



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109844103 A

(43)申请公布日 2019.06.04

(21)申请号 201780056976.2

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

(22)申请日 2017.07.21

公司 11227

(30)优先权数据

代理人 郑斌 彭鲲鹏

62/365,126 2016.07.21 US

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 9/22(2006.01)

2019.03.15

C12N 15/82(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 15/90(2006.01)

PCT/IB2017/054446 2017.07.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/015936 EN 2018.01.25

(71)申请人 美克斯细胞有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 李林鸿 康奈尔·艾伦

马杜苏登·佩什瓦

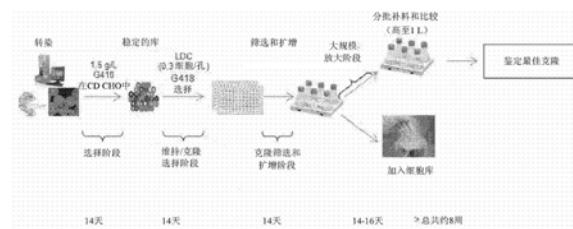
权利要求书4页 说明书46页 附图25页

(54)发明名称

用于修饰基因组DNA的方法和组合物

(57)摘要

组合物和方法涉及内源基因组DNA区域的序列修饰。某些方面涉及用于细胞中的靶基因组DNA区域的位点特异性序列修饰的方法,其包括:用组合物通过电穿孔转染所述细胞,所述组合物包含(a)DNA寡核苷酸;(b)DNA消化剂;和(c)靶向RNA,其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的;其中供体DNA包含:(i)包含与所述靶基因组DNA区域同源的核酸序列的同源区域;和(ii)序列修饰区域;并且其中所述基因组DNA序列在所述靶基因组DNA区域被特异性修饰。



1. 用于细胞中的靶基因组DNA区域的位点特异性序列修饰的方法,其包括:  
用组合物通过电穿孔转染所述细胞,所述组合物包含 (a) DNA寡核苷酸; (b) DNA消化剂;  
和 (c) 靶向RNA,其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的;  
其中所述DNA寡核苷酸包含:
  - (i) 包含与所述靶基因组DNA区域同源的DNA序列的同源区域; 和
  - (ii) 序列修饰区域; 并且其中所述基因组DNA序列在所述靶基因组DNA区域特异性修饰。
2. 权利要求1所述的方法,其中电穿孔是使用流式电穿孔装置的流式电穿孔。
3. 权利要求1至2中任一项所述的方法,其中所述DNA消化剂是核酸酶。
4. 权利要求3所述的方法,其中所述核酸酶包含Cas9。
5. 权利要求3至4中任一项所述的方法,其中所述核酸酶是位点特异性核酸酶。
6. 权利要求5所述的方法,其中所述靶向RNA包含指导RNA。
7. 权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述靶向RNA是加帽的和多腺苷酸化的。
8. 权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述靶向RNA在体外加帽和多腺苷酸化。
9. 权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸是单链的。
10. 权利要求9所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸和靶向RNA与所述靶基因组DNA区域的相同链互补。
11. 权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是多于10个核酸。
12. 权利要求11所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是10至800个核酸。
13. 权利要求12所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是10至600个核酸。
14. 权利要求13所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是10至200个核酸。
15. 权利要求14所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是10至100个核酸。
16. 权利要求15所述的方法,其中所述DNA寡核苷酸是10至50个核酸。
17. 权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述组合物中所述DNA寡核苷酸的浓度大于10 $\mu$ g/mL。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述组合物中所述DNA寡核苷酸的浓度为约10至约500 $\mu$ g/mL。
19. 权利要求18所述的方法,其中所述组合物中所述DNA寡核苷酸的浓度为约35至约300 $\mu$ g/mL。
20. 权利要求19所述的方法,其中所述组合物中所述DNA寡核苷酸的浓度为约35至约200 $\mu$ g/mL。
21. 权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述组合物是非病毒的。
22. 权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。
23. 权利要求22所述的方法,其中所述细胞是人细胞。
24. 权利要求22所述的方法,其中所述细胞是成纤维细胞。
25. 权利要求22所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是外周血淋巴细胞。
26. 权利要求22所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是经扩增T细胞。
27. 权利要求22所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是干细胞。
28. 权利要求27所述的方法,其中所述干细胞是造血干细胞。

29. 权利要求27所述的方法,其中所述细胞是间充质干细胞。
30. 权利要求22所述的方法,其中所述哺乳动物细胞是原代细胞。
31. 权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述基因组DNA序列包含疾病相关基因。
32. 权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述基因组DNA序列包含HBB基因。
33. 权利要求32所述的方法,其中所述序列修饰是所述基因组DNA的校正,其将所述HBB基因的第六个密码子修饰为谷氨酸密码子。
34. 权利要求31所述的方法,其中所述疾病是慢性肉芽肿病。
35. 权利要求31或34所述的方法,其中所述基因组DNA序列包含gp91phox基因。
36. 权利要求1至35中任一项所述的方法,其中所述寡核苷酸包含至少10个核酸的同源序列。
37. 权利要求36所述的方法,其中所述寡核苷酸包含至少20个核酸的同源序列。
38. 权利要求37所述的方法,其中所述寡核苷酸包含至少30个核酸的同源序列。
39. 权利要求1至38中任一项所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于3%。
40. 权利要求39所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于5%。
41. 权利要求40所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于10%。
42. 权利要求1至41中任一项所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少30%。
43. 权利要求42所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少40%。
44. 权利要求43所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少50%。
45. 权利要求1至44中任一项所述的方法,其中所述DNA序列修饰是一个或更多个终止密码子。
46. 权利要求1至45中任一项所述的方法,其中所述组合物包含两种或更多种具有不同同源序列的DNA寡核苷酸。
47. 权利要求46所述的方法,其中所述组合物包含两种或更多种DNA消化剂。
48. 权利要求47所述的方法,其中所述组合物包含两种或更多种位点特异性DNA消化剂;其中所述DNA消化剂靶向不同的基因组位点。
49. 权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述序列修饰改变所述基因组序列的一个或更多个碱基对。
50. 权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述序列修饰向所述基因组序列添加一个或更多个碱基对。
51. 权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述序列修饰缺失所述基因组序列的一个或更多个碱基对。
52. 权利要求1至51中任一项所述的方法,其中所述细胞是从患者分离的细胞。
53. 权利要求52所述的方法,其中所述细胞是冷冻保存的。
54. 权利要求52所述的方法,其中在转染所述细胞之前少于一周的时间从所述患者分离所述细胞。
55. 权利要求52所述的方法,其中在转染所述细胞之前少于一天的时间从所述患者分离所述细胞。
56. 权利要求52至55中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞尚未冷冻。
57. 权利要求52至56中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞包含两种或更多种不

同的细胞类型。

58. 权利要求52至56中任一项所述的方法,其中所述两种或更多种不同的细胞类型包含在多能性的不同阶段的两种或更多种细胞类型。

59. 权利要求52至58中任一项所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于3%。

60. 权利要求59所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于5%。

61. 权利要求60所述的方法,其中所述序列修饰的效率大于10%。

62. 权利要求52至61中任一项所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少30%。

63. 权利要求62所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少40%。

64. 权利要求63所述的方法,其中电穿孔后的细胞生存力为至少50%。

65. 权利要求52至64中任一项所述的方法,其中所述细胞是从所述对象的骨髓中分离的。

66. 权利要求52至65中任一项所述的方法,其中所述细胞包含干细胞。

67. 权利要求66所述的方法,其中所述干细胞包括造血干细胞。

68. 权利要求67所述的方法,其中所述干细胞包含细胞表面标志物CD34+。

69. 权利要求1至68中任一项所述的方法,其还包括对克隆的所分离和选择的细胞进行扩增以产生具有所述DNA序列修饰的克隆细胞。

70. 权利要求69所述的方法,其中扩增细胞以用于大规模制备。

71. 权利要求69或70中任一项所述的方法,其中以大于1L的体积扩增细胞。

72. 权利要求71所述的方法,其中以3L或更大的体积扩增细胞。

73. 权利要求1至72中任一项所述的方法,其中所述细胞在无血清培养基中培养。

74. 权利要求1至73中任一项所述的方法,其还包括针对所述序列修饰对所述细胞进行筛选。

75. 权利要求1至74中任一项所述的方法,其还包括冷冻经转染细胞。

76. 权利要求1至75中任一项所述的方法,其还包括扩增先前冷冻的经转染细胞。

77. 用于产生包含靶基因组DNA序列的基因组DNA序列修饰的稳定细胞系的方法,所述方法包括:

用组合物通过电穿孔转染所述细胞,所述组合物包含 (a) DNA寡核苷酸; (b) DNA消化剂;

(c) 靶向RNA,其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的;

其中供体DNA包含:

(i) 包含与所述靶基因组DNA区域同源的核酸序列的同源区域; 和

(ii) 序列修饰区域; 并且

针对在所述靶基因组DNA区域的所述基因组DNA序列修饰对经转染细胞进行筛选;

通过限制性稀释分离所筛选的经转染细胞以获得克隆细胞;

扩增所分离的经转染细胞以产生包含所述基因组DNA序列修饰的稳定细胞系。

78. 通过权利要求77所述的方法产生的细胞系。

79. 使用权利要求1至78中任一项所述的方法产生的经电穿孔细胞。

80. 通过施用有效量的权利要求79所述的经电穿孔细胞或权利要求78所述的细胞系来治疗患有或怀疑患有疾病或病症的对象的方法。

81. 临床研究方法,其包括施用有效量的权利要求79所述的经电穿孔细胞或权利要求

78所述的细胞系。

## 用于修饰基因组DNA的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年7月21日提交的美国临时专利申请No. 62/365,126的权益。所引用申请的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 公开内容的背景

### 1. 技术领域

[0004] 本发明一般涉及生物技术领域。更具体地，涉及用于修饰基因组DNA的新方法和组合物。

### 2. 背景技术

[0005] 靶向基因组工程涉及在细胞内在沿着DNA的特定位点处以定向方式编辑或改变内源DNA。尽管基因修复和同源定向基因改变的巨大潜力，但当前的基因组工程方法提供非常低的修复或编辑效率，并且有可能引入有害或不期望的DNA序列和结果。

[0006] 内源基因组序列的修饰可提供先进的治疗应用以及先进的研究方法。目前，用于体外干扰基因功能的最常用方法是RNA干扰(RNAi)。但是，这种方法有局限性。例如，RNAi可表现出显著的脱靶效应和毒性。此外，RNAi参与许多内源过程的细胞机制，并且人为地制定可非常好地影响感兴趣途径的机制(例如RNAi)可导致误导或错误结果。对细胞基因组序列进行修饰的高效且无毒的机制将是用于基因敲减的更精确的方法。

[0007] 对内源基因组序列进行修饰的高效且无毒的方法也可以导致离体治疗的进步，因为可以从患者中分离细胞，修改基因组以校正突变，并将患者自身的细胞移植回体内以实现治疗效果。目前的方法过于低效或过于有毒而无法达到这些效果。在本领域中需要高效、无毒且稳定的允许定点基因组DNA修饰的技术

### 发明内容

[0008] 组合物和方法涉及内源靶基因组DNA序列的序列修饰或修改。某些方面涉及用于细胞中的靶基因组DNA区域的位点特异性序列修饰的方法，其包括：用组合物通过电穿孔转染所述细胞，所述组合物包含(a)DNA寡核苷酸；(b)DNA消化剂；和(c)靶向RNA，其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的；其中所述DNA寡核苷酸包含：(i)包含与所述靶基因组DNA区域同源的DNA序列的同源区域；和(ii)序列修饰区域；并且其中所述基因组DNA序列在所述靶基因组DNA区域特异性修饰。

[0009] 另一方面涉及用于细胞中的靶基因组DNA区域的位点特异性序列修饰的方法，其包括：用组合物通过电穿孔转染干细胞，所述组合物包含(a)DNA寡核苷酸；(b)DNA消化剂；和(c)靶向RNA，其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的；其中所述DNA寡核苷酸包含：(i)包含与所述靶基因组DNA区域同源的DNA序列的同源区域；和(ii)序列修饰区域；并且其中所述基因组DNA序列在所述靶基因组DNA区域特异性修饰；并且其中所述细胞是干细胞或其后代。在一些实施方案中，细胞是原代细胞。如本文所用的术语“原代”是指不是永生

化的、并直接取自活组织的细胞。这些细胞经历了非常少的群体倍增,因此与连续(肿瘤或人工永生化)细胞系相比,它们更多地代表了它们来源的组织的主要功能组分,因此代表了针对体内状态的更具代表性的模型。

[0010] 在一些实施方案中,DNA寡核苷酸和靶向RNA与靶基因组DNA区域的相同链互补。在一些实施方案中,DNA消化剂是核酸酶。在一些实施方案中,核酸酶包含Cas9。在一些实施方案中,核酸酶包含Cpf1、CasX或CasY。在一些实施方案中,靶向RNA包含指导RNA。在一些实施方案中,靶向RNA是加帽的和多腺苷酸化的。在一些实施方案中,靶向RNA在体外加帽和/或多腺苷酸化。

[0011] 术语“序列修饰”或“DNA修改”是对DNA序列的改变,并且可包括内源基因组DNA序列的添加、改变或缺失。例如,对于靶基因组序列,供体DNA包含与靶基因组序列互补、相同或同源的序列以及序列修饰或修改区域。序列修饰区域一般位于同源末端之间。序列修饰不与靶基因组序列互补或与靶基因组序列具有低程度的同源性,并且包含靶基因组序列的改变。

[0012] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。术语“同源区”是指供体DNA上与靶基因组DNA序列具有一定程度同源性的区域。同源性可以通过比较可为了比较目的而比对的每个序列中的位置来确定。当所比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则该分子在该位置是同源的。序列之间的同源性程度是序列共有的匹配或同源位置的数目的函数。“不相关的”或“非同源的”序列与本发明的序列之一具有小于40%的同一性,但优选小于25%的同一性。

[0013] 多核苷酸或多核苷酸区域(或者多肽或多肽区域)与另一序列具有一定百分比(例如,至少或至多60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,或其中可来源的任何范围)的“序列同一性”或“同源性”意味着在比对时,在比较两个序列中该百分比的碱基(或氨基酸)是相同的。该比对和百分比同源性或序列同一性可以使用本领域已知的软件程序来确定,例如在Ausubel等编辑(2007) *Current Protocols in Molecular Biology* 中描述的那些。

[0014] 在一些实施方案中,寡核苷酸是单链的。预期单链寡核苷酸将提高细胞对DNA的耐受性并减少DNA诱导的细胞毒性。

[0015] 在某些实施方案中,供体DNA的同源区域与靶基因组序列100%同源或相同。在另一些实施方案中,供体DNA的同源区域为85%、90%、95%或99%同源。

[0016] 在某些实施方案中,供体DNA包含与靶基因组DNA序列同源的核苷酸序列的至少或至多10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、75、100、150和200个残基(或其中可衍生的任何范围)。在一些具体的实施方案中,供体DNA包含与基因组DNA序列相同的序列的至少约10个或至少约15个或至少约20个核酸。在本文中,术语“相同序列”是指与基因组DNA的序列完全匹配的序列。相同序列可以位于DNA序列修饰的5'末端的区域和DNA序列修饰的3'末端的区域中。作为说明性实例,当供体DNA包含至少10个核酸的同源序列时,供体DNA可以例如在序列修饰的每一侧包含5个核酸的同源序列。类似地,包含10个核酸的同源序列的供体DNA可以例如在序列修饰的每一侧包含5个核酸的互补序列。

[0017] 本文中所使用的术语“互补”是指核苷酸之间的Watson-Crick碱基配对,并且具体

地是指相互氢键键合的核苷酸,其中胸腺嘧啶或尿嘧啶残基通过两个氢键与腺嘌呤残基连接,胞嘧啶和鸟嘌呤残基通过三个氢键连接。一般来说,核酸包含被描述为与指定的第二核苷酸序列具有“百分比互补性”的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可与指定的第二核苷酸序列具有80%、90%或100%的互补性,表示序列的10个核苷酸中的8个、10个核苷酸中的9个、10个核苷酸中的10个与指定的第二核苷酸序列互补。例如,核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'100%互补。此外,核苷酸序列3'-TCGA-与核苷酸序列5'-TTAGCTGG-3'的一个区域100%互补。本领域技术人员将认识到两个互补的核苷酸序列包括有义链和反义链。

[0018] 术语“转染”是指用于将生物活性物质(例如核酸、蛋白质、酶或小分子)引入细胞中的方法。核酸可以是DNA(作为质粒或寡聚体递送)和/或RNA或其组合。

[0019] 术语“电穿孔”是指向细胞施加由外部施加的电场的转染方法。在某些实施方案中,所使用的电穿孔方法为静电穿孔。

[0020] 在某些实施方案中,使用流式电穿孔(flow electroporation)对细胞进行电穿孔。流式电穿孔包括:将细胞和负载分子的混悬液转移到包含流体室或流体流路的装置中;所述流体室或流体流路包含沿着流体室或流体流路的侧面设置的电极,并且被配置成使流体室或流体流路内的生物颗粒经历适用于电穿孔的电场;以及将经电穿孔的细胞混悬液转移出该装置。术语“流式电穿孔”是指流体室流路内的细胞的电穿孔。该方法对大规模体积的细胞是特别有效的。相比之下,静电穿孔涉及一组有限体积的细胞的电穿孔,这是由于与跨过液体移动电流和相对电极之间的距离相关的限制。

[0021] 在某些方面中,将表达构建体转染到细胞中包括使细胞的混悬液流动通过流动室中的电场,电场是由至少部分地限定流动室的相对的带相反电荷的电极产生的,其中流动室的热阻小于约10°C/瓦。在另一些某些方面中,转染细胞包括使用这样的流式电穿孔仪器,其包含用于容纳待电穿孔的细胞的混悬液的室;该室至少部分地由相对的带相反电荷的电极限定;并且其中该室的热阻小于约10°C/瓦。

[0022] 在某些方面中,将表达构建体转染到细胞中包括将细胞混悬液电穿孔或使其暴露于室中的电场,电场是由至少部分地限定室的相对的带相反电荷的电极产生的,其中该室的热阻小于约10°C/瓦。在另一些某些方面中,转染细胞包括使用这样的电穿孔仪器,其包含用于容纳待电穿孔的细胞的混悬液的室;该室至少部分地由相对的带相反电荷的电极限定;并且其中该室的热阻小于约10°C/瓦。

[0023] 在某些方面中,室的热阻为约0.1°C/瓦至10°C/瓦。例如,室的热阻可为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10°C/瓦,或者其中可来源的任何热阻。

[0024] 相对的带相反电荷的电极可彼此间隔至少1mm、至少2mm、至少3mm,或者其中可来源的任何距离或范围。在所公开的任意实施方案中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比可为约1至100cm。例如,比例可为约1至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100cm,或者其中可来源的任何值或范围。在

某些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔至少1mm。在另一些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔至少3mm。在甚至另外的一些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔约3mm至约2cm。例如,相对的带相反电荷的电极可彼此间隔约3、4、5、6、7、8、9或10mm,或者其中可来源的任何距离,或者相对的带相反电荷的电极可彼此间隔约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0cm,或者其中可来源的任何距离。在这些实施方案的一些方面中,被电穿孔的细胞基本上不被此热降解。

[0025] 在所公开的任意实施方案中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比可为约1至100cm。例如,比例可为约1至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100cm,或者其中可来源的任何值或范围。在某些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔至少1mm。在另一些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔至少3mm。在甚至另外的一些方面中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且相对的带相反电荷的电极彼此间隔约3mm至约2cm。例如,相对的带相反电荷的电极可彼此间隔约3、4、5、6、7、8、9或10mm,或者其中可来源的任何距离,或者相对的带相反电荷的电极可彼此间隔约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0cm,或者其中可来源的任何距离。在这些实施方案的一些方面中,被电穿孔的细胞基本上不被此热降解。

[0026] 在所公开的任意实施方案中,仪器还可包含冷却元件以散热。例如,冷却元件可包括热电冷却元件。作为另一个实例,冷却元件可包括与电极流动接触的冷却流体。作为又一个实例,冷却元件可包括与电极有效相连的散热器。室的热阻可小于约3°C/瓦。在一些实施方案中,室的热阻为约0.5°C/瓦至4°C/瓦,或者室的热阻为约1°C/瓦至3°C/瓦。例如,室的热阻可为约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0°C/瓦,或者其中可来源的任何值。

[0027] 在某些涉及通过电穿孔转染细胞的方法中,该方法涉及使细胞混悬液暴露于强度大于0.5kV/cm的电场。例如,电场的强度可大于约3.5kV/cm。在某些方面中,电场的强度大于约0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0或3.5kV/cm,或者其中可来源的任何值。

[0028] 在一些实施方案中,转染细胞包括使用流式电穿孔仪器,该仪器包含:限定流动通道的壁,所述流动通道具有电穿孔区,其被配置成接收并短暂容纳连续流动的待电穿孔的细胞的混悬液;与流动通道流体连通的流入口,由此可以将混悬液通过流入口引入流动通道中;与流动通道流体连通的出口,由此可以将混悬液通过出口从流动通道取出;在电穿孔区内限定流动通道的壁,其包含形成流动通道的第一壁的主要部分的第一电极和形成流动通道的与第一壁相对的第二壁的主要部分的第二电极,如此设置第一电极和第二电极使

得当与电能来源电连通时,在其间形成电场,混悬液可以流动通过该电场;并且其中流动通道的热阻小于约10°C/瓦。

[0029] 在某些这样的实施方案中,第一电极和第二电极或相对的带相反电荷的电极彼此间隔至少1mm。此外,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比可为约1至100cm。在一些特定实施方案中,室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比可为约1至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100cm,或者其中可来源的任何值或范围。在某些实施方案中,通过本文中所述的电穿孔方法电穿孔的细胞基本上不被由此热降解。在本文中所述的某些实施方案中,室是流动室。

[0030] 在一些方面中,电穿孔仪器包括用于容纳待电穿孔的细胞的混悬液的室;该室至少部分地由相对的带相反电荷的电极限定;并且其中该室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm。在一些特定方面中,比例为约1至70cm。在另一些特定方面中,比例为约1至50cm。例如,比例可为约1至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100cm,或者其中可来源的任何值。在本文中所述的某些实施方案中,室是流动室。

[0031] 在一些实施方案中,流式电穿孔仪器包含限定流动通道的壁,所述流动通道被配置成接收并暂时容纳连续流动的待电穿孔的细胞的混悬液;与流动通道流体连通的流入口,由此可以将混悬液通过流入口引入流动通道中;与流动通道流体连通的流出口,由此可以将混悬液通过出口从流动通道取出;限定流动通道的壁,其包含形成流动通道的第一壁的至少一部分的第一电极,和形成流动通道的与第一壁相对的第二壁的至少一部分的第二电极,如此设置第一电极和第二电极使得当与电能来源电连通时,在其间形成电场,混悬液可以流动通过该电场;并且其中流动通道的热阻小于约10°C/瓦。在某些方面中,流动通道的热阻为约0.1°C/瓦到10°C/瓦。例如,流动通道的热阻可为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5或10°C/瓦,或者其中可来源的任何热阻。第一电极和第二电极可彼此间隔至少1mm、至少2mm、至少3mm,或者其中可来源的任何距离或范围。在所公开的任意实施方案中,流动室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比可为约1至100cm。例如,比例可为约1至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100cm,或者其中可来源的任何值或范围。在某些方面中,流动室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm,并且第一电极和第二电极彼此间隔至少1mm。在另一些方面中,流动室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至

100cm, 并且第一电极和第二电极彼此间隔至少3mm。在甚至另外的一些方面中, 流动室的与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比为约1至100cm, 并且第一电极和第二电极彼此间隔约3mm至约2cm。例如, 第一电极和第二电极可彼此间隔约3、4、5、6、7、8、9或10mm, 或者其中可来源的任何距离, 或者第一电极和第二电极可彼此间隔约1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0cm, 或者其中可来源的任何距离。在这些实施方案的一些方面中, 在流动通道中被电穿孔的细胞基本上不被由此热降解。

[0032] 在某些所公开的方法和仪器中, 室的热阻为约0.1°C/瓦至约4°C/瓦。在一些方面中, 室的热阻为约1.5°C/瓦至约2.5°C/瓦。例如, 室的热阻可为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0°C/瓦, 或者其中可来源的任何热阻。

[0033] 在某些所公开的方法和仪器中, 流式电穿孔仪器包含: 限定流动通道的壁, 所述流动通道被设置成接收并暂时容纳连续流动的包含颗粒的混悬液; 与流动通道流体连通的流入口, 由此可以将混悬液通过流入口引入流动通道中; 与流动通道流体连通的流出口, 由此可以将混悬液通过流出口从流动通道取出; 限定流动通道的壁, 包含形成流动通道的第一壁的第一电极板和形成流动通道的与第一壁相对的第二壁的第二电极板; 其中选择接触混悬液的电极的面积和电极之间的距离使得流动通道的热阻小于约4°C/瓦; 成对电极设置成与电能来源电连通, 由此在电极之间形成电场; 由此流动通过流动通道的颗粒混悬液可以经历在电极之间形成的电场。在某些方面中, 限定流动通道的电极板还包括由非导电材料制成的并且设置在第一电极板和第二电极板之间以维持电极板处于间隔关系的垫片, 垫片限定通道, 在那里形成流动通道的相对侧壁。垫片可例如与第一电极板和第二电极板中的每一个形成密封。在一些实施方案中, 仪器包含多个流动通道, 并且垫片包含形成该多个通道中的每一个的相对侧壁的多个通道。在一些方面中, 流入口和流出口之一包含有形成在电极板之一中并且与流动通道流体连通的孔。流入口和流出口中的另一个可包含有形成在电极板之一中并且与流动通道流体连通的孔。在某些方面中, 流入口和流出口包含在电极板中的另一个中形成的并且与流动通道流体连通的孔。在所公开的任意实施方案中, 仪器还可包含与流动通道有效相连的冷却元件以散热。例如, 冷却元件可包含热电冷却元件。作为另一个实例, 冷却元件可包含与电极接触的流动的冷却流体。作为又一个实例, 冷却元件可包含与电极有效相连的散热器。流动通道的热阻可小于约3°C/瓦。在一些实施方案中, 流动通道的热阻为约0.5°C/瓦至4°C/瓦, 或者流动通道的热阻为约1°C/瓦至3°C/瓦。例如, 流动通道的热阻可为约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9或4.0°C/瓦, 或者其中可来源的任何值。

[0034] 在某些所公开的方法和仪器中, 第一电极可包含长形的导电结构, 其中第二电极包含管状的导电结构; 其中电极同心地布置成使得第二管状电极以与第一电极间隔开的关系围绕第一电极; 并且其中流动通道设置在第一电极和第二电极之间所限定的环形空间内。电极可形成限定流动通道的壁的至少一部分。在一些实施方案中, 用于保持第一电极和第二电极的同心环形间隔件是间隔开的同心关系。在某些方面中, 仪器布置成与第二类似仪器串联(in series)或并联(in parallel)。

[0035] 在某些涉及通过流式电穿孔转染细胞的方法中,流动通道的热阻小于约10°C/瓦。在一些涉及通过流式电穿孔转染细胞的方法中,该方法涉及使待电穿孔的细胞的混悬液流动通过流动通道,并在流动通过流动通道的同时使混悬液暴露于电场,电场的强度大于0.5kV/cm。例如,电场的强度可大于约3.5kV/cm。在某些方面中,电场的强度大于约0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0或3.5kV/cm,或者其中可来源的任何值。

[0036] 在所公开的关于流式电穿孔仪器的实施方案中,特别考虑到流式电穿孔所述的参数和参数范围可用于本文中所述的方法中使用的静电穿孔仪器。在一些具体实施方案中,使用流式电穿孔,并排除静电穿孔或非流式电穿孔。在另一个具体实施方案中,使用静电穿孔并排除流式电穿孔。

[0037] 任意所公开的方法可包括使用限制性稀释经转染细胞来获得单个细胞集落的步骤。如本文中所用,术语“限制性稀释”是指大量稀释细胞培养物的过程,目的是在各个培养物中获得单个细胞。当这样的经分离的单个细胞增殖时,所得培养物仅包含原始细胞的克隆。例如,可使用多孔板来获得单个细胞培养物或集落。例如,限制性稀释可用于源自患者细胞的iPS研究(例如,用于镰状细胞患者的修复)。使用限制性稀释方法,可以将iPS细胞修饰成经校正的表达血红蛋白的细胞,将其分离并扩增以向患者施用。

[0038] 在所公开的任意方法中,可采用包括扩增经分离和选择的克隆细胞以产生具有特定基因组DNA序列修饰的克隆细胞的步骤。

[0039] 在所公开的涉及扩增经分离的克隆细胞的方法中,扩增可以是用于大规模制备的。例如,可以以大于1L的体积扩增细胞,或者可以以大于3L的体积扩增细胞。在某些方面中,以大于1.0、1.5、2.0、2.5或3.0L(或者其中可来源的任何值)的体积扩增细胞。

[0040] 在所公开的任意方法中,可采用另外的步骤,其包括冷冻经转染的和选择或筛选的细胞。还可采用甚至另外的步骤,其中扩增先前被冷冻的经转染的和选择/筛选的细胞。

[0041] 在所公开的一些方法中,细胞培养物可包含本领域普通技术人员已知的任何另外的成分,如本领域普通技术人员基于培养的细胞的类型容易选择的。例如,可在丁酸钠或相当的盐中培养细胞。

