(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119095953 A
(43)申请公布日 2024.12.06

(21)申请号 202380022625.5

(22)申请日 2023.02.16

(30)优先权数据
63/311,707 2022.02.18 US
63/426,138 2022.11.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/062757 2023.02.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/159136 EN 2023.08.24

(71)申请人 丹娜-法伯癌症研究院
地址 美国马萨诸塞州
申请人 儿童医学中心公司

(72)发明人 P·杰诺韦塞 G·卡西拉蒂

(74)专利代理机构 北京市路盛律师事务所 11326
专利代理师 冯云 李宓

(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 5/0789(2010.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 15/54(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/55(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
C12N 9/78(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 9/12(2006.01)
C07K 14/715(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

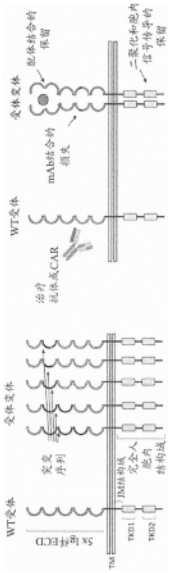
权利要求书10页 说明书110页 附图165页

(54)发明名称

细胞表面受体的表位工程

(57)摘要

具有一个或多个遗传编辑的细胞表面蛋白基因的遗传工程化的造血细胞诸如造血干细胞及其单独或与靶向所述细胞表面蛋白的免疫疗法组合的治疗用途。



CN 119095953 A

1.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的FLT3基因,其中所述遗传工程化的FLT3基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗FLT3抗体的结合降低。

2.如权利要求1所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的FLT3基因包含所述FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。

3.如权利要求2所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。

4.如权利要求3所述的遗传工程化的HSPC,其中在N399位置处的所述突变是N399D或N399G。

5.如权利要求1所述的遗传工程化的HSPC,其中所述治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。

6.如权利要求1所述的遗传工程化的HSPC,其中所述治疗抗FLT3抗体是具有与4G8抗体相同的六个CDR或与4G8抗体竞争的抗体。

7.如权利要求1所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

8.如权利要求7所述的遗传工程化的HSPC,其中所述核酸酶是化脓性链球菌Cas9(SpCas9)、金黄色葡萄球菌(SaCas9)、毛螺菌科细菌Cas12a(LbCas12a)或氨基酸球菌属某种BV3L6(AsCas12a)。

9.如权利要求8所述的遗传工程化的HSPC,其中所述CRISPR系统包含SpCas9。

10.如权利要求8或权利要求9所述的遗传工程化的HSPC,其中所述引导核酸选自由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16组成的组。

11.如权利要求10所述的遗传工程化的HSPC,其中CRISPR系统还包含模板DNA。

12.如权利要求11所述的遗传工程化的HSPC,其中所述模板DNA选自由SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组。

13.如权利要求7所述的遗传工程化的HSPC,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

14.如权利要求13所述的遗传工程化的HSPC,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

15.如权利要求14所述的遗传工程化的HSPC,其中所述核苷酸脱氨酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

16.如权利要求13所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

17.如权利要求13-16中任一项所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

18.如权利要求17所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

19.如权利要求13-18中任一项所述的遗传工程化的HSPC,其中所述引导RNA选自由SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:23组成的组。

20.如权利要求1所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的FLT3基因编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的多肽。

21.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如权利要求1-20中任一项所述的

遗传工程化的HSPC。

22.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求21所述的遗传工程化的造血干细胞群,和

(b)治疗有效量的包含有抗FLT3抗体结合结构域或包含所述抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段的至少一种剂。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗FLT3抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

24.如权利要求22所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)或T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)。

25.如权利要求22所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

26.如权利要求25所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

27.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的CD123基因,其中所述遗传工程化的CD123基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗CD123抗体的结合降低。

28.如权利要求27所述的遗传工程化的HSPC,其中所述治疗抗CD123抗体是克隆7G3抗体或其人源化对应物CSL362。

29.如权利要求28所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的CD123基因包含所述CD123基因的外显子2中的至少一个突变。

30.如权利要求29所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。

31.如权利要求30所述的遗传工程化的HSPC,其中在S59处的所述突变是S59P或S59F。

32.如权利要求27所述的遗传工程化的HSPC,其中所述治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆6H6抗体或抗CD123克隆S18016F抗体。

33.如权利要求32所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的CD123基因包含所述CD123基因的外显子3中的至少一个突变。

34.如权利要求32所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的CD123基因的外显子3中的至少一个突变导致在位置P88处带有突变的多肽。

35.如权利要求34所述的遗传工程化的HSPC,其中在P88处的所述突变是P88L或P88S。

36.如权利要求31所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

37.如权利要求36所述的遗传工程化的HSPC,其中所述引导核酸选自由SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34组成的组。

38.如权利要求35所述的遗传工程化的HSPC,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

39.如权利要求38所述的遗传工程化的HSPC,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

40.如权利要求38所述的遗传工程化的HSPC,其中所述碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

41.如权利要求38所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

42.如权利要求37-41中任一项所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

43.如权利要求42所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

44.如权利要求27所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的CD123基因编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58的多肽。

45.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如权利要求27-44中任一项所述的遗传工程化的HSPC。

46.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求45所述的遗传工程化的造血干细胞群,和

(b)治疗有效量的包含有抗CD123抗体结合结构域或包含所述抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段的至少一种剂。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

48.如权利要求46所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。

49.如权利要求46所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

50.如权利要求49所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

51.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:

(i)遗传工程化的FLT3基因,其中所述遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体结合降低的蛋白质,以及

(ii)遗传工程化的CD123基因,其中所述遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体结合降低的蛋白质。

52.如权利要求51所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的FLT3基因包含所述FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。

53.如权利要求52所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。

54.如权利要求51所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的CD123基因包含所述CD123基因的外显子2中的至少一个突变。

55.如权利要求54所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。

56.如权利要求51所述的HSPC群,其中所述治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。

57.如权利要求51所述的HSPC群,其中所述治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆7G3抗体或CSL362抗体。

58.如权利要求51所述的HSPC群,其中所述HSPC群是使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

59.如权利要求58所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20和2)SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:27。

60.如权利要求59所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:27。

61.如权利要求58所述的HSPC群,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

62.如权利要求61所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

63.如权利要求61所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

64.如权利要求61所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

65.如权利要求61至64中任一项所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

66.如权利要求65所述的HSPC群,其中所述SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

67.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求51-66中任一项所述的HSPC群,和

(b)治疗有效量的至少一种剂,所述至少一种剂包含以下中之一者或两者:(1)抗FLT3抗体结合结构域或包含所述抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗CD123抗体结合结构域或包含所述抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段。

68.如权利要求67所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗FLT3抗体结合结构域和/或所述抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

69.如权利要求67所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。

70.如权利要求67所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

71.如权利要求70所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

72.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的KIT基因,其中所述遗传工程化的KIT基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗KIT抗体的结合降低。

73.如权利要求72所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的KIT基因包含所述KIT基因的外显子7中的至少一个突变。

74.如权利要求73所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。

75.如权利要求74所述的遗传工程化的HSPC,其中在位置H378处的所述突变是H378R。

76.如权利要求72所述的遗传工程化的HSPC,其中所述治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。

77.如权利要求72所述的遗传工程化的HSPC,其中所述遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

78.如权利要求72所述的遗传工程化的HSPC,其中所述引导核酸选自由SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39组成的组。

79.如权利要求77所述的遗传工程化的HSPC,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

80.如权利要求79所述的遗传工程化的HSPC,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

81.如权利要求79所述的遗传工程化的HSPC,其中所述碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

82.如权利要求79所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

83.如权利要求79-82中任一项所述的遗传工程化的HSPC,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

84.如权利要求83所述的遗传工程化的HSPC,其中所述SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

85.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如权利要求72-84中任一项所述的遗传工程化的HSPC。

86.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求85所述的遗传工程化的造血干细胞群,和

(b)治疗有效量的包含有所述抗KIT抗体结合结构域或包含所述抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段的至少一种剂。

87.如权利要求86所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗KIT抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

88.如权利要求86所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)或T急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)。

89.如权利要求86所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

90.如权利要求89所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

91.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:

(i)遗传工程化的KIT基因,其中所述遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体结合降低的蛋白质,和

(ii)遗传工程化的CD123基因,其中所述遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体结合降低的蛋白质。

92.如权利要求91所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的KIT基因包含所述KIT基因的

外显子7中的至少一个突变。

93.如权利要求92所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。

94.如权利要求91所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的CD123基因包含所述CD123基因的外显子2中的至少一个突变。

95.如权利要求94所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。

96.如权利要求91所述的HSPC群,其中所述治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。

97.如权利要求91所述的HSPC群,其中所述治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆7G3抗体或CSL362抗体。

98.如权利要求91所述的HSPC群,其中所述HSPC群是使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

99.如权利要求98所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39和2)SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:27。

100.如权利要求99所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:27。

101.如权利要求98所述的HSPC群,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

102.如权利要求101所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

103.如权利要求101所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

104.如权利要求101所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

105.如权利要求101至104中任一项所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

106.如权利要求105所述的HSPC群,其中所述SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

107.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求91-106中任一项所述的HSPC群,和

(b)治疗有效量的至少一种剂,所述至少一种剂包含以下中的一者或两者:(1)抗KIT抗体结合结构域或包含所述抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗CD123抗体结合结构域或包含所述抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段。

108.如权利要求107所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗KIT抗体结合结构域和/或所述抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

109.如权利要求107所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。

110.如权利要求107所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

111.如权利要求110所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

112.一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:

(i)遗传工程化的FLT3基因,其中所述遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体结合降低的蛋白质,以及

(ii)遗传工程化的KIT基因,其中所述遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体结合降低的蛋白质。

113.如权利要求112所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的FLT3基因包含所述FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。

114.如权利要求113所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。

115.如权利要求112所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的KIT基因包含所述KIT基因的外显子7中的至少一个突变。

116.如权利要求115所述的HSPC群,其中所述遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。

117.如权利要求112所述的HSPC群,其中所述治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。

118.如权利要求112所述的HSPC群,其中所述治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。

119.如权利要求112所述的HSPC群,其中所述HSPC群是使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。

120.如权利要求119所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20和2)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39。

121.如权利要求120所述的HSPC群,其中所述至少两种引导核酸是SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:37。

122.如权利要求119所述的HSPC群,其中所述核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。

123.如权利要求122所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。

124.如权利要求122所述的HSPC群,其中所述碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。

125.如权利要求122所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。

126.如权利要求122至125中任一项所述的HSPC群,其中所述催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。

127.如权利要求126所述的HSPC群,其中所述SpCas9还包含在位置K918N处的突变。

128.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)如权利要求112-127中任一项所述的HSPC群,和

(b)治疗有效量的至少一种剂,所述至少一种剂包含以下中的一者或两者:(1)抗FLT3抗体结合结构域或包含所述抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗KIT抗体结合结构域或包含所述抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段。

129.如权利要求128所述的方法,其中所述至少一种剂包含有包含所述抗FLT3抗体结

合结构域和/或所述抗KIT抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。

130.如权利要求128所述的方法,其中所述造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。

131.如权利要求128所述的方法,所述方法还包括从来自所述人受试者的生物样品中获得HSPC,并且对来自所述人受试者的所述生物样品中的所述HSPC进行遗传工程化,从而形成所述遗传工程化的HSPC群。

132.如权利要求131所述的方法,其中所述生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

133.一种包含多肽的嵌合抗原受体(CAR),其包含:

(a)与一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白的表位结合的一个或多个表位结合片段、

(b)铰链结构域、

(c)跨膜结构域、

(d)共刺激结构域,以及

(e)细胞质信号传导结构域,

其中所述一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白选自FLT3、CD123和/或KIT。

134.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3并且所述CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:73。

135.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3并且所述一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:73的一个或多个表位结合片段。

136.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3并且所述一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)和QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)。

137.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是CD123并且所述CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87。

138.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是CD123并且所述一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的一个或多个表位结合片段。

139.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是CD123并且所述一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。

140.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是CD123并且所述一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。

141.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是KIT并且所述CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:71。

142.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是KIT并且所述一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:71的一个或多个表位结合片段。

143.如权利要求133所述的CAR,其中所述细胞表面谱系特异性蛋白是KIT并且所述一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GFNISVYMMH(SEQ ID NO:88)、SIYPYSGYTYYADSVKG(SEQ ID NO:89)、ARYVYHALDY(SEQ ID NO:90)、RASQRGLRNVAVA(SEQ ID NO:91)、SASSLYS(SEQ ID NO:92)和QQWAVHSLIT(SEQ ID NO:93)。

144.如权利要求133所述的CAR,其中所述一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123并且所述CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79。

145.如权利要求133所述的CAR,其中所述一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123并且所述一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79的一个或多个表位结合片段。

146.如权利要求133所述的CAR,其中所述一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123并且所述一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)、QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)、GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。

147.如权利要求133至146中任一项所述的CAR,其中所述铰链结构域是CD28铰链、IgG4铰链或CD8α铰链。

148.如权利要求133至147中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域是CD28 TM、CD8α TM或4-1BB TM。

149.如权利要求133至148中任一项所述的CAR,其中所述共刺激结构域是CD28z、4-1BB、ICOS或OX40。

150.如权利要求133至149中任一项所述的CAR,其中所述细胞质信号传导结构域是CD3z。

151.一种表达如权利要求133-150中任一项所述的CAR的细胞。

152.如权利要求151所述的细胞,其中所述细胞是免疫细胞。

153.如权利要求152所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞。

154.一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:

(a)遗传工程化的造血干细胞群,和

(b)如权利要求151-153中任一项所述的细胞。

155.一种包含与SEQ ID NO:51中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在N399D处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。

156.一种包含与SEQ ID NO:52中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在N399G处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。

157.一种包含与SEQ ID NO:54中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在S59P处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

158.一种包含与SEQ ID NO:55中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在Y58H和S59P处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

159.一种包含与SEQ ID NO:56中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在S59F处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

160.一种包含与SEQ ID NO:57中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在P88S处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

161.一种包含与SEQ ID NO:58中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在P88L处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

162.一种包含与SEQ ID NO:67中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D、E376Q和H378R处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。

163.一种包含与SEQ ID NO:68中所示的序列至少80％同一的多肽序列的多肽序列,其中所述多肽序列包含在H378R处的突变,并且其中所述多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。

164.一种编码如权利要求155-163中任一项所述的多肽的核酸。

细胞表面受体的表位工程

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年2月18日提交的美国临时申请号63/311,707和于2022年11月17日提交的美国临时申请号63/426,138的优先权权益,所述申请的内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本文提供了具有一个或多个遗传编辑的细胞表面蛋白基因的遗传工程化的造血细胞(诸如造血干细胞),其可与免疫疗法(即细胞毒性剂,诸如嵌合抗原受体T细胞)组合使用,及其治疗用途。

背景技术

[0004] 基因转移技术的创新使得重新编程免疫细胞以靶向癌细胞上表达的分子成为可能。极其有希望的结果促使FDA批准了用于治疗B淋巴母细胞白血病的首个过继性细胞免疫疗法,称为CD19 CAR-T细胞。尽管这些成功有望彻底改变肿瘤学领域,但它们的应用受到了阻碍,因为大多数适合的候选者通常与健康的骨髓细胞共享,从而导致免疫抑制和严重的造血毒性。抗髓系/干细胞CAR-T诱导的毒性限制了它们在HSCT之前有限时间窗口内对挽救疗法的适用性,这可能不足以根除疾病。因此,有效靶向感兴趣的细胞(例如癌细胞)而不靶向或伤害正常细胞群仍是一个尚未满足的需求。

发明内容

[0005] 本公开一般涉及具有一个或多个遗传编辑的细胞表面蛋白基因的遗传工程化的造血细胞诸如造血干细胞,以及能够靶向相同细胞表面蛋白的嵌合抗原受体。

[0006] 在一个实施方案中,提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的FLT3基因,其中遗传工程化的FLT3基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗FLT3抗体的结合降低。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因包含FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。在一个实施方案中,在位置N399处的突变是N399D或N399G。在一个实施方案中,治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。在一个实施方案中,治疗抗FLT3抗体是具有与4G8抗体相同的六个CDR或与4G8抗体竞争的抗体。在一个实施方案中,遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。在一个实施方案中,核酸酶是化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)Cas9(SpCas9)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)(SaCas9)、毛螺菌科细菌(Lachnospiraceae bacterium)Cas12a(LbCas12a),或氨基酸球菌属某种(Acidaminococcus sp.)BV3L6(AsCas12a)。在一个实施方案中,CRISPR系统包含SpCas9。在一个实施方案中,引导核酸选自由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16组成的组。在一个实施方案中,CRISPR系统还包含模板DNA。在一个实施方案中,模板DNA选自由SEQ ID NO:40、SEQ

ID NO:41、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43组成的组。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,核苷酸脱氨酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在另一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9还包含在位置K918N处的突变。在一个实施方案中,引导RNA选自由SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:23组成的组。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的多肽。还提供了遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如上所述的遗传工程化的HSPC。在一些实施方案中,提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的遗传工程化的造血干细胞群,和(b)治疗有效量的包含有抗FLT3抗体结合结构域或包含抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段的至少一种剂。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗FLT3抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)或T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0007] 在一个实施方案中,还提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的CD123基因,其中遗传工程化的CD123基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗CD123抗体的结合降低。在一个实施方案中,治疗抗CD123抗体是克隆7G3抗体或其人源化对应物CSL362。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因包含CD123基因的外显子2中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。在一个实施方案中,在S59处的突变是S59P或S59F。在一个实施方案中,治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆6H6抗体或抗CD123克隆S18016F抗体。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因包含CD123基因的外显子3中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因的外显子3中的至少一个突变导致在位置P88处带有突变的多肽。在一个实施方案中,在P88处的突变是P88L或P88S。在一个实施方案中,遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。在一个实施方案中,引导核酸选自由SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34组成的组。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9还包含在位置K918N处的突变。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因编码包含氨基酸序列SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57或SEQ ID NO:58的多肽。本文还提供了遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如上所述的遗传工程化的HSPC。还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的遗传工程化的造血干细胞群,和(b)治疗有效量的包含有抗CD123抗体结合结构域或包含抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段

的至少一种剂。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0008] 在一些实施方案中,提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:(i)遗传工程化的FLT3基因,其中遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体的结合降低的蛋白质,和(ii)遗传工程化的CD123基因,其中遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体的结合降低的蛋白质。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因包含FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因包含CD123基因的外显子2中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。在一个实施方案中,治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。在一个实施方案中,治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆7G3抗体或CSL362抗体。在一个实施方案中,使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统对HSPC群进行遗传工程化。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20和2)SEQ ID NO:SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:27。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:27。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,SpCas9还包含在位置K918N处的突变。还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的HSPC群,和(b)治疗有效量的至少一种剂,其包含以下中的一者或两者:(1)抗FLT3抗体结合结构域或包含抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗CD123抗体结合结构域或包含抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗FLT3抗体结合结构域和/或抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0009] 在一个实施方案中,还提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC),其包含遗传工程化的KIT基因,其中遗传工程化的KIT基因被工程化使得其经编码的蛋白质与治疗抗KIT抗体的结合降低。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因包含KIT基因的外显子7中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。在一个实施方案中,在位置H378处的突变是H378R。在

一个实施方案中,治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。在一个实施方案中,遗传工程化的HSPC是使用包含引导核酸和核酸酶的CRISPR系统进行遗传工程化的。在一个实施方案中,引导核酸选自由SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39组成的组。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,其中碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,SpCas9还包含在位置K918N处的突变。还提供了遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含如上所述的遗传工程化的HSPC。还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的遗传工程化的造血干细胞群,和(b)治疗有效量的包含有抗KIT抗体结合结构域或包含抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段的至少一种剂。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗KIT抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)或T急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0010] 在一些实施方案中,还提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:(i)遗传工程化的KIT基因,其中遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体的结合降低的蛋白质,和(ii)遗传工程化的CD123基因,其中遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体的结合降低的蛋白质。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因包含KIT基因的外显子7中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因包含CD123基因的外显子2中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致在位置S59处带有突变的多肽。在一个实施方案中,治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。在一个实施方案中,治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆7G3抗体或CSL362抗体。在一个实施方案中,使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统对HSPC群进行遗传工程化。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39和2)SEQ ID NO:24或SEQ ID NO:27。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:27。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,SpCas9还包含在位置K918N处的突变。还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的HSPC群,和(b)治疗有效量的至少一种剂,其包含以下中的一者或两者:(1)抗KIT抗体结合结构域或包含抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗CD123抗体结合结构域或包含抗CD123结合结构域的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗KIT抗体结合结构域和/或抗CD123抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在

一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0011] 本文还提供了一种遗传工程化的造血干细胞(HSPC)群,其包含:(i)遗传工程化的FLT3基因,其中遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体的结合降低的蛋白质,和(ii)遗传工程化的KIT基因,其中遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体的结合降低的蛋白质。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因包含FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致在位置N399处带有突变的多肽。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因包含KIT基因的外显子7中的至少一个突变。在一个实施方案中,遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。在一个实施方案中,治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。在一个实施方案中,治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。在一个实施方案中,使用包含至少两种引导核酸和一种核酸酶的CRISPR系统对HSPC群进行遗传工程化。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是1)SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:20和2)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37,SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:39。在一个实施方案中,至少两种引导核酸是SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:37。在一个实施方案中,核酸酶是与碱基编辑器酶连接的催化受损的SpCas9。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是核苷酸脱氨酶。在一个实施方案中,碱基编辑器酶是胞嘧啶脱氨酶或腺苷脱氨酶。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9是NG-SpCas9或SpRY-SpCas9。在一个实施方案中,催化受损的SpCas9包含在位置D10A处的突变。在一个实施方案中,SpCas9还包含在位置K918N处的突变。还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)如上所述的HSPC群,和(b)治疗有效量的至少一种剂,其包含以下中的一者或两者:(1)抗FLT3抗体结合结构域或包含抗FLT3结合结构域的抗体或抗体片段,和/或(2)抗KIT抗体结合结构域或包含抗KIT结合结构域的抗体或抗体片段。在一个实施方案中,至少一种剂包含有包含抗FLT3抗体结合结构域和/或抗KIT抗体结合结构域的嵌合抗原受体-T(CAR-T)细胞。在一个实施方案中,造血系统恶性肿瘤是B淋巴母细胞白血病(BLL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。在一个实施方案中,所述方法还包括从来自人受试者的生物样品中获得HSPC以及对来自人受试者的生物样品中的HSPC进行遗传工程化,从而形成遗传工程化的HSPC群。在一个实施方案中,生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞、或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0012] 在一些实施方案中,还提供了一种包含多肽的嵌合抗原受体(CAR),所述多肽包含:(a)与一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白的表位结合的一个或多个表位结合片段、(b)铰链结构域、(c)跨膜结构域、(d)共刺激结构域,和(e)细胞质信号传导结构域,其中一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白选自FLT3、CD123和/或KIT。

[0013] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3,并且CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:73。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3,并且一个或多个表位

结合片段包括来自SEQ ID NO:73的一个或多个表位结合片段。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3,并且一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)和QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:86或SEQ ID NO:87的一个或多个表位结合片段。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是KIT,并且CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:71。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是KIT,并且一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:69或SEQ ID NO:71的一个或多个表位结合片段。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是KIT,并且一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GFNISVYMMH(SEQ ID NO:88)、SIYPYSGYTYYADSVKG(SEQ ID NO:89)、ARYVYHALDY(SEQ ID NO:90)、RASQRGLRNVAVA(SEQ ID NO:91)、SASSLYS(SEQ ID NO:92)和QQWAVHSLIT(SEQ ID NO:93)。在一些实施方案中,一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123,并且CAR包含氨基酸序列SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79。在一些实施方案中,一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123,并且一个或多个表位结合片段包括来自SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:79的一个或多个表位结合片段。在一些实施方案中,一个或多个细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123,并且一个或多个表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)、QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)、GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。在上述任何CAR的一些实施方案中,铰链结构域是CD28铰链、IgG4铰链或CD8α铰链。在上述任何CAR的一些实施方案中,跨膜结构域是CD28 TM、CD8α TM或4-1BB TM。在上述任何CAR的一些实施方案中,共刺激结构域是CD28z、4-1BB、ICOS或OX40。在上述任何CAR的一些实施方案中,其中细胞质信号传导结构域是CD3z。

[0014] 本文还提供了表达任何上述CAR的细胞。在一些实施方案中,所述细胞是免疫细胞。在一些实施方案中,所述免疫细胞是T细胞。

[0015] 本文还提供了一种治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向人受试者施用:(a)遗传工程化的造血干细胞群(诸如上述那些中的任一种),和(b)表达任何上述CAR的细胞(诸如免疫细胞)。

[0016] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:51中所示的序列至少80%同一的多肽序列

的多肽序列,其中多肽序列包含在N399D处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。

[0017] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:52中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在N399G处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。

[0018] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:54中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在S59P处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

[0019] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:55中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在Y58H和S59P处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

[0020] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:56中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在S59F处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

[0021] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:57中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在P88S处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

[0022] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:58中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在P88L处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。

[0023] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:67中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D、E376Q和H378R处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。

[0024] 本文还提供了一种包含与SEQ ID NO:68中所示的序列至少80%同一的多肽序列的多肽序列,其中多肽序列包含在H378R处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。

[0025] 本文还提供了编码任何上述多肽的核酸。

[0026] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;也可以使用本领域已知的其他适合的方法和材料。所述材料、方法和实例仅是说明性的而不是旨在限制。本文提到的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献均通过引用整体并入。如有冲突,以本说明书(包括定义)为准。

[0027] 本发明的其他特征和优势将从以下具体实施方式和附图以及权利要求书中显而易见。

附图说明

[0028] 图1描述了由基因诸如FLT3或KIT编码的细胞因子受体的结构。图1(左)举例说明了通过在胞外结构域引入突变来消除治疗抗体结合的表位工程化方法。图1(右)示出了表位工程化的表面蛋白的主要特征:抗体识别损失,但保留配体亲和力、蛋白质功能和细胞内

信号转导。

[0029] 图2左侧是睡美人转座酶实验的示意图,其包括转移载体设计,以将所需受体变体的cDNA序列引入人或鼠类细胞系中,以评估不同抗体克隆对此类变体的识别或通过流式细胞术测量配体亲和力。使用Lonza 4D-Nucleofector用100ng转移质粒和500ng pSB100x转座酶对K562细胞进行电穿孔。图2右侧示出了用人野生型FLT3(hFLT3)、鼠类FLT3(mFLT3)和表位修饰的变体eFLT3-01通过睡美人转座酶转导的K562细胞的流式细胞术图,所述eFLT3-01在胞外结构域4内具有氨基酸取代。转导的细胞通过mCherry荧光(y轴)进行鉴定。用FLT3 BV10A4克隆(对照抗体,结合ECD2)、FLT34G8治疗克隆(结合ECD4)、抗鼠类FLT3抗体和AF488缀合物人FLT3L对细胞进行染色,以评估结合亲和力。

[0030] 图3顶部是人FLT3胞外结构域4与几种动物物种直系同源基因的序列比对。黑色矩形突出显示了在eFLT3-01中已发生突变并且包含在图5所示出的组合文库中的较低保守性的残基。图3底部是人KIT胞外结构域4与几种动物物种直系同源基因的序列比对。黑色矩形突出显示了在eKIT-01中已发生突变并且预计会对由克隆Fab79D结合的表位做出贡献的较低保守性的残基。

[0031] 图4A是示出用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色睡美人转导的K562细胞的流式细胞术图。eFLT3-01变体过表达示出缺乏由4G8克隆的识别,而野生型FLT3由治疗Ab和对照Ab两者结合。

[0032] 图4B是示出通过睡美人转导的K562细胞的荧光FLT3-配体结合的流式细胞术图。将细胞与AF488缀合的人FLT3L和识别ECD2的对照抗体BV10A4一起孵育。图中报告了对照抗体与AF488缀合的人FLT3L之间的MFI比率。eFLT3-01变体表现出与野生型FLT3相当的配体结合亲和力。

[0033] 图4C是睡美人转导的K562细胞蛋白质提取物的蛋白质印迹。将细胞置于血清饥饿状态16h,然后用FLT3L 100ng/mL刺激或不进行刺激并且裂解以获得蛋白质提取物。用识别FLT3胞外结构域、磷酸化FLT3 Y589-591或肌动蛋白(对照)的抗体探测K562(未转导的)、过表达野生型FLT3的K562和过表达eFLT3-01的K562。eFLT3-01变体在响应FLT3L刺激时示出类似于野生型FLT3的激酶结构域磷酸化。

[0034] 图5(左上)示出了在睡美人质粒中克隆的FLT3组合文库的设计。图5(左下)示出了通过野生型FLT3或FLT3组合文库转导的,且用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)染色的K562细胞的流式细胞术图。对分选的单阳性和双阳性细胞的NGS测序突出显示了仅在分选的单阳性样品中存在N399D突变。图5(右)是通过睡美人转导在K562细胞中过表达的FLT3 N399D突变的验证。用BV10A4和4G8克隆共染色示出缺乏由后者的结合,而用AF488缀合的FLT3L评估则保留了配体亲和力。

[0035] 图6A是示出用对照抗体(克隆104D2)和治疗抗体(克隆Fab79D)共染色睡美人转导的NIH3T3细胞的流式细胞术图。eKIT-01变体过表达示出缺乏由Fab79D克隆的Ab识别,而野生型KIT由治疗Ab和对照Ab两者结合。

[0036] 图6B是示出通过睡美人转导的NIH3T3细胞的荧光SCF结合的流式细胞术图。将细胞与AF488缀合的人SCF和对照抗体104D2一起孵育。图中报告了对照抗体与AF488缀合的人SCF之间的MFI比率。eKIT-01变体表现出与野生型KIT相当的配体结合亲和力。

[0037] 图6C是睡美人转导的NIH3T3细胞蛋白质提取物的蛋白质印迹。将细胞置于血清饥

饿状态16h,然后用SCF 100ng/mL刺激或不进行刺激并且裂解以获得蛋白质提取物。用识别KIT胞外结构域、磷酸化KIT Y719或肌动蛋白(对照)的抗体探测NIH3T3(未转导的)、过表达野生型KIT的NIH3T3和过表达eKIT-01的NIH3T3。eKIT-01变体在响应SCF刺激时示出类似于野生型KIT的激酶结构域磷酸化。

[0038] 图6D报告了用除了野生型KIT之外具有几种突变的KIT变体的睡美人系统转导的HEK-293T细胞的流式细胞术图。用对照抗体(克隆104D2)和治疗抗体(Fab79D)对细胞进行染色,以鉴定最佳候选突变,以消除Fab79D结合,同时保留表面表达。

[0039] 图7左上是KIT胞外结构域4简并文库筛选的实验设计,其用于定位克隆Fab79D的表位。ECD 4内的每个氨基酸残基都被完全简并的密码子(NNN)取代,以允许任何氨基酸取代,并且用作为用于转导的细胞的共表达标记的mTagBFP2将氨基酸残基克隆到睡美人质粒中。所述库电穿孔到HEK-293T细胞中。图7左下是对KIT胞外结构域4简并文库进行FACS分选以分离待NGS测序的单阳性细胞(对于KIT对照抗体克隆104D2)的门控策略。图7右侧是以胞外结构域4文库区域内的每个氨基酸位置为列并且氨基酸取代在单阳性与双阳性FACS分选且测序的细胞中富集的热图矩阵。最频繁突变的氨基酸位置代表参与Fab79D表位识别的残基(在图的顶部报告)。

[0040] 图8是通过CRISPR-Cas9或Cas12a同源定向修复介导的FLT3和IL3RA(CD123)阅读框架的靶向EF1-α启动子插入上游的实验布局。此实验的目的是生成报告细胞系,以允许增强且更快通过流式细胞术评估编辑结果,因为未修饰的K562细胞不表达任一基因。相同的策略已应用于KIT基因,以从其内源性基因座过表达它。用RNP复合物连同具有FLT3或IL3RA启动子区同源臂的dsDNA供体模板一起对K562进行电穿孔。然后对表达所需基因的细胞进行FACS分选、单细胞克隆以及筛选,以鉴定具有最高表达的克隆。

[0041] 图9是CD123N末端结构域上的抗CD123克隆7G3表位的图谱。每个氨基酸位置均已被丙氨酸或进化保守的氨基酸取代,并且被筛选用于7G3结合。白色方块鉴定对7G3结合没有影响的残基,而逐渐变深的灰色方块与克隆7G3结合的25-50-75%的损失相关。类似地,图9的底部示出了CD123上的IL3结合位点。

[0042] 图10A示出了在碱基编辑筛选实验中使用的与IL3RA外显子2和3相关的几种sgRNA的位置,以鉴定能够消除克隆7G3结合同时保留CD123表面表达的gRNA和突变。图例报告了与每个sgRNA相关的Cas蛋白的类型。

[0043] 图10B示出了从用不同sgRNA和碱基编辑器对编辑的内源性基因座表达CD123的K562报告细胞的代表性流式细胞术图(在每个图的上方和左侧指示)。细胞用对照抗体、CD123克隆9F5和3种不同的治疗抗体(CD123克隆7G3、6H6和S18016F)染色。附图中报告了电穿孔到细胞中的sgRNA和质粒剂量。

[0044] 图11用几个sgRNA-碱基编辑器对编辑的CD123报告细胞上的碱基编辑筛选实验(分别在图的左侧或顶部报告)。使用Lonza4D-Nucleofector用360pmol sgRNA和500ng碱基编辑器质粒对细胞进行电穿孔,并且在72h后通过流式细胞术对其进行评估。细胞用对照抗体、CD123克隆9F5和3种不同的治疗抗体(CD123克隆7G3)染色。

[0045] 图12A报告了编码FLT3 4G8 CAR和截短的EGFR转导(LV)标记/安全开关的慢病毒载体的设计。产生了第3代LV载体,并且新鲜的PBMC衍生的T细胞在用CD3-CD28 Dynabeads刺激的第2-3天进行转导,在含有IL7和IL15的培养基中培养14天。对于共培养杀伤实验,将

不表达FLT3、野生型FLT3或FLT3的表位工程化变体的K562细胞用4G8-CAR T细胞或未转导的(UT)T细胞以不同的效应子:靶标比率(ET)铺种在96孔板中。

[0046] 图12B(顶行)是通过用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色示出FLT3的表达的铺种的K562细胞的流式细胞术图。图12B(中间和底部行)是铺种后4和48小时的共培养杀伤实验中的活细胞(LiveDead yellow-AnnexinV-)的流式细胞术图。效应细胞通过CellTrace荧光或CD4/CD8表达来鉴定,而靶细胞是CellTrace和CD4/CD8阴性且FSC-A高。

[0047] 图12C是示出所有测试条件下4h时活靶细胞(LiveDead-AnnexinV-)的百分比的图。

[0048] 图12D是示出4小时时T淋巴细胞上的CD107a表面染色作为与靶细胞共培养期间脱粒的标记的图。

[0049] 图12E是报告与靶细胞共培养后48h CellTrace黄色MFI的图,以通过染料稀释评估T细胞增殖。

[0050] 图13A是示出CRISPR-Cas同源定向修复(HDR)编辑策略的3个gRNA相对于FLT3外显子9的位置的示意图。2个gRNA被设计用于与AsCas12a组合使用,另一个用于与SpCas9核酸酶组合使用。使用单链寡脱氧核苷酸(ssODN)作为模板供体,并且报道了4种不同变体的设计。ssODN序列内的黑色方块鉴定与野生型序列不同的突变密码子(包括额外的突变以降低HDR介导的修复后Cas核酸酶重新切割的速率)。还测试了每个ssODN的反向补体。

[0051] 图13B是报告了用图13A中报告的gRNA和ssODN对表达FLT3的报告K562细胞上进行的CRISPR-Cas HDR编辑实验的结果的流式细胞术图。细胞用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色。黑色方块突出显示编辑的细胞。

[0052] 图14A是示出与腺嘌呤碱基编辑器(ABE)组合使用的2个sgRNA相对于FLT3外显子9和N399密码子的位置的示意图。

[0053] 图14B报告了与N399密码子和PAM序列有关的每个gRNA序列。

[0054] 图14C是具有突变的Cas9以允许与替代PAM序列一起使用的3个腺嘌呤碱基编辑器变体的示意图。

[0055] 图14D是示出用图14A和图14B中所描绘的sgRNA和图14C中报告的ABE对表达FLT3的K562报告细胞进行的碱基编辑实验的结果的流式细胞术图。细胞用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色。每个图报告了编辑的细胞的门控和编辑的细胞的百分比。

[0056] 图15A是示出与腺嘌呤碱基编辑器(ABE)组合使用以引入N399D突变的5个sgRNA相对于FLT3外显子9和N399密码子的位置的示意图。图例示出了对每个sgRNA不同的PAM和SpCas9要求。

[0057] 图15B报告了与N399密码子和PAM序列有关的每个gRNA序列。

[0058] 图15C是示出用图15A和图15B中所描绘的sgRNA和两个腺嘌呤碱基编辑器(NG-ABE8e和SPRY-ABE8e-V106W 3xNLS)对表达FLT3的K562报告细胞进行的碱基编辑实验的结果的流式细胞术图。细胞用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色。每个图报告了编辑的细胞的门控和编辑的细胞的百分比。

[0059] 图16A是通过睡美人转导过表达不同FLT3变体并且用抗FLT3对照抗体(克隆

BV10A4)和AF488缀合的人FLT3L共染色的FLT3报告K562细胞的流式细胞术图。双阳性群的斜率与FLT3L亲和力成比例(每个图都报告了FLT3对照抗体与FLT3L染色之间的MFI比率)。

[0060] 图16B是示出与野生型FLT3相比,FLT3对照抗体与AF488缀合的FLT3L染色之间的MFI比率分布的直方图(灰色覆盖)。

[0061] 图17A示出了产生用于编辑人CD34+细胞的碱基编辑器mRNA的定制克隆的pmRNA质粒的设计。

[0062] 图17B描述了用于产生BE mRNA的体外转录方案的工作流程。

[0063] 图17C是体外转录的SpRY-ABE8e-V106W mRNA的Agilent片段分析仪图谱。x轴是核苷酸尺寸,y轴是相对荧光单位(RFU)信号。

[0064] 图18,组A是示出用图15(组B)中所描绘的FLT3-18-NRNsgRNA和IVT腺嘌呤碱基编辑器mRNA(SpRY-ABE8e-V106W3xNLS)对表达FLT3的K562报告细胞进行的碱基编辑实验的结果的流式细胞术图。细胞用对照抗体(克隆BV10A4)和治疗抗体(克隆4G8)共染色。每个图报告了编辑的细胞的门控和编辑的细胞的百分比。实验用不同的mRNA和sgRNA剂量进行(分别在图的顶部和左侧报告)。图18B是通过流式细胞术说明mRNA、gRNA与编辑效率之间的剂量效应相关性的点图。图18(组C)是说明编辑后mRNA、gRNA与细胞活力之间的剂量效应相关性的点图。

[0065] 图19A是报告在FLT3报告K562细胞上进行(与图18相同),使用不同mRNA和sgRNA剂量(左侧报告)的FLT3-18-NRN sgRNA的每个腺嘌呤碱基位置处的编辑效率的热图。热图顶部报告了gRNA序列和预期的编辑窗口。

[0066] 图19B是通过gDNA测序说明mRNA、gRNA与编辑效率之间的剂量效应相关性的点图(仅报告了在A6和A7碱基位置的编辑)。

[0067] 图20A是使用IVT mRNA和FLT3-18-NRN sgRNA对人动员的外周血衍生的CD34+HSPC进行的FLT3碱基编辑实验的实验设计。右侧报告了培养基的组成,同时时间线报告了流式细胞术和gDNA收集的时间点。

[0068] 图20B报告了用于对培养的CD34+HSPC的干细胞表型进行流式细胞术评估的门控策略。

[0069] 图20C是报告编辑后第0天、第3天和第6天培养的CD34+HSPC的倍数扩增的条形图。

[0070] 图20D是示出通过流式细胞术编辑后第3天和第6天培养的CD34+HSPC的组成的条形图(图20B中报告了门控)。

[0071] 图21A是报告在动员的外周血衍生的CD34+HSPC上进行(与图20相同),使用不同mRNA和sgRNA剂量(左侧报告)的FLT3-18-NRN sgRNA的每个腺嘌呤碱基位置处的编辑效率的热图。

[0072] 图21B是通过对CD34+HSPC的gDNA测序说明mRNA、gRNA与编辑效率之间的剂量效应相关性的点图。

[0073] 图22A是示出CAR-T共培养杀伤测定的流式细胞术图,其中靶细胞是未修饰的或碱基编辑的表达FLT3的K562细胞。将靶细胞以不同的效应子:靶标比率(报告在顶部)用4G8-CAR T细胞或未转导的T细胞铺种,并且在6h时通过流式细胞术进行评估。绘制活细胞(AnnexinV-LiveDead yellow-)并且报告相对百分比。

[0074] 图22B报告了共培养后6h时各E:T比率下的靶细胞活力(AnnexinV-LiveDead

yellow-)。

[0075] 图22C报告了共培养后6h时各E:T比率下通过CD107a表面染色的T细胞脱粒。

[0076] 图23A是示出CAR-T共培养杀伤测定的流式细胞术图,其中靶细胞是未修饰的或碱基编辑的人CD34+HSPC(编辑效率46%)。将靶细胞以不同的效应子:靶标比率(报告在顶部)用4G8-CAR T细胞或未转导的T细胞铺种,并且在48h时通过流式细胞术进行评估。

[0077] 图23B报告了在48h时4G8CAR-T细胞对CD34+细胞的特异性杀伤。

[0078] 图23C报告了在48h时4G8CAR-T细胞对CD34+CD90+干细胞富集亚群的特异性杀伤。

[0079] 图24A报告了评估FLT3表位工程化的CD34+HSPC对4G8CAR-T细胞的抗性的体内实验的实验设计。报告了实验时间表和程序,以及治疗组数量。

[0080] 图24B是报告每个治疗组处死时骨髓(BM)中人CD45+植入的相对丰度和绝对计数的条形图。

[0081] 图24C是描述衍生自在FLT3基因中未修饰或碱基编辑的异种移植CD34+HSPC的人植入的谱系组成的条形图。

[0082] 图25A是报告处死时骨髓中人CD45+植入内的人CD34+CD38-祖细胞的相对丰度和绝对计数的条形图(与图24相同的实验)。用未修饰的CD34+HSPC异种移植的小鼠在4G8CAR-T施用后,示出CD34+CD38-祖细胞显著降低。

[0083] 图25B是报告治疗的小鼠脾脏中CAR-T细胞对CD69+细胞(T细胞活化标记)的百分比的条形图(与图24相同的实验)。

[0084] 图25C是报告分为中央记忆(CD45RA-CD62L+,CM)、效应记忆(CD45RA-CD62L-,EM)、初始(CD45RA+CD62L+)或重表达CD45RA的效应记忆细胞(CD45RA+CD62L-,TEMRA)的T细胞表型(通过CD62L和CD45RA的表面表达来评估)的条形图。

[0085] 图25D描绘了来自体内异种移植实验(与图24相同)的骨髓样品的流式细胞术门控策略,以鉴定谱系阴性人祖细胞(活/hCD45+/CD3-/CD19-/CD33-/CD34+/CD38-)。

[0086] 图25E报告了示出处死时骨髓中人CD34+CD38-祖细胞的百分比的从相同条件(与图24相同的实验)下的小鼠的汇集事件获得的累积流式细胞术图。

[0087] 图26A是使用IVT mRNA和FLT3-18-NRN和CD123-N sgRNA对人动员的外周血衍生的CD34+HSPC进行FLT3和CD123双碱基编辑实验的实验设计。右侧报告了培养基的组成,同时时间线报告了流式细胞术和gDNA收集的时间点。

[0088] 图26B是报告编辑后第0天、第3天和第7天培养的CD34+HSPC的倍数扩增的条形图。

[0089] 图26C是突出显示在CD123碱基编辑条件下CD123克隆7G3识别的损失的编辑的CD34+HSPC的流式细胞术图。细胞用对照CD123抗体(克隆9F5)和治疗抗体(7G3)共染色。细胞以CD34+CD90+CD45RA-进行预门控。

[0090] 图27是报告对动员的外周血衍生的CD34+HSPC进行(与图26相同),使用不同mRNA和sgRNA剂量(左侧报告)的FLT3-18-NRN和CD123-N sgRNA的每个腺嘌呤碱基位置处的编辑效率的热图。

[0091] 图28A是用FLT3-18-NRN sgRNA或CD123-N sgRNA组合SpRY-ABE8e-V106W或SpRY-K918-ABE8e-V106W进行碱基编辑的K562细胞的流式细胞术图,以示出CD123碱基编辑效率的提高。

[0092] 图28B报告了用于靶向CD123 S59残基的3种不同gRNA的序列。

[0093] 图28C描绘了具有修饰的SpCas9的几种不同的腺嘌呤碱基编辑器设计,包括更高保真度的变体(HF1,Sniper)、K918N变体、BlackJack变体(对较长的gRNA更耐受)以及这些突变的组合。

[0094] 图28D是报告使用图28B中的3个gRNA(加上FLT3-18-NRN作为对照)和图28C中的碱基编辑器变体的编辑效率的热图。

[0095] 图29A是使用IVT mRNA和FLT3-18-NRN和CD123-R sgRNA对人动员的外周血衍生的CD34+HSPC进行FLT3和CD123双碱基编辑实验的实验设计。右侧报告了培养基的组成,同时时间线报告了流式细胞术和gDNA收集的时间点。

[0096] 图29B是展示在培养的CD34+HSPC中获得CD123碱基编辑效率的门控策略的流式细胞术图。

[0097] 图29C是报告编辑后第0天、第3天和第6天培养的CD34+HSPC的倍数扩增的条形图。

[0098] 图30是报告FLT3-18-NRN和CD123-R sgRNA在每个腺嘌呤位置的碱基编辑效率的热图(与图29相同的实验)。靶碱基报告在热图的底部。右侧的热图报告了通过流式细胞术编辑的CD123碱基的百分比。

[0099] 图31是报告来自与图29相同实验的KIT-gRNA-Y靶向残基H378在每个腺嘌呤位置上对CD34+HSPC的碱基编辑效率的热图。

[0100] 图32A报告确认FLT3表位工程化的人CD34+HSPC对4G8CAR-T细胞的抗性的体内异种移植实验的实验设计。报告了实验时间表和治疗组及数量。

[0101] 图32B报告了所有小鼠移植后8周外周血样品的FLT3碱基编辑效率。

[0102] 图33A报告了处死时骨髓中人CD45+植入上的多形核粒细胞(CD3-CD19-CD33+SSChi,PMN)和粒单核祖细胞(谱系-CD34+CD38+CD45RA+FLT3+,GMP)的百分比(与图32相同的实验)。

[0103] 图33B示出了4G8CAR-T细胞治疗的和未治疗的小鼠在几个时间点的基因组DNA上的FLT3编辑效率。LC,液体培养物(移植前样品);W8、W12,第8周和第12周出血;BM,骨髓;CFU,集落形成单位衍生细胞(从处死时的骨髓样品中铺种)。

[0104] 图34是示出用FLT3或AAVS1编辑的CD34+HSPC异种移植的小鼠骨髓中的多形核粒细胞(CD3-CD19-CD33+SSChi,PMN)、粒单核祖细胞(谱系-CD34+CD38+CD45RA+FLT3+,GMP)和造血干细胞(谱系-CD34+CD38-CD90+CD45RA-,HSC)的相对丰度的代表性流式细胞术图。

[0105] 图35描绘了表达为两个单独的构建体或表达为串联CAR(相同分子上的两个scFv,通过接头分隔)的单或双特异性嵌合抗原受体(CAR)的几种替代设计。

[0106] 图36A是具有通过对照或治疗(洋红色)单克隆抗体识别的胞外结构域(ECD)的III型受体酪氨酸激酶(FLT3,KIT)的示意图。AF488缀合的FLT3L或SCF配体用于评价突变受体的结合亲和力。

[0107] 图36B是示出治疗mAb(分别为用于FLT3和KIT的4G8和Fab79D)至分别具有16个或10个氨基酸取代的嵌合受体(顶部)的损失;以及用于野生型(WT)和突变受体变体的荧光配体结合测定(底部)的流式细胞术图。

[0108] 图36C是未刺激的或与100ng/mL FLT3L或SCF一起孵育的表达FLT3和KIT变体的细胞系的pFLT3 Y589-591和pKIT Y719的蛋白质印迹。

[0109] 图36D是含有在ECD4的16个氨基酸位置具有人或鼠类密码子的FLT3 cDNA的睡美

人质粒(左上);用FLT3文库转导且经FACS分选的(4G8-和4G8+)用于对文库区的NGS测序的K562细胞(右上);以及示出在384-413位置处的相对氨基酸频率的序列标识(底部)的示意图。

[0110] 图36E是含有在ECD4的每个位置上的简并密码子(NNN)的睡美人质粒(左上);用KIT文库转导且经FACS分选的(Fab79D-和Fab79D+)用于对文库区的NGS测序的K562细胞(右上);以及示出在Fab-79D^{low}与双阳性细胞(aa.314至381)中富集的氨基酸取代的对数倍数变化的序列标识(底部;具有多个富集氨基酸取代的位置与先前预测的接触点一致)的示意图。

[0111] 图36F是靶向FLT3密码子N399的测试的gRNA的示意图(左);以及用碱基编辑器表达质粒(NG-ABE8e或SpRY-ABE8e)和sgRNA电穿孔的K562 FLT3报告细胞的代表性图,在编辑后72小时通过流式细胞术评估(右;每个图中报告了对对照mAb BV10A4呈阳性且对克隆4G8呈阴性的细胞的百分比;未编辑条件示出门控策略)。

[0112] 图36G示出通过碱基编辑进行CD123表位筛选。顶部:用于筛选的7G3接触残基的靶向碱基编辑的sgRNA。深蓝色,NGG PAM;灰色,NGN PAM;浅蓝色,NRN PAM。PAM位置通过箭头指示。底部:用SpRY-胞苷(顶行)或腺嘌呤(底行)碱基编辑器处理的CD123报告K562细胞的FACS图。每个图的右下角报告了对对照mAb 9F5呈阳性且对治疗克隆7G3呈阴性的细胞百分比。

[0113] 图36H示出在表达受体变体的K562(对FLT3和CD123)或NIH-3T3(对KIT)细胞上测量的治疗抗体对隐形受体(stealth receptor)变体的亲和力。扣除背景后,对对照mAb归一化的治疗mAb的MFI的平均值±SD(N=3)。通过双因素方差分析进行比较。

[0114] 图36I是FLT3、SCF和IL3亲和力测定。通过睡美人转座酶表达受体变体的细胞系与荧光配体一起孵育,并且通过流式细胞术进行评估。配体的MFI的平均值±SD(N=3 FLT3/CD123;N=4 KIT)。通过双因素方差分析进行比较。

[0115] 图37A是示出FACS分选的4G8-和4G8+细胞中ECD4各个位置(357至421)处的氨基酸频率的FLT3 EC4组合文库的全长序列标识。

[0116] 图37B示出了编码具有mCherry和嘌呤霉素N-乙酰转移酶(PAC)报告基因/抗性盒的FLT3变体的睡美人转座子的设计(顶部),以及示出在K562细胞中表达的N399D和N399G变体的4G8识别损失的流式细胞术图(底部)。

[0117] 图37C示出通过基因转录起始位点(TSS)的EF1α启动子上游的靶向同源定向修复整合来生成FLT3、KIT和CD123报告K562细胞。通过对编码完整EF1α启动子的质粒模板的PCR生成具有50bp长同源臂的dsDNA供体。用SpCas9(FLT3、KIT)或AsCas12a核酸酶(CD123)和识别每个基因编码序列上游区域的gRNA对K562细胞进行电穿孔。以20μL电穿孔体积用Cas RNP对0.5至10ug dsDNA供体模板进行共电穿孔。代表性流式细胞术图示出了对于过表达基因阳性、经FACS分选且扩增的细胞群。对于FLT3和CD123,对分选的细胞进行单细胞克隆以分离具有最高表面表达的克隆。除非另有说明,否则所有表位编辑测试和优化均对K562报告细胞进行。通过对表达FLT3的K562细胞进行第二轮CD123靶向RNP+供体电穿孔,获得双FLT3/CD123报告基因(数据如图49B所示)。

[0118] 图37D示出通过CRISPR-Cas介导的同源定向修复引入FLT3N399D突变。用SpCas9或AsCas12a核酸酶、gRNA和编码N399D突变的200-bp ssODN模板供体(或它们的反向互补体,

rev.comp.)对K562报告细胞进行电穿孔。包括额外的沉默突变以降低HDR修复后核酸酶重新切割的风险。编辑后72小时通过流式细胞术对细胞进行评估。除了4G8-,右下角报告了FLT3+细胞(通过对照mAb BV10A4)的百分比。

[0119] 图37E示出了衍生自表位图谱的KIT突变的表征。对于衍生自KIT表位图谱的氨基酸位置,可用腺嘌呤BE(ABE,红色)或胞苷BE(CBE,蓝色)获得的取代被单独克隆到睡美人转座子中,并且电穿孔到HEK-293T细胞中。在嘌呤霉素选择后,用Fab-79D和对照Ab104D2对细胞进行染色。报告了每个突变的Fab-79D MFI与104D2 MFI之间的比率。为了排除影响SCF与KIT结合的变体,相同的变体与AF488缀合的SCF和对照mAb 104D2(其不会损害SCF结合)一起孵育。条形图中报告了SCF与104D2中值荧光的比率。水平线示出参考突变H378R。

[0120] 图37F示出了KIT H378R腺嘌呤碱基编辑优化。将SpRY-ABE8e与靶向外显子7内的密码子H378的sgRNA一起共电穿孔到K562细胞中。报告了原型间隔区内每个腺嘌呤在gDNA上的编辑效率(相对于KIT-Y sgRNA的位置编号)。

[0121] 图37G顶部示出了编码具有mTagBFP2和嘌呤霉素N-乙酰转移酶(PAC)报告基因/抗性盒的KIT变体的睡美人转座子的设计;以及底部示出了示出在HEK-293T细胞中表达的KIT H378R的Fab79D识别损失的流式细胞术图。

[0122] 图37H示出了通过碱基编辑进行的CD123表位筛选。将图1G中报告的用于7G3接触残基的靶向碱基编辑的sgRNA与腺嘌呤(ABE)或胞苷碱基编辑器(CBE)表达质粒一起共电穿孔到CD123报告K562细胞中。每个图报告了对对照mAb 9F5呈阳性且对治疗克隆7G3呈阴性的细胞百分比。未编辑的条件示出门控策略。BE4,evoApobec-1 BE4max。

[0123] 图37I示出具有sgRNA-F的CD123 CBE导致克隆6H6和S18016F结合损失。用具有与克隆7G3不同的表位的CD123靶向克隆6H6和S18016F对从图37H中报告的BE筛选的相同条件进行染色。

[0124] 图37J示出了编码共表达常见β链CSFR2B以允许胞内信号传导的CD123变体的睡美人转座子的设计。

[0125] 图38A示出FLT3表位工程化的变体保留了激酶活化。来自通过睡美人转座酶表达FLT3变体的K562细胞的蛋白质提取物的蛋白质印迹。将细胞置于血清饥饿状态过夜,并且在37℃下用不同浓度的人FLT3L刺激10分钟。在相同的裂解物上探测pFLT3 Y589-591、总FLT3和肌动蛋白。剥离pFLT3膜后探测总FLT3。右侧报告了归一化的pFLT3信号强度(在肌动蛋白上)。通过双因素方差分析进行比较。

[0126] 图38B示出KIT表位工程化的变体保留了激酶活化。来自通过睡美人转座酶表达KIT变体的NIH-3T3细胞的蛋白质提取物的蛋白质印迹。将细胞置于血清饥饿状态过夜,并且在37℃下用不同浓度的人SCF刺激10分钟。在相同的裂解物上探测pFLT3 Y719、总KIT和肌动蛋白。右图报告了归一化的pKIT信号强度(在总KIT上)。通过双因素方差分析进行比较。

[0127] 图38C示出CD123表位工程化的变体保留了STAT5活化。使通过睡美人转座酶表达CD123变体的BaF3细胞处于缺乏鼠类IL-3的状态,并且用不同浓度的人IL-3刺激。48h后,通过胞内流式细胞术评估细胞的STAT5磷酸化(左侧,代表性FACS图示出不同hIL-3剂量下的CD123 S59P状况;右侧,pSTAT5 PE MFI)。

[0128] 图38D示出FLT3、KIT、CD123表位工程化的变体诱导类似于WT受体的增殖反应。使

通过睡美人转座酶表达FLT3、KIT和CD123变体的BaF3细胞处于缺乏鼠类IL-3的状态过夜，并且分别用不同浓度的人FLT3、SCF和IL-3进行刺激。细胞培养5天，并且通过流式细胞术分析以获得绝对计数(CountBead)。图报告了通过未刺激条件归一化的绝对计数。

[0129] 图39A顶部示出了共表达第2代CAR和截短的人表皮生长因子受体(EGFRt)的双向慢病毒载体(LV)的示意图；以及底部示出了用于生成CAR-T细胞的T细胞培养、转导和分析的示意图。

[0130] 图39B示出在不同的感染复数(MOI)下用LV 4G8-CAR转导后在指定天数(D)时T细胞上EGFRt表面表达的百分比(左侧)和倍数扩增(右侧)。

[0131] 图39C示出FLT3 N399D或N399G避免4G8 CAR杀伤。将通过睡美人转座酶表达FLT3变体的K562细胞与4G8 CAR-T细胞以不同效应子：靶标比率(E:T)进行培养。左侧：与4G8 CAR共培养48h后表达FLT3 WT或N399D的K562细胞的代表性流式细胞术图。T细胞和靶细胞分别通过CD3和FLT3染色来鉴定。从左到右，i)报告相对于E:T＝0的持续活靶细胞分数(AnnexinV-7AAD-细胞的绝对计数)的图；ii)通过CD69染色的T细胞活化(%)和iii)通过BV10A4染色在残余活靶细胞上的FLT3表面表达，以E:T＝0归一化。平均值±SD(N＝4)。通过双因素方差分析进行比较。

[0132] 图39D示出KIT H378R避免79D CAR杀伤。左侧：与79D CAR共培养48h后，通过睡美人转座酶表达KIT WT或H378R的K562细胞的代表性流式细胞术图。T细胞和靶细胞分别通过CD3和KIT染色来鉴定。从左到右，图报告了i)相对于E:T＝0的持续活靶细胞分数(AnnexinV-7AAD-细胞的绝对计数)；ii)通过CD69染色的T细胞活化(%)和iii)通过104D2染色在残余活靶细胞上的KIT表面表达，以E:T＝0归一化。K562：未转导的。平均值±SD(N＝4)。通过双因素方差分析进行比较。

[0133] 图39E示出$CD123^{S59}$BE细胞对CSL362 CAR具有抗性。左侧：与CSL362 CAR共培养48h后针对CD123碱基编辑的或未修饰的CD123报告K562的代表性流式细胞术图。T细胞通过CD3/4/8染色来鉴定。从左到右-图报告了i)相对于E:T＝0的持续活靶细胞分数(AnnexinV-7AAD-细胞的绝对计数)；ii)通过CD69染色的T细胞活化(%)和iii)通过9F5染色在残余活靶细胞上的CD123表面表达。平均值±SD(N＝4)。通过双因素方差分析进行比较。

[0134] 图40A示出在体外培养期间CAR-T细胞CD4/CD8组成。将新鲜健康供体衍生的PBMC与CD3/CD28 Dynabead(珠：细胞比率＝3:1)、IL-7 5ng/mL和IL-15 5ng/mL一起培养，并且在第2天(D)用编码4G8CAR的慢病毒载体(LV)对其进行转导。在第2、4、6、12天通过流式细胞术评估培养物组成。图报告了N＝5种用不同的感染复数(MOI)进行LV转导的条件。平均值±SD。

[0135] 图40B示出通过流式细胞术的CAR-T细胞表型。通过CD62L和CD45RA染色评估T细胞亚群(CD45RA+62L+，初始/T干记忆细胞；CD45RA-62L+，中央记忆，CM；CD45RA-62L-，效应记忆，EM；CD45RA+62L-，重表达CD45RA的终末分化EM细胞，EMRA)。报告了代表性FACS图(左侧)和通过CD4+和CD8+亚群的培养组成(右侧)。D0指Ficoll分离后未培养的外周血T细胞。平均值±SD(N＝5)。

[0136] 图40C示出$FLT3^{WT}$细胞被4G8CAR-T细胞消除，而$FLT3^{N399}$ BE细胞受到保护。用未修饰的或$FLT3^{N399}$碱基编辑的FLT3报告K562细胞进行4G8 CAR-T细胞共培养测定。(左侧)对活细胞(AnnexinV-7AAD-)门控的早期时间点(6h)的代表性流式细胞术图。T细胞通过

CellTrace标记进行鉴定,而K562靶标是FLT3+。(从左到右)6h时靶细胞存活率(%)、6h时通过CD107a表面染色的T细胞脱粒(%)以及48h时存活靶细胞上的FLT3表达(MFI,以E:T＝0归一化)。N＝2。通过双因素方差分析进行比较。

[0137] 图40D示出表位工程化的受体提供保护免受CAR-T细胞的影响。每行报告了与表达FLT3、CD123和KIT的K562细胞共培养的额外的图(与图39C、39D、39E中报告的实验相同)。按列从左到右依次为:共培养48h时CAR-T细胞的CellTrace MFI、与CAR-T细胞共培养48h后的靶细胞活力(%)、与未转导的T细胞共培养48h后的靶细胞活力(%)、与未转导的T细胞共培养48h后的活细胞绝对计数(AnnexinV-7AAD-,以E:T＝0归一化)、共培养48h后的CD69+未转导T细胞(%)、与未转导的T细胞共培养48h后的靶细胞上的FLT3、CD123和KIT MFI(未归一化)。平均值±SD,N＝4。

[0138] 图40E示出了用两个靶细胞群进行共培养测定的实验布局,一个靶细胞群表达FLT3且另一个靶细胞群表达CD123。未修饰的或表位编辑的FLT3和CD123 K562报告细胞以约1:1的比率混合,并且与表达4G8 CAR、CSL362 CAR或未转导的T细胞共培养。以不同效应子:靶标(E:T)比率的每个组成的条形图形式报告活靶细胞(对FLT3+或CD123+预门控)的FLT3+/CD123+组成的百分比。平均值±SD,N＝4。

[0139] 图41A是CD34+HSPC培养、碱基编辑和分析的示意图。mPB,动员的外周的血;HSPC,造血干细胞和祖细胞;FLT3L,FLT3配体;SCF,干细胞因子;TPO,促血小板生成素;SR-1,StemRegenin。

[0140] 图41B是报告在用不同剂量的腺嘌呤BE mRNA电穿孔后测量的FLT3、KIT和CD123的gRNA序列内的每个腺嘌呤的CD34+HSPC的编辑窗口和编辑效率的代表性图。平均值±SD。

[0141] 图41C示出了本体CD34+细胞或FACS分选的干细胞富集CD90+或干细胞耗竭的CD90-亚群中的编辑效率。平均值±SD(N＝2个供体)。

[0142] 图41D示出表位编辑的CD34+HSPC的免疫表型。左侧:展示碱基编辑后第5天体外培养期间CD34+133+HSPC内的CD90/CD45RA亚群的代表性流式细胞术图。右侧是示出$FLT3^{N399}$、KIT^{H378R}、$CD123^{S59}$表位编辑的CD34+细胞的CD90/CD45RA亚群组成的条形图。平均值±SD。样品尺寸在条形图中报告。

[0143] 图41E是在$FLT3^{N399}$表位编辑的HSPC上进行的体外4G8 CAR杀伤测定。用4G8 CAR或未转导的T细胞共培养后48h,持续活细胞的分数(左侧)和通过AnnexinV-7AAD染色的CD34+45RA+细胞(FLT3碱基编辑的或AAVS1碱基编辑的)的活力(右侧)。平均值±SD(N＝4)。通过双因素方差分析进行比较。

[0144] 图41F是在$CD123^{S59}$表位编辑的HSPC上进行的体外CSL362 CAR杀伤测定。用CSL362 CAR或未转导的T细胞共培养后48h,$CD123^{S59}$或AAVS1-BE HSPC中持续活CD90+细胞的分数(左侧)和通过AnnexinV-7AAD染色的CD34+细胞活力(右侧)。N＝8,2个不同的HSPC供体。通过双因素方差分析进行比较

[0145] 图41G示出了相对于用浓度不断增加的Fab-79D mAb铺种并培养48h的无mAb对照的KIT^{H378} BE或AAVS1 BE HSPC的绝对活CD34+细胞的分数。平均值±SD。N＝6,2个不同的HSPC供体。通过双因素方差分析进行比较

[0146] 图41H示出了碱基编辑的HSPC的总CD34+和CD90+45RA-细胞(左上)以及髓系和红系集落(N＝2,左下)的绝对计数。右侧:铺种后14天CFU板(2个复制之一)的代表性图像。

[0147] 图41I是FLT3^{N399}或AAVS1 BE HSPC的初次和二次异种移植和分析的示意性代表图。

[0148] 图41J左侧示出通过流式细胞术在不同时间点的初次受体中的人植入(hCD45+细胞);以及右侧示出通过流式细胞术的BM谱系组成占总人(hCD45+)细胞的百分比。PMN,多形核粒细胞;mono,单核细胞;lin-,谱系阴性。平均值±SD。FLT3^{N399} N=7,AAVS1 BE N=4。通过双因素方差分析进行比较。

[0149] 图41K示出对初次和二次移植的小鼠在不同时间点测量的总循环细胞、造血器官或CFU的FLT3编辑水平。平均值±SD。LC,液体培养物;W8,第8周;W12,第12周;SP,脾脏;BM,骨髓;CFU,集落形成单位。

[0150] 图42A是用于碱基编辑器mRNA体外转录(IVT)的质粒模板的示意性代表图。使用IIS型限制酶BbsI使模板线性化。T7,T7 RNA聚合酶启动子;UTR,非翻译区;HBB,血红蛋白β基因;polyA,聚腺嘌呤序列(约110-120nt)。

[0151] 图42B是用Agilent片段分析仪RNA分析用于质量控制的纯化的IVT SpRY-ABE8e mRNA的代表性图。>90%的IVT mRNA对应于预测的尺寸。

[0152] 图42C是对用sgRNA-18针对FLT3^{N399}碱基编辑的FLT3报告K562细胞进行的SpRY-ABE8e V106W mRNA剂量发现测试。右侧是通过流式细胞术用mRNA x sgRNA剂量的FLT3编辑效率的相关性,以及通过流式细胞术与gDNA分析的FLT3编辑效率的相关性。报告了Spearman r^2和p值。

[0153] 图42D示出CD34+HSPC碱基编辑mRNA优化。在双FLT3/CD123编辑实验中测试了几种SpRY-ABE8e mRNA变体。测试的变量包括:mRNA纯化方法(珠,sparQ PureMag磁珠;柱,NEB Monarch RNA柱)、脱磷酸化、用N1-甲基假尿苷(N1m-U)或5-甲氧基尿苷(5me-U)取代UTP、加帽技术(CleanCap,Trilink CleanCap AG;ARCA,NEB 3′-O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G RNA帽结构类似物)和K918N SpCas9突变的添加(据报道可提高核酸酶效率)[64]。条形图示出了通过基因组DNA(gDNA)分析的FLT3和CD123编辑效率(%)以及体外培养结束时本体(CD34+)和干细胞富集(CD90+45RA-)细胞的绝对计数。

[0154] 图42E示出了碱基编辑的培养条件的优化。CD34+HSPC用SpRY-ABE8e mRNA和FLT3^{N399} sgRNA进行碱基编辑,并且在电穿孔期间添加补充物(RNAsin、Promega RNAsin RNAse抑制剂;甘油)或在不同的培养条件下进行,所述条件包括调节细胞因子浓度(标准:100ng/mL FLT3L、SCF和50ng/mL TPO;1.5x:150ng/mL FLT3L、SCF和75ng/mL TPO;3x:300ng/mL FLT3L、SCF和150ng/mL TPO;+IL-3:标准,添加hIL-320ng/mL)、不同的干细胞保留化合物(标准:SR-10.75μM、UM17135nM;SR-1仅0.75μM;UM171仅35nM;无SR-1/UM171)、添加抗炎化合物(PGE2、前列腺素-E2 10μM;DEX、地塞米松1μM)。条形图示出了通过gDNA分析的FLT3编辑效率(%)以及体外培养结束时本体(CD34+)和干细胞富集(CD90+45RA-)细胞的绝对计数。

[0155] 图42F是条形图。解冻后在不同时间点(24h、48h、72h)对CD34+HSPC进行电穿孔。针对我们选定的靶标(FLT3、CD123、KIT)中的两个的所有组合编辑了每个条件。条形图示出了通过gDNA分析的编辑效率(%)以及体外培养结束时本体(CD34+)和干细胞富集(CD90+45RA-)细胞的绝对计数。

[0156] 图42G是示出用于分析编辑的CD34+HSPC的门控策略的代表性流式细胞术图。从左

到右,针对单态(FSC-H/FSC-A图)、活(PI/FSC-A图;PI,碘化丙啶)、物理参数(SSC-A/FSC-A图)、CD34+(CD34/CD90图)、CD133+(CD34/CD133图)和CD45RA-90+、CD45RA-90-、CD45RA+90-(CD45RA/90图)对细胞进行门控。对单态(S)进行预门控后,珠(B)门控可鉴定CountBead(FSC-$A^{low}PI^{high}$),其根据两个额外的荧光参数进一步进行门控以排除碎片(未示出)。

[0157] 图42H示出表位编辑的HSPC保留对细胞因子刺激的增殖反应。使用不同浓度的相应配体铺种FLT3、KIT和CD123碱基编辑的CD34+HSPC并且培养4天。使用CountBead通过流式细胞术获得绝对计数。

[0158] 图42I示出了实验终点的编辑效率(将技术重复份汇集在一起用于gDNA分析)(参见图42H)。平均值±SD。N=4,2个健康供体。双因素方差分析多重比较。

[0159] 图43A示出了通过流式细胞术(%hCD45+)在用来自图3I中所描绘的实验的BM细胞异种移植的二次受体NBSGW小鼠的12周(W12)时的外周血中和终点时的骨髓(BM)中的人植入(每个初次小鼠均移植到一个二次受体小鼠体内)。平均直±SD。通过双因素方差分析进行比较。

[0160] 图43B示出了二次异种移植小鼠的BM中的髓系(左侧)和淋巴(右侧)谱系的绝对计数。$AAVS1^{BE}N=4$,$FLT3^{N399}N=7$。平均值±SD。通过双因素方差分析进行比较。HSC,造血干细胞;MPP,多能祖细胞;LMPP,淋巴预处理多能祖细胞;CMP,共同髓系祖细胞;GMP,粒单核祖细胞;髓母细胞,定义为CD33/66b+19-14-11c-34-SSC^{low};mono,单核细胞;iPMN,未成熟多形核粒细胞;成熟PMN,成熟粒细胞。

[0161] 图43C示出通过流式细胞术第9、11周(W9、W11)时外周血中以及异种移植了1M CD34+HSPC(AAVS1或KIT^{H378}编辑的)的NBSGW的BM中的人植入(%hCD45+)。平均值±SD。通过双因素方差分析进行比较。

[0162] 图43D示出了来自C的小鼠的BM中的髓系(左侧)和淋巴(右侧)谱系的绝对计数。通过双因素方差分析进行比较。AAVS1N=5,$KIT^{H378}N=4$。

[0163] 图43E示出在移植后第9周(W9)对液体培养物(LC)、总血细胞以及在实验结束时对FACS分选的B(CD19)和髓系(CD33)BM细胞测量的KIT编辑效率。平均值±SD。

[0164] 图43F是用于转导人PDX的在hPGK启动子下编码mNeonGreen荧光蛋白的慢病毒载体的示意性代表图(左侧);以及是示出了患者衍生的AML异种移植物在骨髓(PDX-1)或脾脏(PDX-2)样品上的转导效率的代表性流式细胞术图(右侧)。PDX细胞离体转导过夜,移植到NBSGW小鼠体内进行扩增,FACS分选mNeonGreen+细胞并且注射到二次受体中。

[0165] 图43G示出了用于体内实验的AML PDX解冻时的遗传特征(左侧)和表面免疫表型(右侧)。热图报告了遗传突变和每个标记的阳性细胞的百分比。ITD,内部串联复制;TKD,酪氨酸激酶结构域突变。

[0166] 图44A是用AMLPDX-1共移植并且用4G8CAR-T细胞治疗的$FLT3^{N399}$或AAVS1 BE HSPC的异种移植和分析的示意性代表图。

[0167] 图44B示出对液体培养物(LC)、总血细胞(第8、9周)以及用4G8CAR-T细胞治疗的或未治疗的小鼠的终点时分选的CD33+和CD19+骨髓(BM)细胞测量的FLT3碱基编辑。多重非配对t检验。平均值±SD。

[0168] 图44C是来自用CD34+HSPC、CD34+HSPC+AML PDX-1或CD34+HSPC+AML PDX-1移植并且用4G8 CAR--T治疗的小鼠的BM样品的代表性流式细胞术图。图为对人CD45+预门控;CAR

T细胞通过CD3染色鉴定,AML PDX细胞是mNeonGreen+。平均值±SD。通过单因素方差分析进行比较。

[0169] 图44D是示出hCD45+mNeonGreen-BM细胞内CD3+细胞的百分比的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析进行比较。

[0170] 图44E是示出hCD45+CD3-BM细胞内AML细胞百分比的条形图。平均值±SD。

[0171] 图44F是示出通过流式细胞术测量的AML(mNeonGreen+)细胞占总BM衍生的CFU的百分比的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析对$FLT3^{N399}$与AAVS1 BE条件进行统计学比较。

[0172] 图44G是示出用$FLT3^{N399}$或AAVS1 BE HSPC移植的小鼠中通过4G8 CAR-T耗竭BM B细胞(CD19+)的代表性FACS图。图为对hCD45+CD3-mNeonGreen-预门控。

[0173] 图44H、44I和44J是示出hCD45+CD3-mNeonGreen-内的pre-B(CD19+10+34-)(图44H)、pro-B(CD19+10+34+)(图44I)以及髓系细胞(CD33/66b+)内的未成熟粒细胞(CD33/66b+14-10-11c-SSC^{high})(图44I)的百分比的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析对$FLT3^{N399}$与AAVS1 BE条件进行统计学比较。

[0174] 图44K是示出谱系-CD34+38+10-祖细胞的组成的代表性FACS图。粒单核祖细胞(GMMP)定义为CD45RA+FLT3+,常见髓系祖细胞(CMP)定义为CD45RA-FLT3+,并且巨红系祖细胞(MEP)定义为CD45RA-FLT3-。

[0175] 图44L是示出lin-CD34+38+内的GMP%的条形印迹图。平均值士SD。

[0176] 图44M示出BM中的从HSC到分化的白细胞的髓系谱系亚群的绝对计数。未治疗的小鼠汇集在一起(灰色条),4G8治疗的$FLT3^{N399}$和AAVS1 BE小鼠分别以粉色和黄色报告。平均值±SD。每个群条形图上方报告了CAR治疗组绝对计数($FLT3^{N399}$/AAVS1)的倍数变化。使用多重比较的单因素方差分析。报告了用4G8 CAR治疗的$FLT3^{N399}$与AAVS1 BE条件之间比较的FDR调整的p值(p＜0.05以粗体示出)。

[0177] 图44N是示出谱系-CD34+38-10-祖细胞的组成的代表性FACS图。干细胞(HSC)定义为CD45RA-90+,多能祖细胞(MPP)定义为CD45RA-90-,并且淋巴预处理MPP(LMPP)定义为CD45RA+90-。

[0178] 图44O是示出lin-CD34+38-内的LMPP%的条形图。平均值±SD。

[0179] 图44P示出了BM中的从HSC到分化的白细胞的淋巴谱系亚群的绝对计数。preB/NK定义为CD33/66b-19-56-34+38+10+,B幼淋巴细胞定义为CD33/66b-19-56-34-10+,pro-B细胞定义为CD33/66b-19+10+34+,pre-B细胞定义为CD33/66b-19+10+34-,成熟B细胞定义为CD33/66b-19+10-34-。未治疗的小鼠汇集在一起(灰色条),4G8治疗的$FLT3^{N399}$和AAVS1 BE小鼠分别以粉色和黄色报告。每个群条形图上方报告了CAR治疗组绝对计数($FLT3^{N399}$/AAVS1)的倍数变化。平均值±SD。使用多重比较的单因素方差分析。报告了用4G8 CAR治疗的$FLT3^{N399}$与AAVS1 BE条件之间比较的FDR调整的p值(p＜0.05以粗体示出)。

[0180] 图45A示出在8周时用$AAVS1^{BE}$和$FLT3^{N399}$HSPC异种移植的NBSGW小鼠的外周血谱系组成。平均值±SD。$AAVS1^{BE}$ N＝13,$FLT3^{N399}$N＝18。通过非配对的t检验进行统计学比较。

[0181] 图45B示出谱系阴性CD34+祖细胞在体内被4G8CAR-T耗竭,并且被$FLT3^{N399}$编辑保护(来自图44的实验)。具有CD34+祖细胞门控的谱系阴性细胞(mNeonGreen-CD3-19-14-11c-56-)的代表性流式细胞术图(门控内报告的百分比)。

[0182] 图45C示出hCD45+3-mNeonGreen-BM细胞内的lin-CD34+细胞的百分比。平均值±SD。通过单因素方差分析进行比较。

[0183] 图45D示出了来自图44的小鼠的BM lin-CD34+的相对组成。平均值±SD。使用多重比较的双因素方差分析(仅报告AAVS1与$FLT3^{N399}$的比较)。HSC,造血干细胞;MPP,多能祖细胞;LMPP,淋巴预处理多能祖细胞;CMP,常见的髓系祖细胞;GMP,粒单核祖细胞;MEP,巨红系祖细胞。

[0184] 图45E示出了终点时在髓系(左侧)和淋巴(右侧)BM亚群上的FLT3表达(MFI)。由于细胞数量少,4G8 CAR治疗的$AAVS1^{BE}$条件下的LMPP、MPP和HSC无法评估(NE)。平均值±SD。报告了通过多重非配对t检验的统计学差异。

[0185] 图45F示出来自图44的小鼠BM中通过流式细胞术的CAR细胞表型。CD45RA+62L+,初始;CD45RA-62L+,中央记忆,CM;CD45RA-62L-,效应记忆,EM;CD45RA+62L,重表达CD45RA、EMRA的终末分化EM细胞。

[0186] 图45G是报告(从左到右)BM CD3+细胞内的EGFRt+百分比、BM CD8+CAR T细胞上的PD1(CD279)MFI百分比和BM CD4+CAR T细胞上的PD1(CD279)MFI百分比的条形图。平均值±SD。报告了通过单因素方差分析的$AAVS1^{BE}$与$FLT3^{N399}$条件之间的对比。

[0187] 图45H示出在10周时用$AAVS1^{BE}$和$CD123^{S59}$HSPC异种移植的NBSGW小鼠的外周血谱系组成(来自图46的实验)。平均值±SD(N=11)。报告了通过非配对t检验的统计学比较。

[0188] 图45I示出谱系阴性CD34+祖细胞在体内被CSL362 CAR-T耗竭(来自图46的实验)。左侧是以CD34+祖细胞为门控的谱系阴性细胞(mNeonGreen-CD3-19-14-11c-56-)的代表性流式细胞术图。右侧是以HSC(CD45RA-90+)、MPP(CD45RA-90-)、LMPP(CD45RA+90-)亚群为门控的lin-CD34+38-10-细胞的代表性流式细胞术图。

[0189] 图45J示出了来自图46的小鼠的BM lin-CD34+的相对组成。平均值±SD。使用多重比较的双因素方差分析(仅报告AAVS1与$CD123^{S59}$的比较)。HSC,造血干细胞;MPP,多能祖细胞;LMPP,淋巴预处理多能祖细胞;CMP,常见的髓系祖细胞;GMP,粒单核祖细胞;MEP,巨红系祖细胞。

[0190] 图46A是用AML PDX-1共移植并且用5M CSL362 CAR_T细胞治疗的$CD123^{S59}$或AAVS1 BE HSPC的异种移植和分析的示意性代表图。

[0191] 图46B示出在用CSL362 CAR-T细胞治疗或未治疗的小鼠的终点时对总血细胞(第8、10周)以及分选的CD33+和CD19+髓系(BM)细胞测量的CD123碱基编辑。$CD123^{S59}$ N=6,AAVS1 BE N=5。平均值±SD。通过多重非配对t检验进行统计学比较。

[0192] 图46C示出了来自用CD34+HSPC+AML PDX-1植入的、用CSL362 CAR-T治疗或未治疗的以及仅用AML PDX-1植入的小鼠的BM样品的代表性流式细胞术图。图为对总人CD45+预门控;CAR-T细胞通过CD3染色鉴定,同时AML PDX细胞是mNeonGreen+。

[0193] 图46D是示出hCD45+CD3-BM细胞内AML PDX细胞的百分比的条形图。平均值±SD。

[0194] 图46E是示出hCD45+mNeonGreen-BM细胞内CD3+细胞的百分比的条形图。平均值±SD。

[0195] 图46F是示出BM中总hCD45+3-mNeonGreen-细胞的绝对计数的条形图。平均值±SD。

[0196] 图46G是示出人CD45+3-mNeonGreen-BM细胞内pro-B细胞(CD19+10-34-)的百分比

的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析对CD123^{S59}与AAVS1 BE条件进行统计学比较。

[0197] 图46H左侧示出了示出在用CD123^{S59}或AAVS1 BE HSPC移植的小鼠中,通过CSL362 CAR-T耗竭BM髓系细胞(CD33/66b+19-,通过橙色门控突出显示)的代表性FACS图;并且右侧示出了示出耗竭粒细胞(PMN,CD33/66b+19-14-SSC^{high},橙色门控)的代表性FACS图

[0198] 图46I、46J和46K是示出总髓系细胞(hCD45+细胞内的CD33/66b+19-)(46I)、PMN(CD33/66b+19-细胞内的CD33/66b+19-)(46J)、未成熟PMN(CD33/66b+19-细胞内的CD33/66b+19-14-10-11c-SSC^{high})(46K)的百分比的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析对CD123^{S59}与AAVS1 BE条件进行统计学比较。

[0199] 图46L是示出在用CD123^{S59}或AAVS1 BE HSPC移植的小鼠中通过CSL362 CAR-T的树突状细胞(DC)亚群损失的代表性流式细胞术图。左侧:常规DC(cDC,CD33/66b+14-11c+FLT3+SSC^{low}),图为对CD33/66b+14-SSC^{low}细胞门控。右侧:浆细胞样DC(pDC,CD33/66b+14-11c-FLT3+CD123^{high}SSC^{low}),图为对CD33/66b+14-11c-SSC^{low}细胞门控。

[0200] 图46M和46N是分别示出hCD45+3-mNeonGreen-细胞内的cDC和pDC百分比的条形印迹。

[0201] 图46O示出hCD45+3-mNeonGreen-细胞内的谱系-CD34+祖细胞的百分比。平均值±SD。通过单因素方差分析对CD123^{S59}与AAVS1 BE条件进行统计学比较。

[0202] 图46P和46Q示出BM中从HSC到分化的白细胞的髓系(P)和淋巴(Q)谱系亚群的绝对计数。未治疗的小鼠汇集在一起(灰色条),同时CSL362治疗的CD123^{S59}和AAVS1 BE小鼠分别以粉色和蓝色报告。每个群条形图上方报告了CAR治疗组绝对计数(CD123^{S59}/AAVS1)的倍数变化。平均值±SD。使用多重比较的单因素方差分析。报告了用4G8 CAR治疗的CD123^{S59}与AAVS1 BE条件之间比较的FDR调整的p值($p<0.05$以粗体示出)。

[0203] 图47A示出了终点时髓系(左侧)和淋巴(右侧)BM亚群上的CD123表达(MFI)。平均值±SD。报告了通过多重非配对t检验的统计学差异。

[0204] 图47B示出4G8CAR T细胞在体内耗竭PDX-1但无法根除PDX-2。NSBGW雌性小鼠用AML PDX细胞异种移植,并且10天后用4G8 CAR-T细胞治疗。实验终点是CAR-T施用后14天。从左到右,条形图示出骨髓(BM)中总CD45+细胞内AML PDX细胞的百分比、脾脏(SP)中总CD45+细胞内AML PDX细胞的百分比、BM T细胞的绝对计数、BM中存活AML细胞的FLT3 MFI以及SP中存活AML细胞的FLT3 MFI。平均值±SD。通过单因素方差分析进行比较。

[0205] 图47C示出4G8CAR T细胞在体内耗竭PDX-1,但无法在用AAVS1^{BE}和FLT3^{N399} HSPC预植入的小鼠中根除PDX-2。NBSGW小鼠用编辑的HSPC异种移植,并且在11周后注射PDX-1或PDX-2细胞。10天后,用2.5M 4G8 CAR-T细胞治疗小鼠,并且在2周后评估结果。条形图中报告了在总BM hCD45+细胞内AML细胞的百分比。平均值±SD。通过单因素方差分析进行比较。

[0206] 图47D示出CAR-T细胞组合在体内对PDX-2具有提高的功效。NBSGW小鼠用0.75M PDX-2细胞异种移植,并且在10天后,用2.5M 4G8 CAR或者4G8+CSL362、4G8+Fab79D或CSL362+Fab79DCAR T细胞组合(各2.5M)治疗。两周后评估结果。条形图示出了总BM hCD45+细胞内AML细胞的百分比。平均值±SD。通过单因素方差分析的多重比较与未治疗情况。

[0207] 图47E示出在9周时用AAVS1^{BE}和双编辑的FLT3^{N399}/CD123^{S59}HSPC异种移植的NBSGW小鼠的外周血谱系组成(来自图49D的实验)。通过非配对的t检验进行统计学比较。平均值±SD。

[0208] 图48A是用于用编辑的HSPC和/或AML PDX异种移植的小鼠(来自图46的实验)的骨髓分析的代表性流式细胞术门控策略。细胞以单态、活和物理参数门预门控。群:1.人CD45+;2.T细胞(CAR);3.mNeonGreen+(AML PDX);4.w/o CAR或AML的人CD45+;5.总CD19+;6.总髓系细胞(CD33/66b+);7.粒细胞+肥大细胞;8.单核细胞;9.肥大细胞;10.总粒细胞;11.成熟粒细胞(CD10+/11c+);12.未成熟粒细胞(CD10-/11c-);13.经典树突状细胞,cDC;14.pro-B细胞;15.pre-B细胞;16.成熟B细胞;17.自然杀伤细胞,NK;18.幼淋巴细胞;19.髓母细胞;20.lin-CD34+(CD33/66+lin-CD34+和CD33/66-lin-CD34+汇集用于下游门控);21.Lin-CD34+38+;22.Lin-CD34+38-;23.Pre-B/NK;24.粒单核祖细胞,GMP;25.常见的髓系祖细胞,CMP;26.巨红系祖细胞,MEP;27.造血干细胞,HSC;28.多能祖细胞,MPP;29.淋巴预处理多能祖细胞,LMPP;30.珠门;31.小鼠CD45+;32.浆细胞样DC;33.多能淋巴祖细胞MLP。首先CountBead以单态进行门控,作为FSC-$A^{low}PI^{high}$,然后使用两个额外的荧光参数进行门控(在左下角绘制)。

[0209] 图48B是用于骨髓和脾脏上的T细胞组的代表性流式细胞术门控策略。细胞以单态、活和物理参数门预门控。人CD45+细胞分为CD3+(T细胞)和CD3-,其中残余的AML被门控为mNeonGreen+。CAR+细胞通过EGFR染色鉴定。T细胞表型通过CD45RA和CD62L以门控的CD8+和CD4+细胞进行评估。

[0210] 图49A示出了在本体细胞或FACS分选的CD90+原始祖细胞上测量的单独$FLT3^{N399}$或与KIT^{H378R}组合的CD34+HSPC碱基编辑的效率。报告了来自图41C的KIT^{H378R}单一编辑用于比较。平均值±SD。

[0211] 图49B是示出在多重表位编辑后由4G8和7G3mAb的识别损失的双FLT3/CD123报告K562细胞的代表性流式细胞术图。

[0212] 图49C示出B的每个象限中的编辑的细胞进行了FACS分选,然后与双特异性FLT3/CD123 CAR-T细胞共培养。示出活靶细胞的分数(左侧)、T细胞活化(CD69表达,中间)和脱粒(CD107a表面表达,右侧)的百分比、T细胞上CellTrace标记的中值荧光强度(MFI)以及靶细胞上的FLT3和CD123表面表达(MFI)的图以不同的E:T比率报告。平均值±SD(N=4)。通过双因素方差分析进行统计学比较。

[0213] 图49D是用AML PDX-2共移植并且用1:1的4G8和CSL362CAR-T细胞池治疗的双$FLT3^{N399}$/$CD123^{S59}$表位编辑的或AAVS1 BE HSPC的异种移植和分析的示意性代表图。

[0214] 图49E示出了来自用CD34+HSPC、CD34+HSPC+AML PDX_2或CD34+HSPC+AML PDX-2移植并且用4G8/CSL362 CAR治疗的小鼠的BM样品的代表性流式细胞术图。图以总人CD45+预门控;CAR T细胞通过CD3染色鉴定,AML PDX细胞是mNeonGreen+。

[0215] 图49F是示出hCD45+CD3-BM细胞内AMIPDX细胞的百分比的条形图。平均值±SD。通过单因素方差分析进行统计学比较。

[0216] 图49G示出了来自D的小鼠在终点时对总血细胞(第9、10周)和分选的CD33+和CD19+BM细胞测量的FLT3(左侧)和CD123(右侧)碱基编辑。平均值±SD。通过多重非配对t检验进行统计学比较。

[0217] 图49H示出BM中从HSC到分化的白细胞的髓系(左侧)和淋巴(右侧)谱系亚群的绝对计数。未治疗的小鼠汇集在一起(灰色条),CAR治疗的$FLT3^{N399}$+$CD123^{S59}$小鼠以粉色报告,并且CAR治疗的$AAVS1^{BE}$小鼠以蓝色报告。每个群条形图上方报告了CAR治疗组绝对计数

(FLT3^{N399}+CD123^{S59}/AAVS1)的倍数变化。平均值±SD。使用多重比较的单因素方差分析。报告了用4G8 CAR治疗的FLT3^{N399}/CD123^{S59}与AAVS1 BE条件之间比较的FDR调整的p值(p＜0.05以粗体显示)。

具体实施方式

[0218] 鉴定用于靶向癌症疗法的适合的蛋白质是一项重大挑战。许多潜在的靶蛋白既存在于癌细胞的细胞表面,也存在于正常的非癌细胞的细胞表面,所述靶蛋白可在受试者发育和/或存活中被需要或关键参与。许多靶蛋白有助于此类必需细胞的功能。因此,靶向这些蛋白质的疗法可对受试者造成有害影响,诸如显著的毒性和/或其他副作用。此外,对CAR-T疗法的抗性仍然是治疗造血系统恶性肿瘤诸如急性髓系白血病(AML)的一个挑战,所述疾病由于癌细胞上的癌症抗原发生转换,从而逃避CAR-T疗法。

[0219] 因此,本公开提供了旨在解决至少上述问题的方法、细胞、组合物和药盒。本文所述的方法、细胞、组合物和药盒为血液系统恶性肿瘤提供了安全有效的治疗,所述治疗允许靶向不仅存在于癌细胞上且存在于对于受试者的发育和/或存活至关重要的细胞上的一种或多种细胞表面蛋白。在一些情况下,本文描述了在编码细胞表面蛋白(例如FLT3、CD123和/或KIT)的一个或多个基因中具有遗传编辑的遗传工程化的造血细胞诸如造血干细胞(HSPC);产生此类细胞的方法,例如,经由使用特定引导RNA的CRISPR方法;使用工程化的造血细胞单独或与一种或多种细胞毒性剂(例如,CAR-T细胞)组合治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述一种或多种细胞毒性剂可靶向野生型细胞表面抗原但不靶向由工程化的造血细胞中的编辑的基因编码的那些抗原;以及包含工程化的造血细胞的药盒。

[0220] I.遗传工程化的造血细胞

[0221] 在一些实施方案中,遗传工程化的造血细胞具有编辑的FLT3基因、CD123基因或KIT基因。在一些情况下,这些基因中的一个或多个发生突变。在一些情况下,突变的FLT3基因、CD123基因或KIT基因包括一个或多个非必需表位的突变或缺失,以保留(全部或部分)FLT3基因、CD123基因或KIT基因的生物活性。

[0222] i.造血干细胞

[0223] 在一些实施方案中,本文所述的造血细胞是造血干细胞。造血干细胞/祖细胞(HSPC)能够产生髓系祖细胞和淋巴祖细胞,而这些祖细胞进一步分别产生髓系细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、红细胞、血小板等)和淋巴细胞(例如T细胞、B细胞、NK细胞)。HSPC的特征在于细胞表面标记CD34(例如CD34+)的表达,其可用于HSPC的鉴定和/或分离。

[0224] 在一些实施方案中,HSPC是从受试者(诸如哺乳动物受试者)获得的。在一些实施方案中,哺乳动物受试者是非人灵长类动物、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、牛、猪、马或家养动物。在一些实施方案中,HSPC是从人患者(诸如患有造血系统恶性肿瘤的人患者)获得的。在一些实施方案中,HSPC是从健康供体获得的。在一些实施方案中,HSPC是从随后将被施用遗传工程化的HSPC的受试者中获得的。向获得细胞的相同受试者施用的HSPC被称为自体细胞,而从与将施用细胞的受试者不同的受试者获得的HSPC被称为同种异体细胞(降低排斥发生率的方法是标准的并且是本领域熟知的)。

[0225] HSPC可使用本领域已知的常规手段从任何适合的来源获得。在一些实施方案中,

HSPC可从受试者(或供体)的样品(诸如骨髓样品或血液样品)获得。或者或另外,HSPC可从脐带(即脐带血细胞)获得。在一些实施方案中,HSPC来自骨髓、脐带血细胞或外周血单核细胞(PBMC)。一般来说,骨髓细胞可从受试者(或供体)的髂嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或其他骨髓腔中获得。可以从患者体内取出骨髓,并且通过本领域已知的各种分离和洗涤程序将其分离。分离骨髓细胞的示例性程序包括以下步骤:a)提取骨髓样品;b)将骨髓悬浮液离心分离成三个部分并且收集中间部分或血沉棕黄层;c)将步骤(b)中的血沉棕黄层部分在分离液(通常为Ficoll™)中再离心一次,并且收集含有骨髓细胞的中间部分;以及d)洗涤步骤(c)中收集的部分,以回收可再输血的骨髓细胞。

[0226] HSPC通常存在于骨髓中,但可以通过施用动员剂将其动员到循环血液中,以便从外周血中获取HSPC。在一些实施方案中,向从其获得HSPC的受试者(或供体)施用动员剂,诸如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。使用动员剂进行动员后收集的HSPC数量通常大于未使用动员剂获得的细胞数量。

[0227] 在一些实施方案中,从受试者(或供体)获得样品,然后富集所需的细胞类型(例如CD34+、CD34+CD38-、CD133+、CD90+、CD49f+)。例如,可以如本文所述从血液中分离PBMC和/或CD34+造血细胞。还可以将细胞与其他细胞分离,例如通过用与所需细胞类型的细胞表面上的表位结合的抗体进行分离和/或活化。可以使用的另一种方法包括使用针对细胞表面标记的抗体进行负选择,以选择性地富集特定细胞类型,而无需通过受体结合活化细胞。

[0228] ii突变的细胞表面抗原

[0229] 在一些实施方案中,本文所述的造血干细胞(HSPC)可含有以突变形式(突变体或变体,本文可互换使用)编码一个或多个感兴趣的细胞表面蛋白(例如FLT3、CD123、KIT)的编辑的基因,其与如本文所述的细胞毒性剂(例如抗FLT3抗体、抗CD123抗体、抗KIT抗体)的结合降低或无结合。突变体可以携带细胞毒性剂结合表位的一个或多个突变,使得与天然或野生型细胞表面蛋白对应物相比,其与细胞毒性剂的结合降低或消除。此种突变体优选地保持与野生型对应物基本类似的生物活性。

[0230] 如本文所用,术语“结合降低”是指结合降低至少25%。结合水平可以指与野生型(即,非工程化的、非突变的)蛋白质相比,细胞毒性剂与造血干细胞的结合量或细胞毒性剂与细胞表面蛋白的结合量。在一些实施方案中,结合降低至少25%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,结合降低使得在常规测定中基本上无可检测的结合。如本文所用,“无结合”是指基本上无结合,例如无可检测的结合或仅有如在常规结合测定中所确定的基线结合。

[0231] 在一些情况下,变体在感兴趣的表位内含有一个或多个氨基酸残基取代(例如,2、3、4、5个或更多个),使得细胞毒性剂不结合突变的表位或与突变的表位的结合降低。此种突变体对细胞毒性剂的结合亲和力可显著降低(例如,具有小于其野生型对应物至少40%、50%、60%、70%、80%或90%的结合亲和力)。在一些实例中,此种变体可以消除与细胞毒性剂的结合活性。在其他情况下,突变体含有包含感兴趣的表位的区域的缺失。此种区域可以通过外显子编码。在一些实施方案中,所述区域是编码表位的感兴趣的细胞表面蛋白的结构域。在一个实例中,变体只是缺失了表位。缺失区域的长度可以为3-60个氨基酸,例如5-50、5-40、10-30、10-20等。

[0232] 细胞表面抗原突变体中的突变或缺失可以位于非必需表位内或周围,使得突变或缺失基本上不影响蛋白质的生物活性。

[0233] 如本文所用,术语“表位”是指由抗体的CDR结合的蛋白质(诸如细胞表面抗原)的氨基酸序列(线性或构象)。在一些实施方案中,细胞毒性剂与细胞表面抗原的一个或多个(例如,至少2、3、4、5个或更多个)表位结合。在一些实施方案中,细胞毒性剂与细胞表面抗原的多于一个表位结合,并且对造血细胞进行操作使得每个表位均不存在且/或不能被细胞毒性剂结合。

[0234] 在一些实施方案中,本文所述的遗传工程化的HSPC具有细胞表面抗原的一个或多个编辑的基因,使得编辑的基因表达具有一个或多个非必需表位突变的突变细胞表面抗原。“非必需表位”(或包含此类非必需表位的片段)是指细胞表面蛋白/抗原内的结构域,其中的突变不太可能显著影响细胞表面蛋白的生物活性。例如,包含细胞表面抗原的非必需表位的缺失或突变的造血细胞,此类造血细胞能够增殖和/或经历红细胞生成分化至与表达野生型细胞表面抗原的造血细胞类似的水平。

[0235] 用于鉴定和/或验证细胞表面抗原中的非必需表位的方法是本领域的普通技术人员已知和认可的,并且也在本公开的范围内。此外,用于评价细胞表面抗原和造血细胞的功能性的方法是本领域已知的,并且包括例如增殖测定、分化测定、集落形成、表达分析(例如,基因和/或蛋白质)、蛋白质定位、胞内信号传导、功能测定和体内人源化小鼠模型。

[0236] iii.遗传工程化的造血细胞的制备

[0237] 任何携带一个或多个细胞表面抗原的编辑的基因的遗传工程化的造血细胞诸如HSPC可以通过常规方法或本文所述的方法制备。在一些实施方案中,使用基因组编辑进行遗传工程化。如本文所用,“基因组编辑”是指修饰生物体的基因组(包括任何蛋白质编码或非编码核苷酸序列)以改变靶基因表达的方法。一般来说,基因组编辑方法涉及使用能够裂解基因组核酸的内切核酸酶,例如在靶向的核苷酸序列处。在一些情况下,基因组编辑方法涉及使用死核酸酶或为切口酶的核酸酶。可以通过引入突变来修复基因组中的双链断裂和/或将外源核酸插入靶向的位点。在一些情况下,基因组编辑方法涉及使用与功能结构域(例如就碱基编辑器而言,腺嘌呤或胞苷脱氨酶结构域)融合的催化失活或部分失活的内切核酸酶。其他功能结构域包括先导编辑器、CRISPR-Cas活化子或抑制子等。

[0238] 基因组编辑方法一般基于在靶核酸中生成双链断裂所涉及的内切核酸酶类型进行分类。这些方法包括使用锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)、巨核酸酶和CRISPR/Cas系统。

[0239] 在本公开的一个方面中,通过修饰的正常细胞群替代癌细胞是使用已操作使得细胞不会与细胞毒性剂结合的正常细胞来进行的。此类修饰可以包括使用CRISPR-Cas系统对特定细胞表面蛋白表位的缺失或突变,其中成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-Cas系统是一种工程化的、非天然存在的CRISPR-Cas系统。

[0240] CRISPR系统编码对细菌适应性免疫至关重要的RNA引导的内切核酸酶。CRISPR相关的(Cas)核酸酶可以很容易地被编程以裂解靶DNA序列,用于进行各种基因组编辑。其中一类核酸酶被称为Cas9蛋白,与两种短RNA复合:crRNA和反式活化crRNA(tracrRNA)。最常用的Cas9直系同源物SpCas9使用在5′端具有与靶DNA位点的“原型间隔区”区域互补的20个核苷酸(nt)的crRNA。有效的裂解还需要SpCas9识别原型间隔区相邻基序(PAM)。crRNA和

tracrRNA通常组合成指导SpCas9的DNA裂解活性的单个约100nt的引导RNA(gRNA)。一种名为Cpf1的Cas蛋白已被鉴定也可以被编程以裂解靶DNA序列。与SpCas9不同,Cpf1仅需要单个42nt crRNA,其在3′端具有与靶DNA序列的原型间隔区互补的23nt。

[0241] 在一些实施方案中,Cas内切核酸酶是Cas9核酸酶或其变体。Cas9内切核酸酶裂解产生平端的靶核酸的双链DNA。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶是Cpf1核酸酶或其变体。用Cpf1核酸酶裂解导致核酸末端交错。

[0242] Cas9

[0243] 在一些实施方案中,Cas内切核酸酶是Cas9酶或其变体。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶来源于化脓性链球菌(SpCas9)或金黄色葡萄球菌(SaCas9)。

[0244] SpCas9野生型序列如下(SEQ ID NO:1):

MDKKYSIGLD IGTNSVGWAV ITDEYKVPSK KFKVLGNTDR HSIKKNLIGA
LLFDSGETAE ATRLKRTARR RYTRRKNRIC YLQEIFSNEM AKVDDSFFHR
LEESFLVEED KKHERHPIFG NIVDEVAYHE KYPTIYHLRK KLVDSTDKAD
LRLIYLALAH MIKFRGHFLI EGDLNPDNSD VDKLFIQLVQ TYNQLFEENP
INASGVDAKA ILSARLSKSR RLENLIAQLP GEKKNGLFGN LIALSLGLTP
NFKSNFDLAE DAKLQLSKDT YDDDLDNLLA QIGDQYADLF LAAKNLSDAI

[0245] LLSDILRVNT EITKAPLSAS MIKRYDEHHQ DLTLLKALVR QQLPEKYKEI
FFDQSKNGYA GYIDGGASQE EFYKFIKPIL EKMDGTEELL VKLNREDLLR
KQRTFDNGSI PHQIHLGELH AILRRQEDFY PFLKDNREKI EKILTFRIPY
YVGPLARGNS RFAWMTRKSE ETITPWNFEE VVDKGASAQS FIERMTNFDK
NLPNEKVLPK HSLLYEYFTV YNELTKVKYV TEGMRKPAFL SGEQKKAIVD
LLFKTNRKVT VKQLKEDYFK KIECFDSVEI SGVEDRFNAS LGTYHDLLKI
IKDKDFLDNE ENEDILEDIV LTLTLFEDRE MIEERLKTYA HLFDDKVMKQ

LKRRRYTGWG RLSRKLINGI RDKQSGKTIL DFLKSDGFAN RNFMQLIHDD
SLTFKEDIQK AQVSGQGDSL HEHIANLAGS PAIKKGILQT VKVVDELVKV
MGRHKPENIV IEMARENQTT QKGQKNSRER MKRIEEGIKE LGSQILKEHP
VENTQLQNEK LYLYYLQNGR DMYVDQELDI NRLSDYDVDH IVPQSFLKDD
SIDNKVLTRS DKNRGKSDNV PSEEVVKKMK NYWRQLLNAK LITQRKFDNL
TKAERGGLSE LDKAGFIKRQ LVETRQITKH VAQILDSRMN TKYDENDKLI
REVKVITLKS KLVSDFRKDF QFYKVREINN YHHAHDAYLN AVVGTALIKK

[0246] YPKLESEFVY GDYKVYDVRK MIAKSEQEIG KATAKYFFYS NIMNFFKTEI
TLANGEIRKR PLIETNGETG EIVWDKGRDF ATVRKVLSMP QVNIVKKTEV
QTGGFSKESI LPKRNSDKLI ARKKDWDPKK YGGFDSPTVA YSVLVVAKVE
KGKSKKLKSV KELLGITIME RSSFEKNPID FLEAKGYKEV KKDLIIKLPK
YSLFELENGR KRMLASAGEL QKGNELALPS KYVNFLYLAS HYEKLKGSPE
DNEQKQLFVE QHKHYLDEII EQISEFSKRV ILADANLDKV LSAYNKHRDK
PIREQAENII HLFTLTNLGA PAAFKYFDTT IDRKRYTSTK EVLDATLIHQ
SITGLYETRI DLSQLGGD

[0247] SaCas9野生型序列如下(SEQ ID NO:2):

MKRNYILGLD IGITSVGYGI IDYETRDVID AGVRLFKEAN VENNEGRRSK
RGARRLKRRR RHRIQRVKKL LFDYNLLTDH SELSGINPYE ARVKGLSQKL
SEEEFSAALL HLAKRRGVHN VNEVEEDTGN ELSTKEQISR NSKALEEKYV
AELQLERLKK DGEVRGSINR FKTSDYVKEA KQLLKVQKAY HQLDQSFIDT
YIDLLETRRT YYEGPGEGSP FGWKDIKEWY EMLMGHCTYF PEELRSVKYA

[0248] YNADLYNALN DLNNLVITRD ENEKLEYYEK FQIIENVFKQ KKKPTLKQIA
KEILVNEEDI KGYRVTSTGK PEFTNLKVYH DIKDITARKE IIENAELLDQ
IAKILTIYQS SEDIQEELTN LNSELTQEEI EQISNLKGYT GTHNLSLKAI
NLILDELWHT NDNQIAIFNR LKLVPKKVDL SQQKEIPTTL VDDFILSPVV
KRSFIQSIKV INAIIKKYGL PNDIIIELAR EKNSKDAQKM INEMQKRNRQ
TNERIEEIIR TTGKENAKYL IEKIKLHDMQ EGKCLYSLEA IPLEDLLNNP
FNYEVDHIIP RSVSFDNSFN NKVLVKQEEN SKKGNRTPFQ YLSSSDSKIS
YETFKKHILN LAKGKGRISK TKKEYLLEER DINRFSVQKD FINRNLVDTR
YATRGLMNLL RSYFRVNNLD VKVKSINGGF TSFLRRKWKF KKERNKGYKH
HAEDALIIAN ADFIFKEWKK LDKAKKVMEN QMFEEKQAES MPEIETEQEY
KEIFITPHQI KHIKDFKDYK YSHRVDKKPN RELINDTLYS TRKDDKGNTL

[0249] IVNNLNGLYD KDNDKLKKLI NKSPEKLLMY HHDPQTYQKL KLIMEQYGDE
KNPLYKYYEE TGNYLTKYSK KDNGPVIKKI KYYGNKLNAH LDITDDYPNS
RNKVVKLSLK PYRFDVYLDN GVYKFVTVKN LDVIKKENYY EVNSKCYEEA
KKLKKISNQA EFIASFYNND LIKINGELYR VIGVNNDLLN RIEVNMIDIT
YREYLENMND KRPPRIIKTI ASKTQSIKKY STDILGNLYE VKSKKHPQII KKG

[0250] 一般而言,靶核酸的3′侧或5′侧侧翼有原型间隔区相邻基序(PAM),所述基序可以

与内切核酸酶相互作用并且进一步涉及将内切核酸酶活性靶向靶核酸。一般认为,靶核酸侧翼的PAM序列取决于内切核酸酶以及内切核酸酶来源于的来源。例如,对于来源于化脓性链球菌的Cas9内切核酸酶,PAM序列为NGG,尽管PAM序列NAG和NGA可以较低的效率被识别。对于来源于金黄色葡萄球菌的Cas9内切核酸酶,PAM序列为NNGRRT(SEQ ID NO:3)。

[0251] 因此,在一些情况下,对内切核酸酶进行工程化/修饰,使得它能够识别一个或多个PAM序列。在一些实施方案中,内切核酸酶已被工程化/修饰以识别与未工程化/修饰的内切核酸酶识别的PAM序列不同的一个或多个PAM序列。在一些实施方案中,内切核酸酶已被工程化/修饰以降低酶的脱靶活性。在一些实施方案中,编码内切核酸酶的核苷酸序列被修饰以改变内切核酸酶的PAM识别。例如,Cas内切核酸酶(例如SpCas9)在以下位置中的一个或多个处具有突变:A61、L1111、D1135、S1136、G1218、E1219、N1317、A1322、R1333、R1335、T1337。参见例如国际专利申请公开号WO 2016/141224和WO 2017/040348、美国专利申请公开号2021/0284978A1,所有这些文献均通过引用并入本文。

[0252] 在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶是核酸酶的野生型版本。例如,Cas9内切核酸酶是具有如上所示SEQ ID NO:1序列的SpCas9内切核酸酶。在一些实施方案中,SpCas9内切核酸酶与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少80%,例如至少85%、90%或95%同一,例如,与例如用保守突变替代的SEQ ID NO:1的残基具有高达5%、10%、15%或20%的差异。在优选的实施方案中,内切核酸酶保留亲本的所需活性,例如核酸酶活性(除非亲本是切口酶或死Cas9),和/或与引导RNA和靶DNA相互作用的能力。在其他情况下,Cas9内切核酸酶是具有如上所示SEQ ID NO:2序列的SaCas9内切核酸酶。在一些实施方案中,SaCas9内切核酸酶与SEQ ID NO:2的氨基酸序列至少80%,例如至少85%、90%或95%同一,例如,与例如用保守突变替代的SEQ ID NO:2的残基具有高达5%、10%、15%或20%的差异。在优选的实施方案中,内切核酸酶保留亲本的所需活性,例如核酸酶活性(除非亲本是切口酶或死Cas9),和/或与引导RNA和靶DNA相互作用的能力。

[0253] 在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶是催化失活的Cas9。例如,dCas9在催化活性残基(D10、E762、D839、H983或D986;和/或H840或N863)处含有突变,并且不具有核酸酶活性。例如,突变为:(i)D10A或D10N,和/或(ii)H840A、H840N或H840Y。

[0254] 在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶包括在K918处的突变。例如突变是K918N。

[0255] 在一些实施方案中,编码Cas9内切核酸酶的核苷酸序列被进一步修饰以改变蛋白质的活性。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶已被修饰以使内切核酸酶的一个或多个催化残基失活。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶已被修饰以使内切核酸酶的催化残基之一失活,称为“切口酶”或“Cas9n”。Cas9切口酶内切核酸酶裂解靶核酸的一条DNA链。

[0256] 在一些情况下,内切核酸酶是NG-SpCas9切口酶并且具有以下突变:D10A、L1111R、D1135V、G1218R、E1219F、A1322R、R1335V、T1337R(相对于野生型SpCas9)。在一些情况下,内切核酸酶是SpRY-Cas9切口酶并且具有以下突变:D10A、A61R、L1111R、D1135L、S1136W、G1218K、E1219Q、N1317R、A1322R、R1333P、R1335Q、T1337R(相对于野生型SpCas9)。

[0257] Cpf1(Cas12a)

[0258] 在一些实施方案中,Cas内切核酸酶是Cpf1核酸酶或其变体。Cpf1内切核酸酶一般识别位于靶核酸5′端的PAM序列。对于Cpf1核酸酶,PAM序列是TTTN。本领域技术人员将理解,Cas内切核酸酶Cpf1核酸酶也可以称为Cas12a。在一些实施方案中,宿主细胞表达来源

于毛螺菌科细菌(LbCpf1)、氨基酸球菌属某种(AsCpf1)或土拉弗朗西斯菌(Francisella tularensis)(FnCpf1)的Cpf1核酸酶。每种野生型序列如下所示。

[0259] V型CRISPR相关蛋白Cpf1[毛螺菌科细菌ND2006],GenBank登录号WP_051666128.1(SEQ ID NO:4)

[0260]
MLKNVGIDRL DVEKGRKNMS KLEKFTNCYS LSKTLRFKAI PVGKTQENID
NKRLLVEDEK RAEDYKGVKK LLDRYYLSFI NDVLHSIKLK NLNNYISLFR
KKTRTEKENK ELENLEINLR KEIAKAFKGN EGYKSLFKKD IIETILPEFL
DDKDEIALVN SFNGFTTAFT GFFDNRENMF SEEAKSTSIA FRCINENLTR
YISNMDIFEK VDAIFDKHEV QEIKEKILNS DYDVEDFFEG EFFNFVLTQE
GIDVYNAIIG GFVTESGEKI KGLNEYINLY NQKTKQKLPK FKPLYKQVLS
DRESLSFYGE GYTSDEEVLE VFRNTLNKNS EIFSSIKKLE KLFKNFDEYS
SAGIFVKNGP AISTISKDIF GEWNVIRDKW NAEYDDIHLK KKAVVTEKYE
DDRRKSFKKI GSFSLEQLQE YADADLSVVE KLKEIIIQKV DEIYKVYGSS
EKLFDADFVL EKSLKKNDAV VAIMKDLLDS VKSFENYIKA FFGEGKETNR
DESFYGDFVL AYDILLKVDH IYDAIRNYVT QKPYSKDKFK LYFQNPQFMG
GWDKDKETDY RATILRYGSK YYLAIMDKKY AKCLQKIDKD DVNGNYEKIN
YKLLPGPNKM LPKVFFSKKW MAYYNPSEDI QKIYKNGTFK KGDMFNLNDC
HKLIDFFKDS ISRYPKWSNA YDFNFSETEK YKDIAGFYRE VEEQGYKVSF
ESASKKEVDK LVEEGKLYMF QIYNKDFSDK SHGTPNLHTM YFKLLFDENN
[0261] HGQIRLSGGA ELFMRRASLK KEELVVHPAN SPIANKNPDN PKKTTTLSYD
VYKDKRFSED QYELHIPIAI NKCPKNIFKI NTEVRVLLKH DDNPYVIGID
RGERNLLYIV VVDGKGNIVE QYSLNEIINN FNGIRIKTDY HSLLDKKEKE
RFEARQNWTS IENIKELKAG YISQVVHKIC ELVEKYDAVI ALEDLNSGFK
NSRVKVEKQV YQKFEKMLID KLNYMVDKKS NPCATGGALK GYQITNKFES
FKSMSTQNGF IFYIPAWLTS KIDPSTGFVN LLKTKYTSIA DSKKFISSFD
RIMYVPEEDL FEFALDYKNF SRTDADYIKK WKLYSYGNRI RIFRNPKKNN
VFDWEEVCLT SAYKELFNKY GINYQQGDIR ALLCEQSDKA FYSSFMALMS
LMLQMRNSIT GRTDVDFLIS PVKNSDGIFY DSRNYEAQEN AILPKNADAN
GAYNIARKVL WAIGQFKKAE DEKLDKVKIA ISNKEWLEYA QTSVKH

[0262] V型CRISPR相关蛋白Cpf1[氨基酸球菌属某种BV3L6],NCBI参考序列:WP_021736722.1(SEQ ID NO:5)

MTQFEGFTNL YQVSKTLRFE LIPQGKTLKH IQEQGFIEED KARNDHYKEL

KPIIDRIYKT YADQCLQLVQ LDWENLSAAI DSYRKEKTEE TRNALIEEQA

TYRNAIHDYF IGRTDNLTDA INKRHAEIYK GLFKAELFNG KVLKQLGTVT

[0263] TTEHENALLR SFDKFTTYFS GFYENRKNVF SAEDISTAIP HRIVQDNFPK

FKENCHIFTR LITAVPSLRE HFENVKKAIG IFVSTSIEEV FSFPFYNQLL

TQTQIDLYNQ LLGGISREAG TEKIKGLNEV LNLAIQKNDE TAHIIASLPH

RFIPLFKQIL SDRNTLSFIL EEFKSDEEVI QSFCKYKTLL RNENVLETAE

ALFNELNSID LTHIFISHKK LETISSALCD HWDTLRNALY ERRISELTGK

ITKSAKEKVQ RSLKHEDINL QEIISAAGKE LSEAFKQKTS EILSHAHAAL

DQPLPTTLKK QEEKEILKSQ LDSLLGLYHL LDWFAVDESN EVDPEFSARL

TGIKLEMEPS LSFYNKARNY ATKKPYSVEK FKLNFQMPTL ASGWDVNKEK

NNGAILFVKN GLYYLGIMPK QKGRYKALSF EPTEKTSEGF DKMYYDYFPD

AAKMIPKCST QLKAVTAHFQ THTTPILLSN NFIEPLEITK EIYDLNNPEK

EPKKFQTAYA KKTGDQKGYR EALCKWIDFT RDFLSKYTKT TSIDLSSLRP

SSQYKDLGEY YAELNPLLYH ISFQRIAEKE IMDAVETGKL YLFQIYNKDF

AKGHHGKPNL HTLYWTGLFS PENLAKTSIK LNGQAELFYR PKSRMKRMAH

[0264] RLGEKMLNKK LKDQKTPIPD TLYQELYDYV NHRLSHDLSD EARALLPNVI

TKEVSHEIIK DRRFTSDKFF FHVPITLNYQ AANSPSKFNQ RVNAYLKEHP

ETPIIGIDRG ERNLIYITVI DSTGKILEQR SLNTIQQFDY QKKLDNREKE

RVAARQAWSV VGTIKDLKQG YLSQVIHEIV DLMIHYQAVV VLENLNFGFK

SKRTGIAEKA VYQQFEKMLI DKLNCLVLKD YPAEKVGGVL NPYQLTDQFT

SFAKMGTQSG FLFYVPAPYT SKIDPLTGFV DPFVWKTIKN HESRKHFLEG

FDFLHYDVKT GDFILHFKMN RNLSFQRGLP GFMPAWDIVF EKNETQFDAK

GTPFIAGKRI VPVIENHRFT GRYRDLYPAN ELIALLEEKG IVFRDGSNIL

PKLLENDDSH AIDTMVALIR SVLQMRNSNA ATGEDYINSP VRDLNGVCFD

SRFQNPEWPM DADANGAYHI ALKGQLLLNH LKESKDLKLQ NGISNQDWLA

YIQELRN

[0265] V型CRISPR相关蛋白Cpf1[土拉弗朗西斯菌],GenBank登录号WP_003040289.1(SEQ ID NO:6)

