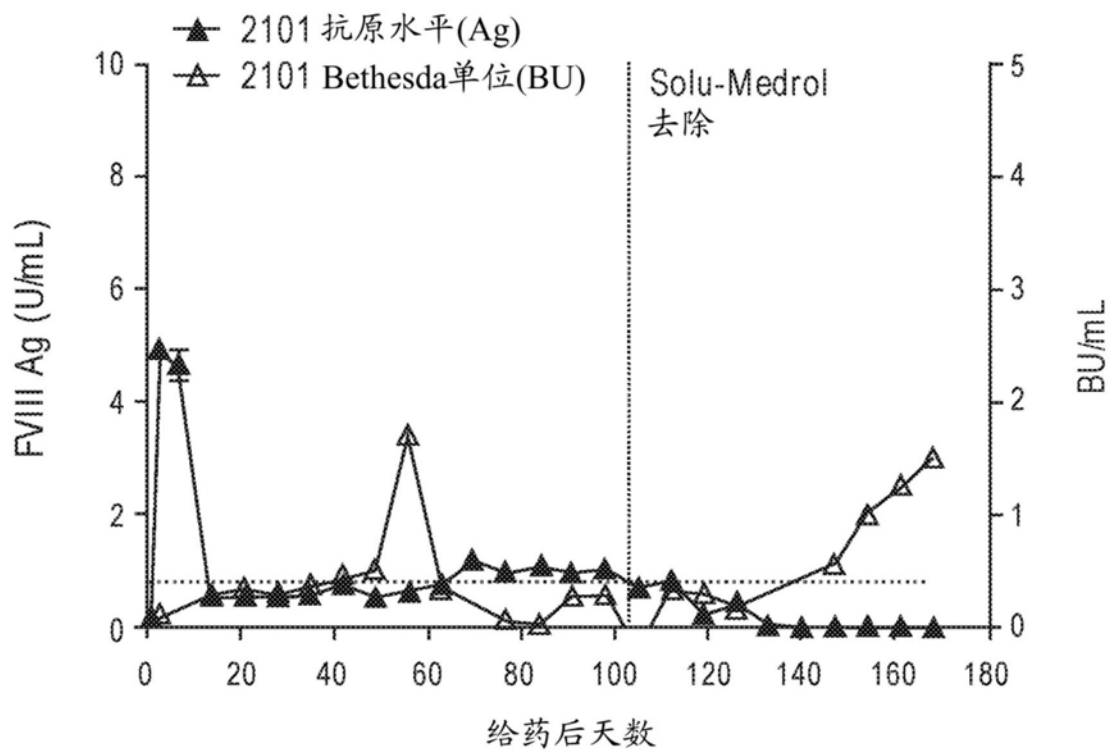


图16A

第2组, AAV2/6, 2E+12 vg/kg

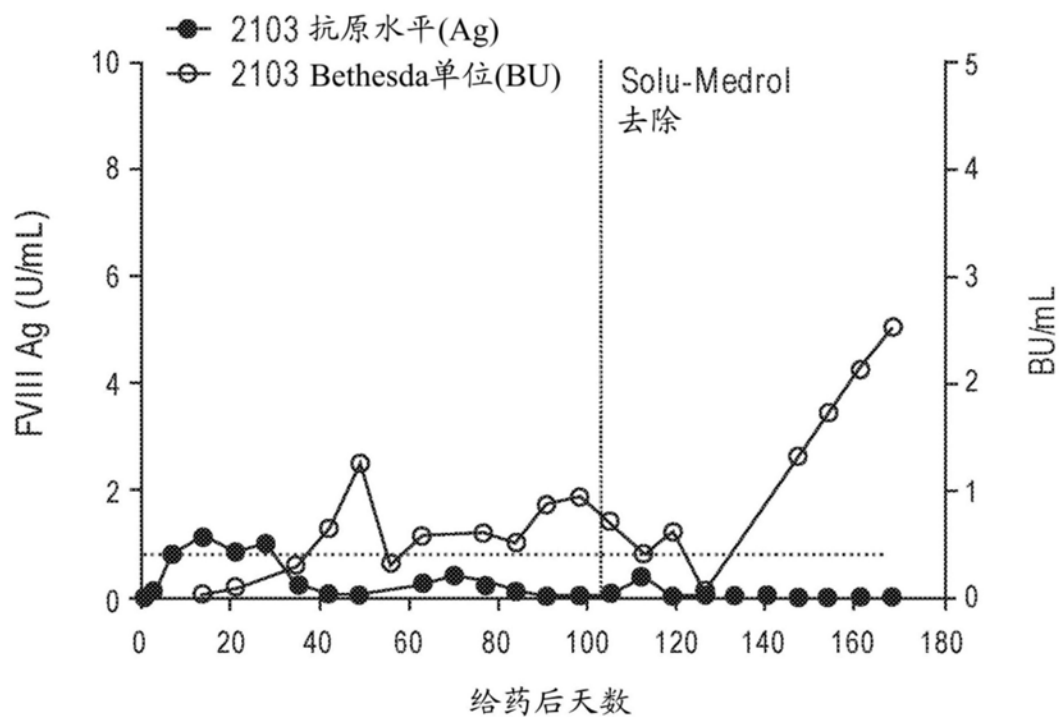


图 16C

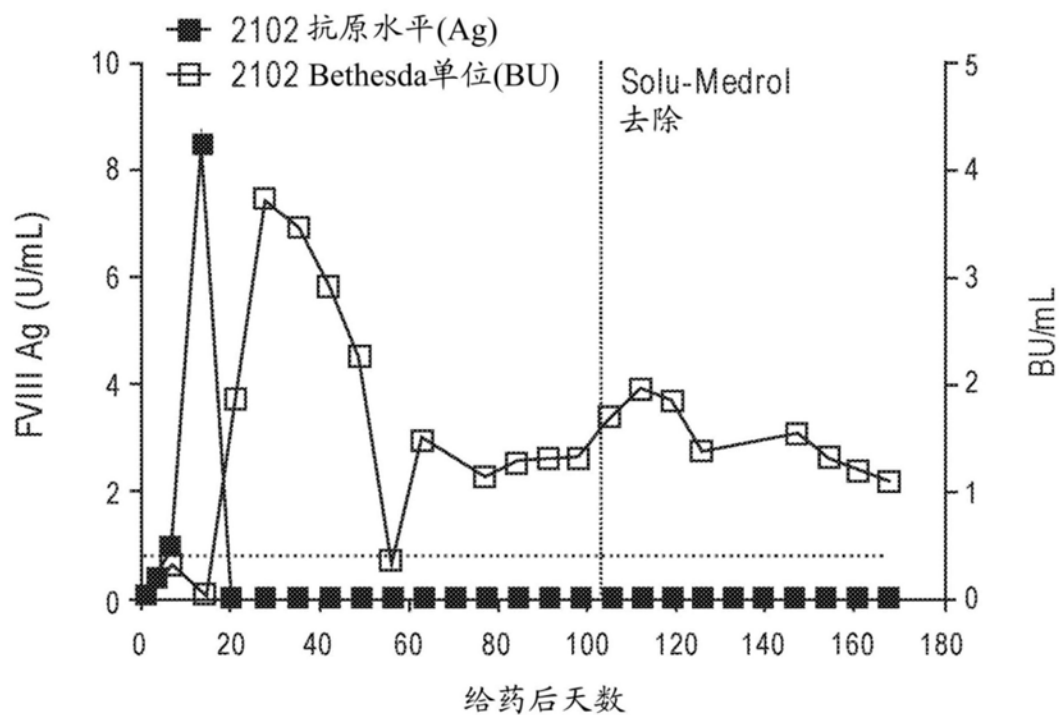