[0042] 在所公开的一些方法中,可采用另外的步骤,其包括扩增经分离和选择或筛选的克隆细胞以产生具有基因组DNA序列修饰的克隆细胞。

[0043] 另外一些方面涉及用于产生包含靶基因组DNA序列的基因组DNA序列修饰或修改的稳定细胞系的方法,所述方法包括:用组合物通过电穿孔转染所述细胞,所述组合物包含(a)DNA寡核苷酸和(b)消化剂;其中供体DNA包含:(i)包含与所述靶基因组DNA区域同源的核酸序列的同源区域;和(ii)序列修饰区域;并且针对在所述靶基因组DNA区域的所述基因组DNA序列修饰对经转染细胞进行筛选;通过限制性稀释分离所筛选的经转染细胞以获得克隆细胞;扩增所分离的经转染细胞以产生包含所述基因组DNA序列修饰的稳定细胞系。

[0044] 本公开还提供了通过本文描述的方法产生的细胞系或经电穿孔细胞。

[0045] 另一个方面涉及治疗患有或怀疑患有疾病或病症的对象的方法,其通过施用有效量的通过本文中所述的方法产生的细胞系或经电穿孔细胞来进行。

[0046] 特别考虑到可以排除本文中所述的一些实施方案。还考虑到当描述范围时,可以排除某些范围。

[0047] 如本说明书中所用,当使用没有数量词修饰的名词时,其可意指一个/种或更多

个/种。如权利要求书中所用,当与词组“包含/包括”连用时,当使用没有数量词修饰的名词时,可意指一个/种或多于一个/种。

[0048] 权利要求中的术语“或”的使用用于表示“和/或”,除非明确指出仅指替代方案或替代方案是相互排斥的,尽管本公开内容支持仅涉及替代方案和“和/或”的定义。如本文所用,“另一个/种”可以意指至少第二个/种或更多个/种。

[0049] 贯穿本申请,术语“约”用于表示值包括确定该值所用的设备、方法的误差所允许的固有差异,或者研究主题之间存在的差异。

[0050] 从以下详细描述中,本发明的其他目的、特点和优点将变得明显。然而,应理解,尽管详细描述和具体实施例表示本发明的一些优选实施方案,但其仅仅以举例说明的方式给出,因为通过该详细描述,在本发明的精神和范围内的多种改变和修改对本领域技术人员变得将明显。

## 附图说明

[0051] 以下附图形成本说明书的一部分并且被包括以进一步证明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或更多个结合本文中给出的一些具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0052] 图1:采用Maxcyte STX静电和流式电穿孔转染技术的稳定细胞系开发过程。附图描绘了稳定细胞产生的工作流程。电穿孔后,可以将细胞培养一段时间而不进行选择以允许从电穿孔程序中恢复(图中未示出)。电穿孔之后,通过在选择剂存在下培养细胞来选择细胞(选择阶段)。在选择阶段之后,在选择剂存在下以较低密度培养细胞以实现限制性稀释克隆(维持/克隆选择阶段)。在产生克隆群体之后,针对外源多肽表达筛选克隆并扩增(克隆筛选和扩增阶段)。筛选之后,将具有期望活性的克隆以更大规模生长用于生产目的(大规模扩大阶段)或进行长期储存,例如冷冻保存。

[0053] 图2A-C:DNA转染对细胞具有不同的细胞毒性。图2示出的是DNA和mRNA转染的外周血淋巴细胞(PBL)和K562细胞的生存力(图2A),DNA和mRNA转染的PBL和K562细胞的GFP表达(图2B),以及DNA和mRNA转染的PBL和K562细胞的细胞数(图2C)。数据表明DNA转染不对K562产生细胞毒性,但确实在静息PBL中诱导强烈的细胞毒性。

[0054] 图3:mRNA-CRISPR转染在K562和PBL的AAVS1位点诱导基因组DNA编辑。图3中示出的是静息PBL细胞与K562细胞的通过Cle-1测定的基因编辑的比较。细胞未进行电穿孔(-EP)或用mRNA-CRISPR(分别为cas9和gRNA)进行电穿孔(+EP)。如下加载该电泳凝胶中的样品:泳道1:标记;泳道2:PBL的-EP;泳道3:PBL的+EP;泳道4:K562的-EP;泳道5:K562的+EP。校正的AAVS-1位点的切割产物是298和170个碱基对,亲本带是468个碱基对。编辑率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。静息电穿孔的静息PBL和K562细胞的编辑率分别为46%和49%。

[0055] 图4:mRNA-CRISPR转染在K562的AAVS1位点诱导基因组DNA编辑。图4中示出的是重复实验结果的电泳凝胶,显示通过用mRNA-CRISPR(Cas9和指导RNA)对细胞进行电穿孔的基因编辑的一致性,通过Cle-1测定,其分别诱导59%和52%的DNA编辑。校正的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对,亲本带为468个碱基对。编辑率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。

[0056] 图5:mRNA-CRISPR转染在PBL和经扩增T细胞的AAVS1位点诱导基因组DNA编辑。图5中示出的是静息PBL细胞与经扩增T细胞的比较。细胞未经转染(-EP),用GFP-mRNA转染,或用mRNA-CRISPR(Cas9+gRNA,c+g)转染。以下顺序加载样品:标记,PBL的-EP、GFP和c+g,以及经扩增T细胞的-EP和c+g。校正的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对,亲本带为468个碱基对。编辑率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。用Cas9和指导RNA电穿孔的PBL和经扩增T细胞分别表现出32%和45%的编辑。

[0057] 图6:K562的AAVS1位点中mRNA-CRISPR转染诱导的Hind III序列整合的单链-DNA-01igo大小依赖性。细胞未经转染(-EP),用单独mRNA-CRISPR转染(c+g),或用mRNA-CRISPR加所示不同大小的单链DNA寡核苷酸转染。以下顺序加载样品:标记,c+g,c+g+26聚体,c+g+50聚体,c+g+70聚体和c+g+100聚体。识别6个核苷酸的HindIII进入AAVS1位点,产生HindIII消化位点。具有整合的寡核苷酸供体序列的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对,亲本带为468个碱基对。整合率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。50、70和100核酸供体寡核苷酸分别显示出43%、35%和34%的整合,而20核酸显示0%整合。

[0058] 图7:经扩增T细胞的AAVS1位点中mRNA-CRISPR寡核苷酸转染诱导的Hind III序列整合。细胞用单独mRNA-CRISPR或用mRNA-CRISPR加50聚体单链寡核苷酸(c+g+o)转染。PCR扩增子用HindIII消化(+H3)或不消化(-H3)。如下加载样品:1)标记;2)c+g-H3;3)c+g+H3;4)c+g+o-H3;5)c+g+o+H3。供体寡核苷酸将6个核苷酸整合到AAVS1位点,产生HindIII消化位点。具有整合的寡核苷酸供体序列的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对,亲本带为468个碱基对。整合率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。用供体寡核苷酸转染的经扩增T细胞表现出15-30%的整合。

[0059] 图8A-C:通过MaxCyte系统的mRNA转染对人经扩增T细胞具有低细胞毒性。与图7中相同的经扩增T细胞的生存力和细胞增殖(图8A),转染后经扩增T细胞的增殖(图8B)和转染后经扩增T细胞的GFP表达(图8C)。数据表明,核酸酶作为mRNA与单链寡聚DNA不仅介导6个核苷酸整合(图7),而且还显示对经扩增T细胞的低细胞毒性。

[0060] 图9:造血干细胞(HSC)的表型和GFP表达。解冻后2天进行电穿孔。数据表明用mRNA转染比用DNA对于CD34+HSC更有效。

[0061] 图10A-D:HSC的DNA-GFP转染比HSC的mRNA-GFP转染具有高得多的细胞毒性。解冻后两天对HSC细胞进行电穿孔。图10中示出是mRNA/DNA转染的CD34+人HSC的生存力(图10A)、增殖(图10B)、GFP表达(图10C)和GFP平均荧光强度(MFI)(图10D)。

[0062] 图11A-C:用mRNA-Cas9/gRNA加不同大小的单链供体DNA寡核苷酸转染HSC具有低细胞毒性。解冻后两天对HSC细胞进行电穿孔。图11中示出是通过mRNA-Cas9/gRNA和所示核酸长度的不同大小的DNA单链寡核苷酸转染的HSC的生存力(图11A)、归一化生存力(图11B)和增殖(图11C)。

[0063] 图12:mRNA-CRISPR转染在CD34+造血干细胞的AAVS1位点诱导基因组DNA编辑。细胞未经转染(-EP),用mRNA-GFP转染(GFP),或用mRNA-CRISPR转染重复4次(C+G 1、2、3、4)。如下加载电泳凝胶的样品:1)标记;2)-EP;3)GFP;4)C+G-1;5)C+G-2;6)C+G-3;7)C+G-4。编辑的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对,亲本带为468个碱基对。编辑率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。用编码Cas9的mRNA和指导RNA转染的HSC在四

个不同的实验中显示出43%、60%、54%和52%的编辑。

[0064] 图13A-B: mRNA-CRISPR寡核苷酸转染在转染后2天在CD34+造血干细胞的AAVS1位点诱导Hind III序列整合。细胞未转染(-EP), 用GFP-mRNA转染(GFP), 用单独mRNA-CRISPR转染(C+G), 或用mRNA-CRISPR加不同大小的寡核苷酸转染(26聚体, 50聚体, 70聚体和100聚体, 100聚体以指定的寡核苷酸浓度)。如下加载电泳凝胶的样品: 1) 标记; 2) -EP-H3; 3) -EP+H3; 4) GFP-H3; 5) GFP+H3; 6) C+G-H3; 7) C+G+H3; 8) 26聚体-H3; 9) 26聚体+H3; 10) 50聚体-H3; 11) 50聚体+H3。图13B中的样品是如下加载的电泳凝胶: 1) 标记; 2) 70聚体-H3; 3) 70聚体+H3; 4) 100聚体-30 $\mu$ g/mL-H3; 5) 100聚体-30 $\mu$ g/mL+H3; 6) 100聚体-100 $\mu$ g/mL-H3; 7) 100聚体-100 $\mu$ g/mL+H3; 8) 100聚体-200 $\mu$ g/mL-H3; 9) 100聚体-200 $\mu$ g/mL+H3。整合的AAVS-1位点的切割产物为298和170个碱基对, 亲本带为468个碱基对。整合率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。用25聚体核酸DNA寡核苷酸转染的HSC表现出0%整合, 而用50聚体和70聚体核酸寡核苷酸转染的HSC分别表现出9%和23%的整合。用30 $\mu$ g/mL的100核苷酸寡核苷酸转染的HSC在该时间点显示0%整合(转染后4天为13%, 数据未显示), 而用100 $\mu$ g/mL和200 $\mu$ g/mL相同寡核苷酸转染的HSC分别表现出28%和43%的整合。

[0065] 图14: 指导RNA提供整合特异性。具有靶向AAVS1位点的gRNA的寡核苷酸整合在AAVS1中, 但不在镰状细胞病(SCD)基因座中。细胞未经电穿孔(-EP)或用mRNA-CRISPR加供体寡核苷酸(c+g+o)电穿孔。-/+H表示不存在(-)或存在(+)HindIII内切核酸酶。如下加载电泳凝胶的样品: 1) 标记; 2) -EP+H; 3) c+g+o-H; 4) c+g+o+H; 5) -EP+H; 6) c+g+o-H; 7) c+g+o+H。泳道2-4代表来自AAVS1基因座的基因组DNA, 泳道5-7代表来自SCD基因座的基因组DNA。整合的AAVS1位点的切割产物为298和170个碱基对, 亲本带为468个碱基对。整合率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)]。用DNA寡核苷酸和AAVS1基因座特异性指导RNA转染的K562细胞特异性整合到AAVS1位点而不是SCD基因座。AAVS1基因座的整合率为20%。

[0066] 图15A-B: 使用靶向AAVS1(图15A)和SCD基因座(图15B)的两种指导RNA的位点特异性整合。如图15B所示, 在SCD基因座处实现供体DNA的位点特异性整合。这些结果在实施例2中进一步描述。

[0067] 图16A-B: 具有序列修饰区域(大写且无阴影)和同源区域(小写和阴影)的示例性供体DNA寡核苷酸。图16A显示了终止密码子作为添加物插入靶基因组DNA中的实例。图16B显示了在靶基因组DNA中改变单个碱基的实例。

[0068] 图17: 转染后1天用编码eGFP的mRNA有效转染HSC。示出了对照细胞(未经转染, 左侧两张显微照片)和经转染细胞(右侧两张显微照片)。对照和经转染细胞两者的细胞都是活的。eGFP接近100%的表达(右下)证明了mRNA转染的有效转染效率。

[0069] 图18: 电穿孔介导HSC中AAVS1位点的有效基因编辑。用mRNA制剂中的cas9(c)和gRNA(g)转染HSC。进行Cel-1测定以分析基因编辑。泳道1是标记。泳道2是对照HSC(-EP)。泳道3是GFP-mRNA转染的HSC。泳道4至7是Cas9/gRNA对HSC的方阵转染(quareate transfection)。

[0070] 图19: gp91phox中最普遍的突变(‘热点’)是外显子7中第676位的C至T突变。使用CRISPR和供体DNA单链寡核苷酸将T突变校正回C, CGD中的终止密码子在校正后回到氨基位点226的Arg, 将恢复gp91的表达。通过使用源自CGD患者的EBV转化的B细胞, 当在转染后5天用FITC缀合的抗gp91抗体测定时, 共转染实际上使gp91表达从1%基础噪音水平(左下)恢

复到10%上调水平(右下)。解冻细胞两天后进行转染。

[0071] 图20A-C显示了gRNA中的Poly A对源自X连锁的CGD患者的B-LCL中的单基因突变修复的影响。(a)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的生存力,其中gRNA含有以不同持续时间酶促添加的各种长度的Poly A。(b)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的增殖,其中gRNA含有以不同持续时间酶促添加的各种长度的PolyA。(c)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的Gp91修复,其中gRNA含有以不同持续时间酶促添加的各种长度的PolyA。所有gRNA均通过ARCA (T7Ultra) 加帽制备。加帽后,5-40分钟的Poly A添加提高了突变修复效率。

[0072] 图21A-C显示了基因修复中加帽和Poly A添加的效果。(a)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的生存力,其中gRNA中具有不同的修饰。(b)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的增殖,其中gRNA中具有不同的修饰。(c)中显示的是在CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的Gp91修复,其中gRNA中具有不同的修饰。在这些实验中,使用TranscriptionAid试剂盒。加帽(通过ARCA)有助于生存力和细胞增殖(细胞增殖提高3-4倍)。加帽和Poly A加尾的组合与未加帽和加尾(聚腺苷酸化)或未加尾的组合可具有相同的基因修复。总之,加帽和加尾组合增加了修复细胞的数量。

[0073] 图22显示了CRISPR/ssOND转染后的总修复细胞,其中gRNA中具有不同的修饰。加帽(通过ARCA)有助于生存力和细胞增殖(细胞增殖提高5倍)。加帽和Poly A加尾的组合与未加帽和加尾或未加尾的组合可具有相同的基因修复。总之,gRNA的加帽和加尾组合增加了修复细胞的数量。

[0074] 图23是供体DNA寡核苷酸的设计示意图。在顶部寡核苷酸1中,gRNA和寡核苷酸与基因组DNA双链体的相同链互补。在底部寡核苷酸2中,gRNA和寡核苷酸与基因组DNA双链体的不同链互补。

[0075] 图24显示了ssDNA寡核苷酸的选择对突变修复效率的影响。当施加的单链DNA(ssDNA)寡聚体和gRNA与基因组DNA双链体的相同链互补时(寡核苷酸1),观察到更高的修复效率。当施加的ssDNA寡聚体和gRNA与基因组DNA双链体的不同链互补时(寡核苷酸2),观察到较低的修复效率。gRNA在CGD的情况下靶向有义链,在SCID的情况下靶向反义链。

[0076] 图25A-C显示了用不同试剂盒制备的gRNA进行基因修复的一致性。(a)中显示的是CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的生存力,其中gRNA由三个具有不同批号的试剂盒制备。(b)中显示了CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的增殖,其中gRNA由三个具有不同批号的试剂盒制备。(c)中显示的是CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的gp91修复,其中gRNA由三个具有不同批号的试剂盒制备。通过不同试剂盒和不同批号制备的gRNA证明了一致且有效的基因修复。

[0077] 图26显示CRISPR/ssOND转染后患者B-LCL的gp91修复,其中在没有酶促反应的情况下添加Poly A加尾的gRNA。使用的正向引物是:5'-TTAATACGACTCACTATAGGCACCCAGATGAA TTGTACGT-3'。20T的反向引物是:5'-TTTTTTTTTTTTTTTTAAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'。30T的反向引物是:5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'。该数据表明,可以在用于扩增作为用于NRA产生的模板的扩增子的反向引物中添加聚T来添加Poly A。

## 具体实施方式

[0078] 本文描述的方法使用DNA寡核苷酸和DNA消化剂来修饰/修改DNA序列。预期本文所述的方法提供低毒性和高效率引入的DNA序列修饰。核酸

[0079] B. 寡核苷酸

[0080] 一些实施方案涉及用包含DNA寡核苷酸和DNA消化剂的组合物通过经电穿孔细胞来对靶基因组DNA序列进行序列修饰。在一些实施方案中，DNA寡核苷酸是单链的。

[0081] 术语“内源基因组DNA”是指细胞的染色体DNA。术语“靶基因组DNA序列”是指DNA序列修饰所针对的内源基因组DNA位点。DNA序列修饰可以是在一个特定位点或多个特定位点改变靶基因组DNA序列的一个或更多个碱基的修饰。改变可包括将靶基因组DNA序列的至少、至多或恰好1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40个碱基对或其中可来源的任何范围改变成不同的至少、至多或恰好1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40个碱基对或其中可来源的任何范围。缺失可以是缺失至少、至多或恰好1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、75、100、150、200、300、400或500个碱基对或其中可来源的任何范围。添加可以是添加至少、至多或恰好1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40或更多个碱基对或其中可来源的任何范围。如果序列修饰以多种方式改变靶基因组DNA，则序列修饰或修改可分类为改变与缺失、改变与添加等。在一个实施方案中，序列修饰是终止密码子。在另一个实施方案中，DNA序列修饰是一个或更多个终止密码子。在另外的一些实施方案中，DNA序列修饰是1、2、3、4、5或10个终止密码子。当序列修饰是终止密码子时，基因编辑的效率和/或可靠性可以提高。

[0082] 术语“寡核苷酸”是指多核苷酸，例如脱氧核糖核酸(DNA)，以及在适当的情况下核糖核酸(RNA)。该术语还应理解为包括作为等同方案的由核苷酸类似物制成的RNA或DNA的衍生物、变体和类似物，以及作为适用于所述的实施方案的单链(有义或反义)和双链多核苷酸。脱氧核糖核苷酸包括脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷和脱氧胸苷。为了清楚起见，当在本文中提及核酸(可以是DNA或RNA)的核苷酸时，使用术语“腺苷”、“胞苷”、“鸟苷”和“胸苷”。应理解，如果核酸是RNA，则具有尿嘧啶碱基的核苷酸是尿苷。

[0083] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用，并且是指任何长度的核苷酸的聚合物形式，其是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或者其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可执行任何已知或未知的功能。以下是多核苷酸的非限制性实例：基因或基因片段(例如，探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的DNA、分离的任何序列的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含经修饰的核苷酸，例如甲基化的核苷酸及核苷酸类似物。如果存在的话，可以在多核苷酸组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分中断。还可以在聚合后修饰多核苷酸，例如通过与标记组分缀合。该术语还是指双链和单链分子二者。除非另有说明或要求，否则本发明的多核苷酸的任何实施方案包括二者：双链形式和已知或预测构成双链形式的两个互补单链形式中的每一个。

[0084] 本文所述的DNA寡核苷酸包含与靶基因组DNA序列和靶基因组DNA序列的序列修饰互补的序列。

[0085] 本文中所使用的术语“互补”是指核苷酸之间的Watson-Crick碱基配对，并且具体地是指相互氢键键合的核苷酸，其中胸腺嘧啶或尿嘧啶残基通过两个氢键与腺嘌呤残基连

接,胞嘧啶和鸟嘌呤残基通过三个氢键连接。一般来说,核酸包括被描述为与指定的第二核苷酸序列具有“百分比互补性”的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可与指定的第二核苷酸序列具有80%、90%或100%的互补性,表示序列的10个核苷酸中的8个、10个核苷酸中的9个、10个核苷酸中的10个与指定的第二核苷酸序列互补。例如,核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'100%互补。此外,核苷酸序列3'-TCGA-与核苷酸序列5'-TTAGCTGG-3'的一个区域100%互补。本领域技术人员将认识到两个互补的核苷酸序列包括有义链和反义链。

[0086] 在某些实施方案中,寡核苷酸包含与靶基因组DNA序列互补的序列的至少约10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48或50个核酸。在一些具体的实施方案中,寡核苷酸包含与基因组DNA序列互补的序列的至少约20个核酸。在本文中,术语“互补序列”是指与基因组DNA的序列完全匹配的序列。互补序列可以位于DNA序列修饰的5'末端的区域和DNA序列修饰的3'末端的区域中。作为说明性实例,当寡核苷酸包含至少20个核酸的互补序列时,寡核苷酸可例如在序列修饰的每一侧包含10个核酸的互补序列。类似地,包含10个核酸的互补序列的寡核苷酸可例如在序列修饰的每一侧包含5个核酸的互补序列。

[0087] DNA寡核苷酸的长度可以为约10、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550或600个核酸至约100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500个核酸或其中可来源的任何范围。在某些实施方案中,寡核苷酸为多于20个核酸,或多于21、22、23、24、25、30或40个核酸。在一些具体实施方案中,寡核苷酸为约30至300个核酸,约25至约200个核酸,约25至约150个核酸,约25至约100个核酸,或约40至约100个核酸。

[0088] 在电穿孔过程中寡核苷酸的浓度可以是电穿孔室和/或样品容器中寡核苷酸的最终浓度。寡核苷酸浓度可以为约10、20、30、50、75、100、150、200、250、300至约350、400、500、1000、1500、2000、3000、4000或5000 $\mu$ g/mL或其中可来源的任何范围。在某些实施方案中,寡核苷酸的浓度为至少30 $\mu$ g/mL。在另一些实施方案中,寡核苷酸的浓度为至少、最多或恰好10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150或200 $\mu$ g/mL或其中可来源的任何范围。

#### [0089] C. DNA消化剂

[0090] 本发明提供了通过用DNA寡核苷酸和DNA消化剂通过电穿孔转染细胞来修饰靶基因组DNA序列的方法。术语“DNA消化剂”是指能够切割核酸的核苷酸亚基之间的键(即磷酸二酯键)的试剂。在一个具体实施方案中,DNA消化剂在RNA上编码。预期在RNA上提供DNA消化剂可以实现在转染后改善细胞生存力和提高列修饰的效率中的一种或更多种。在另一些实施方案中,DNA消化剂为具有酶活性的蛋白质、酶或小分子模拟物。

[0091] 在一个实施方案中,DNA消化剂是转座酶。例如,可以使用设计成用于将所精确限定的DNA序列引入脊椎动物染色体中的合成DNA转座子(例如“睡美人(Sleeping Beauty)”转座子系统)。睡美人转座子系统由睡美人(Sleeping Beauty,SB)转座酶和设计成用于将特定的DNA序列插入脊椎动物的基因组中的转座子构成。DNA转座子以简单的剪切粘贴方式从一个DNA位点易位到另一个DNA位点。转座是一个精确的过程,其中将所限定的DNA片段从一个DNA分子中切除并移动到同一或不同DNA分子或基因组中的另一个位点。

[0092] 与所有其他Tc1/mariner型转座酶一样,SB转座酶将转座子插入受体DNA序列的TA二核苷酸碱基对中。插入位点可以是同一DNA分子的其他位置,也可以是在另一DNA分子(或染色体)中。在哺乳动物(包括人)基因组中,存在约2亿个TA位点。在转座子整合过程中TA插入位点复制。该TA序列的复制是转座的标志,并在一些实验中用于确定机制。转座酶可以编码于转座子内,或者转座酶可以由另外的来源提供,在这种情况下转座子成为非自主要素。非自主转座子是最有用的遗传工具,因为在插入后它们无法独立地继续切除和再次插入。人基因组和其他哺乳动物基因组中鉴定的所有DNA转座子都是非自主的,因为尽管它们包含转座酶基因,但是这些基因是非功能性的并且不能产生可以移动转座子的转座酶。

[0093] 在另一个实施方案中,DNA消化剂是整合酶。例如,phiC31整合酶是编码于噬菌体phiC31的基因组内的序列特异性重组酶。phiC31整合酶介导被称为附着位点(att)的两个34碱基对序列之间的重组,一个是在噬菌体中得到,另一个是在细菌宿主中得到的。已经表明该丝氨酸整合酶在许多不同的细胞类型(包括哺乳动物细胞)中高效地起作用。在phiC31整合酶的存在下,通过在具有与天然attP位点相似的序列的位点(被称为假attP位点)处重组可以将含attB的供体质粒单向整合到靶基因组中。phiC31整合酶可以整合任何尺寸的质粒,作为单一拷贝,并且不需要辅因子。经整合的转基因稳定表达并且是可遗传的。

[0094] 在一个具体实施方案中,DNA消化剂是核酸酶。核酸酶是水解核酸的酶。核酸酶可分为内切核酸酶或外切核酸酶。内切核酸酶是催化在DNA或RNA分子内部的核酸之间的键水解的任何一组酶。外切核酸酶是从DNA或RNA链的末端催化单个核苷酸水解的任何一组酶。核酸酶还可根据它们是否特异性消化DNA或RNA进行分类。特异性催化DNA水解的核酸酶可被称为脱氧核糖核酸酶或DNA酶,而特异性催化RNA水解的核酸酶可被称为核糖核酸酶或RNA酶。一些核酸酶对单链或双链核酸序列具有特异性。一些酶具有外切核酸酶和内切核酸酶特性二者。此外,一些酶能够消化DNA和RNA序列二者。在本文中术语“核酸酶”一般用于指水解核酸序列的任何酶。

[0095] 在不同的核酸酶中,最佳反应条件不同。应考虑的因素包括温度、pH、酶辅因子、盐组成、离子强度和稳定剂。可商购的核酸酶的供应商(例如,Promega Corp.;New England Biolabs,Inc.)提供关于各种酶的最佳条件的信息。如在孵育温度下测量的,大多数核酸酶在pH 7.2至pH 8.5之间使用。此外,大多数核酸酶在37°C下显示出最大活性;然而,少数酶需要更高或更低的温度以获得最佳活性(例如,Taq I,65°C;Sma I,25°C)。DNA浓度也可以是一个因素,因为高DNA浓度可以降低酶活性,而太稀释的DNA浓度可以低于酶的K<sub>m</sub>并且还影响酶活性。

[0096] 核酸酶的非限制性实例包括DNA酶I、Benzonase、外切核酸酶I、外切核酸酶III、绿豆核酸酶(Mung Bean Nuclease)、核酸酶BAL 31、RNA酶I、S1核酸酶、λ外切核酸酶(Lambda Exonuclease)、RecJ和T7外切核酸酶。DNA酶I是非特异性切割DNA以释放具有5'-磷酸化和3'-羟基化末端的二核苷酸、三核苷酸和寡核苷酸产物的内切核酸酶。DNA酶I对单链和双链DNA、染色质和RNA;DNA杂交体起作用。外切核酸酶I催化核苷酸从单链DNA中沿着3'至5'方向去除。外切核酸酶III催化单核苷酸从双螺旋DNA的3'-羟基末端逐步去除。外切核酸酶III还作用于双螺旋DNA的切口以产生单链缺口。单链DNA对外切核酸酶III具有抗性。绿豆核酸酶从DNA末端降解单链延伸。绿豆核酸酶也是RNA内切核酸酶。核酸酶BAL 31降解双螺旋DNA的3'和5'末端二者。核酸酶BAL 31也是在双螺旋DNA和RNA的切口、缺口和单链区域处

切割的高度特异性的单链内切核酸酶。RNA酶I是在所有RNA二核苷酸处切割的单链特异性RNA内切核酸酶。S1核酸酶通过内切核酸降解单链DNA和RNA以获得5'-磷酸基-末端的产物。双链核酸(DNA:DNA、DNA:RNA或RNA:RNA)对S1核酸酶降解具有抗性,除非是极高浓度的酶。 $\lambda$ 外切核酸酶催化5'单核苷酸从双螺旋DNA上去除。其优选的底物为5'-磷酸化双链DNA,尽管 $\lambda$ 外切核酸酶还会以大大降低的速率降解单链和非磷酸化的底物。 $\lambda$ 外切核酸酶不能在切开或缺口处引发DNA消化,RecJ是单链DNA特异性外切核酸酶,其催化脱氧核苷酸单磷酸酯从DNA中沿着5'至3'方向去除。T7外切核酸酶催化5'单核苷酸从双螺旋DNA中去除。T7外切核酸酶催化从5'末端或在双链DNA的切口和缺口处的核苷酸去除。

[0097] 限制性内切核酸酶是可结合本发明的方法使用的核酸酶的另一个实例。表1中提供了限制性内切核酸酶及其识别序列的非限制性实例。

[0098] 表1.限制性内切核酸酶的识别序列。

[0099]

酶	识别序列	酶	识别序列
AatII	GACGTC	Fnu4H I	GCNGC
Acc65 I	GGTACC	Fok I	GGATG
Acc I	GTMKAC	Fse I	GGCCGGCC
Aci I	CCGC	Fsp I	TGCGCA
Acl I	AACGTT	Hae II	RGCGCY
Afe I	AGCGCT	Hae III	GGCC
Afl II	CTTAAG	Hga I	GACGC
Afl III	ACRYGT	Hha I	GCGC

