



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201922777 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 16 日

(21)申請案號：107138062

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 26 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/805 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

C12N15/63 (2006.01)

C12N15/85 (2006.01)

C12N5/077 (2010.01)

C12N5/078 (2010.01)

A61K35/18 (2015.01)

A61K35/28 (2015.01)

A61P7/04 (2006.01)

A61P7/06 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/10/27

中國大陸

201711027708.6

(71)申請人：大陸商博雅輯因（北京）生物科技有限公司（中國大陸）EDIGENE INC. (CN)

中國大陸

(72)發明人：袁鵬飛 YUAN, PENGFEI (CN)；方日國 FANG, RIGUO (CN)；于玲玲 YU,

LINGLING (CN)；夏鵬輝 XIA, PENGHUI (CN)；王佳 WANG, JIA (CN)；梁福

才 LIANG, FUCAI (CN)

(74)代理人：葉璟宗；卓俊傑

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：44 項 圖式數：31 共 109 頁

(54)名稱

一種 sgRNA 構建體、提高胎兒血紅蛋白表達的方法及其應用與用途

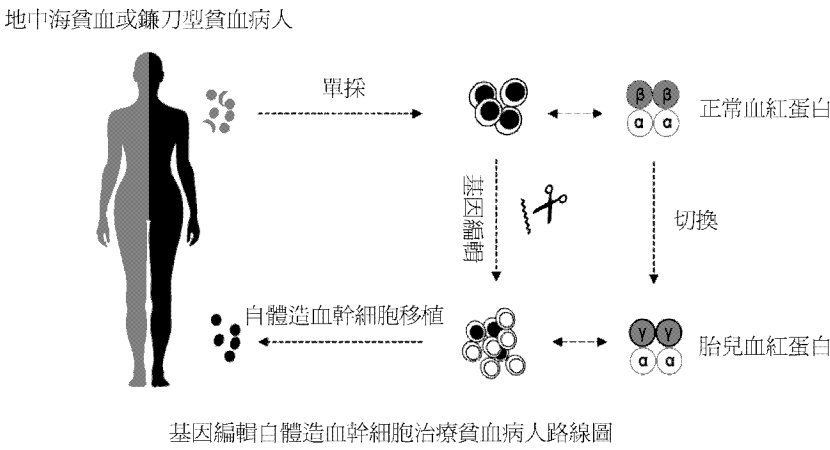
SGRNA CONSTRUCT, METHOD FOR INCREASE THE EXPRESSION OF THE FETAL HEMOGLOBIN AND APPLICATION AND USE THEREOF

(57)摘要

本發明關於高效安全基因編輯造血幹細胞 BCL11A 的增強子位點的方法，包括透過基因編輯技術破壞 BCL11A 基因組 CTCCT 區域。本發明基因編輯後的造血幹細胞具有正常細胞功能，且能顯著提高胎兒血紅蛋白的表達，以抵消地中海貧血患者缺失的正常血紅蛋白。因此，可將基因編輯後的造血幹細胞用於 β-地中海貧血和鐮刀紅細胞貧血的臨床治療。

The present invention relates to a method for genetically editing an enhancer site of hematopoietic stem cell BCL11A efficiently and safely, comprising disrupting the CTCCT region of the BCL11A genome by gene- editing techniques. The hematopoietic stem cells which are genetically edited according to the invention have normal cell functions and can increase the expression of the fetal hemoglobin significantly to counteract the normal-hemoglobin deletion in patients with thalassemia. Therefore, genetically edited hematopoietic stem cells can be used for clinical treatment of β-thalassemia and sickle cell anemia.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】一種sgRNA構建體、提高胎兒血紅蛋白表達的方法及其應用與用途

【英文發明名稱】sgRNA CONSTRUCT, METHOD FOR INCREASE THE EXPRESSION OF THE FETAL HEMOGLOBIN AND APPLICATION AND USE THEREOF

【技術領域】

【0001】 [交叉引用]本申請要求享有 2017 年 10 月 27 日提交的中國專利申請 2017110277086 的優先權，該中國專利申請的公開內容以其整體透過引用併入本申請。

【0002】 本發明關於用於治療地中海貧血和鐮刀型紅細胞貧血等貧血疾病的細胞治療方案，其包含利用基因編輯技術，高效安全地基因修飾人的造血幹細胞的 BCL11A 的增強子位點，尤其是透過基因編輯技術破壞造血幹細胞中 2 號染色體上 CTCCT 連續 6 個鹼基的 BCL11A 基因組區域，上調 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白的表達，實現治療疾病的目的。

【先前技術】

【0003】 地中海貧血又稱為球蛋白生成障礙貧血或者海洋性貧血，是一組由於基因缺陷等遺傳因素導致的溶血性貧血類疾病。遺傳性基因缺陷致使血紅蛋白中一種或幾種球蛋白肽鏈合成缺失或者

不足，從而導致貧血或者溶血的病理狀態。合成血紅蛋白的球蛋白鏈減少或缺失會導致血紅蛋白結構異常，這種含有異常血紅蛋白的紅細胞變形性降低，壽命減短，在骨髓中可能出現原位溶血，進入到外周血液迴圈後被脾臟等臟器提前破壞，致使貧血、體內鐵沉積甚至發育異常。由於不同球蛋白鏈基因突變的多樣性和複雜性，使缺失的球蛋白類型、數量及臨床症狀變異性非常大。

【0004】地中海貧血根據所缺失的球蛋白鏈種類及缺乏程度予以命名和分類。按照不同類型球蛋白肽鏈生成障礙可分為 α 型、 β 型、 δ 型、 $\delta\beta$ 型。目前地中海貧血是全球最普遍的基因缺陷遺傳性疾病之一。據統計，4.83%的全球人口攜帶球蛋白突變基因，其中包括 1.67%的 α 、 β 地中海貧血雜合子，同時包含 1.92%攜帶鐮刀型細胞突變的血紅蛋白，0.95%攜帶血紅蛋白 E，0.29%攜帶血紅蛋白 C 等。由此產生的有疾病症狀的血紅蛋白異常的全球人口出生率不少於 0.024%，是一種常見的基因缺陷型疾病。

【0005】 β 地中海貧血(以下簡稱 β 地貧)是地中海貧血的一種，其發病機理是因為 β 球蛋白肽鏈發生基因突變，多數病人是點突變，少數是大片段基因缺失。基因缺失和某些點突變可以導致一部分 β 球蛋白肽鏈的合成完全被抑制，這類稱為 β^0 地貧；而少數的點突變使 β 鏈的合成部分受到抑制，仍保留一部分肽鏈合成，這類稱為 β^+ 地貧，不同的組合可能出現不同的臨床症狀。 β 地貧基因突變類型非常多，據統計全球約有 300 多種基因異常，已發現的突變點有 100 多種，目前國內臨床報導的有 28 種。其中常見的突變

有 6 種， $\beta 41-42(-TCTT \text{ 缺失})$ ，約占 45%， $IVS-II654(C \text{ 到 } T \text{ 點突變})$ ，約占 24%， $\beta 17(A \text{ 到 } T \text{ 點突變})$ ，約占 14%，TATA 盒子-28(A 到 T 點突變)，約占 9%。 $B71-72(+A \text{ 插入突變})$ ，約占 2%， $\beta 26(G \text{ 到 } A \text{ 點突變})$ 約占 2%等。

【0006】 重型 β 地貧的突變基因類型有兩種，其一是 β 純合子，契爾氏 β^0 與 β^+ 地貧雙重雜合子，因為 β 球蛋白肽鏈生成近于完全受到抑制，體內無法產生 β 球蛋白鏈，由 α 鏈和 β 鏈組成的正常的血紅蛋白 A 合成減少或消失。雖然多餘的 α 鏈蛋白能與紅細胞內 γ 鏈結合形成血紅蛋白 F，但是由於出生後， γ 合成逐漸受到抑制(又稱為血紅蛋白鏈合成切換)，因此，多餘的 α 鏈會沉積在紅細胞內形成包涵體，附著在紅細胞膜表面上，使紅細胞膜特性發生改變，細胞變僵硬而導致變形能力下降，在骨髓中發生被破壞導致“無效造血”。部分地中海貧血的紅細胞雖然能夠在骨髓中生長發育成熟，並最終被釋放到外周血循環中，但當它們透過外周局部微循環(如脾臟等臟器)時，就會因為變形能力下降，容易發生機械破壞。由於上述原因，患兒在臨床上出現出生時無症狀，出生後由於 HbF(胎兒血紅蛋白)表達而且紅細胞壽命長達 120 天，往往當 6 個月後由於 γ 鏈合成被生理性抑制，血紅蛋白鏈合成切換為 β 鏈，同時由於基因缺陷無法合成 β 鏈，細胞發生病理改變引起破壞增加，呈現慢性溶血性貧血表現，進一步導致骨髓構成改變。治療過程中需反復輸血，導致含鐵血黃素沉著症，影響重要臟器功能。

【0007】 鐮刀型紅細胞貧血，與 β -地中海貧血類似，都屬於一種常染色體隱性遺傳病，不同的是該貧血症突變位點單一，由於 β 球蛋白的單一鹼基突變，正常的 β 基因的第 6 位元密碼子由 GAG(編碼谷氨酸)突變為 GTG(編碼纈氨酸)所致。在突變純合子狀態，正常的 α 球蛋白和異常的 β 球蛋白形成四聚體複合物，稱為 HbS, 該四聚體攜帶氧氣的能力是正常血紅蛋白的一半，在去氧狀態下聚集成多聚體，因形成的多聚體排列方向與膜平行，緊密接觸細胞膜，當多聚體數量達到一定程度後，細胞膜由正常的凹形變成鐮刀型。鐮刀型紅細胞，變形性差，容易破碎而發生溶血，造成血管堵塞，損傷，壞死等。

【0008】 β -地中海貧血和鐮刀型紅細胞貧血的治療方法包括：一般支援治療、高劑量輸血及規律去鐵治療、造血幹細胞移植、誘導胎兒血紅蛋白藥物治療和探索性的基因治療。目前，所有治療方案中唯一有治癒希望的方法是異基因造血幹細胞移植，自 1981 年湯瑪斯進行了首例地貧患者造血幹細胞移植並取得成功後，造血幹細胞移植技術在全球多個地貧研究中心開展並成功取代了經典的輸血和去鐵的治療方案。然而，由於 HLA 全相合供者嚴重缺乏和移植後 GVHD(graft-versus-host disease, 移植物抗宿主反應)導致的死亡，依舊限制著造血幹細胞移植治療地中海貧血的廣應用。與此同時，一直以來研究者在持續探索治療地中海貧血的藥物，目前 FDA 唯一批准用於臨床治療的口服藥物是羥基脲，主要透過誘導胎兒血紅蛋白表達緩解疾病臨床症狀，但由於該藥

物的臨床療效不一致且存在很大的副作用，以及劑量相關的骨髓抑制，亟待開發新的治療方法治療 β -地中海貧血和鐮刀型紅細胞貧血等相關貧血疾病。

【0009】 在本說明書的整篇文本中引用了數篇檔。此處的每篇檔(包括任何期刊文章或摘要、公開或未公開的專利申請、授權專利、製造商的說明書、使用說明等)透過提述併入本文。然而，並非認可此處引用的檔事實上是本發明的現有技術。

【發明內容】

【0010】 本發明利用基因編輯技術，例如 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，開發出了新一代的造血幹細胞，該造血幹細胞與現有技術的造血幹細胞相比，對 BCL11A 增強子基因敲除的效率大大增加，從而使分化成熟後的紅細胞胎兒血紅蛋白的表達大大提升，一定程度上解決了現有技術中 BCL11A 增強子編輯效率低，胎兒血紅蛋白表達量不能滿足臨床應用的問題。另外，本發明也進一步改善了對基因編輯後的造血幹細胞的培養和分化策略，不僅大大縮短了從造血幹細胞到成熟紅細胞的分化進程，同時也使收穫的成熟紅細胞的數量大大增加，從而部分滿足了臨床應用的要求。

【0011】 具體地本發明關於如下各項：

【0012】 1. 一種提高人造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：

【0013】 透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體上

從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。

【0014】 2. 項 1 所述的方法，其中所述 BCL11A 基因組區域序列為 CTCCT。3. 項 1 或 2 所述的方法，其中所述基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術或 CRISPR/Cas 基因編輯技術。

【0015】 項 3 所述的方法，其中所述基因編輯技術為 CRISPR/Cas9 基因編輯技術。

【0016】 5. 項 1-4 任一項所述的方法，包括向所述造血幹細胞導入靶向所述 BCL11A 基因組區域的 sgRNA 以實現對所述 BCL11A 基因組區域的編輯。

【0017】 6. 項 3-5 任一項所述的方法，包括向所述造血幹細胞導入包含選自 SEQ ID NOs: 3、4、8 和 33-63 任一序列的 sgRNA 以實現對所述 BCL11A 基因組區域的編輯。

【0018】 7. 項 3-6 任一項的方法，將包含 SEQ ID NO: 4 的序列的 sgRNA 導入所述造血幹細胞以實現對所述 BCL11A 基因組區域的編輯。

【0019】 8. 項 5-7 任一項的方法，其中所述 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的。

【0020】 9. 項 8 的方法，其中所述化學修飾為所述 sgRNA 的 5'端前一個、二個和/或三個鹼基和/或 3'端的最後一個鹼基的 2'-O-

甲基類似物修飾。

【0021】 10. 項 4-9 任一項的方法，其中將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【0022】 11. 項 10 的方法，其中透過電轉方法將 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【0023】 12. 項 11 的方法，其中所述電轉條件為 200-600V，0.5ms-2ms。

【0024】 13. 一種透過 CRISPR/Cas9 系統體外高效編輯造血幹細胞的方法，包括將靶向從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域的 sgRNA 導入造血幹細胞，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間，其中該 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的。

【0025】 14. 項 13 的方法，包括將含有選自 SEQ ID NO：4、8 和 33-63 任一序列的 sgRNA 導入造血幹細胞，其中該 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的。

【0026】 15. 項 13 或 14 的方法，其中將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【0027】 16. 項 15 的方法，其中透過電轉方法將 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【0028】 17. 項 16 的方法，其中所述電轉條件為 200-600V，0.5ms-2ms。

【0029】 18. 透過項 1~17 中任一項所述的方法得到的造血幹細胞。

【0030】 19. 一種透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的人造血幹細胞，其中該造血幹細胞中第 2 號染色體上從 CTTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域透過基因編輯技術被破壞，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。

【0031】 20. 透過分化培養項 18 或 19 所述的造血幹細胞獲得的、處於成熟紅細胞之前的不同分化階段的前體細胞。

【0032】 21. 透過分化培養項 18 或 19 所述的造血幹細胞獲得的成熟紅細胞。

【0033】 22. 一種製造透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的成熟紅細胞或其前體細胞的方法，該方法包括：

(a)使用項 1~17 中任一項所述的方法得到基因改造的造血幹細胞；

(b)使用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基對所述基因改造的造血幹細胞進行造血幹細胞紅系擴增和分化，

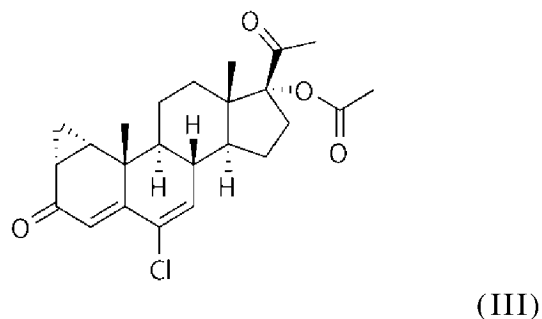
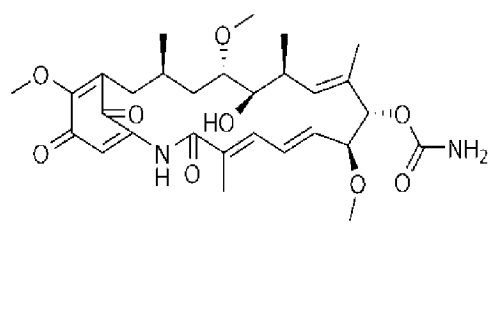
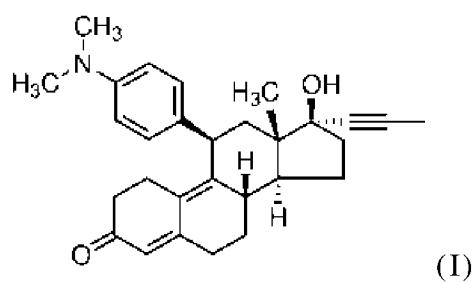
其中，所述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基包括基礎培養基，以及生長因數的組合物，其中所述生長因數的組合物包括幹細胞生長因數(SCF)；白介素 3(IL-3)和促紅細胞生成素(EPO)。

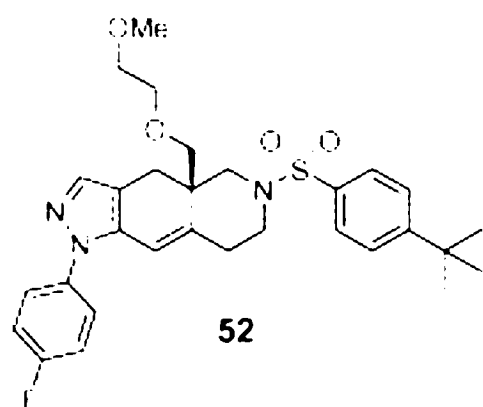
【0034】 23. 根據項 22 所述的方法，該方法更包括：

使用紅系分化脫核培養基進行造血幹細胞紅系分化脫核，

所述紅系分化脫核培養基包含基礎培養基、生長因數、以及孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑。

