



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119120363 A

(43) 申请公布日 2024.12.13

(21) 申请号 202411279640.0

A61K 35/545 (2015.01)

(22) 申请日 2018.03.20

A61P 37/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

62/473,564 2017.03.20 US

A61P 25/28 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 31/00 (2006.01)

201880032723.6 2018.03.20

A61P 3/10 (2006.01)

(71) 申请人 华盛顿大学

C12N 5/0735 (2010.01)

地址 美国密苏里州

C12N 5/10 (2006.01)

(72) 发明人 D·巴特查里亚 Y·王

C07K 16/10 (2006.01)

D·卡拉汉 H·皮扎托

C12N 15/12 (2006.01)

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

专利代理人 陈艳娟 王艳波

(51) Int.Cl.

C12N 5/0781 (2010.01)

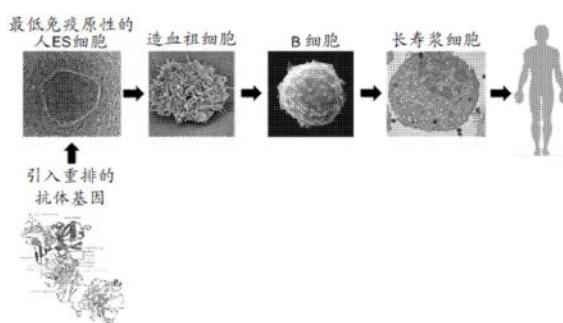
权利要求书3页 说明书29页 附图12页

(54) 发明名称

细胞及其使用和制备方法

(57) 摘要

在本公开的各个方面中，提供了用于避免宿主内免疫排斥的经基因工程改造的干细胞、浆细胞、B细胞，制备它们的方法以及它们的用途。



1. 一种使人胚胎干细胞(ES细胞)分化为浆细胞的方法,所述方法包括:  
生成祖细胞;和  
使祖细胞分化为B细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其中  
所述祖细胞是造血祖细胞或造血内皮细胞;或者  
所述浆细胞产生选自蛋白质、广泛中和抗体或酶的治疗剂。
3. 如权利要求1所述的方法,其中使所述祖细胞分化为B细胞包括:  
表达由诱导型启动子驱动的B谱系促进遗传因子;和  
用刺激物激活祖细胞,从而使B细胞分化。
4. 如权利要求3所述的方法,其中所述遗传因子选自一个或多个由PAX5、EBF1、FOX01A、BCL11A、TCF3、IKZF1、IRF4、IRF8和SPI1组成的组;或者所述刺激物选自多西环素或四环素。
5. 如权利要求3所述的方法,所述方法包括将所述祖细胞与(i)选自一个或多个由Flt3L、SCF和IL-7组成的组的细胞因子,和(ii)MS5基质细胞共培养,持续足以促进B淋巴细胞生成的时间。
6. 如权利要求1所述的方法,其中将所述人ES细胞用病原体特异性抗体基因编码盒进行核转染。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述病原体特异性抗体盒包含VDJ和VJ序列,所述VDJ和VJ序列选自一个或多个由流感抗体、HIV抗体或黄病毒抗体组成的组。
8. 如权利要求7所述的方法,其中所述包含VDJ和VJ序列的病原体特异性抗体盒选自一个或多个由FI6、VRC07、10E8、N6、3BNC117、EDE1和C10组成的组。
9. 一种生成长寿浆细胞的方法,所述方法包括:
  - (i) 将IFN  $\gamma$  或IL-4施用至来源于人ES细胞的B细胞;或者
  - (ii) 将IL-21施用至被工程改造成表达CD40L和BAFF的3T3成纤维细胞。
10. 如权利要求9所述的方法,所述方法包括:提供原代扁桃体幼稚B细胞;以及将IL-4或IFN  $\gamma$  引入到所述原代扁桃体幼稚B细胞中。
11. 如权利要求9所述的方法,其中所述长寿浆细胞相对于野生型浆细胞具有增加的抗体、蛋白质或酶分泌;增多的呼吸用线粒体丙酮酸盐;或升高的葡萄糖摄取。
12. 一种治疗有需要的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的浆细胞,  
其中,  
所述受试者具有病毒,并且所述浆细胞表达来自广泛中和所述病毒的抗体的序列;  
所述受试者患有酶缺乏症,并且所述浆细胞分泌酶;或  
所述受试者患有自身免疫性疾病、神经变性疾病或癌症,并且所述浆细胞表达免疫治疗剂,所述免疫治疗剂任选地选自阿杜那单抗、美罗华或依库珠单抗。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法生成的B细胞或浆细胞。
14. 一种经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的干细胞包括:
  - (i) 相对于野生型干细胞降低的一种或多种HLA-I和HLA-II的表达;或
  - (ii) 编码导致逃避补体固定、逃避NK细胞识别或逃避吞噬的基因的构建体。
15. 如权利要求14所述的经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的干细胞包

括相对于野生型干细胞增加的一种或多种免疫逃避因子的表达。

16. 如权利要求15所述的经基因工程改造的干细胞,其中所述免疫逃避因子选自一个或多个由HLA-E、HLA-G、CD46/Crry、CD47和CD55组成的组。

17. 如权利要求16所述的经基因工程改造的干细胞,其中所述免疫逃避因子选自一个或多个由CD46/Crry和CD55组成的组。

18. 如权利要求15所述的经基因工程改造的干细胞,其中所述免疫逃避因子抑制免疫排斥或促进免疫逃避。

19. 如权利要求14至18中任一项所述的经基因工程改造的干细胞,其中所述干细胞为干细胞、胚胎干细胞、多能干细胞,或者具有低免疫原性。

20. 如权利要求14所述的经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的干细胞包含在编码基因中的失活突变,所述编码基因选自一个或多个由以下组成的组: $\beta$ 2微球蛋白、TAP1、CD74、CIITA和NKG2D的配体。

21. 如权利要求20所述的经基因工程改造的干细胞,其中  
(i) 所述失活突变是在编码基因TAP1或CD74中;或  
(ii) NKG2D的所述配体任选地选自一个或多个由MICA、MICB、Raet1e、Raet1g、Raet1l、U1bp1、U1bp2和U1bp3组成的组。

22. 如权利要求15所述的经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的干细胞包括相对于野生型干细胞增强的HLA-E和HLA-G中的一种或多种的表达。

23. 如权利要求20至21中任一项所述的经基因工程改造的干细胞,其中:  
(i) 对编码 $\beta$ 2微球蛋白和TAP1的基因进行遗传修饰,以消除HLA-I表达并阻止同种异体CD8+T细胞的直接识别;  
(ii) 对编码CD74的基因进行遗传修饰以消除HLA-II表达;或  
(iii) 对编码NKG2D配体的基因进行遗传修饰,以逃避自然杀伤细胞识别;

其中,所述经基因工程改造的干细胞产生后代,并且所述后代显示出降低的免疫原性。

24. 如权利要求14所述的经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的干细胞包括  
(i) 至少一个选自由以下组成的组的免疫逃避基因:HLA-E单链三聚体、HLA-G单链三聚体、K-b单链三聚体、CD46/Crry、CD55和CD47;或  
(ii) 至少一个抑制选自由以下组成的组的途径或细胞类型的免疫逃避基因:NKG2A+NK细胞、ILT2/KIR2DL4+NK细胞、Ly49C+NK细胞、补体/C3b和C4b、补体/C3转化酶、补体/C9和吞噬;和

(iii) 任选地,至少一个自杀基因。

25. 如权利要求14所述的经基因工程改造的干细胞,其中所述经基因工程改造的干细胞包含药物诱导型自杀基因,所述药物诱导型自杀基因选自一个或多个由以下组成的组:iCasp9、HSV胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶和大肠埃希菌硝基还原酶,并且所述药物选自由AP1903、更昔洛韦、5-氟胞嘧啶和CB1954组成的组。

26. 一种制备经基因工程改造的干细胞的方法,所述方法包括:

(i) 引入遗传修饰或失活突变以降低免疫原性;或  
(ii) 将构建体递送至安全港基因座并编码导致逃避补体固定、NK细胞识别或吞噬的基

因。

27. 如权利要求26所述的方法,其中

(i) 通过消除HLA-I表达、消除HLA-II表达以及消除自然杀伤细胞识别而降低所述细胞的免疫原性;

(ii) 所述失活突变是在编码基因中,所述编码基因选自一个或多个由以下组成的组: $\beta$ 2微球蛋白、TAP1、CD74、CIITA和NKG2D的配体,并且NKG2D的所述配体任选地选自一个或多个由MICA、MICB、Raet1e、Raet1g、Raet11、Ulbp1、Ulbp2和Ulbp3组成的组;

(iii) 所述导致逃避补体固定的基因选自一个或多个由CD46/Crry、CD55和CD59组成的组;

(iv) 所述导致逃避NK细胞识别的基因选自一个或多个由HLA-E和HLA-G组成的组;或

(v) 所述导致逃避吞噬的基因是CD47。

28. 一种用权利要求14至25中任一项所述的经基因工程改造的干细胞或经基因工程改造的干细胞的后代或者根据权利要求26至27中任一项所述的方法治疗有此需要的受试者的方法。

29. 如权利要求28所述的方法,其中,

(i) 所述干细胞被移植到受试者中;

(ii) 受试者的组织被自身免疫性疾病破坏;

(iii) 被自身免疫性疾病破坏的受试者的组织得到再生;

(iv) 胰腺细胞或少突胶质细胞得到再生;

(v) 所述受试者患有自身免疫性疾病、癌症、神经变性疾病;

(vi) 所述受试者患有I型糖尿病、多发性硬化、病原体或传染病;

(vii) 产生体液免疫;或

(viii) 产生抗体介导的免疫。

30. 如权利要求12至13和28至29中任一项所述的方法,其中不存在宿主免疫抑制。

## 细胞及其使用和制备方法

[0001] 本申请是申请号为201880032723.6、申请日为2018年03月20日、发明名称为“细胞及其使用和制备方法”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2017年3月20日提交的美国临时申请号62/473,564的优先权，该临时申请通过引用整体并入本文。

[0004] 关于由联邦政府资助研究或研发的声明

[0005] 不适用。

[0006] 通过引用并入的材料

[0007] 序列表作为本公开的一部分，包括包含本发明的核苷酸和/或氨基酸序列的计算机可读取形式。序列表的主题以引用的方式整体并入本文。

### 技术领域

[0008] 本公开总体上涉及细胞疗法。

### 发明背景

[0010] 针对毁灭性传染病的疫苗代表了人类最大医学突破中的一部分。疫苗的基本原理是使用减毒或灭活载体建立免疫力，这些载体模拟天然病原体，但不会造成活载体感染可能引发的全身性损伤。因此，迄今为止所有成功疫苗的先决条件是人体免疫系统必须固有地能够在面对自然活载体感染时最终产生适应性免疫。在像脊髓灰质炎这样的病例中，在适应性免疫能够控制自然病毒之前造成的损害是不可接受的；尽管如此，最终还是获得了持久的免疫力，并阻止后续感染。

[0011] 然而，目前全球很多最棘手的传染病都不能通过人体免疫系统有效控制，不能引发抵抗再次感染的持久免疫。例如，HIV利用其突变性建立了不能被清除的慢性感染，如果没有抗病毒药物的帮助，这种慢性感染不能被有效控制。登革病毒感染导致对同一血清型所致的再感染具有持久的免疫力，但实际上，如果该个体再次感染不同的登革热血清型，则会引起比他/她完全初治时引起的疾病严重得多的疾病。同样，流感毒株不断改变自身的基因；因此，针对特定毒株的免疫很少能对随后在时间和空间上传播的所有流感病毒提供完全保护。疟疾的自然感染不一定产生持久免疫，因为同一个体在一生中可以重复感染很多次。类似这样的病原体会带来一个难题：当免疫系统在面对实际感染时本质上无法产生广泛有效的免疫时，设计成模拟天然病原体的疫苗如何引发免疫？创新性的替代策略如结构引导的序贯免疫、基因疗法和细胞基疗法都已被提出，但是后者途径开发得最少。

[0012] 此外，细胞疗法领域需要避免免疫排斥的免疫抑制技术或细胞技术取得进步。在了解免疫监视和遗传操作方面的进步使得利用细胞修饰的工程改造定制用于避免免疫排斥的细胞成为可能。

## 发明内容

[0013] 在本公开的各个方面中,提供了生成浆细胞、经基因工程改造的干细胞、制备用于避免宿主内免疫排斥的浆细胞和经基因工程改造的干细胞的方法,以及它们的使用方法。

[0014] 本公开的一个方面包括使人类胚胎干细胞(ES细胞)分化成产生治疗剂(例如广泛中和抗体、蛋白质或酶)的可移植浆细胞的方法。在一些实施方案中,该方法包括生成祖细胞(例如生血祖细胞)以及使祖细胞分化为B细胞。

[0015] 在一些实施方案中,使所述祖细胞分化为B细胞包括:表达由诱导型启动子(任选地,PAX5、EBF1、FOX01A、BCL11A、TCF3、IKZF1、IRF4、IRF8或SPI1)驱动的B谱系促进遗传因子;将祖细胞与(i)选自一个或多个由Flt3L、SCF和IL-7组成的组的细胞因子和(ii)MS5基质细胞共同培养,持续足以促进B淋巴细胞生成的时间(任选地,达约20天);或用刺激物活化祖细胞,从而使B细胞分化。

[0016] 在一些实施方案中,遗传因子任选地选自一个或多个由以下组成的组:PAX5、EBF1、FOX01A、BCL11A、TCF3、IKZF1、IRF4、IRF8或SPI1。

[0017] 在一些实施方案中,刺激物选自多西环素或四环素。

[0018] 在一些实施方案中,生血祖细胞是生血内皮细胞;对生血祖细胞进行转导(任选地用慢病毒转导),对组成性表达的rTTA-T2A-GFP;经由核糖体跳跃2A序列连接至报道基因的刺激物诱导型转录激活剂;或者受诱导型启动子驱动、选自一个或多个由PAX5、EBF1、FOX01A、BCL11A、TCF3、IKZF1、IRF4、IRF8或SPI1组成的组的遗传因子进行编码,生成转导细胞,所述转导细胞从组成上表达rTTA和GFP,但在刺激物(例如多西环素)处理后仅表达遗传因子。

[0019] 在一些实施方案中,仅在分化和谱系定型需要因子时,才使用修饰的RNA来暂时地引入它们。

[0020] 在一些实施方案中,用病原体特异性抗体基因编码盒对人ES细胞进行核转染。

[0021] 在一些实施方案中,病原体特异性抗体盒包含VDJ和VJ序列,所述VDJ和VJ序列选自一个或多个由流感抗体、HIV抗体或黄病毒抗体组成的组。

[0022] 在一些实施方案中,包含VDJ和VJ序列的特异性抗体盒选自一个或多个由FI6、VRC07、10E8、N6、3BNC117、EDE1和C10组成的组。

[0023] 在一些实施方案中,Cas9、导向RNA(gRNA)、ZFN或TALEN被用于靶向内源性免疫球蛋白重链和κ轻链基因座。

[0024] 本公开的另一个方面提供了一种生成具有增强的葡萄糖摄取的长寿浆细胞的方法,该方法包括将IFN $\gamma$ 或IL-4施用至来源于人ES细胞的B细胞。

[0025] 在一些实施方案中,所述长寿浆细胞具有增加的抗体分泌和增加的用于呼吸的线粒体丙酮酸盐。

[0026] 本公开的又一个方面提供了一种生成长寿浆细胞的方法,该方法包括:提供原代扁桃体幼稚B细胞;或将IL-4或IFN $\gamma$ 引入到原代扁桃体幼稚B细胞中。

[0027] 本公开的又一个方面提供了一种生成长寿浆细胞的方法,该方法包括:提供被工程改造成表达CD40L和BAFF的3T3成纤维细胞;或在IL-21存在下培养该细胞。

[0028] 本公开的又一个方面提供了一种治疗携带病毒的受试者的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的浆细胞,其中浆细胞表达广泛中和该病毒的抗体的序列。

[0029] 本公开的又一个方面提供了一种治疗需要酶替代疗法的受试者的方法,该方法包括施用被工程改造成分泌酶的浆细胞。

[0030] 在一些实施方案中,通过A<sub>β</sub>基因下游的基因替换或IRES敲入而将所述浆细胞工程改造成分泌酶。

[0031] 本公开的又一个方面提供了一种通过前述方法生成的B细胞或浆细胞。

[0032] 本公开的又一个方面提供了一种治疗自身免疫疾病或癌症的方法,该方法包括表达免疫治疗剂如美罗华(rituxan)或依库珠单抗(eculizimab)的浆细胞。

[0033] 本公开的又一个方面提供了一种治疗神经变性疾病的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的表达免疫治疗剂的浆细胞。

[0034] 在一些实施方案中,所述神经变性疾病是阿尔茨海默病,或者所述免疫治疗剂是阿杜那单抗(aducanumab)。

[0035] 本公开的又一个方面提供了一种经基因工程改造的干细胞,所述经基因工程改造的细胞包含:(i)一种或多种HLA-I和HLA-II相对于野生型干细胞的调节表达;或(ii)编码导致逃避补体固定、逃避NK细胞识别或逃避吞噬的基因的构建体。

[0036] 在一些实施方案中,所述经基因工程改造的干细胞包括一种或多种免疫逃避因子相对于野生型干细胞的调节表达。在一些实施方案中,所述免疫逃避因子的调节表达包括免疫逃避因子的表达增加。

[0037] 在一些实施方案中,所述免疫逃避因子被插入到细胞的至少一个等位基因的安全港基因座(harbor locus)中。在一些实施方案中,所述安全港基因座包含AAVS基因座。

[0038] 在一些实施方案中,所述免疫逃避因子抑制免疫排斥或促进免疫逃避。

[0039] 在一些实施方案中,所述免疫逃避因子选自由HLA-E、HLA-G、CD46/Crry、CD47或CD55组成的组。

[0040] 在一些实施方案中,所述干细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中,所述干细胞是多能干细胞。在一些实施方案中,所述干细胞是低免疫原性的。在一些实施方案中,所述干细胞是人干细胞。

[0041] 在一些实施方案中,所述经基因工程改造的干细胞包含在选自一个或多个由以下组成的组的编码基因中的遗传修饰: $\beta$ 2微球蛋白、TAP1、CD74、CIITA和NKG2D的配体。

[0042] 在一些实施方案中,NKG2D的配体任选地选自一个或多个由MICA、MICB、Raet1e、Raet1g、Raet1l、Ulbp1、Ulbp2和Ulbp3组成的组。

[0043] 在一些实施方案中,所述遗传修饰包括失活突变。

[0044] 在一些实施方案中,所述经基因工程改造的干细胞包含HLA-E和HLA-G中的一种或多种的增强表达。

[0045] 在一些实施方案中,所述经基因工程改造的干细胞包含HLA-E和HLA-G中的一种或多种相对于野生型干细胞的增强表达。

[0046] 在一些实施方案中,(i)对 $\beta$ 2微球蛋白和TAP1编码基因进行遗传修饰以消除HLA-I表达并阻止同种异体CD8+T细胞的直接识别;(ii)对CD74编码基因进行遗传修饰以消除HLA-II表达;(iii)对NKG2D配体编码基因进行遗传修饰以逃避自然杀伤细胞的识别;或(iv)所述干细胞显示降低的免疫原性。

[0047] 在一些实施方案中,(i)至少一种免疫逃避基因选自由以下组成的组:HLA-E单链

三聚体、HLA-G单链三聚体、K-b单链三聚体、CD46/Crry、CD55和CD47；(ii) 至少一种免疫逃避基因抑制选自由以下组成的组的途径或细胞类型：NKG2A+NK细胞、ILT2/KIR2DL4+NK细胞、Ly49C+NK细胞、补体/C3b和C4b、补体/C3转化酶、补体/C9和吞噬；(iii) 任选地，至少一个自杀基因。