图 16B

## 第3组, AAV2/6, 6E+12 vg/kg

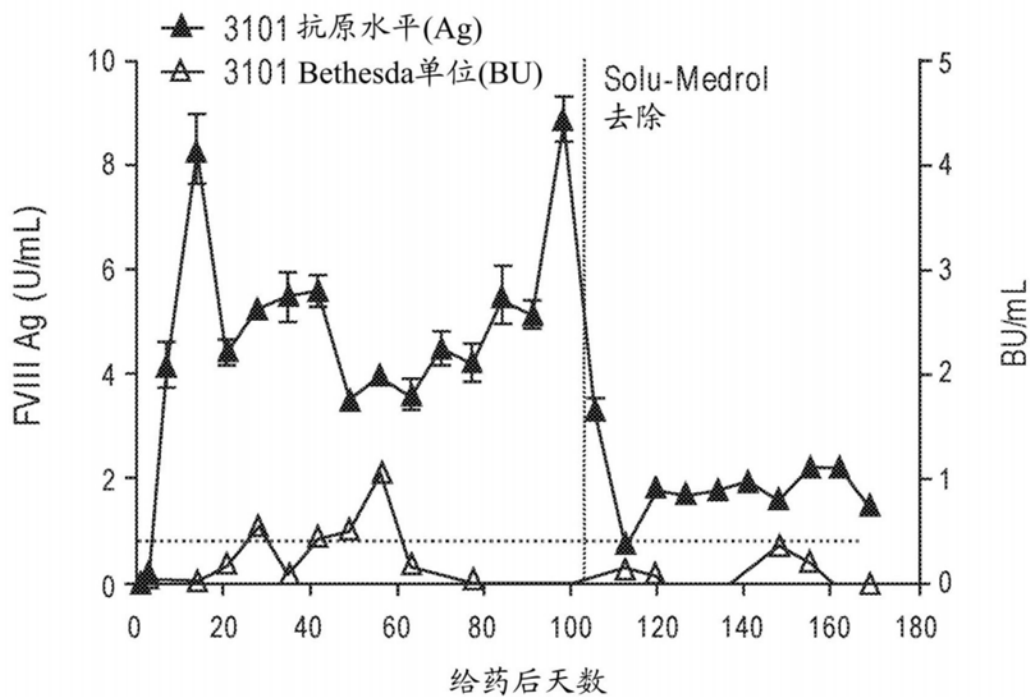


图 17A

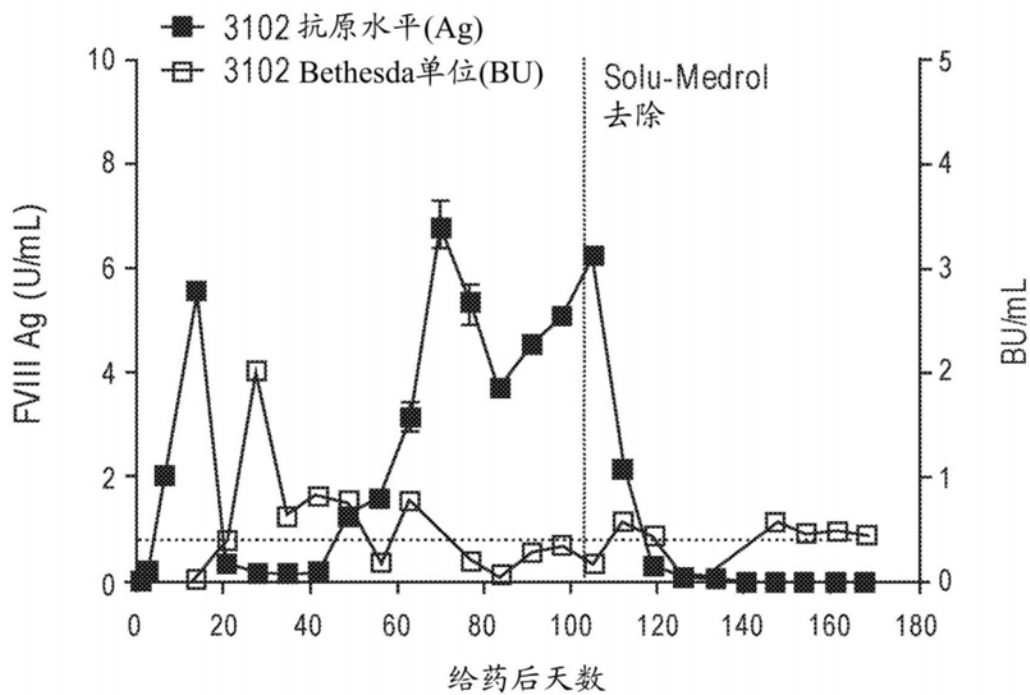


图 17B