酶	识别序列	酶	识别序列
Age I	ACCGGT	Hinc II	GTYRAC
Ahd I	GACNNNNNGTC	Hind III	AAGCTT
Alu I	AGCT	Hinf I	GANTC
Alw I	GGATC	HinP1 I	GCGC
AlwN I	CAGNNNCTG	Hpa I	GTAAAC
Apa I	GGGCC	Hpa II	CCGG
ApaL I	GTGCAC	Hph I	GGTGA
Apo I	RAATTY	Kas I	GGCGCC
Asc I	GGCGCGCC	Kpn I	GGTACC
Ase I	ATTAAT	Mbo I	GATC
Ava I	CYCGRG	Mbo II	GAAGA
Ava II	GGWCC	Mfe I	CAATTG
Avr II	CCTAGG	Mlu I	ACGCGT
[0100]	Bae I	NACNNNNGTAPyC N	Mly I GAGTCNNNN
	BamH I	GGATCC	Mnl I CCTC
Ban I	GGYRCC	Msc I	TGGCCA
Ban II	GRGCYC	Mse I	TTAA
Bbs I	GAAGAC	Msl I	CAYNNNNRTG
Bbv I	GCAGC	MspA1 I	CMGCKG
BbvC I	CCTCAGC	Msp I	CCGG
Bcg I	CGANNNNNTGC	Mwo I	GCNNNNNNNGC
BciV I	GTATCC	Nae I	GCCGGC
Bcl I	TGATCA	Nar I	GGCGCC
Bfa I	CTAG	Nci I	CCSGG
Bgl I	GCCNNNNNGGC	Nco I	CCATGG
Bgl II	AGATCT	Nde I	CATATG
Blp I	GCTNAGC	NgoMI V	GCCGGC
Bmr I	ACTGGG	Nhe I	GCTAGC
Bpm I	CTGGAG	Nla III	CATG

[0101]

酶	识别序列	酶	识别序列
BsaA I	YACGTR	Nla IV	GGNNCC
BsaB I	GATNNNNATC	Not I	GCGGCCGC
BsaH I	GRCGYC	Nru I	TCGCGA
Bsa I	GGTCTC	Nsi I	ATGCAT
BsaJ I	CCNNGG	Nsp I	RCATGY
BsaW I	WCCGGW	Pac I	TTAATTAA
BseR I	GAGGAG	PaeR7 I	CTCGAG
Bsg I	GTGCAG	Pci I	ACATGT
BsiE I	CGRYCG	PflF I	GACNNNGTC
BsiHKA I	GWGCWC	PfIM I	CCANNNTGG
BsiW I	CGTACG	PleI	GAGTC
Bsl I	CCNNNNNNNGG	Pme I	TTTAAAC
BsmA I	GTCTC	Pml I	CACGTG
BsmB I	CGTCTC	PpuM I	RGGWCCY
BsmF I	GGGAC	PshA I	GACNNNGTC
Bsm I	GAATGC	Psi I	TTATAA
BsoB I	CYCGRG	PspG I	CCWGG
Bsp1286 I	GDGCHC	PspOM I	GGGCC
BspD I	ATCGAT	Pst I	CTGCAG
BspE I	TCCGGA	Pvu I	CGATCG
BspH I	TCATGA	Pvu II	CAGCTG
BspM I	ACCTGC	Rsa I	GTAC
BsrB I	CCGCTC	Rsr II	CGGWCCG
BsrD I	GCAATG	Sac I	GAGCTC
BsrF I	RCCGGY	Sac II	CCGCGG
BsrG I	TGTACA	Sal I	GTGAC
Bsr I	ACTGG	Sap I	GCTCTTC
BssH II	GCGCGC	Sau3A I	GATC
BssK I	CCNGG	Sau96 I	GGNCC
Bst4C I	ACNGT	Sbf I	CCTGCAGG

酶	识别序列	酶	识别序列
BssS I	CACGAG	Sca I	AGTACT
BstAP I	GCANNNNNNTGC	ScrF I	CCNGG
BstB I	TTCGAA	SexA I	ACCWGGT
BstE II	GGTNACC	SfaN I	GCATC
BstF5 I	GGATGNN	Sfc I	CTRYAG
BstN I	CCWGG	Sfi I	GGCCNNNNNGGCC
BstU I	CGCG	Sfo I	GGCGCC
BstX I	CCANNNNNNTGG	SgrA I	CRCCGGYG
BstY I	RGATCY	Sma I	CCCGGG
BstZ17 I	GTATAC	Sml I	CTYRAG
Bsu36 I	CCTNAGG	SnaB I	TACGTA
Btg I	CCPuPyGG	Spe I	ACTAGT
Btr I	CACGTG	Sph I	GCATGC
Cac8 I	GCNNNGC	Ssp I	AATATT
Cla I	ATCGAT	Stu I	AGGCCT
Dde I	CTNAG	Sty I	CCWWGG
Dpn I	GATC	Swa I	ATTTAAAT
Dpn II	GATC	Taq I	TCGA
Dra I	TTTAAA	Tfi I	GAWTC
Dra III	CACNNNGTG	Tli I	CTCGAG
Drd I	GACNNNNNNNGTC	Tse I	GCWGC
Eae I	YGGCCR	Tsp45 I	GTSAC
Eag I	CGGCCG	Tsp509 I	AATT
Ear I	CTCTTC	TspR I	CAGTG
Eci I	GGCGGA	Tth111 I	GACNNNGTC
EcoN I	CCTNNNNNAGG	Xba I	TCTAGA
EcoO109 I	RGGNCCY	Xcm I	CCANNNNNNNNTGG
EcoR I	GAATTC	Xho I	CTCGAG
EcoR V	GATATC	Xma I	CCCGGG
Fau I	CCCGCNNN	Xmn I	GAANNNTTC

[0103] 其中R=A或G,K=G或T,S=G或C,Y=C或T,M=A或C,W=A或T,B=非A(C,G或T),H=非G(A,C或T),D=非C(A,G或T)V=非T(A,C或G),并且N=任何核苷酸。

[0104] 本领域普通技术人员将能够根据靶基因组序列和DNA寡核苷酸的特点选择合适的核酸酶。在一个实施方案中,核酸酶是位点特异性核酸酶。在一个相关实施方案中,核酸酶具有至少8个、至少10个、至少12个、至少14个、至少16个、至少18个、至少20个或至少25个碱基对的识别序列。预期转染编码具有超过8、10、12、14、16、18、20或25个碱基对的识别序列的核酸酶的RNA对细胞的毒性较小。此外,提供核酸酶作为RNA还可以降低对细胞的毒性。

[0105] 在一个实施方案中,编码位点特异性核酸酶的RNA编码Cas核酸酶。在一个相关实施方案中,Cas核酸酶是Cas9。在另一个实施方案中,核酸酶是cas9并且靶向RNA是指导RNA。可以与本文中所述的方法和组合物一起使用的序列特异性核酸酶系统的另一个实例包括Cas9/CRISPR系统(Wiedenheft, B. 等Nature 482, 331-338 (2012); Jinek, M. 等Science 337, 816-821 (2012); Mali, P. 等Science 339, 823-826 (2013); Cong, L. 等Science 339, 819-823 (2013))。Cas9/CRISPR(集簇规律间隔短回文重复序列, Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeat)系统利用了RNA指导的DNA结合和序列特异性的靶DNA切割。指导RNA/Cas9组合赋予核酸酶位点特异性。指导RNA(guide RNA, gRNA)包含约20个与靶基因组DNA序列互补的核苷酸,该靶基因组DNA序列在基因组PAM(原间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif))位点(NNG)和恒定RNA支架区域上游。Cas(CRISPR相关)9蛋白与gRNA和与gRNA结合的靶DNA结合并且在PAM位点上游的限定位置中引入双链断裂。Cas9具有与HNH和RuvC内切核酸酶同源的两个独立的核酸酶结构域,并且通过突变两个结构域中任一个,Cas9蛋白可以转化成引入单链断裂的切口酶(Cong, L. 等Science 339, 819-823 (2013))。特别考虑到本发明的方法和组合物可以与Cas9的单链或双链诱导形式以及与其他RNA指导的DNA核酸酶(例如其他细菌的Cas9样系统)一起使用。本文中所述的方法和组合物的序列特异性核酸酶可以是经改造的、嵌合的或分离自生物体的。序列特异性核酸酶可以以编码序列特异性核酸酶的RNA的形式(例如mRNA)引入细胞中。

[0106] 在一些实施方案中,位点=特异性核酸酶包含cpf1、casX或casY。示例性的CRISPR酶和系统描述于US 20160208243中,其通过引用并入本文。预期这些系统可用于本公开的方法中,用于如本文所述修饰基因组DNA。

[0107] 在一个实施方案中,编码位点特异性核酸酶的RNA编码锌指核酸酶。锌指核酸酶一般包含DNA结合结构域(即,锌指)和切割结构域(即,核酸酶)。锌指结合结构域可被改造成识别并结合任何所选的核酸序列。参见,例如,Beerli等(2002)Nat.Biotechnol.20:135-141;Pabo等(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等(2001)Nat.Biotechnol.19:656-660;Segal等(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416;Zhang等(2000)J.Biol.Chem.275(43):33850-33860;Doyon等(2008)Nat.Biotechnol.26:702-708;和Santiago等(2008)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:5809-5814。与天然存在的锌指蛋白相比,经改造的锌指结合结构域可具有新的结合特异性。改造方法包括但不限于合理设计和多种类型的选择。合理设计包括例如使用包含二联体、三联体和/或四联体核苷酸序列和单个锌指氨基酸序列的数据库,其中每个二联体、三联体和/或四联体核苷酸序列与一个或更多个锌指氨基酸序列相关联,所述锌指与特定的三联体或四联体序列结合。参见,例如,美国专利No.6,453,242和6,534,261,其公开内容通过引用整体并入本文。作为一个实例,可使用美国专利6,453,242中所述的算法来设计靶向预选序列的锌指结合结构域。

[0108] 还可使用替代方法(例如使用非简并的识别码表的合理设计)来设计靶向特定序列的锌指结合结构域(Sera等(2002) *Biochemistry* 41:7074-7081)。用于鉴定DNA序列中的潜在靶位点和设计锌指结合结构域的公众可用的基于网络的工具分别可在<http://www.zincfingertools.org>和<http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>上找到(Mandell等(2006) *Nuc.Acid Res.* 34:W516-W523; Sander等(2007) *Nuc.Acid Res.* 35:W599-W605)。

[0109] 锌指结合结构域可被设计成识别并结合长度为约3个核苷酸至约21个核苷酸的DNA序列,或优选长度为约9个至约18个核苷酸的DNA序列。一般来说,锌指结合结构域包含至少三个锌指识别区域(即,锌指)。在一个实施方案中,锌指结合结构域可包含四个锌指识别区域。在另一个实施方案中,锌指结合结构域可包含五个锌指识别区域。在又一个实施方案中,锌指结合结构域可包含六个锌指识别区域。锌指结合结构域可被设计成与任何合适的靶DNA序列结合。参见例如,美国专利No.6,607,882;6,534,261和6,453,242,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0110] 选择锌指识别区域的示例性方法可包括噬菌体展示系统和双杂交系统,并且在美国专利No.5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,410,248;6,140,466;6,200,759和6,242,568;以及WO 98/37186;WO 98/53057;WO 00/27878;WO 01/88197和GB 2,338,237中被公开,其各自通过引用整体并入本文。此外,锌指结合结构域的结合特异性的增强已经例如在WO 02/077227中被描述。

[0111] 用于设计和构建融合蛋白(及编码其的多核苷酸)的锌指结合结构域和方法是本领域技术人员已知的,并且在美国专利申请公开No.20050064474和20060188987中被详细描述,各自通过引用整体并入本文。锌指识别区域和/或多指锌指蛋白可使用合适的接头序列(包括例如长度为五个或更多个氨基酸的接头)连接在一起。对于长度为六个或更多个氨基酸的接头序列的非限制性实例参见,美国专利No.6,479,626;6,903,185和7,153,949,其公开内容通过引用整体并入本文。本文中所述的锌指结合结构域可包含该蛋白的单独的锌指之间的合适接头的组合。

[0112] 在一些实施方案中,锌指核酸酶还可包含核定位信号或序列(Nuclear localization sequence, NLS)。NLS是有利于使锌指核酸酶蛋白靶向核以在染色体的靶序列处引入双链断裂的氨基酸序列。核定位信号是本领域已知的。参见,例如,Makkerh等(1996) *Current Biology* 6:1025-1027。

[0113] 锌指核酸酶还包含切割结构域。锌指核酸酶的切割结构域部分可以是从任何内切核酸酶或外切核酸酶获得的。切割结构域可来源于其的内切核酸酶的非限制性实例包括但不限于限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。参见,例如2002-2003Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass.; 和Belfort等(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388或[www.neb.com](http://www.neb.com)。另外的切割DNA的酶是已知的(例如,S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰腺DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母菌H0内切核酸酶)。另参见Linn等(编辑) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993。这些酶(或其功能片段)中的一种或更多种可用作切割结构域的来源。

[0114] 切割结构域还可来源自如上所述的酶或其部分,其需要二聚化以获得切割活性。对于切割可需要两个锌指核酸酶,因为每个核酸酶包含活性酶二聚体的单体。或者,单个锌指核酸酶可包含产活性酶二聚体的两个单体。如本文中所用,“活性酶二聚体”是能够切

割核酸分子的酶二聚体。两个切割单体可来源自同一内切核酸酶(或其功能片段),或者每个单体可来源自不同的内切核酸酶(或其功能片段)。

[0115] 当使用两个切核单体来形成活性酶二聚体时,两个锌指核酸酶的识别位点优选地这样设置,以使得两个锌指核酸酶与其各自的识别位点的结合将切割单体以这样的彼此空间取向设置:该空间取向允许切割单体例如通过二聚化形成活性酶二聚体。结果是,识别位点的近边缘可相隔约5个至约18个核苷酸。例如,近边缘可相隔约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或18个核苷酸。然而,应理解任何整数数目的核苷酸或核苷酸对可介于两个识别位点之间(例如,约2个至约50个核苷酸对或更多个)。锌指核酸酶的识别位点的近边缘(例如,如本文中详细描述的那些)可相隔6个核苷酸。一般来说,切割的位点位于识别位点之间。

[0116] 限制性内切核酸酶(限制酶)存在于许多物种中,其能够与DNA(在识别位点处)序列特异性结合,并在结合位点处或附近切割DNA。某些限制酶(例如,IIS型)在远离识别位点的位点处切割DNA并且具有可分离的结合和切割结构域。例如,IIS型酶Fok1催化在一条链上的离其识别位点9个核苷酸处和在另一条链上的离其识别位点的13个核苷酸处的DNA双链切割。参见,例如,美国专利No.5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279;Li等(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768;Kim等(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887;Kim等(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。因此,锌指核酸酶可包含来自至少一种IIS型限制酶的切割结构域和一种或更多种锌指结合结构域,其可被改造或可不被改造。示例性IIS型限制酶例如在国际公开WO 07/014,275中被描述,其公开内容通过引用整体并入本文。另外的限制酶还包含可分离的结合和切割结构域,并且这些也在本发明考虑内。参见,例如,Roberts等(2003)Nucleic Acids Res.31:418-420。

[0117] 在另一个实施方案中,靶向内切核酸酶可以是大范围核酸酶(meganuclease)。大范围核酸酶是特征在于大的识别位点的内切脱氧核糖核酸酶,即,识别位点一般为约12个碱基对至约40个碱基对。作为该要求的结果,识别位点一般在任何多给定的基因组中仅出现一次。天然存在的大范围核酸酶识别15至40个碱基对切割位点,并且一般分为四个家族:LAGLIDAG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst盒家族和HNH家族。大范围核酸酶可以通过使用本领域技术人员公知的技术修饰其识别序列来靶向特定的染色体序列。

[0118] 在另一个实施方案中,靶向内切核酸酶可以是转录活化子样效应因子(transcription activator-like effector,TALE)核酸酶。TALE是来自植物病原体黄单胞菌属(Xanthomonas)的转录因子,其可以容易地被改造成结合新的DNA靶标。TALE或其截短形式可与内切核酸酶(例如Fok1)的催化结构域连接,以产生被称为TALE核酸酶或TALEN的靶向性内切核酸酶。

[0119] 在又一个实施方案中,靶向内切核酸酶可以是位点特异性核酸酶。特别地,位点特异性核酸酶可以是其识别序列在基因组中很少出现的“罕见切割剂(rare-cutter)”内切核酸酶。优选地,位点特异性核酸酶的识别序列在基因组中仅出现一次。

[0120] 在又一个实施方案中,靶向内切核酸酶可以是人工靶向DNA双链断裂诱导剂(也被称为人工限制性DNA切割剂)。例如,人工靶向DNA双链断裂诱导剂可包含切割DNA的金属/螯合剂络合物和至少一个与靶向切割位点互补的寡核苷酸。因此,人工靶向DNA双链断裂诱导

剂不包含任何蛋白质。金属/螯合剂络合物的金属可为铈、镉、钴、铬、铜、铁、镁、锰、锌等。金属/螯合剂络合物的螯合剂可为EDTA、EGTA、BAPTA等。在一个优选实施方案中,金属/螯合剂络合物可为Ce (IV) /EGTA。在另一个优选实施方案中,人工靶向DNA双链断裂诱导剂可包含Ce (TV) /EGTA络合物和两条假互补肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)链(Katada等, Current Gene Therapy, 2011, 11 (1) :38-45)。

[0121] 在另一个实施方案中,核酸酶可以是归巢核酸酶。归巢内切核酸酶包括1-5' cel、1-Ceul、1-Psp1、V1-Sce、1-SceTV、I-Csml、1-Pan1、1-Sce11、1-Ppol、1-Sce111、1-Crel、1-Tev1、1-Tev和I-7evIII。其识别序列是已知的。另参见美国专利No.5,420,032;美国专利No.6,833,252;Belfort等(1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388;Ou on等(1989) Gene 82:115-118;Perler等(1994) Nucleic Acids Res. 22,1 125-1 127;Jasin(1996) Trends Genet. 12:224-228;Gimble等(1996) J. Mol. Biol. 263:163-180;Argast等(1998) J Mol. Biol. 280:345-353和New England Biolabs目录。

[0122] 在某些实施方案中,核酸酶包含经改造的(非天然存在的)归巢内切核酸酶(大范围核酸酶)。归巢内切核酸酶和大范围核酸酶(例如1-Sce1、1-Ceul、VI-Psp1、V1-Sce、1-Sce1N、1-Csml、1-Pan1、1-Sce11、1-Ppol、1-Sce111、1-Crel、1-Tev1、1-Tev11和I-7evIII)的识别序列是已知的。另参见美国专利No.5,420,032;美国专利No.6,833,252;Belfort等(1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388;Dujon等(1989) Gene 82:115-118;Perler等(1994) Nucleic Acids Res. 22,1125-1127;Jasin(1996) Trends Genet. 12:224-228;Gimble等(1996) J. Mol. Biol. 263:163-180;Argast等(1998) J. Mol. Biol. 280:345-353和New England Biolabs目录。此外,归巢内切核酸酶和大范围核酸酶的DNA结合特异性可以被改造成结合非天然靶位点。参见,例如,Chevalier等(2002) Molec. Cell 10:895-905;Epinat等(2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962;Ashworth等(2006) Nature 441:656-659;Paques等(2007) Current Gene Therapy 7:49-66;美国专利公开No.20070117128。归巢内切核酸酶和大范围核酸酶的DNA结合结构域可在核酸酶的背景下作为一个整体被改变(即,使得核酸酶包含同源切割结构域)或可以与异源切割结构域融合。

[0123] 在一个实施方案中,DNA消化剂是由omega、锌指、TALE和CRISPR/Cas9组成的组的位点特异性核酸酶或选自该组的位点特异性核酸酶。

[0124] D. 标志物

[0125] 在本发明的某些实施方案中,包含基因组DNA序列修饰的细胞或已经用本发明组合物经转染细胞可通过在组合物中包含标志物来在体外或体内鉴定。这样的标志物赋予细胞可鉴定的变化,允许容易地鉴定已经用组合物经转染细胞。一般来说,选择性标志物是赋予允许选择的特性的标志物。阳性选择性标志物是其中标志物的存在允许其被选择的标志物,而阴性选择性标志物是其中其存在阻止其被选择的标志物。阳性选择性标志物的实例为药物抗性标志物或抗生素抗性基因/标志物。

[0126] 一般来说,包含药物选择标志物会帮助转化体的克隆和鉴定,例如赋予对新霉素、嘌呤霉素、潮霉素、DHFR、GPT、吉欧霉素、G418、福来霉素、杀稻瘟素和组氨醇的抗性的基因是有用的选择性标志物。除了赋予允许基于实施条件来区分转化体的表型的标志物之外,还考虑其他类型的标志物,包括可筛选标志物,例如GFP,其基于比色分析。或者,可使用可筛选酶,例如单纯疱疹病毒胸苷激酶(thymidine kinase, tk)或氯霉素乙酰转移酶

(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)。本领域技术人员也知道如何使用免疫学标志物,其可结合FACS分析。选择性标志物和可筛选标志物的另外的实例是本领域技术人员公知的。在某些实施方案中,标志物为荧光标志物、酶标志物、发光标志物、可光活化标志物、光转化性标志物或比色标志物。荧光标志物包括例如GFP和变体(例如YFP、RFP等)以及其他荧光蛋白(如DsRed、mPlum、mCherry、YPet、Emerald、CyPet、T-Sapphire和Venus)。可光活化标志物包括例如KFP、PA-mRFP和Dronpa。光转化性标志物包括例如mEosFP、KikGR和PS-CFP2。发光蛋白包括例如Neptune、FP595和phialidin。

[0127] 用于本发明的标志物可编码于RNA或DNA上。在一个具体实施方案中,标志物编码于RNA上。

[0128] 在某些方面中,在电穿孔后,通过阴性选择来选择已经将电穿孔组合物内化的细胞。在另一些方面中,在电穿孔后,通过阳性选择来选择已经将电穿孔构建体内化的细胞。在一些方面中,选择包括使细胞暴露于多种浓度的选择剂,该选择剂损害不表达选择抗性基因或在电穿孔期间不接受选择抗性基因的细胞的生存力。在一些方面中,选择涉及使细胞暴露于条件性致死浓度的选择剂。在某些方面中,选择剂或化合物是抗生素。在另一些方面中,选择剂是单独或组合的G418(也被称为遗传霉素和G418硫酸盐)、嘌呤霉素、吉欧霉素、潮霉素、福来霉素或杀稻瘟素。在某些方面中,选择剂的浓度为0.1 $\mu$ g/L至0.5 $\mu$ g/L、0.5 $\mu$ g/L至1 $\mu$ g/L、1 $\mu$ g/L至2 $\mu$ g/L、2 $\mu$ g/L至5 $\mu$ g/L、5 $\mu$ g/L至10 $\mu$ g/L、10 $\mu$ g/L至100 $\mu$ g/L、100 $\mu$ g/L至500 $\mu$ g/L、0.1mg/L至0.5mg/L、0.5mg/L至1mg/L、1mg/L至2mg/L、2mg/L至5mg/L、5mg/L至10mg/L、10mg/L至100mg/L、100mg/L至500mg/L、0.1g/L至0.5g/L、0.5g/L至1g/L、1g/L至2g/L、2g/L至5g/L、5g/L至10g/L、10g/L至100g/L或100g/L至500g/L,或者其中可来源的任何范围。在某些方面中,选择剂的浓度为(y)g/L,其中“y”可以是任何值,包括但不限于0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100,或者其中可来源的任何范围。在一些实施方案中,选择剂以约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9或10g/L,或者其中可来源的任何范围的条件性致死浓度存在于培养基中。

[0129] 在某些实施方案中,不管编码序列自身的长度,核酸片段可与其他核酸序列(例如启动子、多腺苷酸化信号、另外的限制酶位点、多克隆位点、其他编码片段等)组合,使得其总长度可根据考虑而改变。

[0130] E. 载体

[0131] 多肽可通过例如组合物中的核酸分子来编码。在某些实施方案中,核酸分子可以是核酸载体的形式。术语“载体”是用于指其中可以插入异源核酸序列用于引入到其可以被复制和表达的细胞中的载体核酸分子。核酸序列可以是“异源的”,这意味着核酸序列在对其中已引入载体的细胞或向其中掺入的核酸而言是外来的环境中,其包含与该细胞的序列或该核酸同源的但在宿主细胞或核酸内一般不被发现的位置中的序列。载体包括DNA、RNA、

质粒、黏粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如,YAC)。本领域技术人员很好地具备通过标准重组技术(例如,Sambrook等,2001;Ausubel等,1996,二者都通过引用并入本文)构建载体。载体可用于宿主细胞以产生抗体。

[0132] 术语“表达载体”是指包含编码至少部分基因产物的核酸序列的载体,该核酸序列能够被转录或稳定地整合到宿主细胞的基因组中并随后被转录。在一些情况下,然后将RNA分子翻译成蛋白质、多肽或肽。表达载体可以包含多种“控制序列”,其是指在特定宿主生物体中转录并可以翻译有效连接的编码序列所需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体可包含还用于其他功能的本文中所述的核酸序列。考虑到表达标志物的表达载体可用于本发明。在另一些实施方案中,标志物编码于mRNA上而不是表达载体中。

[0133] “启动子”是控制序列。启动子一般是核酸序列中控制转录起始和速率的区域。启动子可包含可结合调节蛋白和分子(例如RNA聚合酶和其他转录因子)的基因元件。短语“有效地设置”、“有效地连接”、“在控制下”和“在转录控制下”意指启动子对于核酸序列处在正确功能位置和/或取向中以控制转录起始和该序列的表达。启动子可与或可不与“增强子”结合使用,所述“增强子”是指参与核酸序列的转录活化的顺式作用调节序列。

[0134] 用于控制肽或蛋白质表达的编码多核苷酸的特定启动子不被认为是关键的,只要其能够在靶细胞,优选细菌细胞中表达多核苷酸即可。在靶向人细胞的情况下,优选将多核苷酸编码区域设置在能够在人细胞中表达的启动子附近并在其控制下。一般而言,这样的启动子可包括细菌、人或病毒启动子。

[0135] 特异性起始信号也可以是编码序列的有效翻译所需要的。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号,包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将容易地能够确定特异性起始信号并提供所需信号。

[0136] 载体可包含多克隆位点(multiple cloning site,MCS),其是包含多个限制酶位点的核酸区域,其中任一个可以与标准重组技术结合使用来消化载体。(参见Carbonelli等,1999,Levenson等,1998和Cocea,1997,通过引用并入本文)。

[0137] 大多数经转录的真核RNA分子经历RNA剪接以从初始转录物中除去内含子。包含基因组真核序列的载体可需要供体和/或受体剪接位点以确保正确处理转录物用于蛋白质表达。(参见Chandler等,1997,通过引用并入本文)。

[0138] 载体或构建体一般会包含至少一个终止信号。“终止信号”或“终止子”由通过RNA聚合酶参与RNA转录物的特异性终止的DNA序列构成。因此,在某些实施方案中,考虑终止RNA转录物产生的终止信号。终止子可以是在体内必需的以达到期望的信息水平。在真核系统中,终止子区域还可包含允许对新转录物进行位点特异性切割以暴露多腺苷酸化位点的特异性DNA序列。这向专门的内源性聚合酶发出向转录物的3'末端添加约200个A残基(polyA)的一段延伸序列的信号。用该polyA尾修饰的RNA分子看起来更加稳定并且被更有效地翻译。因此,在另一些涉及真核生物的实施方案中,优选该终止子包含用于切割RNA的信号,更优选地终止子信号促进多腺苷酸化信息。

[0139] 在表达,特别是真核表达中,其一般包括影响合适的转录物多腺苷酸化的多腺苷酸化信号。

[0140] 为了在宿主细胞中增殖载体,其可包含一个或更多个复制起始位点(一般被称为

“ori”),其是在此处起始复制的特异性核酸序列。或者,如果宿主细胞是酵母,则可以使用自主复制序列(autonomously replicating sequence,ARS)。

[0141] 一些载体可利用允许其在原核和真核细胞二者中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员还理解孵育所有上述的宿主细胞以维持它们和允许载体复制的条件。还理解和已知允许大规模生产载体以及生产由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技术和条件。

[0142] 在某些具体实施方案中,通过电穿孔转染到细胞中的组合物是非病毒的(即,不包含任何病毒组分)。考虑到非病毒方法会降低毒性和/或提高方法的安全性。考虑到使用小DNA寡核苷酸和作为RNA提供的DNA消化剂的组合提供了降低的细胞毒性和提高的基因组DNA序列修饰效率的优点。

#### [0143] F. 核酸修饰

[0144] 在本公开内容的上下文中,术语“未经修饰的寡核苷酸”一般指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)的寡核苷酸或聚合物。在一些实施方案中,核酸分子是未经修饰的寡核苷酸。该术语包括由天然存在的核碱基、糖和共价核苷间连接构成的寡核苷酸。术语“寡核苷酸类似物”是指具有一个或更多个非天然存在部分(其以与寡核苷酸类似的方式起作用)的寡核苷酸。由于所期望的特性(例如增强的细胞摄取、提高的对其他寡核苷酸或核酸靶标的亲和力以及提高的在核酸酶存在下的稳定性),相比于天然存在形式,经常选择这样的非天然存在的寡核苷酸。术语“寡核苷酸”可用于指未经修饰的寡核苷酸或寡核苷酸类似物。

[0145] 核酸分子的具体实例包括含有经修饰的(即非天然存在的核苷间连接的)核酸分子。由于所期望的特性,例如增强的细胞摄取、提高的对其他寡核苷酸或核酸靶标的亲和力以及提高的在核酸酶存在下的稳定性,经常选择这样的非天然存在的核苷间连接超过天然存在形式。在一个具体实施方案中,修饰包括甲基。

[0146] 核酸分子可以具有一个或更多个经修饰的核苷间连接。如本说明书中所限定,具有经修饰的核苷间连接的寡核苷酸包括保留磷原子的核苷间连接和不具有磷原子的核苷间连接。为了本说明书的目的并且如在本领域中有时参考的,在其核苷间骨架中不具有磷原子的经修饰的寡核苷酸也可被认为是寡核苷酸。

