



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111565730 B

(45) 授权公告日 2024.09.17

(21) 申请号 201880085867.8

(22) 申请日 2018.11.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111565730 A

(43) 申请公布日 2020.08.21

(30) 优先权数据
62/583,724 2017.11.09 US
62/716,002 2018.08.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.07.08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/060038 2018.11.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/094725 EN 2019.05.16

(73) 专利权人 桑格摩生物治疗股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·康韦 G·K·李

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 余颖 陶家蓉

(51) Int.Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2017023803 A1, 2017.02.09
US 8563314 B2, 2013.10.22
CN 110325635 A, 2019.10.11
审查员 李非儿

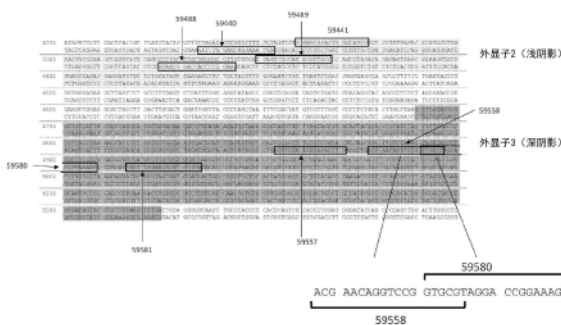
权利要求书3页 说明书39页
序列表17页 附图7页

(54) 发明名称

细胞因子诱导型含SH2蛋白(CISH)基因的遗传修饰

(57) 摘要

本公开内容属于基因组工程改造领域,特别是靶向遗传修饰CISH基因。



1. 一种遗传修饰的细胞,其包含内源性CISH基因外显子2或外显子3内的基因组修饰,其中所述遗传修饰的细胞选自T细胞、树突细胞、B细胞、诱导多潜能干细胞(iPSC)、造血干细胞,其中CISH基因在被一对锌指核酸酶(ZFN)切割后被修饰,其中所述一对锌指核酸酶包含锌指蛋白,所述锌指蛋白包含6个锌指结构域,所述每个锌指结构域包含识别螺旋,并且结合ZFN靶位点,其中所述遗传修饰在ZFN靶位点内,或在ZFN靶位点的1-100个碱基对内,其中所述一对锌指核酸酶包含选自以下对的锌指蛋白:SBS#59488和SBS#59489、SBS#59440和SBS#59441、SBS#59558和SBS#59557、以及SBS#59581和SBS#59580的蛋白质的识别螺旋区,其如下表每行中所示:

SBS #	设计						
	接头	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO:2)	QNATRT K (SEQ ID NO:3)	RSDNLSE (SEQ ID NO:4)	KRCNLRC (SEQ ID NO:5)	DRSTRTK (SEQ ID NO:6)	RRDNLH S (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLK R (SEQ ID NO:8)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	QNVSRPR (SEQ ID NO:11)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLP T (SEQ ID NO:13)	DRSALA R (SEQ ID NO:14)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	DRSNLTR (SEQ ID NO:15)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	ATCCLA H (SEQ ID NO:17)
59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	QAATLS R (SEQ ID NO:19)	RSDHLSA (SEQ ID NO:20)	DRSDLSR (SEQ ID NO:21)	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLT R (SEQ ID NO:23)	QSGNLH V (SEQ ID NO:24)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	NRYDLMT (SEQ ID NO:26)	RSDSLLR (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO:29)	QSSDLTR (SEQ ID NO:30)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	RLDILQQ(S EQ ID NO:31)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSYLPR (SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO:34)	LRQDLK R (SEQ ID NO:35)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSNRIN (SEQ ID NO:36)	QSSDLSR(S EQ ID NO:37)	WKWNL RA (SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDSLLR (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	QKGTLGE (SEQ ID NO:39)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)

且其中ZFN靶位点包含如下所示的核酸序列:

靶位点
5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgetgeat (SEQ ID NO:40)
5' gaGGAGGTgGCAGAGGGTACCccagccc (SEQ ID NO:41)
5' ccAGCAAAGGACGAGGTCTAGaaggcag (SEQ ID NO:42)
5' gtGGAGCGGACTGGGCAGCGgccctgt (SEQ ID NO:43)
5' gaTGCGTGgCCTGGACAAGCAgttggag (SEQ ID NO:44)
5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgctggcat (SEQ ID NO:45)
5' atAGTGCTgCACAAAGGCTGACcacatcc (SEQ ID NO:46)
5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgctgga (SEQ ID NO:47)

2. 如权利要求1所述的遗传修饰的细胞,其中,所述基因组修饰选自插入和/或缺失。
3. 如权利要求1或2所述的遗传修饰的细胞,其中,一种或多种转基因被整合进入所述CISH基因中。
4. 如权利要求3所述的遗传修饰的细胞,其中,所述转基因编码嵌合抗原受体(CAR),免

疫调节因子,工程改造或外源性T细胞受体 (TCR)。

5. 如权利要求4所述的遗传修饰的细胞,其中,所述工程改造的TCR是抗体偶联的T细胞受体 (ACTR)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的遗传修饰的细胞衍生的细胞。

7. 一对锌指蛋白,其中每个锌指蛋白包含6个锌指结构域,其各自包含识别螺旋区,其中所述一对锌指蛋白包含选自以下每一对的锌指蛋白:

SBS#59488和SBS#59489、SBS#59440和SBS#59441、SBS#59558和SBS#59557、以及SBS#59581和SBS#59580的识别螺旋区,

其如下表每行中所示:

SBS #	设计						
	接头	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO:2)	QNATRT K (SEQ ID NO:3)	RSDNLSE (SEQ ID NO:4)	KRCNLRC (SEQ ID NO:5)	DRSTRTK (SEQ ID NO:6)	RRDNLH S (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLK R (SEQ ID NO:8)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	QNVSRPR (SEQ ID NO:11)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLP T (SEQ ID NO:13)	DRSALA R (SEQ ID NO:14)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	DRSNLTR (SEQ ID NO:15)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	ATCCLA H (SEQ ID NO:17)
59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	QAATLS R (SEQ ID NO:19)	RSDHLSA (SEQ ID NO:20)	DRSDLSR (SEQ ID NO:21)	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLT R (SEQ ID NO:23)	QSGNLH V (SEQ ID NO:24)	QSGHLAR(SEQ ID NO:25)	NRYDLMT(SEQ ID NO:26)	RSDSLLR(SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO:29)	QSSDLTR (SEQ ID NO:30)	QSGNLAR(SEQ ID NO:16)	RLDILQQ(S EQ ID NO:31)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	DNSYLPR (SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO:34)	LRQDLK R (SEQ ID NO:35)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	DNSNRIN(SEQ ID NO:36)	QSSDLRS(S EQ ID NO:37)	WKWNL RA (SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDSLLR (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR(SEQ ID NO:25)	QKGTGGE(SEQ ID NO:39)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)

8. 一种融合蛋白,其包含权利要求7所述的一对锌指蛋白和野生型或工程改造的切割结构域或野生型或工程改造的切割半结构域。

9. 一种多核苷酸,其编码一种或多种权利要求7所述的一对锌指蛋白或权利要求8所述的融合蛋白。

10. 一种分离的细胞,其包含一种或多种权利要求7所述的一对锌指蛋白或权利要求8所述的融合蛋白和/或一种或多种权利要求9所述的多核苷酸,所述细胞选自T细胞、树突细胞、B细胞、诱导多潜能干细胞 (iPSC)、或造血干细胞。

11. 如权利要求10所述的分离的细胞衍生的分离的细胞。

12. 一种试剂盒,其包含一种或多种权利要求7所述的一对锌指蛋白或权利要求8所述的融合蛋白,一种或多种权利要求9所述的多核苷酸和/或一种或多种权利要求10或11所述的分离的细胞。

13. 一种生成根据权利要求1-6中任一项所述的遗传修饰的细胞的体外方法,所述方法包括向所述细胞导入编码一种或多种核酸酶的一种或多种多核苷酸,所述一种或多种核酸

酶包含结合CISH基因外显子2或外显子3中靶位点的DNA结合结构域,其中所述一种或多种核酸酶结合并切割所述CISH基因,从而遗传修饰所述细胞,其中所述一种或多种核酸酶是一对锌指核酸酶(ZFN),所述锌指核酸酶包含锌指蛋白,所述锌指蛋白包含6个锌指结构域,所述每个锌指结构域包含识别螺旋,并且结合ZFN靶位点,其中所述遗传修饰在ZFN靶位点内,或在ZFN靶位点的1-100个碱基对内,其中所述一对锌指核酸酶包含选自以下对的锌指蛋白:SBS#59488和SBS#59489、SBS#59440和SBS#59441、SBS#59558和SBS#59557、以及SBS#59581和SBS#59580的蛋白质的识别螺旋区,其如下表每行中所示:

SBS #	接头	设计					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO:2)	QNATRT K (SEQ ID NO:3)	RSDNLSE (SEQ ID NO:4)	KRCNLRC (SEQ ID NO:5)	DRSTRTK (SEQ ID NO:6)	RRDNLH S (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLK R (SEQ ID NO:8)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	QNVSRPR (SEQ ID NO:11)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLP T (SEQ ID NO:13)	DRSALA R (SEQ ID NO:14)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	DRSNLTR (SEQ ID NO:15)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	ATCCLA H (SEQ ID NO:17)
59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	QAATLS R (SEQ ID NO:19)	RSDHLSA (SEQ ID NO:20)	DRSDLSR (SEQ ID NO:21)	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLT R (SEQ ID NO:23)	QSGNLH V (SEQ ID NO:24)	QSGHLAR(SEQ ID NO:25)	NRYDLMT(SEQ ID NO:26)	RSDSLRL(SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO:29)	QSSDLTR (SEQ ID NO:30)	QSGNLAR(SEQ ID NO:16)	RLDILQQ(S EQ ID NO:31)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	DNSYLPR (SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO:34)	LRQDLK R (SEQ ID NO:35)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	DNSNRIN(SEQ ID NO:36)	QSSDLRS(S EQ ID NO:37)	WKWNL RA (SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR(SEQ ID NO:25)	QKGTGGE(SEQ ID NO:39)	RSDNLST(SEQ ID NO:32)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)

14. 如权利要求13所述的方法,其中,所述遗传修饰的细胞包含转基因,所述转基因被整合进入CISH基因并在所述细胞中表达。

15. 一种细胞群,其包含根据权利要求1-5中任一项所述的遗传修饰的细胞。

16. 如权利要求15所述的细胞群,其还包含衍生自所述遗传修饰的细胞的遗传修饰的细胞。

细胞因子诱导型含SH2蛋白(CISH)基因的遗传修饰

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年11月9日提交的美国临时申请号62/583,724和2018年8月8日提交的美国临时申请号62/716,002的权益,其公开通过引用全文纳入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容属于基因组工程改造领域,特别是靶向修饰细胞因子诱导型含SH2蛋白(cytokine inducible SH2-containing protein) (CISH或CIS) 基因。

背景技术

[0004] 细胞之间彼此通信通过直接接触或通过分子“信息”释放到胞外空间,以在表达适当细胞表面受体复合物的靶细胞中协调增殖,迁移,分化和影响基因表达的变化。对于许多细胞因子和生长因子,受体结合通过JAK/STAT信号转导途径启动靶细胞内的信号转导。参见例如,Aaronson,等(2002) *Science* 296(5573):1653-5;Rawlings,等(2004) *J Cell Sci* 117(Pt 8):1281-3;和Jatiani,等(2010) *Genes Cancer* 1(10):979-93。在配体不存在的情况下,受体的细胞质末端与Janus酪氨酸激酶家族的失活成员(JAK1-3或Tyk2)相关联。配体结合诱导两个或更多个受体亚基之间形成受体复合物,使JAK蛋白紧密接近,从而允许通过转磷酸化进行激活。然后,激活的JAK可以使受体胞质结构域上的酪氨酸残基磷酸化,以为信号传导与转录激活(STAT)蛋白之一创建结合位点。

[0005] 哺乳动物中存在7种STAT蛋白,STAT1-4,STAT5a,STAT5b和STAT6。各种STAT蛋白的结构内是Src同源-2(SH2)结构域(参见,Sadowski,等(1986) *Mol Cell Biol* 6(12):4396-408),其指导与受体上的含有磷酸酪氨酸的位点结合,其中STAT蛋白自身可以通过JAK激酶经酪氨酸磷酸化。一旦经磷酸化,STAT蛋白形成同二聚体或异二聚体并被运输至细胞核,在其中它们结合DNA并次级附近基因的转录。因为JAK/STAT途径在调节生长,细胞增殖和免疫应答中起到关键作用,所以该系统的失调可以导致癌症或炎性疾病的发展。

[0006] STAT激活快速诱导这样的一组基因的表达,所述一组基因编码细胞因子信号转导抑制剂(SOCS)和细胞因子诱导型SH2(CISH)结构域包含型的胞内蛋白质家族。参见例如,Palmer等.(2009) 30(12):592-602;Yoshimura,等(2007) *Nat Rev Immunol* 7(6):454-65;Trengove,等(2013) *Am J Clin Exp Immunol* 2(1):1-29。SOCS/CISH蛋白包含可变序列的N末端结构域并作用,之后为SH2结构域和C末端SOCS结构域,其指导E3泛素连接酶复合物的组装,所述E3泛素连接酶复合物用泛素标记靶蛋白,使得它们通过蛋白酶体降解。SOCS/CISH蛋白通过如下方式抑制JAK/STAT信号转导,其通过与STAT竞争结合受体上磷酸酪氨酸位点,从而抑制STAT激活,并且通过指导泛素沉积在各种蛋白质上,增强其转换(turnover)。因此,SOCS/CISH蛋白建立了经典负反馈环路以调节细胞因子和生长因子信号转导,并且当配体不再存在时,增强信号的衰减。一些SOCS蛋白具有其它活性,如直接抑制JAK以及增强其他SOCS蛋白的转换,从而使受体信号转导的调节更为复杂。参见,Kershaw,等(2013) *Biochem Soc Trans.* 41(4):1042-7。

[0007] CISH(也称之为CIS)是鉴定为红细胞生成素(EPO)受体(EPOR)上配体结合后快速诱导的基因(在30分钟内)的首个SOCS蛋白。参见,Yoshimura,等(1995)EMBO J 14(12):2816-26。CISH表达还通过适当细胞类型中的白介素-2(IL-2)、IL-3和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱导。免疫沉淀分析证明CISH蛋白稳定结合IL-3R β 链和EPOR,但是仅在配体结合后,这表明需要受体的酪氨酸磷酸化。CISH蛋白的过表达抑制细胞生长,表明CISH对信号转导具有负面影响。然后,证明CISH表达将依赖于STAT5激活,并在CISH启动子区域中发现了多个STAT5结合位点。参见,Matsumoto,等(1997)Blood 89(9):3148-54。此外,CISH抑制STAT5的EPO依赖性激活并抑制其他STAT5依赖型受体的活性,这表明CISH是STAT5的反馈调节剂。

[0008] 许多种STAT5依赖性受体诱导CISH表达,包括(但不限于)生长激素(GH),催乳素(PRL),促血小板生成素(TPO),瘦蛋白,IL-2,IL-5和IL-9。参见,Bhattacharya,等(2001)Am J Respir Cell Mol Biol 24(3):312-6。已经证明CISH结合并抑制GH受体(GHR)、PRL受体和IL-2受体 β -链的信号转导,并且促进GHR的内化和去活。参见,Ram,等(1999)Biol Chem 274(50):35553-61;Endo,等(2003)J Biochem 133(1):109-13;Aman,等(1999)J Biol Chem 274(42):30266-72;Landsman,等(2005)J Biol Chem 280(45):37471-80。在许多组织中发现Cish mRNA的表达(肝,肾,心,胃,肺,卵巢和骨骼肌)。参见,Palmer,等(2009)30(12):592-602;Anderson,等(2009)138(3):537-44;Clasen,等(2013)J Lipid Res 54(7):1988-97。尽管它明显涉及大量重要细胞因子和生长因子的信号转导器,但是Cish敲除小鼠具有最小的缺陷(除了免疫应答中的细微变化)。参见,Palmer,等(2009)Trends Immunol 30(12):592-602;Tregrove,等(2013)Am J Clin Exp Immunol 2(1):1-29。这可能是由于其他SOCS家族蛋白质的补偿(compensatory)活性。在组成型表达由 β -肌动蛋白启动子驱动的Cish的转基因小鼠中观察到CISH对假定靶基因生物学的影响。这些小鼠的体重下降,乳腺发育缺陷, γ/δ T细胞、天然杀伤(NK)细胞和NKT细胞数量减少,类似Stat5a和/或Stat5b缺陷型小鼠的表型。参见,Matsumoto,等(1999)Mol Cell Biol 19(9):6396-407。

[0009] 因为CISH可能通过多种细胞因子和生长因子影响信号转导,所以发现CISH活性和变体与感染性疾病和癌症相关并不奇怪。几项研究已经表明,对于对象中携带某些CISH多态性,包括疟疾、钩端螺旋体病、乙型肝炎病毒和肺结核的多种感染性物质的易感性增加。参见,Khor,等(2010)N Engl J Med 362(22):2092-101;Esteves,等(2014)PLoS One 9(9):e108534;Hu,等(2014)PLoS One 9(6):e100826;Tong,等(2012)Immunogenetics 64(4):261-5;Ji,等(2014)Infect Genet Evol 28:240-4;Sun,等(2014)PLoS 9(3):e92020。所有研究共有的一个风险等位基因(rs 414171,从转录开始的-292)在外周血单个核细胞中显示出相较于其他等位基因更低水平的CISH表达。参见,Khor和Sun,同上。在乳腺癌中,相较于正常组织,CISH的表达水平在乳腺癌和癌细胞系中升高,导致人们猜测CISH可能通过其激活胞外信号调节激酶(ERK)的能力导致肿瘤生成。Raccurt,等(2003)Br. J. Cancer 89(3):524-32。CISH变体也与奶牛的产奶量性状相关联。参见,Arun,等(2015)Front Genet 6:342。

[0010] 虽然T细胞在通过T细胞受体(TCR)对刺激应答时不利用经典JAK/STAT信号转导通路,但Cish表达在T细胞被CD3的抗体激活时被快速诱导(在30分钟内)。参见,Ji,同上;Chen,等(2003)Int Immunol 15(3):403-9;Palmer,等(2015)J Exp Med 212(12):2095-

113;Yang,等(2013)Nat Immunol 14(7):732-40。STAT5在TCR刺激后快速磷酸化,可能是由TCR相关淋巴细胞特异性蛋白质酪氨酸激酶(Lck)所引起。参见,Welte,等(1999)Science283(5399):222-5。还通过TCR刺激诱导IL-2表达,但是其动力学太慢,无法解释Cish诱导。参见,Yang,等,同上;Li,等(2000)J Exp Med 191(6):985-94。抗原-原初T细胞中体内Cish表达很低,但是在疫苗接种后收集的效应物记忆(TEM)CD8+T细胞和经历抗原的中心记忆(TCM)中逐渐增强。参见,Sallusto,等(1999)Nature 401(6754):708-12。

[0011] 已经检验了Cish在T细胞响应性中的作用。由CD4启动子体内转基因表达Cish生成在CD4+辅助T细胞腔室具有组成型表达的小鼠。参见, Li,等,同上。循环T细胞亚群未受影响,但与预期的抑制反应相反,CD4+T细胞展现出TCR诱导的增殖和细胞因子表达增加以及体内存活率增加。循环T细胞群在Cish敲除小鼠中也是正常的,但是在CD4+和CD8+T细胞子集中再次观测到对TCR刺激应答增强(增殖和细胞因子产生)。参见,Palmer和Yang,同上。Cish作用的分子基础也是不清楚的,因为Cish转基因小鼠中CD4+T细胞的反应性增强被认为是Cish和蛋白质激酶Cθ之间的相互作用,虽然通过Cish抑制CD8 T细胞活性归因于磷脂酶C-γ1的退化加剧。

[0012] Cish缺陷小鼠中T细胞活性增强的一个后果是过继转输的抗原特异性CD8T细胞对黑色素瘤模型中建立的肿瘤持久且更具侵略性的应答。参见,Palmer,同上。此外,在人T细胞中减少CIHS表达增强共转导的肿瘤特异性TCR的功能性。这些数据表明,缓解减轻TCR信号传递的一些负反馈活性可能会对肿瘤产生更强的免疫反应性。然而,小鼠模型中抗黑素瘤活性增强与更大的眼自身免疫相关。相似地,虽然在其他Cish缺陷小鼠系中没有巨大的发育缺陷,但是在老年动物(>6个月)中发展出了自发性肺病,这很显然是由于TH2和TH9 CD4T细胞亚群增加所致。这些研究说明了免疫调节的共同挑战:过度的抑制将使患者易受感染和肿瘤发展的攻击,而过多的刺激会导致自身免疫或慢性炎症性疾病。

[0013] 重组转录因子包含TAL-效应物(TALE)或锌指蛋白(ZFP)的DNA结合结构域和工程改造的核酸酶锌指核酸酶(“ZFNS”),TALEN,CRISPR/CAS核酸酶系统,和归巢核酸内切酶,它们都旨在特异性靶向靶DNA位点结合,该重组转录因子具有调节内源性基因表达的能力并且能够用于基因组工程改造,基因治疗以及疾病治疗,诸如癌症和炎症。参见例如,美国专利号9,877,988;9,394,545;9,150,847;9,206,404;9,045,763;9,005,973;8,956,828;8,936,936;8,945,868;8,871,905;8,586,526;8,563,314;8,329,986;8,399,218;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,067,317;7,262,054;7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;美国专利公开号2003/0232410;2005/0208489;2005/0026157;2005/0064474;2006/0063231;2008/0159996;2010/0218264;2012/0017290;2011/0265198;2013/0137104;2013/0122591;2013/0177983;2013/0177960;和2015/0056705,其公开通过引用其全文纳入本文用于所有目的。此外,基于阿尔古(Argonaute)系统开发了靶向的核酸酶(例如,来自嗜热栖热菌(*T. thermophilus*),称之为‘TtAgo’,参见Swarts,等(2014)Nature 507(7491):258-261),其也具有用于基因组编辑和基因疗法的潜能。