【0035】 24. 根據項 23 所述的方法，其中所述紅系分化脫核培養基中的生長因數包括促紅細胞生成素（EPO），所述孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑為選自下述化合物(I)~(IV)中的任一種或兩種及以上：





(IV)。

【0036】 25. 透過項 22~24 中任一項所述的方法得到的成熟紅細胞或前體細胞。

【0037】 26. 一種組合物，包含項 18 或 19 的造血幹細胞、或項 20 或 25 的前體細胞、或項 21 或 25 的成熟紅細胞。

【0038】 27. 包含項 18 或 19 的造血幹細胞、或項 20 或 25 的前體細胞、或項 21 或 25 的成熟紅細胞的醫用製品。

【0039】 28. 項 18 或 19 的造血幹細胞、或項 20 或 25 的前體細胞、或項 21 或 25 的成熟紅細胞在預防或治療有需要的受試者的疾病中的用途。

【0040】 29. 項 28 的用途，所述疾病為貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病。

【0041】 30. 根據項 29 的用途，其中所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【0042】 31. 項 28-30 中任一項的用途，其中所述受試者為人。

【0043】 32. 項 18 或 19 的造血幹細胞、或項 20 或 25 的前體細胞、或項 21 或 25 的成熟紅細胞在製備預防或治療受試者疾病中的藥物或醫用製品中的用途。

【0044】 33. 項 32 的用途，所述疾病為貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病。

【0045】 34. 根據項 33 的用途，其中所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【0046】 35. 項 32-34 中任一項的用途，其中所述受試者為人。

【0047】 36. 一種 sgRNA 構建體，包含靶向從 CTTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域的 sgRNA，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。

【0048】 37. 申請專利範圍第 36 項的構建體，包含選自 SEQ ID NOs：3、4、8 和 33-63 之一的核苷酸序列。

【0049】 38. 項 36 或 37 的構建體，其包含 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾。

【0050】 39. 項 38 的構建體，其中所述化學修飾為在所述核苷酸序列的 5'端的前一個、二個和/或三個鹼基和/或 3'端的最後一個鹼基的 2'-O-甲基類似物修飾。

【0051】 40. 包含項 36-39 中任一項的構建體的載體、宿主細胞或製劑。

【0052】 41. 包含項 36-39 中任一項的構建體在基因編輯造血幹細胞中的用途。

【0053】 42. 一種治療或預防受試者貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病的方法，其包括給

藥受試者項 18 或 19 的造血幹細胞，項 20 或 25 的前體細胞，或項 21 或 25 的成熟紅細胞。

【0054】 43. 根據項 42 所述的方法，其中，所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【0055】 44. 根據項 43 所述的方法，其中，所述受試者為人。

【0056】 發明效果

【0057】 本發明透過實驗證明，透過破壞 BCL11A 基因中位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間的 BCL11A 基因組區域，例如 CTCCT 的 6bp 鹼基序列，可以解除 BCL11A 基因對胎兒血紅蛋白合成的抑制，從而提高胎兒血紅蛋白的表達，表明“CTCCT”序列及其相鄰的區域是 BCL11A 基因調控胎兒血紅蛋白表達的關鍵區域。

【0058】 本發明的一些實施例中，透過用基因編輯方法破壞造血幹細胞中 2 號染色體上序列為 CTCCT(chr2: 60495251-60495256) 的 BCL11A 基因組區域，製備了基因編輯的造血幹細胞，且透過實驗證明該基因編輯的造血幹細胞向紅系分化能顯著提升 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白 (HbF) 的表達；將其輸注動物體內，能重建動物模型的造血系統。同時，脫靶分析顯示本方法安全性高，幾乎檢測不到基因編輯所引起的副作用。

【圖式簡單說明】

【0059】

圖 1 基因編輯自體造血幹細胞治療 β -地中海貧血和鐮刀紅細胞貧血的治療路線。從病人體內動員外周血，透過體外分離獲得 CD34 陽性的造血幹細胞，體外經過基因編輯，提高胎兒血紅蛋白表達，將經過基因修飾的自體造血幹細胞回輸病人。

圖 2 在癌症細胞系 K562 上多批次實驗檢測最佳電轉條件，電轉 GFP 4 天後的螢光顯微鏡拍照圖。“V”指脈衝電壓，“ms”指脈衝時間。

圖 3 在癌症細胞系 K562 上多批次實驗檢測最佳電轉條件，電轉 GFP 4 天後，流式分析 7-AAD 和 GFP 表達統計分析圖，以 7-AAD 表示細胞活率，7-AAD(7-胺基-放線菌素 D)是一種核酸染料，它不能通過正常質膜，隨著細胞凋亡、細胞死亡過程，質膜對 7-AAD 的通透性逐漸增加，在合適波長的激發光的激發下可發出明亮的紅色螢光，7-AAD 陰性為正常活力細胞；用 GFP 表示電轉效率。“250-1”表示 250V 電壓，1ms 脈衝時間，“250-1-1”，“250-1-2”分別表示 250V 1ms，兩個重複；“300-1-1”，“300-1-2”分別表示 300v 1ms，兩個重複。

圖 4 在 300V, 1ms 電轉條件下，電轉 GFP mRNA 進入造血幹細胞 4 天後的螢光顯微鏡拍照圖，分別包括明場、綠色通道、紅色通道和明場綠色通道疊加四個視野。

圖 5 在 300V, 1ms 電轉條件下，電轉 GFP mRNA 進入造血幹細胞 4 天後流式分析 GFP 和 CD34 蛋白表達情況。

圖 6 針對人 BCL11A 的增強子 58K 位置設計的多條 sgRNA

的示意圖。

圖 7 針對人 BCL11A 的增強子 58K 位點的 150bp 序列資訊。

圖 8 針對人 BCL11A 的增強子 58K 位點 150bp 的位置設計的 23 條 sgRNA 的具體 DNA 序列資訊。

圖 9 在 CD34 陽性造血幹細胞上，電轉 Cas9 mRNA 和多條 sgRNA 4 天後提取基因組，擴增片段和 Sanger 測序，TIDE 軟體分析產生 Indels 效率的統計分析。

圖 10 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2、3、4、5 和 6 sgRNA(即圖中的 Enhancer-2、3、4、5 和 6)進入 3 個不同臍帶血來源的 CD34 陽性造血幹細胞，4 天後，TIDE 軟體分析產生 Indels 效率的統計分析。

圖 11 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的 CD34 陽性造血幹細胞，2 天後進行體外克隆形成實驗(CFU 檢測)，14 天後統計不同血液系統的克隆數目，BFU-E、CFU-M、CFU-GM、CFU-E、CFU-G、CFU-MM 代表紅系、髓系、淋巴系等血液系統不同譜系的克隆形成。其中，Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。

圖 12 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入造血幹細胞，同時移植經過基因修飾和未經過基因修飾的細胞進入經過輻照儀照射的 NPG 免疫缺陷小鼠模型，6 周、8 周、10 周、12 周、16 周後，在小鼠外周血檢測人 CD45 陽性細胞的比例，同時移植 16 周後在小鼠骨髓和脾臟中檢測人 CD45 陽性細胞的比例，

其中 CD45 陽性細胞的比例的計算方式為人 CD45 陽性細胞%/(人 CD45 陽性細胞%+小鼠 CD45 陽性細胞%)，人 CD45 陽性細胞%和小鼠 CD45 陽性細胞%分別是透過流式分析實驗測得的結果。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2 代表經過基因編輯的細胞。

圖 13 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，同時移植經過基因修飾和未經過基因修飾的細胞進入經過輻照儀照射的 NPG 免疫缺陷小鼠模型，16 周後分別在小鼠骨髓、脾臟、外周血中檢測 CD3、CD4、CD8、CD33、CD56、CD19 等人細胞膜蛋白占人 CD45 蛋白的比例。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2 代表經過基因編輯的細胞。

圖 14 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，移植經過基因修飾細胞進入經過輻照儀照射的 NPG 免疫缺陷小鼠模型，16 周後分別在小鼠骨髓、脾臟、外周血中，流式分析檢測小鼠 CD45、人 CD45、CD3、CD4、CD8 的表達結果。SSC-H 通道代表側向角散射，其代表細胞的顆粒度，值越大代表細胞的顆粒度越大，顆粒度指細胞表面的皺折度，細胞內亞細胞器、顆粒的數目等。

圖 15 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，移植經過基因修飾細胞進入經過輻照儀照射的 NPG 免疫缺陷小鼠模型，16 周後分別在小鼠骨髓、脾臟、外周血中，流式分析檢測一隻小鼠的人 CD33、CD56、CD49。SSC-H

通道代表側向角散射，其代表細胞的顆粒度，值越大代表細胞的顆粒度越大，顆粒度指細胞表面的皺折度，細胞內亞細胞器、顆粒的數目等。

圖 16 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，提取移植前細胞和移植後 16 周的外周血、骨髓、脾臟的基因組，擴增目的片段和 Sanger 測序，透過 TIDE 軟體分析基因編輯 Indels 效率。

圖 17 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，進行紅細胞分化，12 天後檢測。A 圖代表分化後的紅細胞拍照圖；B 圖代表檢測人 CD71 和人 235a 兩個膜蛋白表達，表示紅系分化效率。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2 代表經過基因編輯的細胞。

圖 18 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞，進行紅細胞分化，12 天後透過螢光定量 PCR 檢測 BCL11A、HBB、HBG 等基因 mRNA 表達。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2 代表經過基因編輯的細胞。

圖 19 電轉 6 μ g Cas9 mRNA 和 4 μ g BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的造血幹細胞向紅細胞分化 12 天後的細胞內胎兒血紅蛋白 HbF 的表達情況。左側是流式分析圖，右側是胎兒血紅蛋白表達統計分析圖。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2 代表經過基因編輯的細胞。

圖 20 檢測新鮮分離的 β 地中海貧血病人的外周血中 CD45

和 CD34 的表達，左側是對照組，右側是實驗組。實驗樣品分別來自 3 名 β -地中海貧血病人。

圖 21 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2、3、4、5 和 6 sgRNA(即圖中的 Enhancer-2、3、4、5 和 6) 進入 3 個不同 β 地中海貧血病人的外周血分離的 CD34 陽性的造血幹細胞，4 天後，TIDE 軟體分析產生 Indels 效率的統計分析。

圖 22 電轉電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入 β 地中海貧血病人的外周血分離的 CD34 陽性的造血幹細胞，提取基因組，NGS 深度測序分析 14 個潛在的脫靶位點統計圖。

圖 23 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2、3、4、5 和 6 sgRNA(即圖中的 Enhancer-2、3、4、5 和 6)進入 β 地中海貧血病人來源的造血幹細胞，進行紅細胞分化，12 天後檢測。A 圖代表分化後的紅細胞拍照圖；B 圖代表檢測人 CD71 和人 235a 兩個膜蛋白表達，表示紅系分化效率。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2、3、4、5 和 6 代表經過基因編輯的細胞。

圖 24 電轉電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2、3、4、5 和 6 sgRNA(即圖中的 Enhancer-2、3、4、5 和 6)進入 β 地中海貧血病人的外周血分離的 CD34 陽性的造血幹細胞，紅細胞分化 12 天後，檢測 BCL11A 和 γ -球蛋白的基因表達。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-2、3、4、5 和 6 代表經過基因編輯的細胞。

圖 25 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入 β

地中海貧血病人來源的 CD34 陽性的造血幹細胞，2 天後進行體外克隆形成實驗(CFU 檢測)，14 天後統計不同血液系統的克隆數目，BFU-E、CFU-M、CFU-GM、CFU-E、CFU-G、CFU-MM 代表紅系、髓系、淋巴系等血液系統不同譜系的克隆形成。

圖 26 電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-3(Enhancer-3)、增強子-4 (Enhancer-4) 或增強子-5 (Enhancer-5) sgRNA 進入 β 地中海貧血病人來源的 CD34 陽性的造血幹細胞，評估基因編輯效率，BCL11A 基因表達和 γ -球蛋白的基因表達。A)電轉 4 天後，TIDE 軟體分析不同 sgRNAs 產生 Indels 效率的統計分析；B)電轉造血幹細胞後，進行紅細胞分化，12 天後檢測 BCL11A 基因表達。C)電轉造血幹細胞後，進行紅細胞分化，12 天後檢測 γ -球蛋白基因表達。Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。Enhancer-3, Enhancer-4, Enhancer-5 代表經過 Enhancer-3, Enhancer-4, Enhancer-5 sgRNA 導入後基因編輯的細胞。

圖 27 顯示代表未經過基因編輯的細胞(Mock)和經過基因編輯的細胞(利用增強子 2 sg RNA 編輯的)後的色譜結果，顯示 HbF 和 HbA 的表達量。

圖 28 顯示代表未經過基因編輯的細胞(Mock)和經過基因編輯的細胞(利用增強子 3、4、5、以及 6 sg RNA 編輯的)後的色譜結果，顯示 HbF 和 HbA 的表達量。

圖 29 顯示根據圖 27 和圖 28 中的色譜結果進行計算後的 HbF 和 HbA 表達量的比值。

圖 30 顯示實施例 9 中透過 HbF 染色之後的高表達 HbF(約 10%比例)和低表達 HbF(約 10%比例)的細胞所占的比例。

圖 31 顯示對實施例 9 中的高表達 HbF(約 10%比例)和低表達 HbF(約 10%比例)的細胞，提取基因組分別進行 2 代測序分析的結果。

【實施方式】

【0060】 本申請關於對 CD34 陽性造血幹細胞的 BCL11A 增強子位點，尤其是破壞 BCL11A 基因中從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸區域，例如“CTCCT”的 6bp 鹼基序列（chr2: 60495251-60495256），可以解除 BCL11A 基因對胎兒血紅蛋白合成的抑制，從而提高胎兒血紅蛋白的表達。

【0061】 一方面，本發明提供一種提高人造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體上從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。在一些實施例中，所述 BCL11A 基因組區域的序列為 CTCCT。

【0062】 本申請中所指的 BCL11A 基因組區域的“CTCCT”序列是指位於人 2 號染色體上第 60495251 位至第 60495256 位的序列，其中染色體核苷酸位置是根據 GRCh38 標準人類基因序列中的位

置。所屬技術領域中具有通常知識者應明白該 CTCCT 序列參照不同的人基因組序列，其位置可能有所不同。在一些實施例中，所述破壞從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域，包括在此區域引入核苷酸序列的“添加和/或刪除（indel）”，例如引入任何類型（例如選自 A、T、C、G）和/或數量（例如 1-20、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 個）的核苷酸的 indel。在一些實施例中，所述的破壞包括用新的核苷酸序列置換原有的核苷酸序列，例如，用 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個核苷酸置換 CTCCT 連續 6 個核苷酸中 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個核苷酸。在一些實施例中，所述的破壞包括從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域敲入（knock-in）或敲除（knock-out）一段核苷酸序列，例如在 CTCCT 連續 6 個核苷酸的區域敲入或敲除一段核苷酸序列。根據基因分析結果顯示，“CTCCT”的 6bp 鹼基序列包含了 STAT1 和 ELF1 基因的結合位點。

【0063】 不受任何理論或假說的限制，本發明中對 CTCCT 及其附近區域的破壞，例如向該區域引入 indel，可直接影響 STAT1 和 ELF-1 與 BCL11A 增強子的結合，能顯著高效地上調胎兒血紅蛋白的表達，例如本發明實施例透過 Enhancer 2 所證明的。圍繞“CTCCT”區域的基因編輯，例如圍繞“CTCCT”區域上游和/或下游 1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、

1-4、1-3、1-2 個核苷酸區域的基因編輯，例如在這些區域引入 indel，也可以不同程度地提升胎兒血紅蛋白的表達，參見例如本發明圖 10、23 和 24 所示。

【0064】 在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-14 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-14 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495237 至 chr2:60495270 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-13 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-13 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495238 至 chr2:60495269 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-12 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-12 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495239 至 chr2:60495268 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-11 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-11 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495240 至 chr2:60495267 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-10 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-10 個核苷酸的區

域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495241 至 chr2:60495266 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-9 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-9 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495242 至 chr2:60495265 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-8 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-8 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495243 至 chr2:60495264 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-7 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-7 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495244 至 chr2:60495263 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-6 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-6 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495245 至 chr2:60495262 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-5 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-5 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495246 至 chr2:60495261 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTCCT 序列上游 0-4 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-4 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495247 至 chr2:60495260 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從

CTTCCT 序列上游 0-3 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-3 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495248 至 chr2:60495259 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTTCCT 序列上游 0-2 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-2 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495249 至 chr2:60495258 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域為從 CTTCCT 序列上游 0-1 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-1 個核苷酸的區域，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495250 至 chr2:60495257 之間。在一些實施例中，本發明中所破壞的 BCL11A 基因組區域序列為 CTTCCT，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495251 至 chr2:60495256 之間。

