



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110494565 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201780084314.6

(22)申请日 2017.11.30

(30)优先权数据

62/429,709 2016.12.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/064075 2017.11.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/102612 EN 2018.06.07

(71)申请人 朱诺治疗学股份有限公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 H·I·莱维斯基

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C12N 15/66(2006.01)

权利要求书17页 说明书105页

序列表56页

(54)发明名称

工程化B细胞及相关组合物和方法

(57)摘要

本文提供了如用于过继细胞疗法的工程化B细胞。在一些方面中,还提供了用于工程化和产生所述细胞的方法和组合物、含有所述细胞的组合物、以及用于将所述细胞和组合物给予至受试者的方法。在一些实施方案中,将细胞工程化以产生和/或分泌外源蛋白质,如治疗性蛋白质,包括抗体及其抗原结合片段。在一些方面中,所述细胞和方法的特征提供增加的或改进的细胞活性、功效和/或持久性。

1. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质从所述细胞的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

2. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

3. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

4. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。

5. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

6. 一种工程化B细胞,其包含:

一个或多个核酸分子,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列;以及

嵌合受体,所述嵌合受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

7. 一种工程化B细胞,其包含:

一个或多个核酸分子,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列;以及

重组受体,所述重组受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号,

其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

8. 权利要求1-7中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质被所述B细胞分泌或能够被所述B细胞分泌。

9. 权利要求8的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列包含编码分泌信号肽的核苷酸序列。

10. 权利要求9的工程化B细胞,其中所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO:76-202的氨基酸序列。

11. 权利要求1-10中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是二聚体。

12. 权利要求11的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码所述二聚体的第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

13. 权利要求1-12中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

14. 权利要求1-13中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质结合与疾病或病症相

关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述靶分子或靶蛋白质在细胞的表面上表达。

15. 权利要求14的工程化B细胞,其中所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症、和炎性疾病。

16. 权利要求15的工程化B细胞,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

17. 权利要求1-16中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质结合选自以下的分子:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白A1(CCNA1)XX。

18. 权利要求1-17中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子、以及抗体或其抗原结合片段。

19. 权利要求18的工程化B细胞,其中所述细胞因子选自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。

20. 权利要求2-18中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。

21. 权利要求20的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。

22. 权利要求20的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。

23. 权利要求22的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。

24. 权利要求23的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。

25. 权利要求24的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

26. 权利要求20的工程化B细胞,其中所述抗体源自于阿仑单抗、阿特殊单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗(Zenapax®)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗(Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗(Rituxan、MabThera)、司妥昔单抗、托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736,或者是其抗原结合片段。

27. 权利要求20-26中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。

28. 权利要求27的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。

29. 权利要求12或28的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

30. 权利要求20-29中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或所述轻链中包含一个或多个修饰,使得当外源抗体或抗原结合片段在细胞中表达时,与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。

31. 权利要求30的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰位于所述恒定链的CH2和/或CH3区。

32. 权利要求31的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包含杵臼结构(KiH)修饰或对接锁定(DNL)修饰。

33. 权利要求20-32中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

34. 权利要求20-28中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。

35. 权利要求34的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

36. 权利要求1-35中任一项的工程化B细胞,其中编码所述外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。

37. 权利要求1-36中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是原代B细胞。

38. 权利要求1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是能够分化成浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞中的一种或多种的B细胞。

39. 权利要求1-38中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞。

40. 权利要求1-39中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含:选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻;和/或

选自以下的一种或多种细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻和CD38^低。

41. 权利要求1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。

42. 权利要求1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid}和XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻和CD138⁻。

43. 权利要求1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi}和XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻和MHCII^{-/低}。

44. 权利要求1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD40⁺、CD27^{var}、CXCR4、5,7⁺、CD23^低和CD38⁻。

45. 权利要求1-4和6-44中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

46. 权利要求5或45的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。

47. 权利要求46的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。

48. 权利要求46或47的工程化B细胞,其中所述改变的表达是有条件的。

49. 权利要求46或47的工程化B细胞,其中所述改变的表达是可诱导的。

50. 权利要求1和3-49中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子进一步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。

51. 权利要求50的工程化B细胞,其中所述启动子是B细胞启动子。

52. 权利要求51的工程化B细胞,其中所述启动子是浆细胞启动子。

53. 权利要求51的工程化B细胞,其中所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。

54. 权利要求53的工程化B细胞,其中所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、κ轻链启动子或λ轻链启动子。

55. 权利要求50的工程化B细胞,其中所述启动子是组成型活性启动子。

56. 权利要求55的工程化B细胞,其中所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK和CAGG启动子。

57. 权利要求50的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质的表达是有条件的。

58. 权利要求2或50的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子。

59. 权利要求58的工程化B细胞,其中所述条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

60. 权利要求59的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。

61. 权利要求60的工程化B细胞,其中所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。

62. 权利要求61的工程化B细胞,其中所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或者是其类似物。

63. 权利要求1-3和5-62中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。

64. 权利要求4或63的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、κ轻链启动子或λ轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。

65. 权利要求64的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。

66. 权利要求4和63-65中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含与所述免疫球蛋白基因座的相邻剩余编码序列同框的一个或多个编码序列。

67. 权利要求4和63-66中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。

68. 权利要求67的工程化B细胞,其中所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

69. 权利要求68的工程化B细胞,其中所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。

70. 权利要求67的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

71. 权利要求70的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。

72. 权利要求70或71的工程化B细胞,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

73. 权利要求4和63-66中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。

74. 权利要求73的工程化B细胞,其中所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。

75. 权利要求73或74的工程化B细胞,其中所述单链抗体片段是scFv。

76. 权利要求1-75中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞表达内源B细胞受体。

77. 权利要求76的工程化B细胞,其中所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。

78. 权利要求77的工程化B细胞,其中所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

79. 权利要求1-78中任一项的工程化B细胞,其中所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。

80. 权利要求79的工程化B细胞,其中所述基因破坏包括编码所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。

81. 权利要求80的工程化B细胞,其中所述基因破坏是双等位基因的。
82. 权利要求79-81中任一项的工程化B细胞,其中与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。
83. 权利要求79-82中任一项的工程化B细胞,其中所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。
84. 权利要求1-83中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。
85. 权利要求1-5和8-84中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的重组受体,所述重组受体在配体结合后能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。
86. 权利要求6、7或85的工程化B细胞,其中所述受体是嵌合受体,所述嵌合受体包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。
87. 权利要求86的工程化B细胞,其中所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。
88. 权利要求7或85的工程化B细胞,其中所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。
89. 权利要求86-88中任一项的工程化B细胞,其中所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。
90. 权利要求86-89中任一项的工程化B细胞,其中在配体结合后,所述受体经由含有ITAM的细胞内信号传导结构域发出信号。
91. 权利要求6、7和85-90中任一项的工程化B细胞,其中所述配体结合结构域包含抗体部分。
92. 权利要求91的工程化B细胞,其中所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。
93. 权利要求6、7和85-92中任一项的工程化B细胞,其中所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。
94. 权利要求6和85-87中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。
95. 权利要求85和88中任一项的工程化B细胞,其中所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。
96. 权利要求6、7和85-95中任一项的工程化B细胞,其中所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。
97. 权利要求6和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。
98. 权利要求6和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

99. 权利要求6、7和85-98中任一项的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。

100. 权利要求99的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合所述受试者的肿瘤环境中存在的配体。

101. 权利要求99的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

102. 权利要求6、7和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在所述受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在所述受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在所述受试者中普遍表达的配体、在所述受试者中全身表达的配体、在所述受试者中不是组织特异性的配体、和对所述受试者是外源的配体。

103. 权利要求6、7和85-102中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子进一步编码所述受体。

104. 权利要求103的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含将编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。

105. 权利要求104的工程化B细胞,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

106. 权利要求1-2和4-105中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

107. 权利要求3或106的工程化B细胞,其中阻止类别转换的所述修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或所述内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。

108. 权利要求3、106和107中任一项的工程化B细胞,其中阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的所述修饰包括在所述内源抗体基因座处在M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。

109. 权利要求3和106-108中任一项的工程化B细胞,其中所述内源抗体是IgM或IgD。

110. 权利要求1-109中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列,或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

111. 权利要求6、7和85-105中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质在配体结合后从所述细胞分泌或能够从所述细胞分泌。

112. 权利要求1-111中任一项的工程化B细胞,其中所述B细胞是人B细胞。

113. 权利要求1-112中任一项的工程化B细胞,其是从患者获得的原代细胞。

114. 权利要求1-113中任一项的工程化B细胞,其中所述细胞是在容器中或在制剂中。

115. 一种核酸分子,其包含编码治疗性蛋白质和受体的一个或多个编码序列,其中所述受体包含配体结合结构域,并且其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节B细胞的分化的信号。

116. 权利要求115的核酸分子,其进一步包含可操作地连接以控制所述治疗性蛋白质和/或所述受体的表达的至少一个启动子。

117. 权利要求115或权利要求116的核酸分子,其中编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列可操作地连接至第一启动子,并且编码所述受体的核苷酸序列可操作地连接至第二启动子,所述第一启动子和所述第二启动子可以是相同的或不同的。

118. 权利要求115-117中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子包含将编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。

119. 权利要求118的核酸分子,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地为T2A、P2A、E2A或F2A。

120. 一种载体,其包含权利要求115-119中任一项的核酸分子。

121. 权利要求120的载体,其是病毒载体。

122. 权利要求120或权利要求121的载体,其是逆转录病毒载体。

123. 权利要求120-122中任一项的载体,其是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

124. 一种工程化B细胞,其包含权利要求115-119中任一项的核酸分子或权利要求120-123中任一项的载体。

125. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将权利要求115-119中任一项的核酸分子或权利要求120-123中任一项的载体导入B细胞或B细胞前体中。

126. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

127. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

128. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞(1)表达内源抗体,并且(2)包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

129. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座中或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中,所述靶基因座选自重链免疫球蛋白基因座和轻链免疫球蛋白基因座。

130. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

131. 一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,

其中所述B细胞包含嵌合受体,所述嵌合受体包含配体结合结构域,

其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

132.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,

其中所述B细胞包含重组受体,所述重组受体包含配体结合结构域,

其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号,并且

其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

133.权利要求125-132中任一项的方法,其中所述外源蛋白质被所述工程化B细胞分泌或能够被所述工程化B细胞分泌。

134.权利要求133的方法,其中所述一个或多个编码序列包含编码分泌信号肽的核苷酸序列。

135.权利要求134的方法,其中所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO:76-202的氨基酸序列。

136.权利要求125-135中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是二聚体。

137.权利要求136的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

138.权利要求125-137中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

139.权利要求125-138中任一项的方法,其中所述外源蛋白质结合与疾病或病症相关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述分子或蛋白质在细胞的表面上表达。

140.权利要求139的方法,其中所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症、和炎性疾病。

141.权利要求140的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

142.权利要求125-141中任一项的方法,其中所述外源蛋白质结合选自以下的分子: ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)和细胞周期蛋白A1(CCN1) XX。

143.权利要求125-142中任一项的方法,其中所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。

144.权利要求127-143中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。

145. 权利要求144的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。
146. 权利要求144的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。
147. 权利要求146的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。
148. 权利要求147的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。
149. 权利要求148的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。
150. 权利要求144的方法,其中所述抗体源自于阿仑单抗、阿特殊单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗(Zenapax®)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗(Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗(Rituxan、Mabthera)、司妥昔单抗、托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、0C125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736,或者是其抗原结合片段。
151. 权利要求144-150中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。
152. 权利要求151的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。
153. 权利要求137或152的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。
154. 权利要求144-153中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或所述轻链中包含一个或多个修饰,使得当外源抗体或抗原结合片段在所述细胞中表达时,与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。
155. 权利要求154的方法,其中所述一个或多个修饰位于所述恒定链的CH2和/或CH3区。
156. 权利要求155的方法,其中所述一个或多个修饰包含杵臼结构(KiH)修饰或对接锁定(DNL)修饰。
157. 权利要求144-156中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。
158. 权利要求144-152中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。
159. 权利要求158的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。
160. 权利要求125-159中任一项的方法,其中编码所述外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。
161. 权利要求125-160中任一项的方法,其中所述B细胞或B细胞前体是造血干细胞(HSC)或选自幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞的原代B细胞。

162. 权利要求125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是能够分化成选自浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞中的一种或多种细胞的B细胞。

163. 权利要求125-162中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞。

164. 权利要求125-163中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含:选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻;和/或

选自以下的一种或多种细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻和CD38^低。

165. 权利要求125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。

166. 权利要求125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid}和XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻和CD138⁻。

167. 权利要求125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi}和XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻和MHCII^{-/低}。

168. 权利要求125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻;和/或选自以下的一种或多种表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD40⁺、CD27^{var}、CXCR4,5,7⁺、CD23^低和CD38⁻。

169. 权利要求125-168中任一项的方法,其进一步包括使所述B细胞或B细胞前体与调节B细胞分化的一种或多种试剂接触。

170. 权利要求169的方法,其中所述一种或多种试剂选自IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、SCF、G-CSF、CpG、CD40配体、Flt3配体和促血小板生成素。

171. 权利要求169或170的方法,其进一步包括将所述B细胞或B细胞前体与表达一种或多种B细胞谱系生长因子的细胞共培养,所述一种或多种B细胞谱系生长因子包括IL-7和CD40配体。

172. 权利要求125-129和131-171中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

173. 权利要求130或172的方法,其中所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。

174. 权利要求173的方法,其中所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。

175. 权利要求173或174的方法,其中所述改变的表达是有条件的。

176. 权利要求173或174的方法,其中所述改变的表达是可诱导的。

177. 权利要求125、126和128-176中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子进一

步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。

178. 权利要求177的方法,其中所述启动子是B细胞启动子。

179. 权利要求178的方法,其中所述启动子是浆细胞启动子。

180. 权利要求178的方法,其中所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。

181. 权利要求180的方法,其中所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子。

182. 权利要求177的方法,其中所述启动子是组成型活性启动子。

183. 权利要求182的方法,其中所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK和CAGG启动子。

184. 权利要求177的方法,其中所述外源蛋白质的表达是有条件的。

185. 权利要求127或177的方法,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子。

186. 权利要求185的方法,其中所述条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

187. 权利要求186的方法,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。

188. 权利要求187的方法,其中所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。

189. 权利要求188的方法,其中所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或者是其类似物。

190. 权利要求125-128和130-189中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中。

191. 权利要求190的方法,其中所述靶基因座是重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座。

192. 权利要求129或191的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子和 λ 轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。

193. 权利要求129、191和192中任一项的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。

194. 权利要求129和191-193中任一项的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列与所述免疫球蛋白基因座的相邻剩余编码序列同框。

195. 权利要求129和191-194中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。

196. 权利要求195的方法,其中所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

197. 权利要求196的方法,其中所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所

述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。

198. 权利要求195的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

199. 权利要求198的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。

200. 权利要求198或199的方法,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

201. 权利要求129和191-194中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。

202. 权利要求201的方法,其中所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。

203. 权利要求201或202的方法,其中所述单链抗体片段是scFv。

204. 权利要求125-203中任一项的方法,其中所述工程化B细胞受体表达内源B细胞受体。

205. 权利要求204的方法,其中所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。

206. 权利要求205的方法,其中所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

207. 权利要求129和190-206中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含允许通过同源重组将所述一个或多个核酸分子中的至少一个在所述靶基因座处整合到所述B细胞中的序列。

208. 权利要求207的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含与所述靶基因座处的序列同源的侧翼序列。

209. 权利要求129和190-208中任一项的方法,其中将所述一个或多个核酸分子中的至少一个整合到所述靶基因座中由设计者核酸酶介导,所述设计者核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的核酸酶(RGN)。

210. 权利要求209的方法,其中所述RGN是成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-相关的Cas9(CRISPR-Cas9)核酸酶。

211. 权利要求125-128和130-189中任一项的方法,其中将所述一个或多个核酸分子中的至少一个插入随机基因座中。

212. 权利要求125-211中任一项的方法,其中通过病毒转导、转座、电穿孔或化学转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

213. 权利要求212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的逆转录病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

214. 权利要求212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的慢病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

215. 权利要求212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的转座子转座将

所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

216. 权利要求212的方法,其中通过将包含所述一个或多个核酸分子的载体电穿孔或转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

217. 权利要求125-216中任一项的方法,其中所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。

218. 权利要求217的方法,其中所述基因破坏包括编码所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。

219. 权利要求218的方法,其中所述基因破坏是双等位基因的。

220. 权利要求217-219中任一项的方法,其中与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。

221. 权利要求217-220中任一项的方法,其中所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。

222. 权利要求125-221中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。

223. 权利要求125-130和133-222中任一项的方法,其中所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的受体,所述受体在配体结合后能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

224. 权利要求131、权利要求132或权利要求223的方法,其中所述一个或多个核酸分子是第一核酸分子,并且所述方法包括将编码所述受体的第二核酸分子给予到所述B细胞或B细胞前体中。

225. 权利要求131、权利要求132或权利要求223的方法,其中所述一个或多个核酸分子进一步包含编码所述受体的核苷酸序列。

226. 权利要求225的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含将编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。

227. 权利要求226的方法,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

228. 权利要求131、权利要求132或权利要求223-227中任一项的方法,其中所述受体是嵌合受体,所述嵌合受体包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

229. 权利要求228的方法,其中所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。

230. 权利要求132或223-227中任一项的方法,其中所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

231. 权利要求228-230中任一项的方法,其中所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。

232. 权利要求228-231中任一项的方法,其中在配体结合后,所述受体经由含有ITAM的细胞内信号传导结构域发出信号。

233. 权利要求131、132和223-232中任一项的方法,其中所述配体结合结构域包含抗体部分。

234. 权利要求233的方法,其中所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。

235. 权利要求131、132和223-234中任一项的方法,其中所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

236. 权利要求131和223-229中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。

237. 权利要求223-236中任一项的方法,其中所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。

238. 权利要求131、132和223-237中任一项的方法,其中所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。

239. 权利要求131和223-235中任一项的方法,其中所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。

240. 权利要求131和223-235中任一项的方法,其中所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

241. 权利要求131、132和223-240中任一项的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。

242. 权利要求241的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合所述受试者的肿瘤环境中存在的配体。

243. 权利要求241的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

244. 权利要求132或240的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在所述受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在所述受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在所述受试者中普遍表达的配体、在所述受试者中全身表达的配体、在所述受试者中不是组织特异性的配体、和对所述受试者是外源的配体。

245. 权利要求125-127和129-244中任一项的方法,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

246. 权利要求128或245的方法,其中阻止类别转换的所述修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或所述内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。

247. 权利要求128、245和246中任一项的方法,其中阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的所述修饰包括在所述内源抗体基因座处在M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。

248. 权利要求128和245-247中任一项的方法,其中所述内源抗体是IgM或IgD。

249. 权利要求125-248中任一项的方法,其中所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列,或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

250. 权利要求131、132和223-244中任一项的方法,其中所述外源蛋白质在配体结合后

从所述细胞分泌或能够从所述细胞分泌。

251. 权利要求125-250中任一项的方法,其中所述B细胞是人B细胞。

252. 权利要求125-251中任一项的方法,其中所述B细胞是从患者获得的原代B细胞。

253. 一种工程化B细胞,其通过权利要求125-252中任一项的方法制备。

254. 一种药物组合物,其包含权利要求1-114和124中任一项的工程化B细胞或权利要求253的工程化B细胞、以及药学上可接受的载体。

255. 一种制品,其包含权利要求1-114、124和253中任一项的细胞或权利要求254的药物组合物。

256. 权利要求255的制品,其是容器。

257. 权利要求256的制品,其中所述容器是袋子。

258. 一种治疗方法,其包括向患有疾病或病症的受试者给予权利要求1-114和124中任一项的工程化B细胞、权利要求253的工程化B细胞、或包含权利要求254的工程化B细胞的药物组合物。

259. 权利要求258的方法,其中所述外源蛋白质是可用于治疗所述疾病或病症的治疗性蛋白质。

260. 权利要求259的方法,其中所述治疗性蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。

261. 权利要求258的方法,其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段,其特异性结合与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

262. 权利要求261的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。

263. 权利要求261的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。

264. 权利要求263的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。

265. 权利要求264的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。

266. 权利要求265的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

267. 权利要求258-266中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞或记忆B细胞。

268. 权利要求258-267中任一项的方法,其中所述方法进一步包括诱导所述工程化B细胞以增加所述外源蛋白质的产生和/或分泌。

269. 权利要求268的方法,其中所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的内源B细胞受体的配体结合结构域结合的试剂。

270. 权利要求268的方法,其中所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的重组或嵌合受体的配体结合结构域结合的试剂。

271. 权利要求268-270中任一项的方法,其中所述工程化B细胞被诱导以分化成浆母细胞或浆细胞。

272. 权利要求258-266中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是浆母细胞或浆细胞。

273. 权利要求258-272中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是在内源免疫球蛋白启

动子或组成型活性启动子的控制下。

274. 权利要求258-272中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是在诱导型启动子的控制下,并且所述方法进一步包括向所述受试者给予激活所述诱导型启动子的试剂。

275. 权利要求258-274中任一项的方法,其中所述方法导致治疗量的所述工程化B细胞在给予后在所述受试者中持续至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

276. 权利要求258-275中任一项的方法,其中所述工程化B细胞或组合物的给予导致所述外源蛋白质在所述受试者中的作用持续时间为至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

277. 权利要求258-276中任一项的方法,其中与由所述外源蛋白质的单次直接给予产生的最大可耐受作用持续时间相比,所述工程化B细胞或组合物的单次给予导致作用持续时间增加。

278. 权利要求277的方法,其中所述增加是至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

279. 权利要求258-278中任一项的方法,其中所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或障碍、或感染性疾病。

280. 权利要求258-279中任一项的方法,其中所述工程化B细胞对所述受试者而言是自体同源的。

281. 权利要求258-279中任一项的方法,其中所述工程化B细胞对所述受试者而言是同种异体的。

282. 权利要求258-281中任一项的方法,其中所述受试者是人。

283. 权利要求258-282中任一项的方法,其中所给予的细胞的剂量是至少或至少约或者是或是约 1×10^5 个细胞/千克受试者体重,是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞,和/或是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞/m²受试者。

工程化B细胞及相关组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年12月2日提交的标题为“工程化B细胞及相关组合物和方法 (Engineered B Cells and Related Compositions and Methods)”的美国临时申请号62/429,709的优先权,将其内容通过引用以其全文并入。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请是连同电子格式的序列表一起提交的。序列表以2017年11月30日创建的名称为735042006640seqlist.txt的文件提供,其大小为64,032字节。将该序列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0005] 本公开文本在一些方面涉及如用于过继细胞疗法的工程化B细胞。在一些方面中,本公开文本进一步涉及用于工程化和生产所述细胞的方法和组合物、含有所述细胞的组合物、以及用于将所述细胞和组合物给予至受试者的方法。在一些实施方案中,将细胞工程化以产生和/或分泌外源蛋白质,如治疗性蛋白质,包括抗体及其抗原结合片段。在一些方面中,所述细胞和方法的特征提供增加的或改进的细胞活性、功效和/或持久性。

背景技术

[0006] 有多种方法可用于使用治疗性蛋白质如抗体或其抗原结合片段来治疗疾病(包括感染性疾病、癌症和自身免疫性疾病)。此类途径通常涉及重复注射重组产生的蛋白质,其可以经由一种或多种机制提供各种治疗效果。给予后治疗性蛋白质在体内的存在通常是短暂的。需要改进的组合物和方法,例如,以便通过增加疗法的作用持续时间来改善此类疗法的功效。提供了满足此类需求的产品、组合物、方法和制品。

发明内容

[0007] 提供了能够产生和/或分泌外源蛋白质(如治疗性蛋白质)的工程化B细胞,如用于在过继细胞疗法中使用,例如用于治疗有需要的受试者的疾病和/或病症。还提供了包含所述细胞的组合物、产生和使用所述细胞(如用于治疗疾病和/或病症)的方法、以及包含所述细胞或用于在本文描述的方法中使用的制品。

[0008] 在一些实施方案中,提供了包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质从所述细胞的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

[0009] 在一些实施方案中,提供了包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

[0010] 在一些实施方案中,提供了包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或

多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0011] 在一些实施方案中,提供了包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。

[0012] 在一些实施方案中,提供了包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0013] 在一些实施方案中,提供了工程化B细胞,其包含:包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子;以及包含配体结合结构域的嵌合受体,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节工程化B细胞的分化的信号。

[0014] 在一些实施方案中,提供了工程化B细胞,其包含:包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子;以及包含配体结合结构域的重组受体,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节工程化B细胞的分化的信号,其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

[0015] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质被所述B细胞分泌或能够被所述B细胞分泌。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列包含编码分泌信号肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO:76-202的氨基酸序列。

[0016] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是二聚体。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码所述二聚体的第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

[0017] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

[0018] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质结合与疾病或病症相关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述分子或蛋白质在细胞的表面上表达。在一些实施方案中,所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症、和炎性疾病。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤或癌症。在一些实施方案中,所述疾病或病症是病毒感染。在一些实施方案中,所述病毒感染是人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染。

[0019] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质结合选自以下的分子:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原 (CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、

CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1 (WT-1) 或细胞周期蛋白A1 (CCNA1) XX。

[0020] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子、以及抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述细胞因子选自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。

[0021] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0022] 在一些任何此类实施方案中,所述抗体源自于阿仑单抗、阿特珠单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗(Zenapax)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗(Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗(Rituxan、MabThera)、司妥昔单抗、托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、0C125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736,或者是其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或轻链中包含一个或多个修饰,使得当外源抗体或抗原结合片段在细胞中表达时,与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰位于恒定链的CH2和/或CH3区。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰包含杵臼结构(knob-into-hole, KiH)修饰或对接锁定(dock and lock, DNL)修饰。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

[0023] 在一些任何其中所述一个或多个核酸分子包含第一编码序列和第二编码序列的此类实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0024] 在一些任何此类实施方案中,编码外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。

[0025] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是原代B细胞。在一些实施方案中,所述工程化B细胞是能够分化成浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞中的一种或多种的B细胞。在一些实施方案中,所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞。在一些实施方案中,所述工程化B细胞包含:选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5+、BACH2+、BCL-2+、OBF1+、OCT2+、PU.1+、SPIB+、ETS1+、IRF8+、IRF4低、BLIMP1-或XBP1-;和/或选自以下的一种或多种(如全

部)细胞表面标记:CD19+、CD20+、CD21+、CD22+、CD23+、CD24+、CD10-、CD27-或CD38低。

[0026] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。在一些实施方案中,所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5-、BACH2-、BCL-2-、OBF1-、OCT2-、PU.1-、SPIB-、ETS1-、IRF8-、IRF4hi、BLIMP1mid或XBP1+;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19+、CD38高、CD27高、CD269+、MHCII+、CD20-或CD138-。在一些实施方案中,所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5-、BACH2-、BCL-2-、OBF1-、OCT2-、PU.1-、SPIB-、ETS1-、IRF8-、IRF4hi、BLIMP1hi或XBP1+;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CXCR4+、CD27+、CD38高、CD138+、CD269+、CD19低、CD20-或MHCII-/低。在一些实施方案中,所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5+、BACH2+、BCL-2+、OBF1+、OCT2+、PU.1+、SPIB+、ETS1+、IRF8+、IRF4低、BLIMP1-或XBP1-;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19+、CD20+、CD40+、CD27var、CXCR4,5,7+、CD23低或CD38-。

[0027] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力更大。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1或IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1或XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方案中,所述改变的表达是有条件的。在一些实施方案中,所述改变的表达是可诱导的。

[0028] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子进一步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。在一些实施方案中,所述启动子是B细胞启动子。在一些实施方案中,所述启动子是浆细胞启动子。在一些实施方案中,所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。在一些实施方案中,所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子。在一些实施方案中,所述启动子是组成型活性启动子。在一些实施方案中,所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK或CAGG。

[0029] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质的表达是有条件的。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子(transactivator)。在一些实施方案中,条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。在一些实施方案中,所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或是其类似物。

[0030] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含与免疫球蛋白基因座

的相邻剩余编码序列同框的一个或多个编码序列。

[0031] 在一些任何此类实施方案中,外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。在一些实施方案中,所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。在一些实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。在一些实施方案中,所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。在一些实施方案中,所述单链抗体片段是scFv。

[0032] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达内源B细胞受体。在一些实施方案中,所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。在一些实施方案中,所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

[0033] 在一些任何此类实施方案中,所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏包括编码内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏是双等位基因的。在一些实施方案中,与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。

[0034] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。

[0035] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的重组受体,所述重组受体在配体结合后能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。在一些实施方案中,所述受体是嵌合受体,其包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。在一些实施方案中,所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,在配体结合后,所述受体经由含有ITAM的细胞内信号传导

结构域发出信号。

[0036] 在一些任何此类实施方案(其中所述工程化B细胞包含重组受体)中,所述配体结合结构域包含抗体部分。在一些实施方案中,所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。在一些实施方案中,所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。

[0037] 在一些任何此类实施方案中,所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。

[0038] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。

[0039] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

[0040] 在一些任何此类实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。在一些实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合受试者的肿瘤环境中存在的配体。在一些实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

[0041] 在一些任何此类实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在受试者中普遍表达的配体、在受试者中全身表达的配体、在受试者中不是组织特异性的配体、和对受试者是外源的配体。

[0042] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子进一步编码所述受体。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含将编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0043] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止内源抗体的类别转换和/或阻止内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。在一些实施方案中,阻止类别转换的修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。在一些实施方案中,阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰包括在内源抗体基因座处M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。在一些实施方案中,所述内源抗体是IgM或IgD。

[0044] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列,或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

[0045] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质在配体结合后从细胞分泌或能够从细胞分泌。

[0046] 在一些任何此类实施方案中,所述B细胞是人B细胞。

[0047] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是从患者获得的原代细胞。

[0048] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是在容器中或在制剂中。

[0049] 在一些实施方案中,提供了包含编码治疗性蛋白质和受体的一个或多个编码序列的核酸分子,其中所述受体包含配体结合结构域,并且其中在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节B细胞的分化的信号。在一些实施方案中,所述核酸分子进一步包含可操作地连接以控制所述治疗性蛋白质和/或所述受体的表达的至少一个启动子。在一些实施方案中,编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列可操作地连接至第一启动子,并且编码所述受体的核苷酸序列可操作地连接至第二启动子,所述第一启动子和所述第二启动子可以是相同的或不同的。在一些实施方案中,所述核酸分子包含将编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点 (IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地为T2A、P2A、E2A或F2A。

[0050] 在一些实施方案中,提供了包含上述任一实施方案的核酸分子的载体。在一些实施方案中,所述载体是病毒载体。在一些实施方案中,所述载体是逆转录病毒载体。在一些实施方案中,所述载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[0051] 在一些实施方案中,提供了包含上述任一实施方案的核酸分子或载体的工程化B细胞。

[0052] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将上述任何实施方案的核酸分子或载体引入B细胞或B细胞前体中。

[0053] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

[0054] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

[0055] 在一些实施方案中,提供了生产工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞 (1) 表达内源抗体,并且 (2) 包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0056] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座中或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中,所述靶基因座选自重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座。

[0057] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0058] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外

源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述B细胞包含嵌合受体,所述嵌合受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

[0059] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述B细胞包含重组受体,所述重组受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号,并且其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

[0060] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质被所述工程化B细胞分泌或能够被所述工程化B细胞分泌。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列包含编码分泌信号肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO:76-202的氨基酸序列。

[0061] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是二聚体。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

[0062] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

[0063] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质结合与疾病或病症相关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述分子或蛋白质在细胞的表面上表达。在一些实施方案中,所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症、炎性疾病。在一些实施方案中,所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

[0064] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质结合选自以下的分子:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白A1(CCNA1)XX。

[0065] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。

[0066] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0067] 在一些实施方案中,所述抗体源自于阿仑单抗、阿特珠单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗

(Zenapax)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗 (Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗 (Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗 (CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗 (Rituxan、Mabthera)、司妥昔单抗、托西莫单抗 (Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab 片段、0C125 单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C 或 MEDI4736, 或者是其抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。在一些实施方案中, 所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子, 所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或轻链中包含一个或多个修饰, 使得当外源抗体或抗原结合片段在细胞中表达时, 与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。在一些实施方案中, 所述一个或多个修饰位于恒定链的 CH2 和/或 CH3 区。在一些实施方案中, 所述一个或多个修饰包含杵臼结构 (knob-into-hole, KiH) 修饰或对接锁定 (dock and lock, DNL) 修饰。在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段是 scFv。

[0068] 在一些任何其中所述一个或多个核酸分子包含第一编码序列和第二编码序列的此类实施方案中, 所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点 (IRES) 或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开, 所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是 T2A、P2A、E2A 或 F2A。

[0069] 在一些任何此类实施方案中, 编码外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。

[0070] 在一些任何此类实施方案中, 所述 B 细胞或 B 细胞前体是造血干细胞 (HSC) 或选自幼稚成熟 B 细胞、浆母细胞、浆细胞或记忆 B 细胞的原代 B 细胞。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞是能够分化成选自浆母细胞、浆细胞或记忆 B 细胞中的一种或多种细胞的 B 细胞。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞是幼稚成熟 B 细胞。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞包含: 选自以下的一种或多种 (如全部) 表型标记: PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻ 或 XBP1⁻; 和/或选自以下的一种或多种 (如全部) 细胞表面标记: CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻ 或 CD38^低。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆 B 细胞。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞包含选自以下的一种或多种 (如全部) 表型标记: PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid} 或 XBP1⁺; 和/或选自以下的一种或多种 (如全部) 细胞表面标记: CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻ 或 CD138⁻。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞包含选自以下的一种或多种 (如全部) 表型标记: PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi} 或 XBP1⁺; 和/或选自以下的一种或多种 (如全部) 细胞表面标记: CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻ 或 MHCII⁻。在一些实施方案中, 所述工程化 B 细胞包含选自以下的一种或多种 (如全部) 表型标记: PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻ 或 XBP1⁻; 和/或选自以下的一种或多种 (如全部) 细胞表面标记:

CD19+、CD20+、CD40+、CD27var、CXCR4,5,7+、CD23低或CD38-。

[0071] 在一些任何此类实施方案中,所述方法进一步包括使所述B细胞或B细胞前体与调节B细胞分化的一种或多种试剂接触。在一些实施方案中,所述一种或多种试剂选自IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、SCF、G-CSF、CpG、CD40配体、Flt3配体或促血小板生成素。

[0072] 在一些任何此类实施方案中,所述方法进一步包括将所述B细胞或B细胞前体与表达一种或多种B细胞谱系生长因子(任选地包括IL-7和CD40配体)的细胞共培养。

[0073] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力更大。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。在一些实施方案中,所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1或IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1或XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。在一些实施方案中,所述改变的表达是有条件的。在一些实施方案中,所述改变的表达是可诱导的。

[0074] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子进一步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。在一些实施方案中,所述启动子是B细胞启动子。在一些实施方案中,所述启动子是浆细胞启动子。在一些实施方案中,所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。在一些实施方案中,所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子。在一些实施方案中,所述启动子是组成型活性启动子。在一些实施方案中,所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK或CAGG。

[0075] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质的表达是有条件的。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子(transactivator)。在一些实施方案中,条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。在一些实施方案中,所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或是其类似物。

[0076] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中。在一些实施方案中,靶基因座是重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。在一些实施方案中,在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。在一些实施方案中,在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列与所述免疫球蛋白基因座的相邻剩余编码序列同框。

[0077] 在一些任何此类实施方案中,外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。在一些实施方案中,所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部

分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。在一些实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0078] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。在一些实施方案中,所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。在一些实施方案中,所述单链抗体片段是scFv。

[0079] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达内源B细胞受体。在一些实施方案中,所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。在一些实施方案中,所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

[0080] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含允许通过同源重组将所述一个或多个核酸分子中的至少一个在所述靶基因座处整合到B细胞中的序列。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含与所述靶基因座处的序列同源的侧翼序列。

[0081] 在一些任何此类实施方案中,将所述一个或多个核酸分子中的至少一个整合到所述靶基因座中由设计者核酸酶介导,所述设计者核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或RNA指导的核酸酶(RGN)。在一些实施方案中,RGN是成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-相关的Cas9(CRISPR-Cas9)核酸酶。

[0082] 在一些任何此类实施方案中,将所述一个或多个核酸分子中的至少一个插入随机基因座中。

[0083] 在一些任何此类实施方案中,通过病毒转导、转座、电穿孔或化学转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。在一些实施方案中,通过用包含所述一个或多个核酸分子的逆转录病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。在一些实施方案中,通过用包含所述一个或多个核酸分子的慢病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。在一些实施方案中,通过用包含所述一个或多个核酸分子的转座子转座将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。在一些实施方案中,通过将包含所述一个或多个核酸分子的载体电穿孔或转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0084] 在一些任何此类实施方案中,所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏包括编码内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏是双等位基

因的。在一些实施方案中,与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。

[0085] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。

[0086] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的重组受体,所述重组受体在配体结合后能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。在一些实施方案中,所述受体是嵌合受体,其包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。在一些实施方案中,所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,在配体结合后,所述受体经由含有ITAM的细胞内信号传导结构域发出信号。

[0087] 在一些任何此类实施方案(其中所述工程化B细胞包含重组受体)中,所述配体结合结构域包含抗体部分。在一些实施方案中,所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。在一些实施方案中,所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。在一些实施方案中,所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。

[0088] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。

[0089] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

[0090] 在一些任何此类实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。在一些实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合受试者的肿瘤环境中存在的配体。在一些实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

[0091] 在一些任何此类实施方案中,所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在受试者中普遍表达的配体、在受试者中全身表达的配体、在受试者中不是组织特异性的配体、和对受试者是外源的配体。

[0092] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个核酸分子进一步编码所述受体。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含将编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0093] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止内源

抗体的类别转换和/或阻止内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。在一些实施方案中,阻止类别转换的修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。在一些实施方案中,阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰包括在内源抗体基因座处M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。在一些实施方案中,所述内源抗体是IgM或IgD。

[0094] 在一些任何此类实施方案中,所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列,或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