[0147] 对核酸分子的修饰可以包括其中修饰一个或两个末端核苷酸的修饰。

[0148] 一种合适的含磷的经修饰的核苷间连接是硫代磷酸酯核苷间连接。许多其他经修饰的寡核苷酸骨架(核苷间连接)是本领域已知的,并且可用于该实施方案的情况下。

[0149] 教导制备含磷的核苷间连接的代表性美国专利包括但不限于美国专利No.3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;5,194,599;5,565,555;5,527,899;5,721,218;5,672,697;5,625,050;5,489,677和5,602,240,其各自通过引用并入本文。

[0150] 其中不包含磷原子的经修饰的寡核苷酸骨架(核苷间连接)具有通过短链烷基或环烷基核苷间连接、混合杂原子的烷基或环烷基核苷间连接、或者一个或更多个短链杂原子的或杂环的核苷间连接形成的核苷间连接。这些包括具有酰胺骨架的那些;和包含具有混合N、O、S和CH<sub>2</sub>组分部分的那些。

[0151] 教导制备上述非含磷的寡核昔的代表性美国专利包括但不限于美国专利No.5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;5,792,608;5,646,269和5,677,439,其各自通过引用并入本文。

[0152] 寡核昔酸化合物还可以包括寡核昔酸模拟物。当用于寡核昔酸时,术语模拟物旨在包括其中仅呋喃糖环或呋喃糖环和核昔酸间连接二者被新的基团替代的寡核昔酸化合物,仅呋喃糖环被例如吗啉代环替代在本领域中还被称为糖替代(sugar surrogate)。维持杂环碱基部分或经修饰的杂环碱基部分以与合适的靶核酸杂交。

[0153] 寡核昔酸模拟物可以包括寡核昔酸化合物,例如肽核酸(PNA)和环己烯基核酸(被称为CeNA,参见Wang等,J.Am.Chem.Soc.,2000,122,8595-8602)。教导制备寡核昔酸模拟物的代表性美国专利包括但不限于美国专利No.5,539,082;5,714,331和5,719,262,其各自通过引用并入本文。另一类寡核昔酸模拟物被称为磷酸单酯核酸,其在骨架中掺入磷基团。据报道该类寡核昔酸模拟物在抑制基因表达领域中具有有用的物理学和生物学和药理学特性(反义寡核昔酸、核酶、有义寡核昔酸和形成三联体的寡核昔酸),作为检测核酸的探针和作为用于分子生物学的辅助物。已经报道了其中呋喃糖基环被环丁基部分替代的另外的寡核昔酸模拟物。

[0154] 核酸分子还可以包含一个或更多个经修饰或经取代的糖部分。维持碱基部分以与合适的核酸靶化合物杂交。糖修饰可以赋予寡聚化合物核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其他有益生物学特性。

[0155] 代表性经修饰的糖包括碳环或非环糖,糖在其2'、3'或4'位置中的一个或更多个处具有取代基,糖具有替代糖中的一个或更多个氢原子的取代基,并且糖具有在糖中的任何两个其他原子之间的连接。许多糖修饰是本领域已知的,在2'位置处被修饰的糖和在糖的任何2个原子之间具有桥联(使得糖是双环的)的那些特别可用于该实施方案中。在该实施方案中有用的糖修饰的实例包括但不限于包含选自以下的糖取代基的化合物:OH;F;O-、S-或N-烷基;或者O-烷基-O-烷基,其中烷基、烯基和炔基可以是经取代或未经取代的C1至C10烷基或C2至C10烯基和炔基。特别合适的是:2-甲氧基乙氧基(也被称为2'-0-甲氧基乙基、2'-MOE或2'-0CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>0CH<sub>3</sub>)、2'-0-甲基(2'-0-CH<sub>3</sub>)、2'-氟(2'-F)或具有连接4'碳原子与2'碳原子的桥基团的核昔修饰的双环糖,其中示例性桥基团包括--CH<sub>2</sub>--0--、--(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>--0--或--CH<sub>2</sub>--N(R<sub>3</sub>)--0,其中R<sub>3</sub>为H或C1至C12烷基。

[0156] 赋予提高的核酸酶抗性和对核昔酸非常高的结合亲和力的一种修饰是2'-MOE侧链(Baker等,J.Biol.Chem.,1997,272,11944-12000)。2'-MOE取代的直接优点之一是结合亲和力的提高,其大于许多类似的2'修饰,例如O-甲基、O-丙基和O-氨基丙基。还已经表明具有2'-MOE取代基的寡核昔酸是用于体内使用有前途特征的基因表达的反义抑制剂(Martin,P.,Helv.Chim.Acta,1995,78,486-504;Altmann等,Chimia,1996,50,168-176;Altmann等,Biochem.Soc.Trans.,1996,24,630-637和Altmann等,Nucleosides Nucleotides,1997,16,917-926)。

[0157] 2'-糖取代基可以在阿拉伯糖(arabino)(上)位置或核糖(ribo)(下)位置中。一种

2'-阿拉伯糖修饰是2'-F。也可在寡聚化合物的其他位置处进行类似的修饰,特别是3'末端核苷上或2'-5'连接的寡核苷酸中的糖的3'位置和5'末端核苷酸的5'位置。寡聚化合物还可具有糖模拟物,例如环丁基部分替代戊呋糖基糖。教导制备这样的经修饰的糖结构的代表性美国专利包括但不限于美国专利No.4,981,957;5,118,800;5,319,080;5,359,044;5,393,878;5,446,137;5,466,786;5,514,785;5,519,134;5,567,811;5,576,427;5,591,722;5,597,909;5,610,300;5,627,053;5,639,873;5,646,265;5,658,873;5,670,633;5,792,747和5,700,920,其各自通过引用整体并入本文。

[0158] 代表性的糖取代基在题为“Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides”的美国专利No.6,172,209中公开,在此通过引用整体并入。

[0159] 代表性的环状糖取代基在题为“RNA Targeted 2'-Oligomeric compounds that are Conformationally Preorganized”的美国专利No.6,271,358中公开,在此通过引用整体并入。

[0160] 代表性的胍基取代基在题为“Functionalized Oligomers”的美国专利No.6,593,466中公开,在此通过引用整体并入。

[0161] 代表性的乙酰氨基取代基在美国专利No.6,147,200中公开,其在此通过引用整体并入。

[0162] 核酸分子还可包含一种或更多种核碱基(在本领域中一般简称为“碱基”)修饰或取代,其与天然存在或合成的未经修饰的核碱基在结构上可区分,但在功能上可互换。这样的核碱基修饰可以赋予寡聚化合物核酸酶稳定性、结合亲和力或一些其他有益的生物学特性。如本文中所用,“未经修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。在本文中还被称为杂环碱基部分的经修饰的核碱基包括其他合成和天然的核碱基,其许多实例如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤等。

[0163] 杂环碱基部分还可以包括其中嘌呤或嘧啶碱基被其他杂环替代的那些,例如7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮鸟昔、2-氨基吡啶和2-吡啶酮。一些核碱基包括在美国专利No.3,687,808中公开的那些、在The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,第858-859页,Kroschwitz,J.I.,编辑John Wiley&Sons,1990中公开的那些、由Englisch等,Angewandte Chemie,International Edition,1991,30,613公开的那些,以及由Sanghvi,Y.S.,第15章,Antisense Research and Applications,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编辑,CRC Press,1993公开的那些。这些核碱基中的某些特别可用于提高寡聚化合物的结合亲和力。这些包括5-取代的嘧啶,6-氮杂嘧啶及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶和5-丙炔基胞嘧啶。

[0164] 对核酸分子的另外的修饰在美国专利公开2009/0221685中公开,其在此通过引用并入。本文还公开了另外的针对核酸分子的合适的缀合物。

[0165] II.细胞培养

[0166] A.宿主细胞

[0167] 如本文中所用,术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语还包括新鲜分离的细胞和离体培养,活化或扩增的细胞二者。所有这些术语也包括其子代,即任何和所有的后代。应理解的是由于有意或无意的突变,所有子代可能不相同。在表达异

源核酸序列的情况下，“宿主细胞”是指原核或真核细胞，其包括能够复制载体或表达载体编码的异源基因的任何可转化生物体。宿主细胞可以并已经用作载体或病毒的接受者。宿主细胞可以是“经转染的”或“经转化的”，这是指通过其将外源核酸（例如编码重组蛋白的序列）转移或引入宿主细胞中的过程。经转化的细胞包括原代对象细胞及其子代。

[0168] 在某些实施方案中，电穿孔可以在任何原核或真核细胞上进行。在一些方面中，电穿孔涉及人细胞的电穿孔。在另一些方面中，电穿孔涉及动物细胞的电穿孔。在某些方面中，电穿孔涉及细胞系或杂交细胞型的电穿孔。在一些方面中，电穿孔的细胞是癌细胞、肿瘤细胞或永生化细胞。在一些情况下，肿瘤、癌、永生化细胞或细胞系被诱导，在另一些情况下，肿瘤、癌、永生化细胞或细胞系自然地进入其各自的状态或条件。在某些方面中，电穿孔的细胞或细胞系可以为A549、B细胞、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP/、CAP-T、CHO、CH02、CHO-DG44、CHO-K1、COS-1、Cos-7、CV-1、树突细胞、DLD-1、胚胎干（Embryonic Stem, ES）细胞或衍生物、H1299、HEK, 293、293T、293FT、Hep G2、造血干细胞、HOS、Huh-7、诱导性多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS）或衍生物、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、间充质细胞、Min-6、单核细胞、Neuro2a、NIH 3T3、NIH3T3L1、K562、NK-细胞、NS0、Panc-1、PC12、PC-3、外周血细胞、浆细胞、原代成纤维细胞、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、刺激性触发多能性获得（Stimulus-triggered Acquisition of Pluripotency, STAP）细胞或衍生物SW403、T-细胞、THP-1、肿瘤细胞、U2OS、U937、外周血淋巴细胞、经扩增T细胞、造血干细胞或Vero细胞。在一些实施方案中，细胞是外周血淋巴细胞、经扩增T细胞、干细胞、造血干细胞或原代细胞。在一些实施方案中，细胞是造血干细胞。在另一些实施方案中，细胞是外周血淋巴细胞。

[0169] 在一些实施方案中，细胞是从患者分离的细胞。在一些实施方案中，细胞是新鲜分离的。在一些实施方案中，在小于或恰好20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1天或者小于或恰好24、22、20、18、16、14、12、10、8、6、4、2、1小时或其中可来源的任何范围内转染细胞。在一些实施方案中，分离的细胞从未被冷冻。在一些实施方案中，分离的细胞从未在体外传代。在一些实施方案中，分离的细胞已经传代少于或恰好10、9、8、7、6、5、4、3、2、1次或其中可来源的任何范围。术语“传代”旨在表示分裂细胞可以从预先存在的细胞产生大量细胞的过程。传代涉及分裂细胞并将少量细胞转移到每个新容器中。对于贴壁培养，首先需要分离细胞，一般用胰蛋白酶-EDTA的混合物进行。然后可以使用少量分离的细胞来培育新的培养物，而丢弃其余的。此外，通过将所有细胞分配到新鲜烧瓶中，可以容易地扩大培养细胞的量。

[0170] 在某些实施方案中，细胞是本领域已知的难以转染的细胞。这样的细胞是本领域已知的，包括例如原代细胞、昆虫细胞、SF9细胞、Jurkat细胞、CHO细胞、干细胞、缓慢分裂细胞和非分裂细胞。在一些实施方案中，细胞是生殖细胞，例如卵细胞或精细胞。在一些实施方案中，细胞是受精胚胎。在一些实施方案中，细胞是人受精胚胎。

[0171] 在一些实施方案中，细胞可进行限制性稀释法以使克隆的细胞群扩增。限制性稀释克隆的方法是本领域技术人员公知的。这样的方法已经被描述例如用于杂交瘤细胞，但其可以应用于任何细胞。这样的方法在（Cloning hybridoma cells by limiting dilution, Journal of tissue culture methods, 1985, 第9卷, 第3期, 第175-177页, Joan C. Rener, Bruce L. Brown和Roland M. Nardone）中被描述，其通过引用并入本文。

[0172] 在一些实施方案中,在电穿孔前或在电穿孔后培养细胞。在另一些实施方案中,在电穿孔后的选择阶段期间培养细胞。在又一些实施方案中,在维持和克隆选择和初始扩增阶段期间培养细胞。在又一些实施方案中,在筛选阶段期间培养细胞。在另一些实施方案中,在大规模生产阶段期间培养细胞。培养悬浮和贴壁细胞的方法是本领域技术人员公知的。在一些实施方案中,使用可商购的细胞培养容器和细胞培养基悬浮培养细胞。可用于一些实施方案的可商购的培养容器的实例包括ADME/TOX板、细胞室玻片和盖玻片、细胞计数设备、细胞培养表面、康宁HYPERFlask细胞培养容器、包被的培养皿、Nalgene Cryoware、培养室、培养皿、玻璃培养瓶、塑料培养瓶、3D培养形式、培养多孔板、培养板插入物、玻璃培养管、塑料培养管、可叠放的细胞培养容器、低氧培养室、培养皿(Petri dish)和瓶载体、快速培养容器、使用转瓶的大规模细胞培养、旋转烧瓶、3D细胞培养或细胞培养袋。

[0173] 在另一些实施方案中,培养基可使用本领域技术人员公知的组分来配制。培养细胞的配方和方法在以下参考文献中详细地被描述:Short Protocols in Cell Biology J.Bonifacino,等,编辑,John Wiley&Sons,2003,第826页;Live Cell Imaging:A Laboratory Manual D.Spector&R.Goldman,编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2004,第450页;Stem Cells Handbook S.Sell,编辑,Humana Press,2003,第528页;Animal Cell Culture:Essential Methods,John M.Davis,John Wiley&Sons,3月16日,2011;Basic Cell Culture Protocols,Cheryl D.Helgason,Cindy Miller,Humana Press,2005;Human Cell Culture Protocols,Series:Methods in Molecular Biology,第806卷,Mitry,Ragai R.;Hughes,Robin D.(编辑),第三版2012,XIV,435第89页,Human Press;Cancer Cell Culture:Method and Protocols,Cheryl D.Helgason,Cindy Miller,Human Press,2005;Human Cell Culture Protocols,Series:Methods in Molecular Biology,第806卷,Mitry,Ragai R.;Hughes,Robin D.(编辑),第三版2012,XIV,435第89页,Human Press;Cancer Cell Culture:Method and Protocols,Simon P.Langdon,Springer,2004;Molecular Cell Biology.第四版,Lodish H,Berk A,Zipursky SL,等,New York:W.H.Freeman;2000.,第6.2部分Growth of Animal Cells in Culture,其所有都通过引用并入本文。

[0174] 在一些实施方案中,在筛选和扩增阶段期间和/或在大规模生产阶段(也被称为补料分批和比较)期间,通过选择或筛选产生的扩增的经电穿孔的细胞可包含经修饰的基因组DNA序列。

### [0175] III.治疗和药物开发应用

[0176] 在某些实施方案中,通过本文中所述的方法产生的细胞和细胞系是在修饰基因组DNA后提供治疗效果的细胞和细胞系。可通过本文中所述的方法分离、修饰原代细胞,并将其离体用于再引入待治疗的对象中。合适的原代细胞包括外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)、外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocyte,PBL)和其他血细胞亚群(例如但不限于CD4+T细胞或CD8+T细胞)。其他合适的原代细胞包括祖细胞,例如骨髓或淋巴祖细胞。合适的细胞还包括干细胞,例如,作为示例,胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、造血干细胞、神经元干细胞、间充质干细胞、肌肉干细胞和皮肤干细胞。例如,iPSC可以是从患有已知的基因突变相关的患者中离体获得的,并且该突变可以使用本文中所述的方法修饰为野生型等位基因。然后经修饰的iPSC可以分化成多巴胺能神经元并

重新植入患者中。在另一个离体治疗应用中,可以从患有已知的基因突变的患者中分离出造血干细胞,其然后可以被修饰以校正基因突变。然后可以将HSC施用回到患者用于获得治疗效果,或者可以在向患者施用之前在培养物中分化成更成熟的造血细胞。

[0177] 在一些实施方案中,经修饰的基因组DNA序列包含疾病相关基因。疾病相关基因是本领域已知的。考虑到疾病相关基因是在万维网 [genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no\\_limit=1](http://genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no_limit=1) 上公开的基因。基因的完整列表及其相关疾病通过引用整体并入本文。

[0178] 在一些实施方案中,所述方法包括修饰造血干细胞(又称成血细胞)或骨髓祖细胞中的基因组DNA。

[0179] 在一些实施方案中,所述方法包括修饰造血干细胞(又称成血细胞)或骨髓祖细胞中的HBB基因基因组DNA序列。在某些实施方案中,修饰序列以校正基因组序列中的疾病相关突变。例如,可以修改患有镰状细胞性贫血的对象的基因组序列以校正E6V突变。因此,本文所述的方法可用于校正来自具有基因组突变的对象的细胞的基因组序列,所述基因组突变产生具有在第六位置的缬氨酸而不是谷氨酸的β-珠蛋白。因此,在一个实施方案中,序列修饰是校正基因组DNA,其将HBB基因的第六个密码子修饰为谷氨酸密码子。

[0180] HBB基因的蛋白质编码序列由以下序列示例:

[0181]

MVHLTPEKSAVTALWGKVN<sup>V</sup>DEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAV  
MGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNV  
LVCVLAHHFGKEFTPPVQAAYQKV<sup>V</sup>AGVANALAHKYH.

[0182] 带下划线的谷氨酸代表蛋白质第六位的氨基酸。在DNA水平,基因组DNA包含GAG至GTG突变,其产生E6V突变蛋白。

[0183] 在一些实施方案中,所述方法包括修饰细胞中的gp91phox基因。在一些实施方案中,细胞是来自患者的自体细胞。在一些实施方案中,细胞是造血干细胞。在一些实施方案中,该方法用于治疗慢性肉芽肿病(CGD)。

[0184] gp91phox基因的蛋白质编码序列以下序列示例:

[0185] mgnwavnegl sifvilvwlg 1nvflfvwy rvydippkff ytrkllgsal alarapaacl  
nfncl1llp vcrnllsflr gssaccstrv rrqlldrnltf hkmvawmial hsahtiahf fnvewcvnar  
vnnsdpysva lselgdrqne sylnfarkri knpegglyla vtllagityv vitlclilii tsstktirrs  
yfevfwythh lfviiffigla ihgaerivrg qtaeslavhn itvceqkise wgkikecpip qfagnppmtw  
kwivgpmfly lcerlvrfwr sqqkvvitkv vthpfktiel qmkkkgfkm e vgqyifvkcp kvsklewhpf  
tltsapeedf fsihirivgd wteglfnacg cdkqefqdaw klpkiavdgp fgtasedvfs yevvmlvgag  
igvtpfasil ksvwykycnn atnlklkkiy fywlcrdtha fewfadllql lesqmqernn agflsyniyl  
tgwdesqanh favhhdeekd vitglkqktl ygrpndnef ktiasqhptn rigvflcgpe alaetlskqs  
isnsesgprg vhfidfnkenf.

[0186] 在一些实施方案中,所述方法校正外显子7处的gp91phox基因的核苷酸序第676位C至T。将gp91phox的氨基酸位点226处的核苷酸“T”校正为“C”将该位点从终止密码子恢复为正确Arg。因此,在一个实施方案中,序列修饰是校正基因组DNA,其将gp91phox基因的第226位密码子修饰为Arg密码子。

[0187] 在某些方面中,本文中所述的方法涉及改进的用于离体治疗的方法。可从对象中分离细胞群,并且可以以校正缺陷的方式修饰细胞的基因组DNA。然后可将细胞群移植到对象中以用于治疗用途。在某些情况下,分离的细胞群可包含对某些体外操作(例如传统的转染和/或电穿孔方法)敏感的细胞亚群,例如,或者细胞亚群可对传统的转染和/或电穿孔方法或基因组DNA操纵具有抗性。考虑到用本文中所述的方法修饰基因组DNA导致在这样的群中更高效率的序列修饰。

[0188] 序列修饰的效率在本文中也可称为编辑率。这可以经编辑细胞的数目除以细胞总数目来计算。在本文提供的实施例中,编辑率计算为(消化带密度)/[(消化带密度+亲本带密度)。

[0189] 本公开内容的一个方面涉及用于在从对象分离的细胞中对靶基因组DNA区域进行位点特异性序列修饰或修改的方法,其包括:从对象中分离细胞;用包含以下的组合物通过电穿孔转染细胞:(a)DNA寡核苷酸;(b)DNA消化剂;和(c)靶向RNA,其中所述靶向RNA是加帽的和/或多腺苷酸化的;其中所述供体DNA包含:(i)包含与靶基因组DNA区域同源的核酸序列的同源区域;和(ii)序列修饰区域;并且其中在靶基因组DNA区域特异性修饰基因组DNA序列。在一个实施方案中,分离的细胞包含两种或更多种不同的细胞类型。

[0190] 当在本文中使用时,术语“不同细胞类型”可以指源自不同细胞谱系的细胞或源自相同谱系但处于多能性或分化不同阶段的细胞。在一个实施方案中,两种或更多种不同细胞类型包含在多能性或分化不同阶段的两种或更多种细胞类型。在另一个实施方案中,细胞来自相同的谱系,但处于多能性或分化不同阶段。

[0191] 预期本文所述的方法对某些细胞群不具有负选择性。因此,在某些实施方案中,两种或更多种不同细胞类型之间的序列修饰的效率的差异小于1%。在另一些实施方案中,两种或更多种细胞类型之间的序列修饰的效率的差异小于2%、1.5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%。在另一些实施方案中,两种或更多种细胞类型之间细胞生存力的差异小于5%。在另一些实施方案中,两种细胞群之间细胞生存力的差异小于10%、7%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%。

[0192] 在一些具体实施方案中,分离的细胞是从对象的骨髓中分离的细胞。在另一个实施方案中,分离的细胞包含干细胞。干细胞可以是从体内分离的任何干细胞。非限制性实例包括造血干细胞、间充质干细胞和神经干细胞。在一个具体实施方案中,细胞是造血干细胞。在另一个实施方案中,分离的细胞包含细胞表面标志物CD34<sup>+</sup>。

[0193] 另外地,通过本文中所用的方法产生的细胞和细胞系可用于药物开发和/或反向遗传学研究。这样的细胞和动物可显示出与特定突变或与其序列修饰相关的表型,并且可用于筛选与所讨论的突变或突变蛋白特异性地相互作用的药物或可用于治疗患病动物的疾病的药物。这些细胞系还可以提供研究特异性突变的效果的工具,因为细胞系及其对应的“经修饰的”细胞系代表“遗传上相同的”对照,因此提供了用于修复疾病特异性突变、药物筛选和发现,以及疾病机制研究的强大工具。例如,还考虑到该技术可以提供在科学上优于目前的基因敲低技术(例如RNAi和shRNA)的替代方案。在一个实例中,DNA序列修饰是引入目标基因的终止密码子以研究发育或疾病机制或者用于治疗应用。

[0194] IV. 电穿孔

[0195] 某些实施方案涉及使用电穿孔来帮助一种或更多种核酸分子进入宿主细胞中。

[0196] 如本文中所用,“电穿孔”或“电加载(electroloading)”是指向细胞施加电流或电场来帮助核酸分子进入细胞中。本领域技术人员将理解电穿孔的任何方法和技术在本发明考虑内。

[0197] 在本发明的某些实施方案中,可如美国专利No.5,612,207(通过引用具体地并入本文)、美国专利No.5,720,921(通过引用具体地并入本文)、美国专利No.6,074,605(通过引用具体地并入本文);美国专利No.6,090,617(通过引用具体地并入本文);美国专利No.6,485,961(通过引用具体地并入本文);美国专利No.7,029,916(通过引用具体地并入本文)、美国专利No.7,141,425(通过引用具体地并入本文)、美国专利No.7,186,559(通过引用具体地并入本文)、美国专利No.7,771,984(通过引用具体地并入本文)和美国公开No.2011/0065171(通过引用具体地并入本文)中所述的,进行电加载。

[0198] 可用于本发明的情况中的其他电加载方法和仪器还在例如公开的PCT申请No.WO 03/018751和WO 2004/031353;US专利申请No.10/781,440、10/080,272和10/675,592;及US专利No.6,773,669、6,090,617、6,617,154中被描述,其所有都通过引用并入。

[0199] 在本发明的某些实施方案中,可如于2002年8月21日提交的美国专利申请序列No.10/225,446中所述的进行电穿孔,其全部公开内容通过引用具体地并入本文。

[0200] 在本发明的另一些实施方案中,使用MaxCyte STX®、MaxCyte VLX®或MaxCyte GT®流式电穿孔仪器进行流式电穿孔。在一些具体实施方案中,采用在整个本公开内容中所述的参数使用静电穿孔或流式电穿孔。

[0201] 所要求保护的通过电穿孔(优选流式电穿孔)转染细胞的方法能够达到大于40%,大于50%和大于60%、70%、80%或90%(或其中可来源的任何范围)的转染效率。转染效率可以通过表达基因产物的细胞的百分比或通过由基因表达的产物的分泌水平来测量。在电穿孔过程期间和之后,细胞维持高的生存力。生存力一般大于50%或更高。生存力或经电穿孔的细胞可以为起始的未经电穿孔的群或用对照构建体转染的经电穿孔的群的生存力的至多或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%(或其中可来源的任何范围)。

[0202] 在一些实施方案中,目前的方法使用了用于电刺激颗粒混悬液的流式电穿孔装置,其包含具有一个或更多个流入口、一个或更多个流出口和一个或更多个流动通道的流式电穿孔池(cell)仪器组,该流动通道包含:两个或更多个壁,其中流动通道还被配置成接收并短暂容纳来自流入口的连续流动的在混悬液中的颗粒;和相对于流动通道设置的使得每个电极形成流动通道的至少一个壁的成对电极,该电极还包括将电极设置成与电能来源电连通,从而流动通过流动通道的颗粒混悬液可经历在电极之间形成的电场。

[0203] 在一些实施方案中,目前的方法使用流式电穿孔来克服样品尺寸的限制。通过该方法,使细胞混悬液穿过在流动池(优选一次性的)中容纳的平行棒状电极。

[0204] 在另一些实施方案中,使用本文中所述的流式或静电穿孔法来克服样品的热降解。应理解,在目前的方法中可使用不同配置的池。在电穿孔期间,使细胞经历具有预定特点的电脉冲。例如,用于制备样品细胞的具体设置为:电压,750V;脉冲宽度,650微秒;脉冲间隔,100微秒;一次突发(burst)中有2个双相脉冲;突发间隔,12秒;流量,0.05mL/秒。目标分子随后可以随着浓度梯度和/或电场梯度扩散到细胞中。本发明任选地能够使细胞经历一定范围的电场强度。

[0205] 目前的流式电穿孔法的另一个优点是可以转染大量细胞群的速度。例如,可以通过在小于5小时,优选小于4小时,最优选在小于3小时并且最优选在小于2小时内电穿孔样品来通过电穿孔转染淋巴细胞群。电穿孔的时间是样品进行流式电穿孔过程的时间。在某些实施方案中,使用流式电穿孔在30分钟或更短时间内转染1E10细胞。在一些另外的实施方案中,可使用流式电穿孔在30分钟或60分钟或更短时间内转染2E11细胞。

[0206] 对于流式电穿孔,该方法通过将流动池与具有所需流体和样品的容器中的溶液和细胞混悬液相连来启动。通过向控制泵和夹管阀之操作的电穿孔系统提供所需的命令来引入预充溶液(盐水)和细胞混悬液。当细胞通过电极之间的流路时,施加所选定电压、持续时间和频率的电脉冲。在指定的容器中收集产物和废液。

[0207] 使用者将期望的电压和其他参数输入到本发明的流式电穿孔系统中。如上所述,可任选使用一系列设置。计算机与塔中的电子器件连通以将电容器组充电到期望的电压。然后,在将电压传送到流路以产生电场之前合适的开关操作电压(转换器提供交替的脉冲或突发以使由长时间暴露于电场引起的电极损耗最小化)。根据由操作员在本发明的流式电穿孔系统中设置的持续时间和频率参数传送电压。现在详细描述本发明的流式电穿孔系统。

[0208] 流式电穿孔过程可以通过例如设置电穿孔室与容器中的溶液和细胞混悬液流体连通(例如,通过管)来启动,这可在无菌或灭菌环境中进行。可使用一个或更多个泵、真空器、阀、其他改变电穿孔室内的空气压力或体积的机械仪器及其组合(其可以导致细胞混悬液和/或其他试剂以期望的时间和期望的速率流入电穿孔室)来将细胞混悬液和/或其他试剂引入电穿孔室。如果细胞混悬液和/或其他试剂的一部分位于电穿孔室中,则向细胞混悬液和/或其他试剂施加期望的电压、持续时间和/或间隔的电脉冲。在电穿孔后,可以使用一个或更多个泵,真空器,阀,其他改变电穿孔室内的排量(displacement)、压力或体积的电、机械、气动或微流体仪器及其组合从电穿孔室移除经处理的细胞混悬液和/或其他试剂。在某些实施方案中,可使用重力或手动转移来将样品或经处理的样品移入或移出电穿孔室。如果需要的话,可向电穿孔室中引入新的细胞混悬液和/或其他试剂。经电穿孔的样品可以与尚未经电穿孔的样品分开收集。前述的一系列事件可以暂时通过耦联至例如电子电路(例如,提供电脉冲的)、泵、真空器、阀、其组合及影响和控制样品流入和流出电穿孔室的其他部件的计算机来协调。作为一个实例,电穿孔过程可以通过计算机,包括操作者通过监视器上的图形用户界面和/或键盘来实施。合适的阀的实例包括夹管阀、蝶阀和/或球阀。合适的泵的实例包括离心泵或正排量泵。