[0014] 核酸酶介导的基因疗法可以用于遗传工程改造细胞,以具有一种或多种失活的基因和/或致使细胞表达之前并未在该细胞中产生的产物(例如,通过转基因插入和/或通过修正内源性序列)。使用转基因插入的实例包插入编码一种或多种新型治疗性蛋白质的一

种或多种基因,插入编码细胞或个体中缺乏的蛋白质的编码序列,在含有突变的基因序列的细胞中插入野生型基因,和/或插入编码结构核酸如微小RNA或siRNA的序列。“修正”内源性基因序列的有用应用的实例包括改变疾病相关基因突变,改变编码剪接位点的序列,改变调节序列以及靶向改变编码蛋白质结构特征的序列。可以通过同源定向修复(HDR)或通过在非同源末端连接(NHEJ)驱动的过程中的末端捕获来插入转基因构建体。参见例如,美国专利号9,045,763;9,005,973;7,888,121;和8,703,489。

[0015] 使用这些工程改造的转录因子和核酸酶的临床试验已经证明,这些分子能够治疗各种病灶,包括癌症,HIV和/或序页疾病(诸如血红蛋白病和/或血友病)。参见例如,Yu,等(2006)FASEB J.20:479-481;Tebas,等(2014)New Eng J Med 370(10):901。因此,这些方法可以用于治疗疾病。

[0016] 然而,仍然需要用于CISH基因修正以及供体递送的其他方法和组合物用于治疗或/或预防癌症、炎性疾病和需要CISH调节的其他疾病。

发明内容

[0017] 本发明描述了用于基因疗法和基因组工程改造的组合物和方法。具体地,所述方法和组合物涉及内源性CISH基因(突变体或野生型)的核酸酶介导的基因组修饰(例如,一个或多个插入和/或缺失)。基因组修饰可以包括使靶基因失活的插入和/或缺失(“插入缺失”) (例如,通过核酸酶切割基因后通过NHEJ);靶向插入转基因(供体),其包含蛋白质编码序列,例如,患有癌症和/或炎性病症的对象中缺少或有缺陷的蛋白质和/或靶向插入修正性(corrective)供体(例如,恢复具有突变基因的细胞中功能性CISH的序列),嵌合抗原受体(CAR)和/或HLA复合物的一种或多种组分或调节剂,或包含HLA复合物的融合蛋白(例如,B2M-HLA-E或B2M-HLA-G融合蛋白)。包含这些修饰的细胞和/或遗传修饰可以用于离体或体内方法。

[0018] 在某些方面中,本文提供了遗传修饰的细胞,其包含内源性CISH基因外显子2或外显子3内的基因组修饰。还提供了这些遗传修饰的细胞的细胞群。基因组修饰可以包括一个或多个插入和/或缺失(插入缺失)和/或整合一个或多个转基因到CISH基因中(例如,转基因编码嵌合抗原受体(CAR),免疫调节因子(例如,PD1、CTLA-4等),工程改造或外源性T细胞受体(TCR)(例如,抗体偶联的T细胞受体(ACR))。在某些实施方式中,核酸酶切割后修饰CISH基因(例如,一种或多种锌指核酸酶,一种或多种TALEN和/或一种或多种CRISPR/Cas核酸酶系统)。在某些实施方式中,核酸酶包含DNA结合结构域,其结合表2所示的靶位点,例如,包含锌指蛋白的锌指核酸酶,所述锌指蛋白包含4、5或6个锌指结构域,所述锌指结构域包含识别螺旋,诸如包含名为SBS#59488、SBS#59489、SBS#59440、SBS#59441、SBS#59558、SBS#59557、SBS#59581或SBS#59580的蛋白质的识别螺旋区的锌指蛋白。还提供了源自本文所述任何细胞的遗传修饰的细胞(以及这类细胞的细胞群)。在一些实施方式中,细胞选自下组:造血干细胞,T效应细胞和T调节细胞。

[0019] 在其他方面中,本文提供了包含6个锌指结构域的锌指蛋白,其各自包含识别螺旋区,其中所述锌指蛋白包含名为SBS#59488、SBS#59489、SBS#59440、SBS#59441、SBS#59558、SBS#59557、SBS#59581或SBS#59580的蛋白质的识别螺旋区。还提供了包含本文所述任何锌指蛋白的融合蛋白,包括锌指蛋白与野生型或工程改造的切割结构域或切割半结构域的融

合体。还提供了编码本文所述一种或多种ZFP和/或融合蛋白的一种或多种多核苷酸。还提供了包含一种或多种蛋白质(例如,ZFP或融合蛋白)和/或编码这些蛋白质的一种或多种多核苷酸的分离细胞(例如,T效应细胞,T调节细胞和/或造血干细胞)。还提供了这样的试剂盒,其包含本文所述的一种或多种蛋白质,一种或多种多核苷酸和/或一种或多种分离细胞。

[0020] 在其他方面中,本发明提供了生成本文所述遗传修饰的细胞的方法,所述方法包括将一种或多种多核苷酸导入细胞中,所述多核苷酸编码一种或多种核酸酶,其包含结合CISH基因外显子2或外显子3中靶位点的DNA结合结构域,其中所述核酸酶结合并切割CISH基因,从而遗传修饰细胞。在某些实施方式中,遗传修饰的细胞包含转基因,所述转基因被整合进入CISH基因并在细胞中表达。还提供了向有此需要的对象提供蛋白质的方法,所述方法包括给予本文所述遗传修饰的细胞,其中所述细胞在对象中表达转基因(例如,CAR,免疫调节因子,和/或ACTR等)。

[0021] 在一方面中,本公开是用于使用一种或多种核酸酶靶向修饰CISH基因的方法和组合物。将核酸酶,例如,工程改造的兆核酸酶,锌指核酸酶(ZFN)(术语“ZFN”包括对一ZFN),TALE核酸酶(TALEN包括TALE效应结构域与来自限制性内切核酸酶和/或来自兆核酸酶(诸如兆TALE和紧凑型TALEN)的核酸酶结构域的融合体)(术语“TALEN”包括一对TALEN),Ttgo系统和/或CRISPR/Cas核酸酶系统用于在细胞中CISH基因基因座处切割DNA。CISH基因可在切割(例如,通过插入和/或缺失(“插入缺失”))后和/或通过供体转基因的靶向插入而失活。供体转基因可以通过同源定向修复(HDR)或非同源修复机制(例如,NHEJ供体捕获)。本文所述核酸酶可以诱导靶DNA中的双链断裂(DSB)或单链断裂(切口(nick))。在一些实施方式中,将两种切口酶用于通过引入两个切口来产生DSB。在一些情况中,切口酶是ZFN,而在其他一些情况中,切口酶是TALEN或CRISPR/Cas切口酶。本文所述的任何核酸酶(例如,ZFN,TALEN,CRISPR/Cas等)可以靶向CISH基因的内含子和/或外显子(例如,外显子2或3)(包括与内含子和外显子重叠的序列),例如,表2所示靶序列,包括例如,包含表2所示序列的9-20或更多个(9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)连续或非连续氨基酸。

[0022] 在一方面,本文所述是非天然产生的锌指蛋白(ZFP),其结合基因组中CISH基因中的靶位点,其中ZFP包含一个或多个工程改造的锌指结合结构域。在一实施方式中,ZFP是切割感兴趣的靶基因组区域的锌指核酸酶(ZFN),其中ZFP包含一个或多个工程改造的锌指结合结构域和核酸酶切割结构域或切割半结构域。例如,切割结构域和切割半结构域可以获自各种限制性内切核酸酶和/或归巢内切核酸酶,并且可以是野生型或经工程改造的(突变体)。在一实施方式中,切割半结构域源自IIS型限制性内切核酸酶(例如,FokI)。在某些实施方式中,锌指结构域,具有识别螺旋结构域的锌指蛋白,如表1所列一行所示。包含这些锌指蛋白的核酸酶可以包含任何接头序列(例如,将其连接到切割结构域)和任何切割结构域(例如,二聚化突变体,如ELD突变体;在416、422、447、448和/或525中的一个或多个具有突变的FokI结构域;导致切口酶功能性的催化结构域变体)。参见例如,美国专利号8,703,489;9,200,266;8,623,618;和7,914,796;和美国专利公开号2018/0087072。在某些实施方式中,ZFN的ZFP结合表2中所示序列(SEQ ID NO:40-47)内9-18或更多个核苷酸的靶位点。

[0023] 在另一方面,本文所述的是转录激活因子样效应物(TALE)蛋白,其结合基因组中CISH基因中的靶位点(例如,包含表2中所示靶序列SEQ ID NO:40-47的至少9或12个(例如,

9-20或更多个)核苷酸的靶位点),其中所述TALE包含一个或多个工程改造的TALE结合结构域。在一实施方式中,TALE是切割感兴趣的靶基因组区域的核酸酶(TALEN),其中TALEN包含一个或多个工程改造的TALE DNA结合结构域和核酸酶切割结构域或切割半结构域。例如,切割结构域和切割半结构域可以获自各种限制性内切核酸酶和/或归巢内切核酸酶(兆核酸酶)。在一实施方式中,切割半结构域源自IIS型限制性内切核酸酶(例如,FokI)。在其他实施方式中,切割结构域源自兆核酸酶,其中兆核酸酶结构域还展现出DNA结合功能性。

[0024] 在另一方面中,本文所述的是结合基因组中CISH基因中的靶位点的CRISPR/Cas系统,其中CRISPR/Cas系统包含一种或多种工程改造的单向导RNA或功能性等同物,以及Cas9核酸酶。在某些实施方式中,单向导RNA(sgRNA)结合这样的序列,所述序列包含表2中所示靶位点(SEQ ID NO:40-47)的9、12或更多个连续核苷酸。

[0025] 本文所述的核酸酶(例如,ZFN、CRISPR/Cas系统、Ttago和/或TALEN)可以结合和/或切割感兴趣的区域,所述感兴趣的区域位于CISH基因内或其邻近的编码或非编码区中,例如,前导序列,尾随序列或内含子,或者非转录区内,其处于编码区上游或下游。

[0026] 在另一方面中,本文所述的是编码一种或多种核酸酶(例如,本文所述的ZFN、CRISPR/Cas系统、Ttago和/或TALEN)的多核苷酸。例如,多核苷酸可以是mRNA。在一些方面中,mRNA可以经化学修饰(参见例如,Kormann,等(2011)Nature Biotechnology 29(2):154-157)。

[0027] 在另一方面中,本文所述的是ZFN、CRISPR/Cas系统、Ttago和/或TALEN表达载体,其包含多核苷酸,其编码本文所述的一种或多种核酸酶(例如,ZFN、CRISPR/Cas系统、Ttago和/或TALEN),其操作性地连接启动子。在一实施方式中,表达载体是病毒载体(例如,AAV载体)。在一方面中,病毒载体展现出组织特异性趋向性。

[0028] 在另一方面中,本文所述的是这样的宿主细胞,其包含一种或多种核酸酶(例如,ZFN、CRISPR/Cas系统、Ttago和/或TALEN)表达载体。

[0029] 在另一方面,提供了包含本文所述表达载体的药物组合物。一些实施方式中,药物组合物可以包含多于一种表达载体。在一些实施方式中,药物组合物包含第一表达载体和第二表达载体,所述第一表达载体包含第一多核苷酸,所述第二表达载体包含第二多核苷酸。在一些实施方式中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是不同的。在一些实施方式中,第一多核苷酸和第二多核苷酸是基本上相同的。药物组合物还可以包含供体序列(例如,编码在疾病或病症诸如LSD或血友病中缺乏或有缺陷的蛋白质的转基因)。在一些实施方式中,供体序列与表达载体相关联。

[0030] 在一些实施方式中,提供了包含结合CISH DNA-结构域(例如,锌指蛋白或TALE或sgRNA或兆核酸酶)和野生型或工程改造的切割结构域或切割半结构域的融合蛋白。

[0031] 本文所述的核酸酶可以结合和/或切割CISH基因,所述CISH基因位于基因的编码区内或基因内或其邻近的非编码序列中,例如,前导序列,尾随序列或内含子,或者非转录区内,其处于编码区上游或下游。在某些实施方式中,核酸酶结合表2中所示CISH序列内9-20或更多个核苷酸的靶位点。

[0032] 在另一方面中,本文所述的是这样的组合物,所述组合物包含本文所述的一种或多种核酸酶(例如,ZFN、TALEN、TtAgo和/或CRISPR/Cas系统),包括含有DNA-结合结构域(ZFP,TALE,sgRNA等)和核酸酶(切割)结构域的核酸酶。在某些实施方式中,组合物包含与

药上可接受的赋形剂组合的一种或多种核酸酶。在一些实施方式中,组合物包含两组或更多组(对)核酸酶,各组具有不同的特异性。在其他方面中,组合物包含不同类型的核酸酶。在一些实施方式中,组合物包含编码CISH-核酸酶的多核苷酸,而在其他实施方式中,组合物包含CISH-特异性核酸酶蛋白。在其他实施方式中,组合物包含一种或多种供体分子,例如,编码一种或多种功能性CISH蛋白的供体,包括其任何功能性片段。在优选实施方式中,供体包含编码嵌合抗原受体(CAR)和/或一种或多种其他免疫调节蛋白的序列,诸如工程改造的或外源性T细胞受体(TCR)基因,编码ACTR序列的基因, β -2-微球蛋白(B2M)基因和/或包含B2M和HLA-E和/或HLA-G的融合蛋白。在其他方面中,供体包含修正序列,所述修正序列被整合进入细胞中的突变CISH基因中,从而使细胞表达功能性CISH。

[0033] 在另一方面中,本文所述的是编码本文所述的一种或多种核酸酶或核酸酶组分(例如,CRISPR/Cas系统结构域的核酸酶,ZFN,TALEN,或Ttango)的多核苷酸。例如,多核苷酸可以是mRNA或DNA。在一些方面中,mRNA可以经化学修饰(参见例如,Kormann,等(2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-157)。在其他方面中,mRNA可以包含ARCA帽(参见美国专利号7,074,596;和8,153,773)。在其它实施方式中,mRNA可包含未经修饰和经修饰的核苷酸的混合物(参见美国专利公开号2012/0195936)。在另一方面中,本文所述的是核酸酶表达载体,所述核酸酶表达载体包含多核苷酸,其编码本文所述的一种或多种ZFN、TALEN、Ttango或CRISPR/Cas系统,其操作性地连接启动子。在一实施方式中,表达载体是病毒载体,例如,AAV载体。

[0034] 在另一方面中,本文所述的是这样的宿主细胞,其包含一种或多种核酸酶,一种或多种表达载体,和/或一种或多种供体,如本文所述。在某些实施方式中,宿主细胞包含使CISH基因失活的插入和/或缺失,例如,在通过核酸酶切割后通过NHEJ(插入缺失)来造成失活或者在切割后通过插入一种或多种外源性序列(例如转基因)来造成失活。在某些实施方式中,宿主细胞包含一种或多种基因(例如,CISH基因)的突变形式,从而使通过CISH-特异性核酸介导的外源性序列的整合提供CISH蛋白的功能性形式。宿主细胞可以用一种或多种核酸酶表达载体稳定地转化或瞬时转染或它们的组合。在一实施方式中,宿主细胞是T效应细胞,T调节细胞或干细胞,例如,造血干细胞或诱导型多能干细胞。在其他实施方式中,一种或多种核酸酶表达载体在宿主细胞中表达一种或多种核酸酶。在另一实施方式中,宿主细胞还包含外源性多核苷酸供体序列(例如,编码CISH蛋白)。在本文所述的任何实施方式中,宿主细胞可以包含胚胎细胞,例如,一种或多种小鼠、大鼠、兔或其他哺乳动物胚胎(例如,非人灵长类动物)。在一些实施方式中,宿主细胞包含组织。还描述了衍生自本文所述细胞的细胞或细胞系,包括多能(pluripotent)、全能(totipotent)、多潜能(multipotent)或分化细胞,其在内源性CISH基因(例如,内源性CISH基因的外显子2或3)包含修饰(例如,整合的供体序列)。在某些实施方式中,本文所述的是如本文所述的分化细胞,其在内源性CISH基因(例如,内源性CISH基因的外显子2或3)中包含修饰(例如,整合的供体序列),其中分化细胞衍生自本文所述的干细胞。

[0035] 在另一方面中,本文所述是切割细胞中CISH基因的方法,所述方法包括:(a)将一种或多种多核苷酸导入细胞中,所述多核苷酸编码一种或多种核酸酶,所述核酸酶在条件下靶向一种或多种CISH基因,从而使一种或多种核酸酶表达并且一种或多种CISH基因被切割。在某些实施方式中,通过核酸酶切割后,靶CISH基因中的基因组序列被切割,例如,使用

本文所述的核酸酶(或编码核酸酶的载体),并且在采用ZFN、TALEN、TtAgo或CRISPR/Cas系统的靶向切割后“供体”序列插入基因中,从而使供体序列在细胞中表达。供体序列可以编码功能性CISH蛋白。在一些实施方式中,供体序列包含部分CISH基因序列。在优选实施方式中,供体包含免疫调节分子,如嵌合抗原受体(CAR)。此外,供体序列可以存在于核酸酶递送系统(例如,非病毒载体、LNP或病毒载体),存在于分开的递送机制(例如,核酸酶以mRNA作为裸多核苷酸递送或通过LNP递送,而供体使用病毒载体如AAV递送),或者任选地,可以导入细胞,使用分开的和/或不同的核酸递送机制。将供体核苷酸序列插入CISH基因座可以导致转基因的表达分别受控于内源性CISH遗传控制元件。在一些方面中,插入感兴趣的转基因导致表达完整外源性蛋白质序列和缺乏任何CISH编码的氨基酸。在其他方面中,表达的外源性蛋白是融合蛋白并且包含通过转基因和通过CISH基因编码的氨基酸。在一些情况中,CISH序列将存在于外源性蛋白的氨基(N)-末端部分,而在其他实例中,CISH序列将存在于外源性蛋白的羧基(C)-末端部分。在其他情况中,CISH序列将同时存在于外源性蛋白的N-和C-末端部分。供体还可以是整合进入突变内源性CISH基因中的“修正”序列,其不表达CISH蛋白(或以低于正常野生型水平的水平表达),从而使CISH的表达恢复。

[0036] 在一些实施方式中,本发明描述了可以用于在CISH启动子的控制下体内表达转基因的方法和组合物。在一些方面中,转基因可以编码感兴趣的治疗性蛋白质。转基因可以编码蛋白质,因此本发明的方法可以用于蛋白质替代。在一些方面中,转基因编码这样的蛋白质,所述蛋白质调节T细胞响应性并且治疗和/或预防癌症或免疫相关病症。

[0037] 在一些实施方式中,核酸酶靶标和/或切割位点位于CISH基因的外显子中,从而使转基因(例如,CAR,野生型和工程改造的TCR,如ACTR)整合进入CISH的外显子区域,例如,进入外显子2或外显子3。转基因可以体内、离体或体外受控于感兴趣的另一内源性或外源性启动子,其中外源性启动子驱动转基因的表达。因此,本文所述包含表达的转基因(有内源性或外源性启动子)的遗传修饰的细胞可以用于体外方法,用于在细胞培养物(其中蛋白质可以被分离)中产生蛋白质(由转基因),或者用于离体(细胞疗法)方法以向有此需要的对象提供蛋白质(例如,向癌症患者提供CAR或提供对象中异常或不表达的蛋白质)。

[0038] 在另一方面中,描述了修饰内源性基因的方法,所述方法包括在编码CISH蛋白的一种或多种供体序列存在的条件下,向细胞给予编码一种或多种核酸酶(例如,ZFN、TALEN、TtAgo、CRISPR/Cas系统)的一种或多种多核苷酸,从而使供体整合进入核酸酶所靶向的内源性基因。一种或多种分子的整合通过同源定向修复(HDR)或通过非同源末端连接(NHEJ)相关修复进行。在某些实施方式中,使用一对或多对核酸酶,其中核酸酶可以被相同或不同的核酸编码。

[0039] 在另一方面中,本文提供了包含遗传修饰的CISH基因的细胞(例如,T效应细胞,T调节细胞或干细胞)。在某些实施方式中,遗传修饰的细胞包含CISH基因外显子2和/或外显子3内的遗传修饰,例如,通过核酸酶进行的修饰。在某些实施方式中,遗传修饰的CISH基因在经靶向表2所示序列9-20个碱基对的靶位点的核酸酶切割后在CISH基因中包含一个或多个插入和/或缺失(称之为插入缺失),其中基因在通过核酸酶切割后失活。遗传修饰可以位于一个或多个靶位点和/或一个或多个切割位点内和/或靶位点边缘1-50个碱基对内。在其他实施方式中,修饰包含在通过本文所述核酸酶切割后插入外源性序列,例如,转基因(例如,CAR,免疫调节因子,工程改造的或外源性TCR或ACTR等)。在某些实施方式中,通过本文

所述的方法产生细胞。在其他优选实施方式中,将转基因整合进入CISH的外显子(例如,外显子2或3,包括但不限于进入表2所示序列9-20个核苷酸的序列的5-10个碱基对或之内)。包含整合的转基因的细胞可以从内源性启动子(例如,CISH启动子,对应地)表达转基因,或者任选地,转基因可以包含调节和控制元件,诸如驱动转基因表达的外源性启动子。在某些实施方式中,包含转基因的细胞不包含整合进入基因组中的任何病毒载体序列。本文所述遗传修饰的细胞可以用于体外用途,诸如蛋白质产生(由整合的转基因)和/或用于提供细胞或动物模型改变的CISH基因,包括用于筛选用于治疗癌症或炎性疾病的分子。此外,本文所述的遗传修饰的细胞可以用于体内用途,包括但不限于,通过提供细胞(离体细胞疗法)向有此需要的对象提供蛋白质。

[0040] 在本文所述的任何方法和组合物中,细胞可以是任何真核细胞。在某些实施方式中,细胞是T效应细胞和T调节细胞或干细胞。在其他实施方式中,细胞源自患者,例如,自体同源CD34⁺(造血)干细胞(例如,固定于患者,来自骨髓进入外周血液,通过粒细胞集落刺激因子(GCSF)给予)。CD34⁺细胞可以经收获,纯化,培养,并且通过任何合适的方法将核酸酶和/或CISH供体(例如,腺病毒载体供体)导入细胞。

