(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119968464 A
(43)申请公布日 2025.05.09

(21)申请号 202380070578.1

(22)申请日 2023.09.15

(30)优先权数据
63/376,041 2022.09.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2025.04.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/074352 2023.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2024/059824 EN 2024.03.21

(71)申请人 阿森纳生物科学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·利特曼 B·辛格 J·加格农
D·德托马索 A·卡斯
L·加里-鲁普 S·威廉姆斯

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 袁泉

(51)Int.Cl.
C12N 15/113(2006.01)

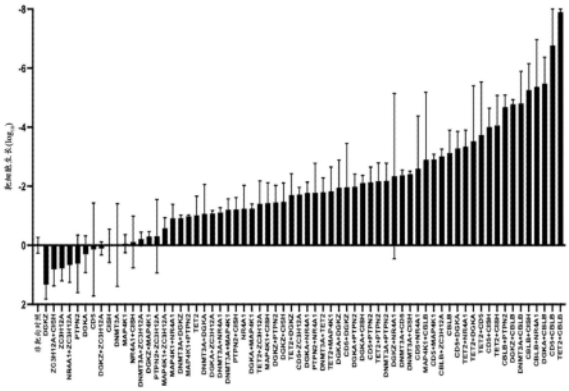
权利要求书11页 说明书101页 附图24页

(54)发明名称

具有组合基因扰动的免疫细胞

(57)摘要

本文提供了降低CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2或ZC3H12A的表达的重组核酸以及包含此类重组核酸的细胞。还提供了制造和使用此类细胞的方法。



CN 119968464 A

1.一种或多种重组核酸,其包含至少一个如SEQ ID NO:12-207中任一者中所述的序列。

2.如权利要求1所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸是指导RNA。

3.如权利要求1-2中任一项所述的一种或多种重组核酸,其还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中所述核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

4.如权利要求3所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

5.如权利要求3或4所述的重组核酸,其中与不包含所述RNP复合物的对照细胞相比,所述核糖核蛋白(RNP)复合物使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

6.如权利要求1-5中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸和所述第二核酸是不同的。

7.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

8.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

9.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:12中所述的序列。

10.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:14中所述的序列。

11.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:13中所述的序列和SEQ ID NO:20中所述的序列。

12.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:20中所述的序列。

13.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:20中所述的序列和SEQ ID NO:22中所述的序列。

14.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:17中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

15.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:20中所述的序列和SEQ ID NO:14中所述的序列。

16.如权利要求1-6中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:22中所述的序列。

17.如权利要求1所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸是短发夹RNA(shRNA)。

18.如权利要求17所述的一种或多种重组核酸,其中与不包含所述shRNA的对照细胞相比,所述shRNA使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DNMT3A、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

19.如权利要求1、17或18所述的一种或多种重组核酸,其包含第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸和所述第二核酸是不同的。

20.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列。

21.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列。

22.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列。

23.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列。

24.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列。

25.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列。

26.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列。

27.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列。

28.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列。

29.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码PTPN2的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列。

30.一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

31.一种或多种重组核酸,其包含至少两种或更多种选自由以下组成的组的核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

32.如权利要求20至31中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列的长

度为至少16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个核苷酸。

33.如权利要求20至32中任一项所述的重组核酸,其中所述核酸是短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)或反义低聚核苷酸。

34.如权利要求33所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸是shRNA。

35.如权利要求20-34中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中与不包含所述核酸的对照细胞相比,所述核酸使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

36.如权利要求20和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码CD5的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。

37.如权利要求21和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。

38.如权利要求22和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码CISH的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的序列。

39.如权利要求23和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码DGKA的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。

40.如权利要求25和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码DNMT3A的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。

41.如权利要求28和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码TET2的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。

42.如权利要求29和31-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。

43.如权利要求30-35中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸序列是与编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

44.如权利要求31-43中任一项所述的一种或多种重组核酸,其至少包含与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:2中所述的序列的人类CBLB的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

45.如权利要求31-43中任一项所述的一种或多种重组核酸,其至少包含与编码包含SEQ ID NO:9中所述的序列的TET2的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:2中所述的序列的人类CBLB的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

46.如权利要求31-43中任一项所述的一种或多种重组核酸,其至少包含与编码包含SEQ ID NO:9中所述的序列的TET2的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

47.如权利要求31-43中任一项所述的一种或多种重组核酸,其至少包含与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以

及与编码包含SEQ ID NO:3中所述的序列的人类CISH的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

48.如权利要求20至47中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸还包含以下一者或多者:编码引发受体的核苷酸序列,所述引发受体包含特异性地结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列,所述嵌合抗原受体包含特异性地结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域;或编码T细胞受体(TCR)的核苷酸序列。

49.如权利要求48所述的一种或多种重组核酸,其中所述第一抗原和所述第二抗原是不同的。

50.如权利要求48或49所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸在5'至3'方向上包含

(a)所述TCR;

(b)如权利要求20至47中任一项所述的核酸。

51.如权利要求48或49所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸在5'至3'方向上包含

(a)如权利要求20至47中任一项所述的核酸;

(b)所述TCR。

52.如权利要求48或49所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸在5'至3'方向上包含

(a)所述CAR;

(b)如权利要求20至47中任一项所述的核酸;以及

(c)所述引发受体。

53.如权利要求48或49所述的一种或多种重组核酸,其中所述核酸在5'至3'方向上包含

(a)所述引发受体;

(b)如权利要求20至47中任一项所述的核酸;以及

(c)所述CAR。

54.如权利要求20至53中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸还包含与宿主细胞染色体中的插入位点互补的5'同源定向修复臂和/或3'同源定向修复臂。

55.如权利要求54所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸包含所述5'同源定向修复臂和所述3'同源定向修复臂。

56.如权利要求20至55中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述重组核酸被纳入表达盒或表达载体中。

57.如权利要求56所述的一种或多种重组核酸,其中所述表达盒或所述表达载体还包含在所述重组核酸上游的组成型启动子。

58.如权利要求20至57中任一项所述的一种或多种重组核酸,其包含第一核酸和第二核酸,其中所述第一核酸和所述第二核酸在单一核酸上编码。

59.如权利要求58所述的一种或多种重组核酸,其中所述第一核酸包含所述5'同源定向修复臂并且所述第二核酸包含所述3'同源定向修复臂。

60.如权利要求58或59中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述第一核酸和所述第二核酸在不同的核酸上编码。

61.如权利要求58至60中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述第一核酸和所述第二核酸被纳入单一表达盒或单一表达载体中。

62.如权利要求61所述的一种或多种重组核酸,其中所述表达盒或所述表达载体还包含在所述第一核酸上游和/或在所述第二核酸上游的组成型启动子。

63.如权利要求56至62中任一项所述的一种或多种重组核酸,其中所述表达载体是非病毒载体。

64.一种表达载体,其包含权利要求1-63中任一项所述的一种或多种重组核酸。

65.如权利要求64所述的表达载体,其中所述表达载体是非病毒载体。

66.如权利要求64或65所述的载体,其中所述重组核酸的5'端和3'端包含与侧接原代细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的一个或多个核苷酸序列。

67.如权利要求66所述的载体,其中所述插入位点位于T细胞受体α恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。

68.如权利要求67所述的载体,其中所述GSH基因座是GS94基因座。

69.一种免疫细胞,其包含至少一种或多种选自由以下组成的组的核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

70.如权利要求69所述的免疫细胞,其中所述一种或多种核酸是shRNA、siRNA、dsRNA或反义低聚核苷酸。

71.如权利要求70所述的免疫细胞,其中所述一种或多种核酸是shRNA。

72.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码CD5的mRNA互补并且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。

73.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。

74.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ

ID NO:73-95中任一者中所述的序列。

75.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。

76.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码DNMT3A的mRNA互补并且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。

77.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码TET2的mRNA互补并且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。

78.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码PTPN2的mRNA互补并且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。

79.如权利要求71所述的免疫细胞,其中所述shRNA与编码ZC3H12A的mRNA互补并且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

80.如权利要求69-79中任一项所述的免疫细胞,其中所述细胞还包含至少第一靶基因的缺失,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。

81.如权利要求80所述的免疫细胞,其还包含至少第二靶基因的缺失,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组,并且其中所述第一靶基因和所述第二靶基因是不同的。

82.如权利要求80或81所述的免疫细胞,其中所述至少第一或第二靶基因通过CRISPR-Cas9基因编辑来缺失。

83.如权利要求69-82中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述核酸或包含所述靶基因的对照细胞相比,所述免疫细胞中至少一种或多种选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的靶基因的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

84.一种免疫细胞,其包含至少第一靶基因的缺失,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。

85.如权利要求84所述的免疫细胞,其还包含至少第二靶基因的缺失,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组,并且其中所述第一靶基因和所述第二靶基因是不同的。

86.如权利要求84或85所述的免疫细胞,其中所述至少第一或第二靶基因通过CRISPR-Cas9基因编辑来缺失。

87.如权利要求84-86中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述至少第一或至少第二靶基因的缺失的对照细胞相比,所述免疫细胞中所述至少第一或至少第二靶基因的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

88.一种包含第一指导RNA的免疫细胞,其中所述第一指导RNA包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

89.如权利要求67所述的免疫细胞,其还包含第二指导RNA,所述第二指导RNA包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

90.如权利要求67或68所述的免疫细胞,其还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中所述核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

91.如权利要求67-69中任一项所述的免疫细胞,其中所述核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

92.一种包含一种或多种核酸的免疫细胞,所述一种或多种核酸包含第一shRNA和第二shRNA,其中所述第一shRNA和所述第二shRNA各自包含SEQ ID NO:23-207中任一者中所述的序列。

93.如权利要求69-92中任一项所述的免疫细胞,其中与不包含所述一种或多种核酸的对照细胞相比,所述一种或多种核酸使所述免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2或ZC3H12A的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

94.如权利要求93所述的免疫细胞,其中与不包含所述第一或第二核酸的对照细胞相比,所述免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

95.如权利要求83、87、93或94中任一项所述的免疫细胞,其中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达通过核酸测定或蛋白质测定来确定。

96.如权利要求95所述的免疫细胞,其中所述核酸测定包括聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR(qPCR)、RT-qPCR、微阵列、基因阵列或RNAseq中的至少一者。

97.如权利要求95所述的免疫细胞,其中所述蛋白质测定包括免疫印迹法、荧光激活细胞分选、流式细胞术、磁激活细胞分选或基于亲和力的细胞分离中的至少一者。

98.如权利要求69至97中任一项所述的免疫细胞,其中所述细胞还包含以下一者或多者:引发受体,其包含特异性地结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性地结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域;或T细胞受体(TCR)。

99.如权利要求69至98中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是原代人类免疫细胞。

100.如权利要求69-99中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是自然杀手(NK)细胞、自然杀手T(NKT)细胞、T细胞、γδT细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞、T细胞祖细胞或诱导性多潜能干细胞(iPSC)。

101.如权利要求69-100中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代T细胞。

102.如权利要求69-101中任一项所述的免疫细胞,其中所述原代免疫细胞是原代人类T细胞。

103.如权利要求69-102中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞无病毒。

104.如权利要求69-103中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是活的、无病毒的原代细胞。

105.如权利要求69-104中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是自体免疫细胞。

106.如权利要求69-104中任一项所述的免疫细胞,其中所述免疫细胞是同种异体免疫细胞。

107.一种原代免疫细胞,其包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含有包含如SEQ ID NO:12-207中所述的序列的第一核酸;并且其中所述原代免疫细胞不包含用于将所述重组核酸引入所述原代免疫细胞中的病毒载体。

108.一种活的、无病毒的原代细胞,其包含一种或多种核糖核蛋白复合物(RNP),其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述指导RNA包含有包含如SEQ ID NO:12-22中所述的序列的第一核酸。

109.如权利要求107或108所述的免疫细胞,其还包含第二不同的核酸,所述核酸包含如SEQ ID NO:12-207中所述的序列。

110.一种原代免疫细胞,其包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述重组核酸包含至少第一核酸,所述第一核酸包含:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列,并且其中所述重组核酸的5'和3'端包含与侧接所述原代细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

111.一种活的、无病毒的原代细胞,其包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含至少第一核酸,所述第一核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷

酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列,并且其中所述重组核酸的5'和3'端包含与侧接所述原代细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

112.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码CD5的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。

113.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码CBLB的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。

114.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码CISH的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的序列。

115.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码DGKA的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。

116.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码DNMT3A的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。

117.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码TET2的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。

118.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码PTPN2的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。

119.如权利要求110或111所述的细胞,其中所述核酸序列为与所述编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA并且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

120.如权利要求107-119中任一项所述的细胞,其中所述细胞还包含引发受体,其包含特异性结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;以及嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域,其中所述第一抗原与所述第二抗原是不同的。

121.一种细胞群体,其包含多个权利要求69-120中任一项所述的免疫细胞。

122.一种药物组合物,其包含权利要求69至120中任一项所述的免疫细胞或权利要求121所述的细胞群体,以及药学上可接受的赋形剂。

123.一种药物组合物,其包含权利要求1至63中任一项所述的重组核酸或权利要求64-67中任一项所述的载体,以及药学上可接受的赋形剂。

124.一种编辑免疫细胞的方法,其包括:

(a)提供包含核酸酶结构域和指导RNA的核糖核蛋白(RNP),其中所述指导RNA包含如SEQ ID NO:12-22中所述的序列;

(b)以非病毒方式将所述RNP引入所述免疫细胞中,其中所述指导RNA与所述原代免疫细胞的基因组的靶区域特异性地杂交,并且其中所述核酸酶结构域使所述靶区域裂解以在所述免疫细胞的所述基因组中产生双链断裂位点。

125.一种编辑免疫细胞的方法,其包括:

(a)提供核糖核蛋白(RNP)-重组核酸复合物,其中所述RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中所述重组核酸包含权利要求20-63中任一项所述的重组核酸,并且其中所述重组

核酸的5’端和3’端包含与侧接所述免疫细胞的所述基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列;

(b)以非病毒方式将所述RNP-重组核酸复合物引入所述免疫细胞中,其中所述指导RNA与所述原代免疫细胞的所述基因组的靶区域特异性地杂交,并且其中所述核酸酶结构域使所述靶区域裂解以在所述免疫细胞的所述基因组中产生所述插入位点;以及

(c)通过将权利要求20-63中任一项所述的重组核酸插入所述免疫细胞的所述基因组中的所述插入位点中来编辑所述免疫细胞。

126.如权利要求124或125所述的方法,其中以非病毒方式引入包括电穿孔。

127.如权利要求124-126中任一项所述的方法,其中所述核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

128.如权利要求125至127中任一项所述的方法,其中所述细胞的所述基因组的所述靶区域为T细胞受体α恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。

129.如权利要求125至128中任一项所述的方法,其中所述重组核酸是双链重组核酸或单链重组核酸。

130.如权利要求125至129中任一项所述的方法,其中所述重组核酸是线性重组核酸或环状重组核酸,任选地其中所述环状重组核酸是质粒。

131.如权利要求124至130中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代人类免疫细胞。

132.如权利要求124至131中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是自体免疫细胞。

133.如权利要求124至131中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是同种异体免疫细胞。

134.如权利要求124至133中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是自然杀手(NK)细胞、自然杀手T(NKT)细胞、T细胞、γδT细胞、CD8+T细胞、CD4+T细胞、原代T细胞、T细胞祖细胞或诱导性多潜能干细胞(iPSC)。

135.如权利要求124至134中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代T细胞。

136.如权利要求124至135中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是原代人类T细胞。

137.如权利要求124至136中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞无病毒。

138.如权利要求124至137中任一项所述的方法,其还包括自患者获得所述免疫细胞和体外引入所述重组核酸。

139.一种治疗受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用权利要求69-121中任一项所述的免疫细胞或权利要求122或123所述的药物组合物。

140.如权利要求139所述的方法,其中所述疾病为癌症。

141.如权利要求140所述的方法,其中所述癌症是实体癌症或液体癌症。

142.如权利要求140或141所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、HER2阳性乳腺癌、雌激素受体阳性乳腺癌、孕激素受体阳性乳腺癌、HER2/雌激素受体/孕激素受体阴性乳腺癌、三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、肺腺鳞癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、结肠癌、直肠癌、微卫星不稳定性(MSI)结肠癌、非MSI结肠癌或非MSI或直肠癌。

143.如权利要求139-142中任一项所述的方法,其中所述细胞的施用增强免疫反应。

144.如权利要求143所述的方法,其中所述增强的免疫反应是适应性免疫反应。

145.如权利要求144所述的方法,其中所述增强的免疫反应是增加的T细胞细胞毒性。

146.如权利要求144所述的方法,其中所述增强的免疫反应是增加的T细胞扩增和/或增殖。

147.如权利要求143所述的方法,其中所述增强的免疫反应是先天性免疫反应。

148.一种增强受试者的免疫反应的方法,其包括向所述受试者施用权利要求69-121中任一项所述的免疫细胞或权利要求122或123所述的药物组合物。

149.如权利要求148所述的方法,其中所述增强的免疫反应是适应性免疫反应。

150.如权利要求149所述的方法,其中所述增强的免疫反应是增加的T细胞细胞毒性。

151.如权利要求149所述的方法,其中所述增强的免疫反应是增加的T细胞扩增和/或增殖。

152.如权利要求149所述的方法,其中所述增强的免疫反应是先天性免疫反应。

153.如权利要求139-152中任一项所述的方法,其中与不包含所述第一核酸或RNP复合物的对照细胞相比,所述免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

154.如权利要求139-153中任一项所述的方法,其中与不包含所述第二核酸或RNP复合物的对照细胞相比,所述免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

155.如权利要求153-154中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达通过核酸测定或蛋白质测定来确定。

156.如权利要求155所述的方法,其中所述核酸测定包括聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR(qPCR)、RT-qPCR、微阵列、基因阵列或RNAseq中的至少一者。

157.如权利要求155所述的方法,其中所述蛋白质测定包括免疫印迹法、荧光激活细胞分选、流式细胞术、磁激活细胞分选或基于亲和力的细胞分离中的至少一者。

158.如权利要求139-157中任一项所述的方法,其还包括与所述免疫细胞同时或在所述免疫细胞之后向所述受试者施用免疫疗法。

具有组合基因扰动的免疫细胞

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2022年9月16日提交的美国临时申请第63/376,041号的权益和优先权,所述申请的公开内容出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有序列表,其已以电子方式提交且通过引用以其整体并入本文中。所述XML拷贝创建于20XX年XX月,命名为XXXXX US_sequencelisting.xml,且大小为X,XXX,XXX个字节。

背景技术

[0005] 癌症是特征在于细胞生长不可控的疾病。已经尝试了许多治疗癌症的方法,包括药物和放射疗法。最新的癌症治疗寻求使用身体的自身免疫细胞来攻击癌细胞。一种有希望的方法使用取自患者且被遗传改造以产生嵌合抗原受体或CAR的T细胞,所述嵌合抗原受体或CAR是给予T细胞靶向特定蛋白质的新能力的受体蛋白。受体是嵌合的,因为其将抗原结合功能和T细胞激活功能组合至单一受体中。

[0006] 使用CAR-T细胞的免疫疗法是有希望的,因为修饰的T细胞具有识别癌细胞以更有效地靶向并破坏所述癌细胞的潜能。在用CAR改造T细胞后,将所得CAR-T细胞引入患者中来攻击肿瘤细胞。CAR-T细胞一旦输注至患者中,其便立即与其在细胞上的靶向抗原接触。CAR-T细胞结合至抗原且变得激活。在抗原接合后,CAR T细胞可按指数方式增殖,起始抗肿瘤细胞因子产生,且靶向肿瘤细胞杀伤。

[0007] 然而,基于CAR T细胞的免疫疗法仍存在一些限制。具体而言,CAR-T细胞可能缺乏外周存活,可能具有降低的扩增和效应功能,易受阻抑和耗竭,且可能不会产生记忆T细胞持久性。因此,需要靶向T细胞固有路径的额外疗法来解决CAR-T疗法的这些障碍。

[0008] 据报道,基因DNMT3A、TET2、CD5、DGKA、DGKZ、MAP4K1、CBLB、FAS、PTPN2、NR4A1、ZC3H12A和CISH的单个扰动可增强T细胞扩增或T细胞介导的靶细胞杀伤,已报道这些特征可预测CAR T和其他治疗性T细胞应用中的T细胞效力。虽然单个基因扰动的影响已经确定,但尚不清楚其中任何两个基因的同时扰动是否会对T细胞扩增或T细胞介导的靶细胞杀伤产生比单个组成基因更显著的影响。

发明内容

[0009] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含至少一个如SEQ ID NO:12-207所述的序列。

[0010] 在一些实施方案中,核酸为指导RNA。

[0011] 在一些实施方案中,还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0012] 在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

[0013] 在一些实施方案中,与不包含RNP复合物的对照细胞相比,核糖核蛋白(RNP)复合物使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0014] 在一些实施方案中,包括第一核酸和第二核酸,其中第一核酸和第二核酸是不同的。

[0015] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

[0016] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

[0017] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:12中所述的序列。

[0018] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:14中所述的序列。

[0019] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:13中所述的序列和SEQ ID NO:20中所述的序列。

[0020] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:20中所述的序列。

[0021] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:20中所述的序列和SEQ ID NO:22中所述的序列。

[0022] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:17中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。

[0023] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:20中所述的序列和SEQ ID NO:14中所述的序列。

[0024] 在一些实施方案中,包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:22中所述的序列。

[0025] 在一些实施方案中,核酸为短发夹RNA(shRNA)。在一些实施方案中,与不包含shRNA的对照细胞相比,shRNA使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DNMT3A、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸是不同的。

[0026] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列。

[0027] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列。

[0028] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列。

[0029] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列。

[0030] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:5中所述的序列。

[0031] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列。

[0032] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列。

[0033] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列。

[0034] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列。

[0035] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码PTPN2的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列。

[0036] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

[0037] 在一个方面中,本文提供了一种或多种重组核酸,其包含至少两种或更多种选自由以下组成的组的核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度至少为15个核苷酸的核酸序列,其与编码

ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

[0038] 在一些实施方案中,核酸序列的长度为至少16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个核苷酸。

[0039] 在一些实施方案中,核酸是短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)或反义低聚核苷酸。

[0040] 在一些实施方案中,核酸为shRNA。

[0041] 在一些实施方案中,与不包含核酸的对照细胞相比,该核酸使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0042] 在一些实施方案中,核酸序列是与编码CD5的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码CISH的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码DGKA的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码DNMT3A的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码TET2的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

[0043] 在一些实施方案中,至少包含与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:2中所述的序列的人类CBLB的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

[0044] 在一些实施方案中,至少包含与编码包含SEQ ID NO:9中所述的序列的TET2的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:2中所述的序列的人类CBLB的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

[0045] 在一些实施方案中,至少包含与编码包含SEQ ID NO:9中所述的序列的TET2的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

[0046] 在一些实施方案中,至少包含与编码包含SEQ ID NO:1中所述的序列的人类CD5的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列,以及与编码包含SEQ ID NO:3中所述的序列的人类CISH的mRNA互补的长度为至少15个核苷酸的核酸序列。

[0047] 在一些实施方案中,重组核酸还包含以下一种或多种:编码引发受体的核苷酸序列,所述引发受体包含特异性地结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;编码嵌合抗原受体(CAR)的核苷酸序列,所述嵌合抗原受体包含特异性地结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域;或编码T细胞受体(TCR)的核苷酸序列。

[0048] 在一些实施方案中,第一抗原和第二抗原是不同的。

[0049] 在一些实施方案中,重组核酸在5'至3'方向上包含TCR;如本文所公开的核酸。

[0050] 在一些实施方案中,重组核酸在5'至3'方向上包含如本文所公开的核酸;TCR。

[0051] 在一些实施方案中,重组核酸在5'至3'方向上包含CAR;如本文所公开的核酸;和引发受体。

[0052] 在一些实施方案中,核酸在5'至3'方向上包含引发受体;如本文所公开的核酸;和CAR。

[0053] 在一些实施方案中,重组核酸还包含与宿主细胞染色体中的插入位点互补的5'同源定向修复臂和/或3'同源定向修复臂。

[0054] 在一些实施方案中,重组核酸包含5'同源定向修复臂和3'同源定向修复臂。

[0055] 在一些实施方案中,将重组核酸纳入表达盒或表达载体中。

[0056] 在一些实施方案中,表达盒或表达载体还包含在重组核酸上游的组成型启动子。

[0057] 在一些实施方案中,包含第一核酸和第二核酸,其中第一核酸和第二核酸在单一核酸上编码。

[0058] 在一些实施方案中,第一核酸包含5'同源定向修复臂,并且第二核酸包含3'同源定向修复臂。

[0059] 在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸在不同的核酸上编码。

[0060] 在一些实施方案中,将第一核酸和第二核酸纳入单一表达盒或单一表达载体中。

[0061] 在一些实施方案中,表达盒或表达载体还包含在第一核酸上游和/或第二核酸上游的组成型启动子。

[0062] 在一些实施方案中,表达载体是非病毒载体。

[0063] 在一个方面中,本文提供了包含本文公开的一种或多种重组核酸的表达载体。

[0064] 在一些实施方案中,表达载体是非病毒载体。

[0065] 在一些实施方案中,重组核酸的5'端和3'端包含与原代细胞基因组中插入位点侧翼的基因组序列同源的一个或多个核苷酸序列。

[0066] 在一些实施方案中,插入位点位于T细胞受体α恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。

[0067] 在一些实施方案中,GSH基因座是GS94基因座。

[0068] 在一个方面中,本文提供了免疫细胞,其包含至少一种或多种选自由以下组成的组的核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID

NO:8中所述的序列;或(12)长度至少为15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

[0069] 在一些实施方案中,一种或多种核酸是shRNA、siRNA、dsRNA或反义低聚核苷酸。

[0070] 在一些实施方案中,一种或多种核酸是shRNA。

[0071] 在一些实施方案中,shRNA与编码CD5的mRNA互补且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码DNMT3A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码TET2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码PTPN2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,shRNA与编码ZC3H12A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

[0072] 在一些实施方案中,细胞还包含至少第一靶基因的缺失,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。

[0073] 在一些实施方案中,还包含至少第二靶基因的缺失,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组,并且其中第一靶基因和第二靶基因是不同的。

[0074] 在一些实施方案中,通过CRISPR-Cas9基因编辑使至少第一或第二靶基因缺失。

[0075] 在一些实施方案中,与不包含核酸或包含靶基因的对照细胞相比,免疫细胞中选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的至少一种或多种靶基因的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0076] 在一个方面中,本文提供了免疫细胞,其包含至少第一靶基因的缺失,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。

[0077] 在一些实施方案中,还包含至少第二靶基因的缺失,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组,并且其中第一靶基因和第二靶基因是不同的。

[0078] 在一些实施方案中,通过CRISPR-Cas9基因编辑使至少第一或第二靶基因缺失。

[0079] 在一些实施方案中,与不包含至少第一或至少第二靶基因的缺失的对照细胞相比,免疫细胞中所述至少第一或至少第二靶基因的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0080] 在一个方面中,本文提供了包含第一指导RNA的免疫细胞,其中第一指导RNA包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

[0081] 在一些实施方案中,还包含第二指导RNA,其包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

[0082] 在一些实施方案中,还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0083] 在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

[0084] 在一个方面中,本文提供了包含一种或多种核酸的免疫细胞,所述一种或多种核酸包含第一shRNA和第二shRNA,其中第一shRNA和第二shRNA各自包含SEQ ID NO:23-207中任一者中所述的序列。

[0085] 在一些实施方案中,与不包含第一核酸的对照细胞相比,第一或第二核酸使免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2或ZC3H12A的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0086] 在一些实施方案中,与不包含第一或第二核酸的对照细胞相比,免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0087] 在一些实施方案中,通过核酸测定或蛋白质测定来确定CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达。

[0088] 在一些实施方案中,核酸测定包括聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR(qPCR)、RT-qPCR、微阵列、基因阵列或RNAseq中的至少一者。

[0089] 在一些实施方案中,蛋白质测定包括免疫印迹法、荧光激活细胞分选、流式细胞术、磁激活细胞分选或基于亲和力的细胞分离中的至少一者。

[0090] 在一些实施方案中,细胞还包含以下一者或多者:引发受体,其包含特异性地结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性地结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域;或T细胞受体。

[0091] 在一些实施方案中,免疫细胞是原代人类免疫细胞。

[0092] 在一些实施方案中,原代免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、T细胞、γδT细胞、CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、原代T细胞、T细胞祖细胞或诱导性多潜能干细胞(iPSC)。

[0093] 在一些实施方案中,原代免疫细胞是原代T细胞。

[0094] 在一些实施方案中,原代免疫细胞是原代人类T细胞。

[0095] 在一些实施方案中,免疫细胞无病毒。

[0096] 在一些实施方案中,免疫细胞是活的无病毒的原代细胞。

[0097] 在一些实施方案中,免疫细胞为自体免疫细胞。

[0098] 在一些实施方案中,免疫细胞为同种异体免疫细胞。

[0099] 在一个方面中,本文提供了原代免疫细胞,所述原代免疫细胞包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含有包含如SEQ ID NO:12-207中所述的序列的第一核酸;并且其中所述原代免疫细胞不包含用于将所述重组核酸引入所述原代免疫细胞中的病毒载体。

[0100] 在一个方面中,本文提供了包含一种或多种核糖核蛋白复合物(RNP)的活的、无病毒的原代细胞,其中RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中指导RNA包含第一核酸,所述第一核酸包含如SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

[0101] 在一些实施方案中,还包含第二种不同的核酸,所述核酸包含如SEQ ID NO:12-207中所述的序列。

[0102] 在一个方面中,本文提供了原代免疫细胞,其包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组

核酸复合物,其中RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含至少第一核酸,所述第一核酸包含:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列,并且其中重组核酸的5'和3'端包含与侧接原代细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0103] 在一个方面中,本文提供了活的无病毒的原代细胞,其包含核糖核蛋白复合物(RNP)-重组核酸复合物,其中RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含至少第一核酸:(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列,并且其中重组核酸的5'和3'端包含与侧接原代细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列。

[0104] 在一些实施方案中,核酸序列是与编码CD5的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码CISH的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的序列。在一些实施

方案中,核酸序列是与编码DGKA的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码DNMT3A的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码TET2的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的序列。在一些实施方案中,核酸序列是与编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的序列。

[0105] 在一些实施方案中,所述细胞还包含引发受体,其包含特异性结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域;以及嵌合抗原受体(CAR),其包含特异性结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域,其中第一抗原与第二抗原不同。

[0106] 在一个方面中,本文提供了细胞群体,其包含多个本文所公开的免疫细胞。

[0107] 在一个方面中,本文提供了药物组合物,其包含本文所公开的免疫细胞或本文所公开的细胞群体和药学上可接受的赋形剂。

[0108] 在一个方面中,本文提供了药物组合物,其包含本文所公开的重组核酸或本文所公开的载体和药学上可接受的赋形剂。

[0109] 在一个方面中,本文提供了编辑免疫细胞的方法,其包括:

[0110] 提供包含核酸酶结构域和指导RNA的核糖核蛋白(RNP),其中指导RNA包含如SEQ ID NO:12-22中所述的序列;将RNP以非病毒方式引入免疫细胞中,其中指导RNA与初级免疫细胞基因组的靶区域特异性杂交,并且其中核酸酶结构域使靶区域裂解以在免疫细胞的基因组中产生双链断裂位点。

[0111] 在一个方面中,本文提供了编辑免疫细胞的方法,其包括:提供核糖核蛋白(RNP)-重组核酸复合物,其中RNP包含核酸酶结构域和指导RNA,其中重组核酸包含本文所公开的重组核酸,且其中重组核酸的5'端和3'端包含与侧接免疫细胞基因组中的插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列;将RNP-重组核酸复合物以非病毒方式引入免疫细胞中,其中指导RNA与原代免疫细胞基因组的靶区域特异性杂交,且其中核酸酶结构域使靶区域裂解以在免疫细胞的基因组中产生插入位点;以及经由将本文所公开的重组核酸插入免疫细胞基因组中的插入位点中来编辑免疫细胞。

[0112] 在一些实施方案中,以非病毒方式引入包括电穿孔。

[0113] 在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

[0114] 在一些实施方案中,细胞的基因组的所述靶区是T细胞受体α恒定(TRAC)基因座或基因组安全港(GSH)基因座。

[0115] 在一些实施方案中,重组核酸是双链重组核酸或单链重组核酸。

[0116] 在一些实施方案中,重组核酸是线状重组核酸或环状重组核酸,任选地其中所述环状重组核酸是质粒。

[0117] 在一些实施方案中,免疫细胞是原代人类免疫细胞。

[0118] 在一些实施方案中,免疫细胞是自体免疫细胞。

[0119] 在一些实施方案中,免疫细胞是同种异体免疫细胞。

[0120] 在一些实施方案中,免疫细胞是自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、T细胞、

γδT细胞、CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、原代T细胞、T细胞祖细胞或诱导性多潜能干细胞(iPSC)。

[0121] 在一些实施方案中,免疫细胞是原代T细胞。

[0122] 在一些实施方案中,免疫细胞是原代人类T细胞。

[0123] 在一些实施方案中,免疫细胞无病毒。

[0124] 在一些实施方案中,还包括自患者获得免疫细胞以及体外引入重组核酸。

[0125] 在一个方面中,本文提供了治疗受试者的疾病的方法,所述方法包括向受试者施用本文所公开的免疫细胞或本文所公开的药物组合物。

[0126] 在一些实施方案中,疾病为癌症。

[0127] 在一些实施方案中,癌症是实体癌症或液体癌症。

[0128] 在一些实施方案中,癌症是乳腺癌、HER2阳性乳腺癌、雌激素受体阳性乳腺癌、孕激素受体阳性乳腺癌、HER2/雌激素受体/孕激素受体阴性乳腺癌、三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、肺腺鳞癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、结肠癌、直肠癌、微卫星不稳定(MSI)结肠癌、非MSI结肠癌或非MSI或直肠癌。

[0129] 在一些实施方案中,施用细胞增强免疫反应。

[0130] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是适应性免疫反应。

[0131] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是增加的T细胞细胞毒性。

[0132] 在一些实施例中,增强的免疫反应是增加的T细胞扩增和/或增殖。

[0133] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是先天性免疫反应。

[0134] 在一个方面中,本文提供了增强受试者的免疫反应的方法,所述方法包括向受试者施用本文所公开的免疫细胞或本文所公开的药物组合物。

[0135] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是适应性免疫反应。

[0136] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是增加的T细胞细胞毒性。

[0137] 在一些实施例中,增强的免疫反应是增加的T细胞扩增和/或增殖。

[0138] 在一些实施方案中,增强的免疫反应是先天性免疫反应。

[0139] 在一些实施方案中,与不包含第一核酸或RNP复合物的对照细胞相比,免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0140] 在一些实施方案中,与不包含第二核酸或RNP复合物的对照细胞相比,免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0141] 在一些实施方案中,通过核酸测定或蛋白质测定来确定免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达。

[0142] 在一些实施方案中,核酸测定包括聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR(qPCR)、RT-qPCR、微阵列、基因阵列或RNAseq中的至少一者。

[0143] 在一些实施方案中,蛋白质测定包括免疫印迹法、荧光激活细胞分选、流式细胞术、磁激活细胞分选或基于亲和力的细胞分离中的至少一者。

[0144] 在一些实施方案中,还包括与免疫细胞同时或在免疫细胞之后向受试者施用免疫疗法。

附图说明

[0145] 参考以下描述和附图将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,在附图中:

[0146] 图1显示相对于非靶向对照细胞,在重复刺激测定中,具有所示基因的单独或组合基因扰动的集成电路T细胞对靶细胞的杀伤情况。条形图表示3-4次重复的中值,误差条表示标准偏差。

[0147] 图2A提供了与具有CD5基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CD5和第二基因(+CD5 KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2B提供了与具有CBLB基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CBLB和第二基因(+CBLB KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2C提供了与具有CISH基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CISH和第二基因(+CISH KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2D提供了与具有DNMT3A基因基因扰动(单一KO)或具有如所示的DNMT3A和第二基因(+DNMT3A KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2E提供了与具有DGKA基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的DGKA和第二基因(+DGKA KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2F提供了与具有DGKZ基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的DGKZ和第二基因(+DGKZ KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2G提供了与具有MAP4K1基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的MAP4K1和第二基因(+MAP4K1 KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2H提供了与具有NR4A1基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的NR4A1和第二基因(+NR4A1 KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2I提供了与具有PTPN2基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的PTPN2和第二基因(+PTPN2 KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2J提供了与具有TET2基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的TET2和第二基因(+TET2 KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。图2K提供了与具有ZC3H12A基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的ZC3H12A和第二基因(+ZC3H12A KO)的T细胞一起孵育后的靶细胞生长情况。空心条表示单独的指示基因的扰动,实心条表示与如所指示的额外基因扰动的组合,误差条表示标准偏差。相对于FDR<.05和<.01(分别以*和**指示)的两种指示基因的添加,组合表现出更优异的杀伤。

[0148] 图3显示相对于非靶向对照细胞,在重复刺激测定中,具有所示基因的单独或组合基因扰动的集成电路T细胞对T细胞的扩增情况。条形图表示3-4次重复的中值,误差条表示标准偏差。

[0149] 图4A提供了靶细胞与具有CD5基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CD5和第二基因(+CD5 KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4B提供了靶细胞与具有CBLB基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CBLB和第二基因(+CBLB KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4C提供了靶细胞生长与具有CISH基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的CISH和第二基因(+CISH KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4D提供了靶细胞与具有DNMT3A基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的DNMT3A和第二基因(+DNMT3A KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4E提供了靶细胞与具有DGKA基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的DGKA和第二基因(+DGKA KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4F提供了靶细胞与具有DGKZ基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的DGKZ和第二基因(+DGKZ KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4G提供了靶细胞与具有MAP4K1基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的MAP4K1和第二基因(+MAP4K1 KO)的T细胞一起孵育后的

T细胞扩增情况。图4H提供了靶细胞与具有NR4A1基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的NR4A1和第二基因(+NR4A1 KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4I提供了靶细胞与具有PTPN2基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的PTPN2和第二基因(+PTPN2 KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4J提供了靶细胞与具有TET2基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的TET2和第二基因(+TET2 KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。图4K提供了靶细胞与具有ZC3H12A基因的基因扰动(单一KO)或具有如所示的ZC3H12A和第二基因(+ZC3H12A KO)的T细胞一起孵育后的T细胞扩增情况。空心条表示单独的指示基因的扰动,实心条表示与如所指示的额外基因扰动的组合,误差条表示标准偏差。相对于FDR<.05和<.01(分别以*和**指示)的两种指示基因的添加,组合表现出更优异的T细胞扩增。

[0150] 图5描绘了具有指示基因扰动的ICT细胞的组合性能(log10相对增殖-log2相对肿瘤生长)的图表。

[0151] 图6A-6E描绘了植入ALPG/MSLN表达肿瘤细胞并用具有指示基因扰动的逻辑门表达肿瘤细胞处理的小鼠的肿瘤体积的图表。图6A描绘了具有DNMT3A/CBLB双敲除的小鼠的肿瘤体积。图6B描绘了具有TET2/PTPN2双敲除的小鼠的肿瘤体积。图6C描绘了具有CBLB/PTPN2双敲除的小鼠的肿瘤体积。图6D描绘了具有PTPN2/CISH双敲除的小鼠的肿瘤体积。图6E描绘了具有PTPN2/ZC3H12A双敲除的小鼠的肿瘤体积。

[0152] 图7A-7H描绘了在所指示shRNA表达后通过qPCR测量的靶基因的mRNA表达的图表。图7A描绘了在所指示shRNA表达后CBLB的表达。图7B描绘了在所指示shRNA表达后CD5的表达。图7C描绘了在所指示shRNA表达后CISH的表达。图7D描绘了在所指示shRNA表达后DNMT3A的表达。图7E描绘了在所指示shRNA表达后PTPN2的表达。图7F描绘了在所指示shRNA表达后TET2的表达。图7G描绘了在所指示shRNA表达后ZC3H12A的表达。图7H描绘了在所指示shRNA表达后DGKA的表达。

[0153] 图8A-8H描绘了与对照相比,通过表达针对ZC3H12A的shRNA或经验证的sgRNA的细胞的RNAseq进行的基因表达分析。点代表与对照相比,在至少一种shRNA或sgRNA表达细胞中差异表达的单个基因。横轴表示与对照相比,sgRNA表达细胞中基因的log倍数变化(logFC)。纵轴表示与对照相比,表达shRNA的细胞中基因的logFC。图8A描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 19的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8B描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 29的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8C描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 10的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8D描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 86的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8E描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 40的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8F描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 97的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8G描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 99的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。图8H描绘了与对照相比,表达ZC3H12A shRNA 106的细胞和表达sgRNA的细胞的基因表达分析。

[0154] 图9描绘了表达指示shRNA组合的ICT细胞的组合性能(log10相对增殖-log2相对肿瘤生长)的图表。

具体实施方式

[0155] 定义

[0156] 除非另有说明,否则权利要求书和说明书中所用的术语如下文所述来定义。

[0157] 如本文所用的术语“基因座”是指基因或遗传标记物在染色体上定位的特定、固定物理位置。

[0158] 术语“安全港基因座”是指可纳入基因或遗传元件、但不破坏相邻基因的表达或调节的基因座。这些安全港基因座还称为安全港位点(SHS)或基因组安全港(GSH)位点。如本文所用的安全港基因座是指可插入如本文所定义编码转基因的序列的“整合位点”或“敲入位点”。在一些实施方案中,插入是在替代位于整合位点处的序列下进行。在一些实施方案中,插入是在不替代整合位点处的序列下进行。所考虑整合位点的实例提供于表D中。

[0159] 如本文所用的术语“插入物”是指整合(插入)靶基因座或安全港位点的核苷酸序列。插入物可用于指使用例如同源定向修复(HDR)CRISPR/Cas9基因组编辑或本领域普通技术人员已知的将核苷酸序列插入基因组区域中的其他方法纳入靶基因座或安全港位点的基因或遗传元件。

[0160] 术语“插入”是指操纵核苷酸序列以引入非天然序列。此例如经由使用限制酶和连接酶来进行,从而可通过用适当限制酶消化两个分子以产生相容性重叠、且然后使用连接酶将分子连结在一起将通常编码所关注基因的所关注DNA序列纳入另一核酸分子中。本领域技术人员非常熟悉所述操纵且实例可参见Sambrook等人(Sambrook、Fritsch和Maniatis,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,1989),所述文献的全文(包括任何图式、图和表)均通过引用并入本文中。

[0161] “CRISPR/Cas”系统是指用于防御外源核酸的一大类细菌系统。CRISPR/Cas系统发现于宽范围的真细菌和古菌生物体中。CRISPR/Cas系统包括I型、II型和III型亚型。野生型II型CRISPR/Cas系统利用RNA介导的核酸酶Cas9与指导物和激活RNA的复合物来识别并裂解外源核酸。本领域中还已知具有指导RNA和激活RNA二者活性的指导RNA。在一些情形下,所述双重活性指导RNA称为小指导RNA(sgRNA)。

[0162] 在众多种真细菌中发现Cas9同源物,包括(但不限于)以下分类群的细菌:放线菌门(Actinobacteria)、产水菌门(Aquificae)、拟杆菌门-绿菌门(Bacteroidetes-Chlorobi)、衣原体门-疣微菌门(Chlamydiae-Verrucomicrobia)、绿弯菌门(Chlroflexi)、蓝菌门(Cyanobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)和热袍菌门(Thermotogae)。例示性的Cas9蛋白是酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)Cas9蛋白。其他Cas9蛋白和其同源物阐述于例如以下文献中:Chylinksi等人,RNA Biol.2013年5月1日;10(5):726-737;Nat.Rev.Microbiol.2011年6月;9(6):467-477;Hou等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2013年9月24日;110(39):15644-9;Sampson等人,Nature.2013年5月9日;497(7448):254-7;以及Jinek等人,Science.2012年8月17日;337(6096):816-21。Cas9核酸酶结构域可被优化以在宿主细胞中具有有效活性或增强的稳定性。

[0163] 如本文所用的术语“Cas9”是指RNA介导的核酸酶(例如细菌或古菌来源或衍生自其的核酸酶)。例示性RNA介导的核酸酶包括前述Cas9蛋白和其同源物,且包括(但不限于)CPF1(参见,例如Zetsche等人,Cell,第163卷,第3期,第759-771页,2015年10月22日)。类似地,如本文所用的术语“Cas9核糖核蛋白”复合物等等是指Cas9蛋白与crRNA(例如指导RNA或小指导RNA)之间的复合物、Cas9蛋白与反式激活crRNA(tracrRNA)之间的复合物、Cas9蛋

白与小指导RNA之间的复合物或其组合(例如,含有Cas9蛋白、tracrRNA和crRNA指导RNA的复合物)。

[0164] 如本文所用的措辞“免疫细胞”包括可产生免疫细胞的所有细胞类型,包括造血细胞,例如造血干细胞、多潜能干细胞和诱导性多潜能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,免疫细胞为B细胞、巨噬细胞、自然杀手(NK)细胞、诱导性多潜能干细胞(iPSC)、人类多潜能干细胞(HSPC)、T细胞或T细胞祖细胞或树突细胞。在一些实施方案中,细胞为先天性免疫细胞。

[0165] 如本文所用,原代细胞或原代干细胞上下文中的术语“原代”是指尚未转化或永生化的细胞。此类原代细胞可培养、继代培养或传代有限次数(例如培养0次、1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次、8次、9次、10次、11次、12次、13次、14次、15次、16次、17次、18次、19次或20次)。在一些情况下,原代细胞适应体外培养条件。在一些情形下,原代细胞自生物体、系统、器官或组织分离,任选地进行分选和利用,例如在无培养或继代培养下直接进行。在一些情形下,原代细胞被刺激、激活或分化。举例而言,原代T细胞可通过与CD3、CD28激动剂、IL-2、IFN-γ或其组合接触(例如,在其存在下培养)来激活。

[0166] 如本文所用的术语“T淋巴细胞”和“T细胞”可互换使用且是指已在胸腺中完成成熟且鉴别身体中的某些外源抗原的细胞。所述术语还指在免疫系统中具有多种作用(包括其他免疫细胞的激活和失活)的主要白细胞类型。T细胞可为任一T细胞,例如培养的T细胞,例如原代T细胞,或衍生自培养的T细胞系(例如Jurkat、SupT1等)的T细胞,或自哺乳动物获得的T细胞。T细胞包括(但不限于)原初T细胞、刺激的T细胞、原代T细胞(例如未培养)、培养的T细胞、永生化T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、自然杀手T细胞、其组合或其亚群。T细胞可以是CD3+细胞。T细胞可以是$CD4^+$、$CD8^+$或$CD4^+$和$CD8^+$。T细胞可为任一类型的T细胞、CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+ T细胞(例如细胞毒性T细胞)、外周细胞(包括但不限于血液单核细胞(PBMC)、外周血白细胞(PBL)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞、原初T细胞、调节T细胞、γδT细胞等)。其可为任何发育阶段的任何T细胞。其他类型的辅助T细胞包括Th3(Treg)细胞、Th17细胞、Th9细胞或Tfh细胞。其他类型的记忆T细胞包括诸如以下的细胞:中枢记忆T细胞(Tcm细胞)、效应记忆T细胞(Tem细胞和TEMRA细胞)。T细胞还可指遗传修饰的T细胞,例如已经修饰以表达T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或引发受体(primeR)的T细胞。T细胞还可自干细胞或祖细胞分化而来。

[0167] “CD4+ T细胞”是指在其表面上表达CD4并与细胞免疫反应相关的T细胞亚群。CD4+ T细胞的特征在于刺激后分泌特性,可包括分泌细胞因子,诸如IFN-γ、TNF-α、IL-2、IL-4和IL-10。“CD4”是一种55kD的糖蛋白,最初被定义为T淋巴细胞上的分化抗原,但也存在于包括单核细胞/巨噬细胞在内的其他细胞上。CD4抗原是免疫球蛋白超家族的成员,并被认为是MHC(主要组织相容性复合物)II类限制性免疫反应中的关联识别元件。在T淋巴细胞上,CD4抗原限定了辅助/诱导子亚群。

[0168] “CD8+ T细胞”是指在其表面上表达CD8的T细胞亚群,受MHC I类限制,并作为细胞毒性T细胞发挥作用。“CD8”分子是存在于胸腺细胞以及细胞毒性和阻抑T淋巴细胞上的分化抗原。CD8抗原是免疫球蛋白超家族的成员,并且是主要组织相容性复合物I类限制性相互作用中的关联识别元件。

[0169] 如本文所用,短语“造血干细胞”是指一种可以产生血细胞的干细胞。造血干细胞可以产生骨髓或淋巴谱系或其组合的细胞。造血干细胞主要存在于骨髓中,但是它们可以从外周血或其部分中分离出来。各种细胞表面标志物可用于鉴定、分选或纯化造血干细胞。在一些情况下,造血干细胞被鉴定为$c\text{-}kit^{+}$和lin^{-}。在一些情况下,人造血干细胞被鉴定为$CD34^{+}$、$CD59^{+}$、$Thy1/CD90^{+}$、$CD38^{lo/-}$、$C\text{-}kit/CD117^{+}$、lin^{-}。在一些情况下,人造血干细胞被鉴定为$CD34^{-}$、$CD59^{+}$、$Thy1/CD90^{+}$、$CD38^{lo/-}$、$C\text{-}kit/CD117^{+}$、lin^{-}。在一些情况下,人造血干细胞被鉴定为$CD133^{+}$、$CD59^{+}$、$Thy1/CD90^{+}$、$CD38^{lo/-}$、$C\text{-}kit/CD117^{+}$、lin^{-}。在一些情况下,小鼠造血干细胞被鉴定为$CD34^{lo/-}$、$SCA\text{-}1^{+}$、$Thy1^{+/lo}$、$CD38^{+}$、$C\text{-}kit^{+}$、lin^{-}。在一些情况下,造血干细胞为$CD150^{+}CD48^{-}CD244^{-}$。

[0170] 如本文所用,短语“造血细胞”是指源自造血干细胞的细胞。造血细胞可通过从生物体、系统、器官或组织(例如,血液或其部分)中分离而获得或提供。或者,可以分离造血干细胞并通过分化干细胞来获得或提供造血细胞。造血细胞包括分化成其他细胞类型潜能有限的细胞。此类造血细胞包括但不限于多潜能祖细胞、谱系限制性祖细胞、普通骨髓祖细胞、粒细胞-巨噬细胞祖细胞或巨核细胞-红系细胞祖细胞。造血细胞包括淋巴和骨髓谱系的细胞,诸如淋巴细胞、红细胞、粒细胞、单核细胞和血小板。

[0171] 如本文所用,术语“构建体”是指分子(包括大分子或多核苷酸)的复合物。

[0172] 如本文所用,术语“整合”是指将构建体的一个或多个核苷酸稳定插入细胞基因组中,即,共价连接至细胞染色体DNA中的核酸序列的过程。其也可以指整合位点处的核苷酸缺失。在插入位点处存在缺失的情况下,“整合”还可包括用一个或多个插入的核苷酸取代缺失的内源序列或核苷酸。

[0173] 关于基因的术语“缺失”、“扰动(perturb/perturbation)”是指目标基因的完全、部分或功能性缺失。

[0174] 术语“外源”是指已引入宿主细胞中且不是该细胞原生的分子或活性。例如,可以通过将编码核酸引入宿主遗传物质中,例如通过整合到宿主染色体中,或作为非染色体遗传物质诸如质粒来引入分子。因此,当与编码核酸的表达结合使用时,该术语是指将编码核酸以可表达的形式引入细胞中。术语“内源”是指在自然、未经编辑的条件下存在于宿主细胞中的分子或活性。类似地,当与编码核酸的表达结合使用时,该术语是指包含在细胞内而不是外源性地引入的编码核酸。

[0175] 术语“异源”指非侧翼序列原生的核酸或多肽序列或结构域,例如,其中未发现异源序列天然偶联至在一端或两端出现的核酸或多肽序列。

[0176] 术语“同源”指侧翼序列原生的核酸或多肽序列或结构域,例如,其中发现同源序列天然偶联至在一端或两端出现的核酸或多肽序列。

[0177] 如本文所用,“多核苷酸供体构建体”是指遗传地插入多核苷酸中并且对该多核苷酸而言是外源的核苷酸序列(例如DNA序列)。多核苷酸供体构建体被转录成RNA并任选地被翻译成多肽。多核苷酸供体构建体可包括原核序列、来自真核mRNA的cDNA、来自真核(例如,哺乳动物)DNA的基因组DNA序列,和合成DNA序列。例如,多核苷酸供体构建体可以是miRNA、shRNA、天然多肽(即,天然存在的多肽)或其片段,或变体多肽(例如,与天然多肽具有小于100%序列同一性的天然多肽)或其片段。

[0178] 如本文所用,术语“互补的”或“互补性”是指核苷酸或核酸之间的特定碱基配对。

互补核苷酸通常为A和T(或A和U)以及G和C。本文所述的指导RNA可包含与细胞中的基因组序列完全互补或基本上互补(例如,具有1-4个错配)的序列,例如DNA靶向序列。

[0179] 如本文所用,术语“转基因”是指已自然转移或通过多种基因改造技术中的任何一种从一种生物体转移到另一种生物体的多核苷酸。其任选地被翻译成多肽。其任选地被翻译成重组蛋白。“重组蛋白”是一种由基因编码的蛋白质——重组DNA——已在支持基因表达和信使RNA翻译的系统中克隆(参见表达系统)。重组蛋白可以是治疗剂,例如治疗本文公开的疾病或病症的蛋白质。如所用,转基因可以指代编码多肽的多核苷酸。

[0180] 术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。

[0181] 如本文所用,术语“可操作地连接”或“操作性地连接”是指核酸序列与单个核酸片段结合,使得一种功能受另一种功能影响。例如,如果启动子能够影响编码序列或功能性RNA的表达(即,编码序列或功能性RNA在启动子的转录控制下),则启动子与其可操作地连接。编码序列可以在有义和反义方向上可操作地连接至控制序列。

[0182] 如本文所用,术语“发育细胞状态”是指,例如,细胞所处的非活性、活性表达、分化、衰老等状态。发育细胞状态还可以指处于前体状态的细胞(例如,T细胞前体)。

[0183] 如所用,术语“编码”是指编码目标蛋白质或多肽的核酸序列。核酸序列可以是DNA分子或RNA分子。在优选实施方案中,分子是DNA分子。在其他优选实施方案中,分子是RNA分子。当作为RNA分子存在时,其将包含引导宿主细胞的核糖体开始翻译的序列(例如,起始密码子,ATG)和引导核糖体结束翻译的序列(例如,终止密码子)。在起始密码子与终止密码子之间是开放阅读框(ORF)。此类术语是本领域普通技术人员已知的。

[0184] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物受试者。示例性受试者包括人、猴子、狗、猫、小鼠、大鼠、牛、马、骆驼、山羊、兔子、猪和绵羊。在某些实施方案中,受试者为人。在一些实施方案中,受试者患有可用本文提供的改造细胞或其群体治疗的疾病或疾患。在一些方面,疾病或疾患为癌症。

[0185] 如本文所用,术语“启动子”是指能够控制编码序列或功能性RNA的表达的核苷酸序列(例如DNA序列)。启动子序列由近端和更远端的上游元件组成,后者元件通常称为增强子。启动子可以完整地源自天然基因,可以由来自天然存在的不同启动子的不同元件组成,并且/或者可包含合成的DNA区段。如本文所考虑的,启动子对于目标细胞而言可以是内源的或者对于目标细胞而言是外源的。本领域技术人员理解不同的启动子可以在不同的组织或细胞类型中,或在不同的发育阶段,或响应于不同的环境条件诱导基因表达。如本领域已知的,可以根据启动子的强度和/或启动子具有活性的条件来选择启动子,例如,组成型启动子、强启动子、弱启动子、诱导型/抑制型启动子、组织特异性或发育调控启动子、细胞周期依赖性启动子等。

