



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107429254 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 15

(21) 申请号 201680016762.8

(22) 申请日 2016.01.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107429254 A

(43) 申请公布日 2017.12.01

(30) 优先权数据
62/110,187 2015.01.30 US
62/209,711 2015.08.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/015836 2016.01.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/123578 EN 2016.08.04

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 亚历山大·马尔森 詹尼弗·道纳
杰弗里·布鲁斯通 凯瑟琳·舒曼
史蒂文·凌

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 单骁越

(51) Int.Cl.
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/113 (2006.01)

审查员 马艳林

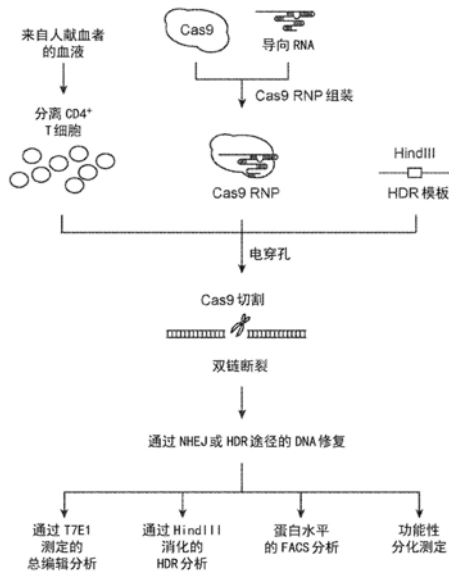
权利要求书3页 说明书47页
序列表20页 附图33页

(54) 发明名称

原代造血细胞中的蛋白递送

(57) 摘要

提供用于向细胞高效递送Cas9和Cas9核糖核蛋白的方法和组合物,所述细胞包括原代造血细胞和原代造血干细胞。



1. 一种编辑细胞的基因组的方法,其中所述细胞是原代T细胞,所述方法包括:
 - a) 提供包含Cas9核糖核蛋白复合物和所述细胞的反应混合物,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含Cas9核酸酶结构域和导向RNA,其中所述导向RNA与所述细胞基因组的靶标区域特异性杂交;并且
 - b) 通过电穿孔将所述Cas9核糖核蛋白复合物引入到所述细胞内。
2. 权利要求1的方法,其中所述方法提供至少20%的基因组编辑效率。
3. 权利要求1的方法,其中所述细胞不包含编码所述Cas9的核酸和/或编码导向RNA的DNA核酸。
4. 权利要求1的方法,其中在a) 的提供之前,所述细胞未被永生化或转化。
5. 权利要求4的方法,其中在b) 的引入之后,所述细胞未被永生化或转化。
6. 权利要求1的方法,其中在a) 的提供之前,所述细胞没有经过传代。
7. 权利要求6的方法,其中在a) 的提供之前,所述细胞直接分离自宿主生物体或组织并被培养。
8. 权利要求6的方法,其中在a) 的提供之前,所述细胞直接分离自宿主生物体或组织并且没有经过培养。
9. 权利要求1的方法,其中所述电穿孔包括将所述反应混合物放置在阴极和阳极之间的室中,并且在所述阴极和所述阳极之间施加20kV/m至100kV/m的电压电位。
10. 权利要求9的方法,其中所述电压电位作为长度为5ms至100ms的脉冲被施加。
11. 权利要求10的方法,其中所述方法还包括重复施加电压电位脉冲2-10次。
12. 权利要求9的方法,其中:

所述室是具有纵向长度和水平横截面积的中空室;
所述室包括由所述纵向长度隔开的第一和第二远端末端;并且
所述室具有:
在第一远端末端的第一电极;和
与所述室的第二远端末端流体连通的包含电解液的储蓄池,所述储蓄池具有第二电极。
13. 权利要求12的方法,其中所述室的纵向长度与水平横截面积之比为50至10,000。
14. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物中的所述Cas9核糖核蛋白复合物的浓度为0.25 μ M至5 μ M。
15. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物中的所述Cas9核糖核蛋白复合物的浓度为0.9 μ M至1.8 μ M。
16. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物包含 1×10^5 至 4×10^5 个原代T细胞。
17. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物包含 2×10^5 至 2.5×10^5 个原代T细胞。
18. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是调节T细胞、效应T细胞或幼稚T细胞。
19. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD4⁺T细胞。
20. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}调节T细胞。
21. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是FOXP3⁺T细胞。
22. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}效应T细胞。
23. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻幼稚T

细胞。

24. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD8⁺T细胞。

25. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。

26. 权利要求1的方法,其中在a) 的提供之前,所述原代T细胞被预先活化。

27. 权利要求1的方法,其中在a) 的提供之前,所述原代T细胞未被刺激。

28. 权利要求1的方法,其中所述原代T细胞包含重组抗原受体。

29. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物进一步包含单链的寡核苷酸DNA模板,并且其中所述方法包括将所述单链的寡核苷酸DNA模板引入到所述细胞内部。

30. 权利要求29的方法,其中所述单链的寡核苷酸DNA模板的浓度为9 μ M至180 μ M。

31. 权利要求29的方法,其中所述单链的寡核苷酸DNA模板的浓度为45 μ M。

32. 权利要求29-31中任一项的方法,其中所述方法提供至少30%的原代T细胞基因组编辑效率。

33. 权利要求29-31中任一项的方法,其中所述方法提供至少10%或至少14%的原代T细胞模板定向基因组编辑效率。

34. 权利要求29-31中任一项的方法,其中所述单链的寡核苷酸DNA模板编码重组抗原受体、其部分或其组分。

35. 权利要求1-33中任一项的方法,其中所述方法进一步包括:

c) 在b) 的引入后,将所述反应混合物转移到包含CD3激动剂和CD28激动剂的培养基中并且培养所述细胞。

36. 权利要求35的方法,其中所述CD3激动剂和CD28激动剂被固定在固体表面上。

37. 权利要求35的方法,其中所述CD3激动剂是抗-CD3抗体。

38. 权利要求35的方法,其中所述CD28激动剂是抗-CD28抗体。

39. 权利要求35的方法,其中所述方法进一步包括:

c) 在c) 的培养后,将所述反应混合物转移到不包含CD3激动剂或CD28激动剂的培养基中并且培养所述细胞。

40. 权利要求1的方法,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含Cas9核酸酶。

41. 权利要求1的方法,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含Cas9切口酶。

42. 权利要求1的方法,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含与限制性内切核酸酶或切口酶融合的Cas9核酸酶结构域。

43. 权利要求1的方法,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含与转录调节剂或染色质修饰剂融合的Cas9核酸酶结构域。

44. 权利要求1的方法,其中所述反应混合物包含至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物。

45. 权利要求44的方法,其中所述至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物包含结构上不同的sgRNA。

46. 权利要求44的方法,其中所述至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物包含结构上不同的Cas9结构域。

47. 一种编辑细胞的基因组的方法,其中所述细胞是原代T细胞,所述方法包括:

a) 提供包含Cas9核酸酶结构域和所述细胞的反应混合物;并且

b) 将所述Cas9核酸酶结构域引入到所述细胞内，
其中所述Cas9核酸酶结构域与所述细胞内的导向RNA形成复合物。

48. 权利要求47的方法，其中所述细胞内的所述导向RNA由所述细胞内的导向RNA基因编码，其中所述导向RNA基因包括DNA。

49. 权利要求47或48的方法，其中所述细胞不包含编码所述Cas9核酸酶结构域的核酸。

50. 权利要求47的方法，其中Cas9递送效率为至少20%或30%。

51. 多个原代T细胞，其中所述多个原代T细胞不包含编码Cas9的核酸和/或编码导向RNA的DNA核酸，并且其中所述多个原代T细胞中的至少20%包含Cas9核糖核蛋白复合物。

52. 权利要求51的多个细胞，其中所述多个细胞中的至少30%包含Cas9核糖核蛋白复合物。

53. 权利要求51的多个细胞，其中所述多个细胞中的至少20%包含Cas9核糖核蛋白复合物和单链的寡核苷酸DNA模板。

54. 权利要求51的多个细胞，其中所述多个细胞没有针对所述Cas9核糖核蛋白复合物的存在进行富集。

55. 权利要求51的多个细胞，其中所述多个细胞中的至少20%或30%在靶标基因组区域包含双链断裂或NHEJ或HDR修复的双链断裂。

原代造血细胞中的蛋白递送

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年1月30日提交的美国临时申请号62/110,187和于2015年8月25日提交的62/209,711的优先权,它们的内容通过引用完全结合在本文中用于所有目的。

[0003] 发明背景

[0004] 用于准确并且有效地操作原代细胞的方法、组合物、反应混合物、试剂盒和装置对于开发基于细胞的疗法以及关于体内多种细胞、组织、器官和系统的功能的基础研究具有巨大的希望。例如,近来在原代抗原特异性T细胞(primary antigen-specific T cells)的产生和应用中的进展对针对癌症和传染病的免疫疗法具有巨大的希望。作为另一个实例,准确靶向原代细胞中的调控基因的能力能够用于研究此类调控的表型结果。

[0005] 发明简述

[0006] 在一方面,本发明涉及提供编辑细胞的基因组的方法,其中所述细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞,所述方法包括:a)提供包含Cas9核酸酶结构域(例如,Cas9 apo蛋白)和细胞的反应混合物;并且b)将所述Cas9核酸酶结构域引入到所述细胞内部,其中所述Cas9核酸酶结构域与所述细胞内的导向RNA形成复合物。在一些实施方案中,在所述细胞内的导向RNA由所述细胞内的导向RNA基因编码,其中所述导向RNA基因包含DNA。在一些实施方案中,所述细胞不包含编码Cas9核酸酶结构域的核酸。在一些实施方案中,Cas9递送的效率为至少约20%或30%。在一些实施方案中,在细胞的基因组如上文所述或本文其他地方所述进行编辑之前、过程中或之后,修饰所述原代造血细胞或原代造血干细胞以表达异源蛋白。在一些实施方案中,所述异源蛋白由病毒(例如,慢病毒)载体编码。在一些实施方案中,所述异源蛋白是嵌合抗原受体(CAR)蛋白或异源性T细胞受体(TCR),包括,但不限于,重排的TCR。

[0007] 在一些实施方案中,本发明提供编辑细胞的基因组的方法,其中所述细胞是原代造血细胞或原代造血干细胞,所述方法包括:a)提供包含Cas9核糖核蛋白复合物和所述细胞的反应混合物,其中所述Cas9核糖核蛋白复合物包含Cas9核酸酶结构域和导向RNA,其中所述导向RNA与所述细胞基因组的靶标区域特异性杂交;并且b)将所述Cas9核糖核蛋白复合物引入到所述细胞内部。在一些实施方案中,所述方法提供至少约20%的基因组编辑效率。在一些实施方案中,所述细胞不包含编码Cas9的核酸和/或编码导向RNA的DNA核酸。

[0008] 在一些实施方案中,在a)的提供之前,所述细胞不被永生化或转化。在一些情形中,在b)的引入之后,所述细胞不被永生化或转化。在一些实施方案中,在a)的提供之前,所述细胞没有经过传代。在一些情形中,在a)的提供之前,所述细胞已经直接分离自宿主生物体或组织并培养。在一些情形中,在a)的提供之前,细胞已经直接分离自宿主生物体或组织但是还未进行培养。

[0009] 在一些实施方案中,所述引入包括电穿孔。在一些实施方案中,所述引入包括:将纳米线或纳米管用所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包被;使所述细胞与所述包被有Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白的纳米线或纳米管接触;并且用所述包被有Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白的纳米线或纳米管刺穿细胞的细胞膜。在一些实施

方案中,所述引入包括:迫使所述反应混合物通过比所述细胞的直径小的细胞变形压缩物(constriction),其中所述迫使在所述细胞的细胞膜中引入瞬时的孔;并且允许所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白通过所述瞬时的孔进入所述细胞。

[0010] 在一些实施方案中,所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包含针对所述细胞上的细胞外受体的配体,并且所述引入包括所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白的受体介导的内化。在一些实施方案中,所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包含细胞穿透肽,并且所述引入包括使所述细胞穿透肽与所述细胞接触。

[0011] 在一些情形中,所述电穿孔包括将反应混合物放置在位于阴极和阳极之间的室中,并且在所述阴极和阳极之间施加约20kV/m至约100kV/m的电压电位。在一些情形中,所述电压电位以具有约5ms至约100ms的持续时间的脉冲施加。在一些情形中,所述方法还包括重复施加电压电位脉冲2-10次。在一些情形中,所述室是具有纵向长度和水平横截面积的中空室;所述室包括由所述纵向长度隔开的第一和第二远端末端;并且所述室具有:在第一远端末端的第一电极;和与所述室的第二远端末端流体连通的包含电解液的储蓄池,所述储蓄池具有第二电极。在一些情形中,所述室具有在50至10,000范围内的纵向长度与水平横截面积比。

[0012] 在一些实施方案中,所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白在所述反应混合物中处在约0.25 μ M至约5 μ M的浓度。在一些实施方案中,所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白在所述反应混合物中处在约0.9 μ M至约1.8 μ M的浓度。在一些实施方案中,每微升(μ L)所述反应混合物包含约 1×10^5 至约 4×10^5 个原代造血细胞或原代造血干细胞、或约 0.9×10^4 至约 3.6×10^4 个原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,每微升(μ L)所述反应混合物包含约 2×10^5 至约 2.5×10^5 个原代造血细胞或原代造血干细胞或 1.8×10^4 至约 2.2×10^4 个原代造血细胞或原代造血干细胞。在一些实施方案中,所述细胞是原代造血细胞。

[0013] 在一些情形中,所述原代造血细胞是免疫细胞。在一些情形中,所述免疫细胞是T细胞。在一些情形中,所述T细胞是调节T细胞、效应T细胞或幼稚T细胞(**naïve** T cell)。在一些情形中,所述调节T细胞、效应T细胞或幼稚T细胞是CD4⁺T细胞。在一些情形中,所述T细胞是CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}调节T细胞。在一些情形中,所述T细胞是FOXP3⁺T细胞。在一些情形中,所述T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}效应T细胞。在一些情形中,所述T细胞是CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻幼稚T细胞。在一些情形中,所述T细胞是CD8⁺T细胞。在一些情形中,所述T细胞是CD4⁺CD8⁺T细胞。在一些情形中,在a)的提供之前,所述T细胞被预先活化。在一些情形中,在a)的提供之前,所述T细胞未被刺激。在一些情形中,所述T细胞包含重组抗原受体。

[0014] 在一些实施方案中,所述反应混合物进一步包含双链或单链的寡核苷酸DNA模板,并且其中所述方法包括将所述双链或单链的寡核苷酸DNA模板引入到所述细胞内部。在一些实施方案中,所述双链或单链的寡核苷酸DNA模板的浓度为约9 μ M至约180 μ M。在一些情形中,所述双链或单链的寡核苷酸DNA模板的浓度约为45 μ M。在一些情形中,所述方法提供至少约20%,21%,22%,23%,24%,25%,26%,27%,28%,29%,30%,31%,32%,33%,34%,35%,36%,37%,38%,39%,40%,41%,42%,43%,44%,45%,46%,47%,48%,49%,50%,51%,52%,53%,54%,55%,56%,57%,58%,59%,60%,61%,62%,63%,64%,65%,66%,67%,68%,69%,70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,

79%，或80%的原代造血细胞（例如，刺激的或未刺激的T细胞）或原代造血干细胞基因组编辑（例如，通过Cas9单链或双链切割位点的切口修复、非同源末端连接修复或同源定向修复）效率。

[0015] 在一些情形中，所述方法提供约20%至约80%、约25%至70%、约30%至约75%、约40%至约75%、约50%至约70%、约20%至约70%、约25%至约65%、约30%至约60%或约35%至约55%的原代造血细胞（例如，刺激的或未刺激的T细胞）或原代造血干细胞基因组编辑（例如，通过Cas9单链或双链切割位点的切口修复、非同源末端连接修复或同源定向修复）效率。

[0016] 在一些情形中，所述方法提供至少约5%，6%，7%，8%，9%，10%，11%，12%，13%，14%，15%，16%，17%，18%，19%，20%，21%，22%，23%，24%，25%，26%，27%，28%，29%，30%，31%，32%，33%，34%，35%，36%，37%，38%，39%，40%，41%，42%，43%，44%，45%，46%，47%，48%，49%，50%，51%，52%，53%，54%，55%，56%，57%，58%，59%，60%，61%，62%，63%，64%，65%，66%，67%，68%，69%，70%，71%，72%，73%，74%，或75%的原代造血细胞（例如，刺激的或未刺激的T细胞）或原代造血干细胞模板定向基因组编辑效率。

[0017] 在一些情形中，所述方法提供约5%至约30%、约7%至约25%、约10%至约20%、约5%至25%、约10%至约25%、约5%至约20%、约5%至约15%、或约10%至约15%的原代造血细胞（例如，刺激的或未刺激的T细胞）或原代造血干细胞模板定向的基因组编辑效率。在一些情形中，单链的寡核苷酸DNA模板编码重组抗原受体、其一部分或其组分。

[0018] 在一些实施方案中，所述细胞是T细胞，并且所述方法还包括：c) 在b) 的引入后，将所述反应混合物转移到包含CD3激动剂和CD28激动剂的培养基中并且培养所述细胞。在一些情形中，将所述CD3激动剂或所述CD28激动剂固定在固体表面上，或者将所述CD3激动剂和所述CD28激动剂固定在固体表面上（例如，固定在一个珠子上或分开的珠子上或在培养平板或孔的表面上）。在一些情形中，所述CD3激动剂是抗-CD3抗体。在一些情形中，所述CD28激动剂是抗-CD28抗体。在一些情形中，所述方法还包括：c) 在c) 的培养后，将所述反应混合物转移到不包含CD3激动剂或CD28激动剂的培养基中并且培养所述细胞。

[0019] 在一些情形中，所述抗-CD3抗体（例如，固定的或可溶性的）处在约1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 或25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。在一些情形中，所述抗-CD3抗体（例如，固定的或可溶性的）处在约0.5至约25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约5至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、或约5至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。在一些情形中，所述抗-CD28抗体（例如，固定的或可溶性的）处在约1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24或25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。在一些情形中，所述抗-CD28抗体（例如，固定的或可溶性的）处在约0.5至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约2至约10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、约1至约7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、或约2至约5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度。

[0020] 在一些实施方案中，所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包含Cas9核酸酶。在一些实施方案中，所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9apo蛋白包含Cas9切口酶。在一些实施方案中，所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包含与限制性内切核酸酶或切口酶融合的Cas9核酸酶结构域。在一些实施方案中，所述Cas9核糖核蛋白复合物或Cas9 apo蛋白包含与转录调节剂或染色质修饰剂融合的Cas9核酸酶结构域。

[0021] 在一些实施方案中,所述反应混合物包含至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物或至少两种结构上不同的Cas9 apo蛋白。在一些情形中,所述至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物包含结构上不同的sgRNA。在一些情形中,所述至少两种结构上不同的Cas9核糖核蛋白复合物或至少两种不同的Cas9 apo蛋白包含结构上不同的Cas9结构域。

[0022] 在另一方面,本发明提供多个原代造血细胞或原代造血干细胞,其中所述多个细胞不包含编码Cas9的核酸和/或编码导向RNA的DNA核酸,并且其中至少20%的所述多个细胞包含Cas9核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,至少30%的所述多个细胞包含Cas9核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,至少20%的所述多个细胞包含Cas9核糖核蛋白复合物和单链寡核苷酸DNA模板。在一些实施方案中,所述多个细胞没有针对Cas9核糖核蛋白复合物的存在进行富集。在一些实施方案中,至少20%或30%的所述多个细胞在靶标基因组区域包含双链断裂或需要NHEJ或HDR的双链断裂。在一些实施方案中,在如上文或本文其他地方所述编辑细胞的基因组之前、过程中或之后,修饰所述原代造血细胞或原代造血干细胞以表达异源蛋白(例如,嵌合抗原受体(CAR))。所述异源蛋白可以由引入到所述细胞内的病毒载体(例如,慢病毒载体)编码。

[0023] 定义

[0024] 如在本说明书和附上的权利要求书中所用的,除非上下文另外清楚指明,单数形式“一个”和“所述”包括复数引用。

[0025] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,该术语包括含有已知的天然核苷酸类似物,其具有与参比核酸相似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸相似的方式代谢。除非另外指明,具体的核酸序列还隐含包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子置换)、等位基因、直向同系物、SNP和互补序列以及清楚所示的序列。具体地,简并密码子置换可以通过产生其中一个或多个所选的(或全部)密码子的第三个位置被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基置换的序列而实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0026] 术语“基因”可以指参与产生或编码多肽链的DNA片段。其可以包括在编码区之前和之后的区域(前导序列和非转录尾区)以及在个体编码片段(外显子)之前的间插序列(内含子)。备选地,术语“基因”可以指参与产生或编码不翻译RNA(诸如rRNA,tRNA,导向RNA(例如,小的导向RNA),或微RNA)的DNA片段。

[0027] “启动子”定义为指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。用于本文时,启动子包括在转录起点附近的必需核酸序列,诸如在II型聚合酶启动子的情形中,包括TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或阻抑元件,其可以位于距转录起点多至数千个碱基对处。

[0028] “表达盒”是重组或合成产生的核酸构建体,具有一系列允许特定核苷酸序列在宿主细胞中转录的特定的核酸元件。表达盒可以是质粒的一部分、病毒基因组或核酸片段。典型地,表达盒包括要转录的多核苷酸,所述要转录的多核苷酸可操作性地与启动子连接。

[0029] “报告基因”编码由于其生化特性(诸如酶活性或化学荧光特征)而容易检测到的蛋白。所述报道子的一个具体的实例是绿色荧光蛋白。由该蛋白产生的荧光可以使用多种商购荧光检测系统检测。其他报道子可以通过染色检测。报道子还可以是在与适当的底物

接触时产生可检测信号的酶。报道子可以是催化可检测的产物形成的酶。适当的酶包括,但不限于,蛋白酶,核酸酶,脂肪酶,磷酸酶和水解酶。报道子可以编码这样的酶,所述酶的底物基本上不能渗透到真核生物的质膜中,由此使其能够紧密控制信号形成。编码酶的适当的报告基因的具体实例包括,但不限于,CAT(氯霉素乙酰转移酶;Alton和Vapnek (1979) Nature 282:864-869); 萤光素酶(lux); β -半乳糖苷酶;LacZ; β -葡糖醛酸糖苷酶;和碱性磷酸酶(Toh, 等人.(1980) Eur. J. Biochem. 182:231-238; 和Hall等人(1983) J. Mol. Appl. Gen. 2:101), 它们分别通过引用完全结合在本文中。其他适当的报道子包括编码特定表位的那些报道子,所述表位能够用特异性识别该表位的标记的抗体检测。

[0030] 术语“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸相似的方式行使功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来被修饰的那些氨基酸,例如,羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,其具有与氢、羧基、氨基和R基团连接的 α 碳,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的R基团(例如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但是以与天然存在的氨基酸相似的方式行使功能的化学化合物。

[0031] 在本领域中存在多种允许以位点特异性方式在多肽链中掺入非天然氨基酸衍生物或类似物的已知方法。例如,参见WO 02/086075。

[0032] 在本文中氨基酸可以以通常已知的三字母符号或IUPAC-IUB生化命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示。类似地,核苷酸可以以其普遍接受的单字母密码表示。

[0033] “多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,表示氨基酸残基的聚合物。所有三种术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物、以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。用于本文时,该术语包括任意长度的氨基酸链,包括全长蛋白,其中氨基酸残基通过共价肽键连接。

[0034] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列。关于具体的核酸序列,“保守修饰的变体”是指编码相同的或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸,或者其中所述核酸不编码基本上相同序列的氨基酸序列。由于遗传密码的简并性,大量功能相同的核酸编码任意给定的蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU全都编码氨基酸丙氨酸。因此,在由密码子限定为丙氨酸的每个位置,所述密码子可以被改变成所述的相对应密码子中的任一种而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默的变异”,其是一类保守修饰的变异。本文中每一个编码多肽的核酸序列也描述所述核酸的每一种可能的沉默变异。技术人员应该认识到,可以修饰核酸中的每个密码子(除了AUG和TGG之外,AUG一般是甲硫氨酸的唯一密码子,TGG一般是色氨酸的唯一密码子),以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每种沉默变异隐含在每个所述序列之中。

[0035] 关于氨基酸序列,技术人员应该认识到,在核酸、肽、多肽或蛋白序列中的个体置换、缺失或添加(其改变、添加或缺失所编码的序列中的单个氨基酸或低百分数的氨基酸)是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致氨基酸与化学相似的氨基酸的置换。提供功能相似的氨基酸的保守置换表在本领域中是公知的。所述保守修饰的变体还包括并且不排除本

发明的多态性变体、中间同系物和等位基因。在一些情形中,Cas9或sgRNA的保守修饰的变体可以如本文所述进行使用。

[0036] 下述八组分别包含相对彼此是保守置换的氨基酸:

[0037] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0038] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0039] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0040] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0041] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0042] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0043] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0044] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)

[0045] (参见,例如,Creighton,Proteins,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(1984))。

[0046] 在本文中,氨基酸可以以它们通常已知的三字母符号或IUPAC-IUB生化命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号表示。类似地,核苷酸可以以其普遍接受的单字母密码表示。

[0047] “易位序列”或“转导序列”表示指导蛋白从一个细胞区室运动到另一个细胞区室或从细胞外空间经由细胞或质膜进入细胞的肽或蛋白(或其活性片段或结构域)序列。指导蛋白从细胞外空间经由细胞或质膜进入细胞内的运动的易位序列是“细胞穿透肽”。定位到细胞核的易位序列称为“核定位”序列、信号、结构域、肽等。易位序列的实例包括,但不限于,TAT转导结构域(参见,例如,S.Schwarze等人,Science 285(1999年9月3日);穿透素(penetratins)或穿透素肽(D.Derossi等人,Trends in Cell Biol.8,84-87);单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus)1型VP22(A.Phelan等人,Nature Biotech.16,440-443(1998),和聚阳离子(例如,聚-精氨酸)肽(Cell Mol.Life Sci.62(2005)1839-1849)。在本领域中,其他的易位序列是已知的。易位肽可以融合(例如,在氨基末端或羧基末端)、缀合或偶联到本发明的化合物上,特别地产生容易进入靶细胞、或经过血脑屏障并进入靶细胞的缀合化合物

[0048] “CRISPR/Cas”系统是指防御外源核酸的广泛种类的细菌系统。CRISPR/Cas系统存在于广泛的真细菌和古细菌生物体中。CRISPR/Cas系统包括I型、II和III亚型。野生型II型CRISPR/Cas系统使用与导向和活化RNA复合的RNA-介导的核酸酶Cas9来识别并切割外源核酸。在本领域中,具有导向RNA和活化RNA二种活性的导向RNA也是已知的。在一些情形中,此类双重活性导向RNA也称为小的导向RNA(sgRNA)。

[0049] Cas9同源物存在于宽泛种类的真细菌中,包括,但不限于下述分类学组的细菌:放线菌(Actinobacteria),产水菌科(Aquificae),拟杆菌-绿菌门(Bacteroidetes-Chlorobi),衣原体科-疣微菌门(Chlamydiae-Verrucomicrobia),绿屈挠菌属(Chloroflexi),氰基细菌(Cyanobacteria),厚壁菌门(Firmicutes),蛋白菌(Proteobacteria),螺旋体属(Spirochaetes),和热袍菌门(Thermotogae)。示例性的Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9蛋白。另外的Cas9蛋白及其同源物记载在,例如,Chylinski,等人,RNA Biol.2013年5月1日;10(5):726-737;Nat.Rev.Microbiol.2011年6月;9(6):467-477;Hou,等人,Proc Natl Acad Sci U S

A. 2013年9月24日; 110 (39) : 15644-9; Sampson等人, Nature. 2013年5月9日; 497 (7448) : 254-7; 和Jinek, 等人., Science. 2012年8月17日; 337 (6096) : 816-21中。所述Cas9核酸酶结构域可以针对在宿主细胞中的有效活性和增强的稳定性进行优化。

[0050] 用于本文时, 术语“Cas9”是指RNA-介导的核酸酶(例如, 细菌或古细菌来源的, 或由其衍生的)。示例性的RNA-介导的核酸酶包括前述Cas9蛋白及其同源物, 并且包括, 但不限于, CPF1(参见, 例如, Zetsche等人, Cell, Volume 163, Issue 3, p759-771, 2015年10月22日)。类似地, 用于本文时, 术语“Cas9核糖核蛋白”复合物等是指下述之间的复合物: Cas9蛋白与crRNA(例如, 导向RNA或小的导向RNA), Cas9蛋白与反式-活化的crRNA(tracrRNA), Cas9蛋白与小的导向RNA, 或它们的组合(例如, 包含Cas9蛋白、tracrRNA和crRNA导向RNA的复合物)。

[0051] 用于本文时, 在编辑细胞的基因组的情形中的短语“编辑”是指在靶标基因组区域中在基因组序列中诱导结构变化。例如, 编辑可以采用诱导在靶标基因组区域向基因组序列中插入缺失(插入/缺失(indel))突变的形式。所述编辑可以通过在靶标基因组区域内诱导双链断裂、或在相反链上诱导一对单链切口并且侧连靶标基因组区域而进行。用于在靶标基因组区域或其内诱导单链或双链断裂的方法包括使用Cas9核酸酶结构域, 或其衍生物, 和针对靶标基因组区域的导向RNA或导向RNA对。

[0052] 用于本文时, 在引入Cas9核糖核蛋白复合物或引入Cas9核酸酶结构域情形中的短语“引入”是指将Cas9蛋白或Cas9核糖核蛋白复合物从细胞外易位到细胞内部。在一些情形中, 引入是指Cas9或Cas9核糖核蛋白从细胞外到细胞核内部的易位。包括多种此类易位方法, 包括, 但不限于, 电穿孔, 与纳米线或纳米管接触, 受体介导的内化, 通过细胞穿透肽易位, 脂质体介导的易位等。

[0053] 用于本文时, 在原代细胞或原代干细胞的情形中的短语“原代”是指没有进行转化或永生化的细胞。此类原代细胞可以培养、传代培养或传代有限次数(例如, 培养0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 或20次)。在一些情形中, 原代细胞适应体外培养条件。在一些情形中, 原代细胞分离自生物体、系统、器官或组织, 可选地进行分选, 并且直接使用, 无需培养或传代培养。在一些情形中, 原代细胞被刺激、活化或分化。例如, 原代T细胞可以通过与CD3、CD28激动剂、IL-2、IFN- γ 或它们的组合接触(例如, 在它们的存在下进行培养)而被活化。

[0054] 用于本文时, 短语“造血干细胞”是指能够产生血细胞的干细胞类型。造血干细胞可以产生骨髓或淋巴谱系的细胞或它们的组合。造血干细胞主要存在于骨髓中, 但是可以从外周血或其级分中分离得到。可以使用多种细胞表面标记来鉴定、分选或纯化造血干细胞。在一些情形中, 造血干细胞被鉴定为c-kit⁺且lin⁻。在一些情形中, 人造造血干细胞被鉴定为CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{10/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻。在一些情形中, 人造造血干细胞被鉴定为CD34⁻, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{10/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻。在一些情形中, 人造造血干细胞被鉴定为CD133⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{10/-}, C-kit/CD117⁺, lin⁻。在一些情形中, 小鼠造血干细胞被鉴定为CD34^{10/-}, SCA-1⁺, Thy1⁺¹⁰, CD38⁺, C-kit⁺, lin⁻。在一些情形中, 所述造血干细胞是CD150⁺CD48⁻CD244⁻。

[0055] 用于本文时, 短语“造血细胞”是指源自造血干细胞的细胞。造血细胞可以通过从生物体、系统、器官或组织(例如, 血液, 或其级分)分离而获得或提供。备选地, 造血干细胞

可以是分离的,并且通过分化干细胞而得到或提供造血细胞。造血细胞包括具有有限的分化成其他细胞型的潜能的细胞。此类造血细胞包括,但不限于,多能性祖先细胞,谱系限制性祖先细胞,常见的骨髓祖先细胞,粒细胞-巨噬细胞祖先细胞或巨核细胞-红细胞祖先细胞。造血细胞包括淋巴和骨髓谱系的细胞,诸如淋巴细胞、红细胞、粒细胞、单核细胞和凝血细胞。在一些实施方案中,所述造血细胞是免疫细胞,诸如T细胞,B细胞,巨噬细胞,或树突细胞。

[0056] 用于本文时,短语“T细胞”是指表达T细胞受体分子的淋巴细胞。T细胞包括,但不限于,幼稚T细胞,刺激的T细胞,原代T细胞(例如,未进行培养的),培养的T细胞,永生化的T细胞,辅助T细胞,细胞毒性T细胞,记忆T细胞,调节T细胞,天然杀伤T细胞,它们的组合,或它们的亚群体。T细胞可以是 $CD4^+$, $CD8^+$,或 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 。T细胞可以是辅助细胞,例如 T_h1 , T_h2 , T_h3 , T_h9 , T_h17 ,或 T_{FH} 型辅助细胞。T细胞可以是细胞毒性T细胞。调节T细胞可以是 $FOXP3^+$ 或 $FOXP3^-$ 。T细胞可以是 α/β T细胞或 γ/δ T细胞。在一些情形中,所述T细胞是 $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ 调节T细胞。在一些情形中,所述T细胞是选自由下述组成的组的调节T细胞:Tr1,Th3, $CD8^+CD28^-$,Treg17,和Qa-1限制性T细胞,或它们的组合或亚群。在一些情形中,所述T细胞是 $FOXP3^+$ T细胞。在一些情形中,所述T细胞是 $CD4^+CD25^{lo}CD127^{hi}$ 效应T细胞。在一些情形中,所述T细胞是 $CD4^+CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO^-$ 幼稚T细胞。

[0057] T细胞可以是已经被遗传操作的重组T细胞。在一些情形中,重组T细胞具有重组的(例如,突变的或异源的)T细胞受体。例如,所述T细胞受体可以在T细胞受体的互补决定区中具有一个或多个突变,从而改变抗原特异性。作为另一个实例,可以使T细胞受体突变(例如,在内部结构域(endodomain))以增加或减少信号传导。作为另一个实例,T细胞受体可以用异源性T细胞受体替换。作为另一个实例,T细胞受体可以用具有不同受体结构域的多肽替换,诸如用抗体或抗体片段替换。在一些情形中,所述T细胞受体是包含靶向结构域(例如,抗体片段)、跨膜结构域和细胞内或内部结构域的结构域的嵌合受体。内部结构域可以包含一个或多个信号传导结构域和/或衔接子结构域,以提供稳健的T细胞活化和抗-抗原活性。

[0058] 用于本文时,术语“非同源末端连接”或NHEJ是指其中不需要同源模板核酸而直接连接DNA链的切断或切口的末端的细胞过程。NHEJ可以导致在修复位点的一个或多个核苷酸的添加、缺失、置换或它们的组合。

[0059] 用于本文时,术语同源定向修复(HDR)是指其中通过由同源性模板核酸聚合而修复DNA链的切断的或切口的末端的细胞过程。因此,原始序列被模板序列替换。同源性模板核酸可以由基因组中其他地方(姐妹染色单体,同源染色体,或在相同或不同染色体上的重复区域)的同源序列提供。备选地,可以引入外源模板核酸,以得到序列在靶位点处的特异性HDR-诱导的变化。以这种方式,可以在切断位点引入特异性的突变。

[0060] 用于本文时,短语“单链寡核苷酸DNA模板”或“ssODT”是指可以由细胞用作模板进行HDR的DNA寡核苷酸。通常,ssODT具有至少一个针对靶位点的同源区域。在一些情形中,ssODT具有两个侧连在包含要插入在靶标切割位点的突变或异源序列的区域两侧的同源区。

[0061] 附图简述

[0062] 图1.在原代人 $CD4^+$ T细胞中人CXCR4基因座的稳健编辑。(A) Cas9:单一-导向RNA核

糖核蛋白 (Cas9 RNP) 递送到原代人CD4⁺T细胞中进行基因组编辑然后进行遗传和表型表征的实验方案。(B) 设计用于编辑人CXCR4基因座中的编码序列的单一-导向RNA (sgRNA) 靶标 (蓝色) 和PAM (绿色) 序列的示意性表示 (SEQ ID NO:31-32)。(C) FACS图显示与对照处理的细胞 (Cas9, 无sgRNA, CTRL) 相比, 增加百分数的细胞具有低CXCR4表达 (CXCR4^{lo}) 和更高的CXCR4 Cas9 RNP浓度。(D) T7内切核酸酶I (T7E1) 测定证明, 与在CXCR4^{hi}细胞中相比, 在FACS-分选的CXCR4^{lo}细胞中观察到具有更多编辑的在CXCR4基因座中的基因组编辑。显示了预测的PCR产物尺寸 (938个核苷酸;nt) 和接近预测的T7E1片段尺寸。使用T7内切核酸酶I测定测量总编辑频率并使用“材料与方法”中所述的式进行分析, 数字结果在琼脂糖凝胶图像下方显示为%编辑 (总)。(E) 将通过分选的Cas9 RNP处理的CXCR4^{hi} (分别为SEQ ID NO:34-43) 和CXCR4^{lo} (分别为SEQ ID NO:45-54) 中的CXCR4基因座测序检测的突变模式与来自CXCR4^{lo}对照处理的细胞 (CTRL) 的序列 (分别为SEQ ID NO:56-65) 进行比较。参比 (REF) 序列显示在来自每个群体的克隆序列的上方, 其中显示了sgRNA靶标 (蓝色) 和PAM (绿色) 序列 (SEQ ID NO:33-Cas9RNP处理的CXCR4^{hi}; SEQ ID NO:44-Cas9 RNP处理的CXCR4^{lo}; SEQ ID NO:55-CXCR4^{lo}对照)。红色虚线表示缺失的碱基, 并且红色序列显示突变的或插入的核苷酸。将来自几种克隆的未突变序列截掉。