【0065】 在一些實施例中，該 BCL11A 基因組區域最上游位於該 CTTCCT 序列的上游第 15 個、14 個、13 個、12 個、11 個、10 個、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個、2 個、或 1 個核苷酸，或 CTTCCT 序列中的 5'端的第 1 個、2 個或 3 個核苷酸。在一些實施例中，該 BCL11A 基因組區域最下游位於該 CTTCCT 序列的下游第 15 個、14 個、13 個、12 個、11 個、10 個、9 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個、3 個、2 個、或 1 個核苷酸，或 CTTCCT 序列中的 3'端的第 1 個、2 個或 3 個核苷酸。在一些實施例中，該 BCL11A 基因組區域最上游位於 chr2: 60495253、chr2: 60495252、chr2: 60495251、chr2: 60495250、chr2: 60495249、chr2: 60495248、

chr2: 60495247、chr2: 60495246、chr2: 60495245、chr2: 60495244、
chr2: 60495243、chr2: 60495242、chr2: 60495241、chr2: 60495240、
chr2: 60495239、chr2: 60495238、chr2: 60495237、或 chr2:60495236。
在一些實施例中，該 BCL11A 基因組區域最下游位於 chr2:
60495254、chr2: 60495255、chr2:60495256、chr2:60495257、
chr2:60495258、chr2:60495259、chr2:60495260、chr2:60495261、
chr2:60495262、chr2:60495263、chr2:60495264、chr2:60495265、
chr2:60495266、chr2:60495267、chr2:60495268、chr2:60495269、
chr2:60495270、或 chr2:60495271。該 BCL11A 基因組區域的最上
游和最下游可以是以上任何一個最上游和最下游位置的組合，並
且該 BCL11A 基因組區域不是 GATAA 位元點。

【0066】 在一些實施例中，本發明所述的 BCL11A 基因組區域選
自如下所示 SEQ ID NO: 31 或 SEQ ID NO: 32 的序列中的 1-36 個
（如約 1-4 個、1-6 個、1-8 個、1-10 個、1-15 個、1-20 個、1-25
個、或 1-30 個）連續的核苷酸序列，並且該核苷酸序列不是
GATAA：

【0067】 SEQ ID NO：31（chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間的
核苷酸序列）

atcagaggccaaacccttcctggagcctgtgataaa

【0068】 SEQ ID NO: 32 （chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間
的核苷酸序列的互補序列）

tttatcacaggctccaggaagggtttggcctctgat

【0069】 因此，一方面，本發明關於一種提高人造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體上 CTCCT 連續 6 個鹼基 (chr2:60495251-60495256) 的 BCL11A 基因組區域。本發明還關於一種提高人造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體上圍繞 CTCCT 連續 6 個鹼基區域上游和/或下游 1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 個核苷酸的區域。

【0070】 在一些實施方案中，所述基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術或 CRISPR/Cas 基因編輯技術。在一些實施方案中，所述基因編輯技術為 CRISPR/Cas9 基因編輯技術。

【0071】 在一些實施方案中，所述方法包括向所述造血幹細胞導入靶向從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域的 sgRNA，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間，如包含 CTCCT 或與 CTCCT 互補的序列的 sgRNA，以實現對所述 BCL11A 基因組的編輯。在一些實施方案中，所述方法包括向所述造血幹細胞導入包含選自 SEQ ID NOs: 3、4、8 和 33-63 任一序列的 sgRNA 以實現對所述 BCL11A 基因組的編輯。

【0072】 本發明提供了用於基因編輯造血幹細胞所需的 sgRNA (如經過化學修飾的 sgRNA)，其包含靶向從 CTCCT 序列上游

0-15 個核苷酸至該 CTTCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域的 sgRNA，其中該 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間，如包含 CTTCC 或與 CTTCC 互補的核苷酸序列，進一步其包含選自 SEQ ID NOs: 3、4、8 和 33-63 任一的核苷酸序列。

【0073】 本發明還提供用於 β -地中海貧血和鐮刀紅細胞貧血患者的造血幹細胞的編輯方法。

【0074】 本發明還提供了一種經基因編輯破壞本發明所述任一 BCL11A 基因組區域的造血幹細胞、成熟紅細胞或成熟紅細胞的前體細胞。在一些實施例中，該造血幹細胞、成熟紅細胞或成熟紅細胞的前體細胞中經破壞的 BCL11A 基因組區域包含圖 31 所示的任一序列，如 Enhancer-2-Indels-1、2、3 或 4。

【0075】 根據本發明的目的之一是基於 CRISPR/Cas 基因編輯技術，高效基因修飾 CD34⁺造血幹細胞。例如可以從臍帶血或骨髓中獲得 CD34 陽性的造血幹細胞，並將 Cas9 和給定的 sgRNA，透過優化的電轉條件導入造血幹細胞，對造血幹細胞進行基因編輯，並將基因編輯後的造血幹細胞移植進入實驗動物以評價該造血幹細胞重建造血系統的能力。所述 sgRNA 可以透過多種設計軟體，例如“CRISPR RGEN TOOLS”軟體，針對 BCL11A 的增強子，例如針對 BCL11A(+58)位點進行設計。在一些實施方案中，對設計的 sgRNA 進行化學修飾，例如在其 5'和 3'末端 3 個鹼基處的 2'-O-甲基類似物修飾和核苷酸間的 3'硫代修飾。可以透過測試 Cas9

mRNA 和不同 sgRNA 的組合，獲取高效的 sgRNA。在某些實施方案中，所述的造血幹細胞是透過使用臨床級別的磁柱分選獲得，用於基因編輯的 Cas9 蛋白編碼核苷酸以及經過化學修飾的 sgRNA 是經過體外轉錄實驗獲得。將基因編輯後的造血幹細胞向紅系分化，檢測紅細胞生成比例，例如，可以將基因編輯後的造血幹細胞移植進入經過輻照儀照射的 NPG 小鼠，評價重建造血系統的能力，也可以分離病人的 CD34 陽性的造血幹細胞，評價基因編輯效率、紅系分化能力、 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白的表達。

【0076】 首先，本發明提供一種提高胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過 CRISPR/Cas9 編輯技術基因編輯造血幹細胞 BCL11A 的增強子位點。編輯過程針對造血幹細胞 BCL11A 的增強子位點靶向序列設計 sgRNA。BCL11A 的增強子根據其轉錄起始位元點的距離(kilo-base 數)存在命名為+62、+58、+55的位元點，有報導稱 BCL11A 基因的紅系增強子能夠負向調控胎兒血紅蛋白(HbF)表達，其中距離轉錄起始位點 55kb(kb 表示 1000 個鹼基)，58kb、62kb 位置是關鍵的調控區域。雖然已經有研究人員針對+55、+58、+62 位點進行研究，但是上述三個位點前後的基因序列均在 1000bp 以上，總共約 6000bp，因此所屬技術領域中具有通常知識者並不知曉具體編輯哪些區域可以實現理想的編輯效果，即使針對一個+58 位點而言，基因編輯效率也差別很大(參見：Bauer, D. E. et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. Science. 342, 253–257 (2013)，以

及 Canver MC, et al. BCL11A 的增強子 dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. Nature. 2015 Nov 12;527(7577):192-7.)。因此，尋找到對編輯效率至關重要的具體區域是所屬技術領域中具有通常知識者首先面臨的問題。

【0077】本申請的發明人透過深入研究發現+58 位置中 150bp 的鹼基序列（位於人類第 2 號染色體第 60495197 位至第 60495346 位元的區域，在本文中簡寫為 chr2:60495197-60495346，其序列例如，如 SEQ ID NO: 2 所示）對基因編輯的效率影響很大，而其中最關鍵的區域為 “CTTCCT”6bp 的鹼基序列區域。透過破壞該區域可以實現顯著高效地提升胎兒血紅蛋白的表達。破壞從 CTTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至該 CTTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域，如圍繞 CTTCCT 序列上游和/或下游 1-15、1-14、1-13、1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 個核苷酸的區域也能夠不同程度地提升胎兒血紅蛋白的表達。

【0078】本發明的 sgRNA 均能高效實現基因編輯正常供體和貧血病人來源的造血幹細胞，其中相對效率更高的候選的 sgRNA 均能顯著提高胎兒血紅蛋白的表達。有文獻報導透過針對+55、+58、+62 位點設計 sgRNAs 文庫，利用 CRISPR/Cas9 進行細胞模型上的篩選，發現靶向+58 處中“GATAA”位點是關鍵的調控序列，即包含”GATAA”序列的 sgRNA 所導致的胎兒血紅蛋白提升效果最明顯。然而，值得注意的是，本發明中發現的 sgRNA 錨定的+58k 附近的

區域與現有技術中公開的關鍵的“GATAA”鹼基位點是不同的。

【0079】 本發明的發明人發現在 BCL11A 基因組區域中序列“CTTCCT”是關鍵的靶點序列(圖 31 中箭頭指向的位置)。如果在基因編輯的細胞中該序列被破壞，則能夠顯著有效地上調胎兒血紅蛋白的表達。根據基因分析的結果顯示的“CTTCCT”6bp 的鹼基序列，其包含了 STAT1 和 ELF1 基因的結合位點。其中，根據文獻報導 STAT1 的結合位元點是“TTCCnGGA”基序 (n 代表任意鹼基) (Raja, et al. Nucleic Acids Research. 2008; George, et al. Journal of Biological Chemistry. 2001; Christoph, et al. Plos one. 2010)，而 ELF-1 的結合位點是“TTCC”基序 (Steven, et al. Scientific Reports. 2015; Yuang-Taung Juang, et al. The Journal of Immunology. 2007)。透過本發明 sgRNA 導入的基因編輯對胎兒血紅蛋白的表達起到了顯著的提升作用，足以應用於臨床治療。

【0080】 所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，在獲知高效基因編輯區域後，所屬技術領域中具有通常知識者可以用任何基因編輯方法，例如基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術和 CRISPR/Cas(如 CRISPR/Cas9)基因編輯技術，以及今後發現的其它基因編輯方法，對所獲知的高效基因編輯區域進行編輯，優化基因編輯條件，實現高效編輯的目的。因此，本發明涵蓋透過任何可利用的基因編輯方法對本發明所鑒定的選自序列 3-25 和 33-63 的 BCL11A 基因靶序列的技術方案。在一些優選實施方案中，本發明關於透過 CRISPR/Cas9 基因編輯技術實現高

效基因編輯的技術方案。

【0081】 如本申請使用的，“CRISPR/Cas”是一種基因編輯技術，包括但不限於各種自然存在或人工設計的 CRISPR/Cas 系統，如 CRISPR/Cas9 系統。自然存在的 CRISPR/Cas 系統 (Naturally occurring CRISPR/Cas system) 是細菌和古細菌在長期演化過程中形成的一種適應性免疫防禦，可用來對抗入侵的病毒及外源 DNA。例如，CRISPR/Cas9 的工作原理是 crRNA (CRISPR-derived RNA) 透過鹼基配對與 tracrRNA (trans-activating RNA) 結合形成 tracrRNA/crRNA 複合物，此複合物引導核酸酶 Cas9 蛋白在與 crRNA 配對的序列靶位點剪切雙鏈 DNA。而透過人工設計 tracrRNA 和 crRNA，可以改造形成具有引導作用的 sgRNA (single guide RNA)，足以引導 Cas9 對 DNA 的定點切割。作為一種 RNA 導向的 dsDNA 結合蛋白，Cas9 效應物核酸酶能夠共定位 RNA、DNA 和蛋白，從而擁有巨大的改造潛力。CRISPR/Cas 系統可使用一類，二類或三類 Cas 蛋白。本發明的一些實施方式中，所述方法使用 Cas9。其他適用的 CRISPR/Cas 系統包括但不限於 WO2013176772，WO2014065596，WO2014018423，US8,697,359 中所描述的系統和方法。

【0082】 本發明的另一方面，關於可實現高效基因編輯的本發明的一系列 sgRNA 分子。

【0083】 本發明中，“sgRNA (single guide RNA)” 和 “gRNA (guide RNA)” 或可以是“單指導 RNA”、“合成的指導 RNA”或“指

導 RNA”可互換使用。本發明的 sgRNA 包含靶向目標序列的指導序列。在優選實施方案中，本發明的 sgRNA 進一步包含 tracr 序列和 tracr 伴侶序列。

【0084】 本發明中的“指導序列”(guide sequence)可以是指定靶向位點的約 17-20bp 的序列，且可與“引導序列”或“間隔子”互換使用。在形成 CRISPR 複合物的背景下，“靶序列”例如是指導序列經設計以與其具有互補性的序列，其中靶序列和指導序列間的雜交促進 CRISPR 複合物的形成，所述雜交要求“靶序列”和“指導序列”或稱“引導序列”有足夠的互補性，能引起雜交並促進 CRISPR 複合物形成即可，完全互補不是必須的。

【0085】 “互補”是指“指導序列”或稱“引導序列”與靶核苷酸序列（就本發明而言為造血幹細胞中 BCL11A 基因組靶核苷酸序列）可以透過沃森和克里克發現的核苷酸配對原則雜交。所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，只要具有足夠的互補性，“指導序列”便可與靶核苷酸序列雜交，而不需要它們之間具有 100% 的完全互補。在一些實施方案中，當使用適當的比對演算法最佳比對時，指導序列及其相應靶序列間的互補程度可為約或大於約 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多。最佳比對可使用用於比對序列的任何適當的演算法確定，包括 Smith-Waterman 演算法、Needleman-Wimsch 演算法、基於 Burrows-Wheeler Transform 的演算法等。

【0086】 通常，在內源 CRISPR 系統的背景下，CRISPR 複合物的

形成(包括指導序列與靶序列雜交並與一種或多種 Cas 蛋白複合)導致靶序列中或靶序列附近(例如，距離靶序列 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50 或更多鹼基對的範圍內)的一條鏈或兩條鏈的切割。不希望受理論所限，tracr 序列可包含野生型 tracr 序列的全部或其一部分，例如野生型 tracr 序列約或大於約 20、23、26、29、32、35、38、41、44、47、50、53、56、59、62、65、70、75、80、85 或更多個核苷酸)或由上述組成的 tracr 序列還可形成 CRISPR 複合物的一部分，例如透過沿 tracr 序列的至少一部分與指導序列可操作連接的 tracr 伴侶序列的全部或一部分雜交。

【0087】 在一些實施方案中，tracr 序列與 tracr 伴侶序列具有足夠的互補性以雜交並參與 CRISPR 複合物的形成。與“靶序列”和“指導序列”或稱“引導序列”雜交的情況類似，完全互補並不是必須的，只要足以發揮其功能即可。在一些實施方案中，在最佳對齊的情況下，tracr 序列沿 tracr 伴侶序列的長度具有至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%的互補性。

【0088】 在本申請中，靶向 BCL11A 基因組區域的 sgRNA 序列包括互補於該 BCL11A 基因組區域至少 17 個，優選 18 個，優選 19 個，或優選 20 個連續核苷酸的 sgRNA。在一些實施方案中，造血幹細胞 BCL11A 位點靶向序列如 SEQ ID NO：31 或 32 所示，並且針對 SEQ ID NO：31 或 32 所示的鹼基區域設計 sgRNA，要求 sgRNA 序列互補於 SEQ ID NO：31 或 32 序列的至少 17 個，優選 18 個，優選 19 個，或優選 20 個連續核苷酸的序列。

【0089】 具體來說，下表列出了靶向從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域的 sgRNA 序列。

SEQ ID NO	sgRNA 序列
3	cacaggtccaggaagggtt
4	atcagaggccaaacccttc
8	ttatcacaggtccaggaa
33	tcagaggccaaacccttcct
34	cagaggccaaacccttcctg
35	agaggccaaacccttcctgg
36	gaggccaaacccttcctgga
37	aggccaaacccttcctggag
38	ggccaaacccttcctggagc
39	gccaaacccttcctggagcc
40	ccaaacccttcctggagcct
41	caaacccttcctggagcctg
42	aaacccttcctggagcctgt
43	aacccttcctggagcctgtg
44	acccttcctggagcctgtga
45	cccttcctggagcctgtgat
46	ccttcctggagcctgtgata
47	cttcctggagcctgtgataa
48	ttcctggagcctgtgataaa

49	ttatcacaggctccaggaag
50	tatcacaggctccaggaagg
51	atcacaggctccaggaaggg
52	tcacaggctccaggaagggt
53	acaggctccaggaagggttt
54	caggctccaggaagggtttg
55	aggctccaggaagggtttgg
56	ggctccaggaagggtttggc
57	gctccaggaagggtttggcc
58	ctccaggaagggtttggcct
59	tccaggaagggtttggcctc
60	ccaggaagggtttggcctct
61	caggaagggtttggcctctg
62	aggaagggtttggcctctga
63	ggaagggtttggcctctgat

【0090】 在一些實施方式中，本發明提供一種提高人造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體第 60495236 位至第 60495255 位，尤其是第 60495238 位的 BCL11A 基因組區域。該基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術或 CRISPR/Cas 基因編輯技術，優選為 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，優選所述 BCL11A 基因組靶核苷酸序列與包含 SEQ ID NO:4 的

sgRNA 的引導序列互補。本發明方法關於將包含 SEQ ID NO：4 的序列的 sgRNA 導入造血幹細胞以實現對所述 BCL11A 基因組的編輯，優選將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸（如 mRNA）共同導入所述造血幹細胞，優選透過電轉條件為 200-600V，0.5ms-2ms 的電轉方法來將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。在一些實施方案中，該 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的，比如，化學修飾為所述 sgRNA 的 5'端前一個、二個和/或三個鹼基和/或 3'端的最後一個鹼基的 2'-O-甲基類似物修飾。在一些實施方案中，本發明還關於一種造血幹細胞，該造血幹細胞中染色體 2 上第 60495236 位至第 60495255 位，尤其是第 60495238 位的 BCL11A 基因組靶序列中的一個或多個位點透過基因編輯技術被破壞。進一步，關於透過體外分化培養該造血幹細胞後得到的紅細胞，以及包含該紅細胞的醫用製品。