[0186] 启动子可以是诱导型启动子(例如,热休克启动子、四环素调控启动子、类固醇调控启动子、金属调控启动子、雌激素受体调控启动子等)。启动子可以是组成型启动子(例如,CMV启动子、UBC启动子)。在一些实施方案中,启动子可以是空间限制和/或时间限制的启动子(例如,组织特异性启动子、细胞类型特异性启动子等)。参见例如美国公布20180127786,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0187] 如本文所考虑的,基因编辑可以涉及基因(或核苷酸序列)敲入或敲除。如本文所用,术语“敲入”是指将DNA序列或其片段添加到基因组中。此类待敲入的DNA序列可包括一

个或多个完整基因,可包括与基因或前述基因的任何部分或片段相关的调控序列。例如,可将编码重组蛋白的多核苷酸供体构建体插入携带突变基因的细胞的基因组中。在一些实施方案中,敲入策略涉及用提供的序列取代现有序列,例如用野生型拷贝取代突变等位基因。另一方面,术语"敲除"是指基因或基因表达的消除。例如,可以通过缺失或添加导致阅读框破坏的核苷酸序列来敲除基因。再如,可通过用不相关的(例如,非编码的)序列置换基因的一部分来敲除基因。

[0188] 如本文所用,术语"非同源末端接合"或NHEJ是指DNA链的切割或切口末端直接接合而不需要同源模板核酸的细胞过程。NHEJ可以导致修复位点处一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代或它们的组合。

[0189] 如本文所用,术语"同源定向修复"或HDR是指通过从同源模板核酸聚合来修复DNA链的切割或缺口末端的细胞过程。因此,原始序列被模板的序列置换。同源模板核酸可以由基因组中其他位置的同源序列(姐妹染色单体、同源染色体,或相同或不同染色体上的重复区域)提供。或者,可以引入外源模板核酸以获得靶位点处特定HDR诱导的序列的变化。通过这种方式,可以在切割位点引入特定的突变。

[0190] 如本文所用,单链DNA模板或双链DNA模板是指可被细胞用作HDR的模板的DNA低聚核苷酸。一般来说,单链DNA模板或双链DNA模板具有至少一个与靶位点同源的区域。在一些情况下,单链DNA模板或双链DNA模板具有两个同源区域,位于包含待插入靶切割位点处的异源序列的区域的两侧。

[0191] 术语"载体"和"质粒"可互换使用,并且如本文所用是指可用于将遗传物质引入细胞中的多核苷酸媒介物。载体可以是线状的或环状的。载体可以整合到宿主细胞的靶基因组中或者在宿主细胞中独立复制。载体可以包含例如复制起点、多克隆位点和/或选择性标志物。表达载体通常包含表达盒。载体和质粒包括但不限于整合载体、原核质粒、真核质粒、植物合成染色体、附加体、粘粒和人工染色体。

[0192] 如本文所用,在引入核酸或包含核酸的复合物例如RNP-DNA模板复合物的上下文中的短语"引入"是指核酸序列或RNP-DNA模板复合物从细胞外到细胞内的易位。在一些情况下,引入是指核酸或复合物从细胞外到细胞核内的易位。考虑了这种易位的各种方法,包括但不限于电穿孔、与纳米线或纳米管接触、受体介导的内化、通过细胞穿透肽的易位、脂质体介导的易位等。

[0193] 如本文所用,术语"表达盒"是以重组或合成方式产生的多核苷酸构建体,其包含可操作地连接至所选多核苷酸以促进该所选多核苷酸在宿主细胞中的表达的调控序列。例如,调控序列可以促进所选多核苷酸在宿主细胞中的转录,或所选多核苷酸在宿主细胞中的转录和翻译。表达盒可以例如整合到宿主细胞的基因组中或存在于表达载体中。

[0194] 如本文所用,短语"有需要的受试者"是指表现出和/或被诊断具有如本文所述的疾病或病症的一种或多种症状或体征的受试者。

[0195] "化学治疗剂"是指可用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂包括用于调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的影响的"抗激素剂"或"内分泌治疗剂"。

[0196] 术语"组合物"是指含有例如本文所考虑的改造细胞或核酸的混合物。在一些实施方案中,组合物可含有额外的组分,诸如佐剂、稳定剂、赋形剂等。术语"组合物"或"药物组合物"是指呈允许包含在其中的活性成分的生物活性对治疗受试者有效的形式的制剂,并

且在药物组合物中提供的量中,其不含有对受试者具有不可接受的毒性的其它组分。

[0197] 术语“原位”是指在活细胞中发生的与活生物体分开生长的过程,例如,在组织培养物中生长。

[0198] 术语“体内”是指在活生物体中发生的过程。

[0199] 如本文所用,术语“离体”一般包括在活组织中或活组织上进行的实验或测量,优选地是在生物体外的人工环境中,优选地是与自然条件的差异极小。

[0200] 如本文所用,术语“哺乳动物”包括人和非人,并且包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、鼠类、牛、马和猪。

[0201] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一性”百分比是指当针对最大对应而进行比较和比对时具有指定百分比的为相同的核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列,如使用下文描述的序列比较算法之一(例如,BLASTP和BLASTN或其他技术人员可用的算法)或通过视觉检查来测量。根据应用,“同一性”百分比可以存在于所比较的序列的区上,例如,存在于功能性结构域上,或者可替代地存在于待比较的两个序列的全长上。

[0202] 对于序列比较,通常一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果需要的话),并且指定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于指定的程序参数计算一个或多个测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0203] 例如,用于比较的最佳序列比对可以通过Smith和Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法;通过Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法;通过Pearson和Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性搜索方法;通过这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package,Genetics Computer Group,575Science Dr.,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或通过目视检查(一般参见Ausubel等人,下文)来进行。

[0204] 适用于确定序列同一性和序列相似性百分比的算法的一个实例是Altschul等人,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)中描述的BLAST算法。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)公开获得。

[0205] 术语“足够的量”意指足以产生所需效果的量,例如足以调节细胞内蛋白质聚集的量。

[0206] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。

[0207] 术语“改善”是指在治疗疾病状态(例如,癌症疾病状态)时的任何治疗方面有益的结果,疾病状态的严重性或进展减轻、缓解或治愈。

[0208] 如本文所用,术语“有效量”是指化合物(例如,本文所述的组合物、本文所述的细胞)足以实现有益或所需结果的量。有效量可以按一次或多次施用、应用或剂量施用,并且不意图限于特定的制剂或施用途径。

[0209] 如本文所用,术语“治疗”包括导致疾患、疾病、病症等的改善或改善其症状的任何作用,例如减轻、减少、调节、改善或消除。

[0210] 术语“调节(modulate/modulation)”是指降低或抑制,或替代地,激活或增加所叙述变量。

[0211] 术语“增加”和“激活”是指所叙述变量增加10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、100％、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更大。

[0212] 术语“降低”和“抑制”是指所叙述变量降低10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0213] 必须注意的是,除非上下文另外明确规定,否则如说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个/种(a/an)”和“该/所述(the)”包括复数个指示物。

[0214] 重组核酸组合物

[0215] CD5抗原(CD5,HGNC:1685,NCBI Entrez Gene:921)是富清道夫受体半胱氨酸(SRCR)超家族的成员。

[0216] Cbl Proto-Oncogene B(CBLB,HGNC:1542,NCBI Entrez Gene:868)是一种E3泛素蛋白连接酶。

[0217] 细胞因子可诱导的含SH2的蛋白(CISH,HGNC:1984,NCBI Entrez Gene:1154)是细胞因子诱导的STAT抑制剂(CIS)蛋白家族的成员。

[0218] 二酰基甘油激酶α(DGKA,HGNC:2849,NCBI Entrez Gene:1606)充当调节剂,其在细胞内信号传导路径中与蛋白激酶C竞争第二信使二酰基甘油。

[0219] 二酰基甘油激酶ζ(DGKZ,HGNC:2857,NCBI Entrez Gene:8525)是另一个二酰基甘油激酶家族成员,如DGKA。

[0220] DNA甲基转移酶3α(DNMT3A,HGNC:2978,NCBI Entrez Gene:1788)是一种DNA甲基转移酶。

[0221] 有丝分裂原激活蛋白激酶激酶激酶激酶1(MAP4K1,HGNC:6863,NCBI Entrez Gene:11184)参与ATP结合活性和MAP激酶激酶激酶激酶活性。

[0222] 核受体亚家族4A组成员1(NR4A1,HGNC:7980,NCBI Entrez Gene:3164)是类固醇-甲状腺激素-类视黄酸受体超家族的成员。

[0223] 蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2,HGNC:9650,NCBI Entrez Gene:5771)是蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)家族的成员。

[0224] Tet甲基胞嘧啶双加氧酶2(TET2,HGNC:25941;NCBI Entrez Gene:54790)参与骨髓细胞生成,且该基因的缺陷与几种骨髓增殖性疾病有关。

[0225] 含锌指CCCH型的12A(ZC3H12A,HGNC:26259,NCBI Entrez Gene:80149)是一种转录激活因子,且可导致心肌细胞死亡。

[0226] 如本文所用,“靶基因”是指细胞中的核酸序列,其中可使用本文所述的重组核酸分子和方法特异性地且有效地调控该序列的表达。在某些实施方案中,靶基因可能牵涉于个体免疫细胞的生长(增殖)、维持(存活)和/或免疫行为。

[0227] 在一些实施方案中,靶基因是PTPN2。在一些实施方案中,靶基因是CD5。在一些实施方案中,靶基因是CBLB。在一些实施方案中,靶基因是CISH。在一些实施方案中,靶基因是DGKA。在一些实施方案中,靶基因是DGKZ。在一些实施方案中,靶基因是DNMT3A。在一些实施方案中,靶基因是MAP4K1。在一些实施方案中,靶基因是NR4A1。在一些实施方案中,靶基因是ZC3H12A。

[0228] 在一些实施方案中,使用本文所述的重组核酸分子和方法对一个以上靶基因进行

缺失或调控。在一些实施方案中,使用本文所述的重组核酸分子和方法对至少两个靶基因进行缺失或调控。在一些实施方案中,重组核酸是shRNA分子。在一些实施方案中,重组核酸分子为指导RNA。

[0229] 在一些实施方案中,一个或多个重组核酸包含至少一个序列。在一些实施方案中,一个或多个重组核酸包含至少两个序列。在一些实施方案中,一个或多个重组核酸包含至少三个序列。在一些实施方案中,一个或多个重组核酸包含至少四个序列。在一些实施方案中,一个或多个重组核酸包含至少五个序列。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸在一种多核苷酸上编码。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸在两种或更多种多核苷酸上编码。在一些实施方案中,一个或多个重组核酸在三种或更多种多核苷酸上编码。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸在四种或更多种多核苷酸上编码。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸在五种或更多种多核苷酸上编码。

[0230] 在一些实施方案中,核酸包含第一核酸和第二核酸,其中第一核酸和第二核酸是不同的。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:12中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:13中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:13中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:12中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:12中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:14中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:13中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:20中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:20中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:20中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:22中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:17中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:13中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:20中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:14中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:22中所述的序列。

[0231] 在一些实施方案中,核酸序列的长度为至少16个、17个、18个、19个、20个、21个或22个核苷酸。

[0232] 在一些实施方案中,核酸为RNA干扰(RNAi)分子。例示性RNAi分子包括短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)或反义低聚核苷酸。在一些实施方案中,核酸是短发夹RNA(shRNA)、小干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)或反义低聚核苷酸。在一些实施方案中,核酸是shRNA。

[0233] 单链发夹核糖核酸(shRNA)是短双链体,其中有义链和反义链通过发夹环连接。它们由茎环结构组成,可以在细胞中从质粒构建体上的RNA聚合酶II或RNA聚合酶III启动子转录。一旦表达,shRNA就会被加工成RNAi种类。从质粒表达shRNA被认为是相对稳定的,因此相比例如使用合成siRNA提供了强大的优势。shRNA表达单位可纳入多种质粒、脂质体、病毒载体和其他媒介物中,用于递送和整合至靶细胞中。从质粒表达shRNA可以稳定整合以实现组成型表达。shRNA在细胞核中合成,经过进一步加工并转运至细胞质,然后并入RNA诱导性沉默复合物(RISC)中发挥活性。shRNA被转化为活性siRNA分子(其能够结合、隔离和/或阻止由靶基因编码的mRNA转录物的翻译)。

[0234] Argonaute蛋白质家族是RISC的主要组成部分。在Argonaute蛋白质家族中,只有Ago2含有能够从shRNA分子的茎部分裂解并释放随从链(passenger strand)的核酸内切酶活性。Argonaute家族的其余三个成员Ago1、Ago3和Ago4不具有可识别的核酸内切酶活性,也被组装到RISC中,并被认为通过裂解非依赖性方式发挥作用。因此,RISC可以被表征为具有裂解依赖性和裂解非依赖性途径。

[0235] RNAi(例如、反义RNA、siRNA、微小RNA、shRNA等)描述于国际公布第WO2018232356A1号、第WO2019084552A1号、第WO2019226998A1号、第WO2020014235A1号、第WO2020123871A1号和第WO2020186219A1号中,所述公布各自出于所有目的通过引用并入本文。

[0236] 反义低聚核苷酸结构和化学修饰描述于国际PCT公布第WO20/132521号中,所述公布通过引用并入本文中。

[0237] dsRNA和shRNA分子以及使用和产生方法描述于美国专利第8,829,264号、美国专利第9,556,431号和美国专利第8,252,526号中,所述专利各自通过引用并入本文中。

[0238] 在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含有包含SEQ ID NO:23-207中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码CD5的mRNA互补且包含SEQ ID NO:47-72中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ ID NO:73-95中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码DNMT3A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:96-122中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码PTPN2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:123-146中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码TET2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:147-175中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码ZC3H12A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者所述的核酸序列的shRNA。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者所述的核酸序列的shRNA。

[0239] 在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含第一核酸和第二核酸,其中第一核酸和第二核酸不同。在一些实施方案中,第一核酸和第二核酸各自是shRNA。

[0240] 在一些实施方案中,第一核酸是与编码DNMT3A的mRNA互补的shRNA,并且第二核酸是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA,并且第二核酸是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码TET2的mRNA互补的shRNA,并且第二核酸是与编码CBLB的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码CD5的mRNA互补的shRNA,且第二核酸是与编码CISH的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA,且第二核酸是与编码CISH的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA,且第二核酸是与编码TET2的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码PTPN2的mRNA互补的shRNA,并且第二核酸是与编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA。在一些实施方案中,第一核酸是与编码TET2的mRNA互补的shRNA,并且第二核酸是与

编码ZC3H12A的mRNA互补的shRNA。

[0241] 在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:120中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:45中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:120中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:120中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:45中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:122中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:122中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:111中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:122中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:46中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:122中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:46中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:120中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:44中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:46中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:45中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:45中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:37中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:46中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:46中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:44中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:29中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:72中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:93中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:93中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:69中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:72中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:94中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:71中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:95中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:95中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:69中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:94中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含

SEQ ID NO:94中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:94中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:93中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:95中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:95中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:178中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:177中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:176中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:146中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:176中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:178中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:143中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:178中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:177中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:176中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:141中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:176中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:174中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:177中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:176中所述的序列。在一些实施方案中,第一核酸包含SEQ ID NO:170中所述的序列,并且第二核酸包含SEQ ID NO:177中所述的序列。

[0242] siRNA分子以及使用和产生方法描述于美国专利第7,361,752号和美国专利公布第US2005/0048647号中,所述二者通过引用并入本文中。

[0243] 用于RNA干扰(例如shRNA、siRNA、dsRNA和反义低聚核苷酸)的其他方法和组合物通常为本领域中已知,且进一步阐述于美国专利第7,361,752号;美国专利第8,829,264号;美国专利第9,556,431号;美国专利第8,252,526号、国际PCT公布第WO00/44895号;国际PCT公布第WO01/36646号;国际PCT公布第WO99/32619号;国际PCT公布第WO00/01846号;国际PCT公布第WO01/29058号;以及国际PCT公布第WO00/44914号;国际PCT公布第WO04/030634号中;所述专利中的每一者均通过引用并入本文中。

[0244] 可用于编码RNAi分子(例如本文所述的shRNA)的核酸序列(或构建体)可包含启动子,其直接或间接地可操作地连接(或联结)至编码RNAi分子的序列。此类启动子可基于宿主细胞和所寻求的效应来选择。适宜启动子的非限制性实例包括组成型和诱导型启动子,例如基于RNA聚合酶II(pol II)的诱导型启动子。适宜启动子的非限制性实例还包括四环素诱导型或可抑制型启动子、EF1a、基于RNA聚合酶I或III的启动子、pol II依赖性病毒启

动子(例如CMV-IE启动子)以及pol III U6和H1启动子。还可使用噬菌体T7启动子(在所述情形下应了解,还必须存在T7聚合酶)。核酸序列无需限于使用任何单一启动子,尤其是因为核酸序列可包含两个或更多个shRNA(即,效应物的组合),包括(但不限于)所纳入的shRNA分子。每一所纳入的启动子可控制shRNA分子组分中的一者或其任一组合。

[0245] 在某些实施方案中,启动子可优先在靶向细胞中有活性,例如,可能期望使用免疫细胞特异性启动子在免疫细胞中优先表达至少一种重组核酸。将此类构建体引入宿主细胞中可在以下条件下实现:重组核酸前体转录物内所含的两种或更多种重组核酸最初驻留在单一初级转录物内,使得单独RNA分子(例如,各自包含其自身茎-环结构的shRNA)随后通过内源核糖核酸酶自此类前体转录物切除。所得成熟重组核酸(例如shRNA)随后可诱导在细胞中产生的靶基因mRNA转录物的降解和/或翻译抑制。另选地,每一前体茎-环结构可作为单独转录物的一部分产生,在所述情形下每一重组核酸序列将优选地包括其自身启动子和转录终止子序列。另外,多个重组核酸前体转录物可驻留在单一初级转录物内。

[0246] 本文所述shRNA重组核酸的茎-环结构可长约40至100个核苷酸,或优选地长约50至75个核苷酸。茎区的长度可为约15-45个核苷酸(或更长)或长度为约20-30个核苷酸。在一些实施方案中,茎区的长度为22个核苷酸。在一些实施方案中,茎区的长度为15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、36个、37个、38个、39个、40个、41个、42个、43个、44个或45个核苷酸。

[0247] 茎可包含完全互补的双链体(任何3′尾除外),然而,茎的任一臂上可存在凸起或内环。此类凸起和不对称内环的数量优选地是极少的(例如1、2或3)且大小为约3个核苷酸或更小。末端环部分可包含约4个或更多个核苷酸,但优选地不超过约25个核苷酸。环部分的大小将优选地为6-15个核苷酸。

[0248] 如本文所述,shRNA的茎区包含随从链和指导链,其中指导链含有与由靶基因编码的靶mRNA转录物互补的序列。优选地,小心地设计指导链和随从链的G-C含量和匹配,以在具和不具核酸内切酶裂解的情况下具有热力学上有利的链解开活性。另外,优选地经由BLAST搜索(www.ncbi.nim.nih.qov/BLAST)来确认指导链的特异性。

[0249] 本发明提供,可使用本文所述的方法和重组核酸来调节多个靶基因的表达水平。举例而言,本发明提供,第一组重组核酸可被设计成包括序列(指导链),所述序列被设计成降低第一靶基因的表达水平,而第二组重组核酸可被设计成包括序列(指导链),所述序列被设计成降低第二靶基因的表达水平。不同组的重组核酸可表达且驻留在相同或单独的初步转录物内。在某些实施方案中,此类多重方法(即,使用本文所述的重组核酸来调节两个或更多个靶基因的表达水平)可对患者具有增强的治疗效应。举例而言,若向患者提供表达本文所述的重组核酸分子的细胞来治疗、预防或改善癌症的效应,则可期望向患者提供两种或更多种类型的重组核酸分子,其被设计成降低参与免疫细胞激活或抑制的多个基因的表达水平。

[0250] 与不包含重组核酸分子的对照细胞相比,本文所述的重组核酸分子能够将细胞中靶基因的表达降低至少超过约50%。举例而言,与不包含重组核酸分子的对照细胞相比,重组核酸分子(例如shRNA)可能能够使细胞中选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A组成的组的靶基因的表达减少至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或更大。与不包含重组核酸分子

的对照细胞相比,重组核酸分子可能能够使细胞中由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A组成的组的靶基因的表达降低至少约50-100%、50-99%、50-95%、50-90%、50-85%、50-80%、50-75%、50-70%、50-65%、50-60%、50-55%。

[0251] 重组核酸分子可以是化学合成的,或体外转录的,并且还可以包括对磷酸-糖主链或核苷残基的一个或多个修饰。

[0252] 可使用将核酸引入细胞的本领域中已知的其他方法,例如脂质介导的载体运输、化学品介导的运输(例如磷酸钙)等等。因此,重组核酸分子构建体可与发挥以下活性中的一者或多者的组分一起引入:增强细胞对RNA的摄取、促进shRNA双链体链的退火、稳定退火的shRNA链或以其他方式增加靶基因的抑制。

[0253] 在一些实施方案中,一种或多种重组核酸还包含与宿主细胞染色体中的插入位点互补的5'同源定向修复臂和/或3'同源定向修复臂。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含5'同源定向修复臂和3'同源定向修复臂。在一些实施方案中,将一种或多种重组核酸纳入表达盒或表达载体中。在一些实施方案中,表达盒或表达载体还包含一种或多种重组核酸上游的组成型启动子。

[0254] 在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含至少第一核酸和至少第二核酸。第一核酸和第二核酸可以是RNAi分子,例如shRNA。在一些实施方案中,将第一核酸和第二核酸纳入单一表达盒或单一表达载体中。在一些实施方案中,表达盒或表达载体还包含在第一核酸上游和/或第二核酸上游的组成型启动子。在一些实施方案中,表达载体是非病毒载体。

[0255] 重组细胞

[0256] 本文还提供了一种重组细胞,其包含至少第一靶基因的缺失或扰动,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A组成的组。在一些实施方案中,细胞还包含至少第二靶基因的缺失或扰动,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A组成的组,并且其中第一靶基因和第二靶基因是不同的。

[0257] 在一些实施方案中,通过CRISPR-Cas9基因编辑使至少第一或第二靶基因缺失或扰动。在一些实施方案中,与不包含第一或第二靶基因的缺失的对照细胞相比,免疫细胞中第一或第二靶基因的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0258] 本文还提供了包含第一指导RNA的免疫细胞,其中第一指导RNA包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。在一些实施方案中,细胞还包含第二指导RNA,其包含SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

[0259] 在一些实施方案中,细胞还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。

[0260] 在一些实施方案中,与不包含第一核酸的对照细胞相比,第一或第二核酸使免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施方案

中,与不包含第一或第二核酸的对照细胞相比,免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0261] 在一些实施方案中,通过核酸测定或蛋白质测定来确定CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的表达。

[0262] 本文还提供了重组细胞,其包含以非病毒方式插入到细胞基因组的靶区域中的至少一种重组核酸。在一些实施方案中,免疫细胞包含长度为至少15个核苷酸的第一核酸序列,其中第一核酸序列为(1)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CD5的mRNA互补,所述人类CD5包含SEQ ID NO:1中所述的序列;(2)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CBLB的mRNA互补,所述人类CBLB包含SEQ ID NO:2中所述的序列;(3)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类CISH的mRNA互补,所述人类CISH包含SEQ ID NO:3中所述的序列;(4)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKA的mRNA互补,所述DGKA包含SEQ ID NO:4中所述的序列;(5)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DGKZ的mRNA互补,所述DGKZ包含SEQ ID NO:5中所述的序列;(6)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码DNMT3A的mRNA互补,所述DNMT3A包含SEQ ID NO:6中所述的序列;(7)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码MAP4K1的mRNA互补,所述MAP4K1包含SEQ ID NO:7中所述的序列;(9)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码TET2的mRNA互补,所述TET2包含SEQ ID NO:10中所述的序列;(10)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码人类蛋白酪氨酸磷酸酶非受体2型(PTPN2)的mRNA互补,所述PTPN2包含SEQ ID NO:9中所述的序列;(11)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码NR4A1的mRNA互补,所述NR4A1包含SEQ ID NO:8中所述的序列;或(12)长度为至少15个核苷酸的核酸序列,其与编码ZC3H12A的mRNA互补,所述ZC3H12A包含SEQ ID NO:11中所述的序列。

[0263] 在一些实施方案中,细胞为免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是原代人类免疫细胞。原代免疫细胞是自然杀手(NK)细胞、自然杀手T(NKT)细胞、T细胞、γδT细胞、CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、原代T细胞、T细胞祖细胞或诱导性多潜能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,原代免疫细胞为原代T细胞。在一些实施方案中,原代免疫细胞为原代人类T细胞。在一些实施方案中,免疫细胞无病毒。在一些实施方案中,免疫细胞是活的无病毒的原代细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为自体免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为同种异体免疫细胞。

[0264] 在一些实施方案中,在靶细胞中由重组核酸分子所靶向的基因(例如,CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A)的表达降低或减少。靶基因表达可降低至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。与不包含重组核酸分子的对照细胞相比,靶基因表达可降低约50%-100%、50%-99%、50%-95%、50%-90%、50%-85%、50%-80%、50%-75%、50%-70%、50%-65%、50%-60%、50%-55%。

[0265] 如本公开中所述包含插入靶基因座或安全港位点的重组核酸分子的细胞可称为改造细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为可产生多潜能免疫细胞的任何细胞。在一些实施方案中,免疫细胞可为诱导性多潜能干细胞(iPSC)或人类多潜能干细胞(HSPC)。在一些实施方案中,免疫细胞包含原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,所述改造细

胞为干细胞、人类细胞、原代细胞、造血细胞、适应性免疫细胞、先天性免疫细胞、自然杀手(NK)细胞、T细胞、CD8+细胞、CD4+细胞或T细胞祖细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,T细胞为调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD8^+$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD4^+$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD4^+CD8^+$ T细胞。

[0266] 在一些实施方案中,改造细胞为干细胞、人类细胞、原代细胞、造血细胞、适应性免疫细胞、先天性免疫细胞、T细胞或T细胞祖细胞。本公开中考虑的免疫细胞的非限制性实例包括T细胞、B细胞、自然杀手(NK)细胞、NKT/iNKT细胞、巨噬细胞、骨髓细胞和树突细胞。本公开中考虑的干细胞的非限制性实例包括多潜能干细胞(PSC)、胚胎干细胞(ESC)、诱导性多潜能干细胞(iPSC)、通过细胞核转移获得的胚胎源性胚胎干细胞(ntES;细胞核转移ES)、雄性种系干细胞(GS细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、造血干细胞/祖细胞干细胞(HSPC)、体细胞干细胞(成人干细胞)、血管母细胞、神经干细胞、间质干细胞和其他细胞(包括骨细胞、软骨细胞、肌细胞、心肌细胞、神经元、肌腱细胞、脂肪细胞、胰腺细胞、肝细胞、肾细胞和滤泡细胞等)的干细胞。在一些实施方案中,改造细胞是T细胞、NK细胞、iPSC和HSPC。在一些实施方案中,本公开中使用的改造细胞是体外生长的人类细胞系(例如,故意永生化的细胞系、癌细胞系等)。

[0267] 在一些实施方案中,免疫细胞为自体免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为同种异体免疫细胞。

[0268] 本文还提供了包含多个原代免疫细胞的细胞群体。在一些实施方案中,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多的细胞的基因组包含至少一种重组核酸分子。在一些实施方案中,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多的细胞的基因组包含至少两种shRNA分子。在一些实施方案中,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多的细胞的基因组包含至少三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种重组核酸分子。

[0269] 本文还提供了包含重组核酸的细胞群体。

[0270] 细胞还可包含嵌合蛋白,例如T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体(CAR)或引发受体。在一些实施方案中,细胞包含至少一种T细胞受体(TCR)。在一些实施方案中,细胞包含至少一种嵌合抗原受体。在一些实施方案中,细胞包含至少一种引发受体。在一些实施方案中,细胞包含至少一种嵌合抗原受体和至少一种引发受体。编码至少一种RNAi分子的至少一种重组核酸分子可以编码在与至少一种RNAi分子相同的DNA模板或核酸片段上,或者编码在与RNAi分子不同的DNA模板或核酸片段上。

[0271] 当TCR和RNAi重组核酸分子编码在同一DNA模板或核酸片段上时,各种组分可按任何顺序放置在DNA模板上。例如,DNA模板可以在5'至3'方向上包含:TCR和至少一种RNAi重组核酸。另选地,DNA模板可以在5'至3'方向上包含:至少一种RNAi重组核酸和TCR。

[0272] 当CAR、引发受体和RNAi重组核酸分子编码在同一DNA模板或核酸片段上时,各种组分可按任何顺序放置在DNA模板上。例如,DNA模板可以在5'至3'方向上包含:CAR、至少一种RNAi重组核酸和引发受体。另选地,DNA模板可在5'至3'方向上包含:i)引发受体、至少一种RNAi重组核酸和CAR;ii)至少一种RNAi重组核酸、引发受体和CAR;iii)至少一种RNAi重组核酸、CAR和引发受体;iv)引发受体、CAR和至少一种RNAi重组核酸;v)CAR、引发受体和至

少一种RNAi重组核酸;vi)至少一种RNAi重组核酸、引发受体、CAR;vii)至少一种RNAi重组核酸、CAR和引发受体。在一些实施方案中,至少一种RNAi重组核酸包含两种重组核酸。在一些实施方案中,重组核酸包含与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者互补的核酸。

[0273] 在一些实施方案中,引发受体包含特异性地结合至第一抗原的第一细胞外抗原结合结构域,并且嵌合抗原受体(CAR)包含特异性地结合至第二抗原的第二细胞外抗原结合结构域。

[0274] 降低基因表达的方法

[0275] 本发明的另一个方面提供了一种用于减弱哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,所述方法包括将至少一种与靶基因mRNA互补的第一重组核酸(例如指导RNA)和包含核酸酶结构域的核糖核蛋白(RNP)引入哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,指导RNA特与原代免疫细胞的至少第一靶基因异性地杂交,并且其中核酸酶结构域裂解靶区域以在免疫细胞的基因组中产生双链断裂位点。在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。在一些实施方案中,至少第一靶基因是CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者。在一些实施方案中,靶基因是CD5。在一些实施方案中,至少第一靶基因是CBLB。在一些实施方案中,至少第一靶基因是CISH。在一些实施方案中,至少第一靶基因是DGKA。在一些实施方案中,至少第一靶基因是DGKZ。在一些实施方案中,至少第一靶基因是DNMT3A。在一些实施方案中,至少第一靶基因是FAS。在一些实施方案中,至少第一靶基因是MAP4K1。在一些实施方案中,至少第一靶基因是NR4A1。在一些实施方案中,至少第一靶基因是PTPN2。在一些实施方案中,至少第一靶基因是TET2。在一些实施方案中,至少第一靶基因是TOX。在一些实施方案中,至少第一靶基因是ZC3H12A。

[0276] 在一些实施方案中,该方法包括将与至少第二靶基因mRNA互补的至少第二重组核酸(例如引导RNA)和包含核酸酶结构域的核糖核蛋白(RNP)引入哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,至少第二靶基因是CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者。在一些实施方案中,至少第二靶基因是CD5。在一些实施方案中,靶基因是CBLB。在一些实施方案中,至少第二靶基因是CISH。在一些实施方案中,至少第二靶基因是DGKA。在一些实施方案中,至少第二靶基因是DGKZ。在一些实施方案中,至少第二靶基因是DNMT3A。在一些实施方案中,至少第二靶基因是FAS。在一些实施方案中,至少第二靶基因是MAP4K1。在一些实施方案中,至少第二靶基因是NR4A1。在一些实施方案中,至少第二靶基因是PTPN2。在一些实施方案中,至少第二靶基因是TET2。在一些实施方案中,至少第二靶基因是TOX。在一些实施方案中,至少第二靶基因是ZC3H12A。

[0277] 本发明的另一个方面提供了一种减弱哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,所述方法包括将与靶基因mRNA互补的重组核酸(例如单链发夹核糖核酸(shRNA)、siRNA、dsRNA或反义低聚核苷酸)引入哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,与靶基因mRNA互补的重组核酸是shRNA。在一些实施方案中,shRNA包含形成双链体区域的19至100个核苷酸的自互补序列,所述自互补序列在细胞内条件下与靶基因mRNA转录物杂交。在一些实施方案中,shRNA包含22nt的自互补序列。在一些实施方案中,shRNA:(i)是RNaseIII酶裂解以产生双链RNA产物的底物,(ii)不产生对哺乳动物细胞的一般序列非依赖性杀伤,并且(iii)降低所述靶

基因以依赖于所述互补区的序列的方式表达。在一些实施方案中,靶基因是CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者。

[0278] 包含重组核酸的免疫细胞可具有降低的或减少的靶基因表达,所述靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者组成的组。在一些实施方案中,与不包含重组核酸分子的对照细胞相比,免疫细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低约50%-100%、50%-99%、50%-95%、50%-90%、50%-85%、50%-80%、50%-75%、50%-70%、50%-65%、50%-60%、50%-55%。

[0279] 在一些实施方案中,与不包含重组核酸、第一核酸或第二核酸的对照细胞相比,CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低了至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0280] 本发明的另一个方面提供了一种用于减弱哺乳动物细胞中靶基因表达的方法,所述方法包括将与靶基因mRNA互补的重组核酸引入哺乳动物细胞中。在一些实施方案中,重组核酸为指导RNA。在一些实施方案中,重组核酸还包含有包含核酸酶结构域的蛋白质,其中核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。在一些实施方案中,核酸酶结构域包含CRISPR相关核酸内切酶(Cas),任选地是Cas9核酸酶。在一些实施方案中,与不包含RNP复合物的对照细胞相比,核糖核蛋白(RNP)复合物使细胞中CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达降低至少50%、55%、60%、65%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0281] 在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:13中所述的序列。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含SEQ ID NO:21中所述的序列和SEQ ID NO:12中所述的序列。在一些实施方案中,一种或多种重组核酸包含SEQ ID NO:12中所述的序列和SEQ ID NO:14中所述的序列。

[0282] 在一些实施方案中,通过核酸测定或蛋白质测定来确定CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者的表达。在一些实施方案中,核酸测定包括聚合酶链式反应(PCR)、定量PCR(qPCR)、RT-qPCR、微阵列、基因阵列或RNAseq中的至少一者。

[0283] 治疗癌症的方法

[0284] 在另一方面中,本发明提供了治疗个体的免疫相关疾患(例如,癌症)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的组合物,所述组合物包含细胞,所述细胞包含至少一个选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的基因的缺失或扰动。

[0285] 在另一方面中,本发明提供了治疗个体的免疫相关疾患(例如,癌症)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的组合物,所述组合物包含细胞,所述细胞包含至少一个如SEQ ID NO:12-22中所述的序列。

[0286] 在另一方面中,本发明提供了治疗个体的免疫相关疾患(例如,癌症)的方法,所述方法包括向个体施用有效量的组合物,所述组合物包含细胞,所述细胞包含至少一种重组核酸,所述重组核酸包含长度至少为15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与选自由CD5、

CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A中的一者或多者组成的组的靶标互补。在一些实施方案中,重组核酸为shRNA分子。在一些实施方案中,shRNA选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A shRNA分子组成的组。在一些实施方案中,细胞至少包含CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A shRNA分子。

[0287] 在另一方面中,本发明提供了增强个体的免疫反应的方法,所述方法包括向个体施用有效量的组合物,所述组合物包含细胞,所述细胞包含至少一种shRNA分子,其中所述shRNA分子与编码选自由以下组成的组的蛋白质的mRNA互补:CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12AshRNA分子中的一者或多者。在一些实施方案中,细胞包含至少一种包含SEQ ID NO:23-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA分子。在一些实施方案中,细胞包含与编码CD5的mRNA互补且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DNMT3A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码TET2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码PTPN2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码ZC3H12A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。

[0288] 在一些实施方案中,本文提供的方法可用于治疗个体的免疫相关疾患。在一个实施方案中,个体是人类。

[0289] 在一些实施方案中,本文提供的方法(诸如增强免疫反应的方法)可用于治疗癌症,因此接受本文所述的系统的个体患有癌症。在一些实施方案中,癌症是实体癌症。在一些实施方案中,癌症是液体癌症。在一些实施方案中,癌症是免疫逃避性的。在一些实施方案中,癌症是免疫反应性的。在具体实施方案中,乳腺癌、HER2阳性乳腺癌、雌激素受体阳性乳腺癌、孕激素受体阳性乳腺癌、HER2/雌激素受体/孕激素受体阴性乳腺癌、三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、肺腺鳞癌、前列腺癌、去势抵抗性前列腺癌、结肠癌、直肠癌、微卫星不稳定(MSI)结肠癌、非MSI结肠癌或非MSI或直肠癌。

[0290] 在一些实施方案中,治疗导致癌症体积或大小的减小。在一些实施方案中,与施用重组核酸或重组细胞之前的癌症体积相比,治疗有效减小癌症体积。在一些实施方案中,治疗导致癌症生长速率的减小。在一些实施方案中,与施用或重组细胞之前的癌症生长速率相比,治疗有效减小癌症生长速率。在一些实施方案中,治疗有效消除癌症。

[0291] 免疫调节方法

[0292] 施用包含至少一个选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的基因的缺失或扰动的细胞的方法可导致免疫反应的调节。调节可以是免疫反应的增加或减少。在一些实施方案中,调节是免疫反应的增加。

[0293] 施用包含至少一个如SEQ ID NO:12-22中所述的序列的细胞的方法可导致免疫反

应的调节。调节可以是免疫反应的增加或减少。在一些实施方案中,调节是免疫反应的增加。

[0294] 施用包含重组核酸的细胞的方法可导致免疫反应的调节,所述重组核酸包含长度为至少15个核苷酸的与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补的核酸序列。在一些实施方案中,细胞包含至少一种包含SEQ ID NO:23-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA分子。在一些实施方案中,细胞包含与编码CD5的mRNA互补且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DNMT3A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码TET2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码PTPN2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码ZC3H12A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。调节可以是免疫反应的增加或减少。在一些实施方案中,调节是免疫反应的增加。

[0295] 在一个方面中,施用如本文所述的细胞可导致促炎分子(例如细胞因子或趋化因子)的诱导。在一些实施方案中,细胞因子是IFNg。一般来说,诱导的促炎分子的存在水平大于同型对照所达到的水平。此类促炎分子进而导致抗肿瘤免疫的激活,包括但不限于T细胞激活、T细胞增殖、T细胞分化、M1样巨噬细胞激活和NK细胞激活。因此,施用包含如本文公开的重组核酸或如本文所述的靶基因的缺失或扰动的系统可诱导导致肿瘤破坏的多种抗肿瘤免疫机制。

[0296] 在另一方面中,本文提供了增加个体的免疫反应的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含至少一个如SEQ ID NO:12-22中所述的序列的细胞。

[0297] 在另一方面中,本文提供了增加个体的免疫反应的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含至少第一靶基因的缺失的细胞,所述第一靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。在一些实施方案中,细胞还包含至少第二靶基因的缺失,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组,并且其中第一靶基因和第二靶基因是不同的。

[0298] 在另一方面中,本文提供了增加个体的免疫反应的方法,所述方法包括向个体施用有效量的包含重组核酸的细胞,所述重组核酸包含长度为至少15个核苷酸的第一核酸序列,所述第一核酸序列与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补。在一些实施方案中,增加受试者的免疫反应的方法包括向受试者施用包含重组核酸的细胞,所述重组核酸包含长度为至少15个核苷酸的第二核酸序列,所述第二核酸序列与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补。

[0299] 在一些实施方案中,细胞存在于还包含药学上可接受的赋形剂的药物组合物中。

[0300] 在本文所述的增加免疫反应的任何和所有方面中,特征或功能方面的任何增加或减少或改变都是与不包含重组核酸的细胞或不包含靶基因的缺失(例如,包含功能性靶基因)的细胞相比,其中所述重组核酸包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补。

[0301] 增加免疫反应可以是增强免疫反应或诱导免疫反应。例如,增加免疫反应涵盖免疫反应的开始或起始,或者提高或放大正在进行的或现有的免疫反应。在一些实施方案中,治疗诱导免疫反应。在一些实施方案中,诱导的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,诱导的免疫反应是先天性免疫反应。在一些实施方案中,治疗增强免疫反应。在一些实施方案中,增强的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,增强的免疫反应是先天性免疫反应。在一些实施方案中,治疗增加免疫反应。在一些实施方案中,增加的免疫反应是适应性免疫反应。在一些实施方案中,增加的免疫反应是先天性免疫反应。在一些实施方案中,通过施用包含重组核酸的细胞来开始或起始免疫反应,所述重组核酸包含至少一种长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补。在一些实施方案中,通过施用包含至少一种重组核酸的细胞来增强免疫反应,所述重组核酸包含长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A互补。在一些实施方案中,通过施用包含至少第二靶基因缺失的细胞来开始或起始免疫反应,所述第二靶基因选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组。在一些实施方案中,通过施用包含至少一个如SEQ ID NO:12-22中所述的序列的细胞和包含核酸酶结构域的蛋白质来开始或起始免疫反应,其中核酸和蛋白质形成核糖核蛋白(RNP)复合物。

[0302] 在另一方面中,本申请提供了利用重组核酸对细胞进行遗传编辑的方法,所述重组核酸包含至少一个长度为至少15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的蛋白质的mRNA互补,从而调节细胞的免疫功能。调节可以是增加免疫反应。在一些实施方案中,调节是免疫功能的增加。在一些实施方案中,功能的调节导致包含重组核酸的细胞的激活,所述重组核酸包含至少一个长度至少为15个核苷酸的核酸序列,所述核酸序列与编码选自由CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A组成的组的蛋白质的mRNA互补。在一些实施方案中,细胞包含至少一种包含SEQ ID NO:23-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA分子。在一些实施方案中,细胞包含与编码CD5的mRNA互补且包含SEQ ID NO:47-72中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CBLB的mRNA互补且包含SEQ ID NO:23-46中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码CISH的mRNA互补且包含SEQ ID NO:73-95中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DGKA的mRNA互补且包含SEQ ID NO:181-204中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码DNMT3A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:96-122中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码TET2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:147-175中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含与编码PTPN2的mRNA互补且包含SEQ ID NO:123-146中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。在一些实施方案中,细胞包含

与编码ZC3H12A的mRNA互补且包含SEQ ID NO:176-180和205-207中任一者中所述的核苷酸序列的shRNA。

[0303] 在另一方面中,本申请提供了利用包含核酸酶结构域和指导RNA的核糖核蛋白(RNP)对细胞进行遗传编辑的方法,其中指导RNA包含如SEQ ID NO:12-22中所述的序列,从而导致细胞的免疫功能的调节。调节可以是增加免疫反应。在一些实施方案中,调节是免疫功能的增加。在一些实施方案中,功能的调节导致细胞的激活,该细胞包含CD5、CBLB、CISH、DGKA、DGKZ、DNMT3A、MAP4K1、NR4A1、PTPN2、TET2和ZC3H12A中至少一者的缺失或扰动。

[0304] 在一些实施方案中,细胞为自然杀手(NK)细胞、T细胞、CD8+ T细胞、CD4+ T细胞、原代T细胞或T细胞祖细胞。

[0305] 在一些实施方案中,包含如本文所述的重组核酸的细胞的功能的调节导致细胞刺激天然和激活T细胞的能力增加,例如通过增加表达重组核酸的细胞的细胞因子或趋化因子分泌。在一些实施方案中,功能的调节增强或增加细胞产生细胞因子、趋化因子、CAR或共刺激或激活受体的能力。在一些实施方案中,调节增加表达重组核酸的细胞的T细胞刺激功能,包括例如细胞触发T细胞受体(TCR)信号传导、T细胞增殖或T细胞细胞因子产生的能力。

[0306] 在一些实施方案中,增加的免疫反应为分泌细胞因子和趋化因子。在一些实施方案中,与同型对照细胞相比,重组核酸诱导细胞中增加的至少一种细胞因子或趋化因子的表达。

[0307] 在一些实施方案中,增强的免疫反应为抗肿瘤免疫细胞募集和激活。

[0308] 在一些实施方案中,与同型对照细胞相比,表达重组核酸的细胞诱导记忆免疫反应。一般而言,记忆免疫反应为在后续暴露于病原体或抗原时免疫系统先前遇到的保护性免疫反应。例示性记忆免疫反应包括感染或接种抗原后的免疫反应。一般而言,记忆免疫反应由淋巴细胞(例如T细胞或B细胞)来调介。在一些实施方案中,记忆免疫反应为对癌症(包括癌细胞生长、增殖或转移)的保护性免疫反应。在一些实施方案中,记忆免疫反应抑制、防止或减少癌细胞生长、增殖或转移。

[0309] 编辑细胞的方法

[0310] 如本文所用的术语“基因编辑”或“基因组编辑”是指一种类型的遗传操纵,其中使用人工操纵的核酸酶或“分子剪刀”自基因组插入、替代或去除DNA。其为可用于阐明序列特异性基因或蛋白质的功能和效应或改变细胞行为(例如用于治疗目的)的工具。

[0311] 目前可用的基因组编辑工具包括锌指核酸酶(ZFN)和转录激活剂样效应核酸酶(TALEN)以将基因纳入安全港基因座(例如腺相关病毒整合位点1(AAVS1)安全港基因座)。利用phiC31整合酶和Bxb1整合酶的DICE(双重整合酶盒交换)系统为用于靶整合的工具。另外,成簇的规律间隔的短回文重复/Cas9(CRISPR/Cas9)技术可用于靶向基因插入。

[0312] 位点特异性基因编辑方法可包括同源依赖机制或同源非依赖机制。

[0313] 在本文所述的方法中考虑本领域中已知的靶向插入基因序列的所有方法以将构建体插入基因靶或安全港基因座。

[0314] 本文提供了在病毒载体不存在下插入一种或多种重组RNAi核酸的方法。在一些实施方案中,在病毒载体不存在下,一种或多种重组核酸可插入原代免疫细胞的基因组中。

[0315] 本文阐述用于达成将编码一种或多种重组核酸的核苷酸序列整合至细胞基因组中的方法和组合物。在一些方法中,整合效率增加,脱靶效应减少,和/或细胞活力的损失减

少。

[0316] 使用核酸酶(例如CRISPR相关的系统(Cas))将编码一种或多种重组核酸的质粒引入免疫细胞中。核酸酶可以核糖核蛋白格式与靶向免疫细胞基因组上的特异性位点的指导RNA(gRNA)一起引入。核酸酶在此特异性位点切割基因组DNA。特异性位点可为编码内源免疫细胞受体的基因组的一部分。因此,在此位点切割基因组将导致免疫细胞不再表达内源免疫细胞受体。

[0317] 质粒可包括与免疫细胞基因组上特异性位点的序列互补的5'和3'同源定向修复臂。互补序列处于由核酸酶切割的位点的任一侧,此允许质粒纳入免疫细胞基因组上的指定插入位点。一旦纳入质粒,细胞便将表达shRNA。

[0318] 最初,将免疫细胞(例如T细胞)激活。免疫细胞可自患者获得。因此,本公开提供了自患者收获免疫细胞(例如T细胞)的方法。然后,将编码一种或多种重组核酸的质粒引入T细胞中。有利地,本公开的质粒可使用电穿孔引入。在经由电穿孔引入质粒时,还可引入核酸酶。通过使用电穿孔,本公开的方法避免使用病毒载体来引入转基因,此为免疫细胞改造中已知的瓶颈。然后将免疫细胞扩增并共培养以产生足够量的改造免疫细胞以用作治疗性治疗。

[0319] 编辑细胞基因组的方法可包括a)提供Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)-DNA模板复合物,其包含:(i)RNP,其中RNP包含Cas9核酸酶结构域和指导RNA,其中指导RNA与细胞基因组的靶区域特异性杂交,且其中Cas9核酸酶结构域使靶区域裂解以在细胞基因组中产生插入位点;以及(ii)双链或单链DNA模板,其中DNA模板的5'端和3'端包含与侧接插入位点的基因组序列同源的核苷酸序列,且其中复合物中RNP对DNA模板的摩尔比为约3:1至约100:1;以及b)将RNP-DNA模板复合物引入细胞中。

[0320] 在一些实施方案中,本文所述的方法提供至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、99%或更高的RNP-DNA模板复合物的递送效率。在一些情形下,该效率是在将RNP-DNA模板引入细胞中后的活细胞方面来确定。在一些情形下,该效率是将RNP-DNA模板引入细胞中的细胞总数(活细胞或非活细胞)方面来确定。

[0321] 作为另一实例,递送效率可通过量化细胞群体中基因组编辑的细胞数(与在引入步骤后获得的总细胞或总活细胞相比)来确定。可利用各种量化基因组编辑的方法。这些方法包括(但不限于)使用错配特异性核酸酶,例如T7核酸内切酶I;一个或多个靶基因座的测序(例如,通过克隆的靶基因座扩增片段的桑格测序(sanger sequencing));以及高通量深度测序。

[0322] 在一些实施方案中,细胞活力损失与将裸DNA引入细胞中或使用病毒载体将DNA引入细胞中后的细胞活力损失相比有所减少。减少可为减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任一百分比。在一些实施方案中,整合的脱靶效应与将裸DNA引入细胞中或使用病毒载体将DNA引入细胞中后的脱靶整合相比有所减少。减少可为减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或这些百分比之间的任一百分比。

[0323] 在一些情形下,本文所述的方法提供已引入RNP-DNA模板的细胞的高细胞活力。在一些情形下,已引入RNP-DNA模板的细胞的活力为至少约20%、25%、30%、35%、40%、

45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、97.5％、99％、99.5％、99％或更高。在一些情形下,已引入RNP-DNA模板的细胞的活力为约20％至约99％、约30％至约90％、约35％至约85％或90％或更高、约40％至约85％或90％或更高、约50％至约85％或90％或更高、约50％至约85％或90％或更高、约60％至约85％或90％或更高、或约70％至约85％或90％或更高。

[0324] 在本文所提供的方法中,RNP对DNA模板的摩尔比可为约3:1至约100:1。举例而言,摩尔比可为约5:1至10:1、约5:1至约15:1、5:1至约20:1;5:1至约25:1;约8:1至约12:1;约8:1至约15:1、约8:1至约20:1、或约8:1至约25:1。

[0325] 在一些实施方案中,DNA模板的浓度为约2.5pM至约25pM。举例而言,DNA模板的浓度可为约2.5pM、3pM、3.5pM、4pM、4.5pM、5pM、5.5pM、6pM、6.5pM、7pM、7.5pM、8pM、8.5pM、9pM、9.5pM、10pM、10.5pM、11pM、11.5pM、12pM、12.5pM、13pM、13.5pM、14pM、14.5pM、15pM、15.5pM、16pM、16.5pM、17pM、17.5pM、18pM、18.5pM、19pM、19.5pM、20pM、20.5pM、21pM、21.5pM、22pM、22.5pM、23pM、23.5pM、24pM、24.5pM、25pM或这些浓度之间的任一浓度。

[0326] 在一些实施方案中,DNA模板的量为约1μg至约10μg。举例而言,DNA模板的量可为约1μg至约2μg、约1μg至约3μg、约1μg至约4μg、约1μg至约5μg、约1μg至约6μg、约1μg至约7μg、约1μg至约8μg、约1μg至约9μg、约1μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约2μg至约3μg、约2μg至约4μg、约2μg至约5μg、约2μg至约6μg、约2μg至约7μg、约2μg至约8μg、约2μg至约9μg、或2μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约3μg至约4μg、约3μg至约5μg、约3μg至约6μg、约3μg至约7μg、约3μg至约8μg、约3μg至约9μg、或约3μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约4μg至约5μg、约4μg至约6μg、约4μg至约7μg、约4μg至约8μg、约4μg至约9μg、或约4μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约5μg至约6μg、约5μg至约7μg、约5μg至约8μg、约5μg至约9μg、或约5μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约6μg至约7μg、约6μg至约8μg、约6μg至约9μg、或约6μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约7μg至约8μg、约7μg至约9μg、或约7μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约8μg至约9μg、或约8μg至约10μg。在一些实施方案中,DNA模板的量为约9μg至约10μg。

[0327] 在一些实施方案中,DNA模板编码shRNA分子或其片段。在一些实施方案中,DNA模板编码至少一种shRNA分子。在一些实施方案中,DNA模板编码至少两种shRNA分子。在一些实施方案中,DNA模板编码一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种shRNA分子。

[0328] 在一些实施方案中,DNA模板包括调节序列,例如启动子序列和/或增强子序列,以调节异源蛋白或其片段在插入细胞基因组中后的表达。

[0329] 在一些情形下,DNA模板为线性DNA模板。在一些情形下,DNA模板为单链DNA模板。在一些情形下,单链DNA模板为纯单链DNA模板。如本文所用的“纯单链DNA”意指基本上缺少DNA的另一链或相对链的单链DNA。“基本上缺少”意指,纯单链DNA的一条链比DNA的另一条链缺少至少100倍。

[0330] 在一些情形下,RNP-DNA模板复合物是通过将RNP与DNA模板在约20℃至约25℃的温度下一起孵育不到约1分钟至约30分钟来形成。举例而言,在约20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃的温度下,RNP可与DNA模板一起孵育约5秒、10秒、15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40

秒、45秒、50秒、55秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟或30分钟或这些时间之间的任一时间量。在另一实例中,在约20℃至约25℃的温度下,RNP可与DNA模板一起孵育不到约1分钟至约1分钟、不到约1分钟至约5分钟、不到约1分钟至约10分钟、约5分钟至10分钟、约5分钟至15分钟、约10分钟至约15分钟、约10分钟至约20分钟、或约10分钟至约30分钟。在一些实施方案中,在将RNP-DNA模板复合物引入细胞中之前,将RNP-DNA模板复合物和细胞混合。

[0331] 在一些实施方案中,引入RNP-DNA模板复合物包括电穿孔。用于对细胞电穿孔以引入RNP-DNA模板复合物的方法、组合物和装置可包括本文实施例中所述的那些方法、组合物和装置。用于对细胞电穿孔以引入RNP-DNA模板复合物的其他或另选方法、组合物和装置可包括WO/2006/001614或Kim,J.A.等人,Biosens.Bioelectron.23,1353-1360(2008)中所述的那些方法、组合物和装置。用于对细胞电穿孔以引入RNP-DNA模板复合物的其他或另选方法、组合物和装置可包括以下中所述的那些方法、组合物和装置:美国专利申请公布第2006/0094095号;美国专利申请公布第2005/0064596号;或美国专利申请公布第2006/0087522号。用于对细胞电穿孔以引入RNP-DNA模板复合物的其他或另选方法、组合物和装置可包括以下中所述的那些方法、组合物和装置:Li,L.H.等人,Cancer Res.Treat.1,341-350(2002);美国专利第6,773,669号;美国专利第7,186,559号;美国专利第7,771,984号;美国专利第7,991,559号;美国专利第6485961号;美国专利第7029916号;以及美国专利申请公布第2014/0017213号;以及美国专利申请公布第2012/0088842号,所述文献均通过引用并入本文中。用于对细胞电穿孔以引入RNP-DNA模板复合物的其他或另选方法、组合物和装置可包括Geng,T.等人,J.Control Release 144,91-100(2010);以及Wang,J.等人,Lab.Chip 10,2057-2061(2010)中所述的那些方法、组合物和装置,所述文献均通过引用并入本文中。

