



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118599915 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 06

(21) 申请号 202410546208.7

C12N 9/22 (2006.01)

(22) 申请日 2018.06.15

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/10 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/520,117 2017.06.15 US

62/552,180 2017.08.30 US

(62) 分案原申请数据

201880053088.X 2018.06.15

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·L·罗斯 A·马森

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

专利代理师 陶家蓉 钱文字

(51) Int. Cl.

C12N 15/90 (2006.01)

权利要求书2页 说明书34页

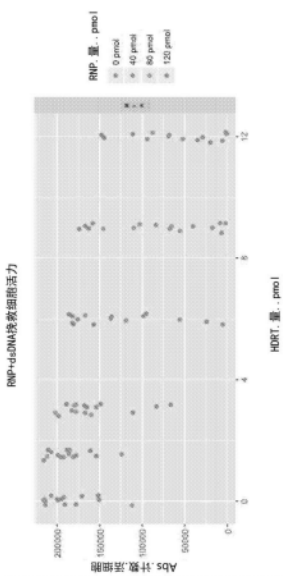
序列表 (电子公布) 附图35页

(54) 发明名称

靶向非病毒DNA插入

(57) 摘要

本文提供了用于编辑细胞基因组的方法和组合物。在一些实施方式中,将长度为至少200个核苷酸的核苷酸序列插入细胞基因组中的靶区域。



1. 一种编辑细胞基因组的方法,所述方法包括:
 - a) 提供Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物,其包含:
 - (i) 所述RNP,其中所述RNP包含Cas9核酸酶结构域和向导RNA,其中所述向导RNA与所述细胞基因组的靶区域特异性地杂交,并且其中所述Cas9核酸酶结构域切割所述靶区域以在所述细胞的基因组中产生插入位点;和
 - (ii) 双链或单链DNA模板,其中所述DNA模板的大小大于约200个核苷酸,其中所述DNA模板的5'和3'端包含与侧接所述插入位点的基因组序列具有同源性的核苷酸序列,并且其中所述复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1;和
 - b) 将所述RNP-DNA模板复合物导入细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其中,通过用所述DNA模板与所述RNP在约20°-25℃的温度孵育不到约1分钟至约30分钟形成所述RNP-DNA模板复合物。
3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述DNA模板是线性DNA模板。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述DNA模板是单链DNA模板。
5. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述DNA模板是纯单链DNA模板。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,在将所述RNP-DNA模板复合物导入所述细胞之前,混合所述RNP-DNA模板复合物和所述细胞。
7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述RNP包含Cas9核酸酶。
8. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中,所述RNP包含Cas9切口酶。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,所述RNP-DNA模板复合物包含至少2种结构不同的RNP复合物。
10. 如权利要求9所述的方法,其中,所述至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA。
11. 如权利要求10所述的方法,其中,所述结构不同的RNP复合物各自包含Cas9切口酶,并且其中所述结构不同的向导RNA杂交所述靶区域的相对链。
12. 如权利要求9所述的方法,其中,所述至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的Cas9核酸酶结构域。
13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中,所述导入包括电穿孔。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中,所述RNP与DNA模板的摩尔比例为约5:1至15:1。
15. 如权利要求1-14中任一项所述的方法,其中,所述RNP与DNA模板的摩尔比例为约5:1至10:1。
16. 如权利要求1-15中任一项所述的方法,其中,所述RNP与DNA模板的摩尔比例为约8:1至12:1。
17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中,所述DNA模板的大小大于约1kb。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中,所述DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。
19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中,所述DNA模板的量为约1μg至约10μg。
20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中,所述细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的方法,其中,将所述RNP-DNA模板复合物导入约 1×10^5 至约 2×10^6 个细胞。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的方法,其中,所述细胞是原代造血细胞。

23. 如权利要求22所述的方法,其中,所述原代造血细胞是免疫细胞。

24. 如权利要求23所述的方法,其中,所述免疫细胞是T细胞。

25. 如权利要求24所述的方法,其中,所述T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。

26. 如权利要求25所述的方法,其中,所述调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞是 $CD4^+$ T细胞。

27. 如权利要求24所述的方法,其中,所述T细胞是 $CD8^+$ T细胞。

28. 如权利要求24所述的方法,其中,所述T细胞是 $CD4^+CD8^+$ T细胞。

靶向非病毒DNA插入

[0001] 在先相关申请

[0002] 本申请要求2017年6月15日提交的美国临时申请号62/520,117和2017年8月30日提交的美国临时申请号62/552,180的权益,其各自通过引用全文纳入本文。

[0003] 联邦资助的研究与开发下作出发明的权利声明

[0004] 本发明是在政府支持下由国家卫生研究院授予的基金号P50 GM082250资助完成。政府对本发明拥有一定的权利。

背景技术

[0005] 已经开发了通过将Cas9-gRNA复合物(RNP)电穿孔到细胞中在细胞基因组中靶向的位点处导入小突变(插入缺失)的能力。然而,因为这些突变是随机的并且通过非同源的末端连接导入,它们可以导致蛋白质被从框架中敲除(Schumann等PNAS112(33):10437-10442(2015))。已经开发了其他方法,通过使化学合成产生的小ssDNA寡核苷酸(ssODN)电穿孔,在基因组中指定的靶位点处导入定义的DNA序列。这允许经由同源介导的修复(称为HDR)整合非常少量的外源性DNA(通常为约1碱基对(bp)-约30碱基对(bp)),其比NHEJ效率低,但是允许确定最终序列。然而,因为这些寡核苷酸的大小受到可以化学合成的DNA的长度(<约200bp)的限制,并且其中很大一部分被同源臂吸收,由于整合的限定大小,许多应用不可以采用该方法。除了大小限制,已确定的是由于固有细胞保护机制的激活,将裸DNA,特别是大于约200bp的裸DNA电穿孔到细胞中常常导致大量细胞死亡(Cornu等Nat.Med.23:415-423(2017);Hornung和Latz,Nature Reviews Immunology 10:123-130(2010);Zhao等,Mol.Ther.13(1):151-159(2006))。虽然已经将非整合性病毒载体,诸如整合酶缺陷型慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体用于递送大供体核酸序列至细胞,但是这些载体需要病毒感染并导致脱靶效应。因此,需要用于将大核苷酸序列靶向插入细胞基因组中的方法和组合物。

发明概述

[0007] 本发明涉及用于编辑细胞基因组的组合物和方法。发明人已经发现,可以将大核苷酸序列,例如,长度大于约200个核苷酸的序列,插入细胞基因组中靶向的区域。在一些方法中,整合长度大于约200个核苷酸的序列发生时降低脱靶效应和/或减少细胞活力的损失。

[0008] 在一些实施方式中,本发明提供了编辑细胞基因组的方法,该方法包括:a)提供Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物,其包含:(i)RNP,其中RNP包含Cas9核酸酶结构域和向导RNA,其中向导RNA与细胞基因组的靶区域特异性地杂交,并且其中Cas9核酸酶结构域切割靶区域以在细胞基因组中产生插入位点;和(ii)双链或单链DNA模板,其中DNA模板的大小大于约200个核苷酸,其中DNA模板的5'和3'末端包含与侧接插入位点的基因组序列具有同源性的核苷酸序列,并且其中复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1-约100:1;和b)将RNP-DNA模板复合物导入细胞。

[0009] 在一些实施方式中,DNA模板是线性DNA模板。在一些示例中,DNA模板是单链DNA模板。在一些实施方式中,单链DNA模板是纯单链DNA模板。

[0010] 在一些实施方式中,通过用DNA模板与RNP在约20°-25℃的温度孵育约1-30分钟形成RNP-DNA模板复合物。在一些实施方式中,在将RNP-DNA模板复合物导入细胞之前混合RNP-DNA模板复合物和细胞。

[0011] 在一些实施方式中,RNP包含Cas9核酸酶。在一些实施方式中,RNP包含Cas9切口酶。在一些实施方式中,RNP-DNA模板复合物包含至少2种结构不同的RNP复合物。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的Cas9核酸酶结构域。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA。在一些实施方式中,其中至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA,结构不同的RNA复合物各自包含Cas9切口酶,并且结构不同的向导RNA杂交靶区域的相对链。

[0012] 在一些实施方式中,将RNP-DNA模板复合物导入细胞包括电穿孔。在一些实施方式中,RNP与DNA模板的摩尔比为约5:1至约15:1。在一些实施方式中,RNP与DNA模板的摩尔比为约5:1至约10:1。在一些实施方式中,RNP与DNA模板的摩尔比为约8:1至约12:1。在一些实施方式中,DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。在一些实施方式中,DNA模板的大小大于约1kb。在一些实施方式中,DNA模板的量为约1μg至约10μg。

[0013] 在一些实施方式中,将RNP-DNA模板复合物导入约 1×10^5 至约 2×10^6 个细胞。在一些实施方式中,细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方式中,原代造血细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。

附图说明

[0014] 本申请包括下述附图。这些附图用于说明组合物和方法的某些实施方式和/或特征,并对组合物和方法的描述构成补充。附图并不旨在限制组合物和方法的范围,除非书面说明明确地表明是这类情况。

[0015] 图1显示了电穿孔高浓度裸DNA以实现细胞中可行编辑效率后的低细胞活力。

[0016] 图2显示了电穿孔时在添加细胞前通过短暂室温孵育使用RNP复合DNA模板(质粒)降低了电穿孔一定量长质粒dsDNA后通常可见的活力损失。

[0017] 图3显示了电穿孔时在添加细胞前通过短暂室温孵育使用RNP复合DNA模板(线性,双链DNA(dsDNA)模板)降低了电穿孔长线性双链DNA后通常可见的活力损失。

[0018] 图4显示了RNP与DNA模板约10:1的示例性摩尔比在电穿孔后保持整合效率以及活力。

[0019] 图5显示了RNP与DNA模板约10:1的示例性摩尔比平衡活力损失和效率的效果,并使整合阳性细胞的数量最大化。

[0020] 图6显示了RNP与DNA模板约10:1的示例性摩尔比允许高效率插入大小大于750碱基对的大模板。

[0021] 图7显示了长DNA模板的插入可以仍然导致一定量的脱靶整合。

[0022] 图8显示了可以通过使用长单链DNA(ssDNA)模板作为供体来减少脱靶整合。

[0023] 图9显示了本文所公开的非病毒整合可以使用两种gRNA和Cas9切口酶(D10A)插入,这防止了脱靶dsDNA断裂。

[0024] 图10A-F显示了CRISPR/Cas9 RNP共同电穿孔减少了dsDNA诱导的活力损失。(A) 经电穿孔进入原代人T细胞的线性dsDNA模板(同源介导的修复模板,约1350bp长,靶向GFP融合体至RAB11A,图11A)随着模板量的增加而导致显著的活力损失。电穿孔相同量的dsDNA模板以及100pmol的RNP令人惊讶地增加活力。(B) 对于质粒和线性dsDNA模板,RNP的添加增加电穿孔后的活力。值得注意的是,并未在短ssDNA寡聚供体核苷酸(ssODN)观测到活力损失。(C) RNP必须与DNA同时递送以观测到活力增加。对来自两个供体的T细胞各自进行两次电穿孔,电穿孔之间为8小时休息。虽然如此紧密地穿插两个电穿孔将导致高度细胞死亡,但是RNP和线性dsDNA模板的递送可以分开递送。然而,相较于首先接受DNA然后接受RNP的细胞,当后续对DNA模板进行电穿孔时,最初的RNP电穿孔并不增加活力。(D-F) 考虑到需要共同导入RNP和DNA,我们测试了在电穿孔之前一起进行额外的预孵育是否会进一步提高活力。随着预孵育时间的增加(0-15分钟)并未观测到活力的差异,但是令人惊奇地是,如果首先混合RNP和细胞并且在即将电穿孔之前添加DNA模板(RNP+细胞;+HDRT),活力增加(E)。然而,在添加细胞之前RNP和DNA HDR模板已混合在一起的孔中(RNP+HDRT;+细胞),无论RNP和DNA模板预孵育多长时间,HDR百分比急剧增加(GFP+细胞)。电穿孔后2天测量活力,并在第4天测量GFP表达。图表(B、D、F)展示了来自两位健康人供体的数据。

[0025] 图11A-F显示了高效大非病毒基因靶向的发展。(A) 经由96孔高通量电穿孔系统性分析细胞培养物和刺激条件、RNP和DNA模板制剂和电穿孔条件的影响能够快速优化细胞活力(培养物中活细胞的总数量)和HDR效率(GFP阳性细胞%)。(B) 长(1350bp)线性dsDNA模板的示意图,所述长线性dsDNA模板编码侧接对管家基因RAB11A的N-末端具有同源性的区域的GFP序列(未按比例绘制)。当在RAB11A的N-末端处诱导dsDNA断裂时,GFP序列可以经由同源介导的修复(HDR)无缝地导入GFP序列,以生成内源性标记的RAB11A-GFP融合蛋白。(C) 电穿孔靶向RAB11A的RNP和HDR模板之前使用T细胞受体(TCR)刺激和细胞因子的各种组合培养原代人T细胞2天,然后在电穿孔后使用各种培养条件培养5天。(D) 在本文所测试的RNP和HDR模板浓度之中,最佳的GFP插入RAB11A在试剂的中间浓度实现。进一步的测试(图16)将最佳浓度缩小至50pmol的RNP和4ug的dsDNA HDR模板。(E) 电穿孔脉冲条件的阵列测试显示,一般而言,实现较高HDR效率的条件降低活力。选择EH115来优化HDR,同步保持充足的活力。(F) 使用C-D中优化的参数,通过非病毒靶向在原代人CD4⁺和CD8⁺T细胞中实现了将GFP高效插入内源性RAB11A基因。电穿孔后3天(E)或5天(C、D和F)测试活力和效率。各个点表示个体血液供体(C和D)或者两个个体供体的平均值加标准偏差(E)。绿色亮点表示为非病毒基因靶向方案最终选择的条件。

[0026] 图12A-B显示了非病毒靶向能够实现原代人T细胞中快速且高效的遗传工程改造。(A) 非病毒基因靶向的图解时间表。设计,由商业供应商订购和组装基因组编辑试剂(gRNA以及同源介导的修复)的任何新组合大约需要1周。电穿孔前2天,刺激分离自血液或各种其他来源的原代人T细胞(图15)。通过PCR以及之后的SPRI纯化可以容易地制备dsDNA HDR模板以获得适合电穿孔的高度浓缩产物。在电泳当日,将与RNP复合的gRNA,HDR模板,和收获的经刺激的T细胞混合并进行电穿孔,该过程进行大约一个半小时。电穿孔后,可以容易地扩增经工程改造的T细胞额外的两周。(B) 活力用于指相对于除了实际的电穿孔以外经历所

有方案步骤(无电穿孔对照)的等同群体的活细胞百分比。凭经验确定电穿孔后活细胞的谷值是在第二天之后,除非另有说明,否则记录该时间点所有的活力测量值。术语效率用于指表达“敲入”外源性序列(如GFP)的培养物中的活细胞百分比。最终,通过将效率乘以绝对细胞计数来计算对所需整合呈阳性的细胞总数。使效率最大化的方法改变通常对于阳性细胞总数而言并不总是最佳的,反之亦然。

[0027] 图13A-D显示了针对非病毒基因靶向优化原代人T细胞刺激。(A)在电穿孔前,施用另一种电穿孔前刺激条件2天。CD3/CD28珠结合刺激以及IL-2、IL-7和IL-15的细胞因子刺激混合物实现比板结合抗体刺激更高的活力,编辑速率和总阳性细胞。(B)珠与细胞的其他比例显示了最佳的1:1比例,并在电穿孔前去除珠。(C)不基于珠的CD3/CD28/CD2刺激产生比处于最佳比例的CD3/CD28珠低的编辑效率。(D)商购的XVivo15培养基相较于RPMI实现相似的活力,但是更高的编辑效率。感兴趣的是,无血清Immunocult培养基也能够高效编辑人原代CD3+T细胞。GFP插入(dsDNA RAB11A-GFP HDRT)的效率以及全部GFP+细胞的绝对计数在电穿孔后4天进行。各条件的两个点表示获自两个健康血液供体的值。

[0028] 图14A-D显示了电穿孔后优化原代人T细胞处理。(A)在刺激后的第2天或第3天电穿孔来自健康人供体的CD3+T细胞实现了高效的靶向GFP整合。在两天进行双重电穿孔虽然略微增加效率,但是当DNA模板包含于两次电穿孔之时显著地降低活力(图10)。(B)电穿孔后的其他CD3/CD28刺激降低增殖潜力。(C)电穿孔后高剂量的IL-2改善效率和活力。与电穿孔前刺激期间不同(图13),进一步添加IL-7和IL-15并不导致编辑的改善。(D)培养后密度对插入效率几乎没有影响。GFP插入(dsDNA RAB11A-GFP HDRT)的效率以及全部GFP+细胞的绝对计数在电穿孔后4天进行。各条件的两个点表示获自两个健康血液供体的值。

[0029] 图15A-B显示了分离自多个来源的新鲜和冷冻T细胞中的高效非病毒基因靶向。(A)将dsDNA RAB11A-GFP HDR模板插入来自两个健康供体的新鲜和冷冻T细胞。在两种条件下观测到高比例的GFP插入,证明了非病毒基因靶向对于需要冷冻细胞的研究或临床方案的适应性。(B)相似地,在分离自全血、血浆单采残留物以及白细胞去除术的原代人CD3+T细胞中观测到高效的GFP靶向整合。

[0030] 图16A-B显示了针对非病毒基因靶向优化RNP和HDR模板制剂。(A)在三个供体中,出现了这样的一致趋势,即电穿孔增加量的dsDNA HDR模板(RAB11A-GFP)逐渐降低细胞活力,同时也增加效率,但是HDR模板和RNP测试的中间浓度给出最大的GFP+细胞总数。(B)在3个其他供体中进一步靶向的优化系列获得了这样的最佳制剂:4ug的HDR模板与50pmol的RNP共同电穿孔。GFP插入的效率以及全部GFP+细胞的绝对计数在电穿孔后4天进行。各图表(B)中的多个点表示技术重复。

[0031] 图17A-C显示了针对大非病毒HDR模板的递送优化电穿孔参数。(A)本文所示原始数据总结于图11E。Lonza 4D nucleofector上电穿孔条件的系统性变异。最终选择的脉冲编码EH115当使用电穿孔缓冲液Lonza P3始终是最高效的编码。其他编码,如E0-148,针对总阳性细胞进行优化。(B)验证性测试电穿孔条件的子集还将OMEM缓冲液中的脉冲编码E0-155鉴定为中度效率,但是高总阳性细胞组合。(C)电穿孔24uL的总体积(RNP+HDRT+细胞)对细胞活力做出了很大贡献并保持了高效率。超过24uL的电穿孔体积通常会导致电穿孔失败。dsDNA RAB11A-GFP插入(A、C)或dsDNA BATF-GFP插入(B)的效率以及全部GFP+细胞的绝对计数在电穿孔后4天进行。

[0032] 图18A-D显示了原代人T细胞中非病毒基因靶向的多种应用。(A) 使用非病毒HDR模板和相应RNP可以在原代人T细胞中的多种内源性基因中实现用GFP融合构建体的高效率基因组靶向。(B) 电穿孔指定的HDR模板7天后共焦显微镜检查存活、原代人T细胞确认融合蛋白靶向的特异性。各图像中的比例尺为5 μ m。(C) GFP融合构建体至批量人原代T细胞中RAB11A和CD4基因的非病毒靶向。RAB11A融合体在CD4+和CD8+细胞中呈GFP阳性,然而CD4+融合体仅在CD4+T细胞中呈阳性(上图为代表性的流式细胞术,下图为定量)。(D) 原代人T细胞经工程改造以表达与内源性转录因子BATF融合的古FP。在电穿孔后11天,分离细胞核并进行CUT和RUN。使用抗-GFP或抗-BATF抗体鉴定GFP-BATF和全部BATF染色质相互作用位点。电穿孔后第4天进行流式细胞术以测试活力和效率(A、C、D)。示出的数据代表至少两个不同供体。

[0033] 图19A-B显示了靶基因座上的可重复非病毒基因靶向。(A) 将5种不同的GFP模板之一以及相应RNP电穿孔至来自6个健康供体的原代CD3+CD8+T细胞后,在模板和供体中观测到GFP表达。注意供体之间GFP阳性细胞内对于5种基因座各自GFP表达水平的一致性(TUBA1B和ACTB较高,RAB11A和FBL标签较低)。(B) (A) 中GFP插入百分比的图形摘要。

[0034] 图20A-B显示了健康供体组中的可重复非病毒基因靶向。(A) 使用开发用于非病毒基因靶向的优化条件将恒定dsDNA RAB11A-GFP HDR模板和RNP电穿孔到获自12个健康供体组的细胞。虽然个体供体之间GFP插入百分比存在显著的可变性,但是所有都实现了稳健整合GFP(CD8+T细胞中为22%-57%)。在用dsDNA RAB11A-GFP HDR模板电穿孔的细胞中观测到一些GFP表达,相较于无电穿孔对照,存在靶向CXCR4的脱靶RNP。(B) (A) 中GFP插入百分比的摘要图表在该12个健康供体组中,相较于CD3+CD4+T细胞(平均值35.2%),在CD3+CD8+T细胞中观测到略微较高比例的GFP表达(平均值42.0%)。

[0035] 图21显示了内源性标记转录因子BATF用于分析染色质占有率(chromatinoccupancy)。获自用GFP-BATF融合体HDR模板电穿孔的(未对未标记的细胞进行电穿孔)原代人T细胞群的CUT和RUN数据的抗-BATF、抗-GFP和无抗体热图。各样品对齐的CUT和RUN结合概况以未标记细胞中的BATF CUT和RUN峰为中心,并以未标记细胞中的BATF峰强度排序。

[0036] 图22A-E显示了联合非病毒基因靶向。(A) 同时电穿孔HDR模板以在原代人T细胞中产生RAB11A-GFP和/或RAB11A-mCherry融合体。当同时导入两种模板时,发现了双重GFP+mCherry+细胞的独特群体与双等位基因靶向相一致。(B) 通过两种荧光团的表达定义象限中个体细胞的潜在基因型。在获得至少一种整合的细胞中观测到的双等位基因整合水平高于偶然(图23)。各个点代表重复,其中编码荧光蛋白的基因的组合各不相同(GFP+mCherry, GFP+BFP, mCherry+BFP),HDR模板的量也各不相同(3-6 μ g)。(C-D) 多重整合相同原代人T细胞中两个分开的基因组基因座处的HDR模板。将2 μ g各模板(各电穿孔总计4 μ g)与25pmol各RNP(总计50pmol)一起电穿孔。在一个位点(例如,GFP+)对整合呈阳性的细胞相比缺少第一整合的细胞更有可能在第二位点(例如,还可以是mCherry+)具有整合。(E) 同时非病毒基因靶向大插入至3种不同的基因组基因座。将1.5 μ g各模板(总计4.5 μ g)与20pmol各种相应RNP(总计60pmol)一起电穿孔。类似于两位点多重化,对单一整合呈阳性的细胞(Q-II中mCherry+和Q-III中GFP+)相较于不具有整合的那些(Q-I)更有可能具有第二整合(BFP+)。对两种整合(GFP+和mCherry+,Q-IV)呈阳性的细胞更有可能具有第三基因的整合(BFP+)。

下图是对荧光团呈单、双和三阳性的细胞进行定量的柱状图。所有荧光读数在电穿孔后4天进行。示出的数据代表至少两个不同供体,除了组图E(一个供体)。

[0037] 图23A-G显示了通过将多重荧光蛋白插入相同的基因座对双等位基因HDR整合进行建模和分析。(A) 当两个荧光蛋白插入相同的基因座时可能的细胞表型。(B) 这些表型种群中的两个的基因型是立即已知的。没有任何功能性插入的细胞(左下角象限,基因型A)必须具有NA/NA基因型(其中NA表示没有HDR的等位基因,包括WT等位基因和NHEJ编辑的等位基因)。双重荧光细胞(右上角象限,基因型E)必须已经获得各模板的一个拷贝(假设常染色体靶基因座和没有脱靶整合),并将具有GFP/RFP的基因型。虽然,两个单一阳性群将在针对HDR插入为杂合(基因型B和C)或者但是针对相同荧光模板的两个拷贝为纯合(基因型D和F)的细胞之间混合。(C) 具有双等位基因HDR整合的细胞的总百分比必须是基因型D、E和F的总和。虽然具有基因型E的细胞(双荧光阳性)的比例从基因型上看是立即显而易见的但是基因型D和F却不是。简单概率模型的应用允许对单个荧光阳性表型中的多个基因型进行反卷积(de-convolution),并因此估算出对HDR为纯合细胞的真实百分比。(D) 在插入RAB11A基因座的许多荧光团排列应用双等位基因HDR分析。(E-F) 在靶基因座上观测到双重荧光双等位基因整合。虽然具有插入的细胞的总百分比随着各靶位点的效率而变化,但是观测的纯合细胞百分比相对通过随机机会预测的倍数富集在所有基因座上都是一致的。(G) 通过HDR试图整合三个不同的荧光团到相同的基因座中。因为最大2个靶向插入是可能的(在该基因座的两个等位基因;假设是二倍体基因组),应当观测到无细胞对所有3个基因座呈阳性(三重阳性)。事实上,虽然观测到大量单一荧光团整合(单阳性),以及对两种荧光团的各种组合呈阳性的细胞(双重阳性),但是相较于双重阳性,三重阳性细胞的数量下降约30倍。所有荧光蛋白表达的流式细胞术分析在电穿孔后4天进行。显示了代表来自一个(E、F)或两个(D、G)健康人供体的多个技术重复。柱状图显示平均值+标准偏差。

[0038] 图24A-B显示了多重整合,其显示了一个基因座处获得HDR整合将增加另一基因座处HDR的可能性。(A) 将来自一组6个dsDNA HDR模板的两个HDR模板排列(靶向RAB11A、CD4和CLTA;各位点具有GFP或RFP)电穿孔到分离自健康人供体的CD3+T细胞。电穿孔指定的两个HDR模板以及它们各自的两个中靶(on-target)RNP后4天,在对其他模板呈阳性或阴性的细胞进行门选时对各模板呈阳性的细胞的百分比进行分析。两个模板的多重化不仅仅可能涵盖各种模板组合,而且门选对一个模板呈阳性的细胞(模板1+细胞)将产生相较于对第一模板呈阴性的细胞(模板1-细胞,黑色)更有可能对第二模板呈阳性的富集的细胞群。将2 μ g的各种模板以及30pmol的各种相关RNP电穿孔用于双重多重化实验。(B) 电穿孔另一模板允许使用各种HDR模板组合的3个位点的多重化。当与单一阳性细胞比较时,对第三模板呈阳性的细胞可以通过门选对两种其他模板呈阳性的细胞被进一步富集。示出的数据为来自两个健康供体的多个技术重复的均值+标准差。

[0039] 图25A-F显示了D10A切口酶和ssDNA HDR模板降低了脱靶整合。(A) 将Cas9 RNP和RAB11A-GFP dsDNA HDR模板的组合电穿孔到原代人T细胞中。dsDNA模板单独,或与含有不匹配人基因组中序列的错义gRNA的RNP组合,产生少量但是可检测量的GFP表达,其在dsDNA模板使用gRNA电穿孔时产生显著地增加,所述gRNA靶向不同于靶向RAB11A-GFP整合位点的位点(“脱靶RNP”靶向CXCR4外显子1)。(B) 当RAB11A-GFP dsDNA HDR模板使用脱靶RNP电穿孔时,脱靶整合持续存在于不同于供体的细胞中,并且当dsDNA HDR模板单独电穿孔时,出

现较少的脱靶整合。(C) Cas9核酸酶变体D10A(切口酶)和失活的dCas9在使用单个脱靶CXCR4 gRNA时显著地减少脱靶整合,但是D10A切口酶(在PAM-出(PAM-out)方向具有“中靶”gRNA对)导致RAB11A dsDNA HDR模板的高效中靶整合。(D)电穿孔ssDNA HDR模板将脱靶整合降低到检测限(相当于无电穿孔模板的水平),不添加核酸酶并且在诱导的脱靶dsDNA断裂处(脱靶gRNA+Cas9)。(E-F)对于RAB11A位点处的GFP融合体的整合,使用具有ssDNA HDR模板的D10A切口酶相较于具有dsDNA模板的Cas9降低中靶HDR(具有中靶gRNA的GFP整合),但是将脱靶整合大大降低至不可检测的水平。所有荧光读数在电穿孔后4天进行。示出的数据代表至少两个不同供体(A和E)或两个不同供体的平均值(C、D和F),并示出标准差。

[0040] 图26A-D显示了多个HDR模板的脱靶整合事件的定量和荧光估值。(A)靶基因座的N-末端处HDR介导的整合的图像。同源臂指定了插入(在该情况下为GFP标签)将被插入的确切序列,允许无痕整合(scarless integration)外源性序列。因为产生了GFP融合蛋白,所以GFP荧光将被视为是该中靶整合的结果,取决于邻近整合位点的RNP切割。(B)经由同源依赖性修复机制通过天然存在的dsDNA断裂或者任选地位于诱导的双链断裂,如位于RNP脱靶切割位点处的那些之一的随机整合来整合双链DNA。可以利用该作用,以允许在缺少进行HDR的能力的衰老细胞类型中所需诱导dsDNA断裂(HITI)处靶向整合dsDNA序列,但是关键地是,dsDNA模板的整体被整合,包括任何潜在的同源臂。在同源臂包含启动子序列(如针对N-末端融合标签)的情况下,这些脱靶整合可以在不存在所需正确HDR插入的情况下驱动插入序列的可观测的表达。(C)柱表示来自用指定组分电穿孔的人CD3+T细胞的真正GFP+百分比。针对荧光蛋白表达的流式细胞术可以用于快速评估功能性脱靶整合。当单独电穿孔模板时荧光细胞百分比增加超过检测限有可能代表了自然产生的dsDNA断裂处的随机整合。并非每个脱靶整合都将产生荧光蛋白表达,但是可以测试不同模板之间功能性脱靶表达中的相对差异。包括靶向CXCR4的RNP将显著增加观测的脱靶同源依赖性整合,有可能是通过HITI型插入事件。最大的增加(在该供体中为1%→30%)来自电穿孔正确的RNP和HDR介导的插入。(D)来自5个模板的中靶GFP表达(右列)与功能性脱靶整合(中列)的比较。绘制了两个生物供体(点)的均值表达(柱)。

[0041] 图27A-B显示了HDR模板与gRNA矩阵的GFP表达。(A)在电穿孔dsDNA HDR模板和相应的gRNA连同CXCR4 gRNA以及非RNP对照的矩阵后7天于来自健康供体的CD3+CD4+原代人T细胞中分析GFP表达。如使用dsDNA模板所预期的,在组合中观察到脱靶整合,但是对于所有gRNA和HDR模板,在中靶条件中观察到最高的GFP表达。(B) (A)中流式细胞术的热图总结。一个HDR模板,即核因子FBL中的C-末端GFP融合标签,在gRNA中具有持续较高的脱靶表达。

[0042] 图28A-D显示了原代人T细胞中使用Cas9切口酶的高效HDR。(A)包含RAB11A的第一外显子的基因组基因座的图像。使用具有单一向导RNA(gRNA 1)的spCas9以及dsDNA HDR模板导致高效的GFP表达(图11F),所述dsDNA HDR模板在起始密码子后直接将GFP与RAB11A整合在框中。使用具有两个gRNA的Cas9切口酶(D10A变体)可以降低脱靶切割的可能性。

[0043] (B-C)测试一系列gRNA以及双gRNA组合在RAB11A N-末端基因座处的GFP插入效率。如所预期,当使用核酸酶失效Cas9(dCas9)时,没有gRNA显示出可观的GFP插入水平。邻近插入位点的多个单一gRNA切割当使用Cas9时显示出GFP整合,但是均没有gRNA 1高效。D10A切口酶使用单一向导时显示很少至几乎没有GFP整合,但是使用多个双向导组合时显

示出高效GFP整合。只有在这样的gRNA组合中观察到GFP整合,所述gRNA组合中两个PAM序列的方向为彼此远离(PAM出(PAM Out))。(D) (图25C)中的原始数据证明了当电穿孔脱靶gRNA (靶向CXCR4)时较低的功能性脱靶整合水平,可能是由于需要D10A切口酶具有紧邻结合的两个gRNA以诱导dsDNA断裂。所有显示(B-D)中的点表示在标记的两个健康供体中的技术重复。