【0091】 在一些實施方式中，本發明提供一種提高人造造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體第 60495247 位至第 60495266 位，尤其是第 60495263 位的 BCL11A 基因組區域。該基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術或 CRISPR/Cas 基因編輯技術，優選為 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，優選所述 BCL11A 基因組靶核苷酸序列與包含 SEQ ID NO: 3 的 sgRNA 的引導序列互補。本發明方法關於將包含 SEQ ID NO：3

的序列的 sgRNA 導入造血幹細胞以實現對所述 BCL11A 基因組的編輯，優選將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸（如 mRNA）共同導入所述造血幹細胞，優選透過電轉條件為 200-600V，0.5ms-2ms 的電轉方法來將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。在一些實施方案中，該 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的，比如，化學修飾為所述 sgRNA 的 5'端前一個、二個和/或三個鹼基和/或 3'端的最後一個鹼基的 2'-O-甲基類似物修飾。在一些實施方案中，本發明還關於一種造血幹細胞，該造血幹細胞中染色體 2 上第 60495247 位至第 60495266 位，尤其是第 60495263 位的 BCL11A 基因組靶序列中的一個或多個位點透過基因編輯技術被破壞。進一步，關於透過體外分化培養該造血幹細胞後得到的紅細胞，以及包含該紅細胞的醫用製品。

【0092】 在一些實施方式中，本發明提供一種提高人造造血幹細胞胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：透過基因編輯技術破壞所述造血幹細胞中 2 號染色體第 60495252 位至第 60495271 位，尤其是第 60495268 位的 BCL11A 基因組區域。該基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN 基因編輯技術或 CRISPR/Cas 基因編輯技術，優選為 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，優選所述 BCL11A 基因組靶核苷酸序列與包含 SEQ ID NO: 8 的 sgRNA 的引導序列互補。本發明方法關於將包含 SEQ ID NO: 8 的序列的 sgRNA 導入造血幹細胞以實現對所述 BCL11A 基因組的

編輯，優選將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸（如 mRNA）共同導入所述造血幹細胞，優選透過電轉條件為 200-600V，0.5ms-2ms 的電轉方法來將所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。在一些實施方案中，該 sgRNA 是經過 2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間 3'硫代修飾的，比如，化學修飾為所述 sgRNA 的 5'端前一個、二個和/或三個鹼基和/或 3'端的最後一個鹼基的 2'-O-甲基類似物修飾。在一些實施方案中，本發明還關於一種造血幹細胞，該造血幹細胞中染色體 2 上第 60495252 位至第 60495271 位，尤其是第 60495268 位的 BCL11A 基因組靶序列中的一個或多個位點透過基因編輯技術被破壞。進一步，關於透過體外分化培養該造血幹細胞後得到的紅細胞，以及包含該紅細胞的醫用製品。

【0093】 在一些實施例中，發明人設計了 23 條靶向 BCL11A 增強子的 sg RNA。下表列出了該 23 條 sg RNA 所靶向的人染色體 2 上的基因組序列位置，以及每條 sgRNA 引發的 Cas9 切割位點。

名稱	人類基因組序列上的位置	切割位點
BCL11A 的增強子-7	chr2:60495203-60495222	chr2:60495219
BCL11A 的增強子-8	chr2:60495208-60495227	chr2:60495224
BCL11A 的增強子-9	chr2:60495217-60495236	chr2:60495233
BCL11A 的增強子-10	chr2:60495218-60495237	chr2:60495234
BCL11A 的增強子-11	chr2:60495219-60495238	chr2:60495235
BCL11A 的增強子-14	chr2:60495221-60495240	chr2:60495223

BCL11A 的增強子-12	chr2:60495222-60495241	chr2:60495238
BCL11A 的增強子-13	chr2:60495223-60495242	chr2:60495239
BCL11A 的增強子-15	chr2:60495228-60495247	chr2:60495244
BCL11A 的增強子-16	chr2:60495229-60495248	chr2:60495245
BCL11A 的增強子-17	chr2:60495230-60495249	chr2:60495246
BCL11A 的增強子-18	chr2:60495231-60495250	chr2:60495247
BCL11A 的增強子-19	chr2:60495234-60495253	chr2:60495250
BCL11A 的增強子-20	chr2:60495235-60495254	chr2:60495251
BCL11A 的增強子-2	chr2:60495236-60495255	chr2:60495238
BCL11A 的增強子-1	chr2:60495247-60495266	chr2:60495263
BCL11A 的增強子-6	chr2:60495252-60495271	chr2:60495268
BCL11A 的增強子-5	chr2:60495253-60495272	chr2:60495269
BCL11A 的增強子-4	chr2:60495257-60495276	chr2:60495273
BCL11A 的增強子-3	chr2:60495264-60495283	chr2:60495280
BCL11A 的增強子-22	chr2:60495299-60495318	chr2:60495301
BCL11A 的增強子-23	chr2:60495319-60495338	chr2:60495335
BCL11A 的增強子-21	chr2:60495320-60495339	chr2:60495336

【0094】 分析上述 23 條 sgRNA 的切割位點發現，這些 sgRNA 所引發的 Cas9 切割位置集中在 BCL11A 基因第 60495219 位至第 60495336 位元基因組區域。並且靶向從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸區域， 例如 C T T C C T 位元點的 s g R N A 產生 Indels 的效率最佳和／或其脫靶

效應較小，即可以高效地進行基因編輯。

【0095】 進一步，在本發明中，發明人設計的 sgRNA 均能有效產生 Indels，本發明優選的 sgRNA 選自 SEQ ID NO s: 3、4、8 和 33-63 中任一個。

【0096】 本發明的一個具體的實施方式更包括 sgRNA 的組合物，其包括本發明關於的上述任一 sgRNA 或其載體。

【0097】 一般而言，sgRNA 中的指導序列是與靶多核苷酸序列具有足夠的互補性以與靶序列雜交並指導 CRISPR 複合物與靶序列的序列特異性結合的任何多核苷酸序列。在一些實施方案中，當使用適當的比對演算法最佳比對時，指導序列及其相應靶序列間的互補程度為約或大於約 80%、85%、90%、95%、97.5%、99% 或更多。最佳比對可使用用於比對序列的任何適當的演算法確定，其非限制性實例包括 Smith-Waterman 演算法、Needleman-Wimsch 演算法、基於 Burrows-Wheeler Transform 的演算法(例如 Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustai X、BLAT、Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND ((Illumina, San Diego, CA)、SOAP (可在 soap.genomics.org.cn 獲得)和 Maq (可在 maq.sourceforge.net 獲得)。在一些實施方案中，指導序列長度可以為約或大於約 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或更多個核苷酸。在一些實施方案中，指導序列長度少於約 75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、12 或更少的核苷酸。

指導序列指導 CRISPR 複合物與靶序列的序列特異性結合的能力可透過任何適當的測定方法評估。例如，可向具有相應靶序列的宿主細胞提供足以形成 CRISPR 複合物的 CRISPR 系統的元件(包括待測試的指導序列)，如可透過使用編碼 CRISPR 序列元件的載體轉染，隨後評估靶序列內的優先切割(如透過如本文所述的 Surveyor 測定)來進行。同樣地，靶多核苷酸序列的切割可在測試管中透過提供靶序列、CRISPR 複合物(包含待測試的指導序列和不同於指導序列的對照指導序列)的元件，並比較測試和對照指導序列在靶序列的結合或切割率，以此進行評估。也可以使用所屬技術領域中具有通常知識者知道的其它測定方法進行上述測定和評估。

【0098】 在本發明中，進行基因編輯過程中所使用的 sgRNA 優選是經過化學修飾的。“化學修飾的 sgRNA”指標對 sgRNA 進行特殊的化學修飾，例如在其 5'和 3'末端 3 個鹼基處的 2'-O-甲基類似物修飾和/或核苷酸間的 3'硫代修飾。

【0099】 本發明人採用的經過化學修飾的 sgRNA 認為具有以下兩個優點。第一、由於 sgRNA 是單鏈形式的 RNA，其半衰期非常短，進入到細胞後，會迅速降解(最長不超過 12 小時)，而 Cas9 蛋白結合 sgRNA 發揮基因編輯作用則至少需要 48hrs。因此，採用經過化學修飾的 sgRNA，進入細胞後，穩定表達，與 Cas9 蛋白結合後，能高效基因編輯基因組，產生 Indels。第二、未經修飾的 sgRNA 穿透細胞膜能力差，無法有效進入細胞或組織發揮相應功能。而

經過了化學修飾的 sgRNA 穿透細胞膜的能力通常是增強的。在本發明中可以採用本領域中常用的化學修飾方法，只要能夠提高 sgRNA 穩定性(延長半衰期)和提升進入細胞膜能力，均可以使用。除了實施例中使用的具體的化學修飾之外，更包括採用其它的修飾方法，例如， Deleavey GF1, Damha MJ. Designing chemically modified oligonucleotides for targeted gene silencing. Chem Biol. 2012 Aug 24;19(8):937-54，以及 Hendel et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. Nat Biotechnol. 2015 Sep;33(9):985-989 文獻中報導的化學修飾方法。

【0100】 在一些實施方案中，所述 sgRNA 和/或 Cas9 編碼核苷酸（如 mRNA）透過電轉導入造血幹細胞，例如，透過 250-360V，0.5-1ms；250-300V，0.5-1ms；250V 1ms；250V 2ms；300V 0.5ms；300V 1ms；360V 0.5ms；或 360V 1ms 的電轉條件導入造血幹細胞。在一些實施方案中，所述 sgRNA 和 Cas9 編碼核苷酸透過電轉方式共同導入造血幹細胞。在一些實施方案中，所述 sgRNA 透過電轉方式導入表達 Cas9 的造血幹細胞。

【0101】 在一些實施方案中，所述 Cas9 編碼核苷酸為 mRNA，如含有 ARCA 帽的 mRNA。在一些實施方案中，所述 Cas9 編碼核苷酸在病毒載體中，如慢病毒載體。在一些實施方案中，所述 Cas9 編碼核苷酸包含如 SEQ ID NO：26 所述的序列。在一些實施方案中，所述 sgRNA 與 Cas9 編碼核苷酸在同一載體中。

【0102】 本發明關於利用本發明關於的基因改造方法獲得的造血幹細胞，以及透過分化培養經所述基因改造得到的造血幹細胞獲得的、處於成熟紅細胞之前的不同分化階段的前體細胞，以及分化培養經所述基因改造得到的造血幹細胞獲得的成熟紅細胞。

【0103】 本發明關於包含透過本發明的方法獲得的藥物組合物，其包括利用本發明關於的基因改造方法獲得的造血幹細胞，或者透過分化培養經所述基因改造得到的造血幹細胞獲得的、處於成熟紅細胞之前的不同分化階段的前體細胞，或者分化培養經所述基因改造得到的造血幹細胞獲得的成熟紅細胞。

【0104】 本發明關於的藥物組合物可以透過給藥包含細胞成分的醫藥製品常規使用的途徑，例如靜脈輸注途徑，給藥有此需要的受試者。給藥劑量可以基於受試者的病情和一般健康狀況具體確定。

【0105】 在一些方面，本發明提供向造血幹細胞遞送包含本發明所述 sgRNA 和/或 Cas9 編碼核苷酸的方法。在一些實施方案中，所述遞送可使用常規的病毒和不基於病毒的基因轉移方法將所述構建體引入造血幹細胞或其它宿主細胞。非病毒遞送系統包括 DNA 質粒、RNA (例如本文所述的載體轉錄物)、裸核酸和脂質體。病毒載體遞送系統包括 DNA 和 RNA 病毒，其具有用於遞送至細胞的游離或整合的基因組。在一些實施方案中，發明人利用電轉方法將 Cas9 和 sgRNA 的編碼基因導入造血幹細胞中對造血幹細胞 BCL11A 基因組區域的具體序列進行基因編輯。經過反復實驗，

發明人發現在 200-600v，0.5ms-2ms 的電轉條件下將 Cas9 的編碼核苷酸和 sgRNA 共同導入造血幹細胞的基因編輯效率顯著高於其它電轉條件下的基因編輯效率。

【0106】 在一些實施方案中，經過化學修飾的 sgRNA 與 Cas9 編碼基因共同電轉進入 CD34+的造血幹細胞，產生高效的基因編輯效率(以 Indels%表示)。實施例中的資料顯示，如果和 Cas9 mRNA 一起電轉的是未經化學修飾的 sgRNA，其 Indels 效率只有 2.7%，遠遠低於電轉經化學修飾的 sgRNA 時獲得的 Indels 效率(效率至少為 10%以上)。

【0107】 如本申請使用的，“Indel”全稱為插入/缺失，即插入和缺失突變。

【0108】 如本文使用，“造血幹細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs)”是發生各種血細胞的最原始的造血細胞。其主要特點是具有旺盛的增殖潛力、多向分化的能力和自我更新能力，因此，它不僅能分化、補充各種血細胞，還能透過自我更新保持幹細胞的特性和數量。造血幹細胞的分化程度和增殖能力不一，有異質性。多能造血幹細胞最原始，先分化為定向多能造血幹細胞，例如能生成粒系、紅系、單核系和巨核-血小板系的髓系造血幹細胞及能發生 B 淋巴細胞和 T 淋巴細胞的淋巴幹細胞。這兩類幹細胞既保持著造血幹細胞基本特點，又略有分化，分別負責“骨髓成分”和淋巴細胞的發生，故稱定向多能造血幹細胞。它們進一步分化成為造血祖細胞，此細胞雖然也是原始的血細胞，

但是它已喪失造血幹細胞的許多基本特點，如已失去多向性分化能力，只能朝向一系或密切相關的二系細胞分化；失去了反復自我更新能力，而要依靠造血幹細胞的增殖分化來補充數量；增殖潛力有限，只能分裂數次。根據造血祖細胞所能分化生成的血細胞系多少，又分為單能造血祖細胞(只分化為一個血細胞系)和寡能造血祖細胞(可分化為 2~3 個血細胞系)。本發明“造血幹細胞”術語涵蓋多能造血幹細胞、定向多能造血幹細胞和造血祖細胞，是具有不同異質性的造血幹細胞的總稱。

【0109】 在本發明的具體的實施方式中，本發明使用的待進行基因編輯的造血幹細胞(HSPCs)可來源於骨髓、臍帶血或外周血單個核細胞 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。

【0110】 如本申請使用的，“CRISPR RGEN”是由韓國科學家 Jin-Soo Kim 的科研團隊開發的專門用於設計 sgRNA 的網站名稱，其網址為 www.rgenome.net/about/。

【0111】 如本文使用，“TIDE”指專門用於分析 Indels 效率的工具性網站名稱，其網址為 tide-calculator.nki.nl。

【0112】 如本文使用，“CD34、CD45RA、CD3、CD4、CD8、CD33、CD19、CD56、CD71、CD235a”是血液系統細胞的膜蛋白標誌物。

【0113】 如本文使用，“BCL11A”是一種轉錄因數，首先在小鼠中發現，作為逆轉錄病毒的結合位元點，被命名為 Evi9，後來在人類基因組中也發現這一基因，定位於 2 號染色體短臂 2p13 位點，主要在 B 淋巴細胞的生髮中心表達。

【0114】 如本文使用，“HBB/ HBG”是血紅蛋白的不同亞型。血紅蛋白是高等生物體內負責運載氧氣的一種蛋白質。血紅蛋白由四條鏈組成，兩條 α 鏈和兩條 β 鏈，每一條鏈有一個包含一個鐵原子的環狀血紅素。氧結合在鐵原子上，由紅細胞運輸，供機體利用。

【0115】 進一步，本發明還關於一種造血幹細胞，其是利用上述本發明的方法，透過 CRISPR/Cas9 編輯技術基因編輯造血幹細胞 BCL11A 的具體序列之後得到的造血幹細胞。此外，包含該造血幹細胞的製品也在本發明的範圍之內。

【0116】 本發明關於的造血幹細胞或製品可以用於治療選自貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行治療的疾病。尤其是可以用於治療 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【0117】 進一步，本發明關於一種紅細胞，其是透過下述體外分化培養透過本發明獲得的經過基因編輯的造血幹細胞而獲得的。

【0118】 進一步，本發明關於從造血幹細胞到成熟紅細胞之間各個分化階段的前體細胞，其是透過下述造血幹細胞紅系擴增和分化步驟處理本發明獲得的經過基因編輯的造血幹細胞而獲得的。

【0119】 其中，上述體外分化培養包括：造血幹細胞紅系擴增和分化步驟；以及造血幹細胞紅系分化脫核步驟。

【0120】 所述紅系擴增和分化步驟使用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基對造血幹細胞進行培養。