[0041] 在一些方面中,干细胞或成熟细胞可以用于细胞疗法,例如,用于成熟细胞的T细胞移植。在其它实施方式中,用于T细胞移植的细胞包含感兴趣的其它基因修饰。在一方面中,T细胞包含对癌症标志物具有特异性的插入的嵌合抗原受体(CAR)。在另一方面中,插入的CAR对B细胞恶性肿瘤的CD19标志物特征具有特异性。在一些实施方式中,T细胞包含对自身免疫疾病具有特异性的CAR。在一些实施方式中,T细胞是调节T细胞并且包含CAR,其能够用于预防移植排斥。

[0042] 在另一方面中,本发明的方法和组合物提供了本文所述组合物(核酸酶,药物组合物,多核苷酸,表达载体,细胞,细胞系和/或动物,诸如转基因动物)的用途,例如,用于治疗癌症,诸如B细胞恶性肿瘤(例如,B细胞急性淋巴细胞性白血病(B-ALL),B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(B-NHL),性淋巴细胞白血病(CLL),霍奇金氏淋巴瘤(Wang,等(2017) *J. Hematol Oncol* 10(1):53),或者用于治疗炎性疾病(例如,结肠炎,参见Blat,等(2014) *Mol Ther* 22(5):1018-1028)。在某些实施方式中,这些组合物用于筛选用于治疗癌症或炎性病症的药物文库和/或其他治疗性组合物(即,抗体,结构RNA等)。这类筛选可以从细胞水平开始并操纵细胞系或原代细胞,并且可以发展到整体动物的治疗水平(例如,兽医或人类治疗)。因此,在某些方面中,本文所述的是治疗和/或预防有此需要的对象中癌症或炎症的方法,所述方法包括向对象给予诸如本文所述的一种或多种核酸酶,多核苷酸和/或细胞。所述方法可以离体和/或体内进行。在某些实施方式中,将本文所述的细胞(例如,包含整合进入CISH基因的转基因的细胞)给予对象。在本文所述的任何方法中,细胞可以是衍生自对象的干细胞(患者源性干细胞)。

[0043] 在本文所述的任何组合物和方法中,核酸酶以mRNA形式导入和/或使用一种或多种非病毒、LNP或病毒载体。在某些实施方式中,将一种或多种核酸酶以mRNA形式导入。在其他实施方式中,使用病毒载体导入转基因,例如,腺相关载体(AAV),包括AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV 8.2、AAV9、AAV rh10、AAV2/8、AAV2/5和AAV2/6,或者通过慢病毒或整合缺陷型慢病毒载体,并将一种或多种核酸酶以mRNA形式导入。在其他实施方式中,将一种或多种核酸酶和供体两者使用一种或多种病毒或非病毒载体导入。核酸酶和供体可被携带

在相同的载体上,或相同类型的不同载体上或不同类型的不同载体上。在某些实施方式中,将一种或多种核酸酶以mRNA形式导入(例如,通过电穿孔),并将供体使用AAV(例如,AAV2/6)、慢病毒或整合缺陷型慢病毒导入。在某些实施方式中,供体以单链DNA导入。

[0044] 一种或多种核酸酶和供体可以同时或依次导入。当依次导入时,给予核酸环和供体之间的时间间隔可以是任何时间段(例如,从数秒至数小时)。在某些实施方式中,导入供体,并在12-36小时(或之间的任何时间)后将一种或多种核酸酶导入细胞。在某些实施方式中,将修饰的细胞孵育数小时至数天(或之间的任何时间),然后将其等分并冷冻。

[0045] 可以使用本发明的组合物和方法修饰任何细胞,包括但不限于,原核或真核细胞,诸如细菌、昆虫、酵母、鱼、哺乳动物(包括非人哺乳动物)和植物细胞。在某些实施方式中,细胞是免疫细胞,例如,T细胞(例如,CD4+、CD3+、CD8+等),树突细胞,B细胞等。在其他实施方式中,细胞是多潜能、全能(totipotent)、多能干细胞,例如,诱导多潜能干细胞(iPSC),造血干细胞(例如,CD34+),胚胎该细胞等。在本文所述的任何方法或组合物中,包含编码CISH的转基因的细胞可以是干细胞或祖细胞。可以用于本发明方法和组合物的特异性干细胞类型包括胚胎干细胞(ESC),诱导型多能干细胞(iPSC)和造血干细胞(例如,CD34+细胞)。iPSC可以源自患者样品和/或源自正常对照,其中可以对源自患者的iPSC进行突变,以在感兴趣基因处成为正常或野生型基因序列,或者可以改变正常细胞,以在感兴趣的基因处成为已知疾病等位基因。相似地,造血干细胞可以分离自患者或分离自供体。然后使这些细胞进行工程改造以表达一种或多种功能性蛋白质,诸如CAR,将其扩增,然后再次导入患者中。在某些实施方式中,细胞是患者源性造血干细胞。在其他实施方式中,细胞是COS,CHO(例如,CHO-S,CHO-K1,CHO-DG44,CHO-DUXB11,CHO-DUKX,CHOK1SV),VERO,MDCK,WI38,V79,B14AF28-G3,BHK,HaK,NS0,SP2/0-Ag14,HeLa,HEK293(例如,HEK293-F,HEK293-H,HEK293-T),和perC6细胞。

[0046] 因此,本文所述的是用于调节CISH基因表达的方法和组合物,包括在外源性序列(诸如CAR)表达或不表达的情况下使CISH失活。组合物和方法可以体外、体内或离体使用,并且包括给予人工转录因子或核酸酶,其包含靶向CISH基因的DNA结合结构域,任选地,在核酸酶的情况下,供体在通过核酸酶切割后整合进入CISH基因。在某些实施方式中,细胞处于癌症或炎性疾病中。在其他实施方式中,本文所述的任何方法修饰细胞,并将经修饰的细胞给予有此需要的对象(例如,患有癌症或炎性病症的对象)。还提供了包含遗传修饰的CISH基因(例如,外源性序列)的遗传修饰的细胞(例如,干细胞,前体细胞,T细胞,肌肉细胞等),包括通过本文所述方法制造的细胞。这些细胞可以用于向患有癌症或炎性疾病的对象提供一种或多种治疗性蛋白质,例如,通过向有此需要的对象给予一种或多种细胞,或者,通过分离细胞所产生的蛋白质并将蛋白质给予有此需要的对象(酶替代疗法)来进行。

[0047] 还提供了包含本发明核酸、蛋白质和/或细胞的试剂盒。该试剂盒可以包含编码核酸酶的核酸(例如,RNA分子或ZFN,TALEN,TtAgo或CRISPR/Cas系统,其编码合适表达载体中包含的基因),或核酸酶蛋白的等分,供体分子,合适的干细胞特性(stemness)修饰剂,细胞,进行本发明方法的说明书等。

[0048] 基于本公开内容整体,这些和其它方面对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

附图说明

[0049] 图1显示了包含CISH基因外显子2和3(阴影)的部分序列(SEQ ID NO:48),并且还显示了基因中的示例性核酸酶靶位点(方框)。

[0050] 图2A-2D显示了经历指定条件下处理的T细胞的FACS分析。图2A(“模拟”)显示了其中细胞未经核酸酶试剂处理而是以与其他细胞相同的方式处理的结果。图2B(“仅AAV”)显示了其中细胞仅接受AAV-GFP供体的结果。图2C(“仅ZFN”)显示了其中细胞仅接受靶向CISH的核酸酶(以mRNA给予)的结果;和图2D(“ZFN+AAV”)显示了其中细胞经历AAV-GFP供体和靶向CISH的ZFN处理的结果。如图所示,相较于所有其他处理条件中较少(仅AAV)或没有(模拟和仅ZFN)GFP表达,至少75%用核酸酶和供体处理的细胞表达GFP。

[0051] 图3显示了指定条件下经历处理的效应T细胞的FACS分析。“仅供体”指仅接受AAV-hPGK-GFP供体的细胞,而“ZFN+供体”指经历使用AAV-hPGK-GFP供体和靶向CISH的ZFN处理的细胞。如图所示,相较于仅用AAV供体处理的细胞中不表达任何GFP,大约72.6%用核酸酶和供体处理的细胞表达GFP。

[0052] 图4是这样的图表,其显示经历指定条件下处理的效应T细胞的Mi seq基因型分析。“模拟”指未经核酸酶试剂处理而是以与其他细胞相同的方式处理的细胞;“PGK-GFP供体”指仅接受AAV-hPGK-GFP供体的细胞;“ZFN”指仅将靶向CISH的核酸酶以mRNA给予的细胞;而“ZFN+PGK-GFP供体”指经历使用AAV-hPGK-GFP供体和靶向CISH的ZFN处理的细胞。如图所示,使用核酸酶(ZFN和ZFN+供体)处理的细胞中大约90%的等位基因被修饰,然而只有使用AAV供体和ZFN处理的细胞产生高水平(大约45%)靶向整合(TI)供体。单独使用AAV供体或模拟处理的组没有可检测水平的基因组修饰。

[0053] 图5是这样的图表,其显示经历指定条件下处理的效应T细胞的Mi seq基因型分析的结果。“模拟”指未经核酸酶试剂处理而是以与其他细胞相同的方式处理的细胞,而“ZFN+供体”指经历这样处理的细胞,所述处理使用AAVS1或靶向CISH的ZFN以及相应的AAV-GFP供体。如图所示,使用核酸酶(ZFN+供体)处理的细胞中大约50-60%等位基因被修饰,然而模拟组没有可检测水平的基因组修饰。

[0054] 图6是这样的图表,其显示了通过Luminex分析通过免疫刺激细胞因子分泌评估的效应T细胞功能数据。“ZFN+供体”指经历这样处理的对象,所述处理使用AAVS1或靶向CISH的ZFN以及相应的AAV-GFP供体。如图所示,相较于TI进入基因组安全港基因座AAVS1,TI转基因供体进入CISH导致效应T细胞免疫刺激功能增加(即,TNF α 上调),假定这是由于在大部分细胞中敲除CISH表达的原因。

具体实施方式

[0055] 本文公开了用于靶向修饰CISH基因的组合物和方法,包括这样的修饰,所述修饰通过将转基因蛋白质(例如,CAR,TCR,ACTR,和/或其他治疗性蛋白质)转基因整合进入细胞的CISH基因(例如,T细胞或淋巴细胞前体,如CD34+造血干细胞)中进行。该方法和组合物可以用于修饰T效应细胞(CD4+和CD8+)和T调节细胞(CD4+、CD25+、CD127lo、FOXP3+)。该细胞适用于输注进入患者,从而由所述细胞提供这些前体向在对象中表达功能蛋白的细胞的后续体内分化,所述对象具有癌症,炎症病症,自身免疫疾病,或者移植物,所述细胞可以治疗和/或预防受体患者中的疾病。如本文所述遗传的修饰细胞(例如,CISH基因中的插入缺失

和/或转基因)适用于输注进入患者,从而使这些干细胞后续体内分化成这样的细胞,所述细胞表达治疗和/或预防患者中疾病(例如,癌症,炎性疾病等)的功能性CISH蛋白。此外,可以体外使用本文所述的细胞(细胞系或细胞群)以产生细胞、细胞系或动物模型用于筛选,和/或由整合的转基因产生蛋白质,其中可以将蛋白质分离并用于治疗对象。

[0056] 本发明设想了对CISH基因的任何遗传修饰,包括但不限于,整合包含序列的供体,所述序列编码任何功能蛋白,包括治疗和/或预防癌症、炎性疾病、自身免疫疾病或移植的蛋白质,或者作为重定向(redirect)T细胞的受体起作用。

[0057] 概述

[0058] 除非另有说明,本方法的实施以及本文所述组合物的制备与应用采用本领域技术范围内的分子生物学、生物化学、染色质结构与分析、计算化学、细胞培养、重组DNA与相关领域的常规技术。这些技术在文献中已有充分描述。参见例如,Sambrook等,《分子克隆:实验室手册》(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL)第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),1989以及第3版,2001;Ausubel等,《新编分子生物学实验指南》(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY),约翰韦利父子公司(John Wiley&Sons),纽约,1987及定期更新;《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY)丛书,圣迭戈学术出版社(Academic Press,San Diego);Wolffe,《染色质结构与功能》(CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION),第3版,学术出版社,圣迭戈,1998;《酶学方法》(METHODS IN ENZYMOLOGY),第304卷,“染色质(Chromatin)”(P.M.Wassarman和A.P.Wolffe编),学术出版社,圣迭戈,1999;和《分子生物学方法》(METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY),第119卷,“染色质方法(Chromatin Protocols)”(P.B.Becker编),休玛纳出版社(Humana Press)托托瓦,1999。

[0059] 定义

[0060] 术语“核酸”,“多核苷酸”和“寡核苷酸”互换使用并指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,可以是直链或环状构型的,是单链或双链形式的。出于本公开目的,这些术语不意在限制聚合物的长度。所述术语可涵盖天然核苷酸的已知类似物,以及在碱基、糖和/或磷酸部分(例如,硫逐磷酸酯主链)经修饰的核苷酸。一般而言,具体核苷酸的类似物具有相同的碱基配对特异性;即,A的类似物将与T碱基配对。

[0061] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该术语还应用于其中一种或多种氨基酸是对应的天然产生的氨基酸的化学类似物或经修饰的衍生物的氨基酸聚合物。

[0062] “结合”指大分子之间(例如蛋白质与核酸之间)的序列特异性、非共价相互作用。只要相互作用作为整体为序列特异性的,则不要求结合相互作用的所有组分都是序列特异性的(例如,与DNA主链中的磷酸残基接触)。这样的相互作用通常表征为解离常数(K_d)是 $10^{-6}M^{-1}$ 或更低。“亲和性”指结合强度:增加的结合亲和性与较低的 K_d 关联。

[0063] “结合结构域”是能与另一分子非共价结合的分子。例如,结合分子可以结合DNA分子(DNA结合蛋白,诸如锌指蛋白,TAL效应物结构域蛋白或单向导RNA),RNA分子(RNA结合蛋白)和/或蛋白质分子(蛋白质结合蛋白)。在蛋白质结合分子的情况下,其可与自身结合(形成同型二聚体、同型三聚体等)和/或其可与一种或多种不同蛋白的一个或多个分子结合。结合分子可具有多于一种类型的结合活性。例如,锌指蛋白具有DNA结合、RNA结合和蛋白结

合活性。因此,DNA结合分子,包括转录因子和人工核酸酶的DNA结合组分,包括但不限于ZFP,TALE和sgRNA。

[0064] “锌指DNA结合蛋白”(或结合结构域)是能以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA的蛋白质或较大蛋白质内的结构域,锌指是通过锌离子配位稳定其结构的结合结构域内氨基酸序列的区域。术语锌指DNA结合蛋白常缩写为锌指蛋白或ZFP。人工核酸酶和转录因子可以包括ZFP DNA结合结构域和功能性结构域和功能性结构域(ZFN的核酸酶结构域或ZFP-TF的转录调节结构域)。术语“锌指核酸酶”包括一个ZFN以及一对ZFN(该对成员称为“左和右”或“第一和第二”或“对”),其二聚化以切割靶基因。

[0065] “TALE DNA结合结构域”或“TALE”是包含一种或多种TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域涉及TALE与其关联靶DNA序列的结合。单个“重复单元”(也称作“重复”)通常长33-35个氨基酸,并且与天然产生的TALE蛋白中的其它TALE重复序列显示至少一些序列同源性。参见例如,美国专利号8,586,526和9,458,205。人工核酸酶和转录因子可以包括TALE DNA结合结构域和功能性结构域和功能性结构域(TALE的核酸酶结构域或TALE-TF的转录调节结构域)。术语“TALEN”包括一个TALEN以及一对TALEN(所述对的成员称为“左和右”或“第一和第二”或“对”),其二聚化以切割靶基因。

[0066] 锌指和TALE结合结构域可经“工程改造”,以结合预定的核苷酸序列,例如,通过对天然产生的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区的工程改造(改变一个或多个氨基酸)。因此,工程改造的DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然产生的蛋白质。用于工程改造DNA结合蛋白的方法的非限制性示例是设计和选择。经设计的DNA结合蛋白是非天然产生的蛋白质,其设计/组成主要来自于合理标准。设计的合理标准包括应用替代法则和计算机算法来处理现有ZFP和/或TALE设计和结合数据的数据库存储信息中的信息。参见例如,美国专利号6,140,081;6,453,242;6,534,261;和8,585,526;还参见国际专利公开号WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536;和WO 03/016496。

[0067] “选择的”锌指蛋白或TALE是不存在于自然界中的蛋白质,其产生的结果主要来自经验过程,例如噬菌体展示、相互作用阱或杂交体选择。参见例如,美国专利号5,789,538;5,925,523;6,007,988;6,013,453;6,200,759;8,586,526;和国际专利公开号WO 95/19431;WO 96/06166;WO 98/53057;WO 98/54311;WO 00/27878;WO 01/60970;WO 01/88197;和WO 02/099084。

[0068] “TtAgo”是原核阿尔古(Argonaute)蛋白质,认为其参与基因沉默。TtAgo源自嗜热细菌(*Thermus thermophilus*)。参见例如,Swarts等,ibid,G. Sheng,et al. (2013) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.111,652)。“TtAgo系统”是所需的全部组分,其包括例如用于被TtAgo酶切割的向导DNA。

[0069] “重组”表示两种多核苷酸之间交换遗传信息的过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)和同源性重组的供体捕获。就本公开的目的而言,“同源重组(HR)”指发生这种交换的特定形式,例如在修复细胞内双链断裂期间通过同源定向修复机制发生。该过程要求核苷酸序列同源性,利用“供体”分子模板修复“靶”分子(即,经历双链断裂的分子),该过程也称作“非交叉基因转化”或“短道基因转化”,因为其导致遗传信息从供体向靶转移。不希望受限于任何特定理论,这种转移可以涉及断裂的靶与供体间形成的异双链体DNA的错配修正,和/或采用供体再合成将成为部分靶的遗传信息的“合成依赖性链退火”,和/或

相关过程。这种专门的HR通常导致靶分子序列的改变,从而供体多核苷酸的部分或全部序列被纳入靶多核苷酸中。

[0070] 在本公开的方法中,本文所述的一种或多种靶向的核酸酶在靶序列(例如,细胞染色质)中预定位点(例如,细胞染色质)处产生双链断裂(DSB)。DSB可以通过同源定向修复或通过非同源定向修复机制导致缺失和/或插入。缺失可以包括任何数量的碱基对。相似地,插入可以包括任何数量的碱基对,包括例如,整合“供体”多核苷酸,任选地,与断裂区域中的核苷酸序列具有同源性。供体序列可被物理整合(physically integrated),或者,供体多核苷酸被用作模板用于通过同源重组进行的断裂修复,导致将供体中的全部或部分核苷酸序列引入细胞染色质。因此,细胞染色质中的第一序列可改变,并且在某些实施方式中,可转化成供体多核苷酸中存在的序列。因此,使用术语“替换”或“置换”可理解为表示一种核苷酸序列被另一种核苷酸序列替换(即,信息意义上序列的替换),而不一定要求一种多核苷酸被另一种多核苷酸物理或化学替换。

[0071] 本文所述的任何方法中,可使用其它锌指蛋白对,TALEN,TtAgo或CRISPR/Cas系统,用于对细胞内其它靶位点进行其它双链切割。

[0072] 本文所述的任意方法可用于通过能破坏感兴趣基因表达的供体序列的靶向整合来插入任何大小的供体和/或使细胞中的一种或多种靶序列部分或完全失活。还提供具有部分或完全失活基因的细胞系。

[0073] 在本文所述的任何方法中,外源性核苷酸序列(“供体序列”或“转基因”)可包含与感兴趣区域中的基因组序列同源但不相同的序列,由此刺激同源重组以在感兴趣区域插入非相同序列。因此,在某些实施方式中,供体序列中与感兴趣区域序列同源的部分呈现与待替换的基因组序列有约80-99%(或其间任意整数)的序列相同性。在其它实施方式中,供体和基因组序列间的同源性超过99%,例如,超过100个连续碱基对的基因组序列与供体之间相差仅1个核苷酸。在某些情况中,供体序列的非同源部分可包含不存在于感兴趣区域的序列,从而将新序列引入感兴趣区域。在这些情况中,非同源序列一般侧接50-1,000个碱基对(或其间的任何整数值)或大于1,000的任何数量个碱基对的序列,其与感兴趣区域中的序列同源或相同。在其它实施方式中,供体序列与第一序列非同源,并且通过非同源重组机制插入基因组。

[0074] “切割”指DNA分子共价主链的断裂。切割可以由多种方法引发,包括但不限于,磷酸二酯键的酶促或化学水解。单链切割和双链切割均可采用,并且双链切割可由不同的单链切割事件所致。DNA切割可导致产生钝端或交错末端。在某些实施方式中,将融合多肽用于靶向双链DNA切割。

[0075] “切割半结构域”是能与第二多肽(两者相同或不同)形成具有切割活性(优选双链切割活性)的复合物的多肽序列。术语“第一和第二切割半结构域”、“+和-切割半结构域”和“右和左切割半结构域”可互换使用,指二聚化的切割半结构域的对。

[0076] “工程改造的切割半结构域”是经修饰以与另一切割半结构域(例如,另一工程改造的切割半结构域)形成专性异二聚体的切割半结构域。还参见美国专利号8,623,618;7,888,121;7,914,796;和8,034,598,通过引用其全部内容纳入本文。

[0077] 术语“序列”指任意长度的核苷酸序列,可以是DNA或RNA;可以是直链、环状或支链且可以是单链或双链。术语“供体序列”指插入基因组的核苷酸序列。供体序列可以是任意

长度,例如长度为2-100,000,000个核苷酸(或其间或其上的任意整数值),优选长度为约100-100,000个核苷酸(或其间的任意整数),更优选长度为约2000-20,000个核苷酸(或其间的任意值),甚至更优选长度为约5-15kb(或其间的任意值)。

