(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113474452 A
(43)申请公布日 2021.10.01

(21)申请号 202080014774.3

(22)申请日 2020.01.16

(30)优先权数据
62/793,210 2019.01.16 US
62/852,573 2019.05.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/013887 2020.01.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/150478 EN 2020.07.23

(71)申请人 纽约市哥伦比亚大学理事会
地址 美国纽约

(72)发明人 S·穆克吉 F·波拉特 A·M·艾力

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
代理人 王珺 李文颖

(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/867(2006.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书82页
序列表48页 附图63页

(54)发明名称

用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法

(57)摘要

本文公开了施用靶向谱系特异性细胞表面抗原例如CD33的剂和缺乏所述谱系特异性细胞表面抗原例如CD33的造血细胞群体以用于血液恶性肿瘤的免疫疗法的方法。还提供了包含CD33中的突变的细胞,以及靶向CD33的gRNA。

CN 113474452 A

1.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向的位点处,所述gRNA包含CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的核苷酸序列,并且其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞相比,CD33的表达水平降低。

2.如权利要求1所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞表达少于20%的所述野生型对应物所表达的CD33。

3.如权利要求2所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不表达CD33。

4.如权利要求1-3中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞是CD34+。

5.如权利要求1-4中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞来自受试者的骨髓细胞或外周血单核细胞。

6.如权利要求5所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

7.如权利要求5所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述受试者是健康人供体。

8.如权利要求1-7中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不包含在任何预测的脱靶位点中,例如在图30中列出的任何位点中的突变。

9.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个权利要求1-8中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

10.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

(i)提供造血干细胞或祖细胞,以及

(ii)将(a)包含与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的核苷酸序列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞表达少于20%的所述野生型对应物所表达的CD33。

12.如权利要求11所述的方法,其中所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不表达CD33。

13.如权利要求10-12中任一项所述的方法,其中(a)和(b)在一个载体上编码,所述载体被引入所述细胞中。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述载体是病毒载体。

15.如权利要求10-12中任一项所述的方法,其中(a)和(b)作为预先形成的核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。

16.如权利要求15所述的方法,其中通过电穿孔将所述核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。

17.如权利要求10-12中任一项所述的方法,其中通过将编码所述Cas9核酸内切酶的mRNA分子递送至所述细胞中来将所述Cas9核酸内切酶引入所述细胞中。

18.如权利要求10-17中任一项所述的方法,其中所述gRNA是单分子向导RNA(sgRNA)。

19.如权利要求18所述的方法,其中所述gRNA是化学修饰的sgRNA。

20.如权利要求10-19中任一项所述的方法,其中所述造血干细胞或祖细胞是CD34+。

21.如权利要求10-20中任一项所述的方法,其中所述造血干细胞或祖细胞来自受试者的骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述受试者患有造血系统病症。

23.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞通过权利要求12-22中任一项所述的方法产生。

24.一种治疗造血系统病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的权利要求1-8和23中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、或权利要求9所述的细胞群体。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述造血系统病症是造血系统恶性肿瘤。

26.如权利要求24或权利要求25所述的方法,所述方法还包括向所述受试者施用有效量的靶向CD33的剂,并且其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

27.如权利要求26所述的方法,其中靶向CD33的所述剂是表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞,所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

28.如权利要求27所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。

29.如权利要求24-28中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞、所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或两者是同种异体的。

30.如权利要求24-29中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞、所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或两者是自体的。

31.如权利要求27-30中任一项所述的方法,其中所述嵌合受体中的所述抗原结合片段是特异性地结合人CD33的单链抗体片段(scFv)。

32.如权利要求24-31中任一项所述的方法,其中所述受试者是患有霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤的人患者。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述受试者是患有白血病的人患者,所述白血病是急性骨髓性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病或慢性成淋巴细胞性白血病。

34.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的间隔区序列。

35.如权利要求34所述的gRNA,其中所述gRNA是单分子gRNA(sgRNA)。

36.如权利要求34或权利要求35所述的gRNA,其中所述gRNA经化学修饰。

37.如权利要求34-36中任一项所述的gRNA,其中所述间隔区序列是SEQ ID NO:70。

38.如权利要求34-37中任一项所述的gRNA,所述gRNA不将基因编辑引导至靶细胞中的任何预测的脱靶位点,例如不将基因编辑引导至靶细胞中的图30中列出的任何位点。

39.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向的位点处,所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)的核苷酸序列。

40.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性的间隔区序列。

用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法

[0001] 本申请要求2019年1月16日提交的美国序列号62/793,210和2019年5月24日提交的美国序列号62/852,573的优先权,其各自的全部内容以引用的方式并入本文。

[0002] 序列表

[0003] 本申请含有已经以电子方式以ASCII格式提交并且特此以引用的方式整体并入的序列表。创建于2020年1月16日的所述ASCII副本被命名为01001-004965-WO1_SL.txt并且大小为83个千字节。

[0004] 发明背景

[0005] 尽管进行了数十年的尝试,但针对癌症的治愈性免疫疗法一直难以实现,其基本基础是通过抗体或通过T细胞(通过T细胞受体)识别抗原的能力(Cousin-Frankel,Science(2013)342:1432)。在与正常细胞相比在肿瘤细胞中靶抗原上调(例如Her-2扩增乳腺癌中的Her-2)的情况下,或在肿瘤细胞表达可被抗体或抗体-毒素缀合物(例如,针对CD20的利妥昔单抗)识别的抗原的情况下,基于抗体的免疫疗法已广泛针对癌症使用(Baselga等人,Annals Oncology(2001)12:S35)。虽然使用基于抗体的免疫疗法的临床试验表明在有限数量的癌症类型中(通常与标准化学疗法结合时)提高了患者存活率,但这些作用往往伴随着重大安全性和有效性问题(Cousin-Frankel Cancer,Science(2013)342:1432)。

[0006] 临床上甚至更难以实现针对癌症的有效T细胞疗法(Schmitt等人,Hum.Gene Ther.(2009)20(11):1240)。针对癌症的有效T细胞疗法依赖于针对癌细胞上的抗原具有高亲和力结合的T细胞。嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)被广泛用于识别细胞上的抗原,具有高亲和力和特异性,并且不需要辅助识别分子,如HLA抗原来“呈递”肽。CAR T细胞的T细胞受体与抗原结合重链和轻链“交换”,从而不需要HLA辅助分子。重组CAR T受体与信号传导结构域融合,从而在CAR T受体与靶抗原结合后活化T细胞。

[0007] CAR T细胞的临床应用仅限于靶向较窄范围的细胞表面抗原,这进一步支持了对癌症治疗的改进和新方法的需求。特别地,诸如急性骨髓性白血病(AML)的疾病需要新的方法,在所述疾病中,不能接受强化化学疗法(目前的护理标准)的老年患者的结果仍然很差,中值存活期仅为5至10个月(Dohner等人,NEJM(2015)373:1136)。

[0008] 本文描述了靶向肿瘤细胞上的某些类别的谱系特异性细胞表面抗原的癌症免疫疗法的新方法。然后将CAR T细胞治疗与通过输注或重新输注缺乏谱系特异性细胞表面抗原的经修饰细胞群体替代非肿瘤细胞相结合。通过使用CAR T细胞在体内维持对患者的监测,预防或减少肿瘤的复发。

发明内容

[0009] 本公开至少部分地基于以下发现:包含结合谱系特异性细胞表面抗原(例如,表达靶向CD33的嵌合受体的免疫细胞)的抗原结合片段的剂选择性地导致表达所述谱系特异性细胞表面抗原的细胞的细胞死亡,而缺乏抗原的细胞(例如,遗传工程化的造血细胞)逃避由此引起的细胞死亡。基于此类发现,预期免疫疗法涉及靶向谱系特异性细胞表面抗原的剂(例如靶向CD33的CAR-T细胞)与缺乏谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33)的造血细胞

的组合将提供治疗造血系统恶性肿瘤的有效方法。

[0010] 在一些方面,本公开提供了一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于本文所述的位点。本公开的一个方面提供了一种遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向的位点处,所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)、GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA(SEQ ID NO:68)或CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的核苷酸序列,并且其中与野生型对应物相比,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞具有降低的CD33表达水平。在一些实施方案中,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞表达少于10%的所述野生型对应物所表达的CD33。在一些实施方案中,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞不表达CD33。在一些实施方案中,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞是$CD34^+$。在一些实施方案中,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞来自受试者(例如,患有造血系统恶性肿瘤的人患者,或健康供体)的骨髓细胞或外周血单核细胞。

[0011] 在一些实施方案中,本公开还提供了一种细胞群体,所述细胞群体包含多个本文所述的遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞。

[0012] 在另一个方面,本公开提供了一种产生遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞的方法,所述方法包括(i)提供造血干细胞和/或祖细胞,和(ii)向所述细胞中引入(a)包含与SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68和/或SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的核苷酸序列的向导RNA(gRNA),和(b)Cas9核酸内切酶,从而产生具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞。在一些实施方案中,所述gRNA和Cas9核酸内切酶在一个载体上编码,所述载体被引入细胞中。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。在一些实施方案中,将所述gRNA和Cas9核酸内切酶作为预先形成的核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。在一些实施方案中,通过电穿孔将核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。

[0013] 在一些方面,本公开还提供了本文所述的gRNA用于使用CRISPR/Cas9系统降低造血细胞干细胞或祖细胞样品中的CD33表达的用途。

[0014] 在一些方面,本公开还提供了CRISPR/Cas9系统用于降低造血细胞干细胞或祖细胞样品中的CD33表达的用途,其中所述CRISPR/Cas9系统的gRNA是本文所述的gRNA。

[0015] 在一些实施方案中,所述gRNA是单分子向导RNA(sgRNA)。在一些实施方案中,所述gRNA是经修饰的sgRNA。在一些实施方案中,所述造血干细胞和/或祖细胞是$CD34^+$。在一些实施方案中,所述造血干细胞和/或祖细胞来自受试者的骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,所述受试者患有造血系统病症。在一些实施方案中,所述受试者是健康HLA匹配的供体。

[0016] 在一些实施方案中,本公开提供了一种通过本文描述的方法产生的遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了一种治疗造血系统病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞或本文所述的细胞群体。在一些实施方案中,所述造血系统病症是造血系统恶性肿瘤。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括向所述受试者施用有效量的靶向CD33的剂,

其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。在一些实施方案中，所述靶向CD33的剂是表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞，所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

[0019] 在一些方面，本公开提供了用于治疗造血系统病症的本文所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或本文所述的细胞群体，其中所述治疗包括向有需要的受试者施用有效量的所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体，并且还包括向所述受试者施用有效量的靶向CD33的剂，其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

[0020] 在一些方面，本公开提供了一种用于治疗造血系统病症的靶向CD33的剂，其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段，其中所述治疗包括向有需要的受试者施用有效量的靶向CD33的剂，并且还包括向所述受试者施用有效量的本文所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或本文所述的细胞群体。

[0021] 本文所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或本文所述的细胞群体与靶向CD33的剂的组合，其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段，所述组合用于治疗造血系统病症，其中所述治疗包括向有需要的患者施用有效量的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或细胞群体以及结合CD33的剂。

[0022] 在一些实施方案中，所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体与靶向CD33的剂同时施用。在一些实施方案中，所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体在靶向CD33的剂之前施用。在一些实施方案中，所述靶向CD33的剂在所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体之前施用。

[0023] 在一些实施方案中，所述免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中，所述免疫细胞、遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞或两者是同种异体的。在一些实施方案中，所述免疫细胞、遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞或两者是自体的。在一些实施方案中，所述嵌合受体中的抗原结合片段是特异性地结合人CD33的单链抗体片段(scFv)。

[0024] 在一些实施方案中，所述受试者是患有霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤的人患者。在一些实施方案中，所述受试者是患有白血病的人患者，所述白血病是急性骨髓性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病或慢性成淋巴细胞性白血病。

[0025] 在另一个方面，本公开提供了一种向导核糖核酸(gRNA)，所述向导核糖核酸包含与SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:70具有至少90％同一性的间隔区序列。在一些实施方案中，所述gRNA是单分子gRNA(sgRNA)。在一些实施方案中，所述gRNA是经修饰的。在具体实例中，所述间隔区序列是SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:70。

[0026] 在以下列举的实施方案中也描述了本文的组合物和方法的特征。

[0027] 1.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞，所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变，其中所述遗传突变位于具有选自以下的序列的位点：

[0028] ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)、

[0029] ATCCCTGGCACTCTAGAACCCGG(SEQ ID NO:49)、

[0030] GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA(SEQ ID NO:51)、

[0031] GGCCGGGTTCTAGAGTGCCAGGG(SEQ ID NO:29)、

[0032] CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)；或

[0033] CCTCACTAGACTTGACCCACAGG(SEQ ID NO:48)。

[0034] 2.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处。

[0035] 3.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞相比,CD33的表达水平降低。

[0036] 4.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致低于20%的野生型对应物细胞中的CD33水平的降低的CD33表达水平。

[0037] 5.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACCCGG(SEQ ID NO:49)的序列的位点处。

[0038] 6.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处。

[0039] 7.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞相比,CD33的表达水平降低。

[0040] 8.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致低于20%的野生型对应物细胞中的CD33水平的降低的CD33表达水平。

[0041] 9.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCACAGG(SEQ ID NO:48)的序列的位点处。

[0042] 10.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向的位点处,所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)或CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的核苷酸序列,并且其中与野生型对应物相比,所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞具有降低的CD33表达水平。

[0043] 11.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向的位点处,所述gRNA包含CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的核苷酸序列。

[0044] 12.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于gRNA所靶向

的位点处,所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)的核苷酸序列。

[0045] 13.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不包含在任何预测的脱靶位点中,例如在图30中列出的任何位点中,例如在SEQ ID NO:99-112中的任一个处的突变。

[0046] 14.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不包含在图29中列出的任何预测的脱靶位点中,例如在SEQ ID NO:79-98中的任一个处的突变。

[0047] 15.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述遗传突变是取代(例如,单核苷酸变体)、插入或缺失,或它们的组合。

[0048] 16.如实施方案15所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述缺失完全在SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:58内。

[0049] 17.如实施方案15或16所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述缺失的长度是1、2、4、5、7、8、10、11、13、14、16或17个核苷酸。

[0050] 18.如实施方案15所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述缺失延伸至SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:58之外。

[0051] 19.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述遗传突变导致移码。

[0052] 20.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞相比,野生型CD33的表达水平降低(例如,低于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%的野生型对应物细胞中的水平)。

[0053] 21.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中与野生型对应物细胞相比,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞具有降低的野生型CD33水平(例如,低于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%的野生型对应物细胞中的水平)。

[0054] 22.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞相比,CD33的表达水平降低(例如,低于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%的野生型对应物细胞中的水平)。

[0055] 23.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中与野生型对应物细胞相比,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞具有降低的CD33水平(例如,低于50%、40%、30%、20%、15%、10%或5%的野生型对应物细胞中的水平)。

[0056] 24.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述遗传突变导致CD33表达的缺乏。

[0057] 25.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞表达少于20%的野生型对应物所表达的CD33。

[0058] 26.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述降低的CD33表达水平是在从所述造血干细胞或祖细胞分化(例如,终末分化)的细胞中,并且所述野生型对应物细胞是从野生型造血干细胞或祖细胞分化(例如,终末分化)的细胞。

[0059] 27.如实施方案26所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中从所述造血干细胞或祖细胞分化的细胞是成髓细胞、成单核细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤细胞。

[0060] 28.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞不表达CD33。

[0061] 29.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞是CD34+。

[0062] 30.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞来自受试者的骨髓细胞或外周血单核细胞。

[0063] 31.如实施方案30所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

[0064] 32.如实施方案30所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,其中所述受试者是健康人供体(例如,HLA匹配的供体)。

[0065] 33.如前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞通过包括使内源性CD33基因与选自CRISPR核酸内切酶、锌指核酸酶(ZFN)、基于转录活化因子样效应物的核酸酶(TALEN)或大范围核酸酶接触(例如,通过使所述细胞与核酸酶或编码所述核酸酶的核酸接触)的方法来制备。

[0066] 34.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个前述实施方案中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞(例如,包含造血干细胞、造血祖细胞或它们的组合)。

[0067] 35.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处。

[0068] 36.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞群体相比,CD33的表达水平降低。

[0069] 37.一种细胞群体,所述细胞群体包含遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致低于20%的野生型对应物细胞群体中的CD33水平的降低的CD33表达水平。

[0070] 38.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处。

[0071] 39.一种细胞群体,所述细胞群体包含多个遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致与野生型对应物细胞群体相比,CD33的表达水平降低。

[0072] 40.一种细胞群体,所述细胞群体包含遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞包含在内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处,其中所述遗传突变导致低于20%的野生型对应物细胞群体中的CD33水平的降低的CD33表达水平。

[0073] 41.如实施方案34-40中任一项所述的细胞群体,所述细胞群体还包含一个或多个

包含一种或多种非工程化的CD33基因的细胞。

[0074] 42.如实施方案34-41所述的细胞群体,所述细胞群体还包含一个或多个对于CD33为纯合野生型的细胞。

[0075] 43.如实施方案34-42中任一项所述的细胞群体,所述细胞群体还包含一个或多个对于CD33为杂合野生型的细胞。

[0076] 44.如实施方案34-43中任一项所述的细胞群体,其中所述群体中至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%的细胞包含在CD33的两个拷贝中的遗传突变。

[0077] 45.如实施方案34-44中任一项所述的细胞群体,所述细胞群体表达少于20%的野生型对应物细胞群体所表达的CD33。

[0078] 46.如实施方案34-45中任一项所述的细胞群体,其中所述降低的CD33表达水平是在从所述造血干细胞或祖细胞分化(例如,终末分化)的细胞中,并且所述野生型对应物细胞是从野生型造血干细胞或祖细胞分化(例如,终末分化)的细胞。

[0079] 47.如实施方案46所述的细胞群体,其中从所述造血干细胞或祖细胞分化的细胞是成髓细胞、成单核细胞、单核细胞、巨噬细胞或自然杀伤细胞。

[0080] 48.如实施方案34-47中任一项所述的细胞群体,所述细胞群体包含造血干细胞和造血祖细胞。

[0081] 49.一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0082] 50.一种药物组合物,所述药物组合物包含实施方案34-48中任一项所述的细胞群体。

[0083] 51.一种制备实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或实施方案34-48中任一项所述的细胞群体的方法,所述方法包括:

[0084] (i)提供造血干细胞或祖细胞(例如,野生型造血干细胞或祖细胞),和

[0085] (ii)将裂解所述位点的核酸酶(例如,核酸内切酶)引入所述细胞中,

[0086] 从而产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0087] 52.如实施方案51所述的方法,其中(ii)包括将结合所述位点的gRNA和结合所述gRNA的核酸内切酶引入所述细胞中。

[0088] 53.如实施方案51所述的方法,其中所述核酸内切酶是ZFN、TALEN或大范围核酸酶。

[0089] 54.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含以下中的任一者的序列:

[0090] AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)、

[0091] GGCCGGGUUCUAGAGUGCCA(SEQ ID NO:68)或

[0092] CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70),

[0093] 或其反向互补序列,或与前述中的任一者具有至少90%或95%同一性的序列,或相对于前述中的任一者具有不超过1、2或3个突变的序列。

[0094] 55.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的间隔区序列。

[0095] 56.如实施方案55所述的gRNA,其中所述间隔区序列包含SEQ ID NO:70。

[0096] 57.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含与SEQ ID NO:67具有至少

90%同一性的间隔区序列。

[0097] 58.如实施方案57所述的gRNA,其中所述间隔区序列包含SEQ ID NO:67。

[0098] 59.一种向导核糖核酸(gRNA),所述向导核糖核酸包含来自以下中的任一者的序列的至少18个(例如,19、20、21或22)个连续核苷酸:

[0099] CCUCAUCCCUGGCACUCUAGAACCCGGC(SEQ ID NO:71)、GAGUGGCCGGGUUCUAGAGUGCCAGGGA(SEQ ID NO:72)或

[0100] UUCUCCUCACUAGACUUGACCCACAGGC(SEQ ID NO:73),

[0101] 或其反向互补序列,或与前述中的任一者具有至少90%或95%同一性的序列,或相对于前述中的任一者具有不超过1、2或3个突变的序列。

[0102] 60.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置1。

[0103] 61.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置2。

[0104] 62.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置3。

[0105] 63.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置4。

[0106] 64.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置5。

[0107] 65.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置6。

[0108] 66.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20、21或22个连续核苷酸开始于所述序列的位置7。

[0109] 67.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19、20或21个连续核苷酸开始于所述序列的位置8。

[0110] 68.如实施方案59所述的gRNA,其中所述至少18、19或20个连续核苷酸开始于所述序列的位置9。

[0111] 69.如实施方案54或59-68中任一项所述的gRNA,其中所述2个突变彼此不相邻。

[0112] 70.如实施方案54或59-68中任一项所述的gRNA,其中所述3个突变彼此都不相邻。

[0113] 71.如实施方案54或59-70中任一项所述的gRNA,其中所述1、2或3个突变是取代。

[0114] 72.如实施方案54或59-70中任一项所述的gRNA,其中所述突变中的一个或多个是插入或缺失。

[0115] 73.如实施方案54-72中任一项所述的gRNA,其中所述间隔序列的长度是约18-23,例如20个核苷酸。

[0116] 74.如实施方案54-73中任一项所述的gRNA,其中所述间隔区序列具有45%-65%或50%-60%,例如55%的GC含量。

[0117] 75.如实施方案54-74中任一项所述的gRNA,所述gRNA包含一种或多种化学修饰(例如,对核碱基、糖或主链部分的化学修饰)。

[0118] 76.如实施方案54-75中任一项所述的gRNA,所述gRNA包含一个或多个2'O-甲基核

苷酸，例如，在本文所述的位置处。

[0119] 77.如实施方案54-76中任一项所述的gRNA，所述gRNA包含一个或多个硫代磷酸酯或硫代PACE键联，例如，在本文所述的位置处。

[0120] 78.如实施方案54-77中任一项所述的gRNA，所述gRNA是单分子gRNA(sgRNA)。

[0121] 79.如实施方案54-78中任一项所述的gRNA，所述gRNA结合Cas9。

[0122] 80.如实施方案54-79中任一项所述的gRNA，所述gRNA结合至tracrRNA。

[0123] 81.如实施方案54-79中任一项所述的gRNA，所述gRNA包含支架序列。

[0124] 82.一种药盒或组合物，所述药盒或组合物包含：

[0125] a)实施方案54-81中任一项所述的gRNA，或编码所述gRNA的核酸，以及

[0126] b)第二gRNA，或编码所述第二gRNA的核酸。

[0127] 83.如实施方案82所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的间隔区序列。

[0128] 84.如实施方案82所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)的间隔区序列。

[0129] 85.如实施方案82-84中任一项所述的药盒或组合物，其中所述第二gRNA靶向谱系特异性细胞表面抗原。

[0130] 86.如实施方案82-85中任一项所述的药盒或组合物，其中所述第二gRNA靶向除CD33以外的谱系特异性细胞表面抗原。

[0131] 87.如实施方案82-86中任一项所述的药盒或组合物，其中所述第二gRNA靶向CLL-1。

[0132] 88.如实施方案82-87中任一项所述的药盒或组合物，其中所述第二gRNA包含GUUGUAGAGAAAUAUUUCUC(SEQ ID NO:115)、GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU(SEQ ID NO:116)或UGAAUAUCUCCAACAAGAUC(SEQ ID NO:119)的间隔区序列。

[0133] 89.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:115的间隔区序列。

[0134] 90.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0135] 91.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:115的间隔区序列。

[0136] 92.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0137] 93.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列。

[0138] 94.如实施方案82-88中任一项所述的药盒或组合物，其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:115的间隔区序列，并且所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0139] 95.如实施方案82-94中任一项所述的药盒或组合物，所述药盒或组合物还包含第三gRNA或编码所述第三gRNA的核酸。

[0140] 96.如实施方案95所述的药盒或组合物，其中所述第三gRNA靶向谱系特异性细胞

表面抗原。

[0141] 97.如实施方案95所述的药盒或组合物,其中所述第三gRNA靶向CD33或CLL-1。

[0142] 98.如实施方案95-97中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列,所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:115的间隔区序列,并且所述第三gRNA包含SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0143] 99.如实施方案95-97中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列,所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:115的间隔区序列,并且所述第三gRNA包含SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0144] 100.如实施方案95-97中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列,所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列,并且所述第三gRNA包含SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0145] 101.如实施方案95-97中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列,所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列,并且所述第三gRNA包含SEQ ID NO:115的间隔区序列。

[0146] 102.如实施方案95-101中任一项所述的药盒或组合物,所述药盒或组合物还包含第四gRNA或编码所述第四gRNA的核酸。

[0147] 103.如实施方案102所述的药盒或组合物,其中所述第四gRNA靶向谱系特异性细胞表面抗原。

[0148] 104.如实施方案102所述的药盒或组合物,其中所述第四gRNA靶向CD33或CLL-1。

[0149] 105.如实施方案102所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA包含根据SEQ ID NO:67的间隔区序列,所述第二gRNA包含根据SEQ ID NO:70的间隔区序列,所述第三gRNA包含SEQ ID NO:115的间隔区序列,并且所述第四gRNA包含SEQ ID NO:116的间隔区序列。

[0150] 106.如实施方案102-105中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA、所述第二gRNA、所述第三gRNA和所述第四gRNA掺混。

[0151] 107.如实施方案102-105中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的所述gRNA、所述第二gRNA、所述第三gRNA和所述第四gRNA在分开的容器中。

[0152] 108.如实施方案82-105中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)和(b)掺混。

[0153] 109.如实施方案82-105中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)和(b)在分开的容器中。

[0154] 110.如实施方案82-109中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的核酸和(b)的核酸是同一核酸的一部分。

[0155] 111.如实施方案82-109中任一项所述的药盒或组合物,其中(a)的核酸和(b)的核酸是单独的核酸。

[0156] 112.一种遗传工程化的造血细胞(例如,造血干细胞或祖细胞),所述遗传工程化的造血细胞包含以下中的一者或多者(例如,2、3或全部):

[0157] (a)内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)的序列的位点处;

[0158] (b)内源性CD33基因的外显子3中的遗传突变,其中所述遗传突变位于具有CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处;

[0159] (c)位于具有GTTGTAGAGAAATATTTCTC(SEQ ID NO:117)的序列的位点处的CLL-1中的遗传突变;

[0160] (d)位于具有GGAGAGGTTCCTGATCTTGT(SEQ ID NO:118)的序列的位点处的CLL-1中的遗传突变。

[0161] 113.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)和(b)。

[0162] 114.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)和(c)。

[0163] 115.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)和(d)。

[0164] 116.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(b)和(c)。

[0165] 117.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(b)和(d)。

[0166] 118.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(c)和(d)。

[0167] 119.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)、(b)和(c)。

[0168] 120.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)、(b)和(d)。

[0169] 121.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)、(c)和(d)。

[0170] 122.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(b)、(c)和(d)。

[0171] 123.如实施方案112所述的造血细胞,所述造血细胞包含(a)、(b)、(c)和(d)。

[0172] 124.如实施方案112-123中任一项所述的造血细胞,所述造血细胞包含从SEQ ID NO:50内的位置跨越至SEQ ID NO:58内的位置的缺失。

[0173] 125.如实施方案112-124中任一项所述的造血细胞,所述造血细胞包含从SEQ ID NO:117内的位置跨越至SEQ ID NO:118内的位置的缺失。

[0174] 126.实施方案54-81中任一项所述的gRNA或实施方案82-111中任一项所述的组合物或药盒用于使用CRISPR/Cas9系统降低造血细胞干细胞或祖细胞样品中的CD33表达的用途。

[0175] 127.CRISPR/Cas9系统用于降低造血细胞干细胞或祖细胞样品中的CD33表达的用途,其中所述CRISPR/Cas9系统的gRNA是实施方案54-81中任一项所述的gRNA或实施方案82-111中任一项所述的组合物或药盒的gRNA。

[0176] 128.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0177] (i)提供造血干细胞或祖细胞(例如,野生型造血干细胞或祖细胞),以及

[0178] (ii)将(a)实施方案22-39中任一项所述的向导RNA(gRNA)或实施方案82-111中任一项所述的组合物或药盒的gRNA;以及(b)结合所述gRNA的核酸酶(例如,核酸内切酶)(例如,Cas9核酸内切酶)引入所述细胞中,

[0179] 从而产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0180] 129.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0181] (i)提供遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞,以及

[0182] (ii)将(a)包含与SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的核苷酸序列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞。

[0183] 130.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0184] (i)提供造血干细胞或祖细胞,以及

[0185] (ii)将(a)包含与SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的核苷酸序

列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0186] 131.一种产生具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0187] (i)提供造血干细胞或祖细胞,以及

[0188] (ii)将(a)包含与SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:70具有至少90%同一性的核苷酸序列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0189] 132.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0190] (i)提供造血干细胞或祖细胞,以及

[0191] (ii)将(a)包含根据SEQ ID NO:67的核苷酸序列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0192] 133.一种产生遗传工程化的造血干细胞或祖细胞的方法,所述方法包括:

[0193] (i)提供造血干细胞或祖细胞,以及

[0194] (ii)将(a)包含根据SEQ ID NO:70的核苷酸序列的向导RNA(gRNA);以及(b)Cas9核酸内切酶引入所述细胞中,从而产生所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0195] 134.如实施方案51-53或126-133中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生与野生型对应物细胞相比,具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0196] 135.如实施方案51-53或126-134中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生具有低于20%的野生型对应物细胞中的CD33水平的降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0197] 136.如实施方案51-53或126-135中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途在多个造血干细胞或祖细胞上进行。

[0198] 137.如实施方案51-53或126-136中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途在包含多个造血干细胞和多个造血祖细胞的细胞群体上进行。

[0199] 138.如实施方案51-53或126-137中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生根据实施方案34-48中任一项所述的细胞群体。

[0200] 139.如实施方案128-138中任一项所述的方法,其中(a)和(b)的核酸在一个载体上编码,所述载体被引入所述细胞中。

[0201] 140.如实施方案139所述的方法,其中所述载体是病毒载体。

[0202] 141.如实施方案139所述的方法,其中(a)和(b)作为预先形成的核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。

[0203] 142.如实施方案141所述的方法,其中通过电穿孔将所述核糖核蛋白复合物引入所述细胞中。

[0204] 143.如实施方案128-142中任一项所述的方法,其中通过将编码所述Cas9核酸内切酶的核酸分子(例如,mRNA分子)递送至所述细胞中来将所述核酸内切酶(例如,Cas9核酸内切酶)引入所述细胞中。

[0205] 144.如实施方案128-143中任一项所述的方法,其中所述gRNA是单分子向导RNA

(sgRNA)。

[0206] 145.如实施方案128-144中任一项所述的方法,其中所述gRNA是经修饰的sgRNA。

[0207] 146.如实施方案128-145中任一项所述的方法,其中所述gRNA是化学修饰的sgRNA。

[0208] 147.如实施方案128-146中任一项所述的方法,其中所述造血干细胞或祖细胞是CD34+。

[0209] 148.如实施方案128-147中任一项所述的方法,其中所述造血干细胞或祖细胞来自受试者的骨髓细胞或外周血单核细胞(PBMC)。

[0210] 149.如实施方案148所述的方法,其中所述受试者患有造血系统病症。

[0211] 150.如实施方案148所述的方法,其中所述受试者是健康供体。

[0212] 151.如实施方案51-53或126-150中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生突变,所述突变引起与野生型对应物细胞相比降低的CD33表达水平。

[0213] 152.如实施方案51-53或126-151中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生突变,所述突变引起与野生型对应物细胞相比降低的野生型CD33表达水平。

[0214] 153.如实施方案51-53或126-152中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生与野生型对应物细胞相比,具有降低的CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0215] 154.如实施方案51-53或126-153中任一项所述的方法或用途,所述方法或用途产生与野生型对应物细胞相比,具有降低的野生型CD33表达水平的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞。

[0216] 155.一种遗传工程化的造血干细胞或祖细胞,所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞通过实施方案51-53或126-154中任一项所述的方法或用途产生。

[0217] 156.一种治疗造血系统病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、或实施方案34-48中任一项所述的细胞群体或实施方案112-125中任一项所述的造血细胞。

[0218] 157.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞,其用于治疗造血系统病症,其中所述治疗包括向有需要的受试者施用有效量的所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体,并且还包括向所述受试者施用有效量的靶向CD33的剂,其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

[0219] 158.一种用于治疗造血系统病症的靶向CD33的剂,其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段,其中所述治疗包括向有需要的患者施用有效量的所述靶向CD33的剂,并且还包括向所述患者施用有效量的实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或实施方案112-125中任一项所述的造血细胞。

[0220] 159.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞和靶向CD33的剂的组合,其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段,所述组合用于治疗造血系统病症,其中所述治疗包括向有需要的患者施用有效量的遗传工程化的造血干细胞或祖细

胞或细胞群体和所述结合CD33的剂。

[0221] 160.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其用于癌症免疫疗法。

[0222] 161.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其用于癌症免疫疗法，其中所述患者患有造血系统病症。

[0223] 162.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其用于患有造血系统病症的患者的造血重建。

[0224] 163.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其用于治疗造血系统病症的方法中，由此本文所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或本文所述的细胞群体重建所述患者。

[0225] 164.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其在免疫疗法中用于降低靶向CD33的剂的细胞毒性作用。

[0226] 165.如实施方案1-33中任一项所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞、如实施方案34-38中任一项所述的细胞群体或如实施方案112-125中任一项所述的造血细胞，其用于使用靶向CD33的剂的免疫疗法方法中，由此本文所述的遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或本文所述的细胞群体降低所述靶向CD33的剂的细胞毒性作用。

[0227] 166.如实施方案156-165中任一项所述的方法、细胞、剂或组合，其中所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体与所述靶向CD33的剂同时施用。

[0228] 167.如实施方案156-165中任一项所述的方法、细胞、剂或组合，其中所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体在所述靶向CD33的剂之前施用。

[0229] 168.如实施方案156-165中任一项所述的方法、细胞、剂或组合，其中所述靶向CD33的剂在所述遗传工程化的造血干细胞或祖细胞或所述细胞群体之前施用。

[0230] 169.如实施方案156-168中任一项所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述造血系统病症是造血系统恶性肿瘤。

[0231] 170.如实施方案156-169中任一项所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其还包括向所述受试者施用有效量的靶向CD33的剂，并且其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

[0232] 171.如实施方案170所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述靶向CD33的剂是表达嵌合抗原受体(CAR)的免疫细胞，所述剂包含结合CD33的抗原结合片段。

[0233] 172.如实施方案171所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述免疫细胞是T细胞。

[0234] 173.如实施方案170-172中任一项所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述免疫细胞、所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞或两者是同种异体的。

[0235] 174.如实施方案170-173所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述免疫细胞、所述遗传工程化的造血干细胞和/或祖细胞或两者是自体的。

[0236] 175.如实施方案170-174中任一项所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述嵌合受体中的抗原结合片段是特异性地结合人CD33的单链抗体片段(scFv)。

[0237] 176.如实施方案170-175中任一项所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述受试者是患有霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤的人患者。

[0238] 177.如实施方案176所述的方法、细胞、剂、用途或组合，其中所述受试者是患有白血病的人患者，所述白血病是急性骨髓性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病或慢性成淋巴细胞性白血病。

[0239] 本公开的一个或多个实施方案的细节在以下说明书中给出。本公开的其它特征或优点将根据若干实施方案的详细描述以及所附权利要求书而显而易见。

附图说明

[0240] 以下附图构成本说明书的一部分，并且被包括来进一步展示本公开的某些方面，通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文呈现的具体实施方案的详细描述，可更好地理解所述方面。

[0241] 图1呈现0型、1型、2型和3型谱系特异性抗原的示例性说明。

[0242] 图2是示出表达靶向0型谱系特异性细胞表面抗原CD307的嵌合受体的免疫细胞的示意图。表达CD307的多发性骨髓瘤(MM)细胞以及表达CD307的其他细胞(如浆细胞)由表达抗CD307嵌合受体的免疫细胞靶向。

[0243] 图3是示出表达靶向2型谱系特异性细胞表面抗原CD33的嵌合受体的免疫细胞的示意图。表达CD33的急性骨髓性白血病(AML)细胞。将人造血干细胞(HSC)遗传工程化为缺乏CD33，并且因此不被表达抗CD33嵌合受体的免疫细胞识别。HSC能够产生骨髓细胞。

[0244] 图4是示出使用CRISPR/Cas系统进行基因组编辑的示意图。sgRNA与谱系特异性细胞表面抗原的外显子的一部分杂交，并且Cas9核酸内切酶在原型间隔区相邻基序(PAM)序列(5′-NGG-3’)上游裂解。所述序列从上至下对应于SEQ ID NO:45和46。

[0245] 图5是示出使用CRISPR/Cas9系统来破坏CD33的基因组编辑策略的示意图。将编码Cas9蛋白和靶向CD33的向导RNA的PX458载体核转染到K-562细胞(一种人白血病细胞系)中。在将Cas9和向导RNA递送至细胞之前(上图)和之后(下图)，使用抗CD33抗体对细胞群体进行流式细胞术。基因组编辑导致基因编码区的缺失和来自细胞表面的CD33的显著减少。

[0246] 图6是示出使用CRISPR/Cas9系统来破坏CD45RA的基因组编辑策略的示意图。将编码Cas9蛋白和靶向CD45RA的向导RNA的PX458载体核转染到TIB-67网织细胞肉瘤小鼠巨噬细胞样细胞中。在将Cas9和向导RNA递送至细胞之前(上图)和之后(下图)，使用抗CD45RA抗体对细胞群体进行流式细胞术。基因组编辑导致基因编码区的缺失和来自细胞表面的CD45RA的显著减少。

[0247] 图7A-7D示出包含靶向CD33的抗原结合片段的示例性嵌合受体的示意图。图7A:靶向CD33的通用嵌合受体，包含抗CD33 scFv、铰链结构域、跨膜结构域、共刺激结构域和信号传导结构域。图7B:靶向CD33的嵌合受体，包含抗CD33 scFv、来自CD8的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域以及来自CD28和CD3ζ的细胞内结构域。图7C:靶向CD33的嵌合受体，包含抗CD33 scFv、来自CD8的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域以及来自ICOS(或CD27、4-1BB或OX-40)和CD3ζ的细胞内结构域。图7D:靶向CD33的嵌合受体，包含抗CD33 scFv、来自CD8

的铰链结构域、来自CD8的跨膜结构域以及来自OX40、CD28和CD3ζ的细胞内结构域。

[0248] 图8是免疫毒素的示意图。

[0249] 图9A-9B示出在用空载体或编码抗CD33嵌合受体的载体转导的K562细胞中表达的抗CD33嵌合受体的表达。图9A:使用识别CD3ζ的第一抗体进行的蛋白质印迹。所述表提供了所测试的每种嵌合受体的估计分子量。图9B:流式细胞术分析显示对抗CD33嵌合受体呈染色阳性的细胞群体的增加。

[0250] 图10A-10C示出抗CD33嵌合受体结合至CD33。图10A:丽春红(Ponceau)染色的蛋白质凝胶。泳道1、3、5:CD33分子。泳道2、4、6:CD33分子+APC缀合物。图10B:使用识别CD3ζ的第一抗体进行的蛋白质印迹。泳道1、3和5含有与CD33分子共孵育的嵌合受体,并且泳道2、4和6含有与CD33-APC缀合物共孵育的嵌合受体。图10C:流式细胞术分析显示表达抗CD33嵌合受体并结合CD33的细胞群体增加。

[0251] 图11A-11B示出表达所指示嵌合受体的NK92细胞对K562细胞的细胞毒性。图11A:CART1和CART2与空HIVzsG载体的比较。图11B:CART3与空HIVzsG载体的比较。

[0252] 图12A-12B示出表达所指示嵌合受体的NK92细胞对缺乏CD33的K562细胞的细胞毒性(表示为y轴上的细胞毒性百分比)。图12A:用靶向CD33的CRISPR/Cas试剂预处理的未分选的K562细胞群体。图12B:缺乏CD33的K562细胞的单个克隆。从左至右的列对应于空HIVzsG载体、CART1、CART2和CART3。

[0253] 图13A-13B示出原代T细胞群体的流式细胞术分析。图13A:基于T细胞标志物$C4^+$、$CD8^+$、或$CD4^+CD8^+$两者的表达的细胞分选。图13B:所指示的原代T细胞群体上CD33的相对表达。

[0254] 图14A-14B示出表达所指示嵌合受体的原代T细胞对K562细胞的细胞毒性。图14A:$CD4^+$T细胞。图14B:$CD4^+/CD8^+$(CD 4/8)和$CD8^+$(CD8)。

[0255] 图15示出使用CRISPR/Cas9系统和两种不同的gRNA(Crispr3,右上图和Crispr5,右下图)对K562细胞中的CD33编辑的流式细胞术分析。

[0256] 图16A-16C示出缺乏CD33的K562细胞呈现正常细胞增殖和红细胞生成分化。图16A:第1天+50μM血红素下对所指示细胞群体的流式细胞术分析。图16B:在第9天对所指示细胞群体的流式细胞术分析。图16C:MTT细胞增殖测定。

[0257] 图17A-17C示出使用CRISPR/Cas9系统和两种不同的gRNA(crispr3,左下图和crispr5,右下图)对人$CD34^+$细胞中的CD33编辑的流式细胞术分析。图17A:使用CRISPR/Cas9系统对人$CD34^+$细胞中的CD33编辑的流式细胞术分析。图17B:crispr3。图17C:crispr5。

[0258] 图18示出与人$CD34^+/CD33^+$细胞相比,人$CD34^+/CD33^-$细胞的集落形成。从左至右的列对应于无慢病毒感染、空载体对照、crispr1、crispr3和crispr5。

[0259] 图19A-19F示出CRISPR/Cas9介导的CD33抗原的遗传消除。图19A示出所述方法:使用基因编辑技术(如CRISPR/Cas9)对从供体获得的动员干细胞或脐带血进行遗传操作以消除CD33表达,并移植到符合HSCT资格的复发患者中。移植后,将使用病毒递送系统对来自同种异体供体的T细胞进行遗传操作,以表达靶向CD33的嵌合抗原受体并输注在接受者中。或者,患者可接受单独或与CAR-T组合的ADC(GO)。图19B-19F示出人细胞中的CD33表达及其消除融。图19B:在人AML细胞系HL-60中、在来自骨髓(BM)和脐带血(CB)的人原代$CD34^+CD33^{WT}$

细胞中和CRISPR/Cas9介导的消除后的人原代$CD34^+CD33^{Del}$中CD33的表达。图19C:CD33基因组基因座的示意性图示,其示出外显子2-4以及靶向CD33的sgRNA(粗体)的位置和序列。从上至下的序列对应于SEQ ID NO:52-53。图19D:$CD34^+CD33^{WT}$细胞和$CD34^+CD33^{Del}$中电穿孔后通过流式细胞术的CD33表面表达。如通过CD90表达所评估,所有细胞都保持其干细胞表型。图19E:桑格(Sanger)测序的色谱图,其示出DNA双链断裂位点周围的区域,上图:$CD34^+CD33^{WT}$细胞,以及下图:$CD34^+CD33^{Del}$。从上至下的序列对应于SEQ ID NO:54-55。图19F:电穿孔后5至7天,与对照相比,$CD34^+$培养细胞显示出一致的CD33缺失。

[0260] 图20A-20E示出CD33的缺失不损害NSG-SGM3小鼠中的植入和造血重建。图20A:实验设计的示意图。图20B-20C示出骨髓来源的$CD34^+$细胞植入和重建:将移植后的外周血(7周;图20B)和全骨髓(21周;图20C)针对不同谱系的细胞进行分析,如所指示。$CD34^+CD33^{Del}$细胞显示出与对照细胞相同的植入($CD45^+$)以及相当百分比的成熟骨髓细胞和淋巴细胞。骨髓$CD34^+CD33^{Del}$细胞显示出相当百分比的骨髓细胞(祖细胞$CD123^+$,成熟$CD14^+$)和淋巴细胞(祖细胞$CD10^+$,成熟$CD19^+$)、T细胞($CD3^+$)和干细胞$CD34^+38^-$。图20D-20E示出脐带血来源$CD34^+$细胞植入和重建:移植后的外周血(9周;图20D)和骨髓(21周;图20E)针对不同谱系的细胞进行分析,如所指示。$CD34^+CD33^{Del}$细胞显示出与对照细胞相同的植入($CD45^+$)以及相当百分比的成熟骨髓细胞和淋巴细胞。骨髓$CD34^+CD33^{Del}$细胞显示出相当百分比的骨髓细胞(祖细胞$CD123^+$,成熟$CD14^+$)和淋巴细胞(祖细胞$CD10^+$,成熟$CD19^+$)、T细胞($CD3^+$)和干细胞$CD34^+38^-$。使用未配对的t检验对数据进行分析,并且在所有检查的组中均未发现显著差异($p>0.05$)。所有数据均表示为平均值±SEM。

[0261] 图21A-21D示出在Cas9+sgRNA(上图)和仅Cas9(下图)细胞中的向导周围的CD33(图21A)和SIGLEC9(图21B)基因的基因组区域的整合基因组查看器(IGV)屏幕截图,如左侧所指示。覆盖轨迹中的灰色条(在右侧指示)显示在每个基因座显示的读数的深度。一般来说,覆盖范围应该是均匀的,因此条形高度应相同,但缺失导致高度下降。读数轨迹显示映射在此区域中的所有读数(灰色框)。缺失由黑色实线和带斜阴影框的插入表示。带有粗边框的读数是没有映射配对物的那些读数。每组中的一个读数没有映射的配对物。对于核苷酸A、C、G和T,错配碱基分别用菱形、空心圆、实心圆和白色填充。选择SIGLEC9基因组区域作为代表性区域以显示在脱靶位点不存在插入缺失,因为1)它属于与CD33具有同源性的SIGLEC家族,2)与任何其他向导相比,它在预期切割位点的10bp内具有最高同源性。底部的染色体坐标是基于hg38。图21C:示出在CD33编辑的细胞和对照细胞之间使用DEseq2方法归一化的log 10平均归一化计数之间的相关性的散点图。图21D:示出使用edgeR方法分析的基因的log2倍数变化和-log 10p值的火山图,显著差异表达($p<0.05$)的基因显示为红色空心圆圈,并且CD33基因由左箭头指示。

[0262] 图22A-22F示出CD33缺失在体外保护$CD34^+$细胞免受CART33细胞毒性。图22A:CART33构建体的示意图。图22B:示出在用对照(黑色)或CART33(绿色或蓝色)病毒进行慢病毒转导后人原代T细胞中的CAR表达的等高线图。每组中的百分比转导在图旁边指定。$CD4^+$和$CD8^+$细胞在实验前独立转导并按1:1混合。图22C-22F:细胞毒性测定。图22C:将CART33细胞或对照T细胞与HL-60或$CD34^+CD33^{WT}$或$CD34^+CD33^{Del}$一起孵育,并通过流式细胞术评估细胞毒性。图22D-22F:三重培养细胞毒性测定。将CART33细胞或对照T细胞与HL-60和$CD34^+CD33^{WT}$细胞(图22D)、或与HL-60和$CD34^+CD33^{Del}$细胞(图22E)、或与$CD34^+CD33^{WT}$和$CD34^+$

$CD33^{Del}$细胞(图22F)一起共孵育。

[0263] 图23A-23F示出治疗模型:$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞抵抗CD33靶向免疫疗法。图23A:实验设计的示意图:在第0天将$5*10^{5}$HL-60和$5*10^{5}CD34^{+}CD33^{Del}$注射到NSGM3小鼠中。一周后将小鼠用PBS或同种异体CART33或对照T细胞处理。3天后新的组接受仅GO,而注射同种异体CART33和对照T细胞的小鼠接受GO或PBS。在第3周重复处理。然后通过连续骨髓抽吸来监测白血病进展和$CD34^{+}CD33^{Del}$植入。图23B:监测骨髓抽吸物中的白血病负荷。将白血病细胞在$Ter119^{-}dtomato^{+}$上门控。图23C:通过3.5周(图23D)和8周(图23E)显示的图像的落射荧光定量进行的白血病负荷测量。用未处理的小鼠(*成像对照)除去背景。图23F:CART33或GO白血病清除不损害$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞随时间推移的植入($hCD45^{+}$细胞%),如通过骨髓抽吸物的流式细胞术所示。将注射$CD34^{+}$的来源的人细胞在$Ter119^{-}dtomato^{-}Ly5^{-}/H2kd^{-}$人$CD45^{+}CART^{-}$上门控。

[0264] 图24A-24D示出CD34+CD33Del HSPC在治疗模型中显示出多系植入和分化。图24A:$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞抵抗CD33靶向免疫疗法并促成骨髓细胞生成和淋巴细胞生成。每种条件下的左侧两个图随时间推移监测骨髓祖细胞的重建,并且右侧两个图是BM抽吸物中的淋巴祖细胞和成熟细胞。在所分析的所有时间点,不同处理组之间未观察到显著差异。图24B-24D示出$CD34^{+}CD33^{WT}$细胞对CD33靶向免疫疗法敏感。图24B:实验设计的示意图:在第0天将$5*10^{5}CD34^{+}CD33^{WT}$单独或与$5*10^{5}$HL-60组合注射到NSG-SGM3小鼠中。一周后将小鼠用PBS或同种异体CART33细胞处理。然后在第3周针对CART33通过骨髓抽吸来监测白血病进展和$CD34^{+}CD33^{WT}$植入。在同一天,将一组小鼠注射GO,并且在4天后进行了分析。图24C-24D:BM抽吸物显示与单独PBS相比,用CART33或GO处理的小鼠中$CD33^{WT}$白血病细胞(图24C)和$CD33^{WT}$原代细胞(图24D)的完全消除。与PBS相比,在CART33与GO之间观察到显著差异。将注射$CD34^{+}$的来源的人细胞在$Ter119^{-}dtomato^{-}Ly5^{-}/H2kd^{-}$人$CD45^{+}CART^{-}$上门控。所有数据均表示为平均值±SEM。

[0265] 图25A-25B示出测试以消除CD33表达的额外sgRNA显示高水平的插入缺失。图25A-25B:CD33基因组基因座的示意性图示,其示出外显子2-4以及两个另外sgRNA靶向的CD33基因座的位置和序列。底部的色谱图是桑格测序的屏幕截图,其示出DNA双链断裂位点周围的区域,左:$CD34^{+}CD33^{WT}$细胞和右:$CD34^{+}CD33^{Del}$。向导序列在色谱图上以蓝色突出显示,并且插入缺失的出现由红色向下箭头指示。序列按出现顺序分别对应于SEQ ID NO:56-57、75-76、113、59和77-78。

[0266] 图26A-26D示出CD33的缺失不损害NSGM3小鼠中的植入和造血重建。图26A-26B示出骨髓来源的$CD34^{+}$细胞植入和重建。图26A:针对不同谱系的细胞分析移植后的骨髓抽吸物(15周),如所指示。$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞显示出与对照细胞相同的植入($CD45^{+}$)以及相当百分比的成熟骨髓细胞和淋巴细胞。条形图代表单个图的总结。图26B:来自主图20C的数据的汇总。图26C-26D示出脐带血来源的$CD34^{+}$细胞植入和重建。图26C:针对不同谱系的细胞分析移植后的骨髓抽吸物(16周),如所指示。$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞显示出与对照细胞相同的植入($CD45^{+}$)以及相当百分比的成熟骨髓细胞和淋巴细胞。条形图代表单个图的总结。图26D:来自图20E的数据的汇总。在所分析的所有细胞类型中,在两组之间未观察到显著差异($p>0.05$),未配对t检验。所有数据均表示为平均值±SEM。

[0267] 图27示出RNAseq数据中读数的覆盖范围。覆盖轨迹的整合基因组查看器(IGV)屏

幕截图显示Cas9+sgRNA(n＝5;下图)和仅Cas9(n＝5;上图)细胞中的向导周围的CD33基因组区域,如左侧所指示。覆盖轨迹中的灰色条(在右侧指示)显示在每个基因座显示的读数的深度。一般而言,覆盖范围应该是均匀的,因此条形高度应相同,但缺失导致条形的高度下降,在下图中用虚线矩形标记。图27按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 114和114。

[0268] 图28示出在全基因组测序中发现的读数和变体的总结。

[0269] 图29示出sgRNA 846(sgRNA:AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67);PAM:CGG)的脱靶位点。在全基因组测序分析中,在预期脱靶切割位点的100bp内未发现插入缺失。与向导序列的错配以粗体表示。图29按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 79-98。

[0270] 图30示出sgRNA 811(sgRNA:CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70);PAM:AGG)的脱靶位点。在全基因组测序分析中,在预期脱靶切割位点的100bp内未发现插入缺失。与向导序列的错配以粗体表示。图30按出现顺序分别公开了SEQ ID NO 99-107、106、107、107、107、107、107-112。

[0271] 图31示出在CD33缺失细胞中差异表达的基因的列表。与CD33野生型细胞相比,在CD33缺失细胞中表达低的基因用负号表示。

[0272] 图32A-32C示出GO靶向免疫疗法清除原代AML细胞并挽救$CD33^{Del}$细胞。图32A:示意性实验设计:在第1天将50万个原代AML细胞注射到NSGS小鼠中。一旦评估了微小残留疾病,经处理的小鼠组就接受慢性剂量的GO(每10天1μg)。处理组的首次GO注射后10天,将小鼠移植50万个$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞。图32B,左图:处理前通过骨髓抽吸物的流式细胞术评估的AML(微小残留疾病)负担。将白血病细胞在$Ter119^{-}hCD45^{+}hCD33^{+}$上门控。右图:在GO慢性处理后BM抽吸物中的AML负荷和$hCD45^{+}hCD33^{Del}$植入。图23B(续):在$Ter119^{-}$、$Ly5^{-}/H2kd^{-}$、$hCD45^{+}$、$hCD33^{-}$上门控的$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞的造血重建(骨髓/淋巴祖细胞和成熟细胞)。图32C.对照组在死亡时的全骨髓(BM)、脾脏和外周血(PB)的存活曲线和分析(实线,未处理;虚线,经处理)。

[0273] 图33A-33D示出缺乏CD33和CLL-1的细胞可成功移植。图33A是一系列流式细胞术图,其示出CD33和CLL-1水平可单独或组合降低。图33B是一系列流式细胞术图,其示出允许移植到小鼠体内的细胞中的CD33和CLL-1水平。图33C和33D:全骨髓样品(图33C)或脾脏样品(图34D)中所指示细胞类型在hCD45+细胞群体内的频率。从左至右,每组四个条形表示以下细胞类型:$CD34^{+WT}$(圆圈);$CD34^{+}CD33^{Del}$(正方形)、$CD34^{+}CLL1^{Del}$(三角形)和$CD34^{+}CD33^{Del}CLL1^{Del}$(倒三角形)。

具体实施方式

[0274] 当靶抗原也存在于受试者的发育和/或存活所必需的或关键涉及的正常细胞、非癌细胞的细胞表面上时,靶向存在于癌细胞的细胞表面上的抗原的癌症免疫疗法特别具有挑战性。由于免疫疗法对除癌细胞以外的此类细胞的细胞毒性作用,靶向这些抗原可能在受试者中导致有害作用。

[0275] 本文所述的方法、核酸和细胞允许靶向不仅存在于癌细胞上、而且存在于对受试者的发育和/或存活至关重要的细胞上的抗原(例如,1型或2型抗原)。所述方法包括:(1)使用靶向这种抗原的剂减少携带靶谱系特异性细胞表面抗原的细胞的数量;和(2)用缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞替代呈递所述抗原并且因此可因施用所述剂而被杀死

的正常细胞(例如,非癌细胞)。本文所述的方法可维持对表达目标谱系特异性细胞表面抗原的靶细胞(包括癌细胞)的监视,并且还维持对于受试者的发育和/或存活可能是至关重要的表达所述谱系特异性抗原的非癌细胞群体。

[0276] 因此,本文描述了表达嵌合受体的免疫细胞和造血细胞(如造血干细胞(HSC)或造血祖细胞(HPC))的共同使用,所述嵌合受体包含靶向谱系特异性细胞表面抗原(例如,CD33)的抗原结合片段,所述造血细胞缺乏用于治疗造血系统恶性肿瘤的谱系特异性细胞表面抗原。本文还提供了嵌合受体、编码这种嵌合受体的核酸、包含这种嵌合受体的载体和表达这种嵌合受体的免疫细胞(例如,T细胞)。本公开还提供了缺乏谱系特异性抗原(如本文所述的那些)的遗传工程化的造血细胞,以及用于制备此类遗传工程化的造血细胞的方法(例如,基因组编辑方法)。

[0277] 定义

[0278] 术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,并且是指脊椎动物,优选哺乳动物,如人。哺乳动物包括但不限于人灵长类动物、非人灵长类动物或鼠、牛、马、犬或猫物种。在本公开的上下文中,术语“受试者”还涵盖可在体外或离体培养或在体内操纵的组织和细胞。术语“受试者”可与术语“生物体”互换使用。

[0279] 术语“多核苷酸”、“核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指具有任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物)的聚合物形式。多核苷酸的实例包括但不限于基因或基因片段的编码或非编码区、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微小RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支链多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。可进一步修饰多核苷酸中的一个或多个核苷酸。核苷酸序列可被非核苷酸组分间断。还可在聚合后,诸如通过与标记剂缀合来修饰多核苷酸。

[0280] 术语“杂交”是指其中一个或多个多核苷酸反应形成通过核苷酸残基碱基之间的氢键合而稳定的复合物的反应。氢键合可通过沃森/克里克碱基配对、Hoogstein结合或以任何其它序列特异性方式发生。复合物可包含形成双链体结构的两条链、形成多链复合物的三条或更多条链、单个自杂交链或这些的任何组合。杂交反应可构成更广泛过程(如PCR的起始或酶对多核苷酸的裂解)中的步骤。能够与给定序列杂交的序列被称为给定序列的“互补序列”。

[0281] 术语“重组表达载体”是指允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽的遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当所述构建体包含编码所述mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列时,并且使所述载体在足以在所述细胞内表达所述mRNA、蛋白质、多肽或肽的条件下与所述细胞接触。本公开的载体整体上不是天然存在的。载体的部分可以是天然存在的。本公开的非天然存在的重组表达载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA,所述核苷酸可以是单链或双链的,合成的或部分从天然来源获得的,并且可含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。

[0282] 如本文所用,“转染”、“转化”或“转导”是指通过使用物理或化学方法将一种或多种外源多核苷酸引入宿主细胞中。

[0283] “抗体”、“抗体的片段”、“抗体片段”、“抗体的功能片段”或“抗原结合部分”可互换使用来表示抗体的保留特异性地结合至特定抗原的能力的一个或多个片段或部分

(Holliger等人,Nat.Biotech.(2005)23(9):1126)。本发明的抗体可以是抗体和/或其片段。抗体片段包括Fab、F(ab')2、scFv、二硫键连接的Fv、Fc或变体和/或混合物。抗体可以是嵌合的、人源化的、单链的或双特异性的。本公开涵盖所有抗体同种型,包括IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。合适的IgG亚型包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。抗体轻链或重链可变区由被三个称为互补决定区(CDR)的高变区间断的"框架"区组成。本发明的抗体或抗原结合部分的CDR可来自非人或人来源。本发明的抗体或抗原结合部分的框架可以是人的、人源化的、非人的(例如,经修饰以降低人中的抗原性的鼠框架)或合成的框架(例如,共有序列)。

[0284] 本发明的抗体或抗原结合部分可特异性地结合,解离常数(K_D)小于约10^{-7}M、小于约10^{-8}M、小于约10^{-9}M、小于约10^{-10}M、小于约10^{-11}M或小于约10^{-12}M。根据本公开的抗体的亲和力可使用常规技术容易地确定(参见例如,Scatchard等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.(1949)51:660;和美国专利号5,283,173、5,468,614或等效物)。

[0285] 术语"嵌合受体"、"嵌合抗原受体"或可替代地"CAR"可在全文中互换使用,并且是指至少包含细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域(本文中也称为"细胞内信号传导结构域")的重组多肽构建体,所述细胞质信号传导结构域包含源自如下文定义的刺激分子的功能性信号传导结构域。Lee等人,Clin.Cancer Res.(2012)18(10):2780;Jensen等人,Immunol Rev.(2014)257(1):127;www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells。在一个实施方案中,刺激分子是与T细胞受体复合物相关的ζ链。在一个方面,细胞质信号传导结构域还包含一个或多个源自至少一种如下文定义的共刺激分子的功能性信号传导结构域。共刺激分子也可以是4-1BB(即CD137)、CD27和/或CD28或这些分子的片段。在另一个方面,CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含源自刺激分子的功能性信号传导结构域。CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含源自共刺激分子的功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。或者,CAR包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含源自一种或多种共刺激分子的两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。CAR还可包含嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含细胞外抗原识别结构域、跨膜结构域和细胞内信号传导结构域,所述细胞内信号传导结构域包含源自一种或多种共刺激分子的至少两个功能性信号传导结构域和源自刺激分子的功能性信号传导结构域。由核酸序列编码的CAR的抗原识别部分可含有任何谱系特异性的抗原结合抗体片段。所述抗体片段可包含一个或多个CDR、可变区(或其部分)、恒定区(或其部分)、或前述任一者的组合。

[0286] 术语"信号传导结构域"是指蛋白质的功能性部分,其通过在细胞内传递信息以通过产生第二信使或通过响应于此类信使而用作效应子,经由定义的信号传导途径调控细胞活性而起作用。

[0287] 术语"ζ"或"ζ链"、"CD3-ζ"或"TCR-ζ"被定义为以GenBank登录号NP_932170、NP_000725或XP_011508447提供的蛋白质;或来自非人物种,例如小鼠、啮齿动物、猴、猿等的等效残基,并且"ζ刺激结构域"或可替代地"CD3-ζ刺激结构域"或"TCR-ζ刺激结构域"被定义为来自ζ链的细胞质结构域的氨基酸残基,所述氨基酸残基足以在功能上传递T细胞活化所