[0063] 图2. 有效的同源定向修复允许原代人T细胞中的靶向的DNA替换。(A) 具有90个核苷酸 (nt) 的同源臂的单链寡核苷酸HDR模板示意性显示, 所述同源臂设计用于取代12nt并且在Cas9 RNP切割的CXCR4基因座引入新型HindIII限制酶切位点 (橙色) (SEQ ID NO:66)。显示了sgRNA靶标 (蓝色) 和PAM (绿色) 序列 (SEQ ID NO:31-32)。(B) 在存在和不存在单链HDR模板的条件下CXCR4 Cas9 RNP-处理的细胞中 (与对照Cas9蛋白-处理的细胞和未染色的细胞相比) 通过流式细胞术评估的CXCR4细胞表面染色的直方图。(C) FACS图 (与图B的直方图相对应) 显示具有Cas9 RNP处理和100pmol ssODT的CXCR4最大消融。(D) 使用T7E1测定来计算总编辑 (定义为在Cas9切割位点产生indel的所有NHEJ和HDR事件总和) 百分数, 而HDR频率通过HindIII消化来确定, 所述HindIII消化特异性切割刚刚整合而成的HindIII位点, 并且将其计算为DNA产物与DNA底物之比。显示了预测的PCR产物尺寸 (938个核苷酸;nt) 和接近预测的T7E1和HindIII消化片段。计算对照细胞中和具有不同浓度ssODT (0, 50, 100和200pmol) 的CXCR4 Cas9 RNP处理的细胞中计算总编辑和HDR频率, 并且数字结果显示在琼脂糖凝胶图像下方。

[0064] 图3. FOXP3的基因组编辑使人Treg细胞因子受体水平不稳定。(A) 设计用于编辑人FOXP3基因座中的编码序列的两个sgRNA靶标 (蓝色) 和PAM序列 (绿色) 的示意性显示 (分别为SEQ ID NO:67-70)。(B) T7E1测定证实在FOXP3基因座中两个靶标处的基因组编辑, 其中显示了预测的PCR产物尺寸 (900个核苷酸;nt) 和接近预测的T7E1片段尺寸。(C) 与对照 (Cas9蛋白, 无sgRNA, 且是同种型染色对照) 相比, 在FOXP3 Cas9RNP处理的细胞中通过流式细胞术评估的细胞内FOXP3水平的直方图。(D) 与对照 (Cas9蛋白, 无sgRNA, 且是未染色的对照) 相比, 在FOXP3Cas9 RNP处理的细胞中通过流式细胞术评估的CD127 (IL7R α) 细胞表面染色的直方图。

[0065] 图4. 靶向FOXP3的Cas9 RNP削弱人诱导的Treg分化。(A) 在离体刺激两天后, 将首次用于免疫的CD4⁺T细胞用Cas9 RNP电穿孔。在Cas9 RNP处理后, 将细胞在产生iTreg的条件下用IL-2和TGF- β 培养。FOXP3 Cas9 RNP减少FOXP3⁺iTreg产生并且导致增加百分数的分

泌IFN γ (一种促炎性细胞因子)的细胞(通过流式细胞术测定)。(B)从三次实验计算具有FOXP3 Cas9 RNP或对照RNP的FOXP3⁺和IFN γ 分泌细胞的量(误差条显示标准差;与对照细胞相关的显著性差异显示为:*p<0.05,**p<0.01)。插入框显示放大比例的FOXP3⁺IFN γ ⁺百分数。(C)FOXP3 Cas9 RNP减少FOXP3⁺CTLA-4⁺iTreg的产生(通过FACS评估)。FOXP3⁻群体中的CTLA-4⁺表达较少受影响,这与FOXP3-依赖性和FOXP3-不依赖性机制(二者均有助于CTLA-4表达)一致。

[0066] 图5:显示在原代人效应T细胞(CD4⁺CD25¹⁰CD127^{hi})中PD-1编码基因组区的成功编辑。

[0067] 图6:显示使用细胞挤压装置将Cas9 RNP递送至未刺激的效应CD4⁺T细胞的结果,在所述细胞挤压装置中,迫使包含细胞和Cas9 RNP的反应混合物通过小于所述细胞直径的细胞变形压缩物。该迫使在所述细胞的细胞膜中引入瞬时的孔,这允许Cas9 RNP经由所述瞬时的孔进入细胞。基于Pacific Blue (PB)-标记的葡聚糖(3kD)FITC-标记的葡聚糖(500kD)的摄入分选细胞。T7内切核酸酶I测定证实了在已经摄取了两种葡聚糖的细胞中的编辑的富集。

[0068] 图7:显示在原代人CD4⁺T细胞中有效的CXCR4编辑。(A) Cas9:单一-导向RNA核糖核蛋白(Cas9 RNP)递送至原代人CD4⁺T细胞用于基因组编辑然后进行遗传和表型表征的实验方案。(B)设计用于编辑人CXCR4基因组中的编码序列的单一-导向RNA (sgRNA)靶标和PAM序列的示意性显示(SEQ ID NO:76和32)。(C)FACS图显示与对照处理的细胞(Cas9,无sgRNA,CTRL;终浓度:1.8 μ M)相比,增加百分数的细胞具有低CXCR4表达(CXCR4¹⁰)和更高的CXCR4 Cas9 RNP浓度(Cas9 RNP¹⁰:0.9 μ M;Cas9 RNP^{hi}:1.8 μ M)。(D)T7内切核酸酶I (T7E1)测定证明,与CXCR4^{hi}细胞相比,在FACS-分选的CXCR4¹⁰细胞中观察到具有更多编辑的CXCR4基因座中的基因组编辑。显示了预测的PCR产物尺寸(938个核苷酸;nt)和接近预测的T7E1消化的片段的尺寸。总编辑频率在琼脂糖凝胶图像下方显示为%总编辑。(E)将在分选的Cas9 RNP (1.8 μ M)处理的CXCR4^{hi}(分别为SEQ ID NO:78-87)和CXCR4¹⁰(分别为SEQ ID NO:89-94)中通过对CXCR4基因座克隆和桑格测序(Sanger sequencing)检测到的突变模式与来自CXCR4¹⁰对照处理的细胞(CTRL)的序列(分别为SEQ ID NO:96-104)进行比较。参比(REF)序列显示在来自每个群体的克隆序列的上方,其中显示了sgRNA靶标(蓝色)和PAM(绿色)序列(SEQ ID NO:77-Cas9 RNP处理的CXCR4^{hi};SEQ ID NO:88-Cas9 RNP处理的CXCR4¹⁰;SEQ ID NO:95-CXCR4¹⁰对照)。红色虚线表示缺失的碱基,并且红色序列显示突变的核苷酸。箭头表示预测的Cas9切断位点。从序列比中去除获自三个另外的CXCR4¹⁰克隆的质量差的序列。

[0069] 图8:有效的同源定向修复允许原代人T细胞中的靶向的DNA替换。(A)具有90nt同源臂的单链寡核苷酸HDR模板的示意性显示,所述同源臂设计用于取代包括PAM序列的12nt并且在Cas9 RNP切割的CXCR4基因座引入新型HindIII限制酶切位点(SEQ ID NO:66)(SEQ ID NO:31-32)。显示了sgRNA靶标和PAM序列。(B)在存在不同浓度的单链HDR模板的条件下CXCR4 Cas9 RNP-处理的细胞中(与对照Cas9蛋白-处理的细胞和未染色的细胞相比)通过流式细胞术评估的CXCR4细胞表面染色的直方图。(C)FACS图(与图B的直方图相对应)显示具有Cas9 RNP处理和100pmol HDR模板的CXCR4最大消融。(D)使用T7E1测定来估测%总编辑(定义为在Cas9切割位点产生插入/缺失的所有NHEJ和HDR事件总和),而HDR频率通过HindIII消化来确定,所述HindIII消化特异性切割刚刚整合而成的HindIII位点,并且将其

计算为DNA产物与DNA底物之比。显示了预测的PCR产物尺寸(938nt)和接近预测的T7E1和HindIII消化片段。

[0070] 图9: ‘在靶’ 和对照HDR模板对PD-1与CXCR4表面表达水平的影响。(A) 对两个具有相同核苷酸组成的不同HDR模板检测对CXCR4表达的影响。在全部用CXCR4 Cas9 RNP处理的细胞中,将CXCR4 HDR模板(第5-8行)与下述进行比较:由与原始CXCR4 HDR相同的核苷酸以随机化顺序组成的对照HDR模板(其包括HindIII限制性位点(第1-4行)),和没有HDR模板处理(第9-12行)。其他对照是Cas9 CTRL(Cas9,无HDR模板;最后两行)和具有100pmol CXCR4 HDR模板的乱序导向Cas9 RNP(在人基因组内没有预测的切割)(第13和14行)。直方图显示使用在2名不同的献血者中检测到的2种差异性体外转录的CXCR4sgRNA(两种不同的纯化策略,参见实施例4的材料与方法部分)的4次实验的结果。如在图12中,对于每名献血者,使用苯酚/氯仿提取的sgRNA进行的实验显示在上方,而使用PAGE纯化的sgRNA的实验显示在下方;对于使用苯酚/氯仿提取的两次实验制备乱序导向物。(B) 在用各自的Cas9 RNP和在靶或脱靶HDR模板编辑后的PD-1(左图)和CXCR4(右图)表面表达水平。将靶向的细胞与用Cas9 CTRL(深灰色)或所示的乱序导向Cas9 RNP处理的细胞进行比较。

[0071] 图10:通过深度测序进行的Cas9 RNP-介导的编辑和HDR的定量分析。(A) 通过对CXCR4基因座的靶向深度测序分析来自图8的试验的CXCR4 Cas9 RNP-介导的插入/缺失和HDR。显示了以预测的切割位点为中心的共100nt,在HDR基因组靶向后具有sgRNA靶标,PAM,和预测的序列(CTRL(SEQ ID NO:105);RNP(SEQ ID NO:106);RNP+HDR(SEQ ID NO:107)。在每个位置,显示了与参比基因组或HDR模板-来源的序列正确比对的读数分数。尽管稀有(~1-2%),对仅有Cas9的对照处理检测到编辑,包括在预测的CXCR4切割位点,这可能表明Cas9 RNP痕量的实验污染。(B) 柱状图总结了在Cas9 CTRL、CXCR4 Cas9 RNP和CXCR4Cas9 RNP细胞中在CXCR4位点和两个预测的脱靶位点使用50pmol或100pmol CXCR4 HDR模板以缺失、插入或成功的HDR靶向编辑的读数分数。去除具有掺入的HDR模板-来源的序列的读数,以计算具有缺失和插入的分数。散布图显示(C) 缺失和(D) 插入的基因组位置(在预测的Cas9切割侧附近的+/-100nt;染色体2:136873140-136873340)和长度。上图显示CXCR4 RNP处理的细胞的缺失/插入;中间图显示在用CXCR4 RNP和CXCR4 HDR模板处理的细胞中没有结合HDR模板序列的读数中的缺失/插入;下图显示在具有HDR模板-来源的序列掺入的读数中的缺失/插入。箭头表示预测的Cas9切割位点的近似位置。

[0072] 图11:在预测的CXCR4切割位点的插入和缺失长度的分布。直方图显示在预测的切割位点+/-20nt内包含不同尺寸的缺失(灰色柱)和插入(黑色柱)的读数的百分数。上图显示CXCR4 RNP处理的细胞的插入和缺失。中图显示在用CXCR4 RNP和CXCR4 HDR模板(下图)处理的细胞中没有掺入HDR模板-来源的序列的读数中的插入和缺失。在用CXCR4 RNP和CXCR4 HDR模板处理的细胞中确实掺入HDR模板-来源的序列的读数中的插入和缺失。

[0073] 图12:图4.Cas9 RNP可以编程用于PD-1或CXCR4的敲入编辑。(A) 具有90nt同源臂的单链PD-1 HDR模板的示意性表示,所述同源臂设计用于取代12nt,其中11nt引入新型HindIII限制酶切位点,从而取代PAM序列(SEQ ID NO:110)。显示了sgRNA靶标和PAM序列(SEQ ID NO:108-109)。(B) 通过流式细胞术评估的PD-1细胞表面表达水平的直方图。所有的细胞都用100pmol PD-1 HDR模板处理。PD-1 Cas9 RNP-处理的细胞以蓝色显示,CXCR4 Cas9 RNP-处理的细胞以浅灰色显示,并且乱序导向(在人基因组内没有预测的切割)Cas9

RNP-处理的细胞以深灰色显示。(C) 通过流式细胞术评估的CXCR4细胞表面表达水平的直方图。所有的细胞都用100pmol CXCR4 HDR模板处理。CXCR4 Cas9 RNP-处理的细胞显示在前四行,PD-1 Cas9 RNP-处理的细胞显示在接下来的四行,并且乱序导向Cas9 RNP-处理的细胞显示在最后两行。图B和C显示使用在2名不同的献血者中检测的2种不同的体外转录并纯化的CXCR4和PD-1 sgRNA (参见实施例4中补充信息材料与方法部分)的4次实验的结果。对于每名献血者,使用苯酚/氯仿提取的sgRNA的实验显示在上方,使用PAGE纯化的sgRNA的实验显示在下方;对于使用苯酚/氯仿提取的两次实验制备乱序导向物。虚线表示分别对PD-1高表达或CXCR4高表达细胞的门控。与CXCR4 Cas9 RNP处理 ($p < 0.001$) 或乱序导向Cas9 RNP处理 ($p < 0.001$) 相比,使用PD-1 Cas9 RNP处理,PD-1高表达细胞的百分数显著更低。与PD-1 Cas9 RNP处理 ($p < 0.001$) 或乱序导向Cas9 RNP处理 ($p < 0.001$) 相比(皮尔森卡方),使用CXCR4 Cas9 RNP处理,CXCR4高表达细胞的百分数显著更低。(D) 通过T7E1测定分析基因组编辑,而HDR通过HindIII消化检测,所述HindIII消化特异性切割刚刚整合而成的HindIII位点;两次测定的切割产物以箭头显示。不同HDR模板的浓度显示在琼脂糖凝胶的上方。CTRL HDR模板是指原始CXCR4 HDR模板的包括HindIII限制位点的乱序版本。在所有条件下,在PD-1扩增子的T7E1中观察到显著性不明的非特异性第二凝胶带。计算总编辑和HDR频率,并且显示在琼脂糖凝胶图像下方。

[0074] 详述

[0075] I. 引言

[0076] 核酸、蛋白和蛋白与核酸的复合物向原代细胞(如原代造血细胞或原代造血干细胞)的递送可能受到低效率的限制。本文所述的是用于实现向原代细胞或原代干细胞的令人惊讶地高效率的Cas9蛋白或Cas9核糖核蛋白复合物的递送的方法和组合物。所述高效率的Cas9或其核糖核蛋白复合物的递送能够实现改进的基因组编辑、染色质修饰、基因调节、细胞分化和细胞活性控制的方法。在一些实施方案中,在原代造血细胞或原代造血干细胞中进行Cas9或其核糖核蛋白复合物的递送。

[0077] 例如,Cas9或Cas9核糖核蛋白向原代造血细胞的高效递送用于基因组编辑、染色质修饰、基因调节、细胞分化和免疫细胞(诸如T细胞)活性的控制。例如,能够将基因组编辑试剂、染色质修饰试剂或用于调节一种或多种基因表达的试剂递送到T细胞中。作为另一个实例,可以将控制T细胞活性、分化或去分化的试剂递送到T细胞中。所述方法可以用于治疗或预防癌症、传染病或自身免疫病。

[0078] 在一些情形中,本文所述的方法和组合物可以用于重组T细胞(如嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞))的产生、修饰、使用或控制。所述CAR T细胞可以用于治疗或预防癌症、传染病或自身免疫病。例如,在一些实施方案中,在被修饰表达异源蛋白(例如,嵌合抗原受体(CAR))的细胞中敲入或敲除一种或多种基因产物。例如,示例性的要敲除的基因产物可以包括PD-1。CAR可以通过任意可用的方法引入,例如,通过病毒(例如,慢病毒)表达引入。可以在编辑细胞的基因组之前、过程中或之后向所述细胞中引入CAR载体,以敲入或敲除基因产物。

[0079] I. 方法

[0080] 用于向原代细胞递送Cas9蛋白的方法可以包括提供包含Cas9核酸酶结构域的反应混合物,并且将所述Cas9核酸酶结构域引入到所述细胞中。在一些情形中,所述方法包括

提供包含Cas9核糖核蛋白复合物和所述细胞的反应混合物,并且b)将所述Cas9核糖核蛋白复合物引入到所述细胞内部。在一些情形中,所述Cas9核糖核蛋白复合物包含Cas9核酸酶结构域和导向RNA(例如,小的导向RNA)。可是设置所述导向RNA使其与所述细胞基因组的靶标区域特异性杂交。

[0081] 在一些情形中,将多种结构上不同的核糖核蛋白复合物引入到细胞中。例如,Cas9蛋白可以与多种(例如,2,3,4,5种以上,例如,2-10,5-100,20-100)结构上不同的导向RNA复合,以靶向多个结构上不同的靶标基因组区域。作为另一个实例,多种结构上不同的Cas9蛋白(例如,2,3,4,5种以上)可以与一种导向RNA或多种结构上不同的导向RNA复合,以将多种不同的效应子功能引入到细胞中。在一些情形中,分开形成Cas9核糖核蛋白复合物,以使所选的Cas9效应子功能(例如,基因组编辑,转录调节等)能够与所选的导向RNA偶联,并且因此被靶向所选的靶标基因组区域。一旦形成,所述多种结构上不同的Cas9核糖核蛋白可以提供在包含细胞的反应混合物中并且如本文所述引入到所述细胞中。

[0082] 在一些实施方案中,本文所述的方法提供至少约20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,97.5%,99%,99.5%,99%或更高的Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物递送效率。在一些实施方案中,本文所述的方法提供约20%至约99%、约30%至约90%、约35%至约85%或90%或更高、约40%至约85%或90%或更高、约50%至约85%或90%或更高、约50%至约85%或90%或更高、约60%至约85%或90%或更高、约70%至约85%或90%或更高的Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物递送效率。在一些情形中,关于在将Cas9或Cas9核糖核蛋白引入到细胞中后存活的细胞确定所述效率。在一些情形中,关于向细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白的细胞总数(存活的或不存活的)确定所述效率。

[0083] 用于确定递送效率的方法包括,但不限于下述中的一种或多种:检测融合到或另外连接到Cas9、导向RNA或Cas9核糖核蛋白复合物上的可检测标记。例如,所述Cas9或导向RNA可以融合到荧光标记上,所述荧光标记在细胞内的内化可以通过本领域已知的方式检测。作为另一个实例,导向RNA可以通过裂解所述细胞、扩增导向RNA并且检测所扩增的导向RNA进行检测。在一些情形中,扩增包括反转录步骤,以产生导向cDNA,并且扩增并检测所述导向cDNA。

[0084] 作为另一个实例,可以通过检测Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的下游效应而确定递送效率。例如,可以通过定量细胞群中基因组编辑的细胞或基因组编辑的等位基因的数目(与总细胞/等位基因或引入步骤后得到的总存活细胞相比较)估测递送。可以使用多种用于定量基因组编辑的方法。这些方法包括,但不限于,使用错配-特异性核酸酶,诸如T7内切核酸酶I;对一个或多个靶标基因座测序(例如,通过对克隆的靶标基因座扩增片段的桑格测序);通过分解追踪插入/缺失(tracking of indels by decomposition,TIDE);和高通量深度测序。

[0085] 在T7内切核酸酶I测定中,收集包含编辑的细胞级分的多个细胞,提取基因组DNA,扩增靶标基因组区域,并且杂交扩增子。编辑的基因组DNA扩增子将与野生型DNA扩增子形成错配的杂化结构。将该DNA用错配特异性核酸酶消化,所述错配特异性核酸酶切割包含一个或多个错配碱基对的双链DNA。可以测定切割的程度,从而确定编辑效率。用于定量编辑效率的备选方法可以包括定量PCR或数字PCR(digital PCR)。在一些情形中,由于下游与靶

标基因组区域结合、或对靶标基因组区域切割的无效或检测编辑事件的无效,编辑的细胞的数目可能低于已经实现递送的细胞的数目。类似地,当递送的Cas9蛋白是与提供转录调节或染色质修饰活性的效应子结构域的融合体时,表现出所述活性的细胞的数目低于已经实现了递送的细胞的数目。由此,可以认为检测到的下游效应的效率是递送效率的下限。

[0086] 在一些情形中,本文所述的方法为已经在细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白的细胞提供高的细胞存活力。在一些情形中,所述高存活力通过在细胞外膜中形成有限数量的具有短暂寿命的孔而实现。在一些情形中,已经向细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白的细胞的存活力为至少约20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,97.5%,99%,99.5%,99%,或更高。在一些情形中,已经向细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白的细胞的存活力为约20%至约99%,约30%至约90%,约35%至约85%或90%或更高,约40%至约85%或90%或更高,约50%至约85%或90%或更高,约50%至约85%或90%或更高,约60%至约85%或90%或更高,或约70%至约85%或90%或更高。

[0087] 在一些情形中,其中递送了Cas9蛋白的细胞不另外包含编码Cas9的核酸。在一些情形中,其中递送了Cas9蛋白的细胞不包含编码结构上与所递送的Cas9蛋白相同的Cas9蛋白的核酸。在所述情形中,可以关于其中已经引入结构迥异的递送的Cas9蛋白的细胞的数目确定递送效率,而不是关于具有任意Cas9蛋白的细胞数目确定。在一些情形中,其中递送了Cas9的细胞不包含编码导向RNA的DNA。例如,可以将以Cas9核糖核蛋白复合物形式存在的Cas9引入到不包含编码导向RNA的DNA、不包含编码Cas9蛋白的DNA和/或不包含编码结构上与所递送的核糖核蛋白复合物中的Cas9蛋白相同的Cas9蛋白的DNA的细胞中。

[0088] A. 向细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白

[0089] 用于向细胞(例如,造血细胞或造血干细胞,包括,例如,来自人的此类细胞)中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的方法包括形成包含所述Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的反应混合物,并且在所述细胞的细胞外膜中引入瞬时的孔。所述瞬时的孔可以通过多种方法引入,包括,但不限于,电穿孔,细胞挤压,或与纳米线或纳米管接触。通常,在存在Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物时,引入瞬时的孔,并且允许所述Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物扩散到所述细胞中。

[0090] 用于对细胞电穿孔从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的方法、组合物和装置可以包括本文实施例中所述的那些。用于对细胞电穿孔从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括WO/2006/001614或Kim, J.A. 等人 *Biosens. Bioelectron.* 23, 1353-1360 (2008) 中记载的那些。用于对细胞电穿孔从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括美国专利申请公布号2006/0094095;2005/0064596;或2006/0087522中记载的那些。用于对细胞电穿孔从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括记载在下述中的那些:Li, L.H. 等人 *Cancer Res. Treat.* 1, 341-350 (2002); 美国专利号6,773,669;7,186,559;7,771,984;7,991,559;6485961;7029916;和美国专利申请公布号2014/0017213;和2012/0088842。用于对细胞电穿孔从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括Geng, T. 等人 *J. Control Release* 144, 91-100 (2010); 和Wang, J., 等人 *Lab. Chip* 10, 2057-2061 (2010) 中记载的那些。

[0091] 在一些情形中,将本文引用的专利或公布中记载的方法或组合物改进以用于Cas9或Cas9核糖核蛋白递送。所述改进包括增加或降低电压、脉冲长度、或脉冲次数。所述改进可以进一步包括改良缓冲液、培养基、电解液或它们的成分。电穿孔可以使用本领域已知的装置进行,诸如Bio-Rad基因脉冲发生器电穿孔装置、Invitrogen Neon转染系统、MaxCyte转染系统、Lonza核染装置(Lonza Nucleofection device)、NEPA基因NEPA21转染装置、包括泵和恒定电压供应的流通电穿孔系统或本领域已知的其他电穿孔装置或系统。

[0092] 在一个示例性的实施方案中,使用在阴极与阳极之间具有长距离的装置进行电穿孔。在一些情形中,在阴极与阳极之间的距离为3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,或45mm。在一些情形中,所述装置配置有电极,所述电极具有相对小的与包含细胞的反应混合物接触的表面积。在一些情形中,所述至少一个电极的表面积或至少一个电极的与反应混合物接触的表面积为或约为 0.1mm^2 , 0.2mm^2 , 0.3mm^2 , 0.33mm^2 , 0.4mm^2 , 0.5mm^2 , 0.6mm^2 , 0.7mm^2 , 0.8mm^2 , 0.9mm^2 ,或 1mm^2 。在一些情形中,阴极与阳极之间的距离与电极表面积的比例为1/50至1/1000。在一些情形中,电穿孔室长轴的长度与电穿孔室横截面积的比例为50至10,000。在一些情形中,所述电穿孔装置具有这样的电穿孔室,其具有由纵向长度隔开的第一和第二末端,其中第一电极位于第一末端,并且包含第二电极的储蓄池与第二末端流体连通。

[0093] 在另一个示例性的实施方案中,使用Lonza 4D Nucleofector™装置进行电穿孔。例如,可以使用Amaxa P3原代细胞96孔Nucleofector™试剂盒或P3原代细胞4D-Nucleofector X试剂盒S进行电穿孔。在一些情形中,通过将细胞重悬在适当的电穿孔缓冲液(例如,具有缓冲液补充剂的Amaxa缓冲液P3),将细胞放置在电穿孔室中,并且对细胞进行电穿孔而进行电穿孔。在一些情形中,使用Nucleofector™装置,使用下述程序中的任一个,对活化的T细胞进行电穿孔:EH-115,CA-137,DS-150,CM-138,DS-120,CM-137,EH-100,CM-150,E0-100,DN-100,EN-138,DS-138,EN-150,DS-137,EW-113,或DS-130。在一些情形中,可以使用Nucleofector™装置应用EH-115程序对活化的T细胞进行电穿孔。在一些情形中,可以使用Nucleofector™装置应用下述程序中的任一种将幼稚T细胞进行电穿孔:EH-100,DN-100,E0-100,EN-138,EW-113,或EN-150。在一些情形中,可以使用Nucleofector™装置应用EH-100或DN-100程序将幼稚T细胞电穿孔。

[0094] 电穿孔可以通过将包含Cas9或Cas9核糖核蛋白和细胞的反应混合物放置在位于阴极与阳极之间室中并在所述阴极与阳极之间施加电压电位。所述电压电位可以为约20kV/m至约100kV/m。在一些情形中,所述电压电位为约30kV/m至约90kV/m,约30kV/m至约80kV/m,约30kV/m至约70kV/m,约30kV/m至约60kV/m,约40kV/m至约60kV/m,约45至约55或60kV/m,或约50至约55kV/m。在一些情形中,所述电压电位为至少约20kV/m,30kV/m,40kV/m,50kV/m,53kV/m,60kV/m,70kV/m,80kV/m,90kV/m,或100kV/m。在一些情形中,所述电压电位为,或约为,0.5,0.75,1,1.2,1.3,1.4,1.5,1.6,1.7,1.8,1.9,2,2.1,2.2,2.3,2.4,或2.5kV。在一些情形中,所述电压电位为约0.5至约2kV,约0.75至约2kV,约1至约2kV,约1.1至约1.9kV,约1.2至约1.8kV,约1.3至约1.7kV,约1.4至约1.7kV,或约1.5至约1.7kV。

[0095] 所述电压电位可以作为脉冲或连续地施加。对于连续的电压施加,可以使用泵或其他液体处理装置使所述反应混物流过电极室。在一些情形中,所述反应混物流过电

极室一次。备选地,所述反应混合物可以通过电极室回流。对于脉冲电压施加,可以优化脉冲长度、脉冲次数和脉冲之间的持续时间,以实现Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的高效率递送。

[0096] 所述电压电位可以作为脉冲施加一次或多次。在一些情形中,所述电压电位脉冲1至10次,1至9次,1至8次,1至7次,1至6次,1至5次,或1至4次。在一些情形中,所述电压电位脉冲2至9次,2至8次,2至7次,2至6次,2至5次,或2至4次。在一些情形中,所述电压电位脉冲1,2,3,4,5,6,7,8,9或10次。

[0097] 所述电压电位脉冲长度可以为1至100ms,2至90ms,3至80ms,4至70ms,5至60ms,5至50ms,5至40ms,6至30ms,7至20ms,或8至15ms。在一些情形中,脉冲长度为,或约为,1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,70,75,80,85,90,95,或100ms。

[0098] 在一些情形中,电压脉冲被限定持续时间的休息期(rest period)中断。在一些情形中,所述休息期为与本文所述的任一前述脉冲长度相等的长度。在一些情形中,所述休息期显著长于所述脉冲长度。例如,反应混合物可以进行电压脉冲,恢复1,2,5,10,15,20,或30分钟,或更久,并且再次施加电压脉冲。在一些情形中,多次电压脉冲的幅度、持续时间或休息期是可变的。例如,第一脉冲可以是比第二脉冲更高的电压电位,或更长的持续时间,或反之亦然。

[0099] 使用纳米线或纳米管引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的方法、组合物和装置可以包括在Proc Natl Acad Sci U S A.2010年2月2日;107(5):1870-1875;美国专利申请公布号2012/0094382;和2013/0260467;以及WO/2014/031173中所述的那些。通常,将Cas9蛋白或Cas9核糖核蛋白复合物包被到一个或多个纳米线或纳米管上,并且与反应混合物中的细胞接触。纳米线或纳米管可以刺穿细胞膜,由此递送所述Cas9蛋白或Cas9核糖核蛋白复合物。

[0100] 用于挤压细胞或使细胞变形从而引入Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的方法、组合物和装置可以包括本文所述的这些。另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括Nano Lett.2012年12月12日;12(12):6322-7;Proc Natl Acad Sci U S A.2013年2月5日;110(6):2082-7;J Vis Exp.2013年11月7日;(81):e50980;和Integr Biol(Camb).2014年4月;6(4):470-5中所述的那些。另外的或备选的方法、组合物和装置可以包括美国专利申请公布号2014/0287509所述的那些。通常,将Cas9蛋白或Cas9核糖核蛋白复合物提供在包含细胞的反应混合物中,并且迫使所述反应混合物通过细胞变形孔或压缩物。在一些情形中,压缩物小于细胞的直径。在一些情形中,压缩物包含细胞变形构件,如强静电荷区、疏水区、或包含纳米线或纳米管的区域。所述迫使可以在细胞的细胞膜中引入瞬时的孔,允许Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物通过所述瞬时的孔进入细胞。在一些情形中,甚至当细胞处在未分裂状态时,挤压细胞或使细胞变形以引入Cas9或Cas9核糖核蛋白也可以是有效的。

[0101] 用于将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物引入到细胞中的方法包括形成包含Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的反应混合物,并且使所述细胞与Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物接触,从而诱导受体-介导的内化。例如,用于受体介导的内化的组合物和方法记述在Wu等人,J.Biol.Chem.262,4429-4432(1987);和Wagner等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,3410-3414(1990)中。一般地,所述受体-介导的内化受细胞表面受体与融合在Cas9上或融合在

Cas9核糖核蛋白复合物上(例如,共价连接或融合到Cas9核糖核蛋白复合物中的导向RNA上)的配体之间的相互作用调控。所述配体可以是与细胞表面上的受体结合或被其识别的任意的蛋白、小分子、聚合物或其片段。示例性的配体是抗体或抗体片段(例如,scFv)。

[0102] 例如,Cas9蛋白可以是Cas9核酸酶结构域与抗-CD3scFv之间的融合体。scFv可以结合T细胞共同受体CD3,其表达在T细胞上,并且诱导受体-介导的Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物内化。其他适当的受体靶标包括,但不限于,靶细胞上的任意细胞表面蛋白。在一些情形中,适当的受体靶标是在靶细胞表面上表达的异源受体(例如,通过向所述靶细胞中引入重组核酸产生的受体)。在向T细胞递送的情形中,所述受体可以是在T细胞表面上表达的任意细胞表面蛋白,如CD28,CTLA-4,PD-1,整联蛋白,凝集素受体,细胞因子受体,或趋化因子受体。在向其他免疫细胞(如巨噬细胞、树突细胞、单核细胞等)递送的情形中,所述受体可以是在靶标巨噬细胞、树突细胞、单核细胞等的表面上的细胞表面蛋白。

[0103] 在一些情形中,融合体是可切割的融合体。在一些情形中,融合体是在细胞表面上被切割或在受体介导的内化时被切割的可切割的融合体。例如,融合体可以包含在配体与Cas9蛋白之间的接头,所述接头是包含一个或多个用于细胞内或膜结合的蛋白酶的切割位点的肽。作为另一个实例,融合体可以包含酯键,所述键在存在一种或多种膜结合的或细胞内酯酶的条件下不稳定。

[0104] 在一些情形中,Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物在体外与用于受体-介导的内化的配体缀合。本领域中已知多种用于向蛋白或核酸缀合小分子、肽和聚合物配体的体外方法。例如,Cas9核酸酶可以在C端融合到分选酶识别位点(例如,LPXTG)上,并且配体可以包含具有游离N端的寡甘氨酸基序。当向Cas9-配体混合物或Cas9核糖核蛋白与配体的混合物中加入分选酶时,Cas9蛋白与配体通过天然肽键共价连接。

[0105] 在一些实施方案中,使用细胞穿透肽将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物引入到细胞中。在一些情形中,所述细胞穿透肽诱导受体-介导的内化。在另一些情形中,细胞穿透肽刺穿细胞膜。在一些情形中,细胞穿透肽形成用于进入细胞的瞬时倒转的胶束结构。一种或多种细胞穿透肽、或一个或多个拷贝的细胞穿透肽、或它们的组合,可以与Cas9、Cas9核糖核蛋白复合物或导向RNA融合。

[0106] 示例性的细胞穿透肽可以包括HIV TAT,TAT2-M1,MPG,PEP-1,穿透素(penetratin),transportan,聚精氨酸,CADY,或它们的衍生物、类似物和突变体。示例性的细胞穿透肽还可以包括美国专利号8575305;8772449;8389481;8691528;8372951;或8614194中所述的那些。细胞穿透肽的小分子模拟物也可以用在本文所述的方法中,用来递送Cas9或Cas9核糖核蛋白,诸如在Nature Methods,4(2).第153-159页(2007)中所述的那些。

[0107] 在本文所述的Cas9或Cas9 RNP引入方法之一(例如,电穿孔)之前,可以刺激(例如,通过接触可溶的或固体表面固定的抗-CD3抗体、抗-CD28抗体或它们的组合)或不刺激细胞(例如,T细胞)。在一些情形中,在本文所述的Cas9或Cas9 RNP引入方法之一(例如,电穿孔)之后,可以刺激(例如,通过接触可溶的或固体表面固定的抗-CD3抗体、抗-CD28抗体或它们的组合)或不进行刺激温育所述细胞(例如,T细胞)。在一些情形中,适当的细胞因子(例如,IL-2)可以在与Cas9或Cas9 RNP引入试剂(例如,电穿孔缓冲液)混合之前与细胞接触,或者在Cas9或Cas9 RNP引入之后与细胞接触,或者它们的组合。

[0108] B.Cas9

[0109] 递送的Cas9蛋白,不管是作为apo蛋白还是与RNA复合,可以采用活性内切核酸酶的形式,使得当与作为具有导向RNA的复合物的一部分的靶标核酸结合时,将双链断裂引入到所述靶标核酸中。该双链断裂可以通过NHEJ引入随机的突变或通过HDR引入特定的突变进行修复。多种Cas9核酸酶可以用在本文所述的方法中。例如,可以使用Cas9核酸酶,其需要紧接在导向RNA所靶向的区域的3'的NGG前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif,PAM)。所述Cas9核酸酶可以被靶向基因组中包含NGG序列的任意区域。作为另一个实例,具有正交PAM基序需求的Cas9蛋白可以用于不具有相邻NGG PAM序列的靶序列。具有正交PAM序列特异性的示例性的Cas9蛋白包括,但不限于,CFP1,在Nature Methods 10,1116-1121 (2013)中所述的那些,和在Zetsche等人,Cell,Volume 163,Issue 3,第759-771页,2015年10月22日中所述的那些。