[0095] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质在配体结合后从细胞分泌或能够从细胞分泌。

[0096] 在一些任何此类实施方案中,所述B细胞是人B细胞。

[0097] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是从患者获得的原代细胞。

[0098] 在一些实施方案中,提供了通过上述任何实施方案的方法制备的工程化B细胞。

[0099] 在一些实施方案中,提供了包含上述任一实施方案的工程化B细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0100] 在一些实施方案中,提供了包含上述任一实施方案的细胞或药物组合物的制品。在一些实施方案中,所述制品是容器。在一些实施方案中,所述容器是袋子。

[0101] 在一些实施方案中,提供了治疗的方法,所述方法包括将上述任一实施方案的工程化B细胞或药物组合物给予至患有疾病或病症的受试者。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是可用于治疗所述疾病或病症的治疗性蛋白质。在一些实施方案中,所述治疗性蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段,其特异性结合与所述疾病或病症相关的配体或抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0102] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞或记忆B细胞。在一些实施方案中,所述方法进一步包括诱导所述工程化B细胞以增加所述外源蛋白质的产生和/或分泌。在一些实施方案中,所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的内源B细胞受体的配体结合结构域结合的试剂。在一些实施方案中,所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的重组或嵌合受体的配体结合结构域结合的试剂。在一些实施方案中,所述工程化B细胞被诱导以分化成浆母细胞或浆细胞。

[0103] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞是浆母细胞或浆细胞。

[0104] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是在内源免疫球蛋白启动子或组成型活性启动子的控制下。

[0105] 在一些任何此类实施方案中,所述外源蛋白质是在诱导型启动子的控制下,并且所述方法进一步包括向所述受试者给予激活所述诱导型启动子的试剂。

[0106] 在一些任何此类实施方案中,治疗量的工程化B细胞在给予后在所述受试者中持续至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

[0107] 在一些任何此类实施方案中,所述治疗导致作用持续时间为至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

[0108] 在一些任何此类实施方案中,与由外源蛋白质的单次直接给予产生的最大可耐受作用持续时间相比,所述工程化B细胞或组合物的单次给予导致作用持续时间增加。在一些实施方案中,所述增加是至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

[0109] 在一些任何此类实施方案中,所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或障碍、或感染性疾病。

[0110] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞对所述受试者而言是自体同源的。

[0111] 在一些任何此类实施方案中,所述工程化B细胞对所述受试者而言是同种异体的。

[0112] 在一些任何此类实施方案中,所述受试者是人。

[0113] 在一些任何此类实施方案中,所给予的细胞的剂量是至少或至少约或者是或是约 1×10^5 个细胞/千克受试者体重,是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞,和/或是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞/ m^2 受试者。

具体实施方式

[0114] I. 将B细胞工程化以产生治疗性蛋白质

[0115] 本文提供了用于过继细胞疗法(例如过继性免疫疗法)的工程化B细胞。所提供的细胞表达和/或分泌已知是或可以是治疗性蛋白质(如抗体或其抗原结合片段)的外源蛋白质。在一些方面中,所述细胞包括处于不同发育阶段或定向于不同B细胞谱系的工程化B细胞,或能够分化成处于不同发育阶段的细胞并且定向于不同B细胞谱系(包括幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞)的B细胞。还提供了如在过继性疗法中在疾病或病症(如感染性疾病、癌症和自身免疫性疾病)的治疗中使用细胞的方法和用途。还提供了用于产生所述细胞的方法、含有所述细胞的组合物、以及含有所述细胞并且用于使用、产生和/或给予所述细胞的试剂盒和装置。在一些实施方案中,所述细胞提供了可用于治疗疾病或病症的治疗性蛋白质的长期存在的来源。

[0116] 在一些实施方案中,所提供的B细胞是工程化的,其具有编码靶向感兴趣的疾病或病症的外源蛋白质的核酸分子。在一些实施方案中,工程化B细胞分泌外源蛋白质,例如抗体或其他治疗性蛋白质。在一些实施方案中,工程化B细胞进一步包含对一种或多种内源基因的修饰,以促进(如增加)所述工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力。

[0117] 单克隆抗体疗法已用于治疗许多疾病,包括感染性疾病、癌症和自身免疫性疾病。此类途径通常涉及重复注射重组产生的抗体,其可以经由一种或多种机制提供各种治疗效果。给予后治疗性抗体在体内的存在通常是短暂的。

[0118] 开发靶向HIV和其他病毒的免疫疗法的努力并非十分简单。已来自某些HIV感染个体的血清和/或B细胞中分离出广泛中和性抗体(BnAb)。在产生它们的个体中,BnAb显现随着时间的推移而产生/维持并提供长期保护。(Li, Y. 等人(2011) *Journal of virology*, 85(17):8954-8967; Krumm, S. A. 等人(2016) *Retrovirology*, 13(1):1; Kwong, P. D. 等人(2011). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1):a007278)。这些广泛中和

性抗体中的某些在动物模型中(以及最近在人受试者中)在被动转移到受感染的个体中之后显示出有希望的结果。(Lu, C.L. 等人(2016). *Science*, 352 (6288) :1001-1004)。然而,只有一小部分的受感染个体产生广泛中和性抗体,并且通过疫苗接种诱导其在其他个体中产生的努力大体上是不成功的。还探索了基因递送途径(例如,使用AAV和其他载体)以促进重组的广泛中和性抗体在受试者细胞中的表达和分泌。(Balazs, A.B. 等人(2012). *Nature*, 481 (7379) :81-84; Balazs, A.B. 等人(2014). *Nature medicine*, 20 (3) :296)。一些这样的途径已成功诱导表达,但可能受限于,例如,受感染细胞不能长期持续。

[0119] 这里描述的工程化B细胞提供了解决这些缺点的解决方案,并且通常适用于可能受益于基于抗体的靶向途径、或任何治疗性蛋白质的更广泛持久的长期表达的任何疾病或病症。简言之,所提供的实施方案涉及将原代B细胞(例如,人B细胞)工程化以表达治疗性蛋白质,例如靶向与感兴趣的疾病或病症相关的一种或多种抗原/表位的抗体(例如,在HIV的情况下,表达广泛中和性抗HIV抗体),或表达作为用于治疗给定疾病或病症的治疗剂的任何蛋白质。如下面更详细讨论的,所述技术涉及以促进或允许促进(以组成型、瞬时的和/或诱导型方式)外源蛋白质(如重组抗体或任何其他治疗性蛋白质)的产生和/或分泌的方式将B细胞工程化。所述技术还涉及将此类工程化B细胞给予至需要治疗感兴趣的疾病或病症的受试者,以及包括所述细胞的制剂、组合物和组合,及产生所述细胞的方法。

[0120] 在一些实施方案中,所述工程化B细胞包括分泌B细胞或能够分化成分泌B细胞的细胞,如记忆B细胞或记忆B细胞的后代。在B细胞发育期间,通常被激活的幼稚B细胞表现出瞬时分泌IgM的能力,并且在T细胞辅助后,可以进行免疫球蛋白类别转换以产生和分泌其他免疫球蛋白。在一些方面中,此类细胞可以变成记忆B细胞,所述记忆B细胞具有自我更新的能力或产生更熟练地产生和分泌抗体的细胞(浆母细胞或浆细胞)。在一些方面中,记忆B细胞填充有内质网(ER),其在一些情况下与分泌相关的未折叠蛋白反应相关。

[0121] 所提供的实施方案利用B细胞的蛋白质分泌机制,其在一些情况下与内质网的能力变化有关,所述变化伴随B细胞中未折叠蛋白反应发生。在一些实施方案中,B细胞的分泌能力与其分化状态有关,并且是B细胞发育的正常过程。通常,B细胞从起源于骨髓的造血干细胞(HSC)发育而来。HSC首先分化成多能祖(MPP)细胞,然后分化成常见的淋巴祖(CLP)细胞。从这里开始,它们发育成B细胞发生在几个阶段,每个阶段的特征在于不同的基因表达模式和免疫球蛋白H链和L链基因位点排列,后者是由于B细胞在其发育时经历V(D)J重组。从前体B细胞向未成熟B细胞发育的进程如下:早期祖B细胞(CD43⁺、CD45⁺、MHCII⁺)、晚期祖B细胞(CD43⁺、CD45⁺、CD19⁺、CD40⁺、MHCII⁺)、大前B细胞(CD43⁺、CD45⁺、CD19⁺、CD40⁺、MHCII⁺)、小前B细胞(CD45⁺、CD19⁺、CD40⁺、MHCII⁺)、和未成熟B细胞(CD45⁺、CD19⁺、CD40⁺、IgM⁺、MHCII⁺)。

[0122] 在骨髓中发育时,B细胞经历两种类型的选择以确保适当的发育。通过涉及前BCR和BCR两者的抗原非依赖性信号传导发生阳性选择。如果这些受体不与其配体结合,则B细胞不会接收适当的信号并停止发育。通过自身抗原与BCR的结合发生阴性选择;如果BCR可以强烈地结合自身抗原,则B细胞经历四种命运之一:克隆缺失、受体编辑、失能、或忽略(B细胞忽略信号并继续发育)。这种阴性选择过程导致中枢耐受状态,该状态中成熟B细胞不与骨髓中存在的自身抗原结合。

[0123] 为了完成发育,未成熟B细胞从骨髓迁移到脾脏并且经过两个过渡阶段:T1和T2

(CD45⁺、CD19⁺、CD40⁺、IgM⁺、IgD⁺、CD21⁺、MHCII⁺)。在它们迁移到脾脏的整个过程中以及在脾脏进入之后,它们被认为是T1B细胞。在脾脏内,T1B细胞转变为T2B细胞。取决于通过BCR和其他受体接收的信号,T2B细胞分化成滤泡(FO)B细胞或边缘区(MZ)B细胞。在未成熟时以及在T1期期间,B细胞表达类别IgH的BCR,但是在转变为T2期之后以及在成熟时直至激活,BCR表达变化为类别IgM和IgD。

[0124] 一旦分化,它们现在被认为是成熟B细胞或幼稚B细胞。人中的幼稚成熟B细胞的典型表型标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻,并且人中的典型表面标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻和CD38^低。

[0125] 成熟B细胞可以分化成浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。浆母细胞是短期存在的、增殖性抗体分泌细胞。

[0126] 浆母细胞在感染早期产生,并且与浆细胞相比,它们的抗体倾向于对其靶抗原具有较弱的亲和力。浆母细胞可以起因于B细胞的T细胞非依赖性激活或来自B细胞的T细胞依赖性激活的滤泡外反应。浆细胞是长期存在的、非增殖性抗体分泌细胞。有证据表明B细胞首先分化成浆母细胞样细胞,然后分化成浆细胞。人中的浆母细胞的典型表型标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid}和XBP1⁺,并且人中的典型表面标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻和CD138⁻。

[0127] 浆细胞在感染后期产生,并且与浆母细胞相比,由于生发中心(GC)中的亲和力成熟而具有对其靶抗原具有较高亲和力的抗体并产生更多的抗体。浆细胞典型地起因于来自B细胞的T细胞依赖性激活的生发中心反应,然而它们也可以起因于B细胞的T细胞非依赖性激活。人中的浆细胞的典型表型标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi}和XBP1⁺,并且人中的典型表面标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻和MHCII^{-/低}。

[0128] 记忆B细胞是休眠B细胞。它们的功能是通过身体循环,并且如果它们检测到已激活其亲本B细胞的抗原(记忆B细胞与其亲本B细胞共享相同的BCR,因此它们检测相同的抗原)发起更强的更快速的抗体应答(称为二抗应答)。记忆B细胞可以通过滤泡外反应和生发中心反应两者从T细胞依赖性激活产生,以及从B1细胞的T细胞非依赖性激活产生。人中的记忆B细胞的典型表型标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻和XBP1⁻,并且人中的典型表面标记可以包括以下中的一种或多种(如全部):CD19⁺、CD20⁺、CD40⁺、CD27^{var}、CXCR4、5、7⁺、CD23^低和CD38⁻。

[0129] 在一些实施方案中,所提供的工程化细胞是记忆细胞,或能够分化成记忆细胞,如能够分裂和繁殖以制造浆细胞的记忆细胞。在一些实施方案中,所提供的工程化细胞进一步含有用以驱动(如诱导或刺激)促有丝分裂或增殖信号或能够调节B细胞向分泌B细胞分化的信号的受体(如重组或嵌合受体)(在本文中也称为驱动受体)。在一些实施方案中,驱动受体模拟内源B细胞受体(BCR)的信号传导能力。在一些方面中,在分化信号后,整合膜蛋白BCR的表达可以通过替代性poly(A)位点使用(其可以导致从mRNA转录物去除编码跨膜结

构域的序列)转换为分泌型免疫球蛋白的表达。此外,在一些方面中,分化改变细胞的分泌能力,使得例如基于每个细胞,浆母细胞或浆细胞由于较高的ER含量而具有更大的分泌蛋白质的合成能力。

[0130] 因此,在一些实施方案中,工程化细胞具有或能够变化为或分化成具有更高的合成蛋白质的能力和/或更高的分泌蛋白质的能力的细胞。在一些实施方案中,驱动受体是对已知配体如疫苗或其他配体有反应的内源BCR,例如对白喉破伤风疫苗有反应的破伤风特异性BCR。在一些实施方案中,B细胞被进一步工程化以具有外源性驱动受体,所述外源性驱动受体具有如响应于配体结合经由含有ITAM的细胞内信号传导结构域(例如CD79a或CD79b)诱导B细胞信号传导途径,从而诱导或刺激促有丝分裂或增殖信号或能够调节B细胞向分泌B细胞分化的信号的能力。

[0131] 在一些实施方案中,所提供的工程化B细胞分泌外源蛋白质,如治疗性蛋白质。还提供了用于在过继细胞治疗方法中使用工程化B细胞的组合物、方法和试剂盒,用于治疗可分泌的外源蛋白质(如治疗性蛋白质)已知或可能治疗或改善的任何疾病或病症。

[0132] II. 工程化B细胞

[0133] 本文提供了表达和分泌外源蛋白质(如治疗性蛋白质,包括抗体或其抗原结合片段)的工程化B细胞。在一些情况下,这样的治疗性蛋白质可以靶向参与疾病或病症(如感染性疾病、癌症、自身免疫性疾病或其他疾病或病症)的一种或多种途径和/或分子。在一些情况下,工程化B细胞可以表达和分泌靶向病原体衍生的抗原或肿瘤或癌症相关抗原的治疗性抗体。在一些方面中,外源蛋白质在工程化B细胞中的表达是有条件的,如在诱导型中。在一些方面中,外源蛋白质在工程化B细胞中的表达是组成型的。

[0134] 在一些实施方案中,所提供的工程化B细胞是其中某些基因(已经被修饰包括编码内源免疫球蛋白的基因、参与外源蛋白质的产生和/或分泌的基因、以及参与B细胞谱系确定的基因)的那些细胞。

[0135] 在一些实施方案中,所提供的工程化B细胞还包括表达驱动受体(如配体结合受体)的那些细胞,所述表达驱动受体能够(如在配体结合后)诱导促有丝分裂或增殖信号或能够调节细胞分化的信号。在一些实施方案中,在配体结合后,受体向工程化B细胞发出信号以表达和/或分泌外源蛋白质。在一些实施方案中,驱动受体是内源B细胞受体。在一些实施方案中,驱动受体是外源性的,如重组或工程化受体,如嵌合受体。在一些实施方案中,工程化B细胞包括导致内源B细胞受体的表达降低或中断的修饰。在一些工程化B细胞中,可以修饰所述细胞以阻止内源抗体的类别转换和/或阻止内源抗体从膜锚定形式转换为分泌形式。在一些方面中,此类特征赋予向个体持久的长期递送外源蛋白质,例如在过继细胞疗法的背景下。

[0136] 通常通过引入一个或多个工程化核酸分子将所述细胞工程化。核酸分子编码外源蛋白质,如治疗性蛋白质,例如抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,核酸分子不编码抗体或其抗原结合片段。在一些工程化B细胞中,所述核酸被整合到靶向基因座(如内源免疫球蛋白基因座)中。在其他工程化B细胞中,所述核酸被整合到随机基因座中。所述核酸还包括进一步编码本文描述的受体(例如驱动受体)的那些核酸。还提供了如通过基因编辑影响内源基因的表达的核酸。例如,一些此类核酸实现对内源基因的表达的阻遏和/或破坏,或实现内源基因的表达的增加。

[0137] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码外源蛋白质的核酸,所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码不是抗体的外源蛋白质的核酸。在一些实施方案中,外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、和细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)。

[0138] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码条件性表达的外源蛋白质的核酸。例如,在一些实施方案中,核酸包含与编码外源蛋白质的核苷酸序列可操作地连接的可诱导调节元件。

[0139] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码外源蛋白质的核酸,并被修饰以阻止内源抗体的类别转换和/或阻止内源抗体从膜锚定形式转换为分泌形式。例如,在一些实施方案中,工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰改变参与调节免疫球蛋白类别转换和/或从膜锚定形式向分泌形式的转换的一种或多种蛋白质。在一些实施方案中,工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰改变参与调节免疫球蛋白类别转换和/或从膜锚定形式向分泌形式的转换的在免疫球蛋白基因座处的一个或多个核苷酸序列。

[0140] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码外源蛋白质的核酸,其中所述核酸被整合到内源免疫球蛋白基因座中。例如,在一些实施方案中所述核酸如通过同源重组被插入内源免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。在一些实施方案中,设计者核酸酶促进了所述整合。

[0141] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含编码外源蛋白质的核酸,并被修饰以增加所述细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力。例如,在一些实施方案中,工程化B细胞被修饰以改变参与B细胞谱系确定的一种或多种蛋白质的表达,或以采用分泌抗体的B细胞(如浆母细胞或浆细胞)的表型。

[0142] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含:编码外源蛋白质和包含配体结合结构域的受体的核酸,其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节工程化B细胞的分化的信号。在一些实施方案中,所述受体是嵌合受体。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是配体结合蛋白,并且所述受体和外源蛋白质不结合相同的配体,或含有不同的配体结合结构域。在一些实施方案中,配体与所述受体的结合增加了所述外源蛋白质的表达和/或分泌。

[0143] 在一些方面中,所提供的工程化B细胞和方法的特征避免了直接向受试者递送的或工程化为在受试者的其他细胞类型中表达的外源蛋白质的瞬时可用性。例如,在一些实施方案中,它们允许在过继细胞疗法的背景下在受试者中表达和/或分泌外源蛋白质的持久能力(其中所述工程化B细胞是长期存在的),和/或可以如通过结合与外源蛋白质提供治疗益处的疾病或病症相关的配体而被诱导以增殖和/或分泌外源蛋白质。

[0144] A. 细胞

[0145] 工程化方法中使用的起始细胞群可以源自于许多来源。起始细胞群可以源自于PBMC或其他血液样品、扁桃体、骨髓或其他如其中存在B细胞的制剂。在一些方面中,起始细胞群可以包括大量(非选择的)B细胞或特定B细胞亚群,如成熟、未成熟、记忆、幼稚或其他B细胞亚群。在一些实施方案中,起始细胞群可以包含能够分化成B细胞的前体细胞,如造血干细胞(HSC)。关于待治疗的受试者,起始细胞可以是同种异体的和/或自体同源的。所述方

法包括现成的方法。在一些方面中,如对于现成的技术,起始细胞是多能的和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,所述方法包括从所述受试者中分离细胞,如本文所述制备、加工、培养和/或工程化它们,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0146] B细胞的亚型和亚群包括前体或未成熟B细胞、幼稚成熟B细胞、记忆B细胞、浆母细胞和浆细胞。前体或未成熟B细胞包括HSC、多能祖(MPP)细胞、常见淋巴祖(CLP)细胞、早期祖B细胞、晚期祖B细胞、大前B细胞、小前B细胞、未成熟B细胞、T1B细胞和T2B细胞。

[0147] 在一些实施方案中,一个或多个B细胞群富集或耗尽对于一种或多种特定标记(如表面标记)呈阳性(标记⁺)或表达高水平的一种或多种特定标记(如表面标记)(标记^高)的细胞、或对于一种或多种标记呈阴性(标记⁻)或表达相对低水平的一种或多种标记(标记^低)的细胞。在一些情况下,此类标记是在某些B细胞群(如幼稚细胞)上不存在或以相对低的水平表达,但在某些其他B细胞群(如非幼稚细胞)上存在或以相对较高的水平表达的那些标记。

[0148] 在一个实施方案中,所述细胞(1)富集(即,阳性选择)对于PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)的细胞;和/或(2)富集(即,阳性选择)对于CD19、CD20、CD21、CD22、CD23和CD24中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD20、CD21、CD22、CD23和CD24中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于CD10、CD27和CD38中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD10、CD27和CD38中的一种或多种(如全部)的细胞。在一些实施方案中,所述细胞富集幼稚成熟B细胞。

[0149] 在一个实施方案中,所述细胞(1)富集(即,阳性选择)对于IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)的细胞;和/或(2)富集(即,阳性选择)对于CD19、CD38、CD27、CD269和MHCII中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD38、CD27、CD269和MHCII中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于CD20和/或CD138呈阳性或表达高表面水平的CD20和/或CD138的细胞。在一些实施方案中,所述细胞富集浆母细胞。

[0150] 在一个实施方案中,所述细胞(1)富集(即,阳性选择)对于IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)的细胞;和/或(2)富集(即,阳性选择)对于CXCR4、CD27、CD38、CD138和CD269中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的CXCR4、CD27、CD38、CD138和CD269中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于CD19、CD20和MHCII中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的

CD19、CD20和MHCII中的一种或多种(如全部)的细胞。在一些实施方案中,所述细胞富集浆细胞。

[0151] 在一个实施方案中,所述细胞(1)富集(即,阳性选择)对于PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的PAX5、BACH2、BCL-2、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高水平的IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种(如全部)的细胞;和/或(2)富集(即,阳性选择)对于CD19、CD20、CD40、CXCR4、CXCR5和CXCR7中的一种或多种(如全部)呈阳性或表达高表面水平的CD19、CD20、CD40、CXCR4、CXCR5和CXCR7中的一种或多种(如全部)的细胞,和/或耗尽(例如,阴性选择)对于CD23和/或CD38呈阳性或表达高表面水平的CD23和/或CD38的细胞。在一些实施方案中,所述细胞富集记忆B细胞。

[0152] B. 编码外源蛋白质的核酸

[0153] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含经由基因工程引入的一个或多个核酸,所述一个或多个核酸包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列。在一些实施方案中,核酸是异源的,即通常不存在于细胞或从细胞获得的样品中,如从另一种生物或细胞获得的核酸,例如,所述核酸通常不在被工程化的细胞和/或这种细胞所来源的生物中发现。在一些实施方案中,核酸不是天然存在的如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合的核酸。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一些是对特定生物(如人)进行密码子优化的。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一些不包含内含子序列。在一些实施方案中,所述一个或多个编码序列中的至少一些不包含编码跨膜结构域的序列。

[0154] 本文描述的任何外源蛋白质可以由含有以任何组合或排列的编码外源蛋白质的一个或多个核酸分子的多核苷酸编码。例如,一个、两个、三个或更多个多核苷酸可以编码在外源蛋白质中包含的一个、两个、三个、或更多个不同的多肽链。在一些实施方案中,一个载体或构建体包含编码在外源蛋白质中包含的一条或多条多肽链的核酸分子,并且一个或多个单独的载体或构建体包含编码在外源蛋白质中包含的一条或多条另外的多肽链的核酸分子。核酸分子中的每一个还可以编码一种或多种标记,如表面标记。在一些实施方案中,一种或多种标记是转导标记、替代标记和/或选择标记。

[0155] 示例性替代标记可以包括截短形式的细胞表面多肽,如是非功能性的并且不转导或不能转导信号或通常被细胞表面多肽的全长形式转导的信号、和/或不内化或不能内化的截短形式。示例性截短的细胞表面多肽包括截短形式的生长因子或其他受体,如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(tEGFR,在SEQ ID NO:5或207中列出的示例性tEGFR序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其修饰形式。tEGFR可以含有被抗体西妥昔单抗(Erbitux®)或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,其可以被用于鉴定或选择已经用tEGFR构建体和编码的外源蛋白质工程化的细胞,和/或用于消除或分离表达所编码的外源蛋白质的细胞。参见美国专利号8,802,374以及Liu等人,Nature Biotech.2016年四月;34(4):430-434)。在一些方面中,标记例如替代标记包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)的全部或部分(例如,截短形式)。

[0156] 在一些实施方案中,标记是或包含荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP);增强型绿色

荧光蛋白 (EGFP), 如超折叠GFP (sfGFP; 在SEQ ID NO:208中列出); 红色荧光蛋白 (RFP), 如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2; 青色荧光蛋白 (CFP); 蓝绿色荧光蛋白 (BFP); 增强型蓝色荧光蛋白 (EBFP); 和黄色荧光蛋白 (YFP); 及其变体, 包括荧光蛋白的物种变体、单体变体、以及密码子优化型和/或增强型变体。在一些实施方案中, 标记是或包含酶 (如萤光素酶)、来自大肠杆菌的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌的胚胎碱性磷酸酶 (SEAP)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶 (luc)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 β -葡萄糖醛酸酶 (GUS) 或其变体。

[0157] 在一些实施方案中, 标记是选择标记。在一些实施方案中, 选择标记是或包含赋予对外源试剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中, 选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中, 选择标记是向哺乳动物细胞赋予抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中, 选择标记是或包含嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博莱霉素抗性基因或其修饰形式。

[0158] 在其中核酸分子编码两条或更多条不同多肽链的某些情况下, 多肽链中的每一条可以由单独的核酸分子编码。例如, 提供了两个单独的核酸, 并且每一个可以单独转移到或引入细胞中以在细胞中表达。

[0159] 在一些实施方案中, 所述核酸分子是编码多条不同多肽链的单个多核苷酸。在一些实施方案中, 编码不同多肽链中每一条的编码序列可以可操作地连接至启动子, 所述启动子可以是相同的或不同的。在一些实施方案中, 所述核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中, 此类核酸分子可以是多顺反子的 (双顺反子的或三顺反子的, 参见例如, 美国专利号6,060,273)。例如, 在一些实施方案中, 转录单元可以是工程化为含有IRES (内部核糖体进入位点) 的双顺反子单元, 其允许通过来自单个启动子的信息来共表达基因产物 (例如编码外源蛋白质的一条或多条链以分泌)。

[0160] 在一些实施方案中, 单个启动子可以指导RNA的表达, 所述RNA在单个开放阅读框 (ORF) 中含有通过编码自切割肽 (例如, 2A序列) 或蛋白酶识别位点 (例如, 弗林蛋白酶) 的序列彼此分开的两个或三个基因 (例如, 编码外源蛋白质的不同多肽链)。因此, 所述ORF编码单个多肽, 其在翻译期间 (在2A的情况下) 或翻译后被加工成单个蛋白质。在一些情况下, 所述肽 (如T2A) 可以导致核糖体跳过 (核糖体跳跃) 2A元件C-末端处的肽键的合成, 这导致2A序列末端与下游的下一个肽之间的分离 (参见例如, de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) 和deFelipe等人Traffic 5:616-626 (2004))。许多2A元件是已知的。可以用于本文公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于, 包括来自口蹄疫病毒的包括2A序列 (F2A, 例如SEQ ID NO:4)、来自马鼻炎A病毒的2A序列 (E2A, 例如SEQ ID NO:3)、来自明脉扁刺蛾 β 四体病毒 (Thosea asigna virus) 的2A序列 (T2A, 例如SEQ ID NO:1或205) 和来自猪捷申病毒-1 (porcine teschovirus-1) 的2A序列 (P2A, 例如SEQ ID NO:2或206), 如美国专利公开号20070116690中所述。

[0161] 在一些实施方案中, 编码标记的核酸和编码重组受体的核酸可操作地连接至两个不同的启动子。

[0162] 本文还提供了包含所述核酸分子的载体和构建体。

[0163] 还提供了含有一个或多个核酸分子、载体或构建体 (如本文描述的任何核酸分子、载体或构建体) 的组合物。在一些实施方案中, 所述核酸分子、载体、构建体或组合物可以被

用于将细胞(如B细胞)工程化,以表达本文描述的任何外源蛋白质和/或重组受体。

[0164] 1. 治疗性蛋白质

[0165] 外源蛋白质包括血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子、以及抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述细胞因子包括但不限于趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。在一些实施方案中,外源蛋白质是可用于治疗和/或预防个体的疾病或病症的治疗性蛋白质。

[0166] 示例性血液因子包括因子I、因子II、因子III、因子IV、因子V、因子VI、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII和因子XIII。在一些实施方案中,血液因子对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0167] 示例性血栓溶解剂包括链激酶、尿激酶和组织纤溶酶原激活剂。在一些实施方案中,组织纤溶酶原激活剂选自阿替普酶、瑞替普酶或替奈普酶。在一些实施方案中,血栓溶解剂对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0168] 示例性激素包括胰岛素、胰高血糖素、生长激素和促性腺激素。在一些实施方案中,促性腺激素选自卵泡刺激激素(FSH)、黄体化激素(LH)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)。在一些实施方案中,激素对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0169] 示例性生长因子包括粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、骨形态发生蛋白(BMP)、促红细胞生成素和促血小板生成素。在一些实施方案中,BMP选自BMP1、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP6、BMP8a、BMP8b、BMP10、或BMP15。在一些实施方案中,生长因子对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0170] 示例性趋化因子包括CC趋化因子(CCL1、CCL2等)、CXC趋化因子(CXCL1、CXCL2等)、C趋化因子(XCL1和XCL2)和CX3C趋化因子(CX3CL1)。在一些实施方案中,趋化因子对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0171] 示例性干扰素包括干扰素- α 、- β 和- γ 。在一些实施方案中,外源蛋白质选自干扰素 α 2a、干扰素 α 2b、人白细胞干扰素- α (HuIFN- α -Le)、干扰素 β 1a、干扰素 β 1b、干扰素 γ 1b。在一些实施方案中,干扰素对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0172] 示例性白细胞介素包括白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-2(IL-2)、白细胞介素-3(IL-3)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-5(IL-5)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-7(IL-7)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-9(IL-9)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-11(IL-11)、白细胞介素-12(IL-12)、白细胞介素-13(IL-13)、白细胞介素-14(IL-14)、白细胞介素-15(IL-15)、白细胞介素-16(IL-16)、白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-18(IL-18)、白细胞介素-19(IL-19)、白细胞介素-20(IL-20)、白细胞介素-21(IL-21)、白细胞介素-22(IL-22)、白细胞介素-23(IL-23)、白细胞介素-24(IL-24)、白细胞介素-25(IL-25)、白细胞介素-26(IL-26)、白细胞介素-27(IL-27)、白细胞介素-28(IL-28)、白细胞介素-29(IL-29)、白细胞介素-30(IL-30)、白细胞介素-31(IL-31)、白细胞介素-32(IL-32)、白细胞介素-33(IL-33)、白细胞介素-35(IL-35)和白细胞介素-36(IL-36)。在一些实施方案中,白细胞介素选自IL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13

或IL-18。在一些实施方案中,白细胞介素对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0173] 示例性肿瘤坏死因子包括肿瘤坏死因子 α (TNF α)、淋巴毒素 α (LT α)、淋巴毒素 β (LT β)、CD40L、CD27L、CD30L、FASL、4-1BBL、OX40L和TNF相关的细胞凋亡诱导配体(TRAIL)。在一些实施方案中,肿瘤坏死因子对于治疗和/或预防疾病或病症(如本文描述的任何疾病或病症)而言是治疗性的。

[0174] 抗体

[0175] 在一些实施方案中,外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,外源蛋白质是或包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的单链抗体片段(scFv)。

[0176] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式,如胞内抗体、肽体(peptibody)、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、多特异性(例如,双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联二-scFv、串联三-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0177] 在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段特异性识别全长抗体的抗原。在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,所述抗体重链恒定区选自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,所述抗体轻链恒定区选自例如 κ 或 λ 。

[0178] 在一些实施方案中,外源蛋白质是抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区;单链抗体分子,如scFv和单结构域V_H单抗;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在具体实施方案中,所述抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0179] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个V_H或V_L结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0180] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。在一些实施方案中,外源蛋白质包含抗体重链结构域,其特异性结合待靶向的细胞或疾病(如病毒感染的

细胞、肿瘤细胞或癌症细胞)的抗原(如癌症标记、病毒抗原、或细胞表面抗原),如本文描述的或本领域已知的任何靶抗原。

[0181] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组方法产生。在一些实施方案中,所述抗体是重组产生的片段,如包含不天然存在的排列的片段(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些),和/或不通过消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些实施方案中,抗体片段是scFv。

[0182] “人源化”抗体是这样的抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基衍生自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基衍生自人FR。人源化抗体任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指所述非人抗体的变体,其经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0183] 在一些实施方案中,外源蛋白质是或包含抗体或抗原结合片段(例如scFv),其特异性识别配体(例如抗原,如在细胞表面上表达的完整抗原)、或可溶性配体(例如,抗原,如本文描述的任何抗原)。

[0184] 在一些实施方案中,外源蛋白质(如抗体或抗原结合片段(例如scFv))可以含有免疫球蛋白恒定区的至少一部分,如一个或多个恒定区结构域。在一些实施方案中,恒定区包括轻链恒定区和/或重链恒定区1(CH1)。在一些实施方案中,抗体包括CH2和/或CH3结构域,如Fc区。在一些实施方案中,Fc区是人IgG(如IgG1或IgG4)的Fc区。

[0185] 在一些实施方案中,Fc结构域含有修饰(例如,取代),使得Fc分子的界面被修饰以帮助和/或促进异二聚化。在一些实施方案中,所述修饰含有杵臼结构(KiH)或对接锁定(DNL)修饰。在一些实施方案中,修饰包括将突起(杵)引入第一Fc多肽中并将腔(臼)引入第二Fc多肽中,使得突起可定位在腔中以促进第一含Fc的多肽和第二含Fc的多肽的复合。靶向用于替代和/或修饰以在多肽中产生突起或腔的氨基酸通常是与第二多肽的界面中的一个或多个氨基酸相互作用或接触的界面氨基酸。

[0186] 人IgG1的CH3界面例如涉及位于四个反平行 β -链上的每个结构域上的16个残基,其从每个表面掩埋1090²(参见例如,Deisenhofer等人(1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller等人, (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway等人, (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621; 美国专利号5,731,168)。CH3结构域的产生突起或腔的修饰描述于例如美国专利号5,731,168; 国际专利申请W0 98/50431和W0 2005/063816; 以及Ridgway等人, (1996) *Prot. Engin.*, 9:617-621中。在一些例子中,用于产生突起或腔而对CH3结构域的修饰通常靶向位于两个中心反平行 β 链上的残基。目的是最小化以下风险,即产生的突起可通过突出到周围溶剂中而被容纳而不是由配偶体CH3结构域中的补偿腔容纳。

[0187] 在一些实施方案中,异二聚体分子含有“杵链”的CH3结构域中的T366W突变,以及“臼链”的CH3结构域中的T366S、L368A、Y407V突变。在一些情况下,例如通过将Y349C突变引入“杵”或“臼”链的CH3结构域中,以及将E356C突变或S354C突变引入另一条链的CH3结构域中,还可以使用CH3结构域之间的另外的链间二硫桥(Merchant, A.M., 等人, *Nature Biotech.* 16 (1998) 677-681)。在一些实施方案中,异二聚体分子含有两个CH3结构域之一中的S354C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。

在一些实施方案中,异二聚体分子包含两个CH3结构域之一中的E356C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的Y349C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异二聚体分子包含两个CH3结构域之一中的Y349C、T366W突变以及两个CH3结构域中的另一个中的E356C、T366S、L368A、Y407V突变。在一些实施方案中,异二聚体分子包含两个CH3结构域之一中的Y349C、T366W突变,以及两个CH3结构域中的另一个中的S354C、T366S、L368A、Y407V突变。其他杵臼结构技术的例子是已知的,如在EP 1 870 459 A1中所述的那些。

[0188] 在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,一个或多个核酸分子包含一个或多个编码序列,其包含编码包含重链抗体序列的第一多肽的第一编码序列、和任选地编码包含轻链抗体序列的第二多肽的第二编码序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含重链可变结构域序列和/或所述第二多肽包含轻链可变结构域序列。在一些实施方案中,所述第一多肽包含全长重链抗体序列和/或所述第二多肽包含全长轻链抗体序列。在一些实施方案中,所述第一和第二编码序列包含在单独的核酸分子中,并且所述外源蛋白质包含在单独的多肽链中包含的第一多肽和第二多肽。在一些实施方案中,所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含所述第一编码序列和所述第二编码序列。在一些实施方案中,单个核酸分子包含连接所述第一编码序列和所述第二编码序列的核苷酸接头。在一些实施方案中,所述核苷酸接头编码肽接头,并且所述外源蛋白质包含单个多肽链,所述单个多肽链包含通过肽接头连接的第一多肽和第二多肽。在一些实施方案中,所述核苷酸接头是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或者是或包含编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(包括但不限于P2A、T2A、E2A和F2A)的核苷酸序列,并且所述外源蛋白质包含在单独的多肽链中包含的第一多肽和第二多肽。

[0189] 在一些实施方案中,被外源蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段)靶向的抗原包括癌症或肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,所述抗原选自与血液癌相关的抗原,所述血液癌包括但不限于白血病,包括急性白血病(如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病以及成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红细胞白血病)、慢性白血病(如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性髓细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0190] 在一些实施方案中,所述抗原选自与实体瘤相关的抗原,所述实体瘤包括但不限于肉瘤和癌,包括肾上腺皮质癌、胆管癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胃癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺癌(例如,髓样甲状腺癌和乳头状甲状腺癌)、嗜铬细胞瘤皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆道癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌(例如,宫颈癌和前浸润性宫颈发育不良)、结直肠癌、肛门癌、肛管、或肛门直肠、阴道癌、外阴癌(例如,鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌和纤维肉瘤)、阴茎癌、口咽癌、食管癌、头癌(例如,鳞状细胞癌)、颈癌(例如,鳞状细胞癌)、睾丸癌(例如,精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌、畸形恶癌、绒毛膜癌、肉瘤、莱迪希细胞瘤(Leydig cell tumor)、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤和脂肪瘤)、膀胱癌、肾癌、黑色素瘤、子宫癌(例如,子宫内膜癌)、尿路