必需的初始信号。

[0288] 术语“遗传工程化的”或“遗传修饰的”是指通过遗传工程化，例如通过基因组编辑来操作的细胞。即，所述细胞含有在所述细胞中不天然存在的异源序列。通常，异源序列通过载体系统或用于将核酸分子引入细胞中的其他方式(包括脂质体)引入。异源核酸分子可整合到细胞的基因组中或可存在于染色体外，例如以质粒的形式。所述术语还包括将遗传工程化的、分离的CAR多肽引入细胞中的实施方案。

[0289] 术语“自体的”是指源自同一个体的任何材料，所述材料随后将被重新引入该同一个体。

[0290] 术语“同种异体的”是指任何材料，所述材料源自与向其引入该材料的个体相同的物种的不同动物。当一个或多个基因座处的基因不相同时，两个或更多个个体被称为彼此同种异体。

[0291] 术语“细胞谱系”是指具有共同祖先并且从相同类型的可识别细胞发育成特定可识别/功能细胞的细胞。本文使用的细胞谱系包括但不限于呼吸系统、前列腺、胰腺、乳腺、肾、肠、神经、骨骼、血管、肝、造血、肌肉或心脏细胞谱系。

[0292] 当用于提及谱系特异性抗原的基因表达或功能时，术语“抑制”是指谱系特异性抗原的基因表达或功能水平的降低，其中抑制是对基因表达或功能的干扰的结果。抑制可以是完全的，在这种情况下没有可检测的表达或功能，或者可以是部分的。部分抑制的范围可从接近完全抑制到几乎没有抑制。通过消除特定靶细胞，CAR T细胞可有效地抑制特定细胞谱系的总体表达。

[0293] “缺乏谱系特异性抗原”的细胞如造血细胞是指与其天然存在的对应物(例如相同类型的内源性造血细胞)或不表达谱系特异性抗原(即通过常规测定如FACS不可检测)的细胞相比具有显著降低的谱系特异性抗原表达水平的细胞。在一些情况下，“缺乏抗原”的细胞的谱系特异性抗原的表达水平可低于天然存在的对应物的同一谱系特异性抗原的表达水平的约40％(例如，30％、20％、15％、10％、5％或更低)。如本文所用，术语“约”是指特定值+/-5％。例如，约40％的表达水平可包括介于35％-45％之间的任何表达量。

[0294] 靶向谱系特异性细胞表面抗原的剂

[0295] 本公开的方面提供了靶向例如靶癌细胞上的谱系特异性细胞表面抗原的剂(例如，靶向CD33的剂，例如，其中所述剂包含结合CD33的抗原结合片段)。这种剂可包含结合并靶向谱系特异性细胞表面抗原的抗原结合片段。在一些情况下，抗原结合片段可以是与谱系特异性抗原特异性结合的单链抗体(scFv)。

[0296] A.谱系特异性细胞表面抗原

[0297] 如本文所用，术语“谱系特异性细胞表面抗原”和“细胞表面谱系特异性抗原”可互换使用，并且是指充分存在于细胞表面上并与一个或多个细胞谱系群体相关的任何抗原。例如，抗原可存在于一个或多个细胞谱系群上，而在其他细胞群体的细胞表面上不存在(或处于降低的水平)。

[0298] 一般而言，谱系特异性细胞表面抗原可基于多种因素进行分类，如抗原和/或呈递所述抗原的细胞群体是否是宿主生物体的存活和/或发育所必需的。以下表1中提供了示例性类型的谱系特异性抗原的总结。还参见图1。

[0299] 表1.谱系特异性抗原的分类

谱系特异性抗原的类型	谱系特异性抗原的特征
0型	a) 抗原是生物体的存活所需的 和 b) 携带0型抗原的细胞类型是生物体的存活所需的，并且不是肿瘤或肿瘤相关病毒所独有的
1型	a) 抗原不是生物体的存活所需的 和 b) 携带1型抗原的细胞类型不是生物体的存活所需的
2型	a) 抗原不是生物体的存活所需的 和 b) 携带2型抗原的细胞类型是生物体的存活所需的
3型	a) 抗原不是生物体的存活所需的 和 b) 携带抗原的细胞类型不是生物体的存活所需的 c) 所述抗原是肿瘤或肿瘤相关病毒所独有的 一个实例是EBV感染的细胞，包括EBV感染的肿瘤细胞(鼻咽癌和伯基特淋巴瘤)中的LMP-2抗原

[0300]

[0301] 如表1和图1所示，0型谱系特异性细胞表面抗原是组织稳态和存活所必需的，并且携带0型谱系特异性细胞表面抗原的细胞类型可能也是受试者的存活所必需的。因此，鉴于0型谱系特异性细胞表面抗原或携带0型谱系特异性细胞表面抗原的细胞在稳态和存活中的重要性，使用常规CAR T细胞免疫疗法靶向此类抗原可能具有挑战性，因为抑制或去除此类抗原和携带此类抗原的细胞可能对受试者的存活有害。因此，谱系特异性细胞表面抗原(例如0型谱系特异性抗原)和/或携带此类抗原的细胞类型可能是存活所需的，例如因为它在受试者中执行重要的非冗余功能，因此这种类型的谱系特异性抗原可能是基于CAR T细胞的免疫疗法的不良靶点。

[0302] 与0型抗原相反，1型细胞表面谱系特异性抗原和携带1型细胞表面谱系特异性抗原的细胞不是受试者的组织稳态或存活所需的。靶向1型细胞表面谱系特异性抗原不太可能对受试者造成有害后果。例如，经工程化以靶向CD307(一种在正常浆细胞和多发性骨髓瘤(MM)细胞上独特表达的1型抗原)的CAR T细胞将导致两种细胞类型的消除(图2)(Elkins等人，Mol Cancer Ther.10:2222(2012))。然而，由于浆细胞谱系对于生物体的存活是消耗性的，所以CD307和其他1型谱系特异性抗原是适用于基于CAR T细胞的免疫疗法的抗原。1型类别的谱系特异性抗原可在多种不同的组织，包括卵巢、睾丸、前列腺、乳腺、子宫内膜和

胰腺中表达。在一些实施方案中，所述剂靶向为1型抗原的细胞表面谱系特异性抗原。

[0303] 与1型抗原相比，靶向2型抗原存在显著困难。2型抗原的特征在于：(1)抗原对于生物体的存活是非必要的(即，不是存活所需的)，和(2)携带所述抗原的细胞谱系对于生物体的存活是必不可少的(即，特定细胞谱系是存活所需的)。例如，CD33是在正常骨髓细胞以及急性骨髓性白血病(AML)细胞中表达的2型抗原(Dohner等人，NEJM 373:1136(2015))。因此，经工程化以靶向CD33抗原的CAR T细胞可导致杀死正常细胞以及AML细胞，这可能与受试者的存活不相容(图3)。在一些实施方案中，所述剂靶向为2型抗原的细胞表面谱系特异性抗原。

[0304] 本公开的方法和组合物可靶向多种抗原。针对这些抗原的单克隆抗体可商购或使用标准技术产生，包括用目标抗原对动物进行免疫，然后是常规单克隆抗体方法，例如Kohler和Milstein,Nature(1975)256:495的标准体细胞杂交技术，如上文所论述。可使用任何标准DNA或蛋白质测序技术对抗体或编码所述抗体的核酸进行测序。

[0305] 在一些实施方案中，使用本文所述的方法和细胞靶向的细胞表面谱系特异性抗原是白细胞或白细胞亚群的细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是与骨髓细胞相关的抗原。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是分化抗原(CD)簇。CD抗原的实例包括但不限于CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3、CD3d、CD3e、CD3g、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8a、CD8b、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD11d、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD16、CD16b、CD17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32a、CD32b、CD32c、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD45、CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RO、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CD60a、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64a、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66F、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CD75、CD75S、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85A、CD85C、CD85D、CD85E、CD85F、CD85G、CD85H、CD85I、CD85J、CD85K、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CD92、CD93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD99R、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CD108、CD109、CD110、CD111、CD112、CD113、CD114、CD115、CD116、CD117、CD118、CD119、CD120a、CD120b、CD121a、CD121b、CD121a、CD121b、CD122、CD123、CD124、CD125、CD126、CD127、CD129、CD130、CD131、CD132、CD133、CD134、CD135、CD136、CD137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CD150、CD152、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156a、CD156b、CD156c、CD157、CD158b1、CD158b2、CD158d、CD158e1/e2、CD158f、CD158g、CD158h、CD158i、CD158j、CD158k、CD159a、CD159c、CD160、CD161、CD163、CD164、CD165、CD166、CD167a、CD168、CD169、CD170、CD171、CD172a、CD172b、CD172g、CD173、CD174、CD175、CD175s、CD176、CD177、CD178、CD179a、CD179b、CD180、CD181、CD182、CD183、CD184、CD185、CD186、CD191、CD192、CD193、CD194、CD195、CD196、CD197、CDw198、CDw199、CD200、CD201、CD202b、CD203c、CD204、CD205、CD206、CD207、CD208、CD209、CD210a、CDw210b、CD212、CD213a1、CD213a2、CD215、CD217、CD218a、CD218b、CD220、CD221、CD222、CD223、CD224、CD225、CD226、CD227、CD228、CD229、CD230、CD231、CD232、CD233、CD234、CD235a、CD235b、CD236、CD236R、CD238、CD239、CD240、CD241、

CD242、CD243、CD244、CD245、CD246、CD247、CD248、CD249、CD252、CD253、CD254、CD256、CD257、CD258、CD261、CD262、CD263、CD264、CD265、CD266、CD267、CD268、CD269、CD270、CD271、CD272、CD273、CD274、CD275、CD276、CD277、CD278、CD279、CD280、CD281、CD282、CD283、CD284、CD286、CD288、CD289、CD290、CD292、CDw293、CD294、CD295、CD296、CD297、CD298、CD299、CD300a、CD300c、CD300e、CD301、CD302、CD303、CD304、CD305、306、CD307a、CD307b、CD307c、D307d、CD307e、CD309、CD312、CD314、CD315、CD316、CD317、CD318、CD319、CD320、CD321、CD322、CD324、CD325、CD326、CD327、CD328、CD329、CD331、CD332、CD333、CD334、CD335、CD336、CD337、CD338、CD339、CD340、CD344、CD349、CD350、CD351、CD352、CD353、CD354、CD355、CD357、CD358、CD359、CD360、CD361、CD362以及CD363。参见www.bdbiosciences.com/documents/BD_Reagents_CDMarkerHuman_Poster.pdf。

[0306] 在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是CD19、CD20、CD11、CD123、CD56、CD34、CD14、CD33、CD66b、CD41、CD61、CD62、CD235a、CD146、CD326、LMP2、CD22、CD52、CD10、CD3/TCR、CD79/BCR和CD26。在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是CD33。

[0307] 可替代地或另外，细胞表面谱系特异性抗原可以是癌抗原，例如差异存在于癌细胞上的细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，癌抗原是对组织或细胞谱系具有特异性的抗原。与特定类型的癌症相关的细胞表面谱系特异性抗原的实例包括但不限于CD20、CD22(非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL))、CD52(B细胞CLL)、CD33(急性髓细胞性白血病(AML))、CD10(gp100)(普通(前-B)急性淋巴细胞性白血病和恶性黑素瘤)、CD3/T细胞受体(TCR)(T细胞淋巴瘤和白血病)、CD79/B细胞受体(BCR)(B细胞淋巴瘤和白血病)、CD26(上皮和淋巴恶性肿瘤)、人白细胞抗原(HLA)-DR、HLA-DP和HLA-DQ(淋巴恶性肿瘤)、RCAS1(妇科癌、胆管腺癌和胰腺导管腺癌)以及前列腺特异性膜抗原。在一些实施方案中，细胞表面抗原是CD33并且与AML细胞相关。

[0308] B.抗原结合片段

[0309] 任何抗体或其抗原结合片段(例如，其结合CD33)可用于构建靶向如本文所述的谱系特异性细胞表面抗原的剂。这种抗体或抗原结合片段可通过常规方法制备，例如使用杂交瘤技术或重组技术。

[0310] 例如，可通过常规杂交瘤技术制备对目标谱系特异性抗原具有特异性的抗体。谱系特异性抗原(其可与载体蛋白如KLH偶联)可用于对宿主动物进行免疫以产生与所述复合物结合的抗体。宿主动物的免疫途径和时间表通常与用于抗体刺激和产生的已确立和常规技术一致，如本文进一步描述的。用于产生小鼠、人源化和人抗体的一般技术是本领域已知的并且在本文中进行了描述。预期可对包括人的任何哺乳动物受试者或由其产生抗体的细胞进行操作以充当产生哺乳动物，包括人杂交瘤细胞系的基础。通常，将宿主动物腹膜内、肌肉内、口服、皮下、足底和/或皮内接种一定量的免疫原，包括如本文所述。

[0311] 可使用Kohler,B.和Milstein,C.(1975)Nature 256:495-497的一般体细胞杂交技术或如Buck,D.W.等人,In Vitro,18:377-381(1982)所修改的一般体细胞杂交技术从淋巴细胞和永生化骨髓瘤细胞制备杂交瘤。可用的骨髓瘤系，包括但不限于X63-Ag8.653和来自Salk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,Calif.,USA的那些，可用于杂交。一般来说，所述技术包括使用融合剂如聚乙二醇或通过本领域技术人员熟知的电手段融合骨髓瘤细胞和淋巴细胞。融合后，将所述细胞与融合培养基分离并在选择性生长培养

基,如次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基中生长,以消除未杂交的亲代细胞。补充有或没有血清的本文所述的任何培养基均可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一种替代方法,EBV永生化B细胞可用于产生本文所述的TCR样单克隆抗体。如果需要,将杂交瘤扩增并亚克隆,并且通过常规免疫测定程序(例如,放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测定)测定上清液的抗免疫原活性。

[0312] 可用作抗体来源的杂交瘤包括产生能够结合至谱系特异性抗原的单克隆抗体的所有衍生物、亲代杂交瘤的后代细胞。可使用已知程序在体外或体内生长产生此类抗体的杂交瘤。如果需要,可通过常规免疫球蛋白纯化程序如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱和超滤从培养基或体液中分离单克隆抗体。不希望的活性(如果存在)可例如通过使制剂在由附着至固相上的免疫原制成的吸附剂上运行并使所需抗体从所述免疫原洗脱或释放来去除。用靶抗原或含有靶氨基酸序列的片段对宿主动物进行免疫可产生抗体(例如,单克隆抗体)群体,所述靶抗原或片段使用双功能或衍生剂,例如马来酰亚胺苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl或R1N=C=NR(其中R和R1是不同的烷基)缀合至在待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质,例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0313] 如果需要,可对目标抗体(例如,由杂交瘤产生)进行测序,并且然后可将多核苷酸序列克隆至用于表达或繁殖的载体中。编码目标抗体的序列可在宿主细胞中的载体中保持,然后可使宿主细胞扩增和冷冻以备将来使用。在替代方案中,多核苷酸序列可用于遗传操作以使抗体“人源化”或提高抗体的亲和力(亲和力成熟)或其他特性。例如,如果抗体用于人的临床试验和治疗,则恒定区可被设计成更类似于人恒定区以避免免疫应答。可能需要对抗体序列进行遗传操作以获得对谱系特异性抗原的更大亲和力。对本领域技术人员来说显而易见的是,可对抗体进行一种或多种多核苷酸改变并且仍然保持其对靶抗原的结合特异性。

[0314] 在其他实施方案中,可通过使用已被工程化为表达特定人免疫球蛋白蛋白质的市售小鼠来获得完全人抗体。被设计用于产生更合乎需要的(例如,完全人抗体)或更稳健的免疫应答的转基因动物也可用于产生人源化或人抗体。这种技术的实例是来自Amgen,Inc.(Fremont,Calif.)的Xenomouse™以及来自Medarex,Inc.(Princeton,N.J.)的HuMAb-Mouse™和TC Mouse™。在另一个替代方案中,可通过噬菌体展示或酵母技术以重组方式制备抗体。参见例如,美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743;和6,265,150;以及Winter等人,(1994)Annu.Rev.Immunol.12:433-455。或者,噬菌体展示技术(McCafferty等人,(1990)Nature 348:552-553)可用于从未免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库在体外产生人抗体和抗体片段。

[0315] 完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段可通过常规方法制备。例如,F(ab')2片段可通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生,并且Fab片段可通过还原F(ab')2片段的二硫键桥产生。

[0316] 遗传工程化的抗体,如人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体可通过例如常规重组技术产生。在一个实例中,编码对靶抗原具有特异性的单克隆抗体的DNA可使用常规程序容易地分离和测序(例如,通过使用能够特异性地结合至编码所述单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞充当这种DNA的优选来源。一旦分离,就可

将DNA置于一种或多种表达载体中，然后转染至否则不产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞)中，以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。参见例如，PCT公布号WO 87/04462。然后可对DNA进行修饰，例如，通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠序列，Morrison等人(1984) Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851，或者通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或一部分共价连接至免疫球蛋白编码序列。以所述方式，可制备具有靶抗原的结合特异性的遗传工程化的抗体，如“嵌合”或“杂合”抗体。

[0317] 开发用于产生“嵌合抗体”的技术是本领域众所周知的。参见例如，Morrison等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851;Neuberger等人(1984)Nature 312,604;和Takeda等人(1984)Nature 314:452。

[0318] 用于构建人源化抗体的方法也是本领域众所周知的。参见例如，Queen等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10033(1989)。在一个实例中，按照本领域中已知的方法，对亲本非人抗体的VH和VL的可变区进行三维分子建模分析。接下来，使用相同的分子建模分析鉴定据预测对形成正确的CDR结构重要的框架氨基酸残基。并行地，使用亲本VH和VL序列作为搜索查询从任何抗体基因数据库中鉴定具有与亲本非人抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列的人VH和VL链。然后选择人VH和VL受体基因。

[0319] 所选人受体基因内的CDR区可用来自亲本非人抗体或其功能变体的CDR区替代。必要时，可使用亲本链的框架区内据预测在与CDR区相互作用中重要的残基(参见上文描述)来取代人受体基因中的相应残基。

[0320] 单链抗体可通过重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备。优选地，在两个可变区之间并入柔性接头。或者，描述用于产生单链抗体的技术(美国专利号4,946,778和4,704,692)可适于产生噬菌体或酵母scFv文库，并且可按照常规程序从文库中鉴定对谱系特异性抗原具有特异性的scFv克隆。可对阳性克隆进行进一步筛选以鉴定结合谱系特异性抗原的那些克隆。

[0321] 在一些情况下，目标谱系特异性抗原是CD33并且抗原结合片段特异性地结合CD33，例如人CD33。下文提供了抗人CD33抗体的示例性重链可变区和轻链可变区的氨基酸和核酸序列。CDR序列以粗体显示并在氨基酸序列中加下划线。

[0322] 抗CD33重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)

QVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYYIH**WIKQTP

[0323] GQGLEWVG**VIYPGNDDISYNQKFQG**KATLTADKSSTTAYMQLS

SLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTTVTVSS

[0324] 抗CD33重链可变区的核酸序列(SEQ ID NO:2)

[0325] CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

[0326] 抗CD33轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)

[0327] EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WY QQIPGQSPRLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDL

[0328] AIYYC**HQYLSSRT**FGQGTKLEIKR

[0329] 抗CD33重链可变区的核酸序列(SEQ ID NO:1)

[0330] GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGAGCCCCGGCGAGAGGGTGACCATGAGCTGC AAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACCAGCAGATCCCCGGCCAGAG CCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTCACCGGCAGCGGCAGCGGCA CCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGAGCAGC AGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG

[0331] 用于构建如本文所述的靶向CD33的剂的抗CD33抗体结合片段可包含与SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13中的那些相同的重链和/或轻链CDR区。此类抗体可在一个或多个框架区中包含氨基酸残基变异。在一些情况下,抗CD33抗体片段可包含与SEQ ID NO:12具有至少70%序列同一性(例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高)的重链可变区:12,和/或可包含与SEQ ID NO:13具有至少70%序列同一性(例如,75%、80%、85%、90%、95%或更高)的轻链可变区。

[0332] 两个氨基酸序列的“同一性百分比”是使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990的算法,如Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993中所修改的算法确定的。这种算法被并入Altschul等人J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)中。BLAST蛋白搜索可用XBLAST程序(得分=50、字长=3)来进行,以获得与本公开的蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两个序列之间存在空位的情况下,可利用如Altschul等人,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所描述的空位BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序时,可使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0333] C.表达嵌合受体的免疫细胞

[0334] 在一些实施方案中,如本文所述的靶向谱系特异性细胞表面抗原的剂是表达嵌合受体的免疫细胞,所述剂包含能够结合至谱系特异性抗原(例如,CD33)的抗原结合片段(例如,单链抗体)。通过嵌合受体的抗原结合片段识别在其细胞表面上具有谱系特异性抗原的靶细胞(例如,癌细胞)将活化信号转导至所述嵌合受体的一个或多个信号传导结构域(例如,共刺激信号传导结构域和/或细胞质信号传导结构域),其可活化表达所述嵌合受体的免疫细胞中的效应子功能。

[0335] 如本文所用,嵌合受体是指可在宿主细胞的表面上表达并包含与细胞表面谱系特异性抗原结合的抗原结合片段的非天然存在的分子。一般来说,嵌合受体包含至少两个源自不同分子的结构域。除了本文所述的抗原结合片段之外,嵌合受体还可包含铰链结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激结构域和细胞质信号传导结构域中的一者或多者。在一些实施方案中,嵌合受体从N末端至C末端包含结合至细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段、铰链结构域、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体还包含至少一个共刺激结构域。

[0336] 在一些实施方案中,本文所述的嵌合受体包含铰链结构域,所述铰链结构域可位

于抗原结合片段与跨膜结构域之间。铰链结构域是通常在蛋白质的两个结构域之间发现的氨基酸区段，并且可允许蛋白质的柔性和一个或两个结构域相对于彼此的移动。可使用提供这种柔性和抗原结合片段相对于嵌合受体的另一个结构域的移动的任何氨基酸序列。

[0337] 铰链结构域可含有约10-200个氨基酸，例如15-150个氨基酸、20-100个氨基酸或30-60个氨基酸。在一些实施方案中，铰链结构域的长度可以是约10、11、12、13、14,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200个氨基酸。

[0338] 在一些实施方案中，铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域。本领域已知的包含铰链结构域的任何蛋白质的铰链结构域适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中，铰链结构域是天然存在的蛋白质的铰链结构域的至少一部分并且赋予嵌合受体柔性。在一些实施方案中，铰链结构域是CD8α或CD28α。在一些实施方案中，铰链结构域是CD8α的铰链结构域的一部分，例如，含有CD8α或CD28α的铰链结构域的至少15(例如，20、25、30、35或40)个连续氨基酸的片段。

[0339] 抗体(如IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体)的铰链结构域也适用于本文所述的嵌合受体。在一些实施方案中，铰链结构域是连接抗体的恒定结构域CH1和CH2的铰链结构域。在一些实施方案中，铰链结构域是抗体的铰链结构域并且包含所述抗体的铰链结构域和所述抗体的一个或多个恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域和所述抗体的CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链结构域包含抗体的铰链结构域和所述抗体的CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，抗体是IgG、IgA、IgM、IgE或IgD抗体。在一些实施方案中，抗体是IgG抗体。在一些实施方案中，抗体是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区以及CH2和CH3恒定区。在一些实施方案中，铰链区包含IgG1抗体的铰链区和CH3恒定区。

[0340] 同样在本公开范围内的是包含铰链结构域的嵌合受体，所述铰链结构域是非天然存在的肽。在一些实施方案中，Fc受体的细胞外配体结合结构域的C末端与跨膜结构域的N末端之间的铰链结构域是肽接头，如$(Gly_xSer)_n$接头(SEQ ID NO:74)，其中x和n可独立地为3与12之间的整数，包括3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或更多。

[0341] 可用于本文所述的嵌合受体的铰链结构域中的另外肽接头是本领域已知的。参见例如，Wriggers等人Current Trends in Peptide Science(2005)80(6):736-746和PCT公布WO 2012/088461。

[0342] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体可包含跨膜结构域。用于嵌合受体中的跨膜结构域可呈本领域已知的任何形式。如本文所用，“跨膜结构域”是指在细胞膜，优选真核细胞膜中热力学稳定的任何蛋白质结构。适用于本文所用的嵌合受体中的跨膜结构域可从天然存在的蛋白质获得。或者，跨膜结构域可以是合成的、非天然存在的蛋白质区段，例如在细胞膜中热力学稳定的疏水性蛋白质区段。

[0343] 跨膜结构域基于跨膜结构域拓扑学进行分类，包括跨膜结构域穿过膜的通过次数和蛋白质的取向。例如，单程膜蛋白穿过细胞膜一次，并且多程膜蛋白穿过细胞膜至少两次(例如，2、3、4、5、6、7次或更多次)。在一些实施方案中，跨膜结构域是单程跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域是将嵌合受体的N末端定向至细胞的细胞外侧并且将嵌合受体的C末端定向至细胞的细胞内侧的单程跨膜结构域。在一些实施方案中，跨膜结构域从单程

跨膜蛋白获得。在一些实施方案中，跨膜结构域是CD8α。在一些实施方案中，跨膜结构域是CD28。在一些实施方案中，跨膜结构域是ICOS。

[0344] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体包含一个或多个共刺激信号传导结构域。如本文所用，术语“共刺激信号传导结构域”是指在细胞内介导信号转导以诱导免疫应答(如效应子功能)的蛋白质的至少一部分。本文所述的嵌合受体的共刺激信号传导结构域可以是来自共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域，其转导信号并调节由免疫细胞(如T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞或嗜酸性粒细胞)介导的应答。

[0345] 在一些实施方案中，嵌合受体包含多于一个(至少2、3、4或更多个)共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中，嵌合受体包含从不同共刺激蛋白获得的多于一个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中，嵌合受体不包含共刺激信号传导结构域。

[0346] 一般来说，许多免疫细胞除了刺激抗原特异性信号外，还需要共刺激，以促进细胞增殖、分化和存活并活化细胞的效应子功能。宿主细胞(例如免疫细胞)中共刺激信号传导结构域的活化可诱导细胞增加或减少细胞因子的产生和分泌、吞噬性质、增殖、分化、存活和/或细胞毒性。任何共刺激蛋白的共刺激信号传导结构域可适用于本文所述的嵌合受体。共刺激信号传导结构域的类型是基于诸如嵌合受体将在其中表达的免疫细胞的类型(例如，原代T细胞、T细胞系、NK细胞系)和所需的免疫效应子功能(例如，细胞毒性)的因素加以选择。用于嵌合受体中的共刺激信号传导结构域的实例可以是共刺激蛋白的细胞质信号传导结构域，包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、Cd40、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3。在一些实施方案中，共刺激结构域源自4-1BB、CD28或ICOS。在一些实施方案中，共刺激结构域源自CD28，并且嵌合受体包含来自4-1BB或ICOS的第二共刺激结构域。

[0347] 在一些实施方案中，共刺激结构域是包含多于一个共刺激结构域或多于一个共刺激结构域的部分的融合结构域。在一些实施方案中，共刺激结构域是来自CD28和ICOS的共刺激结构域的融合体。

[0348] 在一些实施方案中，本文所述的嵌合受体包含细胞质信号传导结构域。任何细胞质信号传导结构域均可用于本文所述的嵌合受体中。一般而言，细胞质信号传导结构域传递信号，如细胞外配体结合结构域与其配体的相互作用，以刺激细胞应答，如诱导细胞的效应子功能(例如，细胞毒性)。

[0349] 对本领域普通技术人员显而易见的是，T细胞活化中涉及的因素是细胞质信号传导结构域的基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)的磷酸化。本领域中已知的任何含ITAM结构域均可用于构建本文所述的嵌合受体。一般而言，ITAM基序可包含被6-8个氨基酸隔开的氨基酸序列YxxL/I的两个重复序列，其中每个x独立地为任何氨基酸，从而产生保守基序YxxL/Ix(6-8)YxxL/I。在一些实施方案中，细胞质信号传导结构域来自CD3ζ。

[0350] 示例性嵌合受体在以下表2和3中提供。

[0351] 表2:嵌合受体的示例性组分

嵌合受体组分	氨基酸序列
抗原结合片段	轻链- GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 14)-重链
CD28 共刺激结构域	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLH SDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPP RDFAAYRS (SEQ ID NO: 6)
ICOS 共刺激结构域(粗体)、ICOS 跨膜结构域(斜体)和 ICOS 的细胞外结构域的一部分(下划线)	LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLC CQLK*FWLPIGCAAFVVVCILGCILI***C WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR AVNTAKKSRLTDVTL** (SEQ ID NO: 7)
[0352] ICOS 共刺激结构域	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR AVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 47)
包含来自 CD28 的铰链结构域(斜体)和跨膜结构域(粗体)的 CD28/ICOS 嵌合体(ICOS 部分以下划线示出)	*IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKH LCPSPLFPGPS***KPFWVLVVVGGVL ACYSLLVTVAFIIFWV**RSKRSRLL HSDYMFMRAVNTAKKSRLTDVTL (SEQ ID NO: 8)
CD3ζ 细胞质信号传导结构域	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQG LSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 15)

[0353] 下文提供了用于构建嵌合受体的示例性组分的核酸序列。

[0354] CD28细胞内信号传导结构域-DNA-人(SEQ ID NO:3)

[0355] ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAA GGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC ACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGC GACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGA TGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC TACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0356] ICOS细胞内信号传导结构域-DNA-人(SEQ ID NO:4)

[0357] CTATCAATTTTTGATCCTCCTCCTTTTAAAGTAACTCTTACAGGAGGATATTTGCATATTTATGAATCA

CAACTTTGTTGCCAGCTGAAGTTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTTGTTGTAGTCTGCATTTTGGGATGCAT
ACTTATTTGTTGGCTTACAAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTCATGAGAG
CAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCC
GCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAA
GAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC
CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0358] CD28/ICOS共刺激信号传导区-DNA-人(SEQ ID NO:5)

[0359] ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAA
GGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGT
CCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGC
ACAGTGACTACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCTAGACTCACAGATGTGACCCTAAGAGTGAAG
TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG
AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTC
AGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGC
CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACAT
GCAGGCCCTGCCCCCTCGC

[0360] 在一些实施方案中,核酸序列编码抗原结合片段,所述抗原结合片段结合至CD33并且包含具有与SEQ ID NO:12中的CDR相同的CDR的重链可变区和具有与SEQ ID NO:13中的CDR相同的CDR的轻链可变区。在一些实施方案中,抗原结合片段包含由SEQ ID NO:12提供的重链可变区和由SEQ ID NO:13提供的轻链可变区。在一些实施方案中,嵌合受体还包含至少一个跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,嵌合受体还包含铰链结构域和/或共刺激信号传导结构域。

[0361] 表3提供本文所述的示例性嵌合受体。示例性构建体从N末端至C末端具有抗原结合片段、跨膜结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实例中,嵌合受体还包含位于抗原结合片段与跨膜结构域之间的铰链结构域。在一些实例中,嵌合受体还包含一个或多个共刺激结构域,所述一个或多个共刺激结构域可位于跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间。

[0362] 表3:示例性嵌合受体

[0363]

构建体	载体	抗原结合片段特异性	铰链结构域	跨膜结构域	信号传导结构域1	信号传导结构域2	信号传导结构域3
CART1 (SEQ ID NO: 20)	HIVzs-Gfp	CD33	CD8α	CD8	4-1BB	CD3ζ	无
CART2 (SEQ ID NO: 21)	HIVzs-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	CD3ζ	无
CART3 (SEQ ID NO: 22)	HIVzs-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	4-1BB	CD3 ζ
CART8 (SEQ ID NO: 23)	HIVzs-Gfp	CD33	CD8α	ICOS	ICOS	4-1BB	CD3 ζ
CART4 双重(SEQ ID NO: 24)	HIVzs-dT	CD19	CD8α	CD28	CD3 ζ	-	-
CART5 双重(SEQ ID NO: 25)	HIVzs-Gfp	CD33	CD8α	CD28	CD28	-	-
CART6 (SEQ ID NO: 26)	HIVzs-dT	CD19	CD8α	CD28	CD28	CD3 ζ	-
CART7 (SEQ ID NO: 27)	HIVzs-Gfp	CD33	CD28hge	CD28	CD28	CD3 ζ	-

[0364] 以上表3中列出的示例嵌合受体的氨基酸序列在下文提供：

[0365] CART1氨基酸序列(SEQ ID NO:20)

[0366] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGC
SCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQ
KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0367] CART2氨基酸序列(SEQ ID NO:21)

[0368] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPT
IASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPG
PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG

LYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0369] CART3氨基酸序列(SEQ ID NO:22)

[0370] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP
GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQ
GLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0371] CART8氨基酸序列(SEQ ID NO:23)

[0372] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRAVNTA
KKSRLTDVTLTKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL
NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQALPPR

[0373] CART4双重氨基酸序列(SEQ ID NO:24)

[0374] MWLQSLLLLGTVACSISIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESGP
GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR
PEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

[0375] CART5双重氨基酸序列(SEQ ID NO:25)

[0376] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRP
GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0377] CART6氨基酸序列(SEQ ID NO:26)

[0378] MWLQSLLLLGTVACSISIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR
LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIGSTSGSGKPGSGEGSTKGLQESGP
GLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR

PEASRPAAGGAVHTRGLDKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPY
APPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0379] CART7氨基酸序列(SEQ ID NO:27)

[0380] MWLQSLLLLGTVACSISEIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSCKSSQSVFFSSSQKNYLAWYQQIPGQSPRL
LIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIYYCHQYLSSRTFGQGTKLEIKRGSTSGSGKPGSGEGST
KGQVQLQQPGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTSYYIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQKFQGKATLTADKS
STTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAREVRLRYFDVWGQGTTVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFP
GPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKF
SRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMGERRR
GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0381] 以上表3中列出的示例嵌合受体的核酸序列在下文提供：

[0382] CART1核酸序列(SEQ ID NO:38)

[0383] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGA
GCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGC
CAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTC
TGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGA
GCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCT
GGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTG
ACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCA
ACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCT
CCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGC
CGTGCACACCAGAGGCCTGGATATCTACATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGTCTCTCG
TGATCACCAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAG
GAAGAGGACGGCTGTAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAG
CGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACG
ACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTG
TATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAA
GGGCCACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGC
CCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0384] CART2核酸序列(SEQ ID NO:39)

[0385] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGA
GCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGC
CAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTC

TGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGA
GCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCT
GGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTG
ACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACA
GCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCT
ACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGT
GCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGCTCG
TGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATGACC
CCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAG
AGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGG
GCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAG
AACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATGAAGGG
CGAACGGCGGAGAGGCAAGGGACACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCC
TGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0386] CART3核酸序列(SEQ ID NO:40)

[0387] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGA
GCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGC
CAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTC
TGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGA
GCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCT
GGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTG
ACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCA
ACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCT
CCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGC
CGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGC
TCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATG
ACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACAGATC
CAAGAGAGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATGCGGCCCGTGCAGACCACCCAGGAAGAGG
ACGGCTGTAGCTGCCGGTTCCCCGAGGAAGAAGAAGGGGGCTGCGAGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGAC
GCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCT
GGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGACGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACG
AACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGAATGAAGGGCGAGCGGCGGAGAGGCAAGGGACAC

GATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAG
ATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0388] CART4双重核酸序列(SEQ ID NO:41)

[0389] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCT
GCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATC
TACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGAC
CATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCG
GAGGCACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTG
CAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCC
TGACTATGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGA
CAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAG
ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCAT
GGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGC
CCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAG
CCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTT
CTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGG
TGCGCGTGAAGTTCAGCCGCAGCGCCGATGCCCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAAC
CTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAG
AAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGA
AGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGAC
GCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCTCGCTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0390] CART5双重核酸序列(SEQ ID NO:42)

[0391] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGA
GCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGC
CAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTC
TGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGA
GCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCT
GGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTG
ACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCTAGCGCCCTGAGCA
ACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCT
CCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGC
CGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCTGC
TCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACATG
ACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACAGAAG

CTGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0392] CART6核酸序列(SEQ ID NO:43)

[0393] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGCAGCATCAGCATCCAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGATAGAGTGACCATCAGCT
GCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATC
TACCACACCAGCAGACTGCACAGCGGCGTGCCCTCTAGATTTTCCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACAGCCTGAC
CATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCAACACCCTGCCCTACACCTTCGGCG
GAGGCACCAAGCTGGAAATCGGCAGCACAAGCGGCTCTGGCAAGCCTGGATCTGGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCTG
CAGGAATCTGGCCCTGGACTGGTGGCCCCTAGCCAGAGCCTGTCTGTGACCTGTACCGTGTCCGGCGTGTCCCTGCC
TGACTATGGCGTGTCCTGGATCAGACAGCCCCCCAGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGAGTGATCTGGGGCAGCGAGA
CAACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAGGTGTTCCTGAAG
ATGAACAGCCTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGCGGCAGCTACGCCAT
GGACTACTGGGGCCAGGGCACAAGCGTGACCGTGTCTGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGC
CCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAACCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCCCTACAATCGCCAGCCAG
CCTCTGTCTCTGAGGCCCGAGGCTTCTAGACCAGCTGCTGGCGGAGCCGTGCACACCAGAGGACTGGACAAGCCCTT
CTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTATAGCCTGCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGG
TGCGCAGCAAGCGGAGCCGGCTGCTGCACTCCGACTACATGAACATGACCCCCAGACGGCCAGGCCCCACCCGGAAA
CACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGGTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGATCCGCCGACGC
CCCTGCCTATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGG
ACAAGAGAAGAGGCCGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAAGAAAGAACCCCCAGGAAGGCCTGTATAACGAA
CTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAACGGCGGAGAGGCAAGGGCCACGA
TGGACTGTATCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCCCTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCTCGCT
GAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0394] CART7核酸序列(SEQ ID NO:44)

[0395] GGTGTCGTGAGCGGCCGCTGAACTGGCCACCATGTGGCTGCAGTCTCTGCTGCTGCTGGGCACCGTGGC
CTGTAGCATCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGGCTCTCTGGCTGTGTCTCCTGGCGAGCGCGTGACCATGA
GCTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGTTCTTCAGCAGCTCCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGATCCCCGGC
CAGAGCCCCAGACTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCAGAGAAAGCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGGCAGCGGCTC
TGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCGTGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTGA
GCAGCCGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGGGCAGCACAAGCGGCAGCGGAAAGCCTGGATCT
GGCGAGGGCTCTACCAAGGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCCGAAGTCGTGAAACCTGGCGCCTCCGTGAA
GATGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCAGACCCCTGGACAGGGCC
TGGAATGGGTGGGAGTGATCTACCCCGGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACCCTG
ACCGCCGACAAGTCTAGCACCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTG
CGCCAGAGAAGTGCGGCTGCGGTACTTCGATGTGTGGGGCCAGGGAACCACCGTGACCGTGTCCAGCATCGAAGTGA
TGTACCCCCCTCCCTACCTGGACAACGAGAAGTCCAACGGCACCATCATCCACGTGAAGGGCAAGCACCTGTGCCCC
AGCCCTCTGTTTCCTGGCCCTAGCAAGCCCTTCTGGGTGCTGGTGGTCGTGGGCGGAGTGCTGGCCTGTTACAGCCT
GCTCGTGACAGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCAGCAAGCGGTCTAGACTGCTGCACAGCGACTACATGAACA
TGACCCCCAGAAGGCCAGGCCCCACCCGGAAGCACTATCAGCCTTACGCCCCTCCCAGAGACTTCGCCGCCTACCGG

TCCAGAGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAA
CCTGGGCAGACGGGAAGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGCAGGGACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCCAGAC
GGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATCGGCATG
AAGGGCGAGCGGAGAAGAGGCAAGGGCCACGATGGACTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGA
CGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCCCCCAGATGAAATTCATCGACGTTAACTATTCTAG

[0396] 本文所述的任何嵌合受体均可通过常规方法(如重组技术)制备。用于制备本文的嵌合受体的方法包括产生编码多肽的核酸,所述多肽包含嵌合受体的每个结构域,包括抗原结合片段和任选的铰链结构域、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域和细胞质信号传导结构域。在一些实施方案中,使用重组技术将编码嵌合受体的每种组分的核酸连接在一起。

[0397] 嵌合受体的每种组分的序列可通过常规技术(例如PCR扩增)从本领域已知的多种来源中的任一种获得。在一些实施方案中,嵌合受体的一种或多种组分的序列获自人细胞。或者,可合成嵌合受体的一种或多种组分的序列。可使用诸如PCR扩增或连接的方法直接或间接地(例如,使用编码肽接头的核酸序列)连接每种组分(例如,结构域)的序列以形成编码嵌合受体的核酸序列。或者,可合成编码嵌合受体的核酸。在一些实施方案中,核酸是DNA。在其他实施方案中,核酸是RNA。

[0398] 在连接每种组分的序列之前或之后,嵌合受体的一种或多种组分(例如,抗原结合片段等)内的一个或多个残基的突变。在一些实施方案中,可在嵌合受体的组分中进行一个或多个突变以调节(增加或降低)所述组分对靶标(例如,靶抗原的抗原结合片段)的亲和力和/或调节所述组分的活性。

[0399] 可将本文所述的任何嵌合受体引入合适的免疫细胞中以通过常规技术表达。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞,如原代T细胞或T细胞系。或者,免疫细胞可以是NK细胞,如已建立的NK细胞系(例如,NK-92细胞)。在一些实施方案中,免疫细胞是表达CD8(CD8$^+$)或CD8和CD4(CD8$^+$/CD4$^+$)的T细胞。在一些实施方案中,T细胞是已建立的T细胞系的T细胞,例如293T细胞或Jurkat细胞。

[0400] 原代T细胞可从任何来源,如外周血单核细胞(PBMC)、骨髓、诸如脾脏、淋巴结、胸腺或肿瘤组织的组织获得。适用于获得所需类型的免疫细胞的来源对于本领域技术人员来说将是显而易见的。在一些实施方案中,免疫细胞群体源自患有造血系统恶性肿瘤的人患者,如源自从患者获得的骨髓或PBMC。在一些实施方案中,免疫细胞群体源自健康供体。在一些实施方案中,免疫细胞获自随后将向其施用表达嵌合受体的免疫细胞的受试者。向从其获得细胞的同一受试者施用的免疫细胞被称为自体细胞,而从不是将向其施用细胞的受试者的受试者获得的免疫细胞被称为同种异体细胞。

[0401] 所需宿主细胞的类型可在通过将细胞与刺激性分子共同孵育而获得的细胞群体中扩增,例如,抗CD3和抗CD28抗体可用于扩增T细胞。

[0402] 为了构建表达本文所述的任何嵌合受体构建体的免疫细胞,可通过如本文所述的常规方法构建用于稳定或瞬时表达所述嵌合受体构建体的表达载体并将其引入免疫宿主细胞中。例如,可将编码嵌合受体的核酸克隆到合适的表达载体中,如与合适的启动子可操作连接的病毒载体。可在合适的条件下使核酸和载体与限制酶接触以在每个分子上产生互补末端,所述互补末端可彼此配对并用连接酶连接。或者,合成核酸接头可连接至编码嵌合

受体的核酸的末端。合成接头可含有对应于载体中的特定限制性位点的核酸序列。表达载体/质粒/病毒载体的选择将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型,但应适合在真核细胞中整合和复制。

[0403] 多种启动子可用于表达本文所述的嵌合受体,包括但不限于巨细胞病毒(CMV)中早期启动子、病毒LTR如劳斯肉瘤病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-1LTR、莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)LTR、骨髓增殖性肉瘤病毒(MPSV)LTR、脾病灶形成病毒(SFFV)LTR、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、单纯疱疹tk病毒启动子、有或无EF1-α内含子的延伸因子1-α(EF1-α)启动子。用于表达嵌合受体的另外启动子包括免疫细胞中的任何组成型活性启动子。或者,可使用任何可调控的启动子,以使得可在免疫细胞内调节其表达。

[0404] 此外,载体可含有例如以下中的一些或全部:选择性标记基因,如用于选择宿主细胞中的稳定或瞬时转染子的新霉素基因;用于高水平转录的来自人CMV立即早期基因的增强子/启动子序列;用于mRNA稳定性的来自SV40的转录终止和RNA加工信号;5'-和3'-非翻译区以获得来自诸如α-珠蛋白或β-珠蛋白的高表达基因的mRNA稳定性和翻译效率;用于正确游离复制的SV40多瘤复制起点和ColE1;内部核糖体结合位点(IRESes),多功能多克隆位点;用于有义和反义RNA的体外转录的T7和SP6 RNA启动子;在触发时导致携带载体的细胞死亡的"自杀开关"或"自杀基因"(例如,HSV胸苷激酶、诱导型半胱天冬酶如iCasp9),以及用于评估嵌合受体表达的报告基因。参见下文章节VI。合适的载体和用于产生含有转基因的载体的方法是本领域熟知的和可获得的。制备用于表达嵌合受体的载体的实例可在例如US2014/0106449中找到,其以引用的方式整体并入本文。

[0405] 在一些实施方案中,嵌合受体构建体或编码所述嵌合受体的核酸是DNA分子。在一些实施方案中,嵌合受体构建体或编码所述嵌合受体的核酸是DNA载体并且可电穿孔至免疫细胞(参见例如,Till等人Blood(2012)119(17):3940-3950)。在一些实施方案中,编码嵌合受体的核酸是RNA分子,其可被电穿孔至免疫细胞。

[0406] 包含编码本文所述的嵌合受体构建体的核酸序列的任何载体也在本公开的范围内。这种载体可通过合适的方法递送至宿主细胞如宿主免疫细胞中。将载体递送至免疫细胞的方法是本领域众所周知的并且可包括DNA、RNA或转座子电穿孔、转染试剂如脂质体或纳米颗粒以递送DNA、RNA或转座子;通过机械变形递送DNA、RNA或转座子或蛋白质(参见例如,Sharei等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA(2013)110(6):2082-2087);或病毒转导。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体通过病毒转导递送至宿主细胞。用于递送的示例性病毒方法包括但不限于重组逆转录病毒(参见例如,PCT公布号WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;WO 93/11230;WO 93/10218;WO 91/02805;美国专利号5,219,740和4,777,127;GB专利号2,200,651;和EP专利号0 345 242)、基于甲病毒的载体和腺相关病毒(AAV)载体(参见例如,PCT公布号WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655)。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体是逆转录病毒。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体是慢病毒。在一些实施方案中,用于表达嵌合受体的载体是腺相关病毒。

[0407] 在使用病毒载体将编码嵌合受体的载体引入宿主细胞的实例中,能够感染免疫细胞并携带载体的病毒颗粒可通过本领域中已知的任何方法产生并且可例如在PCT申请号WO 1991/002805A2、WO 1998/009271A1和美国专利6,194,191中找到。病毒颗粒从细胞培养物

上清液中收获并且可在使所述病毒颗粒与免疫细胞接触之前分离和/或纯化。

[0408] 制备表达本文所述的任何嵌合受体的宿主细胞的方法可包括离体活化和/或扩增免疫细胞。活化宿主细胞是指刺激宿主细胞进入活化状态，在所述状态中细胞可能能够执行效应子功能(例如，细胞毒性)。活化宿主细胞的方法将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型。扩增宿主细胞可涉及使得表达嵌合受体的细胞数量增加的任何方法，例如，允许宿主细胞增殖或刺激所述宿主细胞增殖。用于刺激宿主细胞扩增的方法将取决于用于表达嵌合受体的宿主细胞的类型，并且对本领域技术人员来说将是显而易见的。在一些实施方案中，表达本文所述的任何嵌合受体的宿主细胞在施用于受试者之前在体外活化和/或扩增。

[0409] 在一些实施方案中，靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂是抗体-药物缀合物(ADC)。对本领域普通技术人员显而易见的是，术语“抗体-药物缀合物”可与“免疫毒素”互换使用，并且是指包含与毒素或药物分子缀合的抗体(或其抗原结合片段)的融合分子。抗体与相应抗原的结合允许将毒素或药物分子递送至在其细胞表面(例如靶细胞)上呈递所述抗原的细胞，从而导致靶细胞死亡。

[0410] 在一些实施方案中，所述剂是抗体-药物缀合物。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物包含抗原结合片段和在靶细胞中诱导细胞毒性的毒素或药物。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物靶向2型抗原。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物靶向CD33或CD19。

[0411] 在一些实施方案中，抗体-药物缀合物的抗原结合片段具有与SEQ ID NO:12所提供的重链可变区相同的重链CDR和与SEQ ID NO:13所提供的轻链可变区相同的轻链CDR。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物的抗原结合片段具有由SEQ ID NO:12提供的重链可变区和由SEQ ID NO:13提供的相同轻链可变区。

[0412] 用于抗体-药物缀合物中的毒素或药物是本领域众所周知的，并且对本领域普通技术人员来说将是显而易见的。参见例如，Peters等人Biosci.Rep.(2015)35(4):e00225；Beck等人Nature Reviews Drug Discovery(2017)16:315-337;Marin-Acevedo等人J.Hematol.Oncol.(2018)11:8;Elgundi等人Advanced Drug Delivery Reviews(2017)122:2-19。

[0413] 在一些实施方案中，抗体-药物缀合物还可包含连接抗体和药物分子的接头(例如，肽接头，如可裂解接头)。抗体-药物缀合物的实例包括但不限于贝伦妥单抗维多汀、格列姆巴妥木单抗维多汀/CDX-011、达妥昔单抗马佛多汀/ABT-414、PSMA ADC、泊拉妥珠单抗维多汀/RG7596/DCDS4501A、地宁妥珠单抗马佛多汀/SGN-CD19A、AGS-16C3F、CDX-014、RG7841/DLYE5953A、RG7882/DMUC406A、RG7986/DCDS0780A、SGN-LIV1A、恩弗妥单抗维多汀/ASG-22ME、AG-15ME、AGS67E特立妥珠单抗维多汀/ABBV-399、ABBV-221、ABBV-085、GSK-2857916、替索妥单抗维多汀/HuMax-TF-ADC、Hu Max-Axl-ADC、皮那妥珠单抗维多汀/RG7593/DCDT2980S、利法妥珠单抗维多汀/RG7599/DNIB0600A、英度妥单抗维多汀/MLN-0264/TAK-264、万多妥珠单抗维多汀/RG7450/DSTP3086S、索非妥珠单抗维多汀/RG7458/DMUC5754A、RG7600/DMOT4039A、RG7336/DED N6526A、ME1547、PF-06263507/ADC 5T4、曲妥珠单抗恩他新/T-DM1、米妥昔单抗索他新/IMGN853、科鲁昔单抗拉夫坦辛/SAR3419、那妥昔单抗恩他新/IMGN529、英达西单抗拉夫坦辛/BT-062、阿奈妥单抗拉夫坦辛/BAY 94-9343、SAR408701、SAR428926、AMG 224、PCA062、HKT288、LY3076226、SAR566658、洛伏珠单抗默坦

辛/IMGN901、坎妥珠单抗默坦辛/SB-408075、坎妥珠单抗拉夫坦辛/IMG N242、拉普利妥昔单抗恩他新/IMGN289、IMGN388、比伐珠单抗默坦辛、AVE9633、BIIB015、MLN2704、AMG 172、AMG 595、LOP 628、伐达妥昔单抗他立林/SGN-CD33A、SGN-CD70A、SGN-CD19B、SGN-CD123A、SGN-CD352A、伐妥珠单抗特司林/SC16LD6.5、SC-002、SC-003、ADCT-301/HuMax-TAC-PBD、ADCT-402、MEDI 3726/ADC-401、IMGN779、IMGN632、吉妥珠单抗奥佐米星、依托珠单抗奥佐米星/CMC-544、PF-06647263、CMD-193、CMB-401、曲妥珠单抗duocarmazine/SYD985、BMS-936561/MDX-1203、沙西妥珠单抗戈维替康/IMMU-132、拉贝妥珠单抗戈维替康/IMMU-130、DS-8201a、U3-1402、米拉妥珠单抗阿霉素/IMMU-110/hLL1-DOX、BMS-986148、RC48-ADC/hertuzumab-vc-MMAE、PF-06647020、PF-06650808、PF-06664178/RN927C、鲁帕妥单抗阿多汀/BAY1129980、阿普卢妥单抗伊多汀/BAY1187982、ARX788、AGS62P1、XMT-1522、AbGn-107、MEDI4276、DSTA4637S/RG7861。在一个实例中，抗体-药物缀合物是吉妥珠单抗奥佐米星。

[0414] 在一些实施方案中，抗体-药物缀合物与细胞表面谱系特异性蛋白的表位的结合诱导抗体-药物缀合物的内化，并且药物(或毒素)可在细胞内释放。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物与细胞表面谱系特异性蛋白的表位的结合诱导毒素或药物的内化，其允许毒素或药物杀死表达谱系特异性蛋白的细胞(靶细胞)。在一些实施方案中，抗体-药物缀合物与细胞表面谱系特异性蛋白的表位的结合诱导毒素或药物的内化，其可调控表达谱系特异性蛋白的细胞(靶细胞)的活性。在本文所述的抗体-药物缀合物中使用的毒素或药物的类型不限于任何特定类型。

[0415] 本文所述的ADC可用作对已经历如本文所述的组合疗法的受试者的后续治疗。

[0416] 缺乏谱系特异性细胞表面抗原的造血细胞

[0417] 本公开还提供了造血细胞，如造血干细胞(HSC)和/或造血祖细胞(HPC)，它们已被遗传修饰为缺乏谱系特异性细胞表面抗原(例如，CD33，例如，使用本文描述的gRNA，例如，其中所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)或CCUCACUAG ACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)的核苷酸序列)。在一些实施方案中，细胞包含在具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)或CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处的遗传突变。在一些实施方案中，造血细胞是HSC、HPC或其组合，在本文中称为“HSPC”(“造血干细胞和/或祖细胞”)。在一些实施方案中，本文所述的细胞群体包含多个造血干细胞；在一些实施方案中，本文所述的细胞群体包含多个造血祖细胞；在一些实施方案中，本文所述的细胞群体包含多个造血干细胞和多个造血祖细胞。HSC能够产生骨髓和淋巴祖细胞，所述骨髓和淋巴祖细胞分别进一步产生骨髓细胞(例如，单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞、红细胞、血小板等)和淋巴细胞(例如，T细胞、B细胞，NK细胞)。HSC的特征在于细胞表面标志物CD34(例如$CD34^+$)的表达，其可用于鉴定和/或分离HSC，以及不存在与定型至细胞谱系相关的细胞表面标志物。因此，在一些实施方案中，HSC是$CD34^+$。

[0418] 在一些实施方案中，HSC获自受试者，如哺乳动物受试者。在一些实施方案中，哺乳动物受试者是非人灵长类动物、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、牛、猪、马或家养动物。在一些实施方案中，HSC获自人患者，如患有造血系统恶性肿瘤的人患者。在一些实施方案中，HSC从健康供体获得。在一些实施方案中，HSC获自随后将向其施用表达嵌合受体的免疫细胞的受试者。向从其获得细胞的同一受试者施用的HSC被称为自体细胞，而从不是将向其施用细胞的受试者的受试者获得的HSC被称为同种异体细胞。

[0419] HSC可使用本领域中已知的常规方法从任何合适的来源获得。在一些实施方案中，HSC从来自受试者的样品(如骨髓样品或血液样品)获得。可替代地或此外，HSC可从脐带获得。在一些实施方案中，HSC来自骨髓或外周血单核细胞(PBMC)。一般来说，骨髓细胞可从受试者的髂嵴、股骨、胫骨、脊柱、肋骨或其他骨髓腔获得。可从患者体内取出骨髓并通过本领域中已知的各种分离和洗涤程序进行分离。用于分离骨髓细胞的示例性程序包括以下步骤：a)提取骨髓样品；b)将骨髓悬浮液离心分离成三种级分并收集中间级分或血沉棕黄层；c)将来自步骤(b)的血沉棕黄层级分在分离液(通常为Ficoll(TM))中再离心一次，并收集含有骨髓细胞的中间级分；以及d)洗涤来自步骤(c)的收集级分以回收可重新输注的骨髓细胞。

[0420] HSC通常驻留于骨髓中，但可通过施用动员剂将其动员至循环血液中，以便从外周血中收获HSC。在一些实施方案中，向从其获得HSC的受试者施用动员剂，如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。使用动员剂动员后收集的HSC的数量通常大于未使用动员剂的情况下获得的细胞的数量。在一些实施方案中，HSC是外周血HSC。

[0421] 在一些实施方案中，从受试者获得样品，然后富集所需细胞类型(例如$CD34^+/CD33^-$细胞)。例如，可如本文所述从血液中分离PBMC和/或$CD34^+$造血细胞。细胞也可从其他细胞中分离，例如通过分离和/或用与所需细胞类型的细胞表面上的表位结合的抗体活化。可使用的另一种方法包括使用针对细胞表面标志物的抗体进行负选择，以选择性地富集特定细胞类型，而无需通过受体接合活化细胞。

[0422] 在对HSC进行遗传工程化以使其缺乏谱系特异性细胞表面抗原之前或之后，可扩增HSC群体。细胞可在包含扩增培养基的条件下培养，所述扩增培养基包含一种或多种细胞因子，如干细胞因子(SCF)、Flt-3配体(Flt3L)、促血小板生成素(TPO)、白细胞介素3(IL-3)或白细胞介素6(IL-6)。可使细胞扩增约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天或任何必要的范围。在一些实施方案中，在从受试者获得的样品分离所需细胞群体(例如，$CD34^+/CD33^-$)之后并且在遗传工程化之前扩增HSC。在一些实施方案中，在遗传工程化后扩增HSC，从而选择性地扩增已进行遗传修饰并且缺乏谱系特异性细胞表面抗原的细胞。在一些实施方案中，可选择并独立地扩增在遗传修饰后具有所需特征(例如，表型或基因型)的细胞(“克隆”)或数个细胞。

[0423] 在一些实施方案中，造血细胞被遗传工程化为缺乏(例如，不表达)细胞表面谱系特异性抗原(例如，CD33)。在一些实施方案中，造血细胞被遗传工程化为缺乏所述剂所靶向的相同细胞表面谱系特异性抗原。如本文所用，如果与同遗传工程化的造血细胞(例如，特征在于存在相同的细胞表面标志物，如CD34)相同类型的天然存在的造血细胞相比，造血细胞具有显著降低的细胞表面谱系特异性抗原表达，则认为造血细胞缺乏细胞表面谱系特异性抗原。在一些实施方案中，造血细胞没有可检测的细胞表面谱系特异性抗原表达(例如，不表达细胞表面谱系特异性抗原)。细胞表面谱系特异性抗原的表达水平可通过本领域中已知的任何方式进行评估。例如，细胞表面谱系特异性抗原的表达水平可通过用抗原特异性抗体检测抗原来评估(例如，流式细胞术方法、蛋白质印迹法)。

[0424] 在一些实施方案中，将遗传工程化的造血细胞上细胞表面谱系特异性抗原的表达与天然存在的造血细胞(例如，野生型对应物)上细胞表面谱系特异性抗原的表达进行比较。在一些实施方案中，遗传工程化导致细胞表面谱系特异性抗原的表达水平与天然存在

的造血细胞上的细胞表面谱系特异性抗原的表达相比降低至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。即，在一些实施方案中，与天然存在的造血细胞(例如，野生型对应物)相比，遗传工程化的造血细胞表达少于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的细胞表面谱系特异性抗原(例如CD33)。

[0425] 在一些实施方案中，遗传工程化导致野生型细胞表面谱系特异性抗原(例如CD33)的表达水平与天然存在的造血细胞上的野生型细胞表面谱系特异性抗原的表达水平相比降低至少约50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。即，在一些实施方案中，与天然存在的造血细胞(例如，野生型对应物)相比，遗传工程化的造血细胞表达少于约20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的野生型细胞表面谱系特异性抗原(例如CD33)。

[0426] 在一些实施方案中，造血细胞缺乏编码细胞表面谱系特异性抗原的整个内源性基因。在一些实施方案中，编码细胞表面谱系特异性抗原的整个内源性基因已缺失。在一些实施方案中，造血细胞包含编码细胞表面谱系特异性抗原的内源性基因的一部分。在一些实施方案中，造血细胞表达细胞表面谱系特异性抗原的一部分(例如截短的蛋白质)。在其他实施方案中，编码细胞表面谱系特异性抗原的内源性基因的一部分已缺失。在一些实施方案中，至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或更多的编码细胞表面谱系特异性抗原的基因已缺失。

[0427] 如本领域普通技术人员将理解，编码细胞表面谱系特异性抗原的核苷酸序列的一部分可缺失或可以是一个或多个非编码序列，以使得造血细胞缺乏抗原(例如，具有显著降低的抗原表达)。

[0428] 在一些实施方案中，细胞表面谱系特异性抗原是CD33。CD33的预测结构包括两个免疫球蛋白结构域，IgV结构域和IgC2结构域。在一些实施方案中，CD33的免疫球蛋白C结构域的一部分缺失。

[0429] 任何缺乏细胞表面谱系特异性抗原的遗传工程化的造血细胞如HSC可通过常规方法或通过本文所述的方法来制备。在一些实施方案中，使用基因组编辑进行遗传工程化。如本文所用，“基因组编辑”是指修饰生物体的基因组(包括任何蛋白质编码或非编码核苷酸序列)以敲除靶基因的表达的方法。一般而言，基因组编辑方法涉及使用能够例如在靶向核苷酸序列处裂解基因组的核酸的核酸内切酶。基因组中双链断裂的修复可通过引入突变进行修复，和/或可将外源性核酸插入靶位点。

[0430] 基因组编辑方法通常基于参与在靶核酸中产生双链断裂的核酸内切酶的类型进行分类。这些方法包括使用锌指核酸酶(ZFN)、基于转录活化因子样效应物的核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶和CRISPR/Cas系统。