MSIYQEFVNK YSLSKTLRFE LIPQGKTLEN IKARGLILDD EKRAKDYKKA

KQIIDKYHQF FIEEILSSVC ISEDLLQNYS DVYFKLKKSD DDNLQKDFKS

[0266] AKDTIKKQIS EYIKDSEKFK NLFNQNLIDA KKGQESDLIL WLKQSKDNGI

ELFKANSDIT DIDEALEIIK SFKGWTTYFK GFHENRKNVY SSNDIPTSII

YRIVDDNLPK FLENKAKYES LKDKAPEAIN YEQIKKDLAE ELTFDIDYKT

SEVNQRVFSL DEVFEIANFN NYLNQSGITK FNTIIGGKFV NGENTKRKGI

[0267]
NEYINLYSQQ INDKTLKKYK MSVLFKQILS DTESKSFVID KLEDDSDVVT
TMQSFYEQIA AFKTVEEKSI KETLSLLFDD LKAQKLDLSK IYFKNDKSLT
DLSQQVFDDY SVIGTAVLEY ITQQIAPKNL DNPSKKEQEL IAKKTEKAKY
LSLETIKLAL EEFNKHRDID KQCRFEEILA NFAAIPMIFD EIAQNKDNLA
QISIKYQNQG KKDLLQASAE DDVKAIKDLL DQTNNLLHKL KIFHISQSED
KANILDKDEH FYLVFEECYF ELANIVPLYN KIRNYITQKP YSDEKFKLNF
ENSTLANGWD KNKEPDNTAI LFIKDDKYYL GVMNKKNNKI FDDKAIKENK
GEGYKKIVYK LLPGANKMLP KVFFSAKSIK FYNPSEDILR IRNHSTHTKN
GSPQKGYEKF EFNIEDCRKF IDFYKQSISK HPEWKDFGFR FSDTQRYNSI
DEFYREVENQ GYKLTFENIS ESYIDSVVNQ GKLYLFQIYN KDFSAYSKGR
PNLHTLYWKA LFDERNLQDV VYKLNGEAEL FYRKQSIPKK ITHPAKEAIA
NKNKDNPKKE SVFEYDLIKD KRFTEDKFFF HCPITINFKS SGANKFNDEI
NLLLKEKAND VHILSIDRGE RHLAYYTLVD GKGNIIKQDT FNIIGNDRMK
TNYHDKLAAI EKDRDSARKD WKKINNIKEM KEGYLSQVVH EIAKLVIEYN
AIVVFEDLNF GFKRGRFKVE KQVYQKLEKM LIEKLNYLVF KDNEFDKTGG
VLRAYQLTAP FETFKKMGKQ TGIIYYVPAG FTSKICPVTG FVNQLYPKYE
SVSKSQEFFS KFDKICYNLD KGYFEFSFDY KNFGDKAAKG KWTIASFGSR
LINFRNSDKN HNWDTREVYP TKELEKLLKD YSIEYGHGEC IKAAICGESD
KKFFAKLTSV LNTILQMRNS KTGTELDYLI SPVADVNGNF FDSRQAPKNM
PQDADANGAY HIGLKGLMLL GRIKNNQEGK KLNLVIKNEE YFEFVQNRNN

[0268] 在一些实施方案中,Cpf1内切核酸酶是核酸酶的野生型版本。例如,Cpf1内切核酸酶是具有如上所示SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6序列的Cpf1内切核酸酶。在一些实施方案中,Cpf1内切核酸酶与SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的氨基酸序列至少80%,例如至少85%、90%或95%同一,例如,与例如用保守突变替代的SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6的残基具有高达5%、10%、15%或20%的差异。在优选的实施方案中,内切核酸酶保留亲本的所需活性,例如核酸酶活性(除非亲本是切口酶或死Cas9),和/或与引导RNA和靶DNA相互作用的能力。

[0269] Cpf1(Cas12a)的催化失活变体可称为dCas12a。因此,在一些实施方案中,对于AsCpf1,在D908和E993处进行催化活性破坏突变,例如D908A和E993A;对于LbCpf1,在D832和E925处进行催化活性破坏突变,例如D832A和E925A;并且对于FnCpf1,在D917A和E1006A处进行催化活性破坏突变。

[0270] 功能结构域

[0271] 或者或另外,Cas内切核酸酶(即Cas9或Cas12a)可以与另一种蛋白质或其部分(例如异源功能结构域)融合。在一些实施方案中,异源功能结构域是转录活化结构域(例如,VP64或NF-KB p65)。在一些实施方案中,异源功能结构域是转录沉默子或转录抑制结构域(例如,其中转录抑制结构域是Krueppel相关盒(KRAB)结构域、ERF抑制子结构域(ERD)或mSin3A相互作用结构域(SID);其中转录沉默子是异染色质蛋白1(HP1))。在一些实施方案中,异源功能结构域是修饰DNA甲基化状态的酶(例如,DNA甲基转移酶(DNMT)或TET蛋白(诸

如,TET1))。在一些实施方案中,异源功能结构域是修饰组蛋白亚基的酶(例如,组蛋白乙酰转移酶(HAT)、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)、组蛋白甲基转移酶(HMT)或组蛋白去甲基化酶)。在一些实施方案中,异源功能结构域是生物系链(例如,MS2、Csy4或λN)。在一些实施方案中,异源功能结构域是FokI。

[0272] 在一些实施方案中,异源功能结构域是碱基编辑器,诸如修饰胞嘧啶DNA碱基的脱氨酶,例如来自载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样(APOBEC)脱氨酶家族(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme,catalytic polypeptide-like(APOBEC)family of deaminases)的胞苷脱氨酶,包括APOBEC1、APOBEC2、APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3D/E、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H、APOBEC4、活化诱导胞苷脱氨酶(AID)、胞嘧啶脱氨酶1(CDA1)和CDA2,以及作用于tRNA的胞嘧啶脱氨酶(CDAT)。具体实例包括evoAPOBEC1-BE4max、eA3A-BE5和EA-BE4max。

[0273] 在一些实施方案中,异源功能结构域是修饰腺苷DNA碱基的脱氨酶,例如,脱氨酶是腺苷脱氨酶1(ADA1)、ADA2;作用于RNA的腺苷脱氨酶1(ADAR1)、ADAR2、ADAR3;作用于tRNA的腺苷脱氨酶1(ADAT1)、ADAT2、ADAT3;以及天然存在或工程化的tRNA特异性腺苷脱氨酶(TadA)。例如,ABE8e-TadA-8e。在一些实施方案中,TadA腺苷脱氨酶结构域包含V106W取代。

[0274] 在一些实施方案中,异源功能结构域是抑制或增强内源性DNA修复或碱基切除修复(BER)途径的酶、结构域或肽,例如,尿嘧啶DNA糖基化酶抑制剂(UGI),其抑制尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG,也称为尿嘧啶N-糖基化酶,或UNG)介导的尿嘧啶切除以引发BER;或DNA末端结合蛋白,诸如来自噬菌体Mu的Gam。

[0275] 在一些实施方案中,内切核酸酶是碱基编辑器。碱基编辑器内切核酸酶一般包括与碱基编辑器融合的催化失活的Cas内切核酸酶。例如,内切核酸酶是SpCas9,其在D10、E762、D839、H983或D986处具有突变;且/或在H840或N863处具有突变并且与碱基编辑器融合,诸如上面提到的那些。

[0276] 在一些情况下,内切核酸酶(Cas9或Cas12a)与核定位序列、细胞穿透肽序列、亲和标签和/或荧光蛋白中的一个或多个融合。例如,核定位序列是SV40大T抗原核定位序列(PKKKRKV;SEQ ID NO:82)、核质粒核定位序列(KRPAATKKAGQAKKKK;SEQ ID NO:83)或c-Myc核定位序列(PAAKRVKLD;SEQ ID NO:84)。例如,核定位序列与Cas9或Cas12a蛋白的N末端和/或C末端融合。在一些实施方案中,当异源功能结构域与Cas9或Cas12a蛋白的N末端和/或C末端融合时,核定位序列与异源功能结构域-Cas蛋白复合物的N末端和/或C末端融合或插入在异源功能结构域与Cas蛋白之间。

[0277] 下面提供了示例性Cas内切核酸酶的序列:

[0278] SEQ ID NO:7(SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的氨基酸序列):

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
[0279] ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG
IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF

LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

[0280] SEQ ID NO:85(SpRY-ABE8e 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的氨基酸序列):

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCWMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA
PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
[0281] ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG

IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

[0282] SEQ ID NO:8-SpRY-evoAPOBEC1-BE4 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的氨基酸序列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSSKTGPVAVDPTLRRRIEPHEFEVFFDPRELRKETCLLYE
INWGGRHSIWRHTSQNTNKHVEVNFIEKFTTERYFCPNTRCSITWFLSWSPCGECSRAI
TEFLSRYPNVTLFIYIARLYHLANPRNRQGLRDLISSGVTIQIMTEQESGYCWHNFVNY
SPSNESHWPRYPHLWVRLYVLELYCIILGLPPCLNILRRKQSQLTSFTIALQSCHYQRL
PPHILWATGLKSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVG
WAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRK
NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTI
YHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQ
LFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFK
SNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI
TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEE
FYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY
PFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQ
SFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAI
VDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFL

[0283] DNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKL
INGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIA
NLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRI
EEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVP
QSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTK
AERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSK
LVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK
MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRD
FATVRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPT
VAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIK
LPKYSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQ
LFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTL
TRLGAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSGG
SGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESILMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVM
LLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKIKMLSGGSGGSGGSTNLSDIIEKETGKQLVIQESI
LMLPEEVEEVIGNKPESDILVHTAYDESTDENVMLLTSDAPEYKPWALVIQDSNGENKI
KMLSGGSKRTADGSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

[0284] SEQ ID NO:9-SpRY-K918N-ABE8e-V106W 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的氨基酸序列

MKRTADGSEFESPKKKRKVSEVEFSHEYWMRHALTLAKRARDEREVPVGAVLVLNNRVI
GEGWNRAIGLHDPTAHAEIMALRQGGLVMQNYRLIDATLYVTFEPCVMCAGAMIHSRIG
RVVFGWRNSKRGAAGSLMNVLNYPGMNHRVEITEGILADECAALLCDFYRMPRQVFNAQ
KKAQSSINSGGSSGGSSGSETPGTSESATPESSGGSSGGSDKKYSIGLAIGTNSVGWAV
ITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAERTRLKRTARRRYTRRKNRI
CYLQEIFSNEMAKVDDSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL
RKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE
ENPINASGVDAKAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNF
DLAEDAKLQLSKDTYDDDLDNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKA

PLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYK
FIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYPFL
KDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFI
ERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDL
[0285] LFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNE
ENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLING
IRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLA
GSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEG
IKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSF
LKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAER
GGLSELDKAGFINRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSKLVS
DFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIA
KSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT
VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESIRPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFLWPTVAY
SVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSFEKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPK
YSLFELENGRKRMLASAKQLQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDNEQKQLFV
EQHKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTRL
GAPRAFKYFDTTIDPKQYRSTKEVLDATLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDSGGSKRTAD
GSEFEPKKKRKVGSGSKRPAATKKAGQAKKKKLE

[0286] SEQ ID NO:10-SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的核苷酸序列：

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctc
tgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggccaagaggg
cacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaatagagtgatc
ggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccgaaattat
ggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgccaccctgt
acgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctaggatcggc
cgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgatgaacgt

gctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctggcagatg
aatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaatgctcag
aagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctggctctga
gacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcggggggt
cagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggccgtg
atcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccg
gcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccg
agAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatc
tgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttcca
cagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatct
[0287] tcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctg
agaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccct
ggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgaca
acagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgag
gaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgag
caagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcc
tgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagcaacttc
gacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga
caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacc
tgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcc
cccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgct
gaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccaga
gcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaag
ttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaa
cagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccaga
tccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctg
aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtggg
ccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaacca
tcacccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatc

gagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacag

cctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccg

agggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctg

ctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaa

aatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccc

tgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgag

gaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagaga

gatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagc

agctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggc

atccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgc

caacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatcc

agaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggcc

ggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgt

gaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaacc

[0288] agaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggc

atcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgca

gaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccagg

aactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagcttt

ctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaa

gagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagc

tgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagaga

ggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaacccg

gcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacg

agaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc

gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgc

ccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagc

tggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgcc

aagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcat

gaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctga

tcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccacc
gtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagac
aggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctgatcgcca
gaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtggcctat
tctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaa
agagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgact
ttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaag
tactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAAGCaact
[0289] gcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggcca
gccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtg
gaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagag
agtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggg
ataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaGActg
ggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAtacaGAag
caccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgaga
cacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaaccgccgac
ggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggc
ggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagtaa

[0290] SEQ ID NO:11-SpRY-evoAPOBEC1-BE4 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的核苷酸序列:

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtcag
ttcaaagactgggcctgtcgccgtcgatccaaccctgcgccgccggattgaacctcacg
agtttgaagtgttctttgacccccgggagctgagaaaggagacatgcctgctgtacgag
[0291] atcaactggggaggcaggcactccatctggaggcacacctctcagaacacaaataagca
cgtggaggtgaacttcatcgagaagtttaccacagagcggtacttctgccccaatacca
gatgtagcatcacatggtttctgagctggtcccttgcggagagtgtagcagggccatc
accgagttcctgtccagatatccaaatgtgacactgtttatctacatcgccaggctgta
tcacctggcaaacccaaggaataggcagggcctgcgcgatctgatcagctccggcgtga

ccatccagatcatgacagagcaggagtccggctactgctggcacaacttcgtgaattat
tctcctagcaacgagtcccactggcctaggtacccacacctgtgggtgcgcctgtacgt
gctggagctgtattgcatcatcctgggcctgccccttgtctgaatatcctgcggagaa
agcagagccagctgacctcctttacaatcgccctgcagtcttgtcactatcagaggctg
ccaccccacatcctgtgggccacaggcctgaagtctggcggatctagcggaggatcctc
tggcagcgagacaccaggaacaagcgagtcagcaacaccagagagcagtggcggcagca
gcggcggcagcgacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggc
tgggccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaa
caccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcg
aaacagccgagAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaag
aaccggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacag
cttcttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggc
accccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatc
taccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatcta
[0292] tctggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctga
accccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccag
ctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgc
cagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaaga
agaatggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaag
agcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacga
cgacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccg
ccaagaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatc
accaaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacct
gaccctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttct
tcgaccagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagag
ttctacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgt
gaagctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatcc
cccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttac
ccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatccccta

ctacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcg

aggaaaccatcacccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccag

agcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcc

caagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaat

acgtgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatc

gtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggacta

cttcaagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttca

acgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctg

gacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttga

ggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaag

tgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctg

atcaacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccga

cggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaag

aggacatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgcc

[0293] aatctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtgga

cgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggcca

gagagaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatc

gaagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacac

ccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacg

tggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcct

cagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaa

ccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactact

ggcggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaag

gccgagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggt

ggaaacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacacta

agtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaag

ctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaacta

ccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagt

accctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaag

atgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacag
caacatcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagc
ggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggat
tttgccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccga
ggtgcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcAGgcccaagaggaacagcgataagc
tgatcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTGTGGcccacc
gtggcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaa
gagtgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatc
ccatcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaag
ctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgc
cAAGCAGctgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgt
acctggccagccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacag
ctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagtt
ctccaagagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaaca
agcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctg

[0294] accaGGctgggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCCaagCA
gtacaGGagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcc
tgtacgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgacagcggcgggagcggcggg
agcgggggagcactaatctgagcgacatcattgagaaggagactgggaaacagctggt
cattcaggagtccatcctgatgctgcctgaggaggtggaggaagtgatcggcaacaagc
cagagtctgacatcctggtgcacaccgcctacgacgagtccacagatgagaatgtgatg
ctgctgacctctgacgcccccgagtataagccttgggccctggtcatccaggattctaa
cggcgagaataagatcaagatgctgagcggaggatccggaggatctggaggcagcacca
acctgtctgacatcatcgagaaggagacaggcaagcagctggtcatccaggagagcatc
ctgatgctgcccgaagaagtcgaagaagtgatcggaaacaagcctgagagcgatatcct
ggtccataccgcctacgacgagagtaccgacgaaaatgtgatgctgctgacatccgacg
ccccagagtataagccctgggctctggtcatccaggattccaacggagagaacaaaatc
aaaatgctgtctggcggctcaaaaagaaccgccgacggcagcgaattcgagcccaagaa

gaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggcggccacgaaaaaggccggccagg
caaaaaagaaaaagctcgagtaa

[0295] SEQ ID NO:12-SpRY-K918N-ABE8e-V106W 3xNLS腺嘌呤碱基编辑器的核苷酸序列

[0296]

atgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaaagtctc
tgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggccaagaggg
cacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaatagagtgatc
ggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccgaaattat
ggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgccaccctgt
acgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctaggatcggc
cgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgatgaacgt
gctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctggcagatg
aatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaatgctcag
aagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctggctctga
gacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcgggggt
cagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgggccgtg
atcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccg
gcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccg
agAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggatc
tgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttcca
cagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatct
tcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctg
agaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatctggccct
ggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaaccccgaca
acagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctgttcgag
gaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccagactgag
caagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaagaatggcc
tgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagcaacttc

gacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgacctgga

caacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacc

tgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggcc

cccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgaccctgct

gaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccaga

gcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttctacaag

ttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaa

cagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccaccaga

tccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttacccattcctg

aaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctactacgtggg

ccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgaggaaacca

tcacccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagcttcatc

gagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaagcacag

cctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacgtgaccg

[0297] agggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctg

ctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaa

aatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccc

tgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgag

gaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagaga

gatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtgatgaagc

agctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggc

atccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacggcttcgc

caacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagaggacatcc

agaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggcc

ggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacgagctcgt

gaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagagagaacc

agaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaagagggc

atcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgca

gaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtggaccagg

aactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagcttt
ctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaa
gagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagc
tgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagaga
ggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaaCagacagctggtggaaacccg
gcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacg
agaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctggtgtcc
gatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgc
ccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagc
tggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatgatcgcc
aagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaacatcat
gaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggcctctga
tcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggattttgccacc
gtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgcagac
aggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctgatcgcca
[0298] gaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtggcctat
tctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagagtgtgaa
agagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgact
ttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaag
tactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAAGCaact
gcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacctggcca
gccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtg
gaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctccaagag
agtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagcaccggg
ataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgaccaGActg
ggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAtacaGAag
caccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgaga
cacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaaccgccgac

ggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaaggccggc
ggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgag

[0299] gRNA

[0300] 术语“gRNA”、“引导RNA”和“CRISPR引导序列”可在全文中互换使用,并且是指包含确定CRISPR/Cas系统的Cas DNA结合蛋白特异性的序列的核酸。gRNA与宿主细胞基因组中的靶核酸序列杂交(与其部分或完全互补)。在一些情况下,gRNA统指crRNA和tracrRNA(例如,当使用Cas9核酸酶时-在那些情况下,引导RNA可以被称为单个引导RNA,即sgRNA)。在其他情况下,gRNA仅指crRNA(例如,当使用Cpf1内切核酸酶时)。与靶核酸杂交的gRNA或其部分的长度可以为15-25个核苷酸、18-22个核苷酸或19-21个核苷酸。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列长度为10-30个核苷酸,或15-25个核苷酸。在一些实施

方案中,gRNA序列与靶核酸至少50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或至少100％互补。

[0301] 下表1提供了用于编辑FLT3、CD123和KIT的示例性引导RNA。对于本领域的普通技术人员显而易见的是,gRNA序列的选择可取决于诸如预测的在靶和/或脱靶结合位点的数量等因素。在一些实施方案中,选择gRNA序列以最大化潜在的在靶位点并且最小化潜在的脱靶位点。

[0302]

表 1:

靶基因	gRNA 名称	SEQ ID NO:	序列	突变	碱基编辑器类型	PAM 序列	Cas 要求
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas9-4	13	GAGCAAAAGGGTCTTGATAA	N399 及附近区域	Cas9 核酸酶		Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas9-13	14	AGGGTCTTGATAACGGATAC	N399 及附近区域	Cas9 核酸酶		Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas12a-15	15	TGGTCTCACCTGTATCCGTTATC	N399 及附近区域	Cas12a 核酸酶		Cas12a
FLT3(CD135)	FLT3_e9_Cas12a-15	16	CTTGTGAGCAAAAGGGTCTTGAT	N399 及附近区域	Cas12a 核酸酶		Cas12a
FLT3(CD135)	FLT3_e9_15	17	GTCTTGATAACGGATACAGG	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	TGA	NG-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_16	18	CTTGATAACGGATACAGGTG	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	AGA	NG-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_17	19	TCTTGATAACGGATACAGGT	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	GAG	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_18	20	TTGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_1821	21	CTTGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_1819	22	TGATAACGGATACAGGTGA	N399D、N399G	腺嘌呤碱基编辑器	GAC	SpRY-Cas9
FLT3(CD135)	FLT3_e9_19	23	ATAACGGATACAGGTGAGAC	N399D、N399G	腺嘌呤碱基	CAC	SpRY-Cas9

[0303]

					编辑器		
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N	24	CATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N21	25	GCATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_N19	26	ATAGAATAGTCGGCGTCTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	TAA	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R	27	ATAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	AAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R21	28	CATAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	AAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_R19	29	TAGAATAGTCGGCGTCTTT	S59P、Y58H	腺嘌呤碱基编辑器	AAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_H	30	GGCCACTCGGACGGTGTAGT	R84Q、V85M/I、A86T	胞苷碱基编辑器	TGG	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_Q	31	GCCACTCGGACGGTGTAGTT	R84Q、V85M/I、A86T	胞苷碱基编辑器	GGT	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_L	32	TATTCTATGCCGGTAAATCA	S59F	胞苷碱基编辑器	TAC	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_M	33	ACTATTCTATGCCGGTAAAT	S59F	胞苷碱基编辑器	CAT	SpRY-Cas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA_F	34	CCAACCCACCATTCTCCACG	P88L/S、P89L/S	胞苷碱基编辑器	TGG	SpCas9
IL3RA(CD123)	IL3RA_gRNA	35	CAACCCACCATTCTCCACGT	P88L/S、	胞苷碱基	GGA	NG-Cas9

[0304]

				P89L/S	编辑器		
KIT (CD117)	KIT-e7-X	36	AACTTCATCTAACGAGATTA	H378R	腺嘌呤碱基编辑器	AAA	SpRY-Cas9
KIT (CD117)	KIT-e7-Y	37	ACTTCATCTAACGAGATTAA	H378R	腺嘌呤碱基编辑器	AAG	SpRY-Cas9
KIT (CD117)	KIT-e7-3	38	CTTCATCTAACGAGATTAAA	H378R	腺嘌呤碱基编辑器	AGG	SpCas9
KIT (CD117)	KIT-e7-Z	39	TTCATCTAACGAGATTAAAA	H378R	腺嘌呤碱基编辑器	GGC	NG-Cas9

[0305] 在一些实施方案中,将多个gRNA引入细胞(例如,一个用于FLT3,且一个用于CD123)。在一些实施方案中,将两个或更多个引导RNA以等摩尔量转染到细胞中。在一些实施方案中,两个或更多个引导RNA以不等摩尔的量提供。在一些实施方案中,两个或更多个引导RNA以优化的量提供,使得每个靶标的编辑以相同的频率发生。在一些实施方案中,两

个或更多个引导RNA以优化的量提供,使得每个靶标的编辑以最佳频率发生。

[0306] 模板供体序列

[0307] 在一些实施方案中,本文提供了“模板”供体序列。模板供体序列包括100-500个核苷酸(例如200个核苷酸)长单链寡脱氧核苷酸(ssODN),其充当同源定向修复(HDR)的供体模板,使得将所需的突变引入特定基因。每个供体模板额外包括旁观者氨基酸中选定的沉默突变,以降低成功DNA修复后被CRISPR-Cas核糖核蛋白核酸酶复合物重切割的风险。

[0308] 下表2提供了在FLT中引入突变N399D的示例性模板供体序列。

[0309] 表2:ssODN 200bp长寡核苷酸供体充当通过CRISPR-Cas核酸酶同源定向修复引入FLT3 N399D的模板

[0310]

供体模板名称	SEQ ID NO:	序列
FLT3-N399D-A	40	aagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtcttgatGacggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgccccttgagaaggacagttttatacttatgga
FLT3-N399D-C	41	aagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtTtGgaCGacggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgccccttgagaaggacagttttatacttatgga
FLT3-N399D-F	42	tgaagagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcattCccAtgCgaAcaaaagggATtGgaCGaTggatacaggtgagaccacaaaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgcccttgagaaggacagttttatacttatg
FLT3-N399D-H	43	agagttttgtttttctgtcaggtttaaagcctacccacaaatcagatgtacgtggaccttctctcgaaaatcatttccttgtgagcaaaagggtcttgaCGaTggTtaTaggtgagaccacaCaggactctaagataccatttttagcataattctccttgcttgtcgccccttgagaaggacagttttatacttatggaa

[0311]

FLT3-N399D-A RC	44	tccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccgtCatcaagacccttttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactctt
FLT3-N399D-C RC	45	tccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccgtCGtcCaAacccttttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactctt
FLT3-N399D-F RC	46	cataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctttgtggtctcacctgtatccAtCGtcCaATccctttgTtcGcaTggGaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactcttca
FLT3-N399D-H RC	47	ttccataagtataaaactgtccttctcaagggcgacaagcaaggagaattatgctaaaaatggtatcttagagtcctGtgtggtctcacctAtaAccAtCGtcaagaccctttgctcacaaggaaatgattttcgagagaaggtccacgtacatctgatttgtgggtaggctttaaacctgacagaaaaacaaaactct

[0312] iv.遗传工程化的造血细胞

[0313] 本文提供了用于产生如本文所述的遗传工程化的造血细胞的方法,所述遗传工程化的造血细胞携带用于以突变形式表达一个或多个细胞表面抗原的编辑的基因。此类方法

可涉及提供细胞并且引入用于基因组编辑的CRISPR Cas系统的细胞组分。在一些实施方案中,将包含与编码细胞表面抗原的核苷酸序列的一部分杂交或预测与其杂交的CRISPR-Cas引导RNA(gRNA)的核酸引入细胞中。在一些实施方案中,gRNA在载体上被引入细胞中。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶被引入细胞中。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶以编码Cas内切核酸酶的核酸形式被引入细胞中。在一些实施方案中,gRNA和编码Cas内切核酸酶的核苷酸序列在相同核酸(例如,相同载体)上被引入细胞中。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶以蛋白质的形式被引入细胞中。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶和gRNA在体外预形成,并且以核糖核蛋白复合物形式被引入细胞中。

[0314] v.突变体FLT3

[0315] 在一些实施方案中,细胞表面蛋白是FLT3。野生型FLT3的氨基酸序列如下所示:

[0316] SEQ ID NO:48(FLT3野生型氨基酸序列)

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDNGYSISKFCNHKHQP

[0317]

GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0318] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶(或其变体)对造血细胞群进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体(例如,SpCas9或AsCpf1)对造血细胞群中编码细胞表面抗原的基因进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶在造血细胞群中遗传修饰或编辑FLT3基因,或遗传修饰或编辑CD123基因,或遗传修饰或编辑KIT基因,或遗传修饰或编辑FLT3基因和CD123基因。

[0319] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对突变体FLT3基因进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对FLT3的外显子9中的突变进行遗传工程化(例如,从而导致编码的多肽中位置N399的突变)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体及由SEQ ID NO:13-23中的任一个提供的引导序列在造血细胞群中对突变体FLT3

基因进行遗传工程化。在一些实施方案中,还提供了模板供体DNA序列。例如,模板供体DNA序列由SEQ ID NO:40-43中的任一个提供。

[0320] 在一些实施方案中,遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的FLT3基因包括FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致产生在位置N399处带有突变的多肽。在一些情况下,在N399位置处的突变是N399D或N399G。下面提供了遗传工程化的FLT3的示例性氨基酸序列:

[0321] SEQ ID NO:49 FLT3 N354S、S356Q、D358E、Q363P、E366K、Q378R、T384I、R387Q、K389A、K395R、D398E、N399D、N408D、H411N、Q412K、H419Y;FLT3-ECD4变体(胞外结构域4内带有16个氨基酸取代,这降低了克隆4G8的结合,包括N399D)

[0322]
MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATS
SQEEYEIDPYEKFCFSVRFKAYPRIRCTWIFSQASFPCEQRGLEDGYSISKFCDHKNKP
GEYIFYAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG

VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0323] SEQ ID NO:50 FLT3 N354S、S356Q、D358E、Q363P、E366K、Q378R、T384I、R387Q、K389A、K395R、D398E、N399D(FLT3外显子9突变)

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATS
SQEEYEIDPYEKFCFSVRFKAYPRIRCTWIFSQASFPCEQRGLEDGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP

[0324] NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0325] SEQ ID NO:51(FLT3 N399D变体氨基酸序列)

MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF

[0326] DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDDGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK

[0327] ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG
VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0328] SEQ ID NO:52(FLT3 N399G变体氨基酸序列)

[0329] MPALARDGGQLPLLVVFSAMIFGTITNQDLPVIKCVLINHKNNDSSVGKSSSYPMVSES
PEDLGCALRPQSSGTVYEAAAVEVDVSASITLQVLVDAPGNISCLWVFKHSSLNCQPHF
DLQNRGVVSMVILKMTETQAGEYLLFIQSEATNYTILFTVSIRNTLLYTLRRPYFRKME
NQDALVCISESVPEPIVEWVLCDSQGESCKEESPAVVKKEEKVLHELFGTDIRCCARNE
LGRECTRLFTIDLNQTPQTTLPQLFLKVGEPLWIRCKAVHVNHGFGLTWELENKALEEG
NYFEMSTYSTNRTMIRILFAFVSSVARNDTGYYTCSSSKHPSQSALVTIVEKGFINATN
SSEDYEIDQYEEFCFSVRFKAYPQIRCTWTFSRKSFPCEQKGLDGGYSISKFCNHKHQP
GEYIFHAENDDAQFTKMFTLNIRRKPQVLAEASASQASCFSDGYPLPSWTWKKCSDKSP
NCTEEITEGVWNRKANRKVFGQWVSSSTLNMSEAIKGFLVKCCAYNSLGTSCETILLNS
PGPFPFIQDNISFYATIGVCLLFIVVLTLLICHKYKKQFRYESQLQMVQVTGSSDNEYF
YVDFREYEYDLKWEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIQVAVKMLKEK
ADSSEREALMSELKMMTQLGSHENIVNLLGACTLSGPIYLIFEYCCYGDLLNYLRSKRE
KFHRTWTEIFKEHNFSFYPTFQSHPNSSMPGSREVQIHPDSDQISGLHGNSFHSEDEIE
YENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLEFKSCVHRDLAARNVLVTHGKVVK
ICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPESLFEGIYTIKSDVWSYGILLWEIFSLG

VNPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIYIIMQSCWAFDSRKRPSFPNLTSFLG
CQLADAEEAMYQNVDGRVSECPHTYQNRRPFSREMDLGLLSPQAQVEDS

[0330] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:51中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在N399D处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0331] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:52中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在N399G处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗FLT3抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0332] vi.突变体CD123

[0333] 在一些实施方案中,细胞表面蛋白是CD123。野生型CD123的氨基酸序列如下所示:

[0334] SEQ.ID NO:53(CD123野生型氨基酸序列)

[0335] MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS
QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0336] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对突变体CD123基因进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对CD123的外显子2中的突变(例如,从而导致编码的多肽中位置S59的突变)或CD123的外显子3中的突变(例如,从而导致编码的多肽中位置P88的突

变)进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体及由SEQ ID NO:24-35中的任一个提供的引导序列在造血细胞群中对突变体CD123基因进行遗传工程化。

[0337] 在一些实施方案中,遗传工程化的HSPC包括遗传工程化的CD123基因,其中遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的FLT3基因包括CD123基因的外显子2或外显子3中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的CD123基因的外显子2中的至少一个突变导致产生在位置S59处带有突变的多肽。在一些情况下,在S59位置处的突变是S59P或S59F。在一些情况下,遗传工程化的CD123基因的外显子3中的至少一个突变导致产生在位置P88处带有突变的多肽。在一些情况下,在P88位置处的突变是P88L或P88S。下面提供了遗传工程化的CD123的示例性氨基酸序列:

[0338] SEQ ID NO:54(CD123 S59P变体氨基酸序列)

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYP
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS

[0339] QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0340] SEQ ID NO:55(CD123 Y58H S59P变体氨基酸序列)

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADHP
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS

[0341] QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0342] SEQ ID NO:56(CD123 S59F变体氨基酸序列)

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYF
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS

[0343] QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0344] SEQ ID NO:57(CD123 P88S变体氨基酸序列)

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANSPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS

[0345] QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0346] SEQ ID NO:58(CD123 P88L变体氨基酸序列)

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDADYS
MPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANLPFSTWILFPENSGKPWAGAENLTCWIHDVD
FLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGS

[0347] QSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKF
RYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQNDKL
VVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

[0348] 核苷酸序列如下:

[0349] CD123外显子2野生型序列(SEQ.ID NO:59)

Atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0350] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactattctatgcc
g

[0351] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(I变体)诱导的碱基编辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:60)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0352] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCtctatgcc
g

[0353] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(II变体)诱导的碱基编辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:61)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0354] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactatCctatgcc
g

[0355] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(III变体)诱导的碱基编辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:62)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0356] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCCctatgcc
g

[0357] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(IV变体)诱导的碱基编辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:63)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0358] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactaCCcCatgcc
g

[0359] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(V变体)诱导的碱基编

辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:64)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0360] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactatCcCatgcc

g

[0361] 具有由IL3RA_gRNA_N或IL3RA_gRNA_R和SpRY_ABE8e_V106W(VI变体)诱导的碱基编辑的CD123外显子2序列(SEQ.ID NO:65)

atccaaacccaccaatcacgaacctaaggatgaaagcaaaggctcagcagttgacctgg

[0362] gaccttaacagaaatgtgaccgatatcgagtgtgttaaagacgccgactattcCatgcc

g

[0363] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:54中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在S59P处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0364] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:55中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含Y58H和S59P处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0365] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:56中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在S59F处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0366] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:57中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在P88S处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0367] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:58中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在P88L处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗CD123抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0368] vii.突变体KIT

[0369] 在一些实施方案中,细胞表面蛋白是KIT。野生型KIT的氨基酸序列如下所示:

[0370] SEQ ID NO:66(KIT野生型氨基酸序列)

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK
DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWEDYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL
[0371] VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI
VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH
SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

[0372] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对突变体KIT基因进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体在造血细胞群中对KIT的外显子7中的突变(例如,突变位置H378)进行遗传工程化。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及使用Cas核酸酶或其变体及由SEQ ID NO:36-47中的任一个提供的引导序列在造血细胞群中对突变体KIT基因进行遗传工程化。

[0373] 在一些实施方案中,遗传工程化的HSPC包含遗传工程化的KIT基因,其中遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的KIT基因包含KIT基因的外显子6和/或外显子7中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。在一些情况下,在位置H378处的突变是H378R或H378S或H378P或H378A或H378F或H378K或H378G或H378L或H378M。在一些情况下,KIT的外显子6中的突变导致编码的多肽具有以下突变中的一个或多个:F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D。在一些情况下,KIT的外显子7突变导致在E376Q和/或H378R处具有突变的多肽。

[0374] 下面提供了遗传工程化的KIT的示例性氨基酸序列:

[0375] SEQ ID NO:67 KIT F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D、E376Q、H378R(KIT-ECD4变体氨基酸序列)

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK

[0376] DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINISPVKNTTIFVNDGENVDLVVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWKDYVKSDNESNIRYVSQLRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL
VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI
VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH

[0377] SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

[0378] SEQ ID NO:68(KIT H378R变体氨基酸序列)

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRLLCT
DPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLF
LVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKR
AYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIK
DVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYANNT
FGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRT
FTDKWEDYPKSENESNIRYVSELRLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKP
EILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKL

[0379] VVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVI
VAGMMCIIVMILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLS
FGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGN
HMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH
SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALDLE
DLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVK
GNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKE
GFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSP
NRQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV

[0380] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:67中所示的序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的多肽序列,其中多肽序列包含在F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D、E376Q和H378R处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0381] 在一些实施方案中,本文提供了与SEQ ID NO:68中所示的序列至少80%、85%、

90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％同一的多肽序列,其中多肽序列包含在H378R处的突变,并且其中多肽序列与治疗抗KIT抗体的结合降低。本文还提供了编码所述多肽序列的核酸。

[0382] viii.表达突变体FLT3、CD123和/或KIT基因的遗传工程化的造血细胞

[0383] 在一些实施方案中,细胞表面蛋白是FLT3和CD123。在一些实施方案中,细胞表面蛋白是FLT3和KIT。在一些实施方案中,细胞表面蛋白是KIT和CD123。在一些实施方案中,两个或更多个引导物彼此同时转染。在一些实施方案中,两个或更多个引导物依序或连续提供,即在两次或更多次单独的转染中提供。例如,FLT3引导RNA(SEQ ID NO:13-23中的任一个)、CD123引导RNA(SEQ ID NO:24-35中的任一个)、KIT引导RNA(SEQ ID NO:36-47中的任一个)。

[0384] 在一些实施方案中,遗传工程化的HSPC包括遗传工程化的FLT3基因,其中遗传工程化的FLT3基因编码与治疗抗FLT3抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的FLT3基因包括FLT3基因的外显子9中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的FLT3基因的外显子9中的至少一个突变导致产生在位置N399处带有突变的多肽。在一些情况下,在N399位置处的突变是N399D或N399G。遗传工程化的FLT3的示例性氨基酸序列如上所示(参见SEQ ID NO:49-52)。

[0385] 在一些实施方案中,遗传工程化的HSPC包括遗传工程化的CD123基因,其中遗传工程化的CD123基因编码与治疗抗CD123抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的CD123基因包括CD123基因的外显子2或外显子3中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的CD123基因的外显子2中的突变导致在位置S59处带有突变的多肽。在一些情况下,在S59位置处的突变是S59P或S59F。在一些情况下,突变是S59P和Y58H。在一些情况下,遗传工程化的CD123基因的外显子3中的至少一个突变导致产生在位置P88处带有突变的多肽。在一些情况下,在P88位置处的突变是P88L或P88S。遗传工程化的CD123的示例性氨基酸序列如上所示(参见SEQ ID NO:54-58)。

[0386] 在一些实施方案中,遗传工程化的HSPC包含遗传工程化的KIT基因,其中遗传工程化的KIT基因编码与治疗抗KIT抗体的结合降低的蛋白质。在一些情况下,遗传工程化的KIT基因包含KIT基因的外显子6和/或外显子7中的至少一个突变。在一些情况下,遗传工程化的KIT基因的外显子7中的至少一个突变导致在位置H378处带有突变的多肽。在一些情况下,在位置H378处的突变是H378R或H378S或H378P或H378A或H378F或H378K或H378G或H378L或H378M。在一些情况下,KIT的外显子6中的突变导致编码的多肽具有以下突变中的一个或多个:F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D。在一些情况下,KIT中外显子7的突变导致在E376Q和H378R中的一个或多个处具有突变的多肽。提供的遗传工程化的KIT的示例性氨基酸序列如上所示(参见SEQ ID NO:67-68)。

[0387] II.对细胞表面抗原特异的免疫治疗剂

[0388] 靶向表达细胞表面抗原的细胞(例如癌细胞)的细胞毒性剂可以与如本文所述的遗传工程化的造血细胞共同使用。如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指能够直接或间接诱导表达特定细胞表面抗原的靶细胞(例如,靶癌细胞)的细胞毒性的任何剂。此种细胞毒性剂可包含结合并且靶向特定细胞表面抗原表位的蛋白质结合片段。

[0389] i.治疗抗体/抗体-药物缀合物

[0390] 在一些情况下,细胞毒性剂包括治疗抗体,其可以与药物(例如抗癌药物)缀合以形成抗体-药物缀合物(ADC)。在一些实施方案中,所述剂是抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物包含表位结合片段和在靶细胞中诱导细胞毒性的毒素或药物。

[0391] 在一些实施方案中,治疗抗FLT3抗体是抗FLT3克隆4G8抗体。在一些实施方案中,治疗抗CD123抗体是克隆7G3抗体或其人源化对应物CSL362(“塔妥珠单抗(Talacotuzumab)”)。在一些实施方案中,治疗抗CD123抗体是抗CD123克隆6H6抗体或抗CD123克隆S18016F抗体。在一些实施方案中,治疗抗KIT抗体是抗KIT克隆Fab79D抗体。

[0392] 适用于抗体-药物缀合物的毒素或药物是本领域熟知的,并且对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。参见,例如,Peters等人Biosci.Rep.(2015)35(4):e00225,Beck等人Nature Reviews Drug Discovery(2017)16:315-337;Marin-Acevedo等人J.Hematol.Oncol.(2018)11:8;Elgundi等人Advanced Drug Delivery Reviews(2017)122:2-19。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物还可以包含附接抗体和药物分子的接头(例如,肽接头,诸如可裂解接头或不可裂解接头)。抗体-药物缀合物的实例包括但不限于维汀-布妥昔单抗(brentuximab vedotin)、维汀-格伦托木单抗(glembatumumab vedotin)/CDX-011、迪妥昔珠单抗(depatuxizumab mafodotin)/ABT-414、PSMA ADC、维汀-泊妥珠单抗(polatuzumab vedotin)/RG7596/DCDS4501A、.玛汀-地宁妥珠单抗(Denintuzumab mafodotin)/SGN-CD19A、AGS-16C3F、CDX-014、RG7841/DLYE5953A、RG7882/DMUC406A、RG7986/DCDS0780A、SGN-LIV1A、维汀-恩诺单抗(enfortumab vedotin)/ASG-22ME、AG-15ME、AGS67E、维汀-替利妥珠单抗(telisotuzumab vedotin)/ABBV-399、ABBV-221、ABBV-085,GSK-2857916、维汀-替索妥尤单抗(tisotumab vedotin)/HuMax-TF-ADC、HuMax-Axl-ADC、维汀-匹那妥珠单抗(pinatuzumab veodtin)/RG7593/DCDT2980S、维汀-利法妥珠单抗(lifastuzumab vedotin)/RG7599/DNIB0600A、维汀-英度妥单抗(indusatumab vedotin)/MLN-0264/TAK-264、维汀-万多妥珠单抗(vandortuzumab vedotin)/RG7450/DSTP3086S、维汀-索非妥珠单抗(sofituzumab vedotin)/RG7458/DMUC5754A、RG7600/DMOT4039A、RG7336/DEDN6526A、ME1547、PF-06263507/ADC 5T4、恩美-曲妥珠单抗(trastuzumab emtansine)/T-DM1、索汀-米妥昔单抗(mirvetuximab soravtansine)/IMGN853、雷星-考妥昔单抗(coltuxi mab ravtansine)/SAR3419、恩美-那妥昔单抗(naratuximab emtansine)/IMGN529、雷星-妥昔单抗(indatuximab ravtansine)/BT-062、雷星-阿奈妥单抗(anetumab ravtansine)/BAY 94-9343、SAR408701、SAR428926、AMG 224、PCA062、HKT288、LY3076226、SAR566658、莫星-洛沃妥珠单抗(lorvotuzumab mertansine)/IMGN901、莫星-坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)/SB-408075、雷星-坎妥珠单抗(cantuzumab ravtansine)/IMGN242、恩美-拉瑞妥昔单抗(laprituximab emtansine)/IMGN289、IMGN388、莫星-比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、AVE9633、BIIB015、MLN2704、AMG 172、AMG 595、LOP 628、他立林-伐达妥昔单抗(vadastuximab talirine)/SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-CD19B、SGN-CD123A、SGN-CD352A、泰-洛伐妥珠单抗(rovalpituzumab tesirine)/SC16LD6.5、SC-002、SC-003、ADCT-301/HuMax-TAC-PBD、ADCT-402、MEDI3726/ADC-401、IMGN779、IMGN632、奥加-吉妥单抗(gemtuzumab ozogamicin)、奥加-伊妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)/CMC-544、PF-06647263、CMD-193、CMB-401、多卡-曲妥珠单抗(trastuzumab duocarmazine)/SYD985、BMS-936561/MDX-

1203、戈维-沙妥珠单抗(sacituzumab govitecan)/IMMU-132、戈维-拉贝珠单抗(labetuzumab govitecan)/IMMU-130、DS-8201a、U3-1402、多柔比星-米拉组单抗(milatuzumab doxorubicin)/IMMU-110/hLL1-DOX、BMS-986148、RC48-ADC/赫妥珠单抗(hertuzumab)-Vc-MMAE、PF-06647020、PF-06650808、PF-06664178/RN927C、阿汀-鲁帕妥单抗(lupartumab amadotin)/BAY1129980、伊汀-阿普卢妥单抗(aprutumab ixadotin)/BAY1187982、ARX788、AGS62P1、XMT-1522、AbGn-107、MEDI4276、DSTA4637S/RG7861。在一个实例中,抗体-药物缀合物是奥加-吉妥单抗。

[0393] 在一些实施方案中,抗体-药物缀合物与细胞表面蛋白的表位的结合诱导抗体-药物缀合物的内化,并且药物(或毒素)可以在胞内释放。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物与细胞表面蛋白的表位的结合诱导毒素或药物的内化,这允许毒素或药物杀伤表达细胞表面蛋白的细胞(靶细胞)。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物与细胞表面蛋白的表位的结合诱导毒素或药物的内化,这可以调节表达细胞表面蛋白的细胞(靶细胞)的活性。本文所述的抗体-药物缀合物中使用的毒素或药物的类型不限于任何特定类型。

[0394] 在一些实施方案中,细胞表面抗原的两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)表位已被修饰,从而使得两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)不同的细胞毒性剂(例如,两个ADC)能够靶向所述两个或更多个表位。在一些实施方案中,由ADC携带的毒素可以协同工作以增强功效(例如,靶细胞的死亡)。在一些实施方案中,细胞表面蛋白的两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)表位已被修饰,从而使得两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)不同的细胞毒性剂(例如,两个ADC)能够靶向所述两个或更多个细胞表面抗原的表位。在一些实施方案中,细胞表面抗原的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或更多个)表位已被修饰,并且额外的细胞表面蛋白的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或更多个)表位已被修饰,从而使得两个或更多个(例如,2、3、4、5或更多个)不同的细胞毒性剂(例如,两个ADC)能够靶向细胞表面抗原的表位和额外的细胞表面抗原的表位。在一些实施方案中,靶向多于一个细胞表面抗原或一个细胞表面抗原和一个或多个额外的细胞表面蛋白/抗原可以减少造血系统恶性肿瘤的复发。

[0395] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及施用靶向在遗传工程化的造血细胞群中发生突变的细胞表面抗原表位的ADC。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及施用靶向在遗传工程化的造血细胞群中发生突变的细胞表面抗原表位的ADC和可以靶向一个或多个额外的细胞表面蛋白的一个或多个额外的细胞毒性剂。在一些实施方案中,所述剂可以协同工作通过靶向多于一个细胞表面蛋白以增强功效。

[0396] 本文所述的ADC可用作已接受如本文所述的组合疗法的受试者的后续治疗。

[0397] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及向受试者施用缺乏细胞表面抗原中的非必需表位的遗传工程化的细胞群和一个或多个靶向表达细胞表面抗原的细胞的免疫治疗剂(例如,ADC)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及向受试者施用缺乏1型细胞表面抗原中的非必需表位的遗传工程化的细胞群和一个或多个靶向表达细胞表面抗原的细胞的免疫治疗剂(例如,ADC)。在一些实施方案中,本文所述的方法涉及向受试者施用缺乏2型细胞表面抗原中的非必需表位的遗传工程化的细胞群和一个或多个靶向表达细胞表面抗原的细胞的免疫治疗剂(例如,ADC)。在本文所述的任何实施方案中,例如,如果造血系统恶性肿瘤复发,可以进一步向受试者施用一个或多个额外的免疫治疗剂(例如,靶向一个或多个

额外的表位和/或抗原)。

[0398] ii.表达嵌合抗原受体的免疫细胞

[0399] 在一些实施方案中,如本文所述的靶向特定细胞表面抗原表位的细胞毒性剂是表达嵌合受体的免疫细胞,其包含能够结合细胞表面蛋白(例如,FLT3、CD123或KIT)表位的表位结合片段(例如,单链抗体)。通过嵌合受体的表位结合片段对细胞表面上具有特定蛋白表位的靶细胞(例如癌细胞)的识别向嵌合受体的信号传导结构域(例如,共刺激信号传导结构域和/或细胞质信号传导结构域)转导活化信号,这可活化表达嵌合受体的免疫细胞中的效应功能。

[0400] 在一些实施方案中,免疫细胞表达多于一个的嵌合受体(例如,2、3、4、5或更多),称为双特异性或多特异性免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞表达多于一个的嵌合受体,其中至少一个靶向细胞表面抗原的表位。在一些实施方案中,免疫细胞表达多于一个的嵌合受体,其中每一个靶向特定细胞表面抗原的表位。在一些实施方案中,免疫细胞表达多于一个的嵌合受体,其中至少一个靶向细胞表面抗原的表位,并且其中至少一个靶向额外的细胞表面抗原的表位。在一些实施方案中,靶向多于一个的细胞表面蛋白或一个细胞表面蛋白和一个或多个额外的细胞表面蛋白可以减少造血系统恶性肿瘤的复发。在一些实施方案中,免疫细胞表达靶向多于一个表位(例如,一个抗原的多于一个表位或多于一个抗原的表位)的嵌合受体,称为双特异性嵌合受体。

[0401] 在一些实施方案中,细胞毒性剂靶向两个或更多个谱系特异性细胞表面蛋白的表位。在一些实施方案中,两个或更多个嵌合受体在相同免疫细胞中表达,例如双特异性嵌合受体。此类细胞可用于本文所述的任何方法。在一些实施方案中,表达嵌合受体的细胞被“汇集”,即两组或更多组细胞表达两个或更多个不同的嵌合受体。在一些实施方案中,同时施用表达不同嵌合抗原受体的两个或更多个细胞。在一些实施方案中,依序施用表达不同嵌合抗原受体的两个或更多个细胞。在一些实施方案中,细胞毒性剂靶向FLT3、CD123和/或KIT的表位。在一些实施方案中,靶向FLT3、CD123和/或KIT的嵌合受体在相同免疫细胞(即双特异性免疫细胞)中被表达。此类细胞可用于本文所述的任何方法。在一些实施方案中,表达靶向FLT3、CD123和/或KIT的嵌合受体的细胞“汇集”,即两组或更多组细胞表达两个或更多个不同的嵌合受体。在一些实施方案中,同时施用两组或更多组表达靶向FLT3、CD123和/或KIT的嵌合受体的细胞。在一些实施方案中,依序施用两组或更多组表达靶向FLT3、CD123和/或KIT的嵌合受体的细胞。

[0402] 如本文所用,嵌合受体是指可在宿主细胞表面表达的非天然存在的分子,并且嵌合受体包含提供嵌合受体特异性的结合结构域(例如,与细胞表面谱系特异性蛋白的表位结合的表位结合片段)。一般来说,嵌合受体包含至少两个来源于不同分子的结构域。除了本文所述的表位结合片段之外,嵌合受体还可以包含以下中的一个或多个:铰链结构域(例如,CD28铰链、IgG4铰链或CD8α铰链)、跨膜结构域(例如,CD28 TM、CD8α TM、4-1BB TM)、共刺激结构域(例如,CD28z、4-1BB、ICOS、OX40)、细胞质信号传导结构域(例如,CD3z)及其组合。

[0403] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体包含一个或多个铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域可以位于表位结合片段与跨膜结构域之间。铰链结构域是一般存在于蛋白质的两个结构域之间的氨基酸区段,并且其可允许蛋白质的柔性以及一个或两个结

构域相对于彼此的移动。可以使用任何提供表位结合片段相对于嵌合受体的另一个结构域的此类柔性和移动的氨基酸序列。

[0404] 铰链结构域可含有约10-200个氨基酸,例如15-150个氨基酸、20-100个氨基酸或30-60个氨基酸。在一些实施方案中,铰链结构域的长度可以为约10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个氨基酸。

[0405] 在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域已知的包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域均适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中,铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分并且赋予嵌合受体柔性。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8α的或CD28的。在一些实施方案中,铰链结构域是CD8α铰链结构域的一部分,例如含有CD8α或CD28铰链结构域的至少15个(例如20、25、30、35或40个)连续氨基酸的片段。

[0406] 抗体的铰链结构域(诸如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体)也适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中,铰链结构域是连接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中,铰链结构域是抗体的,并且其包含抗体的铰链结构域和抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链结构域包含抗体的铰链结构域和抗体的CH2恒定区和CH3恒定区。在一些实施方案中,抗体为IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中,抗体为IgG抗体。在一些实施方案中,抗体为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区以及CH2恒定区和CH3恒定区。在一些实施方案中,铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0407] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体包含一个或多个跨膜结构域。用于嵌合受体中的跨膜结构域可以是本领域已知的任何形式。如本文所用,“跨膜结构域”是指细胞膜(优选地,真核细胞膜)中热力学稳定的任何蛋白质结构。适用于本文所用的嵌合受体的跨膜结构域可以从天然存在的蛋白质中获得。或者,跨膜结构域可以是合成的、非天然存在的蛋白区段,例如,在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白区段。

[0408] 跨膜结构域基于跨膜结构域拓扑结构进行分类,其包括跨膜结构域穿过膜的次数和蛋白质的定向。例如,单次跨膜蛋白穿过细胞膜一次,且多次跨膜蛋白穿过细胞膜至少两次(例如,2、3、4、5、6、7次或更多次)。在一些实施方案中,跨膜结构域是单次跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是将嵌合受体的N末端定向至细胞的胞外侧并将嵌合受体的C末端定向至细胞的胞内侧的单次跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域是从单次跨膜蛋白获得的。在一些实施方案中,跨膜结构域是CD28的或4-1BB的或CD8α的。

[0409] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体包含一个或多个共刺激信号传导结构域。如本文所用,术语“共刺激信号传导结构域”是指介导细胞内信号传导以诱导免疫反应(诸如效应功能)的蛋白质的至少一部分。本文所述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,其转导信号并且调节由免疫细胞(诸如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)介导的反应。

[0410] 在一些实施方案中,嵌合受体包含多于一个(至少2、3、4或更多个)的共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体包含从不同共刺激蛋白获得的多于一个的共刺

激信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体不包含共刺激信号传导结构域。

[0411] 一般来说,除了抗原特异性信号的刺激之外,许多免疫细胞还需要共刺激以促进细胞增殖、分化和存活,以及活化细胞的效应功能。宿主细胞(例如免疫细胞)中共刺激信号传导结构域的活化可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬特性、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激蛋白的共刺激信号传导结构域均可适用于本文所述的嵌合受体。共刺激信号传导结构域的类型是基于诸如表达嵌合受体的免疫细胞类型(例如,原代T细胞、T细胞系、NK细胞系)和所需的免疫效应功能(例如,细胞毒性)等因素来选择的。用于嵌合受体的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域,所述共刺激蛋白包括但不限于CD27、CD28ζ(CD28z)、4-1BB、OX40、CD30、ICOS、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3。

[0412] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体包含一个或多个细胞质信号传导结构域。任何细胞质信号传导结构域均可用于本文所述的嵌合受体。一般来说,细胞质信号传导结构域传递信号,诸如胞外配体结合结构域与其配体的相互作用,以刺激细胞反应,诸如诱导细胞的效应功能(例如,细胞毒性)。在一些实施方案中,细胞质信号传导结构域来自CD3ζ(CD3z)。

[0413] 在一些实施方案中,本文提供了靶向FLT3、CD123、FLT3+CD123、KIT、FLT3+KIT或KIT+CD123的嵌合受体构建体。构建体还可包括至少一个铰链结构域(例如来自CD28、CD8α或抗体)、跨膜结构域(例如来自CD28)、一个或多个共刺激结构域(来自CD28z的一个或多个)和细胞质信号传导结构域(例如来自CD3z)或其组合。在一些实施例中,本文所述的方法涉及向受试者施用遗传工程化的造血细胞群(工程化以具有突变体FLT3、CD123、FLT3+CD123、KIT、FLT3+KIT或CD123+KIT)和表达分别靶向FLT3、CD123、FLT3+CD123、KIT、FLT3+KIT或CD123+KIT的嵌合受体的免疫细胞,所述嵌合受体还可包含至少一个铰链结构域(例如来自CD28、CD8α或抗体)、跨膜结构域(例如来自CD28)、一个或多个共刺激结构域(来自CD28z的一个或多个)和细胞质信号传导结构域(例如来自CD3z)或其组合。在一些实施方案中,施用的免疫治疗产品是表达靶向FLT3、CD123和/或KIT的单个嵌合受体的免疫细胞的组合。

[0414] 本文所述的任何嵌合受体均可通过常规方法制备,诸如重组技术。本文用于制备嵌合受体的方法涉及生成编码包含嵌合受体的每个结构域的多肽的核酸,所述嵌合受体包括表位结合片段和任选的铰链结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,使用重组技术将编码嵌合受体组分的核酸连接在一起。

[0415] 另外,任何嵌合受体均可在免疫细胞中表达并且通过常规方法施用于受试者(例如,人受试者)。例如,T细胞可以来源于受试者自身血液(自体)中的T细胞,或来源于另一个健康供体(同种异体)的T细胞。一旦从受试者中分离出来,这些T细胞就会经过遗传工程化以表达特定的CAR,从而对它们进行编程,以靶向肿瘤表面存在的抗原。然后通过惯例将CAR-T细胞输注进受试者体内。

[0416] 在一些实施方案中,CAR与SEQ ID NO:69、71、73、75、77、79、86或87中任一个的氨基酸序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一,其中CAR保留其结合其相应的细胞表面谱系特异性蛋白(例如,KIT、CD123、FLT3

或其组合)的能力。

[0417] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是KIT,并且表位结合片段包含以下CDR序列:GFNISVYMMH(SEQ ID NO:88)、SIYPYSGYTYYADSVKG(SEQ ID NO:89)、ARYVYHALDY(SEQ ID NO:90)、RASQRGLRNVAVA(SEQ ID NO:91)、SASSLYS(SEQ ID NO:92)和QQWAVHSLIT(SEQ ID NO:93)。在一些情况下,表位结合片段包含与GFNISVYMMHWVRQAPGKGLEWVASIYPYSGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARYVYHALDY(SEQ ID NO:94)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的KIT表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与RASQRGLRNVAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWAVHSLIT(SEQ ID NO:95)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的KIT表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与SEQ ID NO:94至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,并且包含与SEQ ID NO:95至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,表位结合片段包含SEQ ID NO 94和95。

[0418] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3,并且表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)和QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)。在一些情况下,表位结合片段包含与GYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDF(SEQ ID NO:102)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的FLT3表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与RASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYT(SEQ ID NO:103)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的FLT3表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与SEQ ID NO:102至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,并且包含与SEQ ID NO:103至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,表位结合片段包含SEQ ID NO 102和103。

[0419] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且表位结合片段包含以下CDR序列:GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。在一些情况下,表位结合片段包含与GYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWMGDIIPSNGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:110)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的CD123表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与ESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYT(SEQ ID NO:111)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应

的CD123表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与SEQ ID NO:110至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,并且包含与SEQ ID NO:111至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,表位结合片段包含SEQ ID NO 110和111。

[0420] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是FLT3和CD123,并且表位结合片段包含以下CDR序列:GYTFTSYWMH(SEQ ID NO:96)、EIDPSDSYKDYNQKFK(SEQ ID NO:97)、RAITTTPFDF(SEQ ID NO:98)、RASQSISNNLH(SEQ ID NO:99)、YASQSIS(SEQ ID NO:100)、QQSNTWPYT(SEQ ID NO:101)、GYSFTDYYMK(SEQ ID NO:104)、DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、ARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:106)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。在一些情况下,表位结合片段包含与GYTFTSYWMHWVRQRPGHGLEWIGEIDPSDSYKDYNQKFKDKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYCARAITTTPFDF(SEQ ID NO:102)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的FLT3表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与RASQSISNNLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFCQQSNTWPYT(SEQ ID NO:103)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的FLT3表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与GYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWMGDIIPSNGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAY(SEQ ID NO:110)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的CD123表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与ESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYT(SEQ ID NO:111)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列,其中表位结合片段保留其与其相应的CD123表位结合的能力。在一些情况下,表位结合片段包含与SEQ ID NO:102至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列、与SEQ ID NO:103至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列、与SEQ ID NO:110至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列以及与SEQ ID NO:111至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一的序列。在一些实施方案中,表位结合片段包含SEQ ID NO 102、103、110和111中的所有四个。

[0421] 在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性蛋白是CD123,并且表位结合片段包含以下CDR序列:DIIPSNGATFYNQKFKG(SEQ ID NO:105)、SQSLLNSGNQKNYLT(SEQ ID NO:107)、WASTRES(SEQ ID NO:108)和QNDYSYPYT(SEQ ID NO:109)。

[0422] 下面提供了示例性CAR序列:

[0423] SEQ ID NO:69-靶向KIT结构域4、变体I的Fab79D-CAR(CD28铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体,CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFNISVYMMH***WV

*RQAPGKGLEWVA****SIYPYSGYTYYADSVKG****RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC*

ARYVYHALDYWGQGTLVTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIQMTQSPSSLSASVGDRVT

ITC***RASQRGLRNVAVA****WYQQKPGKAPKLLIY****SASSLYS****GVPSRFSGSRSGTDFTLTISS*

[0424]

*LQPEDFATYYC****QQWAVHSLIT***FGQGTKVEIKRAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK

HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPR

RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD

KRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLST

ATKDTYDALHMQALPPR

[0425] SEQ ID NO:70-靶向KIT结构域4、变体I的Fab79D-CAR(CD28铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

ATGCTTCTCCTGGTTACGTCACTGCTCTTGTGCGAGCTGCCTCACCCTGCGTTTTTGTT

GATCCCAGAAGTACAGCTTGTCGAGTCCGGCGGCGGACTCGTGCAGCCTGGCGGCTCCC

TTCGCCTCTCCTGCGCTGCCAGTGGATTCAACATCTCTGTCTATATGATGCATTGGGTG

CGGCAAGCACCGGGCAAAGGCTTGGAGTGGGTGGCCTCTATTTATCCGTATTCTGGCTA

TACGTATTATGCGGATAGCGTTAAAGGGCGGTTCACCATATCCGCAGACACCTCTAAGA

ATACAGCTTATTTGCAGATGAACAGTTTGCGAGCGGAAGACACGGCCGTTTATTATTGC

GCCCGATACGTATATCATGCCCTCGACTATTGGGGTCAGGGAACACTCGTCACCGTCTC

ATCTGGGTCAACCAGTGGGTCTGGTAAACCCGGCTCAAGCGAGGGCAGTACCAAAGGAG

ACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCTCATTGTCAGCATCCGTCGGGGACAGAGTAACC

ATAACCTGCCGGGCCAGTCAGCGCGGCCTCCGGAACGTAGCAGTGGCATGGTATCAACA

AAAACCTGGCAAGGCCCCAAAACTCCTTATATATTCAGCTTCTTCCCTTTATTCTGGCG

TGCCCTCCAGGTTCTCCGGGTCACGATCCGGTACCGATTTCACCCTGACTATCAGTTCT

[0426] CTCCAGCCCGAAGACTTTGCAACGTACTACTGCCAACAATGGGCAGTTCACAGTCTTAT

AACATTTGGGCAGGGGACGAAAGTCGAGATCAAACGAGCCGCCATAGAAGTAATGTACC

CACCACCGTACCTGGATAACGAGAAAAGTAACGGTACTATCATACATGTTAAAGGTAAA

CACCTTTGCCCATCCCCACTCTTCCCTGGACCTTCGAAACCGTTCTGGGTTTTGGTGGT

GGTAGGTGGTGTCCTTGCTTGTTATTCCCTGCTGGTCACCGTTGCGTTTATCATCTTCT

GGGTTCGCAGCAAGAGGTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACATGACGCCCCGA

CGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGCGACTTTGCTGC

CTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTACCAACAGGGCC

AGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATGACGTTTTGGAC

AAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAGAACCCCCAGGA

GGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTCCGAAATAGGGA

TGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAGGGCTGTCTACT

GCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCGCGA

[0427] SEQ ID NO:71-靶向KIT结构域4、变体II的Fab79D-CAR(CD28铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体,CDR为粗体)

MLRLLLALNLFPSIQVTGGSSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC***RASQRGLRNVAVA***WY

*QQKPGKAPKLLIY****SASSLYS****GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC****QQWAVHS*

LITFGQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS***GFN***

ISVYMMHWVRQAPGKGLEWVA***SIYPYSGYTYYADSVKG***RFTISADTSKNTAYLQMNSLR

[0428] *AEDTAVYYC****ARYVYHALDY***WGQGTLVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCP

SPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGP

TRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG

RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD

TYDALHMQALPPR

[0429] SEQ ID NO:72-靶向KIT结构域4、变体II的Fab79D-CAR(CD28铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

ATGCTTCGCCTCTTGCTGGCATTGAATCTTTTTCCGAGTATTCAGGTTACAGGAGGCTC

CTCAGACATCCAGATGACCCAATCCCCCTCATCTCTTTCTGCGTCTGTTGGAGACCGAG

TAACGATTACTTGCCGGGCAAGCCAAAGGGGACTCCGCAATGTGGCTGTCGCTTGGTAT

CAACAGAAGCCAGGTAAGGCACCAAAACTTTTGATCTACTCTGCTTCTTCCCTTTACTC

AGGTGTACCGAGCCGCTTCAGTGGCTCCCGGTCCGGAACGGACTTCACTTTGACGATAA

GTTCACTGCAGCCGGAAGACTTCGCCACATATTACTGCCAGCAATGGGCGGTCCACAGC

TTGATTACATTCGGACAAGGAACAAAGGTGGAAATAAAGGGCAGCACGAGTGGTAGCGG

CAAGCCTGGGTCAGGGGAGGGTTCAACGAAAGGGGAGGTCCAACTGGTCGAGTCAGGGG

GCGGACTTGTTCAGCCGGGTGGGAGCCTCCGACTGAGTTGCGCGGCATCCGGTTTTAAT

ATCTCAGTCTATATGATGCACTGGGTTAGACAAGCACCCGGCAAGGGTTTGGAATGGGT

AGCGTCAATATACCCCTATTCTGGCTACACCTATTACGCAGACTCTGTCAAAGGCAGGT

TTACAATCAGCGCGGACACCAGCAAAAACACCGCGTATCTCCAAATGAACAGCCTGCGG

[0430] GCAGAGGACACCGCTGTCTACTACTGCGCACGCTATGTCTACCACGCTTTGGATTATTG

GGGTCAAGGGACGCTGGTCACCGTATCAAGCATCGAGGTAATGTATCCTCCTCCCTATT

TGGATAACGAGAAGTCTAACGGAACTATTATTCACGTAAAGGGTAAACATCTCTGCCCC

AGCCCTTTGTTTCCGGGACCTTCAAAACCTTTTTGGGTTCTGGTGGTGGTTGGGGGAGT

CTTGGCGTGTTATTCCCTTCTCGTGACGGTGGCGTTCATAATATTCTGGGTCCGGAGCA

AAAGATCACGTGGCGGTCACTCAGATTACATGAATATGACGCCGAGGAGGCCGGGTCCT

ACCCGAAAGCATTATCAACCTTACGCACCACCGCGCGACTTCGCAGCTTACCGGTCCAG

GGTGAAGTTTAGCAGAAGTGCTGACGCCCCAGCCTACCAACAGGGCCAAAATCAACTGT

ACAACGAGCTGAACCTGGGACGAAGAGAGGAATACGACGTCCTGGACAAGAGGAGGGGG

CGCGACCCCGAGATGGGGGGGAAGCCGAGGCGCAAGAACCCCCAGGAGGGTCTTTATAA

TGAACTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAAGCCTATTCTGAAATCGGAATGAAGGGTGAGC

GGCGCAGAGGTAAAGGGCACGACGGCCTCTATCAGGGACTTTCTACGGCAACGAAAGAT

ACGTATGACGCACTTCATATGCAAGCCCTTCCGCCCAGA

[0431] SEQ ID NO:73-靶向FLT3结构域4的4G8-CAR(IgG4铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体;CDR为粗体)

[0432] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS***GYTFTSYWMH***WV
*RQRPGHGLEWIG****EIDPSDSYKDYNQKFK****DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYC*
ARAITTTPFDFWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLS
C***RASQSISNNLH***WYQQKSHESPRLLIK***YASQSIS****GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETE*
*DFGVYFC****QQSNTWPYT***FGGGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGGVLACYSLL
VTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0433] SEQ ID NO:74-靶向FLT3结构域4的4G8-CAR (IgG4铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

[0434] ATGCTCTTGTTGGTGACGAGTCTCCTGCTGTGTGAACTGCCGCACCCAGCATTTCTTTT
GATTCCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAACTCGTGAAACCTGGCGCCTCTC
TGAAGCTGAGCTGCAAGAGCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTG
CGCCAGAGGCCTGGCCACGGACTGGAATGGATCGGCGAGATCGACCCCAGCGACAGCTA
CAAGGACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCTGACCGTGGACAGAAGCAGCA
ACACCGCCTACATGCACCTGTCCAGCCTGACCAGCGACGACAGCGCCGTGTACTACTGT
GCCAGAGCCATCACAACCACCCCCTTCGATTTCTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGT
GTCTAGCGGAGGCGGAGGCTCCGGTGGGGGAGGATCTGGGGGAGGCGGAAGCGATATTG
TGCTGACCCAGAGCCCTGCCACACTGAGCGTGACACCAGGCGATAGCGTGTCCCTGTCC
TGCAGAGCCAGCCAGAGCATCTCCAACAACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGTCCCACGA
GAGCCCCAGACTGCTGATTAAGTACGCCAGCCAGTCCATCAGCGGCATCCCCAGCAGAT
TTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAAACCGAG
GACTTCGGCGTGTACTTCTGCCAGCAGAGCAACACCTGGCCTTACACCTTCGGCGGAGG
CACCAAGCTGGAAATCAAGAGAGAGTCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCTTGCCCTG
CTAGCATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTG
GTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTCCGCAGCAAGCGGAGCAGAGGCGGCCACAG
CGACTACATGAACATGACCCCTAGACGGCCTGGCCCCACCAGAAAGCACTACCAGCCCT
ACGCCCCTCCCCGGGACTTTGCCGCCTACAGAAGCCGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCC
GACGCCCCTGCCTACCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAG
AAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCA
AGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATG
GCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGAGGCGGGGCAAGGGCCACGA
CGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGC
AGGCCCTGCCCCCAAGG

[0435] SEQ ID NO:75-靶向CD123 N末端结构域的CSL362-CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体,CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMK***WA

*RQMPGKGLEWMG**DIIPSNGATFYNQKFKG**QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC*

ARSHLLRASWFAYWGQGTMVTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGE

RATINC*ES**SQSLLNSGNQKNYLT**WYQQKPGQPPKPLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTD*

[0436] *FTLTISSLQAEDVAVYYC**QNDYSYPYT**FGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL*

RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRCKRSRGG

HSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL

GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG

HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0437] SEQ ID NO:76-靶向CD123N末端结构域的CSL362-CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

ATGCTTCTCCTGGTTACCTCCTTGCTGTTGTGTGAGCTGCCTCATCCAGCATTTCTCTT

GATACCAGAGGTTCAGCTCGTACAGAGCGGGGCCGAGGTGAAAAAACCCGGCGAGTCTT

TGAAAATATCATGCAAAGGCAGTGGCTATTCCTTTACGGATTACTACATGAAGTGGGCG

AGGCAGATGCCAGGGAAGGGACTCGAATGGATGGGAGACATCATACCGAGCAATGGTGC

GACCTTCTATAACCAAAAATTCAAAGGGCAGGTCACTATTTCCGCTGACAAAAGCATCA

GTACAACGTACTTGCAATGGTCTTCTCTTAAAGCCTCCGACACTGCGATGTACTATTGT

GCGAGATCACATCTCCTGAGAGCGAGTTGGTTCGCCTACTGGGGCCAAGGAACCATGGT

CACGGTCTCAAGTGGCAGCACCTCCGGTTCTGGAAAGCCGGGATCCTCAGAAGGCAGTA

CAAAAGGTGATATTGTCATGACCCAATCCCCCGATAGTCTGGCTGTATCTCTCGGTGAA

AGGGCCACGATAAACTGTGAGTCCTCACAATCCCTTCTGAACTCAGGGAATCAAAAGAA

CTATCTTACTTGGTATCAGCAAAAACCTGGACAACCTCCGAAGCCACTCATATACTGGG

CCTCCACCAGGGAAAGTGGAGTCCCAGACCGATTCTCAGGATCCGGTTCCGGGACCGAC

TTCACGCTCACCATTAGTAGCCTTCAAGCAGAGGATGTAGCAGTGTACTATTGTCAAAA

[0438] TGATTATAGTTACCCTTACACCTTCGGGCAAGGCACGAAACTGGAAATCAAAACCACGA

CCCCGGCTCCACGACCTCCCACCCCCGCCCCCACAATAGCGAGCCAACCACTTAGTTTG

AGACCGGAAGCTTGCCGGCCTGCCGCGGGTGGTGCTGTTCATACAAGAGGCCTGGACTT

CGCTTGCGATATATACATCTGGGCGCCACTCGCCGGCACGTGTGGTGTCCTTCTTCTCT

CTCTGGTAATTACACTCTATTGTAACCATAGAAACCGGTGTAAAAGAAGCCGAGGCGGT

CACAGTGACTATATGAATATGACACCGCGCCGACCCGGACCAACAAGAAAACATTATCA

ACCGTACGCTCCACCCCGCGACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGT

CTGCTGATGCCCCTGCTTACCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTG

GGACGACGAGAGGAATATGACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGG

CGGTAAACCGCGGAGAAAGAACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACA

AAATGGCGGAGGCGTATTCCGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGA

CATGATGGTCTCTACCAAGGGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCA

TATGCAGGCCTTGCCTCCGCGA

[0439] SEQ ID NO:77--靶向FLT3和CD123、变体I的4G8-CSL362-双特异性CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体,CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS***GYTFTSYWMH***WV

*RQRPGHGLEWIG****EIDPSDSYKDYNQKFK****DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTSDDSAVYYC*

ARAITTTPFDFWGQGTTLTVSSGSTSGSGKPGSSEGSTKGDIVLTQSPATLSVTPGDSV

SLSC***RASQSISNNLH***WYQQKSHESPRLLIK***YASQSIS***GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSV

*ETEDFGVYFC****QQSNTWPYT***FGGGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVM

TQSPDSLAVSLGERATINC*ES****SQSLLNSGNQKNYLT***WYQQKPGQPPKPLIY***WASTRES***G

*VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC****QNDYSYPYT***FGQGTKLEIKSGSTSGSGK

[0440] PGSSEGSTKGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMK***WARQMPGKGLEWMG

DIIPSNGATFYNQKFKG*QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC****ARSHLLRASWFA***

YWGQGTMVTVSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMFW

VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR

DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK

NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP

R

[0441] SEQ ID NO:78-靶向FLT3和CD123、变体I的4G8-CSL362-双特异性CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

ATGCTGCTTCTGGTGACTAGCCTGCTCCTGTGCGAGCTGCCCCACCCCGCGTTCCTGCT

CATCCCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCAGGGGCCGAGCTTGTAAAGCCTGGGGCTTCCC

TGAAGCTGTCTTGTAAGTCTTCCGGCTACACGTTCACCTCCTATTGGATGCACTGGGTG

CGCCAGCGTCCGGGGCATGGTCTGGAGTGGATTGGAGAAATTGACCCGAGTGACAGCTA

CAAGGACTACAACCAAAAATTTAAAGACAAGGCCACTTTAACAGTTGACAGGTCCTCCA

ACACGGCTTACATGCACCTGAGCAGTCTGACCAGCGATGACTCCGCCGTGTACTACTGT

GCCCGCGCCATCACCACCACACCCTTCGACTTCTGGGGCCAGGGCACGACCCTTACCGT

GTCGTCGGGATCTACCAGCGGTTCCGGCAAACCGGGTTCGTCGGAGGGCTCGACCAAGG

GGGACATTGTCCTGACCCAGAGCCCGGCTACCCTGTCTGTCACCCCTGGTGATTCTGTT

TCATTGTCCTGTCGGGCATCACAGTCGATCTCTAACAACCTGCACTGGTACCAGCAGAA

AAGCCACGAGTCCCCGCGCCTGCTAATCAAGTATGCATCTCAGAGTATCTCTGGCATCC

[0442] CCTCTCGCTTTAGCGGTTCCGGTTCCGGCACAGATTTCACCTTAAGTATTAACTCCGTG

GAGACCGAGGATTTCGGAGTGTATTTCTGCCAGCAGTCAAATACCTGGCCCTACACCTT

TGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGGGAGGCGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGCT

CCGGCGGAGGGGGATCTGGTGGAGGCGGGTCGGGCGGCGGCGGCTCCGACATCGTGATG

ACCCAGAGTCCCGACTCTCTTGCCGTCTCCTTAGGGGAGCGCGCCACCATAAACTGCGA

GTCTTCCCAGTCCCTCCTGAACTCCGGCAACCAGAAAAACTACCTAACCTGGTACCAAC

AGAAGCCCGGCCAGCCACCCAAGCCACTTATCTACTGGGCCTCCACTCGCGAATCTGGC

GTCCCTGACCGCTTCTCTGGCTCCGGTTCCGGCACCGACTTCACCCTCACTATCTCCTC

TCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGTCAGAACGACTACAGCTATCCCTACA

CCTTCGGCCAGGGTACTAAGTTGGAAATTAAGTCCGGTTCTACTAGCGGGTCCGGTAAA

CCGGGCAGTTCCGAGGGCTCGACCAAGGGCGAGGTACAACTGGTGCAGAGCGGCGCGGA

GGTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTGAAGATCTCATGCAAGGGTTCCGGCTACTCCTTCA

CGGACTATTACATGAAATGGGCCCGCCAGATGCCCGGCAAGGGGCTCGAATGGATGGGG

[0443] GACATCATCCCTAGCAACGGCGCCACGTTCTACAATCAGAAGTTCAAGGGACAGGTCAC
AATTTCCGCGGACAAAAGCATCAGCACTACTTACCTGCAGTGGTCTTCCCTCAAGGCTA
GCGACACCGCCATGTATTACTGCGCGAGAAGTCACTTGCTGCGCGCTAGTTGGTTCGCC
TATTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACAGTGTCCACGACCACGCCTGCGCCGCGACCGCC
TACTCCCGCGCCAACCATCGCTTCCCAACCCCTGTCCTTGAGGCCCGAGGCCTGCAGAC
CTGCGGCTGGCGGGGCTGTTCACACTCGAGGTTTGGATTTTGCTTGCGACATGTTTTGG
GTGCTGGTGGTGGTCGGAGGTGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGCTGGTCACCGTCGCGTT
CATCATCTTCTGGGTGCGGTCTAAGCGCTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACA
TGACGCCCCGACGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGC
GACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTA
CCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATG
ACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAG
AACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTC
CGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAG
GGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCG
CGA

[0444] SEQ ID NO:79--靶向FLT3和CD123、变体II的4G8-CSL362-双特异性CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(表位结合区为斜体,CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIVLTQSPATLSVTPGDSVSLSC***RASQSISNNLH***WYQ
*QKSHESPRLLIK****YASQSIS****GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVETEDFGVYFC****QQSNTWPY***
TFGGGTKLEIKRGSTSGSGKPGSSEGSTKGQVQLQQPGAELVKPGASLKLSCKSS***GYTF***
TSYWMHWVRQRPGHGLEWIG***EIDPSDSYKDYNQKFK***DKATLTVDRSSNTAYMHLSSLTS
DDSAVYYCA***RAITTTPFDF***WGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL
VQSGAEVKKPGESLKISCKGS***GYSFTDYYMKW****ARQMPGKGLEWMG****DIIPSNGATFYNQK*
FKG*QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC****ARSHLLRASWFAY***WGQGTMVTVSSGS
TSGSGKPGSSEGSTKGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINC*ES****SQSLLNSGNQKNYLT****WYQ*
*QKPGQPPKPLIY****WASTRES****GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC****QNDYSYPY***

TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDMFW
VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPR
DFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP
R

[0446] SEQ ID NO:80-靶向FLT3和CD123、变体II的4G8-CSL362-双特异性CAR(CD8a铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)核苷酸序列

ATGCTCCTGCTGGTGACCTCACTGCTGCTTTGCGAGCTGCCCCACCCCGCGTTCCTGCT
GATTCCCGACATCGTGCTTACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCCGTCACCCCCGGCGATT
CTGTCAGCTTAAGTTGTCGCGCTTCCCAGAGCATTAGCAACAACCTGCACTGGTACCAA
CAAAAGTCTCATGAGAGCCCACGGCTGCTGATTAAGTACGCATCACAATCTATCTCTGG
CATCCCCTCGCGCTTTTCTGGGTCCGGCAGTGGAACTGATTTCACCCTCTCCATCAATT
CCGTCGAGACCGAGGACTTTGGGGTGTACTTCTGCCAGCAGTCAAATACCTGGCCTTAC
ACCTTCGGCGGGGGTACGAAGCTGGAGATTAAGCGTGGGTCCACATCCGGCAGCGGTAA
ACCCGGCTCCTCAGAGGGCTCCACAAAAGGCCAGGTTCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCGG
AACTGGTTAAGCCCGGCGCAAGTCTGAAGCTGTCTTGTAAGTCTTCGGGTTACACGTTT
ACTTCGTACTGGATGCACTGGGTTCGCCAGCGTCCTGGCCACcGGACTGGAATGGATCGG

[0447] CGAGATCGATCCTTCCGATTCCTACAAGGACTACAACCAGAAATTTAAGGATAAAGCTA
CTCTAACTGTGGACCGCTCTAGCAACACCGCTTACATGCACCTCAGCTCGCTTACCAGC
GATGACTCTGCGGTGTACTACTGTGCCCGCGCCATCACCACTACGCCATTCGACTTCTG
GGGCCAGGGCACTACTCTTACCGTGTCGTCGGGTGGAGGCGGCTCTGGAGGAGGCGGAA
GCGGAGGAGGTGGTTCTGGAGGCGGAGGCTCTGGTGGAGGCGGATCTGAGGTGCAGCTC
GTCCAGAGCGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCTGGTGAGTCCCTTAAGATTTCCTGTAAGGG
CTCGGGCTACTCCTTCACCGACTACTACATGAAATGGGCGCGTCAGATGCCCGGAAAGG
GACTGGAGTGGATGGGGGACATCATCCCGTCCAATGGCGCTACCTTCTACAACCAGAAG
TTCAAGGGCCAGGTGACCATCAGCGCGGACAAATCCATCTCCACCACGTACCTGCAGTG
GTCTAGTCTGAAGGCCTCTGACACAGCCATGTATTATTGCGCCCGCAGCCACTTGCTGC
GCGCGAGTTGGTTCGCCTATTGGGGCCAGGGTACTATGGTGACTGTGAGCTCCGGTTCG
ACTTCCGGAAGTGGAAAACCGGGATCATCCGAAGGCAGCACCAAGGGTGACATAGTGAT
GACCCAGTCCCCGGATAGCCTTGCCGTGTCCCTGGGCGAGCGCGCCACAATCAACTGCG
AGAGCAGCCAGAGCCTGCTCAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTACCAA
CAGAAGCCCGGCCAGCCACCTAAGCCCCTGATCTATTGGGCTAGTACGAGGGAGTCCGG
CGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCTGGGAGCGGTACAGATTTCACCCTGACTATTTCGA
GCCTGCAAGCTGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGAACGACTACAGCTATCCTTAC
ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGACGACCACGCCTGCGCCGCGACCGCC
TACTCCCGCGCCAACCATCGCTTCCCAACCCCTGTCCTTGAGGCCCGAGGCCTGCAGAC
CTGCGGCTGGCGGGGCTGTTCACACTCGAGGTTTGGATTTTGCTTGCGACATGTTTTGG

[0448] GTGCTGGTGGTGGTCGGAGGTGTCCTGGCTTGTTACTCTCTGCTGGTCACCGTCGCGTT
CATCATCTTCTGGGTGCGGTCTAAGCGCTCACGTGGTGGGCACTCCGACTACATGAACA
TGACGCCCCGACGCCCAGGTCCTACGAGAAAGCATTACCAACCGTACGCTCCACCCCGC
GACTTTGCTGCCTACCGGTCCAGAGTAAAATTCAGTCGGTCTGCTGATGCCCCTGCTTA
CCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAATGAGCTTAATCTGGGACGACGAGAGGAATATG
ACGTTTTGGACAAGCGAAGGGGCCGAGACCCTGAGATGGGCGGTAAACCGCGGAGAAAG
AACCCCCAGGAGGGGTTGTATAATGAATTGCAAAAGGACAAAATGGCGGAGGCGTATTC
CGAAATAGGGATGAAGGGTGAAAGGCGGCGAGGCAAGGGACATGATGGTCTCTACCAAG
GGCTGTCTACTGCCACGAAGGACACCTATGATGCGCTTCATATGCAGGCCTTGCCTCCG
CGA

[0449] SEQ ID NO:86-靶向CD123N末端结构域的CSL362-CAR第2变体(IgG4铰链、CD28

TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWV
KQSHGKSLEWIG**DIIPSNGATFYNqKFKG**KATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYC
TRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDFVMTqSPSSLTVTAGEKVT
MSCKS**SQSLLNSGNQKNYLTW**YLqKPGqPPKLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTL
[0450] TISSVQAEDLAVYYC**qNDYSYPYT**FGGGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0451] SEQ ID NO:87-靶向CD123N末端结构域的CSL362-CAR第3变体(IgG4铰链、CD28 TM、CD28z、CD3z)氨基酸序列(CDR为粗体)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWA
RQMPGKGLEWMG**DIIPSNGATFYNQKFKG**QVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC
ARSHLLRASWFAYWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERAT
INCES**SQSLLNSGNQKNYLTW**YQQKPGQPPKPLIY**WASTRES**GVPDRFSGSGSGTDFTL
[0452] TISSLQAEDVAVYYC**QNDYSYPYT**FGQGTKLEIKRESKYGPPCPPCPASMFWVLVVVGG
VLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0453] III.治疗受试者的方法

[0454] 可以将遗传工程化的造血细胞(诸如HSC)单独或与靶向如本文所述的一个或多个细胞表面抗原的一个或多个细胞毒性剂组合施用于需要治疗的受试者。由于造血细胞在一个或多个细胞表面抗原的基因中进行了遗传编辑,因此造血细胞和/或其后代细胞将以突变形式(例如,但有功能)表达一个或多个细胞表面抗原,使得它们可以逃避被细胞毒性剂(例如,CAR-T细胞)靶向。

[0455] 因此,本公开提供了用于治疗造血系统恶性肿瘤的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用(i)本文所述的遗传工程化的造血细胞群,以及任选地(ii)靶向细胞表面抗原的细胞毒性剂(诸如CAR-T细胞),其基因在造血细胞中被遗传编辑,使得细胞毒性剂不靶向造血细胞或其后代细胞。(i)和(ii)的施用可以同时进行或以任何顺序进行。在一些实施方案中,细胞毒性剂和/或造血细胞可以与药学上可接受的载剂混合以形成药物组合物,这也在本公开的范围内。

[0456] 如本文所用,“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,并且是指脊椎动物,优选地哺乳动物诸如人。哺乳动物包括但不限于人灵长类动物、非人灵长类动物或鼠类、牛、马、犬或猫物种。在一些实施方案中,受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

[0457] 为了实施本文所述的方法,可以向需要治疗的受试者施用有效量的遗传工程化的造血细胞。任选地,造血细胞可以与本文所述的细胞毒性剂共同使用。如本文所用,术语“有效量”可以与术语“治疗有效量”互换使用,并且是指细胞毒性剂、造血细胞群或药物组合物(例如,包含细胞毒性剂和/或造血细胞的组合物)的量,所述量在施用于需要的受试者后足以产生所需的活性。在本公开的上下文中,术语“有效量”是指足以延迟表现、阻止进展、缓

解或减轻通过本公开的方法治疗的病症的至少一种症状的化合物、细胞群或药物组合物的量。请注意,当施用活性成分的组合时,所述组合的有效量可以包括或不包括单独施用时有效的每个成分的量。

[0458] 如本领域技术人员所认识到的,有效量是变化的,取决于所治疗的特定疾患、疾患的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、体型、性别和体重)、治疗持续时间、同步疗法的性质(如果有)、施用的特定途径和医疗保健人员的知识和专业技能范围内的类似因素。在一些实施方案中,有效量减轻、缓解、改善、提高、减少症状,或延迟受试者的任何疾病或病症的进展。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

[0459] 如本文所述,表达嵌合受体的造血细胞和/或免疫细胞可以是受试者自体的,即,细胞是从需要治疗的受试者获得的,经过操作使得细胞不结合细胞毒性剂,然后施用于相同受试者。与施用非自体细胞相比,向受试者施用自体细胞可以导致宿主细胞的排斥降低。例如,从受试者的生物样品中获得HSPC,对HSPC进行遗传工程化,并且将遗传工程化的HSPC施用于相同受试者。在一些情况下,HSPC从生物样品中获得,其中生物样品是骨髓细胞、血液、脐带血细胞或动员的外周血衍生的CD34+造血干细胞和祖细胞。

[0460] 或者,宿主细胞是同种异体细胞,即,细胞从第一个受试者中获得,经过遗传工程化,然后施用于不同于第一个受试者但属于相同物种的第二个受试者。例如,同种异体免疫细胞可以来源于人供体,并且施用于不同于供体的人受体。在一些实施方案中,造血细胞已经过进一步的遗传工程化以降低宿主抗移植物效应。例如,在一些实施方案中,可以对免疫细胞和/或造血细胞进行基因编辑或基因沉默方法,以降低或消除涉及诱导宿主免疫反应的一个或多个蛋白质的表达。

[0461] 施用于哺乳动物(例如,人)的细胞(即,免疫细胞或造血细胞)的典型量可以为例如在约10^6至10^{11}个细胞的范围内。在一些实施方案中,向受试者施用少于10^6个细胞是合意的。在一些实施方案中,向受试者施用少于10^{11}个细胞是合意的。在一些实施方案中,一个或多个剂量的细胞包括约10^6个细胞至约10^{11}个细胞、约10^7个细胞至约10^{10}个细胞、约10^8个细胞至约10^9个细胞、约10^6个细胞至约10^8个细胞、约10^7个细胞至约10^9个细胞、约10^7个细胞至约10^{10}个细胞、约10^7个细胞至约10_{11}个细胞、约10^8个细胞至约10^{10}个细胞、约10^8个细胞至约10^{11}个细胞、约10^9个细胞至约10^{10}个细胞、约10^9个细胞至约10^{11}个细胞或约10^{10}个细胞至约10^{11}个细胞。

[0462] 在一些实施方案中,本文所述的方法涉及向受试者施用遗传工程化的造血细胞群以及施用一个或多个免疫治疗剂(例如,细胞毒性剂)。本领域的普通技术人员将理解,免疫治疗剂可以是相同或不同类型(例如,治疗抗体、表达嵌合抗原受体的免疫细胞群和/或抗体-药物缀合物)。

[0463] 在一些实施方案中,在施用造血细胞之前施用包含与细胞表面蛋白的表位结合的表位结合片段的细胞毒性剂(例如,表达如本文所述的嵌合受体的免疫细胞)。在一些实施方案中,在施用造血细胞之前施用包含与细胞表面蛋白的表位结合的表位结合片段的剂(例如,表达本文所述的嵌合受体的免疫细胞)至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间。

[0464] 或者,在一些实施方案中,在包含与细胞表面蛋白的表位结合的表位结合片段的

细胞毒性剂(例如,表达本文所述的嵌合受体的免疫细胞)之前施用造血细胞。在一些实施方案中,在施用包含与细胞表面蛋白的表位结合的表位结合片段的细胞毒性剂之前施用造血细胞群至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间。

[0465] 在一些实施方案中,靶向细胞表面蛋白的细胞毒性剂和造血细胞群基本上同时施用。在一些实施方案中,施用靶向细胞表面蛋白的细胞毒性剂并且对患者进行一段时间的评价,然后施用造血细胞群。在一些实施方案中,施用造血细胞群并且对患者进行一段时间的评价,然后施用靶向细胞表面蛋白的细胞毒性剂。

[0466] 细胞毒性剂和/或造血细胞群的多次施用(例如剂量)也在本公开的范围内。在一些实施方案中,将细胞毒性剂和/或造血细胞群施用于受试者一次。在一些实施方案中,将细胞毒性剂和/或造血细胞群施用于受试者多于一次(例如,至少2、3、4、5次或更多次)。在一些实施方案中,以规律的间隔(例如每六个月)将细胞毒性剂和/或造血细胞群施用于受试者。

[0467] 施用途径的实例包括静脉内、输注、皮内、皮下、口服(例如吸入)、透皮(局部)、经粘膜和直肠施用。

[0468] 本文所述的任何方法均可用于治疗受试者的血液系统恶性肿瘤。如本文所用,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“治疗(to treat)”是指旨在缓解病理疾患或病症、减缓其进展、减轻其症状和/或停止其进展的治疗措施。因此,需要治疗的人包括那些已经患有病症的人。例如,在一些情况下,治疗癌症意指稳定癌症的进展。在一些情况下,治疗癌症意指减缓癌症的进展。在一些情况下,治疗癌症意指停止癌症的进展。在一些情况下,治疗癌症意指缩小癌症尺寸。在一些情况下,治疗癌症意指提高被诊断患有癌症的受试者的总体存活率。评价癌症进展的方法是本领域已知的,并且包括例如使用成像(例如,X射线、计算机断层扫描、磁共振成像、卡尺测量或正电子发射断层扫描)、细胞学或组织学或肿瘤标记的表达来评估靶病变(参见例如,Eisenhauer等人,2009,European Journal of Cancer 45:228-247和Schwartz等人,2016,European Journal of Cancer 62:132-137;其中每一个均通过引用整体并入本文)。

[0469] 在一些实施方案中,受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人受试者。如本文所用,造血系统恶性肿瘤是指涉及造血细胞(例如,血细胞,包括祖细胞和干细胞)的恶性异常。造血系统恶性肿瘤的实例包括但不限于霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。示例性白血病包括但不限于急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病或慢性淋巴母细胞白血病以及慢性淋巴细胞白血病。

[0470] 在一些实施方案中,涉及造血系统恶性肿瘤的细胞对用于治疗恶性肿瘤的常规或标准治疗剂具有抗性。例如,细胞(例如癌细胞)可对用于治疗恶性肿瘤的化疗剂和/或CAR T细胞具有抗性。

[0471] 在一些情况下,造血系统恶性肿瘤包括:B淋巴母细胞白血病(B-ALL)、急性髓系白血病(AML)、T细胞急性淋巴母细胞白血病(T-ALL)或母细胞性浆细胞样树突状细胞白血病(BPCDN)。

[0472] IV.组合物和药盒

[0473] 任何表达本文所述的嵌合受体的免疫细胞均可在药学上可接受的载剂或赋形剂中作为药物组合物施用。

[0474] 如与本公开的组合物和/或细胞结合使用的短语“药学上可接受的”是指此类组合物的分子实体和其他成分在生理上可耐受并且在施用于哺乳动物(例如,人)时通常不会产生不良反应。优选地,如本文所用,术语“药学上可接受的”意指由联邦监管机构或州政府批准的或在美国药典或其他一般认可的药典上列出用于哺乳动物并且更具体地用于人。“可接受”意指载剂与组合物的活性成分(例如核酸、载体、细胞或治疗抗体)相容,并且不会对施用组合物的受试者产生负面影响。本方法中使用的任何药物组合物和/或细胞均可包含冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂。

[0475] 包括缓冲剂的药学上可接受的载剂,是本领域所熟知的,并且可以包含磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;包括抗坏血酸和甲硫氨酸的抗氧化剂;防腐剂;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;氨基酸;疏水性聚合物;单糖;双糖;和其他碳水化合物;金属复合物;和/或非离子表面活性剂。参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams and Wilkins,编K.E.Hoover。

[0476] 用于治疗造血系统恶性肿瘤的药盒也在本公开的范围内。此种药盒可包含遗传工程化的造血细胞诸如HSPC,以及任选的一个或多个靶向细胞表面抗原的细胞毒性剂,所述细胞毒性剂的基因在造血细胞中进行编辑。此类药盒可包括包含有包含如本文所述的任何遗传工程化的造血细胞的第一药物组合物的容器,以及任选的包含一个或多个靶向如本文所述的细胞表面抗原的细胞毒性剂(例如,表达本文所述的嵌合受体的免疫细胞)的一个或多个额外的容器。

[0477] 在一些实施方案中,药盒可包括用于本文所述任何方法的说明书。所包括的说明书可以包含对遗传工程化的造血细胞的施用的描述,以及任选地对向受试者施用一个或多个细胞毒性剂以在受试者中实现预期活性的描述。药盒还可以包括基于鉴定受试者是否需要治疗来选择适合治疗的受试者的描述。在一些实施方案中,说明书包括向需要治疗的受试者施用遗传工程化的造血细胞和任选的一个或多个细胞毒性剂的描述。

[0478] 与本文所述的遗传工程化的造血细胞和任选的细胞毒性剂的用途相关的说明书一般包括关于预期治疗的剂量、给药时间表和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。本公开的药盒中提供的说明书通常是标签或包装插页上的书面说明书。标签或包装插页表明药物组合物用于治疗受试者的疾病或病症、延迟其发作和/或使其减轻。

[0479] 本文提供的药盒均采用适合的包装。适合的包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐子、软包装等。还设想用于与特定装置(诸如吸入器、鼻腔施用装置或输注装置)组合使用的包装。药盒可以具有无菌接入口(例如,容器可以是静脉注射溶液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。容器还可以具有无菌接入口。药物组合物中的至少一个活性剂是如本文所述的嵌合受体变体。

[0480] 药盒任选地可提供额外组分,诸如缓冲液和解释信息。通常,药盒包括容器以及容器上或与容器相连的标签或包装插页。在一些实施方案中,本公开提供了包含上述药盒的内容物的制品。

[0481] 实施例

[0482] 提供以下实施例以更好地说明所要求保护的本发明,而不应解释为限制本发明的范围。就提到具体材料而言,其仅仅是为了说明的目的,并且不旨在限制本发明。本领域技术人员可以在不运用创造性能力且不脱离本发明的范围的情况下开发出等同的手段或反应物。

[0483] 实施例1:以下实施例中使用的一般方案

[0484] 质粒克隆

[0485] WT-Cas9和NG-Cas9碱基编辑器质粒是通过Addgene获得的(质粒编号138495、138491)。使用NEB HiFi组装主混合物和合成的dsDNA插入物(IDT gBlock)克隆了SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS和其他碱基编辑器变体(参见下面的完整列表)。通过标准位点特异性诱变技术引入单个氨基酸改变(即K918N)或缺失(Blackjack变体)。需要时,使用BsmBI限制酶和具有所需的间隔序列的退火且磷酸化的DNA寡核苷酸将sgRNA克隆到pLentiguide-Puro主链(Addgene)或pLKO-mTagBFP2主链(克隆的)中。使用Mackarey Nagel NucleoBond Xtra Maxi药盒纯化质粒大提(maxiprep)。

[0486] 表3:

[0487]

碱基编辑器	全称	描述	来源
ABE	ABE8e (TadA-8e V106W)	NGG PAM，降低的 RNA 编辑(V106W)	Addgene
ABE	NG-ABE8e	NG PAM	Addgene
ABE	SpRY-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，3xNLS	克隆的
ABE	LbABE8e (TadA-8e V106W)	TTTV PAM，降低的 RNA 编辑(V106W)	Addgene
ABE	enAsABE8e	TTTV PAM	Addgene
ABE	dABE8e TadA 8e V106W	NGG PAM，dCas9	克隆的
ABE	ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NGG PAM，3xNLS	克隆的
ABE	NG-ABE8e 3xNLS	NG PAM，3xNLS	克隆的
ABE	LbABE8e (TadA-8e V106W) 3xNLS	TTTV PAM，3xNLS	克隆的
ABE	RVRR-LbABE8e (TadA-8e V106W) 2xNLS	PAM 放宽的 LbCas12a 变体	克隆的
ABE	SpRY-K918N-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，K918N，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-Sniper-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，高保真 Sniper 变体，3xNLS	克隆的
ABE	dSpRY-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，dCas9，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-BlackJack-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，长 gRNA 耐受变体(Blackjack)，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-Sniper-BlackJack-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM，高保真 Sniper 变体，Blackjack，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-Sniper-K918N-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM，高保真 Sniper 变体，K918N，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-HF1-ABE8e-TadA-8e V106W 3xNLS	NRN PAM，高保真 HF1 变体，3xNLS	克隆的
ABE	SpRY-HF1-BlackJack-ABE8e V106W 3xNLS	NRN PAM，高保真 HF1 变体，Blackjack，3xNLS	克隆的
CBE	evoAPOBEC1-BE4max	NGG PAM，evoAPOBEC1 脱氨酶	Addgene
CBE	NG-evoAPOBEC1-BE4max	NG PAM，	Addgene

[0488]

		evoAPOBEC1 脱氨酶	
CBE	evoAPOBEC1-BE4max 3xNLS	NGG PAM, evoAPOBEC1 脱氨酶 3xNLS	克隆的
CBE	SpRY-evoAPOBEC1-BE4 3xNLS	NRN PAM, evoAPOBEC1 脱氨酶 3xNLS	克隆的
CBE	eA3A-BE5-NG	NG PAM, eAPOBEC3A 脱氨酶, 高纯度	Addgene
CBE	EA-BE4max-NG	NG PAM, evoAPOBEC1 脱氨酶, 高纯度	Addgene

[0489] 流式细胞术配体亲和力测定

[0490] 为了评估突变受体对其配体的结合亲和力,开发了荧光配体结合测定。根据制造商的建议将人SCF和FLT3L(Peprotech)与Alexa Fluor 488抗体标记试剂盒(Invitrogen目录号A20181)缀合。在室温下,将表达FLT3或KIT变体的细胞与FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)、对照抗体(KIT 104D2 PE-Cy7,Biolegend,或FLT3 BV10A4 PE-Cy7,Biolegend)和相应的AF488缀合的配体一起孵育15min。用PBS+2%FBS洗涤样品,并且用BD Fortessa流式细胞仪进行分析。

[0491] 用于FLT3和CD123编辑的报告细胞系

[0492] 由于K562细胞不组成性表达FLT3或CD123,因此这些细胞被工程化为过表达FLT3、CD123、KIT或来自其内源基因组位点的三种基因的任何组合,以充当用于对这些基因进行基因编辑方法的模型。为了获得这些基因的组成性强表达,通过CRISPR-Cas9 (FLT3、KIT)或CRISPR-AsCas12a(CD123)基因编辑策略将完全人EF1α启动子整合到FLT3、CD123或KIT基因的转录起始位点上游(图8)。通过PCR在编码EF1α启动子的睡美人质粒上制备了带有用于靶向的区域的50bp长同源臂的dsDNA线性供体。使用Lonza 4D-Nucleofector系统对野生型K562细胞进行电穿孔,所述系统中Cas9(FLT3、KIT)或Cas12a(CD123)RNP具有靶向相应基因的启动子区域的gRNA。电穿孔反应中包括5至10ug具有匹配的同源臂的dsDNA线性供体,以充当用于同源定向修复整合的模板。用FLT3 BV10A4 PE-Cy7(Biolegend)、KIT 104D2 PE-Cy(Biolegend)或CD123 9F5 BV421和CD123 7G3 BV711(BD)对细胞进行染色,并且通过流式细胞术进行评估。对FLT3、CD123或KIT-high群进行FACS分选,并且通过有限稀释分离单个克隆(图8)。选择通过流式细胞术得到FLT3(克隆AH11)和CD123(克隆3D5)的具有最高MFI的克隆进行扩增。

[0493] 蛋白质印迹

[0494] 将过表达FLT3/CD123变体的K562细胞或过表达KIT的NIH-3T3细胞或HEK-293T细胞在不含FBS的培养基中培养过夜(血清饥饿),然后每种条件下的100万个细胞在37℃下用100ng/mL FLT3L、IL3或SCF(取决于评估的受体)刺激或不刺激(针对5')。然后用冰冷的PBS洗涤细胞3次,裂解并且提取蛋白质用于蛋白质印迹(细胞提取缓冲液,ThermoFisher FNN0011+1mM PMSF)。用BCA测定进行量化后,将蛋白质提取物与Laemmli上样染料(Biorad 161-0747)混合,并且在Novex Tris-Glycine凝胶(Invitrogen)上运行。转移后,用TBST中

的5%w/v BSA封闭膜,并且与识别pKIT(Y719,Cell Signaling 3391T)或pFLT3(Tyr589/591克隆30D4,细胞信号传导3464S)的一抗在4℃下一起孵育过夜。洗涤后,将膜在室温下与抗兔IgG、HRP连接的抗体(Cell Signaling 7074)一起孵育1小时,然后与SuperSignal West Femto化学发光HRP底物(Thermo Scientific 34096)一起孵育,并且用ImageQuant LAS4000进行分析。随后将相同的膜在室温下与Restore(ThermoScientific#21059)剥离缓冲液一起孵育20分钟,以与上述相同的步骤用抗KIT(克隆1C5,Invitrogen MA5-15894)或抗FLT3(克隆OTI7D6,Origene TA808157)一抗进行二次染色。根据一抗用抗兔或抗鼠IgG HRP缀合的抗体进行二抗染色,并且如上所述开发和获取膜。抗肌动蛋白染色被用作负载归一化的内部对照。

[0495] 流式细胞术分析(体外实验)

[0496] 编辑后72小时通过流式细胞术评估编辑的细胞系,并且用与治疗表位或不相关表位结合的抗体克隆进行染色,以充当用于编辑的蛋白质表面表达的对照抗体。对于FLT3编辑,将细胞与FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、FLT3 BV10A4 PE-Cy7 2/100(Biolegend 313314)和FLT3 4G8 BV711(BD 563908)一起孵育。对于CD123编辑,将细胞与FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、CD123 9F5 PE或BV421(BD 555644)1/100、CD123 7G3 BV711或BV421(BD 740722)1/100一起孵育。对于KIT编辑,将细胞与FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、KIT 104D2 PE-Cy7或BV711 2/100(Biolegend 313212)、KIT Fab79D AF488或PE(Creative Biolabs)2/100对细胞进行孵育。在4℃下以100uL/样品体积染色30分钟。为了评估培养的人CD34+HSPC的干细胞表型,收获细胞,在100uL PBS中重悬,并且用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、CD34 BV421(Biolegend)1.5/100、CD90 APC(BD)3.5/100、CD45RA APC-Cy7(Biolegend)3.5/100、CD133/2PE(Miltenyi)4/100染色。在4℃下以100uL/样品体积染色30分钟。在4或5激光BD Fortessa流式细胞仪上分析样品。

[0497] 流式细胞术分析(体内实验)

[0498] 将来自异种移植NSG小鼠的外周血采集到具有10uL 0.5M EDTA的1.5mL Eppendorf管中,并且用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、人CD45 BV786(Biolegend)1.5/100、小鼠CD45 BV570(Biolegend)、CD34 BV421(Biolegend)1.5/100、CD19 BV650(Biolegend)3/100、CD3 BV711(Biolegend)2/100、CD33 BB515(BD)2/100在室温下染色15分钟。然后在室温下用ACK试剂(StemCell技术)裂解血液样品5分钟,并且在PBS+2%FBS中洗涤两次。在4激光BD Fortessa流式细胞仪上分析样品。

[0499] 通过在研钵中粉碎后肢骨骼、通过40-um细胞过滤器过滤并且在Miltenyi MACS运行缓冲液中重悬细胞来获得来自异种移植的小鼠的骨髓。将一部分细胞染色用于流式细胞术分析:用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、7-AAD(BD Pharmigen)3/100、人CD45 BV786(Biolegend)1.5/100、小鼠CD45 BV570(Biolegend)、CD34 BV421(Biolegend)1.5/100、CD19 BV650(Biolegend)或CD19 BV605(Biolegend)3/100、CD3 BV711

(Biolegend)或CD3 PE-Cy7(Biolegend)2/100CD33 BB515(BD)、CD38 BV480(BD)1.5/100或CD38 BUV396(BD)2/100,FLT3 BV10A4 PE-Cy7(Biolegend)、CD123 9F5 PE(BD)、CD90 APC(BD)3.5/100、CD45RA APC-Cy7(Biolegend)3/100在4℃下持续30分钟。将脾脏在40um细胞过滤器上粉碎,并且重悬在Miltenyi MACS运行缓冲液中。将回收的细胞用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、人CD45 Pacific Blue(Biolegend)1.5/100、小鼠CD45 BV570(Biolegend)、CD3 BV711(Biolegend)2/100、EGFR AF488(R&D)1.5/100、CD62L PE(BD)2/100、CD4 APC(BD)2/100、CD8 BV750(Biolegend)2/100、CD45RA APC-Cy7(Biolegend)3/100、CD69 PerCP-Cy5.5(Biolegend)3/100在4℃下染色30分钟。在4激光BD Fortessa流式细胞仪上分析样品。在一些实验中,将BM细胞用hCD45 BV786、mCD45 PerCP-Cy5.5、CD3 PE-Cy5、CD7 AF700、CD10 BUV737、CD11c BUV661、CD14 BV510、CD19 BV605、CD33 PE-Cy7、CD38 BUV396、CD45RA APC-Cy7、CD56 BUV496、CD90 APC、FLT3 PE或BV711以及KIT BV711或CD123 PE抗体染色,并且添加50uL/样品Brilliant染色缓冲液(BD目录号659611)。

[0500] gDNA提取、PCR扩增和Sanger测序

[0501] 使用Qiagen DNeasy Blood&Tissue Kit或Lucigen QuickExtract试剂从干沉淀样品中提取基因组DNA,通过Nanodrop 8000进行量化,并且使用Promega GoTaq G2和相应的引物通过PCR扩增感兴趣的序列。使用Promega SV Wizard Gel和PCR Clean-Up系统纯化PCR产物,并且通过Genewiz送去用于Sanger测序。通过使用用于高通量样品分析的定制脚本,使用EditR R包进行反卷积,自Sanger轨迹计算碱基编辑效率。

[0502] 集落形成测定

[0503] 除非另有说明,否则集落形成单位(CFU)测定是通过在体外CD34+HSPC实验中铺种1000个CD34+细胞/孔,或在异种移植BM衍生的测定中铺种25000个总骨髓细胞/孔来进行的。将细胞重悬在Methocult H4034培养基(StemCell目录号04034)中,并且铺种在SmartDish无弯月面6孔板中。2周后使用StemCell STEMvision系统对孔进行成像。对于流式细胞术分析,在分析前用温PBS软化甲基纤维素培养基,收集并且洗涤两次。

[0504] 实施例2:受体变体设计

[0505] 为了设计出不会被选择的单克隆抗体克隆识别的突变受体变体,根据文献中可获得的信息或通过筛选单独突变受体变体或突变文库来鉴定由不同mAb靶向的表位。总体目标是鉴定出最少修改的靶变体,所述变体保留了表面表达、基因调节和信号转导功能,但缺乏由选择的治疗抗体克隆的识别(图1)。当暴露于针对靶分子(包括但不限于裸单克隆抗体、毒素缀合的抗体、双特异性抗体构建体和嵌合抗原受体细胞)的免疫疗法时,带有此类修饰的表面靶标的细胞被赋予选择性抗性。

[0506] FLT3表位工程化:

[0507] FLT3是III型酪氨酸激酶受体,由以下部分组成:i)胞外配体结合结构域,其特征在于存在五个免疫球蛋白样结构域;ii)单个跨膜区;iii)含有分裂的酪氨酸激酶结构域的胞内部分。前3个胞外结构域涉及与其二聚体配体FLT3-配体(FLT3L)的结合,并且这种相互作用诱导受体二聚化。二聚化后,FLT3活化由胞内酪氨酸激酶结构域彼此紧密定位介导,这有利于它们随后的转磷酸化。

[0508] 比对显示小鼠和人FLT3/FLT3L在氨基酸水平上有85.5%的同一性,并且小鼠和人

FLT3 IgG样结构域4在氨基酸水平上有82％的同一性(95.5％类似)(图3)。此外,小鼠和人FLT3/FLT3L对是相互交叉反应的。抗人FLT3治疗抗体克隆4G8特异性识别人FLT3,并且表位位于胞外结构域4内。通过睡美人转座子系统对过表达野生型人或小鼠FLT3的K562细胞进行染色,证实了克隆4G8不识别其他直系同源变体(即小鼠Flt3),在睡美人转座子系统中,人FLT3或鼠Flt3cDNA序列被克隆到组成性EF1a启动子的下游(图2)。通过睡美人转座子编码的mCherry荧光报告基因用于鉴定转导的细胞。基于这一证据,将位于胞外结构域4中的16个残基(其在直系同源序列中保留相对较少)(图3)取代为对应的鼠类氨基酸,并且生成的变体(eFLT3-01,SEQ ID NO:49)不能被克隆4G8识别(图2)。所生成的变体仍然保留了表面表达(使用结合细胞外结构域2的对照抗FLT3克隆BV10A4确认)、FLT3L结合(参见图4A和4B)和胞内信号传导特性。(参见图4C)。

[0509] 第二步,将引入以生成eFLT3-01(SEQ ID NO:49)的16个突变通过其在FLT3外显子9或外显子10(共同编码FLT3胞外结构域4)内的基因组定位分为两个突变池。这两个FLT3变体的过表达示出,限制于FLT3外显子9(SEQ ID NO:50)的突变足以消除抗FLT3克隆4G8,类似于SEQ ID NO:49。具有限制于外显子10的突变的FLT3变体,并未消除克隆4G8结合。

[0510] 为了鉴定涉及FLT3胞外结构域4的抗FLT3抗体FLT3 4G8克隆识别的关键残基,设计了具有所有16个先前鉴定的残基(野生型或突变型)的组合文库,并且将其克隆到EF1 α启动子下的睡美人转座子转移载体中(GeneScript-图5)。在RPBSA启动子下表达mCherry和嘌呤霉素抗性的反义盒充当转导标记和选择方法。使用具有5、10或100ng转移载体和500ng SB100x转座酶表达质粒的Lonza 4D-Nucleofector系统对K562细胞进行电穿孔。用1ug/mL嘌呤霉素选择核转染的细胞7天,然后通过流式细胞术进行评估。使用BD Aria II分选器将对对照抗体(FLT3 BV10A4 PE-Cy7)呈阳性且对治疗抗体(FLT3 4G8 BV711)呈阴性的细胞进行FACS分选,并且在体外扩增。整合的FLT3文库区是从未分选、单阳性分选和双阳性分选的细胞的gDNA样品PCR扩增的,并且将部分Illumina衔接子添加到扩增子并且提交在Illumina平台(GeneWiz)上进行NGS。通过比较三个样品,仅有一个密码子(N399)在单阳性细胞与双阳性细胞中显示出差异突变富集(图5)。在睡美人过表达系统中对候选突变(N399D)的验证证实其足以消除4G8克隆结合(图5)。将过表达FLT3 N399D变体的K562细胞与AF488缀合的荧光FLT3L一起孵育显示出与野生型FLT3相当的配体结合(图5)。

[0511] KIT表位工程化:

[0512] 基于可获得的文献,抗KIT抗体克隆Fab79D可识别KIT的胞外结构域4中假定的氨基酸接触点(图3)。因此,通过取代直系同源序列中保留较低的10个预测的接触氨基酸,生成了不能被抗KIT抗体克隆Fab79D识别的KIT变体(eKIT-01)(图6A)。此变体保留了人干细胞因子(SCF)亲和力(图6B)和SCF刺激后的胞内结构域磷酸化(图6C)。为了鉴定克隆Fab79D结合的特定氨基酸基础,将每个单个氨基酸改变单独克隆到共表达mCherry和Puromycin抗性的睡美人转移载体中。使用Lonza 4D-Nucleofector系统在具有100ng转移载体和500ng表达SB100x转座酶的质粒的SF溶液中对293T细胞进行电穿孔(图6D)。用嘌呤霉素(2ug/mL)选择细胞,并且通过用KIT Fab79D和KIT 104D2对照抗体染色的流式细胞术进行分析。与通过克隆104D2染色(KIT H378R)的KIT表达相比,Fab79D MFI最低的突变被选择为用于碱基编辑策略开发的候选变体(图6D)。

[0513] 为了扩展这些发现,设计了综合文库方法以进一步定义涉及Fab79D结合的替代密

码子。将KIT胞外结构域4内的每个密码子均由简并碱基(NNN)组成的简并文库克隆到表达人KIT cDNA、mTagBFP报告基因和嘌呤霉素抗性的睡美人转移质粒中(图7)。用文库质粒和pSB100X转座酶质粒对HEK-293T细胞电穿孔以允许转基因的稳定整合。经过嘌呤霉素选择后,对细胞进行FACS分选以获得单阳性和双阳性群。对所述文库区进行PCR扩增和NGS测序。比较单阳性与双阳性群中氨基酸变体的相对富集程度,其中鉴定了除了H378之外,涉及Fab79D结合的额外的密码子(M318、I319、V323、D332、E360、Y362、E376)。

[0514] CD123表位工程化:

[0515] 对于CD123(CD123),据文献报道抗CD123抗体克隆7G3及其人源化版本CSL362可识别CD123 N末端结构域内的假定氨基酸接触点(图9)。类似地,据报道其他市售克隆6H6和S18016E可与N末端结构域结合,但关于它们与CD123的接触点的信息有限。IL3是CD123的配体,并且对IL3结合很重要的CD123残基已通过Ala扫描或进化保守的氨基酸改变进行了绘制(图9)。

[0516] 为了对CD123胞外结构域内的靶表位工程化,采用直接碱基编辑器筛选方法,设计一组靶向CD123 N末端结构域中的I50、E51、Y58、S59、R84、P88或P89的sgRNA(图10)。在过表达CD123的K562细胞上用胞苷或腺嘌呤碱基编辑器(evo-APOBEC1-BE4、ABE8e-V106W)测试了这些gRNA。简而言之,根据制造商的说明,使用Lonza 4D-Nucleofector系统在SF溶液中对0.5M个细胞进行电穿孔。电穿孔反应中包括500ng碱基编辑器表达质粒和300-360pmol sgRNA(整合DNA技术)。然后培养细胞,并且在编辑后72h收获基因组DNA和流式细胞术分析样品。选择生成缺乏几个mAb克隆(7G3/CSL362、6H6、S18016F)的识别,但通过用对照抗体克隆9F5染色保留了表面表达的CD123突变体的sgRNA用于进一步开发(图10,仅报告了表现最佳的候选gRNA:SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34)。

[0517] 进行了第二轮sgRNA筛选,包括与上一轮中鉴定的sgRNA紧密接近的额外序列,并且用几种BE(包括具有放宽的PAM特异性的变体)进行了测试(evo-APOBEC1-BE4、NG-EA-BE4max、NG-A3A-BE5、SpRY-evo-APOBEC1-BE4-SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:11、NG-ABE8e、SpRY-ABE8e-V106E-SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:10、LbCas12a-ABE8e-图11)。使用克隆9F5作为表面表达的归一化物,如先前所述对克隆7G3、6H6和S18016E的结合进行流式细胞术评估。提取了显示所需识别损失的条件下的gDNA,并且对CD123外显子2和3区域进行了Sanger测序,以获得与观察到的表型相关的氨基酸改变。对于抗体克隆7G3或其人源化对应物,CSL362、CD123 S59P(通过gRNA-N、gRNA-R和具有ABE的相关变体引入)和S59F(通过gRNA-L和具有CBE的变体引入)是最佳候选变体。由于旁观者腺嘌呤从A转化为G,通过gRNA-N和gRNA-R也引入了Y58H突变。为了消除抗体克隆6H6和S18016F的结合,P88L/P89L(通过gRNA-F和具有CBE的相关变体引入)是表现最佳的氨基酸取代。通过胞苷碱基编辑引入了其他氨基酸取代池(R84Q、V85M、V85I、A86T)的额外gRNA(gRNA-H和相关变体)被鉴定,并且导致对克隆7G3、6H6和S18016F的亲和力降低(图11)。