上皮癌(例如,鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、输尿管癌和泌尿膀胱癌)、和CNS肿瘤(如神经胶质瘤(如脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤(cranio-pharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0191] 示例性外源蛋白质(例如,抗体或其抗原结合片段)包括与肿瘤或癌症相关抗原结合的外源蛋白质,所述肿瘤或癌症相关抗原是例如选自以下的分子:碳酸酐酶IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体特异的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p(CSAp)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚基、HER2/neu、HMGB-1、低氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-7、IL-18、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PIGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记、bcl-2、bcl-6、Kras、cMET、致癌基因标记和致癌基因产物(参见例如,Sensi等人,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等人,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等人Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。

[0192] 在一些实施方案中,所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段,其源自于阿仑单抗、阿特殊单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗(daclizumab)(Zenapax)、达雷木单抗(daratumumab)、地诺单抗(denosumab)、地努妥昔单抗(dinutuximab)、埃罗妥珠单抗(elotuzumab)、吉妥珠单抗(gemtuzumab)(Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗(ofatumumab)、帕尼单抗、派姆单抗(pembrolizumab)、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗(Rituxan、Mabthera)、司妥昔单抗(siltuximab)、托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物(ado-trastuzumab emtansine)、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段对于治疗和/或预防疾病或病症而言是治疗性的。

[0193] 还包括与病原体相关(如病毒编码的)抗原结合的外源蛋白质(例如,抗体或抗原结合片段),所述抗原包括但不限于源自于以下的抗原:鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、红孢子虫属(*Anaplasma* genus)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、巴西钩口线虫(*Ancylostoma braziliense*)、十二指肠钩口线虫(*Ancylostoma duodenale*)、溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、人蛔虫(*Ascaris lumbricoides*)、曲霉属(*Aspergillus* genus)、星状病毒科(*Astroviridae*)、巴贝西虫属(*Babesia* genus)、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、汉氏巴尔通体(*Bartonella henselae*)、BK病毒、人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳博德特杆菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、疏螺旋体属(*Borrelia* genus)、疏螺旋体属(*Borrelia*)物种、布鲁氏菌属(*Brucella* genus)、马来丝虫(*Brugia malayi*)、布尼亚病毒科(*Bunyaviridae* family)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)和其他伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)物种、鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、杯状病毒科(*Caliciviridae* family)、弯曲杆菌属(*Campylobacter* genus)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、念珠菌属(*Candida*)物种、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎嗜衣原体(*Chlamydophila pneumoniae*)、鹦鹉热嗜衣原体(*Chlamydophila psittaci*)、CJD朊病毒、华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)、肉毒梭状芽胞杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、梭菌属(*Clostridium*)物种、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、球孢子菌属(*Coccidioides*)物种、冠状病毒(*coronavirus*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)、克里米亚-刚果出血热病毒(*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium* genus)、巨细胞病毒(CMV)、登革病毒(DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)、脆弱双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、埃博拉病毒(EBOV)、棘球绦虫属(*Echinococcus* genus)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、尤氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*)、埃立克体属(*Ehrlichia* genus)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、肠球菌属(*Enterococcus* genus)、肠病毒属(*Enterovirus* genus)、肠道病毒(*Enteroviruses*) (主要是柯萨奇病毒A和肠病毒71(EV71))、表皮癣菌属(*Epidermophyton*)物种、埃-巴二氏病毒(EBV)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)0157:H7、0111和0104:H4、肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)和大片吸虫(*Fasciola gigantica*)、FFI朊病毒、丝虫目(*Filarioidea*)总科、虫媒病毒(*Flavivirus*)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、梭杆菌属(*Fusobacterium* genus)、白地霉(*Geotrichum candidum*)、肠贾第虫(*Giardia intestinalis*)、颚口虫属(*Gnathostoma*)物种、GSS朊病毒、瓜纳里托病毒(*Guanarito virus*)、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、亨尼帕病毒(*Henipavirus*) (亨德拉病毒、尼帕病毒)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒1和2(HSV-1和HSV-2)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)、HIV(人免疫缺陷病毒)、威尼克外

瓶霉 (*Hortaea werneckii*)、人博卡病毒 (Human bocavirus) (HBoV)、人疱疹病毒6型 (HHV-6) 和人疱疹病毒7型 (HHV-7)、人偏肺病毒 (hMPV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、人副流感病毒 (HPIV)、人T细胞白血病毒1 (HTLV-1)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、JC病毒、胡宁病毒 (Junin virus)、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒 (KSHV)、金格杆菌 (*Kingella kingae*)、肉芽肿克雷伯菌 (*Klebsiella granulomatis*)、库鲁病朊病毒、拉沙病毒、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、利什曼虫属 (*Leishmania* genus)、细螺旋体属 (*Leptospira* genus)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、马丘波病毒 (Machupo virus)、马拉色氏霉菌属 (*Malassezia*) 物种、马尔堡病毒、麻疹病毒、横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokagawai*)、小孢子虫目门 (*Microsporidia* phylum)、传染性软疣病毒 (MCV)、腮腺炎病毒、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和弥漫型麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepromatosis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、福氏耐格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*)、美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、星形诺卡菌 (*Nocardia asteroides*)、诺卡菌属 (*Nocardia*) 物种、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*)、正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae* family) (流感)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus*) 物种、卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)、细小病毒B19、巴斯德菌属 (*Pasteurella* genus)、疟原虫属 (*Plasmodium* genus)、耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞体病毒 (RSV)、鼻病毒 (Rhinovirus)、鼻病毒 (rhinoviruses)、小株立克次体 (*Rickettsia akari*)、立克次体属 (*Rickettsia* genus)、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒立克次体 (*Rickettsia typhi*)、裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus)、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒 (*Sabia virus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella* genus)、人疥螨 (*Sarcoptes scabiei*)、SARS冠状病毒、血吸虫属 (*Schistosoma* genus)、志贺氏菌属 (*Shigella* genus)、辛诺柏病毒 (*Sin Nombre virus*)、汉坦病毒、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*)、绦虫属 (*Taenia* genus)、猪肉绦虫 (*Taenia solium*)、蜱传脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus) (TBEV)、犬弓首蛔虫 (*Toxocara canis*) 或猫弓首线虫 (*Toxocara cati*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、毛癣菌属 (*Trichophyton*) 物种、毛首鞭形线虫 (*Trichuris trichiura*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、重型天花 (*Variola major*) 或轻型天花 (*Variola minor*)、vCJD朊病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、西尼罗病毒 (West Nile virus)、西部马脑炎病毒、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、黄热病病毒、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶尔森

菌 (*Yersinia pestis*) 或假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0194] 在一些实施方案中,所述外源蛋白质是与HIV相关抗原结合的抗体或其抗原结合片段,所述HIV相关抗原是例如选自以下的分子:HIV Gag多蛋白(p55)、HIV Pol多蛋白、HIV Gag-Pol前体(p160)、HIV基质蛋白(MA,p17)、HIV衣壳蛋白(CA,p24)、HIV间隔肽1(SP1,p2)、HIV核衣壳蛋白(NC,p9)、HIV间隔肽2(SP2,p1)、HIV P6蛋白、HIV逆转录酶(RT,p50)、HIV RNase H(p15)、HIV整合酶(IN,p31)、HIV蛋白酶(PR,p10)、HIV Env(gp160)、gp120、gp41、HIV反式激活因子(Tat)、HIV病毒粒子蛋白表达调节因子(Rev)、HIV慢病毒蛋白R(Vpr)、HIV Vif、HIV负性调节因子(Nef)、和HIV病毒蛋白U(Vpu)。在一些实施方案中,HIV相关抗原是HIV-1和/或HIV-2相关抗原。

[0195] 在一些实施方案中,所述外源蛋白质是衍生自中和(如广泛中和)抗病毒抗体的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段衍生自中和性(如广泛中和性)抗HIV抗体。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段能够结合HIV-1和/或HIV-2。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段能够中和HIV-1的一个或多个组。示例性HIV-1组包括HIV-1 M组、HIV-1 N组、HIV-1 O组和HIV-1 P组。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段能够中和HIV-1的一个或多个(包括至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个或更多个)亚型和/或其重组形式。亚型及其重组形式是已知的;示例性亚型包括亚型A(包括A1和A2)、亚型B、亚型C和重组形式(包括CRF_AE)。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合片段能够中和HIV-2的一个或多个组(包括其亚型)。示例性HIV-2组包括HIV-2 A组、HIV-2 B组、HIV-2 C组、HIV-2 D组、HIV-2 E组、HIV-2 F组、HIV-2 G组和HIV-2 H组。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向gp160的表位。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向gp120的表位。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向围绕gp120的332位处的聚糖为中心的高甘露糖斑块(high-mannose patch)。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向gp120的CD4结合位点(CD4bs)。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向gp41的表位。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体靶向gp41的近膜外部区域(MPER)。在一些实施方案中,广泛中和性抗HIV抗体是或衍生自选自以下的分子:10-1074、10E8、12A12、12A21、2F5、35022、3BC176、3BNC117、3BNC55、3BNC60、3BNC62、447-52D、4E10、5H/I1-BMV-D5、8ANC131、8ANC134、8ANC195、b12、M66.6、CAP206-CH12、10E8I、PG6、PG16、CH01、CH02、CH03、CH04、2G12、PCDN-33A、PCDN-33B、PCDN-38A、PG16、PG9、PGDM1400、PGDM1401、PGDM1402、PGDM1403、PGDM1404、PGDM1405、PGDM1406、PGDM1407、PGDM1408、PGDM1409、PGDM1410、PGDM1411、PGDM1412、PGT121、PGT122、PGT123、PGT124、PGT125、PGT126、PGT127、PGT128、PGT129、PGT130、PGT131、PGT132、PGT133、PGT134、PGT135、PGT136、PGT137、PGT141、PGT142、PGT143、PGT144、PGT145、PGT151、PGT152、HJ16、CH103、CH104、CH105、CH106、HGN194、HJ16、HK20、VRC01、VRC02、VRC03、VRC07、VRC23、VRC-PG04、VRC-PG04b、VRC-PG20、VRC-CH30、VRC-CH31、VRC-CH32、VRC-CH33、VRC-CH34、NIH45-46、1NC9、1B2530和Z13。参见例如,Pritchard,L.K.等人(2015).*Nature communications*,6;Sok,D.,等人(2013).*PLoS Pathog*,9(11),e1003754;Sok,D.,等人(2014).*Science translational medicine*,6(236),236ra63-236ra63;Doores,K.J.,等人(2015).*Journal of virology*,89(2),1105-1118;以及Falkowska,E.,等人(2014).*Immunity*,40(5),657-668。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是任何上述抗HIV抗体的片段。

[0196] 所述外源蛋白质也可以是个体的缺乏与疾病或病症相关的任何循环蛋白质。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是在个体中表达的非功能性循环蛋白质的功能形式。

[0197] 2. 调节序列

[0198] 在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,外源蛋白质的表达是在B细胞特异性启动子和/或增强子的控制下。在一些实施方案中,B细胞特异性启动子指导B细胞中的特异性转基因表达。例如,B细胞特异性启动子可能能够指导外源蛋白质在浆母细胞和/或浆细胞中的表达。B细胞特异性启动子的另一个非限制性例子是能够指导外源蛋白质在整个B细胞发育中从原代和次级淋巴器官中的造血细胞中表达的启动子。在一些实施方案中,B细胞特异性启动子能够在不影响B细胞发育的情况下驱动外源蛋白质的表达。据预期,本文公开的方法或系统受B细胞特异性启动子的来源限制。在一些实施方案中,B细胞特异性启动子可以是任何B细胞特异性基因的启动子/增强子序列,和/或其变体或工程化部分,其通常控制在B细胞中表达的基因的表达,其例子包括但不限于CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD40、CD72、Blimp-1、CD79b(也称为B29或Ig β)、mb-1(也称为Ig α)、IRF4、XBP1、酪氨酸激酶blk、VpreB、免疫球蛋白重链、免疫球蛋白 κ 轻链、免疫球蛋白 λ 轻链、免疫球蛋白J链等的启动子/增强子。在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,外源蛋白质的表达是在免疫球蛋白启动子和/或增强子的控制下。在一些实施方案中,免疫球蛋白启动子和/或增强子是重链启动子和/或增强子、 κ 轻链启动子和/或增强子、或 λ 轻链启动子和/或增强子。

[0199] 在一些实施方案中,免疫球蛋白启动子和/或增强子是重链启动子和/或增强子,其选自重链可变区启动子、内含子增强子($E\mu$)、和在IgH 3'调节区(3'RR)中包含的一个或多个增强子。在一些实施方案中,重链可变区启动子包含八聚体元件。在一些实施方案中,八聚体元件包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列。在一些实施方案中, $E\mu$ 增强子包含核心元件($cE\mu$)和任选地一个或两个侧翼核基质附着区(MAR)。在一些实施方案中, $E\mu$ 包含SEQ ID NO:204的核苷酸序列或其变体,所述变体表现出与SEQ ID NO:204具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列一致性。参见例如,Grosschedl,R.,&Whitehead,D.B.(1985)Cell,41(3):885-897;Ernst,P.,&Smale,S.T.(1995)Immunity 2(5):427-438;Nikolajczyk,B.S.等人(1999)Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology(64卷,第99-108页);Laumen,H.等人(2000)European journal of immunology 30(2):458-469;Ju,Z.等人(2007)Journal of Biological Chemistry 282(48):35169-35178。

[0200] 在一些实施方案中,免疫球蛋白启动子和/或增强子是轻链启动子和/或增强子,其选自轻链可变区启动子、 κ 轻链内含子增强子($E\kappa$)、 λ 轻链内含子增强子($E\lambda$)、 κ 轻链3'增强子(3' $E\kappa$)、 λ 轻链3'增强子(3' $E\lambda$)。在一些实施方案中,轻链可变区启动子包含八聚体元件。在一些实施方案中,八聚体元件包含SEQ ID NO:203的核苷酸序列。在一些实施方案中, $E\kappa$ 增强子包含核心元件($cE\kappa$)和任选地一个或两个侧翼MAR。

[0201] 在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,外源蛋白质的表达是组成型的。在一些实施方案中,表达是在组成型活性启动子的控制下。在一些实施方案中,启动子选自RNA pol I、pol II或pol III启动子。在一些实施方案中,启动子选自:pol III启动子,其是U6或H1启动子;或pol II启动子,其是CMV、SV40早期区域或腺病毒主要晚期启动子。在一些实施方案中,启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK或CAGG。

[0202] 在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,外源蛋白质的表达是有条件的。在一些实施方案中,表达是在条件性启动子或增强子或反式激活因子的控制下。在一些实施方案中,条件性启动子或增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。在一些实施方案中,条件启动子是诱导型启动子。在一些实施方案中,所述启动子包括Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列、多西环素操纵子序列或其类似物。在一些例子中,诱导型启动子包含四环素反应元件(TRE)。在一些例子中,条件启动子或增强子或反式激活因子允许在存在所需条件(如存在诱导物(例如四环素或多西环素),以及存在启动子、增强子或激活因子的相应转录因子)时表达所提供的重组受体。在一些例子中,相应的转录因子天然存在于工程化B细胞中。在其他例子中,还将编码相应转录因子的核酸引入工程化B细胞中。在一些实施方案中,启动子是阻抑型启动子。在一些实施方案中,启动子包括Lac阻抑元件或四环素阻抑元件。

[0203] 3. 信号序列

[0204] 在本文描述的工程化B细胞的一些实施方案中,编码外源蛋白质的一个或多个编码序列包含编码与外源蛋白质融合的信号序列的信号序列编码区(SSCR)。在一些实施方案中,信号序列是多肽序列或足以介导将多肽转位至细胞表面的序列的组合。将多肽转位至细胞表面由分泌途径介导,包括将多肽从细胞溶质转位到内质网,以及随后将多肽转运通过高尔基体,并到达细胞膜,在那里,对于缺乏跨膜结构域的蛋白质(如所提供的编码的外源蛋白质是这种情况),蛋白质可以从细胞中分泌。

[0205] 在一些实施方案中,信号序列包括天然存在的和合成的信号序列。信号肽的例子包括但不限于免疫球蛋白重链和轻链的内源信号肽及其变体(参见例如,Haryadi,R.,等人(2015) *PLoS one*, 10(2):e0116878);HGH的内源信号肽及其变体;干扰素的内源信号肽及其变体,包括I、II和III型干扰素的信号肽及其变体;已知细胞因子的内源信号肽及其变体,如促红细胞生成素(EPO)、胰岛素、TGF- β 1、TNF、IL1- α 和IL1- β 的信号肽及其变体。在一些实施方案中,信号肽是经修饰的HGH信号肽。示例性智人信号序列可以在例如美国专利公开号US20130316366中找到。在一些实施方案中,编码外源蛋白质的一个或多个编码序列包含选自SEQ ID NO:76-202的编码信号序列的SSCR,使得信号序列与外源蛋白质融合以允许分泌。

[0206] 4. 将核酸引入细胞中的方法

[0207] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒粒子(如例如衍生自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒或腺相关病毒(AAV)的载体)将本文描述的核酸转移到细胞(如B细胞或B细胞前体)中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将核酸转移到细胞中(参见例如,Koste等人(2014) *Gene Therapy* 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000) *Exp Hematol* 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月;29(11):550-557。

[0208] 在一些实施方案中,所述逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如衍生自莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,该逆转录病毒包括源自于任何

禽类或哺乳动物细胞来源的那些。所述逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller,A.D.(1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14;Scarpa等人(1991) *Virology* 180:849-852;Burns等人(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993) *Cur.Opin.Genet.Develop.*3:102-109。

[0209] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如Wang等人(2012) *J.Immunother.*35(9):689-701;Cooper等人(2003) *Blood.*101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009) *Methods Mol Biol.*506:97-114;以及Cavalieri等人(2003) *Blood.*102(2):497-505中。

[0210] 在一些实施方案中,经由电穿孔将本文描述的核酸转移到细胞(如B细胞或B细胞前体)中(参见例如,Chicaybam等人,(2013) *PLoS ONE* 8(3):e60298以及Van Tedeloo等人(2000) *Gene Therapy* 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将核酸转移到细胞中(参见例如,Manuri等人(2010) *Hum Gene Ther* 21(4):427-437;Sharma等人(2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2,e74;以及Huang等人(2009) *Methods Mol Biol* 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, New York,N.Y.中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston, *Nature*,346:776-777(1990));以及磷酸锶DNA共沉淀(Brash等人, *Mol.Cell Biol.*,7:2031-2034(1987))。

[0211] 用于转移编码外源蛋白质的基因工程化核酸的其他途径和载体包括例如在国际专利申请公开号WO 2014055668和美国专利号7,446,190中所述的那些。

[0212] 在一些实施方案中,将本文描述的核酸整合到工程化B细胞中的随机基因座中。在一些实施方案中,将核酸插入随机基因座中。在一些实施方案中,核酸替代随机基因座的全部或部分。使用基因工程(如通过病毒转导)引入转基因的技术是众所周知的。参见例如WO 9429438、WO 9533824、WO 9712052、WO 200111067、WO 200218609、WO 2013014537和WO 2014026110。

[0213] 在一些实施方案中,将本文描述的核酸整合到工程化B细胞中的靶基因座中。在一些实施方案中,核酸包含允许通过同源重组在靶基因座处整合的序列。在一些实施方案中,核酸包含与靶基因座处的序列同源的侧翼序列。在一些实施方案中,将核酸插入靶基因座中。在一些实施方案中,核酸替代靶基因座的全部或部分。在一些实施方案中,整合到靶基因座中由设计者核酸酶介导,所述设计者核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或RNA指导的核酸酶(RGN)。在一些实施方案中,RGN是成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-相关的Cas9(CRISPR-Cas9)核酸酶。使用CRISPR/Cas9介导的基因敲入的技术在本领域是已知的。参见例如,Auer,T.O.等人(2014) *Genome research* 24(1):142-153;Kimura,Y.,等人(2014) *Scientific reports*,4;Aida,T.,等人(2015) *Genome biology*,16(1):1;以及Park,A.,等人(2014) *PLoS one*,9(4):e95101。

[0214] 在一些实施方案中,将本文描述的核酸整合到工程化B细胞中的靶基因座中,其中所述靶基因座是免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,免疫球蛋白基因座选自重链免疫

球蛋白基因座、 κ 轻链免疫球蛋白基因座或 λ 轻链免疫球蛋白基因座。在一些实施方案中,将核酸整合到免疫球蛋白基因座中,使得由所述基因座编码的内源免疫球蛋白不能表达。在一些实施方案中,将核酸整合到免疫球蛋白基因座中,使得由所述基因座编码的内源免疫球蛋白仍然可以表达。在一些实施方案中,将核酸插入免疫球蛋白基因座中而不替代任何序列。在一些实施方案中,将核酸插在免疫球蛋白基因座中的编码序列的上游。在一些实施方案中,将核酸可操作地连接至免疫球蛋白基因座处的启动子和/或增强子。在一些其他实施方案中,核酸替代免疫球蛋白基因座的全部或部分,如免疫球蛋白基因座编码序列的全部或部分。在一些实施方案中,核酸替代免疫球蛋白基因座的全部或大部分,并且包含足以表达外源蛋白质的调节序列。在一些实施方案中,核酸替代免疫球蛋白基因座的一部分,如免疫球蛋白基因座中的编码序列的一部分。在一些实施方案中,核酸不替代免疫球蛋白基因座处的一个或多个调节序列,并且包含与一个或多个其余的调节序列可操作地连接的编码序列,使得对外源蛋白质进行与在整合外源蛋白质之前的内源免疫球蛋白相似的调节。在一些此类实施方案中,核酸可以包含与免疫球蛋白基因座处的其余编码序列同框的编码序列,使得将外源蛋白质表达为进一步包括内源免疫球蛋白的一部分的融合蛋白。在一些实施方案中,将核酸靶向内源免疫球蛋白基因座的方法在本领域是已知的,例如,美国专利 5,204,244 和 WO 2013144566。

[0215] 在一些实施方案中,外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。在一些实施方案中,所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。在一些其他实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列通过核苷酸接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。在一些实施方案中,所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。在一些实施方案中,所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽(包括但不限于P2A、T2A、E2A或F2A)。

[0216] 在一些实施方案中,所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。在一些实施方案中,所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。在一些实施方案中,所述单链抗体片段是scFv。

[0217] 用于引入的另外的核酸包括包含以下的那些:(1)改善治疗功效的基因,如通过促进转移的工程化B细胞的活力和/或功能;(2)提供用于选择和/或评估细胞的遗传标记的基因,如以评估体内存活或定位;和/或(3)改善安全性的基因,例如,通过使工程化B细胞在体内对阴性选择易感,如Lupton S.D.等人,Mol. and Cell Biol.,11:6(1991)以及Riddell等人,Human Gene Therapy 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的PCT/US91/08442和

PCT/US94/05601的出版物,其描述了使用由将显阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0218] C. 受体

[0219] 在一些实施方案中,工程化B细胞包括含有配体结合结构域的受体,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii) 能够调节工程化B细胞的分化的信号(下文也称为“驱动受体”)。在一些实施方案中,所述受体(驱动受体)包括与跨膜结构域连接的细胞外抗原(或配体)结合结构域。在一些实施方案中,所述受体还包括与跨膜结构域连接(在一些方面经由接头)的一种或多种细胞内信号传导组分。此类分子可以通过天然B细胞受体模拟或接近信号。

[0220] 在一些实施方案中,所述受体(驱动受体)是抗体的膜锚定形式(例如,B细胞受体的免疫球蛋白组分),并且经由相关的CD79分子发出信号。在一些实施方案中,所述受体是内源B细胞受体。在一些实施方案中,所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。在一些实施方案中,所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

[0221] 在一些实施方案中,所述受体(驱动受体)是构建的具有针对特定抗原(或标记或配体)的特异性的重组受体(如嵌合受体),所述特定抗原(或标记或配体)是例如在其中希望有工程化B细胞活性的特定组织或细胞类型(如与被外源蛋白质靶向的疾病或病症相关的细胞类型)中表达的抗原,例如癌症标记或病原体抗原,或者在全身或在特定组织或位置中更广泛表达的抗原(例如,如所述的环境配体)。在一些实施方案中,所述受体在其细胞外部分包括特异性结合抗原或配体的一个或多个抗原结合分子,如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或一个或多个抗体可变结构域,和/或抗体分子。在一些实施方案中,所述受体包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0222] 在一些实施方案中,所述受体(驱动受体)包含特异性结合抗原或配体的抗体重链结构域,如待靶向的细胞或疾病(如受病原体感染的细胞、肿瘤细胞、或癌症细胞)的细胞表面抗原,如本文描述的或本领域已知的任何抗原。

[0223] 在一些方面中,抗原特异性结合或识别组分与跨膜结构域连接,并且任选地与一个或多个细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述受体包括与所述受体的细胞外结构域融合的跨膜结构域。在一个实施方案中,使用天然地与受体中的结构域之一相关的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。

[0224] 在一些实施方案中,所述受体(驱动受体)包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,所述受体包括BCR复合物的细胞内组分,如介导B细胞激活的CD79A或CD79B链。因此,在一些方面中,所述抗原结合分子与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括含有ITAM的细胞内信号传导结构域,如衍生自CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的那

些。在一些实施方案中,所述受体进一步包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。

[0225] 在一些实施方案中,在结合所述受体(驱动受体)后,所述受体的细胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活工程化B细胞的正常效应子功能或反应中的至少一种。例如,在一些情况下,所述受体诱导B细胞的功能,如免疫球蛋白类别转换、从膜锚定的免疫球蛋白形式转换为分泌的免疫球蛋白形式、和/或工程化B细胞的分化。在一些实施方案中,通过所述受体的信号传导诱导外源蛋白质的产生和/或分泌。在一些实施方案中,该一个或多个细胞内信号传导结构域包括B细胞受体(BCR)的胞质序列,并且在一些方面中还包括共受体(其在天然背景下与这种受体并行起作用以在受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0226] 1. 配体或抗原

[0227] 在一些实施方案中,工程化或内源受体能够经由配体结合结构域(其可以是抗原结合结构域)与配体(如抗原)结合。在一些实施方案中,所提供的受体含有结合(如特异性结合)配体的配体结合结构域。在一些实施方案中,配体结合结构域是或包含受体的配体结合部分,如细胞外结构域(ECD)的全部或部分。在一些实施方案中,配体结合结构域是或包括抗体或其抗原结合片段,如scFv。

[0228] 在一些方面中,配体在细胞表面上表达,与细胞的膜或表面缔合,是可溶的和/或是细胞外基质(ECM)的一部分或与细胞外基质(ECM)相关。在一些实施方案中,配体与细胞的膜或表面缔合。例如,配体是跨膜蛋白,如跨膜受体。在一些例子中,配体经由与跨膜蛋白的相互作用与膜缔合。在一些实施方案中,配体是在免疫细胞(如T细胞或B细胞)表面上表达的细胞表面蛋白。在一些实施方案中,配体是细胞表面受体。

[0229] 在一些方面中,配体可以是多肽、蛋白质、氨基酸、糖蛋白、蛋白聚糖、糖胺聚糖、脂质、核酸、核苷酸、核苷、糖、多糖、小分子、代谢物、脂蛋白、类固醇、离子和/或其组合。在一些实施方案中,抗原是多肽。在一些实施方案中,它是碳水化合物或其他分子。

[0230] 在一些实施方案中,与正常或非靶向细胞或组织相比,配体(如抗原)在疾病或病症的细胞(例如肿瘤或病原细胞)上选择性表达或过表达。因此,被受体靶向的配体和/或抗原包括在被外源蛋白质(例如治疗性蛋白质)靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下表达的那些。在一些实施方案中,工程化B细胞经由所描述的受体(例如含有一个或多个ITAM B细胞信号传导结构域(如来自CD79a或CD79b的信号传导结构域)或与其相关的重组受体或嵌合受体)与此类抗原的结合,刺激通过受体的信号传导,以在与疾病相关的细胞附近诱导外源蛋白质的产生和/或分泌。所述疾病和病症包括增殖性、赘生性和恶性疾病和障碍,包括癌症和肿瘤,包括血液癌。还包括感染性疾病、自身免疫性疾病和适合于用治疗性蛋白质治疗的任何其他疾病或病症。

[0231] 在一些实施方案中,被受体靶向的抗原在一些实施方案中包括癌症或肿瘤相关的抗原。在一些实施方案中,所述抗原选自与血液癌相关的抗原,所述血液癌包括但不限于白血病,包括急性白血病(如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病以及成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红细胞白血病)、慢性白血病(如慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性髓细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤(惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、瓦尔登斯特

伦巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细胞白血病和脊髓发育不良。

[0232] 在一些实施方案中,所述抗原选自与实体瘤相关的抗原,所述实体瘤包括但不限于肉瘤和癌,包括肾上腺皮质癌、胆管癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胃癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺癌(例如,髓样甲状腺癌和乳头状甲状腺癌)、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆道癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌(例如,宫颈癌和前浸润性宫颈发育不良)、结直肠癌、肛门癌、肛管、或肛门直肠、阴道癌、外阴癌(例如,鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌和纤维肉瘤)、阴茎癌、口咽癌、食管癌、头癌(例如,鳞状细胞癌)、颈癌(例如,鳞状细胞癌)、睾丸癌(例如,精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌、畸形恶癌、绒毛膜癌、肉瘤、莱迪希细胞瘤(Leydig cell tumor)、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤和脂肪瘤)、膀胱癌、肾癌、黑色素瘤、子宫癌(例如,子宫内膜癌)、尿路上皮癌(例如,鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、输尿管癌和泌尿膀胱癌)、和CNS肿瘤(如神经胶质瘤(如脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤(也称为多形性胶质母细胞瘤)星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤(craniopharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0233] 在一些实施方案中,抗原选自碳酸酐酶IX、甲胎蛋白、 α -辅肌动蛋白-4、A3、对A33抗体特异的抗原、ART-4、B7、Ba 733、BAGE、BrE3-抗原、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8/m、CCCL19、CCCL21、CD1、CD1a、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD11A、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD29、CD30、CD32b、CD33、CD37、CD38、CD40、CD40L、CD45、CD46、CD52、CD54、CD55、CD59、CD64、CD66a-e、CD67、CD70、CD74、CD79a、CD80、CD83、CD95、CD126、CD133、CD138、CD147、CD154、CDC27、CDK-4/m、CDKN2A、CXCR4、CXCR7、CXCL12、HIF-1 α 、结肠特异性抗原-p(CSAP)、CEA(CEACAM5)、CEACAM6、c-met、DAM、EGFR、EGFRvIII、EGP-1、EGP-2、ELF2-M、Ep-CAM、Flt-1、Flt-3、叶酸受体、G250抗原、GAGE、gp100、GROB、HLA-DR、HM1.24、人绒毛膜促性腺激素(HCG)及其亚基、HER2/neu、HMGB-1、低氧诱导因子(HIF-1)、HSP70-2M、HST-2、Ia、IGF-1R、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-2、IL-4R、IL-6R、IL-13R、IL-15R、IL-17R、IL-18R、IL-6、IL-8、IL-12、IL-15、IL-7、IL-18、IL-25、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、KC4-抗原、KS-1-抗原、KS 1-4、Le-Y、LDR/FUT、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、MAGE、MAGE-3、MART-1、MART-2、NY-ESO-1、TRAG-3、mCRP、MCP-1、MIP-1A、MIP-1B、MIF、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5、MUM-1/2、MUM-3、NCA66、NCA95、NCA90、胰腺癌粘蛋白、胎盘生长因子、p53、PLAGL2、前列腺酸性磷酸酶、PSA、PRAME、PSMA、PIGF、ILGF、ILGF-1R、IL-6、IL-25、RS5、RANTES、T101、SAGE、S100、存活蛋白、存活蛋白-2B、TAC、TAG-72、腱生蛋白、TRAIL受体、TNF- α 、Tn抗原、Thomson-Friedenreich抗原、肿瘤坏死抗原、VEGFR、ED-B纤连蛋白、WT-1、17-1A-抗原、补体因子C3、C3a、C3b、C5a、C5、血管生成标记、bc1-2、bc1-6、Kras、cMET、致癌基因标记和致癌基因产物,包括从其衍生的肽/MHC复合物(参见例如,Sensi等人,Clin Cancer Res 2006,12:5023-32;Parmiani等人,J Immunol 2007,178:1975-79;Novellino等人Cancer Immunol Immunother 2005,54:187-207)。

[0234] 在一些实施方案中,被所述受体靶向的抗原包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚胎抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、c-Met、GD-2、和MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)、细胞周期蛋白(如细胞周期蛋白A1(CCNA1))、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0235] 在一些实施方案中,所述受体结合病原体相关的(如病毒编码的)抗原,包括但不限于源自于以下的抗原:鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、红孢子虫属(*Anaplasma* genus)、嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)、巴西钩口线虫(*Ancylostoma braziliense*)、十二指肠钩口线虫(*Ancylostoma duodenale*)、溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、人蛔虫(*Ascaris lumbricoides*)、曲霉属(*Aspergillus* genus)、星状病毒科(*Astroviridae*)、巴贝西虫属(*Babesia* genus)、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、汉氏巴尔通体(*Bartonella henselae*)、BK病毒、人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳博德特杆菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、疏螺旋体属(*Borrelia* genus)、疏螺旋体属(*Borrelia*)物种、布鲁氏菌属(*Brucella* genus)、马来丝虫(*Brugia malayi*)、布尼亚病毒科(*Bunyaviridae* family)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)和其他伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)物种、鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、杯状病毒科(*Caliciviridae* family)、弯曲杆菌属(*Campylobacter* genus)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、念珠菌属(*Candida*)物种、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎嗜衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)、鸚鵡热嗜衣原体(*Chlamydia psittaci*)、CJD朊病毒、华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*)、肉毒梭状芽胞杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽胞杆菌(*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、梭菌属(*Clostridium*)物种、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、球孢子菌属(*Coccidioides*)物种、冠状病毒(*coronavirus*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)、克里米亚-刚果出血热病毒(*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium* genus)、巨细胞病毒(CMV)、登革病毒(DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4)、脆弱双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、埃博拉病毒(EBOV)、棘球绦虫属(*Echinococcus* genus)、查菲埃立克体(*Ehrlichia chaffeensis*)、尤氏埃立克体(*Ehrlichia ewingii*)、埃立克体属(*Ehrlichia* genus)、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、肠球菌属(*Enterococcus* genus)、肠病毒属(*Enterovirus* genus)、肠道病毒(Enteroviruses)(主要是柯萨奇病毒A和肠病毒71(EV71))、表皮癣菌属(*Epidermophyton*)物种、埃-巴二氏病毒(EBV)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)0157:H7、0111和0104:H4、肝片吸虫(*Fasciola*

hepatica) 和大片吸虫 (*Fasciola gigantica*)、FFI 朊病毒、丝虫目 (*Filarioidea*) 总科、虫媒病毒 (*Flavivirus*)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium* genus)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、肠贾第虫 (*Giardia intestinalis*)、颚口虫属 (*Gnathostoma*) 物种、GSS 朊病毒、瓜纳里托病毒 (*Guanarito virus*)、杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、亨尼帕病毒 (*Henipavirus*) (亨德拉病毒、尼帕病毒)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒1和2 (HSV-1 和 HSV-2)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、HIV (人免疫缺陷病毒)、威尼克外瓶霉 (*Hortaea werneckii*)、人博卡病毒 (Human bocavirus) (HBoV)、人疱疹病毒6型 (HHV-6) 和人疱疹病毒7型 (HHV-7)、人偏肺病毒 (hMPV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、人副流感病毒 (HPIV)、人T细胞白血病病毒1 (HTLV-1)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、JC病毒、胡宁病毒 (*Junin virus*)、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒 (KSHV)、金格杆菌 (*Kingella kingae*)、肉芽肿克雷伯菌 (*Klebsiella granulomatis*)、库鲁病朊病毒、拉沙病毒、嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*)、利什曼虫属 (*Leishmania* genus)、细螺旋体属 (*Leptospira* genus)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、马丘波病毒 (*Machupo virus*)、马拉色氏霉菌属 (*Malassezia*) 物种、马尔堡病毒、麻疹病毒、横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokagawai*)、小孢子虫目门 (*Microsporidia* phylum)、传染性软疣病毒 (MCV)、腮腺炎病毒、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和弥漫型麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepromatosis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、福氏耐格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*)、美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、星形诺卡菌 (*Nocardia asteroides*)、诺卡菌属 (*Nocardia*) 物种、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*)、正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae* family) (流感)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus*) 物种、卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)、细小病毒B19、巴斯德菌属 (*Pasteurella* genus)、疟原虫属 (*Plasmodium* genus)、耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞体病毒 (RSV)、鼻病毒 (*Rhinovirus*)、鼻病毒 (rhinoviruses)、小株立克次体 (*Rickettsia akari*)、立克次体属 (*Rickettsia* genus)、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒立克次体 (*Rickettsia typhi*)、裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus)、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒 (*Sabia virus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella* genus)、人疥螨 (*Sarcoptes scabiei*)、SARS冠状病毒、血吸虫属 (*Schistosoma* genus)、志贺氏菌属 (*Shigella* genus)、辛诺柏病毒 (*Sin Nombre virus*)、汉坦病毒、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*)、绦虫属 (*Taenia* genus)、猪肉绦虫 (*Taenia solium*)、蜱传脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus)

(TBEV)、犬弓首蛔虫 (*Toxocara canis*) 或猫弓首线虫 (*Toxocara cati*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、毛癣菌属 (*Trichophyton*) 物种、毛首鞭形线虫 (*Trichuris trichiura*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、重型天花 (*Variola major*) 或轻型天花 (*Variola minor*)、vCJD 朊病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、西尼罗病毒 (West Nile virus)、西部马脑炎病毒、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、黄热病病毒、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) 或假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0236] 在一些实施方案中,配体(如抗原)是在疾病或病症的细胞上更广泛地表达或不选择性表达或过表达的环境配体。在一些方面中,环境配体是不在疾病细胞上过表达的配体、表现出广泛组织或细胞表达的配体、普遍表达的配体、全身表达的配体、或非组织特异性的配体。在一些实施方案中,工程化B细胞经由所描述的受体(例如含有一个或多个ITAM B细胞信号传导结构域(如来自CD79a或CD79b的信号传导结构域)或与其相关的重组受体或嵌合受体)与此类配体(如抗原)的结合,刺激通过受体的信号传导,以诱导外源蛋白质的更广泛的(如系统性)产生和/或分泌。