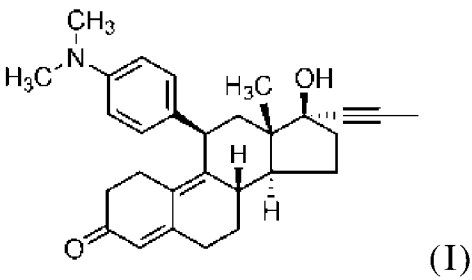
【0121】 所述紅系分化脫核步驟使用紅系分化脫核培養基。

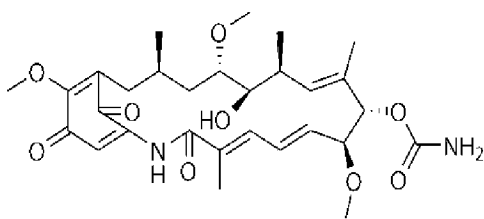
【0122】 在一些實施方案中，所述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基包含：基礎培養基，以及生長因數的組合物，其中，所述生長因數的組合物包括：幹細胞生長因數，即 SCF；白介素 3，即 IL-3；以及促紅細胞生成素，即 EPO。

【0123】 在一些實施方案中，所述紅系分化脫核培養基包含基礎培養基、生長因數、以及孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑。

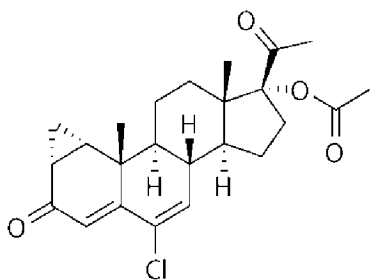
【0124】 利用上述方法培養經基因編輯之後的造血幹細胞，該造血幹細胞可以透過兩步向成熟的紅細胞的分化，相比較現有技術，利用本發明的體外分化培養，只需 14 天，時間更短，相比于現有技術中必須要 21 天以上，該週期被大幅縮短。

【0125】 在一些實施方案中，所述生長因數包括促紅細胞生成素，即 EPO，所述孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑為選自下述化合物(I)~(IV)中的任一種或兩種及以上：

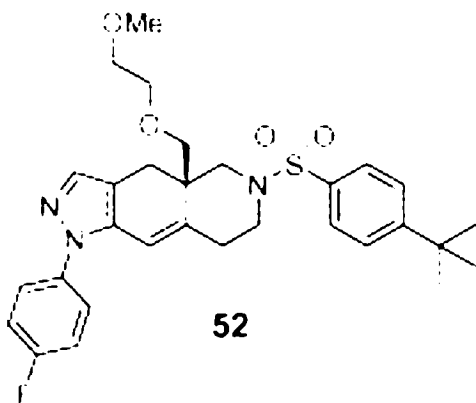




(II)



(III)



(IV)。

【0126】 在一些實施方案中，所述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基包含基礎培養基，所述基礎培養例如 STEMSPAN™ SFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), X-VIVO 15, alpha-MEM, RPMI 1640 和 DF12 等。所述生長因數，例如基礎培養基若選用 STEMSPAN™ SFEM II，則需要額外添加的生長因數包括 50-200 ng/ml SCF, 10-100 ng/ml IL-3, 1-10U/ml EPO，其中 U 的單位定義為：在特定的條件下，1 min 能轉化 1μmol 底物的蛋白量，即 1 IU=1μmol/min。目前國內外大

多數臨床實驗室常省略國際二字，即將 IU 簡寫為 U。EPO，促紅細胞生成素，主要是由腎臟為了回應低氧或者貧血而分泌的糖蛋白，在本實施例中，能促進造血幹細胞向分化。通常發揮作用時間是 7 天左右。

【0127】 基礎培養基若選用 STEMSPAN™ SFEM II 外其它的基礎培養基，則需要添加有 100X ITS(insulin-transferrin-selenium)(其中培養基中 ITS 中各物質的終濃度是：胰島素濃度是 0.1 mg/ml、人轉鐵蛋白是 0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml)(即主要包括胰島素、人轉鐵蛋白以及硒元素)，10-50 µg/ml 維生素 C，0.5-5% BSA(Bovine serum albumin，牛血清白蛋白)，生長因數，例如 50-200 ng/ml SCF, 10-100 ng/ml IL-3, 1-10U/ml EPO。

【0128】 此外，所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，任何常用的基礎培養基均可以使用。例如可以列舉本領域中常用的基礎培養基，例如 STEMSPAN™ SFEM II (購自 STEM CELL TECHNOLOGIES)；例如購自 Thermo Fisher 的 IMDM、DF12、Knockout DMEM、RPMI 1640、Alpha MEM、DMEM 等。

【0129】 此外，可以根據需要進一步在上述培養基中外加一些其他成分，例如可以外加 ITS(即主要包括胰島素、人轉鐵蛋白以及硒元素)、L-穀氨醯胺、維生素 C 以及牛血清白蛋白。例如可以在 IMDM 培養基中外加 ITS、外加 2mM L-穀氨醯胺、外加 10-50 µg/ml 維生素 C 以及 0.5-5 品質%的 BSA(牛血清白蛋白)。此外，上述 DF12 可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清

白蛋白。Knockout DMEM 可以外加同樣濃度的 ITS, L-穀氨醯胺, 維生素 C 和牛血清白蛋白, RPMI 1640 可以外加同樣濃度的 ITS, L-穀氨醯胺, 維生素 C 和牛血清白蛋白, Alpha MEM 可以外加同樣濃度的 ITS, L-穀氨醯胺, 維生素 C 和牛血清白蛋白, DMEM 也可以外加同樣濃度的 ITS, L-穀氨醯胺, 維生素 C 和牛血清白蛋白。在此, 各種基礎培養基中外加的 ITS 的濃度可以是: 胰島素濃度是 0.1 mg/ml、人轉鐵蛋白是 0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml。此外, 外加的 ITS 各成分的濃度也可以根據實際需要來調整。ITS 可以從 Thermofisher 購買, 並根據需要調節成合適的最終使用濃度。

【0130】 在一個實施方案中, 所述紅系分化脫核培養基包含基礎培養基、生長因數和孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑。

【0131】 在一個實施方案中, 所述造血幹細胞紅系分化脫核培養基包含基礎培養基, 例如 STEMSPAN™ SFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), X-VIVO 15, alpha-MEM, RPMI 1640 和 DF12 等。還包含生長因數, 例如基礎培養基若選用 STEMSPAN™ SFEM II, 則需要額外添加的生長因數包括 1-10U/ml EPO, 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ human transferrin(人轉鐵蛋白), 化學小分子為 0.5-10 $\mu\text{mol/ml}$ mifepristone。

【0132】 基礎培養基若選用 STEMSPAN™ SFEM II 外其它的基礎培養基, 則需要添加例如 ITS(insulin-transferrin-selenium)(其中培

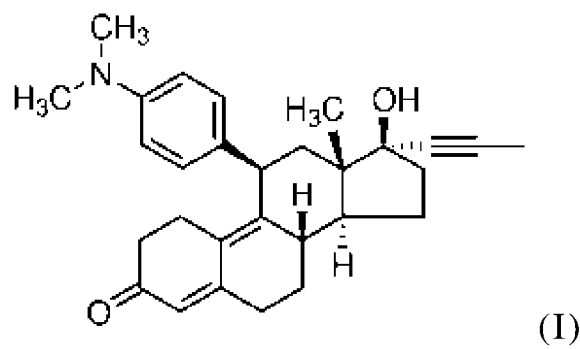
養基中 ITS 中各物質的終濃度是：胰島素濃度是 0.1 mg/ml、人轉鐵蛋白是 0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml)(即主要包括胰島素、人轉鐵蛋白以及硒元素), 10-50 ug/ml 維生素 C, 0.5-5% BSA(Bovine serum albumin,牛血清白蛋白),生長因數,例如 1-10U/ml EPO, 100-1000ug/ml 人轉鐵蛋白,化學小分子例如 0.5-10 μ mol/ml mifepristone。

【0133】此外，所屬技術領域中具有通常知識者可以理解，任何常用的基礎培養基均可以使用。例如可以列舉本領域中常用的基礎培養基，例如 STEMSPAN™ SFEM II (購自 STEM CELL TECHNOLOGIES)；例如購自 Thermo Fisher 的 IMDM、DF12、Knockout DMEM、RPMI 1640、Alpha MEM、DMEM 等。

【0134】此外，可以根據需要進一步在上述培養基中外加一些其他成分，例如可以外加 ITS(即主要包括胰島素、人轉鐵蛋白以及硒元素)、L-穀氨醯胺、維生素 C 以及牛血清白蛋白。例如可以在 IMDM 培養基中外加 ITS、外加 2mM L-穀氨醯胺、外加 10-50 μ g/ml 維生素 C 以及 0.5-5 品質%的 BSA(牛血清白蛋白)。此外，上述 DF12 可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清白蛋白。Knockout DMEM 可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清白蛋白，RPMI 1640 可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清白蛋白，Alpha MEM 可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清白蛋白，DMEM 也可以外加同樣濃度的 ITS，L-穀氨醯胺，維生素 C 和牛血清白

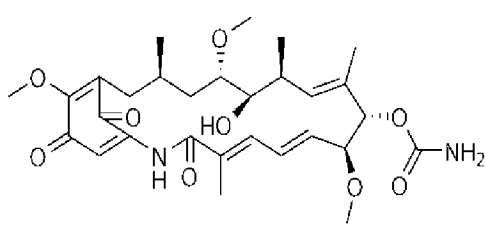
蛋白。在此，各種基礎培養基中外加的 ITS 的濃度可以是：胰島素濃度是 0.1 mg/ml、人轉鐵蛋白是 0.0055mg/ml、硒元素 6.7×10^{-6} mg/ml。此外，外加的 ITS 各成分的濃度也可以根據實際需要來調整。ITS 可以從 Thermofisher 購買，並根據需要調節成合適的最終使用濃度。

【0135】 本文中使用的 mifepristone 是一種化學合成的小分子，該小分子是孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑，結構式如下：



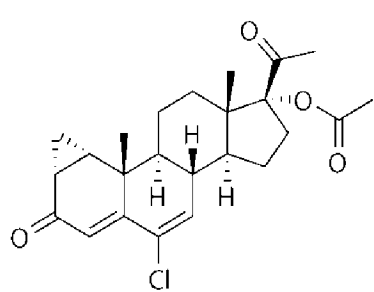
Mifepristone 化學結構圖

【0136】 其它孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和抑制劑也可應用到本發明中，包括 Cyproterone Acetate，Geldanamycin，CORT 108297 等。化學結構式如下：



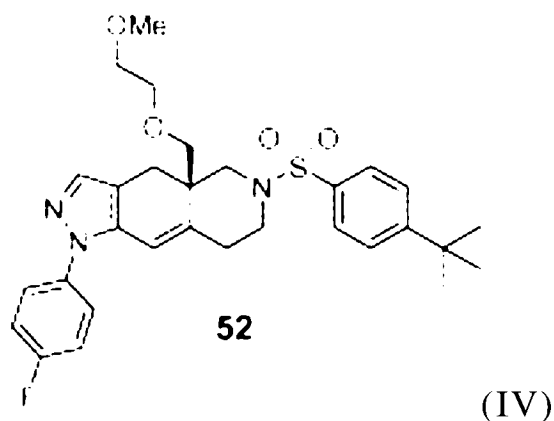
(II)

Cyproterone Acetate 化學結構式



(III)

Geldanamycin 化學結構式



CORT 108297 化學結構式

【0137】 在一些實施方案中，本發明的成熟紅細胞可透過包括下列 a)-c)步驟的方法產生：a)使用本發明所述的任一方法對從人臍帶血中分離 CD34 陽性的 HSPCs 進行基因改造；b)將基因改造後的 HSPCs 經過 5-10 天，例如 5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天，擴增和分化後獲得紅細胞前體細胞，例如成紅細胞（erythroblast）、有核紅細胞、幼紅細胞和網織紅細胞，c)將紅細胞前體細胞再經過 7 天的分化處理獲得成熟的紅細胞。

【0138】 在一些實施方案中，本發明的成熟紅細胞成熟的紅細胞可透過包括下列步驟 a)- d)的方法產生：

【0139】 a)從人臍帶血中透過磁珠分選的方法分離 CD34 陽性的 HSPCs；

【0140】 b) 使用本發明所述的任一方法對所述的 CD34 陽性的 HSPCs 進行基因改造；

【0141】 c)在無血清培養基（Serum-free medium (SFME)）中，添加額外的生長因數，經過 5-10 天，例如 5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天擴增和分化後，將 HSPCs 分化成為紅細胞前體細胞，

該階段的培養基命名為造血幹細胞紅系擴增和分化培養基(HSPCs erythroid expansion and differentiatin medium；縮寫為 HEEDM)；

【0142】 d) 在無血清培養基 (Serum-free medium (SFME)) 中，添加額外的生長因數，經過 7 天分化後，即可獲得成熟的紅細胞，該階段的培養基命名為：造血幹細胞紅系分化脫核培養基 (HSPCs erythroid differentiation enucleation medium, 縮寫為 HEDEM)。

【0143】 即針對經過編輯的 CD34 陽性的造血幹細胞，利用上述本發明的方法可以透過兩步就可以獲得成熟的紅細胞，整個過程的時間可以為 10-18 天、11-17 天、12-16 天、13-15 天、10-17 天、10-16 天、10-15 天或 10-14 天，這個時間將現有技術中利用三步或者四步的方法中的至少 21 天的週期大大縮短。

【0144】 如上所述，本發明關於一種製造透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的成熟紅細胞或其前體細胞的方法，該方法包括：(a)使用本發明的所關於的基因改造方法得到造血幹細胞；(b)使用上述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基對基因改造過的造血幹細胞進行造血幹細胞紅系擴增和分化。

【0145】 進一步，本發明關於一種製造透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的成熟紅細胞或其前體細胞的方法，該方法包括：(a)使用本發明的所關於的基因改造方法得到造血幹細胞；(b)使用上述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基對基因改造過的造血幹細胞進行造血幹細胞紅系擴增和分化；以及(c)使用紅系分化脫核培養基進行造血幹細胞紅系分化脫核。本發明還關於上述方法

中使用的造血幹細胞紅系擴增和分化培養基和/或紅系分化脫核培養基在擴增和/或分化造血幹細胞或成熟紅細胞的前體細胞中的用途。

【0146】 如本申請使用的，“分化”指其中細胞的結構或功能在分裂、增殖和其生長過程中特化的現象，即，生物體細胞或組織的特徵和功能改變以實施給予細胞或組織的功能。一般而言，其指其中相對簡單的系統分為兩種或多種性質不同的部分系統的現象。

【0147】 如本申請使用的，“Ficoll 液密度梯度離心法”，其基本原理是血液中的不同成分的比重存在差異，在低速密度梯度離心時，可將不同的細胞層粉離開。紅細胞和粒細胞密度大於分層液體，並且因紅細胞遇到 ficoll 液之後會迅速凝集成串錢狀而積于管底。唯有於分層液體密度相當的單個核細胞富集在血漿層和分層液之間，即白膜層，造血幹細胞即存在於此層，透過後續磁珠分選即可獲得。在本發明中，單個核細胞是利用商售的淋巴細胞分離管獲得。

【0148】 如本申請使用的，“成熟紅細胞”是指血液中含有最多的一類細胞，具有攜帶氧氣、胺基酸、二氧化碳等營養物質的功能。成熟的紅細胞沒有線粒體和細胞核。

【0149】 如本申請使用的，“白介素 3, IL-3”是指由啟動的 CD4 和 CD8 陽性的 T 淋巴細胞產生的一種細胞因數，其主要生物學功能是參與調控骨髓中造血幹細胞的增殖和分化。

【0150】 如本申請使用的，“促紅細胞生成素，Erythropoietin，EPO”是指 erythroblasts 即紅細胞前體細胞分泌產生的一種生長因數。在成體中，是有腎皮質腎小管周圍間質細胞和肝臟分泌產生的糖蛋白。EPO 能刺激造血幹細胞分化形成成紅細胞。

【0151】 在一些實施方案中，幹細胞因數，stem cell factor (SCF) 包括肥大細胞生長因數(MGF)，Kit 配體(KL)及 Steel 因數(SLF)。

【0152】 如本申請使用的，“造血幹細胞紅系擴增和分化培養基”是指幫助 HSPCs 的細胞大量擴增和向紅系祖細胞分化的配演體系。本發明中該培養基包含兩種主要成分，分別是基礎培養基和生長因數添加劑。基礎培養基是無血清體系，可以是 STEMSPAN™ SFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.)，也可以是 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)，外加 ITS (Thermofisher) 和 L-glutamin(Thermofisher)和維生素 C 和牛血清白蛋白。生長因數添加劑為 IL-3, SCF, EPO 的不同濃度的組合。

【0153】 如本申請使用的，“造血幹細胞紅系分化脫核培養基”是指幫助紅系祖細胞進一步擴增分化成為脫核的紅細胞培養基。本發明中該培養基包含兩種主要成分，分別是基礎培養基和生長因數及化學小分子添加劑。基礎培養基是無血清體系，可以是 STEMSPAN™ SFEM II (STEM CELLS TECHNOLOGY Inc.)，也可以是 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)，外加 ITS (Thermofisher)和 L-glutamin(Thermofisher)和維生素 C 和牛血清白蛋白。生長因數及化學小分子添加劑包括 EPO 和人轉鐵蛋白，

以及化學小分子 mifepristone。

【0154】 在一些實施方案中，造血幹細胞透過磁珠分選，例如把細胞用超級順磁性的 MACS MicroBeads（MACS 微型磁珠）特異性地標記，磁性標記完後，把這些細胞透過一個放在強而穩定磁場中的分選柱。分選柱裡的基質造成一個高梯度磁場。

