



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115605084 A

(43) 申请公布日 2023. 01. 13

(21) 申请号 202180020687.3

(22) 申请日 2021.02.01

(30) 优先权数据

62/968,906 2020.01.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/016041 2021.02.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/155351 EN 2021.08.05

(71) 申请人 S·居姆吕克曲

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·居姆吕克曲

(74) 专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务

所(普通合伙) 44378

专利代理师 黄鑫

(51) Int.Cl.

A01K 2207/12 (2006.01)

A01K 2207/15 (2006.01)

A01K 2227/105 (2006.01)

A61K 31/664 (2006.01)

A61K 31/675 (2006.01)

权利要求书6页 说明书25页

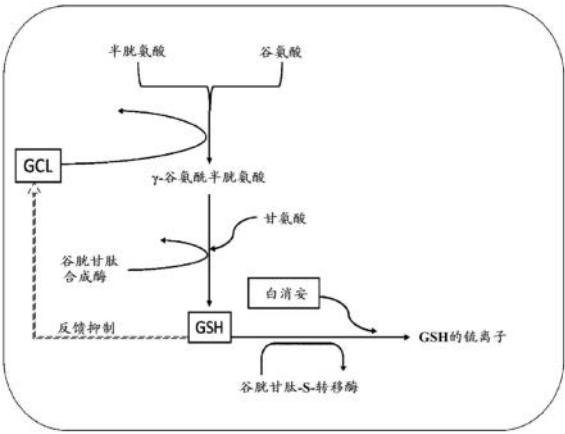
序列表4页 附图8页

(54) 发明名称

用于提供化学保护作用的组合物和方法

(57) 摘要

本公开涉及用于向靶细胞提供化学保护作用的组合物和方法。在一些实施方案中,所述方法包括提供异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基(GCLM)、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。在一些实施方案中,异源基因/蛋白是GCLM。



1. 一种用于在靶细胞中提供或改善化学保护的方法,所述方法包括向靶细胞提供异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。

2. 一种用于在有需要的患者中提供或改善化学保护的方法,所述方法包括向所述患者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的转基因表达允许移植后体内选择。

4. 一种赋予患者化疗抗性细胞的方法,所述方法包括向所述患者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞。

5. 如权利要求4所述的方法,其中所述细胞表达异源GCLM。

6. 一种治疗癌症患者的方法,所述方法包括向所述患者施用包含表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞的药物组合物与非骨髓或骨髓剂量的化学治疗剂。

7. 如权利要求6所述的方法,其中所述细胞异源地表达GCLM。

8. 如权利要求6或7所述的方法,所述方法还包括在所述化学治疗剂之前、之后或与之同时向所述患者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的所述细胞。

9. 如权利要求4-8中任一项所述的方法,所述方法还包括从所述患者分离干细胞或免疫细胞。

10. 如权利要求9所述的方法,其中对所分离的干细胞或免疫细胞进行修饰以表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。

11. 如权利要求10所述的方法,其中对所分离的干细胞或免疫细胞进行修饰以表达异源GCLM。

12. 如权利要求10或11所述的方法,其中所述细胞通过使所分离的细胞与包含编码GCLM或谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的核酸分子的表达载体接触来修饰。

13. 如权利要求12所述的方法,其中所述载体是病毒载体非病毒载体。

14. 如权利要求12所述的方法,其中所述载体是慢病毒载体、腺病毒载体、质粒、逆转录病毒、转座子、游离型表达载体、修饰RNA或它们的任何组合。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述细胞是干细胞或免疫细胞。

16. 如权利要求15所述的方法,其中所述干细胞是胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞 (HSC)、多能干细胞 (PSC)、诱导性PSC (iPSC)、胚胎干细胞 (ESC) 或源自它们的细

胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞或它们的任何组合。

17.如权利要求15所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。

18.如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述修饰细胞与所述患者自体同源,与所述患者同种异体,或它们的组合。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述患者正进行基因疗法、CAR-T疗法的细胞疗法。

20.如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中提供的所述化学保护针对白消安和/或蒽。

21.如权利要求1-20中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述患者施用清髓剂量或非清髓剂量的白消安和/或蒽。

22.一种用于在患者中进行骨髓移植的方法,所述方法包括:

向所述患者施用抗白消安性修饰细胞群体和至少一个非清髓剂量的白消安。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述抗白消安性修饰细胞群体包含编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的异源基因。

24.如权利要求22所述的方法,其中所述异源基因编码GCLM。

25.如权利要求22所述的方法,其中所述抗白消安性修饰细胞群体表达GCLM。

26.如权利要求22所述的方法,其中抗白消安性修饰细胞的所述抗白消安性是由GCLM的表达赋予的。

27.如权利要求22所述的方法,其中在6个月内所述患者的超过50%的骨髓被所述抗白消安性修饰细胞或源自它们的细胞替换。

28.如权利要求22所述的方法,其中所述患者患有HIV、癌症、A1AT缺乏症、WAS、胡尔勒氏综合征、亨特综合征、庞贝病、法布里病、黏多糖贮积症、MPS 1H/S(胡-射二氏综合征)、MPS 1H(胡尔勒氏病)、MPS II-(亨特综合征)、MPS III A、B、C和D(桑迪弗综合征)、MPS I S(席耶氏综合征)、MPS IV A和B(莫尔丘综合征)、MPS IX(透明质酸酶缺乏症)、MPS VII(斯里综合征)、MPS VI(马-拉综合征)、溶酶体贮积病和儿童型脑性肾上腺脑白质营养不良(cALD)。

29.如权利要求22所述的方法,其中所述修饰细胞的抗白消安性是暂时的。

30.如权利要求22所述的方法,其中所述细胞是干细胞或免疫细胞。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述干细胞是胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞(HSC)、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)、胚胎干细胞(ESC)或源自它们的细胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞、CD38-或它们的任何组合。

32.如权利要求30所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞。

33.如权利要求22所述的方法,其中所述修饰细胞与所述患者自体同源,与所述患者同种异体,或它们的组合。

34.如权利要求22所述的方法,所述方法还包括使未修饰的细胞与编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的表达的表达载体接触以产生所述抗白消安性

修饰细胞。

35. 如权利要求34所述的方法,其中所述表达载体是病毒载体或非病毒载体。

36. 如权利要求35所述的方法,其中所述病毒载体是慢病毒或腺病毒载体。

37. 如权利要求34所述的方法,其中所述表达载体是逆转录病毒、转座子、游离型表达载体、修饰RNA、质粒或它们的任何组合。

38. 如权利要求22所述的方法,其中所述至少一个非清髓剂量的化学治疗剂在施用所述修饰细胞之后施用。

39. 如权利要求22所述的方法,其中所述至少一个非清髓剂量的化学治疗剂是非清髓剂量的白消安。

40. 如权利要求22所述的方法,其中非清髓性化学治疗剂每天施用,历时至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月或至少6个月。

41. 如权利要求22所述的方法,所述方法还包括在施用所述抗白消安性修饰细胞与至少一个非清髓剂量的化学治疗剂之间的一个时间段不施用所述非清髓剂量的化学治疗剂。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述时间段选自由约3天、约7天、约10天和约14天组成的组。

43. 如权利要求22所述的方法,其中所述患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被所述修饰细胞替换。

44. 如权利要求22所述的方法,其中所述患者未因施用所述至少一个非清髓剂量的化学治疗剂而清除骨髓细胞和/或免疫受损。

45. 如权利要求22所述的方法,其中所述患者未经历临床相关的贫血、中性粒细胞减少、血小板减少、各类血细胞减少、低血小板、低白细胞或它们的任何组合或相关症状。

46. 如权利要求22所述的方法,其中在施用所述细胞之前进行预调节步骤。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述预调节步骤是非清髓性化学疗法预调节步骤。

48. 如权利要求22所述的方法,其中所述修饰细胞对HIV感染具有抗性。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述修饰细胞异源地表达对HIV感染具有抗性的至少一种HIV辅助受体的突变、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合。

50. 如权利要求48所述的方法,其中所述修饰细胞异源地表达shCCR5、shCXCR4、C-肽融合抑制剂或它们的任何组合。

51. 如权利要求48所述的方法,其中所述修饰细胞不表达HIV辅助受体。

52. 如权利要求48所述的方法,其中所述修饰细胞不表达CCR5、CXCR4或表达CCR5-Δ32或它们的组合。

53. 一种细胞,所述细胞包含编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的表达的异源核苷酸分子,和以下中的一者:i) 编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子;和/或ii) 内源HIV辅助受体突变或缺失。

54. 如权利要求53所述的细胞,其中所述细胞包含如下异源核苷酸序列,所述异源核苷酸序列:

- i. 编码减少CCR5的表达的分子;
- ii. 编码减少CXCR4的表达;
- iii. 编码C-肽融合抑制剂的表达;
- iv. 或它们的任何组合。

55. 如权利要求53所述的细胞,其中所述细胞表达shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂,例如C44。

56. 如权利要求53所述的细胞,其中所述细胞用非病毒基因转移系统进行修饰以表达所述异源核苷酸序列。

57. 如权利要求56所述的细胞,其中所述非病毒基因转移系统是转座子基因转移系统。

58. 如权利要求57所述的细胞,其中所述转座子基因转移系统是睡美人基因转移系统或PiggyBac转座子基因转移系统。

59. 一种组合物,所述组合物包含一种或多种如权利要求53-58中任一项所述的细胞。

60. 一种核酸分子,所述核酸分子编码异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和以下中的一者:i) 编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子。

61. 如权利要求60所述的核酸分子,其中所述异源核苷酸序列编码:

- i. 减少所述CCR5的表达的分子;
 - ii. 减少所述CXCR4的表达的分子;
 - iii. 编码C-肽融合抑制剂的表达的分子;
- 或它们的任何组合。

62. 如权利要求60所述的核酸分子,其中所述核酸分子编码shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂的表达。

63. 一种载体,所述载体包含如权利要求60所述的核酸分子。

64. 如权利要求63所述的载体,其中所述载体是能够用于产生慢病毒的载体。

65. 如权利要求63所述的载体,其中所述载体是慢病毒载体。

66. 一种治疗受试者的HIV的方法,所述方法包括向所述受试者施用异源地表达谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和以下中的一者的细胞的群体:i) 编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子;

和至少一个非清髓剂量的化学治疗剂。

67. 如权利要求66所述的方法,其中所述细胞表达shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂。

68. 如权利要求66或67所述的方法,其中所述细胞异源地表达GCLM。

69. 一种在受试者中表达感兴趣的分子的方法,所述方法包括向所述受试者施用异源地表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和所述感兴趣的分子。

子的细胞;以及施用非清髓剂量的白消安。

70. 如权利要求69所述的方法,其中所述细胞是免疫细胞、干细胞或CD34+和/或CD4+细胞,或如本文另外提供的。

71. 如权利要求69所述的方法,其中所述感兴趣的分子是减少CCR5的表达的分子;减少CXCR4的表达的分子;编码C-肽融合抑制剂的表达的分子;或它们的任何组合。

72. 如权利要求71所述的方法,其中减少CCR5的表达的所述感兴趣的分子是shCCR5。

73. 如权利要求69所述的方法,其中感兴趣的分子是在A1AT缺乏症、WAS、胡尔勒氏综合征、亨特综合征、庞贝病、法布里病、黏多糖贮积症、MPS 1H/S(胡-射二氏综合征)、MPS I H(胡尔勒氏病)、MPSII-(亨特综合征)、MPSIIIA、B、C和D(桑迪弗综合征)、MPS I S(席耶氏综合征)、MPS IV A和B(莫尔丘综合征)、MPS IX(透明质酸酶缺乏症)、MPS VII(斯里综合征)、MPS VI(马-拉综合征)、溶酶体贮积病和儿童型脑性肾上腺脑白质营养不良(cALD)中缺乏的野生型蛋白质。

74. 一种分离的干细胞或免疫细胞,所述细胞包含异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。

75. 如权利要求74所述的细胞,其中所述细胞包含异源GCLM。

76. 如权利要求74或75所述的细胞,其中所述细胞还包含至少一种另外的异源地表达的感兴趣的分子。

77. 如权利要求74-76中任一项所述的细胞,其中所述干细胞是胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞(HSC)、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)、胚胎干细胞(ESC)或源自它们的细胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞或它们的任何组合。

78. 如权利要求74-76中任一项所述的细胞,其中所述免疫细胞是T细胞。

79. 如权利要求78所述的细胞,其中所述T细胞还包含嵌合抗原受体(CAR)。

80. 如权利要求74-79中任一项所述的细胞,其中所述异源GCLM蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其变体,或与SEQ ID NO:1至少90%同一或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列基本上同一的序列。

81. 如权利要求74-80中任一项所述的细胞,其中所述细胞不异源地表达赋予化疗抗性的任何其它蛋白质。

82. 如权利要求74-81中任一项所述的细胞,其中所述细胞不异源地表达ALDH。

83. 如权利要求74-81中任一项所述的细胞,其中所述细胞异源地表达GCLM并内源地表达GCLM。

84. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求74-83中任一项所述的细胞和药学上可接受的缓冲剂或赋形剂。

85. 一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向患者施用白消安,其中所述患者已经施用如权利要求79所述的细胞。

86. 如权利要求81所述的方法,其中所述方法包括在施用所述白消安之前向所述患者施用如权利要求79所述的细胞。

87. 如权利要求85或86所述的方法,其中所述白消安以非清髓剂量施用。

88. 如权利要求85或86所述的方法,其中所述白消安以清髓剂量施用。

89. 如权利要求85-88中任一项所述的方法,其中所述癌症是血液癌症或骨肉瘤。

90. 如权利要求89所述的方法,其中所述血液癌症是白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样真菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、慢性骨髓增生性肿瘤、郎格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征或骨髓增生异常性/骨髓增生性肿瘤。

用于提供化学保护作用的组合物和方法

技术领域

[0001] 本公开涉及用于向靶细胞提供化学保护作用的组合物和方法。

背景技术

[0002] 基因修饰干细胞疗法的一个巨大障碍是缺乏足够的移植。一种建议的解决方案是使这些细胞对细胞毒性剂产生化疗抗性,以在体内选择它们。然而,发现一种这样的单一抗性基因一直具有挑战性,这种基因可赋予对尤其对造血干细胞/祖细胞(HSPC)有毒的剂的足够抗性。产生多药耐药性的基因可产生有希望的结果,但它们伴随着安全问题。由于对HSPC有很大的毒性,所以白消安(Busulfan)主要用于HSPC移植中的预调节方案。因此,迫切需要改进的化学保护组合物和方法。

发明内容

[0003] 本文提供了用于提供或改善靶细胞中的化学保护的方法和组合物。在一些实施方案中,方法包括提供异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基(GCLM)、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。在一些实施方案中,异源基因/蛋白质是GCLM。

[0004] 在一些实施方案中,提供了用于在有需要的患者中提供或改善化学保护的方法。在一些实施方案中,方法包括向患者施用异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。在一些实施方案中,异源基因/蛋白质是GCLM。

[0005] 另外的实施方案提供了谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的转基因表达并允许移植后体内选择。

[0006] 进一步的实施方案提供了细胞是干细胞或免疫细胞。

[0007] 在一些实施方案中,干细胞是胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞(HSC)、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)、胚胎干细胞(ESC)或源自它们的细胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞或它们的任何组合。

[0008] 在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。

[0009] 在一些实施方案中,修饰细胞与患者自体同源,与患者同种异体,或它们的组合。

[0010] 在一些实施方案中,方法还包括使未修饰的细胞与编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的其它多肽的表达的表达载体接触。在一些实施方案中,表达载体编码GCLM。

[0011] 在一些实施方案中,表达载体是病毒载体或非病毒载体。

[0012] 在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒或腺病毒载体。

[0013] 在一些实施方案中,表达载体是逆转录病毒、转座子、游离型表达载体、修饰RNA、

质粒或它们的任何组合。

[0014] 在一些实施方案中,患者正进行基因疗法、细胞疗法或CAR-T疗法。

[0015] 在一些实施方案中,提供的化学保护针对白消安和/或蔡。

附图说明

[0016] 图1示出了谷胱甘肽合成途径和白消安的利用。

[0017] 图2A示出了过表达人GCLM和GFP的慢病毒工程构建体。

[0018] 图2B示出了本文提供的实施方案。

[0019] 图3A和图3B示出了GCLM转导的细胞中增殖率不变,GSH增加。未转导和转导的Jurkat、CEM和TF-1a细胞之间的GSH水平变化分别是2.1、1.7和1.9倍。发现未转导的CEM细胞对白消安暴露最敏感。GCLM的过表达对细胞活力和增殖没有影响。

[0020] 图4示出了GCLM转导的CEM细胞维持高水平的GSH。图4显示,在GCLM转导的细胞中GSH水平增加了1.7倍,并且在白消安暴露后24小时,在不同剂量和时间下的转导细胞中GSH水平保持至少高3.5倍。