[0110] 在一些情形中,Cas9蛋白是切口酶,使得当与作为具有导向RNA的复合物的一部分的靶标核酸结合时,向所述靶标核酸中引入单链断裂或切口。一对Cas9切口酶(分别结合结构上不同的导向RNA)可以被靶向靶标基因组区域的两个邻近的位点,并且由此向所述靶标基因组区域引入一对邻近的单链断裂。切口酶对可以提供提高的特异性,原因在于脱靶效应可能导致单个切口,单个切口通常通过碱基-切除修复机制而无损伤地修复。示例性的Cas9切口酶包括具有D10A或H840A突变的Cas9核酸酶。

[0111] 在一些情形中,Cas9蛋白处于核酸酶无活性形式。例如,Cas9蛋白可以采用与另一种辅助蛋白或效应子结构域融合的无核酸酶活性形式。因此,与导向RNA复合的Cas9核酸酶可以行使功能使所述辅助蛋白、效应子结构域或其活性靶向靶标基因组区域。在一些情形中,无核酸酶活性的Cas9蛋白与内切核酸酶或切口酶融合。例如,无核酸酶活性的Cas9可以与专有的异二聚体内切核酸酶或切口酶(例如,Fok I内切核酸酶的专有的异二聚体)融合。与专有的异二聚体核酸酶的相应成员融合的一对此种无核酸酶活性的内切核酸酶可以用来以提高的特异性将内切核酸酶活性定位在靶标基因组区域。示例性的Cas9异二聚体内切核酸酶融合体包括在Nat Biotechnol.2014年6月;32(6):577-582中所述的那些。

[0112] 在一些情形中,Cas9蛋白,诸如无核酸酶活性的Cas9蛋白,可以用于调节基因表达或修饰染色质结构。在一些情形中,无核酸酶活性的Cas9蛋白可以与靶向基因或基因的启动子的导向RNA形成复合物。由此,所述无核酸酶活性的Cas9蛋白可以干扰转录因子的结合或其他的转录机制,并且因此下调靶基因的转录。使用多种结构上不同的靶向相同基因或启动子区域或它们的组合的导向RNA可以用来进一步减少靶基因的转录。

[0113] 作为另一个实例,Cas9蛋白,如无核酸酶活性的Cas9蛋白,可以与转录激活剂或阻抑剂融合,从而调节靶基因的转录。示例性的激活剂包括,但不限于,一个或多个拷贝的VP8、VP16、VP64、或p65激活结构域(p65AD)。示例性的阻抑剂包括,但不限于,KRAB结构域,染色质遮蔽结构域,SID结构域,或EAR-抑制结构域(SRDX)。转录激活剂或阻抑剂可以进行优化,以用于在宿主细胞中有效的活性或提高的稳定性。

[0114] 在一些情形中,Cas9核酸酶,诸如无核酸酶活性的Cas9核酸酶,可以与一种或多种效应子结构域融合,所述效应子结构域调节DNA甲基化、组蛋白甲基化或脱甲基化、组蛋白脱乙酰基化、RNA polIII磷酸化,或促进核小体压实性增加,如通过减少的DNA酶I超敏性或降低的微球菌(micrococcal)核酸酶可及性测量的。可能促进转录的活化效应子结构域或

酶的组合可能包括DNA脱甲基酶、组蛋白脱甲基酶或甲基酶、组蛋白乙酰基转移酶、RNA polIII磷酸酶或减少核小体压实性(如通过增加的DNA酶I超敏性或增加的微球菌核酸酶可及性测量的)或促进远端增强子元件与近端启动子元件之间的天然或非天然的染色体成环的酶或效应子结构域。可能阻抑转录的阻抑剂效应子结构域或酶的组合可能包括DNA甲基酶、组蛋白脱甲基酶或甲基酶、组蛋白脱乙酰基酶、RNA polIII脱磷酸化酶或增加核小体压实性(如通过降低的DNA酶I超敏性或降低的微球菌核酸酶可及性测量的)或抑制在远端增强子元件与近端启动子元件之间的染色体成环的酶或效应子结构域。

[0115] Cas9核酸酶可以与一种或多种核易位序列融合。使用N-端、C-端或内部核易位序列或一种或多种融合在与Cas9核酸酶融合的结构域或辅助蛋白上的核易位序列能够增强Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物向细胞核的递送。将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的递送导向细胞核能够增加由向所述细胞中引入Cas9或Cas9核糖核蛋白提供的基因组编辑或转录控制的水平。

[0116] 用于将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物引入到细胞中的反应混合物可以具有约0.25 μ M至约5 μ M,约0.5 μ M至约2.5 μ M,或约0.9 μ M至约1.8 μ M的Cas9或Cas9核糖核蛋白浓度。Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的浓度可以是下述浓度或约为下述浓度:0.25 μ M,0.3 μ M,0.4 μ M,0.5 μ M,0.6 μ M,0.7 μ M,0.8 μ M,0.9 μ M,1 μ M,1.1 μ M,1.2 μ M,1.3 μ M,1.4 μ M,1.5 μ M,1.6 μ M,1.7 μ M,1.8 μ M,1.9 μ M,2 μ M,2.1 μ M,2.2 μ M,2.3 μ M,2.4 μ M,2.5 μ M,或更高。在一些情形中,Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物的浓度低于下述浓度或约低于下述浓度:5 μ M,4 μ M,或3 μ M。

[0117] 用于将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物引入到细胞中的反应混合物可以包含约 1×10^5 至约 4×10^5 个靶细胞,约 1.5×10^5 至约 3.5×10^5 个靶细胞,约 1.75×10^5 至约 3×10^5 个靶细胞,或约 2×10^5 至约 2.5×10^5 个靶细胞。在一些情形中,反应混合物中细胞的浓度为约 0.5×10^4 至约 5×10^4 个靶细胞/ μ L,约 0.75×10^4 至约 4×10^4 个靶细胞/ μ L,约 1×10^4 至约 3×10^4 个靶细胞/ μ L,约 1.5×10^4 至约 2.5×10^4 或 3×10^4 个靶细胞/ μ L,或约 1.8×10^4 至约 2.3×10^4 个靶细胞/ μ L。

[0118] C. 模板核酸

[0119] 在一些实施方案中,用于将Cas9或Cas9核糖核蛋白复合物引入到细胞中的反应混合物可以包含用于引导靶基因组区域中Cas9介导的、或Cas9融合体介导的切割或切口的同源定向修复(HDR)的核酸。模板核酸通常是双链或单链DNA寡核苷酸。在一些情形中,所述模板核酸是单链寡核苷酸DNA模板(ssODT)。

[0120] 所述模板核酸在长度上可以包含15个碱基(b)或碱基对(bp)至约5千碱基(kb)或千碱基对(kbp)(例如,长度为约50,75,或100b或bp至约110,120,125,150,200,225,或250b或bp)。通常较长的模板核酸以环形或线性化质粒的形式或作为载体的成分(例如,作为病毒载体的成分)或其扩增或聚合产物的形式提供。较短的模板核酸提供为单链或双链寡核苷酸。示例性的单链或双链模板寡核苷酸长度为,或至少为约15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,110,115,120,125,150,175,200,225,或250b或bp。所述模板寡核苷酸可以包含一个或两个与邻近或侧连靶标切割位点的区域相同或基本上相同的(例如,侧连同源臂)同源臂。在一些情形中,同源臂长度为25至约90个核苷酸。例如,同源臂长度可以为约25,30,

35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,110,115,或120个核苷酸。

[0121] 模板核酸可以以约1 μ M至约200 μ M、约2 μ M至约190 μ M、约2 μ M至约180 μ M、约5 μ M至约180 μ M、约9 μ M至约180 μ M、约10 μ M至约150 μ M、约20 μ M至约140 μ M、约30 μ M至约130 μ M、约40 μ M至约120 μ M、或约45或50 μ M至约90或100 μ M的浓度提供在反应混合物中,以用于引入到细胞中。在一些情形中,模板核酸可以以下述浓度或大约以下述浓度提供在反应混合物中,以用于引入到细胞中:1 μ M,2 μ M,3 μ M,4 μ M,5 μ M,6 μ M,7 μ M,8 μ M,9 μ M,10 μ M,11 μ M,12 μ M,13 μ M,14 μ M,15 μ M,16 μ M,17 μ M,18 μ M,19 μ M,20 μ M,25 μ M,30 μ M,35 μ M,40 μ M,45 μ M,50 μ M,55 μ M,60 μ M,70 μ M,80 μ M,90 μ M,100 μ M,110 μ M,115 μ M,120 μ M,130 μ M,140 μ M,150 μ M,160 μ M,170 μ M,180 μ M,190 μ M,200 μ M,或更高。

[0122] 在一些情形中,在存在模板核酸(例如,ssODT)的条件下,模板定向的和NHEJ基因组编辑的效率可以至少是或至少约为20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,99%,或更高。在一些情形中,通过HDR掺入模板核酸(例如,ssODT)的序列的效率可以至少是或至少约为5%,6%,7%,8%,9%,10%,11%,12%,13%,14%,15%,16%,17%,18%,19%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,95%,99%,或更高。

[0123] 模板核酸可以包含宽泛种类的不同序列。在一些情形中,与切割和HDR之前的靶标基因组区域相比,模板核酸编码终止密码子或移码。所述模板核酸可用于敲除或灭活基因或其部分。在一些情形中,与靶标基因组区域相比,模板核酸编码一个或多个错义突变或框内插入或缺失。所述模板核酸可用于改变靶基因或其部分的表达水平或活性(例如,配体特异性)。

[0124] 例如,模板核酸可以用于替代T细胞受体链或抗体基因的一个或多个互补决定区或其部分。所述模板核酸因此能够改变靶细胞的抗原特异性。例如,可以改变靶细胞识别并且由此引发针对肿瘤抗原或传染病抗原的免疫应答。

[0125] 作为另一个实例,模板核酸可以编码野生型序列,以恢复靶标内源基因或蛋白的表达水平或活性。例如,包含在FoxP3基因中或其启动子区域中的突变的T细胞可以被恢复以治疗X染色体连锁的IPEX或系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)。备选地,模板核酸可以编码导致更低的靶基因表达或活性的序列。例如,通过缺失或减少制备用于免疫治疗癌症或传染病靶标的T细胞中的FoxP3的表达或活性,可以实现增加的免疫治疗性响应。

[0126] 作为另一个实例,模板核酸可以编码改变靶基因的功能的突变。例如,模板核酸可以编码病毒识别或进入必需的细胞表面蛋白的突变。所述突变可以减少病毒识别或感染靶细胞的能力。例如,CCR5或CXCR4突变可以在CD4⁺T细胞中赋予增加的HIV感染抗性。

[0127] 在一些情形中,模板核酸编码这样的序列,即,尽管邻近或侧连充分的同源区域,所述序列完全与内源性序列正交(orthogonal)。例如,模板核酸可以编码与靶基因的内源性启动子不相关的诱导型启动子或阻抑剂元件。诱导型启动子或阻抑剂元件可以插入到靶基因的启动子区域,以提供对所述靶基因表达或活性的暂时的和/或空间上的控制。作为另一个实例,模板核酸可以编码自杀基因、报告基因或变阻基因(rheostat gene)或其部分。自杀基因可以用于在成功的治疗后从宿主去除抗原特异性的免疫治疗细胞。变阻基因可以用于调节免疫治疗过程中免疫应答的活性。报告基因可以用于在引入到宿主中后在体外或

体内监测细胞的数目、位置和活性。

[0128] 示例性的变阻基因是免疫关卡基因。一种或多种免疫关卡基因的表达或活性的增加或减少可以用于调节免疫治疗过程中免疫应答的活性。例如,免疫关卡基因可以在表达上提高,导致减少的免疫应答。备选地,免疫关卡基因可以被灭活,导致增加的免疫应答。示例性的免疫关卡基因包括,但不限于,CTLA-4和PD-1。另外的变阻基因可以包括调节靶细胞的增殖或效应子功能的任意基因。所述变阻基因包括转录因子、趋化因子受体、细胞因子受体、或参与共同抑制途径的基因,如TIGIT或TIMs。在一些情形中,所述变阻基因是合成的或重组的与细胞信号传导机制相互作用的变阻基因。例如,合成的变阻基因可以是药物依赖性或非依赖性的抑制或激活细胞信号传导的分子。此类合成的基因记述在,例如,Ce11155 (6):1422-34 (2013);和Proc Natl Acad Sci U S A.2014年4月22日;111 (16):5896-901 中。

[0129] 示例性的自杀基因包括,但不限于,胸苷激酶、1型单纯疱疹病毒胸苷激酶 (HSV-tk)、细胞色素P450同工酶4B1 (cyp4B1)、胞嘧啶脱氨酶、人叶酰聚谷氨酸合酶 (fpgs),或诱导型casp9。在一些实施方案中,自杀基因选自由下述组成的组:编码HSV-1胸苷激酶(缩写为HSV-tk)、剪接校正的HSV-tk(缩写为cHSV-tk,参见Fehse B等人,Gene Ther (2002) 9 (23):1633-1638)的基因,编码高度丙氧鸟苷(Gancyclovir)-敏感性的HSV-tk突变体(其中在位置75的残基和/或在位置39的残基被突变的突变体)的基因(参见Black ME等人Cancer Res (2001) 61 (7):3022-3026;和Qasim W等人,Gene Ther (2002) 9 (12):824-827)。可使用除基于胸苷激酶的基因之外的自杀基因代替。例如,编码下述的基因可以用作自杀基因:人CD20(临床等级的单克隆抗体(如利妥昔单抗® (Rituximab®))的靶标;参见Serafini M等人,Hum Gene Ther.2004;15:63-76.),诱导型胱天蛋白酶(例如:与人FK506结合蛋白(FKBP)融合的修饰的人胱天蛋白酶9,以允许使用小分子药物的条件性二聚化;参见Di Stasi A等人,N Engl J Med.2011年11月3日;365 (18):1673-83;Tey SK等人,Biol Blood Marrow Transplant.2007年8月;) '3 (8):9'3-24.Epub 2007年5月29日)和FCU1(其将无毒的药物前体5-氟胞嘧啶或5-FC转化为其高度细胞毒性的衍生物5-氟尿嘧啶或5-FU和5'-氟尿苷-5'单磷酸酯或5'-FUMP;Breton E等人,C R Biol.2010年3月;333 (3):220-5.Epub 2010年1月25日.)。

[0130] 在一些实施方案中,模板核酸编码重组抗原受体、其部分或其组分。重组抗原受体、其部分和成分包括记述在美国专利申请公布号2003/0215427;2004/0043401;2007/0166327;2012/0148552;2014/0242701;2014/0274909;20140314795;2015/0031624;和国际申请公布号:W0/2000/023573;和W0/2014/134165中的那些。所述重组抗原受体可以用于靶向特定的肿瘤相关的或传染病相关的抗原的免疫治疗。在一些情形中,本文所述的方法可以用于敲除内源性抗原受体,诸如T细胞受体,B细胞受体,或其部分或成分。本文所述的方法还可以用于敲入重组抗原受体,其部分或成分。在一些实施方案中,内源性受体被敲除并且用重组受体(例如,重组T细胞受体或重组嵌合抗原受体)替代。在一些情形中,重组受体插入在内源性受体的基因组位置中。在一些情形中,重组受体插入在与内源性受体相比是不同的基因组位置中。

[0131] D. 靶标基因组区域

[0132] 本文所述的方法和组合物可以用于基本上靶向宿主细胞的任意基因组序列。靶向

可以导致至少部分靶标基因组序列的突变或替换。备选地,靶向可以导致在靶标基因组区域内和/或附近的染色质的修饰,例如,通过招募染色质修饰效应子蛋白进行。所述染色质修饰可以用来增加或减少处在所述靶标基因组区域或附近的基因的转录。作为另一个备选方案,靶向可以通过招募阻抑剂(例如,KRAB)或激活剂(例如,VP64)结构域至靶标基因组区域而抑制或激活处在所述靶标基因组区域或附近的基因。

[0133] 示例性的靶标基因组区域包括处在PD-1基因或CTLA-4基因内或附近的区域。PD-1和CTLA-4是免疫关卡基因,并且调节或消除一种或多种所述基因能够用于控制靶细胞的免疫原活性。示例性的靶标基因组区域包括在编码用于病毒识别或进入的受体的基因内或附近的区域。例如,CCR5或CXCR4基因可以被靶向,从而突变或下调这些受体,并且由此在被靶向的细胞中赋予HIV感染抗性。

[0134] 示例性的靶标基因组区域包括处在编码参与细胞运输和靶标搜寻(target homing)或靶标识别的蛋白的基因内或附近的区域。所述基因包括,但不限于,T细胞和B细胞受体,T细胞趋化因子受体,如CXCR4,CCR9,CCR7,模式识别受体,皮肤淋巴细胞受体,CD34,L-选择蛋白,CD28,和GLYCAM-1。

[0135] 示例性的靶标基因组区域包括含有参与疾病、与疾病相关或引起疾病的突变的基因。例如,可以靶向处于编码FOXP3的基因处或附近的靶标基因组区域,以增加会恢复FOXP3功能,并且由此治疗患有自身免疫疾病(如IPEX)的患者。作为另一个实例,可以靶向处于编码IL2RA的基因处或附近的靶标基因组区域,以增加或恢复IL2RA功能,并且由此治疗患有自身免疫疾病的患者。作为另一个实例,可以靶向处于编码IL2RG的基因处或附近的靶标基因组区域,以增加或恢复IL2RG功能,并且由此治疗患有免疫缺陷(诸如严重的联合免疫缺陷(severe combined immunodeficiency))的患者。作为另一个实例,可以靶向处于编码GATA2的基因处或附近的靶标基因组区域,以增加或恢复GATA2功能,并且由此治疗患有MonoMAC的患者。

[0136] E. 导向RNA

[0137] 本文所述的是导向RNA和导向RNA的文库。所述导向RNA从5'至3'可以包含:结合区,5'发夹区,3'发夹区,和转录终止序列。可以设置导向RNA与Cas9蛋白形成稳定的且有活性的复合物。在一些情形中,优化导向RNA,从而增加编码所述导向RNA的多核苷酸在宿主细胞中的表达。

[0138] 5'发夹区长度可以为约15个至约50个核苷酸(例如,长度约15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49或约50个核苷酸)。在一些情形中,5'发夹区长度为约30-45个核苷酸(例如,长度约31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44或45个核苷酸)。在一些情形中,5'发夹区长度为、或至少为约31个核苷酸(例如,长度至少约31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44或45个核苷酸)。在一些情形中,5'发夹区包含一个或多个环或凸出部分,每个环或凸出部分约为1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10个核苷酸。在一些情形中,5'发夹区包含约10-30个互补碱基对(例如,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,或30个互补碱基对)的茎。

[0139] 在一些实施方案中,5'发夹区可以包含结合蛋白或结合小分子的结构。在一些情形中,5'发夹功能(例如,与Cas9蛋白相互作用或组装)可以被药物、生长因子、小分子配体、

或与5'茎-环的蛋白结合结构结合的蛋白条件性激活。在一些实施方案中,5'发夹区可以包含非天然核苷酸。例如,可以掺入非天然核苷酸,从而增强蛋白-RNA相互作用,或者增加导向RNA的热稳定性或降解抗性。

[0140] 导向RNA可以包含5'与3'发夹区之间的间插序列。5'与3'发夹区之间的间插序列长度可以为约0至约50个核苷酸,优选长度为约10-约50个核苷酸(例如,长度为,或长度约为10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,或50个核苷酸)。在一些情形中,间插序列设计为线性的、非结构性的、基本上线性的或基本上非结构性的。在一些实施方案中,间插序列可以包含非天然的核苷酸。例如,可以掺入非天然的核苷酸,以增强蛋白-RNA相互作用或增加导向RNA:Cas9核糖核蛋白复合物的活性。作为另一个实例,可以掺入天然核苷酸,以增强导向RNA的热稳定性或降解抗性。

[0141] 3'发夹区可以包含约3,4,5,6,7,或8个核苷酸的环和约4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,或25个核苷酸或更长的茎。在一些情形中,3'发夹区可以包含蛋白-结合、小分子-结合、激素-结合或代谢物-结合结构,所述结构可以条件性稳定导向RNA的二级和/或三级结构。在一些实施方案中,3'发夹区可以包含非天然核苷酸。例如,可以掺入非天然的核苷酸,以增强蛋白-RNA相互作用或增加导向RNA:Cas9核糖核蛋白复合物的活性。作为另一个实例,可以掺入天然核苷酸,以增强导向RNA的热稳定性或降解抗性。

[0142] 在一些实施方案中,导向RNA包括在其3'端的终止结构。在一些情形中,导向RNA包括另外的3'发夹区,例如,在终止之前和在第一3'发夹区之后,其可以与蛋白、小分子、激素等相互作用,用于稳定或另外的功能性,诸如条件性稳定或条件性调节导向RNA:Cas9核糖核蛋白的组装或活性。

[0143] 一般地,结合区被设计为互补的或基本上互补的,并且由此结合或杂交一个靶标基因组区域或一组靶标基因组区域。在一些情形中,结合区可以掺入摆动碱基或简并碱基,以结合多个靶标基因组区域。在一些情形中,结合区可以互补在一组靶标基因组区域中保守的序列,从而结合多种靶标基因组区域。在一些情形中,结合区可以改变,从而增加稳定性。例如,可以掺入非天然核苷酸,从而增加RNA的降解抗性。在一些情形中,结合区可以被改变或设计为避免或减少结合区中的二级结构形成。在一些情形中,可以设计结合区以优化G-C含量。在一些情形中,G-C含量优选为约40%-约60%(例如,40%,45%,50%,55%,60%)。在一些情形中,可以选择结合区,从而以促进导向RNA有效转录的序列起始。例如,结合区在5'端可以以G核苷酸起始。在一些情形中,结合区可以包含修饰的核苷酸,诸如,但不限于,甲基化的或磷酸化的核苷酸。

[0144] 导向RNA可以通过本领域已知的方法进行修饰。在一些情形中,修饰可以包括,但不限于,添加下述序列元件中的一种或多种:5'帽(例如,7-甲基鸟苷酸帽);3'多腺苷酸化尾;核糖开关(riboswitch)序列;稳定性控制序列;发夹;亚细胞定位序列;检测序列或标记;或针对一种或多种蛋白的结合位点。修饰也可以包括引入非天然核苷酸,所述非天然核苷酸包括,但不限于,下述中的一种或多种:荧光核苷酸和甲基化核苷酸。

[0145] 在一些实施方案中,选择导向RNA,从而不具有显著的脱靶效应。在一些情形中,可以确定关于脱靶遗传元件序列的导向RNA结合区的相似性。可以去除具有超过预先指定的

阈值的与一种或多种脱靶基因组区域的高相似性的针对靶标基因组区域的导向RNA。在一些情形中,候选结合区,包括前间区序列邻近基序(PAM)序列,可以使用评分度量法以人工或自动化方式评分。然后,可以选择具有可接受数量的脱靶错配的导向RNA结合区。

[0146] 在一些实施方案中,使sgRNA靶向处在基因处或附近的特定区域。例如,可以使sgRNA靶向处在基因的转录起始位点的5' (上游) 0-750bp区处或其附近的区域。在一些情形中,导向RNA:Cas9核糖核蛋白复合物对该区域的0-750bp靶向可以提供转录激活,或提供增加的转录激活。例如,细胞可以与融合到转录激活剂或表位融合结构域和导向RNA或导向RNA文库上的Cas9结构域接触,所述导向RNA或导向RNA文库靶向一种或多种基因的转录起始位点的5' 的0-750bp区域。

[0147] 作为另一个实例,导向RNA可以被靶向处在基因的转录起始位点的3' (下游)的0-1000bp区域处或附近的区域。在一些情形中,导向RNA:Cas9核糖核蛋白复合物对该区域的0-1000bp靶向能够提供转录阻抑作用或提供增加的转录阻抑作用。例如,细胞可以与融合到转录阻抑剂或表位融合结构域和导向RNA或导向RNA文库上的dCas9接触,所述导向RNA或导向RNA文库靶向一种或多种基因的转录起始位点的3' 的0-1000bp区域。

[0148] 在一些实施方案中,导向RNA被靶向处在转录起始位点(TSS)处或附近的区域(基于自动化或人工标注的数据库)。例如,由Ensembl/Gencode或APPRIS流水线标注的转录体(Rodriguez等人,Nucleic Acids Res.2013年1月;41(数据库期号):D110-7)可以用来鉴定TSS和TSS上游0-750bp(例如,用于靶向一个或多个转录激活剂结构域)或下游0-1000bp(例如,用于靶向一个或多个转录阻抑剂结构域)的靶标遗传元件。

[0149] 在一些实施方案中,sgRNA被靶向预测相对不含核小体的基因组区域。核小体的位置和占据率(occupancies)可以通过使用微球菌核酸酶(MNase)的酶促消化进行测定。微球菌核酸酶是一种内切-外切核酸酶,其优先消化裸DNA和在核小体之间的接头中的DNA,由此富集核小体相连的DNA。为了确定基因组范围的核小体组织,使用高通量测序技术(MNase-seq),对微球菌核酸酶消化剩余的DNA测序。因此,预测具有高MNase-seq信号的区域相对被核小体占据,并且预测具有低MNase-seq信号的区域相对不被核小体占据。因此,在一些实施方案中,sgRNA被靶向具有低MNase-Seq信号的基因组区域。

[0150] 在一些情形中,导向RNA被靶向预测是高度转录活跃的区域。例如,导向RNA可以被靶向预测关于RNA聚合酶II(PolIII)具有相对高的占据率的区域。此类区域可以通过PolIII染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)进行鉴定,其包括使用抗-PolIII抗体亲和纯化与PolIII结合的DNA区域并且通过测序鉴定所纯化的区域。因此,预测具有高PolIII ChIP-seq信号的区域是高度转录活跃的。因此,在一些情形中,导向RNA被靶向具有高PolIII ChIP-seq信号的区域,如ENCODE-公布的PolIII ChIP-seq数据库所公开的(Landt,等人.,Genome Research,2012年9月;22(9):1813-31)。

[0151] 作为另一个实例,sgRNA可以被靶向通过运行测序(run-on sequencing)或整体运行测序(global run-on sequencing(GRO-seq))预测为高度转录活跃的区域。GRO-seq包括将细胞或细胞核与标记的核苷酸和抑制新RNA聚合酶与转录起始位点结合的试剂(例如,肌氨酰)一起温育。因此,仅具有被结合的RNA聚合酶的基因产生标记的转录物。在允许全面转录进行的充分的时间期后,提取标记的RNA,并且通过测序鉴定相应的转录基因。因此,预测具有高GRO-seq信号的区域是高度转录活跃的。由此,在一些情形中,导向RNA靶向具有高

GRO-seq信号的区域,如在公布的GRO-seq数据中所公开的(例如,Core等人,Science.2008年12月19日;322(5909):1845-8;和Hah等人,Genome Res.2013年8月;23(8):1210-23)。

[0152] 在一些实施方案中,基于DNA序列基序、ChIP-seq、ATAC-seq和/或RNA-seq数据,导向RNA可以被靶向推定的调节序列(例如,推定的哺乳动物或人调节序列),诸如启动子、增强子、隔离体(insulator)、沉默基因、剪接调节子等。

[0153] 本文还描述了用于在宿主细胞中产生导向RNA的表达盒和载体。所述表达盒可以包含可操作性连接在编码导向RNA的多核苷酸上的启动子(例如,异源启动子)。所述启动子可以是诱导型或组成型的。所述启动子可以是组织特异性的。在一些情形中,所述启动子是U6,H1,或形成脾脏病灶病毒(spleen focus-forming virus,SFFV)长末端重复启动子。在一些情形中,与人延伸因子1启动子(EF1A)相比,所述启动子是弱的哺乳动物启动子。在一些情形中,所述弱的哺乳动物启动子是泛素C启动子或磷酸甘油酸酯激酶1启动子(PGK)。在一些情形中,在不存在诱导剂的条件下,所述弱的哺乳动物启动子是TetOn启动子。在一些情形中,当使用TetOn启动子时,宿主细胞还与四环素反式激活剂接触。在一些实施方案中,选择所选的导向RNA启动子的长度,以表达与所递送的Cas9的量成比例(例如,在约0.5-倍、1-倍、2-倍、5-倍、7.5-倍或10-倍以内)的量的导向RNA。表达盒可以在载体中,如在质粒、病毒载体、慢病毒载体等中。在一些情形中,表达盒在宿主细胞中。导向RNA表达盒可以是游离型的或整合在宿主细胞中的。

[0154] 本文还描述了用于通过体外转录产生导向RNA的表达盒和载体。

实施例

[0155] 提供下述实施例以举例说明所要求的发明,但并不限制所要求的发明。

[0156] 实施例1:

[0157] T细胞基因组改造对于癌症免疫治疗和用于HIV和自身免疫疾病的基于细胞的治疗具有巨大的希望,但是原代人T细胞的遗传操作还是效率低下的。本发明人已经开发了一种实现高效的Cas9递送的方法。该高效的Cas9递送可以用于高效的基因组编辑、基因沉默和染色质或染色体修饰。所递送的Cas9可以作为与导向RNA预先组装的复合物递送。这些活性Cas9核糖核蛋白(RNP)能够允许在原代人T细胞中的首次成功的Cas9-介导的同源定向修复(HDR)。由此,成熟的免疫细胞中的特异性核苷酸序列可以被高效替换——这是本领域中能够允许进行多样性研究和治疗应用的长久目标。这些研究建立了用于多样性实验和治疗性基因组改造应用的Cas9(例如,Cas9 RNP)技术,包括在原代人T细胞中以HDR进行的有效DNA序列替换。

[0158] 介绍

[0159] CRISPR/Cas9系统已经日益增多地用于编辑哺乳动物种系序列和细胞系(1,2)。正在进行相当多的尝试以在原代人组织中使用这种强大的系统,但是效率尚是有限的,尤其是在原代造血细胞中,诸如在人CD4⁺T细胞中。cas9和小导向RNA(sgRNA)的质粒递送在其他细胞型中是有效的,但是在CD4⁺T细胞中,仅去除1-5%(百分比)的靶蛋白表达(3)。在人T细胞中提高的消除关键靶标和校正致病性基因组序列的能力具有治疗应用,例如,允许离体编辑T细胞,然后重新引入到患者中。

[0160] 正在进行多个科学和临床试验,以用可用的技术操作T细胞基因组,所述技术包括

用转录激活剂样效应子核酸酶(Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN)和锌指核酸酶(ZFN)进行基因缺失,和通过病毒转导进行外源基因引入(4)。遗传操作已经尝试敲除T细胞中的HIV共同受体CXCR4和CCR5,从而获得HIV感染抗性(5-7)。在改造T细胞以识别并杀死血液学恶性病方面已有显著的成功,但是对于实体器官肿瘤的免疫治疗,另外的遗传修饰似乎是有必要的(8-10)。如果被靶向的T细胞基因组基因座可以用特异性替换序列校正,而不是删除,则其他治疗机会将是有可能的(11)。促进T细胞中的同源重组的稳健技术可以允许对影响专门的T细胞功能的突变的的治疗性校正,所述突变包括在患有免疫失调多内分泌腺病肠病X染色体连锁的综合征(Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome, IPEX)的患者中破坏调节T细胞(Treg)发育并且引起严重的多器官自身免疫疾病的突变(12,13)。

[0161] 最近的在哺乳动物细胞系中的报道证明Cas9核糖核蛋白(RNP;与体外转录的单一-导向RNA复合的重组Cas9蛋白)能够实现有效的且特异性的基因组编辑(14-16)。此处,本发明人证明可以高效地进行到原代造血细胞或原代造血干细胞的Cas9递送(例如,以Cas9 RNP的形式)。以与sgRNA的Cas9核糖核蛋白复合物的形式的高效Cas9递送导致CD4⁺T细胞高效的基因组编辑。本发明人不仅能够以随机插入和缺失突变消除CXCR4表达(减少多至70%的具有高CXCR4细胞表面表达的细胞数目;18%相对于在对照处理的细胞中的60%),而且本发明人还能够使用外源性单链DNA模板通过同源定向修复(HDR)在原代T细胞中引入精确靶向的基因组序列(减少多至98%的具有高细胞表面表达的细胞数目;1%相对于在对照处理的细胞中的60%)。这种遗传‘敲入’技术,之前没有报道在原代T细胞中的Cas9-介导的编辑,具有~15%的效率,并且解释大致一半的所观察到的基因组编辑,这证明其可以有效用于疾病相关的突变的的治疗性替换。此外,本发明人证明了使用Cas9 RNP技术进行基因操作来突变FOXP3(其编码Treg的主要转录因子)的功能性结果。Cas9 RNP允许多器官自身免疫疾病IPEX(其中FOXP3突变削弱调节T细胞分化)的人体外模型。这些研究建立了用于实验性和治疗性编辑原代人T细胞中的基因组的Cas9 RNP技术。

[0162] 结果

[0163] 我们目的在于克服原代T细胞中遗传操作的长久存在的挑战,并且建立稳健的基因组改造工具试剂盒。最近的在哺乳动物细胞系中的报道表明Cas9 RNP能够实现有效且特异性的基因组编辑(14-17)。鉴于使用Cas9的DNA递送进行有效的T细胞基因组编辑的显著挑战,我们检测了用于原代人T细胞中靶向的基因组编辑的RNP递送的功效(图1A)。

[0164] 用Cas9 RNP消除HIV共同受体CXCR4

[0165] T细胞改造的主要目的是靶向消除特定的细胞表面受体,包括用于HIV感染的共同受体和削弱肿瘤免疫应答的共同抑制性免疫关卡基因。此处,我们使Cas9 RNP编程靶向CXCR4的编码序列,其编码在CD4⁺T细胞上表达的作为HIV进入的共同受体的趋化因子受体(18,19)。我们纯化了重组酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9,其携带融合在C端的两个核定位信号序列(NLS)。将该Cas9蛋白与体外转录的单一-导向RNA(sgRNA)一起温育,所述单一-导向RNA(sgRNA)设计为独特地识别人CXCR4基因组序列(图1B)。将这些预先组装的RNP复合物电穿孔到由健康的捐赠者分离的人CD4⁺T细胞中(方法)。

[0166] CXCR4 Cas9 RNP的电穿孔引起有效的、位点特异性的基因组DNA编辑。在CXCR4基因中,Cas9 RNP-诱导的双链断裂可能通过非同源末端连接(NHEJ)修复,非同源末端连接是

细胞中的一种主要的DNA修复途径,其产生可变的插入和缺失(插入/缺失),并且通常导致移码突变(20)。流式细胞术揭示表达低水平CXCR4的T细胞的百分数的RNP剂量依赖性的增加,这与CXCR4基因的突变一致(图1C)。T7E1测定是一种评估基因组编辑的便利方法。此处,T7E1证实了在用CXCR4RNP处理的细胞中的基因组DNA编辑,但是在用没有与sgRNA复合的spCas9蛋白处理的对照细胞(CTRL)中没有这种编辑(图1D)。基于CXCR4表达,利用荧光激活的细胞分选(FACS)分离Cas9 RNP-处理的细胞,并且我们发现,与CXCR4^{hi}细胞(4-12%)相比,CXCR4^{lo}细胞中编辑的富集(15-17%)。对靶标CXCR4基因组基因座进行直接鉴定编辑事件的桑格测序表明T7E1测定低估了编辑效率。对CXCR4^{lo}细胞中CXCR4基因的测序表明8/9的克隆具有突变/缺失,而在CXCR4^{hi}和CTRL处理的CXCR4^{lo}细胞中,所述突变/缺失分别仅在4/10的克隆和0/9的克隆中观察到。在CXCR4^{hi}群体中观察到的编辑无一终止编码序列(一个错义突变和三个框内缺失),这与蛋白表达的维持相一致。相反,关于具有在所述基因座中更广泛的突变负担的细胞,富集CXCR4^{lo}群体(图1E)。这些发现表明Cas9RNP成功的基因组靶向和对人CD4⁺T细胞中蛋白表达的功能性影响。FACS能够纯化编辑的细胞,这为原代T细胞中的Cas9 RNP应用提供了另外有用的工具。

[0167] 使用同源定向修复(HDR)的有效的遗传‘敲入’

[0168] 外源模板-介导的HDR是用于精确的基因修饰的有力的技术,其允许特定变体序列的实验性和治疗性编辑。鉴于Cas9 RNP的高编辑效率,我们接下来检测我们能否在原代T细胞中实现外源模板-介导的HDR。我们使用具有90个核苷酸(nt)的同源臂的单链寡核苷酸DNA模板(ssODT)与在Cas9 RNP切割位点的CXCR4基因座重组(15)。设计ssODT以替代来自人参比基因组的12nt,并且引入新的HindIII限制酶切位点(图2A)。在四种不同浓度的ssODT(0,50,100和200pmol)存在下,将Cas9 RNP电穿孔到原代CD4⁺T细胞中。没有ssODT的Cas9 RNP同样减少CXCR4^{hi}细胞的百分数。值得注意的是,加入ssODT显著提高CXCR4消除的效率。在本文所示的实验中,使用100pmol ssODT和Cas9 RNP,我们能够在具有高细胞表面CXCR4表达的细胞数目方面获得多至98%的减少(1%相对于在对照处理的细胞中的60%)(图2B和C)。