[0332] 在一些实施方案中,Cas9蛋白可呈活性核酸内切酶形式,使得当结合至靶核酸作为与指导RNA的复合物的一部分或与DNA模板的复合物的一部分时,将双链断裂引入靶核酸中。双链断裂可通过NHEJ修复以引入随机突变,或通过HDR修复以引入特定突变。各种Cas9核酸酶可用于本文所述的方法中。举例而言,可利用需要紧邻指导RNA靶向区的3'的NGG原间隔子相邻模体(PAM)的Cas9核酸酶。此类Cas9核酸酶可靶向基因组的含有NGG序列的任一区域。作为另一实例,具有正交PAM模体要求的Cas9蛋白可用于靶向不具相邻NGG PAM序列的序列。具有正交PAM序列特异性的例示性Cas9蛋白包括(但不限于)CFP1、Nature Methods 10,1116-1121(2013)中所述的那些Cas9蛋白和Zetsche等人,Cell,第163卷,第3期,第759-771页,2015年10月22日中所述的那些Cas9蛋白,所述文献均通过引用并入本文中。

[0333] 在一些情形下,Cas9蛋白为切口酶,使得当结合至靶核酸作为与指导RNA的复合物的一部分时,将单链断裂或切口引入靶核酸中。各自结合至结构不同的指导RNA的一对Cas9切口酶可靶向靶基因组区域的两个近端位点,且因此将一对近端单链断裂引入靶基因组区域中。切口酶对可提供增强的特异性,因为脱靶效应可能产生单一切口,所述切口通常通过碱基切除修复机制修复而无损伤。例示性Cas9切口酶包括具有D10A或H840A突变的Cas9核酸酶。

[0334] 在一些实施方案中,RNP包含Cas9核酸酶。在一些实施方案中,RNP包含Cas9切口酶。在一些实施方案中,RNP-DNA模板复合物包含至少两种结构不同的RNP复合物。在一些实施方案中,至少两种结构不同的RNP复合物含有结构不同的Cas9核酸酶结构域。在一些实施方案中,至少两种结构不同的RNP复合物含有结构不同的指导RNA。在一些实施方案中,其中至少两种结构不同的RNP复合物含有结构不同的指导RNA,每一结构不同的RNP复合物包含Cas9切口酶,且结构不同的指导RNA与靶区域的相对链杂交。

[0335] 在一些情形下,将包含结构不同的核糖核蛋白复合物的多个RNP-DNA模板引入细胞中。举例而言,Cas9蛋白可与多个(例如2个、3个、4个、5个或更多个,例如2-10个、5-100个、20-100个)结构不同的指导RNA复合以将DNA模板靶向插入多个结构不同的靶基因组区域。

[0336] 在本文所提供的方法和组合物中,细胞包括(但不限于)真核细胞、原核细胞、动物细胞、植物细胞、真菌细胞等等。任选地,细胞是哺乳动物细胞,例如人类细胞。细胞可为体外、离体或体内的。细胞还可为原代细胞、生殖细胞、干细胞或前体细胞。前体细胞可为例如多潜能干细胞或造血干细胞。在一些实施方案中,细胞为原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,原代造血细胞为免疫细胞。在一些实施方案中,免疫细胞为T细胞。在一些实施方案中,T细胞为调节T细胞、效应T细胞或原初T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD4^+$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD8^+$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD4^+CD8^+$ T细胞。在一些实施方案中,T细胞是$CD4^-CD8^-$T细胞。还提供了通过本文所述的任一方法修饰的任一细胞群体。在一些实施方案中,所述方法还包括扩增修饰细胞的群体。

[0337] 在一些情形下,将细胞自受试者去除,使用本文所述的任一方法修饰且施用于患者。在其他情形下,将本文所述的任一构建体体内递送至患者。参见例如美国专利第9737604号和Zhang等人,“Lipid nanoparticle-mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 for tumor therapy”,NPG Asia Materials,第9卷,第e441页(2017),所述文献均通过引用并入本文中。

[0338] 在一些实施方案中,将RNP-DNA模板复合物引入约1x 10^5至约2x 10^6个细胞中。例如,可以将RNP-DNA模板复合物引入约1x10^5至约5x 10^5个细胞、约1x 10^5至约1x 10^6个细胞、1x 10^5至约1.5x 10^6个细胞、1x 10^5至约2x 10^6个细胞、约1x 10^6至约1.5x 10^6个细胞或约1x 10^6至约2x 10^6个细胞中。

[0339] 在一些情形下,本文所述的方法和组合物可用于产生、修饰、使用或控制重组免疫细胞,例如嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)或表达引发受体(primeR)或重组T细胞受体(TCR)的T细胞。此类CAR T细胞可用于治疗或预防受试者的癌症、传染病或自身免疫疾病。举例而言,在一些实施方案中,将一种或多种基因产物插入或敲入T细胞中以表达异源蛋白(例如嵌合抗原受体(CAR)、引发受体或T细胞受体(TCR))。

[0340] 插入位点

[0341] 用于编辑免疫细胞基因组的方法包括编辑人类T细胞基因组的方法,其包括将核酸序列或构建体插入人类免疫细胞中的TCR-α亚基(TRAC)基因的外显子1中的靶区域中。在一些实施方案中,靶区域处于TRAC基因的恒定结构域的外显子1中。在其他实施方案中,靶区域处于编码TCR-α跨膜结构域的序列开始之前的外显子1、外显子2或外显子3中。

[0342] 用于编辑免疫细胞基因组的方法还包括编辑人类免疫T细胞基因组的方法,其包

括将核酸序列或构建体插入人类T细胞中的TCR-β亚基(TRBC)基因的外显子1中的靶区域中。在一些实施方案中,靶区域处于TRBC1或TRBC2基因的外显子1中。

[0343] 特定而言,用于编辑免疫细胞基因组的方法包括编辑人类免疫细胞基因组的方法,其包括将核酸序列或构建体插入基因组安全港(GSH)的靶区域中。

[0344] 用于编辑T细胞基因组的方法还包括编辑人类T细胞基因组的方法,其包括将核酸序列或构建体插入GS94靶区域(基因座chr11:128340000-128350000)中。

[0345] 在一些实施方案中,靶区域是GS94基因座。

[0346] 基因编辑疗法包括例如载体整合和位点特异性整合。位点特异性整合是病毒载体的随机整合的有希望的替代,因为其降低插入诱变或插入肿瘤形成的风险(Kolb等人,Trends Biotechnol.2005 23:399-406;Porteus等人,Nat Biotechnol.2005 23:967-973;Paques等人,Curr Gen Ther.2007 7:49-66)。然而,位点特异性整合继续面临诸如以下的挑战:较差的敲入效率、插入肿瘤形成的风险、相邻基因或转基因的不稳定和/或异常表达、低可及性(例如在相邻基因的20kB内)等。这些挑战可部分地经由鉴别和使用安全港基因座或安全港位点(SHS)来解决,所述位点是其中可纳入基因或遗传元件而不会破坏相邻基因的表达或调节的位点。

[0347] 最广泛使用的推定的人类安全港位点为染色体19q上的AAVS1位点,其最初鉴别为复发性腺相关病毒插入的位点。已基于同源性鉴别出其他潜在SHS,其中位点首先在其他物种(例如允许性鼠Rosa26基因座的人类同源物)中或在越来越多的在一些情况下似乎非必需的人类基因中鉴别出。此类型的其他推定的SHS为CCR5趋化因子受体基因,其在被破坏时赋予对人类免疫缺陷病毒感染的抗性。已基于病毒整合位点映射或基因诱捕分析在人类和其他细胞类型中鉴别出其他潜在基因组SHS,如原始鼠Rosa26基因座。前三种SHS、即AAVS1、CCR5和Rosa26与许多蛋白质编码基因和调节元件非常接近。(参见Sadelain,M.等人(2012).Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome.Nature reviews Cancer,12(1),51-58,所述文献的相关公开内容通过引用以其整体并入本文中)。

[0348] 人类染色体19上的AAVS1(还称为PPP1R12C基因座)为具有预期功能的托管转基因(例如DNA转基因)的已知SHS。其处于位置19q13.42。其具有开放染色质结构且胜任转录。AAVS1的典型SHS基因座为chr19:55,625,241-55,629,351。参见Pellenz等人,"New Human Chromosomal Sites with"Safe Harbor"Potential for Targeted Transgene Insertion."Human gene therapy第30,7卷(2019):814-828,所述文献的相关公开内容通过引用并入本文中。例示性AAVS1靶gRNA和靶序列提供于下文中:

[0349] ●AAVS1-gRNA序列:ggggccactagggacaggatGTTTTAGAGCTA GAAATAGCAAGTTAAAAT AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

[0350] ●AAVS1靶序列:ggggccactagggacaggat

[0351] 位于染色体3上的位置3p21.31的CCR5编码HIV-1的主要辅受体。破坏CCR5基因中的此位点有益于HIV/AIDS疗法且促进靶向其第三外显子的锌指核酸酶的开发。CCR5的典型SHS基因座为chr3:46,414,443-46,414,942。参见Pellenz等人"New Human Chromosomal Sites with"Safe Harbor"Potential for Targeted Transgene Insertion."Human gene therapy第30,7卷(2019):814-828,所述文献的相关公开内容通过引用并入本文中。

[0352] 小鼠Rosa26基因座尤其可用于遗传修饰,因为其可被高效靶向且在测试的大多数细胞类型中表达。Irion等人,2007("Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cell s."Nature biotechnology 25.12(2007):1477-1482,所述文献的相关公开内容通过引用并入本文中)在染色体3(位置3p25.3)中鉴别出人类同源物,即人类ROSA26。人类Rosa26(hRosa26)的典型SHS基因座为chr3:9,415,082-9,414,043。参见Pellenz等人,"New Human Chromosomal Sites with"Safe Harbor" Potential for Targeted Transg ene Insertion."Human gene therapy第30,7卷(2019):814-828,所述文献的相关公开内容通过引用并入本文中。

[0353] 安全港位点的其他实例提供于Pellenz等人,"New Human Chromosomal Sites with"Safe Harbor"Potential for Targeted Transgene Insertion."Human gene therapy第30,7卷(2019):814-828中,所述文献的相关公开内容通过引用并入本文中。其他整合位点的实例提供于表D中。

[0354] 在一些实施方案中,安全港位点允许高转基因表达(足以允许转基因功能或所关注疾病的治疗)和转基因在几天、几周或几个月内的稳定表达。在一些实施方案中,安全港基因座的基因的基因敲除赋予细胞的功能益处,或安全港基因座的基因在细胞内不具已知功能。在一些实施方案中,安全港基因座产生具或不具CD3/CD28刺激的稳定体外转基因表达、如通过iGuide-Seq或CRISPR-Seq检测到的可忽略的脱靶裂解、如通过iGuide-Seq或CRISPR-Seq检测到的相对于其他基因座较少的脱靶裂解、可忽略的转基因非依赖性细胞毒性、可忽略的转基因非依赖性细胞因子表达、可忽略的转基因非依赖性嵌合抗原受体表达、可忽略的邻近基因去调节或沉默、和定位于癌症相关基因外。

[0355] 如所用,"邻近基因"可指距离安全港基因座(整合位点)约100kB、约125kB、约150kB、约175kB、约200kB、约225kB、约250kB、约275kB、约300kB、约325kB、约350kB、约375kB、约400kB、约425kB、约450kB、约475kB、约500kB、约525kB、约550kB内的基因。

[0356] 在一些实施方案中,本公开考虑核酸插入物,其包含一种或多种重组RNAi核酸,例如至少一种shRNA分子。一种或多种重组RNAi核酸的整合可产生例如增强的治疗特性。如本文所用的这些增强的治疗特性是指与相同正常细胞类型的典型免疫细胞相比,细胞的治疗特性增强。举例而言,与典型、未修饰和/或天然存在的NK细胞相比,具有"增强的治疗特性"的NK细胞具有增强的、改良的和/或增加的治疗结果。免疫细胞的治疗特性可包括(但不限于)细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、持久性、免疫反应控制和调节、存活和细胞毒性。免疫细胞的治疗特性还表现为:抗原靶向受体表达;HLA呈递或其缺乏;对肿瘤内微环境的耐受性;旁观免疫细胞的诱导和免疫调节;利用减少改良的靶特异性;对诸如化学疗法的治疗的抗性。

[0357] 如本文所用的术语"插入物大小"是指整合(插入)在靶基因座或安全港位点的核苷酸序列的长度。

[0358] 本公开的插入物是指插入靶基因座或安全港位点的核酸分子或多核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸序列为DNA分子,例如基因组DNA,或包含脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中,插入物包含较小的DNA片段,例如色素体DNA、线粒体DNA或以质粒、F粘粒(fosmid)、粘粒、细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)和/或任何其他亚基因组DNA区段的形式分离的DNA。插入物中的核苷酸被认为是天然存在的核苷酸、非天然存在核苷酸和修饰的

核苷酸。核苷酸可被化学或生物化学修饰,或可含有非天然或衍生化核苷酸碱基,如本领域技术人员将容易地了解。此类修饰包括例如标记、甲基化、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰。多核苷酸可呈任一拓扑构象,包括单链、双链、部分双链、三链、发夹状、环状构象和本领域中考虑的其他三维构象。

[0359] 插入物可以具有编码和/或非编码区。插入物可以包含非编码序列(例如,控制元件,例如启动子序列)。在一些实施方案中,插入物编码一种或多种重组RNAi核酸。

[0360] 在一些实施方案中,核酸序列经由非病毒递送插入免疫细胞的基因组中。在非病毒递送方法中,核酸可为裸DNA或处于非病毒质粒或载体中。非病毒递送技术可为如本文所述或本领域普通技术人员已知的位点特异性整合技术。用于整合至安全港基因座中的位点特异性技术的实例包括(但不限于)使用核酸酶的同源依赖性改造和使用Cas9或其他CRISPR核酸内切酶的同源非依赖性靶向插入。

[0361] 在一些实施方案中,通过将以下引入改造细胞中使插入物整合在安全港位点:(a)裂解安全港位点中的靶区域以产生插入位点的靶向核酸酶;以及(b)核酸序列(插入物),其中插入物通过例如HDR纳入插入位点。可用于本公开方法中的非病毒递送技术的实例提供于美国申请第16/568,116号和美国申请第16/622,843号中,所述申请的相关公开内容通过引用以其整体并入本文中。

[0362] 所考虑安全港整合位点的实例提供于表D中。

[0363] 表D:安全港sgRNA序列

[0364]

sgRNA ID	sgRNA 序列	sgRNA 起始坐标 GRCH38	sgRNA 靶基因座	整合位点	中值(修饰%)，自 2 名供体、2 个引物集汇总
sgRNA_1	GCACCTGAATACCACGCCTG	chr16:88811818	APRT	APRT	79.28
sgRNA_2	CGCCTGCGATGTAGTCGATG	chr16:88811551	APRT	APRT	78.60
sgRNA_3	CAGGACGGGCGAGATGTCCC	chr16:88811640	APRT	APRT	85.25
sgRNA_4	CTGAATCTTTGGAGTACCTG	chr15:44715425	B2M	B2M	78.51
sgRNA_5	GGCCACGGAGCGAGACATCT	chr15:44711550	B2M	B2M	94.75
sgRNA_6	AAGTCAACTTCAATGTCGGA	chr15:44715515	B2M	B2M	70.97
sgRNA_7	GCTTGGAGGCCTGATCAGCG	chr19:36141111	CAPNS1	CAPNS1	89.34
sgRNA_8	CTTATCTCTTCGCAGCGAGG	chr19:36142301	CAPNS1	CAPNS1	91.09
sgRNA_9	CACACATTACTCCAACATTG	chr19:36142676	CAPNS1	CAPNS1	71.98
sgRNA_10	TTCCGCAAAATAGAGCCCCA	chr3:105746019	CBLB	CBLB	91.55
sgRNA_11	TGCACAGAACTATCGTACCA	chr3:105751622	CBLB	CBLB	91.43
sgRNA_12	GCAATAAGACTCTTTAAAGA	chr3:105853470	CBLB	CBLB	76.18
sgRNA_13	CAAAGAGATTACGAATGCCT	chr1:116754658	CD2	CD2	89.80
sgRNA_14	CAAGGCACCCCAGGTTTCCA	chr1:116754663	CD2	CD2	92.70
sgRNA_15	TTACGAATGCCTTGGAAACC	chr1:116754666	CD2	CD2	92.82
sgRNA_16	CAGAGACGCATCTGACCCTC	chr11:118315540	CD3E	CD3E	90.96
sgRNA_17	CATGCAGTTCTCACACACTG	chr11:118313715	CD3E	CD3E	87.47
sgRNA_18	GTGTGAGAACTGCATGGAGA	chr11:118313715	CD3E	CD3E	86.65
sgRNA_19	TCTCATTTCAGGAAACCACT	chr11:118349748	CD3G	CD3G	87.24
sgRNA_20	AGTCATACACCTTAACCAAG	chr11:118349754	CD3G	CD3G	87.99
sgRNA_21	TTCAAGGAAACCAGTTGAGG	chr11:118352458	CD3G	CD3G	86.55
sgRNA_22	GAGCCTTGCCTGGAAATCTG	chr11:61118177	CD5	CD5	84.03

[0365]

sgRNA_23	AAGCGTCAAAAGTCTGCCAG	chr11:61118324	CD5	CD5	89.19
sgRNA_24	CGTTCCAACTCGAAGTGCCA	chr11:61118121	CD5	CD5	83.11
sgRNA_25	GAGCGACTGGGACACGGTGA	chr9:136866246	EDF1	EDF1	88.84
sgRNA_26	GCTGCGCAAGAAGGGCCCTA	chr9:136866211	EDF1	EDF1	91.04
sgRNA_27	TTGTTCTGGCCAGCAGCCCC	chr9:136863433	EDF1	EDF1	85.98
sgRNA_28	CTTCCAGAGCCACATCATCG	chr19:48965791	FTL	FTL	93.10
sgRNA_29	GGGACTCACCAGAGAGAGGT	chr19:48965601	FTL	FTL	88.86
sgRNA_30	CGGTCGAAATAGAAGCCCTA	chr19:48965770	FTL	FTL	93.14
sgRNA_31	AAAAGGATATTGTGCAACTG	chr10:87933015	PTEN	PTEN	92.37
sgRNA_32	TGTGCATATTTATTACATCG	chr10:87933183	PTEN	PTEN	90.64
sgRNA_33	TTTGTGAAGATCTTGACCAA	chr10:87933087	PTEN	PTEN	85.36
sgRNA_34	TGTCATGCTGAACCGCATTG	chr18:12830972	PTPN2	PTPN2	87.94
sgRNA_35	CCACTCTATGAGGATAGTCA	chr18:12859219	PTPN2	PTPN2	92.45
sgRNA_36	TTGACATAGAAGAGGCACAA	chr18:12836828	PTPN2	PTPN2	93.96
sgRNA_37	GAGTACTACACTCAGCAGCA	chr12:6952098	PTPN6	PTPN6	89.61
sgRNA_38	TCACGCACAAGAAACGTCCA	chr12:6954872	PTPN6	PTPN6	82.74
sgRNA_39	AGGTCTCGGTGAAACCACCT	chr12:6951610	PTPN6	PTPN6	91.27
sgRNA_40	AGCATTATCCAAAGAGTCCG	chr1:198696873	PTPRC	PTPRC	88.88
sgRNA_41	ATATTAATTCTTACCAGTGG	chr1:198692370	PTPRC	PTPRC	88.95
sgRNA_42	AGCTTTAAATCAAGGTTCAT	chr1:198756176	PTPRC	PTPRC	96.89
sgRNA_43	ATCCCGAGCCCTAAGGTGCA	chr11:67436325	PTPRCAP	PTPRCAP	84.08
sgRNA_44	GGCAGCGCGGAGGACAGCGT	chr11:67436285	PTPRCAP	PTPRCAP	97.74
sgRNA_45	CTCAGGGGGCTACTACCACC	chr11:67436170	PTPRCAP	PTPRCAP	91.50
sgRNA_46	GTCACCGACGAGACCAGAAG	chr5:82277810	RPS23	RPS23	79.40
sgRNA_47	GTCGTGGACTTCGTACTGCT	chr5:82277843	RPS23	RPS23	83.07
sgRNA_48	TAATTTTTAGGCAAGTGTCG	chr5:82277860	RPS23	RPS23	61.94

[0366]

sgRNA_49	TTAGCTGTTAGACTTGAATA	chr14:51993810	RTRAF	RTRAF	85.50
sgRNA_50	CGAGAGCCGTCAACTTGCGT	chr14:51989652	RTRAF	RTRAF	85.64
sgRNA_51	CGGCTTCAACTGCAAAGGTG	chr14:51989700	RTRAF	RTRAF	88.77
sgRNA_52	TATGAAAAAGCAGAGCGACT	chr15:43793025	SERF2	SERF2	89.61
sgRNA_53	TCTGGCGGGCGAGCTCACGC	chr15:43792989	SERF2	SERF2	86.73
sgRNA_54	CTCACGCTGGTTACCGCCTA	chr15:43792977	SERF2	SERF2	80.57
sgRNA_55	AAAGATTACGAACTTCCCTG	chr12:46207559	SLC38A1	SLC38A1	92.24
sgRNA_56	GTTAAAAACAGACATGCCTA	chr12:46229232	SLC38A1	SLC38A1	91.51
sgRNA_57	ATGCCTAAGGAGGTTGTACC	chr12:46229246	SLC38A1	SLC38A1	79.48
sgRNA_58	CTCCAGGTATCCCATCGAAA	chr18:47869418	SMAD2	SMAD2	79.53
sgRNA_59	CACCAAATACGATAGATCAG	chr18:47870532	SMAD2	SMAD2	86.61
sgRNA_60	TGGCGGCGTGAATGGCAAGA	chr18:47896729	SMAD2	SMAD2	82.91
sgRNA_61	TAGGATGGTAGCACACAACC	chr16:11255478	SOCS1	SOCS1	92.25
sgRNA_62	CAGCAGCAGAGCCCCGACGG	chr16:11255432	SOCS1	SOCS1	83.79
sgRNA_63	CGGCGTGCGAACGGAATGTG	chr16:11255296	SOCS1	SOCS1	84.24
sgRNA_64	TATAGACGCTGCCCGACGTC	chr15:40038895	SRP14	SRP14	95.12
sgRNA_65	TCCAAAGAAGGGTACTGTGG	chr15:40038368	SRP14	SRP14	92.14
sgRNA_66	ACAGTACCCTTCTTTGGAAT	chr15:40038358	SRP14	SRP14	65.82
sgRNA_67	GCGACGGGCGCATCTACGTG	chr12:120469572	SRSF9	SRSF9	83.68
sgRNA_68	CCCGACCTCCATAAGTCCTG	chr12:120465700	SRSF9	SRSF9	92.56
sgRNA_69	GGGGTCCTCGAAGCGCACGA	chr12:120469426	SRSF9	SRSF9	89.94
sgRNA_70	TGCTCTGTTTAGAAGATGAC	chr5:32591641	SUB1	SUB1	79.36
sgRNA_71	ATATTCTTTTCTAGTTAAAG	chr5:32591566	SUB1	SUB1	70.93
sgRNA_72	CCTGTAAAGAAACAAAAGAC	chr5:32591614	SUB1	SUB1	93.66
sgRNA_73	TGGAGAAAGACGTAACTTCG	chr4:105234315	TET2	TET2	83.53
sgRNA_74	TCTGCCCTGAGGTATGCGAT	chr4:105234747	TET2	TET2	90.97

[0367]

sgRNA_75	ATTCCGCTTGGTGAAAACGA	chr4:105235656	TET2	TET2	89.62
sgRNA_76	CAGGCACAATAGAAACAACG	chr3:114295571	TIGIT	TIGIT	92.65
sgRNA_77	CCATTTGTAATGCTGACTTG	chr3:114295700	TIGIT	TIGIT	60.75
sgRNA_78	CTGGGTCACTTGTGCCGTGG	chr3:114295634	TIGIT	TIGIT	87.99
sgRNA_79	GTCAGGGTTCTGGATATCTG	chr14:22547508	TRAC	TRAC	98.20
sgRNA_80	TGGATTTAGAGTCTCTCAGC	chr14:22547541	TRAC	TRAC	88.15
sgRNA_81	CTGCGGCTGTGGTCCAGCTG	chr14:22550661	TRAC	TRAC	94.77
sgRNA_82	ACAAAACTGTGCTAGACATG	chr14:22547658	TRAC	TRAC	87.86
sgRNA_83	TTCTTCCCCAGCCCAGGTAA	chr14:22547778	TRAC	TRAC	89.85
sgRNA_84	CGTCATGAGCAGATTAAACC	chr14:22550625	TRAC	TRAC	95.81
sgRNA_85	GAGAGCGCCTGCGACCCGAG	chr19:58544980	TRIM28	TRIM28	89.44
sgRNA_86	CCAGCGGGTGAAGTACACCA	chr19:58544869	TRIM28	TRIM28	94.79
sgRNA_87	GGAGCGCTTTTCGCCGCCAG	chr19:58544839	TRIM28	TRIM28	91.81
sgRNA_88	TGAGGCCTGGACCTTATGCA	chr10:33134193	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS88)	69.44
sgRNA_89	CCTGGTGGAGTGAACCATGA	chr10:33132917	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS89)	95.25
sgRNA_90	CAAGCACTTAGGTTCCCCTG	chr10:33134633	chr10:33130000-33140000	desert_1 (GS90)	91.13
sgRNA_91	GGTCTCCCTACAATTCAGCG	chr10:72294568	chr10:72290000-72300000	desert_2 (GS91)	92.02
sgRNA_92	CACAGCGCGTGACTGCAATG	chr10:72298268	chr10:72290000-72300000	desert_2 (GS92)	90.22
sgRNA_93	TCTGGGGCACCAATTCTAGG	chr10:72292786	chr10:72290000-72300000	desert_2 (GS93)	86.35
sgRNA_94	GAGCCATGCTTGGCTTACGA	chr11:128342576	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS94)	91.24
sgRNA_95	GTACAAGTACTTATCTCATG	chr11:128343592	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS95)	89.02
sgRNA_96	GAGATAACAACATAACAACA	chr11:128347170	chr11:128340000-128350000	desert_3 (GS96)	96.47

[0368]

sgRNA_97	CATATTCCATAGTCTTTGGG	chr11:65425000	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS97)	88.54
sgRNA_98	CTGCCCCTTAGCAACTTAGG	chr11:65425507	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS98)	92.76
sgRNA_99	TGTTTAAAAATATGTTGACA	chr11:65426264	chr11:65425000-65427000 (NEAT1)	desert_4 (GS99)	90.76
sgRNA_100	CCAGGAATGGAAACTCACGC	chr15:92830315	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS100)	87.84
sgRNA_101	GAGGCCGCTGAATTAACCCG	chr15:92831850	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS101)	85.32
sgRNA_102	ATACACGCACACTTGCAGAA	chr15:92831131	chr15:92830000-92840000	desert_5 (GS102)	99.92
sgRNA_103	GAGCAGACAGAAACCCAGGG	chr16:11225670	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS103)	87.92
sgRNA_104	TGAGTCTCCAAACAGAACAG	chr16:11226284	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS104)	88.53
sgRNA_105	TAATATCACTGACTTCACGG	chr16:11225029	chr16:11220000-11230000	desert_6 (GS105)	87.65
sgRNA_106	TACACACAATGTAAGCAGCA	chr2:87467461	chr2:87460000-87470000	desert_7 (GS106)	71.79
sgRNA_107	GGGAGCTCAATTCGAAACCA	chr2:87468809	chr2:87460000-87470000	desert_7 (GS107)	65.89
sgRNA_108	TTGGACAGGTGAGACAGTCG	chr2:87467001	chr2:87460000-87470000	desert_7 (GS108)	72.64
sgRNA_109	AAGCTCACTCAGATAGTGTG	chr3:186511316	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS109)	76.89
sgRNA_110	CAGGAGAACCACCTTACACG	chr3:186515260	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS110)	86.31
sgRNA_111	GGACAGACCCTGATTCACAA	chr3:186519655	chr3:186510000-186520000	desert_8 (GS111)	85.47
sgRNA_112	ACATGGCAGTCTATGAACAG	chr3:59451154	chr3:59450000-59460000	desert_9 (GS112)	87.77
sgRNA_113	CCTATAGAGAGTACTACTTG	chr3:59456416	chr3:59450000-	desert_9 (GS113)	79.33

[0369]

			59460000		
sgRNA_114	CCAACCGGGTCTTCATTACG	chr3:59457029	chr3:59450000-59460000	desert_9 (GS114)	92.21
sgRNA_115	TCAAGCGTAGAGTTCCGAGT	chr8:127993006	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS115)	93.07
sgRNA_116	TCATGCAATTATGGACCCAG	chr8:127994663	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS116)	89.40
sgRNA_117	CGGGAAAGTGACTGGCCATG	chr8:127996766	chr8:127980000-128000000	desert_10 (GS117)	87.45
sgRNA_118	TGAGATTGAAATCAAATCGG	chr9:7974159	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS118)	84.84
sgRNA_119	TATGCAATATTCATCACGCG	chr9:7977914	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS119)	85.44
sgRNA_120	AATGTGTTAAATCAAATGCA	chr9:7976895	chr9:7970000-7980000	desert_11 (GS120)	83.48

[0370] CRISPR-Cas编辑

[0371] 基因编辑的一个有效实例是CRISPR-Cas方法(例如CRISPR-Cas9)。此方法纳入指导多核苷酸(例如指导核糖核酸或gRNA)和Cas核酸内切酶(例如Cas9核酸内切酶)的使用。

[0372] 如本文所用的多肽(称为“Cas核酸内切酶”或具有“Cas核酸内切酶活性”)是指由Cas基因编码的CRISPR相关的(Cas)多肽,其中Cas多肽为可在可操作地连接至一个或多个指导多核苷酸时裂解的靶DNA序列(参见例如美国专利第8,697,359号)。此定义还包括保留指导多核苷酸依赖性核酸内切酶活性的Cas核酸内切酶的变体。本文所详述的供体DNA插入方法中所用的Cas核酸内切酶为在靶位点(例如在靶基因座内或在安全港位点)将双链断裂引入DNA中的核酸内切酶。

[0373] 如本文所用的术语“指导多核苷酸”是指能够与Cas核酸内切酶复合且允许Cas核酸内切酶识别并裂解DNA靶位点的多核苷酸序列。指导多核苷酸可以是单一分子或双分子。指导多核苷酸序列可为RNA序列、DNA序列或其组合(RNA-DNA组合序列)。仅包含核糖核酸的指导多核苷酸还称为“指导RNA”。在一些实施方案中,使用指导RNA(gRNA)与Cas核酸内切酶(例如Cas9核酸内切酶)的组合将多核苷酸供体构建体插入安全港基因座。

[0374] 指导多核苷酸包括与靶DNA中的核苷酸序列互补的第一核苷酸序列结构域(还称为可变靶向结构域或VT结构域),和与Cas核酸内切酶多肽相互作用的第二核苷酸。其可为包含序列结构域(称为Cas核酸内切酶识别结构域或CER结构域)的双分子(还称为双链指导多核苷酸)。此双分子指导多核苷酸的CER结构域包含沿互补区杂交的两个单独分子。两个单独分子可为RNA序列、DNA序列和/或RNA-DNA组合序列。

[0375] 使用CRISPR-Cas方法的基因组编辑依赖于由RNA指导的Cas核酸内切酶(例如Cas9核酸内切酶)诱导的位点特异性DNA双链断裂(DSB)的修复。这些DSB的同源定向修复(HDR)使得能够通过引入所定义基因组变化(包括碱基取代、序列插入和缺失)精确地编辑基因

组。基于HDR的常规CRISPR/Cas9基因组编辑涉及用Cas9、gRNA和含有与所关注基因组基因座匹配的同源臂的供体DNA转染细胞。

[0376] HITI(同源非依赖性靶向插入)使用基于非同源末端连结(NHEJ)的同源非依赖性策略且所述方法可能比HDR更有效。指导RNA(gRNA)靶向插入位点。对于HITI,供体质粒缺少同源臂且DSB修复并不经由HDR路径来进行。供体多核苷酸构建体可被改造成包括侧接待插入基因或序列的Cas9裂解位点。此导致Cas9在供体质粒和基因组靶序列二者上裂解。靶和供体二者具有钝端且NHEJ路径使用线性化供体DNA质粒,从而整合至基因组DSB位点中。(参见,例如,Suzuki,K.等人(2016).In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration.Nature,540(7631),144-149,所述文献的相关公开内容均以其整体并入本文中)。

[0377] 使用CRISPR-Cas方法实施基因编辑的方法为本领域普通技术人员已知。(参见例如美国申请第US16/312,676号、美国申请第US15/303,722号和美国申请第US15/628,533号,所述申请的公开内容通过引用以其整体并入本文中)。另外,使用核酸内切酶将转基因插入安全港基因座中阐述于例如美国申请第13/036,343号中,所述申请的公开内容通过引用以其整体并入本文中。

[0378] 编码核酸内切酶的指导RNA和/或mRNA(或DNA)可化学连接至增强低聚核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一个或多个部分或缀合物。此类部分的非限制性实例包括脂质部分,例如胆固醇部分、胆酸、硫醚、硫胆固醇、脂族链(例如十二烷二醇或十一基残基)、磷脂(例如二-十六基-外消旋-甘油或1,2-二-O-十六基-外消旋-甘油-3-H-膦酸三乙铵)、聚胺或聚乙二醇链、金刚烷乙酸、棕榈基部分和十八胺或己基氨基-羰基-t氧基胆固醇部分。参见例如美国专利公布第20180127786号,其公开内容通过引用以其整体并入本文中。

[0379] 治疗应用

[0380] 对于治疗应用,将有效量的改造细胞、其群体或其组合物施用于受试者,通常是哺乳动物,通常是人类。

[0381] 改造细胞可通过输注(例如在一段时间内连续输注)或本领域普通技术人员已知的其他施用模式施用于受试者。

[0382] 本文所提供的改造细胞不仅可用于基因疗法,且还可用于非药物用途,例如产生动物模型和产生表达所关注重组核酸的重组细胞系。

[0383] 本公开的改造细胞可为已通过将转基因整合在本文所述的安全港基因座修饰的任何细胞,通常是哺乳动物细胞,通常是人类细胞。例示性细胞提供于重组细胞部分中。

[0384] 本公开的改造细胞、组合物和方法可用于诸如免疫或T细胞疗法的治疗应用。在一些实施方案中,相对于无插入的情况,将编码shRNA分子的序列插入安全港基因座内会维持TCR表达,且在维持TCR功能的同时实现转基因表达。

[0385] 在一些实施方案中,本公开提供了通过向需要治疗的受试者施用包含本文所述的任一改造细胞的组合物来治疗所述受试者的方法。在一些实施方案中,施用改造的细胞组合物产生期望药理学和/或生理学效应。所述效应可为疾病和/或由疾病引起的不良效应的部分或完全治愈。在一些实施方案中,治疗涵盖受试者(例如哺乳动物,例如人类)疾病的任何治疗。另外,治疗可稳定或减轻受试者(例如患者)的不期望的临床症状。本文所提供的细胞、其群体或其组合物可在疾病发生期间或之后施用。

[0386] 在某些实施方案中,受试者患有可通过细胞疗法治疗和/或改善的疾病、疾患和/或损伤。在一些实施方案中,需要细胞疗法的受试者是患有损伤、疾病或疾患的受试者,由此产生细胞疗法(例如,其中将细胞材料施用于受试者的疗法)。然而,请考虑可能治疗、改善和/或减轻与损伤、疾病或疾患相关的至少一种症状的严重程度。

[0387] 施用方法

[0388] 可施用有效量的包含系统的免疫细胞来治疗癌症。包含系统的免疫细胞的适当剂量可基于以下来确定:待治疗癌症的类型、包含系统的免疫细胞的类型、癌症的严重程度和进程、个体的临床疾患、个体的临床病史和对治疗的反应以及主治医师的判断。

[0389] 药物组合物

[0390] 本文所提供的改造重组细胞或重组核酸可作为药物组合物的一部分来施用。除一个或多个重组细胞外,这些组合物可包含药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员所熟知的其他材料。此类材料应为无毒的且不应干扰活性成分的功效。载体或其他材料的精确性质可取决于施用途径,例如口服、静脉内、皮肤或皮下、鼻、肌内、腹膜内途径。药物组合物可包含一种或多种药物赋形剂。可使用任一适宜药物赋形剂,且本领域普通技术人员能够选择适宜药物赋形剂。因此,下文所提供的药物赋形剂意图具有说明性而非限制性。其他药物赋形剂包括阐述于例如Handbook of Pharmaceutical Excipients,Rowe等人(编辑),第6版(2009)中的那些药物赋形剂,其通过引用以其整体并入。

[0391] 本文考虑施用其他治疗剂的各种模式。在一些实施方案中,其他治疗剂通过任一适宜施用模式来施用。

[0392] 组合物可单独或与其他治疗组合施用,根据待治疗的疾患同时或依序施用。

[0393] 药盒和制品

[0394] 本申请提供了药盒,其包括本文所述的系统或细胞组合物中的任一者或多者以及使用说明书。使用说明书可作为药品说明书存在于药盒中,存在于药盒容器或其组分的标记中,或可呈数字形式(例如经由互联网上的链接存在于CD-ROM上)。药盒可包括以下中的一者或多者:基因组靶向核酸、编码基因组靶向核酸的多核苷酸、位点定向多肽和/或编码位点定向多肽的多核苷酸。还考虑药盒内的其他组分,例如缓冲剂(例如复原缓冲剂、稳定缓冲剂、稀释缓冲剂)和/或一种或多种对照载体。

[0395] 在一些实施方案中,药盒进一步含有选自以下中的任一者的组分:二级抗体、用于免疫组织化学分析的试剂、药学上可接受的赋形剂和说明手册和其任一组合。在一个特定实施方案中,药盒包括药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的抗体组合物中的任一者或多者和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0396] 本申请还提供了制品,其包含本文所述的抗体组合物或药盒中的任一者。制品的实例包括小瓶(包括密封小瓶)。

[0397] 实施例

[0398] 下文是用于实施本发明的特定实施方案的实施例。所述实施例仅出于说明目的而提供,且并不意图以任何方式限制本发明的范畴。已努力确保所用数值(例如量、温度等)的准确性,但当然,应允许一定实验误差和偏差。

[0399] 除非另有指示,否则本发明的实践将采用本领域范围内的蛋白质化学、生物化学、

重组DNA技术和药理学的常规方法。此类技术在文献中有充分解释。参见例如T.E.Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,1993);A.L.Lehninger,Biochemistry(Worth Publishers,Inc.,当前新增);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Methods In Enzymology(S.Colowick和N.Kaplan编辑,Academic Press,Inc.);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Easton,Pennsylvania:Mack Publishing Company,1990);Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry第3版(Plenum Press)第A和B卷(1992)。

[0400] 实施例1:影响T细胞杀伤或扩增的组合基因扰动的体外鉴定和表征

[0401] 材料

[0402] T细胞编辑和体外基于细胞的重复刺激评估

[0403] 使用CITE非病毒基因递送生成改造的T细胞。简而言之,使用Miltenyi StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8MicroBead试剂盒自健康人类供体分离泛T细胞。用抗CD3/抗CD28珠刺激分离的T细胞。刺激两天后,将细胞重新悬浮在含有化脓性链球菌Cas9与GS94指导RNA和编码所关注转基因的供体DNA模板复合的溶液中。为了评估各种基因敲除的效果,用靶向DNMT3A、TET2、CD5、DGKA、DGKZ、MAP4K1、CBLB、FAS、PTPN2、NR4A1、ZC3H12A或CISH的Cas9 RNP+sgRNA处理细胞,或如所指示单独地或组合进行处理。有效的sgRNA序列汇总于表1中。随后使用Lonza 4-D Nucleofector对细胞进行电穿孔且在补充有IL-7和IL-15的新鲜培养基中进行恢复。在电穿孔后每2-3天对细胞计数且添加新鲜培养基。所有测试的构建体都编码逻辑门,该逻辑门表达针对ALPG的PrimeR受体(SEQ ID NO:213)和靶向MSLN的CAR(SEQ ID NO:212)。此类细胞被称为集成电路T细胞(ICT)。

[0404] 电穿孔后第4天,通过针对Myc+细胞的基于珠粒的正向选择(Myc标签在引发受体上表达)富集编辑的细胞。将T细胞与K562肿瘤细胞一起共培养,所述肿瘤细胞经过改造以2:1的效应物:靶标(E:T)比率表达ALPG和MSLN。每2-3天通过流式细胞术对T细胞和肿瘤进行量化,并在每个时间点将T细胞正规化为确定的浓度,并以2:1的E:T比率重新刺激。在14天时段内总共进行了六次刺激。

[0405] RSA数据的计算整合

[0406] RSA过程中的T细胞和靶标肿瘤细胞扩增由计算工作流程确定,其中每个孔的总细胞计数用以下公式估算:

[0407] 体积=(珠粒计数+1)÷(珠粒浓度×μL珠粒)

[0408] 每μL的细胞数=标签计数÷体积

[0409] 每mL的细胞数=(1000÷细胞体积)×每μL的细胞数

[0410] 总细胞数=(孔体积÷1000)×每mL的细胞数

[0411] 工作流程使用的主要标签是CD3(T细胞)和GFP(靶肿瘤细胞)。第0天每孔的总T细胞数被指定为接种的总T细胞数,通常为85,000。根据E:T比率计算第0天的总靶标肿瘤细胞数。例如,如果接种85,000个T细胞且E:T比率为2:1,则第0天的靶标肿瘤细胞计数将为42,500。

[0412] 对每个孔进行质量控制,并排除符合以下任何标准的孔:任何T细胞计数减少到0并且随后增加的孔;任何珠粒少于100个的孔;任何活细胞少于20个的孔。

[0413] 在每个重新刺激时间点对细胞进行重新正规化,其中每次刺激的T细胞数通常等于85,000,并尽可能保持2:1的E:T比率,以确保T细胞持续受到挑战。如果每个孔中超过每次刺激的T细胞数,则对T细胞进行稀释。否则,不进行稀释,也不添加额外的T细胞。这反映在计算工作流程中,通过稀释因数对每个时间点观察到的总T细胞数进行正规化,所述稀释因数定义如下,其中是按照上文针对CD3标签的描述进行计算的:

[0414] 如果总细胞数≥每次刺激的T细胞数,则稀释度=每次刺激的T细胞数/总T细胞数

[0415] 如果总细胞数<每次刺激的T细胞数,则为1

[0416] 总T细胞数重新正规化=总T细胞数×稀释度

[0417] 在实验方案中,如果基于每次刺激的T细胞数和E:T比率少于期望靶细胞的数量,则每次刺激时都会添加额外的靶细胞。例如,如果每次刺激的T细胞数=85,000且E:T比率为2:1,则靶标细胞将重新正规化为42,500个细胞。另一方面,如果靶细胞数量超过该量,则不会去除靶细胞,除非如上所述基于T细胞计数发生稀释。这反映在计算工作流程中,如下所示,其中总靶细胞数和总T细胞数是分别按照上文针对GFP和CD3标签的描述进行计算的:

[0418] 稀释的靶标=总靶细胞数×稀释度

[0419] 根据ET比率的靶标=总T细胞数×稀释度÷ET比率

[0420] 总靶细胞数重新正规化=max(稀释的靶标,根据ET比率的靶标)

[0421] 在每个时间点,T细胞和靶细胞扩增值均计算为观察到的总细胞数与先前重新正规化时的细胞量的比率,并累积汇总如下,其中n=总测量值:

[0422] T细胞扩增=(总T细胞数+1)÷(总T细胞数重新正规化+1)

[0423] $$\text{T细胞累积扩增} = \prod_{i=0}^{n} \text{T细胞扩增}_i$$

[0424] T细胞扩增限值为0.05和999,以防止极端值主导累积汇总度量。靶标肿瘤细胞的扩增值以类似方式计算。随后将T细胞和靶细胞扩增度量正规化为对照样品,以进行下游分析。

[0425] 统计学分析

[0426] 使用错误发现率(FDR)统计方法来识别相对于其单个组成基因成对地显著改善T细胞介导的靶向杀伤或T细胞扩增的基因扰动。简而言之,将对数值正规化为每个供体每个板的非靶向对照(NTC),使得重复中的NTC中值=1;T细胞扩增(CD3)为log2,且靶向扩增(GFP)为$\log_{10}$。对ICT扩增与靶细胞杀伤功能数据进行了两项检验:1)配对扰动组合与每个单一扰动(不包括NTC对照)的单尾t检验;以及2)组合扰动与单一扰动值的合成总和相比的单尾t检验,以检验超加性。对于单一基因扰动,t检验中使用的统计数据定义如下:平均值定义为基因扰动A的重复平均值+基因扰动B的重复平均值。标准偏差定义为sqrt(基因扰动A的方差+基因扰动B的方差)。n定义为基因扰动A样品的数量+基因扰动B样品的数量。Benjamini-Hochberg FDR校正实施方式如下:对所有组合中的基因扰动组合与每个单独基因扰动进行单尾t检验校正。与相比的组合基因扰动的单尾t检验。所有测试都校正了各个组成基因扰动的综合总和。倍数变化(即对数尺度差异)计算为组合基因扰动与综合总和相比:(正规化为非靶向对照的组合基因扰动平均对数值)-总和(正规化为NTC的单个基因扰动平均对数值)。组合基因扰动与每个单一扰动相比:(正规化为NTC的组合基因扰动平均对

数值)-(正规化为NTC的单个基因扰动平均对数值)。为了编制表格,采用了0.05的松弛FDR截止值。

[0427] 结果

[0428] 为了识别相对于单个组成基因而言成对扰动时能提供额外益处的基因,进行了成对CRISPR筛选,其中DNMT3A、TET2、CD5、DGKA、DGKZ、MAP4K1、CBLB、FAS、PTPN2、NR4A1、ZC3H12A或CISH在T细胞中通过CRISPR/Cas9单独被切除或彼此组合被切除,并经受重复的基于细胞的杀伤测定以诱导高压力、易疲劳的环境。

[0429] 如图1所示,在单一基因和双基因扰动中观察到了T细胞杀伤活性,范围从带有DGKZ扰动的T细胞杀伤中等下降,至TET2和CBLB组合扰动下观察到的杀伤增加超过7-$\log_{10}$倍。与CBLB的组合扰动在T细胞杀伤方面表现出显著的改良,其中前十个组合扰动中有8个包含CBLB作为组成基因之一。识别出了许多基因扰动组合,所述基因扰动组合相对于单个组成基因表现出统计学上显著更优异的T细胞杀伤力,如表1所汇总,指示组合扰动比单个扰动有益。此外,许多基因组合相对于单个组合的综合总和表现出统计学上显著更优异的T细胞杀伤,如表2所汇总,表明这些组合驱动超加性杀伤活性。

[0430] 表1提供了基因敲除组合,这些组合赋予了比单个组成基因更优异的T细胞细胞毒性。

[0431]

表 1

基因对	基因 A	基因 B	倍数变化:对与基因 A	FDR:对与基因 A	倍数变化:对与基因 B	FDR:对与基因 B	倍数-Max FDR	Max FDR
CBLB+CISH	CBLB	CISH	-2.410	0.020	-5.220	0.004	-2.410	0.020
CBLB+NR4A1	CBLB	NR4A1	-2.690	0.047	-3.900	0.026	-2.690	0.047
CBLB+PTPN2	CBLB	PTPN2	-1.680	0.029	-5.110	0.008	-1.680	0.029
CD5+CBLB	CD5	CBLB	-6.970	0.008	-4.170	0.017	-4.170	0.017
CD5+CISH	CD5	CISH	-4.250	0.022	-4.260	0.008	-4.250	0.022
CD5+DGKA	CD5	DGKA	-3.280	0.034	-3.540	0.013	-3.280	0.034
CD5+MAP4K1	CD5	MAP4K1	-2.820	0.047	-3.000	0.009	-2.820	0.047
DGKA+CBLB	DGKA	CBLB	-5.930	0.011	-2.870	0.026	-2.870	0.026
DGKA+CISH	DGKA	CISH	-2.380	0.028	-2.130	0.013	-2.380	0.028
DGKA+DGKZ	DGKA	DGKZ	-2.260	0.045	-3.500	0.026	-2.260	0.045
DGKA+PTPN2	DGKA	PTPN2	-2.020	0.028	-2.390	0.026	-2.020	0.028
DGKZ+CBLB	DGKZ	CBLB	-6.190	0.010	-1.880	0.029	-1.880	0.029
DGKZ+CISH	DGKZ	CISH	-2.970	0.009	-1.470	0.028	-1.470	0.028
DGKZ+PTPN2	DGKZ	PTPN2	-2.890	0.016	-2.010	0.034	-2.010	0.034

[0432]

DGKZ+ZC3H12A	DGKZ	ZC3H12A	-1.440	0.035	-1.020	0.046	-1.020	0.046
DNMT3A+CBLB	DNMT3A	CBLB	-5.490	0.019	-2.350	0.029	-2.350	0.029
MAP4K1+CISH	MAP4K1	CISH	-1.570	0.028	-1.410	0.034	-1.410	0.034
PTPN2+CISH	PTPN2	CISH	-1.820	0.040	-1.210	0.035	-1.820	0.040
TET2+CBLB	TET2	CBLB	-6.930	0.002	-4.910	0.004	-4.910	0.004
TET2+CD5	TET2	CD5	-3.550	0.036	-4.330	0.026	-3.550	0.036
TET2+CISH	TET2	CISH	-2.870	0.019	-3.660	0.013	-2.870	0.019
TET2+DGKA	TET2	DGKA	-3.420	0.043	-4.470	0.028	-3.420	0.043
TET2+PTPN2	TET2	PTPN2	-1.260	0.043	-2.670	0.019	-1.260	0.043

[0433] 表2提供了相对于单个组成基因而言赋予超加性T细胞杀伤的基因敲除组合。

[0434]

表 2				
对	**基因 A**	**基因 B**	**倍数变化：对与基因 A +基因 B**	**FDR：对与基因 A +基因 B**
CBLB+CISH	CBLB	CISH	-2.34	0.015
CBLB+PTPN2	CBLB	PTPN2	-2.23	0.0072
CBLB+ZC3H12A	CBLB	ZC3H12A	-1.14	0.027
CD5+CBLB	CD5	CBLB	-4.08	0.011
CD5+CISH	CD5	CISH	-4.18	0.0026
CD5+DGKA	CD5	DGKA	-3.46	0.0076
CD5+DGKZ	CD5	DGKZ	-4	0.033
CD5+MAP4K1	CD5	MAP4K1	-2.92	0.011
CD5+PTPN2	CD5	PTPN2	-2.63	0.015
CD5+ZC3H12A	CD5	ZC3H12A	-2.61	0.015
DGKA+CBLB	DGKA	CBLB	-3.05	0.018
DGKA+CISH	DGKA	CISH	-2.31	0.0026
DGKA+DGKZ	DGKA	DGKZ	-3.69	0.017
DGKA+MAP4K1	DGKA	MAP4K1	-1.54	0.010
DGKA+PTPN2	DGKA	PTPN2	-2.57	0.0049
DGKA+ZC3H12A	DGKA	ZC3H12A	-2.23	0.0049
DGKZ+CBLB	DGKZ	CBLB	-3.31	0.0013
DGKZ+CISH	DGKZ	CISH	-2.9	0.0026
DGKZ+MAP4K1	DGKZ	MAP4K1	-1.84	0.0029
DGKZ+PTPN2	DGKZ	PTPN2	-3.43	0.0029

[0435]

DGKZ+ZC3H12A	DGKZ	ZC3H12A	-2.45	0.0018
DNMT3A+CBLB	DNMT3A	CBLB	-2.61	0.024
DNMT3A+CD5	DNMT3A	CD5	-2.51	0.036
DNMT3A+CISH	DNMT3A	CISH	-2.63	0.014
DNMT3A+DGKZ	DNMT3A	DGKZ	-2.61	0.018
DNMT3A+PTPN2	DNMT3A	PTPN2	-2.9	0.014
MAP4K1+CISH	MAP4K1	CISH	-1.51	0.024
MAP4K1+PTPN2	MAP4K1	PTPN2	-1.63	0.016
MAP4K1+ZC3H12A	MAP4K1	ZC3H12A	-1.55	0.010
PTPN2+CISH	PTPN2	CISH	-1.75	0.015
TET2+CBLB	TET2	CBLB	-4.05	0.0029
TET2+CD5	TET2	CD5	-3.47	0.036
TET2+CISH	TET2	CISH	-2.8	0.015
TET2+DGKA	TET2	DGKA	-3.61	0.043
TET2+DGKZ	TET2	DGKZ	-2.46	0.018
TET2+PTPN2	TET2	PTPN2	-1.8	0.016

[0436] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CD5扰动作为单一基因扰动不会显著改良T细胞杀伤,但将CD5扰动与其他基因成对扰动,所述其他基因在作为单一扰动进行评估时,同样不会改良杀伤,包括ZC3H12A、DGKZ、PTPN2、DNMT3A、MAP4K1、DGKA和CISH(图2A)。将CD5扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括TET2和CBLB)组合起来,也表现出比加性活性所预期更优异的杀伤。CD5与NR4A1的组合扰动与任一单独扰动并没有显著差异,从而举例说明并非所有与CD5的组合扰动都会产生超加性效应。

[0437] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CBLB扰动显著改良了T细胞杀伤,表现出3$\log_{10}$倍的杀伤增加(图2B)。与单独进行CBLB扰动观察到的相比,CBLB与作为单一扰动进行评估时不会改良杀伤的其他基因(包括ZC3H12A、PTPN2、DGKZ、DNMT3A、CISH和DGKA)的成对扰动引起显著的杀伤改良。将CBLB扰动与作为单一扰动确实改良杀伤的基因(包括TET2)组合,也表现出比由加性活性可预期的更优异的杀伤。CBLB与NR4A1或MAP4K1的组合扰动与CBLB或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与CBLB的组合扰动不会产生超加性效应。

[0438] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CISH扰动并未显著改变T细胞杀伤(图2C)。与单独的CISH扰动所观察到的相比,CISH与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与PTPN2、MAPK41、DGKZ、DGKA和DNMT3A的配对)引起显著的杀伤改良。将CISH扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括TET2和CBLB)组合起来,也表现出比加性活性所预期更优异的杀伤。CISH与ZC3H12A或NR4A1的组合扰动与CISH或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与CISH的组合扰动不会产生超加性效应。

[0439] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DNMT3A扰动并未显著影响T细胞杀伤(图2D)。与单独的DNMT3A扰动所观察到的相比,DNMT3A扰动与在作为单一扰动进行评估时不会改良杀伤的其他基因的成对扰动(包括与DGKZ、PTPN2、CD5和CISH的配对)引起显著的杀伤改良。将DNMT3A扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括CBLB)组合起来,也表现出比由加性活性预期的更优异的杀伤。DNMT3A与ZC3H12A、DGKA、NR4A1、MAP4K1或TET2的组合扰动与

DNMT3A或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与DNMT3A的组合扰动不会产生超加性效应。

[0440] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DGKA扰动并未显著改变T细胞杀伤(图2E)。与单独的DGKA扰动所观察到的相比,DGKA与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与ZC3H12A、MAP4K1、DGKZ、PTPN2、CISH和CD5的配对)引起显著的杀伤改良。将DGKA扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括TET2和CBLB)组合起来,也表现出比加性活性所预期更优异的杀伤。DGKA与DNMT3A或NR4A1的组合扰动与DGKA或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与DGKA的组合扰动不会产生超加性效应。

[0441] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DGKZ扰动引起了中等的T细胞杀伤减少(图2F)。与单独的DGKZ扰动所观察到的DGKZ与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与PTPN2、CISH和DGKA的配对)引起显著的杀伤改良。将DGKZ扰动与作为单一扰动确实改良杀伤的基因(包括CBLB)组合,也表现出比由加性活性可预期的更优异的杀伤。DGKZ与MAP4K1、DNMT3A、TET2、CD5或NR4A1的组合扰动与DGKZ或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与DGKZ的组合扰动不会产生超加性效应。