【0155】 被磁性標記的細胞滯留在柱裡而未被標記的細胞則流出。當分選柱移出磁場後，滯留柱內的磁性標記細胞就可以被洗脫出來，這樣就完全可以獲得標記和未標記的兩個細胞組份。

【0156】 在本發明的一些具體的實施方式中，利用本發明的所述的 sgRNA，透過本發明描述的基因改造方法，對 3 個不同的臍帶血來源的造血幹細胞進行改造，可以實現高效基因編輯，效率達到至少 40%以上，例如 50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、或 90%以上。例如，甚至於針對於優選的 sgRNA，平均基因編輯效率達到 80%。

【0157】 在本發明的一些具體實施方式中，向小鼠移植了經本發明基因編輯方法得到的造血幹細胞，與移植了未經過基因編輯的造血幹細胞相比，在移植了經基因編輯的造血幹細胞之後，小鼠人源的 hCD45 表達比例持續增高，在外周血樣品中，由第 6 周的 20%提高到 16 周的 60%，16 周的骨髓中比例甚至達到 90%，脾臟達到 70%，表明經過基因編輯的造血幹細胞能夠快速、高效地植入小鼠模型的造血系統，細胞體內分化功能正常。

【0158】 在本發明的一些具體實施方式中，利用本發明的基因編

輯方法對臍帶血來源的造血幹細胞進行改造，然後利用本發明的“兩步法”分化方法進行分化，即利用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基進行擴增和分化，然後利用造血幹細胞紅系分化脫核培養基進行進一步分化。透過檢測顯示，分化後的紅細胞其血紅蛋白（hemoglobin，HBG）表達相比於原始的紅細胞的 HBG 表達提高了 20%-90%、甚至於提高了 100%，即提高約 1 倍(為原始的 2 倍)，胎兒血紅蛋白表達相比於原始的紅細胞的胎兒血紅蛋白的表達也提高了 20%-90%、甚至於高達 100%，即提高約 1 倍(為原始的 2 倍)，甚至於高達 200%，即提高約 2 倍(為原始的 3 倍)，甚至於高達 300%，即提高約 3 倍(為原始的 4 倍)，甚至於高達 400%，即提高約 4 倍(為原始的 5 倍)，甚至於高達 500%以上，即提高約 5 倍以上(為原始的 6 倍以上)等。

【0159】 實施例

【0160】 此後，本發明將參照實施例進一步說明。對所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見的是這些實施例僅出於說明目的而不應理解為對本發明保護範圍的限制。因此，本發明的實質性保護範圍將透過所附申請專利範圍和其等同物限定。

【0161】 實施例 1：高效基因編輯臍帶血來源的 CD34 陽性的造血幹細胞

【0162】 1-1：利用 K562 細胞測試電轉條件

【0163】 由於造血幹細胞來源少且單次分離成本高，因此在本實施例中選擇癌症細胞系 K562(購買自 ATCC 公司，網址：

<https://www.atcc.org>)作為測試電轉條件的模型細胞系。

【0164】 具體地，以下為具體實施步驟。

【0165】 第一批實驗：電轉 5×10^5 個 K562 細胞，GFP mRNA(序列如 SEQ ID No. 1 所示)的量為 $5 \mu\text{g}$ ，選用 BTX830 電轉儀器，分別測試在 250V 1ms, 360V 1ms, 400V 1ms, 500V 1ms 的條件下，4 天後流式分析實驗檢測 GFP 表達和 7-AAD 表達，GFP 表示電轉效率，7-AAD 表示電轉後細胞的生長狀態即活力(viability)。

【0166】 SEQ ID No.1：GFP mRNA 的序列資訊：

atgagtaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtga
tgtaatgggcacaaattttctgtcagtggagagggtgaaggatgcaacatacggaaaacttac
ccttaaattttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcactactttctttat
gggtgttcaatgcttttcaagataccagatcatatgaaacggcatgactttttcaagagtgccatgc
ccgaagggttatgtacaggaaagaactataattttcaaagatgacgggaactacaagacacgtgct
gaagtcaagtttgaaggatgatacccttgtaatagaatcgagttaaaaggattgattttaagaag
atggaaacattcttggacacaaattggaatacaactataactcacacaatgtatacatcatggcag
acaaacaaaagaatggaatcaaagttaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgtt
caactagcagaccattatcaacaaaatactccaattggcgatggccctgtccttttaccagacaac
cattacctgtccacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagagagaccacatggtcctt
cttgagtttgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatacaaatag。

【0167】 第二批實驗：電轉 5×10^5 K562 細胞，上述 GFP mRNA 的量為 $5 \mu\text{g}$ ，選用 BTX830 電轉儀器，測試分別在 250V 1ms, 250V 2ms, 300V 0.5ms, 300V 1ms，360V 0.5ms, 360V 1ms 條件下，4 天後流式分析實驗檢測 GFP 表達和 7-AAD 表達，GFP 表示電轉效率，

7-AAD 表示電轉後細胞的生長狀態即活力(viability)。

【0168】 第三批實驗：電轉 5×10^5 K562 細胞，上述 GFP mRNA 的量為 $5 \mu\text{g}$ ，選用 BTX830 電轉儀器，測試分別在 250V 1ms, 250V 1ms, 300V 1ms, 300V 1ms 條件下，4 天後流式分析實驗檢測 GFP 表達和 7-AAD 表達，GFP 表示電轉效率，7-AAD 表示電轉後細胞的生長狀態即活力(viability)。結果如圖 2 和 3 所示。

【0169】 其中，圖 2 顯示在癌症細胞系 K562 上進行多批次實驗檢測的最佳電轉條件下，在電轉 GFP 4 天後的螢光顯微鏡拍照圖。“V”指脈衝電壓，“ms”指脈衝時間。

【0170】 圖 3 在癌症細胞系 K562 上進行多批次實驗檢測的最佳電轉條件下，在電轉 GFP 4 天後，流式分析 7-AAD 和 GFP 表達統計分析圖，流式分析中的 7-AAD 陰性代表細胞活率，7-AAD(7-胺基-放線菌素 D)是一種核酸染料，它不能通過正常質膜，隨著細胞凋亡、細胞死亡過程，質膜對 7-AAD 的通透性逐漸增加，在合適波長激發光的激發下可發出明亮的紅色螢光，7-AAD 陰性為正常活力細胞；GFP 效率表示電轉效率。其中，以“250-1”為例，其表示 250V 電壓，1ms 脈衝時間。

【0171】 本實驗的資料表明針對癌症細胞系 K562，在“300V 1ms”的電轉條件下，電轉效率和細胞活率的綜合指標最高，在以後的實驗中將作為後續實驗的電轉條件。

【0172】 1-2. 利用 300v 1ms 電轉 GFP mRNA 進入造血幹細胞

【0173】 選取上一步驟中效率和活率最高的條件 300V 1ms，向

5×10⁵ 造血幹細胞(購買自澳賽爾斯生物技術(上海)有限公司, www.allcells.c)電轉上述 GFP mRNA, 4 天後檢測 GFP 和 CD34 的表達情況。結果如圖 4、5 所示。

【0174】 其中, 圖 4 為在 300V, 1ms 電轉條件下, 電轉上述 GFP mRNA 進入造血幹細胞 4 天後的螢光顯微鏡拍照圖, 分別包括明場、綠色通道、紅色通道和明場綠色通道疊加四個視野。

【0175】 圖 5 為在 300V, 1ms 電轉條件下, 電轉 GFP mRNA 進入造血幹細胞 4 天後流式分析 GFP 和 CD34 蛋白表達情況。其中圖 5 中的對照組是造血幹細胞, 但是沒有轉入 GFP mRNA, 且流式分析不染 CD34 抗體的情況。

【0176】 根據圖 4 和 5 的結果可以看出, 本實驗的資料顯示利用“300V 1ms”的電轉條件, 在臍帶血來源的造血幹細胞上 GFP 的表達比例高。

【0177】 1-3: 利用 CRISPR/Cas9 電轉臍帶血來源的造血幹細胞來編輯 BCL11A 位點

【0178】 A、針對 BCL11A 的增強子 58K 位元點(該目標 58K 位元點的序列如 SEQ ID NO: 2 所示), 利用“CRISPR RGEN TOOLS”軟體設計針對 BCL11A(+58)位點的多條 sgRNA 並合成經過化學修飾的 sgRNA, 資訊如圖 6、7、8 所示。

【0179】 SEQ ID NO: 2: CL11A enhancer 58K 位點 150bp 序列:

ctgccagtcctcttctaccccacccacgccccaccctaatacagaggccaaacccttct
ggagcctgtgataaaagcaactgttagcttgactagactagcttcaaagttgtattgaccctggtg

tgttatgtctaagagtagatgcc

【0180】 SEQ ID NO: 3：名稱為 BCL11A 的增強子-1 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-1)：

cacaggctccaggaagggtt

【0181】 SEQ ID NO: 4：名稱為 BCL11A 的增強子-2 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-2)：

atcagaggccaaacccttcc

【0182】 SEQ ID NO: 5：名稱為 BCL11A 的增強子-3 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-3)：

ctaacagttgcttttatcac

【0183】 SEQ ID NO: 6：名稱為 BCL11A 的增強子-4 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-4)：

ttgcttttatcacaggctcc

【0184】 SEQ ID NO: 7：名稱為 BCL11A 的增強子-5 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-5)：

ttttatcacaggctccagga

【0185】 SEQ ID NO: 8：名稱為 BCL11A 的增強子-6 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-6)：

tttatcacaggctccaggaa

【0186】 SEQ ID NO: 9：名稱為 BCL11A 的增強子-7 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-7)：

tgggtggggtagaagaggac

【0187】 SEQ ID NO: 10: 名稱為 BCL11A 的增強子-8 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-8) :

gggcgtgggtgggtagaag

【0188】 SEQ ID NO: 11: 名稱為 BCL11A 的增強子-9 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-9) :

ttagggtggggcggtgggtg

【0189】 SEQ ID NO: 12 : 名稱為 BCL11A 的增強子-10 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-10) :

attagggtggggcggtgggt

【0190】 SEQ ID NO: 13 : 名稱為 BCL11A 的增強子-11 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-11) :

gattagggtggggcggtggg

【0191】 SEQ ID NO: 14 : 名稱為 BCL11A 的增強子-12 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-12) :

tctgattagggtggggcggt

【0192】 SEQ ID NO: 15 : 名稱為 BCL11A 的增強子-13 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-13) :

ctctgattagggtggggcg

【0193】 SEQ ID NO: 16 : 名稱為 BCL11A 的增強子-14 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-14) :

cacgccccaccctaatacag

【0194】 SEQ ID NO: 17 : 名稱為 BCL11A 的增強子-15 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-15)：

ttggcctctgattaggttg

【0195】 SEQ ID NO: 18：名稱 為 BCL11A 的增強子-16 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-16)：

tttggcctctgattaggtg

【0196】 SEQ ID NO: 19：名稱 為 BCL11A 的增強子-17 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-17)：

gtttggcctctgattaggt

【0197】 SEQ ID NO: 20：名稱 為 BCL11A 的增強子-18 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-18)：

ggtttggcctctgattagg

【0198】 SEQ ID NO: 21：名稱 為 BCL11A 的增強子-19 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-19)：

aagggtttggcctctgatta

【0199】 SEQ ID NO: 22：名稱 為 BCL11A 的增強子-20 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-20)：

gaagggtttggcctctgatt

【0200】 SEQ ID NO: 23：名稱 為 BCL11A 的增強子-21 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-21)：

actcttagacataacacacc

【0201】 SEQ ID NO: 24：名稱 為 BCL11A 的增強子-22 的

sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-22)：

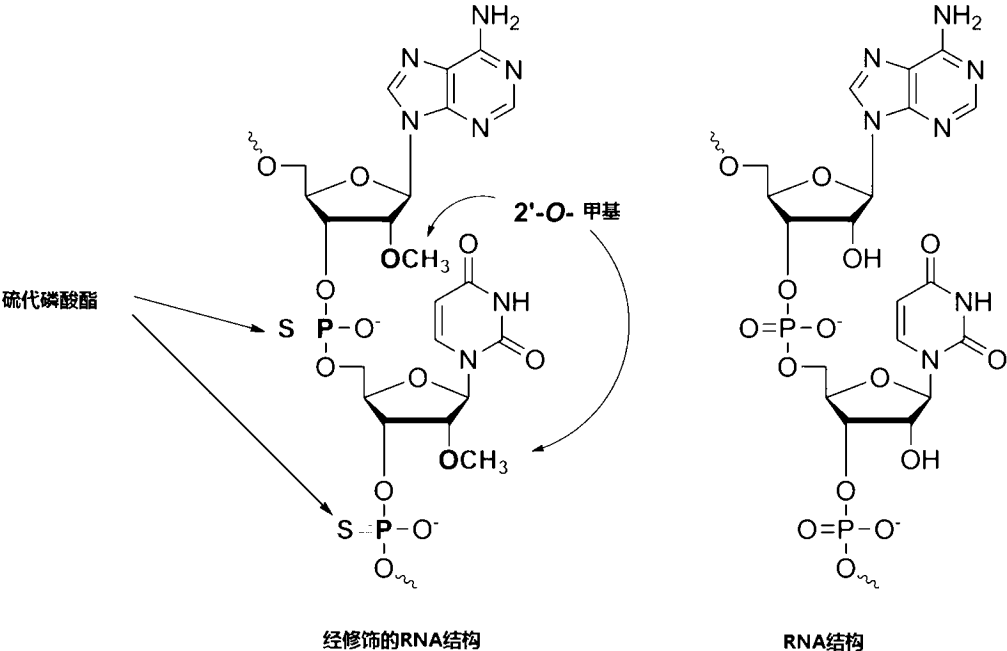
cttcaaagttgtattgaccc

【0202】 SEQ ID NO: 25：名稱為 BCL11A 的增強子-23 的 sgRNA(有時也簡稱為 enhancer-23)：

ctcttagacataacacacca

【0203】 如上所述，針對 BCL11A 的增強子 58K 位點的 150bp 序列設計了上述 23 條 sgRNA。

【0204】 B、選取 300V 1ms 的電轉條件，發明人合成了 Cas9 mRNA(序列如 SEQ ID No.26 所示)和經過化學修飾的上述設計的 23 條 sgRNA。其中，對於 23 條 sgRNA 的化學修飾是指對於 sgRNA 的 5'端的前三個鹼基以及 3'端的最後三個鹼基進行了 2'-O-甲基類似物修飾和核苷酸間的 3'硫代修飾。如下述化學式所示，左側是化學修飾後的 sgRNA，右側是未經過修飾的 sgRNA。



【0205】 在上述確定的電轉條件下向臍帶血來源的 CD34 陽性的造血幹細胞(購買自澳賽爾斯生物技術(上海)有限公司，

www.allcells.com，電轉了上述 23 條經過化學修飾 sgRNA，4 天後透過 TIDE 分析 Indels 效率。結果如圖 9 所示。同樣，在本實施例中，作為對比，將未經化學修飾的 sgRNA 也透過同樣的方法電轉，但是未經化學修飾的 sgRNA，其 Indels 效率只有 2.7%，在以後的實施例中使用的均是經化學修飾的 sgRNA。

【0206】圖 9 顯示在 CD34 陽性造血幹細胞上，電轉 Cas9 mRNA 和 23 條 sgRNA，4 天後提取該 CD34 陽性的造血幹細胞的基因組，選取 sgRNA 切割位點左右各約 450bp，總長度為 903bp 的片段進行擴增，用於擴增的引物序列序列如下所示。

【0207】正向引物: cacctcagcagaaacaaagttatc(SEQ ID NO: 29)

【0208】反向引物: gggaagctccaaactctcaa(SEQ ID NO: 30)

【0209】切割位點選擇: 以 Enhancer-2 為例，5'-ctaacagttgcttttatcac-3',切割位點在 3'端右側(Cong L, et al. Science. 2013)。

【0210】針對上述擴增片段進行 Sanger 測序，測序時使用的上下游引物序列如 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28 所示。針對測序結果利用 TIDE 軟體分析產生 Indels 效率的統計分析。其中，TIDE 軟體是線上分析 Indels 效率的軟體，以一代測序結果為基礎，分析 Indels 引起的雙峰突變的效率，可以參考 tide.deskgen.com。

【0211】結果表明，在該電轉條件下，本實施例中合成的 23 條 sgRNA 均能夠成功基因編輯造血幹細胞，都可以有效地產生 Indels，效率至少 10%。其中效率最高的是 Enhancer-2。