[0044] 图29A-H显示了在具有两个功能丧失IL2RA突变的对象中降低的Treg频率和缺陷的Treg抑制能力。(A)通过流式细胞术分析来自具有功能丧失IL2RA突变的健康供体和所有家族成员,包括IL2RA杂合体(c.530杂合体1、c.800杂合体1-3)以及复合杂合体儿童(compound heterozygote children)(复合杂合体1-3)的CD3+CD4+T细胞以评估CD25hiCD127lo Treg的存在。(B)在健康供体和单一杂合体中,CD4+FoxP3+T细胞主要为CD25hiCD127lo。在复合杂合体中,存在CD127lo CD4+FoxP3+群,但是不表达IL2RA。(C)在两个单独的位点进行的临床表型分析证实复合杂合体具有CD127lo FoxP3+细胞的正常频率。(D)复合杂合体3中IL2RA表面表达的缺乏导致异常的下流信号转导如在使用IL-2而不是IL-7或IL-15刺激后通过pStat 5表达测量。(E)由于不具有从CD25缺陷型复合杂合体分选CD25hi Treg的能力,建立了替代性门选策略,以使用表面标志物CD127loCD45RO+TIGIT+由CD3+CD4+T细胞富集FoxP3+细胞。显示了来自指定门选群的胞内FoxP3染色。(F)虽然这些CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+潜在“Treg”针对FoxP3高度富集并且在使用来自健康供体的CFSE标记的经刺激的响应T细胞(Tresp)培养时显示出一些抑制能力,但是来自复合杂合体的CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+并不显示抑制能力。经刺激的Tresp群(实曲线)、未经刺激的Tresp(虚曲线)。(G)单独校正复合杂合体中的任一CD25突变仍然将留下另一突变,导致细胞成为单一杂合体。为了确认这种潜在的校正会导致一定程度的功能性抑制,将来自c.530和c.800单一杂合体家族成员的CD4+CD25hiCD127lo Treg分离,并如(F)中所述测定其抑制能力。(H)点图总结了来自健康供体,CD25缺陷型复合杂合体(F)和CD25+/-c.530或c.800杂合体(G)的细胞中的Treg抑制能力。虽然来自复合杂合体的CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+“Treg”没有抑制能力,但是来自单一杂合体家族成员的常规CD4+CD25hiCD127loTreg具有一些抑制能力,相较于复合杂合体,与它们缺乏明显的临床表型一致。

[0045] 图30A-E显示了原代人T细胞中非病毒基因靶向校正的单基因自身免疫突变。(A)家族中的3个同胞携带两个不同的IL2RA(编码高亲和力IL-2受体,CD25)突变(c.530A>G在IL2RA外显子4中产生终止密码子;c.800delA,在IL2RA外显子8产生移码突变,其导致大约100个氨基酸错误连续(run-on))。(B)这3个复合杂合体同胞显示出极大地降低,但是并不是完全不存在的在其原代T细胞上的IL2RA的细胞表面表达。通过电穿孔Cas9 RNP和包含正确IL2RA序列(以及靶向的PAM序列中的沉默突变)的dsDNA HDR模板非病毒基因靶向c.530突变在电穿孔2天后成功地拯救了来自各复合杂合体同胞的部分T细胞中的IL2RA细胞表面表达。(C)非病毒基因靶向7天后,靶向的T细胞相较于未靶向的对照在IL-2刺激后显示出Stat5磷酸化水平的增加。(D)非病毒基因靶向以校正c.530突变后9天,来自3个复合杂合体供体的IL2RA+T细胞相较于未靶向的细胞或健康供体细胞包括增加的FoxP3+细胞水平。(E)使用经优化的治疗试剂组(D10A切口酶以及ssDNA HDR模板),c.530突变的校正和非病毒基因靶向是有可能的和高效的。电穿孔后离体扩增9天后(再刺激后2天),对来自一个复合杂

合体供体的T细胞进行IL2RA表面表达染色。

[0046] 图31A-D显示了在IL2RA中鉴定复合杂合突变以及设计校正的CRISPR-Cas9基因组靶向试剂。(A) 使用已知涉及糖尿病单基因形式的超过40个基因的内部靶向的下一代测序多基因组进行的先证者 (proband) 初步基因测试为阴性。在先证者和父母三者中进行的后续外显子组测序揭示了IL2RA基因中的2个致病突变。母亲在IL2RA的外显子4中具有单一杂合突变(c.530G>A) (SEQ ID NO:1) (AGACAAGGTRGACCCAGCC), 导致过早的终止密码子。(B) 父亲在IL2RA的外显子8中具有单一杂合突变((c.800delA) (SEQ ID NO:2) (ACAGGAGGARRRKWRRARAA), 导致移码突变, 导致95个氨基酸长度的错误连续。Sanger测序确认先证者对于两种突变为复合杂合体。(C) IL2RA蛋白的线性描述, 注释有两个已鉴定的IL2RA突变的大致位置。SD1, sushi结构域1; SD2, sushi结构域2; TM, 跨膜; C, 胞质。(D) 将包含特定突变(针对530G>A等位基因的(SEQ ID NO:

[0047] 3) (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGGTAGACCC) 和针对c.800delA等位基因的SEQ ID NO:4 (GACTTTGTTACACCACTACAGGAGGAGAGTA)) 的基因组序列用于设计CRISPR-Cas9基因组靶向试剂以校正2个IL2RA突变。设计gRNA以切割各突变附近的位点, 与c.530突变相隔8bp且与c.800相隔7bp。对于各突变, 设计HDR模板(针对c.530突变的(SEQ ID NO:5)

[0048] (ACAAGATGGACCC) 和针对c.800的(SEQ ID NO:6)

[0049] (AGGAGAAAGAGTA)) 包含校正的序列以及简并碱基中的沉默突变, 以破坏各向导RNA的PAM序列(“NGG”)。示出了针对c.530

[0050] (CAAAATGACCCACGGGAAGACAAGATGGACCC) (SEQ ID NO:7) 和c.800 (SEQ ID NO:8) (GACTTTGTTACACCACTACAGGAGAAAGAGTA) 的校正的等位基因+沉默PAM破坏序列。展示了针对c.530突变位点(hg38ch10:6021526-6021557) 和c800突变位点(hg38 ch10:6012886-6012917) 的基因组区域(未按比例绘制)。使用了ssODN HDR模板(具有60bp同源臂的ssDNA) 和大dsDNA或ssDNA HDR模板(如所示, 具有约300bp的同源臂)。

[0051] 图32A-C显示了HDR介导的校正IL2RA c.530A>G功能丧失突变。(A) 不同于靶向IL2RA的C-末端处c.800delA突变的gRNA, 在单独将RNP (蓝色) 电穿孔到CD3+T细胞后2天靶向c.530A>G突变的gRNA (在内部外显子中产生终止密码子) 在健康供体和单一杂合体(c.800Het 2和3) 中导致大量的(约90%) 的IL2RA敲减。虽然以非常小的IL2RA+百分比开始, 也在所有三种复合杂合体中观测到了敲减, 可能是因为少量蛋白质可以从c.800delA等位基因表面表达出来。这种降低的CD25表达可以通过包含ssODN HDR模板部分挽救, 甚至可以使用大dsDNA HDR模板更充分地挽救这种降低的CD25表达。两种模板类型都包含校正的序列(去除gRNA的PAM序列的沉默突变) 以及60bp(ssODNs) 或约300bp(大dsDNA) 的同源臂(图32)。不同于靶向c.800delA突变用于校正, 只有当包含HDR模板时, 才能从复合杂合体观察到T细胞中的CD25表面表达。在所有三种复合杂合体中, dsDNA HDR模板产生更大百分比的CD25+细胞。(B) 相较于没有电穿孔或仅RNP对照, 来自接受HDR介导的突变校正的复合杂合体患者的CD3+T细胞在电穿孔后7天响应IL-2刺激(200U/mL) 的pStat5信号转导增加。(C) 类似地, 在复合杂合体患者中, 在HDR校正条件下电穿孔后9天, 发现CD25+FoxP3+细胞的比例增加。在复合杂合子3中靶向c.530突变用于HDR校正时, 可以看到较低百分比的校正, 这可能是由于与患者疾病或患者免疫抑制药物治疗方案相关的细胞状态改变所致。根据实施例所示优化的非病毒基因组靶向方案进行电穿孔。对于ssODN电穿孔, 电穿孔1uL H2O中

的100pmol。

[0052] 图33A-C显示了非HDR介导的校正IL2RA c.800delA移码功能丧失突变。(A) 来自携带2个功能丧失IL2RA突变的一个家族的所有儿童的CD3+T细胞中的CD25表面表达的柱状图,包括在其表面表达最小量IL2RA的3个复合杂合体(无电穿孔,灰色)。电穿孔含有针对2个突变之一的位点的gRNA的RNP后两天,IL2RA最终外显子中一个碱基对的缺失(c.800delA)导致超出正常终止密码子的错误连续,来自健康供体和单一杂合体(c800 Het 2和3)的CD3+T细胞显示CD25-细胞略有增加(仅RNP,蓝色)。低敲除可能是由于靶向蛋白质C末端的gRNA所致,其中小插入缺失可能导致表面蛋白质表达的较不明显的损失。令人惊奇的是,单独的RNP在所有三种复合杂合体中的几乎50%的经编辑的T细胞中导致CD25表面表达。相较于仅使用RNP,具有CD25校正的细胞百分比增加可以通过包含具有突变校正的ssODN HDR模板序列(RNP+ssODN,紫色)来实现,并且当使用更长的dsDNA HDR模板来校正突变时可以进一步增加(RNP+dsDNA HDRT,绿色)(图32)。(B) 电穿孔后扩增7天后,经编辑的CD3+T细胞中响应高剂量IL-2刺激(200U/mL)的磷酸Stat5信号转导。pStat5+细胞数量的增加与CD25表面表达(A)的增加相关。(C) 电穿孔后扩增9天后,相较于无电穿孔对照,胞内FoxP3染色揭示了CD3+T细胞中CD25+FoxP3+细胞比例的显著增加,接近在类似培养的健康供体中观察到的CD25+FoxP3+细胞的比例。根据优化的非病毒基因组靶向方案进行电穿孔(实施例)。对于ssODN电穿孔,电穿孔1 μ L H₂O中的100pmol。

[0053] 图34A-B显示了接受免疫抑制剂的复合杂合体IL2RA功能丧失患者的HDR潜能减弱以及改变的临床表型。(A) 在将阳性HDR对照RAB11A-GFPdsDNA HDR模板电穿孔到来自指定患者的CD3+T细胞后6天进行的GFP表达的流式细胞术分析显示,相较于2个c.800杂合体同胞,3种复合杂合体中较低的GFP表达。相较于经类似编辑的12名健康供体(图20),在健康供体中观察到c.800杂合体以及复合杂合体1和2都在正常范围内,而复合杂合体3的GFP表达低于经分析的任何健康供体。值得注意的是,虽然在复合杂合体3中,c.530突变处HDR介导的校正显著低于其他2个复合杂合体(图31A),但是电穿孔单独靶向c.800delA的RNP后,CD25表面表达相似。不同于HDR介导的修复,NHEJ介导的c.800delA处的移码校正可能不需要细胞增殖,这与复合het 3是采血和T细胞分离时唯一使用活性免疫抑制剂的复合杂合体患者相一致。(B) 与患者疾病相关的细胞状态改变也可能导致HDR率的降低。通过流式细胞术测量来自各指定患者的未经编辑的分离CD4+T细胞中的TIGIT和CTLA4表达水平。与改变的激活状态相一致,来自复合杂合体3的细胞具有独特的表型,相较于健康供体,杂合家族成员以及其他两种复合杂合同胞,具有TIGIT和CTLA4表达的增加。

[0054] 图35A-B显示了产生ssDNA HDR模板的多种方法。

[0055] (A) 如果可以产生足够多的长单链DNA序列用于电穿孔,那么在不过度影响中靶效率的情况下可以减少脱靶整合。一种方法涉及两步选择性核酸外切酶消化,其特异性地降解已被5'磷酸化标记的PCR产物的一条链,其易于在扩增前添加到PCR引物中。(B) 还采用了基于顺序体外转录(IVT)和逆转录(RT)反应的第二种ssDNA生产方法。附加有短T7启动子的PCR产物作为IVT模板以产生ssRNA产物。退火RT引物并逆转录后,形成了RNA/DNA杂交体,通过在氢氧化钠中孵育(选择性降解RNA链)可以容易地将其转化为长ssDNA模板。)图35C显示了电穿孔后2天,仅用ssDNA模板电穿孔的CD3+T细胞中的活力高于仅用dsDNA模板电穿孔的那些细胞(图11)。)图35D显示了ssDNA RAB11A-GFP HDR模板显示出与dsDNA模板类似的高

效GFP整合,并在较高摩尔量的模板下维持高效整合,这可能是由于增加的活力(C)以及每摩尔DNA模板较少的质量所致。各点表示至少两名健康供体(C、D)。

[0056] 定义

[0057] 本说明书和所附权利要求书中,单数形式“一”和“所述”包括复数含意,除非另有明确说明。

[0058] 术语“核酸”或“核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参比核酸相似的结合特性,并以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另有说明,否则具体核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代),等位基因,直系同源物,SNP和互补序列以及明确指出的序列。具体而言,可通过产生一个或多个选定(或所有)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来获得简并密码子取代形式(Batzer等,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。核酸一词可与基因、cDNA和基因编码的mRNA互换使用。

[0059] 术语“基因”可以表示参与产生或编码多肽链的DNA区段。它可以包括编码区之前和之后的区域(前导区和尾区)以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。或者,术语“基因”可以表示涉及产生或编码非翻译的RNA,如rRNA、tRNA、向导RNA(例如,小向导RNA)或微小RNA的DNA区段。

[0060] “治疗”指对疾病、病症或紊乱的治疗或缓解或预防的各种成功表现,包括各种客观或主观参数,例如症状的减轻、消退、消除或使病症对患者而言更可耐受,减慢退行或衰退的速度,或使退行终点不那么衰弱。症状的治疗或缓解可以是基于主观或客观参数,包括医生检查的结果。因此,术语“治疗”包括本发明的化合物或药剂给药以预防或延迟、减轻或阻止或抑制紊乱、病症或疾病相关症状或病症的发展,如文中所述。术语“治疗效果”指对象中疾病、疾病症状或疾病副作用的减轻、消除或预防。采用本发明方法的“治疗”或“处理”包括预防对象中症状的发作(所述对象可以是本文所述疾病、病症或紊乱相关疾病或紊乱风险升高但尚未经历或表现出症状的对象),抑制疾病或紊乱的症状(减缓或阻止其发展),令疾病的症状或副作用消减(包括姑息治疗)以及减轻疾病症状(引起消退)。治疗可以是预防性的(以阻止或延迟疾病的发作或阻止其临床或亚临床症状显现)或在疾病或病症显现后对症状的治疗性抑制或缓解。本文中,术语“治疗”包括阻止性(例如预防性)、治愈性或姑息性治疗。

[0061] “启动子”定义为指导核酸转录的一种或多种核酸控制序列。本文中,启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,例如聚合酶II型启动子的TATA元件。启动子还可任选地包括远端增强子或阻遏子元件,它们的位置可以距离转录起始位点数千碱基对。

[0062] “多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。本文中,这些术语涵盖任意长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽键相连。

[0063] 本文中,“互补”或“互补性”指核苷酸之间或核酸之间特定的碱基配对。互补的核苷酸是,通常来说,A和T(或A和U)以及G和C。

[0064] 本文中,对象指个体。例如,对象是哺乳动物,例如灵长类,尤其人。非人灵长类也是对象术语对象包括驯养动物(例如猫、狗等),牲畜(例如牛、马、猪、绵羊、山羊等)和实验

室动物(例如雪貂、龙猫、小鼠、兔子、大鼠、沙鼠、豚鼠等)。因此,兽医用途和医药用途以及制剂都包括在此。该术语不表示特定年龄或性别。因此,旨在覆盖雄性或雌性的成年和新生对象。本文所用患者和对象可以互换使用并且可以表示经受疾病或紊乱的对象。

[0065] “CRISPR/Cas”系统是指用于防御外来核酸的一类广泛的细菌系统。

[0066] CRISPR/Cas系统存在于广泛的真细菌和古细菌中。CRISPR/Cas系统包括如下类型:I、II和III亚型。野生型II型CRISPR/Cas系统利用RNA介导的核酸酶,Cas9,与向导和活化RNA一起,识别和切割外来核酸。本领域也已知具有向导RNA和活化RNA活性的向导RNA。在一些情况中,这类双活性向导RNA称之为小向导RNA(sgRNA)。

[0067] Cas9同源物存在于各种真细菌中,包括但不限于以下分类群的细菌:放线细菌(Actinobacteria),产水菌(Aquificae),拟杆菌-绿菌(Bacteroidetes-Chlorobi),衣原体-疣微生物(Chlamydiae-Verrucomicrobia),绿弯菌(Chloroflexi),蓝细菌(Cyanobacteria),厚壁菌(Firmicutes),变形菌门(proteobacteria),螺旋体(Spirochaetes),和热袍菌(Thermotogae)。示例性的Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9蛋白。其他Cas9蛋白和其同源物述于,例如,Chylinski,等,RNA Biol.2013年5月1日;10(5):726-737;Nat.Rev.Microbiol.2011年6月;9(6):467-477;Hou,等,Proc Natl Acad Sci U S A.2013年9月24日;110(39):15644-9;Sampson等,Nature.2013年5月9日;497(7448):254-7;和Jinek,等,Science.2012年8月17日;337(6096):816-21。可以为了在宿主细胞中具有高效活性或增强稳定性而优化Cas9核酸酶结构域。

[0068] 本文所用术语“Cas9”指RNA介导的核酸酶(例如,来自细菌或古细菌来源,或由其衍生)。示例性的RNA介导的核酸酶包括前述Cas9蛋白和其同源物,并且包括但不限于CPF1(参见例如,Zetsche等,Cell,第163卷,第3期,第759-771页,2015年10月22日)。相似地,本文所用术语“Cas9核糖核蛋白”复合物等术语指这样的复合物:Cas9蛋白和crRNA(例如,向导RNA或小向导RNA),Cas9蛋白和反式活化crRNA(tracrRNA)之间的复合物,Cas9蛋白和小向导RNA,或其组合(例如,包含Cas9蛋白、tracrRNA或crRNA向导RNA的复合物)。

[0069] 本文所用短语“编辑”在编辑细胞的基因组的上下文中指在靶基因组区域诱导基因组序列中的结构改变。例如,编辑可以采取将核苷酸序列插入细胞基因组的形式。核苷酸序列可以编码多肽或其片段。这类编辑可以通过诱导靶基因组区域内的双链断裂进行,或位于相对链且侧接靶基因组区域的单链切口对。在靶基因组区域处或其中诱导单链或双链断裂的方法包括使用Cas9核酸酶结构域或其衍生物和针对靶基因组区域的向导RNA或向导RNA对。

[0070] 本文所用短语“导入”在导入RNP-DNA模板复合物的上下文中指将RNA-DNA模板复合物由细胞外至细胞内的易位。在一些情况中,导入指RNP-DNA模板复合物由细胞外至细胞核内的易位。考虑了这类易位的各种方法,包括但不限于,电穿孔,与纳米线或纳米管接触,受体介导的内化,经由细胞穿透肽的易位,脂质体介导的易位等。

[0071] 本文所用短语“异源性”指通常不天然存在的东西。术语“异源性序列”指通常不天然存在于给定细胞的序列。因此,异源性核苷酸或蛋白质序列可以是:(a)对其宿主细胞是异源的(即,对细胞为异源性的);(b)天然存在于宿主细胞中(即,内源性),但以不自然量存在于细胞中(即,比宿主细胞中天然存在的量大或少);或(c)天然存在于宿主细胞中但位于

其天然基因座外。

[0072] 本文所用短语“原代”在原代细胞或原代干细胞的上下文中指尚未经转化或永生化的细胞。可以培养、继代培养或传代有限次数(例如,培养0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次)这类原代细胞。在一些情况中,原代细胞可以适应体外培养条件。在一些情况中,原代细胞分离自生物体、系统、器官或组织,仍选地,经分选,并在不存在培养或继代培养的情况下利用。在一些情况中,可以刺激、激活或分化原代细胞。例如,通过与CD3、CD28激动剂、IL-2、IFN- γ 或其组合接触(例如,在其存在的情况下培养)可以激活原代T细胞。

[0073] 本文所用短语“造血干细胞”指可以产生血细胞的干细胞类型。造血干细胞可以产生髓系或淋巴系细胞或其组合。造血干细胞主要存在于骨髓,尽管它们可以分离自外周血或其部分。各种细胞表面标志物可以用于鉴定、分选或纯化造血干细胞。在一些情况中,鉴定造血干细胞为c-kit⁺和lin⁻。在一些情况中,将人造造血干细胞鉴定为CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况中,将人造造血干细胞鉴定为CD34⁻、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况中,将人造造血干细胞鉴定为CD133⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、lin⁻。在一些情况中,将小鼠造血干细胞鉴定为CD34^{lo/-}、SCA-1⁺、Thy1^{+/lo}、CD38⁺、C-kit⁺、lin⁻。在一些实施方式中,造血干细胞为CD150⁺CD48⁻CD244⁻。

[0074] 本文所用短语“造血细胞”指源自造血干细胞的细胞。造血细胞可通过从生物体,系统,器官或组织(例如血液或其一部分)中分离获得或提供。或者,可以分离造血干细胞并通过使干细胞分化获得或提供造血细胞。造血细胞包括具有分化为其他细胞类型有限潜力的细胞这类造血细胞包括但不限于,多能祖细胞,谱系受限祖细胞,常见髓样祖细胞,粒细胞巨噬细胞祖细胞或巨核细胞-红系祖细胞。造血细胞包括淋巴和髓系的细胞,如淋巴细胞,红细胞,粒细胞,单核细胞和血小板细胞。在一些实施方式中,造血细胞是免疫细胞,如T细胞、B细胞、巨噬细胞、天然杀伤(NK)细胞或树突细胞。在一些实施方式中,细胞是先天免疫细胞。

[0075] 本文所用短语“T细胞”指表达T细胞受体分子的淋巴细胞。T细胞包括但不限于,原初T细胞,刺激性T细胞,原代T细胞(例如,未培养的T细胞),培养的T细胞,永生T细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,记忆T细胞,调节T细胞,天然杀伤T细胞,其组合或其亚群。T细胞可以是CD4⁺、CD8⁺或CD4⁺和CD8⁺。T细胞可以是辅助细胞,例如,T_h1、T_h2、T_h3、T_h9、T_h17或T_{FH}型辅助细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞。调节T细胞可以是FOXP3⁺或FOXP3⁻。T细胞可以是 α/β T细胞或 γ/δ T细胞。在一些情况中,T细胞是CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}调节T细胞。在一些情况中,T细胞是选自下组的调节T细胞:Tr1、Th3、CD8+CD28⁻、Treg17和Qa-1限制性T细胞或其组合或其亚群。在一些情况中,T细胞是FOXP3⁺T细胞。在一些情况中,T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}效应T细胞。在一些情况中,T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻原初T细胞。

[0076] T细胞可以是经遗传操纵的重组T细胞。在一些情况中,重组T细胞具有重组(例如,突变的或异源性)T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。例如,T细胞受体可以在T细胞受体的互补决定区中具有一个或多个突变,以改变抗原特异性。又例如,可以使T细胞受体突变(例如,在内结构域中),以增加或减少信号传导。又例如,可以用异源性T细胞受体代替T细胞受体。又例如,可以用具有不同受体结构域的多肽,如抗体或抗体片段来代替T细胞受体。在一

些情况中,T细胞受体是包含靶向结构域(例如,抗体片段),跨膜结构域和胞内或内结构域的嵌合受体。内结构域可包含一个或多个信号传导域和/或衔接子域,以提供稳定的T细胞活化和抗抗原活性。

[0077] 本文所用术语“非同源性末端连接”或NHEJ指这样的细胞过程,其中DNA链的切割或切口端在不需要同源性核酸模板的情况下直接连接。NHEJ可以导致修复位点处一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代或其组合。

[0078] 本文所用术语同源介导的修复(HDR)指这样的细胞过程,其中DNA链的切割或切口端通过同源模板核酸的聚合反应修复。因此,原始序列被模板的序列替代。同源性模板核酸可以通过基因组中其他部位的同源性序列(姐妹染色单体,同源性染色体或相同或不同染色体上的重复区域)提供。或者,可以导入外源性模板核酸以在靶位点获得特定的HDR诱导的序列改变。以此方式,可以将特定突变导入切割位点。

[0079] 本文所用单链DNA模板或双链DNA模板指可以被细胞用作HDR模板的DNA寡核苷酸。通常,单链DNA模板或双链DNA模板具有与靶位点同源的至少一个区域。在一些情况中,单链DNA模板或双链DNA模板具有两个同源区域,其侧接包含待插入靶切割位点的异源性序列的区域。

具体实施方式

[0080] 以下描述列举了本发明组合物和方法的各个方面和实施方式。任一特定实施方式都不限定组合物和方法的范围。相反,实施方式仅提供了至少包括在所公开的组合物和方法范围内的各种组合物和方法的非限制性示例。应当从本领域普通技术人员的角度阅读该描述;因此,并不一定包括技术人员众所周知的信息。

[0081] 本文提供了用于编辑细胞基因组的组合物和方法。发明人已经令人惊奇地发现,大核苷酸序列,例如,长度大于约200个核苷酸或碱基对的核苷酸序列,可以在不存在病毒载体的情况下插入细胞基因组中。在一些实施方式中,长度大于约200个核苷酸或碱基对的核苷酸序列,可以在不存在病毒载体的情况下插入原代免疫细胞的基因组中。

[0082] 整合大核酸,例如,大小大于200个核苷酸的核酸至细胞可能受限于整合的低效率、脱靶作用和/或细胞活力的损失。本文描述了用于实现将核苷酸序列,例如,大小大于约200个核苷酸的核苷酸序列,整合到细胞基因组中的组合物和方法。在一些方法中,整合的效率增加,脱靶作用降低和/或细胞活力的损失降低。

[0083] 方法

[0084] 用于编辑细胞基因组的方法可以包括a)提供Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物,其包含:(i)RNP,其中RNP包含Cas9核酸酶结构域和向导RNA,其中向导RNA与细胞基因组的靶区域特异性地杂交,并且其中Cas9核酸酶结构域切割靶区域以在细胞基因组中产生插入位点;和(ii)双链或单链DNA模板,其中DNA模板的大小大于约200个核苷酸,其中DNA模板的5'和3'末端包含与侧接插入位点的基因组序列具有同源性的核苷酸序列,并且其中复合物中RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1-约100:1;和b)将RNP-DNA模板复合物导入细胞。

[0085] 在一些实施方式中,本文所述方法提供的递送RNP-DNA模板复合物效率为至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、

95%、97.5%、99%、99.5%、99%或更高。在一些情况中,相对于将RNP-DNA模板导入细胞后具有活力的细胞确定效率。在一些情况中,相对于这样的细胞(具有活力或不具有活力)的总数确定效率,所述细胞中RNP-DNA模板被导入细胞。

[0086] 又例如,递送的效率可以通过对细胞群中基因组经编辑的细胞的数量进行定量来确定(相较于导入步骤后获得的全部细胞或全部活力细胞)。可以利用用于对基因组编辑进行定量的各种方法。这些方法包括但不限于,使用错配特异性核酸酶,如T7内切核酸酶I;对一个或多个靶基因座进行测序(例如,通过对克隆的靶基因座扩增片段进行Sanger测序);和高通量深度测序。

[0087] 在一些实施方式中,相较于将裸DNA导入或使用病毒载体将DNA导入细胞后细胞活力的损失,细胞活力的损失降低。所述降低可以是降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任意百分比。在一些实施方式中,相较于将裸DNA导入或使用病毒载体将DNA导入细胞后的脱靶整合,整合的脱靶作用降低。所述降低可以是降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任意百分比。

[0088] 在一些实施方式中,本文所述的方法其中已经导入了RNP-DNA模板的细胞提供了高细胞活力。在一些实施方式中,其中已经导入RNP-DNA模板的细胞的活力为至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%或更高。在一些情况中,其中已经导入RNP-DNA模板的细胞的活力为约20%至约99%,约30%至约90%,约35%至约85%或90%或更高,约40%至约85%或90%或更高,约50%至约85%或90%或更高,约50%至约85%或90%或更高,约60%至约85%或90%或更高,或约70%至约85%或90%或更高。

[0089] 在本文所提供的方法中,RNP与DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1。例如,摩尔比可以为约5:1至10:1,约5:1至约15:1,5:1至约20:1;5:1至约25:1;约8:1至约12:1;约8:1至约15:1,约8:1至约20:1,或约8:1至约25:1。

[0090] 在一些实施方式中,DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。例如,DNA模板的浓度可以为约2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、11.5、12、12.5、13、13.5、14、14.5、15、15.5、16、16.5、17、17.5、18、18.5、19、19.5、20、20.5、21、21.5、22、22.5、23、23.5、24、24.5、25pM或这些浓度之间的任意浓度。在一些实施方式中,DNA模板的大小或长度大于约200bp、250bp、300bp、350bp、400bp、450bp、500bp、550bp、600bp、650bp、700bp、750bp、800bp、850bp、900bp、1kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2.0kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4.0kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5.0kb或这些大小之间的任意大小的DNA模板。例如,DNA模板的大小可以为约200bp至约500bp、约200bp至约750bp、约200bp至约1kb、约200bp至约1.5kb、约200bp至约2.0kb、约200bp至约2.5kb、约200bp至约3.0kb、约200bp至约3.5kb、约200bp至约4.0kb、约200bp至约4.5kb、约200bp至约5.0kb。在一些实施方式中,DNA模板的量为约1 μ g至约10 μ g。例如,DNA模板的量可以为约1 μ g至约2 μ g、约1 μ g至约3 μ g、约1 μ g至约4 μ g、约1 μ g至约5 μ g、约1 μ g至约6 μ g、约1 μ g至约7 μ g、约1 μ g至约8 μ g、约1 μ g至约9 μ g、约1 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约2 μ g至约3 μ g、约2 μ g至约4 μ

g、约2 μ g至约5 μ g、约2 μ g至约6 μ g、约2 μ g至约7 μ g、约2 μ g至约8 μ g、约2 μ g至约9 μ g或2 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约3 μ g至约4 μ g、约3 μ g至约5 μ g、约3 μ g至约6 μ g、约3 μ g至约7 μ g、约3 μ g至约8 μ g、约3 μ g至约9 μ g或约3 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约4 μ g至约5 μ g、约4 μ g至约6 μ g、约4 μ g至约7 μ g、约4 μ g至约8 μ g、约4 μ g至约9 μ g或约4 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约5 μ g至约6 μ g、约5 μ g至约7 μ g、约5 μ g至约8 μ g、约5 μ g至约9 μ g或约5 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约6 μ g至约7 μ g、约6 μ g至约8 μ g、约6 μ g至约9 μ g或约6 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约7 μ g至约8 μ g、约7 μ g至约9 μ g或约7 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约8 μ g至约9 μ g或约8 μ g至约10 μ g。在一些实施方式中,DNA模板的量为约9 μ g至约10 μ g。在一些情况中,DNA模板的大小足够大,并且量足以像裸露的DNA一样致命。在一些实施方式中,DNA模板编码异源性蛋白质或其片段。在一些实施方式中,DNA模板包含调控序列,例如,启动子序列和/或增强子序列以调节插入细胞基因组后异源性蛋白质或其片段的表达。

[0091] 在一些情况中,DNA模板是线性DNA模板。在一些情况中,DNA模板是单链DNA模板。在一些情况中,单链DNA模板是纯单链DNA模板。如本文所用,述及“纯单链DNA”表示基本上没有DNA的其他或相对链的单链DNA。述及“基本上没有”表示纯单链DNA的一条DNA链比另一条DNA链少至少100倍。

[0092] 在一些实施方式中,通过用DNA模板与RNP在约20 $^{\circ}$ C-约25 $^{\circ}$ C的温度孵育不到约1分钟-30分钟形成RNP-DNA模板复合物。例如,可以用DNA模板与RNP在约20 $^{\circ}$ C、21 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C、23 $^{\circ}$ C、24 $^{\circ}$ C或25 $^{\circ}$ C的温度孵育约5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒、45秒、50秒、55秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟或30分钟或这些时间之间的任意量的时间。在另一示例中,可以用DNA模板与RNP在约20 $^{\circ}$ C-约25 $^{\circ}$ C的温度孵育不到约1分钟-约30分钟,小于1分钟-约5分钟,小于约1分钟-约10分钟,约5分钟-10分钟,约5分钟-15分钟,约10至约15分钟,约10分钟-约20分钟,或约10分钟-约30分钟。在一些实施方式中,在将RNP-DNA模板复合物导入细胞之前混合RNP-DNA模板复合物和细胞。