[0078] “染色质”是包含细胞基因组的核蛋白结构。细胞染色质包含核酸和蛋白,核酸主要为DNA,蛋白包括组蛋白和非组蛋白染色体蛋白。真核细胞染色质主要以核小体形式存在,其中核小体核心包含约150碱基对的DNA与八聚体关联,所述八聚体包含组蛋白H2A、H2B、H3和H4各两份;以及在核小体核心之间延伸的接头DNA(长度根据生物体而各有不同)。组蛋白H1分子通常与接头DNA关联。就本公开的目的而言,术语“染色质”意在涵盖所有类型的细胞核蛋白,包括原核与真核的。细胞染色质包括染色体和附加体染色质。

[0079] “染色体”是包含细胞的全部或部分基因组的染色质复合物。细胞基因组通常由其核型表征,其为包含该细胞基因组的全部染色体的集合。细胞基因组可包含一条或多条染色体。

[0080] “附加体”是复制的核酸、核蛋白复合物或其它包含并非细胞染色体核型部分的核酸的结构。附加体的示例包括质粒和某些病毒基因组。

[0081] “可及区域”是细胞染色质中这样的位点,其中核酸中存在的靶位点可以通过识别靶位点的外源性分子结合。不希望受任何特定理论的束缚,据信可及区域是未被包装进入核小体结构中的区域。通常可以通过其对化学和酶促探针例如核酸酶的敏感性检测可及区域的不同结构。

[0082] “靶位点”或“靶序列”是限定结合分子将结合的核酸部分的核酸序列,前提是存在结合的充分条件。靶位点可以是任何长度,例如,9-20或更多个核苷酸和长度,并且结合的核苷酸可以是连续的或非连续的。

[0083] “外源性”分子是通常不存在于细胞内的分子,但可通过一种或多种遗传、生化或其它方法导入细胞。“正常存在于细胞中”相对于细胞的具体发育阶段和环境条件确定。因此,例如,仅在肌肉的胚胎发育期间存在的分子对于成体肌肉细胞是外源性分子。类似地,相对于非热激的细胞,通过热激诱导的分子是外源性分子。例如,外源性分子可以包括功能失常的内源性分子的功能性形式或者正常功能的内源性分子的功能失常形式。

[0084] 外源性分子可以是小分子或大分子等,小分子如由组合化学方法所产生,大分子如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质、糖蛋白、脂蛋白、多糖、上述分子的任何经修饰衍生物,或者是包含一种或多种上述分子的任何复合物。核酸包括DNA和RNA,其可以是单链或双链的;可以是直链、支链或环状的;并且可以具有任何长度。核酸包括能够形成双链体的那些,以及形成三链体的核酸。参见,例如美国专利号5,176,996和5,422,251。蛋白质可包括但不限于,DNA结合蛋白、转录因子、染色质重构因子、甲基化DNA结合蛋白、聚合酶、甲基化酶、脱甲基酶、乙酰基转移酶、脱乙酰酶、激酶、磷酸酶、整合酶、重组酶、连接酶、拓扑异构酶、旋转酶和解旋酶。

[0085] 外源性分子可以是与内源性分子同一类型的分子,例如外源性蛋白质或核酸。例如,外源性核酸可以包括感染性病毒基因组、引入细胞内的质粒或附加体,或包含通常不存在于细胞内的染色体。本领域技术人员已知将外源性分子导入细胞内的方法,包括但不限于脂质介导的转移(即脂质体,包括中性和阳离子脂质)、电转导、直接注射、细胞融合、粒子轰击、磷酸钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转移和病毒载体介导的转移。外源性分子也可以

是与内源性分子相同类型但源自与该细胞来源不同物种的分子。例如,可将人核酸序列引入原始源自小鼠或仓鼠的细胞系。

[0086] 不同的是,“内源性”分子是通常存在于特定环境条件下特定发育阶段的特定细胞中的分子。例如,内源性核酸可以包括染色体、线粒体基因组、叶绿体或其它细胞器,或天然产生的附加型核酸。其它内源性分子可包括蛋白质,例如,转录因子和酶。

[0087] 本文所用术语“外源性核酸的产物”包括多核苷酸和多肽产物,例如,转录产物(多核苷酸诸如RNA)和翻译产物(多肽)。

[0088] “融合”分子是其中两个或更多个亚基分子相连(优选共价相连)的分子。亚基分子可以是相同化学类型的分子,也可以是不同化学类型的分子。第一类型的融合分子的示例可包括但不限于,融合蛋白(例如,ZFP或TALE DNA结合结构域与一种或多种活化结构域之间的融合)和融合核酸(例如,编码上文所述的融合蛋白的核酸)。第二类融合分子的示例包括但不限于:形成三链体的核酸与多肽之间的融合体,以及小沟结合子与核酸之间的融合体。

[0089] 细胞内融合蛋白的表达可由融合蛋白递送入细胞造成或通过向细胞递送编码融合蛋白的多核苷酸而引起,其中所述多核苷酸被转录,转录本经翻译产生所述融合蛋白。细胞中蛋白质的表达也可涉及反式剪接、多肽切割和多肽连接。用于将多核苷酸和多肽递送至细胞的方法在本公开内容中的他处呈现。

[0090] 就本公开的目的而言,“基因”包括编码基因产物(见前文)的DNA区域,以及调节基因产物生成的DNA区域,不论这类调节序列是否毗邻编码和/或转录序列。因此,基因包括但不限于,启动子序列、终止子、翻译调节序列,例如核糖体结合位点和内部核糖体进入位点、增强子、沉默子、绝缘子、边界元件、复制起点、基质连接位点和基因座控制区域。

[0091] “基因表达”指将基因所含信息转化成基因产物。基因产物可以是基因的直接转录产物(例如,mRNA、tRNA、rRNA、反义RNA、核糖酶、结构RNA或任何其它类型的RNA)或通过mRNA翻译产生的蛋白质。基因产物还包括经修饰的RNA,通过如下加工修饰,例如加帽、聚腺苷酸化、甲基化,和编辑,以及通过如下加工修饰的蛋白质,例如,甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、ADP-核糖基化、豆蔻酰化和糖基化。

[0092] 基因表达的“调控”指基因活性的改变。表达的调控可包括但不限于,基因活化和基因阻遏。基因组编辑(例如,切割,改变,失活,随机突变)可以用于调控表达。基因失活指相较于没有包含本文所述ZFP、TALE、TtAgo或CRISPR/Cas系统的细胞,基因表达的任何减少。因此,基因失活可以是部分或完全的。

[0093] “感兴趣的区域”是需要结合外源性分子的细胞染色质的任意区域,例如,基因或者基因内或与之毗邻的非编码序列。结合可以是出于靶向DNA切割和/或靶向重组的目的。感兴趣区域可以存在于例如染色体,附加体,细胞器基因组(例如,线粒体、叶绿体),或感染性病毒基因组中。感兴趣的区域可处于基因的编码区中,转录的非编码区域例如前导序列、尾随序列或内含子中,或非转录区域中编码区的上游或下游。感兴趣的区域可如单一核苷酸对一样小,或长达2,000个核苷酸对,或任意整数值的核苷酸对。

[0094] “真核”细胞包括但不限于,真菌细胞(例如酵母)、植物细胞、动物细胞、哺乳动物细胞和人细胞(例如,B细胞),包括干细胞(多能和多潜能)。

[0095] “T效应细胞”(Teff)是对刺激立即作用的CD4⁺或CD8⁺T细胞。这些细胞在分化后在

细胞介导的免疫中起核心作用。通过抗原呈递细胞刺激后激活T细胞,并分化成进行关键效应功能T效应细胞,诸如产生细胞毒性分子和抗体。T效应细胞迁移到炎症(例如,干扰)的位点并产生趋化因子以招募其他免疫细胞。

[0096] “调节T细胞”(Treg)也称为抑制T细胞,并且是调节免疫系统的T细胞的亚群,维持对于自身抗原的耐受并预防自身免疫疾病。Treg具有免疫抑制性并且通常抑制或下调T效应细胞的诱导和增殖。Treg是CD4⁺、CD25⁺、CD127^{lo}和FOXP3⁺。

[0097] 术语“自体的”指衍生自后来将其重新引入的同一个体的任何物质。

[0098] 术语“同种异体的”指衍生自与引入材料的个体相同物种的不同个体的任何材料。当一个或多个基因座处的基因不相同,将两个或更多个个体称为彼此之间为同种异体的。在一些方面中,相同物种个体的同种异体材料可能在基因上具有足够的不同从而产生抗原性相互作用。

[0099] 涉及两个或更多个组分(例如序列元件)的并置,所述组分设置成组分都可正常发挥作用并允许组分中至少一种能介导施加于至少一种其它组分上的作用时,术语“操作性相连”和“操作性连接的”(或“操作地连接”)互换使用。例如,若转录调节序列控制编码序列响应一种或多种转录调节因子存在与否时的转录水平,则所述转录调节序列如启动子与所述编码序列操作性连接。转录调节序列一般与编码序列以顺式操作性地连接,但无需紧邻该序列。例如,增强子是操作性地连接编码序列的转录调节序列,尽管它们是不连续的。

[0100] 对于融合多肽,术语“操作性连接”可指各组分在与其它组分的连接中所发挥的功能与其在未连接时的功能相同。例如,对于其中ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域与激活结构域融合的融合多肽而言,如果在该融合多肽中,ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,同时所述激活结构域能够上调基因表达,那么所述ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域和激活结构域是操作性连接的。在其中ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域与切割结构域融合的融合多肽的情况中,如果在所述融合多肽中,ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域部分能够结合其靶位点和/或其结合位点,同时切割结构域能够切割靶位点附近的DNA,那么所述ZFP、TALE、TtAgo或Cas DNA结合结构域和切割结构域是操作性连接的。

[0101] 蛋白质、多肽或核酸的“功能性片段(或功能片段)”是序列与全长蛋白质、多肽或核酸不相同但保留全长蛋白质、多肽或核酸的相同功能的蛋白质、多肽或核酸。功能性片段可具有比相应的天然分子更多、更少或相同数量的残基,和/或可含有1个或多个氨基酸或核苷酸取代。用于确定核酸功能(例如,编码功能、与另一核酸杂交的能力)的方法是本领域熟知的。类似地,用于确定蛋白质功能的方法也是为本领域熟知的。例如,可测定多肽的DNA结合功能,例如通过滤膜结合、电泳迁移率改变或免疫沉淀试验。DNA切割可通过凝胶电泳分析。参见Ausubel,等,同上。可测定蛋白质与另一蛋白质相互作用的能力,例如,通过共免疫沉淀、双杂交试验或互补分析,既可以是遗传的也可以是生化的。参见例如,Fields,等(1989)Nature 340:245-246;美国专利号5,585,245和国际专利公开号WO 98/44350。

[0102] “载体”能将基因序列转移至靶细胞。“载体构建体”、“表达载体”和“基因转移载体”通常指能指导感兴趣基因表达并能将基因序列转移至靶细胞的核酸构建体。因此,该术语包括克隆和表达载体,以及整合载体。

[0103] 术语“对象”和“患者”可以互换使用,并且表示哺乳动物例如人类患者和非人类灵

长类,以及实验室动物例如兔、狗、猫、大鼠、小鼠和其他动物。因此,本文所用术语“对象”或“患者”表示可给予本发明核酸酶、供体和/或遗传修饰的细胞的任何哺乳动物患者或对象。本没法的对象包括患有疾病的那些。

[0104] “自身免疫疾病”是其中免疫系统正在攻击自身抗原的疾病。自身免疫疾病的实例包括盘状红斑狼疮/深红斑狼疮/冻疮性红斑狼疮/肿胀性红斑狼疮肾病,和嵌合受体,包括与盘状红斑狼疮/深红斑狼疮/冻疮性红斑狼疮/肿胀性红斑狼疮肾病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与盘状红斑狼疮/深红斑狼疮/冻疮性红斑狼疮/肿胀性红斑狼疮肾病相关的自身抗原的实例包括但不限于ANA。

[0105] 在一实施方式中,自身免疫疾病是桥本氏病(Hashimoto's disease),并且嵌合受体包含与桥本氏病相关的自身抗原。与桥本氏病相关的自身抗原的实例包括但不限于,甲状腺过氧化物酶和甲状腺球蛋白。

[0106] 在一实施方式中,自身免疫疾病是NMDAR脑炎,并且嵌合受体包含与NMDAR脑炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与NMDAR脑炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,抗-N-甲基-D-天冬氨酸受体(NR1亚基)。

[0107] 在一实施方式中,自身免疫疾病是自身免疫性溶血性贫血,并且嵌合受体包含与自身免疫性溶血性贫血相关的自身抗原(或其变体或片段)。与自身免疫性溶血性贫血相关的自身抗原的实例包括但不限于,Rh血型抗原,和I抗原。

[0108] 在一实施方式中,自身免疫疾病是寻常型天疱疮,并且嵌合受体包含与寻常型天疱疮相关的自身抗原(或其变体或片段)。与寻常型天疱疮相关的自身抗原的实例包括但不限于,Dsg1/3。

[0109] 在一实施方式中,自身免疫疾病是大疱性类天疱疮,并且嵌合受体包含与大疱性类天疱疮相关的自身抗原(或其变体或片段)。与大疱性类天疱疮相关的自身抗原的实例包括但不限于,BP 180和BP230。

[0110] 在一实施方式中,自身免疫疾病是重症肌无力,并且嵌合受体包含与重症肌无力相关的自身抗原(或其变体或片段)。与重症肌无力相关的自身抗原的实例包括但不限于,乙酰胆碱烟碱突触后受体。

[0111] 在一实施方式中,自身免疫疾病是格雷夫斯氏病(Graves' disease),并且嵌合受体包含与格雷夫斯氏病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与格雷夫斯氏病相关的自身抗原的实例包括但不限于,促甲状腺素受体。

[0112] 在一实施方式中,自身免疫疾病是特发性血小板减少性紫癜(ITP),并且嵌合受体包含与特发性血小板减少性紫癜相关的自身抗原(或其变体或片段)。与特发性血小板减少性紫癜相关的自身抗原的实例包括但不限于,血小板整合素,和GpIIb:IIIa。

[0113] 在一实施方式中,自身免疫疾病是古德帕斯彻氏综合症(Goodpasture's syndrome),并且嵌合受体包含与古德帕斯彻氏综合症相关的自身抗原(或其变体或片段)。与古德帕斯彻氏综合症相关的自身抗原的实例包括但不限于,胶原蛋白 α -3(VI)链。

[0114] 在一实施方式中,自身免疫疾病是类风湿性关节炎,并且嵌合受体包含与类风湿性关节炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与类风湿性关节炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,类风湿因子和钙蛋白酶抑素。

[0115] 在一实施方式中,自身免疫疾病是幼年特发性关节炎,并且嵌合受体包含与幼年

特发性关节炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与幼年特发性关节炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,RF,瓜氨酸化蛋白。

[0116] 在一实施方式中,自身免疫疾病是多发性硬化,并且嵌合受体包含与多发性硬化相关的自身抗原(或其变体或片段)。与多发性硬化相关的自身抗原的实例包括但不限于,髓磷脂碱性蛋白(MBP),髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)肽和 α - β -晶状体蛋白。

[0117] 在一实施方式中,自身免疫疾病是乳糜泻,并且嵌合受体包含与乳糜泻相关的自身抗原(或其变体或片段)。与乳糜泻相关的自身抗原的实例包括但不限于,组织转谷氨酰胺酶(TG2)。

[0118] 在一实施方式中,自身免疫疾病是恶性贫血,并且嵌合受体包含与恶性贫血相关的自身抗原(或其变体或片段)。与恶性贫血相关的自身抗原的实例包括但不限于,胃壁细胞内因子。

[0119] 在一实施方式中,自身免疫疾病是白癜风,并且嵌合受体包含与白癜风相关的自身抗原(或其变体或片段)。与白癜风相关的自身抗原的实例包括但不限于,65-kDa抗原。

[0120] 在一实施方式中,自身免疫疾病是白塞氏病(Behcet's disease),并且嵌合受体包含与白塞氏病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与白塞氏病相关的自身抗原的实例包括但不限于,磷脂酰丝氨酸,核糖体磷蛋白和抗中性粒细胞胞质抗体。

[0121] 在一实施方式中,自身免疫疾病是硬皮病,并且嵌合受体包含与硬皮病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与硬皮病相关的自身抗原的实例包括但不限于,Sc1-70,U1-RNP。

[0122] 在一实施方式中,自身免疫疾病是牛皮癣,并且嵌合受体包含与牛皮癣相关的自身抗原(或其变体或片段)。与牛皮癣相关的自身抗原的实例包括但不限于,钙蛋白酶抑素。

[0123] 在一实施方式中,自身免疫疾病是溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩氏病(Crohn's disease,CD),并且嵌合受体包含与UC和克罗恩氏病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与UC和克罗恩氏病相关的自身抗原的实例包括但不限于,ANA。

[0124] 在一实施方式中,自身免疫疾病是干燥综合症(Sjogren's syndrome),并且嵌合受体包含与干燥综合症相关的自身抗原(或其变体或片段)。与干燥综合症相关的自身抗原的实例包括但不限于,SSA和抗-SSB。

[0125] 在一实施方式中,自身免疫疾病是韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis),并且嵌合受体包含与韦格纳氏肉芽肿病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与韦格纳氏肉芽肿病相关的自身抗原的实例包括但不限于,ANA和ANCA。

[0126] 在一实施方式中,自身免疫疾病是多肌炎或皮肌炎,并且嵌合受体包含与多肌炎或皮肌炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与多肌炎或皮肌炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,Jo-1。

[0127] 在一实施方式中,自身免疫疾病是原发性胆汁性肝硬化,并且嵌合受体包含与原发性胆汁性肝硬化相关的自身抗原(或其变体或片段)。与原发性胆汁性肝硬化相关的自身抗原的实例包括但不限于,gp210,p62,sp 100。

[0128] 在一实施方式中,自身免疫疾病是抗磷脂综合征(APS),并且嵌合受体包含与抗磷脂综合征相关的自身抗原(或其变体或片段)。与抗磷脂综合征相关联的自身抗原的实例包括但不限于,抗-磷脂抗体。

[0129] 在一实施方式中,自身免疫疾病是混合性结蒂组织病(MCTD),并且嵌合受体包含与混合性结蒂组织病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与混合性结蒂组织病相关的自身抗原的实例包括但不限于,U1-RNP,U1-70kd snRNP。

[0130] 在一实施方式中,自身免疫疾病是米勒费雪综合症(Miller Fisher syndrome),并且嵌合受体包含与米勒费雪综合症相关的自身抗原(或其变体或片段)。与米勒费雪综合症相关的自身抗原的实例包括但不限于,GQ1b神经节苷脂。

[0131] 在一实施方式中,自身免疫疾病是格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome),并且嵌合受体包含与格林-巴利综合征相关的自身抗原(或其变体或片段)。与格林-巴利综合征相关的自身抗原的实例包括但不限于,GM1,去唾液酸GM1,和GD1b。

[0132] 在一实施方式中,自身免疫疾病是急性运动性轴索神经病(acute motor axonal neuropathy),并且嵌合受体包含与急性运动性轴索神经病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与急性运动性轴索神经病相关的自身抗原的实例包括但不限于,GM1。

[0133] 在一实施方式中,自身免疫疾病是自身免疫性肝炎,并且嵌合受体包含与自身免疫性肝炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与自身免疫性肝炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,抗核抗体(ANA)和抗平滑肌抗体(ASMA),抗-肝-肾微粒体-1抗体(ALKM-1)和抗-肝胞溶抗体1(ALC-1)。

[0134] 在一实施方式中,自身免疫疾病是疱疹样皮炎,并且嵌合受体包含与疱疹样皮炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与疱疹样皮炎的自身抗原的实例包括但不限于,IgA抗-肌内膜抗体。

[0135] 在一实施方式中,自身免疫疾病是变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss syndrome),并且嵌合受体包含与变应性肉芽肿性血管炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与变应性肉芽肿性血管炎的自身抗原的实例包括但不限于,抗-中性粒细胞胞质抗体抗体(ANCA)。

[0136] 在一实施方式中,自身免疫疾病是微观多血管炎(microscopic polyangiitis),并且嵌合受体包含与微观多血管炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与微观多血管炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,ANCA。

[0137] 在一实施方式中,自身免疫疾病是ANCA血管炎,并且嵌合受体包含与ANCA血管炎相关的自身抗原(或其变体或片段)。与ANCA血管炎相关的自身抗原的实例包括但不限于,中性粒细胞颗粒蛋白。

[0138] 在一实施方式中,自身免疫疾病是急性风湿热,并且嵌合受体包含与急性风湿热相关的自身抗原(或其变体或片段)。与急性风湿热相关的自身抗原的实例包括但不限于,链球菌细胞壁抗原。

[0139] 在一实施方式中,自身免疫疾病是1型糖尿病(T1D),并且嵌合受体包含与T1D相关的自身抗原(或其变体或片段)。与T1D相关的自身抗原的实例包括但不限于,胰岛素(IAA),谷氨酸脱羧酶(GAA或GAD)和蛋白质酪氨酸磷酸酶(IA2或ICA512)。

[0140] 在一实施方式中,自身免疫疾病是膜性肾病,并且嵌合受体包含与膜性肾病相关的自身抗原(或其变体或片段)。与膜性肾病相关的自身抗原的实例包括但不限于,PLA2R1和THSD7A1。

[0141] “干细胞特性(stemness)”指任何细胞以干细胞样的方式作用的相对能力,即全

能,多潜能或寡潜能的程度扩增或者任何特定干细胞可能具有的无限自我更新。“ACTR”是抗体偶联的T细胞受体,其是能够结合外源提供的抗体的工程改造的细胞组分。抗体与ACTR组分的结合装配(arm)了T细胞,使之与由抗体识别的抗原相互作用,并且当遇到抗原时,触发包含ACTR的T细胞以与抗原相互作用(参见美国专利公开号2015/0139943)。

