



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116848240 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 03

(21) 申请号 202180092879.5

(22) 申请日 2021.11.30

(30) 优先权数据

63/122,339 2020.12.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.03

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/061156 2021.11.30

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2022/125329 EN 2022.06.16

(71) 申请人 因思科瑞普特公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 阿米尔·米尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C12N 9/12 (2006.01)

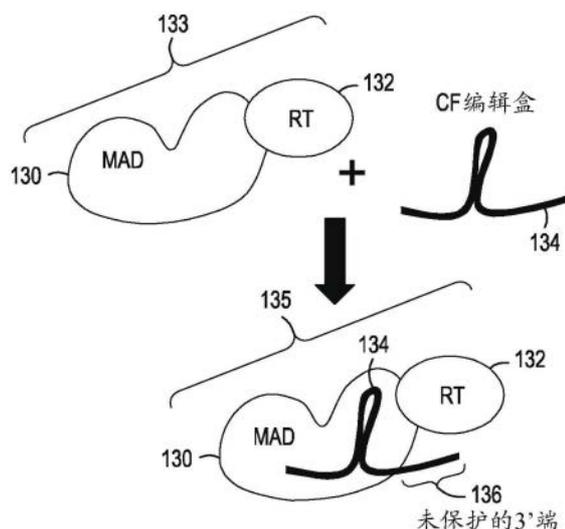
权利要求书2页 说明书31页 附图31页

(54) 发明名称

核酸引导的切口酶编辑中的gRNA稳定

(57) 摘要

本公开内容提供了用于活细胞中核酸引导的切口酶/逆转录酶融合编辑的物质组合物、方法和仪器。使用保留核酸引导的核酸酶的某些特征(例如,结合特异性和以靶向方式裂解一个或多个DNA链的能力)联合逆转录酶活性的融合蛋白(例如,切口酶-RT融合物),改进了编辑效率。采用了包括gRNA和修复模板的编辑盒,其中修复模板的3'端被保护免于降解。



1. 一种CREATE融合编辑盒,所述CREATE融合编辑盒用于进行核酸引导的切口酶/逆转录酶融合编辑,从3'至5'包含:

RNA修复模板,包含:

RNA稳定部分;

接头区;

能够与切口的靶DNA结合的引物结合区;

切口至编辑区;以及

编辑后同源性区;

gRNA,包含:

引导序列;和

支架区。

2. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是G四联体、RNA发夹、RNA假结或外切核糖核酸酶抗性RNA。

3. 根据权利要求2所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是G四联体。

4. 根据权利要求3所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No: 1;SEQ ID No:2;SEQ ID No:3;SEQ ID No:4;SEQ ID No:5;SEQ ID No:6;SEQ ID No:7;SEQ ID No:8;SEQ ID No:9和SEQ ID No:10的G四联体。

5. 根据权利要求3所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No: 11;SEQ ID No:12;SEQ ID No:13;SEQ ID No:14;SEQ ID No:15;SEQ ID No:16;SEQ ID No:17;SEQ ID No:18;SEQ ID No:19和SEQ ID No:20的G四联体。

6. 根据权利要求3所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No: 21;SEQ ID No:22;SEQ ID No:23;SEQ ID No:24;SEQ ID No:25;SEQ ID No:26;SEQ ID No:27;SEQ ID No:28;SEQ ID No:29和SEQ ID No:30的G四联体。

7. 根据权利要求3所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No: 31;SEQ ID No:32;SEQ ID No:33;SEQ ID No:34;SEQ ID No:35;SEQ ID No:36;SEQ ID No:37;SEQ ID No:38;SEQ ID No:39和SEQ ID No:40的G四联体。

8. 根据权利要求3所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No: 41;SEQ ID No:42;SEQ ID No:43;SEQ ID No:44;SEQ ID No:45;SEQ ID No:46;SEQ ID No:47;SEQ ID No:48和SEQ ID No:29的G四联体。

9. 根据权利要求2所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是RNA发夹。

10. 根据权利要求9所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No:50;SEQ ID No:51;SEQ ID No:52;SEQ ID No:53;SEQ ID No:54;SEQ ID No:55;SEQ ID No:65;SEQ ID No:66;SEQ ID No:67;SEQ ID No:68;SEQ ID No:69和SEQ ID No:70的RNA发夹。

11. 根据权利要求2所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是RNA假结。

12. 根据权利要求11所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No:50;SEQ ID No:56;SEQ ID No:57;SEQ ID No:58;SEQ ID No:59;SEQ ID No:60;SEQ ID No:61;SEQ ID No:62;SEQ ID No:63和SEQ ID No:64的RNA假结。

13. 根据权利要求2所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是外切核糖核酸

酶抗性RNA。

14. 根据权利要求13所述的CREATE融合编辑盒,其中所述RNA稳定部分是选自SEQ ID No:71;SEQ ID No:72和SEQ ID No:73的外切核糖核酸酶抗性RNA。

15. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述接头区的长度为0至20个核苷酸。

16. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述引物结合区的长度为0至20个核苷酸。

17. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述切口至编辑区的长度为0至20个核苷酸。

18. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述编辑后同源性区的长度为3至20个核苷酸。

19. 根据权利要求1所述的CREATE融合编辑盒,其中所述gRNA的引导序列能够与基因组靶基因座杂交,并且其中所述gRNA的支架序列能够与核酸引导的核酸酶相互作用或复合。

核酸引导的切口酶编辑中的gRNA稳定

[0001] 相关案件

[0002] 本国际PCT申请要求2020年12月7日提交的题为“gRNA STABILIZATION IN NUCLEIC ACID-GUIDED NICKASE EDITING”的USSN 63/122,339的优先权,其通过引用以其整体并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于活细胞,特别是哺乳动物细胞的改进的核酸引导的切口酶编辑的物质组合物、方法和仪器。

[0004] 发明背景

[0005] 在以下讨论中,将出于背景和介绍的目的描述某些物品和方法。本文包含的任何内容不被解释为对现有技术的“承认”。本申请人明确地保留根据情况证明根据可适用的法定条文由本文引用的方法不构成现有技术的权利。

[0006] 对活细胞的基因组进行精确的、靶向改变的能力一直是生物医学研究和开发的长期目标。最近,已经鉴定出允许操纵基因序列并从而操纵基因功能的各种核酸酶。核酸酶包括核酸引导的核酸酶,其使研究人员能够在活细胞中产生永久性编辑。当然,期望在细胞群体中获得可能的最高的编辑率;然而,在许多情况下,由核酸引导的核酸酶编辑产生的经编辑的细胞的百分比可能是个位数。

[0007] 因此,在核酸引导的核酸酶编辑领域中,对于用于提高编辑效率的改进的方法、组合物、模块和仪器存在需求。本公开内容解决此需求。

[0008] 发明概述

[0009] 提供本概述是为了以简化的形式介绍概念的选择,所述概念在下文的详述中进一步描述。该概述既不意图确定所要求保护的主题的关键或基本特征,也不意图用于限制所要求保护的主题的范围。所要求保护的主题的其他特征、细节、效用和优势从下面撰写的详述,包括附图中阐明的和所附的权利要求中限定的那些方面将是明显的。

[0010] 本公开内容涉及用于在核酸引导的切口酶编辑期间稳定gRNA的方法和组合物。用本发明的组合物和方法,使用保留核酸引导的核酸酶的某些特征(例如,结合特异性和以靶向方式裂解一个或更多个DNA链的能力)联合另一种酶促活性诸如逆转录酶活性的核酸引导的切口酶/逆转录酶融合蛋白(例如,切口酶-RT融合蛋白),改进了编辑效率。切口酶-RT融合酶与包含gRNA和修复模板的CF编辑盒(“CREATE融合编辑盒”)一起使用,其中CF编辑盒在修复模板的3'端用RNA稳定部分保护。

[0011] 因此,提供了一种用于进行核酸引导的切口酶/逆转录酶融合编辑的CREATE融合编辑盒,其从3'至5'包含:1) RNA修复模板,其包含:RNA稳定部分;接头区;能够与切口的靶DNA结合的引物结合区;切口至编辑(nick-to-edit)区;以及编辑后同源性区;和2) gRNA,其包含:引导序列;和支架区。

[0012] 在一些方面, RNA稳定部分是G四联体、RNA发夹、RNA假结或外切核糖核酸酶抗性RNA。在一些方面, RNA稳定部分是G四联体,并且在一些方面, G四联体选自SEQ ID No:1; SEQ

ID No:2;SEQ ID No:3;SEQ ID No:4;SEQ ID No:5;SEQ ID No:6;SEQ ID No:7;SEQ ID No:8;SEQ ID No:9;SEQ ID No:10;SEQ ID No:11;SEQ ID No:12;SEQ ID No:13;SEQ ID No:14;SEQ ID No:15;SEQ ID No:16;SEQ ID No:17;SEQ ID No:18;SEQ ID No:19;SEQ ID No:20;SEQ ID No:21;SEQ ID No:22;SEQ ID No:23;SEQ ID No:24;SEQ ID No:25;SEQ ID No:26;SEQ ID No:27;SEQ ID No:28;SEQ ID No:29;SEQ ID No:30;SEQ ID No:31;SEQ ID No:32;SEQ ID No:33;SEQ ID No:34;SEQ ID No:35;SEQ ID No:36;SEQ ID No:37;SEQ ID No:38;SEQ ID No:39;SEQ ID No:40;SEQ ID No:41;SEQ ID No:42;SEQ ID No:43;SEQ ID No:44;SEQ ID No:45;SEQ ID No:46;SEQ ID No:47;SEQ ID No:48和SEQ ID No:49。在一些方面, RNA稳定部分是RNA发夹;并且在一些方面, RNA发夹选自SEQ ID No:50;SEQ ID No:51;SEQ ID No:52;SEQ ID No:53;SEQ ID No:54;SEQ ID No:55;SEQ ID No:65;SEQ ID No:66;SEQ ID No:67;SEQ ID No:68;SEQ ID No:69和SEQ ID No:70。在一些方面, RNA稳定部分是RNA假结, 其中RNA假结选自SEQ ID No:50;SEQ ID No:56;SEQ ID No:57;SEQ ID No:58;SEQ ID No:59;SEQ ID No:60;SEQ ID No:61;SEQ ID No:62;SEQ ID No:63和SEQ ID No:64。在一些方面, RNA稳定部分是外切核糖核酸酶抗性RNA, 并且在一些方面, 外切核糖核酸酶抗性RNA选自SEQ ID No:71;SEQ ID No:72和SEQ ID No:73。

[0013] 在一些方面, CREATE融合编辑盒具有长度为0至20个核苷酸的接头区。在一些方面, CREATE融合编辑盒具有长度为0至20个核苷酸的引物结合区。在一些方面, CREATE融合编辑盒具有长度为0至20个核苷酸的切口至编辑区。在一些方面, CREATE融合编辑盒具有长度为3至20个核苷酸的编辑后同源性区。在一些方面, CREATE融合编辑盒具有能够与基因组靶基因座杂交的引导序列和能够与核酸引导的核酸酶相互作用或复合的支架序列。

[0014] 下面更详细地描述本发明的这些方面和其他特征和优势。

[0015] 附图简述

[0016] 从以下结合附图对说明性实施方案的详细描述, 将更充分地理解本发明的前述和其他特征和优点, 在附图中:

[0017] 图1A是用于经由核酸引导的切口酶/逆转录酶融合(“切口酶-RT融合”)编辑来编辑活细胞的示例性方法的简化框图。图1B是用于经由切口酶-RT融合编辑来编辑活细胞的示例性方法的可选简化框图。图1C是核酸引导的切口酶/逆转录酶融合蛋白(切口酶-RT融合物)和CF编辑盒的简化图解描绘。图1D是核酸引导的切口酶/逆转录酶融合蛋白(切口酶-RT融合物)和CF编辑盒的简化图解描绘, CF编辑盒包含gRNA和修复模板, 修复模板在修复模板的3'端包含RNA稳定部分(这里是G2四联体、发夹、假结)(即“3'保护的CF编辑盒”或“稳定的CF编辑盒”或“StCFEC”)。图1E示出了作为RNA稳定部分测试的一般假结结构的描绘。

[0018] 图2A-图2C描绘了用于进行切口酶-RT融合编辑的示例性自动化多模块细胞处理仪器的三个不同视图。

[0019] 图3A-图3C描绘了包含在用于培养和转染细胞用于进行切口酶-RT融合编辑的集成仪器中的生物反应器模块的示例性实施方案的各种视图和部件(component)。图3D和图3E描绘了用于培养和转染细胞用于进行切口酶-RT融合编辑的示例性集成仪器。

[0020] 图4A描绘了采用细胞的微载体分区递送用于对在悬浮液中生长的哺乳动物细胞进行切口酶-RT融合编辑的示例性工作流程。图4B描绘了用于培养、传代、转染和编辑iPSC(诱导多能干细胞)的选择, 包括CF编辑盒和切口酶-RT融合酶的顺序转导和转染。图4C描绘

了采用微载体分区递送用于进行哺乳动物细胞的切口酶-RT融合编辑的示例性工作流程。图4D描绘了采用微载体分区递送用于进行哺乳动物细胞的切口酶-RT融合编辑的可选工作流程。

[0021] 图5是示例性自动化多模块细胞处理仪器的实施方案的简化过程图,其包含用于在使用切口酶-RT融合酶和在CF编辑盒的修复模板组分的3'端具有gRNA稳定部分的CF编辑盒(StCFEC)的系统中递归细胞编辑(包括哺乳动物细胞编辑)的固体壁选择/单个化/生长/诱导/编辑/标准化装置。

[0022] 图6包括两个图,所述图报告了显示具有3' gRNA稳定部分的CF编辑盒(StCFEC)增加GFP到BFP系统的编辑的结果。

[0023] 图7是示出StCFEC的单拷贝数(SCN)递送相比于不含RNA稳定部分的CF编辑盒增加编辑的条形图。

[0024] 图8是用于确定细胞生存力和编辑效率的实验设计的简化图。

[0025] 图9是示出StCFEC mRNA的>90%转染效率的条形图。

[0026] 图10是确认各种iPSC系中单拷贝和多拷贝CF编辑盒整合的条形图。

[0027] 图11是示出在不同iPSC系中在不同CF编辑盒和StCFEC慢病毒转染稀释度下核酸酶mRNA(Cas9和MAD2007切口酶-RT融合蛋白)转染后96小时时的细胞生存力的条形图。

[0028] 图12显示了使用MAD2007切口酶-RT融合蛋白在iPSC系中观察到的低得失位率(indel rate)。

[0029] 图13是示出包含RNA稳定部分的慢病毒整合的(lenti-integrated)CF编辑盒与不含稳定部分的CF编辑盒相比在五个iPSC系之间赋予稳健编辑的条形图。

[0030] 图14是描绘确定各种推定的3'稳定部分的编辑效率的筛选工作流程的图。

[0031] 图15A和图15B是报告包含表1中列出的各种推定的3' RNA稳定部分的CF编辑盒相比于G2四联体CF编辑盒和CFg5编辑盒(未保护的)的编辑率的条形图。

[0032] 图16A是在PGP168_G2B iPSC中转染后120小时GFP到BFP编辑率的条形图。图16B是在WTC11_G2B iPSC中转染后120小时GFP到BFP编辑率的条形图。

[0033] 图17示出了在CF编辑盒中用作3'稳定部分的病毒外切核糖核酸酶抗性RNA的编辑率的改进。

[0034] 应当理解,附图不必按比例绘制,并且相同的附图标记是指相同的特征。

[0035] 详述

[0036] 除非明确声明或者特征或功能与另外的实施方案不兼容,否则结合一种实施方案描述的所有功能意在适用于本文描述的另外的实施方案。例如,在结合一种实施方案明确描述给定特征或功能但没有结合替代实施方案明确提及该特征或功能的情况下,应当理解,除非特征或功能与替代实施方案不兼容,否则该特征或功能可以结合替代实施方案来部署、利用或实现。

[0037] 除非另外指出,本文描述的技术的实践可以采用有机化学、聚合物技术、分子生物学(包含重组技术)、细胞生物学、生物化学和测序技术的常规技术和描述,这些都在本领域的技术人员的技术内。这样常规的技术包括聚合物阵列合成、多核苷酸的杂交和连接、和利用标记物的杂交检测。合适的技术的具体的说明可以通过参考本文的实例获得。然而,当然,也可以使用其他等同的程序。这样的技术和描述可以见于标准实验室手册,诸如Green

等人编著(1999),Genome Analysis:A Laboratory Manual Series(第一至第四卷);Weiner,Gabriel,Stephens编著(2007),Genetic Variation:A Laboratory Manual;Dieffenbach,Dveksler编著(2003),PCR Primer:A Laboratory Manual;Mount(2004),Bioinformatics:Sequence and Genome Analysis;Sambrook和Russell(2006),Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual;和Sambrook和Russell(2002),Molecular Cloning:A Laboratory Manual(全部来自Cold Spring Harbor Laboratory Press);Stryer,L.(1995)Biochemistry(第四版)W.H.Freeman,New York N.Y.;Gait,“Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach”(1984),IRL Press, London;Nelson和Cox(2000),Lehninger,Principles of Biochemistry第三版,W.H.Freeman Pub.,New York,N.Y.;Berg等人(2002)Biochemistry,第五版,W.H.Freeman Pub.,New York,N.Y.;出于所有目的,所有这些都通过引用以其整体并入本文。CRISPR特异性技术可以见于例如,Genome Editing and Engineering from TALENs and CRISPRs to Molecular Surgery,Appasani和Church(2018);以及CRISPR:Methods and Protocols,Lindgren和Charpentier(2015);出于所有目的,这两者都通过引用以其整体并入本文。

[0038] 注意,除非上下文另外清楚指示,否则如本文和所附的权利要求书中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物。因此,例如,提及“寡核苷酸”是指一种或更多种寡核苷酸,并且提及“自动化系统”包括提及本领域技术人员已知的用于该系统的等同步骤和方法,等等。此外,应当理解,本文可以使用的术语诸如“左”、“右”、“顶”、“底”、“前”、“后”、“侧”、“高度”、“长度”、“宽度”、“上”、“下”、“内部(interior)”、“外部(exterior)”、“内(inner)”、“外(outer)”等仅描述参考点,并且不必然将本公开内容的实施方案限制为任何特定的方向或配置。此外,术语诸如“第一”、“第二”、“第三”等仅标识如本文公开的许多部分、组件、步骤、操作、功能和/或参考点中的一个,并且同样不必然将本公开内容的实施方案限制为任何特定的配置或方向。

[0039] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本文提及的所有的出版物为了描述和公开可以与本文描述的发明结合使用的装置、方法和细胞群体的目的,以引用方式并入。

[0040] 在提供值的范围情况下,应理解,在该范围的上限值和下限值之间的每一个中间值和该规定的范围内的任何其他规定的值或中间值被涵盖在本发明内。这些较小的范围的上限值和下限值可以独立地被包括在较小的范围内,并且也被涵盖在本发明内,受限于规定的范围内的任何特定地排除的限值。在规定的范围包括限值中的一个或两个的情况下,将那些所包括的限值中的任一个或两个排除的范围也被包括在本发明中。

[0041] 在以下的描述中,阐述了许多具体细节,以提供对本发明的更充分理解。然而,对本领域普通技术人员将明显的是,可以在没有一个是或更多个这些具体细节的情况下,实践本发明。在其他情况下,为了避免使本发明含混不清,没有描述本领域技术人员熟知的特征和熟知的程序。

[0042] 如本文使用的术语“互补”是指核苷酸之间的Watson-Crick碱基配对,并且特别地是指彼此氢键合的核苷酸,其中胸腺嘧啶或尿嘧啶残基通过两个氢键与腺嘌呤残基连接,并且胞嘧啶和鸟嘌呤残基通过三个氢键连接。通常,核酸包含被描述为与指定的第二核苷酸序列具有“互补性百分比”或“同源性百分比”的核苷酸序列。例如,核苷酸序列可以与指

定的第二核苷酸序列具有80%、90%或100%的互补性,这指示序列的10个核苷酸中的8个、10个核苷酸中的9个或10个核苷酸中的10个与指定的第二核苷酸序列互补。例如,核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-AGCT-3'是100%互补的;并且核苷酸序列3'-TCGA-5'与核苷酸序列5'-TAGCTG-3'的区域是100%互补的。

[0043] 术语DNA“控制序列”统指启动子序列、多腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调控结构域、复制起点、内部核糖体进入位点、核定位序列、增强子等,它们共同地提供编码序列在受体细胞中的复制、转录和翻译。只要选择的编码序列能够在适当的宿主细胞中被复制、转录和(对于一些组分)翻译,则并非所有这些类型的控制序列都需要存在。

[0044] 术语“CREATE融合编辑盒”或“CF编辑盒”是指与切口酶-RT融合酶一起使用的核酸分子,该核酸分子包含与用于修复模板转录的编码序列共价连接的用于gRNA转录的编码序列。关于传统编辑盒的另外信息,例如,包含用于核酸引导的核酸酶系统的gRNA和修复模板,参见USPN 9,982,278;10,266,849;10,240,167;10,351,877;10,364,442;10,435,715;10,465,207;10,669,559;10,771,284;10,731,498;和11,078,498,所有这些都通过引用并入本文。

[0045] 术语“CREATE融合编辑系统”或“CF编辑系统”是指在活细胞中实现编辑的核酸引导的切口酶/逆转录酶融合蛋白(“切口酶-RT融合物”)和CREATE融合编辑盒(“CF编辑盒”)的组合。

[0046] 术语“引导核酸”或“引导RNA”或“gRNA”是指包含以下的多核苷酸:1)能够与基因组靶基因座杂交的引导序列和2)能够与核酸引导的核酸酶相互作用或复合的支架序列。

[0047] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间的序列相似性,或者在本公开内容的上下文中,更常见地是指两个核酸分子之间的序列相似性。术语“同源区”是指gRNA或修复模板上与靶DNA序列具有一定程度同源性的区域。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述每个序列可以出于比较的目的而被对齐。当比较的序列中的一个位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么分子在该位置处是同源的。序列之间的同源性程度随着序列共有的匹配或同源位置数而变化。

[0048] 如本文使用的,“核酸引导的切口酶/逆转录酶融合物”或“切口酶-RT融合物”或“切口酶-RT融合酶”是指已被工程化为充当切口酶而不是起始双链DNA断裂的核酸酶的核酸引导的切口酶或核酸引导的核酸酶或CRISPR核酸酶,并且其中核酸引导的切口酶与逆转录酶融合,逆转录酶是用于从RNA模板产生cDNA的酶。利用切口酶-RT融合酶与CF编辑盒一起,在RNA水平通过修复模板的逆转录而不是在DNA水平诸如通过同源重组,在DNA靶序列中掺入编辑。关于切口酶-RT融合物的信息,参见例如USPN 10,689,669和USSN 16/740,421。

[0049] 术语“切口酶-RT编辑组分”是指切口酶-RT融合酶和CF编辑盒中的一种或两者,其中CF编辑盒可以包含RNA稳定部分(“StCFEC”)或不包含RNA稳定部分。

[0050] “可操作地连接”指其中如此描述的组分被配置以执行它们的通常功能的元件布置。因此,可操作地连接至编码序列的控制序列能够实现编码序列的转录,并且在一些情况下,能够实现编码序列的翻译。只要控制序列起作用以指导编码序列的表达,控制序列不必与编码序列邻接。因此,例如,不翻译但转录的间插序列可以存在于启动子序列和编码序列之间,且启动子序列仍可以被认为是“可操作地连接”至编码序列。事实上,这样的序列不必驻留于同一连续DNA分子(即染色体)上,并且仍可以具有引起调控改变的相互作用。

[0051] “PAM突变”是指去除靶序列中的PAM(即前间区邻近基序)或间隔区、使靶序列中的PAM或间隔区突变或以其他方式使靶序列中的PAM或间隔区失活的对靶序列的一个或多个编辑。

[0052] “启动子”或“启动子序列”是能够与RNA聚合酶结合并启动多核苷酸或多肽编码序列(诸如信使RNA、核糖体RNA、小核RNA(small nuclear RNA)或核仁小RNA(small nucleolar RNA)、引导RNA或任何种类的RNA)的转录的DNA调控区。启动子可以是组成型或诱导型的。“pol II启动子”是被RNA聚合酶II结合以催化DNA转录的调控序列。

[0053] 如本文使用的,在采用切口酶-RT融合酶的CREATE融合编辑系统的上下文中,术语“修复模板”是指被设计成用作待被经由逆转录酶掺入到靶DNA中的模板(包含期望的编辑)的核酸(这里是核糖核酸)。

[0054] 术语“RNA稳定性部分”是指附加到CF编辑盒中修复模板的3'端的部分,诸如下文在表1中列出的那些。术语“稳定的CF编辑盒”或“StCFEC”是指在修复模板的3'端包含RNA稳定部分的CF编辑盒。

[0055] 如本文使用的术语“选择标记(selectable marker)”是指引入细胞中的、赋予适于人工选择的性状的基因。一般使用的选择标记是本领域普通技术人员熟知的。可以使用药物选择标记,诸如氨苄青霉素/羧苄青霉素、卡那霉素、氯霉素、诺尔丝菌素、N-乙酰基转移酶、红霉素、四环素、庆大霉素、博来霉素、链霉素、嘌呤霉素、潮霉素、杀稻瘟素和G418。在其他实施方案中,选择标记包括但不限于人类神经生长因子受体(用Mab检测,诸如USPN 6,365,373中描述的);截短的人类生长因子受体(用Mab检测);突变体人类二氢叶酸还原酶(DHFR;可得荧光MTX底物);分泌型碱性磷酸酶(SEAP;可得荧光底物);人类胸苷酸合酶(TS;赋予对抗癌剂氟脱氧尿苷的抗性);人类谷胱甘肽S-转移酶 α (GSTA1;将谷胱甘肽与干细胞选择性烷化剂白消安缀合;CD34+细胞中的化学保护性选择标记);造血干细胞中的CD24细胞表面抗原;赋予对N-磷酸乙酰基-L-天冬氨酸(PALA)的抗性的人类CAD基因;人类多药耐药性-1(MDR-1;通过增加的耐药性可选择的或通过FACS富集的P-糖蛋白表面蛋白);人类CD25(IL-2 α ;可通过Mab-FITC检测);甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT;可通过卡莫司汀(carmustine)选择);鼠李糖;和胞苷脱氨酶(CD;可通过Ara-C选择)。如本文使用的“选择性培养基”是指向其中添加了对选择标记进行正或负选择的化学化合物或生物部分的细胞生长培养基。