[0442] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的MAP4K1扰动并未显著影响T细胞杀伤(图2G)。与单独的MAP4K1扰动所观察到的相比,MAP4K1扰动与在作为单一扰动进行评估时不会改良杀伤的其他基因的成对扰动(包括与ZC3H12A、PTPN2、DGKA和CISH的配对)引起显著的杀伤改良。将MAP4K1扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括TET2和CBLB)组合起来并未进一步改良杀伤活性。MAP4K1与NR4A1、TET2或CBLB的组合扰动与MAP4K1或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与MAP4K1的组合扰动不会产生超加性效应。

[0443] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的NR4A1扰动引起中等的T细胞杀伤改良(图2H)。与NR4A1或成对基因分开所预期的相比,NR4A1与其他基因的成对扰动未能引起杀伤改良。这些发现强调,当基因成对受到干扰时,无法预测哪些基因能够相互补充,成为T细胞杀伤的加性或超加性贡献者。

[0444] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的PTPN2扰动并未显著影响T细胞杀伤(图2I)。与单独的PTPN2扰动所观察到的相比,PTPN2与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与MAP4K1、CISH、DGKZ、DGKA、CD5和DNMT3A的配对)引起显著的杀伤改良。将PTPN2扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括TET2或CBLB)组合起来,也表现出比加性活性所预期更优异的杀伤。PTPN2与ZC3H12A或NR4A1的组合扰动与PTPN2或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与PTPN2的组合扰动不会产生超加性效应。

[0445] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的TET2扰动引起了中等的T细胞杀伤改良(图2J)。与单独的TET2扰动所观察到的相比,TET2与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与ZC3H12A、PTPN2、DGKA、CD5和CISH的配对)引起显著的杀伤改良。将TET2扰动与作为单一扰动确实能改良杀伤的基因(包括NR4A1或CBLB)组合起来,也表现出比加性活性所预期更优异的杀伤。TET2与DGKZ、DNMT3A或MAP4K1的组合扰动与TET2或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与TET2的组合扰动不会产生超加性效应。

[0446] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的ZC3H12A扰动引起了中等的T细胞杀伤减少(图

2K)。与单独的ZC3H12A扰动所观察到的相比,ZC3H12A与作为单一扰动评估时不会改良杀伤的其它基因的成对扰动(包括与MAP4K1和DGKA的配对)引起显著的杀伤改良。与成对基因中的任一者分开所预期的杀伤相比,ZC3H12A与作为单一扰动改良杀伤的基因组合起来引起杀伤改良。ZC3H12A与CISH、NR4A1、DGKZ、DNMT3A、PTPN2、TET2、CD5或CBLB的组合扰动与ZC3H12A或其他配对基因分开的单独扰动并无显著差异,从而举例说明了与ZC3H12A的组合扰动不会产生超加性效应。

[0447] 除了对T细胞介导的靶细胞杀伤的不同影响之外,在单基因和双基因扰动中还观察到了大范围的T细胞扩增,如图3所汇总,范围从具有DGKA+NR4A1扰动的T细胞扩增的中等减少,到相对于非靶向对照,TET2和PTPN2的组合扰动观察到的扩增增加超过4-$\log_{10}$倍。与TET2的组合扰动在T细胞杀伤方面表现出显著的改良,其中前十个组合扰动中有五个包含TET2作为组成基因之一。识别出了许多基因扰动组合,所述基因扰动组合相对于单个组成基因表现出统计学上显著更优异的T细胞扩增,如表3所汇总,指示这些基因的组合扰动比单个扰动有益。此外,许多基因组合相对于单个组合的综合总和表现出统计学上显著更优异的T细胞扩增,如表4所汇总,表明这些组合驱动超加性杀伤活性。

[0448] 表3提供了为任一单个组成基因赋予优异的T细胞扩增的基因敲除组合。

[0449]

表 3

基因对	基因 A	基因 B	倍数变化:对与基因 A	FDR:对与基因 A	倍数变化:对与基因 B	FDR:对与基因 B	倍数-Max FDR	Max FDR
CD5+CBLB	CD5	CBLB	3.38	0.0316	2.54	0.0472	2.54	0.0472
CD5+MAP4K1	CD5	MAP4K1	2.22	0.0221	1.38	0.0393	1.38	0.0393
TET2+CBLB	TET2	CBLB	2.86	0.0245	2.62	0.0472	2.62	0.0472
TET2+CD5	TET2	CD5	2.19	0.0221	2.79	0.0221	2.19	0.0221
TET2+ZC3H12A	TET2	ZC3H12A	3.22	0.0117	1.86	0.0245	1.86	0.0245

[0450] 表4提供了相对于单个组成基因赋予超加性T细胞扩增的基因敲除组合。

[0451]

表 4

基因对	基因 A	基因 B	倍数变化:对与基因 A+基因 B	FDR:对与基因 A+基因 B
CD5+CBLB	CD5	CBLB	2.6	0.0079
CD5+MAP4K1	CD5	MAP4K1	1.44	0.012
TET2+CBLB	TET2	CBLB	2.08	0.011
TET2+CD5	TET2	CD5	2.25	0.0075
TET2+PTPN2	TET2	PTPN2	1.27	0.045
TET2+ZC3H12A	TET2	ZC3H12A	1.32	0.0075

[0452] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CD5扰动并未显著影响T细胞扩增(图4A)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,CD5与MAP4K1、TET2和CBLB的成对扰动改良了扩

增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。CD5与NR4A1、DNMT3A、DGKZ、CISH、PTPN2、DGKA或ZC3H12A的同时扰动不会产生超加性效应,但相对于这些基因分开扰动,CD5与DGKA或MAP4K1的组合观察到了显著影响。

[0453] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CBLB扰动改良了T细胞扩增(图4B)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,CBLB与CD5和TET2的成对扰动改良了扩增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。CBLB与NR4A1、DGKA、DGKZ、MPA4K1、ZC3H12A、CISH、DNMT3A或PTPN2的同时扰动不会产生超加性效应,但相对于这些基因分开扰动,CBLB与DGKA或MAP4K1的组合观察到了显著影响。

[0454] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的CISH扰动使T细胞扩增增加大约3log(图4C)。除了任一单个组分基因扰动的影响之外,CISH与其他基因的成对扰动并未显著改良任何配对中的扩增。

[0455] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DNMT3A扰动并未显著影响T细胞扩增(图4D)。除了任一单个组分基因扰动的影响之外,DNMT3A与其他基因的成对扰动并未显著改良任何配对中的扩增。

[0456] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DGKA扰动增加了T细胞扩增(图4E)。除了任一单个组分基因扰动的影响之外,DGKA与其他基因的成对扰动并未显著改良任何配对中的扩增。

[0457] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的DGKZ扰动并未显著影响T细胞扩增(图4F)。除了任一单个组分基因扰动的影响之外,DGKZ与其他基因的成对扰动并未显著改良任何配对中的扩增。

[0458] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的MAP4K1扰动改良了T细胞扩增(图4G)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,MAP4K1与CD5的成对扰动改良了扩增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。MAP4K1与NR4A1、DGKZ、CISH、DNMT3A、ZC3H12A、DGKA、CBLB、TET2或PTPN2的同时扰动不会产生超加性效应,但相对于任一基因分开扰动,MAP4K1与TET2的组合观察到了显著影响。

[0459] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的NR4A1扰动并未显著影响T细胞扩增(图4H)。除了任一单个组分基因扰动的影响之外,NR4A1与其他基因的成对扰动并未显著改良任何配对中的扩增。

[0460] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的PTPN2扰动使T细胞扩增增加大约2log(图4I)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,PTPN2与TET2的成对扰动改良了扩增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。MAP4K1与NR4A1、DGKZ、ZC3H12A、CISH、CBLB、DGKA、CD5、MAP4K1或DNMT3A的同时扰动不会产生超加性效应。

[0461] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的TET2扰动中等地改良了T细胞扩增(图4J)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,TET2与CD5、CBLB、ZC3H12A或PTPN2的成对扰动改良了扩增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。TET2与DNMT3A、DGKZ、MAP4K1、DGKA、NR4A1或CISH的同时扰动不会产生超加性效应。

[0462] 相对于非靶向对照,CRISPR介导的ZC3H12A扰动改良了T细胞扩增(图4K)。与单个组成基因或这些基因的综合总和相比,ZC3H12A与TET2的成对扰动改良了扩增,指示这些基因的同时扰动产生了超加性效应。TET2与MAP4K1、DGKZ、NR4A1、CBLB、DGKA、PTPN2、CISH、

DNMT3A或CD5的同时扰动不会产生超加性效应。

[0463] 实施例2:体外和体内组合基因扰动的表征

[0464] 材料

[0465] 逻辑门控CAR T生成

[0466] 将来自供体的T细胞从Leukopacks®中分离出来并激活(第0天)。在激活后48小时,对T细胞进行改造(第2天)。为了改造T细胞,将靶向指定位点或针对CD5(SEQ ID NO:12)、CBLB(SEQ ID NO:13)、CISH(SEQ ID NO:14)、DGKA(SEQ ID NO:15)、DNMT3A(SEQ ID NO:17)、PTPN2、TET2、FAS(SEQ ID NO:207)和/或ZC3H12A的sgRNA或靶向FAS(SEQ ID NO:208)和PTPN2(SEQ ID NO:141)的双shRNA构建体或靶向荧光素酶(SEQ ID NO:208和209)的双shRNA对照与sNLS-SpCas9-sNLS核酸酶在室温下复合10分钟,形成核糖核蛋白混合物。表5提供了具体的sgRNA组合。然后将含有逻辑门CAR(SEQ ID NO:212)和PrimeR(SEQ ID NO:213)的质粒和ThermoFisher™基因编辑缓冲液添加至核糖核蛋白中并混合。将混合物添加至激活的T细胞中,并用氙电穿孔仪和Singleshot系统进行电穿孔。在电穿孔后,使用补充有12.5ng/mL IL-7和IL-15的新鲜培养基恢复改造的T细胞。在第3天和第5天,用补充有12.5ng/mL IL-7和IL-15的新鲜培养基补足改造的T细胞。改造后的6天(第8天),对细胞进行逻辑门插入评估并冷冻保存。

[0467] 逻辑门控CAR T的重复刺激测定体外评估

[0468] 在重复刺激测定中,将ALPG/MSLN逻辑门加上基因敲除或shRNA敲低与H1975靶细胞进行了比较。CAR+细胞通过Myc表面蛋白标签富集改造的ALPG/MSLN CAR。将H1975靶细胞以10,000个细胞/孔接种于96孔板中,并添加10,000Myc+CAR T,以使靶细胞与CAR的比率为1:1。通过靶细胞中的荧光标签和用于实时成像的Incucyte®系统来监测靶细胞杀伤。每3天移出1/2的T细胞并将其接种于10,000个新鲜靶细胞上,总共进行4次靶细胞刺激。在重新接种期间,收集了1/4的T细胞针对CAR扩增进行流式分析。性能被量化为在增殖与靶细胞杀伤方面相对于单独CAR的改良倍数。

[0469] 逻辑门控CAR T的肿瘤模型体内评估

[0470] 为了评估用ALPG/MSLN逻辑门改造的T细胞的功效,利用肺癌H1975的皮下模型。将逻辑门加上针对CBLB、CISH、DGKA、DNMT3A、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A基因的组合的基因敲除与未编辑的对照T细胞进行了比较。给NSG MHC I/II KO小鼠注射过表达hALPG和hMSLN的Hi975细胞。将100uL磷酸盐缓冲盐水(PBS)的1:1悬浮液中的H1975细胞注射至小鼠右侧腹中。根据肿瘤体积将动物随机分至治疗组,并将T细胞以$0.1x10^6$剂量注射至尾静脉中。在治疗前测量和开始治疗后每周两次测量肿瘤体积,并计算为V=(长度×宽度2)/2。

[0471] 结果

[0472] 为了评估基因扰动对逻辑门表达CAR-T细胞的性能的影响,使用表达具有CRISPR介导的扰动或shRNA介导的选定基因组合敲低的例示性ALPG/MSLN逻辑门的H1975细胞进行了重复刺激测定。如图5所示,几种测试的基因扰动或敲低的组合增强了逻辑门表达T细胞的组合性能,其中两种组合降低了组合性能。表5提供了增强逻辑门T细胞性能的组合的汇总。

[0473] 表5提供了相对于对照逻辑门T细胞赋予增强性能的基因敲除或敲低组合。

[0474]

基因对	基因A	基因B	组合性能度量
TET2+ZC3H12A	TET2	ZC3H12A	0.50
PTPN2+CISH	PTPN2	CISH	1.12
PTPN2+ZC3H12A	PTPN2	ZC3H12A	1.25
Fas+PTPN2(shRNA)	FAS	PTPN2	1.38
CD5+FAS	CD5	FAS	2.22
CISH(单一)	CISH	n/a	2.91
CBLB(单一)	CBLB	n/a	3.49
CD5+CBLB	CD5	CBLB	4.22
CBLB+PTPN2	CBLB	PTPN2	5.32
TET2+CBLB	TET2	CBLB	6.12
DNMT3A+CBLB	DNMT3A	CBLB	6.34

[0475] 为了评估组合基因敲低对逻辑门T细胞的体内抗肿瘤活性的影响,在皮下NSG肺癌模型中测试了表达具有CRISPR介导的选定基因组合扰动的例示性ALPG/MSLN逻辑门的H1975细胞。

[0476] DNMT3A和CBLB的组合敲除导致肿瘤体积最初减少,随后在肿瘤植入后70天之后开始扩增(图6A)。TET2和PTPN2的组合敲除导致肿瘤体积最初减少,随后在肿瘤植入后约70天开始扩增(图6B)。CBLB和PTPN2的组合敲除导致肿瘤体积在实验期间持续减小(图6C)。PTPN2和CISH的组合敲除导致肿瘤体积最初减少,随后在肿瘤植入后约70天开始扩增(图6D)。PTPN2和ZC3H12A的组合敲除导致肿瘤体积最初减少,随后在肿瘤植入后约80天开始扩增(图6E)。

[0477] 实施例3:体外验证针对靶基因的shRNA

[0478] 方法

[0479] shRNA介导的基因敲低

[0480] 对来自至少3名供体的T细胞进行改造以表达含有针对荧光素酶对照(SEQ ID NO:205和206)或针对CBLB(SEQ ID NO:23-46)、CISH(SEQ ID NO:73-95)、DGKA(SEQ ID NO:181-204)、DNMT3A(SEQ ID NO:96-122)、PTPN2(SEQ ID NO:123-146)、TET2(SEQ ID NO:147-175)或ZC3H12A(SEQ ID NO:176-180)的序列的shRNA模块。在改造后六天,使用Dynabeads MyOne链霉亲和素T1和生物素化抗Myc抗体进行磁富集。然后使通过使用抗Myc PE的流式细胞术测得的高纯度的经编辑的T细胞群体(即,>80%)溶解,并使用Dynabeads mRNA直接纯化试剂盒提取mRNA。在提取后,使用Quant-it RiboGreen RNA测定试剂盒对mRNA进行量化,并使用它来利用SuperScript IV第一链合成试剂盒合成cDNA。然后使用cDNA,利用TaqMan Fast Advanced Master Mix以及RPL13A、CBLB、CISH、DGKA、DNMT3A、PTPN2、TET2或ZC3H12A TaqMan测定进行实时定量逆转录PCR(qPCR)。使用ThermoFisher Scientific的设计和分析软件打开并导出原始数据。

[0481] 为了评估CD5敲低,对来自至少3名供体的T细胞进行改造以表达含有针对荧光素酶(对照)或针对CD5(SEQ ID NO:47-72)的序列的shRNA模块。在编辑后的六天,分别使用抗Myc AF647和抗CD5PE对T细胞进行染色以确定Myc和CD5表达,并通过流式细胞术在Attune NxT流式细胞仪上进行分析。通过取Myc+细胞除以Myc-细胞的CD5的gMFI之比来量化相对

CD5表达。然后将该值正规化为对照组的相对CD5表达以计算敲低。

[0482] 为了同时评估ZC3H12A shRNA(SEQ ID NO 176-180和205-207)的中靶和脱靶效应,利用ICT和针对ZC3H12A的单一shRNA对T细胞进行改造。作为对中靶、间接效应的阳性对照,用例示性MSLN/APLG逻辑门和针对ZC3H12A的单一的经过验证的sgRNA分开对细胞进行改造。改造后的六天,通过使用抗Myc抗体进行正向选择,富集了表达逻辑门的细胞。将富集的细胞沉淀物溶解并提取RNA。

[0483] 将富集的细胞沉淀物重新悬浮于裂解缓冲液中并转移至384孔板中。将带有UMI的条形码oligoDT引物分配至单个细胞溶解物中,并孵育样品以进行引物退火。将逆转录主混合物与稀释的ERCC合成对照分配至每个样品中,并将板孵育以进行逆转录。将逆转录样品汇集至一个反应中,并用Agencourt RNAClean XP珠粒进行纯化。将纯化的样品用核酸外切酶I消化,然后进行扩增。cDNA扩增后,用Agencourt SPRISelect XP珠粒纯化cDNA。将纯化的cDNA用Illumina转座酶标记并编制索引。在NovaSeq(Illumina)上进行测序之前,使用Tapestation对文库进行量化。每个细胞沉淀物至少有200万个目标读段用于测序

[0484] 使用STAR(v2.7.7a)和STARsolo模式将RNA-seq读段与GRCh38基因组进行比对,以删除重复的UMI,并通过HT-RNA样品条形码将读段分配至样品。还使用quantmode GeneCounts选项和Ensembl GRCh38基因组注释通过STAR对表达进行量化。使用edgeR(v3.34)进行差异表达分析。

[0485] 根据对照与shRNA或对照与sgRNA样品之间的比较来选择差异表达的基因(定义为FDR小于0.05)。从该过滤后的基因列表中,对对照与shRNA以及对照与sgRNA样品之间的log2倍数变化进行皮尔逊相关性检验,以确定相关系数和相关的p值。

[0486] 逻辑门控的CAR T生成

[0487] 从Leukopacks®中分离出供体的T细胞并冷冻以供日后使用。使用当天,将来自供体的T细胞解冻,并激活(第0天)。在激活后48小时,对T细胞进行改造(第2天)。为了对T细胞进行改造,将靶向指定位点的sgRNA与sNLS-SpCas9-sNLS核酸酶在室温下复合10分钟,形成核糖核蛋白混合物。然后将含有shRNA模块加上逻辑门CAR(SEQ ID NO:212)和primeR(SEQ ID NO:213)的质粒以及补充的Primary P3溶液添加至核糖核蛋白中并混合,其中所述shRNA模块含有针对荧光素酶(对照)或针对表6中列出的CBLB、CISH、DGKA、DNMT3A、PTPN2、TET2和/或ZC3H12A的组合的序列。将混合物添加至激活的T细胞中,并用Lonza 96孔穿梭系统进行电穿孔。在电穿孔后,使用补充有12.5ng/mL IL-7和IL-15的新鲜培养基恢复改造的T细胞。在第3天和第5天,用补充有12.5ng/mL IL-7和IL-15的新鲜培养基补足改造的T细胞。改造后的6天(第8天),对细胞进行加工以进行下游实验。

[0488] 表6详细列出了测试的shRNA组合

[0489]

组合	基因 1	基因 1 shRNA SEQ ID NO	基因 2	基因 2 shRNA SEQ ID NO
DNMT3A + CBLB	DNMT3A	111、120 和 122	CBLB	29、37、45 和 46
PTPN2 + CBLB	PTPN2	141、143 和 146	CBLB	29、37、44、45 和 46

[0490]

TET2 + CBLB	TET2	170 和 174	CBLB	29、37、44 和 46
CD5 + CISH	CD5	69、71 和 72	CISH	93、94 和 95
PTPN2 + CISH	PTPN2	141、143 和 146	CISH	93、94 和 95
PTPN2 + TET2	PTPN2	141、143 和 146	TET2	170 和 174
PTPN2 + ZC3H12A	ZC3H12A	141、143 和 146	ZC3H12A	176、177 和 178
TET2 + ZCH312A	TET2	170 和 174	ZCH312A	176 和 177

[0491] 逻辑门控CAR T的重复刺激测定体外评估

[0492] 在重复刺激测定中,通过双shRNA模块对ALPG/MSLN CAR加基因敲低与H1975靶细胞进行了比较。通过Myc表面蛋白标签使CAR+细胞富集经过改造的ALPG/MSLN逻辑门表达T细胞

[0493] 将H1975靶细胞以10,000个细胞/孔接种于96孔板中,并添加10,000Myc+CAR T,以使靶细胞与CAR的比率为1:1。通过靶细胞中的荧光标签和用于实时成像的Incucyte® 系统来监测靶细胞杀伤。每3天移出1/2的T细胞并将其接种于10,000个新鲜靶细胞上,总共进行4次靶细胞刺激。在重新接种期间,收集了1/4的T细胞针对CAR扩增进行流式分析。性能被量化为在增殖与靶细胞杀伤方面相对于单独CAR的改良倍数。

[0494] 结果

[0495] 为了评估shRNA阻抑靶基因表达的效率,进行了mRNA水平(CBLB、CISH、DNMT3、PTPN2、TET2、ZC3H12A和DGKA)的qPCR筛选和蛋白质水平(CD5)的流式细胞术筛选。shRNA筛选的结果如图7A-7H所示,并且每个基因的表现最佳的shRNA的基因表达量化列于表7中。

[0496] 表7提供了针对每个靶基因的表现最佳的shRNA的量化

[0497]

靶基因	shRNA	相对表达(平均值)	相对表达(标准偏差)	P 值	N	FDR (Bonferoni)
CBLB	CBLB_11	0.7811882902	0.1817449062	8.40E-03	24	2.02E-01
CBLB	CBLB_23	0.5064121824	0.09030256776	4.79E-03	24	1.15E-01
CBLB	CBLB_3	0.4653553889	0.086001324	2.48E-03	24	5.94E-02

[0498]

CBLB	CBLB_48	0.6400791195	0.2490622559	1.84E-02	24	4.42E-01
CBLB	CBLB_72	0.455072833	0.1699008204	7.80E-08	24	1.87E-06
CD5	CD5_10	0.3388466766	0.05749316079	5.79E-10	13	7.53E-09
CD5	CD5_3	0.3009034067	0.1194872431	4.73E-12	13	6.15E-11
CD5	CD5_9	0.3522695686	0.1236178504	9.74E-12	13	1.27E-10
CISH	CISH_4	0.5027719393	0.1036409325	2.29E-10	22	5.03E-09
CISH	CISH_40	0.4946740586	0.1272717367	1.76E-07	22	3.87E-06
CISH	CISH_81	0.5622487676	0.07461933061	6.89E-03	22	1.52E-01
DGKA	DGKA_11	0.5155510818	0.1016915177	9.51E-03	24	2.28E-01
DGKA	DGKA_5	0.5029489289	0.06581258898	4.90E-04	24	1.18E-02
DNMT3A	DNMT3A_1	0.5970636409	0.08779952857	5.73E-05	27	1.55E-03
DNMT3A	DNMT3A_23	0.7551843186	0.1879517037	2.64E-02	27	7.14E-01
DNMT3A	DNMT3A_55	0.6244501177	0.1499761015	5.05E-02	27	1.36E+00
DNMT3A	DNMT3A_9	0.6105194531	0.1681719158	6.90E-02	27	1.86E+00
PTPN2	PTPN2_13	0.3520551368	0.0842121105	6.76E-03	24	1.62E-01
PTPN2	PTPN2_19	0.4095567925	0.06622379553	1.25E-09	24	2.99E-08
PTPN2	PTPN2_7	0.3828885454	0.1008643433	2.75E-05	24	6.61E-04
TET2	TET2_106	0.6030034673	0.1775375391	1.63E-04	29	4.72E-03
TET2	TET2_14	0.5445736972	0.2174730229	2.27E-01	29	6.58E+00
TET2	TET2_54	0.503674663	0.1867663012	7.11E-04	29	2.06E-02
ZC3H12A	ZC3H12A_10	1.05319672	0.3104389546	7.16E-01	5	3.58E+00
ZC3H12A	ZC3H12A_106	1.067203569	0.287356382	6.28E-01	5	3.14E+00
ZC3H12A	ZC3H12A_86	1.181297584	0.2988798341	2.22E-01	5	1.11E+00

[0499] 进行RNAseq以进一步评估ZC3H12A shRNA的中靶和脱靶效应。观察到shRNA或sgRNA与对照之间差异表达的基因之间存在显著的正相关性(图8A-8H)。使用RNAseq或qRT-PCR观察到ZC3H12A的检测直接敲低的分辨率较低,因此根据相关性分析选择靶向ZC3H12A的shRNA进行进一步分析。

[0500] 进行了重复刺激测定,以评估组合基因靶向对例示性ALPG/MS LN逻辑门表达T细胞的性能的影响。对表6中列出的基因组合测试了选定的shRNA。

[0501] 对于每个基因组合,都鉴定出显著增强逻辑门表达T细胞的双shRNA(图9)。表8汇总了每个基因配对中表现最佳的双shRNA。

[0502] 表8提供了相对于对照逻辑门T细胞赋予增强性能的shRNA组合。

[0503]

基因对	基因 A	基因 B	组合性能(log_{10})
CBLBxDNMT3A	CBLB_48	DNMT3A_55	0.23
CBLBxDNMT3A	CBLB_3	DNMT3A_55	0.40
CBLBxDNMT3A	DNMT3A_55	CBLB_11	0.41
CBLBxDNMT3A	CBLB_3	DNMT3A_1	0.54
CBLBxDNMT3A	CBLB_11	DNMT3A_1	0.66
CBLBxDNMT3A	CBLB_48	DNMT3A_23	0.92
CBLBxDNMT3A	DNMT3A_1	CBLB_48	0.93
CBLBxDNMT3A	CBLB_72	DNMT3A_1	1.30
CBLBxDNMT3A	CBLB_72	DNMT3A_55	1.35
CBLBxPTPN2	CBLB_48	PTPN2_19	0.29
CBLBxPTPN2	PTPN2_19	CBLB_23	0.63
CBLBxPTPN2	PTPN2_7	CBLB_11	0.92
CBLBxPTPN2	CBLB_72	PTPN2_19	1.07
CBLBxPTPN2	CBLB_11	PTPN2_19	1.32
CBLBxPTPN2	CBLB_48	PTPN2_7	1.38
CBLBxPTPN2	CBLB_3	PTPN2_13	1.44
CBLBxPTPN2	CBLB_3	PTPN2_19	1.48
CBLBxPTPN2	CBLB_11	PTPN2_13	1.71
CBLBxTET22	CBLB_48	TET2_14	0.26
CBLBxTET22	CBLB_72	TET2_106	1.05
CBLBxTET22	TET2_106	CBLB_11	1.39
CBLBxTET22	CBLB_72	TET2_14	1.50
CBLBxTET22	CBLB_23	TET2_106	1.57
CBLBxTET22	CBLB_11	TET2_14	1.67
CD5xCISH	CD5_3	CISH_81	0.03
CD5xCISH	CISH_81	CD5_10	0.58
CD5xCISH	CD5_3	CISH_4	0.98
CD5xCISH	CD5_9	CISH_4	1.02
CD5xCISH	CISH_4	CD5_10	1.15
CISHxPTPN2	PTPN2_19	CISH_40	0.54
CISHxPTPN2	CISH_40	PTPN2_13	0.94
CISHxPTPN2	CISH_40	PTPN2_7	1.02
CISHxPTPN2	CISH_81	PTPN2_13	1.08
CISHxPTPN2	CISH_4	PTPN2_13	1.46
CISHxPTPN2	PTPN2_19	CISH_4	2.15
PTPN2xTET2	TET2_14	PTPN2_19	0.46
PTPN2xTET2	PTPN2_7	TET2_14	1.19
PTPN2xTET2	PTPN2_13	TET2_106	1.31

[0504]

PTPN2xZC3H12A	PTPN2_13	ZCH12A_14	0.26
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_13	ZC3H12A_106	0.41
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_7	ZC3H12A_86	0.68
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_13	ZC3H12A_86	0.75
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_19	ZC3H12A_10	0.87
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_7	ZC3H12A_10	1.12
PTPN2xZC3H12A	PTPN2_19	ZC3H12A_106	1.17
PTPN2xZC3H12A	ZC3H12A_86	PTPN2_19	1.34
TET2xZC3H12A	TET2_14	ZC3H12A_86	-0.08
TET2xZC3H12A	TET2_14	ZC3H12A_106	0.74
TET2xZC3H12A	TET2_106	ZC3H12A_86	1.41
TET2xZC3H12A	TET2_106	ZC3H12A_106	1.52

[0505] 尽管本发明已参考优选实施方案和各种替代性实施方案进行特定显示和描述,但相关领域技术人员将了解可在不脱离本发明的精神和范围下在其中进行各种形式和细节变化。

[0506] 在本说明书的主体内引用的所有参考文献、授权专利和专利申请都出于所有目的通过引用以其整体并入本文。

[0507] 非正式序列表

[0508]

SEQ ID NO	名称	序列
1	CD5 mRNA NCBI NM_014207	GAGATACCCGGCCAGACACCCTCACCTGCGGTGC CCAGCTGCCCAGGCTGAGGCAAGAGAAGGCCAG AAACCATGCCCATGGGGTCTCTGCAACCGCTGGC CACCTTGTACCTGCTGGGGATGCTGGTCGCTTCC TGCCTCGGACGGCTCAGCTGGTATGACCCAGATT TCCAGGCAAGGCTCACCCGTTCCAACTCGAAGT GCCAGGGCCAGCTGGAGGTCTACCTCAAGGACG GATGGCACATGGTTTGCAGCCAGAGCTGGGGCC GGAGCTCCAAGCAGTGGGAGGACCCCAGTCAAG CGTCAAAAGTCTGCCAGCGGCTGAACTGTGGGG TGCCCTTAAGCCTTGGCCCCTTCCTTGTCACCTAC ACACCTCAGAGCTCAATCATCTGCTACGGACAAC TGGGCTCCTTCTCCAACTGCAGCCACAGCAGAA ATGACATGTGTCACTCTCTGGGCCTGACCTGCTT AGAACCCCAGAAGACAACACCTCCAACGACAAG GCCCCCGCCCACCACAACTCCAGAGCCCACAGC TCCTCCCAGGCTGCAGCTGGTGGCACAGTCTGGC GGCCAGCACTGTGCCGGCGTGGTGGAGTTCTAC AGCGGCAGCCTGGGGGGTACCATCAGCTATGAG GCCCAGGACAAGACCCAGGACCTGGAGAACTTC

[0509]

		CTCTGCAACAACCTCCAGTGTGGCTCCTTCTTGA AGCATCTGCCAGAGACTGAGGCAGGCAGAGCCC AAGACCCAGGGGAGCCACGGGAACACCAGCCCT TGCCAATCCAATGGAAGATCCAGAACTCAAGCTG TACCTCCCTGGAGCATTGCTTCAGGAAAATCAAG CCCCAGAAAAGTGGCCGAGTTCTTGCCCTCCTTT GCTCAGGTTTCCAGCCCAAGGTGCAGAGCCGTC TGGTGGGGGGCAGCAGCATCTGTGAAGGCACCG TGGAGGTGCGCCAGGGGGCTCAGTGGGCAGCCC TGTGTGACAGCTCTTCAGCCAGGAGCTCGCTGCG GTGGGAGGAGGTGTGCCGGGAGCAGCAGTGTGG CAGCGTCAACTCCTATCGAGTGCTGGACGCTGGT GACCCAACATCCCGGGGGCTCTTCTGTCCCCATC AGAAGCTGTCCCAGTGCCACGAACTTTGGGAGA GAAATTCCTACTGCAAGAAGGTGTTTGTCACATG CCAGGATCCAAACCCCGCAGGCCTGGCCGCAGG CACGGTGGCAAGCATCATCCTGGCCCTGGTGCTC CTGGTGGTGCTGCTGGTCGTGTGCGGCCCCCTTG CCTACAAGAAGCTAGTGAAGAAATTCCGCCAGA AGAAGCAGCGCCAGTGGATTGGCCCAACGGGAA TGAACCAAAACATGTCTTTCCATCGCAACCACAC GGCAACCGTCCGATCCCATGCTGAGAACCCCACA GCCTCCCACGTGGATAACGAATACAGCCAACCTC CCAGGAACTCCCACCTGTCAGCTTATCCAGCTCT GGAAGGGGCTCTGCATCGCTCCTCCATGCAGCCT GACAACTCCTCCGACAGTGACTATGATCTGCATG GGGCTCAGAGGCTGTAAAGAACTGGGATCCATG AGCAAAAAGCCGAGAGCCAGACCTGTTTGTCCT GAGAAAACTGTCCGCTCTTCACTTGAAATCATGT CCCTATTTCTACCCCGGCCAGAACATGGACAGAG GCCAGAAGCCTTCCGGACAGGCGCTGCTGCCCC GAGTGGCAGGCCAGCTCACACTCTGCTGCACAA CAGCTCGGCCGCCCCTCCACTTGTGGAAGCTGTG GTGGGCAGAGCCCCAAAACAAGCAGCCTTCCAA CTAGAGACTCGGGGGTGTCTGAAGGGGGCCCCC TTTCCCTGCCCGCTGGGGAGCGGCGTCTCAGTGA AATCGGCTTTCTCCTCAGACTCTGTCCCTGGTAA GGAGTGACAAGGAAGCTCACAGCTGGGCGAGTG CATTTTGAATAGTTTTTTGTAAGTAGTGCTTTTCC TCCTTCCTGACAAATCGAGCGCTTTGGCCTCTTC TGTGCAGCATCCACCCCTGCGGATCCCTCTGGGG AGGACAGGAAGGGGACTCCCGGAGACCTCTGCA GCCGTGGTGGTCAGAGGCTGCTCACCTGAGCAC AAAGACAGCTCTGCACATTCACCGCAGCTGCCA GCCAGGGGTCTGGGTGGGCACCACCCTGACCCA CAGCGTCACCCCACTCCCTCTGTCTTATGACTCCC CTCCCCAACCCCCTCATCTAAAGACACCTTCCTTT CCACTGGCTGTCAAGCCCACAGGGCACCAGTGC CACCCAGGGCCCGGCACAAAGGGGCGCCTAGTA AACCTTAACCAACTTGGTTTTTTGCTTCACCCAG

			CAATTAAAAGTCCCAAGCTGAGGTAGTTTCAGTC CATCACAGTTCATCTTCTAACCCAAGAGTCAGAG ATGGGGCTGGTCATGTTCCTTTGGTTTGAATAACT CCCTTGACGAAAACAGACTCCTCTAGTACTTGGA GATCTTGGACGTACACCTAATCCCATGGGGCCTC GGCTTCCTTAACTGCAAGTGAGAAGAGGAGGTC TACCCAGGAGCCTCGGGTCTGATCAAGGGAGAG GCCAGGCGCAGCTCACTGCGGCGGCTCCCTAAG AAGGTGAAGCAACATGGGAACACATCCTAAGAC AGGTCCTTTCTCCACGCCATTTGATGCTGTATCTC CTGGGAGCACAGGCATCAATGGTCCAAGCCGCAT AATAAGTCTGGAAGAGCAAAAGGGAGTTACTAG GATATGGGGTGGGCTGCTCCCAGAATCTGCTCAG CTTTCTGCCCCCACCAACACCCTCCAACCAGGCC TTGCCTTCTGAGAGCCCCCGTGGCCAAGCCCAG GTCACAGATCTTCCCCCGACCATGCTGGGAATCC AGAAACAGGGACCCCATTTGTCTTCCCATATCTG GTGGAGGTGAGGGGGCTCCTCAAAAGGGAACTG AGAGGCTGCTCTTAGGGAGGGCAAAGGTTCGGG GGCAGCCAGTGTCTCCCATCAGTGCCTTTTTTAAT AAAAGCTCTTTCATCTATAGTTTGGCCACCATACA GTGGCCTCAAAGCAACCATGGCCTACTTAAAAAC CAAACCAAAAATAAAGAGTTTAGTTGAGGAGAA A
[0510]	2	CBLB mRNA NCBI NM_001321 786	GGGGCCGGGAAGGGGCCTGAGCAGGGAAGGGA CACAGGCGTCCTGAAACAAAGCTTTGGGTTGAG GGCAGAGGCGAGGAGCCAGAGAAGTGAACTCCT CCTTTCCGTGGCCGCTCTTGTCATTTTTCTCTTTT CTCTTTTCAAATGGGCTATTTGTGTGTTAATTTCAT TTGGTTCTTGGGAATAACGACTCACCGCGTTGAT TTAAAGAAAGAACTAAAATTCCAGATGGCAAACT CAATGAATGGCAGAAACCCTGGTGGTCGAGGAG GAAATCCCCGAAAAGGTCGAATTTTGGGTATTAT TGATGCTATTCAGGATGCAGTTGGACCCCCTAAG CAAGCTGCCGCAGATCGCAGGACCGTGGAGAAG ACTTGGAAGCTCATGGACAAAGTGGTAAGACTG TGCCAAAATCCCAAACTTCAGTTGAAAAATAGCC CACCATATATACTTGATATTTTGCCTGATACATATC AGCATTTACGACTTATATTGAGTAAATATGATGAC AACCAGAAACTTGCCCAACTCAGTGAGAATGAG TACTTTAAAATCTACATTGATAGCCTTATGAAAAA GTCAAAACGGGCAATAAGACTCTTTAAAGAAGG CAAGGAGAGAATGTATGAAGAACAGTCACAGGA CAGACGAAATCTCACAAAACTGTCCCTTATCTTC AGTCACATGCTGGCAGAAATCAAAGCAATCTTTC CCAATGGTCAATTCCAGGGAGATAACTTTCGTATC ACAAAAGCAGATGCTGCTGAATTCTGGAGAAAG TTTTTTGGAGACAAAACTATCGTACCATGGAAAG TATTCAGACAGTGCCTTCATGAGGTCCACCAGAT TAGCTCTGGCCTGGAAGCAATGGCTCTAAAATCA

[0511]

		ACAATTGATTTAACTTGCAATGATTACATTTCAGT TTTTGAATTTGATATTTTTACCAGGCTGTTTCAGC CTTGGGGCTCTATTTTGCGGAATTGGAATTTCTTA GCTGTGACACATCCAGGTTACATGGCATTTCTCA CATATGATGAAGTTAAAGCACGACTACAGAAATA TAGCACCAAACCCGGAAGCTATATTTTCCGGTTA AGTTGCACTCGATTGGGACAGTGGGCCATTGGCT ATGTGACTGGGGATGGGAATATCTTACAGACCAT ACCTCATAACAAGCCCTTATTTCAAGCCCTGATTG ATGGCAGCAGGGAAGGATTTTATCTTTATCCTGAT GGGAGGAGTTATAATCCTGATTTAACTGGATTATG TGAACCTACACCTCATGACCATATAAAAGTTACA CAGGAACAATATGAATTATATTGTGAAATGGGCTC CACTTTTCAGCTCTGTAAGATTTGTGCAGAGAAT GACAAAGATGTCAAGATTGAGCCTTGTGGGCATT TGATGTGCACCTCTTGCCTTACGGCATGGCAGGA GTCGGATGGTCAGGGCTGCCCTTTCTGTCGTTGT GAAATAAAAGGAACTGAGCCCATAATCGTGGACC CCTTTGATCCAAGAGATGAAGGCTCCAGGTGTTG CAGCATCATTGACCCCTTTGGCATGCCGATGCTAG ACTTGGACGACGATGATGATCGTGAGGAGTCCTT GATGATGAATCGGTTGGCAAACGTCCGAAAGTGC ACTGACAGGCAGAACTCACCAGTCACATCACCA GGATCCTCTCCCCTTGCCCAGAGAAGAAAGCCA CAGCCTGACCCACTCCAGATCCCACATCTAAGCC TGCCACCCGTGCCTCCTCGCCTGGATCTAATTCA GAAAGGCATAGTTAGATCTCCCTGTGGCAGCCCA ACGGGTTCACCAAAGTCTTCTCCTTGCATGGTGA GAAAACAAGATAAACCACTCCCAGCACCACCTC CTCCCTTAAGAGATCCTCCTCCACCGCCACCTGA AAGACCTCCACCAATCCCACCAGACAATAGACTG AGTAGACACATCCATCATGTGGAAAGCGTGCCTT CCAGAGACCCGCCAATGCCTCTTGAAGCATGGTG CCCTCGGGATGTGTTTGGGACTAATCAGCTTGTG GGATGTCGACTCCTAGGGGAGGGCTCTCCAAAA CCTGGAATCACAGCGAGTTCAAATGTCAATGGAA GGCACAGTAGAGTGGGCTCTGACCCAGTGCTTAT GCGGAAACACAGACGCCATGATTTGCCTTTAGAA GGAGCTAAGGTCTTTTCCAATGGTCACCTTGGAA GTGAAGAATATGATGTTCCTCCCCGGCTTTCTCCT CCTCCTCCAGTTACCACCCTCCTCCCTAGCATAAA GTGTACTGGTCCGTTAGCAAATTCTCTTTCAGAG AAAACAAGAGACCCAGTAGAGGAAGATGATGAT GAATACAAGATTCCTTCATCCCACCCTGTTTCCCT GAATTCACAACCATCTCATTGTCATAATGTAAAAC CTCCTGTTCGGTCTTGTGATAATGGTCACTGTATG CTGAATGGAACACATGGTCCATCTTCAGAGAAGA AATCAAACATCCCTGACTTAAGCATATATTTAAAG GGAGATGTTTTTGATTCAGCCTCTGATCCCGTGCC ATTACCACCTGCCAGGCCTCCAACTCGGGACAAT

[0512]

		CCAAAGCATGGTTCTTCACTCAACAGGACGCCCT CTGATTATGATCTTCTCATCCCTCCATTAGGTGAA GATGCTTTTGATGCCCTCCCTCCATCTCTCCCACC TCCCCCACCTCCTGCAAGGCATAGTCTCATTGAA CATTCAAAACCTCCTGGCTCCAGTAGCCGGCCAT CCTCAGGACAGGATCTTTTTCTTCTTCCTTCAGAT CCCTTTGTTGATCTAGCAAGTGGCCAAGTTCCTTT GCCTCCTGCTAGAAGGTTACCAGGTGAAAATGTC AAAACTAACAGAACATCACAGGACTATGATCAGC TTCCTTCATGTTCAGATGGTTCACAGGCACCAGC CAGACCCCCTAAACCACGACCGCGCAGGACTGC ACCAGAAATTCACCACAGAAAACCCCATGGGCC TGAGGCGGCATTGGAAAATGTCGATGCAAAAATT GCAAAACTCATGGGAGAGGGTTATGCCTTTGAAG AGGTGAAGAGAGCCTTAGAGATAGCCCAGAATA ATGTCGAAGTTGCCCGGAGCATCCTCCGAGAATT TGCCTTCCCTCCTCCAGTATCCCCACGTCTAAATC TATAGCAGCCAGAACTGTAGACACCAAAATGGAA AGCAATCGATGTATTCCAAGAGTGTGGAAATAAA GAGAACTGAGATGGAATTCAAGAGAGAAGTGTC TCCTCCTCGTGTAGCAGCTTGAGAAGAGGCTTGG GAGTGCAGCTTCTCAAAGGAGACCGATGCTTGCT CAGGATGTCGACAGCTGTGGCTTCCTTGTTTTTG CTAGCCATATTTTTAAATCAGGGTTGAACTGACAA AAATAATTTAAAGACGTTTACTTCCCTTGAACTTT GAACCTGTGAAATGCTTTACCTTGTTTACAGTTTG GCAAAGTTGCAGTTTGTTCTTGTTTTTAGTTTAGT TTTGTTTTGGTGTTTTGATACCTGTACTGTGTTCT TCACAGACCCTTTGTAGCGTGGTCAGGTCTGCTG TAACATTTCCCACCAACTCTCTTGCTGTCCACATC AACAGCTAAATCATTTATTCATATGGATCTCTACC ATCCCCATGCCTTGCCCAGGTCCAGTTCCATTTCT CTCATTCACAAGATGCTTTGAAGGTTCTGATTTTC AACTGATCAAACTAATGCAAAAAAAAAAAAGTA TGTATTCTTCACTACTGAGTTTCTTCTTTGGAAAC CATCACTATTGAGAGATGGGAAAAACCTGAATGT ATAAAGCATTTATTTGTCAATAAACTGCCTTTTGT AAGGGGTTTTCACATAACATAGAGGAGCTTCCCT TTTTTGTTTAAGTTTTGTAACCTTTAATCCTCCATA TTCTCATGTCTGTCATCCCAGGGGTGTCACAACT GTAAAAATCTACAATATTAGAAAGCAGCTACTAC AGATGTGGAAGAGAGAACACTTGTATAAGACAAT GCTGTACTGAAGTTATATAACAAGGTCCCCTGATA CTTATGCCTGCATTACTTTGAGGGATGCTGAATGA GAGGACCATCTCCCTGAAATATATTAATAATTTTC AGATAAAATTATGAACATAACATACCTTTTCTCAA GTGGAATTAGAGTTCATTTCCCATTTAAGTGATTA CACTCTATCTCCTAAGAGCTGTGGGAACCAGTTC ATATTGCAGTGGAAACATTAACTCTTCGTTGCACT GTTGAGTGTCAAGGCTACTGTGGCAATGTTTTTT

[0513]

		GCAAAGTTCTCAGTAATTTTCTCTCTGCAATCAA ATTAGAGTTCATATTTAATTTGCAGATTCTCTCATT CATTGCTCCACACTGCTTTATCAAATCAGGTGAA AGAAATTAATGTAGTTTTGCCTATTTTACAAAATG GTGGTTGGTTCTTTAAACACCATGTTATTACTCTT AATAAATCTACAAATATTTATTGAGCATCTATGATA TGCTTGGTGCTGTTAGGCACTGTGTTTTTAAAGC ACAAACTCTCAAAAGCTGATTCCAGCGTAATGTT TTATTTTTGTTTTTCTGTGTTTTTTATGACAAAGTC TGTCTGATAGACAAAGCCTGGAAGGTTTCCCCCA GGGCTTTAGAATTTAGAATTAGCTGGTTTTCATTT CAAATGGGAAATTAATGGAGAAATGAGATAAAAT CATCTCTGTGTAAATGCTTGAACCCACAGAAAGT TTTCTAAATATGGACTAATTGTGGGTTTGTGCATA TTTCTGTGTCTCCTCTTTTCACTTCACACCCACCA TGATATAAAAAGATGCATCAGAGAGTGAGCCTGC CTTCAGGACCTGAAAGGACATGACTGAACATCTA GTAGATCTGGTGGAAATTAATGTTATACAAAAGA CACGTAGACTAAGTTGACCCTGGGAGAGGAGTT AATACATTCCTTTGCAAAGTGACATGTGCCCTTTT TTTGACAGTCTGGCTTTCATGGTATGAGATGAGG ACTCACAGGCCTTGGGTAATTTCTGCTTTTGTATG AATTTTTTCAGATGGTTCTGAGCTGGTTATGTCCC TGGAGGGGAATTTTTCATTTGCCTTAGATGTTCTT CCCATGAGTAGGTACATGAGTGAAGTTTCTTACA CTTTTAAAATTGCATTGGCAAATTTTCTTTTGCTT TATGAACCCCTGTTTTGTCATTATGATTTTTCACTT GTTTTAACAGTTTCAGATGTCACCTTGGAATAGC ACTGTTTATTTTGGCCTTTTTATGATTGCTGATGAT AGGTACAGTCTAAAGGCCAAAAGTTGCCACTTC ATTGTGATAACATTGTTGCAACATTCCTAATATATT AGAGAATGATGTAAAATAAGAATGTTAGAGAACA TAGCACATTCTCATTCAGTTTATAAACAATATTTG AAAATTTCCAGTGAGAATTAAAAAAGGACTAGTG ATGATATAGCAAACCTGGACCTGAAATTTGGGGG TGGGGGGTGGGGGGATATCTGTTTTGCAGAGAAA ATTTACCAGCCTCCAGCAAAATCTCTGCATCTTGT ACTCAATAGCAACCATTAGTATTGTCATTTAAAAA GAATGAATCAAAAATTCATACGTAATGGAATGAA AAGAGGAAAACTTTCTATTAAACACTGTCAAGAA AGACCCATTGCTATCTATCACCTATGAAATTAAAC CTAAAAAAATTTTTTTTTATTGTAAAAGCGACTGC TCGTTGATGTCTGGAAGTGATCCAGACTTTGTTT CACTGTGATCCAAAAAGTTAGACATTCCTTCCATT TCTCAAGATTTGGTAACAATTTTTTTTTAAGTCAG CATTTCATATAATACATAAAATTAAGACAAATTAA CTTACTGATATGTGGCCAATATCAACCCTTCTCAC CCAACCCAAACATGTTCTGGAGATAGAAGGACTT ATCCTCAATTATATTCCAGTAAATTTATCTCCATAA TCTGTTTTATCCCCTAATGTATGATATATCTCACCA

[0514]

		AATTTTTCTAGAATTGAATAAAAGCAGTTTTTGCT TAACTTGAATTTCCTTCCACAAATACAACCTTCAG CTCTTCCCTCTCTGTTTCCCTTTTGCCCACATTGC AAATAGTCTTCATAATAGAACCCTCACTGCAACTT AAAAGGGTCCCATTTCTTAACTCAGCATTTCATAT ACCAAGAACACTTGCAAAGATTTCTTCATAATGT GATTTTTTAATTTTTCAGTTCCAGAAGCATTTCCT ACAGTTCGAACGTTATTTTTTCTCTCAGATTTTCA ACTTGAAGCTTTGATTTGCACTGAATTAACTTGG ATAAAATTTTAGTTTCTCTCTTCAGCTAACAGATT TGGAAGCAAATTACAGTATACTTGAATAATTCAG GTACTACCTGTTGACCTGGAATTTTAGTGATTCTG GGAAAGTTTTCCAGACAAAGACACCAATAGAGT GAAGGGTTTTTTCCCCAATTACTATTTTATTGTTTT TTAAAATGCCTTTTTAAAACTTGTGTGATGTGGCA AAATAGTCATATGTTCAATTAATTTATATTTTATTC ATTCCTTTTCAATTCTGGTTATTATGTAACCTCAAG TACTTTATCTGTTCTTTTAAAGTATTTTATAAAATG AACGTTAACTAAA
3	CISH mRNA NCBI NM_013324	AGTCCCTGTCCTGCGCCCGCGCGCCCCGGGAGC CTACCCAGCACGCGCTCCGCGCCCACTGGTTCCC TCCAGCCGCCGCCGTCCAGCCGAGTCCCCACTCC GGAGTCGCCGCTGCCGCGGGGACATGGTCCTCT GCGTTCAGGGGTGAGCACCCCCTTGTAAGCTCAG GGCTACTGTTGGGTGTCAGGGAACAAAGTTTTAG ACTGCTGCGCTCCAAAGCGGGCACACACATGTAC CTAGAACACACCAGCCACTGTCCCCACCATGATG ATGACACAGCCATGGACACACCCCTGCCCAGAC CTCGTCCTTTGCTGGCTGTGGAGCGGACTGGGCA GCGGCCCCTGTGGGCCCCGTCCCTGGAACTGCCC AAGCCAGTCATGCAGCCCTTGCCTGCTGGGGCCT TCCTCGAGGAGGTGGCAGAGGGTACCCCAGCCC AGACAGAGAGTGAGCCAAAGGTGCTGGACCCAG AGGAGGATCTGCTGTGCATAGCCAAGACCTTCTC CTACCTTCGGGAATCTGGCTGGTATTGGGGTTCC ATTACGGCCAGCGAGGCCCGACAACACCTGCAG AAGATGCCAGAAGGCACGTTCTTAGTACGTGACA GCACGCACCCCAGCTACCTGTTCACGCTGTCAGT GAAAACCACTCGTGGCCCCACCAATGTACGCATT GAGTATGCCGACTCCAGCTTCCGTCTGGACTCCA ACTGCTTGTCCAGGCCACGCATCCTGGCCTTTCC GGATGTGGTCAGCCTTGTGCAGCACTATGTGGCC TCCTGCACTGCTGATACCCGAAGCGACAGCCCCG ATCCTGCTCCCACCCCGGCCCTGCCTATGCCTAA GGAGGATGCGCCTAGTGACCCAGCACTGCCTGCT CCTCCACCAGCCACTGCTGTACACCTAAAACTGG TGCAGCCCTTTGTACGCAGAAGCAGTGCCCGCA GCCTGCAACACCTGTGCCGCCTTGTCATCAACCG TCTGGTGGCCGACGTGGACTGCCTGCCACTGCCC CGGCGCATGGCCGACTACCTCCGACAGTACCCCT

[0515]

		TCCAGCTCTGACTGTACGGGGCAATCTGCCCACC CTCACCCAGTCGCACCCTGGAGGGGACATCAGC CCCAGCTGGACTTGGGCCCCCACTGTCCCTCCTC CAGGCATCCTGGTGCCTGCATACCTCTGGCAGCT GGCCCAGGAAGAGCCAGCAAGAGCAAGGCATG GGAGAGGGGAGGTGTCACACAACTTGGAGGTAA ATGCCCCCAGGCCGCATGTGGCTTCATTATACTGA GCCATGTGTCAGAGGATGGGGAGACAGGCAGGA CCTTGTCTCACCTGTGGGCTGGGCCCAGACCTCC ACTCGCTTGCCTGCCCTGGCCACCTGAACTGTAT GGGCACTCTCAGCCCTGGTTTTTCAATCCCCAGG GTCGGGTAGGACCCCTACTGGCAGCCAGCCTCTG TTTCTGGGAGGATGACATGCAGAGGAACTGAGAT CGACAGTGACTAGTGACCCCTTGTTGAGGGGTAA GCCAGGCTAGGGGACTGCACAATTATACACTATT TATTTATTTATTCTCCTTGGGGTTGGTGTCAGGGG CGAGCCAACCCCACCTCTATGCCCTGAGCCCTGG TAGTCCAGAGACCCCAACTCTGCCCTGGCTTCTC TGGTTCTTCCCTGTGGAAAGCCCATCCTGAGACA TCTTGCTGGAACCAAGGCAATCCTGGATGTCCTG GTACTGACCCACCCGTCTGTGAATGTGTCCACTC TCTTCTGCCCCCAGCCATATTTGGGGAGGATGGA CAACTACAATAGGTAAGAAAATGCAGCCGGAGC CTCAGTCCCCAGCAGAGCCTGTGTCTCACCCCCT CACAGGACAGAGCTGTATCTGCATAGAGCTGGTC TCACTGTGGCGCAGGCCCCGGGGGGGAGTGCCTG TGCTGTCAGGAAGAGGGGGTGCTGGTTTGAGGG CCGCCACTGCAGTTCTGCTAGGTCTGCTTCCTGC CCAGGAAGGTGCCTGCACATGAGAGGAGAGAAA TACACGTCTGATAAGACTTCATGAAATAATAATTA TAGCAAAGAACAGTTTGGTGGTCTTTTCTCTTCC ACTGATTTTTCTGTAATGACATTATACCTTTATTAC CTCTTTATTTTATTACCTCTATAATAAAATGATACC TTTCATGTA
4	DGKA mRNA NCBI NM_201444	AGCTCGGGCTCCAGCTCCAGCGCCGGCGCTTCA GCTGCGACCGCGAGCCCTCTCAAGCAAGGTAGA GACCCCGCGAGCCCCCCAGCGCCCCACCCTCCC CCATCGGAAAAGGACAGGGGTAGGGAAGCCGAG GACCCACGGGCTGCGTTCGTGCTGCTGGGTCGG GAAGGAGGAAGCGTGACAGCTGGAGCGGGCCTA CCCTCTGAAGAGGTCCAAGCAACGGAAGTACTA CTACGAAGCTGCCTTTCTGGCCATCCTTGAGAAA AATAGACAGATGGCCAAGGAGAGGGGCCTAATA AGCCCCAGTGATTTTGCCCAGCTGCAAAAATACA TGGAATACTCCACCAAAAAGGTCAGTGATGTCCT AAAGCTCTTCGAGGATGGCGAGATGGCTAAATAT GTCCAAGGAGATGCCATTGGGTACGAGGGATTCC AGCAATTCCTGAAAATCTATCTCGAAGTGGATAAT GTTCCCAGACACCTAAGCCTGGCACTGTTTCAAT CCTTTGAGACTGGTCACTGCTTAAATGAGACAAA

