



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116490203 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 25

(21) 申请号 202180074274.3

(22) 申请日 2021.10.29

(30) 优先权数据

63/107,992 2020.10.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.04.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/057363 2021.10.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/094284 EN 2022.05.05

(71) 申请人 益缪索夫特公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 克里斯蒂安·S·哈姆佩

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204  
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

A61K 38/46 (2006.01)

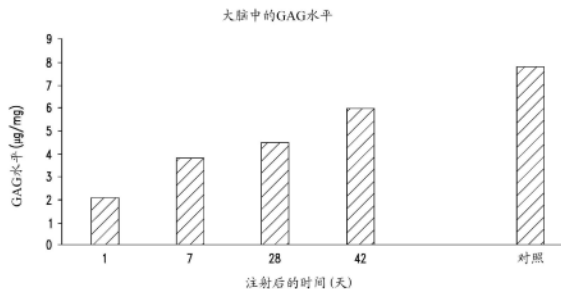
权利要求书3页 说明书37页  
序列表4页 附图4页

## (54) 发明名称

施用遗传修饰的B细胞以用于治疗剂的体内递送的方法

## (57) 摘要

本文提供了用于施用工程化的B细胞以在体内产生治疗剂的方法。在各种实施方案中,将工程化的B细胞直接施用于中枢神经系统(CNS)。本文所公开的组合物和方法可以被用于酶替代疗法,例如,通过产生艾杜糖醛酸酶(IDUA)来治疗与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。



1. 向对象施用遗传修饰的B细胞以用于在体内产生治疗剂的方法,其包括:  
向对象的中枢神经系统(CNS)施用一剂量或多剂量遗传修饰的B细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述施用包括输注入所述对象的脑脊液(CSF)中。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述施用包括脑池内注射。
4. 如权利要求2所述的方法,其中所述施用包括鞘内注射。
5. 如权利要求2所述的方法,其中所述施用包括脑室内注射(ICV)。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述脑室内注射(ICV)发生在一个或多个脑腔中。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述一个或多个脑腔是侧脑室。
8. 如权利要求6所述的方法,其中所述一个或多个脑腔是第三脑室。
9. 如权利要求6所述的方法,其中所述一个或多个脑腔是大脑导水管。
10. 如权利要求6所述的方法,其中所述一个或多个脑腔是第四脑室。
11. 如权利要求1所述的方法,其中通过所述遗传修饰的B细胞产生的治疗剂是艾杜糖醛酸酶(IDUA)。
12. 如权利要求1所述的方法,其中剂量包括以次最优的单剂量浓度的所述遗传修饰的B细胞,其中次最优的单剂量浓度通过以下确定:
  - (i) 测试所述经修饰的B细胞的多个单剂量;
  - (ii) 确定所述经修饰的B细胞的最优单剂量浓度,  
其中单剂量浓度的经修饰的B细胞中存在的经修饰的B细胞剂量的增加导致所述治疗剂的产生;
  - (iii) 测试所述经修饰的B细胞的多个次最优的单剂量浓度;和
  - (iv) 确定所述经修饰的B细胞的次最优的单剂量,  
其中所产生的剂量使得相比较低剂量具有更大的线性增加,  
其中所述次最优的单剂量浓度小于或等于所述最优单剂量浓度的剂量的约二分之一或约三分之一。
13. 如权利要求1所述的方法,其中所述施用任选地包括所述遗传修饰的B细胞的一个或多个连续的剂量。
14. 如权利要求1所述的方法,其中所述对象是哺乳动物。
15. 如权利要求1所述的方法,其中所述对象是人。
16. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞与所述对象是自体同源的。
17. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞与所述对象是同种异体的。
18. 如权利要求1所述的方法,其中所述治疗剂是蛋白质。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述蛋白质是酶。
20. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>+</sup>。
21. 如权利要求1所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>-</sup>。
22. 如权利要求1所述的方法,其中使用睡美人转座子制备所述遗传修饰的B细胞,以在所述B细胞中表达所述治疗剂。
23. 如权利要求1所述的方法,其中使用重组病毒载体制备所述遗传修饰的B细胞,以在所述B细胞中表达所述治疗剂。
24. 如权利要求23所述的方法,其中所述重组病毒载体编码重组逆转录病毒、重组慢病

毒、重组腺病毒或重组腺相关病毒。

25. 如权利要求1所述的方法,其中通过所述B细胞基因组的基因编辑或通过编码所述治疗剂的多核苷酸序列靶向整合到所述B细胞的基因组中来制备所述遗传修饰的B细胞。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述靶向整合包括锌指核酸酶介导的基因整合、CRISPR介导的基因整合或基因编辑、TALE核酸酶介导的基因整合或大范围核酸酶介导的基因整合。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述多核苷酸的靶向整合经由同源重组发生。

28. 如权利要求25所述的方法,其中所述靶向整合包括能够在靶位点处诱导DNA切割的核酸酶的病毒载体介导的递送。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述核酸酶是锌指核酸酶、Cas核酸酶、TALE核酸酶或大范围核酸酶。

30. 如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1相同的序列的多核苷酸。

31. 如权利要求1-29中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1至少约85%相同,或与SEQ ID NO:1至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%相同的序列的多核苷酸。

32. 如权利要求1-31中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在开始培养后第2天或第3天进行工程化。

33. 如权利要求32所述的方法,其中使用包括电穿孔的方法对所述遗传修饰的B细胞进行工程化。

34. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第4天、第5天、第6天或第7天向对象施用。

35. 如权利要求1-33中任一项所述的方法,其中收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第8天或更晚向对象施用。

36. 如权利要求35所述的方法,其中收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第10天或更早向对象施用。

37. 如权利要求1-36中任一项所述的方法,其中所述收获的遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子。

38. 如权利要求1-36中任一项所述的方法,其中在确定所述遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子的培养时间点收获所述遗传修饰的B细胞。

39. 如权利要求1-38中任一项所述的方法,其中在工程化前和工程化后的整个培养期,使所述遗传修饰的B细胞在包含IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、IL-21和多聚化的CD40配体中的每种的培养系统中生长。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述多聚化的CD40配体是使用抗his抗体多聚化的HIS标记的CD40配体。

41. 如权利要求1-40中任一项所述的方法,其还包括在施用于所述对象前扩增所述遗传修饰的B细胞。

42. 如权利要求41所述的方法,其中扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体表现出高度的多克隆性。

43. 如权利要求41所述的方法,其中扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆少于总B细胞群体的0.2%。

44. 如权利要求41所述的方法,其中扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆少于总B细胞群体的0.05%。

45. 如权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞包含编码对甲氨蝶呤具有增强的抗性的人DHFR基因的多核苷酸。

46. 如权利要求45所述的方法,其中所述对甲氨蝶呤具有增强的抗性的人DHFR基因在氨基酸22处含有亮氨酸至酪氨酸的取代,且在氨基酸31处具有苯丙氨酸至丝氨酸的取代。

47. 如权利要求1-46中任一项所述的方法,其包括在收获以用于施用之前用甲氨蝶呤处理所述遗传修饰的B细胞。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述甲氨蝶呤处理为100nM至300nM。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述甲氨蝶呤处理为200nM。

50. 如权利要求1-49中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在施用于所述对象之后在所述中枢神经系统(CNS)中的各组织中穿行。

51. 如权利要求50所述的方法,其中向所述对象施用所述遗传修饰的B细胞导致所述对象的不同组织中糖胺聚糖(GAG)的减少。

52. 如权利要求51所述的方法,其中向所述对象施用所述遗传修饰的B细胞导致所述中枢神经系统(CNS)内的组织中GAG的减少。

53. 如权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在施用后在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一周、两周、三周、四周、五周或六周。

54. 如权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在施用后在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。

55. 如权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在施用后在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一周、两周、三周、四周、五周或六周。

56. 如权利要求1-52中任一项所述的方法,其中所述遗传修饰的B细胞在施用后在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。

57. 如权利要求1-56中任一项所述的方法,其中所述对象患有与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。

58. 如权利要求57所述的方法,其中所述与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症由酶 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)缺乏引起。

59. 如权利要求57所述的方法,其中所述对象患有I型黏多糖贮积症(MPSI)。

60. 如权利要求57-59中任一项所述的方法,其中施用所述遗传修饰的B细胞以治疗所述对象的与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。

61. 如权利要求59所述的方法,其中施用所述遗传修饰的B细胞以治疗所述对象的MPSI。

## 施用遗传修饰的B细胞以用于治疗剂的体内递送的方法

### 关于序列表的声明

[0001] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求2020年10月30日递交的第63/107,992号美国临时申请的权益;其通过引用整体并入本文中。

### 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关的序列表以文本格式提供,以代替纸质副本,并在此通过引用并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称为IMCO\_009\_01WO\_ST25.txt。该文本文件为约10KB,创建于2021年10月28日,并经由EFS-Web以电子方式提交。