[0237] 配体如环境配体包括在经由外源蛋白质靶向的疾病、病症或细胞类型的背景下未过表达或表现出相对低的表达的那些配体。在一些实施方案中,与患病细胞相比,配体在正常细胞上的表达更高。所述疾病和病症包括增殖性、赘生性和恶性疾病和障碍,包括癌症和肿瘤,包括血液癌、免疫系统癌症,如淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤,如B、T、和骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些例子中,所述疾病或障碍是实体瘤,如肉瘤、癌或淋巴瘤。在其他例子中,所述疾病或障碍是感染,如细菌性、病毒性、寄生性或真菌性感染。

[0238] 在一些实施方案中,配体包括归巢受体的配体、粘附受体的配体或趋化因子受体的配体,例如归巢或运输分子、粘附分子或趋化因子。在一些实施方案中,配体是归巢分子或粘附分子。在一些例子中,配体是Ig超家族细胞粘附分子(CAM)、钙粘蛋白、选择素、整合素、归巢或粘附受体。细胞粘附分子典型地在细胞表面上表达,并参与与其他细胞或与细胞外基质(ECM)的粘附。经由在部位如血管内皮细胞中存在的粘附分子与在免疫细胞上表达的归巢或粘附受体(如整合素)之间的相互作用,免疫细胞(如白细胞,包括T细胞)被募集到身体的不同部位。

[0239] 在一些实施方案中,配体是归巢分子或粘附分子,其是在免疫细胞上表达的归巢或粘附受体的配体。在一些实施方案中,配体是选择素、血管地址素、细胞内粘附分子(ICAM)或钙粘蛋白。在免疫细胞上表达的粘附受体可以识别并结合内皮细胞表达的配体,如ICAM-1、2和3以及VCAM-1/粘膜地址素细胞粘附分子-1(MAdCAM-1)。在一些实施方案中,配体选自E-选择素、P-选择素、PNA_d、MAdCAM-1、ICAM-1、VCAM-1、E-钙粘蛋白、I型胶原蛋白、IV型胶原蛋白和层粘连蛋白1。在一些实施方案中,配体是N-CAM(髓鞘蛋白零)、PE-CAM、L1-CAM、连接素(PVRL1、PVRL2、PVRL3)、CDH1、CDH2、CDH3、桥粒芯蛋白(DSG1、DSG2、DSG3、DSG4)、桥粒胶蛋白(DSC1、DSC2、DSC3)、原钙粘附蛋白PCDH1、PCDH15、T-钙粘蛋白、CDH4、CDH5、CDH6、CDH8、CDH11、CDH12、CDH15、CDH16、CDH17、CDH9、CDH10、L-选择素、整合素、LFA-1

(CD11a+CD18)、整合素 α X β 2 (CD11c+CD18)、巨噬细胞-1抗原 (CD11b+CD18)、VLA-4 (CD49d+CD29)、糖蛋白IIb/IIIa (ITGA2B+ITGB3)、CD44、癌胚抗原、CD22、CD24、CD44、CD146或CD164。

[0240] 在一些方面中,配体是趋化因子、或趋化因子受体的配体。例如,配体是选自CCR7、CCR5、CCR10和CCR9的趋化因子受体的配体,或者是选自CCL19、CCL21、CCL3、CCL4、CCL5、CCL8、CCL11、CCL13、CCL14、CCL16、CCL27、CCL28和CCL25的趋化因子。

[0241] 在一些实施方案中,配体在内皮或内皮细胞的表面上表达或与内皮或内皮细胞缔合。例如,配体选自ACE/CD143、C1q R1/CD93、VE-钙粘蛋白、CC趋化因子受体D6、CD31/PECAM-1、CD34、CD36/SR-B3、CD151、CD160、CD300LG/Nepmucin、CL-K1/COLEC11、CL-P1/COLEC12、凝血因子III/组织因子、DC-SIGNR/CD299、DCBLD2/ESDN、ECSCR、EMMPRIN/CD147、内皮因子 (Endoglin)/CD105、内皮粘蛋白 (Endomucin)、内皮唾酸蛋白 (Endosialin)/CD248、EPCR、促红细胞生成素R、ESAM、FABP5/E-FABP、FABP6、ICAM-1/CD54、ICAM-2/CD102、IL-1RI、IL-13R α 1、整合素 α 4/CD49d、整合素 α 4 β 1、整合素 α 4 β 7/LPAM-1、整合素 β 2/CD18、KLF4、LYVE-1、MCAM/CD146、连接素-2/CD112、PD-ECGF/胸苷磷酸化酶、足萼糖蛋白、平足蛋白、S1P1/EDG-1、S1P2/EDG-5、S1P3/EDG-3、S1P4/EDG-6、S1P5/EDG-8、E-选择素/CD62E、E-选择素 (CD62E)/P-选择素 (CD62P)、P-选择素/CD62P、SLAM/CD150、稳定素 (Stabilin)-1、稳定素-2、TEM7/PLXDC1、TEM8/ANTXR1、血栓调节蛋白/BDCA-3、THSD1、Tie-2、TNF RI/TNFRSF1A、TNF RII/TNFRSF1B、TRA-1-85/CD147、TRAIL R1/TNFRSF10A、TRAIL R2/TNFRSF10B、VCAM-1/CD106、VE-抑制素、VEGF R1/F1t-1、VEGF R2/KDR/F1k-1、VEGF R3/F1t-4、VG5Q和vWF-A2。

[0242] 在一些方面中,配体是细胞外基质 (ECM) 的组分或与细胞外基质 (ECM) 相关。例如,配体是ECM中存在的蛋白聚糖、糖胺聚糖、多糖、蛋白质或其组合。在一些方面中,配体是蛋白聚糖或糖胺聚糖,如肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素和/或硫酸角质素。在其他方面,配体是多糖,如透明质酸。在其他方面,配体是蛋白质,如胶原蛋白、弹性蛋白、层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、腱生蛋白、血小板反应蛋白、原纤蛋白、腓骨蛋白、潜在TGF- β 结合蛋白 (LTBP)、基质金属蛋白酶、乙酰肝素酶或去整合素和具有血小板反应蛋白基序 (ADAMTS) 的金属蛋白酶家族蛋白质。

[0243] 在一些例子中,配体是脂质分子或脂蛋白、或其组合或复合物,如血浆脂蛋白颗粒。例如,配体是细胞膜脂质,如磷脂酰胆碱 (PC)、鞘磷脂 (SM)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷酸肌醇 (PI) 或磷脂酰丝氨酸 (PS)。在一些例子中,配体是血浆脂蛋白颗粒或其部分、其可以包括载脂蛋白 (如ApoA、ApoB、ApoC、ApoE)、三酰甘油、胆固醇和磷脂。

[0244] 在一些实施方案中,配体全身性地表达,如在体循环中。在一些实施方案中,配体在循环或血细胞中存在的细胞 (例如白细胞或红细胞) 上表达。例如,配体在红细胞上表达,如ABO血型抗原、Rh因子、水通道蛋白1、Glut1、Kidd抗原蛋白、RhAG、Na⁺/K⁺ATP酶、Ca²⁺ATP酶、Na⁺K⁺2Cl⁻协同转运蛋白、Na⁺-Cl⁻协同转运蛋白、Na-H交换器、K-Cl协同转运蛋白、Gardos通道、ICAM-4、BCAM、RhAG、蛋白质4.1R、血型糖蛋白C和D、XK、RhD/RhCE、达菲蛋白、内收蛋白、束蛋白、血红蛋白或血红素。

[0245] 在一些方面中,配体是可溶性配体,如存在于血液或循环中的可溶性分子。在一些方面中,可溶性配体可以暂时与细胞膜或细胞表面分子或ECM缔合。在一些实施方案中,可溶性配体是信号传导分子、代谢物、小分子、趋化因子、细胞因子、生长因子、激素、可溶性受体、抗体、药物、离子、核酸、氨基酸、脂质、类固醇或糖、或其片段或组合。

[0246] 在一些方面中,配体对受试者而言是内源的。在其他方面,配体对受试者而言是外源的,使得在将配体给予至受试者后诱导受体信号传导。在一些实施方案中,配体是药物或小分子,并且被给予至受试者。在一些方面中,外源性给予的配体是合成配体或天然配体。

[0247] 在一些方面中,配体是可溶性蛋白质配体,如可溶性FAS配体或可溶性NKG2D配体。在一些实施方案中,配体是抗体或其部分。在一些例子中,可溶性配体从膜结合分子上切割下来。在一些例子中,配体是激素、生长因子或细胞因子,如肾上腺髓质素(AM)、血管生成素(Ang)、自分泌运动因子、骨形态发生蛋白(BMP)、脑源性神经营养因子(BDNF)、表皮生长因子(EGF)、促红细胞生成素(EPO)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胎牛生长激素(FBS)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、生长分化因子-9(GDF9)、肝细胞生长因子(HGF)、肝癌源性生长因子(HDGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、角化细胞生长因子(KGF)、移动刺激因子(MSF)、肌生成抑制蛋白(GDF-8)、神经生长因子(NGF)和其他神经营养因子、血小板源性生长因子(PDGF)、促血小板生成素(TPO)、T细胞生长因子(TCGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、TGF- β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、血管内皮生长因子(VEGF)、Wnt信号传导途径分子、胎盘生长因子(PGF)、白细胞介素(IL)-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7或肾胺酶(Renalase)。

[0248] 在一些方面中,配体是小分子或代谢物,例如,腺苷。在一些方面中,配体是可溶性代谢物,如腺苷、三磷酸腺苷、二磷酸腺苷或单磷酸腺苷、乳酸盐、一氧化氮或碳酸氢盐。

[0249] 在一些实施方案中,配体是免疫调节蛋白,如在免疫细胞上表达的蛋白质。在一些实施方案中,配体(如免疫调节蛋白)有时可以在肿瘤微环境中发现或表达。在一些方面中,配体是信号传导分子、受体或免疫检查点分子或抗原。

[0250] 例如,在一些实施方案中,配体是免疫检查点分子。在一些实施方案中,免疫检查点分子在抗原呈递细胞上表达。在一些实施方案中,配体是CD27、OX40、GITR、CD137、CD28、ICOS、A2AR、CD276、VTCN1、B7-H7、BTLA、CTLA-4、CD152、IDO、TDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM-3、VISTA、M-CSF、PDL1、PDL2、CD80、CD86、B7RP1、B7-H3、B7-H4、HVEM、CD137L、OX40L、CD70、CD40、GAL9或腺苷。在一些实施方案中,所提供的配体结合结构域与配体(其是免疫检查点分子,如CTLA-4、PD-1、PDL1或PDL2)的结合,拮抗在抗原呈递细胞(APC)上存在的免疫检查点的功能,从而增强或推进免疫应答。在一些实施方案中,配体是代谢免疫检查点分子,例如,腺苷。

[0251] 在一些实施方案中,配体结合结构域的结合可以通过作为受体的配体刺激或增强信号。在一些情况下,所提供的驱动受体的配体结合结构域与配体的结合降低或减少了配体对其抑制受体的相互作用。因此,在一些情况下,配体与驱动受体的配体结合结构域之间的相互作用可以诱导信号细胞信号传导以在将受体工程化的B细胞中诱导促有丝分裂或增殖信号,并且充当检查点以阻断配体可能原本正常促进的正常抑制性信号传导途径。

[0252] 在一些例子中,配体是细胞表面受体,并且所提供的配体结合结构域与驱动受体的结合拮抗或干扰通过活化或抑制性受体的活化或抑制性信号。在一些实施方案中,所提供的驱动受体的配体结合结构域与配体(其是受体,例如,CTLA-4)的结合,可以干扰CTLA-4信号传导,并且从而逆转由CTLA-4介导的免疫抑制。在一些例子中,配体结合结构域与配体(其是NK细胞抑制性受体CD94和/或NKG2A)的结合可以干扰通过CD94/NKG2A异源二聚体的信号传导,从而逆转NK细胞功能的抑制。

[0253] 在一些实施方案中,配体是在NK细胞上表达的受体(如NK细胞抑制性受体,如CD94、NKG2A)和/或杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)。在其他例子中,配体是在NK细胞上的活化或共刺激受体,例如TRAIL、CD16、NKp30a、Np30b、NKG2C、NKG2D、4Ba、DNAM-1、CD137、OX40或CD27。

[0254] 在一些方面中,配体对受试者而言是外源的。在一些例子中,将配体给予至受试者。

[0255] 在一些实施方案中,配体结合结构域是或包括受体(如细胞因子受体、信号传导分子受体、小分子受体、激素受体、归巢或粘附分子受体或T细胞受体)的配体结合部分。在一些实施方案中,受体是单体受体。在一些实施方案中,受体是二聚体的,并且受体在配体结合后二聚化。在一些实施方案中,配体结合结构域是受体的配体结合部分或细胞外部分。例如,配体结合结构域是趋化因子受体(CCR7、CCR5、CCR10和CCR9)的细胞外部分。

[0256] 在一些例子中,配体结合结构域是特异性结合配体的抗体或其抗原结合部分或片段。在一些实施方案中,配体结合结构域是或包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)的单链抗体片段(scFv)。

[0257] 在一些实施方案中,受体含有抗体或抗原结合片段(例如scFv),其特异性识别配体(例如抗原,如在细胞表面上表达的完整抗原)、或可溶性配体(例如,抗原,如上所述的任何抗原)。

[0258] 2. 接头、跨膜结构域和间隔子

[0259] 在一些实施方案中,所提供的驱动受体(如本文提供的重组受体,例如嵌合受体)包括跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域将细胞外结构域(例如,配体结合结构域)连接至细胞内信号传导结构域(例如,细胞内ITAM信号传导结构域)。配体结合结构域、跨膜结构域和/或细胞内信号传导结构域可以直接或间接地连接。在一些实施方案中,该细胞外结构域和跨膜结构域通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。

[0260] 在一些实施方案中,配体结合结构域经由一个或多个跨膜结构域与细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,所述跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一些方面中,使用天然地与衍生自受体或其部分的配体结合结构域相关的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰所述跨膜结构域以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与所述受体复合物的其他成员的相互作用。

[0261] 在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个之间的氨基酸的接头,如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体)存在并形成受体的跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间的连接。

[0262] 在一些实施方案中,所述跨膜结构域衍生自天然或合成来源。在来源是天然的情况下,在一些方面的结构域衍生自任何膜结合的或跨膜蛋白,如包括跨膜结构域的细胞表面受体,例如整合素受体、细胞因子受体或趋化因子受体。在一些实施方案中,在一些实施方案中的跨膜结构域是合成的。在一些实施方案中,合成的跨膜结构域主要包含疏水残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些实施方案中,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域。

[0263] 在一些实施方案中,跨膜结构域包括衍生自(即包含其至少一个或多个跨膜区)在

免疫细胞(如B细胞)表面上表达的分子(包括B细胞受体)的那些,或分子(包括CD19、CD20、CD21、CD22、CD27、CD23、CD24、CD38、CD40、CD138、CD269、CXCR4、CXCR5或CXCR7)的跨膜区。在一些实施方案中,在细胞上表达的分子的一个或多个跨膜区包括在T细胞或其他免疫细胞表面上表达的分子,包括T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链,CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD40、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、RANK、白细胞介素-1受体1型(IL1R-1)、白细胞介素-1受体1型辅助蛋白(IL1R-1AcP),和/或含有其功能变体的跨膜区,如保留其大部分结构(例如跨膜)特性的那些。

[0264] 在一些实施方案中,重组受体(例如,嵌合受体)进一步包括间隔子,其可以是或包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分或其变体或修饰形式,如铰链区(例如IgG4铰链区)、和/或C_H1/C_L和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区的部分用作配体结合结构域(如抗原识别组分,例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区域。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞反应性。在一些例子中,所述间隔子的长度为或约12个氨基酸或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸,约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、与C_H2和C_H3结构域连接的IgG4铰链或与C_H3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于在Hudecek等人(2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, 国际PCT公开号WO 2014/031687, 美国专利号8,822,647或美国申请公开号US 2014/0271635中描述的那些。

[0265] 在一些实施方案中,恒定区或其部分是人IgG,如IgG4或IgG1。在一些实施方案中,间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP(在SEQ ID NO:6中列出)。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:7中列出的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:8中列出的序列。在一些实施方案中,恒定区或部分人IgD。在一些实施方案中,所述间隔子具有SEQ ID NO:9中列出的序列。在一些实施方案中,间隔区具有展现出与SEQ ID NO:6-9中任一个至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列一致性的氨基酸序列。

[0266] 在一些实施方案中,该间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如在SEQ ID NO:6中列出的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,间隔子是或包含任选地与C_H2和/或C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4衍生的铰链。在一些实施方案中,间隔子是与C_H2和C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如在SEQ ID NO:8中列出。在一些实施方案中,间隔子是仅与C_H3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如在SEQ ID NO:7中列出。在一些实施方案中,间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

[0267] 所提供的驱动受体的结构域的任何连接可以是直接的或间接的,例如通过接头和/或间隔子连接。任何结构域能以多个、以串联存在或被其他结构域、接头或间隔子分开。

[0268] D. 另外的修饰

[0269] 在一些实施方案中,本文描述的工程化B细胞包含一个或多个另外的修饰。在一些实施方案中,所述修饰影响内源免疫球蛋白的表达、活性和/或功能。在一些实施方案中,所

述修饰影响工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力。在一些实施方案中,所述修饰影响工程化B细胞的谱系确定。在一些实施方案中,可以使用基因修饰策略(如在第VI部分中描述的任何策略)进行任何修饰。

[0270] 1. 内源免疫球蛋白

[0271] 在一些实施方案中,本文描述的工程化B细胞包含影响内源免疫球蛋白重链和/或轻链的表达的一个或多个修饰。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链和/或轻链的表达降低了。在一些实施方案中,与在不存在修饰的情况下在工程化B细胞中的表达相比,内源免疫球蛋白重链和/或轻链的表达降低了至少约50%(如至少约55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,内源免疫球蛋白重链和/或轻链的表达被消除了。

[0272] 在一些实施方案中,所述修饰包括将影响内源免疫球蛋白重链和/或轻链的表达的试剂引入工程化B细胞中。在一些实施方案中,所述试剂是抑制性核酸分子。在一些实施方案中,将抑制性核酸(如siRNA或shRNA)用于抑制内源免疫球蛋白重链和/或轻链表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏内源免疫球蛋白重链和/或轻链的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH054299)。

[0273] 在一些实施方案中,所述修饰包括基因编辑以引入影响内源免疫球蛋白重链和/或轻链表达的基因破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏包括编码内源免疫球蛋白重链和/或轻链的基因的破坏。在一些实施方案中,所述基因破坏是双等位基因的。在一些实施方案中,使用CRISPR系统敲除内源免疫球蛋白重链和/或轻链基因的方法进行的敲低在本领域是已知的。用于经由CRISPR敲除内源免疫球蛋白重链和/或轻链基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除内源免疫球蛋白重链和/或轻链基因(例如,用于敲除免疫球蛋白重链恒定区 $\gamma 1$ (IGHG1))的可商购的试剂是可获得的,如来自GeneCopoeia(参见例如目录号HTN254299)。

[0274] 2. 外源蛋白质的产生和/或分泌

[0275] 在一些实施方案中,本文描述的工程化B细胞包含影响工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力的一个或多个修饰。在一些实施方案中,所述修饰影响工程化B细胞的谱系确定。在一些实施方案中,所述修饰影响参与确定工程化B细胞的细胞类型(例如,幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞)的一种或多种基因的表达。

[0276] 在一些实施方案中,参与确定工程化B细胞的细胞类型的一种或多种基因选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1、IRF8、IRF4、BLIMP1和XBP1。在一些实施方案中,与在不存在修饰的情况下在工程化B细胞中的表达相比,一种或多种基因中的一些基因的表达降低。在一些实施方案中,选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种基因的表达降低。在一些实施方案中,表达降低了至少约50%(如至少约为55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施方案中,一种或多种基因中的一些基因的表达被消除了。

[0277] 在一些实施方案中,与在不存在修饰的情况下在工程化B细胞中的表达相比,一种或多种基因中的一些基因的表达增加。在一些实施方案中,选自IRF4、BLIMP1和XBP1的一种

或多种基因的表达增加。在一些实施方案中,表达增加了至少约50% (如至少约为50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%或更多中的任一个,包括这些值之间的任何范围)。

[0278] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含PAX5基因的破坏或降低PAX5基因的表达的试剂。在一些实施方案中,将抑制性核酸(如siRNA或shRNA)用于阻遏PAX5表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏PAX5的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH069449)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏PAX5。使用CRISPR系统敲除PAX5基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:10-15中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除PAX5基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除PAX5基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN269449)。

[0279] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含BACH2基因的破坏或降低BACH2基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏BACH2表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏BACH2的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH065389)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏BACH2。使用CRISPR系统敲除BACH2基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:16-21中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除BACH2基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除BACH2基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN265389)。

[0280] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含BCL-6的破坏或降低BCL-6基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏BCL-6表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏BCL-6的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自OriGene(参见例如目录号TL306420)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏BCL-6。使用CRISPR系统BCL-6基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:22-27中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除BCL-6基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除BCL-6基因的可商购的试剂可从例如OriGene获得(参见例如目录号KN219007G1)。

[0281] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含OBF1基因的破坏或降低OBF1基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏OBF1表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏OBF1的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH013528)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏OBF1。使用CRISPR系

统敲除OBF1基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:28-33中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除OBF1基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除OBF1基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN213528)。

[0282] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含OCT2基因的破坏或降低OCT2基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏OCT2表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏OCT2的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH055116)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏OCT2。使用CRISPR系统敲除OCT2基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:34-39中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除OCT2基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除OCT2基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN255116)。

[0283] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含PU.1基因的破坏或降低PU.1基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏PU.1表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏PU.1的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自OriGene(参见例如目录号TG316738)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏PU.1。使用CRISPR系统敲除PU.1基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:40-45中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除PU.1基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除PU.1基因的可商购的试剂可从例如OriGene获得(参见例如目录号KN212818)。

[0284] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含SPIB基因的破坏或降低SPIB基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏SPIB表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏SPIB的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH064328)。在一些实施方案中,将基因编辑方法用于阻遏或破坏SPIB。使用CRISPR系统敲除SPIB基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:46-51中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除SPIB基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除SPIB基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN264328)。

[0285] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含ETS1基因的破坏或降低ETS1基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏ETS1表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏ETS1的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如

目录号HSH054427)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏ETS1。使用CRISPR系统敲除ETS1基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:52-57中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除ETS1基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除ETS1基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN254427)。

[0286] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含IRF8基因的破坏或降低IRF8基因的表达的试剂。在一些实施方案中,使用抑制性核酸(如siRNA或shRNA)来阻遏IRF8表达。使用抑制性试剂(包括抑制性核酸)(包括使用RNA干扰技术,如siRNA或shRNA)来阻遏IRF8的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)是容易获得的,参见例如来自GeneCopoeia的试剂(参见例如目录号HSH009251)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法阻遏或破坏IRF8。使用CRISPR系统敲除IRF8基因的方法在本领域是已知的。例如,指导RNA序列的示例性靶序列可以包括在SEQ ID NO:58-63中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除IRF8基因的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除IRF8基因的可商购的试剂可从例如GeneCopoeia获得(参见例如目录号HTN209251)。

[0287] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含增加IRF4基因表达的试剂或基因修饰。在一些实施方案中,将核酸酶无活性的CRISPR/Cas系统用于激活IRF4表达。使用此类系统来激活IRF4的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。例如,示例性指导RNA序列可以包括SEQ ID NO:64-66中列出的任何序列。可商购的试剂(如核酸酶死亡的Cas9(dCas9)和gRNA载体)是容易获得的,参见例如来自Santa Cruz Biotechnology的试剂(参见例如目录号sc-400288-ACT)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法增加IRF4的表达。使用CRISPR系统敲入IRF4基因的方法在本领域是已知的。

[0288] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含增加BLIMP1基因的表达的试剂或基因修饰。在一些实施方案中,将核酸酶无活性的CRISPR/Cas系统用于激活BLIMP1表达。使用此类系统来激活BLIMP1的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。例如,示例性指导RNA序列可以包括SEQ ID NO:67-72中列出的任何序列。可商购的试剂(如核酸酶死亡的Cas9(dCas9)和gRNA载体)是容易获得的,参见例如来自Santa Cruz Biotechnology的试剂(参见例如目录号sc-400585-ACT)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法增加BLIMP1的表达。使用CRISPR系统敲入BLIMP1基因的方法在本领域是已知的。

[0289] 在一些实施方案中,工程化B细胞包含或进一步包含增加XBP1基因的表达的试剂或基因修饰。在一些实施方案中,将核酸酶无活性的CRISPR/Cas系统用于激活XBP1表达。使用此类系统来激活XBP1的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内,并且在下面进行详细描述。例如,示例性指导RNA序列可以包括SEQ ID NO:73-75中列出的任何序列。可商购的试剂(如核酸酶死亡的Cas9(dCas9)和gRNA载体)是容易获得的,参见例如来自Santa Cruz Biotechnology的试剂(参见例如目录号sc-400131-ACT)。在一些实施方案中,使用基因编辑方法增加XBP1的表达。使用CRISPR系统敲入XBP1基因的方法在本领域是已知的。

[0290] 在一些实施方案中,本文描述的工程化B细胞包含影响工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力的一个或多个修饰。

[0291] III. 工程化B细胞的方法

[0292] 还提供了用于制备和培养本文提供的工程化B细胞的方法。

[0293] 1. 细胞来源

[0294] 细胞和含有用于工程化的细胞的组合物通常从样品(如生物样品,例如获得自或源自于受试者的生物样品)中分离。在一些实施方案中,细胞从其中分离的受试者是患有特定疾病或病症或需要细胞疗法或将被给予细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、加工和/或工程化)的哺乳动物(如人、如受试者)。

[0295] 因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个加工步骤(如分离、离心、基因工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。所述生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液,如血液、血浆和血清、扁桃体和骨髓,包括由其衍生的加工样品。在一些方面中,细胞从其中衍生或分离的样品是血液或血液衍生的样品,或者是或衍生自单采术或白细胞分离术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞和骨髓、和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0296] 在一些实施方案中,细胞源自于细胞系,例如,B细胞系。在一些实施方案中,细胞获得自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。

[0297] 细胞处理、制备和基于非亲和力的分离

[0298] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、粘附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0299] 在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞分离术获得。在一些方面中,样品含有淋巴细胞,包括B细胞。

[0300] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤所述细胞。在一些实施方案中,所述洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将所述细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含Ca⁺⁺/Mg⁺⁺的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。

[0301] 在一些实施方案中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0302] 基于亲和力的分离和/或标记分布

[0303] 在一些实施方案中,分离方法包括基于细胞中一种或多种特定分子(如表面标记,例如表面蛋白、细胞内标记或核酸)的表达或存在来分离不同细胞类型。在一些实施方案

中,可以使用任何已知的基于此类标记的用于分离的方法。在一些实施方案中,所述分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面中,所述分离包括基于所述细胞的一种或多种标记(通常为细胞表面标记)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过和与此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常是洗涤步骤和从那些未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞中分离已结合所述抗体或结合配偶体的细胞。

[0304] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合所述试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与所述抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面中,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0305] 所述分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达所述标记的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗竭是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0306] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗竭表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0307] 在一些方面中,将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如顺磁珠(例如像Dynabeads®或MACS®珠))一起孵育。磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),所述结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。

[0308] 在一些实施方案中,所述磁性颗粒或珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday,美国专利号4,452,773和在欧洲专利说明书EP 452342 B(将其通过引用特此并入)中描述的那些。胶体大小的颗粒,如在Owen美国专利号4,795,698以及Liberti等人,美国专利号5,200,084中描述的那些是其他例子。

[0309] 该孵育通常在这样的条件下进行,由此抗体或结合配偶体或者与附着于磁性颗粒或珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子(如果存在于该样品内的细胞上的话)特异性结合。

[0310] 在一些方面中,将所述样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面中,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或经受另外的分离步骤。

[0311] 在某些实施方案中,所述磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合伴侣、二抗、凝集

素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,所述磁性颗粒通过对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记所述细胞而不是珠,并且然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0312] 在一些实施方案中,所述磁响应颗粒保持附着于所述细胞,所述细胞随后被孵育,培养和/或工程化;在一些方面中,所述颗粒保持附着于所述细胞以用于给予患者。在一些实施方案中,从所述细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。用于从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化颗粒是可生物降解的。

[0313] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依次洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,所述非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗尽。

[0314] 在某些实施方案中,使用这样的系统、装置或设备进行分离或分开,所述系统、装置或设备进行所述方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或制备步骤中的一种或多种。在一些方面中,所述系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,所述系统是如国际专利申请公开号WO 2009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。

[0315] 在一些实施方案中,该系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动或可编程方式进行分离、加工、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面中,所述系统或设备包括与所述系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结果和/或调整。

[0316] 在一些方面中,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行所述分离和/或其他步骤,例如以用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上自动分离细胞。部件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面中,所述集成计算机控制所述仪器的所有部件并指示所述系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面中,所述磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。所述蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过所述系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0317] 在一些方面中,所述CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌,无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤所述细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,所述管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,所述系统自动将细胞样品施加到分离柱。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细

胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群在去除磁场后从柱中洗脱,并且收集在细胞收集袋内。

[0318] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统配备有细胞加工联合体,其允许通过离心自动化洗涤和分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。例如,外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成细胞养殖室,其实现细胞培养方案例如细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可允许无菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如,Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82,以及Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689-701。

[0319] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记染色的细胞在流体流中载携。在一些实施方案中,通过制备规模(FACS)分类收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573;和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376)。在两种情况下,细胞可以用多种标记来标记,允许以高纯度分离明确定义的B细胞子集。

[0320] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记来标记抗体或结合配偶体,以促进分离供阳性和/或阴性选择。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞在流体流中载携,如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0321] 冷冻保存

[0322] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)细胞的步骤。在一些实施方案中,所述冷冻和后续解冻步骤去除所述细胞群中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将所述细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面中,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将所述细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80°C并储存在液氮储罐的气相中。

[0323] 在一些实施方案中,所提供的方法包括养殖、孵育、培养和/或基因工程步骤。例如,在一些实施方案中,提供了用于孵育耗尽的细胞群和培养起始组合物和/或将它们工程化的方法。

[0324] 因此,在一些实施方案中,在培养起始组合物中孵育细胞群。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,该培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。

[0325] 孵育和培养

[0326] 在一些实施方案中,在基因工程化之前或与其相连地孵育和/或培养细胞。所述孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育所述组合物或细胞。此类条件包括设计用于在群体中诱导细胞的增殖、扩增、激活和/或存活以模拟抗原暴露和/或引发细胞用于基因工程化(如用于引入基因工程化外源蛋白质和/或受体)的那些。

[0327] 条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的试剂))。关于B细胞培养方法的例子,参见WO 2014146074、WO 2010034103、WO 2012072814和WO 2007067046。

[0328] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激剂包括能够刺激细胞的一种或多种试剂,例如配体。此类试剂可以包括IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、SCF、G-CSF、CpG、CD40配体、Flt3配体或促血小板生成素。任选地,所述方法可以进一步包括添加热灭活的细菌细胞如PANSORBIN®(具有蛋白A衣壳的热灭活的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)细胞)的步骤。

[0329] 在一些方面中,按照技术如在美国专利8,133,727以及Luo, X.M.等人(2009)Blood 113(7):1422-1431中所描述的那些来进行孵育。

[0330] 在一些实施方案中,该刺激条件包括适合于人B淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或约在37摄氏度。任选地,孵育可以进一步包括添加提供B细胞谱系生长因子IL-7的饲养细胞(例如,S17细胞或鼠类基质MS5细胞)。

[0331] 在一些方面中,所述方法包括评估一种或多种标记在工程化B细胞或正被工程化的细胞的表面上的表达。在一个实施方案中,所述方法包括例如通过基于亲和力的检测方法,如通过流式细胞术,评估特定B细胞谱系的一种或多种表面标记的表面表达。

[0332] 2. 工程化

[0333] 在一些实施方案中,提供了生产本文描述的工程化B细胞的方法。用于引入基因工程化组分(如外源蛋白质和/或重组受体(驱动受体))的各种方法是熟知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。示例性方法包括用于转移编码外源蛋白质和/或重组受体的核酸的那些方法,包括经由病毒载体,例如逆转录病毒或慢病毒、非病毒载体或转座子(例如睡美人(Sleeping Beauty)转座子系统)来转移。基因转移的方法可以包括转导、电穿孔或导致基因转移到细胞中的其他方法。

[0334] 在一些实施方案中,提供了产生工程化B细胞的方法,包括将包含编码本文描述的外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入输入B细胞或B细胞前体中。

[0335] 在一些实施方案中,输入细胞是B单元。在一些实施方案中,B细胞选自幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞。在一些实施方案中,输入细胞是B细胞前体。在一些实施方案中,B细胞前体是造血干细胞(HSC)。在一些实施方案中,诱导B细胞前体分化成选自幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞的B细胞。

[0336] 在一些实施方案中,输入细胞是B细胞前体,并且诱导输入细胞以分化成B细胞包括输入细胞的体外成熟。用于将HSC体外成熟为分泌B淋巴细胞和浆细胞的各种技术是已知的,并且可以用于本文描述的方法中。参见例如Luo, X.M.,等人(2009).Blood, 113(7),

1422-1431。

[0337] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括修饰输入细胞以增加工程化B细胞产生和/或分泌外源蛋白质的能力。在一些实施方案中,所述修饰包括改变选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1、IRF8、IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种基因的表达。在一些实施方案中,PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1和IRF8中的一种或多种的表达降低或消除。在一些实施方案中,IRF4、BLIMP1和XBP1中的一种或多种的表达增加。在一些实施方案中,经修饰的表达是瞬时的。在一些实施方案中,经修饰的表达是有条件的。在一些实施方案中,经修饰的表达是可诱导的。用于改变基因表达的方法在本领域是已知的并且在下面更详细地描述。

[0338] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括修饰输入细胞以阻止在输入细胞中表达的内源抗体的类别转换。在一些实施方案中,所述修饰包括降低或消除激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达。在一些实施方案中,经修饰的表达是瞬时的。在一些实施方案中,经修饰的表达是有条件的。在一些实施方案中,经修饰的表达是可诱导的。在一些实施方案中,所述修饰包括或进一步包括使编码内源抗体的基因中的一个或多个转换区突变(如缺失其全部或部分)。

[0339] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括修饰输入细胞以阻止在输入细胞中表达的内源抗体从膜锚定形式转换为分泌形式。在一些实施方案中,所述修饰包括或进一步包括使在编码内源抗体的基因中的M1外显子上游的聚腺苷酸化信号突变(如缺失其全部或部分)。

[0340] 在一些实施方案中,所述方法包括向输入细胞中引入包含配体结合结构域的驱动受体(如重组受体),其中,在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节工程化B细胞的分化的信号。在一些实施方案中,所述受体由在编码外源蛋白质的一个或多个核酸分子中包含的一个或多个编码序列编码。在一些实施方案中,所述受体由在来自编码外源蛋白质的一个或多个核酸分子的一个或多个单独核酸分子中包含的一个或多个编码序列编码,并且所述方法进一步包括向输入细胞中引入编码受体的一个或多个核酸分子。

[0341] IV. 组合物、制剂、试剂盒、装置、方法和用途

[0342] 还提供了细胞、细胞群、和含有通过所提供的方法产生的细胞的组合物。所述组合物包括用于给予(如用于过继细胞疗法)的药物组合物和制剂。还提供了用于将细胞和组合物给予至受试者(例如患者)的治疗方法。

[0343] 提供了细胞的方法和用途,包括治疗性方法和用途,如在过继细胞疗法中。在一些实施方案中,所述方法包括将细胞或含有细胞的组合物给予至受试者、组织或细胞,如患有、有风险患上或怀疑患有疾病、病症或障碍的受试者、组织或细胞。在一些实施方案中,所述方法治疗癌症和其他疾病、病症和障碍。在一些实施方案中,将细胞、群体和组合物给予至患有待治疗的特定疾病或病症的受试者,例如经由过继B细胞疗法。在一些实施方案中,将所述细胞或组合物给予所述受试者,如患有或有风险患上所述疾病或病症的受试者。在一些方面中,所述方法由此治疗疾病或病症,例如,改善疾病或病症的一个或多个症状,例如通过减轻表达被工程化B细胞识别的抗原的癌症中的肿瘤负荷,或通过降低在由被工程化B细胞识别的病毒抗原表征的感染中的病毒载量。

[0344] 用于过继细胞疗法的细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。例如,过继T细胞疗法方法,其可以适合于用于过继B细胞疗法的方法,描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85中。参见例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0345] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继B细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受所述细胞疗法的受试者或从衍生自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备所述细胞。因此,在一些方面中,所述细胞来源于需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞给予同一受试者。

[0346] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继B细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受所述细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备所述细胞。在这样的实施方案中,然后将所述细胞给予至相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,所述第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,所述第二受试者与所述第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0347] 在一些实施方案中,向其给予细胞、细胞群或组合物的受试者(例如患者)是哺乳动物,通常是灵长类动物,如人。在一些实施方案中,所述灵长类动物是猴或猿。所述受试者可以是雄性或雌性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青春期、成年和老年受试者。在一些实施方案中,所述受试者是非灵长类哺乳动物,如啮齿动物。在一些例子中,所述患者或受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果(如细胞因子释放综合征(CRS))的经验证的动物模型。

[0348] 还提供了用于在此类方法中使用的药物组合物。

[0349] 在一些实施方案中,细胞和细胞群以组合物(如药物组合物)的形式给予至受试者。在一些实施方案中,药物组合物进一步包含其他药物活性剂或药物,如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,所述细胞群以盐(例如,药学上可接受的盐)的形式给予。合适的药学上可接受的酸加成盐包括衍生自无机酸的那些,所述无机酸是如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,以及衍生自有机酸的那些,所述有机酸是如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸(例如,对甲苯磺酸)。