[0431] 在本公开的一个方面，使用其中谱系特异性抗原被修饰的正常细胞进行用经修饰的正常细胞群替代肿瘤细胞。这种修饰可包括使用CRISPR-Cas9系统耗减或抑制任何谱系特异性抗原，其中成簇规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)-Cas9系统是工程化的、非天然存在的CRISPR-Cas9系统(图4)。

[0432] CRISPR-Cas系统已成功用于编辑各种生物体(包括但不限于细菌、人、果蝇、斑马鱼和植物)的基因组。参见例如，Jiang等人，Nature Biotechnology(2013)31(3):233;Qi等

人,Cell(2013)5:1173;DiCarlo等人,Nucleic Acids Res.(2013)7:4336;Hwang等人,Nat.Biotechnol(2013),3:227);Gratz等人,Genetics(2013)194:1029;Cong等人,Science(2013)6121:819;Mali等人,Science(2013)6121:823;Cho等人Nat.Biotechnol(2013)3:230;以及Jiang等人,Nucleic Acids Research(2013)41(20):e188。

[0433] 本公开利用与谱系特异性抗原多核苷酸中的靶序列杂交的CRISPR/Cas9系统,其中所述CRISPR/Cas9系统包含Cas9核酸酶和工程化的crRNA/tracrRNA(或单向导RNA)。CRISPR/Cas9复合物可结合至谱系特异性抗原多核苷酸并允许裂解抗原多核苷酸,从而修饰所述多核苷酸。

[0434] 本公开的CRISPR/Cas系统可结合至和/或裂解细胞表面谱系特异性抗原内的编码区或非编码区中、在基因内或在基因附近的目标区域,例如,前导序列、尾随序列或内含子,或在编码区上游或下游的非转录区内。本公开中使用的向导RNA(gRNA)可被设计为使得gRNA指导Cas9-gRNA复合物与基因组中的预定裂解位点(靶位点)的结合。可选择裂解位点以释放含有未知序列的区域或含有SNP、核苷酸插入、核苷酸缺失、重排等的区域的片段。

[0435] 基因区的裂解可包括通过Cas酶在靶序列的位置裂解一条或两条链。在一个实施方案中,这种裂解可导致靶基因的转录减少。在另一个实施方案中,裂解还可包括通过与外源模板多核苷酸的同源重组来修复裂解的靶多核苷酸,其中修复导致靶多核苷酸的一个或多个核苷酸的插入、缺失或取代。

[0436] 术语“gRNA”、“向导RNA”和“CRISPR向导序列”可在全文中互换使用,并且是指包含确定CRISPR/Cas系统的Cas DNA结合蛋白的特异性的序列的核酸。gRNA与宿主细胞的基因组中的靶核酸序列(互补、部分或完全)杂交。与靶核酸杂交的gRNA或其部分的长度可介于15-25个核苷酸、18-22个核苷酸或19-21个核苷酸之间。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列的长度是15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸。在一些实施方案中,与靶核酸杂交的gRNA序列的长度介于10-30个或15-25个核苷酸之间。

[0437] 除了结合至靶核酸的序列,在一些实施方案中,gRNA还包含支架序列。编码与靶核酸互补的序列和支架序列的gRNA的表达具有与靶核酸结合(杂交)和将核酸内切酶募集至靶核酸的双重功能,这可产生位点特异性CRISPR活性。在一些实施方案中,这种嵌合gRNA可被称为单向导RNA(sgRNA)。

[0438] 在一些实施方案中,对gRNA进行修饰,例如进行化学修饰。经修饰的gRNA包含至少一个核苷酸,所述核苷酸具有对以下中的至少一者的化学结构的修饰:核碱基、糖和磷酸二酯键联或主链部分(例如,核苷酸磷酸)。示例性gRNA修饰对本领域技术人员来说将是显而易见的,并且可在例如Lee等人,Synthetically modified guide RNA and donor DNA are a versatile platform for CRISPR-Cas9 engineering.Elife.2017年5月2日;6.pii:e25312.doi:10.7554/eLife.25312和美国公布2016/0289675中找到。另外合适的修饰包括硫代磷酸酯主链修饰、2'-O-Me-修饰的糖、2'F-修饰的糖、用双环核苷酸-cEt替代核糖、3'硫代PACE(MSP)或其任何组合。合适的gRNA修饰在例如Rahdar等人PNAS December 22,2015 112(51)E7110-E7117和Hendel等人,Nat Biotechnol.2015Sep;33(9):985-989中进行了描述,所述文献各自以引用的方式整体并入本文。

[0439] 在一些实施方案中,对本文所述的gRNA进行化学修饰。例如,gRNA可包含一个或多个2'-O修饰的核苷酸,例如2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中,gRNA在gRNA的5'端包含

2'-O修饰的核苷酸，例如2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3'端包含2'-O修饰的核苷酸，例如2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端和3'端均包含2'-O-修饰的核苷酸，例如2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸和从gRNA的5'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的，例如2'-O-甲基修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3'端处的核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸和从gRNA的3'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的，例如2'-O-甲基修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸、从gRNA的5'端的第三个核苷酸、gRNA的3'端处的核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸和从gRNA的3'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的，例如2'-O-甲基修饰的。在一些实施方案中，gRNA在从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸处是2'-O-修饰的，例如2'-O-甲基修饰的。在一些实施方案中，在gRNA的3'端处的核苷酸未进行化学修饰。在一些实施方案中，在gRNA的3'端处的核苷酸不具有化学修饰的糖。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸、从gRNA的5'端的第三个核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸处是2'-O-修饰的，例如2'-O-甲基修饰的。在一些实施方案中，2'-O-甲基核苷酸包含与相邻核苷酸的磷酸酯键联。在一些实施方案中，2'-O-甲基核苷酸包含与相邻核苷酸的硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，2'-O-甲基核苷酸包含与相邻核苷酸的硫代PACE键联。

[0440] 在一些实施方案中，gRNA可包含一个或多个2'-O-修饰的和3'磷修饰的核苷酸，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端包含2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3'端包含2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端和3'端包含2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯核苷酸。在一些实施方案中，gRNA包含其中一个或多个非桥接氧原子已被硫原子替代的主链。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸和从gRNA的5'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3'端处的核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸和从gRNA的3'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸、从gRNA的5'端的第三个核苷酸、gRNA的3'端处的核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸和从gRNA的3'端的第三个核苷酸处是2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰的。在一些实施方案中，gRNA在从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸处是2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰的。在一些实施方案中，在gRNA的3'端处的核苷酸未进行化学修饰。在一些实施方案中，在gRNA的3'端处的核苷酸不具有化学修饰的糖。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸、从gRNA的5'端的第三个核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸处是2'-O-修饰的和3'磷修饰的，例如2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰的。

[0441] 在一些实施方案中，gRNA可包含一个或多个2'-O-修饰的和3'-磷修饰的，例如2'-

0-甲基3’硫代PACE核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5’端包含2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3’端包含2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE核苷酸。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5’端和3’端包含2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE核苷酸。在一些实施方案中，gRNA包含主链，其中一个或多个非桥接氧原子已被硫原子替代，并且一个或多个非桥接氧原子已被乙酸酯基团替代。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸和从gRNA的5’端的第三个核苷酸处是2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA的3’端的第三个核苷酸处是2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE修饰的。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸、从gRNA的5’端的第三个核苷酸、gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA的3’端的第三个核苷酸处是2’-O-修饰的和3’硫代PACE修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE修饰的。在一些实施方案中，gRNA在从gRNA的3’端的第二个核苷酸、从gRNA的3’端的第三个核苷酸和从gRNA的3’端的第四个核苷酸处是2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE修饰的。在一些实施方案中，在gRNA的3’端处的核苷酸未进行化学修饰。在一些实施方案中，在gRNA的3’端处的核苷酸不具有化学修饰的糖。在一些实施方案中，gRNA在gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸、从gRNA的5’端的第三个核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸、从gRNA的3’端的第三个核苷酸和从gRNA的3’端的第四个核苷酸处是2’-O-修饰的和3’磷修饰的，例如2’-O-甲基3’硫代PACE修饰的。

[0442] 在一些实施方案中，gRNA包含经化学修饰的主链。在一些实施方案中，gRNA包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，一个或多个非桥接氧原子已被硫原子替代。在一些实施方案中，gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸和从gRNA的5’端的第三个核苷酸各自包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA的3’端的第三个核苷酸各自包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸、从gRNA的5’端的第三个核苷酸、gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA的3’端的第三个核苷酸各自包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，从gRNA的3’端的第二个核苷酸、从gRNA的3’端的第三个核苷酸和从gRNA的3’端的第四个核苷酸各自包含硫代磷酸酯键联。在一些实施方案中，gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸、从gRNA的5’端的第三个核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸、从gRNA的3’端的第三个核苷酸和从gRNA的3’端的第四个核苷酸各自包含硫代磷酸酯键联。

[0443] 在一些实施方案中，gRNA包含硫代PACE键联。在一些实施方案中，gRNA包含主链，其中一个或多个非桥接氧原子已被硫原子替代，并且一个或多个非桥接氧原子已被乙酸酯基团替代。在一些实施方案中，gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸和从gRNA的5’端的第三个核苷酸各自包含硫代PACE键联。在一些实施方案中，gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA的3’端的第三个核苷酸各自包含硫代PACE键联。在一些实施方案中，gRNA的5’端处的核苷酸、从gRNA的5’端的第二个核苷酸、从gRNA的5’端的第三个核苷酸、gRNA的3’端处的核苷酸、从gRNA的3’端的第二个核苷酸和从gRNA

的3'端的第三个核苷酸各自包含硫代PACE键联。在一些实施方案中,从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸各自包含硫代PACE键联。在一些实施方案中,gRNA的5'端处的核苷酸、从gRNA的5'端的第二个核苷酸、从gRNA的5'端的第三个核苷酸、从gRNA的3'端的第二个核苷酸、从gRNA的3'端的第三个核苷酸和从gRNA的3'端的第四个核苷酸各自包含硫代PACE键联。

[0444] gRNA的化学修饰描述于,例如,Hendel,A.等人,Nature Biotech.,2015,第33卷,第9期中,所述文献以引用的方式整体并入本文。

[0445] 如本文所用,"支架序列"(也称为tracrRNA)是指将Cas核酸内切酶募集至与互补gRNA序列结合(杂交)的靶核酸的核酸序列。包含至少一个茎环结构并募集核酸内切酶的任何支架序列均可用于本文所述的遗传元件和载体中。示例性支架序列对本领域技术人员来说将是显而易见的,并且可在例如Jinek等人Science(2012)337(6096):816-821;Ran等人Nature Protocols(2013)8:2281-2308;PCT申请号WO2014/093694和PCT申请号WO2013/176772中找到。

[0446] 在一些实施方案中,gRNA序列不包含支架序列,并且支架序列被表达为单独的转录物。在此类实施方案中,gRNA序列还包含与支架序列的一部分互补并起到结合(杂交)支架序列并将核酸内切酶募集至靶核酸的作用的另外序列。

[0447] 在一些实施方案中,gRNA序列与靶核酸至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或至少100%互补(还参见美国专利8,697,359,其关于gRNA序列与靶多核苷酸序列的互补性的教义以引用的方式并入)。已经证明,CRISPR向导序列与靶核酸的3'端附近的靶核酸之间的错配可消除核酸酶裂解活性(Upadhyay等人Genes Genome Genetics(2013)3(12):2233-2238)。在一些实施方案中,gRNA序列与靶核酸的3'端(例如,靶核酸的3'端的最后5、6、7、8、9或10个核苷酸)至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或至少100%互补。

[0448] 靶核酸在3'侧由原型间隔区相邻基序(PAM)侧接,所述原型间隔区相邻基序可与核酸内切酶相互作用并且进一步参与将核酸内切酶活性靶向至靶核酸。一般认为靶核酸侧翼的PAM序列取决于核酸内切酶和核酸内切酶所来自的来源。例如,对于源自酿脓链球菌的Cas9核酸内切酶,PAM序列是NGG。对于源自金黄色葡萄球菌的Cas9核酸内切酶,PAM序列是NNGRRT。对于源自脑膜炎奈瑟氏菌的Cas9核酸内切酶,PAM序列是NNNNGATT。对于源自嗜热链球菌的Cas9核酸内切酶,PAM序列是NNAGAA。对于源自齿垢密螺旋体的Cas9核酸内切酶,PAM序列是NAAAAC。对于Cpf1核酸酶,PAM序列是TTN。

[0449] 在一些实施方案中,对细胞进行遗传工程化还包括将一种或多种(例如,1、2、3或更多种)Cas核酸内切酶引入细胞中。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和编码gRNA的核酸被提供在同一核酸(例如,载体)上。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和编码gRNA的核酸被提供在不同的核酸(例如,不同的载体)上。可替代地或另外,Cas核酸内切酶可以蛋白质形式提供或引入到细胞中。

[0450] 在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是Cas9酶或其变体。在一些实施方案中,Cas9核酸内切酶源自酿脓链球菌(SpCas9)、金黄色葡萄球菌(SaCas9)、脑膜炎奈瑟氏菌(NmCas9)、嗜热链球菌、空肠弯曲杆菌(CjCas9)或齿垢密螺旋体。在一些实施方案中,编码

Cas核酸内切酶的核苷酸序列可进行密码子优化以在宿主细胞中表达。在一些实施方案中，核酸内切酶是Cas9同源物或直向同源物。在一些实施方案中，对编码Cas9核酸内切酶的核苷酸序列进行进一步修饰以改变蛋白质的活性。在一些实施方案中，已对Cas9核酸内切酶进行修饰以使核酸内切酶的催化残基之一失活，称为“切口酶”或“Cas9n”。Cas9切口酶核酸内切酶裂解靶核酸的一条DNA链。参见例如，Dabrowska等人Frontiers in Neuroscience (2018)12(75)。已经表明，所述酶的RuvC和HNH催化结构域中的一个或多个突变可提高Cas9效率。参见例如，Sarai等人Currently Pharma.Biotechnol.(2017)18(13)。在一些实施方案中，Cas9核酸内切酶是催化失活的Cas9。例如，dCas9包含催化活性残基(D10和H840)的突变，并且不具有核酸酶活性。可替代地或此外，Cas9核酸内切酶可融合至另一种蛋白质或其部分。在一些实施方案中，dCas9与阻遏物结构域，如KRAB结构域融合。在一些实施方案中，此类dCas9融合蛋白与本文所述的构建体一起用于多重基因阻抑(例如，CRISPR干扰(CRISPRi))。在一些实施方案中，dCas9与活化物结构域，如VP64或VPR融合。在一些实施方案中，此类dCas9融合蛋白与本文所述的构建体一起用于基因活化(例如，CRISPR活化(CRISPRa))。在一些实施方案中，dCas9与表观遗传调节结构域如组蛋白去甲基化酶结构域或组蛋白乙酰转移酶结构域融合。在一些实施方案中，dCas9与LSD1或p300或其一部分融合。在一些实施方案中，dCas9融合用于基于CRISPR的表观遗传调节。在一些实施方案中，dCas9或Cas9与Fok1核酸酶结构域融合。在一些实施方案中，与Fok1核酸酶结构域融合的Cas9或dCas9用于基因组编辑。在一些实施方案中，Cas9或dCas9与荧光蛋白(例如，GFP、RFP、mCherry等)融合。在一些实施方案中，与荧光蛋白融合的Cas9/dCas9蛋白用于基因组基因座的标记和/或可视化或者鉴定表达Cas核酸内切酶的细胞。

[0451] 在一些实施方案中，对Cas核酸内切酶进行修饰以增强酶的特异性(例如，减少脱靶效应，保持稳健中靶裂解)。在一些实施方案中，Cas核酸内切酶是特异性增强的Cas9变体(例如，eSPCas9)。参见例如，Slaymaker等人Science(2016)351(6268):84-88。在一些实施方案中，Cas核酸内切酶是高保真Cas9变体(例如，SpCas9-HF1)。参见例如，Kleinstiver等人Nature(2016)529:490-495。

[0452] Cas酶(如Cas核酸内切酶)是本领域已知的并且可从各种来源获得和/或进行工程化/修饰以调节酶的一种或多种活性或特异性。在一些实施方案中，已对Cas酶进行工程化/修饰以识别一个或多个PAM序列。在一些实施方案中，已对Cas酶进行工程化/修饰以识别一个或多个PAM序列，所述一个或多个PAM序列不同于在没有工程化/修饰的情况下Cas酶所识别的PAM序列。在一些实施方案中，已对Cas酶进行工程化/修饰以降低酶的脱靶活性。

[0453] 在一些实施方案中，对编码Cas核酸内切酶的核苷酸序列进行进一步修饰以改变核酸内切酶活性的特异性(例如，减少脱靶裂解、降低细胞中的Cas核酸内切酶活性或寿命、增加同源定向重组和减少非同源末端连接)。参见例如，Komor等人Cell(2017)168:20-36。在一些实施方案中，对编码Cas核酸内切酶的核苷酸序列进行修饰以改变核酸内切酶的PAM识别。例如，Cas核酸内切酶SpCas9识别PAM序列NGG，而包含核酸内切酶的一种或多种修饰的SpCas9的松弛变体(例如，VQR SpCas9、EQR SpCas9、VRER SpCas9)可识别PAM序列NGA、NGAG、NGCG。如果与未修饰的Cas核酸内切酶相比，经修饰的Cas核酸内切酶识别更多潜在PAM序列，则所述Cas核酸内切酶的PAM识别被认为是“松弛的”。例如，Cas核酸内切酶SaCas9识别PAM序列NNGRRT，而包含核酸内切酶的一种或多种修饰的SaCas9的松弛变体(例如，KKH

SaCas9)可识别PAM序列NNNRRT。在一个实例中,Cas核酸内切酶FnCas9识别PAM序列NNG,而包含核酸内切酶的一种或多种修饰的FnCas9的松弛变体(例如,RHA FnCas9)可识别PAM序列YG。在一个实例中,Cas核酸内切酶是包含取代突变S542R和K607R的Cpf1核酸内切酶并识别PAM序列TYCV。在一个实例中,Cas核酸内切酶是包含取代突变S542R、K607R和N552R的Cpf1核酸内切酶并识别PAM序列TATV。参见例如,Gao等人Nat.Biotechnol.(2017)35(8):789-792。

[0454] 在一些实施方案中,使用多于一种(例如,2、3或更多种)Cas核酸内切酶。在一些实施方案中,所述Cas核酸内切酶中的至少一种是Cas9酶。在一些实施方案中,所述Cas核酸内切酶中的至少一种是Cpf1酶。在一些实施方案中,所述Cas9核酸内切酶中的至少一种源自酿脓链球菌酶。在一些实施方案中,所述Cas9核酸内切酶中的至少一种源自酿脓链球菌,并且所述Cas9核酸内切酶中的至少一种源自非酿脓链球菌的生物体。在一些实施方案中,所述核酸内切酶是碱基编辑器。碱基编辑器核酸内切酶通常包含与功能结构域融合的催化失活的Cas核酸内切酶。参见例如,Eid等人Biochem.J.(2018)475(11):1955-1964;Rees等人Nature Reviews Genetics(2018)19:770-788。在一些实施方案中,催化失活的Cas核酸内切酶是dCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与一个或多个尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)结构域融合的dCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与腺嘌呤碱基编辑器(ABE),例如从RNA腺嘌呤脱氨酶TadA进化的ABE融合的dCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与胞苷脱氨酶(例如,APOBEC脱氨酶、pmCDA1、活化诱导的胞苷脱氨酶(AID))融合的dCas9。在一些实施方案中,催化失活的Cas核酸内切酶具有降低的活性并且是nCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与一个或多个尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)结构域融合的nCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与腺嘌呤碱基编辑器(ABE),例如从RNA腺嘌呤脱氨酶TadA进化的ABE融合的nCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与胞苷脱氨酶(例如,APOBEC脱氨酶、pmCDA1、活化诱导的胞苷脱氨酶(AID))融合的nCas9。

[0455] 碱基编辑器的实例包括但不限于BE1、BE2、BE3、HF-BE3、BE4、BE4max、BE4-Gam、YE1-BE3、EE-BE3、YE2-BE3、YEE-CE3、VQR-BE3、VRER-BE3、SaBE3、SaBE4、SaBE4-Gam、Sa(KKH)-BE3、靶-AID、靶-AID-NG、xBE3、eA3A-BE3、BE-PLUS、TAM、CRISPR-X、ABE7.9、ABE7.10、ABE7.10*、xABE、ABESa、VQR-ABE、VRER-ABE、Sa(KKH)-ABE以及CRISPR-SKIP。碱基编辑器的另外实例可例如在美国公布号2018/0312825A1、美国公布号2018/0312828A1和PCT公布号WO 2018/165629A1中找到,所述公布以引用的方式整体并入本文。

[0456] 在一些实施方案中,已对碱基编辑器进行进一步修饰以抑制靶位点处的碱基切除修复并诱导细胞错配修复。本文描述的任何Cas核酸内切酶可与Gam结构域(噬菌体Mu蛋白)融合以保护Cas核酸内切酶免于降解和核酸外切酶活性。参见例如,Eid等人Biochem.J.(2018)475(11):1955-1964。

[0457] 在一些实施方案中,Cas核酸内切酶属于Cas核酸内切酶的2类V型。2类V型Cas核酸内切酶可进一步分类为V-A型、V-B型、V-C型和V-U型。参见例如,Stella等人Nature Structural&Molecular Biology(2017)。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是V-A型Cas核酸内切酶,如Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是V-B型Cas核酸内切酶,如C2c1核酸内切酶。参见例如,Shmakov等人Mol Cell(2015)60:385-397。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是Mad7。

[0458] 可替代地或另外,Cas核酸内切酶是Cpf1核酸酶或其变体。本领域技术人员将理解,Cas核酸内切酶Cpf1核酸酶也可称为Cas12a。参见例如,Strohkendl等人Mol.Cell(2018)71:1-9。在一些实施方案中,宿主细胞表达源自普氏菌属或弗朗西斯氏菌属、氨基酸球菌属(AsCpf1)、毛螺菌科细菌(LpCpf1)或直肠真杆菌的Cpf1核酸酶。在一些实施方案中,编码Cpf1核酸酶的核苷酸序列可进行密码子优化以在宿主细胞中表达。在一些实施方案中,对编码Cpf1核酸内切酶的核苷酸序列进行进一步修饰以改变蛋白质的活性。

[0459] Cpf1(Cas12a)的催化失活变体可称为dCas12a。如本文所述,Cpf1的催化失活变体可融合至功能结构域以形成碱基编辑器。参见例如,Rees等人Nature Reviews Genetics(2018)19:770-788。在一些实施方案中,催化失活的Cas核酸内切酶是dCas9。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与一个或多个尿嘧啶糖基化酶抑制剂(UGI)结构域融合的dCas12a。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与腺嘌呤碱基编辑器(ABE),例如从RNA腺嘌呤脱氨酶TadA进化的ABE融合的dCas12a。在一些实施方案中,核酸内切酶包含与胞苷脱氨酶(例如,APOBEC脱氨酶、pmCDA1、活化诱导的胞苷脱氨酶(AID))融合的dCas12a。

[0460] 可替代地或此外,Cas核酸内切酶可以是Cas14核酸内切酶或其变体。与Cas9核酸内切酶相比,Cas14核酸内切酶源自古细菌,并且尺寸往往更小(例如,400-700个氨基酸)。此外,Cas14核酸内切酶不需要PAM序列。参见例如,Harrington等人Science(2018)。

[0461] 可调节本文所述的任何Cas核酸内切酶以在所需时间调控Cas核酸内切酶的表达水平和/或活性。例如,在细胞周期的一个或多个特定阶段增加Cas核酸内切酶的表达水平和/或活性可能是有利的。已经证明,在细胞周期的G1期,同源定向修复的水平降低,因此在S期、G2期和/或M期期间增加Cas核酸内切酶的表达水平和/或活性可增加Cas核酸内切酶编辑后的同源定向修复。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶的表达水平和/或活性在细胞周期的S期、G2期和/或M期期间增加。在一个实例中,Cas核酸内切酶融合至人双能蛋白(Geminin)的N末端区域。参见例如,Gutschner等人Cell Rep.(2016)14(6):1555-1566。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶的表达水平和/或活性在G1期期间降低。在一个实例中,对Cas核酸内切酶进行修饰以使其在G1期期间具有降低的活性。参见例如,Lomova等人Stem Cells(2018)。

[0462] 可替代地或此外,本文所述的任何Cas核酸内切酶可与表观遗传修饰剂(例如染色质修饰酶,例如DNA甲基化酶、组蛋白脱乙酰酶)融合。参见例如,Kungulovski等人Trends Genet.(2016)32(2):101-113。与表观遗传修饰剂融合的Cas核酸内切酶可被称为"表观效应物"并且可允许暂时和/或瞬时核酸内切酶活性。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶是与染色质修饰酶融合的dCas9。

[0463] 在一些实施方案中,本公开提供了使用CRISPR/Cas9系统抑制造血细胞中的细胞表面谱系特异性抗原的组合物和方法,其中向导RNA序列与编码所述细胞表面谱系特异性抗原的核苷酸序列杂交。在一些实施方案中,细胞表面谱系特异性抗原是CD33,并且gRNA与编码CD33的核苷酸序列的一部分杂交(图5)。表4中提供了靶向CD33的gRNA的实例,但是可开发与CD33杂交的另外gRNA并且可在本文所述的方法中使用。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO:50或SEQ ID NO:51。

[0464] 表4提供了与CD33的一部分杂交或预计与CD33的一部分杂交的示例性向导RNA序列。虽然提供了示例性向导RNA序列的RNA和DNA序列,但熟练的技术人员将理解,除非另有

说明，否则本申请中列出的多核苷酸序列将在代表性DNA序列中列举“T”，但是当序列代表RNA时，“T”将被取代为“U”。

[0465] 表4：靶向CD33的向导RNA序列(提供DNA和RNA序列)

[0466]

名称	向导序列	向导位置	得分
hCD33-IgC1 在本文中称 为“Crispr 1”	ACCTGTCAGGTGAAGTT CGC TGG (SEQ ID NO: 11) ACCUGUCAGGUGAAGU UCGC UGG (SEQ ID NO: 60)	Chr19:+51729 270	87
hCD33-IgC3 在本文中称 为“Crispr 3”	TGGCCGGGTTCTAGAGT GCC AGG (SEQ ID NO: 28) UGGCCGGGUUCUAGAG UGCC AGG (SEQ ID NO: 61)	Chr19:-51729 087	82
hCD33-IgC5 在本文中称 为“Crispr 5”	GGCCGGGTTCTAGAGTG CCA GGG (SEQ ID NO: 29) GGCCGGGUUCUAGAGU GCCA GGG (SEQ ID NO: 62)	Chr19:-51729 086	81
hCD33 gRNA	CACCGAGGAGTGAGTAG TCC TGG (SEQ ID NO: 30)		

[0467]

	CACCGAGGAGUGAGUA GUCC UGG (SEQ ID NO: 63)		
hCD33 gRNA	TCCAGCGAACTTCACCT GAC AGG (SEQ ID NO: 31) UCCAGCGAACUUCACCU GAC AGG (SEQ ID NO: 64)		
hCD33 gRNA	CCTCACTAGACTTGACC CAC AGG (SEQ ID NO: 48) CCUCACUAGACUUGACC CAC AGG (SEQ ID NO: 65)	Chr19，(+)链，开始 51225794，结束 51225813	
hCD33 gRNA	ATCCCTGGCACTCTAGA ACC CGG (SEQ ID NO: 49) AUCCCUGGCACUCUAG AACC CGG (SEQ ID NO: 66)	Chr19，(+)链，开始 51225829，结束 51225848	
hCD33 gRNA	ATCCCTGGCACTCTAGA ACC (SEQ ID NO: 50) AUCCCUGGCACUCUAG AACC (SEQ ID NO: 67)		
hCD33 gRNA	GGCCGGGTTCTAGAGTG CCA (SEQ ID NO: 51) GGCCGGGUUCUAGAGU GCCA (SEQ ID NO: 68)		
hCD33 gRNA	CCTCACTAGACTTGACC CAC (SEQ ID NO:58) CCUCACUAGACUUGACC CAC (SEQ ID NO: 70)		

[0468] 在一些情况下，用于本公开的gRNA可包含与以上表4中的示例性向导RNA序列中的任一个(例如SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:70)至少90％(例如，至少93％、95％、96％、97％、98％或99％)同一的间隔区序列。

[0469] 两种核酸的“同一性百分比”是使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990，如Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993中修改的算法确定的。这种算法被并入Altschul等人J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和

XBLAST程序(2.0版)中。BLAST核苷酸搜索可用NBLAST程序(得分＝100、字长-12)来进行,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。在两个序列之间存在空位的情况下,可利用如Altschul等人,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所描述的空位BLAST。当利用BLAST和空位BLAST程序时,可使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0470] 在一些实施方案中,可能需要将HSC(特别是同种异体HSC)进一步遗传工程化,以减少移植物抗宿主效应。例如,用于复发性AML的标准疗法是造血干细胞移植(HSCT)。然而,成功HSCT的至少一种限制因素是移植物抗宿主病(GVHD),细胞表面分子CD45的表达牵涉于其中。参见例如,Van Besie,Hematology Am.Soc.Hematol Educ Program(2013)56;Mawad Curr.Hematol.Malig.Rep.(2013)8(2):132。CD45RA和CD45RO是CD45的同种型(见于除红细胞外的所有造血细胞上)。在T淋巴细胞中,CD45RA在初始细胞上表达,而CD45RO在记忆细胞上表达。CD45RA T细胞对于HSCT后针对受体特异性抗原的反应性具有高潜力,从而导致GVHD。因此,仍然需要还将降低移植排斥或GVHD的可能性的有效且安全的AML治疗。CD45是1型谱系抗原,因为携带CD45的细胞是存活所需的,但可使用CRISPR使所述抗原从干细胞中缺失。

[0471] 考虑到由于HSCT后GvHD的发展而引起的并发症,本公开还提供了用于靶向CD45RA的组合物和方法。此类组合物和方法旨在预防和/或降低GvHD的发生率或程度。

[0472] 因此,在GVHD的情况下,患者的治疗可包括以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的T细胞,其中所述T细胞包含编码靶向CD45RA谱系特异性抗原的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;以及(2)向所述患者输注造血干细胞,其中所述造血细胞具有降低的CD45RA谱系特异性抗原表达。

[0473] 此外,本公开提供了用于组合抑制CD33和CD45RA谱系特异性抗原的组合物和方法。这种治疗方案可包括以下步骤:(1)向患者施用治疗有效量的T细胞,其中所述T细胞包含编码靶向CD33和CD45RA谱系特异性抗原两者的嵌合抗原受体(CAR)的核酸序列;以及(2)向所述患者输注或重新输注自体或同种异体的造血干细胞,其中所述造血细胞具有降低的CD33和CD45RA谱系特异性抗原表达。

[0474] 在一些实施方案中,还使用CRISPR/Cas9系统在造血细胞中缺失或抑制细胞表面谱系特异性抗原CD45RA。在一些实施方案中,gRNA序列与编码CD45RA的核苷酸序列的一部分杂交(图6)。表5中提供了靶向CD45RA的gRNA的实例,尽管可开发与CD45RA杂交的另外gRNA并且可在本文所述的方法中使用。

[0475] 表5提供了与人CD45的外显子4或外显子5杂交或预计与其杂交的示例性向导RNA序列。

[0476] 表5:靶向CD45的向导RNA序列

[0477]	hCD45靶标外显子4	向导RNA CCAAAGAGTCCGGGGATACT TGG (SEQ ID NO: 9) CCAAGTATCCCCGGACTCTT TGG (SEQ ID NO: 32) AGCATTATCCAAAGAGTCCG GGG (SEQ ID NO: 33) ACTTGGGTGGAAGTATTGTC TGG (SEQ ID NO: 34)
	外显子5	GTTGAGTTTTGCATTGGCGG CGG (SEQ ID NO: 10) GTCTGCGAGTCTGCGTGCGT GGG (SEQ ID NO: 35) CGTCTGCGAGTCTGCGTGCG TGG (SEQ ID NO: 36)
[0478]		GCGAGTCTGCGTGCGTGGGA AGG (SEQ ID NO: 37)

[0479] 本文还提供了产生缺乏细胞表面谱系特异性抗原的细胞的方法,所述方法包括提供细胞并将CRISPR Cas系统的组分引入所述细胞中以用于基因组编辑。在一些实施方案中,将包含与编码谱系特异性细胞表面抗原的核苷酸序列的一部分杂交或预计与其杂交的CRISPR-Cas向导RNA(gRNA)的核酸引入所述细胞中。在一些实施方案中,gRNA在载体上引入所述细胞中。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶引入所述细胞中。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶作为编码Cas核酸内切酶的核酸引入所述细胞中。在一些实施方案中,将gRNA和编码Cas核酸内切酶的核苷酸序列在同一核酸(例如,同一载体)上引入所述细胞中。在一些实施方案中,将Cas核酸内切酶以蛋白质的形式引入所述细胞中。在一些实施方案中,Cas核酸内切酶和gRNA在体外预先形成并且作为复合物引入所述细胞中。

[0480] 本公开进一步提供了工程化的、非天然存在的载体和载体系统,所述载体和载体系统可编码CRISPR/Cas9复合物的一种或多种组分,其中所述载体包含编码(i)与谱系特异性抗原序列杂交的(CRISPR)-Cas系统向导RNA和(ii)Cas9核酸内切酶的多核苷酸。

[0481] 本公开的载体可使用哺乳动物表达载体驱动一种或多种序列在哺乳动物细胞中的表达。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,Nature(1987)329:840)和pMT2PC(Kaufman等人,EMBO J.(1987)6:187)。当用于哺乳动物细胞中时,表达载体的控制功能通常由一种或多种调控元件提供。例如,通常使用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒、猿猴病毒40以及本文公开和本领域已知的其它启动子。对于用于原核和真核细胞的其它合适的表达系统,参见例如,Sambrook等人,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL.第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989的第16和17章。

[0482] 本公开的载体能够指导核酸优先在特定细胞类型中表达(例如,使用组织特异性调控元件来表达核酸)。这种调控元件包括可以是组织特异性或细胞特异性的启动子。当适用于启动子时术语“组织特异性”是指在不同类型的组织中相对不存在相同的目标核苷酸

序列的表达的情况下,能够指导目标核苷酸序列针对特定组织类型(例如,种子)的选择性表达的启动子。如用于启动子的术语“细胞类型特异性”是指在相同组织中的不同细胞类型中相对不存在相同的目标核苷酸序列的表达的情况下,能够指导目标核苷酸序列在特定细胞类型中的选择性表达的启动子。当用于启动子时“细胞类型特异性”也意指能够促进目标核苷酸序列在单个组织中的区域内的选择性表达的启动子。启动子的细胞类型特异性可使用本领域众所周知的方法,例如免疫组织化学染色来评估。

[0483] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可用于将编码CRISPR/Cas9的核酸引入哺乳动物细胞或靶组织中。此类方法可用于向培养物中或宿主生物体中的细胞施用编码CRISPR-Cas系统的组分的核酸。

[0484] 非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA(例如本文所述的载体的转录物)、裸核酸以及与递送媒介物复合的核酸。在一个实施方案中,所使用的非病毒载体递送系统是预先形成的核糖核蛋白复合物(例如,包含与靶向gRNA复合的Cas9蛋白的复合物)。然后可通过电穿孔、基因枪轰击或其他物理递送方法将预先形成的核糖核蛋白复合物引入细胞中。在一个实施方案中,电穿孔用于将预先形成的核糖核蛋白复合物引入细胞中。

[0485] 病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,所述病毒在递送至细胞后具有游离基因或整合的基因组。病毒载体可直接施用于患者(体内),或者它们可用于在体外或离体操作细胞,其中可将经修饰的细胞施用于患者。在一个实施方案中,本公开利用基于病毒的系统,包括但不限于用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒载体。此外,本公开提供了能够整合到宿主基因组中的载体,如逆转录病毒或慢病毒。优选地,用于表达本公开的CRISPR-Cas系统的载体是慢病毒载体。

[0486] 在一个实施方案中,本公开提供了将一种或多种编码CRISPR-Cas的载体引入真核细胞中。细胞可以是癌细胞。可替代地,细胞是造血细胞,如造血干细胞。干细胞的实例包括多潜能、多能和单能干细胞。多潜能干细胞的实例包括胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、胚胎癌细胞和诱导型多潜能干细胞(iPSC)。在一个优选的实施方案中,本公开提供将CRISPR-Cas9引入造血干细胞中。

[0487] 将本公开的载体递送至受试者中的真核细胞中。通过CRISPR/Cas9系统修饰真核细胞可在细胞培养物中进行,其中所述方法包括在修饰之前从受试者分离所述真核细胞。在一些实施方案中,所述方法还包括将所述真核细胞和/或源自其的细胞返回至所述受试者。

[0488] 组合疗法

[0489] 如本文所述,包含结合至细胞表面谱系特异性抗原(例如,CD33)的抗原结合片段的剂可与缺乏细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞(例如使用本文所述的gRNA产生的造血干细胞或祖细胞)组合施用于受试者,例如,其中所述gRNA包含AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)或CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70))的核苷酸序列。在一些实施方案中,细胞包含在具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)或CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点处的遗传突变。如本文所用,术语“受试者”、“个体”和“患者”可互换使用,并且是指脊椎动物,优选哺乳动物,如人。哺乳动物包括但不限于人灵长类动物、非人灵长类动物或鼠、牛、马、犬或猫物种。在一些实施方案中,受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

[0490] 在一些实施方案中，所述剂和/或造血细胞可与药学上可接受的载体混合以形成药物组合物，这也在本公开的范围内。

[0491] 为了实施本文所述的方法，可向需要治疗的受试者共同施用有效量的包含结合至细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂和有效量的造血细胞。如本文所用，术语“有效量”可与术语“治疗有效量”互换使用，并且是指剂、细胞群体或药物组合物(例如，包含剂和/或造血细胞的组合物)在施用于有需要的受试者后足以产生所需活性的量。在本公开的上下文中，术语“有效量”是指化合物、细胞群体或药物组合物的足以延迟通过本公开的方法治疗的病症的表现、阻止所述病症的进展、缓解或减轻所述病症的至少一种症状的量。注意，当施用活性成分的组合时，所述组合的有效量可包括或者可不包括在单独施用的情况下将有效的每种成分的量。

[0492] 如本领域技术人员所认识到的，有效量取决于所治疗的特定疾患、疾患的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、体型、性别和体重)、治疗的持续时间、同步疗法(如果有的话)的性质、具体的施用途径以及健康从业者知识和专业技能范围内的类似因素而变化。在一些实施方案中，有效量缓和、缓解、减轻、改善、减轻受试者的任何疾病或病症的症状或延迟其进展。在一些实施方案中，受试者是人。在一些实施方案中，受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人患者。

[0493] 如本文所述，表达嵌合受体的造血细胞和/或免疫细胞可以是受试者自体的，即，细胞获自需要治疗的受试者，遗传工程化为缺乏细胞表面谱系特异性抗原的表达或嵌合受体构建体的表达，然后施用于同一受试者。与施用非自体细胞相比，向受试者施用自体细胞可使得宿主细胞的排斥减少。可替代地，宿主细胞是同种异体细胞，即，细胞获自第一受试者，遗传工程化为缺乏细胞表面谱系特异性抗原的表达或嵌合受体构建体的表达，并施用于与所述第一受试者不同但属于同一物种的第二受试者。例如，同种异体免疫细胞可源自人供体并施用于与供体不同的人受体。

[0494] 在一些实施方案中，免疫细胞和/或造血细胞是同种异体细胞并且已进行进一步遗传工程化以减少移植物抗宿主病。例如，如本文所述，可对造血干细胞进行遗传工程化(例如，使用基因组编辑)以具有降低的CD45RA表达。

[0495] 在一些实施方案中，将表达本文所述的任何嵌合受体的免疫细胞以有效使靶细胞(例如，癌细胞)的数量减少至少20％，例如50％、80％、100％、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多倍的量施用于受试者。

[0496] 施用于哺乳动物(例如人)的细胞，即免疫细胞或造血细胞的典型量可在例如一百万至一千亿个细胞的范围内；然而，低于或高于这种示例性范围的量也在本公开的范围内。例如，细胞的每日剂量可以是约100万至约500亿个细胞(例如，约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞，或由前述值中的任何两个限定的范围)，优选约1000万至约1000亿个细胞(例如，约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞，或由前述值中的任何两个限定的范围)，更优选约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如，约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞，

或由前述值中的任何两个限定的范围)。

[0497] 在一个实施方案中,将嵌合受体(例如,编码嵌合受体的核酸)引入免疫细胞中,并且受试者(例如,人患者)接受表达所述嵌合受体的免疫细胞的初始施用或剂量。可在前一次施用后以15天、14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天的间隔向患者提供所述剂(例如,表达嵌合受体的免疫细胞)的一次或多次后续施用。每周可向受试者施用多于一个剂量的所述剂,例如,所述剂的2、3、4或更多次施用。受试者每周可接受多于一个剂量的剂(例如,表达嵌合受体的免疫细胞),随后一周不施用所述剂,并且最后接着是一个或多个另外剂量的所述剂(例如,每周多于一次施用表达嵌合受体的免疫细胞)。表达嵌合受体的免疫细胞可每隔一天施用一次,每周3次施用,持续两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周或更多周。

[0498] 在本公开的上下文中,就其涉及本文所述的任何疾病状况而言,术语“治疗(treat)”、“治疗(treatment)”等意指缓解或减轻与这种疾患相关的至少一种症状,或减缓或逆转这种疾患的进展。在本公开的含义内,术语“治疗”还表示停止、延迟发作(即疾病的临床表现之前的时期)和/或降低疾病发展或恶化的风险。例如,与癌症有关,术语“治疗”可意味着消除或降低患者的肿瘤负荷,或预防、延迟或抑制转移等。

[0499] 在一些实施方案中,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂和缺乏所述细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群体。因此,在此类治疗方法中,所述剂识别(结合)表达细胞表面谱系特异性抗原的靶细胞以进行靶向杀伤。缺乏所述抗原的造血细胞允许重建所述剂所靶向的细胞类型。在一些实施方案中,患者的治疗可包括以下步骤:(1)向所述患者施用治疗有效量的靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂和(2)向所述患者输注或重新输注自体或同种异体的造血干细胞,其中所述造血细胞具有降低的谱系特异性疾病相关抗原表达。在一些实施方案中,患者的治疗可包括以下步骤:(1)向所述患者施用治疗有效量的表达嵌合受体的免疫细胞,其中所述免疫细胞包含编码嵌合受体的核酸序列,所述嵌合受体结合细胞表面谱系特异性疾病相关抗原;以及(2)向所述患者输注或重新输注自体或同种异体的造血细胞(例如,造血干细胞),其中所述造血细胞具有降低的谱系特异性疾病相关抗原表达。

[0500] 使用包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂和缺乏所述细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群体的治疗方法的功效可通过本领域中已知的任何方法来评估并且对于熟练的医疗专业人员来说将是显而易见的。例如,可通过受试者的存活率或受试者或其组织或样品中的癌症负荷来评估所述疗法的功效。在一些实施方案中,通过定量属于特定细胞群体或谱系的细胞的数量来评估所述疗法的功效。在一些实施方案中,通过定量呈递所述细胞表面谱系特异性抗原的细胞的数量来评估所述疗法的功效。

[0501] 在一些实施方案中,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂和造血细胞群体同时施用。

[0502] 在一些实施方案中,在施用造血细胞之前施用包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂(例如,表达如本文所述的嵌合受体的免疫细胞)。在一些实施方案中,包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂(例如,表达如本文所述的嵌合受体的免疫细胞)在施用造血细胞之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月

或更长时间施用。在一些实施方案中，在施用造血细胞之前向受试者多次施用包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂(例如，表达如本文所述的嵌合受体的免疫细胞)。

[0503] 在一些实施方案中，在包含结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂(例如，表达如本文所述的嵌合受体的免疫细胞)之前施用造血细胞。在一些实施方案中，在施用包含结合至细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的剂之前至少约1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、3个月、4个月、5个月、6个月或更长时间施用造血细胞群体。

[0504] 在一些实施方案中，靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂和造血细胞群体基本上同时施用。在一些实施方案中，施用靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂并评估患者一段时间，之后施用造血细胞群体。在一些实施方案中，施用造血细胞群体并且评估患者一段时间，之后施用靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂。

[0505] 所述剂和/或造血细胞群体的多次施用(例如，剂量)也在本公开的范围内。在一些实施方案中，向受试者施用所述剂和/或造血细胞群体一次。在一些实施方案中，向受试者施用所述剂和/或造血细胞群体多于一次(例如，至少2、3、4、5或更多次)。在一些实施方案中，所述剂和/或造血细胞群体以规则的间隔时间，例如每六个月施用于受试者。

[0506] 在一些实施方案中，受试者是患有造血系统恶性肿瘤的人受试者。如本文所用，造血系统恶性肿瘤是指涉及造血细胞(例如，血细胞，包括祖细胞和干细胞)的恶性异常。造血系统恶性肿瘤的实例包括但不限于霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、白血病或多发性骨髓瘤。白血病包括急性骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病或慢性成淋巴细胞性白血病和慢性淋巴细胞性白血病。

[0507] 在一些实施方案中，白血病是急性骨髓性白血病(AML)。AML被表征为异质性、克隆性、肿瘤性疾病，其起源于转化细胞，所述转化细胞逐渐获得了破坏关键分化和生长调控途径的关键遗传变化。(Dohner等人，NEJM，(2015)373:1136)。CD33糖蛋白在大多数骨髓性白血病细胞以及正常骨髓细胞和单核细胞前体上表达，并且一直被认为是AML治疗的有吸引力的靶标(Laszlo等人，Blood Rev.(2014)28(4):143-53)。虽然使用基于抗CD33单克隆抗体的疗法的临床试验表明，当与标准化学疗法组合时，一部分AML患者的存活率有所提高，但这些效果也伴随着安全性和功效问题。

[0508] 旨在靶向AML细胞的其它努力包括产生表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞，所述嵌合抗原受体选择性地靶向AML中的CD33。Buckley等人，Curr.Hematol.Malig.Rep.(2):65(2015)。然而，数据是有限的，并且这种方法可能在治疗患者方面的效果如何(是否消除了所有靶向细胞)存在不确定性。此外，由于髓系细胞对于生命是必不可少的，因此耗尽受试者的髓系细胞可能对患者的存活具有不利影响。本公开旨在至少部分地解决与AML治疗相关的此类问题。

[0509] 可替代地或此外，本文所述的方法可用于治疗非造血系统癌症，包括但不限于肺癌、耳鼻喉癌、结肠癌、黑素瘤、胰腺癌、乳腺癌(mammary cancer)、前列腺癌、乳腺癌(breast cancer)、卵巢癌、基底细胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨癌；乳腺癌；宫颈癌；绒毛膜癌；结肠癌和直肠癌；结缔组织癌症；消化系统癌症；子宫内膜癌；食道癌；眼癌；头颈癌；胃癌；上皮内赘生物；肾癌；喉癌；肝癌；纤维瘤，成神经细胞瘤；口腔癌(例如，唇、舌、口和咽)；卵

巢癌;胰腺癌;前列腺癌;成视网膜细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;肾癌;呼吸系统癌症;肉瘤;皮肤癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫癌;泌尿系统癌症,以及其他癌和肉瘤。

[0510] 癌是上皮起源的癌症。意图用本公开的方法治疗的癌包括但不限于腺泡癌、腺泡状癌、肺泡腺癌(也称为腺样囊性癌、腺上皮癌、筛状癌和圆柱瘤)、腺瘤癌、腺癌(adenocarcinoma)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌(也称为细支气管癌、肺泡细胞肿瘤和肺腺瘤病)、基底细胞癌、基底上皮细胞癌(也称为基底细胞瘤或基底细胞癌和发母质癌)、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、乳腺癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑样癌、胆管细胞癌(也称为胆管瘤和胆管癌)、绒毛膜癌、胶样癌(colloid carcinoma)、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、圆柱细胞癌(cylindrical carcinoma)、柱状细胞癌(cylindrical cell carcinoma)、导管癌、硬膜癌、胚胎性癌、髓样癌、眼球上癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、溃疡性癌、纤维癌、胶样癌(gelatiniform carcinoma)、胶状癌(gelatinous carcinoma)、巨大细胞癌(giant cell carcinoma)、巨细胞癌(gigantocellulare)、腺癌(gland ular carcinoma)、粒层细胞癌、发母质癌、多血癌、肝细胞癌(也称为肝细胞瘤、恶性肝细胞瘤和肝癌)、许特耳细胞癌、透明细胞癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、侵蚀性溃疡癌(Krompecher's carcinoma)、库尔契茨基细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆状癌(carcinoma lenticul are)、脂瘤样癌、淋巴上皮癌、乳腺炎性癌、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌(carcinoma melanodes)、黑色素癌(melanotic carcinoma)、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌(carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌(mucous carcinom a)、粘液瘤样癌、鼻咽癌、黑色素癌(carcinoma nigrum)、燕麦细胞癌、骨化性癌、骨样癌、卵巢癌、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前期癌、前列腺癌、肾的肾细胞癌(也称为肾腺癌和hypemephoroid癌)、储备细胞癌、肉瘤样癌、施耐德氏癌(scheinderian carcinoma)、硬癌(scirr hous carcinoma)、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌(solanoid carcinoma)、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓样癌(carcin oma spongiosum)、鳞癌、鳞状细胞癌、串癌(string carcinoma)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌(carcinoma telan giectodes)、移行细胞癌、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberous carcinoma)、疣状癌、绒毛状癌。在优选的实施方案中,本公开的方法用于治疗患有乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌和直肠癌、胰腺癌、胃癌或肾癌的受试者。

[0511] 肉瘤是发生在骨和软组织中的间充质肿瘤。已识别了不同类型的肉瘤,并且这些包括:脂肪肉瘤(包括粘液样脂肪肉瘤和多形性脂肪肉瘤)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性周围神经鞘膜瘤(也称为恶性神经鞘瘤、神经纤维肉瘤或神经源性肉瘤)、尤文氏肿瘤(包括尤文氏骨肉瘤、骨外(即非骨)尤文氏肉瘤和原始神经外胚层肿瘤[PNET])、滑膜肉瘤、血管肉瘤、血管瘤、淋巴管肉瘤、卡波济氏肉瘤、血管内皮瘤、纤维肉瘤、硬纤维瘤(也称为侵袭性纤维瘤病)、隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP)、恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、血管外皮细胞瘤、恶性间质瘤、腺泡状软组织肉瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、促结缔组织增生性小细胞瘤、胃肠道间质瘤(GIST)(也称为胃肠道间质肉瘤)、骨肉瘤(称为骨源性肉瘤)-骨骼和骨骼外以及软骨肉瘤。

[0512] 在一些实施方案中，待治疗的癌症可以是难治性癌症。如本文所用，“难治性癌症”是对指定的护理标准具有抗性的癌症。这些癌症可能最初对治疗有反应(然后复发)，或者它们可能对治疗完全无反应。普通护理标准将根据癌症类型和受试者的进展程度而有所不同。它可以是化学疗法、或手术、或放射或它们的组合。本领域普通技术人员了解此类护理标准。因此，根据本公开针对难治性癌症治疗的受试者可能已经暴露于针对他们的癌症的另一种治疗。或者，如果癌症可能是难治性的(例如，鉴于对癌细胞或受试者病史的分析)，则受试者可能尚未暴露于另一种治疗。难治性癌症的实例包括但不限于白血病、黑素瘤、肾细胞癌、结肠癌、肝癌、胰腺癌、非霍奇金淋巴瘤和肺癌。

[0513] 表达本文所述的嵌合受体的任何免疫细胞可在药学上可接受的载体或赋形剂中作为药物组合物施用。

[0514] 与本公开的组合物和/或细胞结合使用的短语“药学上可接受的”是指此类组合物的分子实体和其他成分在生理上是可耐受的并且当施用于哺乳动物(例如，人)时通常不会产生不良反应。优选地，如本文所用，术语“药学上可接受的”表示联邦或州政府的管理机构批准的或在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的在哺乳动物体内并且更具体地在人体内的使用。“可接受”是指载体与组合物的活性成分(例如，核酸、载体、细胞或治疗性抗体)相容，并且不会对施用所述组合物的受试者产生不利影响。待用于本方法中的任何药物组合物和/或细胞可包含呈冻干制剂或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂。

[0515] 药学上可接受的载体(包括缓冲剂)是本领域众所周知的，并且可包括磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂；低分子量多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；氨基酸；疏水性聚合物；单糖；双糖；和其他碳水化合物；金属络合物；和/或非离子表面活性剂。参见例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy第20版(2000)Lippincott Williams and Wilkins编辑K.E.Hoover。

[0516] 用于治疗性用途的药盒

[0517] 在本公开的范围内还有用于将靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂与缺乏所述细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群体组合使用的药盒。此类药盒可包括一个或多个容器，所述一个或多个容器包含第一药物组合物，所述第一药物组合物包含含有结合细胞表面谱系特异性抗原的抗原结合片段的任何剂(例如，表达本文所述的嵌合受体的免疫细胞)和药学上可接受的载体；以及包含缺乏所述细胞表面谱系特异性抗原的造血细胞群体(例如，造血干细胞)和药学上可接受的载体的第二药物组合物。

[0518] 在一些实施方案中，本文所述的药盒包含结合具有ATCCCTGGCACTCTAGAACC(SEQ ID NO:50)或CCTCACTAGACTTGACCCAC(SEQ ID NO:58)的序列的位点的gRNA。在一些实施方案中，所述gRNA包含CCUCACUAGACUUGACCCAC(SEQ ID NO:70)或AUCCCUGGCACUCUAGAACC(SEQ ID NO:67)的核苷酸序列。

[0519] 在一些实施方案中，所述药盒可包含用于本文所述的任何方法中的使用说明书。所包括的说明书可包括向受试者施用第一和第二药物组合物以在受试者中实现预期活性的描述。药盒还可包括基于鉴定受试者是否需要治疗来选择适合治疗的受试者的描述。在一些实施方案中，说明书包括向需要治疗的受试者施用第一和第二药物组合物的描述。

[0520] 与使用靶向细胞表面谱系特异性抗原的剂以及本文所述的第一和第二药物组合物有关的说明书通常包括关于用于预期治疗的剂量、给药方案和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本公开的药盒中提供的说明书通常是标签或包装插页上的书面说明书。标签或包装插页指示药物组合物用于治疗受试者的疾病或病症、延迟所述疾病或病症的发作和/或减轻所述疾病或病症。

[0521] 本文提供的药盒处于合适的包装中。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装等。还考虑了用于与特定装置(诸如吸入器、经鼻施用装置或输注装置)组合使用的包装。药盒可具有无菌入口(例如,容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内注射溶液袋或小瓶)。容器还可具有无菌入口。药物组合物中的至少一种活性剂是如本文所述的嵌合受体变体。

[0522] 药盒可任选地提供额外的组分,如缓冲剂和解释性信息。通常,药盒包括容器和在容器上或与容器相关的标签或一张或多张包装插页。在一些实施方案中,本公开提供了包含上述药盒的内容物的制品。

[0523] 一般技术

[0524] 除非另有说明,否则本公开的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,所述技术在本领域技术人员的能力范围内。此类技术在文献中充分阐明,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等人,1989)Cold Spring Harbor Press;;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1989)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑1987);Introuction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths,和D.G.Newell编辑1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑):Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等人编辑1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编辑1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practice approach(D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑Harwood Academic Publishers,1995);DNA Cloning:A practical Approach,第I卷和II卷(D.N.Glover编辑1985);Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1985》;Transcription and Translation(B.D.Hames和S.J.Higgins编辑(1984》;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑(1986》;Immobilized Cells and Enzymes(lRL Press,(1986》;以及B.Perbal,A practical Guide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等人(编辑)。

[0525] 无进一步详细描述，据信所属领域的技术人员可基于以上描述在最大程度上利用本公开。因此以下具体实施方案仅被视为说明性的，并且不以任何方式来限定本公开的其余部分。出于本文引用的目的或主题，本文引用的所有出版物以引用的方式并入。

[0526] 实施例1：人白血病细胞系中CD33的体外缺失

[0527] 为了测试CRSPR-Cas9系统在体外靶向CD33的能力，使用Neon™(Thermo Fisher Scientific)将人白血病细胞K-562与Cas9-GFP(PX458，酿脓链球菌)和含有NGG PAM序列的向导RNA(图4)共转染，其中向导RNA被设计为靶向hCD33基因组序列。转染后48小时，使用GFP的FACS分选来鉴定和分离表达Cas9的细胞。然后将细胞孵育96小时并通过流式细胞术测试CD33表达(图5)。使用抗CD33抗体的流式细胞术图显示在Cas9载体和向导RNA递送之前(上图)和之后(下图)K-562细胞的CD33表达。如图5所示，转染后98％的细胞缺乏CD33表达。

[0528] 此实施例展示在人白血病细胞中使用CRISPR-Cas9系统对CD33的有效缺失。

[0529] 实施例2：人白血病细胞系中CD45的体外缺失

[0530] CRISPR-Cas9系统用于在体外靶向CD45RA。简言之，使用Neon™试剂(Thermo Fisher Scientific)将TIB-67网织细胞肉瘤小鼠巨噬细胞样细胞与Cas9-GFP(PX458，酿脓链球菌)和靶向hCD45RA基因组序列的CRISPRs gRNA(含有“NGG”PAM序列)共转染。转染后48小时，使用GFP的FACS分选来鉴定和分离表达CRISPR-Cas9系统的细胞。然后将细胞孵育96小时并测试CD45RA表达(图6)。使用CD45RA抗体的流式细胞术图显示在Cas9载体和向导RNA递送之前(上图)和之后(下图)的CD45RA表达。

[0531] 类似于实施例1，其中CD33表达在白血病细胞中成功降低，此实施例中的发现表明使用CRISPR-Cas9系统有效靶向CD45RA。

[0532] 实施例3：靶向急性骨髓性白血病(AML)中的细胞表面谱系特异性CD33

[0533] 本实施例涵盖靶向AML中的CD33抗原。所述实施例的具体步骤如表6中所概述。

[0534] 表6.实验设计的概要

[0535]

I. 自体 CD33 靶向(CAR) T 细胞疗法	1. 抗 CD33 CAR 构建体的产生 2. 从患者分离 $CD8^+$T 细胞 3. 抗 CD33 CAR T 细胞的制备 4. 将 CD33 CAR T 细胞重新输注至患者体内
II. 使用 $CD34^+CD33^-$细胞进行自体造血干细胞移植	1. 造血干细胞的分离 2. 靶向 CD33 的 CRISPR-Cas9 质粒 3. 通过 CRISPR-CAS 系统产生 $CD34^+CD33^-$细胞 4. 将 $CD34^+CD33^-$细胞重新输注至患者体内
III. 用附着至毒素(免疫毒素)的 CD33 抗体继续治疗患者	

[0536] I.CD33靶向的嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法

[0537] A.抗CD33 CAR构建体的产生

[0538] 本文描述的靶向CD33的嵌合抗原受体可由以下组分按5'至3'的顺序组成:pHIV-Zsgreen慢病毒主链(www.addgene.org/18121/)、肽信号、CD33 scFv、铰链、CD28分子的跨膜区、CD28的细胞内结构域和TCR-ζ分子的信号传导结构域。

[0539] 最初,将肽信号、抗CD33轻链(SEQ ID NO:1)、柔性接头和抗CD33重链(SEQ ID.NO.2)克隆到pHIV-Zsgreen的EcoRI位点中,具有最佳Kozak序列。

[0540] 结合CD33的具有轻链-接头-重链-铰链-CD28/ICOS-CD3ζ的基本结构的示例性嵌合受体的核酸序列在下文提供。

[0541] 第1部分:轻链-接头-重链(SEQ ID NO:16):Kozak起始位点以粗体显示。肽信号L1以斜体显示。抗CD33轻链和重链以粗体和斜体显示,通过接头分隔。

[0542] ggtgtcgtgagcggccgctgaactg**GCCACC**ATG*GACATGAGGGTCCCT*
GCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGA
*TGT**GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCCGGCAGCCTGGCCGTGA***
GCCCCGGCAAGAGGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAG
CGTGTTCTTCAGCAGCAGCCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTACC
AGCAGATCCCCGGCCAGAGCCCCAGGCTGCTGATCTACTGGGC
CAGCACCAGGGAGAGCGGCGTGCCCGACAGGTTCACCGGCAGC
GGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCG
TGCAGCCCGAGGACCTGGCCATCTACTACTGCCACCAGTACCTG
AGCAGCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGA
***GG**GGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCCGGCAGCGGCGAGG*
GCAGCACCAAGGGC***CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGA***
GGTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCC
AGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTACATCCACTGGATCAAGCA
GACCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCGTGATCTACCCC
GGCAACGACGACATCAGCTACAACCAGAAGTTCCAGGGCAAGG
CCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCACCACCGCCTACATGCAG
CTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCG
CCAGGGAGGTGAGGCTGAGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGG
CACCACCGTGACCGTGAGCAGC

[0543] 第2部分:铰链-CD28/ICOS-CD3ζNotI限制酶识别位点以大写字母显示。翻译终止位点以粗体显示。BamHI限制性裂解位点以下划线显示。

[0544] CD28共刺激结构域(SEQ ID NO:17)

[0545] GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaa ccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggt gctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtga ggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccA cccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttca

[0546] gcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctagg acgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagcc gagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctac agtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctca gtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgcTAAcgccccct ctccctcccccccccctaa

[0547] ICOS共刺激结构域(SEQ ID NO:18)

GCGGCCGCActatcaatttttgatcctcctcctttaaagtaactcttacaggaggatatttgc atatttatgaatcacaactttgttgccagctgaagttctggttacccataggatgtgcagcctttgttgtagtct gcattttgggatgcatacttatttgttggcttacaaaaaagaagtattcatccagtgtgcacgaccctaacgg tgaatacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaatctagactcacagatgtgaccctaagagtg

[0548] aagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctca atctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggg aaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcgga ggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttacca gggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccccctcgcTA Acgccccctctccctcccccccccctaa

[0549] 融合(杂合)CD28和ICOS共刺激结构域(SEQ ID NO:19)

GCGGCCGCAattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaatggaa ccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtcccctatttcccggaccttctaagccctttgggt

[0550] gctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattattttctgggtga ggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgttcatgagagcagtgaacacagccaaaaaa tctagactcacagatgtgaccctaagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagca

gggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaaga

gacgtggccgggaccctgagatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtac

[0551] aatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccgga

ggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccctt

cacatgcaggccctgcccccctcgcTAAcgcccctctccctcccccccccctaa

[0552] 在下一步中,将铰链区、CD28结构域(SEQ ID NO:3)和TCR-ζ的细胞质组分克隆到pHIV-Zsgreen(已经含有肽信号和CD33 scFv)的NotI和BamHI位点中。可替代地,CD28结构域可被ICOS结构域(SEQ ID NO:4)取代。

[0553] 除了CD28和ICOS结构域,包含CD28和ICOS细胞内信号传导结构域的片段的融合结构域将进行工程化(SEQ ID NO:5)并用于产生另外的嵌合受体。这种构型,其中嵌合受体包含抗原结合片段、抗CD33轻链可变区、接头、抗CD33重链可变区、CD28/ICOS杂合区(包括CD28的TM区)和TCR-ζ分子的信号传导结构域。

[0554] 可用于产生嵌合受体的组分的示例性氨基酸序列在本文中提供,如CD28结构域(SEQ ID NO:6)、ICOS结构域(SEQ ID NO:7)、CD28/ICOS杂合结构域(SEQ ID NO:8)和TCR-ζ在本文中提供。可替代地,也可产生嵌合受体(B部分)

[0555] B.用于产生抗CD33 CAR构建体的替代方法

[0556] 示例性嵌合受体的示意图呈现在图7,图A-D中。嵌合受体将使用识别CD33抗原的细胞外人源化scFv产生,连接至细胞外CD8铰链区、跨膜和细胞质信号传导结构域以及CD3ζ-信号传导链(图7,图B)。将通过使用人源化scFv产生编码抗CD33嵌合受体的DNA(Essand等人,J Intern Med.(2013)273(2):166)。替代方案包括含有OX-1或41-BB代替CD28或CD28/OX1或CD28/4-1-B-B杂合体的CAR T细胞(图7,图C和D)。

[0557] 为了产生抗CD33 scFV序列,上述抗CD33抗体的可变区的重链和轻链(SEQ ID NO:1和2)的编码区将用特异性引物扩增并克隆到用于在细胞中表达的pHIV-Zsgreen载体中。为了评估scFv(单链可变片段)与靶抗原的结合强度,将在Hek293T细胞中表达scFv。为此,将载体(含有编码区的pHIV-Zsgreen)转化到大肠杆菌Top10F细菌中并制备质粒。将获得的编码scFv抗体的表达载体通过转染引入Hek293T细胞中。将转染的细胞培养五天后,将除去上清液并纯化抗体。

[0558] 可通过本领域已知的方案使用框架取代将所得抗体人源化。参见例如,BioAtla(San Diego)提供了一种这样的方案,其中将源自模板抗体的合成CDR编码片段文库连接至来自限于来自功能表达抗体的种系序列的人框架库的人框架区编码片段(bioatla.com/applications/express-humanization/)。

[0559] 可进行亲和力成熟以提高抗原结合亲和力。这可使用本领域已知的一般技术,如噬菌体展示来实现(Schier R.,J.Mol.Biol(1996),263:551)。可使用例如Biacore分析筛选变体的生物活性(例如,结合亲和力)。为了鉴定作为修饰的良好候选物的高变区残基,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合有显著贡献的高变区残基。此外,由描述的组合文库也可用于提高抗体的亲和力(Rajpal等人,PNAS(2005)102(24):8466)。可替代地,BioAtla开发了用于抗体的快速且有效的亲和力成熟的平台,所述平台也可用于抗体优化的目的(bioatla.co m/applications/functional-maturation/)。

[0560] (C)CAR构建体的组装

[0561] 接下来,抗CD33 scFv将连接至细胞外CD8铰链区、跨膜和细胞质CD28信号传导结构域以及CD3ζ信号传导链。简言之,对抗-CD33 scFv序列具有特异性的引物将用于扩增如上所述的scFv。携带完整人CD8编码序列的质粒(pUN1-CD8).(www.invivogen.com/puno-cd8a)将用于扩增CD8铰链和跨膜结构域(氨基酸135-205)。将从携带完整人CD3ζ编码序列的Invivogen质粒pORF9-hCD247a(http://ww w.invivogen.com/PDF/pORF9-hCD247a_10E26v06.pdf)中扩增CD3ζ片段。最后,将从使用通过Trizol方法从活化的T细胞收集的RNA产生的cDNA扩增CD28(氨基酸153-220,对应于CD28的TM和信号传导结构域)。将使用剪接重叠延伸(SOE)PCR组装含有抗CD33-scFv-CD8-hinge+TM-CD28-CD3ζ的片段。然后将所得PCR片段克隆到pELPS慢病毒载体中。pELPS是第三代慢病毒载体pRRL-SIN-CM V-eGFP-WPRE的衍生物,其中CMV启动子被EF-1α启动子替代,并且将HIV的中心多嘌呤束插入所述启动子的5'(Milone等人,Mol Ther.(2009)(8):1453;Porter等人,NEJM(2011)(8):725)。所有构建体都将通过测序进行验证。

[0562] 可替代地,将产生含有ICOS、CD27、41BB或OX-40信号传导结构域而不是CD28结构域的CAR,将其引入T细胞中并测试其根除CD33阳性细胞的能力(图7,图C)。还考虑了"第三代"嵌合受体的产生(图7,图D),其组合多个信号传导结构域,如CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40,以进一步增强效力(Sadelain等人,Cancer Discov.(2013)4:388)。

[0563] (D)抗CD33 CAR T细胞制备

[0564] 将通过免疫磁性分离(Miltenyi Biotec)从患者的外周血中分离原代人$CD8^+$T细胞。T细胞将在完全培养基(补充有10%热灭活FBS、100U/mL青霉素、100μg/mL硫酸链霉素、10mM HEPES的RPMI1640)中培养并如先前所述用抗CD3和抗CD28 mAb包被的珠(Invitrogen)刺激(Levine等人,J.Immunol.(1997)159(12):5921)。

[0565] 包装细胞系将用于产生病毒载体,所述病毒载体能够转导靶细胞并含有抗CD33嵌合受体。为了产生慢病毒颗粒,将此实施例第(1)部分中产生的CAR转染到永生化正常胎儿肾脏293T包装细胞中,并且将用包括10%FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素的高葡萄糖DMEM培养细胞。转染后48-72小时将收集上清液,并将重组慢病毒浓缩在不含FBS的DMEM中。接下来将在聚凝胺存在下以约5-10的感染复数(MOI)转导原代$CD8^+$T细胞。将每隔一天添加人重组IL-2(R&D Systems)(50IU/mL)。将T细胞在刺激后培养约14天。将通过ZsGreen报告基因(Clontech,Mountain View,CA)的表达评估人原代T细胞的转导效率。

[0566] E.将CAR T细胞输注至患者体内

[0567] 在将抗CD33 CAR T细胞静脉内输注至患者体内之前,将用磷酸盐缓冲盐水洗涤并浓缩细胞。提供封闭且无菌的系统的细胞加工器,如Haemonetics CellSaver(Haemonetics Corporation,Braintree,MA)将用于配制前的洗涤和浓缩步骤。将表达抗CD33嵌合受体的最终T细胞配制成100ml补充有人血清白蛋白的无菌生理盐水。最后,将在1-3天的时间内向患者输注$1-10X10^7$个T细胞/kg(Maude等人,NEJM(2014)371(16):1507)。所输注的表达抗CD33嵌合受体的T细胞的数量将取决于多种因素,如癌症患者的状态、患者的年龄、先前治疗等。

[0568] 此外,除了靶向AML患者中的CD33的嵌合受体外,本文还涵盖表达靶向CD45RA的嵌合受体的免疫细胞。这可通过两种不同的方法来实现:1)分别产生表达抗CD33嵌合受体的

免疫细胞和表达抗CD47RA嵌合受体的免疫细胞，并且分别向患者输注两种类型的免疫细胞，或2)产生同时靶向CD33和CD45RA两者的免疫细胞(Kakarla等人，Cancer(2):151(2014))。

[0569] II.使用CD34+CD33-细胞进行自体造血干细胞移植(HSCT)

[0570] 据了解，根据患者的年龄、疾患、治疗史和进行治疗的机构，有关从患者分离干细胞、调理方案以及向患者输注干细胞的方案存在很大差异。因此，下文描述的方案仅仅是一个实例，并且由本领域普通技术人员进行常规优化。

[0571] A.在过继转移抗CD33 CAR T细胞后，使用外周血干细胞(PBSC)动员分离造血干细胞

[0572] 将通过静脉内施用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)10mg/kg/天对AML患者进行刺激。$CD34^+$细胞阳性选择将使用免疫磁珠和免疫磁富集装置进行。预期使用Fenwall CS 3000+细胞分离器收集至少$2x10^6$个$CD34^+$细胞/kg体重(Park等人，Bone Marrow Transplantation(2003)32:889)。

[0573] B.患者的调理方案

[0574] 用于自体外周血干细胞移植(PBSCT)的调理方案将使用依托泊苷(VP-16)+环磷酰胺(CY)+全身照射(TBI)进行。简言之，所述方案将包括在26小时内作为单次剂量静脉内持续输注(c.i.v.)1.8g/m^2的依托泊苷(VP-16)，然后每天在2小时内静脉内输注60mg/kg的环磷酰胺(CY)持续3天，然后在接下来的3天内每天以300cGy进行全身照射(TBI)。

[0575] 为了计算剂量，将使用理想体重或实际体重，以较小者为准。如先前所述，在确定精确调理方案时，将考虑注入癌症患者的状况、患者的年龄、先前治疗以及进行手术的机构类型的因素。

[0576] C.靶向CD33的CRISPR-Cas9系统的质粒构建

[0577] 含有插入片段Cas9和嘌呤霉素抗性的lentiCRISPR v2将从Addgene(Plasmid#52961)获得(Sanjana等人，Nat Methods(2014)(8):783)。为了克隆单向导RNA(sgRNA)CD33向导序列，将使用FastDigest BsmBI和FastAP(Fermentas)在37℃下切割lentiCRISPR v2并去磷酸化2小时。将使用crispr.mit.edu上的在线优化设计工具来设计靶向CD33的gRNA。可替代地，gRNA将具有图12中描述的序列(SEQ ID NO:11)。CD33 gRNA寡核苷酸将从Integrated DNA Technologies(IDT)获得，使用多核苷酸激酶(Fermentas)在37℃下磷酸化30分钟，然后通过加热至95℃持续5分钟并以1.5℃/分钟冷却至25℃进行退火。T7连接酶将用于使寡核苷酸退火，然后将退火的寡核苷酸在25℃下连接至凝胶纯化载体(Qiagen)中5分钟。然后可使用无内毒素的midi-prep试剂盒(Qiagen)扩增所得到的质粒(Sanjana等人，Nat Methods(2014)(8):783)。

[0578] 可替代地，可使用先前描述的双载体系统(其中gRNA和Cas从单独的载体表达)方案(Mandal等人，Cell Stem Cell(2014)15(5):643)。在此，Mandal等人使用从非病毒载体表达的CRISPR-Cas系统实现了人造血干细胞中基因的有效消除。

[0579] 简言之，将含有C末端SV40核定位信号的人密码子优化的Cas9基因克隆到具有2A-GFP的CAG表达质粒中。为了指导Cas9裂解目标CD33序列，向导RNA(gRNA(SEQ ID.NO.11))将从含有人U6聚合酶III启动子的质粒单独表达。gRNA序列寡核苷酸将从整合DNA技术(IDT)获得，退火，并使用BbsI限制性位点引入质粒中。由于人U6启动子的“G”碱基的转录起始要

求,以及PAM(原型间隔区相邻基序)序列的要求,基因组靶标将包含$GN_{20}GG$核苷酸序列。

[0580] 除了向患者输注CD33耗减的造血干细胞HSC之外,还将开发一种方案,其中患者随后输注CD45RA耗减的HSC。可替代地,发明人将使用CRISPR-Cas9系统产生$CD34^+CD33^-CD45RA^-$细胞以同时减少CD33和CD45RA基因。CD45RA和CD33的示例性向导RNA序列显示在表4和5)中。

[0581] D.转染$CD34^+$细胞HSC以产生$CD34^+CD33^-$细胞

[0582] 在细胞培养级干细胞因子(SCF)300ng/ml、FLT3-L 300ng/ml、促血小板生成素(TPO)100ng/ml和IL-3 60ng/ml存在下,新鲜分离的外周血来源的$CD34^+$细胞(来自步骤4)将以1×10^6个细胞/ml接种到无血清CellGro SCGM培养基中。预刺激24小时后,将使用Amaxa人CD34细胞Nucleofector试剂盒(U-008)(#VPA-1003),用含有Cas9和CD33 gRNA的LentiCRISPR v2转染$CD34^+$HSC(Mandal等人,Cell Stem Cell(2014)15(5):643)。转染后24-48小时,用1.2μg/ml嘌呤霉素选择$CD34^+CD33^-$细胞。选择嘌呤霉素后,$CD34^+CD33^-$细胞将在不含嘌呤霉素的培养基中保持几天。

[0583] E.将$CD34^+CD33^-$细胞重新输注至患者体内

[0584] 用CRISPR-Cas9-CD33离体转染的$CD34^+$细胞($CD34^+CD33^-$细胞)立即使用没有过滤器的标准血液施用设置通过Hickman导管重新输注(Hacein-Bey Abina等人JAMA(2015)313(15):1550)。

[0585] 通常,将监测已经历上述治疗方案的患者循环原始细胞和血细胞减少症的再次出现。此外,根据具体患者中AML的潜在机制,将通过测试信息分子或细胞遗传标志物或信息流式细胞术模式的重现来监测治疗的成功。例如,将使用荧光原位杂交(FISH)与BCR(22号染色体上)和ABL(9号染色体上)的探针检测费城染色体阳性AML中BCR-ABL信号的再现。

[0586] 为了通过CRISPR-Cas9系统评估CD33缺失的成功,将从患者(移植后)分离外周血$CD34^+$细胞并评估CD33表达,例如使用流式细胞术、蛋白质印迹或免疫组织化学。

[0587] 如本文所述,此实施例中描述的HSCT可以是自体的或同种异体的,并且两种方法都是合适的并且可并入本公开中描述的方法中。

[0588] III.任选的步骤:用附着至毒素的CD33抗体继续治疗患者

[0589] A.用CD33免疫毒素吉妥珠单抗奥佐米星(GO)治疗患者

[0590] 患者将用$9mg/m^2$的抗CD33抗体吉妥珠单抗奥佐米星(GO)作为2小时静脉内输注间隔2周的2个剂量进行治疗(Larson等人,Cancer(2005),104(7):1442-52)。GO由针对CD33的人源化单克隆抗体组成,所述抗体与细胞生长抑制剂卡奇霉素缀合(图8)。

[0591] 可替代地,可将抗CD33抗体与不同的毒素,如白喉毒素、假单胞菌外毒素A(PE)或蓖麻毒素A链(RTA)缀合(Wayne等人,Blood(2014)123(16):2470)。类似地,抗CD45RA抗体可附着至毒素并包括在治疗方案中。

[0592] 实施例4:表达抗CD33嵌合受体的T细胞和NK细胞系诱导表达CD33的靶细胞的细胞死亡

[0593] 嵌合受体与CD33的结合

[0594] 使用常规重组DNA技术产生结合CD33的嵌合受体(例如CART1、CART2、CART3),并将其插入pHIV-Zsgreen载体(Addgene;Cambridge,MA)中。含有嵌合受体的载体用于产生慢病毒颗粒,其用于转导不同的细胞类型,例如T细胞系(例如,293T细胞)和NK细胞系(例如,

NK92细胞)。通过蛋白质印迹(图9,图A)和流式细胞术(图9,图B)检测嵌合受体的表达。

[0595] 通过荧光活化细胞分选(FACS)选择表达嵌合受体的细胞,并评估它们结合CD33的能力。简言之,将表达嵌合受体的293T细胞的裂解物与CD33或CD33-别藻蓝蛋白(APC)缀合物共同培养。对样品进行蛋白质电泳,并用丽春红蛋白质染料染色(图10,图A)或转移到膜上并用抗CD3ζ第一抗体进行探测(图10,图B)。在两种情况下,嵌合受体与其靶标CD33之间的结合。

[0596] 还使用CD33作为探针通过流式细胞术评估表达嵌合受体的K562细胞与CD33的结合(图10,图C)。与含有空载体对照的细胞相比,对嵌合受体(CART1、CART2或CART3)的表达和CD33结合呈阳性的细胞的数量增加,从而表明嵌合受体与CD33结合。

[0597] 通过表达嵌合受体的细胞诱导的细胞毒性

[0598] 将表达嵌合受体的NK-92细胞针对诱导在细胞表面上呈递CD33的靶细胞的细胞毒性的能力在功能上进行表征(例如,K562是CD33+的人慢性髓细胞性白血病细胞系)。为了进行细胞毒性测定,将效应细胞(免疫细胞,如NK-92细胞)用编码嵌合受体的慢病毒颗粒感染并扩增。感染后7天,通过FACS分析通过选择也由嵌合受体编码载体编码的荧光标志物(例如,GFP+或Red+)来选择表达嵌合受体的细胞。将选择的表达嵌合受体的细胞扩增一周。感染后14天,进行细胞毒性测定,包括用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色靶细胞(表达靶细胞表面谱系特异性抗原CD33的细胞),并对靶细胞和表达嵌合受体的细胞进行计数。将不同比例的靶细胞和表达嵌合受体的细胞在圆底96孔板中共孵育4.5小时,然后添加7-氨基放线菌素D(7-AAD)以染色非存活细胞。进行流式细胞术以计数存活和非存活靶细胞的群体。如图11的图A和B所示,表达嵌合受体CART1、CART2或CART3的NK92细胞在所评估的每种细胞比率下诱导靶K562细胞的大量细胞死亡。

[0599] 为了确定K562细胞的细胞死亡依赖于嵌合受体对CD33的特异性靶向,使用CRISPR/Cas系统将K562遗传工程化为缺乏CD33。简言之,在K562细胞中表达了人密码子优化的Cas9核酸内切酶和靶向CD33的IgC结构域的一部分的gRNA,从而产生CD33缺陷型K562细胞群体。将细胞扩增并与表达嵌合受体的NK92细胞共孵育,并且如上所述进行细胞毒性测定。如图12图A所示,在与表达嵌合受体的NK92细胞共孵育的情况下,合并的CD33缺陷型K562细胞显示细胞死亡适度减少。然而,当分离、扩增CD33缺陷型K562细胞的单个克隆并用于进行细胞毒性测定时,观察到细胞毒性的更显著降低(图12,图B)。

[0600] 原代T细胞中嵌合受体的表达

[0601] 通过正向选择CD4+、CD8+或CD4+/CD8+细胞,通过FACS从获自供体的PMBC分离原代T细胞群体,从而产生高纯群体(图13,图A和B)。用含有嵌合受体(例如CART1和CART8)的慢病毒载体转导每个原代T细胞群体(CD4+、CD8+或CD4+/CD8+细胞),并使用所得表达嵌合受体的原代T细胞进行细胞毒性测定,如上所述。表达嵌合受体的CD4+T细胞群体与K562(1000个靶K562细胞)共孵育不会导致K562细胞的细胞毒性(图14,图A)。相比之下,在使用表达嵌合受体的CD8+或CD4+/CD8+细胞和1000个靶K562细胞的细胞毒性测定中,CD8+或CD4+/CD8+细胞能够在低细胞比率下诱导K562细胞的细胞死亡(图14,图B)。

[0602] 遗传工程化的人造血干细胞

[0603] 数个gRNA被设计为与CD33的IgC结构域杂交(参见例如,表4,SEQ ID NO:11或28-31)。在K562细胞中,每个gRNA与Cas9核酸内切酶一起在K562细胞中表达。通过流式细胞术

评估CD33的表达(图15)。如针对Crispr 3(SEQ ID NO:28)和Crispr5(SEQ ID NO:29)所示，与表达CD33的对照细胞相比，在表达CD33靶向CRISPR/Cas系统的细胞中发现CD33显著减少。

[0604] 还评估了CD33缺陷型造血干细胞的各种特征，包括增殖、红细胞生成分化和集落形成。简言之，通过将CD33缺陷型造血干细胞和对照细胞暴露于血红素而诱导所述细胞分化，并且在不同时间点通过流式细胞术评估CD71(一种红细胞前体的标志物)(图16，图A和B)。CD33缺陷型造血干细胞经历了红细胞生成分化，并且流式细胞术谱图似乎与对照细胞(CD33+)相似。还对细胞进行MTT测定以测量CD33缺陷型造血干细胞的代谢活性。如图16的图C所示，CD33缺陷型造血干细胞的表现与对照细胞相当。最后，使用显微集落形成测定观察细胞增殖和形成细胞集落的能力。再次，CD33缺陷型造血干细胞能够形成与对照细胞相似程度的集落(图18)。这些结果表明，CD33的一部分的CRISPR/Cas缺失不会显著影响细胞增殖、分化或形成集落的能力。

[0605] 实施例5：基因编辑的干细胞使CD33定向免疫疗法能够用于骨髓恶性肿瘤

[0606] 用于急性骨髓性白血病(AML)的抗原定向免疫疗法，如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)或抗体-药物缀合物(ADC)，由于缺乏能够区分白血病细胞与正常骨髓细胞或骨髓祖细胞的独特可靶向抗原而与严重毒性相关。在此，提出了一种通过靶向谱系特异性骨髓抗原CD33来治疗AML的新方法。本发明的方法将CD33靶向CAR-T细胞和/或ADC、吉妥珠单抗奥佐米星与造血干细胞(HSC)的移植相结合，所述造血干细胞(HSC)已使用基因组工程化方法被工程化为消除CD33表达。显示在人干细胞/祖细胞(HSPC)中使用CRISPR/Cas9技术高效基因消除CD33抗原，并且提供证据表明在HSPC中缺失CD33不会损害其在体内移植和重建多系造血系统的能力。全基因组测序和RNA测序分析揭示没有可检测的脱靶诱变，也没有功能性p53途径的丢失。使用人AML细胞系(HL-60)，对具有微小残留疾病的缓解后骨髓进行建模，并且表明，CD33消除的HSPC的移植与CD33靶向免疫疗法可导致白血病清除，而没有骨髓抑制，如CD33消除的HSPC的多系后代的植入和恢复所证明。因此，本研究有助于靶向免疫疗法的进步，并且可在其他恶性肿瘤中容易地复制。

[0607] 急性骨髓性白血病是对有效疗法的需求未得到满足的疾病，尤其是在缓解后的患者中。针对谱系特异性抗原(LSA)如CD33的免疫疗法显示出中靶效应，但受到毒性的限制，因为正常骨髓细胞和造血祖细胞也表达CD33。在此表明，使用CRISPR方法对HSPC中的CD33进行遗传消除实现使用抗CD33 CAR-T或抗体疗法针对白血病的免疫疗法。对小鼠中具有最小白血病疾病的缓解后人骨髓进行建模，并显示AML的有效清除和CD33缺失的人移植物的重建。这项研究提出了用于治疗骨髓性白血病的新方法，并且可扩展至其它癌症和其它抗原。

[0608] 材料和方法

[0609] 细胞系和原代人细胞

[0610] 永生化的人急性骨髓细胞系HL-60获自ATCC并在含有20％胎牛血清和1％青霉素链霉素的IMDMEM中培养。为了跟踪白血病植入和随时间推移的进展，将HL-60细胞用在EF1α启动子下表达dTomato荧光蛋白的慢病毒颗粒转导。慢病毒载体和颗粒由Vectalys(Toulouse,France)生产。人骨髓或脐带血$CD34^+$干细胞购自StemExpress(Folsom,CA,USA)并保持在含有1％青霉素链霉素、100ng/mL TPO、100ng/mL SCF、100ng/mL IL6和100ng/mL

FLT3L和UM171 0.35nM(Xcessbio,San Diego,CA,USA)的StemSpan SFEM II(STEMCELL Technologies inc)中。所有人细胞因子均购自Biolegend(San Diego,CA,USA)。

[0611] 从纽约血液中心购买的新鲜外周血正常供体leukopak中纯化人T细胞。简言之,将leukopak用2-4倍体积的补充有2mM EDTA的磷酸盐缓冲盐水(1X)稀释,并在4℃下储存。然后将35mL稀释的leukopak小心地铺在15mL的Ficoll-PaqueTM Premium(GE)上,并在摆动转子桶中以400g、25℃下离心30分钟。°然后将单核细胞层转移至新管中,用含有2mM EDTA的PBS(1X)1:1稀释,并在25℃下400g离心15分钟。然后用1X ACK裂解缓冲液(Gibco)去除沉淀物中的红细胞,在室温下孵育5-8分钟,用含有2mM EDTA的PBS(1X)洗涤,并在25℃下再次400g离心10分钟。然后按照制造商的方案,用Miltenyi Biotec $CD4^+$和$CD8^+$微珠从单核细胞沉淀中阳性选择$CD4^+$和$CD8^+$T细胞。然后在同一天使用CD3/CD28 dynabeads 1:1珠与细胞比例(Gibco)活化$CD4^+$和$CD8^+$T细胞,并在含有IL7 10ng/mL和IL15 5ng/mL的Gibco OpTmizer™CTS™T细胞扩增SFM培养基中分别扩增。

[0612] CAR构建、慢病毒产生和转导

[0613] 通过将框内融合至CD8α铰链结构域、CD8跨膜结构域、4-1BB信号传导结构域和CD3ζ细胞内结构域的人源化抗人CD33 scFv(克隆My96)的轻链和重链克隆至慢病毒质粒pHIV-Zsgreen来自Bryan Welm和Zena Werb的礼物(Addgene质粒#18121)来产生抗CD33嵌合抗原受体(Welm等人Cell Stem Cell.2008;2(1):90-102)。所有cDNA片段均由GeneArt(Regensburg,Germany)进行密码子优化和合成。慢病毒颗粒由Vectalys(Toulouse,France)生产。活化后24小时,将$CD4^+$T细胞用慢病毒颗粒以MOI=30转导,并且并行地将$CD8^+$T以MOI=40转导。

[0614] CRISPR/Cas9介导的CD33基因组靶向

[0615] 将人骨髓或脐带血$CD34^+$干细胞保持在含有1%青霉素链霉素和以下人细胞因子的StemSpan SFEM II(STEMCELL technologies inc)中:100ng/mL TPO、100ng/mL SCF、100ng/mL IL6和100ng/mL FLT3L以及UM171 0.35nM(Xcessbio,San Diego,CA,USA)。所有人细胞因子均购自Biolegend(San Diego,CA,USA)。

[0616] TrueCut Cas9蛋白V2购自Invitrogen。化学修饰的靶向CD33的sgRNA是使用Synthego CRISPR Gene KO设计工具设计的,并且购自Synthego。将用于200,000个$CD34^+$细胞的3μg TrueCut Cas9蛋白和1.5μg sgRNA在P3缓冲液(Lonza,Amaxa P3原代细胞4D-Nucleofector试剂盒)中混合,并在37℃下孵育10分钟。然后用PBS洗涤细胞,重新悬浮于P3缓冲液中,与Cas9/sgRNA RNP复合物混合,然后用4D-Nucleofector电穿孔。电穿孔后,将细胞在37℃下培养直至分析。

[0617] 使用来自Biolegend的以下抗体在电穿孔后7天评估缺失效率:hCD34-PerCp/Cy5.5和hCD33-FITC。

[0618] 全基因组和RNA测序

[0619] 在仅用Cas9或RNP复合物Cas9/sgRNA电穿孔后,将$CD34^+$细胞在体外保持10天,并如下分离其DNA或RNA。使用QIAAmp DNA微型试剂盒按照制造商的方案纯化DNA,然后用30ul洗脱,并使用Nanodrop和Qubit dsDNA BR测定测量DNA浓度。按照制造商的方案,使用miRNeasy micro试剂盒纯化RNA,然后用18ul洗脱。进行Nanodrop和Bioanalyzer Pico芯片测定以测量浓度和质量。

[0620] 对于全基因组测序，NEBNext®Ultra™II DNA文库制备试剂盒用于Illumina、簇集和测序试剂。简言之，将基因组DNA通过声学剪切片段化、清理并进行末端修复。连接衔接子并制作DNA文库。DNA文库还通过实时PCR(Applied Biosystems,Carlsbad,CA,USA)进行定量，簇集在流动池的两条泳道上，并根据制造商的说明书负载到Illumina HiSeq仪器上。使用2x150配对末端(PE)配置对样品进行测序。图像分析和碱基识别由HiSeq仪器上的HiSeq控制软件(HCS)进行。使用Illumina HiSeq分析软件v2.1(HAS 2.1)使用默认参数处理DNA序列。

[0621] 对于RNA测序，使用用于测序的SMART-Seq v4 Ultra Low Input试剂盒(Clontech,Mountain View,CA)进行cDNA合成和扩增。使用Nextera XT(Illumina)制备测序文库。使用2x150配对末端(PE)配置对样品进行测序。在调查原始数据的质量后，使用STAR aligner v.2.5.2b将经修剪的读数映射至ENSEMBL上可用的智人参考基因组。此步骤的结果是生成了BAM文件。通过使用来自Subread包v.1.5.2的特征计数来计算独特的基因命中计数。仅计数落在外显子区域内的独特读数。在提取基因命中计数后，使用SARTools包中的edgeR包将基因命中计数表用于下游差异表达分析(Varet等人PLoS One.2016;11(6):e0157022)。如果p值>0.05，则认为基因显著差异表达。

[0622] 流式细胞术和分选

[0623] 体外

[0624] 转导后，将CAR-T细胞扩增至多15天，然后使用Biorad S3e分选仪分选GFP+(使用碘化丙啶排除死细胞)并按1:1混合用于体外和体内实验。通过将CAR-T细胞与生物素化的人CD33蛋白(ACRO生物系统)一起在4℃下孵育20分钟、然后用荧光染料缀合的链霉亲和素染色来评估CAR表达及其识别和结合CD33的能力。

[0625] 在电穿孔后5至7天，使用来自Biolegend的以下抗体分析人$CD34^+$干细胞：hCD34-PerCp/Cy5.5和hCD33-FITC。

[0626] 体内

[0627] 使用来自Biolegend(San Diego,CA,USA)或BD Biosciences(San Jose,CA,USA)的后续抗体通过分析外周血、骨髓抽吸、全骨髓(来自袋装的小鼠)来评估随时间推移造血系统的植入和重建：Ter119-PeCy5、Ly5-BV711、H2kd-BV711、hCD45-BV510、hCD3-Pacific Blue、hCD123-BV605、hCD33-APC、hCD14-APC/Cy7、hCD10-BUV395、hCD19-BV650、CD34-BV421、CD90-PeCy7、hCD38-BUV661和hCD45RA-BUV737。CAR-T细胞稳定地表达荧光蛋白zsGreen，白血病细胞稳定地表达dTomato，并且使用碘化丙啶排除死细胞。将白血病细胞在$Ter119^-dtomato^+$上门控。将注射$CD34^+$的来源的人细胞在$Ter119^-dtomato^-$`$Ly5^-/H2kd^-$人$CD45^+CART^-$上门控。所有数据均使用BioRad ZE5流式细胞术分析仪以高通量模式获取，并使用FlowJo 10.4.2进行分析。同时，还使用PerkinElmer IVIS光谱光学成像系统通过荧光成像评估了白血病进展。使用Living Image 4.4光学成像分析软件获取和分析图像。

[0628] 体外细胞毒性测定

[0629] 将稳定表达zsGreen的效应物分选的CAR-T细胞与以下稳定表达dTomato的靶细胞HL-60和或用Celltrace蓝染色的$CD34^+CD33^{WT}$细胞和或用Celltrace紫(Invitrogen)染色的$CD34^+CD33^{Del}$以不同的比例混合。在孵育后16至24小时，使用7AAD或Sytox Red作为活力染料，使用BioRad ZE5流式细胞术分析仪以高通量模式采集数据，以评估细胞毒性。减去阴性

对照中的自发裂解后，CART33细胞特异性细胞毒性(%)被计算为对CFSE和7-AAD或Sytox Red呈阳性的细胞，使用以下公式：((CART33的阳性细胞%)-(对照T细胞的阳性细胞%))/(100-((对照T细胞的阳性细胞%))x 100。

[0630] 体内实验

[0631] 将NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ(NSG-SGM3)小鼠(The Jackson Laboratory,Bar Harbor,Maine,USA)用亚致死(1.2Gy)全身照射(TBI)调理。在TBI后8-24小时内，将人CD34^{+}CD33^{Del}骨髓或脐带血干细胞(5*10^{5}-1*10^{6})连同5*10^{5}dTomato-HL-60细胞静脉内注射到小鼠体内。一到两周后，将小鼠用静脉内注射的2至3*10^{6}个抗CD33或对照CAR-T细胞(预混合CD4:CD8＝1:1)或6μg GO(吉妥珠单抗奥佐米星)或PBS处理。

[0632] 使用来自Biolegend(San Diego,CA,USA)或BD Biosciences(San Jose,CA,USA)的后续抗体通过分析外周血、骨髓抽吸和全骨髓(来自袋装的小鼠)来评估随时间推移造血系统的植入和重建：Ter119-PeCy5、Ly5-BV711、H2kd-BV711、hCD45-BV510、hCD3-Pacific Blue、hCD123-BV605、hCD33-APC、hCD14-APC/Cy7、hCD10-BUV395、hCD19-BV650、CD34-BV421、CD90-PeCy7、hCD38-BUV661和hCD45RA-BUV737。使用碘化丙啶排除死亡细胞。将注射CD34^{+}的来源的人细胞在Ter119^{-}、Ly5^{-}/H2kd^{-}人CD45^{+}上门控。

[0633] 所有实验均在哥伦比亚大学的机构动物护理和使用委员会批准的方案下进行。

[0634] 统计数据

[0635] 所有统计数据均使用Graphpad Prism 7进行。对于连续变量，进行了未配对的双尾t检验。当p值<0.05时，平均值之间的差异被认为是显著的，否则不显著(ns;p>0.05)。

[0636] 结果

[0637] CRISPR/Cas9介导的CD33抗原的遗传消除

[0638] 表达HL-60的CD33用于模拟骨髓性白血病和来自脐带血(CB)或成人骨髓(BM)的原代CD34^{+}细胞，作为供体造血干祖细胞(HSPC)。使用流式细胞术在HL-60细胞和CD34^{+}细胞中证实了CD33的表面表达(图19B)，如先前所述(Taussig等人Blood.2005;106(13):4086-4092;Haubner等人Leukemia.2018;33(1):64-74;Wisniewski等人Blood Cancer J.2011;1(9):e36;Krupka等人Blood.2014;123(3):356-365)。CRISPR/Cas9(一种最近开发的多功能RNA导向的DNA编辑技术)(Haubner等人Leukemia.2018;33(1):64-74)用于对CD33的基因组基因座进行遗传编辑以消除其表达。设计向导以靶向外显子3基因组位点(图19C，其示出SEQ ID NO:58的sgRNA 811间隔区序列，图25A，其示出SEQ ID NO:29的间隔区序列，以及图25B，其示出SEQ ID NO:50的sgRNA 846间隔区序列)，因为外显子3是所有CD33转录物所共有的，并且与CD33是其中成员的Siglec家族假基因几乎没有相似性。测试了基于质粒、慢病毒和核糖核蛋白(RNP)的递送系统，以检查细胞系和原代细胞中几种向导的效率，并且发现与化学修饰的向导组合的RNP系统在原代细胞中最有效(图19B和19D)。在最佳条件下，使用抗CD33克隆HIM34在流式细胞仪上测量，在大于80％的CD34^{+}HSPC中发现CD33表达的缺失，以下称为CD33^{Del}，(图19B和19D)，所述克隆识别位于所有CD33同种型所共有的C2结构域中的表位。CD33表达的这种降低伴随着DNA上Cas9的预期切割位点处的插入/缺失(插入缺失)的存在，如通过DNA的桑格测序所测量的(图19E，底部色谱图)。测试了另外两种同样靶向外显子3的sgRNA并展示相同的效率(图25A和25B)。如所预期，在没有sgRNA的情况下单独对

Cas9进行电穿孔不会在靶位点诱导任何插入缺失(图19E,顶部色谱图)。$CD33^{Del}$细胞保留CD34和CD90的高表达(图19D,下图)。在几个独立实验中观察到一致高的缺失效率(图19F),在RNP电穿孔后5至7天,$CD33^{WT}$细胞中的平均85%CD33表达降至低于10%CD33表达。此外,缺乏CD33表达的B细胞用作阴性对照,以确认Cas9介导的缺失后表达的丧失。观察到的剩余10%CD33表达可能来自未编辑(两种等位基因的野生型)或部分编辑(仅一种等位基因具有插入缺失)的细胞。

[0639] $CD34^{+}CD33^{Del}$ HSPC显示体内移植和多系分化

[0640] 由于本发明的方法可能涉及移植CD33基因编辑的干细胞($CD33^{Del}$)作为CAR-T靶向CD33抗原(CART33)和ADC递送(GO)的平台,因此测试$CD33^{Del}$细胞移植和促成骨髓生成和淋巴细胞生成的能力是重要的。测试了骨髓和脐带血来源的$CD34^{+}$细胞(图20)。通过尾静脉注射将$CD33^{Del}$ HSPC注射到亚致死照射的NSG-SGM3小鼠中,并分析骨髓和血液(图20A)。在注射了骨髓来源的细胞的小鼠中,移植后7周的外周血分析揭示存在人$CD45^{+}$细胞以及骨髓($CD14^{+}$细胞)和淋巴($CD19^{+}$细胞)来源的成熟细胞(图20B)。对15周时的骨髓抽吸物(图26A)和21周时来自袋装小鼠的全骨髓(图20C)的分析(总结在图26B中)显示嵌合现象,伴随随时间推移人$CD45^{+}$细胞的持续贡献。在所有检查的组织中,存在多系移植,并且存在骨髓(单核细胞)和淋巴(B细胞)来源的祖细胞和成熟细胞。所有细胞保持CD33阴性(图26A和26C)。与野生型细胞相比,没有观察到$CD33^{Del}$细胞的多系移植的显著差异。

[0641] 并行地,对脐带血来源的$CD34^{+}$细胞采用了类似的策略,并获得了类似的结果。在第9周时在外周血中(图20D)、在第16周时在骨髓抽吸物中(图26C)和在移植后21周时在全骨髓中(图20E)观察到多系植入。上述结果表明,CD33对于脐带血(CB)或骨髓(BM)$CD34^{+}$细胞的植入或动物模型中完整人造血系统的持续重建都不是必需的。

[0642] $CD33^{Del}$细胞在髓系分化和功能方面擅长。

[0643] 由于方法的目标是将其转化至临床,因此在体外和体内评估了骨髓$CD33^{Del}$细胞的功能能力。首先,与CD34+CD33WT人源化小鼠相比,在CD34+$CD33^{del}$中分析了骨髓谱系的多样性,并且在骨髓亚群之间没有发现明显差异。测试了单核细胞分化的CD34+CD33WT和CD34+CD33WT在体外吞噬大肠杆菌生物颗粒的能力。没有注意到显著差异。还分析了单核细胞/巨噬细胞在移植有CD34+CD33WT或CD34+CD33del细胞的NSGS小鼠中LPS诱导的细胞因子产生,并且观察到诱导后血浆TNFα、IL6和IL8水平相当。最后,为了评估体内CD33缺失细胞的吞噬功能,在腹膜内注射大肠杆菌生物颗粒后两小时对人源化小鼠的腹腔进行了分析。流式细胞术分析显示,在CD34+CD33WT或CD34+CD33del人源化小鼠中,hCD45+hCD11b+hCD14-hCD16-亚群的相似吞噬摄取。所有这些发现都显示CD33Del骨髓细胞的完整功能。

[0644] 在基因编辑细胞中未观察到可检测的脱靶突变或功能性p53途径的丧失

[0645] 为了评估本研究中使用的两种向导是否在HSP细胞中的脱靶位点引入插入缺失,在用Cas9/sgRNA RNP复合物($CD33^{Del}$)电穿孔的人脐带血$CD34^{+}$HSP细胞的全基因组测序数据中与仅使用Cas9蛋白电穿孔的细胞($CD33^{WT}$)相比,对插入缺失进行了评估。获得了超过6.29亿个通过过滤读数,在超过93%的读数中碱基质量超过Q30(图28)。平均覆盖深度超过26X。为了鉴定单核苷酸变体(SNV)和小插入缺失,将读数与人hg38参考基因组进行比对。

[0646] 图28中呈现在两个样品中检测到的变体的总结。在>90%读数中的插入缺失与预期的切割位点chr19:51225811和chr19:51225846对齐时观察到了稳健中靶活性(图21A)。

重要的是,所有插入缺失都位于所使用的两种sgRNA的预期切割位点内。在整个CD33基因座的靶向区域外观察到的少量小插入缺失不是$CD33^{Del}$电穿孔细胞所独有的,并且也存在于仅用Cas9电穿孔的细胞中。接下来检查数据中预测的脱靶位点中显示高度相似性的插入缺失,与所使用的sgRNA具有至多4个错配(图21B、29和30)。再次,在所检查的任何脱靶基因座中均未发现插入缺失(图29和30)。还检查了TP53基因座中的插入缺失,并且没有一个被发现是$CD33^{Del}$细胞所特有的。

[0647] 为了评估CD33表达的丧失是否导致其他基因表达的变化,比较了从四个不同供体获得的CD33缺失(n=5)和对照(n=5)$CD34^{+}$细胞的基因表达谱。使用RNA测序获得每种样品的基因表达谱,并使用edgeR进行组间比较。在两组之间观察到可比较的基因表达谱,Pearson相关系数为0.9948(图21C),并且基于p调整值未观察到显著差异(图31)。发现十四种基因基于p值显著不同,并且最显著的差异是与对照相比,$CD33^{Del}$样品中CD33的下调(图21D和31)。这些结果证实体外$CD34^{+}$细胞中CD33的缺乏不会严重影响下游基因的表达。在基于p值显示出表达改变的13种基因中,没有任一种途径或细胞过程的富集。值得注意的是,基因表达特征并未表明TP53途径或其他可能损害HSC功能或减弱其长期潜力的DNA损伤途径已被活化。因此得出结论,使用本文所述的基因编辑技术消除脐带血细胞和成人HSC中的CD33似乎不会损害其未来的功能。

[0648] 还使用整合基因组查看器(IGV)手动检查数据中映射至CD33外显子3和RNAseq数据中的TP53转录物的所有编码外显子的读数中的插入缺失。如所预期,在CD33外显子3中的>95%的读数中存在插入缺失(图27)。在TP53中发现了一些具有插入缺失的读数,但它们在重复序列内,并且也存在于对照样品中,从而表明存在测序伪影。总之,这些数据表明,使用本研究中使用的向导在CD33基因座处CRISPR/Cas9介导的基因组编辑在干细胞系统中未产生可检测的脱靶插入缺失。

[0649] T细胞中CD33特异性CAR的表达

[0650] 基于共刺激结构域的数量将CAR分为不同的世代。已经设计了第二代CAR(图22A),包括与CD28跨膜结构域、4-1BB(CD137)共刺激结构域和作为细胞内结构域的来自CD3 TCR的CD3ζ链配对的抗CD33(克隆My96)的单链可变区。在EF1-α启动子的控制下,将CAR cDNA克隆到pHIV-zsGreen慢病毒载体中,从而实现与ZS-green的双顺反子表达。对从正常供体获得的外周血进行分级分离以获得PBMC,并用携带仅载体或CAR构建体的慢病毒颗粒转导(图22B)。PBMC内CD4和CD8细胞的转导效率不相等,因为观察到与CD8细胞相比,CD4的转导较高,并且在其他研究中也进行了类似的观察(Blaeschke等人Cancer Immunol Immunother.2018;67(7):1053-1066)。鉴于PBMC中CD4和CD8细胞的不相等转导,并且为了获得更明确的CD4和CD8细胞组成,分别转导纯化的CD4和CD8细胞,基于来自下游IRES元件的GFP表达进行分选,并以等摩尔比混合。通过测量CAR的表面表达和与缀合至链霉亲和素荧光染料的纯化生物素化CD33蛋白的结合来确认CAR表达。观察到CAR的稳健表达及其与CD33分子的结合(图22B)。

[0651] 表达CAR的T细胞在体外表现出CD33依赖性细胞毒性

[0652] CART33细胞的细胞毒性首先在具有可变CD33表达的靶标上进行评估。证实了对CD33骨髓性白血病细胞HL-60的高杀伤,并且观察到对以降低的水平表达CD33的$CD33^{WT}$干细胞的较低杀伤。值得注意的是,CD33表达的缺乏(由于Cas9/sgRNA介导的缺失)保护了$CD34^{+}$

细胞免受杀伤,因为当与$CD33^{Del}$ $CD34^{+}$细胞一起孵育时没有观察到CART33的细胞毒性。此第一个实验(图22C)也证实了CART33细胞毒性水平与靶细胞上的CD33表达水平之间的相关性,即CART33细胞毒性与靶细胞上CD33的表达水平成正比。

[0653] 然后设计了三重培养测定,用于评估与可变CD33表达的靶标共孵育时的CART33细胞杀伤。当$CD33^{WT}$ HL-60细胞和$CD34^{+}CD33^{WT}$细胞与CART33共孵育时,在两种细胞类型中都观察到了CART33细胞的相关细胞毒性水平(图22D),但是当$CD33^{WT}$ HL-60细胞和$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞与CART33共孵育时,仅HL-60细胞被杀死(图22E)。类似地,所有三种细胞类型$CD34^{+}CD33^{WT}$、$CD34^{+}CD33^{Del}$和CART33细胞(图22F)的共孵育仅在与其CD33表达成正比的水平下展示对$CD33^{WT}$ CD34+的杀伤。此外,在另一种急性骨髓性细胞系KG1上测试了CART33细胞毒性,并在体外发现了CART33的类似CD33依赖性细胞毒性。

[0654] 抗CD33免疫疗法在细胞系来源的异种移植物(CDX)小鼠模型中显示CD33依赖性白血病清除

[0655] 对于体内实验,设计了一种策略来代表微小残留疾病背景下的人类治疗环境(图23A)。在这个模型中,首先通过在亚致死照射的小鼠中注射500,000个HL-60细胞而引发白血病。所述小鼠同时注射了500,000个$CD33^{Del}$ $CD34^{+}$细胞以模拟AML复发模型。初步实验表明,一周的时间足以使AML细胞归巢和植入,因为另外2周后,100%的小鼠变成白血病。这概括了缓解后骨髓,其中AML细胞可能仍然存在,尽管在临床上不可检测到。在共同注射白血病和$CD34^{+}$干细胞一周后,将小鼠分成不同的组并用所描述的剂处理(图23A)。使用成像和流式细胞术随时间推移监测白血病负荷和$CD34^{+}$细胞植入(图23B-23F)。到第3周,在PBS和对照CAR-T细胞处理的小鼠(即仅用载体转导的T细胞,缺乏CAR-T构建体)的骨髓抽吸物中观察到高肿瘤负荷,并且到第3周和第4周,这两组中的所有小鼠死于它们的疾病(图23A)。两只对照T处理的小鼠在3周时具有相对较低的白血病负荷,但在死亡时在BM中进展至非常高的白血病负荷。相反,在12周的过程中,在用CART33细胞、抗CD33 ADC GO或GO与CART33的组合治疗的小鼠的骨髓抽吸物中(图23B)或在3.5周或8周的成像上(参见图23C-23E)未发现$CD33^{WT}$白血病细胞。这些结果表明,在本模型中,CART33和GO两者都是针对表达CD33的白血病的有效剂。

[0656] $CD34^{+}CD33^{Del}$ HSPC在治疗模型中显示多系植入和分化

[0657] 同时,监测小鼠在上述治疗模型中的$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞的多系植入。观察到植入,如所有组的骨髓抽吸物中呈CAR-T和CD33阴性的人$CD45^{+}$细胞的存在所证明的(图23F),从而表明$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞也可植入本治疗模型中。令人感兴趣地,在CART33处理组(CART33+PBS和CART33+GO)中,相对于第3周的初始点,在第6周时间点观察到$CD33^{Del}$人$CD45^{+}$细胞百分比的下降,但这些水平恢复至它们到第9周的初始水平并保持直到第12周的最后点。两组小鼠中相对低的植入和随后的下降可能反映了治疗相关的应激(包括骨髓中CAR-T细胞的抗白血病应答),这在CAR-T组中更为明显并且与GO组中相比持续时间更长。可替代地,使用不同的$CD34^{+}$和T细胞供体可能触发了同种异体应答,这可解释在注射CART33细胞的小鼠中观察到的重建延迟。值得注意的是,这种现象是可逆的,因为植入水平在8周内恢复。

[0658] 接下来通过分析骨髓细胞生成和淋巴细胞生成来研究移植细胞的多能性性质(图24A)。在所分析的所有时间点都发现了CD33阴性骨髓和淋巴祖细胞,以及成熟的骨髓和淋巴细胞(图24A)。虽然在所有处理的小鼠中随时间推移观察到完整的造血系统重建,但在注

射了CAR-T细胞的小鼠中观察到淋巴重建延迟。这可能是同种异体应答的结果，因为已知淋巴祖细胞对同种异体特异性效应更敏感。

[0659] 同时，为了证明CART33和GO对$CD34^{+}CD33^{WT}$原代HSPC的特异性，向亚致死照射的NSG-SGM3小鼠共注射500,000个HL-60细胞和500,000个$CD34^{+}CD33^{WT}$细胞(图24B)。一周后，将一组小鼠用CART33细胞处理，并在第3周抽吸BM，同一天另一组注射GO并在4天后分析它们的BM抽吸物。如在治疗模型中观察到的，处理后确认了完全白血病清除(图24C)。此外，观察到$CD33^{WT}$细胞的完全消除(图24D)。因此，$CD33^{WT}$细胞对GO和CART33疗法仍然敏感，而CD33消除细胞不敏感。

[0660] 论述

[0661] 使用诸如CAR-T或mAB的剂的任何抗原依赖性免疫疗法的成功取决于癌细胞表面上而不是正常细胞或体内其他细胞上独特抗原的存在。不幸的是，此类抗原在癌症中很少见。一种可能的结果是，通过在干细胞中使用基因组工程化方法消除LSA，将有可能产生对抗原依赖性免疫疗法具有抗性的干细胞/祖细胞，从而实现最大免疫疗法。在证明此类抗原耗减细胞在功能上与野生型细胞相似后，它们可用于代替患病细胞。仔细选择对所述谱系的正常功能而言非必要的谱系特异性抗原对这种方法是重要的。在替代方法中，如果LSA是必不可少的，那么代替完全消除LSA的表达，可使用基因编辑技术来修饰LSA上抗原依赖性免疫治疗剂所识别的表位，同时保持LSA功能(称为“功能冗余表位转换”，或FRES)。

[0662] 在本研究中，表明将缺乏谱系抗原CD33的干细胞与同种异体工程化T细胞或ADC组合，可实现白血病消融和完全造血重建。使用了急性骨髓性白血病(一种在治疗领域未满足需求的疾病)，并且证明这种方法是可行的。由于CD33是LSA并且在AML中靶向CD33，因此使用CAR-T或CD33 mAB由于干细胞/祖细胞以及骨髓谱系细胞的消除而导致严重的骨髓抑制和淋巴耗减，所建议的用于治疗AML的方法是用缺乏CD33的细胞重建造血系统。基于CRISPR的方法被用来破坏供体干细胞(脐带血或骨髓$CD34^{+}$细胞)中CD33的表达，以使它们对CAR-T细胞攻击具有“抗性”。

[0663] 最近，两组进行类似的观察并独立报告了本研究中描述的方法(Kim等人Cell.2018;173(6):1439-1453e1419;Humbert等人Leukemia.2019;33(3):762-808)。目前的数据加强了这些研究所进行的观察结果，并且还使用补充方法增加了新的见解。与Kim等人的研究不同，其中将小鼠首先注射CD33基因编辑的$CD34^{+}$细胞，以允许在白血病引入和治疗之前完全植入，本发明方法更接近地模拟具有微小残留疾病的AML复发的情况，因为白血病细胞和基因编辑的干细胞被共同注射，然后是CAR-T或ADC治疗。此外，通过严格选择具有高中靶活性和低脱靶活性的CD33向导RNA，在HSC中观察到了极其有效的CD33表达消除，而无在其他基因中观察到的脱靶插入缺失，从而使得能够对人研究中这种方法的安全性充满信心(Kim等人Cell.2018;173(6):1439-1453e1419)。事实上，在所检查的任何Siglec基因家族和假基因中都没有发现插入缺失。Kim等人观察到SIGLEC22P中的脱靶活性，包括14kb片段的缺失，很可能是由于与针对CD33设计的sgRNA的SIGLEC22P的100％同源性(Kim等人Cell.2018;173(6):1439-1453e1419)。外显子3内位置的选择以及所选sgRNA与其他基因不存在同源性的确认可能使仅CD33消除的特异性成为可能。TP53基因中不存在插入缺失或其他基因组重排(如使用全基因组测序所分析)以及不存在与p53途径或p53本身有关的任何失调基因表明本文开发的方法可在不损害HSC功能的情况下提供具有高特异性的有效基因

组编辑。最后，与病毒介导的Cas9(其为组成型并在体内在HSC中持续存在)的表达相反，Cas9 RNP(其仅在其离体操作过程中暂时存在于HSC中)的使用避免了被发现存在于>50％的群体中的针对Cas9的预先存在的免疫性的未来问题(Charlesworth等人Nat Med.2019;25(2):249-254;Crudele等人Nat Commun 2018;9(1):3497)。

[0664] 此外，与Kim等人相反，本发明的方法涉及使用CD33编辑的HSC(来自脐带血或成人骨髓)进行同种异体BMT，然后使用源自同种异体供体的T细胞进行ADC治疗或CAR-T治疗。这种方法在临床环境中更实用。已经用细胞毒性化学疗法大量预治疗的血液系统恶性肿瘤患者通常产生较差的自体T细胞产量，从而限制了自体CAR-T的效率和有效性。这个问题可通过使用同种异体-BMT和同种异体-T细胞来解决，其中产量和质量不是问题。更重要的是，通过使用ADC(而不是CAR-T)靶向疾病，表明体液疗法可与CAR-T细胞协同作用或作为CAR-T细胞的替代，从而进一步扩展使用体液方法的抗白血病疗法的方法。

[0665] 还应注意，GO药物(由抗CD33抗体克隆P67.6组成)识别位于外显子2中的表位。在人中发现了两种CD33同种型。更常见的同种型是全长蛋白质，包括对GO敏感的外显子2;不太常见的是缺少外显子2的同种型。大约30％的群体携带纯合子单核苷酸多态性(SNP，T/T)，从而导致不常见的缺少外显子2的CD33变体的排他性表达。这种群体也可能与本工作中描述的靶向CD33免疫疗法组合被认为是潜在的HSCT供体库，从而消除了对Cas-9定向消除的需要。然而，这可能极大地限制供体库，从而使所述方法在人研究中几乎不可行。在这方面，Humbert等人(Humbert等人Leukemia.2019;33(3):762-808)使用CRISPR/Cas9方法来使用两种不同的sgRNA靶向侧翼内含子以缺失外显子2。目前尚不清楚选择性地去除V结构域是否具有相对于对整个CD33的破坏的任何优点，因为通过去除整个CD33在小鼠或猴(恒河猴)中均未观察到植入或功能缺陷(Kim等人Cell.2018;173(6):1439-1453e1419)。此外，使用多个向导使潜在脱靶成倍增加，并且向导的效率将可能受到库中效率最低的向导的限制。

[0666] 在本研究中，人$CD34^{+}$BM和CB中CD33的缺失不会导致任何明显的副作用。移植后超过21周，NSG-SGM3小鼠未出现任何异常表型。缺乏可观察到的CD33缺失相关表型可通过Siglecs成员之间的功能冗余或补偿来解释。

[0667] 尽管涉及经修饰免疫细胞的临床试验越来越多，但很少能改善患者的预后，这主要是因为对正常组织的中靶/组织外毒性。虽然CAR-T是最近的方法，其长期影响不太确定，但mAB和ADC的使用在癌症护理中是常规的并且通常是安全的。表明，将CART细胞和/或ADC(例如GO)与工程化的干细胞组合保护正常组织免受中靶/组织外毒性，并且可带来动物模型中的完全缓解和完全造血重建。尽管具有证明的益处，但几乎所有GO治疗的患者都经历正常髓系细胞的大量耗减，这可能导致潜在致命的发热性嗜中性粒细胞减少症和由于GO诱导的骨髓抑制引起的异常出血问题(Amadori等人J Clin Oncol.2016;34(9):972-979)。这些严重的不良事件将GO的使用限制在诱导化学疗法期间的短暂暴露，并且基本上禁止其长期使用。所述研究还表明，较低GO剂量联合或不联合CART33输注可能是治疗AML患者的全新方法。最后，最近GO的重新批准以及针对新型CD33定向试剂(包括新的抗CD33 CAR-T、抗CD33 ADC和CD33双特异性T细胞衔接器或BiTE)的当前临床试验的重新兴起使这种方法在不久的将来可转移至诊所。

[0668] 还设计了易于使用的传递途径来测试新的潜在靶标，这所述靶标具有使CD33成为

可吸引靶标的性质,即由造血细胞严格表达并且也由癌细胞(例如,CD123、CLL-1或CD244)表达的功能冗余的谱系标志物。这种抗原通过CRISPR介导的从HSC消除抗原而呈现“癌症特异性”(Haubner等人Leukemia.2018;33(1):64-74)。所述策略也可在实体瘤中复制,其中功能类器官可能由胚胎或诱导型多能干细胞产生,对所述干细胞进行编辑以消除表达,或者其中原发器官已被去除(即在根治性前列腺切除术后患者中靶向正常前列腺谱系抗原)。最后,提出了使用DNA碱基编辑方法对组织特异性抗原进行“表位修饰”的可能性。“表位修饰”可允许蛋白质保留其功能,但交换小的抗原决定簇。在这种策略中,干细胞保留了功能性蛋白质,但不再拥有免疫疗法的结合位点,而携带未修饰的蛋白质的癌细胞对免疫疗法保持独特的敏感性。

[0669] 实施例6:吉妥珠单抗奥佐米星(GO)靶向免疫疗法清除了原发性急性骨髓性白血病(AML)并挽救了$CD33^{Del}$细胞

[0670] $CD34^{+}CD33^{Del}$细胞是通过使CD34+细胞群体与gRNAs sgRNA811(具有5’CCUCACUAGACUUGACCCAC 3’的向导区;SEQ ID NO:70)和sgRNA 846(具有5’AUCCCUGGCACUCUAGAACC 3’的向导区;SEQ ID NO:67)接触而产生的。为了评估GO治疗后的$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞植入和造血重建,在第一天通过尾静脉将$0.5x10^{6}$个原代人AML细胞注射到NSG-SGM3(NSGS)小鼠中。AML细胞注射两个月后,通过骨髓(BM)抽吸物的流式细胞术评估AML负荷(微小残留疾病)。然后将群组分成两个可比较的组(图32A图:治疗前):其中小鼠将不接受治疗的对照组(圆圈)和其中小鼠将接受慢性剂量的GO的治疗组(三角形)。使用以下抗体在$Ter119^{-}H2kd/Ly5^{-}hCD45^{+}hCD33^{+}$cKit上对白血病细胞进行门控:Ter119 Pecy5、Ly5/H2kd BV711、hCD45 BV510、hCD33 APC、cKit BV650。一旦评估了微小残留疾病,来自治疗组的小鼠就接受第一次注射1μg GO。第一次GO注射十天后,两个小鼠组(未治疗的和治疗的)都移植了$0.5x10^{6}$个$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞。$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞移植十天后,治疗组开始接受慢性剂量的GO(每10天注射1μgr GO)。$CD34^{+}CD33^{Del}$移植三周后,通过流式细胞术分析两个小鼠组的BM抽吸物的AML负荷和$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞植入评估。在对照小鼠中,AML水平大于70%,而在治疗的小鼠中,AML水平低于5%。在对照小鼠中,$hCD33^{Del}$细胞的百分比低于20%,而在治疗的小鼠中,$hCD33^{Del}$细胞的百分比高于70%,从而表明成功植入。(图32B,上图)。接下来,通过流式细胞术分析骨髓/淋巴祖细胞和成熟细胞来评估注射的$CD34^{+}CD33^{Del}$细胞的造血重建能力,如图32B,续)所示。$CD123^{+}$细胞、$CD14^{+}$细胞、$CD10^{+}$细胞和$CD19^{+}$细胞在$hCD45^{+}CD33^{Del}$群体(将细胞在$Ter119^{-}$、$Ly5^{-}/H2kd^{-}$、$hCD45^{+}$、$hCD33^{-}$上进行门控)中的水平在对照组与治疗组之间没有显著差异。如图32C的左上图所示,没有对照小鼠存活150天,而所有治疗的小鼠存活至少150天。AML负荷在对照小鼠死亡时的BM、脾脏和外周血中相当(左下图)。此外,CD33表达在BM和脾脏中最显著,如来自每个相应器官或组织的门控$CD33^{+}$细胞所示(右图)。