## 技术领域

[0003] 本公开整体涉及用于向对象施用工程化的细胞以产生治疗剂(如治疗性蛋白质)的方法。具体公开了用于向中枢神经系统施用工程化的B细胞的方法。

### 背景

[0004] CNS(例如,大脑)中的细胞疗法提出了独特的挑战,因为CNS具有免疫特权。由于这个原因,先前对B细胞的局部施用的努力通常没有扩展到向CNS(例如,大脑)的施用。

### 概述

[0005] 本公开提供了用于向对象的中枢神经系统(CNS)直接施用遗传修饰的(工程化的)B细胞以用于治疗影响此类组织的慢性疾病和病症的方法。

[0006] 一方面,本公开提供了向对象施用遗传修饰的B细胞以用于体内产生治疗剂的方法,其包括:向对象的中枢神经系统(CNS)施用一剂量或多剂量遗传修饰的B细胞。

[0007] 在一些实施方案中,所述施用包括输注入所述对象的脑脊液(CSF)中。

[0008] 在一些实施方案中,所述施用包括脑池内注射。

[0009] 在一些实施方案中,所述施用包括鞘内注射。

[0010] 在一些实施方案中,所述施用包括脑室内注射(ICV)。

[0011] 在一些实施方案中,所述脑室内注射(ICV)发生在一个或多个脑腔中。

[0012] 在一些实施方案中,所述一个或多个脑腔是侧脑室。

[0013] 在一些实施方案中,所述一个或多个脑腔是第三脑室。

[0014] 在一些实施方案中,所述一个或多个脑腔是大脑导水管。

[0015] 在一些实施方案中,所述一个或多个脑腔是第四脑室。

[0016] 在一些实施方案中,通过遗传修饰的B细胞产生的治疗剂是艾杜糖醛酸酶(IDUA)。

[0017] 在一些实施方案中,剂量包括以次最优的单剂量浓度的遗传修饰的B细胞,其中次最优的单剂量浓度通过以下确定:(i)测试所述经修饰的B细胞的多个单剂量;(ii)确定所述经修饰的B细胞的最优单剂量浓度,其中单剂量浓度的经修饰的B细胞中存在的经修饰的B细胞剂量的增加导致所述治疗剂的产生;(iii)测试所述经修饰的B细胞的多个次最优的单剂量浓度;和(iv)确定所述经修饰的B细胞的次最优的单剂量,其中所产生的剂量使得相比较低剂量具有更大的线性增加,其中所述次最优的单剂量浓度小于或等于所述最优单剂量浓度的剂量的约二分之一或约三分之一。

- [0018] 在一些实施方案中,所述施用任选地包括所述遗传修饰的B细胞的一个或多个连续的剂量。
- [0019] 在一些实施方案中,所述对象是哺乳动物。
- [0020] 在一些实施方案中,所述对象是人。
- [0021] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞与所述对象是自体同源的。
- [0022] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞与所述对象是同种异体的。
- [0023] 在一些实施方案中,所述治疗剂是蛋白质。
- [0024] 在一些实施方案中,所述蛋白质是酶。
- [0025] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>+</sup>。
- [0026] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>-</sup>。
- [0027] 在一些实施方案中,使用睡美人转座子制备所述遗传修饰的B细胞以在所述B细胞中表达所述治疗剂。
- [0028] 在一些实施方案中,使用重组病毒载体制备所述遗传修饰的B细胞以在所述B细胞中表达所述治疗剂。
- [0029] 在一些实施方案中,所述重组病毒载体编码重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒或重组腺相关病毒。在一些实施方案中,通过所述B细胞基因组的基因编辑或通过编码所述治疗剂的多核苷酸序列靶向整合到所述B细胞的基因组中来制备所述遗传修饰的B细胞。
- [0030] 在一些实施方案中,所述靶向整合包括锌指核酸酶介导的基因整合、CRISPR介导的基因整合或基因编辑、TALE-核酸酶介导的基因整合或大范围核酸酶介导的基因整合。
- [0031] 在一些实施方案中,所述多核苷酸的靶向整合经由同源重组发生。
- [0032] 在一些实施方案中,所述靶向整合包括能够在靶位点处诱导DNA切割的核酸酶的病毒载体介导的递送。
- [0033] 在一些实施方案中,所述核酸酶是锌指核酸酶、Cas核酸酶、TALE-核酸酶或大范围核酸酶。
- [0034] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1相同的序列的多核苷酸。
- [0035] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1至少约85%相同,或与SEQ ID NO:1至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%相同的序列的多核苷酸。
- [0036] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在开始培养后第2天或第3天进行工程化。
- [0037] 在一些实施方案中,使用包括电穿孔的方法对所述遗传修饰的B细胞进行工程化。
- [0038] 在一些实施方案中,收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第4天、第5天、第6天或第7天向对象施用。
- [0039] 在一些实施方案中,收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的第8天或更晚向对象施用。
- [0040] 在一些实施方案中,收获所述遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的第10天或更早向对象施用。

- [0041] 在一些实施方案中,所述收获的遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子。
- [0042] 在一些实施方案中,在确定所述遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子的培养时间点收获所述遗传修饰的B细胞。
- [0043] 在一些实施方案中,在工程化前和工程化后的整个培养期,使所述遗传修饰的B细胞在包含IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、IL-21和多聚化的CD40配体中的每种的培养系统中生长。
- [0044] 在一些实施方案中,所述多聚化的CD40配体是使用抗his抗体多聚化的HIS标记的CD40配体。
- [0045] 在一些实施方案中,所述方法包括在施用于所述对象前扩增所述遗传修饰的B细胞。
- [0046] 在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体表现出高度的多克隆性。
- [0047] 在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆少于总B细胞群体的0.2%。
- [0048] 在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆少于总B细胞群体的0.05%。
- [0049] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞包含编码对甲氨蝶呤具有增强抗性的人DHFR基因的多核苷酸。
- [0050] 在一些实施方案中,对甲氨蝶呤具有增强抗性的人DHFR基因在氨基酸22处含有亮氨酸至酪氨酸的取代,且在氨基酸31处具有苯丙氨酸至丝氨酸的取代。
- [0051] 在一些实施方案中,所述方法包括在收获以用于施用之前用甲氨蝶呤处理所述遗传修饰的B细胞。
- [0052] 在一些实施方案中,所述甲氨蝶呤处理为100nM至300nM。
- [0053] 在一些实施方案中,所述甲氨蝶呤处理是200nM。
- [0054] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在施用于所述对象之后在所述中枢神经系统(CNS)内的各组织中穿行。
- [0055] 在一些实施方案中,向所述对象施用所述遗传修饰的B细胞导致所述对象的不同组织中糖胺聚糖(GAG)的减少。
- [0056] 在一些实施方案中,向所述对象施用所述遗传修饰的B细胞导致所述中枢神经系统(CNS)内的组织中GAG的减少。
- [0057] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一周、两周、三周、四周、五周或六周。
- [0058] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。
- [0059] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一周、两周、三周、四周、五周或六周。
- [0060] 在一些实施方案中,所述遗传修饰的B细胞在所述中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。
- [0061] 在一些实施方案中,所述对象患有与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。

[0062] 在一些实施方案中,所述与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症由酶 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA缺乏引起。

[0063] 在一些实施方案中,所述对象患有I型黏多糖贮积症(MPS I)。

[0064] 在一些实施方案中,施用所述遗传修饰的B细胞以治疗所述对象的与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。

[0065] 在一些实施方案中,施用所述遗传修饰的B细胞以治疗所述对象的MPS I。

[0066] 本发明的其他方面和优点将很容易从本发明的以下详细描述中看出。

#### 附图简述

[0067] 为了说明本公开的目的,在附图中描绘了本公开的某些实施方案。然而,本公开不限于附图中所描绘的实施方案的精确布置和手段。

[0068] 图1描绘了来自直接向中枢神经系统施用工程化的B细胞的小鼠的完整大脑组织的IDUA活性的分析。

[0069] 图2描绘了来自直接向中枢神经系统施用工程化的B细胞的小鼠的大脑组织的GAG的分析。

[0070] 图3显示了ICV注射LUC转座的人B细胞的NSG小鼠的生物发光成像。两周一次对小鼠进行成像(IVIS)。发光强度按比例表示。

[0071] 图4显示了来自图3的生物发光成像结果的线图。

#### 详述

[0072] 酶缺乏可以导致慢性疾病和病症。酶替代疗法是目前用于通过直接输注外源性酶(治疗剂)来抵消酶缺乏以治疗此类疾病和病症的方法。然而,这种治疗方法有缺点。注射的重组治疗性蛋白的疗效受到蛋白质的有限半衰期的限制,并且可以通过治疗剂提供次最优的组织穿透。本公开解决了酶替代疗法的一些局限性,以更有效地治疗与酶缺乏相关的特定疾病和病症。