[0021] 图5示出了在低剂量白消安下受到保护的GCLM转导细胞。GCLM转导的CEM细胞显示至少3.5倍的增殖率/针对较低剂量的白消安暴露的保护。

[0022] 图6示出了在较高剂量白消安下受到保护的GCLM转导细胞。在较高剂量的白消安下,未转导的细胞在96小时内全部死亡,而活的转导细胞在10和20 μ g/ml白消安下分别扩增了5倍和3倍。

[0023] 图7示出了在白消安暴露1或2小时后GCLM转导的CEM细胞的增殖。面对10或20 μ g/ml和1小时或2小时的白消安暴露,GCLM转导的CEM细胞同样受到保护,并在96小时后从20%的初始转导细胞群达到100%。

具体实施方式

[0024] 尽管并不总是明确说明,但是应当理解,所有数字名称都以术语“约”开头。如本文所用,术语“约”是指数值是近似的,并且小的变化不会显著影响所公开的实施方案的实践。

[0025] 必须指出,除非上下文另外清楚地指出,否则如本文和在所附权利要求书中所使用,单数形式“一(a/an)”和“所述(the)”包括复数对象。因此,例如,对“一个细胞”的提及包括多个细胞。

[0026] 定义

[0027] 如本文所用,以下术语具有以下含义。

[0028] 术语“约”当在如温度、时间、量、浓度等数字名称之前使用时,包括范围,表示可变化(+)或(-)20%、10%、5%或1%的近似值。

[0029] 又如本文所用,“和/或”是指并涵盖一个或多个相关列出项目的任何和所有可能组合,以及在替代方案中(“或”)进行解释时缺少组合。

[0030] 术语“施用(administering)”、“施用(administer)”等是指将剂(例如,细胞)引入受试者。通常,施用有效量,该量可以由治疗医师等确定。可以使用任何施用途径,例如局部、皮下、腹膜、静脉内、动脉内、吸入、阴道、直肠、鼻腔、口服、口腔、引入脑脊髓液或滴入身体隔室。当与组合物(和语法等效物)结合使用时,术语和短语“施用(administering)”和

“施用(administration of)”是指直接施用,其可以是由医学专业人员施用于患者或由患者自行施用;和/或间接施用,其可以是开药的行为。例如,指导患者自行施用剂(例如,细胞)和/或为患者提供药物处方的医师将剂施用于患者。“定期施用”或“周期性施用”是指每天、每周或每个月进行的多次治疗。定期施用也可以指每天施用剂一次、两次、三次或更多次。

[0031] 如本文所用,术语“包含(comprising)”(以及包含的任何形式,例如“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”、“具有(having)”(以及具有的任何形式,例如“具有(have)”和“具有(has)”、“包括(including)”(以及包括的任何形式,例如“包括(includes)”和“包括(include)”或“含有(containing)”(以及含有的任何形式,例如“包含(contains)”和“含有(contain)”)为包括性的或开放式的,不排除附加的、未提及的要素或方法步骤。任何使用过渡短语“包含(comprise)”或“包含(comprising)”的步骤或组合也可以说与过渡短语“由……组成(consisting of)”或“由……组成(consists)”描述相同。

[0032] “有效量”是剂或化合物(例如,细胞或细胞群体)足以实现有益或期望结果的量。有效量可以是一次或多次施用、施加或给药。这些参数的确定完全在本领域的技术范围内。这些考虑因素以及有效的制剂和施用程序是本领域中众所周知的并且在标准教科书中进行了描述。

[0033] 当提及核酸分子、蛋白质、载体或表达盒时,术语“异源”是指通过使用者的操作在细胞中表达并且不是天然存在的核酸分子、蛋白质、载体或表达盒。例如,异源基因是指由放在细胞中的载体或其它媒介物表达的基因,或指基因组中已经通过基因编辑方法(例如CRISPR)或其它重组技术进行修饰以替换细胞中的基因的基因。本领域技术人员将理解,术语“异源”不是指尚未修饰的细胞的基因组中天然存在的基因。“异源”也可以称为“外源”。因此,在一些实施方案中,细胞可以异源性地和从其自身基因组(内源性)表达相同的蛋白质。

[0034] 如本文关于核酸如DNA或RNA所用的术语“分离的”是指分别与存在于大分子的天然来源中的其它DNA或RNA分开的分子。如本文所用,术语“分离的”还指当通过重组DNA技术产生时基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基的核酸或肽,或在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质的核酸或肽。此外,“分离的核酸”意在包括不会作为片段天然存在并且不会在天然状态下发现的核酸片段。“分离的细胞”,例如分离的骨髓细胞是基本上不含其天然存在的环境的其它细胞材料、组织、培养基的细胞。

[0035] 术语“清髓”意指引起长期(通常是不可逆的)各类血细胞减少,在施用后1至3周内杀死骨髓中的细胞并且不允许自体血液学恢复的治疗。Bacigalupo等人,Biol Blood Marrow Transplant.2009,15(12):1628-1633。环磷酰胺的清髓剂量的实例包括但不限于每天2.5mg/kg CTX或更高,历时导致累积毒性的时间段(McKinley等人,Clin J Am Soc Nephrol.2009,4:1754-1760)。

[0036] 术语“非清髓”意指不引起、引起最少或可逆的血细胞减少且毒性很小的治疗。非清髓方案是免疫净化(immuno-ablation)。非清髓剂量的实例包括但不限于:大约每天1.3mg/kg,历时不导致累积毒性的时间段;或每天1.0至1.5mg/kg,历时2至4个月(McKinley等人,Clin J Am Soc Nephrol.2009,4:1754-1760)。其它非清髓剂量在全文中进行了描

述,并包括在非清髓剂量的定义中。导致“累积毒性”的剂或剂的剂量是指随时间推移将导致患者出现毒性的剂量。例如,以每天2.5mg/kg的剂量施用于人类数周时间段的环境磷酸胺会导致累积毒性。非清髓剂量的其它实例可见于例如美国公布No.2019/0269734中,其以引用的方式整体并入本文中。

[0037] “受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用并且是指脊椎动物,例如灵长类动物、哺乳动物或优选人。哺乳动物包括但不限于马科动物、犬科动物、牛科动物、绵羊科动物、鼠科动物、大鼠、猿猴和人类。

[0038] 关于蛋白质或氨基酸序列(或DNA或RNA序列)的术语“序列同一性”是指为了实现最大序列同一性百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分,将序列进行比对并且在需要时引入空位之后,在候选序列中与特定蛋白质或氨基酸序列(或特定DNA或RNA序列中的核苷酸残基)中的氨基酸残基相同的氨基酸残基(或核苷酸残基)的百分比。比对可以通过本领域技术人员已知的任何方法,例如通过使用例如BLAST和EMBOSS的公开可用的程序来实现。本领域的技术人员可确定用于测量比对的适当参数,包括在进行比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法,但在一些实施方案中,使用缺省参数。例如,可以在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)访问这些程序。

[0039] 如本文所用,术语“变体”是不同于参考核酸或蛋白质但保留基本特性(即,生物活性)的核酸或蛋白质。多核苷酸的典型变体在核苷酸序列上与另一个参考多核苷酸不同。核苷酸序列的变化可能会或可能不会改变由参考多核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。核苷酸变化可能导致由参考序列编码的多肽中的氨基酸取代、添加、缺失、融合和/或截短。

[0040] 如本文所用,术语“载体”是指能够转移或转运另一核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常与例如载体核酸分子连接。载体可以包括在细胞中指导自主复制的序列,或者可以包括足以允许整合到细胞DNA中的序列。载体包括例如质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌或酵母人工染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括例如腺病毒、逆转录病毒(例如但不限于复制缺陷型逆转录病毒)和慢病毒。

[0041] 短语“药学上可接受”在本文用以指那些在合理医学判断范围内,适于与人和动物的组织接触使用而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的益处/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0042] 如本文所用,术语“GCLM”在指蛋白质形式时,是指包含SEQ ID NO:1的序列或其变体的蛋白质。

[0043] MGTDSRAAKALLARARTLHLQTGNLLNWGRRLRKKCPSTHSEELHDCIQKTLNEWSSQINPDLVREFPD
VLECTVSHAVEKINPDEREEMKVS AKLFIVESNSSSSTRSAVDMACSVLGVAQLDSV I IASPPIEDGVNLSLEHLQ
PYWEELENLVQSKKIVAIGTSDLDKTQLEQLYQWAQVKPNSNQVNLASCCVMPPDLTAF AKQFDIQLLTHNDPKEL
LSEASFQEALQESIPDIQAHEWVPLWLLRYSVIVKSRGI I KSKGYILQAKRRGS (SEQ ID NO:1)

[0044] 在一些实施方案中,GCLM蛋白质与SEQ ID NO:1至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一或基本上同一。该蛋白质的序列也提供在Genbank登录号NM_002061.3或NP_002052.1(每一者是以引用的方式整体并入本文中)中。Genbank登录号NM_002061.3提供了编码SEQ ID NO:1的核酸分子的一个实例。

[0045] 如本文所用,术语“GCLM”在指核苷酸形式时是指编码GCLM的核酸分子。在一些实

施方案中,核酸分子包含SEQ ID NO:2的序列或其变体,其中这种变体可以与SEQ ID NO:2基本上同一。因为遗传密码具有简并性,所以SEQ ID NO:2是非限制性实例,并且其它核苷酸序列可用于编码GCLM蛋白或与该蛋白同一或基本上同一的蛋白质。SEQ ID NO:2如下:

[0046] ACCCGTCGCCACGCCCCGCCGAGGCCAAGGGCCAGTCACTTGCGGGCCGGCGTCCCGCAGCCCATTGCGCCCCGCCCTGCCCCGCCGCGGGATGAGTAACGGTTACGAAGCACTTTCTCGGCTACGATTTCTGCTTAGTCATGTCTTCCAGGAAACAGCTCCCTCAGTTTGGAATCAGCTCTCCCGCTGCGGCCGCACTAGCCGGAGCCGGAGCCGCAGCCACCGGTGCTTTCCTTTCCCGCCGCCGCCAGCCGCCGTCCGGCCTCCCTCGGGCCCGAGCGCAGACCAGGCTCCAGCCGCGCGGCGCCGGCAGCCTCGCGCTCCCTCTCGGGTCTCTCTCGGGCCTCGGGCACCGCGTCCTGTGGGGCGCCGCTGCTGCCCGCCGCCGCGAGCCCCTTCGCTGCGCGGGCCCTGGGCGGCCGCTGCCATGGGCACCGACAGCCGCGGGCCAAGGCGCTCCTGGCGGGGCCCGCACCTGCACCTGCAGACGGGGAACCTGCTGAATGGGGCCGCTTGCGGAAGAAGTGCCCGTCCACGCACAGCGAGGAGCTTCATGATTGTATCCAAAAACCTTGAATGAATGGAGTTCCCAAATCAACCCAGATTTGGTCAGGGAGTTTCCAGATGTCTTGAATGCACTGTATCTCATGCAGTAGAAAAGATAAATCCTGATGAAAGAGAAGAAATGAAAGTTTCTGCAAACTGTTCAATTGTAGAATCAAACCTTTCATCATCAAC TAGAAGTGCAGTTGACATGGCCTGTTCACTCCTTGGAGTTGCACAGCTGGATTCTGTGATCATTGCTTCACCTCCTATTGAAGATGGAGTTAATCTTTCCTTGGAGCATTTACAGCCTTACTGGGAGGAATTAGAAAACCTTAGTTCAGAGCAAAAAGATTGTTGCCATAGGTACCTCTGATCTAGACAAAACACAGTTGGAACAGCTGTATCAGTGGGCACAGGTAAACCAAATAGTAACCAAGTTAATCTTGCCCTCCTGCTGTGTGATGCCACCAGATTTGACTGCATTTGCTAAACAATTTGACATACAGCTGTTGACTCACAATGATCCAAAAGAACTGCTTTCTGAAGCAAGTTTCCAAGAAGCTCTTCAGGAAAGCATTCCTGACATTCAAGCGCACGAGTGGGTGCCGCTGTGGCTACTGCGGTATTCGGTCATTGTGAAAAGTAGAGGAATTATCAAATCAAAAGGCTACATTTTACAAGCTAAAAGAAGGGGTTCTTAAGTACTTAGGAGCATAAATTACCTGTAATTTCTTCAATATGAGAGAAAATTGAGATGTGTAAAAATCTAGTTACTGCCTGTAAATGGTGTCAATTGAGGCAGATATTCTTTTCGTCATATTTGACAGTATGTTGTCTGTCAAGTTTTAAATACTTATCTTGCCTCCATATCAATCCATTCTCATGAACCTCTGTATTGCTTTCCTTAAACTATTGTTTTCTAATTGAAATTGTCTATAAAGAAAATACTTGCAATATATTTTTCTTTATTTTTATGACTAATATAAATCAAGAAAATTTGTTGTTAGATATATTTGGCCTAGGTATCAGGGTAATGTATATACATATTTTTTATTTCCAAAAAAATTCATTAATTGCTTCTTAAGTCTTATTATAACCAAGCAATTTAATTACAATTGTTAAAACTGAAATACTGGAAGAAGATATTTTTCTGTCATTGATGAGATATATCAGAGTA ACTGGAGTAGCTGGGATTTACTAGTAGTGTAATAAAATTCACCTCTCAATACATGAATGGAACTTAAATTTTTTTTATGTGTCTTGTCTATAGTTTAGCTGTAATAATTTAACCTTGTATTCTTGTGCCATATTCTGTCTTTTTATTA CTTATAAAGACAAACCAAGTAAATCTGAAAGGAGACTAGAAGCTTTGAAATTATTGTTTGGGGGTTTTATAAAGCAACTACTGTCACCTCCATCCAGATTCCTTTTAAATTATTGATCCATCCATAGTATATATTGCTACTCATTCAAGAA TCCTCAATAAGTATTGAGTATTTACCATATGTTGGGATACTGTGGGCTCTGGAGAGAGGAGGGGGCAATAGAGCTAGGAATTAAGAATCAGTTGAGTAAAATGTGTAATATTTATTCCCATTAATAACTGACTAGGAAGGACTAAAAGCCAGAAAGGGATGAAAAAAAAATCCTTAATTCAGGGCCGACATTATCTACTTAAACAACTTTGAGATATGGTCTTAAT TATTTTAAAGCAGAATAATATAATTGAAAGTTTATAGCTAAAAGAGACTATATAGGTCATTTAGTATAATTCTTCA TTAGTTTACGAACCACAAAATTGCAAATAAATAAGCTATGAACTTTGATGTACACTATAAATCTCCTTAATTCTAT AAATTTGTGTCTGTAACCTGAATAGTTTGAAAACCTCTTTTAAAAATCTCTTGATTTTCATCCGGGCGCAGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGTGGGCAGATCACGAGGTCAGGAGTTTGAGACCAGCCTGACCA ACATGGTAAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAAATTGGCTGGGCGTGGTGGCACTCGCCTGTAATCTCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTACAGTGAGCCGAGATCACATCACTGCAC

TCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAACTCTTGTATCTCAATATTTTTAAACCAC
AGGCCTAAATAAACTAATTTTGCTCAAGTTTTCTCAACCTAGGGAAAAAGAACTATGGTTCCATATTCAAATAA
ATATTATAGACCTTTTCCTAAGTAGGATTTTGTGGTTTACTGATTGGGTAATTTGATCATTAAAATTATGTGAAA
TCTGCCCCGGGCACACCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTCTGGGAGGCCAAGGCAGATGATCACCTGAGGTCAGGAG
TTCTAGACCAGCCTGGCTAACATGGTGAAACCCTGTATCTGCTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCGG
GCTCCTGTAATCCCAGCTACTTTGGAGGCGAGGCACGAGAATCGCTTGAACCTGGGAGGCGGAGTTTGCAGTGAGC
CGAGATCACGCCATTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTGCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAATT
ATGTGAAATCATGTGATTTGCCTGGGAAAACCTGTTTAGATATTGAGCTACTTATGCCTTCTAGCCTTTATATTAA
TTGTATGTAATGTTATTAAATATATATATAGTTCATCTTTACATTTGGAAATGCCAACATTTTTTTCATATAAGT
CCTTAAACAAGCGTTCATTTTATTTTAAATCTATACAGTGAACCTGGCCAAGATATTTTAAGAGGGAACCTTAATAT
CCCATTTATTGTTTTTATAACCTGGACTTATAAAAAATGGGTTGTTTGAAGGGTTATTTTGAAAGTGGGGGAAAAA
AAAACTTAGTTGCTAATGTATCTAACTTCAGCAGAGCTTTTTGGTGATCTCCTACCTGCACCCTCAACTCTTGAC
AAAGAAGCAAGACTATAGATTCATTTTCTGAAGGGGATCATGTATGGAATTTTTTGATGAGTTTTTACTTTTACCT
CTCTACTCTTGATTTTCTATTATTGAATACTCTTTTAAACACTGATTTTTAAGGCTTTATATATGTTTTCCAGGC
TGATGTTTACATCTTTTTTTCATGAACATATCAGAATATAGTGAACACTTTTCAAATATTTAAGGACTTAATGTTTA
AAAAGCCATAAAATAGAGAGTGGTAATACTACCAAATAATTACTTAAACTGAAAGCTAAGTTATCAATAGTTTAT
ATAAGAGATGTTTTCTGAGGAGATGTGCATCCAGTGAGACCAAGGTAGAAAGTTTATATAATTGTTTTTTTTCCAG
TAAATATGAAAAAAAAAGCTGTAGCTTGTTTATTACATGTCCAAAATACAGTGGAGCCTTACTTTAACACAATGTA
CTGTAACCTTGAATTTGTTCTGTTATGAGTCTATCTTGAATTTCCATCCATGAAACTGTAGTCACCAAAAGCAACA
AGTATTTTACATGATGTAAAAGACCATACTATGATGGCCATTGCTAGAAATTGAATCACAAATAATAGCTAATAA
TTTTTCATTTTTCAAAAAAGATCATTTGGATAGCAGCTATGTATAAAATGGAAAATAAAAAATTATTCTATTTTGC
ATGAATAGTTCAGACTTTCCCATACCACAGCCAAGCAGTAACTAAAATTAGGATCTTAATTTTCAATGATAAAAGG
TCTAAGGTTCAATTAATTATGCTCCTTAACTGTCTTTCTAGATTTTTCACCCAGTATTTTCAAATTTGGGAA
TGTAACAATTGATATATTTATTGTATGTTGGCTAGCAGTTCATCCTTCTGCAAAATATGCATTCAGAGAAATGTG
AAGCTTGTTTTAATGAAGACTTAAACCATTTGTGTCTTTGTGTTTTTCATATTCAAATACACCAAATTAATTTCT
GAACCTATATTTTTTCATCATTAACTTCCTAATATACCAGAACATATACCTTTTTTCATGTAAAGTTGGCAATGGGAT
ATGGCAGTTTTATTTTTGAAAAATATGTAACATGACTTTAATATTTTTATAGTTTTTCAGAATTAGAAACATAGGAA
GGGAAATGTTTTAATTAGATAAGTCAACTTTTTATGTGTCTGTAGTGGTGTACTATAATAGCAAATTATAAGCA
TTATTAAATGTTTATAATAATTTTTAATATTACCTACATTATGAATTTAACTAAAAATAAGTGTGAGTTGTATATT
TTTTAATTGGGTTGTTTCAATAGCTGGAAGCATCCTGAAGCATTATATTGATTTTTGAACTATTTGAACTCAAACCT
GAGTATGATTTGAAAATAAATTAATAATTTAAAAACATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:2)。

[0047] 在一些实施方案中,核苷酸序列包含SEQ ID NO:2的编码区,即SEQ ID NO:2的核苷酸436至1260。在一些实施方案中,核酸分子仅包含SEQ ID NO:2的编码区或编码GCLM蛋白的序列,或它们的变体。如本文所述的变体可以具有取代或突变。在一些实施方案中,取代是保守取代。在一些实施方案中,GCLM蛋白变体与SEQ ID NO:1基本上同一。

[0048] 序列同一性、同一性百分比和相关术语,如那些术语在本文中所用,是指两个序列,例如两个核酸序列或两个氨基酸或多肽序列的相关性。在氨基酸序列的上下文中,术语“基本上同一”在本文中用于指第一氨基酸含有足够或最少数目的氨基酸残基i)与第二氨基酸序列中比对的氨基酸残基同一,或ii)进行保守取代,使得第一和第二氨基酸序列可以

具有共同的结构域和/或共同的功能活性。例如,含有共同的结构域的氨基酸序列与参考序列,例如本文提供的序列,例如SEQ ID NO:1具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0049] 在核苷酸序列的上下文中,术语“基本上同一”在本文中用于指第一核酸序列含有足够或最少数目的核苷酸与第二核酸序列中比对的核苷酸同一,使得第一和第二核苷酸序列编码具有共同功能活性的多肽,或编码共同结构多肽结构域或共同功能多肽活性。例如,核苷酸序列与参考序列,例如本文提供的序列具有至少约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0050] 两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数目的函数,它考虑到为了两个序列的最佳比对而需要引入的空位的数目和每个空位的长度。可以使用数学算法完成序列的比较和两个序列之间的同一性百分比的确定。在一些实施方案中,两个氨基酸序列之间的同一性百分比是使用Needleman和Wunsch((1970) J.Mol.Biol.48:444-453)算法,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵和空位权重16、14、12、10、8、6或4以及长度权重1、2、3、4、5或6确定的,该算法已经并入到GCG软件包(可在<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中。在一些实施方案中,两个核苷酸序列之间的同一性百分比是使用GCG软件包中的GAP程序(可在<http://www.gcg.com>获得),使用NWSgapdna.CMP矩阵和空位权重40、50、60、70或80以及长度权重1、2、3、4、5或6确定的。一组特别优选的参数(以及除非另有说明,否则应使用的参数)是Blossum 62评分矩阵,空位罚分为12,空位延伸罚分为4,并且移码空位罚分为5。两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比可以使用E.Meyers和W.Miller((1989) CABIOS,4:11-17)的算法,使用PAM120权重残差表、空位长度罚分12和间隙罚分4确定,该算法已经并入到ALIGN程序(2.0版)中。

[0051] 应当理解,本发明的实施方案的分子和化合物可以具有保守或非必需氨基酸取代,这对它们的功能没有实质性影响。术语“氨基酸”旨在涵盖所有分子,无论是天然的还是合成的,包括氨基官能团和酸官能团并能够包括在天然存在的氨基酸的聚合物中。示例性氨基酸包括天然存在的氨基酸;其类似物、衍生物和同类物;具有变异侧链的氨基酸类似物;以及上述任一者的所有立体异构体。如本文所用,术语“氨基酸”包括D-旋光异构体或L-旋光异构体和肽模拟物。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。

[0052] 用于所公开的化学保护方法的细胞可以是本领域技术人员已知的任何合适的细胞。例如,细胞可以是干细胞或免疫细胞。干细胞的非限制性实例包括脐带血细胞、胎儿干细胞、胚胎干细胞(ESC)、造血干细胞(HSC)、造血祖细胞、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)或从中衍生的细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD34⁺和/或CD4⁺。在一些实施方案中,细胞是间充质干细胞、基质干细胞、脐带血来源的造血细胞干/祖细胞、脐带组织来源的干/祖细胞、iPSC、HESC、胎儿组织来源的干细胞、CD4⁺

细胞等。在一些实施方案中,干细胞是CD34+。

[0053] 本文所述的组合物和方法可用于骨髓移植情况,例如W02020/018413中所述的那些情况。

[0054] 举例来说,在一些实施方案中,本文提供了用于在有需要的患者中进行骨髓移植的方法。还提供了用于用表达异源核酸分子表达盒或多个异源表达盒的细胞群体或用基因组已经被编辑并与受试者的基因组不同的细胞替换受试者的骨髓细胞的方法。在一些实施方案中,表达的异源蛋白是GCLM或其变体。在一些实施方案中,这些方法包括向患者施用一种或多种化疗抗性修饰细胞和施用至少一个剂量的化学治疗剂。在某些实施方案中,剂量是化学治疗剂的非清髓剂量。在某些实施方案中,剂量是化学治疗剂的清髓剂量。在一些实施方案中,细胞的量是治疗有效量。在一些实施方案中,施用的化学疗法是白消安。在一些实施方案中,化学治疗剂是以下中的一种或多种:放线菌素(actinomycin)、全反式维甲酸(all-trans retinoic acid)、阿扎胞苷(azacitidine)、硫唑嘌呤(azathioprine)、博来霉素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、白消安、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine, BCNU)、顺铂(cisplatin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、环磷酰胺、阿糖胞苷(cytarabine)、柔红霉素(daunorubicin)、多西紫杉醇(docetaxel)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、埃坡霉素(epothilone)、依托泊苷(etoposide)、氟尿嘧啶(flourouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲(hydroxyurea)、伊达比星(idarubicin)、伊马替尼(imatinib)、伊立替康(irinotecan)、洛莫司汀(lomustine, CCNU)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、美法仑(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、米托蒽醌(mitoxantrone)、尼莫司汀(nimustin, ACNU) 奥沙利铂(oxaliplatin)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、替莫唑胺(temezolamide)、替尼泊苷(teniposide)、噻替派(thiotepa)、硫鸟嘌呤(tioguanine)、拓扑替康(topotecan)、曲奥舒凡(treosulfan)、戊柔比星(valrubicin)、维罗非尼(vemurafenib)、长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)和长春瑞滨(vinorelbine)。

[0055] 如本文所提供,在一些实施方案中,用于所公开的方法中的化疗抗性修饰细胞可以是本领域技术人员已知的任何合适的细胞。例如,细胞可以是干细胞或免疫细胞。干细胞的非限制性实例包括脐带血细胞、胎儿干细胞、胚胎干细胞(ESC)、造血干细胞(HSC)、造血祖细胞、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)或从中衍生的细胞。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,细胞是CD34+和/或CD4+。在一些实施方案中,细胞是间充质干细胞、基质干细胞、脐带血来源的造血干/祖细胞、脐带组织来源的干/祖细胞、iPSC、HESC、胎儿组织来源的干细胞、CD4+细胞等。在一些实施方案中,干细胞是CD34+。

[0056] 用于本发明的方法的化疗抗性修饰细胞可以是来自患者的细胞(即,自体同源细胞)、来自供体的细胞(即,同种异体细胞),或它们的任何组合,已经对这些细胞进行修饰以通过表达异源蛋白,例如GCLM或其变体来赋予化疗抗性。在某些实施方案中,本文提供的方法还包括从患者或供体中分离和/或纯化细胞。在这些实施方案中的某些实施方案中,方法还包括将细胞修饰为化疗抗性。例如,在某些实施方案中,提供了用于在有需要的患者中进行骨髓移植的方法,所述方法包括从患者或受试者分离和/或纯化一种或多种细胞,如本文

所述将一种或多种细胞修饰为化疗抗性,向患者施用有效量的一种或多种化疗抗性修饰细胞,并施用至少一个剂量的化学治疗剂。

[0057] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法,例如基于某些标志物的表达/表达的缺乏、增殖率和分化潜能来分离细胞。在一些实施方案中,基于特定标志物或标志物组合的存在来分离细胞,所述标志物包括例如CD34、CD4、Sca-1 CD38、CD123、CD90、CD45、CD133、抗原呈递细胞标志物(CD8、CD8 α 、CD11b、CD11c、CD103、CD205、CD24、CD115、CD117、CD135、CD11c^低、CD45RA、CD123、ILT-7、MHC II类、MHC II类^低、TLR7和/或TRL9)。在一些实施方案中,基于特定标志物如CD3、CD14、CD19、CD56和/或CD66b的不存在来分离细胞。在其它实施方案中,对例如T细胞、B细胞、粒细胞和/或骨髓单核细胞的标志物进行阴性选择。在一些实施方案中,基于单独或与任何其它标志物组合的Thy-1的存在来分离细胞。在一些实施方案中,基于Lin^{Thy1+Sca-1+}表达谱来分离HSC。在一些实施方案中,可以通过表达谱CD34⁻、Sca1⁻、c-kit⁺来分离小鼠HSC。在一些实施方案中,可以基于CD34表达分离人HSC。

[0058] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括向患者施用一个或多个剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,剂量是化学治疗剂的非骨髓剂量。在一些实施方案中,剂量是骨髓性的。化学治疗剂可以是本领域技术人员已知的任何合适的化学治疗剂。化学治疗剂的非限制性实例包括:放线菌素、全反式维甲酸、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、白消安、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀(BCNU)、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷、柔红霉素、多西紫杉醇、去氧氟尿苷、多柔比星、表柔比星、埃坡霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊马替尼、伊立替康、洛莫司汀(CCNU)、二氯甲基二乙胺、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、尼莫司汀(ACNU)奥沙利铂、太平洋紫杉醇、培美曲塞、替莫唑胺、替尼泊苷、噻替派、硫鸟嘌呤、拓扑替康、曲奥舒凡、戊柔比星、维罗非尼、长春花碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0059] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括向受试者施用有效量的化疗抗性修饰细胞和非骨髓剂量的化学治疗剂。修饰细胞和化学治疗剂可以通过任何适当的途径施用,这对于技术人员来说是显而易见的,取决于待治疗的疾病或疾患。典型的施用途径包括静脉内、动脉内、肌内、皮下、颅骨内、鼻内、皮内、口服或腹膜内。

[0060] 在一些实施方案中,向受试者施用每平方米受试者体表面积约 1×10^8 至约 1×10^{11} 个细胞。细胞可以通过细胞的绝对数目施用于个体,例如,所述个体可以施用约1000个细胞/注射至最多约100亿个细胞/注射,例如每次注射约、至少约或至多约 1×10^8 个、 1×10^7 个、 5×10^7 个、 1×10^6 个、 5×10^6 个、 1×10^5 个、 5×10^5 个、 1×10^4 个、 5×10^4 个、 1×10^3 个、 5×10^3 个(等等)细胞,或任两个数目之间的任何范围,包括端点。在一些实施方案中,约 5×10^6 /kg至约 10×10^6 /kg细胞用于HSC移植。

[0061] 在其它实施方案中,受试者可以施用约1000个细胞/注射/平方米至最多约100亿个细胞/注射/平方米,例如每次注射约、至少约或至多约 1×10^8 /m²、 1×10^7 /m²、 5×10^7 /m²、 1×10^6 /m²、 5×10^6 /m²、 1×10^5 /m²、 5×10^5 /m²、 1×10^4 /m²、 5×10^4 /m²、 1×10^3 /m²、 5×10^3 /m²(等等)细胞,或任两个数目之间的任何范围,包括端点。

[0062] 在其它实施方案中,细胞可以通过相对数目的细胞施用于这类个体,所述个体可以施用每公斤个体约1000个细胞至最多约100亿个细胞,例如每公斤个体约、至少约或至多约 1×10^8 个、 5×10^7 个、 1×10^7 个、 5×10^6 个、 1×10^6 个、 5×10^5 个、 1×10^5 个、 5×10^4 个、 1×10^4

个、 5×10^3 个、 1×10^3 个(等等)细胞,或任两个数目之间的任何范围,包括端点。

[0063] 在一些实施方案中,将至少一个非清髓剂量的化学治疗剂施用于患者。化学治疗剂的施用可以与修饰细胞的施用同时或依次进行。在一些实施方案中,至少一个非清髓剂量的化学治疗剂在施用修饰细胞之后施用。在一些实施方案中,预调节步骤(本文也称为“预处理步骤”)在施用细胞之前进行,其中在施用修饰细胞之前向患者施用至少一个剂量的化学治疗剂,例如氟达拉滨(fludarabine)或环磷酰胺。在一些实施方案中,预调节步骤是非清髓性化学治疗剂预调节步骤。在一些实施方案中,在施用细胞之前不进行预调节步骤。预期即使在施用细胞之前没有预调节步骤(例如氟达拉滨),本公开的细胞仍将能够有效地移植到患者的骨髓中。

[0064] 在一些实施方案中,用于人类受试者或患者的至少一个非清髓剂量的化学治疗剂是非清髓剂量的白消安。在一些实施方案中,环磷酰胺的非清髓剂量是约0.1mg/kg/d至约8mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约7mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约6mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约5mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约4mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约3mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约2mg/kg/d、约0.1mg/kg/d至约1mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约8mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约7mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约6mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约5mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约4mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约3mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约2mg/kg/d、约0.5mg/kg/d至约1mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约8mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约7mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约6mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约5mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约4mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约3mg/kg/d、约1.0mg/kg/d至约2mg/kg/d、约2mg/kg/d至约8mg/kg/d、约2mg/kg/d至约7mg/kg/d、约2mg/kg/d至约6mg/kg/d、约2mg/kg/d至约5mg/kg/d、约2mg/kg/d至约4mg/kg/d、约2mg/kg/d至约3mg/kg/d、约3mg/kg/d至约8mg/kg/d、约3mg/kg/d至约7mg/kg/d、约3mg/kg/d至约6mg/kg/d、约3mg/kg/d至约5mg/kg/d、约3mg/kg/d至约4mg/kg/d、约4mg/kg/d至约8mg/kg/d、约4mg/kg/d至约7mg/kg/d、约4mg/kg/d至约6mg/kg/d、约4mg/kg/d至约5mg/kg/d、约5mg/kg/d至约8mg/kg/d、约5mg/kg/d至约7mg/kg/d、约5mg/kg/d至约6mg/kg/d、约6mg/kg/d至约8mg/kg/d、约6mg/kg/d至约7mg/kg/d或约7mg/kg/d至约8mg/kg/d。尽管量和范围按系列列出,但可以施用的量可以单独列出,也可以作为范围的端点列出。在一些实施方案中,非清髓剂量是约0.1mg/kg、约0.5mg/kg、约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg或约8mg/kg。在一些实施方案中,非清髓剂量小于8mg/kg。剂量可以每天施用。