[0056] 术语“靶DNA序列”、“靶区”、“细胞靶序列”或“基因组靶基因座”是指体外或体内,或者细胞或细胞群体的核酸(例如,基因组或附加体)中期望使用核酸引导的核酸酶编辑系统对至少一个核苷酸进行改变的任何基因座。细胞靶序列可以是基因组基因座或染色体外基因座。靶基因组DNA序列包含编辑区或编辑基因座。

[0057] “载体”是包含待递送至细胞和/或在细胞中表达的一种或更多种期望序列的多种核酸中的任一种。载体通常由DNA构成,但是RNA载体也是可用的。载体包括但不限于质粒、F粘粒(fosmids)、噬菌粒、病毒基因组、BAC、YAC、PAC、合成染色体等。如本文使用的,措辞“引擎载体(engine vector)”包含在本公开内容的CREATE融合编辑系统和方法中使用的切口酶-RT融合酶的编码序列。如本文使用的,措辞“编辑载体”包含与gRNA编码序列共价连接的修复模板,修复模板包含对细胞靶序列的改变,该改变在编辑发生后阻止核酸酶在细胞靶序列中的PAM或间隔区处结合。编辑载体也可以并且优选地确实包含选择标记和/或条形

码,和/或如本文描述的RNA稳定部分。在一些实施方案中,可以将引擎载体和编辑载体组合;即,所有切口酶-RT编辑组分都可以在单个载体上找到。此外,引擎载体和编辑载体包含可操作地连接到例如切口酶-RT融合酶编码序列和CF编辑盒的控制序列。

[0058] 核酸引导的切口酶/逆转录酶融合酶基因组编辑

[0059] 本文描述的组合物和方法是用于向细胞群体引入期望的编辑的传统核酸引导的核酸酶编辑(即RNA引导的核酸酶编辑或CRISPR编辑)的“扭转”或替代;也就是说,本文描述的组合物和方法采用核酸引导的切口酶/逆转录酶融合蛋白(“切口酶-RT融合物”),而不是核酸引导的核酸酶。本文采用的切口酶-RT融合物不同于传统的CRISPR编辑,因为切口酶不是在靶基因组中起始双链断裂,而是在靶基因组的单链中起始切口。切口酶与逆转录酶的融合消除了通过同源重组掺入修复模板的需要;替代地,修复模板是用作切口酶-RT融合物的逆转录部分的模板的核酸,通常是核糖核酸。利用切口酶-RT融合物在RNA水平而不是DNA水平在靶基因组中掺入期望的编辑。融合到逆转录酶的切口酶作为单链切割酶(即切口酶)发挥作用,具有核酸引导的核酸酶的特异性,首先与靶DNA接合,然后使靶DNA的一条链产生切口,随后将CF编辑盒的3'端退火至靶DNA。逆转录酶然后复制修复模板以修复靶DNA,从而将期望的编辑掺入到靶DNA中。本发明的方法和组合物旨在用RNA稳定部分稳定CF编辑盒的3'端,从而产生稳定的CF编辑盒或“StCFEC”。

[0060] 传统的核酸引导的核酸酶编辑开始于核酸引导的核酸酶与细胞中合适的gRNA复合,其中核酸引导的核酸酶可以在期望的位置切割细胞的基因组。引导核酸(即gRNA)帮助核酸引导的核酸酶识别并在特定靶序列处切割DNA。通过操纵引导核酸的核苷酸序列,核酸引导的核酸酶可以被编程为靶向任何DNA序列进行裂解,只要适当的前间区邻近基序(PAM)在附近。在一些CRISPR系统中,核酸引导的核酸酶编辑系统使用组合起来发挥作为引导核酸的功能的两个分开的引导核酸分子,例如CRISPR RNA(crRNA)和反式激活CRISPR RNA(tracrRNA)。在其他CRISPR系统中,引导核酸可以是包括crRNA序列和tracrRNA序列二者的单个引导核酸。一般来说,gRNA与相容的核酸引导的核酸酶复合,然后该核酸酶可以与靶序列杂交,从而将核酸酶引导至靶序列。本方法中使用的切口酶-RT融合物通常保留它们来源的核酸引导的核酸酶的PAM特异性和序列特异性,并且像核酸引导的核酸酶一样,与gRNA复合。

[0061] 引导核酸或gRNA包含引导序列,其中引导序列(与gRNA的支架序列部分相对)是与靶序列具有足够互补性以与靶序列杂交并引导复合的核酸引导的核酸酶与靶序列的序列特异性结合的多核苷酸序列。引导序列和对应的靶序列之间的互补性程度在使用合适的比对算法进行最佳比对时是约以下或多于约以下:50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。最佳比对可以通过使用用于比对序列的任何合适的算法来确定。在一些实施方案中,引导序列的长度是约或多于约10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、35个、40个、45个、50个、75个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,引导序列的长度是少于约75个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个核苷酸。优选地,引导序列是10-30个或15-20个核苷酸长,或者长度是15个、16个、17个、18个、19个或20个核苷酸。

[0062] 在本方法和组合物中,gRNA作为mRNA或作为从CF编辑盒表达的序列提供,任选地插入质粒或载体中,并且gRNA包含引导序列和支架序列两者作为单个转录物。通过改变

gRNA的引导序列,使引导序列与期望的靶DNA序列互补,gRNA被工程化以靶向期望的靶序列,从而允许引导序列和靶序列之间的杂交。通常,为了在靶序列中产生编辑,gRNA/切口酶-RT融合复合物与由gRNA确定的靶序列结合,并且切口酶-RT融合物的切口酶部分识别与靶DNA序列邻近的前间区邻近基序(PAM)序列。靶DNA序列可以是对原核细胞或真核细胞而言为内源或外源的任何多核苷酸,或体外的任何多核苷酸。例如,靶DNA序列可以是驻留于真核细胞的细胞核中的多核苷酸。靶DNA序列可以是编码基因产物(例如,蛋白质)的序列或非编码序列(例如,调控多核苷酸、内含子、PAM或“垃圾”DNA(“junk”DNA))。

[0063] gRNA是CF编辑盒的一部分,CF编辑盒也编码被切口酶-RT融合物的逆转录酶部分复制到靶DNA序列中的修复模板。

[0064] 靶DNA序列与前间区邻近基序(PAM)相关,前间区邻近基序(PAM)是由gRNA/切口酶-RT融合复合物识别的短核苷酸序列。不同的核酸引导的核酸酶的精确定义的PAM序列和长度要求不同;然而,PAM通常是与靶序列邻近或接近的2-7个碱基对序列,并且取决于核酸酶,可以在靶序列的5'或3'。切口酶-RT融合物的PAM相互作用结构域的工程化可以允许改变PAM特异性,改进靶位点识别保真度,降低靶位点识别保真度,或者增加切口酶-RT融合酶的多功能性(versatility)。

[0065] 切口酶-RT融合酶可以识别的靶DNA序列的范围受将特定PAM定位于期望的靶序列附近的需要限制。因此,以基因组编辑必需的精度靶向编辑通常可能是困难的。已经发现,切口酶-RT融合酶可以非常好地识别一些PAM(例如,典型PAM(canonical PAM)),而不太好或较差地识别其他PAM(例如,非典型PAM)。在某些实施方案中并且优选地,编辑靶DNA序列既向细胞靶序列(例如细胞的基因组DNA)引入期望的DNA变化,又去除细胞靶序列中的前间区突变(PAM)区、使细胞靶序列中的前间区突变(PAM)区突变或使细胞靶序列中的前间区突变(PAM)区失活。使细胞靶序列处的PAM失活排除了对该细胞靶序列处的细胞基因组的另外的编辑,例如,在后续轮次的编辑中随后暴露于与gRNA复合的切口酶-RT融合物时。

[0066] 至于切口酶-RT融合编辑系统的切口酶-RT融合物组分,编码切口酶-RT融合物的多核苷酸序列可以被密码子优化,用于在特定细胞类型中表达,诸如古细菌、原核细胞或真核细胞。真核细胞可以是酵母、真菌、藻类、植物、动物或人类细胞。真核细胞可以是特定生物体的细胞或来源于特定生物体,诸如哺乳动物,包括但不限于人类、小鼠、大鼠、兔、犬或非人类哺乳动物,包括非人类灵长类动物。待采用的切口酶-RT融合物的选择取决于许多因素,诸如在靶序列中待进行何种类型的编辑,以及适当的PAM是否位于期望的靶序列附近。关于MADzyme切口酶的信息,参见USPN 10,883,077;11,053,485;和11,085,030;以及2021年3月12日提交的USSN 17/200,089和17/200,110;2021年8月23日提交的17/463,498;以及2021年9月1日提交的17/463,581。

[0067] 除了gRNA和修复模板之外,编辑盒可以包含并且优选地确实包含一个或多个用于通过使用寡核苷酸引物扩增CF编辑盒的引物位点;例如,如果引物位点位于CF编辑盒的一个或多个其他组分的侧翼。

[0068] 另外,CF编辑盒可以包含条形码。条形码是对应于修复模板序列的独特DNA序列,使得条形码可以鉴定对对应细胞靶序列进行的编辑。条形码通常包含四个或多个核苷酸。在一些实施方案中,CF编辑盒包含代表例如gRNA和修复模板的全基因或全基因组文库的gRNA和对应修复模板的集合或文库。CF编辑盒的文库被克隆到载体主链中,其中,例如,

每个不同的修复模板与不同的条形码缔合。

[0069] 使用3'稳定的修复模板改进核酸引导的切口酶/逆转录酶融合编辑

[0070] 本公开内容提供了用于使用在CF编辑盒的3'端处的RNA稳定部分(即“StCFEC”)对生活细胞进行核酸引导的切口酶/逆转录酶融合(“切口酶-RT融合”)编辑的物质组合物、方法和仪器。用本发明的组合物和方法,使用保留核酸引导的核酸酶的某些特征——结合特异性和以靶向方式裂解一个或更多个DNA链的能力——联合逆转录酶活性(使用修复模板使得期望的编辑在RNA水平上掺入到靶DNA序列中)的融合蛋白(即切口酶-RT融合物),改进了编辑效率。

[0071] 图1A是用于经由核酸引导的切口酶/逆转录酶融合(“切口酶-RT融合”)编辑来编辑活细胞的示例性方法100a的简化框图。观察图1A,方法100a开始于设计和合成包含gRNA和含有3' RNA稳定序列或StCFEC的修复模板的CF编辑盒102。如以上描述的,每个CF编辑盒包含gRNA序列和待转录的修复模板(在本文的组合物和方法中,修复模板包含在CF编辑盒序列3'端的RNA稳定部分(“StCFEC”)),其中修复模板包含期望的靶基因组编辑以及PAM或间隔区突变。在CF编辑盒已被合成后,个体CF编辑盒被扩增并插入载体主链中,诸如慢病毒主链,以产生编辑载体104。另外,设计了切口酶-RT融合酶106。切口酶-RT融合酶可以作为载体主链中的编码序列递送至细胞(在一些实施方案中在诱导型启动子的控制下),或者切口酶-RT融合酶可以作为蛋白或蛋白复合物递送至细胞。在方法100a中,将切口酶-RT融合蛋白编码序列插入到引擎载体108中以递送到细胞。在步骤110,引擎载体和编辑载体被引入活细胞中。

[0072] 可以使用各种递送系统将核酸引导的切口酶融合编辑系统组分引入(例如,转化或转染)宿主细胞中108。这些递送系统包括酵母系统、脂质体转染系统、显微注射系统、基因枪系统、病毒微体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子、脂质:核酸缀合物、病毒粒子、人工病毒粒子、病毒载体、电穿孔、细胞可渗透肽、纳米粒子、纳米线、外泌体的使用。可选地,可以使用分子特洛伊木马(trojan horse)脂质体跨越血脑屏障递送核酸引导的核酸酶组分。特别感兴趣的是电穿孔,特别是流通式电穿孔(作为独立的仪器或作为自动化多模块系统中的模块)的使用,如例如USPN 10,253,316;10,329,559;10,323,242;10,421,959;10,465,185;10,519,437;以及2019年10月29日提交的USSN 16/666,964和2019年11月12日提交的USSN 16/680,643中描述的,所有这些都通过引用以其整体并入本文。

[0073] 在转化110后,方法100a中的下一步是为切口酶-RT融合编辑提供条件112。“提供条件”包括将细胞在适当培养基中孵育,并且还可以包括提供条件以诱导诱导型启动子的转录(例如,添加抗生素、升高温度),用于CF编辑盒和切口酶-RT融合物中的一种或两者的转录。在编辑完成后,允许细胞恢复,并且优选地富集已经被编辑的细胞114。可以直接进行富集,诸如经由来自表达选择标记的群体的细胞,或者通过使用替代物,例如与编辑组分中的一种或更多种组分共引入的细胞表面手柄(cell surface handle),以及使用细胞分选,例如使用FACs(荧光激活细胞分选)。在方法100a的这一点时,可以对细胞进行表型或基因型表征,或者任选地,可以重复步骤110-114以进行另外的编辑116。

[0074] 图1B是用于经由切口酶-RT融合编辑来编辑活细胞的示例性方法100b的可选简化框图。观察图1B,方法100b与方法100a一样,以设计和合成CF编辑盒开始,每个CF编辑盒包含gRNA和修复模板,其中每个修复模板包含3'端的RNA稳定部分以及期望的靶基因组编辑

以及PAM或间隔区突变。另外,设计了切口酶-RT融合酶106。如以上描述的,切口酶-RT融合蛋白可以作为载体主链中的编码序列递送到细胞,或者切口酶-RT融合蛋白可以作为蛋白递送到细胞。在方法100b中,经由组合的CF引擎+编辑载体118中的编码序列将切口酶-RT融合蛋白递送至细胞,组合的CF引擎+编辑载体在步骤120被引入活细胞中。同样,如以上描述,有许多方法用于将组合的CF引擎+编辑载体引入细胞群体中。

[0075] 在转化120后,方法100b中的下一步是为核酸引导的核酸酶编辑提供条件112。同样,“提供条件”包括在适当培养基中孵育细胞,并且还可以包括提供条件以诱导诱导型启动子的转录(例如,添加抗生素、升高温度),用于CF编辑盒和切口酶-RT融合物中的一种或两者的转录。在编辑完成后,允许细胞恢复,并且优选地富集已经被编辑的细胞114。同样,富集可以直接进行,诸如经由来自表达选择标记的群体的细胞,或者通过使用替代物,例如与编辑组分中的一种或更多种组分共引入的细胞表面手柄。在方法100b的这一点时,可以对细胞进行表型或基因型表征,或者任选地,可以重复步骤118、120、112和114以进行另外的编辑122。

[0076] 图1C是切口酶-RT融合物和CF编辑盒的简化图解描绘。在图1C中,看到切口酶-RT融合物133的MAD切口酶部分130和逆转录酶部分132,以及编辑盒134。在形成切口酶-RT融合物/CF编辑盒复合物135(例如130+132+134)后,可以看到CF编辑盒的3'端136是未保护的,并且容易被3'外切核酸酶降解,而CF编辑盒的5'部分被切口酶-RT融合物(130+132)的切口酶部分130保护。本发明的方法和组合物旨在保护CF编辑盒的3'端,从而形成例如具有3' RNA稳定部分的CF编辑盒(即“StCFEC”)。

[0077] 图1D是切口酶-RT融合物和包含3' RNA稳定部分的CF编辑盒(StCFEC)的简化图。靶DNA序列已“解链(unwound)”并与StCFEC结合,StCFEC从3'至5'包含:RNA稳定部分(在图1D中,G2四联体、RNA发夹结构或RNA假结)、任选的接头区(未标记)、与被切口的基因组靶区退火的引物结合区(PBR)、可变数量的切口至编辑核苷酸、包含期望的编辑和PAM编辑的StCFEC区、编辑后同源性区(PEH)和gRNA。此处示出的RNA稳定部分可以是G2四联体或类似结构、RNA发夹结构、诸如RNA假结结构(参见下文表1)的部分,或外切核糖核酸酶抗性RNA(也在下文描述)。

[0078] RNA稳定部分和引物结合区之间的接头区可以从0至20个核苷酸,或从2至15个核苷酸,或从4至10个核苷酸变化。接头区的5'是与被切口的基因组靶区退火的引物结合区(PBR),然后是长度为0至10个核苷酸并且优选地长度为0至5个核苷酸的切口至编辑距离。编辑区(编辑(edit))是StCFEC的一个区域,包含期望的编辑,以及对靶序列的一种或更多种编辑,其去除靶序列中的PAM或间隔区、使靶序列中的PAM或间隔区突变或以其他方式使靶序列中的PAM或间隔区失活。在包含期望的编辑和对PAM的编辑的区域之后是编辑后同源性区(PEH),其长度通常为3个至20个核苷酸,或长度为3个至10个核苷酸。修复模板的编辑后同源性区任选地与gRNA的引导序列部分连续或几乎连续。

[0079] 图1E是作为稳定部分测试的广义假结结构的描绘(参见下文表1)。

[0080] 在细胞中进行核酸引导的切口酶融合编辑的自动化细胞编辑仪器和模块

[0081] 自动化细胞编辑仪器的一种实施方案

[0082] 图2A描绘了示例性自动化多模块细胞处理仪器200,以例如在活细胞中经由切口酶-RT融合物进行靶向基因编辑。例如,仪器200可以并且优选地被设计为在实验室环境中

使用的独立台式仪器。仪器200可以包括可重复使用部件和一次性部件的混合物,用于在细胞中进行自动化基因组裂解和/或编辑时进行各种集成的过程而无人工干预。图示了机架(gantry) 202,机架202提供了自动化机械运动系统(致动器)(未示出),该自动化机械运动系统(致动器)向例如自动化(即,机器人)液体操作系统258提供XYZ轴运动控制,该自动化(即,机器人)液体操作系统258包括例如空气置换移液器232,这允许多个模块之间的细胞处理而无人工干预。在一些自动化多模块细胞处理仪器中,空气置换移液器232由机架202移动,并且各种模块和试剂筒保持静止;然而,在其他实施方案中,液体操作系统258可以在各种模块和试剂筒移动时保持静止。自动化多模块细胞处理仪器200中还包含试剂筒210(参见USPN 10,376,889;10,406,525;10,478,822;10,576,474;10,639,637;10,738,271;和10,799,868),该试剂筒210包含储库212和转化模块230(例如,如USPN 10,435,713;10,443,074;和10,851,389中描述的流通式电穿孔(FTEP)装置),以及洗涤储库206、细胞输入储库251和细胞输出储库253。洗涤储库206可以被配置成容纳大的管,例如洗涤溶液,或者在整个迭代过程中经常使用的溶液。尽管在图2A中,两个试剂筒210包括洗涤储库206,但是洗涤储库也可以被包括在洗涤筒中,其中试剂筒和洗涤筒是分开的筒。在这样的情况下,除了插入其中的消耗品(包含在各种插入物中的试剂或其他组分),试剂筒和洗涤筒可以是相同的。

[0083] 在一些实施方式中,试剂筒210是用于在自动化多模块细胞处理/编辑仪器200中使用的包含试剂和细胞的一次性套件。例如,在启动细胞处理前,使用者可以打开自动化多模块细胞编辑仪器200的机箱(chassis)并在自动化多模块细胞编辑仪器200的机箱内定位每个包含各种期望的插入物和试剂的试剂筒210。此外,每个试剂筒210可以插入机箱中的插座中,该机箱具有适合于容纳在其中的试剂的不同温度区。

[0084] 图2A中还图示了机器人液体操作系统258,包括机架202和空气置换移液器232。在一些实例中,机器人操作系统258可以包括自动化液体操作系统,诸如由Mannedorf, Switzerland的Tecan Group Ltd.,Reno,NV,USA的Hamilton Company(参见例如W02018015544A1)或Fort Collins,CO,USA的Beckman Coulter,Inc.(参见例如US20160018427A1)制造的那些。移液器吸头215可以设置在移液器转移吸头供应装置214中,用于与空气置换移液器232一起使用。机器人液体操作系统允许在模块之间转移液体,而无需人工干预。

[0085] 在一些实施方式中,试剂筒210的插入物或组件标记有机器可读标记(未示出),诸如条形码,用于由机器人操作系统258识别。例如,机器人液体操作系统258可以扫描每个试剂筒210内的一个或更多个插入物以确认内容物。在其他实施方式中,机器可读标记可以标记在每个试剂筒210上,并且自动化多模块细胞编辑仪器200的处理系统(未示出,但参见图2B的元件237)可以基于机器可读标记鉴定存储材料地图。在图2A中图示的实施方案中,细胞生长模块包括细胞生长瓶218(详细描述参见USPN 10,435,662;10,433,031;10,590,375;10,717,959;和10,883,095)。另外还可以看到切向流过滤(TFF)模块222(详细描述参见USSN 16/516,701和16/798,302)。作为图2A的自动化多模块细胞处理仪器200的一部分,还图示了由例如机器人液体处理系统258和空气置换移液管232提供服务的单个化模块240(例如,固体壁分离、孵育和标准化装置(SWIIN装置)在此示出并在USPN 10,533,152;10,633,626;10,633,627;10,647,958;10,723,995;10,801,008;10,851,339;10,954,485;10,

532,324;10,625,212;10,774,462;和10,835,869中详细描述)。另外可见的是可采用磁分离的选择模块220。还应注意三个散热器(heatsink)255的放置。

[0086] 图2B是图2A中描绘的示例性多模块细胞处理仪器200的内容物的简化展示。例如,基于筒的源材料(诸如在试剂筒210中的源材料)可以被定位于仪器200的平台(deck)上的指定区域中,以供机架202上的空气置换移液管232获取(access)。多模块细胞处理仪器200的平台可以包括保护槽(未示出),使得从仪器200的任何模块溢出(spilling)、滴落或溢流(overflowing)的污染物容纳在保护槽的边缘(lip)内。还看到试剂筒210,其显示为设置有热组件211,热组件211可以在不同区域创建适合于不同试剂的温度区。注意,试剂筒之一还包括流通式电穿孔装置230(FTEP),由FTEP接口(例如歧管臂(manifold arm))和致动器231提供服务。还看到具有相邻热组件225的TFF模块222,其中TFF模块由TFF接口(例如歧管臂)和致动器223提供服务。热组件225、235和245包含热电装置,诸如Peltier装置,以及散热器、风扇和冷却器。旋转生长瓶218在生长模块234内,其中生长模块由两个热组件235提供服务。在220看到选择模块。还看到SWIIN模块240,其包括SWIIN筒244,其中SWIIN模块还包括热组件245、冷却格栅264、照明243(在该实施方案中为背光)、蒸发和冷凝控制249,并且其中SWIIN模块由SWIIN接口(例如,歧管臂)和致动器247提供服务。在该视图中还看到触摸屏显示器201、显示器致动器203、照明205(多模块细胞处理仪器200一侧一个)和照相机239(多模块细胞处理仪器200两侧各一个照相机)。最后,元件237包括电子器件,诸如处理器(237)、电路控制板、高压放大器、电源和电源输入;以及气动器件(pneumatics),诸如泵、阀和传感器。

[0087] 图2C图示了用作自动化多模块细胞编辑仪器200的台式版本的多模块细胞处理仪器200的前透视图。例如,机箱290可以具有约24-48英寸的宽度、约24-48英寸的高度和约24-48英寸的深度。机箱290可以并且优选地被设计成容纳自动化细胞处理中使用的所有模块和一次性供应装置,并且在没有人工干预的情况下执行所需的所有过程;即,机箱290被配置成提供集成的、独立的自动化多模块细胞处理仪器。如图2C中图示的,机箱290包括触摸屏显示器201、冷却格栅264,冷却格栅264允许空气经由内部风扇(未示出)流动。触摸屏显示器向使用者提供关于自动化多模块细胞编辑仪器200的处理状态的信息,并接受来自使用者的输入用于进行细胞处理。在该实施方案中,机箱290由可调节的支脚270a、270b、270c和270d提升(支脚270a-270c在该图2C中示出)。例如,可调节的支脚270a-270d允许在机箱290下方的另外的气流。

[0088] 在一些实施方式中,机箱290内部是关于图2A和图2B描述的大部分或全部部件,包括沿着机架设置的机器人液体处理系统、包括流通式电穿孔装置的试剂筒210、细胞生长模块234中的旋转生长瓶218(参见图2B)、切向流过滤模块222、SWIIN模块240以及各种模块的接口和致动器。另外,机箱290容纳控制电路、液体操作管、气泵控制器、阀、传感器、热组件(例如,加热和冷却单元)和其他控制机构。关于多模块细胞编辑仪器的实例,参见USPN 10,253,316;10,329,559;10,323,242;10,421,959;10,465,185;10,519,437;10,584,333;10,584,334;10,647,982;10,689,645;10,738,301;10,738,663;10,947,532;10,894,958;10,954,512;和11,034,953,所有这些都通过引用以其整体并入本文。

[0089] 自动化细胞编辑仪器的可选实施方案

[0090] 生物反应器可用于在仪器外培养细胞或允许在仪器上培养、编辑和回收细胞;例

如,作为多模块全自动封闭仪器的一个模块。此外,生物反应器经由生长过程中表达的抗生素标志物或经由与磁珠偶联的表达的抗体和与生物反应器缔合的磁体来支持细胞选择/富集。存在许多本领域已知的生物反应器,包括在例如W02019/046766;USPN 10,699,519;10,633,625;10,577,576;10,294,447;10,240,117;10,179,898;10,370,629;和9,175,259中描述的那些;以及从Lonza Group Ltd. (Basel, Switzerland);Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany), Terumo BCT (Lakewood, CO, USA) 和Sartorius GmbH (Gottingen, Germany) 可得的那些。

[0091] 图3A示出了适合于在本文描述的自动化多模块细胞处理仪器中进行细胞培养、转染和编辑的生物反应器组件300的一种实施方案。与用于支持发酵或着眼于收获由在生物反应器中生长的生物体产生的产物的其他过程的大多数生物反应器不同,本生物反应器(和在其中进行的过程)被配置为培养细胞、监测细胞生长(经由例如光学工具或电容)、传代细胞、选择细胞、转染细胞以及支持经编辑的细胞的生长和收获。生物反应器组件300包括包含主体304的细胞生长容器301,主体304具有包含端口308的盖组件302,端口308包括被配置为容纳马达以经由叶轮轴352驱动叶轮306的马达集成端口310。生长容器301的主体304的锥形形状以及在一些实施方案中的双叶轮允许以更大的动态体积范围(诸如,例如高达500ml和低至100ml)工作,用于微载体的快速沉降。

[0092] 生物反应器组件300还包含生物反应器支架组件303,生物反应器支架组件303包含主体312和生长容器保持器(holder)314,生长容器保持器314包含生长容器301的主体304在操作中被设置在其中的加热夹套或其他加热工具(未示出)。生长容器301的主体304是生物相容性的并且优选地是透明的——在一些实施方案中,在UV和IR范围以及可见光谱中——使得生长中的细胞可以通过例如集成到盖组件302中的照相机或传感器或者通过生物反应器支架组件303的主体312中的观察孔或槽346来可视化。照相机支架在344处示出。