[0048] 在一些实施方案中，(i) 免疫逃避基因或免疫逃避因子被递送至阻止沉默的安全港基因座，所述免疫逃避因子选自一个或多个由以下组成的组：HLA-E单链三聚体、HLA-G单链三聚体、K-b单链三聚体、CD46/Crry、CD55和CD47；(ii) 所述自杀基因选自一个或多个由以下组成的组：iCasp9、HSV胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶和大肠埃希菌硝基还原酶；或者(iii) 所述自杀基因选自具有诱导药物的自杀基因，所述诱导药物选自由AP1903、更昔洛韦、5-氟胞嘧啶和CB1954组成的组。

[0049] 本公开的又一个方面提供了一种经基因工程改造的干细胞，所述经基因工程改造的干细胞包含在编码基因中的遗传修饰，所述基因逃避一种或多种选自由以下组成的组的免疫细胞的识别：CD8<sup>+</sup>T细胞、CD4<sup>+</sup>T细胞和NK细胞。

[0050] 在一些实施方案中，所述遗传修饰是在选自一个或多个由以下组成的组的编码基因中： $\beta$ 2微球蛋白、TAP1、CD74、CIITA和NKG2D的配体，其中所述NKG2D的配体任选地选自一个或多个由以下组成的组：MICA、MICB、Raet1e、Raet1g、Raet11、U1bp1、U1bp2和U1bp3。

[0051] 在一些实施方案中，所述遗传修饰包括失活突变。

[0052] 本公开的又一个方面提供了一种经基因工程改造的干细胞，所述经基因工程改造的干细胞包含一种或多种免疫逃避因子相对于野生型人干细胞的调节表达。

[0053] 在一些实施方案中，所述免疫逃避因子的调节表达包括免疫逃避因子表达增加。

[0054] 在一些实施方案中，所述免疫逃避因子被插入到细胞的至少一个等位基因的安全港基因座中。

[0055] 在一些实施方案中，所述安全港基因座包括AAVS基因座。

[0056] 在一些实施方案中，所述免疫逃避因子抑制免疫排斥或促进免疫逃避。

[0057] 在一些实施方案中，所述干细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中，所述干细胞是多能干细胞。在一些实施方案中，所述干细胞是低免疫原性的。在一些实施方案中，所述干细胞是人干细胞。

[0058] 在一些实施方案中，所述免疫逃避因子选自一个或多个由HLA-E、HLA-G、CD46/Crry、CD47和CD55组成的组。

[0059] 在一些实施方案中，所述经基因工程改造的干细胞包括HLA-I和HLA-II中的一种或多种相对于野生型干细胞的调节表达。

[0060] 本公开的又一个方面提供了一种制备经基因工程改造的干细胞的方法，该方法包括将构建体递送至安全港基因座，并编码导致逃避补体固定、NK细胞识别或吞噬的基因。在一些实施方案中，导致逃避补体固定的基因选自一个或多个由CD46/Crry、CD55和CD59组成的组。在一些实施方案中，导致逃避NK细胞识别的基因选自一个或多个由HLA-E和HLA-G组成的组。在一些实施方案中，导致逃避吞噬的基因是CD47。

[0061] 本公开的又一个方面提供了一种用经基因工程改造的干细胞治疗有此需要的受试者的方法，或一种经基因工程改造的干细胞。

[0062] 在一些实施方案中，将所述干细胞移植到受试者中；受试者的组织被自身免疫疾

病破坏；使被自身免疫疾病破坏的受试者的组织再生；使胰腺细胞或少突胶质细胞再生；所述受试者患有I型糖尿病、多发性硬化、携带病原体或患有传染病；产生体液免疫；或产生抗体介导的免疫。

[0063] 在一些实施方案中，利用基因编辑去除HLA-II表达所需的转录因子CD74或CIITA，其中所述经基因工程改造的干细胞保留了造血潜能，并且衍生单核细胞缺乏可检测的HLA-II表达。

[0064] 在一些实施方案中，不存在宿主免疫抑制。

[0065] 其他目标和特征将在下文中部分地显而易见并被部分地指出。

## 附图说明

[0066] 本领域技术人员将理解下述附图仅出于说明目的。附图不意图以任何方式限制本教导的范围。

[0067] 图1A至图1B示出了从hES细胞生成最终的造血前体。(A) hES细胞分化方案的示意图。(B) 分化的实例。H1 hES细胞分化为中胚层，然后分化为最终的生血内皮，持续8天。将这些细胞与OP9-DLL4细胞一起再共培养3周，以产生定型的CD7+CD5+CD4-CD8-‘DN’ T细胞。

[0068] 图2A至图2B显示多西环素诱导的Pax5表达促进了hES来源的祖细胞向B细胞的分化。(A) 用于转导生血内皮的慢病毒载体的示意图。(B) 代表性数据表明与MS5基质细胞共培养25天后，经多西环素处理的慢病毒转导细胞的B细胞分化。

[0069] 图3A至图3C显示了流感特异性抗体基因靶向至内源性免疫球蛋白基因座。(A) IgH靶向策略的示意图。(B) 从吉欧霉素(zeocin)耐药克隆或K562细胞系阳性对照转染子进行基因组DNA的PCR筛选。针对Igκ靶向作用也采取了类似的策略。(C) 在Cre重组酶转染后，对携带流感抗体基因的基因组DNA hES克隆进行PCR筛选，以供耐药盒用。

[0070] 图4显示IFN $\gamma$ 促进了体外浆细胞分化期间的葡萄糖摄取。在存在或不存在指定细胞因子的情况下，将幼稚B细胞在表达CD40L和BAFF的NIH 3T3细胞上培养3天。然后，将细胞与50 $\mu$ M 2NBDG(一种荧光葡萄糖类似物)温育30分钟，并用流式细胞仪进行分析。

[0071] 图5A至图5B示出了听小骨中原代人骨髓浆细胞的植入和持久性。将1-5x 10<sup>6</sup>个富含CD138的人骨髓浆细胞注射到NSG小鼠的预成型人听小骨中。在第7和28天进行血清ELISA分析(A)，并在第28天进行流式细胞分析(B)。(A)的检测下限为3pg/ml。

[0072] 图6A至图6E示出了HLA缺失性hES细胞系的生成。(A) 基因组编辑工作流程的示意图。将Cas9和靶向至HLA表达必需基因的三种gRNA核转染至H1 hES细胞中。两轮亚克隆和MiSeq分析得到克隆突变细胞系。(B) 靶基因的MiSeq分析实例。在6个等位基因中的5个等位基因中引入了移码突变。(C) 在存在或不存在IFN $\gamma$ 处理的情况下，对野生型或HLA-KO hES细胞进行染色以供HLA-I表达用。在 $\beta$ 2m和TAP1缺失性细胞中不存在HLA-I表达。(D) 将HLA-KO hES细胞或对照来源的单核细胞和树突细胞与用CFSE标记的同种异体T细胞混合。4天后对CFSE稀释度进行定量。(E) 单核细胞和树突细胞来源于HLA-KO hES细胞或对照hES细胞，通过流式细胞术测量HLA-II表达。

[0073] 图7A至图7B示出了需递送至AAVS基因座的免疫逃避基因。(A) 逃避人(上图)或小鼠(下图)免疫识别的AAVS靶向构建体的示意图。(B) 将AAVS构建体转染至HLA-KO hES细胞中，并针对嘌呤霉素或新霉素耐药进行选择。通过流式细胞术对免疫逃避基因的表达进行

定量。

[0074] 图8A至图8C显示AAVS构建体介导了免疫逃避。(A)用图7中的构建体1(SEQ ID NO:1)或2(SEQ ID NO:2)转染CHO细胞,并用流式细胞仪进行分析。(B)测试含有图7中构建体1(上排)或构建体2(下排)的稳定转染CHO细胞的补体沉积。(C)将用图7中的构建体1转染的721.221细胞与原代人NK细胞一起培养。测量NK细胞脱粒随CD107a表达的变化。

[0075] 图9A至图9B示出了人源化小鼠中HLA-KO移植植物的存活率。(A)对含有脐带血CD34+细胞的未预处理的NSG-W41小鼠的稳健植入。脐带血的 $10^5$ 个CD34+细胞移植后20周脾脏嵌合的实例。(B)HLA-KO在人源化NSG-W41小鼠中形成畸胎瘤,而野生型hES细胞则未能如此。

[0076] 图10示出了细胞基疗法的发展以及工程改造可提供持久的抗体介导的免疫力的通用可移植细胞的策略,表明基于干细胞的疗法可以产生针对可突变病毒的免疫力。

[0077] 图11A至图11B示出了HLA-KO细胞中MICA和MICB的成功删除。(A)对靶向MICA和MICB的两个单独gRNA进行转染,并对克隆进行移码突变测序。克隆B05、H10和F01在一个等位基因的MICA和MICB中携带移码突变。(B)用gRNA靶向MICA-MICB融合等位基因。在另一条染色体上,在克隆B05、H10和F01中的MICA和MICB间观察到间插序列删除引起的框内融合。用gRNA重新靶向这种融合等位基因,并分离了5个携带移码突变的克隆。

## 具体实施方式

[0078] 本公开至少部分基于以下发现:(1)使人多能干细胞分化为可移植的分泌抗体或分泌酶的浆细胞,以及(2)编码NKG2D的配体的基因(逃避自然杀伤细胞识别,并导致用于移植的人多能干细胞基本无免疫原性或具有最低的免疫原性)中的突变(例如使用CRISPR/Cas9),以及阻止补体沉积的基因表达可以消除人多能干细胞免疫原性的主要决定因素。总之,这就允许了针对自身免疫疾病、神经变性疾病、癌症和传染病的可扩展的现有疗法,以及使用改变的细胞来避免免疫排斥的ES细胞基疗法的普遍应用。

[0079] 如本文所述,已经开发了用于修饰人多能干细胞,使它们逃避免疫系统的多个分支的识别的方法和靶标。本公开提供了生成最低免疫原性的供体多能干细胞系的方法(所述最低免疫原性的供体多能干细胞系可以在没有宿主免疫抑制的情况下,作为再生医学的“现成”疗法的来源使用),以及通过此类方法生成的细胞。

[0080] 本公开的一个方面提供了经改变以避免免疫排斥的细胞的可扩展输入。商业上可行的细胞基疗法可能需要可扩展的细胞输入,以降低治疗成本并实现标准化生产,并且可以用作用于建立细胞疗法的细胞的同种异体来源。

[0081] 本文描述了针对传染病的可扩展细胞疗法的各个步骤的开发。这些步骤可以集合成为一个一体化途径来提供对传染性病原体的防护,这些步骤也可以用于其他细胞疗法应用中。

[0082] 最低免疫原性或基本无免疫原性的人类胚胎干细胞

[0083] 最低免疫原性的“通用”供体hES细胞系的生成已成为再生医学中许多领域的目标。数十年的移植研究表明,移植的免疫学屏障是巨大的,并且还未完全明白如何最佳地实现真正“通用的”细胞系。

[0084] 本文描述了用于移植,特别地,用于针对传染病的肝细胞基免疫疗法的基本无免疫原性或最低免疫原性的hES细胞。此类用于移植的细胞系的创建可实现可扩展的现成细

胞疗法。这是私营企业正在开发的大多数干细胞基疗法所需要的。此类细胞系还可以促进被自身免疫破坏的组织,例如I型糖尿病中的胰腺 $\beta$ 细胞和多发性硬化中的少突胶质细胞的再生医学。

[0085] 本文描述了免疫原性的几个主要决定因素的清除。

[0086] 疾病治疗的应用

[0087] 本公开提供了可扩展的现成疗法来源的生产,其应用范围包括免疫疗法、胰岛 $\beta$ 细胞置换,或针对多发性硬化的少突胶质细胞的恢复。

[0088] 与首次暴露后已经突变的病毒相比,不同类型的抗体介导针对先前遇到过的病毒的长期免疫力。本文描述了导致这些不同抗体的信号的识别,并确定它们如何防御病原体。

[0089] 本文描述了用于提供针对全球相关病原体的持久免疫力的组合物和方法。传染病导致全部死亡人数的近1/3,因此是世界范围内主要的死亡原因。尽管对引起这些疾病的微生物进行了数十年的研究,但许多最棘手的传染病已被证明通过疫苗接种难以对付。因此,如果需要开发成功的疫苗,就需要新的途径。开发抗HIV疫苗的努力就是有用的实例。一小部分HIV血清阳性群体产生了非常有效的抗体,能够中和大于90%的临床HIV分离株。对于流感病毒和登革热病毒,均已发现类似的罕见但广泛中和的抗体。然而,这些抗体中很多抗体的结构异常,体细胞突变数量非常高。因此,尚不清楚如何在一般人群中产生这些类型的应答。

[0090] 已经提出几种创造性的可能性并通过实验进行探索。首先,已经提出通过基于结构的HIV糖蛋白免疫原设计和顺序接种,可以将抗体应答导向广泛中和特性。几项研究使用免疫球蛋白敲入小鼠或携带更多不同谱系的动物证明了这种方法的可行性。然而,这些研究仍处于小鼠模型的早期阶段,并且这种策略是否可以转化为人类疫苗还有待观察。实际上,对于其他棘手的病原体,还不清楚是否有专门用于HIV抗原表位结构设计的类似资源。在第二种途径中,使用腺相关病毒(AAV)载体肌内递送广泛中和抗体基因供异源表达。小鼠和灵长类动物模型均显示令人鼓舞的结果,因此进行临床试验。尽管大体上是安全的,但是先前研究揭示的主要问题是,除非将载体递送至免疫赦免区,否则异源基因表达的持续时间可能相当短暂。这可能是由于人体内广泛的先存免疫力和针对AAV的CD8<sup>+</sup>T细胞应答所致。在第三种途径中,使用慢病毒基基因疗法修饰造血干细胞(HSC),使它们表达广泛中和抗体。在自体移植时,可以形成HSC衍生的遗传修饰B细胞和浆细胞以分泌这些中和抗体。由于实际可行性的问题,最后这种途径受到的关注要少得多。造血干细胞移植,即使是自体移植,也需要细胞减灭调理以实现有效的移植物植入。此外,慢病毒载体在宿主基因组中的随机整合已被证明会引发白血病。最后,该方法是不可扩展的,导致成本高昂。如此处所述,这些问题在后一种途径中,通过使用可扩展的最低免疫原性的输入生成病原体特异性B细胞而得以解决。

[0091] 组织再生。

[0092] 需要可以用于使人体组织再生的低成本且易操作的干细胞。这里描述了具有最低免疫原性并被认为是“通用”供体的干细胞系(例如,经基因工程改造的)。这些细胞可以在没有宿主免疫抑制的情况下,作为再生医学的“现成”疗法的来源使用。

[0093] 浆细胞和血清抗体

[0094] 本文描述了使用多能干细胞产生抗体介导的免疫。据信目前还没有这方面的先行

论文,也没有其他正在进行的利用多能干细胞产生抗体介导的免疫的研究项目。

[0095] 本文描述了使用人类多能干细胞产生体液免疫的新方法(参见例如实施例1)。

[0096] 实现体液免疫的组成步骤是公认的。一百多年前人们就已经知道血清抗体抵御病原体的效力(参见例如Behring,1965年)。长寿浆细胞的存在及其维持血清抗体的职责在本领域中被广泛接受(参见例如Slifka等人,1998年)。

[0097] 从hES细胞生成最终造血前体(DHP)是众所周知的;参见例如Kennedy等人,2012年。因此,除非本文另有说明,本公开的过程可以按照此类过程进行。如本文所述,首先使用Kennedy等人(Cell Reports,2012)和Sturgeon等人(Nat Biotech,2014)所述的方法,从ES分化出最终造血前体(DHP)。

[0098] 通过用本领域已知的任何方法激活PAX5,可以实现从DHP向B细胞的分化。例如,可以通过基因转导或用小分子活化将PAX5激活。如实施例1中所示,通过使用慢病毒载体将PAX5转导至靶细胞,将PAX5激活。另外,可以将辅助基质细胞(例如3T3成纤维细胞)工程改造成通过逆转录病毒转导表达这些因子的亚组(例如BAFF和CD40L)。如本文所述,人类胚胎干细胞(ES细胞)可以分化成浆细胞。例如,ES细胞可以是H1人类胚胎干细胞。

[0099] 祖细胞是一种生物细胞,它与干细胞一样,具有分化成特定类型细胞的趋势,但已经比干细胞更具特异性,并被迫分化成其“靶”细胞。例如,祖细胞可以是造血祖细胞(例如,造血内皮细胞)或造血祖细胞。

[0100] 如本文所述,可以使用转录因子或细胞因子和B谱系促进激活蛋白或遗传因子的异位表达,使最终造血祖细胞(DHP)分化成B细胞。这些细胞因子包括浓度范围为1-100ng/ $\mu$ l的IL-7、Flt3L和SCF。本文所述的其他细胞因子是IFN $\gamma$ 或IL-4。B谱系促进激活蛋白(也称为B谱系促进转录因子或遗传因子)包括PAX5、EBF1、FOXO1A、BCL11A、TCF3、IKZF1、IRF4、IRF8和SPI1。遗传因子可以用慢病毒载体、修饰型RNA或质粒转染进行诱导表达。

[0101] 浆细胞的应用。

[0102] 如本文所述,浆细胞可用作传染病的预防治疗。例如,描述了将流感抗体基因敲入到hES细胞的内源性基因座(参见例如实施例1,图3)中。这些抗体与流感病毒的保守部分结合并中和几乎所有流感病毒株(参见例如实施例1)。作为另一个实例,浆细胞可以用于治疗进行性慢性感染如HIV(参见例如实施例1)。作为另一个实例,浆细胞可以用于针对与酶缺乏有关的疾病如胡尔勒综合征(参见例如实施例1)或第九因子缺乏症的酶替代疗法。作为另一个实例,浆细胞可以用于治疗癌症(参见例如实施例1)。作为另一个实例,浆细胞可以用于治疗自身免疫疾病(参见例如实施例1)。作为另一个实例,浆细胞可以用于治疗阿尔茨海默病(参见例如实施例1)。作为另一个实例,表达抗体的浆细胞可以用于治疗需要抗体疗法的受试者(例如,使用免疫治疗剂)。例如,免疫治疗剂可以是抗体。作为一个实例,所述免疫治疗剂可以是美罗华(rituxan)、依库珠单抗(eculizimab)或阿杜那单抗(aducanumab)。

[0103] 如本文所述,所述组合物和方法可以用于治疗神经变性疾病或病症。例如,神经变性疾病或病症可以是阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化(ALS)、亚历山大病、Alpers病、Alpers-Huttenlocher综合征、 $\alpha$ -甲基酰基辅酶A消旋酶缺乏症、Andermann综合征、Arts综合征、共济失调神经病变谱、共济失调(例如伴眼球运动不能、常染色体显性小脑共济失调、耳聋和嗜眠症)、Charlevoix-Saguenay的常染色体隐性痉挛性共济失调、巴顿病、 $\beta$ -螺旋桨蛋白相关神经变性疾病、脑-眼-面部-骨骼肌综合征(COFS)、皮质基底节变性、CLN1疾病、

CLN10疾病、CLN2疾病、CLN3疾病、CLN4疾病、CLN6疾病、CLN7疾病、CLN8疾病、认知功能障碍、先天性无痛无汗症、痴呆、伴有神经丝氨酸蛋白酶抑制剂包涵体的家族性脑病、家族性英国痴呆、家族性丹麦痴呆、脂肪酸羟化酶相关的神经变性疾病、Gerstmann-Straussler-Scheinker疾病、GM2-神经节苷脂贮积病(例如AB变异)、HMSN 7型(例如伴视网膜色素病变)、亨廷顿氏病、婴儿神经轴性营养不良、婴儿发作性上行遗传性痉挛性瘫痪、亨廷顿病(HD)、婴儿发作性脊椎小脑共济失调、青少年原发性侧索硬化、肯尼迪病、库鲁病、利氏病(Leigh's Disease)、Marinesco-Sjögren综合征、轻度认知受损(MCI)、线粒体膜蛋白相关神经变性疾病、运动神经元病、单肢肌萎缩、运动神经元病(MND)、多系统萎缩、多系统萎缩伴直立性低血压(Shy-Drager综合征)、多发性硬化、多系统萎缩、唐氏综合症中的神经变性疾病(NDS)、老年性神经变性、神经变性伴脑铁积聚、视神经脊髓炎、泛酸盐激酶相关神经变性疾病、眼肌阵挛、肌蛋白病、进行性多灶性脑白质病、帕金森病(PD)、PD相关疾病、多囊性脂膜性骨发育不良伴硬化性脑白质病、肌蛋白病、进行性外眼肌瘫痪、核黄素转运蛋白缺失性神经病、Sandhoff病、脊髓性肌萎缩症(SMA)、脊髓小脑性共济失调(SCA)、纹状体黑质变性、传播性海绵状脑病(或肌蛋白病)或Wallerian样变性。