[0350] 在一些方面中,药物组合物中的载体的选择部分地由特定重组受体、载体或工程化B细胞,以及由用于给予所述载体或工程化B细胞的特定方法确定。因此,存在多种合适的制剂。例如,所述药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。所述防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。

[0351] 此外,在一些方面中,在所述组合物中包括缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面中,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。所述缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。

用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (2005年5月1日) 中。

[0352] 在某些实施方案中, 可以将包含本文描述的细胞群的药物组合物配制为包含物复合物, 如环糊精包合物复合物, 或配制为脂质体。脂质体可以用于将所述宿主细胞 (例如, T 细胞或 NK 细胞) 靶向特定组织。许多方法可用于制备脂质体, 例如在例如 Szoka 等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), 以及美国专利 4, 235, 871、4, 501, 728、4, 837, 028 和 5, 019, 369 中描述的那些。

[0353] 在一些方面中, 所述药物组合物可以利用定时释放、延迟释放和持续释放递送系统, 使得所述组合物的递送发生在待治疗部位的致敏之前并且有足够的时间引起致敏。许多类型的释放递送系统是可行的并且对本领域普通技术人员而言是已知的。此类系统可以避免重复给予所述组合物, 从而增加对受试者和医师的便利性。

[0354] 在一些实施方案中, 所述药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量 (如治疗有效量或预防有效量) 的细胞。在一些实施方案中, 通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给予, 取决于病症, 重复所述治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而, 其他剂量方案可能是有用的并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注给予所述组合物、通过多次推注给予所述组合物或通过连续输注给予所述组合物来递送。

[0355] 在某些实施方案中, 以约 100 万至约 1000 亿个细胞 (像例如 100 万至约 500 亿个细胞 (例如, 约 500 万个细胞、约 2500 万个细胞、约 5 亿个细胞、约 10 亿个细胞、约 50 亿个细胞、约 200 亿个细胞、约 300 亿个细胞、约 400 亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围), 如约 1000 万至约 1000 亿个细胞 (例如, 约 2000 万个细胞、约 3000 万个细胞、约 4000 万个细胞、约 6000 万个细胞、约 7000 万个细胞、约 8000 万个细胞、约 9000 万个细胞、约 100 亿个细胞、约 250 亿个细胞、约 500 亿个细胞、约 750 亿个细胞、约 900 亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围), 并且在一些情况下约 1 亿个细胞至约 500 亿个细胞 (例如, 约 1.2 亿个细胞、约 2.5 亿个细胞、约 3.5 亿个细胞、约 4.5 亿个细胞、约 6.5 亿个细胞、约 8 亿个细胞、约 9 亿个细胞、约 30 亿个细胞、约 300 亿个细胞、约 450 亿个细胞或在这些范围之间的任何值) 给予受试者。

[0356] 在一些实施方案中, 使用标准给予技术、制剂和/或装置给予所述细胞和组合物。提供了用于储存和给予所述组合物的制剂和装置 (如注射器和小瓶)。给予可以是自体同源的或异源的。例如, 免疫应答细胞或祖细胞可以获得自一名受试者, 并且给予至同一受试者或不同的相容受试者。本发明的外周血衍生的免疫应答细胞或其后代 (例如, 体内、离体或体外衍生的) 可以经由局部注射 (包括导管给予)、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给予来给予。当给予本发明的治疗性组合物 (例如, 含有基因修饰的免疫应答细胞的药物组合物) 时, 通常将其配制成单位剂量可注射形式 (溶液、悬浮液、乳液)。

[0357] 制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂给予的那些。在一些实施方案中, 肠胃外给予所述细胞群。如本文所用术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方案中, 使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送将所述细胞群给予受试者。

[0358] 在一些实施方案中, 细胞的组合物作为无菌液体制剂 (例如, 等渗水溶液、悬浮液、

乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面中可以缓冲至所选pH)提供。液体制剂一般比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地,液体组合物稍微更方便给予,特别是通过注射。在另一方面,粘性组合物可以配制在适当的粘度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0359] 无菌可注射溶液可以通过将基因工程化组分掺入溶剂中来制备,例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。所述组合物也可以是冻干的。所述组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等,这取决于所需的给予和制备的途径。在一些方面中,可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0360] 可以添加各种增强所述组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保。通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0361] 在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种附加治疗剂共同给予或与另一种治疗性干预联合给予(同时或以任何顺序依次给予)。在一些情境下,将所述细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同给予,使得所述细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之前给予所述细胞群。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之后给予所述细胞群。

[0362] 在将所述细胞给予至哺乳动物(例如人)后,工程化B细胞群的生物活性在一些方面中通过许多已知方法中的任何一种来测量。要评估的参数包括工程化或天然B细胞或其他免疫细胞与抗原的体内(例如通过成像)或离体(例如通过ELISA或流式细胞术)的特异性结合。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何合适的方法(如描述于例如Kochenderfer等人,J. Immunotherapy, 32(7):689-702(2009)和Herman等人J. Immunological Methods, 285(1):25-40(2004)中的细胞毒性测定)测量工程化B细胞破坏靶细胞的能力。在某些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量所述细胞的生物活性。在一些方面中,通过评估临床结果(如肿瘤负担或负荷的减少)来测量生物活性。

[0363] 在某些实施方案中,工程化B细胞以任何数量的方式进行修饰,使得其治疗或预防功效增加。例如,由工程化B细胞表达的工程化重组受体可以直接地或通过接头间接地缀合至靶向部分。将化合物(例如,重组受体)与靶向部分缀合的实践在本领域是已知的。参见例如,Wadwa等人,J. Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0364] V. 给予方法和在过继细胞疗法中的用途

[0365] 提供了给予细胞、群体和组合物的方法,以及此类细胞、群体和组合物治疗或预防疾病、病症和障碍(包括感染性疾病和癌症)的用途。在一些实施方案中,将细胞、群体和组合物给予至患有特定疾病或病症的受试者或患者,所述疾病或病症将例如经由细胞分泌的外源蛋白质(例如治疗性蛋白质)结合过继B细胞疗法来治疗。在一些实施方案中,将通过所提供的方法制备的细胞和组合物(如孵育和/或其他加工步骤后的工程化组合物和生产结

束组合物) 给予至受试者, 如患有疾病或病症或具有患上疾病或病症的风险的受试者。在一些方面中, 所述方法由此治疗疾病或病症, 例如, 改善疾病或病症的一个或多个症状, 例如通过减轻表达被由工程化B细胞产生和/或分泌的外源蛋白质识别的抗原的癌症中的肿瘤负荷。在一些实施方案中, 通过给予的工程化B细胞分泌的外源蛋白质是已知或确实治疗疾病或病症的治疗剂。

[0366] 在一些实施方案中, 所提供的方法通常涉及向患有疾病或病症的受试者给予所提供的工程化B细胞的剂量, 所述疾病或病症是例如其组分被B细胞分泌的外源蛋白质特异性识别和/或被B细胞分泌的外源蛋白质治疗的疾病或病症, 所述外源蛋白质是例如治疗性蛋白质, 如抗体或其抗原结合片段。给予通常实现疾病或病症的一个或多个症状的改善和/或治疗或预防疾病或病症或其症状。

[0367] 所述疾病、病症和障碍包括肿瘤, 包括实体瘤、血液恶性肿瘤和黑色素瘤; 以及感染性疾病, 如受病毒或其他病原体 (例如, HIV、HCV、HBV、CMV) 的感染; 以及寄生性疾病。在一些实施方案中, 所述疾病或病症是肿瘤、癌症、恶性肿瘤、赘生物或其他增殖性疾病。此类疾病包括但不限于血液 (或血源性) 癌, 所述血液 (或血源性) 癌包括白血病, 包括急性白血病 (如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性骨髓性白血病以及成髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红细胞白血病)、慢性白血病 (如慢性髓细胞 (粒细胞) 白血病、慢性髓细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤 (惰性和高级形式)、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom's macroglobulinemia)、重链疾病、骨髓增生异常综合征、毛细细胞白血病和脊髓发育不良; 以及实体瘤, 所述实体瘤包括肉瘤和癌, 包括肾上腺皮质癌、胆管癌、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤和其他肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胃癌、淋巴恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺癌 (例如, 髓样甲状腺癌和乳头状甲状腺癌)、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆道癌、绒毛膜癌、维尔姆斯瘤 (Wilms' tumor)、宫颈癌 (例如, 宫颈癌和前浸润性宫颈发育不良)、结直肠癌、肛门癌、肛管、或肛门直肠、阴道癌、外阴癌 (例如, 鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌和纤维肉瘤)、阴茎癌、口咽癌、食管癌、头癌 (例如, 鳞状细胞癌)、颈癌 (例如, 鳞状细胞癌)、睾丸癌 (例如, 精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎性癌、畸形恶癌、绒毛膜癌、肉瘤、莱迪希细胞瘤 (Leydig cell tumor)、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤和脂肪瘤)、膀胱癌、肾癌、黑色素瘤、子宫癌 (例如, 子宫内膜癌)、尿路上皮癌 (例如, 鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、输尿管癌和泌尿膀胱癌)、和CNS肿瘤 (如神经胶质瘤 (如脑干神经胶质瘤和混合神经胶质瘤)、胶质母细胞瘤 (也称为多形性胶质母细胞瘤) 星形细胞瘤、CNS淋巴瘤、生殖细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤 (craniopharyngioma)、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤和脑转移)。

[0368] 在一些实施方案中, 所述疾病或病症是感染性疾病或病症, 例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染。此类疾病包括但不限于受选自以下的病原体感染: 鲍氏不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、红孢子虫属 (*Anaplasma* genus)、嗜吞噬细胞无形体 (*Anaplasma phagocytophilum*)、巴西钩口线虫 (*Ancylostoma braziliense*)、十二指肠钩口线虫 (*Ancylostoma duodenale*)、溶血隐秘杆菌 (*Arcanobacterium haemolyticum*)、人蛔

虫 (*Ascaris lumbricoides*)、曲霉属 (*Aspergillus* genus)、星状病毒科 (*Astroviridae*)、巴贝西虫属 (*Babesia* genus)、炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)、汉氏巴尔通体 (*Bartonella henselae*)、BK病毒、人芽囊原虫 (*Blastocystis hominis*)、皮炎芽生菌 (*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳博德特杆菌 (*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*)、疏螺旋体属 (*Borrelia* genus)、疏螺旋体属 (*Borrelia*) 物种、布鲁氏菌属 (*Brucella* genus)、马来丝虫 (*Brugia malayi*)、布尼亚病毒科 (*Bunyaviridae* family)、洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 和其他伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*) 物种、鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia mallei*)、类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*)、杯状病毒科 (*Caliciviridae* family)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter* genus)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、念珠菌属 (*Candida*) 物种、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肺炎嗜衣原体 (*Chlamydophila pneumoniae*)、鹦鹉热嗜衣原体 (*Chlamydophila psittaci*)、CJD朊病毒、华支睾吸虫 (*Clonorchis sinensis*)、肉毒梭状芽胞杆菌 (*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、梭菌属 (*Clostridium*) 物种、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、球孢子菌属 (*Coccidioides*) 物种、冠状病毒 (*coronavirus*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、贝氏柯克斯体 (*Coxiella burnetii*)、克里米亚-刚果出血热病毒 (*Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*)、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、隐孢子虫属 (*Cryptosporidium* genus)、巨细胞病毒 (CMV)、登革病毒 (DEN-1、DEN-2、DEN-3 和 DEN-4)、脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*)、埃博拉病毒 (EBOV)、棘球绦虫属 (*Echinococcus* genus)、查菲埃立克体 (*Ehrlichia chaffeensis*)、尤氏埃立克体 (*Ehrlichia ewingii*)、埃立克体属 (*Ehrlichia* genus)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、肠球菌属 (*Enterococcus* genus)、肠病毒属 (*Enterovirus* genus)、肠道病毒 (Enteroviruses) (主要是柯萨奇病毒A和肠病毒71 (EV71))、表皮癣菌属 (*Epidermophyton*) 物种、埃-巴二氏病毒 (EBV)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 0157:H7、0111 和 0104:H4、肝片吸虫 (*Fasciola hepatica*) 和大片吸虫 (*Fasciola gigantica*)、FFI朊病毒、丝虫目 (*Filarioidea*) 总科、虫媒病毒 (Flavivirus)、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、梭杆菌属 (*Fusobacterium* genus)、白地霉 (*Geotrichum candidum*)、肠贾第虫 (*Giardia intestinalis*)、颚口虫属 (*Gnathostoma*) 物种、GSS朊病毒、瓜纳里托病毒 (*Guanarito virus*)、杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、亨尼帕病毒 (Henipavirus) (亨德拉病毒、尼帕病毒)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒1和2 (HSV-1 和 HSV-2)、荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、HIV (人免疫缺陷病毒)、威尼克外瓶霉 (*Hortaea werneckii*)、人博卡病毒 (Human bocavirus) (HBoV)、人疱疹病毒6型 (HHV-6) 和人疱疹病毒7型 (HHV-7)、人偏肺病毒 (hMPV)、人乳头瘤病毒 (HPV)、人副流感病毒 (HPIV)、人T细胞白血病病毒1 (HTLV-1)、日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus)、JC病毒、胡宁病毒 (Junin virus)、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒 (KSHV)、金格杆菌 (*Kingella kingae*)、肉芽肿克雷伯菌 (*Klebsiella granulomatis*)、库鲁病朊病毒、拉沙病毒、嗜肺军

团菌 (*Legionella pneumophila*)、利什曼虫属 (*Leishmania* genus)、细螺旋体属 (*Leptospira* genus)、单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、马丘波病毒 (Machupo virus)、马拉色氏霉菌属 (*Malassezia*) 物种、马尔堡病毒、麻疹病毒、横川后殖吸虫 (*Metagonimus yokagawai*)、小孢子虫目门 (*Microsporidia* phylum)、传染性软疣病毒 (MCV)、腮腺炎病毒、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*) 和弥漫型麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium lepromatosis*)、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、溃疡分枝杆菌 (*Mycobacterium ulcerans*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、福氏耐格里阿米巴 (*Naegleria fowleri*)、美洲板口线虫 (*Necator americanus*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、星形诺卡菌 (*Nocardia asteroides*)、诺卡菌属 (*Nocardia*) 物种、旋盘尾丝虫 (*Onchocerca volvulus*)、恙虫病东方体 (*Orientia tsutsugamushi*)、正粘病毒科 (*Orthomyxoviridae* family) (流感)、巴西副球孢子菌 (*Paracoccidioides brasiliensis*)、并殖吸虫属 (*Paragonimus*) 物种、卫氏并殖吸虫 (*Paragonimus westermani*)、细小病毒B19、巴斯德菌属 (*Pasteurella* genus)、疟原虫属 (*Plasmodium* genus)、耶氏肺孢子虫 (*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞体病毒 (RSV)、鼻病毒 (*Rhinovirus*)、鼻病毒 (*rhinoviruses*)、小株立克次体 (*Rickettsia akari*)、立克次体属 (*Rickettsia* genus)、普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*)、立氏立克次体 (*Rickettsia rickettsii*)、伤寒立克次体 (*Rickettsia typhi*)、裂谷热病毒 (Rift Valley fever virus)、轮状病毒、风疹病毒、萨比亚病毒 (*Sabia virus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella* genus)、人疥螨 (*Sarcoptes scabiei*)、SARS冠状病毒、血吸虫属 (*Schistosoma* genus)、志贺氏菌属 (*Shigella* genus)、辛诺柏病毒 (*Sin Nombre virus*)、汉坦病毒、申克孢子丝菌 (*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus* genus)、无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、粪类圆线虫 (*Strongyloides stercoralis*)、绦虫属 (*Taenia* genus)、猪肉绦虫 (*Taenia solium*)、蜱传脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus) (TBEV)、犬弓首蛔虫 (*Toxocara canis*) 或猫弓首线虫 (*Toxocara cati*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、旋毛形线虫 (*Trichinella spiralis*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、毛癣菌属 (*Trichophyton*) 物种、毛首鞭形线虫 (*Trichuris trichiura*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、解脲脲原体 (*Ureaplasma urealyticum*)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、重型天花 (*Variola major*) 或轻型天花 (*Variola minor*)、vCJD朊病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、西尼罗病毒 (West Nile virus)、西部马脑炎病毒、班氏吴策线虫 (*Wuchereria bancrofti*)、黄热病病毒、小肠结肠炎耶尔森菌 (*Yersinia enterocolitica*)、鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) 和假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。

[0369] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是HIV感染。在一些实施方案中,HIV感染是HIV-1或HIV-2感染,包括受本文描述的任何HIV组、亚型或变体的感染。示例性HIV-1组包括HIV-1 M组、HIV-1 N组、HIV-1 O组和HIV-1 P组。亚型及其重组形式是已知的;示例性亚型包括亚型A(包括A1和A2)、亚型B、亚型C,并且重组形式包括CRF_AE。示例性HIV-2组包括

HIV-2 A组、HIV-2 B组、HIV-2 C组、HIV-2 D组、HIV-2 E组、HIV-2 F组、HIV-2 G组和HIV-2 H组。

[0370] 在一些实施方案中,所述疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0371] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。在一些实施方案中,向其给予细胞、细胞群或组合物的受试者(例如患者)是哺乳动物,通常是灵长类动物,如人。在一些实施方案中,所述灵长类动物是猴或猿。所述受试者可以是雄性或雌性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青春期、成年和老年受试者。在一些实施方案中,所述受试者是非灵长类哺乳动物,如啮齿动物。

[0372] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变体如“治疗”(“treat”或“treating”))是指疾病或病症或障碍、或者与之相关的症状、不良效果或结果或表型的完全或部分改善或减轻。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的缓解、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善预后。所述术语并不一定暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或结果的影响。

[0373] 如本文所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定、抑制和/或延期疾病(如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或所治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患上疾病。例如,可能延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0374] 如本文所用,“预防”包括提供关于受试者的疾病的发生或复发的预防,所述受试者可能易患所述疾病但尚未被诊断患有所述疾病。在一些实施方案中,所提供的细胞和组合物用于延迟疾病的发展或延缓疾病的进展。

[0375] 如本文所用,“抑制”功能或活性是当与除了感兴趣的条件或参数以外的原本相同的条件相比时,或者与另一种条件相比时,减少功能或活性。例如,与不存在所述细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,抑制肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速率。

[0376] 在给药的情况下,药剂(例如药物制剂、细胞或组合物)的“有效量”是指在必要的剂量/量下和必要的时间段内有效实现所需结果(例如治疗或预防结果)的量。

[0377] 药剂(例如药物制剂或细胞)的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。所述治疗有效量可以根据诸如疾病状态、受试者的年龄、性别和体重以及给予的细胞群等因素而变化。在一些实施方案中,所提供的方法包括以有效量(例如治疗有效量)给予所述细胞和/或组合物。

[0378] “预防有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需预防结果的量。通常但不是必要地,因为在疾病之前或疾病的早期阶段在受试者中使用预防剂量,所以预防有效量将小于治疗有效量。在肿瘤负荷较低的情况下,在一些方面,预防有效量将高于治疗有效量。

[0379] 用于过继细胞疗法的细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合

物一起使用。例如,过继T细胞疗法方法,其可以适合于过继B细胞疗法,描述于例如 Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915; Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8 (10) :577-85中。参见例如,Themeli等人 (2013) Nat Biotechnol.31 (10) :928-933;Tsukahara等人 (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1) :84-9;Davila等人 (2013) PLoS ONE 8 (4) :e61338。

[0380] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继B细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受所述细胞疗法的受试者或从衍生自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备所述细胞。因此,在一些方面中,所述细胞来源于需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将所述细胞给予同一受试者。

[0381] 在一些实施方案中,细胞疗法(例如过继B细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受所述细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备所述细胞。在这样的实施方案中,然后将所述细胞给予至相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,所述第一受试者和所述第二受试者在遗传上是相同的或相似的。在一些实施方案中,所述第二受试者与所述第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0382] 所述细胞可以通过任何合适的方式给予,例如通过推注输注,通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下注射、结膜下注射、眼球筋膜囊下注射、球后注射、球周注射或后巩膜递送。在一些实施方案中,它们通过肠胃外、肺内和鼻内给予以及(如果需要用于局部治疗的话)病灶内给予。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内、胸腔内、颅内或皮下给予。在一些实施方案中,给定剂量通过细胞的单次推注给药来给予。在一些实施方案中,给定剂量通过细胞的多次推注给药例如在不超过3天的时间内来给予,或通过细胞的连续输注给药。

[0383] 为了预防或治疗疾病,适当的剂量可取决于待治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、细胞是否针对预防或治疗目的而被给予、先前的治疗、受试者的临床病史和对细胞的应答以及主治医师的决断。在一些实施方案中,所述组合物和细胞适合一次或在一系列治疗中给予受试者。

[0384] 在一些实施方案中,所述细胞作为组合治疗的一部分给予,如与另一种治疗性干预如抗体或工程化细胞或受体或其他药剂(如细胞毒性剂或治疗剂)同时给予或以任何顺序依次给予。因此,在一些实施方案中,所述细胞与一种或多种另外的治疗剂共同给予或与另一种治疗性干预联合给予(同时或以任何顺序依次给予)。在一些情境下,将所述细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同给予,使得所述细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,所述细胞在一种或多种附加治疗剂之前给予。在一些实施方案中,所述细胞在一种或多种附加治疗剂之后给予。

[0385] 在一些实施方案中,所述方法包括在剂量给予之前给予化学治疗剂例如调节化学治疗剂,例如以便减轻肿瘤负荷。

[0386] 在将所述细胞给予受试者(例如人)后,在一些方面中工程化B细胞群的生物活性通过许多已知方法中的任何一种来测量。在一些实施方案中,可以通过测定外源蛋白质(如治疗性蛋白质)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在某些实施方案中,还可以通过

测定某些细胞因子(如IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12和TNF α)的表达和/或分泌来测量细胞的生物活性。在一些方面中,通过评估临床结果(如肿瘤负担或负荷的减少)来测量生物活性。在一些方面,评估毒性结果、细胞的持久性和/或扩增和/或宿主免疫应答的存在或不存在。

[0387] 在一些实施方案中,所述方法包括诱导所述工程化B细胞以增加所述外源蛋白质的产生和/或分泌。在一些实施方案中,所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的内源B细胞受体的配体结合结构域结合的试剂。在一些实施方案中,所述试剂是被内源B细胞受体识别的疫苗,如所描述的任何一种。在一些实施方案中,所述诱导包括向受试者给予与在工程化B细胞中表达的驱动受体(如重组或嵌合受体)的配体结合结构域结合的试剂。在一些实施方案中,配体与工程化B细胞的驱动受体的结合诱导工程化B细胞分化成浆母细胞或浆细胞。在一些实施方案中,工程化B细胞是浆母细胞或浆细胞。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是在内源免疫球蛋白启动子或组成型活性启动子的控制下。在一些实施方案中,所述外源蛋白质是在诱导型启动子的控制下,并且所述方法进一步包括向受试者给予激活所述诱导型启动子的试剂。

[0388] 在一些实施方案中,所述方法导致在受试者中的作用持续时间(特定方法有效的时间长度)为至少约1个月、至少2个月、至少6个月、至少一年、至少2年或更长时间。在一些实施方案中,与由向受试者单次直接给予外源蛋白质引起的最大耐受作用持续时间(治疗剂的最大耐受剂量的作用持续时间)相比,向受试者单次给予工程化B细胞或组合物导致受试者中的作用持续时间增加。在一些实施方案中,所述增加是至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

[0389] 给药

[0390] 在一些实施方案中,细胞以所需剂量给予,所述所需剂量在一些方面包括所需剂量或数量的细胞或一种或多种细胞类型和/或所需比例的细胞类型。因此,在一些实施方案中,细胞剂量基于细胞总数(或每kg体重的细胞数)和所需的单独群体或亚型比例。在一些实施方案中,细胞剂量基于所需的单独群体中的细胞或单独细胞类型的总数(或每kg体重的细胞数)。在一些实施方案中,剂量基于这种特征的组合,如所需的总细胞数、所需比例和所需的单独群体中的细胞总数。

[0391] 在一些实施方案中,以所需剂量的总细胞(如所需剂量的B细胞)的耐受差异或在耐受差异之内给予细胞的群体或亚型。在一些方面,所需剂量是所需细胞数或被给予所述细胞的受试者的每单位体重的所需细胞数例如细胞/kg。在一些方面,所需剂量等于或高于最小细胞数或每单位体重的最小细胞数。在一些方面,在以所需剂量给予的总细胞中,单独群体或亚型以等于或接近所需输出比例存在,例如,在这种比例的一定耐受差异或误差内。

[0392] 在一些实施方案中,细胞以所需剂量的一种或多种细胞单独群体或亚型的耐受差异或在耐受差异之内给予。在一些方面,所需剂量是所需的亚型或群体的细胞数或所需的被给予所述细胞的受试者的每单位体重的此类细胞数(例如细胞/kg)。在一些方面,所需剂量等于或高于最小的群体或亚型的细胞数或每单位体重的最小的群体或亚型的细胞数。

[0393] 因此,在一些实施方案中,剂量基于所需的总细胞的固定剂量和所需比例,和/或基于所需的一种或多种单独亚型或亚群(例如各自)的固定剂量。因此,在一些实施方案中,

剂量基于所需的固定或最小剂量的B细胞。

[0394] 在某些实施方案中,将细胞、或细胞的单独群体或亚型以约至少100万至约至少1000亿个细胞(像例如100万至约500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围),并且在一些情况下约至少1亿个细胞至约至少500亿个细胞(例如,约至少1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞或在这些范围之间的任何值)给予至受试者。

[0395] 在一些实施方案中,总细胞的剂量和/或细胞单独亚群的剂量在或约 10^4 与在或约 10^9 个细胞/千克(kg)体重之间的范围内,如在 10^5 与 10^6 个细胞/kg体重之间,例如,在或约 1×10^5 个细胞/kg体重、 1.5×10^5 个细胞/kg体重、 2×10^5 个细胞/kg体重、或 1×10^6 个细胞/kg体重。例如,在一些实施方案中,细胞以在或约 10^4 与在或约 10^9 个B细胞/千克(kg)体重之间,如在约 10^5 与 10^6 个B细胞/kg体重之间,例如,在或约 1×10^5 个B细胞/kg体重、 1.5×10^5 个B细胞/kg体重、 2×10^5 个B细胞/kg体重、或 1×10^6 个B细胞/kg体重,或在其一定误差范围内给予。

[0396] 在过继细胞疗法的背景下,给定“剂量”的给予包括以单一组合物和/或单次不间断给药的方式(例如以单次注射或连续输注的方式)给予给定量或数量的细胞,并且还包括在不超过3天的指定时间段内以在多个单独组合物或输注中提供的分割剂量的方式给予给定量或数量的细胞。因此,在一些情况下,剂量是指定数量的细胞的单次或连续给药,在单个时间点给予或开始。然而,在一些情况下,剂量在几天,如不超过三天的时间内以多次注射或输注的方式给予,如每天一次持续三天或两天或者通过在一天的时间内多次输注。

[0397] 因此,在一些方面中,细胞以单一药物组合物给予。

[0398] 在一些实施方案中,细胞以共同含有单一剂量的细胞的多种组合物给予。

[0399] 因此,在一些方面中,一个或多个剂量可以作为分剂量给予。例如,在一些实施方案中,剂量可以在2天或3天内给予受试者。用于分割给药的示例性方法包括在第一天给予25%的剂量并在第二天给予剩余的75%的剂量。在其他实施方案中,可以在第一天给予33%的剂量,并且在第二天给予剩余的67%。在一些方面,在第一天给予10%的剂量,在第二天给予30%的剂量,并且在第三天给予60%的剂量。在一些实施方案中,分割剂量不超过3天。

[0400] 在一些实施方案中,多个剂量例如通过给予第一剂量和一个或多个后续剂量来给予,其中每个后续剂量在第一剂量或先前剂量给予之后大于约28天的时间点给予。

[0401] 在一些实施方案中,剂量含有的细胞数量、工程化B细胞数量、或外周血单核细胞(PBMC)数量在每千克受试者体重从约 10^5 至约 10^6 个此类细胞的范围内,和/或此类细胞数量为每千克受试者体重不多于约 10^5 或约 10^6 个此类细胞。例如,在一些实施方案中,第一剂量或后续剂量包括每千克受试者体重小于或不多于在或约 1×10^5 、在或约 2×10^5 、在或约 5×10^5 、或在或约 1×10^6 个此类细胞。在一些实施方案中,第一剂量包括每千克受试者体重在或

约 1×10^5 、在或约 2×10^5 、在或约 5×10^5 、或在或约 1×10^6 个此类细胞,或者在任何两个前述值之间的范围内的值。在特定的实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指工程化B细胞的数量。在其他实施方案中,细胞的数量和/或浓度是指给予的所有细胞、B细胞或外周血单核细胞(PBMC)的数量或浓度。

[0402] 在一些实施方案中,例如,在受试者是人的情况下,剂量包括少于约 1×10^8 个总的工程化B细胞、B细胞、或外周血单核细胞(PBMC),例如,在约 1×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围内,如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 或 1×10^8 个总的此类细胞,或在任何两个前述值之间的范围。

[0403] 在一些实施方案中,剂量含有每受试者 m^2 的少于约 1×10^8 个总的工程化B细胞、B细胞或外周血单核细胞(PBMC)细胞,例如,在每受试者 m^2 的约 1×10^6 至 1×10^8 个此类细胞的范围内,如每受试者 m^2 的 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 或 1×10^8 个此类细胞,或在任何两个前述值之间的范围。

[0404] 在某些实施方案中,剂量中的细胞、工程化B细胞、B细胞或外周血单核细胞(PBMC)数量为每千克受试者体重大于约 1×10^6 个此类细胞,例如每千克体重 2×10^6 、 3×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 或 1×10^{10} 个此类细胞,和/或每 m^2 受试者 1×10^8 、或 1×10^9 、 1×10^{10} 个此类细胞或总数,或在任何两个前述值之间的范围。

[0405] 在一些方面,剂量的大小基于一个或多个标准来确定,如受试者对现有治疗例如抗病毒疗法或化学疗法的反应、受试者的疾病负荷如病毒载量或肿瘤负载、体积、尺寸或程度、转移的程度或类型、分期和/或受试者发生毒性结果的可能性或发生率,例如CRS、巨噬细胞激活综合征、肿瘤溶解综合征、神经毒性和/或针对所给予的细胞和/或重组受体的宿主免疫应答。

[0406] VI. 基因表达、活性和/或功能的修饰

[0407] 在一些实施方案中,在本文描述的工程化B细胞中修饰一个或多个基因的表达、活性和/或功能。提供了用于实现此类修饰的方法。

[0408] 在一些实施方案中,所述修饰是基因阻遏。在一些实施方案中,所述基因阻遏通过实现基因的破坏(基因编辑),如敲除、插入、错义或移码突变(如双等位基因移码突变)、缺失基因的全部或部分(例如,一个或多个外显子或其部分)、和/或敲入来进行。在一些实施方案中,此类破坏通过专门设计用于靶向基因序列或其部分的序列特异性或靶向核酸酶来实现,所述序列特异性或靶向核酸酶包括DNA结合靶向核酸酶(如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN))、和RNA指导的核酸酶(如CRISPR相关核酸酶(Cas))。

[0409] 在一些实施方案中,通过引入靶向基因的抑制性核酸分子来进行基因阻遏。在一些实施方案中,抑制性核酸包括小干扰RNA(siRNA)、微小RNA改造的shRNA、短发夹RNA(shRNA)、发夹siRNA、微小RNA(miRNA前体)或微小RNA(miRNA)。

[0410] 在一些实施方案中,所述修饰是基因激活。在一些实施方案中,通过增加基因的拷贝数(如基因的敲入)或通过激活基因的转录和/或翻译来进行基因激活。在一些实施方案中,通过RNA指导的核酸酶(如CRISPR相关核酸酶(Cas))组合包含基因编码序列的供体模板来实现敲入。在一些实施方案中,通过包含核酸酶失活突变并与转录激活因子融合的RNA指导的核酸酶如CRISPR相关核酸酶(Cas)来实现转录激活。

[0411] 1. 基因阻遏技术

[0412] 在一些实施方案中,通过破坏基因来进行对基因的表达、活性和/或功能的阻遏。在一些方面中,与在不存在基因破坏的情况下或在不存在引入以实现破坏的组分的情况下的表达相比,基因被破坏使得其表达降低了至少或至少约20%、30%或40%、通常至少或至少约50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0413] 在一些实施方案中,通过在基因中诱导一个或多个双链断裂和/或一个或多个单链断裂(通常以靶向的方式)来进行基因破坏。在一些实施方案中,所述双链或单链断裂由核酸酶(例如核酸内切酶,如基因靶向核酸酶)产生。在一些方面中,在基因的编码区中(例如在外显子中)诱导断裂。例如,在一些实施方案中,诱导发生在编码区的N末端部分附近,例如在第一个外显子中、在第二个外显子中、或在随后的外显子中。

[0414] 在一些方面中,所述双链或单链断裂经由细胞修复过程(如通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR))进行修复。在一些方面中,修复过程易于出错并导致基因破坏,如移码突变,例如双等位基因移码突变,其可能导致基因的完全敲除。例如,在一些方面中,所述破坏包括诱导缺失、突变和/或插入。在一些实施方案中,所述破坏导致提早终止密码子的存在。在一些方面中,插入、缺失、转位、移码突变和/或提前终止密码子的存在导致对基因的表达、活性和/或功能的阻遏。

[0415] 在一些实施方案中,所述阻遏是瞬时的或可逆的,使得基因的表达在稍后的时间被恢复。在其他实施方案中,所述阻遏不是可逆的或瞬时的,例如,是永久性的。

[0416] 在一些实施方案中,所述基因阻遏使用反义技术,如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或用于选择性抑制或阻遏基因表达的核酶来实现。siRNA技术包括基于RNAi的siRNA技术,其利用具有与从基因转录的mRNA的核苷酸序列同源的序列和与所述核苷酸序列互补的序列的双链RNA分子。siRNA通常与从基因转录的mRNA的一个区域同源/互补,或者可以包含与不同区域同源/互补的多个RNA分子的siRNA。

[0417] DNA靶向分子和复合物;靶向核酸内切酶

[0418] 在一些实施方案中,所述阻遏使用与基因特异性结合或杂交的DNA靶向分子(如DNA结合蛋白或DNA结合核酸)或含有其的复合物、化合物或组合物来实现。在一些实施方案中,DNA靶向分子包含DNA结合结构域,例如锌指蛋白(ZFP)DNA结合结构域、转录激活因子样蛋白(TAL)或TAL效应子(TALE)DNA结合结构域、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)DNA结合结构域、或来自大范围核酸酶的DNA结合结构域。

[0419] 锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域可以“被工程化”以与预先确定的核苷酸序列结合,例如通过工程化(改变一个或多个氨基酸)天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区。工程化的DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。设计的合理标准包括应用替换规则和计算机化算法,以用于处理存储现有ZFP和/或TALE设计和绑定数据的信息的数据库中的信息。参见例如,美国专利号6,140,081、6,453,242和6,534,261;还参见WO 98/53058、WO 98/53059、WO 98/53060、WO 02/016536和WO 03/016496以及美国公开号20110301073。

[0420] 在一些实施方案中,DNA靶向分子、复合物或组合含有DNA结合分子和一个或多个另外的结构域(如效应子结构域),以促进基因的阻遏或破坏。例如,在一些实施方案中,通过包含DNA结合蛋白和异源调节结构域或其功能片段的融合蛋白来进行基因破坏。在一些方面中,结构域包括例如转录因子结构域,如激活因子、阻遏因子、共激活因子、共阻遏因

子、沉默子、致癌基因、DNA修复酶及其相关因子和调节剂、DNA重排酶及其相关因子和调节剂、染色质相关蛋白及其调节剂(例如激酶、乙酰化酶和脱乙酰酶)、以及DNA修饰酶(例如甲基转移酶、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸内切酶及其相关因子和调节剂)。有关DNA结合结构域和核酸酶切割结构域的融合的细节,参见例如,美国专利申请公开号20050064474;20060188987和2007/0218528;通过引用以其整体并入本文。在一些方面中,另外的结构域是核酸酶结构域。因此,在一些实施方案中,使用工程化蛋白质,如核酸酶和含核酸酶的复合物或融合蛋白(其由与非特异性DNA切割分子(如核酸酶)融合或复合的序列特异性DNA结合结构域构成),通过基因或基因组编辑促进基因破坏。

[0421] 在一些方面中,这些靶向嵌合核酸酶或含核酸酶的复合物通过诱导靶向双链断裂或单链断裂、刺激细胞DNA修复机制(包括易错的非同源末端连接(NHEJ)和同源定向修复(HDR))来进行精确的基因修饰。在一些实施方案中,核酸酶是核酸内切酶,如锌指核酸酶(ZFN)、TALE核酸酶(TALEN)、RNA指导的核酸内切酶(RGEN)(如CRISPR相关(Cas)蛋白)或大范围核酸酶。

[0422] 在一些实施方案中,提供供体核酸,例如供体质粒或编码外源蛋白质和/或重组受体的核酸,并将其在引入DSB后通过HDR在基因编辑位点处插入。因此,在一些实施方案中,基因的破坏和编码外源蛋白质和/或重组受体的核酸的引入同时进行,由此基因通过编码外源蛋白质和/或重组受体的核酸的敲入或插入被部分破坏。

[0423] 在一些实施方案中,没有提供供体核酸。在一些方面中,引入DSB后的NHEJ介导的修复导致插入或缺失突变,其可能例如通过产生错义突变或移码引起基因破坏。

[0424] ZFP和ZFN;TAL、TALE和TALEN

[0425] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包括与效应子蛋白如核酸内切酶融合的DNA结合蛋白,如一种或多种锌指蛋白(ZFP)或转录激活因子样蛋白(TAL)。例子包括ZFN、TALE和TALEN。参见Lloyd等人,Frontiers in Immunology,4(221),1-7(2013)。