[0093] 生物反应器组件300支持细胞从500,000个细胞输入到100亿个细胞输出,或从100万个细胞输入到250亿个细胞输出,或从500万个细胞输入到500亿个细胞输出或这些范围的组合的生长,这取决于例如生长容器301的主体304的尺寸、用于培养细胞的培养基、用于培养的微载体的类型和尺寸以及数量(如果使用微载体),以及细胞是贴壁的还是非贴壁的。包含组件300的生物反应器支持贴壁和非贴壁细胞两者的生长,其中贴壁细胞通常由微载体生长(grown of microcarriers),如在2021年4月24日提交的USSN 17/237,747中详细描述。可选地,用于在本文描述的生物反应器中培养哺乳动物细胞的另一种选择是使用专门的培养基(诸如由ACCELLTA™ (Haifa, Israel) 开发) 在悬浮液中培养单细胞。在这种培养基中培养的细胞必须经许多次细胞传代适应这一过程;然而,一旦适应,细胞可以被培养到>4000万个细胞/ml的密度,并在大约一周内扩增50-100x,这取决于细胞类型。

[0094] 生长容器301的主体304优选地通过注射成型制造,在一些实施方案中,叶轮306和叶轮轴352也是如此。叶轮306也可由不锈钢、金属、塑料或下文列出的聚合物制造。注射成型允许尺寸和配置的灵活性,并且还允许例如将体积标记添加到生长容器301的主体304。另外地,制造生长容器301的主体304的材料应该能够冷却到约4°C或更低,并加热到约55°C或更高,以适应细胞生长。此外,用于制造瓶的材料优选地能够承受高达55°C的温度而不变形。用于生长容器301的主体304的合适材料包括环烯烃共聚物(COC)、玻璃、聚氯乙烯、聚乙烯、聚醚醚酮(PEEK)、聚丙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚砜、聚(二甲基硅氧

烷)、环烯烃聚合物(COP)以及这些聚合物和其它聚合物的共聚物。优选的材料包括聚丙烯、聚碳酸酯或聚苯乙烯。用于制造的材料可以取决于待培养、转染和编辑的细胞类型,并且有利于贴壁和非贴壁细胞两者的生长以及涉及基于微载体的转染的工作流程。生长容器301的主体304可以是可重复使用的,或者可选地,可以被制造和配置为用于单次使用。在一种实施方案中,生长容器301的主体304可以支持25ml至500ml的细胞培养物体积,但是可以按比例放大以支持高达3L的细胞培养物体积。

[0095] 生物反应器支架组件包含支架或框架350、在操作期间容纳生长容器301的主体312。支架/框架350和主体312由不锈钢、其它金属或聚合物/塑料制造。生物反应器支架组件主体还包含加热夹套(在图3A中未见)以将生长容器主体304——和因此细胞培养物——维持在期望的温度。另外地,支架组件可以容纳一组传感器和照相机(照相机支架在344处示出)以监测细胞培养物。

[0096] 图3B描绘了容器盖组件302的一种实施方案的俯视图。生长容器盖组件302被配置为气密性的,为细胞培养、转染和编辑提供密封的无菌环境,以及在封闭系统中提供生物安全性。生长容器301的容器盖组件302和主体304(此处未示出,但在图3A上示出)可以经由紧固件诸如螺栓可逆地密封,或者使用生物相容性胶水或超声焊接永久地密封。在一些实施方案中,容器盖组件302由诸如S316L不锈钢的不锈钢制造,但也可以由金属、其它聚合物(诸如同上列出的那些)或塑料制造。如在该图3B——以及在图3A中看到的——容器盖组件302包含许多不同的端口以适应液体的添加和移除;气体添加和移除;用于插入传感器以监测培养参数(下文更详细地描述);容纳一个或更多个照相机或其他光学传感器;通过例如液体操作装置提供进入生长容器301的主体304;以及容纳用于马达集成的马达以驱动一个或更多个叶轮306。图3B中描绘的示例性端口包括三个液体进入端口316(在4点钟、6点钟和8点钟方向)、一个液体离开端口322(在11点钟方向)、电容传感器318(在9点钟方向)、一个“气体进入”端口324(在12点钟方向)、一个“气体离开”端口320(在10点钟方向)、光学传感器326(在1点钟方向)、在2点钟方向的防爆片(rupture disc)328、提供对生长容器301的主体304的访问的两个自密封端口317、330(在7点钟和3点钟方向);以及温度探头332(在5点钟方向)(注意,该图3B中的钟面是倾斜的)。

[0097] 在该图3B的容器盖组件302中示出的端口仅是示例性的,并且对于本领域的普通技术人员来说,鉴于本公开内容,应该明显的是,例如,单个液体进入端口316可以用于适意向细胞培养物添加所有液体,而不是对添加到细胞培养物的每种不同液体都具有一个液体进入端口。类似地,可以存在多于一个气体进入端口324,诸如可以被添加的每种气体(例如 O_2 、 CO_2)一个。另外,尽管示出了温度探头332,但可选地,温度探头可位于生物反应器支架组件的容器保持器314的外侧,与加热器夹套(在该图3B中未见314、302)分离或集成到加热器夹套中。一个或更多个自密封端口317、330(如果存在)允许经由机架(未示出)通过例如移液管、注射器或其他液体输送系统进入生长容器301的主体304。如图3A中示出,另外可以存在驱动叶轮的马达集成端口310,尽管生长容器301的其他配置可以可选地将马达驱动集成在生长容器301的主体304的底部。生长容器盖组件302还可以包含用于观察和监测细胞的照相机端口。

[0098] 另外的传感器包括检测溶解的 O_2 浓度、溶解的 CO_2 浓度浓度、培养物pH、乳酸浓度、葡萄糖浓度、生物量和光密度的传感器。传感器可以使用光学(例如,荧光检测)、电化学或

电容感测,并且是可重复使用的或者被配置和制造用于一次性使用。适于在生物反应器中使用的传感器可从Omega Engineering (Norwalk,CT,USA);PreSens Precision Sensing (Regensburg,Germany);C-CIT Sensors AG (Waedenswil,Switzerland) 和ABER Instruments Ltd. (Alexandria,VA,USA) 获得。在一种实施方案中,使用反射光密度传感器测量光密度,以促进消毒、改进动态范围和简化机械组装。防爆片(如果存在)在加压环境中提供安全性,并且被编程为在生长容器中超过阈值压力时破裂。如果生长容器中的细胞培养物是贴壁细胞的培养物,则可以使用如2021年4月24日提交的USSN 17/237,747中描述的微载体。在这样的情况下,液体离开端口可以包括过滤器,诸如不锈钢或塑料(例如聚偏二氟乙烯(PVDF)、尼龙、聚丙烯、聚丁烯、缩醛、聚乙烯或聚酰胺)过滤器或滤料(frit),以防止微载体在例如培养基更换期间从培养物中被抽出,但允许死亡细胞从容器中取出。另外地,液体端口可以包含过滤吸管,以允许已经从微载体解离的细胞被抽入细胞围栏(corral),同时将用过的微载体留在生长容器的主体中。用于初始细胞生长的微载体可以是纳米孔(其中孔径尺寸通常<20nm)、微孔(具有尺寸>20nm至<1 μ m之间的孔)或大孔(具有尺寸>1 μ m,例如20 μ m的孔),并且微载体的直径通常为50-200 μ m;因此,液体离开端口的过滤器或滤料的孔径将取决于微载体的尺寸而不同。

[0099] 用于细胞生长的微载体取决于细胞类型和期望的细胞数量,并且通常包括天然或合成的细胞外基质或细胞粘附促进剂(例如,针对细胞表面蛋白的抗体或聚-L-赖氨酸)的涂层,以促进细胞生长和粘附。用于细胞培养的微载体可从商业上广泛获得,例如 Millipore Sigma, (St.Louis,MO,USA);ThermoFisher Scientific (Waltham,MA,USA); Pall Corp. (Port Washington,NY,USA);GE Life Sciences (Marlborough,MA,USA);和 Corning Life Sciences (Tewkesbury,MA,USA)。至于细胞外基质,天然基质包括胶原、纤维蛋白和玻连蛋白(例如可从ESBio,Alameda,CA,USA获得),并且合成基质包括 **MATRIGEL**[®] (Corning Life Sciences,Tewkesbury,MA,USA)、**GELTREX**[™] (ThermoFisher Scientific,Waltham,MA,USA)、**CULTREX**[®] (Trevigen,Gaithersburg,MD,USA),可从 Cellendes (Tubingen,Germany) 获得的仿生水凝胶;和可从Xylyx (Brooklyn,NY,USA) 获得的组织特异性细胞外基质;此外,denovoMatrix (Dresden,Germany) 提供screenMATRIX[™],一种便于快速测试大量细胞微环境(例如细胞外基质)以优化感兴趣细胞生长的工具。

[0100] 图3C是不含安装在端口308中的传感器的组装的生物反应器342的侧面透视图。可以看到容器盖组件302、生物反应器支架组件303、生长容器301的主体(在该图3C中未见)插入其中的生物反应器支架主体312。还存在两个照相机支架344、马达集成端口310和基底350。

[0101] 图3D示出了生物反应器/细胞围栏组件360的实施方案,包括如图3A中描述的用于细胞培养、转染和编辑的生物反应器组件300(在该图3D中未示出)并且还包含细胞围栏361。生物反应器组件包含生长容器,该生长容器包含锥形主体304,该主体304具有包含端口308a、308b和308c的盖组件302,包括经由叶轮轴352驱动叶轮306a、306b的马达集成端口310,以及两个观察端口346。细胞围栏361包含主体364、端帽,其中靠近生物反应器组件300的端帽耦接到过滤吸管362,该过滤吸管362包含设置在生物反应器组件300的主体304内的过滤部分363(在该图3D中未示出)。过滤吸管设置在生物反应器组件300的主体304内,但不到达生物反应器组件300的底面,以留下“死体积”供用过的微载体沉降,同时将细胞从生长

容器301移至细胞围栏361中。细胞围栏可以包含或不包含温度或CO₂探头,并且可以或不封装在绝缘夹套内。

[0102] 与生长容器的主体304一样,细胞围栏361由任何生物相容性材料制造,诸如聚碳酸酯、环烯烃共聚物(COC)、玻璃、聚氯乙烯、聚乙烯、聚醚醚酮(PEEK)、聚丙烯、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚砜、聚(二甲基硅氧烷)、环烯烃聚合物(COP)以及这些聚合物和其他聚合物的共聚物。同样,端帽由生物相容性材料制造,诸如聚碳酸酯、环烯烃共聚物(COC)、玻璃、聚氯乙烯、聚乙烯、聚醚醚酮(PEEK)、聚丙烯、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚砜、聚(二甲基硅氧烷)、环烯烃聚合物(COP)以及这些聚合物和其他聚合物的共聚物。细胞围栏可以耦接到一个或更多个装置或与一个或更多个装置集成,诸如流通池,其中可以计数细胞培养物的等分试样。另外地,细胞围栏可包含用于向细胞围栏中的细胞添加培养基、其它试剂和/或新鲜微载体的另外的液体端口。细胞围栏361的主体364的体积可以为25mL至3000mL,或250mL至1000mL,或450mL至500mL。

[0103] 在操作中,包含生物反应器组件300(在该图3D中未示出)和细胞围栏361的生物反应器/细胞围栏组件360培养、传代、转染哺乳动物细胞并支持哺乳动物细胞的编辑和进一步生长(注意,该图3D中未示出生物反应器支架组件)。将细胞转移到包含培养基和微载体的生长容器中。允许细胞粘附到微载体。大约2,000,000个微载体(例如,具有增强的附着表面处理的层粘连蛋白-521包被的聚苯乙烯)用于大约2,000万个细胞的初始培养,其中每个微载体有大约50个细胞。细胞生长直到每个微载体有大约500个细胞。对于培养基更换,允许包含细胞的微载体沉降,并经由吸管过滤器抽吸用过的培养基,其中过滤器具有足够小的网以排除微载体。过滤器的网尺寸将取决于存在的微载体和细胞的尺寸,但通常为50 μ m至500 μ m,或70 μ m至200 μ m,或80 μ m至110 μ m。为了使细胞传代,让微载体沉降,并从生长容器中移除用过的培养基,并向生长容器中添加磷酸缓冲盐水或另一种洗涤剂,以洗涤微载体上的细胞。任选地,允许微载体再次沉降,并移除一些洗涤剂。此时,细胞从微载体上解离。解离可以通过例如使气体或空气鼓泡通过生长容器中的洗涤剂、通过增加叶轮速度和/或方向、通过酶促作用(经由例如胰蛋白酶)或通过这些方法的组合来完成。在一种实施方案中,将化学剂诸如RelesRTM试剂(STEMCELL Technologies Canada INC., Vancouver, BC, Canada)添加到剩余洗涤剂中的微载体,持续大多数细胞从微载体上解离所需的时间段,诸如1分钟至60分钟,或3分钟至25分钟,或5分钟至10分钟。在经过足够的时间来解离细胞后,将细胞生长培养基添加到生长容器中以停止酶促反应。

[0104] 再一次,现在用过的微载体被允许沉降到生长容器的底部,并且细胞通过过滤吸管被抽吸到细胞围栏361中。生长容器被配置成允许2mL至200mL、或6mL至50mL、或8mL至12mL的“死体积”,低于该“死体积”,过滤吸管不会抽吸培养基,以确保沉降的用过的微载体在流体更换期间不被运送到过滤吸管。在从生物反应器容器中抽吸细胞后,留下培养基的“死体积”和用过的微载体,用过的微载体通过非过滤吸管被抽吸到废物中。用过的微载体(和生物反应器容器)在磷酸缓冲盐水或其它缓冲液中稀释一次或更多次,其中洗涤剂和用过的微载体经由非过滤吸管继续被抽吸,留下清洁的生物反应器容器。洗涤后,将新鲜微载体或RBMC和新鲜培养基分配到生物反应器容器中,并将细胞围栏中的细胞分配回生物反应器容器中,分别用于另一轮传代或用于转染和编辑。

[0105] 图3E描绘了生物反应器和生物反应器/细胞围栏组件360,其包含具有主体304、包

含马达集成端口310的盖组件302、包含过滤器363的过滤吸管362和非过滤吸管371的生长容器。还可以看到细胞围栏361、从细胞围栏到夹管阀366的流体管线368,以及也连接到夹管阀366用于培养基更换的管线369。非过滤吸管368还通过夹管阀366流向废物365。还可以看到蠕动泵367。关于生物反应器和细胞围栏的更多详细信息,参见2021年4月24日提交的USSN 17/239,540。

[0106] 用于在生物反应器中将试剂包递送至哺乳动物细胞的示例性实施方案

[0107] 图4A描绘了采用微载体分区递送用于编辑在悬浮液中生长的哺乳动物细胞的示例性工作流程,其中细胞共定位在包含待转染到细胞中的切口酶-RT编辑组分的试剂包微载体(reagent bundle microcarriers,“RBMC”)上。在第一步中,培养待编辑的细胞几个传代,例如,脱离仪器,以确保细胞健康。细胞可以在2D培养物中、3D培养物(如果细胞在3D培养物中生长或适应3D培养物时是有活力的)中或微载体上培养。这种初始的细胞生长通常发生在自动化仪器之外。如果需要,将细胞解离并添加到生物反应器中的培养基中,生物反应器中包含细胞生长培养基,诸如MEM、DMEM、RPMI,或对于干细胞,mTeSR™Plus无血清、无饲养物细胞培养基(STEMCELL Technologies Canada INC., Vancouver, BC, Canada)和细胞生长微载体。如果细胞最初在微载体上培养,则将微载体转移到包含细胞生长培养基诸如mTeSR™Plus无血清、无饲养物细胞培养基(STEMCELL Technologies Canada INC., Vancouver, BC, Canada)和另外的微载体的生物反应器中。大约 $1e7$ 个或 $1e8$ 个细胞被转移到自动化仪器上的细胞生长模块进行生长。

[0108] 在仪器外细胞生长的同时,也在仪器外制造试剂包微载体(RBMC)。本说明书提供了两种示例性方法的描绘,其中几个步骤涉及制造可用于在本文描述的模块和自动化仪器中编辑细胞的RBMC(参见图4C和图4D)。

[0109] 细胞以生物反应器中的微载体上的3D培养物培养,持续例如三至四天,或者直到存在期望数量的细胞,例如 $1e8$ 个细胞。注意,该图4A中的所有过程可以在生物反应器和细胞围栏中发生。在这个生长周期期间,监测细胞的细胞数量、pH和任选地其他参数。如以上描述的,细胞生长监测可以通过成像来进行,例如,通过允许微载体沉降并对生物反应器的底部成像。可选地,培养物的等分试样可以被取出并流经单独的流通池,例如在单独的模块中,用于成像。例如,细胞围栏除了与生物反应器容器集成之外,还可以与流通池或其他用于细胞计数的装置集成,其中细胞围栏中细胞培养物的等分试样可以被取出并在流通池中计数。

[0110] 在另一选择中,细胞可以表达荧光蛋白,并且测量细胞培养物的荧光,或者荧光染料可以用于染色细胞,特别是活细胞。这种基于微载体的工作流程可以在生物反应器和细胞围栏中进行,大部分(如果不是全部)步骤在同一装置中进行;因此,可以对两个或许多样品同时并行部署几个生物反应器和细胞围栏。在又另一种选择中,电容率或电容用于监控微载体上的细胞覆盖。在又另一种实施方案中,细胞的等分试样可以从生物反应器或细胞围栏中取出,并运出仪器,并在商业细胞计数器(即,Thermofisher Countess, Waltham, MA, USA)上手动计数。

[0111] 用于初始细胞生长的微载体可以是无孔的(其中孔径尺寸通常是 $<20\text{nm}$ 的尺寸)、微孔的(具有尺寸在 $>20\text{nm}$ 至 $<1\mu\text{m}$ 之间的孔)或大孔的(具有尺寸在 $>1\mu\text{m}$ 之间,例如 $20\mu\text{m}$ 的孔)。在微载体培养物中,细胞在无孔或微孔微载体的表面上作为单层生长,这些微载体在

形态上通常是球形的;可选地,细胞在表面上生长并在大孔微载体的孔中作为多层生长。微载体优选具有比培养基稍大的密度,以便于细胞和培养基的容易分离,用于例如培养基更换和成像及传代;然而,微载体的密度也足够低,以允许微载体在最小搅拌或鼓泡速率下完全悬浮。保持低的搅拌或鼓泡速率是优选的,以避免对细胞的流体动力损伤。

[0112] 用于细胞生长的微载体取决于细胞类型和期望的细胞数量,并且通常包括天然或合成的细胞外基质或细胞粘附促进剂(例如,针对细胞表面蛋白的抗体或聚-L-赖氨酸)的涂层,以促进细胞生长和粘附。用于细胞培养的微载体可从商业上广泛获得,例如 Millipore Sigma, (St.Louis,MO,USA); Thermo Fisher (Waltham,MA,USA); Pall Corp. (Port Washington,NY,USA); GE Life Sciences (Marlborough,MA,USA); 和 Corning Life Sciences (Tewkesbury,MA,USA)。至于细胞外基质,天然基质包括胶原、纤维蛋白和玻连蛋白(例如可从 ESBio, Alameda, CA, USA 获得), 并且合成基质包括 **Matrigel**[®] (Corning Life Sciences, Tewkesbury, MA, USA)、Geltrex[™] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、**Cultrex**[®] (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA), 可从 Cellendes (Tubingen, Germany) 获得的仿生水凝胶; 和可从 Xylyx (Brooklyn, NY, USA) 获得的组织特异性细胞外基质; 此外, denovoMatrix (Dresden, Germany) 提供 screenMATRIX[™], 一种便于快速测试大量细胞微环境(例如细胞外基质)以优化感兴趣细胞生长的工具。

[0113] 在细胞生长之后,通过例如停止生物反应器中的叶轮旋转或鼓泡作用并允许微载体沉降来进行传代。在一种方法中,使用酶诸如胶原酶、胰蛋白酶或链霉蛋白酶,或通过包括 EDTA 或其他螯合化学物质的非酶促方法从微载体中移出细胞,并且在从载体中移出后,添加培养基来稀释酶以抑制酶促作用。下文详细描述了与细胞围栏相关的解离程序。在添加培养基后,然后通过允许微载体沉降和经由过滤吸管将细胞抽吸到细胞围栏中,将细胞与微载体分离。然后,细胞可以任选地经由过滤器、筛或通过细胞围栏中的鼓泡或其他搅拌而彼此解离。接下来,包含制造的试剂包的微载体(试剂包微载体或 RBMC)和解离的细胞在生长容器中的适当培养基中合并。可选地,细胞可以经由在体积减小的生长容器中或在细胞围栏中的微载体桥传代(microcarrier bridge passaging)从细胞生长微载体转移到 RBMC,而不是从细胞生长微载体移出细胞并在 RBMC 上重新接种。桥传代包括允许新的微载体(例如 RBMC)与负载细胞的微载体物理接触,使得后一微载体上的细胞可以迁移到 RBMC。

[0114] RBMC 不是在仪器上制备的,而是预先制造的。用于试剂包的微载体可以是微孔微载体,所述微孔微载体由于微孔过多,可以比无孔或大孔微载体在每个载体直径上携带更大的试剂有效载荷。优选的微载体是微孔的,为试剂递送提供增加的表面积,并且在表面上官能化以便能够结合试剂。用于 RBMC 的优选微载体包括 Pierce[™] 链霉亲和素 UltraLink[™] 树脂(一种用链霉亲和素官能化的交联聚丙烯酰胺载体,包含 50nm 至 100nm 的孔径); Pierce[™] NeutrAvidin[™] Plus UltraLink[™] 树脂(一种用抗生物素蛋白官能化的交联聚丙烯酰胺载体,包含 50nm 至 100nm 的孔径); 以及 UltraLink[™] Hydrazide 树脂(一种用肼官能化的交联聚丙烯酰胺载体,包含 50nm 至 100nm 的孔径), 均可从 Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) 获得; 具有炔烃、叠氮化物、光可裂解叠氮化物和二硫化物表面官能团的交联琼脂糖树脂, 可从 Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ, USA) 获得; Sepharose[™] 树脂(具有胺、羧基、碳二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和环氧表面官能团的交联琼脂糖), 可从 GE Health (Chicago, IL, USA) 获得。

[0115] 微载体负载有扩增的CF编辑盒或扩增的CF编辑质粒、引擎质粒、切口酶-RT融合酶、切口酶-RT融合mRNA或核糖核蛋白(RNP),这取决于例如,经由,例如经由化学或光连接的官能化基团,或者取决于微载体上的表面涂层(如果存在)。通过1)分区和扩增编辑盒的单个拷贝以在RBCM中产生克隆拷贝,或通过2)汇集和扩增编辑盒,随后将编辑盒分成子池(sub-pool)并用包含与编辑盒上的独特序列具有特异性和互补的核酸的微载体“下拉”扩增的编辑盒来制备RBCM。汇集子池(sub-pooling)的步骤起到使编辑盒池“去多重化(de-multiplex)”的作用,从而增加“下拉”过程的效率和特异性。因此,去多重化允许大量进行编辑盒的扩增和纠错,随后将编辑盒的克隆拷贝高效负载到微载体上。

[0116] 图4B描绘了用于培养、传代、转染和编辑iPSC(诱导多能干细胞)的示例性选择,其中存在克隆高拷贝数(HCN)RBCM——即脂质纳米颗粒包被的微载体的顺序递送,其中每个微载体包被有携带单个克隆编辑盒的递送媒介物(CF编辑盒或CF编辑载体)的许多拷贝——随后是大量酶递送。注意,如上描述的生物反应器和细胞围栏可用于所有过程。遵循图1B的工作流程,首先将细胞接种在RBCM上以将CF编辑盒的克隆拷贝递送到细胞。同样,RBCM通常是在仪器外制造(fabricated)或制造(manufactured)。允许细胞生长并且在24-48小时后,将培养基更换成包含抗生素的培养基,以选择已经转染的细胞。将细胞传代、重新接种和再次培养,并且然后传代和重新接种,这一次接种到包含lipofectamine和切口酶-RT融合酶的微载体上,切口酶-RT融合酶作为在启动子控制下的编码序列提供,或作为微载体表面上的蛋白提供。作为选择,可以在溶液中大量提供切口酶-RT融合酶。切口酶-RT融合酶被微载体上的细胞获取,然后孵育细胞并允许其生长。根据需要更换培养基,并使细胞从微载体上脱离,用于随后的生长和分析。

[0117] 图4B中示出的方法的可选示例性选择包括对iPSC进行培养、传代、转染和编辑的步骤。在该实施方案中,同时递送CF编辑盒RBCM(即试剂包脂质纳米颗粒包被的微载体),其中每个微载体包被有携带单个克隆CF编辑盒的CF编辑盒或CF编辑载体的许多拷贝,以及切口酶-RT融合酶(例如,作为受其启动子控制的编码序列,作为核糖核蛋白复合体,或作为蛋白)。同样,RBCM通常是在仪器外制造(fabricated)或制造(manufactured)。注意,下文描述的集成仪器可用于所有过程。如图4B中示出的工作流程,首先将细胞接种在微载体上生长。然后将细胞传代、脱离、重新接种、培养并再次脱离以增加细胞数量,根据需要每24-48小时或24-72小时更换培养基。脱离后,将细胞接种在RBCM上,用于在共转染反应中编辑盒和酶的克隆递送。转染后,细胞生长24-48小时,之后将培养基更换成包含抗生素的培养基进行选择。细胞被选择和传代,重新接种并再次培养。根据需要更换培养基,并使细胞从微载体上脱离,用于随后的生长和分析。

[0118] 图4C和图4D描绘了用lipofectamine/CF编辑盒有效载荷和细胞填充微载体的可选方法。在图4C示出的方法400a的左上,使lipofectamine402和编辑盒有效载荷404合并,并且在溶液中形成编辑LNP(lipofectamine核酸有效载荷)406。并行地,微载体408(“MC”)与诸如层粘连蛋白521的涂层410合并以促进吸附和细胞附着。然后将层粘连蛋白521包被的微载体与编辑LNP 406合并以形成部分负载的微载体412。到这一点形成RBCM(即,包含编辑LNP 406的部分负载的微载体412)的过程通常在仪器外进行。并行地并且通常在仪器外,通过合并lipofectamine402和切口酶mRNA418形成切口酶LNP 420。切口酶LNP 420与部分负载的微载体412合并并吸附到部分负载的微载体412上,以形成包含编辑LNP 406和切口