[0073] 将分化的B细胞组合物用于转基因的长期体内表达已被确定为治疗包括酶缺乏症在内的各种疾病和病症的一种有前途的策略。然而,用于施用经修饰的B细胞以用于递送治疗剂以便在体内达到试剂的治疗有效水平的方法尚未被描述。本公开提供了通过将工程化的B细胞直接施用于中枢神经系统(CNS)来施用遗传修饰的(工程化的)B细胞的方法,该方法包括表达编码修饰的人DHFR的转基因以用于在体内产生艾杜糖醛酸酶(IDUA),以用于治疗慢性疾病和病症,特别是与溶酶体储存功能障碍相关的疾病和病症。

[0074] 本文所述的实施方案部分涉及发明人的令人惊讶的发现,即通过直接注射到CNS中来施用分化的B细胞组合物导致延长的B细胞存活和转基因在CNS中的表达。此外,表达的转基因在大脑中产生了药理作用。

#### 定义

[0075] 为了便于理解本发明,本文中所使用的许多术语和缩写词被按如下定义:

[0076] 如本文所用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包括复数方面,除非上下文另有明确规定。例如,对“一种载体”的提及包括单一载体,以及两种或更多种载体;对“一个/种细胞(a cell)”的提及包括一个/种细胞,以及两个/种或更多个/种细胞;等等。

[0077] 术语“和/或”在两个或多个项目的列表中使用,意指所列项目中的任何一个可以单独使用,或者与所列项目中的任何一个或多个组合使用。例如,表达“A和/或B”旨在意

指A和B中的一个或两个,即仅A、仅B、或A和B组合。表达“A、B和/或C”旨在意指仅A、仅B、仅C、A和B组合、A和C组合、B和C组合或A、B和C组合。

[0078] 在整个本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”或诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变型将被理解为暗示包含所述元素或整数或者元素或整数的组,但不排除任何其他元素或整数,或者元素或整数的组。

[0079] 通过“由…组成”,意指包括且限于短语“由…组成”之后的任何内容。因此,短语“由…组成”表示所列元素是必需的或强制性的,并且不可能存在其他元素。通过“基本上由…组成”意指包括在短语后面列出的任何元素,并限于不干扰或有助于在公开中为列出的元素指定的活性或作用的其他元素。因此,短语“基本上由…组成”表示所列元素是必需的或强制性的,但其他元素是任选的,并且可能存在或可能不存在,这取决于它们是否影响所列元素的活性或作用。

[0080] 提及术语“例如”旨在意指“例如,但不限于”,并因此应理解,其后的内容仅为特定实施方案的实例,但绝不应被解释为限制性实例。除非另有说明,否则“例如”的使用旨在明确地表明本发明已经考虑并涵盖了其他实施方案。

[0081] 在整个本说明书中,对“实施方案(embodiment)”或“一实施方案”或“实施方案(an embodiment)”或“一些实施方案”和“某些实施方案”的提及意指结合该实施方案描述的特定特征、结构或特性被包括在本发明的至少一项实施方案中。因此,在整个本说明书的各个地方出现的短语“在一实施方案中”或“在实施方案中”或“在某些实施方案中”或“在一些实施方案中”不一定都指同一实施方案。此外,在一个或多个实施方案中,可以以任何合适的方式组合特定特征、结构或特性。

[0082] “增加的”或“增强的”量通常是“统计学上显著的”量,并且可以包括本文所述的量或水平的1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍或更多倍(例如,100、500、1000倍)(包括其间的且大于1的所有整数和小数点,例如,2.1、2.2、2.3、2.4等)的增加。类似地,“减少的”、“降低的”或“较少的”量通常是“统计学上显著的”量,并且可以包括本文所述的量或水平的约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40或50倍或更多倍(例如,100、500、1000倍)(包括其间的且大于1的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的减少。

[0083] 如本文所用的,“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括所述事件或情况发生的情况和其不发生的情况。

[0084] 如本文所用的,“实质上”或“基本上”意指充足或可观的量、数量、大小;几乎全部地或完全地;例如某一给定量的95%或更大。

[0085] 本文所使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,且并非旨在为限制性的。除非另有定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。与本文所述材料和方法类似或等效的任何材料和方法都可以被用于实践本发明。本发明的实践可以采用本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。此类技术在文献中进行了完整解释,如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版(Sambrook等人,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(MJ.Gait编辑,1984);Methods in

Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, 编辑, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney, 编辑, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather 和 P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, 和 D.G. Newell, 编辑, 1993-1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir 和 C.C. Blackwell, 编辑); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller 和 M.P. Calos, 编辑, 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel 等人, 编辑, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等人, 编辑, 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan 等人, 编辑, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway 和 P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., 编辑, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd 和 C. Dean, 编辑, Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow 和 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 和 J.D. Capra, 编辑, Harwood Academic Publishers, 1995); 和 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita 等人, 编辑, J.B. Lippincott Company, 1993)。

[0086] 术语“体外”、“离体”和“体内”在本文中旨在具有它们正常的科学含义。因此,例如,“体外”意指用分离的细胞组分进行的实验或反应,诸如例如,在试管中使用适当的底物、酶、供体和任选的缓冲液/辅因子进行的酶促反应。“离体”意指使用从生物体中移除或独立繁殖的功能器官或细胞进行的实验或反应。“体内”意指在其正常完整状态下的活的生物体内进行的实验或反应。

[0087] 如本文所用的,“哺乳动物”包括人类以及家畜如实验室动物和家养宠物(例如猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马和兔子),以及非家畜(如野生动物等)。

[0088] 如本文所用的,“对象”包括表现出疾病或症状的任何动物,或有表现疾病或症状风险的任何动物,这些动物可以用本发明的试剂治疗。合适的对象包括实验室动物(如小鼠、大鼠、兔子或豚鼠)、农场动物和家畜或宠物(如猫或狗)。包括非人类灵长类动物和优选地人类患者。

[0089] 如本文所用的,“增殖”或“扩增”是指细胞或细胞群体数量增加的能力。

[0090] 如本文所用的,“分化”或“分化的”用于指未成熟(非特化)细胞获得成为成熟(特化)细胞的特性从而获得特定形式和功能的过程和条件。干细胞(非特化的)通常暴露于不同的条件(例如生长因子和形态发生因子),以诱导所述干细胞的特定谱系定型或分化。例如,转变为浆细胞的记忆B细胞被分化。

[0091] 如本文所用的,术语“CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>+</sup>”用于指表达CD38和CD138表面标志物且不表达CD20表面标志物的细胞,其中“+”表示存在,且“-”表示不存在。因此,可替代地,术语“是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>-</sup>”用于指表达CD38表面标志物且不同时表达CD38和CD138表面标志物的细胞。

[0092] B细胞是作为抗原呈递细胞(APC)并内化抗原的特异性免疫细胞。抗原通过受体介导的内吞作用被B细胞摄取并加工。抗原被加工成抗原肽,加载到MHC II分子上,并在B细胞

胞外表面上呈递给CD4+辅助T细胞。这些T细胞与MHC II/抗原分子结合并引起B细胞的激活。在T细胞刺激后,被激活的B细胞开始分化为更特化的细胞。生殖中心B细胞可以分化为长寿的记忆B细胞或浆细胞。此外,二次免疫刺激可能导致记忆B细胞产生额外的浆细胞。在由记忆或非记忆B细胞形成浆细胞之前,会形成前体浆母细胞,其最终分化为浆细胞,所述浆细胞产生大量抗体(参见例如,Trends Immunol.2009年6月;30(6):277-285;Nature Reviews,2005,5:231-242)。浆母细胞分泌的抗体比B细胞多,但比浆细胞分泌的抗体少。它们快速分裂,且它们继续内化抗原并将抗原呈递给T细胞。浆母细胞具有迁移到趋化因子产生位点(例如在骨髓中)的能力,从而它们可以分化为长寿的浆细胞。最终,浆母细胞可能会作为浆母细胞保留几天,然后死亡,或者不可逆转地分化为成熟、完全分化的浆细胞。具体而言,能够归巢至含有浆细胞生存小生境的组织(例如,在骨髓中)的浆母细胞能够取代驻留的浆细胞,从而成为长寿的浆细胞,这些浆细胞可能会继续分泌高水平的蛋白质数年。最终分化的浆细胞通常不表达常见的泛B细胞标志物(如CD19和CD20),并且表达相对少的表面抗原。浆细胞表达CD38、CD78、CD138和白细胞介素-6受体(IL-6R),并且缺乏CD45的表达,并且这些标志物可以例如通过流式细胞术用于鉴定浆细胞。CD27也是浆细胞的良好标志物,因为幼稚B细胞是CD27-,记忆B细胞是CD27+,且浆细胞是CD27++。记忆B细胞亚群也可能表达表面IgG、IgM和IgD,而浆细胞在细胞表面上不表达这些标志物。CD38和CD138在浆细胞上以高水平表达(参见Wikipedia,The Free Encyclopedia,“Plasma cell”页面版本ID:404969441;最后修改日期:2010年12月30日09:54UTC,2011年1月4日检索;还参见:Jourdan等人.Blood.2009年12月10日;114(25):5173-81;Trends Immunol.2009年6月;30(6):277-285;Nature Reviews,2005,5:231-242;Nature Med.2010,16:123-129;Neuberger,M.S.;Honjo,T.;Alt,Frederick W.(2004).Molecular biology of B cells.Amsterdam:Elsevier,第189-191页;Bertil Glader;Greer,John G;John Foerster;Rodgers,George G.;Paraskevas,Frixos(2008).Wintrobe's Clinical Hematology,第2卷.Set.Hagerstwon,MD:Lippincott Williams&Wilkins.第347页;Walport,Mark;Murphy,Kenneth;Janeway,Charles;Travers,Paul J.(2008).Janeway's immunobiology.New York:Garland Science,第387-388页;Rawstron AC(May 2006).“Immunophenotyping of plasma cells”.Curr Protoc Cytom)。