[0104] 如本文所述,所述组合物和方法可以用于治疗癌症。例如,所述癌症可以是急性淋巴细胞白血病(ALL);急性髓性白血病(AML);肾上腺皮质癌;艾滋病相关性癌症;卡波西肉瘤(软组织肉瘤);艾滋病相关淋巴瘤(淋巴瘤);原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤(淋巴瘤);肛门癌;阑尾癌;胃肠类癌;星形细胞瘤;儿童期中枢神经系统非典型畸胎/横纹肌样瘤(脑癌);皮肤基底细胞癌;胆管癌;膀胱癌;骨癌(包括尤因肉瘤和成骨肉瘤以及恶性纤维性组织细胞瘤);脑部肿瘤;乳腺癌;支气管肿瘤;伯基特淋巴瘤;类癌(胃肠);儿童类癌;心(心脏)肿瘤;中枢神经系统癌症;儿童期非典型畸胎/横纹肌样瘤(脑癌);儿童期胚胎肿瘤(脑癌);儿童期生殖细胞肿瘤(脑癌);原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;宫颈癌;胆管上皮细胞癌;胆管癌脊索瘤;慢性淋巴细胞性白血病(CLL);慢性粒细胞性白血病(CML);慢性骨髓增生性肿瘤;结肠直肠癌;颅咽管瘤(脑癌);皮肤T细胞癌;导管原位癌(DCIS);儿童期中枢神经系统胚胎性瘤(脑癌);子宫内膜癌(子宫癌);儿童期室管膜细胞瘤(脑癌);食道癌;成感觉神经细胞癌;尤因肉瘤(骨癌);颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;眼癌;眼内黑色素瘤;眼内黑色素瘤;视网膜母细胞瘤;输卵管癌;恶性骨纤维组织细胞瘤或成骨肉瘤;胆囊癌;胃部(胃)癌;胃肠类癌;胃肠道基质瘤(GIST)(软组织肉瘤);生殖细胞肿瘤;中枢神经系统生殖细胞肿瘤(脑癌);儿童期颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;睾丸癌;妊娠滋养细胞疾病;毛细胞白血病;头颈癌;心脏肿瘤;肝细胞(肝)癌;朗格汉斯细胞组织细胞增多症;霍奇金淋巴瘤;下咽部癌(头颈癌);眼内黑色素瘤;胰岛细胞瘤;胰腺神经内分泌肿瘤;卡波西肉瘤(软组织肉瘤);肾脏(肾细胞)癌;朗格汉斯细胞组织细胞增生症;喉癌(头颈癌);白血病;唇和口腔癌(头颈癌);肝癌;肺癌(非小细胞和小细胞);淋巴瘤;男性乳腺癌;恶性骨纤维组织细胞瘤或成骨肉瘤;黑色素瘤;眼内(眼);默克尔细胞癌(皮肤癌);恶性间皮瘤;转移性癌症;隐匿性原发性转移性鳞状颈癌(头颈癌);NUT基因相关性中线癌;口部癌(头颈癌);多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤;蕈样肉芽肿(淋巴瘤);骨髓发育异常综合征;骨髓增生异常/骨髓增殖性肿瘤;慢性髓性白血病(CML);急性髓性白血病(AML);骨髓增殖性肿瘤;鼻腔和副鼻窦癌(头颈癌);鼻咽癌(头颈癌);神经母细胞瘤;非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;口腔癌,唇癌或口腔癌;口咽癌(头颈癌);

癌) ;成骨肉瘤和恶性骨纤维组织细胞瘤;卵巢癌;胰腺癌;胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤);乳头状瘤病;副神经节瘤;副鼻窦和鼻腔癌(头颈癌);甲状腺旁腺癌;阴茎癌;咽部癌症(头颈癌);嗜铬细胞瘤;垂体瘤;浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;乳腺癌;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;原发性腹膜癌;前列腺癌;直肠癌;复发癌;肾细胞(肾脏)癌;视网膜母细胞瘤;儿童期横纹肌肉瘤(软组织肉瘤);唾液腺癌(头颈癌);肉瘤;儿童期横纹肌肉瘤(软组织肉瘤);儿童期血管肿瘤(软组织肉瘤);尤因肉瘤(骨癌);卡波西肉瘤(软组织肉瘤);成骨肉瘤(骨癌);子宫肉瘤;Sézary综合征(淋巴瘤);皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;皮肤鳞状细胞癌;隐匿性原发性转移性鳞状颈癌(头颈癌);胃(胃部)癌;皮肤T细胞淋巴瘤;淋巴瘤;蕈样肉芽肿和Sézary综合征;睾丸癌;咽喉癌(头颈癌);鼻咽癌;口咽癌;下咽部癌;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;甲状腺肿瘤;肾盂和输尿管移行细胞癌(肾脏(肾细胞)癌);输尿管和肾盂移行细胞癌(肾脏(肾细胞)癌);尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;血管肿瘤(软组织肉瘤);外阴癌;或肾芽细胞瘤。

[0105] 如本文所述,所述组合物和方法可用于治疗自身免疫疾病或病症。例如,所述自身免疫性疾病或病症可以是驰援不能;爱迪生病;成人Still病;无丙种球蛋白血症;斑秃;淀粉样变性;关节强硬性脊椎炎;抗GBM/抗TBM肾炎;抗磷脂综合征;自身免疫性血管性水肿;自身免疫性自主神经异常;自身免疫性脑脊髓炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性内耳病(AIED);自身免疫性心肌炎;自身免疫性卵巢炎;自身免疫性睾丸炎;自身免疫性胰腺炎;自身免疫性视网膜病;自身免疫性荨麻疹;轴索和神经元神经病(AMAN);巴萎病(Balo病);白塞氏病(Behcet disease);良性黏膜类天疱疮;大疱性类天疱疮;卡斯托曼综合征(CD);乳糜泻;恰加斯病;慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP);慢性复发性多病灶性骨髓炎(CRMO);Churg-Strauss综合征(CSS)或嗜酸性肉芽肿(EGPA);疤痕性类天疱疮;Cogان综合征;冷凝集素病;先天性心脏传导阻滞;柯萨奇病毒性心肌炎;CREST综合征;克罗恩病;疱疹样皮炎;皮肌炎;Devic病(视神经脊髓炎);盘状狼疮;Dressler综合征;子宫内膜异位症;嗜酸细胞性食管炎(EoE);嗜酸性筋膜炎;结节性红斑;原发性混合型冷球蛋白血症;Evans综合征;纤维肌痛;致纤维性肺泡炎;巨细胞动脉炎(颞动脉炎);巨细胞心肌炎;肾小球肾炎;Goodpasture综合征;肉芽肿伴多血管炎;Graves病;格林-巴利综合征;桥本甲状腺炎;溶血性贫血;亨-舍二氏紫癜(Henoch-Schonlein purpura)(HSP);妊娠疱疹或妊娠性类天疱疮(PG);化脓性汗腺炎(HS)(反常性痤疮);低丙种球蛋白血症;IgA肾病;IgG4相关性硬化性疾病;免疫性血小板减少性紫癜(ITP);包涵体肌炎(IBM);间质性膀胱炎(IC);青少年型关节炎;青少年糖尿病(1型糖尿病);青少年肌炎(JM);川崎病;Lambert-Eaton综合征;白细胞破裂性血管炎;扁平苔藓;硬化性苔藓;木样结膜炎;线状IgA病(LAD);狼疮;慢性莱姆病;梅尼埃病;显微镜下型多动脉炎(MPA);混合性结缔组织病(MCTD);Mooren溃疡;Mucha-Habermann病;多灶性运动神经病(MMN)或MMNCB;多发性硬化;重症肌无力;肌炎;嗜睡症;新生儿狼疮;视神经脊髓炎;中性粒细胞减少症;眼疤痕性类天疱疮;视神经炎;复发性风湿病(PR);PANDAS;副肿瘤性小脑退变(PCD);阵发性夜间血红蛋白尿(PNH);Parry Romberg综合征;扁平部睫状体炎(外周葡萄膜炎);Parsonnage-Turner综合征;天疱疮;周围神经病变;周围性脑脊髓炎;恶性贫血(PA);POEMS综合征;结节性多动脉炎;多腺体综合征I、II、III型;风湿性多肌痛;多发性肌炎;心肌梗死后综合征;心包切开术后综合征;原发性胆汁性肝硬化;原发性硬化性胆管炎;孕激素性皮炎;银屑病;银屑病关节炎;单纯红细胞再生障碍性

贫血 (PRCA)；坏疽性脓皮病；雷诺现象；反应性关节炎；反射性交感神经性营养不良；复发性多软骨炎；不宁腿综合征 (RLS)；腹膜后纤维化；风湿热；类风湿性关节炎；肉瘤状病；Schmidt 综合征；巩膜炎；硬皮病；Sjögren 综合征；精子和睾丸自身免疫性；僵人综合征 (SPS)；亚急性细菌性心内膜炎 (SBE)；Susac 综合征；交感性眼炎 (SO)；Takayasu 动脉炎；颞动脉炎/巨细胞动脉炎；血小板减少性紫癜 (TTP)；Tolosa-Hunt 综合征 (THS)；横断性脊髓炎；1型糖尿病；溃疡性结肠炎 (UC)；未分化结缔组织病 (UCTD)；葡萄膜炎；血管炎；白癜风；Vogt-Koyanagi-Harada 病；或韦格纳肉芽肿 (或肉芽肿伴多血管炎 (GPA))。

[0106] 如本文所述，可以生成表达抗体的浆细胞。例如，可以由用病原体特异性抗体基因编码盒核转染的人ES细胞生成浆细胞。

[0107] 如本文所述，浆细胞可以表达对病毒有特异性的抗体。例如，该病毒可以是流感病毒、HIV、疟疾或黄病毒（例如，登革热、寨卡病毒、西尼罗河病毒、蜱传脑炎病毒、黄热病病毒、细胞融合因子病毒 (CFAV)、Palm Creek 病毒 (PCV)、帕拉马塔河病毒 (PaRV)）。例如，浆细胞可以表达对 FI6、VRC07、10E8、N6、3BNC117、EDE1 或 C10 有特异性的抗体。

[0108] 通过基因组编辑（一种免疫工程途径）进行基因工程改造的干细胞

[0109] 如本文所述，对经基因工程改造的多能干细胞系进行修饰，使细胞逃避免疫系统的多个分支的识别。通常在一组基因和靶标上进行此类基因的替代，其中一些已在现有技术中有描述。对于本领域技术人员而言，添加到现有技术修饰中的本发明的关键新颖特征将是显而易见的。

[0110] 含有本发明的新型修饰的细胞可单独地或以与先前所述那些细胞组合的形式逃避 CD8<sup>+</sup>T 细胞、CD4<sup>+</sup>T 细胞、NK 细胞、补体或吞噬细胞的识别。此外，所述细胞可以含有诱导自杀基因和耐药盒。这容许在出现不良反应时选择性消除移植物，并在培养中容易进行药物选择以鉴定克隆细胞系。总之，该方法允许生成免疫原性大幅降低的人多能干细胞以供移植。

[0111] 如本文所述，发现破坏特异性免疫受体并将特异性转基因引入到人干细胞（即，通过基因敲除和/或转基因 (cDNA) 插入进行修饰）中可以产生通用的供体多能干细胞。

[0112] 本文提供了一种经基因工程改造的干细胞，其中 (i) 对  $\beta$ 2 微球蛋白和 TAP1 编码基因进行了遗传修饰，以消除 HLA-I 表达并阻止同种异体 CD8+T 细胞的直接识别；(ii) 消除了 HLA-II 表达，从而逃避了 CD4+T 细胞的直接识别；或 (iii) 对 NKG2D 配体编码基因进行了遗传修饰，以逃避自然杀伤 (NK) 细胞识别。

[0113] 本文还提供了一种干细胞系和一种生成逃避以下免疫细胞的识别的干细胞系的方法：(i) CD8<sup>+</sup>T 细胞（即因编码  $\beta$ 2 微球蛋白和 TAP1 的基因中缺乏具有遗传修饰的 MHC I 类表达）；(ii) CD4<sup>+</sup>T 细胞（即因编码 CD74 和 CIITA 的基因中缺乏具有遗传修饰的 MHC II 类表达）；和/或 (iii) NK 细胞（即因编码 NKG2D 配体的基因（例如，MICA、MICB、Raet1e、Raet1g、Raet1l、U1bp1、U1bp2 和 U1bp3）中的遗传修饰）。

[0114] 本文还提供了一种用于制备经基因工程改造的干细胞的方法，该方法包括将构建体递送至 ES 细胞中的 AAVS 基因座，以表达以下基因（或免疫逃避因子）用于指定目的：(i) 导致逃避补体固定的 CD46/Crry、CD55 和 CD59；(ii) 导致逃避 NK 细胞识别的 HLA-E 和 HLA-G 单链三聚体，以及 K-b 单链三聚体（在小鼠中显示）；(iii) 导致逃避吞噬巨噬细胞的 CD47；(iv) 导致诱导自杀基因的 icasp9 和 HSV 胸苷激酶（分别因 AP1903 和更昔洛韦死亡）；和/或 (v) 导致

耐药性的嘌呤霉素和新霉素耐药盒。

[0115] 还提供了用经基因改造的多能干细胞治疗受试者的方法,其中:所述受试者患有自身免疫疾病,例如I型糖尿病或多发性硬化,或所述患者患有传染病(例如破坏组织的传染病);所述受试者具有受损的组织,并且所述受损组织是由经基因工程改造的干细胞(例如,胰腺细胞、少突胶质细胞)再生的。

[0116] 编码β2微球蛋白和TAP1的基因的遗传修饰。

[0117] 本公开提供了编码β2微球蛋白和TAP1的基因中的遗传修饰。这消除了HLA-I表达并阻止同种异体CD8+T细胞的直接识别。如本文所述,所述遗传修饰可以是失活突变。

[0118] 本公开进一步提供了编码CD74和CIITA的基因中的突变。这消除了HLA-II表达并逃避CD4+T细胞的直接识别。先前的研究描述了分别阻止HLA-I和HLA-II表达的基因突变。但是,如本文所述(参见例如实施例2图6),已经鉴定出作为靶标的两个另外的基因。例如,为了阻止HLA-I表达,描述了TAP1突变的使用。除β2M之外,TAP1的删除也被证明是重要的,因为这两个基因中任一基因的删除单独地不足以完全去除HLA-I表达。先前的研究证实了残留CD8+T细胞对TAP1缺失性细胞具有反应性,并且β2M缺失性移植物可以通过获得血清β2M在β2M充足的宿主中重新表达HLA-I表达。作为另一个实例,为了阻止HLA-II表达,描述了突变的CD74。除CIITA外,CD74的删除也被证明是重要的,因为一些细胞类型可以独立于CIITA表达HLA-II。根据去除HLA-I和II的主要突变,可以去除这些额外的基因以阻止HLA表达遗漏。

[0119] 如本文所述,失活突变可以是基因中导致HLA-I或HLA-II表达减少或消除的任何突变(参见例如图6)。失活突变可以包括改变读码框和阻止功能蛋白质翻译的核苷酸插入或删除。例如,TAP1基因的一个等位基因中2个碱基对删除和TAP1基因的另一个等位基因中1个碱基对插入,导致翻译过早终止和HLA-I表达缺乏(参见例如图6)。

[0120] 本公开进一步显示,这些HLA缺失性细胞在用同种异体人免疫系统重构的异种嵌合小鼠中产生畸胎瘤。如本文所示,已经证明该细胞缺乏HLA-I和HLA-II的表达。进一步表明,源自这些细胞的单核细胞不能刺激同种异体T细胞增殖。如本文所进一步证明,所述经修饰细胞被证明可逃避用人免疫系统重构的小鼠的排斥。本文还证明AAVS靶向构建体正确地表达了所有预期基因,并赋予对自然杀伤细胞识别和补体沉积的抗性。

[0121] 目前认为,以前的途径都没有结合HLA-I和HLA-II的破坏。此外,认为在以前的方法中作为靶标的基因不足以介导HLA-I和HLA-II表达的完全丧失。

[0122] 预防吞噬和NK细胞活化。

[0123] 本公开进一步提供了在编码NKG2D配体的基因中产生的以逃避自然杀伤(NK)细胞识别的突变。NK细胞具有许多不同的识别模式,并且NKG2D是已知在所有NK细胞上表达的唯一激活受体。因此,与现有技术中描述的其他替代策略相反,NKG2D配体的去除消除了所有NK细胞的反应性。

[0124] 本公开进一步提供了待递送至人ES细胞中的AAVS基因座的构建体的设计和验证。这些构建体编码导致逃避NK细胞识别的基因(HLA-E和HLA-G单链三聚体)和导致逃避吞噬的基因(CD47和HLA-G单链三聚体)。这些基因的表达大幅减少了NK细胞的活化(参见例如实施例2)。这些构建体同时编码诱导自杀基因(例如icasp9和HSV胸昔激酶)和耐药盒(例如嘌呤霉素和新霉素耐药)。这容许在出现不良反应时选择性消除移植物,并在培养中容易进行

药物选择以鉴定克隆细胞系。总之,该过程允许生成免疫原性大幅降低的人多能干细胞以供移植。

[0125] 预防补体沉积。

[0126] 本公开进一步提供了待递送至人ES细胞中的AAVS基因座的构建体的设计和验证。这些构建体编码导致逃避补体固定的基因(例如CD46/Crry、CD55和CD59)。本文描述了使用CD46/Crry、CD55和CD59的表达来阻止细胞上的经典和替代补体沉积(参见例如实施例2)。据认为,阻止经典和替代补体沉积对于预防抗体依赖性免疫排斥至关重要。

[0127] 分子工程改造

[0128] 提供了以下定义和方法以更好地限定本发明,并指导本领域一般技术人员实施本发明。除非另外指出,否则术语应由相关领域的普通技术人员按照常规用法来理解。

[0129] 如本文所用,术语“异源DNA序列”、“外源DNA片段”或“异源核酸”均指的是这样的序列,所述序列源自对于特定宿主细胞来说是外来的来源,或者如果源自相同的来源,则所述序列是从其原始形式进行修饰而得到的。因此,宿主细胞中的异源基因包括对特定宿主细胞来说为内源但已通过例如使用DNA改组进行修饰的基因。该术语还包括自然存在的DNA序列的非自然存在的多个拷贝。因此,该术语指的是对于细胞来说是外来或异源的DNA节段,或者对于细胞来说是同源的但是出现在宿主细胞核酸内不常发现所述元件的位置上的DNA节段。对外源DNA节段进行表达以生成外源性多肽。“同源”DNA序列是与引入该序列的宿主细胞自然相关的DNA序列。

[0130] 表达载体、表达构建体、质粒或重组DNA构建体一般被理解为指的是通过人为干预(包括通过重组手段或直接化学合成)产生的具有一系列特定核酸元件的核酸,所述特定核酸元件允许例如宿主细胞中的特定核酸的转录或翻译。表达载体可以是质粒、病毒或核酸片段的一部分。通常,表达载体可以包括与启动子可操作连接的待转录核酸。