酶LNP 420两者的完全负载的RBMC 422。此时,哺乳动物细胞414已经在生物反应器和细胞围栏中培养和传代几次至许多次。细胞414填充完全负载的RBMC 422,其中细胞414然后获取编辑LNP 406和切口酶LNP 420(即,被其转染),该过程可能需要几个小时直至几天。在转染过程结束时,转染的哺乳动物细胞驻留在完全负载的微载体422的表面上。

[0119] 作为图4C中示出的方法400a的可选方案,图4D描绘了方法400b,其特征在于编辑LNP和切口酶LNP的同时吸附。同样,合并lipofectamine 402和编辑载体有效载荷404,其中在溶液中形成编辑LNP(lipofectamine核酸有效载荷)406。并行地,通过合并lipofectamine 402和切口酶mRNA418形成切口酶LNP 420。同样并行地,微载体408与诸如层粘连蛋白521的涂层410合并,以促进吸附和细胞附着。层粘连蛋白521包被的微载体同时与编辑LNP 406和切口酶LNP 420两者合并以形成完全负载的微载体424,其中编辑LNP 406和切口酶LNP 420两者共吸附到层粘连蛋白包被的微载体的表面上。到这一点形成RBMC(即,包含编辑LNP 406和切口酶-RT融合LNP 420两者的完全负载的微载体424)的过程通常在仪器外进行。

[0120] 此时,将包含编辑LNP 406和切口酶-RT融合LNP 420的完全负载的微载体424添加到包含待转染的哺乳动物细胞414的生物反应器中的培养基(任选地含有另外的lipofect试剂402)中。哺乳动物细胞414已经在生物反应器和细胞围栏中培养和传代一次到许多次。细胞414填充完全负载的RBMC 424,其中细胞414然后获取编辑LNP 406和切口酶-RT融合LNP 420(即,被其转染),该过程可能需要几个小时直至几天。在转染过程结束时,转染的哺乳动物细胞驻留在完全负载的微载体424的表面上。在这些示例性方法中,切口酶-RT融合mRNA用于形成切口酶-RT融合LNP;然而,可以负载切口酶-RT酶以形成LNP,或者CF编辑盒和切口酶-RT融合酶可以以核糖核蛋白(RNP)的形式负载在LNP上。关于微载体和RBMC的另外详细信息,请参见2021年4月24日提交的USSN 17/239,540。

[0121] 自动化多模块细胞处理仪器的使用

[0122] 图5图示了多模块细胞处理仪器的一种实施方案。该实施方案描绘了对细胞群体进行递归基因切口酶-RT融合编辑的示例性系统。细胞处理仪器500可以包括壳体526、用于存储待转化或转染的细胞的储库502和细胞生长模块(包括例如旋转生长瓶)504。将待转化的细胞从储库502转移至细胞生长模块504进行培养,直至细胞达到靶OD。在细胞达到靶OD后,生长模块可以冷却或冷冻细胞以供后续处理,或者将细胞转移至细胞浓缩(例如过滤)模块506,在此处细胞经历缓冲液交换并被赋予电感受态,并且细胞的体积可以显著减低。在将细胞浓缩至适当的体积后,细胞被转移至电穿孔装置508或其他转化模块。除了用于储存细胞的储库502之外,多模块细胞处理仪器还包含用于储存将被引入电感受态细胞群体522的引擎载体和编辑载体或引擎+编辑载体或载体和切口酶-RT酶的储库。将载体转移到电穿孔装置508,电穿孔装置508已经包含生长到靶OD的细胞培养物。在电穿孔装置508中,核酸(或核酸和蛋白)被电穿孔到细胞中。电穿孔后,将细胞转移到任选的恢复和稀释模块510中,在此处细胞在转化后短暂恢复。

[0123] 在恢复后,可以将细胞转移至储存模块512,在此处可以将细胞储存在例如4°C或-20°C以供后续处理,或者可以将细胞稀释并转移至选择/单个化/生长/诱导/编辑/标准化(或例如SWIIN)模块520。在SWIIN 520中,细胞排列成使得每微孔平均有一至二十或五十个左右的细胞。排列的细胞可以在选择培养基中,以选择已经用一个或多个编辑载体转化

或转染的细胞。在单个化后,细胞生长直到2-50次倍增并建立集落。在集落建立后,通过提供诱导编辑的条件(例如温度、添加诱导或阻遏化学物质)诱导编辑。然后启动编辑并允许继续进行,允许细胞在微孔中生长至终末尺寸(例如集落的标准),并且然后用处治来自该轮编辑的载体的条件处理。在处治后,细胞可以从微孔中冲洗出来并汇集,然后转移到储存(或恢复)单元512,或者可以转移回生长模块504进行另一轮编辑。在汇集和转移到生长模块之间,通常存在一个或更多个另外的步骤,诸如细胞恢复、培养基交换(使细胞成为电感受态)、细胞浓缩(通常通过例如过滤与培养基交换同时进行)。

[0124] 注意,选择/单个化/生长/诱导/编辑/标准化和处治模块可以是同一模块,其中所有过程都在例如固体壁装置中进行,或者选择和/或稀释可以在分开的容器中发生,然后将细胞转移至固体壁单个化/生长/诱导/编辑/标准化/编辑模块(或例如SWIIN) 520。类似地,细胞可以在标准化后汇集,转移到单独的容器中,并在单独的容器中处治。作为在例如固体壁装置中单个化的可选方案,可以使转化的细胞在主体液体中生长并且可以在主体液体中诱导编辑(参见例如2019年8月14日提交的USSN 16/540,767和2019年8月20日提交的16/545,097)。在推定编辑的细胞被汇集后,它们可以经历另一轮编辑,另一轮编辑开始于培养、细胞浓缩和处理以赋予电感受态,以及经由电穿孔模块508被另一编辑盒中的又一修复模板转化。

[0125] 在电穿孔装置508中,选自第一轮编辑的细胞被第二组编辑载体转化,并且重复该循环,直至细胞已经被期望数量的例如CF编辑盒转化和编辑。图5中例示的多模块细胞处理仪器由处理器524控制(处理器524被配置成基于使用者输入来操作仪器)或者由包括与试剂筒相关的至少一个脚本在内的一个或更多个脚本来控制。处理器524可以控制各个过程的定时、持续时间和温度,试剂的分配以及仪器500的各个模块的其他操作。例如,脚本或处理器可以控制细胞、试剂、载体和编辑盒的分配;哪些编辑盒用于细胞编辑且按什么顺序;恢复和表达模块中使用的时间、温度和其他条件,细胞生长模块中读取OD的波长,细胞生长到的靶OD,以及细胞达到靶OD的靶时间。另外,处理器可以被编程为通知使用者(例如,经由应用程序)自动化多模块细胞处理仪器中细胞的进展。

[0126] 鉴于本公开内容,对于本领域普通技术人员来说明显的是,所描述的过程可以是递归和多重化的;即,细胞可以经历关于图5描述的工作流程,然后所得到的编辑的培养物可以经历另一轮(或若干轮或许多轮)使用不同CF编辑盒的另外的编辑(例如递归编辑)。例如,来自第一轮编辑的细胞可以被稀释,并且由CF编辑盒A编辑的编辑细胞的等分试样可以与CF编辑盒B组合,由CF编辑盒A编辑的编辑细胞的等分试样可以与CF编辑盒C组合,由CF编辑盒A编辑的编辑细胞的等分试样可以与CF编辑盒D组合,等等,用于第二轮编辑。在第二轮后,可以使每个双重编辑的细胞的等分试样经历第三轮编辑,其中,例如,将AB编辑的、AC编辑的、AD编辑的CF编辑的细胞各自的等分试样与另外的编辑盒(诸如CF编辑盒X、Y和Z)组合。即,双重编辑的细胞AB可以与CF编辑盒X、Y和Z组合并且由CF编辑盒X、Y和Z编辑,以产生三重编辑的编辑细胞ABX、ABY和ABZ;双重编辑的细胞AC可以与CF编辑盒X、Y和Z组合并且由CF编辑盒X、Y和Z编辑,以产生三重编辑的细胞ACX、ACY和ACZ;并且双重编辑细胞AD可以与CF编辑盒X、Y和Z组合并且由CF编辑盒X、Y和Z编辑,以产生三重编辑的细胞ADX、ADY和ADZ,等等。在此过程中,可以执行许多编辑排列和组合,产生非常多样化的细胞群体和细胞文库。

[0127] 在任何递归过程中，“处治”包含CF编辑盒的编辑载体是有利的。“处治”是一个过程，其中将在先前一轮编辑中使用的一个或更多个CF编辑载体从转化的细胞消除。处治可以通过以下完成：例如使用处治质粒裂解一个或更多个编辑载体从而使编辑载体无功能；经由细胞生长稀释细胞群体中的一个或更多个编辑载体（即细胞经历的生长周期越多，保留一个或更多个编辑载体的子细胞就越少），或者通过例如利用编辑载体上的热敏感复制起点。处治的条件取决于处治的机制；即，在这个实例中，处治质粒如何裂解编辑载体。关于处治的另外信息，参见例如USPN 10,837,021和11,053,507；和2021年6月21日提交的USSN 17,353,282；以及2021年7月27日提交的17/300,518。

实施例

[0128] 提出以下实施例，以便为本领域技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开内容和描述，且以下实施例并不意图限制发明人视作其发明的范围，它们也不意图代表或暗示下文的实验是进行的所有实验或仅有的实验。本领域的技术人员应该明白，可以在对具体方面中所示的发明作出许多变化和/或修饰而不脱离本发明所广泛描述的精神或范畴。因此，本文的方面在各个方面中被认为是说明性的而非限制性的。

[0129] 实施例I：GFP到BFP转换测定

[0130] 使用具有稳定整合的GFP基因的基因组拷贝的哺乳动物细胞（HEK293T-GFP）创建了GFP到BFP的报告细胞系。这些细胞系使得能够通过各种不同的机制（包括流式细胞术，荧光细胞成像，以及通过对基因组整合的GFP基因测序进行基因型检测）对不同类别的基因组编辑（NHEJ、HDR、无编辑）进行表型检测。GFP基因缺乏编辑或完全修复切割事件导致细胞保持GFP阳性。通过非同源末端连接（NHEJ）途径修复的切割事件往往导致核苷酸插入或缺失事件（得失位（indel）），从而导致编码序列的移码突变，导致失去GFP基因表达和荧光。使用GFP到BFP的HDR供体作为修复模板，通过同源指导修复（HDR）途径修复的切割事件，导致细胞荧光谱从GFP荧光谱转换为BFP荧光谱。

[0131] 实施例II：CREATE融合编辑

[0132] CREATE融合编辑系统是活细胞编辑系统，其使用与具有逆转录酶活性的肽融合的切口酶-RT融合蛋白（例如，MAD2007切口酶等，参见USPN 10,883,077；11,053,485；和11,085,030；以及2021年3月12日提交的USSN 17/200,089和17/200,110；2021年8月23日提交的17/463,498；和2021年9月1日提交的17/463,581）以及编码包含与一种或更多种细胞中核酸的靶区互补的区域的gRNA/修复模板（即CF编辑盒）的核酸，所述区域包含相对于该一种或更多种细胞中的靶区的至少一个核苷酸的突变和前间区邻近基序（PAM）突变。

[0133] 在第一设计中，来源于MAD2007核酸酶（参见USPN 9,982,279和10,337,028）的切口酶，例如MAD7切口酶（参见USPN 10,883,077），在C-末端融合到工程化逆转录酶（RT）上，并克隆到CMV启动子的下游。在这种情况下，所用的RT源自Moloney鼠白血病病毒（MMLV）。

[0134] gRNA和修复模板（CF编辑盒）被设计成与EGFP到BFP编辑位点附近的单个区域互补。3'端的修复模板包含含有TY到SH编辑的13bp的区域和与切口的EGFP DNA序列互补的13bp的第二区域。这允许切口的基因组DNA退火到修复模板的3'端，然后通过逆转录酶延伸以将编辑掺入到基因组中。第二gRNA和修复模板（CF编辑盒）靶向EGFP DNA序列中编辑位点上游86bp的区域。设计这种CF编辑盒使得它能够使切口酶相对于另一个CF编辑盒切割

相对的链。这两个CF编辑盒都克隆在U6启动子的下游。还包含终止CF编辑盒转录的poly-T序列。

[0135] 将质粒转化到NEB稳定大肠杆菌(*E. coli*) (Ipswich, NY, USA)中,并使其在25mL LB培养物中生长过夜。次日,使用Qiagen Midi Prep试剂盒(Venlo, Netherlands)从大肠杆菌纯化质粒。然后用RNA酶A(ThermoFisher, Waltham, MA, USA)处理纯化的质粒,并使用DNA清洁和浓缩试剂盒(Zymo, Irvine, CA, USA)再次纯化。

[0136] HEK293T细胞在补充有10% FBS和1X青霉素和链霉素的DMEM培养基中培养。将100ng总DNA(50ng gRNA质粒和50ng CFE质粒)与1 μ l PolyFect(Qiagen, Venlo, Netherlands)在96孔板中的25 μ l OptiMEM中混合。将复合物孵育10分钟,并且然后将重悬于100 μ L DMEM的20,000个HEK293T细胞添加到混合物中。然后将得到的混合物在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂孵育80小时。

[0137] 使用TrypLE Express试剂(ThermoFisher, Waltham, MA, USA)从平底96孔板收获细胞,并将其转移到v底96孔板。然后将板以500g离心5分钟。然后吸出TrypLE溶液,并将细胞沉淀重悬于FACS缓冲液(1 \times PBS, 1% FBS, 1mM EDTA和0.5% BSA)中。然后在Attune NxT流式细胞仪上对GFP+、BFP+和RFP+细胞进行分析,并在FlowJo软件上分析数据。

[0138] 所鉴定的RFP+BFP+细胞指示经历精确或不精确编辑过程的富集细胞的比例。BFP+细胞指示经历成功编辑过程并表达BFP的细胞。GFP-细胞指示已被不精确编辑从而导致GFP开放阅读框破坏并丧失表达的细胞。

[0139] 在该示例性实验中,编辑位于修复模板中大约5'的位置,并且编辑的3'是与切口的基因组互补的区域,尽管意图的编辑也可以进一步存在于与切口的基因组同源的区域。切口酶-RT融合酶(MAD2007切口酶)在靶位点产生切口,并且切口的DNA退火至修复模板3'端的其互补序列。切口酶-RT融合物的逆转录酶部分然后延伸DNA,从而将意图的编辑直接掺入到基因组中。

[0140] 然后测试CREATE融合编辑系统在GFP+HEK293T细胞中的有效性。在所设计的测定系统中,成功的精确编辑产生BFP+细胞,而不精确编辑的细胞使细胞变为BFP和GFP双阴性。CF编辑盒与CFE2.1或CFE2.2组合给出~40%-45%的BFP+细胞,指示几乎一半的细胞群体已经经历成功编辑(数据未示出)。GFP-细胞为群体的~10%。第二切口编辑盒(nicking editing cassette)的使用,如Liu等人Nature, 576(7785):149-157(2019)中描述的,并没有进一步增加精确编辑率;事实上,它显著增加了不精确编辑的GFP阴性细胞群体,并且编辑率较低。

[0141] 先前的文献已经显示,在相对链上的双切口(距离<90bp)确实会导致双链断裂,这往往经由NHEJ修复,从而导致不精确的插入或缺失。总之,结果表明CREATE融合编辑主要产生精确编辑的细胞,并且不精确编辑的细胞比例低得多(数据未示出)。

[0142] 富集手柄,特别是连接到核酸酶表达的荧光报告物(在这种情况下,红色荧光蛋白或RFP)被包括在本实验中,作为接收编辑机构的细胞的代表物。当仅对3-4次细胞分裂后的RFP阳性细胞进行分析(计算富集)时,用CF编辑盒测试的高达75%的细胞为BFP+(数据未示出),表明摄取或表达连接的报告物可以用于富集具有较高CREATE融合编辑系统介导的基因编辑率的细胞群体。事实上,CREATE融合编辑和所描述的富集方法的组合使用产生了显著提高的意图的编辑率(数据未示出)。

[0143] 实施例III:用CF编辑盒的CREATE融合编辑

[0144] 使用具有对天然序列的意图的编辑和在该位点破坏核酸酶切割的编辑的CF编辑盒在哺乳动物细胞中进行CREATE融合编辑。简言之,使用以下方案产生慢病毒载体:在6孔板中,使用Lipofectamine LTX将含有编辑盒的1000ng慢病毒转移质粒连同1500ng慢病毒包装质粒(ViraSafe慢病毒包装系统,Cell BioLabs)转染到HEK293T细胞中。转染后72小时收集含有慢病毒的培养基。选择慢病毒CF编辑盒设计的两个克隆,并包括空的慢病毒主链作为阴性对照。

[0145] 转导前一天,将20,000个HEK293T细胞接种在6孔板中。将不同体积的CF编辑盒慢病毒(10 μ l至1000 μ l)连同10 μ g/ml聚凝胺添加到6孔板中的HEK293T细胞。转导48小时后,将含有15 μ g/ml杀稻瘟素的培养基添加到孔中。将细胞在选择中维持一周。选择后,选择具有最低存活细胞数的孔(<5%细胞)用于之后的实验。

[0146] 使用Neon转染系统(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)将实验构建体或野生型SpCas9电穿孔到HEK293T细胞中。简言之,将400ng总质粒DNA与缓冲液R中的100,000个细胞以15 μ l的总体积混合。使用10 μ l Neon吸头用20ms和1150v的2次脉冲对细胞进行电穿孔。电穿孔后80小时,在流式细胞仪上对细胞进行分析。由编辑盒的单个拷贝递送实现了高达15%的未富集编辑率(数据未示出)。

[0147] 然而,当编辑与RFP+细胞的计算选择相组合时,由CF编辑盒的单个拷贝递送实现了高达30%的富集编辑率。这种通过选择接收编辑机构的细胞进行的富集被显示导致精确、完全的预期编辑增加至2倍(数据未示出)。两个或更多个富集/递送步骤也可用于在自动化仪器(例如,使用用于细胞手柄富集和鉴定具有BFP表达的细胞的模块)中实现CREATE融合编辑的更高编辑率。当该方法富集具有较高CF编辑盒表达水平的细胞时,编辑率甚至进一步增加,并且因此仪器的生长和/或富集模块可以包括CF编辑盒富集。

[0148] 实施例IV:测试细胞中RNA稳定部分的有效性

[0149] 图6包括两个图,显示含有gRNA和在修复模板上具有3' gRNA稳定部分的CF编辑盒(即“稳定的CF编辑盒”或“StCFEC”)增加了GFP到BFP系统的编辑。在左边的图中,“G2U1g1c1”表示包含G2四联体(“G2U1”)、具有3bp切口至编辑距离的修复模板(“g1”)、克隆1的StCFEC;“G2U1g1c2”表示包含G2四联体(“G2U1”)、具有3bp切口至编辑距离的修复模板(“g1”)、克隆2的StCFEC;“G2U1g5c1”表示包含G2四联体(“G2U1”)、具有20bp切口至编辑距离的修复模板(“g5”)、克隆1的StCFEC;“G2U1g5c2”表示包含G2四联体(“G2U1”)、具有20bp切口至编辑距离的修复模板(“g5”)、克隆2的StCFEC;GFPg1表示其中修复模板包含3bp切口至编辑距离(“g1”),不含稳定部分的CF编辑盒(对照);GFPg5表示其中修复模板包含20bp切口至编辑距离(“g5”),不含稳定部分的CF编辑盒(对照);并且NogRNA表示在转导中不包含CF编辑盒的对照。g1(3bp)和g5(20bp)之间的区别是切口至编辑距离,其中人们将预期切口至编辑距离越长,稳定性越重要。右边的图显示,在不同浓度范围内,StCFEC比未稳定的CF编辑盒在编辑方面更有效。

[0150] 图7是条形图,示出单拷贝数慢病毒递送StCFEC相比于CF编辑盒(即,不含RNA稳定部分的CF编辑盒)增加编辑。“SCN引导”表示由慢病毒递送并整合到HEK293T-GFP细胞中的单个拷贝数的CF编辑盒;“HCN引导”表示由慢病毒递送并整合到HEK293T-GFP细胞中的高拷贝数(2-5个拷贝)的CF编辑盒;“CFg1”表示其中修复模板包含3bp切口至编辑距离(“g1”)、

不含RNA稳定部分的CF编辑盒；“CFg5”表示其中修复模板包含3bp切口至编辑距离(“g5”)、不含RNA稳定部分的CF编辑盒；“无核酸酶”表示不使用核酸酶的对照；“G2U1”表示G2四联体RNA稳定部分(参见图1D)；并且“C1”和“C2”表示克隆。注意，与HCN CFg1相比，使用HCN G2U1g1的编辑存在大约5%的增加；与HCN CFg5相比，使用HCN G2U1g5的编辑存在10%的增加；与SCN CFg1相比，用SCN G2U1g1的编辑存在大约12%-14%的增加；与SCN CFg5相比，用SCN G2U1g5的编辑存在大约10%的增加；并且HCN和SCN G2U1gRNA(例如用RNA部分稳定的CF编辑盒)之间的编辑差异在10%-20%之内。

[0151] 图8是用于确定细胞生存力和编辑效率的实验设计的简化图。对于细胞系的产生，产生五个包含GFP慢病毒的单个拷贝的iPSC(诱导多能干细胞)系：PGP86；PGP168；PGP170；PGP326；和WTC11。用GFPCF编辑盒1(3bp切口至编辑距离)-/+G2四联体慢病毒(G1对G2U1)转导这些细胞系。1:10,000和1:50慢病毒稀释度分别用于每个细胞的大约单拷贝(SCN)和多拷贝(MCN)数。用切口酶-RT融合mRNA转染这些系，并测试转染效率和编辑。一个板用Cas9 mRNA转染以测试切割效率，并且一个板仅用脂质转染以测试转染活力。

[0152] 图9是示出StCFEC的>90%转染效率的条形图。在24小时通过Thy1.2染色测量切口酶-RT融合mRNA转染效率。所有细胞系都示出大于90%的转染效率。在该图中，“G1”表示不含RNA稳定部分的CF编辑盒；“G4”表示在CF编辑盒的修复模板的3'端上具有G2四联体(例如，G2U1)RNA稳定部分的CF编辑盒；1:10K和1:50是样品的慢病毒稀释度。

[0153] 图10是通过ddPCR确认单拷贝和多拷贝CF编辑盒整合的条形图。在该图中，“G1”表示不含RNA稳定部分的CF编辑盒；“G4”表示具有G2四联体(例如，G2U1)RNA稳定部分的CF编辑盒。使用靶向2号染色体和WPRE(土拨鼠肝炎病毒转录后应答元件)的引物-探针组，通过ddPCR测量拷贝数。对于编辑盒整合的细胞系，通过减去从EGFP亲本系检测到的拷贝来计算拷贝数。EGFP慢病毒用于以大约1个拷贝/细胞产生亲本系。注意1:10K产生单拷贝整合；1:50产生平均2-4个拷贝/细胞，并且在细胞系间观察到相似的转导效率。

[0154] 图11是示出在不同iPSC系中在不同慢病毒转染稀释度下核酸酶mRNA(Cas9和MAD2007切口酶-RT融合蛋白)转染后96小时时的细胞生存力的条形图。在该图中，“G1”表示不含RNA稳定部分的CF编辑盒；“G4”表示在修复模板的3'端具有G2四联体(例如，G2U1)RNA稳定部分的CF编辑盒；“未转导的”表示不含整合到细胞系中的编辑盒的细胞系；“未转染的”表示未用切口酶-RT融合物或核酸酶mRNA转染的细胞系。在96小时通过刃天青测量细胞生存力，并将数据针对各自仅脂质的孔进行标准化，以考虑细胞铺板中的变异性。切口酶-RT mRNA转染示出大约70%的生存力，在1:50稀释度(2-4个拷贝)中的生存力通常低于1:10K稀释度(1个拷贝)中的生存力。更多的编辑盒整合表现为增加了切割/切口的频率，导致增加的细胞周期停滞或凋亡。细胞系PGP86和PGP326的生存力表现出对mRNA转染更敏感(对于大多数编辑的样品<70%)。

[0155] 图12显示了使用MAD2007切口酶-RT融合蛋白在iPSC系中观察到的低得失位率。“g1-G4”表示在修复模板的3'端具有G2四联体RNA稳定部分的CF编辑盒。在每个细胞系(模拟)中有5%-10%的GFP背景细胞群体，并且在所有具有CF编辑的iPSC系中观察到低得失位率。得失位率在一些样品中随着增加的G2四联体的拷贝数而增加。

[0156] 图13是示出慢病毒整合的3'稳定CF编辑盒(StCFEC)的StCFEC在五个iPSC系之间赋予稳健编辑的条形图。慢病毒整合的CF编辑盒的3'稳定在五个iPSC系之间赋予稳健编

辑。单拷贝GFP编辑盒整合产生5%-8%的编辑,并且增加拷贝数产生10%-15%的编辑率。在单拷贝中添加G2四联体(G2U1)使编辑率增加大约3X。与单拷贝相比,增加拷贝数同时添加G-四联体使编辑率翻倍,编辑率增加了30%至43%。与不含G2四联体的单拷贝相比,编辑增加了5-8X。

[0157] 图14是描绘确定各种推定的3'稳定部分的编辑效率的筛选工作流程的图。

[0158] 图15A和图15B是显示表1中列出的各种推定的3' RNA稳定部分相对于G2U1g5 StCFEC和CFg5(未保护的)CF编辑盒的编辑率的条形图。

[0159] 表1

[0160]

稳定部分名称	稳定部类型	稳定部分序列	HEK 细胞中相对于未保护的 CFg5 的改进倍数	SEQ ID NO.
CFg5	NA	NA	1	
G2U1g5	G-四联体	GGTGGTGGTGG	1.8	1
gaaa1	G-四联体	GCCGAAAGGC	1.4	2
gaaa2	G-四联体	GATACCGAAAGGTATC	1.3	3
gaaa3	G-四联体	GATCTGACCGAAAGG TCAGATC	1.3	4
gaaa4	G-四联体	GATCGTCTGACCGAAA GGTCAGACGATC	1.5	5
gaaa5	G-四联体	GAGGCTCGTCTGACC GAAAGGTCAGACGAG CCTC	1.6	6
gaaa6	G-四联体	GAGGCTTCTAGCGTCT GACCGAAAGGTCAGA CGCTAGAAGCCTC	1.7	7
GG1	G-四联体	GGTGGTGGTGG	1.4	8

[0161]