[0426] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包含以序列特异性方式与DNA结合的一种或多种锌指蛋白(ZFP)或其结构域。ZFP或其结构域是蛋白质或者较大蛋白质内的结构域,其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA,锌指是通过锌离子配位而稳定其结构的结合结构域内氨基酸序列的区域。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。

[0427] ZFP包括靶向特定DNA序列、通常为9-18个核苷酸长、通过单个指的组装产生的人工ZFP结构域。

[0428] ZFP包括以下那些,其中单个指结构域长度为大约30个氨基酸且含有 α 螺旋,所述 α 螺旋含有通过锌与单个 β 转角两个半胱氨酸配位的两个不变的组氨酸残基,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指。通常,可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置(-1、2、3和6)处进行氨基酸取代来改变ZFP的序列特异性。因此,在一些实施方案中,所述ZFP或含有ZFP的分子是非天然存在的,例如被工程化以与选择的靶位点结合。参见例如,Beerli等人(2002)Nature Biotechnol.20:135-141;Pabo等人(2001)Ann.Rev.Biochem.70:313-340;Isalan等人(2001)Nature Biotechnol.19:656-660;Segal等人(2001)Curr.Opin.Biotechnol.12:632-637;Choo等人(2000)Curr.Opin.Struct.Biol.10:411-416;美国专利号6,453,242;6,534,261;6,599,692;6,503,717;6,689,558;7,030,215;6,794,136;7,067,317;7,262,054;7,070,934;7,361,635;7,253,273;以及美国专利公开号

2005/0064474;2007/0218528;2005/0267061,将全部都通过引用以其整体并入本文。

[0429] 在一些方面中,通过使基因中的第一靶位点与第一ZFP接触来进行基因的阻遏,从而阻遏基因。在一些实施方案中,使基因中的靶位点与包含六个指和调节结构域的融合ZFP接触,从而抑制基因的表达。

[0430] 在一些实施方案中,接触步骤进一步包括使基因中的第二靶位点与第二ZFP接触。在一些方面中,所述第一靶位点和所述第二靶位点是相邻的。在一些实施方案中,所述第一ZFP和所述第二ZFP是共价连接的。在一些方面中,所述第一ZFP是包含调节结构域或至少两个调节结构域的融合蛋白。在一些实施方案中,所述第一ZFP和所述第二ZFP是融合蛋白,各自包含调节结构域或各自包含至少两个调节结构域。在一些实施方案中,调节结构域是转录阻遏因子、转录激活因子、核酸内切酶、甲基转移酶、组蛋白乙酰转移酶或组蛋白脱乙酰酶。

[0431] 在一些实施方案中,ZFP由与启动子可操作地连接的ZFP核酸编码。在一些方面中,所述方法进一步包括首先将核酸在脂质:核酸复合物中或作为裸核酸给予至细胞的步骤。在一些实施方案中,ZFP由包含与启动子可操作地连接的ZFP核酸的表达载体编码。在一些实施方案中,ZFP由与诱导型启动子可操作地连接的核酸编码。在一些方面中,ZFP由与弱启动子可操作地连接的核酸编码。

[0432] 在一些实施方案中,靶位点位于基因的转录起始位点的上游。在一些方面中,靶位点与基因的转录起始位点相邻。在一些方面中,靶位点与基因的转录起始位点下游的RNA聚合酶暂停位点相邻。

[0433] 在一些实施方案中,所述DNA靶向分子是或包含与DNA切割结构域融合以形成锌指核酸酶(ZFN)的锌指DNA结合结构域。在一些实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的切割结构域(或切割半结构域)和一个或多个锌指结合结构域(其可以被或可以不被工程化)。在一些实施方案中,切割结构域来自IIS型限制性核酸内切酶Fok I。Fok I通常催化DNA的双链切割,在一条链上距其识别位点9个核苷酸处,并且在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处。参见例如,美国专利号5,356,802;5,436,150和5,487,994;以及Li等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279;Li等人(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768;Kim等人(1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887;Kim等人(1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982。

[0434] 在一些实施方案中,ZFN靶向工程化B细胞中存在的基因。在一些方面中,ZFN例如在基因的编码区中的预定位点处有效地产生双链断裂(DSB)。所靶向的典型区域包括外显子、编码N-末端区域的区域、第一外显子、第二外显子、和启动子或增强子区域。在一些实施方案中,ZFN的瞬时表达促进了工程化B细胞中靶基因的高效的和永久性破坏。特别地,在一些实施方案中,ZFN的递送导致基因的永久性破坏,其效率超过50%。

[0435] 许多基因特异性的工程化的锌指是可商购的。例如,Sangamo Biosciences(美国加利福尼亚州列治文)已经与Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)合作开发了一个用于锌指构建的平台(CompoZr®),允许研究人员一并绕过锌指构建和验证,并为数千种蛋白质提供了特异性靶向锌指。Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405。在一些实施方案中,使用或定制设计可商购的锌指。(参见例如,Sigma-Aldrich目录号CSTZFND、CSTZFN、CTI1-1KT和PZD0020)。

[0436] TALE和TALEN

[0437] 在一些实施方案中,DNA靶向分子包含天然存在的或工程化(非天然存在的)转录激活因子样蛋白(TAL)DNA结合结构域,如在转录激活因子样蛋白效应子(TALE)蛋白中,参见例如,美国专利公开号20110301073,将其通过引用以其整体并入本文。

[0438] TALE DNA结合结构域或TALE是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单个“重复单元”(也称为“重复”)的长度通常为33-35个氨基酸,并且表现出与天然存在的TALE蛋白中的其他TALE重复序列具有至少一些序列同源性。每个TALE重复单元包含组成重复可变二残基(RVD)的1个或2个DNA结合残基,通常位于重复的位置12和/或13。已确定用于这些TALE的DNA识别的天然(经典)代码,使得在位置12和13处的HD序列导致与胞嘧啶(C)的结合、NG与T结合、NI与A结合、NN与G或A结合、和NG与T结合,并且非经典(非典型)RVD也是已知的。参见美国专利公开号20110301073。在一些实施方案中,通过设计对靶DNA序列具有特异性的TAL阵列,可以使TALE靶向任何基因。靶序列通常以胸苷开头。

[0439] 在一些实施方案中,分子是DNA结合核酸内切酶,如TALE-核酸酶(TALEN)。在一些方面中,TALEN是包含从TALE衍生的DNA结合结构域和核酸酶催化结构域以切割核酸靶序列的融合蛋白。在一些实施方案中,已经将TALE DNA结合结构域工程化,以结合在编码靶抗原和/或免疫抑制分子的基因内的靶序列。例如,在一些方面中,TALE DNA结合结构域可以靶向CD38和/或腺苷受体如A2AR。

[0440] 在一些实施方案中,TALEN识别并切割基因中的靶序列。在一些方面中,DNA的切割导致双链断裂。在一些方面中,所述断裂刺激同源重组率或非同源末端连接(NHEJ)率。通常,NHEJ是不完美的修复过程,其经常导致切割位点处的DNA序列的变化。在一些方面中,修复机制涉及通过直接重新连接(Critchlow和Jackson,Trends Biochem Sci.1998年10月;23(10):394-8)或经由所谓的微观同源介导的末端连接将两个DNA末端的剩余部分重新连接。在一些实施方案中,经由NHEJ的修复导致小的插入或缺失,并且可以用于破坏并因此阻遏基因。在一些实施方案中,所述修饰可以是至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。在一些方面中,可以通过本领域中熟知的方法鉴定和/或选择其中发生了切割诱导的诱变事件(即与NHEJ事件连贯的诱变事件)的细胞。

[0441] 在一些实施方案中,TALE重复被组装成特异性地靶向基因。(Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405)。已经构建了靶向18,740个人蛋白质编码基因的TALEN文库(Kim等人,Nature Biotechnology.31,251-258(2013))。通过Collectis Bioresearch(Paris,France)、Transposagen Biopharmaceuticals(Lexington,KY,USA)、和Life Technologies(Grand Island,NY,USA)可商购获得定制设计的TALE阵列。具体地,靶向CD38的TALEN是可商购的(参见Gencopoeia,目录号HTN222870-1、HTN222870-2和HTN222870-3,可获自万维网网址:www.genecopoeia.com/product/search/detail.php?prt=26&cid=&key=HTN222870)。示例性分子描述于例如美国专利公开号US 2014/0120622和2013/0315884中。

[0442] 在一些实施方案中,将TALEN作为由一种或多种质粒载体编码的转基因引入。在一些方面中,质粒载体可以含有选择标记,其提供对接收所述载体的细胞的鉴定和/或选择。

[0443] RGEN(CRISPR/Cas系统)

[0444] 在一些实施方案中,使用一种或多种DNA结合核酸进行阻遏,如经由RNA指导的核酸内切酶(RGEN)的破坏或由另一种RNA指导的效应分子的其他形式的阻遏。例如,在一些实施方案中,使用成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白进行阻遏。参见Sander和Joung,Nature Biotechnology,32(4):347-355。

[0445] 通常,“CRISPR系统”共同地是指转录物和涉及CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导其活性的其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列(涵盖“同向重复序列”)和在內源CRISPR系统的背景下的tracrRNA加工的部分同向重复序列)、指导序列(在內源CRISPR系统的背景下也称为“间隔子(spacer)”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0446] 在一些实施方案中,该CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统包括与DNA特异性结合的非编码RNA分子(指导)RNA和具有核酸酶功能性(例如,两个核酸酶结构域)的Cas蛋白(例如,Cas9)。

[0447] 在一些实施方案中,CRISPR系统的一种或多种元件衍生自I型、II型或III型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR系统的一种或多种元件衍生自包含內源CRISPR系统的特定生物,如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0448] 在一些实施方案中,将Cas核酸酶和gRNA(包括对靶序列特异的crRNA和固定的tracrRNA的融合物)引入细胞中。通常,在gRNA 5'末端处的靶位点使用互补碱基配对将Cas核酸酶靶向靶位点,例如基因。在一些实施方案中,靶位点是根据其恰好位于前间区序列邻近基序(PAM)序列的5'的位置选择的,如通常为NGG或NAG。在这一方面中,通过修饰指导RNA的前20个核苷酸以对应于靶DNA序列来将gRNA靶向所希望的序列。

[0449] 在一些实施方案中,CRISPR系统在靶位点处诱导DSB,随后进行破坏,如本文所讨论的。在其他实施方案中,使用被认为是“切口酶”的Cas9变体在靶位点处对单链产生切口。在一些方面中,使用成对的切口酶,例如以提高特异性,各自自由靶向序列的一对不同gRNA指导,使得在同时引入切口时引入5'突出端。在其他实施方案中,催化失活的Cas9与异源效应子结构域如转录阻遏因子或激活因子融合,以影响基因表达。

[0450] 通常,CRISPR系统的特征在于促进在靶序列位点处形成CRISPR复合物的元件。通常,在CRISPR复合物形成的背景下,“靶序列”一般是指代指导序列被设计为与其具有互补性的序列,其中在靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则不一定需要完全互补性。

[0451] 靶序列可以包含任何多核苷酸,如DNA或RNA多核苷酸。在一些实施方案中,靶序列位于细胞的细胞核或细胞质中。在一些实施方案中,靶序列可能在细胞的细胞器内。通常,可以用于重组到包含靶序列的靶基因座中的序列或模板称为“编辑模板”或“编辑多核苷酸”或“编辑序列”。在一些方面中,外源模板多核苷酸可以称为编辑模板。在一些方面中,重组是同源重组。

[0452] 通常,在內源CRISPR系统的背景下,CRISPR复合物(包含与靶序列杂交并与一种或多种Cas蛋白复合的指导序列)的形成导致靶序列中或附近(例如从靶序列的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、20个、50个或更多个碱基对内)的一条或两条链的切割。不希望受理论束缚,tracr序列,其可能包含野生型tracr序列的全部或一部分(例如,野生型tracr序列的约或多于约20个、26个、32个、45个、48个、54个、63个、67个、85个或更多个核

昔酸) 或由其组成, 还可以例如通过沿着tracr序列的至少一部分与可操作地连接至指导序列的tracr配对序列的全部或部分杂交形成CRISPR复合物的一部分。在一些实施方案中, tracr序列与tracr配对序列具有足够的互补性, 以杂交并参与CRISPR复合物的形成。

[0453] 与靶序列一样, 在一些实施方案中, 不一定需要完全互补。在一些实施方案中, 当最佳比对时, tracr序列沿着tracr配对序列的长度具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性。在一些实施方案中, 将驱动CRISPR系统的一个或多个元件的表达的一种或多种载体引入细胞中, 使得CRISPR系统的元件的表达在一个或多个靶位点处指导CRISPR复合物的形成。例如, Cas酶、与tracr-配对序列连接的指导序列和tracr序列可以各自与单独载体上的单独调节元件可操作地连接。可替代地, 可以将从相同或不同调节元件表达的两个或更多个元件组合在单个载体中, 而一个或多个另外的载体提供未包括在第一载体中的任何CRISPR系统组分。在一些实施方案中, 组合在单个载体中的CRISPR系统元件能以任何合适的方向排列, 如相对于第二元件位于5' (位于第二元件“上游”) 或相对于第二元件位于3' (位于第二元件“下游”) 的一个元件。一个元件的编码序列可以位于第二元件的编码序列的相同或相反链上, 并且以相同或相反的方向取向。在一些实施方案中, 单个启动子驱动编码CRISPR酶的转录物和一个或多个指导序列、tracr配对序列 (任选地可操作地连接至指导序列)、以及嵌入一个或多个内含子序列内的tracr序列 (例如每个在不同的内含子中、两个或更多个在至少一个内含子中、或全部在单个内含子中) 的表达。在一些实施方案中, CRISPR酶、指导序列、tracr配对序列和tracr序列与相同的启动子可操作地连接并从其表达。

[0454] 在一些实施方案中, 载体包含一个或多个插入位点, 如限制性核酸内切酶识别序列 (也称为“克隆位点”)。在一些实施方案中, 一个或多个插入位点 (例如, 约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个插入位点) 位于一种或多种载体的一个或多个序列元件的上游和/或下游。在一些实施方案中, 载体包含tracr配对序列上游、以及任选地在与tracr配对序列可操作地连接的调节元件的下游的插入位点, 使得在将指导序列插入到插入位点中之后并且在表达后, 指导序列指导CRISPR复合物与真核细胞中的靶序列的序列特异性结合。在一些实施方案中, 载体包含两个或更多个插入位点, 每个插入位点位于两个tracr配对序列之间, 以便允许在每个位点处插入指导序列。在这样的排列中, 所述两个或更多个指导序列可以包含单个指导序列的两个或更多个拷贝、两个或更多个不同的指导序列、或这些的组合。当使用多个不同的指导序列时, 可以将单个表达构建体用于将CRISPR活性靶向至细胞内的多个不同的相应靶序列。例如, 单个载体可以包含约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个或更多个指导序列。在一些实施方案中, 可以提供约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个此类含有指导序列的载体, 并任选地将其递送至细胞。

[0455] 在一些实施方案中, 载体包含与编码CRISPR酶 (如Cas蛋白) 的酶编码序列可操作地连接的调节元件。Cas蛋白的非限制性例子包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9 (也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其修饰形式。这些酶是已知的; 例如, 酿脓链球菌 (*S. pyogene*) Cas9蛋白的氨基酸序列

可以在SwissProt数据库中在登录号Q99ZW2下找到。在一些实施方案中,未经修饰的CRISPR酶如Cas9具有DNA切割活性。在一些实施方案中,CRISPR酶是Cas9,并且可以是来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)或肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)的Cas9。在一些实施方案中,CRISPR酶指导在靶序列的位置处(如在靶序列内和/或在靶序列的互补序列内)的一条或两条链的切割。在一些实施方案中,CRISPR酶指导从靶序列的第一个或最后一个核苷酸的约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、15个、20个、25个、50个、100个、200个、500个或更多个碱基对内的一条或两条链的切割。在一些实施方案中,载体编码相对于相应的野生型酶突变的CRISPR酶,使得突变的CRISPR酶缺乏切割含有靶序列的靶多核苷酸的一条或两条链的能力。例如,在来自酿脓链球菌(*S. pyogenes*)的Cas9的RuvC I催化结构域中的天冬氨酸至丙氨酸取代(D10A)将Cas9从切割两条链的核酸酶转化为切口酶(切割单链)。在一些实施方案中,Cas9切口酶可以与一个或多个指导序列(例如两个指导序列,其分别靶向DNA靶标的正义链和反义链)组合使用。这种组合允许对两条链产生切口并用于诱导NHEJ。

[0456] 在一些实施方案中,编码CRISPR酶的酶编码序列针对在特定细胞(如真核细胞)中表达进行了密码子优化。真核细胞可以是特定生物的那些或源自于特定生物,如哺乳动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、狗或非人灵长类动物。通常,密码子优化是指通过用更频繁或最常用于该宿主细胞的基因中的密码子替代天然序列的至少一个密码子(例如,约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、50个或更多个密码子)来修饰核酸序列以增强在目的宿主细胞中的表达,同时保持天然氨基酸序列的过程。各种物种表现出对特定氨基酸的某些密码子的特别偏好。密码子偏倚(生物体之间密码子使用的差异)通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,其转而又被认为取决于被翻译的密码子的特性和特定转移RNA(tRNA)分子的可用性(除了别的之外)。所选择的tRNA在细胞中的优势通常是肽合成中最常使用的密码子的反映。因此,基于密码子优化,可以针对在给定生物中的最佳基因表达来定制基因。在一些实施方案中,编码CRISPR酶的序列中的一种或多种密码子(例如,1个、2个、3个、4个、5个、10个、15个、20个、25个、50个或更多个或所有密码子)对应于特定氨基酸的最常用的密码子。

[0457] 通常,指导序列是与靶多核苷酸序列具有足够的互补性以与靶序列杂交并且指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,在指导序列与其相应的靶序列之间的互补程度是约或多于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。

[0458] 最佳比对可以使用用于比对序列的任何合适的算法来确定,所述算法的非限制性例子包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler变换的算法(例如Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies)、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(可获自soap.genomics.org.cn)和Maq(可获自maq.sourceforge.net)。在一些实施方案中,指导序列的长度为约或多于约5个、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,指导序列的长度为少于约75个、50个、45个、40个、35个、30个、25个、20个、15个、12个或更少个核苷酸。可以通过任何合适的测定来评估指导序列指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的能力。例如,可以例如通过用编码

CRISPR序列的组分的载体转染将足以形成CRISPR复合物CRISPR系统组分(包括待测试的指导序列)提供给具有相应靶序列的细胞,随后例如通过如本文描述的Surveyor测定评估在靶序列内的优先切割。类似地,可以通过提供靶序列、CRISPR复合物的组分(包括待测试的指导序列和与测试指导序列不同的对照指导序列),并比较在测试和对照指导序列反应之间在靶序列处的结合或切割速率,在试管中评价靶多核苷酸序列的切割。

[0459] 可以选择指导序列来靶向任何靶序列。在一些实施方案中,靶序列是细胞基因组内的序列。示例性靶序列包括在靶基因组中独特的那些序列。在一些实施方案中,指导序列被选择为降低所述指导序列内的二级结构的程度。可以通过任何合适的多核苷酸折叠算法来确定二级结构。

[0460] 通常, tracr配对序列包括与tracr序列具有足够互补性以促进以下中的一种或多的一种的任何序列:(1) 在含有相应的tracr序列的细胞中切除侧翼为tracr配对序列的指导序列;以及(2) 在靶序列处形成CRISPR复合物,其中所述CRISPR复合物包含与tracr序列杂交的tracr配对序列。通常,互补性程度是关于tracr配对序列和tracr序列沿着两个序列中的较短序列的长度的最佳比对。

[0461] 最佳比对可以通过任何合适的比对算法来确定,并且可以进一步考虑二级结构,如tracr序列或tracr配对序列内的自身互补性。在一些实施方案中,当最佳比对时在tracr序列与tracr配对序列之间沿着两者中的较短者的长度的互补性程度为约或多于约25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%或更高。在一些实施方案中, tracr序列的长度为约或多于约5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、40个、50个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,将tracr序列和tracr配对序列包含在单个转录物中,使得两者之间的杂交产生具有二级结构(如发夹)的转录物。在一些方面中,用于在发夹结构中使用的环形成序列的长度为四个核苷酸,并且具有序列GAAA。然而,可以使用更长或更短的环序列,也可以使用替代序列。在一些实施方案中,序列包括核苷酸三联体(例如,AAA)和另外的核苷酸(例如C或G)。环形成序列的例子包括CAAA和AAAG。在一些实施方案中,转录物或转录的多核苷酸序列具有至少两个或更多个发夹。在一些实施方案中,转录物具有两个、三个、四个或五个发夹。在另外的实施方案中,转录物具有最多五个发夹。在一些实施方案中,单个转录物进一步包括转录终止序列,如polyT序列,例如六个T核苷酸。

[0462] 在一些实施方案中,CRISPR酶是包含一个或多个异源蛋白结构域的融合蛋白的一部分(例如,除了CRISPR酶之外,约或多于约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个结构域)。CRISPR酶融合蛋白可以包含任何另外的蛋白质序列,并且任选在任何两个结构域之间的接头序列。可以与CRISPR酶融合的蛋白质结构域的例子包括但不限于表位标签、报告基因序列和具有以下活性中的一种或多种的蛋白质结构域:甲基化酶活性、去甲基化酶活性、转录激活活性、转录阻遏活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的非限制性例子包括组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感血凝素(HA)标签、Myc标签、VSV-G标签和硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的例子包括但不限于谷胱甘肽-5-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖醛酸酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、和自发荧光蛋白(包括蓝色荧光蛋白(BFP))。CRISPR酶可以与

编码蛋白质或蛋白质片段的基因序列融合,所述蛋白质或蛋白质片段结合DNA分子或结合其他细胞分子,包括但不限于麦芽糖结合蛋白(MBP)、S-tag、Lex A DNA结合结构域(DBD)融合物、GAL4A DNA结合结构域融合物、和单纯性疱疹病毒(HSV)BP16蛋白融合物。可以形成包含CRISPR酶的融合蛋白的一部分的另外的结构域描述于US20110059502(通过引用并入本文)中。在一些实施方案中,将标记的CRISPR酶用于鉴定靶序列的位置。

[0463] 在一些实施方案中,将与指导序列组合(并且任选地与其复合)的CRISPR酶递送至细胞。

[0464] 在一些方面中,靶多核苷酸在真核细胞中被修饰。在一些实施方案中,所述方法包括允许CRISPR复合物与靶多核苷酸结合以实现所述靶多核苷酸的切割,从而修饰所述靶多核苷酸,其中所述CRISPR复合物包含与指导序列(其与在所述靶多核苷酸内的靶序列杂交)复合的CRISPR酶,其中所述指导序列与tracr配对序列连接,所述tracr配对序列转而又与tracr序列杂交。

[0465] 在一些方面中,所述方法包括修饰多核苷酸在真核细胞中的表达。在一些实施方案中,所述方法包括允许CRISPR复合物与多核苷酸结合,使得所述结合导致所述多核苷酸的表达增加或减少;其中所述CRISPR复合物包含与指导序列(其与所述多核苷酸内的靶序列杂交)复合的CRISPR酶,其中所述指导序列与tracr配对序列连接,所述tracr配对序列转而又与tracr序列杂交。

[0466] 编码基因破坏分子和复合物的核酸的递送

[0467] 在一些方面中,将编码DNA靶向分子、复合物或组合的核酸给予至或引入细胞。核酸通常以表达载体(如病毒表达载体)的形式给予。在一些方面中,表达载体是逆转录病毒表达载体、腺病毒表达载体、DNA质粒表达载体或AAV表达载体。在一些方面中,将编码破坏分子或复合物的一个或多个多核苷酸(如DNA靶向分子)递送至细胞。在一些方面中,递送是通过递送一种或多种载体、其一种或多种转录物和/或由其转录的一种或多种蛋白质,是递送至细胞。

[0468] 在一些实施方案中,由于将编码多肽的多核苷酸引入细胞中,多肽在细胞中原位合成。在一些方面中,多肽可以在细胞外部产生,并且然后引入其中。用于将多核苷酸构建体引入动物细胞中的方法是已知的,并且作为非限制性例子包括其中将多核苷酸构建体整合到细胞基因组中的稳定转化方法、其中不将多核苷酸构建体整合到细胞基因组中的瞬时转化方法、和病毒介导的方法。在一些实施方案中,可以通过例如重组病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒)、脂质体等将多核苷酸引入细胞中。例如,在一些方面中,瞬时转化方法包括显微注射、电穿孔或粒子轰击。在一些实施方案中,鉴于在细胞中被表达,多核苷酸可以包括在载体中,更特别地质粒或病毒中。

[0469] 在一些实施方案中,可以将基于病毒和非病毒的基因转移方法用于将核酸引入哺乳动物细胞或靶组织中。可以将此类方法用于将编码CRISPR、ZFP、ZFN、TALE和/或TALEN系统的组分的核酸给予至在培养物中或在宿主生物体中的细胞。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA(例如本文描述的载体的转录物)、裸核酸、和与递送媒介物(如脂质体)复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞之后具有附加型或整合的基因组。关于基因治疗程序的综述,参见Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Felgner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993);

Dillon, TIBTECH 11:167-175 (1993); Miller, Nature 357:455-460 (1992); Van Brunt, Biotechnology 6(10):1149-1154 (1988); Vigne, Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, British Medical Bulletin 51(1):31-44 (1995); Haddada 等人, in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm (eds) (1995); 以及 Yu 等人, Gene Therapy 1:13-26 (1994)。

[0470] 非病毒递送核酸的方法包括脂转染、核转染、显微注射、基因枪、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子、和DNA的试剂增强摄取。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386; 4,946,787; 和4,897,355中; 脂转染试剂是市售的(例如, TransfectamTM和LipofectinTM)。适合用于多核苷酸的有效受体识别脂转染的阳离子和中性脂质包括 Felgner, WO 91/17424; WO 91/16024 中的那些。递送可以是至细胞(例如体外或离体给予)或靶组织(例如体内给予)。

[0471] 在一些实施方案中,递送是经由使用基于RNA或DNA病毒的系统来递送核酸。在一些方面中,病毒载体可以直接给予至患者(体内),或者它们可以用于体外或离体处理细胞,并且然后给予至患者。在一些实施方案中,基于病毒的系统包括用于基因转移的逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关和单纯性疱疹病毒载体。

[0472] 在一些方面中,可以将报告基因(其包括但不限于谷胱甘肽-S转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、HcRed、DsRed、青色荧光蛋白(CFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、和自发荧光蛋白(包括蓝色荧光蛋白(BFP)))引入细胞中以编码基因产物,所述基因产物用作标记,通过所述标记测量基因产物表达的改变或修饰。在另外的实施方案中,可以经由载体将编码基因产物的DNA分子引入细胞中。在一些实施方案中,基因产物是萤光素酶。在另外的实施方案中,基因产物的表达降低了。

[0473] 抑制性核酸分子

[0474] 在一些实施方案中,使用作为RNA干扰剂的抑制性核酸分子实现基因阻遏,所述抑制性核酸分子可以用于选择性抑制或阻遏所述基因的表达。例如,基因阻遏可以通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)、反义和/或核酶进行。在一些实施方案中, RNA干扰剂还可以包括可以在细胞内加工以产生shRNA的其他RNA种类,包括但不限于与天然存在的miRNA前体或miRNA样RNA的设计前体相同的RNA种类。

[0475] 在一些实施方案中, RNA干扰剂是至少部分双链的RNA,其具有本领域已知的通过RNAi机制介导基因表达的抑制的分子特有的结构或包含彼此杂交以形成这种结构的至少部分互补的部分的RNA链。当RNA含有彼此杂交的互补区域时,所述RNA将被说成自我杂交。在一些实施方案中,抑制性核酸(如RNA干扰剂)包括与靶基因基本上互补的部分。在一些实施方案中,被靶向转录物的RNA干扰剂也可以被认为被靶向编码和指导所述转录物合成的基因。在一些实施方案中,靶区域可以是靶转录物的与RNA干扰剂的反义链杂交的区域。在一些实施方案中,靶转录物可以是作为RNA干扰抑制的靶标的任何RNA。

[0476] 在一些实施方案中,如果(1)所述RNAi剂包含在长度为约15-29个核苷酸的区域(例如长度为至少大约15、大约17、大约18或大约19个核苷酸的区域)上与所述转录物至少大约80%、大约85%、大约90%、大约91%、大约92%、大约93%、大约94%、大约95%、大约96%、大约97%、大约98%、大约99%或大约100%互补的部分(例如,链);和/或(2)由所述

RNAi剂的一条链的一串15个核苷酸和所述转录物的15个核苷酸部分在于哺乳动物细胞的细胞质或细胞核内通常发现的条件下(不包括温度)下形成的双链体的 T_m 比由所述RNA干扰剂及其完全互补体的相同15个核苷酸形成的双链体的 T_m 低不超过大约 15°C 或不超过大约 10°C ;和/或(3)所述转录物的稳定性在所述RNA干扰剂的存在下与不存在它的情况下相比降低的话,则认为RNA干扰剂“靶向”转录物和编码所述转录物的基因。

[0477] 在一些实施方案中, RNA干扰剂任选地包括一种或多种核苷酸类似物或修饰。本领域普通技术人员将认识到RNAi剂可以包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物、经修饰的核苷酸或主链等。在一些实施方案中, RNA干扰剂可以在转录后被修饰。在一些实施方案中, RNA干扰剂可以含有杂交或自我杂交以形成以下结构的一条或多条链, 所述结构包括长度在约15-29个核苷酸之间的双链体部分, 任选地在所述双链体内具有一个或多个错配的或未配对的核苷酸。

[0478] 在一些实施方案中, 术语“短的干扰RNA”(siRNA)是指长度在约15-29个核苷酸之间的双链部分并且任选地还在任一条链或两条链上包括单链突出端{例如, 长度为1-6个核苷酸}的核酸。在一些实施方案中, 所述双链部分的长度可以在17-21个核苷酸之间, 例如长度为19个核苷酸。在一些实施方案中, 所述突出端存在于每条链的3'端, 可以是约或大约2至4个核苷酸长, 并且可以由DNA或核苷酸类似物组成。siRNA可以由杂交在一起的两条RNA链形成, 或者可以可替代地由较长的双链RNA或由包括自我杂交部分的单RNA链(如短发夹RNA)产生。本领域普通技术人员将理解, 在由两条siRNA链形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。在一些实施方案中, siRNA的一条链(“反义”或“指导”链)包括与靶核酸(例如, mRNA转录物)杂交的部分。在一些实施方案中, 所述反义链与所述靶标在约15-29个核苷酸(有时在17-21个核苷酸之间, 例如19个核苷酸)上完全互补, 这意味着所述siRNA与所述靶转录物在此长度上在没有单个错配的情况下杂交。然而, 本领域普通技术人员将理解, 在所述siRNA链和所述靶转录物之间形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。

[0479] 在一些实施方案中, 短发夹RNA(shRNA)是包含至少两个互补部分和至少一个单链部分的核酸分子, 所述至少两个互补部分杂交或能够杂交以形成足够长以介导RNAi(通常长度在15-29个核苷酸之间)的双链体结构, 并且所述至少一个单链部分通常长度在大约1与10个核苷酸之间, 其形成连接形成所述双链体的两个序列的末端的环。在一些实施方案中, 所述结构还可以包含突出端。在一些实施方案中, 通过所述shRNA的自我互补部分的杂交形成的双链体可以具有与siRNA类似的性质, 并且在一些情况下, 可以通过保守的细胞RNAi机器将shRNA加工成siRNA。因此, shRNA可以是siRNA的前体, 并且可以类似地能够抑制靶转录物的表达。在一些实施方案中, shRNA包括与靶核酸(例如, mRNA转录物)杂交, 并且可以在约15-29个核苷酸(有时在17-21个核苷酸之间, 例如19个核苷酸)上与所述靶标完全互补的部分。然而, 本领域普通技术人员将理解, 在所述shRNA链和所述靶转录物之间形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。

[0480] 2. 基因激活技术

[0481] 在一些实施方案中, 通过修饰内源基因的表达, 通过引入基因的外源拷贝, 或通过稳定和/或去阻遏基因产物来实施基因的表达、活性和/或功能的增强。在一些方面中, 与不存在基因激活的情况下或在不存在引入以实现增强的组分的情况下的表达和/或活性相

比,基因的表达和/或活性增加了至少或约20%、30%或40%,通常至少或约50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0482] 在一些实施方案中,通过破坏与基因相关的负调节元件或基因的负转录调节因子,如通过本文描述的任何靶向破坏方法来修饰内源基因的表达。在一些实施方案中,通过引入与基因相关的正调节元件或基因的正转录激活因子来修饰内源基因的表达。用于引入基因修饰和表达外源蛋白质的方法在本领域是熟知的。

[0483] 在一些实施方案中,激活是瞬时的或可逆的,使得基因的表达在稍后的时间降低至未修饰的水平。在其他实施方案中,激活不是可逆的或瞬时的,例如是永久性的。

[0484] 在一些实施方案中,使用反义技术,如通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)和/或用于选择性抑制或阻遏基因的负调节因子的表达的核酶来实现基因激活。

[0485] DNA靶向分子和复合物;靶向核酸内切酶

[0486] 在一些实施方案中,所述激活使用与基因相关调节元件特异性结合或杂交的DNA靶向分子(如DNA结合蛋白或DNA结合核酸)或含有其的复合物、化合物或组合物来实现。在一些实施方案中,DNA靶向分子包含DNA结合结构域,例如锌指蛋白(ZFP)DNA结合结构域、转录激活因子样蛋白(TAL)或TAL效应子(TALE)DNA结合结构域、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)DNA结合结构域、或来自大范围核酸酶的DNA结合结构域。

[0487] 在一些实施方案中,DNA靶向分子、复合物或组合含有DNA结合分子和一个或多个另外的结构域(如效应子结构域),以促进基因的激活。例如,在一些实施方案中,通过包含DNA结合蛋白和异源调节结构域或其功能片段的融合蛋白来进行基因激活。在一些方面中,结构域包括例如转录因子结构域,如激活因子、共激活因子、致癌基因、DNA修复酶及其相关因子和调节剂、DNA重排酶及其相关因子和调节剂、染色质相关蛋白及其调节剂(例如激酶、乙酰化酶和脱乙酰酶)、以及DNA修饰酶(例如甲基转移酶、拓扑异构酶、解旋酶、连接酶、激酶、磷酸酶、聚合酶、核酸内切酶及其相关因子和调节剂)。

[0488] RGEN(CRISPR/Cas系统)

[0489] 在一些实施方案中,使用一种或多种DNA结合核酸进行激活,如经由RNA指导的核酸内切酶(RGEN)的激活或由另一种RNA指导的效应分子的其他形式的激活。例如,在一些实施方案中,使用CRISPR相关(Cas)蛋白进行激活。参见Perez-Pinera,P.,等人(2013)Nature methods,10(10):973-976。

[0490] 通过点突变(SpCas9中的D10A和H840A)可以使得RuvC-和HNH-核酸酶结构域失活,从而产生不能切割靶DNA的核酸酶,即死亡的Cas9(dCas9)分子。dCas9分子保留了基于gRNA靶向序列与靶DNA结合的能力。dCas9可以用转录激活因子加标签,并且将这些dCas9融合蛋白靶向启动子区域导致下游靶基因的稳健转录激活。最简单的基于dCas9的激活因子和阻遏因子由直接与单个转录激活因子(例如VP64)融合的dCas9组成。另外,已经开发了更精细的激活策略,其导致哺乳动物细胞中靶基因的更大激活。这些包括:加表位标签的dCas9和抗体-激活因子效应蛋白共表达(例如HNH-系统)、dCas9与几个不同的激活结构域串联融合(例如dCas9-VP64)、或具有“经修饰的支架”gRNA的dCas9-VP64和另外的RNA结合“辅助激活因子”共表达(例如SAM激活因子)。重要的是,dCas9介导的基因激活是可逆的,因为它不会永久性地修饰基因组DNA。

[0491] VII. 定义

[0492] 除非另外定义,否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命名旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中不包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0493] 如本文所用,基因表达的“阻遏”是指与在不存在阻遏的情况下的基因产物的表达水平相比,消除或降低细胞中由受试基因编码的一种或多种基因产物的表达。示例性基因产物包括由基因编码的mRNA和蛋白质产物。在一些情况下,阻遏是瞬时的或可逆的,并且在其他情况下是永久性的。在一些情况下,阻遏是关于功能性或全长蛋白质或mRNA,尽管事实是可以产生截短的或非功能性产物。在本文的一些实施方案中,与表达相反,基因活性或功能受到阻遏。基因阻遏通常通过人工方法诱导,即通过添加或引入化合物、分子、复合物或组合物,和/或通过破坏基因的核酸或与基因相关的核酸(如在DNA水平)。用于基因阻遏的示例性方法包括基因沉默、敲低、敲除和/或基因破坏技术,如基因编辑。例子包括反义技术,如RNAi、siRNA、shRNA和/或核酶(其通常导致表达的瞬时降低),以及导致靶基因失活或破坏的基因编辑技术(例如,通过诱导断裂和/或同源重组)。

[0494] 如本文所用,基因的“破坏”是指在DNA水平上的基因序列的变化。例子包括插入、突变和缺失。破坏通常导致由基因编码的正常或“野生型”产物的表达的阻遏和/或完全不存在。此类基因破坏的例子是插入、移码和错义突变,基因或部分基因的缺失、敲入和敲除(包括整个基因的缺失)。此类破坏可以发生在编码区中(例如,在一个或多个外显子中),从而如通过插入终止密码子导致不能产生全长产物、功能产物或任何产物。此类破坏也可能通过启动子或增强子或影响转录激活的其他区域中的破坏而发生,以便阻止基因的转录。基因破坏包括基因靶向,包括通过同源重组的靶向基因失活。

[0495] 如本文所用,术语“引入”包括在体外或在体内将DNA引入细胞中的各种方法,此类方法包括转化、转导、转染和感染。载体可用于将编码分子的DNA引入细胞中。可能的载体包括质粒载体和病毒载体。病毒载体包括逆转录病毒载体、慢病毒载体或其他载体,如腺病毒载体或腺相关载体。