[0131] “启动子”一般被理解为指导核酸转录的核酸控制序列。诱导型启动子一般被理解为作为对特定刺激或激活剂的响应,介导可操作连接的基因的转录的启动子(例如,多西环素或四环素诱导型启动子)。启动子可以包括接近转录起始位点的必需核酸序列,例如就聚合酶II型启动子而言为TATA元件。启动子可以任选地包括远端增强子或阻抑物元件,它们可以位于从转录起始点起的多达数千个碱基对上。

[0132] 如本文所用,“可转录的核酸分子”指的是能够被转录成RNA分子的任何核酸分子。已知的方法是将构建体引入细胞中,使得可转录的核酸分子被转录成功能性mRNA分子,该功能性mRNA分子被翻译并因而被表达为蛋白质产物。构建体还可以被构建成能够表达反义RNA分子,以便抑制特异性目标RNA分子的翻译。对于本公开的实施而言,制备和使用构建体和宿主细胞的常规组合物和方法是本领域技术人员所熟知的(参见例如Sambrook和Russel(2006)Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN-10:0879697717;Ausubel等人(2002)Short Protocols in Molecular Biology,第5版,Current Protocols,ISBN-10:0471250929;Sambrook和Russel(2001)Molecular Cloning:ALaboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN-10:0879695773;Elhai,J.和Wolk,C.P.1988.Methods in Enzymology 167,747-754)。

[0133] “转录起始位点”或“启动位点”是第一个核苷酸周围的位置,它是转录序列的一部

分,也定义为位置+1。基因的所有其他序列及其控制区域均可相对于该位点进行编号。下游序列(即,3'方向上的其他蛋白质编码序列)可以被指定为正,而上游序列(大部分为5'方向上的控制区域)被指定为负。

[0134] “可操作地连接”或“功能性连接”优选指的是单个核酸片段上的核酸序列的结合,使一个核酸序列的功能受另一个核酸序列影响。例如,对于调控DNA序列与对RNA或多肽编码的DNA序列,如果这两条序列的位置使得调控DNA序列影响编码DNA序列的表达(即,编码序列或功能性RNA处于启动子的转录控制之下),则称这两条序列彼此“可操作地连接”或“结合”。编码序列可以在有义或反义取向上与调控序列可操作地连接。这两个核酸分子可以是单个连续核酸分子的一部分,并且可以是相邻的。例如,如果启动子调节或介导细胞中目标基因的转录,则启动子与目标基因可操作地连接。

[0135] “构建体”一般被理解为源自任何来源、能够进行基因组整合或自主复制的任何重组核酸分子,如质粒、粘粒、病毒、自主复制的核酸分子、噬菌体或线状或环状单链或双链DNA或RNA核酸分子,包括其中一个或多个核酸分子已被可操作地连接的核酸分子。

[0136] 本公开的构建体可以含有与可转录核酸分子可操作地连接的启动子,所述可转录核酸分子与3'转录终止核酸分子可操作地连接。此外,构建体可以包括但不限于源自例如3'非翻译区(3'UTR)的额外调控核酸分子。构建体可以包括但不限于mRNA核酸分子的5'非翻译区(5'UTR),它可以在翻译启动中起重要作用,并且也可以是表达构建体中的遗传组分。这些额外的上游和下游调节核酸分子可以源自相对于启动子构建体上存在的其他单元为天然或异源的来源。

[0137] 术语“转化”指的是将核酸片段转移到宿主细胞的基因组中,导致遗传学上稳定的遗传。包含转化的核酸片段的宿主细胞被称为“转基因”细胞,并且包含转基因细胞的生物被称为“转基因生物”。

[0138] “转化的”、“转基因的”和“重组的”指的是已引入异源核酸分子的宿主细胞或生物,例如细菌、蓝细菌、动物或植物。核酸分子可以稳定整合到本领域一般已知并公开的基因组中(Sambrook 1989; Innis 1995; Gelfand 1995; Innis&Gelfand 1999)。已知的PCR方法包括但不限于使用配对引物、巢式引物、单一特异性引物、简并引物、基因特异性引物、载体特异性引物、部分错配引物等的方法。术语“未转化的”指的是尚未经历转化过程的正常细胞。

[0139] “野生型”指的是在自然界发现的没有任何已知突变的病毒或生物。

[0140] 具有上述所需的同一性百分比并保留所表达蛋白质所需活性的变异核苷酸及其编码多肽的设计、生成和测试属于本领域的技术范围。例如,突变体的定向进化和快速分离可以根据参考文献中描述的方法进行,所述参考文献包括但不限于Link等人(2007)Nature Reviews 5(9), 680-688; Sanger等人(1991)Gene 97(1), 119-123; Ghadessy等人(2001)Proc Natl Acad Sci USA 98(8) 4552-4557。因此,本领域的技术人员可以生成具有例如与本文所述参考序列有至少95-99%同一性的大量核苷酸和/或多肽变体,并根据本领域中的常规方法针对所需的表型进行筛选。

[0141] 核苷酸和/或氨基酸序列同一性百分比(%)被理解为当比对两个序列时,候选序列中与参考序列中的核苷酸或氨基酸残基相同的核苷酸或氨基酸残基的百分比。为了确定同一性百分比,对序列进行比对,必要时引入空位以获得最大的序列同一性百分比百分比。

确定同一性百分比的序列比对程序是本领域技术人员所熟知的。使用通常可公开获取的计算机软件如BLAST、BLAST2、ALIGN2或Megalign (DNASTAR) 来比对序列。本领域的技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。当比对序列时,给定序列A与给定序列B、和给定序列B,或相对于给定序列B的序列同一性百分比(或者可以描述为具有或包含一定序列同一性百分比的给定序列A与给定序列B、和给定序列B,或相对于给定序列B的序列同一性百分比)可以计算如下:序列同一性百分比 = X/Y × 100,其中X是根据由序列比对程序或序列比对算法对A和B进行的比对被评定为相同匹配的残基数,Y是B中残基的总数。如果序列A的长度不等于序列B的长度,则A与B的序列同一性百分比将不等于B与A的序列同一性百分比。

[0142] 一般而言,只要保留了所需活性,就可以在任何位置进行保守取代。可以进行所谓的保守交换,其中被替换的氨基酸具有与原始氨基酸相似的性质,例如,用Asp交换Glu,用Asn交换Gln,用Ile交换Val,用Ile交换Leu和用Thr交换Ser。例如,具有相似性质的氨基酸可以是脂肪族氨基酸(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸);含羟基或硫/硒的氨基酸(例如丝氨酸、半胱氨酸、硒代半胱氨酸、苏氨酸、蛋氨酸);环状氨基酸(例如脯氨酸);芳族氨基酸(例如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸);碱性氨基酸(例如组氨酸、赖氨酸、精氨酸);或酸性氨基酸及其酰胺(例如门冬氨酸、谷氨酸,门冬酰胺、谷氨酰胺)。删除是用直接键取代氨基酸。删除的位置包括多肽端基和各个蛋白质结构域之间的连键。插入是将氨基酸引入到多肽链中,直接键在形式上被一个或多个氨基酸替换。氨基酸序列可以借助本领域已知的计算机模拟程序进行调节,这可以生成具有例如改良的活性或改变的调节性的多肽。基于这种人工生成的多肽序列,可以使用所需宿主细胞的特定密码子体外合成编码此类调节多肽的相应核酸分子。

[0143] 宿主细胞可以使用本领域已知的各种标准技术进行转化(参见例如Sambrook和Russel (2006) Condensed Protocols from Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10:0879697717;Ausubel等人(2002) Short Protocols in Molecular Biology,第5版,Current Protocols, ISBN-10:0471250929; Sambrook和Russel (2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10:0879695773;Elhai,J.和Wolk,C.P.1988.Methods in Enzymology 167,747-754)。此类技术包括但不限于病毒感染、磷酸钙转染、脂质体介导的转染、微粒介导的递送、受体介导的摄取、细胞融合、电穿孔等。可以选择转染的细胞并使其繁殖以提供重组宿主细胞,所述重组宿主细胞包含稳定整合于宿主细胞基因组中的表达载体。

[0144]

<u>保守取代 I</u>	
<u>侧链特征</u>	<u>氨基酸</u>
非极性脂肪族	G A P I L V
极性不带电	C S T M N Q
极性带电	D E K R
芳族	H F W Y
其他	N Q D E

[0145]

**保守取代 II**侧链特征氨基酸非极性(疏水)

A.脂肪族:	A L I V P
B.芳族:	F W
C.含硫:	M
D.边缘:	G

[0146]

不带电-极性

A.羟基:	S T Y
B.酰胺:	N Q
C.巯基:	C
D.边缘:	G
带正电(碱性):	K R H
带负电(酸性):	D E

[0147]

**保守取代 III**原始残基示例性取代

Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Ile, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met(M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp(W)	Tyr, Phe
Tyr (Y)	Trp, Phe, Tur, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0148] 可以引入到宿主细胞中的示例性核酸包括例如来自另一个物种的DNA序列或基因,或者甚至源自或存在于同一物种但通过基因工程改造方法掺入到接受者细胞中的基因或序列。术语“外源性”还意在指正常情况下在被转化的细胞中不存在的,或可能不能以转化DNA节段或基因中所发现的形式、结构等简单存在的基因,或者正常情况下存在的且需要按照与自然表达模式不同的方式表达例如过表达的基因。因此,术语“外源性”基因或DNA意在指被引入到接受者细胞中的任何基因或DNA节段,不管此类细胞中是否已经存在相似的基因。外源性DNA中包括的DNA类型可以包括该细胞中已经存在的DNA、相同类型生物体的另一个体的DNA、不同生物体的DNA,或外部产生的DNA(例如含有基因反义信息的DNA序列或编码合成或修饰的DNA型式的DNA序列)。

[0149] 根据本文所述途径开发的宿主菌株可以通过本领域已知的各种方法进行评估(参见例如,Studier(2005) Protein Expr Purif. 41 (1), 207-234; Gellissen, ed. (2005) Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Wiley-VCH, ISBN-10: 3527310363; Baneyx (2004) Protein Expression Technologies, Taylor&Francis, ISBN-10: 0954523253)。

[0150] 下调或沉默基因的方法是本领域已知的。例如,可以使用反义寡核苷酸、蛋白质适体、核苷酸适体和RNA干扰(RNAi)(例如小干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)和微小RNA(miRNA)下调或消除所表达的蛋白质活性(参见例如Fanning和Symonds(2006) Handb Exp Pharmacol. 173, 289-303G, 其描述了锤头核酶和小发夹RNA; Helene, C. 等人(1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660, 27-36; Maher(1992) Bioassays 14 (12): 807-15, 其描述了靶向脱氧核苷酸序列; Lee等人(2006) Curr Opin Chem Biol. 10, 1-8, 其描述了适体; Reynolds等人(2004) Nature Biotechnology 22 (3), 326-330, 其描述了RNAi; Pushparaj和Melendez(2006) Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 33 (5-6), 504-510, 其描述了RNAi; Dillon等人(2005) Annual Review of Physiology 67, 147-173, 其描述了RNAi; Dykxhoorn和Lieberman(2005) Annual Review of Medicine 56, 401-423, 其描述了RNAi)。RNAi分子可在市场上从多种来源获取(例如,Ambion, TX; Sigma Aldrich, MO; Invitrogen)。使用多种算法的几种siRNA分子设计程序是本领域已知的(参见例如,Cenix algorithm, Ambion; BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer, Invitrogen; siRNA Whitehead Institute Design Tools, Bioinformatics&Research Computing)。对于限定最佳siRNA序列有影响的特征包括siRNA末端的G/C含量、siRNA的特定内部结构域的Tm、siRNA长度、靶序列在CDS(编码区域)中的位置,以及3'悬垂物的核苷酸含量。

[0151] 制剂

[0152] 本文所述的剂和组合物可以使用例如Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R.Gennaro, Ed.), 第21版, ISBN: 0781746736 (2005) (其以引用方式整体并入本文中) 所描述的一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂, 通过任何常规方式进行配制。此类制剂将包含治疗有效量的本文所述的生物活性剂, 所述治疗有效量的本文所述的生物活性剂可以是纯净的形式, 可以与适量载体在一起, 以提供用于向受试者适当施用的形式。

[0153] 术语“制剂”指的是制备成适合于向受试者(例如人)施用的形式的药物。因此, “制剂”可以包括药学上可接受的赋形剂, 包括稀释剂或载体。

[0154] 如本文所用, 术语“药学上可接受的”可以描述不会引起不可接受的药理活性损失

或不可接受的不良副作用的物质或组分。药学上可接受的成分的实例可以是在United States Pharmacopeia (USP 29) 和National Formulary (NF 24), United States Pharmacopeial Convention, Inc, Rockville, Maryland, 2005 (“USP/NF”) 或更新版本中具有专题论文的那些,以及在不断更新的FDA中的非活性成分检索在线数据库中列出的组分。也可以使用USP/NF等中未描述的其他可用组分。

[0155] 如本文所用,术语“药学上可接受的赋形剂”可以包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂或吸收延迟剂。此类介质和剂用于药学活性物质的用途是本领域所熟知的(一般参见《雷明顿制药科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (A.R.Gennaro, Ed.), 第21版, ISBN: 0781746736 (2005)。除非任何常规介质或剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合物。还可以将补充活性化合物掺入到组合物中。

[0156] “稳定的”制剂或组合物可以指这样的组合物,其具有足够的稳定性,能够在诸如介于约0°C与约60°C之间的方便的温度下储存,持续商业上合理的时间,例如至少约一天、至少约一周、至少约一个月、至少约三个月、至少约六个月、至少约一年或者至少约两年。

[0157] 制剂应适合施用方式。根据本公开使用的剂可以通过已知的方法配制,以便通过几种途径施用于受试者,所述途径包括但不限于肠胃外、肺部、经口、外用、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、眼部、颊部和直肠。各种剂还可以与一种或多种额外的剂组合施用或者与其他生物活性或生物惰性剂一起施用。此类生物活性或惰性剂可以与一种或多种剂流体连通或机械连通或者通过离子、共价、范德华力、疏水、亲水或其他物理力连接于一种或多种剂。

[0158] 可以配制控释(或缓释)制品以延长一种或多种剂的活性并减少给药频率。控释制品也可用于影响作用开始时间或其他特征,例如剂的血液水平,从而影响副作用的出现。控释制品可以被设计成初始释放产生所需治疗效果的一定量的一种或多种剂,并逐渐且持续地释放所述剂的其他量,从而在较长时间内维持治疗效果水平。为了在身体内维持接近恒定的剂水平,可以使所述剂按照一定速率从该剂量形式中释放出来,所释放的剂将替换被身体代谢或从身体排泄的剂的量。剂的控释可以通过各种诱导因素如pH值变化以及温度、酶、水或其他生理条件或分子的变化来进行刺激。

[0159] 如本文所述的剂或组合物还可以与如下文进一步描述的其他治疗模式组合使用。因此,除本文所述的疗法之外,还可以向受试者提供已知可有效治疗所述疾病、病症或病状的其他疗法。

#### [0160] 治疗方法

[0161] 还提供了一种在有需要的受试者中用细胞基疗法(例如经基因工程改造的干细胞的分化后代)治疗疾病(例如自体免疫疾病、被自体免疫疾病破坏的组织、病原体、癌症、酶缺乏症或神经变性疾病),以及施用治疗有效量的细胞基疗法,以便在逃避自然杀伤细胞识别的同时用多能干细胞治疗疾病(例如病原体、传染病)的方法。

[0162] 进一步地,使用本发明的方法加以修饰以避免免疫排斥的ES细胞可以用于生成目前正在开发用于患者治疗的任何其他细胞类型。在减少或不需要免疫抑制剂的情况下,将此类分化细胞施用给需要此类细胞的患者。

[0163] 一般对有需要的受试者执行本文所述的方法。需要本文所述的治疗方法的受试者

可以是患有、被诊断患有、疑似患有组织损伤、病原体或传染病或有发生组织损伤、病原体或传染病风险的受试者。对治疗需求的确定通常根据与所讨论疾病或病状一致的病史和体格检查进行评估。通过本文所述方法可以治疗的各种病状的诊断属于本领域的技术范围。受试者可以是动物受试者(包括哺乳动物,如马、母牛、犬、猫、绵羊、猪、小鼠、大鼠、猴、仓鼠、豚鼠和鸡)和人。例如,受试者可以是人类受试者。

[0164] 一般而言,经基因工程改造的干细胞(例如经基因工程改造的多能干细胞)的安全有效量是例如可在受试者中产生所需治疗效果,同时使不良副作用减到最低的量。在各种实施方案中,有效量的来源于本文所述经基因工程改造的干细胞的浆细胞可以实质上抑制组织损伤、病原体或传染病,减慢组织损伤、病原体或传染病的进展,或者限制组织损伤、病原体或传染病的发展。

[0165] 根据本文所述的方法,施用可以是肠胃外、肺部、经口、外用、皮内、听小骨、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、眼部、颊部或直肠施用。

[0166] 当用于本文所述的治疗时,有效量的来源于经基因工程改造的干细胞(例如经基因工程改造的多能干细胞)的浆细胞可以按纯的形式使用,或者按药学上可接受的盐的形式(如果存在此类形式)并且与或不与药学上可接受的赋形剂一起使用。例如,本公开的化合物可以按适合于任何医学治疗的合理获益/风险比足量施用,以便实质上抑制组织损伤、病原体或传染病,减慢组织损伤、病原体或传染病的进展,或者限制组织损伤、病原体或传染病的发展。经基因工程改造的干细胞可以具有最低的免疫原性,从而逃避免疫系统的多个分支的识别。

[0167] 可与药学上可接受的载体组合以产生单一剂量形式的本文所述的组合物的量,将根据所治疗的宿主和特定的施用方式而变化。本领域的技术人员将能够理解,每种剂量形式的单个剂量中所包含的药剂的单位含量不需要其自身构成治疗有效量,因为通过施用多个单个剂量可以达到必要的治疗有效量。

[0168] 本文所述的组合物的毒性和治疗功效可以通过在细胞培养物或实验动物中测定LD<sub>50</sub>(致使50%群体死亡的剂量)和ED<sub>50</sub>(在50%群体中治疗有效的剂量)的标准药学程序进行确定。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其可以表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>,其中较大的治疗指数在本领域中一般被理解为是最佳的。

[0169] 任何特定受试者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括正在治疗的病症和所述病症的严重程度;采用的具体化合物的活性;采用的具体组合物;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用时间;施用途径;所采用的组合物的排泄速率;治疗持续时间;与所采用的特定化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域众所周知的其他因素(参见例如,Koda-Kimble等人(2004)Applied Therapeutics:The Clinical Use of Drugs,Lippincott Williams&Wilkins,ISBN 0781748453;Winter(2003)Basic Clinical Pharmacokinetics,第4版,Lippincott Williams&Wilkins,ISBN 0781741475;Sharqel(2004)Applied Biopharmaceutics&Pharmacokinetics,McGraw-Hill/Appleton&Lange,ISBN 0071375503)。例如,将组合物的起始剂量控制在低于达到所需治疗效果需要的水平,并逐渐增加剂量直至达到所需效果,这完全在本技术技术人员的能力范围内。如果需要,有效日剂量可以分成多个剂量以便于施用。因此,单剂量组合物可以含有此类构成日剂量的量或其约数。但是,应当理解的是,本公开的化合物和组合物的日总用量将由主治医师在合

理的医学判定范围内决定。

[0170] 同样,本文所述的每种病态、疾病、病症和病状以及其他情况均可从本文所述的组合物和方法中获益。一般而言,治疗一种病态、疾病、病症或病状包括预防或延迟可能患有所述病态、疾病、病症或病状或易患所述病态、疾病、病症或病状但尚未出现或显示其临床或亚临床症状的哺乳动物的临床症状的出现。治疗还可以包括抑制所述病态、疾病、病症或病状,例如阻止或减少疾病或其至少一种临床或亚临床症状的发展。此外,治疗可以包括缓解疾病,例如导致病态、疾病、病症或病状,或者它的临床症状或亚临床症状中的至少一者消退。待治疗的受试者的获益可以是统计学显著的,或者至少能够被受试者或医生感知。