[0093] 在一些实施方式中,导入RNP-DNA模板复合物包括电穿孔。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的方法、组合物和装置可以包括本文实施例中所述的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于W0/2006/001614或Kim,J.A.等Biosens.Bioelectron.23,1353-1360(2008)中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于美国专利申请公开号2006/0094095;2005/0064596;或2006/0087522中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于Li,L.H.等Cancer Res.Treat.1,341-350(2002);美国专利号6,773,669;7,186,559;7,771,984;7,991,559;6485961;7029916;和美国专利申请公开号2014/0017213和2012/0088842中的那些。用于电穿孔细胞以导入RNP-DNA模板复合物的其他或另外的方法、组合物和装置可以包括述于Geng,T.等J.Control Release 144,91-100(2010);和Wang,J.,等Lab.Chip 10,2057-2061(2010)中的那些。

[0094] 在一些实施方式中,Cas9蛋白质可以处于激活的内切核酸酶形式,因此当与靶核

酸结合作为具有向导RNA的复合物的部分或者具有DNA模板的复合物的部分时,双链断裂导入靶核酸。可以这样修复双链断裂:通过NHEJ修复以导入随机突变或通过HDR以导入特定突变。本文所述方法可以利用各种Cas9核酸酶。例如,可以利用这样的Cas9核酸酶,所述Cas9核酸酶需要紧邻向导RNA靶向的区域3'的NGG原型间隔子邻近基序(proto spacer adjacent motif) (PAM)。这类Cas9核酸酶可靶向包含NGG序列的基因组的任何区域。又例如,具有正交PAM基序的Cas9蛋白可以利用不具有邻近NGG PAM序列的靶序列。具有正交PAM序列特异性的示例性的Cas9包括但不限于,CFP1, Nature Methods 10, 1116-1121 (2013) 中所述的那些,和Zetsche等, Cell, 第163卷, 第3期, 第759-771页, 2015年10月22日中所述的那些。

[0095] 在一些情况中,Cas9蛋白是切口酶,因此当与靶核酸结合作为具有向导RNA的复合物的部分时,将单链断裂或切口导入靶核酸。各自结合结构不同的向导RNA的Cas9切口酶对可以靶向靶基因组区域的2个近端位点,并且因此将近端单链断裂对导入靶基因组区域。切口酶对可以提供增强的特异性,因为脱靶作用有可能导致单一切口,这通常通过碱基切除修复机制在无损伤的情况下修复。示例性Cas9切口酶包含具有D10A或H840A突变的Cas9核酸酶。

[0096] 在一些实施方式中,RNP包含Cas9核酸酶。在一些实施方式中,RNP包含Cas9切口酶。在一些实施方式中,RNP-DNA模板复合物包含至少2种结构不同的RNP复合物。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的Cas9核酸酶结构域。在一些实施方式中,至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA。在一些实施方式中,其中至少两种结构不同的RNP复合物包含结构不同的向导RNA,结构不同的RNA复合物各自包含Cas9切口酶,并且结构不同的向导RNA杂交靶区域的相对链。

[0097] 在一些情况中,将包含结构不同的核糖核蛋白复合物的多个RNP-DNA模板导入细胞。例如,Cas9蛋白可以与多个(例如,2、3、4、5或更多个,例如,2-10、5-100、20-100个)结构不同的向导RNA复合以在多个结构不同的靶基因组区域靶向插入DNA模板。

[0098] 在本文所提供的方法和组合物中,细胞包括但不限于,真核细胞,原核细胞,动物细胞,植物细胞,真菌细胞等。任选地,细胞是哺乳范围细胞,例如,人细胞。细胞可以是体外、离体和/或体内的。细胞还可以是原代细胞、生殖细胞、干细胞或前体细胞。例如,前体细胞可以是多潜能干细胞或造血干细胞。在一些实施方式中,细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方式中,原代造血细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD4-CD8-T细胞。还提供了通过本文所述任何方法修饰的任何细胞的群体。在一些实施方式中,该方法还包括扩增经修饰的群体。

[0099] 在一些情况中,将细胞从对象移除,使用本文所述任何方法修饰并给予患者。在其他情况中,将本文所述的任何构建体递送至患者体内。参见例如,美国专利号9737604和Zhang等“脂质纳米颗粒介导的CRISPR/Cas9高效递送用于肿瘤治疗(Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy),” NPG Asia Materials第9卷,第e441页(2017)。

[0100] 在一些实施方式中,将RNP-DNA模板复合物导入约 1×10^5 至约 2×10^6 个细胞。例如,RNP-DNA模板复合物可以导入约 1×10^5 至约 5×10^5 个细胞、约 1×10^5 至约 1×10^6 、 1×10^5 至约

1.5×10^6 、 1×10^5 至约 2×10^6 、约 1×10^6 至约 1.5×10^6 个细胞或约 1×10^6 至约 2×10^6 。

[0101] 在一些情况中,本文所述的方法和组合物可以用于生成、修饰、使用或控制重组T细胞,如嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)。这类CAR T细胞可以用于治疗或预防对象中的癌症、传染性疾病或自身免疫疾病。例如,在一些实施方式中,将一种或多种基因产物插入或敲入T细胞以表达异源性蛋白质(例如,嵌合抗原受体(CAR))。

[0102] 组合物

[0103] 本文还提供了多个细胞,其中至少20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,99%或更多细胞的基因组包含异源性DNA模板的靶向插入,其中DNA模板的大小为至少约200bp。在一些实施方式中,多个细胞包含原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方式中,原代造血细胞是免疫细胞。在一些实施方式中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。某些实施方式中,T细胞为CD8⁺T细胞。在一些实施方式中,T细胞为CD4⁺CD8⁺T细胞。

[0104] 在此公开的材料、组合物以及组分可用于在此公开的方法和组合物、可与在此公开的方法和组合物联用、可用于制备在此公开的方法和组合物,或者是在此公开的方法和组合物的产物。本文公开了以上及其他材料,应理解的是,在公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时,即便没有明确具体指向这些化合物的多种个体或各别组合和集合性组合以及排列组合中的每一种,这每一种都是本文所具体涵盖和具体描述的。例如,如果公开和论述了一种方法,并且论述了可对该方法中一个或多个分子实施的多种改变,则于是具体涵盖了所述改变的和所述方法的每一种和所有可能的组合与排列,除非特别说明并非如此。同样地,还特别考虑和公开了这些的任何子集或组合。这一概念适用于本申请所有方面的内容,包括但不限于采用本文所述组合物的方法的步骤。这样,如果有多种可执行的其他步骤,则应认为,这些其他步骤中的每一个都可与本文所述方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合联合执行,并且就此具体涵盖并视为公开了此类组合或组合子集中的每一个。

[0105] 本文引用的出版物及其中援引相关的材料都具体通过引用整体纳入本文。

[0106] 实施例

[0107] 提供以下实施例仅为说明而非限定。本领域技术人员不难发现有多项非关键参数可变或可修饰并得出基本相同或相似的结果。

[0108] 实施例I

[0109] 实施例I中所提供的数据按照下述方案所概述生成。

[0110] ●建立了临床方案/供体知情同意

[0111] ●使用SepMate以制造商的方案进行PBMC分离

[0112] ●使用EasySep以制造商的方案进行大量(Bulk)T细胞分离

[0113] ●使用Bambanker培养基以制造商的方案进行冷冻

[0114] ○2千万个细胞/mL

[0115] ●解冻

[0116] ○在解冻的细胞顶部添加1mL罗斯威尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)培养基(RPMI),然后合并并在培养基中洗涤

[0117] ○细胞在刺激前仅在培养基中静息过夜

- [0118] 原代T细胞培养
- [0119] ●培养基
- [0120] ○RPMI+10%FBS
- [0121] ○XVivo15+5%FBS;或
- [0122] ○Immunocult (无血清)
- [0123] ■能够用于在无血清环境中培养细胞
- [0124] ●刺激
- [0125] ○1:1CD3/CD28雌性Dyna珠 (Dynabead)
- [0126] ■可以使用0.25:1到上至2:1的比例
- [0127] ■电穿孔前去除磁珠可以提高效率
- [0128] ●细胞因子
- [0129] ■电穿孔前
- [0130] ■200U/mL的IL-2 (必需)
- [0131] ■5ng/mL的IL-7 (非必需)
- [0132] ■5ng/mL的IL-15 (非必需)
- [0133] ○电穿孔后
- [0134] ■500U/mL的IL-2 (必需)
- [0135] ●培养密度
- [0136] ○电穿孔前
- [0137] ■ 1×10^6 个细胞/mL培养基
- [0138] ●通常为,1mL注入24孔板中,30mL注入T75烧瓶中或70mL注入T175烧瓶中
- [0139] ○电穿孔后
- [0140] ■第0天-在200uL培养基中将 0.25×10^6 个电穿孔的细胞注入96孔圆形底板的1孔中
- [0141] ■第2天-孔中充满了100uL新鲜培养基 (电穿孔后细胞因子浓度为3倍)
- [0142] ■第4天-转移到具有新鲜细胞因子的48孔板中的500uL培养基中以进一步扩增,随后每2-3天分裂一次,以保持每毫升培养物约 1×10^6 个细胞,每次添加新鲜细胞因子
- [0143] RNP产生
- [0144] ●160uM crRNA与160uM tracrRNA以1:1混合
- [0145] ○以-80℃储存等分储液
- [0146] ■冻干的RNA重悬在含有150mM MgCl的Tris-HCL (7.4pH) 中
- [0147] ○crRNA和tracrRNA购自Dharmacon或IDT,来自相应制造商的tracrRNA始终与其crRNA一起使用
- [0148] ●在37℃下孵育30分钟
- [0149] ○产生80uM gRNA
- [0150] ●80uM gRNA与40uM Cas9以1:1混合
- [0151] ○轻拍侧壁混合管,直到Cas9沉淀溶解
- [0152] ●在37℃下孵育15分钟
- [0153] ○产生20uM RNP

- [0154] ●RNP可立即使用,使用前在4℃短暂存储,或在-80℃长期存储并在解冻后使用
- [0155] 同源介导的修复模板 (HDRT) 生产
- [0156] ●构建
- [0157] ○由PCR产物和GeneBlocks (IDT) 使用吉布森组装 (Gibson Assemblies) 构建HDRT序列以将包含5'和3'同源臂的最终HDRT和所需插入置于克隆载体中,用于进一步增殖
- [0158] ●生产
- [0159] ○线性dsDNA HDRT序列通过高输出PCR扩增 (Kapa Hotstart聚合酶) 产生
- [0160] ○PCR扩增子经将SPRI纯化并浓缩至4uL H2O/100uL PCR反应输入物的最终体积
- [0161] ○HDRT的浓度通过nanodrop以1:20稀释度分析
- [0162] ○通过凝胶电泳测定纯度
- [0163] 原代T细胞电穿孔
- [0164] ●电穿孔参数
- [0165] ○细胞数-1,000,000 (最低200,000或最高2,000,000将是有效的)
- [0166] ○细胞体积-20uL (此量可以在大约10μl和大约20μl之间变化)
- [0167] ■细胞以90G离心10分钟,吸出,并在即将电穿孔前重悬于电穿孔缓冲液中
- [0168] ○电穿孔缓冲液-P3
- [0169] ■替代缓冲液 (包括P2和OMEM) 也是有效的,但是具有不同的最佳脉冲编码
- [0170] ■缓冲液P2产生较高的活力,但效率较低,但是阳性细胞总数相似
- [0171] ■具有最佳脉冲编码的OMEM缓冲液 (E0155) 实现与具有最佳脉冲编码的P3相似的活力和效率
- [0172] ○RNP体积-约5uL (50pmol)
- [0173] ■最低1uL (20pmol) 且最高5uL (100pmol) 为有效的
- [0174] ■最佳RNP量随HDRT的量而变化,然而大约10:1的RNP与HDRT的示例性摩尔比为有效的
- [0175] ○HDRT体积-约1uL
- [0176] ■体积可在约0.5μL至约2uL之间变化
- [0177] ○HDRT总量-约5pmol
- [0178] ■更低和更高的量都是可能的,具有不同的效率
- [0179] ○总电穿孔体积-约24uL
- [0180] ○脉冲编码-EH115
- [0181] ■许多其他脉冲编码是可能的,但是已经证明EH115是最高效的●电穿孔方案
- [0182] ○首先,将HDRT等分到与96孔电穿孔板的孔相对应的96孔聚丙烯V型底板的孔中
- [0183] ○然后将指定的RNP类似地添加至96孔聚丙烯V型底板中
- [0184] ○将HDRT和RNP在室温下一起孵育5分钟
- [0185] ■短至30秒显示功效无差异
- [0186] ■重要的是在添加细胞之前一起孵育HDRT和RNP
- [0187] ○最后,将细胞重悬于电穿孔缓冲液中,并将20uL细胞添加到96孔聚丙烯V型底板的每个孔中,并通过已经存在于孔中的HDRT和RNP上下吹打三次进行混合
- [0188] ○将24uL细胞+RNP+HDRT混合物从各孔转移到96孔电穿孔板的相应孔中进行电穿

孔

[0189] ●电穿孔后处理

[0190] ○电穿孔后立即将80uL预热的培养基添加到电穿孔板的每个孔中

[0191] ○将平板在37℃孵育箱中孵育15分钟

[0192] ■未经电穿孔后孵育的效率稍低。孵育约15分钟-约60分钟有可能不会损失效率。

[0193] ○以上述密度将细胞从电穿孔板转移到培养板中

[0194] ■通常,将电穿孔板分成4个相同的96孔圆底板,其中预装了培养基和细胞因子。

[0195] 结果

[0196] 例如,通过使用PCR产生允许大插入大小(>1kb)的线性dsDNA构建体来制备较长DNA构建体将是有益的。这可以高通量完成,然而,直到本发明之前,这是不可能的,因为DNA的导入具有高毒性并导致大量细胞死亡。如图1所示,处于实现可行的编辑效率所必需的裸DNA浓度时,细胞活力非常低,因此该方法不可行。

[0197] 将长DNA模板与RNP复合拯救细胞活力

[0198] 当电穿孔导致大量细胞死亡的量的长dsDNA(质粒或线性dsDNA)时,发明人发现将DNA与RNP复合形成RNP-DNA模板复合物(电穿孔时在添加细胞之前通过短暂的室温孵育)减少活力损失。对于质粒模板(图2)和线性dsDNA模板(图3)都是如此。随着电穿孔DNA量的增加,RNP的量也增加,以保持活力(图3)。

[0199] 针对整合效率和活力的Cas9与DNA模板的比例

[0200] RNP与DNA模板约10:1的摩尔比在电穿孔后保持整合效率以及活力(图4)。然而,3:1-约100:1的比例也是有效的。使用RNP与DNA模板约10:1的比例平衡活力损失和效率的效果,并实现整合阳性细胞的最大数量(图5)。该比率还允许大模板(>750bp)的高效插入(图6)

[0201] dsDNA模板具有一些脱靶整合,其可以ssDNA模板减少

[0202] 插入长DNA模板可能导致少量脱靶整合(图7),这类似于使用AAV作为供体模板时观察到的脱靶整合。然而,本文提供的某些方法使用长ssDNA模板作为供体,这导致脱靶整合减少(图8)。

[0203] 使用Cas9切口酶防止脱靶dsDNA断裂

[0204] 除脱靶整合外,另一个问题是由Cas9所引入的脱靶dsDNA断裂(其可以通过NHEJ作为突变进行修复)。如本文所示,本文所公开的高效非病毒整合可以使用两种gRNA和Cas9切口酶(D10A)插入(图9),这防止了脱靶dsDNA断裂。

[0205] 实施例II

[0206] 分离人原代T细胞用于基因靶向

[0207] 由健康人供体中分离原代人T细胞是来自新鲜全血样品,来自TrimaApheresis(太平洋血液中心)后的白细胞减少(leukoreduction)腔室的残留物或白细胞分离术产品(干细胞公司(StemCell))。使用SepMate管(干细胞公司,按照制造商的说明)通过Ficoll离心从全血样品中分离外周血单核细胞(PBMC)。使用EasySep人T细胞分离试剂盒(干细胞公司,按照制造商的说明)通过磁性负选择由所有细胞来源的PBMC中分离出T细胞。除非另有说明,否则直接刺激和使用分离的T细胞(新鲜)。使用冷冻细胞时,将按照制造商说明在Bambanker冷冻培养基(斗牛犬生物公司(Bulldog Bio))中冷冻的先前分离的T细胞融化,

在没有刺激的培养基中培养1天,然后按照针对新鲜分离的样品所述进行刺激和处理。根据UCSF人类研究委员会 (CHR) 批准的方案,告知新鲜健康人类献血者知情同意。根据耶鲁大学内部审查委员会 (IRB) 批准的方案获得用于基因编辑的患者样品。

[0208] 原代T细胞培养

[0209] 除非另有说明,否则将大量T细胞在含有5%胎牛血清、50mM 2-巯基乙醇和10mM N-乙酰L-胱氨酸的XVivo15培养基(干细胞公司)中培养。在指定实验中使用无添加剂以及RPMI+10%FBS的无血清培养基(ImmunoCult XFT细胞扩增培养基,干细胞公司)(图15)。分离后,立即使用抗-人CD3/CD28磁性dyna珠(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))以1:1的珠粒与细胞浓度以及200U/mL的IL-2(UCSF药物公司(UCSF Pharmacy))、5ng/mL的IL-7(赛默飞世尔公司)和5ng/mL的IL-15(生命技术公司(Life Tech))的细胞因子混合物刺激T细胞2天。电穿孔后,将T细胞在含有500U/mL的IL-2的培养基中培养。整个培养过程中,T细胞的密度维持在每mL培养基1百万个细胞左右。电穿孔后每隔2-3天,添加额外的培养基,以及额外的新鲜IL-2,以使最终浓度达到500U/mL,并根据需要将细胞转移至更大的培养容器中,以保持100万个细胞/mL的密度。

[0210] RNP产生

[0211] 如前所述(7、16),通过将双组分gRNA退火至Cas9产生RNP。简言之,化学合成crRNA和tracrRNA(Dharmacon, IDT),并重组产生和纯化重组Cas9-NLS、D10A-NLS或dCas9-NLS(QB3 Macrolab)将冻干的RNA以160uM的浓度重悬于具有150mM KCl的Tris-HCL(7.4pH)中,并以等分试样储存在-80℃。解冻crRNA和tracrRNA等分试样,按体积1:1混合,并在37℃下孵育30分钟以形成80uM gRNA溶液。然后将以40uM存储在20mMHEPES-KOH pH 7.5、150mM KCl、10%甘油、1mM DTT中的重组Cas9及其变体与80uM的gRNA以1:1的体积(gRNA与Cas9摩尔比为2:1)在37℃下混合15分钟以形成20uM的RNP。RNP通常在复合后立即进行电穿孔。

[0212] dsDNA HDRT产生

[0213] 由PCR产物产生双链DNA HDRT序列。使用吉布森组装构建新型HDR序列以将HDR模板序列(由同源臂(通常由IDT合成为gBlock)和所需的插入(如GFP)组成)置入克隆载体中,用于进行序列确认和进一步的增殖。将这些质粒用作高输出PCR扩增(Kapa Hotstart聚合酶)的模板。PCR扩增子(dsDNA HDRT)经SPRI纯化(1.0X)并洗脱至3uL H2O/100uL PCR反应输入物的最终体积。通过分光光度计(nanodrop)以1:20的稀释度分析HDRT的浓度。通过凝胶电泳在1.0%琼脂糖凝胶中确认扩增的HDRT大小。

[0214] 通过外切核酸酶消化产生ssDNA HDRT

[0215] 为了产生长ssDNA作为HDR供体,经由使用常规未修饰的PCR引物以及第二磷酸化PCR引物的PCR扩增感兴趣的DNA。将使用磷酸化引物扩增的DNA链将会是使用方法降解的链。这允许使用相应的磷酸化PCR引物制备单链正义或单链反义DNA。为了产生感兴趣的ssDNA链,PCR产物的磷酸化链经由使用两种酶(链酶(Strandase)混合物A和链酶混合物B)的后续处理在37℃下处理5分钟(每1kb)降解。在80℃孵育5分钟使酶失活。将得到的ssDNA HDR模板进行SPRI纯化(1.0X)并在H2O中洗脱。可在制造商的网站上找到有关Guide-it™长ssDNA生产系统的更详细的方案(美国宝生物工程有限公司(Takara Bio USA, Inc.)目录号#632644)。

[0216] 通过逆转录合成产生ssDNA HDRT

[0217] 这样合成ssDNA供体,通过逆转录RNA中间体,然后水解所得的RNA:DNA杂交产物中的RNA链,如(28)中所述。简言之,首先将所需HDR供体克隆到T7启动子下游,并通过PCR扩增T7-HDR供体序列。使用HiScribe T7RNA聚合酶(新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs))通过体外转录合成RNA,并使用TGIRT-III(InGex)进行逆转录。逆转录后,分别添加NaOH和EDTA至0.2M和0.1M,并在95℃下进行10分钟的RNA水解。使用HCl淬灭反应,使用Ampure XP磁珠(贝克曼库尔特公司(BeckmanCoulter))纯化最终的ssDNA产物,并在无菌的无RNA酶H2O中洗脱。通过毛细管电泳(生物分析仪(Bioanalyzer),安捷伦(Agilent))分析ssDNA质量。

[0218] 原代T细胞电穿孔

[0219] 最初T细胞刺激后2天,对RNP和HDR模板进行电穿孔。T细胞从它们的培养容器中收获,并通过将细胞放在磁体上2分钟来去除磁性CD3/CD28dyna珠。进行电穿孔之前,立即将去珠化(de-beaded)的细胞以90g离心10分钟,吸取,并以20uL缓冲液/100万个细胞重悬于Lonza电穿孔缓冲液P3中。为了进行最佳编辑,使用具有脉冲编码EH115的Lonza 4D 96孔电穿孔系统对各孔的100个T细胞进行电穿孔。200,000至200万个细胞/孔的替代细胞浓度显示出较低的效率。按指示使用替代电穿孔缓冲液,但具有不同的最佳脉冲设置(OMEM缓冲液为E0155)。除非另有说明,否则将2.5uL的RNP(总共50pmol)与2uL的HDR模板以每次2ug/uL(总共4ug的HDR模板)一起电穿孔。

[0220] 细胞、RNP和HDRT的添加顺序似乎很重要(图10)。对于96孔实验,首先将HDRT等分到96孔聚丙烯V型底板的孔中。然后将RNP添加到HDRT中,并允许其在室温下一同孵育至少30秒。最后,添加重悬于电穿孔缓冲液中的细胞,通过吹打与HDRT和RNP短暂混合,然后将24uL的总体积(细胞+RNP+HDRT)转移到96孔电穿孔比色皿中。电穿孔后,立即将80uL预热培养基(无细胞因子)添加到各孔中,并将细胞在孵育箱中于37℃静置15分钟,同时保留在电穿孔比色皿中。15分钟后,将细胞移至最终培养容器中。

[0221] 流式细胞术

[0222] 在Attune NxT声学聚焦细胞计数器(赛默飞世尔公司)上进行流式细胞术分析。针对CD3-APC-eFluor 780(SK7,eBiosciences公司)、CD4-PerCP(SK3,Tonbo公司)、CD8-PE-Cy7(SK1,BD公司)、IL2RA/CD25-APC(BC96,Tonbo公司)进行表面染色。使用pStat5(Y694)-PacBlue(克隆47,BD公司)进行胞内磷酸化染色。使用FoxP3-AF488(206D,Biolegend公司)进行针对FoxP3的胞内细胞因子染色。

[0223] 共聚焦显微分析

[0224] 通过将10μl悬浮的活T细胞溶液滴注到3x1"显微镜载玻片上并放置25mm2盖玻片来制备样品。在垂直构型的Nikon A1r激光扫描共聚焦显微镜上进行成像。通过488nm OBIS激光(Coherent)实现激发。使用了长工作距离(LWD)60x Plan Apo 1.20NA水浸物镜,并通过NIS-Elements软件实现了附加的数字变焦。在启用了2x线平均的“Galvano”镜像设置(mirror setting)下获取图像,并将其导出为TIFF以待在FIJI(ImageJ,NIH)中进行分析。

[0225] CUT和RUN

[0226] 在电穿孔后11天和抗-CD3/抗-CD28珠再刺激后4天(未标记的细胞未经电穿孔),对表位经标记的原代人T细胞进行CUT&RUN。如通过流式细胞术在供体1和供体2样品中分别确定大约20%和10%的电穿孔细胞显示出GFP-BATF表达。如(18)所述,使用抗-GFP

(ab290)、抗-BATF (sc-100974) 和兔抗-小鼠 (ab46540) 抗体进行 CUT 和 RUN。简言之, 收集并洗涤了 600 万个细胞 (在含 GFP-BATF 的细胞中有 3000 万个抗-GFP CUT 和 RUN 的细胞)。分离细胞核, 并和第一抗体 (GFP 或 BATF) 在 4℃ 下旋转孵育 2 小时。将 BATF CUT 和 RUN 样品与兔抗-小鼠抗体再孵育一个小时。然后, 将核与蛋白 A-微球菌核酸酶 (由 Henikoff 实验室馈赠) 一起在 4℃ 温育 1 小时。将细胞核平衡至 0℃, 并允许进行 MN 酶消化 30 分钟。分离并纯化溶解的染色质 CUT 和 RUN 片段。制备配对末端的测序文库并在 Illumina Nextseq 机器上运行, 并按照 Skene 和 Henikoff, “用于高分辨率映射 DNA 结合位点的有效靶向核酸酶策略 (An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA bindingsites),” *Elife* 6 (2017) doi:10.7554/eLife.21856 中所述处理测序数据。对于峰值识别和热图生成, 将映射到着丝粒的读数过滤。

[0227] TLA 测序和分析

[0228] 如前所述, 通过 Cergentis 进行 TLA 测序¹⁶。相似地, 如前所述, 通过 Cergentis 对整合位点和转基因融合进行数据分析¹⁶。在两个健康供体中进行 TLA 测序, 各自用 dsDNA 或 ssDNA HDR 模板之一在 RAB11A 位点上编辑以整合 GFP 融合, 去除显示出引物二聚体或引物偏倚证据的测序读数 (即, 超过 99% 观察到的读数来自单个引物组)。

[0229] 体外 Treg 抑制试验

[0230] 使用 Easy Sep 人 CD4+T 细胞富集试剂盒 (干细胞科技公司 (STEMCELL Technologies)) 富集 CD4+T 细胞。通过流式细胞术对来自 IL2RA 缺陷型对象和 HD 的 CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg 富集的细胞以及来自 CD25+/- 个体的 CD3+CD4+CD25hiCD127lo Treg 进行分选。用 5μM 的 CellTrace CFSE (英杰公司 (Invitrogen)) 标记 CD3+CD4+CD25-CD127+ 应答 T 细胞 (Tresp)。在以 1 珠:1 个细胞比例载有抗-CD2、抗-CD3 和抗-CD28 (Treg 抑制性检测物 (Suppression Inspector); 美天旎生物技术公司 (Miltenyi Biotec)) 的珠存在的情况下, 以 1:1 的比例共培养 Treg 和 HD Tresp。在第 3.5 至 4.5 天, 通过 FACS 分析共培养物的 CFSE 稀释度。使用以下公式计算抑制百分比: 1- (含 Treg 的增殖 % / 不含 Treg 的经刺激的 Tresp 的增殖 %)。分选和 TSDR 分析校正的 Treg

[0231] 将来自健康对照和具有 IL2RA 复合杂合突变 (D6) 的患者的离体扩增的 Treg 和 T 效应细胞解冻并染色。根据 CD25 和 CD62L 标志物的表达将活细胞直接分选到补充有蛋白酶 K 的 Zymo Research M 消化缓冲液 (2x) (目录号 D5021-9) 中。将裂解液在 65℃ 孵育 2 小时以上, 然后冷冻。样品的亚硫酸氢盐转化和焦磷酸测序通过 EpigenDx (试验 ID ADS783-FS2) 进行, 以询问横跨距离 ATG 从 -2330 到 -2263 的 FOXP3 基因 9 个 CpG 位点内含子 1 的甲基化状态。

[0232] 杂合/纯合整合预测模型

[0233] 如果把将不同荧光蛋白整合到同一位点的两个 HDR 模板导入到细胞中 (电穿孔), 那么可以仅从荧光表型估算在单一常染色体基因组基因座 (两个潜在等位基因) 具有双等位基因插入的细胞百分比。一个简单的概率模型仅需要两个假设。

[0234] 假设 1: 除了有助于荧光表型的靶基因座以外, 在其他位点没有脱靶整合。

[0235] 假设 2: 特定第二荧光蛋白 (即, RFP) 的整合并不取决于细胞其他等位基因处整合了何种荧光蛋白 (即, 第一等位基因上的 GFP 或 RFP 整合同样有可能在第二等位基因上具有 RFP 整合)。

[0236] 按照图 26A-C 中的标记, 已知 4 种不同的表型群的百分比:

- [0237] ● %GFP⁻RFP⁻
- [0238] ● %GFP⁺RFP⁻
- [0239] ● %GFP⁻RFP⁺
- [0240] ● %GFP⁺RFP⁺
- [0241] 对此,立即知晓2种基因型:
- [0242] 1) 基因型A=NA/NA= %GFP⁻RFP⁻
- [0243] 2) 基因型E=GFP/RFP= %GFP⁺RFP⁺
- [0244] 其余的4种基因型合计为2种剩余的单一荧光阳性表型:
- [0245] 3) 基因型B+基因型D=GFP/NA+GFP/GFP= %GFP+RFP-
- [0246] 4) 基因型C+基因型F=RFP/NA+RFP/RFP= %GFP-RFP+
- [0247] 还由下述表型知晓RFP+细胞将有可能是GFP+细胞以及GFP+细胞将有可能是RFP+细胞的概率:
- [0248] 5) 给定为RFP+,成为GFP+的可能性= $P(\text{GFP} | \text{RFP}) = (\% \text{GFP+RFP+}) / (\% \text{RFP++ \% GFP+RFP+})$
- [0249] 6) 给定为GFP+,成为RFP+的可能性= $P(\text{RFP} | \text{GFP}) = (\% \text{GFP+RFP+}) / (\% \text{GFP++ \% GFP+RFP+})$
- [0250] 按照假设2,如果细胞在其第二等位基因处接受GFP整合的概率与第一整合是GFP还是RFP无关,那么可以确定单一阳性基因型之间的关系(图26):
- [0251] 7) $D = P(\text{GFP} | \text{RFP}) * B$
- [0252] 8) $F = P(\text{RFP} | \text{GFP}) * C$
- [0253] 将等式7和8分别插入等式3和4中,并按照已知表型简化求解剩余的基因型:
- [0254] 9) $B = \% \text{GFP+RFP-} / (1 + (\% \text{GFP+RFP+}) / (\% \text{RFP++ \% GFP+RFP+}))$
- [0255] 10) $C = \% \text{GFP-RFP+} / (1 + (\% \text{GFP+RFP+}) / (\% \text{GFP++ \% GFP+RFP+}))$
- [0256] 11) $D = \% \text{GFP+RFP--} B$
- [0257] 12) $F = \% \text{GFP-RFP+-} C$
- [0258] 根据已知的基因型,可以容易地计算出观测到具有单等位基因或双等位基因插入的细胞百分比以及其他统计数据:
- [0259] ● 观测到的杂合细胞% = B+C
- [0260] ● 观测到的纯合细胞% = D+E+F
- [0261] ● 观测到具有至少1个插入的细胞% = B+C+D+E+F = 1-A = 1- %GFP-RFP-
- [0262] ● 观测到具有GFP的等位基因% = (B+E+2D)/2
- [0263] ● 观测到具有RNP的等位基因% = (C+E+2F)/2
- [0264] ● 观测到具有插入的等位基因% = 等位基因_{GFP}% + 等位基因_{RFP}%
- [0265] 如果HDR等位基因是随机分布的(实质上处于Hardy-Weinberg平衡中),那么可以由观测到具有至少1个插入(HDR)的细胞百分比计算预期的纯合细胞%:
- [0266] ● p=HDR等位基因(GFP或RFP)
- [0267] ● q=非-HDR等位基因(NA)
- [0268] ● X=观测到具有至少1个HDR的细胞%
- [0269] 13) p+q=1

[0270] 14) $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

[0271] 由于具有HDR (GFP或RFP) 等位基因的任何细胞都将显示出表型 (在这种情况下为GFP+或RFP+) :

[0272] 15) $X = p^2 + 2pq$

[0273] 将X代入公式14并简化:

[0274] 16) $q = (1 - X)^{1/2}$

[0275] 17) $p = 1 - q$

[0276] 18) $p = 1 - (1 - X)^{1/2}$

[0277] 如果HDR模板插入在靶等位基因中是随机的,那么 p^2 将给出预期的HDR整合纯合细胞百分比:

[0278] 19) $p^2 = 2 - 2(1 - X)^{1/2} - X$

[0279] 因为X是已知的,可以直接由观测到具有至少一个HDR的全部细胞%直接计算出预期的纯合细胞%,然后可以通过考虑两个独立荧光团的整合所提供的信息来比较观测到的纯合细胞%。

[0280] 患有自身免疫/免疫调节异常的家族的临床病史

[0281] 该先证者是这样的高加索人婴儿,其在15周龄时入院,出现呕吐、易激怒(fussiness)和呼吸急促后进行医学评估,发现严重的糖尿病酮症酸中毒和920mg/dL的血清葡萄糖水平。诊断后1周,针对GAD65、IA-2和胰岛素自身抗体的检测为呈阴性;然而,当在三个不同实验室于5-7月龄时进行的重复抗体测试时显示出针对IA-2和胰岛素自身抗体的阳性结果以及在两个实验室中非常高水平的GAD65抗体[在Mayo实验室为42.8nmol/L (<0.02)和在BarbaraDavis中心为896IU/mL (0.0-5.0)]时,确认了自身免疫性糖尿病。甲状腺功能障碍和乳糜泻的检测结果为阴性,但IgA水平较低表明部分IgA缺乏。重复C肽测试,完全检测不到,包括在7月龄时在喂食后90分钟测量时候,血清葡萄糖水平为202mg/dL,在此时也无法检测到胰岛素原。在最初DKA用静脉内注射胰岛素治疗后,他在每天多次皮下注射胰岛素(甘精胰岛素和赖脯胰岛素)后出院,随后转为使用连续葡萄糖监测的胰岛素泵。他一直需要高替代剂量的胰岛素,范围为0.8-0.9单位/千克/天(7月龄时为基础的48%)。他在妊娠37周时通过剖腹产接生,出生体重为3.629千克(75%),没有任何并发症,并且也没有对其发育进展的担忧,否则他的病史也并不明显。他的父母有着不同的高加索人血统,并否认了血缘关系。

[0282] 表1提供了有关家族成员的临床信息。更详细的信息如下:

[0283] 1. 母亲 (37) :

[0284] a. 儿童时患肺炎-解释为病毒性

[0285] b. 儿童时患有耳感染,接受抗生素治疗

[0286] c. 牙齿问题(可能与抗生素有关)

[0287] d. 她的父亲在其30多岁时患胰岛素依赖型糖尿病。他具有低白细胞其还有头皮疹状皮肤炎。

[0288] e. 她母亲患有狼疮

[0289] 2. 父亲 (44)

[0290] a. 摩洛哥血统

- [0291] b.没有重大的医学问题
- [0292] c.存在这样的一些担忧,其对常见病毒感染的应答时间可能延长
- [0293] 3.受影响的儿童(14):
- [0294] a.免疫性血小板减少性紫癜:(+抗-血小板抗体)。
- [0295] b.中性粒细胞减少症(抗-中性粒细胞抗体)
- [0296] c.自身免疫性溶血性贫血(DAT+,即,直接Coombs+)
- [0297] d.头皮核状皮炎
- [0298] e.高细胞骨髓:CD4/CD8比率倒置(0.36)。
- [0299] f.口腔溃疡
- [0300] g.用管子治疗耳感染
- [0301] h.儿童时患有腹泻
- [0302] i.46XX-没有已知的染色体异常
- [0303] j.外周血流式细胞术:82.7%的CD45+细胞是CD3+,而5.9%的是CD19
- [0304] +。CD19+CD5+细胞是缺陷型B细胞。43.6%的CD45+细胞是CD8
- [0305] +,其CD4/CD8比率倒置(0.6)。TCR($\alpha\beta$)+CD3+CD4-CD8-T淋巴细胞相对增加(26%的TCR $\alpha\beta$ +CD3+细胞和5%的CD45+白细胞)。
- [0306] k.已使用免疫抑制治疗,包括泼尼松(prednisone)(20mg),IgG-前-IgA,Flonase鼻喷雾剂和局部类固醇和Symbicort。也用Neupogen治疗。
- [0307] 4.受影响的儿童
- [0308] a.3+糖尿病自身抗体(抗GAD,MIAA,ICA,阴性ZnT8和ICA512/IA-2)
- [0309] 正常OGTT
- [0310] b.1岁时用管子治疗耳感染
- [0311] c.冬季湿疹
- [0312] 5.未受影响的女儿(15)
- [0313] a.过敏,但健康
- [0314] 6.受影响的儿子(4)
- [0315] a.冬季湿疹
- [0316] b.HSV阳性测试
- [0317] c.出生后1年内患胰岛素依赖型糖尿病,入院时C肽<0.1,dx后1年抗-GADab+(>30(nl<1U/ml),但在dx时为阴性,dx后1年ICA512 Ab+(1.3(nl<1.0))),但在dx时为阴性。
- [0318] (1.3(nl<1.0))),但在dx时为阴性。
- [0319] 7.未受影响的女儿(9)
- [0320] a.哮喘
- [0321] 遗传测试以鉴定IL2RA突变
- [0322] 使用已知涉及糖尿病单基因形式的超过40个基因的内部靶向的下一代测序多基因组进行的先证者(proband)初步基因测试为阴性。在先证者和父母三者中进行的后续外显子组测序揭示了IL2RA基因中的致病复合杂合突变。两个同胞仅携带一个突变,但具有两个突变的另外两个同胞具有自身免疫性的证据:发现一个年龄较大的男性同胞(为4岁或5岁)在没有高血糖的情况下,具有阳性糖尿病自身抗体,而一个较大的女性同胞在11岁时诊

断患有自身免疫介导的全血细胞减少症。在3个复合杂合儿童中,CD25表达显著降低。

[0323] IL2RA患者的临床表型

[0324] CD25缺陷型儿童T细胞上的IL2-Ra细胞表面表达几乎完全丧失,因此在他们的血液中几乎没有可检测到的CD3+CD4+CD25hiCD127lo Treg,而携带杂合IL2RA突变的家庭亲属在其Treg上显示出CD25表达降低(图34)。然而,CD25缺陷型对象中的CD3+CD4+CD127loFOXP3+T细胞频率与HD和CD25+/-个体频率相似,因此表明Treg可能在没有IL2-Ra功能的情况下发育(图34)。使用策略分离不具有CD25表达的Treg,我们发现相较于HD对应物,来自CD25缺陷型对象的CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg富集的细胞显示出抑制应答性T细胞(Tresp)增殖的能力缺陷(图34)。相反,来自具有单一杂合IL2RA突变的亲属的Treg可以抑制Tresp增殖,尽管其能力次优(图34)。因此,校正来自这些患者FOXP3+T细胞表面上的功能性IL2-Ra表达可能提供了用于开发离体基因治疗的重要方法。

[0325] 结果

[0326] 人T细胞可以纯化自血液,经离体工程改造,然后通过自体移植返回至循环。研发了经工程改造的T细胞以治疗癌症和传染性疾病(Fesnak等“经工程改造的T细胞:癌症免疫疗法的前景和挑战(Engineered T cells:the promise and challenges of cancer immunotherapy),”Nat.Rev.Cancer 16,566-581(2016);和Esensten等“工程改造治疗性T细胞:从合成生物学到临床试验(Engineering Therapeutic T Cells:From Synthetic Biology to Clinical Trials),”Annu.Rev.Pathol.12,305-330(2017))。

[0327] 这些基于细胞的治疗取决于对T细胞进行遗传重编程的能力,例如,以增强它们识别和攻击特定抗原的能力(Roybal等“合成免疫学:入侵免疫细胞以扩大其治疗能力(Synthetic Immunology:Hacking Immune Cells to Expand Their Therapeutic Capabilities),”Annu.Rev.Immunol.35,229-253(2017))。开发这样的基于细胞的疗法用于自身免疫疾病和器官移植,所述基于细胞的疗法涉及设计成抑制炎症的经修饰的效应T细胞(Treg)(Bluestone等“使用多克隆调节T细胞的1型糖尿病免疫疗法(Type 1diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells,)”Sci.Transl.Med.7,315ra189(2015))。

[0328] 已经使用多种方法来修饰原代人T细胞的基因组。可以使用慢病毒载体插入长DNA序列(多个千碱基),但整合位点是非靶向的(Verhoeyen等,述于《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology)(2009年),第97-114页)。慢病毒是导入基因构建体(例如嵌合抗原受体(CAR))的主要手段(Kalos等,“具有嵌合抗原受体的T细胞具有强大的抗肿瘤作用并可以在晚期白血病患者中建立记忆性(T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumoreffects and can establish memory in patients with advanced leukemia)”Sci.Transl.Med.3,95ra73(2011))。为了敲除特定内源性基因,可以将序列特异性核酸酶,如Cas9,TALEN或锌指核酸酶(ZFN),电穿孔到产生双链断裂的T细胞中(Schumann等,“使用Cas9核糖核蛋白生成敲入的原代人类T细胞(Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins,)”Proceedings of the National Academy of Sciences.112,10437-10442(2015);和Perez等“通过锌指核酸酶的基因组编辑在CD4+T细胞中建立HIV-1抗性(Establishment of HIV-1resistance in CD4+T cells bygenome editing using zinc-finger nucleases),”Nat.Biotechnol.26,

808-816(2008)),所述双链断裂通过非同源末端连接(NHEJ)导致插入和缺失突变的非随机光谱(van Overbeek等,“DNA修复概况揭示Cas9介导的断裂处的非随机结果(DNA Repair Profiling Reveals Nonrandom Outcomes at Cas9-Mediated Breaks),”Mol.Cell.63, 633-646(2016)。已经使用小(<200bp)化学合成ssDNA寡核苷酸(ssODN)的共递送以经由同源介导的修复对短DNA序列进行修饰,所述ssODN与侧接特定核酸酶切割位点的序列具有同源性(Schumann等(2015))。

[0329] 长得多的DNA序列的靶向整合将使更多的应用成为可能。最近,这通过这样实现,对序列特异性核酸酶进行电穿孔,然后用含有HDR模板的整合酶缺陷型腺相关载体(AAV)进行感染(Sather等,“在原代人造血细胞中使用megaTAL核酸酶和AAV供体模板高效修饰CCR5 (Efficient modification of CCR5 in primary human hematopoietic cells using a megaTAL nuclease and AAV donor template),”Sci.Transl.Med.7,307ra156(2015);和Hubbard等“靶向基因编辑恢复X连锁的Hyper-IgM综合征中的CD40L调节功能(Targeted gene editing restores regulated CD40L function in X-linked hyper-IgM syndrome).”Blood 127,2513-2522(2016))。这种电穿孔和感染方法已产生了新型治疗性T细胞工程改造策略(Eyquem等,“使用CRISPR/Cas9将CAR靶向TRAC基因座增加肿瘤排斥(Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection),”Nature 543,113-117(2017)),但会导致脱靶整合,可能导致潜在不需要的病毒感染,并且因为病毒制备中的挑战而在通量中受限。

[0330] 测试细胞培养条件、Cas9 RNP和HDR模板的浓度以及电穿孔参数以开发用于高效非病毒基因组靶向的方法。确定可以将高浓度的Cas9 RNP和长DNA模板(>1Kb)共递送到原代人T细胞的多个基因座中且对细胞活力影响有限的条件。

[0331] 非病毒靶向可用于校正导致Treg功能障碍和单基因自身免疫性疾病的致病突变。本文描述了这样的家庭,其中两个孩子已发展出早期发作的自身免疫性疾病,而第三个孩子具有表明非常高风险1型糖尿病(T1D)的自身抗体,并通过外显子组测序鉴定了IL2RA中的因果功能丧失突变。IL2RA对于调节T细胞功能和免疫稳态至关重要。使用本文所提供的非病毒CRISPR基因组靶向方法,实现了高效突变校正,其恢复了IL2RA的细胞表面表达以及功能性下游信号传导。原代人类免疫细胞中的非病毒基因组靶向将能够功能性研究和校正来自患者的细胞中的突变。结合改善的基因靶向(非病毒模板,高效率和特异性,以及长靶向构建体)的细胞疗法有望为自身免疫疾病以及免疫缺陷症、传染性疾病、器官移植和癌症免疫疗法的治疗提供巨大的希望。

[0332] 非病毒人T细胞基因组靶向的开发

[0333] 人T细胞中基因组靶向的主要局限性在于DNA传递会导致细胞死亡(Cornu等,“基因组编辑到临床的改良策略(Refining strategies to translate genome editing to the clinic),”Nat.Med.23,415-423(2017))。虽然导入短单链寡聚脱氧核苷酸(ssODN)HDR模板不会导致T细胞中显著的活力丧失,但是较大的线性dsDNA模板却导致了广泛的毒性(Y.Zhao等,“使用RNA电穿孔高效转染原代人小鼠T淋巴细胞(High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation),”Mol.Ther.13,151-159(2006);和Hornung等“胞内DNA识别(Intracellular DNA recognition),”I10,123-130(2010))。

[0334] 如本文所示,当使用CRISPR-Cas9核糖核酸蛋白(Cas9 RNP)共电穿孔时,长(>1kb)线性dsDNA模板毒性较低(图10)。这表明共同递送Cas9 RNP和长dsDNA的适当混合物能够进行HDR并保持细胞活力。

[0335] 在原代人T细胞中优化非病毒基因组靶向。针对靶标整合的效率、细胞活力以及整合阳性细胞的总数调整方案(图11A和图12)Cas9 RNP与dsDNA HDR模板一起进行了电穿孔,所述dsDNA HDR模板旨在向管家基因RAB11A导入N末端GFP融合(图11B)。电穿孔后3-5天进行高通量流式细胞术,以监测整合和细胞活力。首先,鉴定电穿孔前和后显著增加基因靶向率的刺激和细胞因子处理(图11C以及图13和14)。这些条件允许高效靶向分离自各种来源的新鲜或冷冻原代T细胞(图15)。在这些经充分刺激的T细胞中以不同的量测试各种比例的Cas9 RNP和HDR模板浓度(图11D和图16),并鉴定能够实现高效基因靶向的合适浓度。最后,测试了电穿孔条件以使基因靶向最大化,同时保持高水平的细胞活力(图11E和图17)。非病毒基因靶向可以在原代人CD4⁺和CD8⁺T细胞中50%以上的细胞中实现将GFP融合体导入内源性RAB11A管家基因(图11F)。

[0336] 快速和组合的基因靶向应用

[0337] 本文所提供的方法在基因组位点和人血液供体中非病毒基因靶向应用的简便性和速度(图18和图12)。编码具有同源侧接序列的GFP-融合体的构建体高效且可重复地靶向整个基因组中的多个位点(图18A和图19)。这些靶向的GFP融合体标记各种亚细胞结构(Leonetti等“内源性人蛋白质高通量GFP标记的可扩展策略(A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins),”*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*113,E3501-8(2016))。共聚焦显微镜确认了通过靶向多种基因而产生的融合蛋白的特异性,并且还证明了用GFP靶向内源基因能够对存活的人T细胞中的蛋白质定位进行成像(图18B)。在来自数十个健康人供体组的细胞中,靶向GFP整合到多种基因中证明了原代人T细胞中具有很高的重现性(图19和20)通过用GFP标记内源编码的CD4表面受体,进一步证实了靶向整合的特异性以及标记基因的细胞类型特异性表达模式。在标记的CD4⁺T细胞中,而不在CD8⁺T细胞中特异性地观测到CD4和GFP表达之间的线性关系(图18C)。综上所述,这些发现确立了非病毒基因组靶向可以用于通过将大DNA序列插入基因组中的靶向位点来修饰内源基因。

[0338] 融合标签不仅允许对内源性蛋白进行成像,而且还可以用于特定蛋白的生化靶向。例如,ChIP-Seq,以及最近的CUT和RUN(Skene和Henikoff,“DNA结合位点高分辨率映射的有效靶向核酸酶方案(An efficient targeted nuclease strategy for high resolution mapping of DNA binding sites),”*Elife* 6(2017),doi:10.7554/eLife.21856),广泛地用于映射转录因子结合位点;然而,这些试验常常受限于有效和特异性抗体的可用性。作为原理的证明,将抗-GFP抗体用于在原代T细胞中进行CUT和RUN,其中靶向编码BATF(一种关键TF)的内源性基因以生成GFP融合体。用抗-GFP CUT和RUN鉴定的结合位点与用抗-BATF抗体鉴定的位点紧密匹配(图18D和图21)。

[0339] 用两种不同的荧光团靶向同一基因的两个等位基因将提供一种量化和富集具有双等位基因修饰的细胞的方法。将靶向RAB11A基因相同位点的两种不同荧光蛋白(图22A和图23)导入并证明>5%的细胞具有成功的双等位基因整合。重要的是,表达两种荧光蛋白的细胞数量低估了具有双等位基因整合的细胞的百分比,因为一些细胞将在两个等位基因上

接受GFP或mCherry。构建模型以说明相同荧光蛋白的纯合整合(图22B,图23)。该模型估计在多达约10%的细胞中的RAB11A基因中存在双等位基因整合。这表明具有一个RAB11A整合的细胞也更有可能会经历了第二靶向整合,并且在三个基因组基因座中都观察到了这种作用(图23)。靶向RAB11A基因座的三个荧光标签的共同递送表明,非常低比例的细胞表达所有三个荧光团,这与这些实验中低比例的脱靶整合相一致(图23G)。总之,使用多个非病毒构建体来靶向相同的基因座允许鉴定人T细胞中的双等位基因组编辑。

[0340] 多重编辑基因组位点组合集将提供扩展的研究和治疗应用。测试了多个非病毒HDR模板是否可以与多个RNP共递送,以生成具有一个以上经修饰的基因座的原代细胞。已经发现,不仅可以进行多重基因靶向(图22C),而且还可以通过对具有一种修饰的细胞进行门选来富集具有两种修饰的细胞(图22D和图24)(Agudelo等,“无标记共选择用于人细胞中CRISPR驱动的基因组编辑(Marker-free coselection for CRISPR-driven genome editing in human cells),”*Nat.Methods.*14,615-620(2017))。还实现了三基因靶向,并且可以通过对具有两个靶向插入的细胞进行门选显著富集具有第三修饰的细胞(图22E和图24)。总之,非病毒基因靶向可用于实现原代T细胞的复杂遗传修饰,从而可用于多种研究和治疗应用。

[0341] D10A切口酶和ssDNA HDR模板减少脱靶整合。

[0342] 使用HDR模板,尤其是对于治疗应用的主要问题之一是脱靶整合的潜力。即使将整合酶缺陷型AAV用作供体模板,也已观察到这一点(Dever等,“人类造血干细胞中的CRISPR/Cas9 β -珠蛋白基因靶向(CRISPR/Cas9 β -globingene targeting in human haematopoietic stem cells),”*Nature* 539,384-389(2016))。本文发现了使用线性dsDNA模板进行非病毒基因靶向的功能性脱靶整合的类似证据。双链DNA模板可以HDR独立性方式整合在天然存在的dsDNA断裂位点处(Murnane et al.“Recombination events during integration of transduced DNA into normal human cells,”*Nucleic Acids Res.*18, 2733-2738(1990)),以及靶向的核酸酶如Cas9所诱导的特定dsDNA断裂处,这种作用称为同源依赖性靶向整合((Auer等“斑马鱼中通过同源非依赖性DNA修复进行的高效CRISPR/Cas9介导的敲入(Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair),”*Genome Res.*24,142-153(2014);和Suzuki等“通过CRISPR/Cas9介导的同源非依赖性靶向整合进行体内基因组编辑(In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration),”*Nature* 540,144-149(2016))。寻找了使用N端GFP-RAB11A融合构建体进行的非预期非同源整合,所述N端GFP-RAB11A融合构建体在其5'同源臂内包含内源性RAB11A启动子序列,该构建体可以驱动脱靶整合位点处的GFP表达(图25A和图26)。已经发现,功能性脱靶整合存在于来自不同生物供体的细胞中(图25B),并在使用不同靶序列和HDR模板的实验中观察到(图26和27)。脱靶整合必须在注定用于治疗用途的细胞中最小化,以确保整合的序列保持在适当的内源性调节之下,并且脱靶位点不会被破坏。

[0343] 为了减少脱靶Cas9切割所导致的脱靶整合,使用D10A Cas9切口酶变体进行了非病毒基因靶向。该变体要求两个gRNA紧密结合和切割以产生双链断裂,从而减少脱靶dsDNA断裂的数量(Miyaoka等,“HDR和NHEJ的系统定量揭示了基因组编辑中的基因座、核酸酶和细胞类型(Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus,

nuclease, and cell type ongenome-editing),”*Sci.Rep.*6 (2016), doi:10.1038/srep23549; Vriend等, “Cas9诱导的双链断裂、缺口和成对缺口的同源重组修复的不同遗传控制 (Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks),” *Nucleic Acids Res.*44, 5204-5217 (2016); 和 Bothmer等, “内源基因座上DNA修复与CRISPR/Cas9诱导的DNA损伤之间相互作用的特征 (Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus),” *Nat. Commun.*8, 13905 (2017)。测试了RAB11A基因座上针对GFP整合的一系列gRNA组合, 当使用D10切口酶时, 发现了显示高效GFP导入的一组“PAM-Out”向导(图28)。如所预期, 相较于Cas9, 将D10A与单一脱靶向导一起使用显示出功能性脱靶整合的显著降低, 这与使用无核酸酶能力的dCas9时所见的水平相当(图25C)。

[0344] 即使使用D10A切口酶, dsDNA HDR模板仍会引起罕见但是可观察到的脱靶整合(相较于与没有Cas9核酸酶的情况下观察到的比例), 可能位于天然存在的dsDNA断裂处(图25A和C)。有理由认为, 可以通过将dsDNA HDR模板用长ssDNA HDR模板替换来消除剩余的脱靶整合, 所述长ssDNA HDR模板不可以在双链断裂处进行非特异性整合(Quadros等, “Easi-CRISPR: 用于使用长ssDNA供体和CRISPR核糖核蛋白一步生成携带条件和插入等位基因的小鼠的一种稳健方法 (Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins),” *Genome Biol.*18, 92 (2017); 和 Leonetti等 <http://www.biorxiv.org/content/early/2017/08/21/178905>)。

[0345] 为了测试这一假设, 使用两种方法生成了ssDNA HDR模板, 这些模板产生了电穿孔所需的大量长ssDNA(图35)。ssDNA HDR模板将功能性脱靶整合减少了约100倍, 同时保持了高效的靶上整合(图25D)。可以将D10A Cas9切口酶与ssDNA模板一起使用。在这些实验中, 尽管降低了靶整合率, 但将非特异性整合降至没有模板情况下观察到的背景水平(图25E和F)。对于需要关注潜在脱靶活性的位点, 可以采用D10A Cas9切口酶和ssDNA HDR模板来降低由脱靶诱导的双链断裂和天然断裂分别所引起的整合率, 这可能使其成为用于治疗性修饰患者T细胞的一种有吸引力的方法。

[0346] 通过非病毒基因靶向的治疗性突变校正。

[0347] 人们一直致力于应用非病毒基因靶向来校正导致患者T细胞单基因免疫失调的突变。鉴定了这样的单基因原代免疫失调家族, 其患有由编码IL-2 α 受体(IL2RA)的基因(也称为CD25)的隐性功能丧失突变所引起的自身免疫疾病(Sharfe等“由于白细胞介素2受体 α 链的突变所导致的人免疫 (Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*94, 3168-3171 (1997); Caudy等“CD25缺陷导致免疫失调, 多内分泌病, 肠病, X连锁样综合症、失效和CD4淋巴细胞的缺陷型表达 (CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes),” *J. Allergy Clin. Immunol.*119, 482-487 (2007); 和 Goudy等, “人IL2RA空突变介导淋巴组织增殖和自身免疫的免疫缺陷 (Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and

autoimmunity),”Clin.Immunol.146,248-261(2013))。IL2RA对于Treg和免疫稳态必不可少(Sakaguchi等“由表达IL-2受体 α -链(CD25)的活化T细胞维持的免疫自我耐受性,破坏自我耐受的单一机制导致各种自身免疫疾病(Immunologic self-tolerance maintained by activated T cellsexpressing IL-2receptor alpha-chains(CD25).Breakdown of a single mechanismof self-tolerance causes various autoimmune diseases),”J.Immunol.155,1151-1164(1995);和Rudensky等.“调节性T细胞和Toxp3(Regulatory T cellsand Foxp3),”Immunol.Rev.241,260-268(2011)),并且在具有两个功能丧失突变的复合杂合体的家族中的儿童具有多效性自身免疫表现(表1)。一个受新生1型糖尿病(T1D)的影响,而另一个在童年发展出顽固的自身免疫性血细胞减少症。所有三个IL2RA缺陷型家族成员均表现出病理性血清自身抗体。IL2RA缺陷型儿童的IL2RA细胞表面表达几乎完全丧失,因此在他们的血液中几乎没有可检测到的CD3+CD4+CD25hiCD127lo Treg,而携带杂合IL2RA突变的家庭亲属在其Treg上显示出IL2RA表达降低(图30)。然而,IL2RA缺陷型对象中的CD3+CD4+CD127loFOXP3+T细胞的频率类似于健康供体(HD)和杂合体家族成员的频率,这表明尽管存在IL2RA突变,Treg样细胞仍会发育并持续存在。使用策略分离不具有CD25表达的Treg,我们发现相较于HD对应物,来自CD25缺陷型对象的CD3+CD4+CD127loCD45RO+TIGIT+Treg富集的细胞显示出抑制应答性T细胞(Tresp)增殖的能力缺陷(图29)。相反,来自具有单一杂合IL2RA突变的亲属的Treg可以抑制Tresp增殖,尽管其能力次优(图29)。因此,校正来自这些患者FOXP3+T细胞表面上的功能性IL2RA表达可能提供了用于开发离体基因治疗的重要方法。

[0348] 表1

[0349]

患者	性别	IL-2RA 突变状态	自身免疫疾病表型	临床史	自身抗体
c.530 杂合体 1 (母亲)	F	c.530 A> G /WT	无	童年患耳感染	无
c.530 杂合体 1 (父亲)	M	c.800delA /WT	无	无医学问题	无
c.800 杂合体 2	F	c.800delA /WT	无	过敏	无
c.800 杂合体 3	F	c.800delA /WT	无	无医学问题	无
复合杂合体 1	M	c.530 A>G/c.800del A	1 型糖尿病	1 年龄中患胰岛素依赖性糖尿病	抗-GAD, ICA512
复合杂合体 2	M	c.530 A>G/c.800del A	糖尿病自身抗体	耳感染; 湿疹	抗-GAD, MIAA, ICA
复合杂合体 3	F	c.530 A>G/c.800del A	免疫性血小板减少性紫癜; 自身免疫性中性粒细胞减少症	耳感染; 溶血性贫血; 疹状皮炎; 高细胞骨髓, CD4/CD8 比率倒置; 口腔溃疡	抗-血小板

[0350] 整个外显子组测序表明,IL2RA缺陷型儿童在IL2RA中具有复合杂合体突变(图30A和图31)。c.530A>G处的一个突变产生一个提早终止密码子。细胞培养和电穿孔方法的改进使得使用约120bp化学合成的ssDNA HDR模板高效纠正突变成为可能(图32)。使用更长的

dsDNA模板的比率更高(图30B和图32和33)。校正后的患者源性T细胞在其表面表达IL2RA。虽然在所有三个同胞中校正成功,但是在复合杂合体3中观察到了较低比例的IL2RA表达,这可能是由于与患者疾病相关的细胞状态改变或她是唯一接受免疫抑制治疗的同胞的事实(表1和图34)。第二突变c.800delA导致最终IL2RA外显子阅读框中的移码,这导致误读最终外显子中编码的基因的部分,以及超过正常终止密码子的错误连续翻译。即使没有HDR模板,也可以改善这种移码(图33)。在该位点,仅由Cas9 RNP所引起的基因组切割就足以导致高效的IL2RA细胞表面表达,可能通过恢复具有插入/缺失突变的正确框架来实现(图33)。综上所述,这些数据表明了如何在患者T细胞中利用HDR模板依赖性和非HDR模板依赖性修复机制校正独特突变。

[0351] 针对来自该家族具有单基因Treg缺陷的患者的一种潜在的治疗策略是离体T细胞基因校正,然后输注自体校正的Treg。通过靶向校正产生的Treg细胞可以限制造血干细胞移植的某些潜在风险。测试了对IL2RA突变之一进行校正是否导致产生有效信号转导,以及是否在有意义的FOXP3+Treg的部分中发生了校正。校正c.530A>G突变后,细胞能够通过高亲和力IL-2受体IL2RA功能性地发出信号。响应IL-2处理,修饰的细胞显示出STAT5磷酸化增加,这是有效信号转导的标志(图31C以及图33和34)。此外,流式细胞术确认部分经IL2RA校正的细胞表达了FOXP3,FOXP3是Treg中的关键转录因子(图30D和图32和33)。

[0352] 编码IL2RA的内源性基因在受组成超级增强子(super-enhancer)的多个顺式调节原件的严格控制下(Farh等,“因果自体免疫疾病变体的遗传和表观遗传精细定位(Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants),”*Nature* 518,337-343(2015);和Simeonov等“发现具有无偏倚的CRISPR激活的刺激反应性免疫增强剂(Discovery of Stimulation-Responsive Immune Enhancers with Unbiased CRISPR Activation),”*Nature* 549(7670):111-115(2017))。因此,IL2RA的治疗性校正可能取决于基因在其内源性基因组基因座中的特异性修复。鉴于使用Cas9和dsDNA的GFP插入表明dsDNA的非特异性整合的潜力,我们使用D10A Cas9切口酶和长ssDNA模板特异性修复c.530A>G患者突变。使用这些试剂有可能特异性和选择性地校正来自患者约20%的T细胞中的突变基因(图30E)。

[0353] 非病毒基因靶向能够将限定序列高效插入整个原代人T细胞基因组中。这些插入可以包括从导入或校正单碱基对突变到整合内源性基因座处大功能性序列和标签的范围,并且有可能进行整个基因组的多重整合。对于工程改造的T细胞的治疗应用,可以通过使用D10A Cas9切口酶和ssDNA HDR模板显著减少脱靶整合。本文提供的方法和结果将加快工程改造的T细胞疗法以及遗传性疾病的治疗的开发。