[0496] 如本文所用的,单数形式“一种/个(a/an)”和“所述(the)”包括复数种/个指示物,除非上下文另外明确说明。例如,“一种/个(a或an)”意指“至少一种/个”或“一种/个或多个/个”。

[0497] 贯穿本公开内容,所要求保护的主体各个方面以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应所述被解释为对所要求保护的主体范围的僵硬限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的各个数值。例如,在提供一系列值的情况下,应当理解,在所述范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述或中间值包含在所要求保护的主体内。这些更小范围的上限和下限可以独立地被包括在更小范围之内,并且也被涵盖在所要求保护的主体之内,服从于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述的范围包括一个或两个限制时,排除了那些被包括的限制的任一个或两者的范围也被包括在所要求保护的主体之内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0498] 如本文所用术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差

范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对所述值或参数本身的实施方案。

[0499] 如本文所用,受试者包括任何活的生物体,如人和其他哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人和非人动物,包括农场动物、运动动物、啮齿动物和宠物。

[0500] 如本文所用的,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0501] 如本文所用,术语“治疗(treatment、treat和treating)”是指疾病或病症或障碍,或与其相关的症状、不良反应或结果、或表型的完全或部分减轻或减少。在某些实施方案中,效果是治疗性的,使得其部分或完全治愈疾病或病症或归因于其的不良症状。

[0502] 如本文所用,化合物或组合物或组合的“治疗有效量”是指在必要的剂量下和必要的时间段内有效实现所需治疗结果(如针对治疗疾病、病症或障碍)和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用的量。所述治疗有效量可以根据诸如疾病状态、受试者的年龄、性别和体重以及给予的细胞群等因素而变化。

[0503] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阳性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中的可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上与已知对所述标记呈阳性的细胞的水平相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记呈阴性的细胞的水平。

[0504] 如本文所用,细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的不存在,例如通过用与所述标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上低于已知对所述标记呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0505] 在一些实施方案中,一种或多种标记的表达减少是指当与参比细胞群相比时,平均荧光强度的 $11\log^{10}$ 的损失和/或表现出标记的细胞的百分比减少至少约20%的细胞、25%的细胞、30%的细胞、35%的细胞、40%的细胞、45%的细胞、50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞、和100%的细胞、以及在20%与100%之间的任何%。在一些实施方案中,对一种或多种标记呈阳性的细胞群是指当与参比细胞群相比时,表现出标记的细胞的百分比为至少约50%的细胞、55%的细胞、60%的细胞、65%的细胞、70%的细胞、75%的细胞、80%的细胞、85%的细胞、90%的细胞、95%的细胞、和100%的细胞、以及在50%与100%之间的任何%。

[0506] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0507] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0508] VIII. 示例性实施方案

[0509] 实施方案1. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质从所述细胞的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

[0510] 实施方案2. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

[0511] 实施方案3. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0512] 实施方案4. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。

[0513] 实施方案5. 一种包含一个或多个核酸分子的工程化B细胞,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0514] 实施方案6. 一种工程化B细胞,其包含:

[0515] 一个或多个核酸分子,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列;以及

[0516] 嵌合受体,所述嵌合受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

[0517] 实施方案7. 一种工程化B细胞,其包含:

[0518] 一个或多个核酸分子,所述一个或多个核酸分子包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列;以及

[0519] 重组受体,所述重组受体包含配体结合结构域,其中,在配体结合后,所述受体能够诱导 (i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或 (ii) 能够调节所述工程化B细胞的分化的信号,

[0520] 其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

[0521] 实施方案8. 实施方案1-7中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质被所述B细胞分泌或能够被所述B细胞分泌。

[0522] 实施方案9. 实施方案8的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列包含编码分泌信号肽的核苷酸序列。

[0523] 实施方案10. 实施方案9的工程化B细胞,其中所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO: 76-202的氨基酸序列。

[0524] 实施方案11.实施方案1-10中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是二聚体。

[0525] 实施方案12.实施方案11的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码所述二聚体的第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

[0526] 实施方案13.实施方案1-12中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

[0527] 实施方案14.实施方案1-13中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质结合与疾病或病症相关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述分子或蛋白质在细胞的表面上表达。

[0528] 实施方案15.实施方案14的工程化B细胞,其中所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症和炎性疾病。

[0529] 实施方案16.实施方案15的工程化B细胞,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

[0530] 实施方案17.实施方案1-16中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质结合选自以下的分子:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白A1(CCNA1)XX。

[0531] 实施方案18.实施方案1-17中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子、以及抗体或其抗原结合片段。

[0532] 实施方案19.实施方案18的工程化B细胞,其中所述细胞因子选自趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子。

[0533] 实施方案20.实施方案2-18中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。

[0534] 实施方案21.实施方案20的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。

[0535] 实施方案22.实施方案20的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。

[0536] 实施方案23.实施方案22的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。

[0537] 实施方案24.实施方案23的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。

[0538] 实施方案25.实施方案24的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0539] 实施方案26.实施方案19的工程化B细胞,其中所述抗体源自于阿仑单抗、阿特殊单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单

抗、西妥昔单抗、达利珠单抗 (Zenapax)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗 (Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗 (Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗 (CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗 (Rituxan、Mabthera)、司妥昔单抗、托西莫单抗 (Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、0C125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736,或者是其抗原结合片段。

[0540] 实施方案27. 实施方案20-26中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。

[0541] 实施方案28. 实施方案27的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。

[0542] 实施方案29. 实施方案12或28的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点 (IRES) 或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的核苷酸序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0543] 实施方案30. 实施方案20-29中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或所述轻链中包含一个或多个修饰,使得当外源抗体或抗原结合片段在细胞中表达时,与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。

[0544] 实施方案31. 实施方案30的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰位于所述恒定链的CH2和/或CH3区。

[0545] 实施方案32. 实施方案31的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包含杵臼结构 (KiH) 修饰或对接锁定 (DNL) 修饰。

[0546] 实施方案33. 实施方案20-32中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

[0547] 实施方案34. 实施方案20-28中任一项的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。

[0548] 实施方案35. 实施方案34的工程化B细胞,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

[0549] 实施方案36. 实施方案1-35中任一项的工程化B细胞,其中编码所述外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。

[0550] 实施方案37. 实施方案1-36中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是原代B细胞。

[0551] 实施方案38. 实施方案1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是能够分化成浆母细胞、浆细胞和记忆B细胞中的一种或多种的B细胞。

[0552] 实施方案39. 实施方案1-38中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞。

[0553] 实施方案40. 实施方案1-39中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含:选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、0BF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻或XBP1⁻;和/或

[0554] 选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻或CD38^低。

[0555] 实施方案41.实施方案1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。

[0556] 实施方案42.实施方案1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid}或XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻或CD138⁻。

[0557] 实施方案43.实施方案1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi}或XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻或MHCII^{-/低}。

[0558] 实施方案44.实施方案1-37中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻或XBP1⁻;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD40⁺、CD27^{var}、CXCR4、5、7⁺、CD23^低或CD38⁻。

[0559] 实施方案45.实施方案1-4和6-44中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0560] 实施方案46.实施方案5或45的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。

[0561] 实施方案47.实施方案46的工程化B细胞,其中所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1或IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1或XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。

[0562] 实施方案48.实施方案46或47的工程化B细胞,其中所述改变的表达是有条件的。

[0563] 实施方案49.实施方案46或47的工程化B细胞,其中所述改变的表达是可诱导的。

[0564] 实施方案50.实施方案1和3-49中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子进一步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。

[0565] 实施方案51.实施方案50的工程化B细胞,其中所述启动子是B细胞启动子。

[0566] 实施方案52.实施方案51的工程化B细胞,其中所述启动子是浆细胞启动子。

[0567] 实施方案53.实施方案51的工程化B细胞,其中所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。

[0568] 实施方案54.实施方案53的工程化B细胞,其中所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、κ轻链启动子或λ轻链启动子。

[0569] 实施方案55.实施方案50的工程化B细胞,其中所述启动子是组成型活性启动子。

[0570] 实施方案56.实施方案55的工程化B细胞,其中所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK或CAGG。

[0571] 实施方案57.实施方案50的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质的表达是有条件的。

[0572] 实施方案58.实施方案2或50的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子。

[0573] 实施方案59.实施方案58的工程化B细胞,其中所述条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

[0574] 实施方案60.实施方案59的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。

[0575] 实施方案61.实施方案60的工程化B细胞,其中所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。

[0576] 实施方案62.实施方案61的工程化B细胞,其中所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或是其类似物。

[0577] 实施方案63.实施方案1-3和5-62中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个被整合到所述B细胞的重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座中或替代其全部或部分。

[0578] 实施方案64.实施方案4或63的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含一个或多个编码序列,所述一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。

[0579] 实施方案65.实施方案64的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。

[0580] 实施方案66.实施方案4和63-65中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含与所述免疫球蛋白基因座的相邻剩余编码序列同框的一个或多个编码序列。

[0581] 实施方案67.实施方案4和63-66中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。

[0582] 实施方案68.实施方案67的工程化B细胞,其中所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

[0583] 实施方案69.实施方案68的工程化B细胞,其中所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。

[0584] 实施方案70.实施方案67的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

[0585] 实施方案71.实施方案70的工程化B细胞,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。

[0586] 实施方案72.实施方案70或71的工程化B细胞,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0587] 实施方案73.实施方案4和63-66中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。

[0588] 实施方案74.实施方案73的工程化B细胞,其中所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。

[0589] 实施方案75.实施方案73或74的工程化B细胞,其中所述单链抗体片段是scFv。

[0590] 实施方案76.实施方案1-75中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞表达内源B细胞受体。

[0591] 实施方案77.实施方案76的工程化B细胞,其中所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。

[0592] 实施方案78.实施方案77的工程化B细胞,其中所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

[0593] 实施方案79.实施方案1-77中任一项的工程化B细胞,其中所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。

[0594] 实施方案80.实施方案79的工程化B细胞,其中所述基因破坏包括编码所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。

[0595] 实施方案81.实施方案80的工程化B细胞,其中所述基因破坏是双等位基因的。

[0596] 实施方案82.实施方案79-81中任一项的工程化B细胞,其中与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0597] 实施方案83.实施方案79-82中任一项的工程化B细胞,其中所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。

[0598] 实施方案84.实施方案1-83中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。

[0599] 实施方案85.实施方案1-5和8-84中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的重组受体,所述重组受体在配体结合后能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

[0600] 实施方案86.实施方案6、7或85的工程化B细胞,其中所述受体是嵌合受体,所述嵌合受体包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0601] 实施方案87.实施方案86的工程化B细胞,其中所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。

[0602] 实施方案88.实施方案7或85的工程化B细胞,其中所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0603] 实施方案89.实施方案86-88中任一项的工程化B细胞,其中所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。

[0604] 实施方案90.实施方案86-89中任一项的工程化B细胞,其中在配体结合后,所述受

体经由含有ITAM的细胞内信号传导结构域发出信号。

[0605] 实施方案91.实施方案6、7和85-90中任一项的工程化B细胞,其中所述配体结合结构域包含抗体部分。

[0606] 实施方案92.实施方案91的工程化B细胞,其中所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。

[0607] 实施方案93.实施方案6、7和85-92中任一项的工程化B细胞,其中所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

[0608] 实施方案94.实施方案6和85-87中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。

[0609] 实施方案95.实施方案85和88中任一项的工程化B细胞,其中所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。

[0610] 实施方案96.实施方案6、7和85-95中任一项的工程化B细胞,其中所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。

[0611] 实施方案97.实施方案6和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。

[0612] 实施方案98.实施方案6和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

[0613] 实施方案99.实施方案6、7和85-98中任一项的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。

[0614] 实施方案100.实施方案99的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合所述受试者的肿瘤环境中存在的配体。

[0615] 实施方案101.实施方案99的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

[0616] 实施方案102.实施方案6、7和85-93中任一项的工程化B细胞,其中所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在所述受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在所述受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在所述受试者中普遍表达的配体、在所述受试者中全身表达的配体、在所述受试者中不是组织特异性的配体、和对所述受试者是外源的配体。

[0617] 实施方案103.实施方案6、7和85-102中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子进一步编码所述受体。

[0618] 实施方案104.实施方案103的工程化B细胞,其中所述一个或多个核酸分子包含分离编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列的接头序列。

[0619] 实施方案105.实施方案104的工程化B细胞,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0620] 实施方案106.实施方案1-2和4-105中任一项的工程化B细胞,其中所述工程化B细

胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0621] 实施方案107.实施方案3或106的工程化B细胞,其中阻止类别转换的修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或所述内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。

[0622] 实施方案108.实施方案3、106和107中任一项的工程化B细胞,其中阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰包括在所述内源抗体基因座处在M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。

[0623] 实施方案109.实施方案3和106-108中任一项的工程化B细胞,其中所述内源抗体是IgM或IgD。

[0624] 实施方案110.实施方案1-109中任一项的工程化B细胞,其中所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列,或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

[0625] 实施方案111.实施方案6、7和85-105中任一项的工程化B细胞,其中所述外源蛋白质在配体结合后从所述细胞分泌或能够从所述细胞分泌。

[0626] 实施方案112.实施方案1-111中任一项的工程化B细胞,其中所述B细胞是人B细胞。

[0627] 实施方案113.实施方案1-112中任一项的工程化B细胞,其是从患者获得的原代细胞。

[0628] 实施方案114.实施方案1-113中任一项的工程化B细胞,其中所述细胞是在容器中或在制剂中。

[0629] 实施方案115.一种核酸分子,其包含编码治疗性蛋白质和受体的一个或多个编码序列,其中所述受体包含配体结合结构域,并且其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i) 促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节B细胞的分化的信号。

[0630] 实施方案116.实施方案115的核酸分子,其进一步包含可操作地连接以控制所述治疗性蛋白质和/或所述受体的表达的至少一个启动子。

[0631] 实施方案117.实施方案115或实施方案116的核酸分子,其中编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列可操作地连接至第一启动子,并且编码所述受体的核苷酸序列可操作地连接至第二启动子,所述第一启动子和所述第二启动子可以是相同的或不同的。

[0632] 实施方案118.实施方案115-117中任一项的核酸分子,其中所述核酸分子包含将编码所述治疗性蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列分开的接头序列。

[0633] 实施方案119.实施方案118的核酸分子,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或者编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0634] 实施方案120.一种载体,其包含实施方案115-119中任一项的核酸分子。

[0635] 实施方案121.实施方案120的载体,其是病毒载体。

[0636] 实施方案122.实施方案120或实施方案121的载体,其是逆转录病毒载体。

[0637] 实施方案123.实施方案120-122中任一项的载体,其是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[0638] 实施方案124.一种工程化B细胞,其包含实施方案92-96中任一项的核酸分子或实施方案120-123中任一项的载体。

[0639] 实施方案125.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将实施方案115-119中任一项的核酸分子或实施方案120-123中任一项的载体导入B细胞或B细胞前体中。

[0640] 实施方案126.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,所述一个或多个编码序列是在一个或多个元件的控制下以实现所述外源蛋白质的分泌,其中所述外源蛋白质不是抗体。

[0641] 实施方案127.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述外源蛋白质在所述工程化B细胞中的表达是有条件的。

[0642] 实施方案128.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞(1)表达内源抗体,并且(2)包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0643] 实施方案129.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座中或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中,所述靶基因座选自重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座。

[0644] 实施方案130.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,所述一个或多个修饰导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0645] 实施方案131.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,

[0646] 其中所述B细胞包含嵌合受体,所述嵌合受体包含配体结合结构域,

[0647] 其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

[0648] 实施方案132.一种产生工程化B细胞的方法,所述方法包括将包含编码外源蛋白质的一个或多个编码序列的一个或多个核酸分子引入B细胞或B细胞前体中,

[0649] 其中所述B细胞包含重组受体,所述重组受体包含配体结合结构域,

[0650] 其中在配体结合后,所述受体能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号,并且

[0651] 其中所述外源蛋白质不与所述受体的配体结合结构域的靶标结合和/或所述外源蛋白质不含有在所述受体的配体结合结构域中包含的配体结合位点。

[0652] 实施方案133.实施方案125-132中任一项的方法,其中所述外源蛋白质被所述工程化B细胞分泌或能够被所述工程化B细胞分泌。

[0653] 实施方案134.实施方案133的方法,其中所述一个或多个编码序列包含编码分泌

信号肽的核苷酸序列。

[0654] 实施方案135.实施方案134的方法,其中所述分泌信号肽包含选自SEQ ID NO:76-202的氨基酸序列。

[0655] 实施方案136.实施方案125-135中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是二聚体。

[0656] 实施方案137.实施方案136的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述二聚体的第一结构域或第一亚基的第一编码序列和编码第二结构域或第二亚基的第二编码序列。

[0657] 实施方案138.实施方案125-137中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是治疗性蛋白质。

[0658] 实施方案139.实施方案125-138中任一项的方法,其中所述外源蛋白质结合与疾病或病症相关的靶分子,其中所述分子任选地是蛋白质,其中所述分子或蛋白质在细胞的表面上表达。

[0659] 实施方案140.实施方案139的方法,其中所述疾病或病症选自肿瘤或癌症、自身免疫性疾病、感染性疾病或病症、炎性疾病。

[0660] 实施方案141.实施方案140的方法,其中所述疾病或病症是肿瘤或癌症。

[0661] 实施方案142.实施方案125-141中任一项的方法,其中所述外源蛋白质结合选自以下的分子:ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎儿乙酰胆碱受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、雌激素受体、孕酮受体、肝配蛋白B2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、Wilms肿瘤1(WT-1)或细胞周期蛋白A1(CCNA1)XX。

[0662] 实施方案143.实施方案125-142中任一项的方法,其中所述外源蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。

[0663] 实施方案144.实施方案127-143中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段。

[0664] 实施方案145.实施方案144的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。

[0665] 实施方案146.实施方案144的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。

[0666] 实施方案147.实施方案146的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。

[0667] 实施方案148.实施方案147的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。

[0668] 实施方案149.实施方案148的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0669] 实施方案150.实施方案144的方法,其中所述抗体源自于阿仑单抗、阿特殊单抗、

巴利昔单抗、贝伐珠单抗(Avastin®)、博纳吐单抗、维汀-布仑妥昔单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、达利珠单抗(Zenapax)、达雷木单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗、埃罗妥珠单抗、吉妥珠单抗(Mylotarg)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Zevalin)、伊匹单抗、奈西妥木单抗、尼妥珠单抗、纳武单抗、奥比妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗、帕妥珠单抗、匹地利珠单抗(CT-011)、雷莫芦单抗、利妥昔单抗(Rituxan、Mabthera)、司妥昔单抗、托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-美坦新偶联物、扎鲁妥木单抗、CEA-scan Fab片段、OC125单克隆抗体、ab75705、B72.3、MPDL3280A、MSB001078C或MEDI4736,或者是其抗原结合片段。

[0670] 实施方案151.实施方案144-150中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子编码所述抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链。

[0671] 实施方案152.实施方案151的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含单个核酸分子,所述单个核酸分子包含编码所述抗体或其抗原结合片段的重链的第一编码序列和编码所述轻链的第二编码序列。

[0672] 实施方案153.实施方案137或152的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被内部核糖体进入位点(IRES)或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽的序列分开,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0673] 实施方案154.实施方案144-153中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段在所述重链和/或所述轻链中包含一个或多个修饰,使得当外源抗体或抗原结合片段在所述细胞中表达时,与内源抗体的重链和/或轻链错配的频率减少。

[0674] 实施方案155.实施方案154的方法,其中所述一个或多个修饰位于所述恒定链的CH2和/或CH3区。

[0675] 实施方案156.实施方案155的方法,其中所述一个或多个修饰包含杵臼结构(KiH)修饰或对接锁定(DNL)修饰。

[0676] 实施方案157.实施方案144-156中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是全长抗体。

[0677] 实施方案158.实施方案144-152中任一项的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是单链抗体片段。

[0678] 实施方案159.实施方案158的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段是scFv。

[0679] 实施方案160.实施方案125-159中任一项的方法,其中编码所述外源蛋白质的一个或多个编码序列不包含内含子序列。

[0680] 实施方案161.实施方案125-160中任一项的方法,其中所述B细胞或B细胞前体是造血干细胞(HSC)或选自幼稚成熟B细胞、浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞的原代B细胞。

[0681] 实施方案162.实施方案125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是能够分化成选自浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞中的一种或多种细胞的B细胞。

[0682] 实施方案163.实施方案125-162中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是幼稚成熟B细胞。

[0683] 实施方案164.实施方案125-163中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含:选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、0BF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻或XBP1⁻;和/或

[0684] 选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD21⁺、CD22⁺、CD23⁺、CD24⁺、CD10⁻、CD27⁻或CD38^低。

[0685] 实施方案165.实施方案125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是浆母细胞、浆细胞或记忆B细胞。

[0686] 实施方案166.实施方案125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{mid}或XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD38^高、CD27^高、CD269⁺、MHCII⁺、CD20⁻或CD138⁻。

[0687] 实施方案167.实施方案125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁻、BACH2⁻、BCL-2⁻、OBF1⁻、OCT2⁻、PU.1⁻、SPIB⁻、ETS1⁻、IRF8⁻、IRF4^{hi}、BLIMP1^{hi}或XBP1⁺;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CXCR4⁺、CD27⁺、CD38^高、CD138⁺、CD269⁺、CD19^低、CD20⁻或MHCII^{-/低}。

[0688] 实施方案168.实施方案125-161中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含选自以下的一种或多种(如全部)表型标记:PAX5⁺、BACH2⁺、BCL-2⁺、OBF1⁺、OCT2⁺、PU.1⁺、SPIB⁺、ETS1⁺、IRF8⁺、IRF4^低、BLIMP1⁻或XBP1⁻;和/或选自以下的一种或多种(如全部)细胞表面标记:CD19⁺、CD20⁺、CD40⁺、CD27^{var}、CXCR4、5、7⁺、CD23^低或CD38⁻。

[0689] 实施方案169.实施方案125-168中任一项的方法,其进一步包括使所述B细胞或B细胞前体与调节B细胞分化的一种或多种试剂接触。

[0690] 实施方案170.实施方案169的方法,其中所述一种或多种试剂选自IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、SCF、G-CSF、CpG、CD40配体、Flt3配体或促血小板生成素。

[0691] 实施方案171.实施方案169或170的方法,其进一步包括将所述B细胞或B细胞前体与表达一种或多种B细胞谱系生长因子的细胞共培养,所述一种或多种B细胞谱系生长因子任选地包括IL-7和CD40配体。

[0692] 实施方案172.实施方案125-129和131-171中任一项的方法,其中所述工程化B细胞包含一个或多个修饰,其导致所述工程化B细胞产生和/或分泌所述外源蛋白质的能力更大。

[0693] 实施方案173.实施方案130或172的方法,其中所述一个或多个修饰包括参与B细胞谱系确定的蛋白质的改变的表达。

[0694] 实施方案174.实施方案173的方法,其中所述一个或多个修饰包括:降低或消除的选自PAX5、BACH2、BCL-6、OBF1、OCT2、PU.1、SPIB、ETS1或IRF8中的一种或多种蛋白质的表达,和/或增加的选自IRF4、BLIMP1或XBP1中的一种或多种蛋白质的表达。

[0695] 实施方案175.实施方案173或174的方法,其中所述改变的表达是有条件的。

[0696] 实施方案176.实施方案173或174的方法,其中所述改变的表达是可诱导的。

[0697] 实施方案177.实施方案125、126和128-176中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子进一步包含与所述一个或多个编码序列之一可操作地连接的至少一个启动子。

[0698] 实施方案178.实施方案177的方法,其中所述启动子是B细胞启动子。

[0699] 实施方案179.实施方案178的方法,其中所述启动子是浆细胞启动子。

[0700] 实施方案180.实施方案178的方法,其中所述启动子是免疫球蛋白(Ig)启动子。

[0701] 实施方案181.实施方案180的方法,其中所述启动子是免疫球蛋白重链启动子、 κ

轻链启动子或 λ 轻链启动子。

[0702] 实施方案182.实施方案177的方法,其中所述启动子是组成型活性启动子。

[0703] 实施方案183.实施方案182的方法,其中所述启动子选自SV40、CMV、UBC、EF1A、PGK或CAGG。

[0704] 实施方案184.实施方案177的方法,其中所述外源蛋白质的表达是有条件的。

[0705] 实施方案185.实施方案127或177的方法,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子、增强子或反式激活因子。

[0706] 实施方案186.实施方案185的方法,其中所述条件性启动子、增强子或反式激活因子是诱导型启动子、增强子或反式激活因子,或者阻抑型启动子、增强子或反式激活因子。

[0707] 实施方案187.实施方案186的方法,其中所述一个或多个编码序列中的至少一个可操作地连接至条件性启动子,所述条件性启动子是诱导型启动子。

[0708] 实施方案188.实施方案187的方法,其中所述条件性启动子不是免疫球蛋白启动子。

[0709] 实施方案189.实施方案188的方法,其中所述启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或是其类似物。

[0710] 实施方案190.实施方案125-128和130-189中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个通过插入靶基因座或替代靶基因座的全部或部分而被整合到所述靶基因座中。

[0711] 实施方案191.实施方案190的方法,其中所述靶基因座是重链免疫球蛋白基因座或轻链免疫球蛋白基因座。

[0712] 实施方案192.实施方案129或191的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至选自免疫球蛋白重链启动子、 κ 轻链启动子或 λ 轻链启动子的内源免疫球蛋白启动子。

[0713] 实施方案193.实施方案129、191和192中任一项的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列可操作地连接至内源Ig增强子。

[0714] 实施方案194.实施方案129和191-193中任一项的方法,其中在所述一个或多个核酸分子中的至少一个中包含的一个或多个编码序列与所述免疫球蛋白基因座的相邻剩余编码序列同框。

[0715] 实施方案195.实施方案129和191-194中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是包含第一多肽和第二多肽的抗体,所述第一多肽包含重链序列,所述第二多肽包含轻链序列,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述第一多肽的第一编码序列和编码所述第二多肽的第二编码序列。

[0716] 实施方案196.实施方案195的方法,其中所述第一编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链基因座中或替代其全部或部分,和/或所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

[0717] 实施方案197.实施方案196的方法,其中所述第一编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白重链基因座相关的启动子和/或增强子,和/或所述第二编码序列可操作地连接至与所述内源免疫球蛋白轻链基因座相关的启动子和/或增强子。

[0718] 实施方案198.实施方案195的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列通过接头序列连接,使得所述工程化B细胞能够表达所述第一多肽和所述第二多肽。

[0719] 实施方案199.实施方案198的方法,其中所述第一编码序列和所述第二编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分。

[0720] 实施方案200.实施方案198或199的方法,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0721] 实施方案201.实施方案129和191-194中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是包含重链序列和轻链序列的单链抗体片段,并且其中所述一个或多个编码序列包含编码所述单链抗体片段的编码序列。

[0722] 实施方案202.实施方案201的方法,其中所述编码序列被整合到内源免疫球蛋白重链或轻链基因座中或替代其全部或部分,使得所述工程化B细胞能够表达所述单链抗体片段。

[0723] 实施方案203.实施方案201或202的方法,其中所述单链抗体片段是scFv。

[0724] 实施方案204.实施方案125-203中任一项的方法,其中所述工程化B细胞受体表达内源B细胞受体。

[0725] 实施方案205.实施方案204的方法,其中所述内源B细胞受体对疫苗中存在的配体具有特异性。

[0726] 实施方案206.实施方案205的方法、其中所述疫苗选自白喉、破伤风和/或百日咳疫苗;流感疫苗;麻疹、腮腺炎、风疹和/或水痘疫苗;肝炎疫苗;脊髓灰质炎疫苗;狂犬病疫苗;带状疱疹疫苗;天花疫苗;伤寒疫苗;和黄热病疫苗。

[0727] 实施方案207.实施方案129和190-206中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含允许通过同源重组将所述一个或多个核酸分子中的至少一个在所述靶基因座处整合到所述B细胞中的序列。

[0728] 实施方案208.实施方案207的方法,其中所述一个或多个核酸分子中的至少一个包含与所述靶基因座处的序列同源的侧翼序列。

[0729] 实施方案209.实施方案129和190-208中任一项的方法,其中将所述一个或多个核酸分子中的至少一个整合到所述靶基因座中由设计者核酸酶介导,所述设计者核酸酶选自锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或RNA指导的核酸酶(RGN)。

[0730] 实施方案210.实施方案209的方法,其中所述RGN是成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-相关的Cas9(CRISPR-Cas9)核酸酶。

[0731] 实施方案211.实施方案125-128和130-189中任一项的方法,其中将所述一个或多个核酸分子中的至少一种插入随机基因座中。

[0732] 实施方案212.实施方案125-211中任一项的方法,其中通过病毒转导、转座、电穿孔或化学转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0733] 实施方案213.实施方案212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的逆转录病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0734] 实施方案214.实施方案212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的慢病毒载体转导将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0735] 实施方案215.实施方案212的方法,其中通过用包含所述一个或多个核酸分子的转座子转座将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0736] 实施方案216.实施方案212的方法,其中通过将包含所述一个或多个核酸分子的载体电穿孔或转染将所述一个或多个核酸分子引入所述B细胞中。

[0737] 实施方案217.实施方案125-216中任一项的方法,其中所述B细胞包含降低或消除内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达的试剂或基因破坏。

[0738] 实施方案218.实施方案217的方法,其中所述基因破坏包括编码所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的基因的破坏。

[0739] 实施方案219.实施方案218的方法,其中所述基因破坏是双等位基因的。

[0740] 实施方案220.实施方案217-219中任一项的方法,其中与在不存在所述试剂或基因破坏的情况下在所述B细胞中的表达相比,所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0741] 实施方案221.实施方案217-220中任一项的方法,其中所述内源免疫球蛋白重链和/或轻链产物不被表达。

[0742] 实施方案222.实施方案125-221中任一项的方法,其中所述一个或多个核酸分子是经密码子优化的。

[0743] 实施方案223.实施方案125-130和133-222中任一项的方法,其中所述工程化B细胞表达包含配体结合结构域的受体,所述受体在配体结合后能够诱导(i)促有丝分裂或增殖信号;和/或(ii)能够调节所述工程化B细胞的分化的信号。

[0744] 实施方案224.实施方案131、实施方案132或实施方案223的方法,其中所述一个或多个核酸分子是第一核酸分子,并且所述方法包括将编码所述受体的第二核酸分子给予到所述B细胞或B细胞前体中。

[0745] 实施方案225.实施方案131、实施方案132或实施方案223的方法,其中所述一个或多个核酸分子进一步包含编码所述受体的核苷酸序列。

[0746] 实施方案226.实施方案225的方法,其中所述一个或多个核酸分子包含分离编码所述外源蛋白质的核苷酸序列和编码所述受体的核苷酸序列的接头序列。

[0747] 实施方案227.实施方案226的方法,其中所述接头序列是或包含内部核糖体进入位点(IRES),或编码自切割肽或导致核糖体跳跃的肽,所述自切割肽或导致核糖体跳跃的肽任选地是T2A、P2A、E2A或F2A。

[0748] 实施方案228.实施方案131、实施方案132或实施方案223-227中任一项的方法,其中所述受体是嵌合受体,所述嵌合受体包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0749] 实施方案229.实施方案228的方法,其中所述信号传导结构域通过跨膜结构域和任选地一个或多个间隔子或接头与所述配体结合结构域分开。

[0750] 实施方案230.实施方案132或223-227中任一项的方法,其中所述受体被包含在包含内源蛋白质的复合物中,所述内源蛋白质包含含有ITAM的细胞内信号传导结构域。

[0751] 实施方案231.实施方案228-230中任一项的方法,其中所述含有ITAM的细胞内信号传导结构域包含源自于CD79A、CD79B、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d的细胞内信号传导结构域。

[0752] 实施方案232.实施方案228-231中任一项的方法,其中在配体结合后,所述受体经

由含有ITAM的细胞内信号传导结构域发出信号。

[0753] 实施方案233.实施方案131、132和223-232中任一项的方法,其中所述配体结合结构域包含抗体部分。

[0754] 实施方案234.实施方案233的方法,其中所述抗体部分是或包含全长抗体或其抗原结合片段。

[0755] 实施方案235.实施方案131、132和223-234中任一项的方法,其中所述受体包含源自于B细胞受体、T细胞受体的 α 、 β 、 δ 或 γ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜结构域。

[0756] 实施方案236.实施方案131和223-229中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是抗体或抗原结合片段,并且所述受体的配体结合结构域与所述外源蛋白质包含相同的重链和/或轻链。

[0757] 实施方案237.实施方案223的方法,其中所述受体是所述外源蛋白质的膜锚定形式。

[0758] 实施方案238.实施方案131、132和223-237中任一项的方法,其中所述受体由不包含内含子序列的核酸序列编码。

[0759] 实施方案239.实施方案131和223-235中任一项的方法,其中所述外源蛋白质和所述受体识别相同的靶抗原,和/或所述配体结合结构域和所述外源蛋白质含有相同的配体结合位点。

[0760] 实施方案240.实施方案131和223-235中任一项的方法,其中所述外源蛋白质和所述受体结合不同的配体和/或具有不同的配体结合位点。

[0761] 实施方案241.实施方案131、132和223-240中任一项的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合与疾病或病症相关的配体。

[0762] 实施方案242.实施方案241的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合所述受试者的肿瘤环境中存在的配体。

[0763] 实施方案243.实施方案241的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合病毒相关的配体。

[0764] 实施方案244.实施方案132或240的方法,其中所述受体的配体结合结构域结合受试者的环境配体,所述环境配体选自在所述受试者的疾病细胞上未过表达的配体、在所述受试者中表现出广泛的组织或细胞表达的配体、在所述受试者中普遍表达的配体、在所述受试者中全身表达的配体、在所述受试者中不是组织特异性的配体、和对所述受试者是外源的配体。

[0765] 实施方案245.实施方案125-127和129-244中任一项的方法,其中所述工程化B细胞表达内源抗体并且包含阻止所述内源抗体的类别转换和/或阻止所述内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰。

[0766] 实施方案246.实施方案128或245的方法,其中阻止类别转换的修饰包括:降低或消除的激活诱导的脱氨酶(AID)、尿嘧啶DNA糖基化酶和/或脱嘧啶/脱嘌呤(AP)-核酸内切酶的表达;和/或所述内源抗体基因座中的一个或多个转换区的突变。

[0767] 实施方案247.实施方案128、245和246中任一项的方法,其中阻止在所述工程化B细胞中表达的内源抗体从膜相关形式转换为分泌形式的修饰包括在所述内源抗体基因座

处在M1外显子上游的聚腺苷酸化信号的突变。

[0768] 实施方案248. 实施方案128和245-247中任一项的方法, 其中所述内源抗体是IgM或IgD。

[0769] 实施方案249. 实施方案125-248中任一项的方法, 其中所述一个或多个编码序列不含有编码跨膜结构域的核苷酸序列, 或者所述外源蛋白质不在细胞表面上表达或不能在细胞表面上表达。

[0770] 实施方案250. 实施方案131、132和223-244中任一项的方法, 其中所述外源蛋白质在配体结合后从所述细胞分泌或能够从所述细胞分泌。

[0771] 实施方案251. 实施方案125-250中任一项的方法, 其中所述B细胞是人B细胞。

[0772] 实施方案252. 实施方案125-251中任一项的方法, 其中所述B细胞是从患者获得的原代B细胞。

[0773] 实施方案253. 一种工程化B细胞, 其通过实施方案125-252中任一项的方法制备。

[0774] 实施方案254. 一种药物组合物, 其包含实施方案1-114和124中任一项的工程化B细胞或实施方案253的工程化B细胞、以及药学上可接受的载体。

[0775] 实施方案255. 一种制品, 其包含实施方案1-114、124和253中任一项的细胞或实施方案254的药物组合物。

[0776] 实施方案256. 实施方案255的制品, 其是容器。

[0777] 实施方案257. 实施方案256的制品, 其中所述容器是袋子。

[0778] 实施方案258. 一种治疗方法, 其包括向患有疾病或病症的受试者给予实施方案1-114和124中任一项的工程化B细胞、实施方案253的工程化B细胞或实施方案254的药物组合物。

[0779] 实施方案259. 实施方案258的方法, 其中所述外源蛋白质是可用于治疗所述疾病或病症的治疗性蛋白质。

[0780] 实施方案260. 实施方案259的方法, 其中所述治疗性蛋白质选自血液因子、血栓溶解剂、激素、生长因子、细胞因子(包括趋化因子、干扰素、白细胞介素、淋巴因子和肿瘤坏死因子)、以及抗体或其抗原结合片段。

[0781] 实施方案261. 实施方案211的方法, 其中所述外源蛋白质是抗体或其抗原结合片段, 其特异性结合与所述疾病或病症相关的配体或抗原。

[0782] 实施方案262. 实施方案261的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段结合癌症相关抗原。

[0783] 实施方案263. 实施方案261的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段结合病原体相关抗原。

[0784] 实施方案264. 实施方案263的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段结合病毒抗原。

[0785] 实施方案265. 实施方案264的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗病毒抗体或其抗原结合片段。

[0786] 实施方案266. 实施方案265的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段是广泛中和性抗HIV抗体或其抗原结合片段。

[0787] 实施方案267. 实施方案258-266中任一项的方法, 其中所述工程化B细胞是幼稚成

熟B细胞或记忆B细胞。

[0788] 实施方案268.实施方案267的方法,其进一步包括诱导所述工程化B细胞以增加所述外源蛋白质的产生和/或分泌。

[0789] 实施方案269.实施方案268的方法,其中所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的内源B细胞受体的配体结合结构域结合的试剂。

[0790] 实施方案270.实施方案268的方法,其中所述诱导包括向所述受试者给予与在所述工程化B细胞中表达的重塑或嵌合受体的配体结合结构域结合的试剂。

[0791] 实施方案271.实施方案268-270中任一项的方法,其中所述工程化B细胞被诱导以分化成浆母细胞或浆细胞。

[0792] 实施方案272.实施方案258-266中任一项的方法,其中所述工程化B细胞是浆母细胞或浆细胞。

[0793] 实施方案273.实施方案258-272中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是在内源免疫球蛋白启动子或组成型活性启动子的控制下。