[0171] 来源于经基因工程改造的干细胞的后代的施用可以作为单一事件发生,或在一段时间的治疗过程中发生。例如,经基因工程改造的干细胞的后代可以每日施用、每周施用、每两周施用或每月施用。对于急性病状的治疗,治疗的时间过程通常为至少几天。某些病状可能会使治疗从几天延长到几周。例如,治疗可以持续一周、两周或三周。对于更慢性的病状,治疗时间可能从数周延长至数月,甚至一年或更长时间。

[0172] 根据本文所述方法进行的治疗可以在组织损伤、病原体或传染病的常规治疗方法之前、同时或之后进行。

[0173] 经基因工程改造的干细胞的后代可以与另一种剂例如抗生素、抗炎药或另一种剂同时或依序施用。例如,经基因工程改造的干细胞的后代可以与另一种剂例如抗生素或抗炎药同时施用。同时施用可以通过施用单独的组合物进行,每种组合物含有经基因工程改造的干细胞的后代、抗生素、抗炎药或另一种剂中的一种或更多种。同时施用可以通过施用含有经基因工程改造的干细胞的后代、抗生素、抗炎药或另一种剂中的两种或更多种的一种组合物进行。经基因工程改造的干细胞的分化后代可以与抗生素、抗炎药或另一种剂一起依序施用。例如,来源于经基因工程改造的干细胞的细胞可以在施用抗生素、抗炎药或另一种剂之前或之后施用。

#### [0174] 施用

[0175] 本文所述的试剂和组合物可以根据本文所述的方法以本领域已知的各种方式施用。所述剂和组合物可以作为外源性材料或内源性材料治疗性地使用。外源性剂是在身体外部产生或制造并施用于身体的剂。内源性剂是通过某些类型的装置(生物或其他装置)在身体内部产生或制造,用于递送至身体内或递送至身体内其他器官的剂。

[0176] 如上文所讨论,施用可以是肠胃外、肺、经口、外用、皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、眼、听小骨内、颊部或直肠施用。

[0177] 本文所述的剂和组合物可以通过本领域众所周知的各种方法施用。施用可以包括例如涉及经口摄取、直接注射(例如,全身或立体定向)、被工程改造成分泌目标因子的细胞植入、释放药物的生物材料、聚合物基质、凝胶、可透过性膜、渗透系统、多层涂层、微粒、可植入基质装置、微型渗透泵、可植入泵、注射用凝胶和水凝胶、脂质体、胶束(例如,最多 $30\mu m$ )、纳米球(例如,小于 $1\mu m$ )、微球(例如, $1-100\mu m$ )、储库装置、上述任何一种的组合,或其他合适的递送媒介物的方法,以不同的比例提供所需的释放曲线。剂或组合物的控释递送的其他方法将是技术人员已知的,并且在本公开的范围内。

[0178] 递送系统可以包括例如输液泵,所述输液泵可以按照与将胰岛素或化疗药物递送至特定器官或肿瘤所用方式相似的方式施用剂或组合物。通常,使用这样的系统,可以将剂

或组合物与可生物降解的生物相容聚合物植入物组合施用,所述植入物在受控的时间段内在所选择的部位释放所述剂。聚合物材料的实例包括聚酸酐、聚原酸酯、聚乙醇酸、聚乳酸、聚乙烯乙酸乙烯酯以及它们的共聚物和组合。此外,控释系统可放置于治疗靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分。

[0179] 可以将剂封装于各种载体递送系统中并施用。载体递送系统的实例包括微球、水凝胶、聚合物植入物、智能聚合物载体和脂质体(一般参见Uchegbu and Schatzlein, eds. (2006) *Polymers in Drug Delivery*, CRC, ISBN-10:0849325331)。用于分子或生物分子剂递送的基于载体的系统可以:提供细胞内递送;调整生物分子/剂的释放速率;增加生物分子到达其作用部位的比例;改善药物向其作用部位的运输;允许与其他剂或赋形剂的共同局部沉积;改善剂的体内稳定性;通过降低清除率延长剂在其作用部位的停留时间;减少剂向非靶组织的非特异性递送;降低由剂引起的刺激;降低剂的高初始剂量引起的毒性;改变剂的免疫原性;降低给药频率、改善产品的味道;或提高产品的有效期限。

[0180] 药盒

[0181] 本文还提供了药盒。此类药盒可以包括本文所述的剂或组合物,并且在某些实施方案中,可以包括施用说明书。此类药盒可以使本文所述的方法容易执行。当以药盒形式提供时,所述组合物的不同组分或用于制备所述组合物的不同组分可以包装在单独的容器中,并在临使用前混合。组分包括但不限于祖细胞、通用多能干细胞的后代以及用于体外生成治疗细胞的试剂,例如IL-4、IFN $\gamma$ 、BMP4、bFGF、VEGF、IL-6、IGF1、IL-11、SCF或EP0。此类对组分的单独包装,如果需要的话,可以以小袋或分配装置形式呈现,所述小袋或分配装置可以包含一个或多个含有该组合物的单位剂量形式。该小袋可以例如包括金属或塑料箔,例如吸塑袋。此类对组分的单独包装在某些情况下还可允许长期贮存而不损失组分活性。

[0182] 药盒还可以包括在单独容器中的试剂,诸如待添加到单独包装的冻干活性组分中的无菌水或生理盐水。例如,密封的玻璃安瓿可以含有冻干组分,并且在单独的安瓿中含有无菌水、无菌生理盐水或无菌,它们均已在中性非反应性气体如氮气下包装。安瓿可以由任何合适的材料制成,例如玻璃、有机聚合物(例如聚碳酸酯、聚苯乙烯)、陶瓷、金属或通常用于盛放试剂的任何其他材料。合适的容器的其他实例包括可以用与安瓿相似的物质制造的瓶,以及可以由衬有箔的内部如铝或合金构成的包壳。其他容器包括试管、小瓶、烧瓶、瓶子、注射器等。容器可以具有无菌接入口,例如具有可以用皮下注射针刺穿的塞子的瓶子。其他容器可以具有两个用易移除的膜隔开的隔室,该易移除的膜在移除后允许组分混合。可移除的膜可以是玻璃、塑料、橡胶等。

[0183] 在某些实施方案中,药盒可以与说明材料一起供应。说明书可以打印在纸或其他基材上,和/或可以作为电子可读介质提供,例如软盘、小型CD-ROM、CD-ROM、DVD-ROM、Zip盘、录像带、录音带等。详细说明书可以与药盒无实际关联;相反,用户可以被引导到药盒的生产商或分销商指定的因特网站。

[0184] 本文所述的利用分子生物学方案的组合物和方法,可以根据本领域已知的各种标准技术(参见例如Sambrook和Russel (2006) *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879697717; Ausubel等人 (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*, 第5版, *Current Protocols*, ISBN-10:0471250929; Sambrook和Russel (2001) *Molecular Cloning:*

A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0879695773; Elhai, J. 和 Wolk, C.P. 1988. Methods in Enzymology 167, 747-754; Studier (2005) Protein Expr Purif. 41(1), 207-234; Gellissen, ed. (2005) Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems, Wiley-VCH, ISBN-10: 3527310363; Baneyx (2004) Protein Expression Technologies, Taylor & Francis, ISBN-10: 0954523253)。

[0185] 提供了本文所述的定义和方法,以更好地限定本公开并指导本领域一般技术人员实施本公开。除非另外指出,否则术语应由相关技术领域的普通技术人员按照常规用法来理解。

[0186] 在一些实施方案中,用于描述本公开的某些实施方案并对其提出权利要求的表示成分数量、性质(如分子量)、反应条件等的数字应被理解为在一些情况下被术语“约”修饰。在一些实施方案中,术语“约”用于表示数值包括用于确定该值的设备或方法的平均值标准偏差。在一些实施方案中,在书面说明书和所附权利要求书中所示的数字参数为近似值,其可以根据特定实施方案寻求获得的所需性质而变化。在一些实施方案中,数值参数应按照所报告的有效数位的数目并且通过应用惯常的四舍五入法来解释。尽管本公开的一些实施方案以宽范围示出的数字范围和参数为近似值,但是在具体实例中所示的数值尽可能精确地报告。在本公开的一些实施方案中展示的数值可包含因存在于其相应测试测量中的标准偏差而必然导致的某些误差。本文值的范围的列举仅仅旨在用作单独提及落入范围中的每个独立值的简写方法。除非本文另外指明,每个单独值均并入在本说明书中,就如其在本文中被单独地列举一样。

[0187] 在一些实施方案中,在描述特定实施方案的背景下(尤其是在以下某些权利要求的背景下)使用的术语“一个/种(a)”和“一个/种(an)”和“该/所述”和类似提法可以理解为涵盖单数和复数,另有具体说明的除外。在一些实施方案中,本文(包括权利要求书)所用的术语“或”用于表示“和/或”,除非明确表示仅指代备选项或备选项相互排斥。

[0188] 术语“包含(comprise)”、“具有(have)”和“包括(include)”是开放式连系动词。这些动词中一个或多个的任何形式或时态如“包含(comprise)”、“包含(comprising)”、“具有(has)”、“具有(having)”、“包括.includes)”和“包括(including)”也是开放式的。例如,“包含”、“具有”或“包括”一个或多个步骤的任何方法不限于只具有那一个或多个步骤,并且还可以涵盖其它未列出的步骤。相似地,“包含(comprises)”、“具有(has)”和“包括/includes)”一个或多个特征的任何组合物或装置不限于仅具有那一个或多个特征,并可以涵盖其它未列出的特征。

[0189] 本文中描述的所有方法可以按任何合适的顺序进行,本文另有说明或上下文明显矛盾的除外。与本文中某些实施方案相关提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“例如/如/诸如(such as)”)的使用,仅仅意在更好地阐述本公开,并且不对以另外方式要求的本公开的范围构成限制。说明书中的语言不应被理解为指示任何未要求保护的要素是实施本公开所必需的。

[0190] 本公开的替代要素或实施方案的分组不应被理解为限制。每个组成员均可单独提及并且单独地要求保护或者以与该组的其他成员或本文发现的其他要素的任何组合的方式要求保护。出于便利或专利性的原因,组的一个或多个成员可以包括在一个组中或从该

组中删除。当出现任何此类包括或删除时,本说明书在本文中应被认为含有已改变的组,从而满足所附权利要求书中所使用的所有马库什(Markush)组的书面描述。

[0191] 本申请中所引用的所有出版物、专利、专利申请和其他参考文献均通过引用整体并入本文用于所有目的,引用程度如同每篇单独的出版物、专利、专利申请或其他参考文献被具体而单独地指出通过引用整体并入本文用于所有目的。本文中参考文献的引用不应被理解为承认此类参考文献是本公开的现有技术。

[0192] 详细地描述本公开后,将显而易见的是在不脱离所附权利要求中所限定的本公开的范围的情况下,修改、变更和同等实施方案均有可能。此外,应当认识到,本公开中的所有实例均作为非限制性实例提供。

[0193] 实施例

[0194] 提供了以下非限制性实施例以进一步说明本公开。本领域的技术人员应该理解,下列实施例中公开的技术代表本发明人已发现在本公开的实施中运用良好的方法,因此可以被认为构成实施本公开的方式的实例。但是,本领域的技术人员应当根据本公开理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对所公开的具体实施方案进行许多改变,并且仍然获得相似或类似的结果。

[0195] 实施例1:人ES细胞分化为产生广泛中和抗体的可移植浆细胞

[0196] 以下实施例描述了将人ES细胞分化为产生广泛中和抗体的可移植浆细胞。

[0197] 骨髓长寿浆细胞在感染或接种疫苗后维持血清抗体。

[0198] 大多数临幊上使用的疫苗取决于中和抗体的产生和维持。因此,疫苗接种后保护作用的主要相关因素是免疫引发的浆细胞来源的抗体的数量、亲和力、表位特异性和持续时间。浆细胞是终末分化的B淋巴细胞,其每秒分泌数千个抗体分子,并将其转录组的近70%用于抗体合成。在T细胞依赖性抗体应答的前几天,浆细胞发生凋亡前只能存活几天。然后,表达亲和力逐渐升高的抗体的其他浆细胞从生发中心反应中产生。这些亲和力成熟的浆细胞可以持续长达数十年,并且大多存在于骨髓中。这些长寿的浆细胞可组成性地分泌抗体,而与抗原的存在无关并且没有细胞分裂,并且是体液免疫的主要决定因素。由于它们的抗体分泌多产率,已证实仅1 $\mu$ l的免疫血清(相当于来源于仅约3个抗原特异性长寿浆细胞的抗体)足以保护幼稚小鼠免受致命的西尼罗河病毒感染。本文所述的数据证明了这些细胞表达中和抗体时它们的保护效力。

[0199] 从hES细胞生成最终造血前体的方法。

[0200] 为了开发可扩展的抗原特异性可移植长寿浆细胞来源,使用了H1人类胚胎干细胞。这些是最好的特征化人ES细胞,具有最小的谱系偏倚,并且易于生成造血细胞。造血作用发生至少两个不同波次:原始和最终。原始造血作用生成一组受限的红系谱系和髓系谱系。相反,最终造血作用最终产生包括淋巴细胞在内的成年型血细胞。因此,hES细胞工作的主要治疗目标是生成最终造血前体。按照Sturgeon等人,Nat Biotech,2014所述,优化了使用H1 hES细胞可重复地生成最终造血内皮(最终造血细胞的前体)的方法。该方法在中胚层诱导过程中采用信号的顺序操作,包括该过程的第2天时规范WNT信号激活的关键步骤(参见例如图1A)。这最终容许甚至用缺乏这种潜能的多能细胞系生成T细胞((参见例如图1B))。重要的是,这些分化是在限定的无血清条件下进行,从而使重现性最大化并实现简便的故障排除。

[0201] 开发用最终造血前体产生B细胞的途径。

[0202] 生成最终造血祖细胞后,探索了使这些前体分化为B细胞的方法。迄今为止,鲜有研究报道从人ES细胞分化为稳健的B细胞,这些途径要么不能生成成熟的B细胞,要么只能在一种特定的iPS系上进行。这些途径均未使用限定的条件,并且对这些途径进行调整以适应于当前测试的任何hES细胞系均未成功。因此,生成了造血内皮的组合(参见例如图1),然后表达PAX5(B谱系促进转录因子)。用编码组成性表达rTTA-T2A-GFP(经由核糖体跳跃2A序列连接至报道基因的多西环素诱导型转录激活因子)和受多西环素诱导型启动子驱动的PAX5的慢病毒载体转导最终造血内皮细胞(参见例如图2A)。因此,转导的细胞组成性地表达rTTA和GFP,但仅在多西环素处理后表达PAX5。与F1t3L、SCF、IL7和MS5基质细胞共培养20天后,仅在多西环素处理后观察到B细胞(参见例如图2B)。因此,限定的转录因子表达能够通过其他顽强的祖细胞促进B淋巴细胞生成。

[0203] CRISPR/Cas9介导流感特异性抗体基因引入到hES细胞的内源基因座中。

[0204] 先前用hES细胞生成B细胞的尝试,已经得到无表面抗原受体表达的不成熟淋巴细胞。为了解决这个问题并为发育中的B细胞提供病原体特异性,分别生成了含有来自FI6(一种广泛中和流感特异性抗体)的VDJ和VJ序列的靶向盒和吉欧霉素(zeocin)与潮霉素耐药盒(参见例如图3A)。将这些靶向盒与Cas9和导向RNA(gRNA)一起核转染至H1 hES细胞中,以靶向内源性免疫球蛋白重链和κ轻链基因座(也可以使用ZFN或TALEN)。选择吉欧霉素和杀稻瘟素耐药的细胞,并进行PCR分析以确认正确的靶向作用(参见例如图3B)。然后,用编码Cre重组酶的构建体转染这些细胞,并分离出缺乏耐药盒的亚克隆(参见例如图3C,该图示出了用FI6基因靶向的IgH和Igk的PCR确认以及耐药盒的去除)。

[0205] 从B细胞生成长寿浆细胞的方法。

[0206] 最近鉴定了促进从B细胞体内形成长寿而不是短寿浆细胞的信号。结果表明,长寿浆细胞比短寿对应物输入高很多的葡萄糖。这种升高的葡萄糖摄取促进了升高的抗体分泌和线粒体丙酮酸盐用于呼吸作用,这是浆细胞长期持续所必需的。目前认为,升高的葡萄糖摄取是实现短寿浆细胞与长寿浆细胞前瞻性分离的唯一已知性质。通过外源性因子的体外筛选,发现IFN $\gamma$ 和IL-4可促进葡萄糖摄取(参见图4)。

[0207] 评估浆细胞寿的异种移植模型。

[0208] 除上述工作外,几种方案还报告了能够延长人类浆细胞体外存活的方法。然而,针对人类浆细胞的异种移植模型的缺乏妨碍了体内存活率的分析。为了解决这个问题,开发了一个系统,其中将来自人骨髓的粘附成纤维细胞/间充质干细胞皮下移植到免疫缺陷的NOD-SCID IL2r $\gamma$ 中<sup>-/-</sup>(NSG)小鼠中。移植后约8周形成骨样听小骨,提供了完整的人体微环境。这些听小骨稳健地支持正常的人类造血以及原发性骨髓恶性肿瘤,其中一些以前从未在异种移植植物中生长。为了检验这些听小骨是否也支持正常浆细胞存活,向听小骨中直接注入1-5x 10<sup>6</sup>原代人骨髓CD138<sup>+</sup>浆细胞。在移植后第2和第4周观察到血清人IgG,且在这些时间点之间抗体浓度没有下降(参见例如图5A)。在第4周时,收获听小骨进行浆细胞的流式细胞(参见例如图5B)和ELISPOT(数据未显示)分析。在所有注射的听小骨中均观察到抗体分泌细胞。这些数据证明人听小骨支持正常的长寿浆细胞存活和功能。据信这是该类别的第一个此类系统。

[0209] 从hES细胞生成病原体特异性B细胞。

[0210] 使用限定的转录因子表达驱动从FI6敲入hES细胞起的B细胞发育,如图2至图3所示。基因组整合的慢病毒的使用可以提供棘手的翻译策略。仅在分化和谱系定型需要时,方可使用此类非整合的途径(例如修饰的RNA)暂时性地引入因子。为此,PAX5表达介导具有EBF1的正反馈回路,以维持B谱系定型。因此,外源性PAX5的短暂表达可以引发内源性PAX5表达的稳定维持。为了确定外源性PAX5表达促进B细胞定型的窗口,仅在与MS5细胞共培养的D1-7、D8-14或D15-21施用多西环素。将用编码EBF1的慢病毒进行类似试验。将通过流式细胞术鉴定CD19<sup>+</sup>B细胞,并使用血凝素四聚体试剂或使用本领域已知的方法和试剂确认流感特异性IgM的表达。

[0211] 如果能够发生B-1a细胞的优先发育,则Pax5表达在本系统中可促进B谱系定型。这些表达CD5的B-1a细胞来源于早期胎儿前体,而不是源自成人干细胞。B-1a细胞尚未显示出具有生成长寿浆细胞的能力。如果在PAX5培养中观察到占优势的B-1a细胞分化,则可以使用Notch信号使造血内皮细胞朝向最终血细胞生成进一步分化。如上所示,当与表达Notch配体δ样4(DL4)的OP9细胞共培养时,造血内皮生成T细胞。Notch配体分两个阶段促进T细胞发育。首先,Notch信号对于促进最终血细胞生成至关重要。其次,Notch信号可促进从造血祖细胞起的T细胞定型。为了确定最终造血所需的Notch信号传导窗口,将用多西环素诱导型PAX5慢病毒载体转导造血内皮,然后在OP9-DL4细胞上共培养1-10天。已经证实这种短暂周期的Notch信号传导促进HSC样细胞,从该细胞得到常规的B-2和B-1b细胞。将通过FACS纯化转导的细胞并将其转移至MS5细胞中,以便在多西环素存在下进行B细胞分化20天。将检查B细胞的CD5表达以量化B-1a频率。