[0209] 作为一个实例,流式电穿孔仪器可包含由垫片隔开的至少两个电极,其中垫片和至少两个电极限定室。在一些实施方案中,电穿孔室还可包含至少三个穿过垫片的口,其中第一口用于样品流入室中,第二口用于经处理的样品从室流出,并且第三口用于非样品流体流入室中或从室流出。在一些实施方案中,当样品流入室中时,非样品流体从室流出,并且当经处理的样品流出室时,非样品流体流入室中。作为另一个实例,流式电穿孔仪器可包含具有顶部和底部的包括至少两个平行电极的电穿孔室,该室形成在两个电极之间并且在电穿孔室的底部具有两个室口,在电穿孔室的顶部具有两个室口。这样的仪器还可以包含至少一个样品容器,其通过室的底部中的第一室口与电穿孔室流体连通,并且电穿孔室可以通过室的顶部中的第二室口与样品容器流体连通,形成第一流体路径。此外,至少一个产

物容器可以通过室的底部中的第三室口与电穿孔室流体连通，并且电穿孔室可以通过室的顶部中的第四室口与产物容器流体连通，从而形成第二流体路径。在一些实施方案中，可使用单口电穿孔室。在另一些实施方案中，可以使用电极、垫片、口和容器的多种其他合适的组合。电穿孔室可以包含约1至10mL的内部体积；然而，在另一些实施方案中，电穿孔室可以包含更小的内部体积（例如，0.75mL、0.5mL、0.25mL或更小）或更大的内部体积（例如，15mL、20mL、25mL或更大）。在一些实施方案中，电穿孔室及相关部件可以是一次性的（例如，医用级VI级材料），例如PVC袋、PVC管、连接器、硅酮泵管等。

[0210] 可以将任何数量的容器（例如，1、2、3、4、5、6或更多）与电穿孔室流体连通。容器可以是可收缩、可膨胀或固定体积的容器。例如，第一容器（例如，样品源或样品容器）可以包含细胞混悬液，并且在电穿孔期间可包含或可不包含进入细胞混悬液的细胞中的物质。如果不包含该物质，则可以包括含有该物质的第二容器使得在进入电穿孔室之前在管线内混合该物质或在电穿孔室中混合该物质。在一个另外的配置中，可以附连另一容器，其可保留待丢弃的流体。可使用一个或更多个另外的容器作为经处理的样品或产物的容器。经处理的样品或产物的容器保留由电穿孔过程产生的细胞或其他产物。此外，一个或更多个另外的容器可以包含可用于将样品分离成分散体积或单位体积的多种非样品流体或气体。非样品流体或气体容器可以通过第三口和/或第四口与电穿孔室流体连通。可以将非样品流体或气体容器并入经处理的样品容器或样品容器（例如，非样品流体容器可以包含一部分经处理的样品容器或样品容器）中；因此，在处理样品期间，非样品流体或气体可以从经处理的样品容器转移到另一容器（其可包括样品容器）。可将非样品流体或气体容器并入室中，只要非样品流体或气体的压缩不影响电穿孔即可。本发明的另外的方面可包括连接至样品容器并且可向室供应试剂或其他样品的其他容器。

[0211] 在一些另外的实施方案中，电穿孔仪器是静电穿孔并且不涉及流动的细胞，而是涉及在单个室中的细胞混悬液。当使用这样的仪器时，可使用流式电穿孔所述的参数来限制热降解、提高细胞生存力、提高序列修饰掺入的效率、提高转染效率等。这样的参数包括例如整个申请中所述的流式电穿孔参数和室的热阻、电极间距、与缓冲液接触的组合电极表面与电极之间的距离之比以及电场。

[0212] 特别考虑可以排除本文描述的实施方案。还考虑了当描述范围时，可以排除某些范围。

[0213] 在某些方面中，在电穿孔期间细胞的密度是受控变量。在电穿孔期间细胞的细胞密度可不同或者可根据但不限于细胞类型、期望的电穿孔效率或所得经电穿孔的细胞的期望的生存力而改变。在某些方面中，细胞密度在整个电穿孔期间是恒定的。在另一些方面中，在电穿孔过程期间细胞密度是改变的。在某些方面中，在电穿孔前的细胞密度可为 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^4$ ，其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10。在另一些方面中，在电穿孔前的细胞密度可为 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^5$ ，其中y为2、3、4、5、6、7、8、9或10（或其中可来源的任何范围）。在又一些方面中，在电穿孔前的细胞密度可为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^6$ ，其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10。在某些方面中，在电穿孔前的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^7$ ，其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10或者其中可来源的任何范围。在又一些方面中，在电穿孔前的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{11}$ 个

细胞/mL或 $1 \times 10^{11}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{12}$ 个细胞/mL。在某些方面中,在电穿孔前的细胞密度可为 $(y) \times 10^6$ ,其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100中的任一者或者其中可来源的任何范围。在某些方面中,在电穿孔前的细胞密度可为 $(y) \times 10^{10}$ ,其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000中的任一者(或者其中可来源的任何范围)。

[0214] 在某些方面中,在电穿孔期间细胞的密度是受控变量。在电穿孔期间细胞的细胞密度可不同或者可根据但不限于细胞类型、期望的电穿孔效率或所得经电穿孔的细胞的期望的生存力而改变。在某些方面中,细胞密度在整个电穿孔中是恒定的。在另一些方面中,在电穿孔过程期间细胞密度是改变的。在某些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^4$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在另一些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^5$ ,其中y为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在又一些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^6$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在某些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^7$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在又一些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{11}$ 个细胞/mL或 $1 \times 10^{11}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{12}$ 个细胞/mL。在某些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $(y) \times 10^6$ ,其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100中的任一者(或者其中可来源的任何范围)。在某些方面中,在电穿孔期间的细胞密度可为 $(y) \times 10^{10}$ ,其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000中的任一者(或者其中可来源的任何范围)。

[0215] 在某些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $1 \times 10^4$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^4$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在另一些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $1 \times 10^5$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^5$ ,其中y为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在又一些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^6$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在某些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $(y) \times 10^7$ ,其中y可以为2、3、4、5、6、7、8、9或10(或者其中可来源的任何范围)。在又一些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^9$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL、 $1 \times 10^{10}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{11}$ 个细胞/mL或 $1 \times 10^{11}$ 个细胞/mL至 $1 \times 10^{12}$ 个细胞/mL(或者其中可来源的任何范围)。在某些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为 $(y) \times 10^{10}$ ,其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100中的任一者(或者其中可来源的任何范围)。

的任何范围)。在某些方面中,在电穿孔后的细胞密度可为  $(y) \times 10^{10}$ , 其中y可以为0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000中的任一者(或者其中可来源的任何范围)。

[0216] 在某些实施方案中,电穿孔可以在任何原核或真核细胞上进行。在一些方面中,电穿孔涉及对人细胞进行电穿孔。在另一些方面中,电穿孔涉及对动物细胞进行电穿孔。在某些方面中,电穿孔涉及将细胞系或杂交细胞类型电穿孔。在一些方面中,要电穿孔的细胞为癌细胞、肿瘤细胞或永生化细胞。在一些情况下,肿瘤、癌、永生化的细胞或细胞系被诱导,在另一些情况下,肿瘤、癌、永生化的细胞或细胞系进入其各自的天然状态或条件下。在某些方面中,电穿孔的细胞或细胞系可以为A549、B细胞、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP/、CAP-T、CHO、CHO2、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-DUXB11、COS-1、Cos-7、CV-1、树突细胞、DLD-1、胚胎干(ES)细胞或衍生物、H1299、HEK、293、293T、293FT、Hep G2、造血干细胞、HOS、Huh-7、诱导性多能干细胞(iPS)或衍生物、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、间充质细胞、Min-6、单核细胞、Neuro2a、NIH 3T3、NIH3T3L1、NK细胞、NS0、Panc-1、PCI2、PC-3、外周血细胞、浆细胞、原代成纤维细胞、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、刺激性触发多能性获得(STAP)细胞或衍生物SW403、T-细胞、THP-1、肿瘤细胞、U2OS、U937或Vero细胞。

[0217] 在某些实施方案中,细胞是本领域已知的难以转染的细胞。这样的细胞是本领域已知的,包括例如原代细胞、昆虫细胞、SF9细胞、Jurkat细胞、CHO细胞、干细胞、缓慢分裂细胞和非分裂细胞。

[0218] 在一些情况下,可以在一定量的时间内对一定量的细胞进行电穿孔。鉴于所述的平台的灵活性、一致性和可再现性,可以在小于0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100秒(或者其中可来源的任何范围)内对多至或大于约  $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 或 $(y) \times 10^{15}$ (或者其中可来源的任何范围)个细胞进行电穿孔,其中y可以为1、2、3、4、5、6、7、8或9中任一者(或者其中可来源的任何范围)。在另一些情况下,可以在小于0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110或120分钟(或者其中可来源的任何范围)内对多至或大于约  $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 或 $(y) \times 10^{15}$ (或者其中可来源的任何范围)个细胞进行电穿孔,其中y可以为1、2、3、4、5、6、7、8或9中任一者(或者其中可来源的任何范围)。在又一些方面中,可以在小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时(或者其中可来源的任何范围)内对多至或大于约  $(y) \times 10^4$ 、 $(y) \times 10^5$ 、 $(y) \times 10^6$ 、 $(y) \times 10^7$ 、 $(y) \times 10^8$ 、 $(y) \times 10^9$ 、 $(y) \times 10^{10}$ 、 $(y) \times 10^{11}$ 、 $(y) \times 10^{12}$ 、 $(y) \times 10^{13}$ 、 $(y) \times 10^{14}$ 或 $(y) \times 10^{15}$ (或者其中可来源的任何范围)的细胞进行电穿孔,其中y可以为1、2、3、4、5、6、7、8或9中任一者(或者其中可来源的任何范围)。

[0219] 表达式“(y)  $\times 10^e$ ”被理解为意指可以取任意数值的变量“y”乘以升高到指数值e的10。例如,  $(y) \times 10^4$ , 其中y为2,被理解为意指 $2 \times 10^4$ ,相当于20,000,等于20,000。 $(y) \times 10^e$

还可以写为(y)\*10e4或(y)x10<sup>4</sup>或(y)\*10<sup>4</sup>。

[0220] 细胞或培养基的体积可根据待电穿孔的细胞量、待筛选的细胞量、待筛选的细胞类型、待产生的蛋白质类型、期望的蛋白质的量、细胞生存力和与期望的细胞浓度相关的某些细胞特征而改变。可以用于所述方法和所述组合物的体积的实例包括但不限于0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ml或L(或者其中可来源的任何范围)以及其中可来源的任何范围。可保持这样的体积的容器被考虑用于本文中所述的实施方案中。这样的容器包括但不限于细胞培养皿、培养皿(petri dish)、烧瓶、生物袋、生物容器、生物反应器或大桶。特别考虑了用于大体积的容器,例如能够容纳10L或更大体积的那些容器。在某些实施方案中,使用100L或更大的体积。

[0221] 特别考虑到通过本文中所述的方法对细胞进行电穿孔提供了提高的效率和/或降低的毒性的益处。这样的测量可通过测量并入基因组DNA序列修饰的细胞的量,测量表达标志物的细胞的量和/或测量在电穿孔后细胞的生存力来进行。

[0222] 在一些实施方案中,序列修饰的效率大于约2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或80%。序列修饰的效率可以通过确定具有序列修饰的细胞的数量并除以细胞的总数量来测量。基因组DNA序列修饰的掺入可以通过本领域已知的方法来确定,例如直接基因组DNA测序、差别限制性消化(如果序列修饰是添加、移除或改变限制酶位点)、凝胶电泳、阵列毛细管电泳、MALDI-TOF MS、动态等位基因特异性杂交、分子信标、限制性片段长度多态性、引物延伸、温度梯度凝胶电泳等。

[0223] 在另一些实施方案中,电穿孔后的细胞生存力为至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。细胞生存力可以通过本领域已知的方法来测量。例如,可以通过细胞计数器装置在电穿孔之前和之后计数细胞。在另一些实施方案中,测量凋亡。大量核酸的引入被认为可诱导凋亡。考虑到本文中所述的方法导致比本领域其他方法更少的细胞凋亡。在某些实施方案中,在电穿孔后表现出凋亡的细胞的量小于50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。凋亡是指程序性细胞死亡的具体过程,并且可以通过本领域已知的方法来测量。例如,凋亡可通过膜联蛋白V测定、经活化的胱天蛋白酶3/7检测测定和Vybrant®凋亡测定(Life Technologies)来测量。

[0224] 在一些另外的实施方案中,表达编码标志物的核酸的细胞的百分比大于约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%或其中可来源的任何范围。在另一些实施方案中,与引入外源核酸之前的细胞数目相

比,表达编码标志物的核酸的活细胞的百分比大于约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、6%、65%、70%、75%、80%、85%或90%,或其中可来源的任何范围。

[0225] 当本公开内容的一个具体实施方案包括范围或具体值时,如本文中所述,特别考虑到在本发明的一些实施方案中可排除范围和特定值(即,浓度、核酸的长度和百分比)。还考虑到当本公开内容包括要素列表(例如细胞类型)时,本发明的一些实施方案可特别地排除列表中的一个或更多个要素。

[0226] VI. 实施例

[0227] 包括以下实施例以证明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,以下实施例中公开的技术代表本发明人发现的在本发明的实践中作用得很好的技术,因此可以被认为是构成用于其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应理解在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变,并且仍然获得相同或相似的结果。

[0228] 实施例1

[0229] 细胞培养:将冷冻保存的PBMC解冻并在RPMI-1640+10%FBS+100u/ml rhIL-2+抗生素中培养过夜。除去组织培养瓶中的附着细胞。将K562在RPMI-1640+10%FBS+2mM L-谷氨酰胺+抗生素中培养。成纤维细胞(Fibroblasts)在DMEM+10%FBS+抗生素中。按照活化试剂盒的方案,通过Dynalbeads Human T-Activator CD3/CD28 (Invitrogen, Carlsbad CA) 活化经扩增T细胞。活化后3-6天转染细胞。

[0230] 电穿孔:对于PBL、经扩增T细胞或K562,直接收集细胞,或者对于成纤维细胞,用胰蛋白酶消化。用MXCT EP缓冲液洗涤后,将细胞与mRNA (200ug/ml Cas9和100ug/ml gRNA,或100ug/ml GFP) 和/或单链DNA寡核苷酸 (100μg/mL,除非另有说明) 混合并进行电穿孔。在EP孵育后20分钟之后,将细胞培养2-5天,然后收集细胞沉淀用于基因修饰测定。

[0231] 基因组DNA提取:使用Purelink genomic DNA Mini试剂盒(Invitrogen, Carlsbad CA) 提取基因组DNA。提取的基因组DNA在使用前储存在-4℃冰箱中。

[0232] 基因修饰测定:使用SURVEYOR突变检测试剂盒(Trangenomic, Omaha NE) 进行Cel-1测定以测定基因的基因组DNA编辑。遵循该公司提供的试剂盒的方案。通过HindIII消化测定识别HindIII的6个核苷酸的整合。用10%TBE凝胶(Invitrogen, Carlsbad CA) 分析样品。

[0233] CRISPR (Cas9和gRNA):针对SSAV1安全港(safe harbor)位点上的特异性5' GGGGCCACTAGGGACAGGAT TGG 3'位点的Cas9和gRNA的整个试剂盒购自华盛顿大学圣路易斯基因组工程中心。用于扩增含有gRNA靶位点的基因组DNA区段的引物(F-5' TTCGGGTACCTCTCACTCC 3'; R-5' GGCTCCATCGTAAGCAAACC3')包括在试剂盒中。将约468bp的扩增子用于进一步的Cel-1测定和HindIII消化测定,如果发生基因组DNA修饰,其消化将产生两条约170和298bp的带。

[0234] CRISPR mRNA:用mMESSAGE mACHINE® T7Ultra Kit (Invitrogen, Carlsbad CA) 由购自圣路易斯华盛顿大学的模板质粒DNA制备mRNA。

[0235] 单链寡核苷酸:寡核苷酸的序列如下:

[0236] 实施例2

[0237] 本文描述的方法可用于校正患者造血干细胞(HSC)中的致病突变以治愈遗传疾

病。该实施例描述了校正慢性肉芽肿病 (CGD) 中的突变以用于治愈该疾病的方法。该疾病不仅证明了本文所述的基因治疗方法的概念验证,而且还推进该疾病的治疗方法,而这是迄今为止仍然是未被满足的挑战。由于CGD中的基因突变是众所周知的,所以具有该疾病的细胞的体外功能测定技术是成熟的,建立了CGD的动物模型,并且低百分比的校正可以导致显著的临床功效。非病毒方法将用于递送编码CRISPR (Cas9和gRNA对) 的信使RNA (mRNA) 和靶向位于外显子7上的gp91phox基因中第676位的最普遍突变 ('热点') 的DNA寡核苷酸以将点突变从 'T' (导致疾病表型) 转换到 'C' (在正常细胞中普遍存在)。通过使用MaxCyte的符合cGMP和法规的紧密系统流式电穿孔平台,将促进CRISPR的递送。

[0238] 如果可以显示作为模型疾病的CGD中的突变在临床相关功效中被校正,则本文所述方法的这种概念验证实际上将该技术平台验证为潜在治愈性疗法,用于将所述方法扩展来治愈其中已知突变与疾病相关的多种其他疾病。此外,由于MaxCyte Flow Transfection System是符合GMP标准的FDA-Master-File支持的大容量转染技术平台,并且已通过当前的临床试验和商业化验证,因此不仅对于CGD,而且对于许多其他遗传病,该方案研究的成功可以很容易地转化为临床研究和商业化。

[0239] HSC是用于治愈CGD的最佳选择,并将用于该方案中。校正自体HSC中的突变基因的基因治疗具有治愈遗传疾病的最佳潜力。对于CGD,临幊上已发现HSC是对抗这种疾病的合适候选者。到目前为止,已经在临幊上测试了使用自体HSC的CGD的基因治疗,所述自体HSC由编码由组成型启动子驱动的疾病基因/eDNA的病毒载体转导。该方法已证明来自基因组内随机整合位点的基因整合和表达的可行性,即使表达校正基因的细胞<1-5%,也为患者带来了显著的临幊益处。然而,关于常规基因治疗的主要问题是由于无法控制基因整合到基因组中的位置而导致的插入诱变的风险,以及干细胞中cDNA的组成型表达,这将导致所有子谱系,甚至是在正常健康状况下可能不表达该基因的那些细胞的cDNA表达。

[0240] 非病毒方法具有其优点。然而,通过非病毒转染方法在大多数造血细胞中DNA质粒转染的高细胞毒性和低转染效率阻碍了非病毒转染方法用于HSC转染。通过十多年的研幊,发现使用电穿孔进行转染的高细胞毒性和低转染效率是由于DNA摄取介导的细胞凋亡/细胞焦亡 (pyroptosis),而不是电穿孔介导的细胞杀伤。为了将非病毒转染方法应用于基因治疗,必须找到有效转染转基因和改善细胞生存力的方法。

[0241] 已发现mRNA转染是具有低细胞毒性的表达转基因的有效方式。mRNA转染的瞬时表达特征对于许多应用是有利的,例如强制表达CRISPR、TALEN或ZFN的核酸酶。通过在mRNA制剂中的核酸酶的电穿孔在基因组DNA中进行有效的特异性基因编辑使该方法的进一步应用重新焕发活力。在mRNA制剂中使用核酸酶电穿孔的IND提交的一些成功批准是很好的例子。对于将mRNA转染用于临床试验的这些当前应用,有意避免DNA材料以降低细胞毒性。因此,该应用是通过基因插入缺失的基因敲除应用领域中的巧妙设计。目前的非病毒转染仍然不能用于将基因或核苷酸添加到基因组DNA中。

[0242] 本文所述的当前发现表明,尽管质粒DNA摄取介导高细胞毒性,但是单链DNA寡核苷酸的转染不会诱导细胞毒性。这一发现允许将非病毒方法用于单核苷酸突变或少数核苷酸突变的基因校正,作为替代方式以代替基因治疗中eDNA的组成型表达,这将显著解决目前的基因治疗方法中所担心的诱变和某些子谱系中非需要的表达的问题。由于大多数遗传性疾病涉及单核苷酸或少数核苷酸突变,因此这种基因校正方法对于对抗遗传疾病可能非

常重要和实用。转换为mRNA制剂和作为CGD HSC中基因校正的供体DNA的DNA单链寡核苷酸中的核酸酶转染(本方案中的CRSPR为例)不仅对CGD具有最小的风险和高度有希望的结果,而且对于其他遗传疾病的基因治疗也是如此。

[0243] 研究设计

[0244] 遗传疾病是对我们社会的未满足的挑战。大多数遗传性疾病(例如CGD或镰状细胞病)已经用控制症状的唯一能力进行治疗,例如使用抗菌/抗真菌预防性的IFN- $\gamma$ 用于CGD和输血用于镰状细胞病。尽管在CGD患者的抗生素/抗真菌治疗方面取得了重大进展,但由于缺乏有效的治疗疾病的方法,CGD患者不幸会发生严重的并且甚至致命的复发性感染。干细胞移植可以治愈疾病,但其需要严格匹配的供体,这是很难找到的,限制了适用性。

[0245] 使用突变校正的自体HSC离体的基因治疗已经证明了有益于患者的功效,提高了治愈遗传疾病的希望。到目前为止,这种使用病毒作为基因递送方法的方法主要使用编码突变亚基的整个cDNA和启动子来组成性地表达用于临床试验的治疗性蛋白质。由于随机整合在整个基因组中以及所有子谱系(其中一些可能天然不表达蛋白质)的恒定表达,这种方法的安全性是大的问题,导致可能的插入诱变并且可能是一些未知的子序列。

[0246] 校正自体HSC基因组的特定突变位点处的突变核苷酸的非病毒方法在插入诱变、基因表达沉默、病毒感染细胞的消耗和基因表达调节问题方面具有较少的问题。然而,到目前为止,基因治疗中的非病毒方法不受欢迎,因为非病毒方法的效率在生存力和转染效率两方面都太低。然而,通过使用核酸酶(TALEN或CRISPR),最近申请人发现电穿孔可以介导有效的核苷酸整合到靶基因组位点,有效校正特定突变核苷酸,以及从突变细胞到许多细胞类型(包括HSC)中功能蛋白表达细胞的有效表型逆转,而没有明显的细胞毒性,其效率远高于目前的报道,因此重新点燃了使用非病毒方法进行基因治疗的希望。此外,MaxCyte开发的基于电穿孔的符合cGMP的可扩展基因递送技术可以很容易地将这一发现转化为临床试验和潜在的商业化。

[0247] 慢性肉芽肿病(CGD)是一组遗传性疾病,其中吞噬细胞不产生用于杀死某些病原体的活性氧化合物(最重要的是,超氧化物基团)。在美国,CGD影响约每20万人中的1人,每年诊断出约20例新病例。CGD的管理涉及早期诊断、患者教育和用于预防和治疗感染的抗生素。复发性感染和炎症的发病率是一个主要问题,感染率为每年约0.3。来自匹配供体的造血干细胞(HSC)移植具有疗效,但具有显著的相关风险(移植排斥、移植物抗宿主病、化学治疗相关毒性)和匹配供体的可用性。已经在临幊上测试了使用自体干细胞的基因治疗,所述自体干细胞由编码由组成型启动子驱动的疾病基因/cDNA的病毒载体转导。该方法已证明来自基因组内随机整合位点的基因整合和表达的可行性,其为患者带来了显著的益处。然而,关于常规基因治疗的主要问题是由于不能控制基因整合到基因组中的位置而导致插入诱变的风险。

[0248] 本文所述的组合物和方法可用于CGD患者中突变的靶向校正。可以使用基于信使RNA的非病毒的位点特异性基因编辑工具(CRISPR/Cas9酶),其具有特异性靶向CGD患者HSC中的相应突变的校正序列。使用本文描述的方法,可以开发非病毒的位点特异性的离体基因修饰的细胞疗法作为CGD的治疗。

[0249] 开发用于CGD突变的位点特异性校正的方案:第一目标校正是通过首先使用来自患者的EBV转化的B细胞的外显子7中gp91phox中第676位的C至T的最普遍的突变(‘热点’)。

在这种特殊的CGD中,将氨基酸位点226处的核苷酸“T”校正为“C”,使该位点从终止密码子恢复为正确的Arg,并且可以通过gp91表达定量来自校正细胞的表达并通过测序确认。

[0250] 确认CGD患者HSC中的功能性基因校正:可以获得来自具有特定C676T突变的CGD患者的自体HSC。可以优化转染程序,并且可以使用本文描述的方法校正突变的基因。校正效率可以通过检测gp91表达和体外超氧化物产生的功能恢复来确定,然后在异种移植模型中进行小鼠移植研究以评估这种校正的患者HSC的植入和从小鼠取回的人细胞中的功能恢复。

[0251] 用于临床翻译的扩大制备过程:可以获得来自合适的CGD患者的自体HSC。然后可以在扩展的符合cGMP的制备过程中校正突变基因。然后可以检查体外校正效率和功能恢复。

[0252] 经过数十年的研究,申请人和其他人发现DNA转染对大多数造血细胞具有细胞毒性,这是阻止非病毒方法有效用于基因治疗的最大批评障碍。申请人发现DNA是细胞毒性的来源,而不是一般直觉上认为的电穿孔。寻找有效转染但具有低细胞毒性和高转染效率的适当替代方案是我们长期以来的目标。申请人是率先开展mRNA转染的第一组之一,并发现mRNA转染符合要求。如图17所示,形态学上,HSC的流式电穿孔转染可通过mRNA介导高转染效率和低细胞毒性。

[0253] 如图10A-D所示,不同的mRNA浓度导致比质粒DNA高得多的转染效率,所有这些都导致比利用DNA质粒转染的细胞更高的细胞生存力。GFP-mRNA转染提供高生存力(图10A)、高转染效率(图10C-D)、相对于对照细胞的相同细胞增殖率(图10B),但DNA质粒引起高细胞毒性(图10A)、延迟的细胞增殖(图10B)和较低的转染效率(图10C-D)。

[0254] 申请人进一步确认,不仅mRNA有利于转染,单链DNA寡核苷酸也不会引起细胞毒性,这开启了通过非病毒方法进行基因校正的可能性。如图11所示,通过mRNA和单链寡核苷酸,HSC的流式电穿孔转染具有高转染效率和低细胞毒性。用MAXCYT流式电穿孔技术转染HSC。对照和GFP-mRNA转染导致相似的生存力(图11B)、增殖(图11C)。CRISPR(cas9(c)和gRNA(g))和单链寡核苷酸(25聚体、50聚体、70聚体和100聚体)的转染均具有类似的生存力和增殖,但略低于对照细胞。然而,细胞维持高生存力和增殖(相对于对照细胞 $\geq 80\%$ ),证明了HSC中c+g+寡核苷酸转染的高生存力。

[0255] mRNA转染不仅细胞毒性低,其还在转染后介导有效功能。如图18所示,流式电穿孔介导HSC中AAVS1位点的有效基因编辑。实现了大约50%的基因编辑。此外,CRISPR和单链DNA寡核苷酸在转染中的组合使用也可介导有效的核苷酸整合,即基因校正所需的同源重组过程。如图13A-B所示,流式电穿孔介导有效的核苷酸整合到HSC的AAVS1位点。实现了HSC的特定基因组位点的有效核苷酸整合。6-核苷酸Hind III识别序列的整合是寡核苷酸大小和浓度依赖性。其在HSC中可以实现高至约40%的整合。

[0256] 通过转染CRISPR和单链DNA寡核苷酸的核苷酸整合可以直观地认为不同于核苷酸校正,其不增加核苷酸长度。基因校正将进一步与正确功能蛋白的基因表达的校正不同。为了通过概念验证进一步证明,申请人证明CRISPR和单链寡核苷酸的mRNA转染不仅可以介导基因整合、基因校正,而且可以介导表型逆转以具有功能性基因表达。如图19所示,在CGD患者EBV转化的B细胞中,流式电穿孔介导gp91表达的有效恢复。在相同的EBV转化的B细胞中识别Hind III的6-核苷酸整合的实际速率远高于表达gp91的细胞的速率(数据未显示)。这

也成功地在患者HSC中高效率地进行(>5% ;数据未显示)。

[0257] 可以使用以下方法来校正患者中的CGD:通过首先使用来自患者的EBV转化的B细胞,可以首先靶向外显子7中的gp91phox中第676位C至T的最普遍的突变(‘热点’)。在这种特殊的CGD中,将氨基酸位点226处的核苷酸“T”校正为“C”,使该位点从终止密码子恢复为正确的Arg,并且可以通过gp91表达定量来自校正细胞的表达并通过测序确认。

[0258] 可以首先测试四种gRNA(g1、g2、g3和g4)并验证其功效。这些gRNA列于下表:

[0259]

靶向gp91的gRNA	
g1	TTTCCTATTACTAAATGATCNGG
g2	CACCCAGATGAATTGTACGTNGG
g3	TGCCCACGTACAATTCATCTNGG
g4	AGTCCAGATCATTTAGTAATNGG

[0260] 可测试50聚体至200聚体的寡核苷酸大小(如下表所示,01-04)对基因校正效率的影响。如果大小仍未引起细胞内的DNA传感器以引发细胞凋亡或细胞焦亡,则预期较长的寡核苷酸大小可导致更好的校正结果。

[0261]