[0093] 本文所述方法中使用的B细胞包括泛B细胞、记忆B细胞、浆母细胞和/或浆细胞。在一实施方案中,经修饰的B细胞是记忆B细胞。在一实施方案中,经修饰的B细胞是浆母细胞。在一实施方案中,经修饰的B细胞是浆细胞。

[0094] 如本文所用的,术语“分离的”用于指从天然环境中去除的分子或细胞。如本文所用的,术语“非天然存在”用于指分离的分子或细胞,其具有与天然下发现的对应物明显不同的结构。

[0095] 如本文所用的,含有“纯化细胞群”或“纯化细胞组合物”的组合物意指组合物中至少30%、50%、60%,通常为至少70%,且更优选80%、90%、95%、98%、99%或更多的细胞是所鉴定的类型。

[0096] 在本说明书中,除非另有说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值,以及在适当的情况下包括其分数(如整数的十分之一和百分之一)。术语“约(about)”,当紧挨在数值或数字之前时,意指数值或数字

的范围加或减10%。

[0097] 术语“多核苷酸”或“核酸”在本文中可互换使用,是指核苷酸的聚合物,其可以是mRNA、RNA、cRNA、cDNA或DNA。该术语通常指长度至少为10个碱基的核苷酸的聚合形式,其为核糖核苷酸或脱氧核苷酸,或任一类型核苷酸的修饰形式。该术语包括单链和双链形式的DNA。

[0098] 术语“多肽”、“肽”或“蛋白质”在本文中可互换使用,以表示通过相邻残基的 $\alpha$ -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一系列线性氨基酸残基。氨基酸残基通常是天然的“L”异构形式。然而,“D”异构形式的残基可以取代任何L-氨基酸残基,只要多肽保留所期望的功能性质。

[0099] 如本文所用的,“抗体”被理解为意指任何抗原结合分子或分子复合物,其包含与靶抗原特异性结合或特异性相互作用的至少一个互补决定区(CDR)。术语“抗体”包括全长免疫球蛋白分子,其包含通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链,以及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(其可以缩写为HCVR、VH或VH)和重链恒定区。重链恒定区通常包含三个结构域-CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(其可以缩写为LCVR、VL、VK、VK或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区通常将包含一个结构域(CL1)。VH区和VL区还可以被细分为高变区,称为互补决定区(CDR),中间穿插着更保守的区域,也被称为框架区(FR)。

[0100] 术语“宿主”、“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”或“转化的细胞”或“工程化的细胞”,其包括原代转化的细胞及其衍生的后代,而不考虑传代次数。后代在核酸含量上可能与亲本细胞不完全相同,并且可能包含突变。本文包括具有与在最初转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物活性的突变后代。宿主细胞是可用于产生本发明的抗原结合分子的任何类型的细胞系统。宿主细胞包括培养的细胞,例如培养的哺乳动物细胞,诸如但不限于B细胞。

[0101] 如本文所用的,可互换使用的术语“载体”和“构建体”可以是核酸分子,优选衍生自例如质粒、噬菌体或病毒的DNA分子,其中可以插入或克隆核酸序列。载体可以包含一个或多个独特的限制性位点,并且可能能够在包括靶细胞或组织或其祖细胞或组织的限定宿主细胞中自主复制,或者与限定宿主的基因组整合,使得克隆的序列是可复制的。因此,载体可以是自主复制的载体,即作为染色体外实体存在的载体,其复制独立于染色体复制,例如线性或闭环质粒、染色体外元件、微小染色体或人工染色体。该载体可以包含用于确保自我复制的任何工具。可替代地,载体可以是当被引入宿主细胞中时被整合到基因组中并与整合到其中的染色体一起复制的载体。载体系统可以包括单个载体或质粒、两个或更多个载体或质粒,它们一起包含要引入宿主细胞基因组中的总DNA或转座子。载体的选择通常将取决于载体与其中要引入载体的宿主细胞的兼容性。载体还可以包括选择标记(如抗生素抗性基因),其可以被用于选择合适的转化体。此类抗性基因的实例为本领域技术人员所熟知的。在一些实施方案中,载体被用于产生本发明的工程化的NK细胞或工程化的巨噬细胞。

[0102] 如本文所用的,“表达构建体”是指核酸分子,其包含治疗性蛋白的编码序列、启动子,并且可以包括其其他调控序列,所述盒可以被工程化成遗传元件和/或包装到病毒载体(例如,病毒颗粒)的衣壳中。通常,用于产生病毒载体的此类表达盒包含本文所述的构建体

序列,其侧接有病毒基因组的包装信号和其他表达控制序列(如本文所述的那些序列)。任何表达控制序列都可以使用本领域已知的技术针对特定物种进行优化(包括例如密码子优化)。

[0103] 通过本文所用的“控制元件”、“控制序列”、“调节序列”等意指在特定宿主细胞中表达可操作连接的编码序列所需的核酸序列(例如DNA)。适用于原核细胞的控制序列(例如,包括启动子),以及任选的顺式作用序列(如操作子序列和核糖体结合位点)。适用于真核细胞的控制序列包括转录控制序列(如启动子)、多腺苷酸化信号、转录增强子、翻译控制序列(如翻译增强子)和内部核糖体结合位点(IRES)、调节mRNA稳定性的核酸序列,以及将由转录的多核苷酸编码的产物靶向细胞内的胞内区室或胞外环境的靶向序列。

[0104] 如本文所用的,“生物活性(biological activity/bioactivity)”是指在体外测定中或在细胞、组织、器官或生物体(例如,动物、哺乳动物或人)中由于施用本文所包括的任何化合物、试剂、多肽、缀合物、药物组合物而诱导的任何应答。生物活性可以指激动作用或拮抗作用。生物活性可能是有益的效果;或者生物活性可能不是有益的,即毒性。在一些实施方案中,生物活性将指药物或药物组合物对活体对象(例如哺乳动物,如人类)具有的积极或消极影响。因此,术语“生物活性”意在描述如本文所述的具有生物活性的任何化合物。生物活性可以通过本领域技术人员目前已知的任何适当方式进行评估。此类测定可以是定性的或定量的。技术人员将容易理解需要采用不同的测定来评估不同多肽的活性;对于普通研究人员来说,这是一项常规任务。此类测定通常很容易在实验室环境中实施,几乎没有优化要求,并且更通常可以获得商业试剂盒,该试剂盒使用大多数实验室通用的各种技术为各种多肽提供简单、可靠和可重复的生物活性读数。当没有此类试剂盒可用时,普通技术的研究人员可以轻松地设计和优化靶多肽的内部生物活性测定,而无需过度的实验;因为这是科学过程的一个常规方面。

[0105] “治疗剂”是指当以治疗有效量施用于对象(例如,优选哺乳动物,更优选人类)时,能够实现治疗以下所限定的疾病或病况的任何化合物。

[0106] 如本文所用的,术语“治疗(treat/treating/treatment)”至少包括与患者的疾病或病况相关的症状的改善,其中改善在广义上用于指至少参数的大小降低,例如与正在治疗的病况相关的征状。由此,本文所用的“治疗”涵盖了对患有目标疾病或病况对象(优选人类的目标疾病和病况)的治疗,并且包括:(i)预防或抑制对象中该疾病或病况的发生,特别是当该对象易患该病况但尚未被诊断为患有该病况时;(ii)抑制疾病或病况,即阻止其发展;(iii)缓解疾病或病况,即使得疾病或病况消退;或(iv)缓解由该疾病或病况引起的症状。如本文所用的,术语“疾病”、“病症”和“病况”可以互换使用,或者可以不同,因为特定的疾病(malady)、损伤或病况可能没有已知的病原体(因此病因尚未确定),并因此,它尚未被视为损伤或疾病,而仅被视为不期望的病况或综合征,其中临床医生已经识别出一组或多或少特定的症状。