[0065] 在一些实施方案中,施用清髓剂量。在一些实施方案中,白消安的清髓剂量是约8至约12mg/kg,它可以在一天之内施用。

[0066] 在一些实施方案中,非清髓剂量的化学治疗剂每天施用,历时至少约1天、至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天、至少约6天、至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约1年或更长时间。

[0067] 在一些实施方案中,提供非清髓剂量达不会导致累积毒性的时间段。举例而言,所述不会导致累积毒性的时间段是少于约1年、少于约6个月、少于约3个月、少于约2个月、少于约1个月、少于约3周、少于约2周、少于约1周、少于约6天、少于约5天、少于约4天、少于约3天或少于约2天的时间段。

[0068] 在一些实施方案中,在施用环磷酰胺抗性修饰细胞与至少一个非骨髓剂量的化学治疗剂之间的一个时间段内至少中断一次。举例而言,所述时间段可以是约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约1周、约2周、约3周、约一个月、约2个月、约3个月、约6个月、约一年或更多。在一些实施方案中,时间段是约3天、约7天、约10天和约14天。

[0069] 在一些实施方案中,患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约一年内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约6个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约5个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约4个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约3个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约2个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约1个月内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约2周内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。在一些实施方案中,在约1周内患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。

[0070] 在一些实施方案中,在所述方法期间患者未清除骨髓细胞和/或免疫受损。在一些实施方案中,患者未经历临床相关的贫血、中性粒细胞减少、血小板减少、各类血细胞减少、低血小板、低白细胞、低红细胞或它们的任何组合或相关症状。

[0071] 在另一个实施方案中,在用本公开的细胞和化学治疗剂治疗后,受试者或受试者组可能表现出以下结果中的一种或多种:

[0072] (i) 与对照物相比白细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%);

[0073] (ii) 与对照物相比粒细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%);

[0074] (iii) 与对照物相比中性粒细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%);

[0075] (iv) 与对照物相比淋巴细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%);

[0076] (v) 与对照物相比嗜酸性粒细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约

20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%) ;

[0077] (vi) 与对照物相比单核细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%) ;

[0078] (vii) 与对照物相比嗜碱性粒细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%) ;

[0079] (viii) 与对照物相比红细胞增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%) ;

[0080] (ix) 与对照物相比血液的所有三种细胞组分(红细胞、白细胞和血小板)增加至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%或至少约99% (实际变化%或中值变化%) ;

[0081] (x) 至少约6个月、约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约15年、约20年、约25年、约30年、约35年、约40年、约45年、约50年、约55年、约60年或更长时间的时间段没有复发;

[0082] (xi) 与对照物相比患者的无复发生存时间增加至少约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约15年、约20年、约25年、约30年、约35年、约40年、约45年、约50年、约55年、约60年或更长时间;或

[0083] (xii) 与对照物相比患者生存时间增加至少约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约15年、约20年、约25年、约30年、约35年、约40年、约45年、约50年、约55年、约60年或更长时间。

[0084] 在本文提供的方法的某些实施方案中,化疗抗性修饰细胞可包含一种或多种与化疗抗性无关的另外的修饰。例如,在某些实施方案中,细胞可以被进一步修饰成表达另外的HIV/疾病特异性修饰。因此,在某些实施方案中,本文提供的骨髓移植方法还包括并入一种或多种另外的修饰,包括一种或多种HIV/疾病特异性修饰。例如,在某些实施方案中,提供了用于在有需要的患者中进行骨髓移植的方法,所述方法包括从患者或受试者分离和/或纯化一种或多种细胞,如本文所述将一种或多种细胞修饰为化疗抗性,将一种或多种另外的修饰并入到一种或多种细胞中,向患者施用有效量的一种或多种化疗抗性修饰细胞,并施用至少一个剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,剂量是非清髓剂量的化学治疗剂。

[0085] 在一些实施方案中,修饰细胞被进一步修饰为HIV抗性。举例而言,修饰细胞可以被进一步修饰成表达赋予HIV感染抗性的至少一种突变HIV辅助受体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂的表达或它们的任何组合。在一些实施

方案中,细胞被修饰成表达抑制或降低HIV辅助受体表达的分子。在一些实施方案中,分子是反义分子。在一些实施方案中,细胞被修饰成表达shCCR5、shCXCR4、GP-41融合抑制剂、C46融合抑制剂、C34融合抑制剂、任何其它C-肽融合抑制剂或它们的任何组合。在一些实施方案中,CCR5突变是CCR5-Δ32突变。在一些实施方案中,细胞中的CCR5基因的两个拷贝都被CCR5-Δ32突变替换。在一些实施方案中,CCR5基因的一个拷贝被CCR5-Δ32突变替换。

[0086] 本公开提供了被修饰成具有化疗抗性,例如环磷酰胺抗性和HIV抗性的细胞。在一些实施方案中,细胞可以被修饰成具有环磷酰胺抗性和HIV抗性。HIV抗性可以通过至少一种HIV辅助受体的表达降低、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂的表达或它们的任何组合来赋予。HIV抗性可以由CCR5HIV辅助受体的表达降低、CXCR4辅助受体的表达降低、C-肽融合抑制剂(例如C46融合抑制剂或C34融合抑制剂)的表达或它们的任何组合来赋予。

[0087] 细胞也可以被修饰成表达任何感兴趣的分子。感兴趣的分子可以根据使用者或特定患者的需要进行修改。

[0088] 在一些实施方案中,修饰细胞与至少一种其它HIV疗法一起施用。合适的其它HIV疗法包括本领域技术人员已知的任何HIV疗法。其它HIV疗法的非限制性实例包括联合用药(例如,依法韦伦(efavirenz)/恩曲他滨(emtricitabine)/富马酸替诺福韦二吡呋酯(tenofovir disoproxil fumarate) (**Atripla®**)、恩曲他滨/利匹韦林(rilpivirine)/富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Complera®**)、埃替拉韦(elvitegravir)/可比司他(cobicistat)/恩曲他滨/富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Stribild®**)和阿巴卡韦(abacavir)/多替拉韦(dolutegravir)/拉美夫定(lamivudine) (**Triumeq®**)、核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI)(例如,阿巴卡韦(**Ziagen®**)、依法韦伦/恩曲他滨(emtricitabine)/富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Atripla®**)、拉美夫定/齐多夫定(zidovudine) (**Combivir®**)、恩曲他滨/利匹韦林/富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Complera®**)、恩曲他滨(**Emtriva®**)、拉美夫定(**Epivir®**)、阿巴卡韦/拉美夫定(**Epzicom®**)、齐多夫定(**Retrovir®**)、阿巴卡韦/拉美夫定/齐多夫定(**Trizivir**)、恩曲他滨/富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Truvada®**)、去羟肌苷(didanosine) (**Videx®**)、去羟肌苷缓释剂(**VidexEC®**)、富马酸替诺福韦二吡呋酯(**Viread®**)和司他夫定(stavudine) (**Zerit®**))、非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)、蛋白酶抑制剂(例如替拉那韦(tipranavir) (**Aptivus®**)、茚地那韦(indinavir) (**Crixivan®**)、阿扎那韦(atazanavir)/可比司他(**Evotaz®**)、沙奎那韦(saquinavir) (**Invirase®**)、洛匹那韦(lopinavir)/利托那韦(ritonavir) (**Kaletra®**)、福沙那韦(fosamprenavir) (**Lexiva®**)、利托那韦(**Norvir®**)、达芦那韦(darunavir)/可比司他(**Prezcobix®**)、达芦那韦(**Prezista®**)、阿扎那韦(**Reyataz®**)、奈非那韦(nelfinavir) (**Viracept®**))、进入抑制剂(例如,恩夫韦肽(enfuvirtide) (**Fuzeon®**))、整合酶抑制剂(例如,雷特格韦(raltegravir) (**Isentress®**)、多替拉韦(**Tivicay®**)和埃替拉韦(**Vitekta®**))、趋化因子辅助受体拮抗剂(CCR5拮抗剂)(例如,马拉维诺(maraviroc) (**Selzentry®**)或维立韦罗(vicriviroc))、细胞色素P4503A抑制剂和基于免疫的疗法(例如,硫酸羟氯喹(hydroxychloroquine sulfate) (**Plaquenil**))。在一些实施方案中,修饰细胞和至少一种其它HIV疗法同时施用。在其它实施方案中,修饰细胞和至少一种其它HIV疗法依次施用。在一

些实施方案中,明确排除至少一种上述其它HIV疗法的施用,例如,在一些实施方案中,明确排除NRTI。在一些实施方案中,除了本文公开的修饰细胞和至少一个非清髓剂量的化学治疗剂(例如,白消安)之外,不施用其它HIV疗法。

[0089] 细胞、化学治疗剂和任选的其它HIV疗法可以对HIV患者施用一次或可以施用多次,例如在治疗期间每1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时或23小时一次,或每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天一次,或每1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周或更长时间一次,或任两个数字之间的任何范围,包括端点。

[0090] 在一些实施方案中,提供了治疗HIV患者的方法。在一些实施方案中,方法包括将患者CD34⁺干细胞从骨髓中动员进入外周。在一些实施方案中,通过施用G-CSF(粒细胞集落刺激因子)来动员细胞。G-CSF可以作为例如1天、2天、3天、4天或5天的方案施用。在一些实施方案中,施用G-CSF 3-5天。动员的细胞可以使用如单采术等方法来捕获。在一些实施方案中,一旦CD34⁺细胞计数为或超过 10.0 至 $20.0 \times 10^6/\text{kg}$ 体重,则通过例如单采术来分离细胞。在一些实施方案中,细胞计数为或超过 5.0 至 $25.0 \times 10^6/\text{kg}$ 体重。尽管使用CD34⁺细胞作为标志物来捕获细胞进行转导,但也可以使用其它细胞标志物,例如本文所述的那些标志物。例如,所使用的细胞基于特定标志物或标志物组合的存在来分离,所述标志物包括例如CD34、CD4、Sca-1、CD38、CD123、CD90、CD45、CD133、抗原呈递细胞标志物(CD8、CD8 α 、CD11b、CD11c、CD103、CD205、CD24、CD115、CD117、CD135、CD11c^低、CD45RA、CD123、ILT-7、MHC II类、MHC II类^低、TLR7和/或TRL9)。在一些实施方案中,基于特定标志物如CD3、CD14、CD19、CD56和/或CD66b的不存在来分离细胞。在其它实施方案中,对例如T细胞、B细胞、粒细胞和/或骨髓单核细胞的标志物进行阴性选择。在一些实施方案中,基于单独或与任何其它标志物组合的Thy-1的存在来分离细胞。在一些实施方案中,基于Lin⁻Thy1⁺Sca-1⁺表达谱来分离HSC。在一些实施方案中,可以通过表达谱CD34⁻、Sca1⁺、c-kit⁺来分离小鼠HSC。在一些实施方案中,可以基于CD34表达分离人HSC。在一些实施方案中,分离的细胞是CD34⁺或CD4⁺或它们的任何组合。

[0091] 在一些实施方案中,方法包括离心收集细胞。例如,这样做是为了开发富含细胞的团块。然后将细胞重新悬浮在冷冻保存溶液中并冷冻。在一些实施方案中,冷冻保存溶液包含肝素化Plasmalyte溶液和10%DMSO(二甲亚砜)的溶液。在一些实施方案中,细胞最初储存在-4℃下,然后将样品冷冻至-156℃(当储存在气相中时)至-196℃(当储存在液相中时)的目标温度。

[0092] 在一些实施方案中,方法包括将转导的细胞输注到受试者中。在一些实施方案中,受试者患有HIV。在一些实施方案中,受试者未患HIV,但处于感染HIV的高风险中,因此希望变得具有HIV抗性。

[0093] 在一些实施方案中,在输注修饰细胞后,施用非清髓剂量的化学治疗剂,例如白消安。本文提供了非清髓剂量的非限制性实例。

[0094] 在一些实施方案中,提供了治疗受试者的HIV的方法,所述方法包括向所述受试者施用异源地表达ALDH1和以下中的一者的细胞群体:i) 编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助

受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子。在一些实施方案中,方法包括施用至少一个非骨髓剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,细胞与受试者自体同源。在一些实施方案中,细胞与受试者同种异体。在一些实施方案中,细胞表达shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂。这些蛋白质的序列可见于例如W02020/018413,其以引用的方式整体并入本文中。

[0095] 在一些实施方案中,提供了治疗癌症患者的方法。在一些实施方案中,方法包括将患者CD34⁺干细胞从骨髓中动员进入外周。在一些实施方案中,通过施用G-CSF(粒细胞集落刺激因子)来动员细胞。G-CSF可以作为例如1天、2天、3天、4天或5天的方案施用。在一些实施方案中,施用G-CSF 3-5天。动员的细胞可以使用如单采术等方法来捕获。在一些实施方案中,一旦CD34⁺细胞计数为或超过 10.0 至 $20.0 \times 10^6/\text{kg}$ 体重,则通过例如单采术来分离细胞。在一些实施方案中,细胞计数为或超过 5.0 至 $25.0 \times 10^6/\text{kg}$ 体重。尽管使用CD34⁺细胞作为标志物来捕获细胞进行转导,但也可以使用其它细胞标志物,例如本文所述的那些标志物。例如,所使用的细胞基于特定标志物或标志物组合的存在来分离,所述标志物包括例如CD34、CD4、Sca-1 CD38、CD123、CD90、CD45、CD133、抗原呈递细胞标志物(CD8、CD8 α 、CD11b、CD11c、CD103、CD205、CD24、CD115、CD117、CD135、CD11c^低、CD45RA、CD123、ILT-7、MHC II类、MHC II类^低、TLR7和/或TRL9)。在一些实施方案中,基于特定标志物如CD3、CD14、CD19、CD56和/或CD66b的不存在来分离细胞。在其它实施方案中,对例如T细胞、B细胞、粒细胞和/或骨髓单核细胞的标志物进行阴性选择。在一些实施方案中,基于单独或与任何其它标志物组合的Thy-1的存在来分离细胞。在一些实施方案中,基于Lin⁻Thy1⁺Sca-1⁺表达谱来分离HSC。在一些实施方案中,可以通过表达谱CD34⁻、Sca1⁺、c-kit⁺来分离小鼠HSC。在一些实施方案中,可以基于CD34表达分离人HSC。在一些实施方案中,分离的细胞是CD34⁺或CD4⁺或它们的任何组合。

[0096] 在一些实施方案中,方法包括离心收集细胞。例如,这样做是为了开发富含细胞的团块。然后将细胞重新悬浮在冷冻保存溶液中并冷冻。在一些实施方案中,冷冻保存溶液包含肝素化Plasmalyte溶液和10%DMSO(二甲亚砜)的溶液。在一些实施方案中,细胞最初储存在-4℃下,然后将样品冷冻至-156℃(当储存在气相中时)至-196℃(当储存在液相中时)的目标温度。

[0097] 在一些实施方案中,方法包括转导分离的细胞以对化学治疗剂如白消安产生抗性。如本文所述,化疗抗性可以通过GCLM的表达来实现。GCLM可以通过使用载体(如本说明书通篇所述),例如使用慢病毒载体,引入选定的细胞。GCLM可操作地连接到细胞特异性启动子。在一些实施方案中,启动子是CD34启动子。在一些实施方案中,启动子是hCD34启动子。在一些实施方案中,启动子是hCD4启动子。在一些实施方案中,GCLM的序列表达为如SEQ ID NO:1中提供的蛋白质。在一些实施方案中,GCLM由包含SEQ ID NO:2的序列或其编码区的核酸分子编码。由于遗传密码的简并性质,SEQ ID NO:2的序列作为非限制性实例提供,并且其它核酸分子可用于编码包含SEQ ID NO:1的蛋白质的表达。在一些实施方案中,GCLM包含1-10个不改变GCLM功能的保守取代。在一些实施方案中,表达的GCLM与SEQ ID NO:1基本上同一。

[0098] GCLM在载体中的表达也可以由增强子元件驱动。例如,增强子元件可以是CD3E增强子。

[0099] 在一些实施方案中,CD34⁺细胞可以通过磁珠分离来分离。慢病毒载体介导的人CD34⁺细胞转导可以包括例如在添加细胞因子干细胞因子(SCF)、Fms相关酪氨酸激酶3配体(FLT3L)、血小板生成素(TPO)、IL-6、IL-2、IL-3、纤连蛋白或它们的任何组合的培养基中对细胞进行24小时的预刺激。在一些实施方案中,然后将细胞与表达GCLM的慢病毒接触(感染)。可以在无血清X-Vivo 10培养基中存在SCF、FLT3L和TPO细胞因子(各100ng ml⁻¹)的情况下进行接触。然后可以任选地冷冻或不冷冻细胞。在一些实施方案中,细胞不与AAV或AV载体接触。