[0142] 融合分子

[0143] 本文描述了组合物,例如,核酸酶,其能够用于切割细胞中选定的靶基因(例如,CISH)。在某些实施方式中,融合分子的一种或多种组分(例如,核酸酶)是天然产生的。在其他实施方式中,融合分子的一个或多个组分(例如,核酸酶)是非天然产生的,即,在DNA-结合分子和/或切割结构域中工程改造。例如,可以改变天然产生的核酸酶的DNA结合部分以结合选定的靶位点(例如,CRISPR/Cas的单向导RNA或兆核酸酶,其已经工程改造以结合不同于同源结合位点的位点)。在其他实施方式中,核酸酶包含异源性DNA结合和切割结构域(例如,锌指核酸酶;TAL效应结构域DNA结合蛋白;具有异源性切割结构域的DNA结合结构域)。因此,实施本发明可以使用任何核酸酶,包括但不限于,至少一种ZFN,TALEN,兆核酸酶,CRISPR/Cas核酸酶等,其中核酸酶切割靶基因,其中切割导致靶基因的基因组修饰(例如,切割的基因中的插入和/或缺失)。

[0144] 本文还描述了增加切割活性的特异性的方法,这通过独立滴定核酸酶复合物工程改造的切割半结构域伴侣(partner)。在一些实施方式中,两个伴侣(半切割结构域)的比例以1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:8、1:9、1:10或1:20的比例或这之间的任意值提供。在其他实施方式中,两个伴侣的比例大于1:30。在其他实施方式中,两个伴侣以选择为不同于1:1的比例部署。当单独或组合使用时,本发明的方法和组合物通过降低脱靶切割活性来提供靶向特异性的令人惊讶和出乎意料的增加。这些实施方式中所用的核酸酶可以包括ZFN、TALEN、CRISPR/Cas、CRISPR/dCas和TtAgo或其任意组合。

[0145] A. DNA结合分子

[0146] 本文所述的融合分子可以包含任何DNA结合分子(也称之为DNA结合结构域),包括蛋白质结构域和/或多核苷酸DNA结合结构域。在某些实施方式中,DNA结合结构域结合这样的序列,所述序列包含表2中所示序列的9-12个连续核苷酸(SEQ ID NO:40-47)。

[0147] 在某些实施方式中,本文所述的组合物和方法采用兆核酸酶(归巢内切核酸酶)DNA结合结构域,用于结合供体分子和/或结合细胞基因组中感兴趣的区域。天然产生的兆核酸酶识别15-40碱基对的切割位点,并且通常分为四个家族:LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst箱家族和HNH家族。示例性的归巢内切核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。其识别序列是已知的。还可参见美国专利号5,420,032;美国专利号6,833,252;Belfort等(1997)Nucleic Acids Res.25:3379-3388;Dujon等(1989)Gene 82:115-118;Perler等(1994)Nucleic Acids Res.22,1125-1127;Jasin(1996)Trends Genet.12:224-228;Gimble等(1996)J.Mol.Biol.263:163-180;Argast等(1998)J.Mol.Biol.280:345-353和新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs)产品目录。此外,归巢内切核酸酶和兆核酸酶的DNA结合特异性可被工程改造以结合非天然靶位点。参见例如,Chevalier,等(2002)Molec.Cell 10:895-905;Epinat,等(2003)Nucleic Acids Res.31:2952-2962;Ashworth,等(2006)Nature 441:656-659;Paques,等(2007)Current Gene Therapy 7:49-

66;和美国专利公开号2007/0117128。兆核酸酶和归巢内切核酸酶的DNA结合结构域可以在整个核酸酶的背景下进行改变(即,从而使核酸酶包含同源切割结构域)或者可以融合至异源性切割结构域。

[0148] 在其他实施方式中,本文所述方法和组合物中使用的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含天然产生的或工程改造的(非天然产生的)TAL效应DNA结合结构域。参见例如,美国专利号8,586,526,其通过引用全文纳入本文。已知黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的植物病原菌在重要农作物中导致很多疾病。黄单胞菌属的病原性取决于保守的III型分泌(T3S)系统,该系统向植物细胞内注入超过25种不同的效应物蛋白。这些注射的蛋白质包括模仿植物转录活化剂并操纵植物转录组的转录活化剂样(TAL)效应物(参见Kay等,(2007) *Science* 318:648-651)。这些蛋白质含有DNA结合结构域和转录活化结构域。最为充分表征的TAL-效应物之一是来自野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)的AvrBs3(参见Bonas等(1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136和国际专利公开号W02010/079430)。TAL-效应物含有串联重复的集中化结构域,各重复含有约34个氨基酸,它们是这些蛋白质的DNA结合特异性的关键。此外,它们含有核定位序列和酸性转录活化结构域(综述参见Schornack S,等(2006) *J Plant Physiol* 163(3):256-272)。此外,在致植物病细菌烟草青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)中,已在烟草青枯菌生物变型1菌株GMI1000和生物变型4菌株RS1000中发现两个基因,称为brg11和hpx17,其与黄单胞菌属(*Xanthomonas*)的AvrBs3家族具有同源性(参见Heuer等(2007) *Appl and Envir Micro* 73(13):4379-4384)。这些基因在核苷酸序列上彼此具有98.9%的同一性,但区别为hpx17重复结构域中的1,575bp缺失。然而,两种基因产物均与黄单胞菌属的AvrBs3家族蛋白质具有低于40%序列相同性。参见例如,美国专利号8,586,526,其通过引用全文纳入本文。

[0149] 这些TAL效应物的特异性取决于串联重复中存在的序列。重复序列包含约102bp,且所述重复彼此通常为91-100%同源(Bonas等,同上)。重复的多态性通常位于12和13位,并且似乎在位置12和13的高可变双残基(RVD)的种类与TAL效应物靶序列中连续核苷酸的种类之间存在一一对应(参见Moscou和Bogdanove,(2009) *Science* 326:1501以及Boch等(2009) *Science* 326:1509-1512)。实验上,已确定用于这些TAL效应物DNA识别的天然编码,因此位于位置12与13的HD序列导致对于胞嘧啶(C)的结合,NG结合至T,NI结合至A、C、G或T,NN结合至A或G,且ING结合至T。这些DNA结合重复已被组装进入具有新的重复组合与数量的蛋白质,产生能在植物细胞中与新序列相互作用并活化非内源性报告基因的表达的人工转录因子(Boch等,同上)。已将经工程改造的TAL蛋白连接至FokI切割半结构域,以产生TAL效应物结构域核酸酶融合体(TALEN)。参见例如,美国专利号8,586,526;Christian,等(2010) *Genetics* 186(2):757-61电子出版10.1534/genetics.110.120717。在某些实施方式中,TALE结构域包含N-帽和/或C-帽,如美国专利号8,586,526所述。

[0150] 在某些实施方式中,用于体内切割和/或靶向切割细胞基因组的一种或多种核酸酶的DNA结合结构域包含锌指蛋白。优选地,该锌指蛋白是非天然产生的,其中它经工程改造以结合至所选的靶位点。参见例如,Beerli等(2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo等(2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan等(2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal等(2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo等(2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; 美国专利号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,

503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;和美国专利公开号2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061,其均通过引用其全文纳入本文。

[0151] 与天然产生的锌指蛋白相比,经工程改造的锌指结合结构域可具有新结合特异性。工程改造方法包括但不限于合理设计和不同选择类型。例如,合理设计包括利用包含三体(或四体)核苷酸序列和单独锌指氨基酸序列的数据库,其中各三体或四体核苷酸序列与一种或多种结合该特定三体或四体序列的锌指氨基酸序列相关联。参见例如,共同拥有的美国专利号6,453,242和6,534,261,通过引用其全文的方式纳入本文。

[0152] 示例性选择方法包括噬菌体展示和双杂交系统,公开于美国专利号5,789,538、5,925,523、6,007,988、6,013,453、6,410,248、6,140,466、6,200,759和6,242,568,以及国际专利公开号WO 98/37186、WO 98/53057、WO 00/27878和WO 01/88197,以及GB专利号2,338,237。此外,已经在例如共同拥有的国际专利公开号WO 02/077227中描述了对锌指结合结构域的结合特异性的增强。

[0153] 此外,如这些及其它参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指的锌指蛋白可利用任何合适的接头序列连接在一起,包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。长度为6或更多个氨基酸的示例性接头序列还参见例如美国专利号6,479,626、6,903,185和7,153,949。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的个体锌指之间的合适接头的任何组合。

[0154] ZFP可与一个或多个核酸酶(切割)结构域可操作地结合(连接)以形成ZFN。术语“ZFN”包括二聚化以切割靶基因的一对ZFN。相对于称之为脱靶位点的其他非预期切割位点,方法和组合物还可用于增加ZFN(包括核酸酶对)对其预期靶的特异性(参见美国专利公开号20180087072)。因此,本文所述的核酸酶可以在其一个或多个DNA结合结构域主链区域中包含突变和/或在其核酸酶切割结构域中包含一个或多个突变。这些核酸酶可以在ZFP DNA结合结构域(“ZFP主链”)内包含对氨基酸的突变,所述突变可与DNA主链上的磷酸发生非特异性相互作用,但它们不包含DNA识别螺旋的变化。因此,本发明包括ZFP主链中阳离子氨基酸残基的突变,这对于核苷酸靶标特异性不是必需的。在一些实施方式中,ZFP主链中的这些突变包括将阳离子氨基酸残基突变为中性或阴离子氨基酸残基。在一些实施方式中,ZFP主链中的这些突变包括将极性氨基酸残基突变为中性或非极性氨基酸残基。在优选的实施方式中,在相对于DNA结合螺旋的(-5)位,(-9)位和/或(-14)位处发生突变。在一些实施方式中,锌指可在(-5),(-9)和/或(-14)处包含一个或多个突变。在其它实施方式中,多指型锌指蛋白中的一个或多个锌指可包含(-5),(-9)和/或(-14)中的突变。在一些实施方式中,将(-5),(-9)和/或(-14)处的氨基酸(例如精氨酸(R)或赖氨酸(K))突变为丙氨酸(A),亮氨酸(L),Ser(S),Asp(N),Glu(E),Tyr(Y)和/或谷氨酰胺(Q)。

[0155] 在一些方面中,DNA结合结构域(例如,ZFP、TALE、sgRNA等)靶向CISH基因。在某些实施方式中,DNA结合结构域靶向CISH基因的外显子区域,例如,外显子2或外显子3。

[0156] 靶位点选择(例如,CISH基因的外显子和/或内含子内);用于设计和构建融合蛋白(及其编码多核苷酸)的ZFP和方法是本领域技术人员已知的,并且详细描述于美国专利号6,140,081、5,789,538、6,453,242、6,534,261、5,925,523、6,007,988、6,013,453、6,200,759;和国际专利公开号WO 95/19431、WO 96/06166、WO 98/53057、WO 98/54311、WO 00/27878、WO 01/60970、WO 01/88197、WO 02/099084、WO 98/53058、WO 98/53059、WO 98/

53060、WO 02/016536和WO 03/016496。

[0157] 此外,如这些及其它参考文献中所公开的,锌指结构域和/或多指的锌指蛋白可利用任何合适的接头序列连接在一起,包括例如长度为5个或更多个氨基酸的接头。长度为6或更多个氨基酸的示例性接头序列还参见例如美国专利号6,479,626、6,903,185和7,153,949。本文所述的蛋白质可包括蛋白质的个体锌指之间的合适接头的任何组合。

[0158] 在某些实施方式中,DNA结合分子是CRISPR/Cas核酸酶系统的部分。参见例如,美国专利号8,697,359和美国专利公开号2015/0056705。编码该系统的RNA组分的CRISPR(规律成簇的间隔短回文重复序列)基因座,以及编码蛋白质的Cas(CRISPR相关)基因座(Jansen等.(2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575;Makarova等.(2002) *Nucleic Acids Res.* 30:482-496;Makarova等.(2006) *Biol. Direct* 1:7;Haft等.(2005) *PLoS Comput. Biol.* 1:e60)组成了CRISPR/Cas核酸酶系统的基因序列。微生物宿主中的CRISPR基因座包含CRISPR-相关(Cas)基因以及能够对CRISPR介导的核酸切割的特异性进行编程的非编码RNA元件的组合。

[0159] II型CRISPR是最充分表征的系统之一,并且以4个连续步骤进行靶向DNA双链断裂。首先,从CRISPR基因座转录两个非编码RNA:前-crRNA阵列和tracrRNA。第二,tracrRNA杂交至前-crRNA的重复序列区域,并且介导从前-crRNA到含个体间隔子序列的成熟crRNA的过程。第三,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过沃森-克里克碱基配对指导Cas至靶DNA,其位于crRNA上的间隔子和原型间隔子邻近基序(PAM)旁边的靶DNA上的原型间隔子之间,所述PAM是靶标识别的额外要求。最后,Cas9介导靶DNA的切割,以在原型间隔子内产生双链断裂。CRISPR/Cas系统活性包括3步:(i)通过称作“适应”的过程将外来DNA序列插入CRISPR阵列,以防止未来的攻击,(ii)表达相关蛋白质,以及表达和处理所述阵列,然后(iii)采用外来核酸进行RNA介导的干扰。因此,在细菌细胞中,多个所谓的“Cas”蛋白参与CRISPR/Cas系统的自然功能,并且在多种功能中发挥作用(例如外来DNA的插入等)。

[0160] 在某些实施方式中,Cas蛋白可为天然产生的Cas蛋白的“功能性衍生物”。天然序列多肽的“功能性衍生物”是与天然序列多肽具有共同定性生物性质的化合物。“功能性衍生物”包括但不限于天然序列的片段或天然序列多肽的衍生物及其片段,前提是它们与相应的天然序列多肽具有共同的生物活性。本文设想的生物活性是功能性衍生物将DNA底物水解成片段的能力。术语“衍生物”涵盖多肽的氨基酸序列变体,共价修饰形式,和其融合体。Cas多肽的合适衍生物或其片段包括但不限于Cas蛋白的突变体、融合体、共价修饰形式或其片段。包括Cas蛋白或其片段的Cas蛋白以及Cas蛋白或其片段的衍生物可获自细胞或通过化学合成或通过这两种方法的组合获得。所述细胞可以是天然产生Cas蛋白的细胞,或天然产生Cas蛋白并经遗传工程改造的细胞,所述遗传工程改造使所述细胞以较高表达水平产生内源性Cas蛋白或从外源引入的核酸产生Cas蛋白,其中所述核酸编码与内源性Cas相同或不同的Cas。在一些情况中,细胞天然不产生Cas蛋白,但是经遗传工程改造以产生Cas蛋白。在一些实施方式中,Cas蛋白是小Cas9同源物,用于经AAV载体的递送(Ran等(2015) *Nature* 510:186)。

[0161] 在一些实施方式中,DNA结合分子是TtAgo系统的部分(参见Swarts等,如上;Sheng等,如上)。在真核细胞中,基因沉默通过阿尔古(Argonaute, Ago)家族的蛋白介导。在该范例中,Ago与小(19-31nt)RNA结合。该蛋白质-RNA沉默复合物通过小RNA与靶标之间的沃森-

克里克碱基配对识别靶RNA,并且通过内切核酸裂解活性切割靶RNA (Vogel (2014) Science 344:972-973)。相比之下,原核Ago蛋白与小单链DNA片段结合,并且可能作用于检测并移除外源性(通常是病毒)DNA (Yuan等, (2005) Mol. Cell 19, 405; Olovnikov等 (2013) Mol. Cell 51, 594; Swarts等, 同上)。示例性的原核Ago蛋白包括:来自嗜嗜热菌 (*Aquifex aeolicus*)、类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 和嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) 的那些。

[0162] 最为充分表征的原核Ago蛋白之一是来自嗜热栖热菌 (*T. thermophilus*) 的一种 (TtAgo; Swarts等, 同上)。TtAgo与具有5'磷酸基团的15nt或13-25nt单链DNA片段关联。被TtAgo结合的该“向导DNA”可用于引导该蛋白质-DNA复合物结合第三方 (third-party) DNA分子中的沃森-克里克互补DNA序列。一旦这些向导DNA中的序列信息允许鉴定靶DNA, TtAgo-向导DNA复合物即能切割该靶DNA。在与其靶DNA结合时,这样的机制还被TtAgo-向导DNA复合物的结构支持 (G. Sheng等, 同上)。来自类球红细菌的Ago (RsAgo) 具有相似的性质 (Olovnikov等, 同上)。

[0163] 任何DNA序列的外源性向导DNA均可被加载到TtAgo蛋白上 (Swarts等, 同上)。因为TtAgo切割的特异性由向导DNA引导,所以与外源性研究物特异性的 (investigator-specified) 向导DNA形成的TtAgo-DNA复合物将引导TtAgo靶DNA切割至互补性研究物特异性的靶DNA。由此,人们可在DNA中生成靶向的双链断裂。TtAgo-向导DNA系统(或来自其它生物体的直系同源Ago-向导DNA系统)的应用允许细胞内基因组DNA的靶向切割。这样的切割可以是单链的或双链的。对于哺乳动物基因组DNA的切割,优选应用针对哺乳动物细胞中表达进行优化的TtAgo密码子形式。此外,可优选应用体外形成的TtAgo-DNA复合物处理细胞,其中TtAgo蛋白融合至细胞穿透肽。并且,可优选应用已通过诱变而被改变的TgAgo蛋白的形式以在37摄氏度具有增强的活性。Ago-RNA-介导的DNA切割可以被用于影响包括使用本领域用于开发DNA断裂的技术标准的基因敲除、靶向基因添加、基因修正、靶基因缺失在内的所有结果。

[0164] 因此,核酸酶包含DNA结合分子,该DNA结合分子特异性地结合期望将供体(转基因)插入其中的任何基因中的靶位点。

[0165] B. 切割结构域

[0166] DNA结合结构域可以操作性地连接任何合适的切割结构域以形成核酸酶。例如,已经将ZFP DNA-结合结构域与核酸酶结构域融合以产生ZFN——这样的一种功能性实体,其能够通过其工程改造的(ZFP) DNA结合结构域识别其预期核酸靶标并且通过核酸酶活性导致DNA在ZFP结合位点附近被切断,包括用于各种生物体中的基因组修饰。参见例如,美国专利号7,888,121;8,623,618;7,888,121;7,914,796;和8,034,598;和美国专利公开号2011/0201055。此外,已经将TALE DNA-结合结构域与核酸酶结构域融合以产生TALEN。参见例如,美国专利号8,586,526。

[0167] 如上所述,切割结构域相对于DNA结合结构域可以是异源的,例如,锌指DNA结合结构域和来自核酸酶的切割结构域或TALEN DNA结合结构域和切割结构域,或兆核酸酶DNA结合域和来自不同核酸酶的切割结构域。异源性切割结构域可获自任何内切核酸酶或外切核酸酶。可衍生出切割结构域的示范性核酸内切核酸酶,包括但不限于限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。切割DNA的其它酶是已知的(例如,S1核酸酶;绿豆核酸酶;胰DNA酶I;微球菌核酸酶;酵母HO内切核酸酶)。可将一种或多种这些酶(或其功能性片段)用作切割结构域

和切割半结构域的来源。

[0168] 类似地,切割半结构域可衍生自如上所述的任何核酸酶或其部分,其需要二聚化以用于切割活性。一般而言,若融合蛋白包含切割半结构域,则需要两种融合蛋白供于切割。或者,可使用包含两个切割半结构域的单个蛋白。这两个切割半结构域可衍生自同一核酸内切核酸酶(或其功能性片段),或各切割半结构域可衍生自不同的核酸内切核酸酶(或其功能性片段)。此外,优选两种融合蛋白的靶位点相对彼此布置,从而这两种融合蛋白与其各自靶位点的结合使切割半结构域彼此处于允许切割半结构域形成功能性切割结构域(例如,通过二聚化)的空间定位。因此,在某些实施方式中,这些靶位点的邻近边缘间隔有5-8个核苷酸或15-18个核苷酸。然而,可在两个靶位点之间介入任何整数个核苷酸或核苷酸对(例如,2-50个核苷酸对或更多)。总之,切割的位点位于靶位点之间。

[0169] 限制性内切核酸酶(限制性酶)存在于许多物种中,其能够序列特异性结合DNA(在识别位点处),并在结合位点处或其附近切割DNA。某些限制性酶(例如,IIS型)在从识别位点移除的位点处切割DNA并具有可分开的结合与切割结构域。例如,IIS型酶FokI催化DNA的双链切割,其中一条链在距离其识别位点9个核苷酸处被切割,另一条链在距离其识别位点13个核苷酸处被切割。参见例如,美国专利号5,356,802、5,436,150和5,487,994;以及Li等,(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li等,(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim等(1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim等(1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982。因此,在一个实施方式中,融合蛋白包括来自至少一种IIS型限制性酶的切割结构域(或切割半结构域)和一种或多种经或未经工程改造的锌指结合域。

[0170] 切割结构域可与结合域分离的一个示例性IIS型限制性酶是FokI。该具体酶作为二聚体具有活性。Bitinaite等,(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575。因此,就本公开的目的而言,认为所述融合蛋白所用FokI酶的部分是切割半结构域。因此,对于利用锌指-Fok I融合体的靶向双链切割和/或靶向细胞序列置换,可使用各自含有一个Fok I切割半结构域的二种融合蛋白重建催化活性的切割结构域。或者,也可使用包含锌指结合结构域和两个FokI切割半结构域的单个多肽分子。采用锌指-Fok I融合的靶向切割和靶向序列变化的参数在本申请他处提供。

[0171] 切割结构域或切割半结构域可以是蛋白质的任何部分,其保留了切割活性,或保留了多聚化(例如,二聚化)以形成功能性切割结构域的能力。

[0172] 示例性IIS型限制酶描述于国际专利公开号W0 07/014275中,其通过引用其全文的方式纳入本文。其它限制性酶也包含可分开的结合和切割结构域,并且这些是本发明所设想的。参见例如Roberts等.(2003) (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420。

[0173] 在某些实施方式中,切割结构域包含一个或多个经工程改造的切割半结构域(也称作二聚化结构域突变体),使同二聚作用最小化或被阻止,例如,如美国专利号8,623,618;7,888,121;7,914,796;和8,034,598,以及美国专利公开号2011/0201055所述,其全部内容通过引用其全文方式纳入本文。位于FokI位置446、447、479、483、484、486、487、490、491、496、498、499、500、531、534、537和538的氨基酸残基都是影响FokI切割半结构域二聚化的靶标。