[0516]

		TGTGACAAAAGATGTGGTGTGTCTCAATGATGTT TCCTGCTACTTTTCCCTTCTGGAGGGTGGTCGGC CAGAAGACAAGTTAGAATTCACCTTCAAGCTGTA CGACACGGACAGAAATGGGATCCTGGACAGCTC AGAAGTGGACAAAATTATCCTACAGATGATGCGA GTGGCTGAATACCTGGATTGGGATGTGTCTGAGC TGAGGCCGATTCTTCAGGAGATGATGAAAGAGAT TGACTATGATGGCAGTGGCTCTGTCTCTCAAGCT GAGTGGGTCCGGGCTGGGGCCACCACCGTGCCA CTGCTAGTGCTGCTGGGTCTGGAGATGACTCTGA AGGACGACGGACAGCACATGTGGAGGCCCAAGA GGTTCCCCAGACCAGTCTACTGCAATCTGTGCGA GTCAAGCATTGGTCTTGGCAAACAGGGACTGAG CTGTAACCTCTGTAAGTACACTGTTCACGACCAG TGTGCCATGAAAGCCCTGCCTTGTGAAGTCAGCA CCTATGCCAAGTCTCGGAAGGACATTGGTGTCCA ATCACATGTGTGGGTGCGAGGAGGCTGTGAGTCC GGGCGCTGCGACCGCTGTCAGAAAAAGATCCGG ATCTACCACAGTCTGACCGGGCTGCATTGTGTAT GGTGCCACCTAGAGATCCACGATGACTGCCTGCA AGCGGTGGGCCATGAGTGTGACTGTGGGCTGCT CCGGGATCACATCCTGCCTCCATCTTCCATCTATC CCAGTGTCCTGGCCTCTGGACCGGATCGTAAAAA TAGCAAAACAAGCCAGAAGACCATGGATGATTTA AATTTGAGCACCTCTGAGGCTCTGCGGATTGACC CTGTTCCTAACACCCACCCACTTCTCGTCTTTGTC AATCCTAAGAGTGGCGGGAAGCAGGGGCAAAGG GTGCTCTGGAAGTTCCAGTATATATTAAACCCTCG ACAGGTGTTCAACCTCCTAAAGGATGGTCCTGAG ATAGGGCTCCGATTATTCAAGGATGTTCCTGATAG CCGGATTTTGGTGTGTGGTGGAGACGGCACAGTA GGCTGGATTCTAGAGACCATTGACAAAGCTAACT TGCCAGTTTTGCCTCCTGTTGCTGTGTTGCCCCTG GGTACTGGAAATGATCTGGCTCGATGCCTAAGAT GGGGAGGAGGTTATGAAGGACAGAATCTGGCAA AGATCCTCAAGGATTTAGAGATGAGTAAAGTGGT ACATATGGATCGATGGTCTGTGGAGGTGATACCTC AACAAACTGAAGAAAAAAGTGACCCAGTCCCCT TTCAAATCATCAATAACTACTTCTCTATTGGCGTG GATGCCTCTATTGCTCATCGATTCCACATCATGCG AGAGAAATATCCGGAGAAGTTCAACAGCAGAAT GAAGAACAAGCTATGGTACTTCGAATTTGCCACA TCTGAATCCATCTTCTCAACATGCAAAAAGCTGG AGGAGTCTTTGACAGTTGAGATCTGTGGGAAAC CGCTGGATCTGAGCAACCTGTCCCTAGAAGGCAT CGCAGTGCTAAACATCCCTAGCATGCATGGTGGC TCCAACCTCTGGGGTGATACCAGGAGACCCCATG GGGATATCTATGGGATCAACCAGGCCTTAGGTGC TACAGCTAAAGTCATCACCGACCCTGATATCCTG AAAACCTGTGTACCAGACCTAAGTGACAAGAGA

[0517]

		CTGGAAGTGGTTGGGCTGGAGGGTGCAATTGAG ATGGGCCAAATCTATACCAAGCTCAAGAATGCTG GACGTCGGCTGGCCAAGTGCTCTGAGATCACCTT CCACACCACAAAAACCCTTCCCATGCAAATTGAC GGAGAACCCTGGATGCAGACGCCCTGTACAATCA AGATCACCCACAAGAACCAGATGCCCATGCTCAT GGGCCCACCCCCCCGCTCCACCAATTTCTTTGGC TTCTTGAGCTAAGGGGGACACCCTTGGCCTCCAA GCCAGCCTTGAACCCACCTCCCTGTCCCTGGACT CTACTCCCGAGGCTCTGTACATTGCTGCCACATAC TCCTGCCAGCTTGGGGGAGTGTTCCTTCACCCTC ACAGTATTTATTATCCTGCACCACCTCACTGTTCC CCATGCGCACACACATACACACACCCCAAAACAC ATACATTGAAAGTGCCTCATCTGAATAAAATGACT TGTGTTTCCCCTTTGGGATCTGCTAA
5	DGKZ mRNA NCBI NM_001105 540	CAAACTAGGACTTGCTCAGCAGAGGCCGCCAGC CCGGAGCTGGATCCAGAGCCCGGCCTTGGGGAC CCCAGCTCCCACCTGCGCCCTGCCTTCCAGATCA GCCAACCGCCTGCCATGGAGACTTTCTTTAGGAG ACATTTCCGGGGGAAGGTGCCAGGCCCTGGAGA GGGGCAGCAGCGGCCCAGCAGCGTGGGGCTGCC CACAGGCAAGGCCCGGCGTCGCTCCCCCGCTGG GCAGGCCTCCTCCTCACTGGCACAGCGGCGCCG CTCCAGCGCCCAGCTCCAGGGCTGCCTCCTGAGT TGCGGGGTGAGGGCCCAGGGTTCCAGCCGCCGG CGCTCCAGCACTGTGCCCCCTTCCTGCAACCCCC GCTTCATCGTGGATAAGGTGCTCACTCCACAGCC TACCACCGTGGGGGCCCAGCTTCTGGGTGCACCC CTGCTGTTGACCGGGCTTGTGGGCATGAATGAGG AGGAGGGTGTCCAGGAGGATGTGGTAGCCGAGG CATCGAGCGCCATCCAGCCAGGCACCAAGACAC CAGGGCCACCCCCACCTCGGGGCGCCCAGCCGC TGTTGCCCCTACCCCGCTACCTGCGCCGAGCCTC CTCCCACCTGCTCCCCGCGGATGCCGTATATGACC ACGCTCTCTGGGGCCTGCACGGCTACTATCGGCG CCTCAGCCAGCGGCGGCCCTCAGGCCAGCACCC TGGCCCTGGGGGCCGAAGAGCCTCAGGCACCAC CGCCGGCACCATGCTGCCCACCCGTGTGCGCCCA CTGTCCCGCAGGCGCCAGGTAGCCCTACGGCGC AAGGCGGCCGGACCCCAGGCCTGGAGCGCCCTG CTCGCGAAAGCCATCACCAAGTCGGGCCTCCAG CACCTGGCCCCCCCTCCGCCCACCCCTGGGGCCC CGTGCAGCGAGTCAGAGCGGCAGATCCGGAGTA CAGTGGACTGGAGCGAGTCAGCGACATATGGGG AGCACATCTGGTTCGAGACCAACGTGTCCGGGG ACTTCTGCTACGTTGGGGAGCAGTACTGTGTAGC CAGGATGCTGAAGTCAGTGTCTCGAAGAAAGTG CGCAGCCTGCAAGATTGTGGTGCACACGCCCTGC ATCGAGCAGCTGGAGAAGATAAATTTCCGCTGTA AGCCGTCCTTCCGTGAATCAGGCTCCAGGAATGT

[0518]

		CCGCGAGCCAACCTTTGTACGGCACCACTGGGTA CACAGACGACGCCAGGACGGCAAGTGTCGGCAC TGTGGGAAGGGATTCCAGCAGAAGTTCACCTTCC ACAGCAAGGAGATTGTGGCCATCAGCTGCTCGTG GTGCAAGCAGGCATACCACAGCAAGGTGTCCTG CTTCATGCTGCAGCAGATCGAGGAGCCGTGCTCG CTGGGGGTCCACGCAGCCGTGGTCATCCCGCCCA CCTGGATCCTCCGCGCCCGGAGGCCCCAGAATAC TCTGAAAGCAAGCAAGAAGAAGAAGAGGGCATC CTTCAAGAGGAAGTCCAGCAAGAAAGGGCCTGA GGAGGGCCGCTGGAGACCCTTCATCATCAGGCCC ACCCCCTCCCCGCTCATGAAGCCCCTGCTGGTGT TTGTGAACCCCAAGAGTGGGGGCAACCAGGGTG CAAAGATCATCCAGTCTTTCCTCTGGTATCTCAAT CCCCGACAAGTCTTCGACCTGAGCCAGGGAGGG CCCAAGGAGGCGCTGGAGATGTACCGCAAAGTG CACAACCTGCGGATCCTGGCGTGCGGGGGCGAC GGCACGGTGGGCTGGATCCTCTCCACCCTGGACC AGCTACGCCTGAAGCCGCCACCCCCTGTTGCCAT CCTGCCCCTGGGTACTGGCAACGACTTGGCCCGA ACCCTCAACTGGGGTGGGGGCTACACAGATGAG CCTGTGTCCAAGATCCTCTCCCACGTGGAGGAGG GGAACGTGGTACAGCTGGACCGCTGGGACCTCC ACGCTGAGCCCAACCCCGAGGCAGGGCCTGAGG ACCGAGATGAAGGCGCCACCGACCGGTTGCCCC TGGATGTCTTCAACAACTACTTCAGCCTGGGCTT TGACGCCCACGTCACCCTGGAGTTCCACGAGTCT CGAGAGGCCAACCCAGAGAAATTCAACAGCCGC TTTCGGAATAAGATGTTCTACGCCGGGACAGCTT TCTCTGACTTCCTGATGGGCAGCTCCAAGGACCT GGCCAAGCACATCCGAGTGGTGTGTGATGGAATG GACTTGACTCCCAAGATCCAGGACCTGAAACCC CAGTGTGTTGTTTTCCTGAACATCCCCAGGTACT GTGCGGGCACCATGCCCTGGGGCCACCCTGGGG AGCACCACGACTTTGAGCCCCAGCGGCATGACG ACGGCTACCTCGAGGTCATTGGCTTCACCATGAC GTCGTTGGCCGCGCTGCAGGTGGGCGGACACGG CGAGCGGCTGACGCAGTGTCGCGAGGTGGTGCT CACCACATCCAAGGCCATCCCGGTGCAGGTGGAT GGCGAGCCCTGCAAGCTTGCAGCCTCACGCATCC GCATCGCCCTGCGCAACCAGGCCACCATGGTGCA GAAGGCCAAGCGGCGGAGCGCCGCCCCCCTGCA CAGCGACCAGCAGCCGGTGCCAGAGCAGTTGCG CATCCAGGTGAGTCGCGTCAGCATGCACGACTAT GAGGCCCTGCACTACGACAAGGAGCAGCTCAAG GAGGCCTCTGTGCCGCTGGGCACTGTGGTGGTCC CAGGAGACAGTGACCTAGAGCTCTGCCGTGCCC ACATTGAGAGACTCCAGCAGGAGCCCGATGGTG CTGGAGCCAAGTCCCCGACATGCCAGAAACTGT CCCCCAAGTGGTGCTTCCTGGACGCCACCACTGC

[0519]

		CAGCCGCTTCTACAGGATCGACCGAGCCCAGGA GCACCTCAACTATGTGACTGAGATCGCACAGGAT GAGATTTATATCCTGGACCCTGAGCTGCTGGGGG CATCGGCCCGGCCTGACCTCCCAACCCCCACTTC CCCTCTCCCCACCTCACCCTGCTCACCCACGCCC CGGTCACTGCAAGGGGATGCTGCACCCCCTCAA GGTGAAGAGCTGATTGAGGCTGCCAAGAGGAAC GACTTCTGTAAGCTCCAGGAGCTGCACCGAGCTG GGGGCGACCTCATGCACCGAGACGAGCAGAGTC GCACGCTCCTGCACCACGCAGTCAGCACTGGCA GCAAGGATGTGGTCCGCTACCTGCTGGACCACGC CCCCCCAGAGATCCTTGATGCGGTGGAGGAAAA CGGGGAGACCTGTTTGCACCAAGCAGCGGCCCT GGGCCAGCGCACCATCTGCCACTACATCGTGGAG GCCGGGGCCTCGCTCATGAAGACAGACCAGCAG GGCGACACTCCCCGGCAGCGGGCTGAGAAGGCT CAGGACACCGAGCTGGCCGCCTACCTGGAGAAC CGGCAGCACTACCAGATGATCCAGCGGGAGGAC CAGGAGACGGCTGTGTAGCGGGCCGCCCACGGG CAGCAGGAGGGACAATGCGGCCAGGGGACGAG CGCCTTCCTTGCCCACCTCACTGCCACATTCCAG TGGGACGGCCACGGGGGGACCTAGGCCCCAGGG AAAGAGCCCCATGCCGCCCCCTAAGGAGCCGCC CAGACCTAGGGCTGGACTCAGGAGCTGGGGGGG CCTCACCTGTTCCCCTGAGGACCCCGCCGGACCC GGAGGCTCACAGGGAACAAGACACGGCTGGGTT GGATATGCCTTTGCCGGGGTTCTGGGGCAGGGCG CTCCCTGGCCGCAGCAGATGCCCTCCCAGGAGTG GAGGGGCTGGAGAGGGGGAGGCCTTCGGGAAG AGGCTTCCTGGGCCCCCTGGTCTTCGGCCGGGTC CCCAGCCCCCGCTCCTGCCCCACCCCACCTCCTC CGGGCTTCCTCCCGGAAACTCAGCGCCTGCTGCA CTTGCCTGCCCTGCCTTGCTTGGCACCCGCTCCG GCGACCCTCCCCGCTCCCCTGTCATTTCATCGCG GACTGTGCGGCCTGGGGGTGGGGGGCGGGACTC TCACGGTGACATGTTTACAGCTGGGTGTGACTCA GTAAAGTGGATTTTTTTTC
6	DNMT3A mRNA NM_022552	GCGCGGGCGGCGGCGGCGGCGAGAGCAGAGGA CGAGCCGGGACGCGGCGCCGCGGCACCAGGGCG CGCAGCCGGGCCGGCCCGACCCCACCGGCCATA CGGTGGAGCCATCGAAGCCCCCACCCACAGGCT GACAGAGGCACCGTTCACCAGAGGGCTCAACAC CGGGATCTATGTTTAAGTTTTAACTCTCGCCTCCA AAGACCACGATAATTCCTTCCCCAAAGCCCAGCA GCCCCCCAGCCCCGCGCAGCCCCAGCCTGCCTCC CGGCGCCCAGATGCCCGCCATGCCCTCCAGCGGC CCCGGGGACACCAGCAGCTCTGCTGCGGAGCGG GAGGAGGACCGAAAGGACGGAGAGGAGCAGGA GGAGCCGCGTGGCAAGGAGGAGCGCCAAGAGC CCAGCACCACGGCACGGAAGGTGGGGCGGCCTG

[0520]

		GGAGGAAGCGCAAGCACCCCCCGGTGGAAAGC GGTGACACGCCAAAGGACCCTGCGGTGATCTCC AAGTCCCCATCCATGGCCCAGGACTCAGGCGCCT CAGAGCTATTACCCAATGGGGACTTGGAGAAGCG GAGTGAGCCCCAGCCAGAGGAGGGGAGCCCTGC TGGGGGGCAGAAGGGCGGGGCCCCAGCAGAGG GAGAGGGTGCAGCTGAGACCCTGCCTGAAGCCT CAAGAGCAGTGGAAAATGGCTGCTGCACCCCCA AGGAGGGCCGAGGAGCCCCTGCAGAAGCGGGC AAAGAACAGAAGGAGACCAACATCGAATCCATG AAAATGGAGGGCTCCCGGGGCCGGCTGCGGGGT GGCTTGGGCTGGGAGTCCAGCCTCCGTCAGCGG CCCATGCCGAGGCTCACCTTCCAGGCGGGGGAC CCCTACTACATCAGCAAGCGCAAGCGGGACGAG TGGCTGGCACGCTGGAAAAGGGAGGCTGAGAAG AAAGCCAAGGTCATTGCAGGAATGAATGCTGTG GAAGAAAACCAGGGGCCCGGGGAGTCTCAGAA GGTGGAGGAGGCCAGCCCTCCTGCTGTGCAGCA GCCCACTGACCCCGCATCCCCCACTGTGGCTACC ACGCCTGAGCCCGTGGGGTCCGATGCTGGGGAC AAGAATGCCACCAAAGCAGGCGATGACGAGCCA GAGTACGAGGACGGCCGGGGCTTTGGCATTGGG GAGCTGGTGTGGGGGAAACTGCGGGGCTTCTCC TGGTGGCCAGGCCGCATTGTGTCTTGGTGGATGA CGGGCCGGAGCCGAGCAGCTGAAGGCACCCGCT GGGTCATGTGGTTCGGAGACGGCAAATTCTCAGT GGTGTGTGTTGAGAAGCTGATGCCGCTGAGCTCG TTTTGCAGTGCGTTCCACCAGGCCACGTACAACA AGCAGCCCATGTACCGCAAAGCCATCTACGAGGT CCTGCAGGTGGCCAGCAGCCGCGCGGGGAAGCT GTTCCCGGTGTGCCACGACAGCGATGAGAGTGA CACTGCCAAGGCCGTGGAGGTGCAGAACAAGCC CATGATTGAATGGGCCCTGGGGGGCTTCCAGCCT TCTGGCCCTAAGGGCCTGGAGCCACCAGAAGAA GAGAAGAATCCCTACAAAGAAGTGTACACGGAC ATGTGGGTGGAACCTGAGGCAGCTGCCTACGCA CCACCTCCACCAGCCAAAAAGCCCCGGAAGAGC ACAGCGGAGAAGCCCAAGGTCAAGGAGATTATT GATGAGCGCACAAGAGAGCGGCTGGTGTACGAG GTGCGGCAGAAGTGCCGGAACATTGAGGACATC TGCATCTCCTGTGGGAGCCTCAATGTTACCCTGG AACACCCCCTCTTCGTTGGAGGAATGTGCCAAAA CTGCAAGAACTGCTTTCTGGAGTGTGCGTACCAG TACGACGACGACGGCTACCAGTCCTACTGCACCA TCTGCTGTGGGGGCCGTGAGGTGCTCATGTGCGG AAACAACAACTGCTGCAGGTGCTTTTGCGTGGA GTGTGTGGACCTCTTGGTGGGGCCGGGGGCTGC CCAGGCAGCCATTAAGGAAGACCCCTGGAACTG CTACATGTGCGGGCACAAGGGTACCTACGGGCTG CTGCGGCGGCGAGAGGACTGGCCCTCCCGGCTC

[0521]

		CAGATGTTCTTCGCTAATAACCACGACCAGGAAT TTGACCCTCCAAAGGTTTACCCACCTGTCCCAGC TGAGAAGAGGAAGCCCATCCGGGTGCTGTCTCT CTTTGATGGAATCGCTACAGGGCTCCTGGTGCTG AAGGACTTGGGCATTCAGGTGGACCGCTACATTG CCTCGGAGGTGTGTGAGGACTCCATCACGGTGG GCATGGTGCGGCACCAGGGGAAGATCATGTACGT CGGGGACGTCCGCAGCGTCACACAGAAGCATAT CCAGGAGTGGGGCCCATTCGATCTGGTGATTGGG GGCAGTCCCTGCAATGACCTCTCCATCGTCAACC CTGCTCGCAAGGGCCTCTACGAGGGCACTGGCC GGCTCTTCTTTGAGTTCTACCGCCTCCTGCATGAT GCGCGGCCCAAGGAGGGAGATGATCGCCCCTTC TTCTGGCTCTTTGAGAATGTGGTGGCCATGGGCG TTAGTGACAAGAGGGACATCTCGCGATTTCTCGA GTCCAACCCTGTGATGATTGATGCCAAAGAAGTG TCAGCTGCACACAGGGCCCGCTACTTCTGGGGTA ACCTTCCCGGTATGAACAGGCCGTTGGCATCCAC TGTGAATGATAAGCTGGAGCTGCAGGAGTGTCTG GAGCATGGCAGGATAGCCAAGTTCAGCAAAGTG AGGACCATTACTACGAGGTCAAACTCCATAAAGC AGGGCAAAGACCAGCATTTTCCTGTCTTCATGAA TGAGAAAGAGGACATCTTATGGTGCACTGAAATG GAAAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCACTATACTG ACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGA GACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTGCCAGTCAT CCGCCACCTCTTCGCTCCGCTGAAGGAGTATTTT GCGTGTGTGTAAGGGACATGGGGGCAAACTGAG GTAGCGACACAAAGTTAAACAAACAAACAAAAA ACACAAAACATAATAAAACACCAAGAACATGAG GATGGAGAGAAGTATCAGCACCCAGAAGAGAAA AAGGAATTTAAAACAAAAACCACAGAGGCGGAA ATACCGGAGGGCTTTGCCTTGCGAAAAGGGTTGG ACATCATCTCCTGATTTTTCAATGTTATTCTTCAGT CCTATTTAAAAACAAAACCAAGCTCCCTTCCCTT CCTCCCCCTTCCCTTTTTTTTCGGTCAGACCTTTT ATTTTCTACTCTTTTCAGAGGGGTTTTCTGTTTGT TTGGGTTTTGTTTCTTGCTGTGACTGAAACAAGA AGGTTATTGCAGCAAAAATCAGTAACAAAAAATA GTAACAATACCTTGCAGAGGAAAGGTGGGAGAG AGGAAAAAAGGAAATTCTATAGAAATCTATATATT GGGTTGTTTTTTTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTT TGGGTTTTTTTTTTTACTATATATCTTTTTTTTGTTG TCTCTAGCCTGATCAGATAGGAGCACAAGCAGGG GACGGAAAGAGAGAGACACTCAGGCGGCAGCAT TCCCTCCCAGCCACTGAGCTGTCGTGCCAGCACC ATTCCTGGTCACGCAAAACAGAACCCAGTTAGCA GCAGGGAGACGAGAACACCACACAAGACATTTT TCTACAGTATTTCAGGTGCCTACCACACAGGAAA CCTTGAAGAAAATCAGTTTCTAGAAGCCGCTGTT

[0522]

		ACCTCTTGTTTACAGTTTATATATATATGATAGATAT GAGATATATATATAAAAGGTACTGTTAACTACTGT ACAACCCGACTTCATAATGGTGCTTTCAAACAGC GAGATGAGTAAAAACATCAGCTTCCACGTTGCCT TCTGCGCAAAGGGTTTCACCAAGGATGGAGAAA GGGAGACAGCTTGCAGATGGCGCGTTCTCACGG TGGGCTCTTCCCCTTGGTTTGTAACGAAGTGAAG GAGGAGAACTTGGGAGCCAGGTTCTCCCTGCCA AAAAGGGGGCTAGATGAGGTGGTCGGGCCCGTG GACAGCTGAGAGTGGGATTCATCCAGACTCATGC AATAACCCTTTGATTGTTTTCTAAAAGGAGACTC CCTCGGCAAGATGGCAGAGGGTACGGAGTCTTC AGGCCCAGTTTCTCACTTTAGCCAATTCGAGGGC TCCTTGTGGTGGGATCAGAACTAATCCAGAGTGT GGGAAAGTGACAGTCAAAACCCCACCTGGAGCA AATAAAAAAACATACAAAACGTACTGGTGCTTTC CTGTCTAAGTCGCCTTTTGTGTGTTCTTTTATGAG GCCCCCACCATCCACCCCTCTGTGCACAAGGCGG CTCCCGGCCCCTGGAATGTGATGTTTTTGGTCATC TCCAAAGGCTGCAGTTTTATACTGGGAGGCTGAT GACACCTTTTATTATAATTATTCTTATGGTTCTGGT TATAATTATGTTTGTTTTAAGATTTTCTTTAAGAAA ACAAAAACCCAACACCCTTCCCTTTAGGTTTCAA ACCAAGGTGCGGGAGCAGGGTGCTTCTGAGTTA GCGGTGGCTCTGGTGCCCTGGCTCCCACCCCTCG GGCCAGGTGGGCCACTGGGCATGGTGACAGCTG GGCGGCCAGGGAGTCCCCAAGGTCTGCCTTCTG GGCTTGTCACTCTTCTCTTCTACTTCCCCTCCTCT TGAGTCGGGTGTGTCAGGGCTGGAGGGAGGACC GGCCGTCTCTCTCCTTGTGTGTGTGATTGGAGTG GTGTGTATTTCTTTTCTAGTACTTGGTCTGATGATA GCTGTGCTCTTACCTCGAGTCAGCAGCACCTGGA GCCCCAAGTGCTCAACACTTTGTTCTACTTCCTA CAAGGCAGGCGGCCTGGCGTCAGTAGTAGGAAG GGATGGCATTGTTGGCTCCAGGGTGAGGGCCCG ACGGGCAGGTGCTTGCCTGGGTAGATGGGGTGTA GATATGTGGCATATAGAGATATATATTTTATAATGG GAGGGGGGATGGCACCTCCTGGGACTGGTAGAG CTGGGAGGTGTGTCGGCAAGCACATGGCCCCAA GTCCACGTCCCTAGAAAGATGGGGCCTACAGTGA TAGGCGCTCTATAAATACATAGATAGGGTCATGTT TAAGAAATATTATGGGGTGGGGAGTGGGGGAAGC AGGCTTAGTGTGCTGAGCCTCGGTCCCCACTGCA GACCTAAACCCCACACCAATCAGTCAATCTCACA CGCATACACAGGAGCATATTTCTGTACTGATGCAT AATGAATGCACTCACACACACACACACACGCCA GGGGGCTCCCAGCACTCTTCTCCCAGGGTTCAGG ACTTTGTGGAGTCAGCCCGTGCAGCTATTTACCT CTGTTGCCCTGATTGCAGGTAGACTGTCAATCCC AGAAGTTGCTAGGTGCTGAGGCAGGAAAGGAG

[0523]

		GAGGTTTCTTTTAGCAGGTGCTCTCCTCTAGCAG GTAGTGTTCTATCTCTTTTGCCCCTGGTGATGTCA AAAGATTCTTCTGTTAGCAACCTGTGATACTGAC CTGCAACTCTAGGCACCAGTCAAGTCAGCCCTCA ACTCCCCCTACCTATTCTCCCCAACTGAAATCAA ATTGACATCCAGGTCTGTCTTGGCCAGGGGGCTT CCATTGGGGAAAAAAAATGGGACAGTGAACCTC ACCTATTGAATAAACCAAATTAGTAATTAGTGACA AAACCAAACCAAGGCTTTGGACCCCCTGCTCATT ACTCAGGAGTAAATTCACACAGCTGGTGGCCGGT CTCACCCCTTTTTGGGGTGCTTGGTCCTGGACCC CAATCTACTGTCTCCTCGACAGATTGGTGTTTAAG ATCATGCCCAGTTGCTTCCTGTCACCTCTTGACA GGTGGTGACTGGGCTGCTGTGGGGCTGGAGCAG CGAGGAAGGGAGCCTCTGCCCCCTCAGTGGAGT CCCTGTGCTAACTGTGGTGCTCACCCAGCTCCTC CTTGCTCCCGCGGGGCTCTGTCCTTCGGGCCTGG AGTCCACCAGCGCCACTCCAGGAGGGCTGGGGG AGGAGGGGCTGCCTCAGGCAGTCCAAGGTGCTC CCTCCCCCGCTGGCCAATGCTAAGGTCTTCCCGG CTCCCAGGGTCAGGACAGAGTCTTCTAAGGCTCA GGCTCTCCCAAGCCACTGCTTAGTGACAGTTAGC CTTTCCCAGCGGCCCAAGCTCCACCGGAACTGG GCCTGGTGCTCCAACCAAAGGGTTGGTGTTGGG ACTTGGGAAGAGACTTGGTAGCCAAGGGCATGG CAAGCCTGGGGGATTCCTGTGGGCCGGCTTGCTC GAGGAGGGAGTGCTGGGCACAGAGGAGCCCTTA TGGCTGACAGCTTGAGAGCACTTGTTCCTCCAGA TCTAGCCACTTGACCAGGCCCTAGAATGGACCAG ATGCCCCAGGGGTCATGGCCCCCCCCCCCCCCCC CTTGCAGGGACGAGAGTTAACAATCACCAGCTTT TCTTCCGGCCCAGCCTGTGTGCTTGGTCTCACAG TAGAATTTAGGAGAGTGTGGGGCTTTGGGATTGT GCCAACTTGGCCAAGCTGAGATATGCTTAATCCA CCTCAACGCTGGGGCCTCTGGGGACAGGTATTGG GTCACCTTCCAAGGGGTGCTGAACTTCAGCAGG CTGTAGATAAGGCAGAGGTTAGAGGCAGTGGAG TGGGGGAACCAAGAAGGCCTAGGGAAAATTGCC AGGCATATTCCCTGTGGAATTTTCTTTCCGAAGAG TAGGCCCATTTCCCCCTTAGAAACAAGGGTTCTG GGGGCTGATGACAGCTTCCCCTGCAGGTGCCAG GTGGCGCATGATGCCAAAGAGATCCGTGGCTCTT GCCTGGGGGAGGTAGCCAGGTGCTCGTGCTGGG GACACAGTCCTTGGCCTCCTGCCTAAGCAGGAA GCTAGTTTCCAGCAGGCGGCTGGTACTAACCCCC CGCCCCACGGGAGCGACAGGCTGGTGCACCGGC AGACTGGGGGGCCGCAGGCGGGCACTAGCAGGG GTCTGCAGTCCATAGATGATGACATGAATCTGTTG CTGTCCTTTTGTCTCTAGGCCCCAGAGACTTCTTG CTATTGAACATCCTATTGGAAAGCAAACTTTCCA

[0524]

		AGAGAGCACCCGGGACCTGTTAGCTTTTGAAAC AGGCCTGGGTGTGATTGACTGGTAGAGATGCCTG TGTGATTTTTGGCGCATTGCAGGAGTGTGGATTG GGACAGGCACCCCAGCAGGAAGGAAGGCTGAC ACCAAAGGGGTCTCACAGGGCCCAGCTCCCCTT GCTTCCCGATAATTGGCCACCAGGCCATGGCGAC TCTGGGGAAGCCTAGATGGGAACACCCACCTTCT CCAGCAGTAGAAGGAATATTTCAGCAGAGCCATC TGGGAGATGTTCTTATAGGAAAACTGCAGTCATT CATTTCATAGTTTTGCTTATATAAATAGAGTACATT TGGGAGGCAGTTTTGAATTCCTGTTGCTACTCTG CTTGGTGCGGAGTTGCAGTGGCCCCAAGTGTCTT TCAGAGCTGTTGCTTTTAGGATCCCCCTCAAGCT GTGGGTTAGGGCCAGGGCAGGGAGGGGGTGCTG CCTGGCACTGTGCCCTGAAGAGGGCTGCTTGCTT CCTTTGGTCGGGAGCACGGCAGAGCCAACATTCT GGTGGGAACCGAGTTTCTAGCCAGGCCCCTGTTT TGGTCCCGGGAGGTGAGTAATCTGAGTTTGTCAT TGCGTATTCTCCACGCTGCCTGCTCTCAGTGCTG GAGACTAGAGAGCGACCCTGGAGTTGTCCTCTG GGAGTCCTGCCTGTTTGCCAGGGAGCAGCTGAA ACCTCCCCGCTCCCAATCCCGGGGGTGGAAAAG GTGTAGTGGAGGAATGGTCTGGAGCTGGGATGG CCCTTCTGGCCATGCCCTGCTGAGCCAGGATTAA GGAAAGTGTCAGCCGCCTCCTTACCAGGCCCTGT GCTGGGGTCAGGAGGACCGGGAGGAGAGGGAA GGGGTGAGAGGATGGACTCTGCTGTTGTAGTGTG AGCTCTGGAATCTTTACGTTTTGGTAAAGGCAGG CCAGGGTCTTTGAGGATCGAGTTGGGGAACCTTG CCTCTGTGTTTCCGAGACCCAGCTAAGGTGGGCC TTTGGTGGGTGACCTGTCTCTGACCCGAGGCAGC AGAGTTTTGGGGGAGGGAGAAACAAGCAAGGA GCAGGGAGGACAAGGACACAAGATCCCTTTGCT GGTGGTGACTTACTCACTTCCCCCACCAGAGGGC CTGGGACTCCCGAAACTCCCGTAACTGGAAAGC TCCCTGGCTCAGCTCCACTGGGGGGTGAGGAGG GCGGCTCCCTCAGCCCCAGCCTAGCGGCCTCCAA CCCTGTGCCTGAGAACATGAGCAGCGGTCTAAA GCATCCCCTAGTCCCATTTCACTTCACAGACCGAT TTGGTTGCACAGCCCTAGAATTCAACAGACAACA AAAATGCTGAAATTCCTTAGAATACGCAGAGGGA GGAGGTGACTCACCAAGGTGCTAAAACATTTTAT TAAAAATATATATTGTTAAATTAAGTCTGCTGTCTG GACAATGACTGTTTGTTTTGTTTTCTTGTAGTGGA GTTTAAAAGAGACTATTATTTTACTCTGATATATTA TTATTAAAAAGGCATTTTAACTTTGTACTTGAAAA CTAAATGAGCGATTTCATGTGTTTTAGCTGAGGC ATTGAAGTAGCGGGTGCTTACTTATTTGTGGGAA ATCATGTATTCATACTGAAGAATAAACTCCGTAGC TGATTTGGTAATAACTTTTACTGTTACAGACGATT

[0525]

		TCGCTTTGACCCCGGTGGCAGAGCACTTTTACTC CACATTCCACGCAGCTAAATGCAGGACTTCCCAG ACTCTTCCCTCCCCAGCCCTCTTTCCTTTCTCTTA AGTTCCTCTTTTCTCCTTTATTATTATTATTTTTTTT TCCTGGTTCCAGCATCCTTTCACCACTGTATTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTAGGGTTGCTTCTCTATTTATTGACAA TAATAATGTACATTTCACAGTCTGGTTCTAGGACA TTCAGGGAAGGGCGAGTGGGGGCCCGAGGGGTC CCTGCCCCACCCGCCTGGTGTCCTGTTGTATCTCT GTGTAAGTGATGCTCGTGACATAGCTGTTTATGAA ATAATTAAAGAGGTCAATGCGTACAACAGATGTA GAAAGTCTGTCAGTTCCGCCTTCATCACATTTTTT TTTGTGCCCAGAAGAATATAATAAAGCTCCTTTCT AATGTACTTGTGCTGGAGAACACTTGAATAAATG GACTGTTTTTGTGCAAAAAGAAAAA
7	MAP4K1 mRNA NCBI NM_001042 600	AGTTGAGCCCTGAGGCCCTGCTGGCCCCTGGGC GCAGGCCCAGCTCAGGCCCCCAGGGATGGACGT CGTGGACCCTGACATTTTCAATAGAGACCCCCGG GACCACTATGACCTGCTACAGCGGCTGGGTGGCG GCACGTATGGGGAAGTCTTTAAGGCTCGAGACA AGGTGTCAGGGGACCTGGTGGCACTGAAGATGG TGAAGATGGAGCCTGATGATGATGTCTCCACCCT TCAGAAGGAAATCCTCATATTGAAAACTTGCCGG CACGCCAACATCGTGGCCTACCATGGGAGTTATC TCTGGTTGCAGAAACTCTGGATCTGCATGGAATT CTGTGGGGCTGGTTCTCTCCAGGACATCTACCAA GTGACAGGCTCCCTGTCAGAGCTCCAGATTAGCT ATGTCTGCCGGGAAGTGCTCCAGGGACTGGCCTA TTTGCACTCACAGAAGAAGATACACAGGGACATC AAGGGAGCTAACATCCTCATCAATGATGCTGGGG AGGTCAGATTGGCTGACTTTGGCATCTCGGCCCA GATTGGGGCTACACTGGCCAGACGCCTCTCTTTC ATTGGGACACCCTACTGGATGGCTCCGGAAGTGG CAGCTGTGGCCCTGAAGGGAGGATACAATGAGC TGTGTGACATCTGGTCCCTGGGCATCACGGCCAT CGAACTGGCCGAGCTACAGCCACCGCTCTTTGAT GTGCACCCTCTCAGAGTTCTCTTCCTCATGACCA AGAGTGGCTACCAGCCTCCCCGACTGAAGGAAA AAGGCAAATGGTCGGCTGCCTTCCACAACTTCAT CAAAGTCACTCTGACTAAGAGTCCCAAGAAACG ACCCAGCGCCACCAAGATGCTCAGTCATCAACTG GTATCCCAGCCTGGGCTGAATCGAGGCCTGATCC TGGATCTTCTTGACAAACTGAAGAATCCCGGGAA AGGACCCTCCATTGGGGACATTGAGGATGAGGA GCCCGAGCTACCCCCTGCTATCCCTCGGCGGATC AGATCCACCCACCGCTCCAGCTCTCTGGGGATCC CAGATGCAGACTGCTGTCGGCGGCACATGGAGTT CAGGAAGCTCCGAGGAATGGAGACCAGACCCCC AGCCAACACCGCTCGCCTACAGCCTCCTCGAGAC

[0526]

		CTCAGGAGCAGCAGCCCCAGGAAGCAACTGTCA GAGTCGTCTGACGATGACTATGACGACGTGGACA TCCCCACCCCTGCAGAGGACACACCTCCTCCACT TCCCCCCAAGCCCAAGTTCCGTTCTCCATCAGAC GAGGGTCCTGGGAGCATGGGGGATGATGGGCAG CTGAGCCCGGGGGTGCTGGTCCGGTGTGCCAGT GGGCCCCCACCAAACAGCCCCCGTCCTGGGCCT CCCCCATCCACCAGCAGCCCCCACCTCACCGCCC ATTCAGAACCCTCACTCTGGAACCCACCCTCCCG GGAGCTTGACAAGCCCCCACTTCTGCCCCCCAA GAAGGAAAAGATGAAGAGAAAGGGATGTGCCCT TCTCGTAAAGTTGTTCAATGGCTGCCCCCTCCGG ATCCACAGCACGGCCGCCTGGACACATCCCTCCA CCAAGGACCAGCACCTGCTCCTGGGGGCAGAGG AAGGCATCTTCATCCTGAACCGGAATGACCAGGA GGCCACGCTGGAAATGCTCTTTCCTAGCCGGACT ACGTGGGTGTACTCCATCAACAACGTTCTCATGT CTCTCTCAGGAAAGACCCCCCACCTGTATTCTCA TAGCATCCTTGGCCTGCTGGAACGGAAAGAGAC CAGAGCAGGAAACCCCATCGCTCACATTAGCCCC CACCGCCTACTGGCAAGGAAGAACATGGTTTCCA CCAAGATCCAGGACACCAAAGGCTGCCGGGCGT GCTGTGTGGCGGAGGGTGCGAGCTCTGGGGGCC CGTTCCTGTGCGGTGCATTGGAGACGTCCGTTGT CCTGCTTCAGTGGTACCAGCCCATGAACAAATTC CTGCTTGTCCGGCAGGTGCTGTTCCCACTGCCGA CGCCTCTGTCCGTGTTCGCGCTGCTGACCGGGCC AGGCTCTGAGCTGCCCGCTGTGTGCATCGGCGTG AGCCCCGGGCGGCCGGGGAAGTCGGTGCTCTTC CACACGGTGCGCTTTGGCGCGCTCTCTTGCTGGC TGGGCGAGATGAGCACCGAGCACAGGGGACCCG TGCAGGTGACCCAGGTAGAGGAAGATATGGTGAT GGTGTTGATGGATGGCTCTGTGAAGCTGGTGACC CCGGAGGGGTCCCCAGTCCGGGGACTTCGCACA CCTGAGATCCCCATGACCGAAGCGGTGGAGGCC GTGGCTATGGTTGGAGGTCAGCTTCAGGCCTTCT GGAAGCATGGAGTGCAGGTGTGGGCTCTAGGCT CGGATCAGCTGCTACAGGAGCTGAGAGACCCTA CCCTCACTTTCCGTCTGCTTGGCTCCCCCAGGCC TGTAGTGGTGGAGACACGCCCAGTGGATGATCCT ACTGCTCCCAGCAACCTCTACATCCAGGAATGAG TCCCTAGGGGGGTGTCAGGAACTAGTCCTTGCAC CCCCTCCCCCCATAGACACACTAGTGGTCATGGCA TGTCCTCATCTCCCAATAAACATGACTTTAGCCTC TGC
8	NR4A1 mRNA NCBI NM_002135	AGTCCCAGTGGCGGAGGCTACGAAACTTGGGGG AGTGCACAGAAGAACTTCGGGAGCGCACGCGGG ACCAGGGACCAGGCTGAGACTCGGGGCGCCAGT CCGGGCAGGGGCAGCGGGAGCCGGCCGGGTAGG GTGCAGCCTGAGGCTTGTTCAGCAGAACAGGTG

[0527]

		CAAGCCACATTGTTGCCAAGACCTGCCTGAAGCC GGATTCTCCCCACTGCCTCCTTCAACCCCGCCTC TTCCTCCTCCTGTGGGACTGCTCCCCCCTCCTGT GAGGCTAGATAGATGCCCTGTATCCAAGCCCAAT ATGGGACACCAGCACCGAGTCCGGGACCCCGTG ACCACCTGGCAAGCGACCCCCTGACCCCTGAGT TCATCAAGCCCACCATGGACCTGGCCAGCCCCGA GGCAGCCCCCGCTGCCCCCACTGCCCTGCCCAGC TTCAGCACCTTCATGGACGGCTACACAGGAGAGT TTGACACCTTCCTCTACCAGCTGCCAGGAACAGT CCAGCCATGCTCCTCAGCCTCCTCCTCGGCCTCC TCCACATCCTCGTCCTCAGCCACCTCCCCTGCCT CTGCCTCCTTCAAGTTCGAGGACTTCCAGGTGTA CGGCTGCTACCCCGGCCCCCTGAGCGGCCCAGTG GATGAGGCCCTGTCCTCCAGTGGCTCTGACTACT ATGGCAGCCCCTGCTCGGCCCCGTCGCCCTCCAC GCCCAGCTTCCAGCCGCCCCAGCTCTCTCCCTGG GATGGCTCCTTCGGCCACTTCTCGCCCAGCCAGA CTTACGAAGGCCTGCGGGCATGGACAGAGCAGC TGCCCAAAGCCTCTGGGCCCCCACAGCCTCCAG CCTTCTTTTCCTTCAGTCCTCCCACCGGCCCCAG CCCCAGCCTGGCCCAGAGCCCCCTGAAGTTGTTC CCCTCACAGGCCACCCACCAGCTGGGGGAGGGA GAGAGCTATTCCATGCCTACGGCCTTCCCAGGTT TGGCACCCACTTCTCCACACCTTGAGGGCTCGGG GATACTGGATACACCCGTGACCTCAACCAAGGCC CGGAGCGGGGCCCCAGGTGGAAGTGAAGGCCGC TGTGCTGTGTGTGGGGACAACGCTTCATGCCAGC ATTATGGTGTCCGCACATGTGAGGGCTGCAAGGG CTTCTTCAAGCGCACAGTGCAGAAAAACGCCAA GTACATCTGCCTGGCTAACAAGGACTGCCCTGTG GACAAGAGGCGGCGAAACCGCTGCCAGTTCTGC CGCTTCCAGAAGTGCCTGGCGGTGGGCATGGTG AAGGAAGTTGTCCGAACAGACAGCCTGAAGGGG CGGCGGGGCCGGCTACCTTCAAAACCCAAGCAG CCCCCAGATGCCTCCCCTGCCAATCTCCTCACTTC CCTGGTCCGTGCACACCTGGACTCAGGGCCCAG CACTGCCAAACTGGACTACTCCAAGTTCCAGGA GCTGGTGCTGCCCCACTTTGGGAAGGAAGATGCT GGGGATGTACAGCAGTTCTACGACCTGCTCTCCG GTTCTCTGGAGGTCATCCGCAAGTGGGCGGAGA AGATCCCTGGCTTTGCTGAGCTGTCACCGGCTGA CCAGGACCTGTTGCTGGAGTCGGCCTTCCTGGAG CTCTTCATCCTCCGCCTGGCGTACAGGTCTAAGC CAGGCGAGGGCAAGCTCATCTTCTGCTCAGGCCT GGTGCTACACCGGCTGCAGTGTGCCCGTGGCTTC GGGGACTGGATTGACAGTATCCTGGCCTTCTCAA GGTCCCTGCACAGCTTGCTTGTCGATGTCCCTGC CTTCGCCTGCCTCTCTGCCCTTGTCCTCATCACCG ACCGGCATGGGCTGCAGGAGCCGCGGCGGGTGG

			AGGAGCTGCAGAACCGCATCGCCAGCTGCCTGA AGGAGCACGTGGCAGCTGTGGCGGGCGAGCCCC AGCCAGCCAGCTGCCTGTCACGTCTGTTGGGCA AACTGCCCGAGCTGCGGACCCTGTGCACCCAGG GCCTGCAGCGCATCTTCTACCTCAAGCTGGAGGA CTTGGTGCCCCCTCCACCCATCATTGACAAGATC TTCATGGACACGCTGCCCTTCTGACCCCTGCCTG GGAACACGTGTGCACATGCGCACTCTCATATGCC ACCCCATGTGCCTTTAGTCCACGGACCCCCAGAG CACCCCCAAGCCTGGGCTTGAGCTGCAGAATGA CTCCACCTTCTCACCTGCTCCAGGAGGTTTGCAG GGAGCTCAAGCCCTTGGGGAGGGGGATGCCTTC ATGGGGGTGACCCCACGATTTGTCTTATCCCCCCC AGCCTGGCCCCGGCCTTTATGTTTTTTGTAAGATA AACCGTTTTTAACACATAGCGCCGTGCTGTAAAT AAGCCCAGTGCTGCTGTAAATACAGGAAGAAAG AGCTTGAGGTGGGAGCGGGGCTGGGAGGAAGG GATGGGCCCCGCCTTCCTGGGCAGCCTTTCCAGC CTCCTGCTGGCTCTCTCTTCCTACCCTCCTTCCAC ATGTACATAAACTGTCACTCTAGGAAGAAGACAA ATGACAGATTCTGACATTTATATTTGTGTATTTTCC TGGATTTATAGTATGTGACTTTTCTGATTAATATAT TTAATATATTGAATAAAAAATAGACATGTAGTTGG AA
[0528]	9	PTPN2 mRNA NCBI NM_002828. 4	GCATGCGCCGCAGCGCCAGCGCTCTCCCCGGATC GTGCGGGGCCTGAGCCTCTCCGCCGGCGCAGGC TCTGCTCGCGCCAGCTCGCTCCCGCAGCCATGCC CACCACCATCGAGCGGGAGTTCGAAGAGTTGGA TACTCAGCGTCGCTGGCAGCCGCTGTACTTGGAA ATTCGAAATGAGTCCCATGACTATCCTCATAGAGT GGCCAAGTTTCCAGAAAACAGAAATCGAAACAG ATACAGAGATGTAAGCCCATATGATCACAGTCGT GTTAAACTGCAAAATGCTGAGAATGATTATATTAA TGCCAGTTTAGTTGACATAGAAGAGGCACAAAG GAGTTACATCTTAACACAGGGTCCACTTCCTAAC ACATGCTGCCATTTCTGGCTTATGGTTTGGCAGCA GAAGACCAAAGCAGTTGTCATGCTGAACCGCATT GTGGAGAAAGAATCGGTTAAATGTGCACAGTACT GGCCAACAGATGACCAAGAGATGCTGTTTAAAG AAACAGGATTCAGTGTGAAGCTCTTGTCAGAAG ATGTGAAGTCGTATTATACAGTACATCTACTACAA TTAGAAAATATCAATAGTGGTGAAACCAGAACAA TATCTCACTTTCATTATACTACCTGGCCAGATTTTG GAGTCCCTGAATCACCAGCTTCATTTCTCAATTTC TTGTTTAAAGTGAGAGAATCTGGCTCCTTGAACC CTGACCATGGGCCTGCGGTGATCCACTGTAGTGC AGGCATTGGGCGCTCTGGCACCTTCTCTCTGGTA GACACTTGTCTTGTTTTGATGGAAAAAGGAGATG ATATTAACATAAAACAAGTGTTACTGAACATGAG AAAATACCGAATGGGTCTTATTCAGACCCCAGAT

[0529]

		CAACTGAGATTCTCATACATGGCTATAATAGAAGG AGCAAAATGTATAAAGGGAGATTCTAGTATACAG AAACGATGGAAAGAACTTTCTAAGGAAGACTTAT CTCCTGCCTTTGATCATTCACCAAACAAAATAATG ACTGAAAAATACAATGGGAACAGAATAGGTCTAG AAGAAGAAAAACTGACAGGTGACCGATGTACAG GACTTTCCTCTAAAATGCAAGATACAATGGAGGA GAACAGTGAGAGTGCTCTACGGAAACGTATTCG AGAGGACAGAAAGGCCACCACAGCTCAGAAGG TGCAGCAGATGAAACAGAGGCTAAATGAGAATG AACGAAAAAGAAAAAGGTGGTTATATTGGCAAC CTATTCTCACTAAGATGGGGTTTATGTCAGTCATT TTGGTTGGCGCTTTTGTTGGCTGGACACTGTTTTT TCAGCAAAATGCCCTATAAACAATTAATTTTGCCC AGCAAGCTTCTGCACTAGTAACTGACAGTGCTAC ATTAATCATAGGGGTTTGTCTGCAGCAAACGCCT CATATCCCAAAAACGGTGCAGTAGAATAGACATC AACCAGATAAGTGATATTTACAGTCACAAGCCCA ACATCTCAGGACTCTTGACTGCAGGTTCCTCTGA ACCCCAAACTGTAAATGGCTGTCTAAAATAAAGA CATTCATGTTTGTTAAAAACTGGTAAATTTTGCAA CTGTATTCATACATGTCAAACACAGTATTTCACCT GACCAACATTGAGATATCCTTTATCACAGGATTTG TTTTTGGAGGCTATCTGGATTTTAACCTGCACTTG ATATAAGCAATAAATATTGTGGTTTTATCTACGTTA TTGGAAAGAAAATGACATTTAAATAATGTGTGTA ATGTATAATGTACTATTGACATGGGCATCAACACT TTTATTCTTAAGCATTTCAGGGTAAATATATTTTAT AAGTATCTATTTAATCTTTTGTAGTTAACTGTACTT TTTAAGAGCTCAATTTGAAAAATCTGTTACTAAA AAAATAAATTGTATGTCGATTGAATTGTACTGGAT ACATTTTCCATTTTTCTAAAGAGAAGTTTGATATG AGCAGTTAGAAGTTGGAATAAGCAATTTCTACTA TATATTGCATTTCTTTTATGTTTTACAGTTTTCCCC ATTTTAAAAAGAAAAGCAAACAAAGAAACAAAA GTTTTTCCTAAAAATATCTTTGAAGGAAAATTCTC CTTACTGGGATAGTCAGGTAAACAGTTGGTCAAG ACTTTGTAAAGAAATTGGTTTCTGTAAATCCCATT ATTGATATGTTTATTTTTCATGAAAATTTCAATGTA GTTGGGGTAGATTATGATTTAGGAAGCAAAAGTA AGAAGCAGCATTTTATGATTCATAATTTCAGTTTA CTAGACTGAAGTTTTGAAGTAAACACTTTTCAGT TTCTTTCTACTTCAATAAATAGTATGATTATATGCA AACCTTACATTGTCATTTTAACTTAATGAATATTTT TTAAAGCAAACTGTTTAATGAATTTAACTGCTCAT TTGAATGCTAGCTTTCCTCAGATTTCAACATTCCA TTCAGTGTTTAATTTGTCTTACTTAAACTTGAAAT TGTTGTTACAAATTTAATTGCTAGGAGGCATGGAT AGCATACATTATTATGGATAGCATACCTTATTTCAG TGGTTTTCAAACTATGCTCATTGGATGTCCAGGTG

[0530]

		GGTCAAGAGGTTACTTTCAACCACAGCATCTCTG CCTTGTCTCTTTATATGCCACATAAGATTTCTGCAT AAGGCTTAAGTATTTTAAAGGGGGCAGTTATCATT TAAAAACAGTTTGGTCGGGCGCGGTGGCTCATGC CTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAAGTGGG CAGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGC CTGGCCAACGTGGTGAAACACCATCTCTACTAAA AATGCAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGAGGGCA CCTGTAATCTCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGTAG GAGAATTGCTTGAACCCAGGAGATGGAGGTTGC AGTGAGCTGAGATCACGTCACTGCACTCCAGCC AGGGCGACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAGAA ACAAACAAAAAAAAACAGTTTGGGCCGGGTGTGG TGGCTCACGCTTGTAATCCCAGCACTTCGGAAGG CCAAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAAGAGATGG AGACTGTCCTGGCCAACATGGTGAAATCCCTTCT TTACTAAAAATACAAAAATTATCTGGGCGTGGTG GTGCATGCCTGTAGTCCCAGCTCCTTGGGAGGCT AAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGCAG AGGTTGCAGTGAGCCGAGATTGCACCACTGCAC TCCAGCCTGGCAACAGAGCAAGACTTCGTCTCA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTTGAAAACCATTG GTATAGATAGATATTTTGAATTGATTTGCATAGTCT CCTTGAATGTGTTAAATTATGTTGAAAGTATGAAA GCAGGATGTAGGTGGTACTACATATTAAATAAGAT TTATATAACA
10	TET2 mRNA NCBI XM_024454 103.2	AAACAGAAGGTGGGCCGGGGCGGGGAGAAACA GAACTCGGTCAATTTCCCAGTTTGTCGGGTCTTT AAAAATACAGGCCCCTAAAGCACTAAGGGCATGC CCTCGGTGAAACAGGGGAGCGCTTCTGCTGAAT GAGATTAAAGCGACAGAAAAGGGAAAGGAGAG CGCGGGCAACGGGATCTAAAGGGAGATAGAGAC GCGGGCCTCTGAGGGCTGGCAAACATTCAGCAG CACACCCTCTCAAGATTGTTTACTTGCCTTTGCTC CTGTTGAGTTACAACGCTTGGAAGCAGGAGATG GGCTCAGCAGCAGCCAATAGGACATGATCCAGG AAGAGCAGTAAGGGACTGAGCTGCTGAATTCAA CTAGAGGGCAGCCTTGTGGATGGCCCCGAAGCA AGCCTGATGGAACAGGATAGAACCAACCATGTTG AGGGCAACAGACTAAGTCCATTCCTGATACCATC ACCTCCCATTTGCCAGACAGAACCTCTGGCTACA AAGCTCCAGAATGGAAGCCCACTGCCTGAGAGA GCTCATCCAGAAGTAAATGGAGACACCAAGTGG CACTCTTTCAAAAGTTATTATGGAATACCCTGTAT GAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGTCCTGA CTTTACACAAGAAAGTAGAGGGTATTCCAAGTGT TTGCAAAATGGAGGAATAAAACGCACAGTTAGT GAACCTTCTCTCTCTGGGCTCCTTCAGATCAAGA AATTGAAACAAGACCAAAAGGCTAATGGAGAAA GACGTAACTTCGGGGTAAGCCAAGAAAGAAATC