[0100] 在一些实施方案中,方法包括将转导的细胞输注到受试者中。在一些实施方案中,受试者患有癌症。在一些实施方案中,在输注修饰细胞后,施用非清髓剂量的化学治疗剂,例如白消安。在一些实施方案中,用量是50-200mg的剂量并每天给与。在一些实施方案中,白消安的非清髓剂量是约0.15mg/kg/d至小于2.5mg/kg/d、约0.4mg/kg/d至约1.7mg/kg/d或约0.8mg/kg/d至约1.5mg/kg/d。在一些实施方案中,白消安的非清髓剂量是约0.15mg/kg/d、约0.2mg/kg/d、约0.25mg/kg/d、约0.3mg/kg/d、约0.35mg/kg/d、约0.4mg/kg/d、约0.45mg/kg/d、约0.5mg/kg/d、约0.55mg/kg/d、约0.6mg/kg/d、约0.65mg/kg/d、约0.7mg/kg/d、约0.75mg/kg/d、约0.8mg/kg/d、约0.85mg/kg/d、约0.9mg/kg/day、约0.95mg/kg/d、约1.0mg/kg/d、约1.1mg/kg/d、约1.2mg/kg/d、约1.3mg/kg/d、约1.4mg/kg/d、约1.5mg/kg/d、约1.6mg/kg/d、约1.7mg/kg/d、约1.8mg/kg/d、约1.9mg/kg/d、约2.0mg/kg/d、约2.1mg/kg/d、约2.2mg/kg/d、约2.3mg/kg/d或约2.4mg/kg/d。在一些实施方案中,白消安的非清髓剂量是约1.3mg/kg/d。在一些实施方案中,白消安的非清髓剂量是约0.8mg/kg/d至约1.6mg/kg/d、约0.8mg/kg/d、约0.98mg/kg/d、约1.3mg/kg/d、约1.5mg/kg/d或约1.6mg/kg/d。在一些实施方案中,白消安的非清髓剂量是约0.5至约2mg/kg/d。可以如本文所提供的那样施用剂量。

[0101] 在一些实施方案中,在输注修饰细胞之前还对受试者进行氟达拉滨治疗。在一些实施方案中,在收集后第2天(或移植前第-5天),用氟达拉滨(15mg/m²)治疗患者5天(直到移植前-1天)。在一些实施方案中,代替氟达拉滨,在移植前的第-1天,患者可以用4mg/kg白消安治疗。在一些实施方案中,患者在移植前第-2天用单剂量的1000mg/m²白消安治疗。然而,在细胞输注后,受试者用本文提供的非清髓剂量的白消安治疗。

[0102] 在一些实施方案中,受试者用白消安清髓剂治疗。

[0103] 在一些实施方案中,单个核酸分子,例如单个载体,用于编码或表达本文提供的各核酸分子或蛋白质。在一些实施方案中,单个慢病毒包含本文提供的核酸序列。在一些实施方案中,提供了一种慢病毒,其包含编码GCLM或其变体的单个表达构建体。可操作地连接编码GCLM的核酸分子的启动子和应答元件是非限制性的并且可以使用其它启动子和应答元件。本领域技术人员将理解,所示的不同启动子可以相互交换。

[0104] 在一些实施方案中,核酸分子包含位于编码GCLM蛋白的核酸分子侧翼的5' LTR和3' LTR。在一些实施方案中,载体编码另一个感兴趣的分子以在与GCLM蛋白相同的细胞中表达。因此,在一些实施方案中,核酸分子包含编码GCLM的序列和感兴趣的序列,其可以是例如期望在骨髓或本文提供的细胞类型中表达的任何其它蛋白质、反义、miRNA或其它核酸分子。

[0105] 本文在某些实施方案中提供了如上文关于所公开的方法以及这些细胞在所公开

的方法中的用途所描述的化疗抗性修饰细胞。还提供了产生这些细胞的方法,其通过将一种或多种赋予化疗抗性的修饰并入合适的细胞中,并且任选地并入一种或多种与化疗抗性无关的另外的修饰,例如另外的疾病特异性修饰来进行。

[0106] 在某些实施方案中,本文还提供了组合物,包括用于本文提供的方法的组合物,其包含至少一种如本文提供的化疗抗性修饰细胞。在一些实施方案中,组合物还包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体或它们的任何组合。

[0107] 组合物可包含药学上可接受的赋形剂、药学上可接受的盐、稀释剂、载体、媒介物和本领域技术人员众所周知的这类其它非活性剂。药物制剂中常用的媒介物和赋形剂包括例如滑石粉、阿拉伯树胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、可可脂、水性或非水性溶剂、油、石蜡衍生物、乙二醇等。溶液可以使用水或生理相容的有机溶剂如乙醇、1,2-丙二醇、聚乙二醇、二甲亚砜、脂肪醇、甘油三酯、甘油偏酯等制备。组合物可以使用常规技术制备,包括无菌等渗盐水、水、1,3-丁二醇、乙醇、1,2-丙二醇、与水混合的聚乙二醇、林格溶液(Ringer's solution)等。一方面,添加着色剂以有助于将组合物定位并正确放置到预期的治疗部位。

[0108] 组合物可以包括防腐剂和/或稳定剂。防腐剂的非限制性实例包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠、苯甲酸、山梨酸、山梨酸钾、丙酸、苯扎氯铵(benzalkoniumchloride)、苯甲醇、硫柳汞、苯汞酸盐、洗必泰(chlorhexidine)、苯酚、3-甲酚、季铵化合物(QAC)、三氯丁醇、2-乙氧基乙醇和咪唑烷脒(imidurea)。

[0109] 为了控制张力,组合物可以包含生理盐,例如钠盐。氯化钠(NaCl)是优选的,它可以在1到20mg/ml之间存在。可能存在的其它盐包括氯化钾、磷酸二氢钾、无水磷酸二钠、氯化镁和氯化钙。

[0110] 组合物可以包括一种或多种缓冲剂。典型的缓冲剂包括:磷酸盐缓冲液;Tris缓冲液;硼酸盐缓冲液;琥珀酸盐缓冲液;组氨酸缓冲液;或柠檬酸盐缓冲液。缓冲液的浓度通常在5-20mM范围内。组合物的pH值通常在5与8之间,更通常在6与8之间,例如在6.5与7.5之间,或在7.0与7.8之间。

[0111] 在一些实施方案中,组合物可以包括冷冻保护剂。冷冻保护剂的非限制性实例包括二醇(例如乙二醇、丙二醇和甘油)、二甲亚砜(DMSO)、甲酰胺、蔗糖、海藻糖、右旋糖和它们的任何组合。

[0112] 在一些实施方案中,细胞是培养细胞的群体的一部分(即,体外)。在另一个实施方案中,细胞是受试者的细胞群体的一部分(即,体内)。举例而言,为了治疗或预防癌症或感兴趣的疾病,可以将修饰细胞和/或非清髓剂量的化学治疗剂递送到在受试者中形成组织或器官的体内细胞或体内细胞的群体。或者,为了进行实验以研究其对特定类型细胞的影响,可以将修饰细胞和/或非清髓剂量或清髓剂量的化学治疗剂递送到培养细胞或培养细胞的群体。

[0113] 组合物可以包括在可植入装置中。本发明考虑的合适的可植入装置包括血管内支架(stent)(例如,自膨胀支架、球囊膨胀支架和支架移植物)、支架(scaffold)、移植物等。这种可植入装置可以用能够治疗或预防癌症或其它疾病的组合物涂布在至少一个表面上或进行浸渍。

[0114] 可以通过任何合适的方式和途径将组合物施用于受试者。非限制性实例包括内部、肺部、直肠、鼻、阴道、舌、静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内、皮内和皮下途径。

[0115] 非骨髓或骨髓剂量的化学治疗剂可以口服、肠胃外、静脉内或如本文提供的其它方式施用。

[0116] 如本文所提供,在一些实施方案中,提供了细胞,例如但不限于干细胞或免疫细胞,所述细胞包含异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。在一些实施方案中,细胞包含异源GCLM。在一些实施方案中,细胞还包含至少一种另外的异源性地表达的感兴趣的分子。在一些实施方案中,干细胞是胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞(HSC)、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)、胚胎干细胞(ESC)或源自它们的细胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞或它们的任何组合。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。

[0117] 在一些实施方案中,感兴趣的分子是嵌合抗原受体。在一些实施方案中,包含如上所述的异源GCLM或GSH途径中的其它蛋白质的T细胞还包含嵌合抗原受体(CAR)。CAR可以是任何CAR。包含异源CAR和异源GCLM或相关GSH途径基因产物的细胞一旦施用于患者则可以用于选择CAR细胞。在一些实施方案中,异源GCLM蛋白包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其变体,或与SEQ ID NO:1至少90%同一或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列基本上同一的序列。在一些实施方案中,细胞不异源性地表达赋予化疗抗性的任何其它蛋白质。在一些实施方案中,细胞不异源性地表达ALDH。在一些实施方案中,细胞异源性地表达GCLM并内源地表达GCLM。

[0118] 在一些实施方案中,提供了一种细胞,所述细胞包含编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的表达的异源核苷酸分子和以下中的一者:i)编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子;和/或ii)内源HIV辅助受体突变或缺失。在一些实施方案中,细胞包含编码GCLM的异源核苷酸分子。在一些实施方案中,细胞包含如下异源核苷酸序列,所述异源核苷酸序列编码减少CCR5的表达的分子;编码减少CXCR4的表达;编码C-肽融合抑制剂的表达;或它们的任何组合。在一些实施方案中,细胞表达shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂,例如C44。

[0119] 在一些实施方案中,细胞用非病毒基因转移系统进行修饰以表达本文提供的异源核苷酸序列。在一些实施方案中,非病毒基因转移系统是转座子基因转移系统。在一些实施方案中,转座子基因转移系统是睡美人(Sleeping Beauty)基因转移系统或PiggyBac转座子基因转移系统。在一些实施方案中,细胞用CRISPR系统进行修饰以异源性地表达GCLM和本文提供的其它感兴趣的分子。

[0120] 在一些实施方案中,提供了核酸分子,所述核酸分子编码异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和以下中的一者:i)编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子。在一些实施方案中,异源核苷酸序列编码减少CCR5的表达的分子;减少CXCR4的表达的分子;编码C-肽融合抑制剂的表达的分子;或它们的任何组合。在一些实施方案中,核酸分子编码shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合

抑制剂的表达。

[0121] 在一些实施方案中,提供了如本文所述的载体,其包含本文提供的核酸分子。在一些实施方案中,载体是能够用于产生慢病毒的载体。在一些实施方案中,如本文所述,载体是慢病毒载体。

[0122] 在一些实施方案中,本文还提供了组合物,其包含一种或多种如本文提供的细胞。在一些实施方案中,组合物是药物组合物。本文提供了药物组合物的非限制性实例。如本文所述,

[0123] 80.一种药物组合物,其包含如权利要求70-79中任一项所述的细胞和药学上可接受的缓冲剂或赋形剂。

[0124] 本文提供的细胞可以用于化学保护适用的各种方法中。这可以用于例如向患者施用化疗抗性基因修饰细胞并接着使用化学疗法杀死非化疗抗性细胞,同时保护化疗抗性细胞并允许其继续繁殖。这可以用作一种选择表达异源蛋白,例如谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和感兴趣的分子的修饰细胞的方式。另外,当所述细胞被用于用异源地表达谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的正常细胞或非病变细胞替换相同细胞类型的疾病细胞时,它可以在没有除谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽以外的感兴趣的分子的情况下进行。例如,这可以在进行骨髓移植时或在细胞表达导致病变的蛋白质的缺陷或突变型式时进行。本文提供了病变的实例,包括但不限于溶酶体贮积病。

[0125] 因此,在一些实施方案中,提供了用于提供或改善靶细胞中的化学保护的方法。在一些实施方案中,方法包括向靶细胞提供异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。细胞可例如施用于需要这类靶细胞的患者。在一些实施方案中,异源蛋白是GCLM。

[0126] 在一些实施方案中,提供了用于提供或改善有需要的患者中的化学保护的方法。在一些实施方案中,方法包括向所述患者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞。在一些实施方案中,异源蛋白是GCLM。在一些实施方案中,细胞还包含感兴趣的异源分子,例如蛋白质或嵌合抗原受体。本文提供了这类感兴趣的蛋白质的非限制性实例。然而,这些是非限制性实例并且任何感兴趣的分子都可以用于本文提供的细胞和方法中。

[0127] 在一些实施方案中,谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的异源表达允许移植后体内选择。

[0128] 在一些实施方案中,提供了赋予患者化疗抗性细胞的方法。在一些实施方案中,方法包括向患者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细

胞。在一些实施方案中,细胞异源地地表达GCLM。

[0129] 在一些实施方案中,提供了治疗癌症患者的方法。在一些实施方案中,方法包括向患者施用包含表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞的药物组合物与非清髓或清髓剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,细胞表达异源GCLM。非清髓或清髓剂量的化学治疗剂可以在表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽,例如GCLM的细胞之前、之后或同时施用。

[0130] 在一些实施方案中,方法还包括从受试者分离干细胞或免疫细胞。在一些实施方案中,对所分离的干细胞或免疫细胞进行修饰以表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽,例如GCLM。在一些实施方案中,通过使所分离的细胞与包含编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的核酸分子的表达载体接触,细胞被修饰成表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽。

[0131] 在一些实施方案中,载体是病毒载体非病毒载体。在一些实施方案中,载体是慢病毒载体、腺病毒载体、质粒、逆转录病毒、转座子、游离型表达载体、修饰RNA或它们的任何组合。

[0132] 如本文所提供,细胞可以是干细胞或免疫细胞。在一些实施方案中,干细胞是但不限于胎儿干细胞、脐带血来源的干细胞、造血干细胞(HSC)、多能干细胞(PSC)、诱导性PSC(iPSC)、胚胎干细胞(ESC)或源自它们的细胞,例如CD34+细胞、CD90+细胞、CD45+细胞、CD17+细胞、CD45RA-细胞或它们的任何组合。在一些实施方案中,免疫细胞是T细胞。在一些实施方案中,T细胞还包含嵌合抗原受体。

[0133] 修饰细胞可以与患者自体同源,与患者同种异体,或它们的组合。

[0134] 在一些实施方案中,患者正进行基因疗法、细胞疗法或CAR-T疗法。

[0135] 如本文所提供,提供的化学保护可以针对白消安和/或砒。在一些实施方案中,本文提供的方法包括向患者(受试者)施用清髓剂量或非清髓剂量的白消安和/或砒。

[0136] 在一些实施方案中,提供了在患者中进行骨髓移植的方法。在一些实施方案中,方法包括向患者施用抗白消安性修饰细胞群体和至少一种非清髓或清髓剂量的白消安。在一些实施方案中,抗白消安性修饰细胞群体包含编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的异源基因。在一些实施方案中,异源基因编码GCLM。在一些实施方案中,抗白消安性修饰细胞群体表达GCLM。在一些实施方案中,抗白消安性修饰细胞的抗白消安性是由GCLM的表达赋予的。在一些实施方案中,在6个月内患者的超过50%的骨髓被抗白消安性修饰细胞或源自它们的细胞替换。在一些实施方案中,患者患有HIV、癌症、A1AT缺乏症、WAS、胡尔勒氏综合征(Hurler Syndrome)、亨特综合征(Hunter Syndrome)、庞贝病(Pompe Disease)、法布里病(Fabry Disease)、黏多糖贮积症、MPS I H/S(胡-射二氏综合征(Hurler/Scheie syndrome))、MPS I H(胡尔勒氏病)、MPS II-(亨特综合征)、MPS III A、

B、C和D(桑迪弗综合征(Sanfillipo syndrome))、MPS I S(席耶氏综合征(Scheie syndrome))、MPS IV A和B(莫尔丘综合征(Morquio syndrome))、MPS IX(透明质酸酶缺乏症)、MPS VII(斯里综合征(Sly syndrome))、MPS VI(马-拉综合征(Maroteaux-Lamy syndrome))、溶酶体贮积病和儿童型脑性肾上腺脑白质营养不良(cALD)。在一些实施方案中,癌症是血液癌症或恶性肿瘤。在一些实施方案中,血液癌症是但不限于白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样真菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、t细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、慢性骨髓增生性肿瘤、郎格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征或骨髓增生异常性/骨髓增生性肿瘤。