[0518] 实施例3:FLT3变体对靶向FLT3的CAR-T细胞具有抗性

[0519] 为了测试FLT3变体是否对靶向FLT3的CAR-T细胞具有选择性抗性,进行了体外杀伤测定。

[0520] CAR-T细胞产生

[0521] 使用合成的dsDNA片段(IDT gBlocks)克隆了III代慢病毒构建体,所述构建体表

达在组成性hPGK启动子下具有CD28跨膜区和CD28共刺激结构域的第2代FLT3特异性4G8克隆嵌合抗原受体。包括在最小CMV启动子下表达人EGFR cDNA的截短变体的反义盒以充当通过使用抗EGFR抗体Cetuximab进行体内耗竭的转导标记和安全开关。根据公开的方法,通过磷酸钙瞬时共转染HEK-293T细胞中的5个质粒(转移载体、pMD2、pMDL-RRE、pREV和pAdvantage质粒)来制备VSV-G假型自失活慢病毒颗粒。将含有病毒颗粒的上清液通过超速离心(20000rpm,20℃,2小时)浓缩500倍,并且在PBS中重悬。通过转导不同浓度的293T细胞并且通过流式细胞术或ddPCR计算转导效率来滴定浓缩的LV。

[0522] 通过聚蔗糖梯度分离从全血中分离出外周血单核细胞(PBMC)。通过流式细胞术估算T细胞分数后,将新鲜分离或解冻的PBMC与CD3-CD28 Dynabead一起以3:1的珠:T细胞比率(Gibco 11131D)在室温下缓慢搅拌孵育45min,然后进行磁分离(DynaMag-5 Magnet,Invitrogen 12303D)。将阳性选择的细胞用Dynabead以1M/mL的浓度在含有10%FBS、1%P/S、人IL-75ng/mL(Peprotech)和人IL-155ng/mL(Peprotech)的IMDM中培养。在Dynabead刺激开始后48h,根据编码所选CAR的慢病毒颗粒的实验,将T细胞以MOI 5至MOI10进行转导。自刺激开始后第7天,通过磁分离从培养物中去除Dynabead,并且将T细胞在补充有10%FBS、1%P/S、人IL-7 5ng/mL(Peprotech)和人IL-15 5ng/mL(Peprotech)的IMDM中额外扩增5-7天。通过流式细胞术定期评估T细胞表型和转导效率(通过EGFR表面染色)。扩增的CAR-T细胞或未转导的T细胞可用于杀伤测定、体内施用或在刺激开始后12-14天进行活体冷冻。

[0523] 将K562细胞(未修饰的、碱基编辑的或在睡美人转导后过表达受体变体)铺种于96孔板中(25000个靶细胞/孔)。通过用编码具有CD28共刺激结构域的第2代4G8-CAR构建体的慢病毒载体转导外周血单核细胞(PBMC)以及共表达EGFRt(截短的EGFR)安全开关来生成抗FLT3 CAR-T细胞(参见上面的方案)。根据制造商的建议,用CellTrace黄色(Invitrogen C34567)标记靶向FLT3的4G8 CAR-T细胞或未转导的T细胞。然后将靶向FLT3的4G8 CAR-T细胞或未转导的T细胞以不同的效应子:靶标比率(E:T比率)共铺种在相同的孔中,通常为10、5、2.5、1.25、0.625,并且在37℃在加湿培养箱中以5%CO_2进行孵育。4小时后,收获50%的培养物体积用于通过用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、FLT3 BV10A4 PE-Cy72/100(Biolegend 313314)、CD4 APC(BD)2/100、CD8 BV750(Biolegend)2/100、CD107a BV711(Biolegend)2/100、CD69 PerCP-Cy5.5(Biolegend)2/100染色进行流式细胞术分析。染色混合物包括流式计数珠以归一化细胞计数(Biolegend Precision Count Bead)。然后将细胞洗涤并且重悬在补充有AnnexinV FITC(Biolegend)3/100的AnnexinV结合缓冲液(Biolegend)中。在4或5激光BD Fortessa流式细胞仪上分析样品。铺种后48小时通过用FcR阻断试剂(Miltenyi 130-059-901)2/100uL、LIVE/DEAD可固定黄色死细胞染色剂(Invitrogen L34967)1/1000、FLT3 BV10A4 PE-Cy7 2/100(Biolegend 313314)、CD4 APC(BD)2/100、CD8 BV750(Biolegend)2/100、CCR7 BV421(Biolegend)2/100、CD45RA APC-Cy7(Biolegend)3/100、CD33 PerCP-Cy5.5(Biolegend)染色的流式细胞术评估剩余的培养物体积。然后将细胞洗涤并且重悬在补充有AnnexinV FITC(Biolegend)3/100的AnnexinV结合缓冲液(Biolegend)中。

[0524] 图12A示出了共培养杀伤测定的实验设计,以评估修饰的FLT3变体对CAR-T细胞介

导的杀伤的抗性。图12B是示出孵育后4小时和48小时活细胞的共培养组成的流式细胞术图。顶行示出通过流式细胞术在WT或工程化的K562细胞上的FLT3表达。表达未修饰的野生型FLT3的细胞被选择性杀伤,而工程化的FLT3(e9-FLT3)则幸免。图12C示出了孵育后4小时通过AnnexinV和LiveDead黄色染色的得到的靶细胞活力。图12D示出仅对于暴露于表达未修饰的FLT3的靶细胞的FLT3-CAR-T,在4小时时通过CD107a表面染色进行选择性T细胞脱粒。图12E示出在共培养后48小时,仅对于暴露于表达未修饰的FLT3的靶细胞的FLT3-CAR--T,通过染料稀释(CellTrace黄色)进行选择性T细胞增殖。未修饰的K562:野生型细胞;WT FLT3 OE:K562报告细胞系,其内源启动子过表达FLT3(参见报告细胞系生成);“WT FLT3 OE(睡美人)”和“e9 FLT3 OE(睡美人)”:用驱动FLT3变体的过表达的睡美人转座子转导的K562细胞。e9-FLT3变体与WT-FLT3相比具有12个氨基酸改变,包括N399D(SEQ ID NO:50)。

[0525] 实施例4:同源定向修复以将N399D引入FLT3

[0526] 为了测试FLT3 N399D是否可以通过同源定向修复引入,设计了CRISPR Cas同源定向修复(HDR)策略。与靶向FLT3外显子9基因座的几种gRNA组合的SpCas9或AsCas12a核酸酶与作为用于HDR的供体模板的200nt长的单链寡脱氧核苷酸(ssODN)组合进行测试。每个供体模板包括旁观者氨基酸中选定的沉默突变,以降低DNA成功修复后被CRISPR-Cas9 RNP核酸酶复合物重切割的风险。还测试了每个ssODN供体(称为A、C、H、F)的反向互补性。将ssODN模板供体的序列报告为SEQ ID NOS:40至43(参见上表2)。使用Lonza 4D-Nucleofector系统在SF溶液中对通过在内源性FLT3基因座上游的EF1-a启动子的靶向整合来过表达FLT3的K562报告细胞进行电穿孔,根据实验条件,SF溶液中补充有与62.5pmol退火的trRNA:gRNA复合的50pmol 3xNLS Cas9核酸酶(IDT),或与62.5pmol sgRNA复合的50pmol AsCas12a Ultra(IDT)。Cas9 gRNA e9-4-NGG与ssODN-A和C及其反向互补体(最终浓度为5uM)组合进行测试。Cas12a gRNA e9-15-TTTV和e9-16-TTTV与ssODN-H和F及其反向互补体(最终浓度为5uM)组合进行测试。电穿孔反应中包含IDT HDR增强剂0.2uL/20uL(30uM)。电穿孔后72h通过流式细胞术评估编辑程序的结果。图13A(顶部)示出具有突出显示的N399残基的FLT3的外显子9及其相对于3个gRNA(一个SpCas9 gRNA(e9-4-NGG)和两个Cas12a gRNA(e9-15-TTTV和e9-16-TTTV))的位置。靶向gRNA的FLT3外显子9报告为SEQ ID NOS:13至16(参见上表1)。图13A(底部)示出了通过同源定向修复利用单链寡脱氧核苷酸供体模板插入N399D(箭头)突变。模板设计中包括了额外的沉默单核苷酸改变,以降低通过Cas9-gRNA复合物(深色方块)的重切割率。

[0527] 图13B示出了使用作为表面表达的归一化物的FLT3克隆104D2和克隆4G8染色以评估N399D突变的效率的K562报告细胞电穿孔后72小时的FACS图。成功编辑的细胞由黑色矩形突出显示,示出N399D突变可以通过CRISPR-Cas同源定向修复插入人细胞系,导致mAb克隆4G8识别损失。

[0528] 实施例5:可通过CRISPR腺嘌呤碱基编辑器引入在N399位置处的FLT3突变

[0529] 为了在FLT3基因座以高效率且低毒性引入所需的单密码子改变,而不引入双链DNA断裂,我们测试了CRISPR-Cas碱基编辑。我们设计了一组sgRNA,预测与腺嘌呤碱基编辑器组合会引入N399D或N399G突变。选择CRISPR-Cas9碱基编辑器ABE8e(TadA-8e V106W)来开发编辑策略,并且通过使Cas9切口酶蛋白突变进一步优化以放宽PAM特异性,从而允许在不存在常规NGG PAM的情况下进行编辑。为此,克隆了碱基编辑器的NG-SpCas9和SpRY-Cas9

变体。为了进一步提高效率,将第3个核定位位点(NLS)与蛋白质的C末端部分融合。除非另有说明,否则碱基编辑实验是通过对具有500ng碱基编辑质粒和300-360pmol sgRNA(整合DNA技术)的过表达FLT3基因的报告K562电穿孔进行的。然后培养细胞,并且在编辑后72h收获基因组DNA和流式细胞术分析样品。

[0530] 图14示出了举例说明用于N399碱基编辑的PAM要求的代表性实验。用WT-SpCas9切口酶(PAM要求:NGG)、NG-SpCas9切口酶(PAM要求:NG)和SpRY-Cas9切口酶(PAM要求:NRN)、ABE构建体测试了两种具有NG PAM的SpCas9 sgRNA(SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18,参见上表1)。图14A示出了FLT3基因中sgRNA和N399密码子的相对位置。图14B为具有标出下划线的靶腺嘌呤的gRNA原间隔序列。图14C示出了三种腺嘌呤碱基编辑器构建体(与具有或不具有V106W突变的TadA脱氨酶结构域连接的野生型Cas9、NG-Cas9或SpRY-Cas9变体)的设计。V106W突变与RNA编辑降低相关,这是腺嘌呤碱基编辑器已知的不良影响。ABE8e-V106W和NG-ABE8e也可通过Addgene获得(目录产品编号分别为138495和138491)。克隆的SpRY-ABE8e-V106W(SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8)包含额外的C末端核质粒核定位序列(NLS)。图14D展示了电穿孔后72h的碱基编辑结果的FACS图,其中K562细胞用抗FLT3克隆BV10A4(归一化物)和4G8(治疗抗体)染色。编辑的细胞的百分比报告在每个条件的FACS图的右下角。仅具有放宽的PAM特异性的碱基编辑器变体(NG-ABE8e和SpRY-ABE8e-V106W)显示出有效编辑,其中高达41.1%的细胞对克隆4G8染色呈阴性。

[0531] 为了提高N399密码子的碱基编辑效率,通过筛选额外的sgRNA与近乎无PAM的SpRY-Cas9变体组合实现了定制的编辑窗口定位。图15A示出了FLT3 N399的基因组背景及其相对于5个sgRNA的位置,包括来自前一个实施例的两个(SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18)和三个具有NRN PAM的额外gRNA(SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:23)。图15B为具有标出下划线的靶腺嘌呤的sgRNA原间隔序列。图15C是将500ng碱基编辑器表达质粒和360pmol sgRNA电穿孔到K562细胞中的碱基编辑实验的FACS图。编辑的细胞的百分比报告在每个条件的FACS图的右下角。SpRY-ABE8e-V106W与sgRNA FLT3_e9_18组合通过流式细胞术实现最高效率,高达66.3%的编辑的细胞无法被克隆4G8识别。

[0532] 实施例6:通过ABE引入的FLT3突变保留了蛋白质表达和配体结合

[0533] 来自实施例5的碱基编辑细胞的Sanger测序揭示了N399密码子(序列:AAC)内的两个腺嘌呤的A至G的编辑,可能生成N399D或N399G突变。为了进一步测试在N399位置处含有突变的FLT3变体是否仍然保留生理性FLT3L结合,进行了荧光配体结合测定。图16A示出了用表达各种FLT3变体的K562细胞进行的荧光配体结合测定:N339D(SEQ ID NO:51)、N399G(SEQ ID NO:52)、外显子9突变(SEQ ID NO:50)或WT FLT3(SEQ ID NO:48)。每个图都报告了FLT3L AF488与FLT3 BV10A4 PE-Cy7之间的荧光比率。图16B示出了每个变体的FLT3L AF488与FLT3 BV10A4 PE-Cy7之间的荧光比率分布(直方图)。数据显示,FLT3腺嘌呤碱基编辑产生的N399D和N399G变体保留了生理性FLT3L结合亲和力。

[0534] 实施例7:使用SpRY-ABE8e-V106W mRNA可在人白血病细胞系和人CD34+HSPC中导致高效碱基编辑

[0535] 为了将碱基编辑程序转化到原代细胞,需要开发一种用于碱基编辑器的适合的递送方法,因为据报道细菌质粒转染对干细胞有毒性。

[0536] 我们采用通过体外转录产生的碱基编辑器mRNA将碱基编辑方案转化到人CD34+

HSPC。使用MEGAscript T7转录试剂盒(Invitrogen AM1333)或NEB T7 HiScribe试剂盒(E2040S)和定制质粒(SEQ ID NO:81;参见图17A及下文)模板通过体外转录(IVT)产生编码腺嘌呤碱基编辑器(SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS或SpRY-K918N-ABE8e-V106W3xNLS)的功能性mRNA,所述模板编码碱基编辑器阅读框下游至T7启动子序列、最小5′UTR和下游至2个拷贝的HBB(血红蛋白B)3′UTR和polyA序列(60-120bp长)。图17B举例说明了用于生成用于原代人CD34+碱基编辑的共转录5′-加帽的和3′-多腺苷酸化的mRNA的体外转录工作流程。通过用3′-O-Me-m7G(5′)ppp(5′)G RNA帽结构类似物(NEB S1411)取代80%的GTP实现了共转录加帽。使用Qiagen RNAesy mini kit或NEB Monarch mRNA CleanUp(T2050L)纯化IVT反应产物,通过Nanodrop量化并且通过Agilent片段分析仪分析进行质量控制(典型电泳图如图17C所示。

[0537] SEQ ID NO:81-用于体外转录SpRY_ABE8e_V106W腺嘌呤碱基编辑器的pmRNA质粒,包括5′UTR、HBB 3′UTRx2和120bp长polyA尾

[0538]
atatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattat
gcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattagtcat
cgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttg
actcacggggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcac
caaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatggg
cggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccgtcaga
tccgctagagatccgcggccgcAGCGCTGGTACCtaatacgactcactatagggagaCT
GCCAAGatgaaacggacagccgacggaagcgagttcgagtcaccaaagaagaagcggaa
agtctctgaggtggagttttcccacgagtactggatgagacatgccctgaccctggcca
agagggcacgggatgagagggaggtgcctgtgggagccgtgctggtgctgaacaataga
gtgatcggcgagggctggaacagagccatcggcctgcacgacccaacagcccatgccga
aattatggccctgagacagggcggcctggtcatgcagaactacagactgattgacgcca

ccctgtacgtgacattcgagccttgcgtgatgtgcgccggcgccatgatccactctagg

atcggccgcgtggtgtttggatggagaaattctaaaagaggcgccgcaggctccctgat

gaacgtgctgaactaccccggcatgaatcaccgcgtcgaaattaccgagggaatcctgg

cagatgaatgtgccgccctgctgtgcgatttctatcggatgcctagacaggtgttcaat

gctcagaagaaggcccagagctccatcaactccggaggatctagcggaggctcctctgg

ctctgagacacctggcacaagcgagagcgcaacacctgaaagcagcgggggcagcagcg

gggggtcagacaagaagtacagcatcggcctggccatcggcaccaactctgtgggctgg

gccgtgatcaccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacac

cgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaa

cagccgagAGAacccggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaac

cggatctgctatctgcaagagatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagctt

cttccacagactggaagagtccttcctggtggaagaggataagaagcacgagcggcacc

ccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtaccccaccatctac

cacctgagaaagaaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgcggctgatctatct

[0539] ggccctggcccacatgatcaagttccggggccacttcctgatcgagggcgacctgaacc

ccgacaacagcgacgtggacaagctgttcatccagctggtgcagacctacaaccagctg

ttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccatcctgtctgccag

actgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcgagaagaaga

atggcctgttcggaaacctgattgccctgagcctgggcctgacccccaacttcaagagc

aacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacga

cctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgcca

agaacctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcacc

aaggcccccctgagcgcctctatgatcaagagatacgacgagcaccaccaggacctgac

cctgctgaaagctctcgtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcg

accagagcaagaacggctacgccggctacattgacggcggagccagccaggaagagttc

tacaagttcatcaagcccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaa

gctgaacagagaggacctgctgcggaagcagcggaccttcgacaacggcagcatccccc

accagatccacctgggagagctgcacgccattctgcggcggcaggaagatttttaccca

ttcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgaccttccgcatcccctacta

cgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatgaccagaaagagcgagg

aaaccatcacccccctggaacttcgaggaagtggtggacaagggcgcttccgcccagagc

ttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccaacgagaaggtgctgcccaa

gcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaaatacg

tgaccgagggaatgagaaagcccgccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtg

gacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactactt

caagaaaatcgagtgcttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacg

cctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggac

aatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgagga

cagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgcccacctgttcgacgacaaagtga

tgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatc

aacggcatccgggacaagcagtccggcaagacaatcctggatttcctgaagtccgacgg

cttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaaagagg

acatccagaaagcccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaat

[0540] ctggccggcagccccgccattaagaagggcatcctgcagacagtgaaggtggtggacga

gctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaaatggccagag

agaaccagaccacccagaagggacagaagaacagccgcgagagaatgaagcggatcgaa

gagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacaccca

gctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatatgtacgtgg

accaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcag

agctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccg

gggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggc

ggcagctgctgaacgccaagctgattacccagagaaagttcgacaatctgaccaaggcc

gagagaggcggcctgagcgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtgga

aacccggcagatcacaaagcacgtggcacagatcctggactcccggatgaacactaagt

acgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaaagtgatcaccctgaagtccaagctg

gtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactacca

ccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaaccgccctgatcaaaaagtacc

ctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtgcggaagatg

atcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtacttcttctacagcaa
catcatgaacttttcaagaccgagattaccctggccaacggcgagatccggaagcggc
ctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggatttt
gccaccgtgcggaaagtgctgagcatgccccaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggt
gcagacaggcggcttcagcaaagagtctatcAGAcccaagaggaacagcgataagctga
tcgccagaaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcCTTTGGcccaccgtg
gcctattctgtgctggtggtggccaaagtggaaaagggcaagtccaagaaactgaagag
tgtgaaagagctgctggggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatccca
tcgactttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctg
cctaagtactccctgttcgagctggaaaacggccggaagagaatgctggcctctgccAA
GCaactgcagaagggaaacgaactggccctgccctccaaatatgtgaacttcctgtacc
tggccagccactatgagaagctgaagggctcccccgaggataatgagcagaaacagctg
tttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagttctc
caagagagtgatcctggccgacgctaatctggacaaagtgctgtccgcctacaacaagc
[0541] accgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgtttaccctgacc
aGActgggagcccctAGAgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccCTaagCAAta
caGAagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgt
acgagacacggatcgacctgtctcagctgggaggtgactctggcggctcaaaaagaacc
gccgacggcagcgaattcgagcccaagaagaagaggaaagtcggcagcggaagcaaaag
gccggcggccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagctcgagtaaaccggtC
CCGGGtctagaagctcgctttcttgctgtccaatttctattaaaggttcctttgttccc
taagtccaactactaaactgggggatattatgaagggccttgagcatctggattctgcc
taataaaaaacatttattttcattgctcATGCATatagaagctcgctttcttgctgtcc
aatttctattaaaggttcctttgttccctaagtccaactactaaactgggggatattat
gaagggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacatttattttcattgctcttA
GCtaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaGTCTTCactagtAAGCTGCTGATaaacccgctgatcagcctcgactgtgcc
ttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaag

gtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagt

aggtgtcattctattctgggggtggggtggggcaggacagcaaggggaggattggga

agtcaatagcaggcatgctggggatgcggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaa

ccagctggggctcgataccgtcgacctctagctagagcttggcgtaatcatggtcatag

ctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaag

cataaagtgtaaagcctagggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgc

gctcactgcccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc

caacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctcactga

ctcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaa

tacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccag

caaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccc

ccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggac

tataaagataccaggcgtttcccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacc

ctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctca

[0542] tagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtg

tgcacgaaccccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgag

tccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattag

cagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggct

acactagaagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaa

agagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagcggtggtttttttgt

ttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttt

ctacggggtctgacactcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgaga

ttatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaat

ctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcac

ctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtag

ataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgaga

cccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagc

gcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagtctattaattgttgccgggaa

gctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacgttgttgccattgctacagg

[0543]

```
catcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgat
caaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcct
ccgatcgttgtcagaagtaagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcact
gcataattctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtact
caaccaagtcattctgagaatagtgtatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtca
atacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacg
ttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaac
ccactcgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtga
gcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttg
aatactcatactcttcctttttcaatattattgaagcatttatcagggttattgtctca
tgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaatagggggttccgcgcaca
tttccccgaaaagtgccacctgacgtcgacggatcgggagatcgatctcccgatcccct
agggtcgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagtatctgctcc
ctgcttgtgtgttggaggtcgctgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaagg
caaggcttgaccgacaattgcatgaagaatctgcttagggttaggcgttttgcgctgct
tcgcgatgtacgggccagatatacgcgttgacattgattattgactagttattaatagt
aatcaattacggggtcattagttcatagcccatatattgagttccgcgttacataactt
acggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataat
gacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagt
atttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatc
```

[0544] 图18举例说明了使用不同剂量(20uL电穿孔体积中0.5至5ug)的电穿孔IVT SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS碱基编辑器mRNA和180或360pmol FLT3-e9-18sgRNA对K562报告细胞进行的碱基编辑实验。编辑的细胞用4G8克隆(靶向抗体)和BV10A4克隆染色用于表达归一化(图18A)。每个图的右下角报告了通过流式细胞术的编辑的细胞的百分比。图18B通过流式细胞术示出了mRNA/gRNA剂量与编辑效率的关系,而图18C通过流式细胞术示出了mRNA/gRNA剂量与细胞活力的关系(LiveDead黄色染色)。热图示出了通过来自图19A中实验样品的PCR扩增gDNA的Sanger测序的碱基编辑效率。使用EditR包对Sanger轨迹进行反卷积,以计算A至G的转换效率。gRNA和mRNA剂量报告在左侧,而gRNA序列内靶腺嘌呤的编号以列报告(PAM对应于位置21-23)。图19B报告了通过流式细胞术(4G8-细胞)与Sanger测序得到的编辑效率之间的关系。

[0545] 为了证实FLT3碱基编辑对原代人CD34+造血干细胞和祖细胞的可行性,进行了体外碱基编辑和扩增培养实验。将动员的外周血衍生的CD34+HSPC解冻并且在补充有1%青霉素/链霉素、SCF 100ng/mL(Peprotech)、FTL3L 100ng/mL(Peprotech)、TPO 50ng/mL(Peprotech)、Stemregenin-1 0.75uM(StemCell技术)、UM171 35nM(Selleckhem)的StemCell SFEMII培养基中以0.5-0.75百万/mL进行培养。解冻后48小时,使用Lonza 4D-Nucleofector系统在P3电穿孔溶液(Lonza)中对0.15-0.25百万(M)个HSPC进行电穿孔,所述溶液中补充有每20uL反应2.5-7.5ug碱基编辑器mRNA(SpRY-ABE8e-V106W)和sgRNA(整合DNA技术)250-450pmol。将细胞在上述培养基中培养5-7天。为了测试对CAR-T细胞杀伤的特异性抗性,将编辑的或未编辑的CD34+细胞在编辑后在体外扩增3天,然后与抗FLT3 CAR-T细胞或未转导的T细胞共培养。

[0546] 图20A示出了动员的外周血衍生的CD34+HSPC的体外扩增培养和FLT3碱基编辑的实验布局和时间线。使用1、2.5或5ug的SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS mRNA以及180或360pmol的FLT3-e9-18 sgRNA对细胞进行电穿孔。图20B举例说明了体外扩增培养期间CD34+细胞的流式细胞术免疫表型的门控策略。图20C示出了CD34+细胞相对于不同碱基编辑条件的体外倍数扩增,表明与未治疗对照相比,碱基编辑程序的毒性有限。图20D总结了编辑后第3天和第6天通过流式细胞术的培养的CD34+的组成,示出在电穿孔和mRNA碱基编辑后干细胞和祖细胞亚群没有发生偏差。

[0547] 图21A报告了电穿孔后第6天通过Sanger测序的编辑效率。gRNA和mRNA剂量报告在左侧,而gRNA序列内靶向的腺嘌呤的编号以列报告(PAM对应于位置21-23)。图21B以散点图形式报告了人CD34+HSPC中碱基编辑效率与不同gRNA x mRNA剂量之间的关系。

[0548] 实施例8:用SpRY-ABE8e-V106W mRNA对表达人FLT3的白血病细胞系或人CD34+HSPC进行的FLT3碱基编辑赋予对4G8CAR-T细胞的抗性

[0549] 为了测试从图18中进行的实验中获得的碱基编辑细胞是否对4G8 CAR-T细胞具有抗性,进行了先前报告的共培养实验。图22A报告了以不同效应子:靶标比率下共培养4小时后存活细胞的流式细胞术图。编辑的细胞(编辑效率约89%)受到保护免于CAR-T细胞杀伤,并且在较高的E:T比率下仍能存活。图22B报告了与4G8抗FLT3CAR-T细胞或未转导的T细胞共培养后4小时通过AnnexinV和LiveDead黄色染色的靶细胞(未编辑或FLT3碱基编辑的K562)活力,突出显示了对未修饰细胞的选择性杀伤。图22C报告了与未编辑或FLT3碱基编辑的K562细胞共培养4小时时通过表面CD107a染色进行的CAR-T/T细胞脱粒。仅暴露于未修饰的细胞的CAR-T细胞才示出显著脱粒。

[0550] 类似地,为了测试碱基编辑的人造血干细胞和祖细胞是否对FLT3靶向免疫疗法具有抗性,将图20中进行的实验中编辑的CD34+与4G8 CAR-T细胞或未转导的T细胞共培养。图23示出了来自图20中实验第3天培养的使用未修饰或FLT3碱基编辑的mPB CD34+细胞(编辑效率约46%)的CAR-T细胞共培养实验。图23A报告了以不同效应子:靶标比率与4G8抗FLT3CAR-T细胞或未转导的T细胞共培养48h时存活细胞的流式细胞术图。图23B报告了以不同的效应子:靶标比率与4G8抗FLT3 CAR-T细胞或未转导的T细胞共培养的CD34+细胞的特异性杀伤。图23C报告了对干细胞富集CD34+90+亚群的特异性杀伤。尽管与在细胞系上进行的实验相比,CAR-T介导的杀伤差异不太明显,但由于通过培养的CD34+HSPC暴露于FLT3L时FLT3表达相对较低,修饰的HSPC显示出由FLT3编辑赋予的抗性,并且在富集更多干细胞的CD90+细胞中差异更大。

[0551] 实施例9:FLT3编辑的HSPC受到CAR-T细胞介导的体内杀伤保护

[0552] 为了进一步证实针对由抗FLT3 CAR-T细胞介导的在靶杀伤的保护作用,进行了免疫缺陷NSG小鼠体内异种移植实验(图24A示出了实验设计)。人动员外周血衍生的CD34+HSPC如先前的举例说明进行编辑,并且在亚致死照射(2.5Gy)后24h通过尾静脉注射以每只小鼠100万个进行移植。用未编辑的HSPC异种移植的小鼠充当对照组。每组进一步分为两个治疗亚群,媒介物(PBS)或4G8-CAR T细胞,移植后第7周每只小鼠150万个细胞。在第8周(CAR-T细胞治疗后一周)对小鼠实施安乐死。图24B报告了通过流式细胞术的人骨髓植入(人CD45+细胞的百分比,不包括CD3+细胞)和人绝对CD45+细胞计数。CD3+被排除在人植入之外,因为它们来源于注射的CAR_T细胞。在移植了未编辑的细胞的小鼠中观察到更为严重

的人植入耗竭。图24C报告了骨髓上的人植入组合物(不包括CD3+细胞),表明了由编辑的HSPC生成的多谱系植入。

[0553] 图25A报告了处死时骨髓中的造血干细胞和祖细胞频率(CD34+CD38-)和绝对丰度,表明了FLT3碱基编辑针对CAR-T介导的杀伤的保护作用。图25D(门控策略)和图25E(谱系-CD34+38-持续细胞的分数)报告了来自每个组的小鼠的骨髓分析的汇集事件所产生的示例性流式细胞术图。图25B示出通过表面CD69染色的治疗的小鼠脾脏中的CAR-T细胞活化程度相对较高。CAR_T细胞通过EGFR染色(与CAR共表达作为标记和安全开关)来鉴定。图25C报告了治疗的小鼠脾脏中通过CD62L和CD45RA表达的CAR-T细胞表型。初始:CD45RA+CD62L+,中央记忆(CM):CD45RA-CD62L+;效应记忆(EM):CD45RA-CD62L-;终末分化效应记忆(TEMRA):CD45RA+CD62L-。在用未编辑的HSPC异种移植的治疗的小鼠中,向效应子亚群的相对偏向是明显的。

[0554] 为了进一步评估通过N399的FLT3碱基编辑对CD34+HSPC免受CAR-T细胞杀伤的保护作用,在NBSGW小鼠中进行了第二次体内实验,其允许在没有照射的情况下进行人HSPC的异种移植和植入,并且由于鼠类HSPC中的亚等位基因Kit突变(纯合W41等位基因),人造血重建水平更高。图32报告了第8周出血时移植人细胞的实验设置和FLT3碱基编辑效率。治疗组在移植后第11周接受了250万个4G8 CAR-T细胞,并且在移植后第13周对治疗组实施安乐死。这种实验设置允许改进的对由FLT3碱基编辑赋予的髓系祖细胞和谱系保护的评估。图33A示出了通过流式细胞术测定的处死时骨髓中粒细胞(多形核细胞,PMN)的相对丰度,与AAVS1对照编辑的细胞相比,移植了FLT3编辑的HSPC的小鼠中保护作用明显。由于成熟的粒细胞不表达FLT3,这表明在祖细胞水平上存在一定程度的保护。与此假设一致,定义为谱系-CD34+CD38+FLT3+CD45RA+的粒单核细胞祖细胞(GMP),仅在异种移植了模拟编辑的HSPC的小鼠中被FLT3 CAR-T细胞选择性耗竭(图33A)。图33B报告了4G8-CAR治疗组或未治疗组中几个时间点的FLT3碱基编辑效率。4G8-CAR施用后,对未修饰的细胞进行渐进性阴性选择,从而导致选择FLT3编辑的细胞(这在用治疗的小鼠的骨髓样品铺种的集落形成单位测定所衍生的后代中更为明显)。图34报告了显示粒细胞、粒单核细胞祖细胞(GMP)和HSPC(谱系-CD34+CD38-CD90+CD45RA-)群的代表性FACS图。

[0555] 实施例10:用SpRY-ABE8e-V106W mRNA对人CD34+HSPC进行CD123碱基编辑是可行的,并且可以与FLT3碱基编辑一起进行多重编辑

[0556] 与FLT3碱基编辑实验类似,我们使用人CD34+HSPC中的SpRY-ABE8e-V106W mRNA和CD123 gRNA-N引入S59P突变,单独或与FLT3 N399碱基编辑组合。将动员的外周血衍生的CD34+HSPC解冻并且在补充有1%青霉素/链霉素、SCF 100ng/mL(Peprotech)、FTL3L 100ng/mL(Peprotech)、TPO 50ng/mL(Peprotech)、Stemregenin-1 0.75uM(StemCell技术)、UM171 35nM(Selleckhem)的StemCell SFEMII培养基中以0.5-0.75百万/mL进行培养。解冻后48小时,使用Lonza 4D-Nucleofector系统在P3电穿孔溶液(Lonza)中对0.15-0.25百万(M)个HSPC进行电穿孔,所述溶液中每20uL反应补充有5-7.5ug碱基编辑器mRNA(SpRY-ABE8e-V106W)和sgRNA(整合DNA技术)420-450pmol。将细胞在上述培养基中培养7天。图26A举例说明了实验布局和培养基组成。图26B示出了培养的CD34+HSPC的体外扩增,而图26C示出了7G3克隆与成功碱基编辑的CD34+HSPC结合的损失。流式细胞术图表为对干细胞富集的CD90+亚群门控,示出当用克隆9F5染色归一化时,通过7G3染色的损失对HSPC进行CD123碱

基编辑。图27报告了FLT3单编辑、CD123单编辑和FLT3+CD123双碱基编辑条件下的编辑效率。虽然通过碱基编辑引入S59P突变是可行的,但与FLT3 N399(>64%)相比,在我们的设置中获得的效率相对较低(高达29.3%)。

[0557] 实施例11;通过优化sgRNA位置和在腺嘌呤碱基编辑器的Cas9蛋白内引入K918N取代,可以提高CD123碱基编辑效率

[0558] 为了查看是否可以提高CD123 S59密码子的编辑效率,与我们的SpRY-ABE8e设计组合测试了含有K918N突变的Cas9蛋白,所述突变与提高的Cas9催化活性相关。如图28A所示,K918N突变的引入导致了对编辑效率的序列特异性影响,CD123-gRNA-N编辑得到提高而FLT3-gRNA-18编辑略有降低。图28A示出将500ng碱基编辑器表达质粒和360pmol sgRNA电穿孔到K562报告细胞后第3天通过流式细胞术的碱基编辑结果。对于CD123,将编辑的细胞用7G3(靶向抗体)加9F5克隆(归一化)染色。gRNA CD123-N(CD123_gRNA_N,SEQ ID NO:24)与SpRY-ABE8e-V106W-3xNLS BE组合进行测试(如之前的实验中所述),或与SpRY-K3918N-ABE8e-V106W-3xNLS(SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:12,序列见上文)组合进行测试。每个图的右下角报告了通过流式细胞术的编辑的细胞的百分比。

[0559] 为了进一步提高CD123编辑效率,将两个额外的sgRNA(CD123-gRNA-R及其21bp长版本CD123-gRNA-R21)与基准CD123-gRNA-N和FLT3-gRNA-18一起克隆到人U6启动子下的pHKO-mTagBFP2质粒中。图28B报告了CD123 S59靶向gRNA的相对位置和序列。此外,还克隆了额外的腺嘌呤碱基编辑器设计,并且与SpRY-ABE8e-V106W一起测试(图28C):SpRY-K918N-ABE8e-V106W、SpRY-HF1-ABE8e-V106W、SpRY-HF1-BlackJack-ABE8e-V106W、SpRY-BlackJack-ABE8e-V106W、SpRY-Sniper-ABE8e-V106W SpRY-Sniper-BlackJack-ABE8e-V106W。HF1变体包括与gRNA间隔区不匹配碱基的较低耐受性和较低的脱靶编辑(高保真度)相关的N497A、R661A、Q695A、Q926A取代。Sniper变体包括F539S、M763I、K890N取代,其可产生保留在靶效率的另一种保真度更高的SpCas9变体。BlackJack是一种Cas9变体,旨在耐受21-bp及更长的sgRNA,这对更高保真度的变体相对更为重要。对于sgRNA所有组合(CD123-gRNA-N、CD123-gRNA-R、CD123-gRNA-R21、FLT3-gRNA-18)在K562报告细胞中对500ng碱基编辑器质粒和500ng sgRNA表达质粒进行共电穿孔,并且在编辑后72h通过流式细胞术评估结果。图28D总结了筛选程序的结果,其突出显示了CD123 S59碱基编辑的改进组合。具体来说,不包括HF1变体,CD123-gRNA-R的平均效率比CD123-gRNA-N高1.42倍,而其21bp长的对应物(CD123-gRNA-R21)的效率仅高1.21倍。K918N突变的引入可使CD123编辑对gRNA-R提高1.08倍,对gRNA-N提高1.05倍。与Sniper突变组合,K918N对gRNA-R的效率提高了1.22倍,对gRNA-N的效率提高了1.16倍。总之,与FLT3相比,转换到CD123-gRNA-R并引入K918N突变将部分弥补CD123编辑观察到的较低效率,而FLT3似乎相对不受K918N取代的影响。

[0560] 实施例12:用SpRY-K918N-ABE8e-V106W mRNA在CD34+HSPC中提高双链体碱基编辑效率

[0561] 通过优化多个参数(mRNA制备、K918N突变引入、sgRNA选择),使用SpRY-K918N-ABE8e-V106W体外转录mRNA实现了对FLT3和CD123基因座的CD34+HSPC碱基编辑效率的提高。图29报告了示例性实验。图29A总结了实验设计,图29B报告了通过流式细胞术对CD123编辑评估的门控策略,而图29C表明了与未治疗的(仅电穿孔)对照相比,FLT3+CD123碱基编辑细胞的类似扩增。Sanger测序揭示FLT3 N399编辑效率高达85%,CD123 S59编辑效率高

达41％(图30)。

[0562] 实施例13:可通过腺嘌呤碱基编辑在CD34+HSPC中引入KIT H378R突变

[0563] 使用与实施例12相同的实验设置,我们测试是否可以通过碱基编辑在人CD34+HSPC中引入H378R突变。通过电穿孔SpRY-K918N-ABE8e-V106W体外转录mRNA(4ug/20uL电穿孔量)和KIT-gRNA-Y(SEQ ID NO:37),实现了高达60％的编辑效率。

[0564] 实施例14:抗FLT3和CD123双特异性嵌合抗原受体的生成

[0565] 合理设计的抗FLT3和CD123双特异性嵌合抗原受体应产生强大的抗白血病功效。图29A是靶向FLT3结构域4和CD123 N末端结构域的假定的第2代双特异性嵌合抗原受体的示意图。图29B是靶向CD123(CSL362克隆,SEQ ID NO:75-76)和FLT3(4G8克隆,SEQ ID NO:73-74)的第2代单特异性CAR和具有不同定向的scFv结构域和/或不同的胞外接头、跨膜结构域、胞内共刺激结构域(SEQ ID NO:77-80)的双特异性嵌合抗原受体的设计。

[0566] 实施例15:碱基编辑生成隐形受体

[0567] 作为我们表位工程化的策略的靶标,我们选择了细胞因子受体FLT3、KIT和CD123(IL3RA)。Fms样酪氨酸激酶3(FLT3,CD135)和原癌基因c-KIT(KIT,CD117)是III类受体酪氨酸激酶,其在93％和85％的AML病例中以野生型(WT)或突变形式表达,分别为[32-37]。CD123是IL-3受体的α亚基(IL3RA),是存在于＞75％的AML病例表面并且在白血病干细胞[38-40]表面过表达的I型细胞因子受体。这些基因存在于正常造血发育的各个阶段,并且它们在AML细胞上的过表达与不良预后相关,在成人和儿童患者[33,36,41-43]中,HSCT后复发的发生率较高且总体生存率较低。为了开发我们的方法,我们选择了目前正在评估用于开发抗AML免疫疗法的单克隆抗体(mAb):克隆4G8[22,44](FLT3)、Fab-79D[21,45](KIT)和7G3[46-48](CD123)。先前的研究报告了4G8识别FLT3胞外结构域(ECD)4,而克隆BV10A4识别ECD2内不相关的表位,因此可以充当评价FLT3表面表达[44]的对照。由于4G8是通过用人FLT3转染的细胞系使BALB/c小鼠免疫生成的,我们推断4G8可以识别人特异性表位,尽管人与小鼠FLT3[49]之间存在高度同源性(85.8％同一性和91.5％类似性)和FLT3配体(FLT3L)交叉反应性。

[0568] 我们首先证实,用鼠类直系同源物(16个密码子改变)取代ECD4的嵌合人FLT3会导致4G8结合损失,但不影响FLT3L结合和胞内激酶磷酸化(图36A、36B左侧,36C顶部)。为了鉴定涉及4G8结合的最少残基数,我们设计了基于睡美人转座子的组合文库,其中ECD4内的16个不匹配位置中的每一者处均具有人或鼠类密码子(图36D,左上)。用此文库转导的K562细胞的流式细胞术分析显示,细胞群对对照抗体(BV10A4)呈阳性且对4G8呈阴性(图36D,右上)。通过对分选的单(BV10A4+4G8-)和双阳性(BV10A4+4G8+)细胞进行的靶向深度测序测量每个位置处人密码子与鼠密码子的相对丰度,揭示单个氨基酸取代的富集(N399D;图36D,底部和图37A)。为了验证此结果,我们用FLT3 N399D变体转导K562细胞并且证实FLT3的表面表达水平与野生型相当,但损失了4G8结合(图37B)。

[0569] 接下来,我们评估了基因编辑策略以引入N399D取代。为了轻松评估我们的基因组工程化的程序对不依赖FLT3信号传导的细胞的结果,我们生成了K562报告细胞,其通过将EF1α组成性启动子上游靶向整合至转录起始位点来从其内源性基因座表达FLT3(图37C)。然后我们证实,可以使用SpCas9或AsCas12a核酸酶和200-bp ssODN供体模板通过同源定向修复(HDR)插入N399D突变,并且成功编辑的细胞显示4G8结合损失,同时保留FLT3表面表达(图37D)。尽管如此,核酸酶的使用带有与DNA双链断裂(DSB)和基因敲除相关的遗传毒性的

内在风险,这发生在大部分未编辑的细胞中(图37D)。

[0570] 由于表位工程化可以通过引入单点突变来实现,我们推断碱基编辑(BE)可以通过避免对DSB的需求成为表位编辑的适合且更安全的选择。399位置的天冬酰胺由AAC密码子编码,其可以通过腺嘌呤碱基编辑(ABE)转化为GAC(天冬氨酸)或GGC(甘氨酸)。我们通过用几种sgRNA(以1bp交错方式,靶腺嘌呤位于原型间隔区的位置3至9)与新一代TadA-8e脱氨酶组合电穿孔FLT3报告细胞来测试此假设,所述脱氨酶与SpCas9切口酶(NGG PAM)或具有放宽的PAM特异性的Cas9变体(NG-SpCas9n和SpRY-Cas9n,图36F)连接。通过流式细胞术的评估显示具有4G8识别损失的表位编辑成功,其中SpRY-ABE8e与FLT3-sgRNA-18组合实现了最高效率(66.3%,图36F)。与基于HDR的策略相比,碱基编辑的和未碱基编辑的细胞均保留了正常的表面FLT3表达,没有明显的基因敲除。由于N399D和N399G都是我们编辑策略的潜在结果,因此我们在所有进一步的验证分析中都包括了此种突变。

[0571] 类似的策略也适用于Fab-79D的表位图谱,Fab-79D是靶向KIT的mAb,据报道其可以与KIT ECD4结合并且阻断配体诱导的二聚化[45]。我们首先通过在先前预测为与KIT ECD4(F316S、M318V、I319K、V323I、I334V、E360K、P363V、E366D、E376Q、H378R)的潜在接触点的位置引入10个氨基酸改变(来自KIT直系同源物)来证实Fab-79D结合的损失,并且验证了干细胞因子(SCF)结合和胞内激酶磷酸化的保留(图36B右侧,36C底部)。为了全面筛选ECD4突变与克隆Fab-79D之间的相互作用,我们使用简并密码子文库进行了筛选,其中KIT ECD4的每个位置都被随机氨基酸取代(图36E左侧)。我们用所述文库转导HEK-293T细胞并且分选出与Fab-79D结合降低但保留KIT表达的细胞和保留Fab-79D染色的细胞(图36E右侧)。文库区域的NGS测序以及单阳性细胞内每个位置处的特定密码子富集的比较揭示了几种能够降低Fab-79D亲和力的突变(图36E底部)。为了验证这些发现,我们通过选择可通过文库鉴定的10个位置处(M318、I319、V323、D332、I334、D357、E360、E376和H378)的腺嘌呤或胞苷碱基编辑复制的突变,单独克隆了20个氨基酸取代,并且选择了H378R进行进一步开发,因为当针对KIT对照Ab(克隆104D2)归一化时,它显示出Fab-79D结合的最高降低,同时保留了与SCF的结合(图37E)。此外,与FLT3 N399D类似,H378R可以通过ABE插入,从而允许潜在的组合和双表位工程化。与对FLT3所做的一样,我们在K562细胞上筛选了3种不同的sgRNA,其编辑窗口针对H378(位置5、6或7的靶标A)与SpRY-ABE8e的组合,并且鉴定KIT-Y是最高效率的组合(图37C、F)。

[0572] 对于CD123,影响治疗克隆7G3(或其人源化对应物CSL362-Talacotuzumab)结合的表位和氨基酸取代均在先前已有报道[48]。为了开发我们的表位编辑策略,我们通过测试针对CD123 N末端结构域位置E51、Y58、S59、R84、P88和P89的sgRNA设计了针对K562报告细胞的靶向BE筛选(图37E),并且将它们与CBE(具有NGG、NG和SpRY Cas变体的evo-APOBEC1-BE4)和ABE(ABE8e、NG和SpRY变体,图36G)合理组合。虽然几种组合引入了降低7G3对CD123亲和力的突变,但仅有gRNA CD123-N和CD123-R与SpRY-ABE8e组合以及gRNA CD123-L与SpRY-evo-APOBEC1-BE4组合才能完全消除7G3结合(图36G和图37H)。编辑的细胞的测序揭示ABE和CBE分别导致S59P和S59F取代。通过腺嘌呤碱基编辑,还可以引入用gRNA CD123-R的效率高于用CD123-N的效率的旁观者突变(Y58H),并且因此将其包括在进一步验证中。由于与FLT3和KIT ABE组合编辑多个表位的可能性,我们选择了通过gRNA CD123-R与ABE引入的S59P进行进一步开发。最后,通过用两种额外靶向CD123的mAb测试我们的碱基编辑的CD123

报告细胞,我们发现P88/P89的胞苷碱基编辑导致P88S/P89S或P88L/P89L的组合)导致克隆6H6和S18016E识别几乎完全损失,从而扩大了与表位工程化的细胞组合具有潜在应用的mAb池(图37I)。

[0573] 为了精确量化我们选定的Ab对表位工程化的受体的亲和力的损失,我们通过睡美人转座酶用每个受体变体(FLT3 WT、N399D、N399G;KIT WT、H378R;CD123 WT、S59P和Y58H-S59P)转导K562细胞,并且观察到在WT受体的mAb饱和浓度(>5000ng/mL,图36H)下,所有测试的变体也几乎完全不存在识别。值得注意的是,FLT3 N399G(通过编辑位置399的AAG密码子中的两个腺嘌呤引入)在其降低4G8结合的能力方面与N399D没有差异。类似地,将Y58H旁观者突变添加到CD123 S59P中显示7G3结合中的类似降低,而不会影响细胞膜上的CD123表达。

[0574] 总之,我们得出结论,FLT3、KIT和CD123的表位工程化是可行的,并且可以通过选择适当的gRNA和碱基编辑酶组合高效实现而无需DSB。

[0575] 实施例16:表位编辑保留了受体功能

[0576] 由于选择的靶标是人HSPC上表达的基本细胞因子/生长因子受体,并且在干细胞维持和谱系分化中具有相关作用,我们严格评价了我们的工程化程序是否会改变受体功能。通过使用荧光缀合的FLT3L、SCF和IL-3配体,我们证实了在所有测试的浓度(1至>1000ng/mL;图36I)中与它们各自的WT或表位工程化的受体具有相当的结合。CD123变体与常见的β亚基(CSF2RB/CD131)共表达以形成异二聚IL-3受体并且允许信号转导,因为通过流式细胞术,K562细胞不表达CSF2RB(图37J)。通过蛋白质印迹证实了FLT3和KIT的胞内信号传导级联的活化,这在配体结合后显示出相当且剂量依赖性的激酶磷酸化(图38A、B)。对于CD123,我们通过测量下游STAT5信号转导子的磷酸化证实了配体介导的受体活化,所述磷酸化在所有测试的IL-3浓度下在WT和表位工程化的变体中均被同等活化(图38C)。最后,为了证实配体依赖性增殖反应的完全保留,我们对BaF3细胞进行了激酶互补测定,BaF3细胞是鼠类IL-3依赖性淋巴母细胞系,需要通过STAT5通路的信号传导以增殖和存活[50]。我们证实了在鼠类IL-3饥饿期间暴露于人FLT3L、SCF和人IL-3后,通过WT和表位工程化的受体变体对细胞增殖相当且剂量依赖性的挽救(图38D)。

[0577] 实施例17:隐形受体对CAR-T细胞有抗性

[0578] 最近的研究显示,自抗FLT3克隆4G8[22]、抗KIT Fab-79D[21]或抗CD123 CSL362(克隆7G3[48,51]-mAb的人源化变体)生成的CAR-T细胞对人AML细胞具有显著的功效。为了评价表位工程化的细胞对靶向CAR-T疗法的抗性,我们在具有CD28共刺激结构域的第2代CAR构建体中克隆了4G8、Fab79D和CSL362单链可变片段(scFv),并且使用具有双向启动子的慢病毒载体共表达优化的[52]截短的EGFR选择/耗竭标记(tEGFR;图39A)。对于CAR-T细胞的产生,我们使用了在IL-7+IL-15存在的情况下基于CD3-CD28珠刺激的培养方案,其扩增具有T干细胞记忆表型[53]的细胞(图39A、图40A、B)。我们获得了高CAR转导效率(通过tEGFR染色得到>85%),与培养开始时相比,体外扩增>20倍(图39B)。

[0579] 通过对K562报告细胞进行体外杀伤测定,我们发现,虽然过表达WT FLT3、KIT或CD123的大多数细胞被其各自的特异性CAR_T(与E:T=0相比,在E:T=10时,存活细胞<2%)杀伤,但表达表位工程化的变体的K562细胞在不同效应子:靶标比率(E:T 0.625至10)下对CAR-T细胞杀伤(绝对计数和细胞活力)具有抗性并且存活至实验终止(图39C-E和图

40C、D)。在与表达WT基因的细胞一起培养的条件下,T细胞活化(CD69表达)和脱粒(CD107a表面表达)显著更高,这与CAR-T缺乏表位编辑的变体的识别一致(图40C、D)。此外,存活的K562报告细胞仍然以与未治疗的对照相当的水平表达靶向受体(图39C、D、E右侧)。未转导的T细胞在所有测试的条件下培养时均未表现出靶杀伤或CD69上调(图40D)。为了进一步证实CAR-T细胞的严格表位特异性杀伤,我们共培养了未修饰或碱基编辑的双靶细胞(表达FLT3和CD123的K562细胞)的混合群,并且观察到表位编辑的群在与对应的CAR-T细胞一起铺种时表现出选择性抗性(图40E)。

[0580] 总之,这些数据提供了严格的验证,过表达表位工程化的FLT3、KIT和CD123变体的细胞对CAR-T细胞识别和杀伤具有抗性。

[0581] 实施例18:人HSPC的有效表位编辑

[0582] 为了有效地将我们的核苷酸变体引入人原代HSPC的内源性基因中,我们基于化学修饰的sgRNA和体外转录(IVT)SpRY-ABE8emRNA的共电穿孔,优化了动员外周血(mPB)衍生的CD34+细胞的碱基编辑方案(图41A和图42A-C)。在优化mRNA体外转录、培养和电穿孔条件以及HSPC刺激后编辑时间点后(图42D、E、F),我们实现了FLT3、KIT和CD123的靶标A>G转化率分别高达86.6%、78.6%和67.9%。我们能够有效地编辑FLT3-18、KIT-Y和CD123-R sgRNA窗口内的靶腺嘌呤(图41B)。对治疗的细胞的分析显示,在存在干细胞保留化合物(StemRegenin、SR-1和UM171;图41D和图42E)的情况下,在体外培养期间,表型鉴定的祖细胞(LMPP、CD90-45RA+;MPP、CD90-45RA-;HSC、CD90+45RA-)的组成没有偏差。与我们先前观察到的HDR介导的编辑[54]相反,在本体细胞、定向祖细胞(CD90-)和更原始的HSPC亚群(CD90+45RA-;图41C)中,碱基编辑效率是等同的。

[0583] 为了证实FLT3^{N399}和CD123^{S59}表位工程化的HSPC对免疫疗法的抗性,我们通过在电穿孔后3-5天以不同E:T比率铺种用4G8编辑的HSPC和CSL362 CAR-T细胞进行了杀伤测定。通过FLT3-和CD123 CAR-T的特异性杀伤分别在CD45RA+和CD90+亚群中最为明显,因此其用于通过绝对计数评估这些实验的结果。虽然在对照位点(AAVS1安全基因组港)编辑的细胞通过CAR-T细胞共培养消除,但表位编辑的细胞显示出更高的活力和绝对计数,与我们在K562共培养中观察到的情况类似(图41E、F)。由于KIT在人中具有已知的造血外表达[55],我们专注于使用mAb而不是CAR-T细胞,这可能导致不太严重的在靶毒性,并且可以用于非基因毒性调理或表位工程化的细胞的体内选择。通过铺种用浓度不断增加的二聚化阻断Fab-79DmAb编辑的HSPC,我们观察到KIT^{H378}编辑的HSPC在响应SCF时保留的扩增动力学,而AAVS1^{BE}细胞以剂量依赖性方式受到抑制(图41G)。

[0584] 为了证实受体工程化的CD34+HSPC的功能的保留,将治疗的细胞用其各自不断增加的浓度的配体而不添加其他细胞因子再培养4天。在培养结束时,我们观察到所有3个靶标的剂量依赖性HSPC增殖性扩增,除IL-3浓度为1-10ng/mL时的CD123^{S59} BE外,受体编辑的与AAVS1编辑的对照之间没有差异(图42H)。尽管如此,我们并没有观察到BE HSPC的反选择,从而证实了无论CD123表位编辑如何,CD34+细胞都均匀扩增(图42I)。为了进一步证实对增殖的最小影响并且评价受体编辑的HSPC的分化能力,我们对针对FLT3、CD123、KIT或AAVS1基因碱基编辑的HSPC进行了细胞培养和集落形成单位(CFU)测定,并且观察了体外扩增后的绝对细胞计数以及与未治疗的对照相当的髓系和红系集落数量(图41H)。将治疗的HSPC异种移植到雌性NBSGW免疫缺陷小鼠体内,显示了FLT3^{N399} HSPC保留的植入、重植入和

多谱系分化能力(图41I、J),这与AAVS1编辑的对照相当。FLT3编辑的百分比与输入细胞中测量的百分比(BE效率约35%)相当,并且在移植后长达13周内保持稳定(图41K),从而证实成功编辑了最原始的HSPC亚群,并且没有对$FLT3^{N399}$细胞进行反选择。将骨髓(BM)细胞移植到二次受体内,可产生较高的人造血植入,并且在二次移植后长达17周内谱系分布没有差异(图43A、B),且FLT3编辑水平与初次受体测量的水平保持相当(图41K)。由于小鼠Flt31与人FLT3具有交叉反应性,这些结果进一步证实了表位工程化的$FLT3^{N399}$变体的功能。类似地,KIT^{H378}编辑的HSPC的体内重建能力和多谱系分化与匹配的$AAVS1^{BE}$对照相当(图43C-E),没有谱系分化的偏差和编辑的细胞的反选择,从而进一步证实碱基编辑程序不会影响治疗的细胞的适应性和功能。

[0585] 总之,这些数据显示可以通过腺嘌呤碱基编辑器有效实现表位工程化的HSPC,而不会影响干细胞功能和分化能力。

[0586] 实施例19:$FLT3^{BE}$HSPC对4G8CAR-T体内治疗具有抗性

[0587] 为了评价FLT3 CAR-T细胞是否可有效用于治疗AML同时保留$FLT3^{N399}$造血,我们依序用CD34+HSPC($FLT3^{BE}$或$AAVS1^{BE}$)和人患者衍生的AML异种移植(PDX-1)植入NBSGW小鼠,其特征在于MLL-AF9和FLT3-ITD突变并且先前用报告基因-mNeonGreen转导-以促进其在混合的造血中的检测(图43F、G)。在PDX攻击10天后,用4G8 CAR-T细胞治疗小鼠,并且通过对系列血液样品进行细胞荧光分析来监测其造血组成,并在实验结束时对造血器官(BM、脾脏、SP;图44A)进行监测。如先前的实验所观察到的,在AML PDX或CAR-T细胞施用之前,移植的小鼠在两个编辑组中显示出类似的外周血组分(图45A),并且编辑水平与输入细胞相当(约85%),在髓系和淋巴谱系中没有差异(分别为FACS分选的CD33+和CD19+细胞;图44B)。用4G8 CAR-T治疗的小鼠显示出BM和SP中的CAR-T细胞植入和完全AML根除(图44C-F),并且BM中的$FLT3^{N399}$细胞分数虽小但显著增加(髓系细胞内88%与90%以及淋巴细胞内89%与94%;图44B)。BM的多参数流式细胞术分析揭示,仅在用4G8 CAR治疗的$AAVS1^{BE}$组中CD19+B细胞(pre-B细胞和pro-B细胞)相对耗竭,而用$FLT3^{N399}$ HPSC植入的小鼠受到保护(图44G-I)。在分化的髓系细胞(CD33/66b+,不包括AML细胞)中,与$FLT3^{N399}$小鼠相比,$AAVS1^{BE}$中未成熟粒细胞(CD14-10-11c-SSC^{high})[56]的比例降低(图44J)。$FLT3^{N399}$ BE向谱系阴性祖细胞(lin-CD34+,图45B-D)赋予了选择性抗性,特别是粒单核细胞祖细胞(GMP,lin-CD34+38+45RA+FLT3+,图44K、L)和淋巴预处理多能祖细胞(LMPP,lin-CD34+38-45RA+90-10-,图44N、O),而这些抗性在$AAVS1^{BE}$组中却几乎被完全消除(AAVS1 BE与FLT3 N399中分别为1.4%与26.6%GMP w/in lin-CD34+38+和4.8%与43.3%LMPP w/in lin^-CD34+38-)。为了更精确地鉴定被4G8 CAR耗竭并且通过表位工程化选择性保护的造血亚群,我们比较了治疗的$FLT3^{N399}$与$AAVS1^{BE}$组之间不同谱系的绝对计数。在$AAVS1^{BE}$条件下,常见的髓系祖细胞(CMP,lin-CD34+38+CD45RA-FLT3+)、树突状细胞(CD33+14-11c+FLT3+SSC^{low})和GMP的绝对计数降低($AAVS1^{BE}$与$FLT3^{N399}$中,CMP降低0.48倍、GMP降低0.01倍、cDC降低0.41倍,图44M)。在淋巴谱系和祖细胞LMPP中,pre-B/NK(lin-CD34+38+10+)和下游亚群(B幼淋巴细胞、pro-B和pre-B)在$FLT3^{N399}$与$AAVS1^{BE}$组中受到保护($AAVS1^{BE}$与$FLT3^{N399}$中LMPP 0.02倍、pre-B/NK 0.19倍、pro-B 0.2倍、pre-B 0.18x倍改变,图44P)。在CAR治疗的条件下成熟B细胞(FLT3-)的增加可能反映了响应于CAR介导的串扰的扩增。此外,暴露于4G8 CAR的$AAVS1^{BE}$中持续存在的pre-B/NK、B幼淋巴细胞、pro-B和pre-B细胞、单核细胞和髓母细胞(CD33/66b+14-11c-

34-SSC^{low})的FLT3中值荧光强度(MFI)低于FLT3^{N399}编辑组中相同群中测量的(图45E),从而提供了额外的证据表明FLT3^{N399}细胞可以保留FLT3表达同时避免CAR介导的杀伤。有趣的是,虽然在实验结束时检测到的CAR-T细胞在所有组中显示出类似的表型(主要是效应记忆和中央记忆)(图45F),但与AAVS1^{BE}对照相比,暴露于FLT3^{N399}造血的CAR-T细胞展示出较低的扩增和PD-1表达的显著降低(图45G),这表明由于缺乏对表位工程化的造血的识别,CAR-T暴露于较低的抗原负荷导致活化和/或耗竭总体减少。重要的是,无论是否存在人PDX植入,FLT3^{N399}表位编辑都能提供相同的针对4G8 CAR杀伤的保护,从而突出显示了在保留造血重建的同时选择性消除AML细胞的可能性。

[0588] 总之,这些数据证实,在NBSGW模型中,FLT3 CAR-T细胞免疫疗法优选耗竭B细胞和祖细胞亚群(GMP、LMPP),而FLT3^{N399}表位编辑则对这些亚群赋予保护。

[0589] 实施例20:CD123^{BE} HSPC对CSL362 CAR-T体内治疗具有抗性

[0590] 与对FLT3表位编辑所做的一样,我们将CD123^{S59}HSPC异种移植到NBSGW小鼠中,证实了与AAVS1^{BE} HSPC类似的植入和多谱系重建能力(图46A和图45H),并且编辑的细胞的分数较高且稳定(图46B)。然后给移植的小鼠注射也表达CD123+的PDX-1(图43G)并且在10天后用CSL362 CAR-T细胞治疗。与4G8 CAR-T疗法类似,CSL362 CAR-T细胞几乎完全根除AML细胞(图46C、D),并且与CD123^{S59}相比,在用AAVS1^{BE} HSPC植入的小鼠中展示出更高的扩增(图46E)。在终点时对BM进行流式细胞术分析,突出显示了用AAVS1^{BE} HSPC移植的小鼠中人造血细胞(CD45+,排除AML和CAR T细胞后;图46F)的绝对计数显著降低,髓系细胞(CD33/66b+)(包括成熟和未成熟粒细胞)相对耗竭,而CD123^{S59}HSPC的后代受到保护(图46H-K)。与4G8 CAR观察到的杀伤模式不同,在淋巴谱系中,仅在CSL362 CAR-T治疗的AAVS1^{BE}小鼠中pro-B细胞的百分比显示出降低的趋势(图46G)。树突状细胞(DC),包括CD123^{high}浆细胞样DC,通过CSL362 CAR-T治疗被耗竭,而在CD123^{S59}BE组中它们得以保留(图46L-N)。与FLT3表位编辑类似,lin-CD34+祖细胞在CD123^{S59}组中相对保留(图460和图45F、G)。AAVS1^{BE}中,包括CMP、GMP、髓母细胞、粒细胞和DC亚群的髓系群的绝对计数显著降低,并且受到CD123^{S59}表位编辑的保护。在淋巴细胞中,当将AAVS1^{BE}与CD123^{S59}进行比较时,我们观察到B幼淋巴细胞部分耗竭为成熟B细胞(图46P、Q)。如对于FLT3所观察到的,在CD123^{S59}编辑中持续的GMP、髓母细胞、单核细胞、cDC和pDC的CD123中值荧光强度(MFI)比用CSL362 CAR治疗的AAVS1^{BE}条件更高,而我们没有观察到淋巴亚群的相关差异(图47A)。

[0591] 总之,这些数据显示,通过CD123 CAR-T细胞对CD123^{S59}表位编辑的造血诱导的在靶毒性降低,否则会导致髓系谱系、DC的耗竭以及造血细胞绝对计数的总体降低。

[0592] 实施例21:多重编辑使AML疗法更有效

[0593] 我们推断,编辑两个或更多个表位可使通过同时攻击多个AML靶标的免疫疗法更有效,而不会增加造血毒性。为了评价在原代HSPC上进行多个表位编辑的可行性,我们将SpRY-ABE8e mRNA与两个gRNA在CD34+细胞上共电穿孔,并且观察到的编辑效率与单次BE后在相同靶标上测量的相当,而细胞毒性没有明显增加(图48A和图42D、F)。为了获得对多种CAR-T疗法的保护作用的概念验证,我们在双报告K562细胞系上进行了FLT3和CD123的双重编辑(实现>55%的双编辑的细胞,图48B),并且用通过与4G8和CSL362 CAR共转导获得的双特异性CAR-T细胞治疗分选的单编辑和双编辑细胞。共培养2天后,仅双表位编辑的细胞没有诱导T细胞活化(CD69)、脱粒(CD107a)或增殖(CellTrace稀释)并且展示出完全的免于

杀伤的保护,同时保留了FLT3和CD123的表达(图48B、C)。

[0594] 为了模拟双靶向免疫疗法赋予的增加的功效,我们鉴定了一种AML PDX,当单独或与人FLT3 N399表位编辑的造血组合进行异种移植时,其通过4G8 CAR-T细胞治疗(以MLL-AF10和突变的TP53为特征的PDX-2,图43F、G)无法有效根除(图47B、C)。当向$FLT3^{N399}$移植的小鼠施用时,4G8 CAR对PDX-2显示出更高的抗白血病功效趋势(图47C),从而表明肿瘤外CAR活化对治疗成功具有不利作用。接下来,我们测试了靶向我们选择的两个抗原的任何CAR_T细胞组合是否能够更有效地消除PDX-2 AML细胞,并且发现4G8 CAR-T与Fab79-D和CSL362 CAR-T的组合是最有效的(图47D),这与同时靶向两种必需的AML抗原时提高的杀伤是一致的。为了获得双重编辑的HSPC对组合的CAR-T细胞疗法具有抗性的正式证据,我们将双$FLT3^{N399}$/$CD123^{S59}$表位编辑的HSPC或$AAVS1^{BE}$对照异种移植到NBSGW小鼠体内。证实多谱系植入(图47E)和注射PDX-2 AML细胞后,我们用4G8和CSL362 CAR-T细胞(1:1比率共输注,图48D)治疗小鼠。正如我们的CAR组合实验所表明的那样,双CAR-T疗法能够从BM和SP中完全根除AML细胞(图48E、F)。FLT3和CD123编辑的细胞均持续存在直到终点,并且在淋巴细胞和髓系细胞中均检测到(图48G)。通过分析非恶性造血,我们观察到用双CAR-T细胞治疗的$AAVS1^{BE}$小鼠中髓系和淋巴造血谱系普遍降低,GMP、粒细胞、cDC、LMPP、pre-B/NK、pro-B细胞和pre-B细胞的耗竭最为强烈,并且几乎所有其他亚群中都有不太突出但显著的降低,从而表明我们在单独使用4G8与CSL362 CAR时观察到的耗竭模式之间存在混合耗竭模式(图48H)。

[0595] 总之,这些数据提供了概念验证,可以在HSPC中有效获得多重表位工程化,并且使多靶标免疫疗法有效且降低重叠的在靶肿瘤外造血毒性。

[0596] 实施例15-21的参考文献:

[0597] 1.Brentjens,R.J.et al.CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acutelymphoblastic leukemia.Sci Transl Med 5,177ra38(2013).

[0598] 2.Turtle,C.J.et al.Durable molecular remissions in chroniclymphocytic leukemia treated with CD19-specific chimeric antigenreceptor-modified T cells after failure of ibrutinib.J.Clin.Oncol.35,3010-3020(2017).

[0599] 3.Fry,T.J.et al.CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy.Nat.Med.24,20(2018).

[0600] 4.Brentjens,R.J.et al.Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias.Blood 118,4817(2011).

[0601] 5.Spiegel,J.Y.et al.CAR T cells with dual targeting of CD19 and CD22 in adult patients with recurrent or refractory B cellmalignancies:a phase 1 trial.Nat Med 27,1419(2021).

[0602] 6.Kantarjian,H.et al.Acute myeloid leukemia:current progress and future directions.Blood Cancer J 11,41(2021).

[0603] 7.Longo,D.L.,Döhner,H.,Weisdorf,D.J.&Bloomfield,C.D.Acute Myeloid

Leukemia.n engl j med 12,1136-52(2015).

[0604] 8.Döhner,H.et al.Diagnosis and management of AML in ad ults:2017 ELN recommendations from an international expert panel.Blood vol.129 424-447 Preprint at https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196(2017).

[0605] 9.Isidori,A.et al.Immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia:Where We Stand.Article 11,1(2021).

[0606] 10.Pollyea,D.A.&Jordan,C.T.Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells.Blood vol.129 1627-1635Preprint at https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-696039(2017).

[0607] 11.Hofmann,S.et al.Chimeric Antigen Receptor(CAR)T Cell Therapy in Acute Myeloid Leukemia(AML).J Clin Med 8,200(2019).

[0608] 12.Haubner,S.et al.Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorial targeted therapy in AML.Leukemia 2018 33:133,64-74(2018).

[0609] 13.Kügler,M.et al.A recombinant trispecific single-chain Fvderivative directed against CD123 and CD33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting.Br J Haematol 150,574-86(2010).

[0610] 14.Lambert,J.et al.Gemtuzumab ozogamicin for de novo acute myeloid leukemia:final efficacy and safety updates from the open-label,phase III ALFA-0701 trial.Haematologica 104,113-119(2019).

[0611] 15.Chen,L.et al.Targeting FLT3 by chimeric antigen receptor T cells for the treatment of acute myeloid leukemia.Leukemia vol.31 1830-1834 Preprint at https://doi.org/10.1038/leu.2017.147(2017).

[0612] 16.el Khawanky,N.et al.Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia.Nature Communications 2021 12:112,1-20(2021).

[0613] 17.Zhang,H.et al.Successful Anti-CLL1 CAR T-Cell Therapy in Secondary Acute Myeloid Leukemia.Front Oncol 10,685(2020).

[0614] 18.Kenderian,S.S.et al.CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia.Leukemia 29,1637-47(2015).

[0615] 19.Wang,J.et al.CAR-T cells targeting CLL-1 as an approach to treat acute myeloid leukemia.doi:10.1186/s13045-017-0553-5.

[0616] 20.Casucci,M.et al.CD44v6-targeted T cells mediate potent antitumor effects against acute myeloid leukemia and multiple myeloma.(2013)doi:10.1182/blood-2013-04.

[0617] 21.Myburgh,R.et al.Anti-human CD117 CAR T-cells efficiently eliminate healthy and malignant CD117-expressing hematopoietic cells.Leukemia 34,2688-2703(2020).

[0618] 22.Jetani,H.et al.CAR T-cells targeting FLT3have potent activity

against FLT3-ITD+AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib.Leukemia 32,1168-1179(2018).

[0619] 23.F,B.et al.Gene-edited stem cells enable CD33-directed immune therapy for myeloid malignancies.Proc Natl Acad Sci U S A 116,11978-87

[0620] 24.Kim,M.Y.et al.Genetic Inactivation of CD33 in Hematopoietic Stem Cells to Enable CAR T Cell Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia.Cell 173,1439-1453.e19(2018).

[0621] 25.Ulyanova,T.,Blasioli,J.,Woodford-Thomas,T.A.&Thomas,M.L.The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitoryreceptor.Eur.J.Immunol.29,3440-3449(1999).

[0622] 26.Paul,S.P.,Taylor,L.S.,Stansbury,E.K.&McVicar,D.W.Myeloid specific human CD33is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1and SHP-2.Blood 96,483-490(2000).

[0623] 27.Ishida,A.et al.Negative regulation of Toll-like receptor-4 signaling through the binding of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein,CD14,with the sialic acid-binding lectin,CD33.J.Biol.Chem.289,25341-25350(2014).

[0624] 28.Jacoby,E.et al.CD19 CAR immune pressure induces B-precursor acute lymphoblastic leukaemia lineage switch exposing inherent leukaemic plasticity.Nat Commun 7,(2016).

[0625] 29.Ruella,M.&Maus,M.v.Catch me if you can:Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies.Comput Struct Biotechnol J 14,357-362(2016).

[0626] 30.Sotillo,E.et al.Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy.Cancer Discov 5,1282-1295(2015).

[0627] 31.Vago,L.et al.Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation.N Engl J Med 361,478-488(2009).

[0628] 32.Grafone,T.,Palmisano,M.,Nicci,C.&Storti,S.An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia:Biology and treatment.Oncology Reviews vol.6 64-74 Preprint at https://doi.org/10.4081/oncol.2012.e8(2012).

[0629] 33.Mekawy,M.A.,Eissa,D.S.,Hamza,M.T.,Hamed,G.M.&Youssef,M.K.FLT3 receptor/CD135 expression by flow cytometry in acute myeloid leukemia:Relation to FLT3 gene mutations and mRNA transcripts.EgyPtian Journal of Medical Human Genetics 19,345-351(2018).

[0630] 34.F Kuchenbauer,W.K.C.S.A.K.W.H.T.H.Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia.Haematologica 90,1617-25(2005).

[0631] 35.Valverde,L.R.et al.C-kit receptor(CD117)expression in acute leukemia.Ann Hematol 72,11-15(1996).

[0632] 36.Gao,X.et al.High Expression of c-kit mRNA Predicts Unfavorable Outcome in Adult Patients with t(8;21)Acute Myeloid Leukemia.PLoS One 10, e0124241(2015).

[0633] 37.Schwartz,S.et al.Expression of the c-kit receptor(CD117)is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia(AML), including cytogenetically good-risk AML,and lacks prognostic significance.Leuk Lymphoma 34,85-94(1999).

[0634] 38.Bras,A.E.et al.CD123 expression levels in 846acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping.Cytometry B Clin Cytom 96, 134(2019).

[0635] 39.Ehninger,A.et al.Distribution and levels of cell surface expression of CD33 and CD123 in acute myeloid leukemia.Blood Cancer J 4, (2014).

[0636] 40.Haubner,S.et al.Coexpression profile of leukemic stem cell markers for combinatorialtargeted therapy in AML.Leukemia 2018 33:133,64-74(2018).

[0637] 41.Perriello,V.M.et al.CD123 Is Consistently Expressed on NPM1-Mutated AML Cells.Cancers(Basel)13,496(2021).

[0638] 42.Kandeel,E.Z.,Madney,Y.,Eldin,D.N.&Shafik,N.F.Overexpression of CD200 and CD123 is a major influential factor in the cl inical course of pediatric acute myeloid leukemia.Exp Mol Pathol 118,(2021).

[0639] 43.Cheng,J.,Qu,L,Wang,J.,Cheng,L&Wang,Y.High expression of FLT3 is a risk factor in leukemia.Mol Med Rep 17,2885(2018).

[0640] 44.Hofmann,M.et al.Generation,selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia.(2012)doi:10.1038/leu.2011.372.

[0641] 45.Reshetnyak,A.V et al.Structural basis for KIT receptor tyrosine kinase inhibition by antibodies targeting the D4 membrane-proximal region.doi:10.1073/pnas.1317118110.

[0642] 46.Herzog,E.et al.Pharmacodynamic Activity and Preclinical Safety of CSL362,a Novel Humanised,Affinity Matured Monoclonal Antibody Against Human Interleukin 3Receptor.Blood 120,1524-1524(2012).

[0643] 47.Xie,L.H.et al.CD123 target validation and preclinical evaluation of ADCC activity of anti-CD123 antibody CSL362 in combination with NKs from AML patients in remission.Blood Cancer J 7,(2017).

[0644] 48.Broughton,S.E.et al.Dual Mechanism of Interleukin-3 Receptor Blockade by an Anti-Cancer Antibody.CellReports 8,410-419(2014).

[0645] 49.Li,Y.et al.A novel Flt3-deficient HIS mouse model with selective enhancement of human DC development.Eur J Immunol 46,1291-1299(2016).

[0646] 50.Warmuth,M.,Kim,S.,Gu,X.J.,Xia,G.&Adrián,F.Ba/F3 cells and their

use in kinase drug discovery.Curr Opin Oncol 19,55-60(2007).

[0647] 51.el Khawanky,N.et al.Demethylating therapy increases anti-CD123 CAR T cell cytotoxicity against acute myeloid leukemia.Nat Commun 12,(2021).

[0648] 52.Vavassori,V.et al.Modeling,optimization,and comparable efficacy of T cell and hematopoietic stem cell gene editing for treating hyper-IgM syndrome.EMBO Mol Med 13,(2021).

[0649] 53.Cieri,N.et al.IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors.Blood 121,573-584(2013).

[0650] 54.Genovese,P.et al.Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells.Nature 510,235-240(2014).

[0651] 55.Lennartsson,J.&Rönnstrand,LStem cellfactor receptor/c-Kit:From basic Science to clinicalimplications.Physiol Rev 92,1619-1649(2012).

[0652] 56.Basso-Ricci,L.et al.Multiparametric Whole Blood Dissection:A one-shot comprehensive picture of the human hematopoietic system.Cytometry 91,952(2017).

[0653] 57.Dolgin,E.First CD123-targeted drug approved after wowing in rare cancer.Nat Biotechnol 37,202-203(2019).

[0654] 58.Biasco,L.et al.In Vivo Tracking of Human Hematopoiesis Reveals Patterns of Clonal Dynamics during Early and Steady-State Reconstitution Phases.Cell Stem Cell 19,107-119(2016).

[0655] 59.Leibowitz,M.L.et al.Chromothripsis as an on-targetconsequence of CRISPR-Cas9 genome editing.Nat Genet 53,895-905(2021).

[0656] 60.Schiroli,G.et al.Precise Gene Editing Preserves Hematopoietic Stem Cell Function following Transient p53-Mediated DNA Damage Response.Cell Stem Cell 24,551-565.e8(2019).

[0657] 61.Ferrari,S.et al.Efficient gene editing of human long-term hematopoietic stem cells validated by clonal tracking.Nat Biotechnol 38,1298(2020).

[0658] 62.Gill,S.et al.Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells.Blood 123,2343-2354(2014).

[0659] 63.Russkamp,N.F.,Myburgh,R.,Kiefer,J.D.,Neri,D.&Manz,M.G.Anti-CD117immunotherapy to eliminate hematopoietic and leukemia stem cells.Exp Hematol 95,31-45(2021).

[0660] 64.Hand,T.H.et al.Catalytically Enhanced Cas9 through Directed Protein Evolution.CRISPR Journal 4,223-232(2021).

[0661] 其他实施方案

[0662] 应当理解,尽管已结合其具体实施方式描述了本发明,但前述描述旨在说明而非限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围定义。其他方面、优点和修改均

在以下权利要求书的范围内。

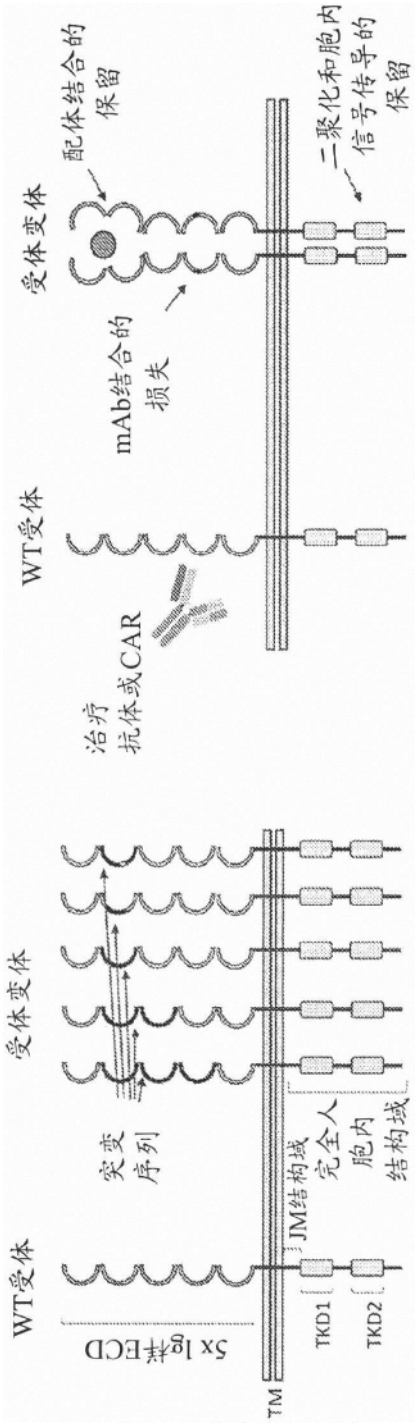

WT受体
5x Ig样ECD
TM
TKD1
TKD2
JM结构域
完全人
胞内
结构域
突变
序列
受体变体
治疗
抗体或CAR
WT受体
mAb结合的
损失
受体变体
配体结合的
保留
二聚化和胞内
信号传导的
保留

图1

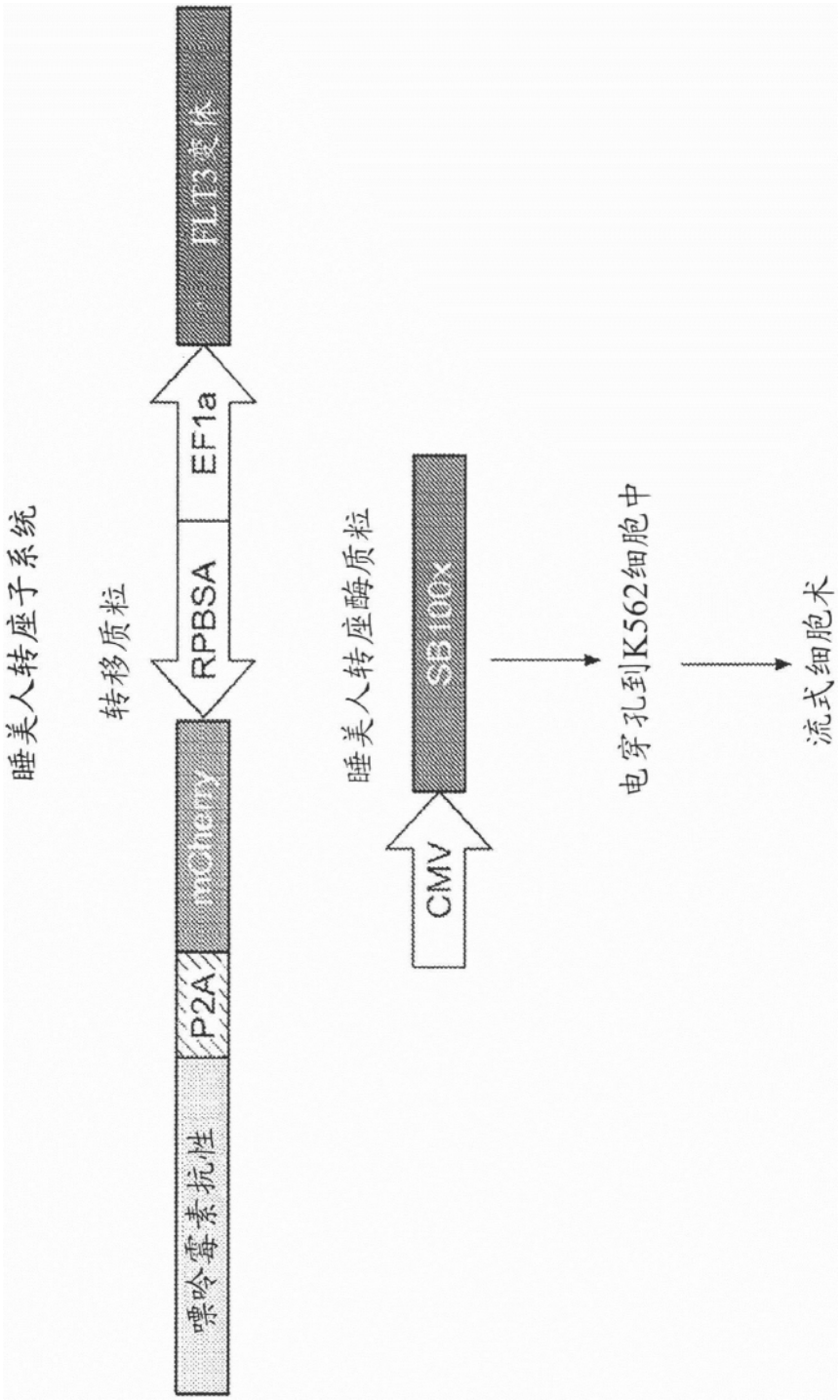

睡美人转座子系统
转移质粒
RPBSA
EF1a
FL13变体
P2A
MCherry
嘌呤霉素抗性
睡美人转座酶质粒
CMV
SB100X
电穿孔到K562细胞中
流式细胞术

图2

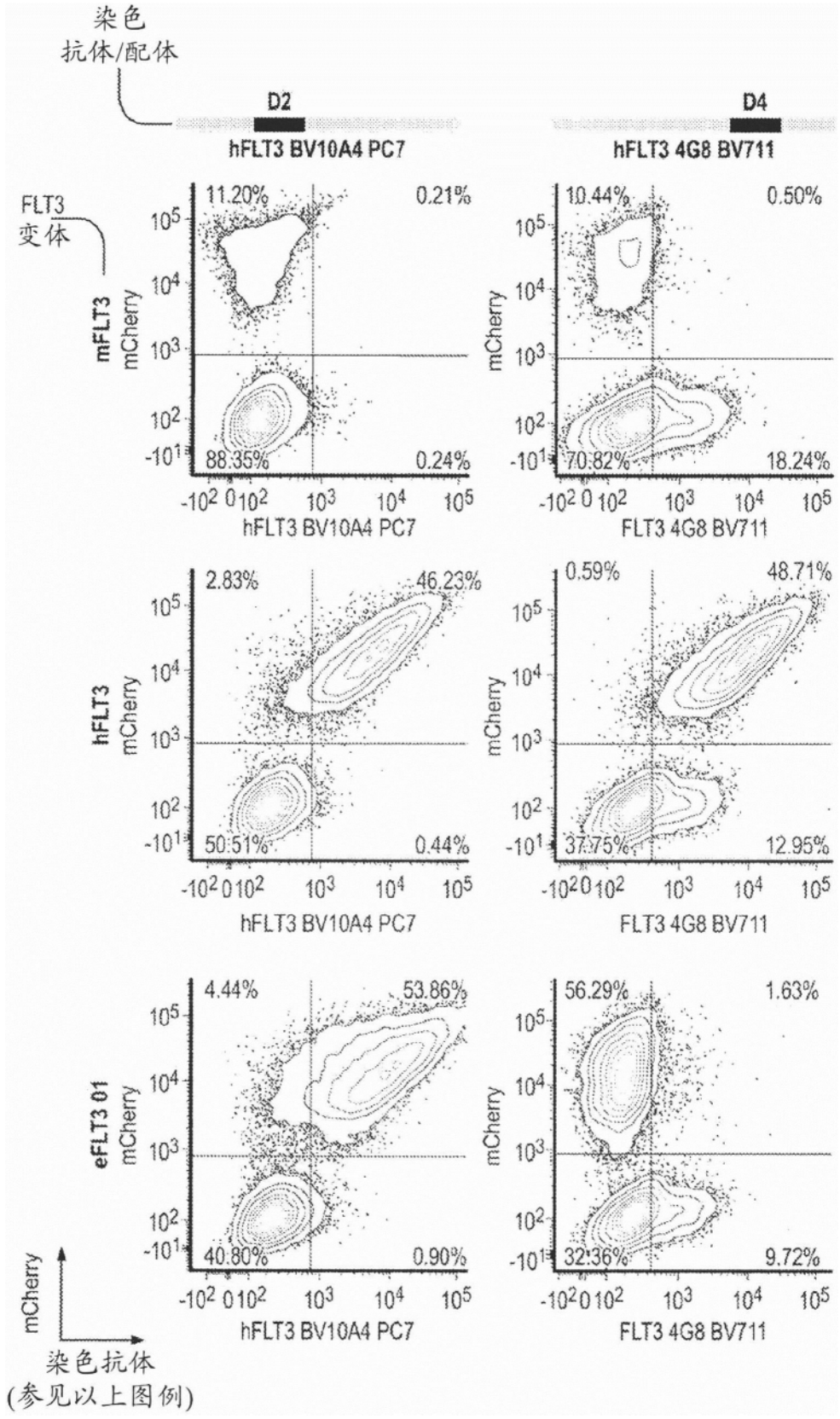

染色
抗体/配体
D2
D4
hFLT3 BV10A4 PC7
hFLT3 4G8 BV711
FLT3
变体
mFLT3
hFLT3
eFLT3 01
mCherry
11.20%
0.21%
88.35%
0.24%
10.44%
0.50%
70.82%
18.24%
2.83%
46.23%
50.51%
0.44%
0.59%
48.71%
37.75%
12.95%
4.44%
53.86%
40.80%
0.90%
56.29%
1.63%
32.36%
9.72%
hFLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
染色抗体
(参见以上图例)

图2(续)

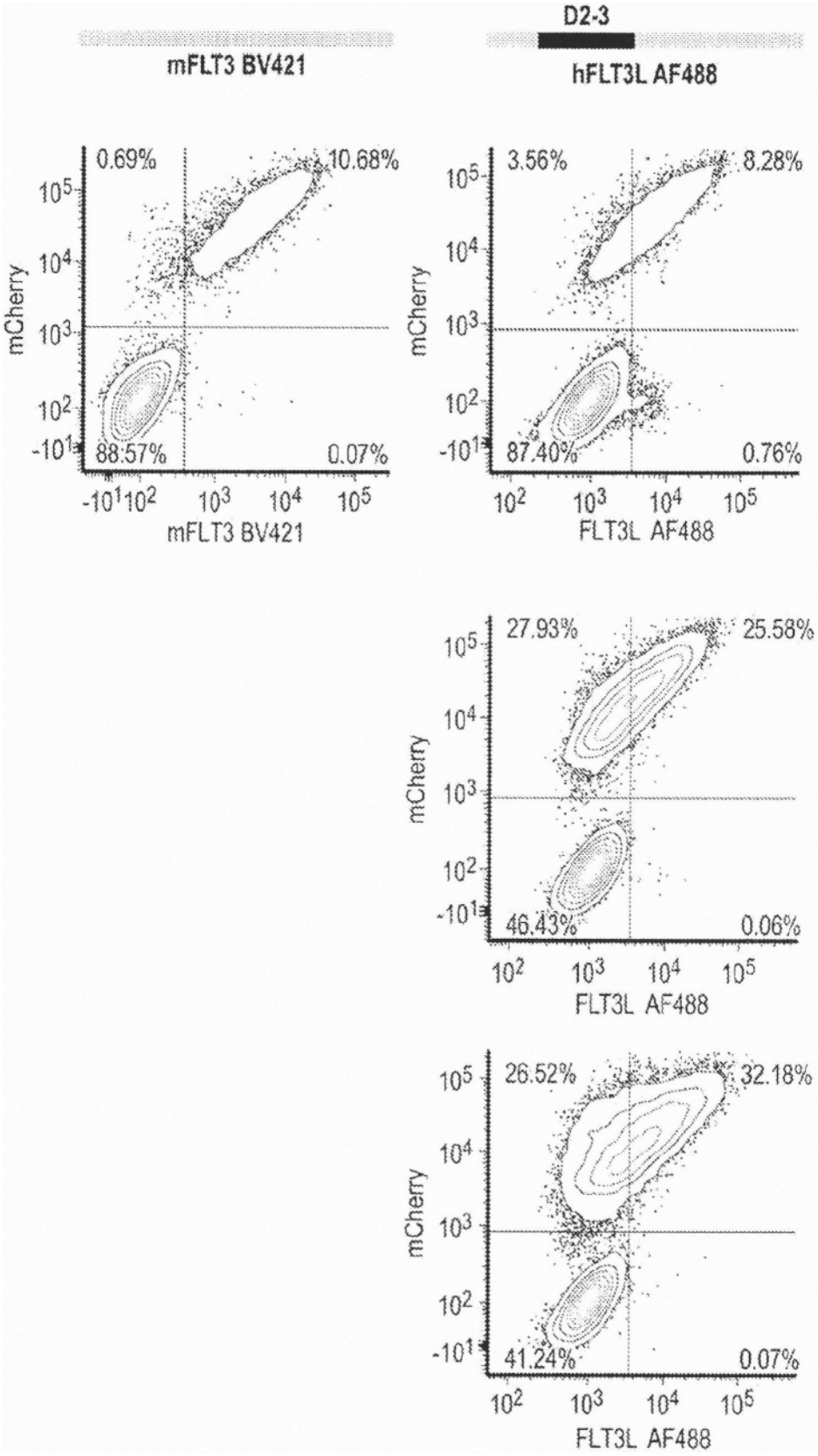

D2-3
mFLT3 BV421
hFLT3L AF488
0.69%
10.68%
88.57%
0.07%
3.56%
8.28%
87.40%
0.76%
27.93%
25.58%
46.43%
0.06%
26.52%
32.18%
41.24%
0.07%
mCherry
mFLT3 BV421
FLT3L AF488

图2(续)

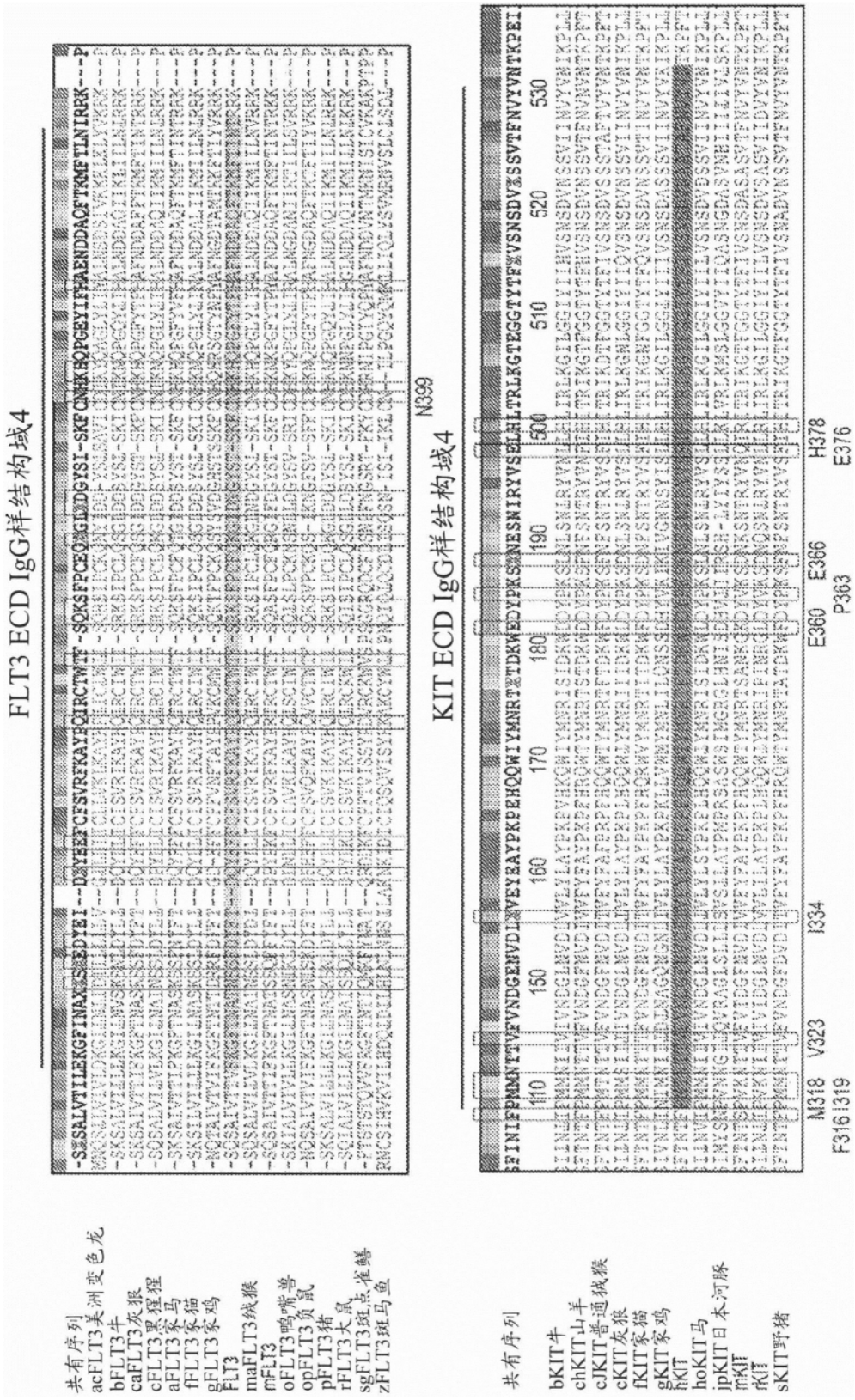

FLT3 ECD IgG样结构域4
KIT ECD IgG样结构域4
N399
共有序列
acFLT3美洲变色龙
bFLT3牛
caFLT3灰狼
cFLT3黑猩猩
aFLT3家马
fFLT3家猫
gFLT3家鸡
FLT3
maFLT3绒猴
mFLT3
oFLT3鸭嘴兽
opFLT3负鼠
pFLT3猪
rFLT3大鼠
sgFLT3斑点雀鳝
zFLT3斑马鱼
共有序列
bKIT牛
chKIT山羊
cJKIT普通狨猴
cKIT灰狼
fKIT家猫
gKIT家鸡
hKIT
hoKIT马
jpKIT日本河豚
mKIT
rKIT
sKIT野猪
M318
V323
I334
E360
E366
H378
F316
I319
P363
E376

图3

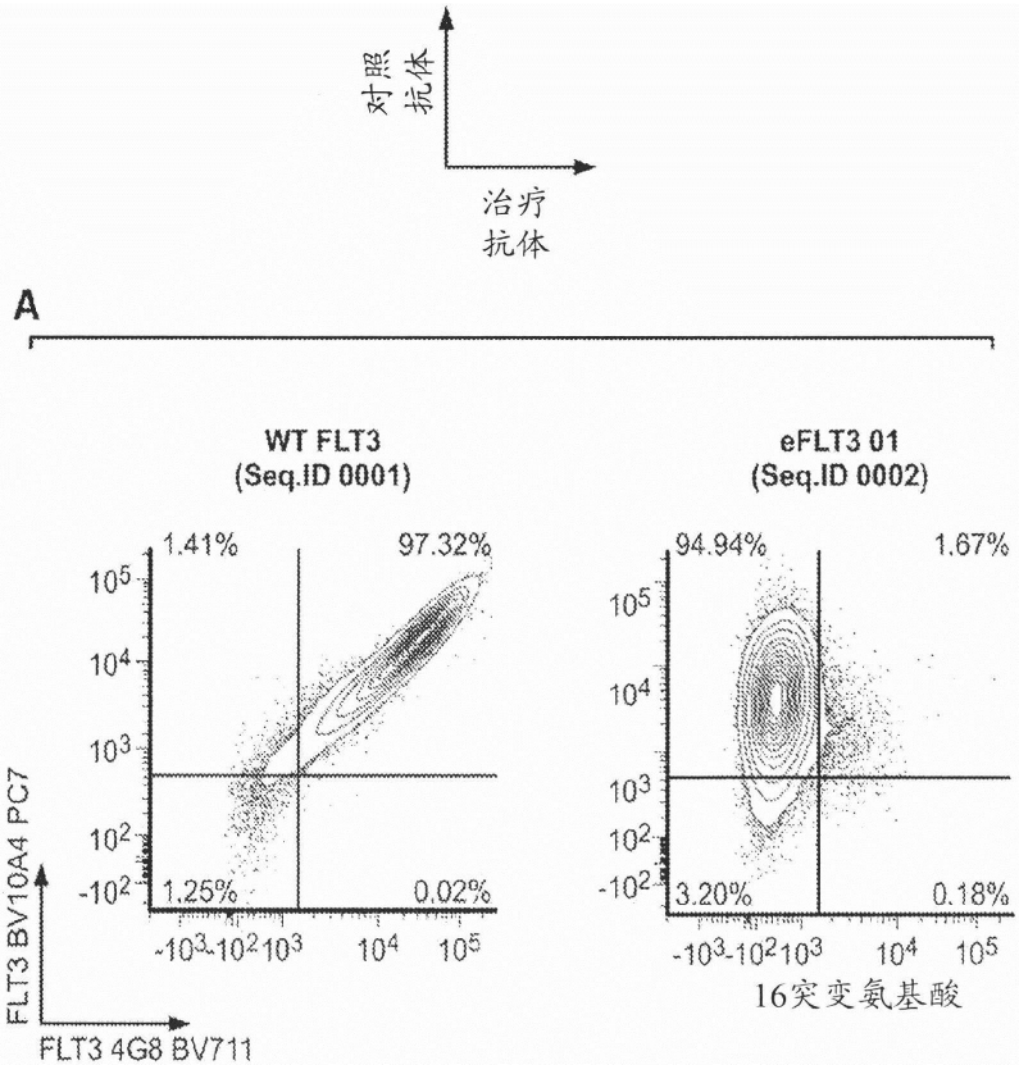

对照抗体
治疗抗体
A
WT FLT3
(Seq.ID 0001)
eFLT3 01
(Seq.ID 0002)
1.41%
97.32%
1.25%
0.02%
94.94%
1.67%
3.20%
0.18%
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
16突变氨基酸

图4A

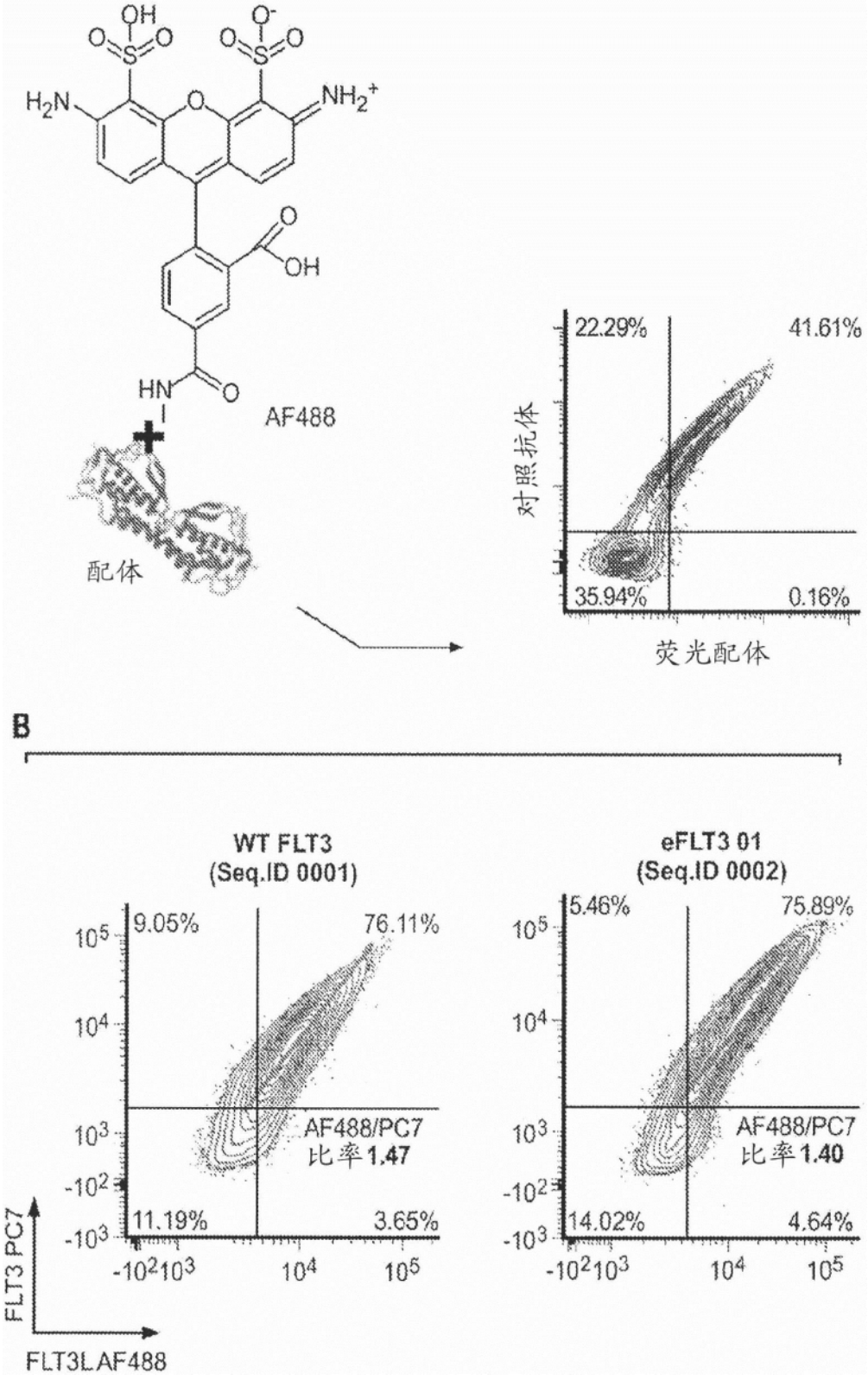

AF488
配体
22.29%
41.61%
35.94%
0.16%
对照抗体
荧光配体
B
WT FLT3
(Seq.ID 0001)
9.05%
76.11%
AF488/PC7
比率1.47
11.19%
3.65%
eFLT3 01
(Seq.ID 0002)
5.46%
75.89%
AF488/PC7
比率1.40
14.02%
4.64%
FLT3 PC7
FLT3LAF488

图4B

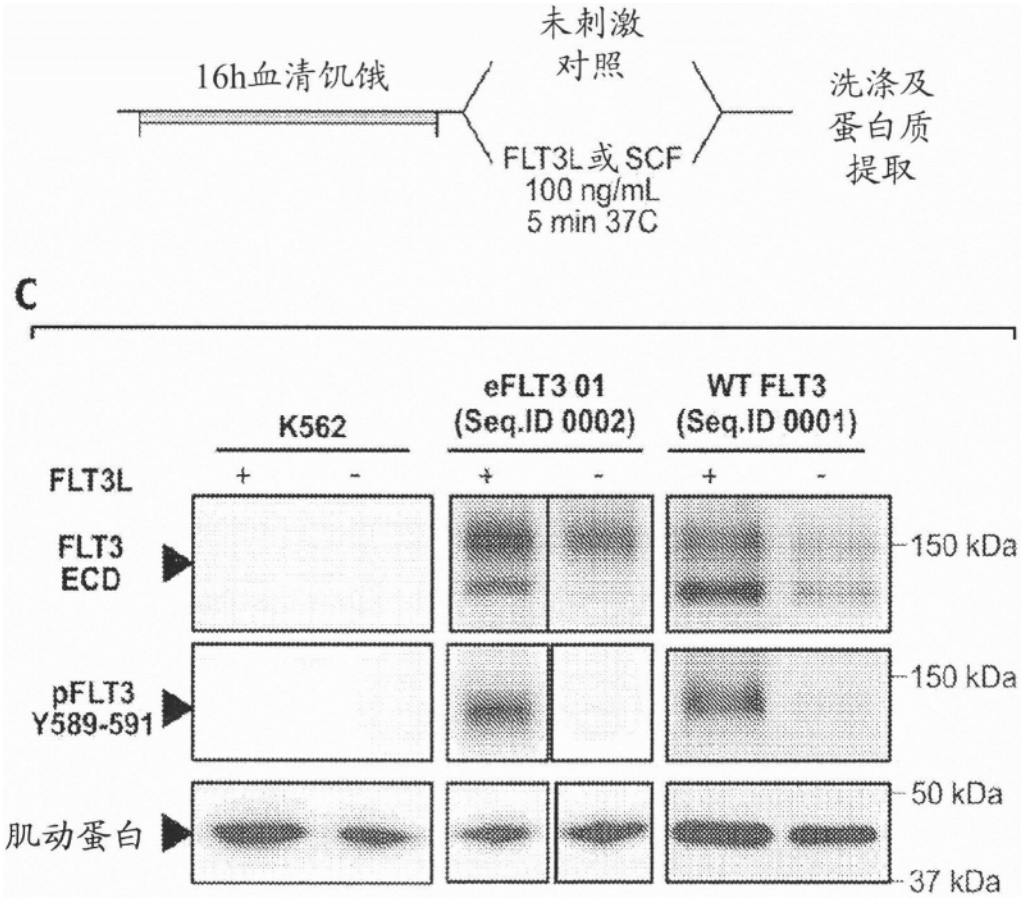

未刺激
对照
16h血清饥饿
洗涤及
蛋白质
提取
FLT3L或SCF
100 ng/mL
5 min 37C
C
K562
eFLT3 01
(Seq.ID 0002)
WT FLT3
(Seq.ID 0001)
FLT3L
+
-
+
-
+
-
FLT3
ECD
150 kDa
pFLT3
Y589-591
150 kDa
肌动蛋白
50 kDa
37 kDa

图4C

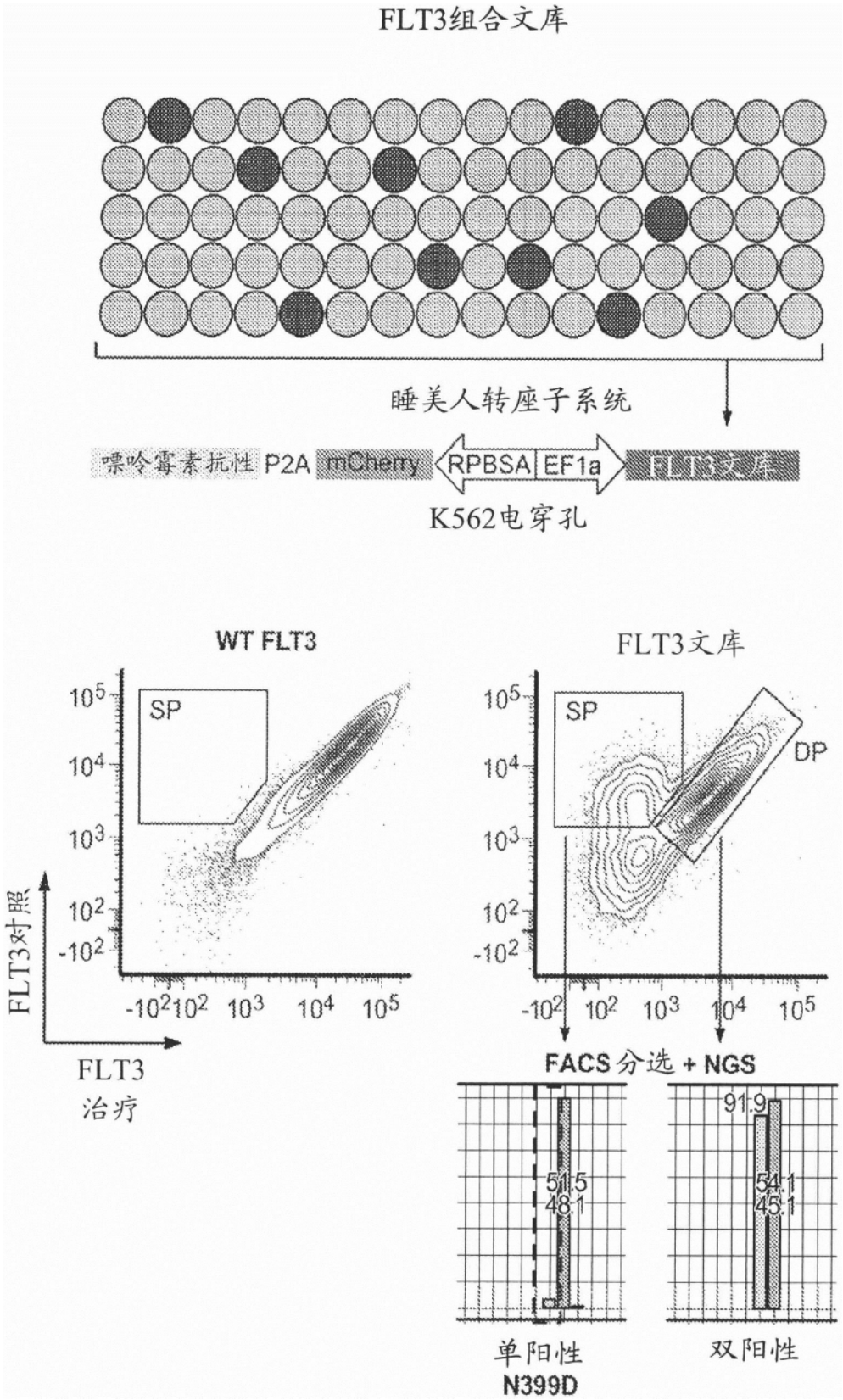

FLT3组合文库
睡美人转座子系统
嘌呤霉素抗性
P2A
mCherry
RPBSA
EF1a
FLT3文库
K562电穿孔
WT FLT3
FLT3文库
SP
DP
FLT3对照
FLT3
治疗
FACS分选 + NGS
51.5
48.1
91.9
54.1
45.1
单阳性
双阳性
N399D

图5

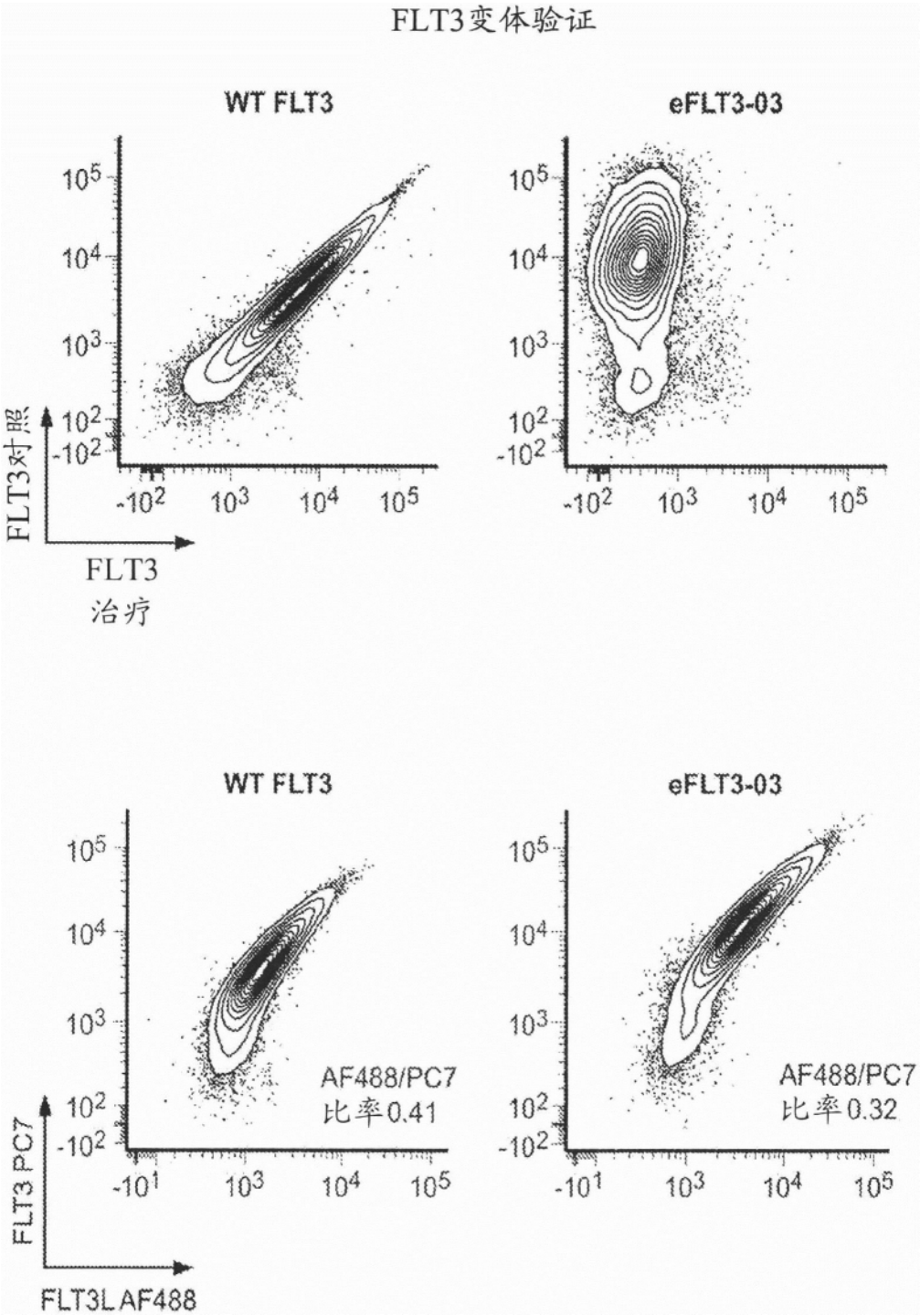

FLT3变体验证
WT FLT3
eFLT3-03
FLT3对照
FLT3
治疗
WT FLT3
eFLT3-03
AF488/PC7
比率0.41
AF488/PC7
比率0.32
FLT3 PC7
FLT3L AF488

图5(续)

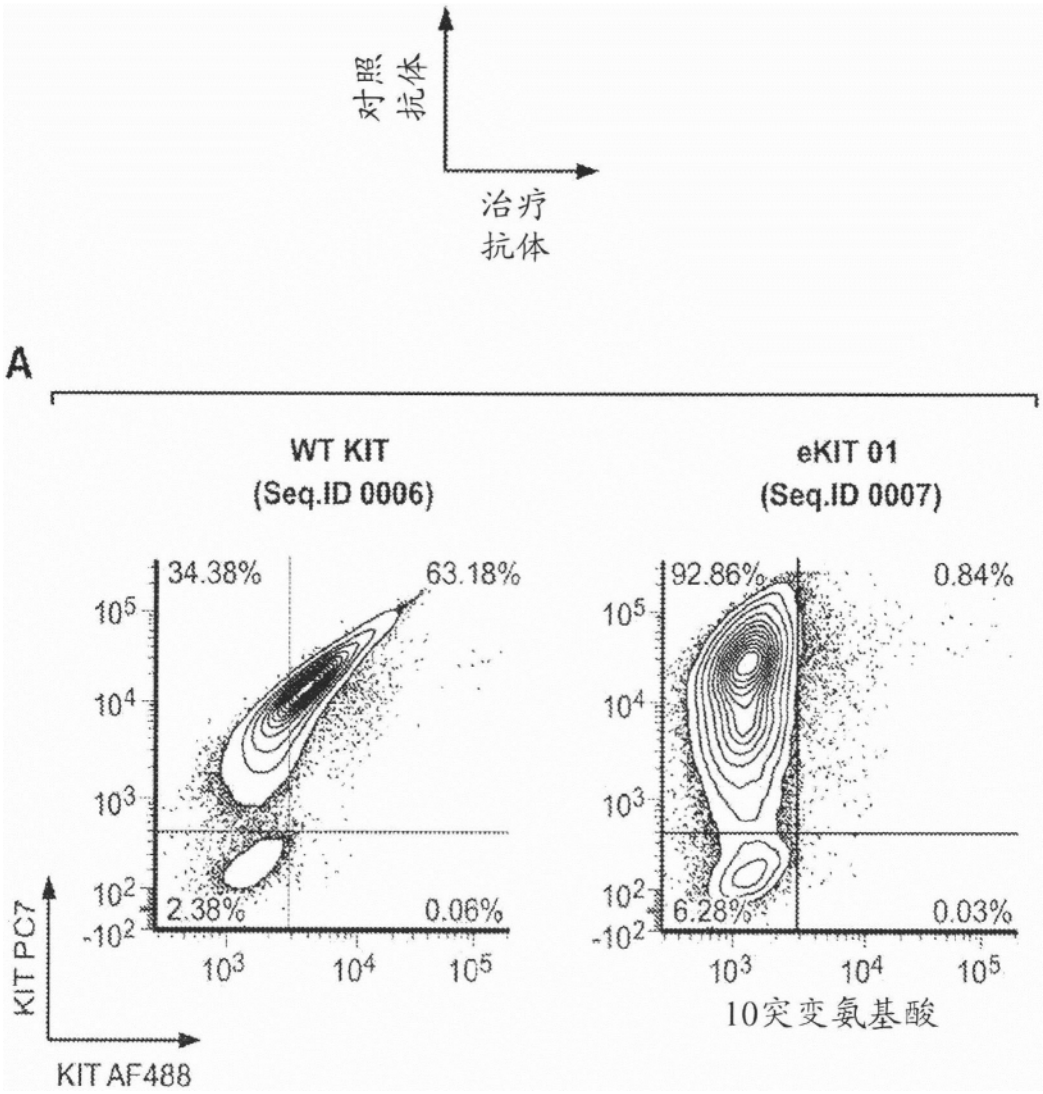

对照抗体
治疗抗体
A
WT KIT
(Seq.ID 0006)
eKIT 01
(Seq.ID 0007)
34.38%
63.18%
2.38%
0.06%
92.86%
0.84%
6.28%
0.03%
KIT PC7
KIT AF488
10突变氨基酸