	用于基因校正的单链寡合寡核苷酸
01	5'ACATTTTCACCCAGATGAATTGTACGTGGGCAGACCGCAGAGAGTTGGC-3'
02	5'CTATTACTAAATGATCTGGACTTACATTTTCACCCAGACGAATTGTACGTGG GCAGACCGCAGAGAGTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTGTGAA-3'
03	5'TCTTTAATAAAACAATTAAATTCTATTACTAAATGATCTGGACTTACATT TTCACCCAGATGAATTGTACGTGGGCAGACCGCAGAGAGTTGGCTGTGCATAA TATAACAGTTGTGAACAAAAAATCTCAGAATGGGGAA-3
04	5'CAGAGCACTTAAATATGCAGAATCTTTAATAAAACAATTAAATTCTA TTACTAAATGATCTGGACTTACATTTTCACCCAGATGAATTGTACGTGGCAG ACCGCAGAGAGTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTGTGAACAAAAAATCTCA GAATGGGGAAAAATAAAGGAATGCCAATCCCTCA-3

[0262] 对于第一研究阶段,寡核苷酸可用于整合HindIII识别位点(AAGCTT),并且可使用通过Cet-1测定的插入缺失效率和通过PCR扩增的扩增子的HindIII消化测定的HindIII识别位点的整合效率来测试四种gRNA的靶向效率。然后可以使用去除了HindIII识别序列的寡核苷酸,并且突变位点的T至C改变以测试gp91表达的恢复延长的长时间以理解基因校正的持久性。

[0263] 为了确认真实的校正,可以使用下面列出的三种测定:1) 使用针对gp91的抗体进行测定以检查gp91表达的恢复;2) 对gp91阳性细胞进行分选,并对PCR扩增子进行测序以验

证校正;3)通过用佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)刺激测量增强的化学发光来测定O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生的体外功能研究。

[0264] 由于申请人已经生产并测试了Cas9,申请人不期望与在突变位点附近的位点获得有效基因编辑有关的任何问题。cel-1测定可用于检查基因编辑的效率。Hind III识别位点也可以引入到突变位点以检查寡核苷酸整合。利用先前描述的方法和数据,发现了具有100聚体大小的寡核苷酸的两种测试的gRNA-2非常有希望的结果。gp91基因表达恢复至超过3%的水平。如果需要,可以设计不同的结构化低聚物。这些包括用于细胞内寡核苷酸稳定性的具有键修饰的寡核苷酸,或甚至双链寡核苷酸。通过进一步优化,相信可以获得5-10%的校正效率,其水平可以高到足以看到CGD患者的显著临床益处。

[0265] 确认CGD患者HSC中的功能性基因校正:可以获得来自具有特定C676T突变的CGD患者的自体HSC。可以优化转染,并且可以使用上述四种gRNA和寡核苷酸校正突变的基因。然后可以测试通过检测gp91表达和体外超氧化物产生的功能恢复的校正效率。

[0266] 一旦实现了约5-10%的gp91表达的恢复,可以在异种移植模型中进行SCID小鼠植入研究以评估这种校正的患者HSC的植入约1-4个月的植入持续时间。此外,还可以测试从小鼠中回收的人体细胞的功能恢复。还可以测试利用1e6-5e6/小鼠的i.v.尾静脉注射的校正的HSC的植入1至3个月的持续时间。

[0267] 为了确认基因校正,可以使用以下研究:1)使用针对gp91的抗体来测定gp91表达的恢复;2)对gp91阳性细胞进行分选,并对PCR扩增子进行测序以验证校正;3)通过用14-17天分化的骨髓细胞的佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)刺激测量增强的化学发光来测定O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生的体外功能研究;4)在14-17天分化的骨髓细胞的PMA刺激后,用二氢罗丹明123(DHR)荧光探针进行O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生功能研究的体外FACS分析;5)在半固体琼脂糖中分化的骨髓集落的PMA刺激后,由硝基四氮唑(NBT)形成还原型甲<sup>脂</sup>的超氧化物O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生的体外功能研究;以及6)在PMA刺激后使用(DHR)荧光探针,在SCID小鼠中从移植的HSC中回收的分化的骨髓的超氧化物O<sub>2</sub><sup>-</sup>产生的体外功能性FACS研究。

[0268] 申请人在HSC培养、转染和基因编辑中的CD34HSC方面非常有经验。解冻和用细胞因子培养后的转染条件和转染时间点可以进一步优化。可以检查基因编辑,并且可以修饰寡核苷酸以引入Hind III识别核苷酸以检查突变位点处核苷酸整合的效率。可优化低聚物大小和浓度以及CRISPR比率和浓度以获得有效的基因编辑和Hind III整合。Hind III识别位点整合可以与突变的基因校正相关联。在解冻后培养HSC 1至5天可能是必要或有利的,以使HSC进入完全增殖期,以便具有有效的校正效率。由于申请人已经从校正的CGD患者HSC中看到分化的嗜中性粒细胞中gp91表达恢复>6%,因此预计不会出现问题。

[0269] 用于临床翻译的扩大制备过程:可以获得来自合适的CGD患者的自体HSC。预计每个人的临床试验需要4e8-4e9HSC。然后可以研究用于制备未来临床试验的扩展程序和细胞处理。按扩展可以从2e6HSC到1e8HSC,然后从1e8到1e9或4e9。将在体外测定转染的细胞。然后可以在扩展的符合cGMP的制备过程中校正突变的基因。然后可以评估体外校正效率和功能恢复。也可以进行异种移植模型中的SCID小鼠植入研究以评估这种矫正的患者HSC的植入。

[0270] 可以使用以下实验来确认基因校正:1)使用针对gp91的抗体来测定gp91表达的恢复;2)对gp91阳性细胞进行分选,并对PCR扩增子进行测序以验证校正;3)通过用14-17天分

化的骨髓细胞的佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯 (PMA) 刺激测量增强的化学发光来测定O2<sup>-</sup>产生的体外功能研究;4) 在14-17天分化的骨髓细胞的PMA刺激后,用二氢罗丹明123 (DHR) 荧光探针进行O2<sup>-</sup>产生功能研究的体外FACS分析;5) 在半固体琼脂糖中分化的骨髓集落的PMA刺激后,由硝基四氮唑 (NBT) 形成还原型甲酇的超氧化物O2<sup>-</sup>产生的体外功能研究;以及6) 在PMA刺激后使用 (DHR) 荧光探针,在SCID小鼠中从移植的HSC中回收的分化的骨髓的超氧化物O2<sup>-</sup>产生的体外功能性FACS研究。

[0271] 本文描述的方法可用于开发用于制备具有用于治疗CGD的有效突变校正的大量自体HSC的翻译平台技术,作为遗传疾病的示例性平台。来自提议研究的结果将用于开发技术转移包,包括制备过程的开发、分析方法和产品特性描述以及在NIH cGMP设施翻译成IND启用研究的发布测试要求,以支持提交IND行为申请人体临床试验。本实施例中描述的方法也可用于开发用于制备用于治疗CGD的临床相关数量的基因校正的自体HSC的可扩大方法。该项目将产生突变校正的自体HSC,具有高活力、低毒性和临床相关的基因校正水平。此外,这些结果可进一步验证所开发方法在治疗其他遗传疾病中的应用,并需要进行单独的进一步研究。

#### [0272] 实施例3

[0273] 基因修复需要特定的核酸酶和供体DNA。通过优化核酸酶的靶向部分 (CRISPR的gRNA) 和供体DNA的序列部分,可以实现基因修复的效率。制备gRNA的当前实践是体外转录gRNA (未加帽和未加尾) 或整体 (约100聚体) 或以两个片段 (双链体) 合成gRNA。对于体外转录制备gRNA,目前的实践中没有加帽或加尾 (参见来自技术支持的之前的三张幻灯片)。

[0274] 本实施例证明,如果将gRNA加帽和加尾,体外转录的gRNA在单基因突变修复中可以具有更高的效率 (由于改善的细胞生存力和增殖),并且当寡核苷酸和gRNA与基因组DNA序列的同一侧互补时,供体单链DNA寡核苷酸可以导致更高的修复效率。

[0275] 用于修复的第一个选择的单基因突变发生在外显子7c.676C>T,具有gp91phox缺陷 (特殊的X连锁形式的CGD),gp91phox缺陷由于突变而导致终止密码子。用于修复的第二个选择的单基因突变发生在IL2受体γ链中的内含子7剪接位点的G到A突变 (c.924+1G>A)。

[0276] 使用来自具有不同突变的两名患者的EBV转化的患者B细胞 (B-LCL)。对于每种疾病,B细胞在x连锁的gp91<sup>phox</sup>基因中具有单基因突变,其导致gp91不表达。具有IL2受体γ链突变的x连锁严重联合免疫缺陷导致IL2受体γ链不表达。成功的基因修复将导致gp91和IL2R<sub>gc</sub>表达的恢复。

[0277] 除非另有说明,否则使用mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA转录试剂盒 (T7Ultra)。除非另有说明,否则遵循试剂盒提供的方案。对于加帽、加尾效果的研究,使用TranscriptAid T7高产量转录试剂盒 (TranscriptAid)。当没有添加帽和Poly A时,遵循试剂盒中的方案。对于加帽,使用4:1 ARCA:GTP。对于Poly A,使用来自mMESSAGE mMACHINE® T7ULTRA转录试剂盒的用于Poly A添加的试剂。

[0278] Cas9mRNA通过使用线性化的cas 9质粒制备。gRNA RNA通过使用来自gRNA质粒的扩增子制备。与靶位点互补的100聚体大小的单链DNA寡核苷酸购自IDT。

[0279] Gp91-gRNA靶向序列: CACCCAGATGAATTGTACGTNGG (红色是突变的核苷酸)。

[0280] 在本实施例的实验中使用以下引物、寡核苷酸和序列：

[0281]

gp91-gRNA模板的正向引物	5'- TTAATACGACTCACTATAGGCACCCAGATGAATTG TACGT-3'
gp91-gRNA模板的反向引物	5'-aaaagcaccgactcggtgcc-3'
与gp91-gRNA所靶向的相同双链体互补的寡核苷酸序列	5'- CTATTACTAAATGATCTGGACTTACATTTCACCC AGACGAATTGTACGTGGGCAGACCGCAGAGAGTT TGGCTGTGCATAATATAACAGTTGTGAAC-3
与gp91-gRNA靶向的相反双链体互补的寡核苷酸序列	5'- TGTTATATTATGCACAGCCAAACTCTCTGCGGTCT GCCCACGTACAATTCTGCTGGGTGAAAAATGTAAG TCCAGATCATTAGTAATAGGAAATTAAAT-3

[0282]

X-SCID-gRNA靶向序列	5' TTCTCA <u>TCGAAAAGTTCCCG</u> 3' (underlined is the mutated nucleotide)
X-SCID-gRNA模板的正向引物	5'- TTAATACGACTCACTATAGTTCTCATCGAAAAGT TCCCG-3
X-SCID-gRNA模板的反向引物	5'-aaaaggcaccgactcggtgcc-3'
与X-SCID-gRNA靶向的相同双链体互补的寡核苷酸序列	5'- GTTGGCAGTTGATAGACTGCAGCATGCTTATGACA GCGTTCTCACCGAAAAGTTCCCGTGGTATTCAAGTA ACAAGATCCTCTAGGTTCTCAGGGTGGGA-3'
与X-SCID-gRNA靶向的相反双链体互补的寡核苷酸序列	5'- TCCCACCCCTGAAGAACCTAGAGGATCTTGTACTG AATAC CACGGGAAC TTTCGGTGAGAACGCTGTCATAAGCATGCTGCAGT CTATCAACTGCCAAC-3

[0283] 根据本公开内容,本文中所公开和要求保护的所有方法可以在不进行过度实验的情况下进行和执行。虽然已经就一些优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对本领域技术人员明显的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下可以对本文中所述的方法的步骤或步骤顺序进行变化。更具体地,明显的是,在化学和生理上相关的某些试剂可替代本文中所述的试剂,同时获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员明显的所有这样的类似替代和修改被认为是在由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念内。