[0137] 本文以及通篇提供的抗白消安性可以是暂时的,使得基因产物如GCLM的异源表达是短暂的。

[0138] 在一些实施方案中,方法包括使未修饰的细胞与编码谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的表达的表达载体接触以产生抗白消安性修饰细胞。在一些实施方案中,细胞将表达GCLM。在一些实施方案中,表达载体是病毒载体或非病毒载体。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒或腺病毒载体。在一些实施方案中,表达载体是逆转录病毒、转座子、游离型表达载体、修饰RNA、质粒或它们的任何组合。

[0139] 在一些实施方案中,至少一个非清髓或清髓剂量的化学治疗剂在施用修饰细胞之后施用。在一些实施方案中,至少一个非清髓或清髓剂量的化学治疗剂是非清髓或清髓剂量的白消安。在一些实施方案中,非清髓性化学治疗剂每天施用,历时至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少4个月、至少5个月或至少6个月。在一些实施方案中,方法还包括在施用抗白消安性修饰细胞与至少一个非清髓剂量的化学治疗剂之间的一个时间段内不施用非清髓剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,所述时间段选自自由约3天、约7天、约10天和约14天组成的组。

[0140] 在一些实施方案中,患者的超过约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或100%的骨髓被修饰细胞替换。

[0141] 在一些实施方案中,患者未清除骨髓细胞和/或未因施用至少一个非清髓剂量的化学治疗剂而免疫受损。在一些实施方案中,患者未经历临床相关的贫血、中性粒细胞减少、血小板减少、各类血细胞减少、低血小板、低白细胞或它们的任何组合或相关症状。

[0142] 在一些实施方案中,修饰细胞对HIV感染具有抗性。在一些实施方案中,修饰细胞异源地表达至少一种对HIV感染具有抗性的HIV辅助受体的突变、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合。这些也可以称为除谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)修饰亚基GCLM、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽以外的感兴趣的分子。在一些实施方案中,修饰细胞异源地表达shCCR5、shCXCR4、C-肽融合抑制剂或它们的任何组合。在一些实施方案中,修饰细胞不表达HIV辅助受体。在一些实施方案中,修饰细胞不表达CCR5、CXCR4或表达CCR5- Δ 32或它们的组合。

[0143] 在一些实施方案中,提供了治疗受试者的HIV的方法。在一些实施方案中,方法包

括向受试者施用异源性地表达谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和以下中的一者的细胞群体:i) 编码至少一种HIV辅助受体突变体、至少一种HIV辅助受体的一种突变或多种突变、至少一种HIV融合抑制剂、减少HIV辅助受体表达的分子或它们的任何组合的异源核苷酸分子;和至少一个非清髓剂量的化学治疗剂。在一些实施方案中,细胞异源性地表达GCLM。在一些实施方案中,细胞异源性地表达shCCR5、shCXCR4和/或C-肽融合抑制剂。在一些实施方案中,化学治疗剂是白消安。

[0144] 在一些实施方案中,提供了在受试者中表达感兴趣的分子的方法。在一些实施方案中,方法包括向受试者施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽和感兴趣的分子的细胞;以及施用非清髓剂量的白消安。在一些实施方案中,细胞异源性地表达GCLM。在一些实施方案中,细胞是CD34+和/或CD4+,或如本文提供的其它方面,例如如本文提供的免疫细胞或干细胞。在一些实施方案中,感兴趣的分子是如下分子,其减少CCR5的表达;减少CXCR4的表达;编码C-肽融合抑制剂的表达;或它们的任何组合。在一些实施方案中,减少CCR5的感兴趣的分子是shCCR5。在一些实施方案中,感兴趣的分子是在A1AT缺乏症、WAS、胡尔勒氏综合征、亨特综合征、庞贝病、法布里病、黏多糖贮积症、MPS 1 H/S (胡-射二氏综合征)、MPS I H (胡尔勒氏病)、MPS II- (亨特综合征)、MPS III A、B、C和D (桑迪弗综合征)、MPS I S (席耶氏综合征)、MPS IV A和B (莫尔丘综合征)、MPS IX (透明质酸酶缺乏症)、MPS VII (斯里综合征)、MPS VI (马-拉综合征)、溶酶体贮积病和儿童型脑性肾上腺脑白质营养不良 (cALD) 中缺乏的野生型蛋白质。在一些实施方案中,感兴趣的分子是嵌合抗原受体。

[0145] 在一些实施方案中,提供了治疗患者的癌症的方法。在一些实施方案中,方法包括向患者施用白消安,其中患者已经施用表达异源谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 修饰亚基GCLM、GCLC (GCL催化亚基)、GCL (呈二聚体或完整酶形式) 或GSH合成途径中的提供等效功能的任何其它多肽的细胞。在一些实施方案中,细胞异源性地表达GCLM。在一些实施方案中,方法包括在施用白消安之前向患者施用细胞。在一些实施方案中,白消安以非清髓剂量施用。在一些实施方案中,白消安以清髓剂量施用。在一些实施方案中,癌症是血液癌症。在一些实施方案中,血液癌症是白血病、急性成淋巴细胞性白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、淋巴瘤、艾滋病相关淋巴瘤、皮肤t细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、蕈样真菌病、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、塞扎里综合征、T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、慢性骨髓增生性肿瘤、郎格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征或骨髓增生异常性/骨髓增生性肿瘤。在一些实施方案中,癌症是骨肉瘤。

[0146] 以下实施例例示了本文所述的化合物、组合物和方法,而非限制。本领域技术人员已知的其它合适的修改和更改在以下实施方案的范围内。

[0147] 实施例1

[0148] 在某些实施方案中,使用利用谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 的方法和组合物,该酶是在谷胱甘肽 (GSH) 合成途径的第一步起作用的酶,有助于白消安的清除。谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (GCL) 酶的化学保护作用通过过表达其修饰亚基GCLM来分析。值得注意的是,可

以使用任何合适的形式,包括GCLM(GCL修饰亚基)、GCLC(GCL催化亚基)、GCL(呈二聚体或完整酶形式)和GSH合成途径中的具有相同功能的其它酶。(参见Franklin等人,Mol.Aspects Med.2009;30(1-2):86-98。)

[0149] 方法:

[0150] 使用表达GCLM和绿色荧光蛋白(GFP)基因的慢病毒载体转导Jurkat、CEM和Tf-1a细胞系。通过将未转导细胞的群体或(20%转导、80%未转导)细胞的混合群体与浓度范围为0至200 μ g/ml的白消安一起孵育1小时、2小时或4小时来进行化学保护实验。然后将细胞在不含白消安的培养物中孵育24小时、48小时、72小时和96小时。通过使用梯形规则从不同时间和孵育浓度估计浓度-时间曲线下面积(AUC)。使用荧光测定法测量暴露前和暴露后的GSH水平。通过Nucleocounter NC-200和流式细胞术使用PI和7-AAD染色方案测量不同时间点的细胞存活和增殖。通过流式细胞术评估受保护的GFP+细胞的化学选择。基线GSH水平和GCLM表达也通过荧光和RT-PCR测定在从3个不同供体收获的原代人HSPC中测量。

[0151] 将细胞与白消安(0、1、2、4、6、8、10、20、40、60、80、100和200 μ g/ml)在无血清培养基(RPMI)中一起孵育1小时、2小时和4小时。然后用冰冷的缓冲液(PBS+0.5% HSA+0.1%葡萄糖)洗涤。洗涤后的细胞在RPMI+20%FBS中培养。在24小时、48小时、72小时和96小时时间点进行测量。

[0152] 结果

[0153] 未转导和转导的Jurkat、CEM和TF-1a细胞之间的GSH水平变化分别是2.1、1.7和1.9倍。发现未转导的CEM细胞对白消安暴露最敏感。所有细胞培养物中的细胞死亡和增殖均以AUC依赖性方式进行。CEM细胞中1.7倍的GSH活性赋予了至少3.5倍的针对白消安的保护作用。在培养72小时,在10 μ g/ml白消安暴露1小时后,转导的CEM细胞的纯度从20%提高到88%,并且转导的活细胞数从 30×10^3 /ml增加至 84×10^3 /ml。在剂量高于10 μ g/ml或暴露时间超过1小时下,转导的细胞在72小时后为100%的培养物。在72小时,转导的活细胞的扩增倍数与未处理的转导的对照物和未转导的对照物(2.8、3.2和3.3)相似。在整个实验过程中,转导的细胞中的GSH水平保持稳定,而未转导的细胞中的GSH在白消安暴露后被耗尽。原代人HSPC中的GSH水平与未转导的Tf-1a细胞相似。此外,RT-PCR分析表明GCLM在这些细胞中没有大量表达。

[0154] 实施例2:

[0155] 基因修饰造血干/祖细胞(HSPC)疗法缺乏足够的移植一直是最大的挑战。已经提出了使用针对细胞毒性剂的化疗抗性基因在体内选择这些细胞。白消安(HSPC移植中调节方案常用的细胞毒性化学疗法剂)通过谷胱甘肽(GSH)缀合来清除。细胞质中GSH水平升高介导白消安毒性。GSH合成途径的第一步和限速酶涉及谷氨酸-半胱氨酸连接酶(GCL)(图1)。本文提供的结果表明,通过过表达修饰亚基GCLM来增加GCL酶活性能够在体外赋予针对白消安毒性的保护作用。

[0156] 使用表达GCLM和绿色荧光蛋白(GFP)基因的慢病毒载体转导Jurkat、CEM和Tf-1a细胞系(图2A)。通过将未转导细胞的群体或(20%转导、80%未转导)细胞的混合群体与浓度范围为低(2至10 μ g/ml)至中等和高(10至200 μ g/ml)的白消安一起孵育1小时或2小时来进行化学保护实验。然后将细胞孵育并在无白消安的培养物中记录24小时、48小时、72小时和96小时时间点的活细胞数(图2B)。通过FACS分析用荧光测定法测量转导前和转导后以及

暴露后的GSH水平。每天通过Nucleocounter NC-200和流式细胞术使用PI和7-AAD染色方案测量不同时间点的细胞存活和增殖。通过流式细胞术评估受保护的GFP阳性细胞的化学选择。

[0157] 实验表明,转导的Jurkat、CEM和TF-1a细胞中的GSH水平增加(图3A)。GCLM的过表达对细胞活力和增殖没有影响(图3B)。在整个实验过程中,转导的细胞中的GSH水平保持稳定,而未转导的细胞中的GSH在白消安暴露后被耗尽(图4)。在GLCM转导的CEM细胞中增加的GSH活性在较低剂量下提供了至少3.5倍的针对白消安的保护(图5)。在更高剂量(10或20ug/ml)的白消安暴露下,它还表现出对转导细胞群体的保护和增殖(图6)。中等水平的白消安暴露在72-96小时内实现了对化学保护细胞和100%转导细胞群体的选择(图7)。

[0158] 这些结果表明,在多种不同剂量和暴露时间下,单独的GCL修饰亚基表达的增加具有显著的针对白消安的化学保护作用。这表明了GCLM转基因表达可用于白消安保护,从而选择基因修饰细胞。如本文所论述,基因修饰的自体同源HSPC移植的最大障碍之一是缺乏足够的移植。白消安是一种对骨髓干细胞具有较高毒性而对其它器官毒性有限的剂。在基因修饰的自体同源非清髓性骨髓移植中,GCLM基因也可用于增加使用白消安作为体内选择剂的基因修饰干细胞的移植率。这些结果令人惊讶和出乎意料。

[0159] 结论:

[0160] 因此,本文提供的实施方案表明,单独的异源GCL修饰亚基的表达增加可以赋予针对白消安的显著化学保护作用。这表明了GCLM转基因表达可用于基因修饰的自体同源HSPC移植中的移植后体内选择。

[0161] 标准方法

[0162] 以下中描述了分子生物学中的标准方法:Sambrook,Fritsch和Maniatis(1982和1989第2版,2001第3版)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Sambrook和Russell(2001)Molecular Cloning,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY;Wu(1993)Recombinant DNA,第217卷,Academic Press,San Diego,CA)。标准方法也出现在以下中:Ausbel等人(2001)Current Protocols in Molecular Biology,第1-4卷,John Wiley and Sons公司,New York,NY,描述了细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷)、哺乳动物细胞和酵母中的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)和生物信息学(第4卷)。

[0163] 描述了用于蛋白质纯化的方法,包括免疫沉淀、色谱法、电泳、离心和结晶(Coligan等人(2000)Current Protocols in Protein Science,第1卷,John Wiley and Sons公司,New York)。描述了化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生、蛋白质的糖基化(参见例如Coligan,等人(2000)Current Protocols in Protein Science,第2卷,John Wiley and Sons公司,New York;Ausubel等人(2001)Current Protocols in Molecular Biology,第3卷,John Wiley and Sons公司,NY,NY,第16.0.5-16.22.17页;Sigma-Aldrich公司(2001)Products for Life Science Research,St.Louis,MO;第45-89页;Amersham Pharmacia Biotech(2001)BioDirectory,Piscataway,N.J.,第384-391页)。描述了多克隆和单克隆抗体的生产、纯化和片段化(Coligan等人(2001)Current Protocols in Immunology,第1卷,John Wiley and Sons公司,New York;Harlow和Lane(1999)Using Antibodies,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring

Harbor, NY; Harlow和Lane, 上述)。可利用表征配体/受体相互作用的标准技术(参见例如 Coligan等人(2001) *Current Protocols in Immunology*, 第4卷, John Wiley公司, New York)。

[0164] 本文引用的所有参考文献均以引用的方式并入, 其引用程度如同具体且单独地指示每个单独的出版物、数据库条目(例如Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利以引用的方式并入一般。根据37C.F.R. §1.57 (b) (1), 申请人意图对以引用的方式并入的这一声明与每个单独的出版物、数据库条目(例如Genbank序列或GeneID条目)、专利申请或专利相关, 每一项都按照37C.F.R. §1.57 (b) (2) 明确标识, 即使这类引用与以引用的方式并入的专门声明不紧邻。如果有的话, 在说明书中包括以引用的方式并入的专门声明不会以任何方式削弱以引用的方式并入的一般声明。本文引用参考文献并不意味着承认该参考文献是相关的现有技术, 也不构成对这些出版物或文献的内容或日期的任何承认。

[0165] 本发明的实施方案不限于本文所述的特定实施方案的范围。根据上文的描述和任何附图, 除本文所述的实施方案外, 对实施方案的各种修改对于本领域的技术人员是显而易见的。这些修改也在所附权利要求书范围之内。

序列表

<110> S • 居姆吕克曲 (GUMRUKCU, Serhat)

<120> 用于提供化学保护作用的组合物和方法

<130> 147144.000502

<150> 62/968,906

<151> 2020-01-31

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

```

Met Gly Thr Asp Ser Arg Ala Ala Lys Ala Leu Leu Ala Arg Ala Arg
1           5           10           15
Thr Leu His Leu Gln Thr Gly Asn Leu Leu Asn Trp Gly Arg Leu Arg
          20           25           30
Lys Lys Cys Pro Ser Thr His Ser Glu Glu Leu His Asp Cys Ile Gln
          35           40           45
Lys Thr Leu Asn Glu Trp Ser Ser Gln Ile Asn Pro Asp Leu Val Arg
          50           55           60
Glu Phe Pro Asp Val Leu Glu Cys Thr Val Ser His Ala Val Glu Lys
65           70           75           80
Ile Asn Pro Asp Glu Arg Glu Glu Met Lys Val Ser Ala Lys Leu Phe
          85           90           95
Ile Val Glu Ser Asn Ser Ser Ser Ser Thr Arg Ser Ala Val Asp Met
          100          105          110
Ala Cys Ser Val Leu Gly Val Ala Gln Leu Asp Ser Val Ile Ile Ala
          115          120          125
Ser Pro Pro Ile Glu Asp Gly Val Asn Leu Ser Leu Glu His Leu Gln
          130          135          140
Pro Tyr Trp Glu Glu Leu Glu Asn Leu Val Gln Ser Lys Lys Ile Val
145          150          155          160
Ala Ile Gly Thr Ser Asp Leu Asp Lys Thr Gln Leu Glu Gln Leu Tyr
          165          170          175
Gln Trp Ala Gln Val Lys Pro Asn Ser Asn Gln Val Asn Leu Ala Ser

```

180	185	190
Cys Cys Val Met Pro Pro Asp Leu Thr Ala Phe Ala Lys Gln Phe Asp		
195	200	205
Ile Gln Leu Leu Thr His Asn Asp Pro Lys Glu Leu Leu Ser Glu Ala		
210	215	220
Ser Phe Gln Glu Ala Leu Gln Glu Ser Ile Pro Asp Ile Gln Ala His		
225	230	235
Glu Trp Val Pro Leu Trp Leu Leu Arg Tyr Ser Val Ile Val Lys Ser		
245	250	255
Arg Gly Ile Ile Lys Ser Lys Gly Tyr Ile Leu Gln Ala Lys Arg Arg		
260	265	270