[0174] 在某些实施方式中,工程改造的切割半结构域源自FokI并在相对于如下所示野生

型全长FokI编码的氨基酸残基416、422、447、448和/或525中的一个或多个中包含一个或多个突变(参见例如,美国专利公开号2018/0087072):

[0175] 野生型FokI切割半结构域(SEQ ID NO:1)

[0176] QLVKSELEEKSELRHKLKYPHEYIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRGKHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNKHINPNEWVKVYPSSVTEFKFLFVSGHFKGNYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIGGEMIKAGTLTLEEVRKFNNGEINF

[0177] 这些突变降低FokI结构域和DNA分子之间的非特异性相互作用。在其他实施方式中,源自FokI的切割半结构域在氨基酸残基414-426、443-450、467-488、501-502和/或521-531中的一个或多个中包含突变。突变可以包括对残基的突变,所述残基在存在于与FokI同源的天然限制酶中。在某些实施方式中,突变是取代,例如,用不同的氨基酸取代野生型残基,例如,丝氨酸(S),例如,R416S或K525S。在优选实施方式中,位置416,422,447,448和525处的突变包括用不带电荷或带负电荷的氨基酸替换带正电荷的氨基酸。在另一个实施方式中,工程改造的切割半结构域包含氨基酸残基499、496和486中的突变,还包含个氨基酸残基416、422、447、448或525中一个或多个中的突变。在优选实施方式中,本发明提供了融合蛋白,其中所述工程改造的切割半结构域包含这样的多肽,其中位置486处的野生型Gln(Q)残基被替换为Glu(E)残基,位置499处的野生型Ile(I)残基被替换为Leu(L)残基,且位置496处的野生型Asn(N)残基被替换为Asp(D)或Glu(E)残基(“ELD”或“ELE”),以及位置416、422、447、448或525处的一个或多个突变。

[0178] 可以使用具有多于一个突变的切割结构域,例如,在一个切割半结构域的位置490(E→K)和538(I→K)处的突变以产生工程改造的切割半结构域,命名为“E490K:I538K”,并且通过将另一切割半结构域中的位置486(Q→E)和499(I→L)进行突变以产生工程改造的切割半结构域,命名为“Q486E:I499L”;将位置486处的野生型Gln(Q)残基替换为Glu(E)残基、位置499处的野生型Iso(I)残基替换为Leu(L)残基和位置496处的野生型Asn(N)残基替换为Asp(D)或Glu(E)残基的突变(也分别称之为“ELD”和“ELE”结构域);工程改造的切割半结构域,其包括在位置490、538和537处的突变(相对于野生型FokI编号),例如这样的突变,所述突变用Lys(K)残基替换了位置490处的野生型Glu(E)残基,用Lys(K)残基替换了位置538处的Iso(I)残基,和用Lys(K)残基或Arg(R)残基替换了位置537处的野生型His(H)残基(也分别称之为“KKK”和“KKR”结构域);和/或工程改造的切割半结构域,其在位置490和537处包括突变(相对于野生型FokI进行编号),例如这样的突变,所述突变用Lys(K)残基替换了位置490处的野生型Glu(E)残基并用Lys(K)残基或Arg(R)残基替换了位置357处的野生型His(H)残基(也分别称之为“KIK”和“KIR”结构域)。参见例如美国专利号7,914,796;8,034,598和8,623,618,其公开内容通过引用其全文纳入本文用于所有目的。在其它实施方式中,经工程改造的切割半结构域包含“Sharkey”和/或“Sharkey”突变(参见Guo等,(2010) J.Mol.Biol.400(1):96-107)。

[0179] 或者,核酸酶可利用称为“分裂-酶(split-enzyme)”的技术(参见例如,美国专利公开号2009/0068164)在核酸靶位点处体内组装。这类分裂酶的组分可在另外的表达构建物上表达,或者可以连接于单独的组分相互分开的某一开放读框中,例如,组分由自切割2A肽或IRES序列分开。组分可以是单独的锌指结合结构域或兆核酸酶核酸结合结构域的结构域。

[0180] 可在使用前筛选核酸酶的活性,例如,在如在美国专利号8,563,314中所述的基于酵母的染色体系统中。

[0181] Cas9相关CRISPR/Cas系统包含两个RNA非编码组分:tracrRNA和前-crRNA阵列,其包含由相同的直接重复(DR)间隔的核酸酶向导序列(间隔子)。为了使用CRISPR/Cas系统以完成基因组工程改造,这些RNA的功能必须存在(参见Cong,等(2013) *Scienceexpress* 1/10.1126/science 1231143)。在一些实施方式中,tracrRNA和前-crRNA通过独立的表达构建体或作为单独的RNA提供。在其他实施方式中,构建嵌合RNA,其中将工程改造的成熟crRNA(赋予靶特异性)与tracrRNA融合(提供与Cas9的相互作用)以产生嵌合cr-RNA-tracrRNA杂合体(也称之为单向导RNA)。(参见Jinek,等(2012) *Science* 337:816-821; Jinek,等(2013) *eLife* 2:e00471.DOI:10.7554/eLife.00471和Cong,同上)。

[0182] 在一些实施方式中,使用CRISPR-Cpf1系统。在弗朗西斯氏菌种(*Francisella* spp)中鉴定的CRISPR-Cpf1系统是2型CRISPR-Cas系统,其在人细胞中介导稳健的DNA干扰。尽管功能性保守,Cpf1和Cas9在许多方面不同,包括在其向导RNA和底物特异性上(参见Fagerlund等,(2015) *Genom Bio* 16:251)。Cas9和Cpf1蛋白之间主要的区别在于Cpf1并不利用tracrRNA,并且因此仅需要crRNA。FnCpf1 crRNA长度为42-44个核苷酸(19个核苷酸的重复以及23-25个核苷酸的间隔子),并且包含单一的茎环,其耐受维持二级结构的序列变化。此外,Cpf1 crRNA显著短于Cas9所需的约100个核苷酸的工程改造的sgRNA,并且对FnCpf1的PAM需求是置换链上的5'-TTN-3'和5'-CTA-3'。尽管Cas9和Cpf1都在靶DNA中产生双链断裂,Cas9使用其RuvC-和HNH-样结构域以在向导RNA的种子序列内产生钝端切口,然而Cpf1使用RuvC-样结构域以产生种子外的错位切口。因为Cpf1产生的错位切口远离关键的种子区域,NHEJ将不会破坏靶位点,因此保证Cpf1可以继续切割相同位点直到所需的HDR重组事件发生。因此,在本文所述的方法和组合物中,应当理解的是,术语“Cas”包括Cas9和Cpf1蛋白。因此,本文所用“CRISPR/Cas系统”指CRISPR/Cas和/或CRISPR/Cpf1系统,同时包括核酸酶和/或转录因子系统。

[0183] 靶位点

[0184] 如上详述,DNA结合结构域可经工程改造以结合任何所选序列。与天然产生的DNA结合结构域相比,经工程改造的DNA结合结构域可具有新型结合特异性。

[0185] 在某些实施方式中,一种或多种靶核酸靶向CISH基因,例如,基因的内含子和/或外显子(例如,外显子2或3)。在某些实施方式中,核酸酶结合表2中所示序列内9-20或更多个核苷酸(连续或非连续)的靶位点。

[0186] 在某些实施方式中,核酸酶靶向“安全港”基因座,诸如人细胞中的AAVS1、HPRT、ALB和CCR5基因,以及小鼠细胞中的Rosa26(参见例如,美国专利号7,888,121;7,972,854;7,914,796;7,951,925;8,110,379;8,409,861;8,586,526;美国专利公开号2003/0232410;2005/0208489;2005/0026157;2006/0063231;2008/0159996;2010/00218264;2012/0017290;2011/0265198;2013/0137104;2013/0122591;2013/0177983;和2013/0177960)和植物中的Zp15基因座(参见美国专利号8,329,986)。

[0187] 合适靶基因的其他非限制性实例包括: β 球蛋白基因(HBB), γ (δ)球蛋白基因(HBG1),B细胞淋巴瘤/白血病11A(BCL11A)基因,Kruppel样因子1(KLF1)基因,CCR5基因,CXCR4基因,PPP1R12C(AAVS1)基因,次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因,白蛋白基因,

VIII因子基因, IX因子基因, 富含亮氨酸的重复激酶2(LRRK2)基因, 亨廷顿(Htt)基因, 视紫红质(RHO)基因, 囊性纤维化跨膜电导调节剂(CFTR)基因, 表面活性剂蛋白B基因(SFTPB), T细胞受体 α (TRAC)基因, T细胞受体 β (TRBC)基因, 程序性细胞死亡1(PD1)基因, 细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)基因, 人白细胞抗原(HLA)A基因, HLA B基因, HLA C基因, HLA-DPA基因, HLA-DQ基因, HLA-DRA基因, LMP7基因, 与抗原加工相关的转运蛋白(TAP)1基因, TAP2基因, 泰帕森基因(TAPBP), II型主要组织相容性复合物反式活化因子(CIITA)基因, 肌营养不良蛋白基因(DMD), 糖皮质激素受体基因(GR), CISH基因, Rag-1基因, RFX5基因, FAD2基因, FAD3基因, ZP15基因, KASII基因, MDH基因和/或EPSPS基因。在一些方面中, 一种或多种核酸酶结合和/或切割检查点抑制基因, 例如, PD-1, CTLA4, 抑制性配体B7家族的受体, 或者通过LAG3、2B4、BTLA、TIM3、A2aR和杀伤抑制剂受体(KIR和C型凝集素受体)切割信号转导涉及的受体或配体基因, 参见Pardoll(2012)Nat Rev Cancer 12(4):252, HLA复合基因(I类: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, B2M; II类: HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DQA, HLA-DRA, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB, HLA-DRB)或TCR; 和/或这样的基因, 所述基因编码HLA复合物的肽加载过程和抗原处理所涉及产物(例如, TAP, 胰蛋白酶, 钙网蛋白, 钙粘蛋白, LMP2, LMP7或Erp57)。参见例如, 美国专利号8,956,828和8,945,868。

[0188] 供体

[0189] 在某些实施方式中, 本公开涉及核酸酶介导的外源性序列(例如, 编码治疗性蛋白)向细胞基因组中的靶向整合。值得注意的是, 插入外源性序列(也称为“供体序列”或“供体”或“转基因”), 例如, 用于使特定区域缺失和/或修正突变基因用于增加野生型基因的表达。容易理解的是, 供体序列通常与其所被放置的基因组序列不相同。供体序列可以包含通过两个同源区域侧接的非同源性序列(例如, 转基因), 以允许在感兴趣的位置进行有效HDR或者可以通过非同源定向修复机制整合。参见例如, 美国专利号9,045,763;9,005,973;和7,888,121。此外, 供体序列可以包含载体分子, 所述载体分子包含与细胞染色质中感兴趣的区域不同源的序列。供体分子可以包含与细胞DNA同源的几个不连续区域。此外, 为了靶向插入通常不存在于感兴趣区域中的序列, 所述序列可以存在于供体核酸分子中并侧接与感兴趣区域中的序列同源的区域。

[0190] 至于核酸酶, 可以任何型式导入供体。在某些实施方式中, 可以使用DNA和/或病毒载体通过本领域已知的方法导入供体。参见例如, 美国专利号9,005,973;8,936,936;和8,703,489。可以双链或单链型式将供体导入细胞中。可以环状或线性型式将供体导入细胞中。如果以线性型式导入, 那么可以通过本领域技术人员已知的方法保护供体序列的末端(例如, 免于核酸外切降解)。例如, 将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加到线性分子的3'末端和/或将自互补寡核苷酸连接于一个或两个末端。参见例如, Chang, 等(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963;Nehls, 等(1996)Science 272:886-889。保护外源性多核苷酸免于降解的其他方法包括但不限于, 添加末端氨基基团和使用修饰的核苷酸间键, 例如硫代磷酸酯, 氨基磷酸酯和O-甲基核糖或脱氧核糖残基。

[0191] 在某些实施方式中, 供体包括长度大于1kb的序列(例如, 编码序列, 也称之为转基因), 例如, 2-200kb, 2-10kb(或其间任意值)。供体还可以包括至少一个核酸酶靶位点。在某些实施方式中, 供体包括至少2个靶位点, 例如, 对于一对ZFN, TALEN, TtAgo或CRISPR/Cas系统。通常, 核酸酶靶向位点位于转基因序列的外侧, 例如, 转基因序列的5'和/或3', 用于切

割转基因。核酸酶切割位点可以针对任何核酸酶。在某些实施方式中,双链供体中包含的核酸酶靶位点与用于切割内源性靶标的核酸酶相同,切割的供体通过同源依赖性方法整合。

[0192] 可以插入供体,使其表达受整合位点的内源性启动子驱动,即驱动插入供体的内源基因表达的启动子。然而,显然供体可以包含启动子和/或增强子,例如,组成型启动子或诱导型或组织特异性启动子。

[0193] 供体分子可以插入内源性基因,从而使所有、一些或没有内源性基因表达。在一些实施方式中,将转基因整合进入CISH基因内源基因座中,以修正突变形式(例如,在来自CISH基因功能性形式缺乏或不足患者的细胞中),例如,将转基因整合进行内源性CISH基因中,例如CISH基因的外显子(例如,外显子2或外显子3)。在其他实施方式中,将转基因整合进入CISH基因的内源性基因座中,从而表达功能性蛋白质。因此,供体可以包括产生功能性蛋白质的任何蛋白质编码序列,包括但不限于,CAR,工程改造或外源性TCR(参见美国专利号8,956,828)和/或ACTR(美国专利公开号2017/0281682)及其组合。

[0194] 此外,虽然不是表达所必需的,但是外源性序列可以还包括转录或翻译调节序列或其他序列,例如,启动子,增强子,绝缘子,内部核糖体进入位点,编码2A肽和/或聚腺苷酸化信号的序列。此外,可以包括剪接受体序列。

[0195] 可以使用本领域已知的标准技术由PCR由质粒、细胞或其他来源分离本文所述供体序列上携带的转基因。使用的供体可以包括多种类型的拓扑结构,包括环形超螺旋,松弛环形,线性等。或者,可以使用标准寡核苷酸合成技术化学合成它们。另外,供体可能被甲基化或缺乏甲基化。供体可以处于细菌或酵母人工染色体(BAC或YAC)的形式。

[0196] 本文所述的供体多核苷酸可以包括一个或多个非天然碱基和/或主链。具体地,可以使用本文所述的方法进行具有甲基化胞嘧啶的供体分子的插入,以在感兴趣的区域中实现转录静止状态。

[0197] 外源性(供体)多核苷酸可包含感兴趣的任何序列(外源性序列)。示例性的外源性序列包括但不限于,任何多肽编码序列(例如,cDNA),启动子序列,增强子序列,表位标签,标志物基因,切割酶识别位点和各种类型的表达构建体。标志物基因包括但不限于,编码介导抗生素抗性(例如氨苄青霉素抗性,新霉素抗性,G418抗性,嘌呤霉素抗性)的蛋白质的序列,编码有色或荧光或发光蛋白(例如绿色荧光蛋白,增强型绿色荧光蛋白,红色荧光蛋白,荧光素酶)的序列,和介导增强的细胞生长和/或基因扩增的蛋白质(例如,二氢叶酸还原酶)。表位标签包括,例如,一个或多个拷贝的FLAG、His、myc、Tap、HA或任何可检测的氨基酸序列。

[0198] 在一些实施方式中,供体还包括编码其表达在细胞中为所需要的任何多肽的多核苷酸,包括但不限于抗体,抗原,酶,受体(细胞表面或核或嵌合抗原受体(CAR)),激素,淋巴因子、细胞因子、报告多肽、生长因子和上述任一种的功能性片段。例如,编码序列可以是cDNA。

[0199] 在某些实施方式中,外源性序列可以包含标志物基因(上述),从而允许选择已经经历靶向整合的细胞,以及编码其他功能的连接序列。标志物基因的非限制实例包括GFP,药物选择标志物等。

[0200] 在某些实施方式中,转基因可以包括,例如,野生型基因以替换突变的内源性序列。例如,可以将野生型(或其他功能性)CISH基因序列插入干细胞的基因组中,其中基因的

内源性拷贝被突变。转基因可插入内源性基因座,或可替代地靶向安全港基因座。

[0201] 按照本说明书的教导,这类表达盒的构建利用分子生物学领域中众所周知的方法(参见例如,Ausubel或Maniatis)。在使用表达盒产生转基因动物之前,可以通过将表达盒引入合适的细胞系(例如,原代细胞,转化细胞,或永生细胞系)中测试表达盒对与选定控制元件相关的应激诱导物的响应性。

[0202] 此外,虽然不是表达式所必需的,但是外源性序列可以还包括转录或翻译调节序列,例如,启动子,增强子,绝缘子,内部核糖体进入位点,编码2A肽和/或聚腺苷酸化信号的序列。此外,感兴趣基因的控制元件可以可操作地连接报告基因以产生嵌合基因(例如,报告物表达盒)。

[0203] 可以实现靶向插入非编码核酸序列。编码反义RNA、RNAi、shRNA和微小RNA(miRNA)的序列也可以用于靶向插入。

[0204] 在其他实施方式中,供体核酸可以包含非编码序列,所述非编码序列是供于其他核酸酶设计的靶位点。随后,可以在细胞中表达其他核酸酶,从而通过插入另一感兴趣的供体分子来切割和修饰原始供体分子。以此方式,可以产生供体分子的重复整合,从而允许在感兴趣的特定基因座或安全港基因座处进行性状堆叠(trait stack)。

[0205] 细胞

[0206] 因此,本文提供了遗传修饰的细胞,其包含遗传修饰的CISH基因。遗传修饰的细胞可以在CISH基因内的任何位置进行修饰,包括非编码或编码区,例如,在CISH基因外显子2和/或外显子3内。在某些实施方式中,修饰包含转基因的整合,所述转基因在细胞,包括通过本文所述方法产生的细胞(例如,T细胞或干细胞)中表达功能性蛋白质。使用一种或多种核酸酶以靶向的方式将转基因整合进入细胞的基因组中。在某些实施方式中,将转基因整合进入CISH基因中,例如,癌症患者或患有炎症疾病的患者中。可以将转基因整合进入CISH的内含子和/或外显子区域,例如,外显子2或外显子3。在某些实施方式中,将转基因整合进入表2所示至少9个碱基对的靶位点任意侧的核苷酸中或5-10个核苷酸内。因此,本文提供了遗传修饰的细胞,其包含整合进入CISH基因外显子2或3的转基因(其表达功能性蛋白质),以及包含遗传修饰的细胞衍生的细胞。

[0207] 不同于随机整合,靶向整合确保转基因被整合进入特定的基因中。转基因可以整合进入靶基因中的任何位置。在某些实施方式中,将转基因整合进入核酸酶切割位点处或其附近,例如,切割位点上游或下游的1-300(或其间任意值)个碱基对内,更优选切割位点任意侧1-100个碱基对(或其间任意值)内,甚至更优选切割位点任意侧1-50个碱基对(或其间任意值)内。在某些实施方式中,包含转基因的整合序列不包含任何载体序列(例如,病毒载体序列)。

[0208] 可以如本文所述遗传修饰任何细胞类型以包含转基因,包括但不限于细胞和细胞系。如本文所述包含转基因的细胞的其他非限制性实例包括T细胞(例如,CD4+、CD3+、CD8+);树突细胞;B细胞;自体(例如,患者来源)或异源性多能,全能或多潜能干细胞(例如,CD34+细胞,诱导型多能干细胞(iPSC),胚胎干细胞等)。在某些实施方式中,本文所述的细胞是源自患者的CD34+细胞。细胞可以在培养基中经遗传修饰,或者可以通过向对象提供如本文所述的核酸酶和/或供体经体内被遗传修饰。

[0209] 本文所述的细胞能够用于治疗 and/或预防患病对象中的癌症或炎症疾病,例如,通

过离体疗法。可以扩增核酸酶修饰的细胞,然后使用标准技术将其重新导入患者。参见例如,Tebas,等(2014)New Eng J Med 370(10):901。在干细胞的情况下,输注进入对象中后,这些前体体内分化成表达功能性CISH蛋白的细胞。还提供了包含本文所述细胞的药物组合物。此外,细胞可以在给予患者之前冷冻保存。

[0210] 本文所述的细胞和离体方法提供了治疗和/或预防对象(例如,哺乳动物对象)中的病症(例如,癌症或炎性疾病),并且消除了持续预防性药物给药的需求或风险程序诸如同种异体骨髓移植或伽马逆转录病毒递送。因此,本文所述的发明提供了治疗和/或预防癌症、炎性疾病和其中需要免疫调节的其他病症更安全,成本效益好且省时的方法。

[0211] 递送

[0212] 核酸酶,编码这些核酸酶的多核苷酸,供体多核苷酸和包含本文所述的蛋白质和/或多核苷酸的组合物可以通过任何合适的方式递送。某些实施方式中,体内递送核酸酶和/或供体。在其他实施方式中,将核酸酶和/或供体递送至分离的细胞(例如,自体同源或异源性干细胞),用于提供能够用于离体递送至患者(细胞疗法)的修饰细胞。

[0213] 递送含本文所述核酸酶的方法述于,例如,美国专利号6,453,242;6,503,717;6,534,261;6,599,692;6,607,882;6,689,558;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219和7,163,824,其全部公开内容通过引用其全文的方式纳入本文。

[0214] 还可以使用任何核酸递送机制递送本文所述核酸酶和/或供体构建体,包括裸DNA和/或RNA(例如,mRNA)和载体,其包含编码一种或多种所述组件的序列。可采用任何载体系统,包括但不限于,质粒载体、DNA小环、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体和腺相关病毒载体等及其组合。还参见例如,美国专利号6,534,261;6,607,882;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219;和7,163,824;和美国专利公开号2014/0335063,其通过引用其全文的方式纳入本文。此外,显而易见的是,这些系统中的任一种系统可以包含治疗所需的一种或多种序列。因此,在将一种或多种核酸酶和供体构建体导入细胞时,核酸酶和/或供体多核苷酸可以被相同的递送系统或不同的递送机制携带。当使用多个系统时,各递送机制可以包含编码一种或多宗核酸酶和/或供体构建体的序列(例如,编码一种或多种核酸酶的mRNA和/或携带一种或多种供体构建体的AAV或mRNA)。