## 第3组, AAV2/6, 6E+12 vg/kg

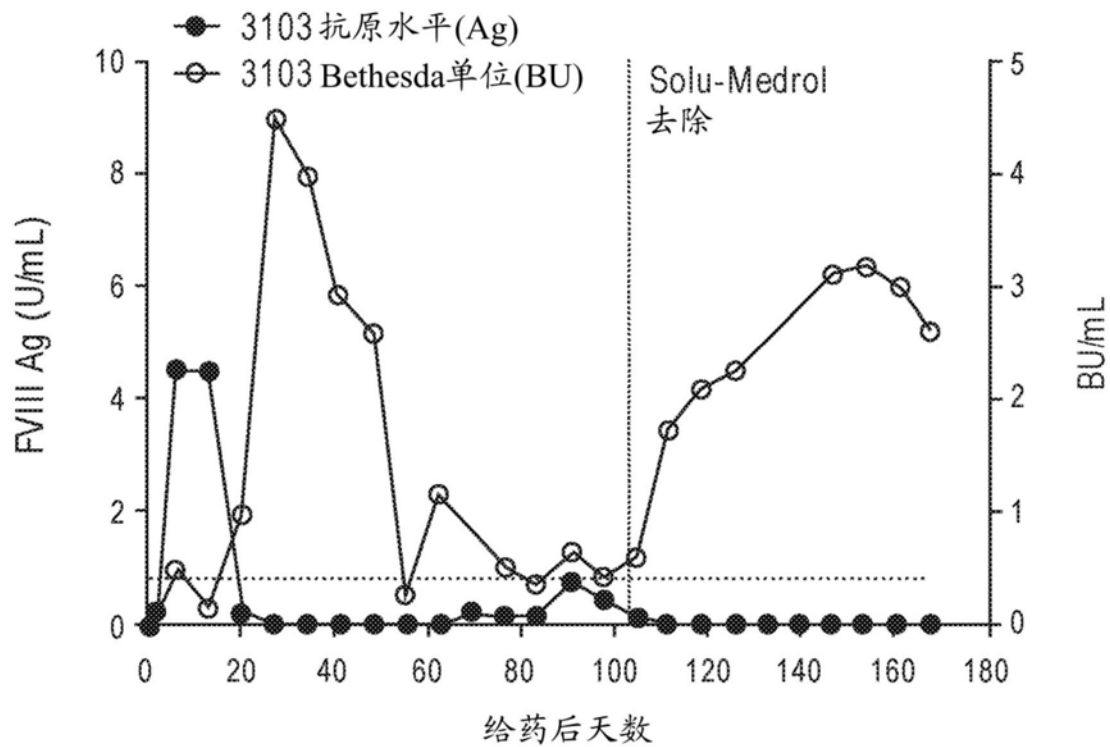


图17C

第4组, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

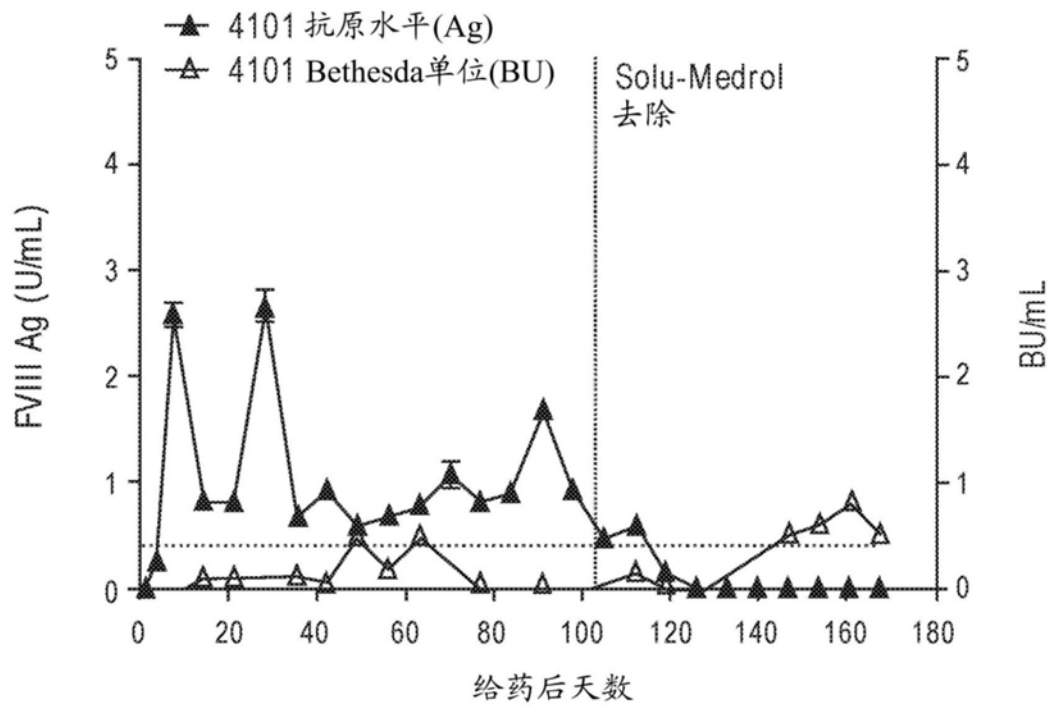