图6A

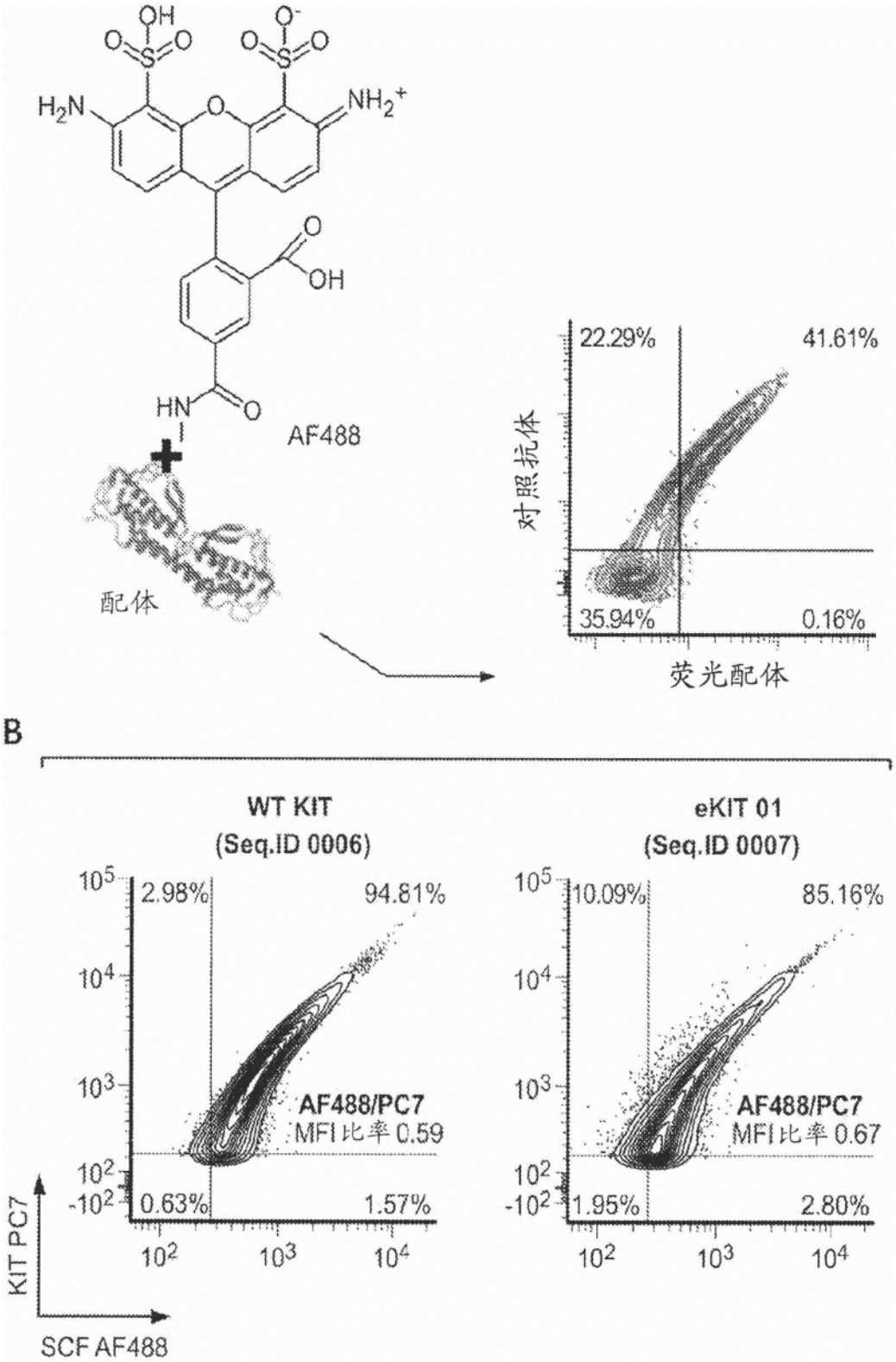

AF488
配体
22.29%
41.61%
35.94%
0.16%
对照抗体
荧光配体
B
WT KIT
(Seq.ID 0006)
eKIT 01
(Seq.ID 0007)
2.98%
94.81%
0.63%
1.57%
10.09%
85.16%
1.95%
2.80%
AF488/PC7
MFI比率 0.59
AF488/PC7
MFI比率 0.67
KIT PC7
SCF AF488

图6B

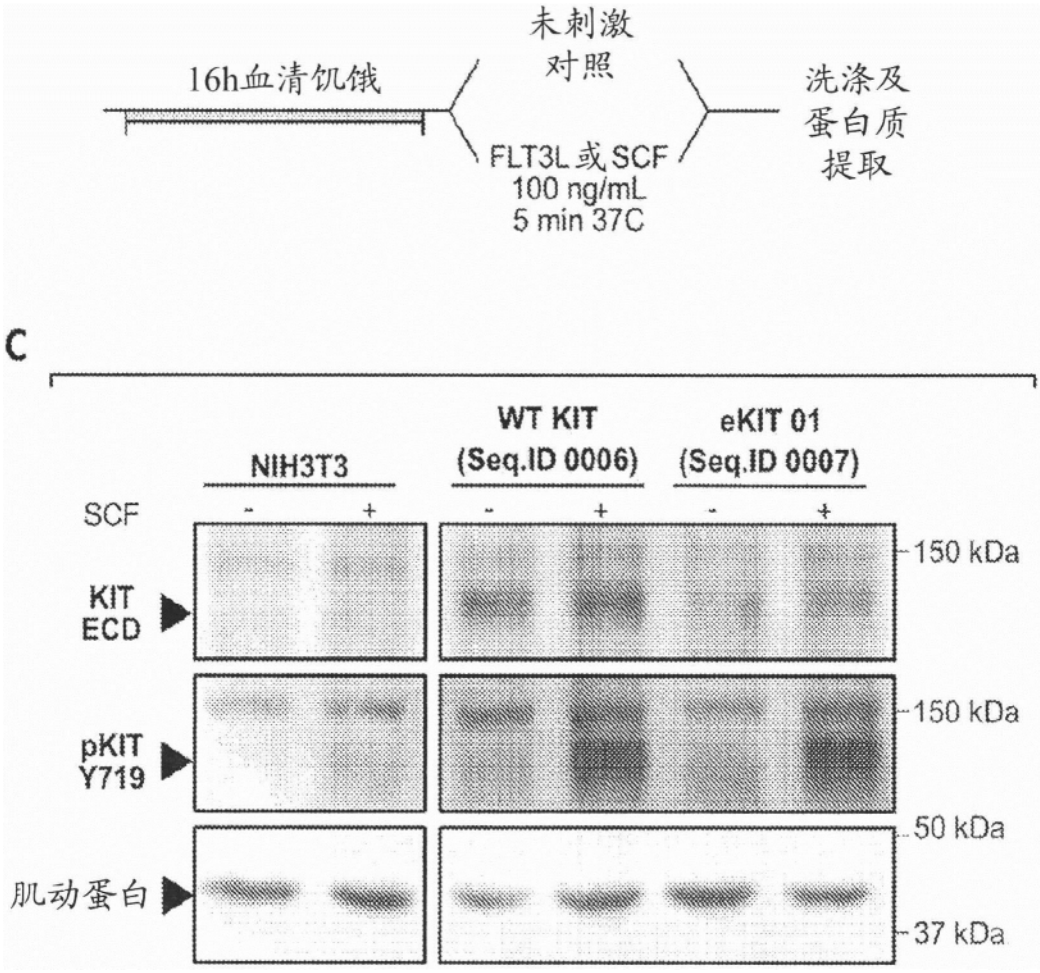

未刺激
对照
16h血清饥饿
洗涤及
蛋白质
提取
FLT3L或SCF
100 ng/mL
5 min 37C
C
NIH3T3
WT KIT
(Seq.ID 0006)
eKIT 01
(Seq.ID 0007)
SCF
-
+
-
+
-
+
KIT
ECD
150 kDa
pKIT
Y719
150 kDa
50 kDa
肌动蛋白
37 kDa

图6C

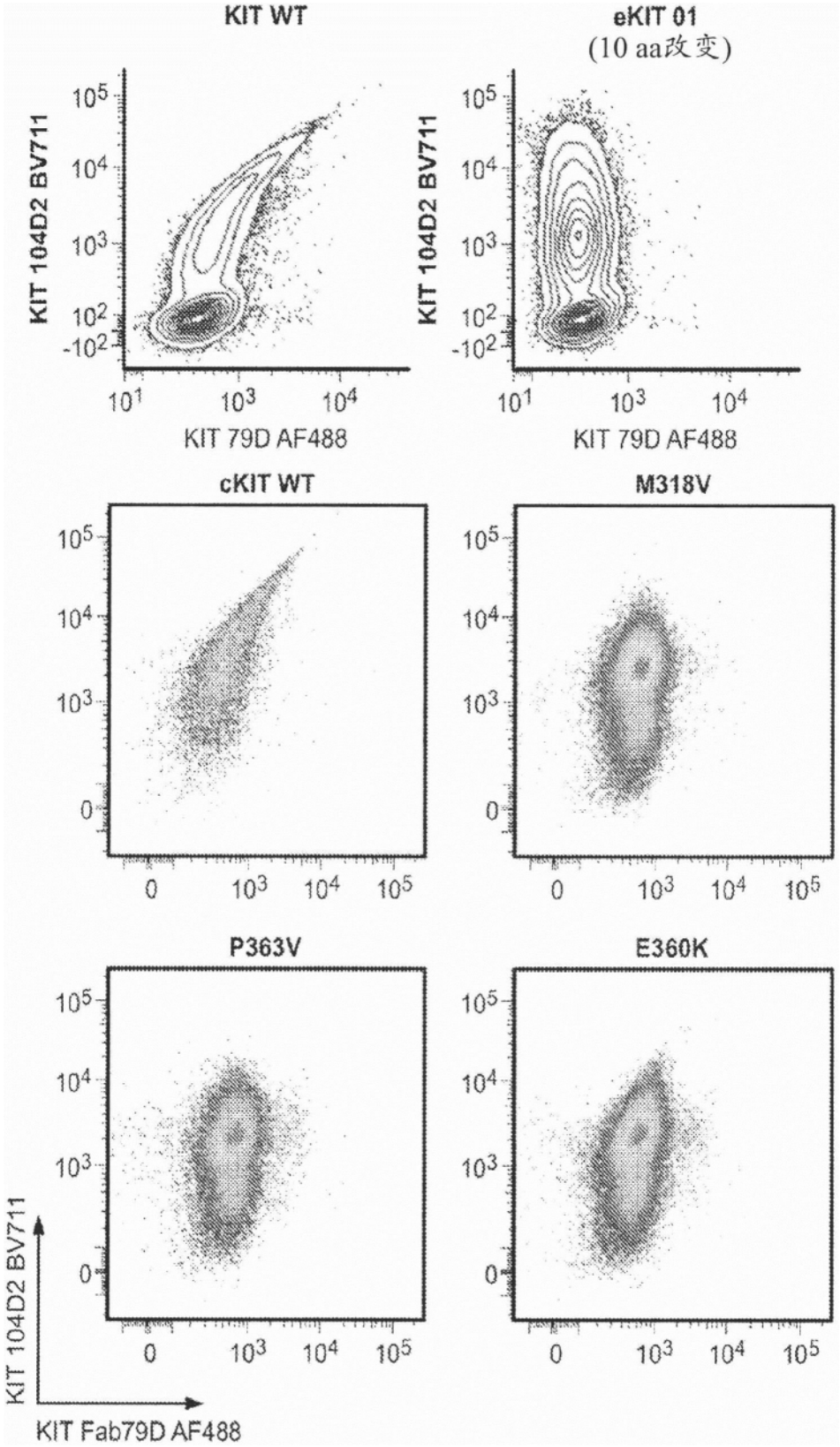

KIT WT
eKIT 01
(10 aa改变)
KIT 104D2 BV711
KIT 79D AF488
cKIT WT
M318V
P363V
E360K
KIT Fab79D AF488

图6D

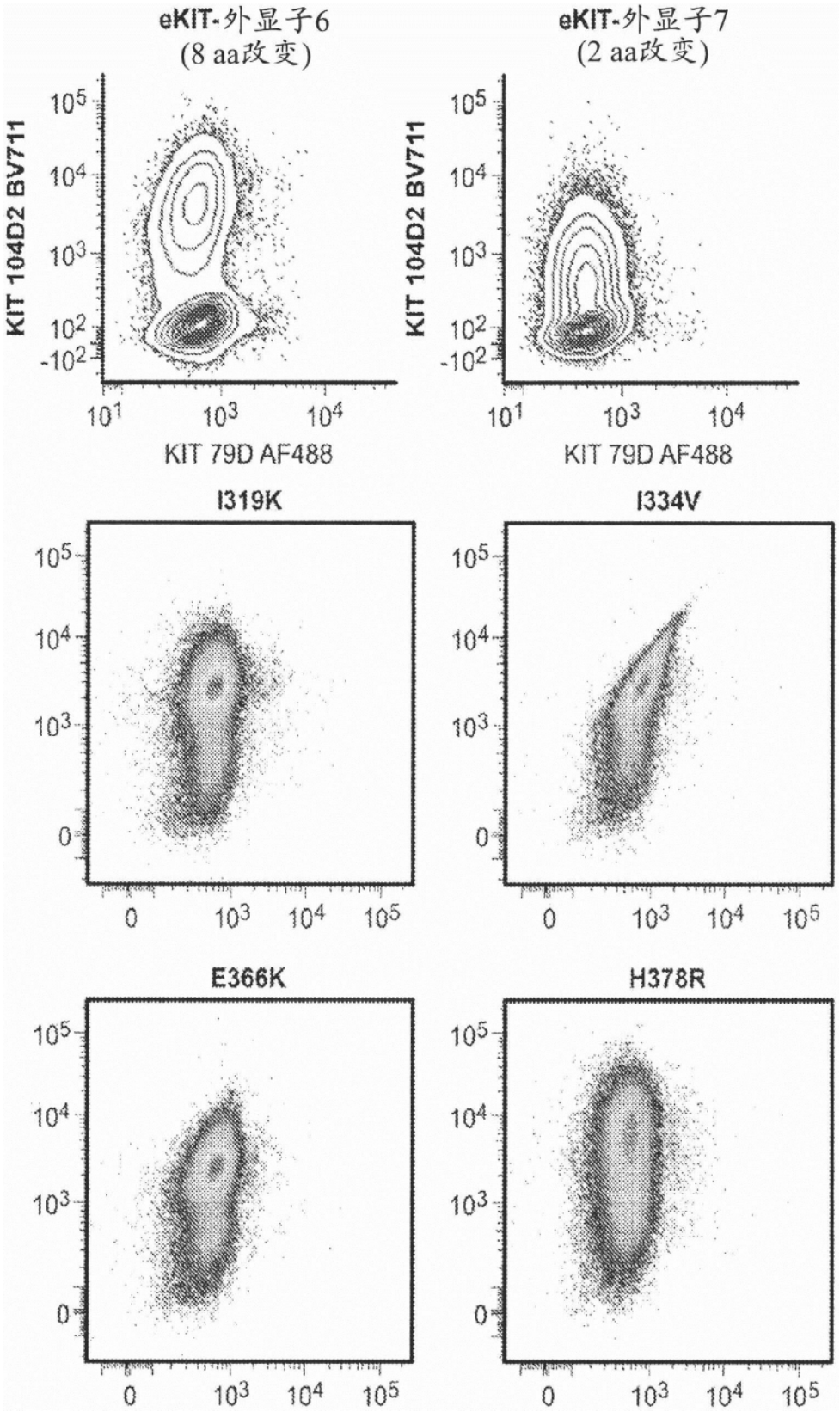

eKIT-外显子6
(8 aa改变)
eKIT-外显子7
(2 aa改变)
KIT 104D2 BV711
KIT 79D AF488
I319K
I334V
E366K
H378R

图6D(续)

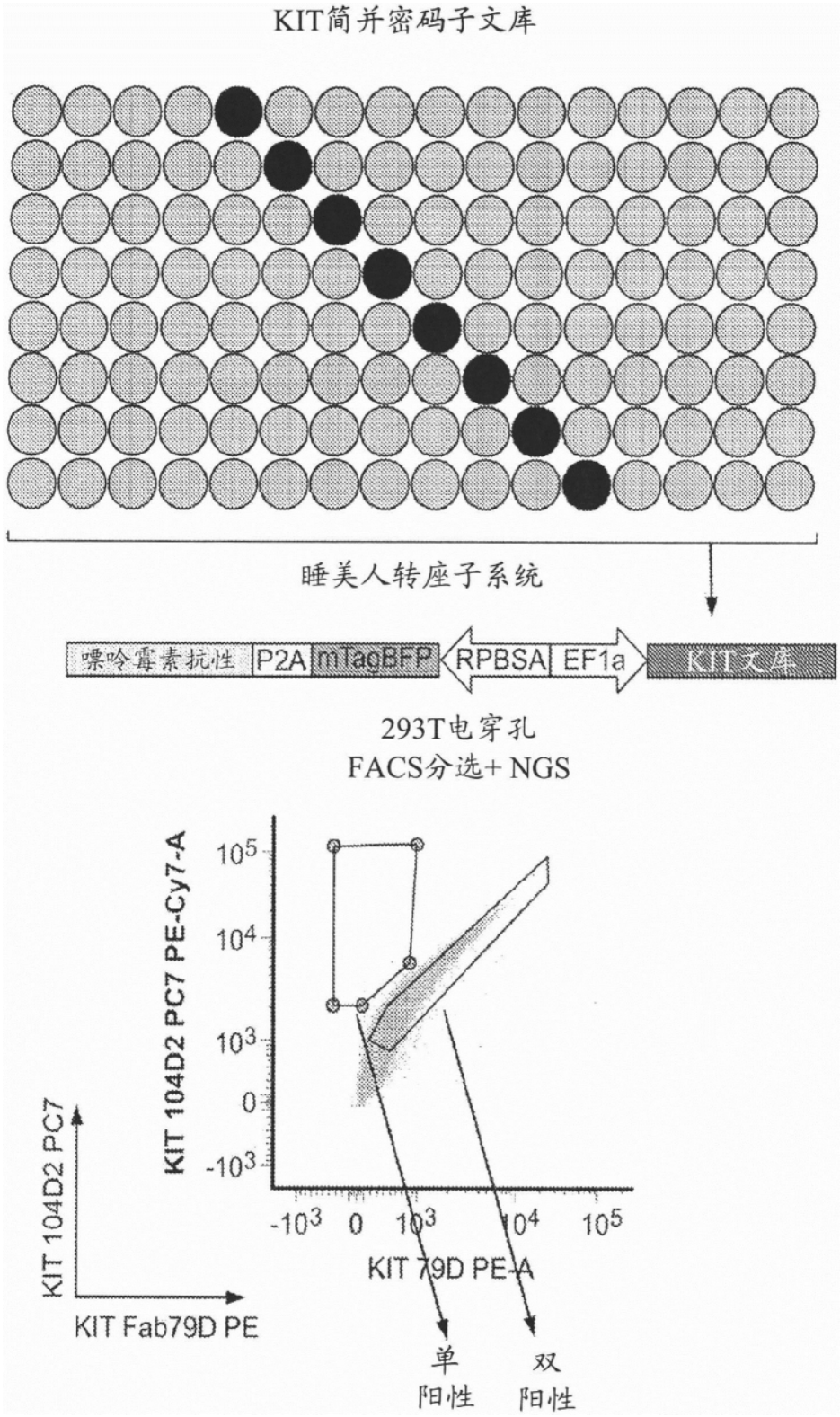

KIT简并密码子文库
睡美人转座子系统
嘌呤霉素抗性
P2A
mTagBFP
RPBSA
EF1a
KIT文库
293T电穿孔
FACS分选+ NGS
KIT 104D2 PC7 PE-Cy7-A
KIT 79D PE-A
KIT 104D2 PC7
KIT Fab79D PE
单阳性
双阳性

图7

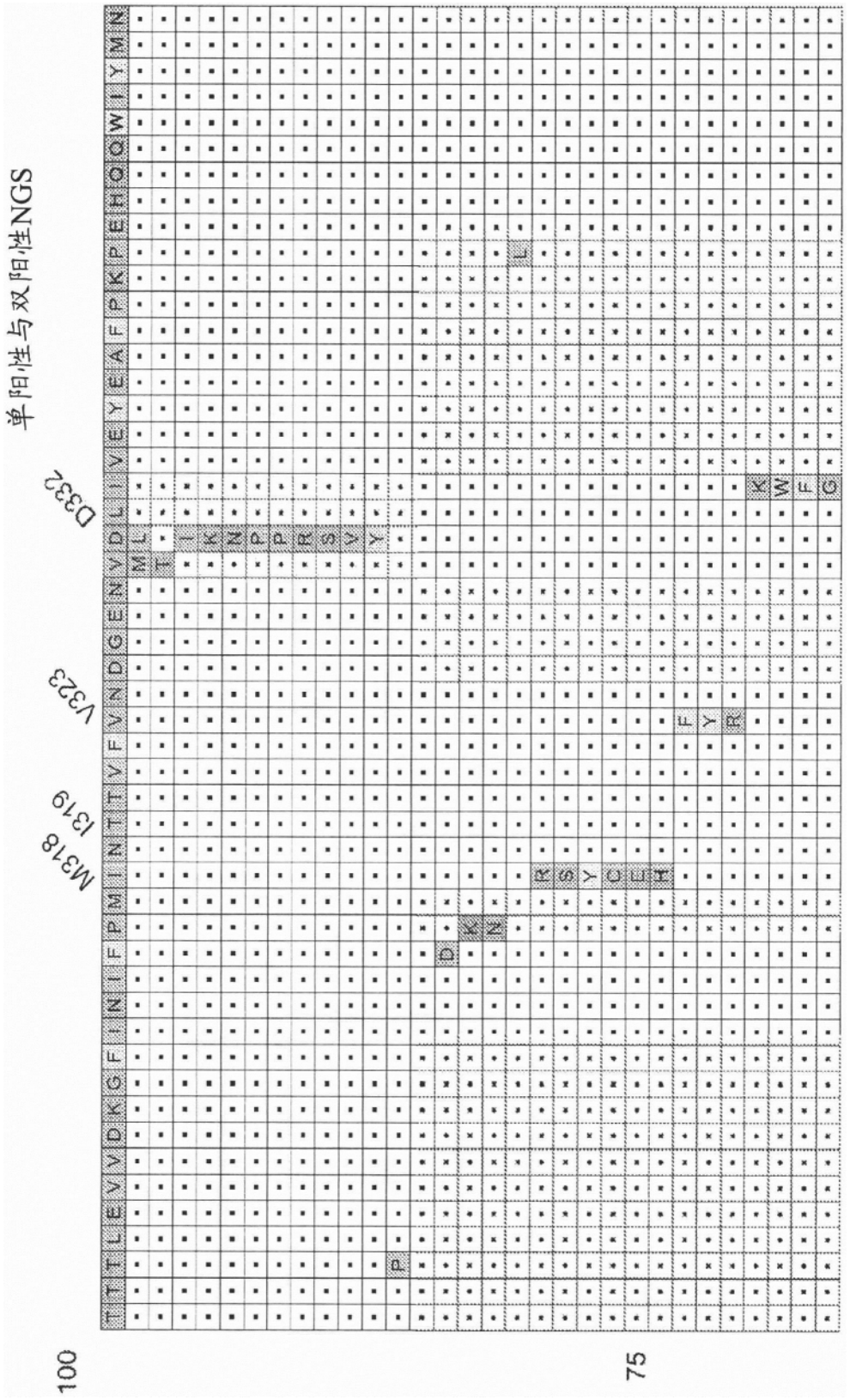


图7(续)

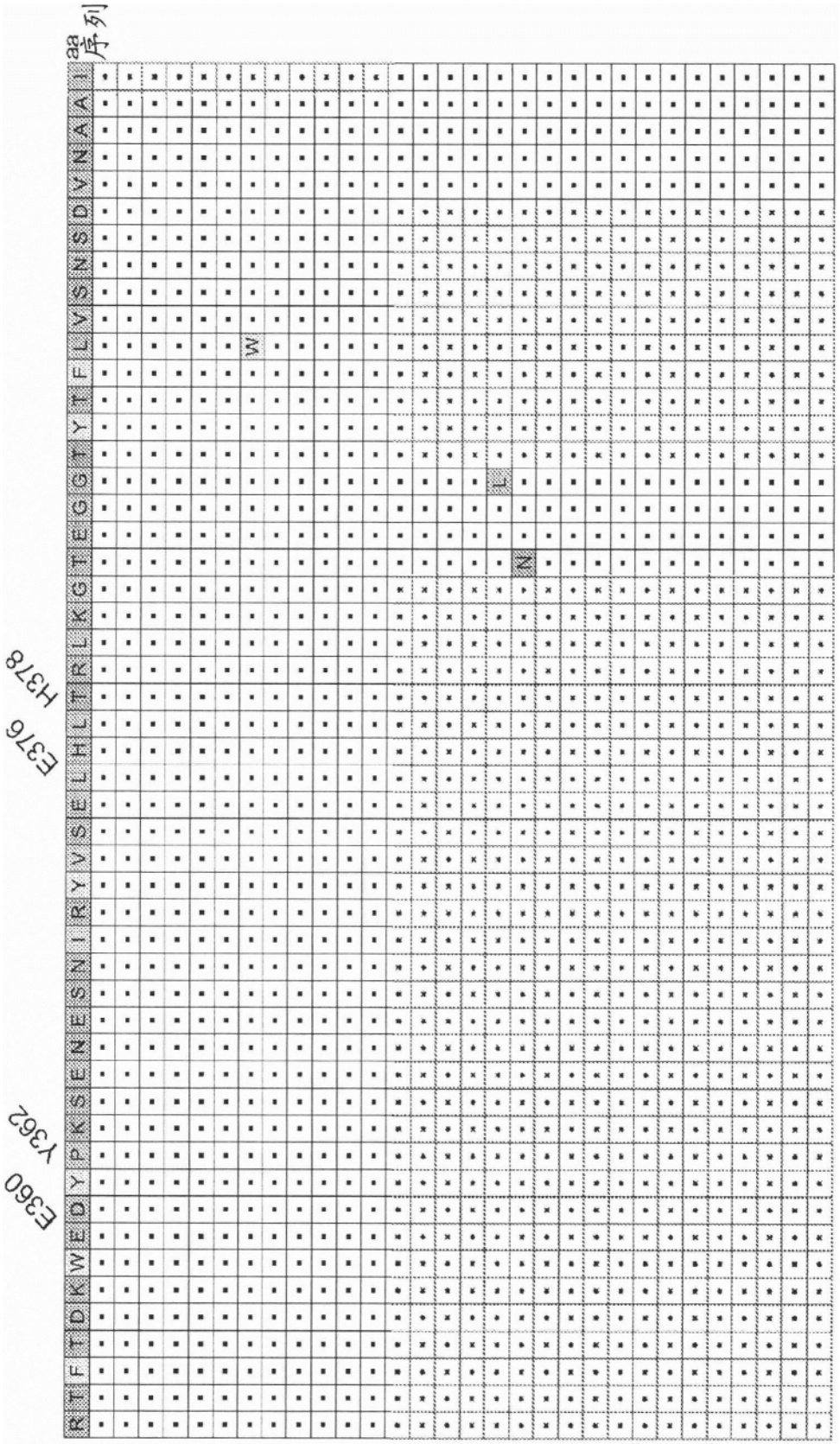


图7(续)

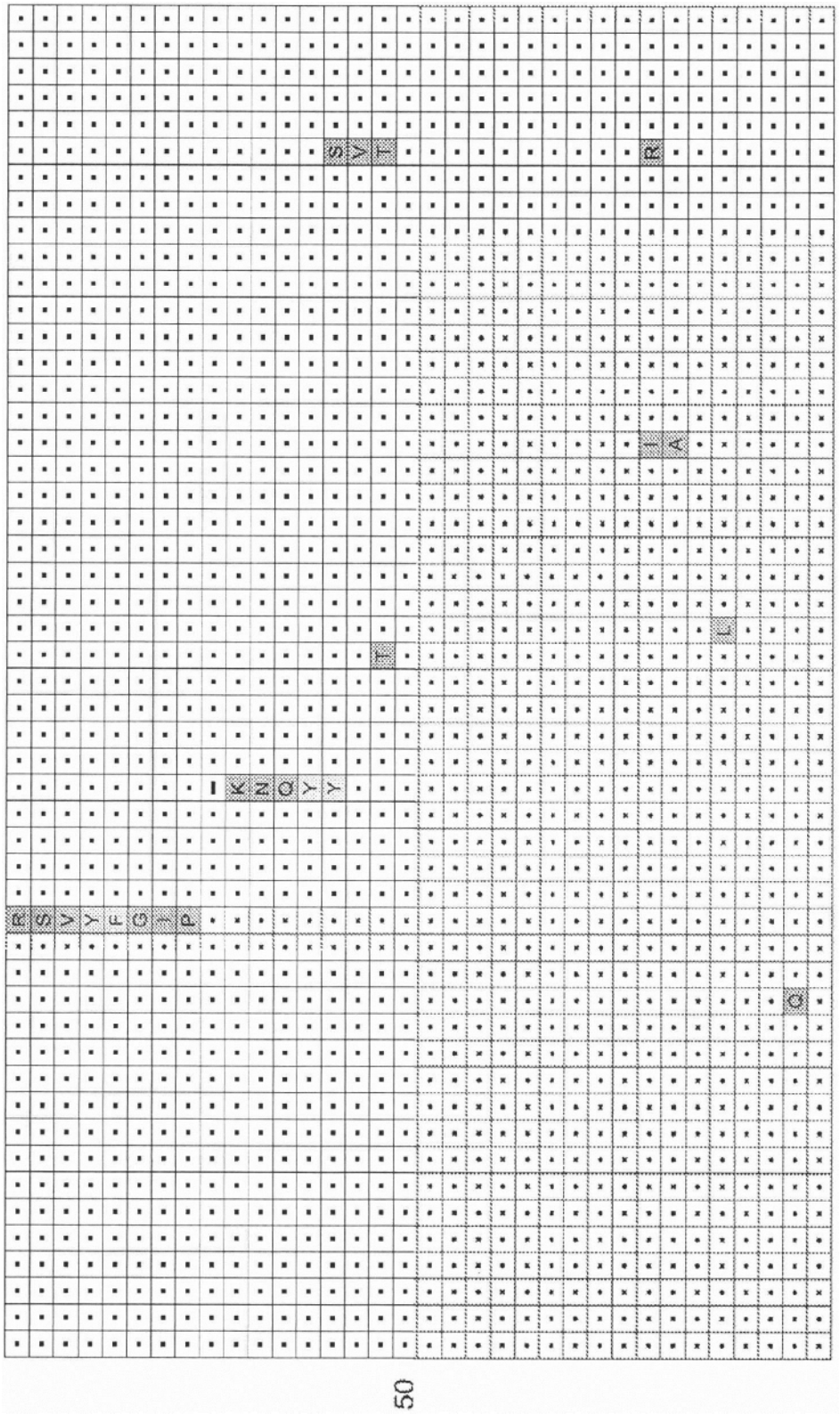


图7(续)

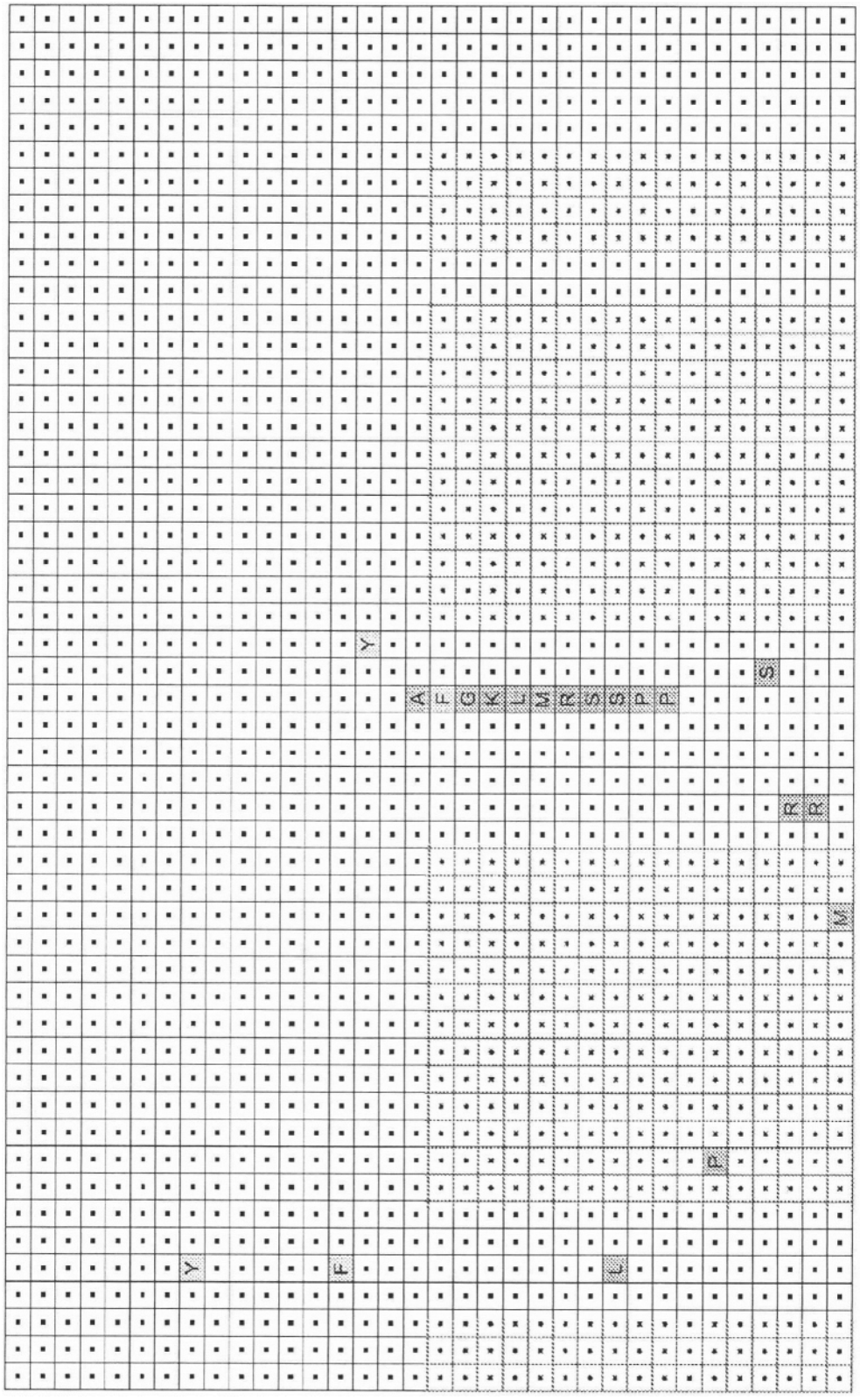


图7(续)

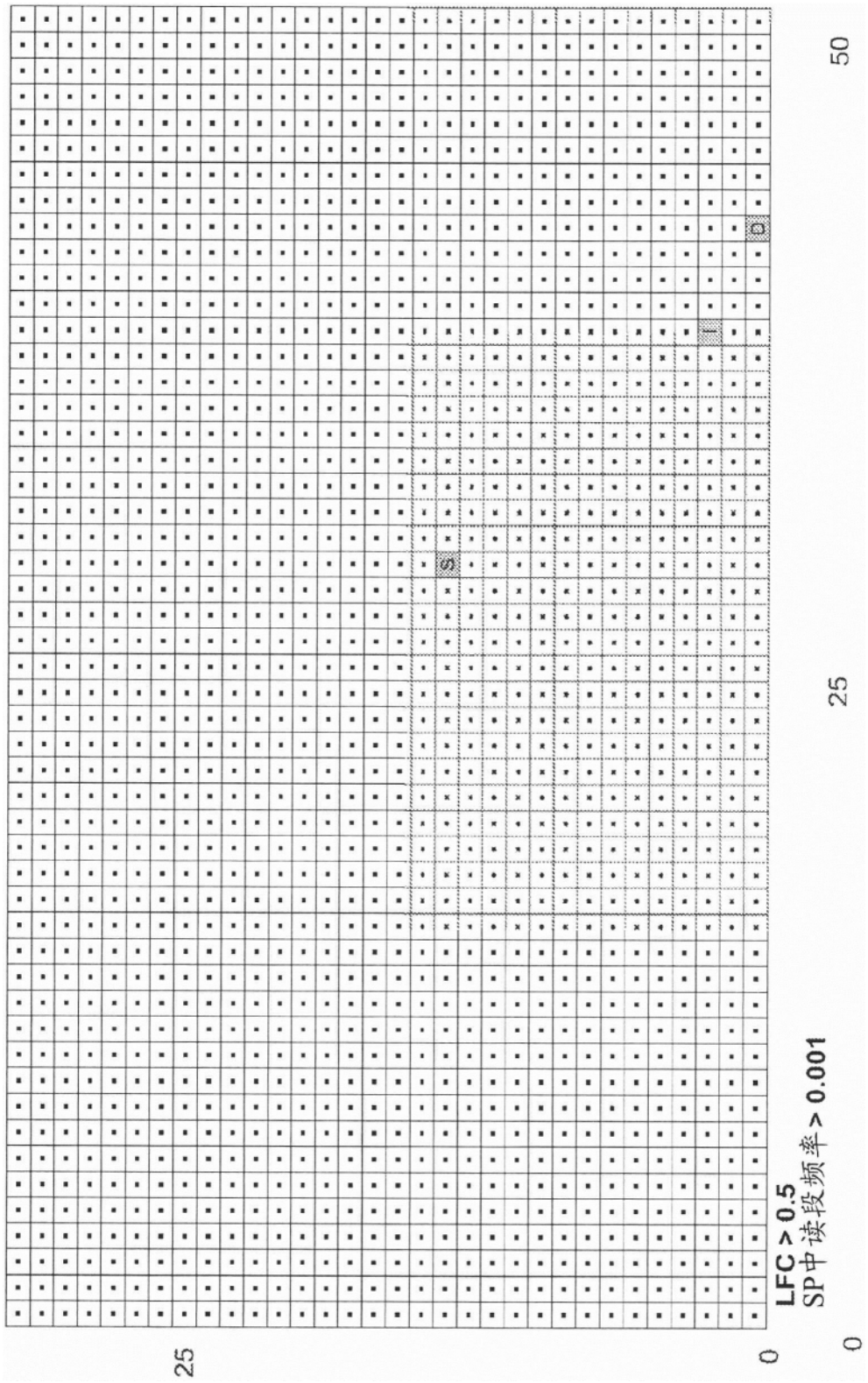


图7(续)

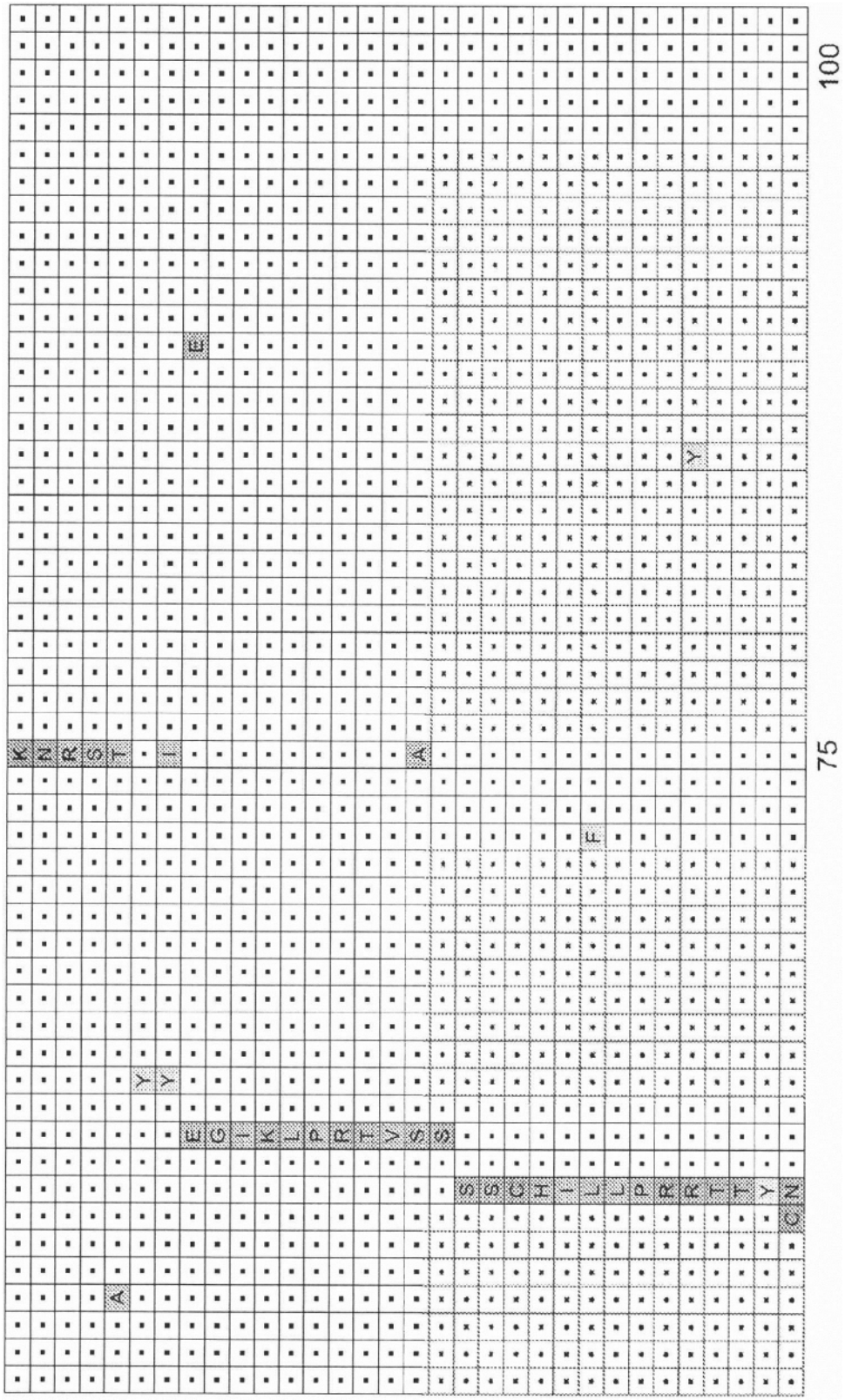


图7(续)

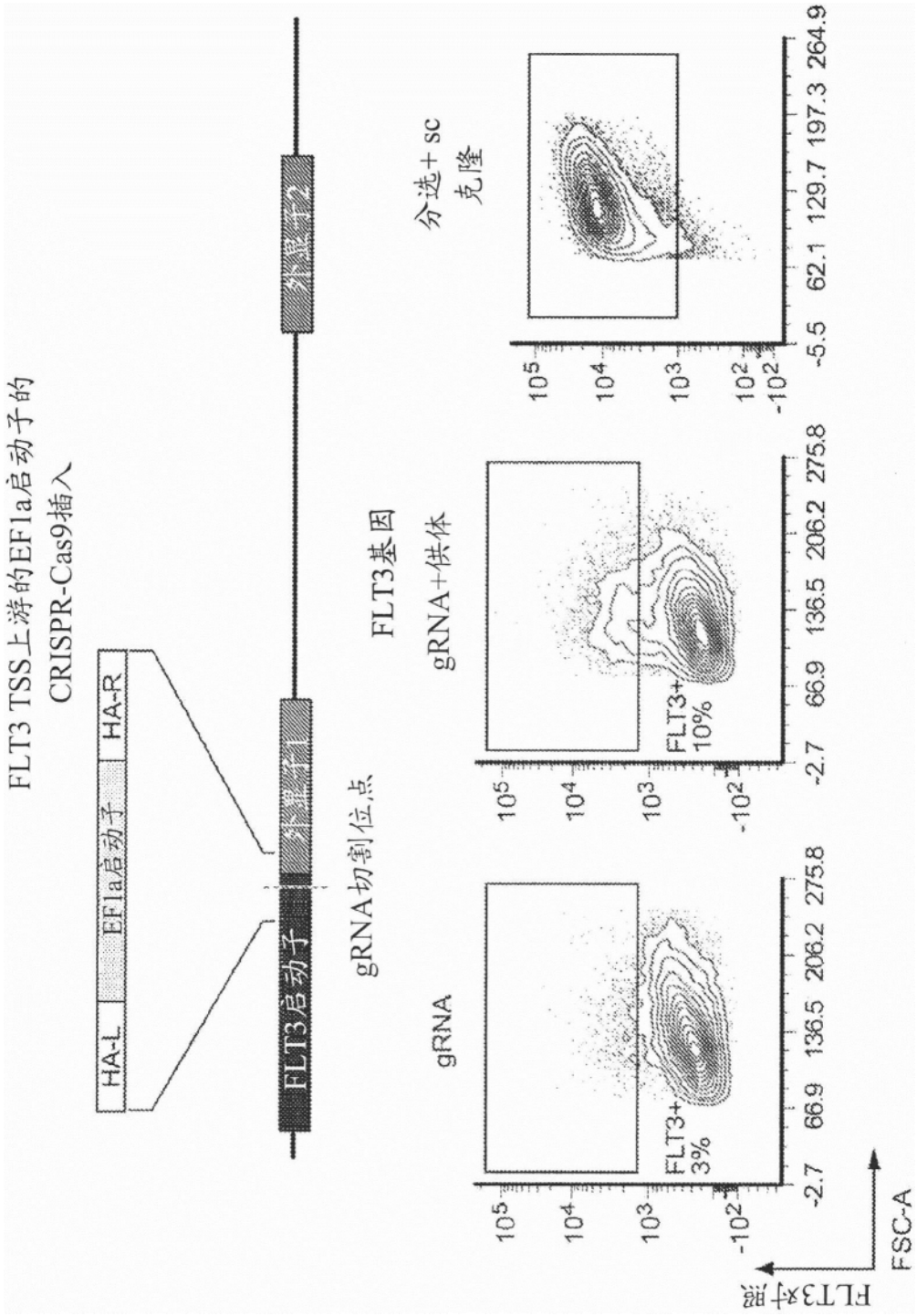

FLT3 TSS上游的EF1a启动子的
CRISPR-Cas9插入
HA-L
EF1a启动子
HA-R
FLT3启动子
外显子1
外显子2
gRNA切割位点
FLT3基因
gRNA
gRNA+供体
分选+ sc
克隆
FLT3+
3%
FLT3+
10%
FLT3对照
FSC-A

图8

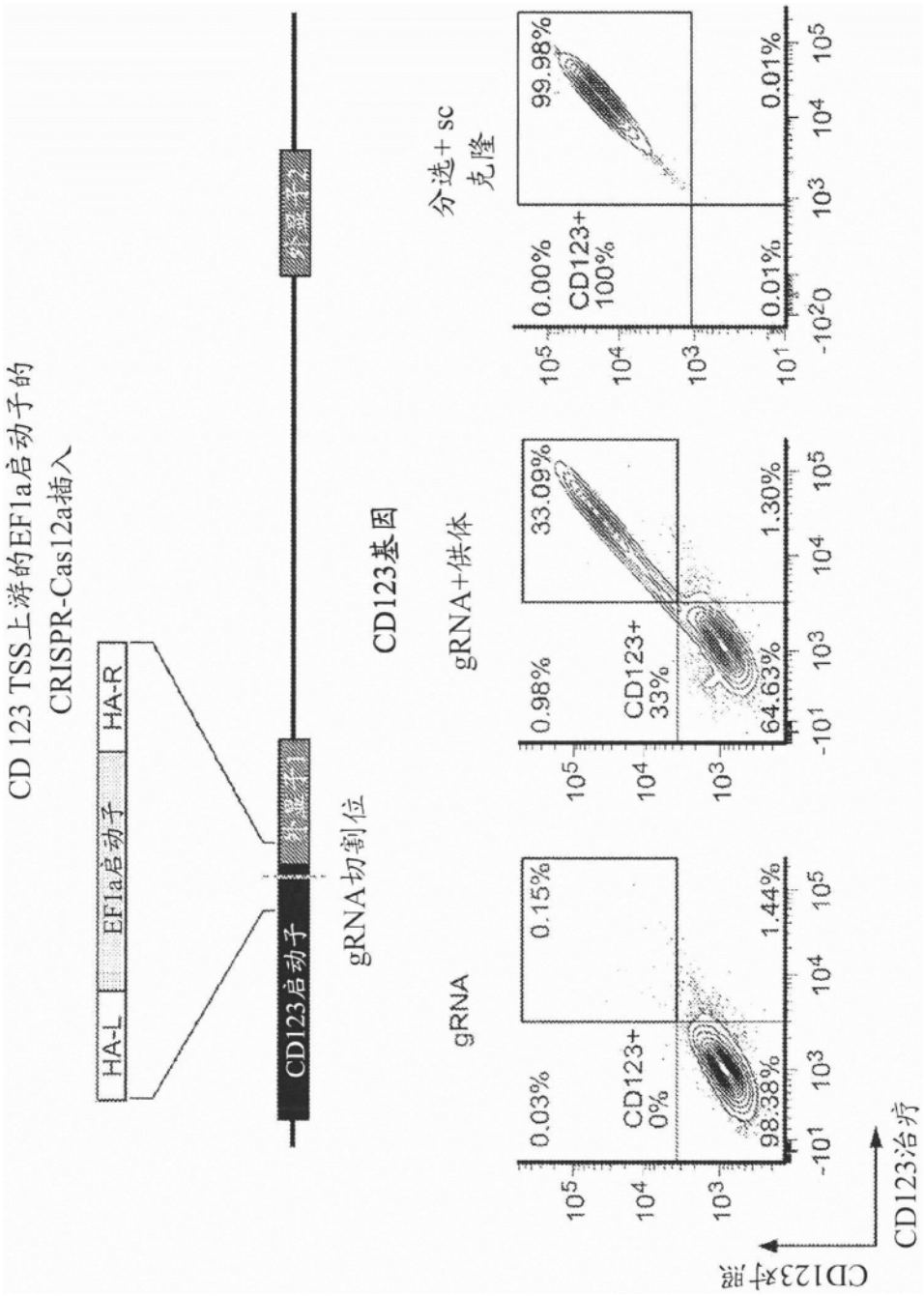

CD 123 TSS上游的EF1a启动子的
CRISPR-Cas12a插入
HA-L
EF1a启动子
HA-R
CD123启动子
外显子1
gRNA切割位
CD123基因
gRNA
gRNA+供体
分选+ sc
克隆
0.03%
CD123+
0%
98.38%
0.15%
1.44%
0.98%
CD123+
33%
64.63%
33.09%
1.30%
0.00%
CD123+
100%
99.98%
0.01%
0.01%
CD123对照
CD123治疗

图8(续)

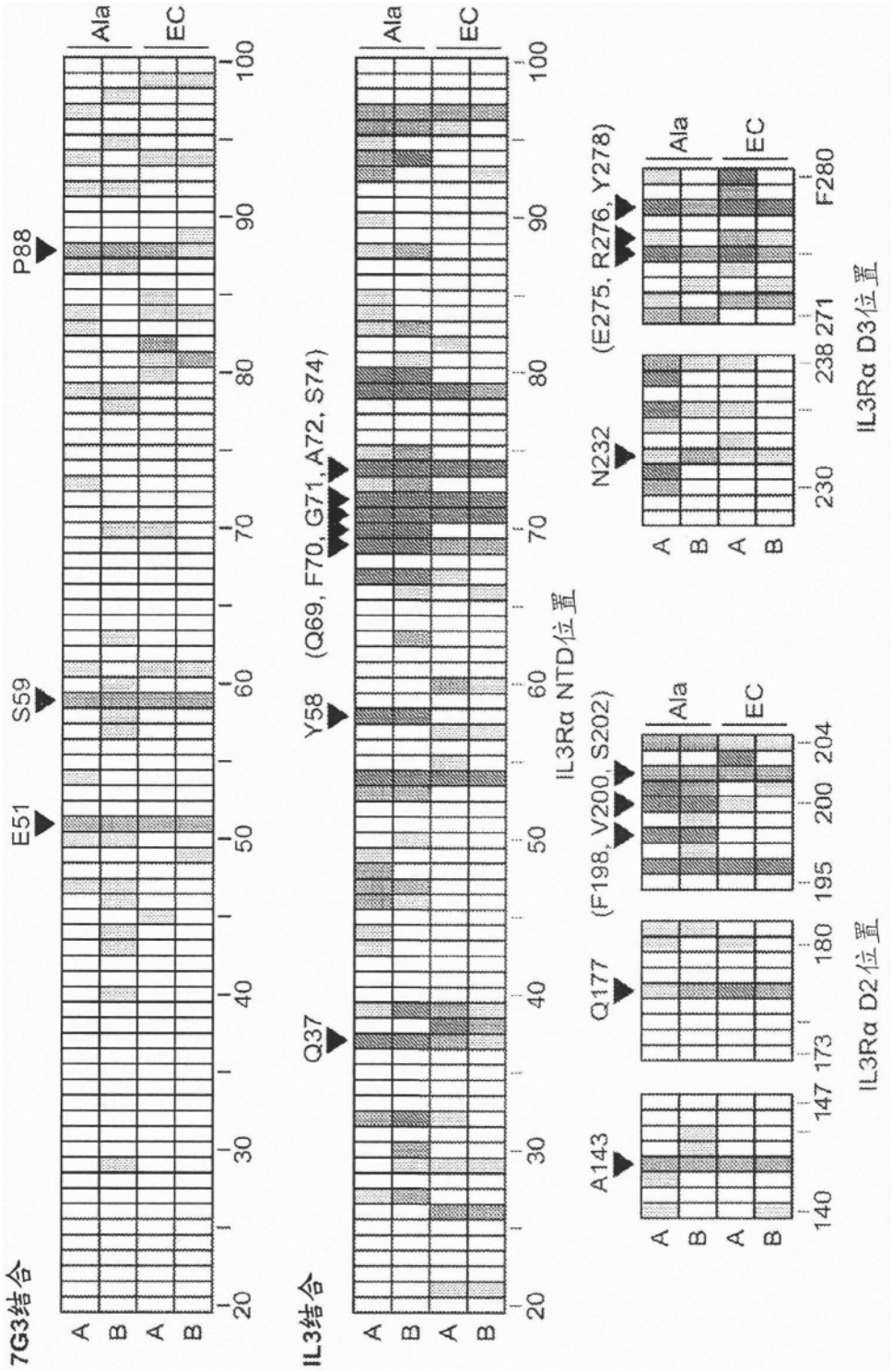

7G3结合
IL3结合
Ala
EC
P88
E51
S59
Q37
Y58
(Q69, F70, G71, A72, S74)
IL3Rα NTD位置
A143
Q177
(F198, V200, S202)
N232
(E275, R276, Y278)
IL3Rα D2位置
IL3Rα D3位置
A
B
20
30
40
50
60
70
80
90
100
140
147
173
180
195
200
204
230
238
271
F280

图9

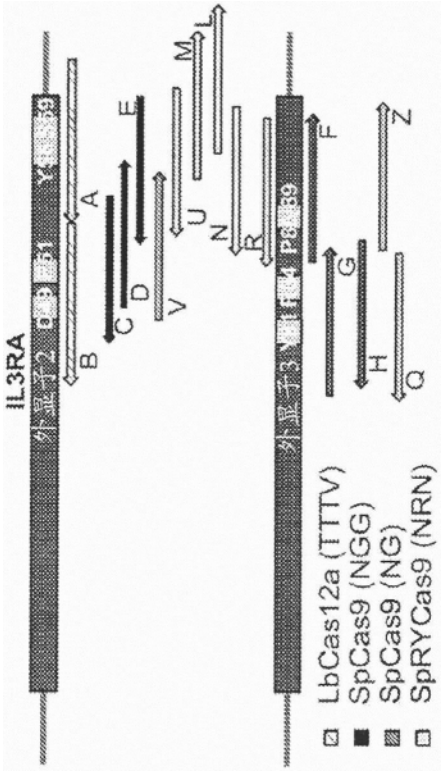

IL3RA
外显子2
外显子3
A
B
C
D
E
V
U
M
L
N
R
F
G
H
Z
Q
LbCas12a (TTTV)
SpCas9 (NGG)
SpCas9 (NG)
SpRYCas9 (NRN)

图10A

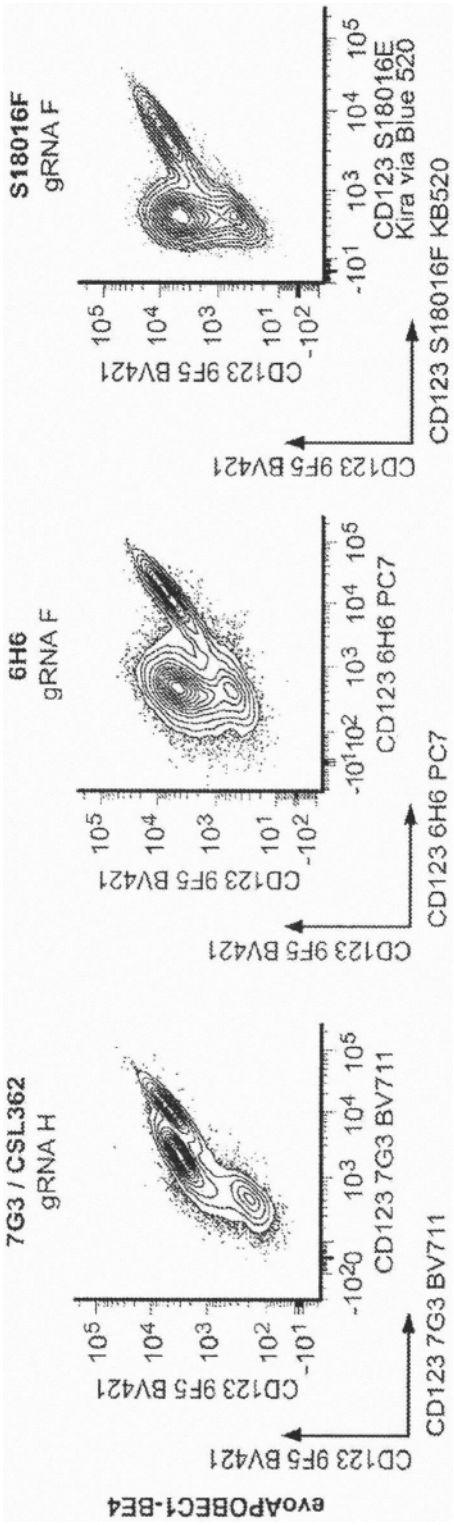

evoAPOBEC1-BE4
7G3 / CSL362
gRNA H
CD123 9F5 BV421
CD123 7G3 BV711
CD123 9F5 BV421
CD123 7G3 BV711
6H6
gRNA F
CD123 9F5 BV421
CD123 6H6 PC7
CD123 9F5 BV421
CD123 6H6 PC7
S18016F
gRNA F
CD123 9F5 BV421
CD123 S18016E
Kira via Blue 520
CD123 9F5 BV421
CD123 S18016F KB520

图10B

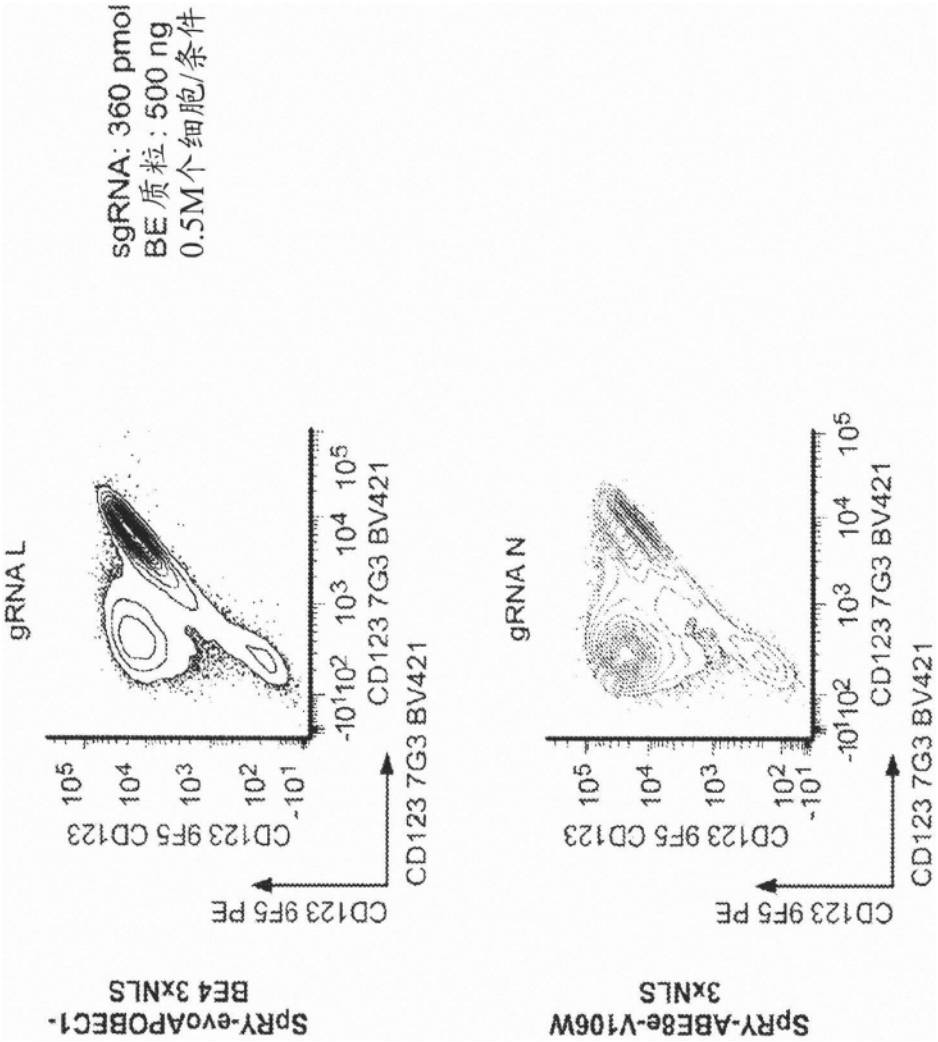

sgRNA: 360 pmol
BE 质粒：500 ng
0.5M个细胞/条件
gRNA L
gRNA N
CD123 9F5 CD123
CD123 9F5 PE
CD123 7G3 BV421
SpRY-evoAPOBEC1-BE4 3xNLS
SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS

图10B(续)

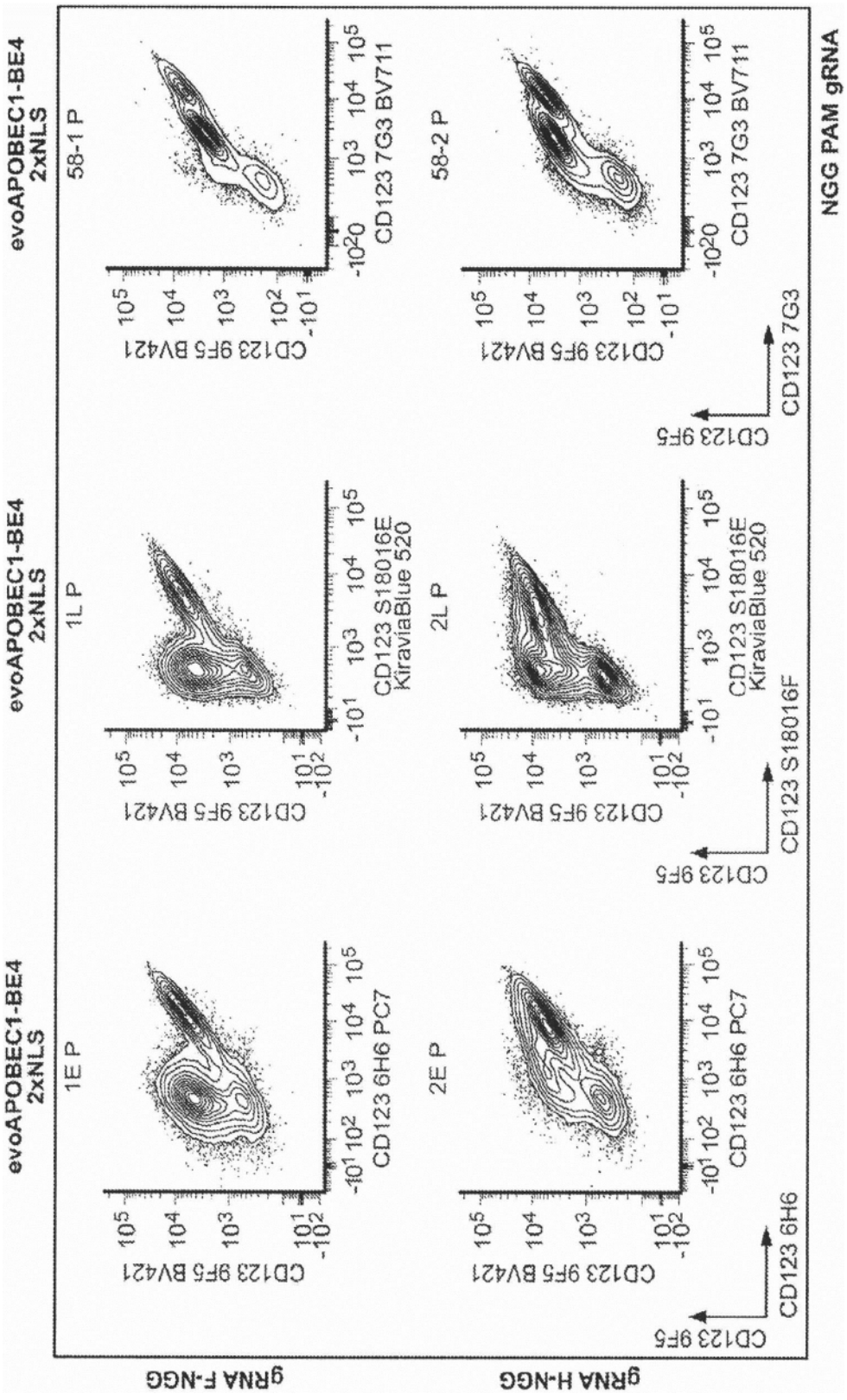

evoAPOBEC1-BE4 2xNLS
1E P
2E P
1L P
2L P
58-1 P
58-2 P
CD123 9F5 BV421
CD123 6H6 PC7
CD123 S18016E KiraviaBlue 520
CD123 7G3 BV711
CD123 S18016F
CD123 6H6
CD123 7G3
CD123 9F5
gRNA F-NGG
gRNA H-NGG
NGG PAM gRNA

图11

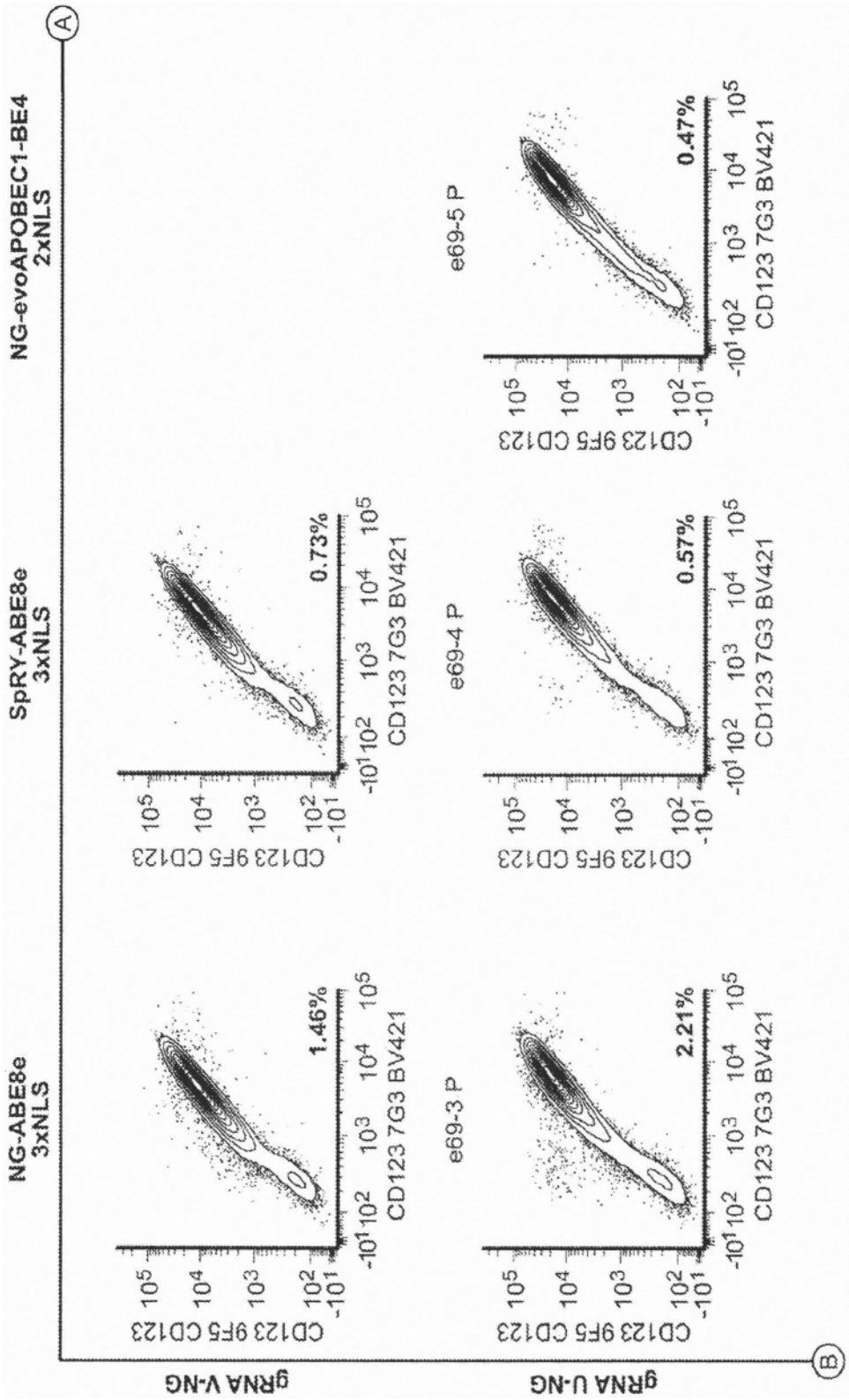

NG-ABE8e 3xNLS
SpRY-ABE8e 3xNLS
NG-evoAPOBEC1-BE4 2xNLS
gRNA V-NG
gRNA U-NG
e69-3 P
e69-4 P
e69-5 P
1.46%
0.73%
2.21%
0.57%
0.47%
CD123 9F5 CD123
CD123 7G3 BV421

图11(续)

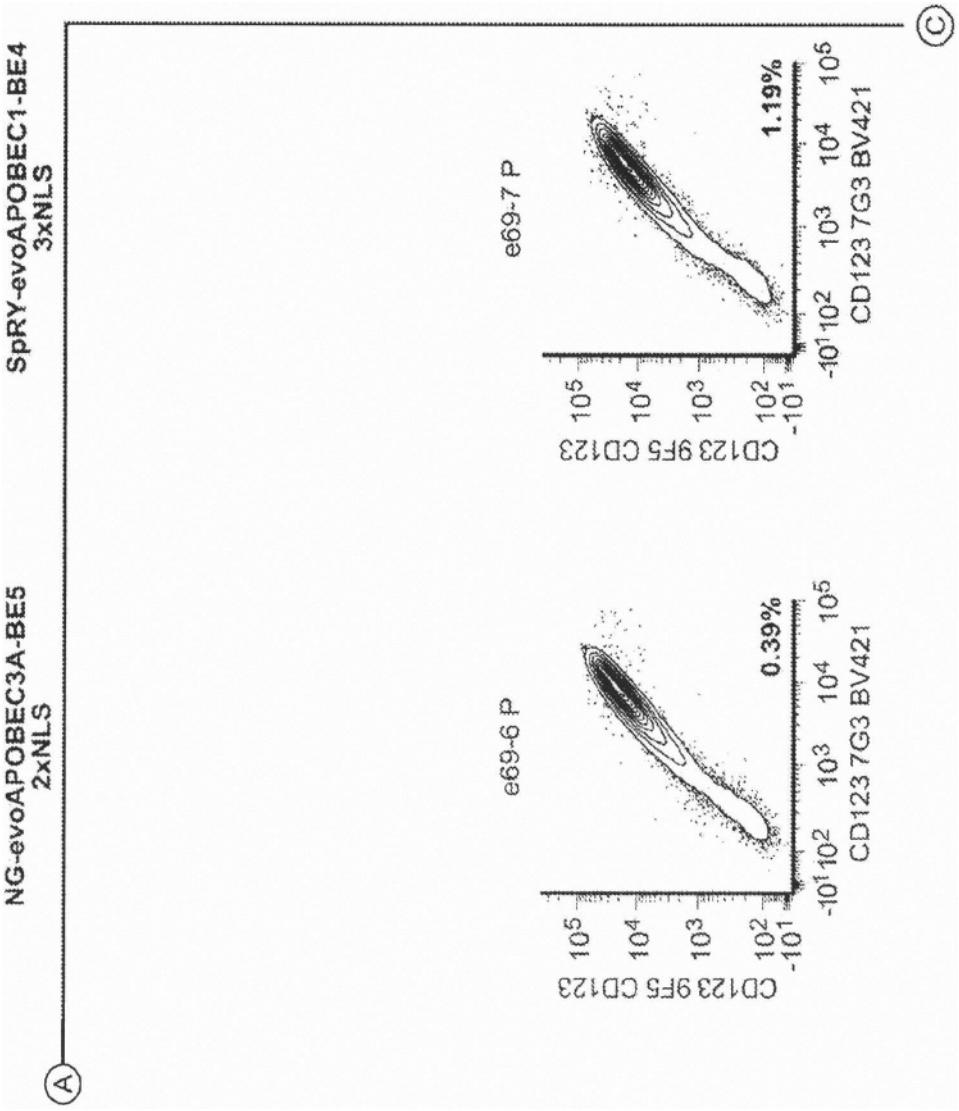

NG-evoAPOBEC3A-BE5
2xNLS
SpRY-evoAPOBEC1-BE4
3xNLS
A
C
e69-6 P
e69-7 P
0.39%
1.19%
CD123 9F5 CD123
CD123 7G3 BV421

图11(续)

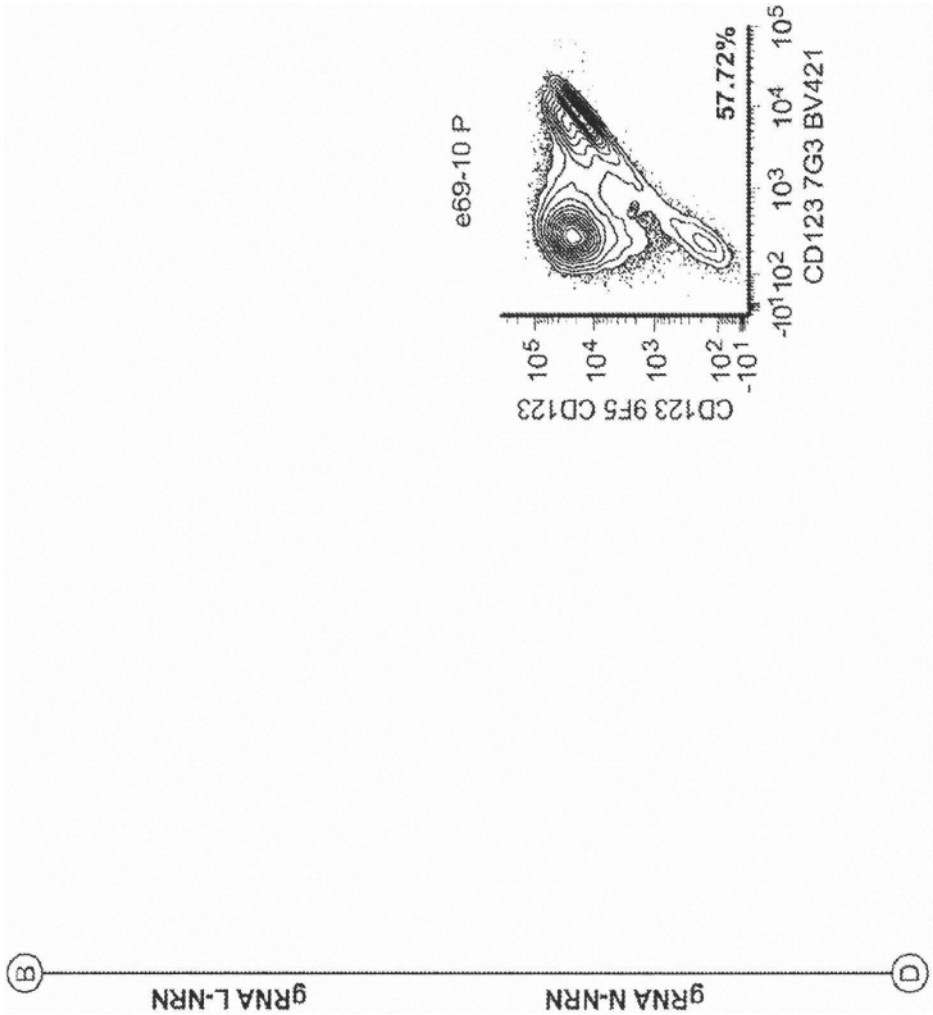

B
gRNA L-NRN
gRNA N-NRN
D
e69-10 P
57.72%
CD123 7G3 BV421
CD123 9F5 CD123

图11(续)

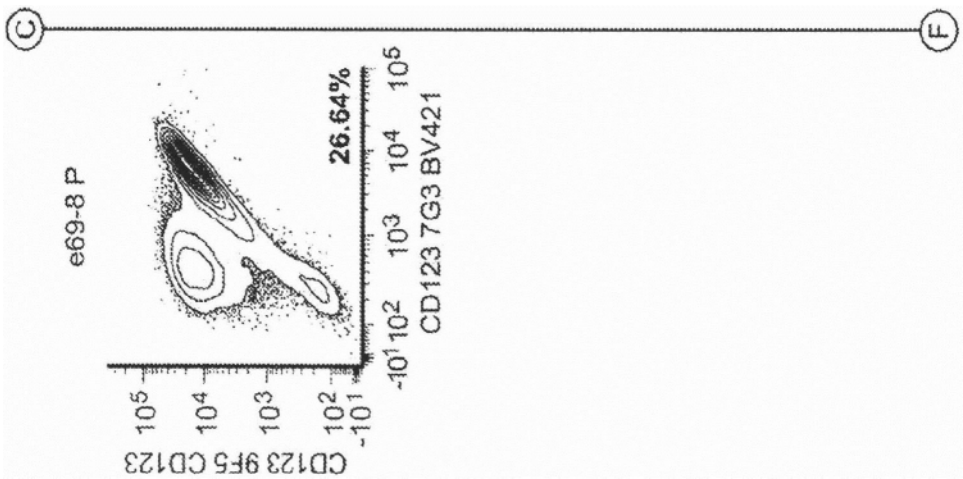

C
F
e69-8 P
26.64%
CD123 7G3 BV421
CD123 9F5 CD123

图11(续)

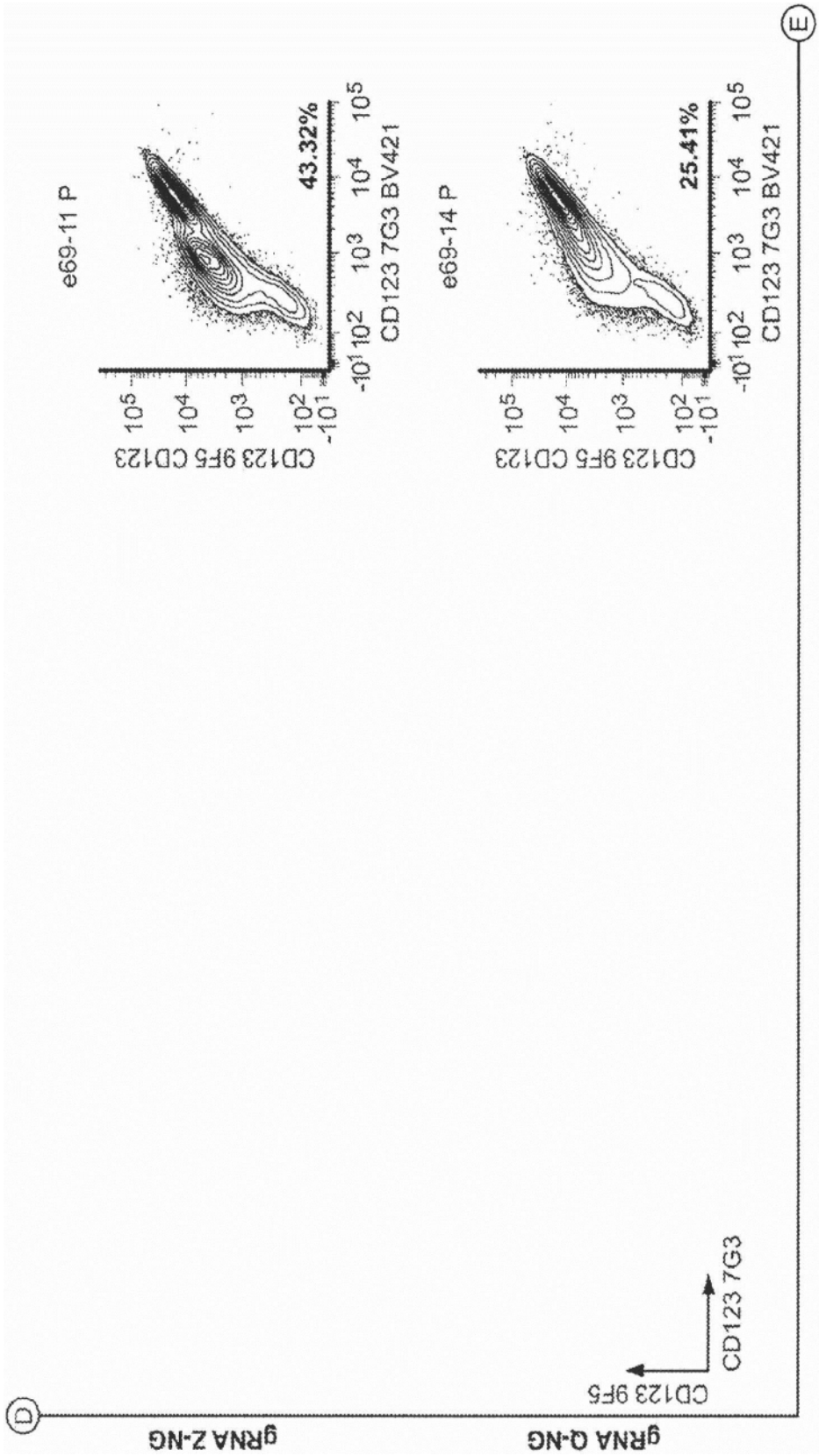

E
D
gRNA Q-NG
gRNA Z-NG
CD123 9F5
CD123 7G3
e69-14 P
25.41%
e69-11 P
43.32%
CD123 9F5 CD123
CD123 7G3 BV421

图11(续)

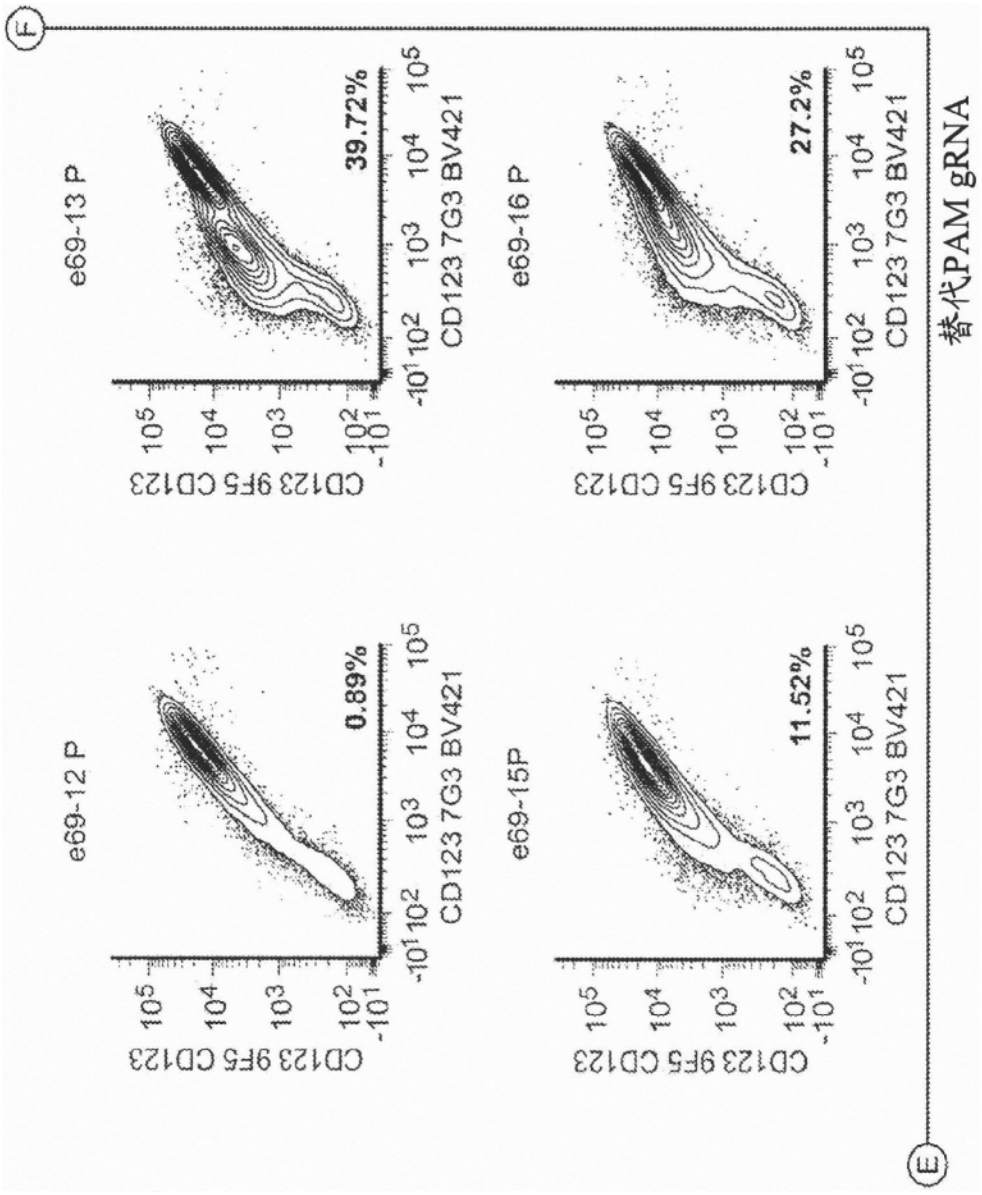

F
e69-13 P
39.72%
e69-16 P
27.2%
e69-12 P
0.89%
e69-15P
11.52%
CD123 9F5 CD123
CD123 7G3 BV421
E
替代PAM gRNA

图11(续)

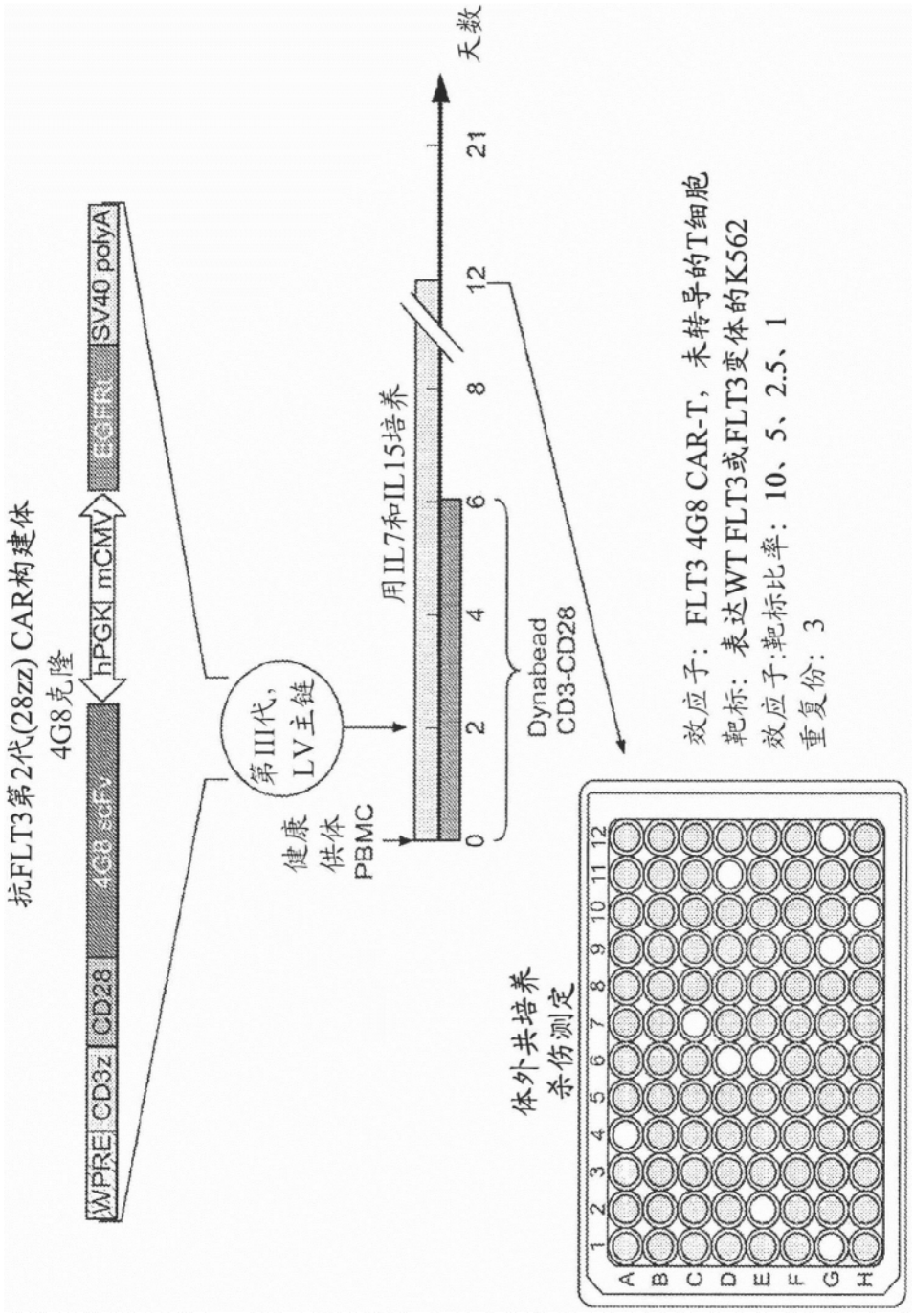

抗FLT3第2代(28zz) CAR构建体
4G8克隆
WPRE
CD3z
CD28
4G8 scFv
hPGK
mCMV
EGFRt
SV40 polyA
第III代，
LV主链
健康
供体
PBMC
用IL7和IL15培养
0
2
4
6
8
12
21
天数
Dynabead
CD3-CD28
效应子：FLT3 4G8 CAR-T，未转导的T细胞
靶标：表达WT FLT3或FLT3变体的K562
效应子:靶标比率：10、5、2.5、1
重复份：3
体外共培养
杀伤测定
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
A
B
C
D
E
F
G
H

图12A

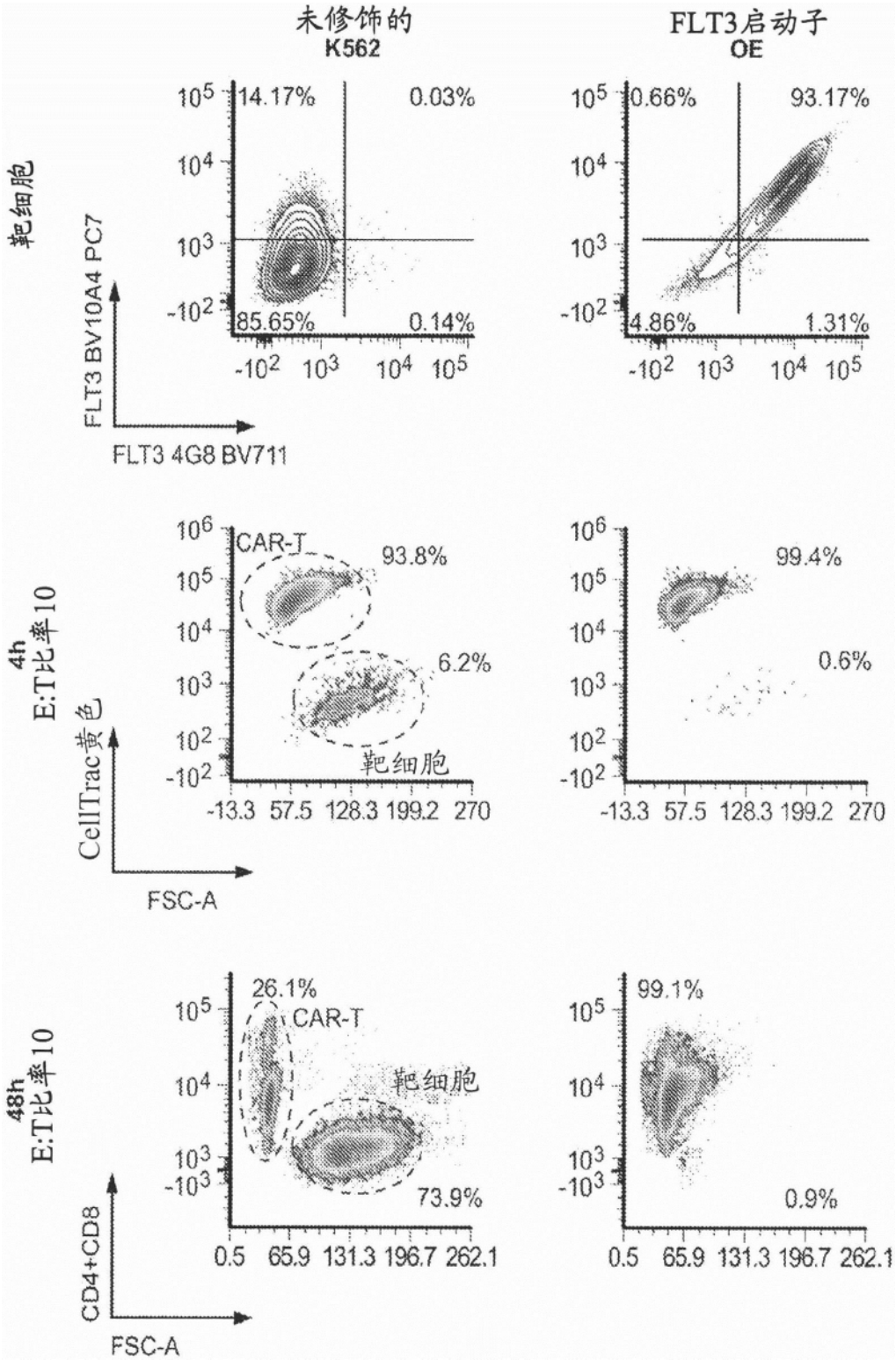

未修饰的
K562
FLT3启动子
OE
靶细胞
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
14.17%
0.03%
85.65%
0.14%
0.66%
93.17%
4.86%
1.31%
4h
E:T比率10
CellTrac黄色
FSC-A
CAR-T
93.8%
6.2%
靶细胞
99.4%
0.6%
48h
E:T比率10
CD4+CD8
26.1%
CAR-T
靶细胞
73.9%
99.1%
0.9%

图12B

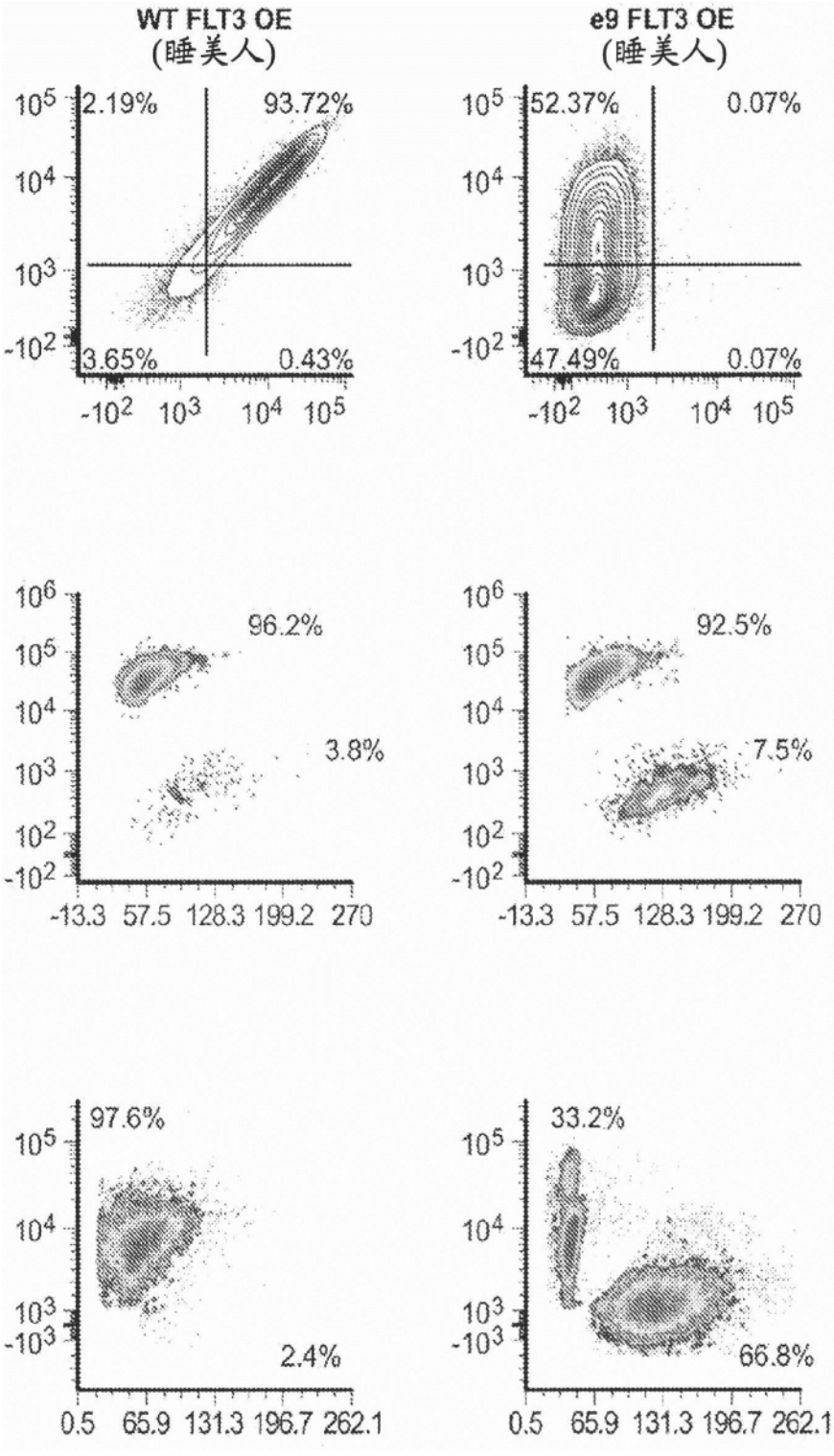

WT FLT3 OE
(睡美人)
e9 FLT3 OE
(睡美人)
2.19%
93.72%
3.65%
0.43%
52.37%
0.07%
47.49%
0.07%
96.2%
3.8%
92.5%
7.5%
97.6%
2.4%
33.2%
66.8%

图12B(续)

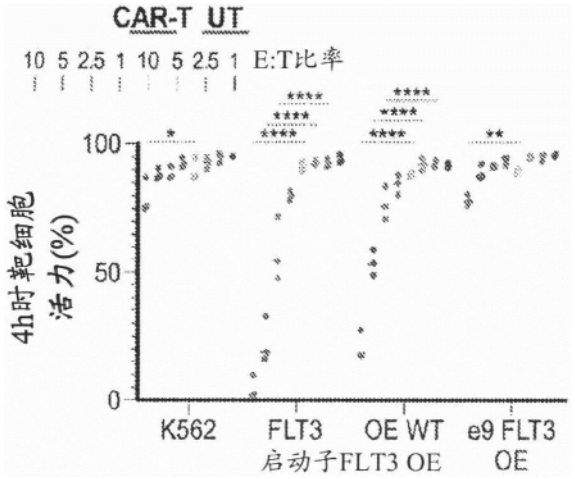


图12C

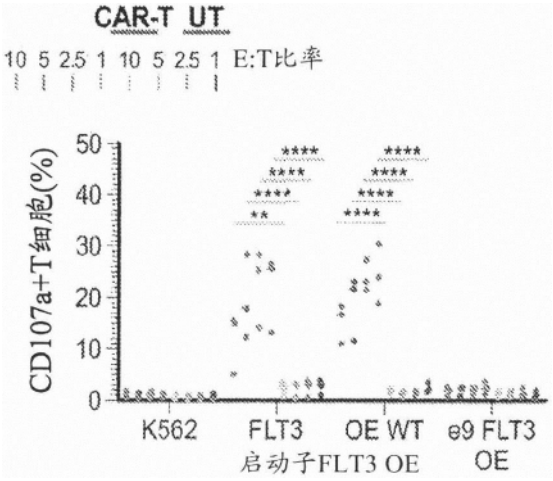


图12D

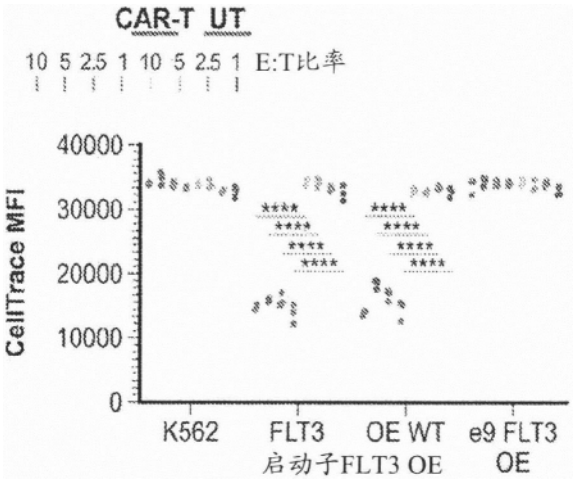


图12E

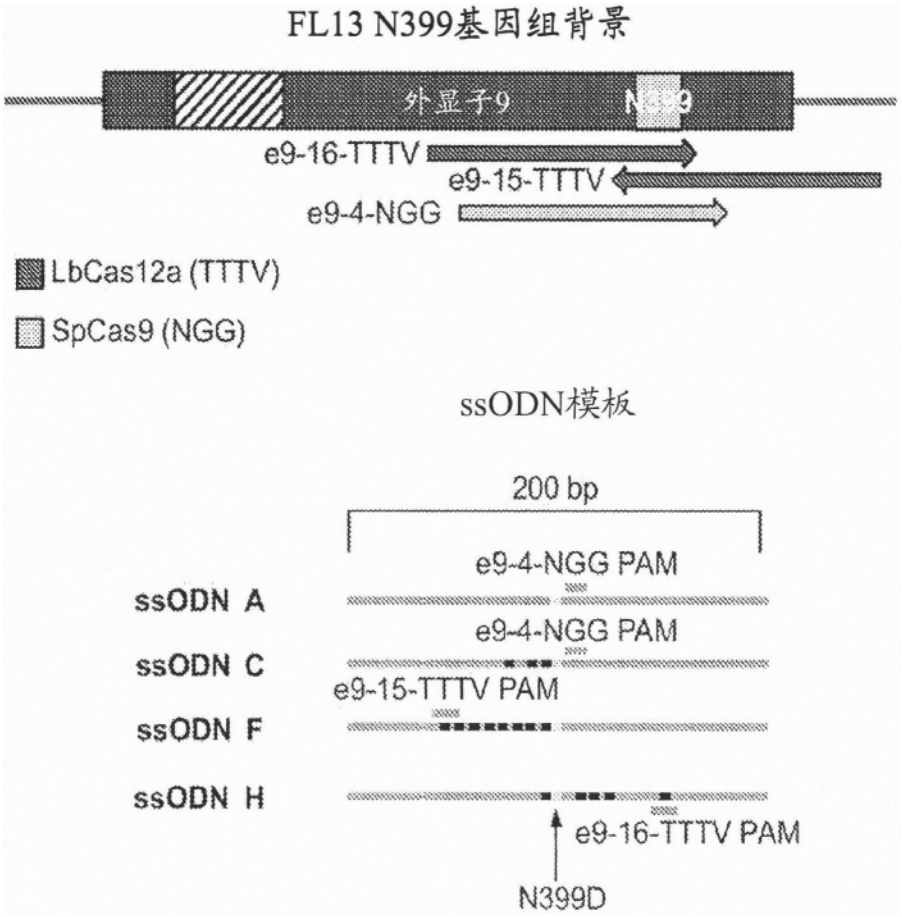

FL13 N399基因组背景
外显子9
e9-16-TTTV
e9-15-TTTV
e9-4-NGG
LbCas12a (TTTV)
SpCas9 (NGG)
ssODN模板
200 bp
e9-4-NGG PAM
ssODN A
e9-4-NGG PAM
ssODN C
e9-15-TTTV PAM
ssODN F
ssODN H
e9-16-TTTV PAM
N399D

图13A

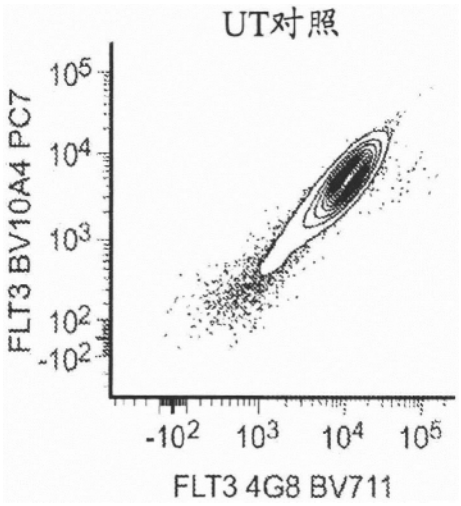

UT对照
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711

图13B

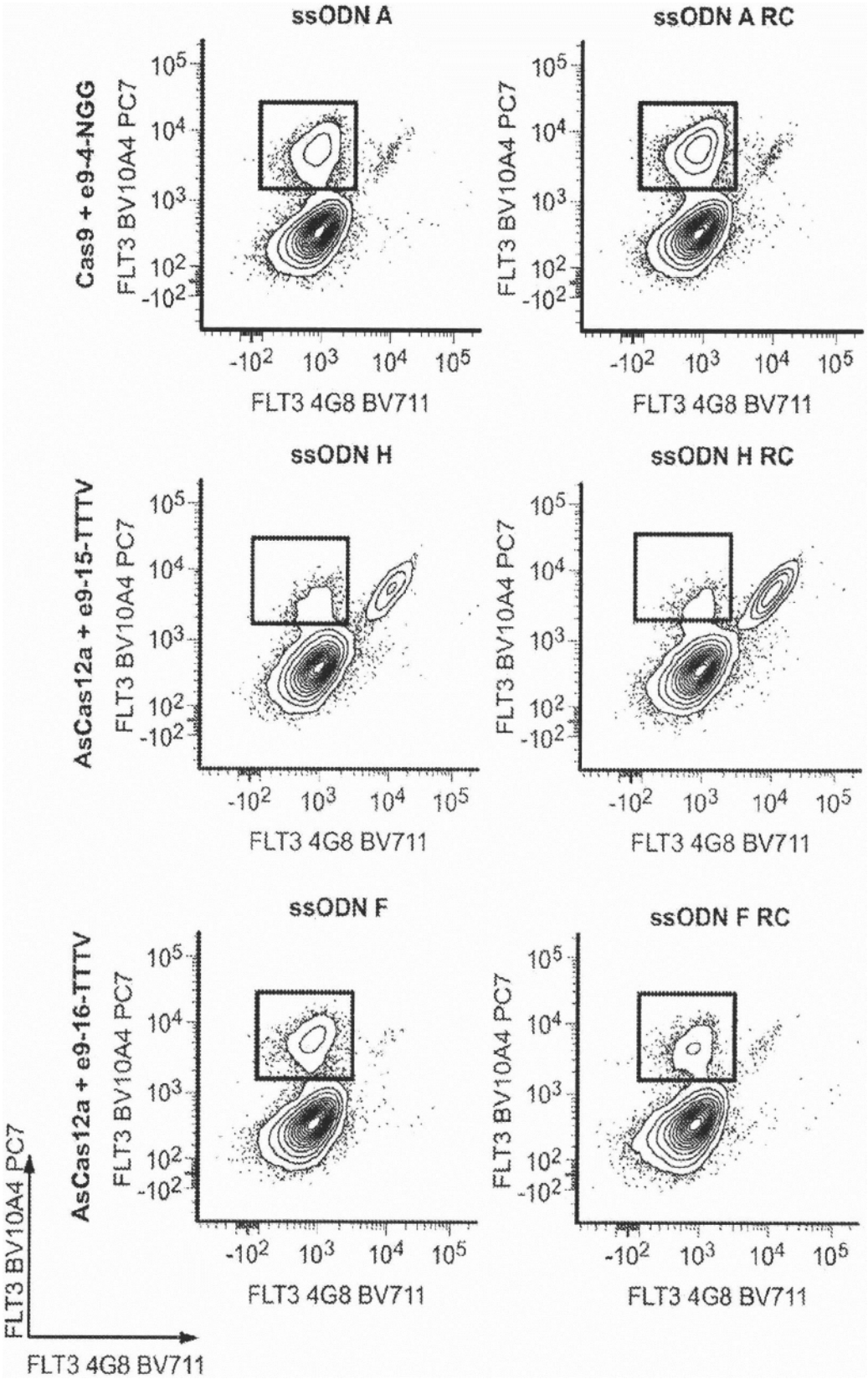

ssODN A
ssODN A RC
Cas9 + e9-4-NGG
AsCas12a + e9-15-TTTV
AsCas12a + e9-16-TTTV
ssODN H
ssODN H RC
ssODN F
ssODN F RC
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
10^5
10^4
10^3
10^2
-10^2

图13B(续)

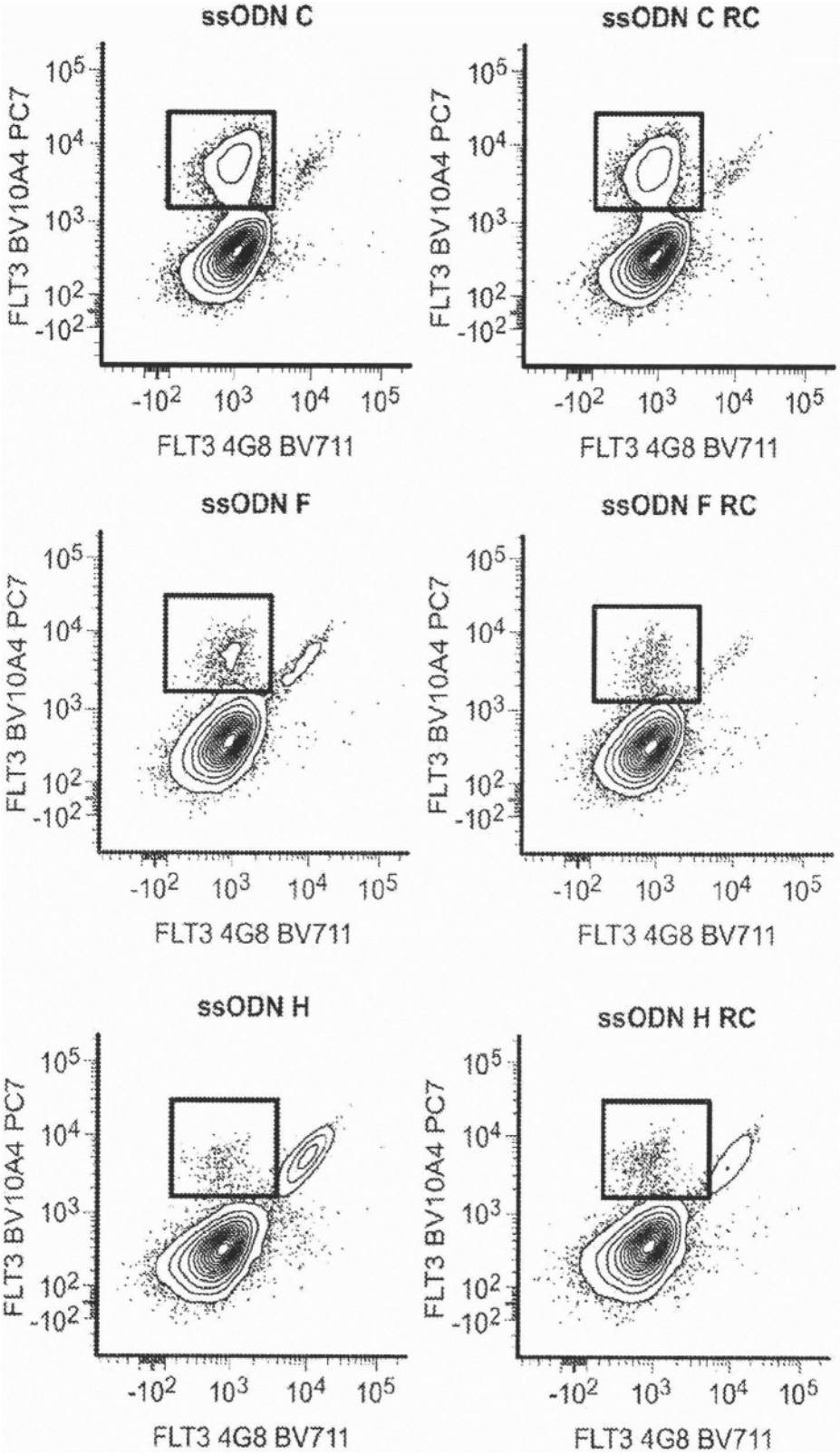

ssODN C
ssODN C RC
ssODN F
ssODN F RC
ssODN H
ssODN H RC
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
10^5
10^4
10^3
10^2
-10^2

图13B(续)

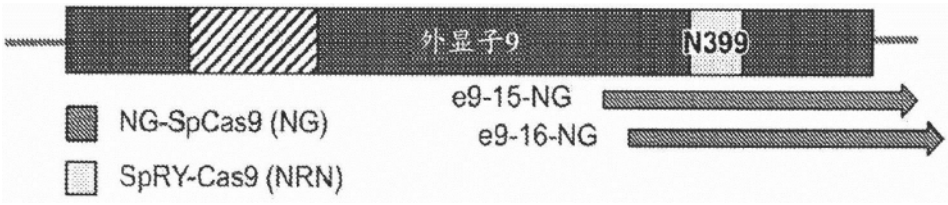


图14A



图14B

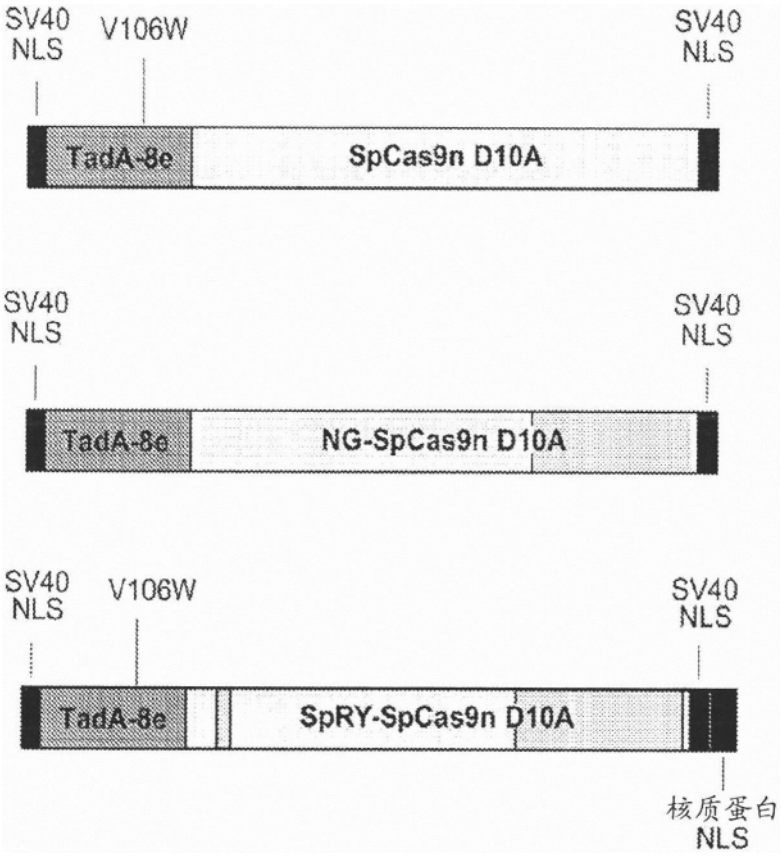


图14C

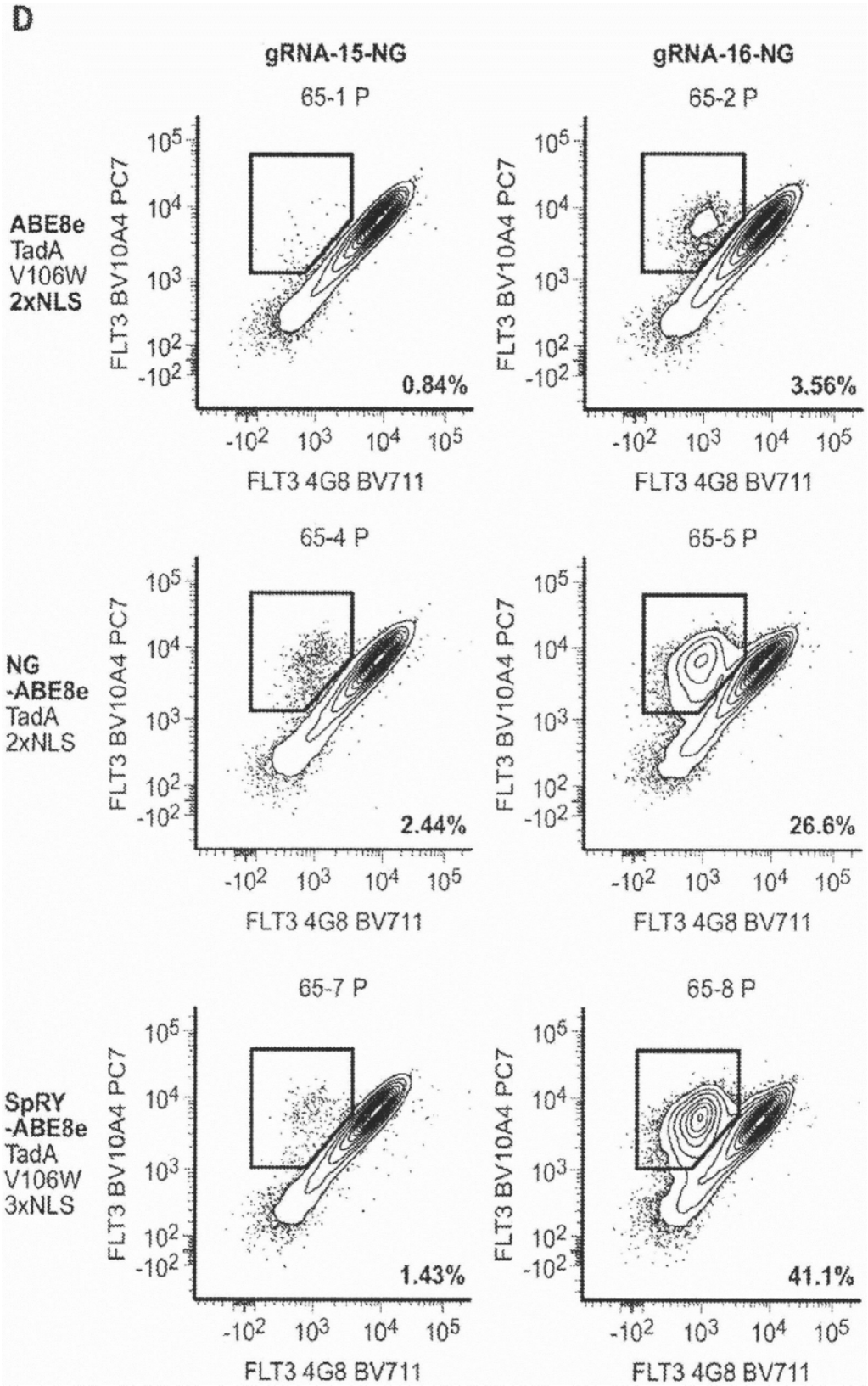

D
gRNA-15-NG
gRNA-16-NG
65-1 P
65-2 P
65-4 P
65-5 P
65-7 P
65-8 P
ABE8e
TadA
V106W
2xNLS
NG
-ABE8e
TadA
2xNLS
SpRY
-ABE8e
TadA
V106W
3xNLS
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
0.84%
3.56%
2.44%
26.6%
1.43%
41.1%