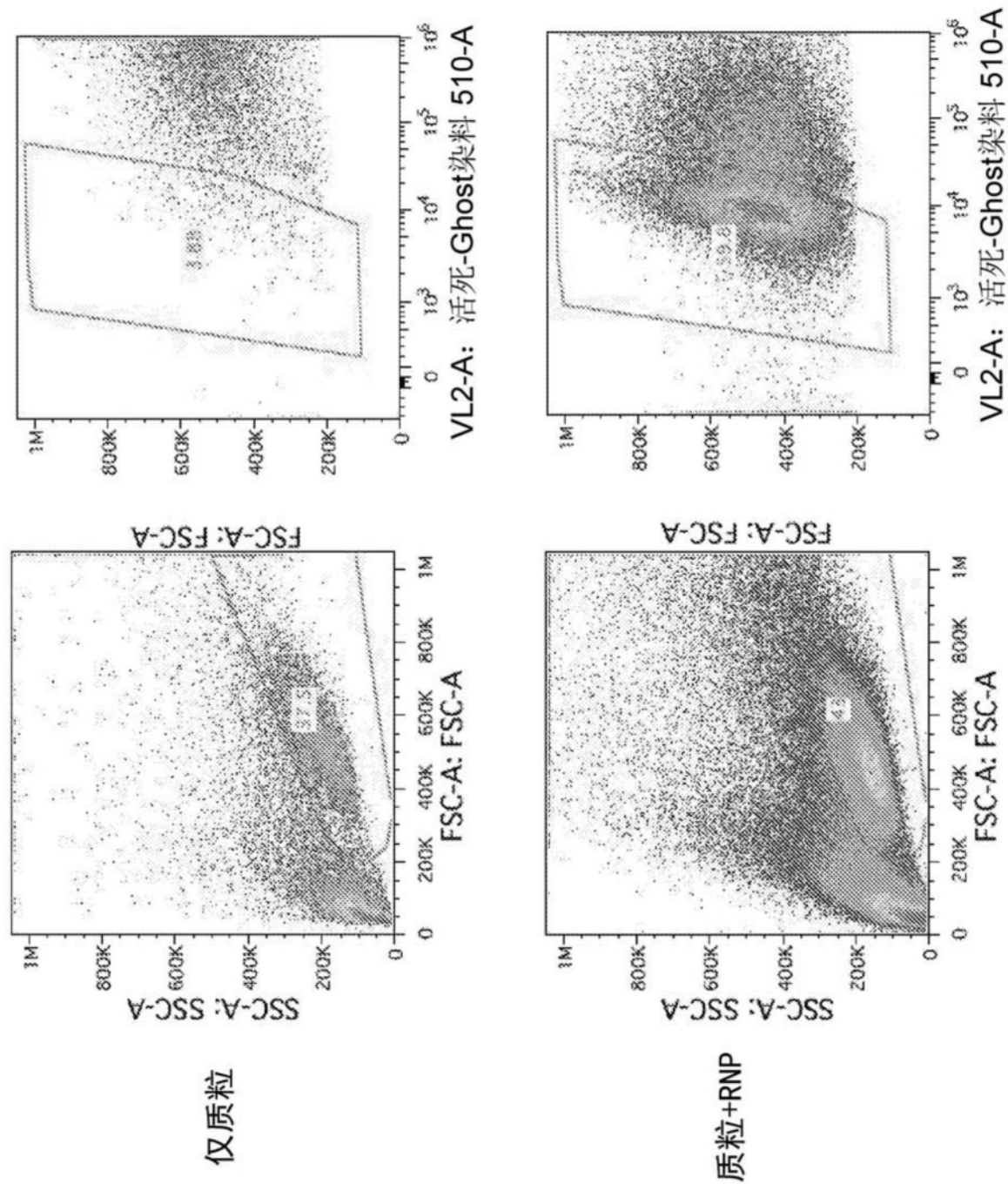


图1

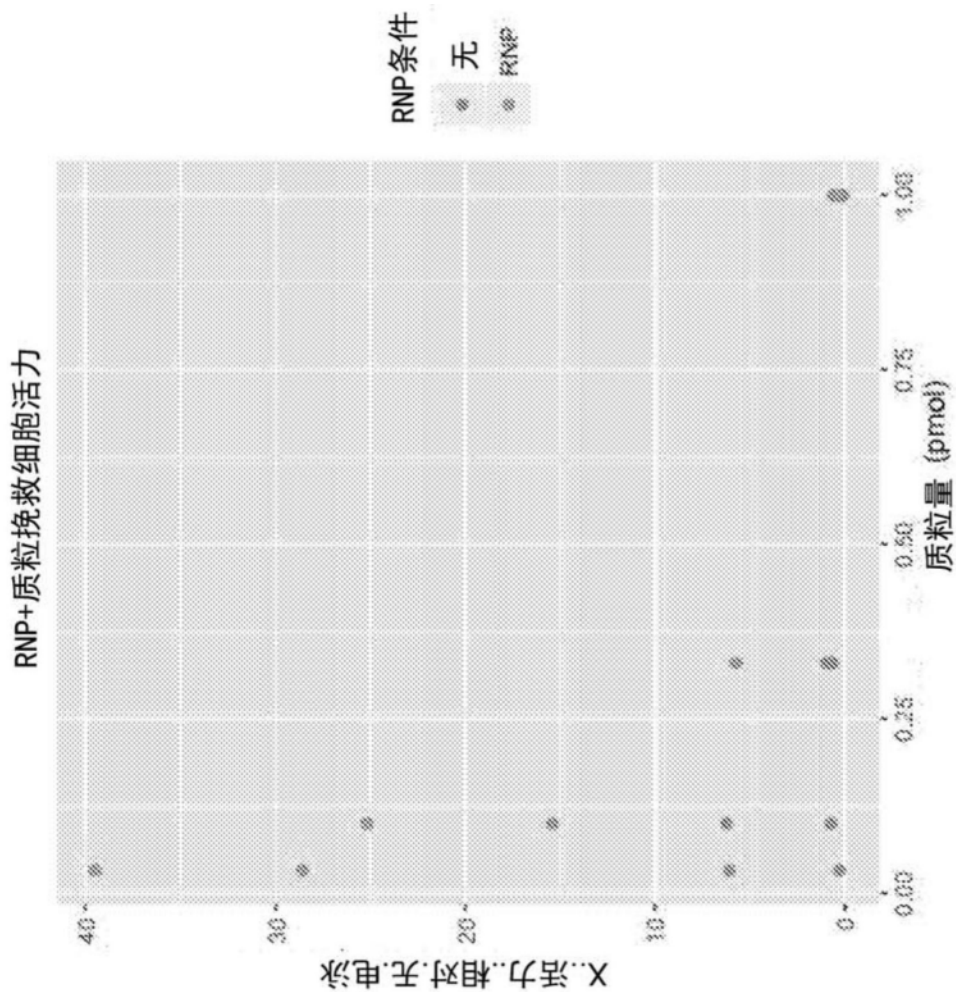


图2

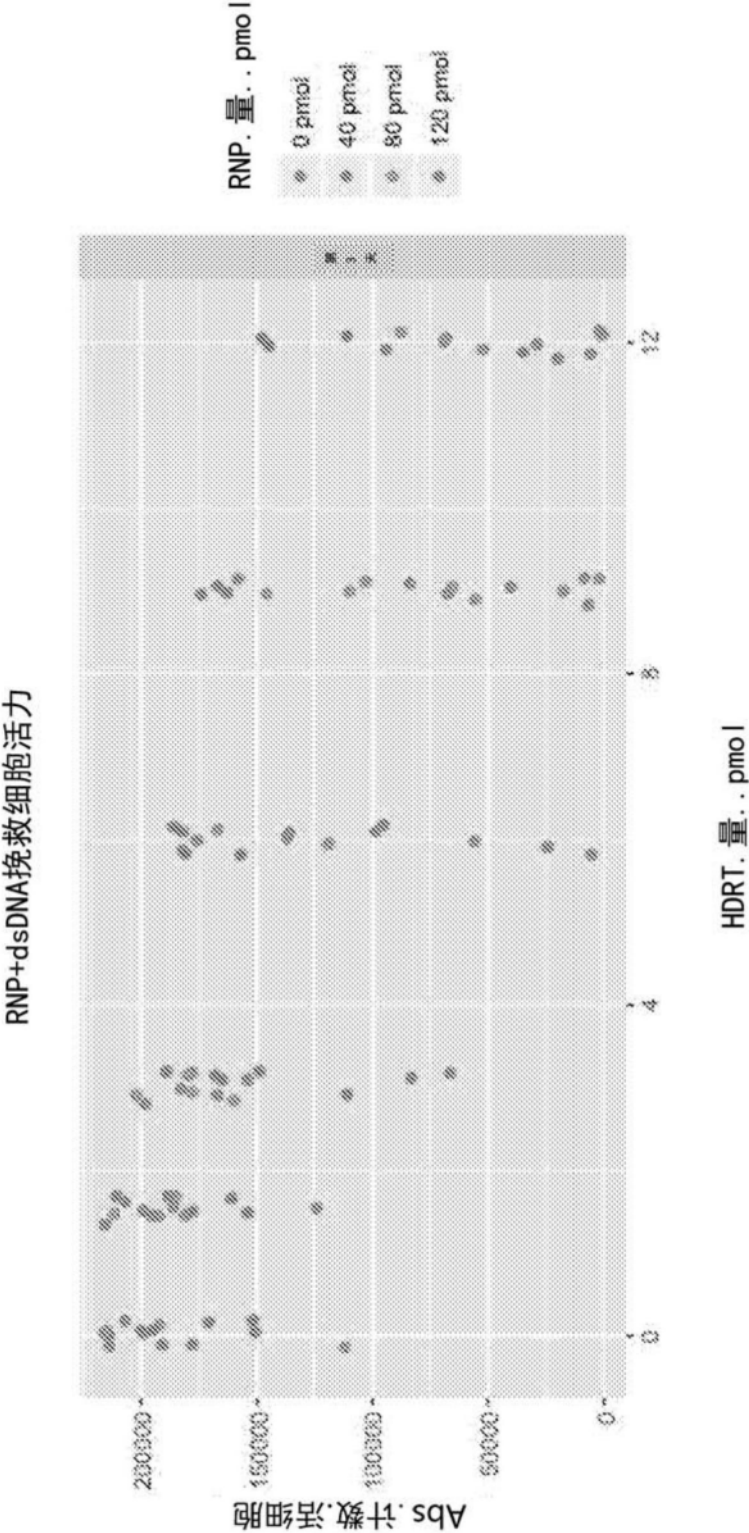


图3

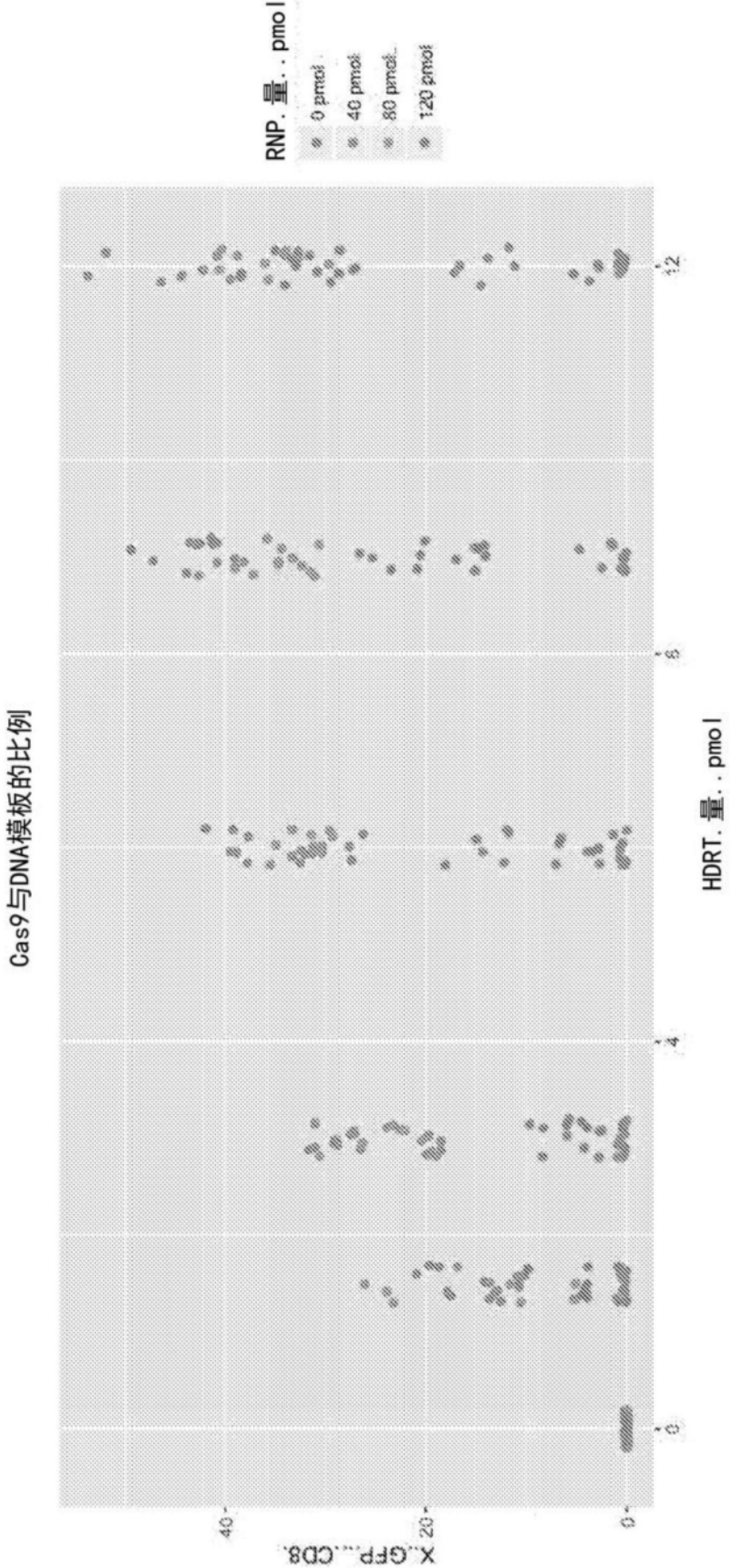


图4

摩尔比例平衡活力丧失和效率

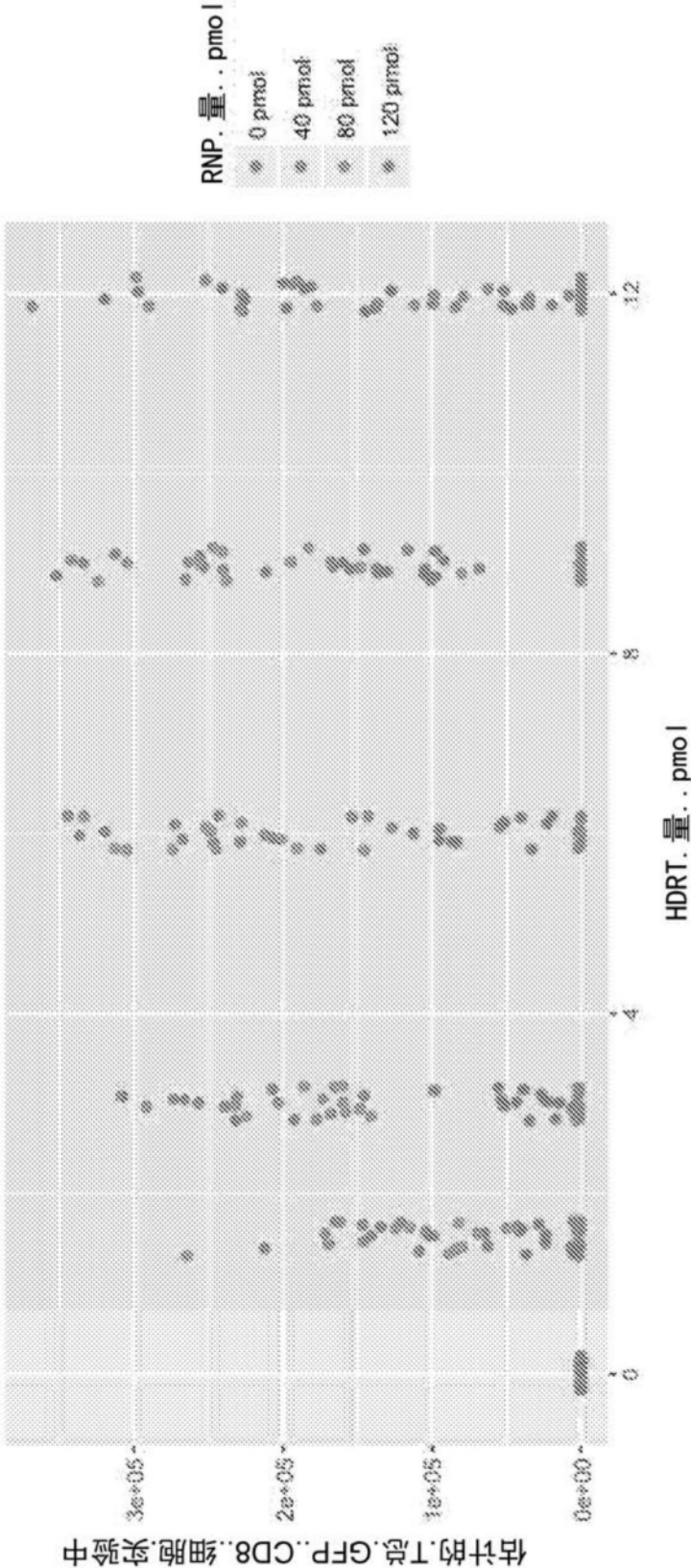


图5

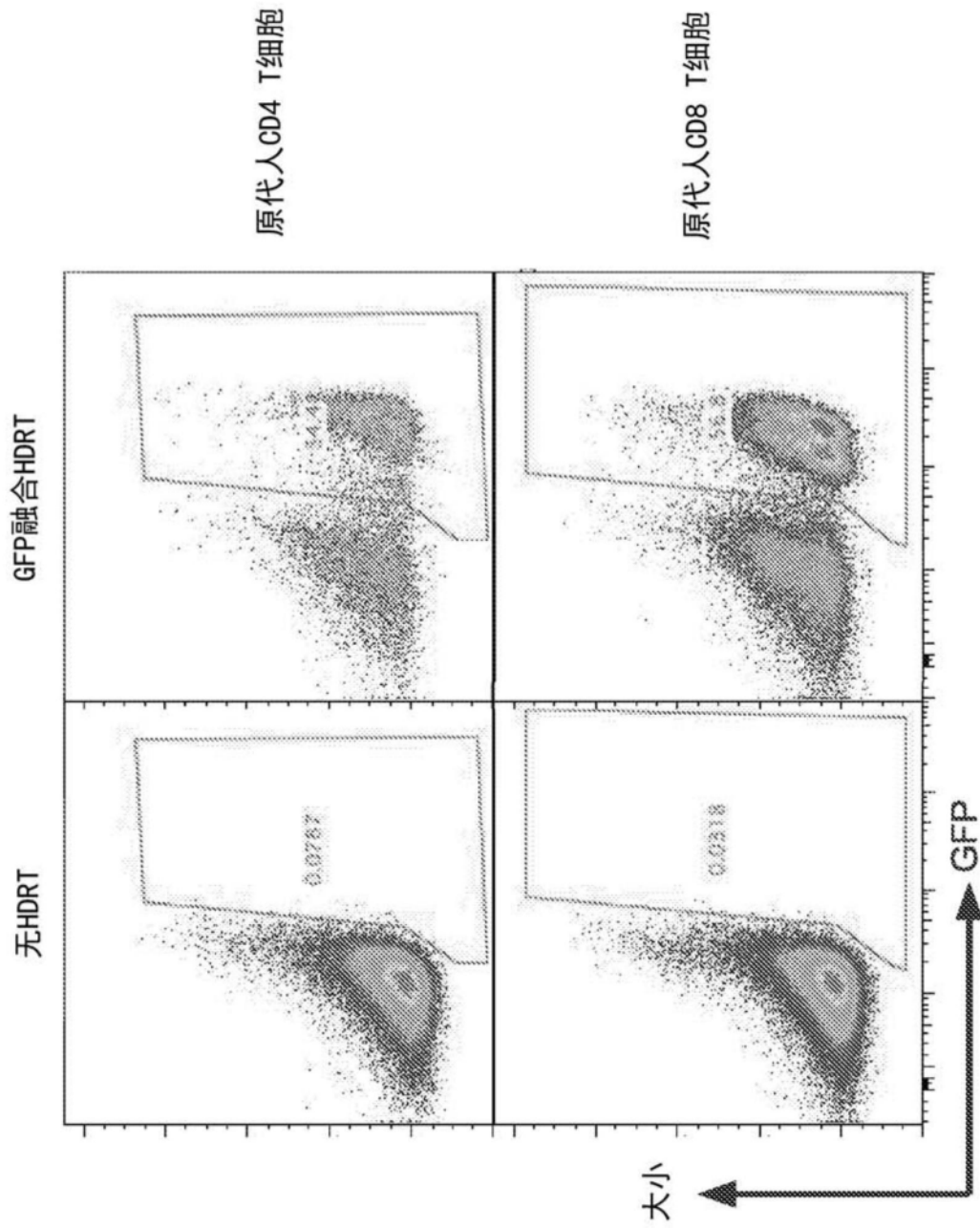


图6

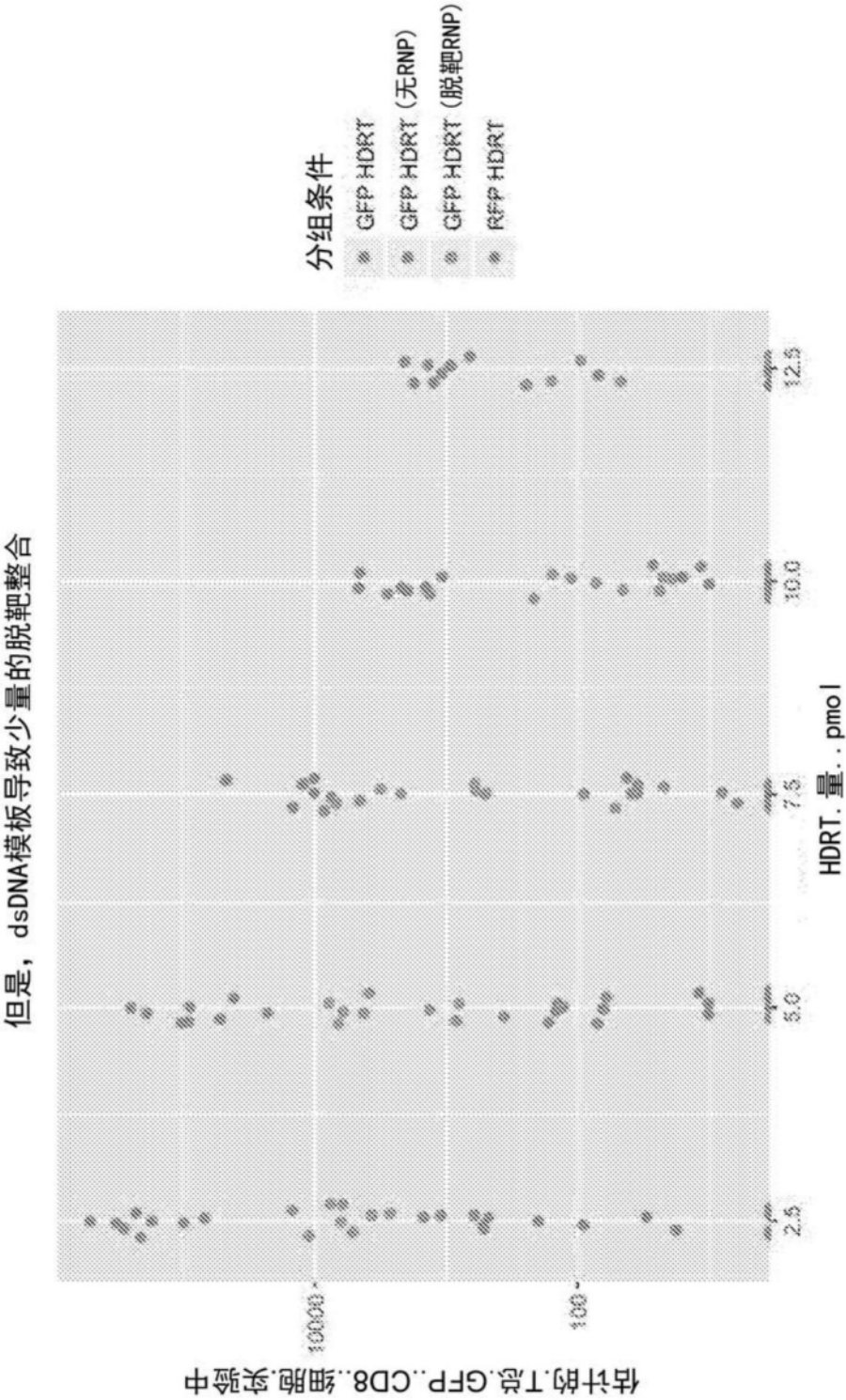


图7

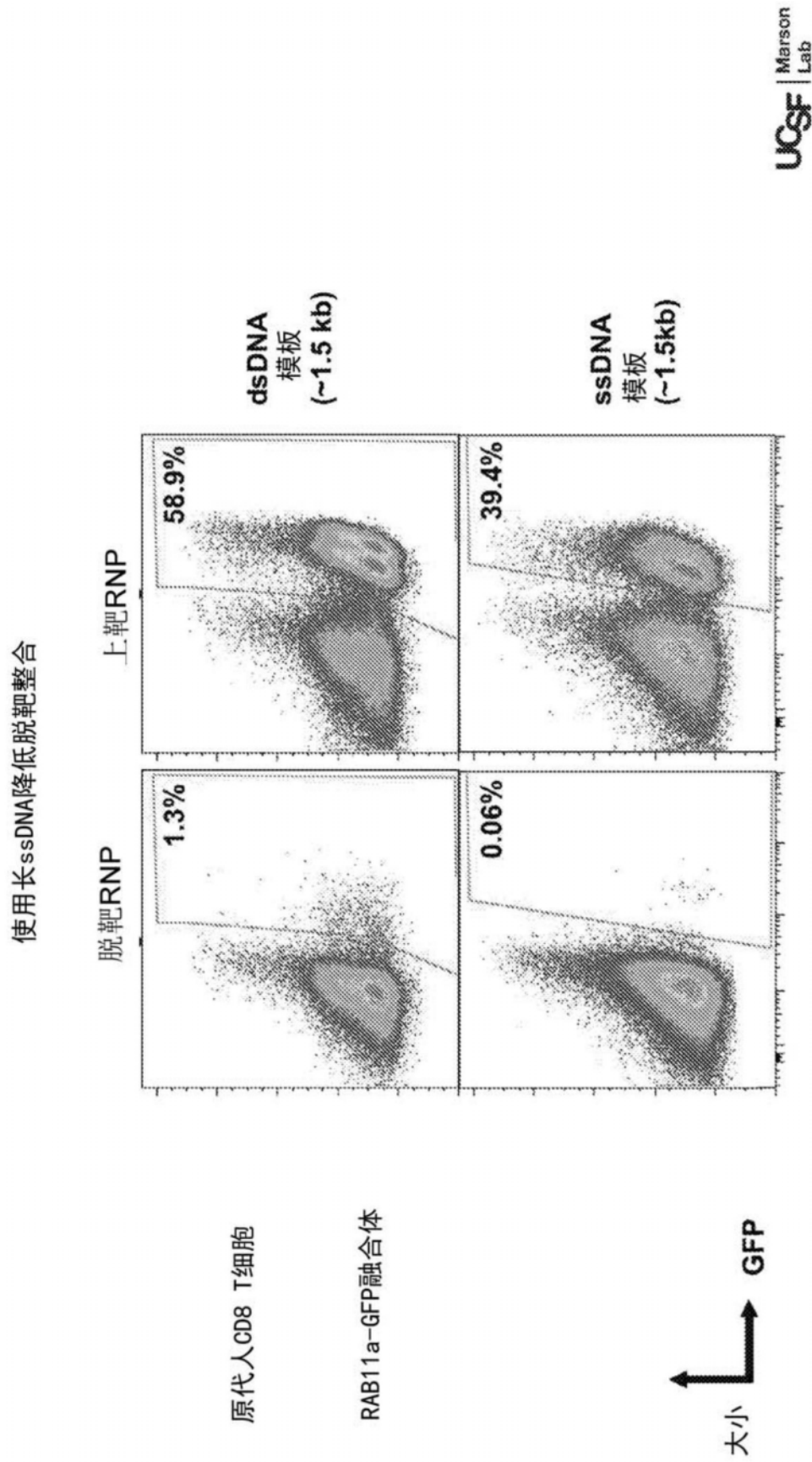


图8