[0671] 实施例7:$CD34^{+}CD33^{Del}CLL1^{Del}$细胞的产生

[0672] $CD34^{+}CD33^{Del}CLL1^{Del}$双重缺失细胞通过用gRNA的不同组合转染$CD34^{+}$细胞来产生,包括:sgRNA 811(针对CD33的具有5’CCUCACUAGACUUGACCCAC 3’的间隔区序列;SEQ ID NO:70)、sgRNA 846(针对CD33的具有间隔区序列5’AUCCCUGGCACUCUAGAACC 3’;SEQ ID NO:67)、具有5’GUUGUAGAGAAAUAUUUCUC 3’(SEQ ID NO:115)的间隔区序列的CLL-1gRNA和具有向导区5’GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU 3’(SEQ ID NO:116)的第二CLL-1gRNA。在第1天,为了在

CRISPR/Cas9介导的靶基因消除后获得，使用核转染用sgRNA转染细胞。转染后四天，通过流式细胞术评估CD33和CLL1的表达。在第5天，将$CD34^{+WT}$、$CD34^{+}CD33^{Del}$、$CD34^{+}CLL1^{Del}$或$CD34^{+}CD33^{Del}CLL1^{Del}$细胞静脉内注射到NSGS小鼠中。如图33A所示，使用这些gRNA单独地和组合地成功耗减了CD33和/或CLL1水平。通过桑格测序(数据未示出)确认了所需基因座处的突变。

[0673] 注射后四周，通过流式细胞术分析注射小鼠的骨髓(BM)抽吸物以确定在$Ter119^{-}$、$Ly5^{-}/H2kd^{-}$、$hCD45^{+}$上门控的$CD34^{+}$细胞中CD33和/或CLL1的存在(图33B)。在骨髓样品中成功检测到单一缺失和双重缺失细胞。此外，在全骨髓样品(图33C)和脾脏样品(图33D)中的hCD45+群体中检测到CD123+、CD14+、CD10+和CD19+细胞。此分析表明，CD33和/或CLL1的耗减不会损害造血多系移植。

[0674]

靶标	向导序列	切割位点	外显子	SEQ ID NO:
CD33	CCUCACUAGACUUGACCCAC	51,225,811	3	70
CD33	AUCCCUGGCACUCUAGAACC	51,225,846	3	67
CLL1	GUUGUAGAGAAAUAUUUCUC	9,979,406	3	115
CLL1	GGAGAGGUUCCUGAUCUUGU	9,979,450	3	116

[0675] 其他实施方案

[0676] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合结合。本说明书中公开的每个特征可被替换为用于相同、等同或相似目的的特征。因此，除非另有明确规定，否则所公开的每个特征仅是一系列通用等效或类似特征的一个实例。

[0677] 从以上描述中，本领域技术人员可容易地确定本公开的必要特征，并且在不脱离本公开的精神和范围的情况下，可对本公开进行各种变化和修改以使其适于各种用法和条件。因此，其他实施方案也在权利要求书内。

[0678] 等效方案

[0679] 虽然已经在本文描述和说明了若干发明实施方案，但本领域普通技术人员将容易地预想多种其他手段和/或结构以用于执行功能和/或获得本文所描述的结果和/或一个或多个优点，并且此类变化和/或修改中的每一者被视为在本文所描述的发明实施方案的范围之内。更一般地，本领域技术人员将容易理解，本文所描述的所有参数、尺寸、材料和结构都是示例性的，并且实际参数、尺寸、材料和/或结构将取决于使用本发明教义的具体应用或应用。本领域的技术人员将认识到，或仅仅使用常规实验就能够确定本文所描述的具体的本发明实施方案的许多等效物。因此，应当理解，前述实施方案仅以举例的方式呈现，并且在所附权利要求书及其等效物的范围内，本发明实施方案可以除了具体描述和要求保护的方式之外的方式来实践。本公开的本发明实施方案涉及本文所描述的每个单独的特征、系统、物品、材料、药盒和/或方法。此外，如果此类特征、系统、物品、材料、药盒和/或方法并不互相矛盾，那么两个或更多个此类特征、系统、物品、材料、药盒和/或方法的任何组合都包括在本公开的本发明范围内。

[0680] 如本文所定义和使用的所有定义应理解为凌驾于字典的定义、以引用方式并入的文献中的定义和/或所定义术语的普通含义。

[0681] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请都相对于每个被引用的主题以引用的方式并入，这在一些情况下可涵盖文件的全部内容。

[0682] 如本文所用,在说明书和在权利要求书中,不定冠词“一个(种)”应理解为意指“至少一个(种)”,除非相反地明确指示。

[0683] 如在本说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应当理解为意指所结合的要素中的“一个或两个”,即在一些情况下结合存在并且在其他情况下分开存在的要素。用“和/或”列出的多个要素应以相同的方式理解,即,如此联合的要素中的“一个或多个”。除了由“和/或”从句所具体标识的要素以外,其他要素可任选地存在,无论是否与所具体标识的那些要素相关。因此,作为非限制性实例,当与开放式语言诸如“包含”结合使用时,对“A和/或B”的提及在一个实施方案中可仅指代A(任选地包括除B以外的要素);在另一个实施方案中,仅指代B(任选地包括除A以外的要素);在又一个实施方案中,指代A和B两者(任选地包括其他要素);等。

[0684] 如在本说明书和权利要求书中所使用的,“或”应理解为具有与如上述定义的“和/或”相同的含义。例如,当分离列表中的项目时,“或”或“和/或”应解释为包括性的,即包括多个要素或要素列表中的至少一个要素,但是也包括多于一个要素,以及任选地包括另外未列出的项目。只有诸如“仅仅之一”或“正好之一”的术语明确地相反地指出,否则当在权利要求书中使用“由……组成”时,将指代包括正好是多个要素或要素列表中的一个要素。一般而言,当前面有诸如“任一”、“之一”、“仅仅之一”或“正好之一”等排他性术语时,如本文所使用的术语“或”应仅解释为表明排他性的替代方案(即“一个或另一个但不是两者”)。当“基本上由……组成”用于权利要求书中时,应具有其在专利法领域中所使用的通常含义。

[0685] 如本文在说明书中和权利要求书中所使用,关于具有一个或多个要素的列表的短语“至少一个”应理解为意指选自所述要素列表中的任一个或多个要素的至少一个要素,但未必包括在所述要素列表内具体地列出的每一个要素中的至少一个,并且不排除所述要素列表中多个要素的任何组合。此定义还允许除了短语“至少一个(种)”指代的要素列表内所具体定义的要素以外,无论是否与所具体定义的那些要素相关,要素可任选地存在。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或者等效地,“A或B中的至少一个”,或者等效地,“A和/或B中的至少一个”)可在一个实施方案中指代至少一个A,任选地包括多于一个A,但不存在B(并且任选地包括除了B之外的要素);在另一个实施方案中,指代至少一个B,任选地包括多于一个B,但不存在A(并且任选地包括除了A之外的要素);在又一实施方案中,指代至少一个A,任选地包括多于一个A,以及至少一个B,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其他要素);等等。

[0686] 还应理解,除非明确相反地指出,否则在包括多于一个步骤或动作的本文所要求保护的任何方法中,方法的步骤或动作的顺序不一定限于其中方法的步骤或动作被列举的顺序。

序列表

<110> 纽约市哥伦比亚大学理事会(THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK)

<120> 用于抑制谱系特异性抗原的组合物和方法

<130> 01001/004965-WO1

<140>

<141>

<150> 62/852,573

<151> 2019-05-24

<150> 62/793,210

<151> 2019-01-16

<160> 119

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 1

gagatcgtgc tgacccagag ccccggcagc ctggccgtga gccccggcga gagggtgacc 60

atgagctgca agagcagcca gagcgtgttc ttcagcagca gccagaagaa ctacctggcc 120

tggtaccagc agatccccgg ccagagcccc aggctgctga tctactgggc cagcaccagg 180

gagagcggcg tgcccgacag gttcaccggc agcggcagcg gcaccgactt caccctgacc 240

atcagcagcg tgcagcccga ggacctggcc atctactact gccaccagta cctgagcagc 300

aggaccttcg gccagggcac caagctggag atcaagagg 339

<210> 2

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 2

caggtgcagc tgcagcagcc cggcgccgag gtggtgaagc ccggcgccag cgtgaagatg 60

agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctactaca tccactggat caagcagacc 120

cccggccagg gcctggagtg ggtgggcgtg atctaccccg gcaacgacga catcagctac 180

aaccagaagt tccagggcaa ggccaccctg accgccgaca agagcagcac caccgcctac 240
atgcagctga gcagcctgac cagcgaggac agcgccgtgt actactgcgc cagggaggtg 300
aggctgaggt acttcgacgt gtggggccag ggcaccaccg tgaccgtgag cagc 354

<210> 3
<211> 657
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 3

attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60
catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt cccctatttc ccggaccttc taagcccttt 120
tgggtgctgg tggtggttgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 180
tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac 240
atgactcccc gccgccccgg gcccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc 300
gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac 360
cagcagggcc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat 420
gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac 480
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag 540
attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc aaggggcacg atggccttta ccagggtctc 600
agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 657

<210> 4
<211> 603
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 4

ctatcaattt ttgatcctcc tccttttaaa gtaactctta caggaggata tttgcatatt 60
tatgaatcac aactttgttg ccagctgaag ttctggttac ccataggatg tgcagccttt 120
gttgtagtct gcattttggg atgcatactt atttgttggc ttacaaaaaa gaagtattca 180
tccagtgtgc acgaccctaa cggtgaatac atgttcatga gagcagtgaa cacagccaaa 240
aaatctagac tcacagatgt gaccctaaga gtgaagttca gcaggagcgc agacgccccc 300
gcgtaccagc agggccagaa ccagctctat aacgagctca atctaggacg aagagaggag 360
tacgatgttt tggacaagag acgtggccgg gaccctgaga tgggggaaa gccgagaagg 420
aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac 480
agtgagattg ggatgaaagg cgagcgccgg aggggcaagg ggcacgatgg cctttaccag 540

ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac gacgcccttc acatgcaggc cctgcccccc 600
cgc 603
<210> 5
<211> 627
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 5
attgaagtta tgtatcctcc tccttaccta gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc 60
catgtgaaag ggaaacacct ttgtccaagt cccctatttc ccggaccttc taagcccttt 120
tgggtgctgg tggtggttgg tggagtcctg gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc 180
tttattattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgttc 240
atgagagcag tgaacacagc caaaaaatct agactcacag atgtgaccct aagagtgaag 300
ttcagcagga gcgcagacgc ccccgcgtac cagcagggcc agaaccagct ctataacgag 360
ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat gttttggaca agagacgtgg ccgggaccct 420
gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag 480
aaagataaga tggcggaggc ctacagtgag attgggatga aaggcgagcg ccggaggggc 540
aaggggcacg atggccttta ccagggtctc agtacagcca ccaaggacac ctacgacgcc 600
cttcacatgc aggccctgcc ccctcgc 627
<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 6

Ile	Glu	Val	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn
1				5				10					15		
Gly	Thr	Ile	Ile	His	Val	Lys	Gly	Lys	His	Leu	Cys	Pro	Ser	Pro	Leu
			20					25				30			
Phe	Pro	Gly	Pro	Ser	Lys	Pro	Phe	Trp	Val	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly
		35					40					45			
Val	Leu	Ala	Cys	Tyr	Ser	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ile	Ile	Phe
	50					55					60				
Trp	Val	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn
65					70					75					80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
85 90 95
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
100 105

<210> 7
<211> 89
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 7
Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly
1 5 10 15
Tyr Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp
20 25 30
Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys
35 40 45
Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His
50 55 60
Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys
65 70 75 80
Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
85

<210> 8
<211> 97
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 8
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1 5 10 15
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
20 25 30
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
35 40 45
Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Phe
65 70 75 80

Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr
85 90 95

Leu

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 9

ccaaagagtc cggggatact tgg 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 10

gttgagtttt gcattggcgg cgg 23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 11

acctgtcagg tgaagttcgc tgg 23

<210> 12

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多肽

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多肽

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30
Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95
Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 14

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成肽

<400> 14

Gly Ser Thr Ser Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
1 5 10 15

Thr Lys Gly

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成多肽

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
85 90 95

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
100 105 110

Arg

<210> 16

<211> 850

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 16
ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catggacatg agggtccctg ctcagctcct 60
ggggctcctg ctgctctggc tctcaggtgc cagatgtgag atcgtgctga cccagagccc 120
cggcagcctg gccgtgagcc ccggcaagag ggtgaccatg agctgcaaga gcagccagag 180
cgtgttcttc agcagcagcc agaagaacta cctggcctgg taccagcaga tccccggcca 240
gagccccagg ctgctgatct actgggccag caccagggag agcggcgtgc ccgacaggtt 300
caccggcagc ggcagcggca gcggcaccga cttcaccctg accatcagca gcgtgcagcc 360
cgaggacctg gccatctact actgccacca gtacctgagc agcaggacct tcggccaggg 420
caccaagctg gagatcaaga ggggcagcac cagcggcagc ggcaagcccg gcagcggcga 480
gggcagcacc aagggccagg tgcagctgca gcagcccggc gccgaggtgg tgaagcccgg 540
cgccagcgtg aagatgagct gcaaggccag cggctacacc ttcaccagct actacatcca 600
ctggatcaag cagacccccg gccagggcct ggagtgggtg ggcgtgatct accccggcaa 660
cgacgacatc agctacaacc agaagttcca gggcaaggcc accctgaccg ccgacaagag 720
cagcaccacc gcctacatgc agctgagcag cctgaccagc gaggacagcg ccgtgtacta 780
ctgcgccagg gaggtgaggc tgaggtactt cgacgtgtgg ggccagggca ccaccgtgac 840
cgtgagcagc 850
<210> 17
<211> 695
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 17
gcggccgcaa ttgaagttat gtatcctcct ccttacctag acaatgagaa gagcaatgga 60
accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt tgtccaagtc ccctatttcc cggaccttct 120
aagccctttt gggtgctggt ggtggttggt ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta 180
acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac 240
tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg cccacccgca agcattacca gccctatgcc 300
ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc 360
cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc tataacgagc tcaatctagg acgaagagag 420
gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga 480
aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc 540
tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc cggaggggca aggggcacga tggcctttac 600
cagggtctca gtacagccac caaggacacc tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc 660

cctcgctaac gcccctctcc ctccccccc cctaa 695

<210> 18

<211> 641

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 18

gcggccgcac tatcaatttt tgatcctcct ccttttaaag taactcttac aggaggatat 60

ttgcatattt atgaatcaca actttgttgc cagctgaagt tctggttacc cataggatgt 120

gcagcctttg ttgtagtctg cattttggga tgcatactta tttgttggct tacaaaaaag 180

aagtattcat ccagtgtgca cgaccctaac ggtgaataca tgttcatgag agcagtgaac 240

acagccaaaa aatctagact cacagatgtg accctaagag tgaagttcag caggagcgca 300

gacgccccg cgtaccagca gggccagaac cagctctata acgagctcaa tctaggacga 360

agagaggagt acgatgtttt ggacaagaga cgtggccggg accctgagat gggggggaaag 420

ccgagaagga agaaccctca ggaaggcctg tacaatgaac tgcagaaaga taagatggcg 480

gaggcctaca gtgagattgg gatgaaaggc gagcgccgga ggggcaaggg gcacgatggc 540

ctttaccagg gtctcagtac agccaccaag gacacctacg acgcccttca catgcaggcc 600

ctgccccctc gctaacgccc ctctccctcc ccccccccta a 641

<210> 19

<211> 665

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 19

gcggccgcaa ttgaagttat gtatcctcct ccttacctag acaatgagaa gagcaatgga 60

accattatcc atgtgaaagg gaaacacctt tgtccaagtc ccctatttcc cggaccttct 120

aagccctttt gggtgctggt ggtggttggt ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta 180

acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac 240

tacatgttca tgagagcagt gaacacagcc aaaaaatcta gactcacaga tgtgacccta 300

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc 360

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 420

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 480

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 540

cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 600

tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgctaac gcccctctcc ctccccccc 660

cctaa 665

<210> 20

<211> 503

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多肽

<400> 20

```
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1               5                  10                  15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro
            20                  25                  30
Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
        35                  40                  45
Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
    50                  55                  60
Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65                  70                  75                  80
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
                85                  90                  95
Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
            100                 105                 110
Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
        115                 120                 125
Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
    130                 135                 140
Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145                 150                 155                 160
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
                165                 170                 175
Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
            180                 185                 190
Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
        195                 200                 205
Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
    210                 215                 220
Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225                 230                 235                 240
```

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile
260 265 270
Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr
275 280 285
Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
290 295 300
Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly
305 310 315 320
Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala
325 330 335
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Lys Arg Gly
340 345 350
Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val
355 360 365
Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu
370 375 380
Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
385 390 395 400
Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
405 410 415
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
420 425 430
Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
435 440 445
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
450 455 460
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
465 470 475 480
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
485 490 495
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500

<210> 21
<211> 509
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 21

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro
20 25 30
Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
35 40 45
Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
50 55 60
Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95
Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
100 105 110
Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145 150 155 160
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175
Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
180 185 190
Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
195 200 205
Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220
Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met
260 265 270
Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr
275 280 285

Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
290 295 300
Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
305 310 315 320
Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val
325 330 335
Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile
340 345 350
Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr
355 360 365
Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln
370 375 380
Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys
385 390 395 400
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
405 410 415
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
420 425 430
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
435 440 445
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
450 455 460
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
465 470 475 480
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
485 490 495
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
500 505

<210> 22
<211> 552
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 22
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro

20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
35 40 45

Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
100 105 110

Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145 150 155 160

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
180 185 190

Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
195 200 205

Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220

Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile
260 265 270

Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr
275 280 285

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
290 295 300

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly
305 310 315 320

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
325 330 335

Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
340 345 350
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
355 360 365
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
370 375 380
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Lys Arg
385 390 395 400
Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro
405 410 415
Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu
420 425 430
Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
435 440 445
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
450 455 460
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
465 470 475 480
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
485 490 495
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
500 505 510
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
515 520 525
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
530 535 540
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
545 550

<210> 23
<211> 542
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 23
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro

20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
35 40 45

Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
50 55 60

Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
100 105 110

Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
130 135 140

Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145 150 155 160

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175

Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
180 185 190

Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
195 200 205

Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220

Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile
260 265 270

Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr
275 280 285

Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
290 295 300

Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly
305 310 315 320

Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Trp Leu Pro Ile Gly Cys Ala
325 330 335

Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu Ile Cys Trp Leu
340 345 350
Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn Gly Glu Tyr
355 360 365
Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp
370 375 380
Val Thr Leu Thr Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys
385 390 395 400
Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys
405 410 415
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val
420 425 430
Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
435 440 445
Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
450 455 460
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg
465 470 475 480
Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys
485 490 495
Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg
500 505 510
Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys
515 520 525
Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
530 535 540

<210> 24
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 24
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
20 25 30
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

35 40 45

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
50 55 60
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
85 90 95
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
100 105 110
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Ser Thr Ser Gly Ser
115 120 125
Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Leu Gln Glu Ser
130 135 140
Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
145 150 155 160
Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
165 170 175
Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
180 185 190
Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
195 200 205
Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
210 215 220
Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
225 230 235 240
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245 250 255
Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
275 280 285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser
290 295 300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro
305 310 315 320
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
325 330 335
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Val Lys Phe Ser
340 345 350

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
355 360 365
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
370 375 380
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
385 390 395 400
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
405 410 415
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
420 425 430
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
435 440 445
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
450 455

<210> 25
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 25
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro
20 25 30
Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
35 40 45
Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
50 55 60
Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95
Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
100 105 110
Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly

130 135 140

Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145 150 155 160
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175
Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
180 185 190
Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
195 200 205
Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220
Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile
260 265 270
Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr
275 280 285
Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser
290 295 300
Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala Ala Gly Gly
305 310 315 320
Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val
325 330 335
Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe
340 345 350
Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp
355 360 365
Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr
370 375 380
Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
385 390 395

<210> 26
<211> 500
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

多肽

<400> 26

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
20 25 30
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
35 40 45
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
50 55 60
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
65 70 75 80
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
85 90 95
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
100 105 110
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gly Ser Thr Ser Gly Ser
115 120 125
Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Leu Gln Glu Ser
130 135 140
Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr
145 150 155 160
Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln
165 170 175
Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu
180 185 190
Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys
195 200 205
Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr
210 215 220
Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly
225 230 235 240
Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
245 250 255
Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
260 265 270
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
275 280 285
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser

290 295 300
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Lys Pro
305 310 315 320
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
325 330 335
Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
340 345 350
Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
355 360 365
Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
370 375 380
Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
385 390 395 400
Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
405 410 415
Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
420 425 430
Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
435 440 445
Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
450 455 460
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
465 470 475 480
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
485 490 495
Leu Pro Pro Arg
500

<210> 27
<211> 484
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 27
Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15
Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Pro
20 25 30

Gly Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe
35 40 45
Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly
50 55 60
Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly
65 70 75 80
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
85 90 95
Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His
100 105 110
Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115 120 125
Lys Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val
145 150 155 160
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
165 170 175
Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly
180 185 190
Leu Glu Trp Val Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr
195 200 205
Asn Gln Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
210 215 220
Thr Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
225 230 235 240
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp
245 250 255
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ile Glu Val Met Tyr Pro
260 265 270
Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val
275 280 285
Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys
290 295 300
Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
305 310 315 320
Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg
325 330 335
Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro

340 345 350
Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
355 360 365
Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
370 375 380
Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
385 390 395 400
Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
405 410 415
Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
420 425 430
Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
435 440 445
Met Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
450 455 460
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
465 470 475 480
Leu Pro Pro Arg

<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 28
tggccgggtt ctagagtgcc agg 23

<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 29
ggccgggttc tagagtgcca ggg 23

<210> 30
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 30
caccgaggag tgagtagtcc tgg 23
<210> 31
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 31
tccagcgaac ttcacctgac agg 23
<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 32
ccaagtatcc ccggactctt tgg 23
<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 33
agcattatcc aaagagtccg ggg 23
<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 34

acttgggtgg aagtattgtc tgg 23

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 35

gtctgcgagt ctgcgtgcgt ggg 23

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 36

cgtctgcgag tctgcgtgcg tgg 23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 37

gcgagtctgc gtgcgtggga agg 23

<210> 38

<211> 1568

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

多核苷酸

<400> 38

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60

caccgtggcc tgtagcatca gcgagatcgt gctgacccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180
ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300
tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aaatcaagcg 420
gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agacccctgg 600
acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840
cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900
ccctgccccc agacctccta ccccagcccc tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag 960
gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggcc tggatatcta 1020
catctgggcc ccactggccg gcacctgtgg cgtgctgctg ctgtctctcg tgatcaccaa 1080
gagaggccgg aagaagctgc tgtacatctt caagcagccc ttcatgcggc ccgtgcagac 1140
cacccaggaa gaggacggct gtagctgccg gttccccgag gaagaagaag ggggctgcga 1200
gctgagagtg aagttcagca gaagcgccga cgcccctgcc tatcagcagg gccagaacca 1260
gctgtacaac gagctgaacc tgggcagacg ggaagagtac gacgtgctgg acaagcggag 1320
aggcagggac cctgagatgg gcggcaagcc cagacggaag aaccctcagg aaggcctgta 1380
taacgaactg cagaaagaca agatggccga ggcctactcc gagatcggaa tgaagggcga 1440
gcggagaaga ggcaagggcc acgatggact gtaccagggc ctgagcaccg ccaccaagga 1500
cacctatgac gccctgcaca tgcaggccct gccccccaga tgaaattcat cgacgttaac 1560
tattctag 1568

<210> 39
<211> 1586
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 39

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgtagcatca gcgagatcgt gctgacccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180
ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300

tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aaatcaagcg 420
gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agacccctgg 600
acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctgccc tgagcaacag 840
catcatgtac ttcagccact tcgtgcccgt gtttctgccc gccaagccta ccacaacccc 900
tgcccctaga cctcctaccc cagcccctac aatcgccagc cagcctctgt ctctgaggcc 960
cgaggcttct agaccagctg ctggcggagc cgtgcacacc agaggactgg acaagccctt 1020
ctgggtgctg gtggtcgtgg gcggagtgct ggcctgttac agcctgctcg tgacagtggc 1080
cttcatcatc ttttgggtgc gcagcaagcg gtctagactg ctgcacagcg actacatgaa 1140
catgaccccc agaaggccag gccccacccg gaagcactat cagccttacg cccctcccag 1200
agacttcgcc gcctaccggt ccagagtgaa gttcagcaga agcgccgacg cccctgccta 1260
tcagcagggc cagaaccagc tgtacaacga gctgaacctg ggcagacggg aagagtacga 1320
cgtgctggac aagagaagag gccgggaccc tgagatgggc ggcaagccca gacggaagaa 1380
ccctcaggaa ggcctgtata acgaactgca gaaagacaag atggccgagg cctactccga 1440
gatcggcatg aagggcgaac ggcggagagg caagggacac gatggactgt accagggcct 1500
gagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc cctgcacatg caggccctgc cccccagatg 1560
aaattcatcg acgttaacta ttctag 1586

<210> 40
<211> 1715
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 40

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgtagcatca gcgagatcgt gctgacccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180
ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300
tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aaatcaagcg 420
gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540

caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agacccctgg 600
acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840
cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900
ccctgccccc agacctccta ccccagcccc tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag 960
gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggac tggacaagcc 1020
cttctgggtg ctggtggtcg tgggcggagt gctggcctgt tacagcctgc tcgtgacagt 1080
ggccttcatc atcttttggg tgcgcagcaa gcggtctaga ctgctgcaca gcgactacat 1140
gaacatgacc cccagaaggc caggccccac ccggaagcac tatcagcctt acgcccctcc 1200
cagagacttc gccgcctaca gatccaagag aggccggaag aagctgctgt acatcttcaa 1260
gcagcccttc atgcggcccg tgcagaccac ccaggaagag gacggctgta gctgccggtt 1320
ccccgaggaa gaagaagggg gctgcgagct gagagtgaag ttcagcagaa gcgccgacgc 1380
ccctgcctat cagcagggcc agaaccagct gtacaacgag ctgaacctgg gcagacggga 1440
agagtacgac gtgctggaca agagaagagg ccgggaccct gagatgggcg gcaagcccag 1500
acggaagaac cctcaggaag gcctgtataa cgaactgcag aaagacaaga tggccgaggc 1560
ctactccgag atcggaatga agggcgagcg gcggagaggc aagggacacg atggactgta 1620
ccagggcctg agcaccgcca ccaaggacac ctatgacgcc ctgcacatgc aggccctgcc 1680
ccccagatga aattcatcga cgttaactat tctag 1715

<210> 41
<211> 1436
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 41

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgcagcatca gcatccagat gacccagacc accagcagcc tgagcgccag 120
cctgggcgat agagtgacca tcagctgcag agccagccag gacatcagca agtacctgaa 180
ctggtatcag cagaaacccg acggcaccgt gaagctgctg atctaccaca ccagcagact 240
gcacagcggc gtgccctcta gattttccgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac 300
catctccaac ctggaacagg aagatatcgc tacctacttc tgtcagcaag gcaacaccct 360
gccctacacc ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcggc agcacaagcg gctctggcaa 420
gcctggatct ggcgagggct ctaccaaggg cctgcaggaa tctggccctg gactggtggc 480
ccctagccag agcctgtctg tgacctgtac cgtgtccggc gtgtccctgc ctgactatgg 540
cgtgtcctgg atcagacagc cccccagaaa gggcctggaa tggctgggag tgatctgggg 600
cagcgagaca acctactaca acagcgccct gaagtcccgg ctgaccatca tcaaggacaa 660

ctccaagagc caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgccatcta 720
ctactgcgcc aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg 780
cacaagcgtg accgtgtctg ccctgagcaa cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc 840
cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac ccctgcccct agacctccta ccccagcccc 900
tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg 960
agccgtgcac accagaggac tggacaagcc cttctgggtg ctggtggtcg tgggcggagt 1020
gctggcctgt tatagcctgc tcgtgacagt ggccttcatc atcttttggg tgcgcgtgaa 1080
gttcagccgc agcgccgatg cccctgccta tcagcaggga cagaaccagc tgtacaacga 1140
gctgaacctg ggcagacggg aagagtacga cgtgctggac aagagaagag gccgggaccc 1200
tgagatgggc ggcaagccca gaagaaagaa cccccaggaa ggcctgtata acgaactgca 1260
gaaagacaag atggccgagg cctacagcga gatcggcatg aagggcgaac ggcggagagg 1320
caagggccac gatggactgt atcagggcct gagcaccgcc accaaggaca cctatgacgc 1380
cctgcacatg caggctctgc cccctcgctg aaattcatcg acgttaacta ttctag 1436

<210> 42
<211> 1253
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 42

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgtagcatca gcgagatcgt gctgacccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180
ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300
tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aaatcaagcg 420
gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agacccctgg 600
acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtctagcg ccctgagcaa 840
cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac 900
ccctgccccc agacctccta ccccagcccc tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag 960
gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg agccgtgcac accagaggac tggacaagcc 1020
cttctgggtg ctggtggtcg tgggcggagt gctggcctgt tacagcctgc tcgtgacagt 1080

ggccttcatc atcttttggg tgcgcagcaa gcggtctaga ctgctgcaca gcgactacat 1140
gaacatgacc cccagaaggc caggccccac ccggaagcac tatcagcctt acgcccctcc 1200
cagagacttc gccgcctaca gaagctgaaa ttcatcgacg ttaactattc tag 1253

<210> 43
<211> 1559
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 43

ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgcagcatca gcatccagat gacccagacc accagcagcc tgagcgccag 120
cctgggcgat agagtgacca tcagctgcag agccagccag gacatcagca agtacctgaa 180
ctggtatcag cagaaacccg acggcaccgt gaagctgctg atctaccaca ccagcagact 240
gcacagcggc gtgccctcta gattttccgg cagcggctcc ggcaccgact acagcctgac 300
catctccaac ctggaacagg aagatatcgc tacctacttc tgtcagcaag gcaacaccct 360
gccctacacc ttcggcggag gcaccaagct ggaaatcggc agcacaagcg gctctggcaa 420
gcctggatct ggcgagggct ctaccaaggg cctgcaggaa tctggccctg gactggtggc 480
ccctagccag agcctgtctg tgacctgtac cgtgtccggc gtgtccctgc ctgactatgg 540
cgtgtcctgg atcagacagc cccccagaaa gggcctggaa tggctgggag tgatctgggg 600
cagcgagaca acctactaca acagcgccct gaagtcccgg ctgaccatca tcaaggacaa 660
ctccaagagc caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgccatcta 720
ctactgcgcc aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg 780
cacaagcgtg accgtgtctg ccctgagcaa cagcatcatg tacttcagcc acttcgtgcc 840
cgtgtttctg cccgccaagc ctaccacaac ccctgccccc agacctccta ccccagcccc 900
tacaatcgcc agccagcctc tgtctctgag gcccgaggct tctagaccag ctgctggcgg 960
agccgtgcac accagaggac tggacaagcc cttctgggtg ctggtggtcg tgggcggagt 1020
gctggcctgt tatagcctgc tcgtgacagt ggccttcatc atcttttggg tgcgcagcaa 1080
gcggagccgg ctgctgcact ccgactacat gaacatgacc cccagacggc caggccccac 1140
ccggaaacac tatcagcctt acgcccctcc cagagacttc gccgcctacc ggtccagagt 1200
gaagttcagc agatccgccg acgcccctgc ctatcagcag ggacagaacc agctgtacaa 1260
cgagctgaac ctgggcagac gggaagagta cgacgtgctg gacaagagaa gaggccggga 1320
ccctgagatg ggcggcaagc ccagaagaaa gaacccccag gaaggcctgt ataacgaact 1380
gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc atgaagggcg aacggcggag 1440
aggcaagggc cacgatggac tgtatcaggg cctgagcacc gccaccaagg acacctatga 1500
cgccctgcac atgcaggctc tgcccccctcg ctgaaattca tcgacgttaa ctattctag 1559

<210> 44
<211> 1514

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多核苷酸
<400> 44
ggtgtcgtga gcggccgctg aactggccac catgtggctg cagtctctgc tgctgctggg 60
caccgtggcc tgtagcatca gcgagatcgt gctgacccag agccctggct ctctggctgt 120
gtctcctggc gagcgcgtga ccatgagctg caagagcagc cagagcgtgt tcttcagcag 180
ctcccagaag aactacctgg cctggtatca gcagatcccc ggccagagcc ccagactgct 240
gatctactgg gccagcacca gagaaagcgg cgtgcccgat agattcaccg gcagcggctc 300
tggcaccgac ttcaccctga caatcagcag cgtgcagccc gaggacctgg ccatctacta 360
ctgccaccag tacctgagca gccggacctt tggccagggc accaagctgg aaatcaagcg 420
gggcagcaca agcggcagcg gaaagcctgg atctggcgag ggctctacca agggccaggt 480
gcagctgcag cagcctggcg ccgaagtcgt gaaacctggc gcctccgtga agatgtcctg 540
caaggccagc ggctacacct tcaccagcta ctacatccac tggatcaagc agacccctgg 600
acagggcctg gaatgggtgg gagtgatcta ccccggcaac gacgacatca gctacaacca 660
gaagttccag ggcaaggcca ccctgaccgc cgacaagtct agcaccaccg cctacatgca 720
gctgtccagc ctgaccagcg aggacagcgc cgtgtactac tgcgccagag aagtgcggct 780
gcggtacttc gatgtgtggg gccagggaac caccgtgacc gtgtccagca tcgaagtgat 840
gtaccccct ccctacctgg acaacgagaa gtccaacggc accatcatcc acgtgaaggg 900
caagcacctg tgccccagcc ctctgtttcc tggccctagc aagcccttct gggtgctggt 960
ggtcgtgggc ggagtgctgg cctgttacag cctgctcgtg acagtggcct tcatcatctt 1020
ttgggtgcgc agcaagcggt ctagactgct gcacagcgac tacatgaaca tgaccccag 1080
aaggccaggc cccacccgga agcactatca gccttacgcc cctcccagag acttcgccgc 1140
ctaccggtcc agagtgaagt tcagcagaag cgccgacgcc cctgcctatc agcagggcca 1200
gaaccagctg tacaacgagc tgaacctggg cagacgggaa gagtacgacg tgctggacaa 1260
gcggagaggc agggaccctg agatgggcgg caagcccaga cggaagaacc ctcaggaagg 1320
cctgtataac gaactgcaga aagacaagat ggccgaggcc tactccgaga tcggcatgaa 1380
gggcgagcgg agaaggaggca agggccacga tggactgtac cagggcctga gcaccgccac 1440
caaggacacc tatgacgccc tgcacatgca ggccctgccc cccagatgaa attcatcgac 1500
gttaactatt ctag 1514
<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 未知(Unknown)
<220>
<223> 未知的描述:
细胞表面抗原序列

<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (19)..(19)
<223> a、c、t、g、未知或其它
<400> 45
atcgatcgat cgtacgcgng g 21
<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> 未知(Unknown)
<220>
<223> 未知的描述：
细胞表面抗原序列
<220>
<221> 修饰的_碱基
<222> (20)..(20)
<223> a、c、t、g、未知或其它
<400> 46
atgcatcgta catcgatcgn gg 22
<210> 47
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<400> 47
Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn
1 5 10 15
Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg
20 25 30
Leu Thr Asp Val Thr Leu
35
<210> 48
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 48

cctcactaga cttgacccac agg 23

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 49

atccctggca ctctagaacc cgg 23

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 50

atccctggca ctctagaacc 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 51

ggccgggttc tagagtgcca 20

<210> 52

<211> 31

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 52

ttctcctcac tagacttgac ccacaggccc a 31

<210> 53

<211> 31

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 53
tgggcctgtg ggtcaagtct agtgaggaga a 31
<210> 54
<211> 37
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 54
cctgtgggtc aagtctagtg aggagaaaga ggggatg 37
<210> 55
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 55
cctgtgggtc aagtctaggg gggagaaaga ggggatgc 38
<210> 56
<211> 31
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 56
tcatccctgg cactctagaa cccggccact c 31
<210> 57
<211> 31
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 57
gagtggccgg gttctagagt gccagggatg a 31
<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 58
cctcactaga cttgacccac 20

<210> 59
<211> 31
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 59
gtggccgggt tctagagtgc cagggatgag g 31
<210> 60
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 60
accugucagg ugaaguucgc ugg 23
<210> 61
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 61
uggccggguu cuagagugcc agg 23
<210> 62
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 62
ggccggguuc uagagugcca ggg 23
<210> 63
<211> 23
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 63

caccgaggag ugaguagucc ugg 23

<210> 64

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 64

uccagcgaac uucaccugac agg 23

<210> 65

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 65

ccucacuaga cuugacccac agg 23

<210> 66

<211> 23

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 66

aucccuggca cucuagaacc cgg 23

<210> 67

<211> 20

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 67

aucccuggca cucuagaacc 20

<210> 68
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 68
ggccggguuc uagagugcca 20
<210> 69
<400> 69
000
<210> 70
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 70
ccucacuaga cuugacccac 20
<210> 71
<211> 28
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 71
ccucaucccu ggcacucuag aacccggc 28
<210> 72
<211> 28
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 72
gaguggccgg guucuagagu gccaggga 28

<210> 73
<211> 28
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 73
uucuccucac uagacuugac ccacaggc 28
<210> 74
<211> 156
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(25)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(38)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(51)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(64)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (66)..(77)

<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(90)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (92)..(103)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (105)..(116)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (118)..(129)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (131)..(142)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (144)..(155)
<223> 此区域可包含3-12个残基
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(156)
<223> 此序列可包含3-12个"GlyxSer"
重复单元,其中x = 3-12
<220>
<223> 有关取代和优选实施方案的详细说明,参见提交的说明书
<400> 74

```
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1               5                  10                  15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
            20                  25                  30
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
        35                  40                  45
```

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
50 55 60
Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
65 70 75 80
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
100 105 110
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155

<210> 75
<211> 40
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 75
agtggccggg ttctagagtg ccagggatga ggattttggg 40
<210> 76
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 人工序列的描述:合成
寡核苷酸
<400> 76
agtggccggg ttctagagtg ccggggatga ggattttggg 40
<210> 77
<211> 42
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 77
ctcatccctg gcactctaga acccggccac tccaaaaacc tg 42
<210> 78
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人工序列的描述:合成

寡核苷酸

<400> 78

ctcatccctg gcactctaga acccggccac tccaaaaacc tg 42

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 79

atccctggca ctcaggagcc 20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 80

aaccctggct ctctaaaacc 20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 81

atccctggca ccctggcacc 20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 82

atccctggca ctccagggcc 20

<210> 83

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 83

agccctggca gtctggaacc 20

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 84
atcccaggcc ctctataacc 20
<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 85
atccatggta ctctggaacc 20
<210> 86
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 86
aacccaggca ctctagcacc 20
<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 87
acccctagca ctctagagcc 20
<210> 88
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 88
acccctggca gtctagagcc 20
<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 89
atccctgaca ctctgggacc 20
<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 90
agccctcgca ctctggaacc 20
<210> 91

<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 91
atctctggca gactagaacc 20
<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 92
acccctgaca ctctagaaag 20
<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 93
atccctggca cactgggccc 20
<210> 94
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 94
atcactgtct ccctagaacc 20
<210> 95
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 95
atccctgacc ctccagaaca 20
<210> 96
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 96
acccctggct ccctagagcc 20
<210> 97
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 97
ctgcctggct ctctagcacc 20
<210> 98
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 98
gtctctggca ctctaggccc 20
<210> 99
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 99
cctcacaaga ttagacccac 20
<210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 100
tctcactggc cttgacccac 20
<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 101
cctcactgga cttgactcag 20
<210> 102
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 102
cctcactgga caagacccac 20
<210> 103
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 103
cctcactaga ctagatccat 20
<210> 104

<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 104
cctcgctagc ctttacccac 20
<210> 105
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 105
cctcacaaga caagacccac 20
<210> 106
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 106
cttcaccagc cttgacccac 20
<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 107
cctcaccagc cctgacccac 20
<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 108
tcacactggc cttgacccac 20
<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 109
ccttactagc ctccacccac 20
<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 110
cctcacaaga taagacccac 20
<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 111
cctaactaga attgccacac 20
<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 112
cctctatata cttgtcccac 20
<210> 113
<211> 31
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 113
cctcatccct ggcactctag aacccggcca c 31
<210> 114
<211> 57
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 114
actagacttg acccacaggc ccaaaatcct catccctggc actctagaac ccggcca 57
<210> 115
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 115
guuguagaga aauauuucuc 20
<210> 116
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>

<223> 合成寡核苷酸
<400> 116
ggagagguuc cugaucuugu 20
<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 117
gttgtagaga aatatttctc 20
<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 118
ggagaggttc ctgatcttgt 20
<210> 119
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成寡核苷酸
<400> 119
ugaauaucuc caacaagauc 20

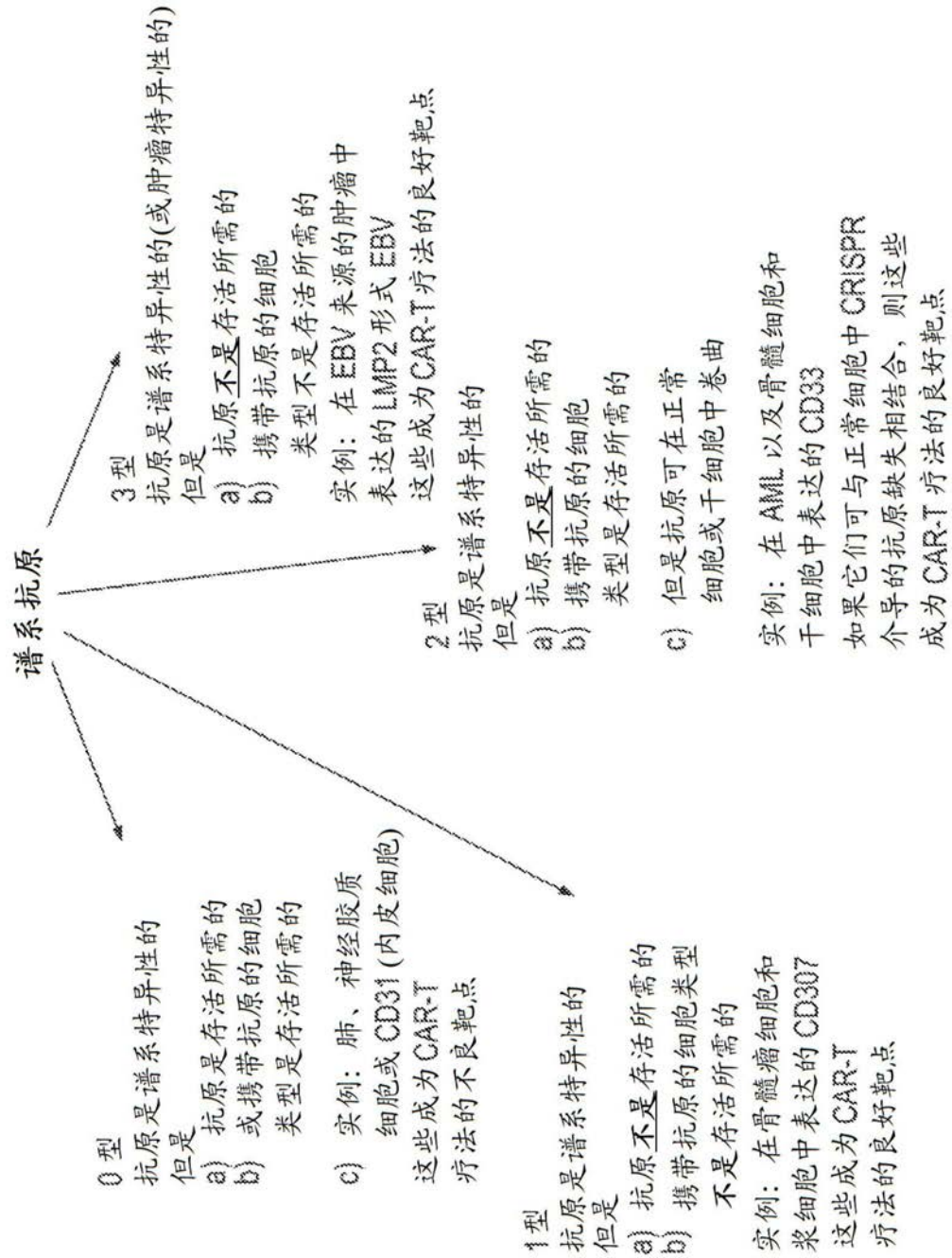

谱系抗原
0型
抗原是谱系特异性的
但是
a) 抗原是存活所需的
b) 或携带抗原的细胞
类型是存活所需的
c) 实例：肺、神经胶质
细胞或CD31(内皮细胞)
这些成为CAR-T
疗法的不良靶点
1型
抗原是谱系特异性的
但是
a) 抗原不是存活所需的
b) 携带抗原的细胞类型
不是存活所需的
实例：在骨髓瘤细胞和
浆细胞中表达的CD307
这些成为CAR-T
疗法的良好靶点
2型
抗原是谱系特异性的
但是
a) 抗原不是存活所需的
b) 携带抗原的细胞
类型是存活所需的
c) 但是抗原可在正常
细胞或干细胞中卷曲
实例：在AML以及骨髓细胞和
干细胞中表达的CD33
如果它们可与正常细胞中CRISPR
介导的抗原缺失相结合，则这些
成为CAR-T疗法的良好靶点
3型
抗原是谱系特异性的(或肿瘤特异性的)
但是
a) 抗原不是存活所需的
b) 携带抗原的细胞
类型不是存活所需的
实例：在EBV来源的肿瘤中
表达的LMP2形式EBV
这些成为CAR-T疗法的良好靶点

图1

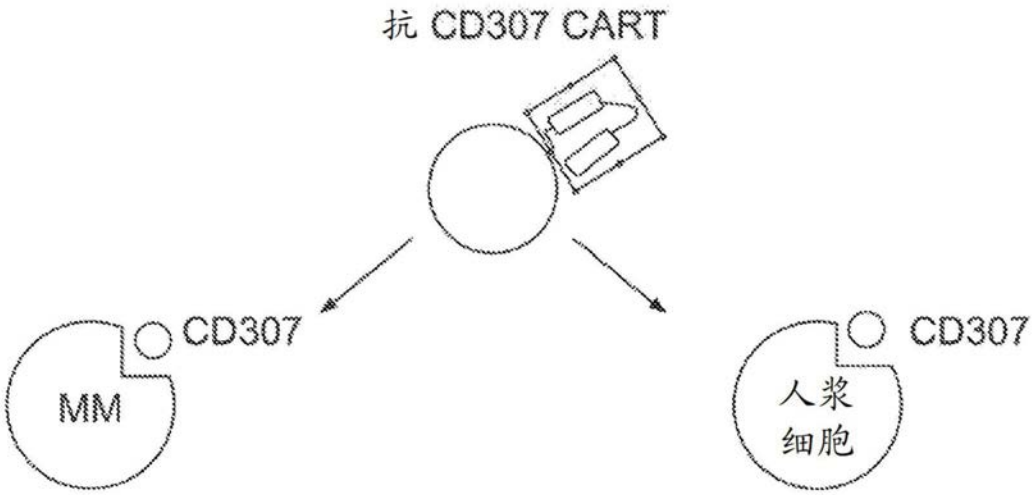

抗 CD307 CART
CD307
MM
CD307
人浆
细胞

图2

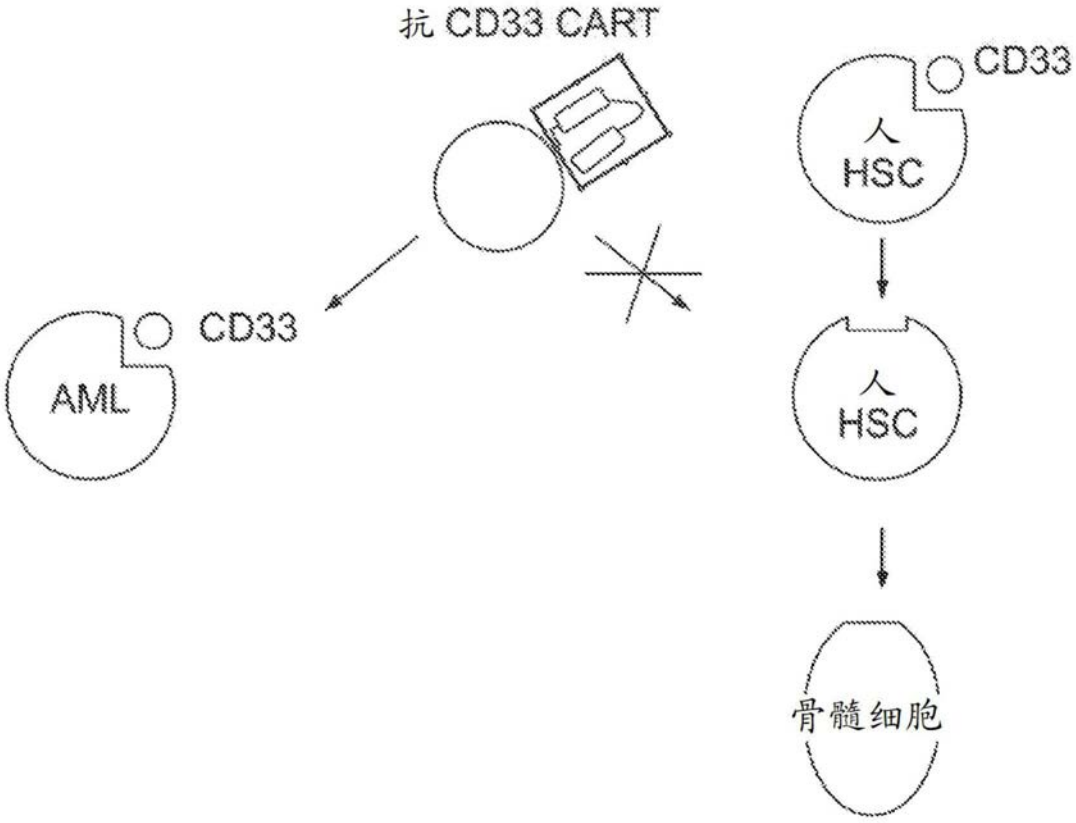

抗 CD33 CART
CD33
AML
CD33
人
HSC
人
HSC
骨髓细胞

图3

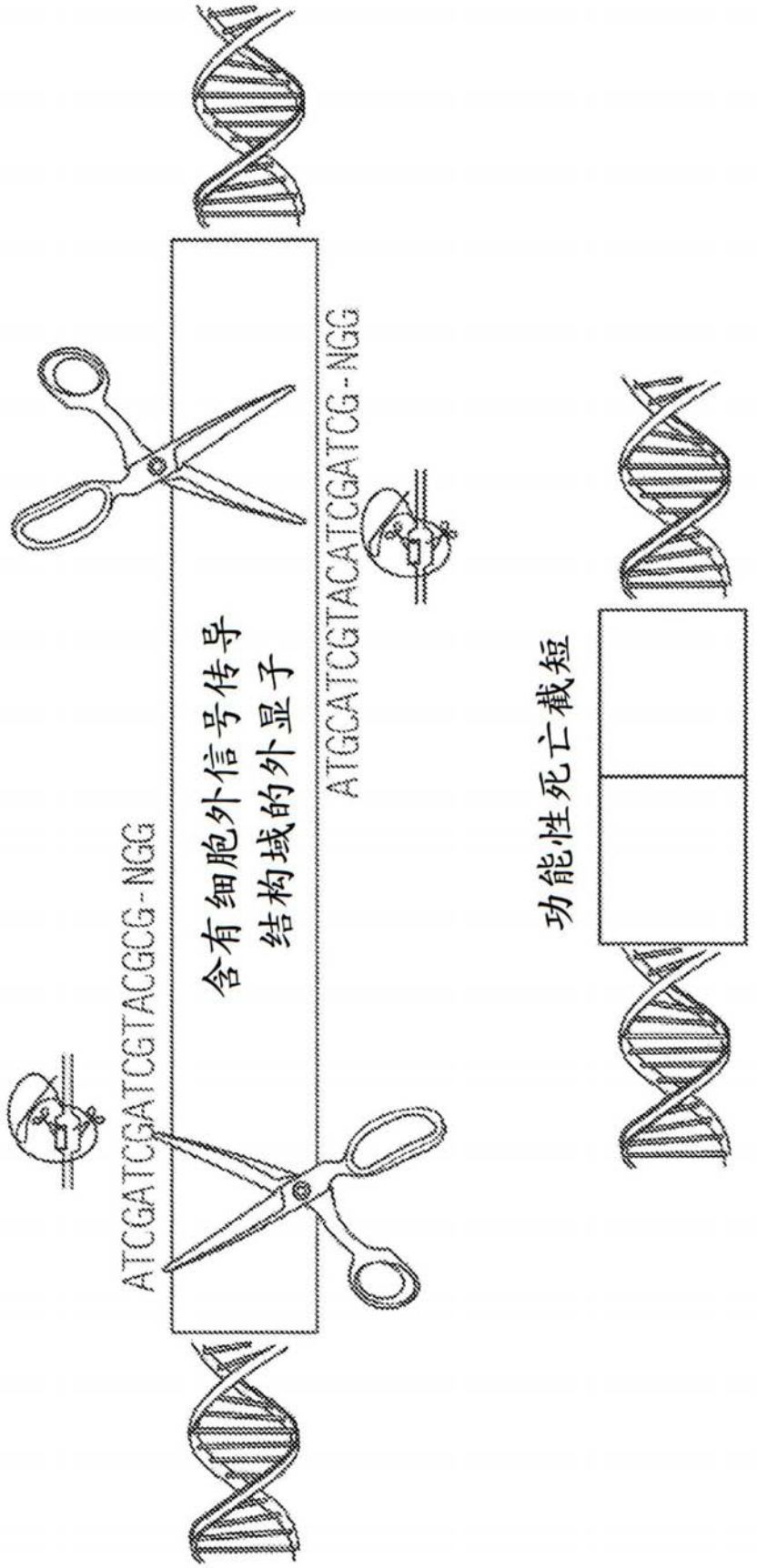

ATCGATCGATCGTACGGCG-NGG
含有细胞外信号传导
结构域的外显子
ATGCATCGTACATCGATCG-NGG
功能性死亡截短

图4

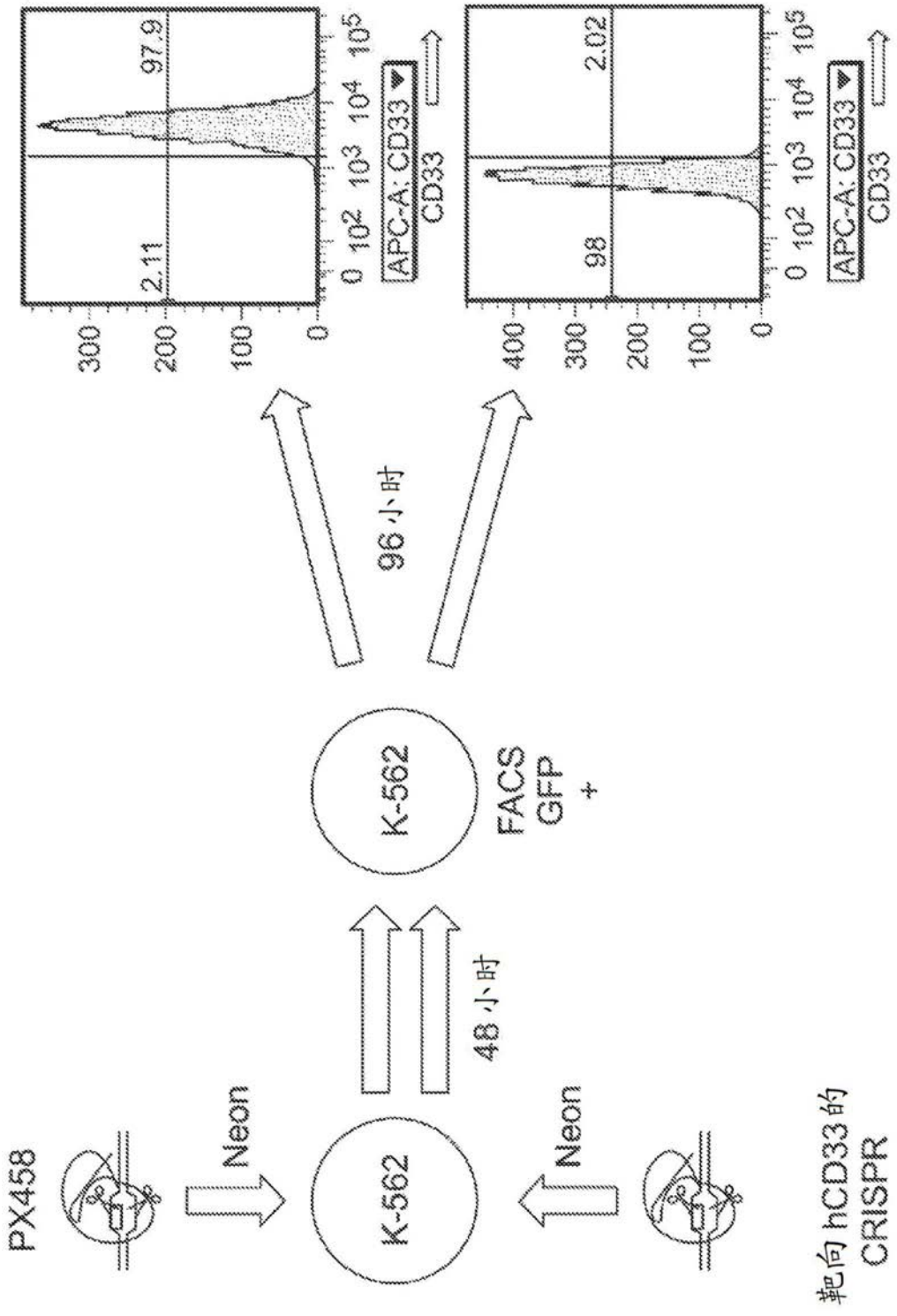

PX458
Neon
K-562
48小时
Neon
靶向hCD33的CRISPR
K-562
FACS
GFP +
96小时
97.9
2.11
APC-A: CD33
CD33
2.02
98
APC-A: CD33
CD33

图5

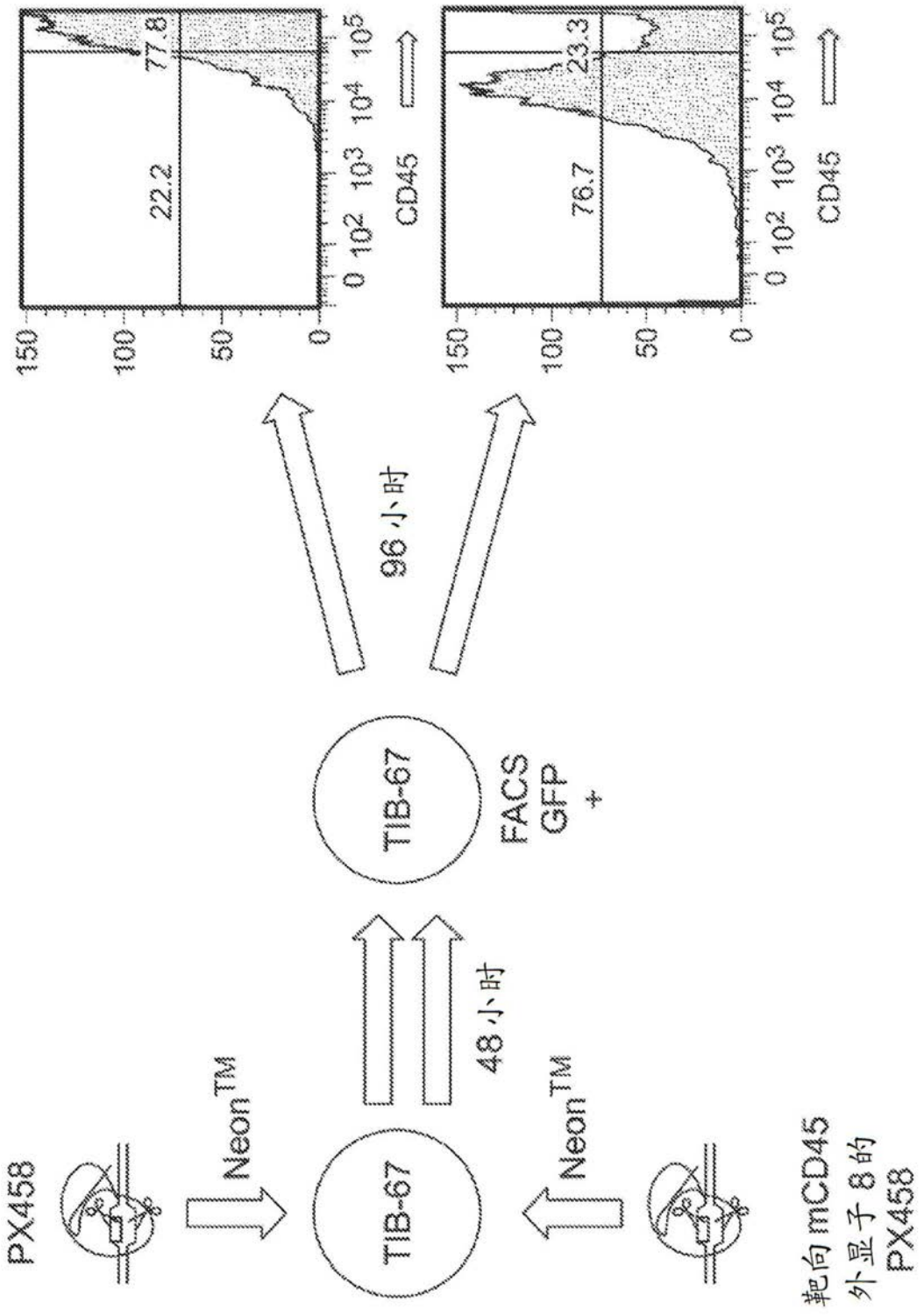

PX458
Neon™
TIB-67
48小时
Neon™
靶向mCD45外显子8的PX458
TIB-67
FACS
GFP +
96小时
77.8
22.2
CD45
23.3
76.7
CD45
150
100
50
0
0 10² 10³ 10⁴ 10⁵