图 18A

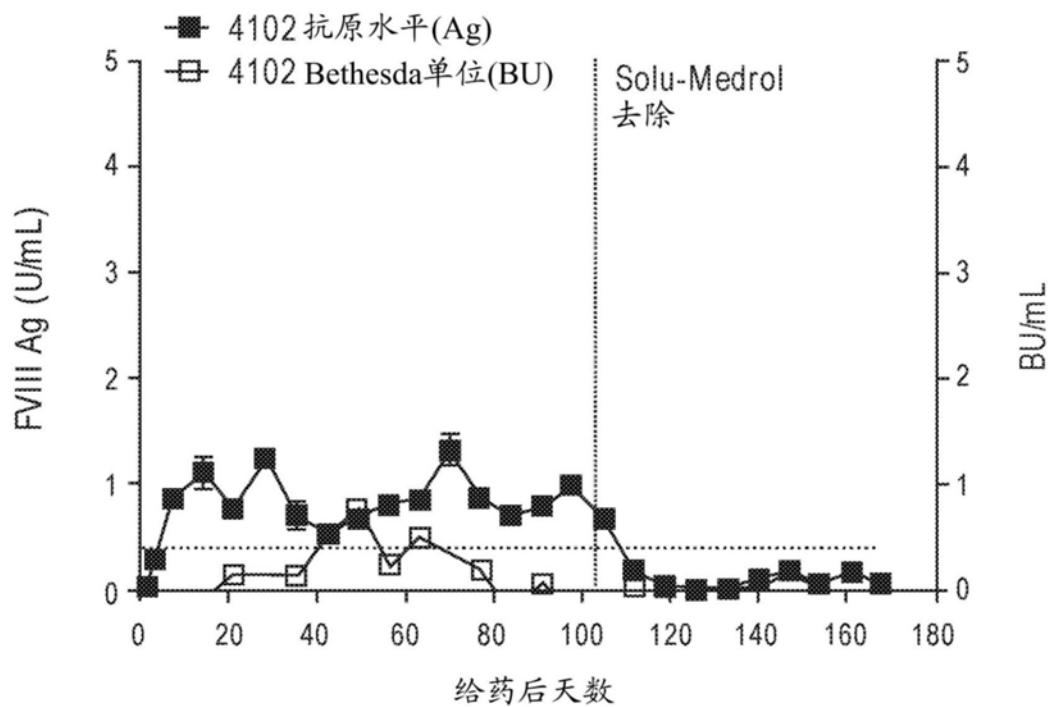


图 18B

第4组, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

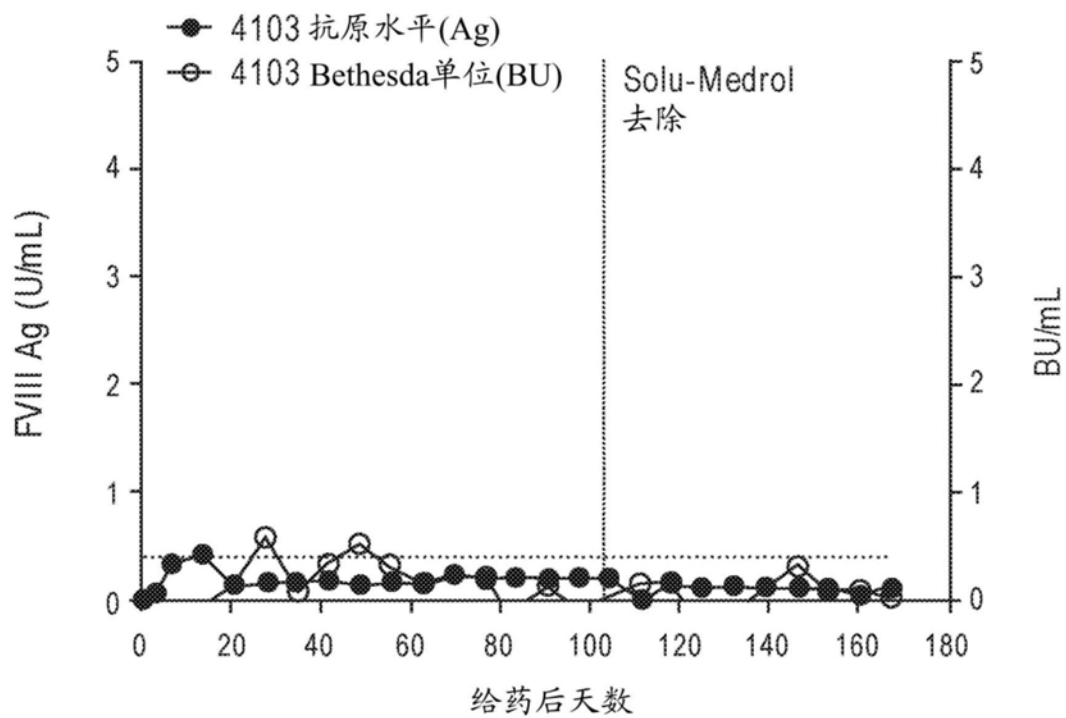


图 18C