Cas9切口酶防止脱靶断裂，仍然允许高效率插入

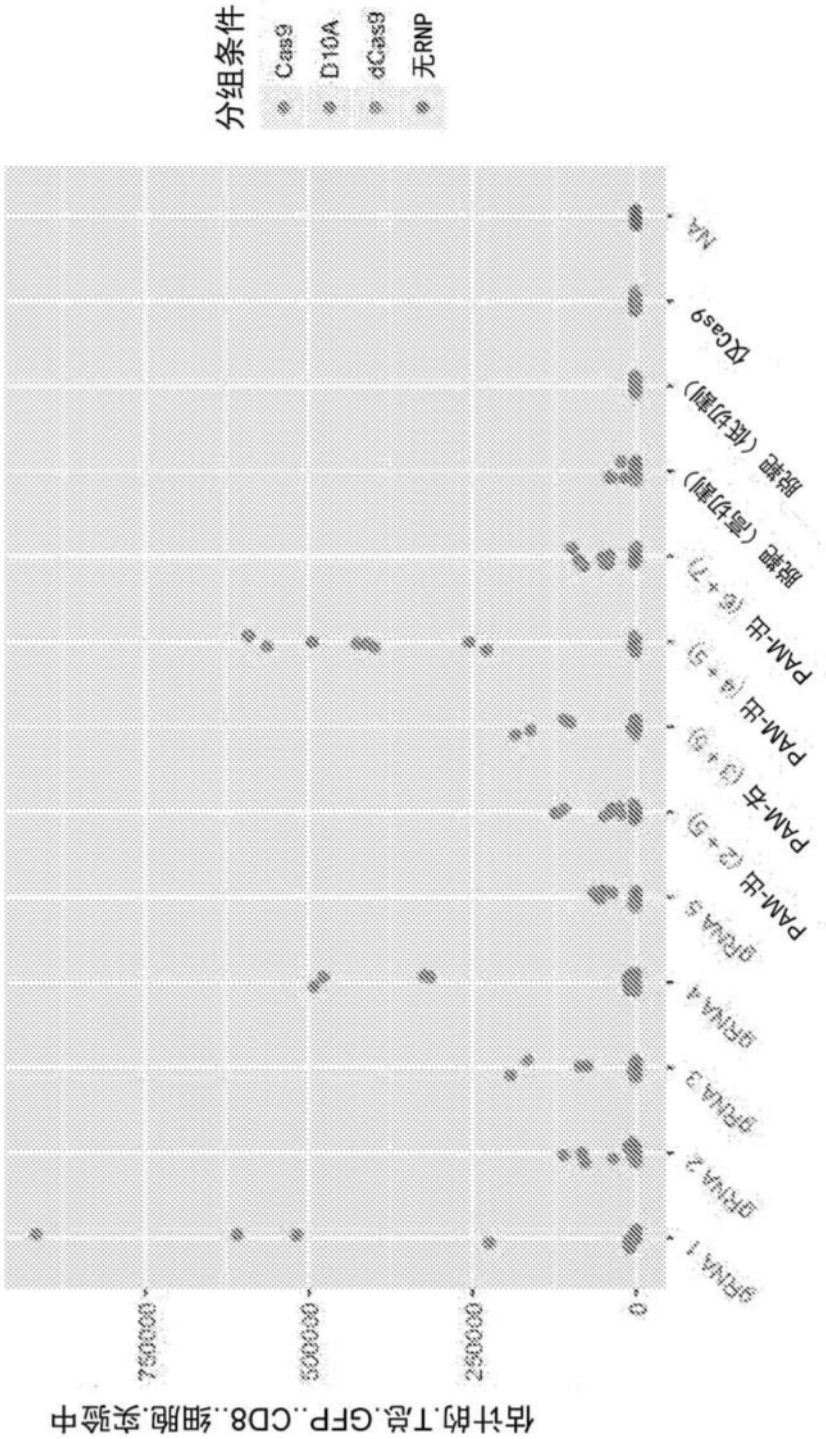


图9

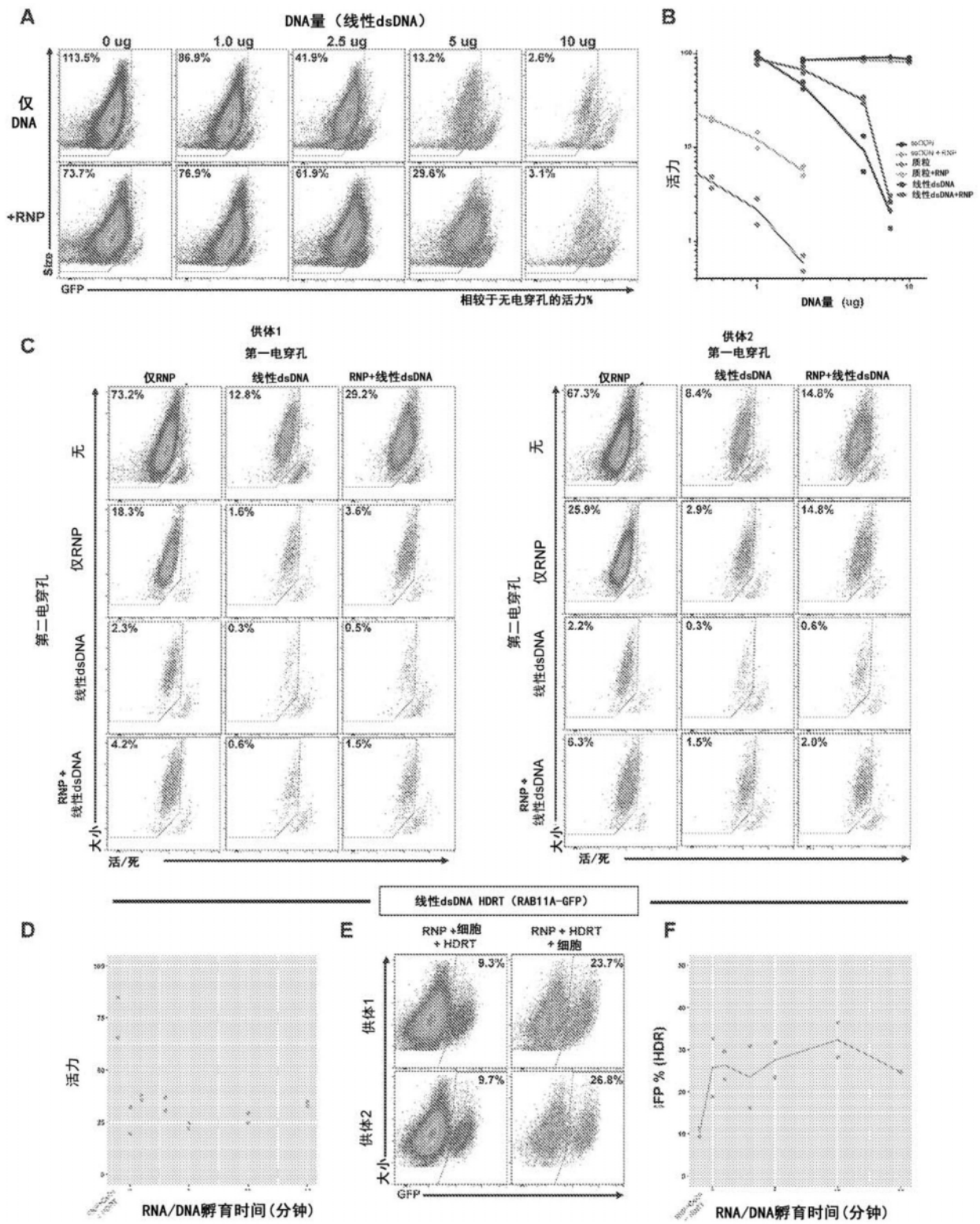


图10

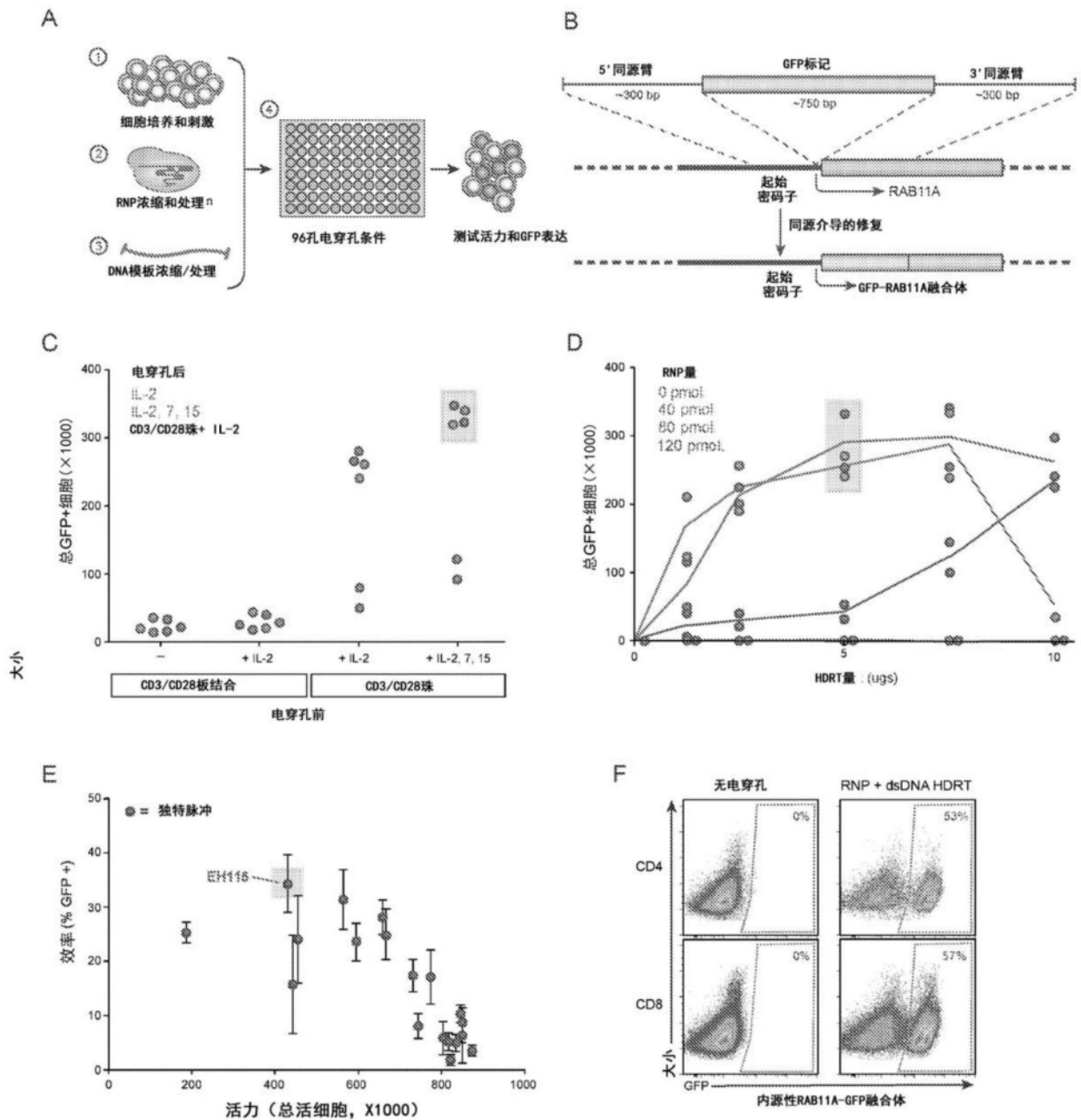


图11

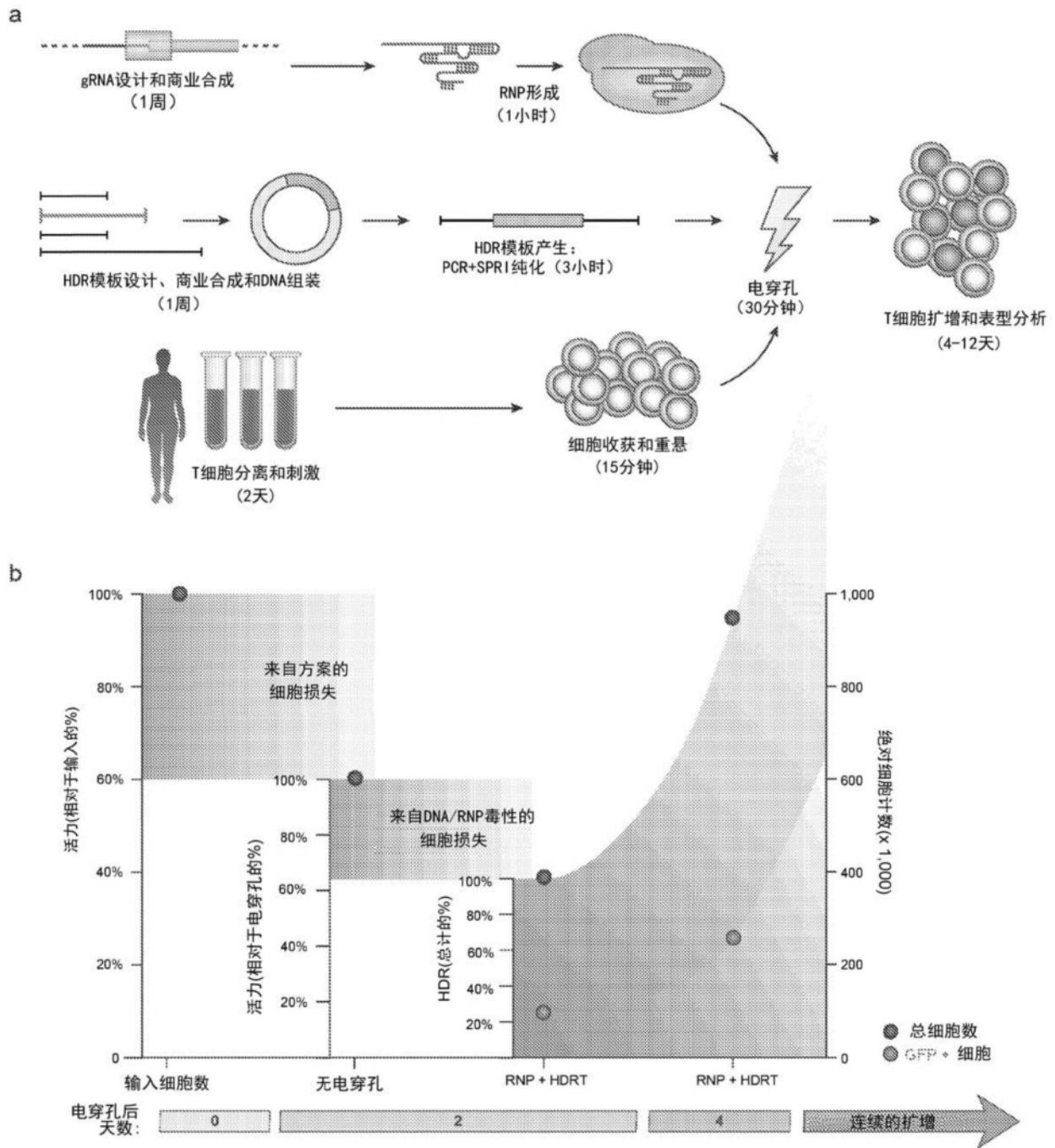


图12

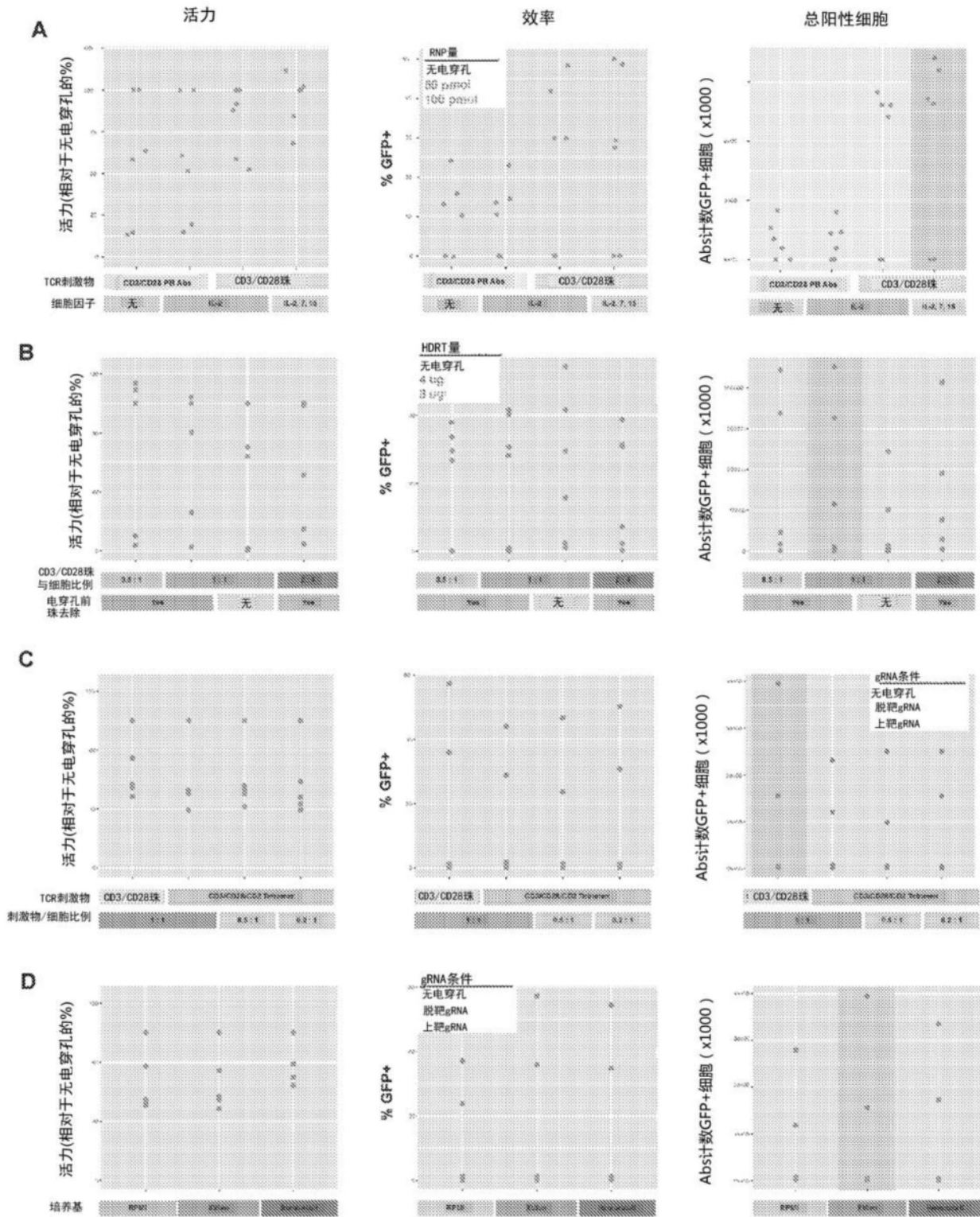


图13

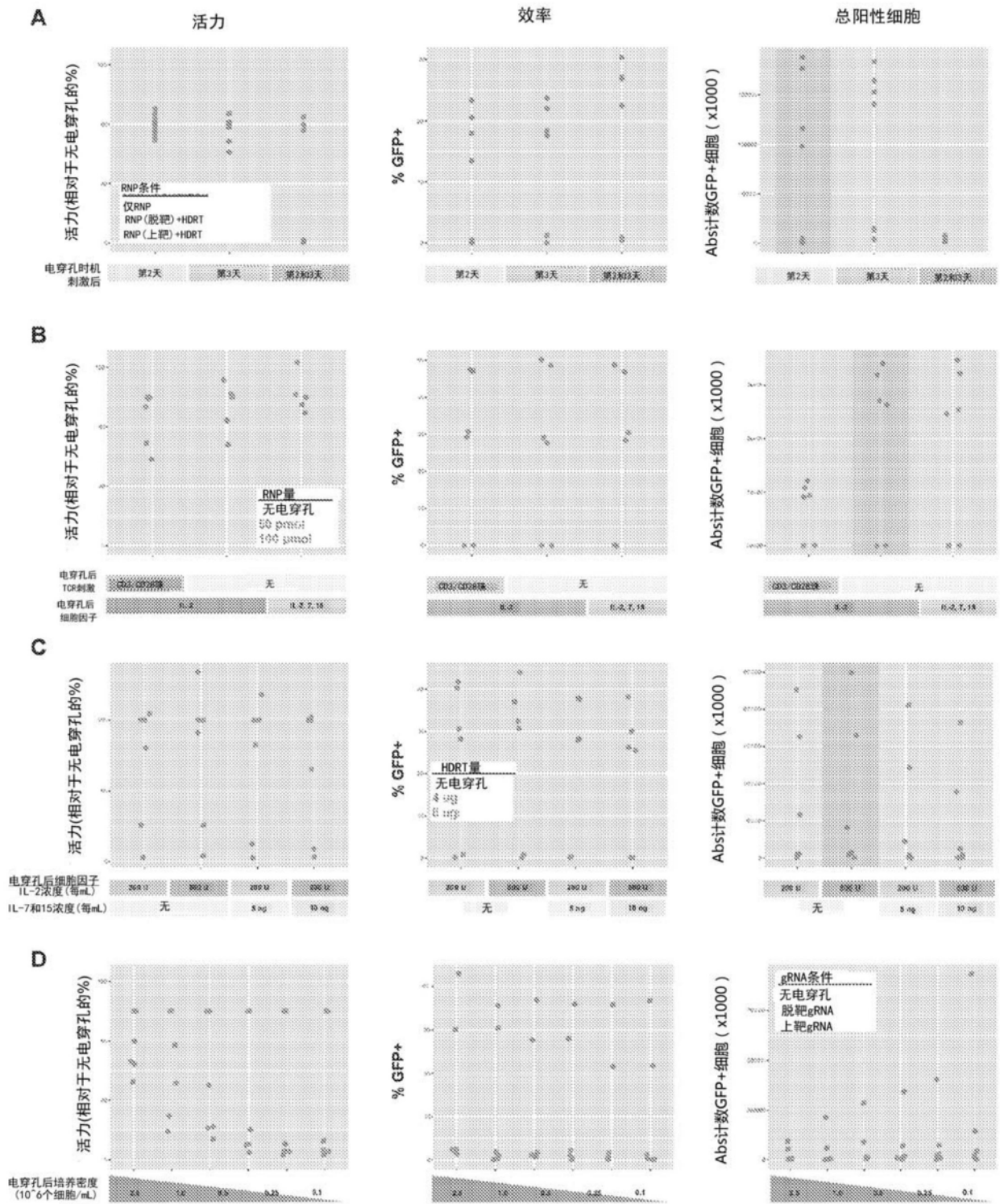


图14

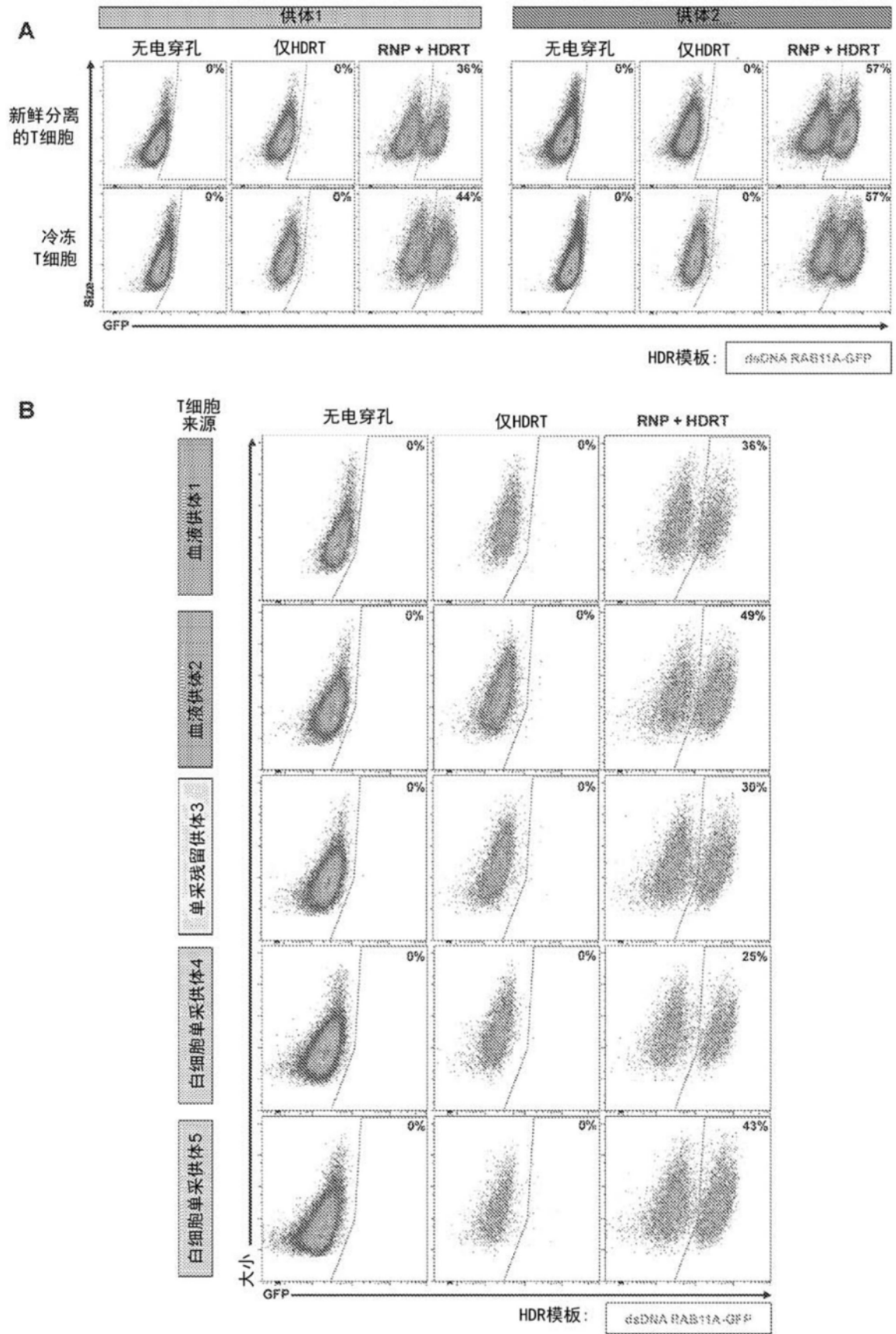


图15

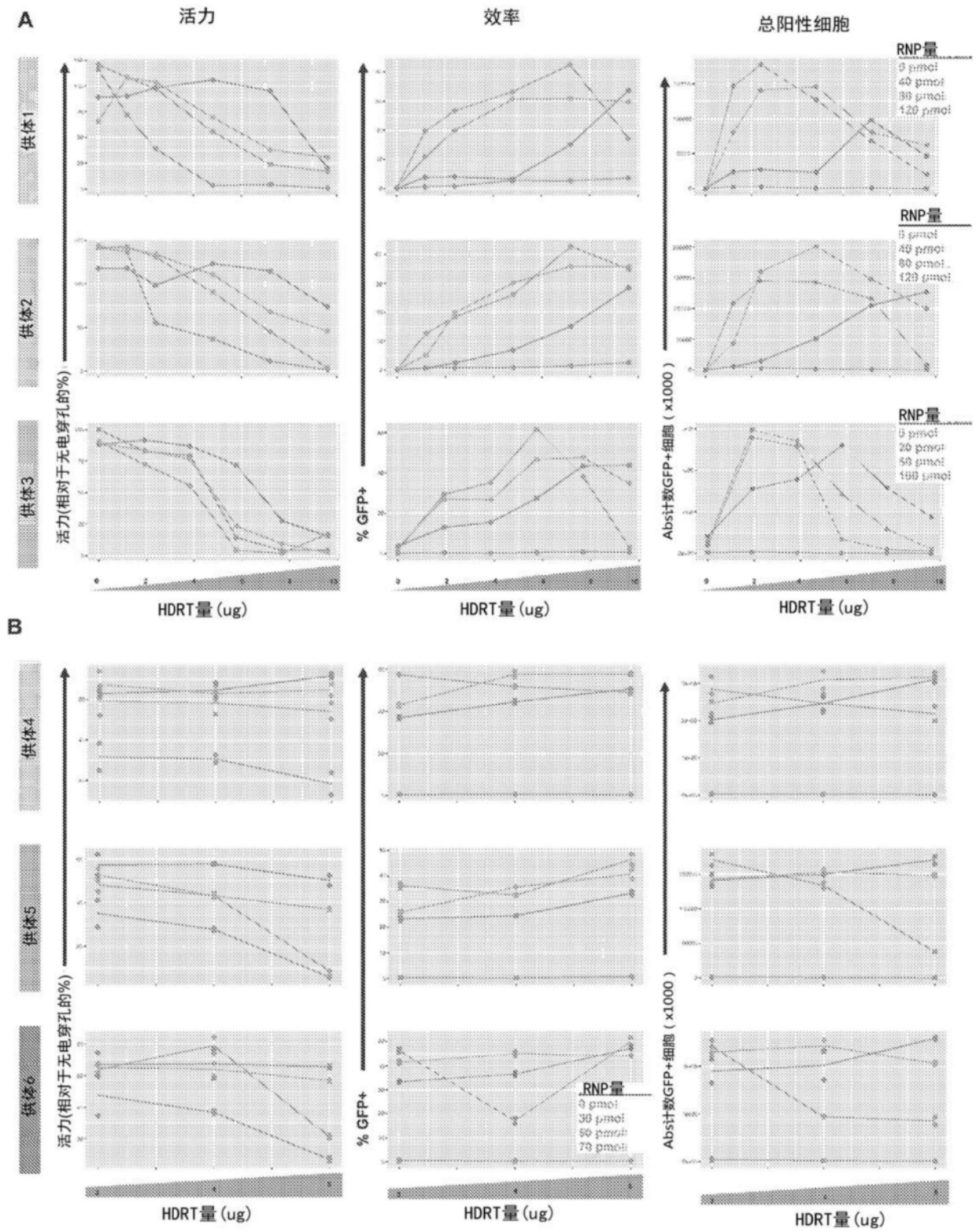