Gly Ser

<210> 2

<211> 5066

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

```

accgctcgcc acgccccgcc caggccaagg gccagtcact tgcgggccgg cgtccccgcag 60
cccatctcgcg ccccgcccct gccccgccgc gggatgagta acggttacga agcactttct 120
cggctacgat ttctgcttag tcattgtctt ccaggaaaca gctccctcag tttggaatca 180
gctctccccgc tgcggccgca gtagccggag ccggagccgc agccaccggt gccttccttt 240
cccgccgccg ccagccgcc gtccggcctc cctcgggccc gagcgcagac caggctccag 300
ccgcgcggcg ccggcagcct cgcgctccct ctcggggtctc tctcgggcct cgggcaccgc 360
gtcctgtggg gcggccgcct gcctgcccgc ccgccgcag ccccttcgct gcgcggcccc 420
tgggcgggccg ctgcatggg caccgacagc cgcgcggcca aggcgctcct ggcgcgggcc 480
cgcaccctgc acctgcagac ggggaacctg ctgaactggg gccgcctgcg gaagaagtgc 540
ccgtccacgc acagcgagga gttcatgat tgtatccaaa aaaccttgaa tgaatggagt 600
tcccaaatca acccagattt ggtcagggag tttccagatg tcttggaatg cactgtatct 660
catgcagtag aaaagataaa tctgatgaa agagaagaaa tgaaagtttc tgcaaaactg 720
ttcattgtag aatcaaaactc ttcatcatca actagaagtg cagttgacat ggcctgttca 780
gtccttgagg ttgcacagct ggattctgtg atcattgctt cacctcctat tgaagatgga 840
gttaatcttt ccttgaggca ttacagcct tactgggagg aattagaaaa cttagttcag 900
agcaaaaaga ttgttgccat aggtacctct gatctagaca aaacacagtt ggaacagctg 960
tatcagtggg cacaggtaaa accaaatagt aaccaagtta atcttgctc ctgctgtgtg 1020
atgccaccag atttgactgc atttgctaaa caatttgaca tacagctgtt gactcacaat 1080
gatccaaaag aactgcttct tgaagcaagt ttccaagaag ctcttcagga aagcattcct 1140
gacattcaag cgcacgagtg ggtgccgctg tggctactgc ggtattcggg cattgtgaaa 1200

```

```

agtagaggaa ttatcaaadc aaaaggctac attttacaag ctaaaagaag gggttcttaa 1260
ctgacttagg agcataactt acctgtaatt tccttcaata tgagagaaaa ttgagatgtg 1320
taaaaatcta gttactgcct gtaaattggtg tcattgaggc agatattctt tcgtcatatt 1380
tgacagtatg ttgtctgtca agttttaaat acttatcttg cctccatatac aatccattct 1440
catgaacctc tgtattgctt tccttaaaact attgttttct aattgaaatt gtctataaag 1500
aaaatacttg caatatattt ttcctttatt tttatgacta atataaatca agaaaatttg 1560
ttgttagata tattttggcc taggtatcag ggtaatgtat atacatattt tttatttcca 1620
aaaaaaattc attaatgtct tcttaactct tattataacc aagcaattta attacaattg 1680
ttaaaactga aatactggaa gaagatattt ttctgtcat tgatgagata tatcagagta 1740
actggagtag ctgggattta ctagtagtgt aaataaaatt cactcttcaa tacatgaatg 1800
gaaacttaaa ttttttttta tgtgtccttg cttatagttt agctgtaata atttaacctt 1860
gtattcttgt gccatattct gtctttttat tacttataaa gacaaaccaa agtaaactctg 1920
aaaggagact agaagcttg aaattattgt ttgggggttt tataaaagca actactgtca 1980
cctccatcca gattctttta aattattgat ccatccatag tatatattgc tactcattca 2040
agaatcctca ataagtattg agtatttacc atatgttggg atactgtggg ctctggagag 2100
aggagggggc aatagagcta ggaattaaga atcagttgag taaaatgtgt aatattttatt 2160
ccccattaat aactgactag gaaggactaa aagccagaaa ggggatgaaa aaaaaatcct 2220
taattcaggg ccgacattat ctacttaaac aactttgaga tatggcttta attattttta 2280
agcagaataa tataattgaa agtttatagc taaaagagac tatataggta atttagtata 2340
attcttcatt agtttacgaa ccacaaaatt gcaataaat aagctatgaa ctttgatgta 2400
cactataaat ctcttaatt ctataaattt gtgtctgtaa cctgaatagt ttgaaaactt 2460
ctttaaaaaat ctcttgatt tcatccgggc gcagtggctc acacctgtaa tcccagcact 2520
ttgggaggcc gaggtgggca gatcacgagg tcaggagttt gagaccagcc tgaccaacat 2580
ggtaaaaccc catctctact aaaatacaaa aattggctgg gcgtgggtggc actgcctgt 2640
aatctcagct acttgggagg ctgaggcagg agaatcgctt gaacccggga ggcggaggtt 2700
acagtgagcc gagatcacat cactgcactc cagcctgggc gacagagcga gactccatct 2760
caaaaaaaaaa aaaaaactct tgtatctcaa tatttttaaa ccacaggcct aaataaaact 2820
aattttgctc aagttttctc aacctaggga aaaagaacta tggttccata ttcaaaataa 2880
atattataga cccttttctc aagtaggatt ttgtggttta ctgattgggt aatttgatca 2940
ttaaaattat gtgaaactct cccgggcaca cctcatgcct gtaatcccag cactctggga 3000
ggccaaggca gatgatcacc tgaggtcagg agttctagac cagcctggct aacatgggtga 3060
aaccctgtat ctgctaaaaa tacaaaaatt agccaggcgt ggtggcgggc tcctgtaatc 3120
ccagctactt tggaggcgag gcacgagaat cgcttgaacc tgggaggcgg agtttgcagt 3180
gagccgagat cacgccattg cactccagcc tgggcgacag agcgagactg cgtctcaaaa 3240
aaaaaaaaaa aagaaaaatt atgtgaaatc atgtgatttg cctgggaaaa cttgtttaga 3300
tattgagcta cttatgcctt ctagccttta tattaattgt atgtaatgtt attaaatata 3360
tatatagttc atctttacat ttggaaatgc ccaacatttt tttcatataa gtccttaaac 3420
aagcgttcat tttattttta atctatacag tgaactggcc aagatatttt aagagggaac 3480
tttaatatcc catttattgt tttataacc ctggacttat aaaaatgggt tgtttgaagg 3540

```

gttatTTTTga aagtggggga aaaaaaaact tagttgctaa tgtatctaaa cttcagcaga 3600
gctTTTTTggt gatctcctac ctgcaccctc aactcttgac aaagaagcaa gactatagat 3660
tcatttttctg aaggggatca tgtatggaat tttttgatga gtttttactt ttacctctct 3720
actcttgatt ttctattatt gaatactctt ttaaaacact gatttttaag gctttatata 3780
tgTTTTccag gctgatgttc acatcttttt ttcatgaact atcagaatat agtgaacact 3840
tttcaaatat ttaaggactt aatgttttaa aagccataaa atagagagtg gtaatactac 3900
caaataatta cttaaaaactg aaagctaagt tatcaatagt ttatataaga gatgttttct 3960
gaggagatgt gcatccagtg agaccaaggt agaaagttta tataattggt ttttttccag 4020
taaatatgaa aaaaaaagct gtagcttggt tattacatgt ccaaaataca gtggagcctt 4080
actttaacac aatgtactgt aacttggaat ttgttctggt atgagtctat cttgaattcc 4140
catccatgaa actgtagtca ccaaaagcaa caagtatttt cacatgatgt aaaagaccat 4200
actatgatgg ccattgctag aaattgaatc acaataata gctaataatt tttcattttt 4260
caaaaaagat catttgata gcagctatgt ataaaatgga aaataaaaaa ttattctatt 4320
ttgcatgaat agttcagact ttcccatacc acagccaagc agtaactaaa attagatctt 4380
taattttcaa tgataaaaagg tctaaggttc atttaattat gctcctttaa cactgtcttt 4440
ctagatTTTT caccagtat tttcaaaatt tgggaatgta aacaattgat atatttattg 4500
tatgttggct agcagttcat ctttctgcaa aatatgcatt cagagaaatg tgaagcttgt 4560
tttaatgaag acttaaacca tttgtgtcat ttgtgttttc atattcaa atacacaaatt 4620
aaaattctga acctatattt ttcatcatta acttccta ataccagaac atataccttt 4680
ttcatgtaaa gttggcaatg ggatatggca gttttatttt tgaaaaatat gtaacatgac 4740
tttaatatTT ttatagtttt cagaattaga aacataggaa gggaaaatgt tttaattaga 4800
taagtcaact ttttatgtgt ctgtagtggt gtactataat agcaaattat aaagcattat 4860
taaagtTTta taataatttt taatattacc tacattatga atttaactaa aataaagtgt 4920
gagttgtata ttttttaatt gggttgtttc aatagctgga agcatcctga agcattatat 4980
tgatTTTTga actatttgaa ctcaaactga gtatgatttg aaaataaatt aataatttaa 5040
aaacatccaa aaaaaaaaaa aaaaaa 5066