[0794] 实施方案274.实施方案258-272中任一项的方法,其中所述外源蛋白质是在诱导型启动子的控制下,并且所述方法进一步包括向所述受试者给予激活所述诱导型启动子的试剂。

[0795] 实施方案275.实施方案258-274中任一项的方法,其中治疗量的所述工程化B细胞在给予后在所述受试者中持续至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

[0796] 实施方案276.实施方案258-275中任一项的方法,其中所述治疗导致作用持续时间为至少约1个月、至少2个月、至少6个月或至少一年。

[0797] 实施方案277.实施方案258-276中任一项的方法,其中与由所述外源蛋白质的单次直接给予产生的最大可耐受作用持续时间相比,所述工程化B细胞或组合物的单次给予导致作用持续时间增加。

[0798] 实施方案278.实施方案277的方法,其中所述增加是至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍或5倍。

[0799] 实施方案279.实施方案258-278中任一项的方法,其中所述疾病或病症是癌症、肿瘤、自身免疫性疾病或障碍、或感染性疾病。

[0800] 实施方案280.实施方案258-279中任一项的方法,其中所述工程化B细胞对所述受试者而言是自体同源的。

[0801] 实施方案281.实施方案258-279中任一项的方法,其中所述工程化B细胞对所述受试者而言是同种异体的。

[0802] 实施方案282.实施方案258-281中任一项的方法,其中所述受试者是人。

[0803] 实施方案283.实施方案258-282中任一项的方法,其中所给予的细胞的剂量是至少或至少约或者是或是约 1×10^5 个细胞/千克受试者体重,是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞,和/或是至少或至少约或者是或是约 1×10^7 个细胞/ m^2 受试者。

[0804] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围,所提供的实施例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授,对组合物和的各种修改将变得清楚。可以在不脱离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这些变化,并且这些变化旨在落入本公开文本的范围内。

[0805] 序列

#	序列	注释
1	EGRGSLLTCDGVEENPGP	T2A 人工
2	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A 人工
3	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A 人工
4	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A 人工
5	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFHTHTPLDP QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVVISGKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCK ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVEN SECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKIPSIATGMVGMGALL LLLVALGIGLGM	tEGFR 人工
6	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4铰链) (aa) 智人
7	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLGK	铰链-CH3间隔子 智人
8	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMH EALHNHYTQKSLSLGK	铰链-CH2-CH3间隔子 智人
9	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEE QEERETKTEPCPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLT WEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHP	IgD-铰链-Fc 智人

[0806]

[0807]

	LPPQRLMALREPAAPVVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMW LEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHE DSRLLNASRSLEVSIVTDH	
10	GCTGATGGAGTACGACGAGC	PAX5 gRNA靶标1
11	TGTGAATGGACGGCCACTCC	PAX5 gRNA靶标2
12	GGCTCGTCGTACTIONCATCAG	PAX5 gRNA靶标3
13	TTGGATCCTCAATTACCCC	PAX5 gRNA靶标4
14	GGTCCTAGGTATTATGAGAC	PAX5 gRNA靶标5
15	TGTAGTCCGCCAGAGGATAG	PAX5 gRNA靶标6
16	CAGTATTAACCCTGCGCCCT	BACH2 gRNA靶标1
17	CGGCCAGCGCTGCCGAAA	BACH2 gRNA靶标2
18	GTCTGCTCCGAGAACGATC	BACH2 gRNA靶标3
19	GTTCTGCGCATGCACAACC	BACH2 gRNA靶标4
20	AGTTTATTCATGATGTCCGA	BACH2 gRNA靶标5
21	CTGTGACGTGACTTTGATCG	BACH2 gRNA靶标6
22	CTACAAGTGTGACCGCTGCC	BCL6 gRNA靶标1
23	CAGGGCCATACCGGTATGGA	BCL6 gRNA靶标2
24	GAGCCGCAGGACGTGCACTT	BCL6 gRNA靶标3
25	TAACCAGACCCTTCCGGTTC	BCL6 gRNA靶标4
26	TGTTAACGATGTTATTGAGC	BCL6 gRNA靶标5
27	AGCATGTTGTGGACACTTGC	BCL6 gRNA靶标6
28	TTCACACGGACGCCCTGGTA	OBF1 gRNA靶标1
29	ACTCTACCGCCGTAGGTGC	OBF1 gRNA靶标2
30	CTCCAAAAGCAGCTTGTCGA	OBF1 gRNA靶标3
31	AAGCTCCGCCACGCCGCGAG	OBF1 gRNA靶标4
32	AGAGGCATAGGTCAACTG	OBF1 gRNA靶标5
33	AGCTTCATGGGGCACATACT	OBF1 gRNA靶标6
34	GACTCCCATCAGAGCACAC	OCT2 gRNA靶标1
35	TGCTCAGTTCCTGCTACCGC	OCT2 gRNA靶标2
36	CCAGTTGGGGACACGGAGAA	OCT2 gRNA靶标3
37	TGCGGTAGCAGGAACTGAGC	OCT2 gRNA靶标4

[0808]

38	CAGGTGCTTACCTTTGTACT	OCT2 gRNA靶标5
39	GGAGTCCAGACCTTGCTTCT	OCT2 gRNA靶标6
40	AATACTCGTGCGTTTGGCGT	PU.1 gRNA靶标1
41	GCTCCGACGCGGACATGA	PU.1 gRNA靶标2
42	GTGTCTGACGGCGAGGCGGA	PU.1 gRNA靶标3
43	TCTCGAACTCGCTGTGCACG	PU.1 gRNA靶标4
44	CCAGCACTTCGCCGCTGAAC	PU.1 gRNA靶标5
45	GATCCGTGTCATAGGGCACC	PU.1 gRNA靶标6
46	CGGCACCACCATGCTCGCCC	SPIB gRNA靶标1
47	CGGGCCACACTTCAGCTGTC	SPIB gRNA靶标2
48	AGATGGCGTCTTCTATGACC	SPIB gRNA靶标3
49	CTCACCAGACAGCTGAAGTG	SPIB gRNA靶标4
50	TCACTTACTGTGCAGCCTCC	SPIB gRNA靶标5
51	CCAGGAGCCCCCTCTGAATC	SPIB gRNA靶标6
52	GAGAGTCGGCTTGAGATCGA	ETS1 gRNA靶标1
53	TGGAAACCACAGTTCATTTCG	ETS1 gRNA靶标2
54	GAAGATCCTCGAATGAACTG	ETS1 gRNA靶标3
55	GACTCTCACCATCATCAAGA	ETS1 gRNA靶标4
56	CACTAAAGAACAGCAACGAC	ETS1 gRNA靶标5
57	ACGAGGCGCTGAGTAAGGGA	ETS1 gRNA靶标6
58	ACCTGAATGGTGCGGTCGT	IRF8 gRNA靶标1
59	ACCTACGACGCGCACCATTC	IRF8 gRNA靶标2
60	GTGGTCGGCGGCTTCGACAG	IRF8 gRNA靶标3
61	GCGTAACCTCGTCTTCCAAG	IRF8 gRNA靶标4
62	CGGAAATGTCCAGTTGGGAC	IRF8 gRNA靶标5
63	ATTGACAGTAGCATGTATCC	IRF8 gRNA靶标6
64	ACTTTGCAAGCCGAGAGCCG	IRF4 SAM gRNA 1
65	CGGGAACCCACCCCGGCCG	IRF4 SAM gRNA 2
66	GCAGCCCCAGCCTTCACGC	IRF4 SAM gRNA 3
67	ATCTTCTACTTCCCTTGA	BLIMP1 SAM gRNA 1
68	ATGCGAAGAGAGGAAGCTCT	BLIMP1 SAM gRNA 2

[0809]

69	CGGCTGTGCTAGCAATCTGG	BLIMP1 SAM gRNA 3
70	ACAAGTGTACTTTAGGACT	BLIMP1 SAM gRNA 4
71	CTTGGAACCTTGCCTTTTTG	BLIMP1 SAM gRNA 5
72	GGAAACACTGGGTGGGGCAA	BLIMP1 SAM gRNA 6
73	AGGACCGTGGCTATGGAGTC	XBP1 SAM gRNA 1
74	GACCCAAGTACCTTTGGCC	XBP1 SAM gRNA 2
75	GGCGTGGCAGCGGCAATCCC	XBP1 SAM gRNA 3
76	MEFGLRWVFLVAILKDVQC	Ig HC信号肽1
77	MEFGLSWVFLVAILKGVQC	Ig HC信号肽2
78	MELGLSWVFLVAILKGVQC	Ig HC信号肽3
79	MELGLRWVFLVAFLEGVQC	Ig HC信号肽4
80	MELGLRWVFLVTFFWGVQC	Ig HC信号肽5
81	MELGLRWVLLVAILEGVHC	Ig HC信号肽6
82	MELGLRWVFLVALLEGVHC	Ig HC信号肽7
83	MELGLRWVFLIATLAGARC	Ig HC信号肽8
84	MELGLRWVFLVAILEGVQC	Ig HC信号肽9
85	MELGLYWVFLVAILEGVQC	Ig HC信号肽10
86	MDLGLYWVFLVAILEGVEC	Ig HC信号肽11
87	MELGLCWVFLVAILEGVPC	Ig HC信号肽12
88	MELGLCWVFLVAILEGVQC	Ig HC信号肽13
89	MELGLNWVLLVAILEGVQC	Ig HC信号肽14
90	MELGLSWVFLVAILEGVHC	Ig HC信号肽15
91	MELGLSWVFLVAILEGVQC	Ig HC信号肽16
92	MELGLSWVFLVILEGVQC	Ig HC信号肽17
93	MESGLTWLFLVAILKGVHC	Ig HC信号肽18
94	MKHLWFFLLVAAAPRWVLS	Ig HC信号肽19
95	MKHLWFFLLVAPPRWVLS	Ig HC信号肽20
96	MKHLWFFLLVATPRWVLS	Ig HC信号肽21
97	MRHLWFFLLVAAAPRWVLS	Ig HC信号肽22
98	MKHLWFFLLVAAAPRSVLS	Ig HC信号肽23
99	MSVSFLIFLPLGLPWGVLS	Ig HC信号肽24

[0810]

100	MGHPWFFLLVTAPRWVLS	Ig HC信号肽25
101	MDWTWRILFLVAAATGAHS	Ig HC信号肽26
102	MDWTWRILFLVAAATDAYS	Ig HC信号肽27
103	MDWTWRILFLVAAATSAHS	Ig HC信号肽28
104	MDWTWRILFLVAAATEAHS	Ig HC信号肽29
105	MDWTWRILFLVTAATGAHS	Ig HC信号肽30
106	MDWTWRLLFLVAAVTSAHS	Ig HC信号肽31
107	MDWTWSILFLVAAATGAHS	Ig HC信号肽32
108	MDWTWSILFLVTAATGAHS	Ig HC信号肽33
109	MDWTWSILFLVAGASGAHS	Ig HC信号肽34
110	MDWTWSILFLVAAATGARP	Ig HC信号肽35
111	MGWTWSILFLVAATTGAPS	Ig HC信号肽36
112	MDWTWSILFLVAAATGAQS	Ig HC信号肽37
113	MDWAWRILFLVAAATGVHS	Ig HC信号肽38
114	MDCTWRILLVAVATGTHA	Ig HC信号肽39
115	MDCTWRILLVAAATGTHA	Ig HC信号肽40
116	MDWTWRILFLAAAATGVQS	Ig HC信号肽41
117	MDWTWTILFLVAGATGVKS	Ig HC信号肽42
118	MDWTWSILFLVAAATGVHS	Ig HC信号肽43
119	MDWTWRFLFVAAAVTGVQS	Ig HC信号肽44
120	MDWTWILFLVAAATRVHS	Ig HC信号肽45
121	MDWTWRFLLVAAATGVPS	Ig HC信号肽46
122	MDWTWRFLIVVAAATGVQS	Ig HC信号肽47
123	MDWTWRFLFVAAATSVQS	Ig HC信号肽48
124	MDWTWRFLFVAAATGVQS	Ig HC信号肽49
125	MDWTWRFLFVAAAGTGVQS	Ig HC信号肽50
126	MDWTWRFLFVAAASTGVQS	Ig HC信号肽51
127	MDWTWRVLFVAAASTGVQS	Ig HC信号肽52
128	MDRTWRLLFVAAATGVQS	Ig HC信号肽53
129	MDWTWRFLFVAAAAGVQS	Ig HC信号肽54
130	MGWTWRFLFVAAAAGVQS	Ig HC信号肽55

[0811]

131	MDWTWTFVVAATGVQS	Ig HC信号肽56
132	MDWTWRVFCLLAVAPGVQS	Ig HC信号肽57
133	MDWTWRVFCLLAVAPGADS	Ig HC信号肽58
134	MDWTWRVFCLLAVAPGANS	Ig HC信号肽59
135	MDWTWRVFCLLAVAPGAHS	Ig HC信号肽60
136	MDWTWRVFCLLAVISGGQS	Ig HC信号肽61
137	MDWTWRFLFVVAIGVQS	Ig HC信号肽62
138	MDLMCKMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽63
139	MDLLHKNMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽64
140	MGLLHKNMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽65
141	MDLLHKNMKHLWFFLLVAAPRWGLS	Ig HC信号肽66
142	MDVMCKMKHLWFFLLVAAPRWVLA	Ig HC信号肽67
143	MDLKCKMKRLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽68
144	MDLLCKNMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽69
145	MDLLCKMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽70
146	MELMCKMKHLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽71
147	MDLMCKMKHLWFFLLVAAPGWVLS	Ig HC信号肽72
148	MCKTMKQLWFFLLVAAPRWVLS	Ig HC信号肽73
149	MAKTNLFLLIFSLLSLSSAAQPAMA	Ig HC信号肽74
150	MDTLCSTLLLLTIPSWVLS	Ig HC信号肽75
151	MGSTAILALLAVLQGVCA	Ig HC信号肽76
152	MELSLSWFFLLTIQGVQC	Ig HC信号肽77
153	MELGLSWIFLLAILKGVQC	Ig HC信号肽78
154	MDLGLSWIFLLTILKGVQC	Ig HC信号肽79
155	MELGLTWIFLLAILKGVQC	Ig HC信号肽80
156	MELGLSWIFLVAILKGVQC	Ig HC信号肽81
157	MDLGLSWFLVALLKGVQC	Ig HC信号肽82
158	MEFGLSCVFLVAIFKGVHC	Ig HC信号肽83
159	MEFGLSCLFLVAILKGVRC	Ig HC信号肽84
160	MEFGLSWIFLVVIKGVQC	Ig HC信号肽85
161	MEFGLSWIFLVVILKGVQC	Ig HC信号肽86

[0812]

162	MEFGLSWIFLATILKGVQC	Ig HC信号肽87
163	MEFGLSWIFLAAILKGVQC	Ig HC信号肽88
164	MEFGLSWIFLAAILKGVQG	Ig HC信号肽89
165	MKFGLSWIFLPAILKGVQC	Ig HC信号肽90
166	MEFGLSWFLVAILKGVQC	Ig HC信号肽91
167	MEFGLSWLLLVAAILKGVQC	Ig HC信号肽92
168	MEFGLSWFLVTILKGVQC	Ig HC信号肽93
169	MEFGLSWVFLVAIKGVQCQV	Ig HC信号肽94
170	MEFGLSWVFLVAIKGVQC	Ig HC信号肽95
171	MEFGLSWVFLVAVIKGVQC	Ig HC信号肽96
172	MEFGLTWVFLVAVIKGVHC	Ig HC信号肽97
173	MQFGLSWVFLVALLRGVQC	Ig HC信号肽98
174	MDFGLAWVFLVALLRGVQC	Ig HC信号肽99
175	MEFGLNWVLLVALLRGVQC	Ig HC信号肽100
176	MEFGLSWVFLVALLRGVQC	Ig HC信号肽101
177	MEFGLSWVFLVALLRGVEC	Ig HC信号肽102
178	MEFGLSWVFLVALFRGVQC	Ig HC信号肽103
179	MESGLSWVFLVALLRGVQC	Ig HC信号肽104
180	MELGLSWVFLVSLLAGVQC	Ig HC信号肽105
181	MELGLSWIFLVALLRGVQC	Ig HC信号肽106
182	MEFGLSWVLLVFLQGVQC	Ig HC信号肽107
183	MEFGLSWVFLVGILKGVQC	Ig HC信号肽108
184	MEFGLSWVYLVAILKGVQC	Ig HC信号肽109
185	MEFWLSWVFLVAILKGVQC	Ig HC信号肽110
186	MVLQTQVFISLLLWISGSYG	Ig LC信号肽1
187	MRLPAQLLGLLMLWVSGSSG	Ig LC信号肽2
188	METPAQLLFLLLLWLPVSDTTG	Ig LC信号肽3
189	METPAQLLFLLLLWLP GTTG	Ig LC信号肽4
190	METPAQLLFLLLLWLPDITG	Ig LC信号肽5
191	MEAPAQLLFLLLLWLPDSTG	Ig LC信号肽6
192	MEAPAQLLFLLLLWLPD TTG	Ig LC信号肽7

[0813]

193	MDMRVLAQLLGLLLCFPGARC	Ig LC信号肽8
194	MDMRVPAQLLGLLLWLPDTRC	Ig LC信号肽9
195	MDMRVPAQLLGLLLWLRGARC	Ig LC信号肽10
196	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC	Ig LC信号肽11
197	MKYLPTAAAGLLLAQPAMA	Ig LC信号肽12
198	MKYLPTAAAGLLHAAQPAMA	Ig LC信号肽13
199	MKKNIAFLASMFVSIATNAYA	Ig LC信号肽14
200	MKQSTIALALLPLFTPVTKA	Ig LC信号肽15
201	MKKTAIAlAVALAGFATVAQAA	Ig LC信号肽16
202	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	信号肽
203	ATGCAAAT	可变区启动子八聚体序列
204	CGGCCCGATGCGGGACTGCGTTTTGACCATCATAAATCAAGTTTATTTTT TAATTAATTGAGCGAAGCTGGAAGCAGATGATGAATTAGAGTCAAGATGG CTGCATGGGGGTCTCCGGCACCCACAGCAGGTGGCAGGAAGCAGGTCACC GCGAGAGTCTATTTAGGAAGCAAAAAACACAATTGGTAAATTTATCACT TCTGGTTGTGAAGAGGTGGTTTTGCCAGGCCAGATCTGAAAGTGCTCTA CTGAGCAAAACAACACCTGGACAATTTGCGTTTCTAAAATAAGGCGAGGCT GACCGAAACTGAAAAGGCTTTTTTAACATCTGAATTTCAATTTCAATCTT AGCTTATCAACTGCTAGTTTGTCAAACAGCATATCAACTTCTAAACTGCAT TCATTTTAAAGTAAGATGTTTAAAGAAATTAACAGTCTTAGGGAGAGTTT ATGACTGTATTCAAAAAGTTTTTAAATTAGCTTGTTATCCCTTCATGTGAT AATTAATCTCAAATACTTTTCGATACCTCAGAGCATTATTTTCATAATGACT GTGTTACAATCTTTTT	重链内含子增强子
205	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A 人工
206	GSGATNFSLKQAGDVEENPGP	P2A 人工
207	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFHTPPLDP QELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRKQHGQFSLAVVSLNI TSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCK	tEGFR

[0814]

	<p>ATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVEN SECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGEN NTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNPKIPSIATGMVVGALL LLLVVALGIGLFM</p>	
<p>208</p>	<p>MVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGK LPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTITFKDDG TYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQK NGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDP NEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYKMVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNG HKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDH MKQHDFFKSAMPEGYVQERTITFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF KEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHY QQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMD ELYK</p>	<p>超折叠绿色荧光蛋 白</p>

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
 1 5 10 15
 Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> F2A
 <400> 4

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 5
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 截短的EGFR(tEGFR)
 <400> 5

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
 20 25 30
 Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
 35 40 45
 Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
 50 55 60
 Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
 65 70 75 80
 Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
 85 90 95
 Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
 100 105 110
 Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
 115 120 125
 Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 9
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <220>
 <223> IgD-铰链-Fc
 <400> 9
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
 65 70 75 80
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
 85 90 95
 Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
 100 105 110
 Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
 115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
 130 135 140
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
 165 170 175
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
 180 185 190
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
 195 200 205
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
 210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
 260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> PAX5 gRNA靶标1

<400> 10

gctgatggag tacgacgagc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> PAX5 gRNA靶标2

<400> 11

tgtgaatgga cggccactcc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PAX5 gRNA靶标3	
<400> 12	
ggctcgtcgt actccatcag	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PAX5 gRNA靶标4	
<400> 13	
ttggatcctc caattacccc	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PAX5 gRNA靶标5	
<400> 14	
ggtcctaggt attatgagac	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PAX5 gRNA靶标6	
<400> 15	
tgtagtccgc cagaggatag	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标1	
<400> 16	
cagtattaac cctgcgcct	20
<210> 17	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标2	
<400> 17	
cggcccagcg ctgccgcaaa	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标3	
<400> 18	
gtctgcttcc gagaacgatc	20
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标4	
<400> 19	
gttcctgcgc atgcacaacc	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标5	
<400> 20	
agtttattca tgatgtccga	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BACH2 gRNA靶标6	
<400> 21	
ctgtgacgtg actttgatcg	20
<210> 22	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标1	
<400> 22	
ctacaagtggt gaccgctgcc	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标2	
<400> 23	
cagggccata ccggtatgga	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标3	
<400> 24	
gagccgcagg acgtgcactt	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标4	
<400> 25	
taaccagacc cttccggttc	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标5	
<400> 26	
tgттаacgat gttattgagc	20

<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BCL6 gRNA靶标6	
<400> 27	
agcatgttgt ggacacttgc	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标1	
<400> 28	
ttcacacgga cgccctggta	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标2	
<400> 29	
actctcaccg ccgtaggtgc	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标3	
<400> 30	
ctccaaaagc agcttgtcga	20
<210> 31	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标4	
<400> 31	

aagctccgcc acgccccgag	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标5	
<400> 32	
agaggcatag gtcaaacactg	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OBF1 gRNA靶标6	
<400> 33	
agcttcatgg ggcacatact	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标1	
<400> 34	
gactcccat cagagcacac	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标2	
<400> 35	
tgctcagttc ctgctaccgc	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标3	

<400> 36	
ccagttgggg acacggagaa	20
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标4	
<400> 37	
tgcggtagca ggaactgagc	20
<210> 38	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标5	
<400> 38	
caggtgctta cctttgtact	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> OCT2 gRNA靶标6	
<400> 39	
ggagtccaga ccttgcttct	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PU.1 gRNA靶标1	
<400> 40	
aataactcgtg cgtttgcggt	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	

<223> PU.1 gRNA靶标2	
<400> 41	
gctccgcagc ggcgacatga	20
<210> 42	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PU.1 gRNA靶标3	
<400> 42	
gtgtctgacg gcgaggcgga	20
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PU.1 gRNA靶标4	
<400> 43	
tctcgaactc gctgtgcacg	20
<210> 44	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PU.1 gRNA靶标5	
<400> 44	
ccagcacttc gccgctgaac	20
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> PU.1 gRNA靶标6	
<400> 45	
gatccgtgtc atagggcacc	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	

<220>	
<223> SPIB gRNA靶标1	
<400> 46	
cggcaccacc atgctcgccc	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SPIB gRNA靶标2	
<400> 47	
cgggccacac ttcagctgtc	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SPIB gRNA靶标3	
<400> 48	
agatggcgtc ttctatgacc	20
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SPIB gRNA靶标4	
<400> 49	
ctcaccagac agctgaagtg	20
<210> 50	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SPIB gRNA靶标5	
<400> 50	
tcacttactg tgcagcctcc	20
<210> 51	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> SPIB gRNA靶标6	
<400> 51	
ccaggagccc cctctgaatc	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标1	
<400> 52	
gagagtcggc ttgagatcga	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标2	
<400> 53	
tggaaccac agttcattcg	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标3	
<400> 54	
gaagatcctc gaatgaactg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标4	
<400> 55	
gactctcacc atcatcaaga	20
<210> 56	
<211> 20	

<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标5	
<400> 56	
cactaaagaa cagcaacgac	20
<210> 57	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> ETS1 gRNA靶标6	
<400> 57	
acgaggcgct gagtaaggga	20
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标1	
<400> 58	
acctgaatgg tgcgcgtcgt	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标2	
<400> 59	
acctacgacg cgcaccattc	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标3	
<400> 60	
gtggtcggcg gcttcgacag	20
<210> 61	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标4	
<400> 61	
gcgtaacctc gtcttccaag	20
<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标5	
<400> 62	
cggaaatgtc cagttgggac	20
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF8 gRNA靶标6	
<400> 63	
attgacagta gcatgtatcc	20
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF4 SAM gRNA 1	
<400> 64	
actttgcaag ccgagagccg	20
<210> 65	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF4 SAM gRNA 2	
<400> 65	
cgggaacccc accccggccg	20

<210> 66	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> IRF4 SAM gRNA 3	
<400> 66	
gcagccccca gccttcacgc	20
<210> 67	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 1	
<400> 67	
atcttcttac ttcccttga	20
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 2	
<400> 68	
atgcgaagag aggaagctct	20
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 3	
<400> 69	
cggctgtgct agcaatctgg	20
<210> 70	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 4	
<400> 70	

acaagtgtta ctttaggact	20
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 5	
<400> 71	
cttgaacct tgcctttttg	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> BLIMP1 SAM gRNA 6	
<400> 72	
ggaaacactg ggtggggcaa	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> XBP1 SAM gRNA 1	
<400> 73	
aggaccgtgg ctatggagtc	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> XBP1 SAM gRNA 2	
<400> 74	
gaccccaagt acctttggcc	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> XBP1 SAM gRNA 3	

<400> 75

ggcgtggcag cggcaatccc

20

<210> 76

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽1

<400> 76

Met Glu Phe Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Asp

1

5

10

15

Val Gln Cys

<210> 77

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽2

<400> 77

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys

<210> 78

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽3

<400> 78

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽4

<400> 79

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Phe Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 80

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽5

<400> 80

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Thr Phe Phe Trp Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 81

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽6

<400> 81

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Leu Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 82

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽7

<400> 82

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 83

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽8

<400> 83

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Ile Ala Thr Leu Ala Gly
1 5 10 15

Ala Arg Cys

<210> 84

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽9

<400> 84

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 85

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽10

<400> 85

Met Glu Leu Gly Leu Tyr Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 86

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽11

<400> 86

Met Asp Leu Gly Leu Tyr Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Glu Cys

<210> 87

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽12

<400> 87

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Pro Cys

<210> 88

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽13

<400> 88

Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 89

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽14

<400> 89

Met Glu Leu Gly Leu Asn Trp Val Leu Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 90

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽15

<400> 90

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val His Cys

<210> 91

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽16

<400> 91

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 92

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽17

<400> 92

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Val Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 93

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽18

<400> 93

Met Glu Ser Gly Leu Thr Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 94

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽19

<400> 94

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 95

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽20

<400> 95

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Pro Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 96

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽21

<400> 96

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Thr Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 97

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽22

<400> 97

Met Arg His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 98

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽23

<400> 98

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Ser
1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽24

<400> 99

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp

1 5 10 15

Gly Val Leu Ser

20

<210> 100

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽25

<400> 100

Met Gly His Pro Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Thr Ala Pro Arg Trp

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 101

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽26

<400> 101

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 102

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽27

<400> 102

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Asp

1 5 10 15

Ala Tyr Ser

<210> 103

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽28

<400> 103

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Ser

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽29

<400> 104

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Glu

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 105

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽30

<400> 105

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Thr Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 106

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽31

<400> 106

Met Asp Trp Thr Trp Arg Leu Leu Phe Leu Val Ala Ala Val Thr Ser

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 107

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽32

<400> 107

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Ala His Ser

<210> 108

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽33

<400> 108

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Thr Ala Ala Thr Gly

1

5

10

15

Ala His Ser

<210> 109

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽34

<400> 109

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Gly Ala Ser Gly

1

5

10

15

Ala His Ser

<210> 110

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽35

<400> 110

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1	5	10	15
Ala Arg Pro			
<210> 111			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> Ig HC信号肽36			
<400> 111			
Met Gly Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Thr Thr Gly			
1	5	10	15
Ala Pro Ser			
<210> 112			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> Ig HC信号肽37			
<400> 112			
Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly			
1	5	10	15
Ala Gln Ser			
<210> 113			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> Ig HC信号肽38			
<400> 113			
Met Asp Trp Ala Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly			
1	5	10	15
Val His Ser			
<210> 114			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> Ig HC信号肽39			
<400> 114			

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Val Ala Thr Gly
1 5 10 15
Thr His Ala
<210> 115
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> Ig HC信号肽40
<400> 115

Met Asp Cys Thr Trp Arg Ile Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Thr His Ala
<210> 116
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> Ig HC信号肽41
<400> 116

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Ala Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser
<210> 117
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> Ig HC信号肽42
<400> 117

Met Asp Trp Thr Trp Thr Ile Leu Phe Leu Val Ala Gly Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val Lys Ser
<210> 118
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> Ig HC信号肽43

<400> 118

Met Asp Trp Thr Trp Ser Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 119

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽44

<400> 119

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 120

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽45

<400> 120

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

<210> 121

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽46

<400> 121

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Leu Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Pro Ser

<210> 122

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽47

<400> 122

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Ile Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 123

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽48

<400> 123

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Ser
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 124

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽49

<400> 124

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 125

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽50

<400> 125

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Gly Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 126

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽51

<400> 126

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 127

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽52

<400> 127

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Leu Phe Val Val Ala Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 128

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽53

<400> 128

Met Asp Arg Thr Trp Arg Leu Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 129

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽54

<400> 129

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Ala Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽55

<400> 130

Met Gly Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Ala Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 131

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽56

<400> 131

Met Asp Trp Thr Trp Thr Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 132

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽57

<400> 132

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 133

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽58

<400> 133

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly
1 5 10 15

Ala Asp Ser

<210> 134

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽59

<400> 134

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala Asn Ser

<210> 135

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽60

<400> 135

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly

1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 136

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽61

<400> 136

Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Cys Leu Leu Ala Val Ile Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gln Ser

<210> 137

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽62

<400> 137

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Val Ala Ile Gly

1 5 10 15

Val Gln Ser

<210> 138

<211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽63
 <400> 138
 Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 139
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽64
 <400> 139
 Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 140
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽65
 <400> 140
 Met Gly Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 141
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽66
 <400> 141

Met Asp Leu Leu His Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Gly Leu Ser
 20 25

<210> 142

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽67

<400> 142

Met Asp Val Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ala
 20 25

<210> 143

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽68

<400> 143

Met Asp Leu Lys Cys Lys Lys Met Lys Arg Leu Trp Leu Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 144

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽69

<400> 144

Met Asp Leu Leu Cys Lys Asn Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 145

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽70

<400> 145

Met Asp Leu Leu Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 146

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽71

<400> 146

Met Glu Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 147

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽72

<400> 147

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Gly Trp Val Leu Ser
 20 25

<210> 148

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽73

<400> 148

Met Cys Lys Thr Met Lys Gln Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala

1 5 10 15
 Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser
 20
 <210> 149
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽74
 <400> 149
 Met Ala Lys Thr Asn Leu Phe Leu Phe Leu Ile Phe Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ser Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala
 20 25
 <210> 150
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽75
 <400> 150
 Met Asp Thr Leu Cys Ser Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser
 <210> 151
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽76
 <400> 151
 Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Ala
 <210> 152
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>

<223> Ig HC信号肽77

<400> 152

Met Glu Leu Ser Leu Ser Trp Phe Phe Leu Leu Thr Ile Ile Gln Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 153

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽78

<400> 153

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 154

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽79

<400> 154

Met Asp Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Thr Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 155

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽80

<400> 155

Met Glu Leu Gly Leu Thr Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 156

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽81

<400> 156

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 157

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽82

<400> 157

Met Asp Leu Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Leu Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 158

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽83

<400> 158

Met Glu Phe Gly Leu Ser Cys Val Phe Leu Val Ala Ile Phe Lys Gly
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 159

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽84

<400> 159

Met Glu Phe Gly Leu Ser Cys Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Arg Cys

<210> 160

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽85

<400> 160

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 161

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽86

<400> 161

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Val Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 162

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽87

<400> 162

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Thr Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 163

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽88

<400> 163

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 164

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽89

<400> 164

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Ala Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Gly

<210> 165

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽90

<400> 165

Met Lys Phe Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Pro Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 166

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽91

<400> 166

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 167

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽92

<400> 167

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Leu Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 168

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽93

<400> 168

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 169

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽94

<400> 169

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val

20

<210> 170

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽95

<400> 170

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 171

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽96

<400> 171

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Val Ile Lys Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 172

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽97

<400> 172

Met Glu Phe Gly Leu Thr Trp Val Phe Leu Val Ala Val Ile Lys Gly

1

5

10

15

Val His Cys

<210> 173

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽98

<400> 173

Met Gln Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys

<210> 174

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽99

<400> 174

Met Asp Phe Gly Leu Ala Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys

<210> 175

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽100

<400> 175

Met Glu Phe Gly Leu Asn Trp Val Leu Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Gln Cys
 <210> 176
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽101
 <400> 176

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Gln Cys
 <210> 177
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽102
 <400> 177

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Glu Cys
 <210> 178
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽103
 <400> 178

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Phe Arg Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Val Gln Cys
 <210> 179
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ig HC信号肽104
 <400> 179

Met Glu Ser Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 180

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽105

<400> 180

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ser Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 181

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽106

<400> 181

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 182

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽107

<400> 182

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Leu Leu Val Val Phe Leu Gln Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 183

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽108

<400> 183

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Gly Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 184

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽109

<400> 184

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Tyr Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 185

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig HC信号肽110

<400> 185

Met Glu Phe Trp Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 186

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽1

<400> 186

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ser Tyr Gly

20

<210> 187

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽2

<400> 187

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly
 20

<210> 188

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽3

<400> 188

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Val Ser Asp Thr Thr Gly
 20

<210> 189

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽4

<400> 189

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Gly Thr Thr Gly
 20

<210> 190

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽5

<400> 190

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Ile Thr Gly

20

<210> 191

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽6

<400> 191

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Ser Thr Gly

20

<210> 192

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽7

<400> 192

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly

20

<210> 193

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽8

<400> 193

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys

1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys

20

<210> 194

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽9

<400> 194

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys

20

<210> 195

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽10

<400> 195

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys

20

<210> 196

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽11

<400> 196

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Ser Gly Ala Arg Cys

20

<210> 197

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽12

<400> 197

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 198

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽13

<400> 198

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu His Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

<210> 199

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽14

<400> 199

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Ser Ile

1 5 10 15

Ala Thr Asn Ala Tyr Ala

20

<210> 200

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽15

<400> 200

Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr

1 5 10 15

Pro Val Thr Lys Ala

20

<210> 201

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> Ig LC信号肽16

<400> 201

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala
1 5 10 15
Thr Val Ala Gln Ala Ala
 20

<210> 202

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 信号肽

<400> 202

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
 20

<210> 203

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 可变区启动子八聚体序列

<400> 203

atgcaaat

8

<210> 204

<211> 582

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 重链内含子增强子

<400> 204

cggccccgat gcgggactgc gttttgacca tcataaatca agtttatttt ttttaattaat 60
tgagcgaagc tggaagcaga tgatgaatta gagtcaagat ggctgcatgg gggctctccgg 120
caccacagc aggtggcagg aagcaggtca ccgcgagagt ctatttttagg aagcaaaaaa 180
acacaattgg taaatttatt acttctggtt gtgaagaggt ggttttgccc aggccccagat 240
ctgaaagtgc tctactgagc aaaacaacac ctggacaatt tgcgtttcta aaataaggcg 300
aggctgaccg aaactgaaaa ggcttttttt aactatctga atttcatttc caatcttagc 360
ttatcaactg ctagtttggtg caaacagcat atcaacttct aaactgcatt catttttaaa 420
gtaagatggt taagaaatta aacagtctta gggagagttt atgactgtat tcaaaaagtt 480

ttttaaatta gcttggtatc ccttcatgtg ataattaatc tcaaatactt tttcgatacc 540
 tcagagcatt attttcataa tgactgtgtt cacaatcttt tt 582
 <210> 205
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> T2A
 <400> 205
 Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 20
 <210> 206
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> P2A
 <400> 206
 Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20
 <210> 207
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 截短的EGFR(tEGFR)
 <400> 207
 Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
 1 5 10 15
 Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
 20 25 30
 Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
 35 40 45
 Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
 50 55 60

Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn	65	70	75	80
Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg	85	90	95	
Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile	100	105	110	
Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	115	120	125	
Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp	130	135	140	
Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn	145	150	155	160
Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu	165	170	175	
Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser	180	185	190	
Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu	195	200	205	
Leu	Glu	Gly	Glu	Pro	Arg	Glu	Phe	Val	Glu	Asn	Ser	Glu	Cys	Ile	Gln	210	215	220	
Cys	His	Pro	Glu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ala	Met	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	225	230	235	240
Arg	Gly	Pro	Asp	Asn	Cys	Ile	Gln	Cys	Ala	His	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	245	250	255	
His	Cys	Val	Lys	Thr	Cys	Pro	Ala	Gly	Val	Met	Gly	Glu	Asn	Asn	Thr	260	265	270	
Leu	Val	Trp	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ala	Gly	His	Val	Cys	His	Leu	Cys	His	275	280	285	
Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Pro	290	295	300	
Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser	Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	305	310	315	320
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met		325	330	335	
<210> 208																			
<211> 239																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																			
<220>																			

<223> 超折叠绿色荧光蛋白

<400> 208

Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
1				5					10					15	
Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Arg	Gly
				20				25						30	
Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Asn	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
				35				40						45	
Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
				50			55					60			
Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
65					70					75					80
Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
					85					90					95
Arg	Thr	Ile	Thr	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Thr	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
					100					105					110
Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
					115					120					125
Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
					130					135					140
Asn	Phe	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
145					150						155				160
Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	Val	Glu	Asp	Gly	Ser
					165					170					175
Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
					180					185					190
Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Lys	Leu
					195					200					205
Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
					210					215					220
Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	
225						230									235