稳定部分名称	稳定部类型	稳定部分序列	HEK 细胞中相对于未保护的 Cfg5 的改进倍数	SEQ ID NO.
GG10	G-四联体	GGAGGAGGAGGAGGA GGAGG	1.6	9
GG11	G-四联体	GGAGGTGGAGGTGGA GGTGG	1.7	10
GG12	G-四联体	GGCCTGTGGCCTGTGG CCTGTGG	1.2	11
GG13	G-四联体	GGCCTGTTGGCCTGTT GGCCTGTTGG	1.9	12
GG14	G-四联体	GGTAGCATTGGTAGCA TTGGTAGCATTGG	1.4	13
GG2	G-四联体	GGAGGAGGAGG	1.4	14
GG3	G-四联体	GGCGGCCGGCGG	1.2	15
GG4	G-四联体	GGAAGGAAGGAAGG	1.4	16
GG5	G-四联体	GGCTGGCTGGCTGG	1.6	17
GG6	G-四联体	GGCAGGCAGGCAGG	1.3	18
GG7	G-四联体	GGAGAGGAGAGGAGA GG	1.4	19
GG8	G-四联体	GGAAAGGAAAGGAAA GG	1.5	20
GG9	G-四联体	GGTCAGGTCAGGTCA GG	1.8	21
GGG1	G-四联体	GGGTGGGTGGGTGGG	1.5	22
GGG10	G-四联体	GGGAGGAGGGAGGAG GGAGGAGGG	1.8	23
GGG11	G-四联体	GGGAGGTGGGAGGTG GGAGGTGGG	1.9	24
GGG12	G-四联体	GGGCCTGTGGGCCTGT GGGCCTGTGGG	1.6	25
GGG13	G-四联体	GGGCCTGTTGGGCCTG TTGGGCCTGTGGG	1.7	26
GGG14	G-四联体	GGGTAGCATTGGGTAG CATTGGGTAGCATTGG G	1.7	27
GGG2	G-四联体	GGGAGGGAGGGAGGG	1.4	28
GGG3	G-四联体	GGGCGGGCGGGCGGG	1.5	29
GGG4	G-四联体	GGGAAGGGAAGGGAA	1.5	30

稳定部分名称	稳定部类型	稳定部分序列	HEK 细胞中相对于未保护的 Cfg5 的改进倍数	SEQ ID NO.
		GGG		
GGG5	G-四联体	GGGCTGGGCTGGGCT GGG	1.7	31
GGG6	G-四联体	GGGCAGGGCAGGGCA GGG	1.7	32
GGG7	G-四联体	GGGAGAGGGAGAGGG AGAGGG	2	33
GGG8	G-四联体	GGGAAAGGGAAAGGG AAAGGG	1.5	34
GGG9	G-四联体	GGGTCAGGGTCAGGG TCAGGG	1.8	35
GGGG1	G-四联体	GGGGTGGGGTGGGGT GGGG	2	36
GGGG10	G-四联体	GGGGAGGAGGGGAGG AGGGGAGGAGGGG	1.6	37
GGGG11	G-四联体	GGGGAGGTGGGGAGG TGGGGAGGTGGGG	1.4	38
GGGG12	G-四联体	GGGGCCTGTGGGGCC TGTGGGGCCTGTGGG G	1.3	39
GGGG13	G-四联体	GGGGCCTGTTGGGGC CTGTTGGGGCCTGTTG GGG	1.8	40
GGGG14	G-四联体	GGGGTAGCATTGGGGT AGCATTGGGGTAGCAT TGGGG	1.5	41
GGGG2	G-四联体	GGGGAGGGGAGGGGA GGGG	1.8	42
GGGG3	G-四联体	GGGGCGGGCGGGGC GGGG	1.5	43
GGGG4	G-四联体	GGGGAAGGGGAAGGG GAAGGGG	1.2	44
GGGG5	G-四联体	GGGGCTGGGGCTGGG GCTGGGG	1.7	45
GGGG6	G-四联体	GGGGCAGGGGCAGGG GCAGGGG	1.6	46
GGGG7	G-四联体	GGGGAGGGGAGAG GGGAGAGGGG	1.8	47

[0162]

[0163]

稳定部分名称	稳定部类型	稳定部分序列	HEK 细胞中相对于未保护的 Cfg5 的改进倍数	SEQ ID NO.
GGGG8	G-四联体	GGGGAAAGGGGAAAG GGGAAAGGGG	1.7	48
GGGG9	G-四联体	GGGGTCAGGGGTCAG GGGTCAGGGG	1.7	49
guga1	发夹	GCCGTGAGGC	1.1	50
guga2	发夹	GATACCGTGAGGTATC	1.1	51
guga3	发夹	GATCTGACCGTGAGGT CAGATC	1.6	52
guga4	发夹	GATCGTCTGACCGTGA GGTCAGACGATC	1	53
guga5	发夹	GAGGCTCGTCTGACC GTGAGGTCAGACGAG CCTC	1.2	54
guga6	发夹	GAGGCTTCTAGCGTCT GACCGTGAGGTCAGA CGCTAGAAGCCTC	1.2	55
psd-1	假结	GCGACTTCGGTCGCCG AA	1.5	56
psd-2	假结	GCGACTTCGCATGTCG CATGCGAA	1.4	57
psd-3	假结	GCGACTTCGCATAGAC GTCGCGTCTATGCGAA	1.8	58
psd-4	假结	GCGACTAGTTCGCTAG TCGCCGAA	1.4	59
psd-5	假结	GCGACTAGTTCGCATC TAGTCGCATGCGAA	1.2	60
psd-6	假结	GCGACTAGTTCGCATA GACCTAGTCGCGTCTA TGCGAA	1.5	61
psd-7	假结	GAGCTAGCATCATTCG TGATGCTAGCTCCGAA	1.6	62
psd-8	假结	GAGCTAGCATCATTCG CATTGATGCTAGCTCA TGCGAA	1.4	63
psd-9	假结	GAGCTAGCATCATTCG CATAGACTGATGCTAG CTCGTCTATGCGAA	1.5	64
uucg1	发夹	GCCTTCGGGC	1.3	65

稳定部分名称	稳定部类型	稳定部分序列	HEK 细胞中相对于未保护的 CFg5 的改进倍数	SEQ ID NO.
uucg2	发夹	GATACCTTCGGGTATC	1.1	66
uucg3	发夹	GATCTGACCTTCGGGT CAGATC	0.9	67
uucg4	发夹	GATCGTCTGACCTTCG GGTCAGACGATC	1.6	68
uucg5	发夹	GAGGCTCGTCTGACCT TCGGGTCAGACGAGC CTC	1.6	69
uucg6	发夹	GAGGCTTCTAGCGTCT GACCTTCGGGTCAGA CGCTAGAAGCCTC	1.5	70
TABV	外切核糖核酸酶抗性 RNA	GGCAAGGTACGGATTA GCCGTAGGGGCTTGA GAACCCCCCTCCCCA CTC	1	71
TBEV	外切核糖核酸酶抗性 RNA	CACAGATCATGGAATG ATGCGGCAGCGCGCG AGAGCGACGGGGAAG TGGTCGCACCCGACG CACCATCCATGAAGCA ATACTTCGTGAGACCC	1.2	72
ZIKV	外切核糖核酸酶抗性 RNA	GGGTCAGGCCGGCGA AAGTCGCCACAGTTTG GGGAAAGCTGTGCAG CCTGTAACCCC	1.6	73

[0165] 图16A是在PGP168 iPSC中转染后120小时GFP到BFP编辑率的条形图。图16B是在WTC11 iPSC中转染后120小时GFP到BFP编辑率的条形图。注意,G2U1 G-四联体改进了g1 (3bp切口至编辑) 和g5 (20bp切口至编辑) 两者的编辑率;用CF编辑盒g5 (无RNA稳定部分) 观察到大约0.5%至2.5%的编辑率;一些RNA稳定元件接近用G2U1观察到的编辑率,尽管没有一个表现优于G2U1;相比于PGP168,在WTC11中观察到更低的总体编辑率,这与更低的转染效率一致;并且在细胞系之间观察到g1、g5+/-G2U1的相同趋势。

[0166] 图17示出了用作3' 稳定部分的病毒外切核糖核酸酶抗性RNA的编辑率的改进。外切核糖核酸酶抗性RNA (xrRNA) 是在黄病毒的病毒基因组3' UTS区发现的一类RNA,其作用是提供外切核糖核酸酶保护。将TABV、TBEV和ZIKV xrRNA附加到GFPCF编辑盒的3' 端,并与具有20bp切口至编辑距离(G2U1g5)的G2U1保护的CF编辑盒进行比较,并与包含20bp切口至编辑距离(g5)且在3' 端没有保护的CF编辑盒进行比较。

[0167] 虽然本发明通过许多不同形式的实施方案来满足,但是如结合本发明的优选的实施方案详细描述,应理解本公开内容应被认为是对本发明的原理的示例而不意在将本发明局限于本文说明和描述的具体实施方案。本领域的技术人员可以作出许多变化而不脱离本发明的精神。本发明的范围将通过附加的权利要求和它们的等同物判断。摘要和标题不应被解释为限制本发明的范围,因为它们的目的使适当的机构以及一般公众能够迅速确

定本发明的一般性质。在所附的权利要求书中,除非使用术语“手段(means)”,否则其中列举的特征或要素都不应该被解释为根据35 U.S.C.§112, ¶6的手段加功能的限定。