图6

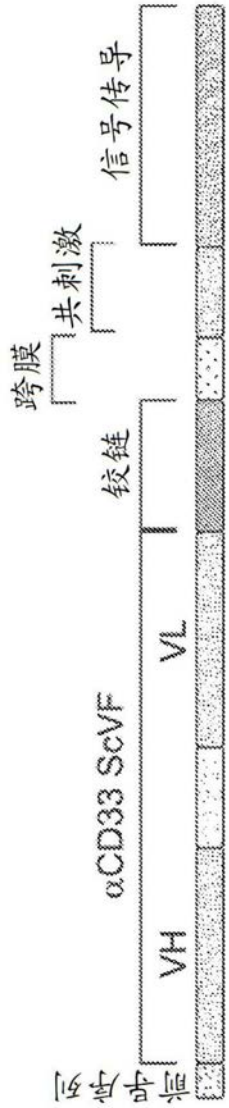


图7A

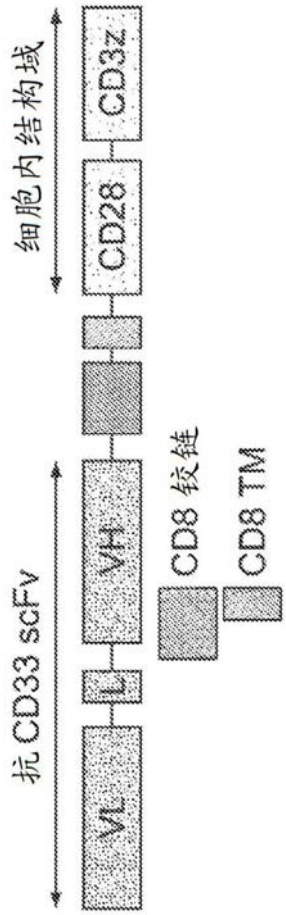


图7B

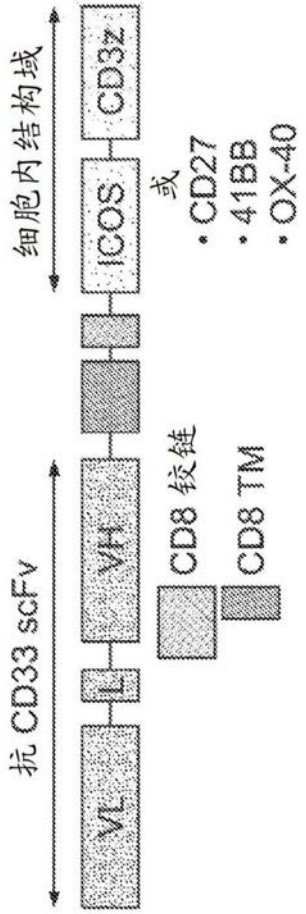

抗 CD33 scFv
VL
L
VH
CD8 铰链
CD8 TM
ICOS
或
• CD27
• 41BB
• OX-40
CD3z
细胞内结构域

图7C

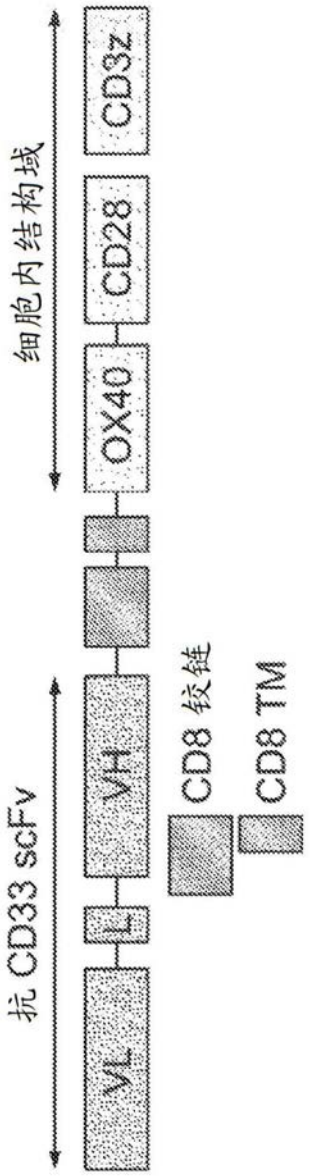


图7D

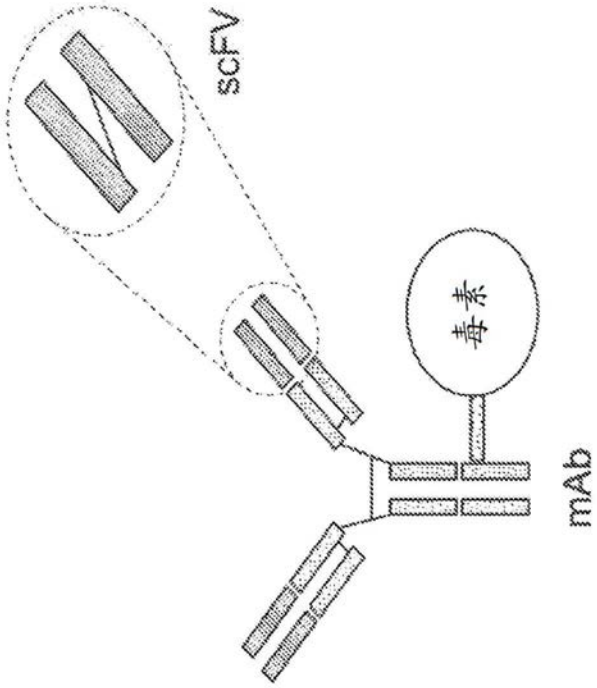
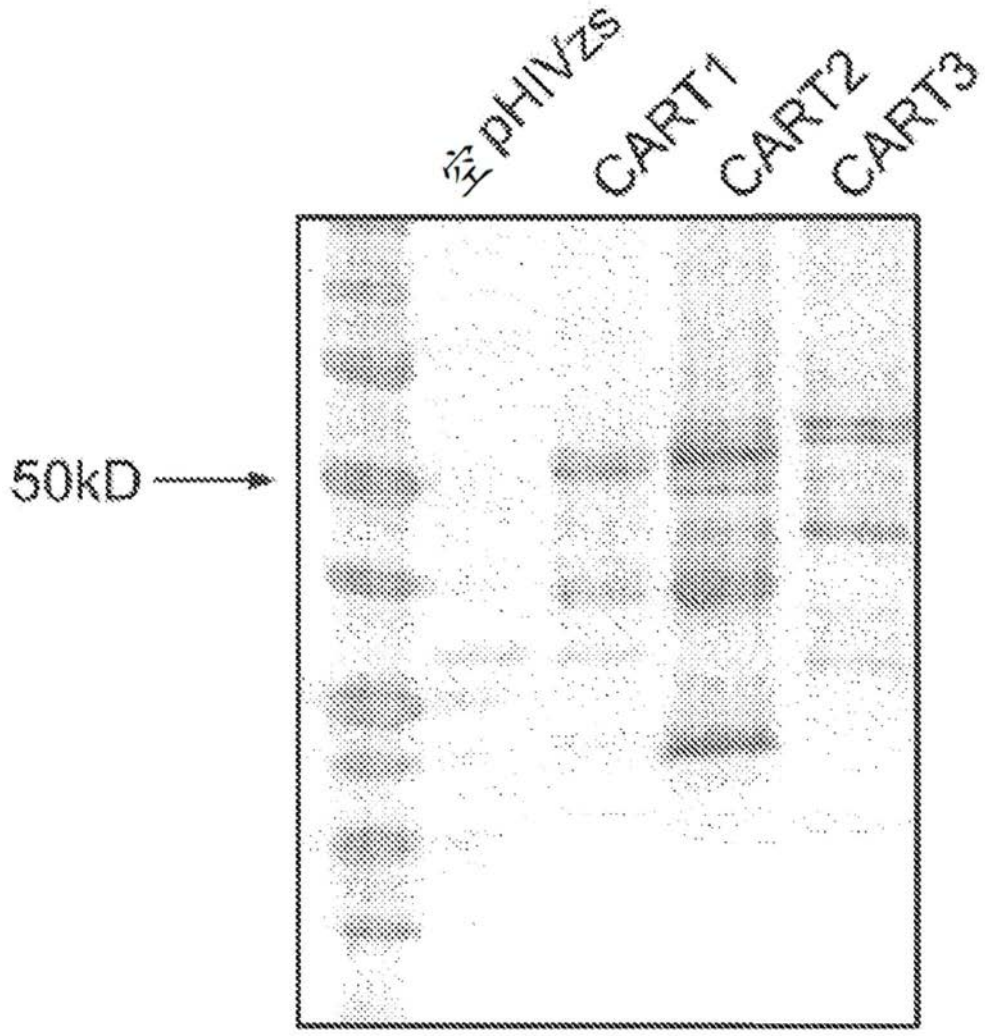


图8



用抗CD3TCRz抗体染色
表位:C末端CD3z

构建体	MW kDa
CART1	55.3AAAA
CART2	56.3
CART3	61

图9A

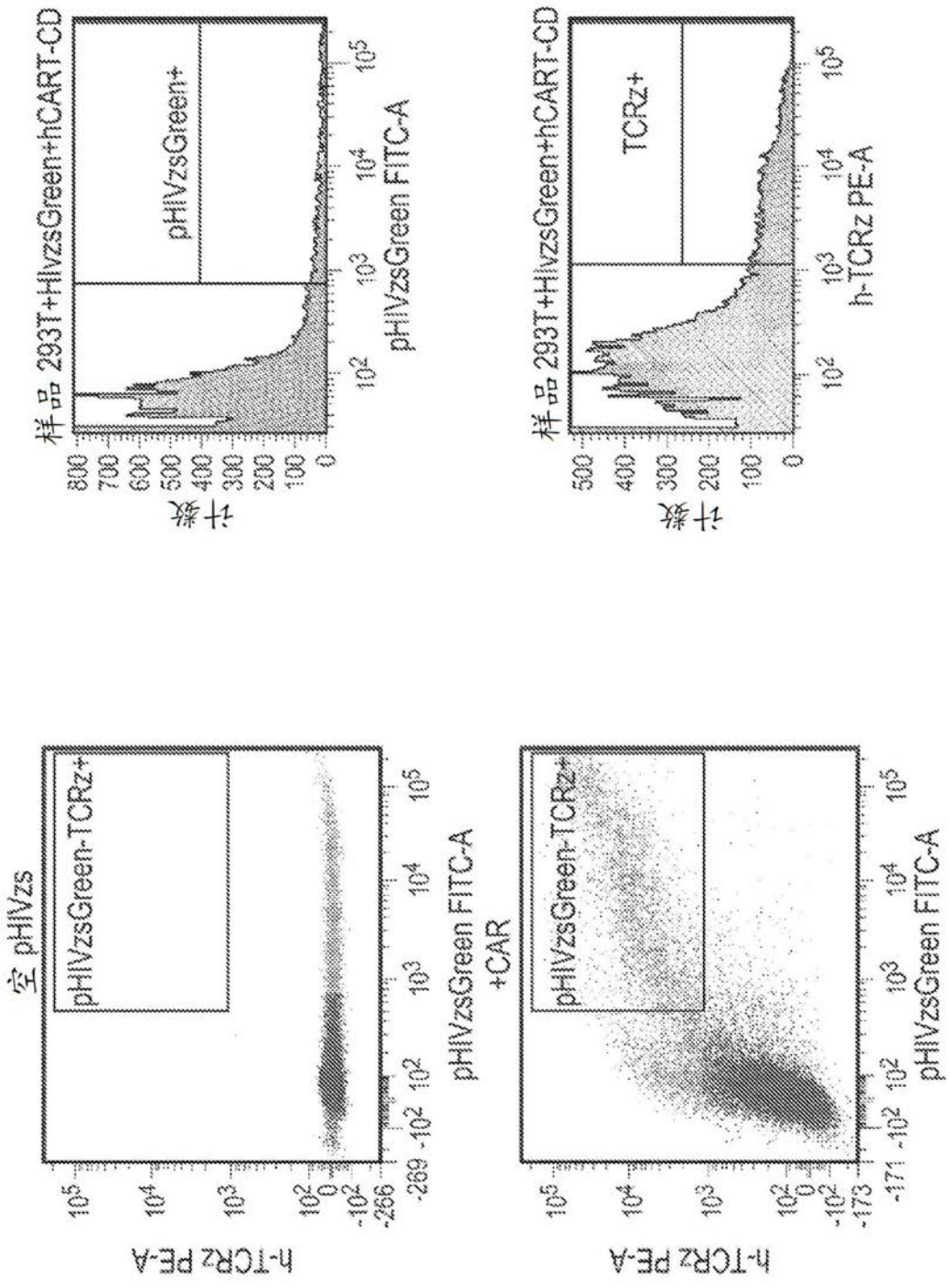

样品 293T+HIVzsGreen+hCART-CD
pHIVzsGreen+
计数
pHIVzsGreen FITC-A
样品 293T+HIVzsGreen+hCART-CD
TCRz+
计数
h-TCRz PE-A
空 pHIVzs
pHIVzsGreen-TCRz+
h-TCRz PE-A
pHIVzsGreen FITC-A
+CAR
pHIVzsGreen-TCRz+
h-TCRz PE-A
pHIVzsGreen FITC-A

图9B

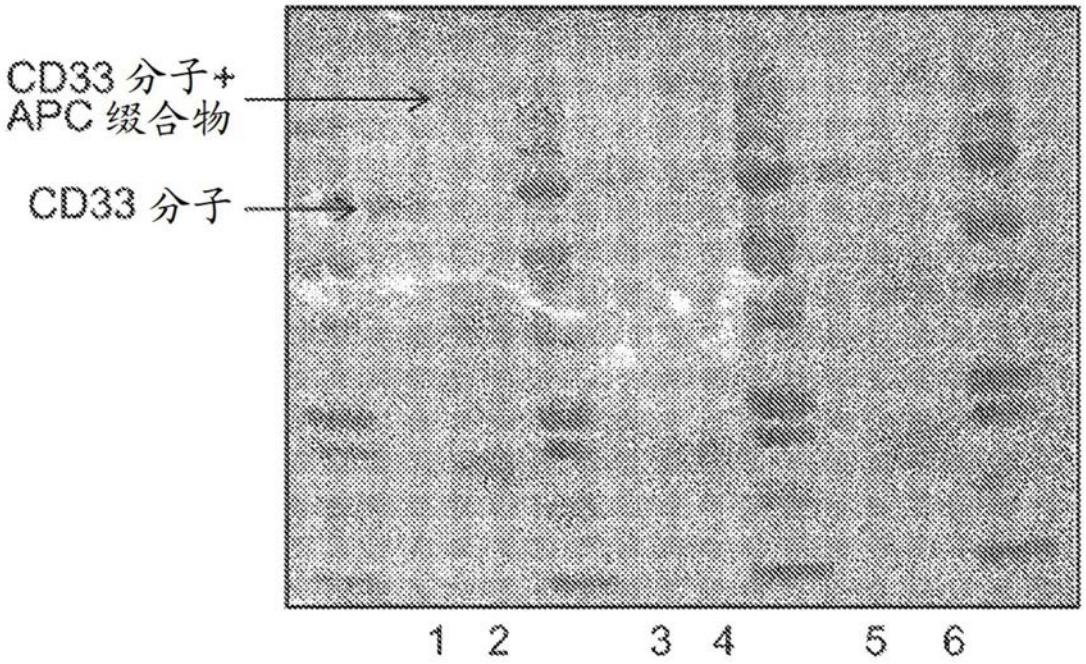

CD33 分子+
APC 缀合物
CD33 分子
1 2 3 4 5 6

图10A

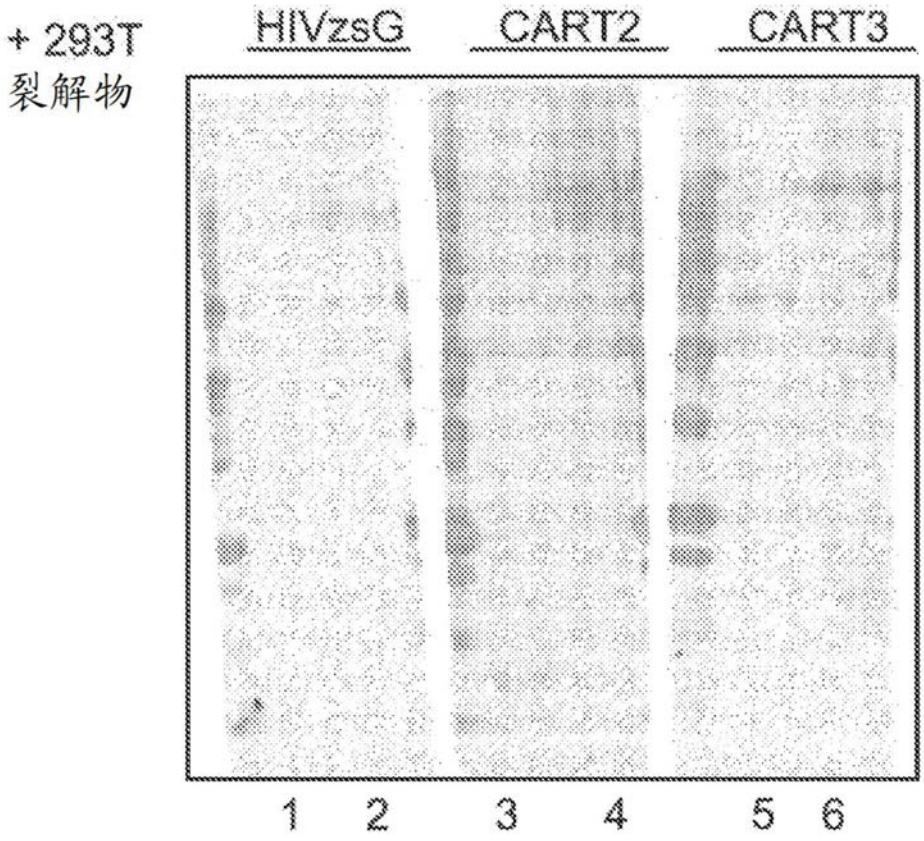

+ 293T
裂解物
HIVzsG
CART2
CART3
1 2 3 4 5 6

图10B

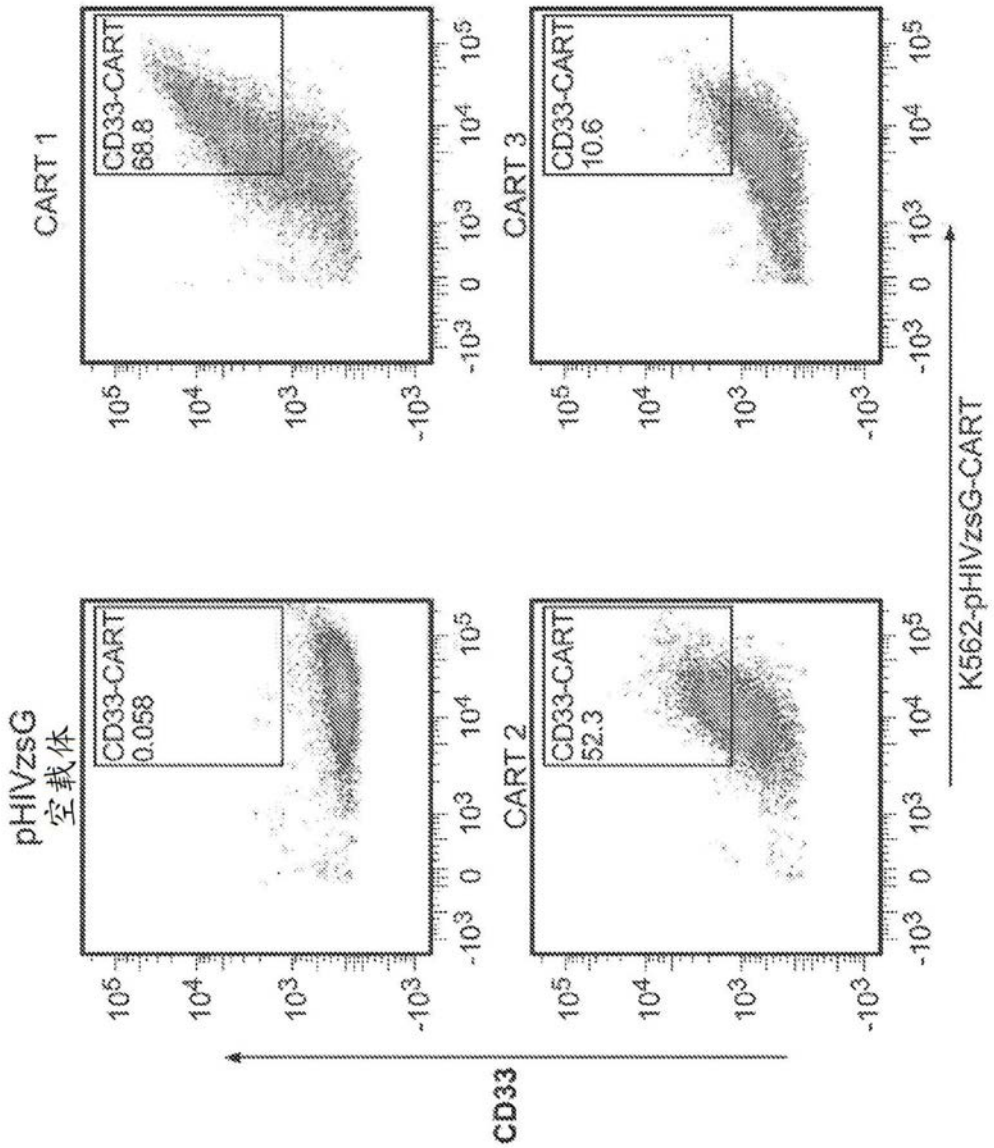

pHIVzsG
空载体
CART 1
CART 2
CART 3
CD33-CART
0.058
CD33-CART
69.8
CD33-CART
52.3
CD33-CART
10.6
CD33
K562-pHIVzsG-CART

图10C

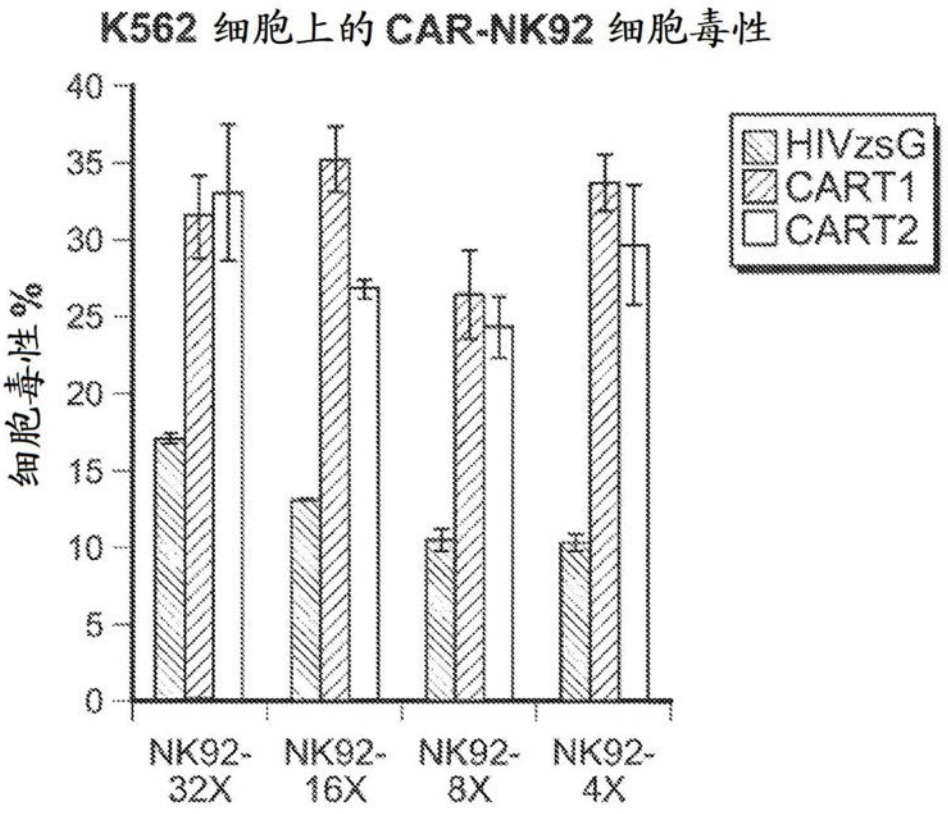

K562 细胞上的 CAR-NK92 细胞毒性
细胞毒性%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
HIVzsG
CART1
CART2
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图11A

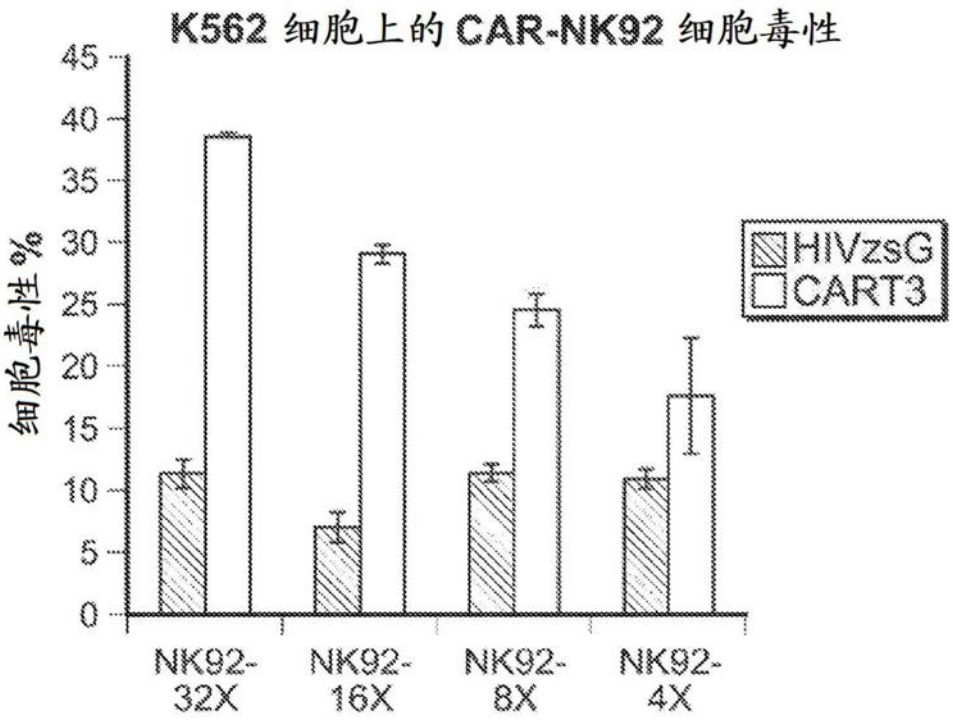

K562 细胞上的 CAR-NK92 细胞毒性
细胞毒性%
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
HIVzsG
CART3
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图11B

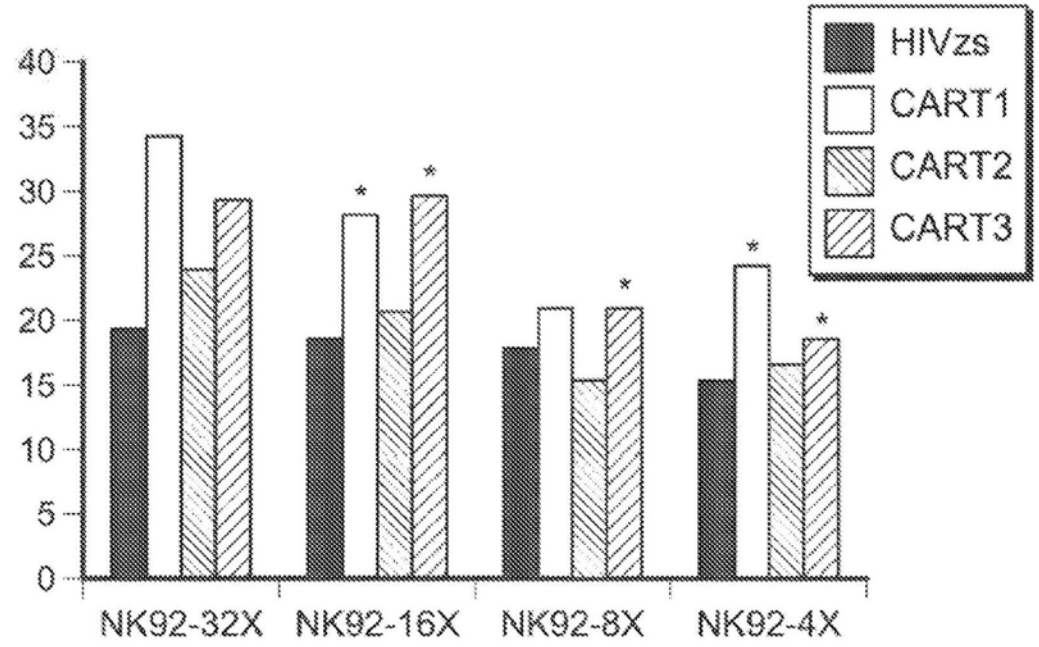

HIVzs
CART1
CART2
CART3
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
NK92-32X
NK92-16X
NK92-8X
NK92-4X

图12A

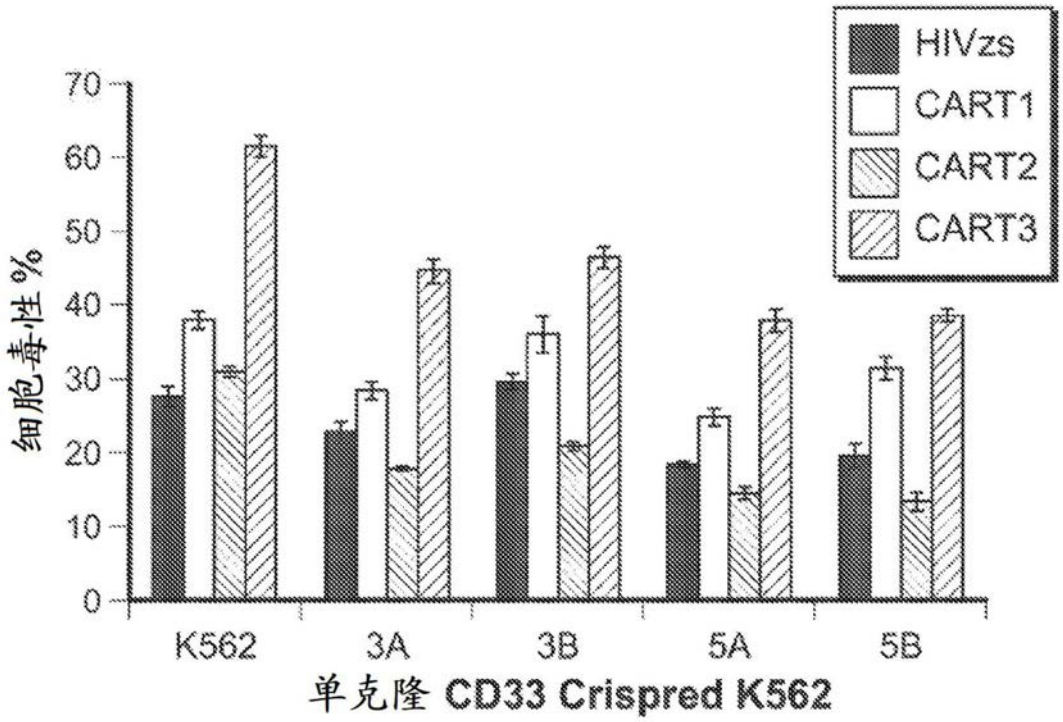

HIVzs
CART1
CART2
CART3
细胞毒性%
70
60
50
40
30
20
10
0
K562
3A
3B
5A
5B
单克隆 CD33 Crispred K562

图12B

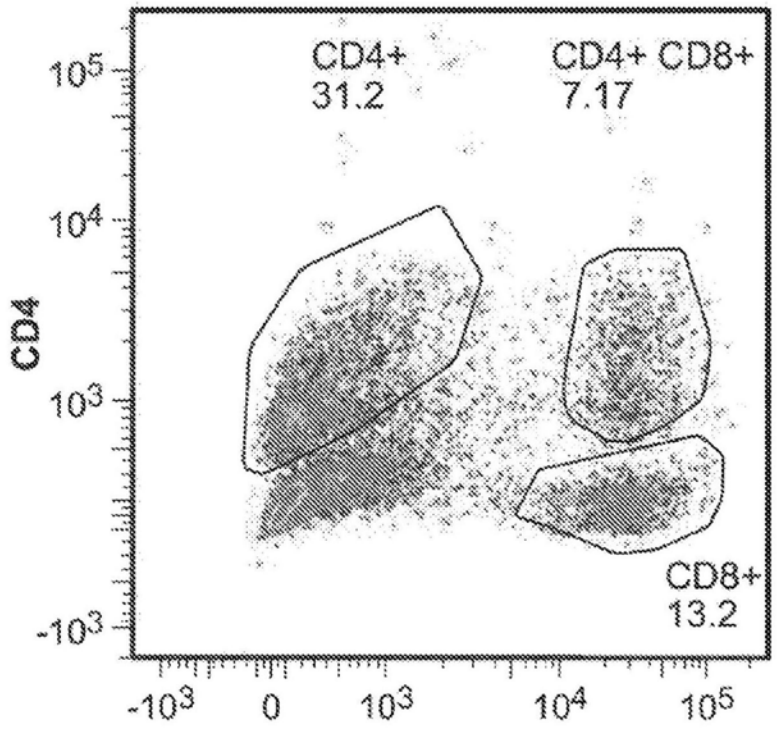


图13A

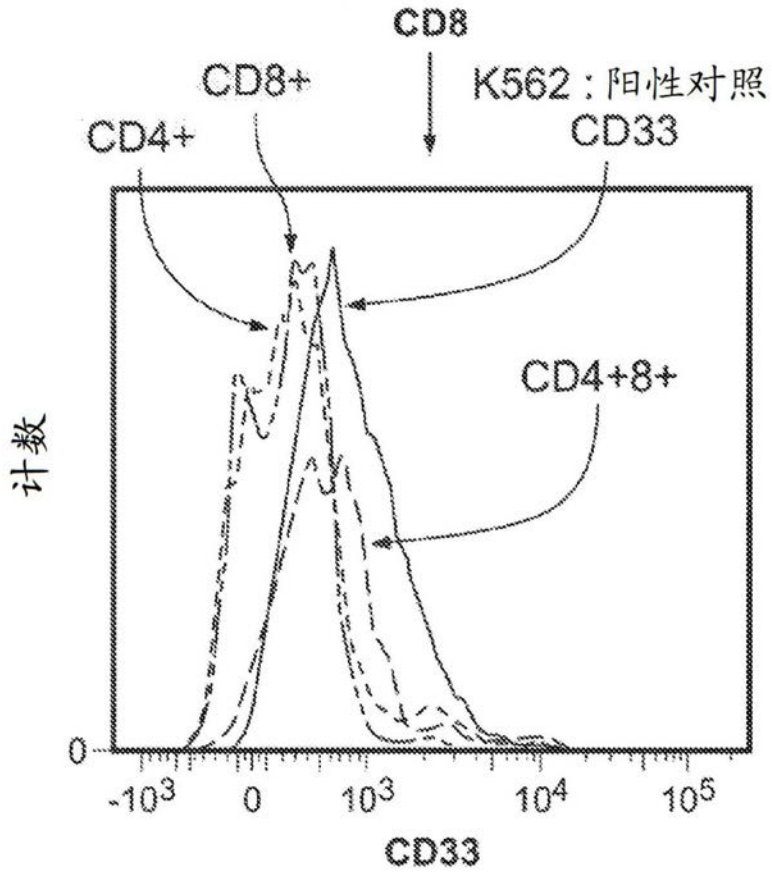


图13B

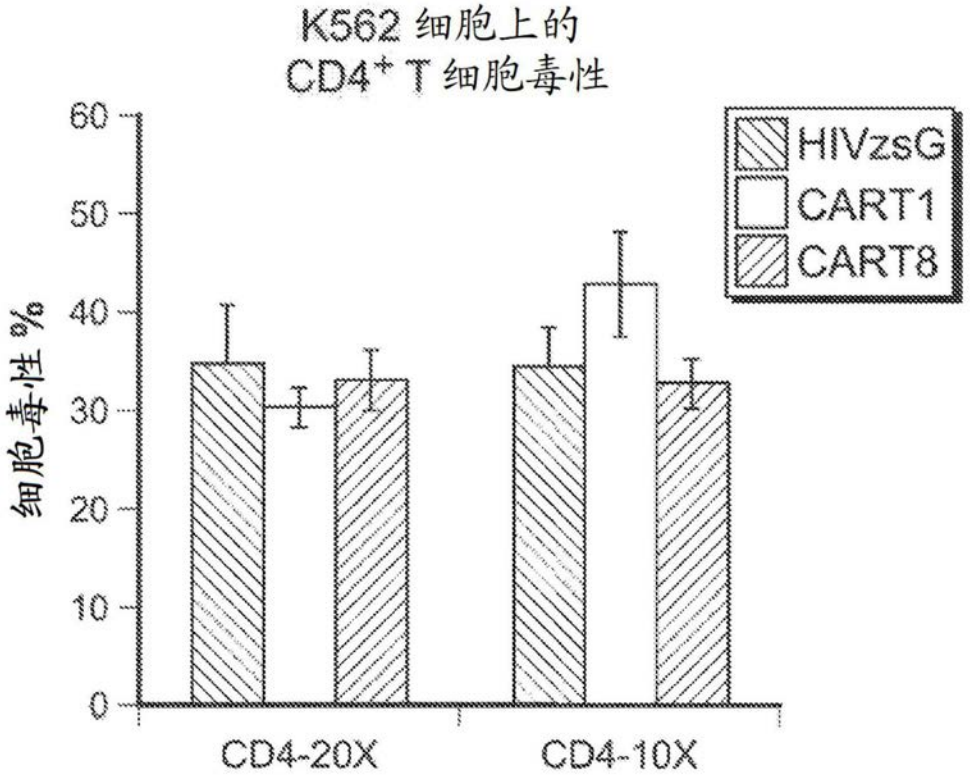

K562 细胞上的
CD4+ T 细胞毒性
细胞毒性 %
60
50
40
30
20
10
0
HIVzsG
CART1
CART8
CD4-20X
CD4-10X

图14A

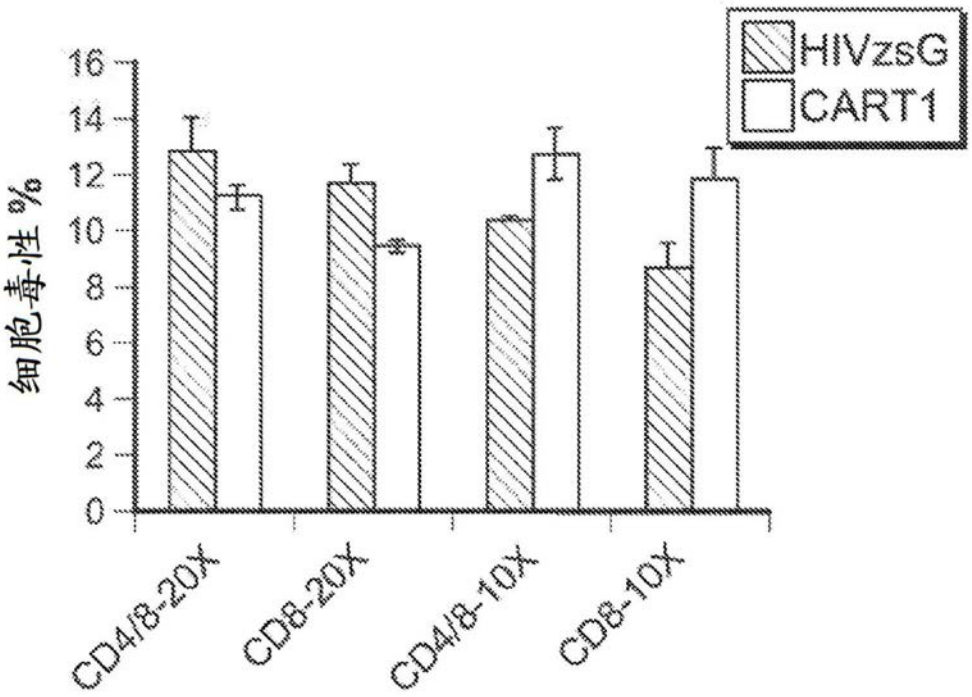

细胞毒性 %
16
14
12
10
8
6
4
2
0
HIVzsG
CART1
CD4/8-20X
CD8-20X
CD4/8-10X
CD8-10X

图14B

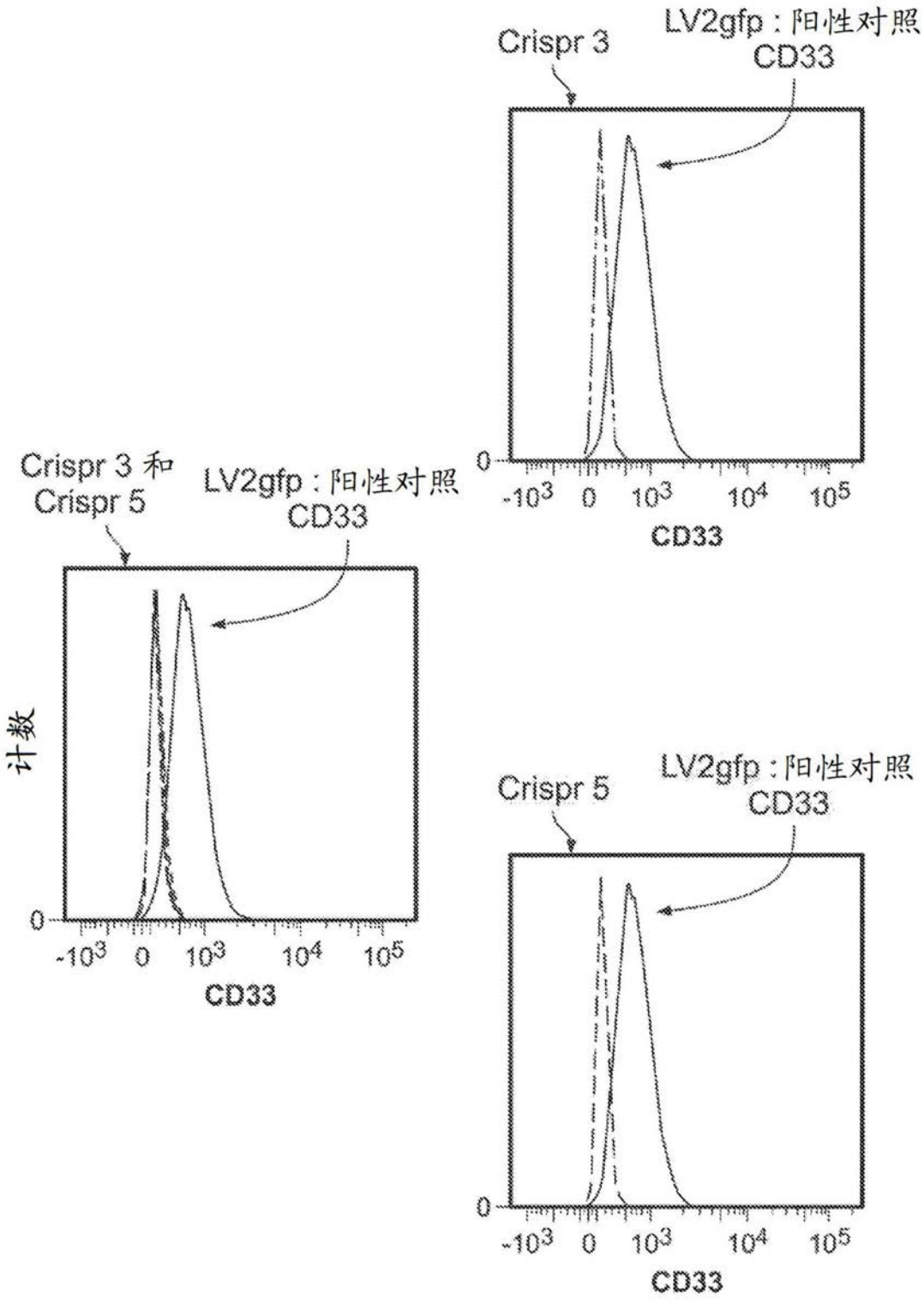

Crispr 3
LV2gfp：阳性对照
CD33
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33
Crispr 3 和
Crispr 5
LV2gfp：阳性对照
CD33
计数
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33
Crispr 5
LV2gfp：阳性对照
CD33
0
-10³ 0 10³ 10⁴ 10⁵
CD33

图15

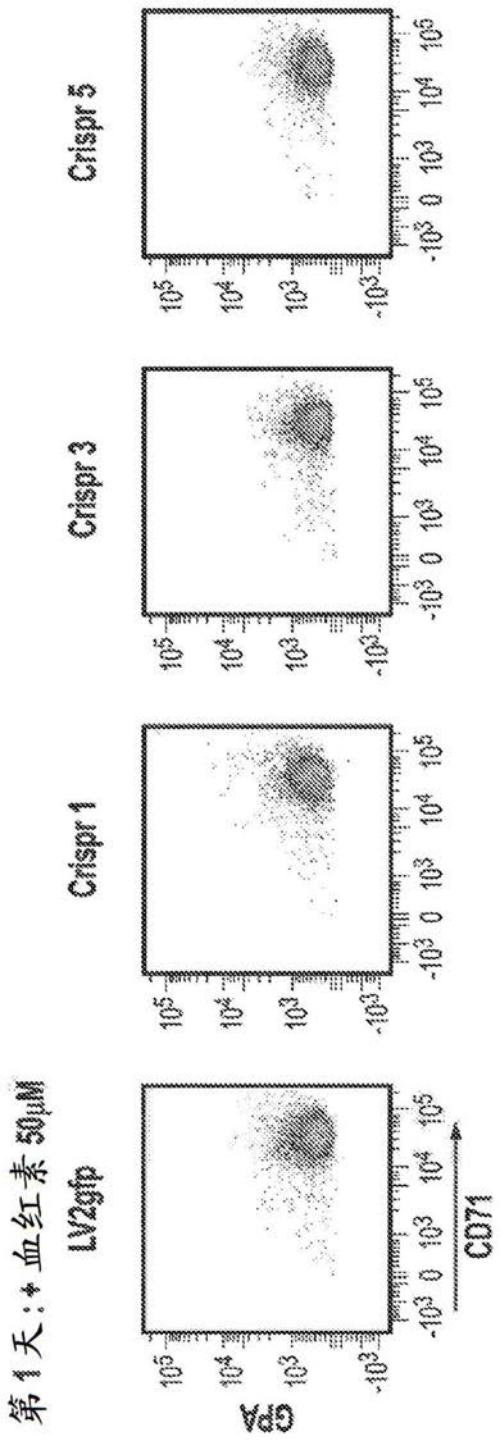


图16A

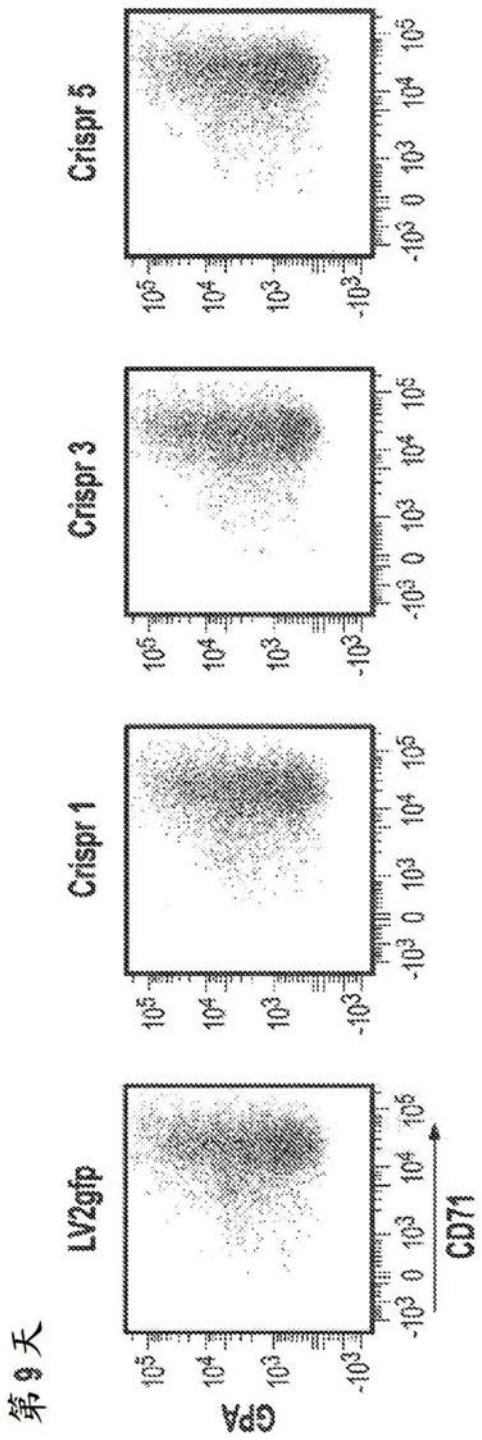


图16B

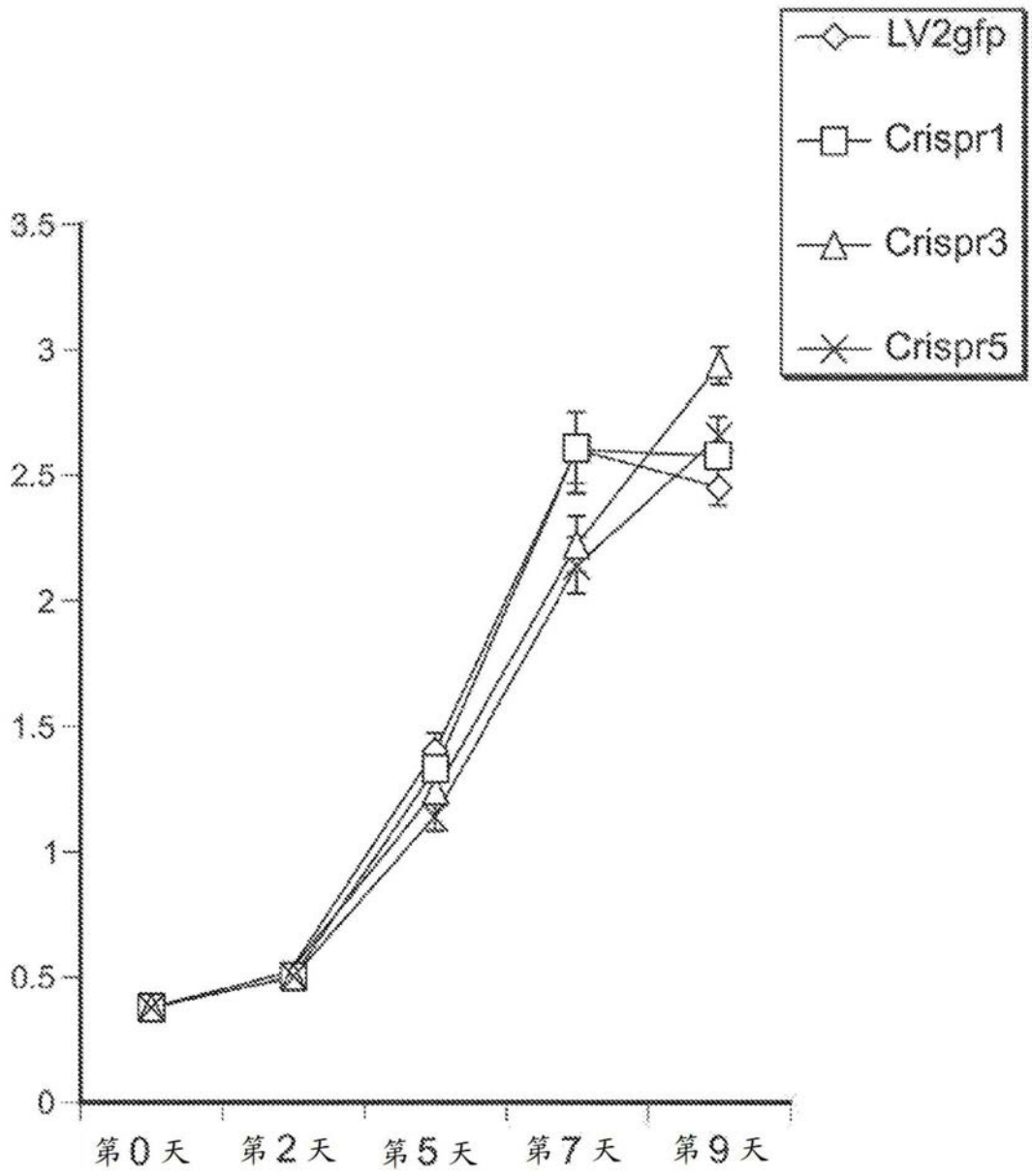

LV2gfp
Crispr1
Crispr3
Crispr5
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
第0天
第2天
第5天
第7天
第9天

图16C

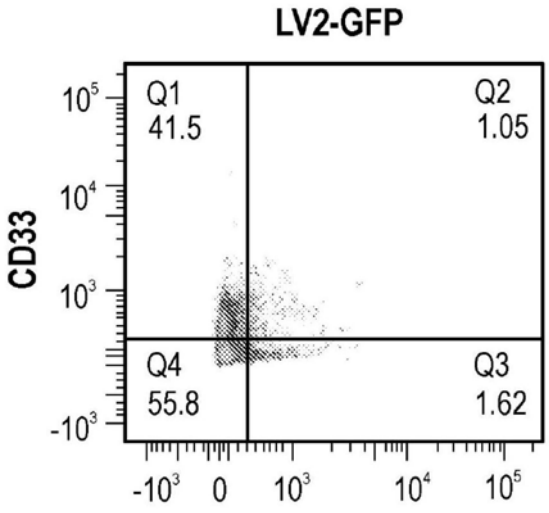

LV2-GFP
CD33
Q1
41.5
Q2
1.05
Q4
55.8
Q3
1.62
10^5
10^4
10^3
-10^3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图17A

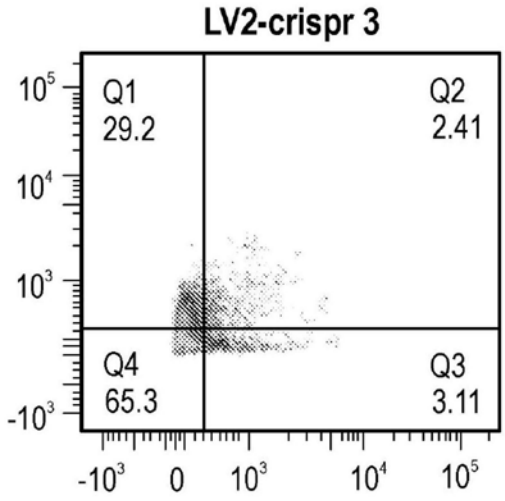

LV2-crispr 3
Q1
29.2
Q2
2.41
Q4
65.3
Q3
3.11
10^5
10^4
10^3
-10^3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图17B

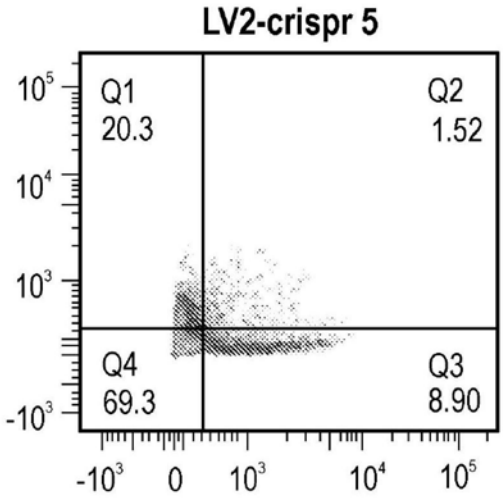

LV2-crispr 5
Q1
20.3
Q2
1.52
Q4
69.3
Q3
8.90
10^5
10^4
10^3
-10^3
-10^3
0
10^3
10^4
10^5

图17C

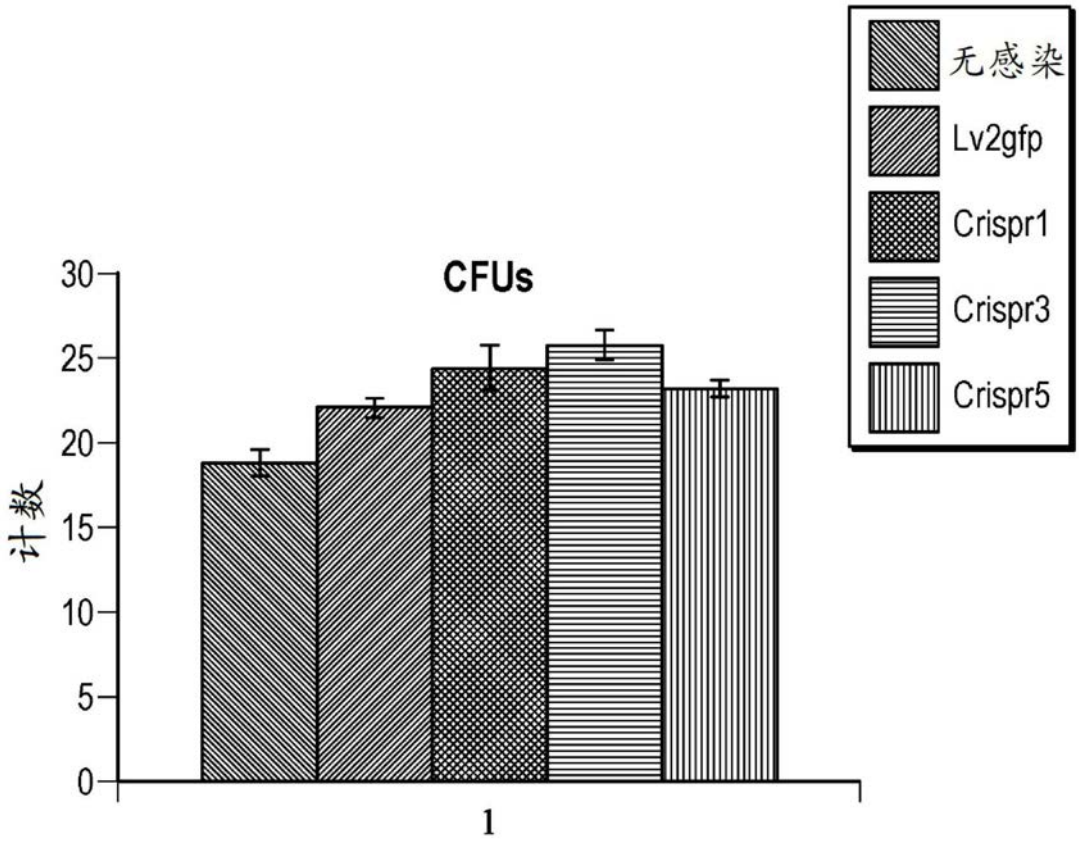

无感染
Lv2gfp
Crispr1
Crispr3
Crispr5
CFUs
计数
30
25
20
15
10
5
0
1

图18

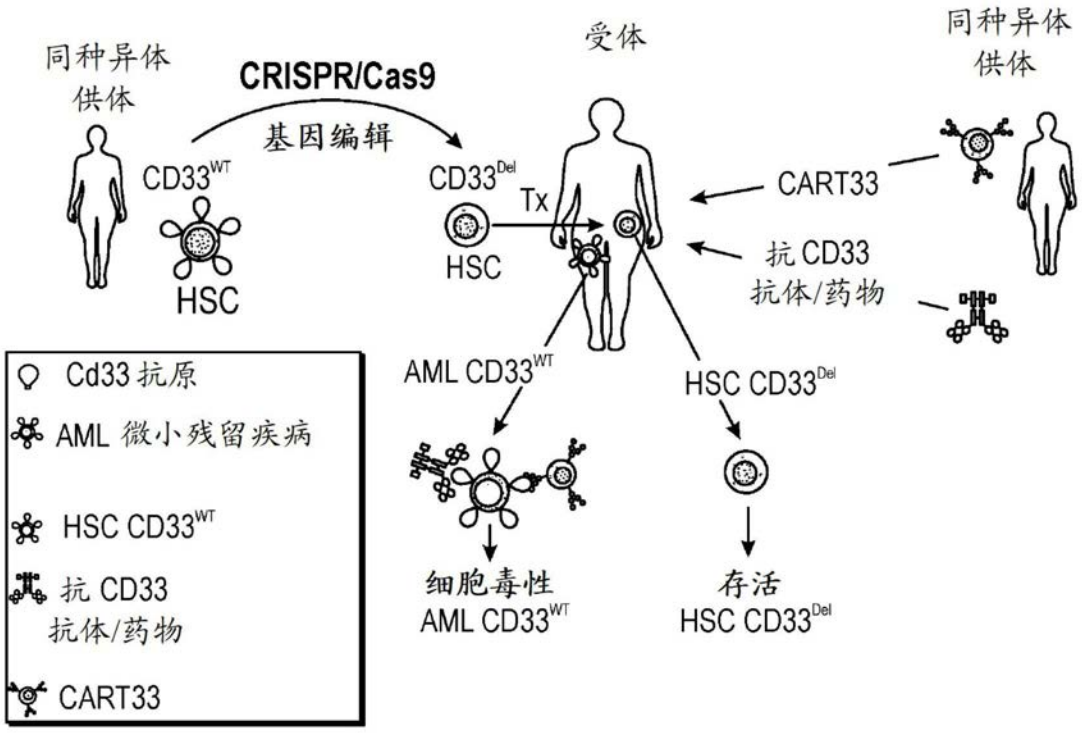

同种异体
供体
CRISPR/Cas9
基因编辑
CD33WT
HSC
CD33Del
Tx
HSC
受体
同种异体
供体
CART33
抗 CD33
抗体/药物
AML CD33WT
HSC CD33Del
细胞毒性
AML CD33WT
存活
HSC CD33Del
Cd33 抗原
AML 微小残留疾病
HSC CD33WT
抗 CD33
抗体/药物
CART33