[0215] 可采用常规的基于病毒和非病毒的转基因方法来将编码核酸酶或供体构建体的核酸导入细胞(例如,哺乳动物细胞)和靶组织中。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、DNA小环,裸核酸以及与递送载剂(诸如脂质体或泊洛沙姆(poloxamer))复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞后具有附加型或整合的基因组。基因治疗操作的综述见于Anderson(1992)Science 256:808-813;Nabel和Felgner(1993)TIBTECH 11:211-217;Mitani和Caskey(1993)TIBTECH 11:162-166;Dillon(1993)TIBTECH 11:167-175;Miller(1992)Nature 357:455-460;Van Brunt(1988)Biotechnology 6(10):1149-1154;Vigne(1995)Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36;Kremer和Perricaudet(1995)British Medical Bulletin 51(1):31-44;Haddada等.(1995)Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler和Böhm(编);和Yu等.(1994)Gene Therapy 1:13-26。

[0216] 核酸的非病毒递送方法包括电穿孔、脂质转染、显微注射、基因枪、病毒颗粒、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸偶联物、脂质纳米颗粒(LNP)、裸DNA、裸RNA、加帽

RNA、人工病毒粒和试剂增强型DNA摄取。利用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声孔效应也可用于递送核酸。

[0217] 其它示例性的核酸递送系统包括Amaya生物系统公司(德国科隆)、迈克赛特公司(Maxcyte, Inc.) (马里兰州罗克韦尔)、BTX分子递送系统公司(马萨诸塞州霍利斯顿)和哥白尼治疗公司(Copernicus Therapeutics Inc.) (参见例如美国专利号6,008,336)提供的那些。脂质转染描述于例如,美国专利号5,049,386、4,946,787和4,897,355,并且脂质转染试剂市售可得(例如,TransfectamTM和LipofectinTM)。适于多核苷酸的高效受体-识别脂质转染的阳离子和中性脂质包括Felgner、国际专利公开号W0 91/17424,W0 91/16024的那些。在一些方面中,核酸酶以mRNA递送,而转基因通过其他方式递送,诸如病毒载体,小环DNA,质粒DNA,单链DNA,线性DNA,脂质体,纳米颗粒等。

[0218] 脂质:核酸复合物(包括靶向的脂质体,例如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员熟知的(参见例如,Crystal(1995) Science 270:404-410;Blaese等.(1995) Cancer Gene Ther.2:291-297;Behr等.(1994) Bioconjugate Chem.5:382-389;Remy等.(1994) Bioconjugate Chem.5:647-654;Gao等.(1995) Gene Therapy 2:710-722;Ahmad等.(1992) Cancer Res.52:4817-4820;美国专利号4,186,183;4,217,344;4,235,871;4,261,975;4,485,054;4,501,728;4,774,085;4,837,028;和4,946,787)。

[0219] 递送的其它方法包括将待被递送的核酸包装到EnGeneIC递送载体(EDV)中。采用双特异性抗体将这些EDV被特异性递送至靶组织,其中,所述抗体的一个臂对靶组织具有特异性,而另一个臂对EDV具有特异性。抗体将EDV带至靶细胞表面,然后EDV通过内吞作用进入细胞。一旦进入细胞,内容物即被释放(参见MacDiarmid等(2009) Nature Biotechnology 27(7):643)。

[0220] 使用基于RNA或DNA病毒的系统递送编码经工程改造的CRISPR/Cas系统的核酸利用高度演化的过程来将病毒靶向身体中特定的细胞并且将该病毒负载物(payload)运输至核。病毒载体可直接给予对象(体内)或其可用于体外处理细胞,并将经修饰的细胞给予对象(离体)。用于CRISPR/Cas系统的常规的基于病毒的系统包括但不限于,用于基因传递的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关、牛痘和单纯性疱疹病毒载体。宿主基因组中的整合可采用逆转录病毒、慢病毒和腺相关病毒基因传递方法进行,通常导致插入的转基因的长期表达。此外,已在许多不同的细胞类型和靶组织中观察到了高转导功效。

[0221] 逆转录病毒的趋性可通过引入外来包膜蛋白、扩大靶细胞的潜在靶群体来改变。慢病毒载体是能够转导或感染非分裂细胞的逆转录病毒载体,并且通常产生高病毒效价。逆转录病毒转基因系统的选择取决于靶组织。逆转录病毒载体包含顺式作用的长末端重复,其具有包装长达6-10kb的外来序列的能力。最小的顺式作用LTR足以用于载体的复制和包装,其随后用于将治疗基因整合进入靶细胞,以提供永久的转基因表达。广泛应用的逆转录病毒载体包括基于鼠白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、类人猿免疫缺陷型病毒(SIV)、人类免疫缺陷型病毒(HIV),及其组合的那些(参见例如,Buchscher等.(1992) J.Virol.66:2731-2739;Johann等.(1992) J.Virol.66:1635-1640;Sommerfelt等.(1990) Virol.176:58-59;Wilson等.(1989) J.Virol.63:2374-2378;Miller等.(1991) J.Virol.65:2220-2224;国际专利公开号W0 1994/026877)。

[0222] 在其中优选瞬时表达的应用中,可采用基于腺病毒的系统。基于腺病毒的载体能

能够在许多细胞类型中获得极高的转导效率,并且不需要细胞分裂。采用这种载体,已获得了高效价和高水平的表达。该载体可在相对简单的系统中大量产生。腺相关病毒(“AAV”)载体也用于用靶核酸转导细胞,例如,用于核酸和肽的体外生成,以及用于体内和离体基因治疗法(参见例如,West等.,*Virology* 160:38-47;美国专利号4,797,368;国际专利公开号W0 93/24641;Kotin(1994)*Human Gene Therapy* 5:793-801;Muzyczka(1994)*J.Clin.Invest.*94:1351。重组AAV载体的构建描述于多个公开文本中,包括美国专利号5,173,414;Tratschin等.(1985)*Mol.Cell.Biol.*5:3251-3260;Tratschin等.(1984)*Mol.Cell.Biol.*4:2072-2081;Hermonat和Muzyczka(1984)*PNAS* 81:6466-6470;和Samulski等.(1989)*J.Virol.*63:03822-3828。可以使用任何AAV血清型,包括AAV1,AAV3,AAV4,AAV5,AAV6和AAV8,AAV 8.2,AAV9,和AAV rh10和假型AAV,诸如AAV2/8,AAV2/5和AAV2/6。

[0223] 目前有至少六种病毒载体法可用于临床试验中的基因传递,其采用通过将基因插入辅助细胞系来产生转导剂进行涉及缺陷型载体的互补的方法。

[0224] pLASN和MFG-S是已用于临床试验的逆转录病毒载体的示例(Dunbar等.(1995)*Blood* 85:3048-305;Kohn等.(1995)*Nat.Med.*1:1017-102;Malech等.(1997)*PNAS* 94:2212133-12138)。PA317/pLASN是用于基因治疗试验的第一治疗载体。(Blaese,等(1995)*Science* 270:475-480(1995))。已在MFG-S包装的载体中观察到50%或更高的转导功效。(Ellem等.(1997)*Immunol Immunother.*44(1):10-20;Dranoff等.(1997)*Hum.Gene Ther.*1:111-2。

[0225] 重组腺相关病毒载体(rAAV)是一种具有前景的替代性基因递送系统,其基于缺陷型和非病原性细小病毒腺相关2型病毒。全部载体源自这样的质粒,所述质粒仅保留了侧接转基因表达盒的AAV 145碱基对(bp)反向末端重复序列。高效的基因转移和稳定的转基因递送是该载体系统的关键特征,这归因于向转导的细胞的基因组的整合。(Wagner,等(1998)*Lancet* 351:9117 1702-3;Kearns,等(1996)*Gene Ther.*9:748-55)。根据本发明也可使用其它AAV血清型,包括AAV1、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV8、AAV9和AAVrh10,以及其所有变体。

[0226] 复制缺陷型重组腺病毒载体(Ad)可以高效价生成,并且容易地感染多种不同的细胞类型。大多数腺病毒载体是经工程改造的,从而转基因替代了Ad E1a、E1b和/或E3基因;随后该复制缺陷型载体在提供缺失反式基因功能的人293细胞中传播。Ad载体可体内转导多种类型的组织,包括不分裂的、分化的细胞,例如发现于肝、肾和肌肉中的那些。传统的Ad载体具有较大携载能力。临床试验中Ad载体应用的一个示例涉及用于采用肌内注射进行抗肿瘤免疫的多核苷酸治疗(Sterman等.(1998)*Hum.Gene Ther.*7:1083-9)。临床试验中用于转基因的腺病毒载体的应用的其它示例包括Rosenecker等.(1996)*Infection*24(1):5-10;Sterman等.(1998)*Hum.Gene Ther.*9(7):1083-1089;Welsh等.(1995)*Hum.Gene Ther.*2:205-18;Alvarez等.(1997)*Hum.Gene Ther.*5:597-613;Topf等.(1998)*Gene Ther.*5:507-513;Sterman等.(1998)*Hum.Gene Ther.*7:1083-1089。

[0227] 采用包装细胞来形成能够感染宿主细胞的病毒颗粒。所述细胞包括293细胞,其包装腺病毒,和 ψ 2细胞或PA317细胞,其包装逆病毒。用于基因治疗的病毒载体通常由将核酸载体包装成病毒颗粒的生产细胞系产生。所述载体通常包含包装和后续整合进入宿主(若

可行)所需的最小病毒序列,其它病毒序列被编码待表达的蛋白质的表达盒所替代。失去的病毒功能通过包装细胞系以反式提供。例如,用于基因治疗的AAV载体通常仅加工来自AAV基因组的反向末端重复(ITR)序列,其为包装和整合进入宿主基因组所需。病毒DNA被包装进入细胞系,其包含编码其它AAV基因,即rep和cap,但缺乏ITR序列的辅助质粒。所述细胞系也用腺病毒(作为辅助物)感染。辅助病毒促进AAV载体的复制和AAV基因从辅助质粒的表达。因为缺乏ITR序列,辅助质粒不以显著的量包装。腺病毒的污染可通过,例如,热处理(相比AAV,腺病毒对热处理更为敏感)来减少。

[0228] 在许多基因治疗应用中,希望将基因治疗载体以高度特异性递送至特定组织类型。因此,病毒载体可经修饰以通过将配体表达成与病毒包衣蛋白融合的位于病毒外表面上的蛋白来具有针对给定细胞类型的特异性。选择对于已知存在于感兴趣的细胞类型上的受体具有亲和性的配体。例如,Han等(1995),*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9747-9751 (1995),报道了莫洛尼鼠白血病病毒可经修饰以表达融合至gp70的人调蛋白,并且该重组病毒感染表达人表皮生长因子受体的某些人乳腺癌细胞。该原理可延伸至其它病毒-靶细胞对,其中靶细胞表达受体,并且病毒表达包含针对该细胞表面受体的配体的融合蛋白。例如,丝状噬菌体可经工程改造以显示对于几乎任何所选细胞受体具有特异性结合亲和力的抗体片段(例如,FAB或Fv)。尽管上文描述主要应用至病毒载体,相同的原理可应用至非病毒载体。所述载体可经工程改造以包含特定的摄取序列,其有利于被特定靶细胞摄取。

[0229] 基因治疗载体可通过给予个体对象来体内递送,通常通过全身性给予(例如,静脉内、腹膜内、肌内、皮下、舌下或颅内输注)局部施用,如下所述,或通过肺吸入。或者,载体可离体递送至细胞,例如来自个体患者的外植的细胞(例如,淋巴细胞、骨髓抽出物、组织活检物)或通用供体造血干细胞,然后将所述细胞再植入患者,通常在选择已引入载体的细胞之后进行。

[0230] 也可将包含核酸酶和/或供体构建体的载体(例如,逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)直接给予生物体用于体内细胞转导。或者,可给予裸DNA。给予通过常用于引入分子并最终与血液或组织细胞接触的任何常规途径进行,包括但不限于,注射、输注、局部施用、吸入和电穿孔。合适的给予所述核酸的方法可得且为本领域技术人员熟知,并且,尽管可利用超过一种途径给予特定组合物,某特定途径通常能提供比另一途径更直接和更有效的反应。

[0231] 适合用于导入本文所述多核苷酸的载体包括非整合型慢病毒载体(IDLV)。参见例如,Ory,等(1996)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11382-11388;Dull,等(1998)*J. Virol.* 72:8463-8471;Zuffery,等(1998)*J. Virol.* 72:9873-9880;Follenzi,等(2000)*Nature Genetics* 25:217-222;美国专利号8,936,936。

[0232] 药学上可接受的运载体部分地由所给予的特定组合物以及用于给予组合物的特定方法确定。因此,有多种合适的药物组合物制剂可用,如下所述(参见例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences);第17版,1989)。

[0233] 显而易见的是,可以使用相同或不同的系统递送编码核酸酶的序列和供体构建体。例如,供体多核苷酸可以通过AAV携带,而一种或多种核酸酶可以通过mRNA携带。此外,不同系统可以相同或不同的途径给予(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉注射、腹腔给予及/或肌内注射。可以同时或以任何先后顺序递送多种载体。

[0234] 离体和体内给药的制剂包括液体或乳化液体中的悬浮物。活性成分通常与赋形剂

混合,后者是药学上可接受的,并与活性成分相容。合适的赋形剂包括,例如,水,盐水,右旋糖,甘油,乙醇等及其组合。另外,组合物可含有少量辅助物质,如湿润或乳化剂,pH缓冲剂,稳定剂或增强药物组合物效力的其他试剂。

[0235] 应用

[0236] 本文所公开的方法和组合物用于提供癌症、炎症病症和其他疾病的治疗方法,例如,通过提供调节T细胞响应性的蛋白质。细胞可以经体内修饰或者可以经离体修饰并随后给予对象。因此,该方法和组合物提供了病症的治疗和/或预防。

[0237] 转基因(例如,CAR转基因,HLA基因,工程改造或外源性TCR基因或ACTR)的靶向整合可用于修正异常CISH相关基因,插入野生型基因(例如,治疗性蛋白质),或改变表达内源性基因的表达。例如,可以将编码CAR的转基因整合进入细胞,以提供产生功能性CAR蛋白的细胞。基因组编辑还可以包括修正有缺陷的内源性基因中的突变(例如,点突变),从而使基因的表达恢复并治疗病症。

[0238] 在某些实施方式中,将一种或多种CAR整合进入CISH基因。CAR转基因是本领域已知的并且包含对特定肿瘤抗原具有特异性的胞外单链可变片段(scFv),其与包含共刺激结构域和激活结构域的胞内信号传导部分连接。共刺激结构域可以源自,例如,CD28,而激活域可以源自,例如,CD3- ζ 。CAR转基因可以包含2、3、4或更多个共刺激结构域。例如,可以设计CAR scFv以靶向CD19,其是由B细胞谱系中的细胞所表达的跨膜蛋白,包括所有正常B细胞和B细胞恶性肿瘤,包括但不限于,NHL、CLL和非T细胞ALL。参见例如,美国专利号9,855,298。除了一种或多种CAR转基因,还可以将一种或多种HLA,B2M和/或其他免疫调节蛋白整合进入CISH基因,包括但不限于,B2M和HLA-G和/或HLA-的融合体,如2018年8月8日提交的美国专利申请号16/058,307所述。

[0239] 作为非限制性实例,本文所述的方法和组合物可用于治疗和/或预防癌症如B细胞白血病和/或炎症性疾病如结肠炎。

[0240] 下述实施例涉及本公开的示例性实施方式,其中核酸酶包括锌指核酸酶(ZFN)。将理解的是,这是仅是出于示例的目的并且可以使用其他核酸酶,例如,TALEN、TtAgo和CRISPR/Cas系统,具有工程改造的DNA结合结构域的寻靶核酸内切酶(兆核酸酶)和/或自然产生的工程改造的寻靶核酸内切酶(兆核酸酶)DNA结合结构域和异源性切割结构域的融合体和/或兆核酸酶和TALE蛋白的融合体。例如,可以设计其他核酸酶以结合包含本文公开序列的9-12个连续核苷酸的序列(例如,表2)。

[0241] 实施例

[0242] 实施例1:靶向CISH的锌指蛋白核酸酶

[0243] 设计靶向CISH的锌指蛋白并将其纳入mRNA、质粒、AAV或腺病毒载体,基本上如Urnov,等(2005)Nature 435(7042):646-651,Perez,等(2008)Nature Biotechnology 26(7):808-816所述,并且如美国专利号6,534,261所述。表1显示了示例性CISH ZFP DNA结合结构域的DNA结合结构域内的识别螺旋以及这些ZFP的靶位点(DNA靶位点用大写字母表示;非接触核苷酸用小写字母表示)。ZFP识别螺旋接触的靶位点中的核苷酸以大写字母表示;未接触的核苷酸以小写字母指示。还针对表2中所示的CISH序列设计了TALEN和/或sgRNA(例如,包含表2中所示靶位点9-20或更多(包括9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21或更多)个核苷酸(连续或不连续)的靶位点,根据本领域已知的方法。参见例如,美国专利

号8,586,526 (TALEN使用典型或非典型RVD) 和美国专利公开号2015/0056705。

[0244] 表1: CISH锌指蛋白识别螺旋设计

SBS #	接头	设计					
		F1	F2	F3	F4	F5	F6
[0245] 59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO:2)	QNATRT K (SEQ ID NO:3)	RSDNLSE (SEQ ID NO:4)	KRCNLRC (SEQ ID NO:5)	DRSTRTK (SEQ ID NO:6)	RRDNLH S (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLK R (SEQ ID NO:8)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	QNVSRPR (SEQ ID NO:11)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLP	DRSALA	RSDNLAR	DRSNLTR	QSGNLAR	ATCCLA
		T (SEQ ID NO:13)	R (SEQ ID NO:14)	(SEQ ID NO:10)	(SEQ ID NO:15)	(SEQ ID NO:16)	H (SEQ ID NO:17)
[0246] 59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	QAATLS R (SEQ ID NO:19)	RSDHLSA (SEQ ID NO:20)	DRSDLSR (SEQ ID NO:21)	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	DRSHLA R (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLT R (SEQ ID NO:23)	QSGNLH V (SEQ ID NO:24)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	NRYDLMT (SEQ ID NO:26)	RSDSLRL (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO:29)	QSSDLTR (SEQ ID NO:30)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	RLDILQQ (SEQ ID NO:31)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSYLPR (SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO:34)	LRQDLK R (SEQ ID NO:35)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSNRIN (SEQ ID NO:36)	QSSDLRS (SEQ ID NO:37)	WKWNL RA (SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDSLRL (SEQ ID NO:27)	CREYRG K (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	QKGTGGE (SEQ ID NO:39)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)

[0247] 表2: 锌指蛋白的靶位点

SBS#	靶位点
[0248] 59488	5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (SEQ ID NO:40)
59489	5' gaGGAGGTgGCAGAGGTACCCcagccc (SEQ ID NO:41)
59440	5' ccAGCAAAGGACGAGGTCTAGaaggcag (SEQ ID NO:42)
59441	5' gtGGAGCGGACTGGGcAGCGgcccctgt (SEQ ID NO:43)
59558	5' gaTGCCTGgCCTGGACAAGCAgttgag (SEQ ID NO:44)
59557	5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (SEQ ID NO:45)
59581	5' atAGTGCTgCACAAGGCTGACcacatcc (SEQ ID NO:46)
59580	5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (SEQ ID NO:47)

[0249] 测试所有ZFN成对组合的切割活性, 激活的T细胞用编码靶向CISH的ZFN的mRNA就一定范围的mRNA进行电穿孔(100uL转染反应中, 0.5μg至6μg/3E6个T细胞)。转染后将T细胞扩增3-4天, 收获基因组DNA, 并通过深度测序评估CISH编辑效率。发现所有的对都具有活性, 如表3所示(其中以指定剂量显示指定对的百分比切割, 例如, 使用6μg mRNA, 使用59488/59489对切割了89%的CISH基因)。

[0250] 表3: 核酸酶介导的切割

	ZFN 对		6 μ g	2 μ g	0.5 μ g	
[0251]	外显子 2	59488	59489	89	84	60
		59440	59441	84	82	59
[0251]	外显子 3	59558	59557	84	80	55
		59581	59580	82	83	72

[0252] 显而易见的是,这些设计可在任何指模块之间和/或ZFP和切割结构域之间包括任何接头,包括但不限于典型或非典型接头(指之间)和/或ZFP和切割结构域之间的接头,如美国专利号9,394,531所述。还参见,美国专利号8,772,453和美国专利公开号2015/0064789。

[0253] 此外,核酸酶(ZFN,CRISPR/Cas系统和TALEN)中的任一种可以包含工程改造的切割结构域,例如美国专利号8,623,618中公开的异二聚体(例如,ELD和KKR工程改造的切割结构域)和/或在位置416、422、447、448和/或525中具有一个或多个突变的切割结构域,如美国专利公开号2018/0087072中所述。ZFN也可以在ZFP主链残基中包含一个或多个突变,如美国专利公开号2018/0087072中所述。这些突变体与本文所述示例性DNA结合结构域组合使用。

[0254] 实施例2:靶向CISH供体插入

[0255] 还使用AAV GFP供体进行向CISH基因座中的靶向整合。首先,构建AAV GFP供体以编码GFP表达盒,其由同源臂5'和3'侧接至CISH切割位点。当使用靶向CISH的ZFN处理细胞并与AAV供体共同给予时,侧接同源臂对于介导通过同源定向修复途径靶向整合GFP表达盒进入CISH切割位点而言是必要的。在该实验中,激活的T细胞使用CISH mRNA电穿孔,并共同给予AAV GFP供体。7天后通过FACS分析GFP阳性细胞%来评估靶向整合效率。