[0169] 在用Cas9 RNP和ssODT处理的细胞中,观察到显著有效的HDR(图2D)。不使用ssODT,我们观察到24%的总编辑(定义为在Cas9切割位点产生插入/缺失的所有NHEJ和HDR事件的总和),如通过T7E1测定测量的。在存在50pmol ssODT的条件下,观察到多至33%的总编辑。以该浓度,通过靶标基因座的HindIII消化,观察到14%HDR,这表明>40%的编辑由HDR导致(其余~60%观察到的编辑可能是由NHEJ导致)。尽管HDR的百分数略低于100pmol ssODT(12%),但是计算出较高的HDR与总编辑之比(使用100pmol为0.48相对于使用50pmol为0.42)。在该条件下,接近完全的CXCR4染色丧失表明通过HDR引入的突变(84DLLFV88→84ESLDP88;SEQ ID NO:1和2)强烈影响CXCR4的细胞表面表达或其被抗体的识别(图2B和C)。在该实验中,使用200pmol ssODT,编辑效率减小。

[0170] 总编辑和HDR都可以通过分选CXCR4^{lo}群体进行富集,但是作用不如图1明显,这与在未分选的群体中更大分数的CXCR4^{lo}细胞相一致。注意到,在这些实验中,应用更严格的门控来分离具有最高CXCR4表达的细胞,并且在该CXCR4^{hi}群体中,没有观察到编辑。这些研究总体上证明与ssODT联用的Cas9 RNP在原代人T细胞中精确替换被靶向的DNA序列的能力。

[0171] FOXP3突变在Treg分化过程中的功能效应

[0172] 我们接着检测Cas9 RNP-介导的基因组编辑能否改变促炎性效应T细胞亚群与抑制性FOXP3⁺Treg之间的平衡,所述促炎性效应T细胞亚群与针对病原体和恶性病的保护作用相关,所述抑制性FOXP3⁺Treg是防止自身免疫性发展所必需的。FOXP3是小鼠中功能性Treg所必需的(21-24)。人中FOXP3基因中的突变导致削弱的Treg发育和功能,引起IPEX,这是一种多器官自身免疫性综合征(12,13)。Cas9 RNP-介导的基因组编辑提供了在人FOXP3基因中实验性引入突变并且检测其对Treg发育的影响的独特的机会。

[0173] 为了检测FOXP3突变的功能性结果,我们用Cas9 RNP靶向两个外显子位点(图3A)。为了辅助对X染色体上FOXP3基因座中的编辑的解释,使用来自男性捐赠者的细胞进行这些实验。我们检测了在如之前所述分离自人男性捐赠者的原代CD4⁺CD25⁺CD127^{lo}Treg中Cas9 RNP的功效(25)。在用FOXP3 Cas9 RNP处理的Treg中,通过T7E1测定检测到成功的基因组编辑,但是在仅用Cas9蛋白转染的对照细胞中没有检测到(图3B)。FOXP3 Cas9 RNP引起增加百分数的FOXP3阴性细胞(通过细胞内染色评测的)(图3C)。流式细胞术结果表明,由于Cas9 RNP处理,多至40%的细胞失去FOXP3表达(在对照处理的细胞中85%FOXP3⁺相对于使用FOXP3 Cas9 RNP1的63%,使用FOXP3 Cas9 RNP2的46%和使用组合的FOXP3 Cas9 RNP 1和2的54%)。FOXP3消除的细胞的分数可能开始时较高,原因在于FOXP3 Cas9 RNP处理似乎引起Treg中的增殖缺陷(数据未显示)。

[0174] Cas9 RNP编辑揭示在原代人Treg中FOXP3消除的表型结果。流式细胞术证实了在FOXP3 Cas9 RNP处理的具有升高水平的CD127(IL7R α)的细胞中改变的细胞因子受体表达(图3D)。CD127直接被FOXP3转录抑制(25),这表明,由于丢失Treg的主要调节剂,Cas9 RNP处理引起预测的失调。所述发现与Treg功能需要的基因表达程序的去稳定性(由于Cas9RNP-介导的FOXP3消除)一致。

[0175] 我们接着尝试在体外总结与IPEX患者中的FOXP3突变相关的缺陷型Treg分化。将Cas9 RNP递送至离体刺激的幼稚T细胞,随后将其在IL-2和TGF- β 中培养,从而促使iTreg产生(26-28)。在仅用Cas9蛋白处理的对照细胞中,发展了30%的FOXP3⁺iTreg。FOXP3 Cas9 RNP 1,FOXP3 Cas9 RNP 2,以及用FOXP3 Cas9 RNP 1和2二者处理,都导致减少百分数的FOXP3⁺iTreg(分别为8%,9%和11%)(图4A)。在三次独立的实验中观察到减少百分数的FOXP3⁺iTreg,和产生促炎性细胞因子干扰素- γ (IFN γ)的细胞分数的小但是可重现的增加(图4B)。

[0176] 为了进一步检验FOXP3突变在iTreg分化过程中的功能性作用,我们使Cas9 RNP-处理的细胞进行针对CTLA-4(为参与Treg抑制的主要细胞表面受体(29))的FACS分析。用FOXP3 Cas9 RNP处理减少表达CTLA-4的细胞的百分数(图4C)。在对照细胞中,在iTreg中以及在刺激的FOXP3⁻效应T细胞中诱导CTLA-4。我们发现FOXP3靶向强烈减少CTLA-4⁺FOXP3⁺iTreg的百分数,但是对FOXP3⁻细胞中的CTLA-4表达具有中等作用,这与FOXP3-依赖性和FOXP3-不依赖性机制(二者均有助于CTLA-4表达)相一致(23,30)。使用短寿命的Cas9 RNP的电穿孔改变FOXP3消除的T细胞的发育潜能。这种技术可以用于筛选人Treg分化所需要的另外的基因或调节元件。重要的是,通过Cas9 RNP方法在T细胞中的高效基因组编辑允许IPEX的人体外疾病模型,证实FOXP3突变削弱iTreg分化。

[0177] 讨论

[0178] 向原代造血细胞和/或原代造血干细胞有效的Cas9递送提供了用于细胞、组织和

系统功能的基础研究以及基于细胞的疗法的开发和应用的有力平台。例如,Cas9-介导的基因组改造可以用于实验性和治疗性靶向对炎性和阻抑性人T细胞亚组至关重要的DNA元件。我们在此处报道通过递送体外组装的且功能性的Cas9 RNP在人常规和调节CD4⁺T细胞中成功的基因组改造。Cas9 RNP的电穿孔允许CXCR4细胞表面受体的靶向‘敲除’。RNP还促进原代人T细胞的最先的成功的Cas9-介导的遗传‘敲入’。在成熟的免疫细胞中,高效的靶向的DNA替换在本领域中实现长久以来的允许多样性研究和治疗性应用的目标。最后,我们还利用Cas9RNP靶向刺激的人幼稚T细胞和Treg中的FOXP3(主要转录调节剂),以建模患有IPEX的患者中Treg分化的功能性削弱。这些研究总体上建立了用于人原代T细胞遗传操作的广泛应用的工具试剂盒。

[0179] 与其他CRISPR/Cas9递送方法相比,使用瞬时RNP递送的基因组改造具有显著的优点。最近的工作报道了通过转染携带cas9基因和导向RNA编码序列的质粒消除大量人CD4⁺T细胞中的细胞表面标记(3)。尽管是成功的,但是,与其他细胞型相比,在CD4⁺T细胞中效率显著低,这可能是由于欠佳的Cas9或sgRNA水平,欠佳的核易位或欠佳的细胞内RNP复合物形成(或这些因素的组合)。基于RNP的递送避开的这些挑战。Cas9 RNP的递送在细胞中提供快速的编辑作用和快速的蛋白周转,原因在于,据报道它们在递送的24小时内被降解(14)。Cas9编辑的这种限制的瞬时窗口(temporal window)能够使得Cas9 RNP比其他递送模式(其中,细胞暴露于Cas9更长的时间期限)更安全地用于治疗性应用。现在,我们的发现表明Cas9 RNP能够快速且有效地编辑人T细胞。

[0180] 此处,我们能够实现显著有效的HDR,在一个实验中,使用Cas9 RNP和靶向CXCR4的HDR模板,CXCR4^{hi}细胞减少98%。影响原代T细胞中的编辑和HDR效率的其余的变量可以被优化,以实现甚至更高的基因组编辑效率。例如,细胞型和细胞周期动力学的变化能够显著改变Cas9RNP效率(15)。在原代人T细胞中,编辑效率还可能受T细胞供体特异性因素(例如,遗传,最近的感染)、体外T细胞激活状态和被靶向的基因座的特征(例如,DNA序列,染色质状态)影响。

[0181] 编辑人T细胞亚组中特异性的DNA序列的能力允许实验研究转录因子、顺式调节元件和参与T细胞炎症和阻抑功能的靶基因。此处,作为理论验证,我们证明了敲除FOXP3(一个关键转录调节剂)来评估对下游表达程序和细胞分化的功能影响的能力。这些实验在体外建模了与孟德尔多器官自身免疫综合征IPEX相关的Treg分化。广泛的努力已经绘制了控制多样性且专门化的T细胞亚组的发育和功能的关键基因调节路线(31)。我们最近报道了大部分有助于人自身免疫疾病危险的原因性遗传变体绘制在T细胞中的关键调节元件(32)。原代T细胞的基因组编辑提供了一种有利的干扰测试,以评估调节元件的功能并表征疾病相关的编码和非编码变异的影响。

[0182] 治疗性编辑需要改进的技术来鉴定群体中被成功编辑的细胞。与转化的细胞系不同,编辑的细胞的选择不能在培养中无限期维持的原代细胞中特别有挑战性。此处,基于在细胞表面受体表达中的表型变化,我们证明了编辑的细胞的FACS富集。Cas9 RNP-介导的HDR的成功还允许引入遗传标记,以纯化均匀编辑的细胞用于特定的应用。

[0183] 治疗性T细胞改造需要原代细胞中高度有效且精确靶向的基因组编辑。例如,本文报道的高效Cas9递送技术提供原代细胞中高度有效且精确靶向的基因组编辑。所述高度有效的递送可以用于校正遗传变体并且改造人T细胞功能,以用于感染、自身免疫性和癌症的

治疗。

[0184] 材料和方法

[0185] 人T细胞分离和培养

[0186] 按照UCSF人类研究委员会 (Committee on Human Research,CHR) 核准的流程,从人捐赠者采集全血到肝素钠真空采血管 (Becton Dickinson) 中,并且在12小时内处理。通过Ficoll梯度离心分离外周血单核细胞 (PBMC)。将血液以1:1的比例与不含Ca²⁺和Mg²⁺的Hank平衡盐溶液 (HBSS) 混合,转移至50ml Falcon管 (30ml血液HBSS混合物/管) 中并且下面垫有12ml Ficoll-Paque PLUS (Amersham/GE healthcare)。密度梯度离心 (1000g,20min,不中断) 后,小心取出PBMC层,并且将细胞用不含Ca²⁺和Mg²⁺的HBSS洗涤两次。将CD4⁺T细胞预先用Easysep人CD4⁺T细胞富集试剂盒 (Stemcell technologies) 按照制造商的流程进行富集。将预先富集的CD4⁺T细胞用下述抗体染色:αCD4-PerCp (SK3;Becton Dickinson),αCD25-APC (BC96;TONBO Biosciences),αCD127-PE (R34-34;TONBO Biosciences),αCD45RA-violetFluor450 (HI100;TONBO Biosciences) 和αCD45RO-FITC (UCHL1;TONBO Biosciences)。使用FACS Aria Illu (Becton Dickinson) 分离CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}Treg、CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}T效应子 (Teff) 和CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}CD45RA^{hi}CD45RO⁻幼稚T细胞 (Tnaive)。Treg、Teff和Tnaive的纯度>97%。

[0187] 对于Cas9 RNP转染,将Treg、Teff或Tnaive在αCD3 (UCHT1;BD Pharmingen) 和αCD28 (CD28.2;BD Pharmingen) 包被的平板上预先活化48小时。将平板用在PBS中的10μg/ml αCD3和αCD28在37℃包被至少2小时。对于iTreg分化,将FACS-分选的Tnaive在100IU/ml IL-2 (Aldesleukin,UCSF Pharmacy) 和10ng/ml TGF-β1 (Tonbo Biosciences) 的存在下用包被平板的αCD3和αCD28激活。在抗-IFN γ 的存在下进行一个iTreg分化实验,并且在图4的分析中排除抗-IL-4封闭抗体。

[0188] Teff在RPMI完全培养基 (补充了下述的RPMI-1640 (UCSF CCF):5mmol/l 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (UCSF CCF),2mmol/l Glutamax (Gibco),50μg/ml青霉素/链霉素 (Corning),50μmol/l 2-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich),5mmol/l非必需氨基酸 (Corning),5mmol/l丙酮酸钠 (UCSF CCF),和10%胎牛血清 (Atlanta Biologicals),细胞密度为5x10⁵个细胞/ml) 中活化。电穿孔后,培养基中补充40IU/ml IL-2。

[0189] Treg在RPMI完全培养基中活化。电穿孔后,向所述培养基中添加300IU/ml IL-2,以进一步扩增细胞。在电穿孔后第1天、第3天和第5天,对Treg、Teff或Tnaive进一步补充它们各自的培养基。Teff和Teff保持在5x10⁵/ml的细胞密度。Treg以2.5x10⁵个细胞/ml的细胞密度培养。

[0190] Cas9的表达和纯化

[0191] 本研究中所用的重组酿脓链球菌 (*S. pyogenes*) Cas9在C端携带HA标签和两个促进穿过细胞膜转运的核定位信号肽。在大肠杆菌 (*E. coli*) Rosetta 2细胞 (EMD Millipore) 中由质粒pMJ915表达带有N端六组氨酸标签和麦芽糖结合蛋白的蛋白。His标签和麦芽糖结合蛋白由TEV蛋白酶切割,并且通过Jinek等人,2012所述的流程纯化Cas9。将Cas9在-80℃保存在20mM HEPES (pH 7.5),150mM KCl,10%甘油,1mM tris (2-氯乙基) 磷酸酯 (TCEP) 中。

[0192] sgRNA的体外T7转录

[0193] 通过重叠PCR,由合成的寡核苷酸组装编码T7启动子、20nt靶标序列和嵌合sgRNA

构架的DNA模板。简言之,对于CXCR4 sgRNA模板,按照供应商的流程,PCR反应包含SLKS3 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G-3';SEQ ID NO:3)和SLKS1 (5'-GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG C-3';SEQ ID NO:4)的20nM预混合物,T25 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3';SEQ ID NO:5)和SLKS1 (5'-GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG-3';SEQ ID NO:6)的1 μ M预混合物,200 μ M dNTP和Phusion聚合酶(NEB)。热循环仪设置由下述组成:30循环:95 $^{\circ}$ C 10sec,57 $^{\circ}$ C 10sec和72 $^{\circ}$ C 10sec。PCR产物用苯酚:氯仿:异戊醇提取一次,然后用氯仿提取一次,然后在-20 $^{\circ}$ C用异丙醇沉淀过夜。DNA沉淀用70%乙醇洗涤三次,通过真空干燥,并且溶解在DEPC-处理的水中。通过相同的方法,由T25,SLKS1,SLKS2和SLKS4 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG AGG AGC CTC GCC CAG CTG GAG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G-3';SEQ ID NO:7)组装FOXP3sgRNA模板。

[0194] 100 μ l T7体外转录反应由下述组成:30mM Tris-HCl (pH 8),20mM MgCl₂,0.01% Triton X-100,2mM亚精胺,10mM新鲜的二硫苏糖醇,5mM每种核糖核苷酸三磷酸,100 μ g/ml T7Pol和0.1 μ M DNA模板。将反应物在37 $^{\circ}$ C温育4小时,并且加入5单位的不含RNA酶的DNA酶I (Promega),以在37 $^{\circ}$ C消化DNA模板1小时。反应在60 $^{\circ}$ C用2xSTOP溶液(95%去离子甲酰胺,0.05%溴酚蓝和20mM EDTA)淬灭5分钟。通过在含有6M尿素的10%聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳纯化RNA。从凝胶上切下RNA条带,在15ml管中捣碎,并且用5体积的300mM乙酸钠(pH 5)在4 $^{\circ}$ C洗脱过夜。加入一当量的异丙醇,以在-20 $^{\circ}$ C沉淀RNA。通过离心收集RNA沉淀,用70%乙醇洗涤三次,并且真空干燥。为了重折叠sgRNA,首先将RNA沉淀物溶解在20mM HEPES (pH 7.5),150mM KCl,10%甘油和1mM TCEP中。将sgRNA加热至70 $^{\circ}$ C 5分钟,并且冷却至室温。加入MgCl₂至终浓度为1mM。再次将sgRNA加热至50 $^{\circ}$ C 5分钟,冷却至室温,并且保持在冰上。使用Nanodrop通过OD_{260nm}确定sgRNA浓度,并且使用20mM HEPES (pH 7.5),150mM KCl,10%甘油,1mM TCEP和1mM MgCl₂调节至100 μ M。将sgRNA保存在-80 $^{\circ}$ C。

[0195] Cas9 RNP组装和电穿孔

[0196] 在实验前,立即通过将20 μ M Cas9与20 μ M sgRNA以1:1的比例在37 $^{\circ}$ C在20 μ M HEPES (pH 7.5),150mM KCl,1mM MgCl₂,10%甘油和1mM TCEP中温育10分钟(至终浓度为10 μ M)制备Cas9 RNP。

[0197] 将T细胞用Neon转染试剂盒和装置(Invitrogen)电穿孔。将2-2.5 $\times 10^5$ 个T细胞用PBS洗涤三次,然后重悬在9 μ l缓冲液T (Neon试剂盒,Invitrogen)中。向细胞混悬液中添加Cas9 RNP(1-2 μ l,仅10 μ M Cas9(CTRL)或Cas9:sgRNA RNP;终浓度0.9-1.8 μ M)和HDR模板(0-200pmol),混合并用Neon电穿孔装置(Invitrogen;1600V,10msec,3次脉冲)转染到细胞中。所述HDR模板是与靶序列互补(-链)的单链寡核苷酸,并且包含侧连90-nt同源臂的HindIII限制性序列(序列:5'-GGG CAA TGG ATT GGT CAT CCT GGT CAT GGG TTA CCA GAA GAA ACT GAG AAG CAT GAC GGA CAA GTA CAG GCT GCA CCT GTC AGT GGC CGA AAG CTT GGA TCC CAT CAC GCT TCC CTT CTG GGC AGT TGA TGC CGT GGC AAA CTG GTA CTT TGG GAA CTT CCT ATG CAA GGC AGT CCA TGT CAT CTA CAC AGT-3';SEQ ID NO:8)。

[0198] 将电穿孔的Treg、Teff或Tnaive转移到在 α CD3/CD28包被的48孔平板中的500 μ l它们各自的培养基中。电穿孔后24小时,将细胞重悬,并转移到未包被的孔平板中。电穿孔后

4-6天,通过FACS和T7内切核酸酶I测定分析T细胞。

[0199] 靶标区域的PCR扩增

[0200] 将 5×10^4 - 2×10^5 个细胞重悬在100 μ l快速提取溶液(Epicenter)中,添加以裂解所述细胞,并且提取基因组DNA。将细胞裂解物在65 $^{\circ}$ C温育20分钟,然后在95 $^{\circ}$ C温育20分钟,并保存在-20 $^{\circ}$ C。通过NanoDrop(Thermo Scientific)确定基因组DNA的浓度。

[0201] 使用下述引物组PCR扩增基因组区域,所述基因组区域包含CXCR4靶标,FOXP3靶标1或FOXP3靶标2靶位点。对于CXCR4:正向5'-AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC-3'(SEQ ID NO:9),和反向5'-GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC-3'(SEQ ID NO:10)(938bp)。对于FOXP3靶标1:正向5'-TTC AAA TAC TCT GCA CTG CAA GCC C-3'(SEQ ID NO:11),和反向5'-CAT GTA CCT GTG TTC TTG GTG TGT GT-3'(SEQ ID NO:12)(900bp)。对于FOXP3靶标2:正向5'-GCT GAC ATT TTG ACT AGC TTT GTA AAG CTC TGT GG-3'(SEQ ID NO:13),和反向5'-TCT CCC CGA CCT CCC AAT CCC-3'(SEQ ID NO:14)(900bp)。设计CXCR4引物,以避免在同源臂外退火而扩增HDR模板。按照供应商的流程,PCR反应包含200ng基因组DNA和在高GC缓冲液中的Kapa Hot start高保真聚合酶(Kapa Biosystems)。热循环仪设置由下述组成:一个循环的95 $^{\circ}$ C 5min,35个循环的下述:98 $^{\circ}$ C 20sec,62 $^{\circ}$ C (CXCR4和FOXP3靶标2)或60 $^{\circ}$ C (FOXP3靶标1) 15sec,以及72 $^{\circ}$ C 1min,和一个循环的72 $^{\circ}$ C 1min。PCR产物在含有SYBR Safe(Life Technologies)的2%琼脂糖凝胶上纯化。使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen)从琼脂糖凝胶上洗脱PCR产物。使用NanoDrop装置(Thermo scientific)定量PCR DNA的浓度。将200ng PCR DNA用于T7内切核酸酶I和HindIII分析。

[0202] 通过T7内切核酸酶I测定分析编辑效率

[0203] 通过T7内切核酸酶I测定确定编辑效率。T7内切核酸酶I识别并且切割由野生型和突变体DNA链杂交产生的错配的异源双链体DNA。杂交反应包含在KAPA高GC缓冲液中的200ng PCR DNA和50mM KCl,并且在具有下述设置的热循环仪上进行:95 $^{\circ}$ C,10min,95-85 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,85 $^{\circ}$ C,1min,85-75 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,75 $^{\circ}$ C,1min,75-65 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,65 $^{\circ}$ C,1min,65-55 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,55 $^{\circ}$ C,1min,55-45 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,45 $^{\circ}$ C,1min,45-35 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,35 $^{\circ}$ C,1min,35-25 $^{\circ}$ C,-2 $^{\circ}$ C/sec,25 $^{\circ}$ C,1min,并且保持在4 $^{\circ}$ C。添加缓冲液2和5单位的T7内切核酸酶I(NEB),以消化重新退火的DNA。在37 $^{\circ}$ C温育1小时后,反应用6x蓝色凝胶上样染料(Thermo Scientific)在70 $^{\circ}$ C猝灭10分钟。将产物在含有SYBR金(Life technologies)的2%琼脂糖凝胶上解析。使用Image Lab定量DNA条带强度。利用下述等式计算编辑百分数: $(1 - (1 - (b+c/a+b+c))^{1/2}) \times 100$,其中“a”是DNA底物的条带强度,“b”和“c”是切割产物。

[0204] 通过HindIII限制性消化分析HDR

[0205] CXCR4 HDR模板在基因的基因座中引入HindIII限制性位点。使用引物5'-AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC-3'(SEQ ID NO:9)和5'-GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC-3'(SEQ ID NO:10)经PCR扩增938bp的区域。反应包含200ng PCR DNA和10单位在CutSmart缓冲液中的HindIII高保真酶(NEB)。在37 $^{\circ}$ C温育2小时后,将反应应用一体积的凝胶上样染料在70 $^{\circ}$ C猝灭10分钟。产物在含有SYBR金(Life technologies)的2%琼脂糖凝胶上解析。利用Image Lab定量条带强度。利用下述等式计算HDR百分数: $(b+c/a+b+c) \times 100$,其中“a”是DNA底物的条带强度,“b”和“c”是切割产物。

[0206] 编辑的T细胞的FACS分析

[0207] 在冰上使用 α CXCR4-APC (12G5;BD Pharmingen) 进行CXCR4细胞表面染色15分钟。在整个染色过程中将细胞保持在4℃直到细胞分选,从而避免抗体-介导的内化和抗体的降解。利用FACS Aria Illu (Becton Dickinson) 分选细胞。

[0208] 对于Cas9 RNP-编辑的Treg和iTreg的分析,使用下述抗体: α CD-PacificBlue (RPA-T4;BD Pharmingen), α FOXP3-AlexaFluor488 (206D;Biolegend), α CD25-APC (BC96; TONBO Biosciences), α CD127-PECy7 (HIL-7R-M21;BD Pharmingen), α IL-17a-PerCp-Cy5.5 (N49-653;BD Pharmingen), α IL-10-PE (JES3-9D7;BD Pharmingen), α IFN γ -AlexaFluor700 (B27;Biolegend), α CTLA-4-PE (L3D10;Biolegend)。

[0209] 将细胞用100ng/ml PMA (Sigma-Aldrich) 和1 μ g/ml Iononmycin (Sigma-Aldrich) 刺激2小时。加入1 μ M莫能星 (Monensin) (Biolegend) 用于3小时另外的细胞刺激。将细胞在室温 (RT) 针对表面标记染色20分钟,然后用FOXP3/转录因子Fix/Perm (TONBO Biosciences) 温育30分钟。为了增加FOXP3信号,将Treg用在Flow Cytometry Perm缓冲液 (TONBO Biosciences) 中的100U/ml DNA酶I (Sigma-Aldrich) 温育。由于后续的细胞分选和T7EI分析, iTreg不用DNA酶I处理。在室温 (RT) 进行细胞内细胞因子和转录因子染色30分钟。使用LSRFortessaDual (Becton Dickinson) 获得Treg, iTreg用FACS Aria Illu (Becton Dickinson) 获得并分选。

[0210] 统计学

[0211] 利用t-检验,将在三次iTreg分化实验中在FOXP3 Cas9 RNP处理后分泌FOXP3⁺和IFN γ 的细胞的量与对照处理后的量进行比较。计算标准偏差,并且显示为误差条。分析的结果显示在图4B中。

[0212] 应该理解本文所述的实施例和实施方案仅是出于举例说明的目的,并且依据其本领域技术人员将想到各种改进或变化,并且所述各种改进或变化包括在本申请的精神和范围内以及附上的权利要求书的范围内。本文引用的所有公布、专利和专利申请通过引用完全结合在本文中用于所有目的。

[0213] 参考文献

[0214] 1.Doudna JA&Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 (基因组编辑。使用CRISPR-Cas9的基因组改造的新前沿). Science 346 (6213):1258096.

[0215] 2.Hsu PD, Lander ES, & Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering (用于基因组改造的CRISPR-Cas9的研发和应用). Cell 157 (6):1262-1278.

[0216] 3.Mandal PK, 等人. (2014) Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9 (使用CRISPR/Cas9在人造血干细胞和效应细胞中有效的基因消除). Cell Stem Cell 15 (5):643-652.

[0217] 4.Maus MV, 等人. (2014) Adoptive immunotherapy for cancer or viruses (用于癌症或病毒的过继免疫疗法). Annual Review of Immunology 32:189-225.

[0218] 5.Tebas P, 等人. (2014) Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV (在感染HIV的人的自体CD4T细胞中的CCR5的基因编辑)

.The New England Journal of Medicine 370(10):901-910.

[0219] 6.Didigu CA,等人.(2014) Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+T cells from HIV-1 infection (HIV共同受体ccr5和cxcr4的同时锌指核酸酶编辑保护CD4+T细胞免于HIV-1感染).Blood 123(1):61-69.

[0220] 7.Hutter G,等人.(2009) Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation (通过CCR5 Delta32/Delta32干细胞植入长期控制HIV).The New England Journal of Medicine 360(7):692-698.

[0221] 8.Restifo NP,Dudley ME,&Rosenberg SA(2012) Adoptive immunotherapy for cancer:harnessing the T cell response (癌症的过继免疫疗法:控制T细胞反应).Nature Reviews.Immunology 12(4):269-281.

[0222] 9.Porter DL,Levine BL,Kalos M,Bagg A,&June CH(2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia (在慢性淋巴样白血病中嵌合抗原受体-修饰的T细胞).The New England Journal of Medicine 365(8):725-733.

[0223] 10.Moon EK,等人.(2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors (可逆的多因子T细胞功能低下能够限制实体瘤中嵌合抗原受体-转导的人T细胞的功效).Clinical Cancer Research:An Official Journal of the American Association for Cancer Research20(16):4262-4273.

[0224] 11.Genovese P,等人.(2014) Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells (在人重新注入的造血干细胞中的靶向基因组编辑).Nature 510(7504):235-240.

[0225] 12.Bennett CL,等人.(2001) The immune dysregulation,polyendocrinopathy, enteropathy,X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3 (免疫失调、多内分泌腺病、肠病、X染色体连锁的综合征 (IPEX) 由FOXP3突变引起).Nature Genetics 27(1):20-21.

[0226] 13.Wildin RS,等人.(2001) X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy (X染色体连锁的新生儿糖尿病、肠病和内分泌病综合征是小鼠糠病的人等价体).Nature Genetics 27(1):18-20.

[0227] 14.Kim S,Kim D,Cho SW,Kim J,&Kim JS(2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins (通过递送纯化的Cas9核糖核蛋白在人细胞中的高效RNA-指导的基因组编辑).Genome Research 24(6):1012-1019.

[0228] 15.Lin S,Staahl B,Alla RK,&Doudna JA(2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery (通过CRISPR/Cas9递送的控制的定时安排增加同源定向的人基因组改造).eLife 3.

[0229] 16.Zuris JA,等人.(2014) Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo (阳离子脂

质介导的蛋白递送允许体外和体内的有效的基于蛋白的基因组编辑). *Nature Biotechnology*.

[0230] 17.Sung YH, 等人. (2014) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases (使用RNA-指导的内切核酸酶在小鼠和斑马鱼中的高效基因敲除). *Genome Research* 24(1):125-131.

[0231] 18.Berson JF, 等人. (1996) A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (参与T细胞-向性人免疫缺陷病毒1型毒株的融合和进入的七跨膜结构域受体). *Journal of Virology* 70(9):6288-6295.

[0232] 19.Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, & Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor (HIV-1进入辅因子:七跨膜、G蛋白偶联的受体的功能性cDNA克隆). *Science* 272(5263):872-877.

[0233] 20.Symington LS & Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice (双链断裂末端切除和修复途径的选择). *Annual Review of Genetics* 45:247-271.

[0234] 21.Khattari R, Cox T, Yasayko SA, & Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+T regulatory cells (Scurfin在CD4+CD25+T调节细胞中的主要作用). *Nature Immunology* 4(4):337-342.

[0235] 22.Fontenot JD, Gavin MA, & Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+regulatory T cells (Foxp3编程CD4+CD25+调节T细胞的发育和功能). *Nature Immunology* 4(4):330-336.

[0236] 23.Hori S, Nomura T, & Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3 (通过转录因子Foxp3控制调节T细胞发育). *Science* 299(5609):1057-1061.

[0237] 24.Brunkow ME, 等人. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse (破坏叉头/有翼的-螺旋蛋白scurf在糠病小鼠中导致致死性淋巴组织增生病症). *Nature Genetics* 27(1):68-73.

[0238] 25.Liu W, 等人. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+T reg cells (CD127表达与FoxP3和人CD4+T调节细胞的阻抑功能反相关). *The Journal of Experimental Medicine* 203(7):1701-1711.

[0239] 26.Chen W, 等人. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3 (通过转录因子的TGF-β诱导作用使外周CD4+CD25-幼稚T细胞转化为CD4+CD25+调节T细胞). *The Journal of Experimental Medicine* 198(12):1875-1886.

[0240] 27.Fantini MC, 等人. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through Foxp3 induction and down-regulation of

Smad7 (刀刃:TGF- β 通过Foxp3诱导作用和Smad7下调在CD4+CD25-T细胞中诱导调节性表型). *Journal of Immunology* 172 (9) :5149-5153.

[0241] 28. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, & Horwitz DA (2002) Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25-precursors (由CD4+CD25-前体离体产生生产TGF- β 的调节T细胞). *Journal of Immunology* 169 (8) :4183-4189.

[0242] 29. Wing K, 等人. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+regulatory T cell function (CTLA-4控制Foxp3+调节T细胞功能). *Science* 322 (5899) :271-275.

[0243] 30. Wu Y, 等人. (2006) FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT (FOXP3通过与NFAT协作控制调节T细胞功能). *Cell* 126 (2) :375-387.

[0244] 31. Vahedi G, 等人. (2013) Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes (差异性转录体组和表观基因组的辅助T细胞性质和进化). *Immunological Reviews* 252 (1) :24-40.

[0245] 32. Farh KK, 等人. (2014) Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants (因果性自身免疫疾病变体的遗传和表观遗传精细绘图). *Nature*.