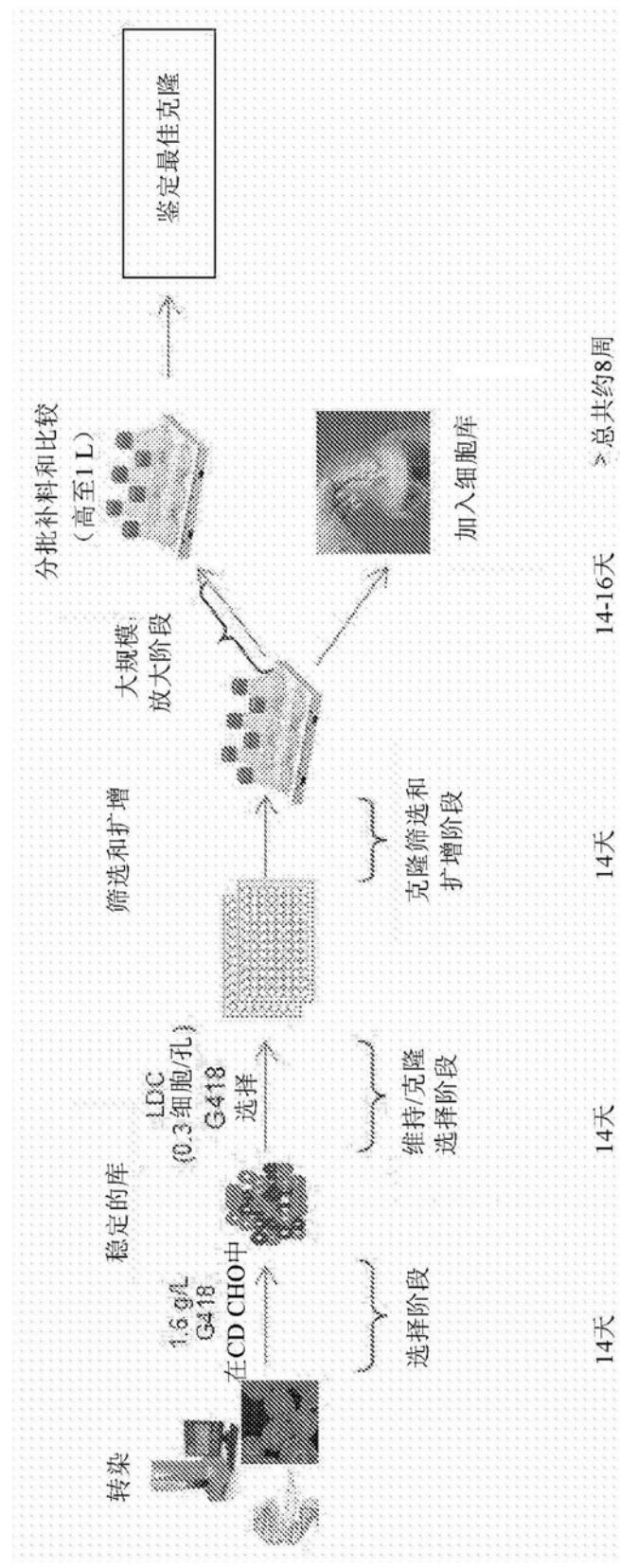


图1

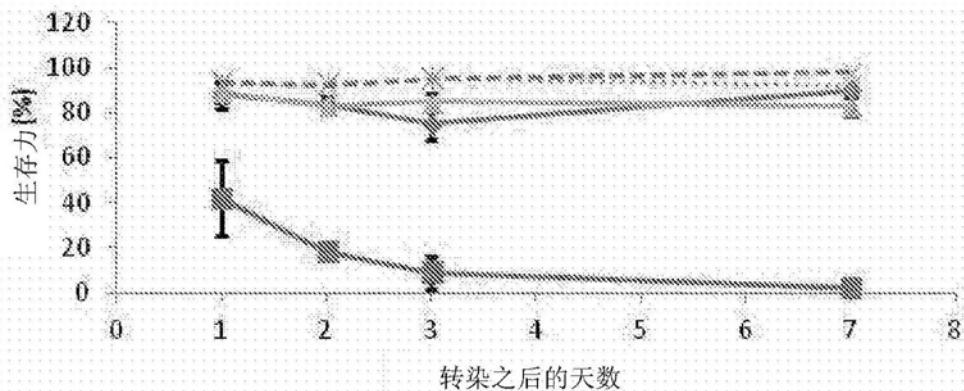


图2A

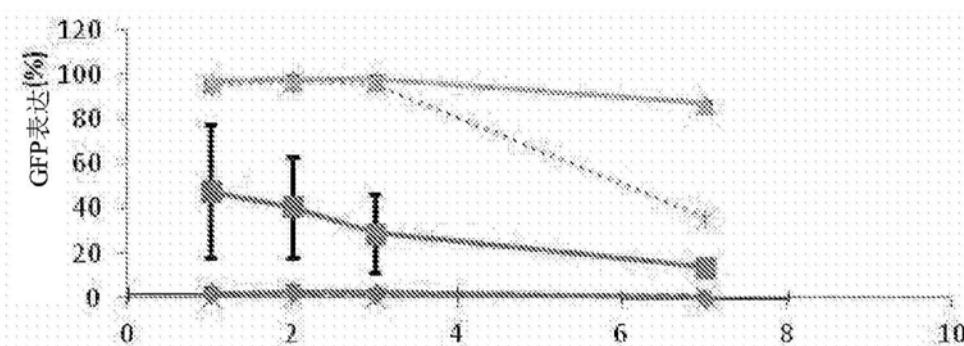


图2B

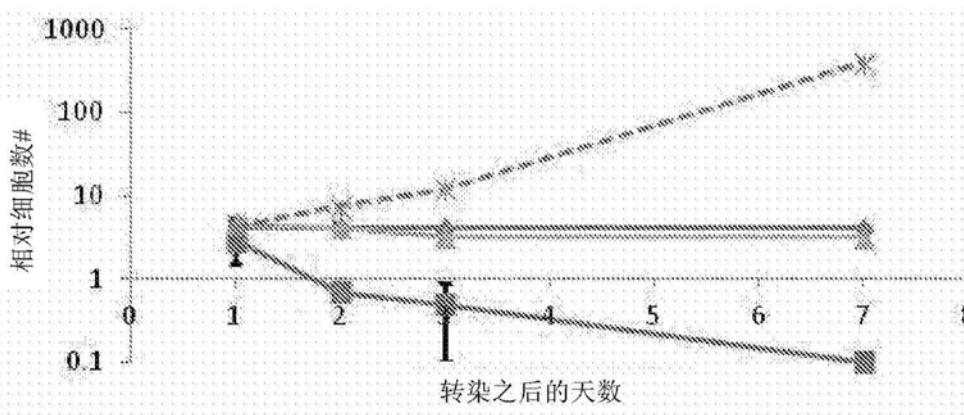


图2C

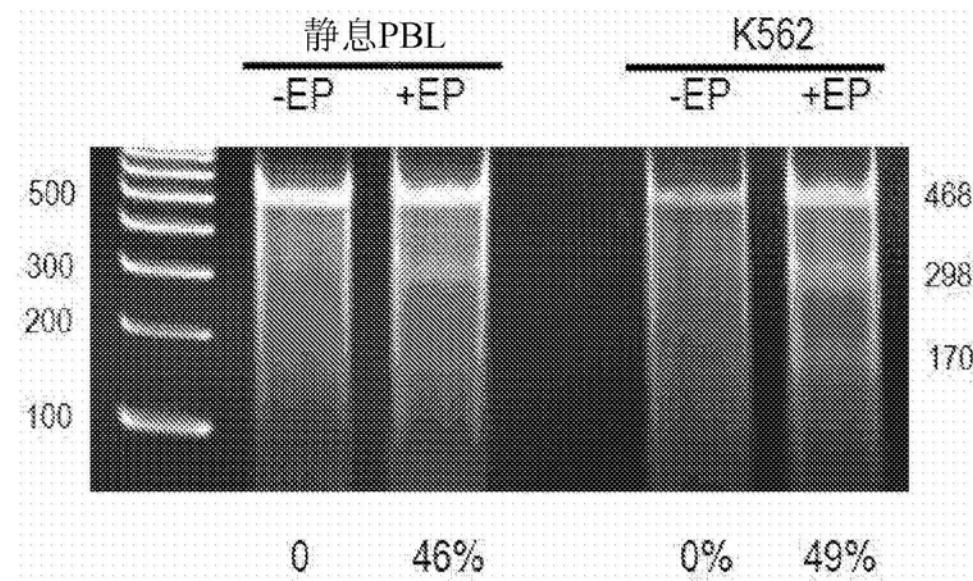


图3

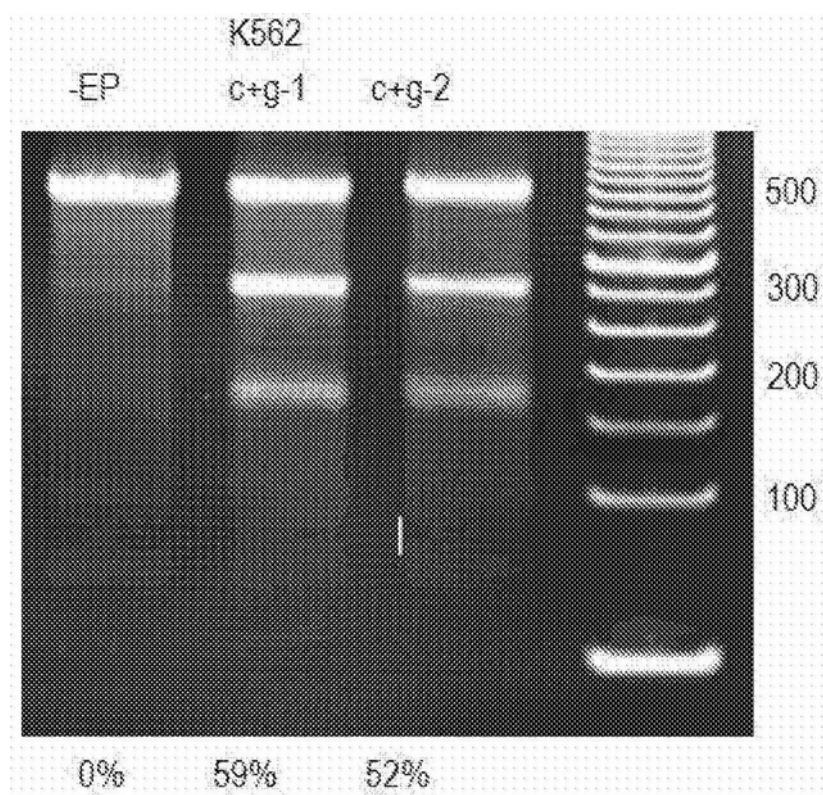


图4

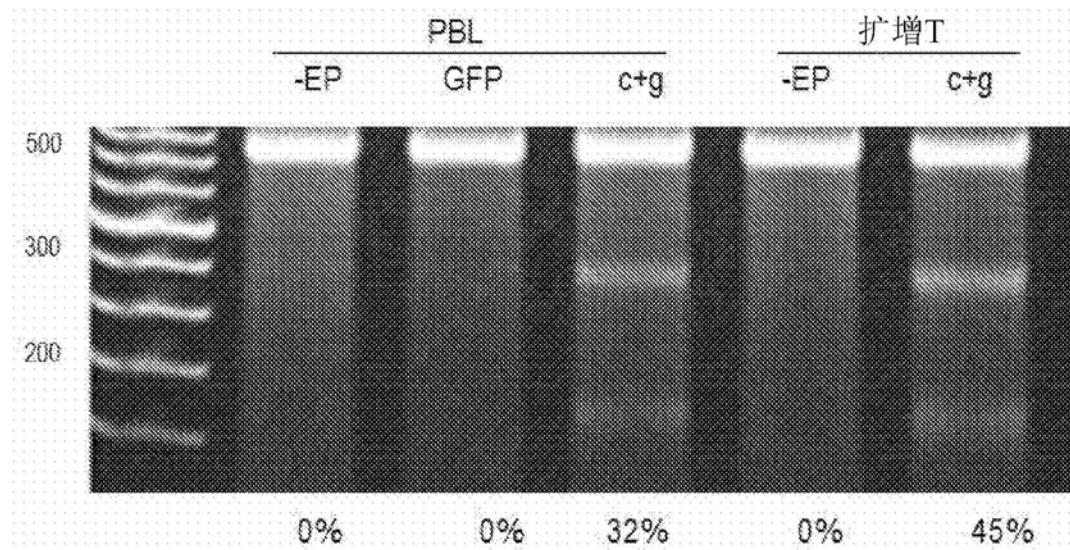


图5

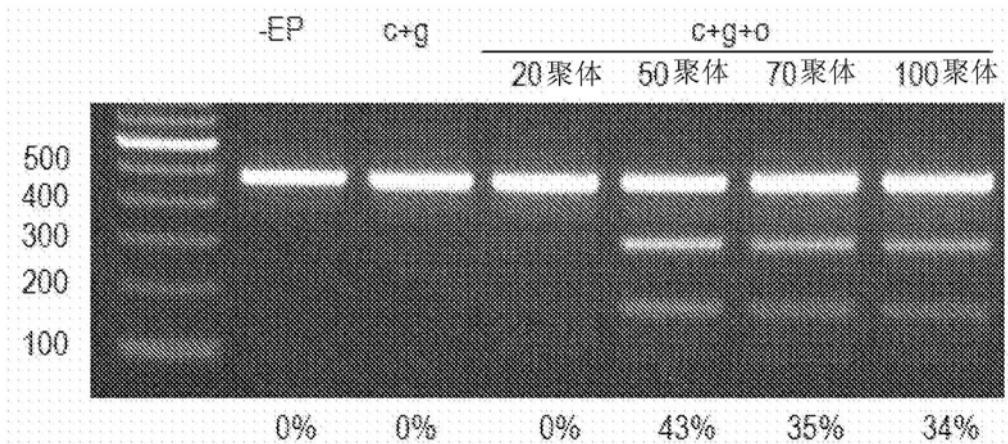


图6

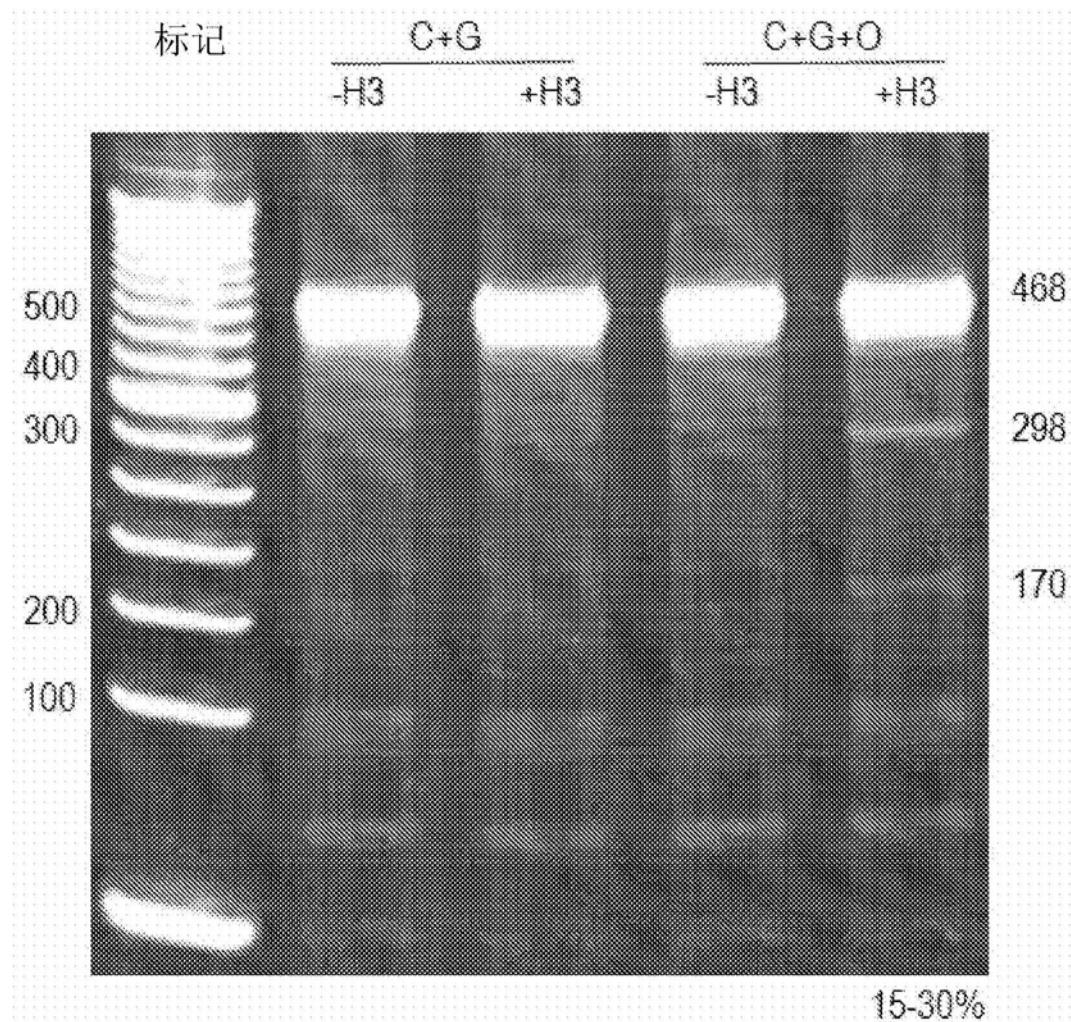


图7

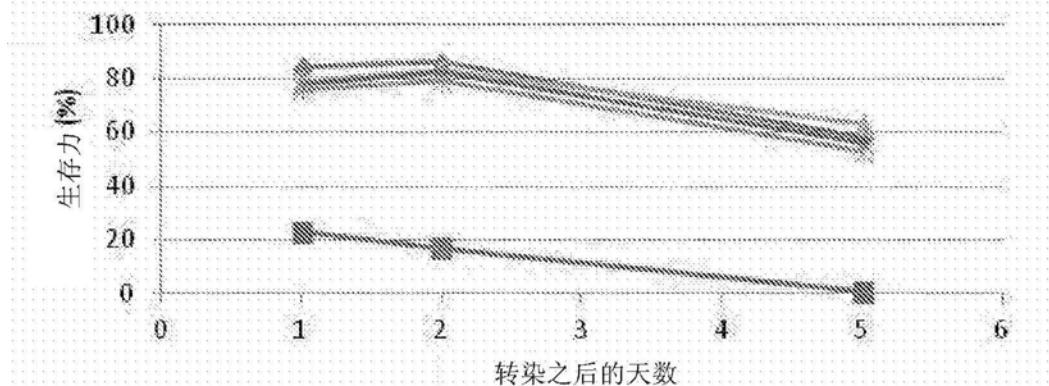


图8A

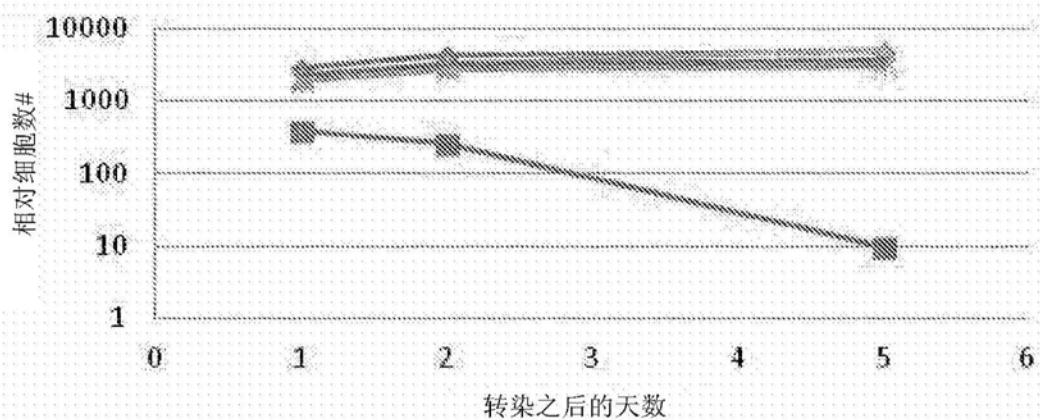


图8B

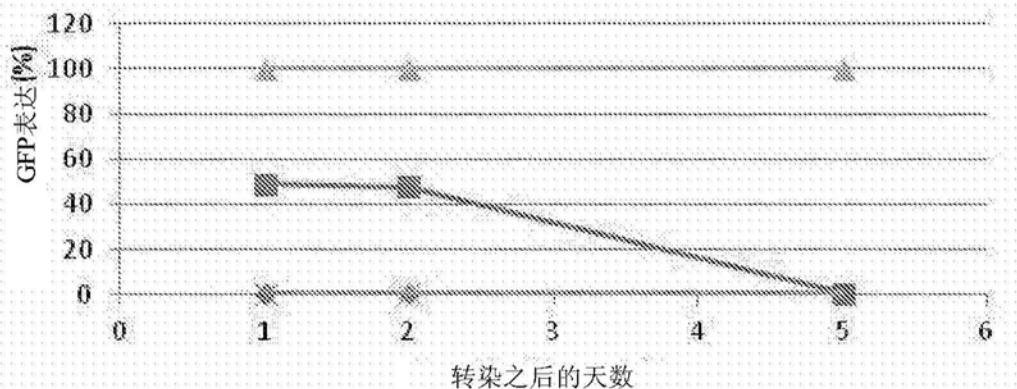


图8C

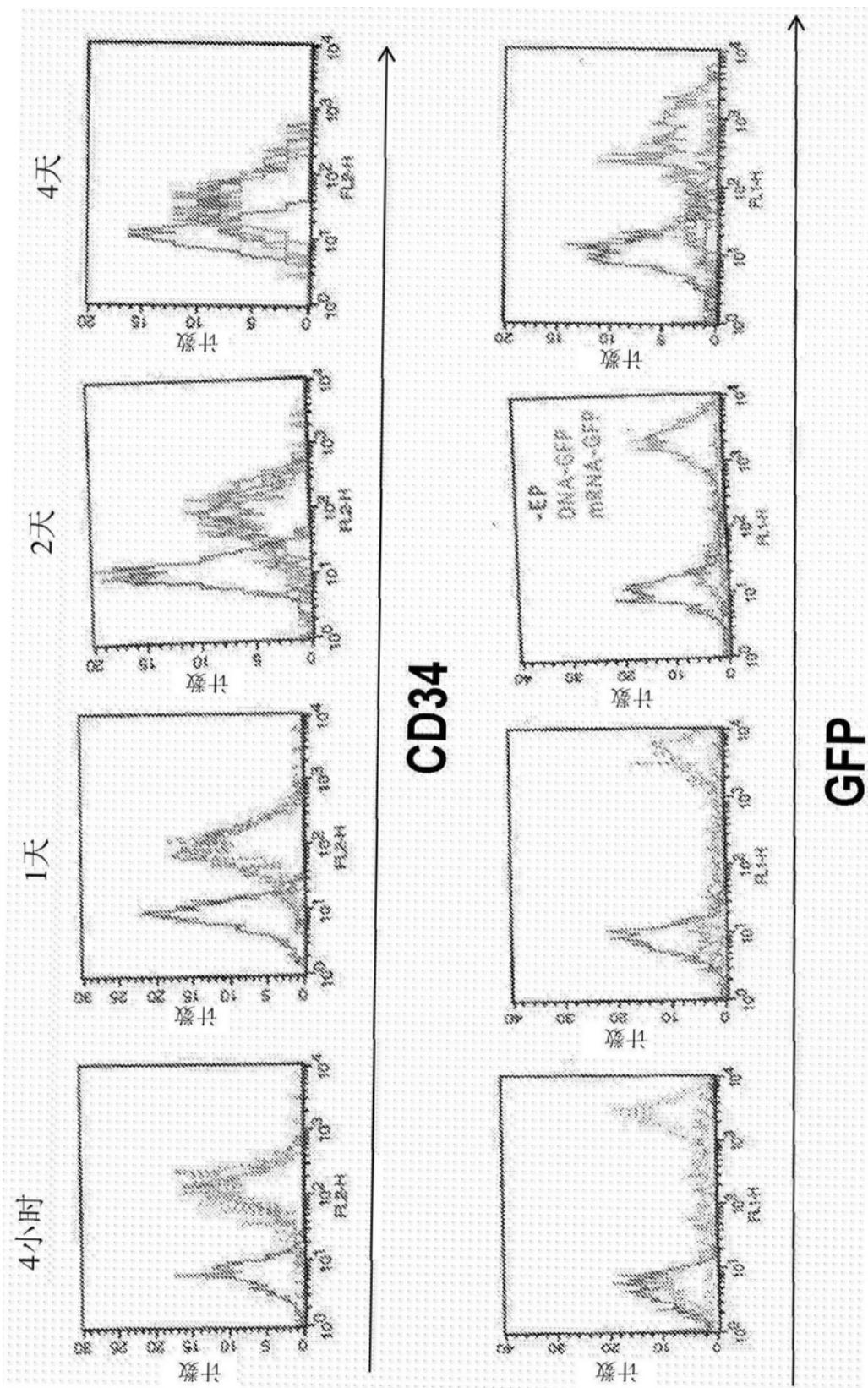


图9

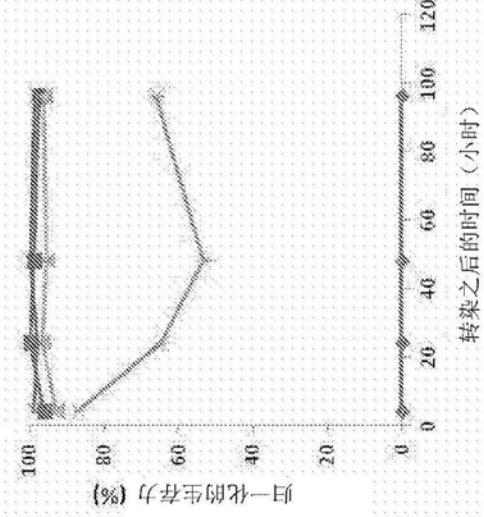


图10A

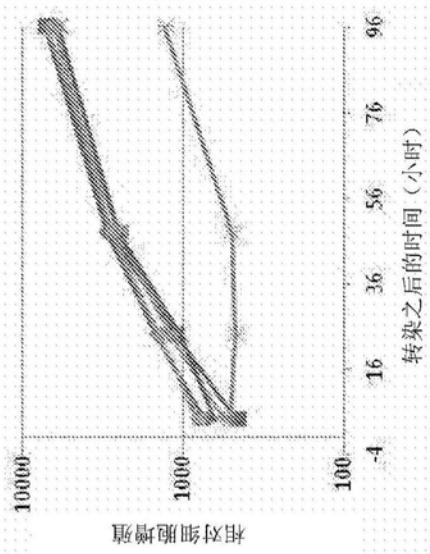


图10B

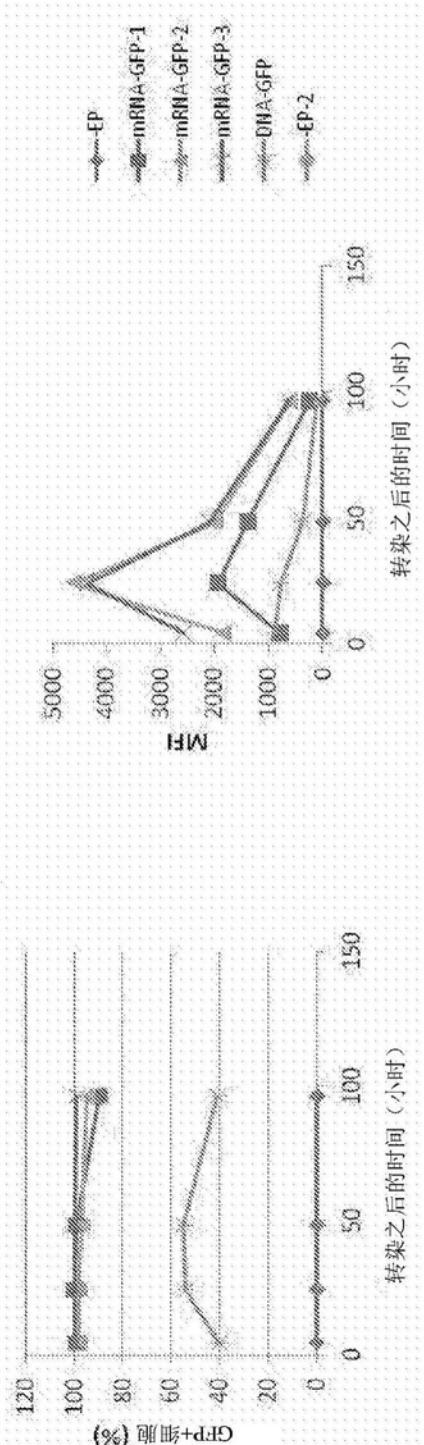


图10C

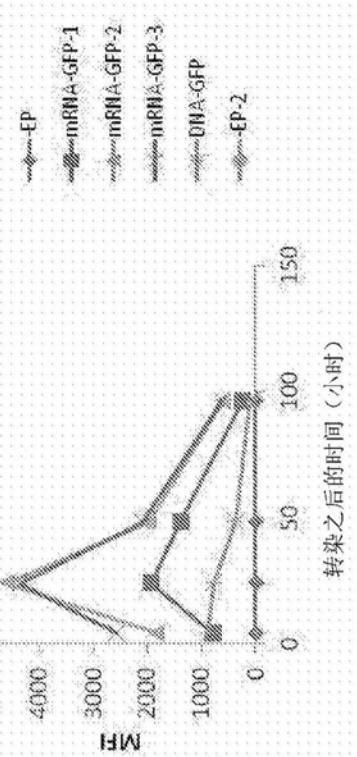


图10D

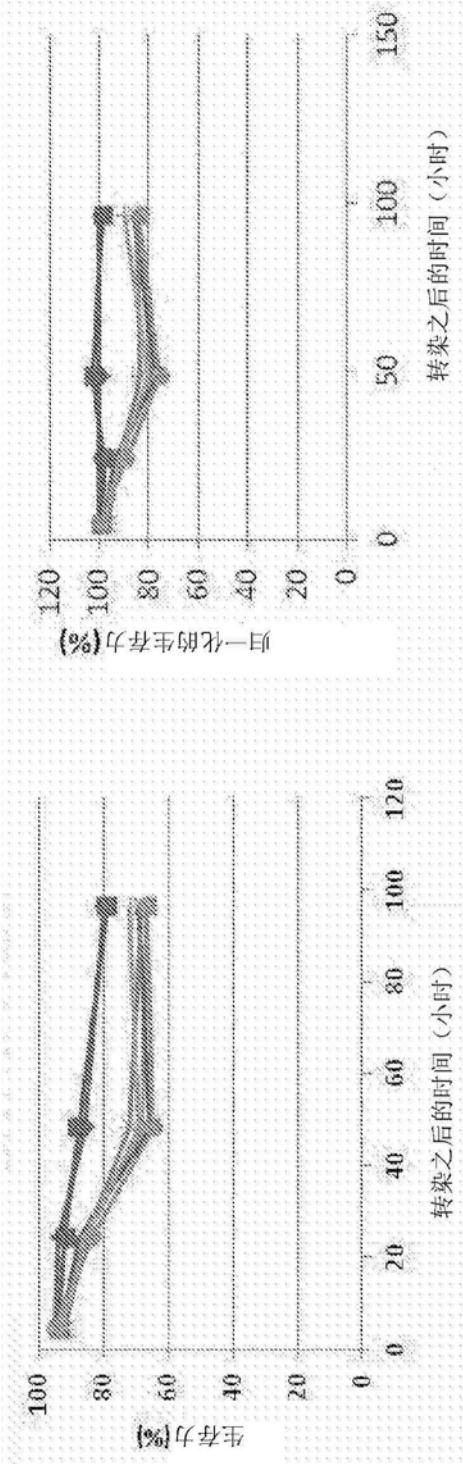


图11A

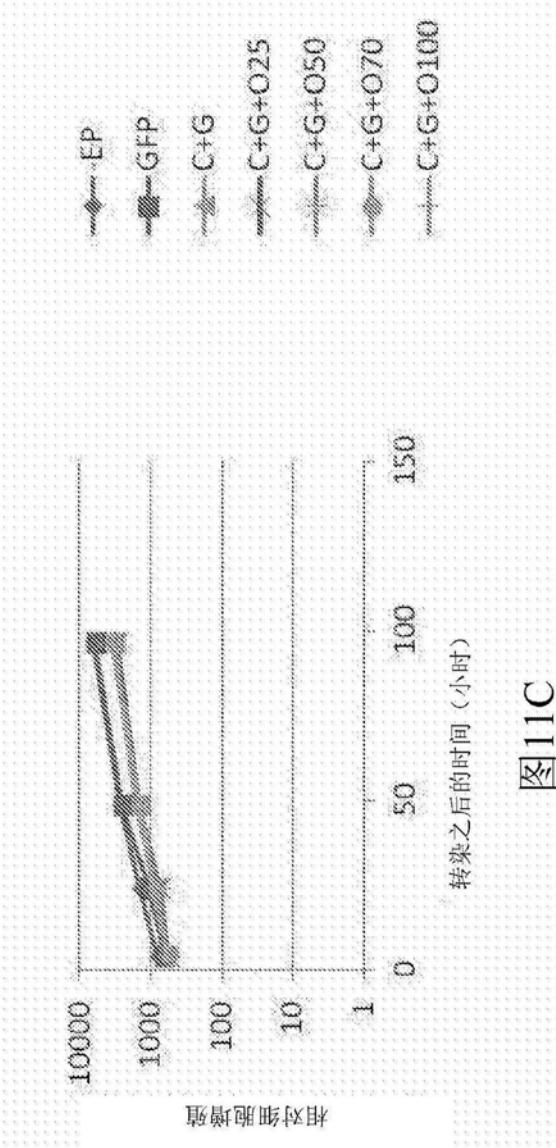
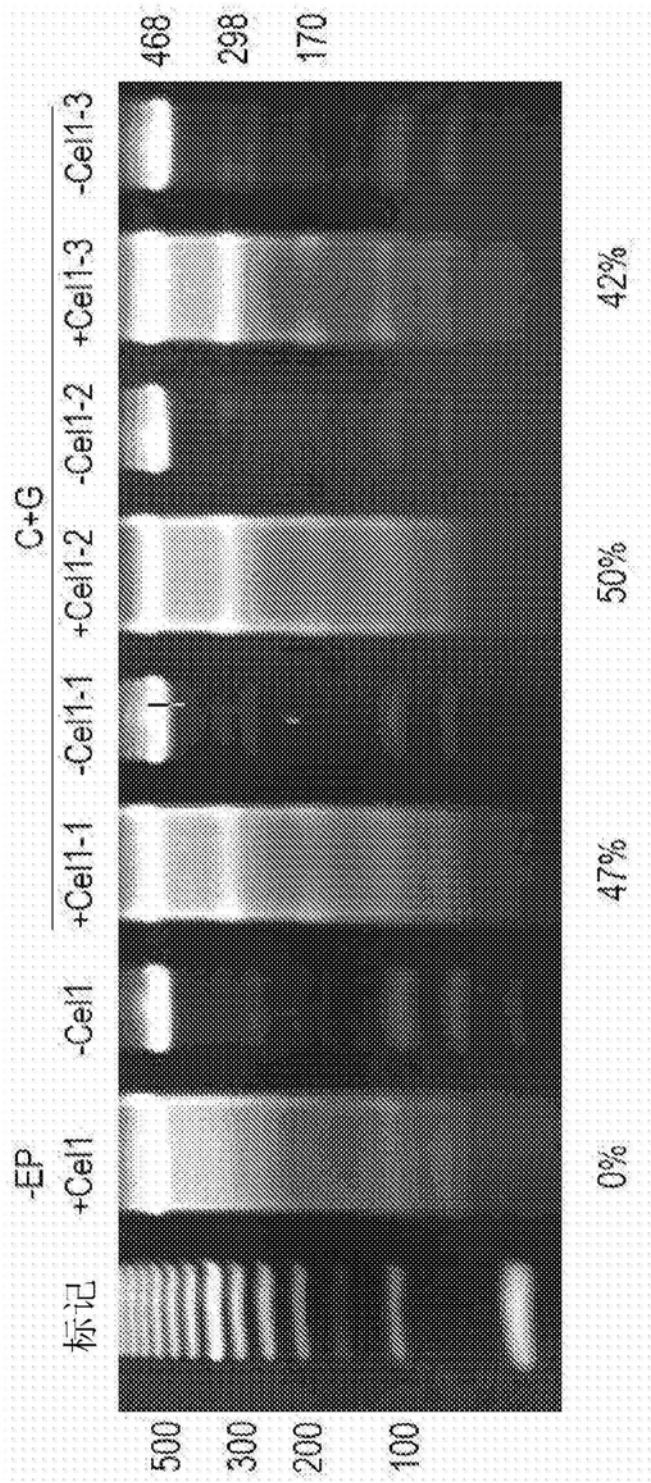


图11B

图11C



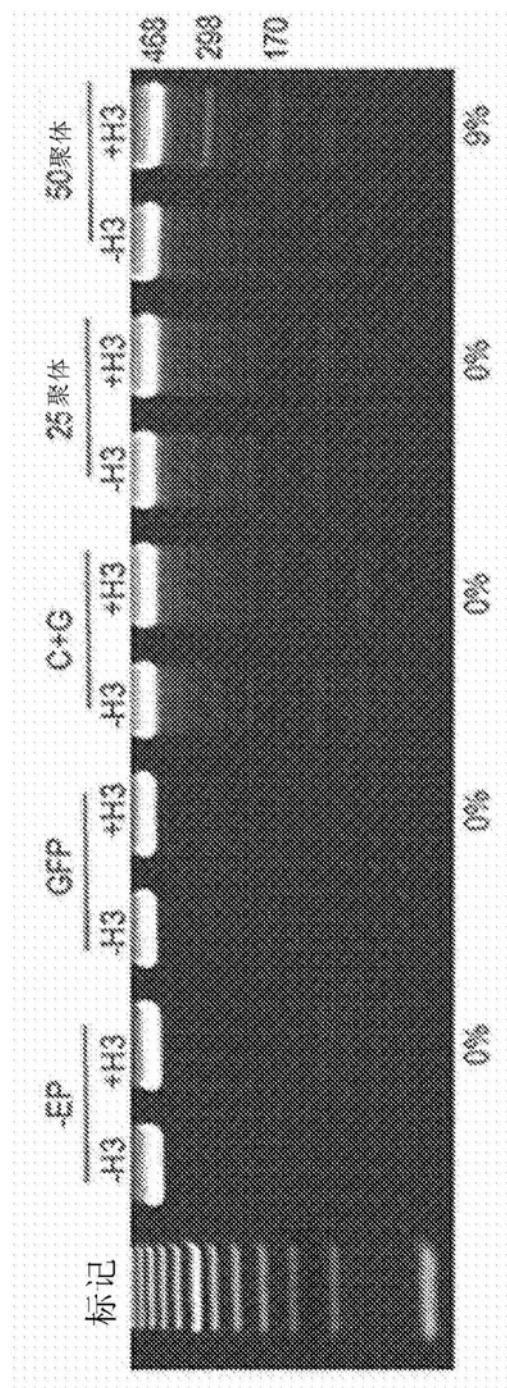


图13A

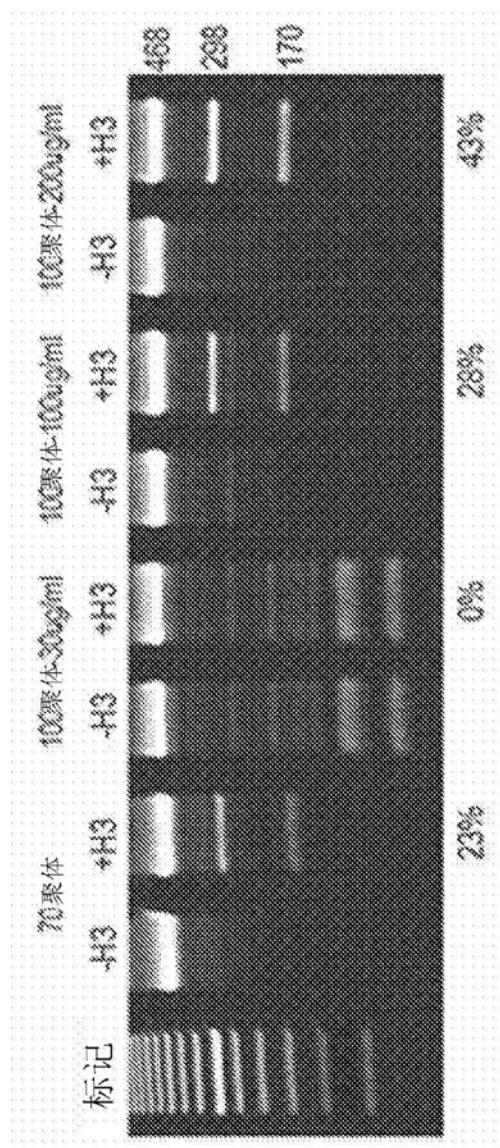


图13B

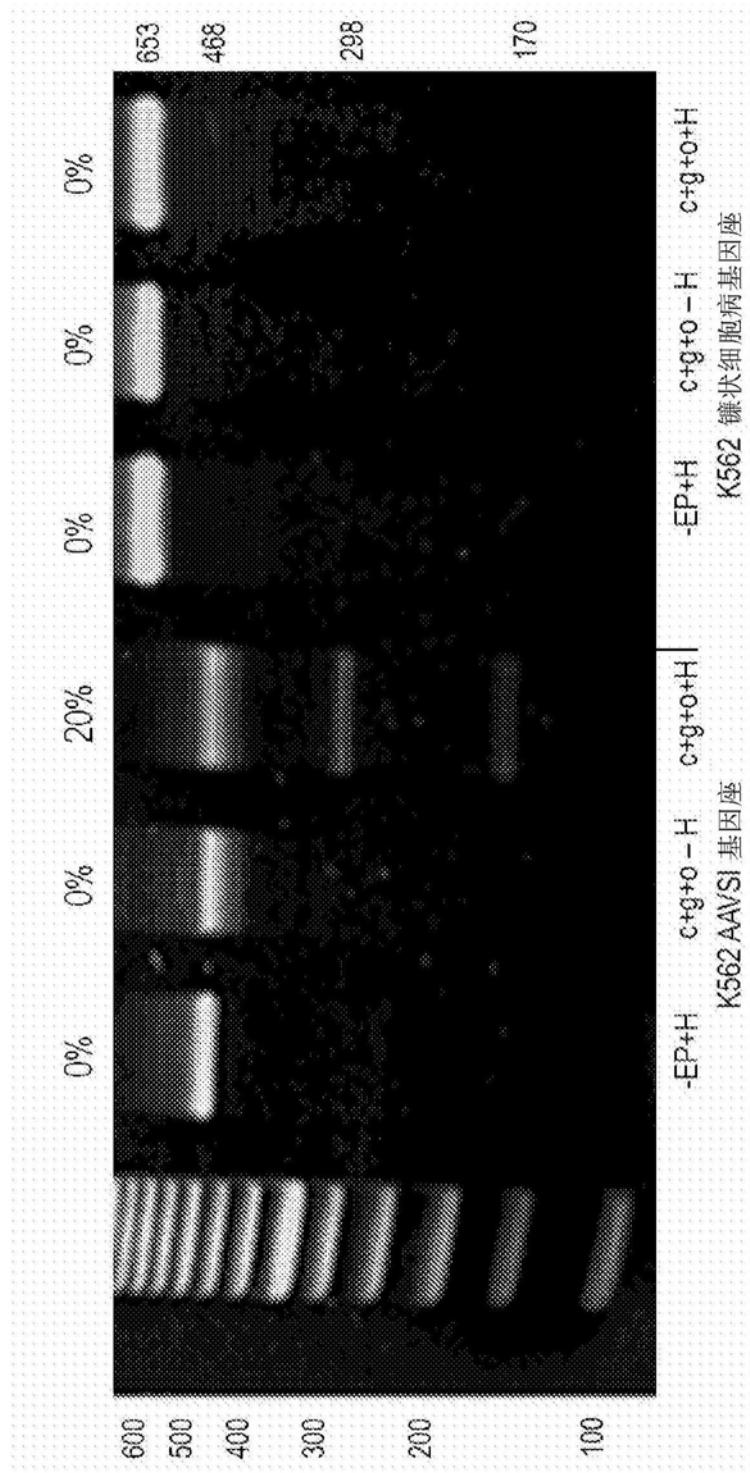


图14

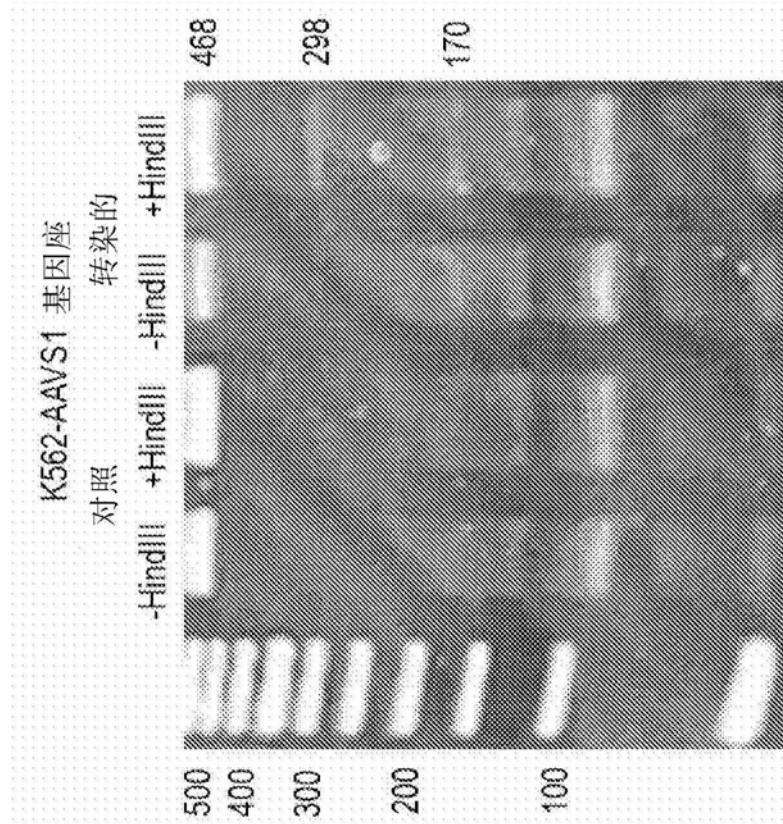


图15A

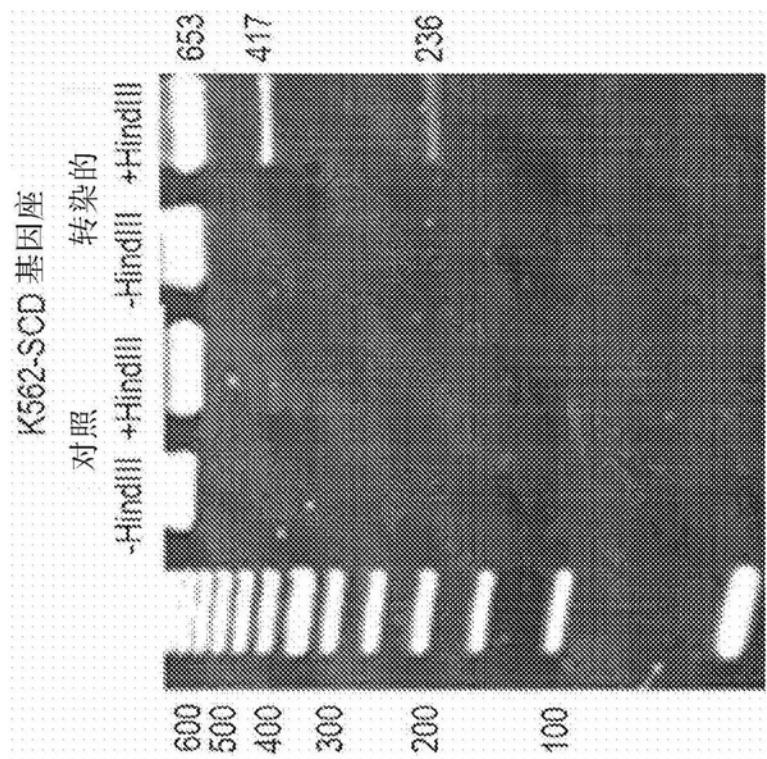


图15B

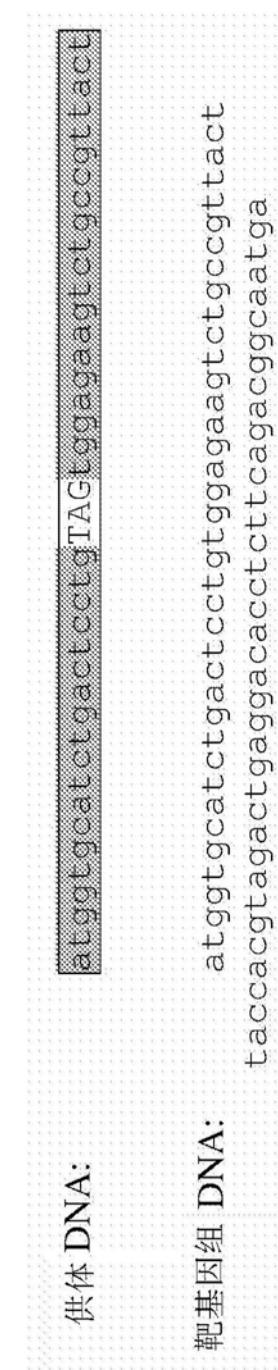


图16A

供体 DNA: atggtagcatatcgactcccttAgggaaatgtggccgttact

靶基因组 DNA: atggtagcatctgactcctgtggagaagtctggccgttact  
taccacgttagactgaggacacctttcagacggcaatga