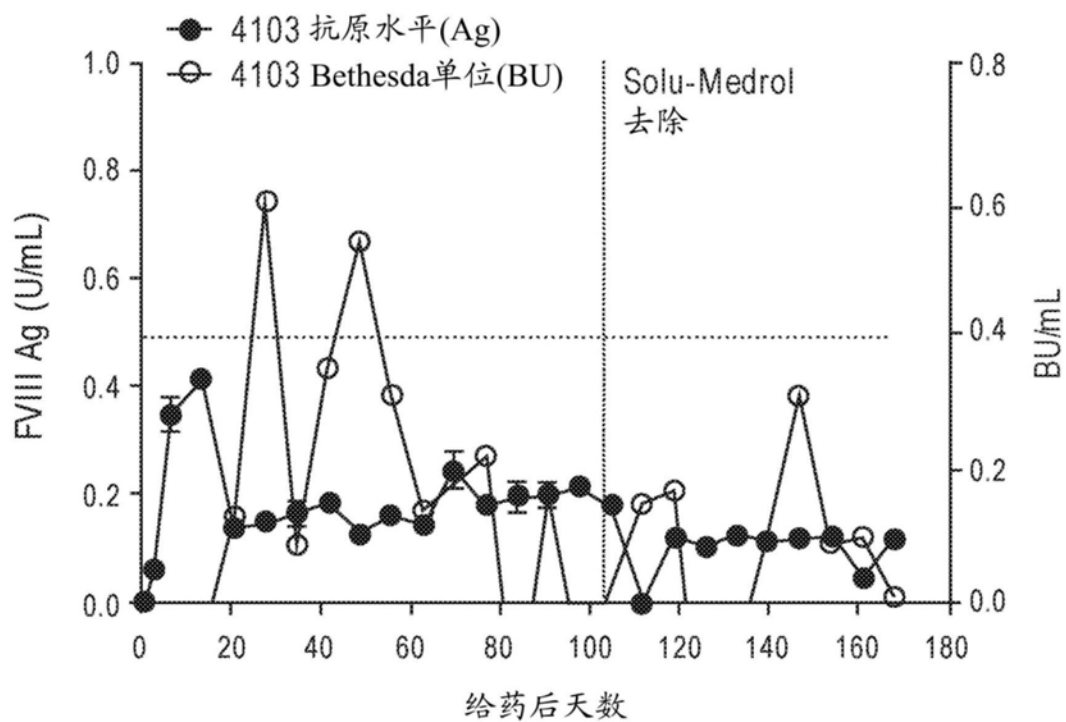


图 18D

## 第5组, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

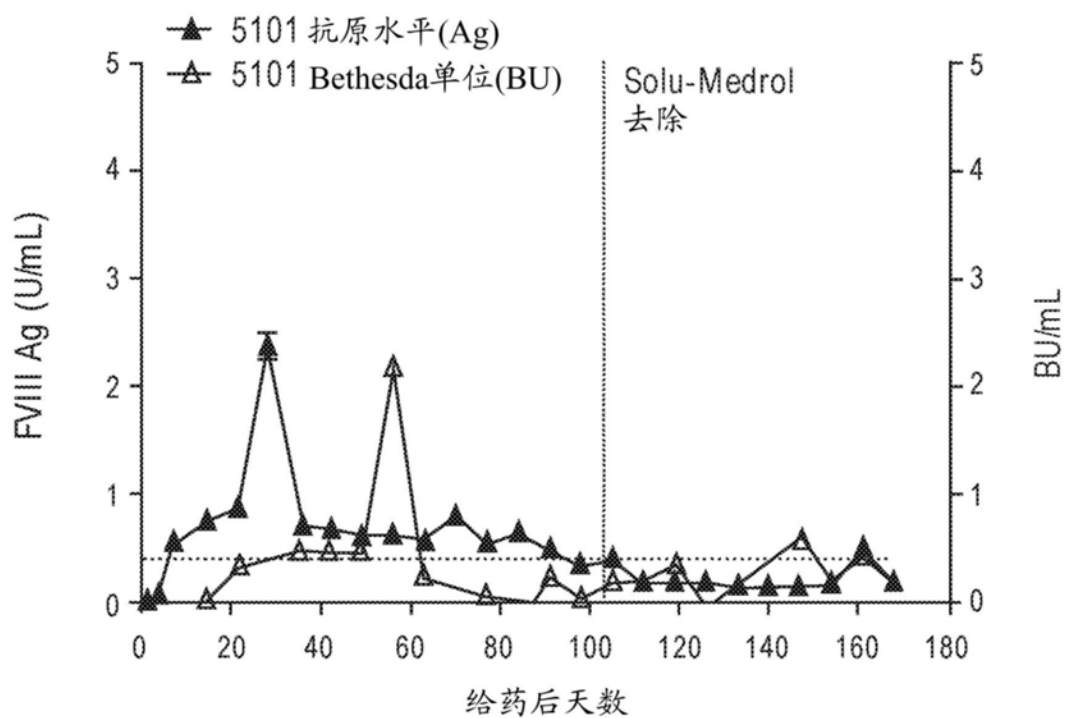


图 19A