[0256] 如图2和3所示,对GFP表达的FACS分析表明,接受本文所述靶向CISH的核酸酶和供体的细胞中获得了至少70%的供体(GFP)插入效率。

[0257] 实施例3:相较于AAVS1安全港基因座,CISH处供体插入后免疫刺激激活增强

[0258] 还使用AAV GFP供体进行向CISH或AAVS1基因座中的靶向整合。首先,构建AAV GFP供体以编码GFP表达盒,其由同源臂5'和3'侧接至CISH或AAVS1切割位点。当细胞使用靶向CISH或AAVS1的ZFN(CISH特异性ZFN:SB59440/SB59441(如上表1所示);AAVS1特异性ZFN(包含名为SB30054和SB30035的ZFP,如美国专利号9,957,526所述)处理并与相应的AAV供体共同给予时,侧接同源臂对于介导通过同源定向修复途径将GFP表达盒靶向整合进CISH或AAVS1切割位点而言是必要的。在该实验中,激活的效应T细胞使用CISH或AAVS1 ZFN mRNA电穿孔,并共同给予相应的AAV GFP供体。7天后通过Miseq分析评估基因组修饰效率。

[0259] 如图5所示,在接受本文所述的靶向CISH或AAVS1的核酸酶和AAV GFP供体的细胞中获得高水平的基因组修饰效率。图6表明,TCR介导的激活后,在CISH处靶向整合GFP供体增强了效应T细胞免疫刺激功能,有可能是由于敲除了CISH(细胞因子信号传导的抑制因子(SOCS)家族的成员)表达。

[0260] 实施例4:离体方法

[0261] 将本文所述遗传修饰的细胞(例如,T细胞或造血干细胞)给予患有癌症或炎性病

症的患者,所述遗传修饰的细胞包含整合进入CISH基因的转基因(例如,CAR和/或其他治疗性转基因)。给予(单次或多次给药)细胞是细胞疗法中已知的任何方法。给药后疾病或病症(或其症状)得到改善。

[0262] 本文中提及的所有专利、专利申请和出版物均以参考的方式用全文纳入本文。

[0263] 尽管出于理解清楚的目的,本发明通过说明和示例的方式提供了一些细节,但本领域技术人员可理解在不偏离本发明的精神或范围的情况下可实施各种改变和改进。因此,上述说明和实施例不应理解为是限制性的。

	Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly		
	65	70	75
			80
	Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile		
		85	90
			95
	Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg		
		100	105
			110
	Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser		
		115	120
			125
	Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn		
		130	135
			140
[0002]	Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly		
	145	150	155
			160
	Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys		
		165	170
			175
	Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly		
		180	185
			190
	Glu Ile Asn Phe		
		195	
	<210> 2		
	<211> 7		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 2

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 3

Gln Asn Ala Thr Arg Thr Lys

1 5

[0003]

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 4

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 5

Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 6

Asp Arg Ser Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0004]

<400> 7

Arg Arg Asp Asn Leu His Ser

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 8

Gly His Thr Ser Leu Lys Arg

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 9

Thr Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 10

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg

1 5

[0005]

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 11

Gln Asn Val Ser Arg Pro Arg

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 12
Gln Ser Gly His Leu Ser Arg
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 13
Arg Trp Gln Tyr Leu Pro Thr
1 5

[0006]

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 14
Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肽

<400> 15
Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg
1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 16

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg

1

5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0007]

<400> 17

Ala Thr Cys Cys Leu Ala His

1

5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 18

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg

1

5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 19

Gln Ala Ala Thr Leu Ser Arg

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 20

Arg Ser Asp His Leu Ser Ala

1 5

[0008]

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 21

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 22

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 23

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

[0009]

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 24

Gln Ser Gly Asn Leu His Val

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 25

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 26

Asn Arg Tyr Asp Leu Met Thr

1

5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 27

Arg Ser Asp Ser Leu Leu Arg

1

5

[0010]

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 28

Cys Arg Glu Tyr Arg Gly Lys

1

5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 29

Gln Ser Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 30

Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

[0011]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 31

Arg Leu Asp Ile Leu Gln Gln

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 32

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr

1 5

	<220>		
	<223> 未知的描述: CISH 靶位点序列		
	<400> 43		
	gtggagcggg ctgggcagcg gccctgt		28
	<210> 44		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> 未知		
	<220>		
	<223> 未知的描述: CISH 靶位点序列		
	<400> 44		
	gatgcgtggc ctggacaagc agttggag		28
[0015]	<210> 45		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> 未知		
	<220>		
	<223> 未知的描述: CISH 靶位点序列		
	<400> 45		
	gagtccagac ggaagctgga gtcggcat		28
	<210> 46		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> 未知		
	<220>		
	<223> 未知的描述: CISH 靶位点序列		
	<400> 46		
	atagtgtctgc acaaggctga cccatcc		28

	<210> 47	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: CISH 靶位点序列	
	<400> 47	
	ccggaaaggc caggatgcgt gccttggga	28
	<210> 48	
	<211> 1100	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	
	<223> 未知的描述: CISH 序列	
	<400> 48	
[0016]	atgggtcctc cactcactgc tcatccactg ctttctagac ctctccttt gctggctgtg	60
	gagcggactg ggcagcggcc cctgtgggcc ccgtccctgg aactgcccaa gccagtcag	120
	cagcccttgc ctgctggggc cttcctcag gaggtggcag agggtaaccc agcccagaca	180
	gagagtgagc caaaggtgct ggaccagag gaggatctgc tgtcatagc caagaccttc	240
	tcctaccttc gggaatctgg tgagtctgag gggggaggca ggcctttcc tgagtgtct	300
	ggtgggagaa gcttagttct gcctttgagt ctgatttggg aggcatagcc cggcccagga	360
	gagtctgatg ggagaggcac agccctctct agggaagcgt gaagctggag gactgcctt	420
	gacttgact ggattggta cccagctaa ttccactat gtccttggc cccctctgca	480
	cttccttagg ctggtattgg ggtccatta cggccagcga ggcccgaaa cacctgcaga	540
	agatgccaga aggcacgttc ttagtacgtg acagcacgca cccagctac ctgttcacgc	600
	tgtagtgaa aaccactcgt ggccccacca atgtacgcat tgagtatgcc gactccagct	660
	tccgtctgga ctccaactgc ttgtccaggc cacgcatcct ggcctttccg gatgtgtca	720

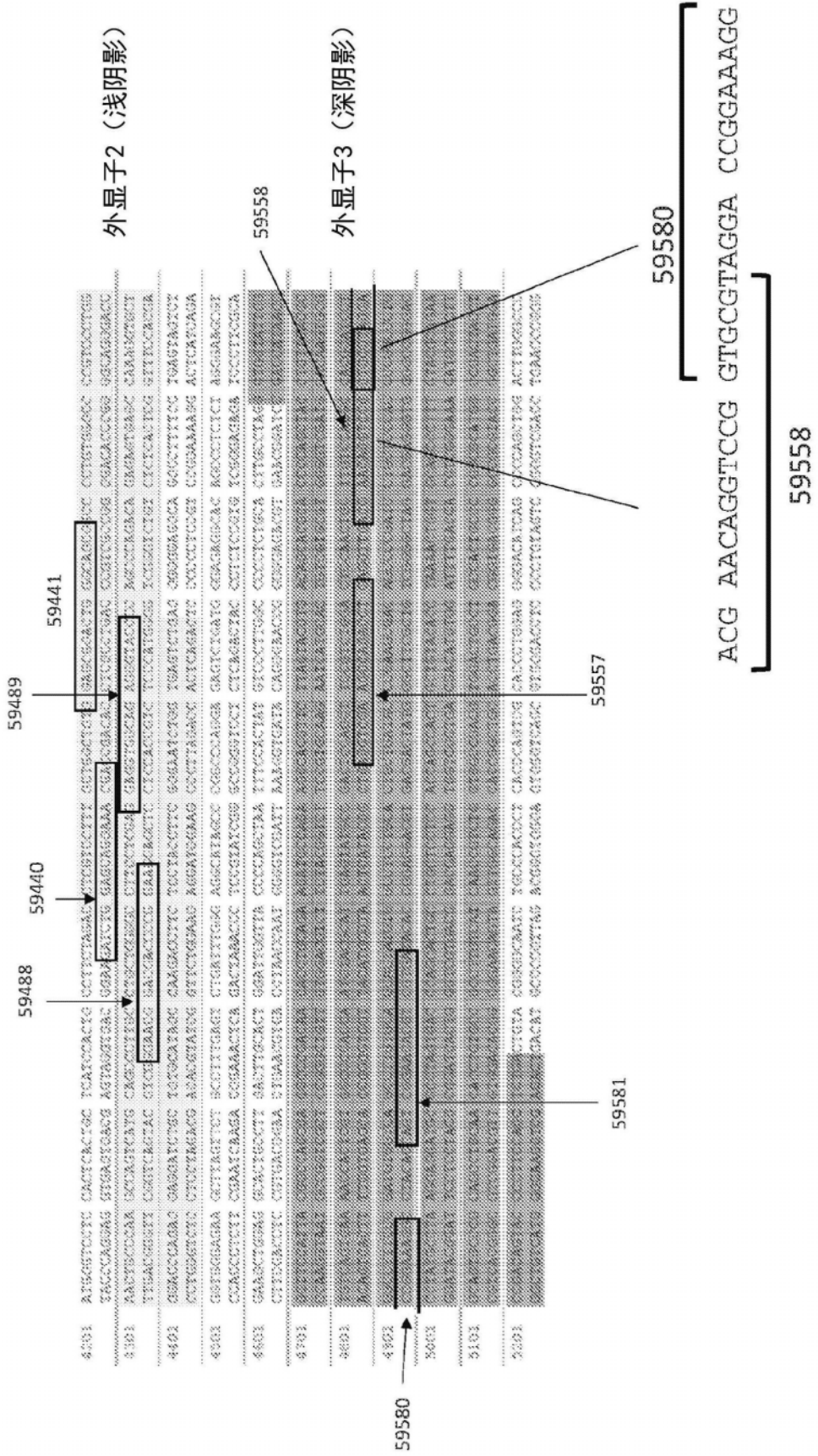


图1

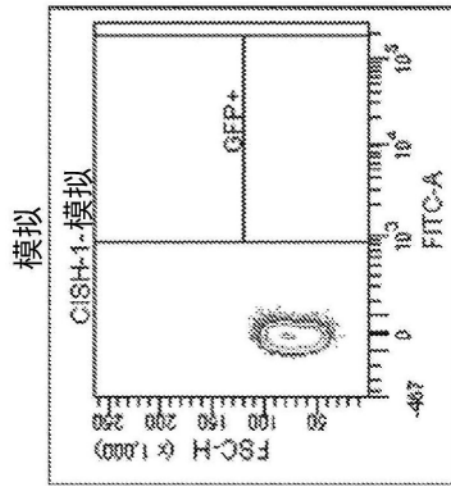


图2A

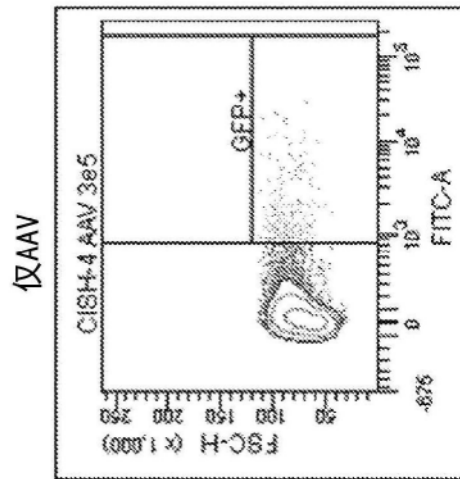


图2B

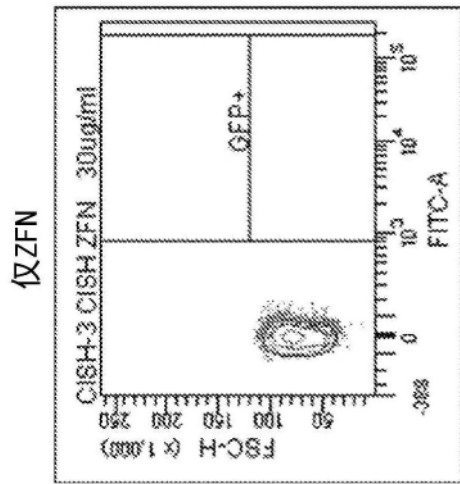


图2C

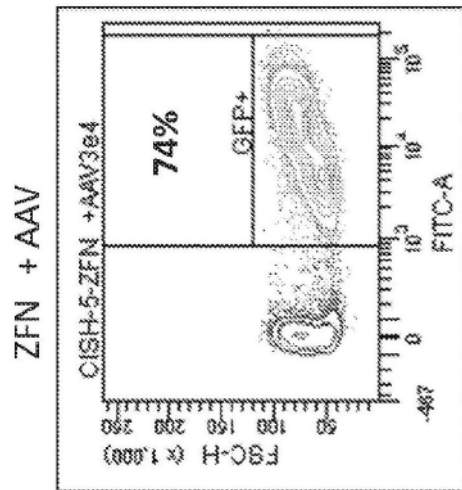


图2D

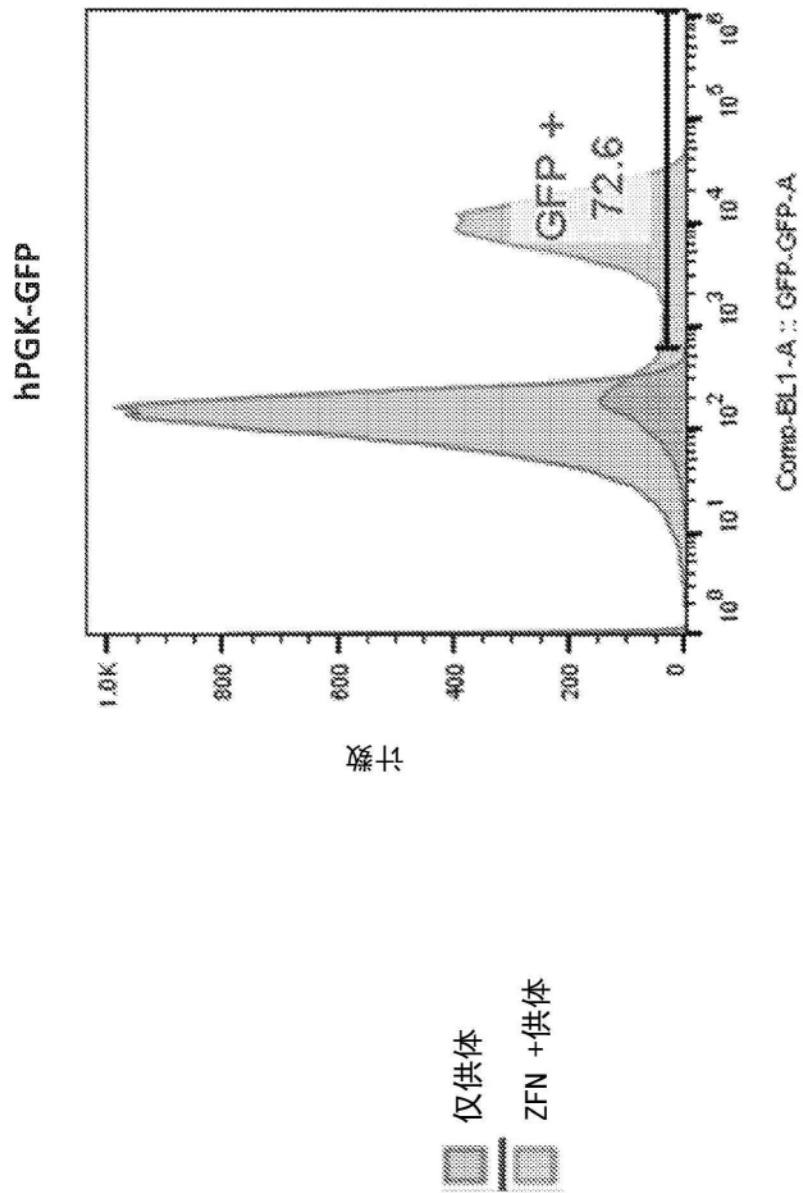


图3

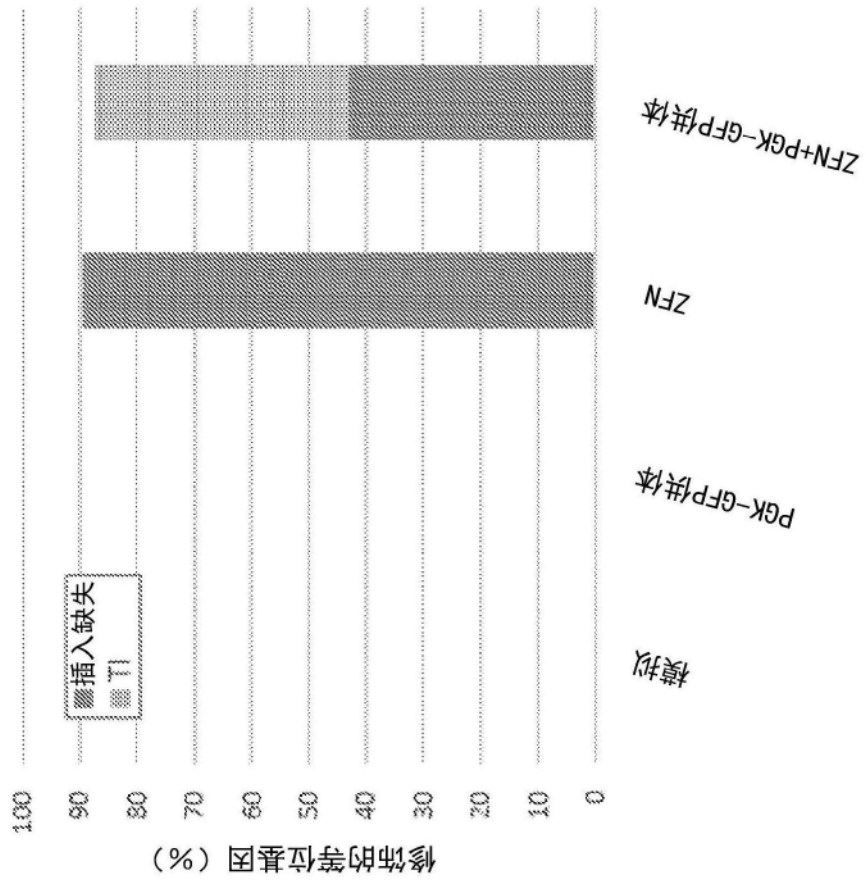


图4

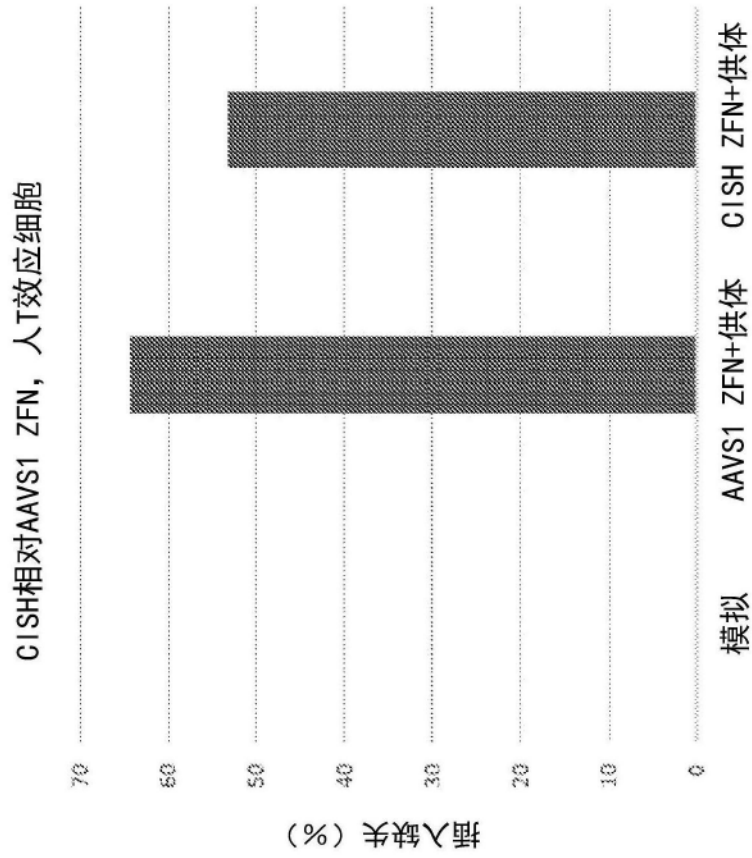


图5

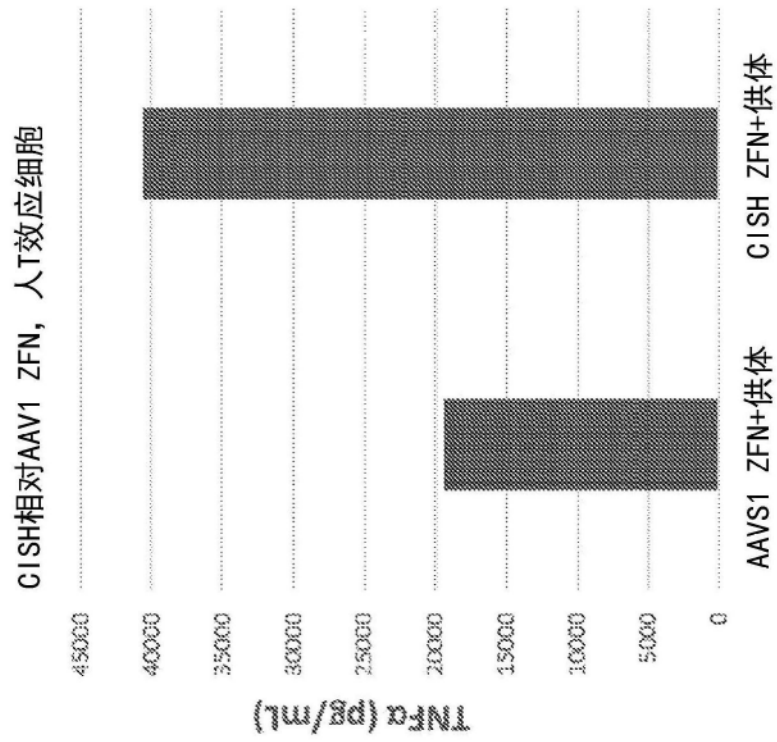


图6