[0246] 实施例2

[0247] 设计针对PD-1外显子1 (PD-1靶标1 (SEQ ID NO:75), 由sgRNA1靶向, PD-1靶标2 (SEQ ID NO:74), 由sgRNA2靶向) 和外显子2 (PD-1靶标3 (SEQ ID NO:72), 由sgRNA3靶向, PD-1靶标4 (SEQ ID NO:73), 由sgRNA4靶向) 的sgRNA (图5A)。还产生HDR寡核苷酸 (SEQ ID NO:71), 其提供在sgRNA靶标位点诱导的双链断裂的模板定向修复 (图5A)。产生包含sgRNA1-4的Cas9 RNP, 并且递送到原代人效应T细胞 (CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi}) 中, 并且回收所述细胞。在通过FACS分析后对细胞的分析揭示了使用多种Cas9 RNP以及它们的组合的高效PD-1消除。通过PD-1细胞表面表达的FACS分析评估靶向PD-1编码序列的Cas9RNP与两种不同的HDR模板的多种组合的功能作用。使用Cas9 RNP与所述两种HDR模板中的每一种 (设计用于缺失一部分编码序列并且引入未成熟终止密码子和新的HindIII限制酶消化位点) 的多种组合观察到消除。

[0248] 我们还编辑了表达嵌合抗原受体的 (CAR) CD4⁺和CD8⁺T细胞。使用前述的PD-1 Cas9 RNP (PD-1 sgRNA 2) 编辑T细胞。用PD-1 Cas9 RNP核转染后接着用CAR-GFP慢病毒转导。通过FACS评估CAR-GFP表达和PD-1表面表达。我们能够产生PD-1-/低CAR⁺T细胞。

[0249] 实施例3

[0250] 提供包含Cas9 RNP、FITC标记的葡聚糖、Pacific Blue (PB) 标记的葡聚糖和未刺激的CD4⁺T细胞的反应混合物, 并且通过SQZ细胞挤压装置 (SQZ Biotech) 挤压。通过FACS将细胞分选为双重标记 (FITC和PB) 和未标记的细胞群体。使用T7内切核酸酶1 (T7E1) 测定来检测这两种细胞群体的Cas9-介导的基因组编辑。基于Pacific Blue (PB) -标记的葡聚糖 (3000MW) FITC-标记的葡聚糖 (500,000MW) 的摄入分选细胞, 并且T7内切核酸酶1测定证实了在摄入两种葡聚糖的细胞中的编辑富集 (图6)。

[0251] 实施例4

[0252] 介绍

[0253] 本实施例提供在实施例1中进行的实验的其他详情以及另外相关相关的实验方法和结果。本检验者证明了本文所述的方法和组合物以随机插入和缺失突变消除靶基因的能力,所述随机插入和缺失突变可能由Cas9-诱导的双链DNA断裂(DSB)的非同源末端连接(NHEJ)导致。具有CXCR4中的基因组编辑的细胞可以基于低CXCR4表达通过分选进行富集。本实施例进一步证明使用本文所述的方法和组合物在原代T细胞中在CXCR4和PD-1处通过利用Cas9 RNP和外源性单链DNA模板的同源定向修复(HDR)引入精确靶向的核苷酸替换的能力。该技术允许Cas9-介导的‘敲入’原代人T细胞的产生。靶位点的深度测序证实Cas9 RNP以多至~20%的效率(使用50pmol HDR模板获得~22%,使用100pmol获得~18%)促进‘敲入’基因组修饰,其占总编辑事件的多至大约三分之一。这些发现表明,可以证明Cas9 RNP-介导的核苷酸替换可用于疾病相关的突变的的治疗性校正。这建立了Cas9 RNP技术用于原代人T细胞中基因组的实验性和治疗性敲除和敲入编辑的用途。

[0254] 结果

[0255] 本文所述的方法和组合物克服了原代T细胞中遗传操作的长久以来的挑战,并且建立了有效的基因组改造工具试剂盒。最近的在哺乳动物细胞系中的报道表明Cas9 RNP能够实现有效且特异性的基因组编辑(15-18)。本文所述的实验证明了Cas9 RNP递送对于原代人T细胞中的靶向基因组编辑的功效(图7A)。

[0256] 用Cas9 RNP消除HIV共同受体CXCR4。T细胞改造的主要目的是靶向消除特异性的细胞表面受体,包括HIV感染的共同受体和削弱肿瘤免疫应答的共同一致性免疫关卡基因。本实施例证明了编程的Cas9 RNP靶向CXCR4外显子序列的用途,所述外显子序列编码在造血和细胞归巢中具有多种作用的趋化因子受体,所述趋化因子受体表达在CD4⁺T细胞上并且作为HIV进入的共同受体(19-21)。使用纯化的重组酿脓链球菌Cas9,其携带两个融合在C端的核定位信号序列(NLS)。将该Cas9蛋白与体外转录的单一-导向RNA(sgRNA)(设计用于独特地识别人CXCR4基因组序列)一起温育(图7B)。将这些预先组装的Cas9 RNP复合物电穿孔到分离自健康捐赠者的人CD4⁺T细胞中。

[0257] CXCR4 Cas9 RNP的电穿孔引起基因组DNA有效的、位点特异性的编辑。CXCR4基因中Cas9 RNP-诱导的DSB可能通过NHEJ(细胞中的一种主要DNA修复途径)修复,其产生可变的插入和缺失(插入/缺失)并且通常导致移码突变和基因功能丧失(22)。流式细胞术揭示表达低水平的CXCR4的T细胞百分数的Cas9 RNP剂量依赖性增加,这与CXCR4基因的突变一致(图7C)。T7内切核酸酶I(T7E1)测定是一种评估基因组中特定位置处的编辑的便利方法。此处,T7E1测定证实了在用CXCR4 Cas9 RNP处理的细胞中在CXCR4基因座处的基因组DNA编辑,但是在仅用Cas9蛋白处理的对照细胞(无sgRNA;CTRL)中没有。基于CXCR4表达,利用荧光活化的细胞分选(FACS)分离Cas9 RNP-处理的细胞。使用T7E1测定,与CXCR4^{hi}细胞(使用可变剂量的Cas9 RNP,4-12%)相比,发现在CXCR4^{lo}细胞中的编辑富集(15-17%)(图7D)。为直接鉴定编辑事件进行的靶标CXCR4基因组位点的桑格测序表明T7E1测定可能具有低估的编辑效率。T7E1测定利用野生型和突变序列的变性和杂交,从而产生错配的DNA双链体,然后通过T7内切核酸酶消化该双链体。然而,错配双链体的杂交可能是无效的,尤其是当插入/缺失突变显著不同于野生型序列时,这使自杂交产生更多更有利的产物。关于使用内切核酸酶测定观察到的编辑效率的低估的其他潜在的原因包括不完全的双链体解链,无效的

单个碱基对插入/缺失切割,和由于大基因组编辑在琼脂糖凝胶上从预测的300和600个碱基对产物的偏差(23)。CXCR4^{lo}细胞中CXCR4基因测序表明5/6的克隆具有突变/缺失,而所述突变/缺失仅分别在CXCR4^{hi}和CTRL处理的CXCR4^{lo}细胞中4/10的克隆和0/9的克隆中观察到。重要的是,在CXCR4^{hi}群体中观察到的编辑无一终止编码序列(一个错义突变和三个框内缺失),这与蛋白表达的保持相一致。相反,对在基因座中具有更广泛的突变负担的细胞富集CXCR4^{lo}群体(图7E)。这些方法表明使用Cas9 RNP的成功基因组靶向和对人CD4⁺T细胞中蛋白表达的功能影响。FACS能够富集编辑的细胞的群体,这为在原代T细胞中的Cas9 RNP应用提供了另外有用的工具。

[0258] 使用同源定向修复(HDR)的有效的基因‘敲入’。外源性模板-介导的HDR是用于精确基因修饰的有力技术,其能够允许特定变体序列的实验性和治疗性编辑。鉴于Cas9 RNP的高编辑效率,我们接着检测能否实现在原代T细胞中的外源性模板-介导的HDR。使用具有90个核苷酸同源臂的单链寡核苷酸DNA模板(HDR模板)与Cas9 RNP切割位点的CXCR4基因座重组(16)。设计CXCR4 HDR模板替换来自人基因组12个核苷酸,包括CRISPR-介导的DNA切割所需要的前间区邻近基序(PAM)序列,并且引入HindIII限制酶切位点(图8A)。在四种不同浓度的CXCR4 HDR模板(0,50,100和200pmol;参见材料和方法的补充信息)的存在下,将Cas9 RNP电穿孔到原代CD4⁺T细胞中。无HDR模板的Cas9 RNP同样减少CXCR4^{hi}细胞的百分数。显著地,在本实验中,添加CXCR4 HDR模板提高CXCR4消除的功效,尽管这种对细胞表面表达的影响并没有在所有实验中都观察到(图9A)。在本文所示的实验中,使用100pmol HDR模板和Cas9 RNP,~60%的细胞失去高水平的细胞表面CXCR4表达(1%相对于在对照处理的细胞中的60%)(图8B和C)。

[0259] 在用Cas9 RNP和单链寡核苷酸HDR模板处理的细胞中观察到高效的HDR(图8D)。在50pmol CXCR4 HDR模板的存在下,观察到多至33%的总编辑(定义为在Cas9切割位点产生插入/缺失的所有NHEJ和HDR事件的总和),如通过T7E1测定估测的。以这一浓度,通过靶标基因座的HindIII消化估测14%的HDR,这表明高分数的编辑由HDR导致(参见下文关于进一步定量的结果)。在添加HDR模板的情况下CXCR4染色的几乎完全丧失表明由HDR引入的突变(84DLLFV88→84ESLDP88)强烈影响CXCR4的细胞表面表达或其被抗体的识别(图8B和C)。使用200pmol HDR模板减少编辑效率,这可能是由于细胞毒性的结果。

[0260] 总编辑和HDR二者都可以通过分选CXCR4^{lo}群体进行富集,尽管影响不如图7中明显,这与未分选群体中较大分数的CXCR4^{lo}细胞一致。注意到,在这些实验中,应用更严格的门控来分离具有最高CXCR4表达的细胞,并且在该CXCR4^{hi}群体中,没有观察到编辑。这些研究总体上证明与单链寡核苷酸HDR模板联用的Cas9 RNP精确替换原代人T细胞中靶向的DNA序列的能力。

[0261] 靶标基因组DNA的深入测序。靶标CXCR4基因座的深入测序允许对基因组编辑事件的更详细的和定量的分析。图10中突出显示的结果表明与对照处理的细胞相比,使用或不用CXCR4 HDR模板,在CXCR4 Cas9RNP-处理的细胞中插入、缺失和HDR-介导的核苷酸替换的频率。在CXCR4 Cas9 RNP处理的细胞中,我们发现55%的与在200个核苷酸窗口内包含至少一个插入/缺失的CXCR4靶位点重叠的读数聚集在预测的切割位点周围(图10A,B)。如上文讨论的,T7E1测定可用于鉴定编辑的基因座,但是可能低估实际的编辑效率(图8D中T7E1测定的定量表明33%的编辑,相比于通过深入测序计算的55%的编辑效率)。我们还测序了关

于CXCR4 Cas9 RNP的两个顶端预测的‘脱靶’位点(图10B)。在两个脱靶位点处(~1-2%)观察到罕见的缺失/插入,但是比率与在仅用Cas9蛋白处理的对照细胞中关于那些位点所观察到的比率(~1-2%)相当。

[0262] 深入测序结果允许靶标区域中观察到的缺失/插入突变和它们的空间分布的定量分析。与酿脓链球菌Cas9切割PAM序列上游~3个核苷酸报道一致,我们发现在PAM上游4个核苷酸处的最高频率的缺失/插入(图10A)。缺失/插入在整个测序区域内分布(图10C和D),大部分事件在切割位点附近(>94%在40个核苷酸内)。CXCR4 Cas9 RNP处理的细胞中,在切割位点的+/-100核苷酸内,我们观察到95%的读数具有包含缺失事件的缺失/插入,而10%包含插入事件。有趣的是,在具有插入事件的读数中,~50%也包含至少一个缺失。我们观察到宽泛的插入和缺失尺寸,多个读数表现出长度多至~80个核苷酸的缺失(平均18个核苷酸,SD 15个核苷酸)和长度多至~55个核苷酸的一些插入(平均4.4个核苷酸,SD4.8个核苷酸)(图10C,D和11)。该插入/缺失尺寸和定位的范围与在图7中的CXCR4^{hi}选择的细胞的桑格测序种观察到广泛的突变负担相一致。

[0263] 深入测序验证了仅在用Cas9 RNP和CXCR4 HDR模板二者处理的细胞中在CXCR4基因座处的12个核苷酸的成功靶向替换。我们观察到,使用50pmol HDR模板有25%的HDR模板序列插入,使用100pmol HDR模板有21%(图10A)。在具有HDR模板序列掺入的读数中,~14%的检测的HDR模板读数具有围绕所掺入的HindIII位点的另外的非特异性插入/缺失或在聚集在预测的切割位点处的200个核苷酸窗口内的其他不完全的编辑形式。然而,与其中没有检测到HindIII位点的读数相比,在具有HindIII位点掺入的读数中的插入/缺失频率减少(图10C,D和11)。有趣的是,在有和无CXCR4 HDR模板的CXCR4 Cas9 RNP之间存在一致的缺失事件模式,具有2个核苷酸(11%)和22个核苷酸(5.4%)的缺失的富集(图11)。PAM序列的替换可能辅助限制‘敲入’序列的重新切割。总之,18-22%的读数(使用改变浓度的HDR模板)在整个测序的基因组靶位点具有正确替换的核苷酸,这表明可能证明这种方法对于产生实验性和治疗性核苷酸‘敲入’原代人T细胞是有用的。

[0264] 关键细胞表面受体的特异性‘敲入’靶向。为了证实Cas9 RNP调节在其他基因组位点处的HDR,我们设计了导向RNA和HDR模板,用以靶向PD-1(PDCD1)基因座。PD-1是在慢性激活的或耗竭的T细胞的表面上发现的‘免疫关卡’细胞表面受体,其可以抑制有效T细胞介导的癌症清除。核准PD-1的单克隆抗体阻断用于治疗晚期恶性病,并且可以证明遗传缺失PD-1可用于改造T细胞,以用于基于细胞的癌症免疫疗法(12)。将原代人T细胞用PD-1 Cas9 RNP和PD-1 HDR模板(设计用于在PD-1的第一个外显子中产生移码突变并且‘敲入’HindIII限制性位点)电穿孔,由此替换PAM序列(图12A)。

[0265] 为了检验Cas9 RNP-介导的靶向的特异性,我们比较了用PD-1 Cas9RNP相对于CXCR4 Cas9 RNP(其应该不靶向PD-1基因座)或乱序导向Cas9 RNP(在人基因组内没有预测的切割)处理后的PD-1细胞表面表达。我们使用两名不同的献血者和使用利用两种不同的体外转录流程产生的sgRNA进行了平行的重复实验(参见材料和方法的补充信息)。相对于与PD-1 HDR模板一起递送的CXCR4 Cas9 RNP和乱序导向Cas9 RNP二者,与PD-1 HDR模板一起电穿孔的PD-1 Cas9 RNP显著减少具有高PD-1细胞表面表达的细胞的百分数(图12B)。类似地,相对于利用CXCR4 HDR模板的PD-1和乱序导向Cas9 RNP处理二者,CXCR4 Cas9 RNP和CXCR4HDR模板引起CXCR4^{hi}细胞群体减少(图12C)。CXCR4丢失不是与CXCR4 Cas9 RNP一起递

送的单链DNA的非特异性作用;与用CXCR4Cas9 RNP和CXCR4 HDR模板处理后相比,在用CXCR4 Cas9 RNP和乱序HDR模板处理后,我们观察到更高百分比的表达CXCR4的细胞(图9A)。这些发现证实了使用程序性Cas9 RNP和HDR模板处理对原代T细胞中细胞表面受体表达的靶标特异性调节。

[0266] 然后我们检测了HDR模板对于核苷酸替换的特异性(图12D;相对应的细胞表面表达数据的实例显示在图9B中)。如预测的,我们观察到通过PD-1 Cas9 RNP的有效的PD-1编辑,不管它们是与PD-1 HDR模板、CXCR4 HDR模板一起还是不与任何HDR模板一起递送。相反,在PD-1Cas9 RNP和PD-1 HDR模板二者的存在下,HindIII位点仅掺入在PD-1中,但是使用CXCR4 HDR模板没有掺入,由于缺少序列同源性,所述CXCR4 HDR模板应该不在PD-1基因座处重组。类似地,在用CXCR4Cas9 RNP和CXCR4 HDR模板处理后,HindIII位点仅掺入在CXCR4中;使用PD-1 HDR模板、对照的乱序HDR模板(具有HindIII位点)或不使用HDR模板,在CXCR4基因座处没有观察到HDR(图12D)。总之,这些研究确定程序化的Cas9 RNP和相对应的HDR模板的特异性配对可以在原代人T细胞中提供靶向的核苷酸替换。

[0267] 材料和方法

[0268] 人T细胞分离和培养。由新鲜的全血或血块黄层分离人原代T细胞。通过Ficoll梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。用Easysep人CD4⁺T细胞富集试剂盒(Stemcell technologies)按照供应商的流程预先富集CD4⁺T细胞。将预先富集的CD4⁺T细胞用下述抗体染色: α CD4-PerCp(SK3;Becton Dickinson), α CD25-APC(BC96;TONBO Biosciences), α CD127-PE(R34-34;TONBO Biosciences), α CD45RA-violetFluor450(HI100;TONBO Biosciences)和 α CD45RO-FITC(UCHL1;TONBO Biosciences)。使用FACS Aria Illu(Becton Dickinson)分离CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi} T效应子(Teff)。

[0269] Cas9 RNP组装和电穿孔。在实验之前立即通过将20 μ M Cas9与20 μ M sgRNA以1:1的比例在20 μ M HEPES(pH 7.5),150mM KCl,1mM MgCl₂,10%甘油和1mM TCEP中在37 $^{\circ}$ C温育10分钟(至终浓度为10 μ M)而制备Cas9 RNP。将T细胞用Neon转染试剂盒和装置(Invitrogen)电穿孔。

[0270] 基因组编辑的分析。通过T7内切核酸酶I测定估测编辑效率。设计HDR模板在靶向的基因的基因座中引入HindIII限制位点;利用HindIII限制性酶消化证实成功的HDR。通过2步PCR法组装基因组DNA文库(其侧连用于CXCR4在靶的Cas9靶位点区域和两个预测的脱靶基因),并且利用Illumina HiSeq 2500测序。

[0271] 材料和方法的补充信息

[0272] 人T细胞分离和培养。由新鲜的全血或血块黄层(Stanford Blood Center)分离人原代T细胞。由UCSF人类研究委员会(CHR)核准,由人献血者采集全血到肝素钠真空采血管中(Becton Dickinson),并且在12小时内处理。通过Ficoll梯度离心分离外周血单核细胞(PBMC)。将新鲜血液以1:1的比例与不含Ca²⁺和Mg²⁺的Hank平衡盐溶液(HBSS)混合,将血块黄层用HBSS以1:10的比例稀释。将30ml各种HBSS/血液溶液转移到50ml Falcon管中,并且下面垫有12ml Ficoll-Paque PLUS(Amersham/GE healthcare)。密度梯度离心(1000g,20min,不中断)后,小心取出PBMC层,并且将细胞用不含Ca²⁺和Mg²⁺的HBSS洗涤两次。将CD4⁺T细胞预先用Easysep人CD4⁺T细胞富集试剂盒(Stemcell technologies)按照制造商的流程进行富集。将预先富集的CD4⁺T细胞用下述抗体染色: α CD4-PerCp(SK3;Becton

Dickinson), α CD25-APC (BC96; TONBO Biosciences), α CD127-PE (R34-34; TONBO Biosciences), α CD45RA-violetFluor450 (HI100; TONBO Biosciences) 和 α CD45RO-FITC (UCHL1; TONBO Biosciences)。使用 FACS Aria Illu (Becton Dickinson) 分离 CD4⁺CD25^{lo}CD127^{hi} T 效应子 (Teff)。Teff 的纯度 >97%。

[0273] 对于 Cas9 RNP 转染, 将由全血分离的效应 CD4⁺T 细胞在 α CD3 (UCHT1; BD Pharmingen) 和 α CD28 (CD28.2; BD Pharmingen) 包被的平板上预先活化 48 小时。将平板在 37 °C 用在 PBS 中的 10 μ g/ml α CD3 和 α CD28 包被至少 2 小时。将血块黄层来源的 T 细胞在用 10 μ g/ml α CD3 (在 PBS 中, 在 37 °C 至少 2 小时) 包被的平板上用直接添加在 RPMI 完全培养基中的 5 μ g/ml α CD28 活化。

[0274] T 细胞在 RPMI 完全培养基 (补充了下述的 RPMI-1640 (UCSF CCF): 5mmol/l 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) (UCSF CCF), 2mmol/l Glutamax (Gibco), 50 μ g/ml 青霉素/链霉素 (Corning), 50 μ mol/l 2-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich), 5mmol/l 非必需氨基酸 (Corning), 5mmol/l 丙酮酸钠 (UCSF CCF), 和 10% (v/v) 胎牛血清 (Atlanta Biologicals)) 中活化。电穿孔后, 培养基中补充 40 IU/ml IL-2。

[0275] Cas9 的表达和纯化。用于本研究的重组酿脓链球菌 Cas9 在 C-端携带 HA 标签和两个促进穿过核膜转运的核定位信号肽。在大肠杆菌 Rosetta2 细胞 (EMD Millipore) 中由质粒 pMJ915 表达带有 N 端六组氨酸标签和麦芽糖结合蛋白的蛋白。His 标签和麦芽糖结合蛋白由 TEV 蛋白酶切割, 并且通过 Jinek M 等人 (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity (适应性细菌免疫性中的可编程的双重 RNA-指导 DNA 内切核酸酶)。Science 337 (6096): 816-821 所述的流程纯化 Cas9。将 Cas9 在 -80 °C 保存在 20mM HEPES (pH 7.5), 150mM KCl, 10% (v/v) 甘油, 1mM tris (2-氯乙基) 磷酸酯 (TCEP) 中。

[0276] 利用 PAGE 纯化的 sgRNA 的体外 T7 转录。通过重叠 PCR, 由合成的寡核苷酸组装编码 T7 启动子、20 个核苷酸 (nt) 靶标序列和嵌合 sgRNA 构架的 DNA 模板。简言之, 对于 CXCR4 sgRNA 模板, 按照供应商的流程, PCR 反应包含 SLKS3 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G-3'; SEQ ID NO:3) 和 SLKS1 (5'-GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG C-3'; SEQ ID NO:4) 的 20nM 预混合物, T25 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3'; SEQ ID NO:5) 和 SLKS1 (5'-GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG-3'; SEQ ID NO:6) 的 1 μ M 预混合物, 200 μ M dNTP 和 Phusion 聚合酶 (NEB)。热循环仪设置由下述组成: 30 个循环: 95 °C, 10sec, 57 °C, 10sec 和 72 °C, 10sec。PCR 产物用苯酚:氯仿:异戊醇提取一次, 然后用氯仿提取一次, 然后在 -20 °C 异丙醇沉淀过夜。DNA 沉淀用 70% (v/v) 乙醇洗涤三次, 通过真空干燥, 并且溶解在焦碳酸二乙酯 (DEPC) - 处理的水中。PD-1 sgRNA 模板由 T25, SLKS1, SLKS2 和 SLKS11 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA CTG GCC AGG GCG CCT GTG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG G-3'; SEQ ID NO:15) 以相同的方法组装而成。

[0277] 100- μ l T7 体外转录反应由下述组成: 30mM Tris-HCl (pH 8), 20mM MgCl₂, 0.01% (v/v) Triton X-100, 2mM 亚精胺, 10mM 新鲜的二硫苏糖醇, 5mM 每种核糖核苷酸三磷酸, 100 μ g/ml T7Pol 和 0.1 μ M DNA 模板。将反应物在 37 °C 温育 4 小时, 并且加入 5 单位的不含 RNA 酶的

DNA酶I (Promega), 以在37°C消化DNA模板1小时。反应在60°C用2xSTOP溶液(95% (v/v) 去离子甲酰胺, 0.05% (w/v) 溴酚蓝和20mM EDTA) 淬灭5分钟。通过在含有6M尿素的10% (v/v) 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳纯化RNA。从凝胶上切下RNA条带, 在50ml管中捣碎, 并且用25ml 300mM乙酸钠(pH 5) 在4°C以轻柔摇动洗脱过夜。然后将溶液以4000g离心10分钟, 并且使RNA上清通过0.45 μ m滤器。向过滤的上清中加入一当量的异丙醇, 以在-20°C过夜沉淀RNA。通过离心收集RNA沉淀, 用70% (v/v) 乙醇洗涤三次, 并且真空干燥。为了重折叠sgRNA, 首先将RNA沉淀物溶解在20mM HEPES (pH 7.5), 150mM KCl, 10% (v/v) 甘油和1mM TCEP中。将sgRNA加热至70°C 5分钟, 并且冷却至室温。加入MgCl₂至终浓度为1mM。再次将sgRNA加热至50°C 5分钟, 冷却至室温, 并且保持在冰上。使用Nanodrop通过OD_{260nm}确定sgRNA浓度, 并且使用20mM HEPES (pH 7.5), 150mM KCl, 10% (v/v) 甘油, 1mM TCEP和1mM MgCl₂调节至100 μ M。将sgRNA保存在-80°C。

[0278] 利用苯酚/氯仿提取的sgRNA的体外T7转录。通过退火互补的单链ultramer而产生用于体外T7转录的DNA模板(Ultramer序列: CXCR4_1:5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA GCG TGA TGA CAA AGA GGG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AA GGC TAG TCC GTT ATC AAC TTG AAA AAG TGG CAC CGA GTC GGT G-3' (SEQ ID NO: 16); CXCR4_2:5'-CAC CGA CTC GGT GCC ACT TTT TCA AGT TGA TAA CGG ACT AGC CTT ATT TTA ACT TGC TAT GCT GTT TCC AGC ATA GCT CTA AAA CCC TCT TTG TCA TCA CGC TTC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3' (SEQ ID NO:17); PD-1_1:5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGA CTG GCC AGG GCG CCT GTG TTT TAG AGC TAT GCT GGA AAC AGC ATA GCA AGT TAA AAT AAG GCT AGT CCG TTA TCA ACT TGA AAA AGT GGC ACC GAG TCG GTG C-3' (SEQ ID NO:18); PD-1_2:5'-GCA CCG ACT CGG TGC CAC TTT TTC AAG TTG ATA ACG GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG CTA TGC TGT TTC CAG CAT AGC TCT AAA ACA CAG GCG CCC TGG CCA GTC GCT ATA GTG AGT CGT ATT A-3' (SEQ ID NO:19))。将Ultramer以1:1的比例混合在无核酸酶的双链体缓冲液(IDT)中, 加热至95°C 2分钟, 然后在室温(RT)温育30分钟。

[0279] 100- μ l T7体外转录反应液包含1x转录优化的缓冲液(Promega), 10mM新鲜的二硫苏糖醇, 2mM每种核糖核苷酸三磷酸, 400U T7 Pol (Promega), 0.5U焦磷酸酶(Life technologies)和2 μ g DNA模板。将反应物在37°C温育4小时。添加5U不含RNA酶的DNA酶I (Promega), 以在37°C消化DNA模板30分钟。反应用5 μ l 0.5M EDTA终止。

[0280] 鉴于在PAGE纯化过程中在孔之间的核酸交换的可能性的考虑, 我们与PAGE纯化的sgRNA平行检测苯酚/氯仿纯化的sgRNA, 如在图12和9A中所示。在加入190 μ l不含RNA的H₂O后进行苯酚/氯仿纯化。使用80 μ l 3M乙酸钠和420 μ l异丙醇沉淀sgRNA, 并且在-20°C温育4小时。将RNA沉淀物用70% (v/v) EtOH洗涤两次并用100% (v/v) EtOH洗涤一次。将真空干燥的沉淀物重构, 并且如“利用PAGE纯化的sgRNA的体外T7转录”所述使sgRNA重折叠。

[0281] Cas9 RNP组装和电穿孔。在实验前, 立即通过将20 μ M Cas9与20 μ M sgRNA以1:1的比例在37°C在20 μ M HEPES (pH 7.5), 150mM KCl, 1mM MgCl₂, 10% (v/v) 甘油和1mM TCEP中温育10分钟(至终浓度为10 μ M)制备Cas9 RNP。

[0282] 将T细胞用Neon转染试剂盒和装置(Invitrogen)电穿孔。将2.5x 10⁵个T细胞用PBS洗涤三次, 然后重悬在8 μ l缓冲液T (Neon试剂盒, Invitrogen)中。向细胞混悬液中添加Cas9 RNP (2 μ l不含sgRNA的10 μ M Cas9 CTRL或1-2 μ l的Cas9:sgRNA RNP; 终浓度0.9-1.8 μ M)

和HDR模板(0-200pmol,如所示),至终体积为11 μ l(用Cas9保存缓冲液调节),并且混合。将10 μ l混悬液用Neon电穿孔装置(Invitrogen;1600V,10msec,3次脉冲)电穿孔。用于CXCR4和PD-1的HDR模板是与靶序列互补的单链寡核苷酸(反义链),并且包含HindIII限制性序列与90-nt的同源臂。在成功的HDR后,各个PAM位点被删除,这应该防止Cas9 RNP对所编辑的位点的再次切割。PD-1 HDR模板通过用11nt替换12nt而另外在早至氨基酸位置25引起移码和无义突变(CXCR4 HDR模板:5'-GGG CAA TGG ATT GGT CAT CCT GGT CAT GGG TTA CCA GAA GAA ACT GAG AAG CAT GAC GGA CAA GTA CAG GCT GCA CCT GTC AGT GGC CGA AAG CTT GGA TCC CAT CAC GCT TCC CTT CTG GGC AGT TGA TGC CGT GGC AAA CTG GTA CTT TGG GAA CTT CCT ATG CAA GGC AGT CCA TGT CAT CTA CAC AGT-3'(SEQ ID NO:8);PD-1 HDR模板:5'-AAC CTG ACC TGG GAC AGT TTC CCT TCC GCT CAC CTC CGC CTG AGC AGT GGA GAA GGC GGC ACT CTG GTG GGG CTG CTC CAG GCA TGC AGA TAA TGA AAG CTT CTG GCC AGT CGT CTG GGC GGT GCT ACA ACT GGG CTG GCG GCC AGG ATG GTT CTT AGG TAG GTG GGG TCG GCG GTC AGG TGT CCC AGA GC-3'(SEQ ID NO:20))。CXCR4 HDR对照供体是包含HindIII限制性位点的初始CXCR4 HDR模板的序列乱序版本(CXCR4对照HDR模板:5'-TTC AAA ACT AGC GTC AGG GGC TCG ATT TAC TCG GGA CTT GCT ACA ACA TCG CAG TCA CGC GCA CGA TCC TTC CAG GAT TGG AGG TGG ACT TAG ATA AAG CTT CCG TGT GCA CCG TAT AGA TTC GTT GAT GCA GGC TAT TCC CGT GAT CCC ACG CGG AGG TGA TGG AGC GTC AAG CAT AGC TAG CAC AGA TGA-3'(SEQ ID NO:21))。

[0283] 将电穿孔的T细胞转移到在 α CD3/CD28包被的48孔平板中的500 μ l它们各自的培养基中。将平板在37 $^{\circ}$ C用在PBS中的10 μ g/ml α CD3(UCHT1;BD Pharmingen)和 α CD28(CD28.2;BD Pharmingen)包被至少2小时。电穿孔后24小时,将细胞重悬,并转移到未包被的孔平板中。电穿孔后3-4天,通过FACS和T7内切核酸酶I测定分析T细胞。

[0284] 编辑的T细胞的FACS分析。使用 α CXCR4-APC(12G5;BD Pharmingen)和 α PD-1-PE(EH12.2H7;Biolegend)在冰上进行细胞表面染色15分钟。在整个染色过程中将细胞保持在4 $^{\circ}$ C直到细胞分选,从而使抗体-介导的内化和抗体的降解最小化。利用FACS Aria Illu(Becton Dickinson)分选细胞。

[0285] 靶标区域的PCR扩增。将 5×10^4 - 2×10^5 个细胞重悬在100 μ l快速提取溶液(Epicenter)中,添加以裂解所述细胞,并且提取基因组DNA。将细胞裂解物在65 $^{\circ}$ C温育20分钟,然后在95 $^{\circ}$ C温育20分钟,并保存在-20 $^{\circ}$ C。通过NanoDrop(Thermo Scientific)确定基因组DNA的浓度。

[0286] 使用下述引物组PCR扩增含CXCR4或PD-1靶位点的基因组区域。对于CXCR4:正向5'-AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC-3'(SEQ ID NO:9),和反向5'-GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC-3'(SEQ ID NO:10)(938bp)。对于PD-1:正向5'-GGG GCT CAT CCC ATC CTT AG-3'(SEQ ID NO:22),和反向5'-GCC ACA GCA GTG AGC AGA GA-3'(SEQ ID NO:23)(905bp)。设计两个引物组,以避免在同源臂外退火而扩增HDR模板。按照供应商的流程,PCR反应包含200ng基因组DNA和在高GC缓冲液中的Kapa Hot start高保真聚合酶(Kapa Biosystems)。热循环仪设置由下述组成:一个循环的95 $^{\circ}$ C5min,35个循环的下述:98 $^{\circ}$ C20sec,62 $^{\circ}$ C(对于CXCR4)或68 $^{\circ}$ C(对于PD-1)15sec和72 $^{\circ}$ C1min,和一个循环的72 $^{\circ}$ C1min。PCR产物在含有SYBR Safe(Life Technologies)的2%(w/v)琼脂糖凝胶上

纯化。使用QIAquick凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 从琼脂糖凝胶上洗脱PCR产物。使用NanoDrop装置 (Thermo scientific) 定量PCR DNA的浓度。将200ng PCR DNA用于T7内切核酸酶I和HindIII分析。对于图7E, PCR产物用TOPO Zero平端PCR克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆并且送去桑格测序。

[0287] 通过T7内切核酸酶I测定分析编辑效率。通过T7内切核酸酶I测定估测编辑效率。T7内切核酸酶I识别并且切割由野生型和突变体DNA链杂交产生的错配的异源双链体DNA。杂交反应包含在KAPA高GC缓冲液中的200ng PCR DNA和50mM KCl, 并且在具有下述设置的热循环仪上进行: 95°C, 10min, 95-85°C, -2°C/sec, 85°C 1min, 85-75°C, -2°C/sec, 75°C 1min, 75-65°C, -2°C/sec, 65°C 1min, 65-55°C, -2°C/sec, 55°C 1min, 55-45°C, -2°C/sec, 45°C 1min, 45-35°C, -2°C/sec, 35°C 1min, 35-25°C, -2°C/sec, 25°C 1min, 并且保持在4°C。添加缓冲液2和5单位的T7内切核酸酶I (NEB) 以消化重新退火的DNA。在37°C温育1小时后, 反应用6x蓝色凝胶上样染料 (Thermo Scientific) 在70°C猝灭10分钟。将产物在含有SYBR金 (Life technologies) 的2%琼脂糖凝胶上解析。使用Image Lab定量DNA条带强度。利用下述等式计算编辑百分数: $(1 - (1 - (b+c/a+b+c))^{1/2}) \times 100$, 其中“a”是DNA底物的条带强度, “b”和“c”是切割产物。关于PD-1T7E1测定的定量 (图12D), DNA底物强度计算为在所有条件下观察到的两个大条带的总和。基于T7E1的总编辑%的计算仅允许估测切割效率。

[0288] 通过HindIII限制性消化分析HDR。设计HDR模板在被靶向基因的基因座中引入HindIII限制性位点。为了检测在CXCR4基因座中成功引入HindIII位点, 使用引物5'-AGA GGA GTT AGC CAA GAT GTG ACT TTG AAA CC-3' (SEQ ID NO:9) 和5'-GGA CAG GAT GAC AAT ACC AGG CAG GAT AAG GCC-3' (SEQ ID NO:10) PCR扩增938bp的区域。对于PD-1基因座, 使用引物5'-GGG GCT CAT CCC ATC CTT AG-3' (SEQ ID NO:22) 和5'-GCC ACA GCA GTG AGC AGA GA-3' (SEQ ID NO:23) 扩增905bp的区域。反应由200ng PCR DNA和在CutSmart缓冲液 (NEB) 中的10单位HindIII高保真酶组成。在37°C温育2小时后, 将反应用一体积的凝胶上样染料在70°C猝灭10分钟。产物在含有SYBR金 (Life technologies) 的2% (w/v) 琼脂糖凝胶上解析。使用Image Lab定量条带强度。使用下述等式计算HDR百分数: $(b+c/a+b+c) \times 100$, 其中“a”是DNA底物的条带强度, “b”和“c”是切割产物。

[0289] 在靶和脱靶位点的深入测序分析。通过2步PCR方法使用下文列出的引物扩增侧连关于CXCR4在靶的Cas9靶位点和两个脱靶基因的基因组区域。CXCR4在靶 (5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNC TTC CTG CCC ACC ATC TAC TCC ATC ATC TTC TTA ACT G-3' (SEQ ID NO:24) 和5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN CAG GTA GCG GTC CAG ACT GAT GAA GGC CAG GAT GAG GAC-3' (SEQ ID NO:25)), 脱靶#1 (POU结构域, 2类, 转录因子1同种型1 [POU2F1] 基因座; 5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNG CTA TAA TAG TAC AAG TAT ATG TTA AAT AAG AGT CAT AGC ATG-3' (SEQ ID NO:26) 和5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN CTG GCT TTA TAT ATA TAC ATA GAT AGA CGA TAT AGA TAG C-3' (SEQ ID NO:27)), 和脱靶#2 (谷氨酸受体1同种型1前体 [GRIA1] 基因座; 5'-ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT NNN NNC CTG GTC CCA GCC CAG CCC CAG CTA TTC AGC ATC C-3' 和5'-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC TNN NNN ACT CTG CAC TGG TAT ATC AAT ACA CTT GTT TTT CTC ATC CC-3' (SEQ ID NO:28))。首先, 按照供应商流程,

使用Kapa Hot start高保真聚合酶(Kapa Biosystems)PCR扩增来自编辑的样品和对照样品的100-150ng的基因组DNA。热循环仪设置由下述组成:一个循环的95°C 5min,和15-20个循环:98°C 20sec,63°C 15sec和72°C 15sec,和一个循环的72°C 1min。得到的扩增子在2% (w/v) 琼脂糖凝胶上解析,用SYBR金染色,并且使用Qiagen凝胶提取试剂盒提取。

[0290] 在第二PCR步骤中,使用Kapa Hot start高保真聚合酶(Kapa Biosystems),在所述扩增子上连接Illumina TruSeq通用衔接子(5' -AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T-3';SEQ ID NO:29)和修饰的Illumina RNA PCR条形码引物(5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT-Index-GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC T-3';SEQ ID NO:30)。热循环仪设置由下述组成:一个循环的98°C 30sec,8-10个循环:98°C 20sec,65°C 15sec和72°C 15sec,和一个循环的72°C 5min。得到的扩增子在2% (w/v) 琼脂糖凝胶上解析,用SYBR金染色,并且使用Qiagen凝胶提取试剂盒提取。将条形码化和纯化的DNA样品通过Qubit 2.0荧光计(Life Technologies)定量,通过BioAnalyzer(Agilent)分析大小,通过qPCR定量,并且以等摩尔比例汇集。将测序文库用Illumina HiSeq 2500测序。

[0291] 深入测序数据的分析。与不包含HDR模板-来源的序列的那些读数分开提取并分析包含由HDR模板导致的特有的12nt的测序读数。将所有不包含所替换的12nt的读数与参比hg19基因组比对,并且试验Burrows-Wheeler Aligner(BWA)将所有包含替换的12nt的读数与具有预测的置换的修饰的hg19基因组比对。然后利用samtools mpileup定量绘制在CXCR4基因的每个位置的总读数,并且利用常规的检验CIGAR串的脚本来估测每个读数的插入和缺失的数目和位置。对于使用CXCR4RNP(无HDR模板)的实验,估测插入效率为:(距切割位点+/-100bp具有插入的读数数目)/(距切割位点+/-读数总数)。对于使用CXCR4 RNP(无HDR模板)的实验的缺失效率,其估测为:(距切割位点+/-100bp具有缺失的读数数目)/(距切割位点+/-读数总数)。对于使用CXCR4 RNP+HDR模板的实验,仅基于不包含源自HDR的12nt替换的读数计算插入和缺失效率(这些是图10B只能怪所示的分数)。总编辑效率计算为:(距切割位点+/-100bp具有插入/缺失的读数数目)/(距切割位点+/-读数总数)。HDR效率估测为:(距切割位点+/-100bp含HindIII位点的读数数目)/(距切割位点+/-100bp的读数总数)。对距切割位点+/-20bp的区域估测插入和缺失尺寸分布。深入测序数据可在NCBI Sequence Read Archive(SRA,BioProject:SUB996236)得到。

[0292] 参考文献

[0293] 1.Doudna JA&Charpentier E(2014)Genome editing.The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9(基因组编辑。使用CRISPR-Cas9的基因组改造的新前沿).Science 346(6213):1258096.