图14D

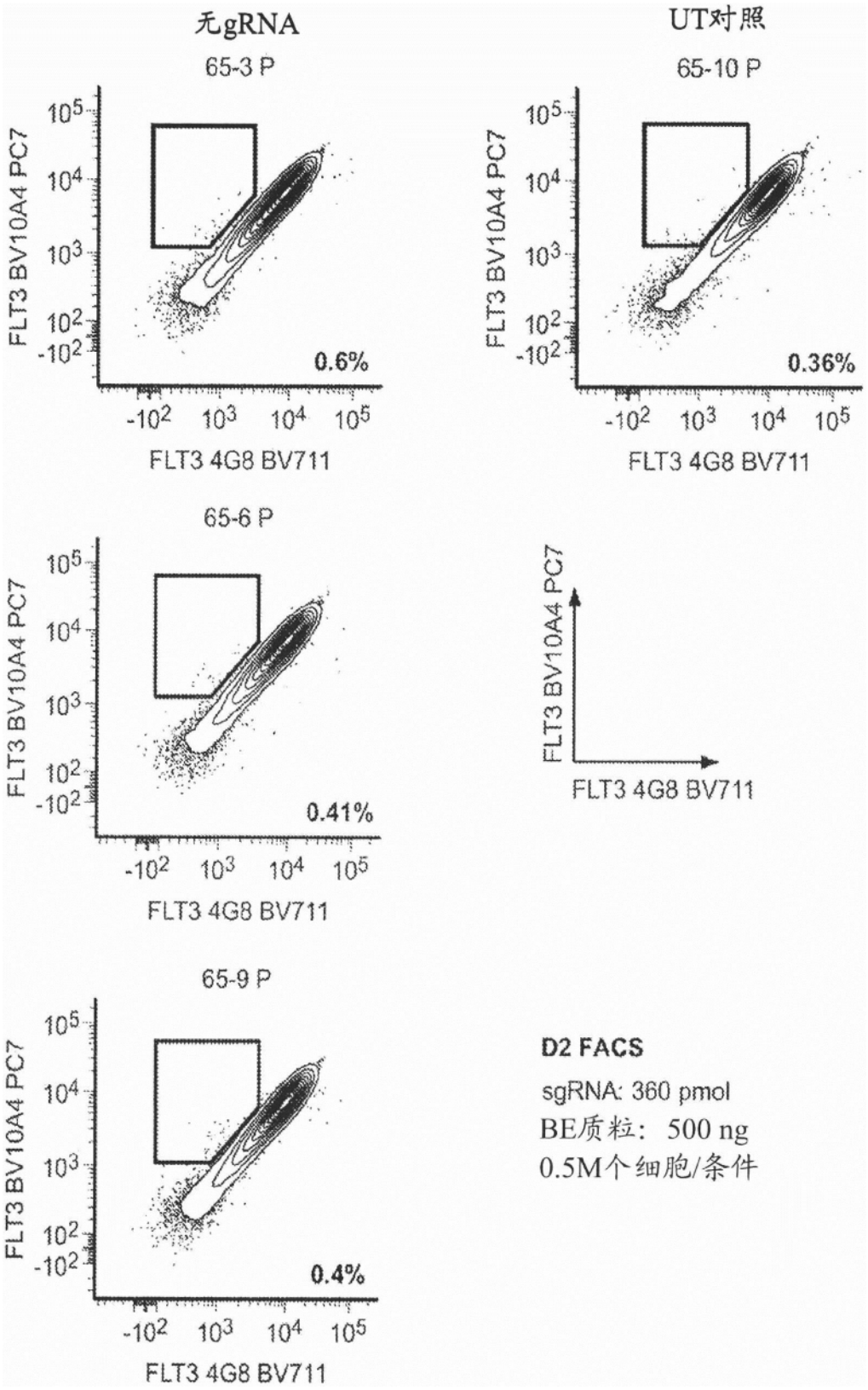

无gRNA
65-3 P
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
0.6%
UT对照
65-10 P
0.36%
65-6 P
0.41%
65-9 P
0.4%
D2 FACS
sgRNA: 360 pmol
BE质粒： 500 ng
0.5M个细胞/条件

图14D(续)

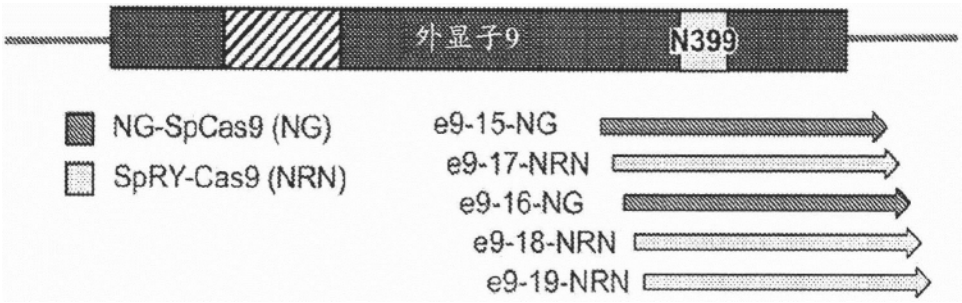

外显子9
N399
NG-SpCas9 (NG)
SpRY-Cas9 (NRN)
e9-15-NG
e9-17-NRN
e9-16-NG
e9-18-NRN
e9-19-NRN

图15A

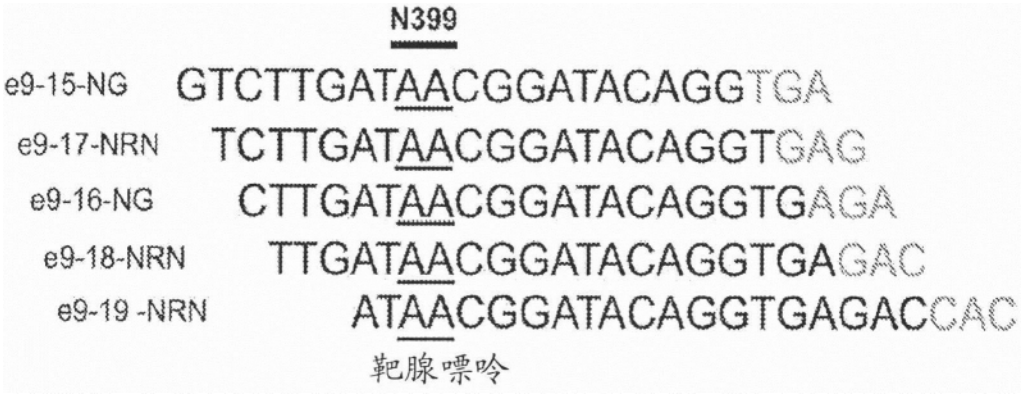

N399
e9-15-NG GTCTTGATAACGGATACAGGTGA
e9-17-NRN TCTTGATAACGGATACAGGTGAG
e9-16-NG CTTGATAACGGATACAGGTGAGA
e9-18-NRN TTGATAACGGATACAGGTGAGAC
e9-19 -NRN ATAACGGATACAGGTGAGACCAC
靶腺嘌呤

图15B

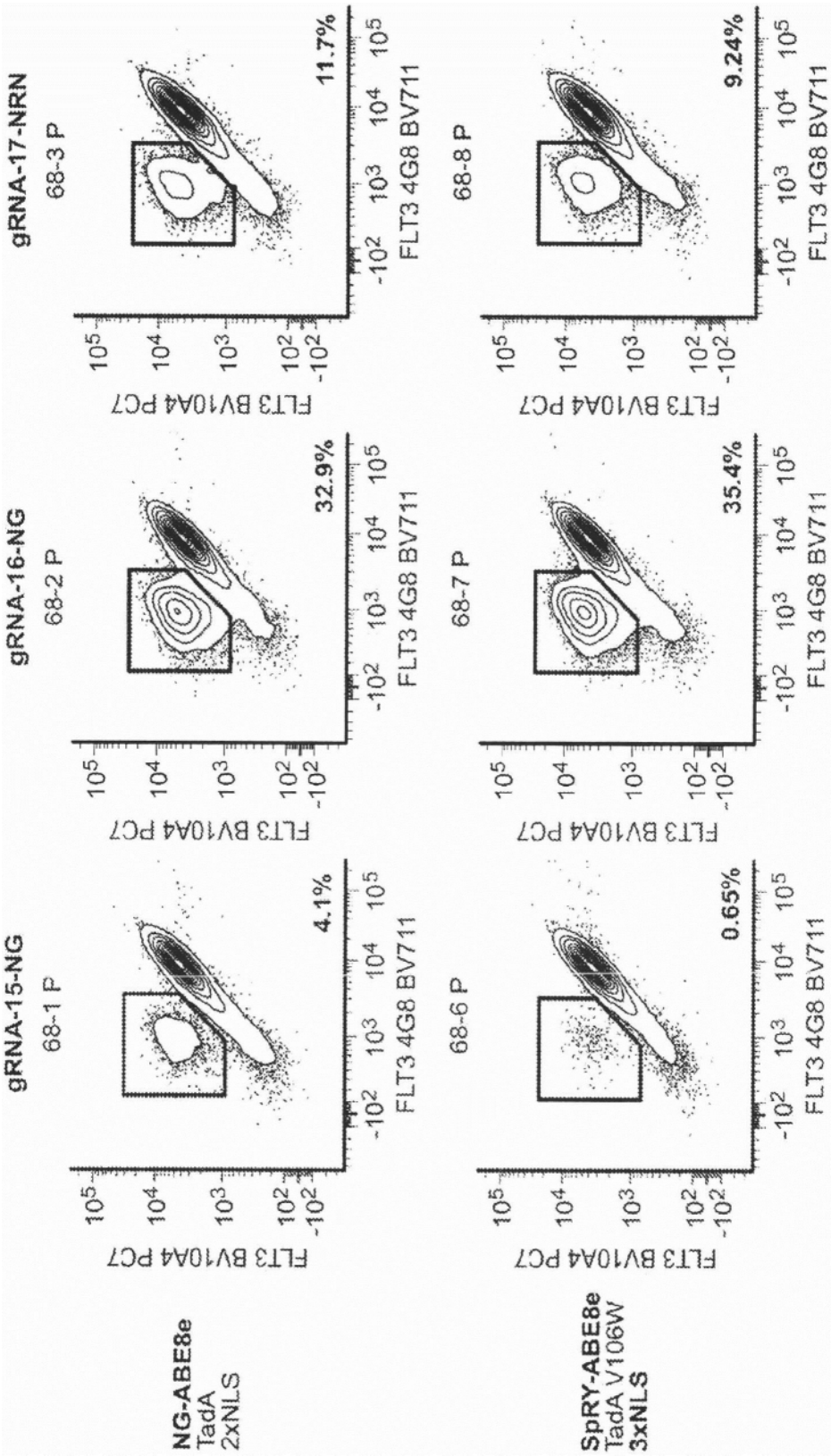

gRNA-15-NG
68-1 P
4.1%
gRNA-16-NG
68-2 P
32.9%
gRNA-17-NRN
68-3 P
11.7%
68-6 P
0.65%
68-7 P
35.4%
68-8 P
9.24%
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
NG-ABE8e
TadA
2xNLS
SpRY-ABE8e
TadA V106W
3xNLS

图15C

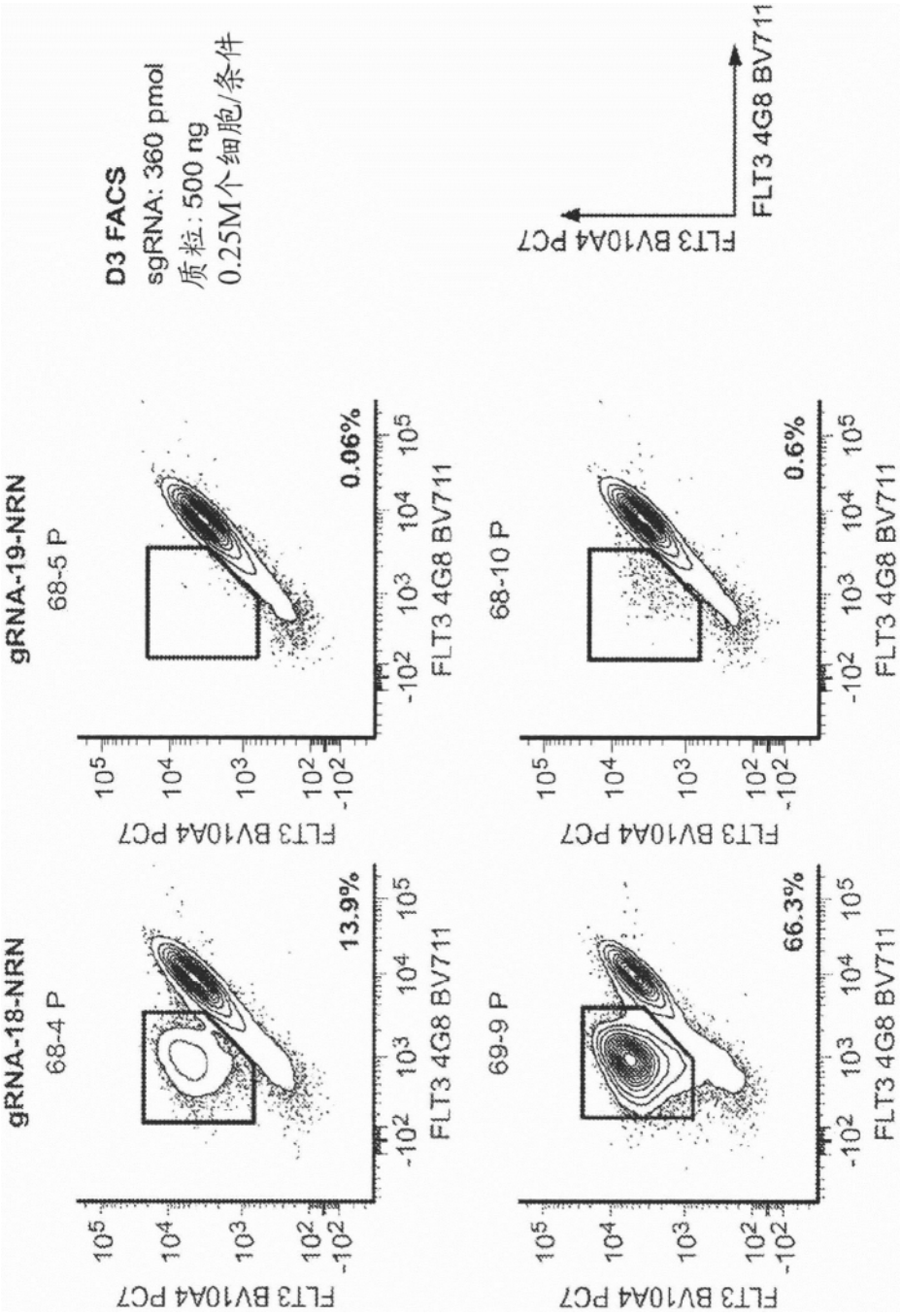

D3 FACS
sgRNA: 360 pmol
质粒: 500 ng
0.25M个细胞/条件
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
gRNA-19-NRN
68-5 P
0.06%
68-10 P
0.6%
gRNA-18-NRN
68-4 P
13.9%
69-9 P
66.3%

图15C(续)

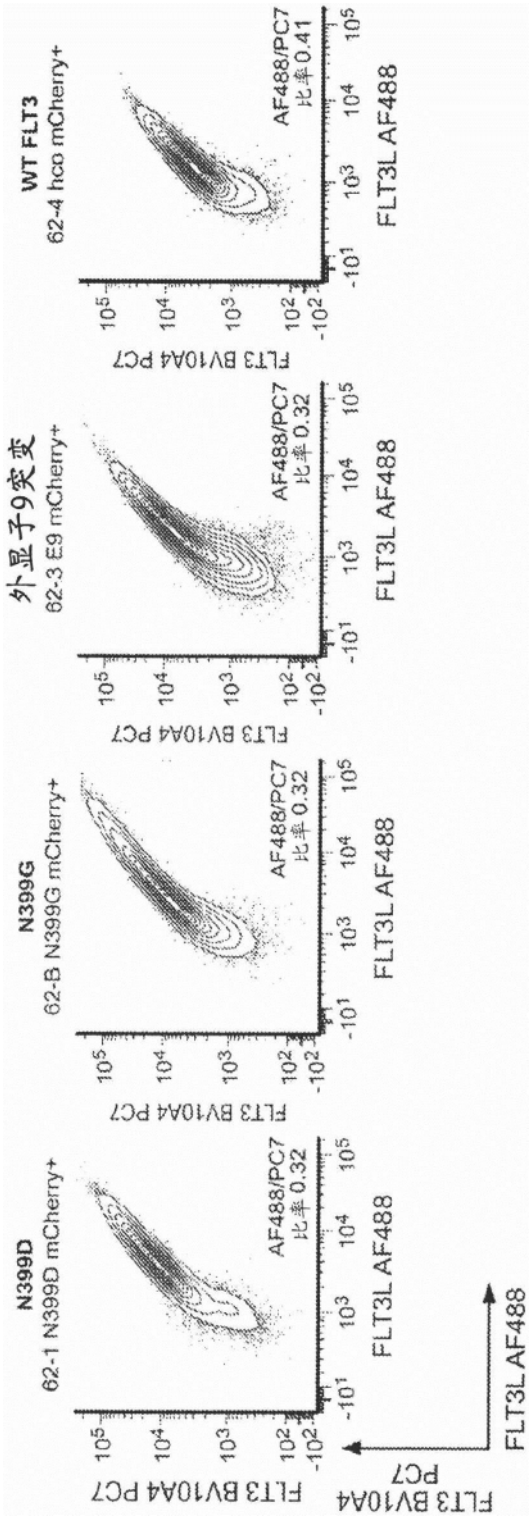

WT FLT3
62-4 hco mCherry+
AF488/PC7
比率0.41
外显子9突变
62-3 E9 mCherry+
AF488/PC7
比率0.32
N399G
62-8 N399G mCherry+
AF488/PC7
比率0.32
N399D
62-1 N399D mCherry+
AF488/PC7
比率0.32
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3L AF488

图16A

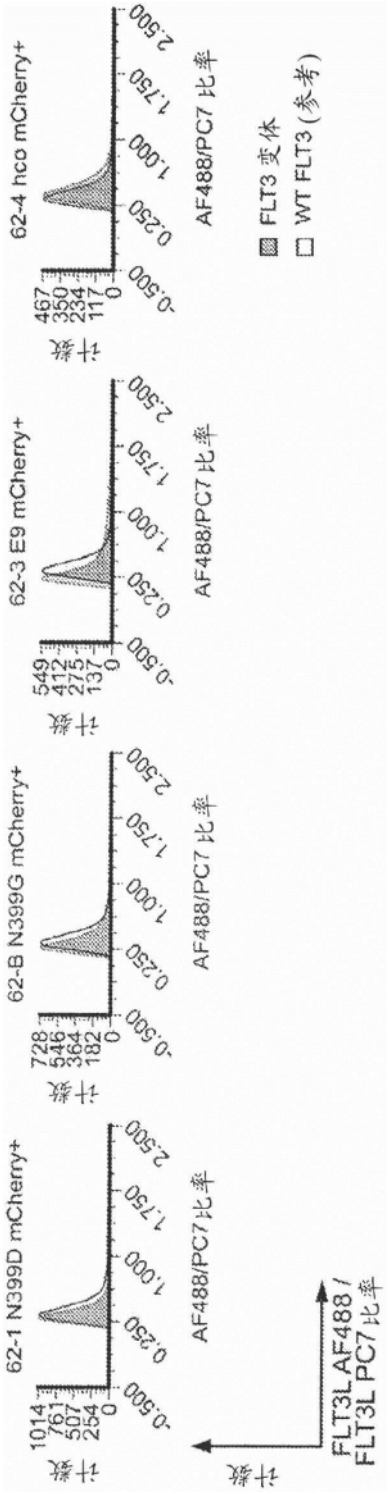

62-1 N399D mCherry+
62-B N399G mCherry+
62-3 E9 mCherry+
62-4 hcb mCherry+
计数
AF488/PC7 比率
FLT3 变体
WT FLT3 (参考)
FLT3L AF488 / FLT3L PC7 比率

图16B

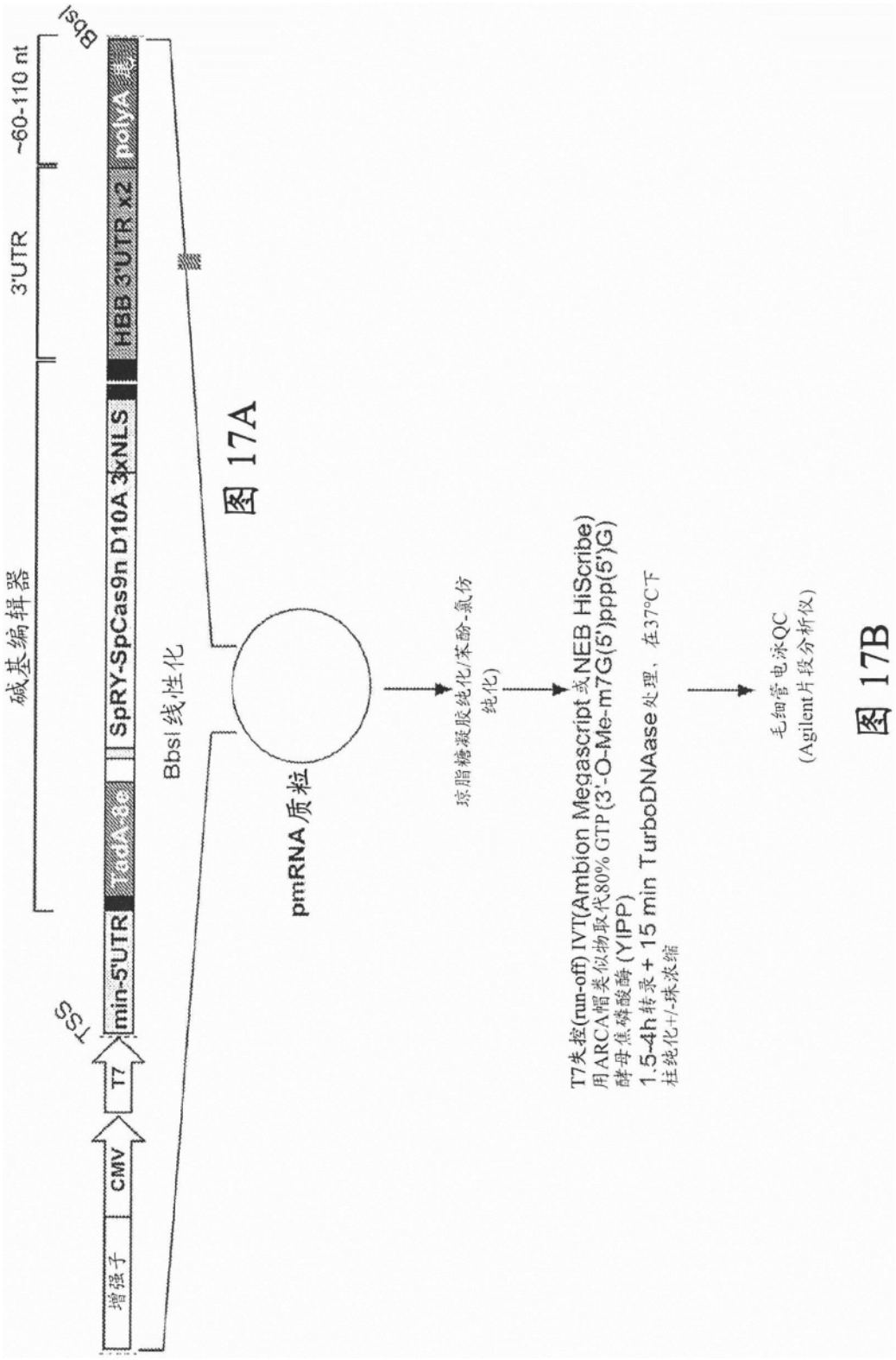

增强子
CMV
T7
TSS
min-5'UTR
TEV A-tag
SpRY-SpCas9n D10A 3xNLS
HBB 3'UTR x2
polyA 尾
BbsI
~60-110 nt
3'UTR
碱基编辑器
Bbsl 线性化
pmRNA 质粒
琼脂糖凝胶纯化/苯酚-氯仿纯化)
T7失控(run-off) IVT(Ambion Megascript 或NEB HiScribe)
用ARCA帽类似物取代80% GTP (3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G)
酵母焦磷酸酶 (YIPP)
1.5-4h转录 + 15 min TurboDNAase处理，在37°C下
柱纯化+/-珠浓缩
毛细管电泳QC
(Agilent片段分析仪)

图 17A

图 17B

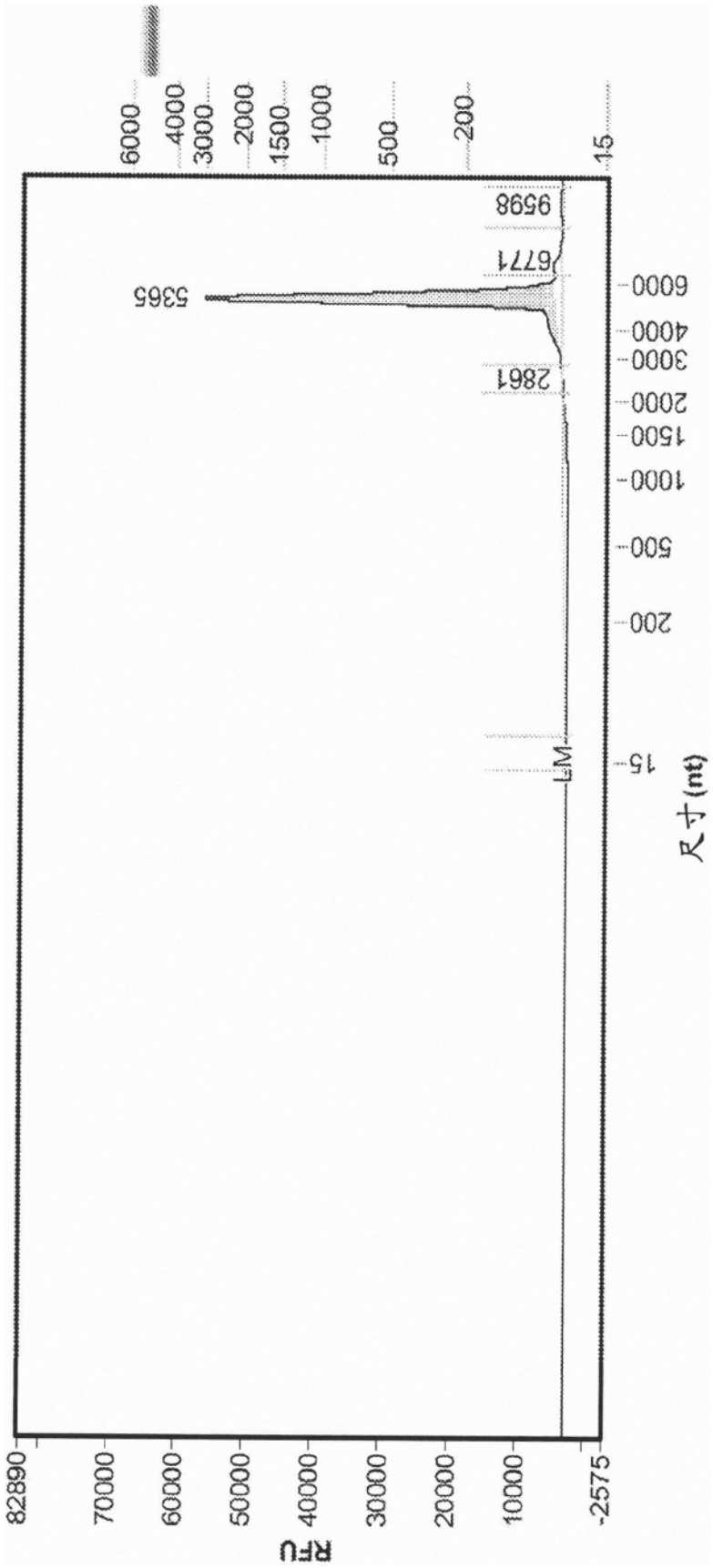

6000
4000
3000
2000
1500
1000
500
200
15
9598
6771
5365
2861
LM
尺寸(nt)
RFU
82890
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
-2575

图17C

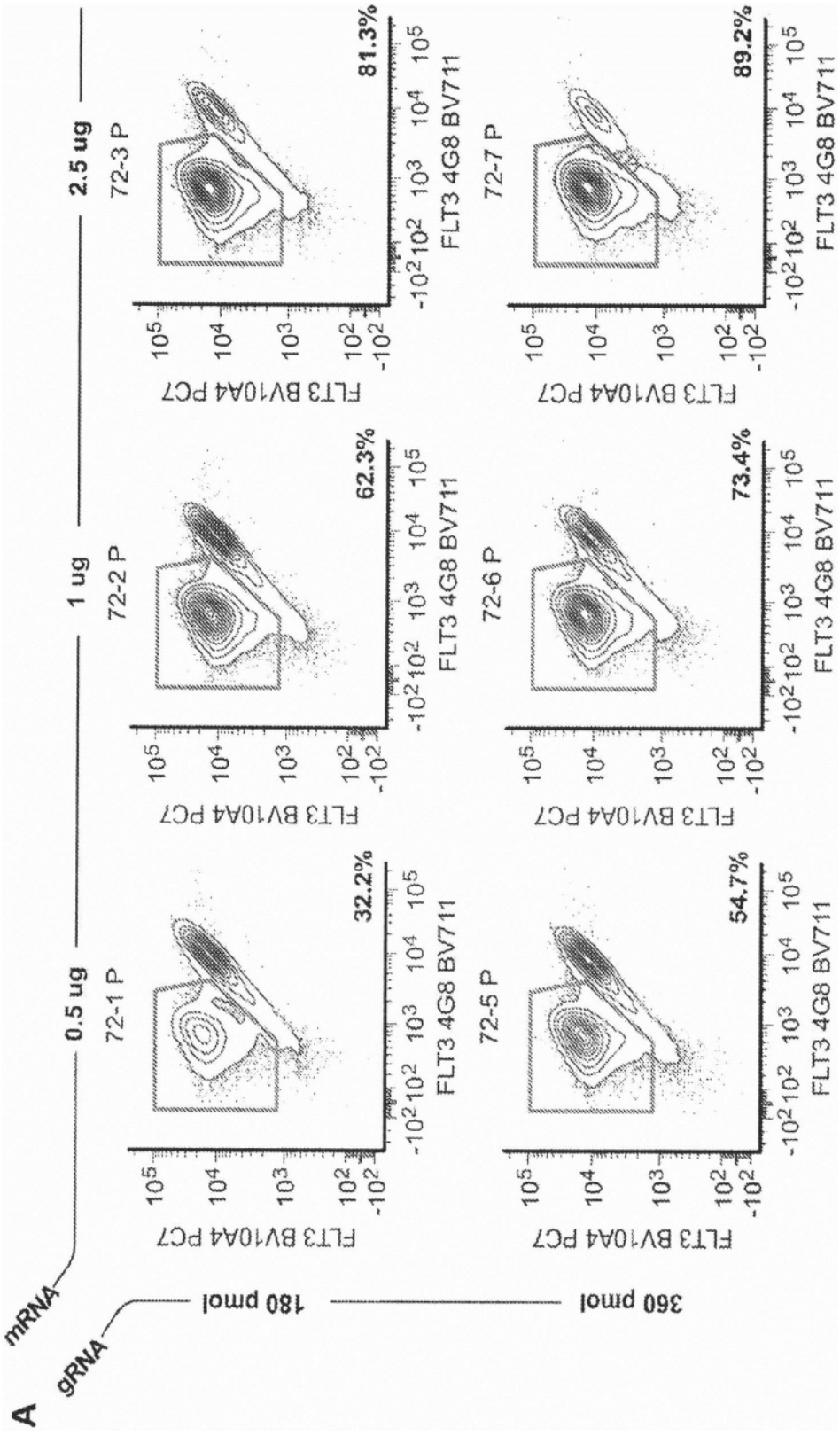

A
gRNA
mRNA
180 pmol
360 pmol
0.5 ug
1 ug
2.5 ug
72-1 P
72-2 P
72-3 P
72-5 P
72-6 P
72-7 P
32.2%
62.3%
81.3%
54.7%
73.4%
89.2%
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711

图18

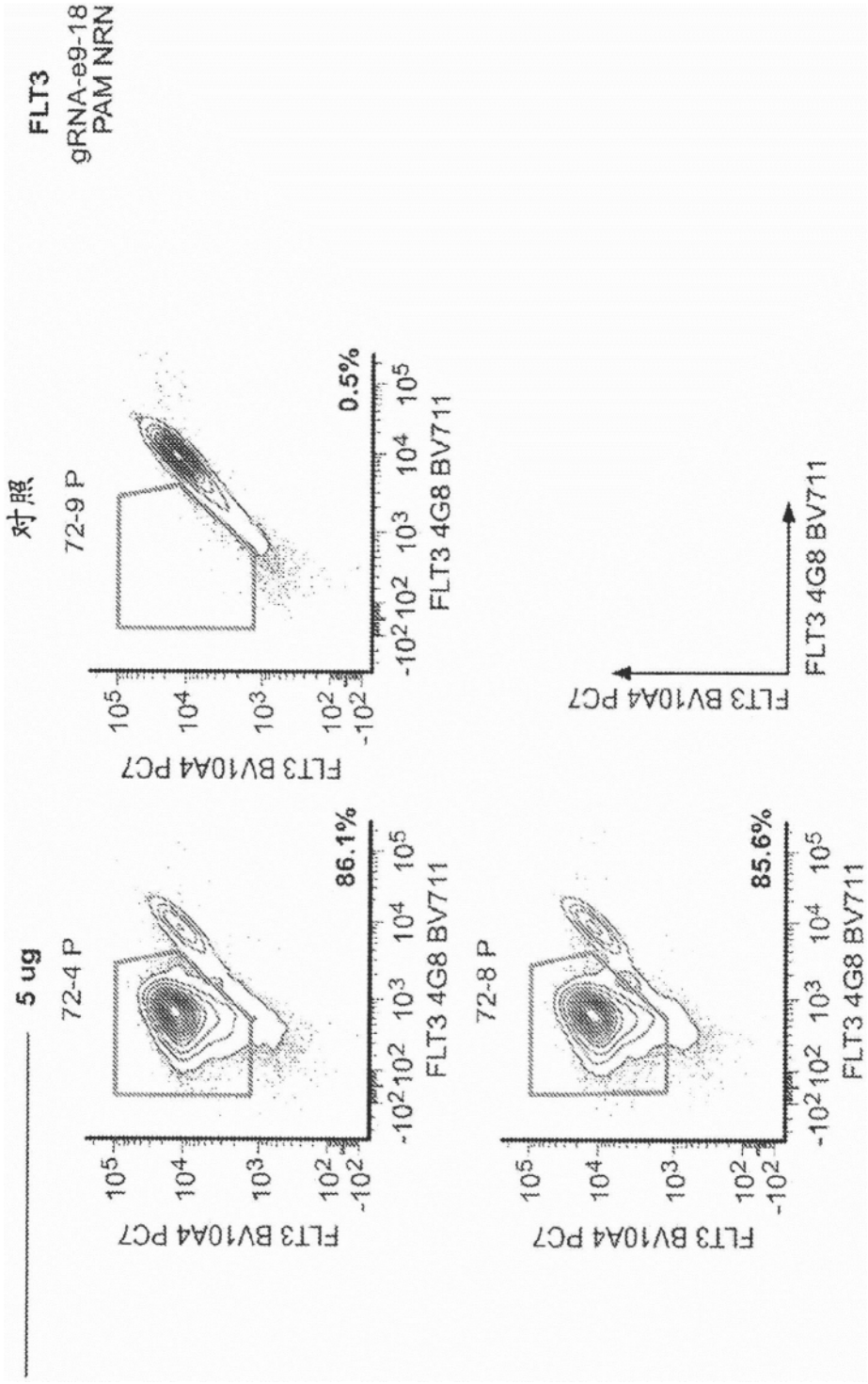

FLT3
gRNA-e9-18
PAM NRN
对照
72-9 P
0.5%
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
5 ug
72-4 P
86.1%
72-8 P
85.6%

图18(续)

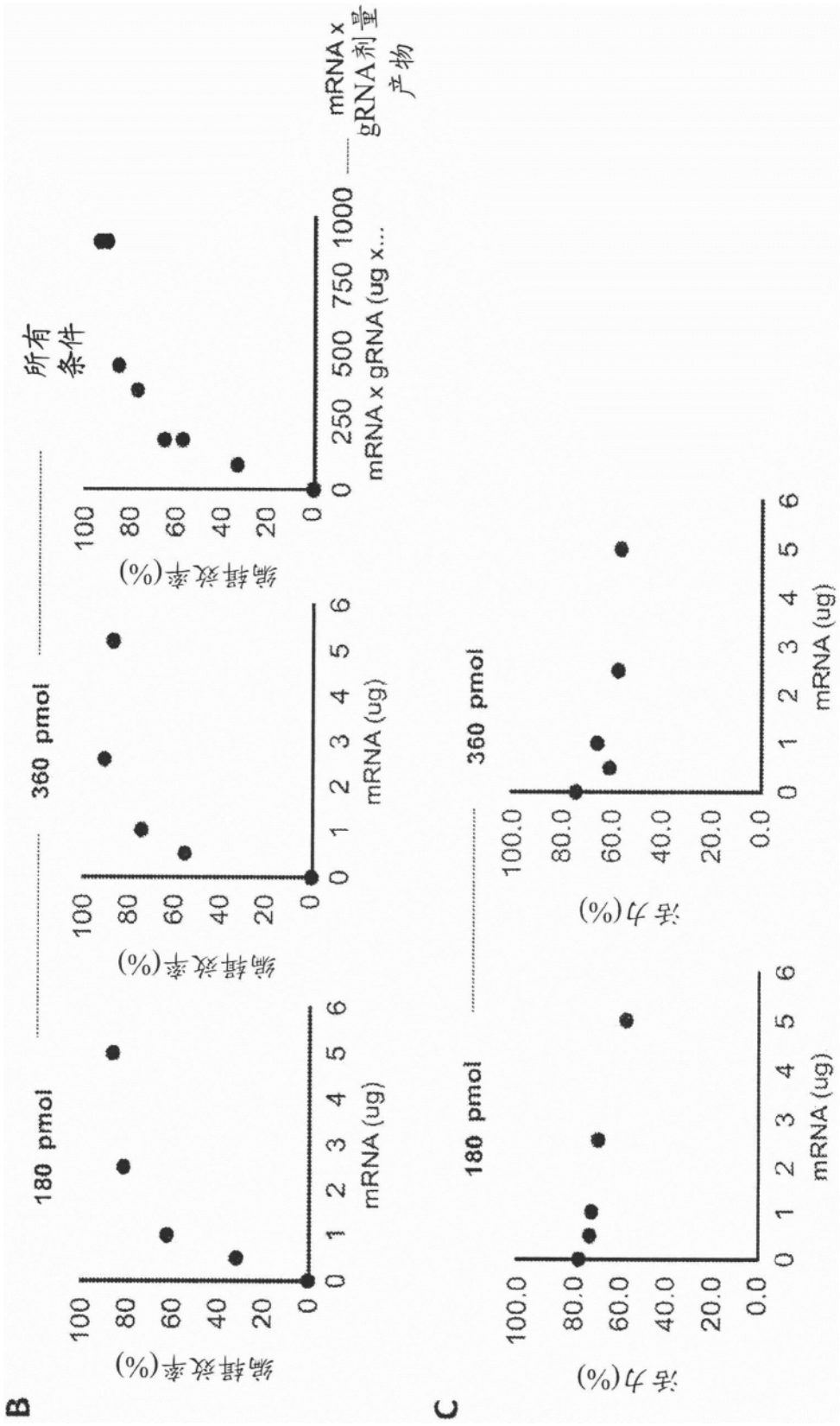

B
180 pmol
360 pmol
所有条件
编辑效率(%)
mRNA (ug)
mRNA x gRNA (ug x...
mRNA x gRNA剂量产物
C
活力(%)

图18(续)

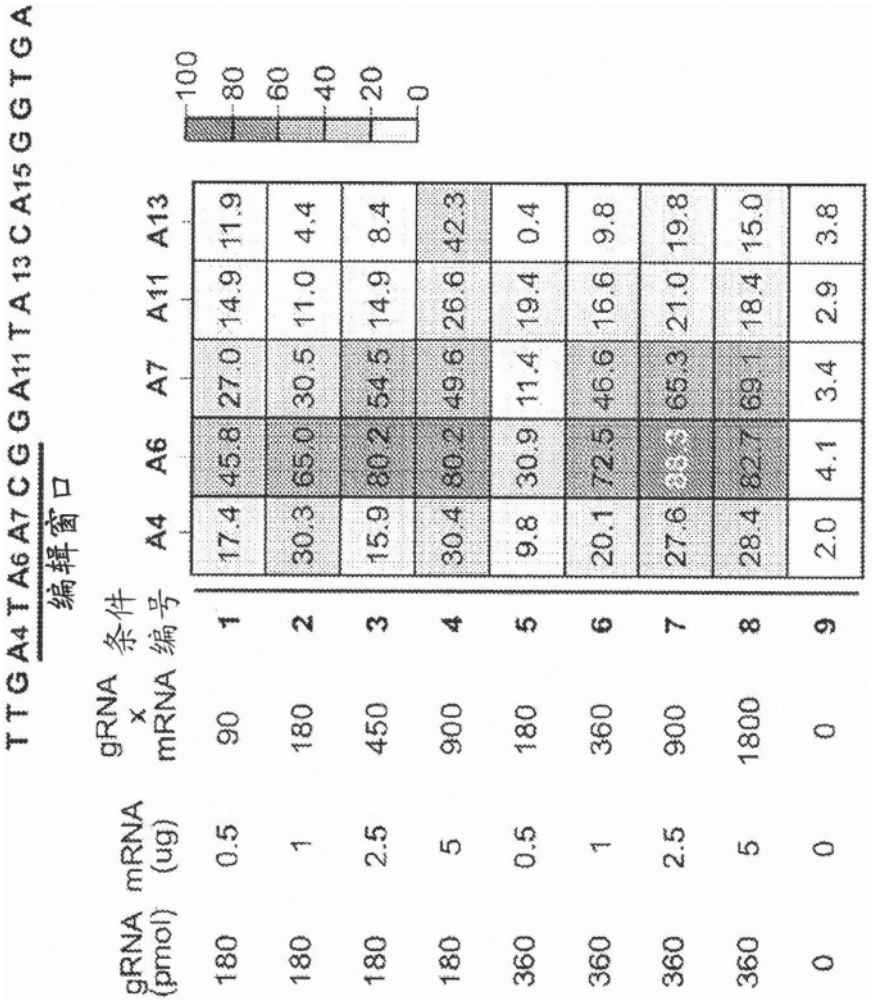

T T G A4 T A6 A7 C G G A11 T A 13 C A15 G G T G A
编辑窗口
gRNA (pmol)
mRNA (ug)
gRNA x mRNA
条件编号
A4
A6
A7
A11
A13
100
80
60
40
20
0
180 0.5 90 1 17.4 45.8 27.0 14.9 11.9
180 1 180 2 30.3 65.0 30.5 11.0 4.4
180 2.5 450 3 15.9 80.2 54.5 14.9 8.4
180 5 900 4 30.4 80.2 49.6 26.6 42.3
360 0.5 180 5 9.8 30.9 11.4 19.4 0.4
360 1 360 6 20.1 72.5 46.6 16.6 9.8
360 2.5 900 7 27.6 88.3 65.3 21.0 19.8
360 5 1800 8 28.4 82.7 69.1 18.4 15.0
0 0 0 9 2.0 4.1 3.4 2.9 3.8

图19A

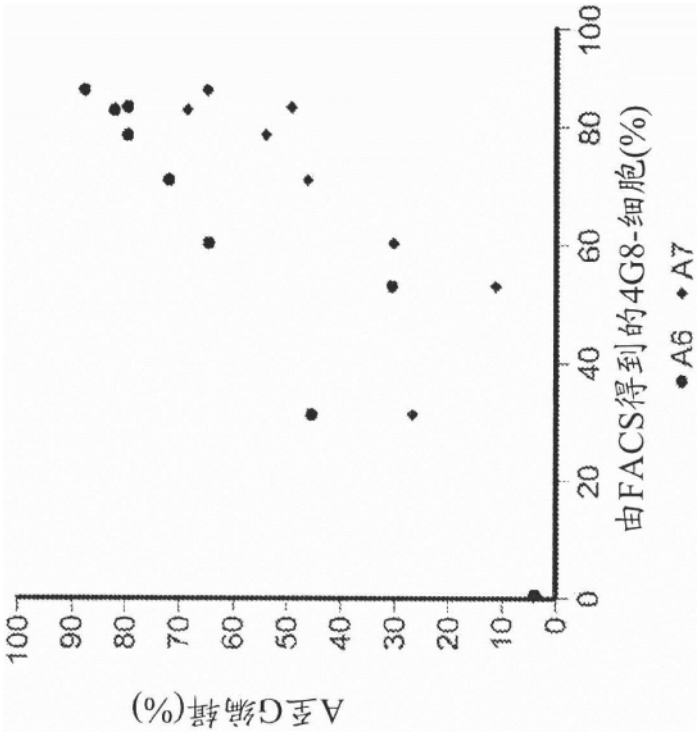

由FACS得到的4G8-细胞(%)
A6
A7
A至G编辑(%)
0
20
40
60
80
100
10
30
50
70
90

图19B

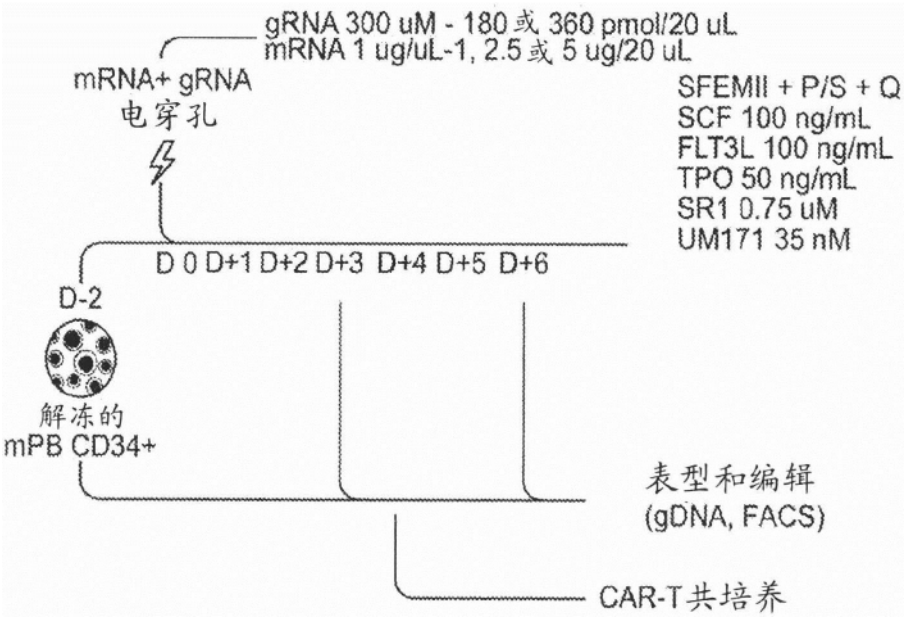

gRNA 300 uM - 180或360 pmol/20 uL
mRNA 1 ug/uL-1, 2.5或5 ug/20 uL
mRNA+ gRNA
电穿孔
SFEMII + P/S + Q
SCF 100 ng/mL
FLT3L 100 ng/mL
TPO 50 ng/mL
SR1 0.75 uM
UM171 35 nM
D 0 D+1 D+2 D+3 D+4 D+5 D+6
D-2
解冻的
mPB CD34+
表型和编辑
(gDNA, FACS)
CAR-T共培养

图20A

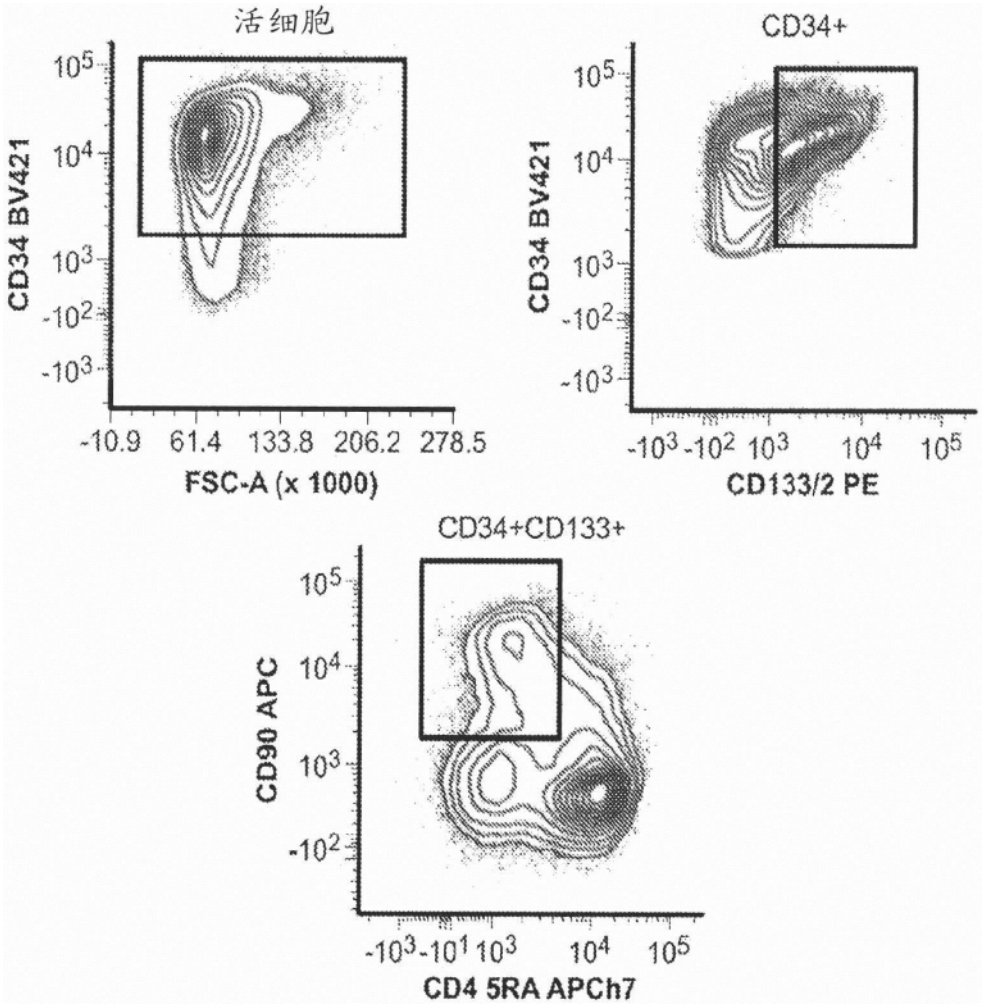

活细胞
CD34 BV421
FSC-A (x 1000)
CD34+
CD133/2 PE
CD34+CD133+
CD90 APC
CD4 5RA APCh7

图20B

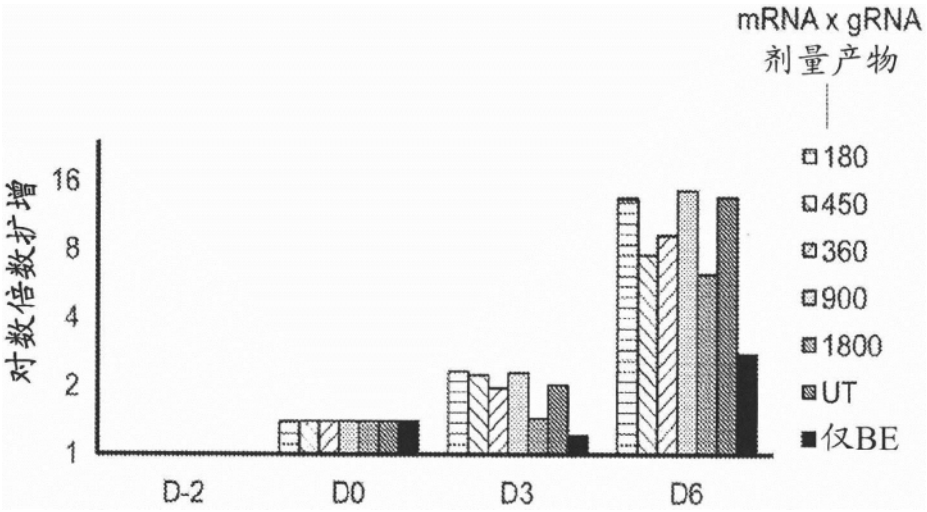

mRNA x gRNA
剂量产物
180
450
360
900
1800
UT
仅BE
对数倍数扩增
D-2
D0
D3
D6

图20C

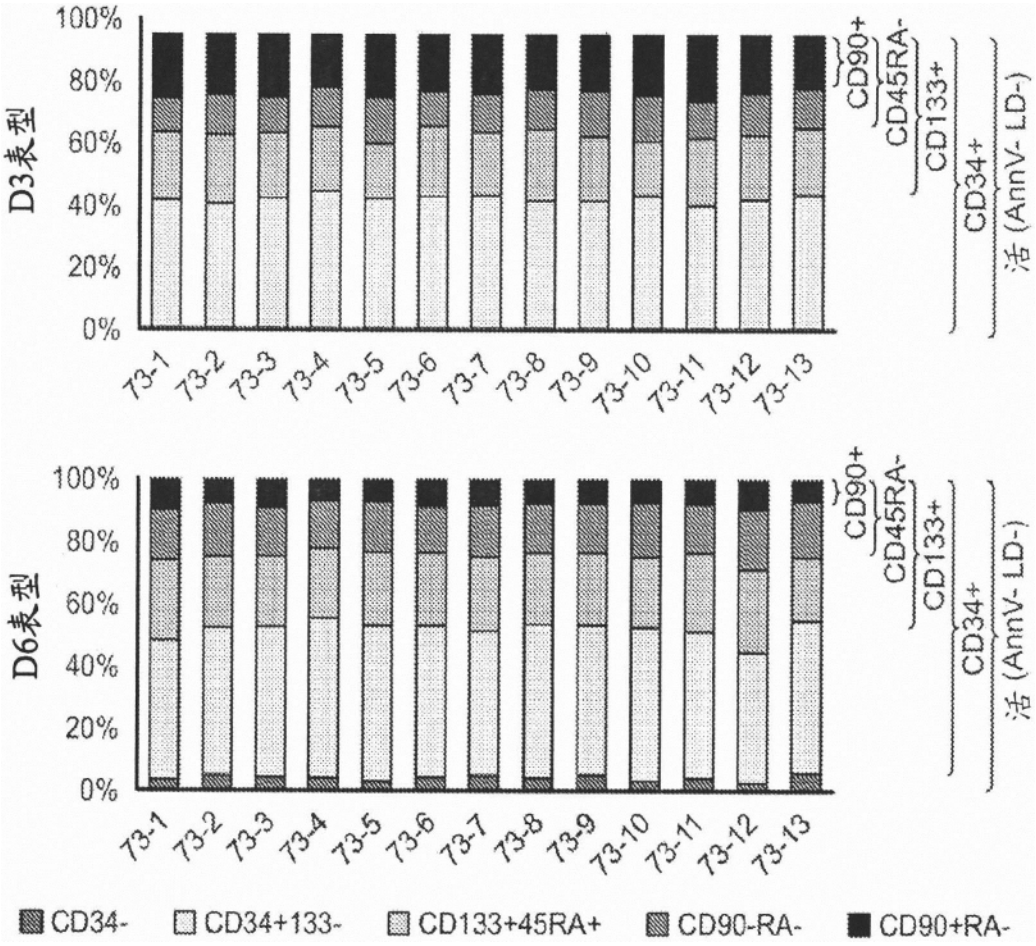

D3表型
D6表型
100%
80%
60%
40%
20%
0%
73-1
73-2
73-3
73-4
73-5
73-6
73-7
73-8
73-9
73-10
73-11
73-12
73-13
CD90+
CD45RA-
CD133+
CD34+
活 (AnnV- LD-)
CD34-
CD34+133-
CD133+45RA+
CD90-RA-
CD90+RA-

图20D

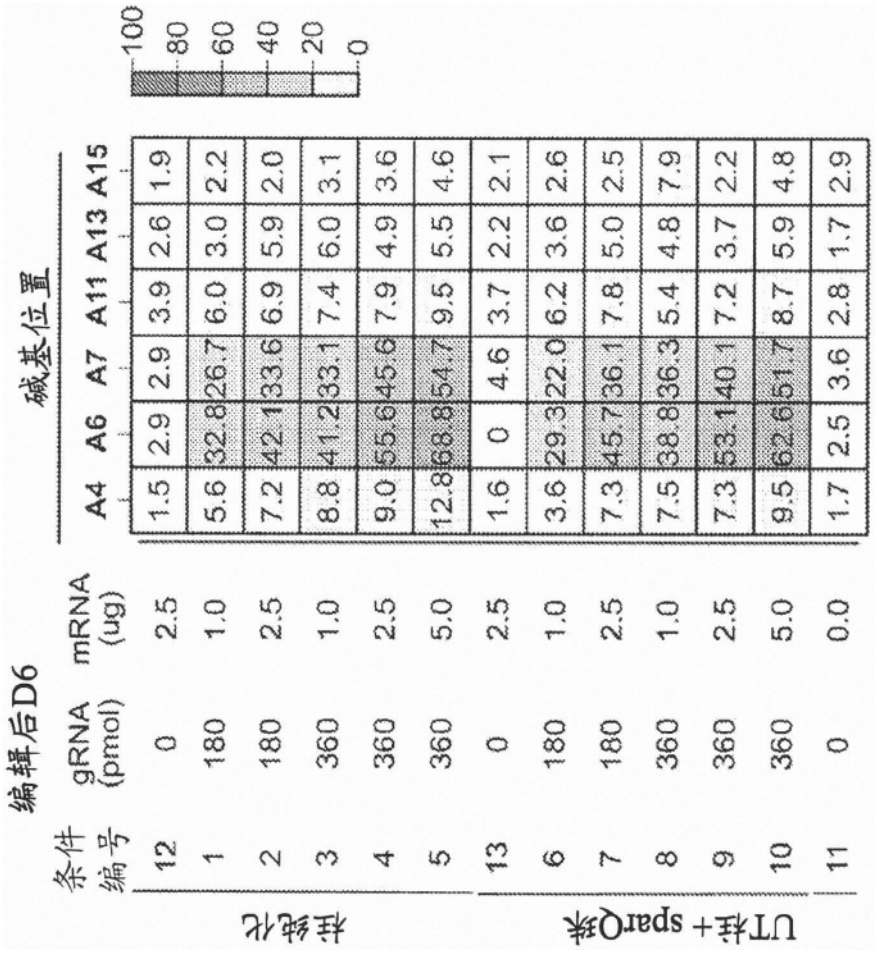

100
80
60
40
20
0
碱基位置
A4 A6 A7 A11 A13 A15
编辑后D6
条件编号
gRNA (pmol)
mRNA (ug)
柱纯化
UT柱+ sparQ珠
12 0 2.5 1.5 2.9 2.9 3.9 2.6 1.9
1 180 1.0 5.6 32.8 26.7 6.0 3.0 2.2
2 180 2.5 7.2 42.1 33.6 6.9 5.9 2.0
3 360 1.0 8.8 41.2 33.1 7.4 6.0 3.1
4 360 2.5 9.0 55.6 45.6 7.9 4.9 3.6
5 360 5.0 12.8 68.8 54.7 9.5 5.5 4.6
13 0 2.5 1.6 0 4.6 3.7 2.2 2.1
6 180 1.0 3.6 29.3 22.0 6.2 3.6 2.6
7 180 2.5 7.3 45.7 36.1 7.8 5.0 2.5
8 360 1.0 7.5 38.8 36.3 5.4 4.8 7.9
9 360 2.5 7.3 53.1 40.1 7.2 3.7 2.2
10 360 5.0 9.5 62.6 51.7 8.7 5.9 4.8
11 0 0.0 1.7 2.5 3.6 2.8 1.7 2.9

图21A

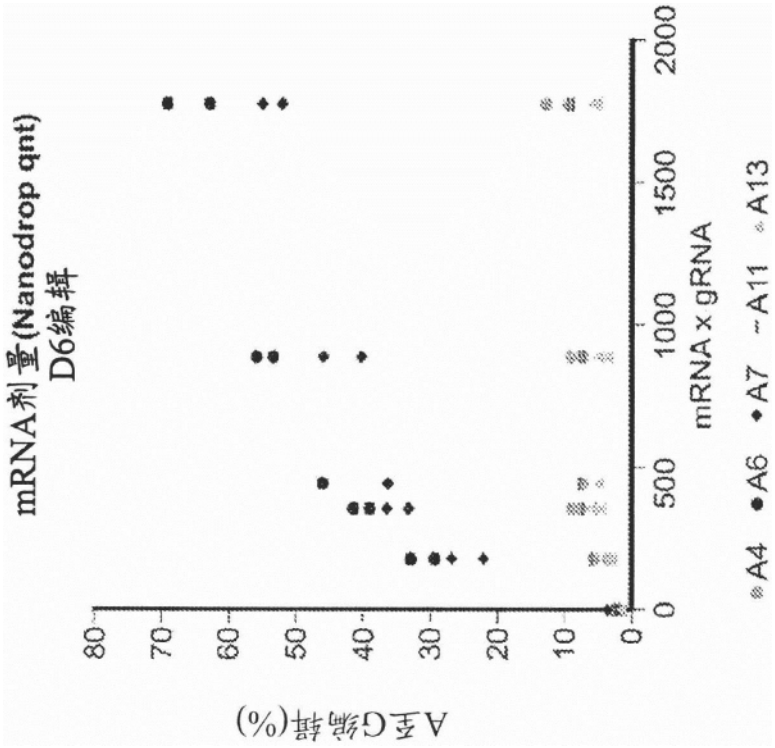


图21B

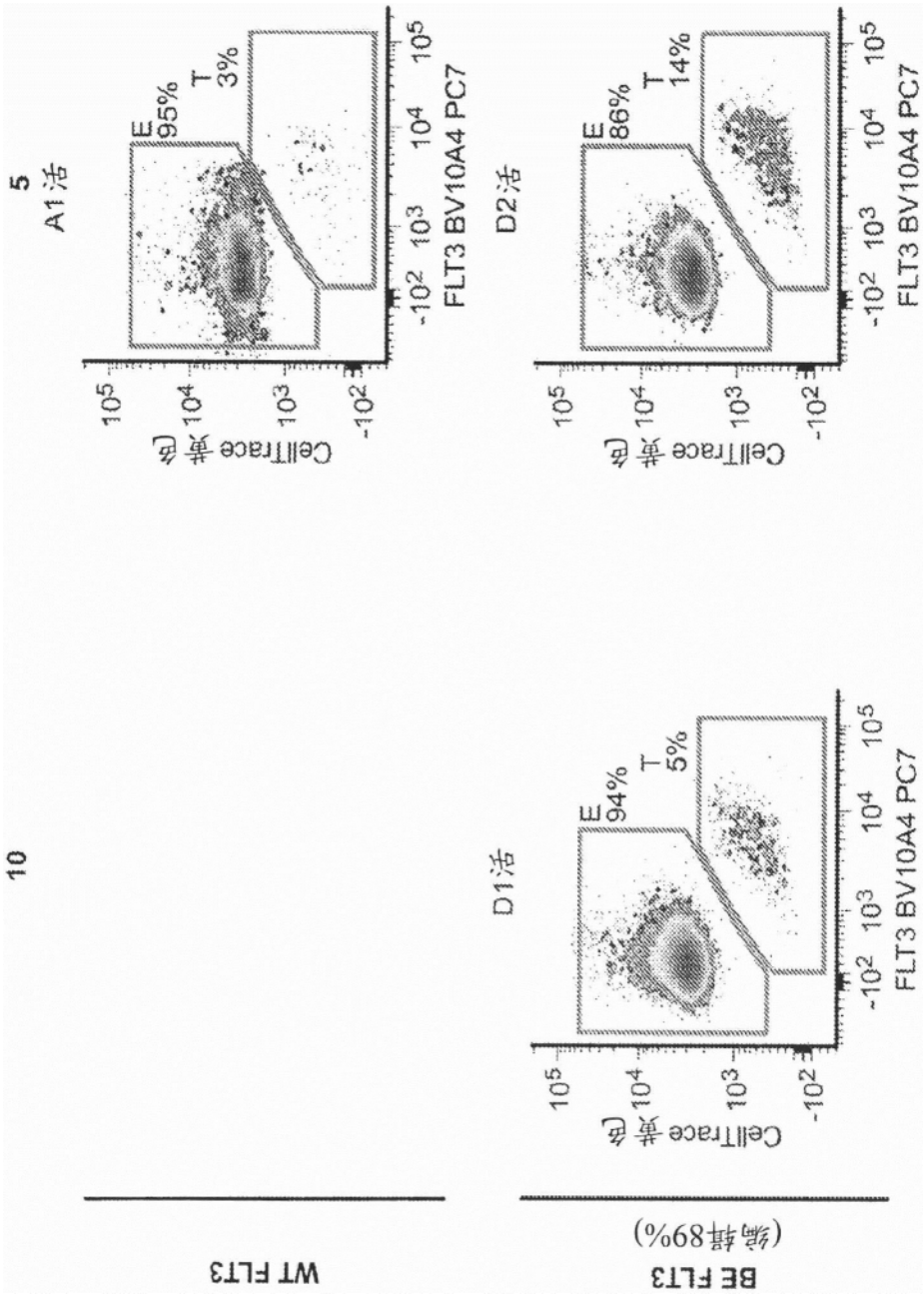

WT FLT3
BE FLT3
(纯合89%)
D1活
D2活
A1活
E 94%
T 5%
E 86%
T 14%
E 95%
T 3%
CellTrace 黄色
FLT3 BV10A4 PC7

图22A

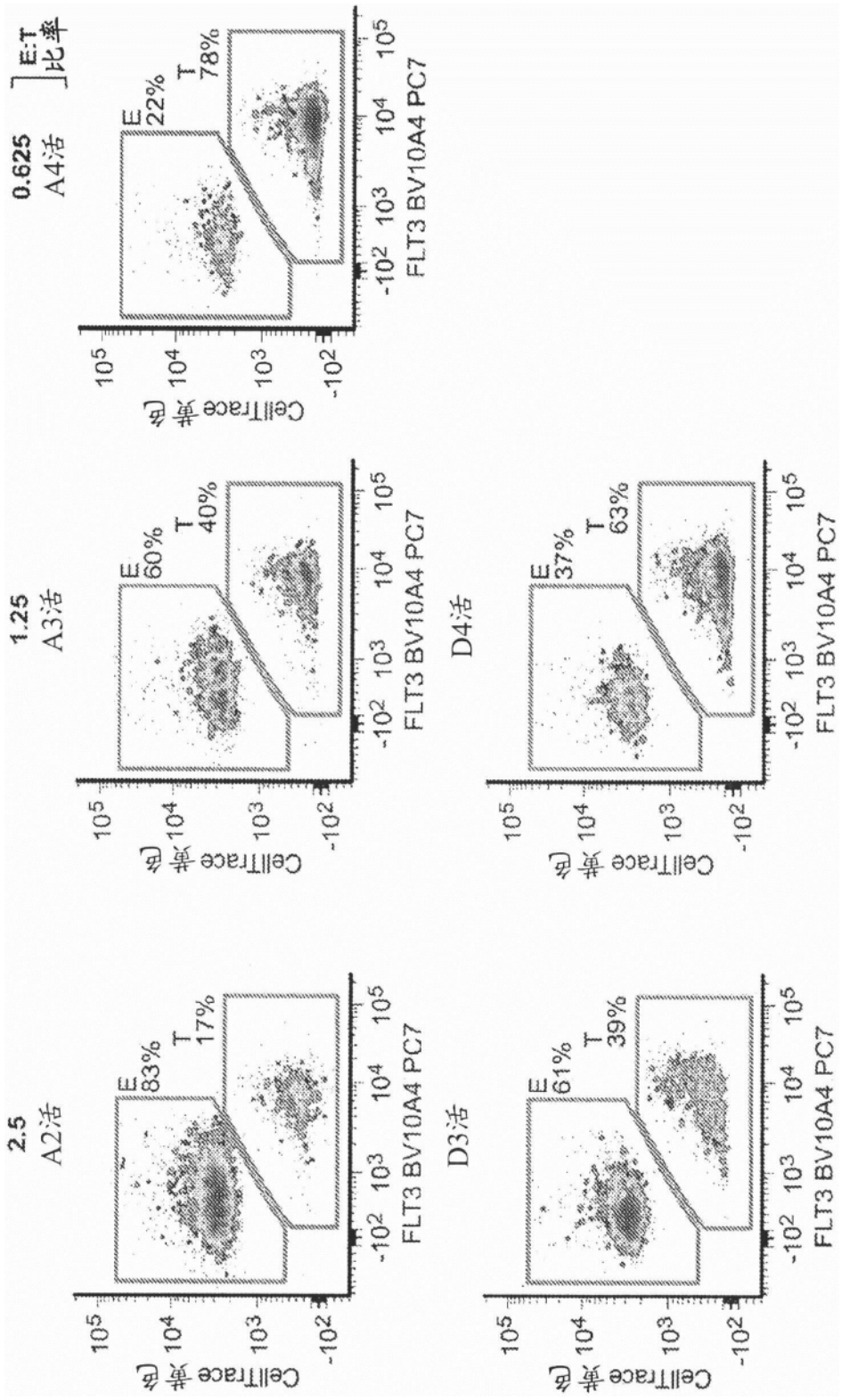

E:T
比率
0.625
A4活
E
22%
T
78%
1.25
A3活
E
60%
T
40%
2.5
A2活
E
83%
T
17%
D4活
E
37%
T
63%
D3活
E
61%
T
39%
CellTrace黄色
FLT3 BV10A4 PC7

图22A(续)

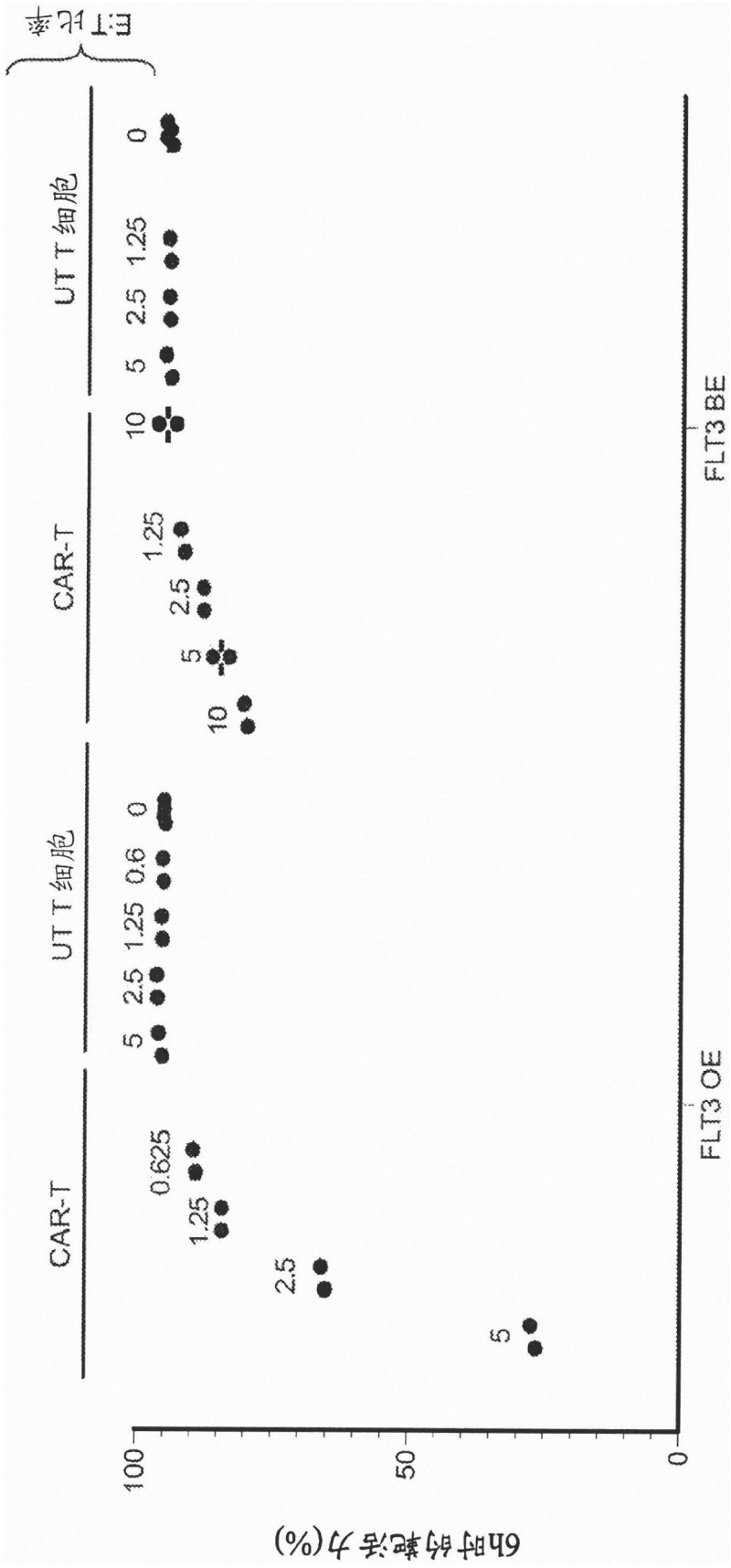

E:T比率
CAR-T
UT T细胞
CAR-T
UT T细胞
0.625
1.25
2.5
5
0.6
0
10
1.25
2.5
5
10
5
2.5
1.25
0
FLT3 OE
FLT3 BE
100
50
0
6h时的靶活力(%)

图22B

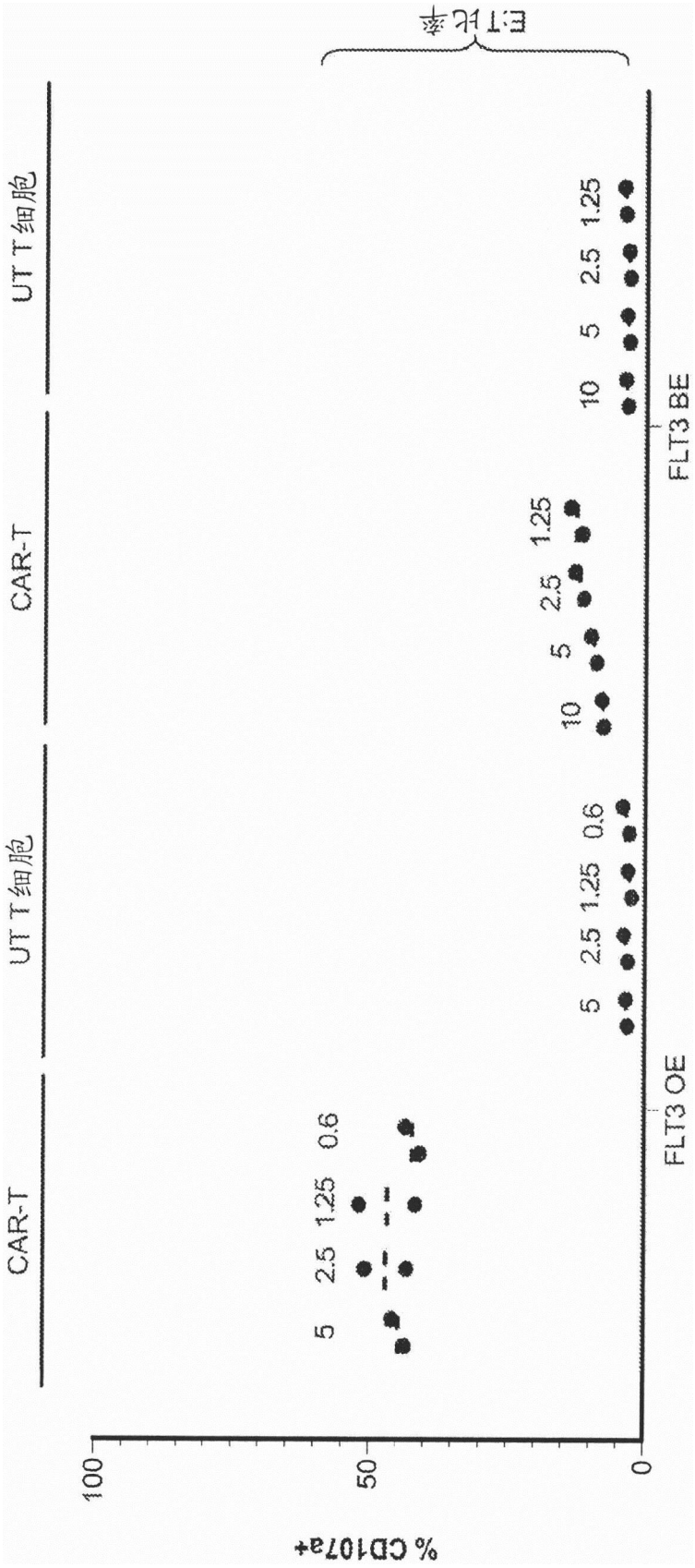

% CD107a+
100
50
0
CAR-T
UT T细胞
CAR-T
UT T细胞
5
2.5
1.25
0.6
5
2.5
1.25
0.6
10
5
2.5
1.25
10
5
2.5
1.25
FLT3 OE
FLT3 BE
E:T比率

图22C

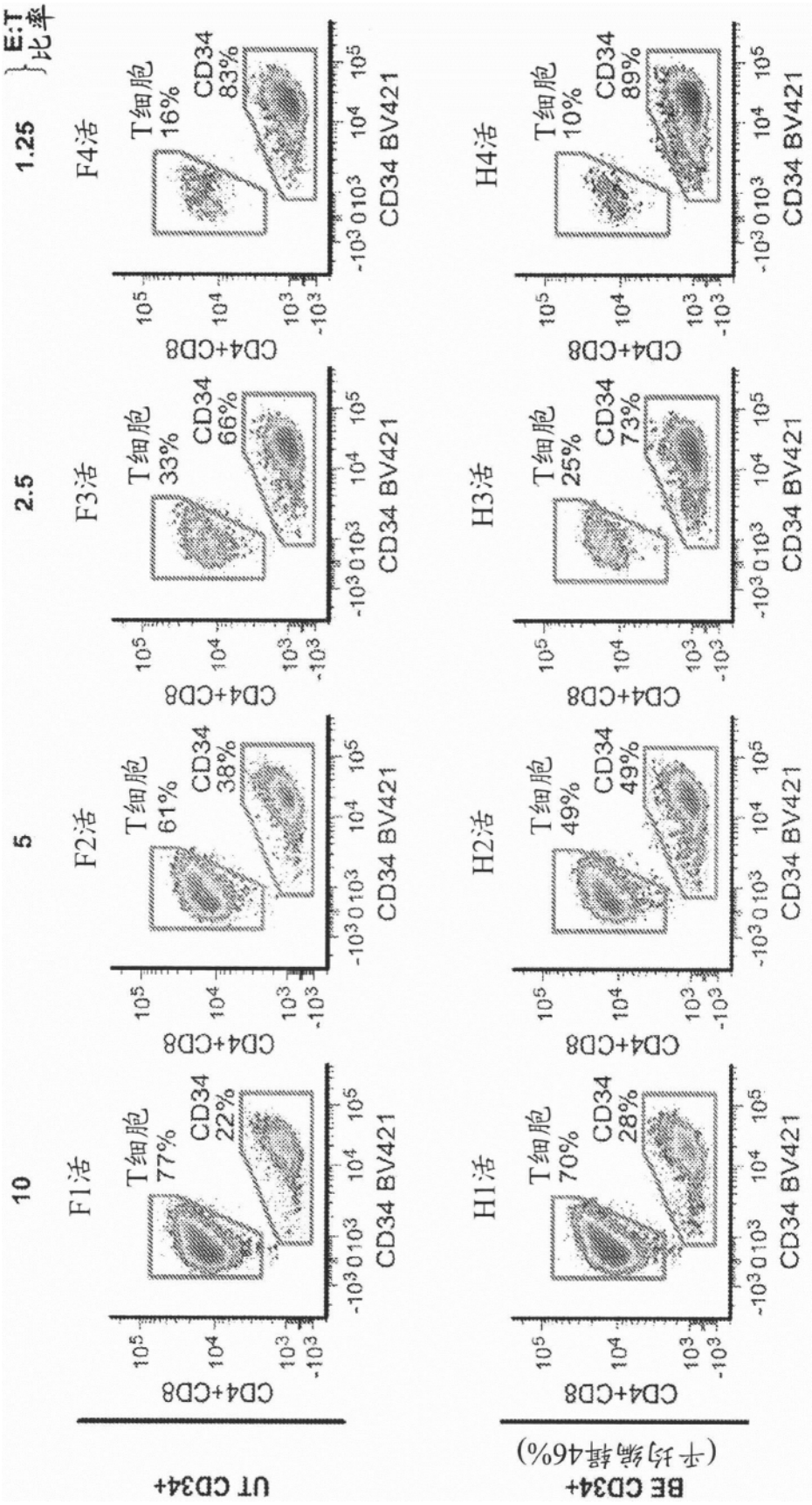

E:T比率
10
5
2.5
1.25
F1活
F2活
F3活
F4活
H1活
H2活
H3活
H4活
T细胞
77%
CD34
22%
T细胞
61%
CD34
38%
T细胞
33%
CD34
66%
T细胞
16%
CD34
83%
T细胞
70%
CD34
28%
T细胞
49%
CD34
49%
T细胞
25%
CD34
73%
T细胞
10%
CD34
89%
CD4+CD8
CD34 BV421
UT CD34+
BE CD34+
(平均编辑46%)

图23A

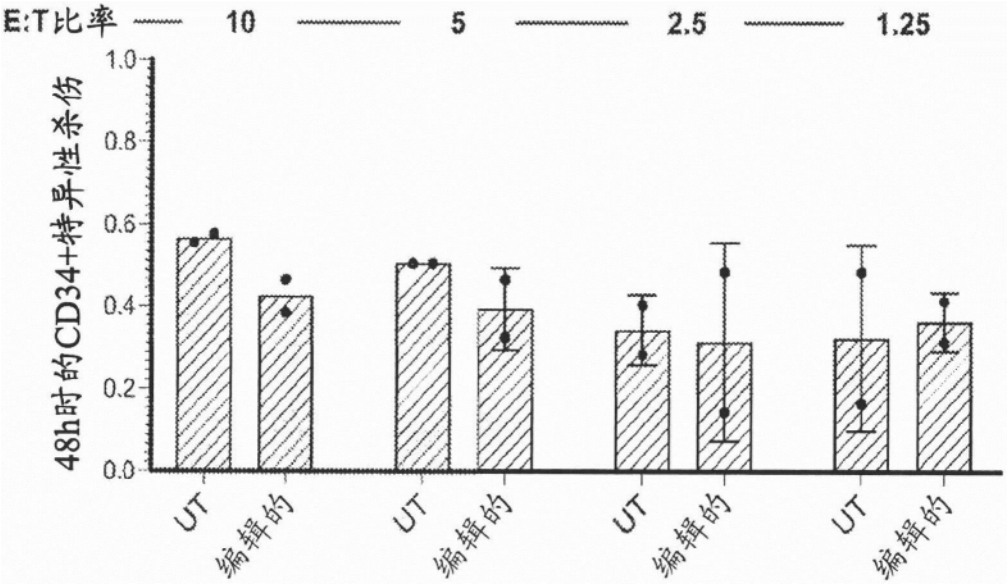

E:T比率
10
5
2.5
1.25
48h时的CD34+特异性杀伤
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
UT
编辑的
UT
编辑的
UT
编辑的
UT
编辑的

图23B

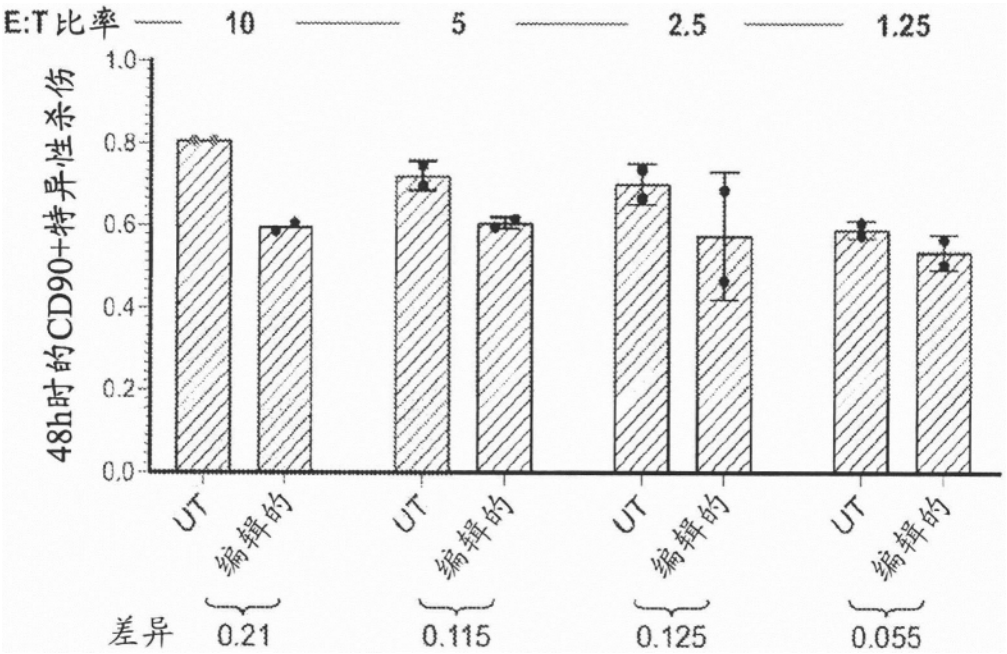
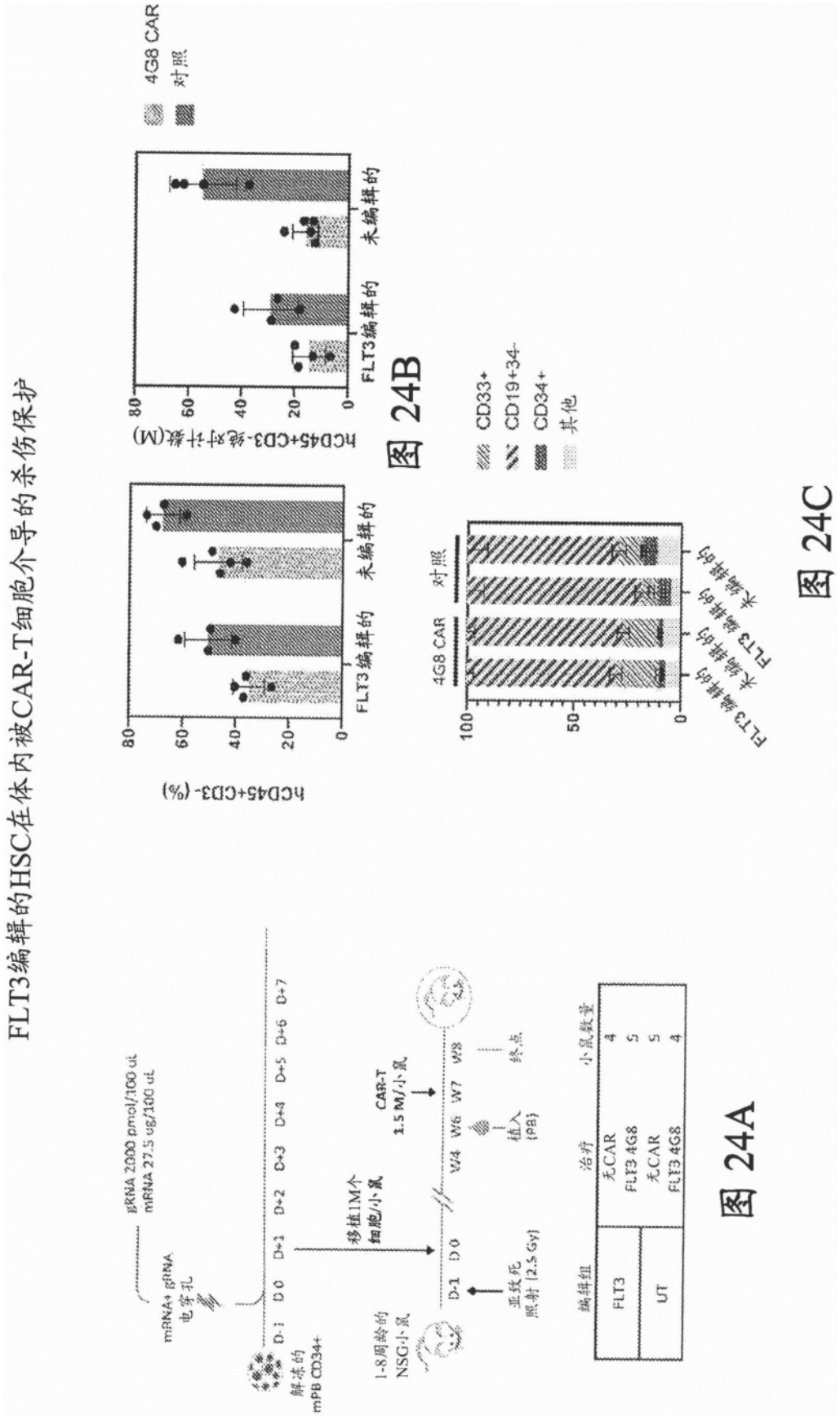

E:T比率
10
5
2.5
1.25
48h时的CD90+特异性杀伤
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
UT
编辑的
UT
编辑的
UT
编辑的
UT
编辑的
差异
0.21
0.115
0.125
0.055

图23C


FLT3编辑的HSC在体内被CAR-T细胞介导的杀伤保护
gRNA 2000 pmol/100 uL
mRNA 27.5 ug/100 uL
mRNA+ gRNA
电穿孔
D-1 D0 D+1 D+2 D+3 D+4 D+5 D+6 D+7
解冻的
mPB CD34+
移植1M个
细胞/小鼠
CAR-T
1.5 M/小鼠
1-8周龄的
NSG小鼠
D-1 D0 W4 W6 W7 W8
亚致死
照射 (2.5 Gy)
植入
(PB)
终点
编辑组
治疗
小鼠数量
FLT3
无CAR 4
FLT3 4G8 5
UT
无CAR 5
FLT3 4G8 4
图 24A
hCD45+CD3-(%)
FLT3编辑的
未编辑的
hCD45+CD3-绝对计数(M)
4G8 CAR
对照
图 24B
4G8 CAR
对照
CD33+
CD19+34-
CD34+
其他
FLT3 编辑的
FLT3 未编辑的
图 24C

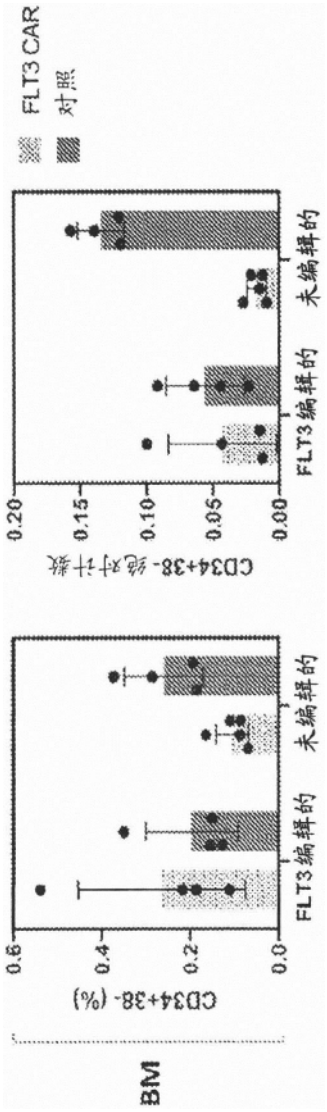

FLT3 CAR
对照
BM
CD34+38- (%)
0.0
0.2
0.4
0.6
FLT3编辑的
未编辑的
CD34+38- 绝对计数
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
FLT3编辑的
未编辑的

图25A

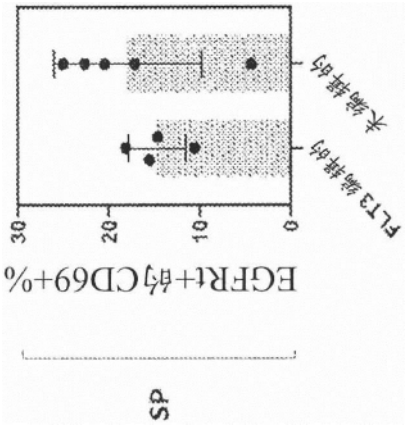

SP
EGFRt+的CD69+%
0
10
20
30
FLT3编辑的
未编辑的

图25B

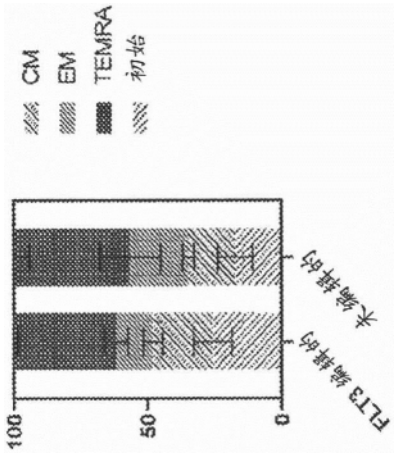


图25C

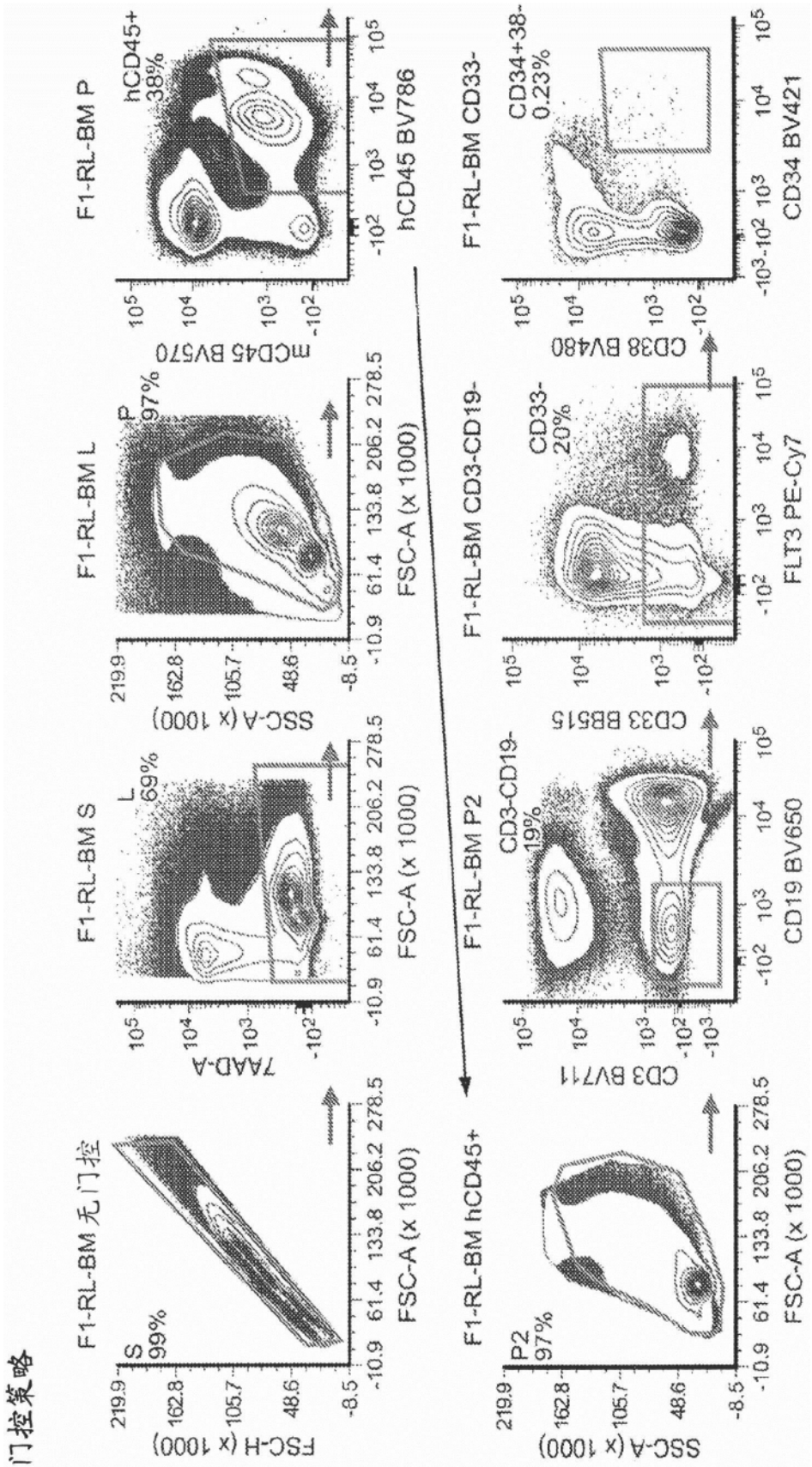

门控策略
F1-RL-BM 无门控
S
99%
FSC-H (x 1000)
FSC-A (x 1000)
F1-RL-BM S
L
69%
7AAD-A
FSC-A (x 1000)
F1-RL-BM L
P
97%
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
F1-RL-BM P
hCD45+
38%
mCD45 BV570
hCD45 BV786
F1-RL-BM hCD45+
P2
97%
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
F1-RL-BM P2
CD3-CD19-
19%
CD3 BV711
CD19 BV650
F1-RL-BM CD3-CD19-
CD33-
20%
CD33 BB515
FLT3 PE-Cy7
F1-RL-BM CD33-
CD34+38-
0.23%
CD38 BV480
CD34 BV421

图25D

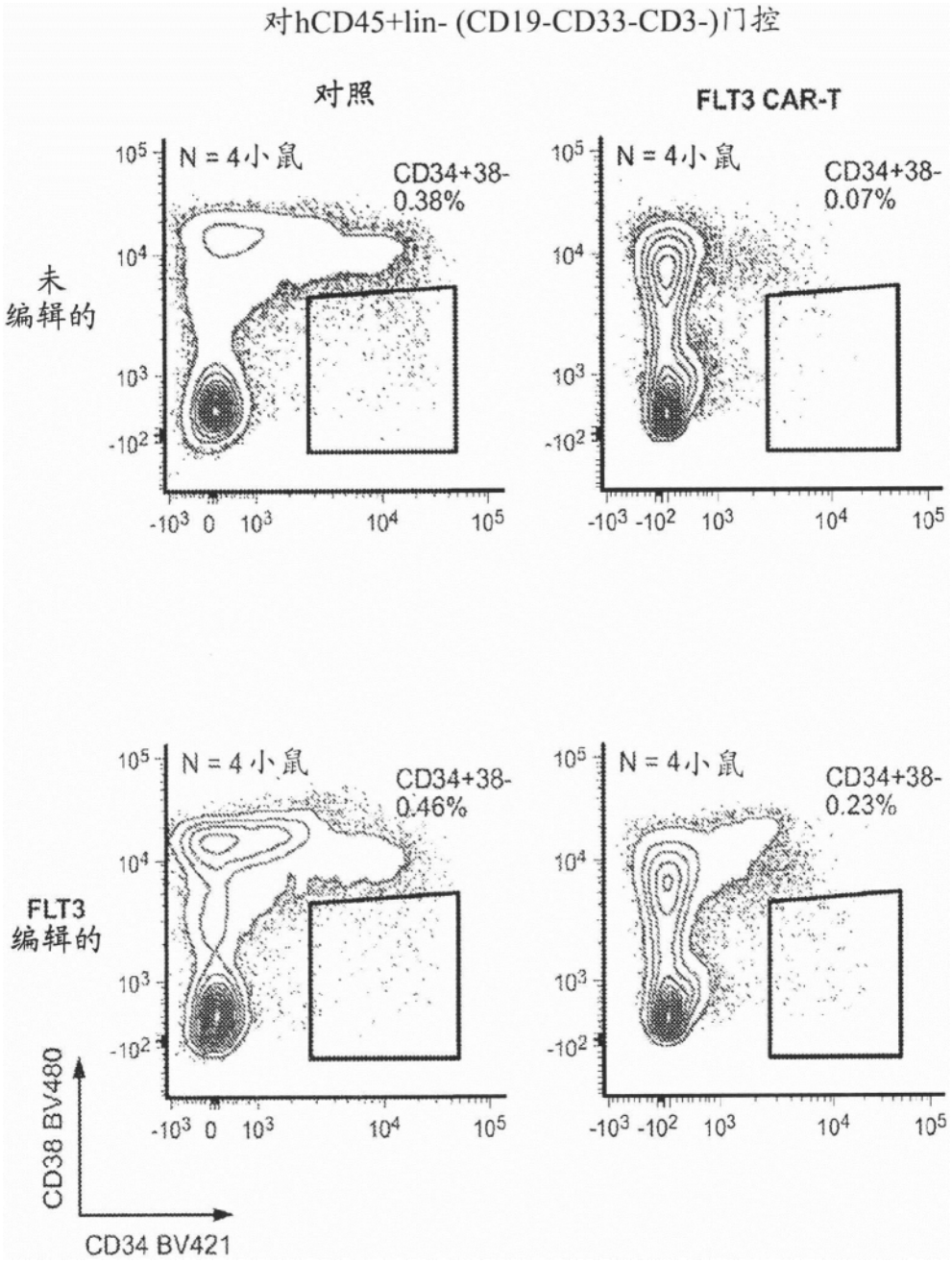

对hCD45+lin- (CD19-CD33-CD3-)门控
对照
FLT3 CAR-T
未编辑的
FLT3编辑的
N = 4小鼠
CD34+38-
0.38%
0.07%
0.46%
0.23%
CD38 BV480
CD34 BV421

图25E

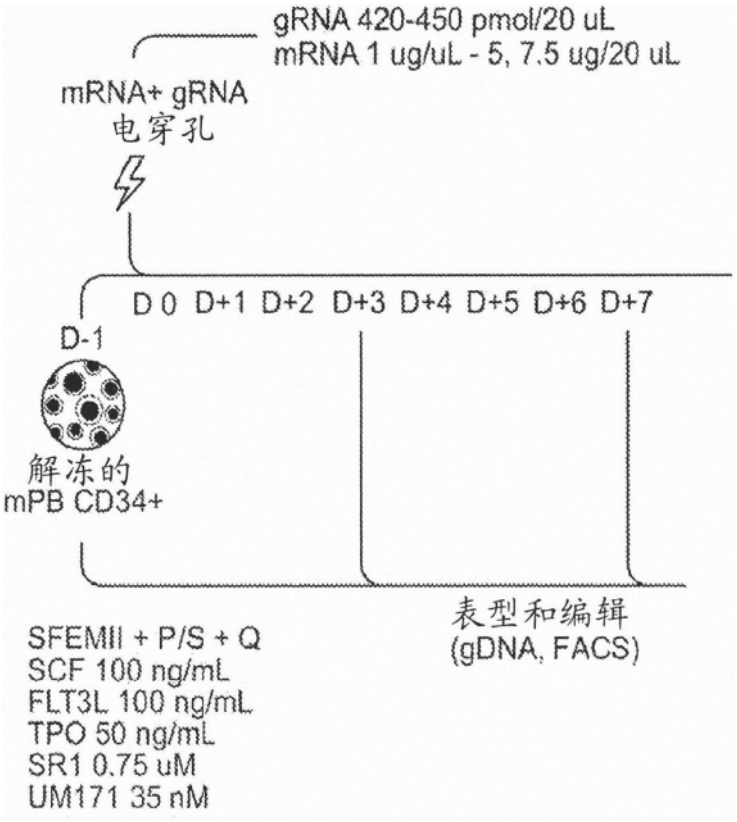

gRNA 420-450 pmol/20 uL
mRNA 1 ug/uL - 5, 7.5 ug/20 uL
mRNA+ gRNA
电穿孔
D 0 D+1 D+2 D+3 D+4 D+5 D+6 D+7
D-1
解冻的
mPB CD34+
表型和编辑
(gDNA, FACS)
SFEMII + P/S + Q
SCF 100 ng/mL
FLT3L 100 ng/mL
TPO 50 ng/mL
SR1 0.75 uM
UM171 35 nM

图26A

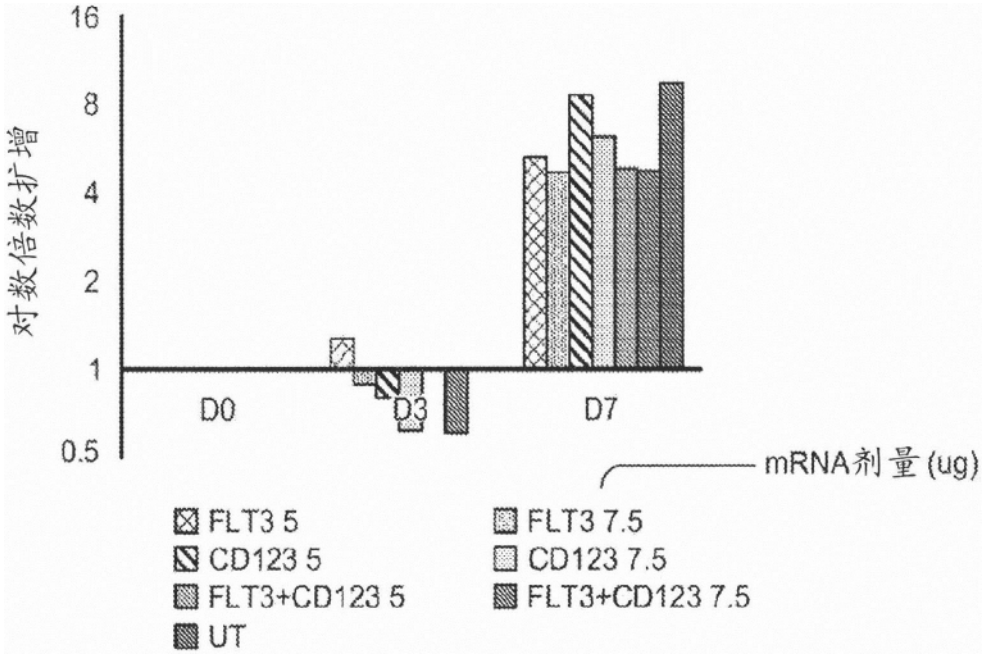

对数倍数扩增
16
8
4
2
1
0.5
D0
D3
D7
mRNA剂量 (ug)
FLT3 5
CD123 5
FLT3+CD123 5
UT
FLT3 7.5
CD123 7.5
FLT3+CD123 7.5

图26B

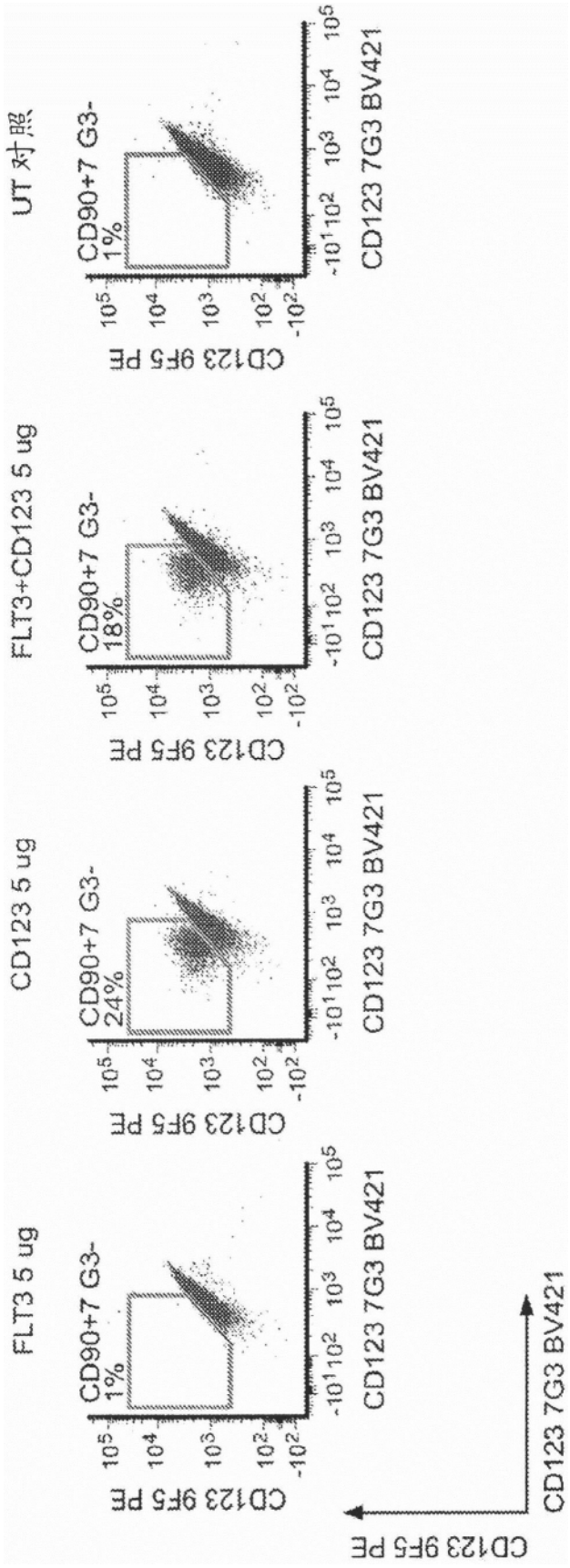
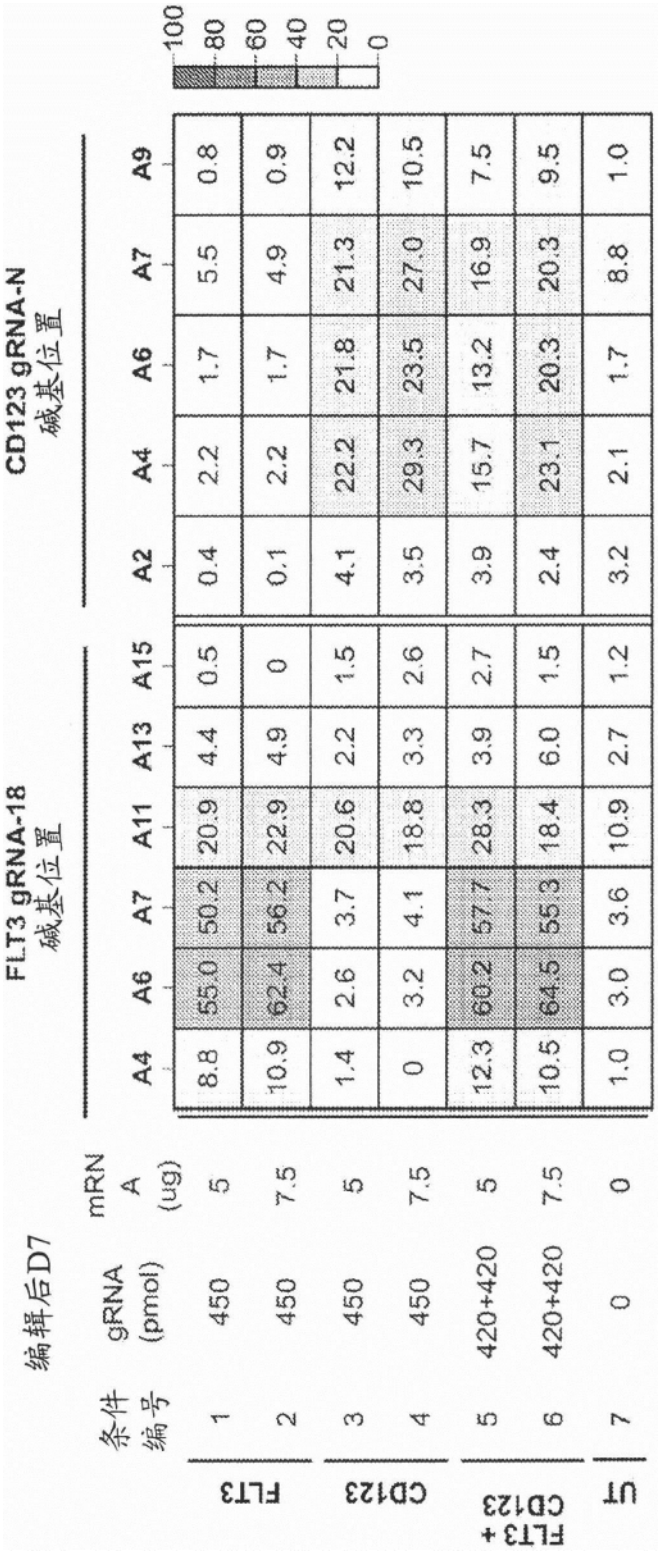

FLT3 5 ug
CD123 5 ug
FLT3+CD123 5 ug
UT 对照
CD90+7 G3-
1%
24%
18%
1%
CD123 9F5 PE
CD123 7G3 BV421

图26C



	条件编号	gRNA (pmol)	mRNA (ug)	A4	A6	A7	A11	A13	A15	A2	A4	A6	A7	A9
FLT3	1	450	5	8.8	55.0	50.2	20.9	4.4	0.5	0.4	2.2	1.7	5.5	0.8
	2	450	7.5	10.9	62.4	56.2	22.9	4.9	0	0.1	2.2	1.7	4.9	0.9
CD123	3	450	5	1.4	2.6	3.7	20.6	2.2	1.5	4.1	22.2	21.8	21.3	12.2
	4	450	7.5	0	3.2	4.1	18.8	3.3	2.6	3.5	29.3	23.5	27.0	10.5
FLT3 + CD123	5	420+420	5	12.3	60.2	57.7	28.3	3.9	2.7	3.9	15.7	13.2	16.9	7.5
	6	420+420	7.5	10.5	64.5	55.3	18.4	6.0	1.5	2.4	23.1	20.3	20.3	9.5
UT	7	0	0	1.0	3.0	3.6	10.9	2.7	1.2	3.2	2.1	1.7	8.8	1.0

图27

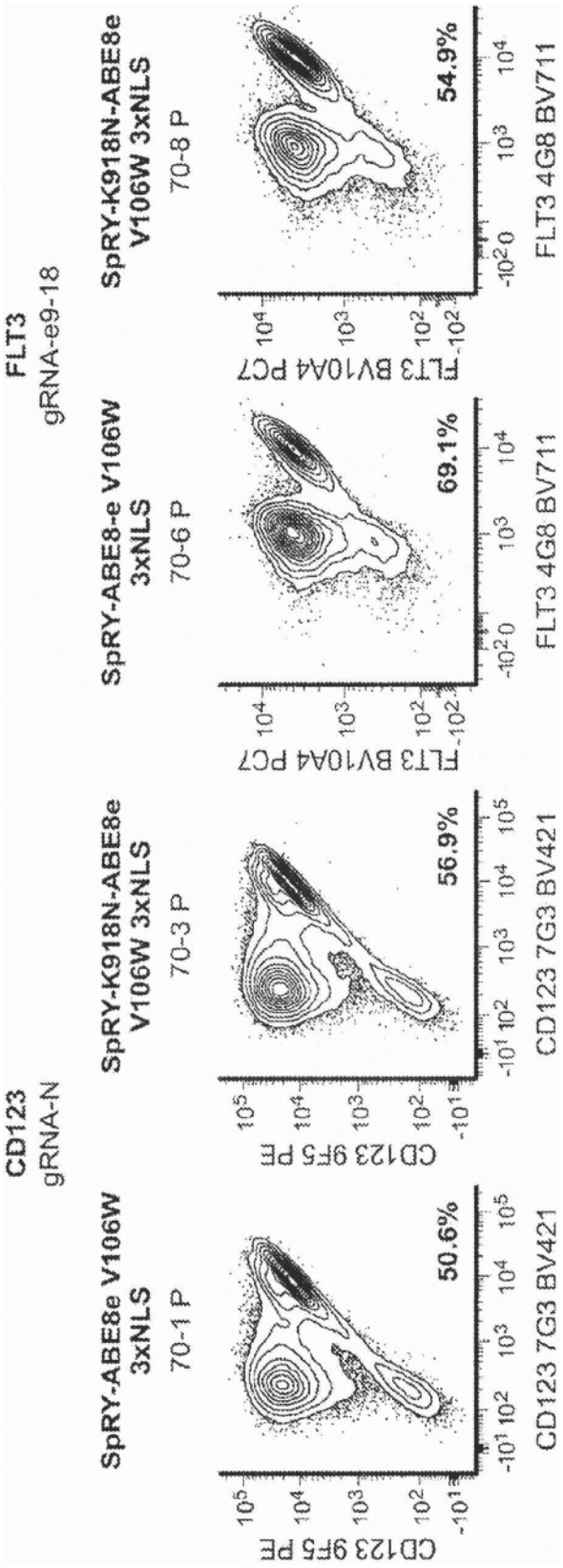

CD123
gRNA-N
FLT3
gRNA-e9-18
SpRY-ABE8e V106W 3xNLS
70-1 P
50.6%
SpRY-K918N-ABE8e V106W 3xNLS
70-3 P
56.9%
SpRY-ABE8-e V106W 3xNLS
70-6 P
69.1%
SpRY-K918N-ABE8e V106W 3xNLS
70-8 P
54.9%
CD123 9F5 PE
FLT3 BV10A4 PC7
CD123 7G3 BV421
FLT3 4G8 BV711