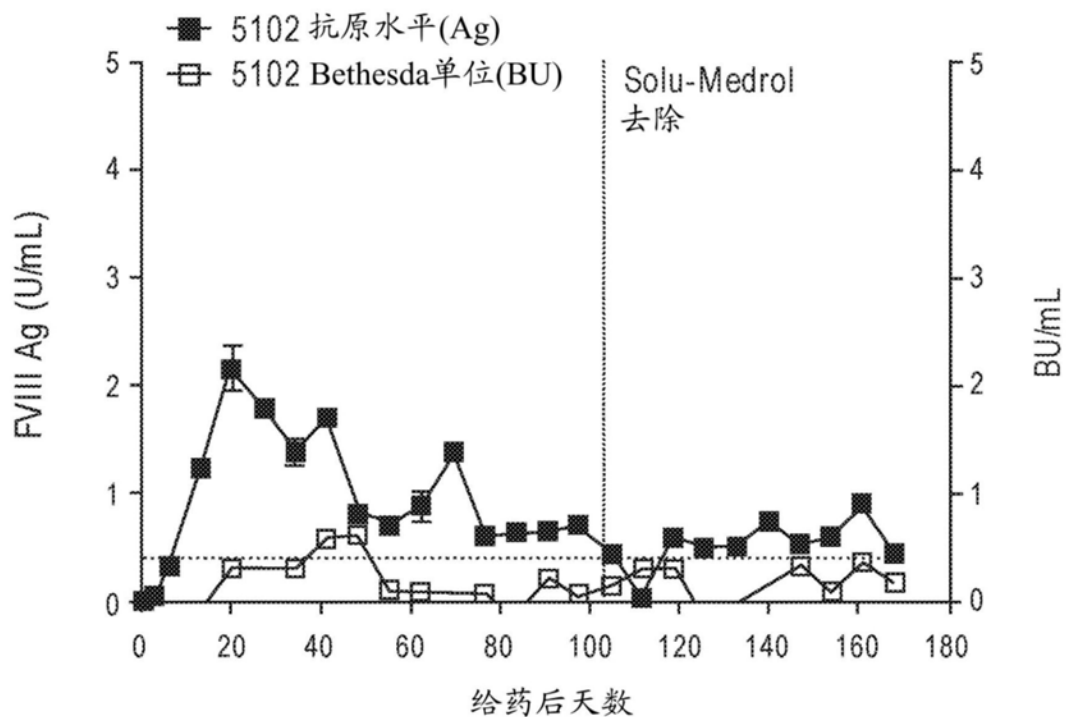


图 19B

## 第5组, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

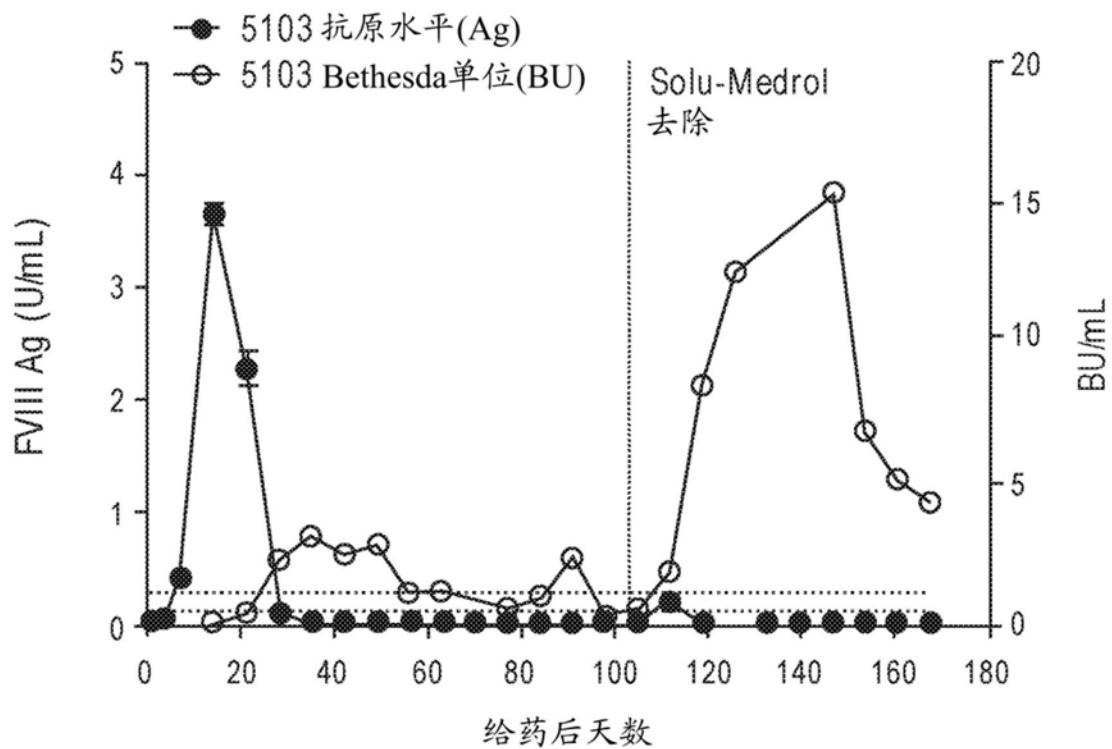


图19C