图16

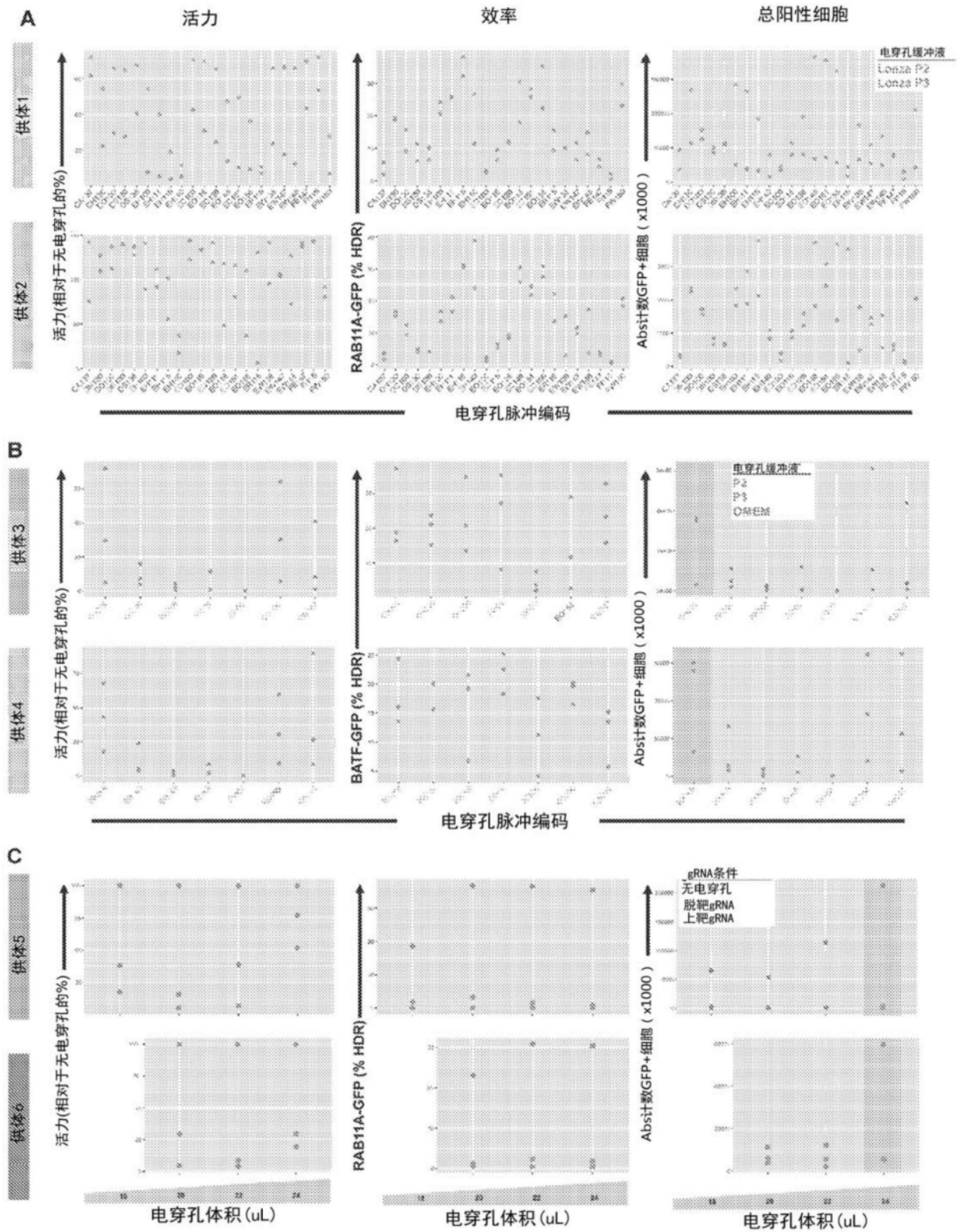


图17

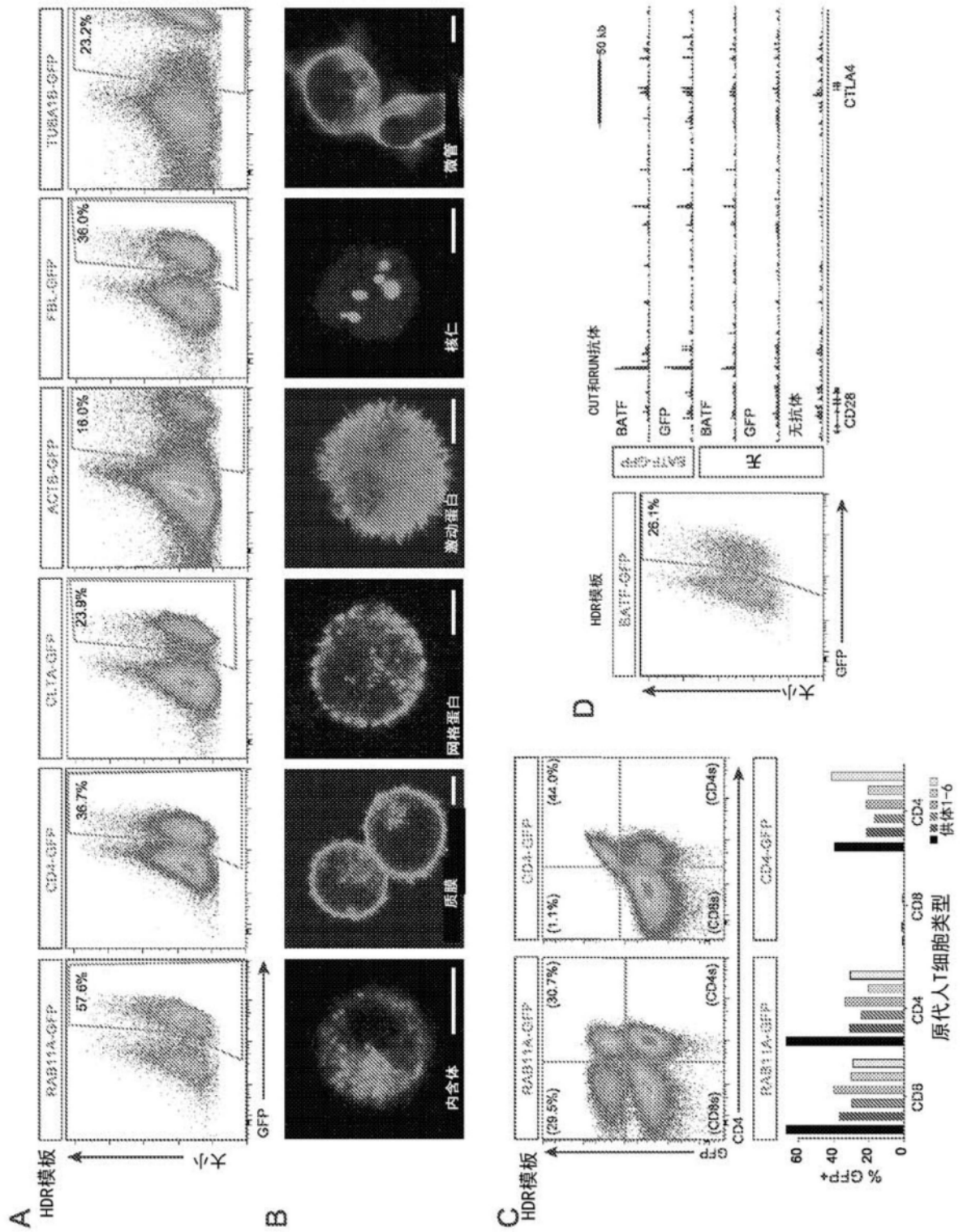


图18

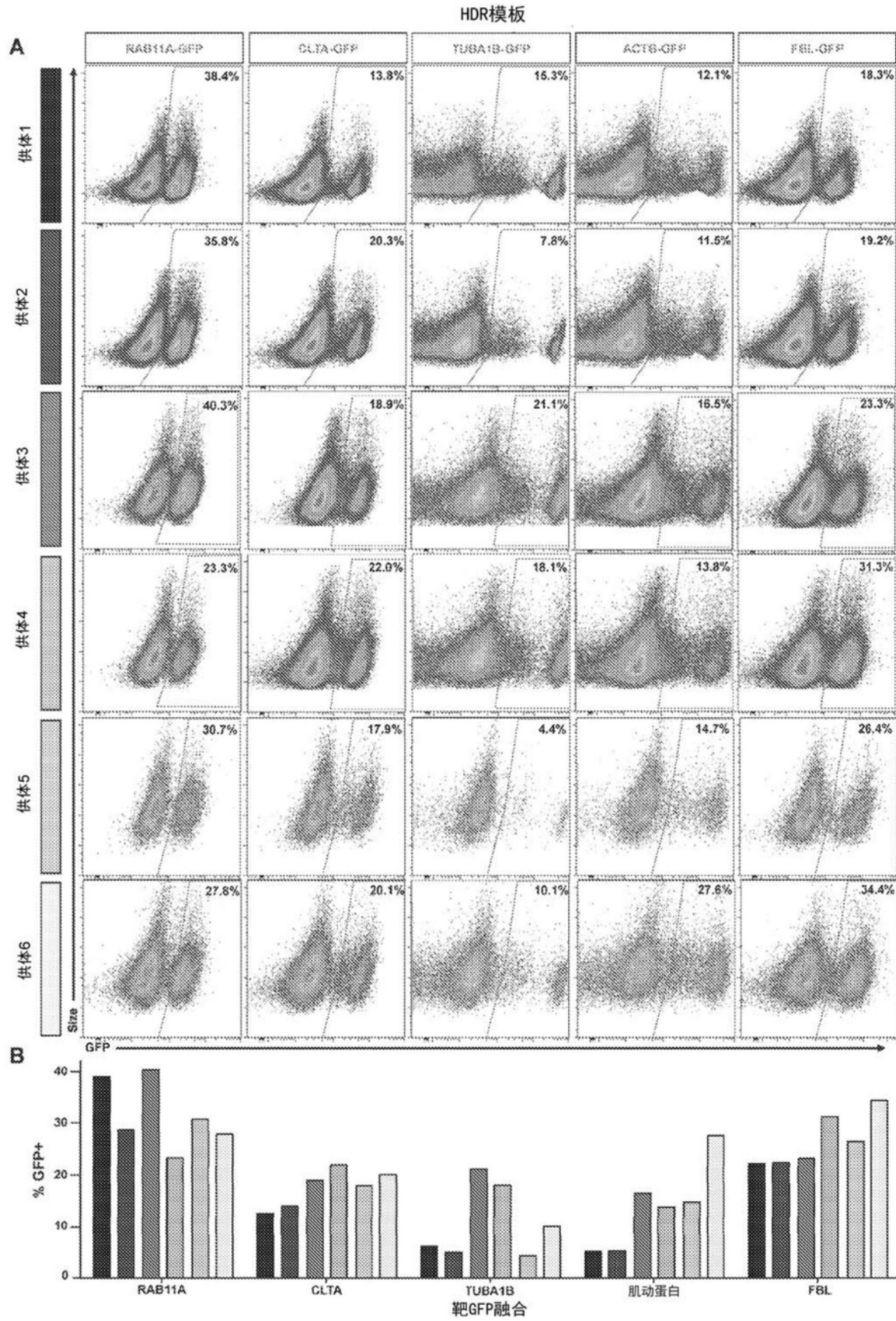


图19

供体2

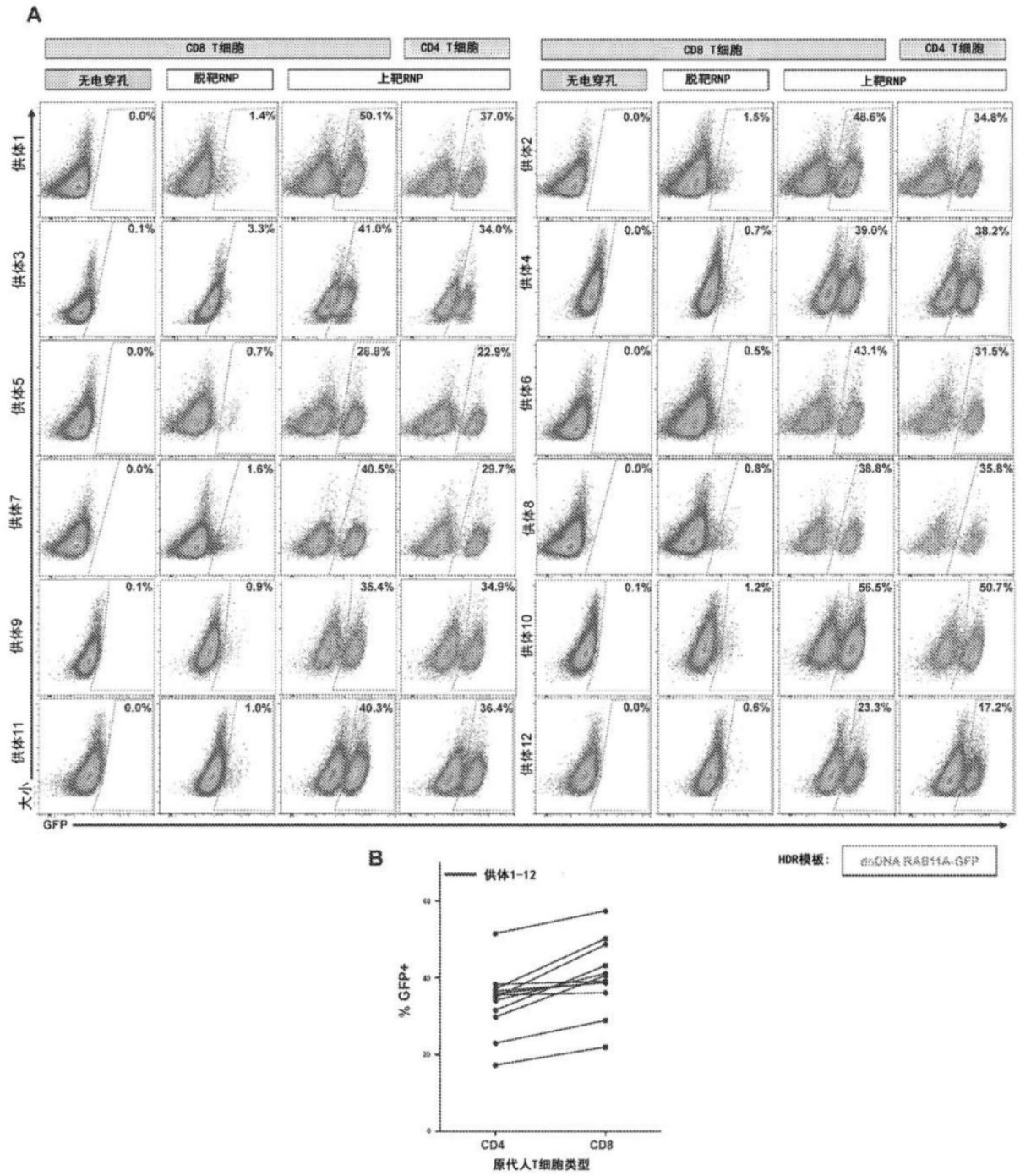


图20

A

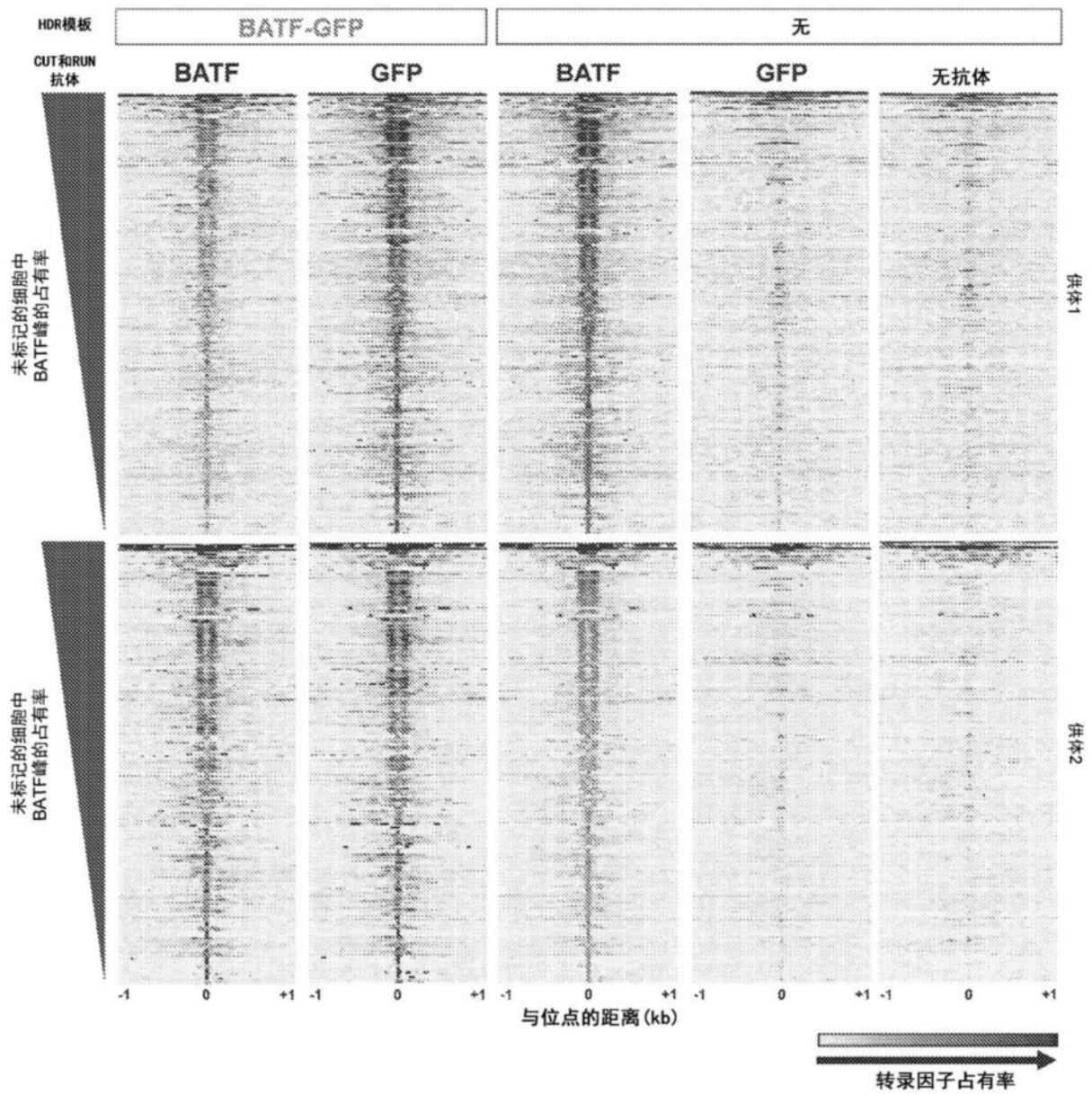


图21

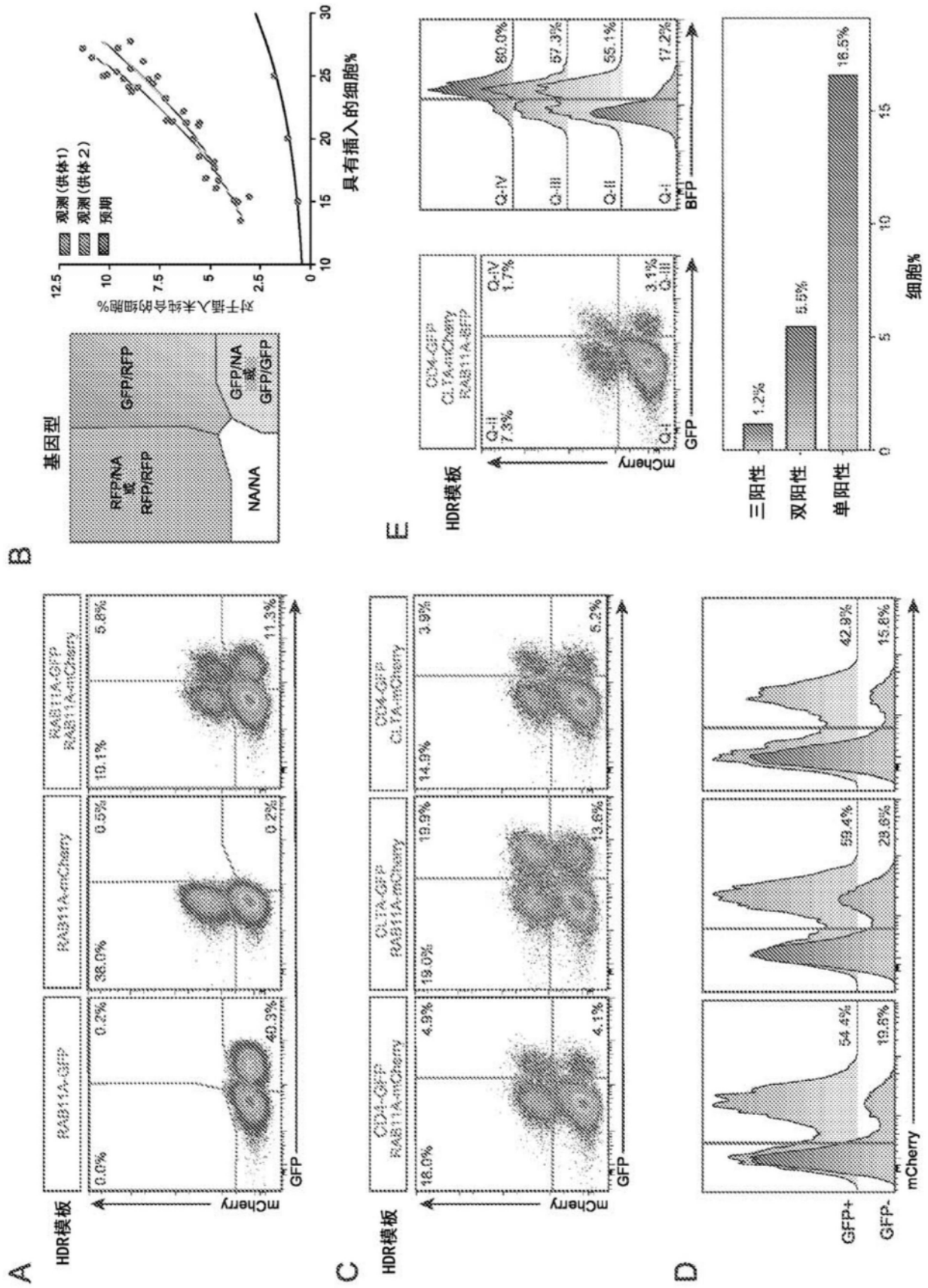


图22

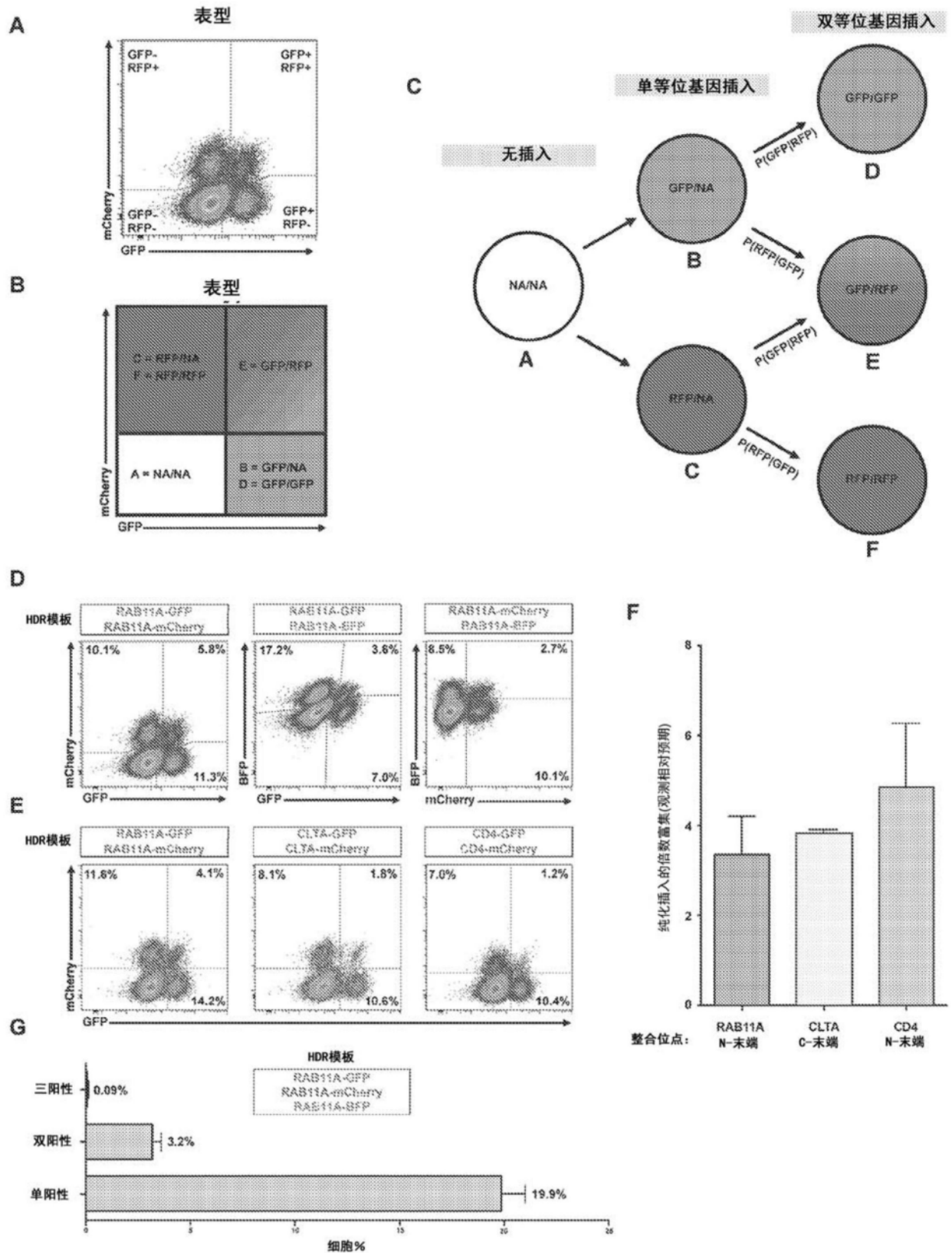
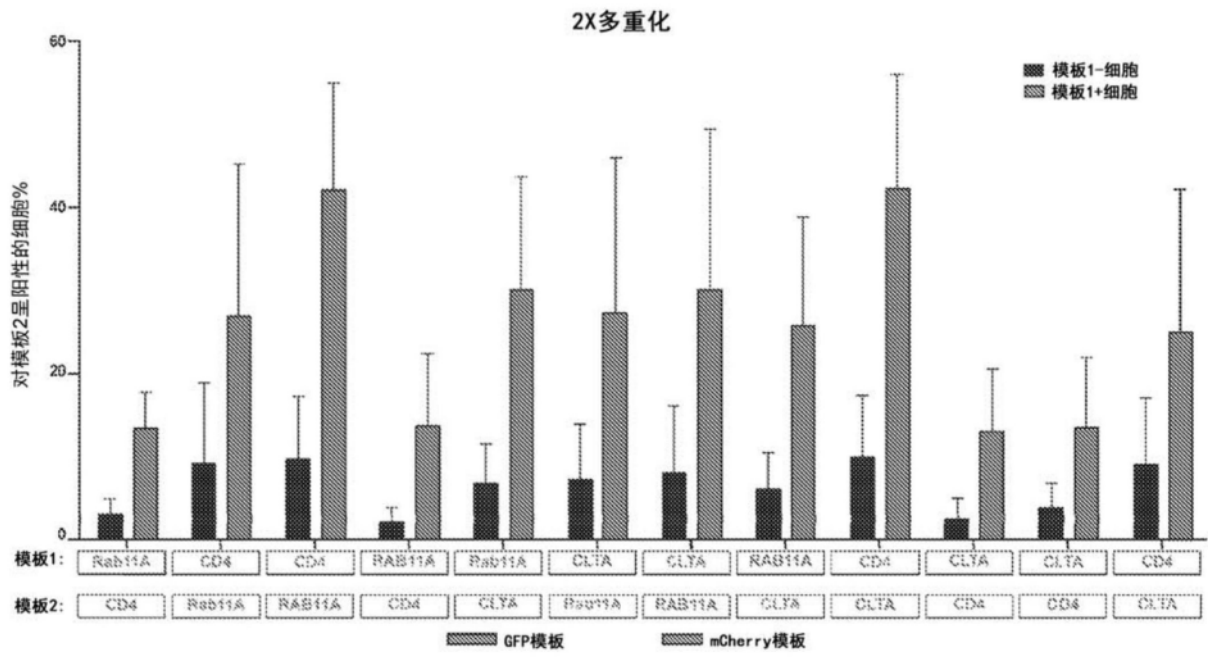