图28A

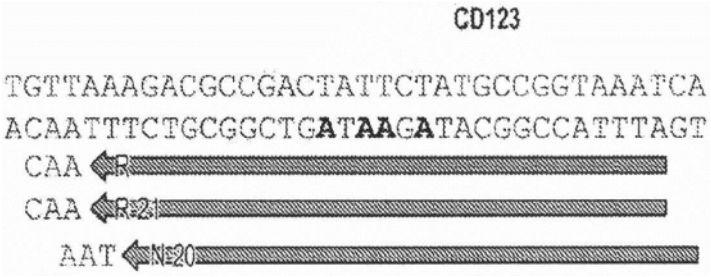

CD123
TGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGTAAATCA
ACAATTTCTGCGGCTGATAAGATACGGCCATTTAGT
CAA
R
CAA
R=21
AAT
N=20

图28B

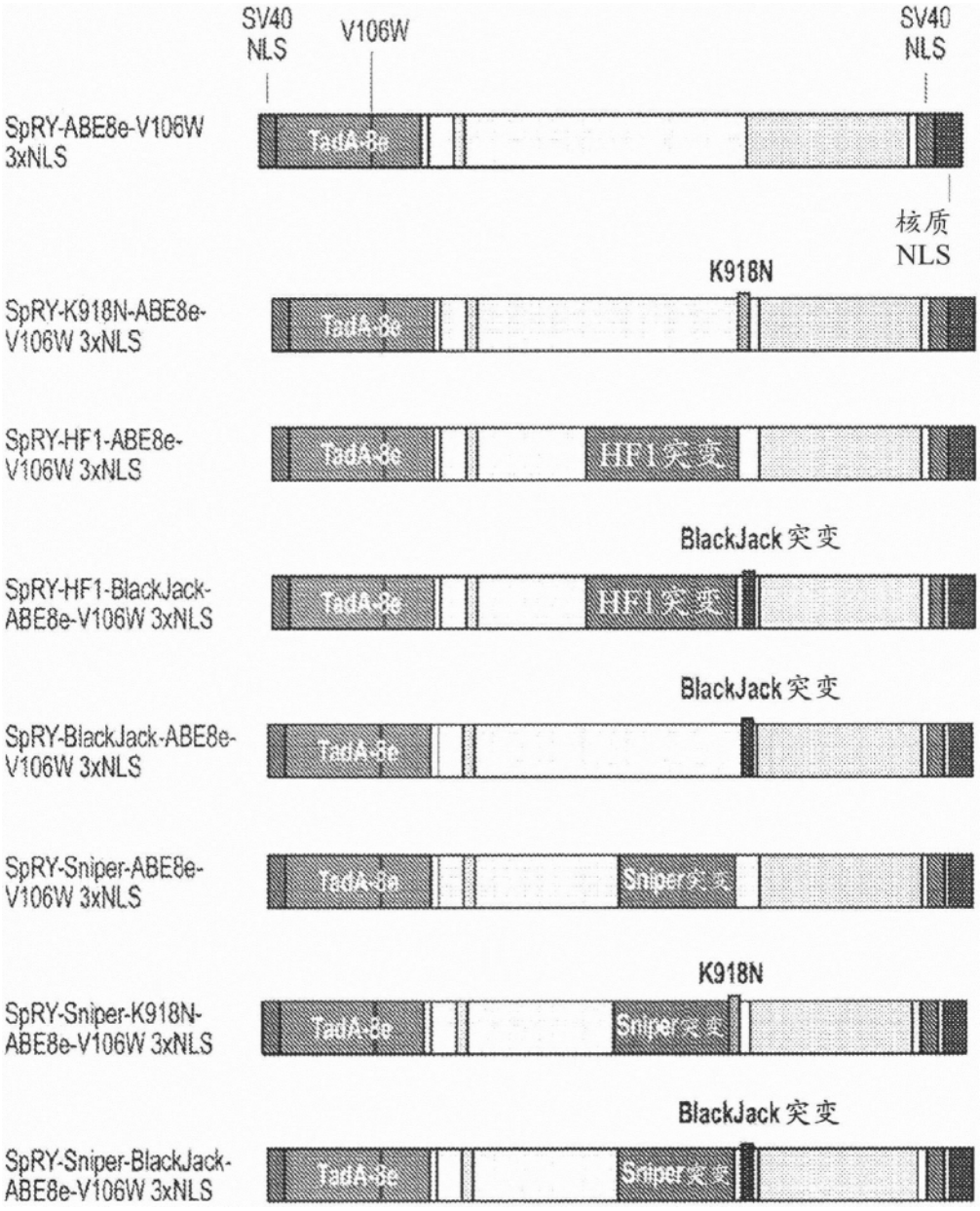

SV40 NLS
V106W
SV40 NLS
SpRY-ABE8e-V106W 3xNLS
TadA-8e
核质 NLS
K918N
SpRY-K918N-ABE8e-V106W 3xNLS
SpRY-HF1-ABE8e-V106W 3xNLS
HF1突变
BlackJack突变
SpRY-HF1-BlackJack-ABE8e-V106W 3xNLS
SpRY-BlackJack-ABE8e-V106W 3xNLS
SpRY-Sniper-ABE8e-V106W 3xNLS
Sniper突变
SpRY-Sniper-K918N-ABE8e-V106W 3xNLS
SpRY-Sniper-BlackJack-ABE8e-V106W 3xNLS

图28C

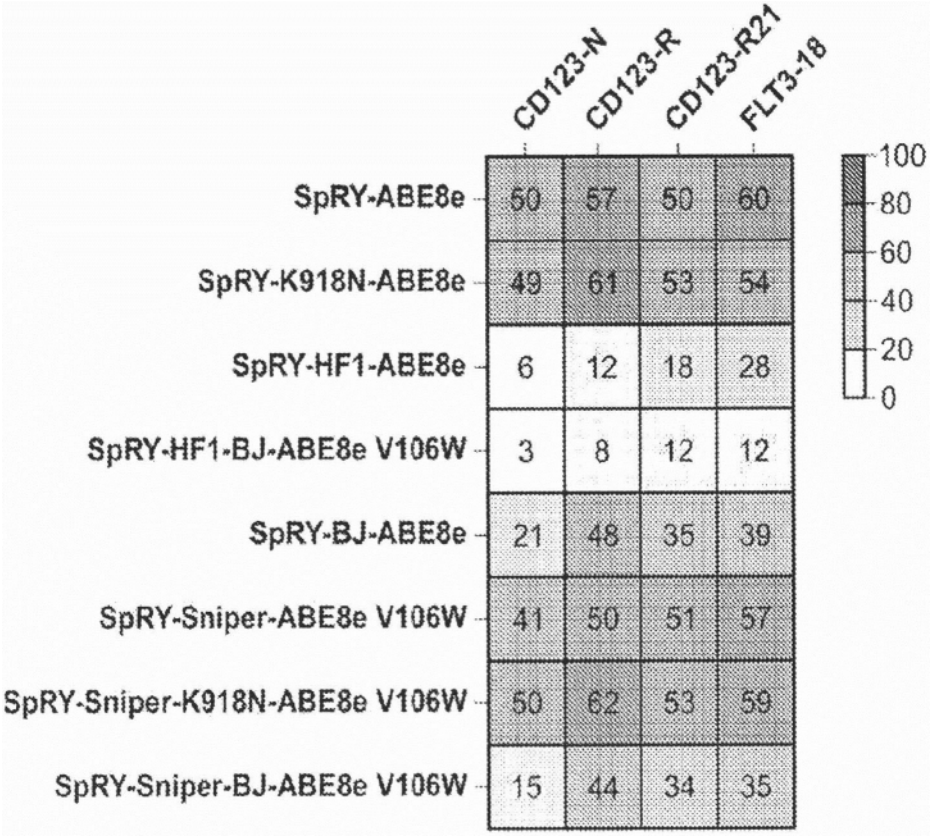

CD123-N
CD123-R
CD123-R21
FLT3-18
SpRY-ABE8e 50 57 50 60
SpRY-K918N-ABE8e 49 61 53 54
SpRY-HF1-ABE8e 6 12 18 28
SpRY-HF1-BJ-ABE8e V106W 3 8 12 12
SpRY-BJ-ABE8e 21 48 35 39
SpRY-Sniper-ABE8e V106W 41 50 51 57
SpRY-Sniper-K918N-ABE8e V106W 50 62 53 59
SpRY-Sniper-BJ-ABE8e V106W 15 44 34 35
100
80
60
40
20
0

图28D

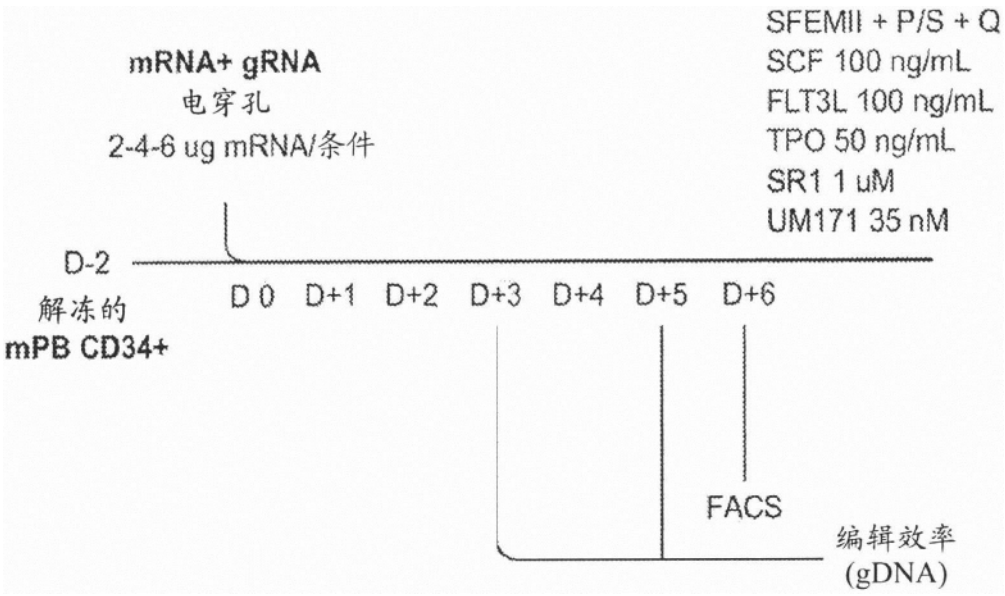

SFEMII + P/S + Q
SCF 100 ng/mL
FLT3L 100 ng/mL
TPO 50 ng/mL
SR1 1 uM
UM171 35 nM
mRNA+ gRNA
电穿孔
2-4-6 ug mRNA/条件
D-2
解冻的
mPB CD34+
D 0 D+1 D+2 D+3 D+4 D+5 D+6
FACS
编辑效率
(gDNA)

图29A

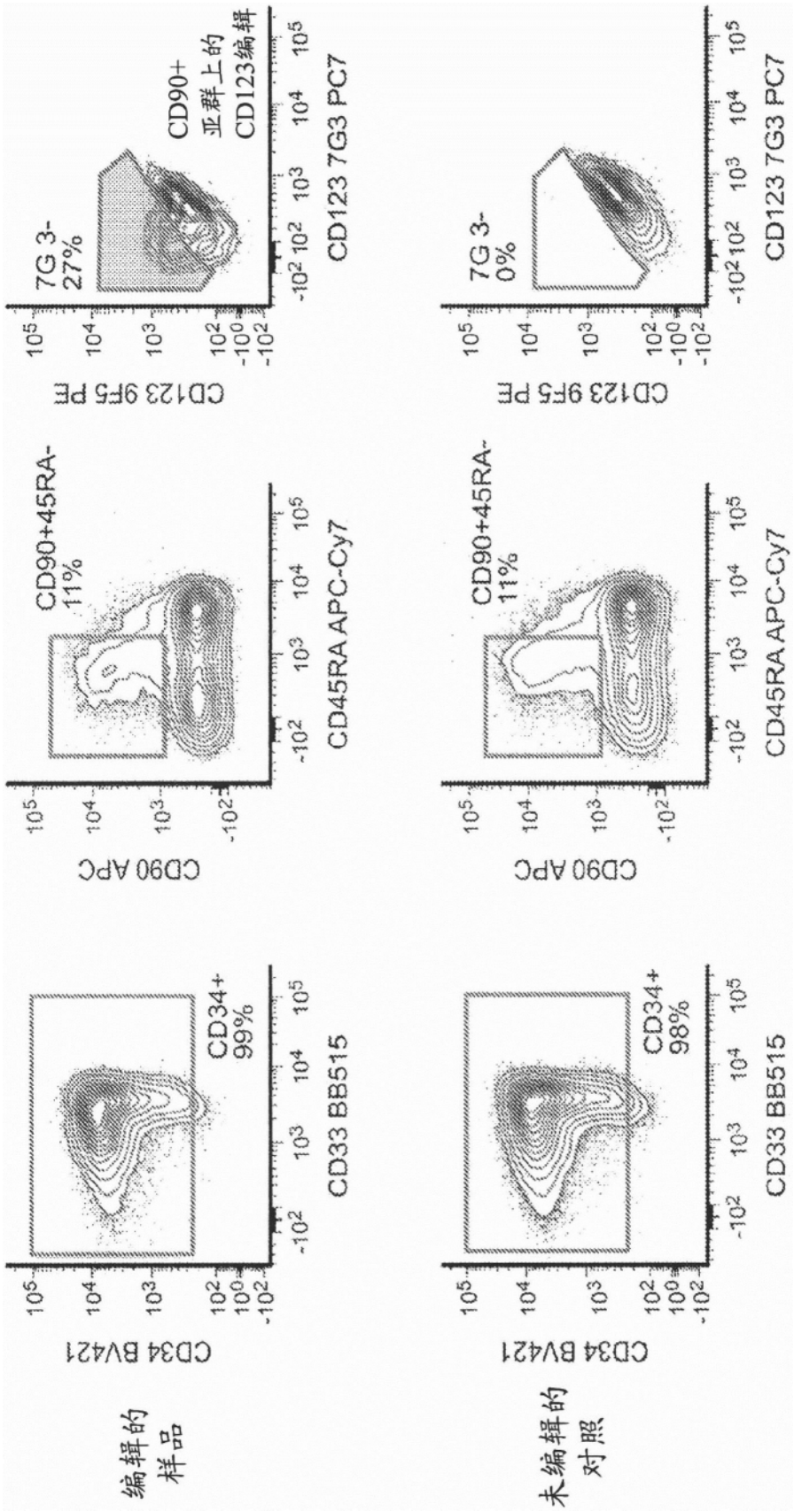

编辑的样品
未编辑的对照
CD34 BV421
CD33 BB515
CD34+ 99%
CD34+ 98%
CD90 APC
CD45RA APC-Cy7
CD90+45RA- 11%
CD90+45RA- 11%
CD123 9F5 PE
CD123 7G3 PC7
7G 3- 27%
7G 3- 0%
CD90+ 亚群上的 CD123编辑

图29B

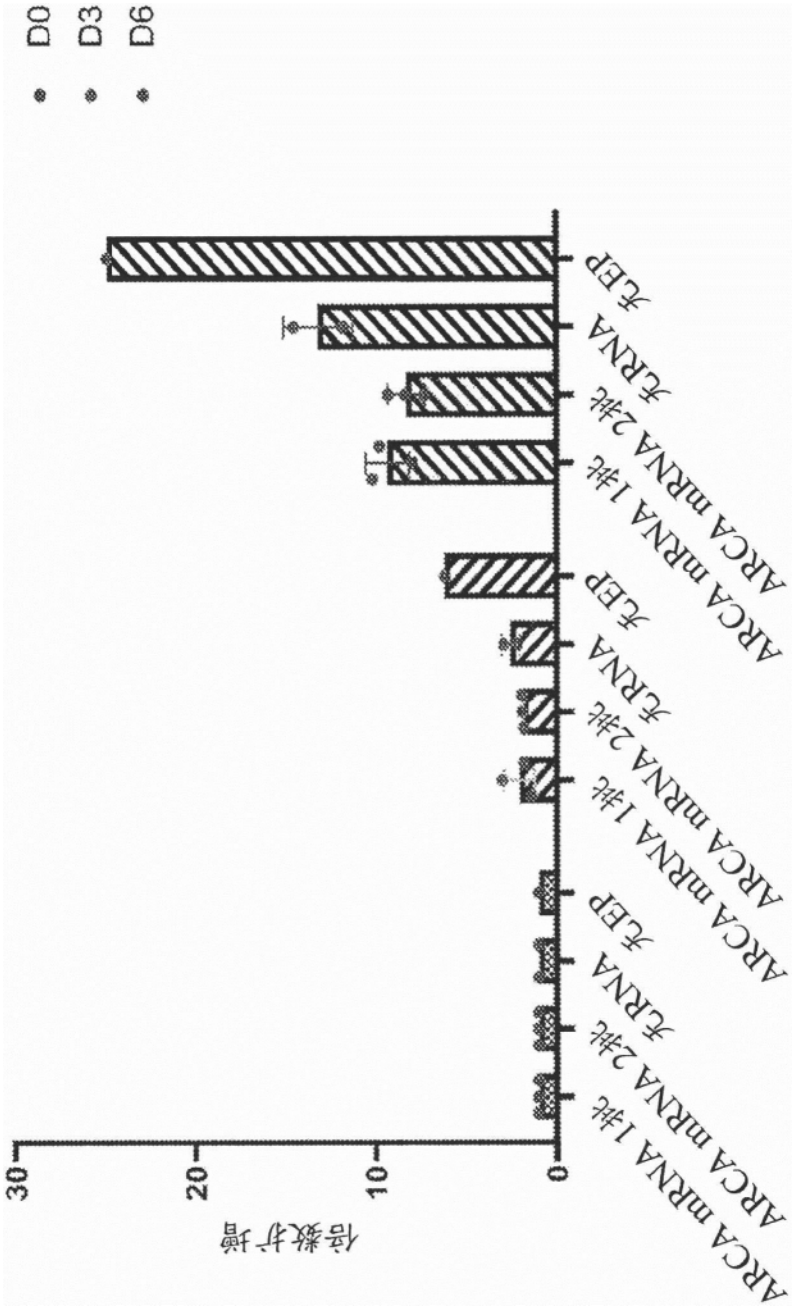

D0
D3
D6
倍数扩增
0
10
20
30
ARCA mRNA 1批
ARCA mRNA 2批
无RNA
无EP
ARCA mRNA 1批
ARCA mRNA 2批
无RNA
无EP
ARCA mRNA 1批
ARCA mRNA 2批
无RNA
无EP

图29C

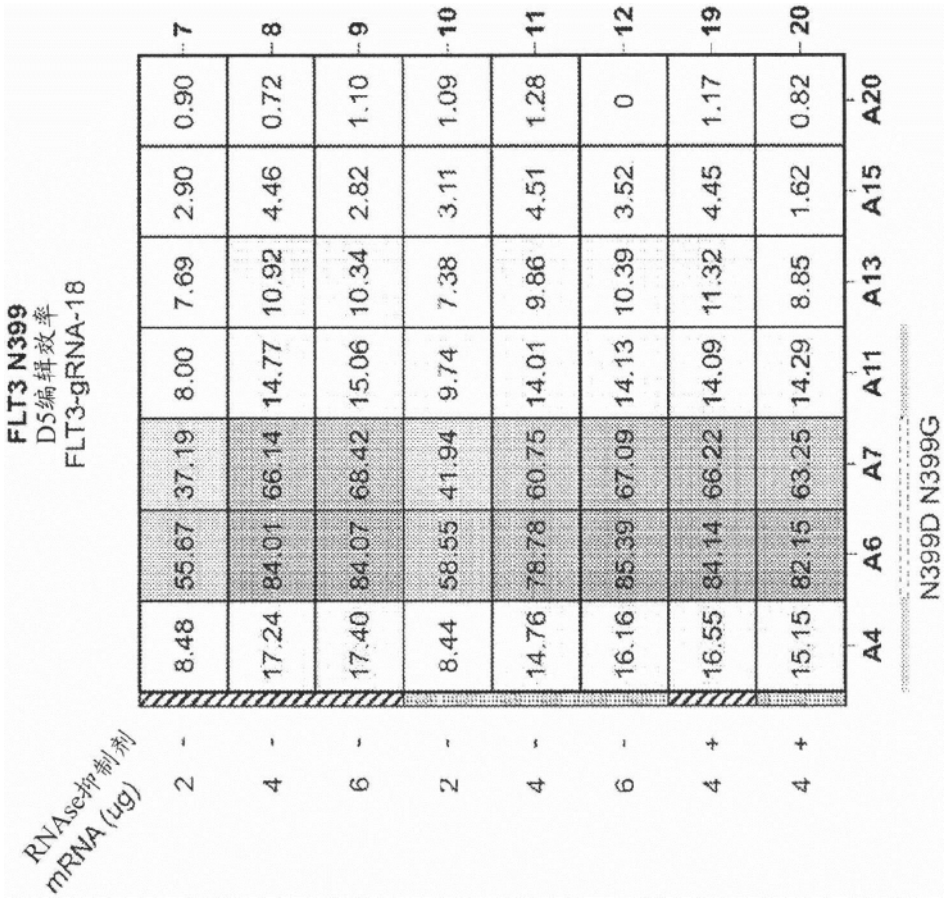

FLT3 N399
D5编辑效率
FLT3-gRNA-18
RNAse抑制剂
mRNA (ug)
A4 A6 A7 A11 A13 A15 A20
N399D N399G
2 - 8.48 55.67 37.19 8.00 7.69 2.90 0.90 7
4 - 17.24 84.01 66.14 14.77 10.92 4.46 0.72 8
6 - 17.40 84.07 68.42 15.06 10.34 2.82 1.10 9
2 - 8.44 58.55 41.94 9.74 7.38 3.11 1.09 10
4 - 14.76 78.78 60.75 14.01 9.86 4.51 1.28 11
6 - 16.16 85.39 67.09 14.13 10.39 3.52 0 12
4 + 16.55 84.14 66.22 14.09 11.32 4.45 1.17 19
4 + 15.15 82.15 63.25 14.29 8.85 1.62 0.82 20

图30

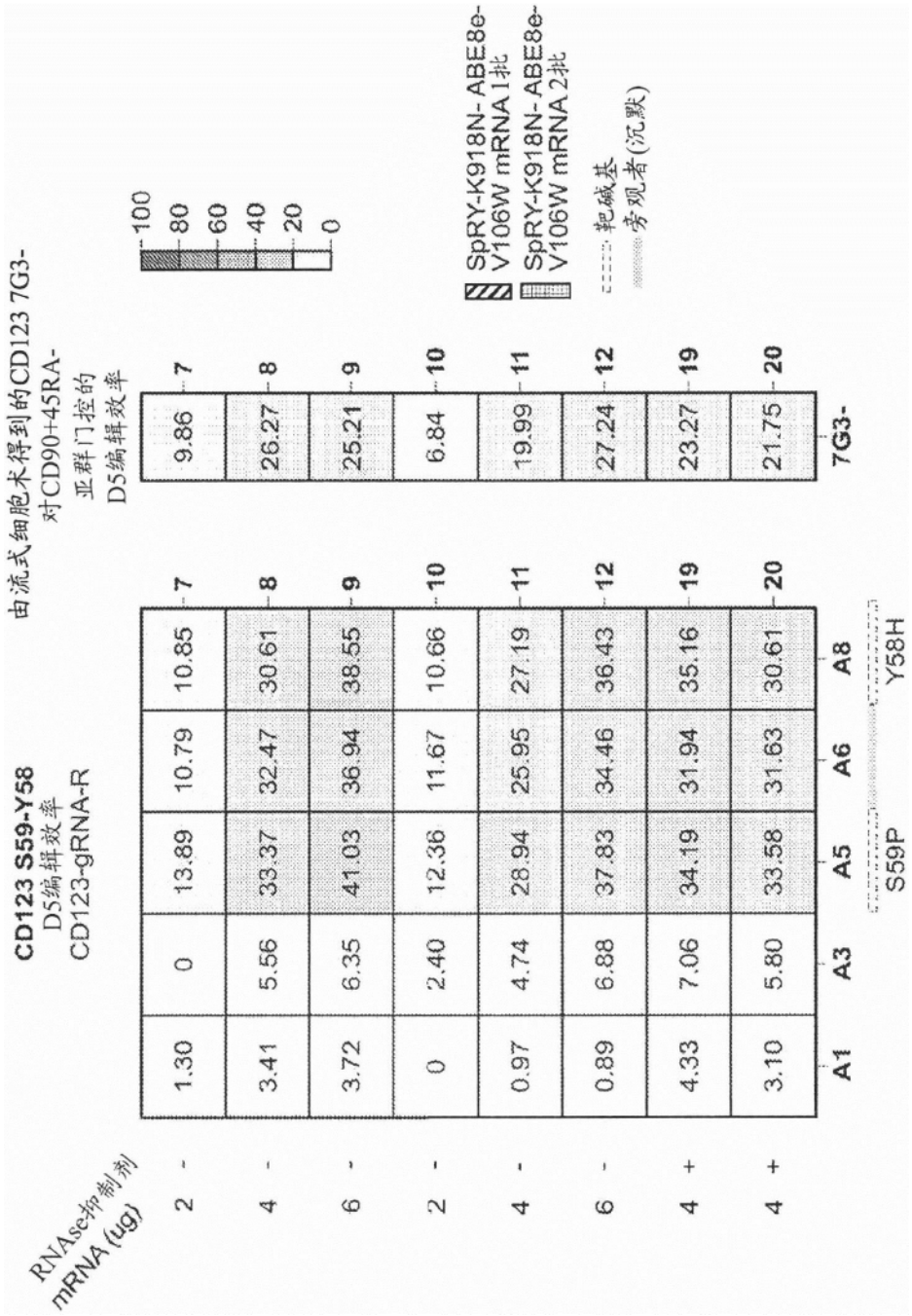

由流式细胞术得到的CD123 7G3-对CD90+45RA-亚群门控的D5编辑效率
CD123 S59-Y58 D5编辑效率
CD123-gRNA-R
RNAse抑制剂
mRNA (ug)
2 - 1.30 0 13.89 10.79 10.85 7
4 - 3.41 5.56 33.37 32.47 30.61 8
6 - 3.72 6.35 41.03 36.94 38.55 9
2 - 0 2.40 12.36 11.67 10.66 10
4 - 0.97 4.74 28.94 25.95 27.19 11
6 - 0.89 6.88 37.83 34.46 36.43 12
4 + 4.33 7.06 34.19 31.94 35.16 19
4 + 3.10 5.80 33.58 31.63 30.61 20
A1 A3 A5 A6 A8
S59P Y58H
9.86 7
26.27 8
25.21 9
6.84 10
19.99 11
27.24 12
23.27 19
21.75 20
7G3-
100 80 60 40 20 0
SpRY-K918N-ABE8e-V106W mRNA 1批
SpRY-K918N-ABE8e-V106W mRNA 2批
靶碱基
旁观者(沉默)

图30(续)

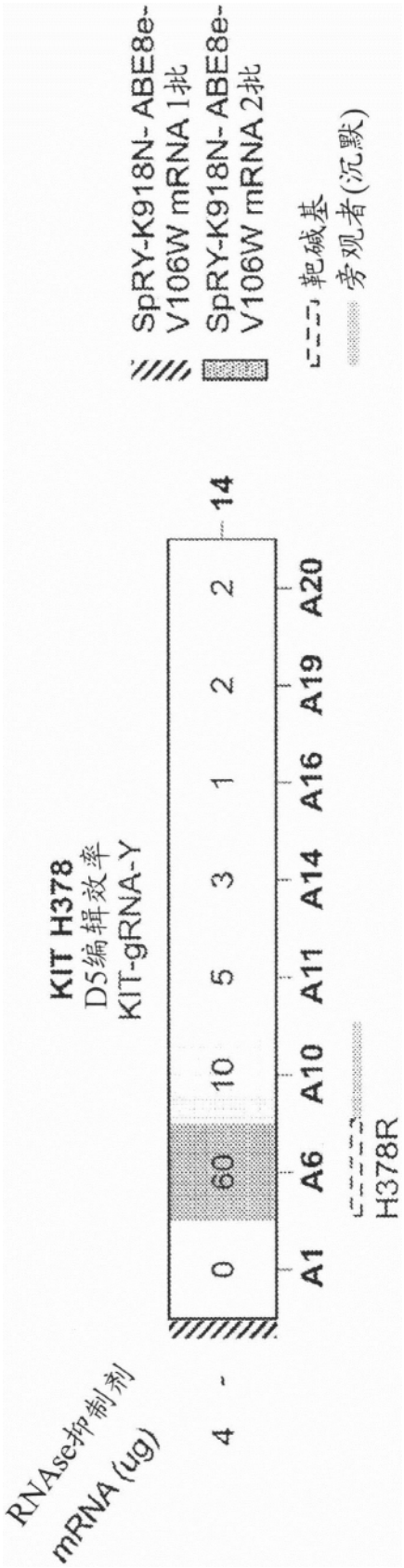

SpRY-K918N-ABE8e-V106W mRNA 1批
SpRY-K918N-ABE8e-V106W mRNA 2批
靶碱基
旁观者(沉默)
KIT H378
D5编辑效率
KIT-gRNA-Y
RNAse抑制剂
mRNA (ug)
4
-
0
60
10
5
3
1
2
2
14
A1
A6
A10
A11
A14
A16
A19
A20
H378R

图31

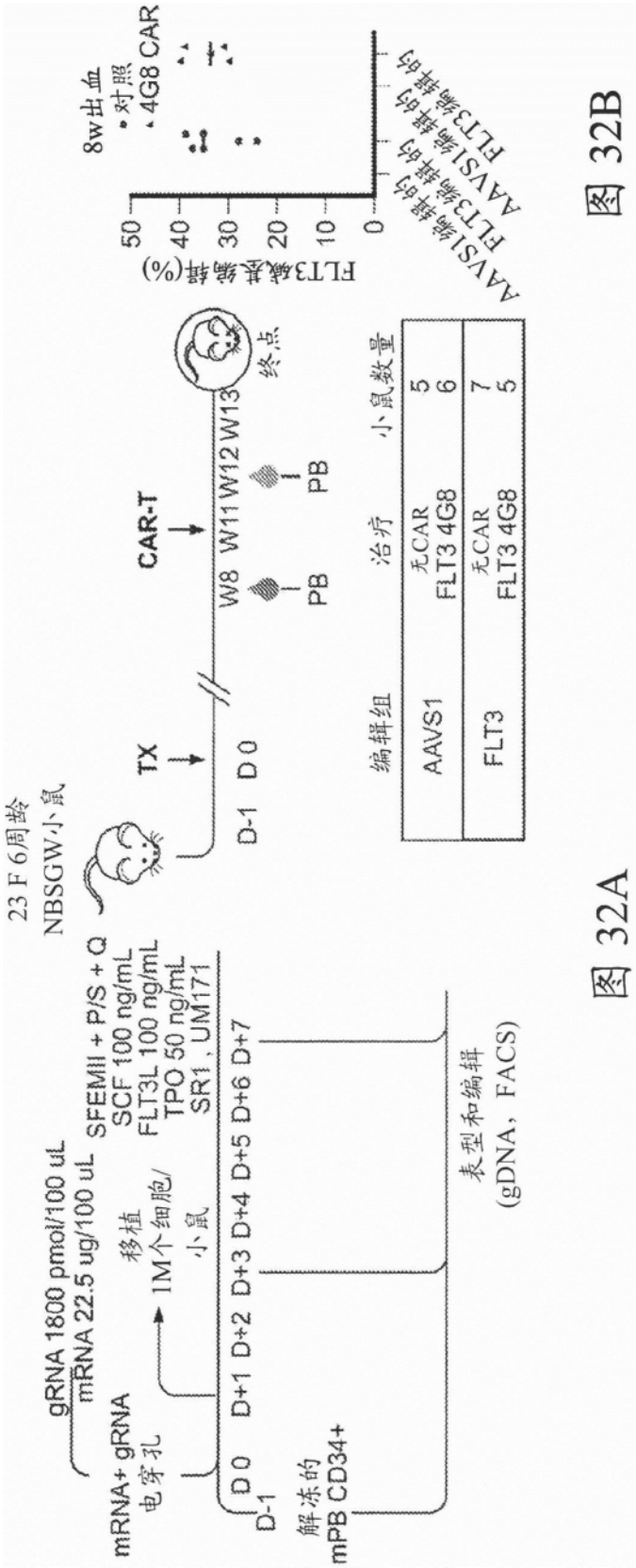

mRNA+ gRNA
电穿孔
gRNA 1800 pmol/100 uL
mRNA 22.5 ug/100 uL
移植
1M个细胞/
小鼠
SFEMII + P/S + Q
SCF 100 ng/mL
FLT3L 100 ng/mL
TPO 50 ng/mL
SR1，UM171
D-1
D 0 D+1 D+2 D+3 D+4 D+5 D+6 D+7
解冻的
mPB CD34+
表型和编辑
(gDNA，FACS)
23 F 6周龄
NBSGW小鼠
TX
D-1 D 0
CAR-T
W8 W11 W12 W13
PB PB
终点
编辑组
治疗
小鼠数量
AAVS1
无CAR 5
FLT3 4G8 6
FLT3
无CAR 7
FLT3 4G8 5
FLT3成功编辑(%)
50 40 30 20 10 0
AAVS1编辑的
FLT3编辑的
AAVS1编辑的
FLT3编辑的
8w出血
对照
4G8 CAR

图 32A

图 32B

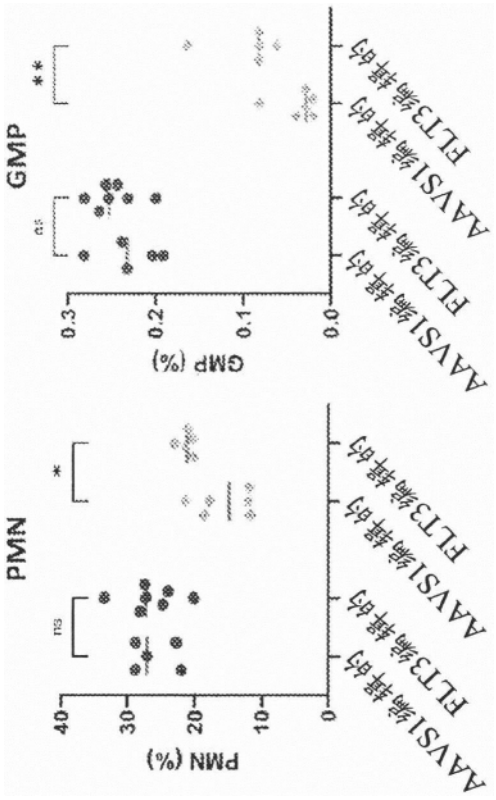

GMP
PMN
GMP (%)
PMN (%)
AAVS1编辑的
FLT3编辑的
ns
*
**

图33A

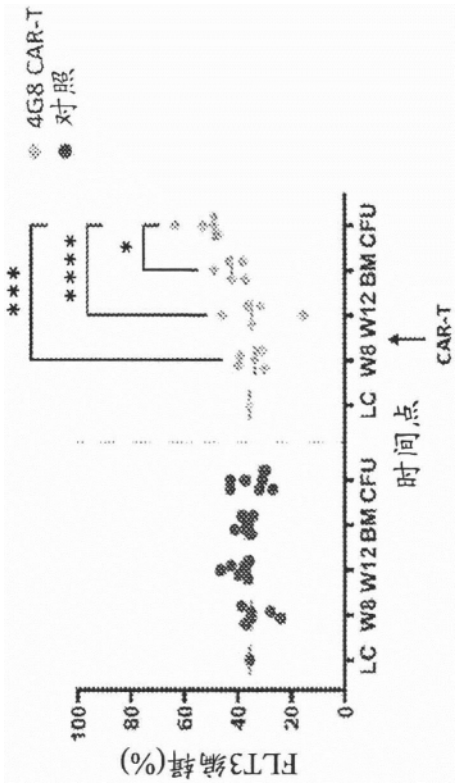

4G8 CAR-T
对照
FLT3编辑(%)
时间点
LC W8 W12 BM CFU
CAR-T
***
****
*

图33B

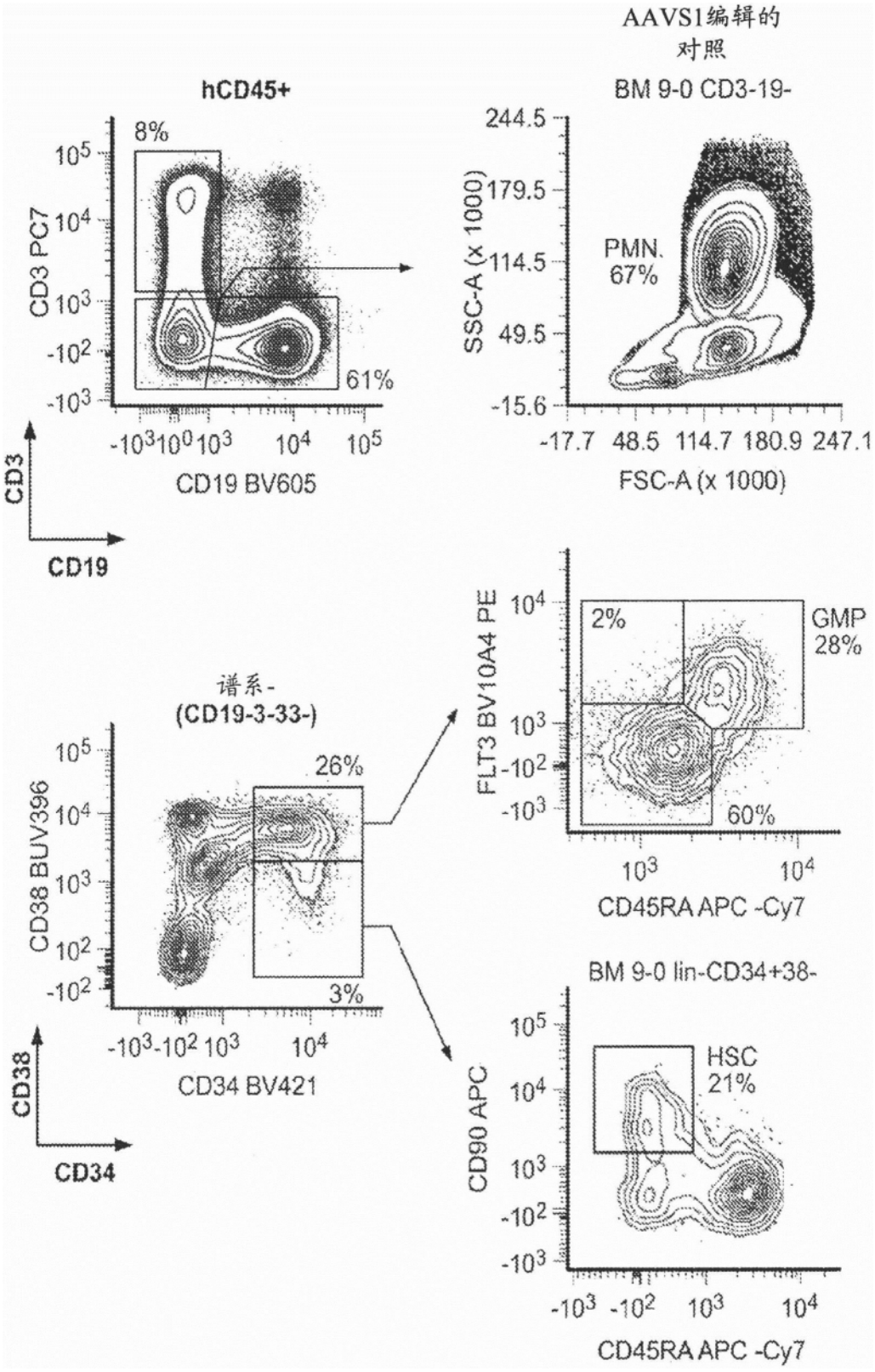

AAVS1编辑的
对照
hCD45+
8%
61%
CD3 PC7
CD19 BV605
CD3
CD19
BM 9-0 CD3-19-
PMN.
67%
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
244.5
179.5
114.5
49.5
-15.6
-17.7 48.5 114.7 180.9 247.1
谱系-
(CD19-3-33-)
26%
3%
CD38 BUV396
CD34 BV421
CD38
CD34
2%
GMP
28%
60%
FLT3 BV10A4 PE
CD45RA APC -Cy7
BM 9-0 lin-CD34+38-
HSC
21%
CD90 APC
CD45RA APC -Cy7

图34

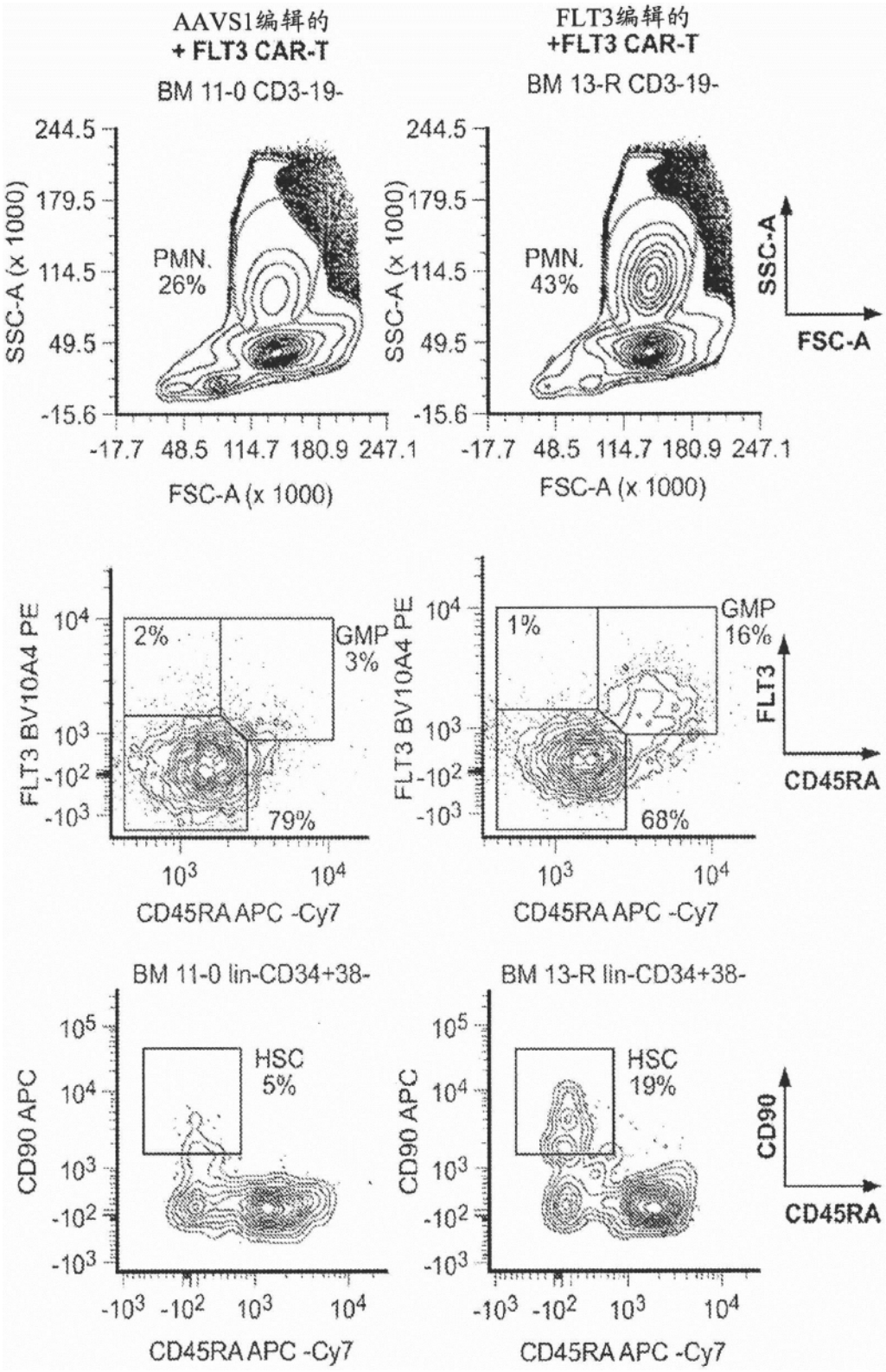

AAVS1编辑的
+ FLT3 CAR-T
BM 11-0 CD3-19-
FLT3编辑的
+FLT3 CAR-T
BM 13-R CD3-19-
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
PMN.
26%
PMN.
43%
SSC-A
FSC-A
FLT3 BV10A4 PE
CD45RA APC -Cy7
2%
GMP
3%
79%
1%
GMP
16%
68%
FLT3
CD45RA
BM 11-0 lin-CD34+38-
BM 13-R lin-CD34+38-
CD90 APC
HSC
5%
HSC
19%
CD90
CD45RA

图34(续)

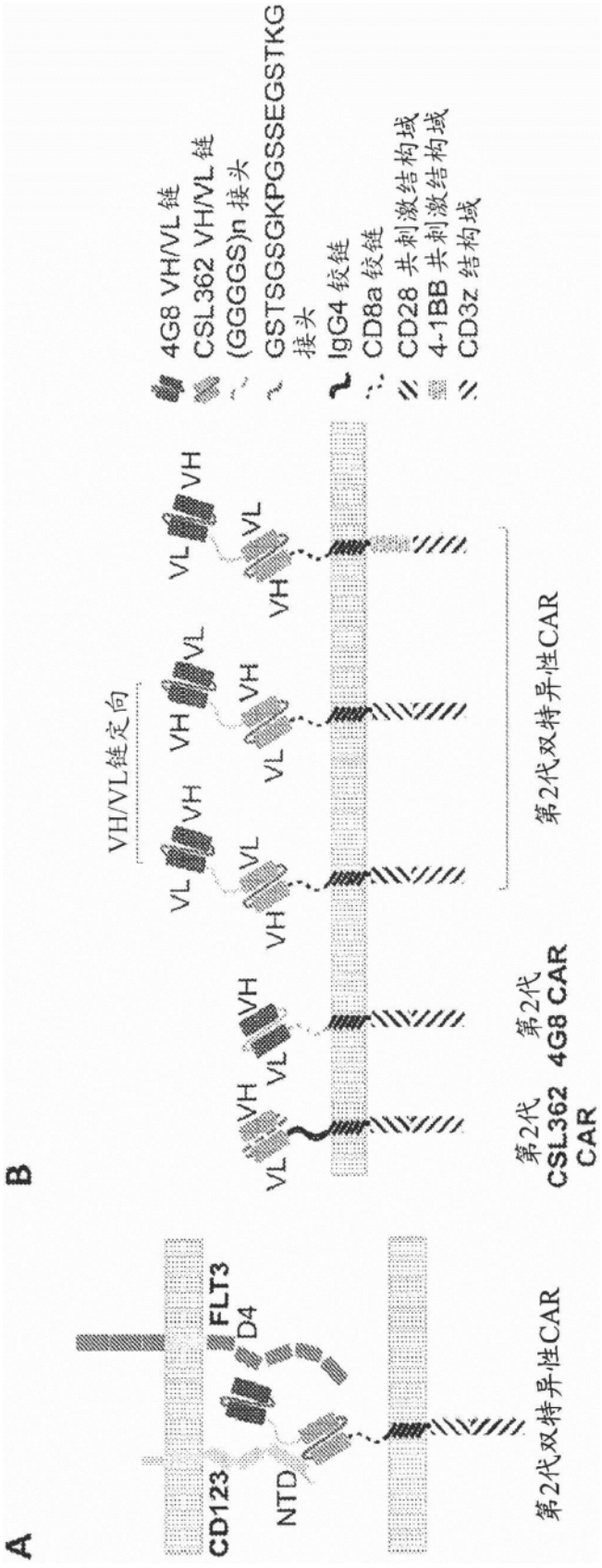

A
CD123
FLT3
D4
NTD
第2代双特异性CAR
B
VH/VL链定向
第2代
CSL362
CAR
第2代
4G8 CAR
第2代双特异性CAR
4G8 VH/VL链
CSL362 VH/VL链
(GGGGS)n 接头
GSTSGSGKPGSSEGSTKG
接头
IgG4 铰链
CD8a 铰链
CD28 共刺激结构域
4-1BB 共刺激结构域
CD3z 结构域

图35

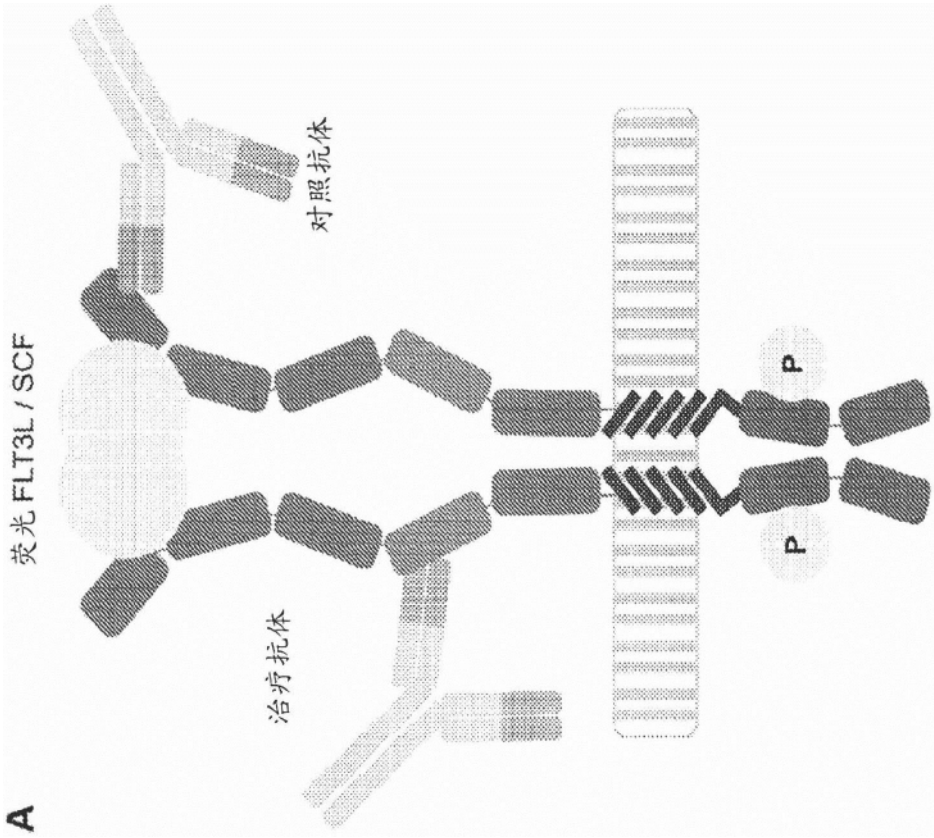


图36

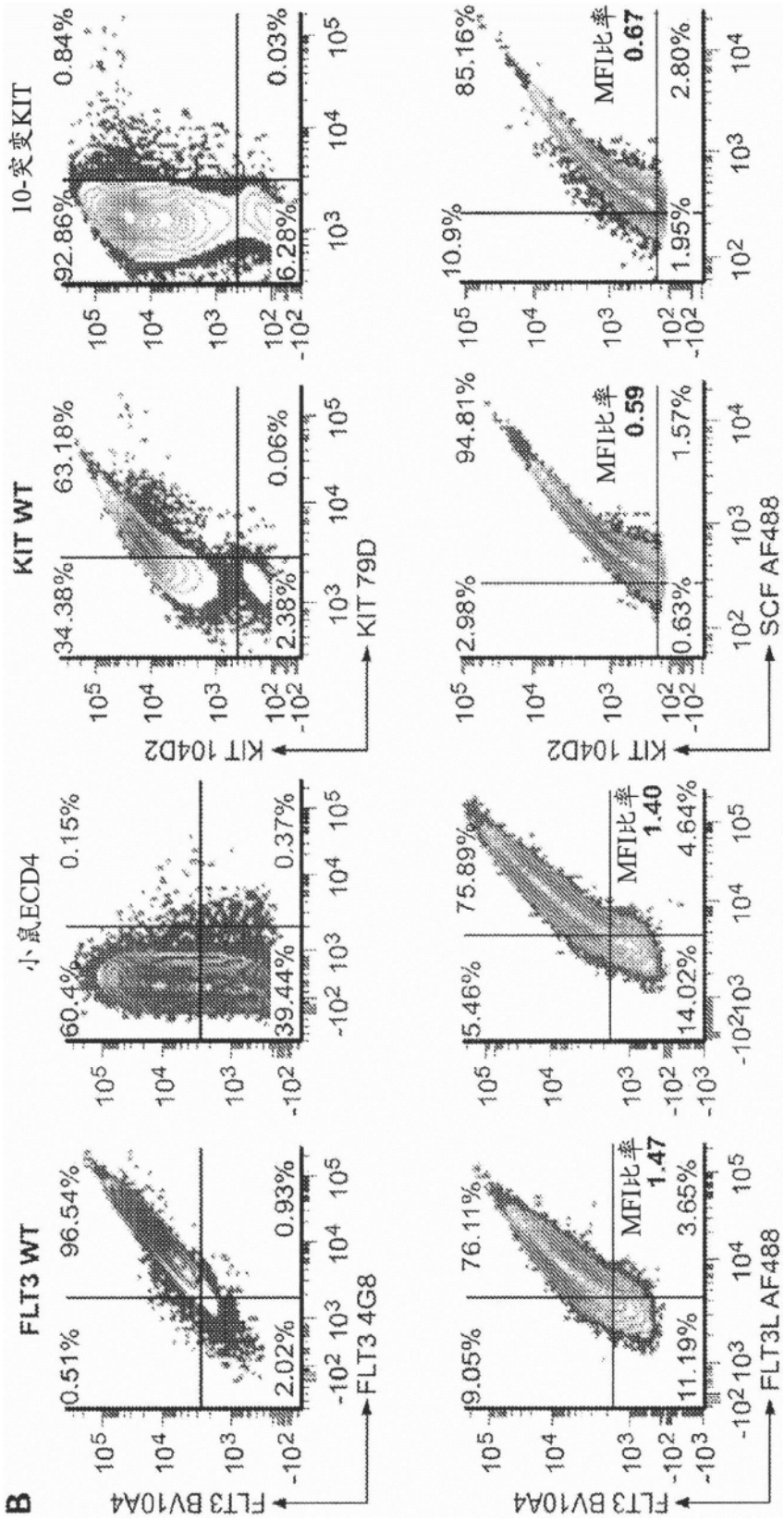

B
FLT3 WT
KIT WT
10-突变KIT
小鼠ECD4
FLT3 4G8
KIT 79D
SCF AF488
FLT3L AF488
KIT 104D2
FLT3 BV10A4
MFI比率
1.47
1.40
0.59
0.67
0.51%
96.54%
2.02%
0.93%
60.4%
0.15%
39.44%
0.37%
34.38%
63.18%
2.38%
0.06%
92.86%
0.84%
6.28%
0.03%
9.05%
76.11%
11.19%
3.65%
75.89%
5.46%
14.02%
4.64%
2.98%
94.81%
0.63%
1.57%
10.9%
85.16%
1.95%
2.80%

图36(续)

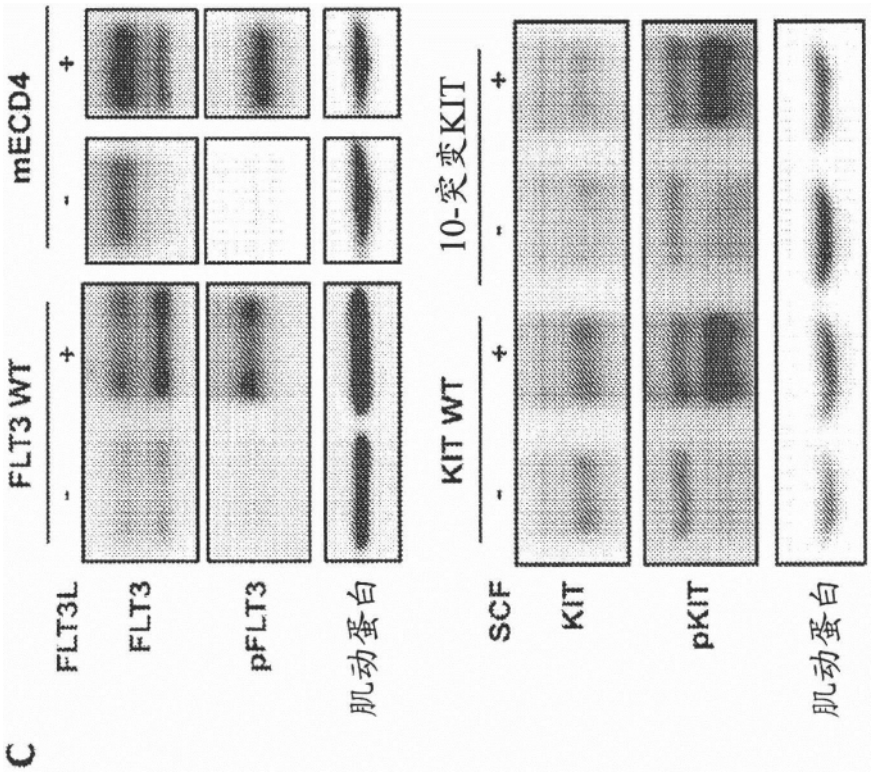

C
FLT3 WT
mECD4
-
+
-
+
FLT3L
FLT3
pFLT3
肌动蛋白
KIT WT
10-突变KIT
-
+
-
+
SCF
KIT
pKIT
肌动蛋白

图36(续)

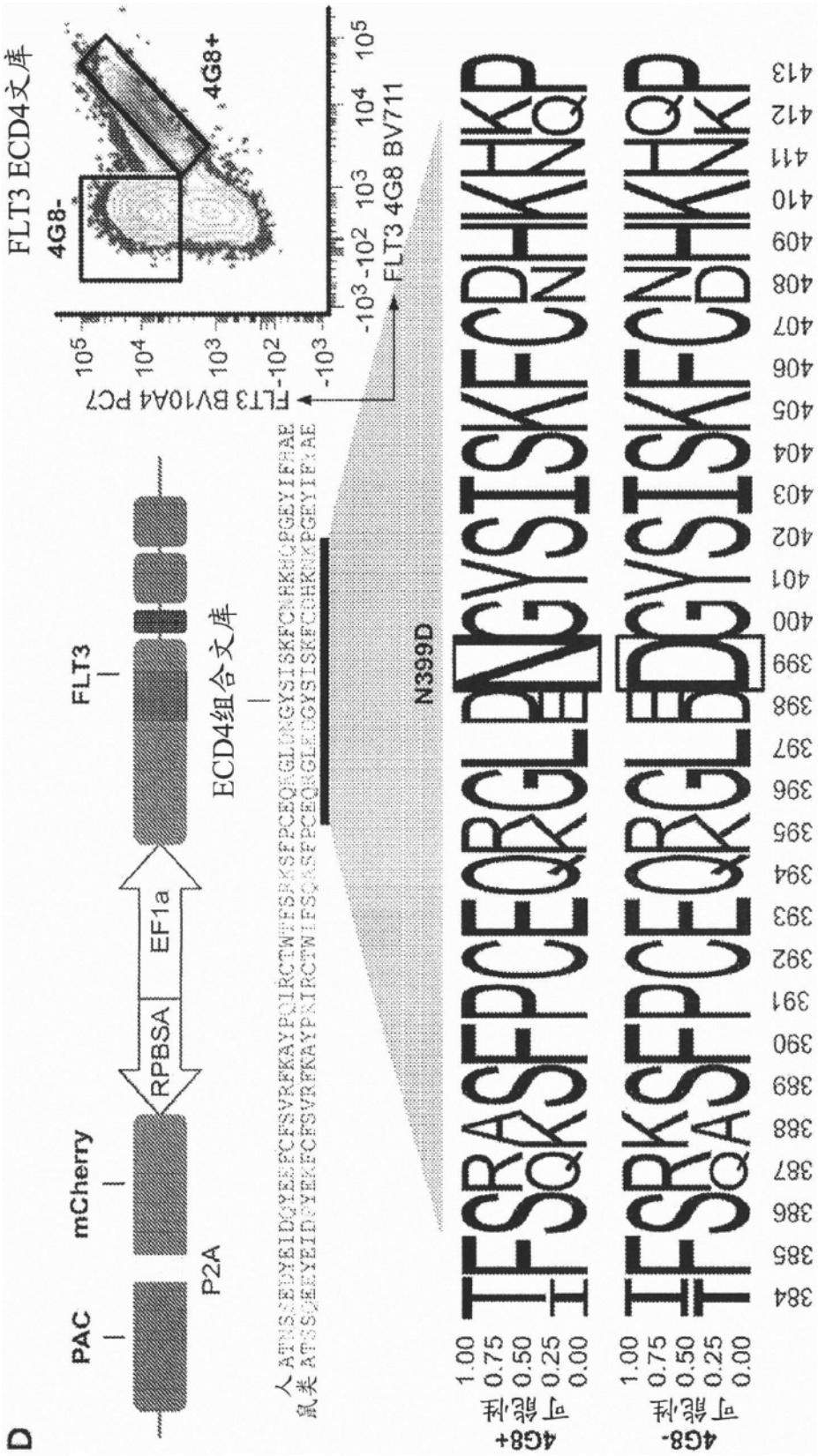

D
PAC
mCherry
P2A
RPBSA
EF1a
FLT3
ECD4组合文库
人 ATPSSEDYEIDQYEEPCFSVREKAYPQIRCTWPFSRKSFPCEQRGLDNGYSISKFCNHKHQPGEYIFPAE
鼠类 ATPSSEEYEIDTYEKPCFSVREKAYPNIRCTWIFSQASFPCEQNGLEDGYSISKFCDHKHKPGEYIFYAE
N399D
FLT3 ECD4文库
4G8-
4G8+
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711
可能性
4G8+
4G8-

图36(续)

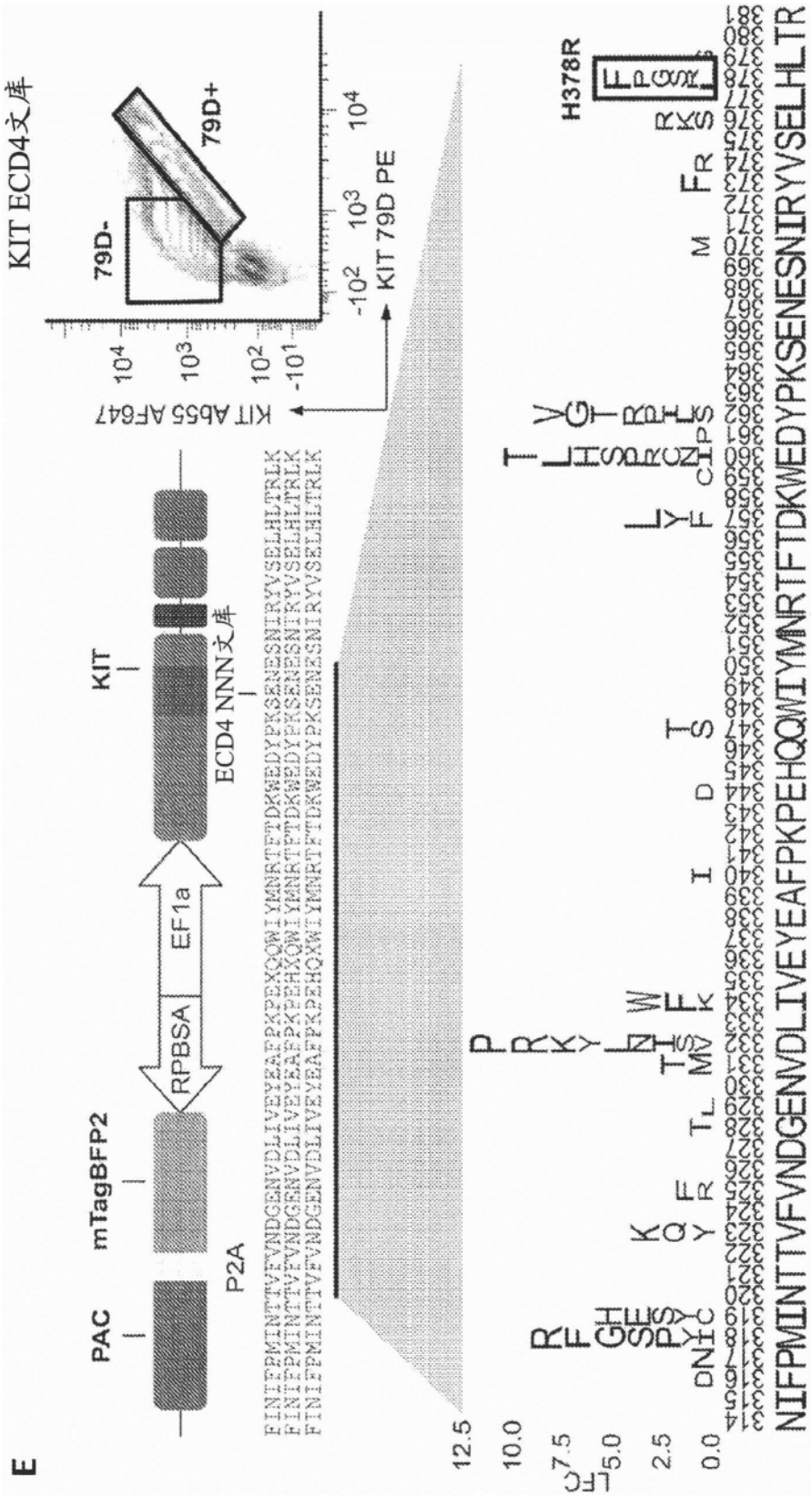

E
PAC
mTagBFP2
P2A
RPBSA
EF1a
KIT
ECD4 NNN文库
KIT ECD4文库
79D-
79D+
KIT 79D PE
H378R

图36(续)

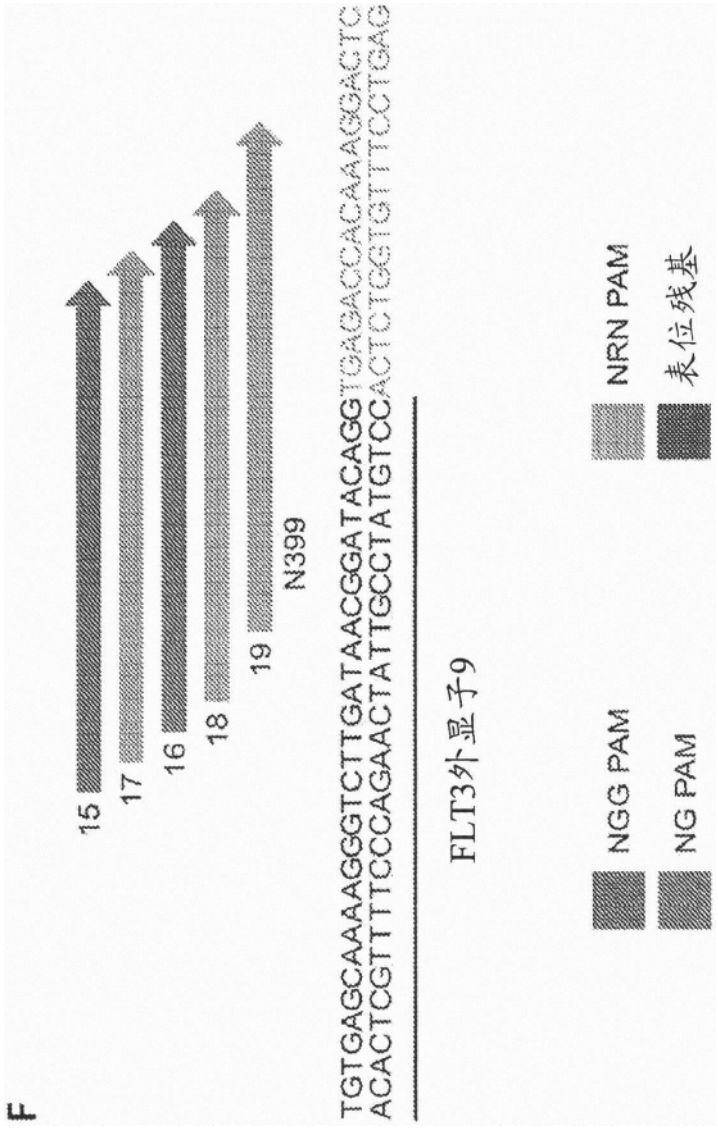

F
15
17
16
18
19
N399
TGTGAGCAAAAGGGTCTTGATAACGGATACAGGTGAGACCACAAAGGACTC
ACACTCGTTTTCCCAGAACTATTGCCTATGTCCACTCTCGTGTTTCCTGAG
FLT3外显子9
NGG PAM
NG PAM
NRN PAM
表位残基

图36(续)

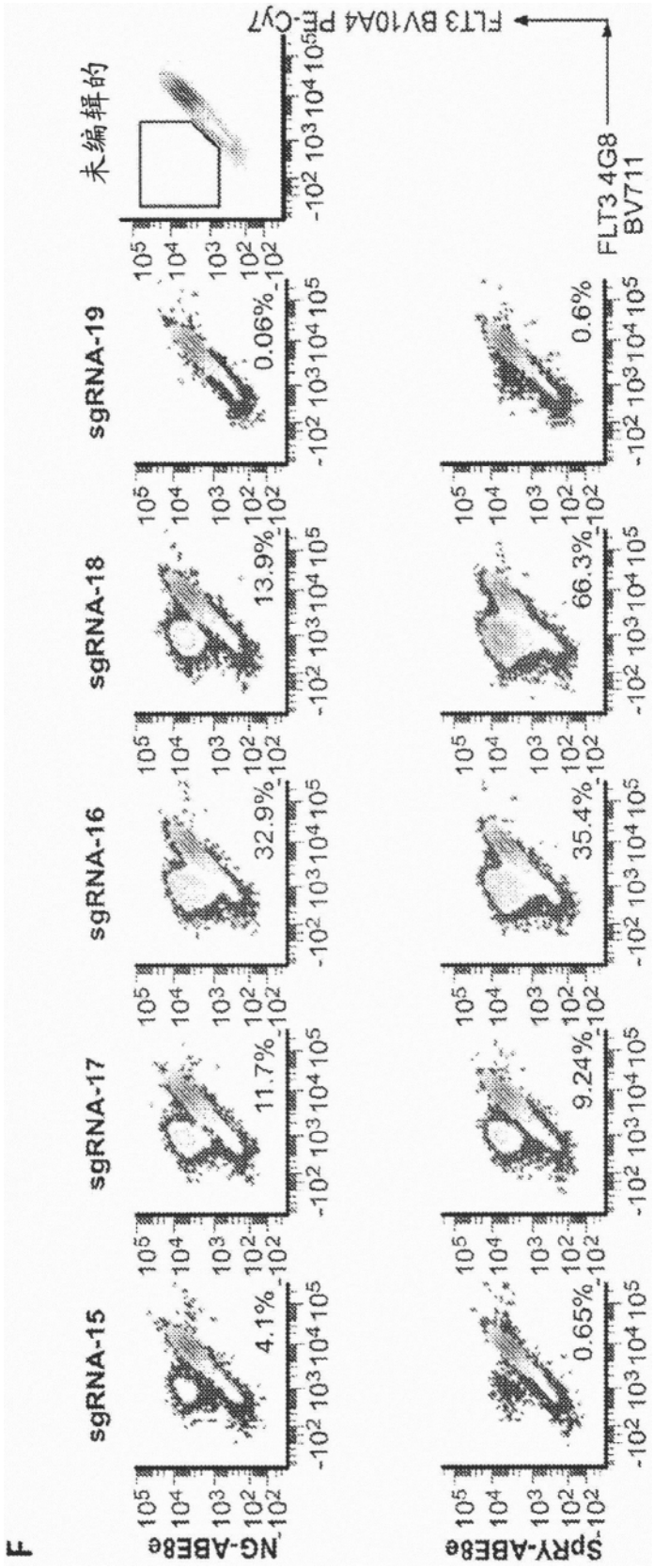

F
NG-ABE8e
SpRY-ABE8e
sgRNA-15
sgRNA-17
sgRNA-16
sgRNA-18
sgRNA-19
未编辑的
4.1%
11.7%
32.9%
13.9%
0.06%
0.65%
9.24%
35.4%
66.3%
0.6%
FLT3 4G8 BV711
FLT3 BV10A4 PE-Cy7

图36(续)

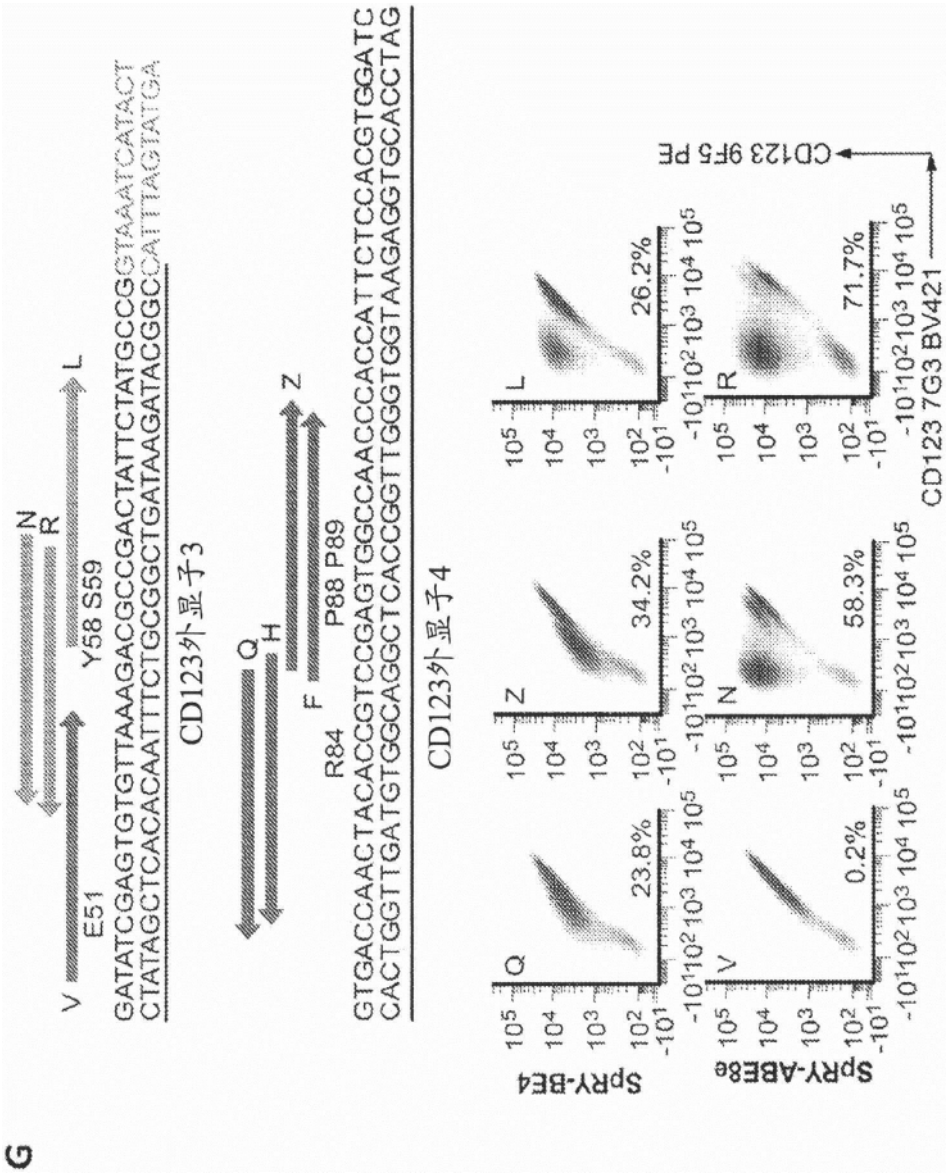

G
N
R
L
V
E51
Y58 S59
GATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGTAAATCATACT
CTATAGCTCACACAATTTCTGCGGCTGATAAGATACGGCCATTTAGTATGA
CD123外显子3
Q
H
Z
F
R84
P88 P89
GTGACCAACTACACCGTCCGAGTGGCCAACCCACCATTCTCCACGTGGATC
CACTGGTTGATGTGGCAGGCTCACCGGTTGGGTGGTAAGAGGTGCACCTAG
CD123外显子4
SpRY-BE4
SpRY-ABE8e
Q
V
Z
N
L
R
23.8%
0.2%
34.2%
58.3%
26.2%
71.7%
CD123 7G3 BV421
CD123 9F5 PE

图36(续)

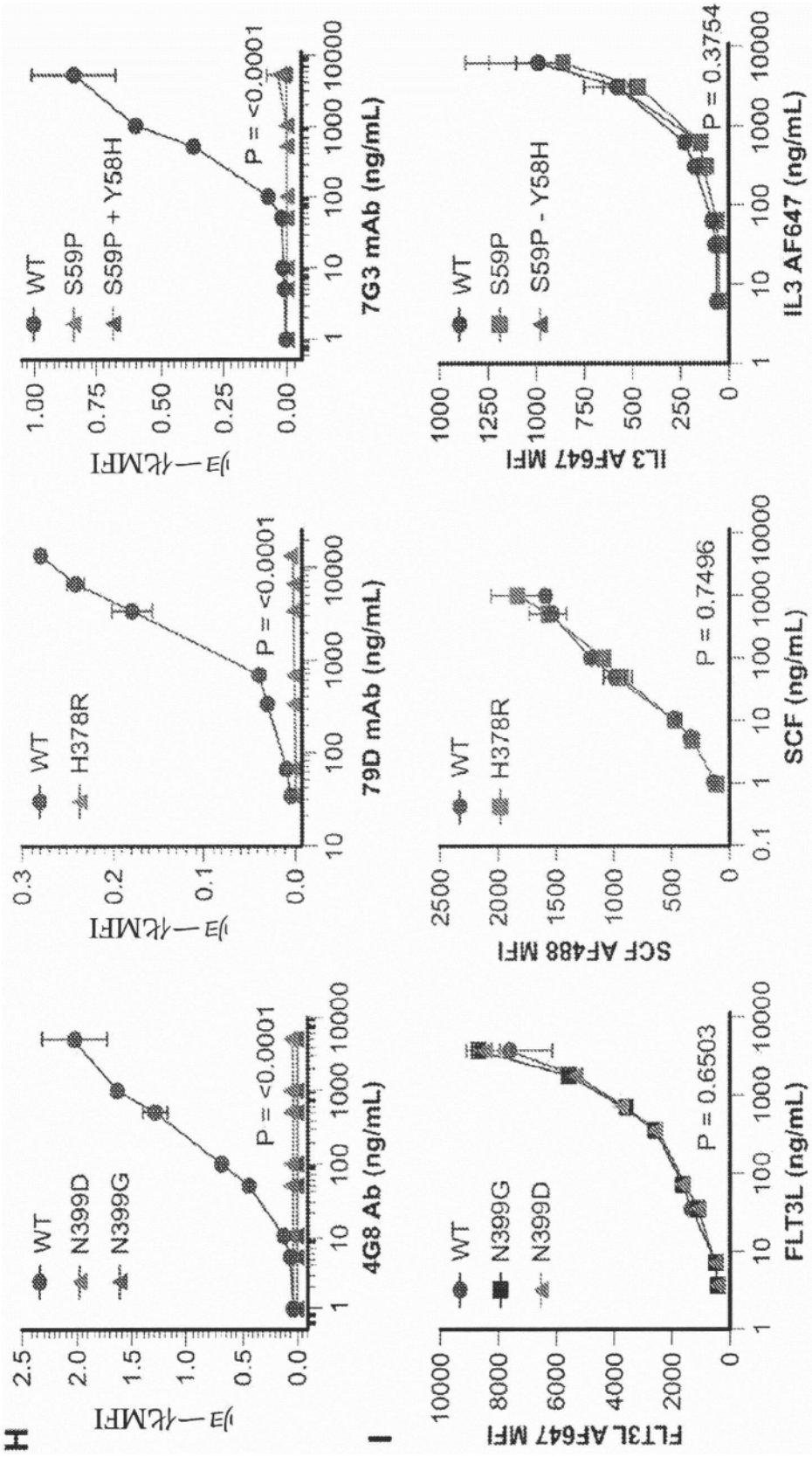

H
WT
N399D
N399G
P = <0.0001
4G8 Ab (ng/mL)
79D mAb (ng/mL)
H378R
P = <0.0001
7G3 mAb (ng/mL)
S59P
S59P + Y58H
P = <0.0001
I
FLT3L AF647 MFI
P = 0.6503
FLT3L (ng/mL)
SCF AF488 MFI
P = 0.7496
SCF (ng/mL)
IL3 AF647 MFI
S59P - Y58H
P = 0.3754
IL3 (ng/mL)

图36(续)

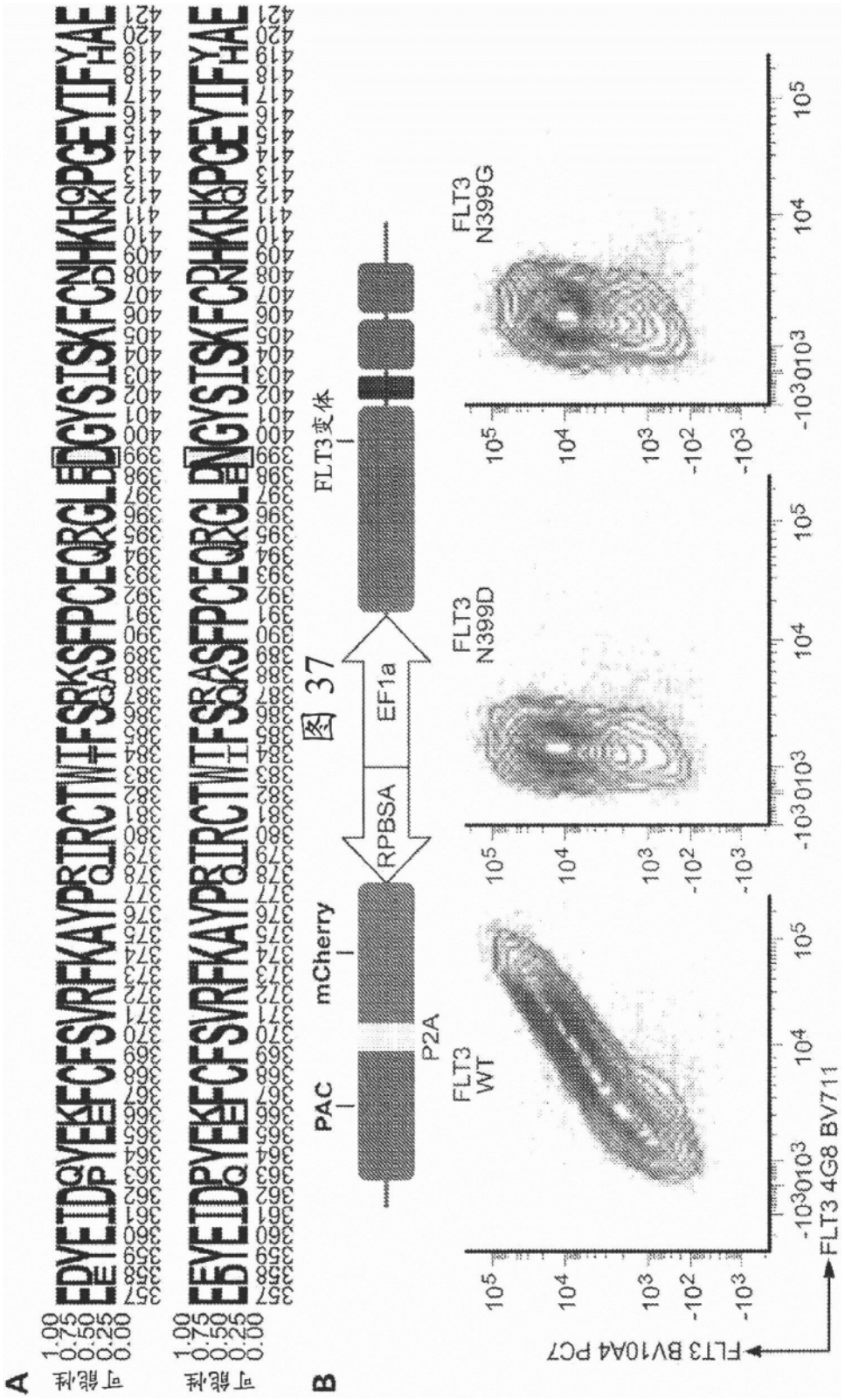

A
可能性
B
PAC
mCherry
P2A
RPBSA
EF1a
FLT3变体
FLT3 WT
FLT3 N399D
FLT3 N399G
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711

图37

图37(续)

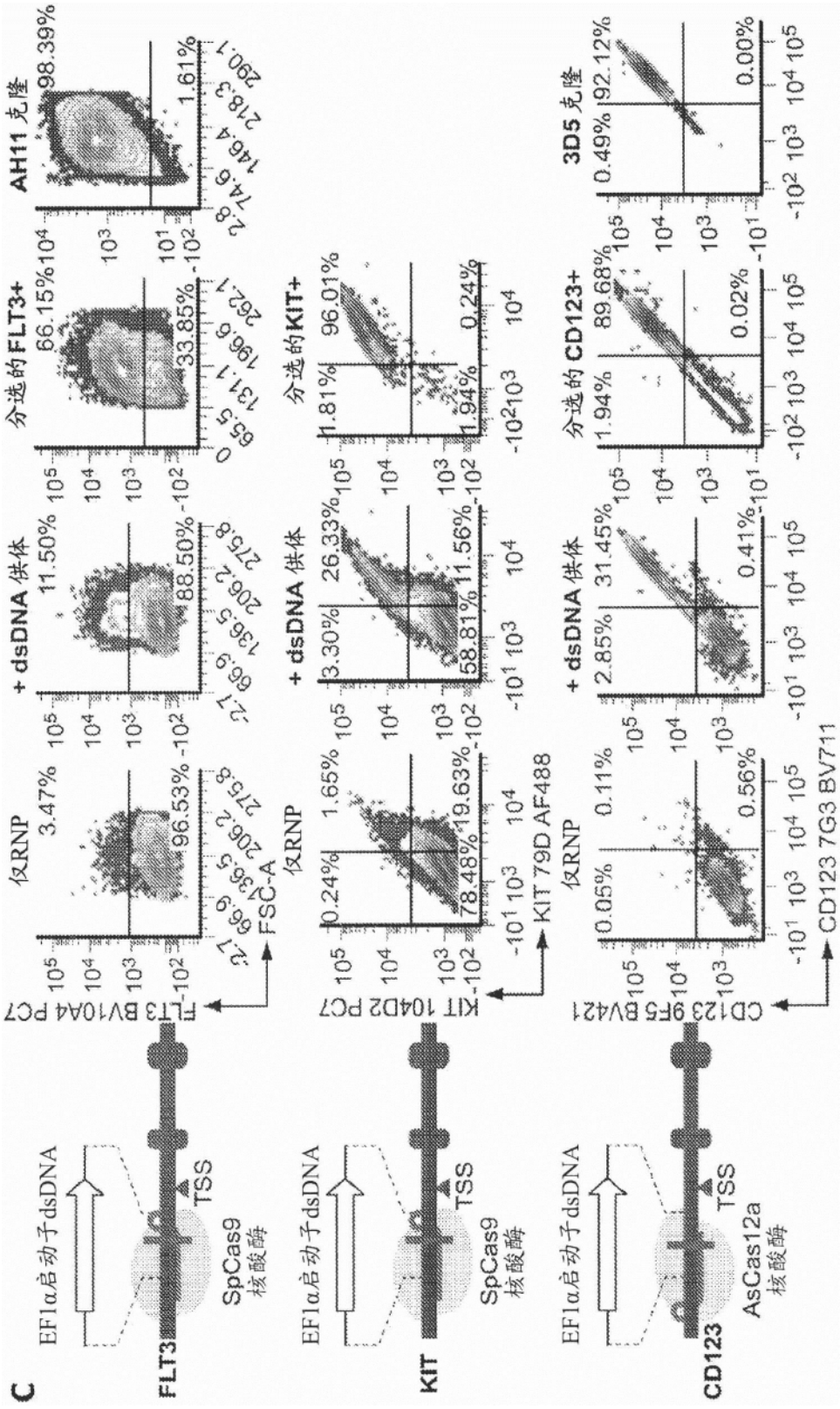

C
EF1α启动子dsDNA
FLT3
TSS
SpCas9
核酸酶
KIT
CD123
AsCas12a
仅RNP
+ dsDNA 供体
分选的FLT3+
分选的KIT+
分选的CD123+
AH11 克隆
3D5 克隆
FLT3 BV10A4 PC7
KIT 104D2 PC7
CD123 9F5 BV421
KIT 79D AF488
CD123 7G3 BV711
FSC-A
3.47%
96.53%
11.50%
88.50%
66.15%
33.85%
98.39%
1.61%
0.24%
1.65%
78.48%
19.63%
3.30%
26.33%
58.81%
11.56%
1.81%
96.01%
1.94%
0.24%
0.05%
0.11%
0.56%
2.85%
31.45%
0.41%
1.94%
89.68%
0.02%
0.49%
92.12%
0.00%

图37(续)

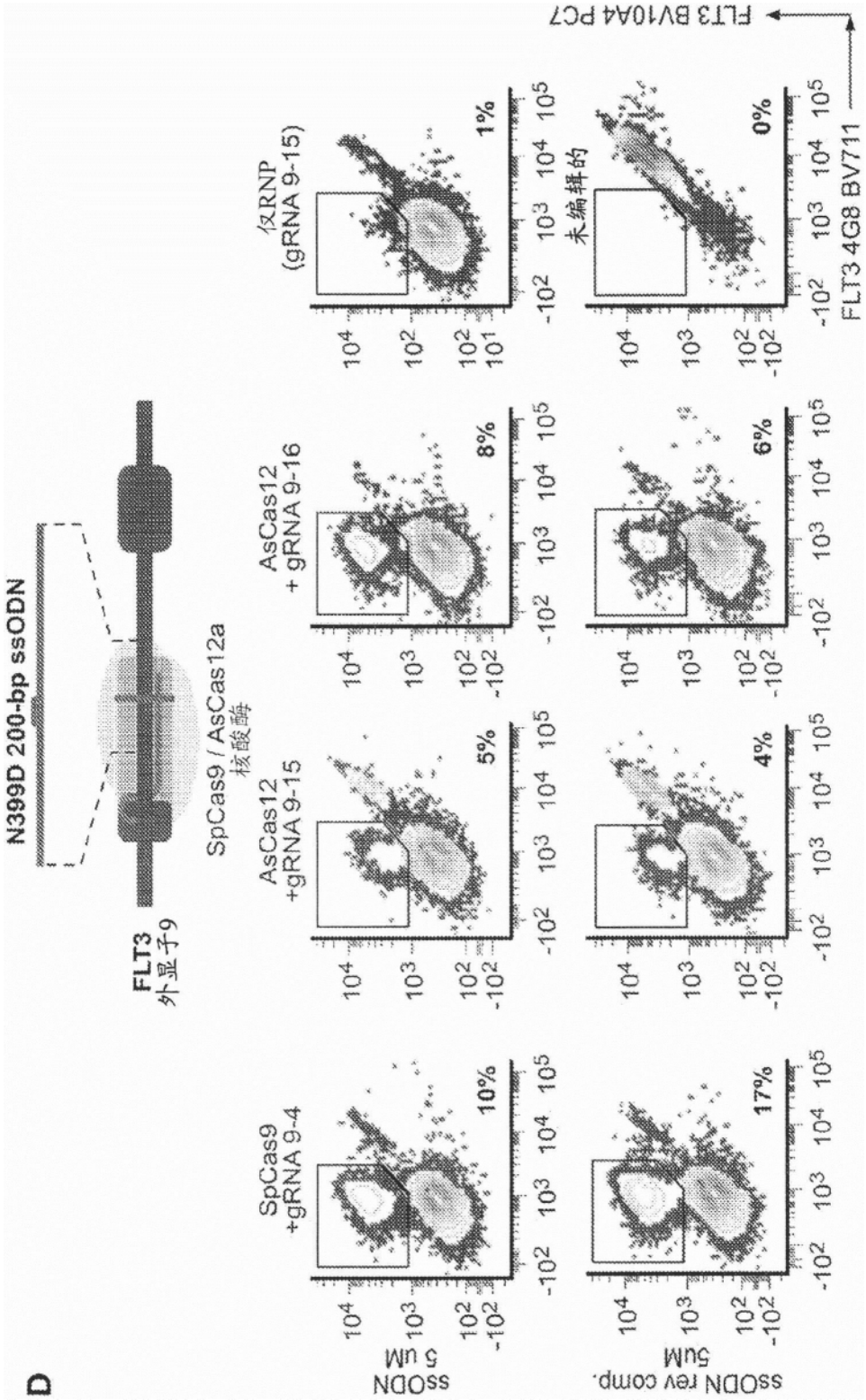

D
N399D 200-bp ssODN
FLT3
外显子9
SpCas9 / AsCas12a
核酸酶
SpCas9
+gRNA 9-4
AsCas12
+gRNA 9-15
AsCas12
+ gRNA 9-16
仅RNP
(gRNA 9-15)
未编辑的
10%
5%
8%
1%
17%
4%
6%
0%
ssODN
5 uM
ssODN rev comp.
5uM
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711

图37(续)

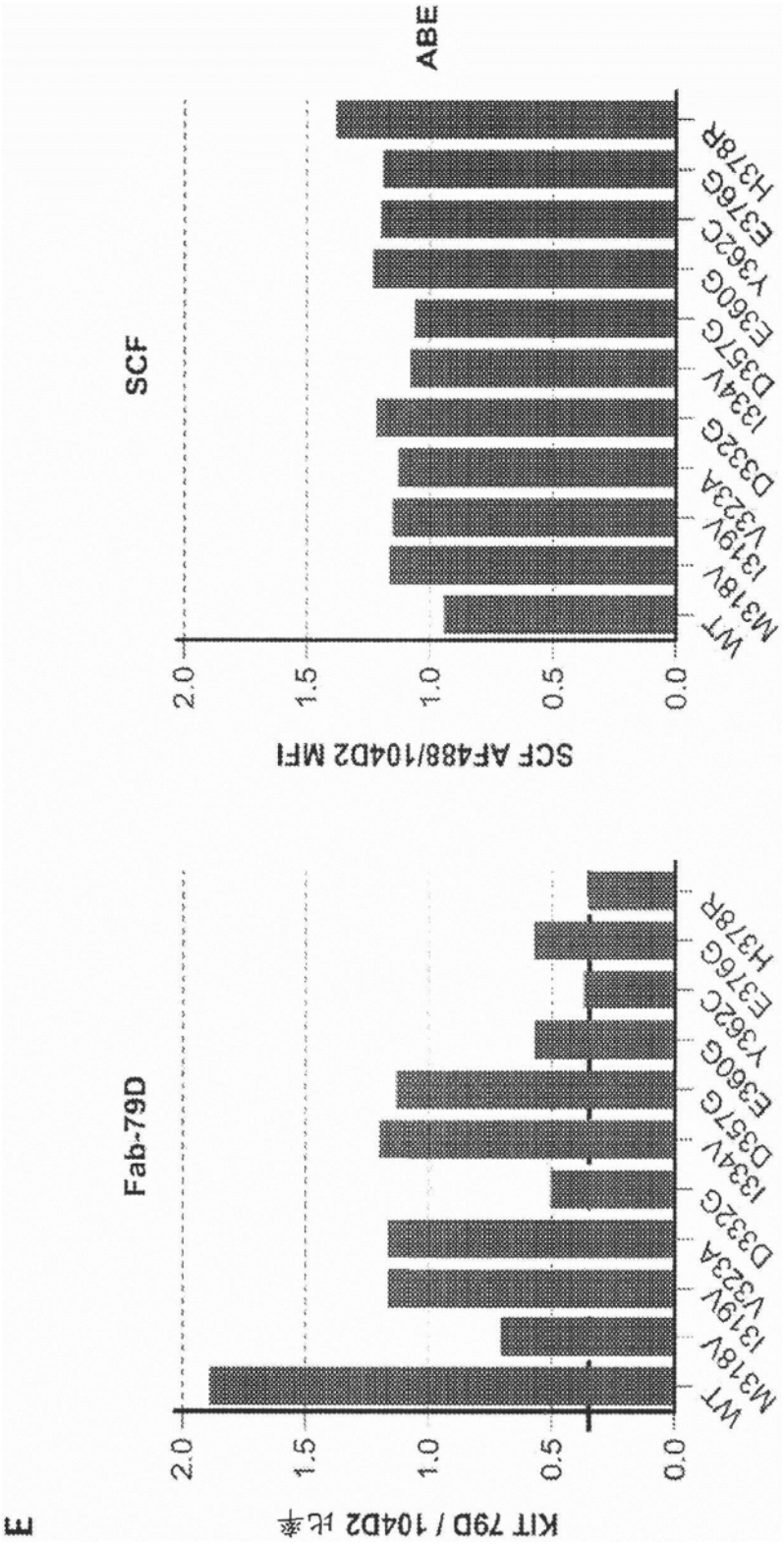

E
KIT 79D / 104D2 比率
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Fab-79D
WT
M318V
I319V
V323A
D332G
I334V
D357G
E360G
V362C
E376G
H378R
SCF AF488/104D2 MFI
SCF
ABE

图37(续)

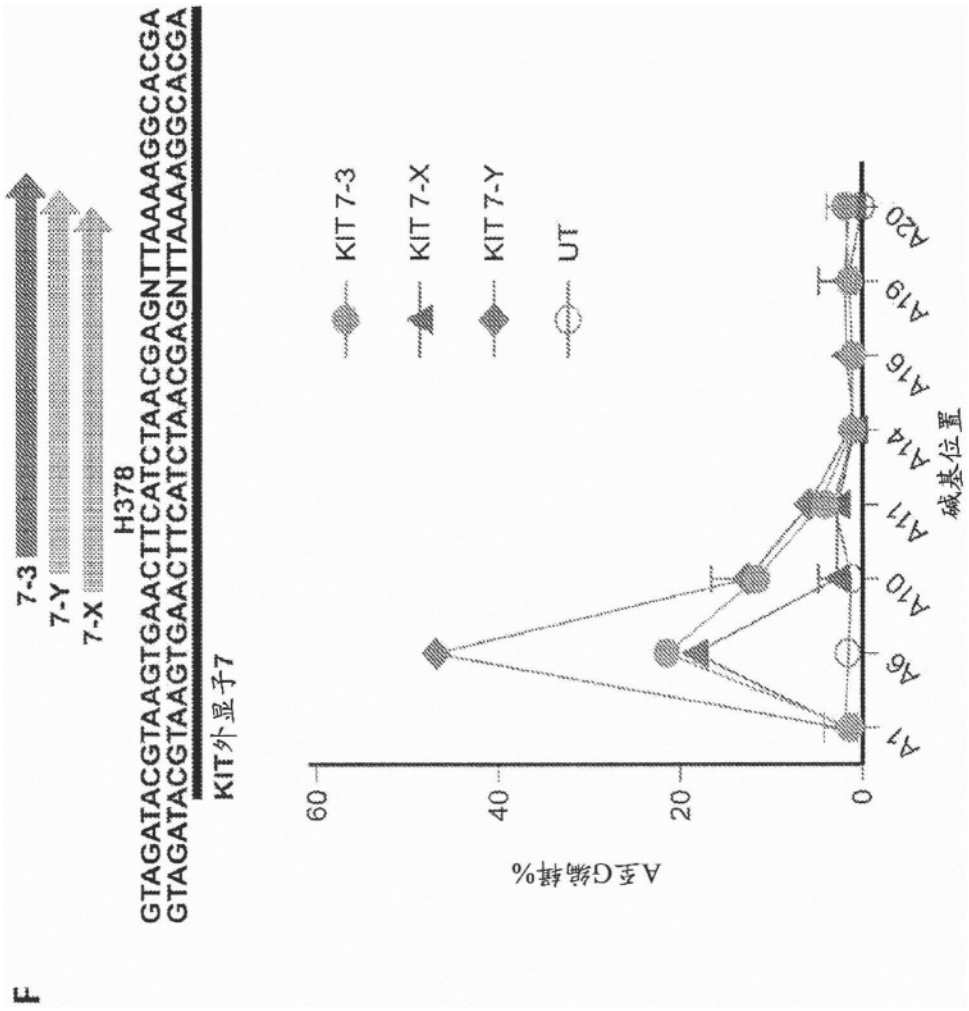

F
7-3
7-Y
7-X
H378
GTAGATACGTAAGTGAACTTCATCTAACGAGNTTAAAAGGCACGA
GTAGATACGTAAGTGAACTTCATCTAACGAGNTTAAAAGGCACGA
KIT外显子7
KIT 7-3
KIT 7-X
KIT 7-Y
UT
A至G编辑%
60
40
20
0
A7
A6
A10
A11
A14
A16
A19
A20
碱基位置

图37(续)

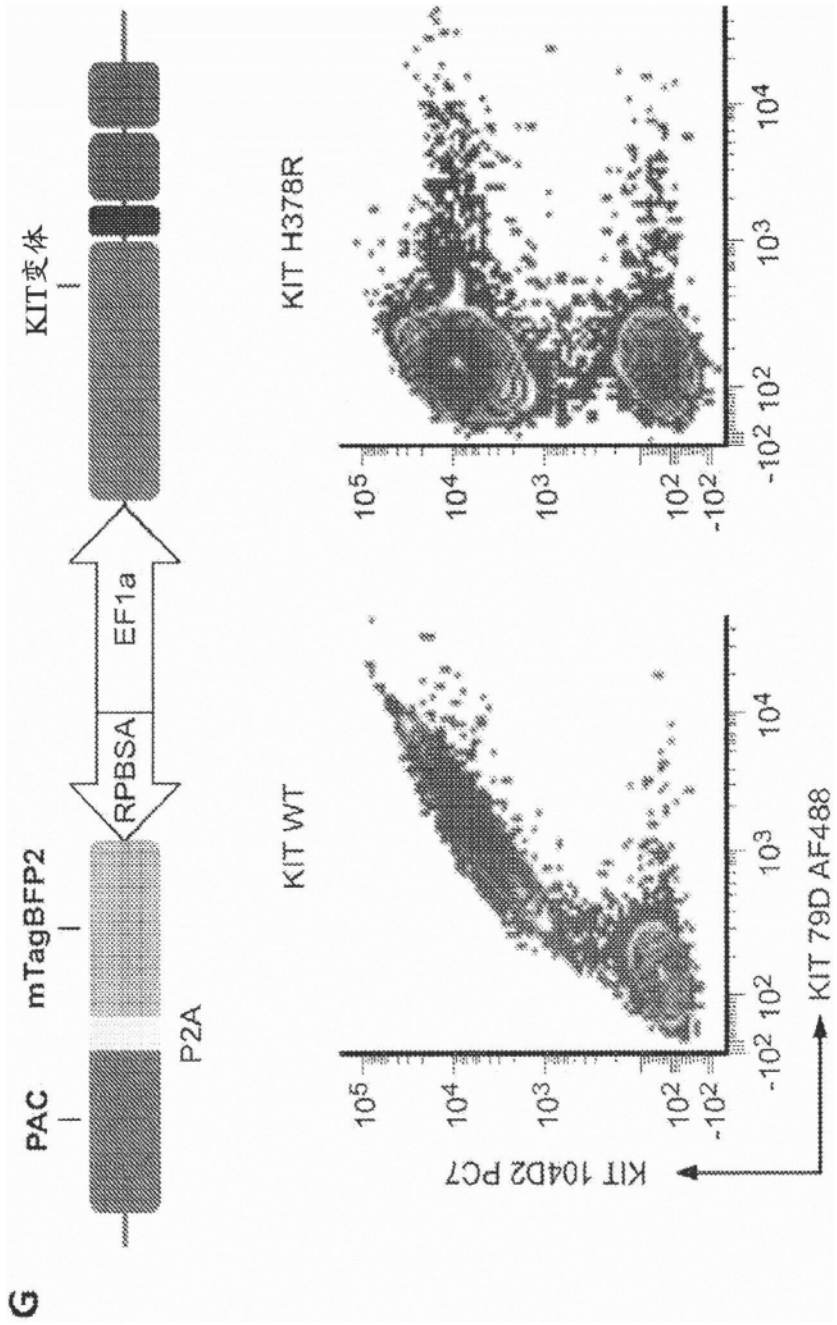

G
PAC
mTagBFP2
P2A
RPBSA
EF1a
KIT变体
KIT WT
KIT H378R
KIT 104D2 PC7
KIT 79D AF488
10^5
10^4
10^3
10^2
-10^2

图37(续)

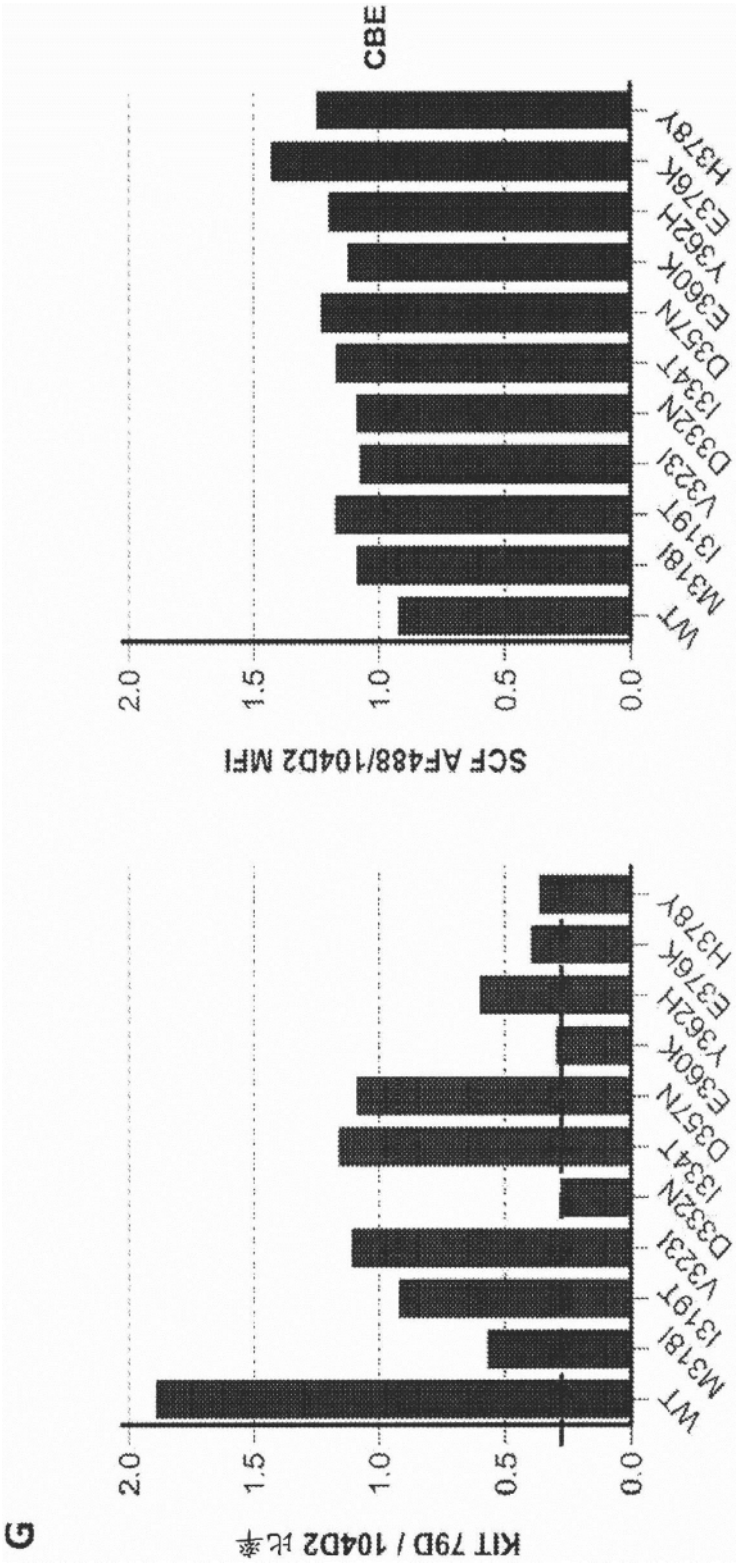

CBE
SCF AF488/104D2 MFI
KIT 79D / 104D2 比率
WT
M318I
I319T
V323I
D332N
I334T
D357N
E360K
Y362H
E376K
H378Y
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

图37(续)

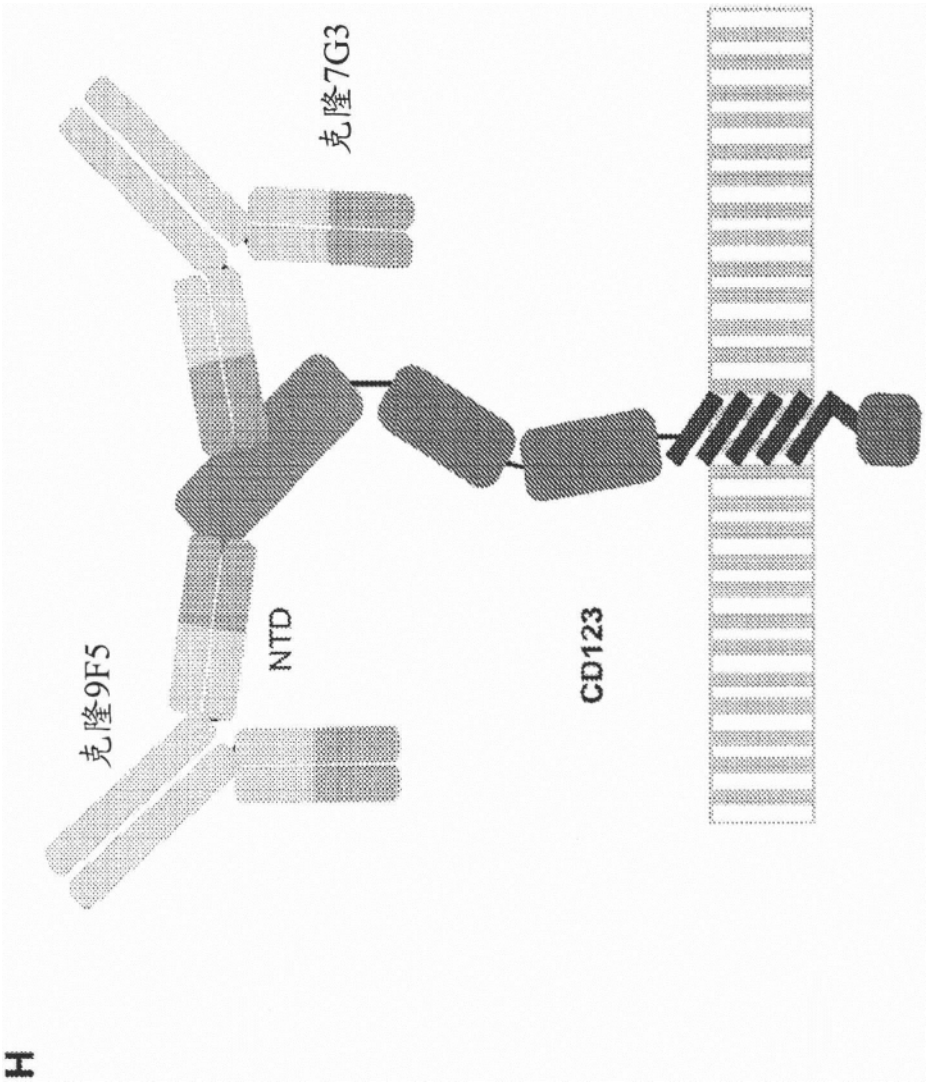


图37(续)

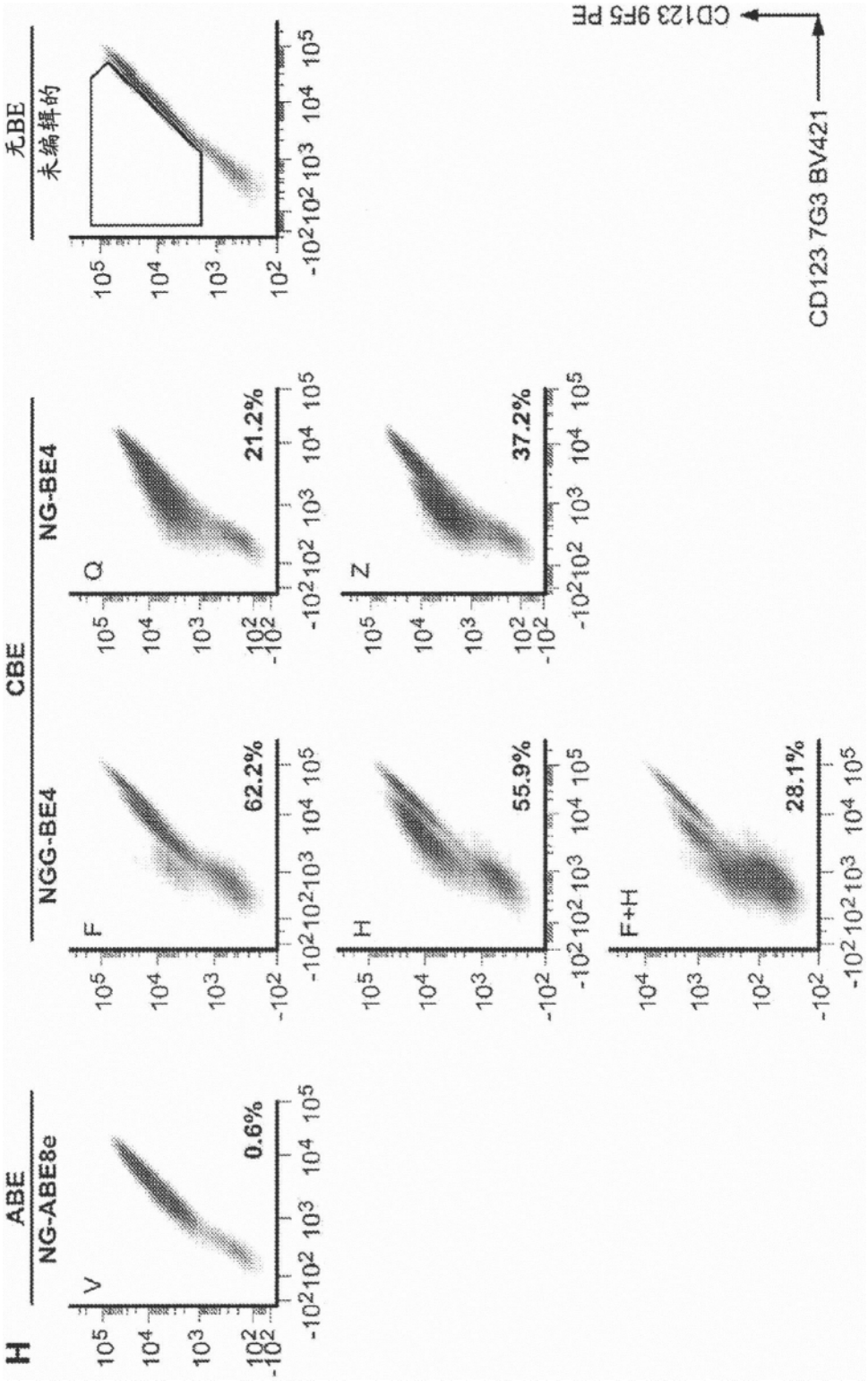

H
ABE
NG-ABE8e
V
0.6%
CBE
NGG-BE4
F
62.2%
NG-BE4
Q
21.2%
无BE
未编辑的
H
55.9%
Z
37.2%
F+H
28.1%
CD123 9F5 PE
CD123 7G3 BV421

图37(续)

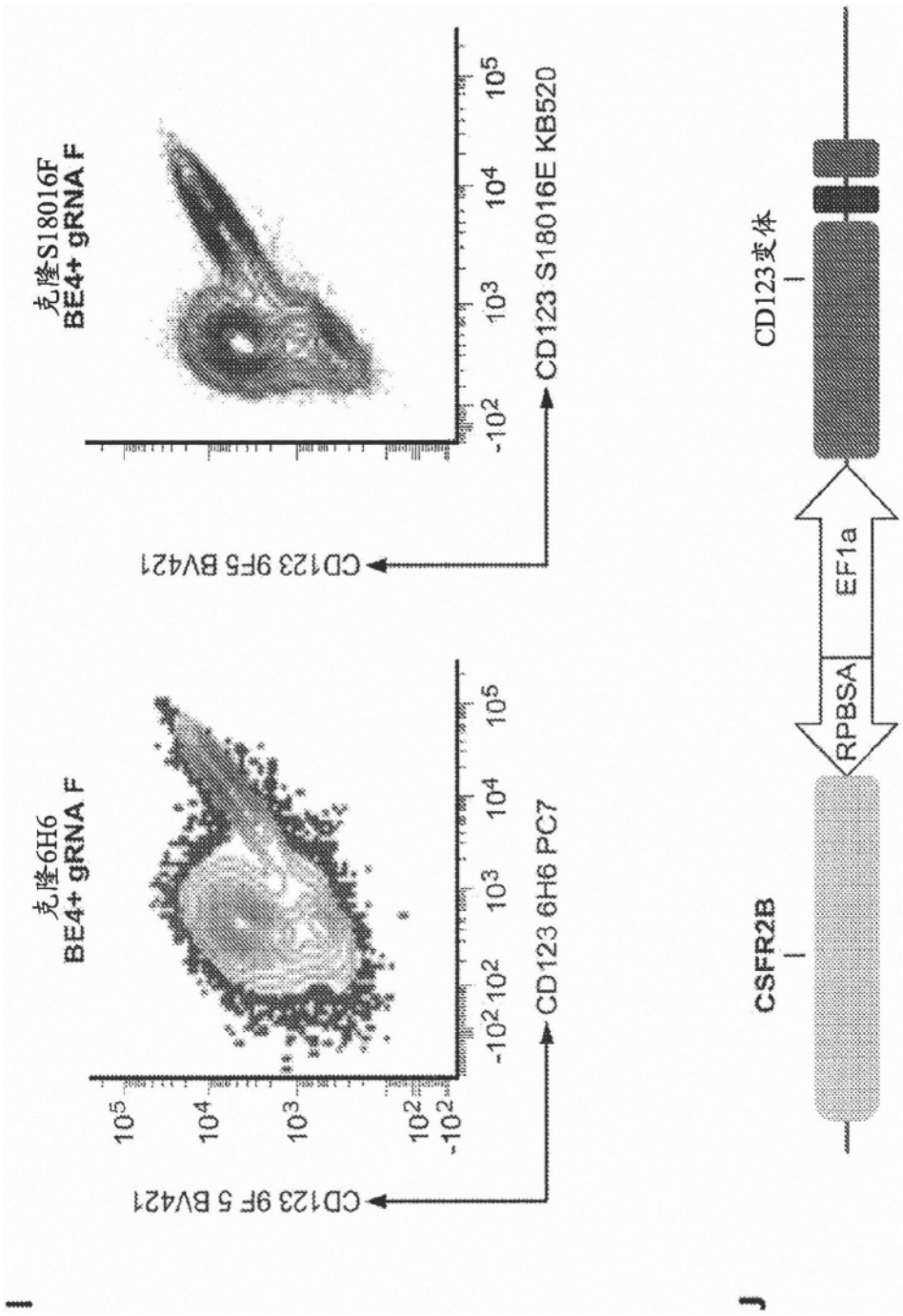

I
克隆6H6
BE4+ gRNA F
CD123 9F 5 BV421
CD123 6H6 PC7
J
CSFR2B
RPBSA
EF1a
CD123变体
克隆S18016F
BE4+ gRNA F
CD123 9F5 BV421
CD123 S18016E KB520