[0212] 从成熟的人B细胞产生长寿浆细胞。

[0213] 除了如上所述的那样产生成熟的B细胞外,原代扁桃体幼稚B细胞还被用来采用本发明的方法优化向长寿浆细胞的分化。将CD20<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>B细胞分选到表达人CD40L和BAFF的NIH 3T3细胞上。将IL-4或IFNγ以1-100ng/ml的浓度添加到培养物中。在第6天时,将CD38<sup>高</sup>CD27<sup>高</sup>成浆细胞/浆细胞经静脉内或直接注射到NSG小鼠的听小骨中,如图5所示。每两周对血清人IgG取样。如果在8-16周内维持血清抗体,则处死动物并收获听小骨进行流式细胞和ELISPOT分析,如图5所示。

[0214] 尽管葡萄糖摄取升高,但存在体外来源的浆细胞在体内移植后不能持久的可能性。将与上面概括的体外培养途径平行地采用他人报告的培养方法。可以使用Transwell培养方法,其中浆细胞可以体外维持数月时间。在这个途径中,将成纤维细胞L细胞工程改造成表达CD40L,并在IL-21存在下培养细胞。在后面的时间点处,通过Transwell过滤器将浆细胞与基质细胞分离。通过定期更换培养基,这些细胞可以达到静止状态并可以维持数月时间。使用这种分化系统,浆细胞将被移植到听小骨中以供长期体内维持。

[0215] 感染(例如流感)的治疗。

[0216] 使hES细胞分化为长寿的浆细胞,然后将其移植到携带人听小骨的NOD-SCID-IL2rg(NSG)小鼠内,以便在动物模型中验证该方法。这些听小骨是在给小鼠移植来自人骨髓的间充质细胞后形成的(如上文所述)。在一周或更多周后(使流感特异性抗体浓度升高的足够时间),用正常情况下对NSG小鼠致命的流感剂量感染这些小鼠。然后,测定小鼠的存活率和流感病毒负荷。

[0217] 对于在人类中的治疗使用,预防性施用修饰成长寿浆细胞(能够避免免疫排斥)的

hES细胞作为疫苗。

[0218] 慢性感染的治疗。

[0219] 将NSG幼鼠与脐带血CD34+细胞(静脉内)和间充质细胞(如上所述)同时重构以形成听小骨。在T细胞重构后,然后将使小鼠感染HIV以击中人类CD4+T细胞,然后将移植广泛中和HIV特异性浆细胞。将测定HIV滴度和抗体,以了解正在进行的感染被抑制的程度。可以采用Halper-Stromberg等人在2014Cell 158(5) 989-999中所述的小鼠模型。一旦发育出通用细胞,就可以在非人类灵长类动物和SIV中进行测试。

[0220] 对于治疗使用,将本发明的细胞施用于慢性感染患者,而不管该病毒是活跃的还是休眠的。

[0221] 酶替代疗法。

[0222] 使用了Hurler综合征的小鼠模型(Clark等人,1997Science 6(4) 503-11),其中存在 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶缺失性。全身性酶替代对Hurler综合症有治疗作用。将小鼠模型与NSG杂交,形成听小骨(如上所述),并移植被工程改造成分泌 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶而不是抗体的浆细胞(通过基因替换或A $\beta$ 基因下游的IRES敲入)。测量酶浓度和脑神经病理学(例如,溶酶体扩张)。

[0223] 癌症的治疗。

[0224] 给NSG/听小骨小鼠(如上所述)移植原发性非霍奇金淋巴瘤,然后施用表达美罗华的浆细胞(Chao等人2010Cell 142(5) 699-713)。通过组织学和流式细胞术对肿瘤负荷进行定量。如果内置了自杀基因,当残留疾病消失时可以去除浆细胞。

[0225] 自身免疫性疾病的治疗。

[0226] 给NSG/听小骨小鼠移植表达舒立瑞/依库珠单抗的浆细胞。用抗Gq1b抗体治疗这些小鼠,并测量运动功能和瘫痪状态。Halstead等人(2008 131(Pt5) 1197-208)描述了自身免疫性疾病的这种小鼠模型。

[0227] 使用治疗性抗体的治疗。

[0228] 本公开的细胞和方法可以用于治疗需要治疗性抗体的受试者。例如,治疗性抗体可以在修饰的ES细胞上过表达,如本文所述。例如,通过将本发明的修饰的ES细胞工程改造表达治疗性抗体,例如阿杜那单抗(aducanumab)以避免A $\beta$ 斑块的累积,可以实现对阿尔茨海默病的治疗。

[0229] 材料和方法。

[0230] 本文所述的这些研究使用H1(WA01,NIH注册号#0043)细胞(一种雄性来源的细胞系)进行修饰和分化。但是,所有小鼠实验都使用雄性和雌性,并且作为变量包含在实验中。此外,供体异种移植物均来自雄性和雌性。进行Y染色体PCR以确定匿名供体的性别,并将这些数据作为变量再次包括在分析中。

[0231] 程序描述:hES细胞分化和遗传修饰的大部分工作在体外进行。将用适量的免疫受损的NOD-SCID/IL2r $\gamma$ c缺失性(NSG)小鼠作为听小骨和浆细胞以及畸胎瘤的接受者。将较少量的野生型C57B16小鼠用作畸胎瘤接受者。接受者将为8周大,两种性别均有。

[0232] 在小鼠中进行的这些研究是基于细胞的疫苗临床开发的前奏。以前在小鼠中的研究已经被证明与此类应用高度相关,并且对小鼠免疫力的细胞、分子和遗传方面也了解甚多。考虑到潜在的好处,可以相对较低的成本有效地在小鼠中进行研究。

[0233] 缓解疼痛或不适的程序:尽最大努力确保小鼠的疼痛和不适水平为最低。用吸入异氟烷将小鼠麻醉,然后进行眼眶后注射。处死畸胎瘤直径为20mm的小鼠。处死出现疾病的小鼠,并在动物设施中按常规使用前哨笼。

[0234] 根据美国兽医协会安乐死小组的建议,通过吸入一氧化碳将小鼠安乐死。

[0235] 实施例2:对人ES细胞进行遗传修饰以降低免疫原性

[0236] 以下实施例描述了用于降低免疫原性的人ES细胞的遗传修饰。

[0237] 通用供体hES细胞是很多领域的目标,但免疫学障碍是巨大的。人多能干细胞可以无限生长,因此解决了浆细胞疗法可扩展性的一个方面。但是,除非干细胞系是自体的,否则必须进行免疫抑制以阻止移植物排斥。这几乎肯定会将此类疗法限制于直接危及生命的疾病。自体iPS疗法虽然可能不会受到免疫排斥,但无法扩展到普通人群。为了解决这些问题,本文提出创建“通用”供体细胞系。这些细胞系已从基因上去除其免疫原性,从而使来源于单一细胞系的细胞和组织能够被移植到任何接受者。已经证明HLA表达的去除是此类通用供体细胞系的要求,但是小鼠同种异体移植研究表明,仅此一项不足以预防排斥。随后的研究表明抗体、补体、NK细胞和吞噬细胞是移植物排斥的其他介质。从HLA缺失性细胞系开始,已鉴定出hES细胞对这些其他免疫排斥介质中的每一种的反应。

[0238] 材料和方法如上文所述,另有说明的除外。

[0239] HLA缺失性hESC细胞系的生成。

[0240] 优化了稳健的工作流程,以便在人ES细胞中产生靶向突变。将Cas9表达构建体和多达3种不同的gRNA编码载体共转染到H1人ES细胞中。手动挑选单个菌落,并对靶基因进行MiSeq分析,以鉴定携带因非同源末端连接错误引入的移码突变的克隆。然后,通过荧光激活细胞分选(FACS)将候选克隆按1个细胞/孔精确地铺板,并再次进行MiSeq分析,以确认突变和缺乏嵌合性(参见例如图6A)。接下来,将克隆扩增,进行核型分析,并确认它们分化为造血谱系的潜能。通过基于CRISPR/Cas9的靶向突变,产生了缺乏HLA表达的核型正常的hES细胞系。通过靶向区域的MiSeq分析鉴定出一个克隆,其在 $\beta2m$ 和TAP1的两个等位基因以及和CD74的一个等位基因中携带失活突变(参见例如图6B)。在该克隆中,干扰素- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )诱导的HLA-I表达被完全消除(参见例如图6C),并确认了正常核型。该HLA-I缺失性细胞系来源的单核细胞未能刺激同种异体原代CD8 $^{+}$ T细胞增殖(参见例如图6D,该图显示表明HLA-I缺失性hES细胞后代不能刺激T细胞)。随后,使用CRISPR重新靶向这种HLA-I缺失性细胞系,以消除CD74的其余等位基因和CIITA的两个等位基因(HLA-II表达所需的转录因子)。该克隆也被确认具有正常核型。随后的分析确认,每次遗传修饰后细胞都保留了造血潜能,并且衍生的单核细胞缺乏可检测到的HLA-II表达(参见例如图6E,该图显示CIITA/CD74缺失性细胞不能表达HLA-II)。

[0241] 靶向AAVS的免疫逃避盒的生成。

[0242] 据认为,HLA-I表达的消除使细胞易发生NK细胞裂解。激活受体NKG2D的配体被消除(见下文)。但是,NKG2D阻断仅去除约50%的NK细胞介导的特异性裂解。因此,将采取额外的步骤进一步消除NK细胞反应性,例如通过使与肽和 $\beta2m$ 共价连接形成单链三聚体的HLA-E和HLA-G表达。这些三聚体不与内源性HLA交换肽或 $\beta2m$ ,并抑制表达NKG2A和ILT2的NK细胞。免疫应答的其他方面(包括抗体结合、补体沉积和巨噬细胞吞噬)也可能导致排斥反应。为了解决和逃避这些免疫机制中的每一个方面,构建了一套多顺反子载体用于靶向人AAVS基

因座(参见例如图表7A表1)。这个基因座被认为是免受沉默的“安全港”。流式细胞分析确认了HLA缺失性hES细胞中的表达,参见例如图7B)。免疫逃避和自杀基因及靶标的总结可见表1。

[0243] 表1.在AAVS基因座中可以表达的人和小鼠基因。

基因名称	抑制的途径/细胞类型
HLA-E 单链三聚体(小鼠中的 Qa1)	NKG2A+NK 细胞
HLA-G 单链三聚体(仅人)	ILT2/KIR2DL4+NK 细
K-b 单链三聚体(仅小鼠)	Ly49C+NK 细胞
CD46/Crry (在小鼠中)	补体/C3b 和 C4b
CD55	补体/C3 转化酶
CD59	补体/C9
CD47	吞噬
<b>需递送至 AAVS 位点的自杀基因</b>	
基因名称	诱导死亡的药物
iCasp9	AP1903
HSV 胸苷激酶	更昔洛韦

[0245] 通过转染至CHO细胞中并通过流式细胞术评估免疫逃避基因的表达,验证了靶向构建体。结果表明,人CD55和HLA-E单链三聚体显示出紧密的共表达(参见例如图8A),确认了图7中2A序列和构建体1(SEQ ID NO:1)的功能。为了确认所插入的基因产物的正确功能,通过新霉素选择鉴定了稳定的表达hCD55的CHO细胞系。然后,用抗CHO抗体将这些细胞染色,与人C7缺失性血清一起温育,最后针对C3c、C3d和C4c沉积进行染色。hCD55和hCD46的表达消除了补体沉积,而培养物中的残留hCD55-细胞显示出稳健的补体沉积(参见例如图8B)。这些数据确认了hCD55转基因的功能性。为了确认HLA-E单链三聚体正确地发挥作用,在721.221细胞中生成了稳定的细胞系(一种易受NK细胞影响的靶标细胞系)。正如通过细胞表面CD107a染色所测量的,未经修饰的721.221细胞与原代PBMC一起温育会导致稳健的NK细胞脱粒。但是,与表达HLA-E的721.221细胞共温育可特异地抑制NKG2A+NK细胞脱粒(参见例如图8C)。

[0246] NKG2D配体缺失性hES细胞的生成。

[0247] 由于HLA-I的缺乏可能使靶细胞易遭受NK细胞介导的细胞裂解,因此通过CRISPR/Cas9靶向NKG2D配体。其中,RNA-seq分析表明只有MICA和MICB在长寿浆细胞中被表达。约400个核转染克隆的初步测序显示有一个细胞系在MICA和MICB的2个等位基因中携带移码突变,在另一个染色体中存在一个大缺失,从而在MICA和MICB之间产生了框内融合(图11A)。将这种MICA/B融合用CRISPR/Cas9重新靶向,以生成一个在MICA和MICB的全部4个等位基因中均有移码突变的克隆(图11B)。验证了这种克隆的正常核型。自此以后,将HLA、MICA/B缺失性hES细胞称之为HM-KO hES。

[0248] HLA/MICA+MICBKO (HM-KO) hES细胞中稳定AAVS免疫逃避转染子的生成。

[0249] 从HM-KO hES细胞开始,进行了两组核转染。一组核转染是用图7A中所示的人免疫逃避盒进行,而另一组核转染是用小鼠免疫逃避盒(mAAVS)进行。将这些构建体与Cas9表达构建体和靶向AAVS基因座的gRNA共转染。选择具有新霉素和嘌呤霉素耐药的细胞,并通过流式细胞术确认基因的表达(参见例如图7B)。

[0250] 测试体内畸胎瘤形成。

[0251] 为了在体内测试人免疫逃避,制造了人源化NSG W41小鼠。将约 $2 \times 10^5$ 个脐带血CD34+细胞(从Saint Louis脐带血库获得)移植到未预处理的NSG W41小鼠(参见例如图9A)中。对小鼠放血以确认人类重组,将每种形式的修饰hESC的100万个细胞包埋在基质胶中,并皮下移植到人源化NSG-W41小鼠中。在12周的过程中监测畸胎瘤生长,或监测畸胎瘤生长直到肿瘤达到20mm的质量,然后对小鼠实施安乐死。接种HLA缺失性细胞的人源化小鼠形成畸胎瘤,但是接种未经修饰的hES细胞的人源化小鼠未形成畸胎瘤(参见例如图9B,该图显示HLA-KO hES细胞逃避了人源化小鼠产生的排斥)。在某些实验中,将用AP1903处理小鼠以激活iCasp9并引发畸胎瘤消退。免疫应答的某些方面在人源化NSG W41小鼠中不起作用。例如,NK细胞在该体系中形成较差,抗体应答极少。因此,将使用稳定表达mAAVS构建体的HM-KO细胞进行C57B16小鼠的畸胎瘤测定。在这种异种环境中,预计排斥反应会延迟。