图23

A



B

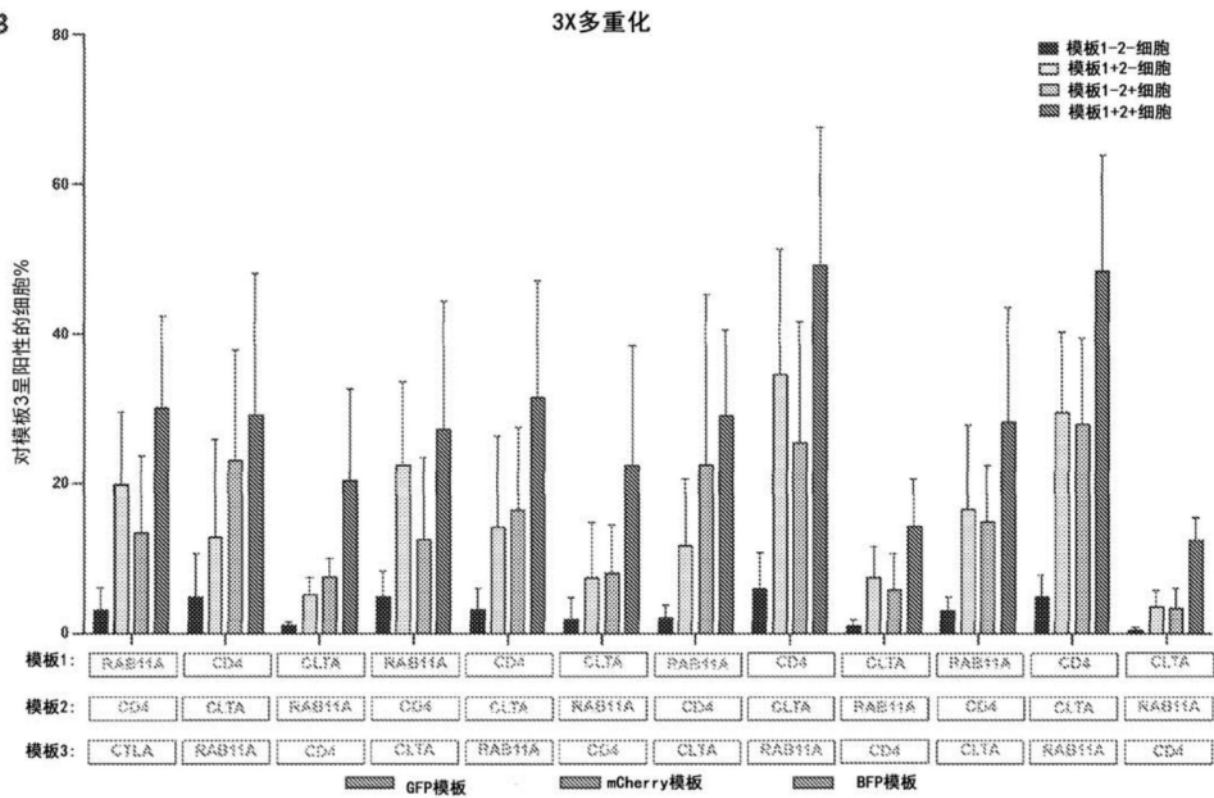


图24

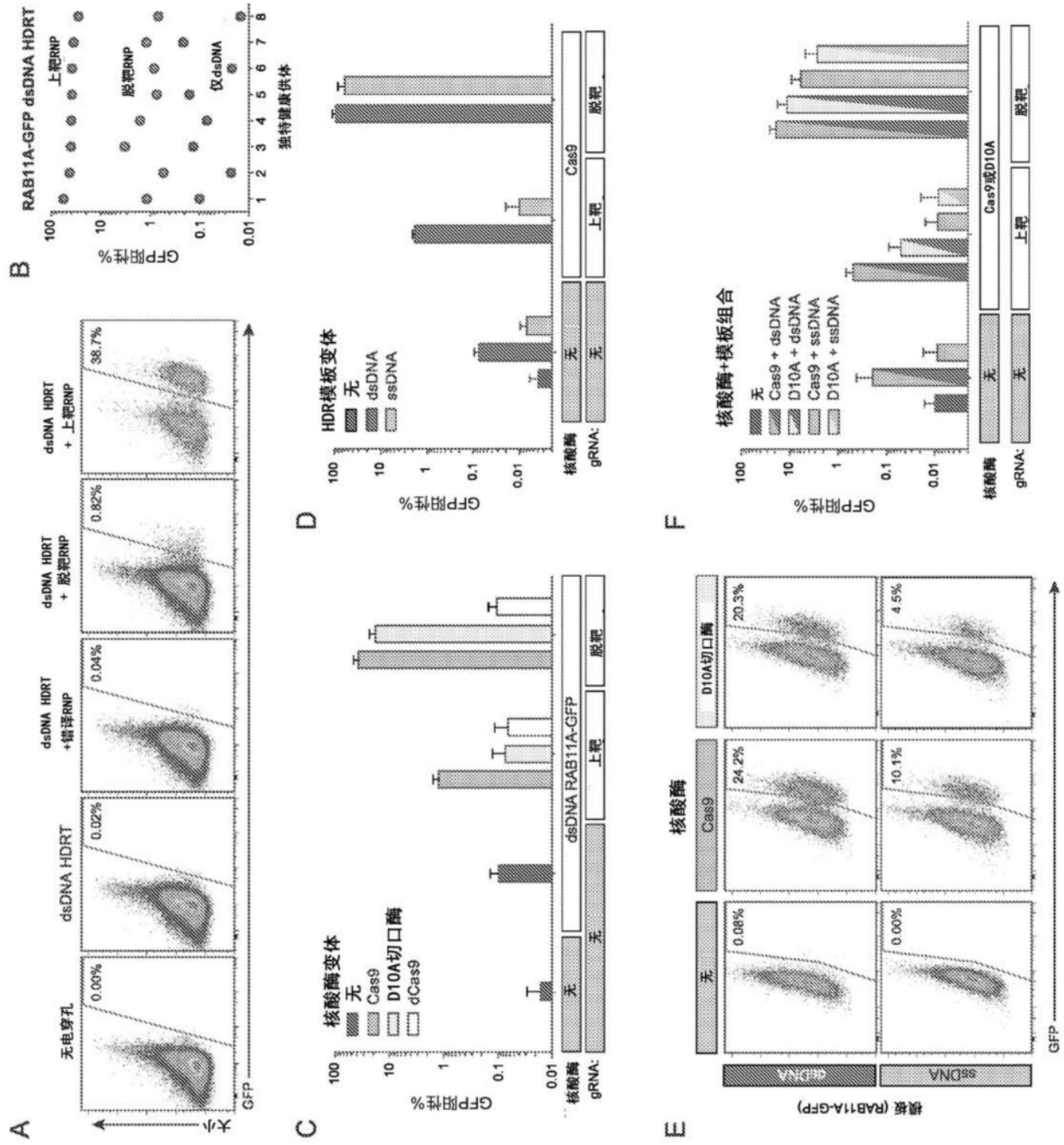


图25

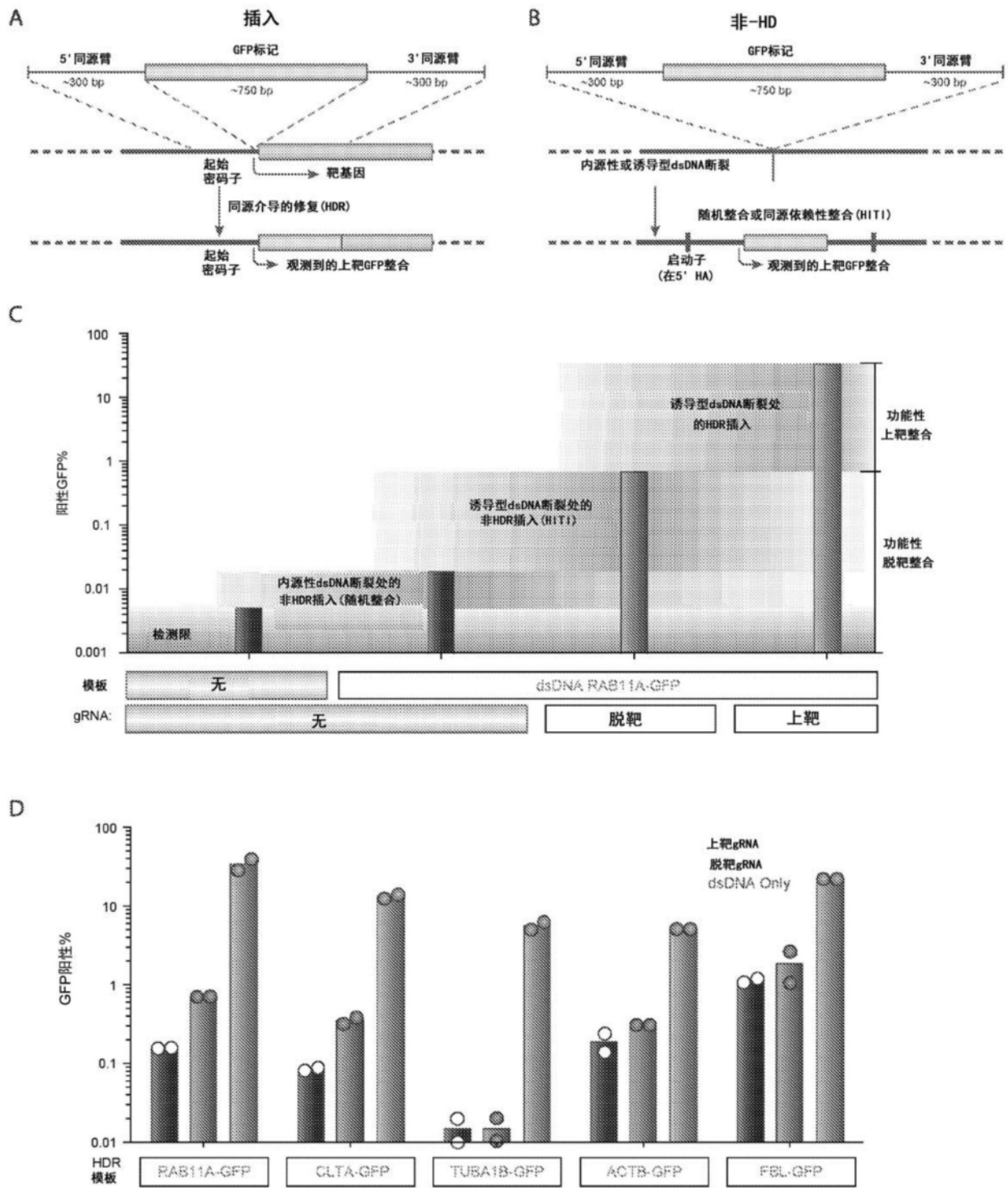


图26

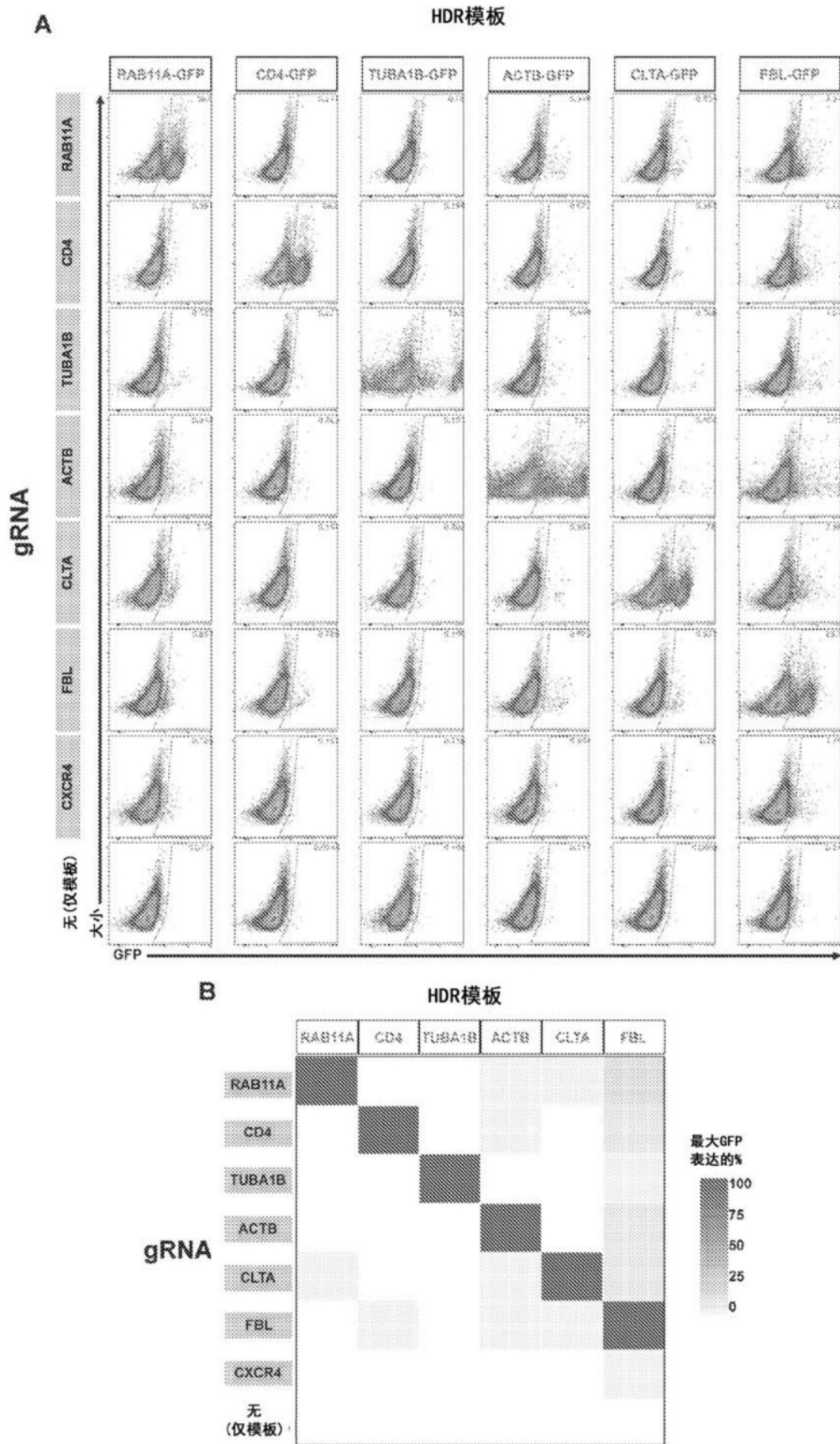


图27

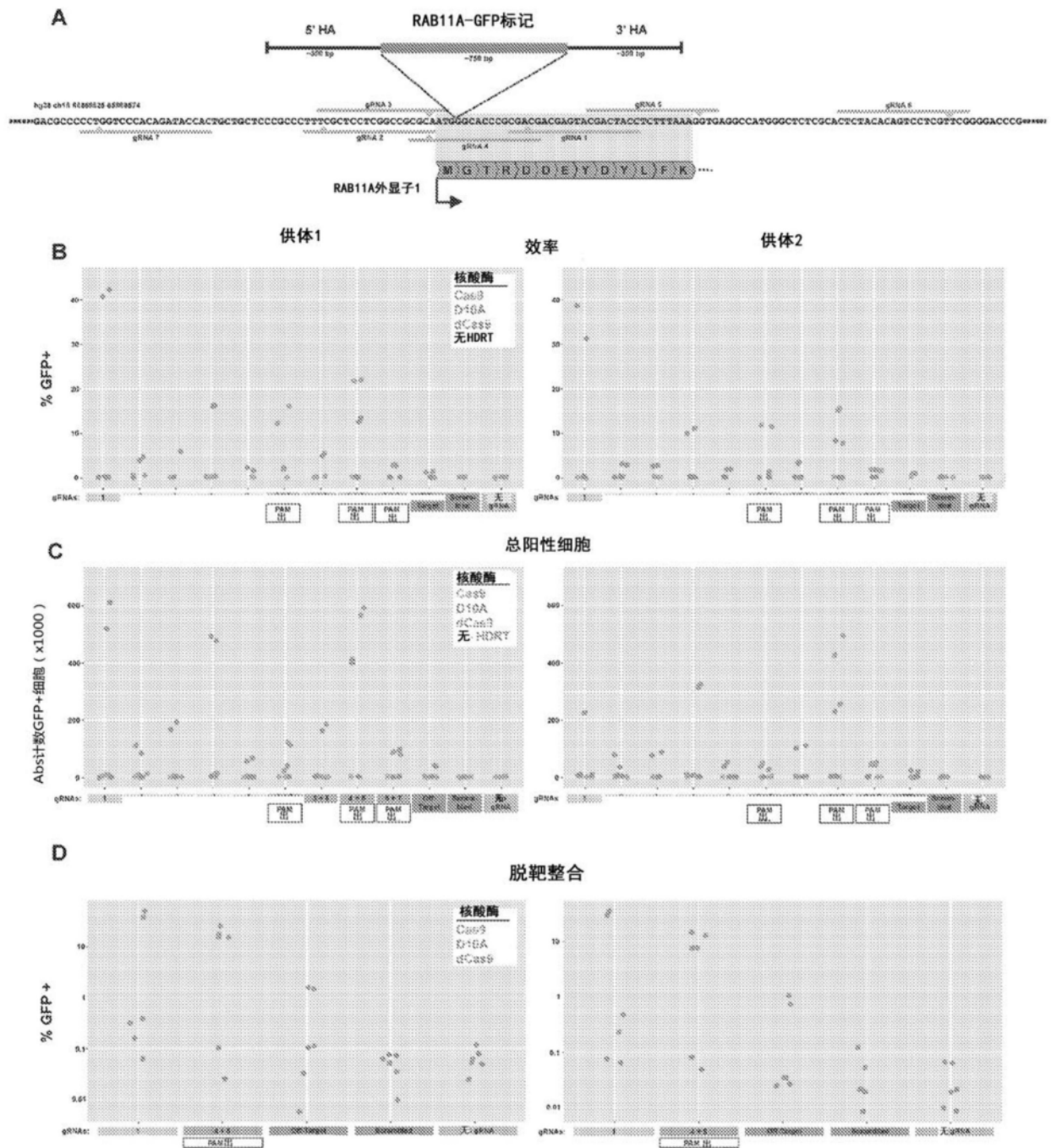


图28

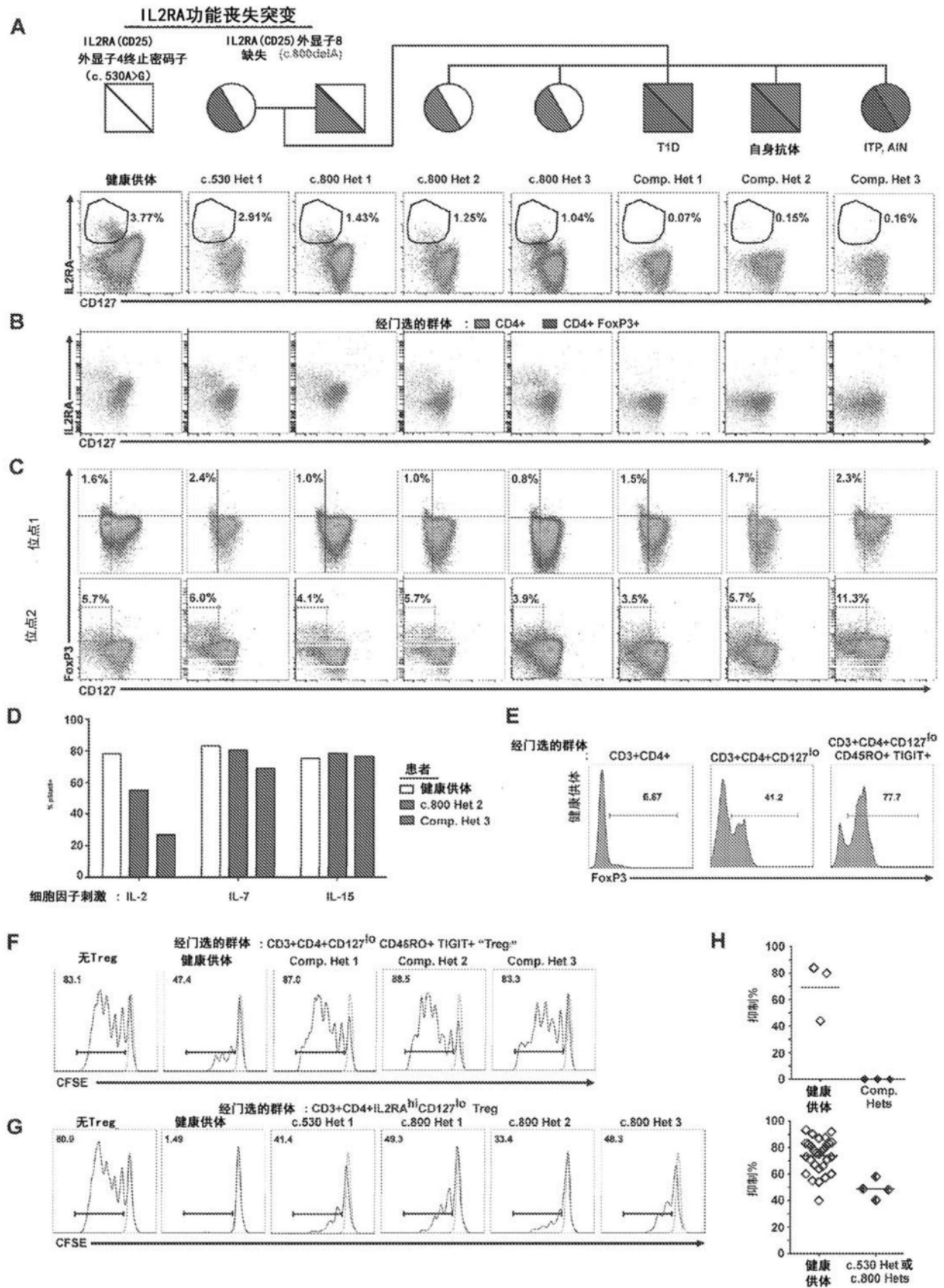


图29

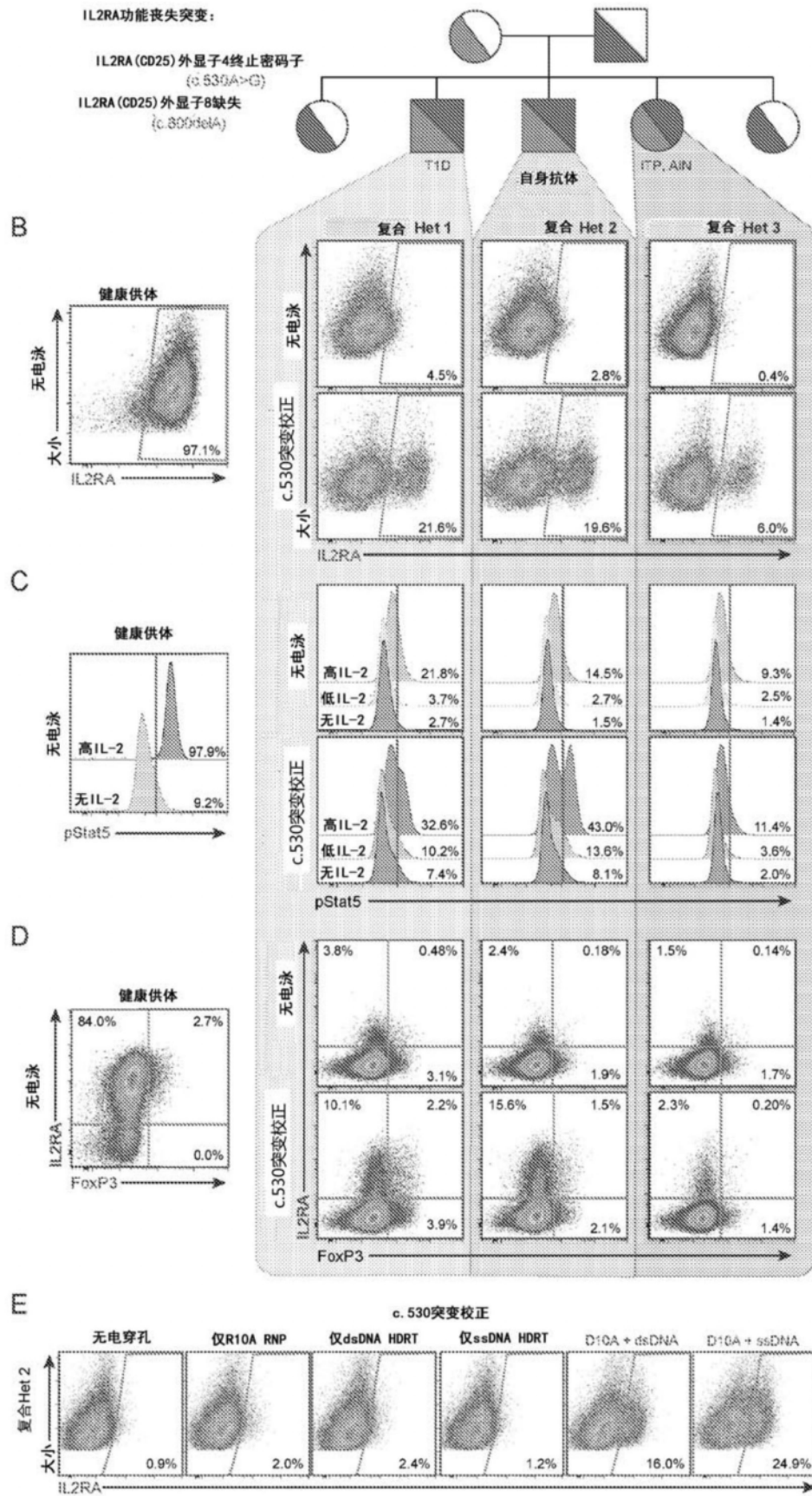


图30

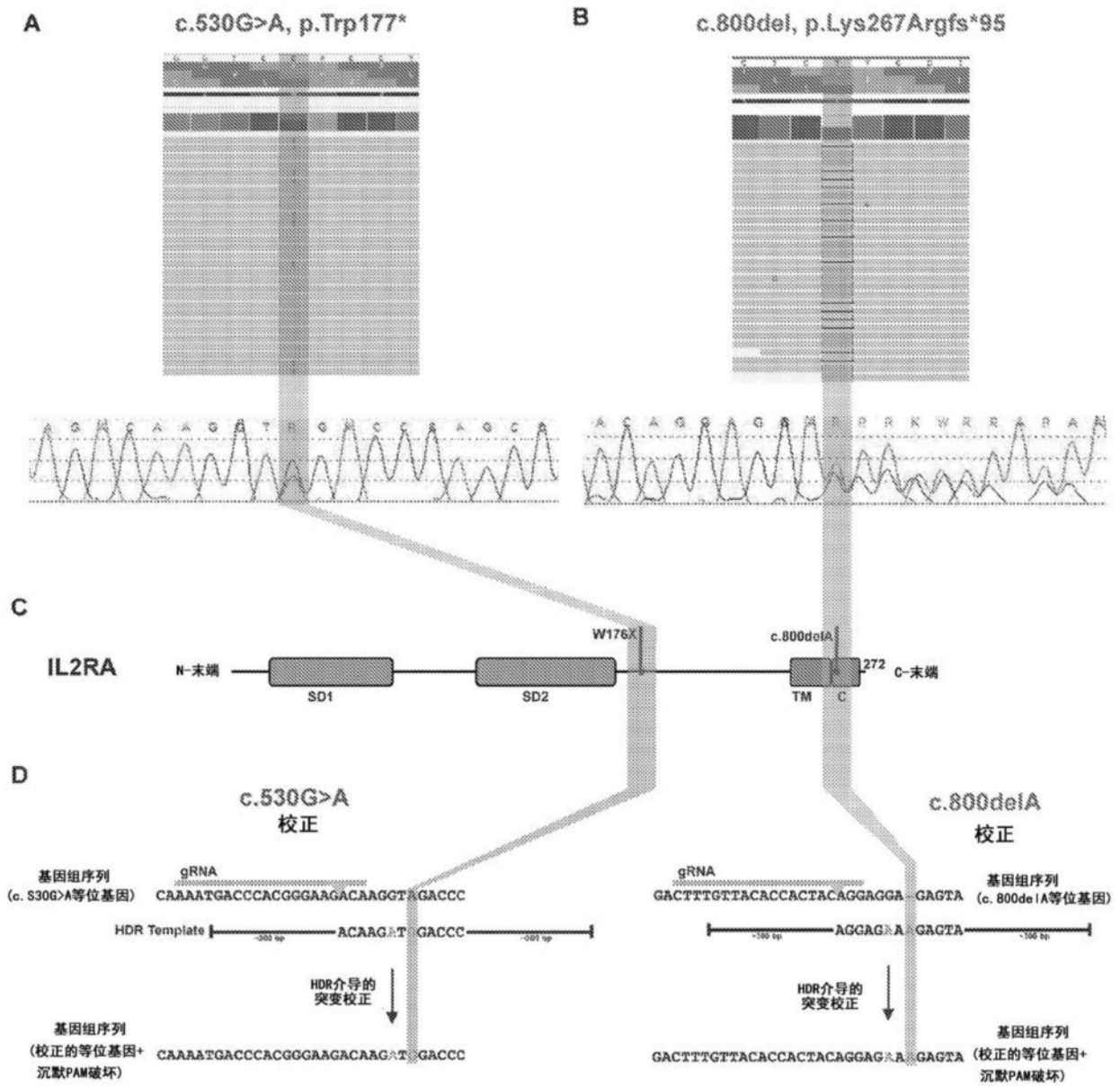


图31

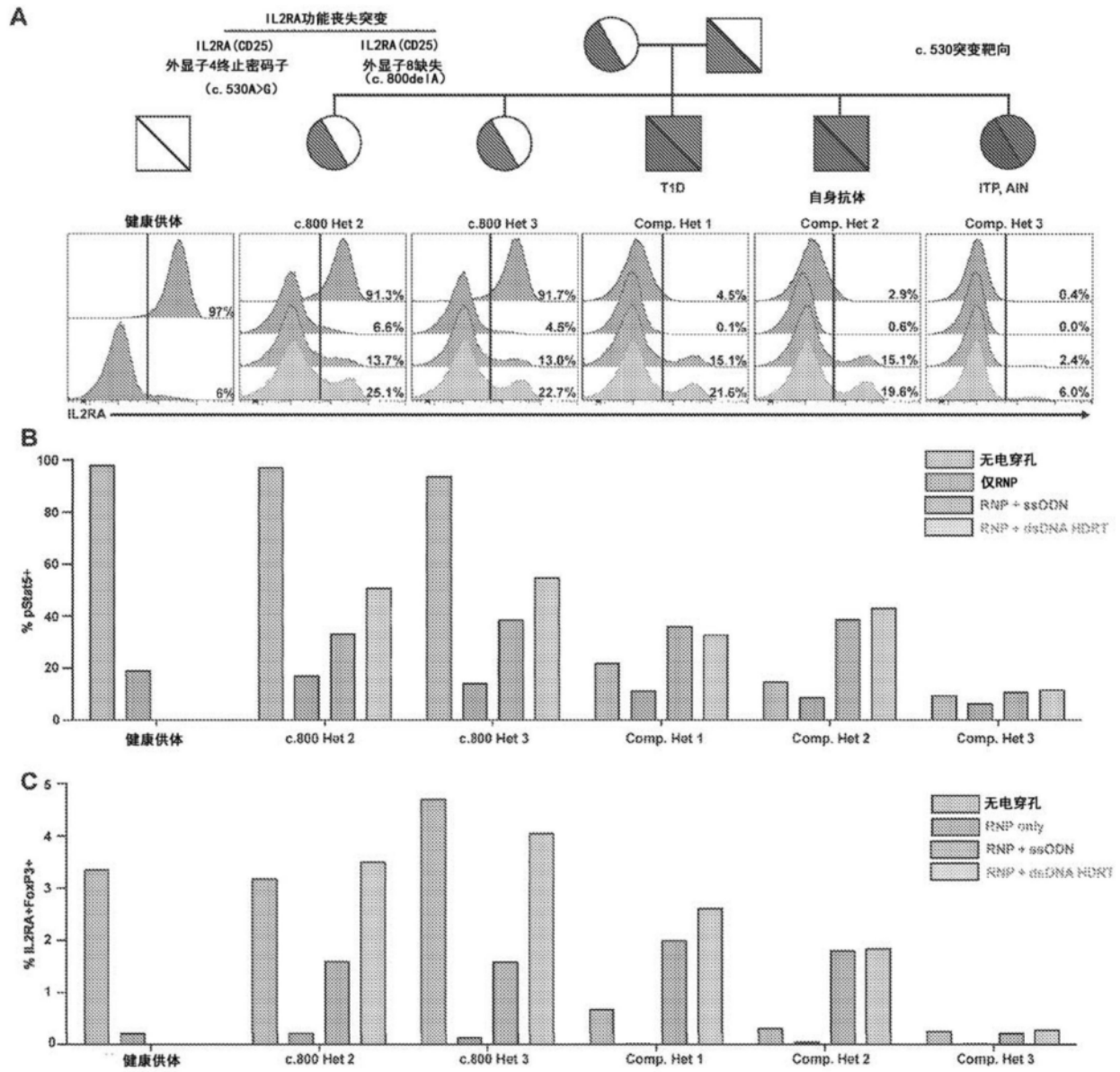


图32

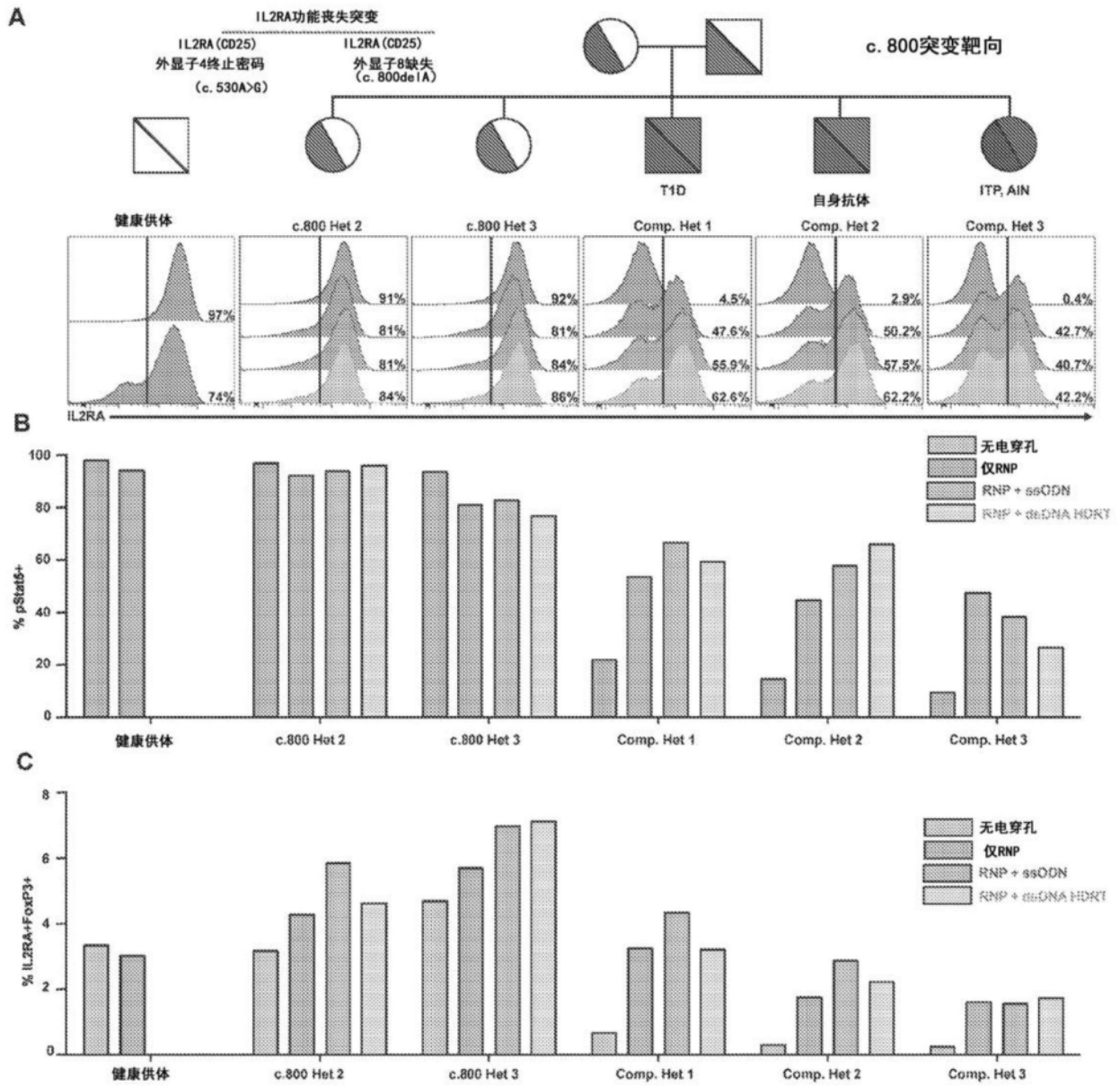


图33

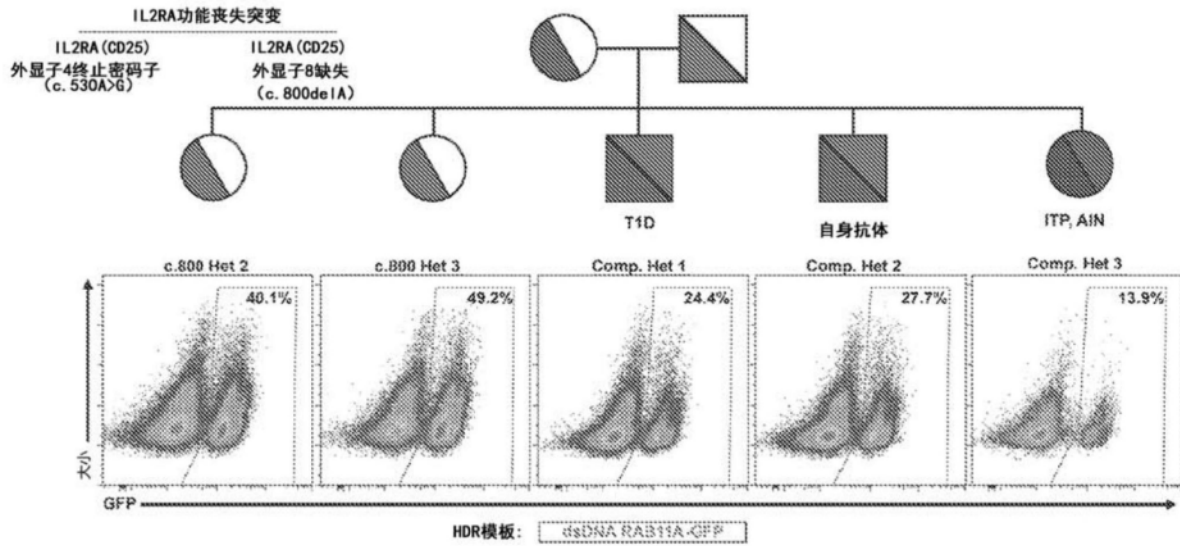
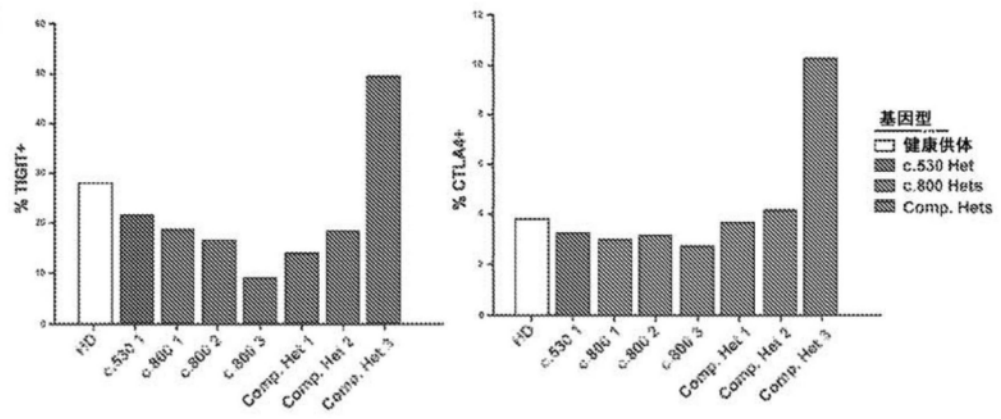
A**B**

图34

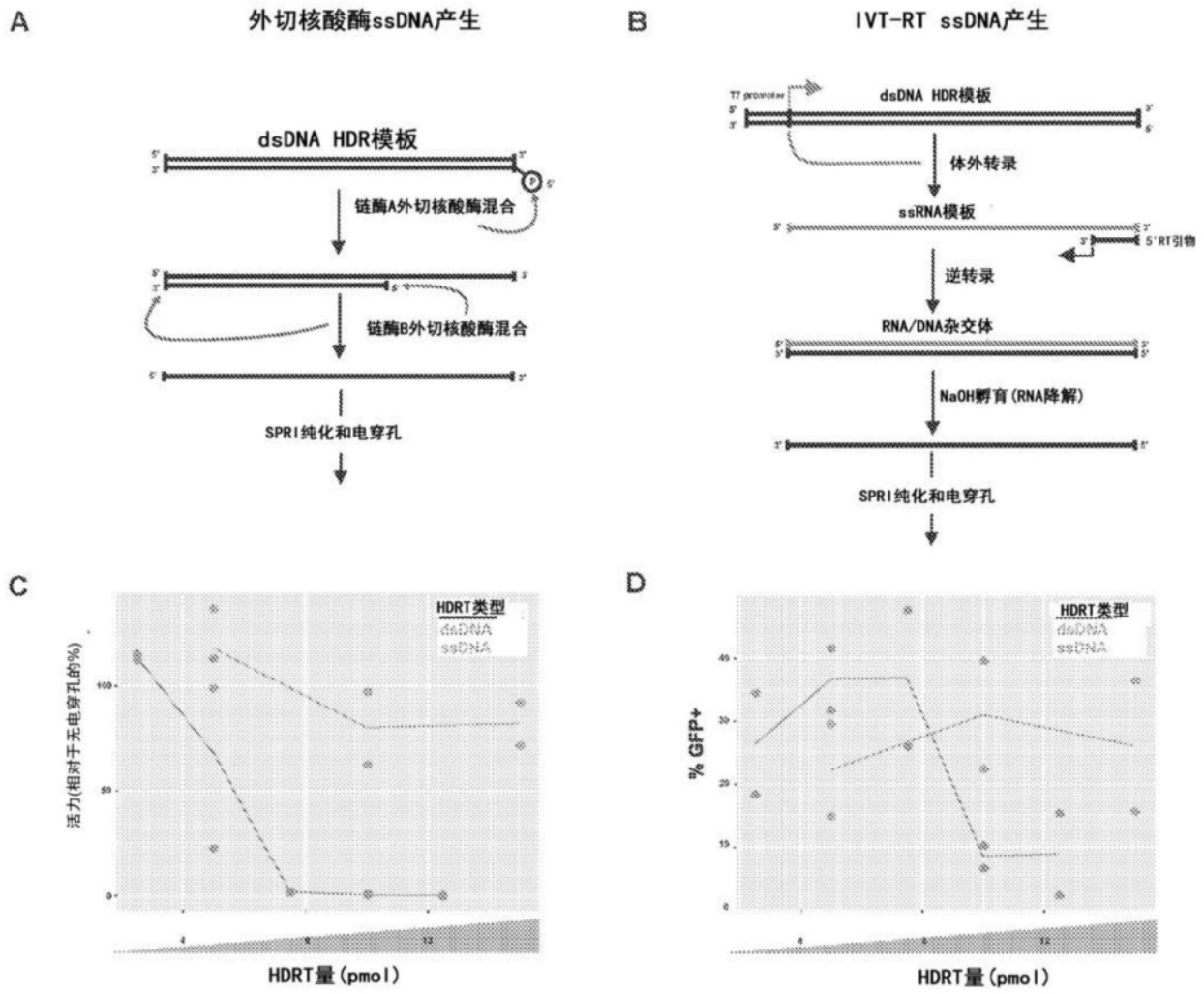


图35