[0531]

		CAGGTGAAAGCAGTCAACCAAATGTCTCCGATTT GAGTGATAAGAAAGAATCTGTGAGTTCTGTAGCC CAAGAAAATGCAGTTAAAGATTTCACCAGTTTTT CAACACATAACTGCAGTGGGCCTGAAAATCCAG AGCTTCAGATTCTGAATGAGCAGGAGGGGAAAA GTGCTAATTACCATGACAAGAACATTGTATTACTT AAAAACAAGGCAGTGCTAATGCCTAATGGTGCTA CAGTTTCTGCCTCTTCCGTGGAACACACACATGG TGAACTCCTGGAAAAAACACTGTCTCAATATTAT CCAGATTGTGTTTCCATTGCGGTGCAGAAAACCA CATCTCACATAAATGCCATTAACAGTCAGGCTACT AATGAGTTGTCCTGTGAGATCACTCACCCATCGC ATACCTCAGGGCAGATCAATTCCGCACAGACCTC TAACTCTGAGCTGCCTCCAAAGCCAGCTGCAGTG GTGAGTGAGGCCTGTGATGCTGATGATGCTGATA ATGCCAGTAAACTAGCTGCAATGCTAAATACCTG TTCCTTTCAGAAACCAGAACAACTACAACAACA AAAATCAGTTTTTGAGATATGCCCATCTCCTGCAG AAAATAACATCCAGGGAACCACAAAGCTAGCGT CTGGTGAAGAATTCTGTTCAGGTTCCAGCAGCAA TTTGCAAGCTCCTGGTGGCAGCTCTGAACGGTAT TTAAAACAAAATGAAATGAATGGTGCTTACTTCA AGCAAAGCTCAGTGTTCACTAAGGATTCCTTTTC TGCCACTACCACACCACCACCACCATCACAATTG CTTCTTTCTCCCCCTCCTCCTCTTCCACAGGTTCC TCAGCTTCCTTCAGAAGGAAAAAGCACTCTGAAT GGTGGAGTTTTAGAAGAACACCACCACTACCCC AACCAAAGTAACACAACACTTTTAAGGGAAGTG AAAATAGAGGGTAAACCTGAGGCACCACCTTCC CAGAGTCCTAATCCATCTACACATGTATGCAGCCC TTCTCCGATGCTTTCTGAAAGGCCTCAGAATAATT GTGTGAACAGGAATGACATACAGACTGCAGGGA CAATGACTGTTCCATTGTGTTCTGAGAAAACAAG ACCAATGTCAGAACACCTCAAGCATAACCCACCA ATTTTTGGTAGCAGTGGAGAGCTACAGGACAACT GCCAGCAGTTGATGAGAAACAAAGAGCAAGAGA TTCTGAAGGGTCGAGACAAGGAGCAAACACGAG ATCTTGTGCCCCCAACACAGCACTATCTGAAACC AGGATGGATTGAATTGAAGGCCCCTCGTTTTCAC CAAGCGGAATCCCATCTAAAACGTAATGAGGCAT CACTGCCATCAATTCTTCAGTATCAACCCAATCTC TCCAATCAAATGACCTCCAAACAATACACTGGAA ATTCCAACATGCCTGGGGGGCTCCCAAGGCAAG CTTACACCCAGAAAACAACACAGCTGGAGCACA AGTCACAAATGTACCAAGTTGAAATGAATCAAGG GCAGTCCCAAGGTACAGTGGACCAACATCTCCA GTTCCAAAAACCCTCACACCAGGTGCACTTCTCC AAAACAGACCATTTACCAAAAGCTCATGTGCAGT CACTGTGTGGCACTAGATTTCATTTTCAACAAAG AGCAGATTCCCAAACTGAAAAACTTATGTCCCCA

[0532]

		GTGTTGAAACAGCACTTGAATCAACAGGCTTCA GAGACTGAGCCATTTTCAAACTCACACCTTTTGC AACATAAGCCTCATAAACAGGCAGCACAAACAC AACCATCCCAGAGTTCACATCTCCCTCAAAACCA GCAACAGCAGCAAAAATTACAAATAAAGAATAA AGAGGAAATACTCCAGACTTTTCCTCACCCCCAA AGCAACAATGATCAGCAAAGAGAAGGATCATTCT TTGGCCAGACTAAAGTGGAAGAATGTTTTCATGG TGAAAATCAGTATTCAAAATCAAGCGAGTTCGAG ACTCATAATGTCCAAATGGGACTGGAGGAAGTAC AGAATATAAATCGTAGAAATTCCCCTTATAGTCAG ACCATGAAATCAAGTGCATGCAAAATACAGGTTT CTTGTTCAAACAATACACACCTAGTTTCAGAGAA TAAAGAACAGACTACACATCCTGAACTTTTTGCA GGAAACAAGACCCAAAACTTGCATCACATGCAA TATTTTCCAAATAATGTGATCCCAAAGCAAGATCT TCTTCACAGGTGCTTTCAAGAACAGGAGCAGAA GTCACAACAAGCTTCAGTTCTACAGGGATATAAA AATAGAAACCAAGATATGTCTGGTCAACAAGCTG CGCAACTTGCTCAGCAAAGGTACTTGATACATAA CCATGCAAATGTTTTTCCTGTGCCTGACCAGGGA GGAAGTCACACTCAGACCCCTCCCCAGAAGGAC ACTCAAAAGCATGCTGCTCTAAGGTGGCATCTCT TACAGAAGCAAGAACAGCAGCAAACACAGCAAC CCCAAACTGAGTCTTGCCATAGTCAGATGCACAG GCCAATTAAGGTGGAACCTGGATGCAAGCCACAT GCCTGTATGCACACAGCACCACCAGAAAACAAA ACATGGAAAAAGGTAACTAAGCAAGAGAATCCA CCTGCAAGCTGTGATAATGTGCAGCAAAAGAGC ATCATTGAGACCATGGAGCAGCATCTGAAGCAGT TTCACGCCAAGTCGTTATTTGACCATAAGGCTCTT ACTCTCAAATCACAGAAGCAAGTAAAAGTTGAA ATGTCAGGGCCAGTCACAGTTTTGACTAGACAAA CCACTGCTGCAGAACTTGATAGCCACACCCCAGC TTTAGAGCAGCAAACAACTTCTTCAGAAAAGAC ACCAACCAAAAGAACAGCTGCTTCTGTTCTCAAT AATTTTATAGAGTCACCTTCCAAATTACTAGATAC TCCTATAAAAAATTTATTGGATACACCTGTCAAGA CTCAATATGATTTCCCATCTTGCAGATGTGTAGAG CAAATTATTGAAAAAGATGAAGGTCCTTTTTATAC CCATCTAGGAGCAGGTCCTAATGTGGCAGCTATT AGAGAAATCATGGAAGAAAGGTTTGGACAGAAG GGTAAAGCTATTAGGATTGAAAGAGTCATCTATAC TGGTAAAGAAGGCAAAAGTTCTCAGGGATGTCC TATTGCTAAGTGGGTGGTTCGCAGAAGCAGCAGT GAAGAGAAGCTACTGTGTTTGGTGCGGGAGCGA GCTGGCCACACCTGTGAGGCTGCAGTGATTGTGA TTCTCATCCTGGTGTGGGAAGGAATCCCGCTGTC TCTGGCTGACAAACTCTACTCGGAGCTTACCGAG ACGCTGAGGAAATACGGCACGCTCACCAATCGCC

[0533]

		GGTGTGCCTTGAATGAAGAGAGAACTTGCGCCT GTCAGGGGCTGGATCCAGAAACCTGTGGTGCCT CCTTCTCTTTTGGTTGTTCATGGAGCATGTACTAC AATGGATGTAAGTTTGCCAGAAGCAAGATCCCAA GGAAGTTTAAGCTGCTTGGGGATGACCCAAAAG AGGAAGAGAAACTGGAGTCTCATTTGCAAAACC TGTCCACTCTTATGGCACCAACATATAAGAAACTT GCACCTGATGCATATAATAATCAGATTGAATATGA ACACAGAGCACCAGAGTGCCGTCTGGGTCTGAA GGAAGGCCGTCCATTCTCAGGGGTCACTGCATGT TTGGACTTCTGTGCTCATGCCCACAGAGACTTGC ACAACATGCAGAATGGCAGCACATTGGTATGCAC TCTCACTAGAGAAGACAATCGAGAATTTGGAGG AAAACCTGAGGATGAGCAGCTTCACGTTCTGCCT TTATACAAAGTCTCTGACGTGGATGAGTTTGGGA GTGTGGAAGCTCAGGAGGAGAAAAAACGGAGT GGTGCCATTCAGGTACTGAGTTCTTTTCGGCGAA AAGTCAGGATGTTAGCAGAGCCAGTCAAGACTT GCCGACAAAGGAAACTAGAAGCCAAGAAAGCTG CAGCTGAAAAGCTTTCCTCCCTGGAGAACAGCT CAAATAAAAATGAAAAGGAAAAGTCAGCCCCAT CACGTACAAAACAAACTGAAAACGCAAGCCAGG CTAAACAGTTGGCAGAACTTTTGCGACTTTCAGG ACCAGTCATGCAGCAGTCCCAGCAGCCCCAGCC TCTACAGAAGCAGCCACCACAGCCCCAGCAGCA GCAGAGACCCCAGCAGCAGCAGCCACATCACCC TCAGACAGAGTCTGTCAACTCTTATTCTGCTTCTG GATCCACCAATCCATACATGAGACGGCCCAATCC AGTTAGTCCTTATCCAAACTCTTCACACACTTCA GATATCTATGGAAGCACCAGCCCTATGAACTTCTA TTCCACCTCATCTCAAGCTGCAGGTTCATATTTGA ATTCTTCTAATCCCATGAACCCTTACCCTGGGCTT TTGAATCAGAATACCCAATATCCATCATATCAATG CAATGGAAACCTATCAGTGGACAACTGCTCCCCA TATCTGGGTTCCTATTCTCCCCAGTCTCAGCCGAT GGATCTGTATAGGTATCCAAGCCAAGACCCTCTG TCTAAGCTCAGTCTACCACCCATCCATACACTTTA CCAGCCAAGGTTTGGAAATAGCCAGAGTTTTACA TCTAAATACTTAGGTTATGGAAACCAAAATATGCA GGGAGATGGTTTCAGCAGTTGTACCATTAGACCA AATGTACATCATGTAGGGAAATTGCCTCCTTATCC CACTCATGAGATGGATGGCCACTTCATGGGAGCC ACCTCTAGATTACCACCCAATCTGAGCAATCCAA ACATGGACTATAAAAATGGTGAACATCATTCACC TTCTCACATAATCCATAACTACAGTGCAGCTCCGG GCATGTTCAACAGCTCTCTTCATGCCCTGCATCTC CAAAACAAGGAGAATGACATGCTTTCCCACACA GCTAATGGGTTATCAAAGATGCTTCCAGCTCTTAA CCATGATAGAACTGCTTGTGTCCAAGGAGGCTTA CACAAATTAAGTGATGCTAATGGTCAGGAAAAGC

[0534]

		AGCCATTGGCACTAGTCCAGGGTGTGGCTTCTGG TGCAGAGGACAACGATGAGGTCTGGTCAGACAG CGAGCAGAGCTTTCTGGATCCTGACATTGGGGGA GTGGCCGTGGCTCCAACTCATGGGTCAATTCTCA TTGAGTGTGCAAAGCGTGAGCTGCATGCCACAA CCCCTTTAAAGAATCCCAATAGGAATCACCCCAC CAGGATCTCCCTCGTCTTTTACCAGCATAAGAGC ATGAATGAGCCAAAACATGGCTTGGCTCTTTGGG AAGCCAAAATGGCTGAAAAAGCCCGTGAGAAAG AGGAAGAGTGTGAAAAGTATGGCCCAGACTATG TGCCTCAGAAATCCCATGGCAAAAAAGTGAAAC GGGAGCCTGCTGAGCCACATGAAACTTCAGAGC CCACTTACCTGCGTTTCATCAAGTCTCTTGCCGA AAGGACCATGTCCGTGACCACAGACTCCACAGT AACTACATCTCCATATGCCTTCACTCGGGTCACAG GGCCTTACAACAGATATATATGATATCACCCCCTT TTGTTGGTTACCTCACTTGAAAAGACCACAACCA ACCTGTCAGTAGTATAGTTCTCATGACGTGGGCA GTGGGGAAAGGTCACAGTATTCATGACAAATGTG GTGGGAAAAACCTCAGCTCACCAGCAACAAAAG AGGTTATCTTACCATAGCACTTAATTTTCACTGGC TCCCAAGTGGTCACAGATGGCATCTAGGAAAAG ACCAAAGCATTCTATGCAAAAAGAAGGTGGGGA AGAAAGTGTTCCGCAATTTACATTTTTAAACACT GGTTCTATTATTGGACGAGATGATATGTAAATGTG ATCCCCCCCCCCCCGCTTACAACTCTACACATCTGT GACCACTTTTAATAATATCAAGTTTGCATAGTCAT GGAACACAAATCAAACAAGTACTGTAGTATTACA GTGACAGGAATCTTAAAATACCATCTGGTGCTGA ATATATGATGTACTGAAATACTGGAATTATGGCTTT TTGAAATGCAGTTTTTACTGTAATCTTAACTTTTAT TTATCAAAATAGCTACAGGAAACATGAATAGCAG GAAAACACTGAATTTGTTTGGATGTTCTAAGAAA TGGTGCTAAGAAAATGGTGTCTTTAATAGCTAAA AATTTAATGCCTTTATATCATCAAGATGCTATCAGT GTACTCCAGTGCCCTTGAATAATAGGGGTACCTTT TCATTCAAGTTTTTATCATAATTACCTATTCTTACA CAAGCTTAGTTTTTAAAATGTGGACATTTTAAAG GCCTCTGGATTTTGCTCATCCAGTGAAGTCCTTGT AGGACAATAAACGTATATATGTACATATATACACA AACATGTATATGTGCACACACATGTATATGTATAA ATATTTTAAATGGTGTTTTAGAAGCACTTTGTCTA CCTAAGCTTTGACAACTTGAACAATGCTAAGGTA CTGAGATGTTTAAAAAACAAGTTTACTTTCATTTT AGAATGCAAAGTTGATTTTTTTAAGGAAACAAAG AAAGCTTTTAAAATATTTTTGCTTTTAGCCATGCA TCTGCTGATGAGCAATTGTGTCCATTTTTAACACA GCCAGTTAAATCCACCATGGGGCTTACTGGATTC AAGGGAATACGTTAGTCCACAAAACATGTTTTCT GGTGCTCATCTCACATGCTATACTGTAAAACAGTT

[0535]

		TTATACAAAATTGTATGACAAGTTCATTGCTCAAA AATGTACAGTTTTAAGAATTTTCTATTAACTGCAG GTAATAATTAGCTGCATGCTGCAGACTCAACAAA GCTAGTTCACTGAAGCCTATGCTATTTTATGGATC ATAGGCTCTTCAGAGAACTGAATGGCAGTCTGCC TTTGTGTTGATAATTATGTACATTGTGACGTTGTC ATTTCTTAGCTTAAGTGTCCTCTTTAACAAGAGGA TTGAGCAGACTGATGCCTGCATAAGATGAATAAA CAGGGTTAGTTCCATGTGAATCTGTCAGTTAAAA AGAAACAAAAACAGGCAGCTGGTTTGCTGTGGT GGTTTTAAATCATTAATTTGTATAAAGAAGTGAAA GAGTTGTATAGTAAATTAAATTGTAAACAAAACTT TTTTAATGCAATGCTTTAGTATTTTAGTACTGTAAA AAAATTAAATATATACATATATATATATATATATATAT ATATATATATGAGTTTGAAGCAGAATTCACATCAT GATGGTGCTACTCAGCCTGCTACAAATATATCATA ATGTGAGCTAAGAATTCATTAAATGTTTGAGTGAT GTTCCTACTTGTCATATACCTCAACACTAGTTTGG CAATAGGATATTGAACTGAGAGTGAAAGCATTGT GTACCATCATTTTTTTCCAAGTCCTTTTTTTTATTG TTAAAAAAAAAAGCATACCTTTTTTCAATACTTG ATTTCTTAGCAAGTATAACTTGAACTTCAACCTTT TTGTTCTAAAAATTCAGGGATATTTCAGCTCATGC TCTCCCTATGCCAACATGTCACCTGTGTTTATGTA AAATTGTTGTAGGTTAATAAATATATTCTTTGTCA GGGATTTAACCCTTTTATTTTGAATCCCTTCTATTT TACTTGTACATGTGCTGATGTAACTAAAACTAATT TTGTAAATCTGTTGGCTCTTTTTATTGTAAAGAAA AGCATTTTAAAAGTTTGAGGAATCTTTTGACTGTT TCAAGCAGGAAAAAAAAATTACATGAAAATAGA ATGCACTGAGTTGATAAAGGGAAAAATTGTAAGG CAGGAGTTTGGCAAGTGGCTGTTGGCCAGAGAC TTACTTGTAACTCTCTAAATGAAGTTTTTTTGATC CTGTAATCACTGAAGGTACATACTCCATGTGGACT TCCCTTAAACAGGCAAACACCTACAGGTATGGTG TGCAACAGATTGTACAATTACATTTTGGCCTAAAT ACATTTTTGCTTACTAGTATTTAAAATAAATTCTTA ATCAGAGGAGGCCTTTGGGTTTTATTGGTCAAAT CTTTGTAAGCTGGCTTTTGTCTTTTTAAAAAATTT CTTGAATTTGTGGTTGTGTCCAATTTGCAAACATT TCCAAAAATGTTTGCTTTGCTTACAAACCACATG ATTTTAATGTTTTTTGTATACCATAATATCTAGCCC CAAACATTTGATTACTACATGTGCATTGGTGATTT TGATCATCCATTCTTAATATTTGATTTCTGTGTCAC CTACTGTCATTTGTTAAACTGCTGGCCAACAAGA ACAGGAAGTATAGTTTGGGGGGTTGGGGAGAGT TTACATAAGGAAGAGAAGAAATTGAGTGGCATAT TGTAAATATCAGATCTATAATTGTAAATATAAAACC TGCCTCAGTTAGAATGAATGGAAAGCAGATCTAC AATTTGCTAATATAGGAATATCAGGTTGACTATATA

[0536]

		GCCATACTTGAAAATGCTTCTGAGTGGTGTCAAC TTTACTTGAATGAATTTTTCATCTTGATTGACGCA CAGTGATGTACAGTTCACTTCTGAAGCTAGTGGT TAACTTGTGTAGGAAACTTTTGCAGTTTGACACT AAGATAACTTCTGTGTGCATTTTTCTATGCTTTTTT AAAAACTAGTTTCATTTCATTTTCATGAGATGTTT GGTTTATAAGATCTGAGGATGGTTATAAATACTGT AAGTATTGTAATGTTATGAATGCAGGTTATTTGAA AGCTGTTTATTATTATATCATTCCTGATAATGCTAT GTGAGTGTTTTTAATAAAATTTATATTTATTTAATG CACTCTAA
11	ZC3H12A mRNA NCBI XM_011542 198	AGGACTCGGCCCCATGGAGACGCCGCCGGCCGC CGCTGGCGCATGGCGGGTAGGAGCTGTGGCGCG GGGCCTTCCAGGAGTCTGAGCTATGAGTGGCCCC TGTGGAGAGAAGCCTGTCCTGGAAGCCAGCCCC ACCATGAGTCTGTGGGAATTTGAGGACAGCCAC AGCCGTCAGGGCACCCCAAGGCCGGGTCAAGAG CTGGCCGCTGAGGAGGCCTCGGCCCTGGAACTG CAGATGAAGGTGGACTTCTTCCGGAAGCTGGGC TATTCATCCACGGAGATCCACAGCGTCCTGCAGA AGCTGGGCGTCCAGGCAGACACCAACACGGTGC TGGGTGAGCTGGTGAAACACGGGACAGCCACCG AGCGGGAGCGCCAGACCTCACCGGACCCCTGCC CTCAGCTCCCTCTAGTCCCGCGGGGTGGTGGCAC CCCTAAGGCTCCCAACCTGGAGCCTCCACTCCCA GAAGAGGAAAAGGAGGGCAGCGACCTGAGACC AGTGGTCATCGATGGGAGCAACGTGGCCATGAG CCATGGGAACAAGGAGGTCTTCTCCTGCCGGGG CATCCTGCTGGCAGTGAACTGGTTTCTGGAGCGG GGCCACACAGACATCACAGTGTTTGTGCCATCCT GGAGGAAGGAGCAGCCTCGGCCCGACGTGCCCA TCACAGACCAGCACATCCTGCGGGAACTGGAGA AGAAGAAGATCCTGGTGTTCACACCATCACGAC GCGTGGGTGGCAAGCGGGTGGTGTGCTATGACG ACAGATTCATTGTGAAGCTGGCCTACGAGTCTGA CGGGATCGTGGTTTCCAACGACACATACCGTGAC CTCCAAGGCGAGCGGCAGGAGTGGAAGCGCTTC ATCGAGGAGCGGCTGCTCATGTACTCCTTCGTCA ATGACAAGCTTGCCATCGGCCCCTTCTCAGCAAT TAGAAGTCCCTGCATGGCTCCCACCTCCAGAGAG TTCTTTGCACCCTCTGCAGGTTTATGCCCCCTGAT GACCCACTGGGCCGGCACGGGCCCAGCCTGGAC AACTTCCTGCGTAAGAAGCCACTCACTTTGGAGC ACAGGAAGCAGCCGTGTCCCTATGGAAGGAAAT GCACCTATGGGATCAAGTGCCGATTCTTCCACCC AGAGCGGCCAAGCTGCCCCCAGCGCTCTGTGGC AGATGAGCTCCGTGCCAATGCTCTCCTCTCACCC CCCAGAGCCCCAAGCAAGGACAAAAATGGCCGG CGGCCTTCACCTTCATCCCAGTCCAGCTCTCTGC TAACAGAGAGTGAGCAGTGCAGCCTGGATGGGA

[0537]

		AGAAGCTGGGGGCCCAGGCATCCCCAGGGTCCC GCCAAGAGGGTCTAACACAGACCTATGCCCCATC AGGCAGGAGCCTCGCACCTAGCGGGGGCAGTGG CAGCAGCTTTGGGCCCACAGACTGGCTCCCACA GACGCTGGACTCACTCCCGTACGTCTCCCAGGAT TGCCTGGACTCGGGCATTGGCTCCCTGGAGAGCC AGATGTCGGAACTTTGGGGGGTTCGAGGAGGAG GCCCTGGTGAGCCGGGCCCACCCCGAGCCCCTTA CACGGGCTACAGTCCCTATGGATCTGAGCTCCCA GCCACCGCAGCCTTCTCTGCCTTTGGCCGGGCCA TGGGTGCTGGCCACTTCAGTGTCCCTGCCGACTA CCCACCCGCGCCCCCTGCCTTTCCACCTCGAGAG TACTGGTCTGAACCATACCCACTGCCCCCACCCA CATCAGTCCTTCAGGAGCCCCCAGTGCAGAGCCC AGGGGCTGGCAGGAGCCCGTGGGGCAGGGCAG GCAGCCTGGCCAAGGAGCAGGCCAGCGTGTATA CTAAGCTGTGTGGTGTGTTTCCCCCGCACCTGGT GGAGGCTGTGATGGGGCGCTTCCCACAGCTCCTG GACCCCCAGCAGCTGGCTGCCGAGATCCTCTCCT ACAAGTCCCAGCACCCCAGTGAGTAAGCTGCCT GTGGCTGGCAAGGGCAGCACCCCCAGCCTCCAA GGGCCGTCAGGCTGGGCTTTGGGCCATTGAGCA GCCCATTCCCAGCCCTGAGGCCCACCCCAGAGG CTGGACAGAGGGAGGATTCAAGTCGGGAAGGAA ACCCACAAACCAAAGATACTGTAGGATTGGTTCT GGCCCATGCAGCACCTCTAGCTGTCTGCCTCAGT GGGTCAGAAGCGATCACCCTGTTGATACACATTG TATCTCTGTAGTTTAAGGAGACGCTGCCGGTAAC GGCGTCGGTCCGTGGCTGAGGCCCAAACCGTCT TTTCTCTCAGAGGGTGGGGAGGGAGGTGGGGGC AGCAGAGGCCTGGGCTGGGTGCCCTGTGCACGC CACCCCACTTCCGCCCTACCCCTGGGACGTTGGC CTTGGCTGGCTAGTTGGGCACCGTGTGCCTGCCC TCCAAGGGCCTCCTCTACGCCAATGAGGCCTCAT CTGTGCTCTCGCTGGGCACGTGGCTTCATGTCAG TAAGCAAGATGCTTCTTAATAACCCACCTTCTGCC CCACTCTATTCCTTATCCTGCTGCCCCTGTAGGGG TCAAGGGCCCTCCGTCTACACCCTCTTCTTCTCCT CCATCCTTTATTCAGAGTCATCTCGCCCTTCCCCA TGGGTGGGGGGAACCTGTGTTTGTTTGTGTGCACA TGTAAATTTTAAATATTTTAAGCAGAAAGTCCTTA CCTCCTGTAACACATCAATAAAGTACAATCATTGT GAGCCCTTTCAA
12	CD5 sgRNA*	CAUACCAGCUGAGCCGUCCG
13	CBLB sgRNA*	AAAAUAUCAAGUAUAUAUGG
14	CISH sgRNA*	GCCAAAGGUGCUGGACCCAG
15	DGKA	UCCGGAUCUUUUUCUGACAG

[0538]

	sgRNA*	
16	DGKZ sgRNA*	GGUAGCCCUACGGCGCAAGG
17	DNMT3A sgRNA*	UGACACGCCAAAGGACCCUG
18	MAP4K1 sgRNA*	AGAGGGUGCACAUCAAAGAG
19	NR4A1 sgRNA*	CAUGGACCUGGCCAGCCCCG
20	PTPN2 sgRNA*	UUGACAUAGAAGAGGCACAA
21	TET2 sgRNA*	AAAGAGCAAGAGAUUCUGAA
22	ZC3H12A sgRNA*	CAGCUCCCUCUAGUCCCGCG
23	CBLB shRNA 81	GTATTCATCATCATCTTCCTCT
24	CBLB shRNA 19	TTTAACTTCATCATATGTGAGA
25	CBLB shRNA 14:2	TTTATAAACTGAATGAGAATGT
26	CBLB shRNA 9	TTCATCATCATCTTCCTCTACT
27	CBLB shRNA 79	TTTGACTTTTTCATAAGGCTAT
28	CBLB shRNA 64	TGAATACTTTCCATGGTACGAT
29	CBLB shRNA 11	TTAAAGTACTCATTCTCACTGA
30	CBLB shRNA 23:2	TATAATTGAGGATAAGTCCTTC
31	CBLB shRNA 27:2	TTAGAAAACTTTCTGTGGGTTC
32	CBLB shRNA 28:2	TAATATATTAGGAATGTTGCAA
33	CBLB shRNA 65	TGAAATAAGGGCTTGTTATGAG
34	CBLB shRNA 18:2	TTTAGAAAACTTTCTGTGGGTT
35	CBLB shRNA 4:2	TTTATTAAGAGTAATAACATGG
36	CBLB shRNA 30	TTTGATTTCTTCTCTGAAGATG
37	CBLB shRNA 48	TCTTCATACATTCTCTCCTTGC
38	CBLB shRNA 5	TAAATATATGCTTAAGTCAGGG
39	CBLB	TCTTGTATTCATCATCATCTTC

[0539]

	shRNA 45	
40	CBLB shRNA 4	TACATTATGACAATGAGATGGT
41	CBLB shRNA 6:2	TTAATTGAACATATGACTATTT
42	CBLB shRNA 3:2	TTTATTGACAAATAAATGCTTT
43	CBLB shRNA 53	TATGACAATGAGATGGTTGTGA
44	CBLB shRNA 23	TTCTAAAGGCAAATCATGGCGT
45	CBLB shRNA 3	TTACATTATGACAATGAGATGG
46	CBLB shRNA 72	TGTGAATTCAGGGAAACAGGGT
47	CD5 shRNA 64	TGCAGATCATAGTCACTGTCGG
48	CD5 shRNA 25	TTGATTTTCCTGAAGCAATGCT
49	CD5 shRNA 77	TGATTTTCCTGAAGCAATGCTC
50	CD5 shRNA 13	TTTTGGTTCATTCCCGTTGGGC
51	CD5 shRNA 75	TCCAAGTACTAGAGGAGTCTGT
52	CD5 shRNA 74	TGACACATGTCATTTCTGCTGT
53	CD5 shRNA 8	TTATTCAAACCAAAGGAACATG
54	CD5 shRNA 64	TGCAGATCATAGTCACTGTCGG
55	CD5 shRNA 21	TTCGTTATCCACGTGGGAGGCT
56	CD5 shRNA 98	TGATTGAGCTCTGAGGTGTGTA
57	CD5 shRNA 47	TTGGAAGGCTGCTTGTTTTGGG
58	CD5 shRNA 11	TAGAAGATGAACTGTGATGGAC
59	CD5 shRNA 7	TTGGTTTTTAAGTAGGCCATGG
60	CD5 shRNA 1	TTTTATTAAAAAAGGCACTGAT
61	CD5 shRNA 18	TTCACTAGCTTCTTGTAGGCAA
62	CD5 shRNA 47	TTGGAAGGCTGCTTGTTTTGGG
63	CD5	TTGGGTTAGAAGATGAACTGTG

[0540]

	shRNA 2	
64	CD5 shRNA 34	TATTCAAACCAAAGGAACATGA
65	CD5 shRNA 5	TATTCAAAATGCACTCGCCCAG
66	CD5 shRNA 12	TGGGTTAGAAGATGAACTGTGA
67	CD5 shRNA 51	AAGATGAACTGTGATGGACTGA
68	CD5 shRNA 35	TCAAACCAAAGGAACATGACCA
69	CD5 shRNA 10	TGAGCTTCCTTGTCACTCCTTA
70	CD5 shRNA 23	TAGGGACATGATTTCAAGTGAA
71	CD5 shRNA 9	AAAACTATTCAAAATGCACTCG
72	CD5 shRNA 3	AAACTATTCAAAATGCACTCGC
73	CISH shRNA 123	ATAAATAAATAAATAGTGTATA
74	CISH shRNA 55	TGAGACACAGGCTCTGCTGGGG
75	CISH shRNA 5	TAAAGGTATAATGTCATTACAG
76	CISH shRNA 10	TCACGTACTAAGAACGTGCCTT
77	CISH shRNA 74	TGCAGATACAGCTCTGTCCTGT
78	CISH shRNA 111	TAAAATAAAGAGGTAATAAAGG
79	CISH shRNA 2	TATCATTTTATTATAGAGGTAA
80	CISH shRNA 66	TAGGAGAAGGTCTTGGCTATGC
81	CISH shRNA 7	TTTCATGAAGTCTTATCAGACG
82	CISH shRNA 23	TCTATGCAGATACAGCTCTGTC
83	CISH shRNA 111	TAAAATAAAGAGGTAATAAAGG
84	CISH shRNA 51	TGAAGTCTTATCAGACGTGTAT
85	CISH shRNA 84	TAGAGGTAATAAAATAAAGAGG
86	CISH shRNA 15	TTCATGAAGTCTTATCAGACGT
87	CISH	GAAGGTAGGAGAAGGTCTTGGC

[0541]

	shRNA 114	
88	CISH shRNA 131	AGAGGTAATAAAATAAAGAGGT
89	CISH shRNA 96	TAAAGAGGTAATAAAGGTATAA
90	CISH shRNA 3	TATTATTTCATGAAGTCTTATC
91	CISH shRNA 77	TCTTATCAGACGTGTATTTCTC
92	CISH shRNA 8	TCATTACAGAAAAATCAGTGGA
93	CISH shRNA 81	AAAGGTATAATGTCATTACAGA
94	CISH shRNA 40	TTATCAGACGTGTATTTCTCTC
95	CISH shRNA 4	TGTCATTACAGAAAAATCAGTG
96	DNMT3A shRNA 30	TATTAGCGAAGAACATCTGGAG
97	DNMT3A shRNA 7	TTGGCATCAATCATCACAGGGT
98	DNMT3A shRNA 79	TGCTTTATGGAGTTTGACCTCG
99	DNMT3A shRNA 51	ATCAATCATCACAGGGTTGGAC
100	DNMT3A shRNA 45	TCTTCCACAGCATTCATTCCTG
101	DNMT3A shRNA 6	TTTGGCATCAATCATCACAGGG
102	DNMT3A shRNA 71	AGGGATTCTTCTCTTCTTCTGG
103	DNMT3A shRNA 69	TTCAATCATGGGCTTGTTCTGC
104	DNMT3A shRNA 49	TCAATCATGGGCTTGTTCTGCA
105	DNMT3A shRNA 64	TAGCGAAGAACATCTGGAGCCG
106	DNMT3A shRNA 34	ATGAAGACAGGAAAATGCTGGT
107	DNMT3A shRNA 2	TTATTAGCGAAGAACATCTGGA
108	DNMT3A shRNA 54	TTCATTCCTGCAATGACCTTGG
109	DNMT3A shRNA 26	TAGGGATTCTTCTCTTCTTCTG
110	DNMT3A shRNA 66	TTCCATCAAAGAGAGACAGCAC
111	DNMT3A	TCTTTGTAGGGATTCTTCTCTT

[0542]

	shRNA 23	
112	DNMT3A shRNA 76	GTTTGTTTAACTTTGTGTCGCT
113	DNMT3A shRNA 8	TCAATAATCTCCTTGACCTTGG
114	DNMT3A shRNA 3	TTCTCATTCATGAAGACAGGAA
115	DNMT3A shRNA 5	TTTCTCATTCATGAAGACAGGA
116	DNMT3A shRNA 14	TCTTCTCTTCTTCTGGTGGCTC
117	DNMT3A shRNA 29	TTAGCGAAGAACATCTGGAGCC
118	DNMT3A shRNA 4	TTATCATTCACAGTGGATGCCA
119	DNMT3A shRNA 25	TTGCTGAACTTGGCTATCCTGC
120	DNMT3A shRNA 55	TTTAACTTTGTGTCGCTACCTC
121	DNMT3A shRNA 9	TTGTTTAACTTTGTGTCGCTAC
122	DNMT3A shRNA 1	TTTGTTTAACTTTGTGTCGCTA
123	PTPN2 shRNA 4	TTAACAAAAATATTTAATGCTG
124	PTPN2 shRNA 2	TAACAAAAATATTTAATGCTGC
125	PTPN2 shRNA 1	TTAATATAATCATTCTCAGCAT
126	PTPN2 shRNA 126	TCTGCAAAGTCTTCTGCTGGTG
127	PTPN2 shRNA 88	TACTGTATAATACGACTTCACA
128	PTPN2 shRNA 108	TTTAGAGGAAAGTCCTGTACAT
129	PTPN2 shRNA 3	TTTTATGTTAATATCATCTCCT
130	PTPN2 shRNA 58	TAATACGACTTCACATCTTCTG
131	PTPN2 shRNA 23	TCTGTATACTAGAATCTCCCTT
132	PTPN2 shRNA 6	TAATTGTAGTAGATGTACTGTA
133	PTPN2 shRNA 62	ATGAGAATCTCAGTTGATCTGG
134	PTPN2 shRNA 104	TTTAACACGACTGTGATCATAT
135	PTPN2	TCGAATTTCCAAGTACAGCGGC

[0543]

	shRNA 61	
136	PTPN2 shRNA 45	TAATATAATCATTCTCAGCATT
137	PTPN2 shRNA 48	TCTGTTTTCTGGAAACTTGGCC
138	PTPN2 shRNA 127	TTAACCGATTCTTTCTCCACAA
139	PTPN2 shRNA 118	TCATTAAAAACACTTAACACAT
140	PTPN2 shRNA 67	TAAAGGTTCTGCAAAGTCTTCT
141	PTPN2 shRNA 19	TCTGACAAGAGCTTCACACTGA
142	PTPN2 shRNA 71	ATACGACTTCACATCTTCTGAC
143	PTPN2 shRNA 7	TTCTATGTCAACTAAACTGGCA
144	PTPN2 shRNA 56	TTCTAGACCTATTCTGTTCCCA
145	PTPN2 shRNA 89	TACGACTTCACATCTTCTGACA
146	PTPN2 shRNA 13	TATAATACGACTTCACATCTTC
147	TET2 shRNA 3	TATATTTACAATTATAGATCTG
148	TET2 shRNA 10	TTATATTTACAATTATAGATCT
149	TET2 shRNA 98	TTTATTCTCTGAAACTAGGTGT
150	TET2 shRNA 90	TTGTTTGAACAAGAAACCTGTA
151	TET2 shRNA 53	AAGAATTCAAATATGAACCTGC
152	TET2 shRNA 7	TAACATTACAATACTTACAGTA
153	TET2 shRNA 78	TAAAATGAAAGTAAACTTGTTT
154	TET2 shRNA 9	TCATATTGAGTCTTGACAGGTG
155	TET2 shRNA 91	AAGTATTGAAAAAAGGTATGCT
156	TET2 shRNA 27	TTTATTAAAAACACTCACATAG
157	TET2 shRNA 70	TTATGTGTTGAAAAACTGGTGA
158	TET2 shRNA 75	TTACTATACAACTCTTTCACTT
159	TET2	TTTGTTGAAAATGAAATCTAGT

[0544]

	shRNA 59	
160	TET2 shRNA 101	TATACAACTCTTTCACTTCTTT
161	TET2 shRNA 5	TCACATTTACATATCATCTCGT
162	TET2 shRNA 6	TTTAGATGTAAAACTCTGGCTA
163	TET2 shRNA 97	TTATAAACCAAACATCTCATGA
164	TET2 shRNA 2	TTAAGTAATACAATGTTCTTGT
165	TET2 shRNA 71	TTTATCAACTCAGTGCATTCTA
166	TET2 shRNA 1	TTAACTGACAGATTCACATGGA
167	TET2 shRNA 80	TTAAAAAGACAAAAGCCAGCTT
168	TET2 shRNA 16	TTAGATGTAAAACTCTGGCTAT
169	TET2 shRNA 35	TATATTAGCAAATTGTAGATCT
170	TET2 shRNA 106	TAAGCTAAGAAATGACAACGTC
171	TET2 shRNA 4	TAAGATTACAGTAAAAACTGCA
172	TET2 shRNA 8	TTTAATTTACTATACAACTCTT
173	TET2 shRNA 31	TTTGAATACTGATTTTCACCAT
174	TET2 shRNA 14	TTATGTATCAAGTACCTTTGCT
175	TET2 shRNA 54	TCTTATAAACCAAACATCTCAT
176	ZC3H12A shRNA 86	TTCCATAGGGACACGGCTGCTT
177	ZC3H12A shRNA 106	TCTGTTAGCAGAGAGCTGGACT
178	ZC3H12A shRNA 10	TTCACAATGAATCTGTCGTCAT
179	ZC3H12A shRNA 19	TACAGAGATACAATGTGTATCA
180	ZC3H12A shRNA 29	TGTATCAACAGGGTGATCGCTT
181	DGKA shRNA 14	TTAGGATTGACAAAGACGAGAA
182	DGKA shRNA 42	TCAGCTTGAGAGACAGAGCCAC
183	DGKA	TTACTCATCTCTAAATCCTTGA

[0545]

	shRNA 3	
184	DGKA shRNA 96	TCTGGTACACAGGTTTTCAGGA
185	DGKA shRNA 25	TTTAGCACTGCGATGCCTTCTA
186	DGKA shRNA 10	ATAATAAATACTGTGAGGGTGA
187	DGKA shRNA 77	TAGTAGTACTTCCGTTGCTTGG
188	DGKA shRNA 101	TTCGTAGTAGTACTTCCGTTGC
189	DGKA shRNA 37	TCTGGGAACATTATCCACTTCG
190	DGKA shRNA 87	TGAGAAGATGGATTCAGATGTG
191	DGKA shRNA 15	TAATAAATACTGTGAGGGTGAA
192	DGKA shRNA 81	TCTTTTGTCACATTTGTCTCAT
193	DGKA shRNA 1	TAGATTTTCAGGAATTGCTGGA
194	DGKA shRNA 22	TTTGCATGTTGAGAAGATGGAT
195	DGKA shRNA 76	TTTCATGGCACACTGGTCGTGA
196	DGKA shRNA 4	TCAAATTTAAATCATCCATGGT
197	DGKA shRNA 49	ATAGATTTTCAGGAATTGCTGG
198	DGKA shRNA 90	ATATGTACCACTTTACTCATCT
199	DGKA shRNA 95	TTGCATGTTGAGAAGATGGATT
200	DGKA shRNA 6	TTTAAATCATCCATGGTCTTCT
201	DGKA shRNA 13	TTTACTCATCTCTAAATCCTTG
202	DGKA shRNA 12	TAAATCATCCATGGTCTTCTGG
203	DGKA shRNA 11	TAGTCAATCTCTTTCATCATCT
204	DGKA shRNA 5	TTAGCTTTGTCAATGGTCTCTA
205	ZC3H12A shRNA 40	TTGACGAAGGAGTACATGAGCA
206	ZC3H12A shRNA 97	TGAATCTGTCGTCATAGCACAC
207	ZC3H12A	TACTGACATGAAGCCACGTGCC

[0546]

	shRNA 99	
208	f 荧光素酶 shRNA	TAGATAAGCATTATAATTCCTA
209	r 荧光素酶 shRNA	TTAATCAGAGACTTCAGGCGGT
210	FAS sgRNA	ACTGCGTGCCCTGCCAAGAA
211	FAS shRNA	TTAAGAATCTTTTCAAACACTA
212	MSLN CAR	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMN WVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATL TVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRG FDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIELT QSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS SVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIKAAAT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQALPPR
213	ALPG PrimeR	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYVAWY QQKPGKAPKLLIYNAKSLASGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQHHYVSPWTFGGGTKLEIK GGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGFSLTSYGVSWIRQPAGKGLEWIGVIWEDG STNYHSALISRVTMSVDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCARPHYGSSYVGAMEYWGAGTTVTVSSATTT PAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACFMYVAAAAFVLLF FVGCGVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKK RREPLGEDSVGLKPLKNAMVSKLSQLQTELLAALL ESGLSKEALLQALGEPGPYLLAGEGPLDKGESCGG GRGELAELPNGLGETRGSEDETDDDGEDFTPPILKE LENLSPEEAAHQKAVVETLLQEDPWRVAKMVKSY LQQHNIPQREVVDTTGLNQSHLSQHLNKGTPMKT QKRAALYTWYVRKQREVAQQFTHAGQGGLIEEPT GDELPTKKGRRNRFKWGPASQQILFQAYERQKNPS KEERETLVEECNRAECIQRGVSPSQAQGLGSNLVTE VRVYNWFANRRKEEAFRHKLAMTCRDEFPTMVFP SGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQ APAPVPVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALL QLQFDDEDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQ LLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPD PAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLSQ ISS

[0547] *前3个核苷酸是2'-o-甲基类似物和3'-硫代磷酸酯核苷酸间连键。

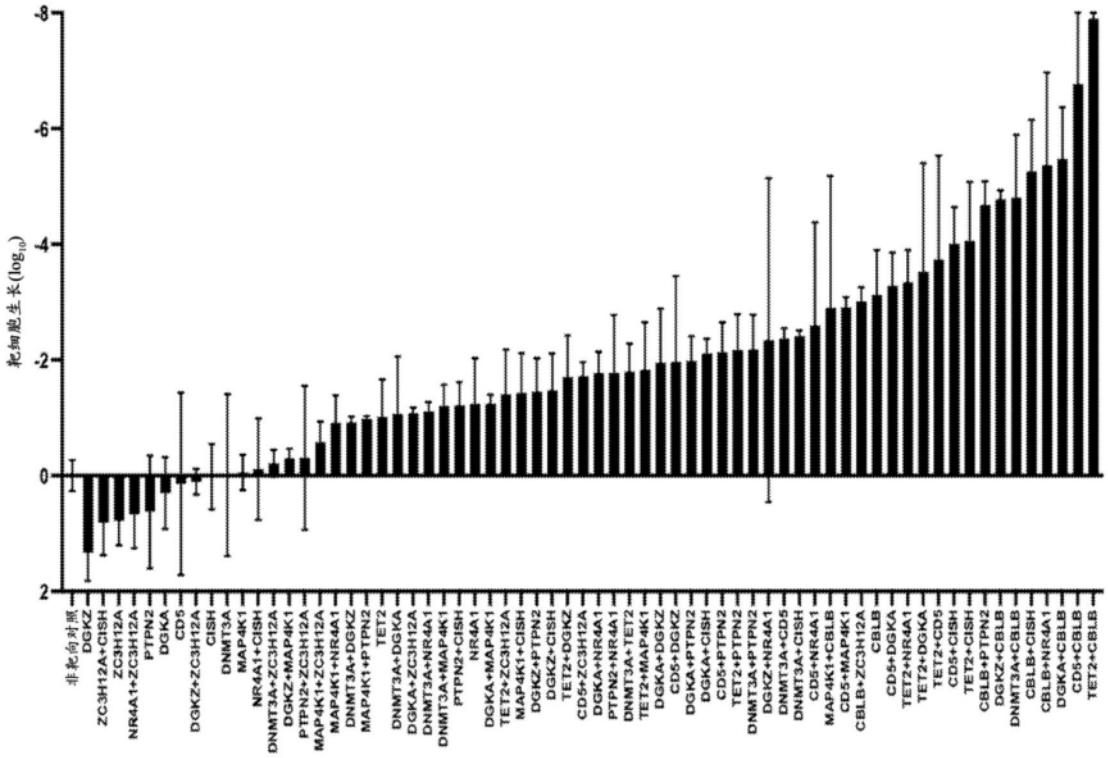

靶细胞生长(log10)
-8
-6
-4
-2
0
2
非靶向对照
DGKZ
ZC3H12A+CISH
ZC3H12A
NR4A1+ZC3H12A
PTPN2
DGKA
CD5
DGKZ+ZC3H12A
CISH
DNMT3A
MAP4K1
NR4A1+CISH
DNMT3A+ZC3H12A
DGKZ+MAP4K1
PTPN2+ZC3H12A
MAP4K1+ZC3H12A
MAP4K1+NR4A1
DNMT3A+DGKZ
MAP4K1+PTPN2
TET2
DNMT3A+DGKA
DGKA+ZC3H12A
DNMT3A+NR4A1
DNMT3A+MAP4K1
PTPN2+CISH
NR4A1
DGKA+MAP4K1
TET2+ZC3H12A
MAP4K1+CISH
DGKZ+PTPN2
DGKZ+CISH
TET2+DGKZ
CD5+ZC3H12A
DGKA+NR4A1
PTPN2+NR4A1
DNMT3A+TET2
TET2+MAP4K1
DGKA+DGKZ
CD5+DGKZ
DGKA+PTPN2
DGKA+CISH
CD5+PTPN2
TET2+PTPN2
DNMT3A+PTPN2
DGKZ+NR4A1
DNMT3A+CD5
DNMT3A+CISH
CD5+NR4A1
MAP4K1+CBLB
CD5+MAP4K1
CBLB+ZC3H12A
CBLB
CD5+DGKA
TET2+NR4A1
TET2+DGKA
TET2+CD5
CD5+CISH
TET2+CISH
CBLB+PTPN2
DGKZ+CBLB
DNMT3A+CBLB
CBLB+CISH
CBLB+NR4A1
DGKA+CBLB
CD5+CBLB
TET2+CBLB

图1

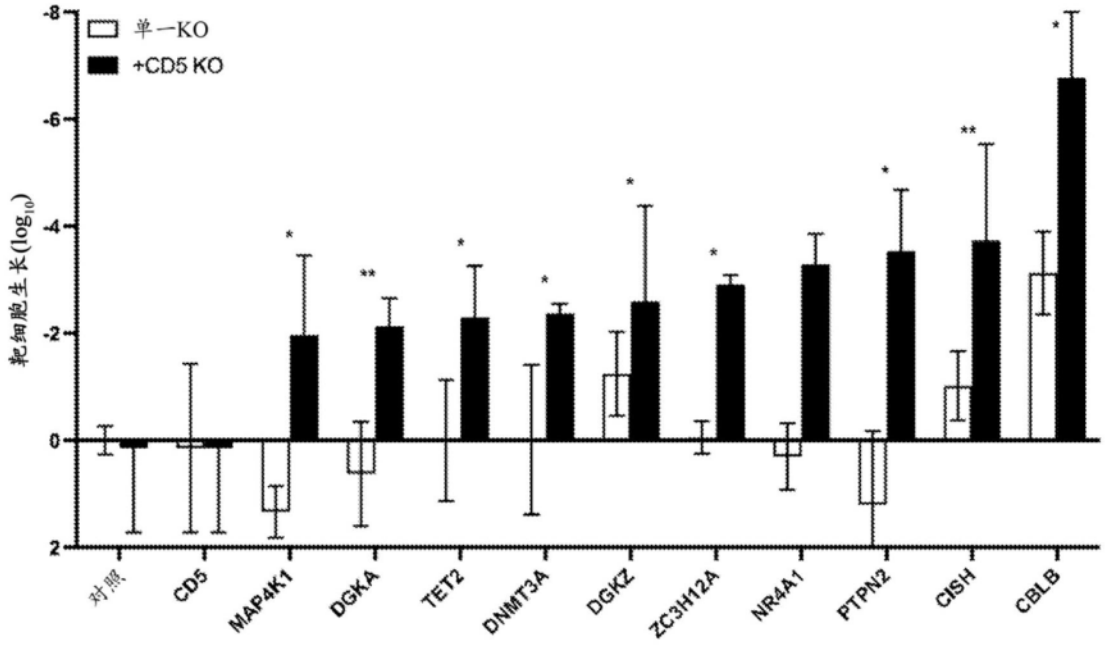

单一KO
+CD5 KO
靶细胞生长(log10)
-8
-6
-4
-2
0
2
*
**
*
*
*
*
*
**
*
对照
CD5
MAP4K1
DGKA
TET2
DNMT3A
DGKZ
ZC3H12A
NR4A1
PTPN2
CISH
CBLB