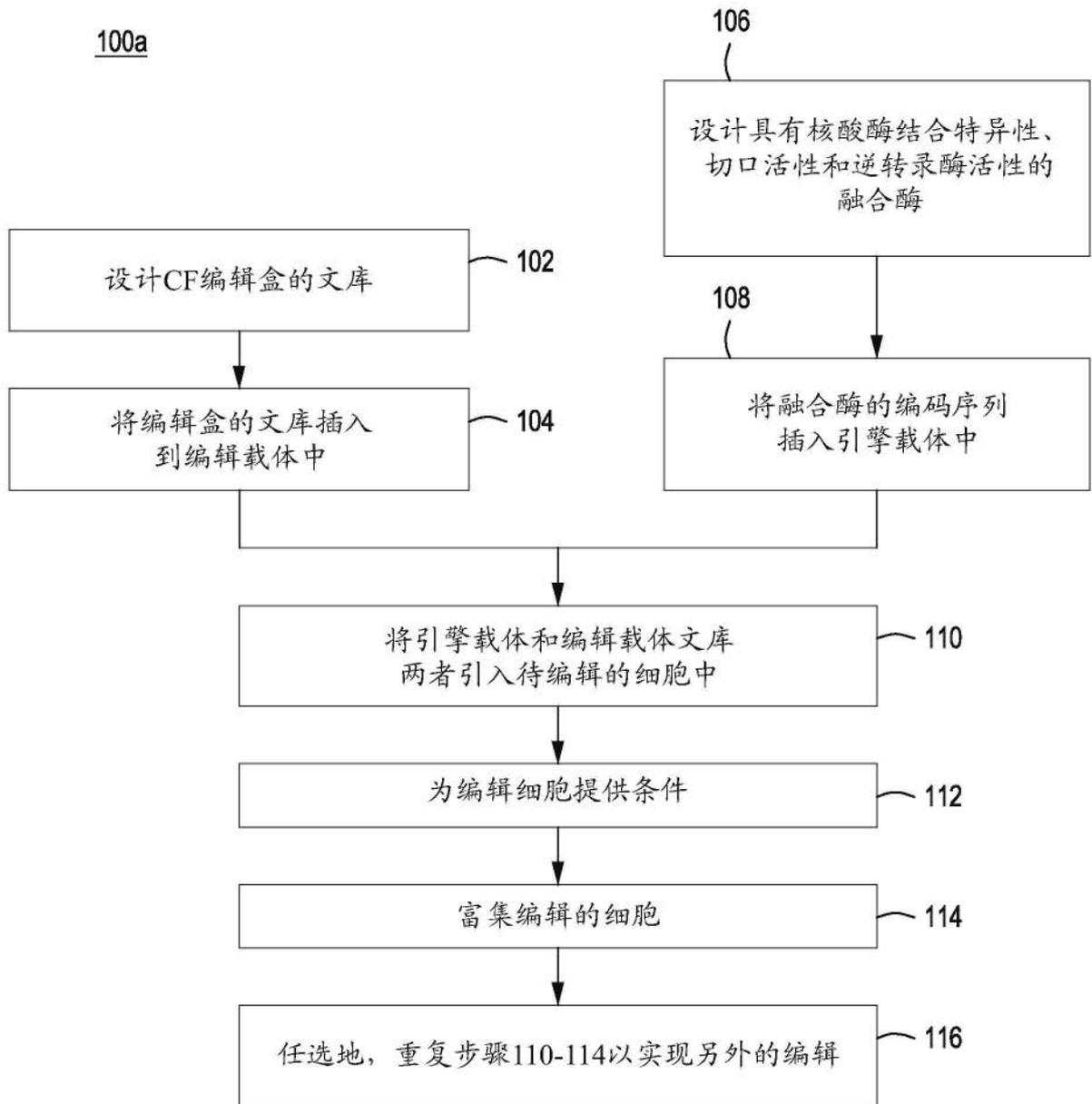


图1A

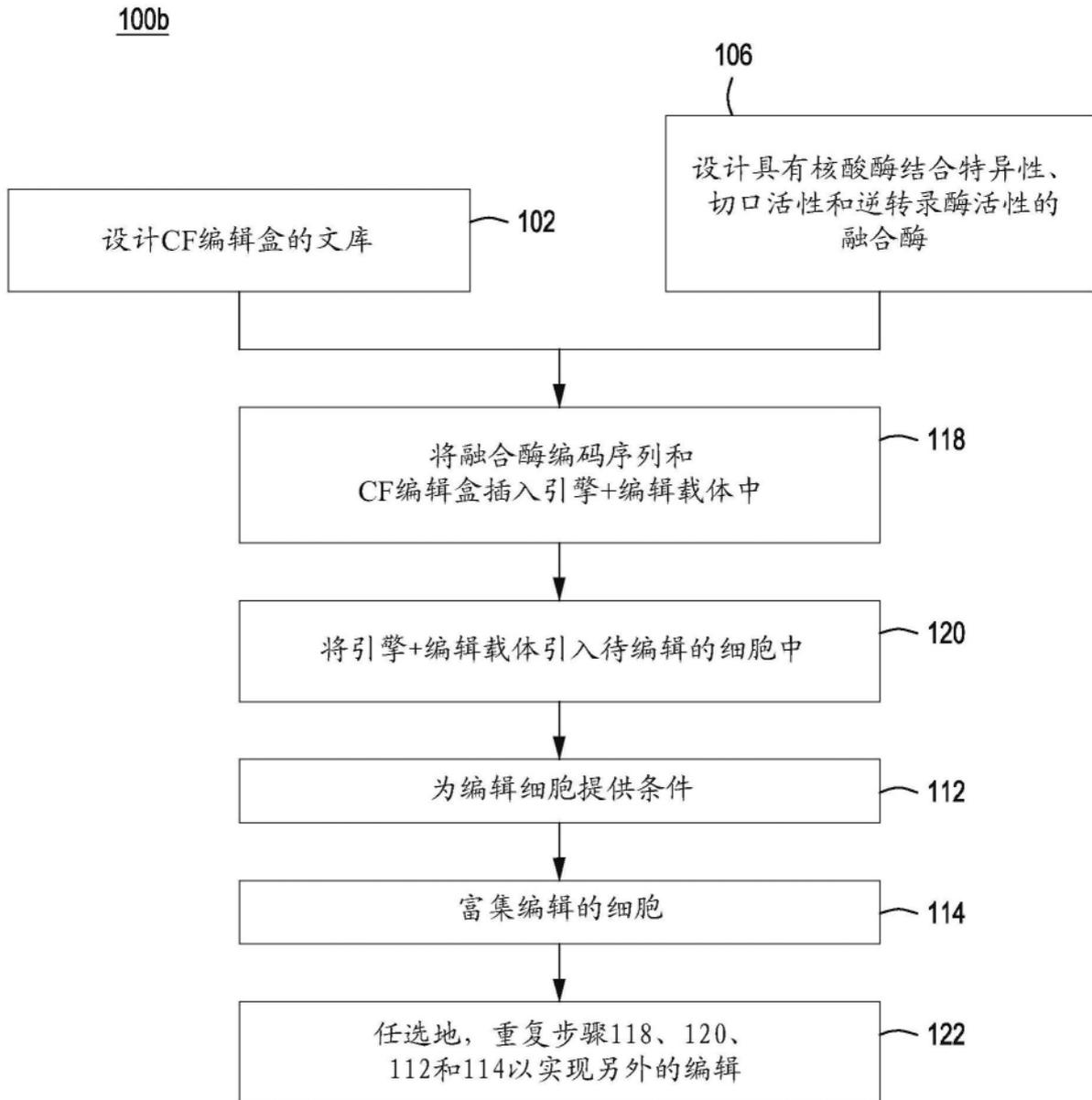


图1B

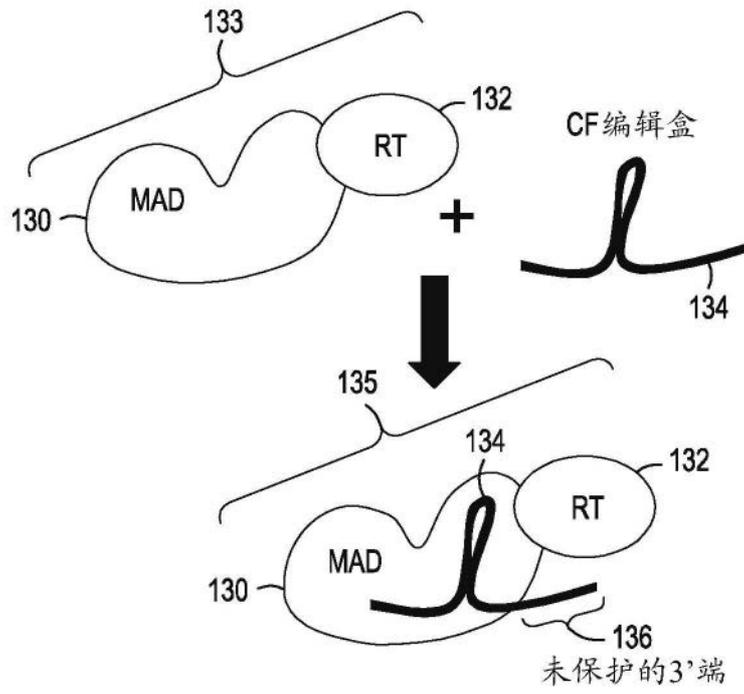


图1C

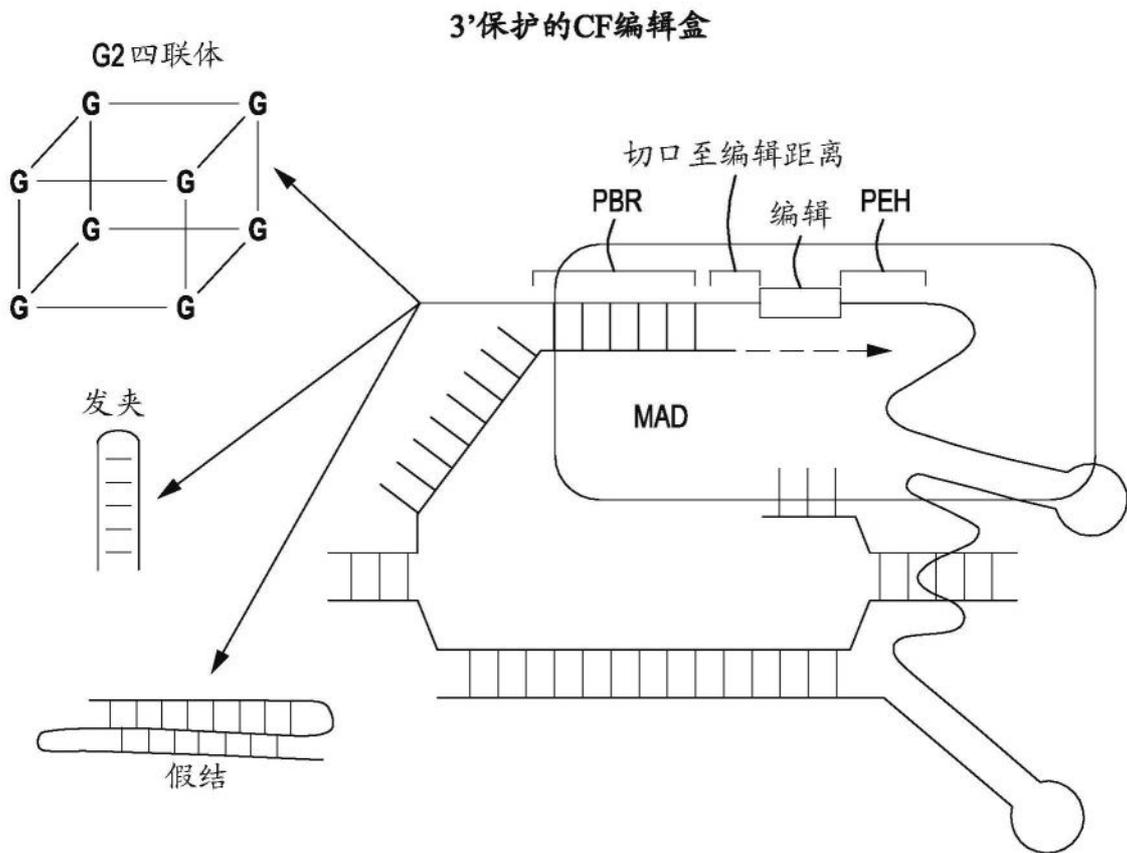


图1D

假结结构的设计

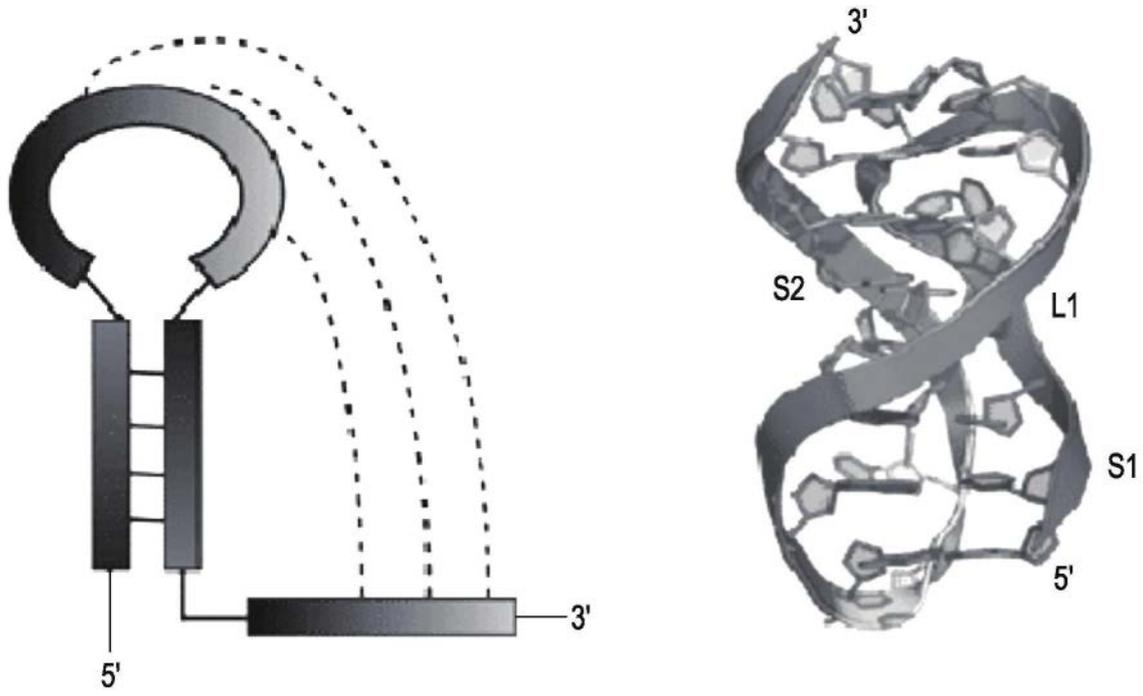


图1E

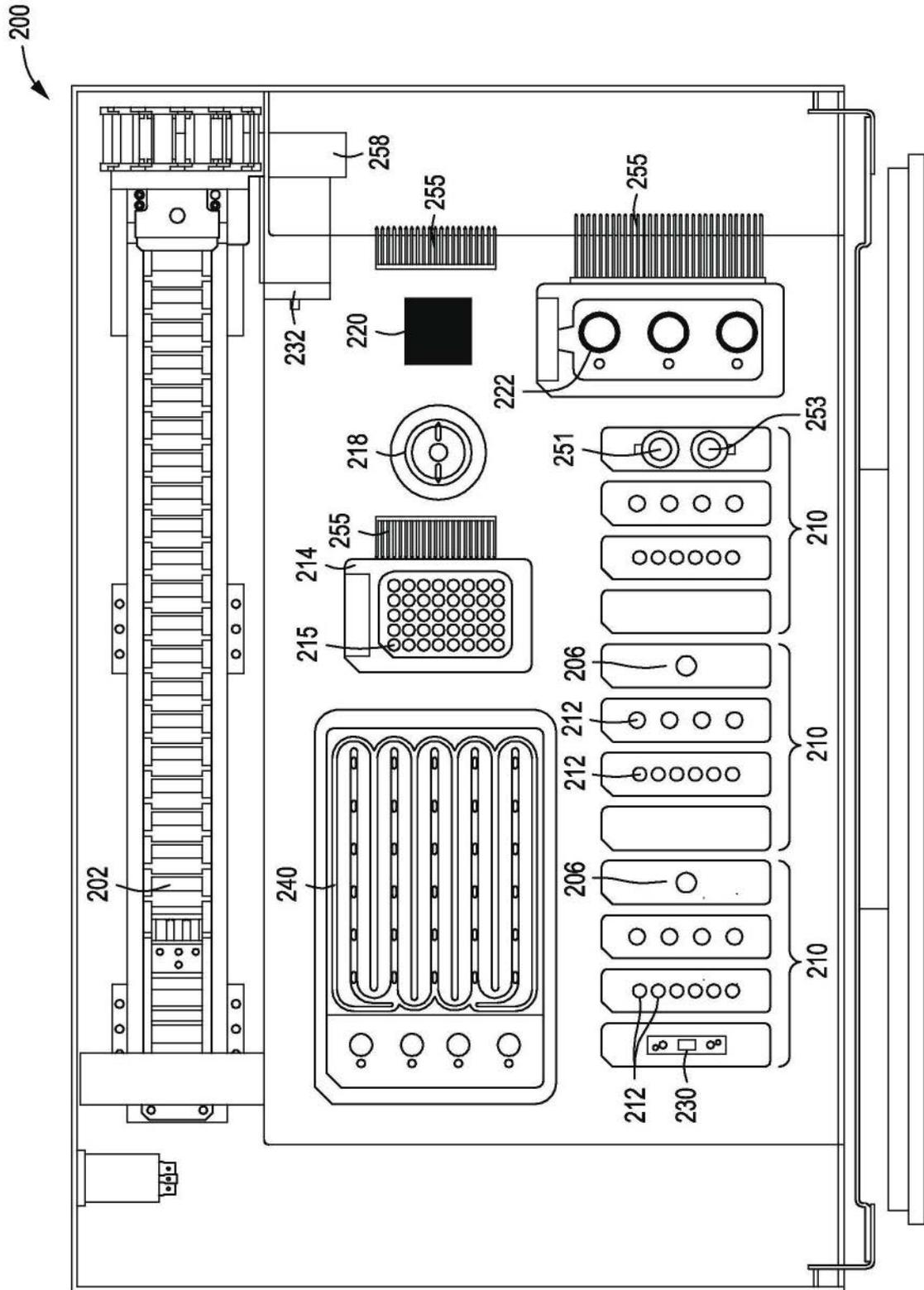


图2A

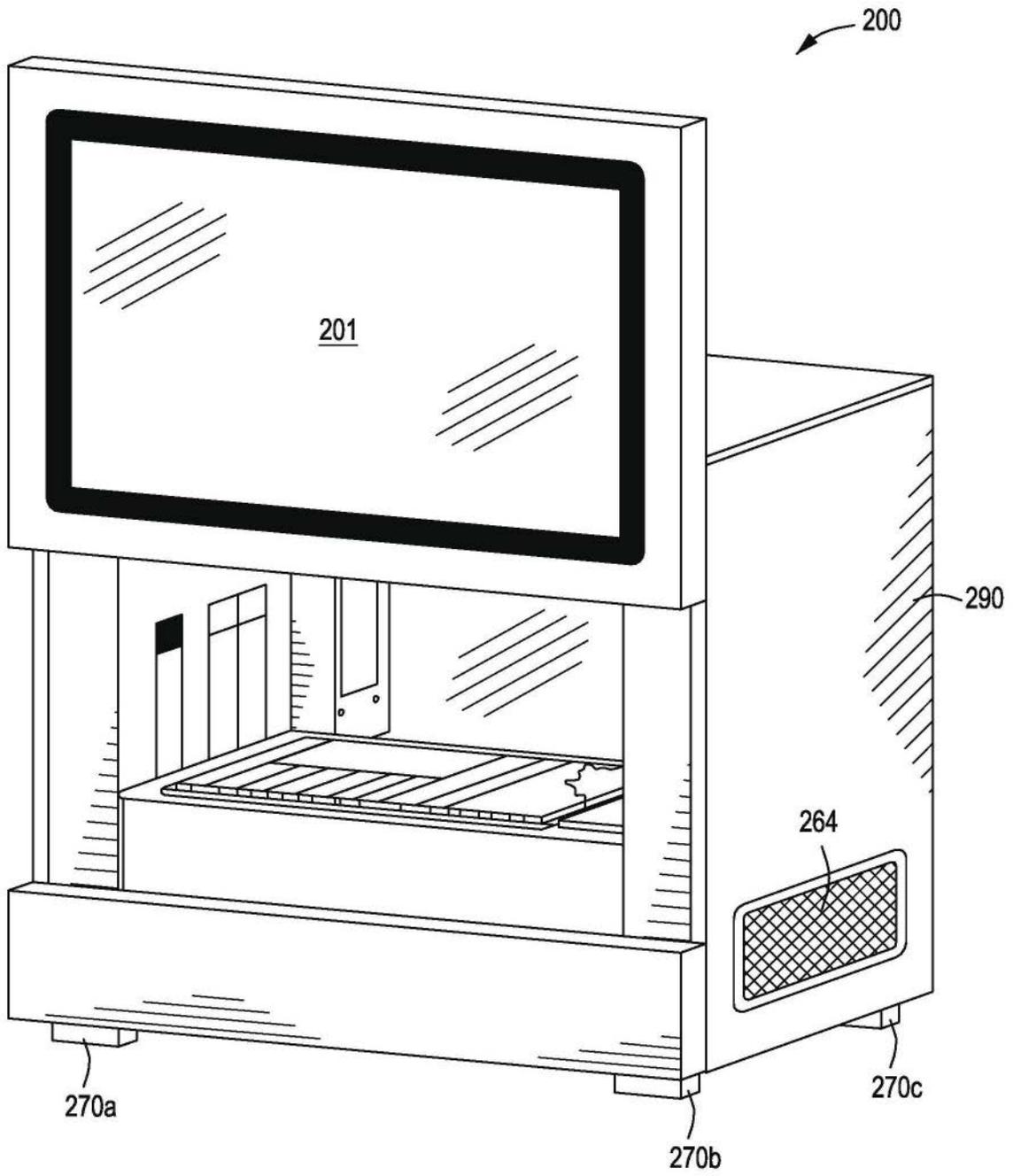


图2C

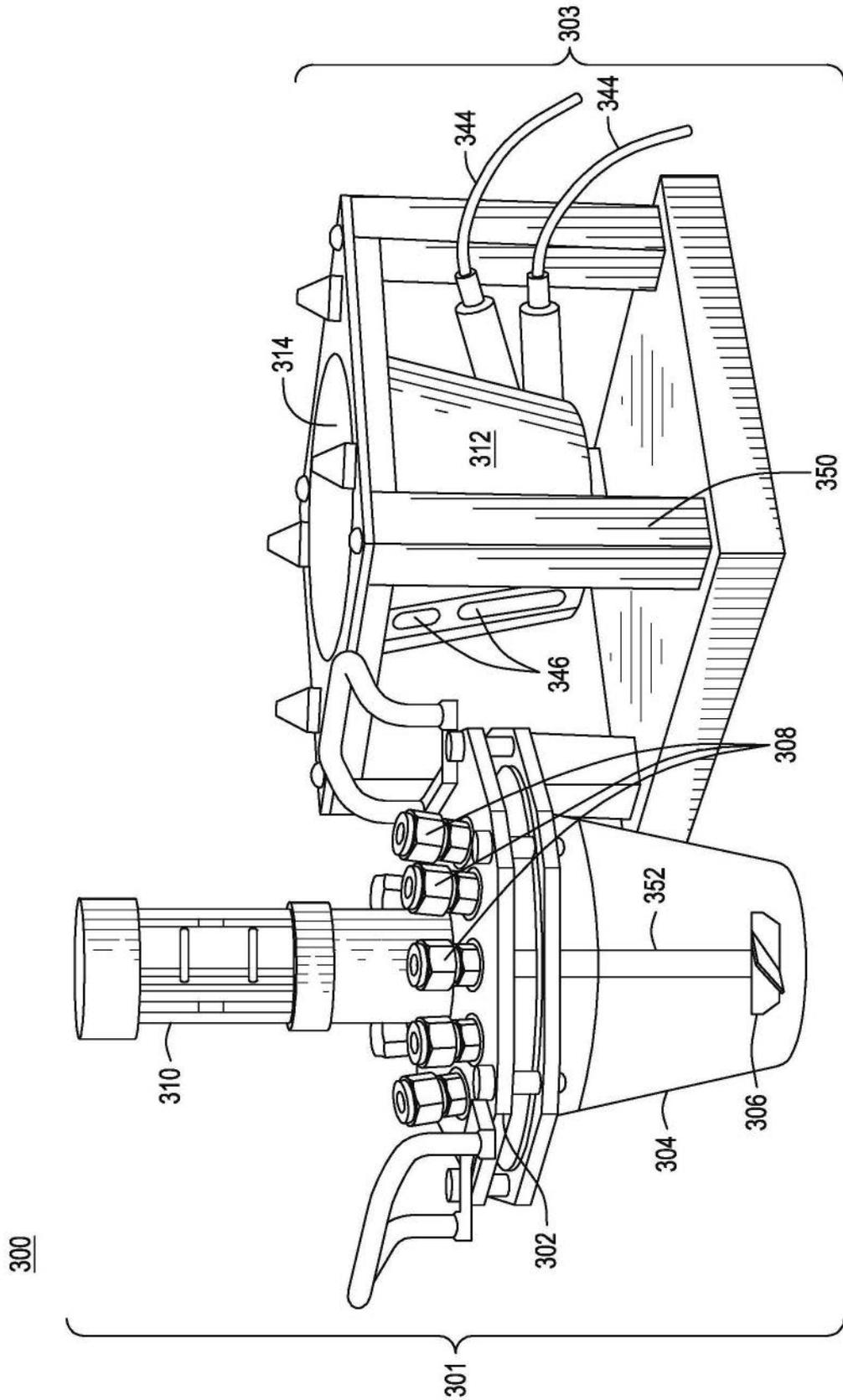


图3A

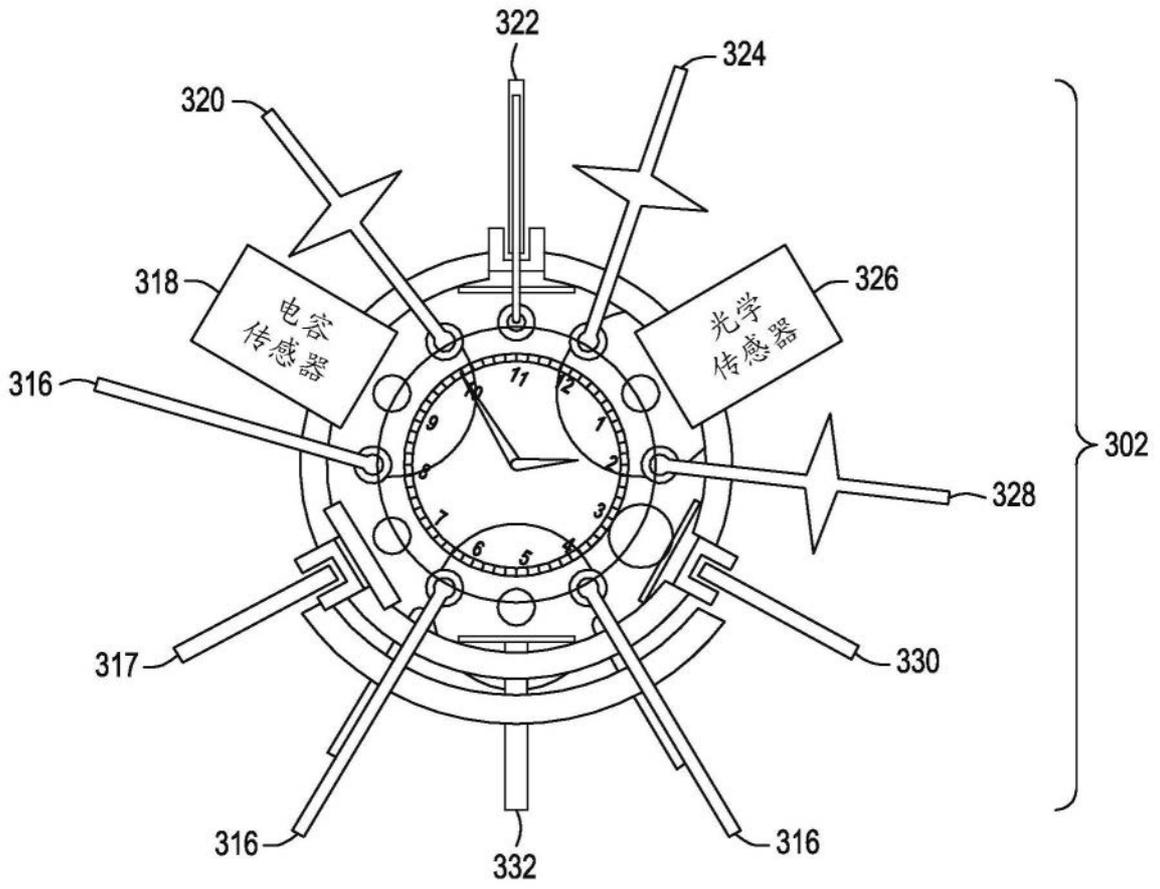


图3B

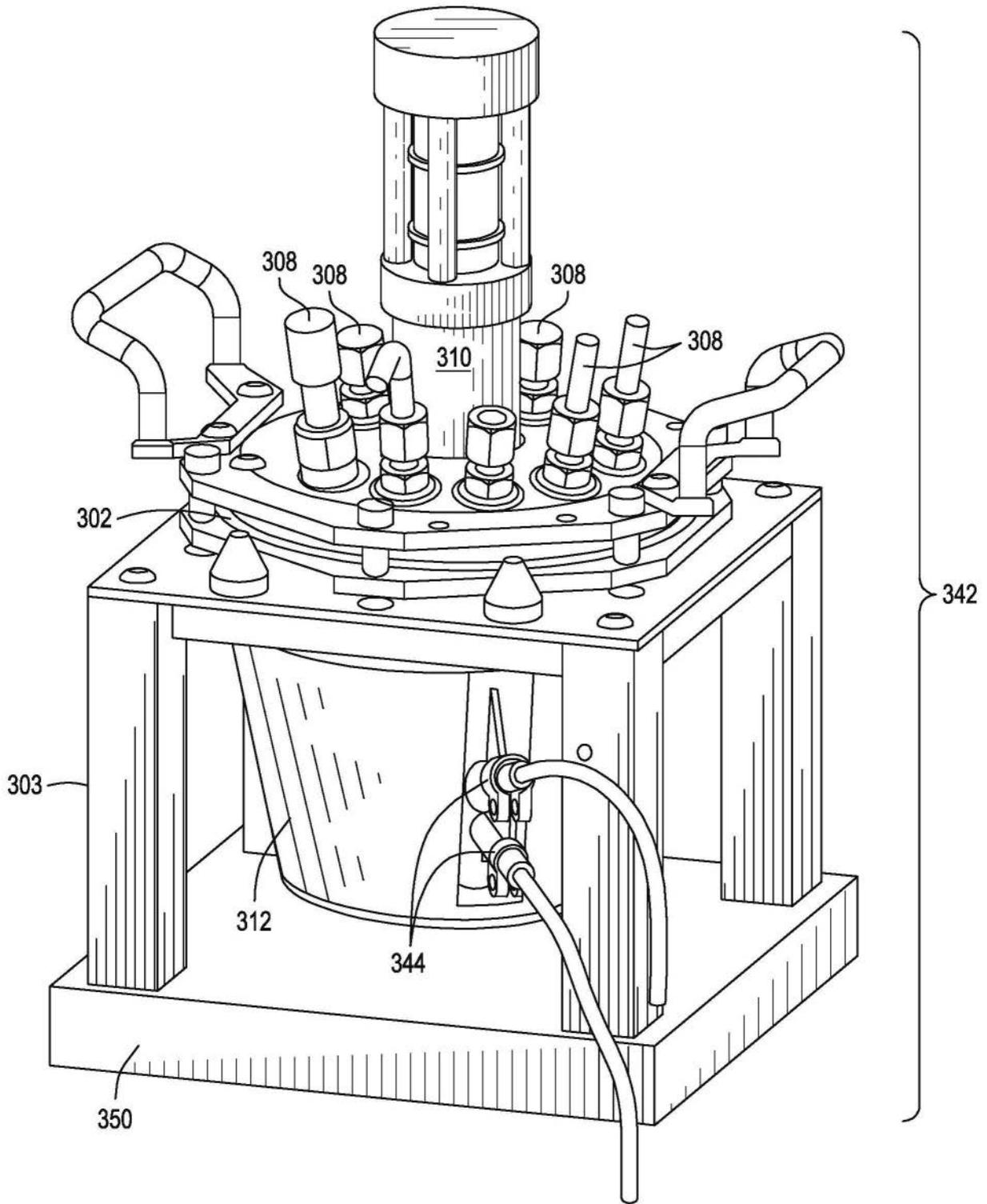


图3C

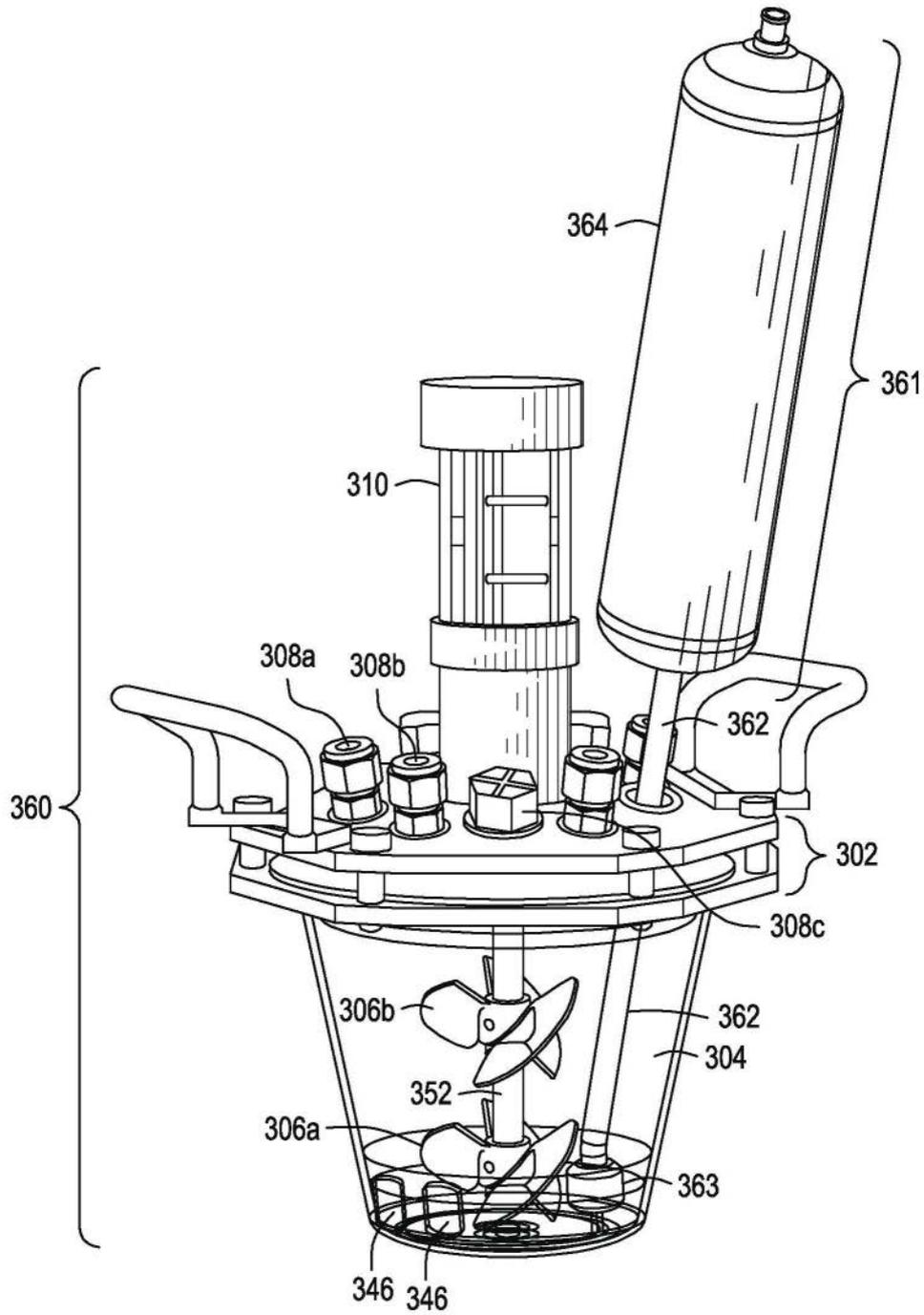


图3D

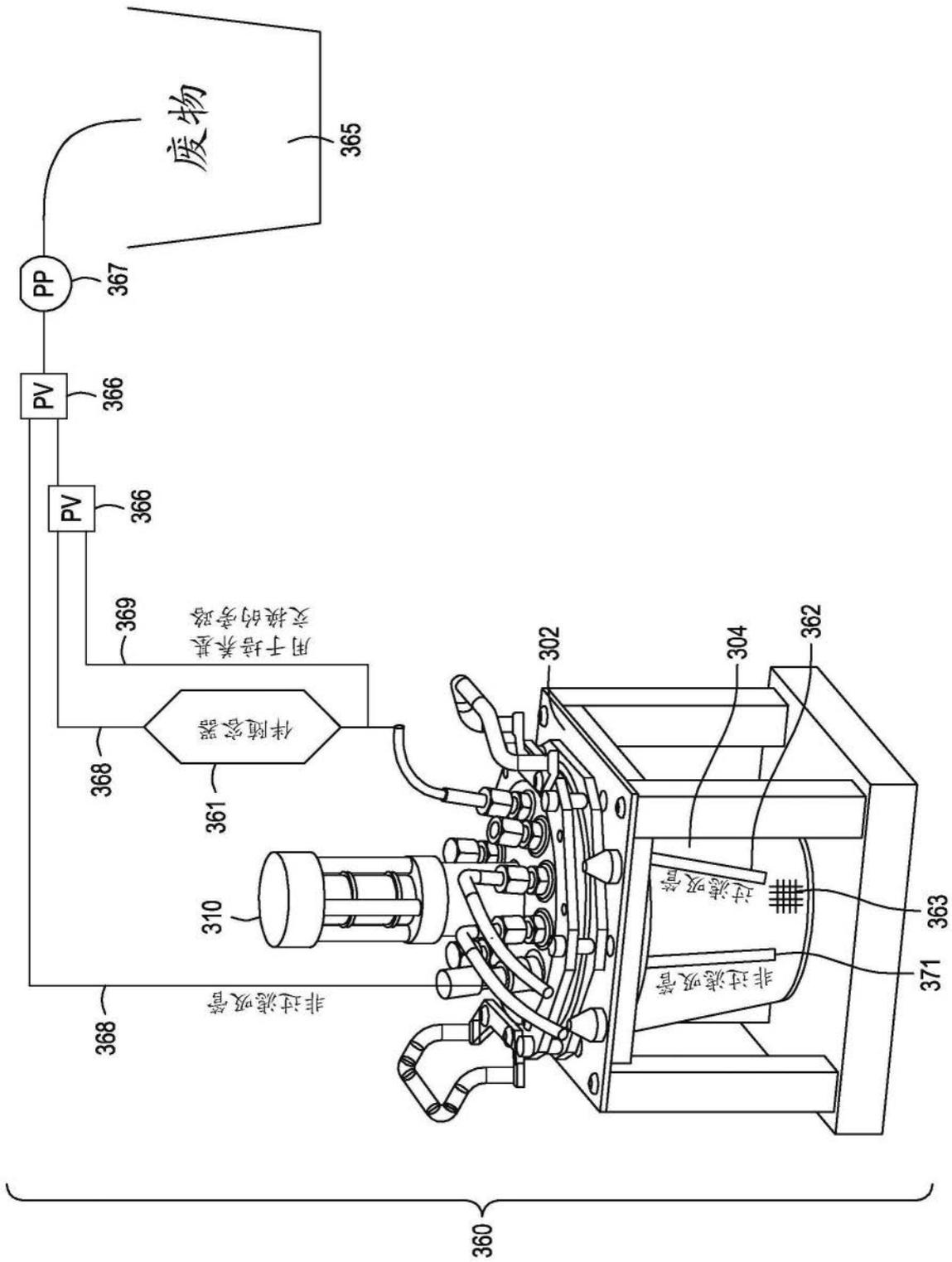