图37(续)

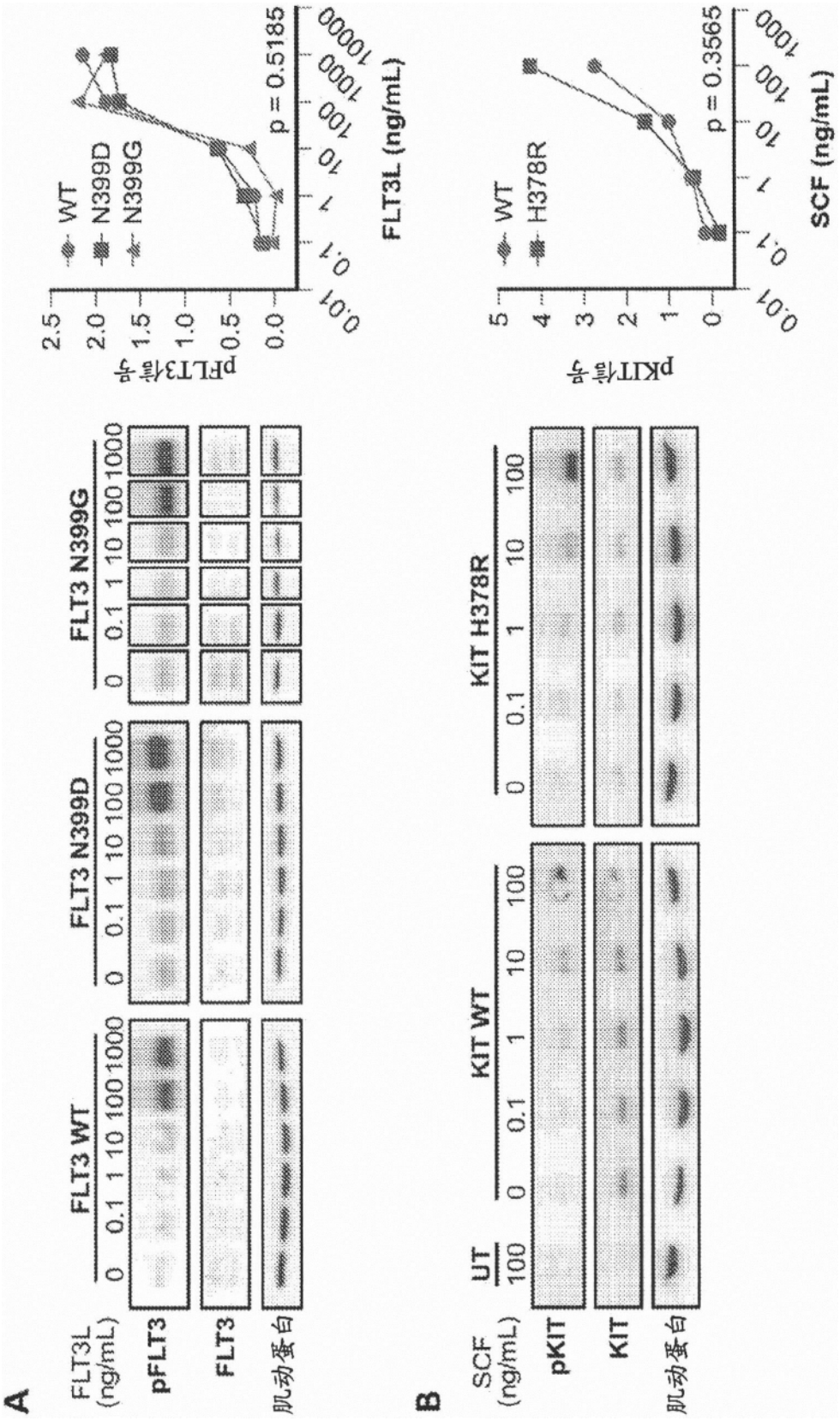

A
FLT3L (ng/mL)
FLT3 WT
FLT3 N399D
FLT3 N399G
0 0.1 1 10 100 1000
pFLT3
FLT3
肌动蛋白
WT
N399D
N399G
p = 0.5185
pFLT3信号
FLT3L (ng/mL)
B
SCF (ng/mL)
UT
100
KIT WT
KIT H378R
0 0.1 1 10 100
pKIT
KIT
肌动蛋白
WT
H378R
p = 0.3565
pKIT信号
SCF (ng/mL)

图38

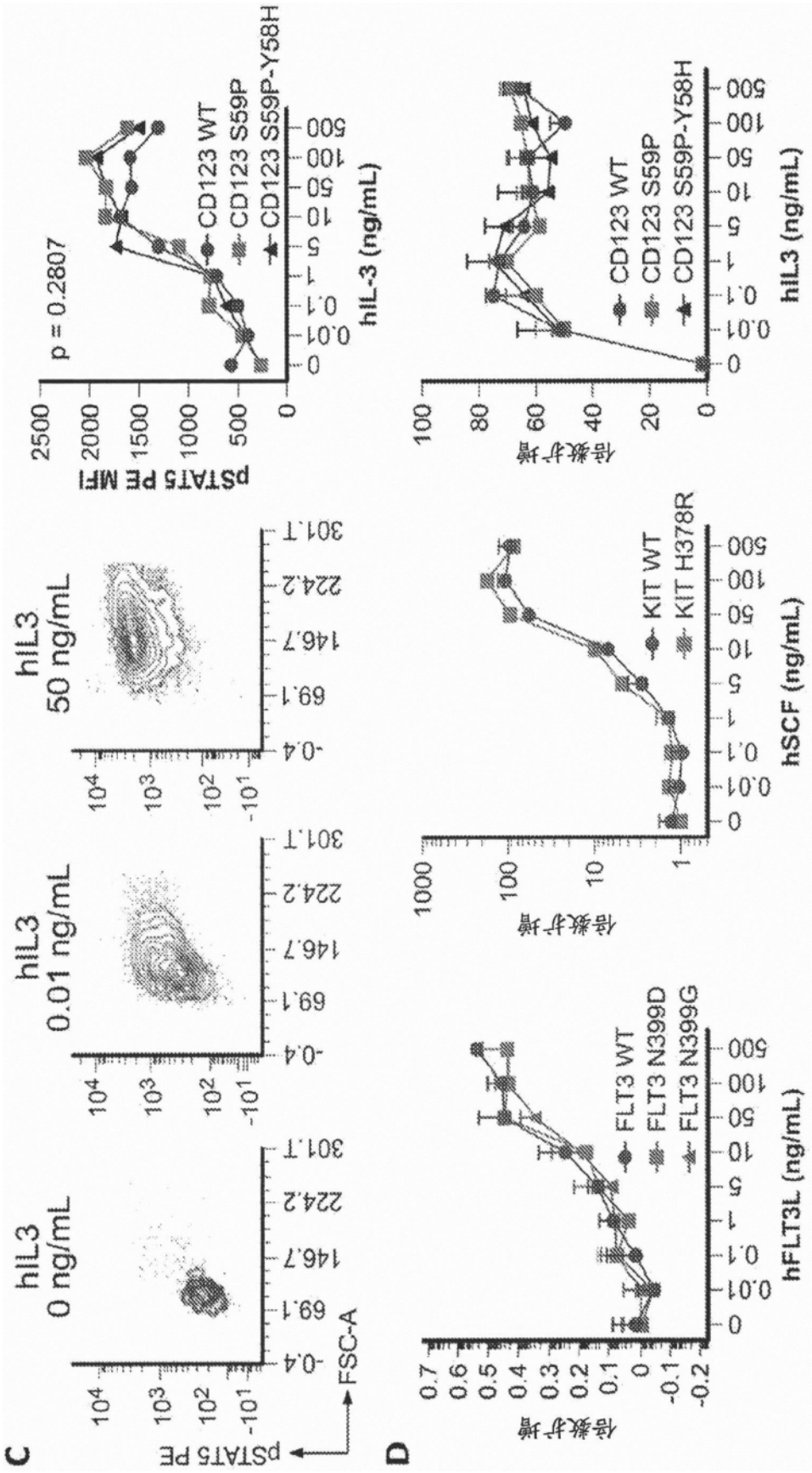

C
hIL3
0 ng/mL
hIL3
0.01 ng/mL
hIL3
50 ng/mL
pSTAT5 PE
FSC-A
pSTAT5 PE MFI
p = 0.2807
CD123 WT
CD123 S59P
CD123 S59P-Y58H
hIL-3 (ng/mL)
D
倍数扩增
hFLT3L (ng/mL)
FLT3 WT
FLT3 N399D
FLT3 N399G
hSCF (ng/mL)
KIT WT
KIT H378R
hIL3 (ng/mL)

图38(续)

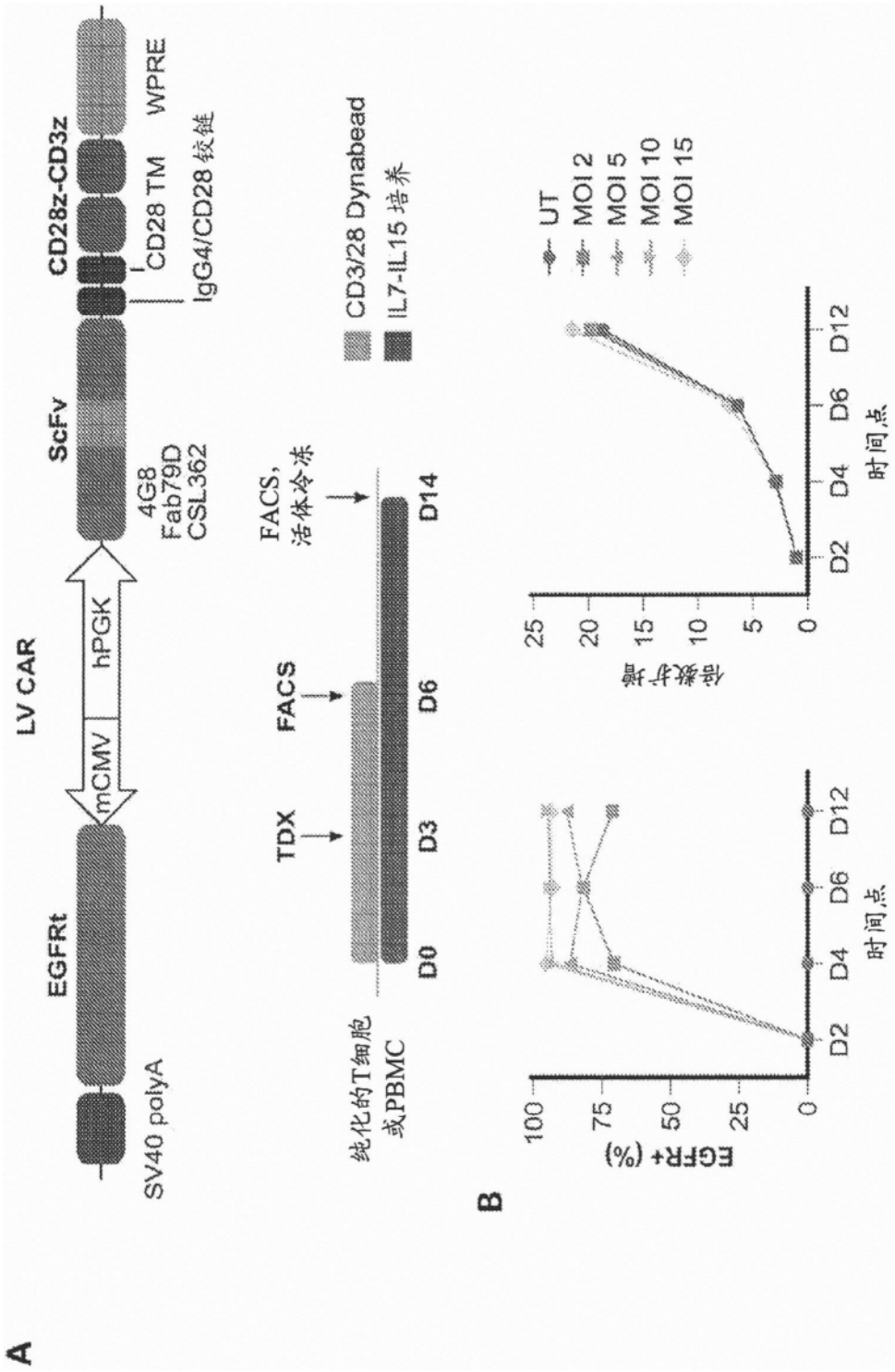

A
LV CAR
EGFRt
SV40 polyA
mCMV
hPGK
ScFv
4G8
Fab79D
CSL362
CD28z-CD3z
CD28 TM
IgG4/CD28 铰链
WPRE
纯化的T细胞
或PBMC
TDX
FACS
FACS,
活体冷冻
D0
D3
D6
D14
CD3/28 Dynabead
IL7-IL15 培养
B
EGFR+ (%)
时间点
UT
MOI 2
MOI 5
MOI 10
MOI 15
倍数扩增
时间点

图39

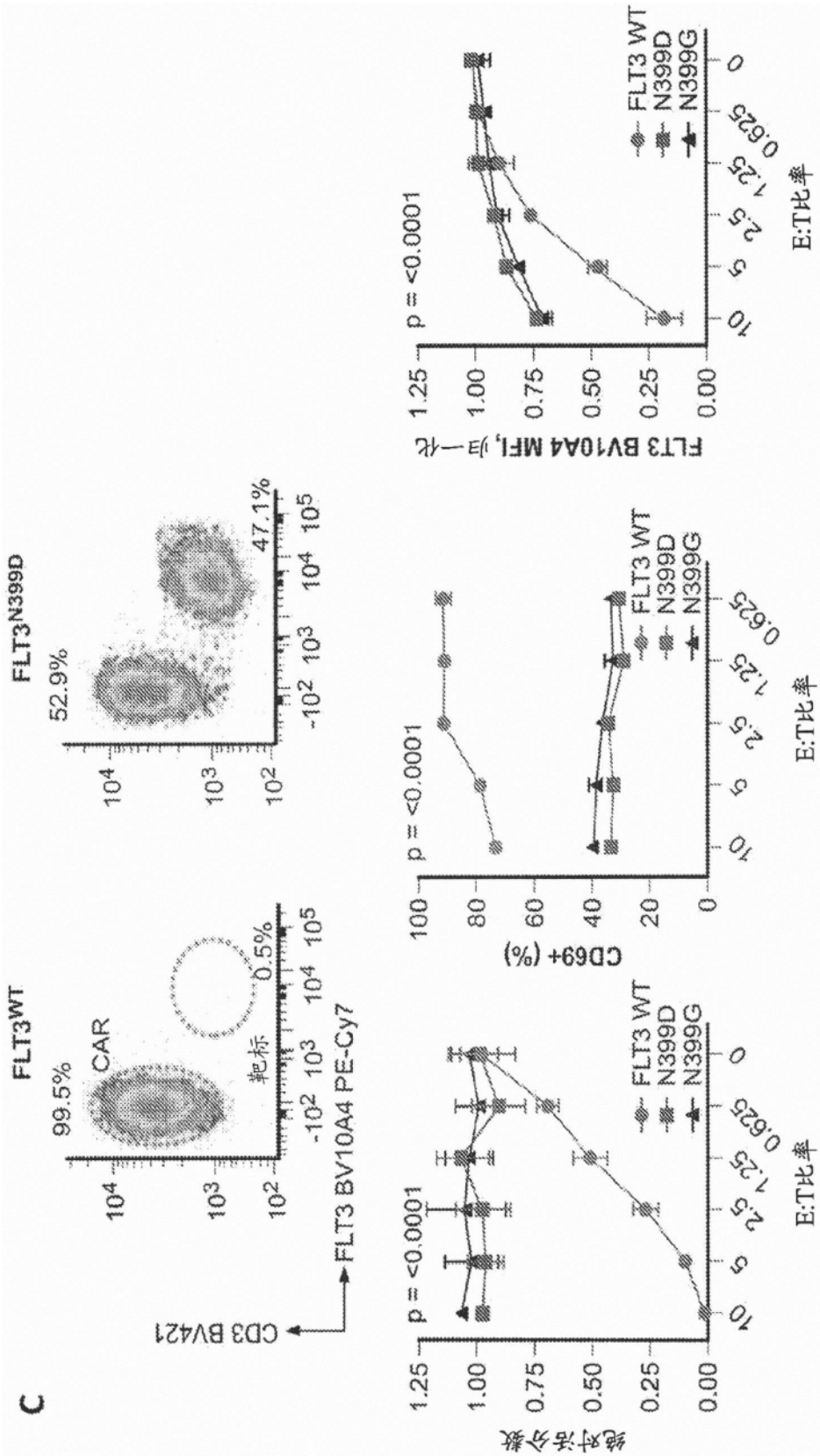

C
FLT3WT
99.5%
CAR
0.5%
靶标
FLT3 BV10A4 PE-Cy7
CD3 BV421
FLT3N399D
52.9%
47.1%
p = <0.0001
CD69+ (%)
FLT3 WT
N399D
N399G
E:T比率
p = <0.0001
FLT3 BV10A4 MFI, 归一化
FLT3 WT
N399D
N399G
E:T比率
p = <0.0001
特异活力数
FLT3 WT
N399D
N399G
E:T比率

图39(续)

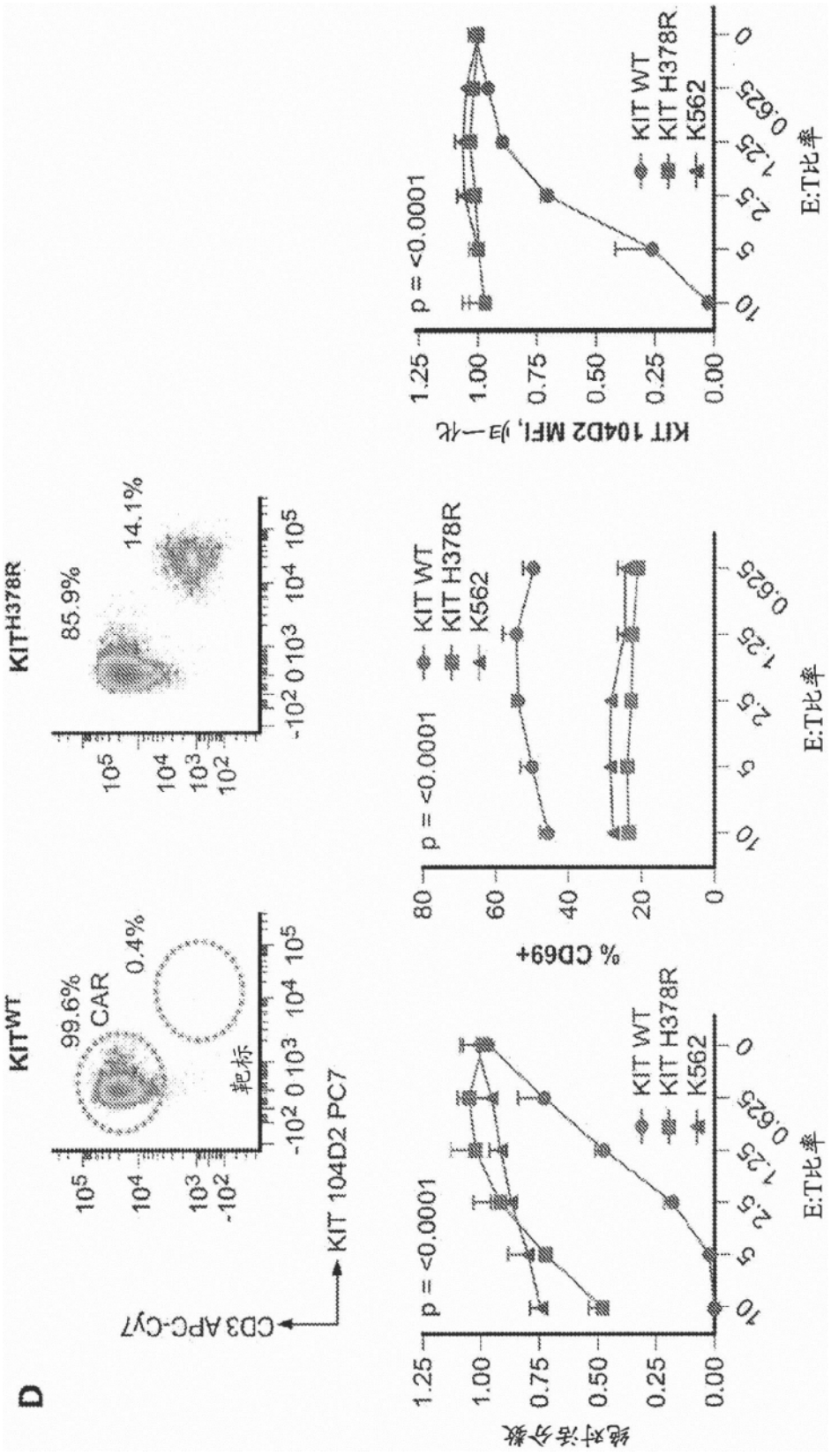

D
KIT WT
99.6%
CAR
0.4%
靶标
CD3 APC-Cy7
KIT 104D2 PC7
KIT H378R
85.9%
14.1%
% CD69+
p = <0.0001
KIT WT
KIT H378R
K562
E:T比率
KIT 104D2 MFI, 归一化
绝对活分数

图39(续)

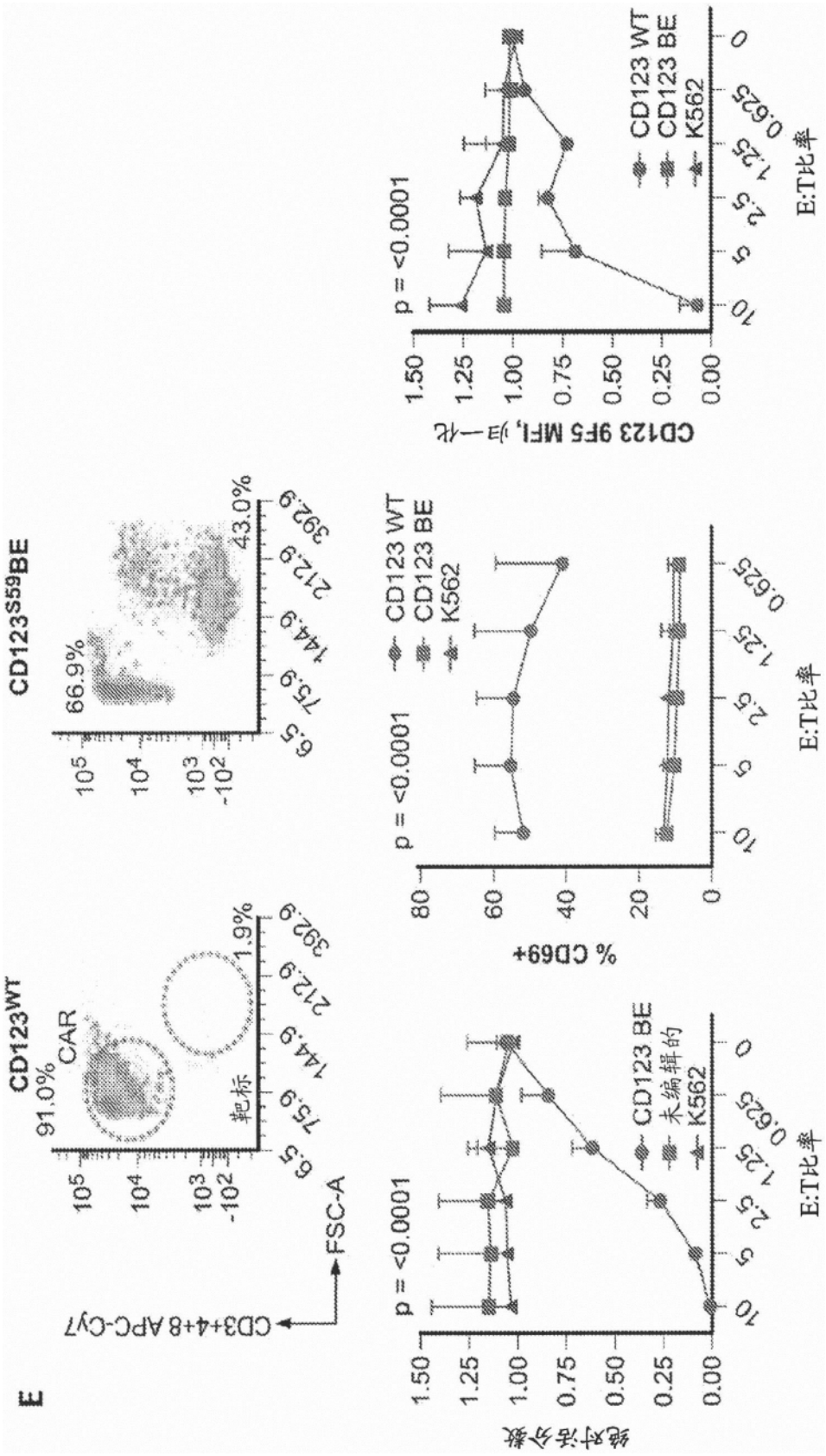

E
CD123WT
91.0%
CAR
靶标
CD123S59BE
66.9%
43.0%
CD3+4+8 APC-Cy7
FSC-A
p = <0.0001
CD123 BE
未编辑的
K562
CD123 WT
CD123 BE
K562
% CD69+
CD123 9F5 MFI, 归一化
E:T比率

图39(续)

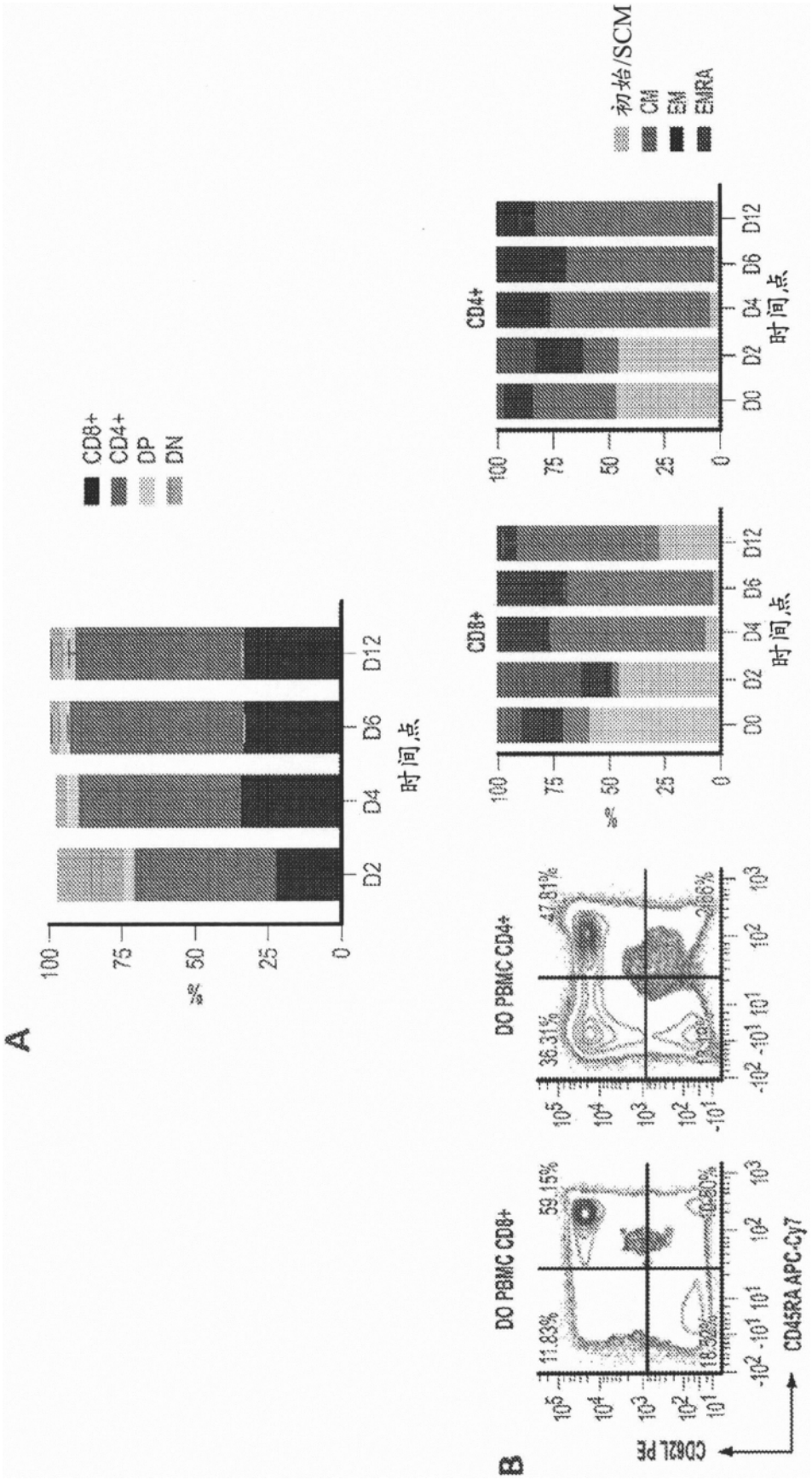

A
CD8+
CD4+
DP
DN
%
时间点
D2
D4
D6
D12
B
DO PBMC CD8+
DO PBMC CD4+
CD62L PE
CD45RA APC-Cy7
初始/SCM
CM
EM
EMRA

图40

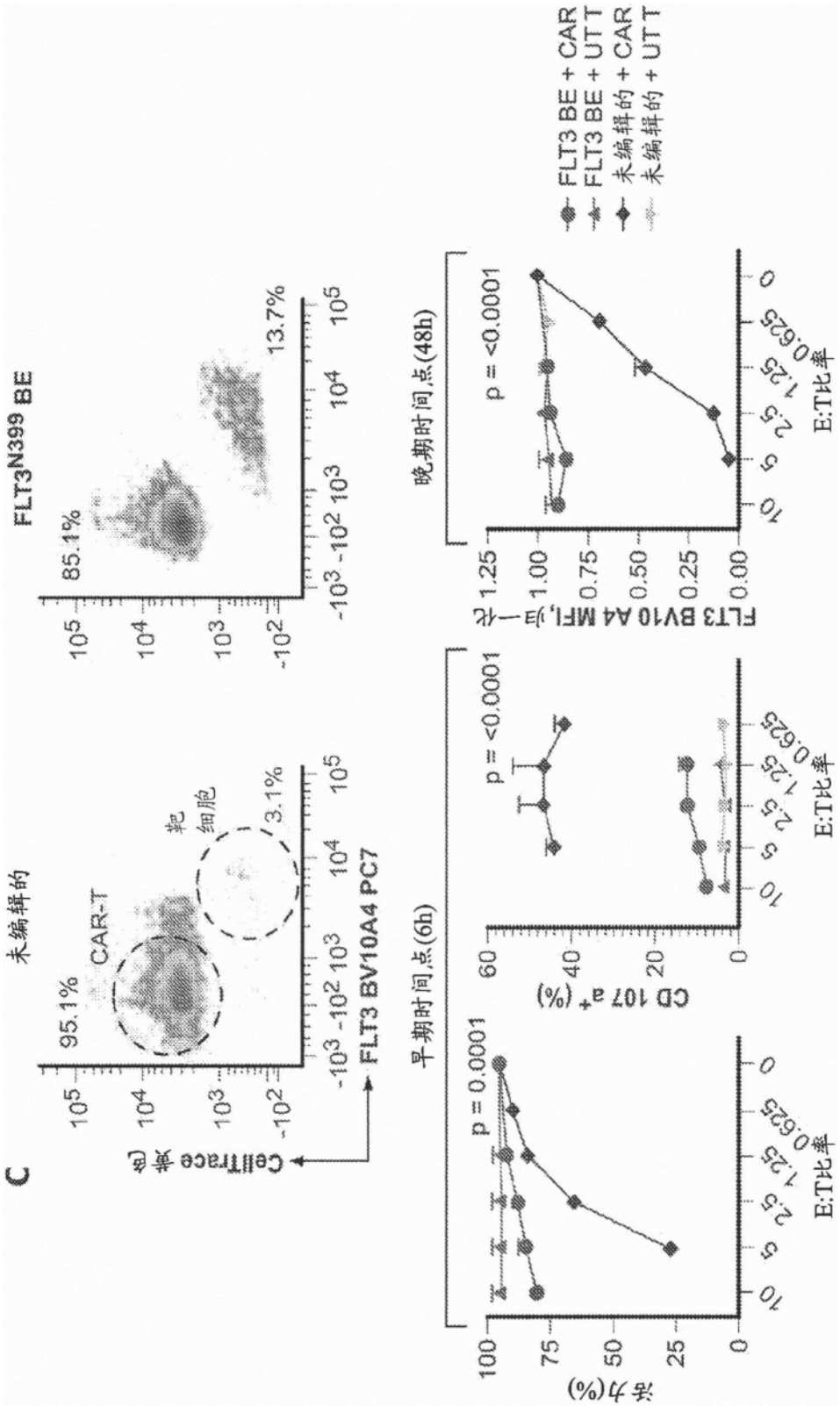

C
未编辑的
FLT3N399 BE
95.1%
CAR-T
靶细胞
3.1%
85.1%
13.7%
CellTrace 黄色
FLT3 BV10A4 PC7
早期时间点(6h)
晚期时间点(48h)
p = 0.0001
p = <0.0001
p = <0.0001
活力(%)
CD 107 a+ (%)
FLT3 BV10A4 MFI, 归一化
E:T比率
FLT3 BE + CAR
FLT3 BE + UTT
未编辑的 + CAR
未编辑的 + UTT

图40(续)

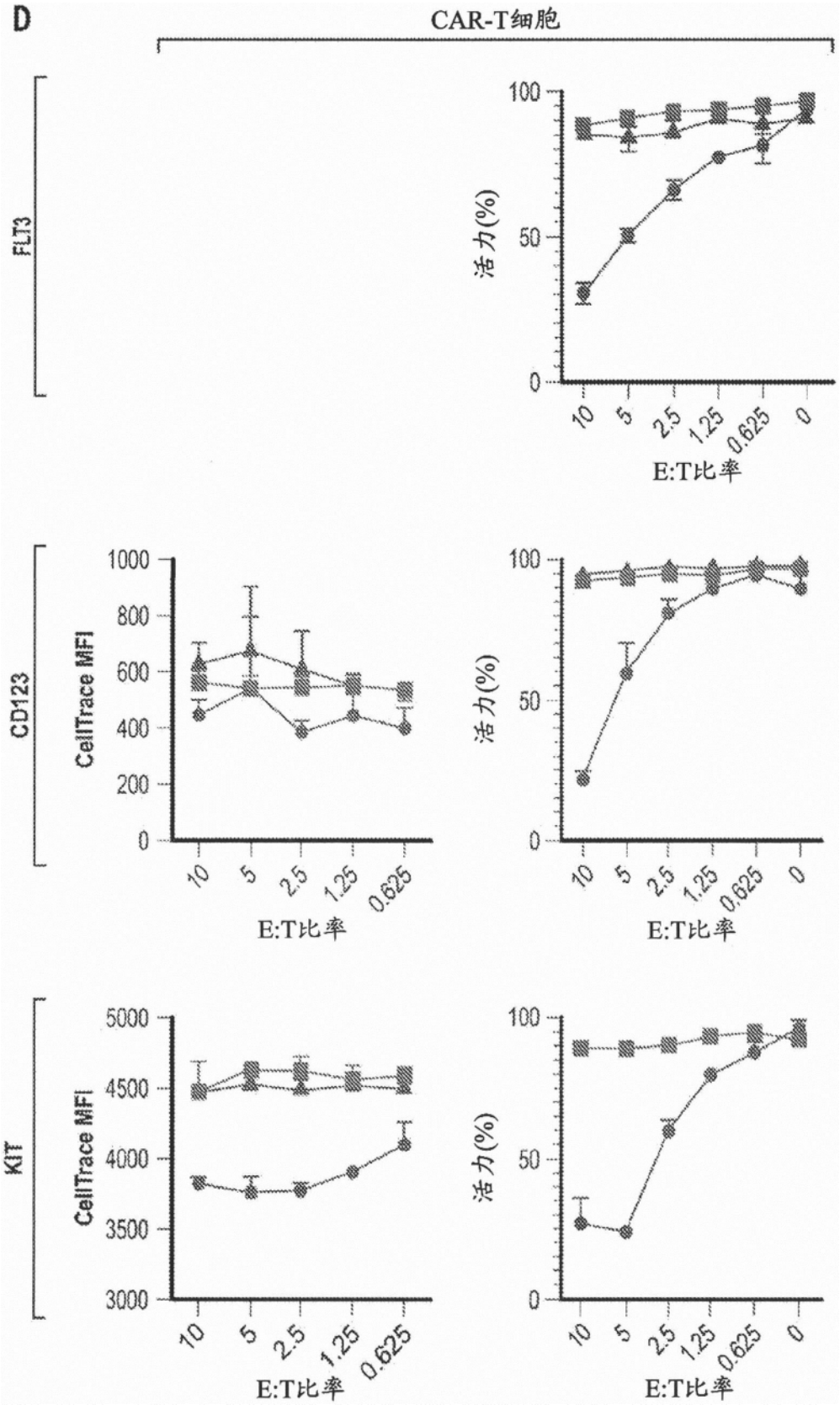

D
CAR-T细胞
FLT3
CD123
KIT
CellTrace MFI
活力(%)
E:T比率
10
5
2.5
1.25
0.625
0

图40

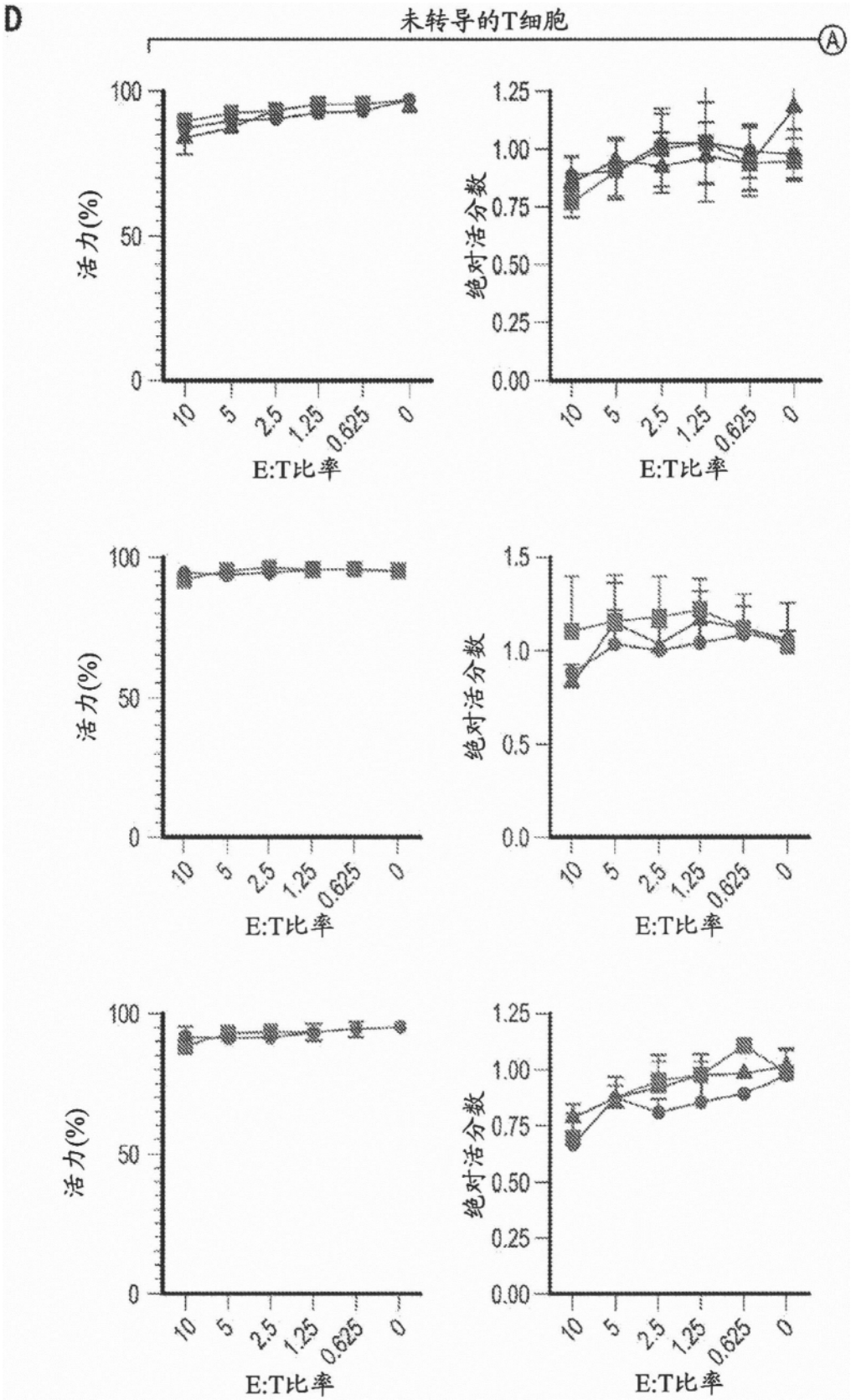

D
未转导的T细胞
A
活力(%)
绝对活分数
E:T比率
100
50
0
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
1.5
1.0
0.5
0.0
10
5
2.5
1.25
0.625
0

图40(续)

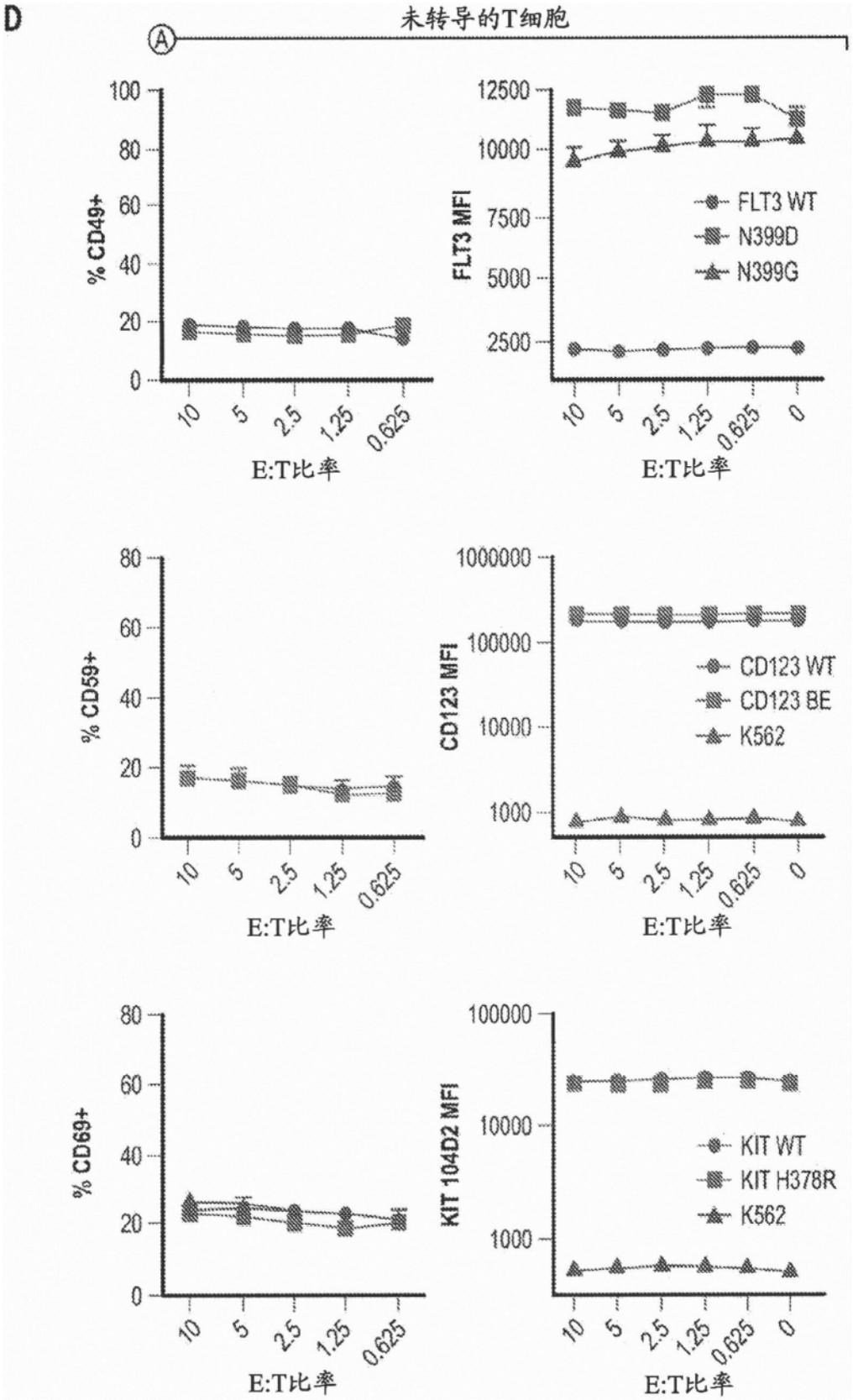

D
未转导的T细胞
A
% CD49+
FLT3 MFI
FLT3 WT
N399D
N399G
% CD59+
CD123 MFI
CD123 WT
CD123 BE
K562
% CD69+
KIT 104D2 MFI
KIT WT
KIT H378R
K562
E:T比率
10
5
2.5
1.25
0.625
0

图40(续)

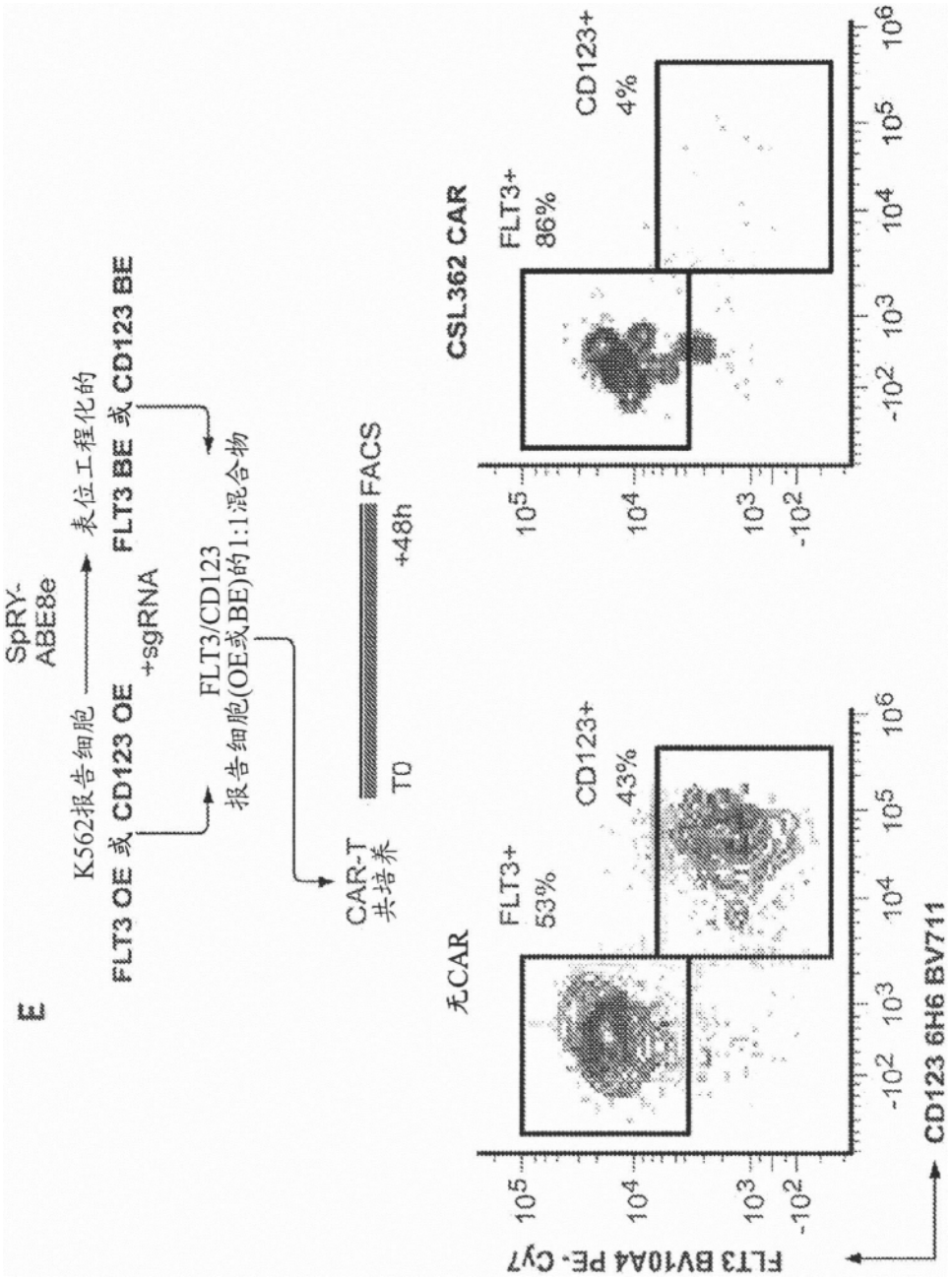

E
SpRY-ABE8e
表位工程化的
K562报告细胞
FLT3 OE 或 CD123 OE
+sgRNA
FLT3 BE 或 CD123 BE
FLT3/CD123
报告细胞(OE或BE)的1:1混合物
CAR-T
共培养
T0
FACS
+48h
无CAR
FLT3+
53%
CD123+
43%
CSL362 CAR
FLT3+
86%
CD123+
4%
FLT3 BV10A4 PE-Cy7
CD123 6H6 BV711

图40

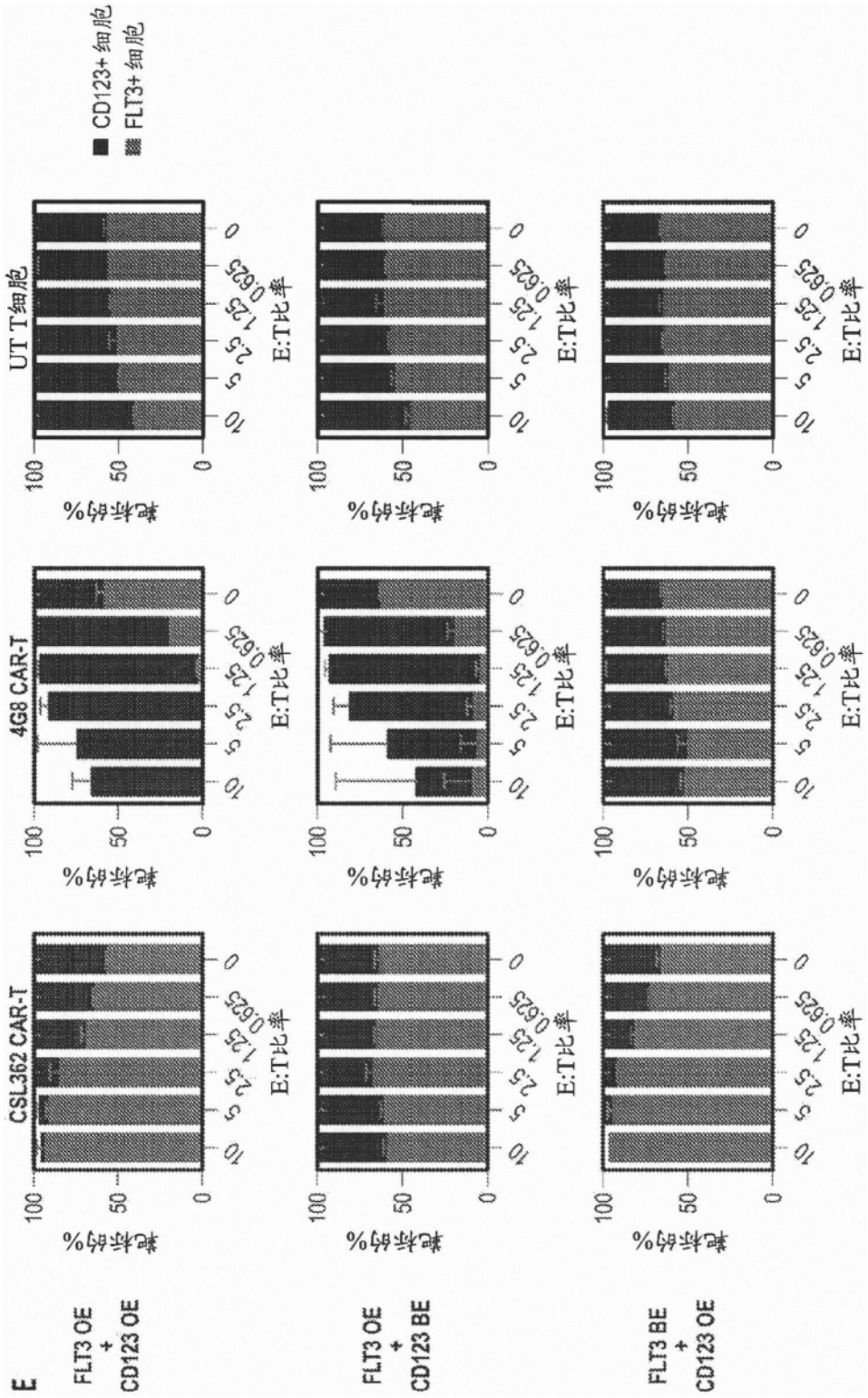

E
FLT3 OE + CD123 OE
FLT3 OE + CD123 BE
FLT3 BE + CD123 OE
CSL362 CAR-T
4G8 CAR-T
UT T细胞
CD123+ 细胞
FLT3+ 细胞
靶标的%
E:T比率
100
50
0
10
5
2.5
1.25
0.625
0

图40(续)

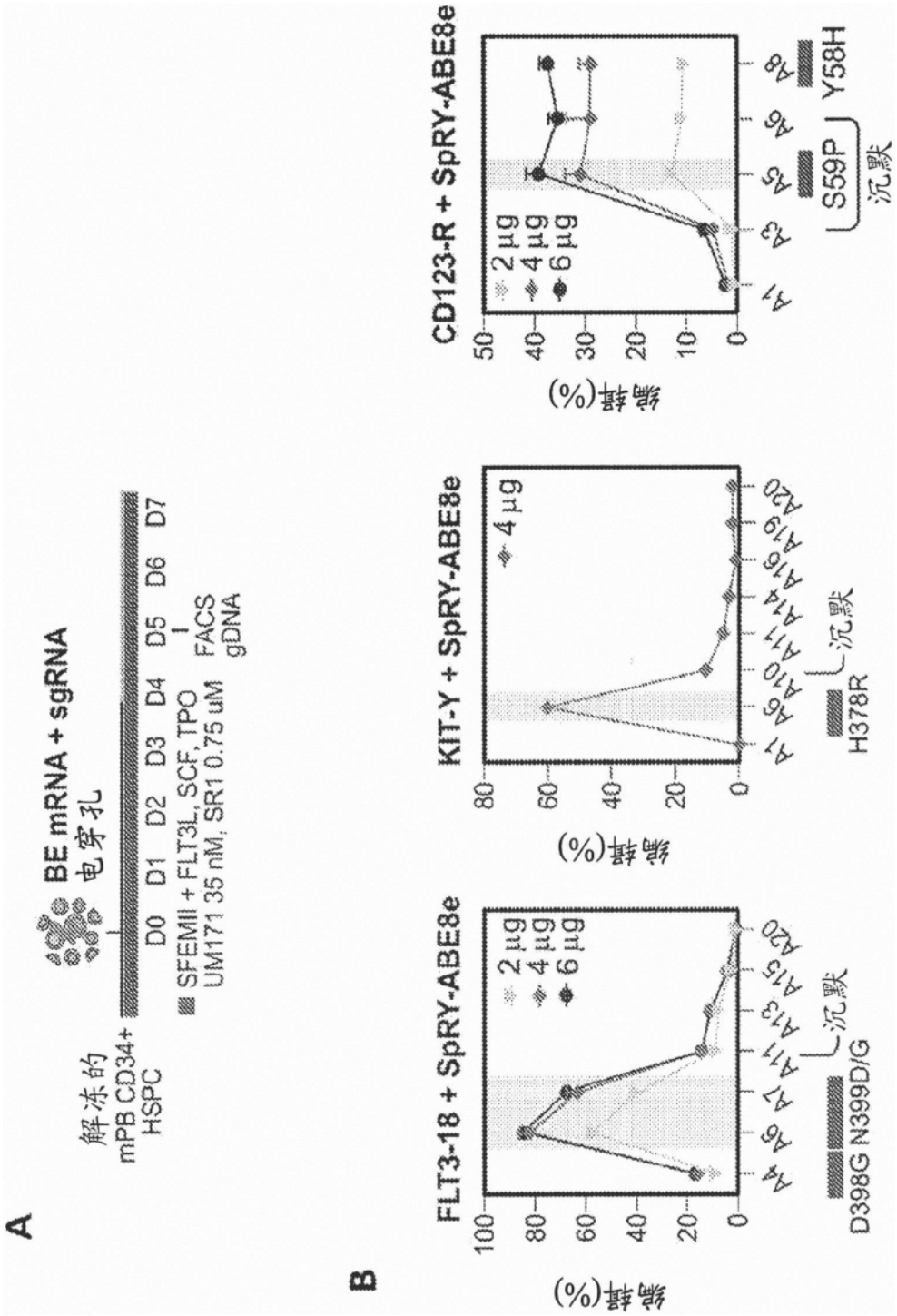

A
BE mRNA + sgRNA
电穿孔
解冻的
mPB CD34+
HSPC
D0 D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7
SFEMII + FLT3L, SCF, TPO
UM171 35 nM, SR1 0.75 uM
FACS
gDNA
B
FLT3-18 + SpRY-ABE8e
2 μg
4 μg
6 μg
编辑(%)
A4 A6 A7 A11 A13 A15 A20
沉默
D398G N399D/G
KIT-Y + SpRY-ABE8e
4 μg
编辑(%)
A7 A6 A10 A11 A14 A16 A19 A20
沉默
H378R
CD123-R + SpRY-ABE8e
2 μg
4 μg
6 μg
编辑(%)
A1 A3 A5 A6 A8
S59P
Y58H
沉默

图41

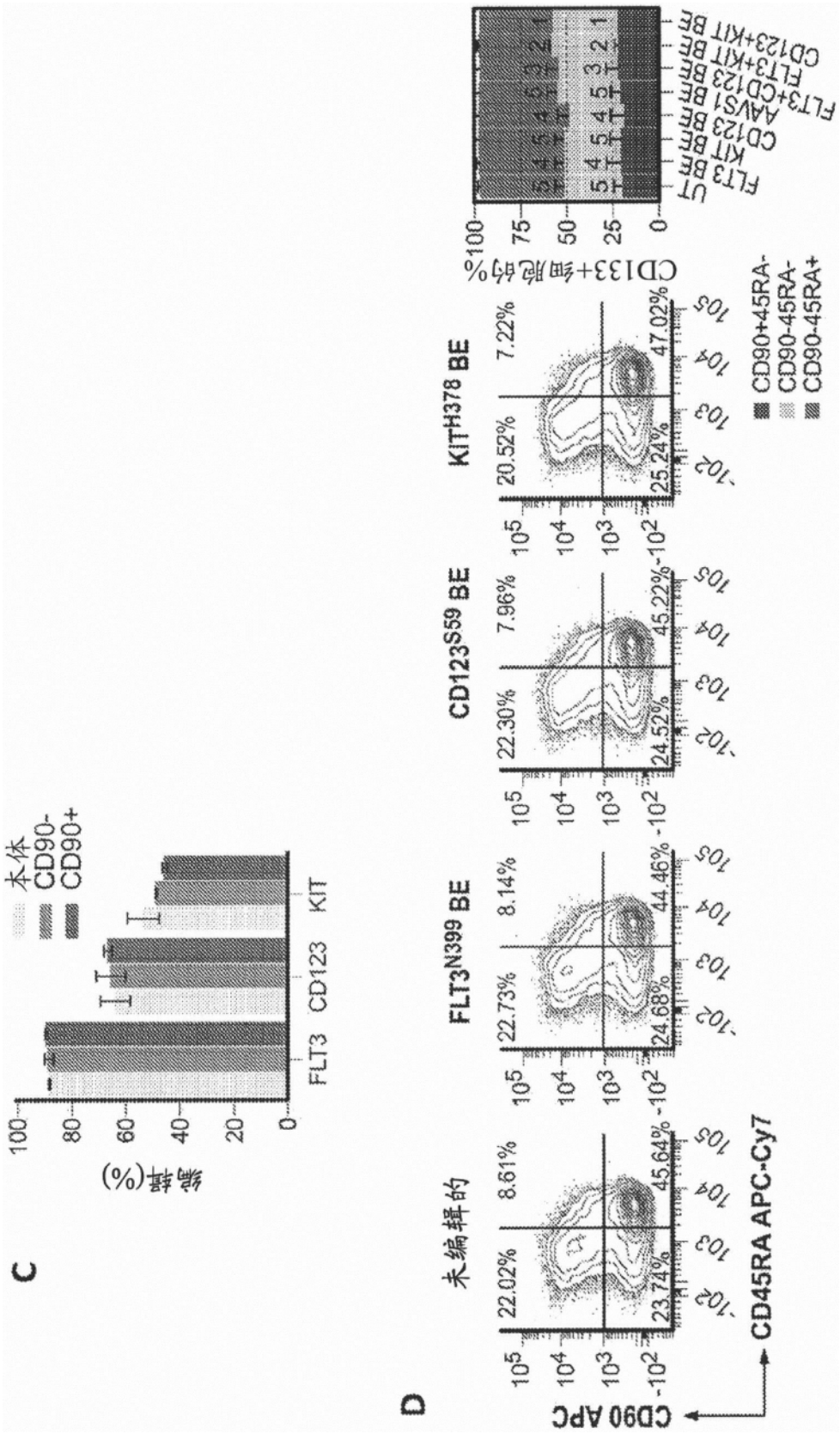

C
本体
CD90-
CD90+
编辑(%)
FLT3
CD123
KIT
D
未编辑的
FLT3N399 BE
CD123S59 BE
KITH378 BE
CD90 APC
CD45RA APC-Cy7
CD90+45RA-
CD90-45RA-
CD90-45RA+
CD133+细胞的%
FLT3 BE
KIT BE
CD123 BE
AAVS1 BE
FLT3+CD123 BE
FLT3+KIT BE
CD123+KIT BE

图41(续)

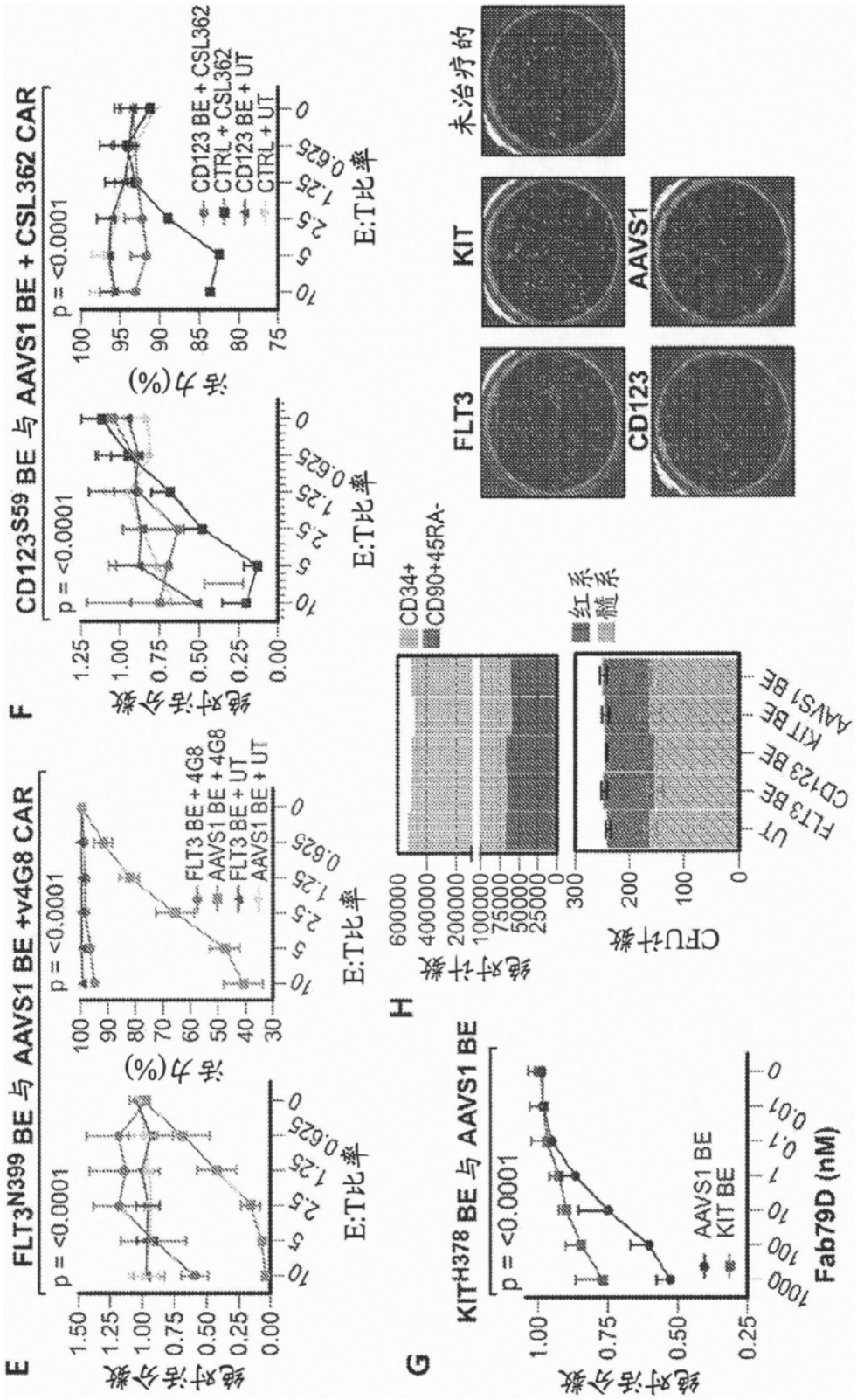

E
FLT3N399 BE 与 AAVS1 BE +v4G8 CAR
p = <0.0001
FLT3 BE + 4G8
AAVS1 BE + 4G8
FLT3 BE + UT
AAVS1 BE + UT
活力(%)
绝对活分数
E:T比率
F
CD123S59 BE 与 AAVS1 BE + CSL362 CAR
p = <0.0001
CD123 BE + CSL362
CTRL + CSL362
CD123 BE + UT
CTRL + UT
活力(%)
绝对活分数
E:T比率
G
KITH378 BE 与 AAVS1 BE
p = <0.0001
AAVS1 BE
KIT BE
绝对活分数
Fab79D (nM)
H
CD34+
CD90+45RA-
绝对计数
红系
髓系
CFU计数
UT
FLT3 BE
CD123 BE
KIT BE
AAVS1 BE
FLT3
KIT
AAVS1
CD123
未治疗的

图41(续)

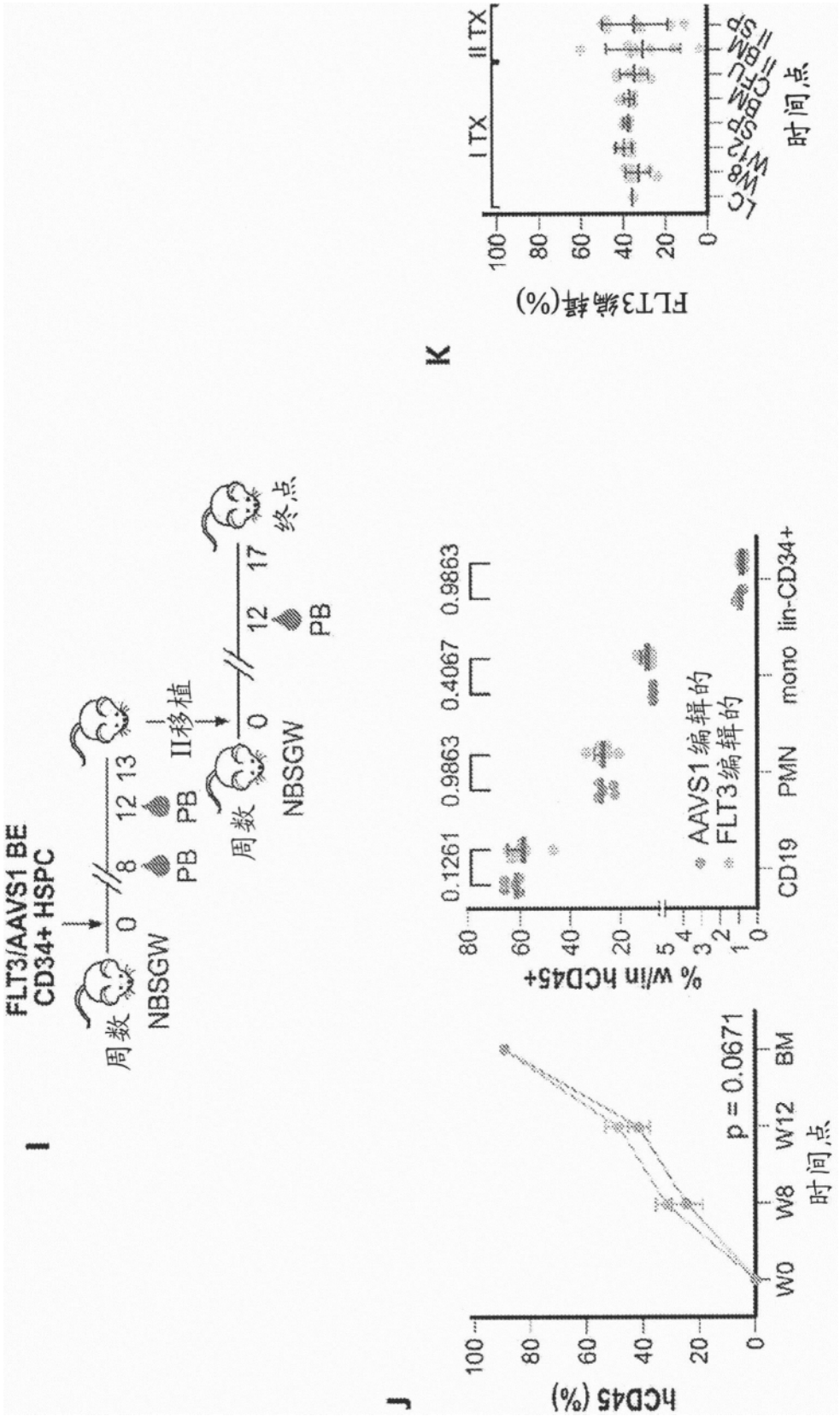

I
FLT3/AAVS1 BE
CD34+ HSPC
周数
NBSGW
0
8
12 13
PB
PB
II移植
周数
NBSGW
0
12
17
终点
PB
J
hCD45 (%)
100
80
60
40
20
0
W0
W8
W12
BM
时间点
p = 0.0671
% w/in hCD45+
80
60
40
20
5
4
3
2
1
0
0.1261
0.9863
0.9863
0.4067
0.9863
AAVS1编辑的
FLT3编辑的
CD19
PMN
mono
lin-CD34+
K
FLT3编辑(%)
100
80
60
40
20
0
I TX
II TX
时间点

图41(续)

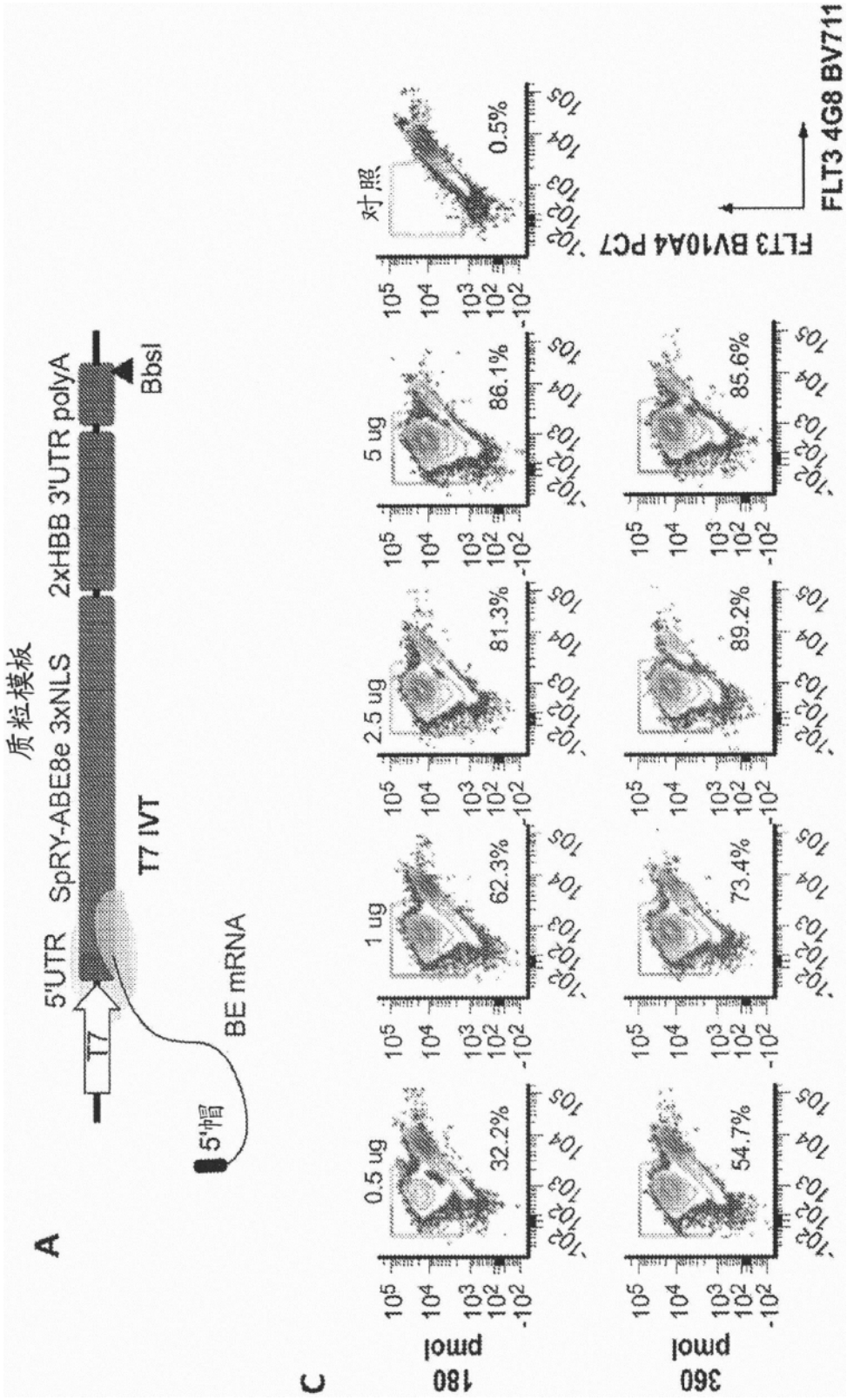

A
质粒模板
5'UTR
SpRY-ABE8e 3xNLS
2xHBB 3'UTR polyA
BbsI
T7
T7 IVT
BE mRNA
5'帽
C
180 pmol
360 pmol
0.5 ug
1 ug
2.5 ug
5 ug
对照
32.2%
62.3%
81.3%
86.1%
0.5%
54.7%
73.4%
89.2%
85.6%
FLT3 BV10A4 PC7
FLT3 4G8 BV711

图42

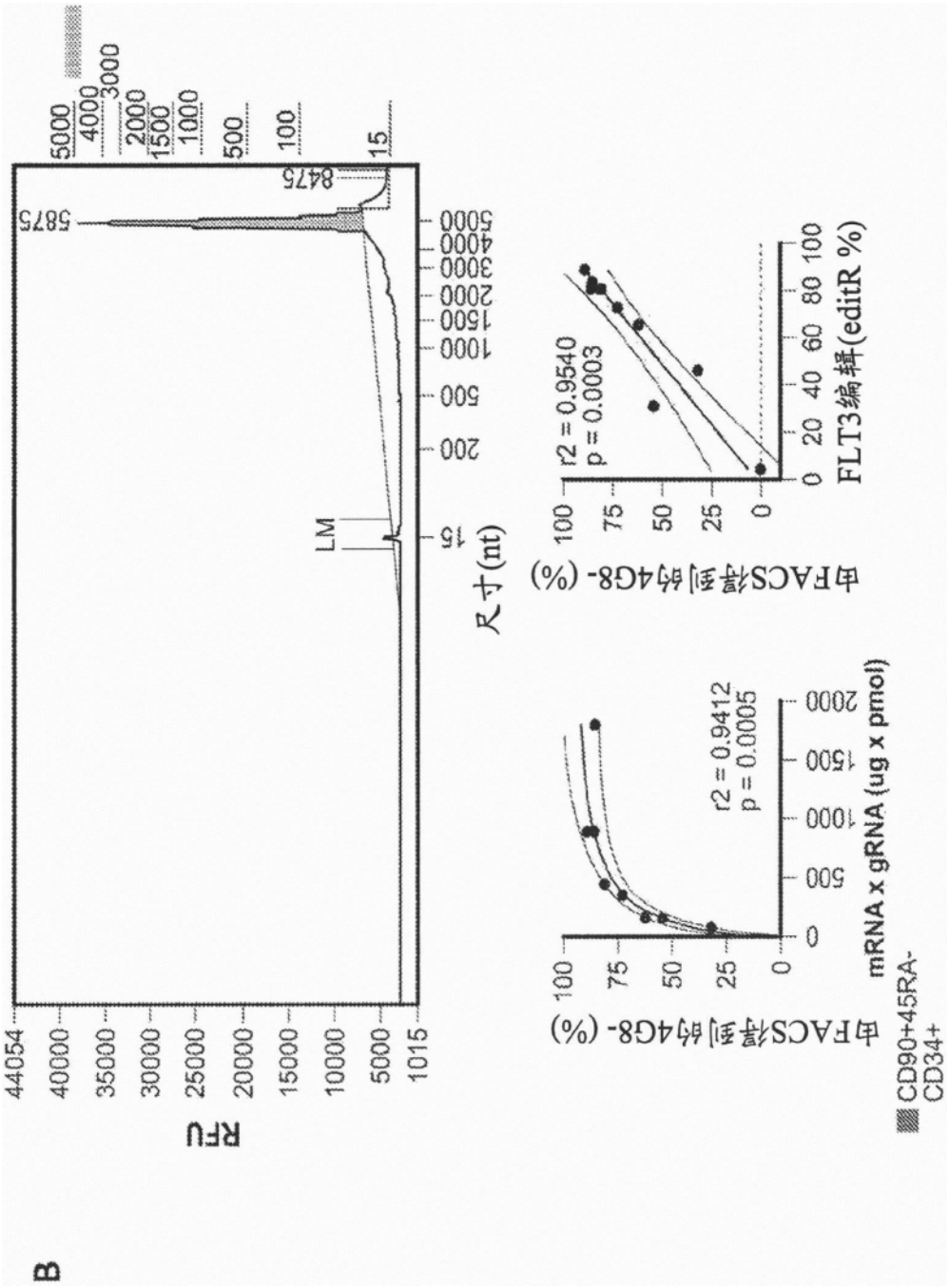

B
RFU
44054
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
1015
尺寸(nt)
LM
5875
8475
由FACS得到的4G8- (%)
FLT3编辑(editR %)
r2 = 0.9540
p = 0.0003
mRNA x gRNA (ug x pmol)
r2 = 0.9412
p = 0.0005
CD90+45RA-
CD34+

图42(续)

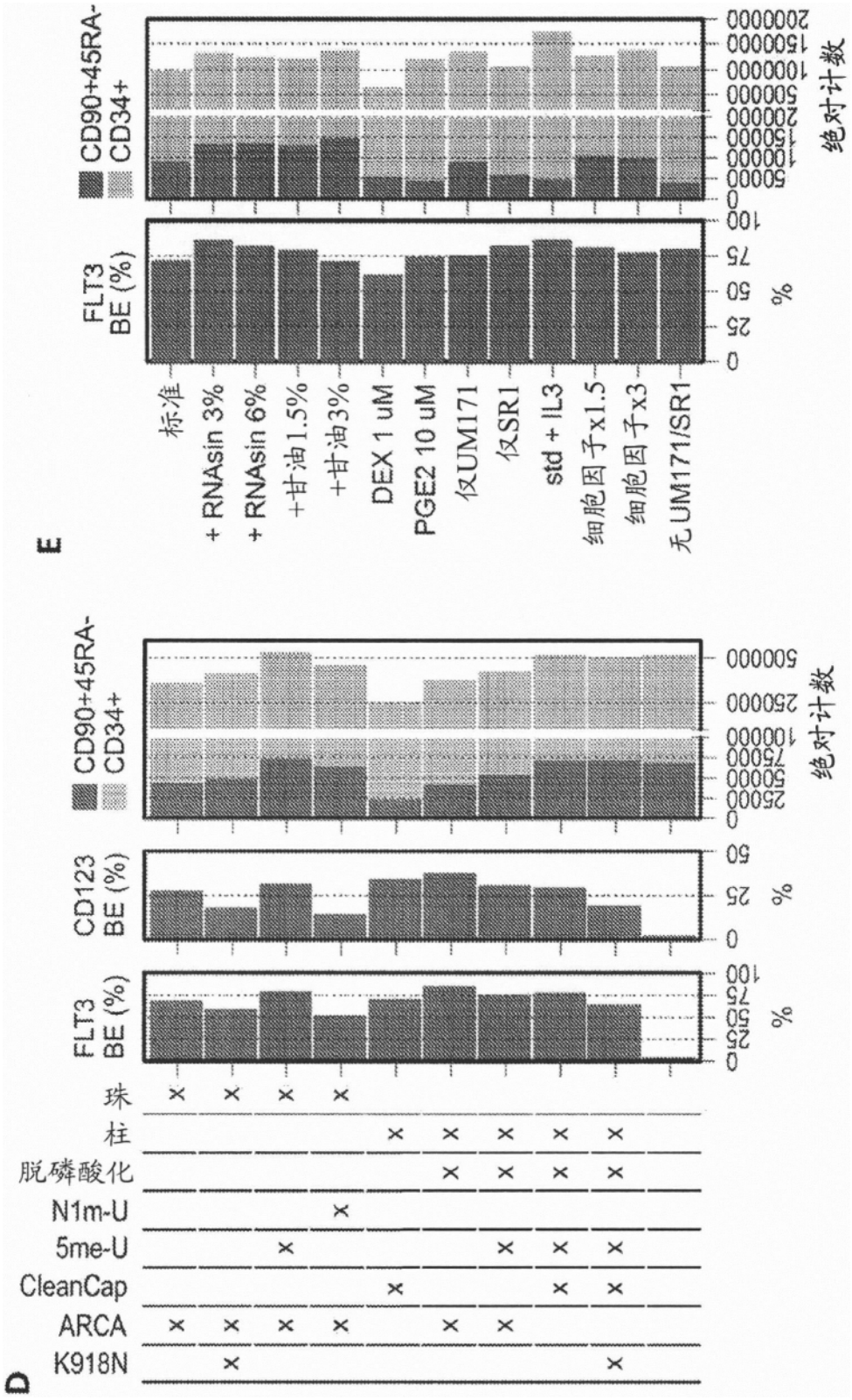

E
标准
+ RNAsin 3%
+ RNAsin 6%
+甘油1.5%
+甘油3%
DEX 1 uM
PGE2 10 uM
仅UM171
仅SR1
std + IL3
细胞因子x1.5
细胞因子x3
无UM171/SR1
FLT3 BE (%)
CD90+45RA- CD34+
绝对计数
D
珠
柱
脱磷酸化
N1m-U
5me-U
CleanCap
ARCA
K918N
FLT3 BE (%)
CD123 BE (%)
CD90+45RA- CD34+
绝对计数

图42(续)

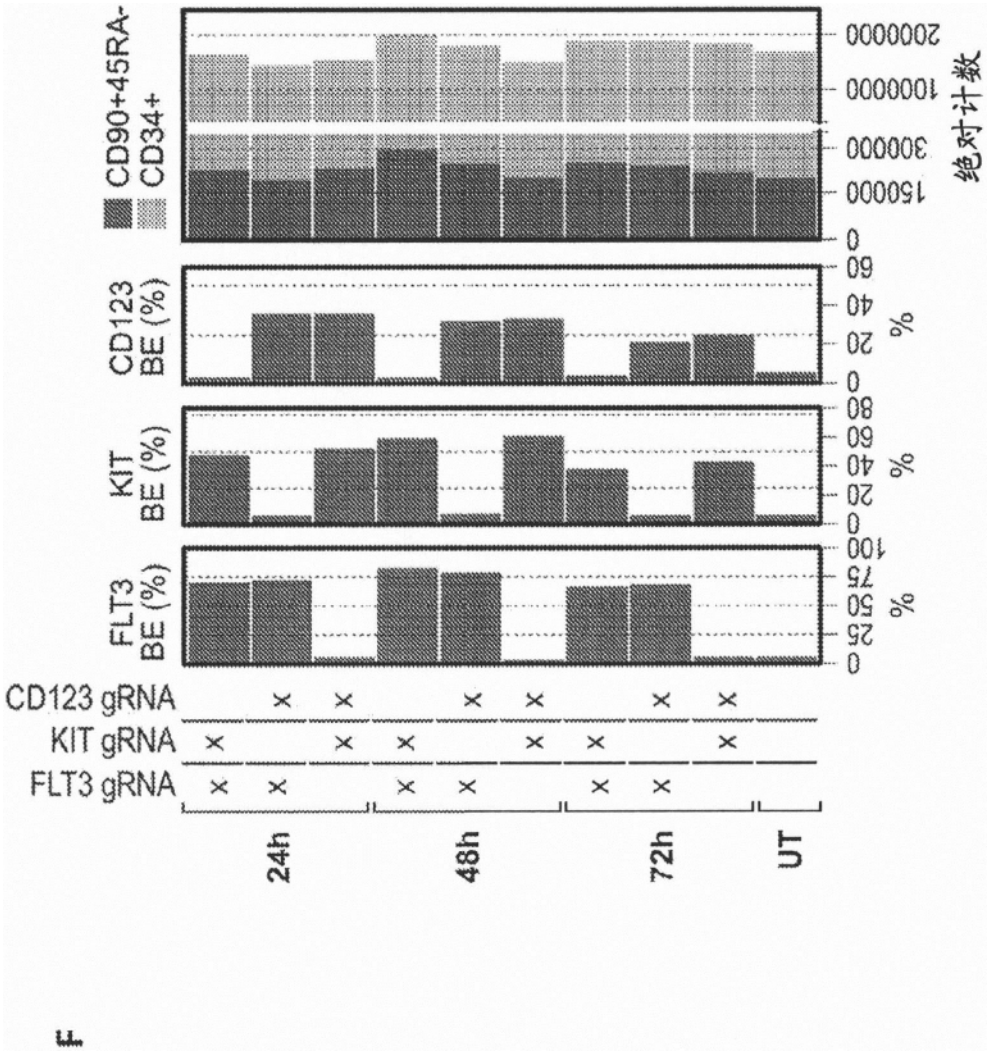

CD90+45RA-
CD34+
绝对计数
2000000
1000000
300000
150000
0
CD123
BE (%)
60
40
20
0
%
KIT
BE (%)
80
60
40
20
0
%
FLT3
BE (%)
100
75
50
25
0
%
CD123 gRNA
KIT gRNA
FLT3 gRNA
24h
48h
72h
UT
F

图42(续)

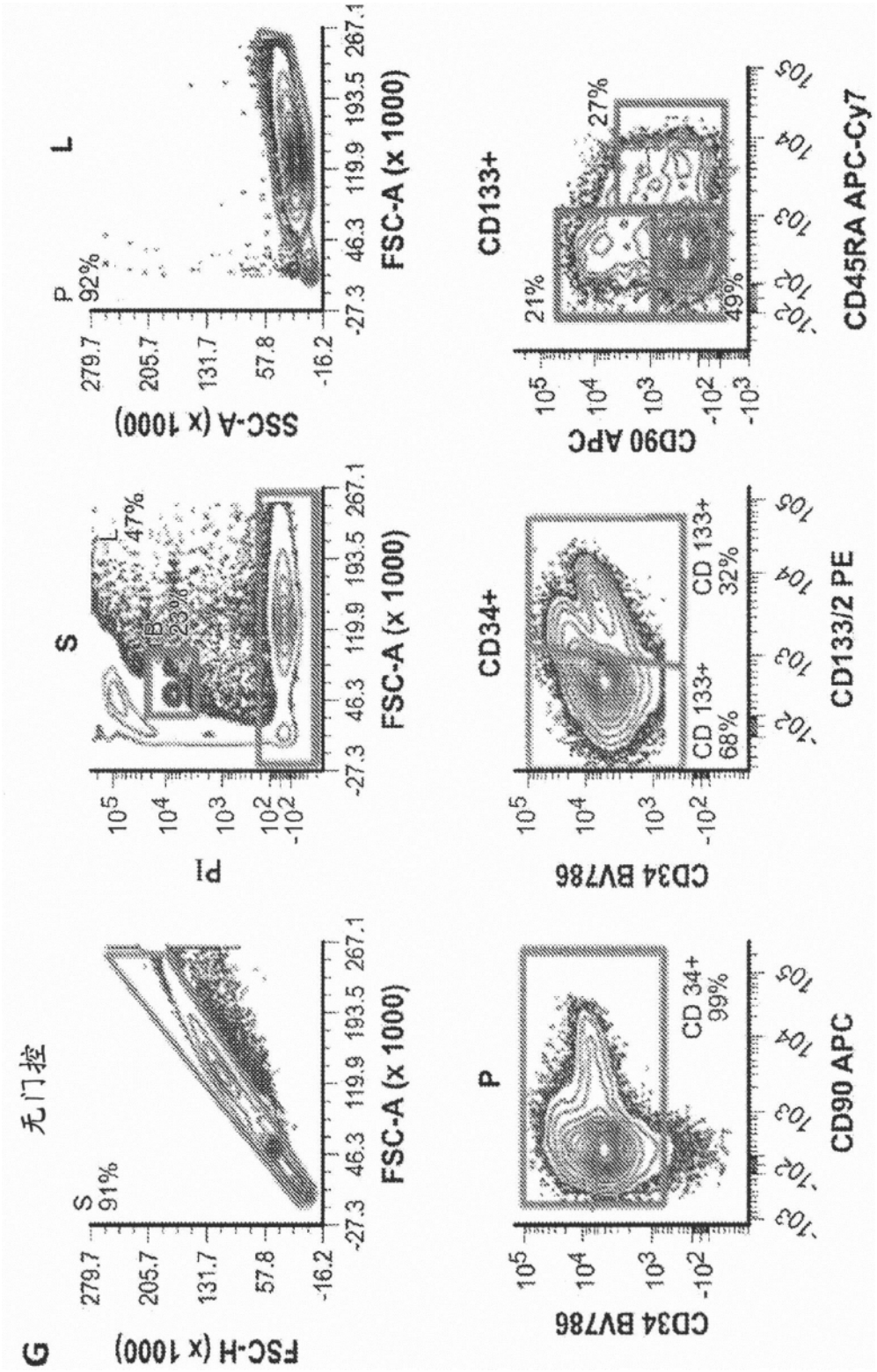

G
无门控
S
91%
FSC-H (x 1000)
279.7
205.7
131.7
57.8
-16.2
-27.3 46.3 119.9 193.5 267.1
FSC-A (x 1000)
P
CD 34+
99%
CD34 BV786
CD90 APC
S
L
47%
PI
FSC-A (x 1000)
CD34+
CD 133+
68%
CD 133+
32%
CD34 BV786
CD133/2 PE
P
92%
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
CD133+
21%
27%
49%
CD90 APC
CD45RA APC-Cy7

图42(续)

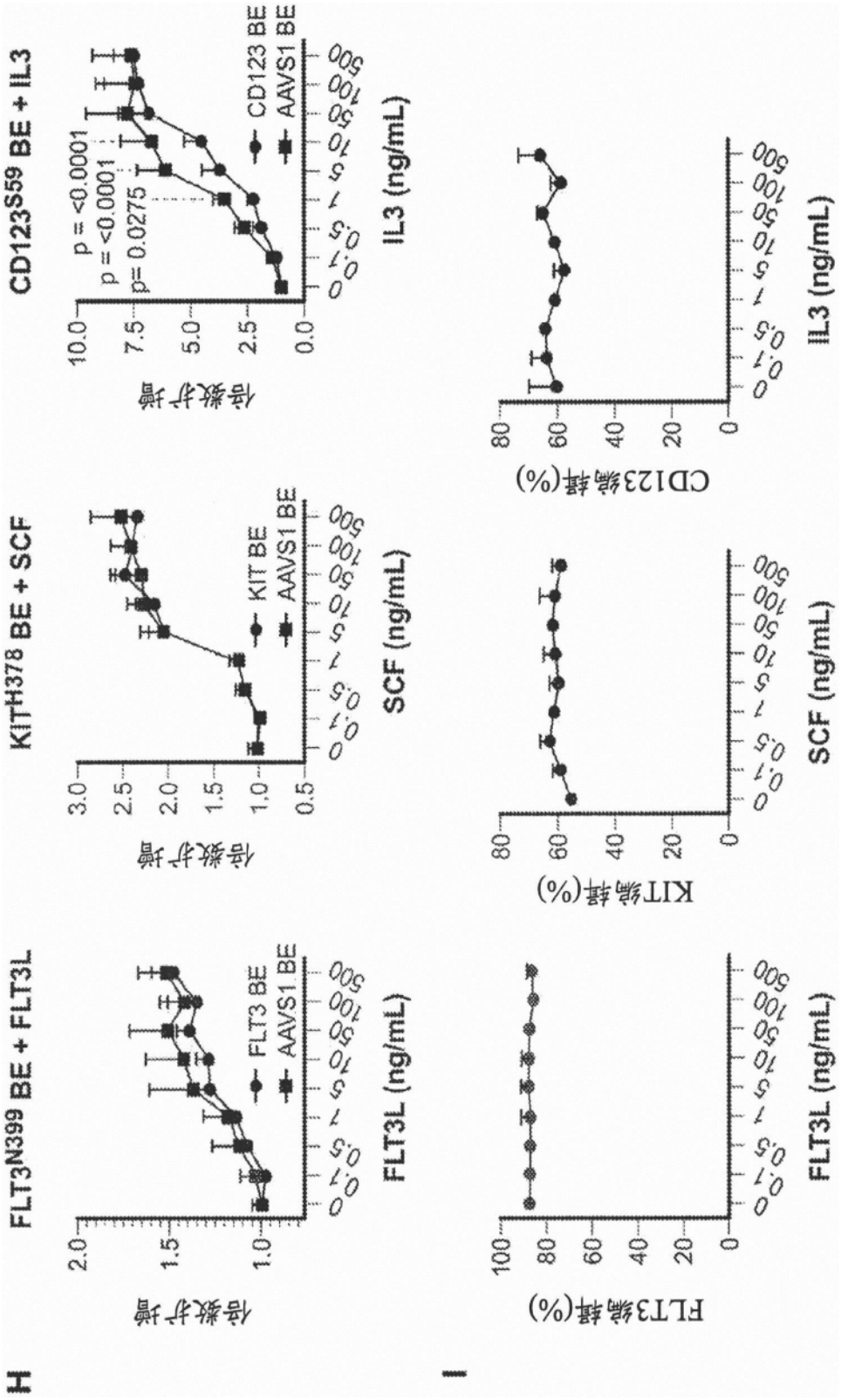

H
FLT3N399 BE + FLT3L
倍数扩增
FLT3L (ng/mL)
FLT3 BE
AAVS1 BE
KITH378 BE + SCF
SCF (ng/mL)
KIT BE
AAVS1 BE
CD123S59 BE + IL3
IL3 (ng/mL)
CD123 BE
AAVS1 BE
p = <0.0001
p = <0.0001
p= 0.0275
I
FLT3编辑(%)
FLT3L (ng/mL)
KIT编辑(%)
SCF (ng/mL)
CD123编辑(%)
IL3 (ng/mL)

图42(续)

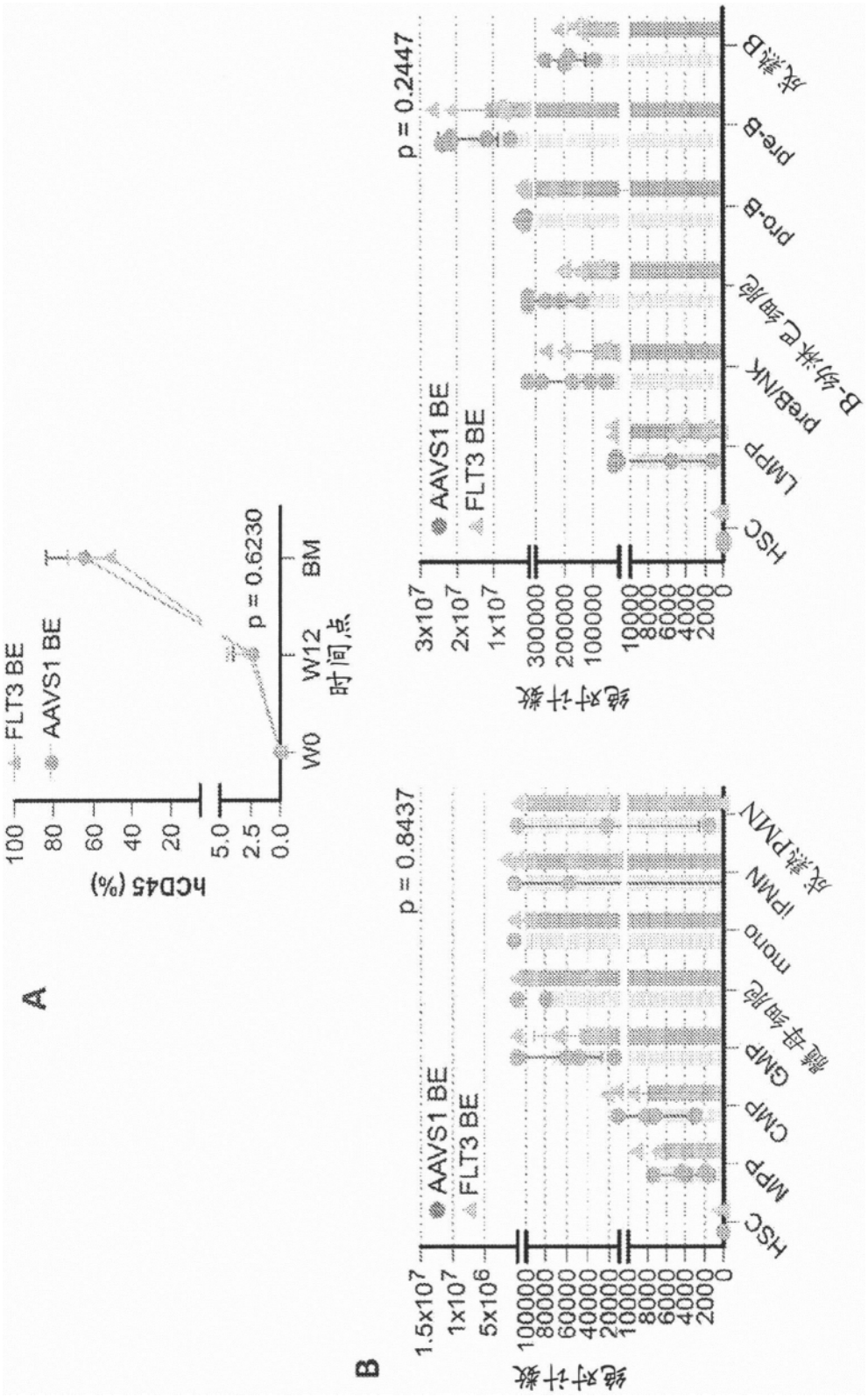

A
hCD45 (%)
FLT3 BE
AAVS1 BE
p = 0.6230
W0
W12
BM
时间点
B
绝对计数
AAVS1 BE
FLT3 BE
p = 0.8437
HSC
MPP
CMP
GMP
髓母细胞
mono
iPMN
成熟PMN
p = 0.2447
HSC
LMPP
preBNK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
成熟B

图43

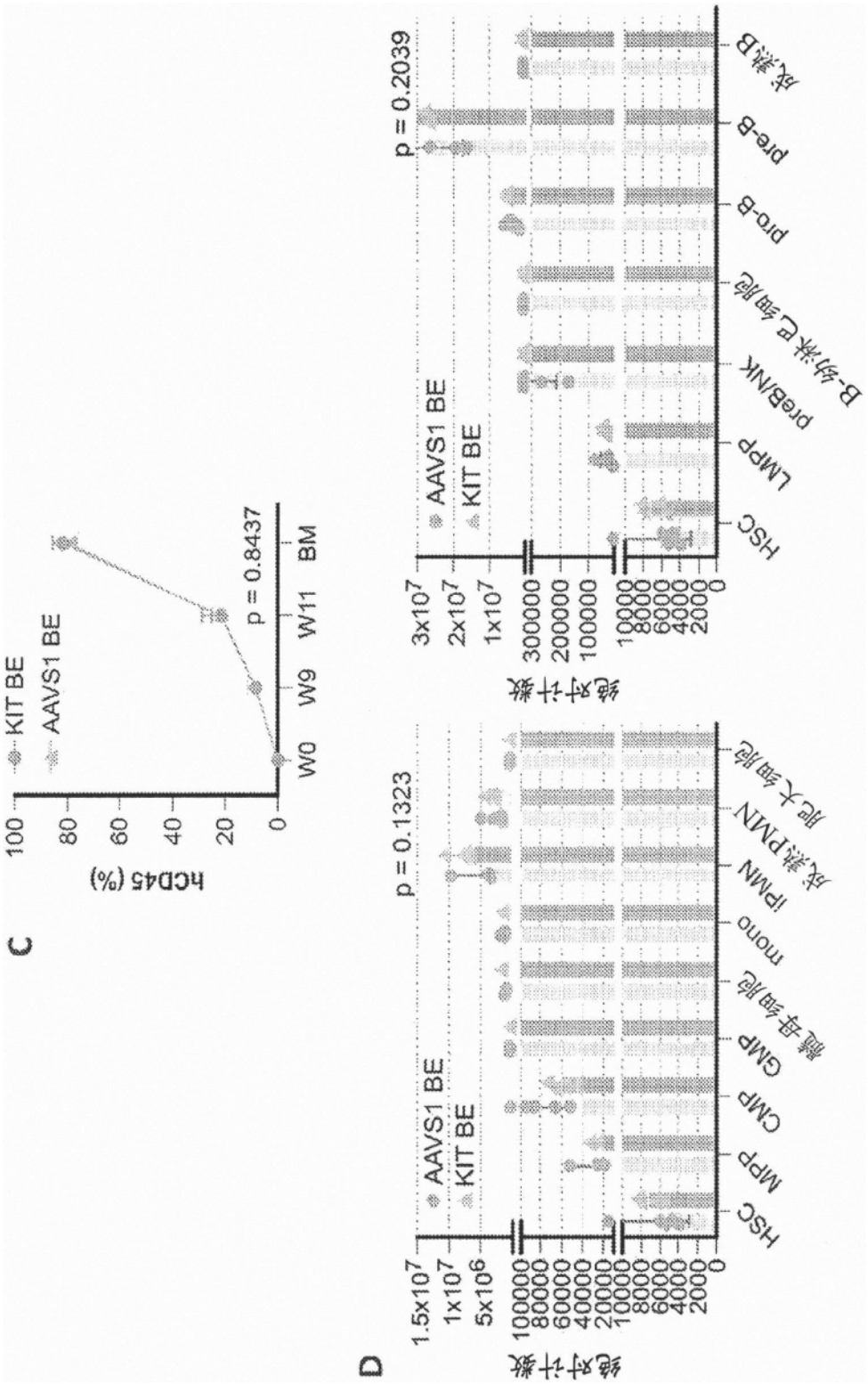

C
hCD45 (%)
100
80
60
40
20
0
KIT BE
AAVS1 BE
p = 0.8437
W0
W9
W11
BM
D
绝对计数
p = 0.1323
AAVS1 BE
KIT BE
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
100000
80000
60000
40000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
MPP
CMP
GMP
粒-单细胞
mono
iPMN
成熟PMN
前-大细胞
p = 0.2039
AAVS1 BE
KIT BE
3x10^7
2x10^7
1x10^7
300000
200000
100000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
成熟B

图43(续)

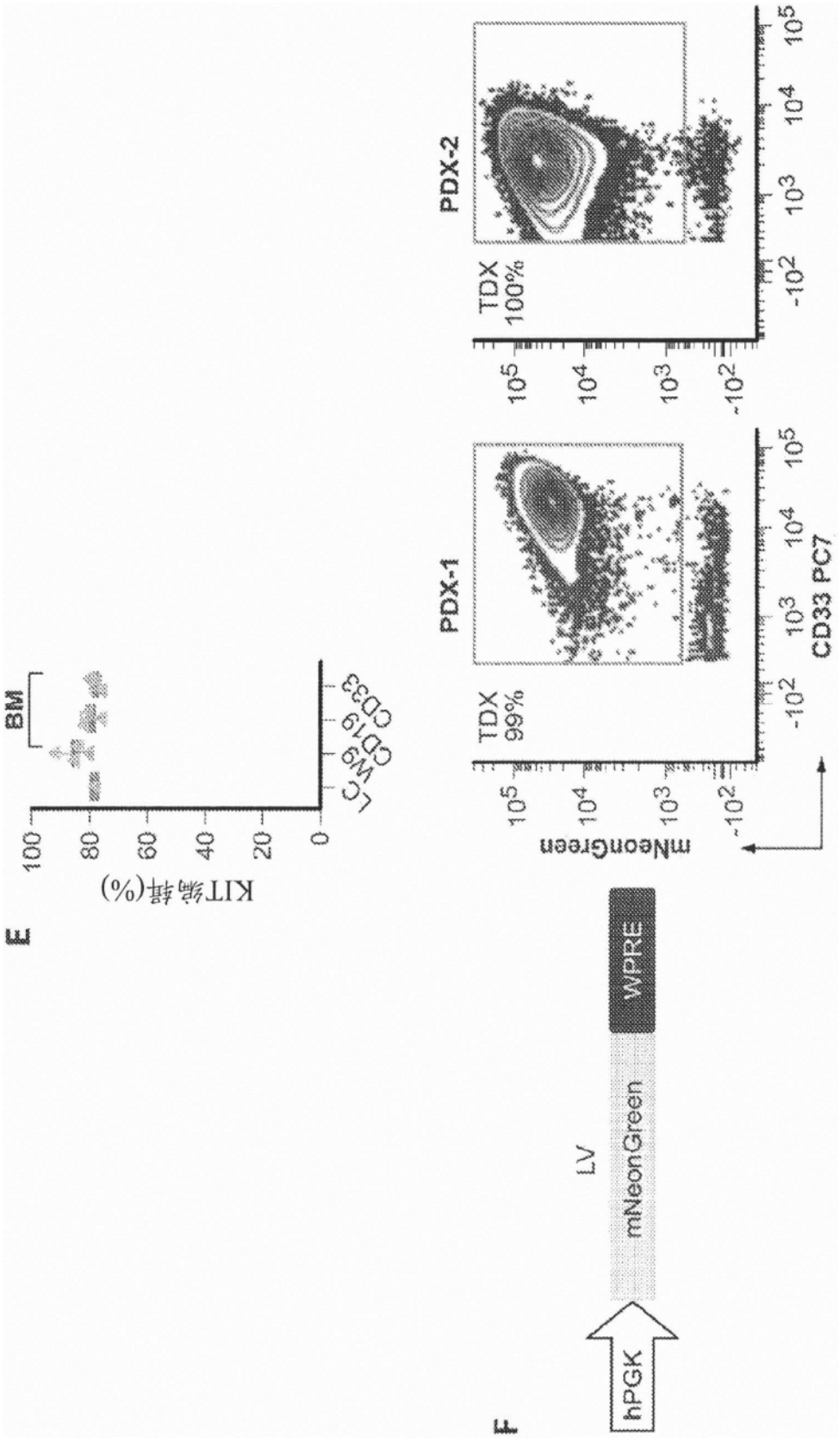

F
hPGK
LV
mNeonGreen
WPRE
mNeonGreen
CD33 PC7
PDX-1
TDX
99%
PDX-2
TDX
100%
E
KIT端粒(%)
BM
LC
W9
CD19
CD33

图43(续)

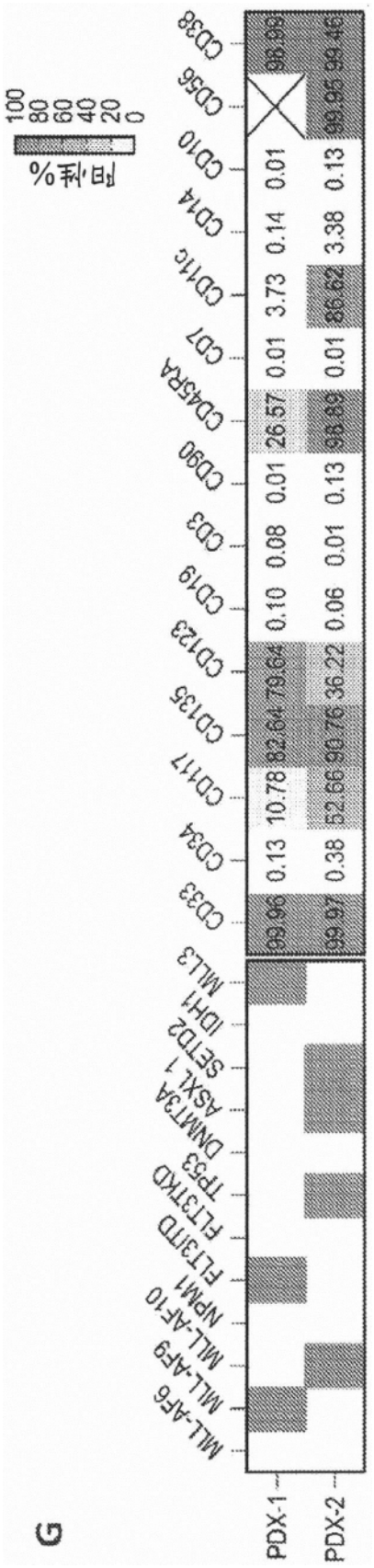

G
PDX-1
PDX-2
MLL-AF6
MLL-AF9
MLL-AF10
NPM1
FLT3ITD
FLT3TKD
TP53
DNMT3A
ASXL1
SETD2
IDH1
MLL3
CD33
CD34
CD117
CD135
CD123
CD19
CD3
CD90
CD45RA
CD7
CD11c
CD14
CD10
CD56
CD38
99.96 0.13 10.78 82.64 79.64 0.10 0.08 0.01 26.57 0.01 3.73 0.14 0.01 99.06
99.97 0.38 52.66 90.76 36.22 0.06 0.01 0.13 93.89 0.01 86.62 3.38 0.13 99.95 99.46
阳性%
100
80
60
40
20
0

图43(续)

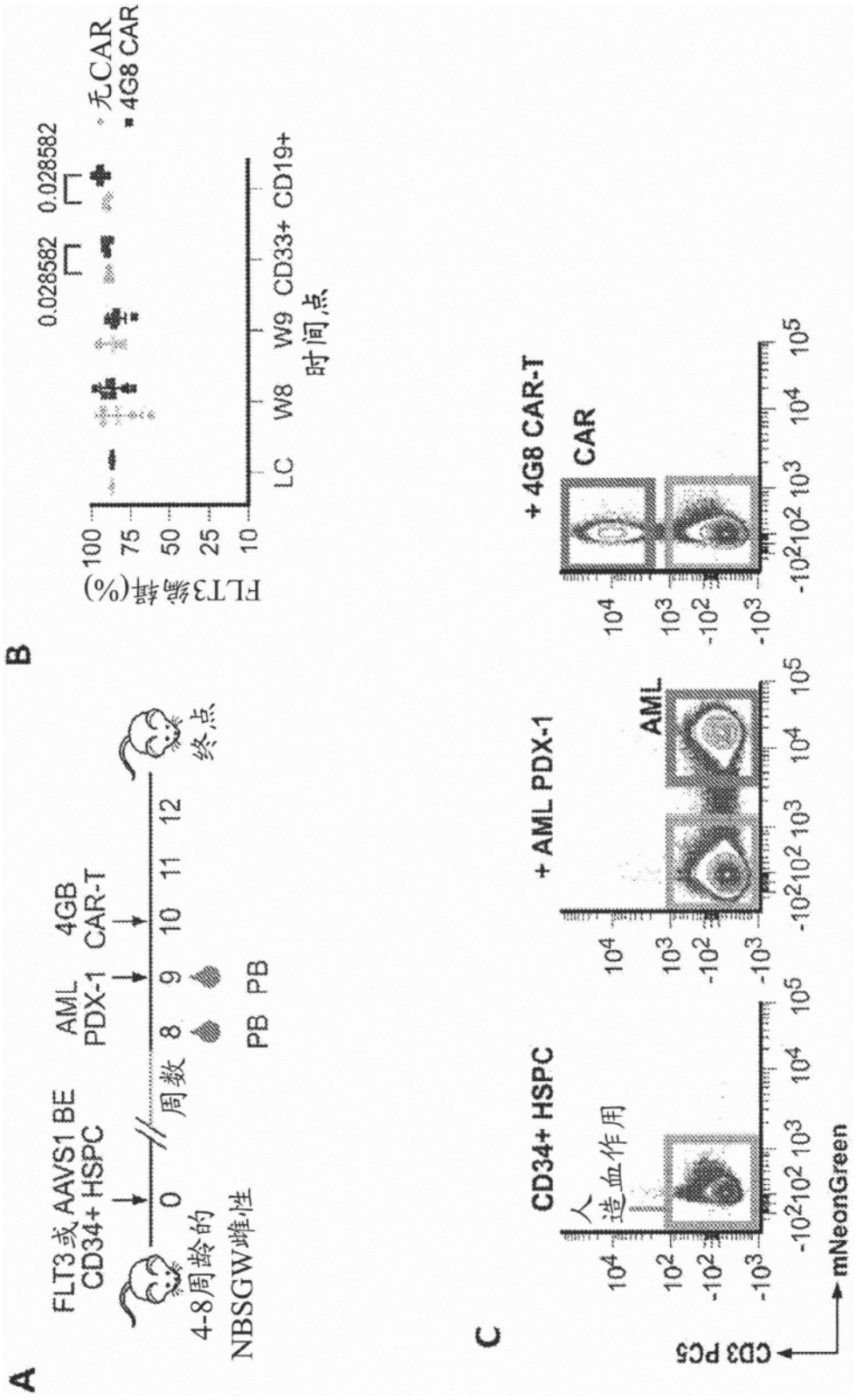

A
FLT3或AAVS1 BE
CD34+ HSPC
AML
PDX-1
4GB
CAR-T
4-8周龄的
NBSGW雌性
周数
0
8
9
10
11
12
PB
PB
终点
B
FLT3编辑(%)
100
75
50
25
10
0.028582
0.028582
无CAR
4G8 CAR
LC
W8
W9
CD33+ CD19+
时间点
C
CD34+ HSPC
人造血作用
+ AML PDX-1
AML
+ 4G8 CAR-T
CAR
CD3 PC5
mNeonGreen

图44

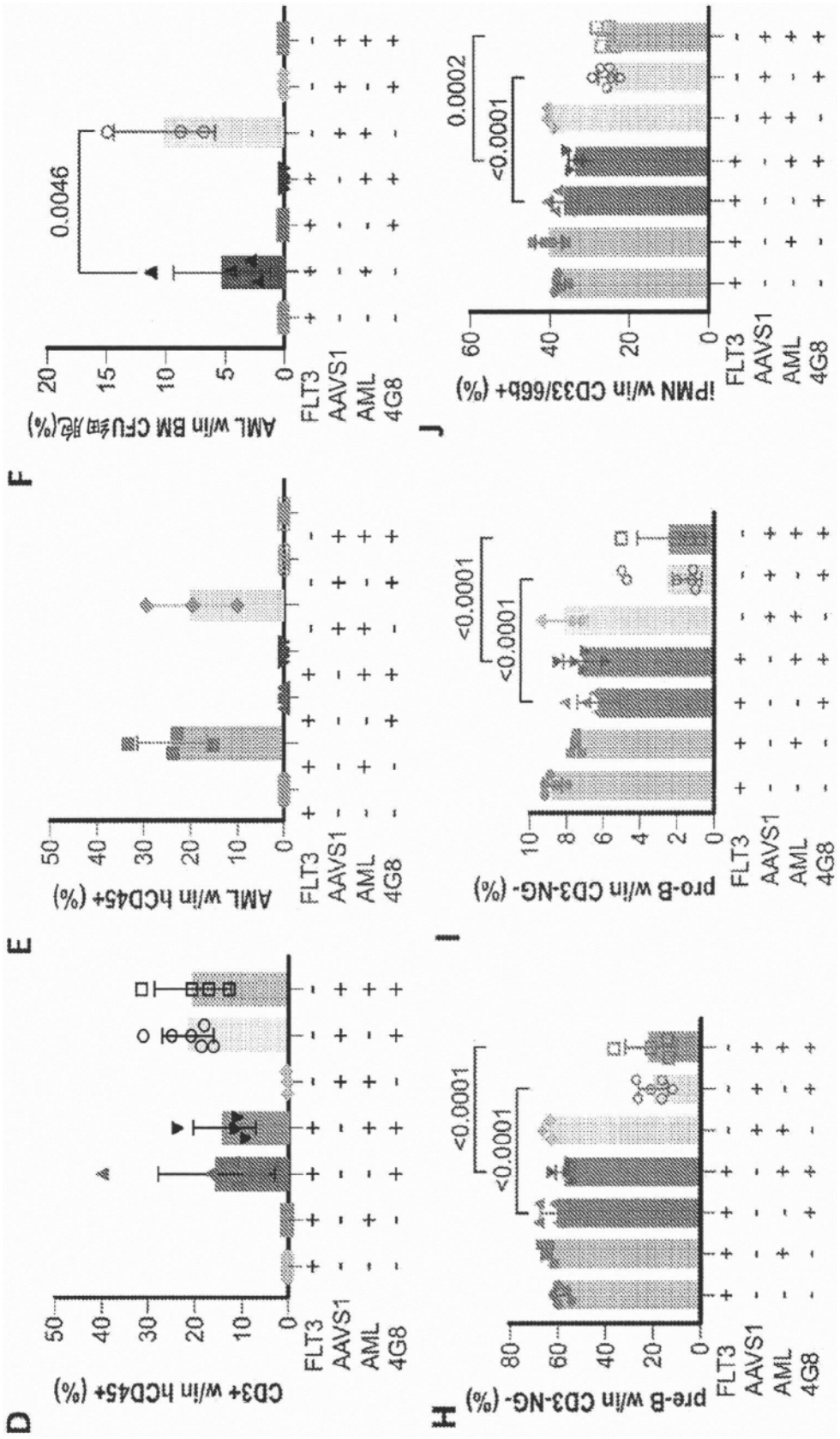

D
CD3+ w/in hCD45+ (%)
E
AML w/in hCD45+ (%)
F
AML w/in BM CFU细胞(%)
H
pre-B w/in CD3-NG- (%)
I
pro-B w/in CD3-NG- (%)
J
iPMN w/in CD33/66b+ (%)
FLT3
AAVS1
AML
4G8
0.0046
<0.0001
<0.0001
<0.0001
<0.0001
0.0002