[0107] 如本文所用的,“治疗有效的”是指足以治疗或改善或以某种方式减轻与疾病或病症(如酶缺乏症、蛋白质缺乏症、激素缺乏症、炎症、癌症、自身免疫或感染)相关的症状的工程化的B细胞或治疗剂的量。当参考方法使用时,该方法足以有效地治疗或改善,或以某种方式减少与疾病或病况相关的症状。例如,参考疾病的有效量是足以阻断或预防其发作的量;或者如果疾病病理学已经开始,则减轻、改善、稳定、逆转或减缓疾病的进展,或者以其

他方式减少疾病的病理学后果。在任何情况下,有效量可以单次施用,或者可以分剂量施用。

[0108] 术语“组合”是指一种剂量单元形式的固定组合,或用于组合施用的部分的试剂盒,其中工程化的B细胞和治疗剂以及组合伴侣(例如,下文解释的另一种药物,也被称为“治疗剂”或“共剂”)可以在同一时间独立施用或在时间间隔内单独施用。在一些情况下,组合伴侣表现出合作效应,例如协同效应。本文所用的术语“共同施用”或“组合施用”等意在包括将所选的组合伴侣施用于有需要的单个对象(例如患者),且旨在包括不一定通过相同的施用途径或同时施用试剂的治疗方案。本文所使用的术语“药物组合”意指由超过一种的活性成分混合或组合产生的产物,并且包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”意指活性成分(例如,化合物和组合伴侣)以单一实体或剂量的形式同时施用于患者。术语“非固定组合”意指活性成分(例如化合物和组合伴侣)作为单独的实体同时、并行或顺序施用于患者,没有特定的时间限制,其中此类施用在患者体内提供了两种化合物的治疗有效水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如三种或更多种活性成分的施用。

#### 施用遗传修饰的B细胞

[0109] 本公开整体涉及通过引入核酸改变B细胞来产生治疗剂以及施用经修饰的B细胞的方法。在一些实施方案中,术语“工程化的B细胞”、“遗传工程化的B细胞”、“经修饰的B细胞”和“遗传修饰的B细胞”在本文中可互换地使用,指的是此类改变的B细胞,其包含一种或多种核酸(例如,转基因)以产生治疗剂(例如,能够表达多肽如治疗性多肽的转基因)。

[0110] 因此,本文所述的用于施用经修饰的B细胞的方法可用于B细胞向CNS的长期体内递送和治疗剂在CNS中的表达。本公开提供了用于在确保产物安全的同时实现产生治疗剂的细胞的足够富集和数量以及在CNS中实现足够水平的治疗剂的方法。

[0111] 如本文所用的,短语“长期体内存活”和“长期存活”是指本文所述的经修饰的B细胞在施用后在对象中存活10天或更多天。长期存活可测量为数天、数周或甚至数年。在一些实施方案中,大多数经修饰的B细胞在施用后在体内存活10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50天或更多天。在一些实施方案中,大多数经修饰的B细胞在施用后在体内存活2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52周或更多周。在一些实施方案中,经修饰的B细胞在体内存活1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30年或更多年。另外,虽然本文所描述的经修饰的B细胞可以在体内存活10天或更多天,但应理解大多数经修饰的B细胞在施用后在体内存活1、2、3、4、5、6、7、8、9天或更多天。因此,考虑了将本文所描述的经修饰的B细胞用于短期治疗(例如,7天)和长期治疗(例如,30天或更多天)的方法。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一周、两周、三周、四周、五周或六周。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在中枢神经系统(CNS)中持续存在至少约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一周、两周、三周、四周、五周或六周。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在中枢神经系统(CNS)中持续存在最多约一个月、两个月、三个月、四个月、五个月或六个月。

[0112] 一方面,本公开提供了向对象施用遗传修饰的B细胞以用于体内产生治疗剂的方法,其包括:向对象的中枢神经系统(CNS)施用一剂量或多剂量遗传修饰的B细胞。

[0113] 在一些实施方案中,通过遗传修饰的B细胞产生的治疗剂是艾杜糖醛酸酶(IDUA)。

[0114] 在一些实施方案中,所述施用包括输注入对象的脑脊液(CSF)中。在一些实施方案中,所述施用包括脑池内注射。在一些实施方案中,所述施用包括鞘内注射。在一些实施方案中,所述施用包括脑室内注射(ICV)。在一些实施方案中,脑室内注射(ICV)发生在一个或多个脑腔中。在一些实施方案中,一个或多个脑腔是侧脑室。在一些实施方案中,一个或多个脑腔是第三脑室。在一些实施方案中,一个或多个脑腔是大脑导水管。在一些实施方案中,一个或多个脑腔是第四脑室。

[0115] 经修饰的B细胞可以作为单一剂量或多个剂量施用。在一些实施方案中,剂量包括以次最优的单剂量浓度的遗传修饰的B细胞,其中次最优的单剂量浓度通过以下确定:(i)测试经修饰的B细胞的多个单剂量;(ii)确定经修饰的B细胞的最优单剂量浓度,其中单剂量浓度的经修饰的B细胞中存在的经修饰的B细胞剂量的增加导致治疗剂的产生;(iii)测试经修饰的B细胞的多个次最优的单剂量浓度;和(iv)确定经修饰的B细胞的次最优的单剂量,其中所产生的剂量使得相比较低剂量具有更大的线性增加,其中次最优的单剂量浓度小于或等于最优单剂量浓度剂量的约二分之一或约三分之一。在一些实施方案中,施用任选地包括一个或多个连续剂量的遗传修饰的B细胞。

[0116] 特定对象的最优剂量和治疗方案可以由医学领域的技术人员通过监测患者的疾病病征并相应地调整治疗来确定。在测量生物样品(例如体液或组织样品)中的治疗剂(例如目标基因或蛋白质)的水平后,也可以调整治疗,也可以用于评估治疗功效,并且可以相应地调整治疗以增加或减少。

[0117] 在本公开的一些方面,可以通过以下确定用于多剂量方案的经修饰的B细胞的最优剂量:首先为对象确定B细胞的最优单剂量浓度,减少最优单剂量浓度中存在的B细胞数量以提供经修饰的B细胞的次最优的单剂量浓度,以及向对象施用两剂或更多剂次最优的单剂量浓度的经修饰的B细胞。在一些方面,向对象施用2剂、3剂或更多剂次最优的单剂量浓度的经修饰的B细胞。在一些方面,向对象施用2剂、3剂或更多剂次最优的单剂量浓度的经修饰的B细胞使得在体内协同产生经修饰的B细胞经工程化以表达的治疗性多肽。在一些方面,次最优的单剂量浓度包括比最优单剂量浓度小1/2或3、4、5、6、7、8、9、10倍或更小。在一些方面,治疗性多肽是IDUA。

[0118] 在一实施方案中,向对象施用单剂量的经修饰的B细胞。在一实施方案中,向对象依次施用两剂或更多剂经修饰的B细胞。在一实施方案中,向对象依次施用三剂经修饰的B细胞。在一实施方案中,向对象每周、每两周、每月、每两个月、每季度、每半年、每年或每两年施用一剂经修饰的B细胞。在一实施方案中,当经修饰的B细胞产生的治疗剂的量减少时,向对象施用第二剂或随后剂量的经修饰的B细胞。

[0119] 在一些实施方案中,可以施用 $10^6$ /千克范围内的更低数量的B细胞。在一些实施方案中,以 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 或 $1 \times 10^{12}$ 个细胞向对象施用B细胞。

[0120] 在一些实施方案中,以某一频率(例如,每周、每两周、每月、每两个月或每季度)向对象施用一定剂量的经修饰的B细胞,直到在对象中检测到所期望量(例如,有效量)的治疗

剂。在一些实施方案中,监测对象中治疗剂的量。在一实施方案中,当经修饰的B细胞所产生的治疗剂的量降低到所期望的量以下时,向对象施用随后剂量的经修饰的B细胞。在一些实施方案中,所期望的量是产生所期望效果的范围。例如,在用于减少患有MPS I的个体中的糖胺聚糖(GAG)的量的方法中,所期望的IDUA的量是与不存在IDUA时的GAG水平相比降低某一组织中GAG水平的量。

[0121] 本公开的B细胞也可以使用任何数量的基质施用。基质在组织工程化的背景下已经使用了很多年(参见,例如Principles of Tissue Engineering (Lanza, Langer, 和Chick (编辑), 1997)。本公开在用作人工淋巴器官来支持和维持B细胞的新背景下利用此类基质。因此,本公开可以利用那些已经证明在组织工程化中有用的基质组合物和制剂。因此,可用于本公开的组合物、装置和方法中的基质类型实际上是无限的,并且可包括生物基质和合成基质。在一特定实例中,利用了由第5,980,889号;第5,913,998号;第5,902,745号;第5,843,069号;第5,787,900号;或第5,626,561号美国专利所示的组合物和装置。基质包括当施用于哺乳动物宿主时通常与生物相容性相关的特征。基质可以由天然和/或合成材料形成。在期望在动物体内留下永久性结构或可移除结构(如植入物)的情况下,基质可以是不可生物降解的;或可生物降解的。基质可以采取海绵、植入物、管、telfa垫、纤维、中空纤维、冻干组分、凝胶、粉末、多孔组合物或纳米颗粒的形式。另外,可以设计基质以允许持续释放接种的细胞或所产生的细胞因子或其他活性剂。在某些实施方案中,本公开的基质是柔性和弹性的,并且可以被描述为半固体支架,其对诸如无机盐、水性流体和包括氧气在内的溶解的气体试剂的物质是可渗透的。