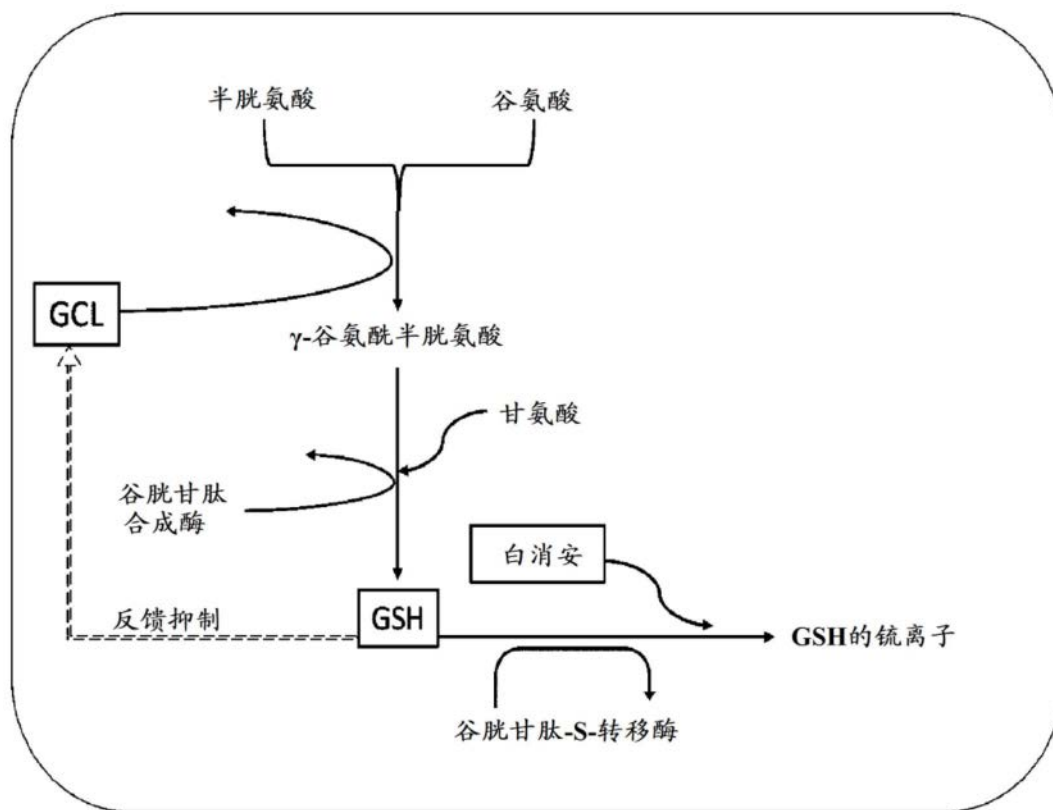


图1



图2A 共表达GCLM和GFP的慢病毒的载体图。

图2A

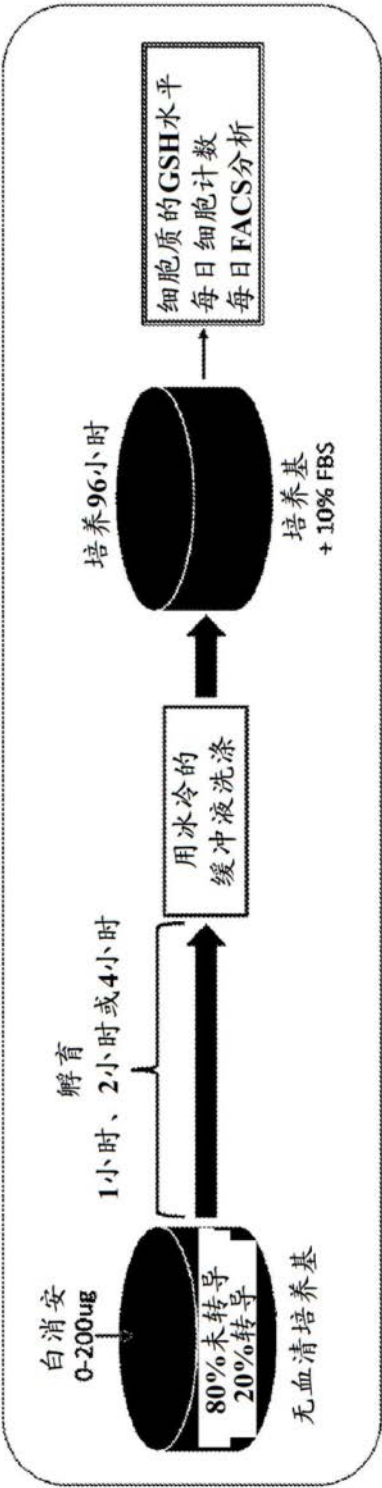


图2B

- 上图中概述了体外化学保护实验模型。
- 进行了六个独立的实验并示出了代表性数据

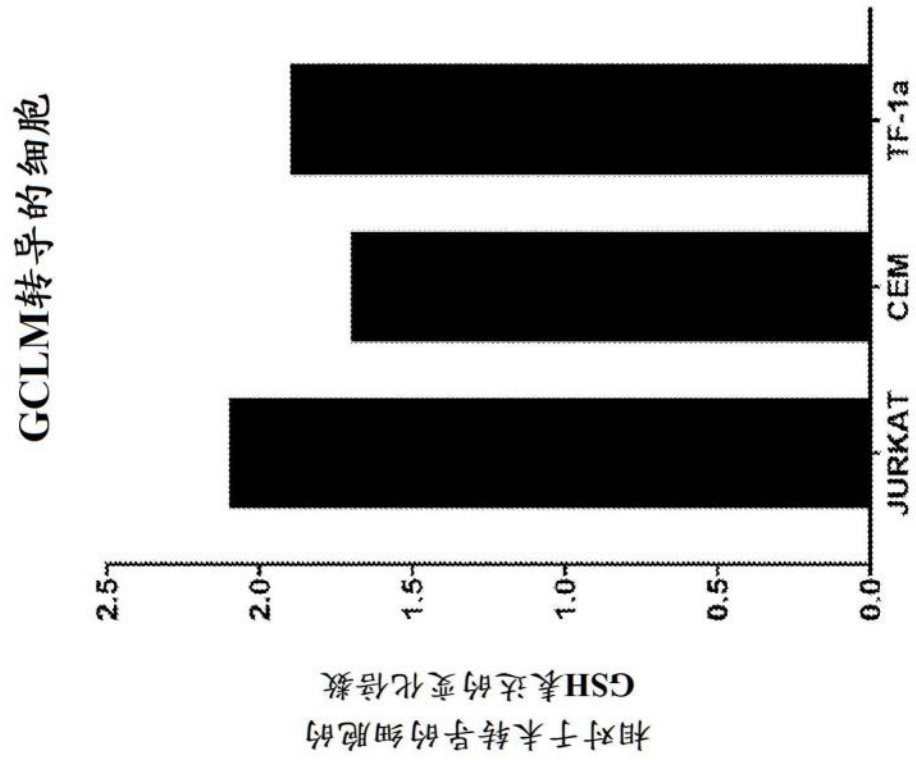


图3A

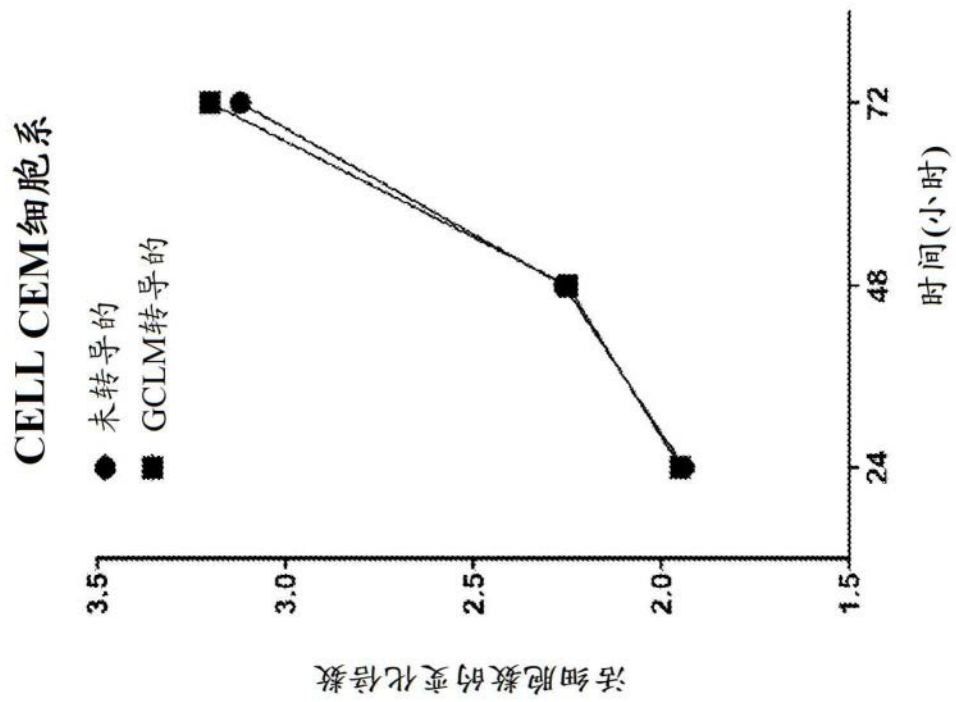


图3B

24小时的GCLM转导的CEM

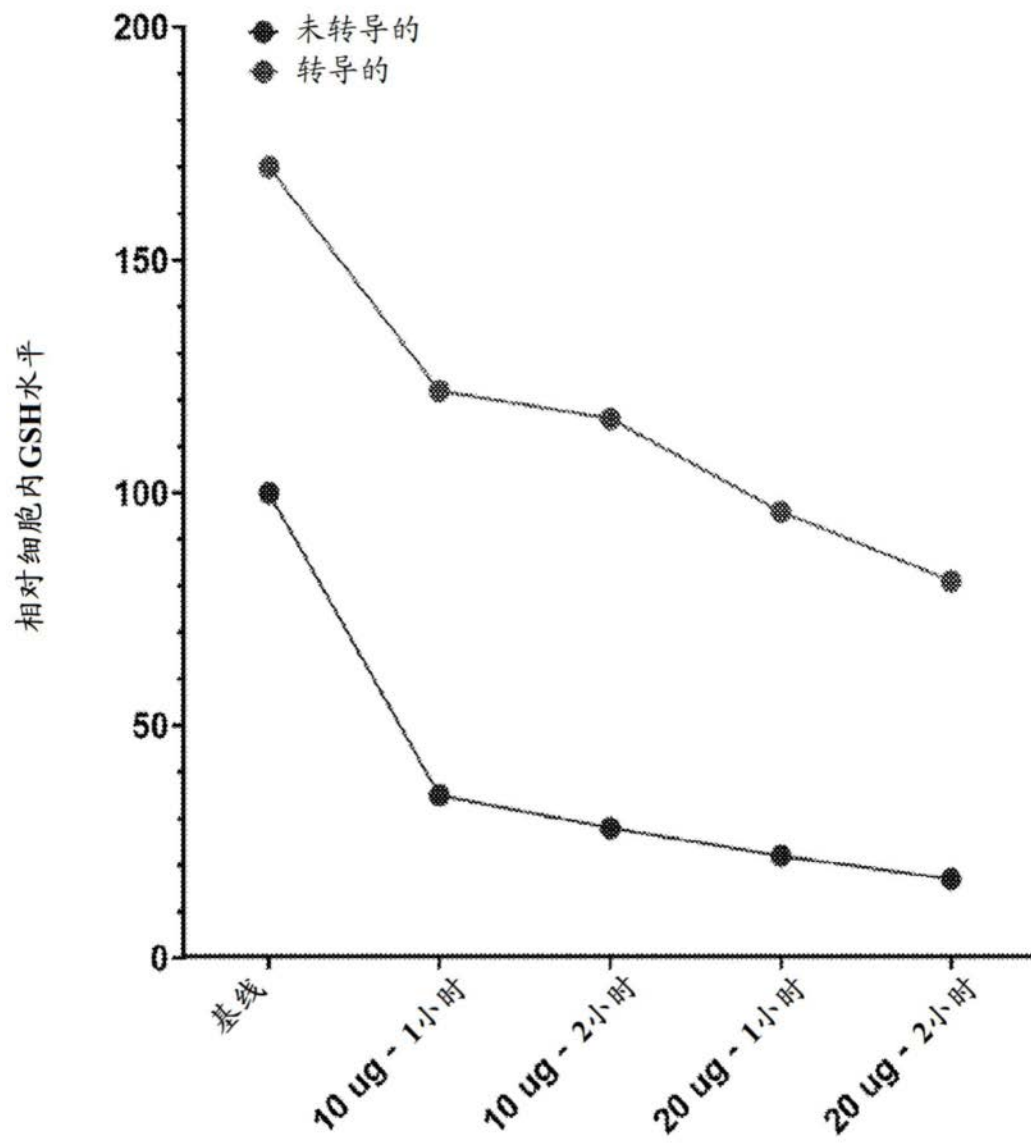


图4

GCLM转导的 + 0/4/8 ug白消安

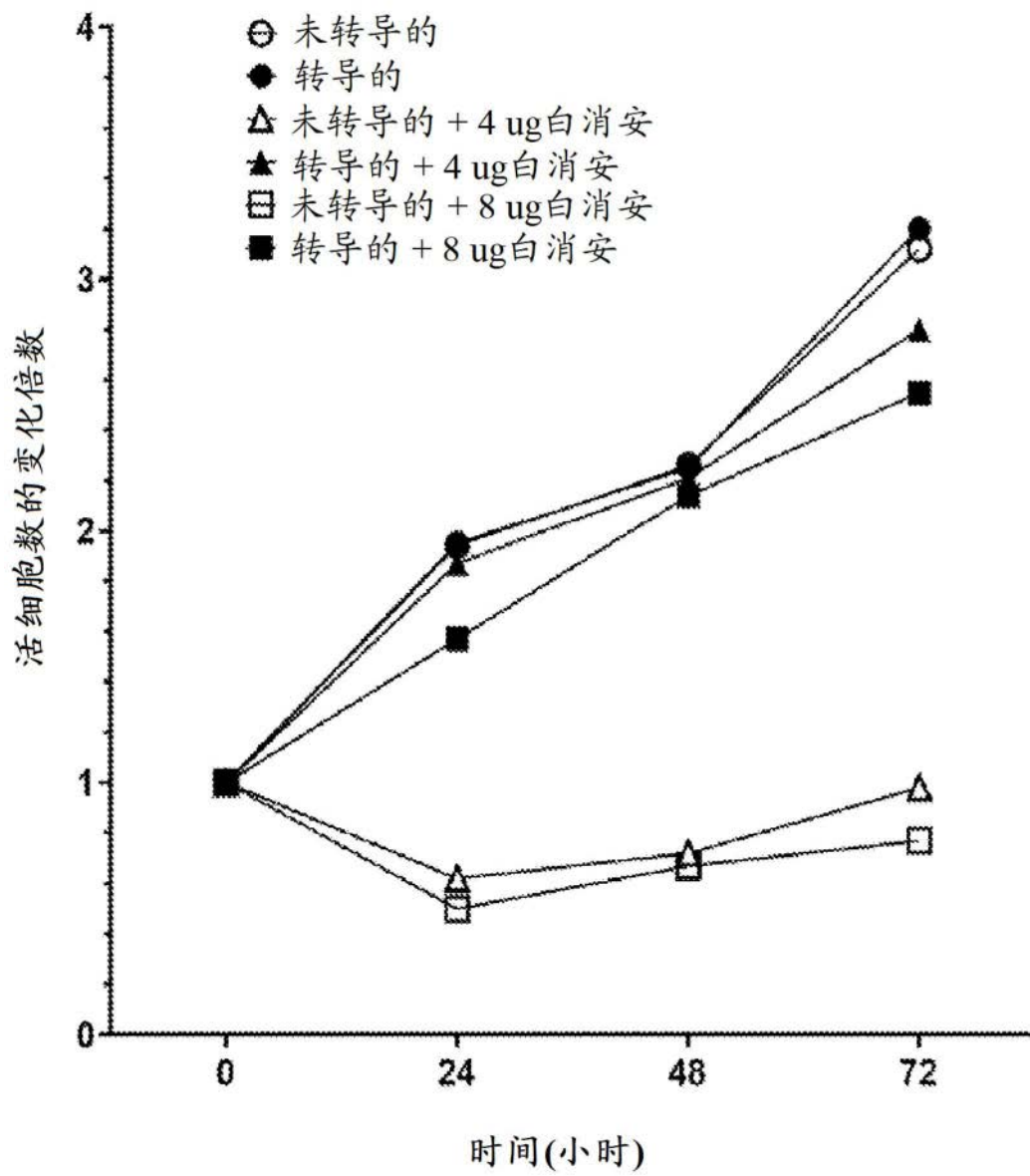


图5

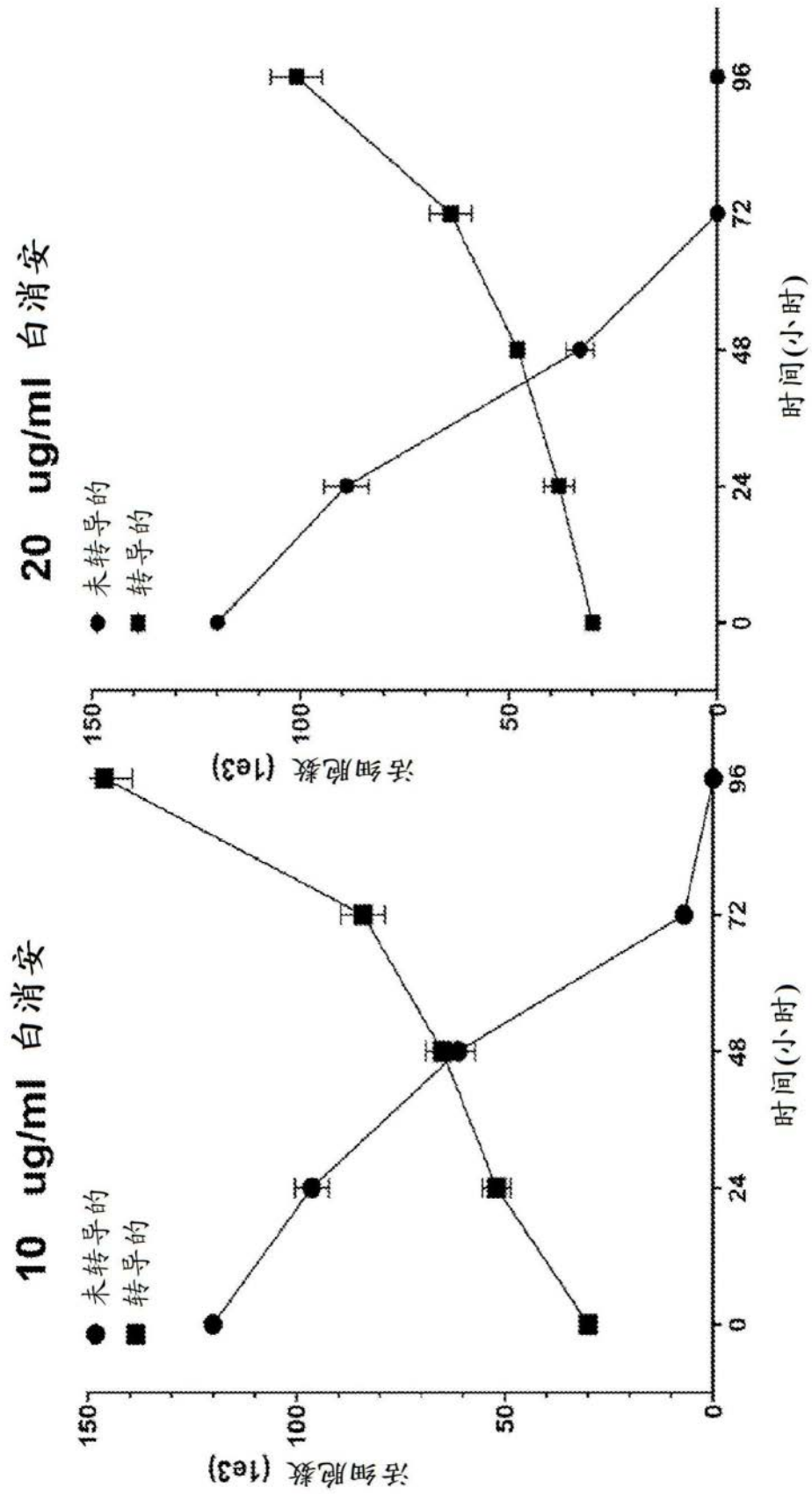


图6

GCLM转导的CEM + 1/2小时白消安

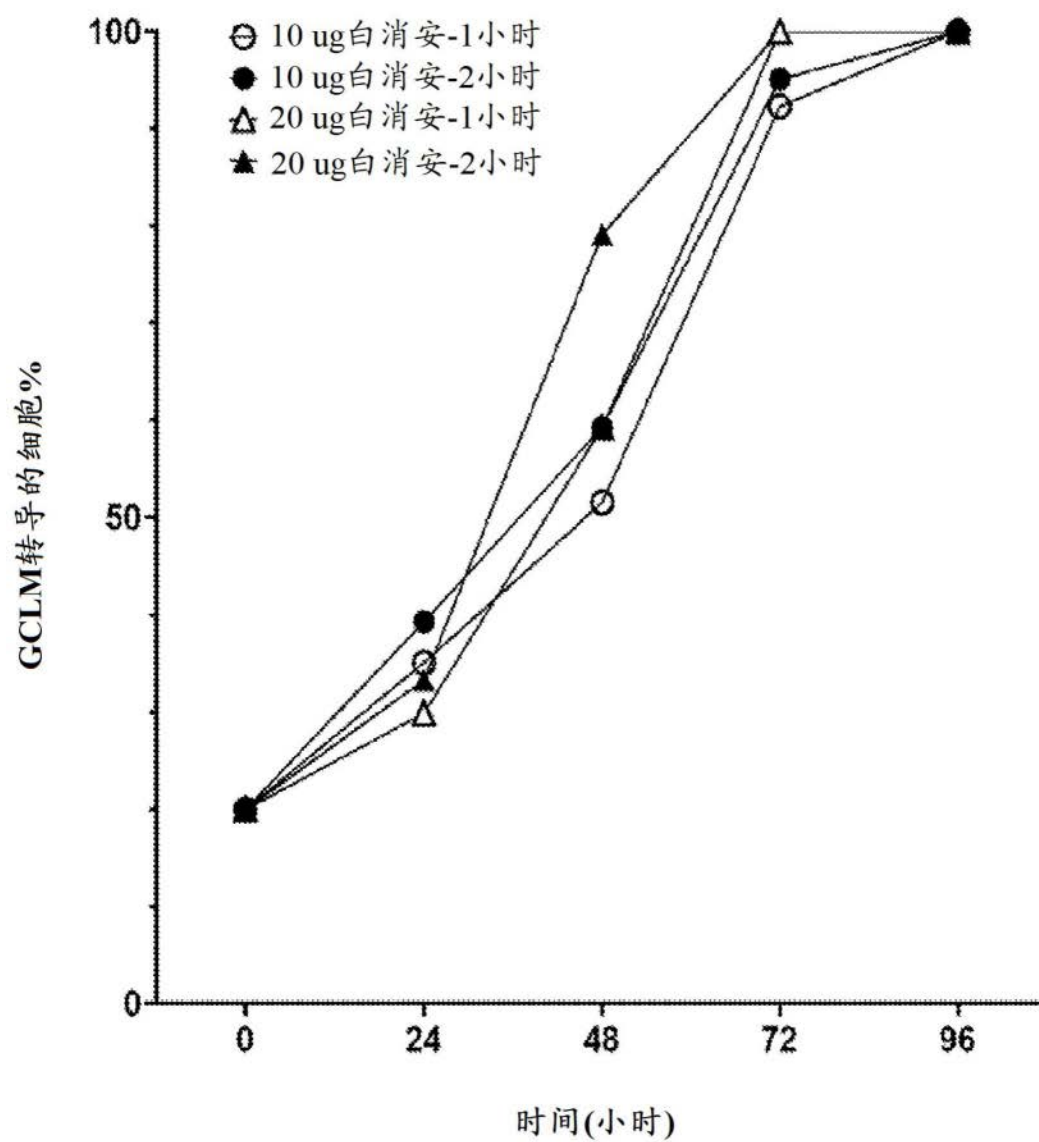


图7