图3E

用于编辑在悬浮液中生长的细胞的微载体分步递送

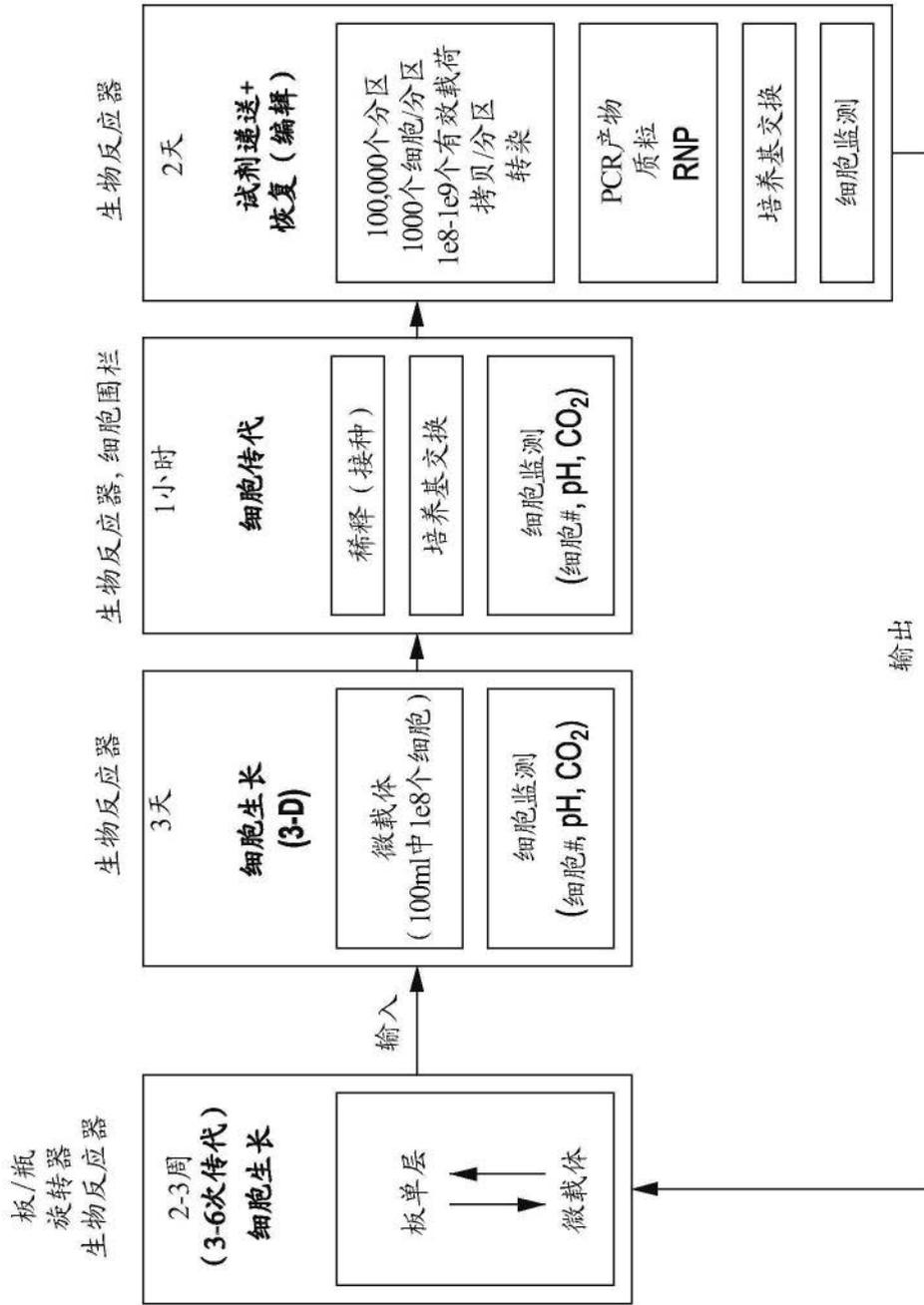


图4A

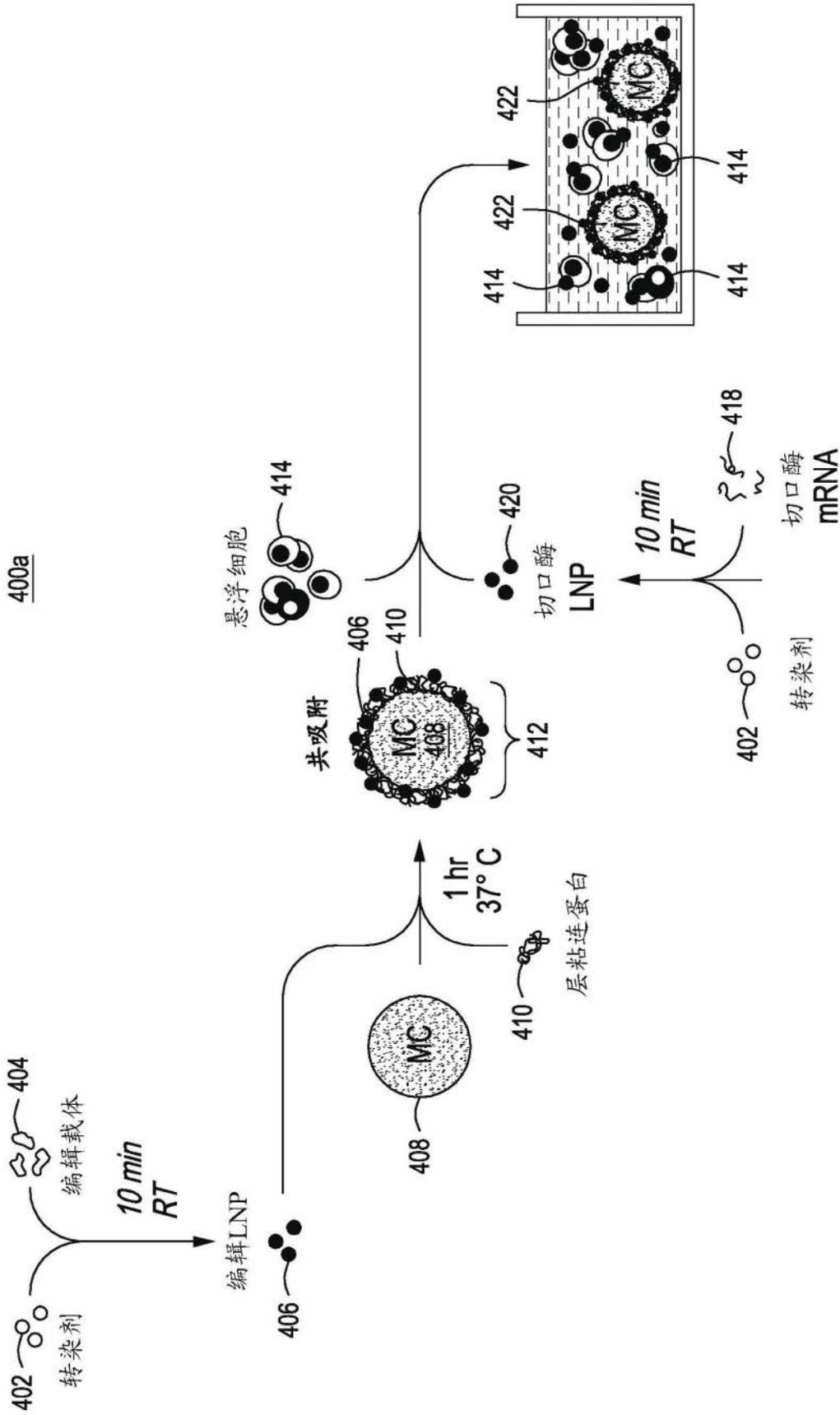


图4C

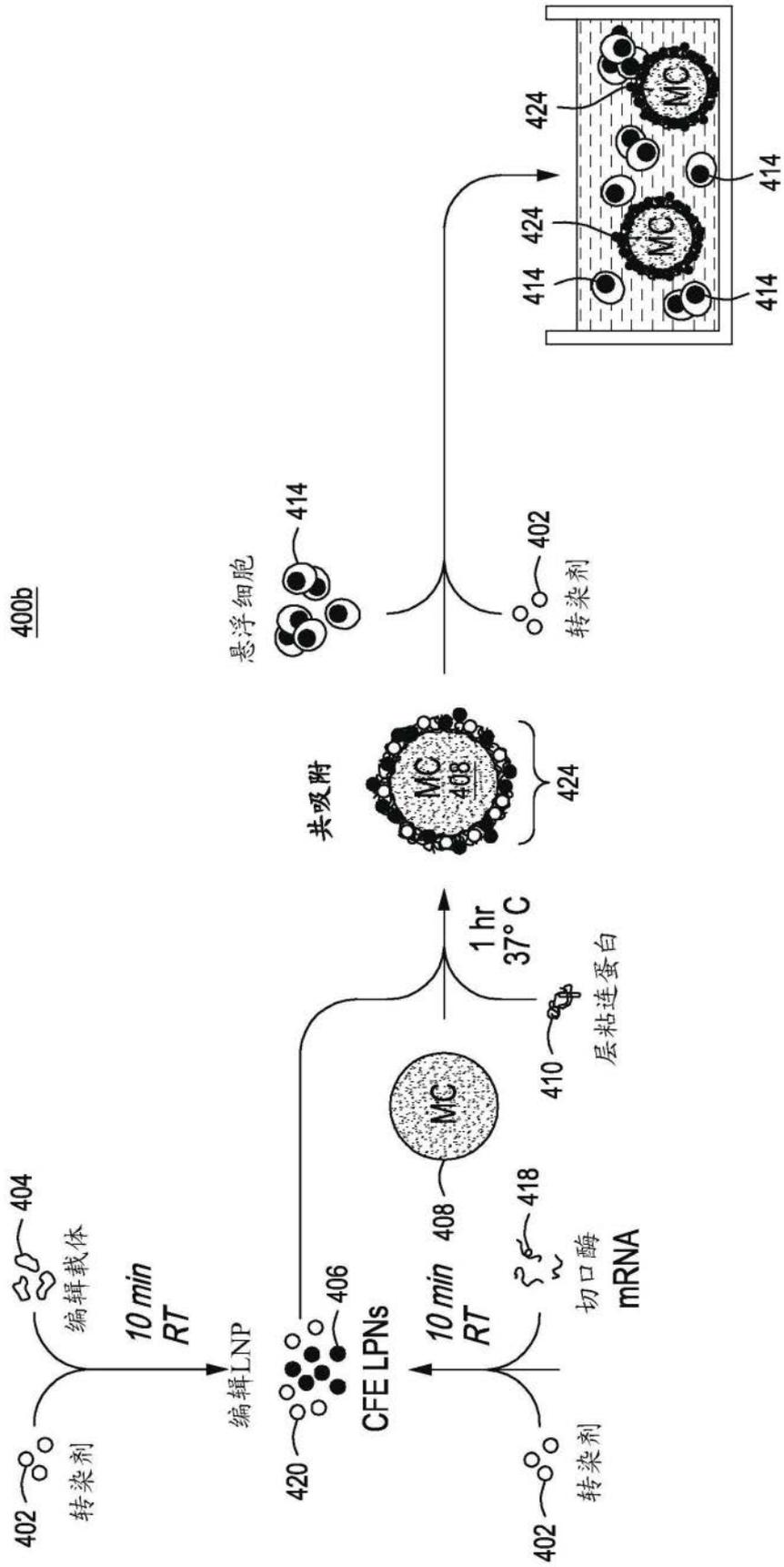


图4D

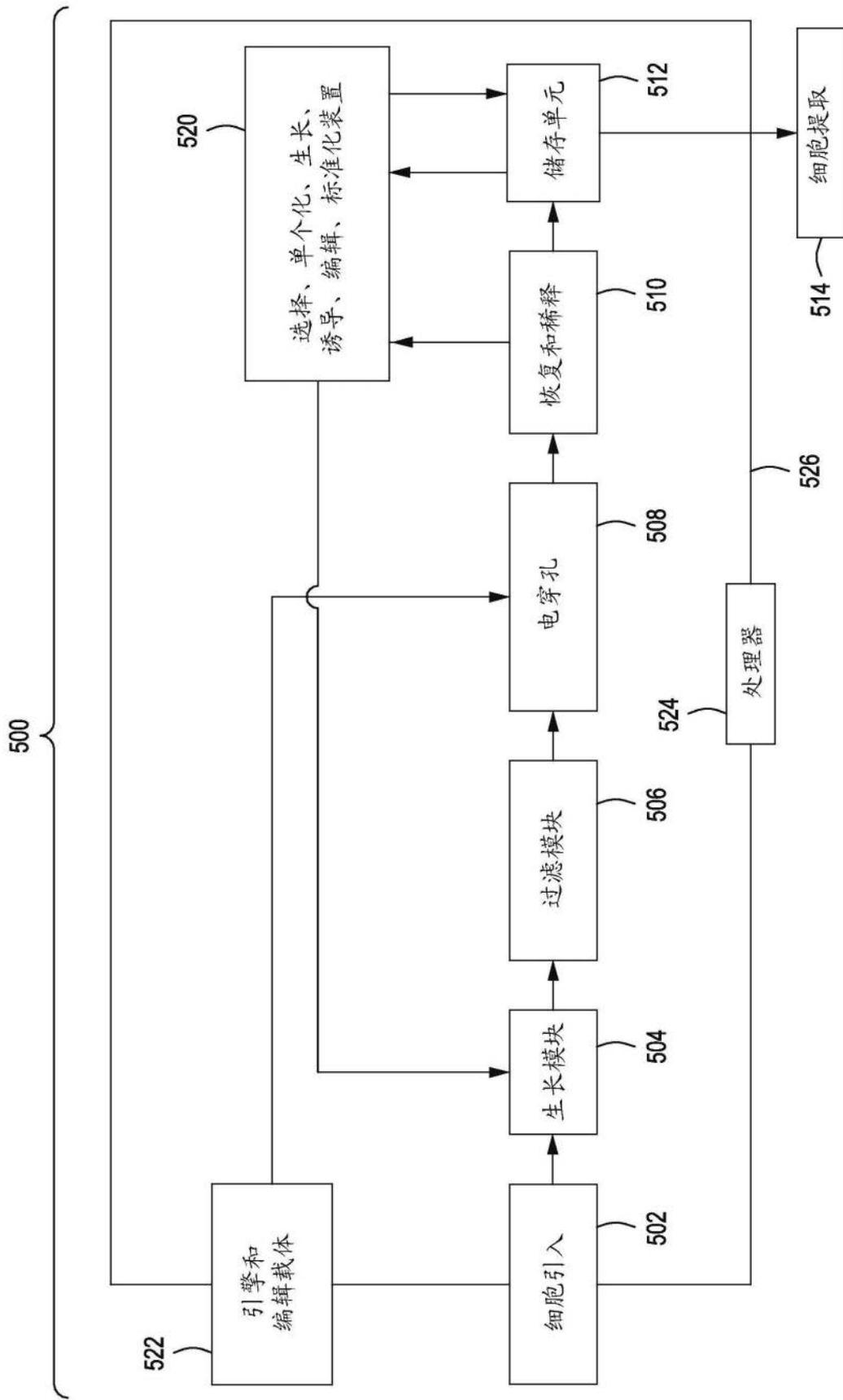


图5

CF编辑盒的G2四联体的稳定增加HEK293T细胞中GFP到BFP系统的编辑

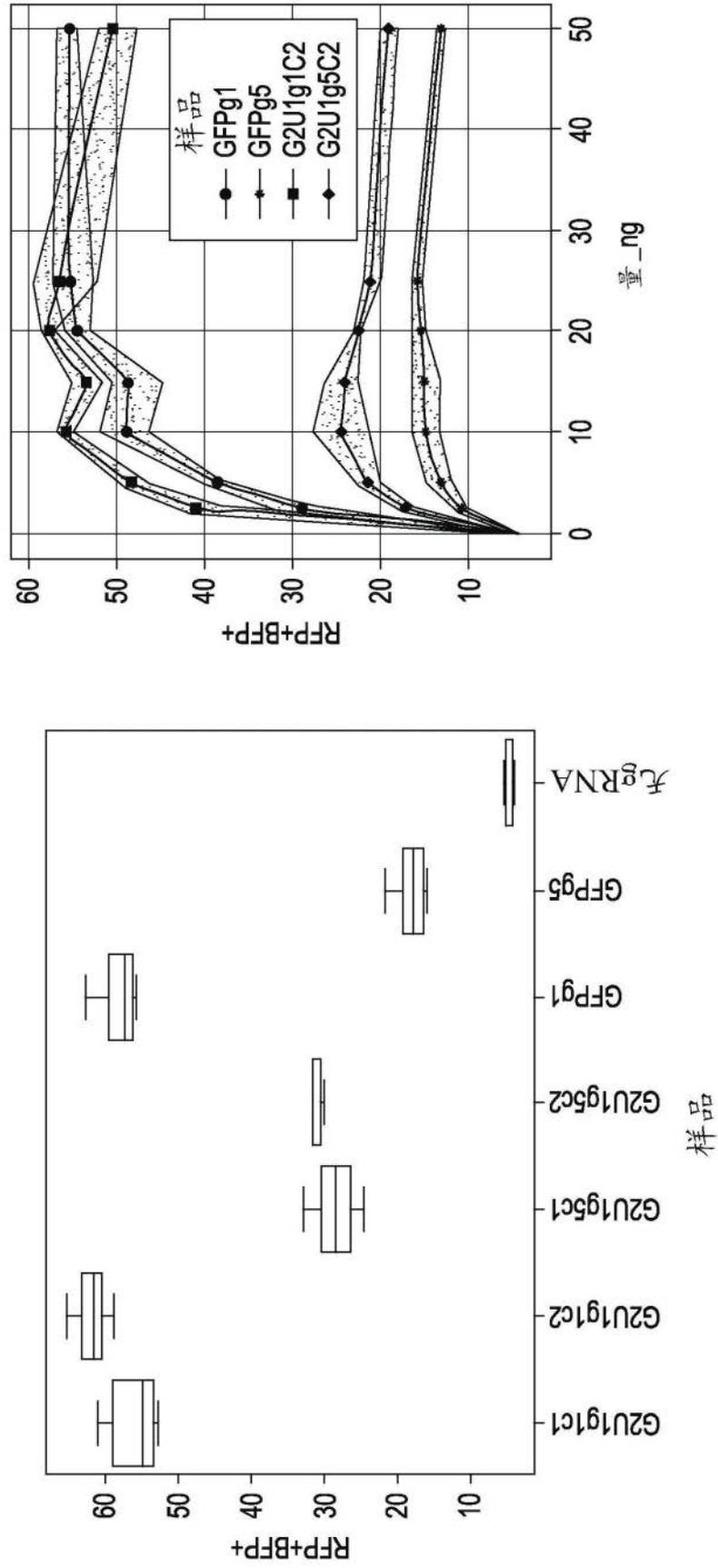


图9

G2四联体稳定的编辑盒的SCN递送增加HEK293T-GFP细胞中的编辑



图7

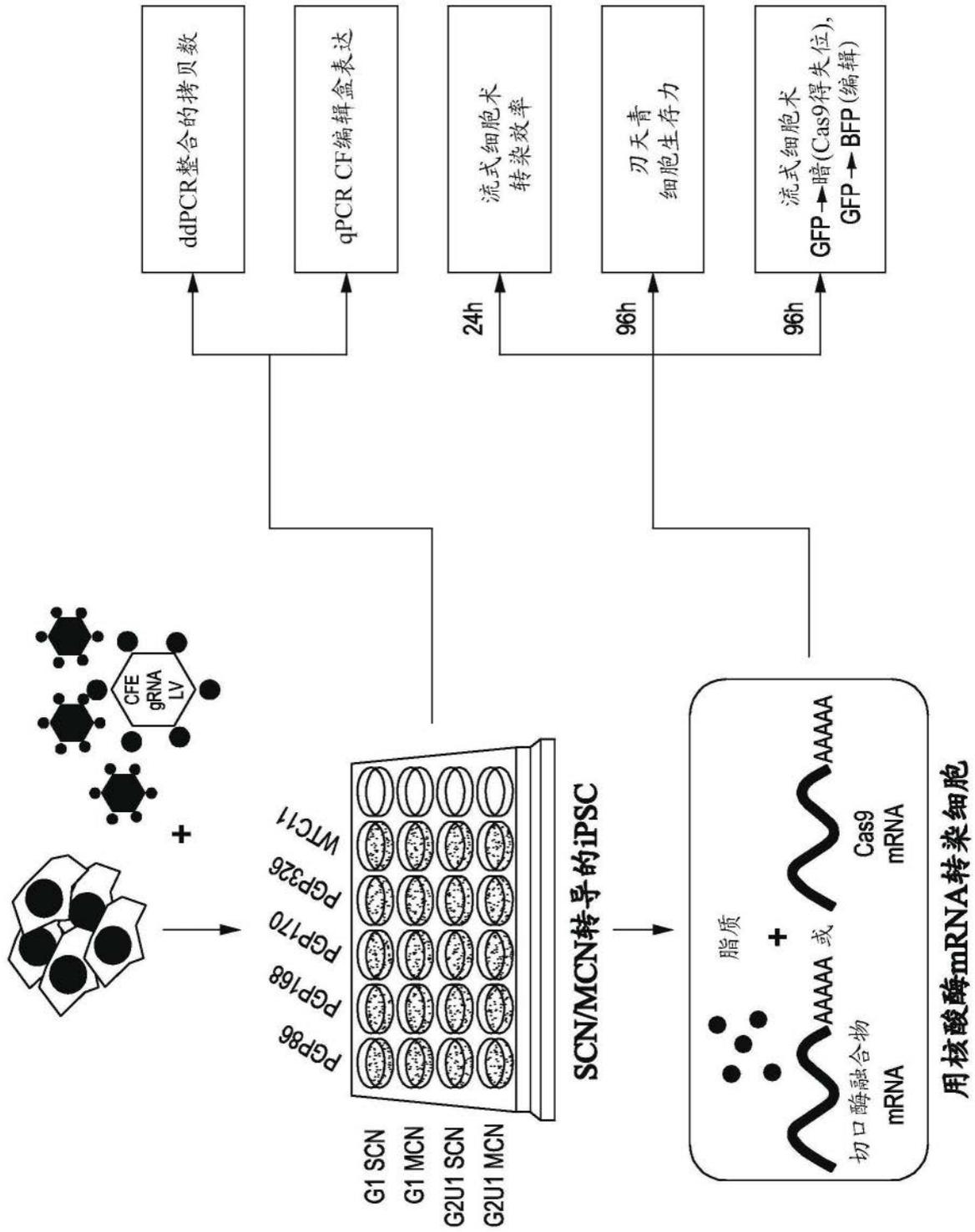


图8

StCFEC mRNA的>90%转染效率

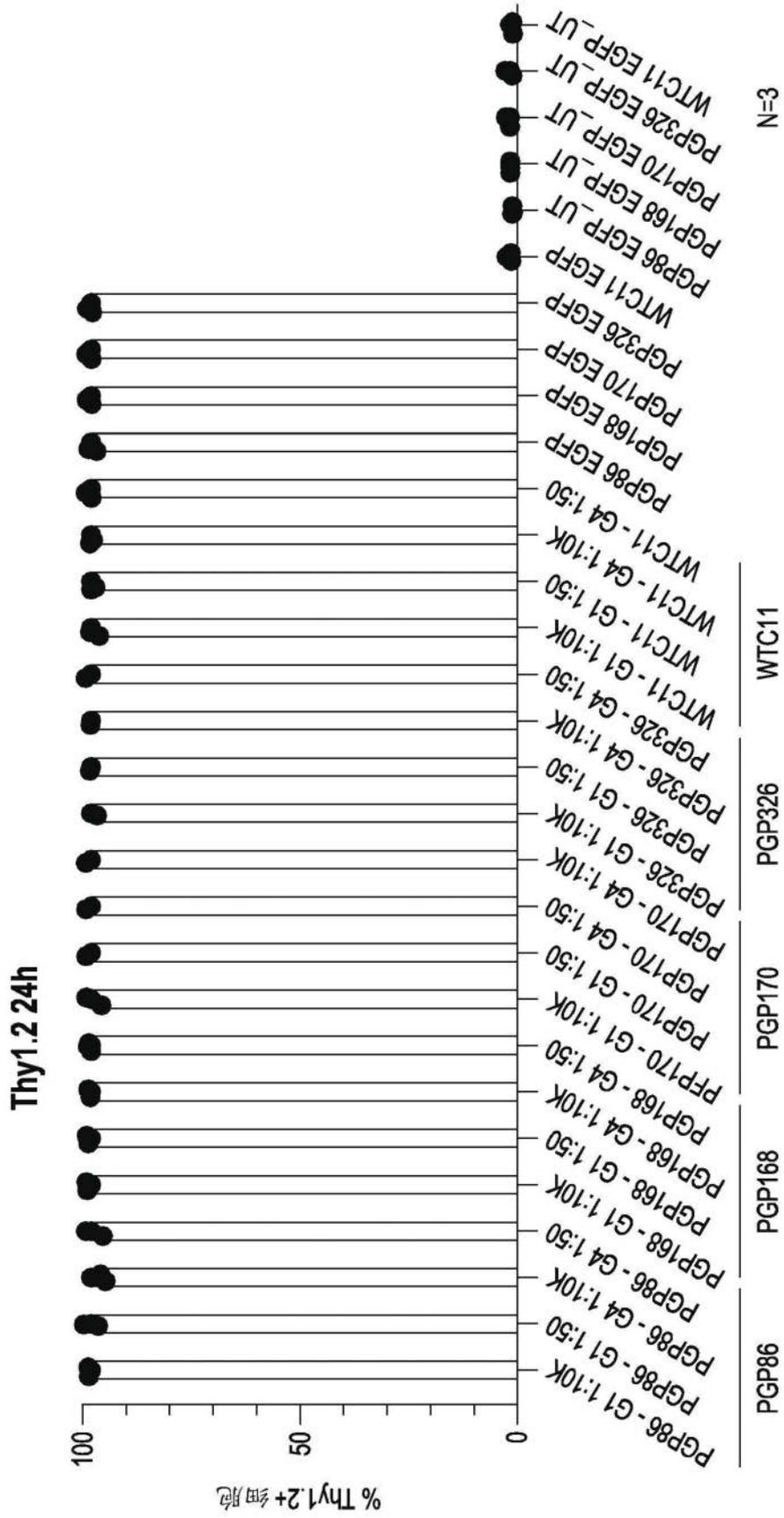


图9

ddPCR确认单拷贝和多拷贝整合

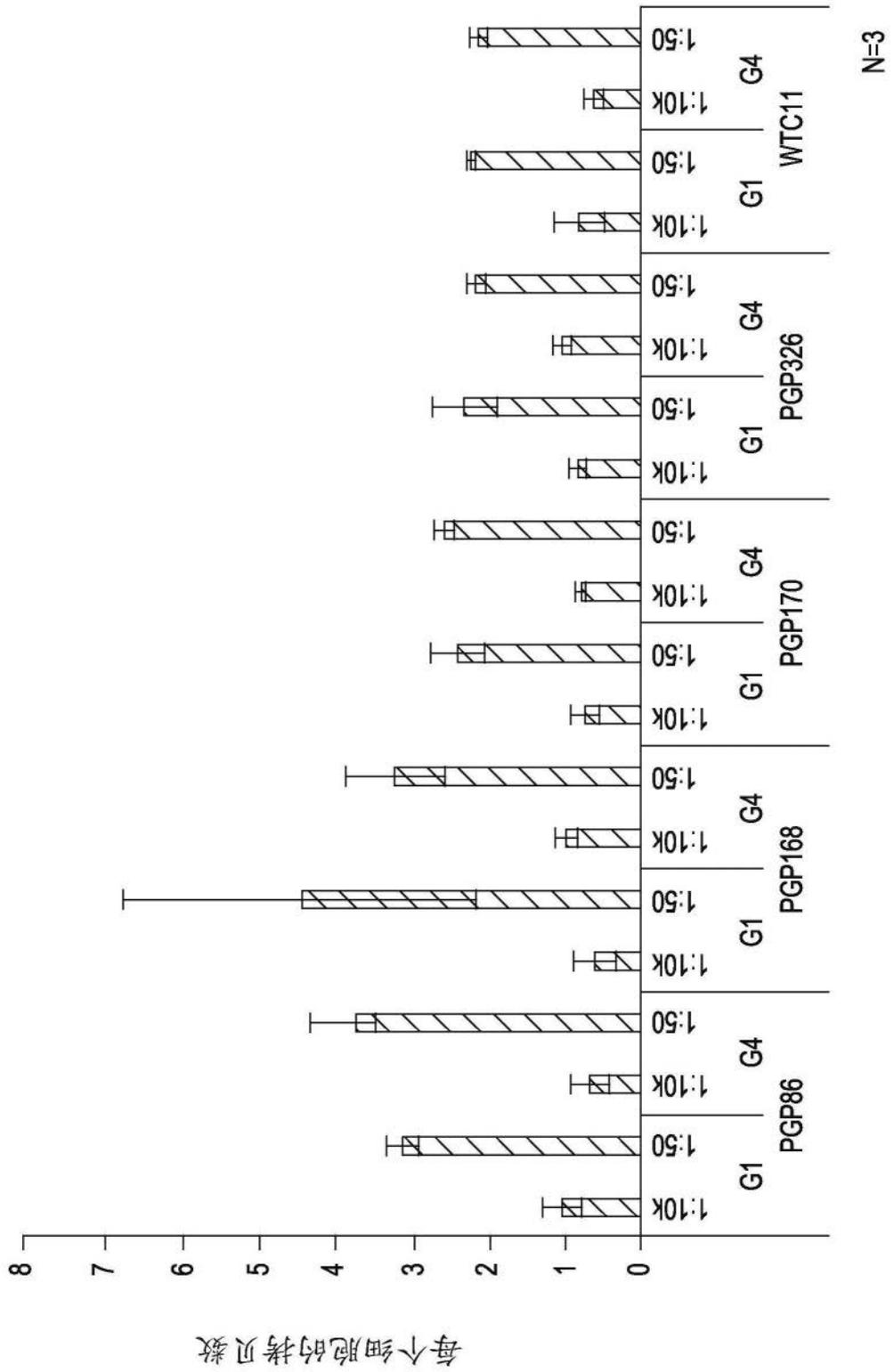


图10

细胞生存力
在96h时的细胞生存力