[0252] 预计经修饰hES细胞逃避免疫识别,因此在人源化NSG-W41小鼠中形成畸胎瘤。

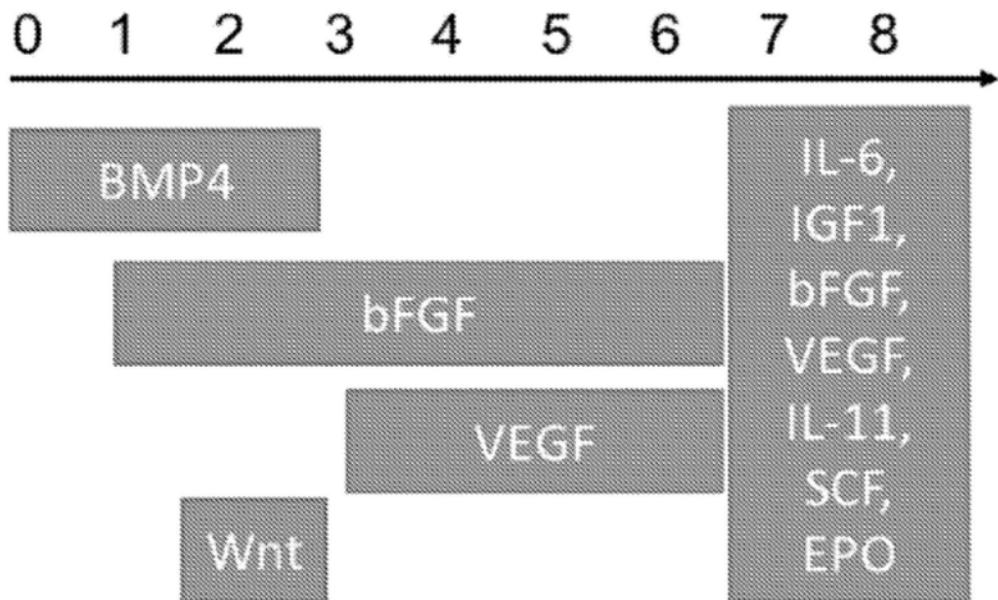


图1A

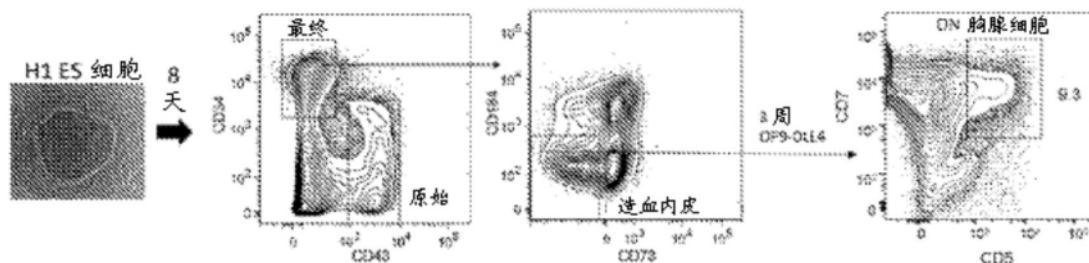


图1B

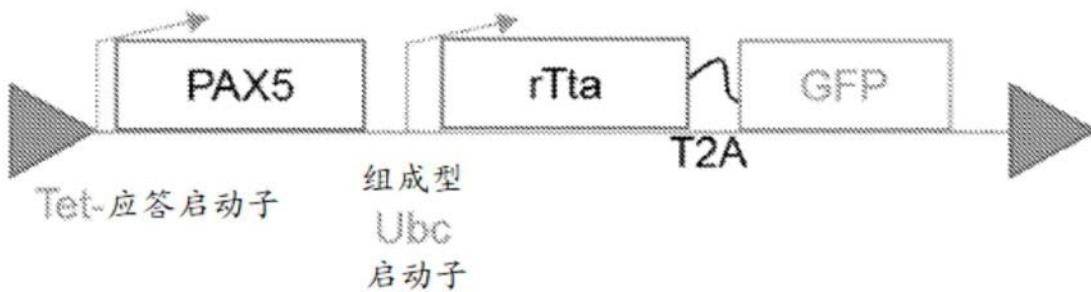


图2A

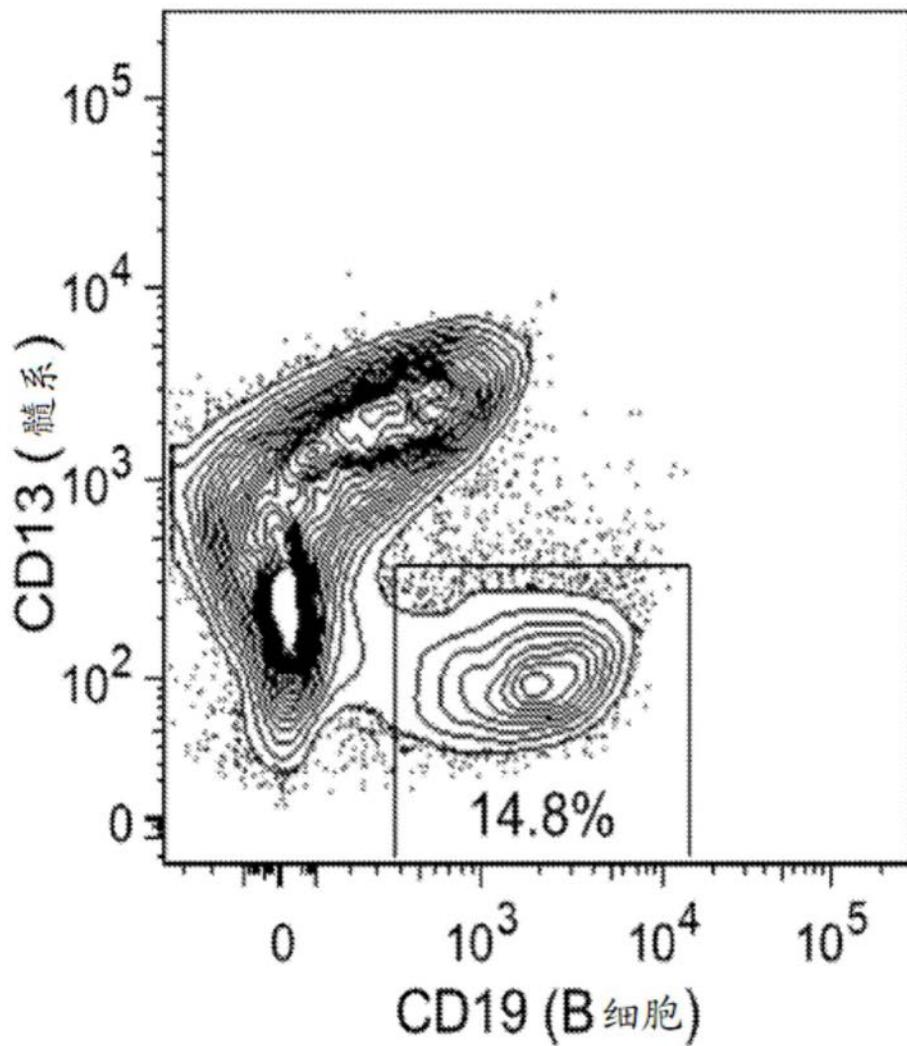


图2B

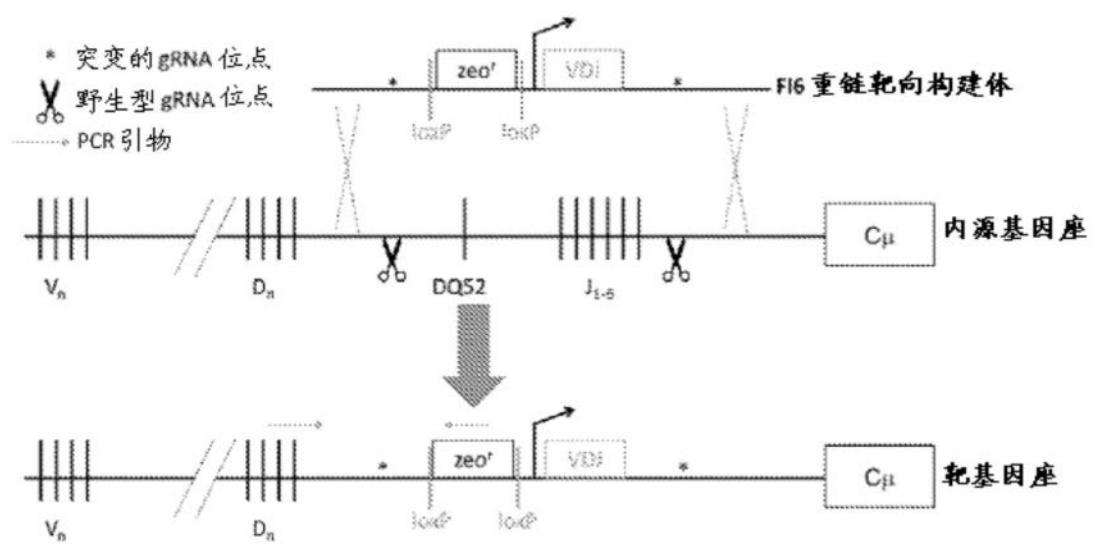


图3A

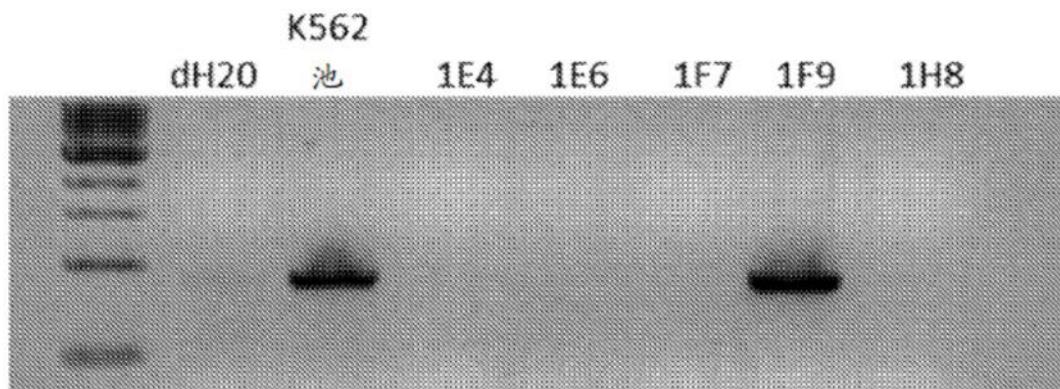
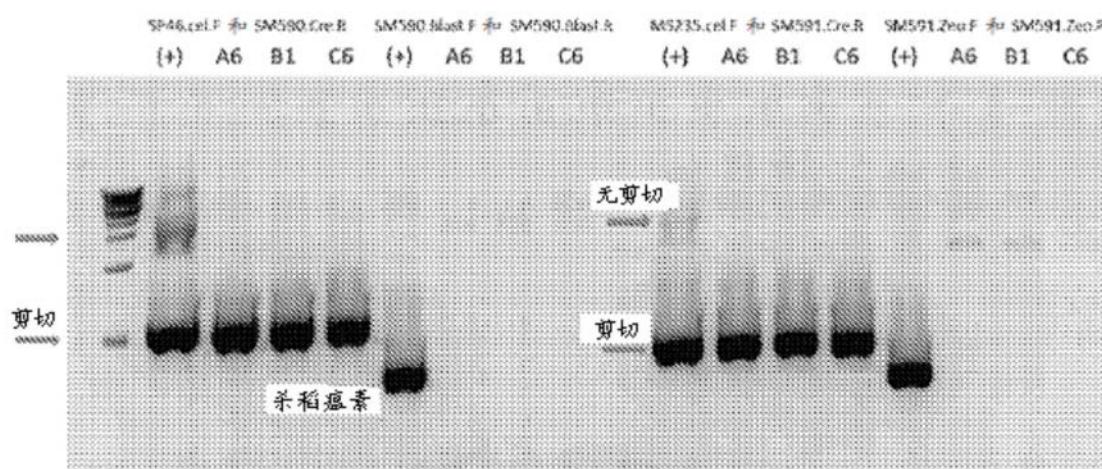


图3B



(+) : Cre 核转染池

阳性  
无剪切 : 1562 bp  
剪切 : 479 bp  
杀稻瘟素盒 : 258 bp

阴性  
无剪切 : 1689 bp  
剪切 : 577 bp  
Zeo盒 : 387 bp

图3C

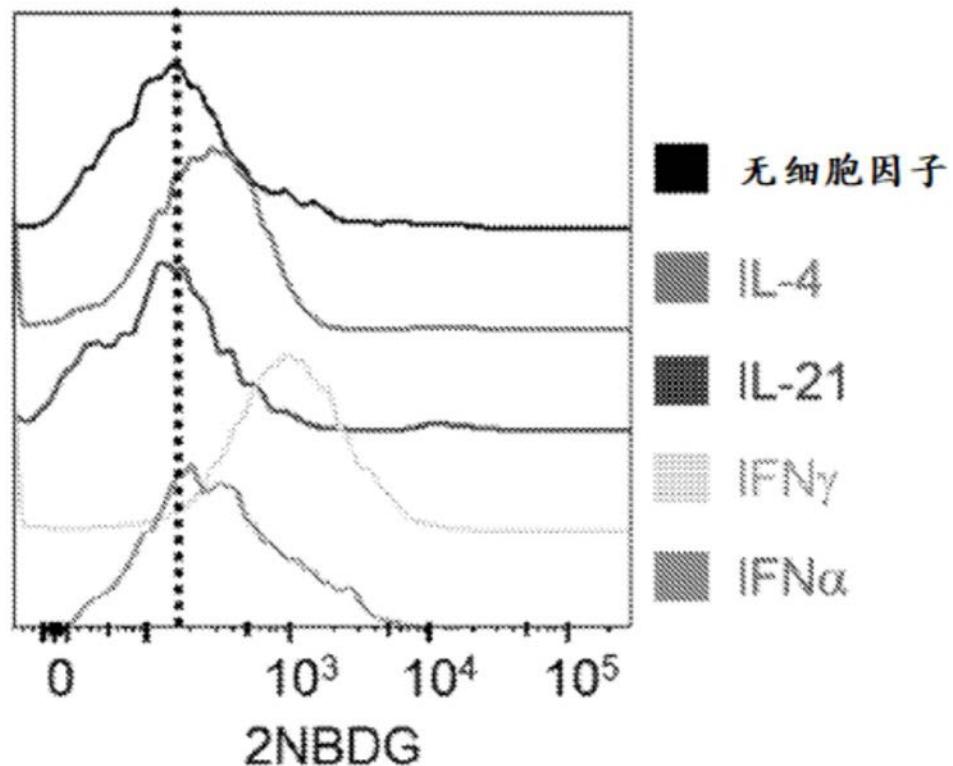


图4

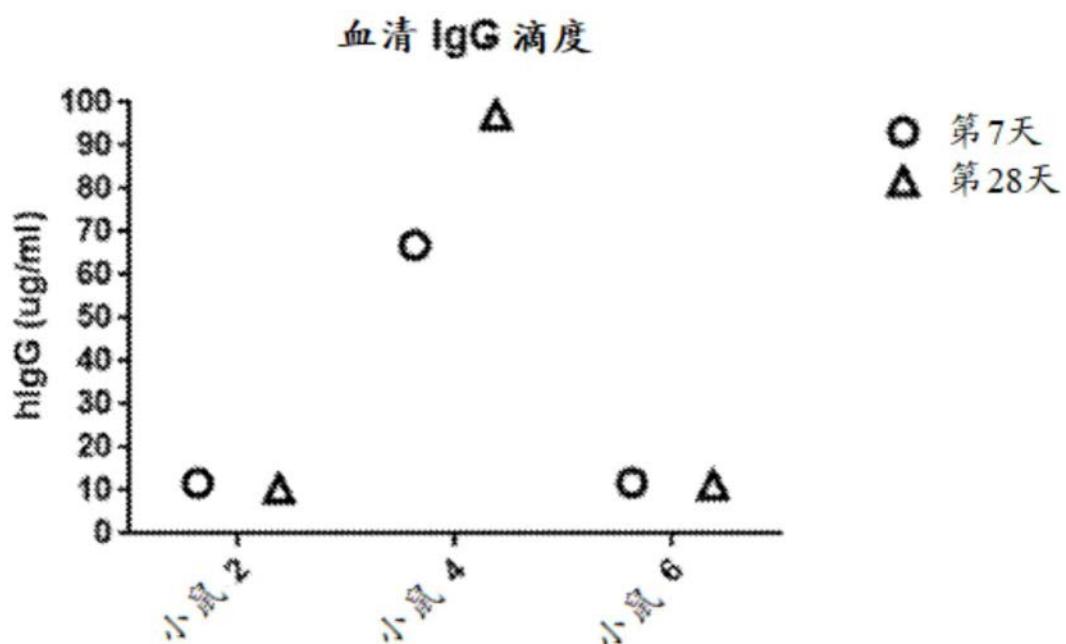


图5A

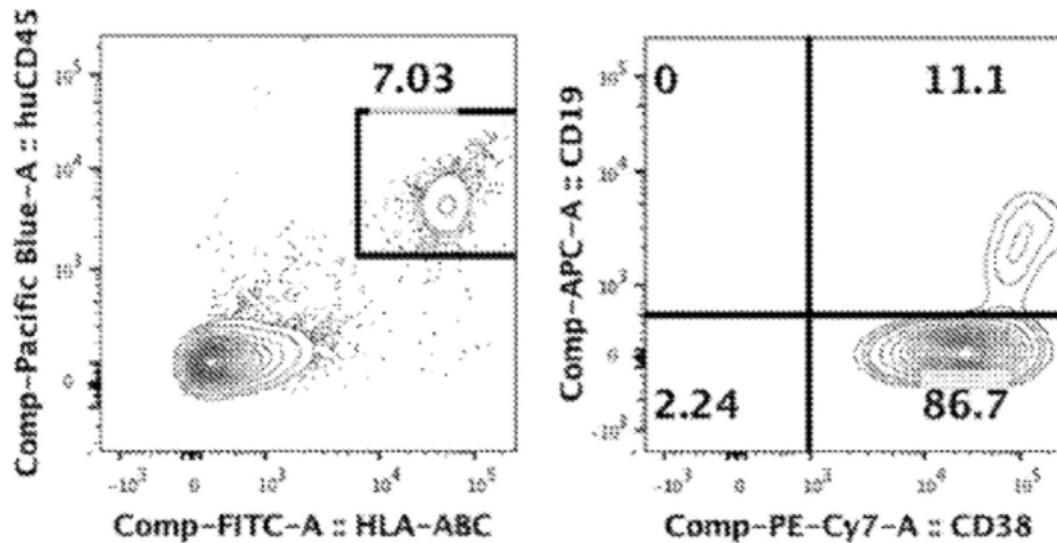


图5B

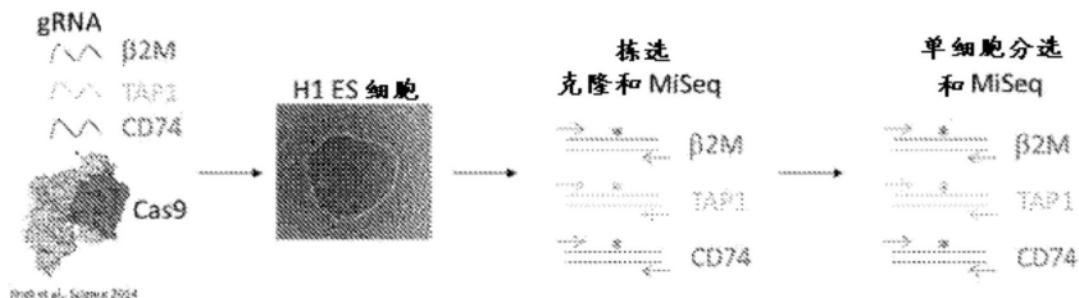


图6A

HLA-I			HLA-II		
<i>TAP1</i>		<i>β2M</i>		<i>CD74</i>	
读数	总计 %	读数	总计 %	读数	总计 %
-2 bp Del	294 50	+5 bp Ins	248 53	-9 bp Del	457 59
+1 bp Ins	287 49	-1 bp Del	216 47	-10 bp Del	317 41
WT	3 0.5	总计	464	总计	774
总计	584				