## 第5组, AAV2/8, 6E+12 vg/kg

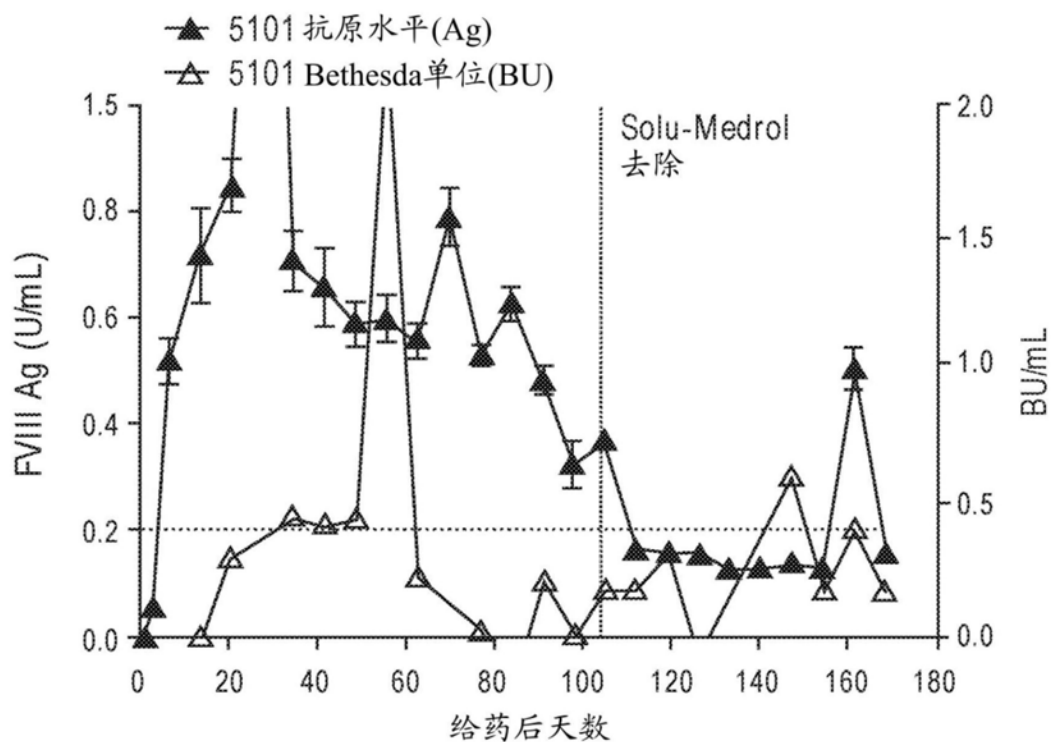


图 19D

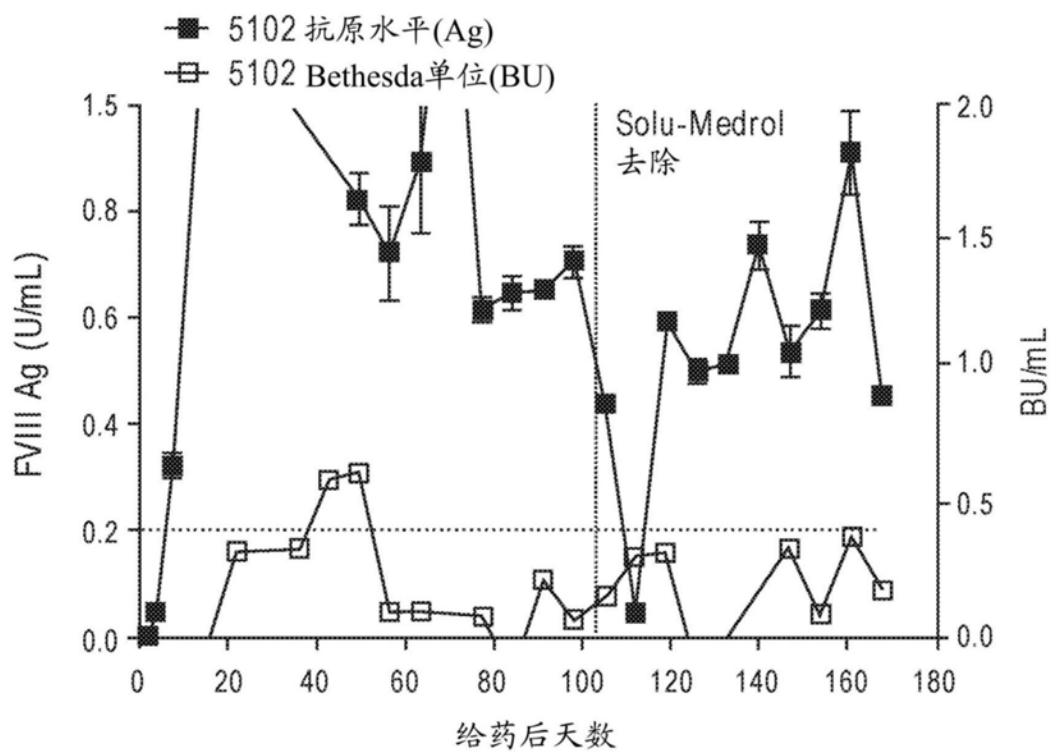


图 19E

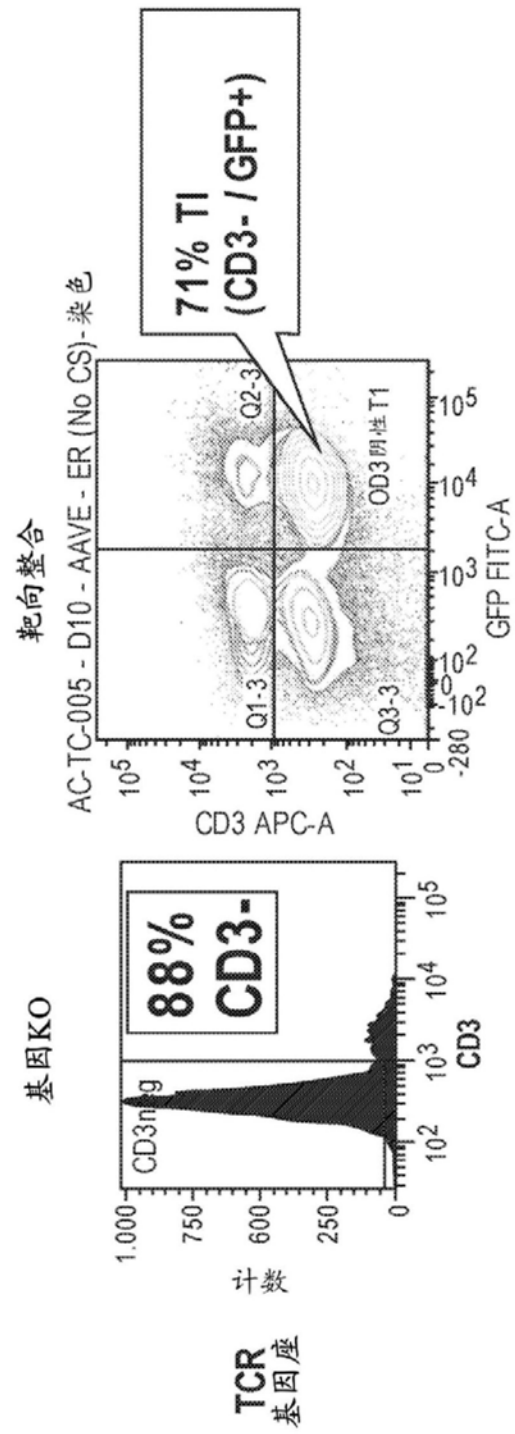