图19A

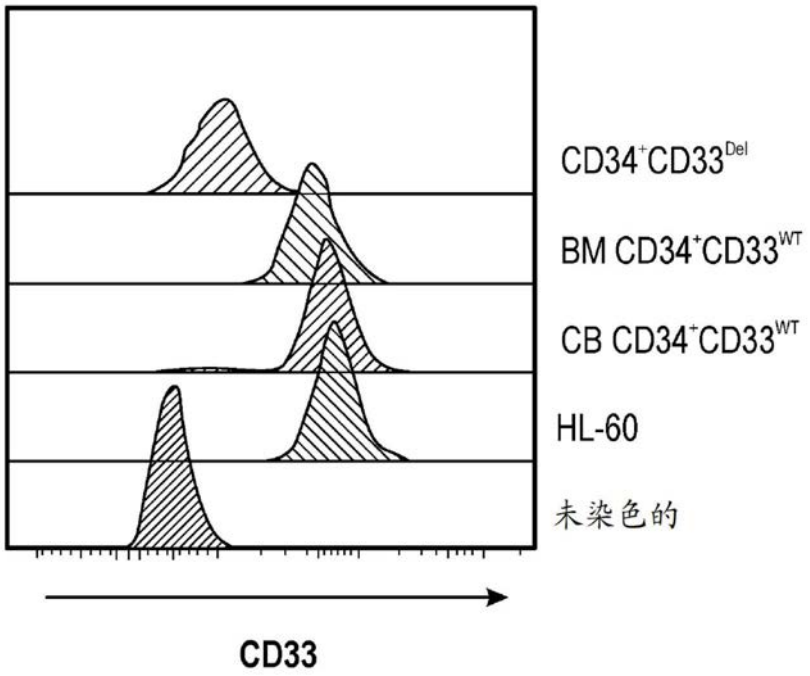

CD34+CD33Del
BM CD34+CD33WT
CB CD34+CD33WT
HL-60
未染色的
CD33

图19B

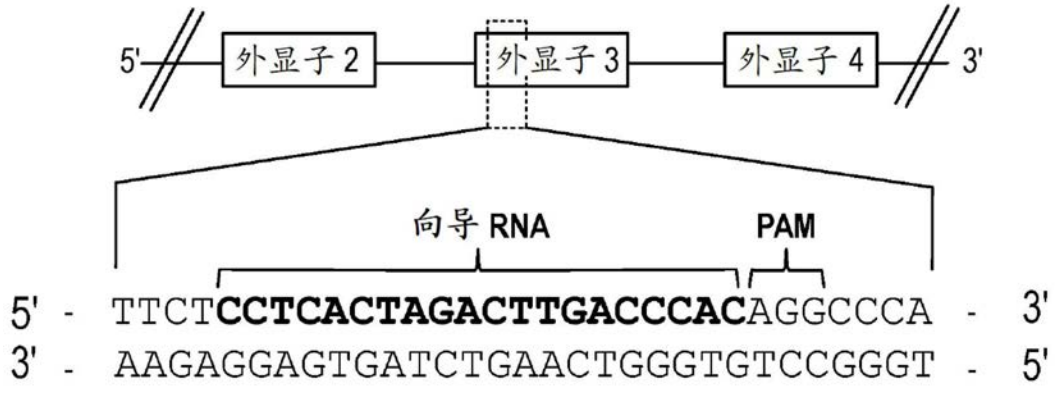

5'
外显子 2
外显子 3
外显子 4
3'
向导 RNA
PAM
5' - TTCTCCTCACTAGACTTGACCCACAGGCCCA - 3'
3' - AAGAGGAGTGATCTGAACTGGGTGTCCGGGT - 5'

图19C

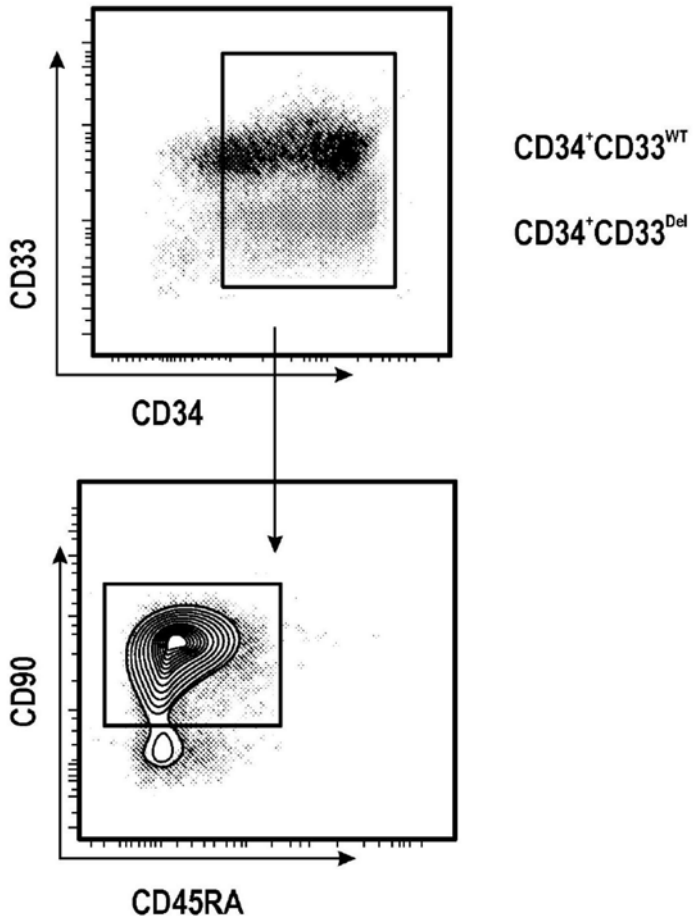

CD33
CD34
CD34+CD33WT
CD34+CD33Del
CD90
CD45RA

图19D

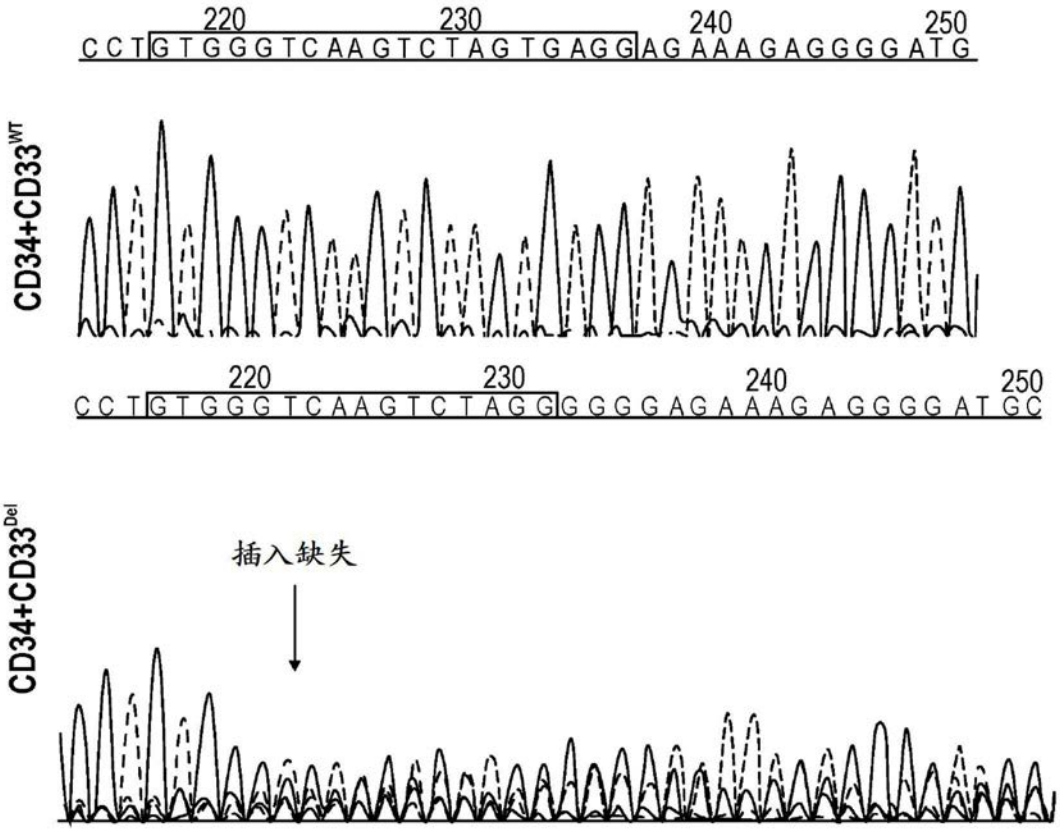

220
230
240
250
CCTGTGGGTCAAGTCTAGTGAGGAGAAAGAGGGGATG
CD34+CD33WT
220
230
240
250
CCTGTGGGTCAAGTCTAGGGGGGAGAAAGAGGGGATGC
CD34+CD33Del
插入缺失

图19E

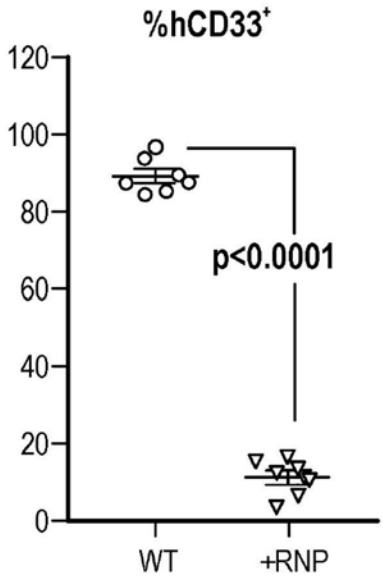

%hCD33+
120
100
80
60
40
20
0
p<0.0001
WT
+RNP

图19F

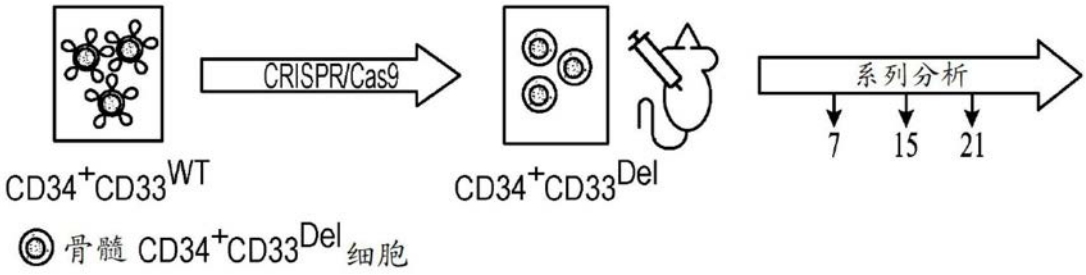

CRISPR/Cas9
系列分析
7
15
21
CD34+CD33WT
CD34+CD33Del
骨髓 CD34+CD33Del 细胞

图20A

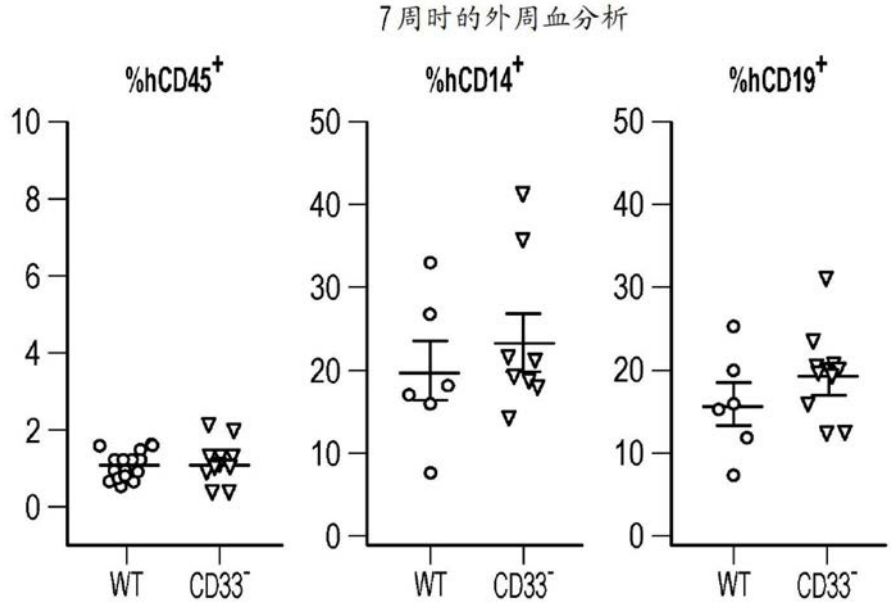

7周时的外周血分析
%hCD45+
%hCD14+
%hCD19+
WT
CD33-

图20B

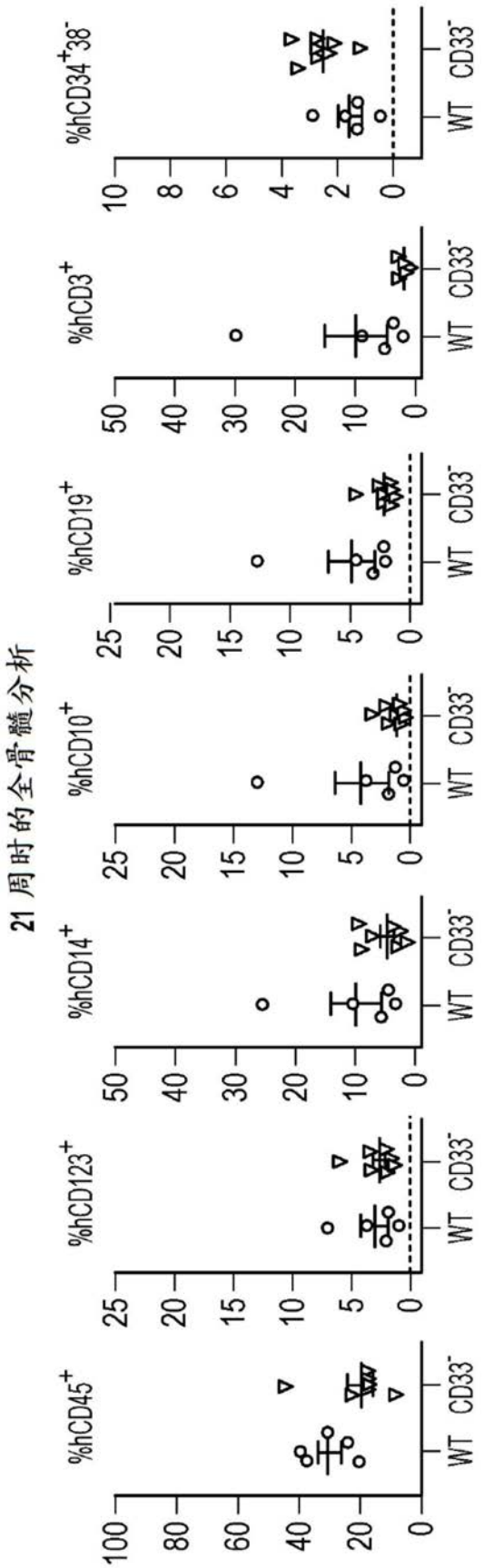

21 周时的全骨髓分析
%hCD45+
%hCD123+
%hCD14+
%hCD10+
%hCD19+
%hCD3+
%hCD34+38-
WT
CD33-

图20C

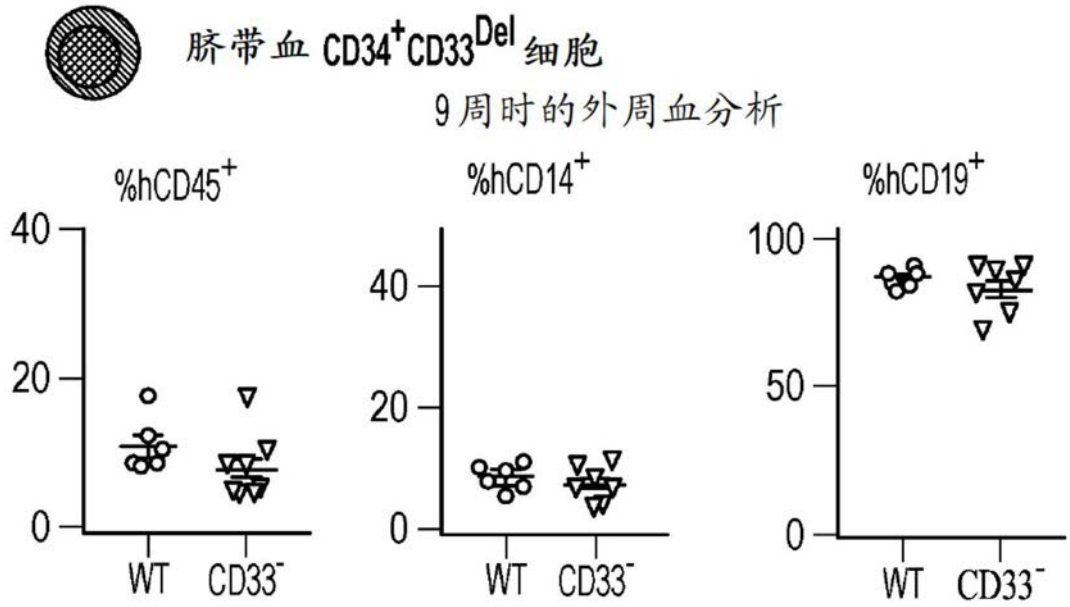

脐带血 CD34+CD33Del 细胞
9周时的外周血分析
%hCD45+
40
20
0
WT
CD33-
%hCD14+
40
20
0
WT
CD33-
%hCD19+
100
50
0
WT
CD33-

图20D

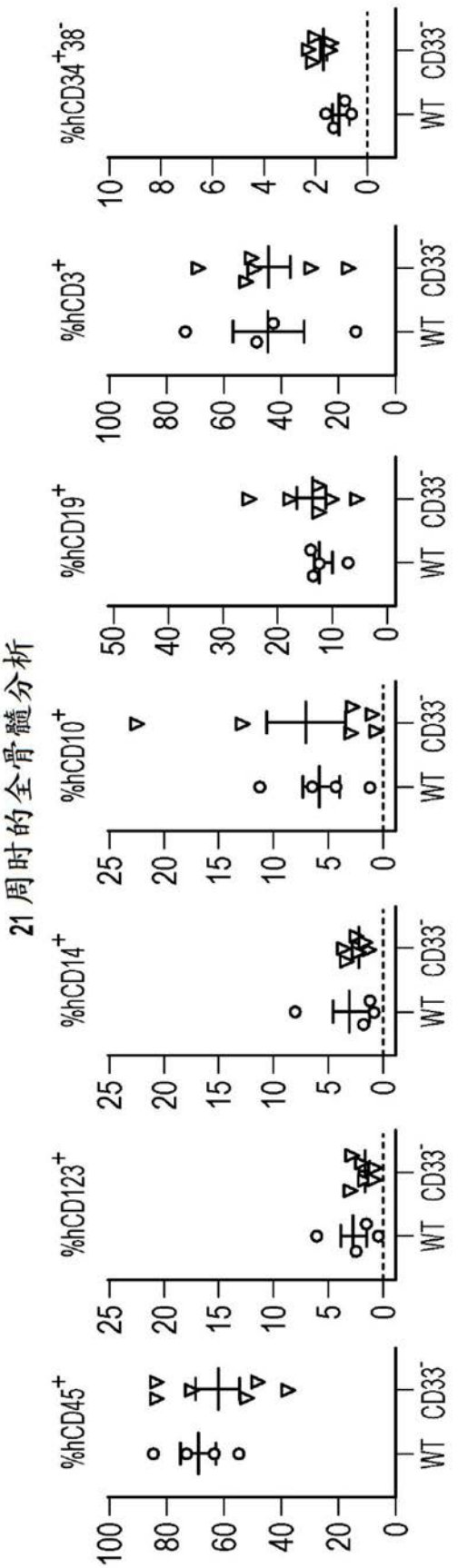

21周时的全骨髓分析
%hCD45+
%hCD123+
%hCD14+
%hCD10+
%hCD19+
%hCD3+
%hCD34+38-
WT
CD33-

图20E

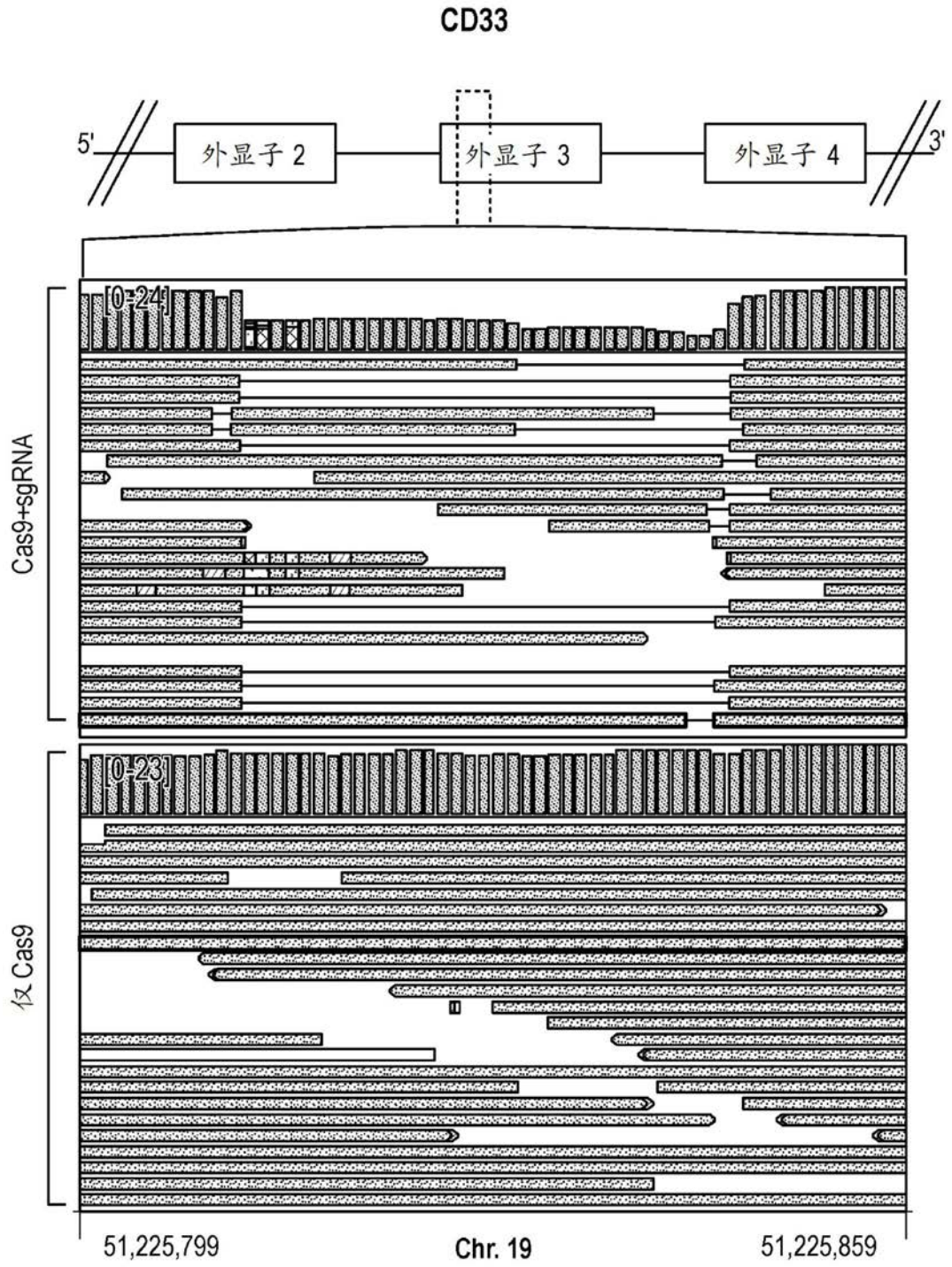

CD33
5'
外显子 2
外显子 3
外显子 4
3'
[0-24]
Cas9+sgRNA
[0-23]
仅 Cas9
51,225,799
Chr. 19
51,225,859

图21A

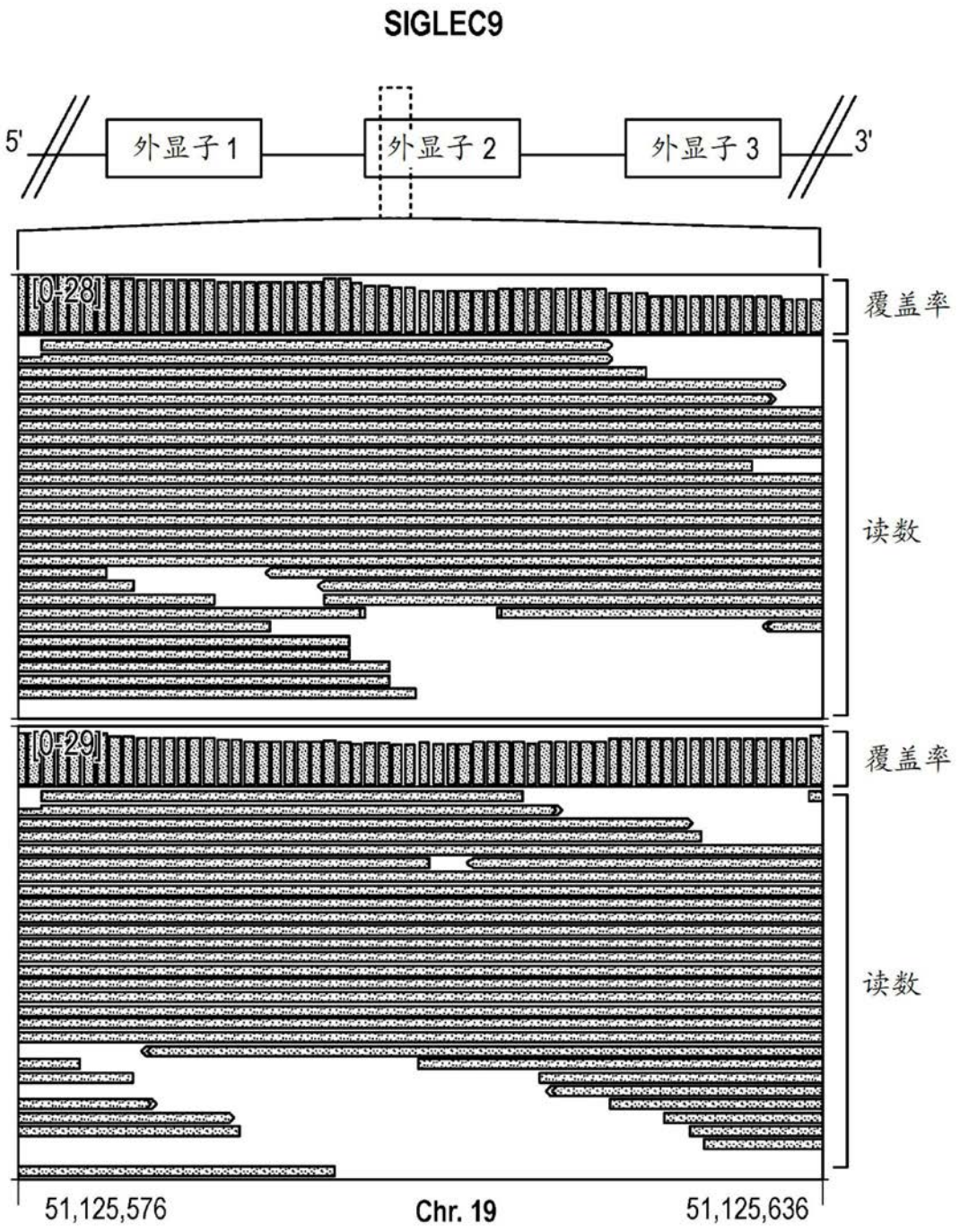

SIGLEC9
5'
外显子 1
外显子 2
外显子 3
3'
[0-28]
覆盖率
读数
[0-29]
覆盖率
读数
51,125,576
Chr. 19
51,125,636

图21B

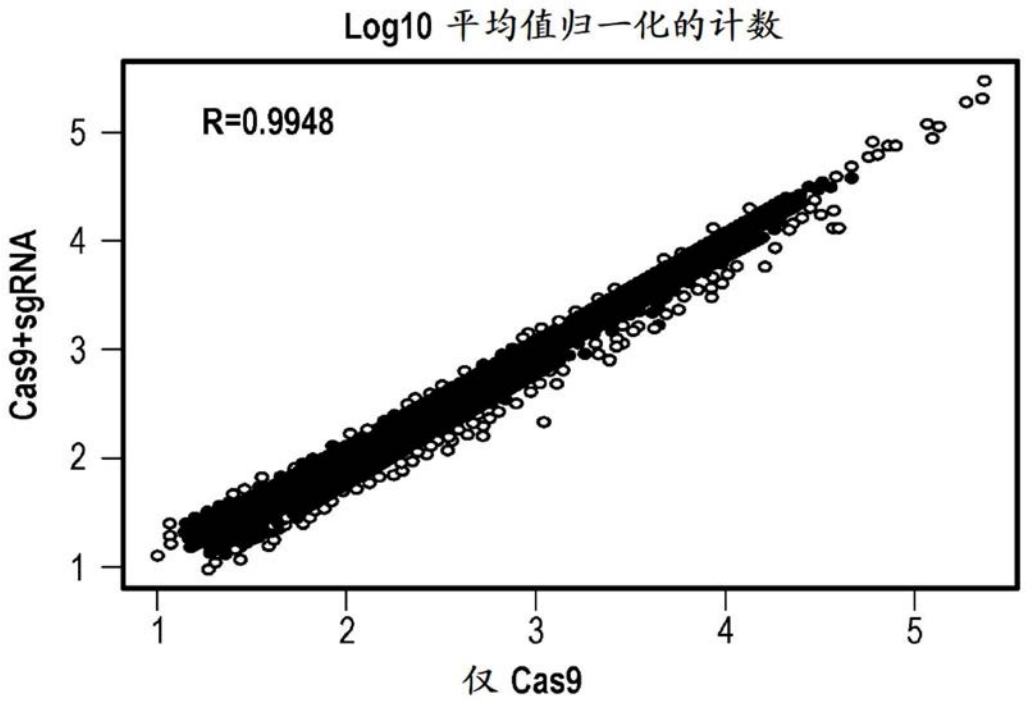

Log10 平均值归一化的计数
R=0.9948
Cas9+sgRNA
仅 Cas9
1
2
3
4
5

图21C

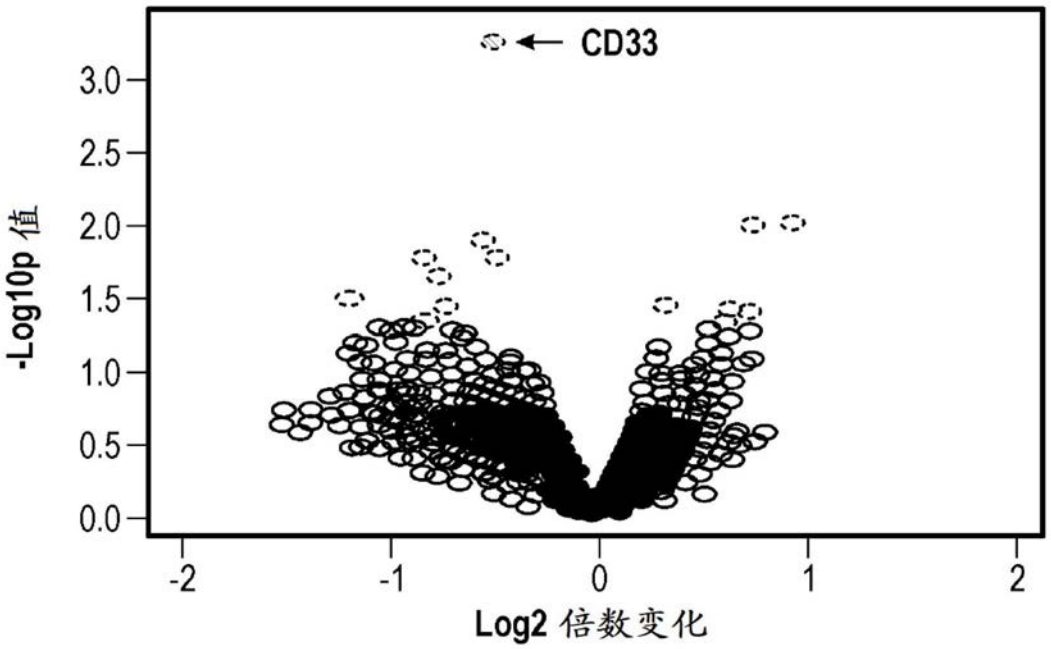

CD33
-Log10p 值
Log2 倍数变化
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-2
-1
0
1
2

图21D

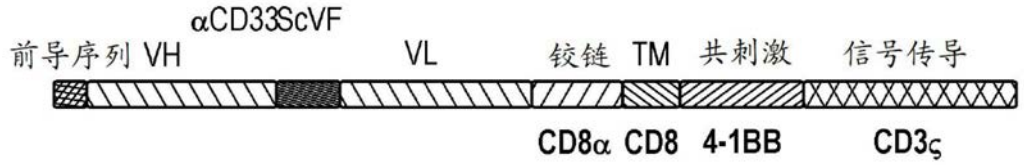


图22A

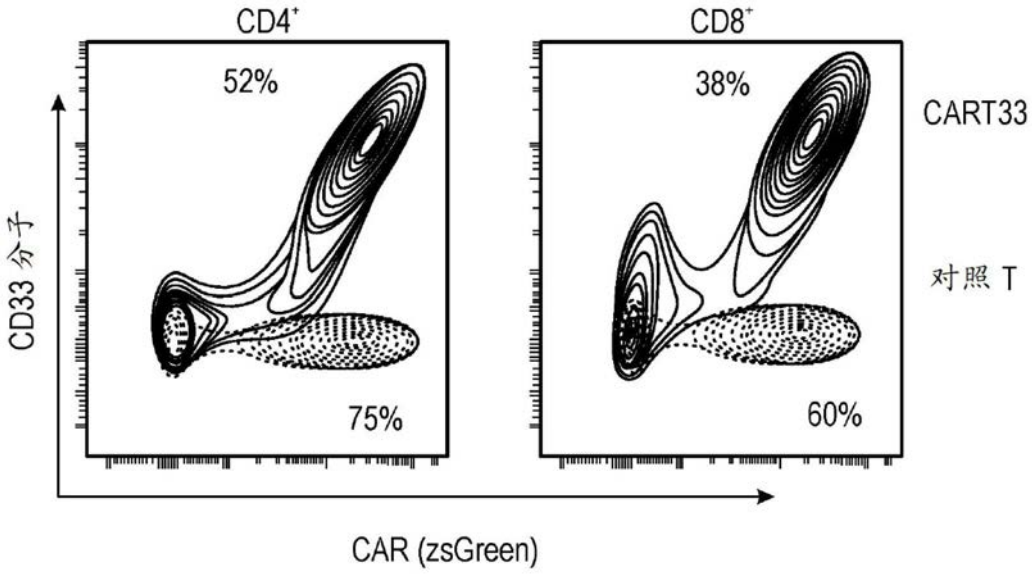


图22B

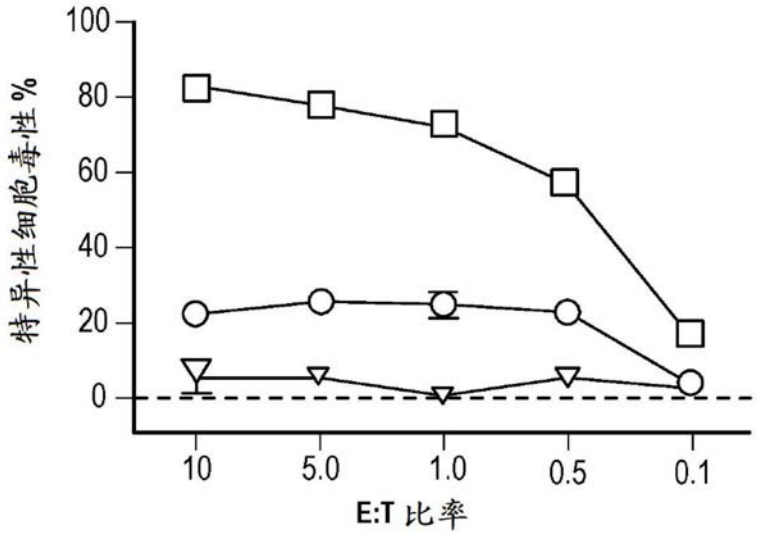


图22C

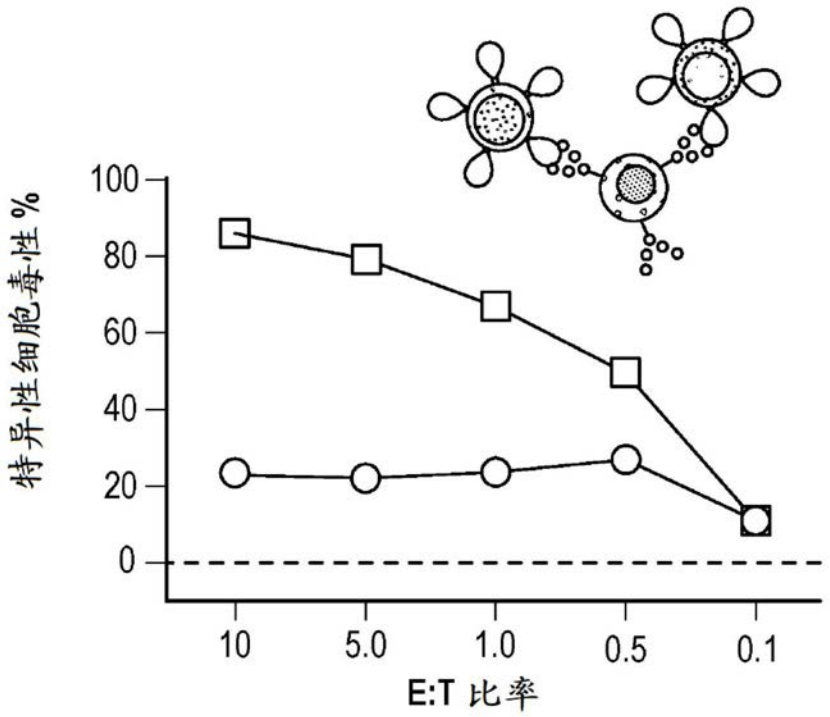

特异性细胞毒性 %
100
80
60
40
20
0
10
5.0
1.0
0.5
0.1
E:T 比率

图22D

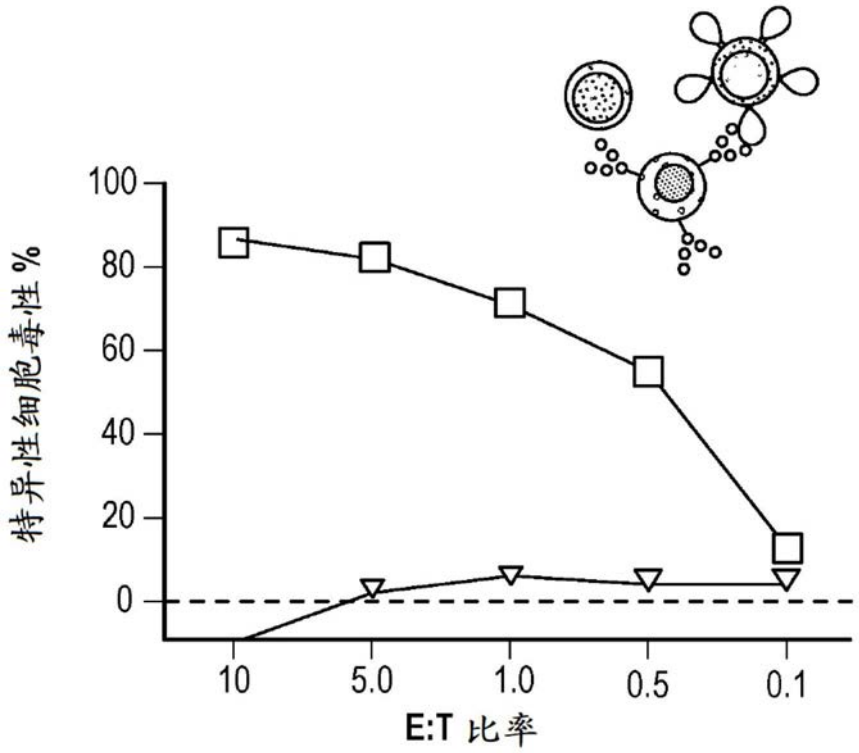

特异性细胞毒性 %
100
80
60
40
20
0
10
5.0
1.0
0.5
0.1
E:T 比率

图22E

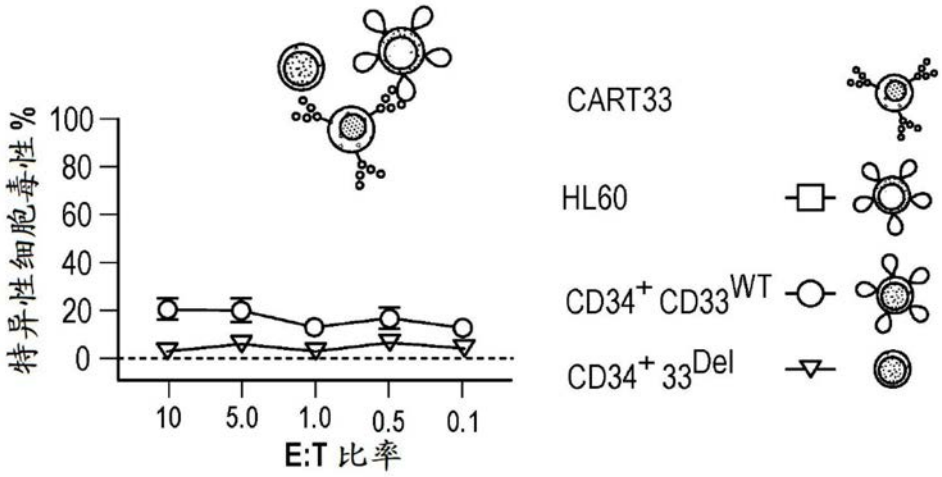

特异性细胞毒性 %
100
80
60
40
20
0
10
5.0
1.0
0.5
0.1
E:T 比率
CART33
HL60
CD34+ CD33WT
CD34+ 33Del

图22F

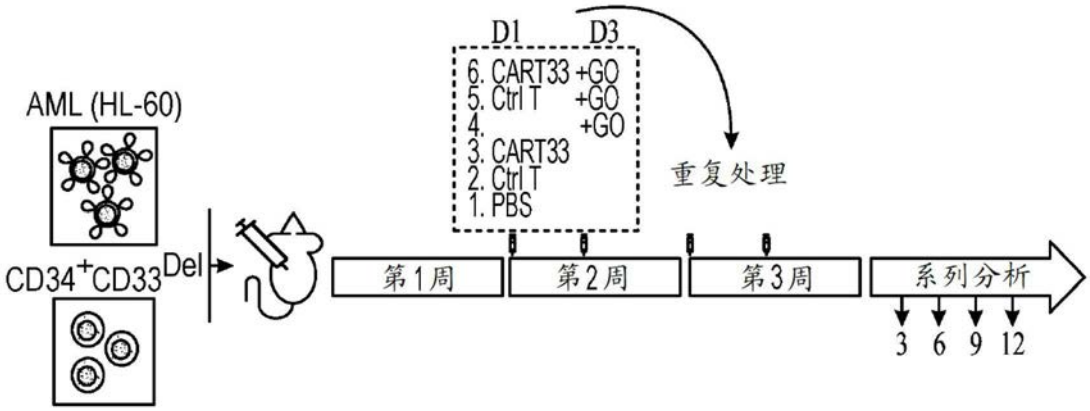

AML (HL-60)
CD34+CD33Del
D1
D3
6. CART33 +GO
5. Ctrl T +GO
4. +GO
3. CART33
2. Ctrl T
1. PBS
重复处理
第1周
第2周
第3周
系列分析
3
6
9
12

图23A

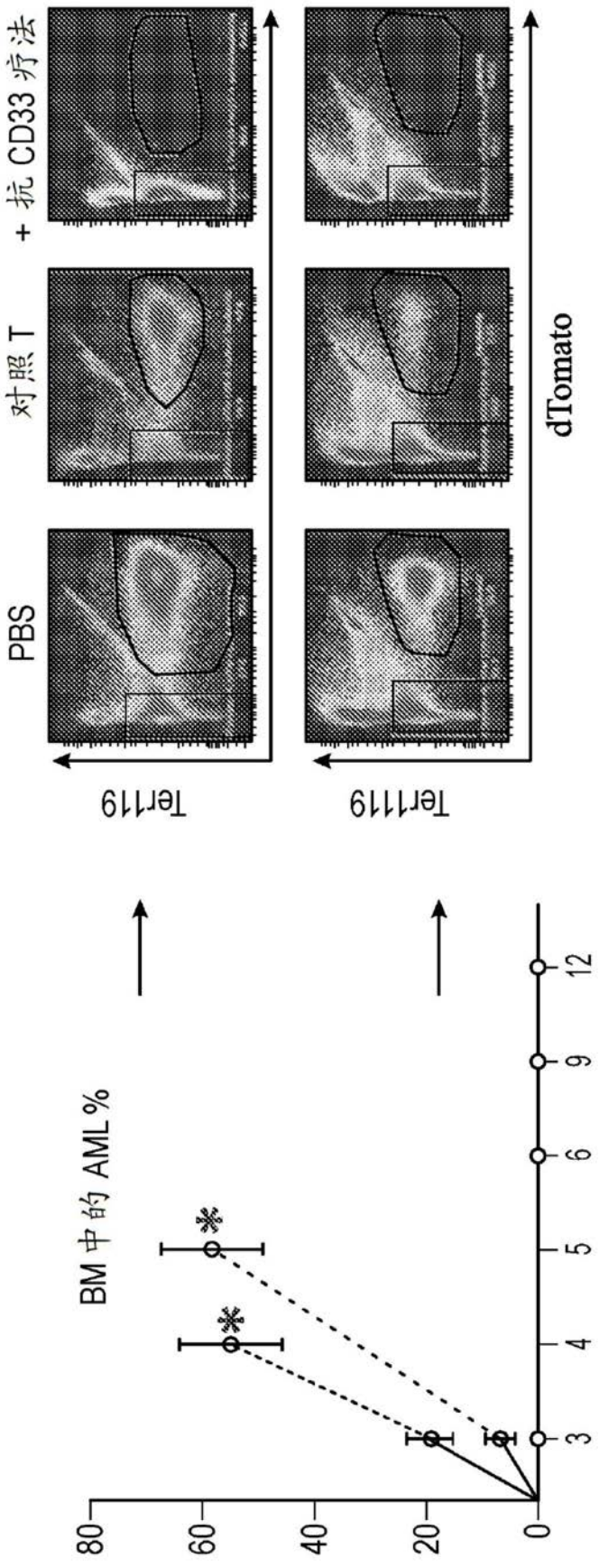

PBS
对照 T
+ 抗 CD33 疗法
Ter119
Ter119
dTomato
BM 中的 AML %
80
60
40
20
0
3
4
5
6
9
12

图23B

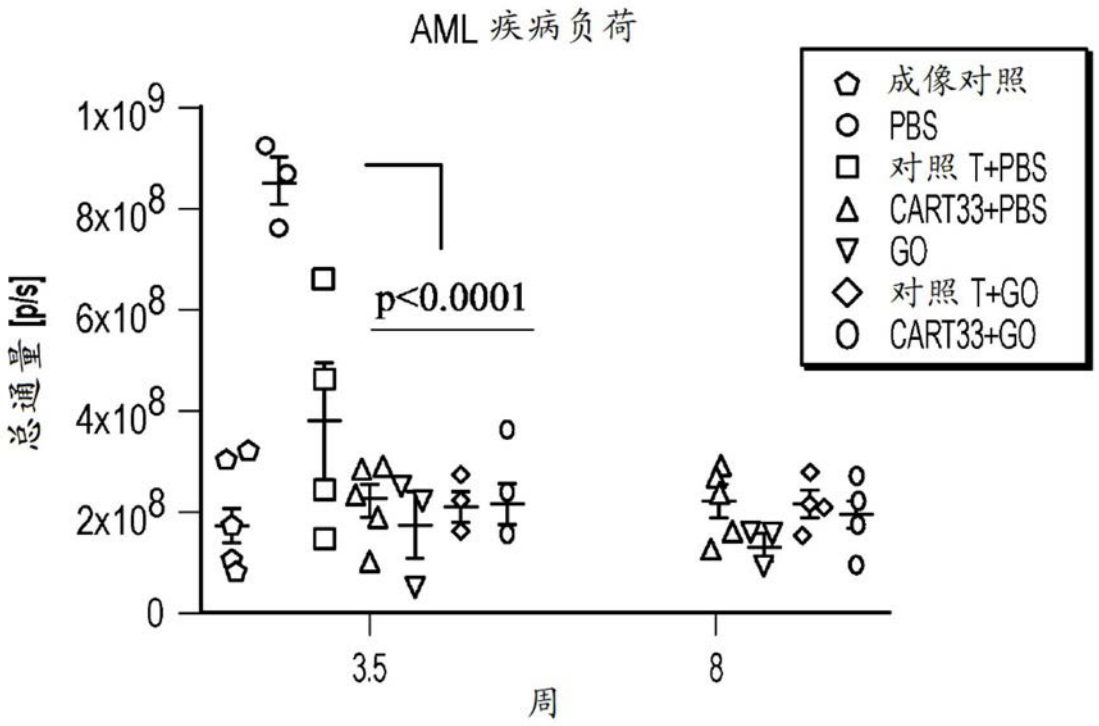

AML 疾病负荷
总通量 [p/s]
1x10^9
8x10^8
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
p<0.0001
3.5
8
周
成像对照
PBS
对照 T+PBS
CART33+PBS
GO
对照 T+GO
CART33+GO

图23C

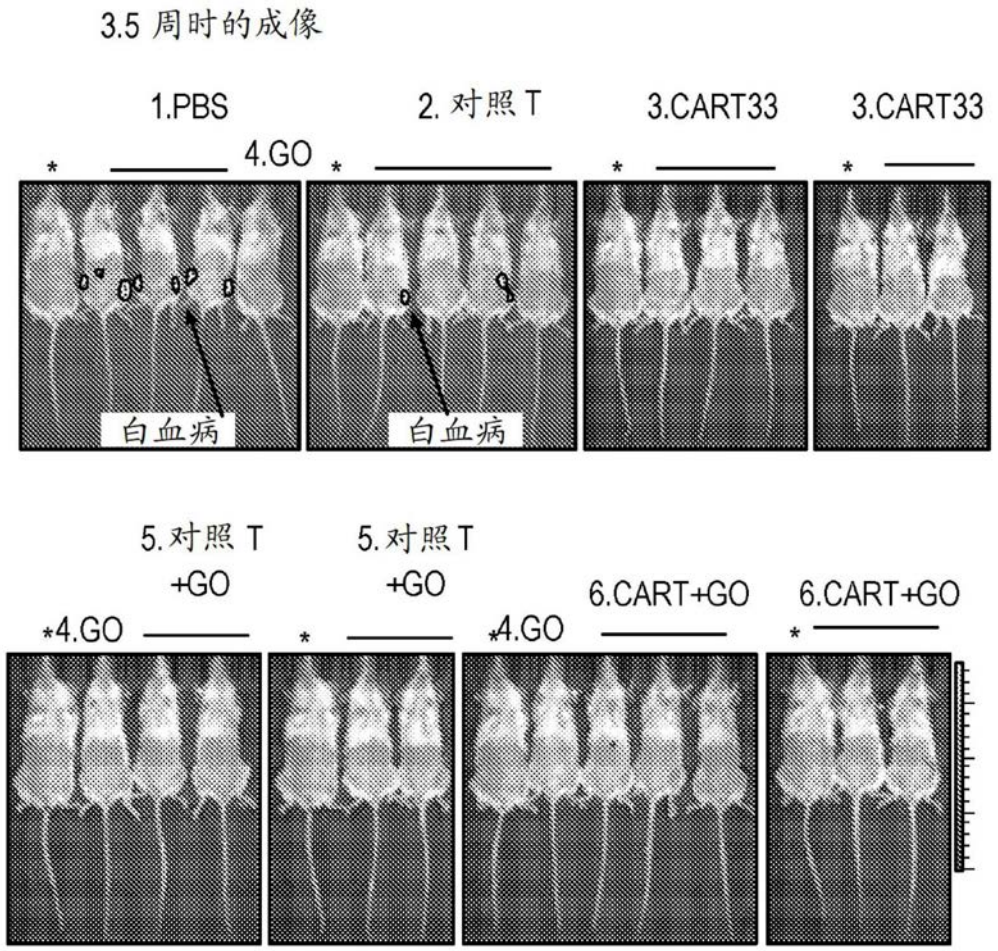

3.5 周时的成像
1.PBS
2. 对照 T
3.CART33
3.CART33
4.GO
白血病
白血病
5. 对照 T +GO
5. 对照 T +GO
6.CART+GO
6.CART+GO
4.GO
4.GO

图23D

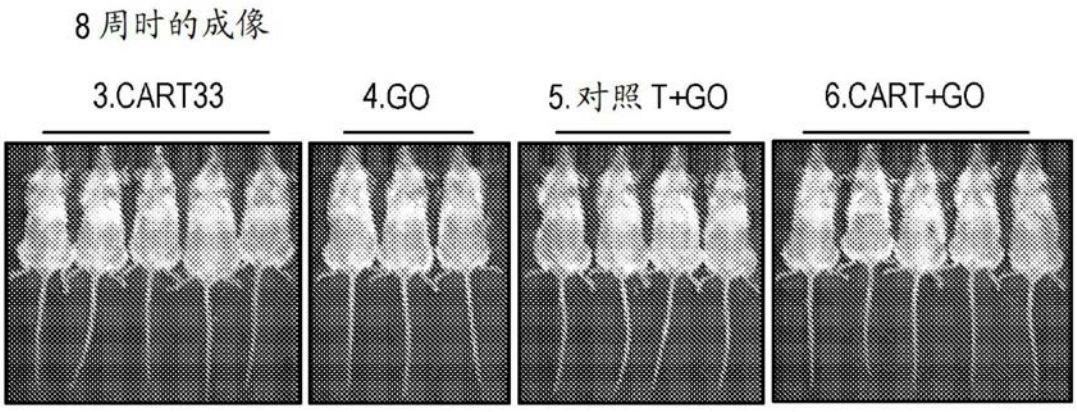

8 周时的成像
3.CART33
4.GO
5. 对照 T+GO
6.CART+GO

图23E

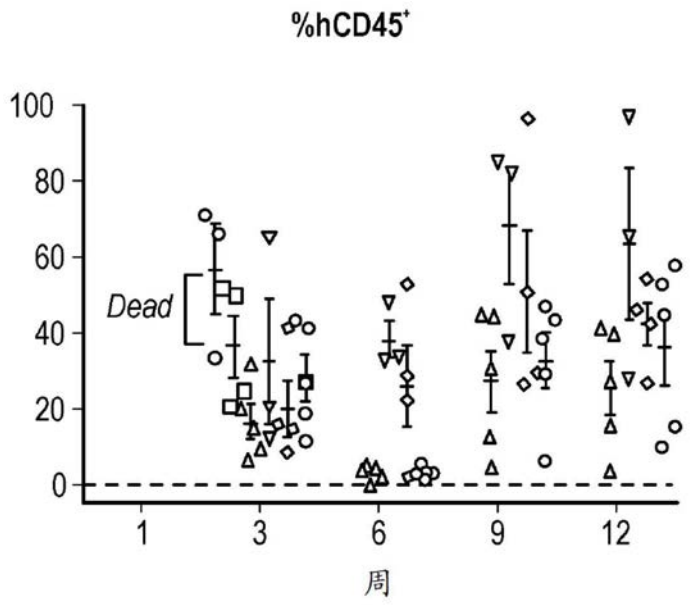

%hCD45+
100
80
60
40
20
0
Dead
1
3
6
9
12
周

图23F


祖细胞
成熟
骨髓
祖细胞
成熟
淋巴

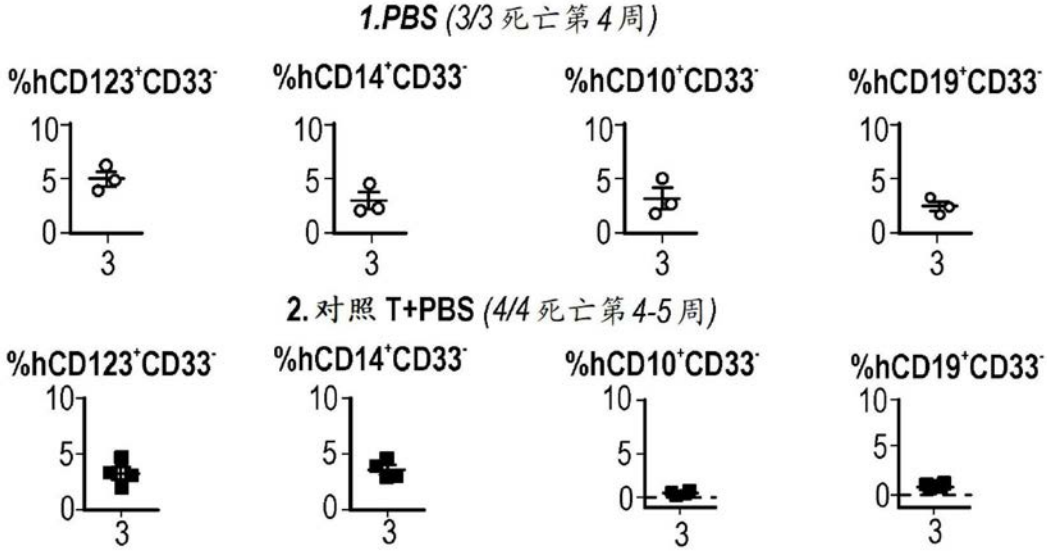

1.PBS (3/3 死亡第4周)
%hCD123+CD33-
%hCD14+CD33-
%hCD10+CD33-
%hCD19+CD33-
10
5
0
3
2. 对照 T+PBS (4/4 死亡第4-5周)

图24A

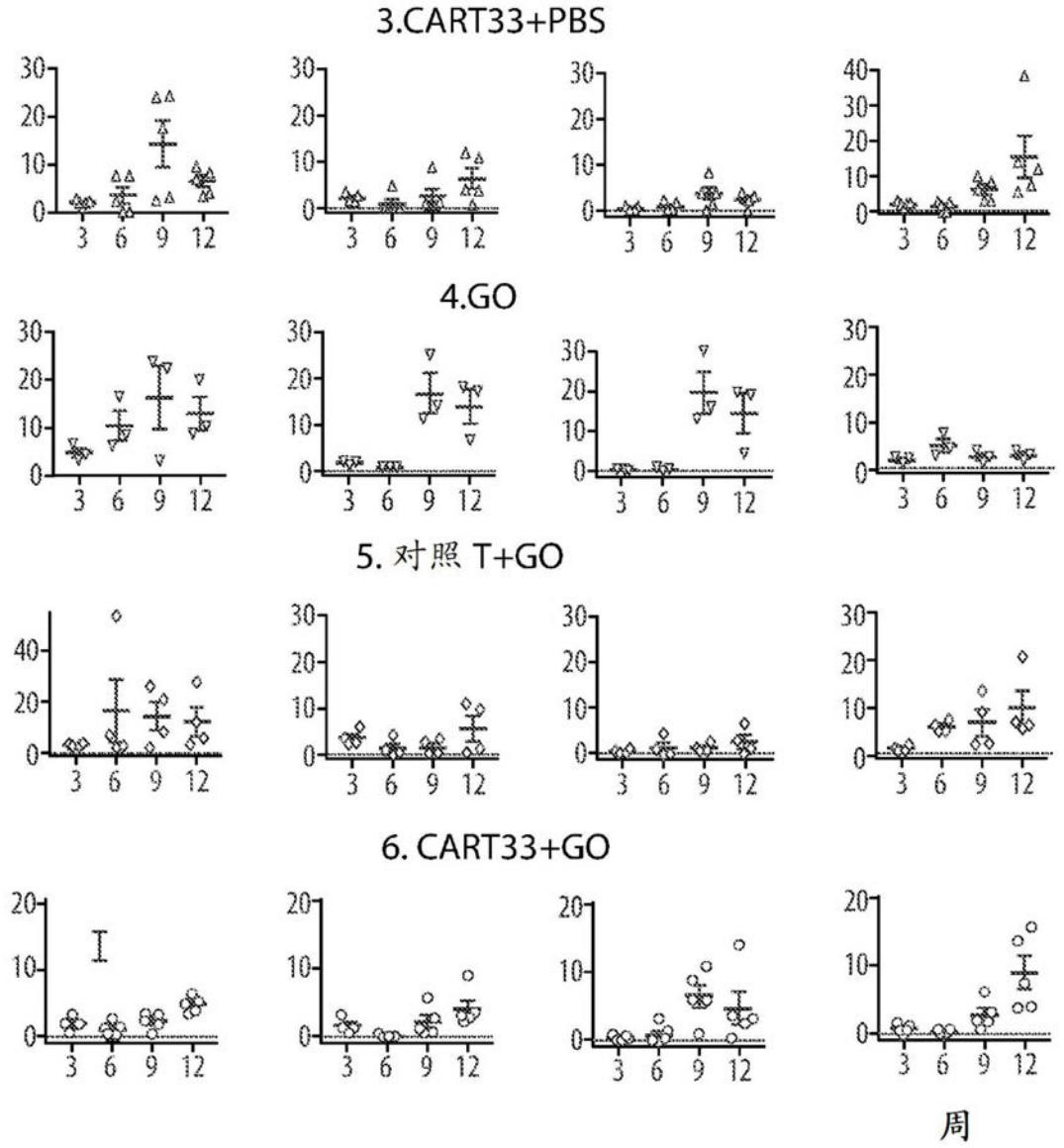

3.CART33+PBS
4.GO
5. 对照 T+GO
6. CART33+GO
周

图24A(续)