图6B

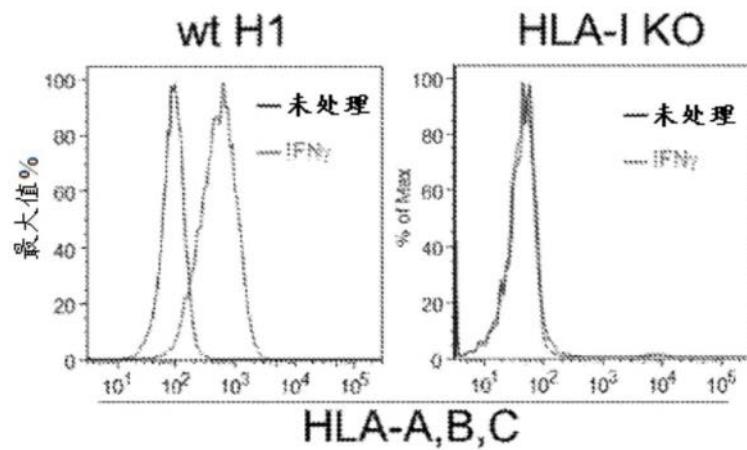


图6C

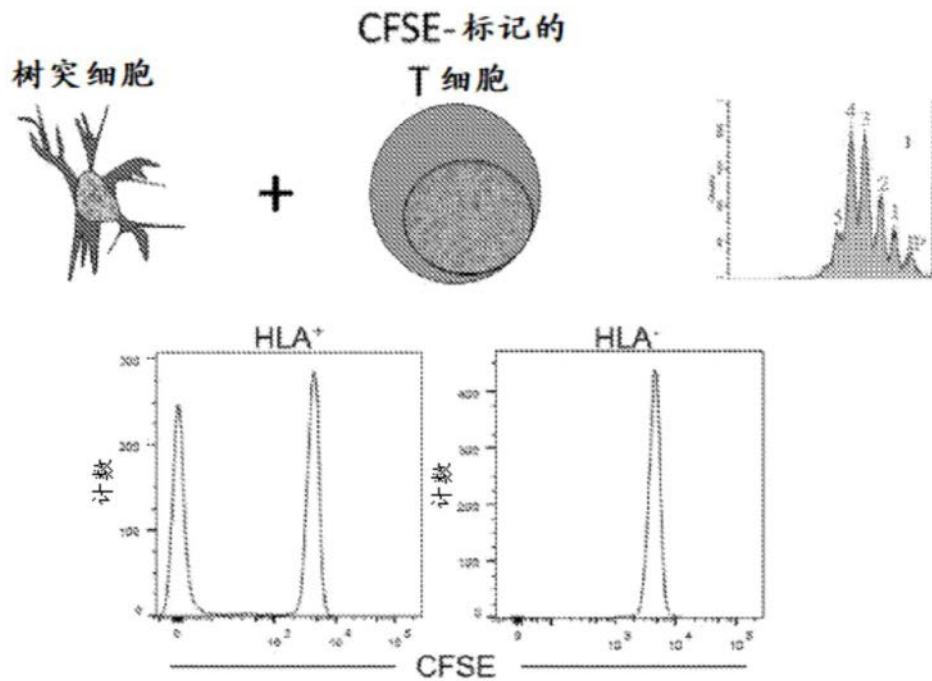


图6D

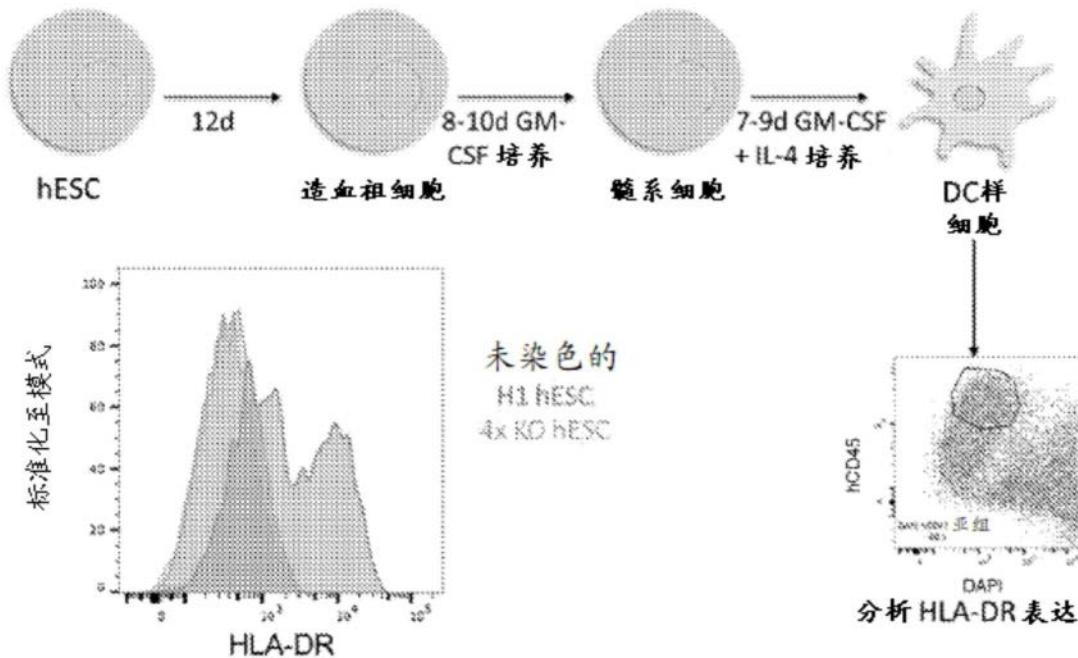


图6E

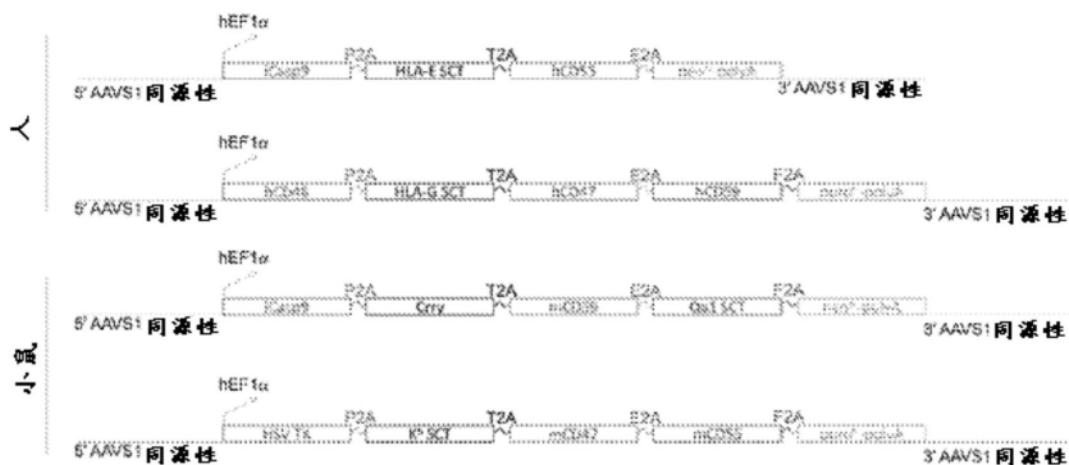


图7A

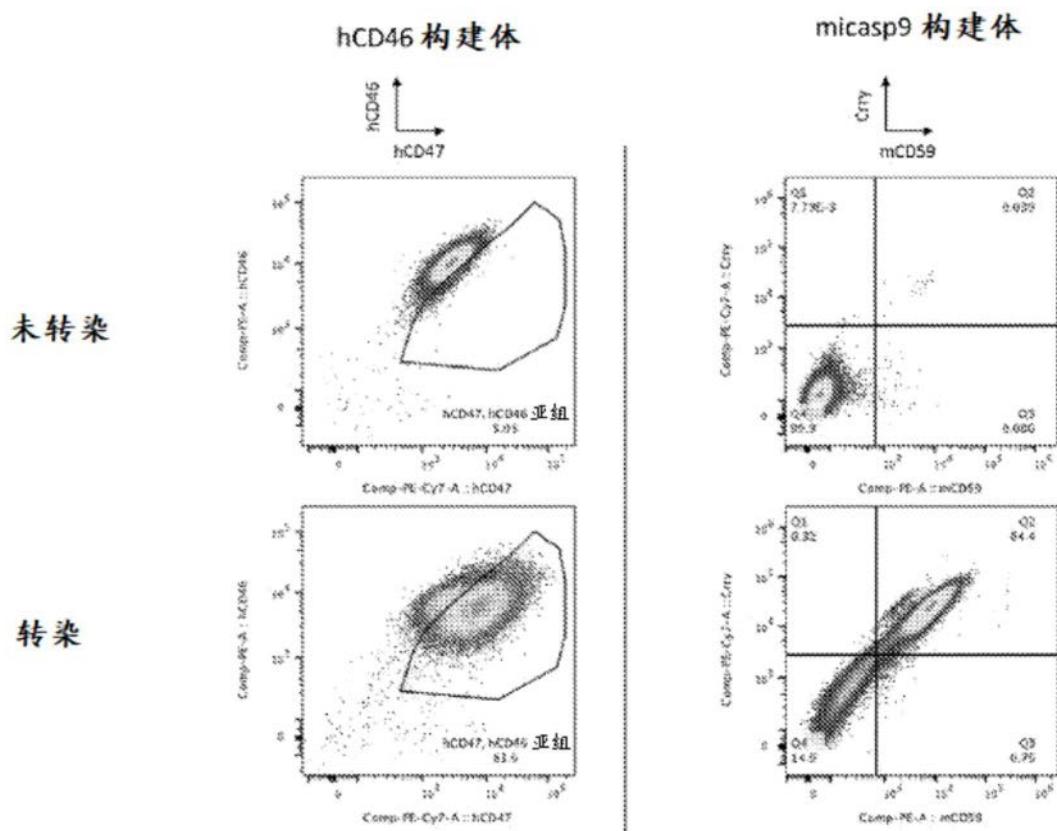


图7B

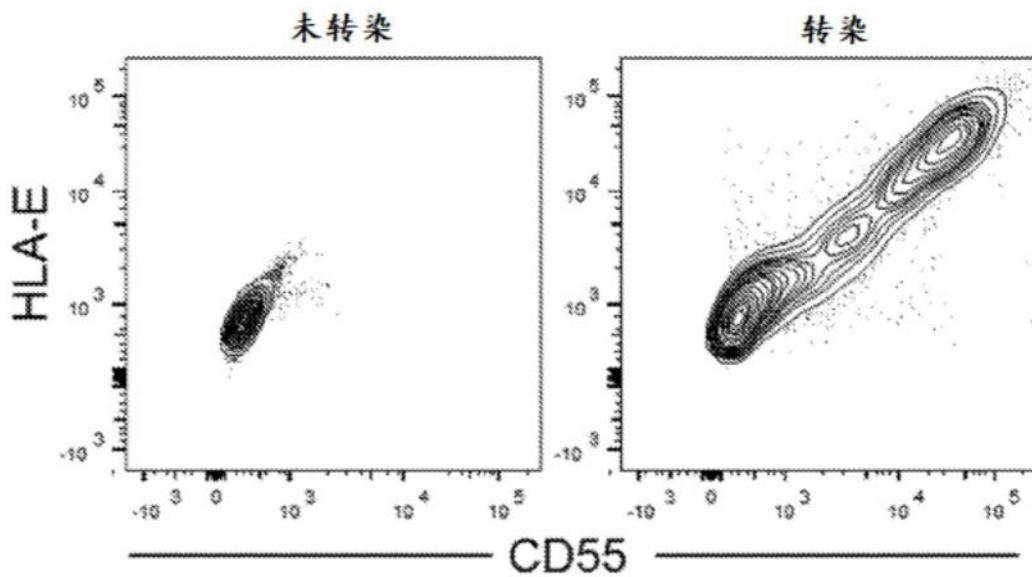


图8A

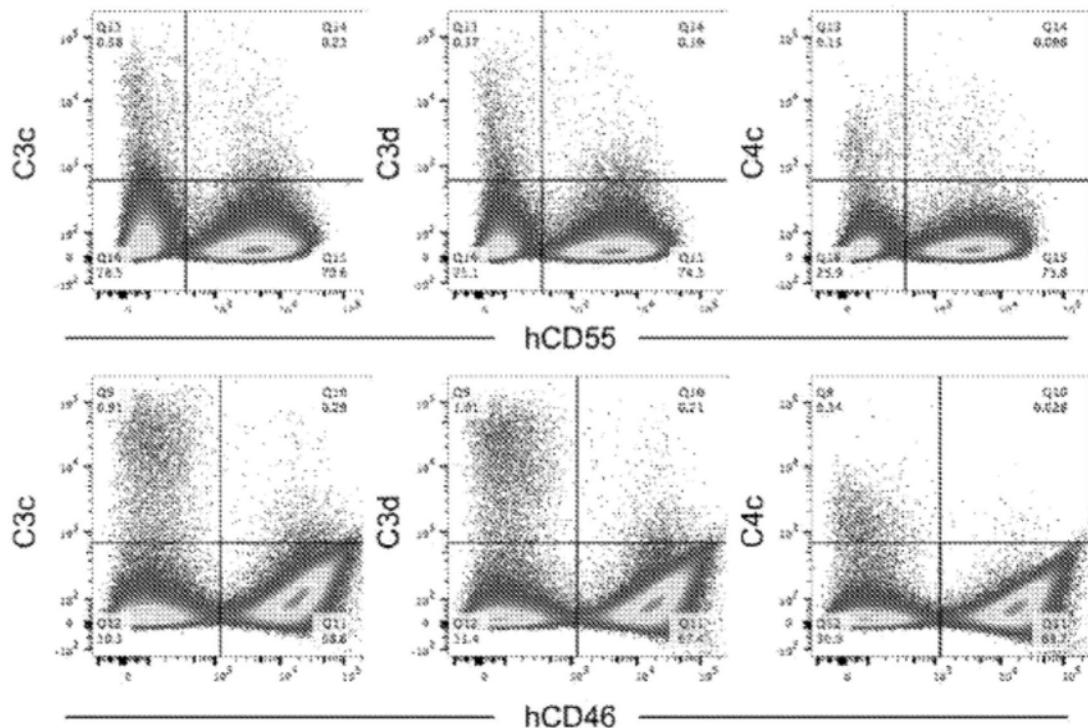


图8B

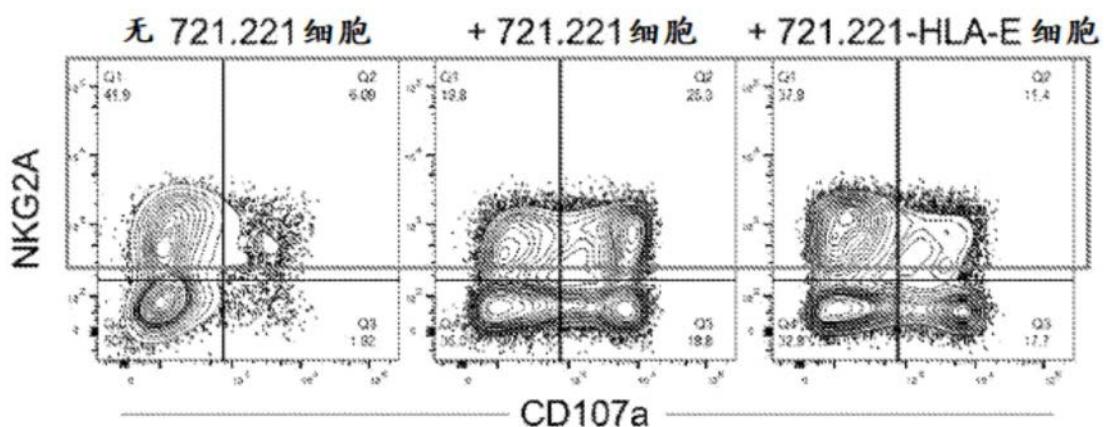


图8C

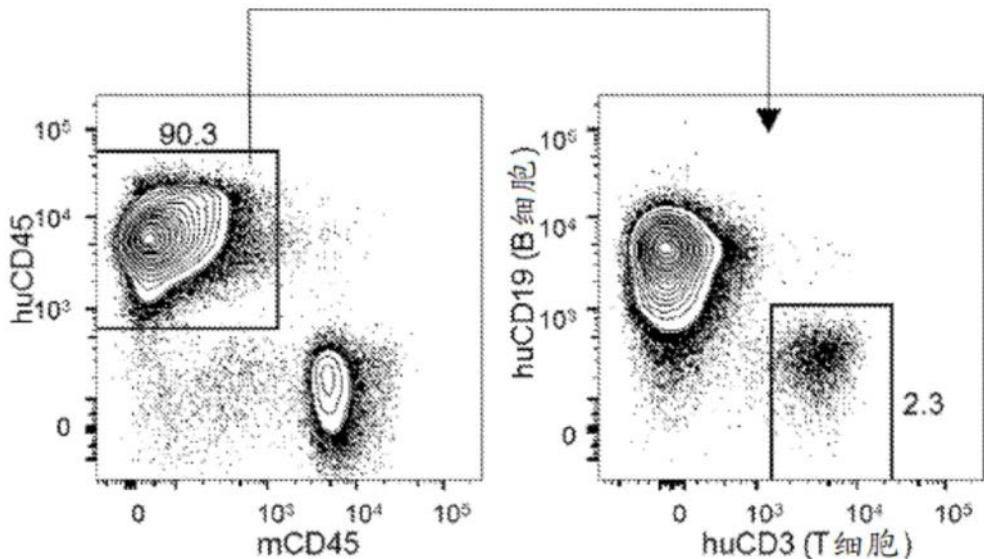


图9A

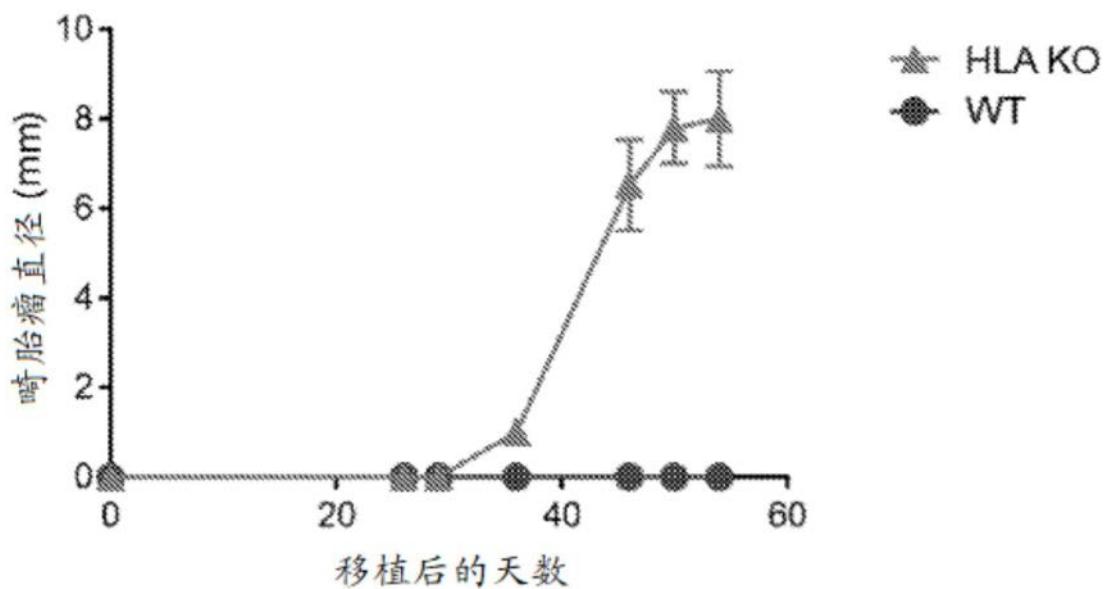


图9B

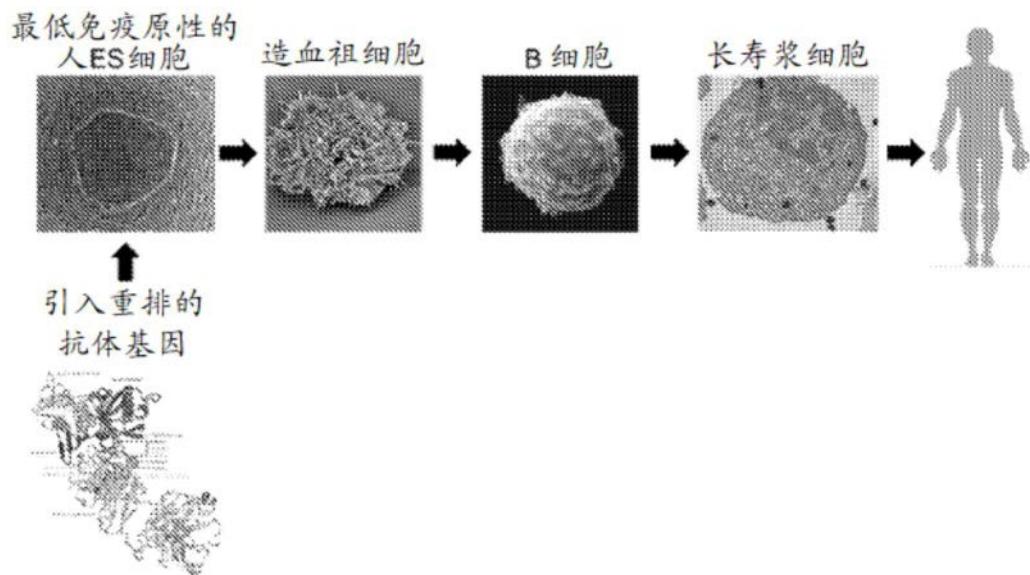


图10

MICA			MICB		
克隆	#1-Indel	#1-读数(%)	克隆	#1-Indel	#1-读数(%)
A04	0	27 (100.0%)	B05	1	292 (100.0%)
C04	9	101 (78.9%)	C04	1	363 (99.2%)
B05	-1	87 (98.9%)	H10	1	426 (100.0%)
E02	0	10 (100.0%)	G08	1	1049 (99.6%)
H10	-1	143 (99.3%)	C06	1	1859 (99.7%)
C06	0	974 (98.8%)	E07	1	975 (94.9%)
F01	-1	189 (75.9%)	F08	1	438 (89.6%)
A07	0	157 (99.4%)	F01	1	566 (80.4%)
E07	0	354 (98.9%)	H12	1	108 (75.5%)
D10	0	30 (54.5%)	A07	1	409 (50.1%)
A02	0	288 (98.6%)	A02	0	591 (61.8%)
			F09	0	780 (69.2%)

图11A

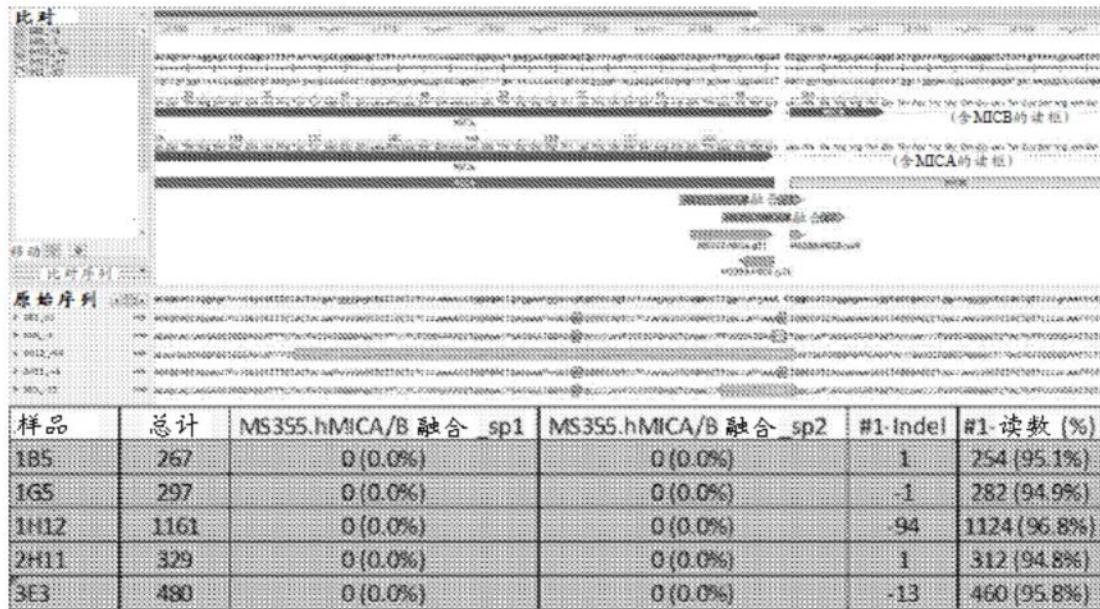


图11B