图16B

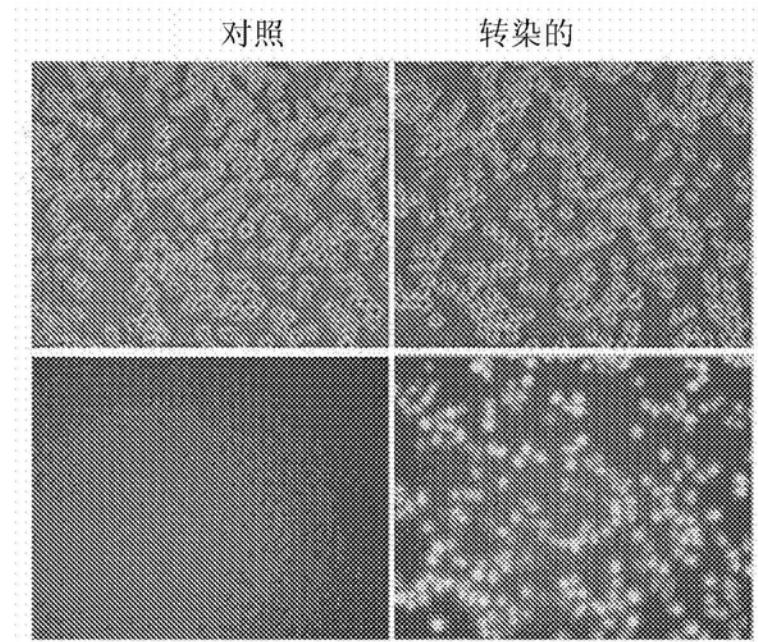


图17

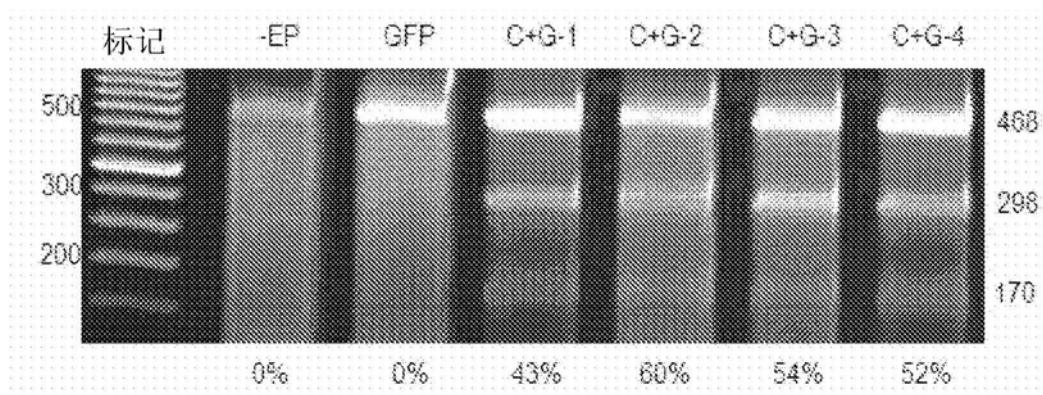


图18

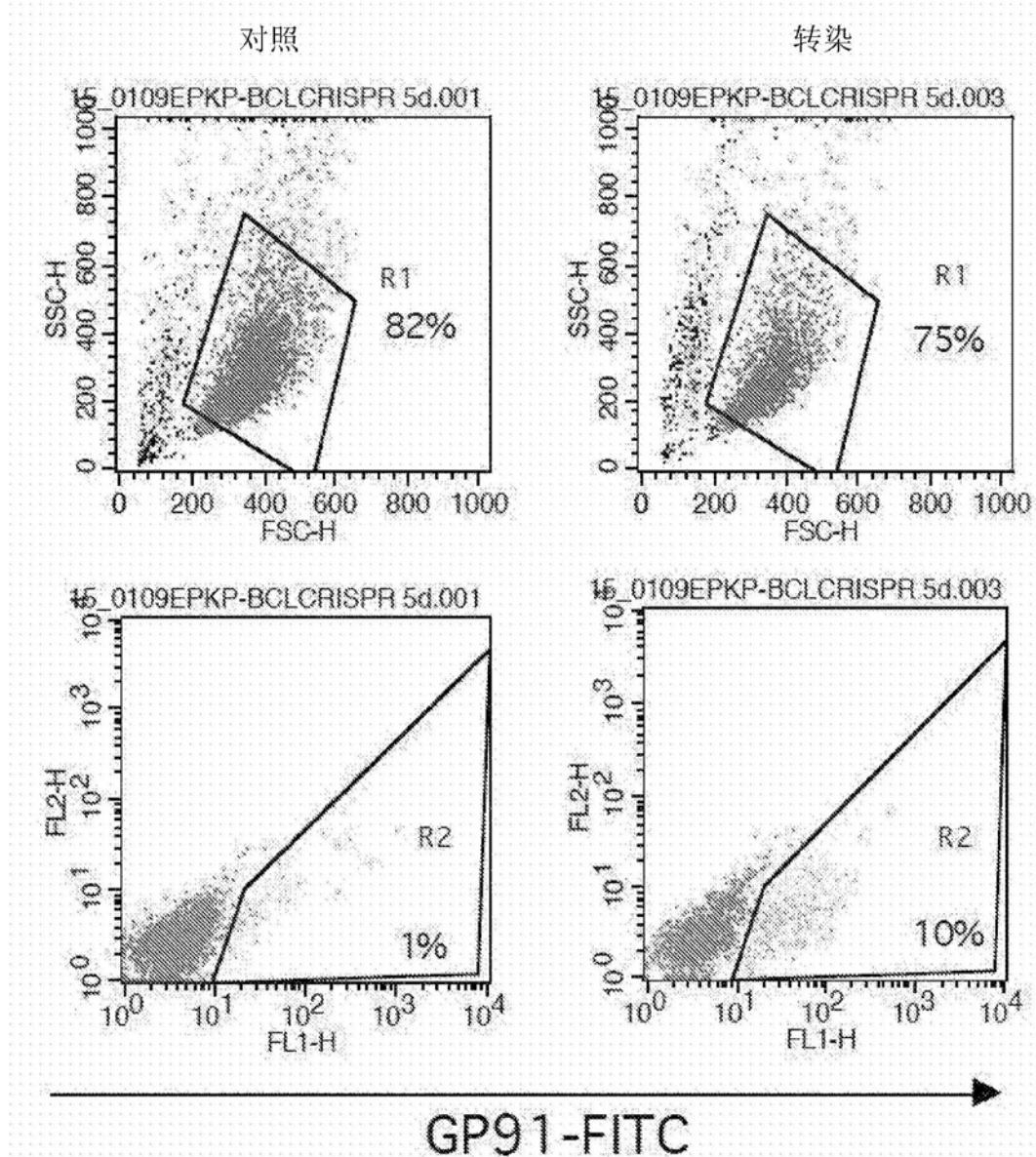


图19

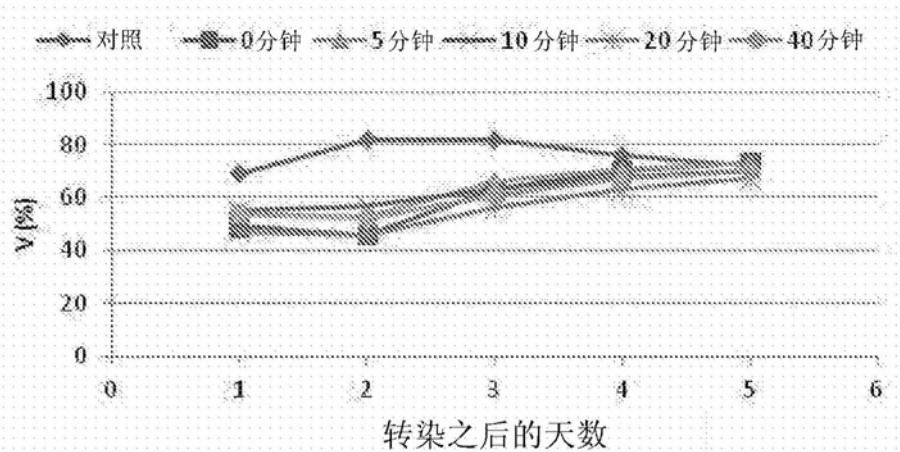


图20A

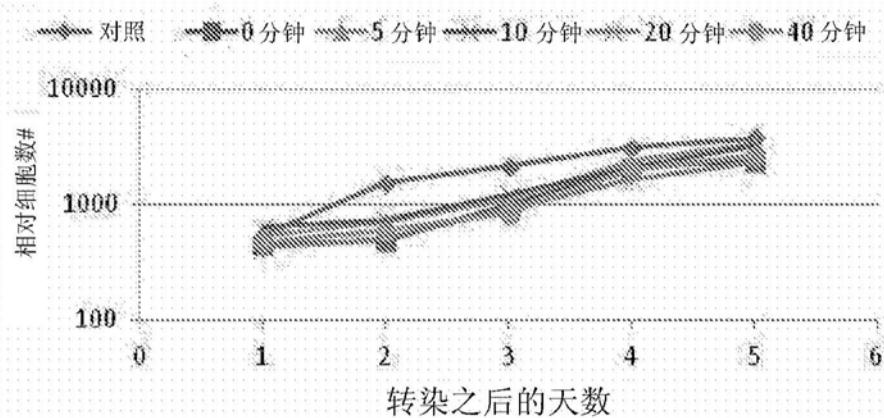


图20B

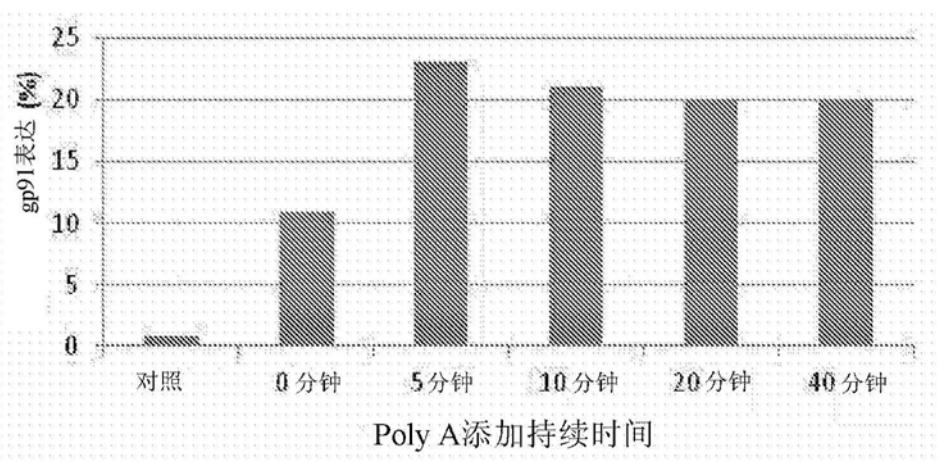


图20C

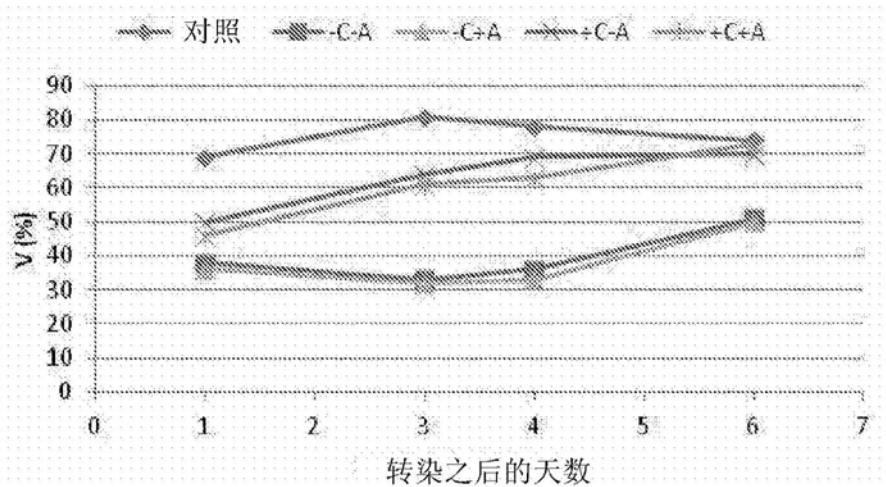


图21A

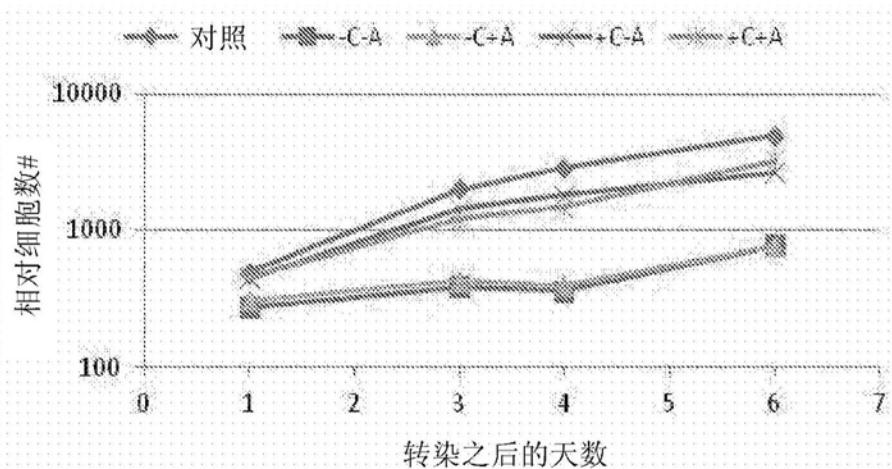


图21B

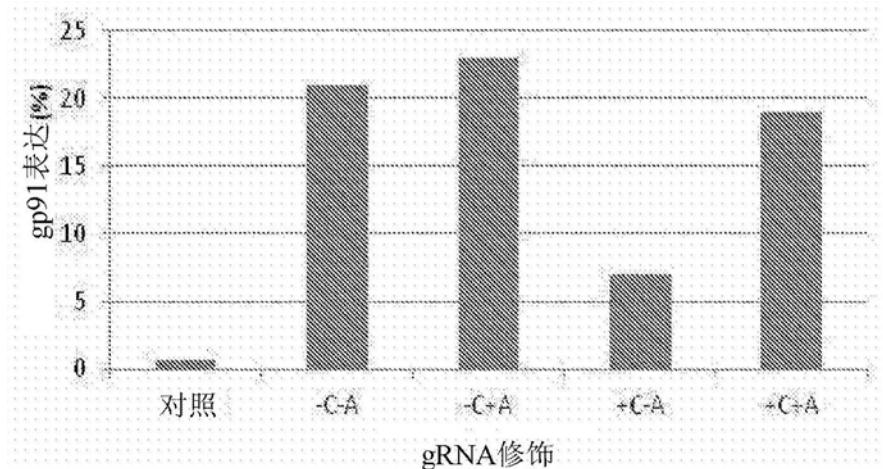


图21C

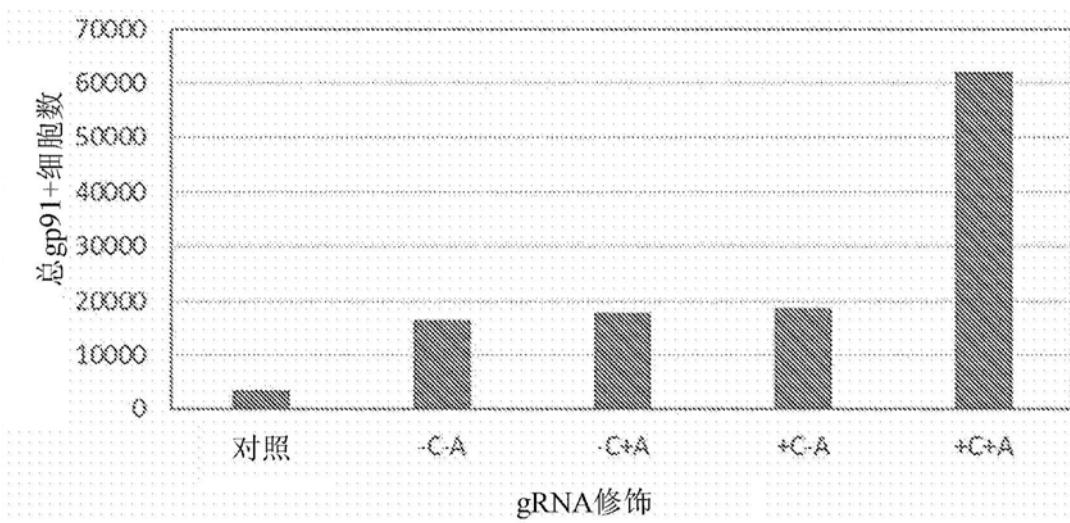


图22

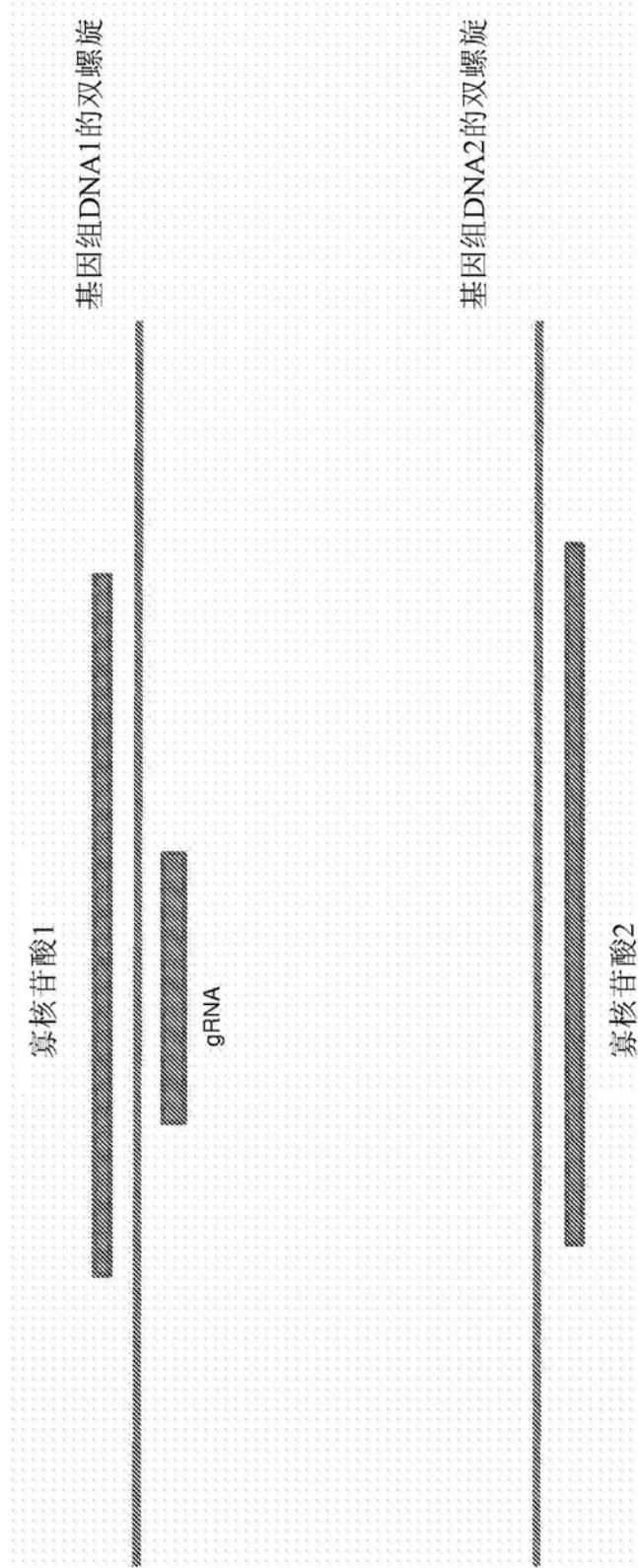


图23

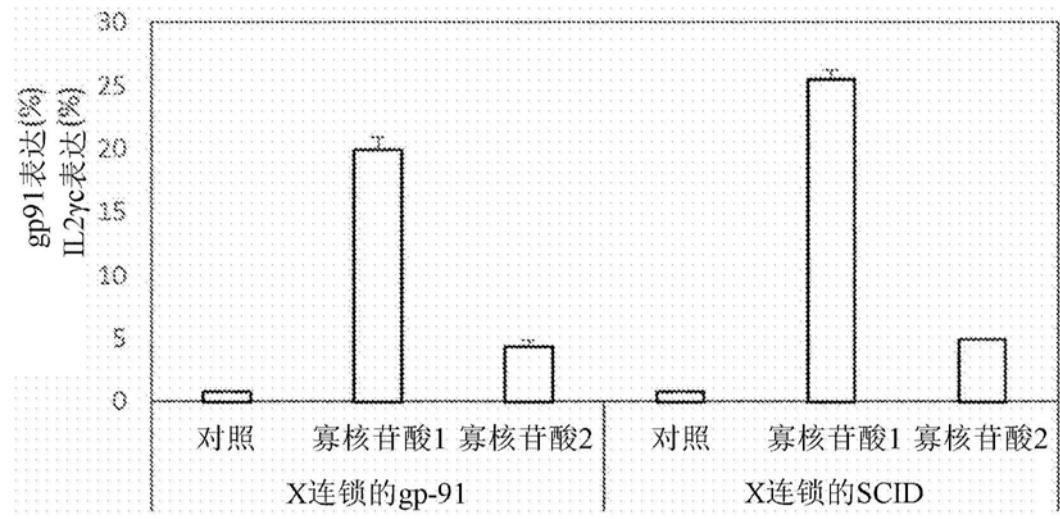


图24

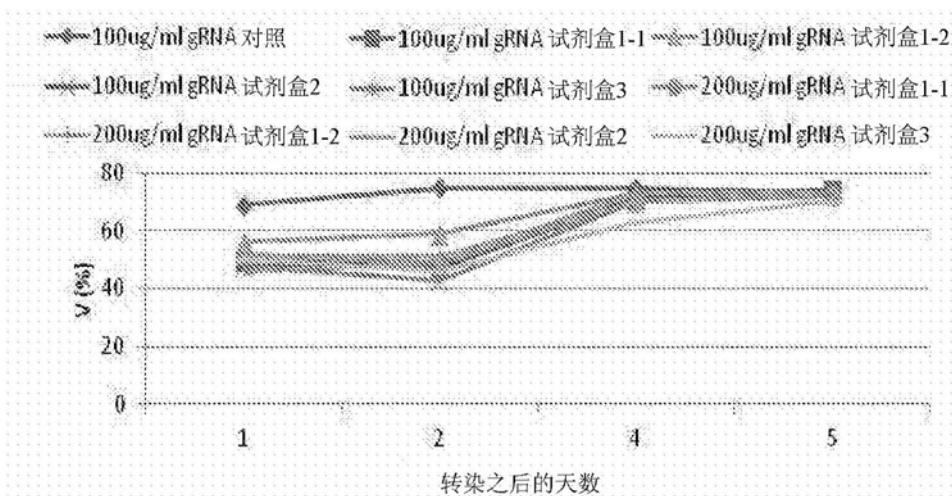


图25A

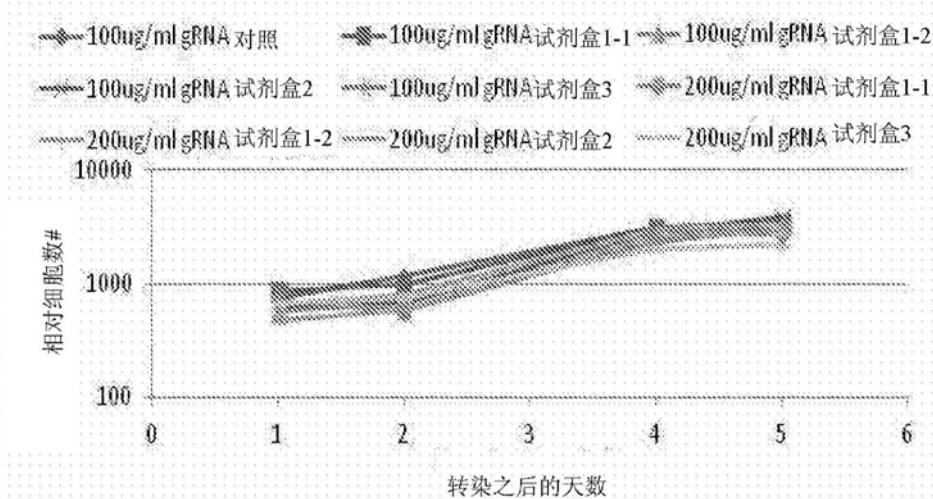


图25B

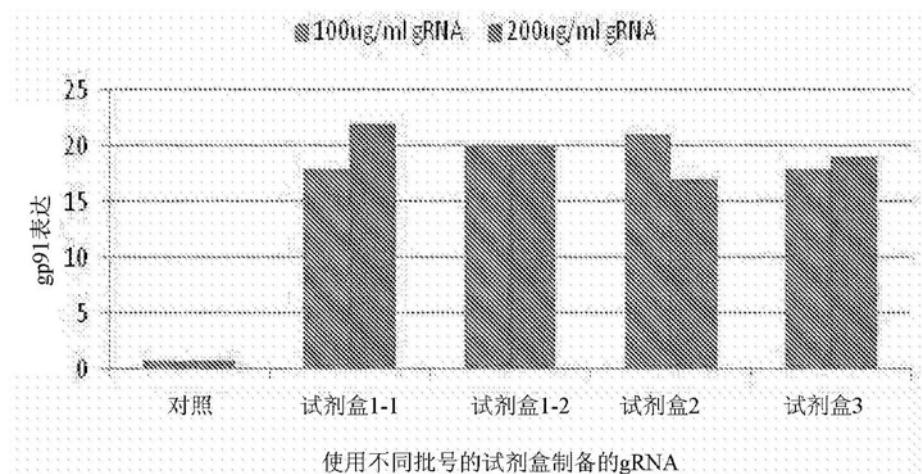


图25C

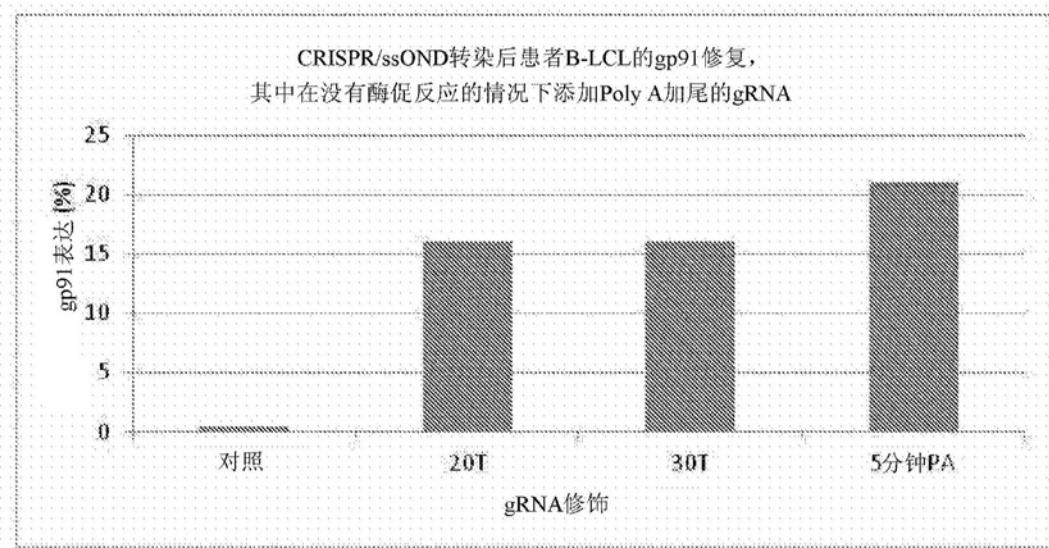


图26