图20A

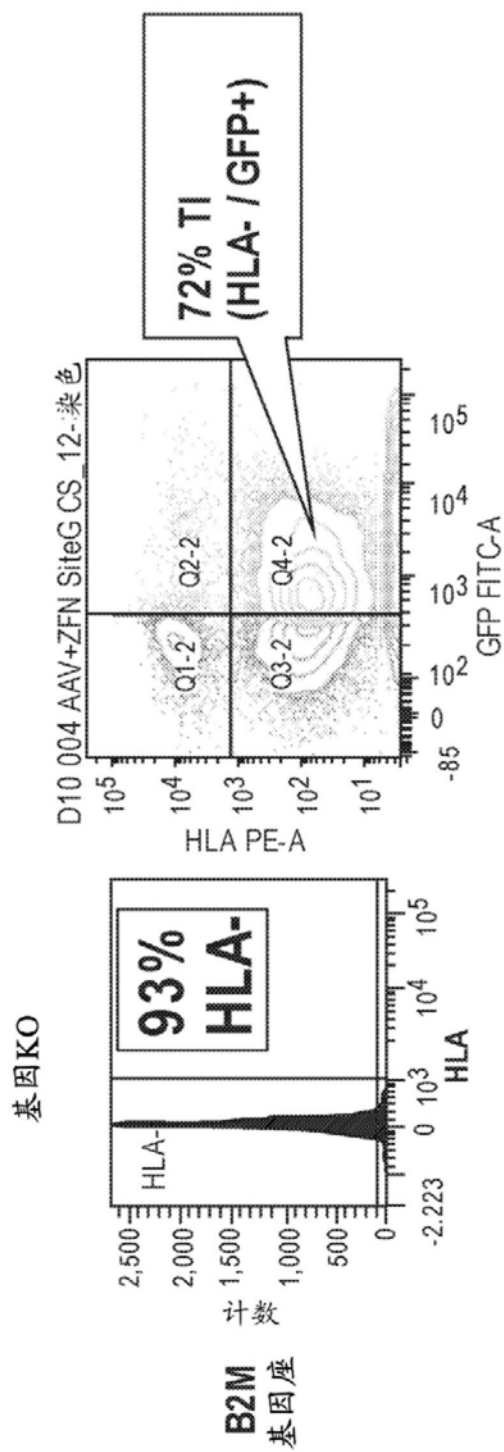


图20B

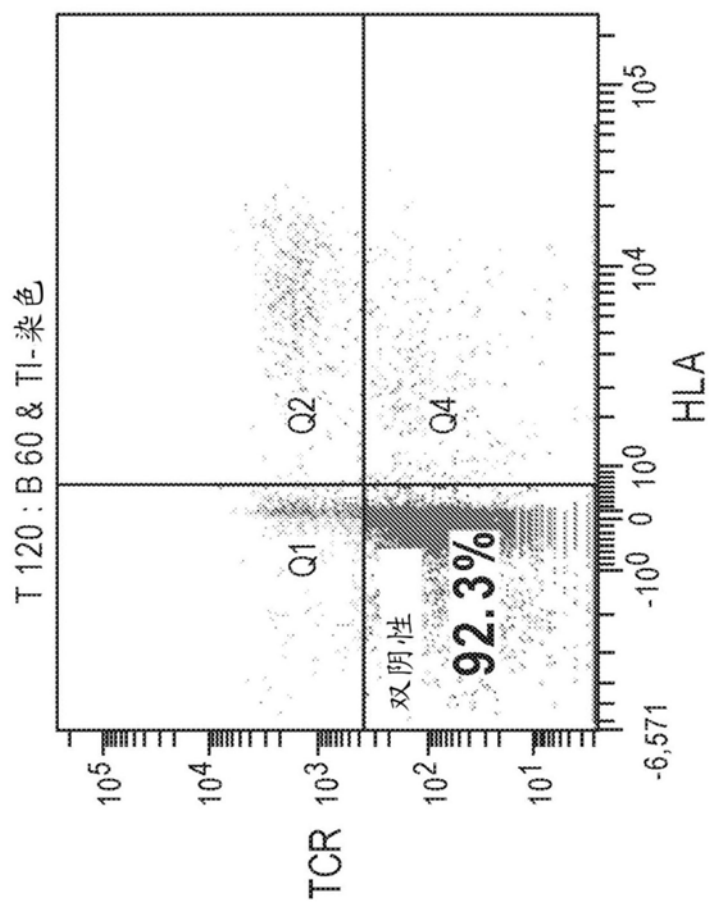


图20C

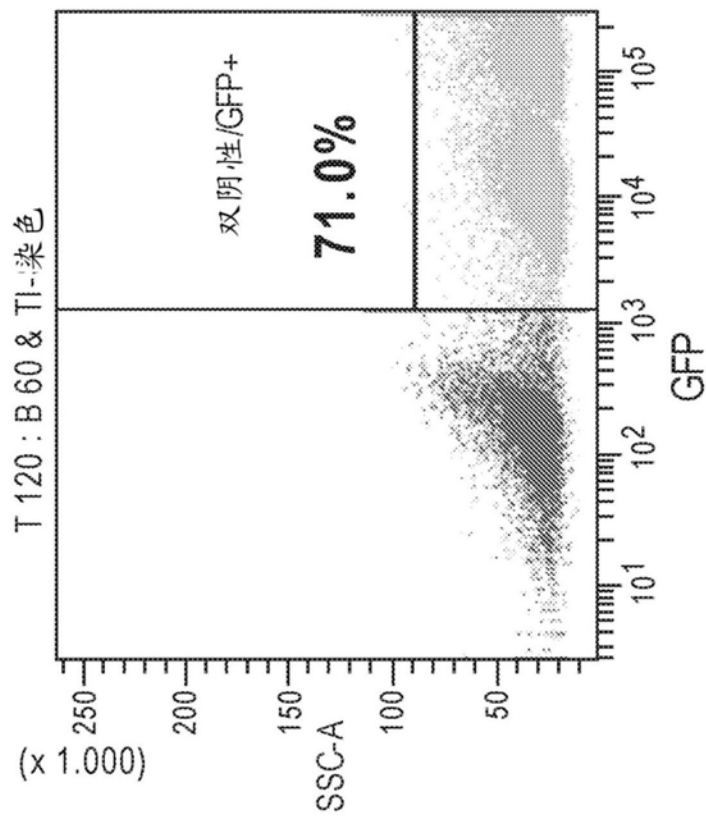


图20D