[0122] 本文使用基质作为生物相容性物质的实例。然而,本公开不限于基质,并因此,无论术语基质(matrix/matrices)出现在哪里,这些术语都应该被理解为包括允许细胞保留或细胞穿越的装置和其他物质,其是生物相容的,并且能够允许大分子直接穿过该物质,使得该物质本身是半渗透膜或者与特定的半渗透物质结合使用。

[0123] 在一些实施方案中,对象是哺乳动物。在一些实施方案中,对象是人。

[0124] 在一些实施方案中,对象患有与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。在一些实施方案中,与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症由酶 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)缺乏引起。在一些实施方案中,对象患有I型黏多糖贮积症(MPS I)。在一些实施方案中,施用遗传修饰的B细胞以治疗对象的与溶酶体储存功能障碍相关的疾病或病症。在一些实施方案中,施用遗传修饰的B细胞以治疗对象的MPS I。

[0125] 在一些实施方案中,施用遗传修饰以表达IDUA的B细胞(IDUA+B细胞)被用于治疗患有或怀疑患有MPS I的对象。在一些实施方案中,向对象施用单一最优剂量的IDUA+B细胞。在一些实施方案中,向对象施用两剂或更多剂IDUA+B细胞。在一些实施方案中,向对象施用的两剂或更多剂IDUA+B细胞包含比单一最优剂量IDUA+B细胞更少的IDUA+B细胞。在一些实施方案中,当以低于IDUA+B细胞的最大有效单剂量的IDUA+B细胞剂量向对象施用两剂或更多剂IDUA+B细胞时。在一些实施方案中,向对象施用IDUA+B细胞使得在健康对照对象中见到的正常水平的IDUA。在一些实施方案中,向对象施用IDUA+B细胞导致对象中大于正常水平的IDUA。在一些实施方案中,向对象施用IDUA+B细胞使得对象中的GAG水平降低至正常水平。在一些实施方案中,向对象施用IDUA+B细胞将对象中的GAG水平降低至小于对象中GAG的正常水平。

### 治疗剂

[0126] 如本文所用的,“目标基因”或“基因”或“目标核酸”是指要在靶转染细胞中表达的转基因。虽然可以使用术语“基因”,但这并不意味着这是一种在基因组DNA中发现的基因,并且可以与术语“核酸”互换使用。通常,目标核酸提供用于编码治疗剂的合适核酸,并且可以包括cDNA或DNA,并且可以包括或不包括内含子,但通常不包括内含子。如其他地方所指出的,目标核酸与表达控制序列可操作地连接,以在靶细胞中实现目标蛋白质的有效表达。在一些实施方案中,本文所述的载体可以包含一个或多个目标基因,并且可以包括2个、3个、4个或5个或更多个目标基因。

[0127] 如本文所述的由遗传修饰的B细胞递送的治疗剂可以是蛋白质。用于本文所述用途的目标蛋白质包括提供所期望活性的任何蛋白质。在这方面,目标蛋白质包括但不限于酶。

[0128] 在一些实施方案中,目标核酸编码蛋白质。在一些实施方案中,目标核酸编码酶。在一些实施方案中,目标核酸编码用于治疗溶酶体储存障碍的酶。在一些实施方案中,目标核酸编码艾杜糖醛酸酶(IDUA)。

[0129] 在一些实施方案中,通过经修饰的B细胞产生的治疗剂是蛋白质。在一些实施方案中,通过遗传修饰的B细胞产生的治疗剂是酶。在一些实施方案中,通过遗传修饰的B细胞产生的治疗剂是艾杜糖醛酸酶(IDUA)。

[0130] 因此,本公开提供了用于遗传修饰B细胞的编码本公开的治疗剂(例如,目标蛋白质)的多核苷酸(分离的或纯化的或纯的多核苷酸)、包含此类多核苷酸的载体(包括克隆载体和表达载体),以及用根据本公开的多核苷酸或载体转化或转染的细胞(例如宿主细胞)。在某些实施方案中,考虑了编码本公开的目标蛋白质的多核苷酸(DNA或RNA)。本文还考虑了编码目标蛋白质的表达盒。

[0131] 本公开还涉及包括本公开的多核苷酸的载体,且特别涉及重组表达构建体。在一实施方案中,本公开考虑了包含编码本公开的蛋白质的多核苷酸,以及引起或促进此类蛋白质编码序列的转录、翻译和加工的其他多核苷酸序列的载体。用于原核和真核宿主的合适的克隆和表达载体描述于,例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,NY,(1989)中。示例性的克隆/表达载体包括克隆载体、穿梭载体和表达构建体,其可以基于质粒、噬菌粒、噬粒、粘粒、病毒、人工染色体或本领域已知的适合于扩增、转移和/或表达其中包含的多核苷酸的任何核酸媒介物。

### 细胞和组合物

[0132] 在一些实施方案中,本文所述的经修饰的B细胞已在体外被激活/分化,并被转染以表达如本文所述的治疗剂。在一些实施方案中,本文所述的经修饰的B细胞已在体外被激活/分化并被工程化(例如,使用靶向转基因整合方法,如锌指核酸酶、TALEN、大范围核酸酶或CRISPR介导的转基因整合)以表达本文所述的治疗剂。在一些实施方案中,所述组合物包含已分化成血浆B细胞、已被转染或以其他方式工程化并表达一种或多种目标蛋白质的B细胞。靶细胞群(如本公开的转染的或以其他方式工程化的和激活的B细胞群)可以单独施用,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分(如细胞因子或细胞群)组合施用。

[0133] 在一实施方案中,在经修饰的B细胞对特定的化学引诱剂具有最佳迁移能力的时间点,在体外激活/分化后,从培养物中收获已被工程化为表达一种或多种目标蛋白质的经

修饰的B细胞。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在B细胞培养的第7天、第8天或第9天。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在转染或工程化后B细胞培养的第5天、第6天或第7天。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在转染或工程化后B细胞培养的第8天,或在比转染或工程化后第8天更晚的培养时间(例如,第9天、第10天、第11天、第12天、第13天、第14天、第15天、第16天、第17天、第18天、第19天、第20天或比第20天更晚)。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在B细胞培养的第10天之前。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在转染或工程化后B细胞培养的第8天之前。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在B细胞培养的第6天或第7天。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在转染或工程化后B细胞培养的第4天或第5天。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在B细胞培养的第9天之前。在一些实施方案中,最佳迁移能力可以在转染或工程化后B细胞培养的第7天之前。在一些实施方案中,最佳迁移能力对于归巢至CXCL12的经修饰的B细胞是最优的。在一些实施方案中,最佳迁移能力对于归巢至接收经修饰的B细胞的一次或多次施用的对象的骨髓的经修饰的B细胞是最优的。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在培养的约第7天至约第9天以至CXCL12和/或对象的骨髓的最佳迁移能力施用对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在转染或工程化后培养的约第5天至约第7天以至CXCL12和/或对象的骨髓的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在培养的约第10天之前以至CXCL12和/或对象的骨髓的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在转染或工程化后培养的约第8天之前以至CXCL12和/或对象的骨髓的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,最佳迁移能力对于归巢至CXCL13的经修饰的B细胞是最优的。在一些实施方案中,最佳迁移能力对于归巢至接收经修饰的B细胞的一次或多次施用的对象中的炎症位点的经修饰的B细胞是最优的。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在培养的约第6天或约第7天以至CXCL13和/或对象中的炎症位点的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在转染或工程化后培养的约第4天或约第5天以至CXCL13和/或对象中的炎症位点的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在培养的约第10天之前以至CXCL13和/或炎症位点的最佳迁移能力施用于对象。在一些实施方案中,收获B细胞,以用于在转染或工程化后培养的约第8天之前以至CXCL13和/或炎症位点的最佳迁移能力施用于对象。

[0134] 在一些实施方案中,最佳迁移能力对于归巢至CXCL12和CXCL13的经修饰的B细胞是最优的。在一些实施方案中,在B细胞培养的第7天收获对于归巢至CXCL12和CXCL13为最佳迁移能力的B细胞。在一些实施方案中,在转染或工程化后B细胞培养的第5天收获对于归巢至CXCL12和CXCL13为最佳迁移能力的B细胞。