▨ Cas9 ▩ CFE

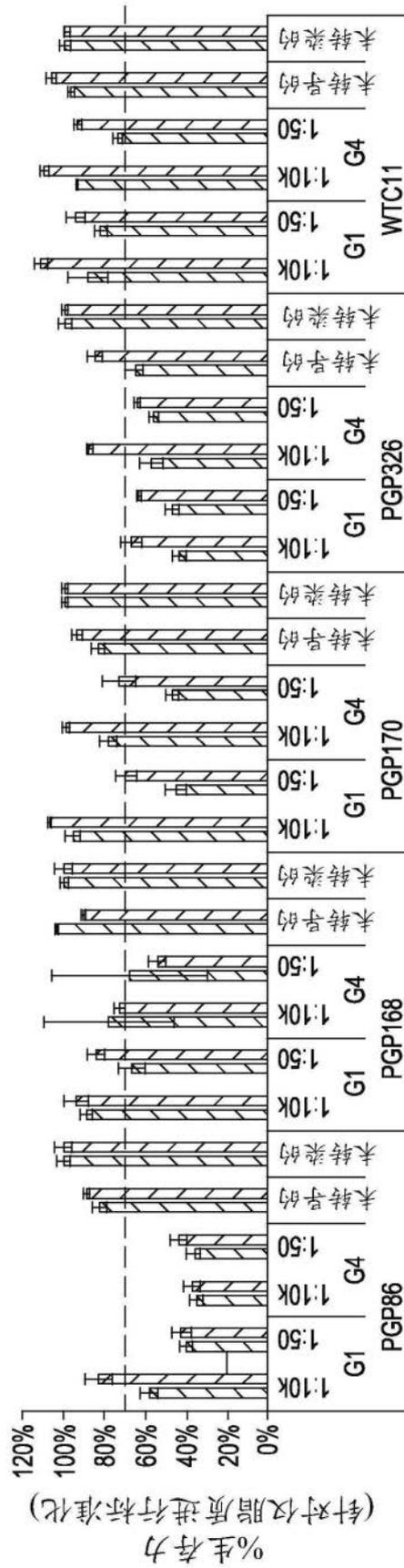


图11

由SCN和MCN整合的慢病毒表达的3' G2四联体CFE编辑盒支持低得失位率

CFE GFP LOF, 96h

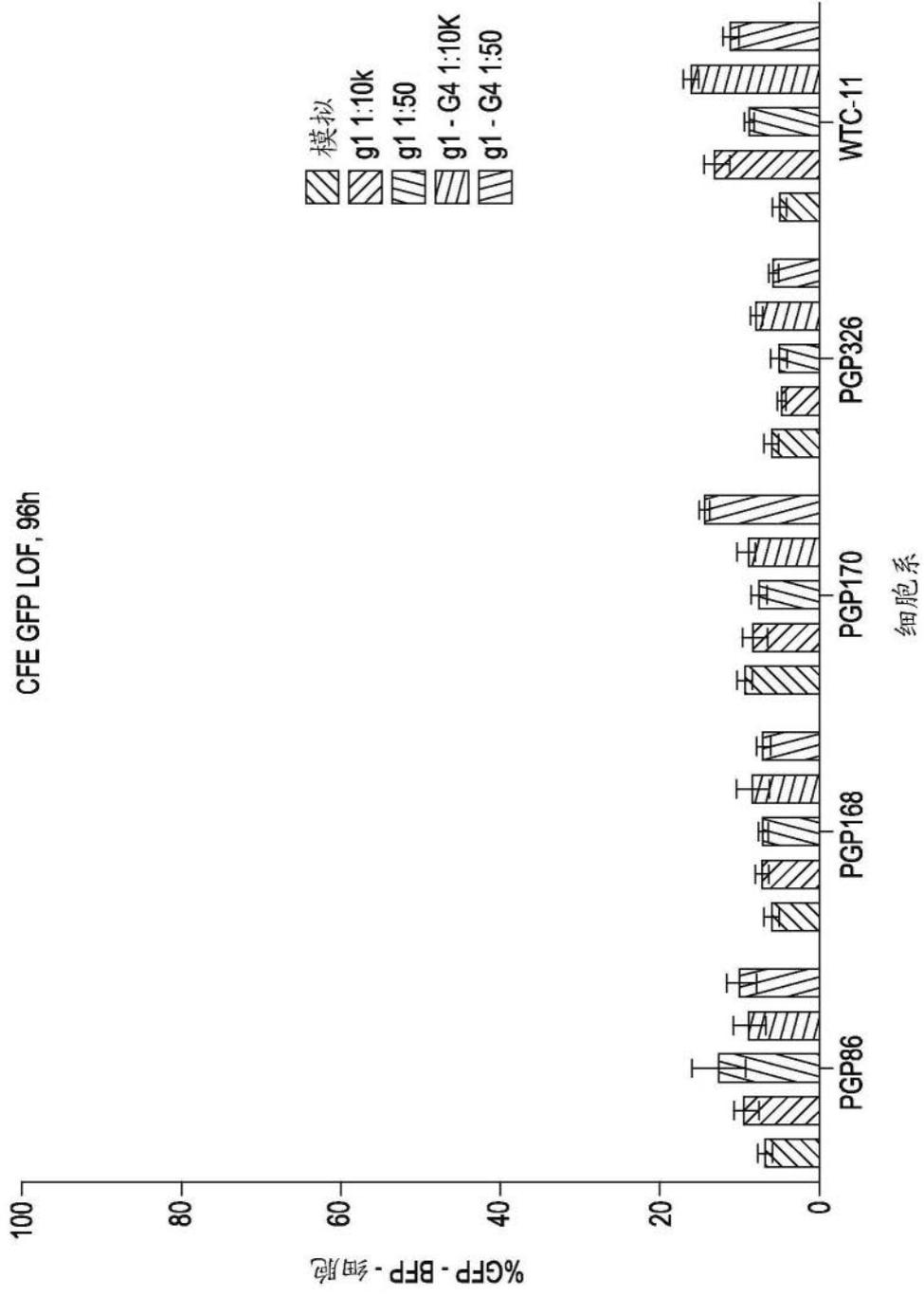


图12

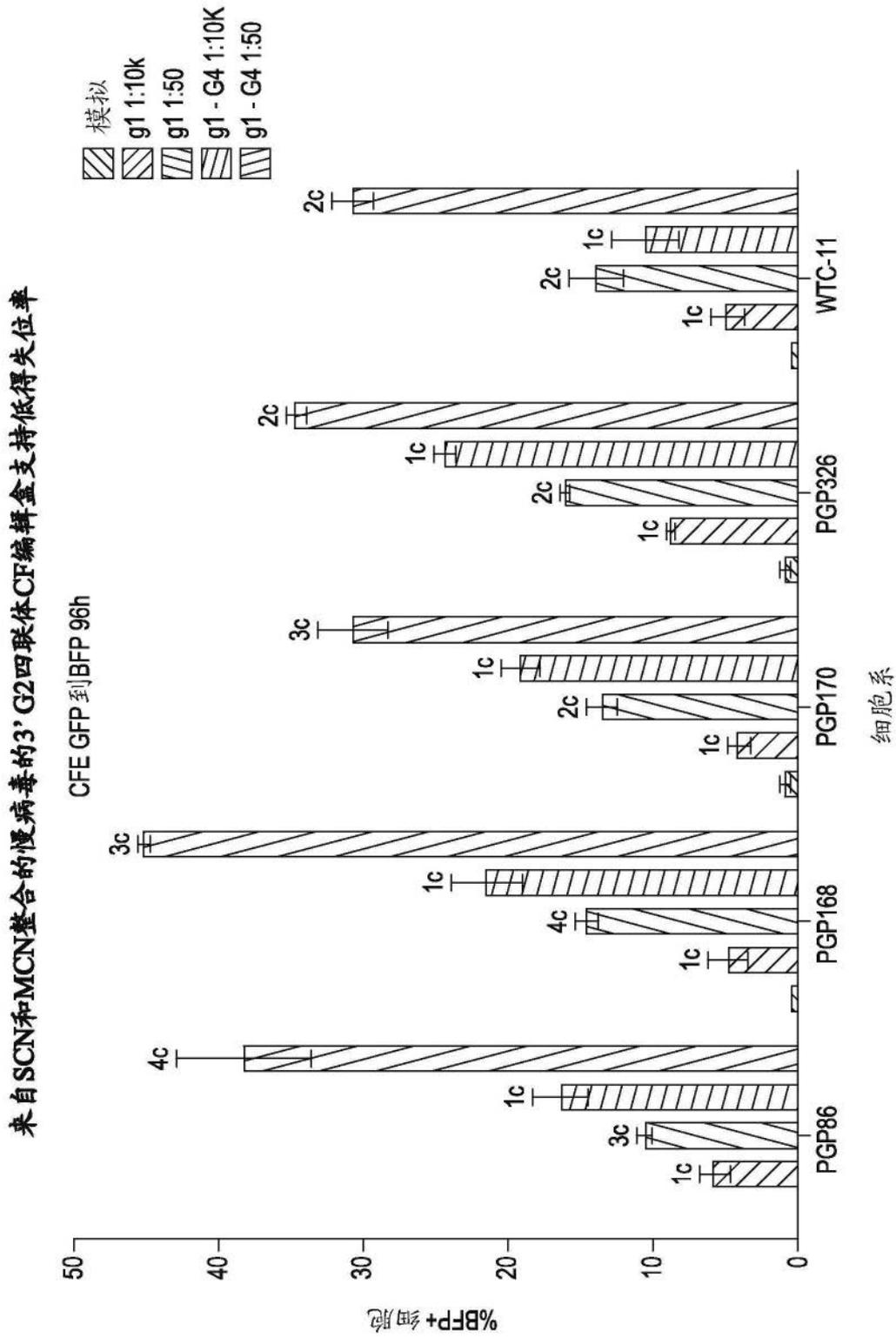


图13

筛选工作流程

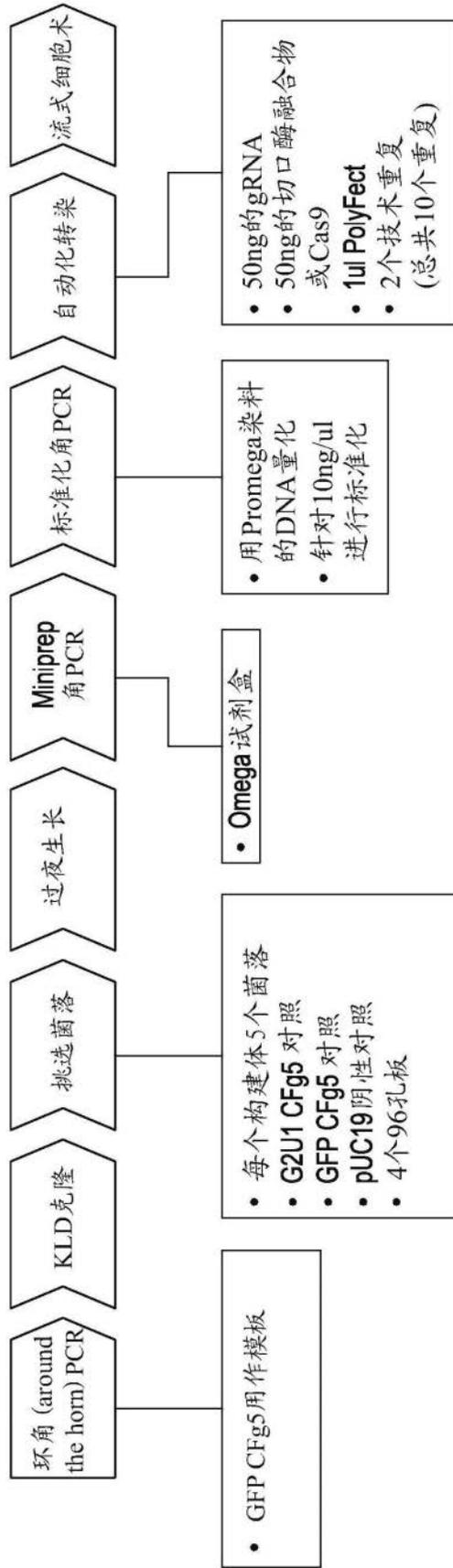


图14

CF编辑系统介导的完全富集的编辑

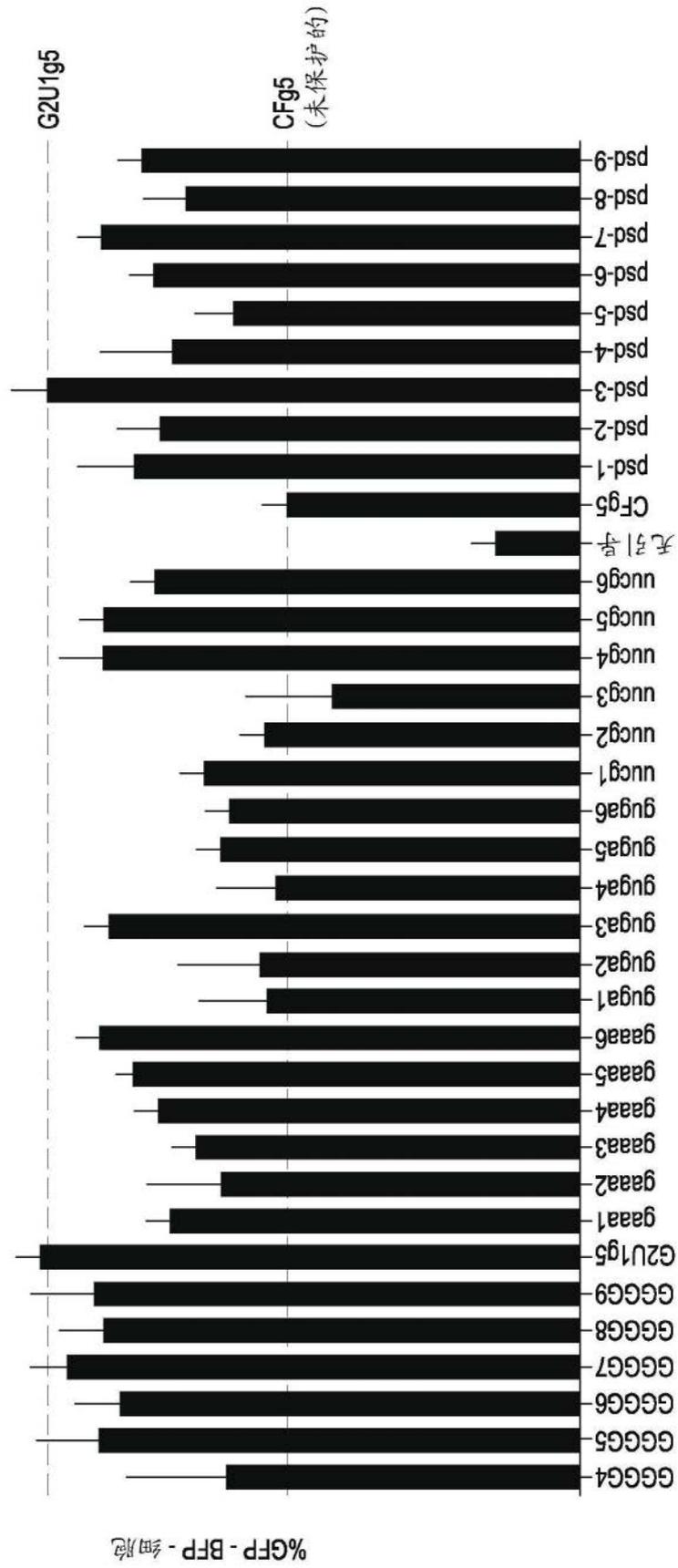


图15B

GFP到BFP编辑率，转染后120h

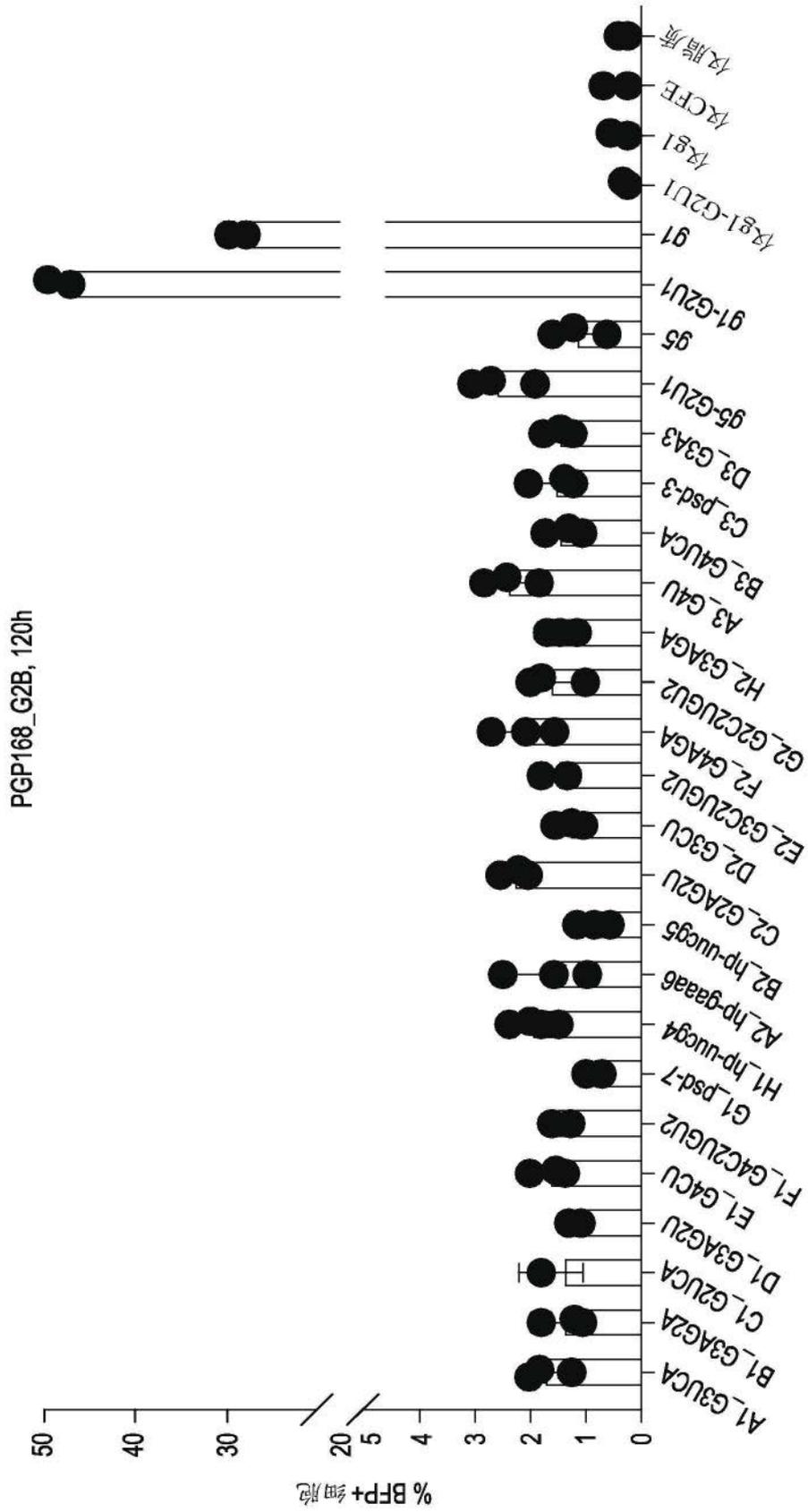


图16A

GFP到BFP编辑率，转染后120h

WTC11_G2B, 120h

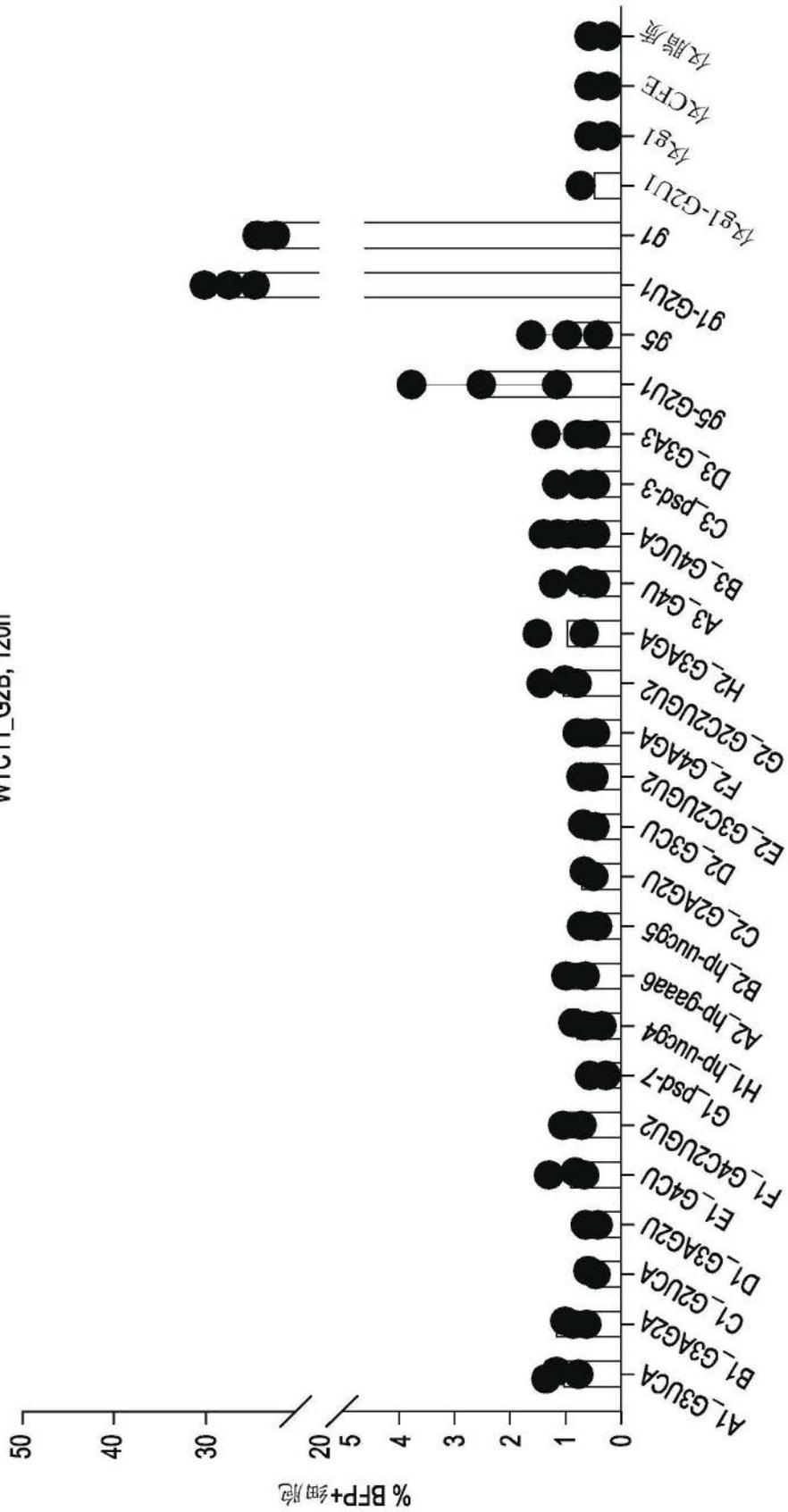


图16B

天然存在的病毒外切核糖核酸酶抗性CF编辑盒也改进编辑

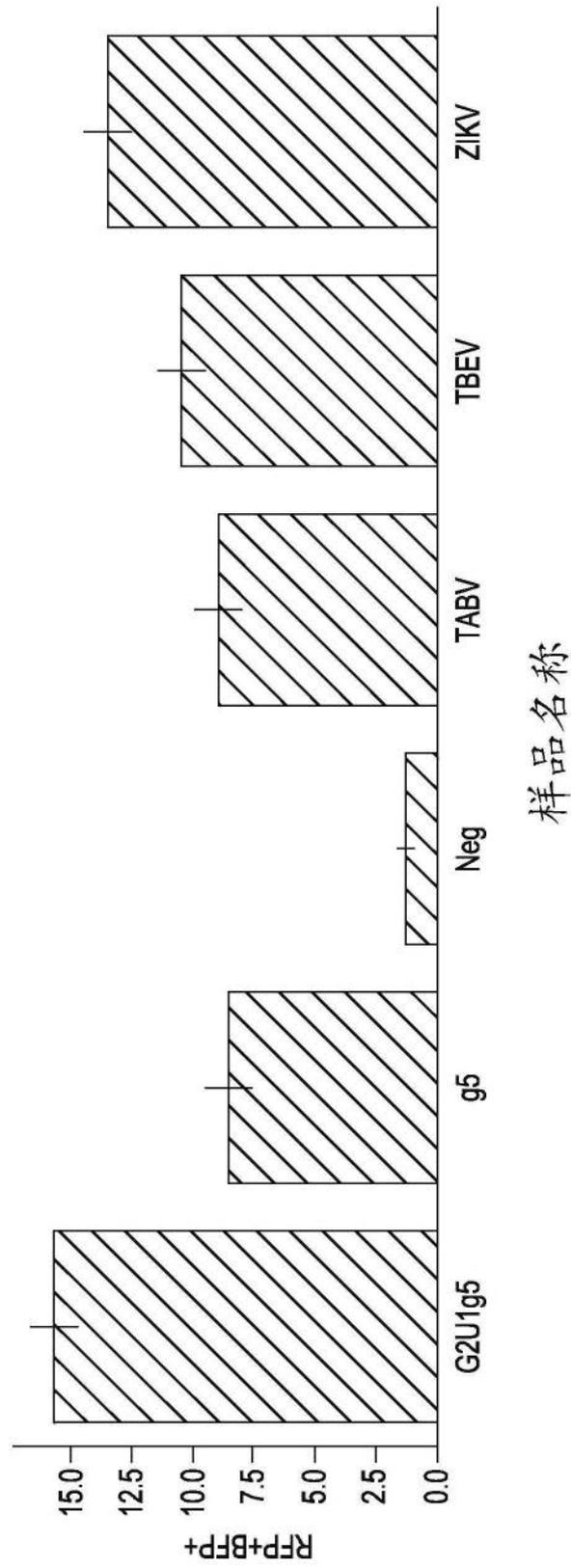


图17