图44(续)

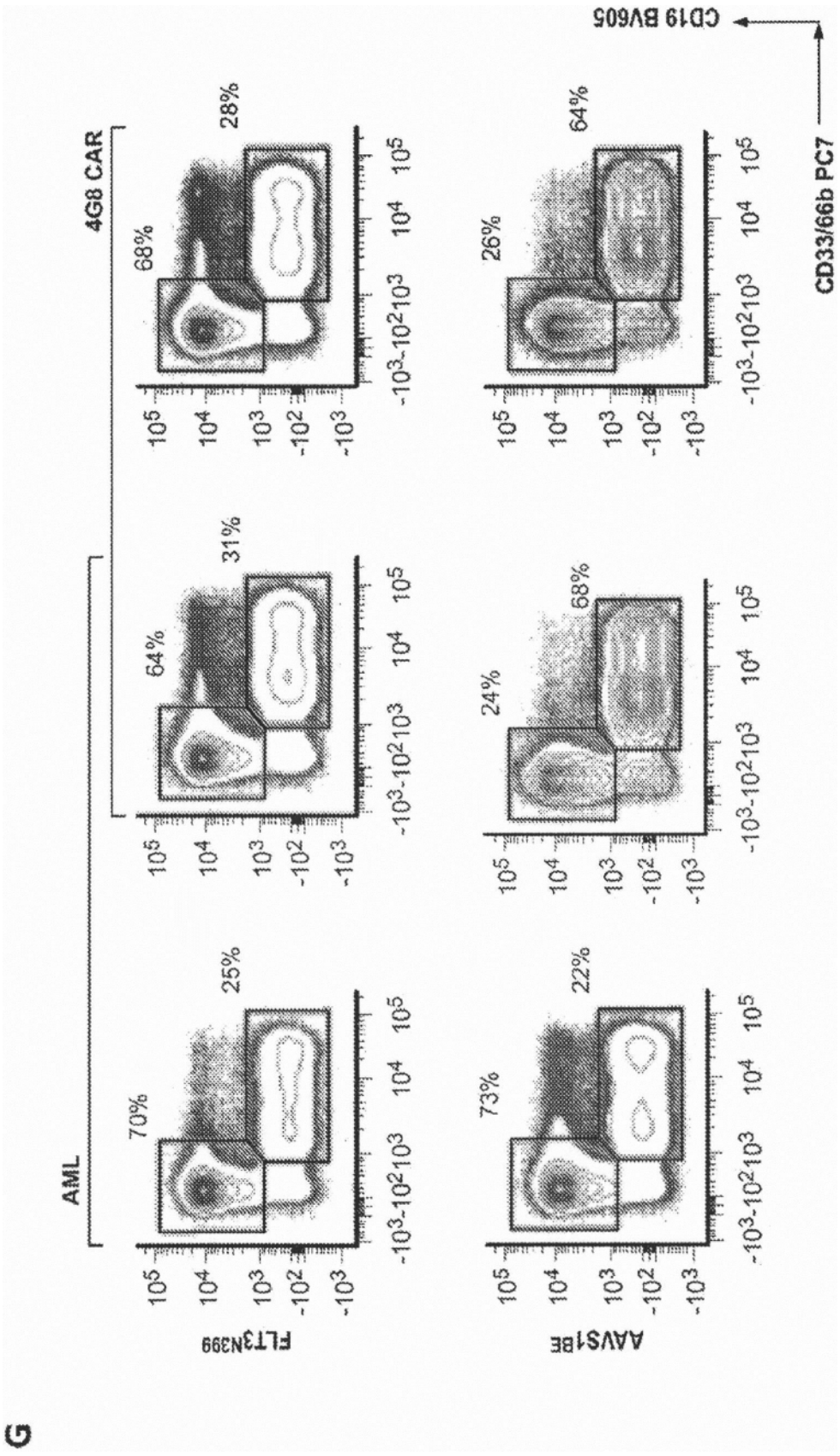

G
AML
4G8 CAR
70%
25%
64%
31%
73%
22%
24%
68%
68%
28%
26%
64%
FLT3N399
AAVS1BE
CD33/66b PC7
CD19 BV605

图44(续)

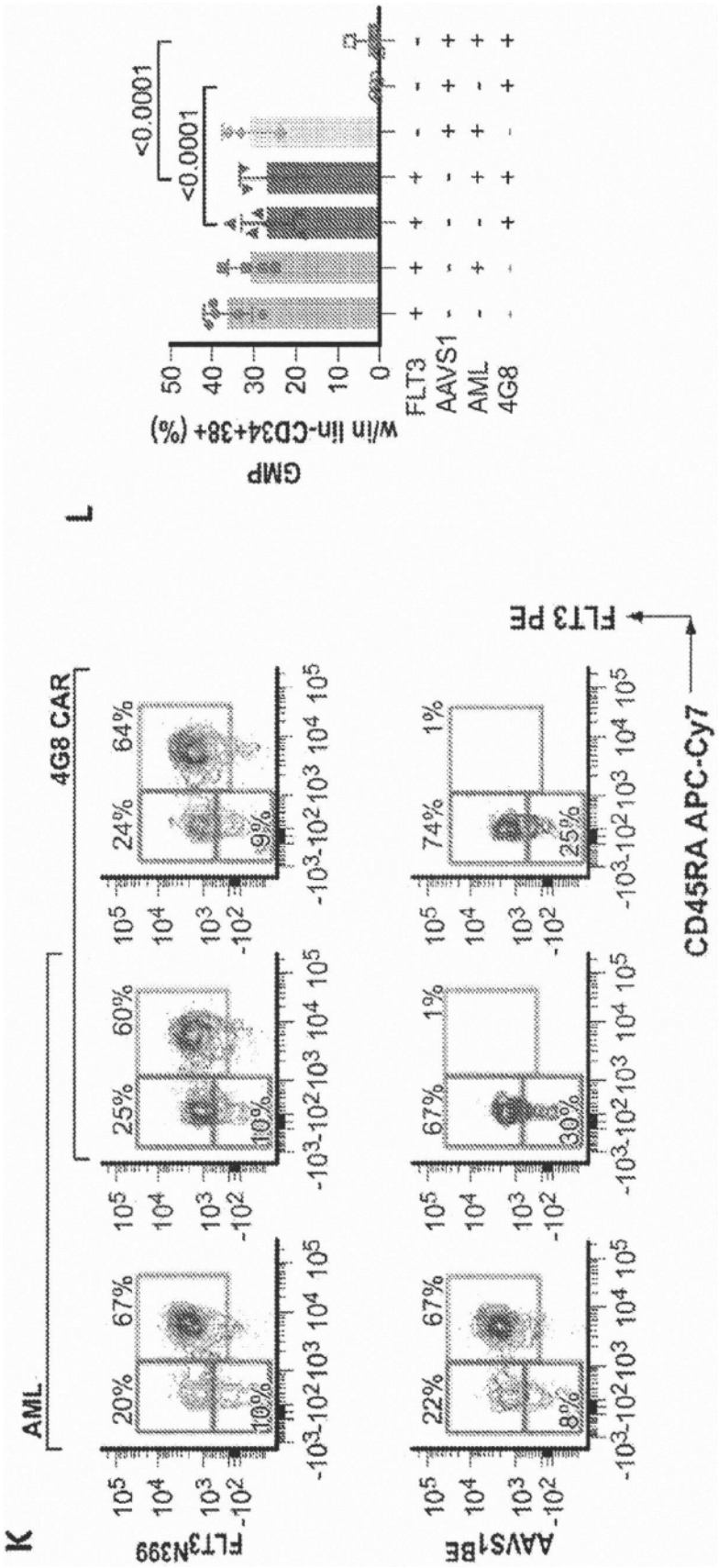

K
AML
4G8 CAR
FLT3N399
AAVS1BE
CD45RA APC-Cy7
FLT3 PE
L
GMP
w/in lin-CD34+38+ (%)
<0.0001
<0.0001
FLT3
AAVS1
AML
4G8

图44(续)

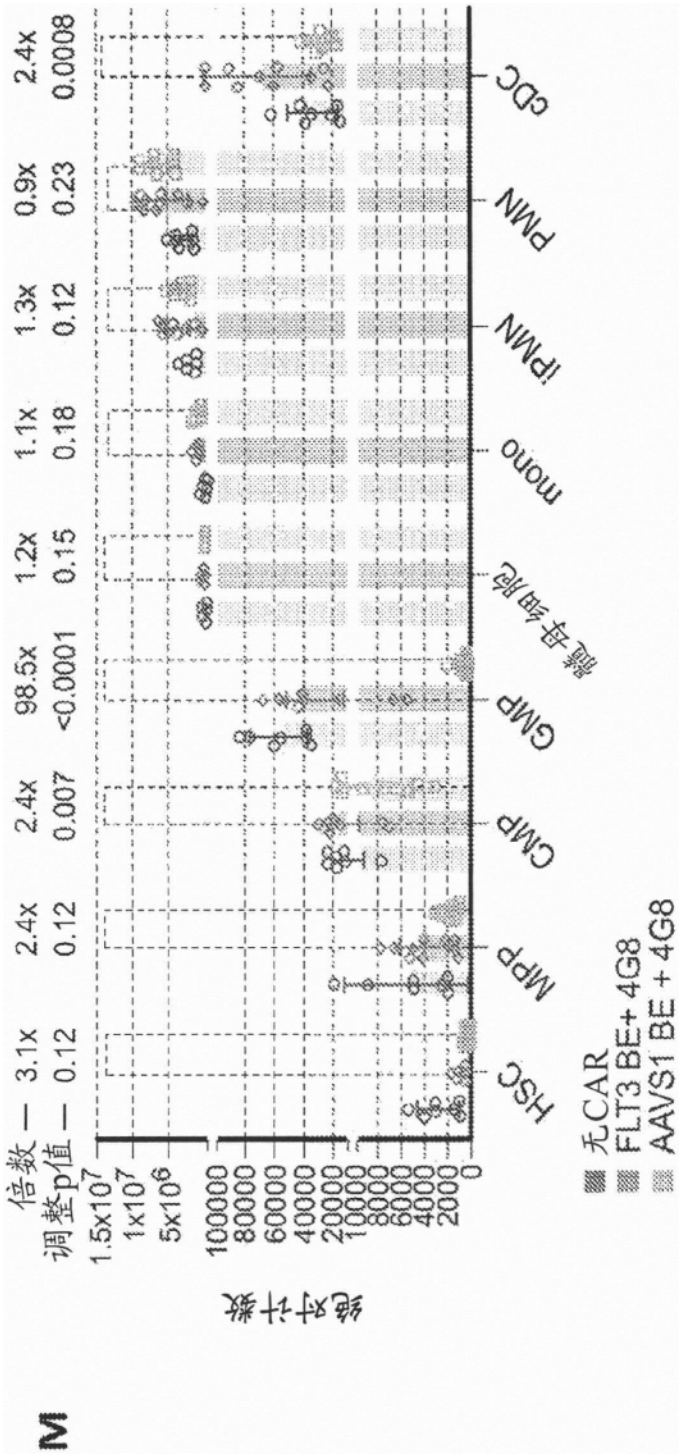

M
绝对计数
倍数 — 3.1x 2.4x 2.4x 98.5x 1.2x 1.1x 1.3x 0.9x 2.4x
调整p值 — 0.12 0.12 0.007 <0.0001 0.15 0.18 0.12 0.23 0.0008
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
100000
80000
60000
40000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
MPP
CMP
GMP
祖-母细胞
mono
iPMN
PMN
cDC
无CAR
FLT3 BE+ 4G8
AAVS1 BE + 4G8

图44(续)

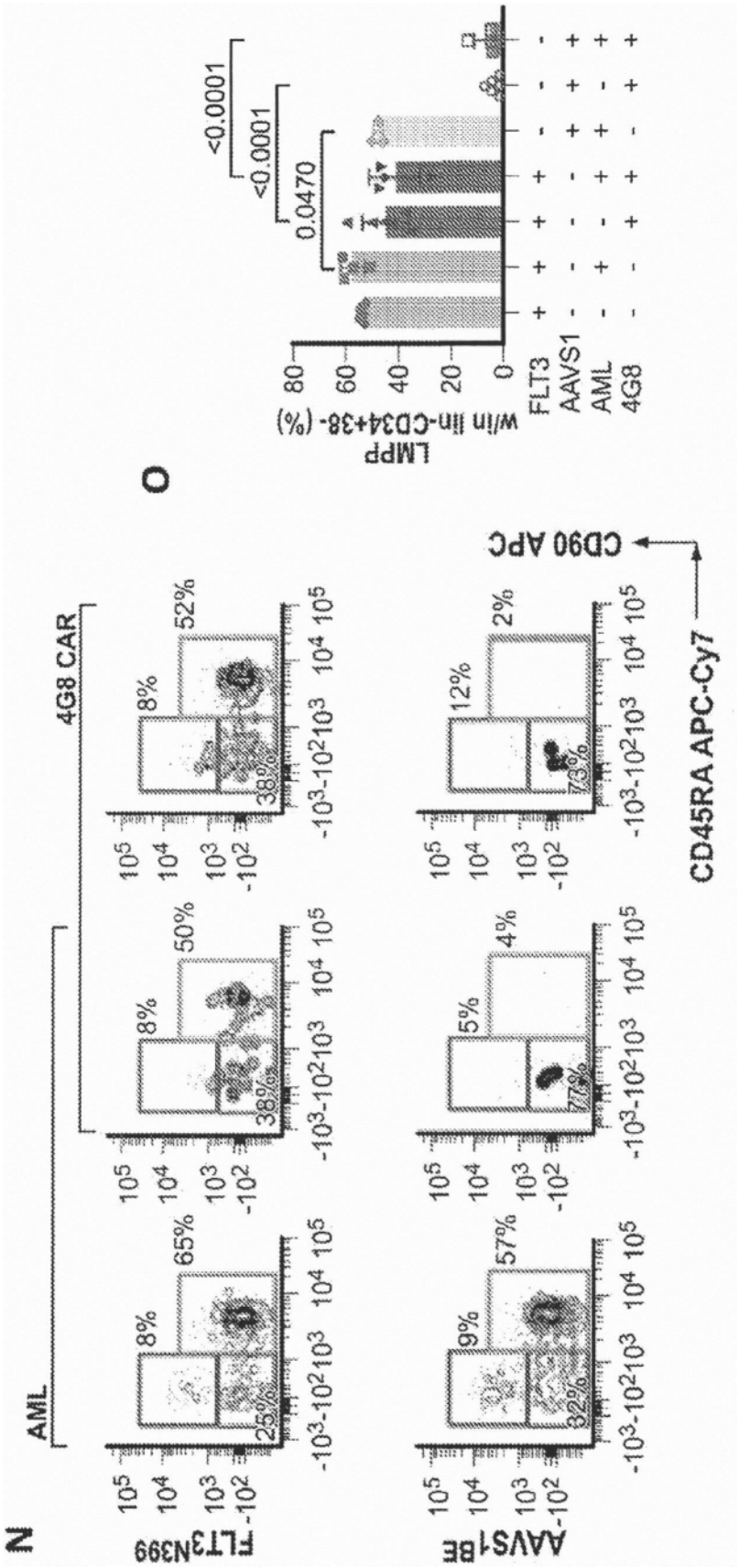

O
LMPP
w/in lin-CD34+38- (%)
80
60
40
20
0
<0.0001
<0.0001
0.0470
FLT3
AAVS1
AML
4G8
+ + - - + + - -
+ - + - + - + -
- + - + - + - +
N
AML
4G8 CAR
FLT3N399
AAVS1BE
CD45RA APC-Cy7
CD90 APC
8%
65%
25%
8%
50%
38%
8%
52%
38%
9%
57%
32%
5%
4%
77%
12%
2%
73%

图44(续)

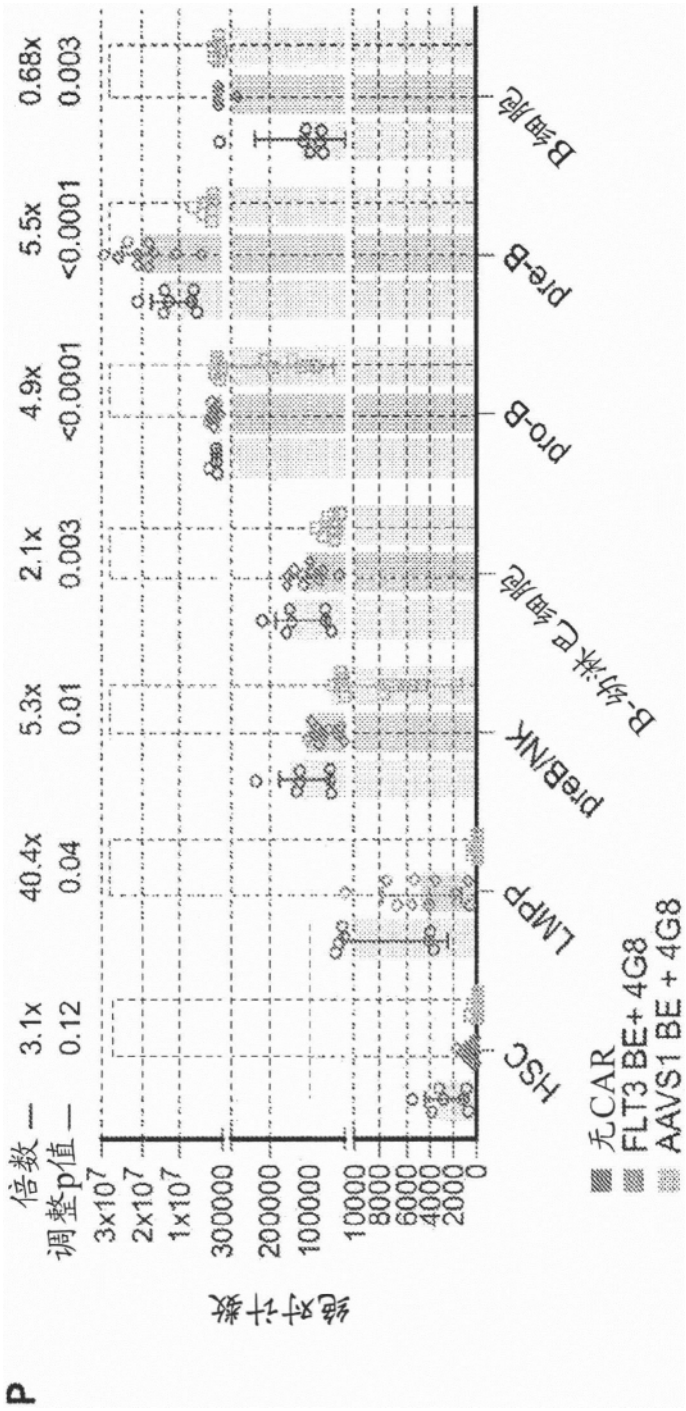

P
绝对计数
倍数 —
调整p值 —
3.1x
0.12
40.4x
0.04
5.3x
0.01
2.1x
0.003
4.9x
<0.0001
5.5x
<0.0001
0.68x
0.003
3x10^7
2x10^7
1x10^7
300000
200000
100000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
LMPP
preBNK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
B细胞
无CAR
FLT3 BE+ 4G8
AAVS1 BE + 4G8

图44(续)

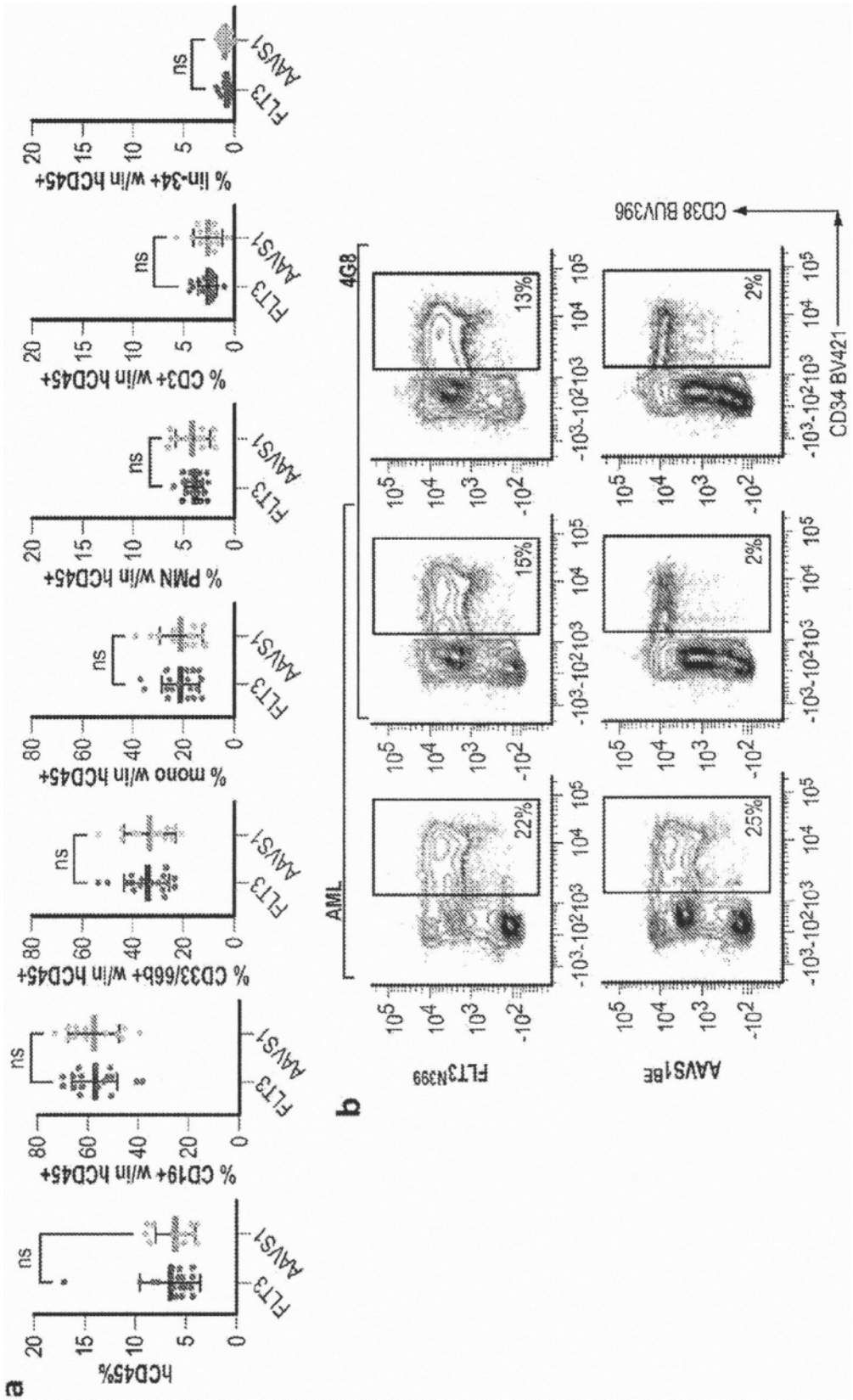

a
hCD45%
% CD19+ w/in hCD45+
% CD33/66b+ w/in hCD45+
% mono w/in hCD45+
% PMN w/in hCD45+
% CD3+ w/in hCD45+
% lin-34+ w/in hCD45+
ns
FLT3
AAVS1
b
AML
4G8
FLT3N399
AAVS1BE
CD38 BUV396
CD34 BV421
22%
25%
15%
2%
13%
2%

图45

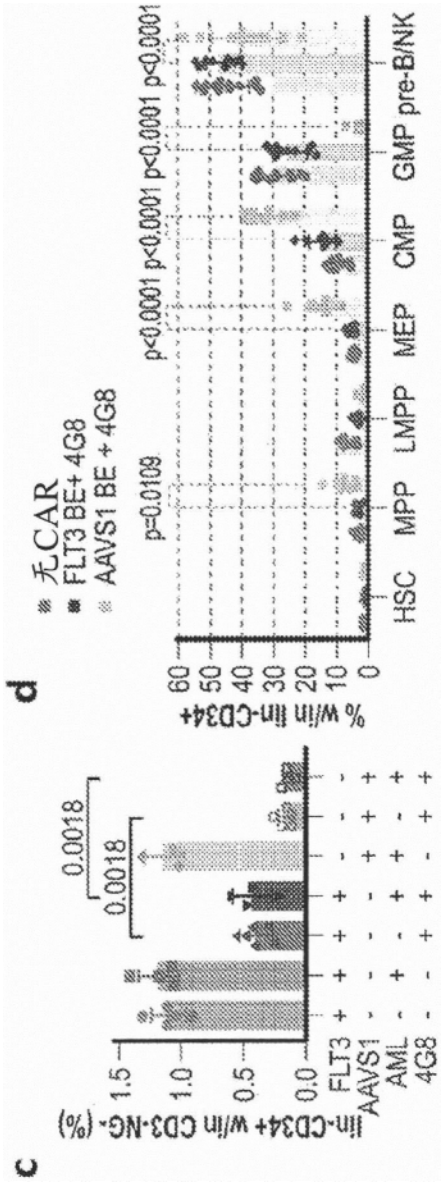

c
lin-CD34+ w/in CD3-NG- (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
0.0018
0.0018
FLT3
AAVS1
AML
4G8
d
无CAR
FLT3 BE+ 4G8
AAVS1 BE + 4G8
% w/in lin-CD34+
60
50
40
30
20
10
0
p=0.0109
p<0.0001 p<0.0001 p<0.0001 p<0.0001
HSC
MPP
LMPP
MEP
CMP
GMP
pre-B/NK

图45(续)

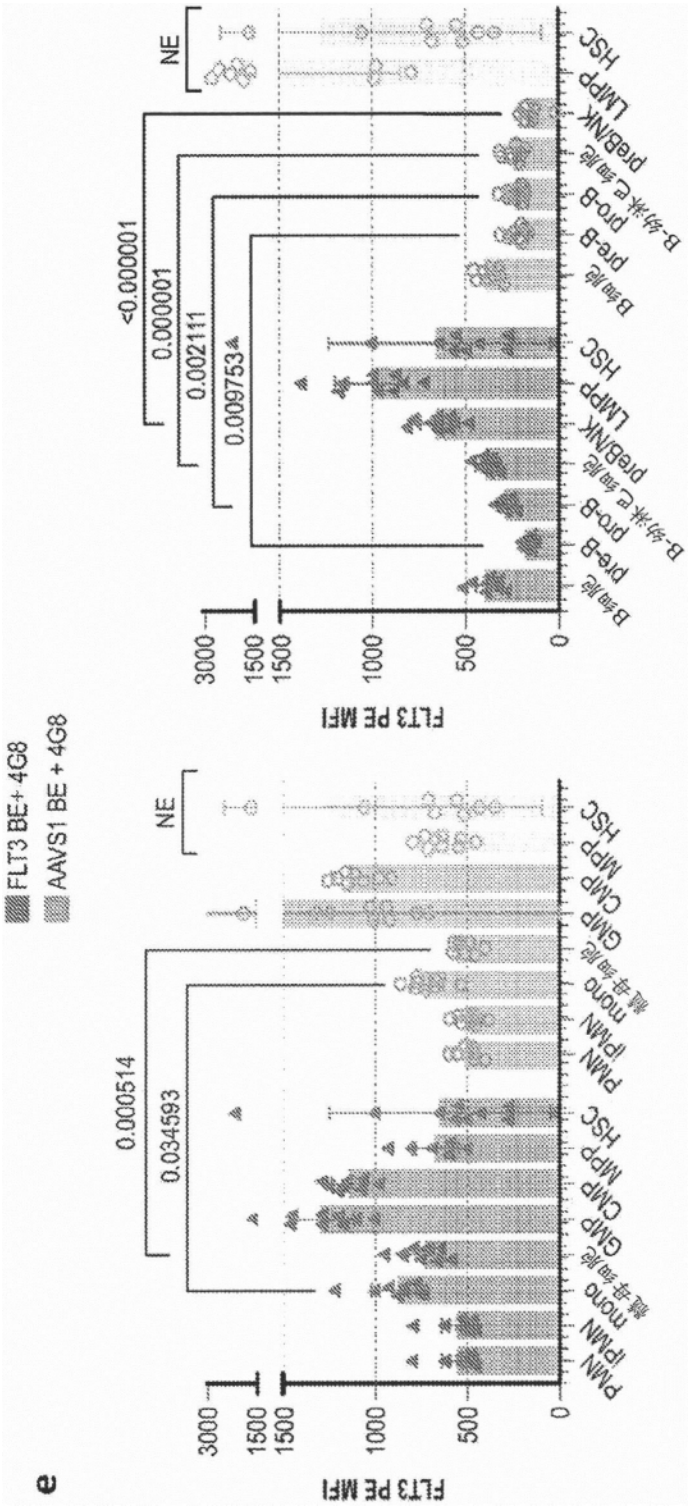

e
FLT3 BE+ 4G8
AAVS1 BE + 4G8
FLT3 PE MFI
3000
1500
1500
1000
500
0
NE
HSC
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
B细胞
HSC
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
B细胞
<0.000001
0.000001
0.002111
0.009753
FLT3 PE MFI
3000
1500
1500
1000
500
0
NE
HSC
MPP
CMP
GMP
粒-单细胞
mono
pMN
iPMN
HSC
MPP
CMP
GMP
粒-单细胞
mono
pMN
iPMN
0.000514
0.034593

图45(续)

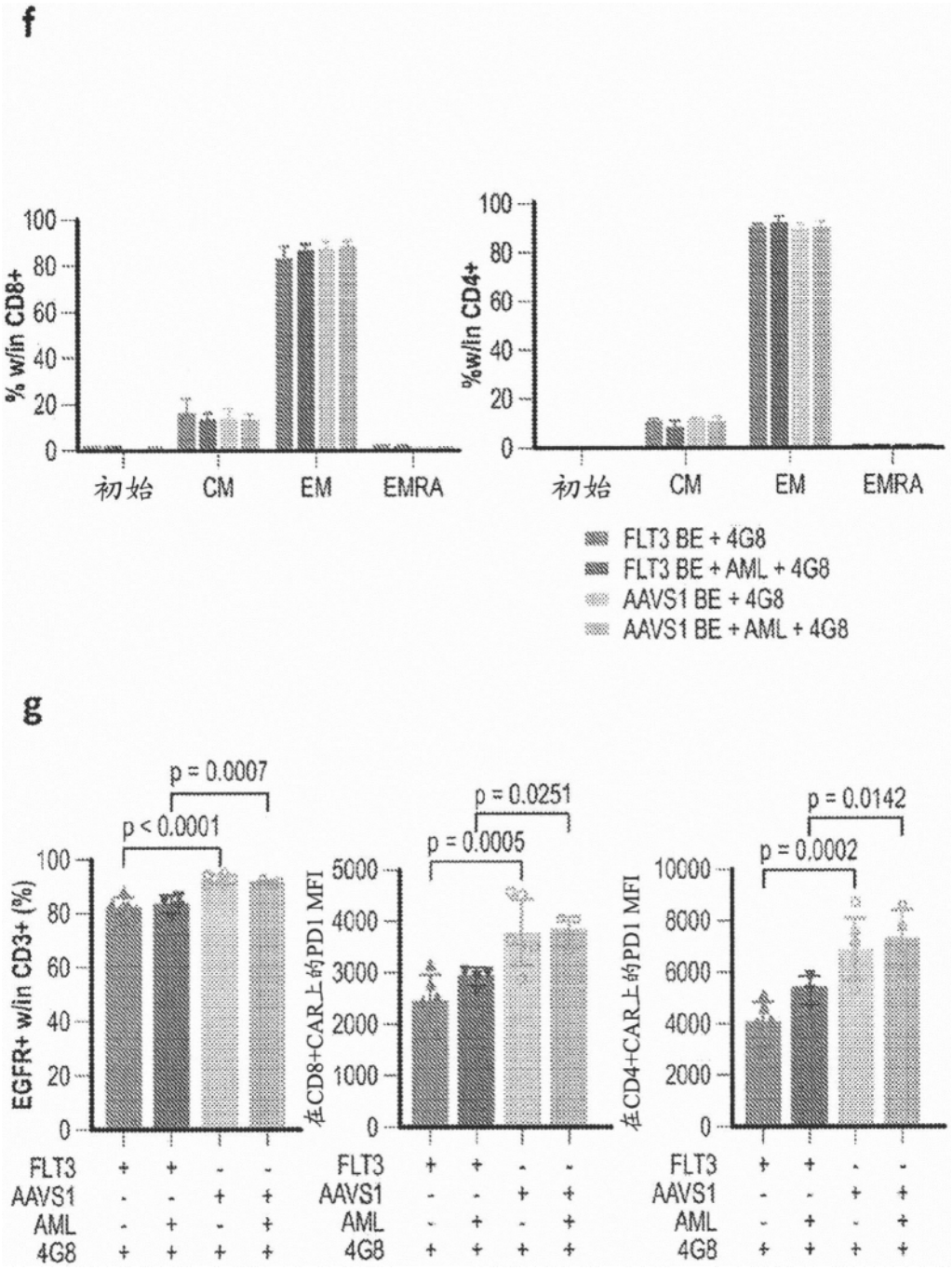

f
% w/in CD8+
%w/in CD4+
初始
CM
EM
EMRA
FLT3 BE + 4G8
FLT3 BE + AML + 4G8
AAVS1 BE + 4G8
AAVS1 BE + AML + 4G8
g
EGFR+ w/in CD3+ (%)
在CD8+CAR上的PD1 MFI
在CD4+CAR上的PD1 MFI
p = 0.0007
p < 0.0001
p = 0.0251
p = 0.0005
p = 0.0142
p = 0.0002
FLT3
AAVS1
AML
4G8

图45(续)

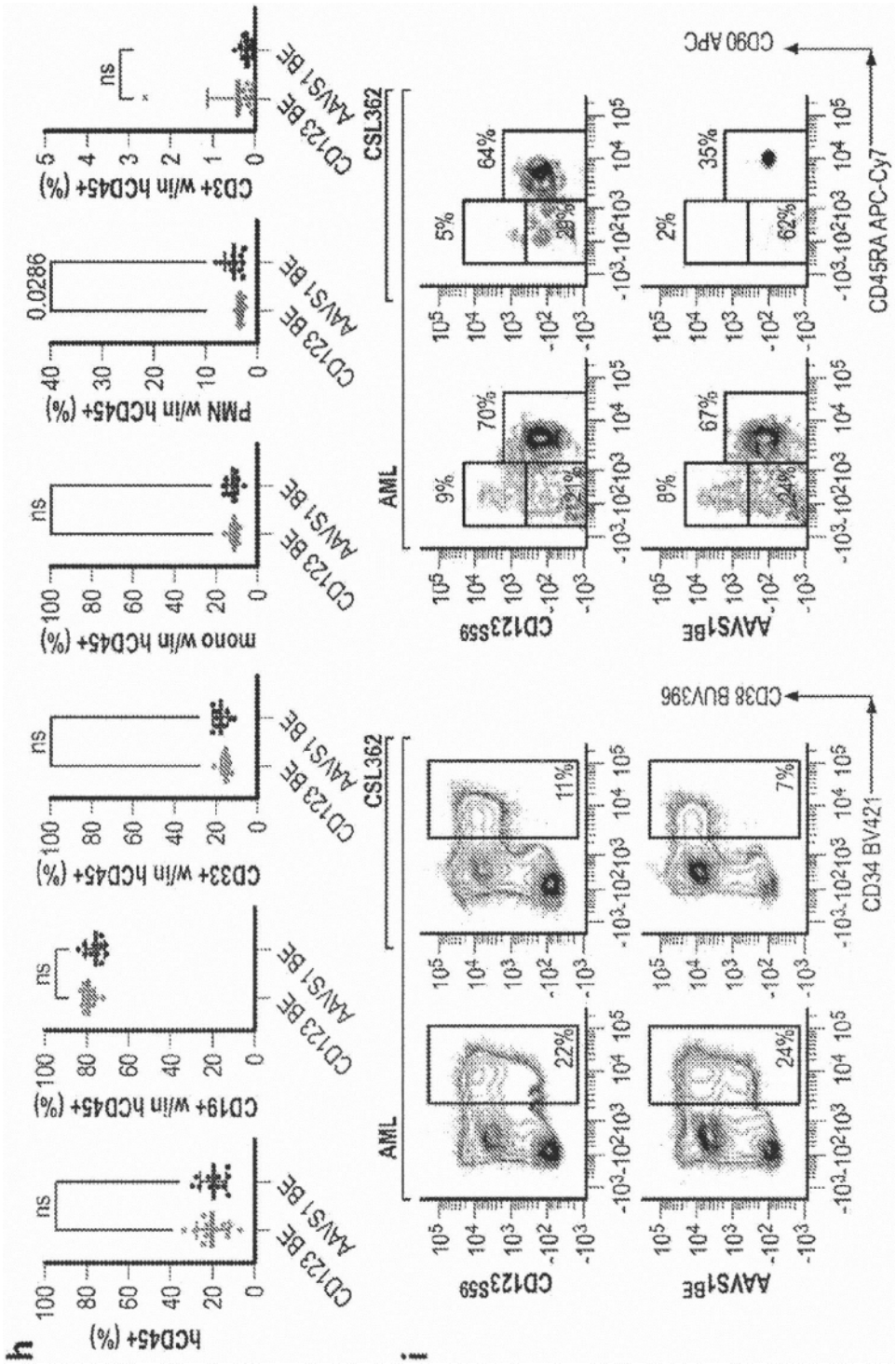

h
hCD45+ (%)
CD19+ w/in hCD45+ (%)
CD33+ w/in hCD45+ (%)
mono w/in hCD45+ (%)
PMN w/in hCD45+ (%)
CD3+ w/in hCD45+ (%)
CD123 BE
AAVS1 BE
ns
0.0286
i
AML
CSL362
CD123559
AAVS1BE
CD38 BUV396
CD34 BV421
CD90 APC
CD45RA APC-Cy7
22%
24%
11%
7%
9%
8%
70%
67%
5%
2%
64%
35%

图45(续)

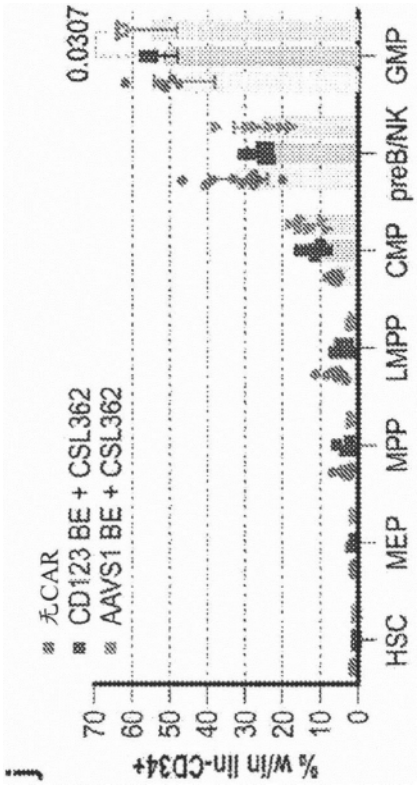

0.0307
无CAR
CD123 BE + CSL362
AAVS1 BE + CSL362
% w/in lin-CD34+
70
60
50
40
30
20
10
0
HSC
MEP
MPP
LMPP
CMP
preB/NK
GMP

图45(续)

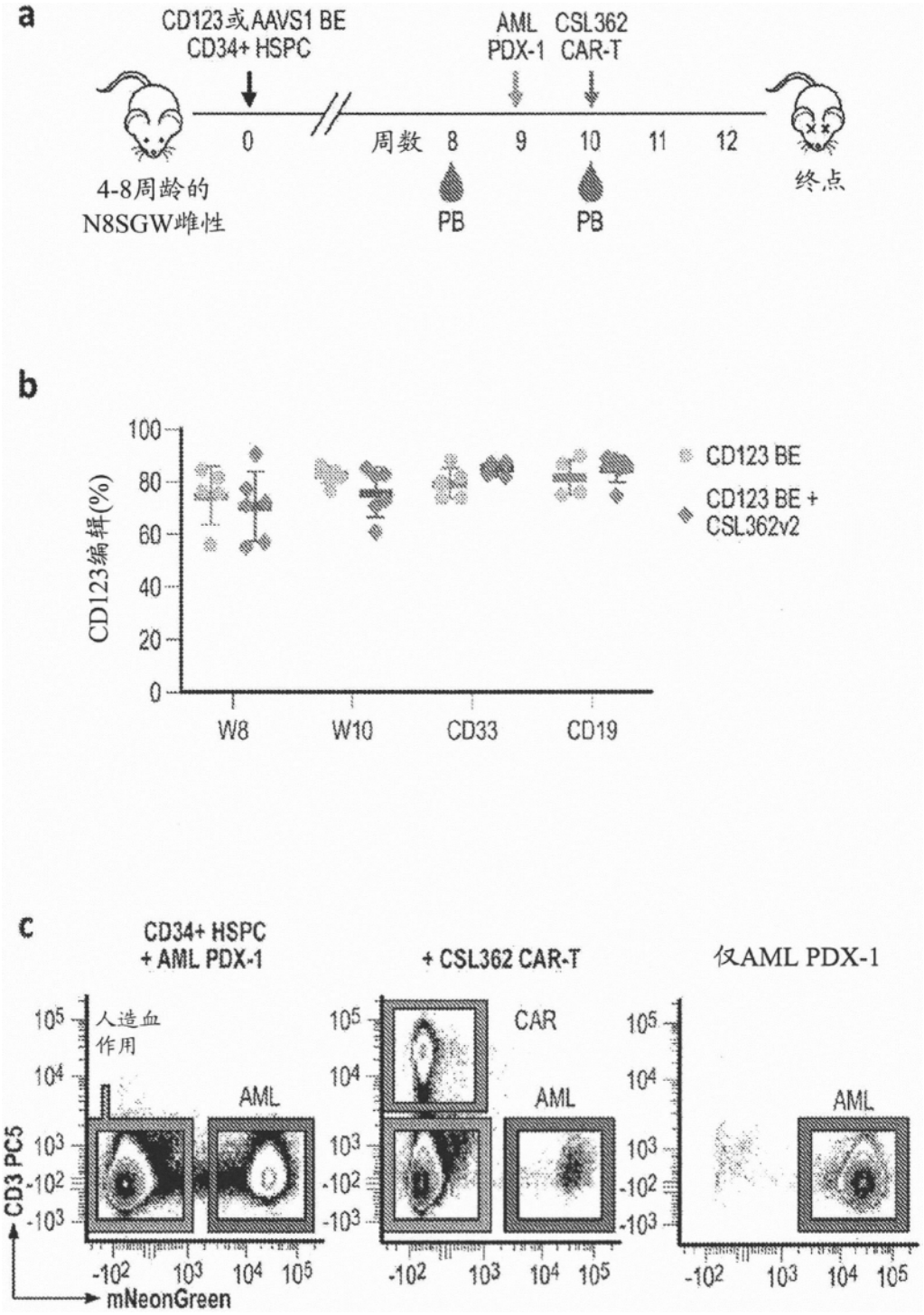

a
CD123或AAVS1 BE
CD34+ HSPC
AML
PDX-1
CSL362
CAR-T
0
周数
8
9
10
11
12
4-8周龄的
N8SGW雌性
PB
PB
终点
b
CD123编辑(%)
100
80
60
40
20
0
W8
W10
CD33
CD19
CD123 BE
CD123 BE +
CSL362v2
c
CD34+ HSPC
+ AML PDX-1
+ CSL362 CAR-T
仅AML PDX-1
人造血
作用
AML
CAR
AML
AML
CD3 PC5
mNeonGreen

图46

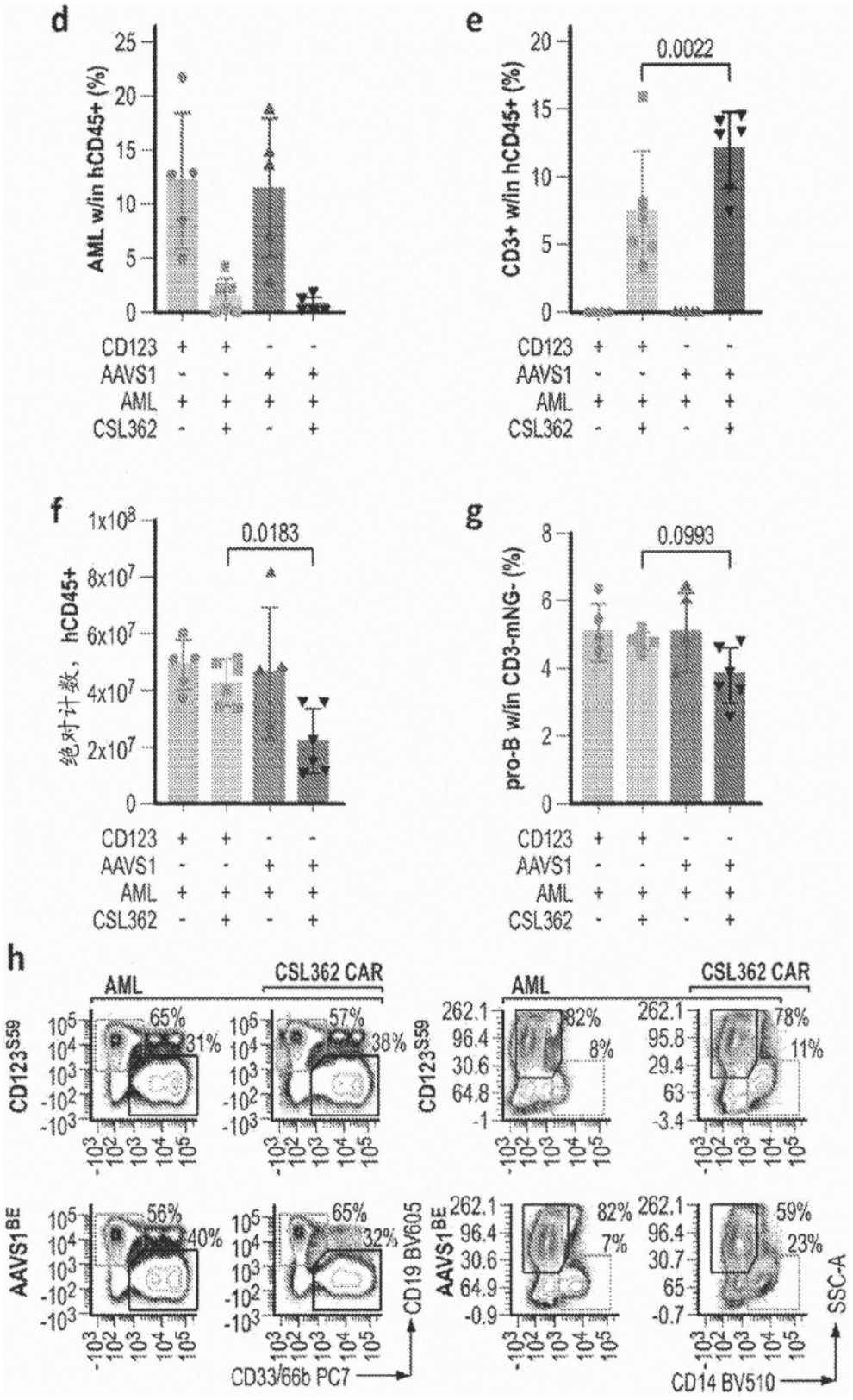

d
AML w/in hCD45+ (%)
CD123
AAVS1
AML
CSL362
e
CD3+ w/in hCD45+ (%)
0.0022
f
绝对计数，hCD45+
0.0183
g
pro-B w/in CD3-mNG- (%)
0.0993
h
AML
CSL362 CAR
CD123S59
AAVS1BE
CD19 BV605
CD33/66b PC7
SSC-A
CD14 BV510

图46(续)

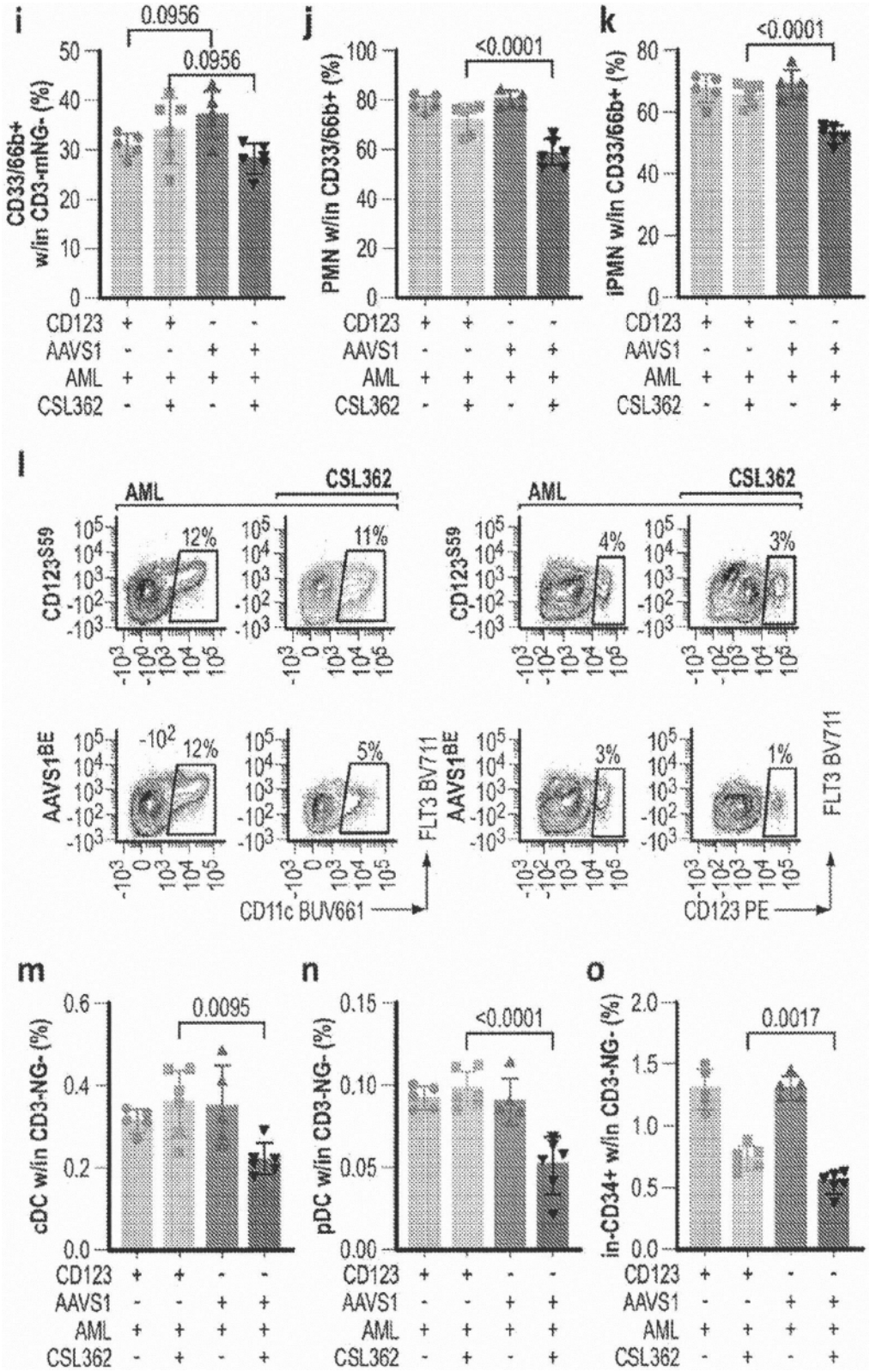

i
0.0956
0.0956
CD33/66b+ w/in CD3-mNG- (%)
CD123 + + - -
AAVS1 - - + +
AML + + + +
CSL362 - + - +
j
<0.0001
PMN w/in CD33/66b+ (%)
k
<0.0001
iPMN w/in CD33/66b+ (%)
l
AML
CSL362
12%
11%
4%
3%
CD123S59
AAVS1BE
5%
3%
1%
FLT3 BV711
CD11c BUV661
CD123 PE
m
0.0095
cDC w/in CD3-NG- (%)
n
<0.0001
pDC w/in CD3-NG- (%)
o
0.0017
in-CD34+ w/in CD3-NG- (%)

图46(续)

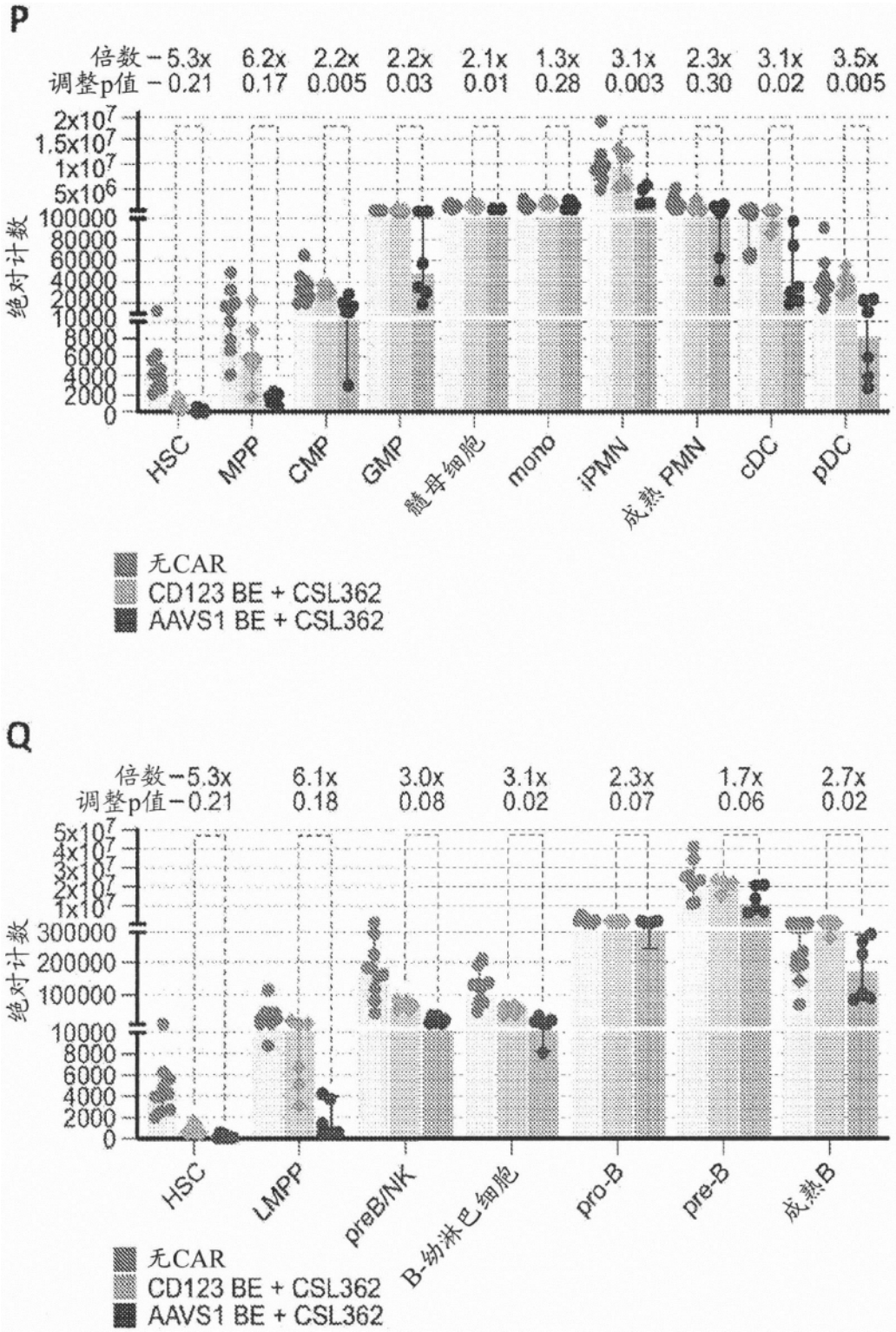

P
倍数 – 5.3x 6.2x 2.2x 2.2x 2.1x 1.3x 3.1x 2.3x 3.1x 3.5x
调整p值 – 0.21 0.17 0.005 0.03 0.01 0.28 0.003 0.30 0.02 0.005
绝对计数
2x10^7
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
100000
80000
60000
40000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
MPP
CMP
GMP
髓母细胞
mono
iPMN
成熟 PMN
cDC
pDC
无CAR
CD123 BE + CSL362
AAVS1 BE + CSL362
Q
倍数 – 5.3x 6.1x 3.0x 3.1x 2.3x 1.7x 2.7x
调整p值 – 0.21 0.18 0.08 0.02 0.07 0.06 0.02
绝对计数
5x10^7
4x10^7
3x10^7
2x10^7
1x10^7
300000
200000
100000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
成熟B
无CAR
CD123 BE + CSL362
AAVS1 BE + CSL362

图46 (续)

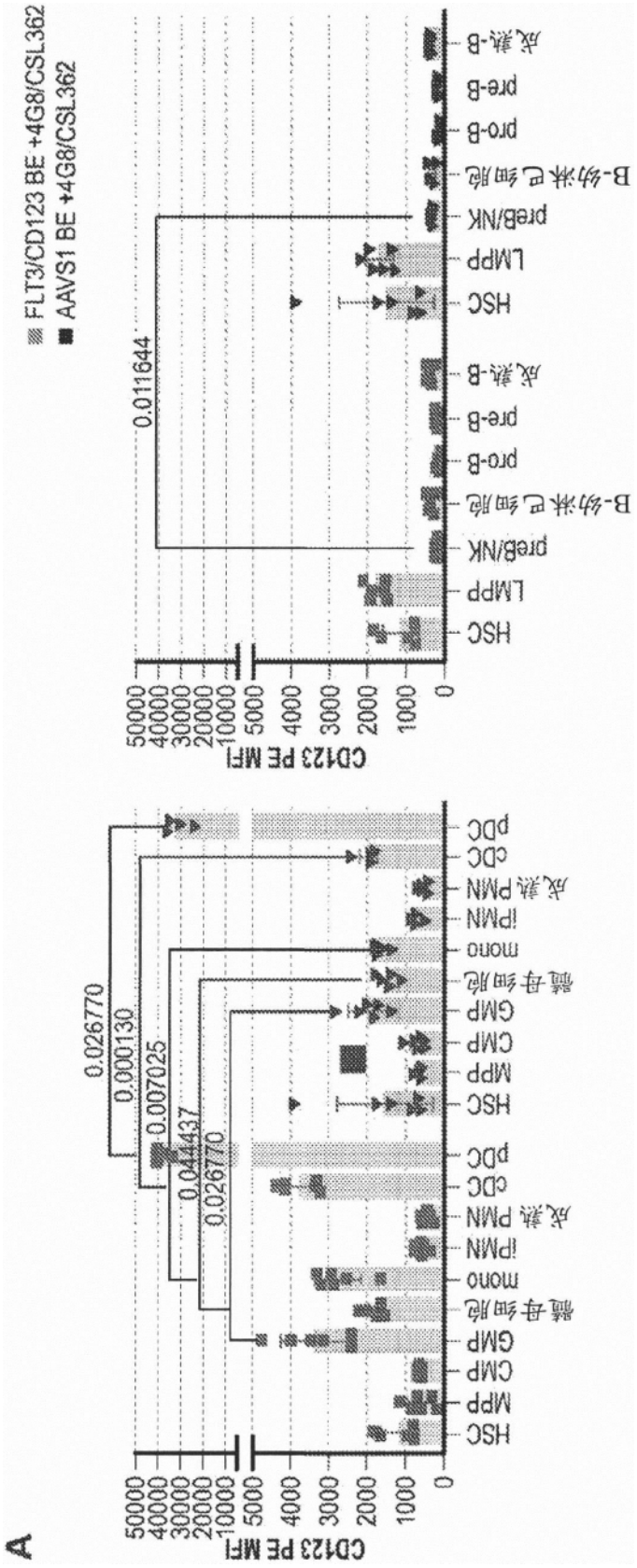

A
CD123 PE MFI
50000
40000
30000
20000
10000
5000
4000
3000
2000
1000
0
HSC
MPP
CMP
GMP
髓-母细胞
mono
iPMN
成熟 PMN
cDC
pDC
0.026770
0.044437
0.007025
0.000130
0.026770
FLT3/CD123 BE +4G8/CSL362
AAVS1 BE +4G8/CSL362
0.011644
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
成熟-B

图47

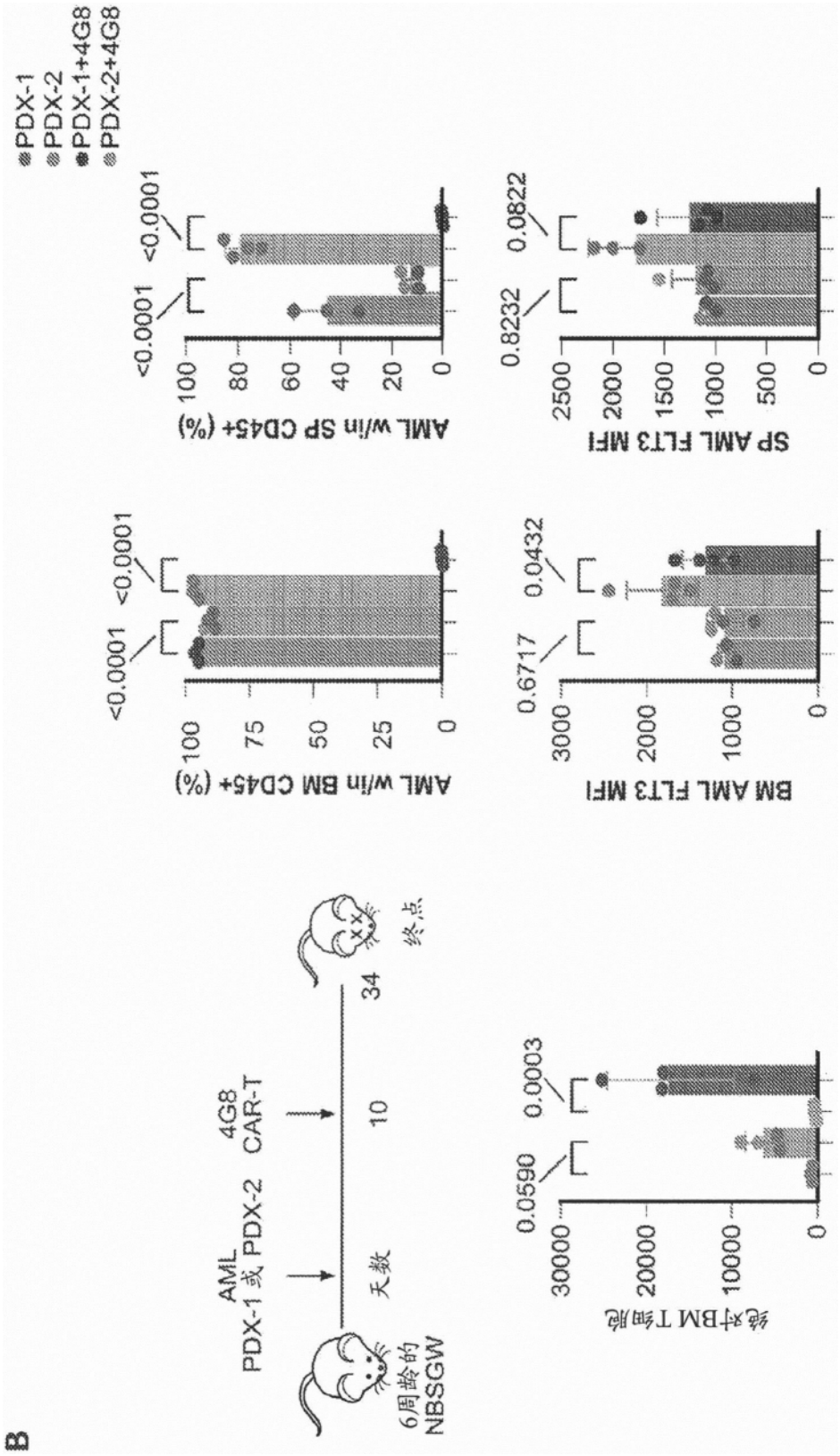

B
6周龄的 NBSGW
AML PDX-1 或 PDX-2
4G8 CAR-T
天数
10
34
终点
PDX-1
PDX-2
PDX-1+4G8
PDX-2+4G8
AML w/in BM CD45+ (%)
AML w/in SP CD45+ (%)
BM AML FLT3 MFI
SP AML FLT3 MFI
绝对BM T细胞
<0.0001
0.6717
0.0432
0.8232
0.0822
0.0590
0.0003

图47(续)

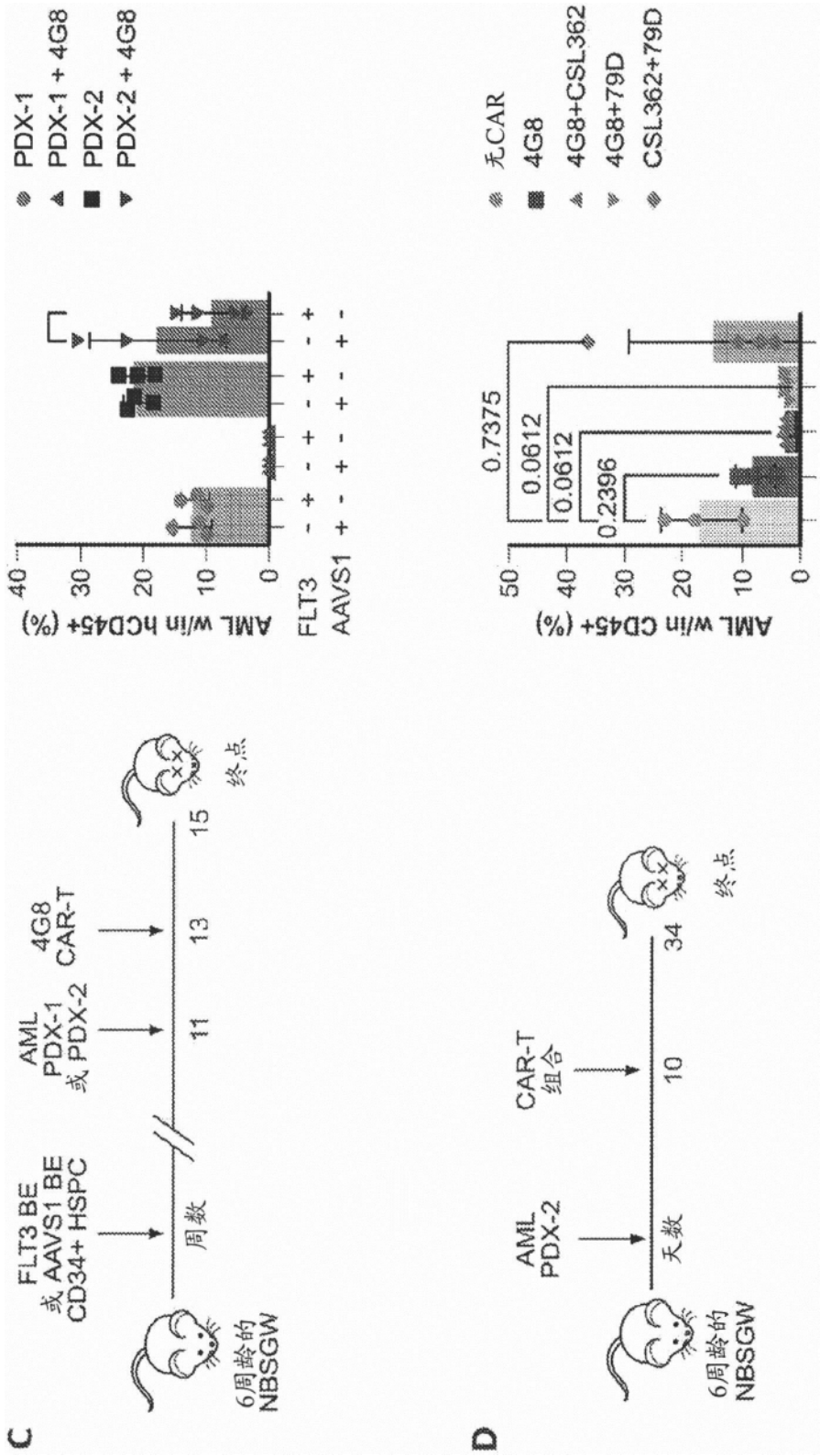

C
6周龄的NBSGW
FLT3 BE或AAVS1 BE CD34+ HSPC
周数
AML PDX-1或PDX-2
4G8 CAR-T
终点
AML w/in hCD45+ (%)
FLT3
AAVS1
PDX-1
PDX-1 + 4G8
PDX-2
PDX-2 + 4G8
D
6周龄的NBSGW
AML PDX-2
天数
CAR-T组合
终点
AML w/in CD45+ (%)
0.7375
0.0612
0.0612
0.2396
无CAR
4G8
4G8+CSL362
4G8+79D
CSL362+79D

图47(续)

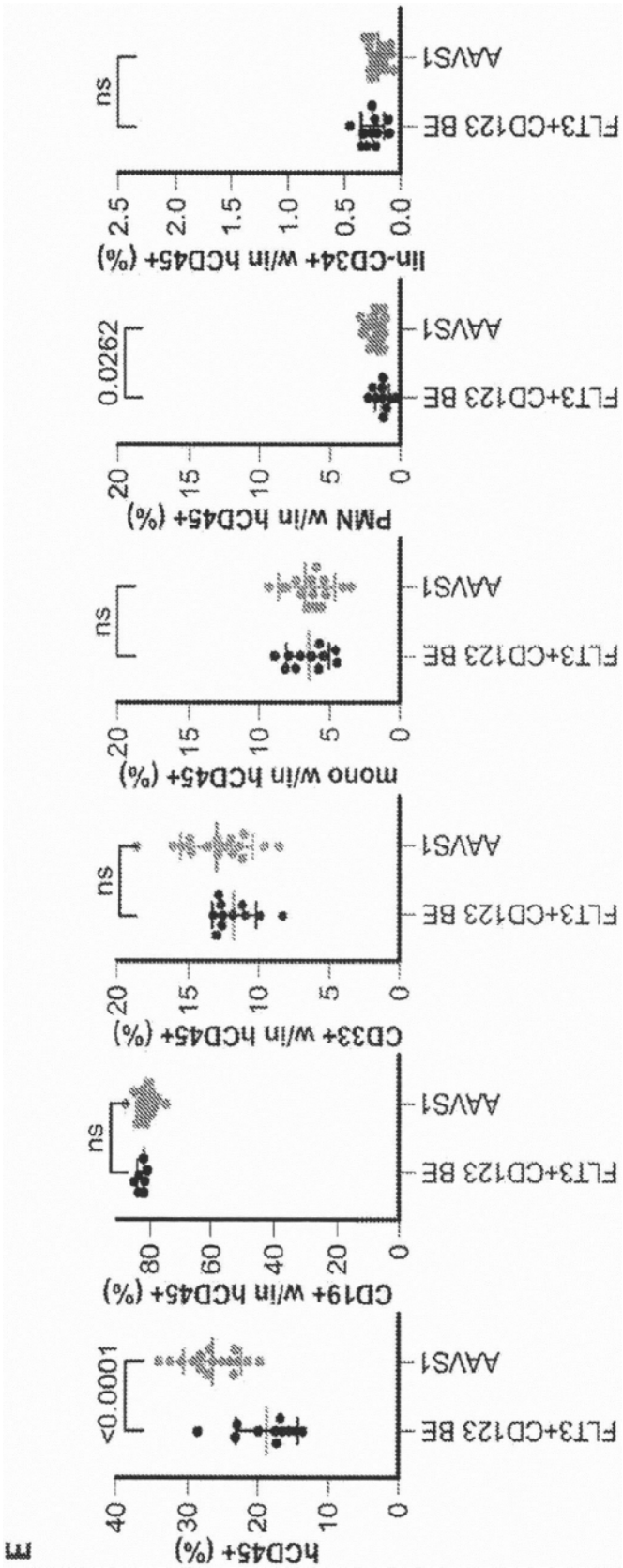

m
hCD45+ (%)
<0.0001
CD19+ w/in hCD45+ (%)
ns
CD33+ w/in hCD45+ (%)
ns
mono w/in hCD45+ (%)
PMN w/in hCD45+ (%)
0.0262
lin-CD34+ w/in hCD45+ (%)
ns
FLT3+CD123 BE
AAVS1

图47(续)

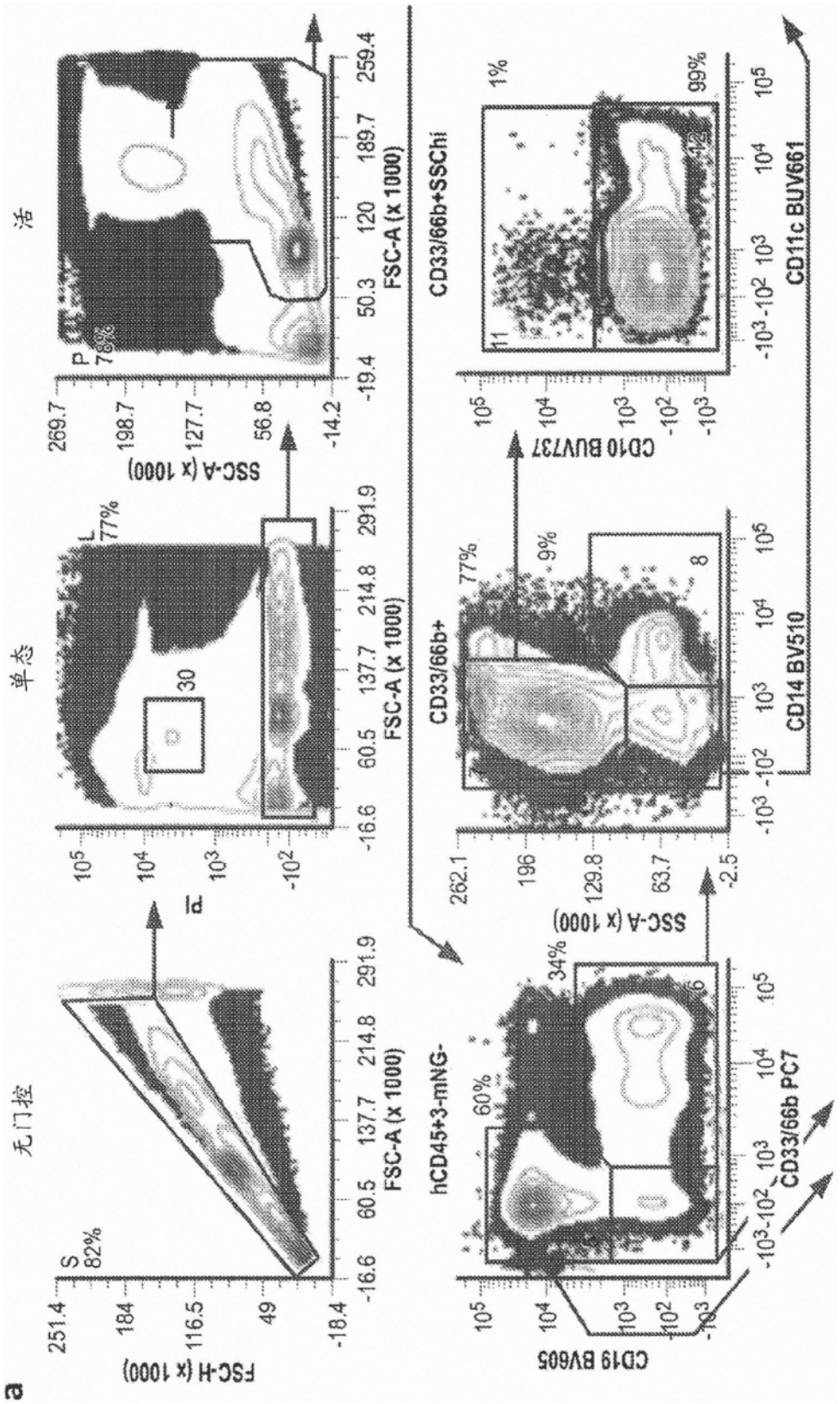

a
无门控
S
82%
FSC-H (x 1000)
FSC-A (x 1000)
单态
L
77%
30
PI
活
P
78%
SSC-A (x 1000)
FSC-A (x 1000)
hCD45+3-mNG-
60%
34%
CD19 BV605
CD33/66b PC7
CD33/66b+
77%
9%
CD14 BV510
SSC-A (x 1000)
CD33/66b+SSChi
1%
99%
CD10 BUV737
CD11c BUV661

图48

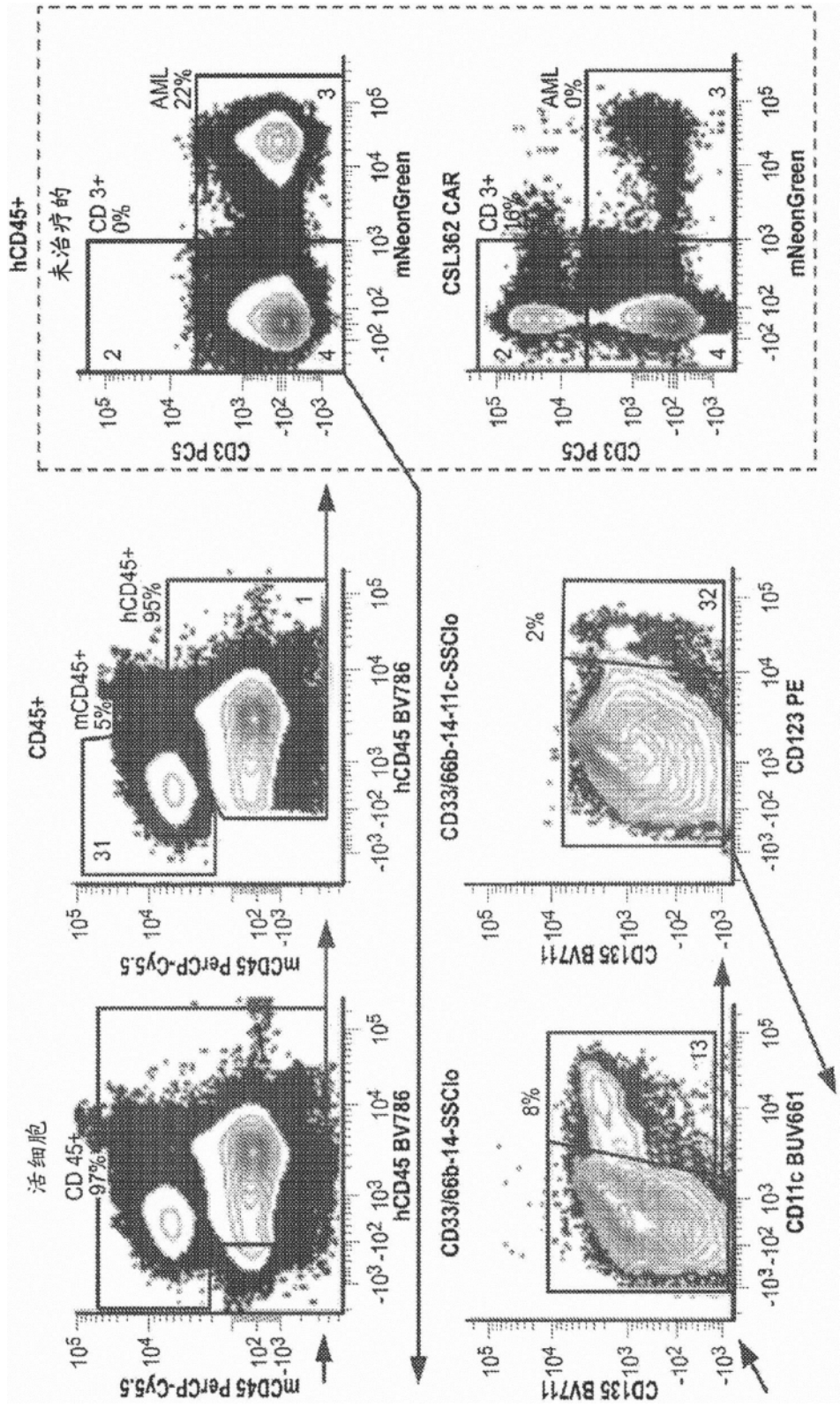

hCD45+
未治疗的
CD 3+
0%
AML
22%
CD3 PC5
mNeonGreen
CSL362 CAR
CD 3+
16%
AML
0%
CD45+
mCD45+
5%
hCD45+
95%
mCD45 PerCP-Cy5.5
hCD45 BV786
CD33/66b-14-11c-SSClo
2%
CD123 PE
CD135 BV711
活细胞
CD 45+
97%
CD33/66b-14-SSClo
8%
CD11c BUV661

图48(续)

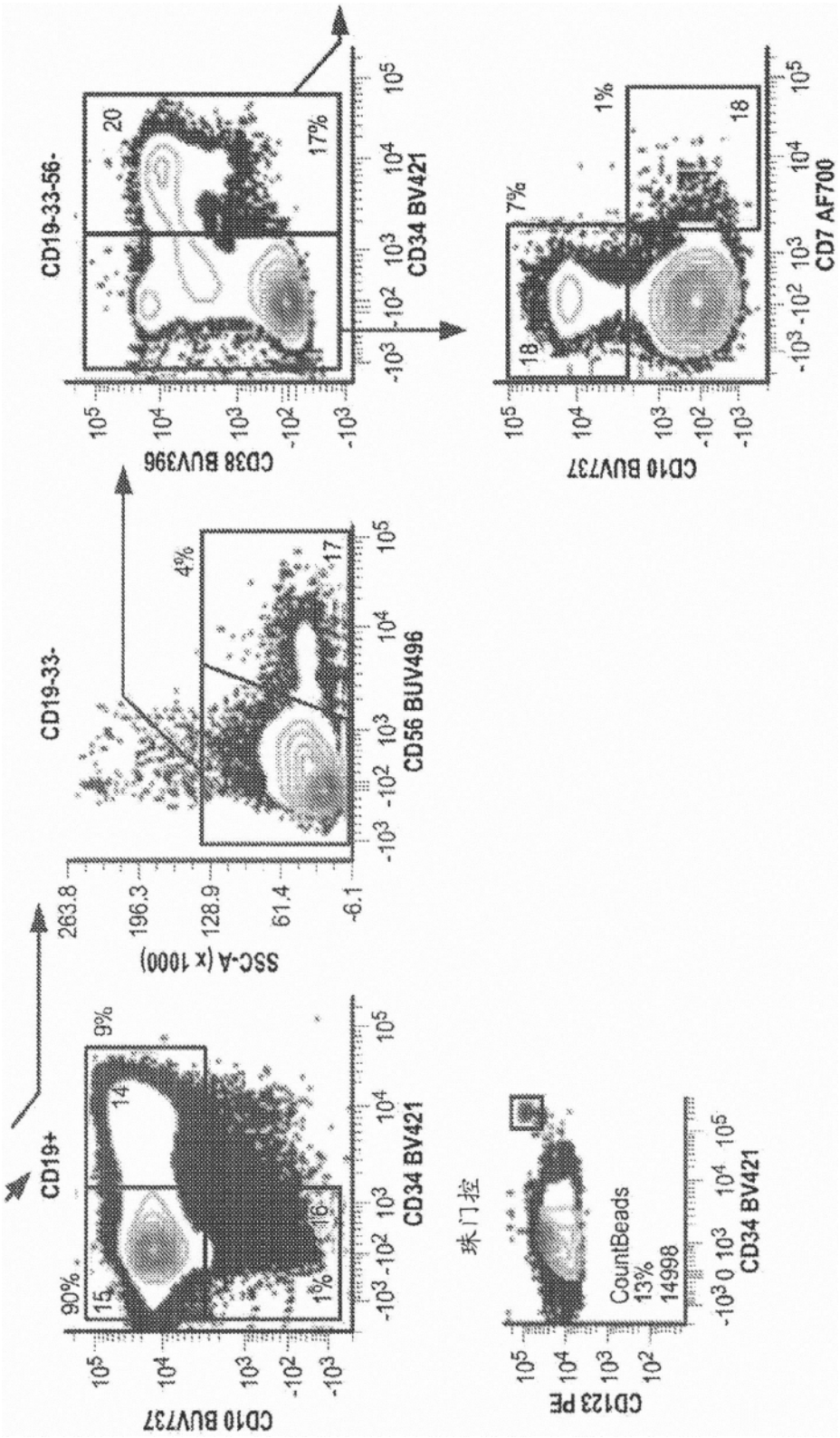

CD19-33-56-
CD38 BUV396
CD34 BV421
20
17%
CD10 BUV737
CD7 AF700
7%
18
1%
18
CD19-33-
CD56 BUV496
4%
17
SSC-A (x 1000)
263.8
196.3
128.9
61.4
-6.1
CD19+
90%
15
9%
14
1%
16
CD34 BV421
CD10 BUV737
珠门控
CountBeads
13%
14998
CD34 BV421
CD123 PE

图48(续)

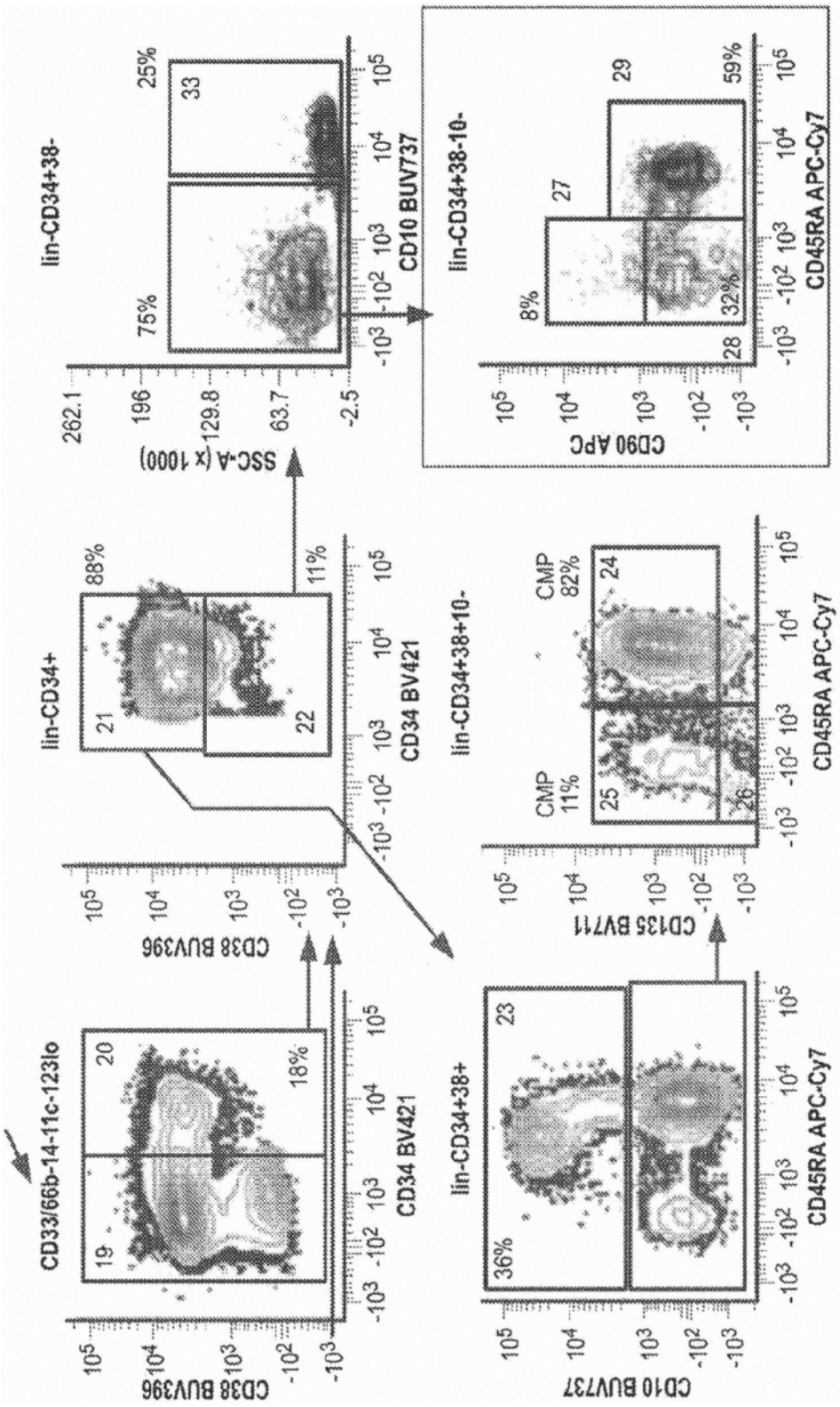

lin-CD34+38-
SSC-A (x 1000)
CD10 BUV737
lin-CD34+38-10-
CD90 APC
CD45RA APC-Cy7
lin-CD34+
CD38 BUV396
CD34 BV421
lin-CD34+38+10-
CD135 BV711
CMP
lin-CD34+38+
CD33/66b-14-11c-123lo

图48(续)

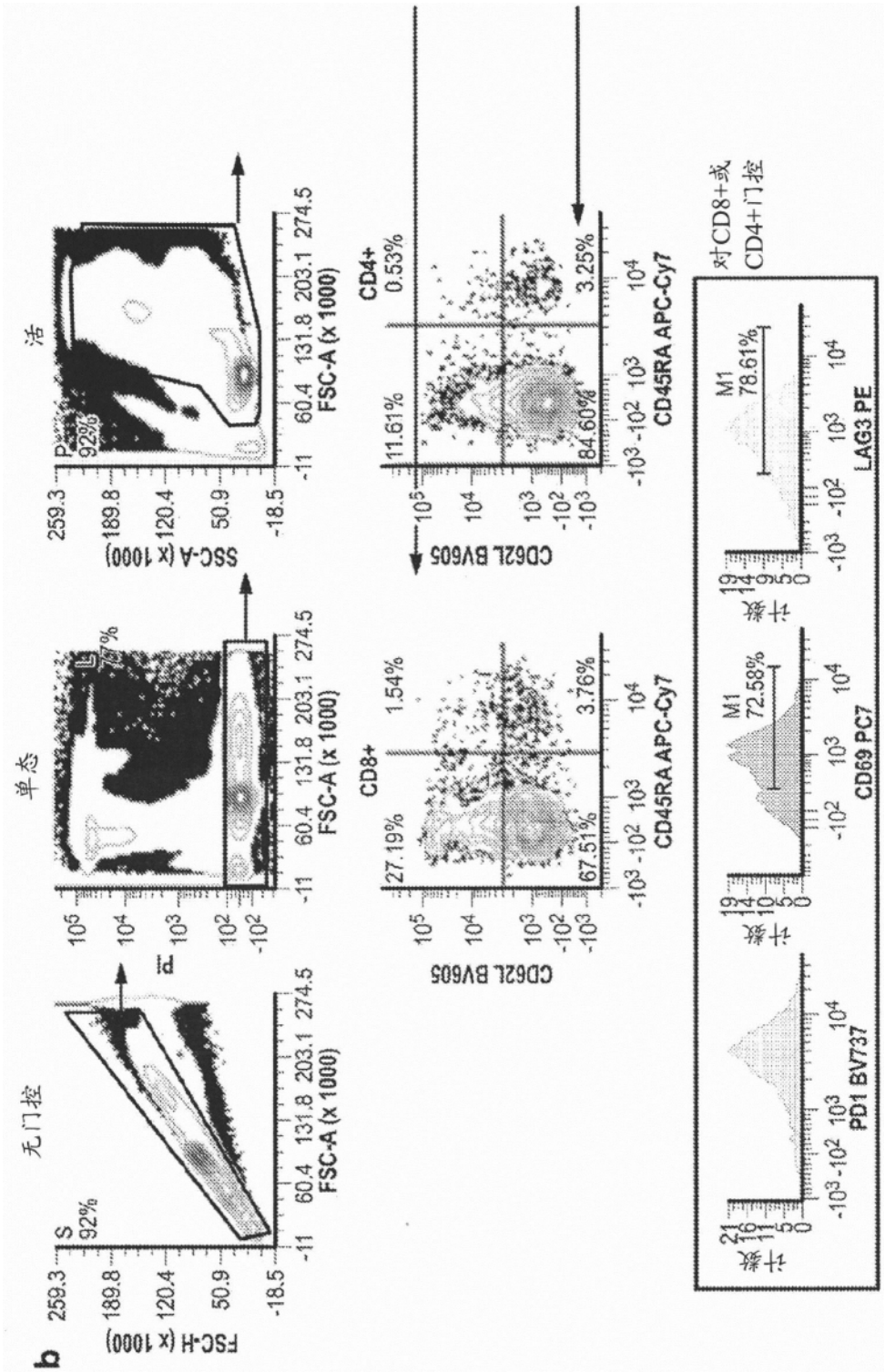

b
无门控
FSC-H (x 1000)
259.3
189.8
120.4
50.9
-18.5
S
92%
FSC-A (x 1000)
-11 60.4 131.8 203.1 274.5
单态
SSC-A (x 1000)
P
92%
活
CD62L BV605
CD8+
27.19%
1.54%
67.51%
3.76%
CD45RA APC-Cy7
CD4+
11.61%
0.53%
84.60%
3.25%
M1
72.58%
CD69 PC7
M1
78.61%
LAG3 PE
PD1 BV737
计数
对CD8+或CD4+门控

图48(续)

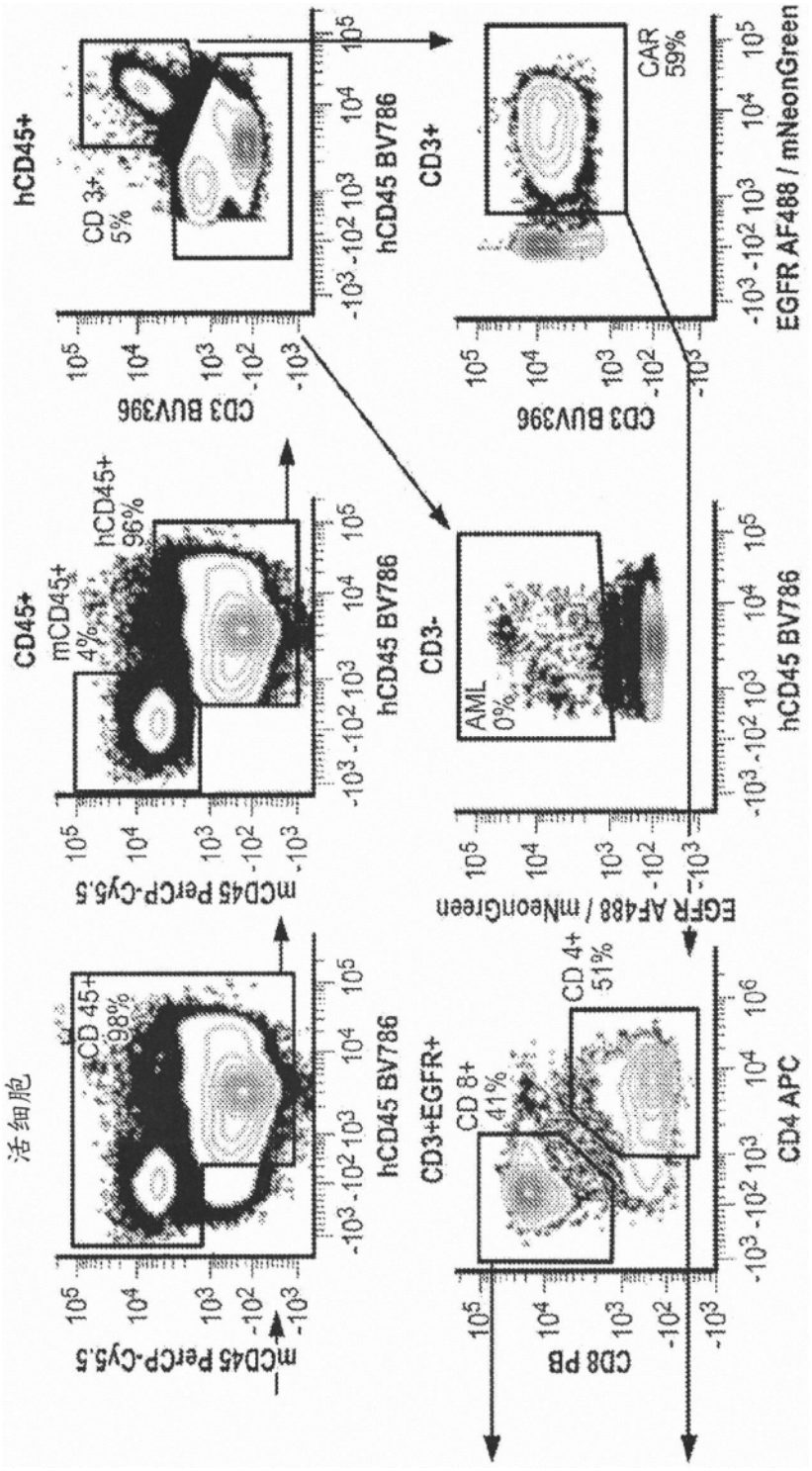

活细胞
mCD45 PerCP-Cy5.5
hCD45 BV786
CD 45+
98%
CD45+
mCD45+
4%
hCD45+
96%
CD3+EGFR+
CD 8+
41%
CD 4+
51%
CD8 PB
CD4 APC
CD3-
AML
0%
EGFR AF488 / mNeonGreen
hCD45+
CD 3+
5%
CD3 BUV396
CAR
59%
EGFR AF488 / mNeonGreen

图48(续)

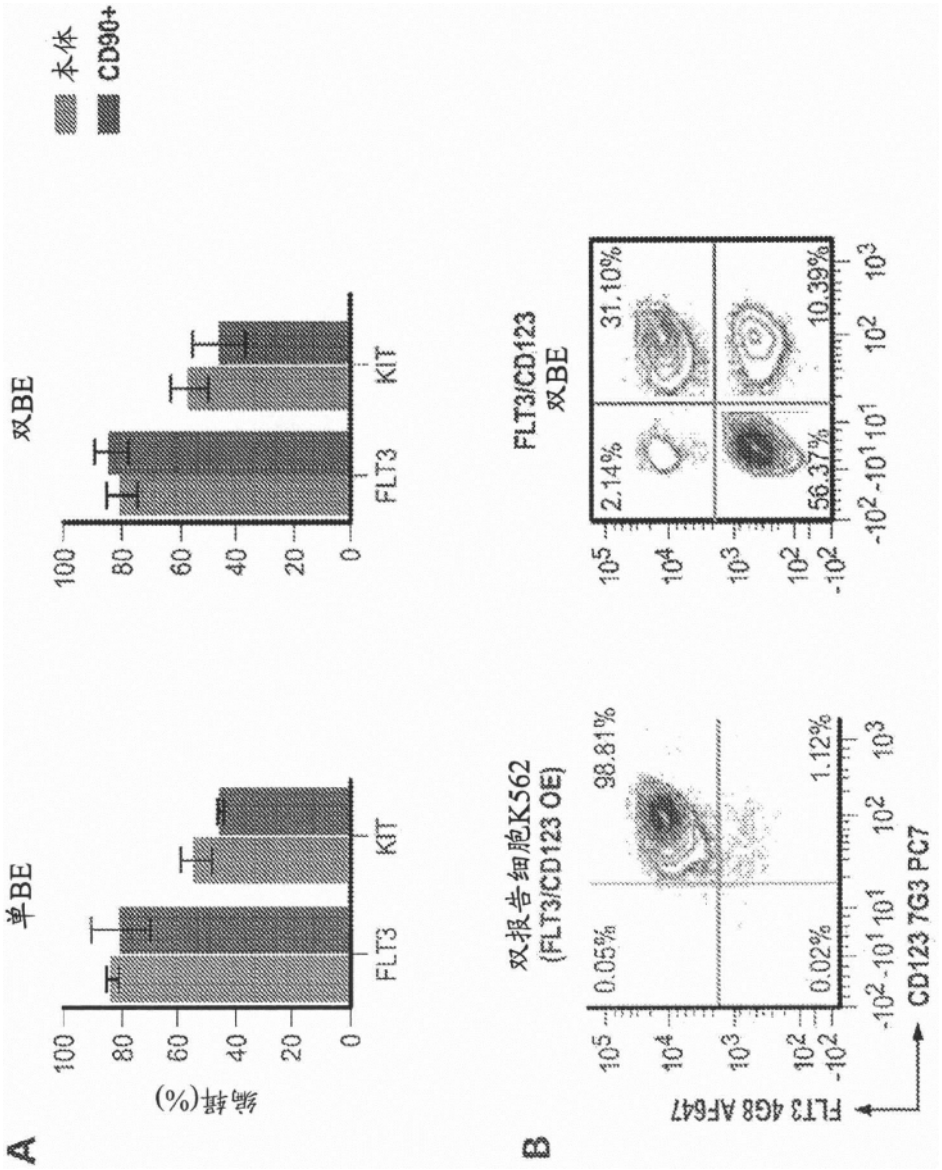

A
单BE
双BE
本体
CD90+
编辑(%)
FLT3
KIT
B
双报告细胞K562
(FLT3/CD123 OE)
FLT3/CD123
双BE
0.05%
98.81%
0.02%
1.12%
2.14%
31.10%
56.37%
10.39%
FLT3 4G8 AF647
CD123 7G3 PC7

图49

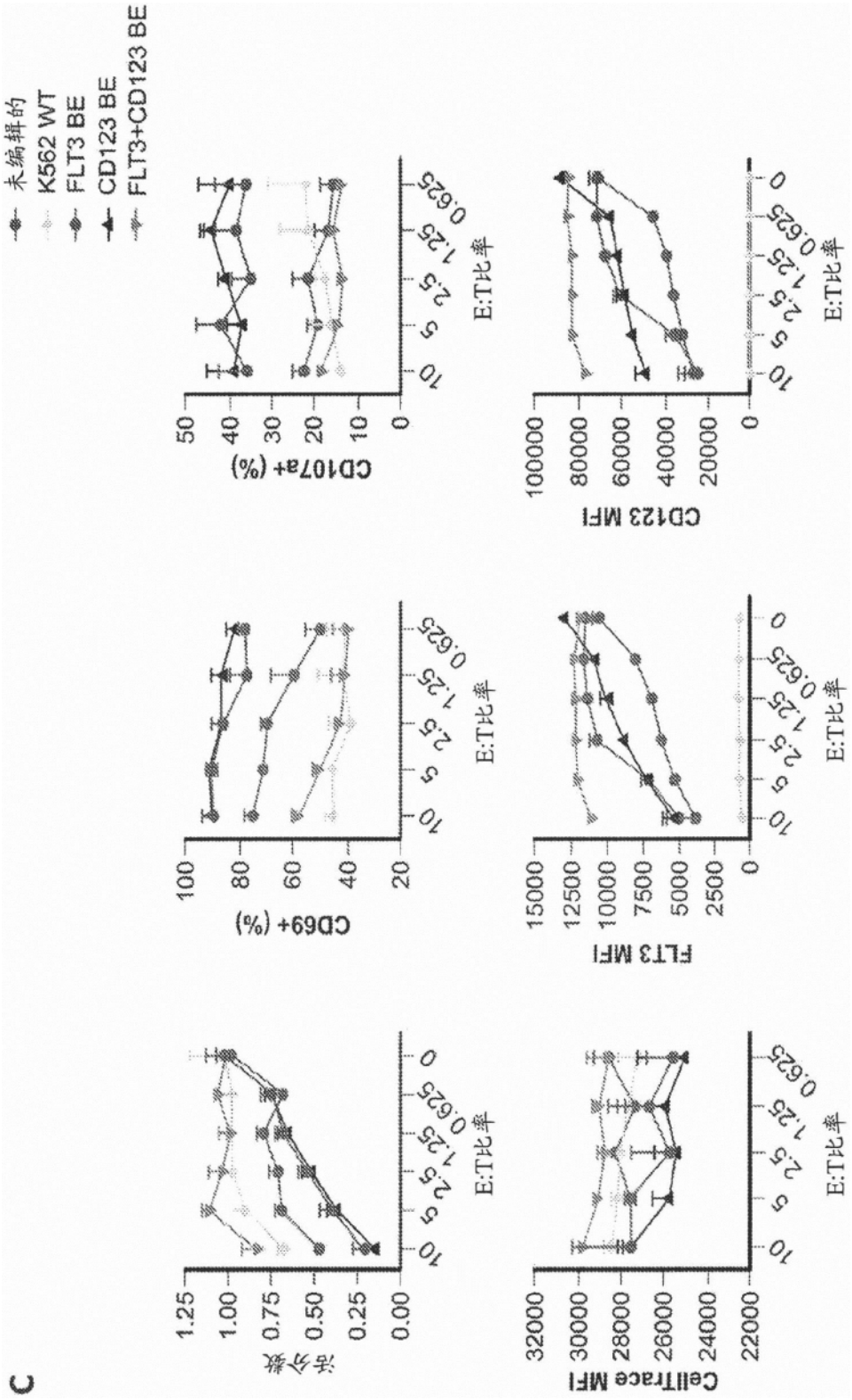

C
未编辑的
K562 WT
FLT3 BE
CD123 BE
FLT3+CD123 BE
活分数
CD69+ (%)
CD107a+ (%)
CellTrace MFI
FLT3 MFI
CD123 MFI
E:T比率
0
0.625
1.25
2.5
5
10

图49(续)

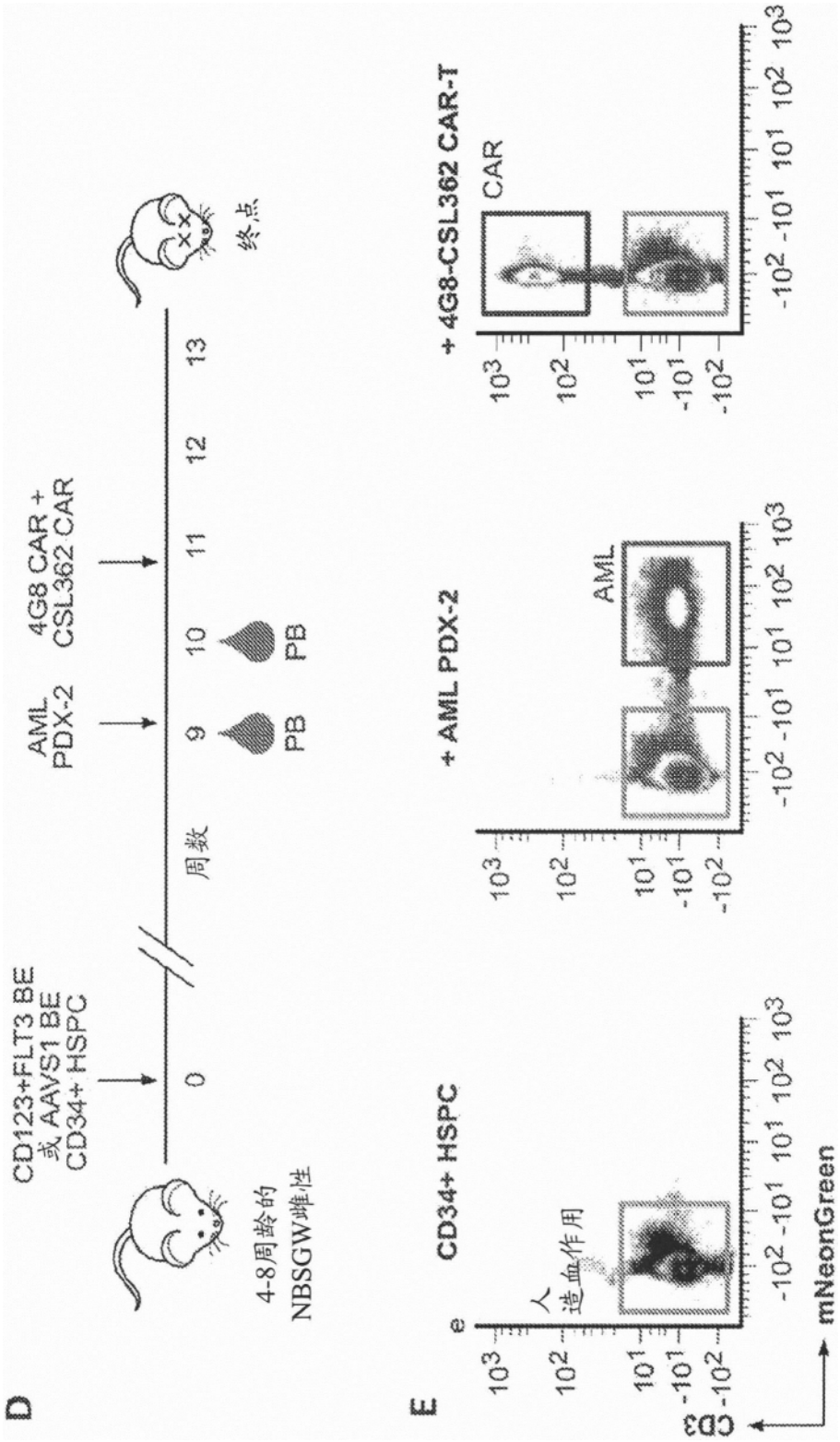

D
CD123+FLT3 BE
或 AAVS1 BE
CD34+ HSPC
4-8周龄的
NBSGW雌性
0
周数
AML
PDX-2
4G8 CAR +
CSL362 CAR
9
10
11
12
13
PB
PB
PB
终点
E
CD34+ HSPC
人
造血作用
+ AML PDX-2
AML
+ 4G8-CSL362 CAR-T
CAR
CD3
mNeonGreen

图49(续)

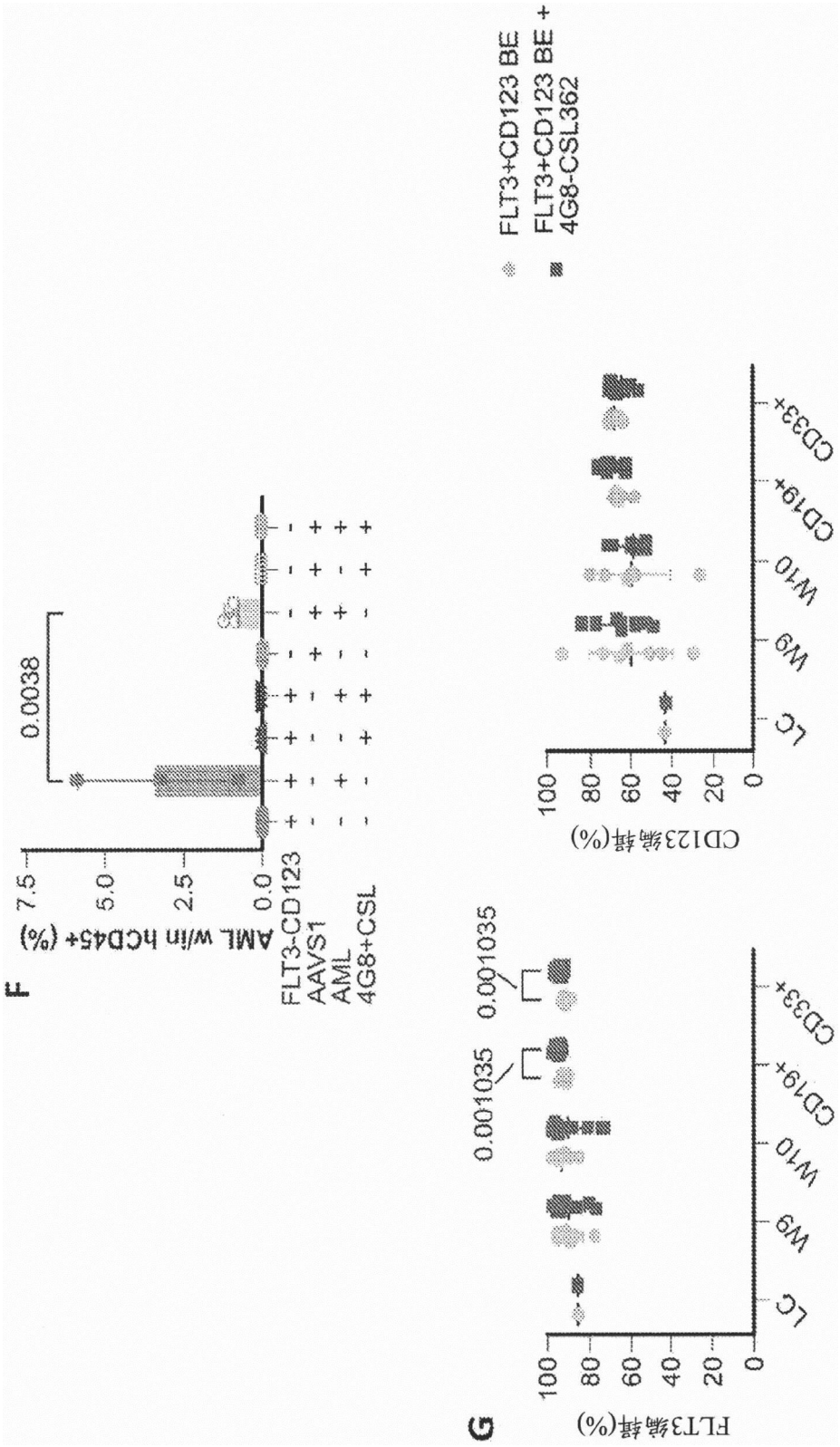

F
AML w/in hCD45+ (%)
7.5
5.0
2.5
0.0
0.0038
FLT3-CD123
AAVS1
AML
4G8+CSL
G
FLT3+CD123 BE
FLT3+CD123 BE + 4G8-CSL362
CD123编辑(%)
FLT3编辑(%)
100
80
60
40
20
0
LC
W9
W10
CD19+
CD33+
0.001035
0.001035

图49(续)

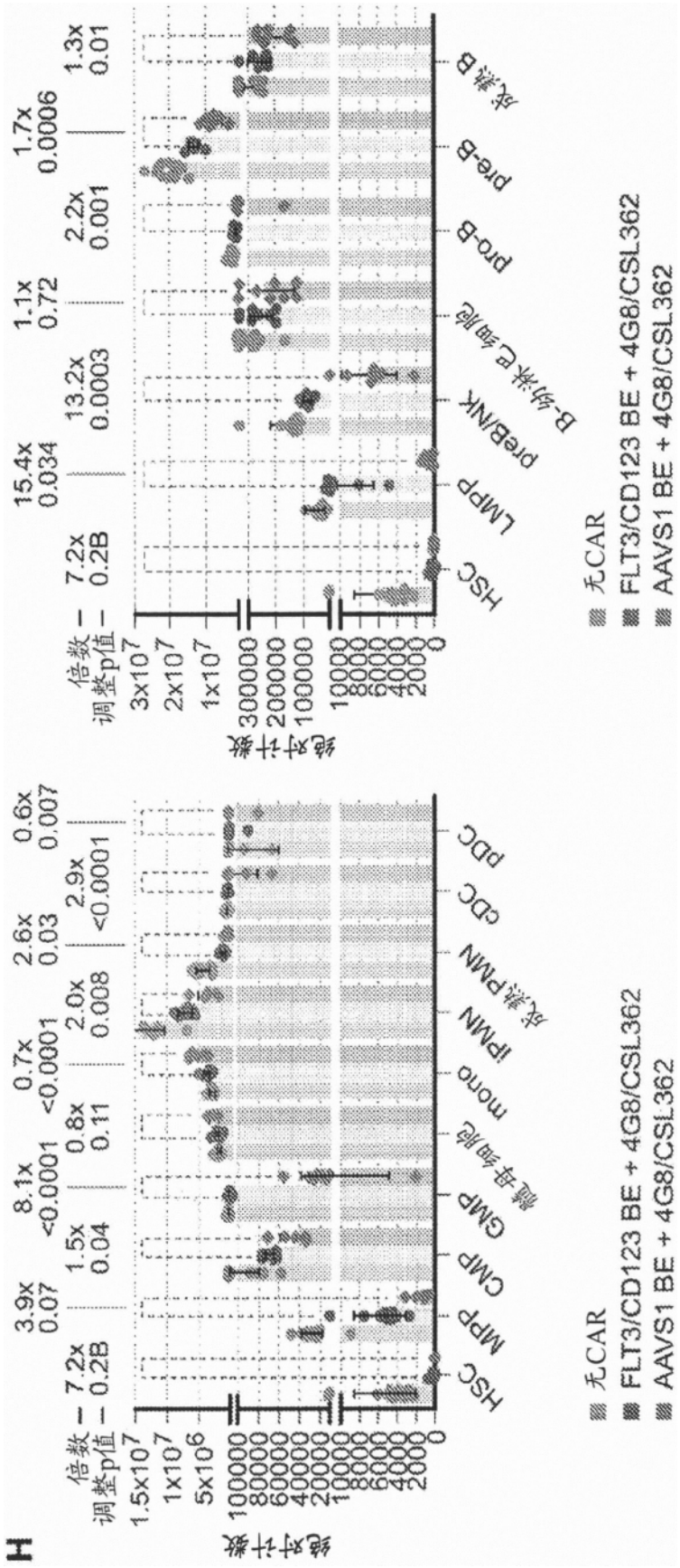

H
绝对计数
倍数 — 7.2x 3.9x 8.1x 0.7x 2.6x 0.6x
调整p值 — 0.2B 0.07 1.5x <0.0001 0.8x <0.0001 2.0x 0.03 2.9x 0.007
0.04 0.11 0.008 <0.0001
1.5x10^7
1x10^7
5x10^6
100000
80000
60000
40000
20000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
MPP
CMP
GMP
髓母细胞
mono
iPMN
成熟PMN
cDC
pDC
无CAR
FLT3/CD123 BE + 4G8/CSL362
AAVS1 BE + 4G8/CSL362
绝对计数
倍数 — 7.2x 15.4x 1.1x 13.2x 2.2x 1.7x 1.3x
调整p值 — 0.2B 0.034 0.72 0.0003 0.001 0.0006 0.01
3x10^7
2x10^7
1x10^7
300000
200000
100000
10000
8000
6000
4000
2000
0
HSC
LMPP
preB/NK
B-幼淋巴细胞
pro-B
pre-B
成熟B
无CAR
FLT3/CD123 BE + 4G8/CSL362
AAVS1 BE + 4G8/CSL362

图49(续)