[0135] 在一些实施方案中,当至少约20%的B细胞在趋化性测定中迁移到特定的化学引诱剂时,收获工程化的B细胞。例如,但不限于此,当至少约20%的B细胞在趋化性测定中迁移到CXCL12时,可以收获工程化的B细胞(例如,其产生IDUA)。或者,在另一非限制性实例中,当至少约20%的B细胞在趋化性测定中迁移到CXCL13时,可以收获工程化的B细胞(例如,其产生IDUA)。此外,当至少约30%的B细胞在趋化性测定中迁移到特定的化学引诱剂(例如,CXCL12或CXCL13)时,或者当至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%或至少约70%的B细胞在趋化性测定中迁移到特定的化学引诱物(例如,CX3L12或CXCL3)时,可以收获工程化的B细胞(例如,其产生IDUA)。此外,当超过70%的B细胞在趋化性测定中迁移时,可以

收获工程化的B细胞(例如,其产生IDUA)。此类趋化性测定是本领域已知的,并在本文中进行了描述(参见例如,本文的实施例6)。

[0136] 简言之,本公开的细胞组合物可以包含分化和激活的B细胞群与一种或多种药学或生理学可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合,所述B细胞群已被转染并表达本文所述的治疗剂。此类组合物可以包含缓冲剂,如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水、乳酸林格溶液等;碳水化合物,如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或右旋糖酐、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。本公开的组合物优选被配制用于直接注射到中枢神经系统中。

[0137] 在一些实施方案中,经修饰的B细胞可以包含药物组合物。

[0138] 如本文所用的,术语“药物组合物”是指药物可接受的组合物,其中所述组合物包含工程化的B细胞,并且在一些实施方案中还包含药学上可接受的载体。

[0139] 如本文所用的,术语“药学上可接受的”意指经联邦或州政府监管机构批准,或在美国药典、其他公认药典中列出,以及在动物中,且更特别是在人类和/或非人类哺乳动物中安全使用的其他制剂。

[0140] 如本文所用的,术语“药学上可接受的载体”或“药学上有效的赋形剂”是指与其一起施用工程化的B细胞的赋形剂、稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或媒介物。此类载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂。抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖也可以是载体。用于产生与载体组合的组合作用的方法是本领域技术人员已知的。在一些实施方案中,语言“药学上可接受的载体”旨在包括与药物施用兼容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途在本领域是众所周知的。参见例如Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 第20版, (Lippincott, Williams&Wilkins 2003)。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则可以考虑组合物中的此类用。

[0141] 适合施用的药物组合物的制剂通常包含与药学上可接受的载体(如无菌水或无菌等渗盐水)组合的活性成分。此类制剂可以以适合团注施用或连续施用的形式制备、包装或出售。可注射制剂可以以单位剂型制备、包装或销售,如在安瓿或含有防腐剂的多剂量容器中。用于施用的制剂包括但不限于混悬液、溶液、油性或水性媒介物中的乳液、糊剂等。此类制剂还可以包含一种或多种另外的成分,其包括但不限于混悬剂、稳定剂或分散剂。制剂还可以包括水性溶液,其可以含有赋形剂(如盐)、碳水化合物和缓冲剂,或者无菌的、无热原的水。示例性的施用形式可以包括无菌水性溶液中的溶液或混悬液,例如丙二醇水溶液或葡萄糖水溶液。如果需要的话,此类剂型可以被适当地缓冲。

[0142] 本发明的组合物可以另外包含在药物组合物中常规发现的其他辅助组分。因此,例如,组合物可以含有另外的、相容的药学活性物质,诸如例如止痒剂、收敛剂、局部麻醉剂或抗炎剂,或者可以含有可用于物理配制本发明组合物的各种剂型的另外物质,如染料、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、增稠剂和稳定剂。然而,当添加此类物质时,其不应过度干扰本公开的组合物组分的生物活性。制剂可以消毒,并且如果需要,可以与与制剂无有害相互作用的助剂,例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着

色剂和/或芳香物质等混合。

[0143] 在一些实施方案中,一种或多种药物活性成分可与工程化的B细胞组合使用。

[0144] 在一些实施方案中,将使用本文所述方法或本领域已知的其他方法转染和激活的B细胞结合(例如在之前、同时或之后)任何数量的相关治疗模式施用于患者,包括但不限于用诸如抗病毒剂的试剂,化学疗法,辐射,免疫抑制剂(如环孢菌素、bisulfin、硼替佐米、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、霉酚酸酯和FK506)、抗体或其他免疫消融剂(如CAMPATH)、抗CD3抗体或其他抗体疗法、细胞毒素、氟达拉滨(fiudarabine)、环孢霉素、FK506、雷帕霉素、霉酚酸、类固醇、FR901228、细胞因子和辐射进行治疗。这些药物抑制钙依赖性磷酸酶钙调磷酸酶(环孢菌素和FK506)、蛋白酶体(硼替佐米),或抑制对生长因子诱导的信号传导很重要的p70S6激酶(雷帕霉素)。(Liu等人,Cell 66:807-815,1991;Henderson等人,Immun.73:316-321,1991;Bierer等人,Curr.Opin.Immun.5:763-773,1993;Isoniemi(同上))。

[0145] 施用于患者的上述组合物的剂量将随着所治疗的病况的确切性质和治疗的接受者而变化。用于人类施用的剂量缩放可以根据领域接受的实践进行。

[0146] 在一些实施方案中,在施用之前评估细胞组合物的纯度。在一些实施方案中,对细胞组合物进行治疗剂产生的稳健性测试。在一些实施方案中,对细胞组合物进行无菌性测试。在一些实施方案中,对细胞组合物进行筛选以确认其与受体对象匹配。

[0147] 在一些实施方案中,细胞组合物在4°C下储存和/或运输。在另一实施方案中,将细胞组合物冷冻以用于储存和/或运输。细胞组合物可以在例如-20°C或-80°C下冷冻。在一些实施方案中,冷冻细胞组合物的步骤包括液氮。在一实施方案中,使用控制速率的冷冻器冷冻细胞组合物。因此,本文所述的方法还可以包括解冻步骤。

#### 工程化的B细胞

[0148] 在本文所述方法的某些实施方案中,可以使用技术人员已知的任何数量的技术,如FICOLL™(可用于制备高密度溶液的蔗糖和环氧氯丙烷的共聚物)分离,从对象收集的单元血液中获得B细胞。B细胞可以从多种来源获得,包括外周血单个核细胞(PBMC)、骨髓、淋巴组织、脐带血、来自感染部位的组织、脾脏组织和肿瘤。在一些实施方案中,通过单采或白细胞分离获得来自个体循环血液的细胞。单采产品通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。在一些实施方案中,可以洗涤通过单采收集的细胞以除去血浆部分,并将细胞置于适当的缓冲液或培养基中用于随后的处理步骤。在本文所述方法的一实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在可替代实施方案中,洗涤溶液缺乏钙并且可以缺乏镁,或者可以缺乏许多(如果不是全部的话)二价阳离子。正如本领域普通技术人员容易理解的那样,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法来完成,如根据制造商的说明书使用半自动“流通式”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器)。洗涤后,可以将细胞重悬在各种生物相容性缓冲液中,诸如例如PBS。可替代地,可以去除单采样品中不期望的组分,并将细胞直接重悬在培养基中。

[0149] 可以使用本领域已知的技术从外周血或白细胞采集物中分离B细胞。例如,可以使用FICOLL™(Sigma-Aldrich,圣路易斯,MO)和通过使用本领域已知的各种抗体,如Rosette四聚体复合物系统(StemCell Technologies,温哥华,加拿大)或MACS™微珠技术(Miltenyi Biotec,圣地亚哥,CA)中的任何一种的阴性或阳性选择纯化的CD 19+B细胞分离PBMC。在一些实施方案中,如Jourdan等人(Blood.2009年12月10日;114(25):5173-81)所述分离记忆B

细胞。例如,在使用抗CD2磁珠去除CD2<sup>+</sup>细胞后,可以通过FACS分选CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>记忆B细胞。可以使用抗CD138磁性微珠分选或其他类似的方法和试剂纯化骨髓浆细胞(BMPC)。可以分离人B细胞,例如使用CD19微珠,人(Miltenyi Biotec,圣地亚哥,CA)。可以分离人记忆B细胞,例如,使用记忆B细胞分离试剂盒,人(Miltenyi Biotec,圣地亚哥,CA)。

[0150] 其他分离试剂盒可商购获得,如R&D系统的MagCelect人B细胞分离试剂盒(Minneapolis,MN)。在一些实施方案中,静息B细胞可以通过在不连续的Percoll梯度上沉淀来制备,如(Defranco等人,(1982)J.Exp.Med.155:1523)中所述。

[0151] 在一些实施方案中,使用基于梯度的纯化(例如,FICOLL™)从血液样本中获得外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方案中,PBMC是从基于单采的收集中获得的。在一实施方案中,通过分离泛B细胞从PBMC中分离B细胞。分离步骤可以利用正选择和/或负选择。在一些实施方案中,负选择包括使用抗CD3缀合的微珠耗尽T细胞,从而提供T细胞耗尽部分。在一些实施方案中,通过CD27的正选择将记忆B细胞从泛B细胞或T细胞耗尽部分分离。在一特定实施方案中,通过耗尽不需要的细胞并随后用CD27微珠进行正选择来分离记忆B细胞。不需要的细胞,例如T细胞、NK细胞、单核细胞、树突状细胞、粒细胞、血小板和红系细胞,可以使用针对CD2、CD14、CD16、CD36、CD43和CD235a(血型糖蛋白A)的生物素化抗体和抗生物素微珠的混合物来耗尽。