【0212】SEQ ID NO: 26: Cas9 mRNA 序列

gacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggccgtgat
caccgacgagtacaaggtgcccagcaagaaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcaca
gcatcaagaagaacctgatcggagccctgctgttcgacagcggcgaaacagccgaggccaccc
ggctgaagagaaccgccagaagaagatacaccagacggaagaaccggtatctgctatctgcaag
agatcttcagcaacgagatggccaaggtggacgacagcttcttcacagactggaagagtccttc
ctggtggaagaggataagaagcacgagcggcaccccatcttcggcaacatcgtggacgaggtg
gcctaccacgagaagtaccccaccatctaccacctgagaaagaaactggtggacagcaccgac
aaggccgacctgcggtgatctatctggccctggcccacatgatcaagtccggggccacttct
gatcgagggcgacctgaaccccgacaacagcgacgtggacaagctgttcacccagctggtgca
gacctacaaccagctgttcgaggaaaaccccatcaacgccagcggcgtggacgccaaggccat
cctgtctgccagactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcgcccagctgcccggcga
gaagaagaatggcctgttcggcaacctgattgcctgagcctgggcctgacccccaacttcaag
agcaacttcgacctggccgaggatgccaaactgcagctgagcaaggacacctacgacgacgac
ctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacgccgacctgtttctggccgccaagaacc
tgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccct
gagcgcctctatgatcaagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctc
gtgcggcagcagctgcctgagaagtacaaagagattttcttcgaccagagcaagaacggctacg
ccggctacattgacggcgagccagccaggaagagttctacaagttcatcaagcccatcctgga
aaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctgcggaagc
agcggaccttcgacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattct
gcggcggcaggaagatttttaccattcctgaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctg
accttcgcgcatcccctactacgtgggccctctggccaggggaaacagcagattcgcctggatga
ccagaaagagcgaggaaaccatcacccctggaacttcgaggaagtgggtggacaagggcgctt
ccgcccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgcccacgagaagggtgct

gccaagcacagcctgctgtacgagtacttcaccgtgtataacgagctgaccaagtgaatacgtgaccgaggggaatgagaaagcccgcccttcctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtgaccgtgaagcagctgaaagaggactacttcaagaaatcgagtgttcgactccgtggaaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctgggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttcctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagatatcgtgctgaccctgacactgtttgaggacagagagatgatcgaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaaagtgatgaagcagctgaagcggcgagatacaccggctggggcaggctgagccggaagctgatcaacggcatccgggacaagcagtcgggaagacatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaacttcatgcagctgatccacgacgacagcctgacctttaagaggacatccagaaagcccagggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgccaatctggccggcagccccgccattaagaagggcacatcctgcagacagtgaagggtggtggacgagctcgtgaaagtgatgggccggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaatggccagagagaaccagaccaccagaaggacagaagaacagccgcgagagaaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggcagccagatcctgaaagaacaccccgtggaaaacacccagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatgggcgggatgtgtacgtggaccaggaactggacatcaaccggctgtccgactacgatgtggaccatatcgtgcctcagagctttctgaaggacgactccatcgacaacaaggtgctgaccagaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgaagaagatgaagaactactggcggcagctgctgaacgccaagctgattaccagagaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagaggcggcctgacgaactggataaggccggcttcatcaagagacagctggtggaaaccggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccggatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatcacctgaagtccaagctggtgtccgatttccggaaggatttccagttttacaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgcccacgacgcctacctgaacgccgtcgtgggaacgccctgatcaaaaagtaccctaagctggaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgta

cgacgtgcggaagatgatcgccaagagcgagcaggaaatcggcaaggctaccgccaagtactt
 cttctacagcaacatcatgaactttttcaagaccgagattacctggccaacggcgagatccgga
 agcggcctctgatcgagacaaacggcgaaaccggggagatcgtgtgggataagggccgggatt
 ttgccaccgtgcggaagtgctgagcatgccccaaagtgaatatcgtgaaaaagaccgaggtgca
 gacaggcggccttcagcaaagagtctatcctgccccaaagaggaacagcgataagctgatcgccag
 aaagaaggactgggaccctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtg
 ctggtggtggccaaagtggaaaagggaagtccaagaaactgaagagtgtgaaagagctgctg
 gggatcaccatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgactttctggaagccaagg
 gctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaa
 aacggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaaactgcagaagggaacgaactggccct
 gccctccaaatatgtgaacttctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggtcccccg
 aggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagcacaagcactacctggacgagatcatcga
 gcagatcagcgagttctccaagagagtgatcctggccgacgctaacttggaacaaagtgtgtcc
 gcctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatatcatccacctgttta
 ccctgaccaatctgggagccccctgccgccttcaagtactttgacaccaccatcgaccggaagag
 gtacaccagcaccaaagaggtgctggacgccaccctgatccaccagagcatcaccggcctgta
 cgagacacggatcgacctgtctcagctgggagggcgac

【0213】 SEQ ID NO: 27 測序引物

cacctcagcagaaacaaagttatc

【0214】 SEQ ID NO: 28 測序引物

gggaagctccaaactctcaa

【0215】 C、根據上述實驗結果，選取基因編輯效率相對高效的
 Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6，
 在 300V 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2、

Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 進入臍帶血來源的造血幹細胞 4 天後檢測 Indels 效率，結果如圖 10 所示。圖 10 顯示電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA、Enhancer-3 sgRNA、Enhancer-4 sgRNA、Enhancer-5 sgRNA 以及 Enhancer-6 sgRNA 進入 3 個不同臍帶血來源的 CD34 陽性的造血幹細胞，4 天後，採用與上述相同的方法利用 TIDE 軟體分析產生 Indels 效率的統計分析。

【0216】 圖 10 的結果表明在 3 個不同的臍帶血來源的造血幹細胞上，5 條 sgRNA 均實現高效基因編輯，效率達到至少 40%以上，其中效率最高的是 Enhancer-2 sgRNA，平均基因編輯效率達到 80%，顯著高於 Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6，同時比現有的文獻報導的在造血幹細胞上基因編輯效率高(Xu, et al. Molecular Therapy. 2017; DeWitt, et al. Sci Transl Med. 2016)。

【0217】 基於此，後續實驗以 Enhancer-2 sgRNA 為目的靶點開展。

【0218】 **實施例 2: 基因編輯臍帶血來源的造血幹細胞的體外克隆形成**

【0219】 本實驗關於基因編輯臍帶血來源的造血幹細胞的克隆形成單位(CFU, colony-formation units)檢測。

【0220】 選取 300V 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入臍帶血來源的造血幹細胞，將 800-1000 個細胞重懸入 1ml H4434(購自加拿大 STEM CELLS TECHNOLOGIES)和

IMDM(購自 Thermo Fisher)以及 FBS(購自 Thermo Fisher)的混合液中,14 天後顯微鏡下觀察 CFU-M、BFU-E、CFU-E、CFU-G、CFU-GM、GEMM 等不同形態的克隆形成數目,結果如圖 11 所示。其中,圖 11 顯示電轉 Cas9 mRNA 和 BCL11A 的增強子-2 sgRNA 進入臍帶血來源的 CD34 陽性造血幹細胞,2 天後進行體外克隆形成實驗(CFU 檢測),14 天後統計不同血液系統的克隆數目,BFU-E、CFU-M、CFU-GM、CFU-E、CFU-G、CFU-MM 代表紅系、髓系、淋巴系等血液系統不同譜系的克隆形成。其中,Mock: 代表未經過基因編輯的細胞。

【0221】 根據實施例 2 的資料表明,與未經過基因編輯的造血幹細胞相比,基因編輯後的細胞功能體外分化功能正常,能分化不同血液系統譜系的克隆。

【0222】 實施例 3: 基因編輯臍帶血來源的造血幹細胞重建小鼠模型的造血系統

【0223】 選取 300V 1ms 的電轉條件,電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入臍帶血來源的造血幹細胞,移植進入經過輻照儀照射的 NPG 免疫缺陷小鼠模型(購自北京維通達生物技術有限公司(Beijing Vitalstar Biotechnology, Inc.))。在移植 6 周、8 周、10 周、12 周、16 周後的外周血中檢測人 CD45 和小鼠 CD45 的表達情況,同時檢測移植 16 周後骨髓、脾臟的人 CD45 和小鼠 CD45 的表達情況,其結果如圖 12 和圖 14 所示。其中移植到小鼠中的方法為:在細胞移植 24 小時前,進行 1.0Gy 射線照射,清除小鼠

模型的骨髓。隨後將用 20 μ L 0.9%的生理鹽水重懸的 1.0×10^6 的細胞注射到小鼠的尾靜脈中，隨後放入潔淨級別的動物房中飼養。

【0224】 圖 12 和圖 14 的結果表明經過基因編輯的造血幹細胞，移植進入小鼠模型後，與未經過基因編輯的造血幹細胞相比，經過基因修飾的細胞隨著時間延長，人源的 hCD45 表達比例持續增高，在外周血樣品中，由第 6 周的 20%提高到 16 周的 60%，16 周的骨髓中比例甚至達到 90%，脾臟達到 70%，表明經過基因編輯的造血幹細胞能夠快速、高效地植入小鼠模型的造血系統，細胞體內分化功能正常。而現有的文獻報導表明，6 周後外周血中 CD45 表達比例在 1-10%之間，16 周後 CD45 表達比例在 20-40%之間，骨髓中 CD45 表達比例在 50%左右，因此，本發明中的動物實驗結果明顯好於現有領域中報導的移植實驗結果(Xu, et al. Molecular Therapy. 2017; DeWitt, et al. Sci Transl Med. 2016; Mettananda, et al. Nature Communications. 2017)。

【0225】 同時，在移植基因編輯的細胞的小鼠中，16 周後檢測了人源的 CD3、CD4、CD8、CD33、CD19、CD56 等細胞膜蛋白的表達如圖 13、14、15 所示。結果表明，經過基因修飾的細胞能正常表達這些蛋白，表明可以分化為 T 細胞、B 細胞、巨噬細胞等血液系統的細胞，能高效重建小鼠模型的造血系統。與現有文獻報導結果相比，首先我們檢測了 CD3、CD4、CD8、CD33、CD19、hCD56 等 6 個細胞膜表面蛋白判定 T 細胞、髓系細胞、B 細胞和 NK 細胞等在小鼠血液中表達情況，更準確地評估移植的人造血幹

細胞重建小鼠造血系統的能力，而現有文獻中僅測試了 CD3、CD19、CD56、CD33 等蛋白表達。其次我們檢測了外周血、骨髓和脾臟等三個重要的血液系統相關組織中以上 6 個蛋白的表達譜，更全面地評估了重建小鼠造血系統的能力，而現有文獻中只以骨髓作為檢測的組織(Chang, et al. Methods & Clinical Development. 2017; DeWitt, et al. Sci Transl Med. 2016; Mettananda, et al. Nature Communications. 2017)。

【0226】此外，雖然基因編輯的細胞能夠快速、高效重建小鼠模型的造血系統。針對重建小鼠模型的細胞是否發生了基因編輯的判斷結果如圖 16 所示，提取移植前細胞、移植 16 周後外周血、骨髓和脾臟的基因組，擴增目的片段和 Sanger 測序，透過 TIDE 分析，檢測 Indels 效率。結果表明移植 16 周後的外周血、骨髓和脾臟的人源細胞均發生了基因編輯，效率與移植前細胞相似，在 50~70%之間。

【0227】**實施例 4: 基因編輯臍帶血來源的造血幹細胞紅系分化檢測 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白表達**

【0228】4-1. 紅細胞分化

【0229】選取 300v 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入臍帶血來源的造血幹細胞，利用下述“兩步法”分化方案進行分化。

【0230】其中兩步法分化為利用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基進行分化，然後利用造血幹細胞紅系分化脫核培養基進行分

化。

【0231】 造血幹細胞紅系擴增和分化培養基為基礎培養基為 StemSpan™ SFEM II, 生長因數為 50-200 ng/ml SCF, 10-100 ng/ml IL-3, 1-10U EPO/ml, 培養條件：利用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基培養造血幹細胞 1.0×10^5 cells/ml, 擴增 7 天。

【0232】 造血幹細胞紅系分化脫核培養基為基礎培養基為 STEMSPAN™ SFEM II, 生長因數為 1-10U EPO, 100-1000 μ g/ml 人轉鐵蛋白, 化學小分子為 0.5-10 μ m mifepristone, 將利用上一步驟培養的 1.0×10^6 cells/ml 細胞在造血幹細胞紅系分化脫核培養基分化 5 天。

【0233】 然後, 檢測 CD71 和 CD235a 表達, 如圖 17 所示。實驗組和對照組均能高效分化成為紅細胞, CD71 和 CD235a 的表達比例均在 90% 以上。

【0234】 4-2. 檢測 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白表達

【0235】 提取上述紅細胞分化後的細胞的 mRNA, 反轉錄成 cDNA, 透過螢光定量 PCR 檢測 BCL11A、HBB、HBG 等基因的表達, 如圖 18 所示。結果表明, 基因敲除 BCL11A enhancer 位點的細胞 BCL11A 基因表達下調 1 倍, HBG 表達提高一倍。

【0236】 檢測紅系分化後的細胞的胎兒血紅蛋白表達, 如圖 19 所示, 流式分析結果表明基因敲除 BCL11A enhancer 位點的細胞, 胎兒血紅蛋白表達提高約 1 倍。

【0237】 實施例 5：基因編輯 β -地中海貧血病人來源的造血幹細

胞的 BCL11A 的增強子位點

【0238】 5-1. β -地中海貧血病人外周血來源的造血幹細胞分離

【0239】 透過常規的磁珠分選獲得 CD34 陽性的造血幹細胞。結果如圖 20 所示。

【0240】 5-1. 電轉 β -地中海貧血病人外周血來源的造血幹細胞

【0241】 選取 300V 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 進入 β -地中海貧血病人外周血來源的造血幹細胞，4 天後檢測 Indels 效率，結果如圖 21 所示。表明在 3 個不同的病人外周血來源的造血幹細胞上，5 條 sgRNA 均可實現高效基因編輯，其中，效率最高的是 Enhancer-2，達到至少 70%以上。

【0242】 實施例 6: 基因編輯貧血病人外周血來源的造血幹細胞紅系分化檢測 γ 球蛋白和胎兒血紅蛋白表達

【0243】 將實施例 5 中經過基因編輯的造血幹細胞進行體外紅系分化，方法見實施例 4-1。分化結果如圖 22 所示，實驗結果表明對照組、Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 紅系分化效率相似，均高表達 CD71 和 CD235a 細胞膜蛋白。

【0244】 12 天後，提取紅細胞分化後的細胞的 mRNA，反轉錄成 cDNA，透過螢光定量 PCR 檢測 BCL11A、HBB、HBG、HBA 等基因的表達，如圖 23 所示。結果表明，除 Enhancer-6 以外，Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4 和 Enhancer-5 均能下調細胞

中 BCL11A 基因表達，其中 Enhancer-2 效果最為顯著下調約 1 倍左右；此外，Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 均能夠提高 γ 球蛋白表達，其中效果最顯著的是 Enhancer-2， γ 球蛋白表達提高 9 倍，符合臨床治療的標準。與現有文獻中的結果相比，首先我們以重症地貧病人來源的造血幹細胞作為起始的評估細胞來源，精確驗證了本發明的方法符合臨床治療的要求，而現有文獻只使用了正常人的骨髓或者外周血的樣本；其次，現有文獻中報導的提高胎兒血紅蛋白的倍數只在 4-7 倍之間，低於本發明中提高胎兒血紅蛋白的表達比例。由此表明，本發明的實驗結果顯著優於現有的文獻報導 (Chang et al. Methods& Clinical Development. 2017; Matthew C et al. Nature.2015)。

【0245】此外，為了更精確地評估 Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 基因編輯 BCL11A enhancer 位點對於胎兒血紅蛋白 (HbF) 和正常血紅蛋白 (HbA) 的蛋白表達量的影響，在本發明中，我們提取了造血幹細胞分化 12 天後獲得的紅細胞的蛋白，進行了 HPLC 試驗 (High Performance Liquid Chromatography, 高效液相色譜法)，如圖 27、28 和 29 所示。結果表明，1) 保留時間約為 5.4 min 和 10 min 處の色譜峰分別代表 HbF 和 HbA。2) 與未經過基因編輯的細胞相比，Enhancer-2、Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 基因編輯的細胞 HbF 表達量更高 (峰更高和峰面積更大)，HbA 的表達量更低

(峰更低和峰面積更小)，表明基因編輯 BCL11A enhancer 位點提高了 HbF 的表達，且下調了 HbA 的表達。3)其中，Enhancer-2 的 HbF/HbA 的比例為約為 5.28，mock 的 HbF/HbA 的比例為約為 0.79，提高了 6.68 倍，顯著高於 Enhancer-3、Enhancer-4、Enhancer-5 以及 Enhancer-6 對於 HbF/HbA 的比例倍數。在臨床上，如本發明的背景中所述重型 β 地貧患者由於 β 球蛋白缺失，血液中的血紅蛋白由少量的 HbA 和占絕大部分的 HbF 組成，通常重型 β 地貧患者的血紅蛋白約為 20g/L，其中 HbF 占比達到 90%以上。我們按照占比 90%計算，經過基因編輯後的細胞 HbF 表達量提高了 6.68 倍，最終的血紅蛋白量為 $20 \times 0.9 \times 6.68 + 20 \times 0.1 = 122.24$ g/L，正常人的血紅蛋白表達量的範圍是 115-150g/L 之間，該結果完全符合臨床治療的標準(Antonio Cao, et al. Genes in Medicine. 2010; 2010 年《重型 β 地中海貧血的診斷和治療指南》)。與現有文獻相比，本發明是唯一在 β 地貧患者的造血幹細胞上，透過 HPLC 實驗精確評估了基因編輯 BCL11A enhancer 提高胎兒血紅蛋白的有效性的發明研究，且結果表明顯著提高了胎兒血紅蛋白的表達，達到治療重型 β 地貧患者的臨床要求(Chang et al. Methods& Clinical Development. 2017; Matthew C et al. Nature.2015；Lin Ye， et al. PNAS. 2016; Matthew H. Porteus, Advances in Experimental Medicine and Biology. 2013)。