图2A

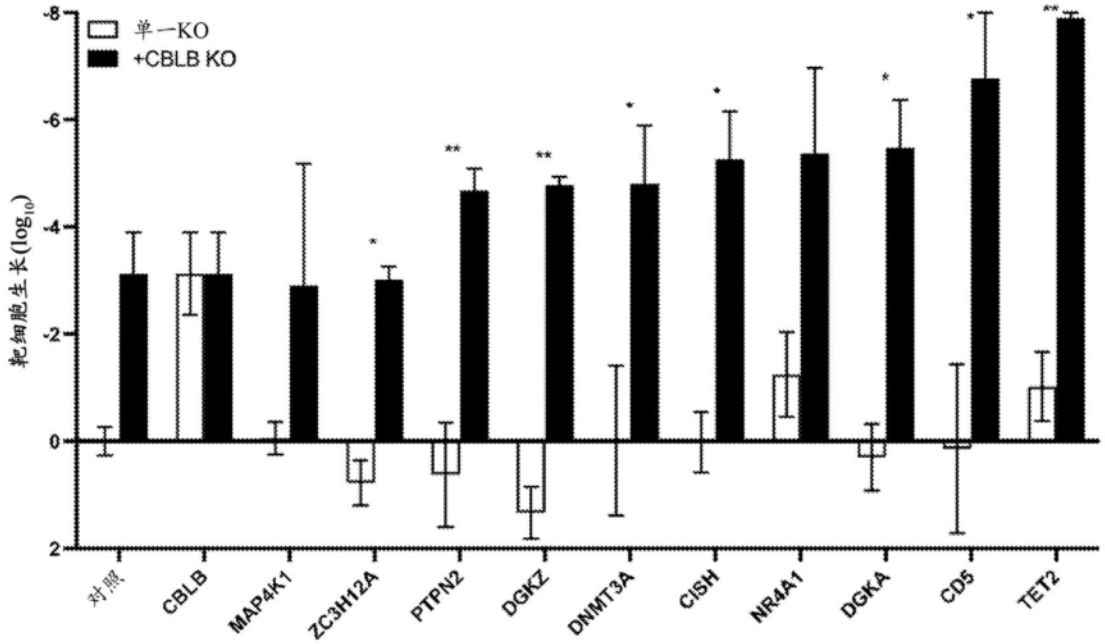

单一KO
+CBLB KO
靶细胞生长(log10)
8
6
4
2
0
-2
对照
CBLB
MAP4K1
ZC3H12A
PTPN2
DGKZ
DNMT3A
CISH
NR4A1
DGKA
CD5
TET2

图2B

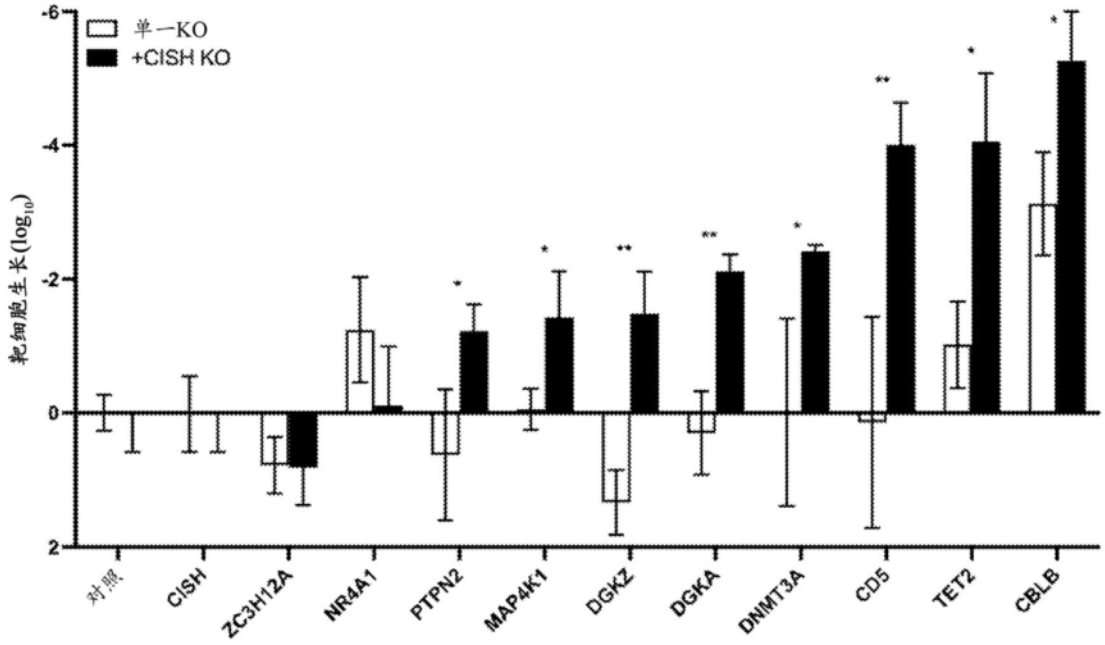

单一KO
+CISH KO
靶细胞生长(log10)
6
4
2
0
-2
对照
CISH
ZC3H12A
NR4A1
PTPN2
MAP4K1
DGKZ
DGKA
DNMT3A
CD5
TET2
CBLB

图2C

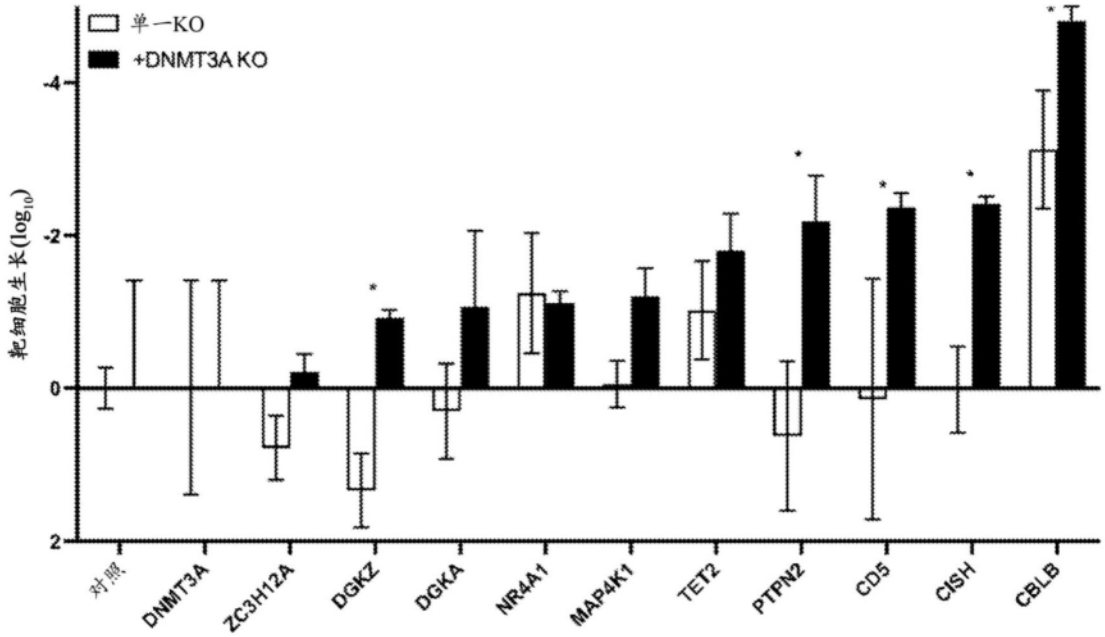

单一KO
+DNMT3A KO
靶细胞生长(log10)
-4
-2
0
2
对照
DNMT3A
ZC3H12A
DGKZ
DGKA
NR4A1
MAP4K1
TET2
PTPN2
CD5
CISH
CBLB

图2D

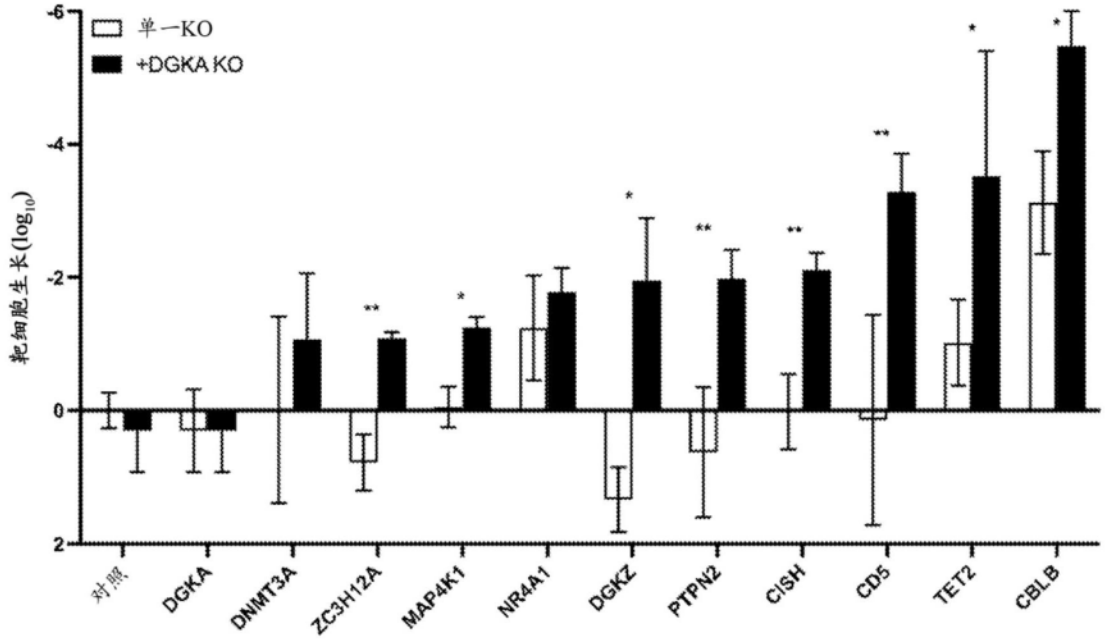

单一KO
+DGKA KO
靶细胞生长(log10)
-6
-4
-2
0
2
对照
DGKA
DNMT3A
ZC3H12A
MAP4K1
NR4A1
DGKZ
PTPN2
CISH
CD5
TET2
CBLB

图2E

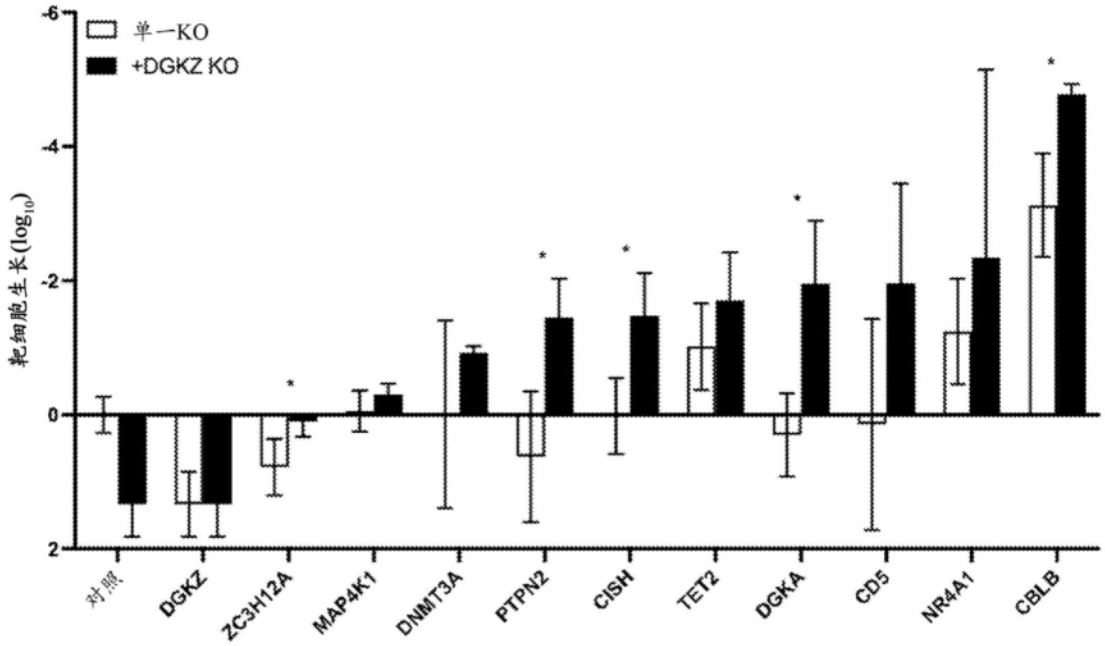

单一KO
+DGKZ KO
靶细胞生长(log10)
6
4
2
0
2
对照
DGKZ
ZC3H12A
MAP4K1
DNMT3A
PTPN2
CISH
TET2
DGKA
CD5
NR4A1
CBLB

图2F

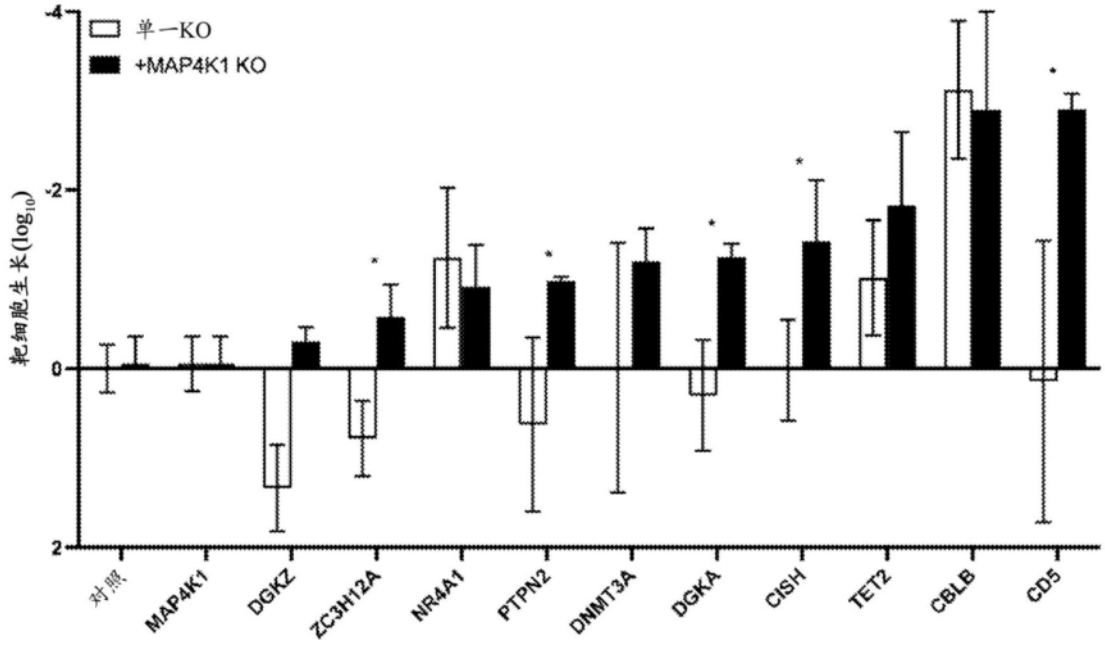

单一KO
+MAP4K1 KO
靶细胞生长(log10)
4
2
0
2
对照
MAP4K1
DGKZ
ZC3H12A
NR4A1
PTPN2
DNMT3A
DGKA
CISH
TET2
CBLB
CD5

图2G

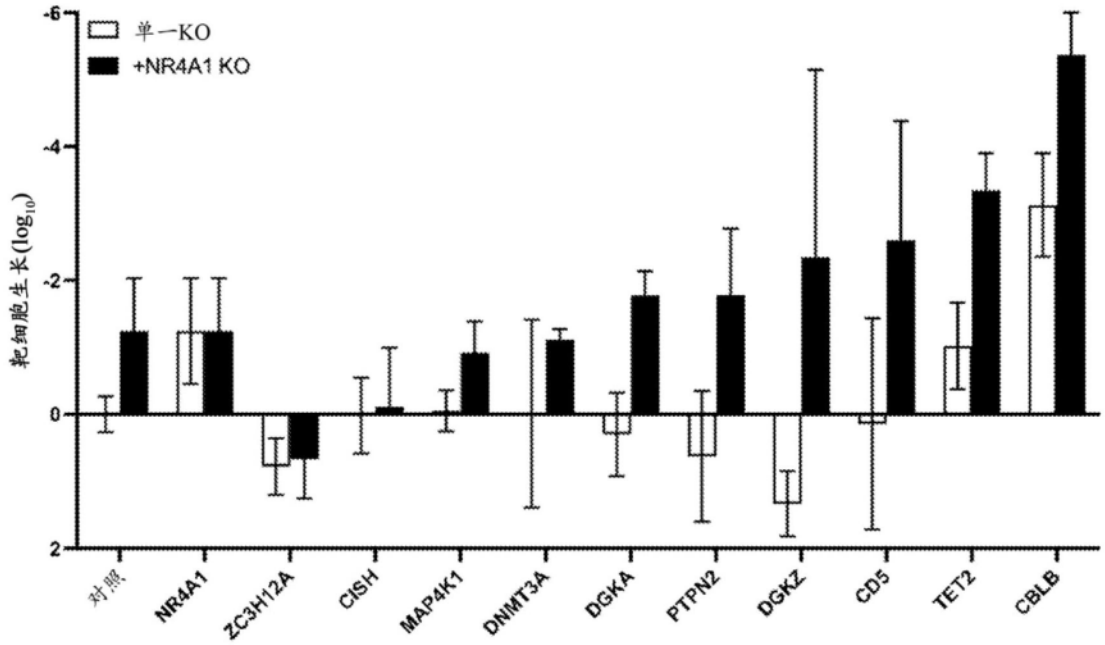

单一KO
+NR4A1 KO
靶细胞生长(log10)
-6
-4
-2
0
2
对照
NR4A1
ZC3H12A
CISH
MAP4K1
DNMT3A
DGKA
PTPN2
DGKZ
CD5
TET2
CBLB

图2H

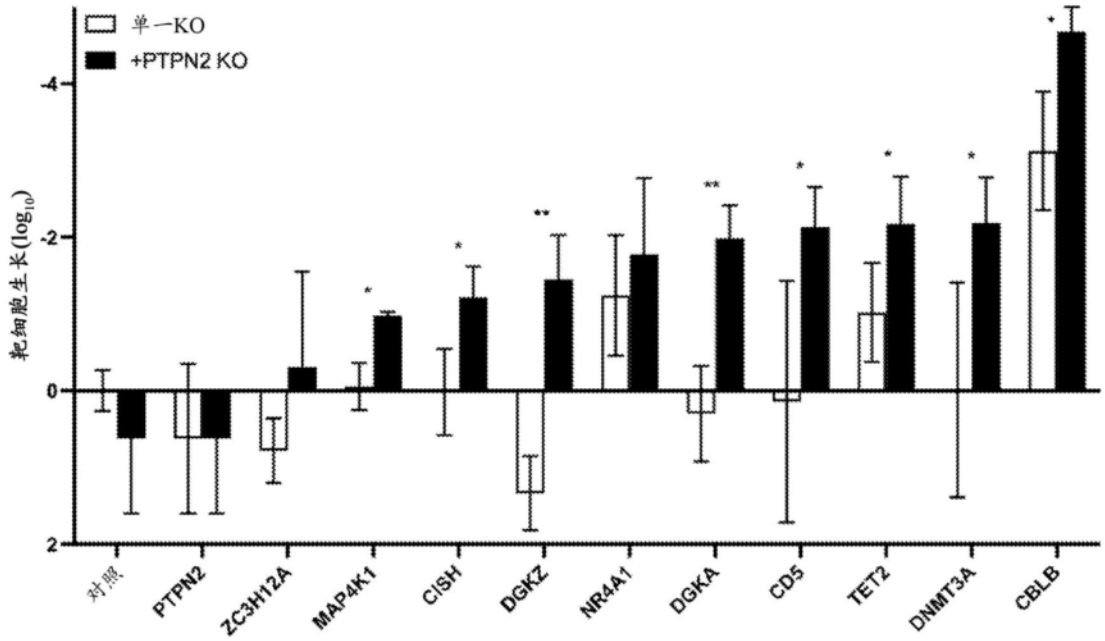

单一KO
+PTPN2 KO
靶细胞生长(log10)
-4
-2
0
2
*
**
对照
PTPN2
ZC3H12A
MAP4K1
CISH
DGKZ
NR4A1
DGKA
CD5
TET2
DNMT3A
CBLB

图2I

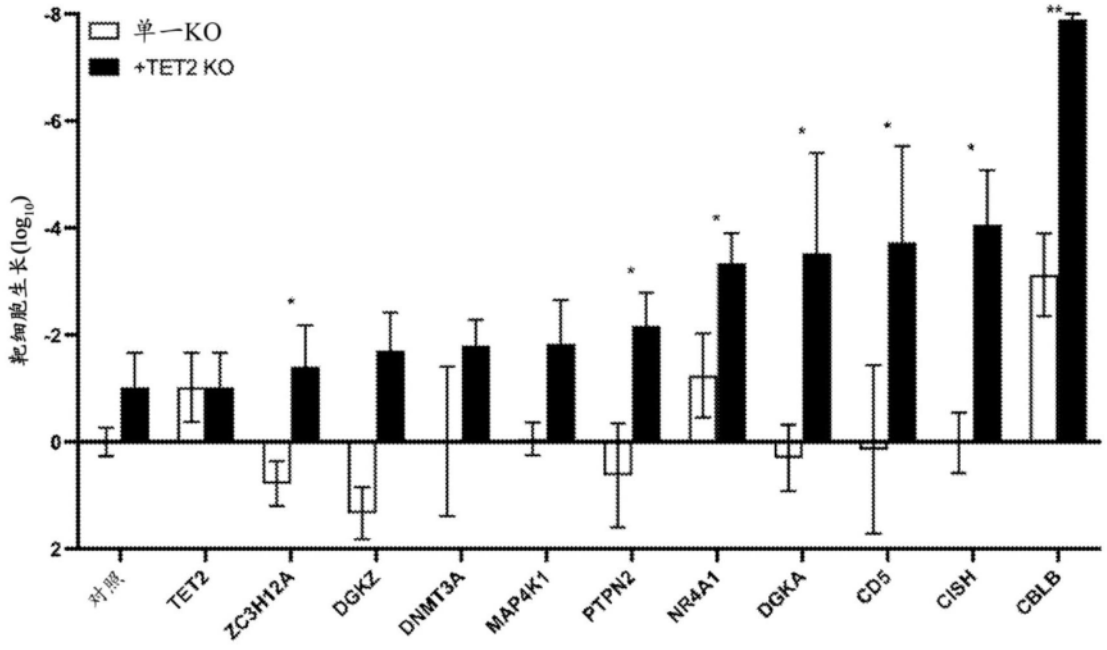

单一KO
+TET2 KO
靶细胞生长(log10)
对照
TET2
ZC3H12A
DGKZ
DNMT3A
MAP4K1
PTPN2
NR4A1
DGKA
CD5
CISH
CBLB

图2J

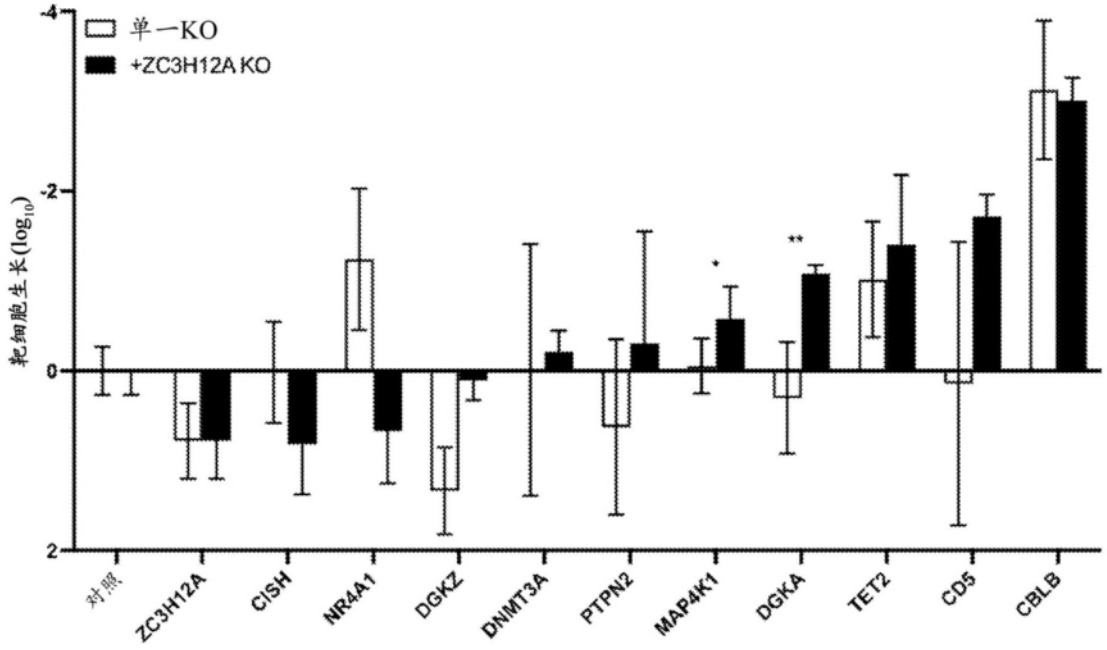

单一KO
+ZC3H12A KO
靶细胞生长(log10)
对照
ZC3H12A
CISH
NR4A1
DGKZ
DNMT3A
PTPN2
MAP4K1
DGKA
TET2
CD5
CBLB

图2K

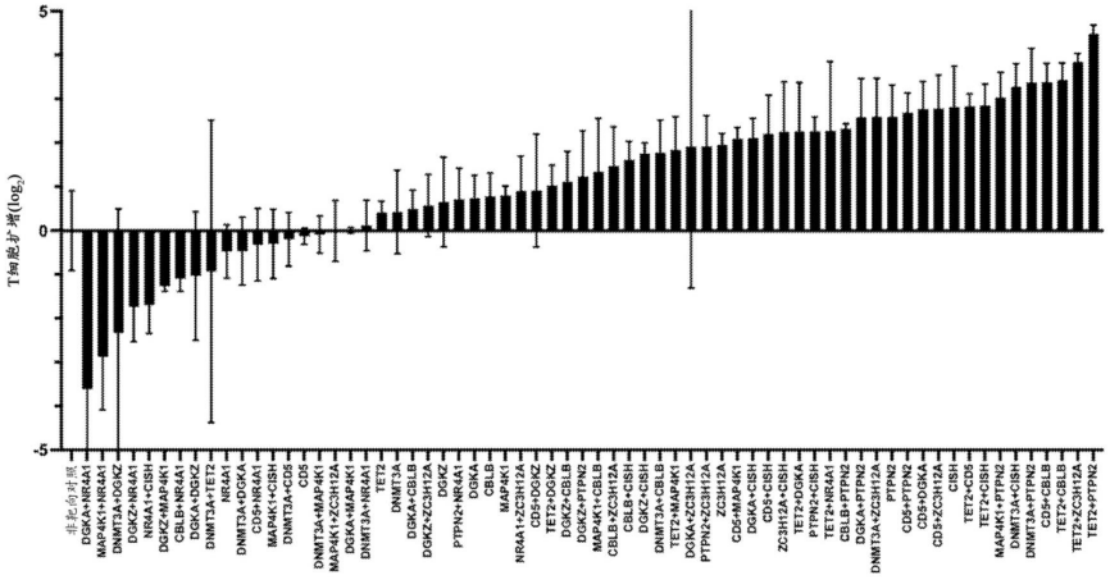

T细胞扩增(log2)
5
0
-5
非靶向对照
DGKA+NR4A1
MAP4K1+NR4A1
DNMT3A+DGKZ
DGKZ+NR4A1
NR4A1+CISH
DGKZ+MAP4K1
CBLB+NR4A1
DGKA+DGKZ
DNMT3A+TET2
NR4A1
DNMT3A+DGKA
CD5+NR4A1
MAP4K1+CISH
DNMT3A+CD5
CD5
DNMT3A+MAP4K1
MAP4K1+ZC3H12A
DGKA+MAP4K1
DNMT3A+NR4A1
TET2
DNMT3A
DGKA+CBLB
DGKZ+ZC3H12A
DGKZ
PTPN2+NR4A1
DGKA
CBLB
MAP4K1
NR4A1+ZC3H12A
CD5+DGKZ
TET2+DGKZ
DGKZ+CBLB
DGKZ+PTPN2
MAP4K1+CBLB
CBLB+ZC3H12A
CBLB+CISH
DGKZ+CISH
DNMT3A+CBLB
TET2+MAP4K1
DGKA+ZC3H12A
PTPN2+ZC3H12A
ZC3H12A
CD5+MAP4K1
DGKA+CISH
CD5+CISH
ZC3H12A+CISH
TET2+DGKA
PTPN2+CISH
TET2+NR4A1
CBLB+PTPN2
DGKA+PTPN2
DNMT3A+ZC3H12A
PTPN2
CD5+PTPN2
CD5+DGKA
CD5+ZC3H12A
CISH
TET2+CD5
TET2+CISH
MAP4K1+PTPN2
DNMT3A+CISH
DNMT3A+PTPN2
CD5+CBLB
TET2+CBLB
TET2+ZC3H12A
TET2+PTPN2

图3

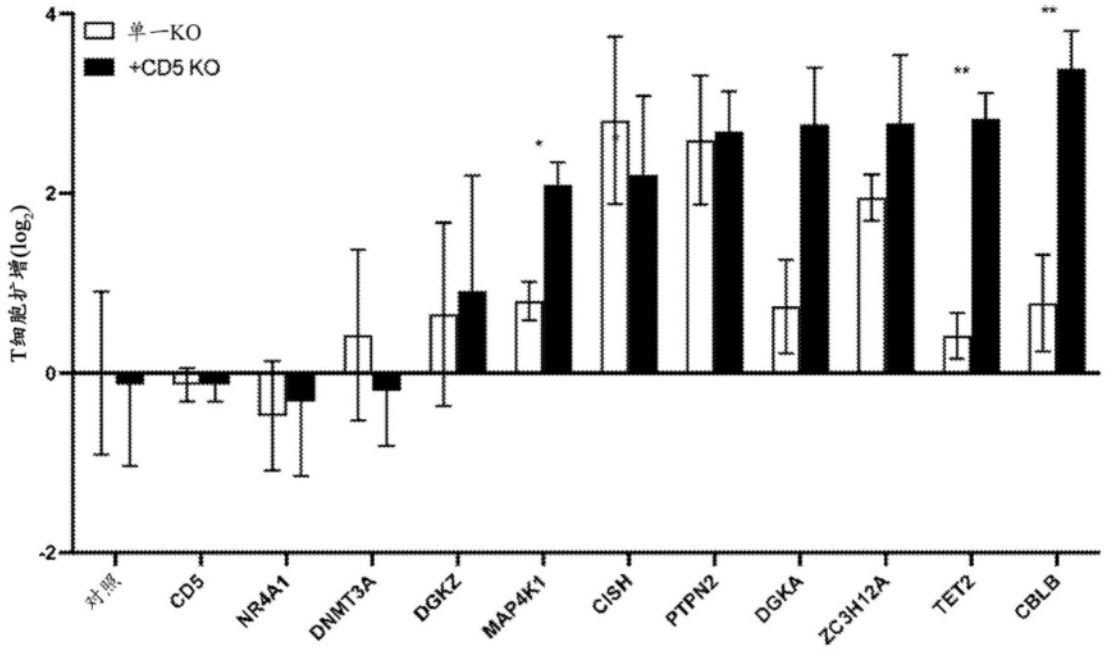

单一KO
+CD5 KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
*
*
**
**
对照
CD5
NR4A1
DNMT3A
DGKZ
MAP4K1
CISH
PTPN2
DGKA
ZC3H12A
TET2
CBLB

图4A

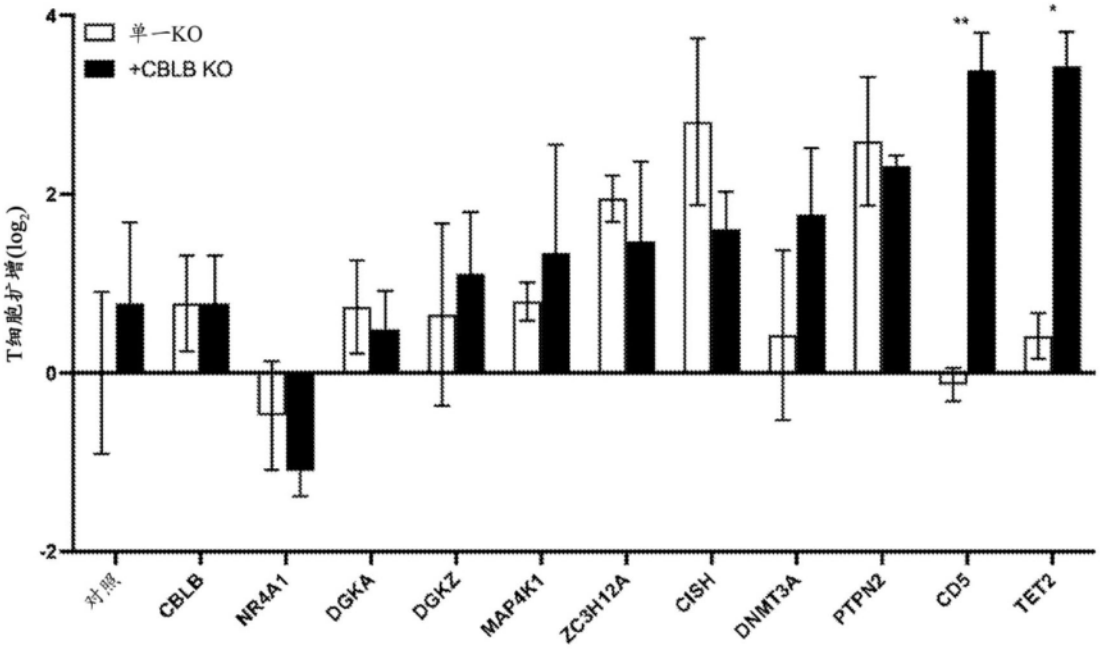

单一KO
+CBLB KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
**
*
对照
CBLB
NR4A1
DGKA
DGKZ
MAP4K1
ZC3H12A
CISH
DNMT3A
PTPN2
CD5
TET2

图4B

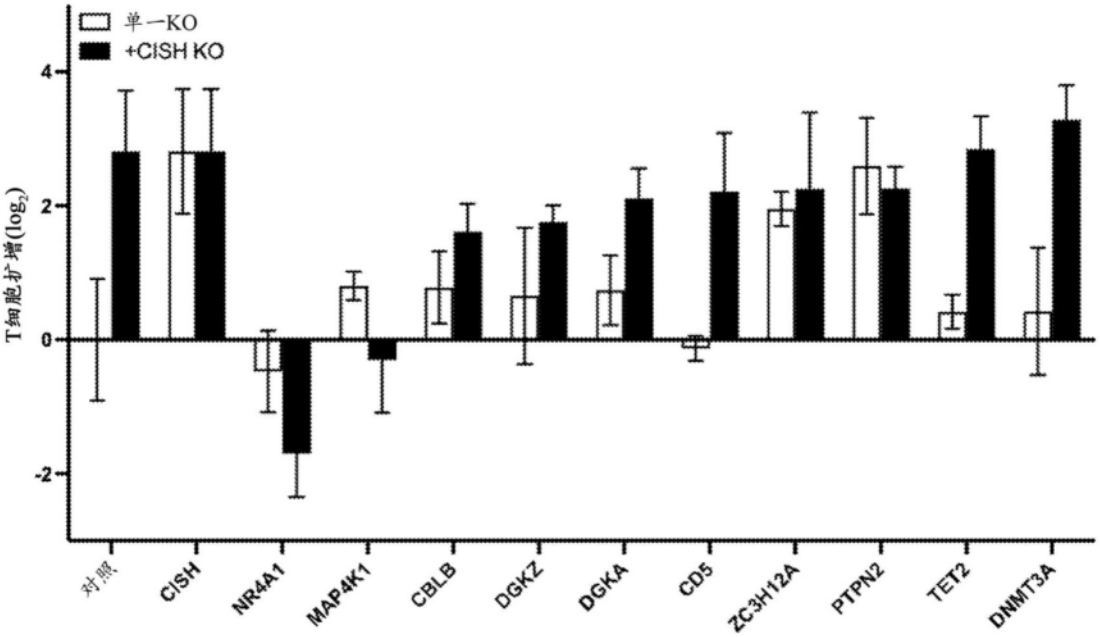

单一KO
+CISH KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
对照
CISH
NR4A1
MAP4K1
CBLB
DGKZ
DGKA
CD5
ZC3H12A
PTPN2
TET2
DNMT3A

图4C

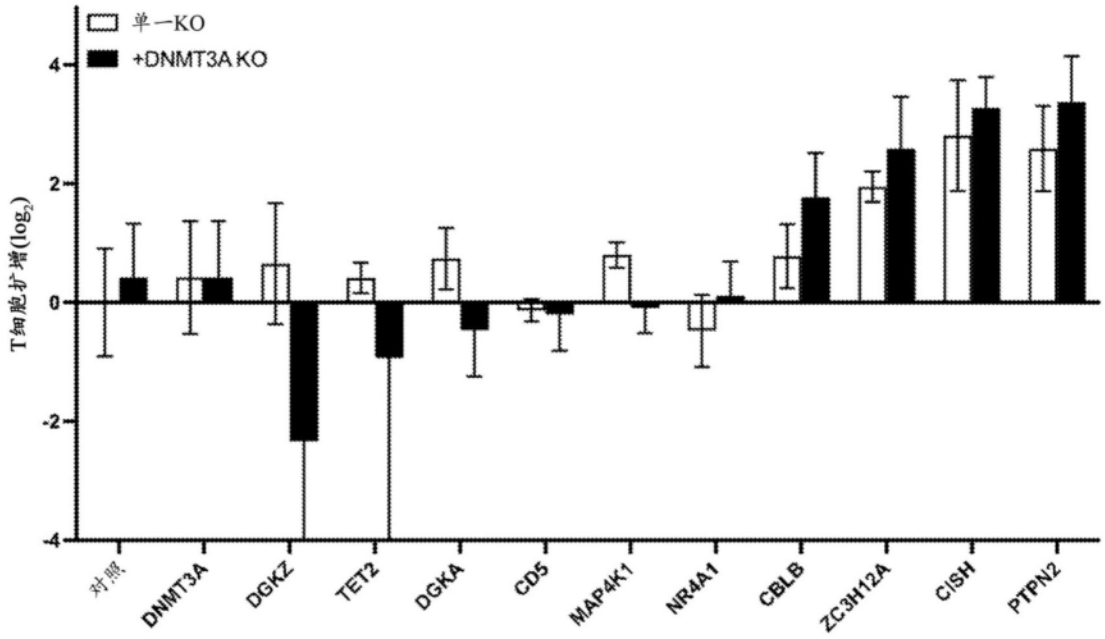

单一KO
+DNMT3A KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
-4
对照
DNMT3A
DGKZ
TET2
DGKA
CD5
MAP4K1
NR4A1
CBLB
ZC3H12A
CISH
PTPN2

图4D

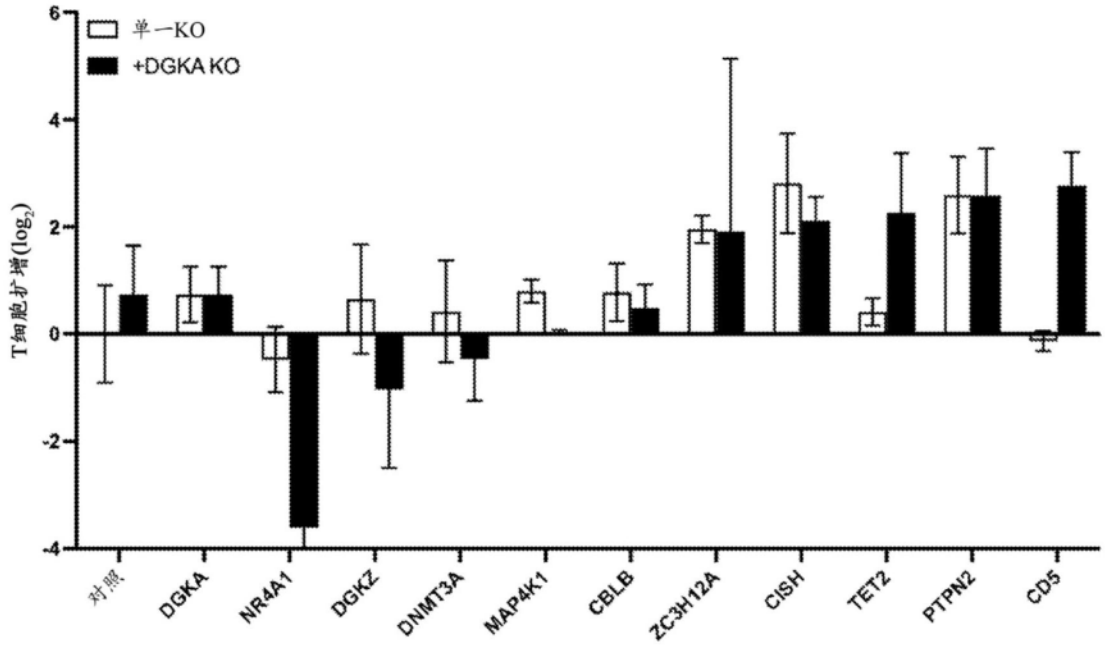

单一KO
+DGKA KO
T细胞扩增(log2)
6
4
2
0
-2
-4
对照
DGKA
NR4A1
DGKZ
DNMT3A
MAP4K1
CBLB
ZC3H12A
CISH
TET2
PTPN2
CD5

图4E

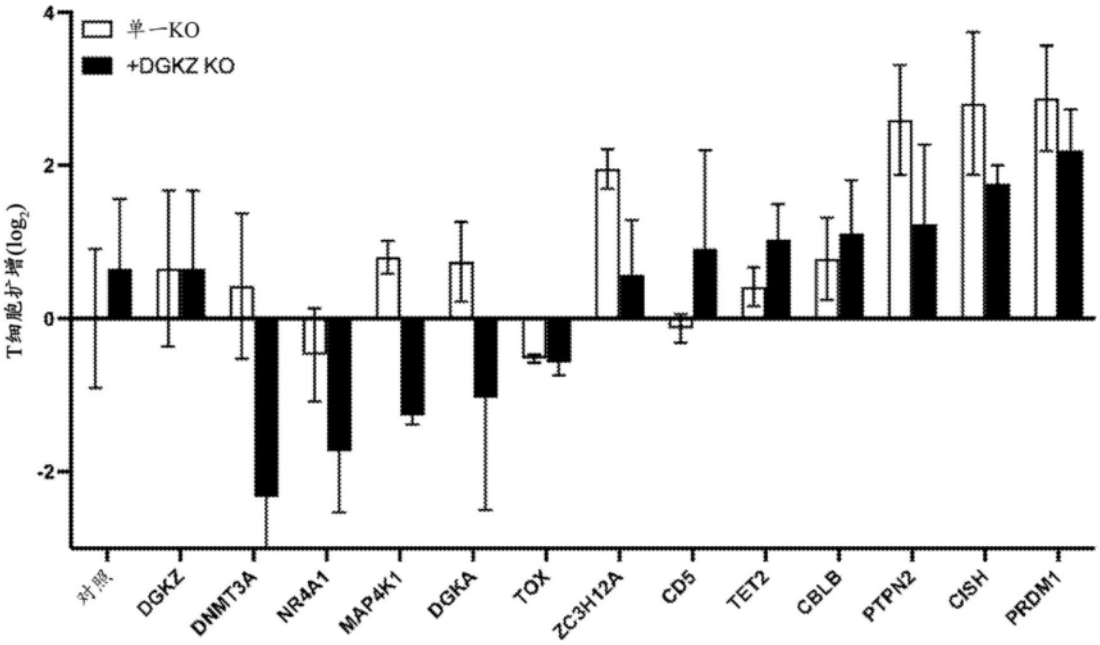

单一KO
+DGKZ KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
对照
DGKZ
DNMT3A
NR4A1
MAP4K1
DGKA
TOX
ZC3H12A
CD5
TET2
CBLB
PTPN2
CISH
PRDM1

图4F

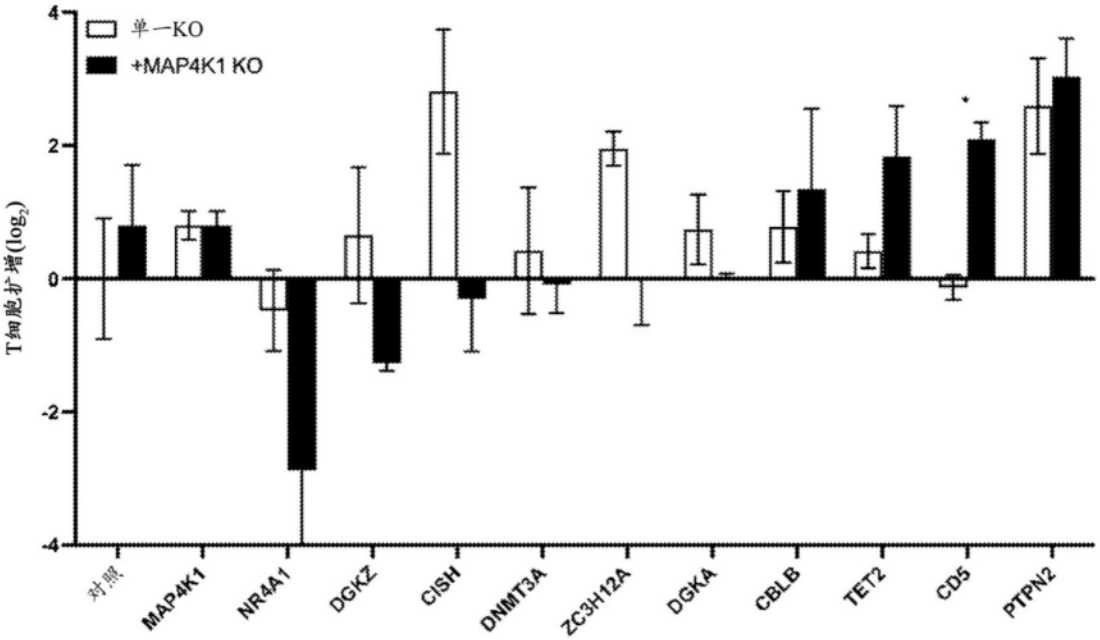

单一KO
+MAP4K1 KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
-4
对照
MAP4K1
NR4A1
DGKZ
CISH
DNMT3A
ZC3H12A
DGKA
CBLB
TET2
CD5
PTPN2

图4G

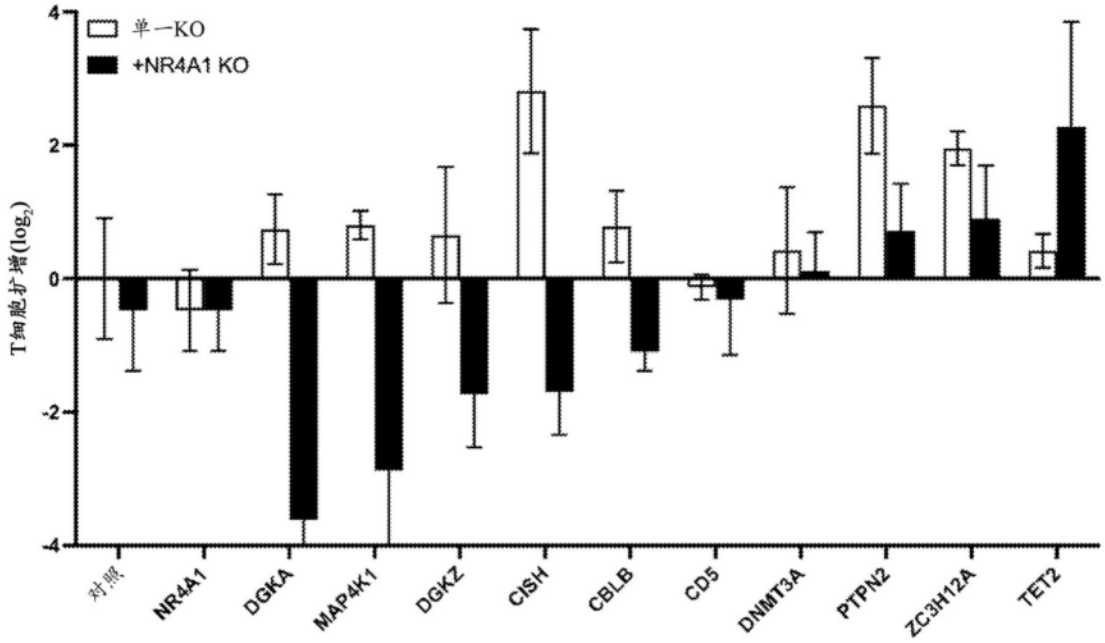

单一KO
+NR4A1 KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
-2
-4
对照
NR4A1
DGKA
MAP4K1
DGKZ
CISH
CBLB
CD5
DNMT3A
PTPN2
ZC3H12A
TET2

图4H

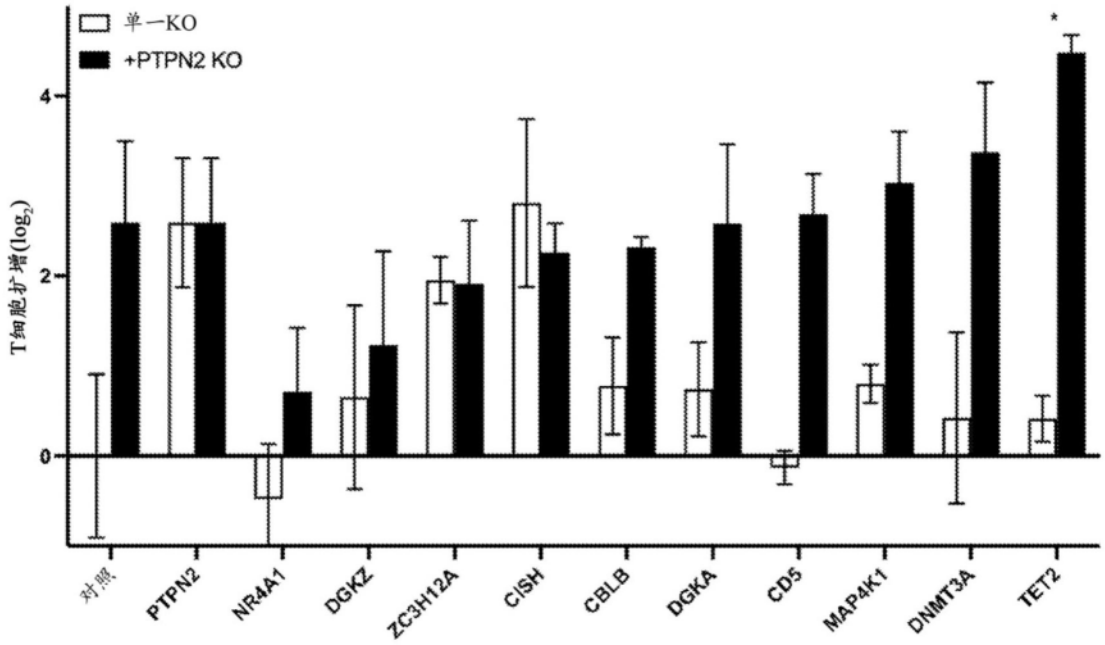

单一KO
+PTPN2 KO
T细胞扩增(log2)
*
4
2
0
对照
PTPN2
NR4A1
DGKZ
ZC3H12A
CISH
CBLB
DGKA
CD5
MAP4K1
DNMT3A
TET2

图4I

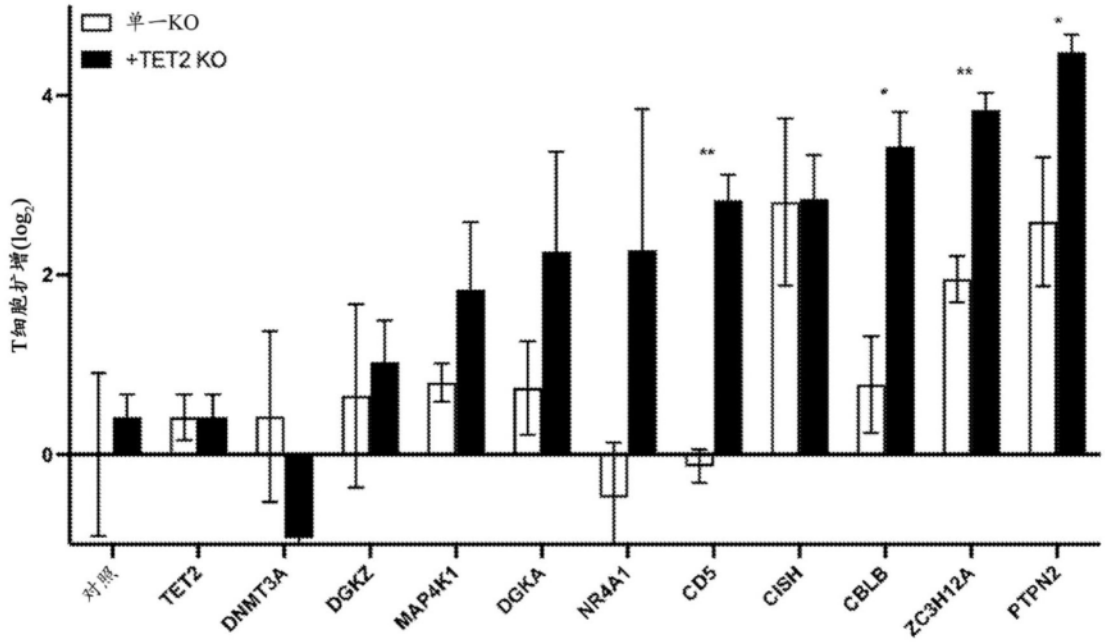

单一KO
+TET2 KO
T细胞扩增(log2)
4
2
0
**
*
**
*
对照
TET2
DNMT3A
DGKZ
MAP4K1
DGKA
NR4A1
CD5
CISH
CBLB
ZC3H12A
PTPN2

图4J

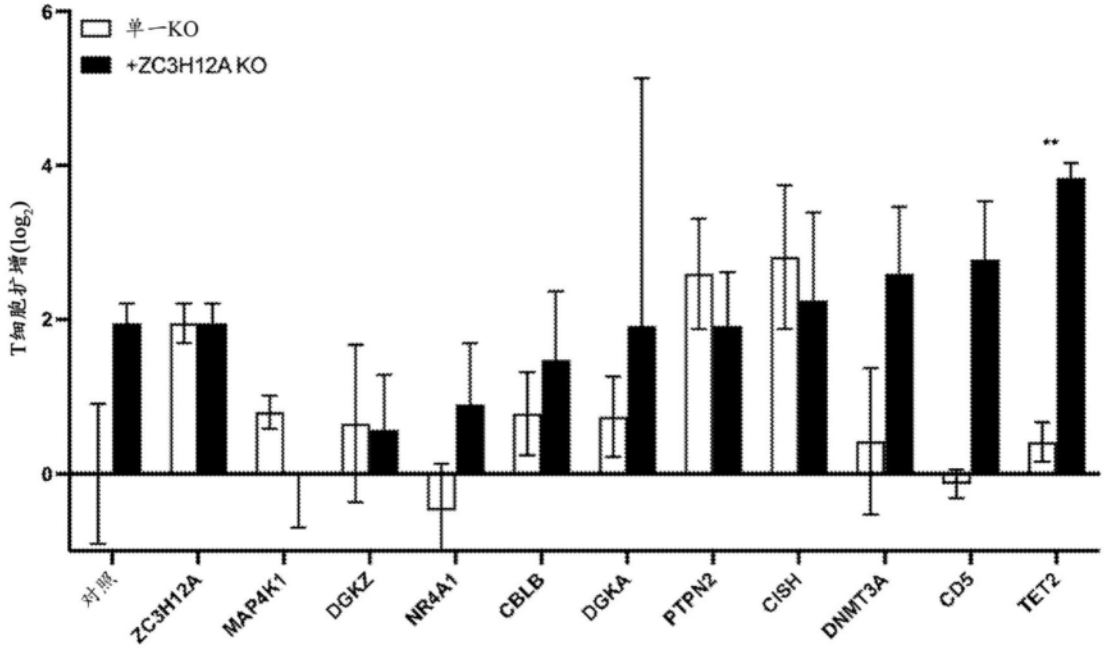

单一KO
+ZC3H12A KO
T细胞扩增(log2)
6
4
2
0
**
对照
ZC3H12A
MAP4K1
DGKZ
NR4A1
CBLB
DGKA
PTPN2
CISH
DNMT3A
CD5
TET2

图4K

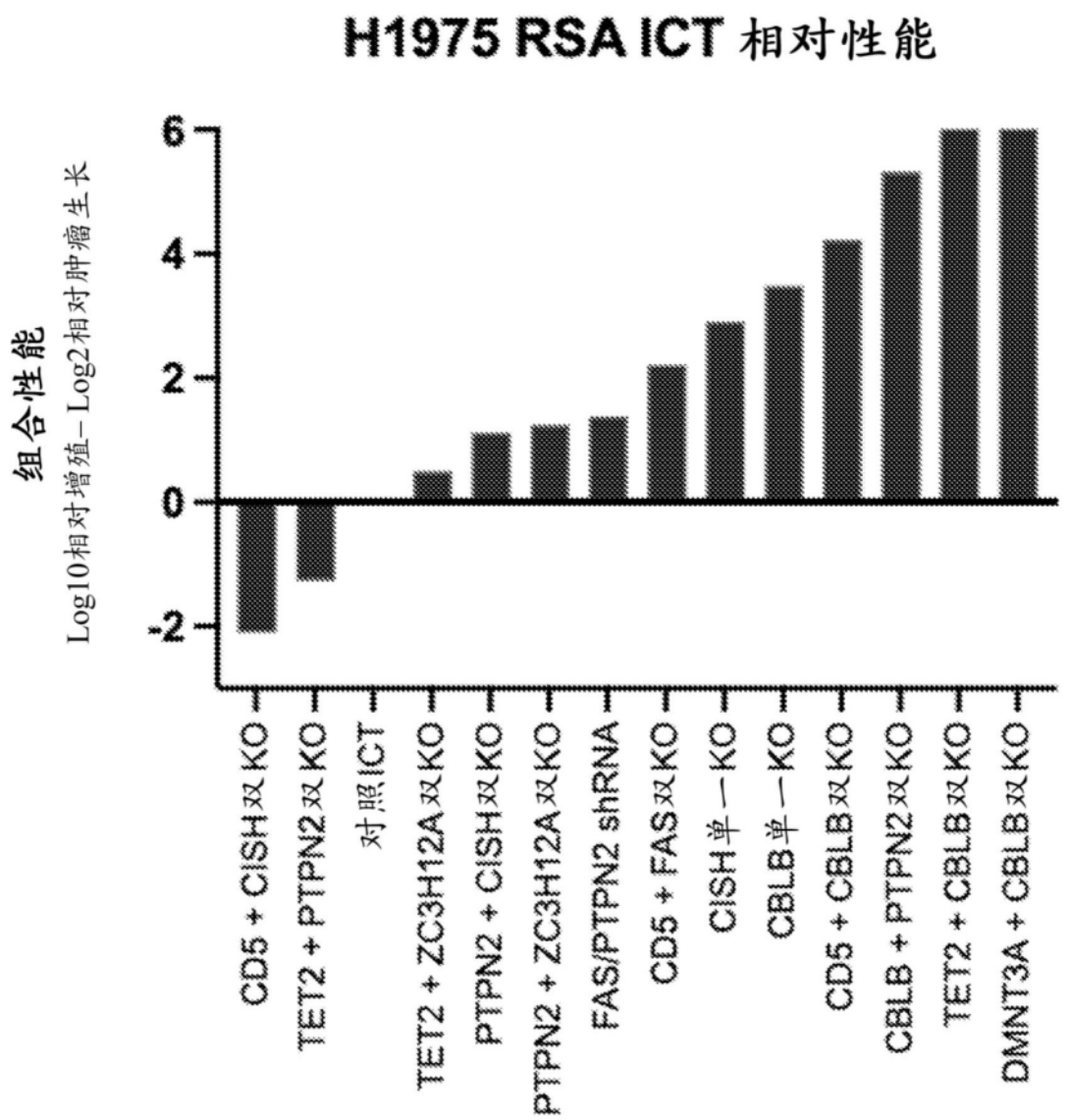

H1975 RSA ICT 相对性能
组合性能
Log10相对增殖– Log2相对肿瘤生长
6
4
2
0
-2
CD5 + CISH双KO
TET2 + PTPN2双KO
对照ICT
TET2 + ZC3H12A双KO
PTPN2 + CISH双KO
PTPN2 + ZC3H12A双KO
FAS/PTPN2 shRNA
CD5 + FAS双KO
CISH单一KO
CBLB单一KO
CD5 + CBLB双KO
CBLB + PTPN2双KO
TET2 + CBLB双KO
DMNT3A + CBLB双KO