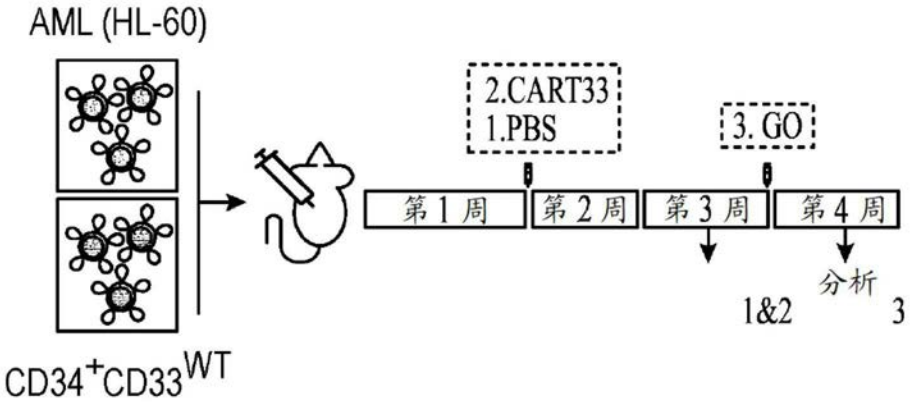

AML (HL-60)
CD34+CD33WT
2.CART33
1.PBS
3. GO
第 1 周
第 2 周
第 3 周
第 4 周
分析
1&2
3

图24B

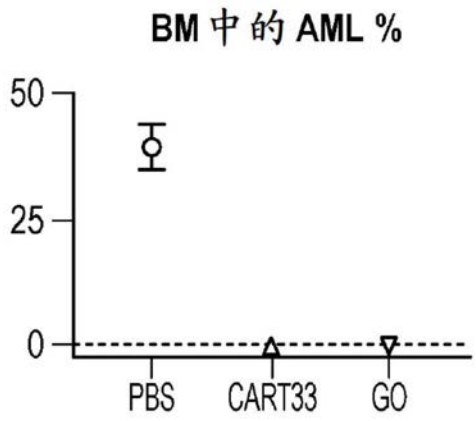

BM中的AML %
50
25
0
PBS
CART33
GO

图24C

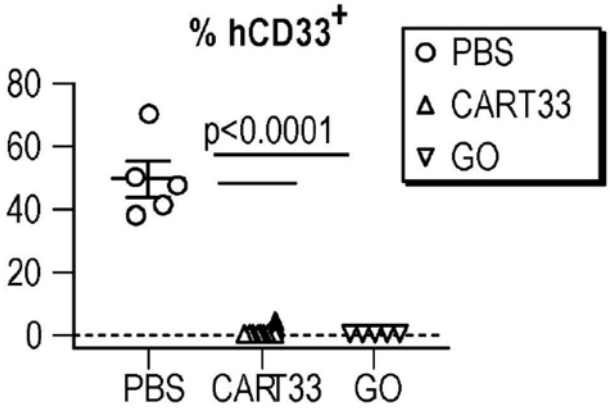

% hCD33+
80
60
40
20
0
p<0.0001
PBS
CART33
GO
PBS
CART33
GO

图24D

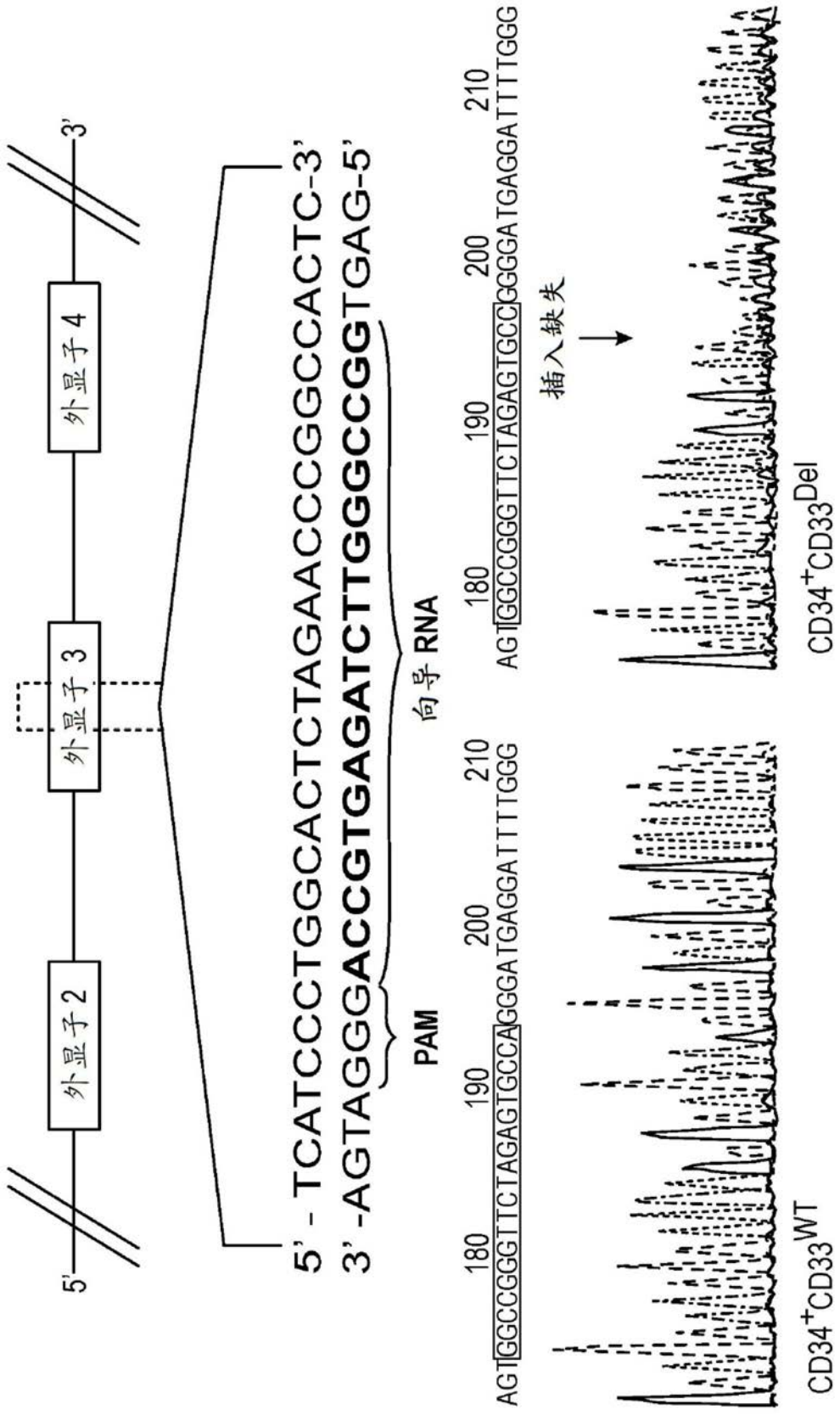

5'
外显子2
外显子3
外显子4
3'
5' - TCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTC-3'
3' -AGTAGGGACCGTGAGATCTTGGGCCGGTGAG-5'
PAM
向导 RNA
180 190 200 210
AGTGGCCGGGTTCTAGAGTGCCAGGGATGAGGATTTTGGG
插入缺失
180 190 200 210
AGTGGCCGGGTTCTAGAGTGCCGGGATGAGGATTTTGGG
CD34+CD33WT
CD34+CD33Del

图25A

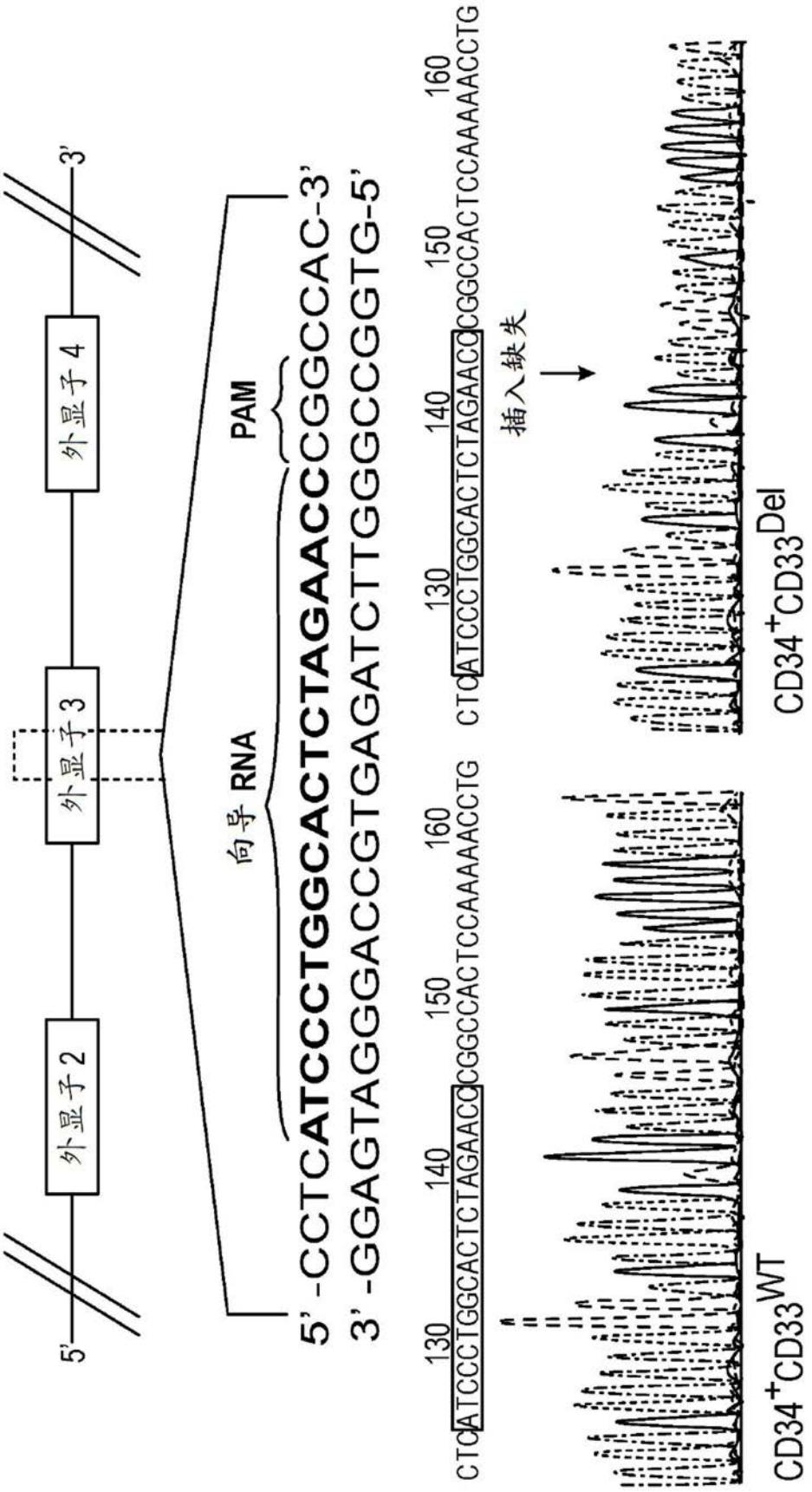

外显子2
外显子3
外显子4
5'
3'
向导 RNA
PAM
5'-CCTCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCAC-3'
3'-GGAGTAGGGACCGTGAGATCTTGGGCCGGTG-5'
130
140
150
160
CTCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTCCAAAAACCTG
插入缺失
CD34+CD33WT
CD34+CD33Del

图25B

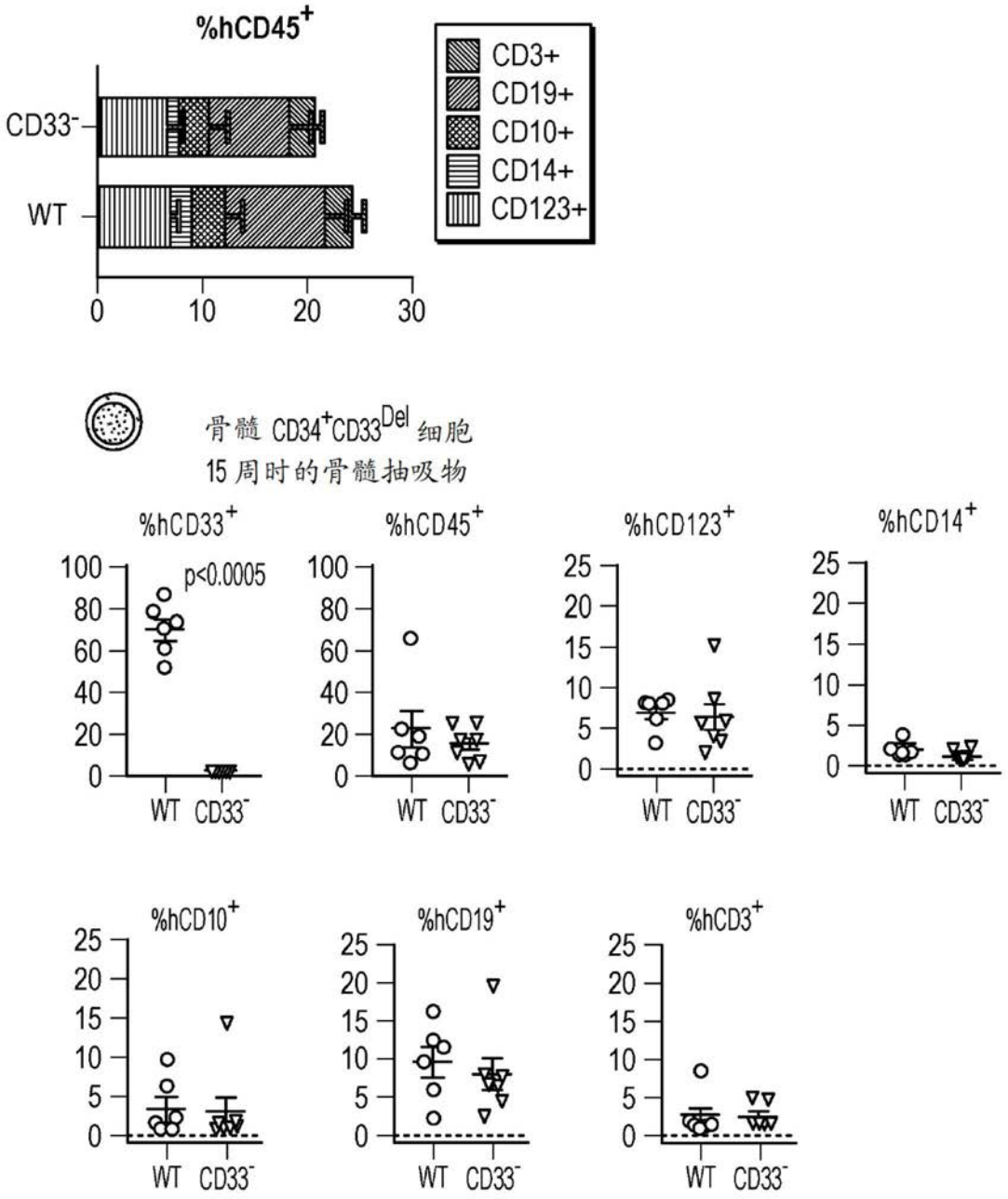

%hCD45+
CD33-
WT
0
10
20
30
CD3+
CD19+
CD10+
CD14+
CD123+
骨髓 CD34+CD33Del 细胞
15 周时的骨髓抽吸物
%hCD33+
p<0.0005
%hCD45+
%hCD123+
%hCD14+
%hCD10+
%hCD19+
%hCD3+
WT
CD33-

图26A

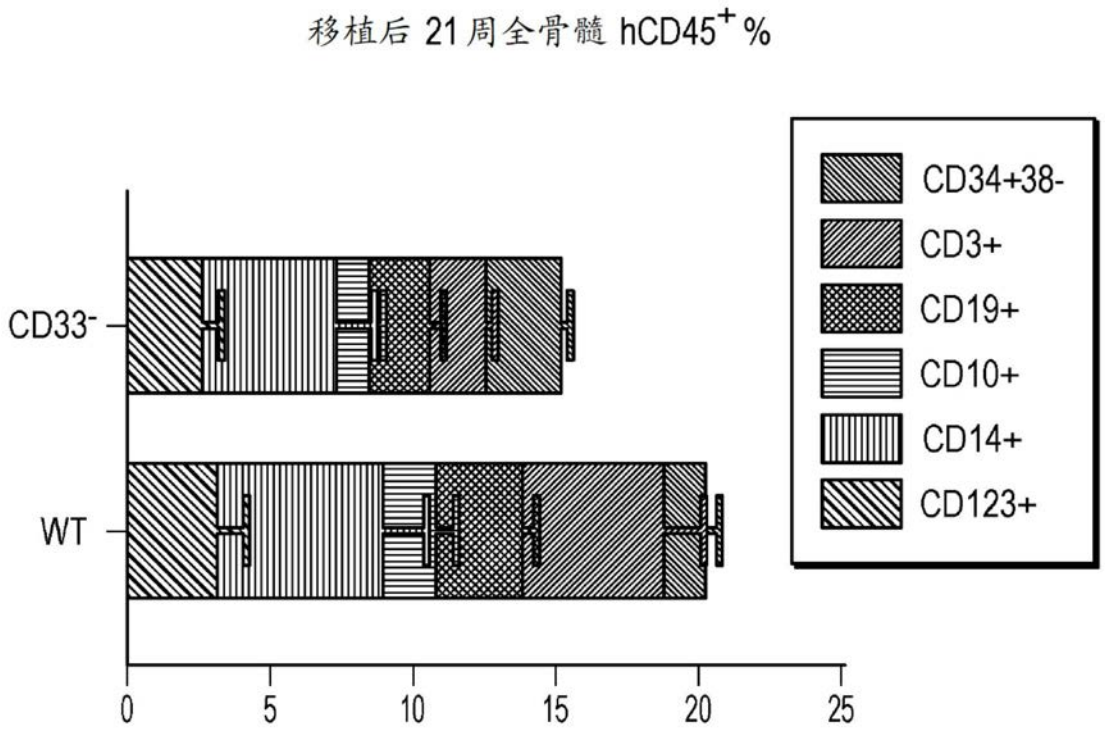
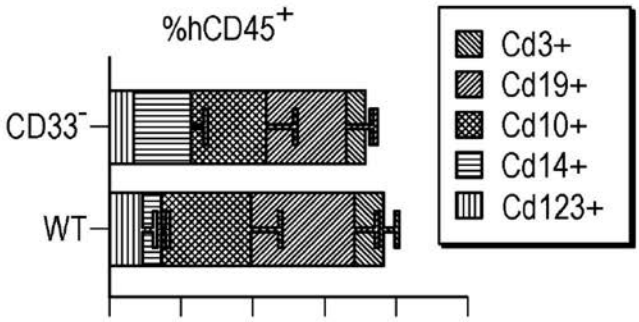

移植后 21 周全骨髓 hCD45+ %
CD33-
WT
0
5
10
15
20
25
CD34+38-
CD3+
CD19+
CD10+
CD14+
CD123+

图26B


%hCD45+
CD33-
WT
Cd3+
Cd19+
Cd10+
Cd14+
Cd123+

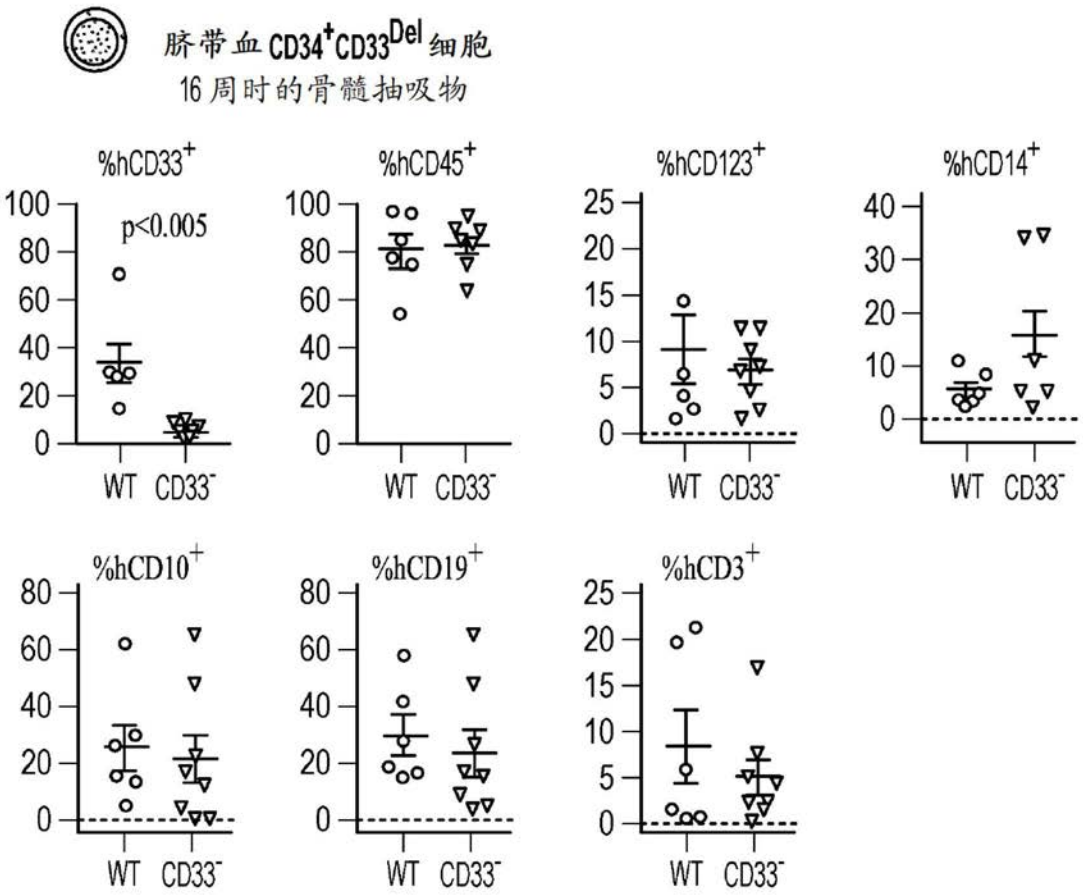

脐带血 CD34+CD33Del 细胞
16 周时的骨髓抽吸物
%hCD33+
p<0.005
%hCD45+
%hCD123+
%hCD14+
%hCD10+
%hCD19+
%hCD3+
WT
CD33-

图26C

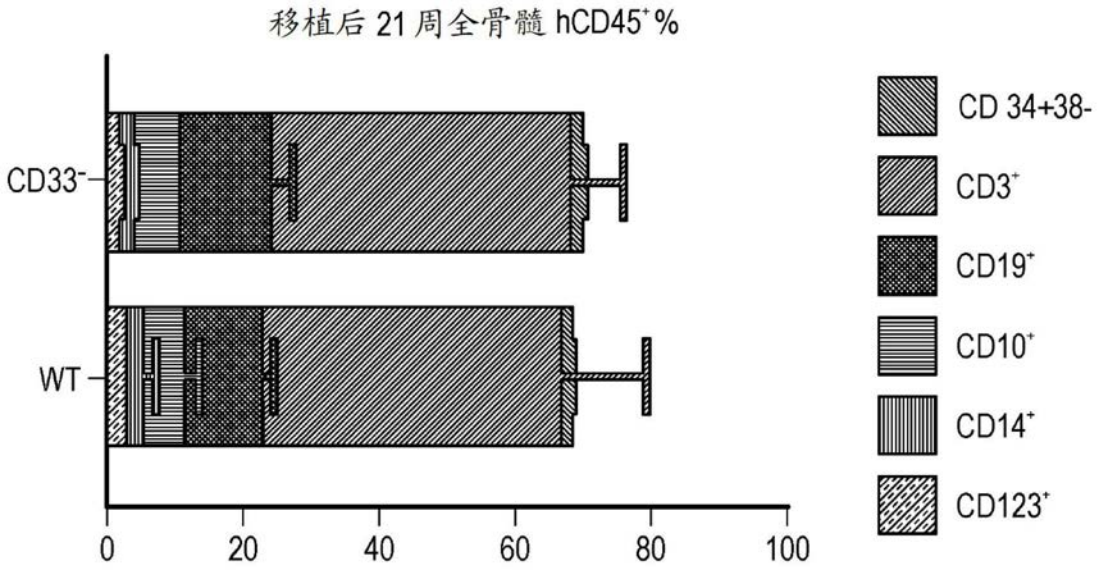

移植后21周全骨髓hCD45+%
CD33-
WT
0
20
40
60
80
100
CD 34+38-
CD3+
CD19+
CD10+
CD14+
CD123+

图26D

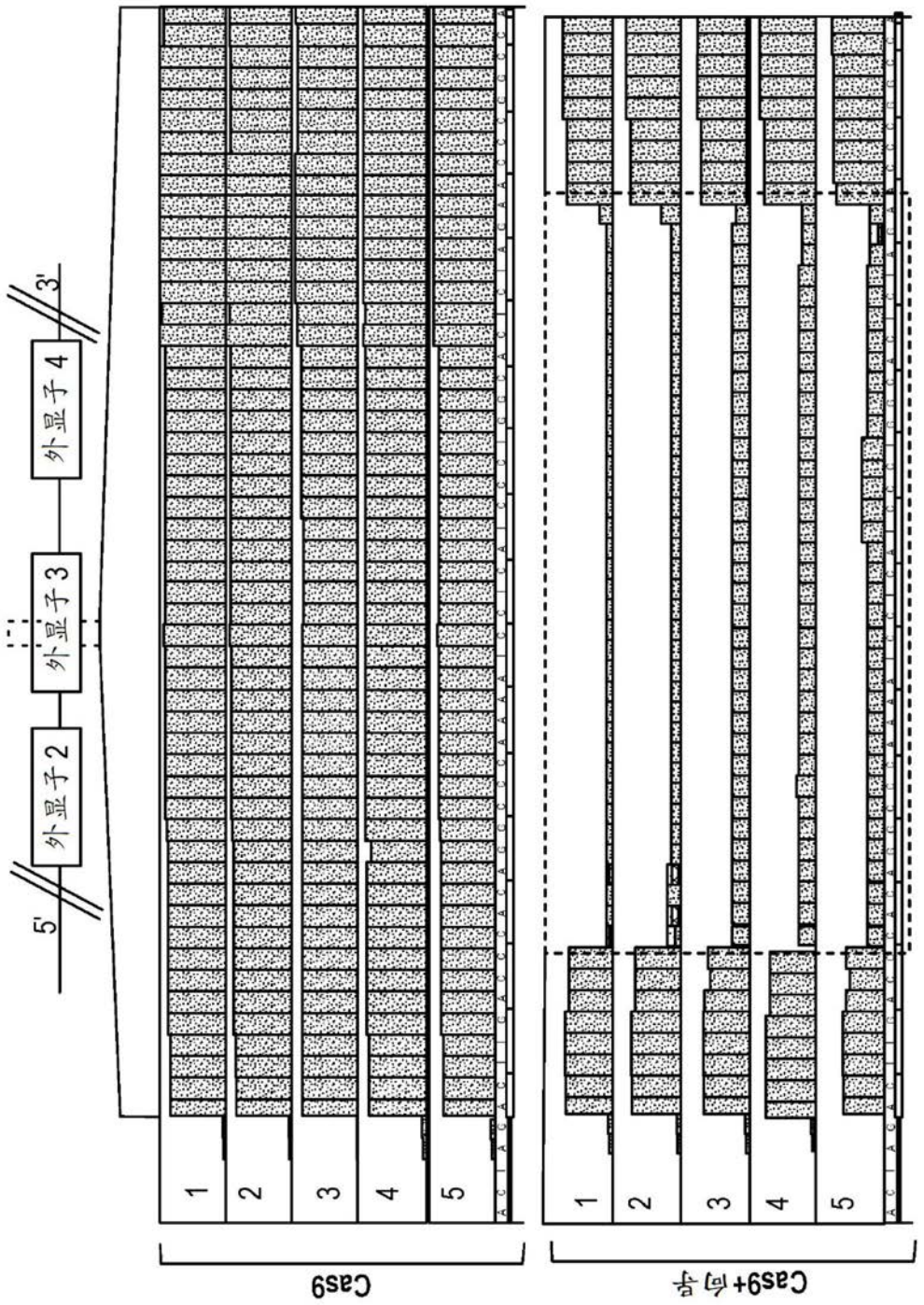


图27

	Cas9			Cas9+sgRNA		
总 PF 读数	629,724,054			659,744,702		
Q30 碱基百分比	93.46%			93.43%		
	SNVs	插入 s	缺失 s	SNVs	插入 s	缺失 s
小变体总结				3,744,33		
总通过	6	401,796	418,883	1	401,386	418,187
dbSNP 中发现的百分比	94.24%	85.75%	86.70%	94.25%	85.82%	86.89%
Het/Hom 比率	1.613	2.008	2.358	1.614	2	2.343
Ts/TV 比率	2.063	-	-	2.063	-	-
根据后果的变体						
移码	-	58	67	-	57	67
非同义	10,248	144	192	10,300	157	191
同义	11,638	-	-	11,625	-	-
终止获得	77	6	0	77	6	0
终止丢失	19	0	1	19	0	1

图28

脱靶位点	错配	染色体	切割位点	PAM	基因	插入缺失
ATCCCTGGCACTC**AG**GA**G**CC	3	chr9	129,640,094	AGG	ASB6	无
A**A**CCCTGGCT**C**TCTA**A**AACC	3	chr12	112,995,250	AGG	RP1-71H24_1	无
ATCCCTGGCAC**C**C**T**G**C**ACC	3	chr14	99,627,517	TGG		无
ATCCCTGGCACTC**C**AG**G**CC	3	chr17	9,253,589	TGG	STX8	无
A**G**CCCTGGCA**G**TCT**G**GAACC	3	chr8	52,941,254	TGG		无
ATCCC**A**GGC**C**CTCTA**T**AACC	3	chr1	236,691,946	TGG	ACTN2	无
ATCC**A**TGGTACTCT**G**GAACC	3	chr22	35,609,583	AGG	MB	无
A**A**CCC**A**GGCACTCTAG**C**ACC	3	chr2	203,480,837	AGG	RAPH1	无
AC**A**CCCTAGCACTCTAGA**G**CC	3	chr1	26,560,691	AGG	RPS6KA1	无
AC**C**CCTGGCA**G**TCTAGA**G**CC	3	chr4	25,435,756	AGG		无
ATCCCTGA**C**ACTCT**G**G**G**ACC	3	chr12	3,595,172	TGG		无
A**G**CCCT**C**GCACTCT**G**GAACC	3	chr14	74,598,895	AGG	LTBP2	无
ATCTCTGGCA**G**A**G**ACTAGAACC	3	chr5	94,207,405	AGG	KIAA0825	无
AC**C**CCTG**A**CACTCTAGAA**AG**	4	chr16	57,399,318	AGG		无
ATCCCTGGCAC**A**CT**G**G**C**CC	4	chr2	106,853,582	AGG	ST6GAL2	无
ATC**A**CTTGT**C**TC**C**CTAGAACC	4	chr9	125,259,035	TGG		无
ATC**C**CTG**A**C**C**CTC**C**AGAACA	4	chr9	131,545,888	TGG	RP11-40A7.2	无
AC**C**CCTGGCT**C**C**C**TAGA**G**CC	4	chr10	125,810,087	TGG	UROS	无
CTG**C**CTGGC**T**CTCTAG**C**ACC	4	chr11	205,054	TGG	BET1L	无
GTC**T**CTTGGCACTCTAG**GC**CC	4	chr11	2,689,716	AGG	KCNQ1	无

图29

脱靶位点	错配	染色体	切割位点	PAM	基因	插入缺失
CCTCAC**A**AGAT**TA**GACCCAC	3	chr12	86,341,556	TGG	MGAT4C	无
TCTCACT**GGC**CTTGACCCAC	3	chr9	134,687,890	TGG	COL5A1	无
CCTCACT**G**GACTTGACT**C**A**G**	3	chr1	209,621,235	GGG	LAMB3	无
CCTCACT**GG**AC**AA**GACCCAC	3	chr12	19,574,394	TGG	AEBP2	无
CCTCACTAGACT**A**GAT**C**AT	3	chr9	973,903	TGG		无
CCTC**G**CTAG**CC**TT**T**ACCCAC	3	chr7	157,876,963	AGG	PTPRN2	无
CCTCAC**A**AGAC**AA**GACCCAC	3	chr8	62,858,829	TGG	NKAIN3	无
C**T**TCAC**C**AG**CC**TTGACCCAC	3	chr19	51,125,605	AGG	SIGLEC9	无
CCTCAC**C**AG**CCC**TGACCCAC	3	chr19	51,143,004	AGG	SIGLEC7	无
C**T**TCAC**C**AG**CC**TTGACCCAC	3	chr19	51,144,414	AGG	SIGLEC7	无
CCTCAC**C**AG**CCC**TGACCCAC	3	chr19	51,185,448	AGG	SIGLEC20P	无
CCTCAC**C**AG**CC**TGACCCAC	3	chr19	51,211,800	AGG	SIGLEC22P	无
CCTCAC**C**AG**CCC**TGACCCAC	3	chr19	51,501,106	AGG	SIGLEC12	无
CCTCAC**C**AG**CCC**TGACCCAC	3	chr19	51,509,057	AGG	SIGLEC27P	无
CCTCAC**C**AG**CC**TGACCCAC	3	chr19	51,530,952	AGG	SIGLEC6	无
TCACACT**GGC**CTTGACCCAC	4	chr9	130,997,236	TGG		无
CCTTACTAG**CC**T**CC**ACCCAC	4	chr5	127,098,351	GGG		无
CCTCAC**A**AGA**TAA**GACCCAC	4	chr2	223,246,492	TGG		无
CCT**A**ACTAGA**A**TTG**CC**AC**A**C	4	chr2	228,144,164	AGG	SPHKAP	无
CCTCT**A**TA**T**ACTTGT**C**CCAC	4	chr1	46,408,719	AGG	FAAH	无

图30

基因	Log2倍数变化	P值	Padj	描述
CD33	-0.837	0.000455048	0.999	骨髓细胞表面抗原 CD33
CDON	1.033	0.009579405	0.999	细胞粘附分子相关
AC027279.1	0.824	0.01015653	0.999	非编码 RNA
LDLR	-0.563	0.012597131	0.999	低密度脂蛋白受体
PRAME	-0.87	0.016800466	0.999	优先在肿瘤中表达的黑素瘤抗原
INSIG1	-0.494	0.017206864	0.999	胰岛素诱导型基因 1 蛋白
HMGB1P31	-0.797	0.022454929	0.999	非编码 RNA
AP005019.1	-1.261	0.032232654	0.999	非编码 RNA
PCLAF	0.382	0.035486149	0.999	PCNA 相关因子:PCLAF
CD22	-0.76	0.03640001	0.999	B 细胞受体 CD22
TPTE2	0.712	0.037739962	0.999	磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸 3-磷酸酶 TPTE2
ZNF469	0.811	0.039222723	0.999	锌指蛋白 469
SVOPL	-0.867	0.04599215	0.999	推定转运蛋白 SVOPL
FFAR4	0.678	0.046205968	0.999	游离脂肪酸受体 4

图31

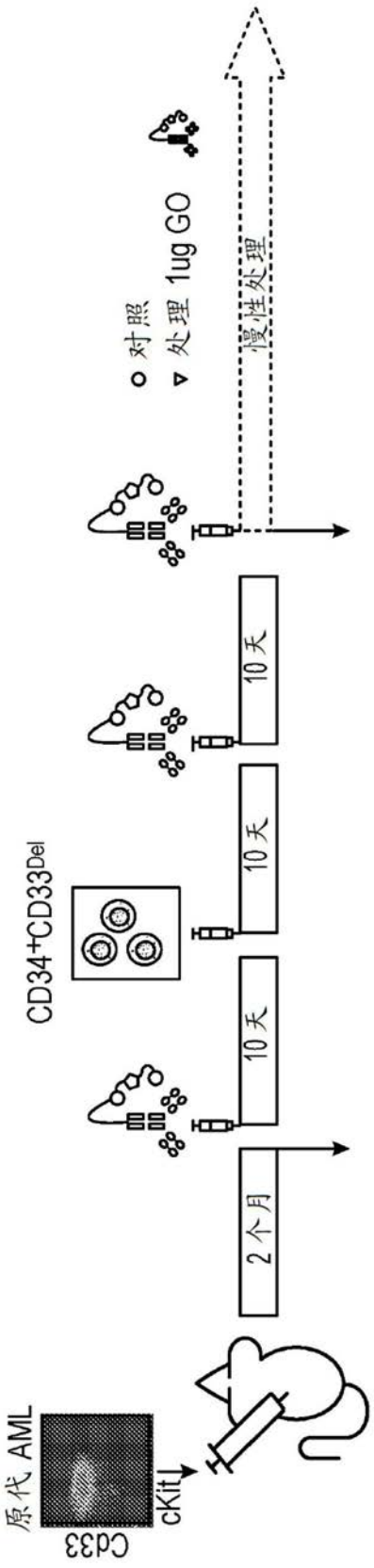

原代 AML
cKitL
Cd33
2个月
10天
CD34+CD33Del
10天
10天
10天
对照
处理 1ug GO
慢性处理

图32A

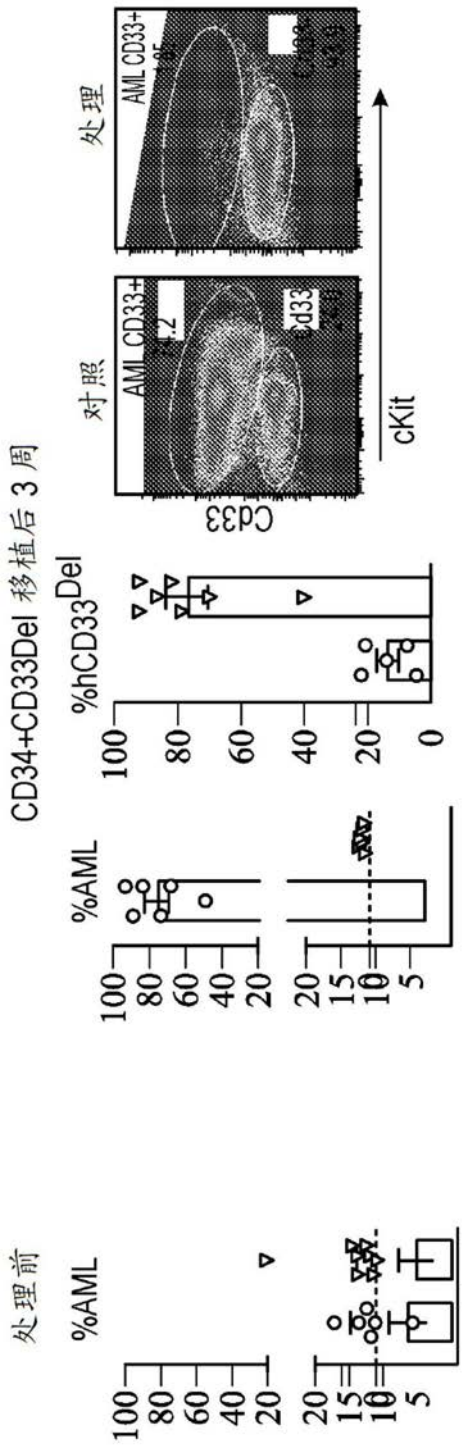

处理前
%AML
CD34+CD33Del 移植后 3 周
%AML
%hCD33Del
对照
处理
AML CD33+
cKit
Cd33

图32B

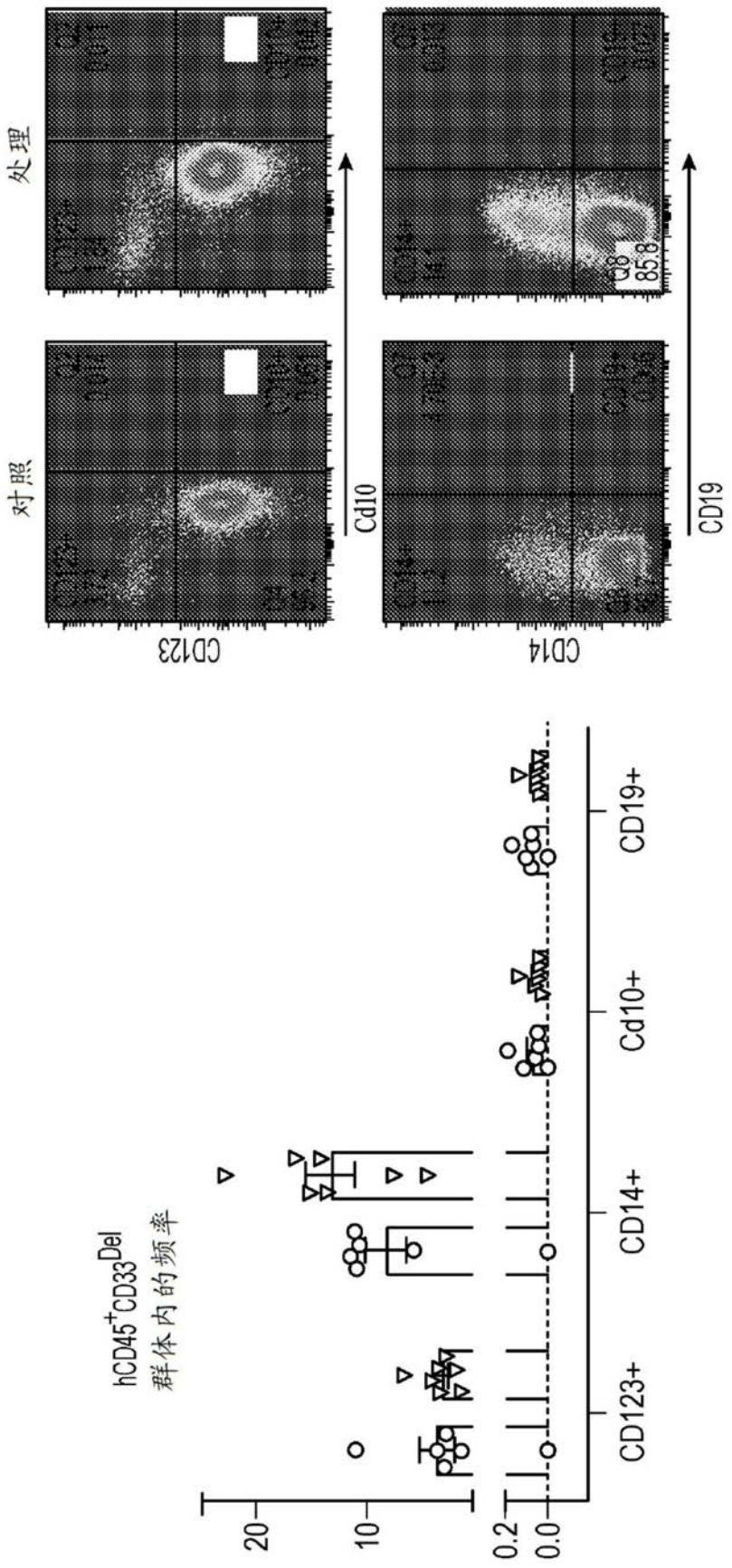

处理
对照
CD123
CD14
Cd10
CD19
hCD45+CD33Del
群体内的频率
20
10
0.2
0.0
CD123+
CD14+
Cd10+
CD19+

图32B(续)

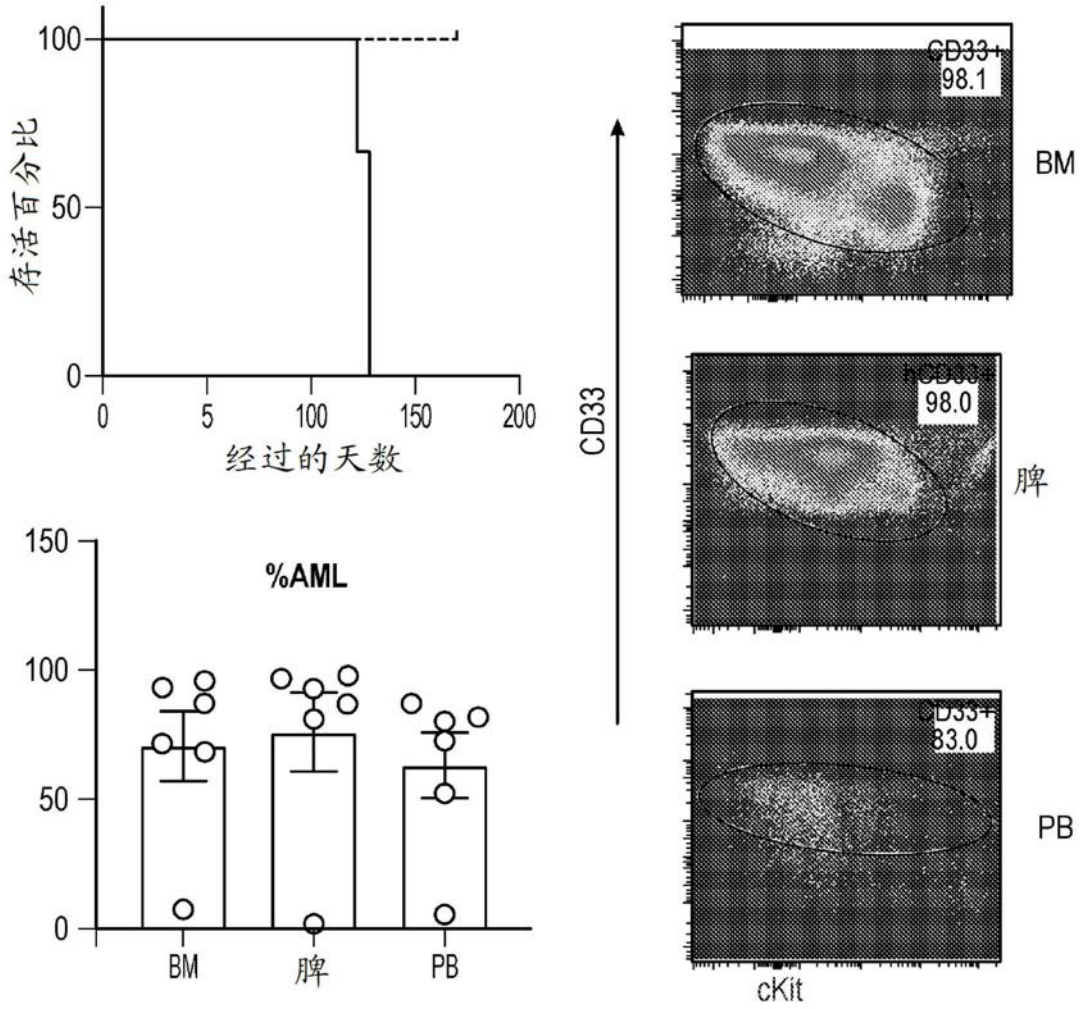

100
50
0
存活百分比
0
5
100
150
200
经过的天数
150
100
50
0
%AML
BM
脾
PB
CD33
CD33+
98.1
BM
CD33+
98.0
脾
CD33+
83.0
PB
cKit

图32C

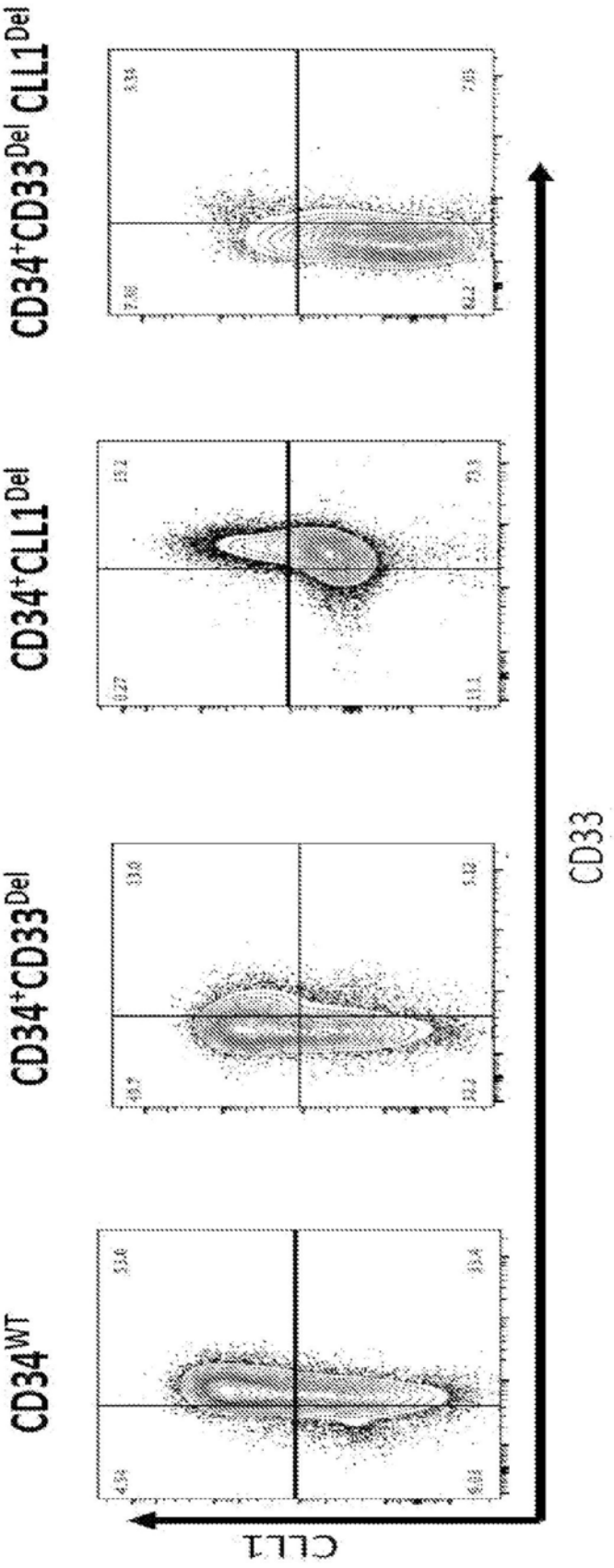

CD34WT
CD34+CD33Del
CD34+CLL1Del
CD34+CD33DelCLL1Del
CLL1
CD33

图33A

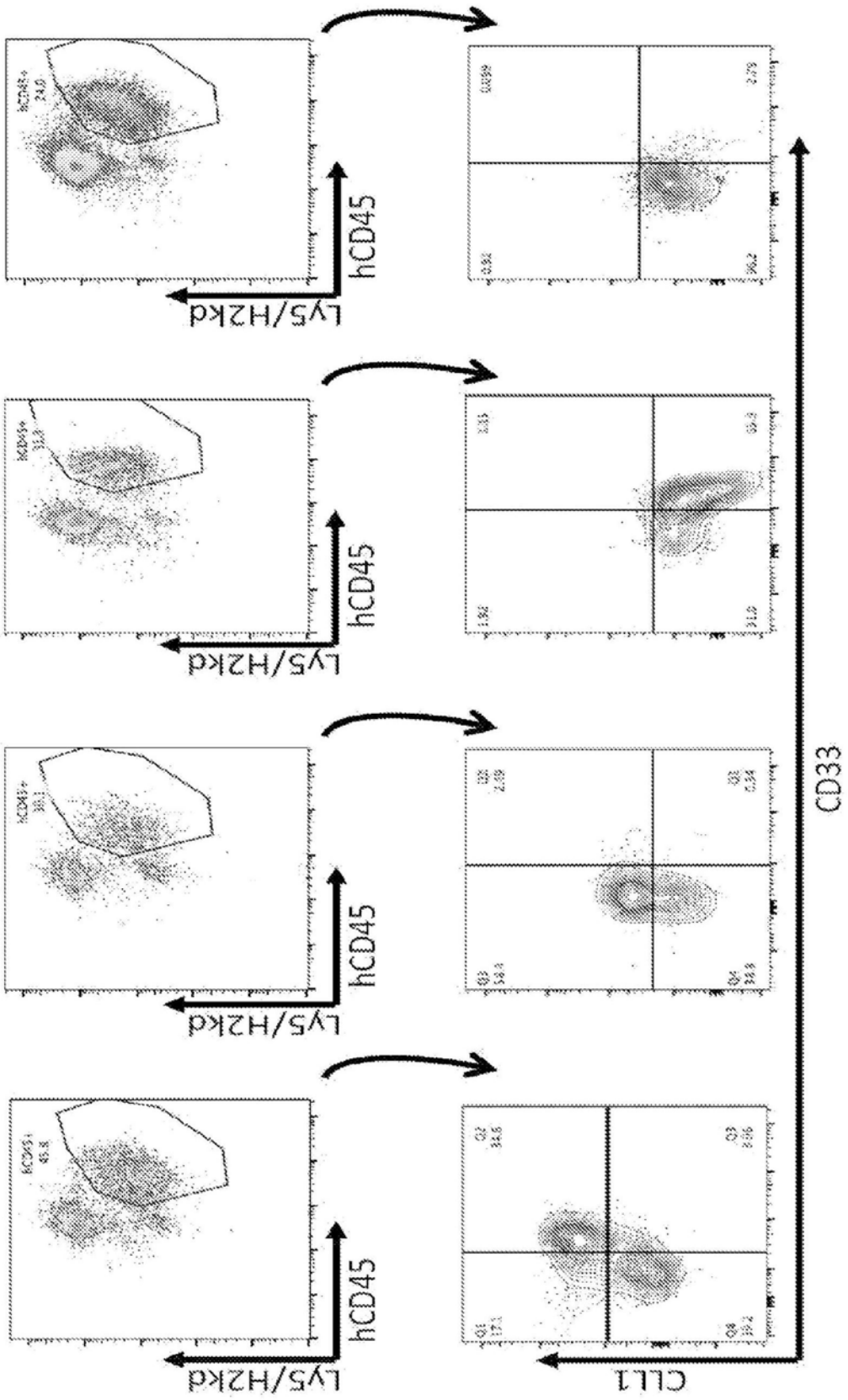


图33B

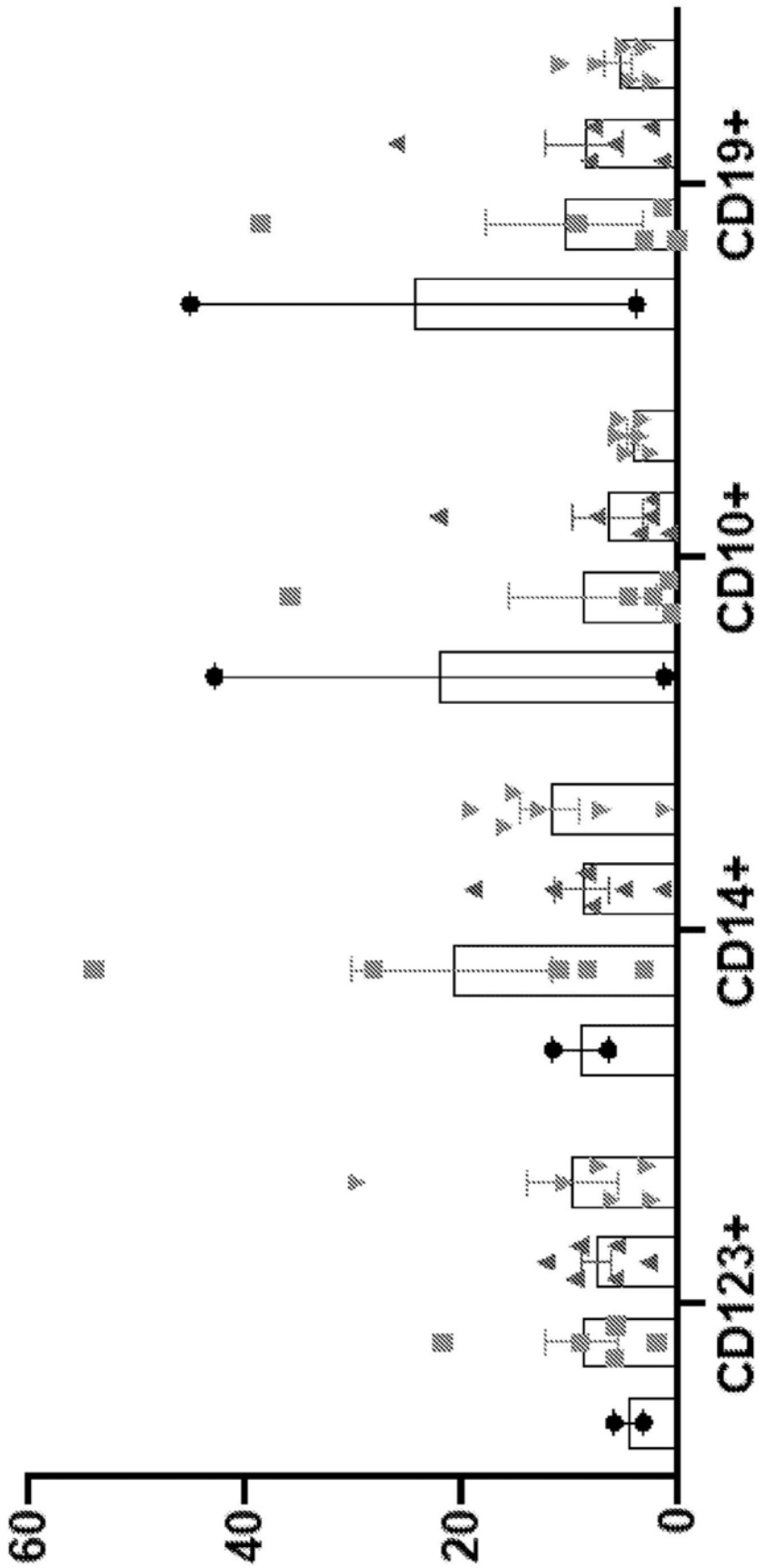


图33C

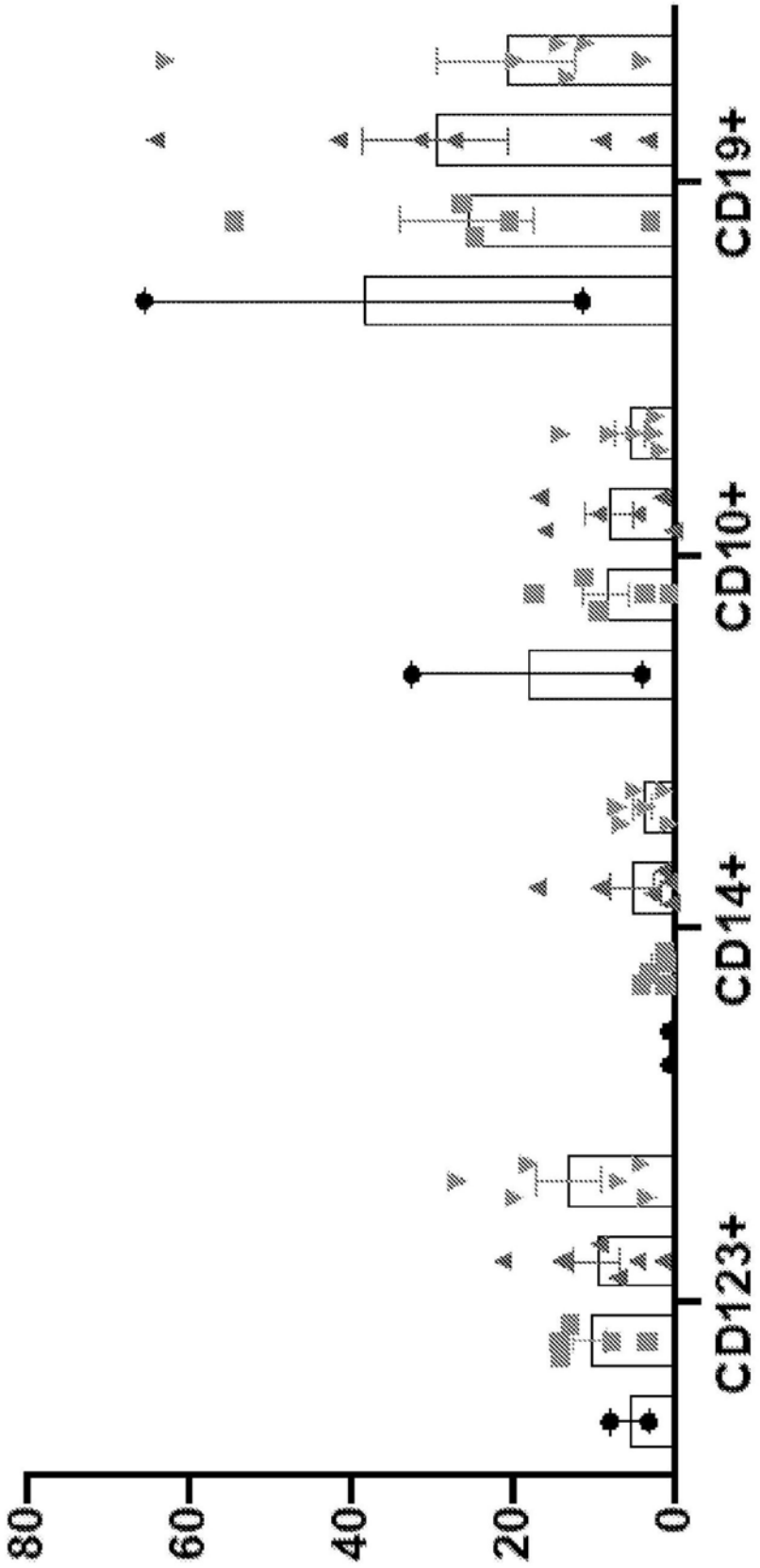


图33D