[0294] 2.Hsu PD,Lander ES,&Zhang F(2014)Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering(用于基因组改造的CRISPR-Cas9的研发和应用).Cell 157(6):1262-1278.

[0295] 3.Mandal PK,等人.(2014)Efficient Ablation of Genes in Human Hematopoietic Stem and Effector Cells using CRISPR/Cas9(使用CRISPR/Cas9在人造血干细胞和效应细胞中有效的基因消除).Cell Stem Cell 15(5):643-652.

[0296] 4.Maus MV,等人.(2014)Adoptive immunotherapy for cancer or viruses(用

于癌症或病毒的过继免疫疗法). *Annual Review of Immunology* 32:189-225.

[0297] 5. Passerini L, 等人. (2013) CD4(+) T cells from IPEX patients convert into functional and stable regulatory T cells by FOXP3 gene transfer (通过FOXP3基因转移将来自IPEX患者的CD4(+) T细胞转化为功能性且稳定的调节T细胞). *Science Translational Medicine* 5(215):215ra174.

[0298] 6. Hutter G, 等人. (2009) Long-term control of HIV by CCR5Delta32/Delta32stem-cell transplantation (通过CCR5Delta32/Delta32干细胞植入长期控制HIV). *The New England Journal of Medicine* 360(7):692-698.

[0299] 7. Didigu CA, 等人. (2014) Simultaneous zinc-finger nuclease editing of the HIV coreceptors ccr5 and cxcr4 protects CD4+T cells from HIV-1infection (HIV共同受体ccr5和cxcr4的同时锌指核酸酶编辑保护CD4+T细胞免于HIV-1感染). *Blood* 123(1):61-69.

[0300] 8. Tebas P, 等人. (2014) Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV (在感染HIV的人的自体CD4T细胞中的CCR5的基因编辑). *The New England Journal of Medicine* 370(10):901-910.

[0301] 9. Restifo NP, Dudley ME, & Rosenberg SA (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response (癌症的过继免疫疗法: 控制T细胞反应). *Nature Reviews. Immunology* 12(4):269-281.

[0302] 10. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, & June CH (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia (在慢性淋巴样白血病中嵌合抗原受体-修饰的T细胞). *The New England Journal of Medicine* 365(8):725-733.

[0303] 11. Moon EK, 等人. (2014) Multifactorial T-cell hypofunction that is reversible can limit the efficacy of chimeric antigen receptor-transduced human T cells in solid tumors (可逆的多因子T细胞功能低下能够限制实体瘤中嵌合抗原受体-转导的人T细胞的功效). *Clinical Cancer Research* 20(16):4262-4273.

[0304] 12. Topalian SL, Drake CG, & Pardoll DM (2015) Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy (免疫关卡基因阻断: 一种常见的癌症治疗的共同方法). *Cancer Cell* 27(4):450-461.

[0305] 13. John LB, 等人. (2013) Anti-PD-1 antibody therapy potently enhances the eradication of established tumors by gene-modified T cells (抗-PD-1抗体疗法通过基因修饰的T细胞有力地增强建立的肿瘤的根除). *Clinical Cancer Research* 19(20):5636-5646.

[0306] 14. Genovese P, 等人. (2014) Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells (在人重新注入的造血干细胞中的靶向基因组编辑). *Nature* 510(7504):235-240.

[0307] 15. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, & Kim JS (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins (通过递送纯化的Cas9核糖核蛋白在人细胞中的高效RNA-指导的基因组编辑). *Genome Research* 24(6):1012-1019.

- [0308] 16. Lin S, Staahl B, Alla RK, & Doudna JA (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery (通过CRISPR/Cas9递送的控制的定时安排增加同源定向的人基因组改造). *eLife* 3.
- [0309] 17. Zuris JA, 等人. (2014) Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo (阳离子脂质介导的蛋白递送允许体外和体内的有效的基于蛋白的基因组编辑). *Nature Biotechnology*.
- [0310] 18. Sung YH, 等人. (2014) Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases (使用RNA-指导的内切核酸酶在小鼠和斑马鱼中的高效基因敲除). *Genome Research* 24(1):125-131.
- [0311] 19. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, & Littman DR (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development (趋化因子受体CXCR4在造血作用和小脑发育中的功能). *Nature* 393(6685):595-599.
- [0312] 20. Berson JF, 等人. (1996) A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains (参与T细胞-向性人免疫缺陷病毒1型毒株的融合和进入的七跨膜结构域受体). *Journal of Virology* 70(9):6288-6295.
- [0313] 21. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, & Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor (HIV-1进入辅因子:七跨膜、G蛋白偶联的受体的功能性cDNA克隆). *Science* 272(5263):872-877.
- [0314] 22. Symington LS & Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice (双链断裂末端切除和修复途径的选择). *Annual Review of Genetics* 45:247-271.
- [0315] 23. Guschin DY, 等人. (2010) A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification (用于监测内源性基因编辑的快速通用测定). *Methods in Molecular Biology* 649:247-256.
- [0316] 24. Vahedi G, 等人. (2013) Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes (差异性转录体组和表观基因组的辅助T细胞性质和进化). *Immunological Reviews* 252(1):24-40.
- [0317] 25. Farh KK, 等人. (2015) Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants (因果性自身免疫疾病变体的遗传和表观遗传精细绘图). *Nature* 518(7539):337-343.

		序列表	
	<110>	加利福尼亚大学董事会 Marson, Alexander Doudna, Jennifer Bluestone, Jeffrey Schumann, Kathrin Lin, Steven	
	<120>	原代造血细胞中的蛋白递送	
	<130>	081906-0970785 (219910PC)	
	<150>	US 62/110,187	
	<151>	2015-01-30	
	<150>	US 62/209,711	
	<151>	2015-08-25	
	<150>	PCT/US2016/015836	
	<151>	2016-01-29	
	<160>	110	
	<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
	<210>	1	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	CHAIN	
	<223>	synthetic CXCR4 sequence positions 84-88	
	<400>	1	
		Asp Leu Leu Phe Val	
		1 5	
[0001]	<210>	2	
	<211>	5	
	<212>	PRT	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	CHAIN	
	<223>	synthetic mutated CXCR4 sequence positions 84-88	
	<400>	2	
		Glu Ser Leu Asp Pro	
		1 5	
	<210>	3	
	<211>	82	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic primer SLKS3	
	<400>	3	
		taatacgact cactatagga agcgtgatga caaagagggt tttagagcta tgctggaaac	60
		agcatagcaa gttaaataa gg	82
	<210>	4	
	<211>	73	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic primer SLKS1	
	<400>	4	
		gcaccgactc ggtgccactt ttcaagttg ataacggact agccttattt taacttgcta	60
		tgctgtttcc agc	73

	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic primer T25	
	<400> 5	
	taatacgact cactatag	18
	<210> 6	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic primer SLKS1	
	<400> 6	
	gcaccgactc ggtgccactt tttcaag	27
	<210> 7	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic primer SLKS4	
	<400> 7	
	taatacgact cactatagag gagcctgcc cagctggagt tttagageta tgctggaaac	60
	agcatagcaa gttaaaataa gg	82
[0002]	<210> 8	
	<211> 192	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic HDR template sequence	
	<400> 8	
	gggcaatgga ttggtcatcc tggcatgagg ttaccagaag aaactgagaa gcatgacgga	60
	caagtacagg ctgcacctgt cagtggccga aagcttggat cccatcacgc ttccttctg	120
	ggcagttgat gccgtggcaa actggtactt tggaacttc ctatgcaagg cagtccatgt	180
	catctacaca gt	192
	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 forward primer	
	<400> 9	
	agaggagtta gccaatgt gactttgaaa cc	32
	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 reverse primer	
	<400> 10	

	ggacaggatg acaataccag gcaggataag gcc	33
	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 1 forward primer	
	<400> 11	
	ttcaaatact ctgcactgca agecc	25
	<210> 12	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 1 reverse primer	
	<400> 12	
	catgtacctg tgttcttggg gtgtgt	26
	<210> 13	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 2 forward primer	
	<400> 13	
[0003]	gctgacattt tgactagctt tgtaaagctc tgtgg	35
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 2 reverse primer	
	<400> 14	
	tctccccgac ctceccaatcc c	21
	<210> 15	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic PD-1 sgRNA	
	<400> 15	
	taatacgact cactatagcg actggccagg gcgcctgtgt tttagagcta tgctggaaac	60
	agcatagcaa gttaaataa gg	82
	<210> 16	
	<211> 123	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic ultramer sequence CXCR4_1	
	<400> 16	
	taatacgact cactatagga agcgtgatga caaagagggt tttagagcta tgctggaaac	60
	agcatagcaa gttaaataa ggctagtcgg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg	120

	gtg	123
	<210> 17	
	<211> 123	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic ultramer sequence CXCR4_2	
	<400> 17	
	caccgactcg gtgccacttt ttcaagttga taacggacta gccttatttt aacttgctat	60
	gctgtttcca gcatagctct aaaacctct ttgcatcac gcttcctata gtgagtcgta	120
	tta	123
	<210> 18	
	<211> 124	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic ultramer sequence PD-1_1	
	<400> 18	
	taatacgact cactatagcg actggccagg ggcctgtgt tttagagcta tgctggaaac	60
	agcatageca gttaaaataa ggctagtcg ttatcaactt gaaaaagtgg caccgagtcg	120
	gtgc	124
	<210> 19	
	<211> 124	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
[0004]	<221> misc_feature	
	<223> synthetic ultramer sequence PD-1_2	
	<400> 19	
	gcaccgactc ggtgccactt ttcaagttg ataacggact agccttattt taacttgcta	60
	tgctgtttcc agcatagctc taaaacacag ggcctggc cagtcgctat agtgagtcgt	120
	atta	124
	<210> 20	
	<211> 191	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic PD-1 HDR template sequence	
	<400> 20	
	aacctgacct gggacagttt ccttccgct cacctccgc tgagcagtgg agaaggcggc	60
	actctggtgg ggctgctcca gcatgcaga taatgaaagc ttctggccag tcgtctggc	120
	ggtgctacaa ctgggctggc ggccaggatg gttcttaggt aggtggggtc ggcggtcagg	180
	tgtcccagag c	191
	<210> 21	
	<211> 192	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 HDR control template sequence	
	<400> 21	
	ttcaaaacta gcgtcagggg ctcgatttac tcgggacttg ctacaacatc gcagtcacgc	60
	gcagatcct tccaggattg gaggtggact tagataaagc ttccgtgtgc accgtataga	120
	ttcgttatg caggctatc ccgtgatccc acgcggaggt gatggagcgt caagcatagc	180

	tagcacagat ga	192
	<210> 22	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic PD-1 forward primer	
	<400> 22	
	ggggctcatt ccattcttag	20
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic PD-1 reverse primer	
	<400> 23	
	gccacagcag tgagcagaga	20
	<210> 24	
	<211> 76	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 on-target primer	
	<220>	
[0005]	<221> misc_feature	
	<222> (34)..(38)	
	<223> N is A, C, G or T	
	<400> 24	
	acactcttc cctacagac gctcttccga tctnnnnct tctgcccac catctactcc	60
	atcatcttet taactg	76
	<210> 25	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 on-target primer	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(39)	
	<223> N is A, C, G or T	
	<400> 25	
	gtgactggag ttcagacgtg tctcttccg atctnnnnnc aggtagcggc ccagactgat	60
	gaaggccagg atgaggac	78
	<210> 26	
	<211> 79	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 off-target primer	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(39)	

	<223> N is A, C, G or T	
	<400> 26	
	gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctnnnnnc tggctttata tatatacata	60
	gatagacgat atagatagc	79
	<210> 27	
	<211> 73	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 off-target primer	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (34)..(38)	
	<223> N is A, C, G or T	
	<400> 27	
	acactctttc cctacacgac gctcttccga tctnnnnnc tgggtcccagc ccagccccag	60
	ctattcagca tcc	73
	<210> 28	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic CXCR4 off-target primer	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(39)	
[0006]	<223> N is A, C, G or T	
	<400> 28	
	gtgactggag ttcagacgtg tgctcttccg atctnnnna ctctgcactg gtatatcaat	60
	acacttggtt ttctcatccc	80
	<210> 29	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic adapter primer	
	<400> 29	
	aatgatacgg cgaccaccga gatctacct cttccctac acgacgtct tccgatct	58
	<210> 30	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic barcode primer	
	<400> 30	
	caagcagaag acggcatacg agatgtgact ggagttcaga cgtgtgctct tccgatct	58
	<210> 31	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic primer	

	<400> 31	
	cctcctcttt gtcacacgc ttc	23
	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic primer	
	<400> 32	
	gaagcgtgat gacaaagagg agg	23
	<210> 33	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic reference sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 33	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 34	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
[0007]	<400> 34	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 35	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 35	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 36	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 36	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 37	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	

	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 37	
	gtttgccatg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 38	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 38	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 39	
	<211> 72	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 39	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagtcgg cactgacag	60
	gtgcagcctg ta	72
	<210> 40	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0008]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 40	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 41	
	<211> 66	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 41	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgggagg tcggccactg acaggtgcag	60
	cctgta	66
	<210> 42	
	<211> 75	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 42	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaggaggt cggccactga	60
	caggtgcage ctgta	75
	<210> 43	
	<211> 78	
	<212> DNA	

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 43	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 44	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic reference sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 44	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 45	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 45	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 46	
[0009]	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 46	
	gtggcaaact ggtactttgg gaacttccta tgcaaggcag tccatgtcat ctacacagtc	60
	aaccttaca gcagtgtc	78
	<210> 47	
	<211> 76	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 47	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaaggagg tcggccaactg	60
	acaggtgcag cctgta	76
	<210> 48	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 48	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgacg ctgacaggtg cgcctgtac	60
	ttgtcgtca tgcgtctc	78

	<210> 49	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 49	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaagga agtcgtgctc tgacaggagg aggccggcct	60
	tggacatgtg gcttctga	78
	<210> 50	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 50	
	gtttgccacg gccactgaca ggtgcagcct gta	33
	<210> 51	
	<211> 71	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 51	
[0010]	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgata ggaggtcggc cactgacagg	60
	tgcagcctgt a	71
	<210> 52	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 52	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 53	
	<211> 76	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 53	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaaggacg tccgccgctg	60
	agaggtgcag gctgta	76
	<210> 54	
	<211> 77	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	

	<400> 54	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagaggag gtcggccact	60
	gacaggtgca gcctgta	77
	<210> 55	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic reference sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 55	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 56	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 56	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 57	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
[0011]	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 57	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 58	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 58	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 59	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 59	
	gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
	tgacaggtgc agcctgta	78
	<210> 60	
	<211> 78	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	60	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	61	
	<211>	78	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	61	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	62	
	<211>	78	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	62	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	63	
	<211>	78	
[0012]	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	63	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	64	
	<211>	78	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	64	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	65	
	<211>	78	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400>	65	
		gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg acaaagagga ggtcggccac	60
		tgacaggtgc agcctgta	78
	<210>	66	

	<211> 12	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic donor sequence	
	<400> 66	
	aagcttggat cc	12
	<210> 67	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 2 primer	
	<400> 67	
	tcatggctgg gctctccagg ggg	23
	<210> 68	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 2 primer	
	<400> 68	
	ccccctggag agcccagcca tga	23
	<210> 69	
	<211> 23	
[0013]	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 1 primer	
	<400> 69	
	ccctccagct gggcgaggct cct	23
	<210> 70	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic FOXP3 Target 1 primer	
	<400> 70	
	aggagcctcg cccagctgga ggg	23
	<210> 71	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic HDR template sequence	
	<400> 71	
	tagtaagett	10
	<210> 72	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic sgRNA target (3) sequence for PD-1 exon 2	
	<400>	72	
		ccacgctcat gtggaagtca cgcccgttgg gcagttgtgt gacacggaag cgg	53
	<210>	73	
	<211>	52	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic sgRNA target (4) sequence for PD-1 exon 2	
	<400>	73	
		cgcttcggtg tcacacaact gccaacggg cgtgacttcc acatgagcgt gg	52
	<210>	74	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic sgRNA target (2) sequence for PD-1 exon 1	
	<400>	74	
		ccgcccagac gactggccag ggcgcctgtg gg	32
	<210>	75	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
[0014]	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic sgRNA target (1) sequence for PD-1 exon 1	
	<400>	75	
		cccacaggcg ccctggccag tcgtctgggc gg	32
	<210>	76	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic primer	
	<400>	76	
		cctcctcttt gtcatcacgc ttc	23
	<210>	77	
	<211>	70	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic reference sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400>	77	
		tgccacggca tcaactgccc agaagggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
		caggtgcagc	70
	<210>	78	
	<211>	70	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	

	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 78	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 79	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 79	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 80	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 80	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 81	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0015]	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 81	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 82	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 82	
	tgccatggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 83	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 83	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 84	
	<211> 64	
	<212> DNA	

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 84	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagtcggcca ctgacaggtg	60
	cagc	64
	<210> 85	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 85	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 86	
	<211> 67	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 86	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aggaggtcgg cactgacag	60
	gtgcagc	67
[0016]	<210> 87	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-hi	
	<400> 87	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgggaggtcg gccactgaca ggtgcagc	58
	<210> 88	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic reference sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 88	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 89	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 89	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 90	

	<211> 69	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 90	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggggaag cgtgatgaca aaaggaggtc ggccactgac	60
	aggtgcagc	69
	<210> 91	
	<211> 68	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 91	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggggaag cgtgatgaca aaggaggctg gccactgaca	60
	ggtgcagc	68
	<210> 92	
	<211> 63	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 92	
[0017]	tgccacggca tcaactgccc agaaggggaag cgtgatagga ggtcgggccac tgacaggtgc	60
	agc	63
	<210> 93	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 93	
	tgccacggcc actgacaggt gcagc	25
	<210> 94	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for Cas9 RNP treated CRCX4-lo	
	<400> 94	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggggaag cgtgatg	37
	<210> 95	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic reference sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 95	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggggaag cgtgatgaca aaggagggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70

<210>	96	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
<400>	96	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
<210>	97	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
<400>	97	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
<210>	98	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
<400>	98	
[0018]	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
<210>	99	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
<400>	99	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
<210>	100	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
<400>	100	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
<210>	101	
<211>	70	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<221>	misc_feature	
<223>	synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	

	<400> 101	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 102	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 102	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 103	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 103	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 104	
	<211> 70	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
[0019]	<221> misc_feature	
	<223> synthetic locus sequence for CRCX4-lo control	
	<400> 104	
	tgccacggca tcaactgccc agaaggaag cgtgatgaca aagaggaggt cggccactga	60
	caggtgcagc	70
	<210> 105	
	<211> 102	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic Cas9 sequence	
	<400> 105	
	caaagtacca gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg gaagcgtgat gacaaagagg	60
	aggtcggcca ctgacaggtg cagcctgtac ttgtcctgca tg	102
	<210> 106	
	<211> 101	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> synthetic Cas9 sequence	
	<400> 106	
	caaagtacca gtttgccacg gcatcaactg cccagaaggg aagcgtgatg agaaagagga	60
	ggtcggccac tgacaggtgc agcctgtact tgtcctgcat g	101
	<210> 107	
	<211> 39	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic Cas9 sequence	
	<400>	107	
		caaagtacca gtttgccacg gcatcaactg cccagaagg	39
	<210>	108	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic target sequence	
	<400>	108	
		cgactggcca gggcgctgt ggg	23
	<210>	109	
[0020]	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic target sequence	
	<400>	109	
		cccacaggcg ccctggccag tcg	23
	<210>	110	
	<211>	11	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<221>	misc_feature	
	<223>	synthetic PD-1 HDR template sequence	
	<400>	110	
		ttcgaaagta a	11

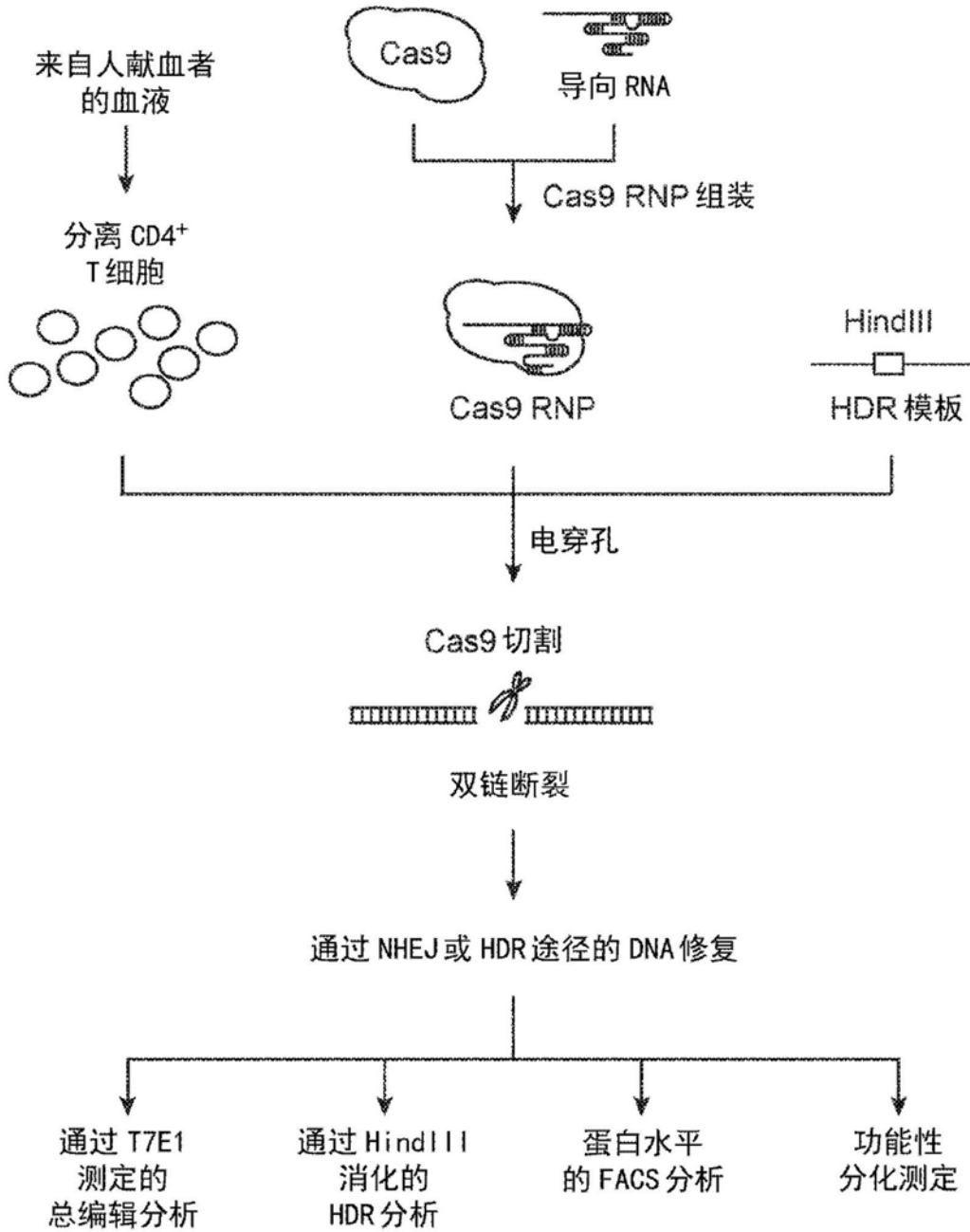


图1A

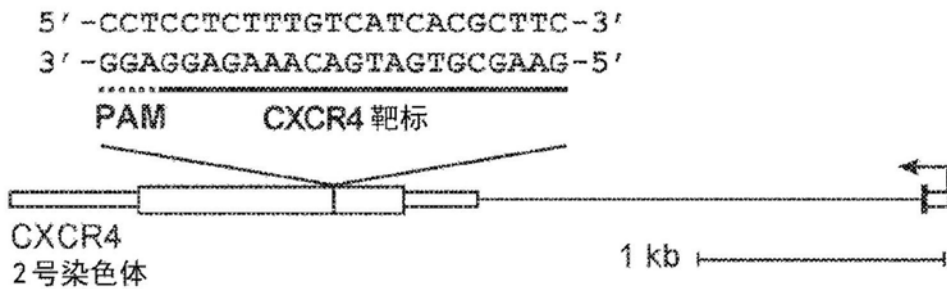


图1B

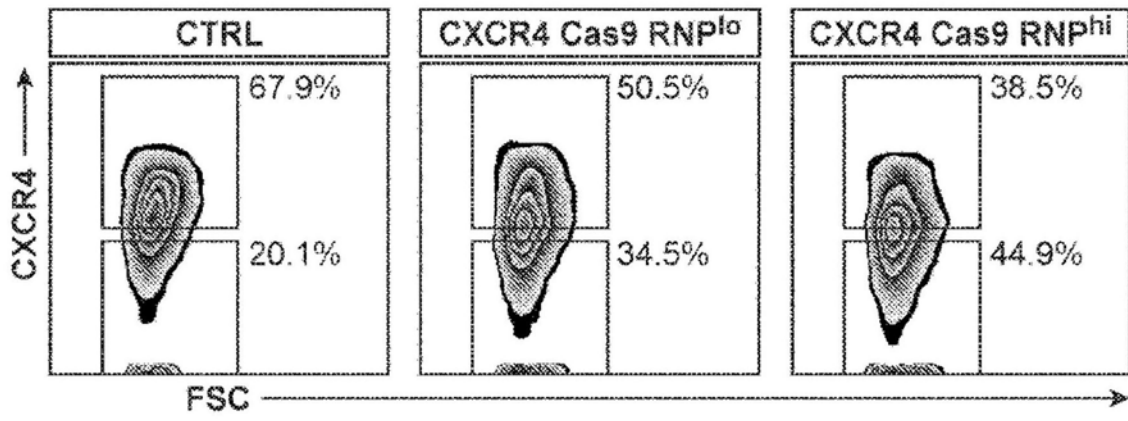


图1C

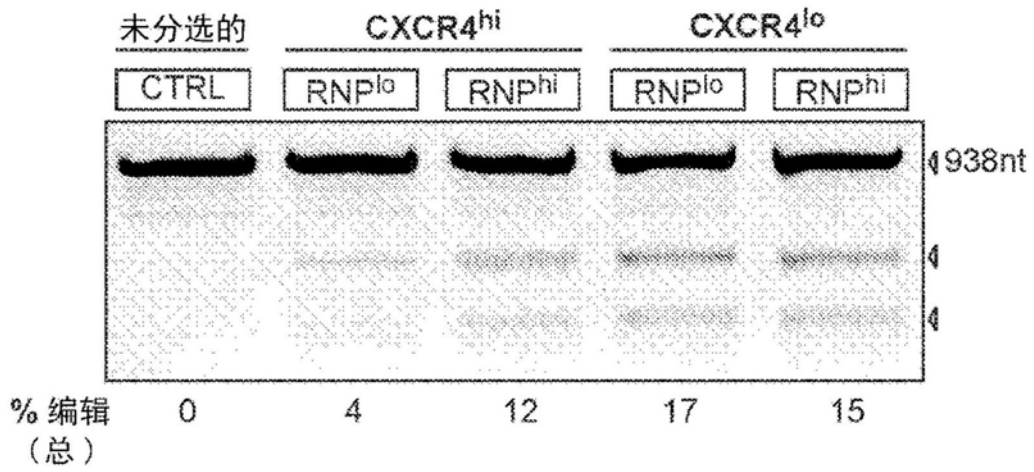


图1D

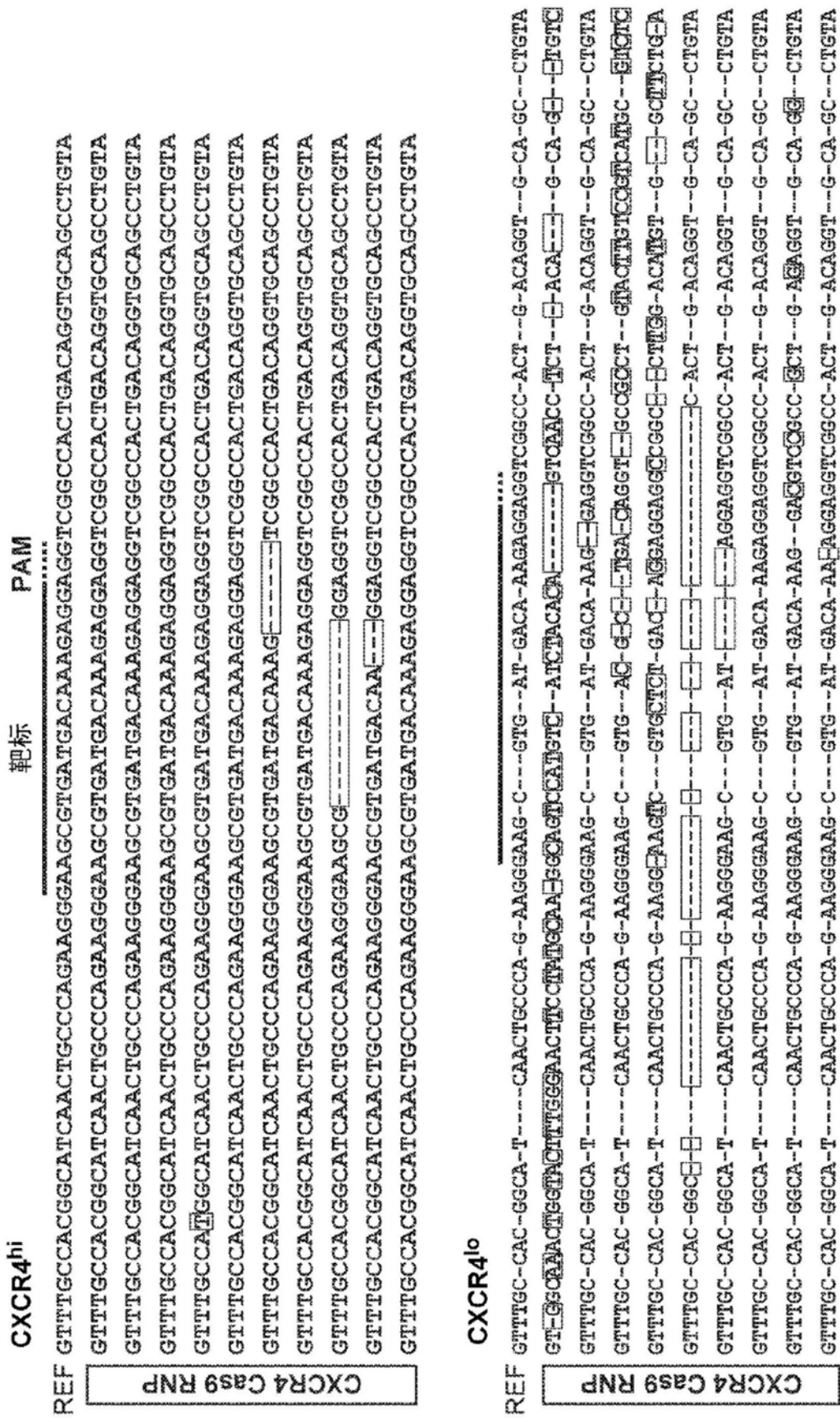


图1E
74

CXCR4^{lo}

REF GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA
 GTTTGCCACGGCATCAACTGCTCCCAAGAGGGAAGCCGTGATGACAAAGAGGAGGTCGGCCACTGACAGGTCAGCCCTGTA

CTRL

图1E(续)