图5

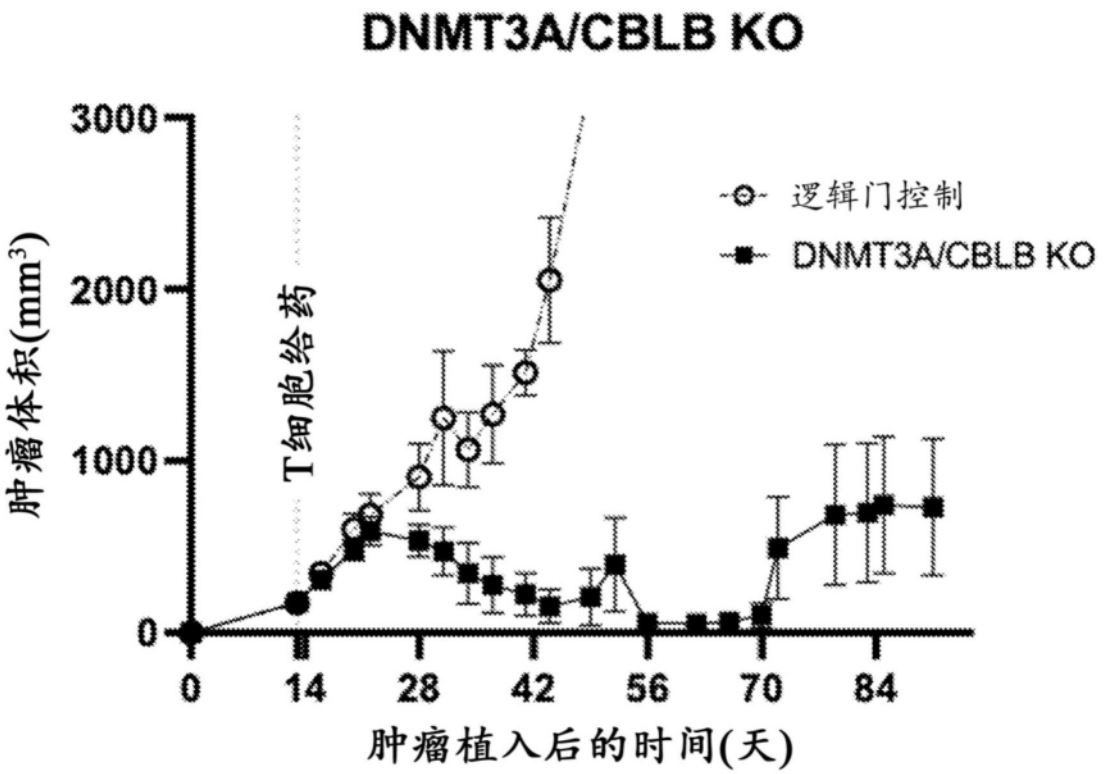

DNMT3A/CBLB KO
3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm³)
T细胞给药
逻辑门控制
DNMT3A/CBLB KO
0
14
28
42
56
70
84
肿瘤植入后的时间(天)

图6A

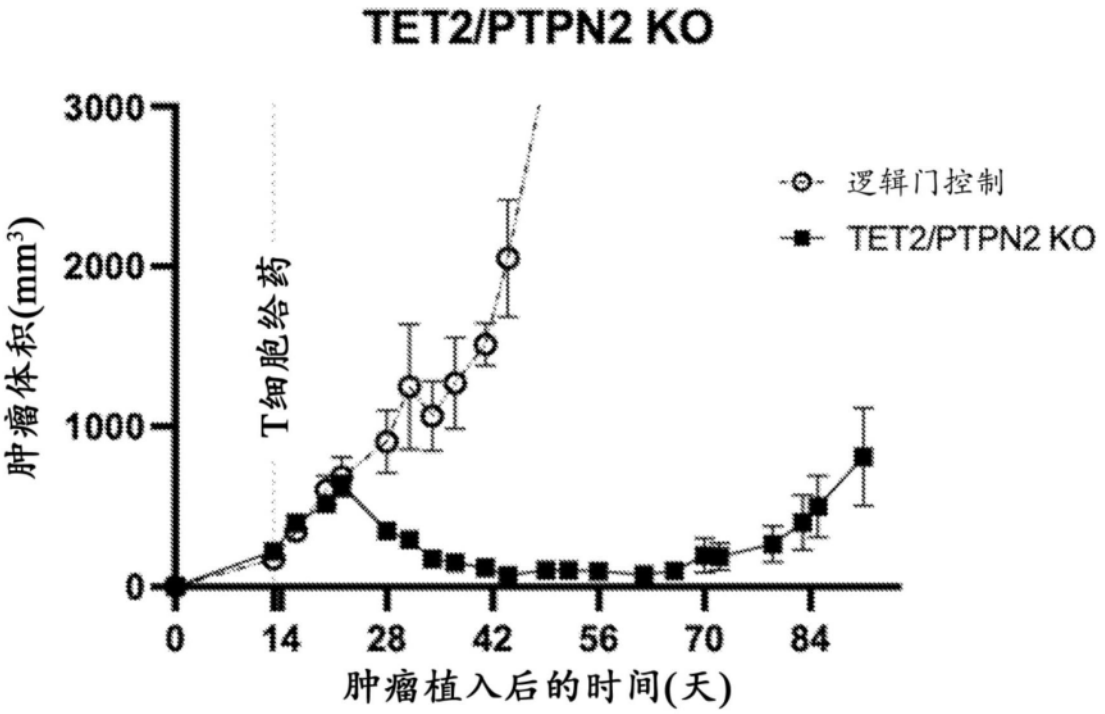

TET2/PTPN2 KO
3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm³)
T细胞给药
逻辑门控制
TET2/PTPN2 KO
0
14
28
42
56
70
84
肿瘤植入后的时间(天)

图6B

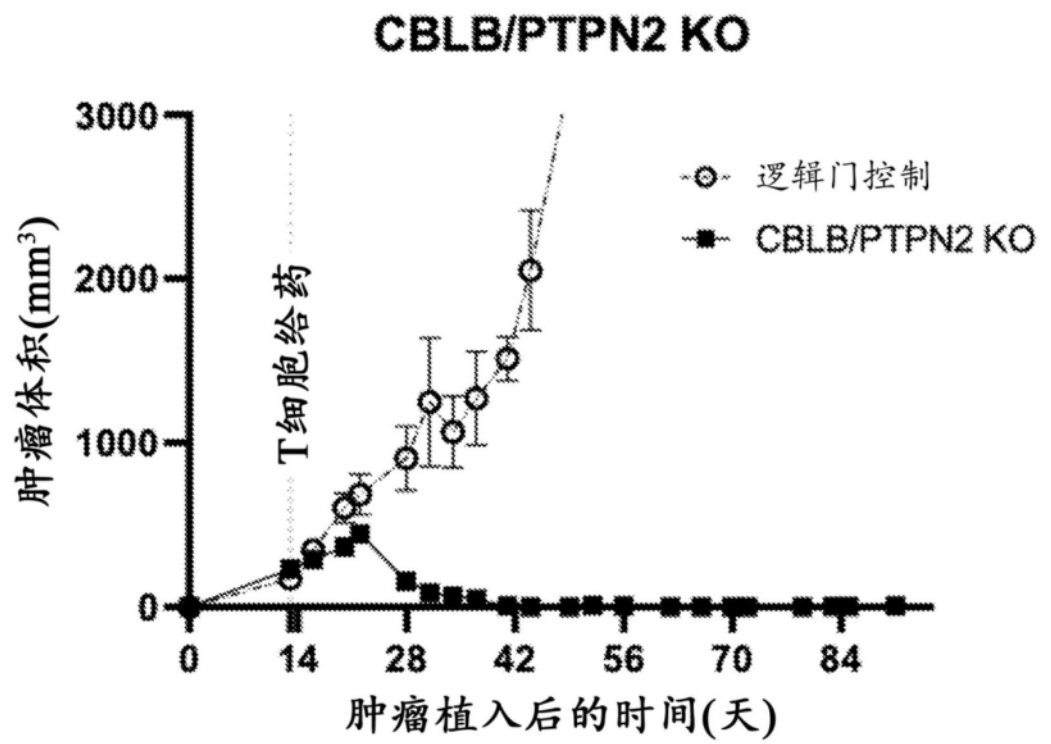

CBLB/PTPN2 KO
3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm3)
T细胞给药
逻辑门控制
CBLB/PTPN2 KO
0
14
28
42
56
70
84
肿瘤植入后的时间(天)

图6C

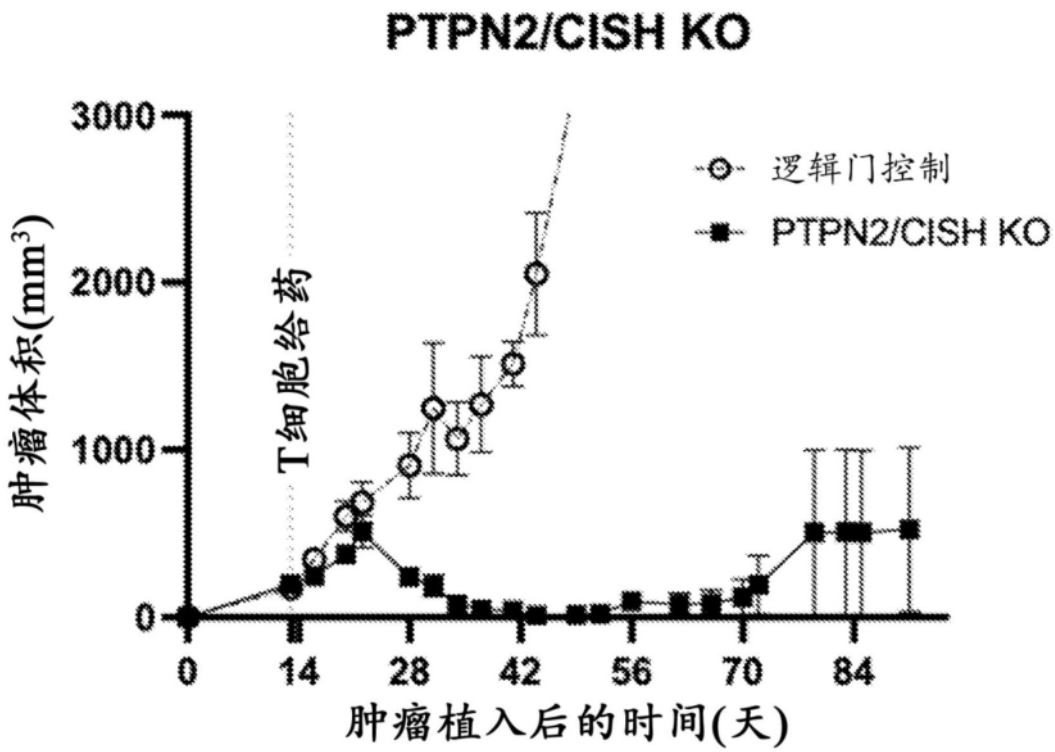

PTPN2/CISH KO
3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm3)
T细胞给药
逻辑门控制
PTPN2/CISH KO
0
14
28
42
56
70
84
肿瘤植入后的时间(天)

图6D

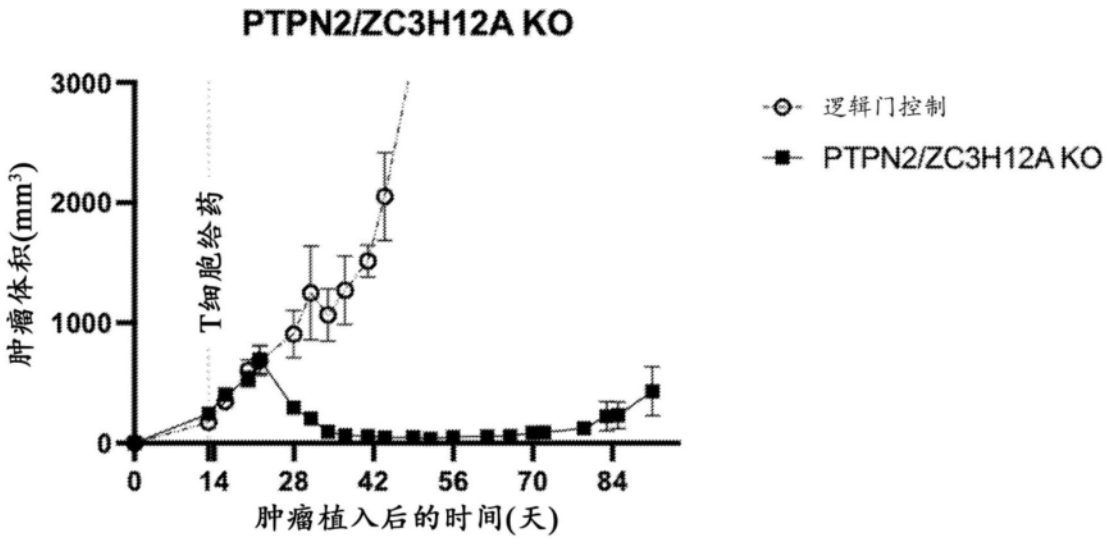

PTPN2/ZC3H12A KO
肿瘤体积(mm³)
3000
2000
1000
0
T细胞给药
0
14
28
42
56
70
84
肿瘤植入后的时间(天)
逻辑门控制
PTPN2/ZC3H12A KO

图6E

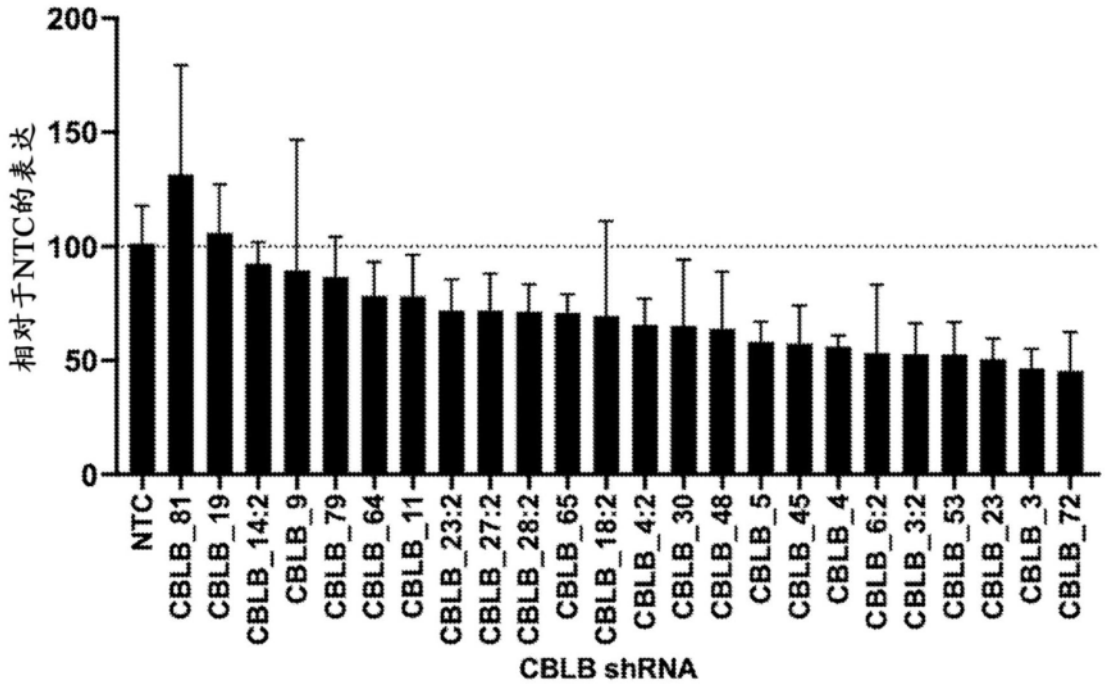

相对于NTC的表达
200
150
100
50
0
NTC
CBLB_81
CBLB_19
CBLB_14:2
CBLB_9
CBLB_79
CBLB_64
CBLB_11
CBLB_23:2
CBLB_27:2
CBLB_28:2
CBLB_65
CBLB_18:2
CBLB_4:2
CBLB_30
CBLB_48
CBLB_5
CBLB_45
CBLB_4
CBLB_6:2
CBLB_3:2
CBLB_53
CBLB_23
CBLB_3
CBLB_72
CBLB shRNA

图7A

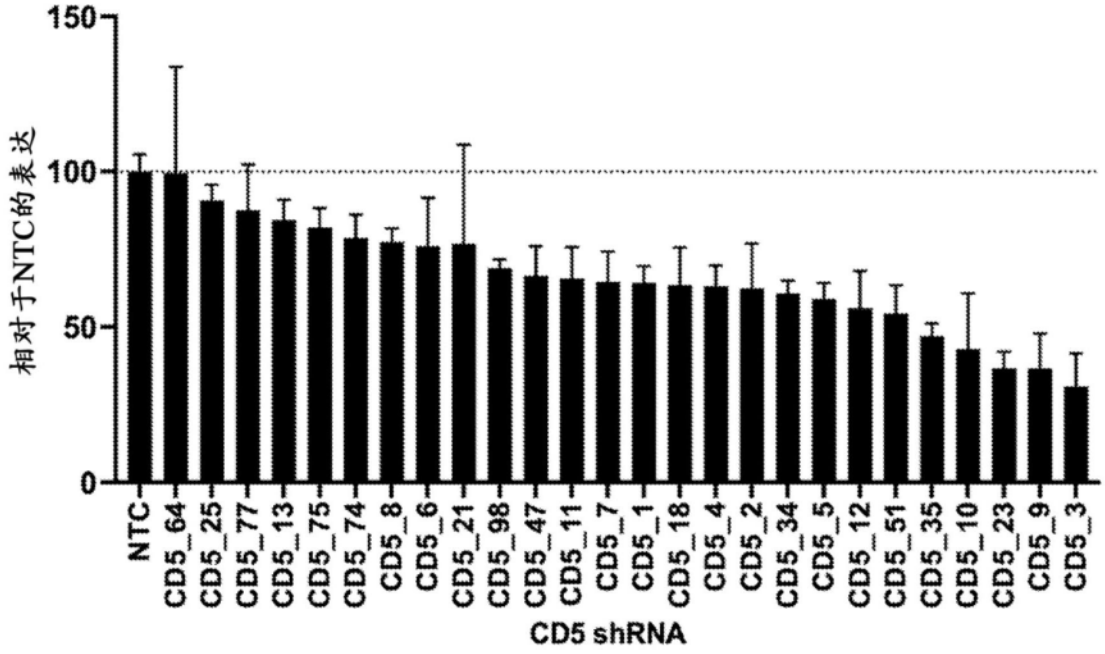

150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
CD5_64
CD5_25
CD5_77
CD5_13
CD5_75
CD5_74
CD5_8
CD5_6
CD5_21
CD5_98
CD5_47
CD5_11
CD5_7
CD5_1
CD5_18
CD5_4
CD5_2
CD5_34
CD5_5
CD5_12
CD5_51
CD5_35
CD5_10
CD5_23
CD5_9
CD5_3
CD5 shRNA

图7B

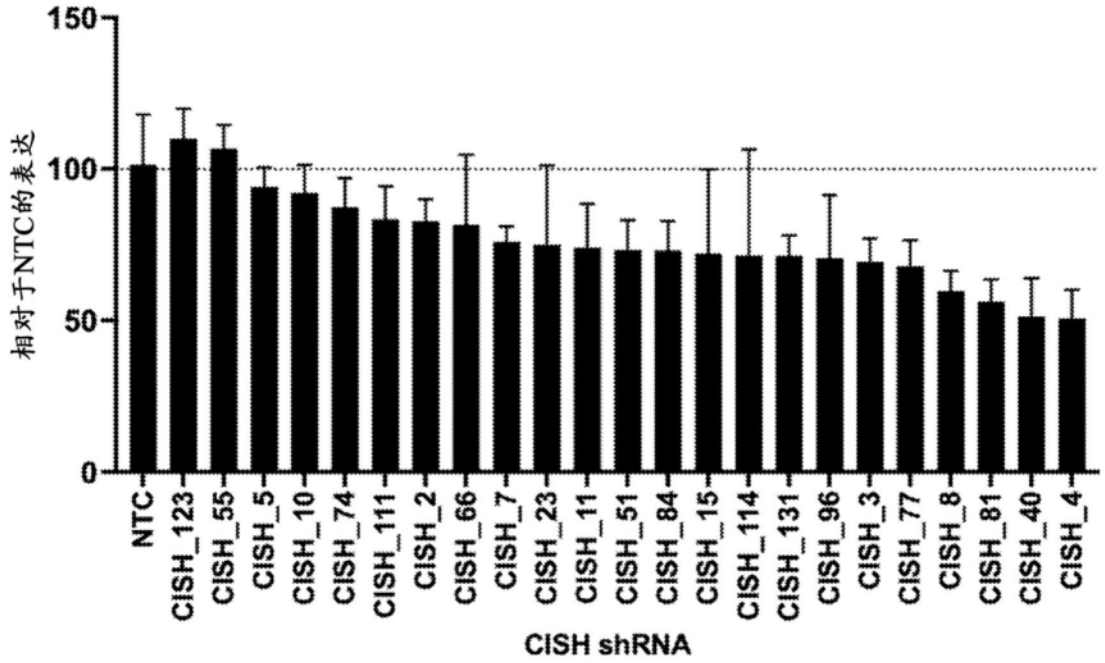

150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
CISH_123
CISH_55
CISH_5
CISH_10
CISH_74
CISH_111
CISH_2
CISH_66
CISH_7
CISH_23
CISH_11
CISH_51
CISH_84
CISH_15
CISH_114
CISH_131
CISH_96
CISH_3
CISH_77
CISH_8
CISH_81
CISH_40
CISH_4
CISH shRNA

图7C

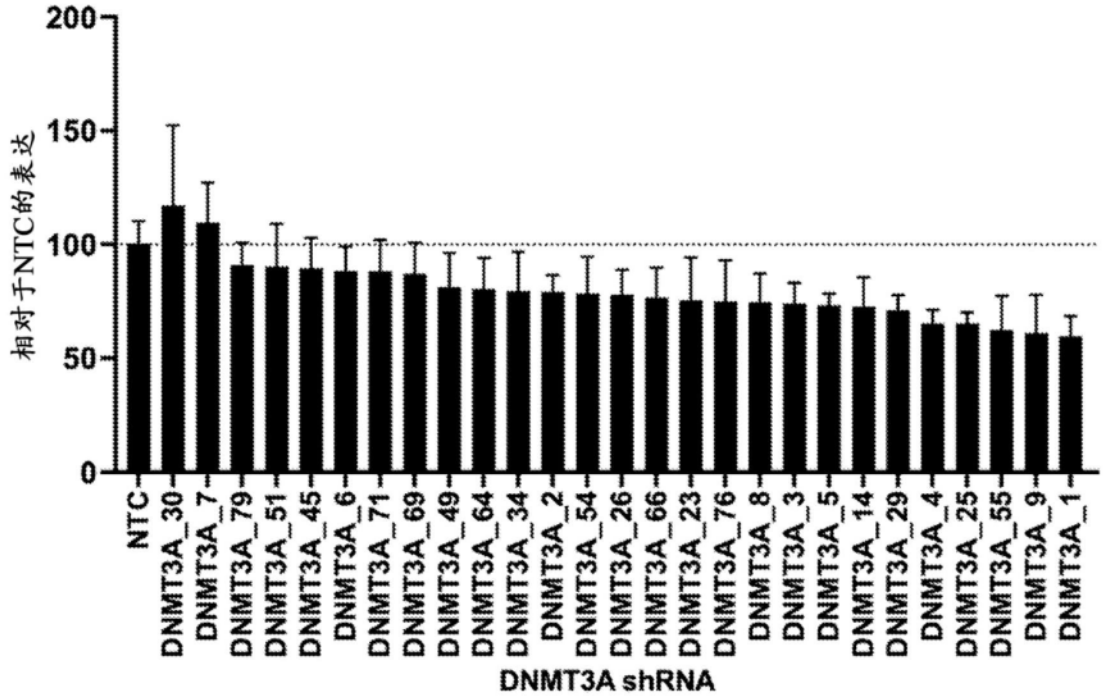

200
150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
DNMT3A_30
DNMT3A_7
DNMT3A_79
DNMT3A_51
DNMT3A_45
DNMT3A_6
DNMT3A_71
DNMT3A_69
DNMT3A_49
DNMT3A_64
DNMT3A_34
DNMT3A_2
DNMT3A_54
DNMT3A_26
DNMT3A_66
DNMT3A_23
DNMT3A_76
DNMT3A_8
DNMT3A_3
DNMT3A_5
DNMT3A_14
DNMT3A_29
DNMT3A_4
DNMT3A_25
DNMT3A_55
DNMT3A_9
DNMT3A_1
DNMT3A shRNA

图7D

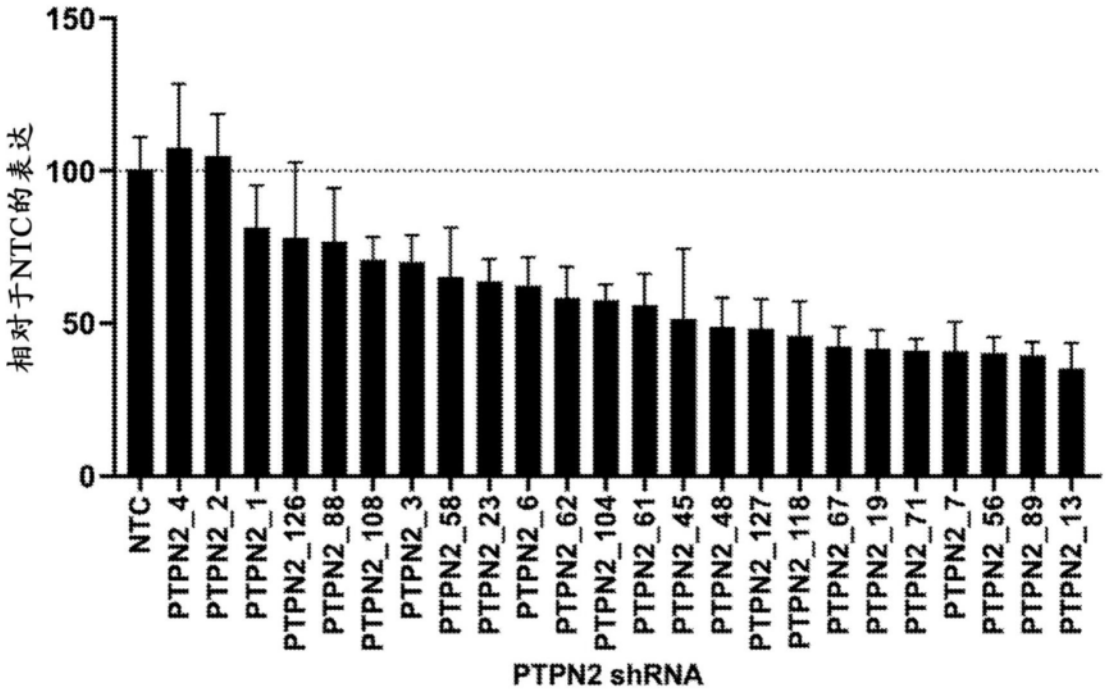

150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
PTPN2_4
PTPN2_2
PTPN2_1
PTPN2_126
PTPN2_88
PTPN2_108
PTPN2_3
PTPN2_58
PTPN2_23
PTPN2_6
PTPN2_62
PTPN2_104
PTPN2_61
PTPN2_45
PTPN2_48
PTPN2_127
PTPN2_118
PTPN2_67
PTPN2_19
PTPN2_71
PTPN2_7
PTPN2_56
PTPN2_89
PTPN2_13
PTPN2 shRNA

图7E

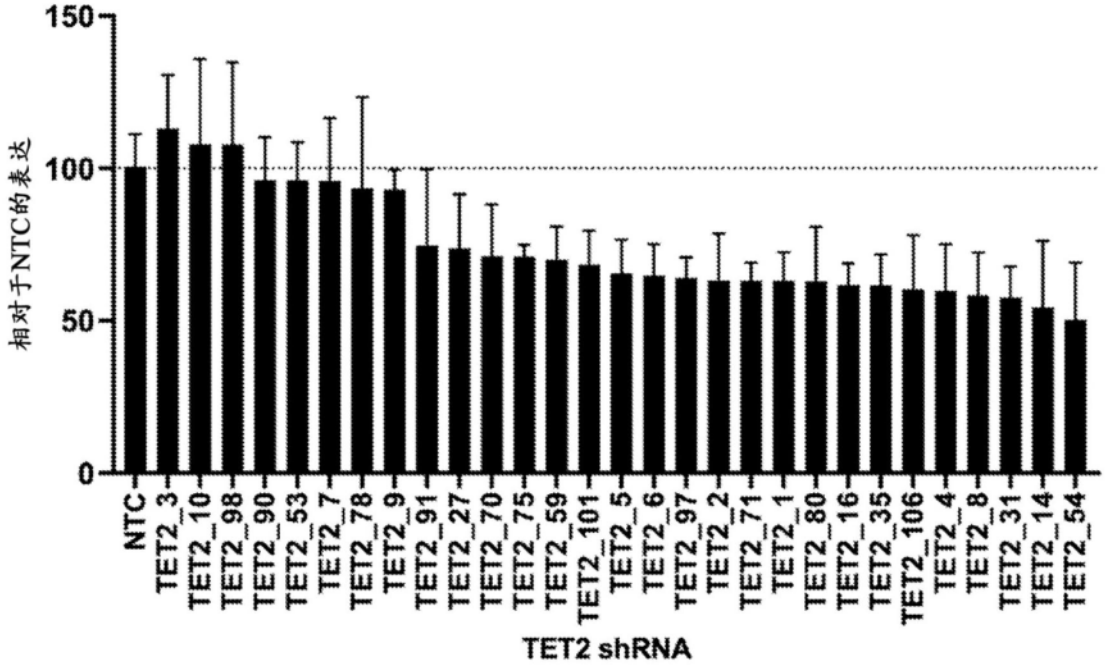

150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
TET2_3
TET2_10
TET2_98
TET2_90
TET2_53
TET2_7
TET2_78
TET2_9
TET2_91
TET2_27
TET2_70
TET2_75
TET2_59
TET2_101
TET2_5
TET2_6
TET2_97
TET2_2
TET2_71
TET2_1
TET2_80
TET2_16
TET2_35
TET2_106
TET2_4
TET2_8
TET2_31
TET2_14
TET2_54
TET2 shRNA

图7F

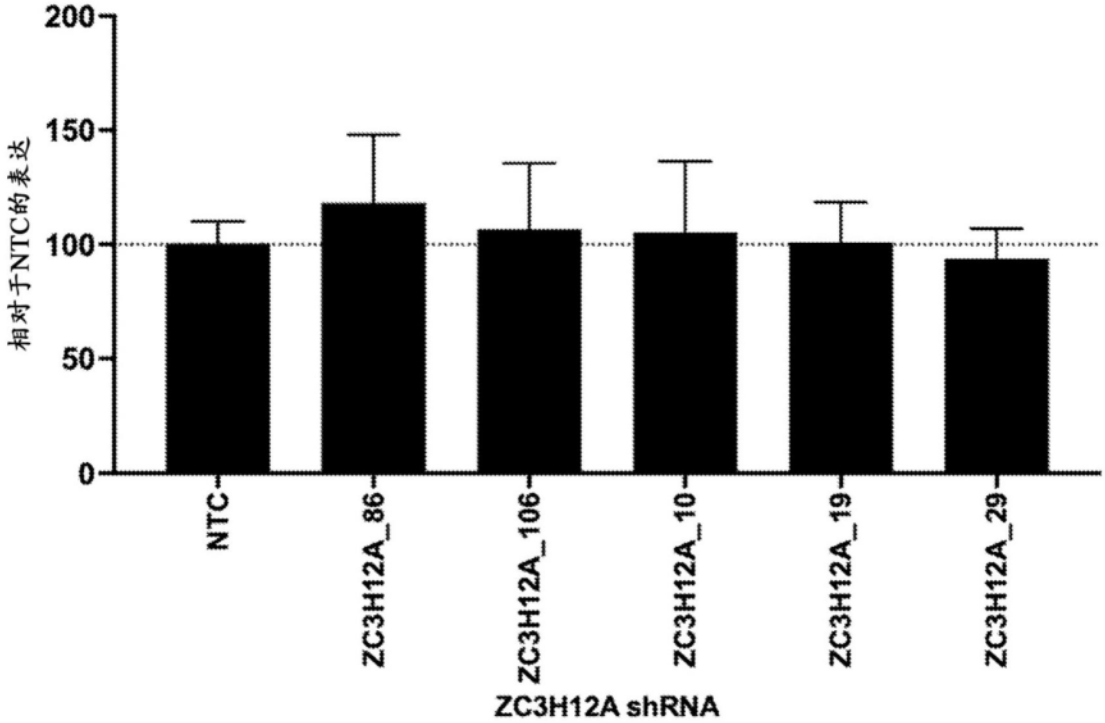

200
150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
ZC3H12A_86
ZC3H12A_106
ZC3H12A_10
ZC3H12A_19
ZC3H12A_29
ZC3H12A shRNA

图7G

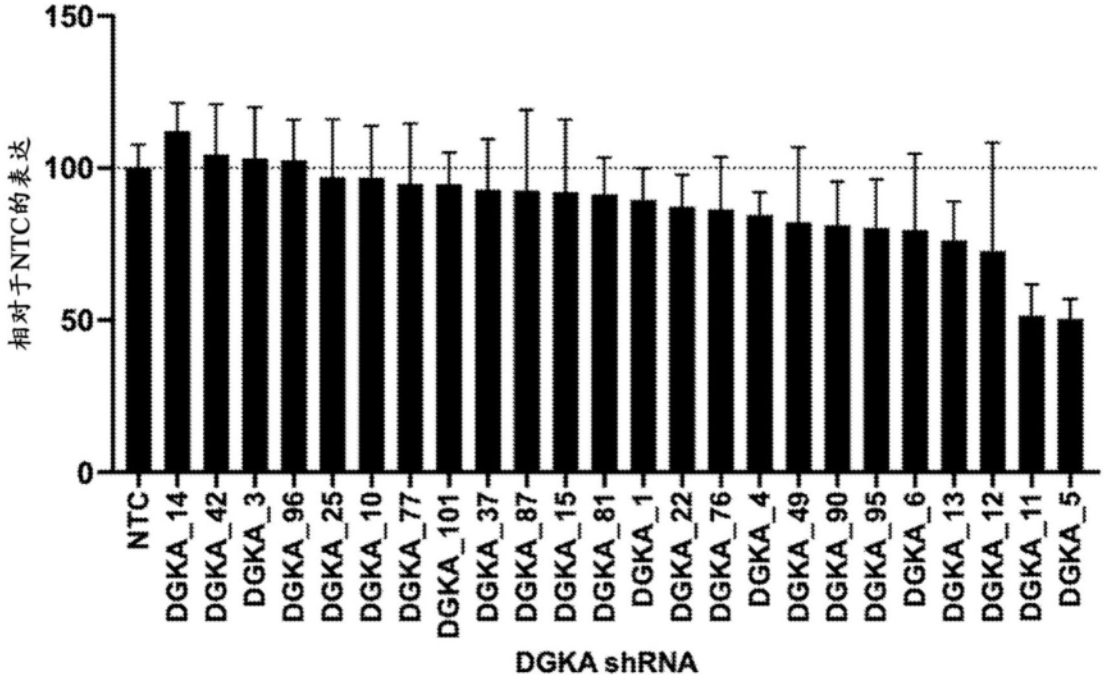

150
100
50
0
相对于NTC的表达
NTC
DGKA_14
DGKA_42
DGKA_3
DGKA_96
DGKA_25
DGKA_10
DGKA_77
DGKA_101
DGKA_37
DGKA_87
DGKA_15
DGKA_81
DGKA_1
DGKA_22
DGKA_76
DGKA_4
DGKA_49
DGKA_90
DGKA_95
DGKA_6
DGKA_13
DGKA_12
DGKA_11
DGKA_5
DGKA shRNA

图7H

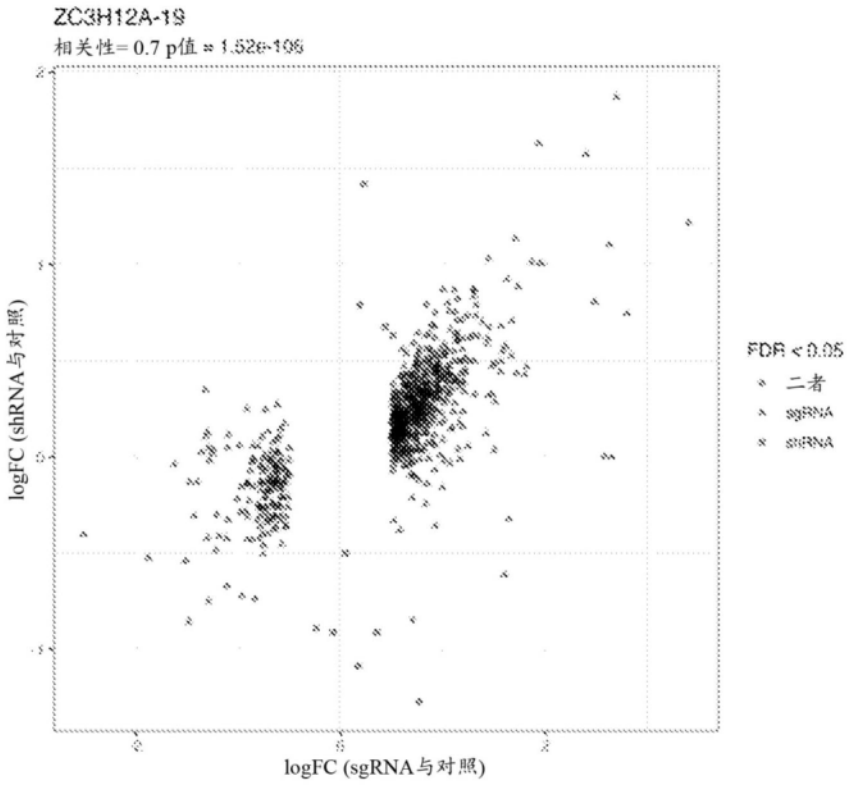

ZC3H12A-19
相关性= 0.7 p值 = 1.52e-106
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8A

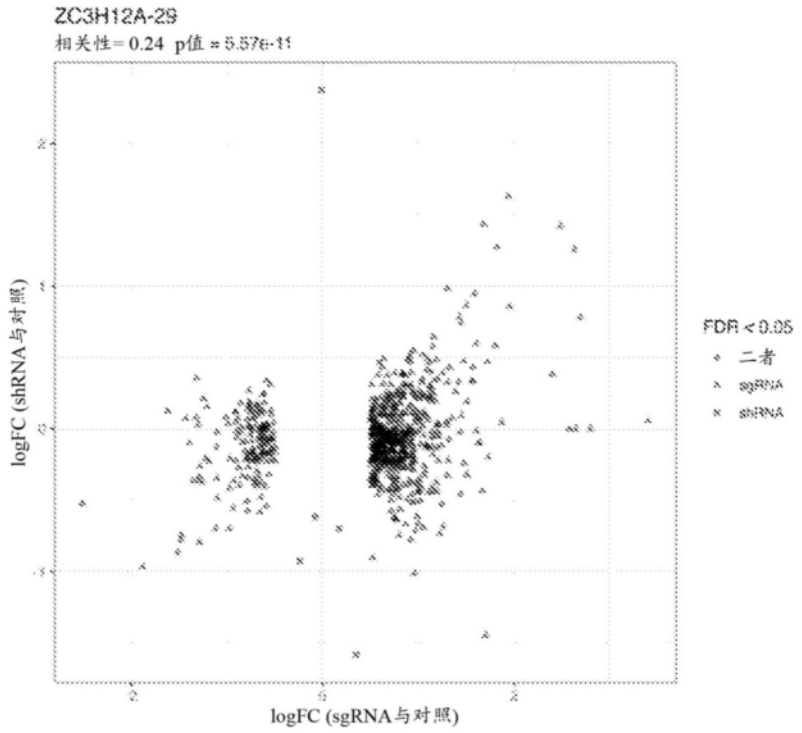

ZC3H12A-29
相关性= 0.24 p值 = 5.57e-11
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8B

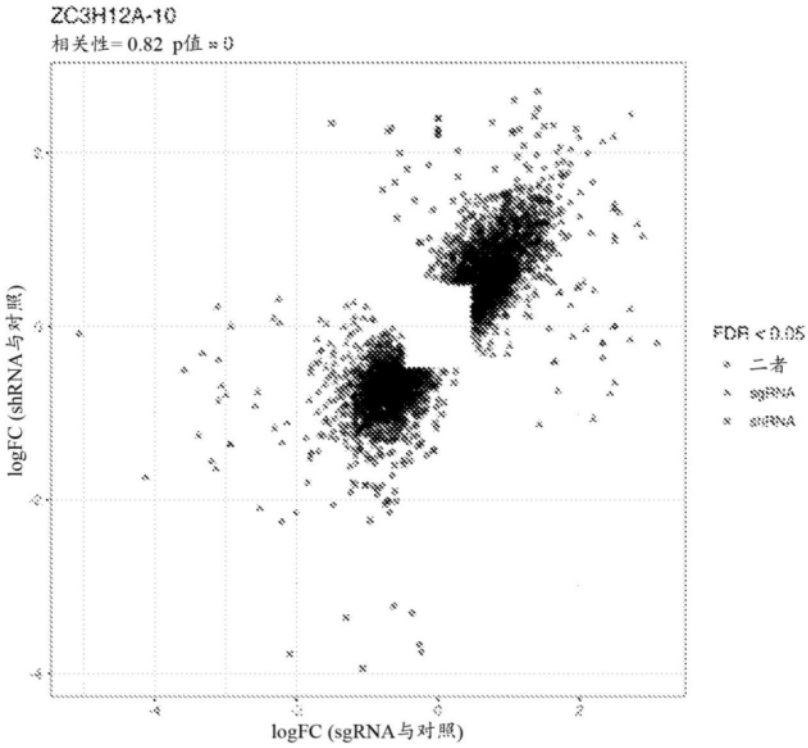

ZC3H12A-10
相关性= 0.82 p值 = 0
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8C

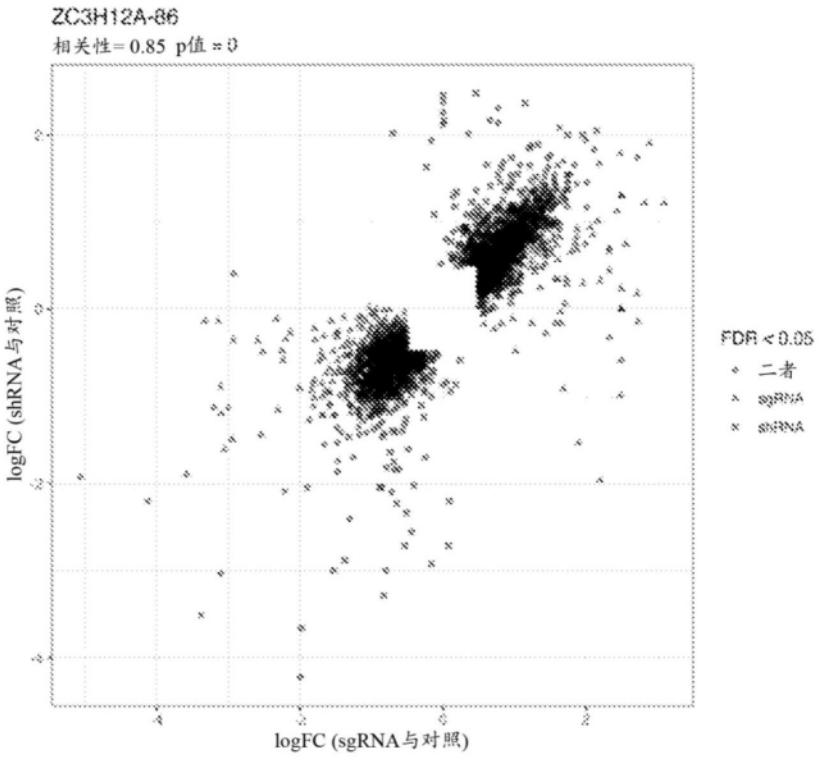

ZC3H12A-86
相关性= 0.85 p值 = 0
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8D

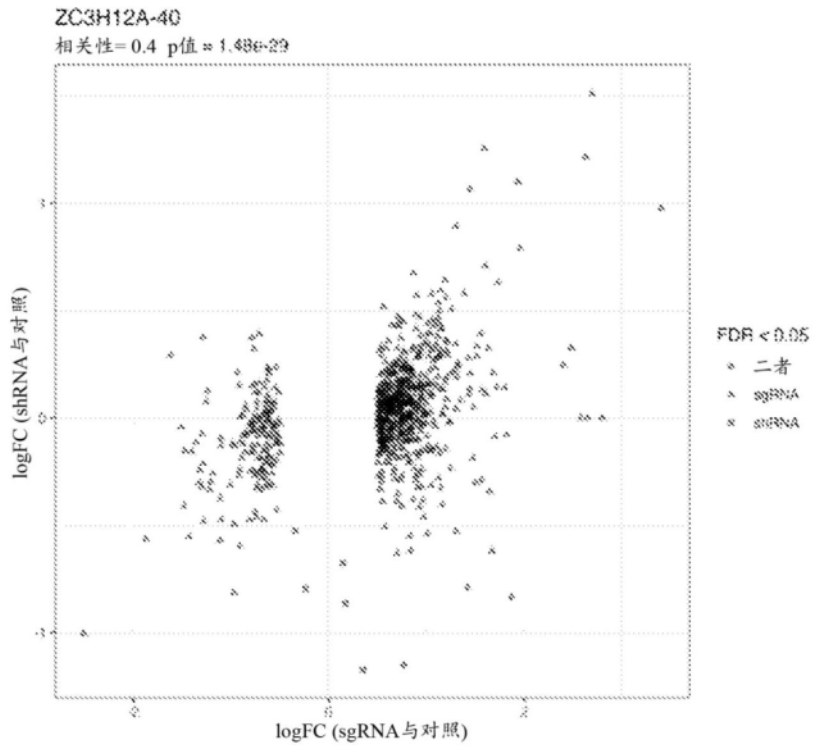

ZC3H12A-40
相关性= 0.4 p值 = 1.486e-29
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8E

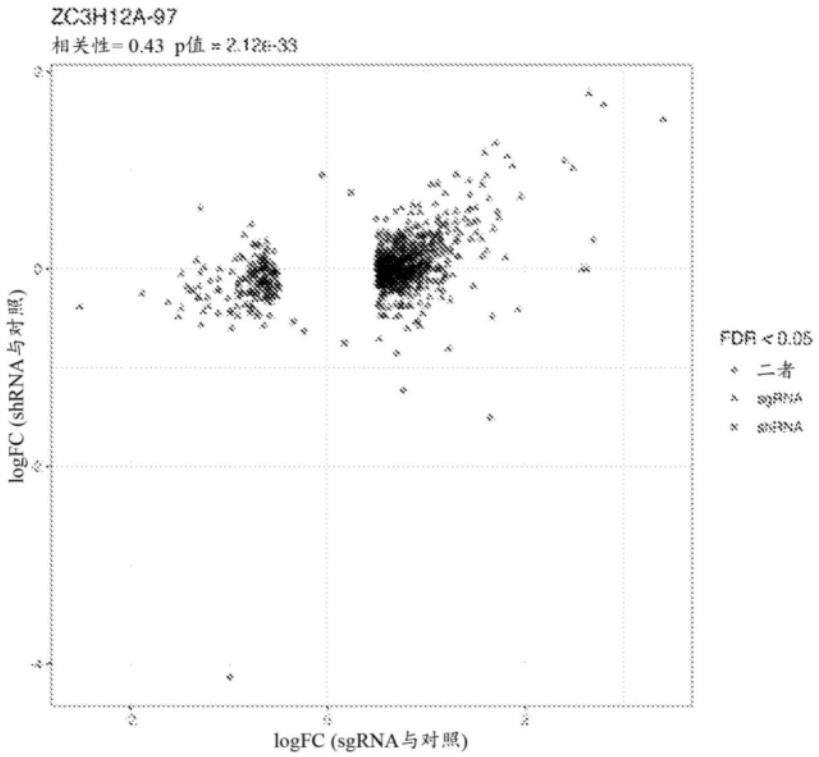

ZC3H12A-97
相关性= 0.43 p值 = 2.12e-33
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8F

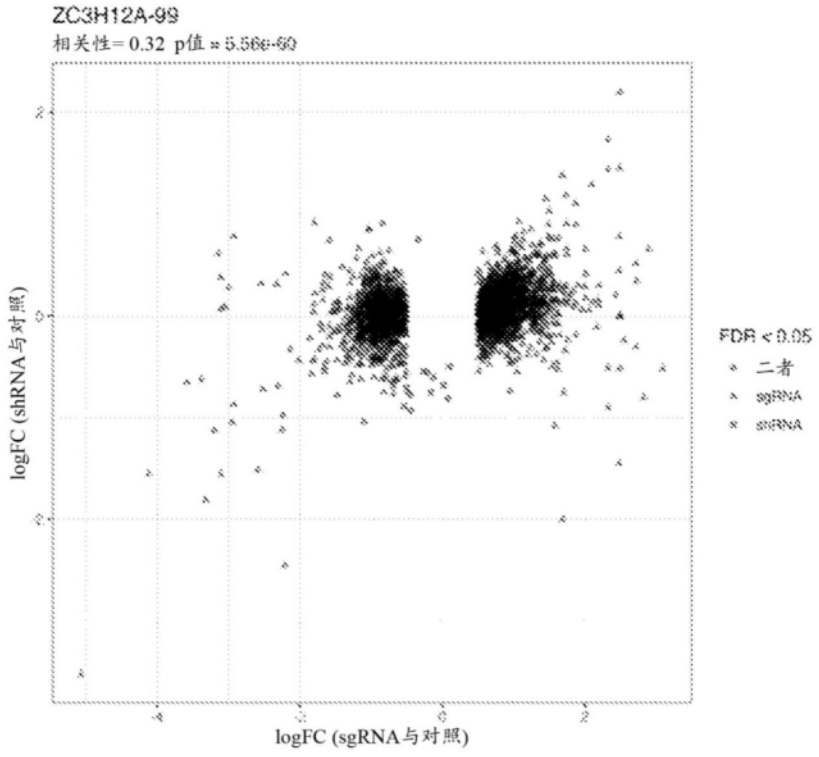

ZC3H12A-99
相关性= 0.32 p值 = 5.56e-60
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8G

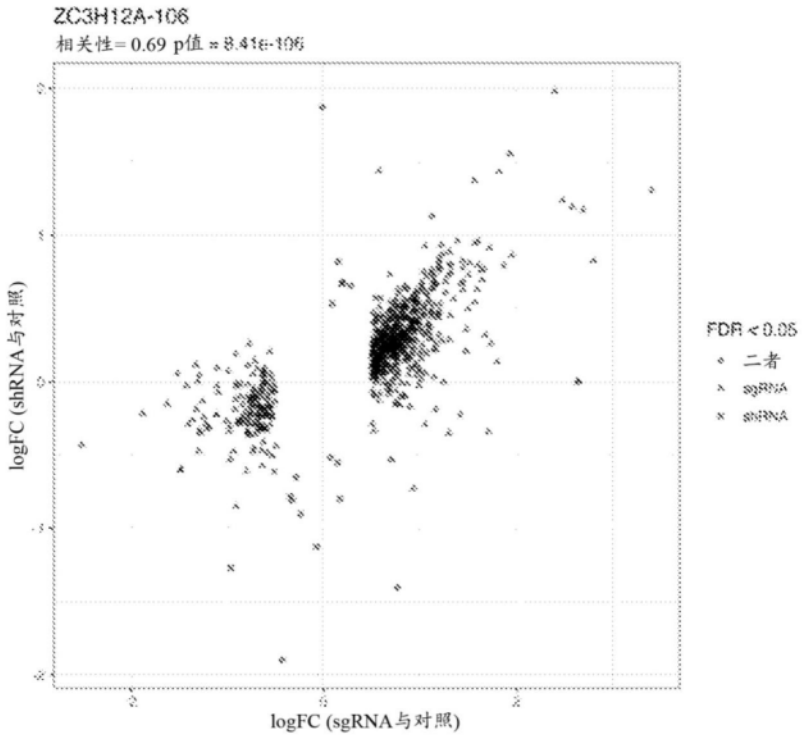

ZC3H12A-106
相关性= 0.69 p值 = 8.41e-106
logFC (shRNA与对照)
logFC (sgRNA与对照)
FDR < 0.05
二者
sgRNA
shRNA

图8H

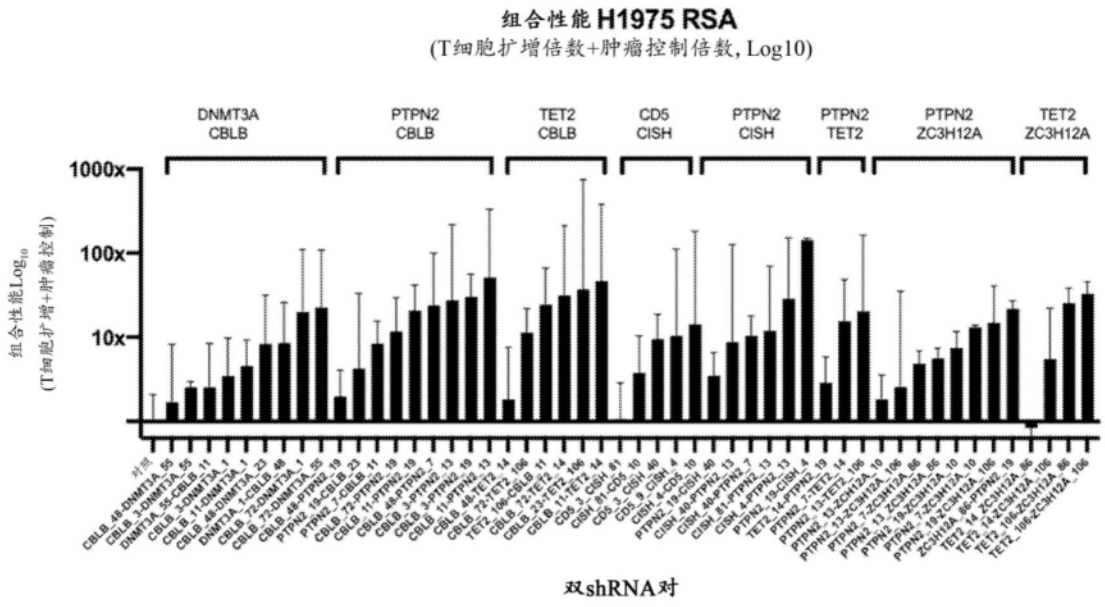

组合性能 H1975 RSA
(T细胞扩增倍数+肿瘤控制倍数, Log10)
DNMT3A CBLB
PTPN2 CBLB
TET2 CBLB
CD5 CISH
PTPN2 CISH
PTPN2 TET2
PTPN2 ZC3H12A
TET2 ZC3H12A
1000x
100x
10x
组合性能Log10 (T细胞扩增+肿瘤控制)
双shRNA对

图9