【0246】實施例 7: 基因編輯貧血病人外周血來源的造血幹細胞體外克隆形成

【0247】 選取 300V 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入貧血病人外周血來源的造血幹細胞，將 500-800 個細胞重懸入 1ml H4434(購自加拿大 STEM CELLS TECHNOLOGIES)和 IMDM(購自 Thermo Fisher)以及 FBS(購自 Thermo Fisher)的混合液中，14 天後顯微鏡下觀察 CFU-M、BFU-E、CFU-E、CFU-G、CFU-GM、GEMM 等不同形態的克隆形成數目，結果如圖 25 所示。

【0248】 本實驗資料表明，與未經過基因編輯的造血幹細胞相比，基因編輯後的細胞功能體外分化功能正常，能分化不同血液系統譜系的克隆。

【0249】 **實施例 8: 基因編輯貧血病人外周血來源的造血幹細胞的脫靶效應**

【0250】 本實驗關於基因測序方法，具體是透過 2 代測序技術 (Next generation sequencing, NGS)分析基因編輯貧血病人外周血來源的造血幹細胞的脫靶效應(off-target effect)。

【0251】 選取 300V 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入貧血病人外周血來源的造血幹細胞，擴增 4 天後，提取基因組進行 2 代測序分析。我們透過軟體預測了 14 個潛在的脫靶位點，結果如圖 22 所示。

【0252】 本實驗資料表明，基因編輯中靶(on-target)效率為 76%，而 14 個潛在的脫靶位點的比率均低於 0.3%，與二代測序本身誤差相當，由此可見，在測序誤差範圍內，我們並沒有檢測到由於基

因編輯而導致的脫靶現象，所以該基因編輯方案是安全的。

【0253】 根據上述實施例的資料可以看出，針對不同來源的細胞，Enhancer-2 均顯示出最好的效果。

【0254】 實施例 9

【0255】 選取 300v 1ms 的電轉條件，電轉 Cas9 mRNA 和 Enhancer-2 進入貧血病人外周血來源的造血幹細胞，隨後進行上述實施例 4 的“兩步法”進行紅細胞分化，除了在實施例 9 中，擴增的時間為 4 天，然後分化 14 天，經過 14 天之後，進行 HbF 染色，透過流式分選分離獲得高表達 HbF(約 10%比例)和低表達 HbF(約 10%比例)的細胞，提取基因組分別進行 2 代測序分析（深度測序分析）。

【0256】 其中 HbF 染色的步驟如下：1)收集培養板中的細胞，600g 5min 離心，去除上清；2)加入 4 攝氏度預冷的含有 0.05%戊二醛的磷酸鹽緩衝液，室溫固定 10 分鐘。600g 5min 離心，去除上清；3)加入含有 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液，吹打重懸，600g 5min 離心，去除上清。重複三次，以盡可能去除殘留的戊二醛；4)加入含有 0.1% Triton X-100 的 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液，室溫放置 4 min，600g 5min 離心，去除上清；5)加入含有 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液，吹打重懸，600g 5min 離心，去除上清；6)加入含有 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液 100 ul，加入 5ul HbF 流式抗體，室溫染色 15 分鐘；7)加入 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液，600g 5min 離心，去除上清；8)加入 0.1%BSA 的磷酸鹽緩衝液 100ul，吹打重懸，上

機進行流式分析。

【0257】 將高表達 HbF 和低表達 HbF 的兩群細胞進行深度測序分析對比之後，分析結果如圖 31 所示，根據圖 31 可以看出在高表達 HbF 的細胞群中主要有 5 類基因型，其中，野生型的效率，占比是 46.47%，“-5”占比是 14.38%，“-1”占比是 14.60%，“-4”占比是 14.55%，“+1”占比是 10.00%。該結果表明主要是“-5”、“-1”、“-4”、“+1”四種基因型的細胞高表達了胎兒血紅蛋白 HbF。從上述 4 種基因型中可以看出序列“CTTCCT”是關鍵的靶點序列(圖 31 中箭頭指向的位置)。根據實施例 9 的結果顯示如果在基因編輯的細胞中該序列被破壞，則能夠有效地上調胎兒血紅蛋白的表達。

【0258】 根據基因分析的結果顯示的“CTTCCT”6bp 的鹼基序列，其包含了 STAT1 和 ELF1 基因的結合位點。其中，根據文獻報導 STAT1 的結合位元點是“TTCCnGGA”基序 (n 代表任意鹼基) (Raja, et al. Nucleic Acids Research. 2008;George, et al. Journal of Biological Chemistry. 2001; Christoph, et al. Plos one. 2010)，而 ELF-1 的結合位點是”TTCC”基序(Steven, et al. Scientific Reports. 2015; Yuang-Taung Juang, et al. The Journal of Immunology. 2007)。

【0259】 其中，STAT1 和 ELF1 都是參與血液系統發育、紅細胞發育中關鍵的調控轉錄因數。其中，STAT1 透過和轉錄因數 BCL11A 結合形成調控網路，負向調控紅細胞發育(Jason D Buenrostro, et al. BioRxiv. 2017 ;Keita Kirito, et al. Blood. 1998)；而轉錄因數 ELF-1

在血液系統發育過程中，與 GATA-2，FLI-1 形成複合物，啟動下游關鍵轉錄因數 GATA1 的表達 (Gemma, et al. *Developmental Biology*. 2006)。

【0260】本發明的實驗結果提示，透過破壞 BCL11A 基因中包含“CTTCCT”6bp 的鹼基序列，破壞了 STAT1 和 ELF-1 的結合位點使 STAT1 和 ELF-1 不能結合到 BCL11A enhancer 上，解除了 BCL11A 基因對胎兒血紅蛋白合成的抑制，從而提高血液中胎兒血紅蛋白的表達。

【0261】工業實用性

【0262】根據本發明，本發明的方法有以下幾個優點，首先本方法能夠基因編輯地中海貧血病人來源的造血幹細胞，完全滿足臨床治療地中海貧血和鐮刀型紅細胞貧血的要求；其次，透過使用經過化學修飾的 sgRNA，基因編輯效率高，顯著提高胎兒血紅蛋白的表達，細胞能夠重建模型小鼠的造血系統；最後，脫靶分析顯示安全性高。基於此，本發明開發的方法將有可能代替傳統的造血幹細胞移植治療技術來治癒重型地中海貧血和鐮刀型紅細胞貧血的患者。

【0263】儘管已提及具體特徵對本發明進行詳細描述，但對所屬技術領域中具有通常知識者顯而易見的是此描述僅用於優選的實施方案而非限制本發明的範圍。因此，本發明的實質範圍會透過所附申請專利範圍和其等同物來進行限定。

【符號說明】

【0264】 無。



201922777

【發明摘要】

【中文發明名稱】一種sgRNA構建體、提高胎兒血紅蛋白表達的方法及其應用與用途

【英文發明名稱】sgRNA CONSTRUCT, METHOD FOR INCREASE THE EXPRESSION OF THE FETAL HEMOGLOBIN AND APPLICATION AND USE THEREOF

【中文】本發明關於高效安全基因編輯造血幹細胞BCL11A的增強子位點的方法，包括透過基因編輯技術破壞BCL11A基因組CTTCCT區域。本發明基因編輯後的造血幹細胞具有正常細胞功能，且能顯著提高胎兒血紅蛋白的表達，以抵消地中海貧血患者缺失的正常血紅蛋白。因此，可將基因編輯後的造血幹細胞用於 β -地中海貧血和鐮刀紅細胞貧血的臨床治療。

【英文】The present invention relates to a method for genetically editing an enhancer site of hematopoietic stem cell BCL11A efficiently and safely, comprising disrupting the CTTCCT region of the BCL11A genome by gene-editing techniques. The hematopoietic stem cells which are genetically edited according to the invention have normal cell functions and can increase the expression of the fetal hemoglobin significantly to counteract the normal-hemoglobin deletion in patients with thalassemia. Therefore, genetically edited

hematopoietic stem cells can be used for clinical treatment of β -thalassemia and sickle cell anemia.

【指定代表圖】圖1。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種提高胎兒血紅蛋白(HbF)表達的方法，包括：

透過基因編輯技術破壞造血幹細胞中 2 號染色體上從 CTCCT 序列上游 0-15 個核苷酸至所述 CTCCT 序列下游 0-15 個核苷酸的 BCL11A 基因組區域， 其中所述 BCL11A 基因組區域位於 chr2:60495236 至 chr2:60495271 之間。

【第2項】 如申請專利範圍第1項所述的方法，其中所述BCL11A 基因組區域序列為CTCCT。

【第3項】 如申請專利範圍第1項或第2項所述的方法，其中所述基因編輯技術為基於鋅指核酸酶的基因編輯技術、TALEN基因編輯技術或CRISPR/Cas基因編輯技術。

【第4項】 如申請專利範圍第3項所述的方法，其中所述基因編輯技術為CRISPR/Cas9基因編輯技術。

【第5項】 如申請專利範圍第1項或第2項所述的方法，包括向所述造血幹細胞導入靶向所述BCL11A基因組區域的sgRNA以實現對所述BCL11A基因組區域的編輯。

【第6項】 如申請專利範圍第5項所述的方法，包括向所述造血幹細胞導入包含選自SEQ ID NOs: 3、4、8和33-63任一序列的sgRNA以實現對所述BCL11A基因組區域的編輯。

【第7項】 如申請專利範圍第5項所述的方法，將包含SEQ ID NO：4的序列的sgRNA導入所述造血幹細胞以實現對所述BCL11A 基因組區域的編輯。

【第8項】 如申請專利範圍第5項所述的方法，其中所述sgRNA是經過2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間3'硫代修飾的。

【第9項】 如申請專利範圍第8項所述的方法，其中所述修飾為所述sgRNA的5'端前一個、二個和/或三個鹼基和/或3'端的最後一個鹼基的2'-O-甲基類似物修飾。

【第10項】 如申請專利範圍第5項所述的方法，其中將所述sgRNA與所述Cas9編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【第11項】 如申請專利範圍第10項所述的方法，其中透過電轉方法將所述sgRNA與所述Cas9編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【第12項】 如申請專利範圍第11項所述的方法，其中所述電轉條件為200-600V，0.5ms-2ms。

【第13項】 一種透過CRISPR/Cas9系統體外高效編輯造血幹細胞的方法，包括將靶向從CTTCCT序列上游0-15個核苷酸至所述CTTCCT序列下游0-15個核苷酸的BCL11A基因組區域的sgRNA導入所述造血幹細胞，其中所述BCL11A基因組區域位於chr2:60495236至chr2:60495271之間，其中所述sgRNA是經過2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間3'硫代修飾的。

【第14項】 如申請專利範圍第13項所述的方法，包括將含有選自SEQ ID NO：4、8和33-63任一序列的sgRNA導入所述造血幹細胞，其中所述sgRNA是經過2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間3'硫代修飾的。

【第15項】 如申請專利範圍第13項或第14項所述的方法，其中將所述sgRNA與所述Cas9編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【第16項】 如申請專利範圍第15項所述的方法，其中透過電轉方法將所述sgRNA與所述Cas9編碼核苷酸共同導入所述造血幹細胞。

【第17項】 如申請專利範圍第16項所述的方法，其中所述電轉條件為200-600V，0.5ms-2ms。

【第18項】 一種透過如申請專利範圍第1項或第13項所述的方法得到的造血幹細胞。

【第19項】 一種透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的造血幹細胞，其中所述造血幹細胞中第2號染色體上從CTTCCT序列上游0-15個核苷酸至所述CTTCCT序列下游0-15個核苷酸的BCL11A基因組區域的sgRNA導入所述造血幹細胞，其中所述BCL11A基因組區域位於chr2:60495236至chr2:60495271之間。

【第20項】 一種透過分化培養如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞獲得的、處於成熟紅細胞之前的不同分化階段的前體細胞。

【第21項】 一種透過分化培養如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞獲得的成熟紅細胞。

【第22項】 一種製造透過基因改造使胎兒血紅蛋白(HbF)表達升高的成熟紅細胞或其前體細胞的方法，所述方法包括：

(a)使用如申請專利範圍第1項或第13項所述的方法得到基因改造的造血幹細胞；

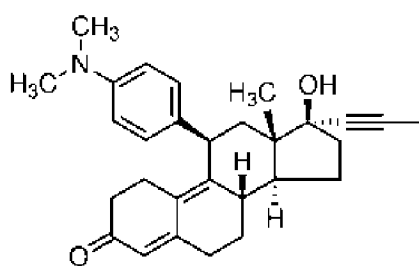
(b)使用造血幹細胞紅系擴增和分化培養基對所述基因改造的造血幹細胞進行造血幹細胞紅系擴增和分化，

其中，所述造血幹細胞紅系擴增和分化培養基包括基礎培養基，以及生長因數的組合物，其中所述生長因數的組合物包括幹細胞生長因數（SCF）、白介素3（IL-3）和促紅細胞生成素（EPO）。

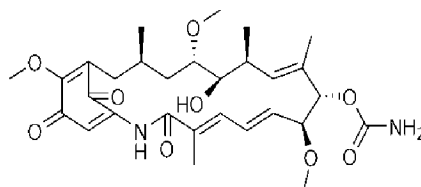
【第23項】如申請專利範圍第22項所述的方法，所述方法更包括：

使用紅系分化脫核培養基進行造血幹細胞紅系分化脫核，所述紅系分化脫核培養基包含基礎培養基、生長因數、以及孕酮受體和糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑。

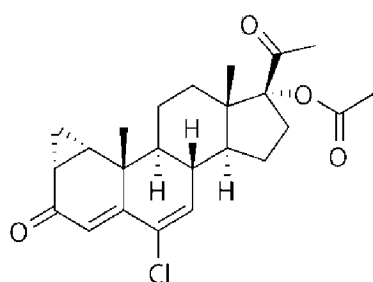
【第24項】如申請專利範圍第23項所述的方法，其中所述紅系分化脫核培養基中的所述生長因數包括促紅細胞生成素（EPO），所述孕酮受體和所述糖皮質激素受體的拮抗劑和/或抑制劑為選自下述化合物(I)~(IV)中的任一種或兩種及以上：



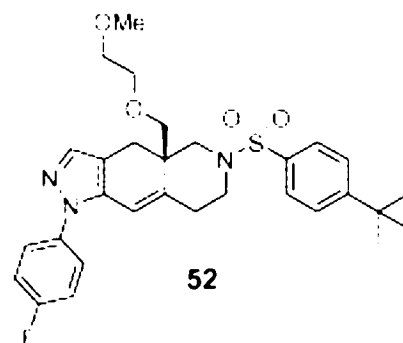
(I)



(II)



(III)



(IV)。

【第25項】 一種透過如申請專利範圍第22項至第24項中任一項所述的方法得到的成熟紅細胞或前體細胞。

【第26項】 一種組合物，包含如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞、或如申請專利範圍第20項所述的前體細胞、或如申請專利範圍第21項所述的成熟紅細胞。

【第27項】 一種包含如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞、或如申請專利範圍第20項所述的前體細胞、或如申請專利範圍第21項所述的成熟紅細胞的醫用製品。

【第28項】 一種如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞、或如申請專利範圍第20項所述的前體細胞、或如申請專利範圍第21項所述的成熟紅細胞在預防或治療有需要的受試者的疾病中的用途。

【第29項】 如申請專利範圍第28項所述的用途，所述疾病為貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病。

【第30項】 如申請專利範圍第29項所述的用途，其中所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【第31項】 如申請專利範圍第28項所述的用途，其中所述受試者為人。

【第32項】 一種如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞、或如申請專利範圍第20項所述的前體細胞、或如申請專利範圍第21項

所述的成熟紅細胞在製備預防或治療受試者疾病中的藥物或醫用製品中的用途。

【第33項】 如申請專利範圍第32項所述的用途，所述疾病為貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病。

【第34項】 如申請專利範圍第33項所述的用途，其中所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【第35項】 如申請專利範圍第32項所述的用途，其中所述受試者為人。

【第36項】 一種sgRNA構建體，包含靶向從CTTCCT序列上游0-15個核苷酸至所述CTTCCT序列下游0-15個核苷酸的BCL11A基因組區域的sgRNA，其中所述BCL11A基因組區域位於chr2:60495236至chr2:60495271之間。

【第37項】 如申請專利範圍第36項所述的構建體，包含選自SEQ ID NOs：3、4、8和33-63之一的核苷酸序列。

【第38項】 如申請專利範圍第36項或第37項所述的構建體，其包含2'-O-甲基類似物和/或核苷酸間3'硫代修飾。

【第39項】 如申請專利範圍第38項所述的構建體，其中所述修飾為在所述核苷酸序列的5'端的前一個、二個和/或三個鹼基和/或3'端的最後一個鹼基的2'-O-甲基類似物修飾。

【第40項】 一種包含如申請專利範圍第36項所述的構建體的載體、宿主細胞或製劑。

【第41項】 一種包含如申請專利範圍第36項所述的構建體在基因編輯造血幹細胞中的用途。

【第42項】 一種治療或預防受試者貧血性疾病、失血性疾病、腫瘤或其它需要大量輸血進行預防或治療的疾病的方法，其包括給藥受試者如申請專利範圍第19項所述的造血幹細胞，如申請專利範圍第20項所述的前體細胞，或如申請專利範圍第21項所述的成熟紅細胞。

【第43項】 如申請專利範圍第42項所述的方法，其中，所述疾病為 β -地中海貧血或鐮刀型紅細胞貧血。

【第44項】 如申請專利範圍第43項所述的方法，其中，所述受試者為人。