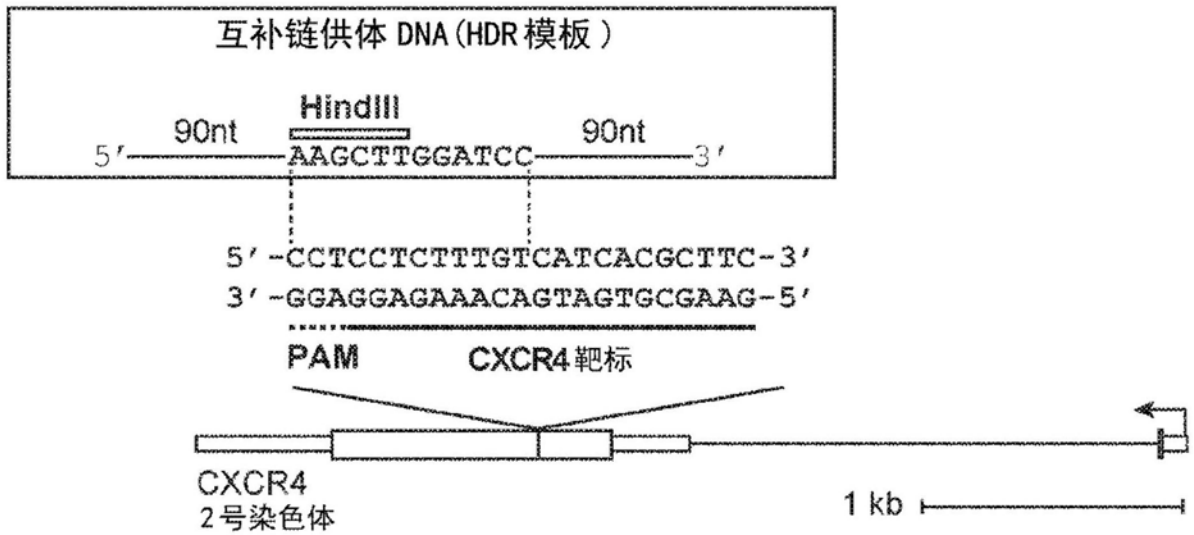


图2A

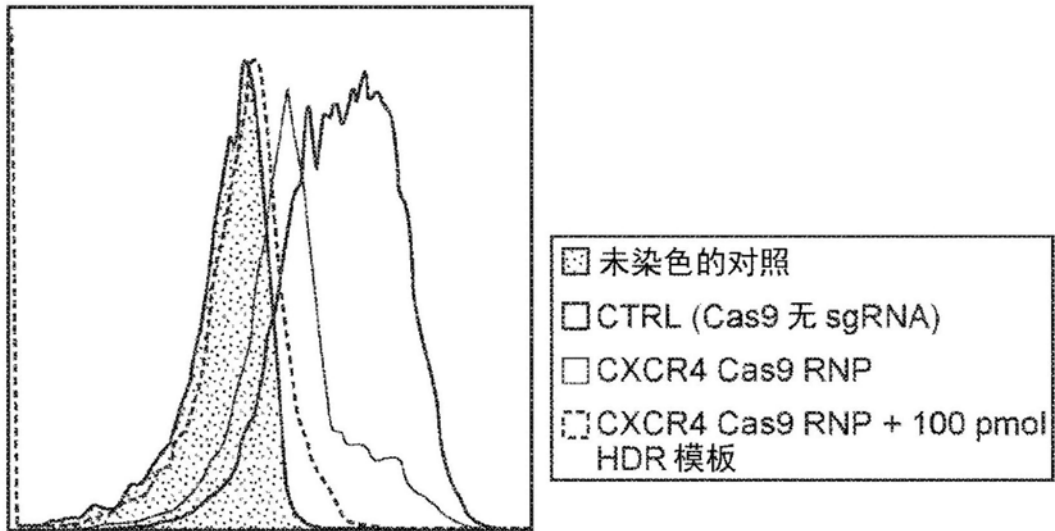


图2B

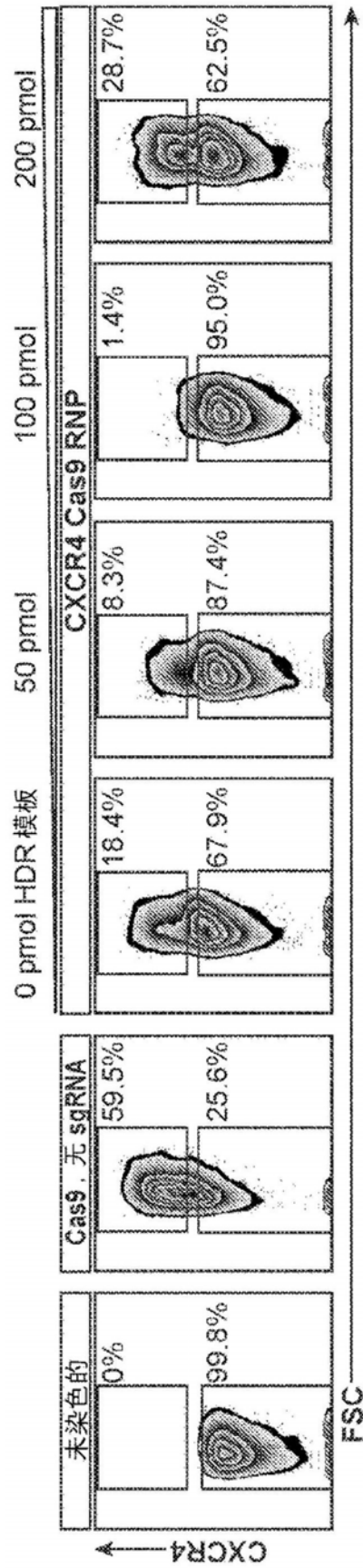


图2C

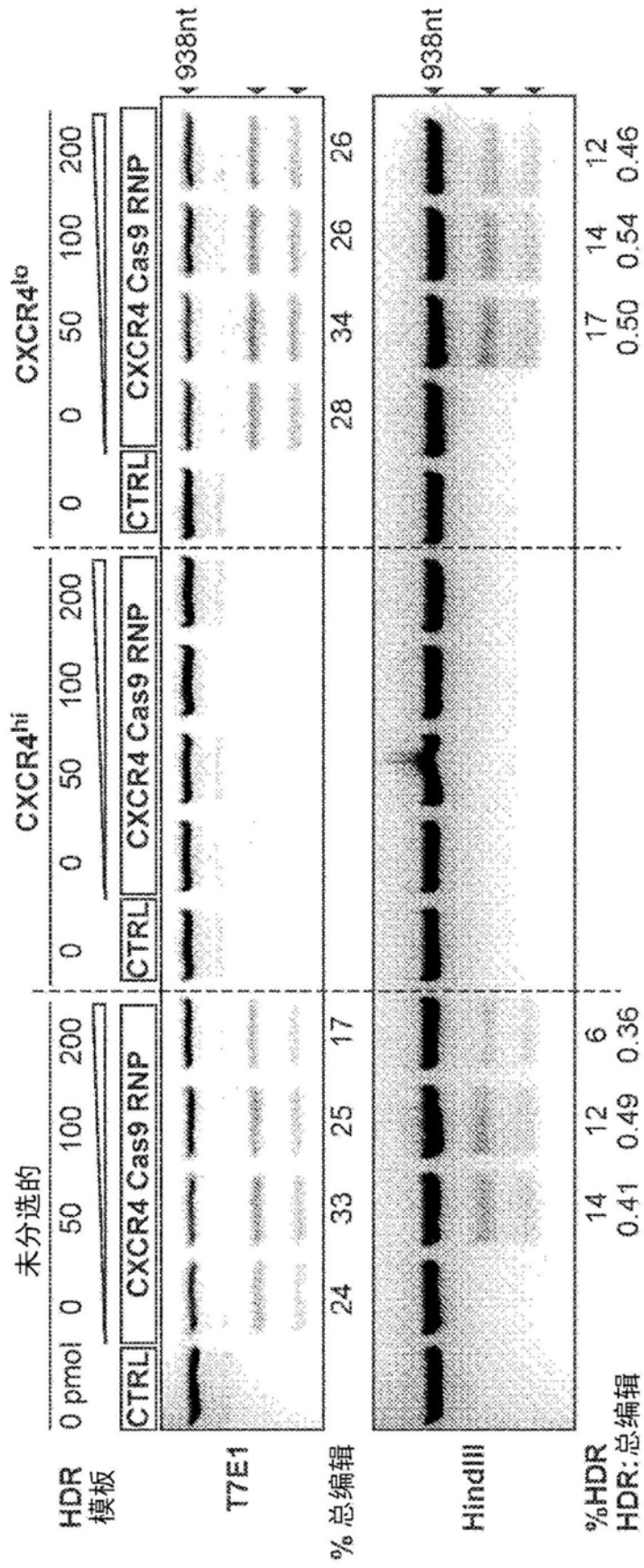


图2D

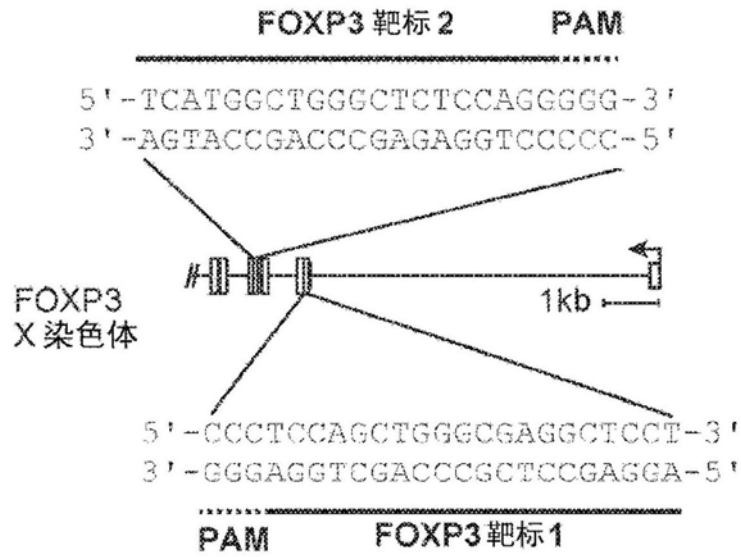


图3A

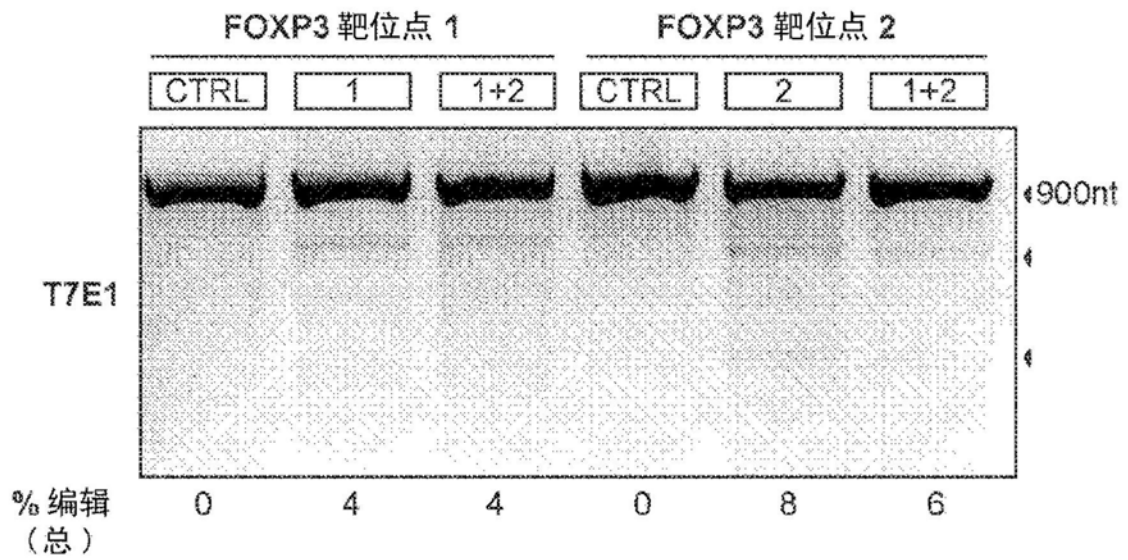


图3B

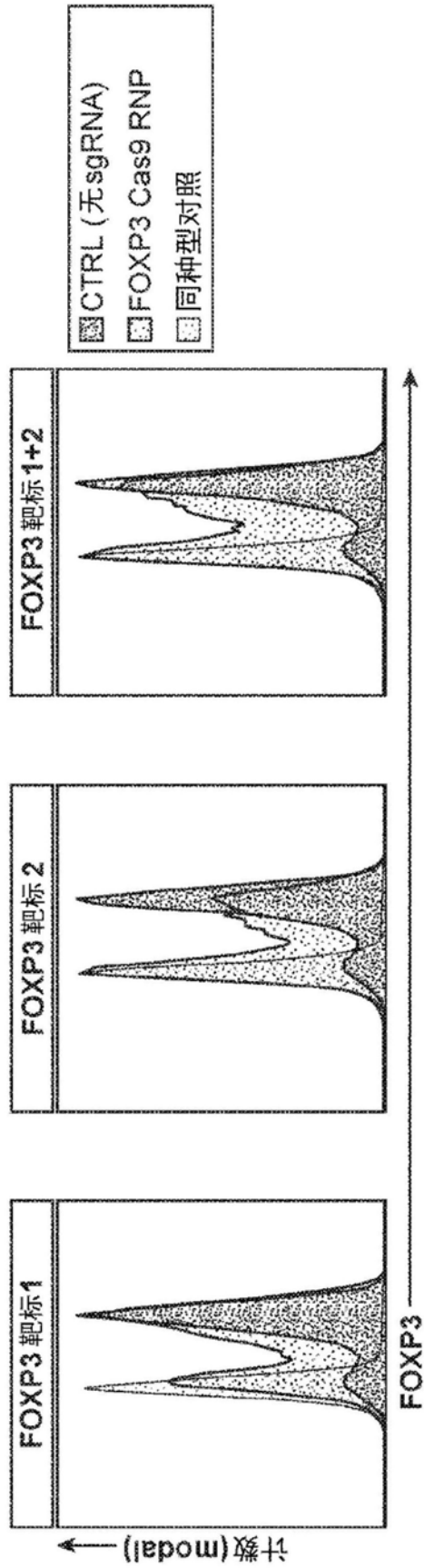


图3C

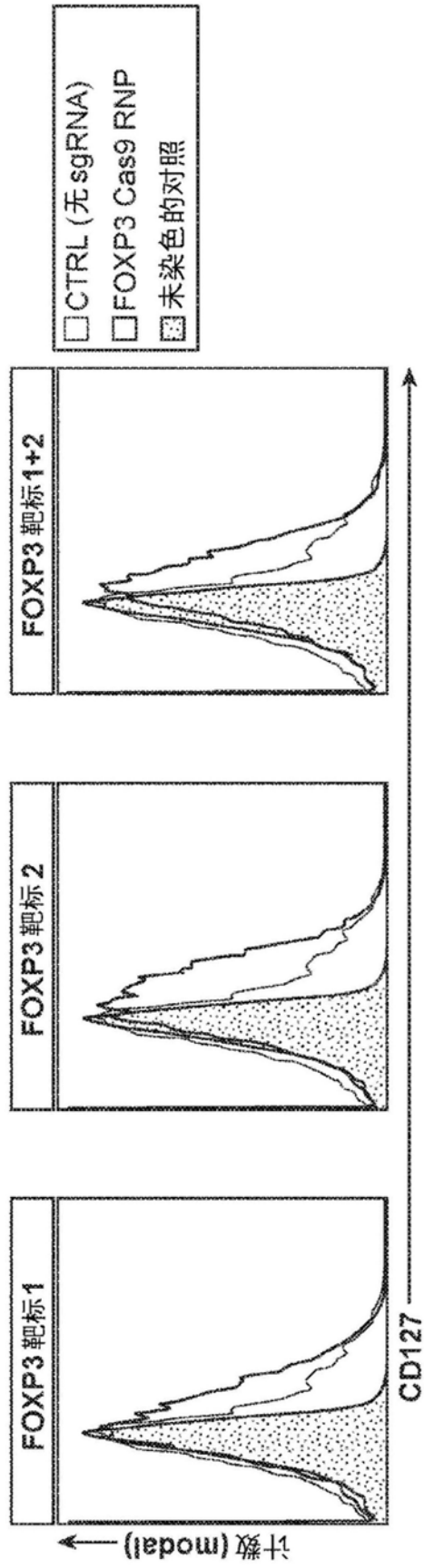


图3D

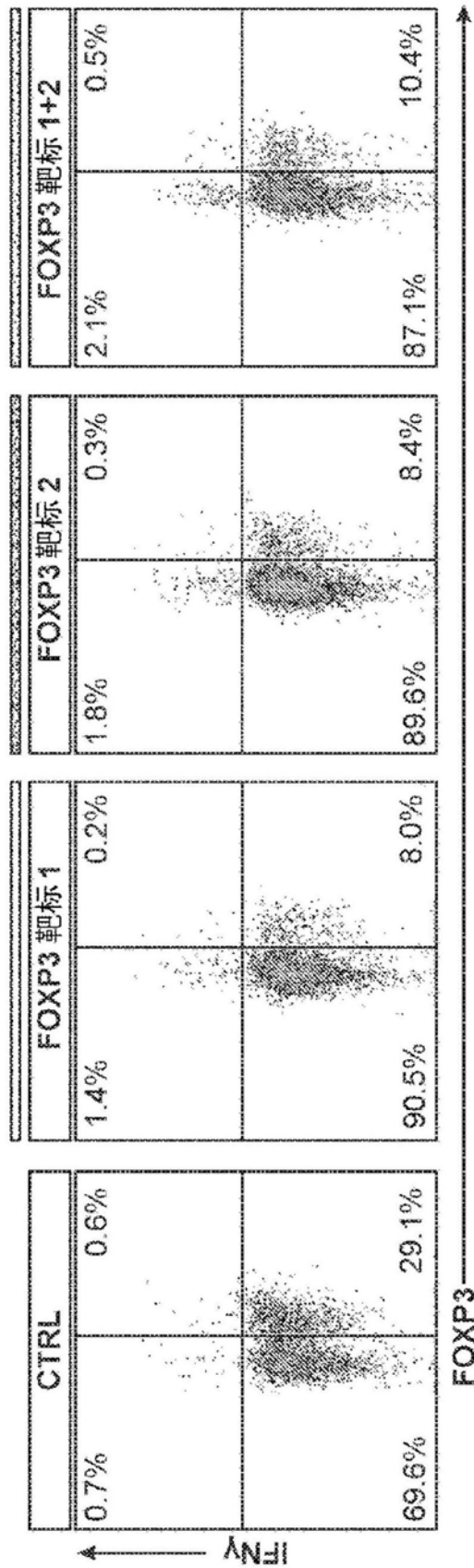


图4A

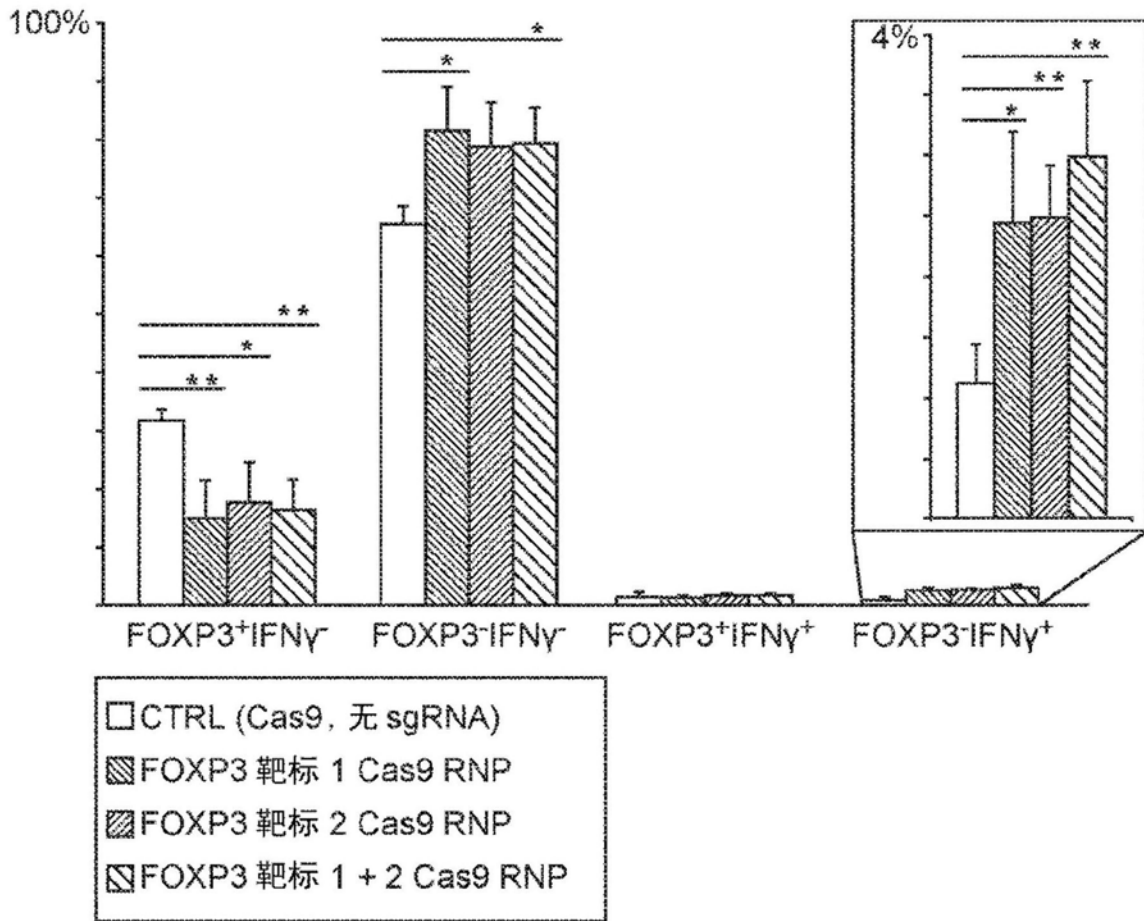


图4B

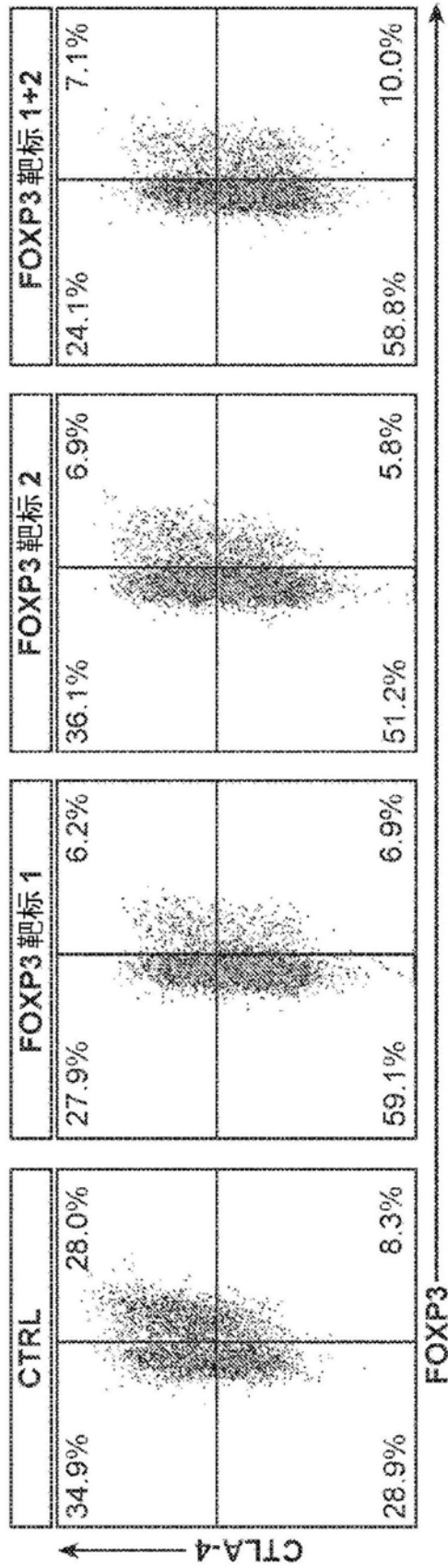


图4C

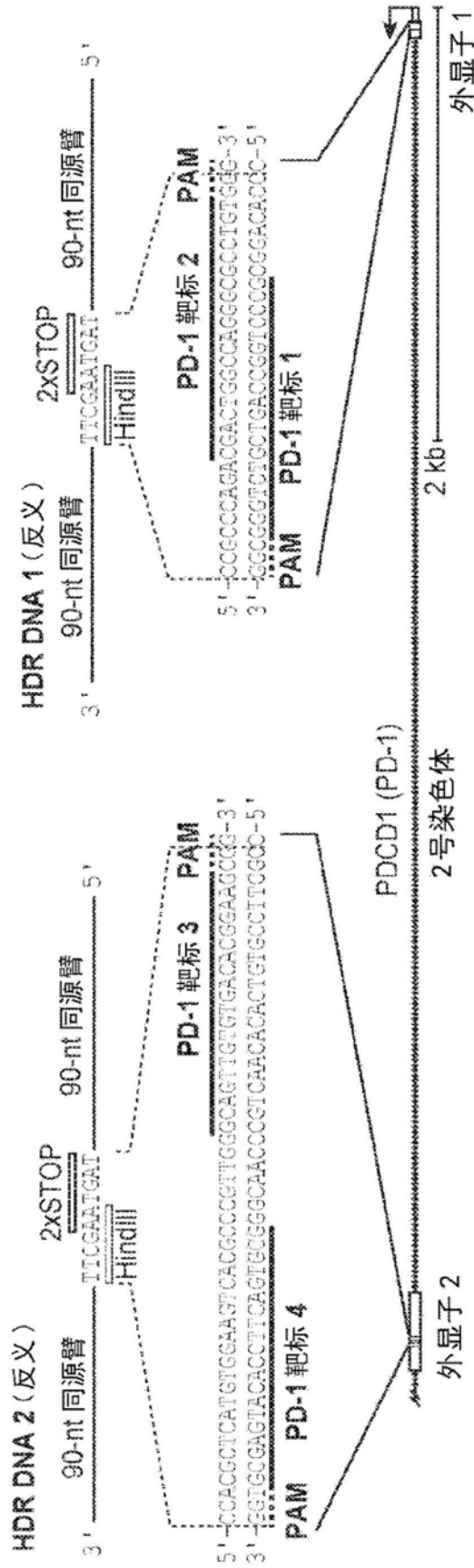


图5A

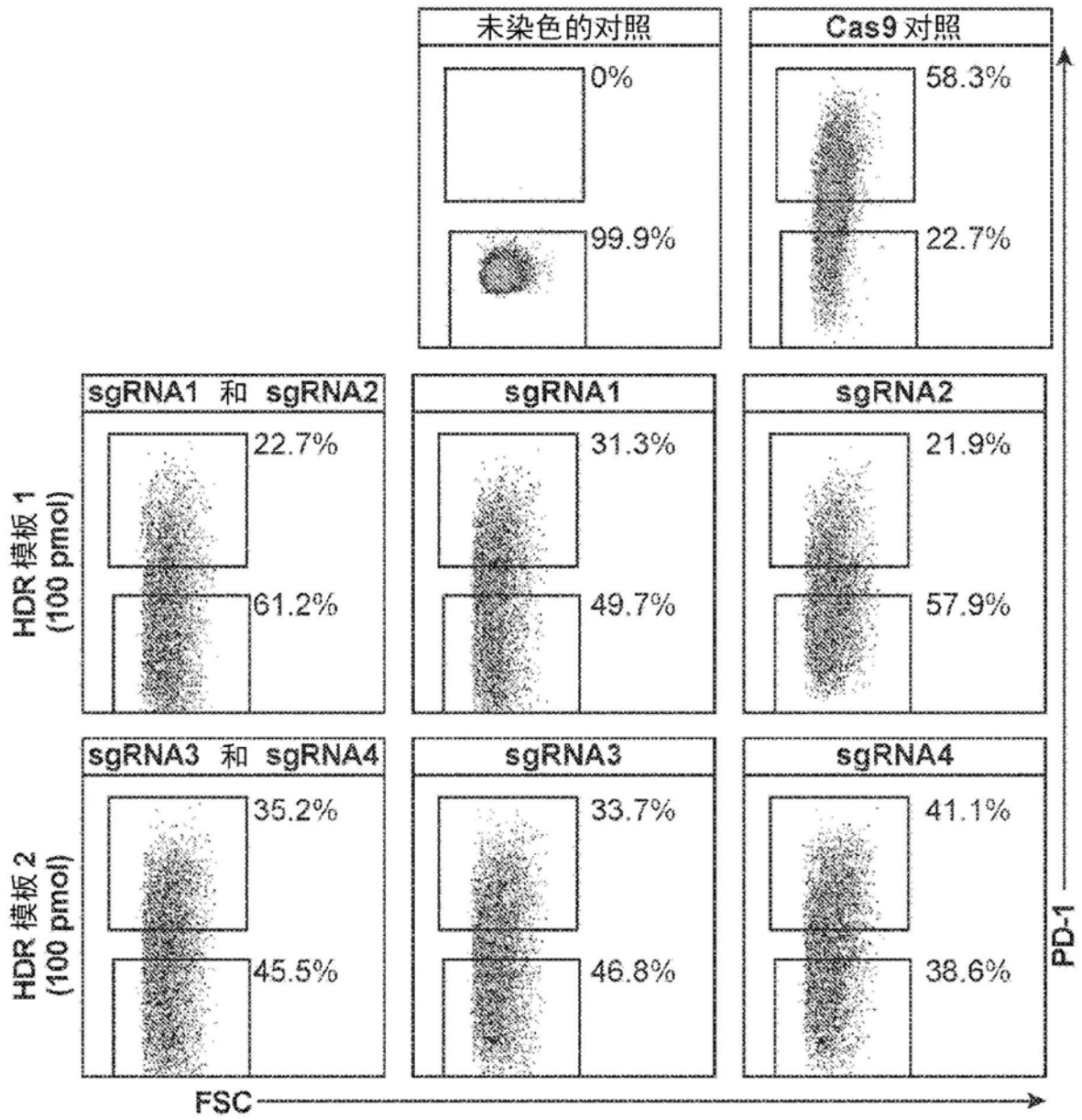


图5B

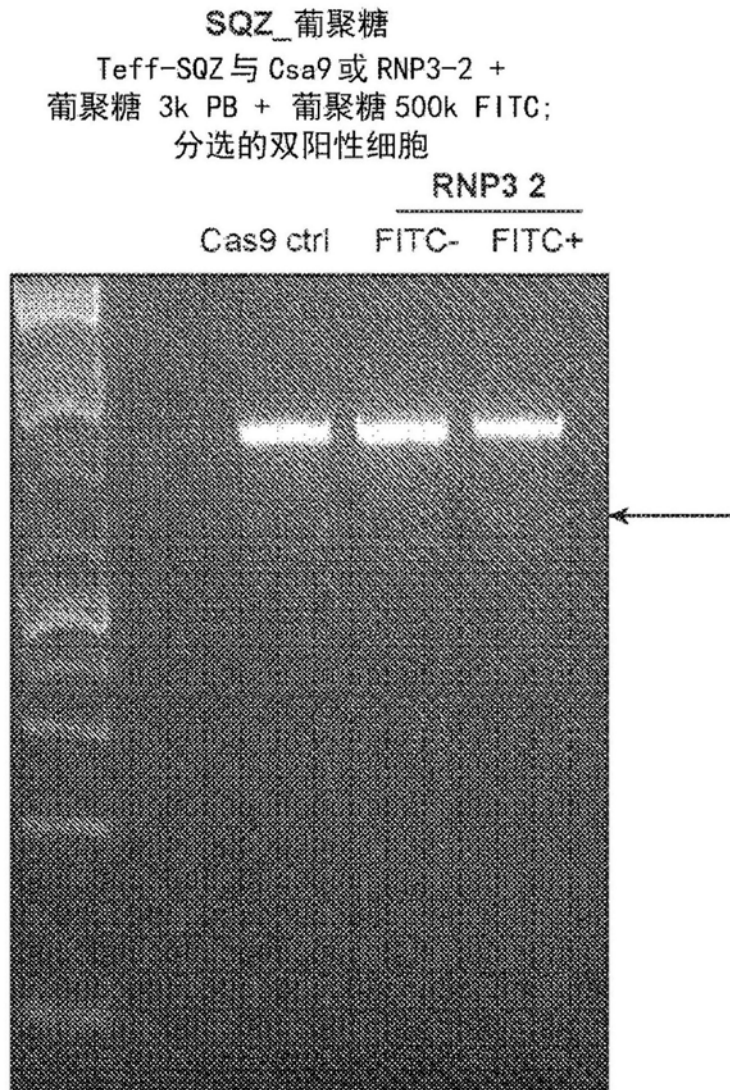


图6

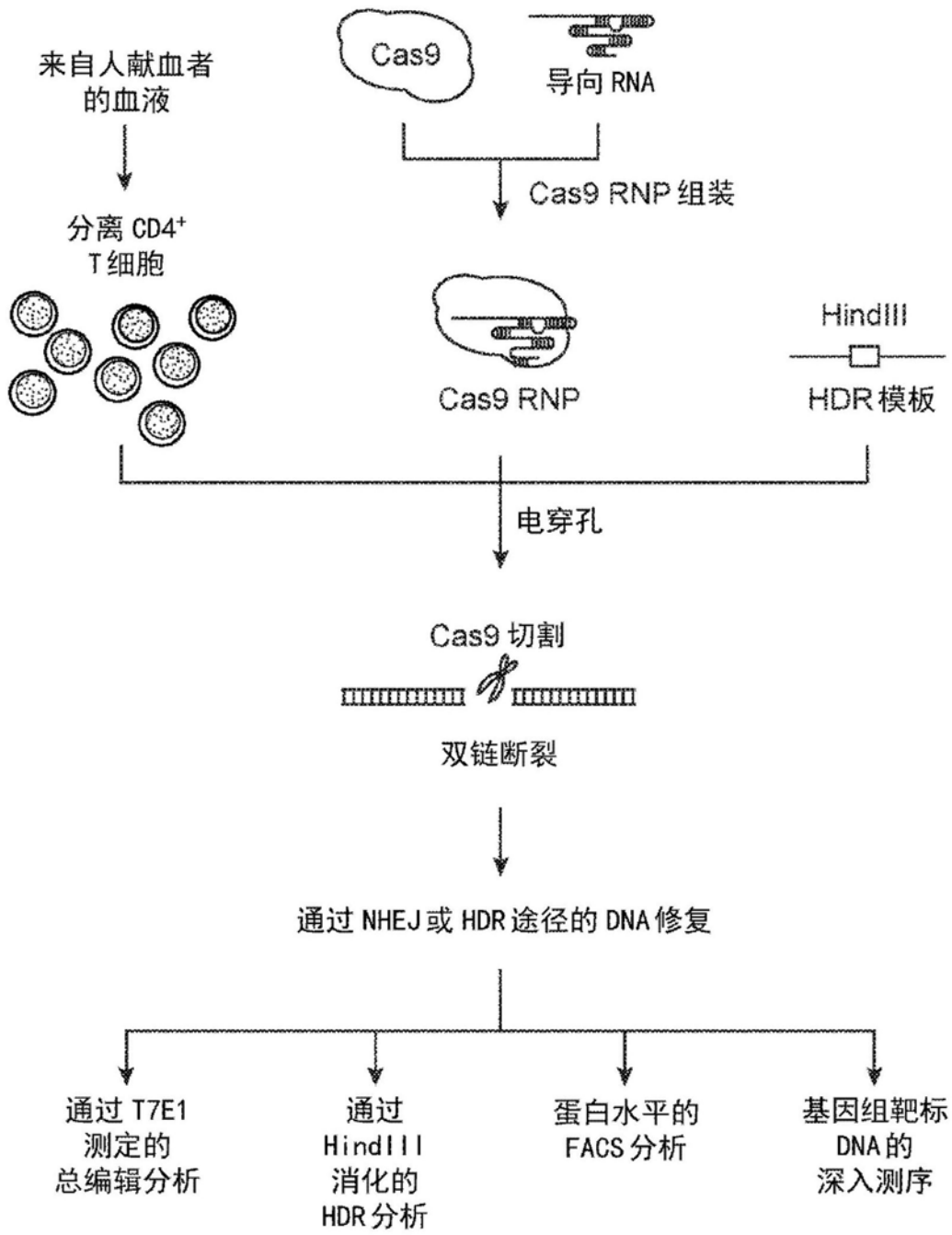


图7A

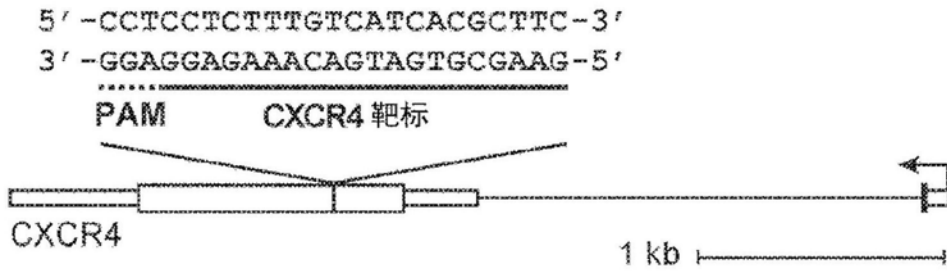


图7B

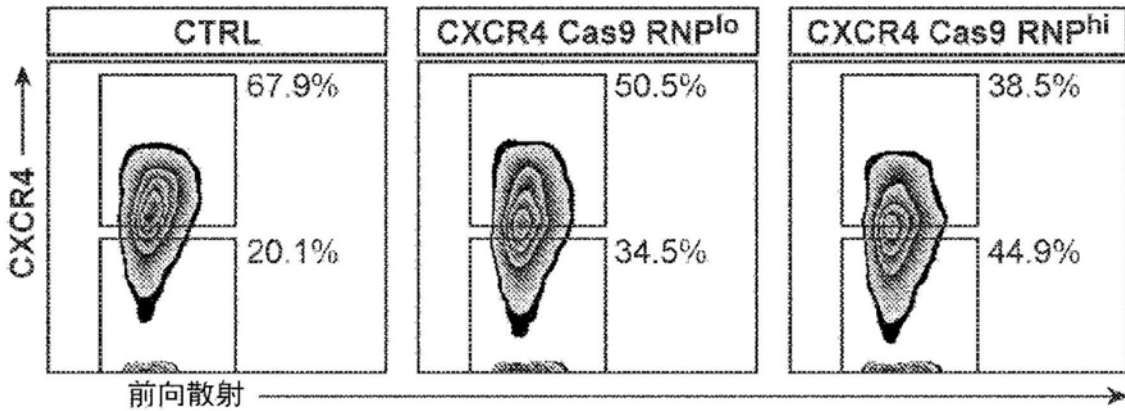


图7C

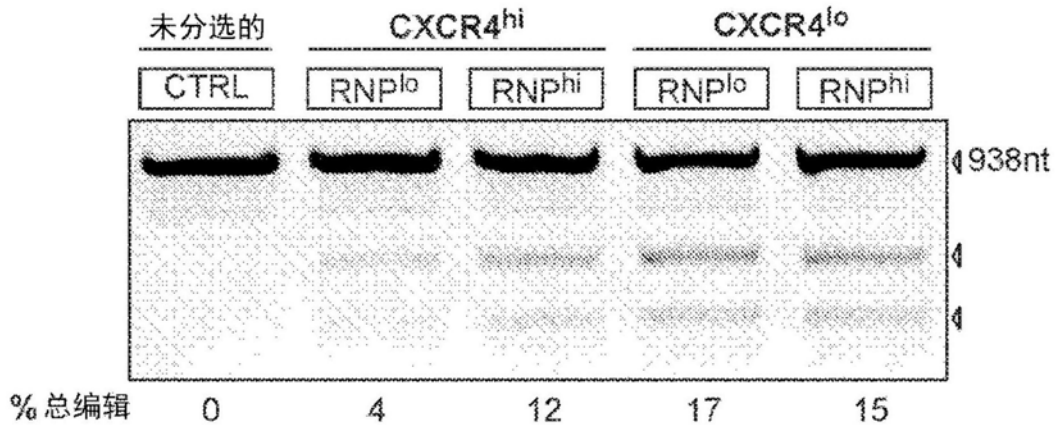


图7D

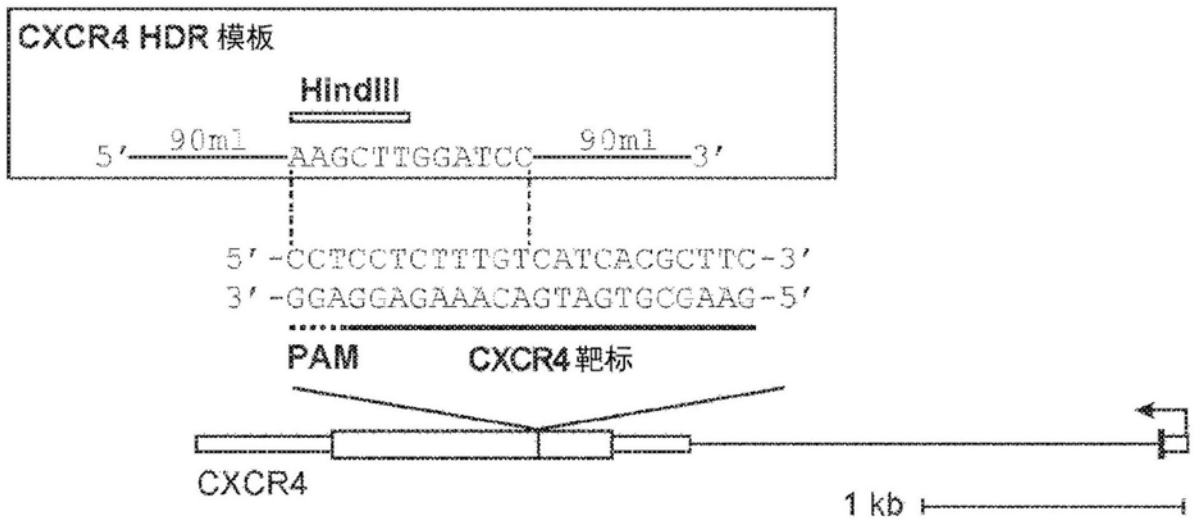


图8A

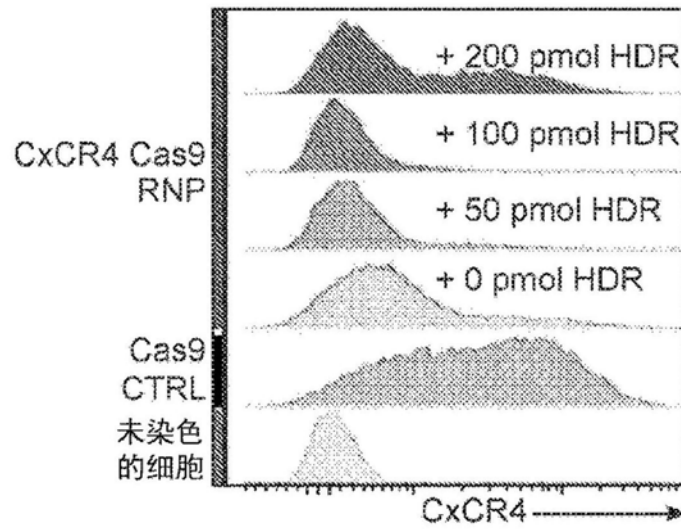


图8B

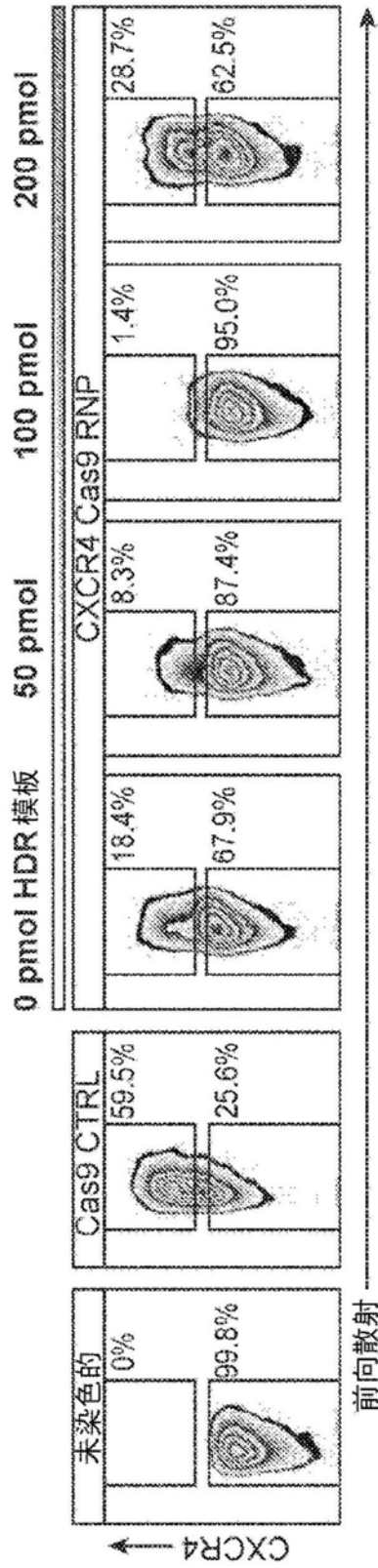


图8C

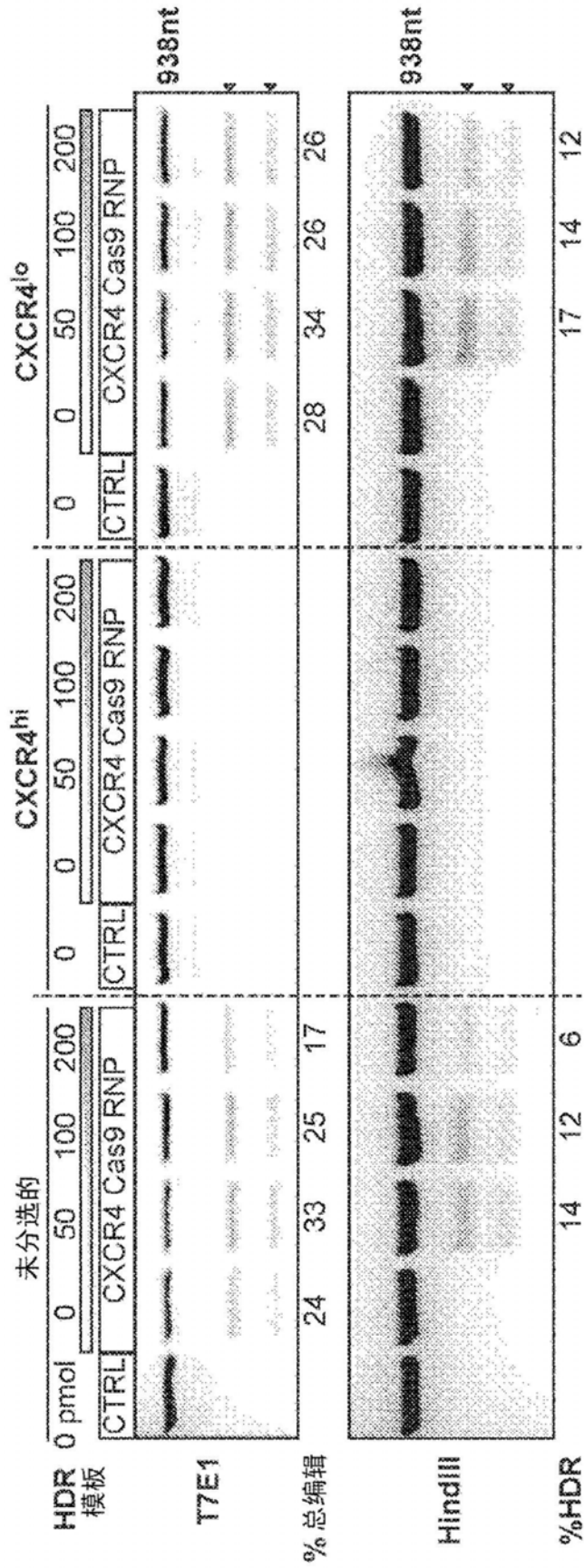


图8D

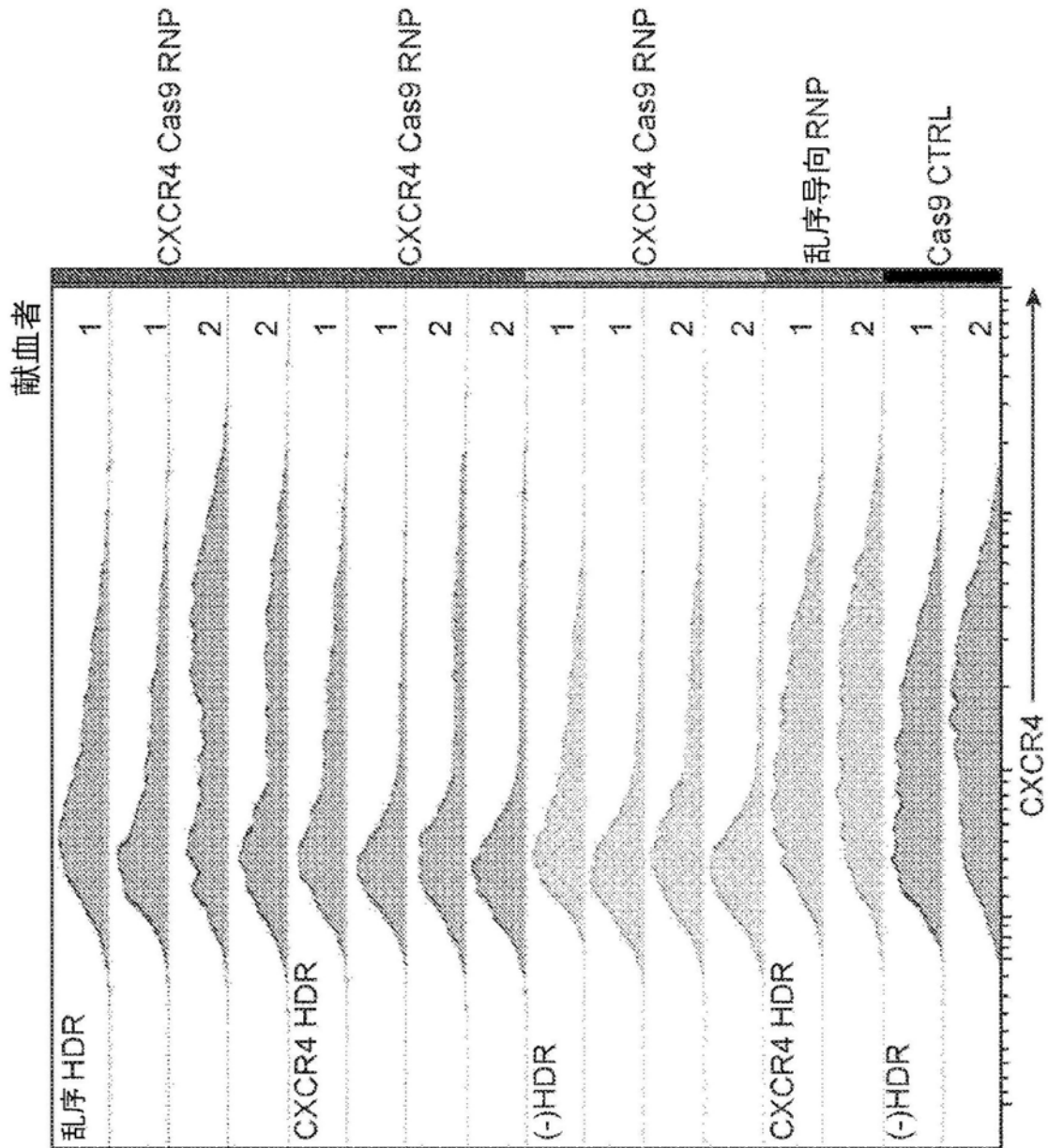


图9A

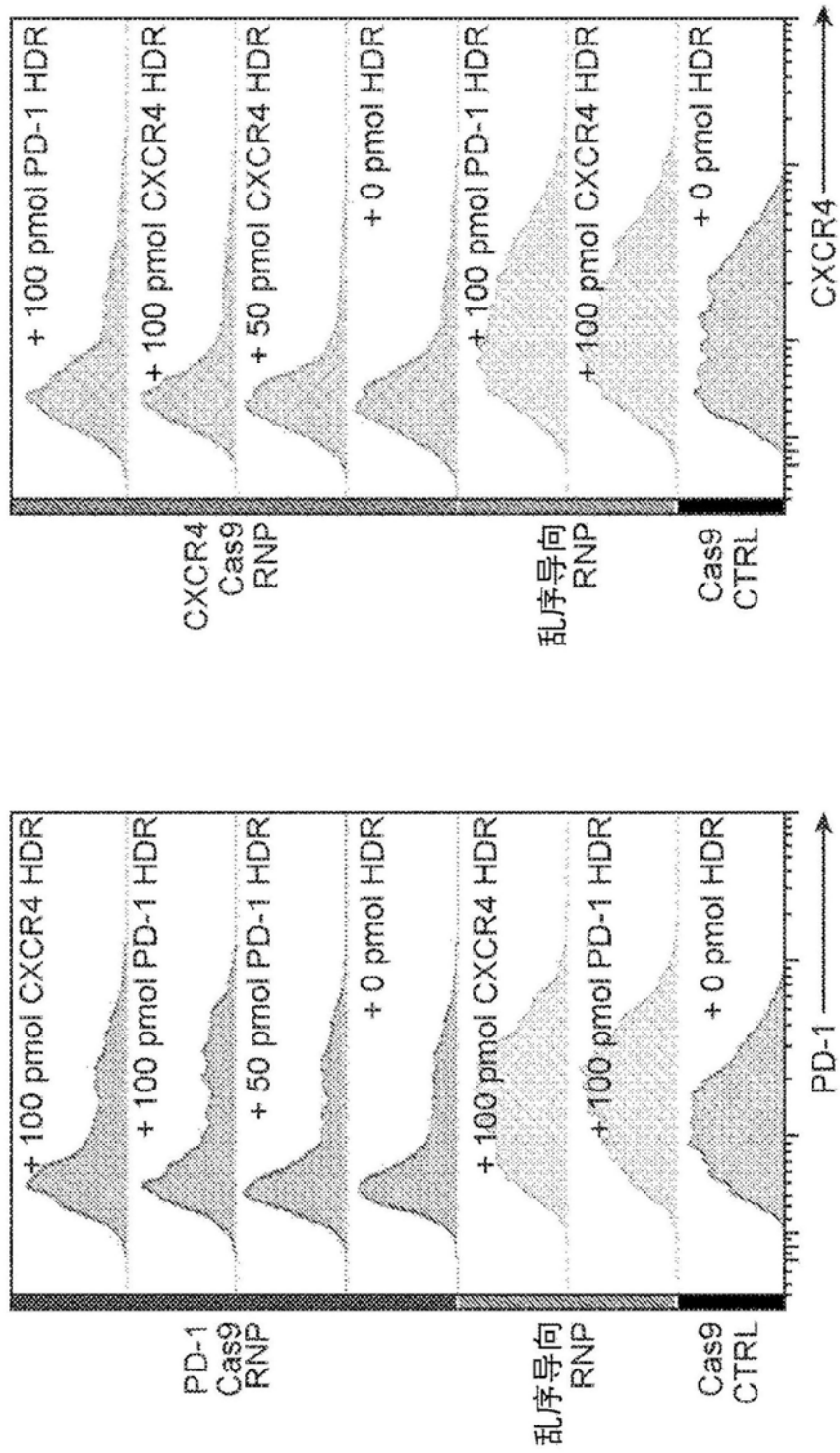


图9B

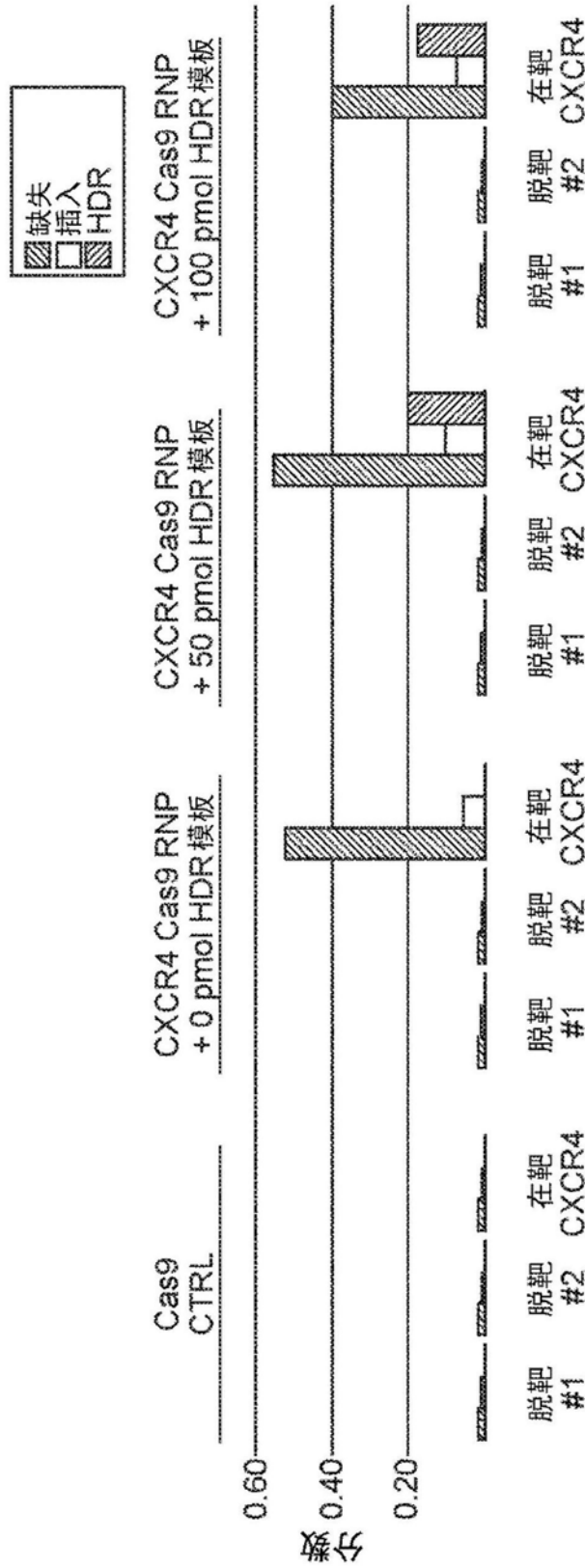


图10B

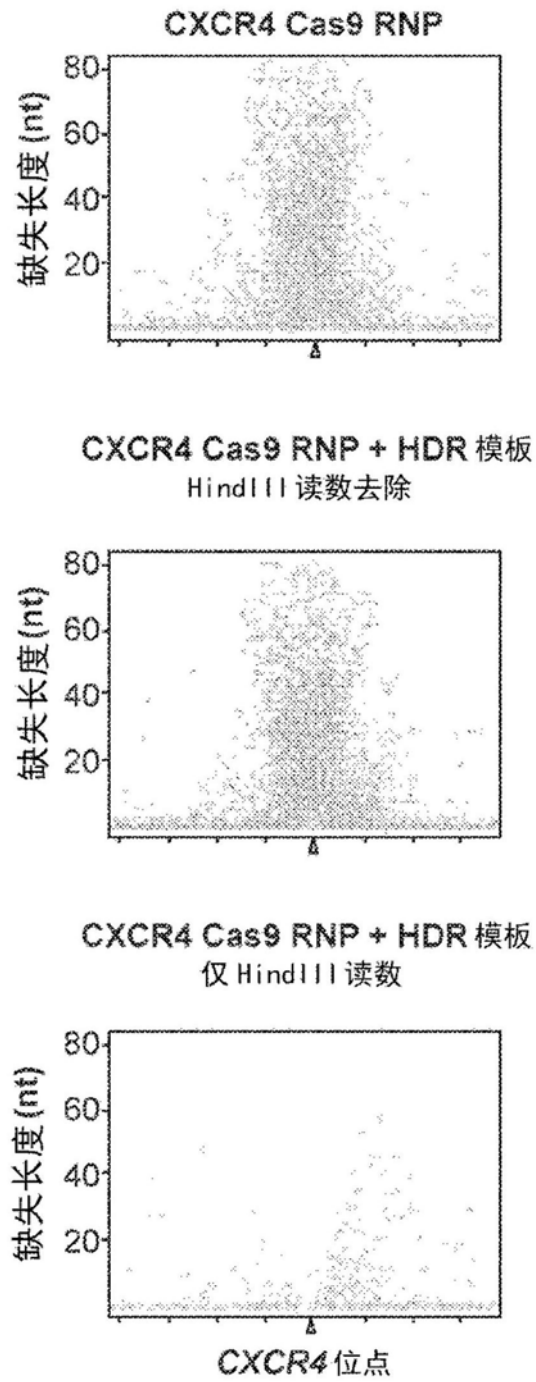


图10C

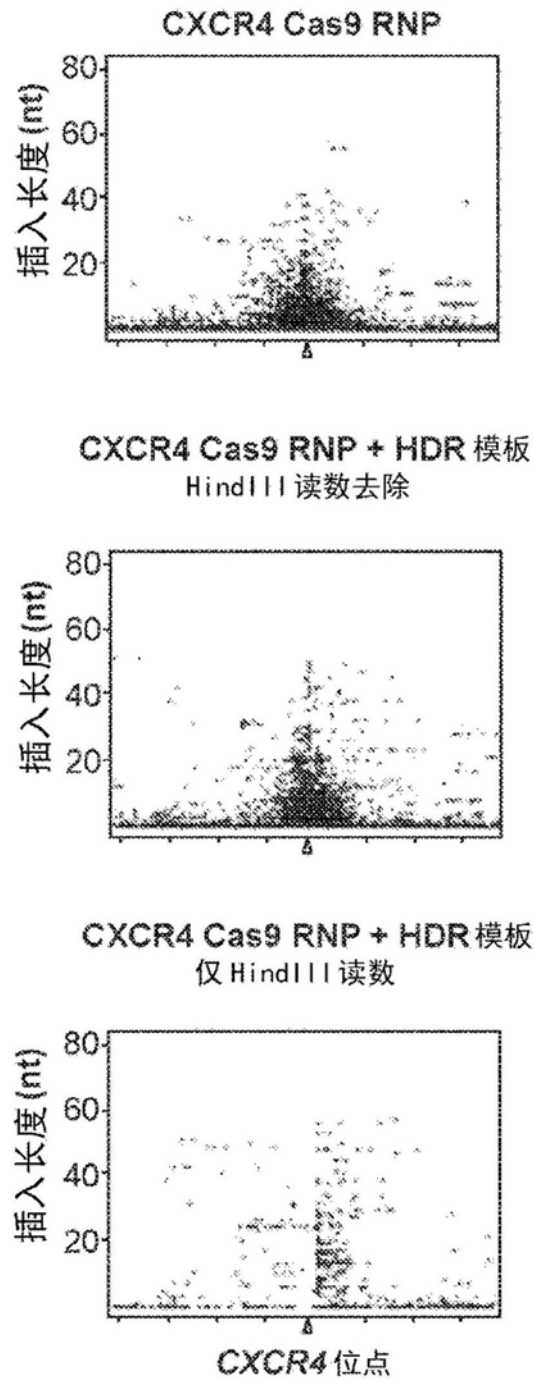


图10D

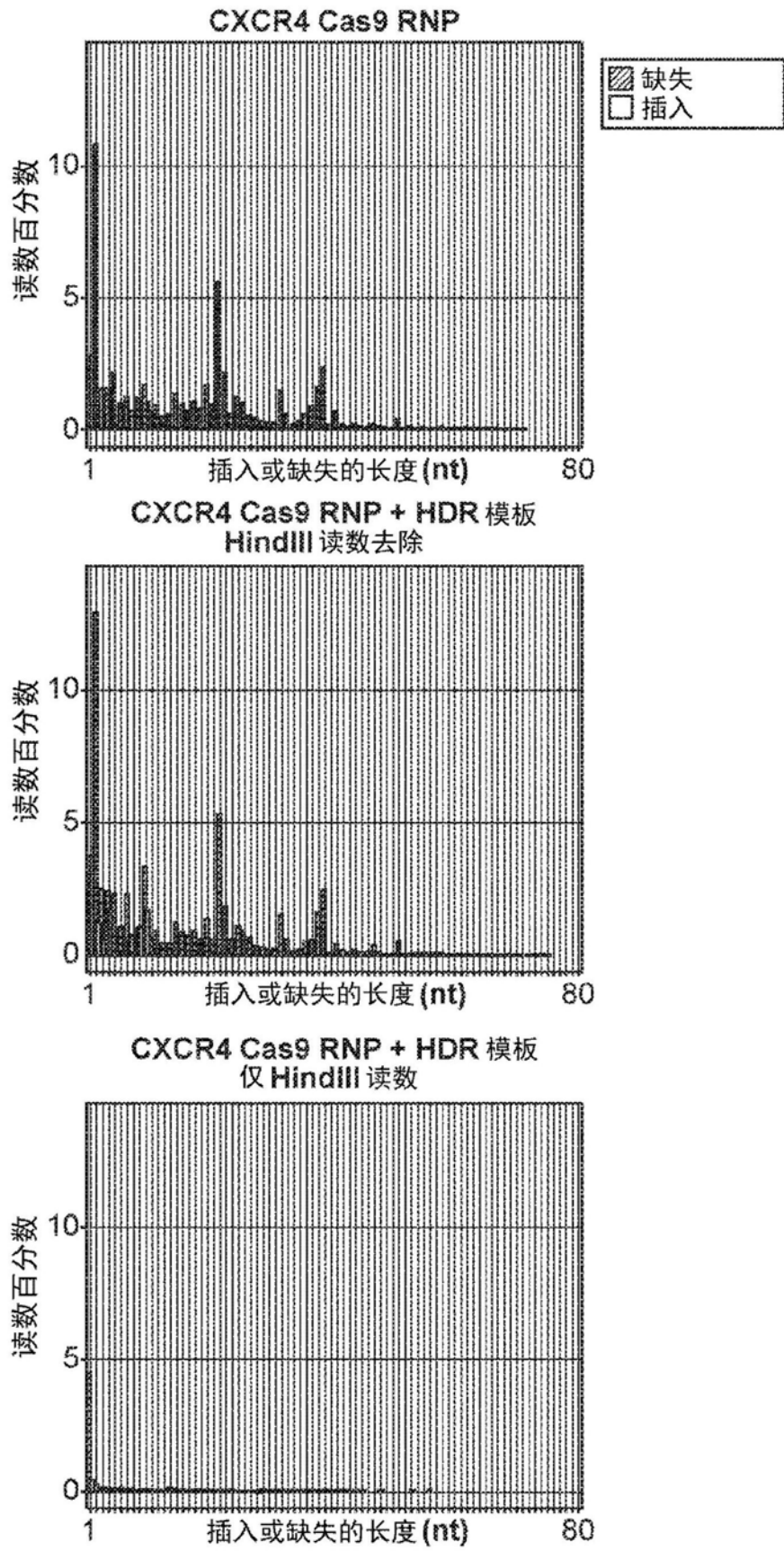


图11

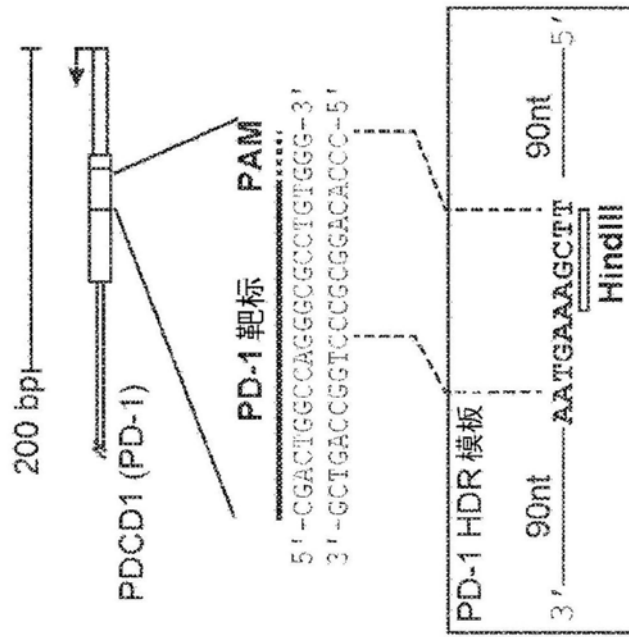


图12A

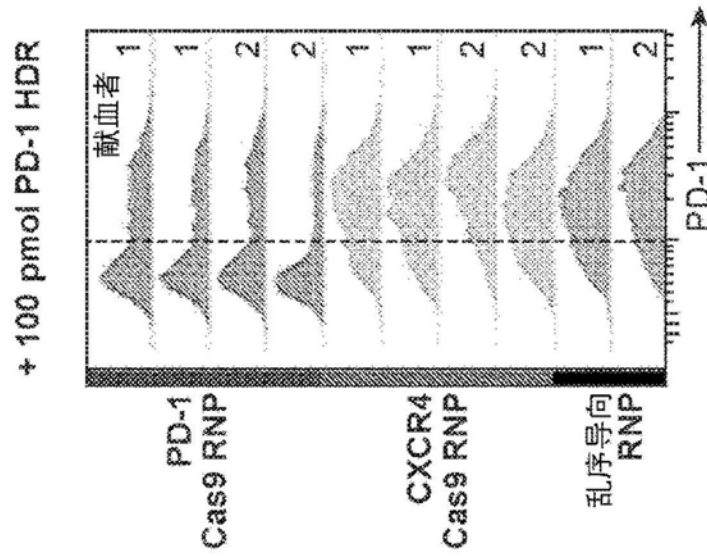


图12B

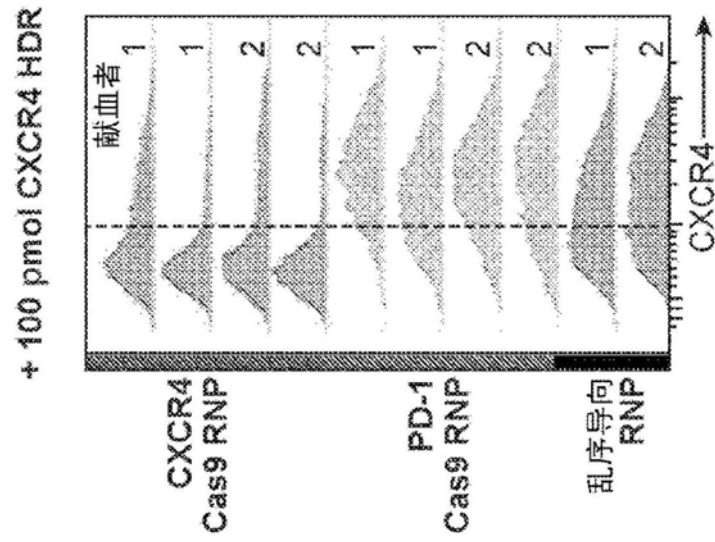


图12C

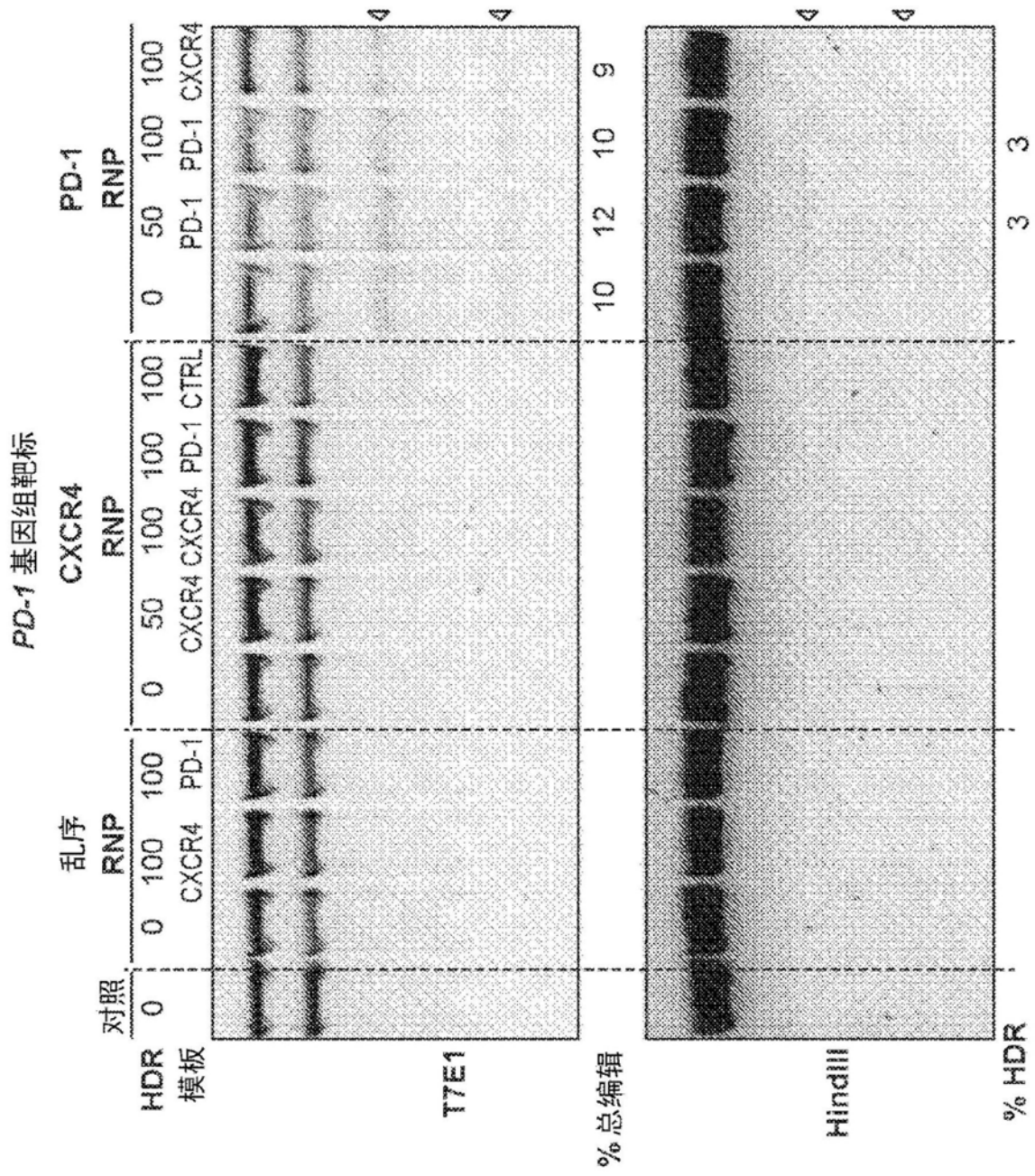


图12D

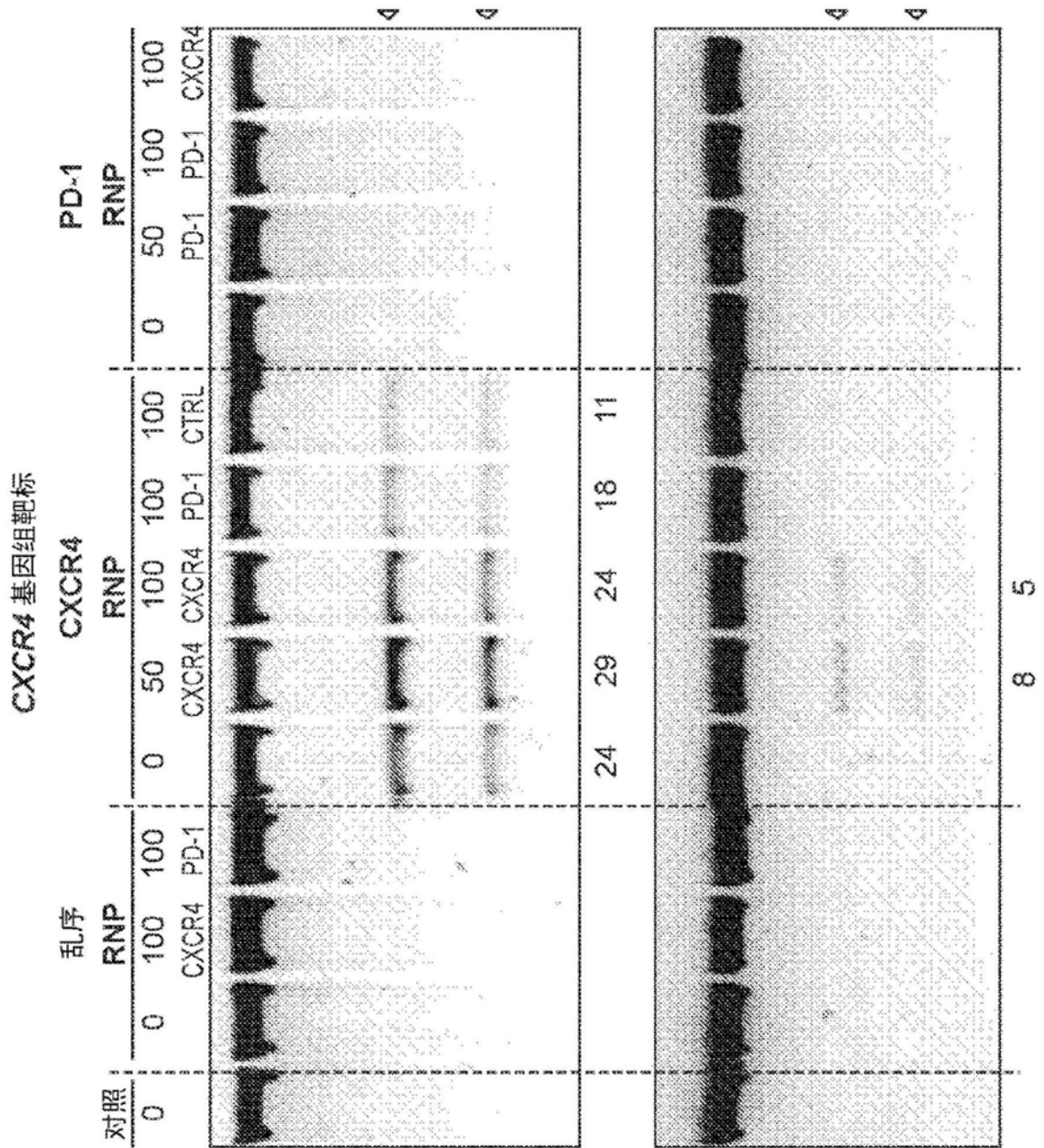


图12D(续)