[0152] 在一些实施方案中,获得切换的记忆B细胞。本文使用的“切换的记忆B细胞”或“切换的B细胞”是指经历了同种型类切换的B细胞。在一些实施方案中,切换的记忆B细胞被针对IgG进行正选择。在一些实施方案中,通过耗尽表达IgD和IgM的细胞来获得切换的记忆B细胞。可以例如使用切换的记忆B细胞试剂盒,人(Miltenyi Biotec,圣地亚哥,CA)分离切换的记忆B细胞。

[0153] 例如,在一些实施方案中,可以用生物素化的CD2、CD14、CD16、CD36、CD43、CD235a(血型糖蛋白A)、抗IgM和抗IgD抗体的混合物标记非靶标细胞。这些细胞随后可以用抗生物素微珠进行磁性标记。可以通过耗尽磁性标记的细胞来获得高纯度的切换的记忆B细胞。

[0154] 在一些实施方案中,来自记忆B细胞独特基因的启动子序列,诸如例如CD27基因(或其他记忆B细胞特异性且未在幼稚B细胞中表达的基因),被用于驱动选择性标志物的表达,诸如例如突变的二氢叶酸还原酶,从而允许在甲氨蝶呤存在下对记忆B细胞进行正选择。在另一实施方案中,来自泛B细胞基因,诸如例如CD19基因的启动子序列用于驱动选择性标志物,诸如例如突变的二氢叶酸还原酶的表达,从而允许在甲氨蝶呤存在下对记忆B细胞进行正选择。在另一实施方案中,使用CD3或通过添加环孢菌素来耗尽T细胞。在一些实施方案中,通过正选择从泛B细胞中分离CD138<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,通过正选择从PBMC中分离CD138<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,通过正选择从泛B细胞中分离CD38<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,通过正选择从PBMC中分离CD38<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,通过正选择从PBMC中分离CD27<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,使用本领域可用的体外培养方法从PBMC中选择性扩增记忆B细胞和/或浆细胞。

[0155] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞与对象是自体同源的。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞与对象是同种异体的。

[0156] B细胞(如记忆B细胞)可以使用体外方法进行培养,以激活B细胞并将其分化为浆细胞或浆母细胞或两者。如本领域技术人员所认识到的,可以使用标准流式细胞术方法通

过细胞表面蛋白表达模式来鉴定浆细胞。例如,终末分化的浆细胞表达相对较少的表面抗原,并且不表达常见的泛B细胞标志物(如CD19和CD20)。相反,浆细胞可以通过CD38、CD78、CD138和IL-6R的表达以及CD45的缺乏表达来鉴定。CD27也可以被用于鉴定浆细胞,因为幼稚B细胞是CD27<sup>-</sup>,记忆B细胞是CD27<sup>+</sup>,且浆细胞是CD27<sup>++</sup>。浆细胞表达高水平的CD38和CD138。

[0157] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>+</sup>。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞是CD20<sup>-</sup>、CD38<sup>+</sup>和CD138<sup>-</sup>。

[0158] 如本文所用的,除非针对病毒载体另有说明,否则“载体”意指能够运输与其连接的另一种核酸的核酸分子。示例性载体包括质粒、微环、转座子(例如,睡美人转座子)、酵母人工染色体、自我复制RNA和病毒基因组。某些载体可以在宿主细胞中自主复制,而其他载体可以整合到宿主细胞的基因组中,并从而与宿主基因组一起复制。另外,某些载体在本文中被称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”),其包含与表达控制序列可操作地连接的核酸序列,并因此能够指导那些序列的表达。在某些实施方案中,表达构建体衍生自质粒载体。说明性构建体包括经修饰的pNASS载体(Clontech,帕洛阿尔托,CA),其具有编码氨苄青霉素抗性基因、多腺苷酸化信号和T7启动子位点的核酸序列;pDEF38和pNEF38(CMC ICOS Biologies, Inc.),其具有CHEF1启动子;以及具有CMV启动子的pD18(Lonza)。其他合适的哺乳动物表达载体是众所周知的(参见例如Ausubel等人,1995; Sambrook等人,同上;还参见例如来自Invitrogen,圣地亚哥,CA;Novagen,麦迪逊,WI;Pharmacia,皮斯卡塔韦,NJ的目录)。

[0159] 可以制备有用的构建体,其包括在适当的调控控制下编码二氢叶酸还原酶(DHFR)的序列,以用于促进融合蛋白的生产水平的提高,该水平是在应用适当的选择剂(例如,甲氨蝶呤)后基因扩增的结果。在一实施方案中,使用编码治疗基因(例如,IDUA)的双功能转座子以及耐药DHFR,组合在甲氨蝶呤(MTX)中孵育以富集成功转座的B细胞,产生更有效的产物。

[0160] 通常,如上所述的,重组表达载体将包括复制起点和允许宿主细胞转化的选择性标记,以及衍生自高表达基因的启动子,以直接转录下游结构序列。根据本公开的与多核苷酸可操作连接的载体产生克隆或表达构建体。示例性克隆/表达构建体包含与本公开的多核苷酸可操作地连接的至少一种表达控制元件,例如启动子。在根据本公开的载体和克隆/表达构建体中也考虑了另外的表达控制元件,如增强子、因子特异性结合位点、终止子和核糖体结合位点。根据本公开的多核苷酸的异源结构序列与翻译起始和终止序列在适当阶段组装。因此,例如,本文提供的编码核酸可以包含在各种表达载体构建体(例如,微环)中的任何一种中,作为用于在宿主细胞中表达此类蛋白质的重组表达构建体。

[0161] 适当的DNA序列可以插入载体中,例如通过各种程序。通常,通过本领域已知的程序将DNA序列插入适当的限制性内切核酸酶切割位点中。考虑了用于克隆、DNA分离、扩增和纯化的标准技术,以用于涉及DNA连接酶、DNA聚合酶、限制性内切核酸酶等的酶促反应,以及各种分离技术。例如,多种标准技术描述于Ausubel等人.(Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA, 1993); Sambrook等人.(Molecular Cloning, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1989); Maniatis等人.(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor

Laboratory, Plainview, NY, 1982); Glover (Ed.) (DNA Cloning 第I卷和第II卷, IRL Press, Oxford, UK, 1985); Hames和Higgins (编辑) (Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK, 1985); 和其他地方中。

[0162] 表达载体中的DNA序列与至少一种合适的表达控制序列(例如组成型启动子或调节型启动子)可操作地连接,以指导mRNA合成。此类表达控制序列的代表性实例包括如上所述的真核细胞或其病毒的启动子。可以使用CAT(氯霉素转移酶)载体、卡那霉素载体或具有选择性标记的其他载体从任何期望的基因中选择启动子区域。真核启动子包括CMV立即早期、HSV胸苷激酶、早期和晚期SV40、来自逆转录病毒的LTR、E2F、EF1 $\alpha$ 和小鼠金属硫蛋白-1。合适的载体和启动子的选择完全在本领域普通技术人员的水平内,并且本文描述了某些特别优选的重组表达构建体的制备,所述优选的重组表达构建体包含至少一个可操作地连接到编码根据本公开的蛋白质或多肽的核酸的启动子或调节的启动子。

[0163] 在一些实施方案中,质粒可以包含SEQ ID NO:1的序列。在一些实施方案中,质粒可以由SEQ ID NO:1的序列组成。在一些实施方案中,质粒可以包含与SEQ ID NO:1至少约60%相同的序列或由其组成。在一些实施方案中,质粒可以包含与SEQ ID NO:1至少约85%相同,或与SEQ ID NO:1至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%相同的序列或由其组成。

[0164] 也考虑了本公开的多核苷酸的变体。变体多核苷酸与如本文所述的限定序列的多核苷酸之一,或者在约65-68°C下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠或约42°C下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺的严格杂交条件下或与限定序列的那些多核苷酸之一杂交的那些至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%,且优选地95%、96%、97%、98%、99%或99.9%相同。多核苷酸变体保留了编码具有本文所述功能的结合结构域或其融合蛋白的能力。

[0165] 在一些实施方案中,用转基因转染遗传修饰的B细胞。WO 2014/152832和WO 2016/100932中提供了用于转染B细胞的示例性方法,这两种方法都通过引用整体并入本文中。可以使用本领域中可用的将DNA或RNA引入B细胞中的各种方法中的任何一种来完成B细胞的转染。合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、压力介导的转染或“细胞挤压”(例如,CellSqueeze微流体系统、SQZ生物技术)、纳米粒子介导或脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒,例如痘苗的转导。参见例如,Graham等人.,1973,Virology 52:456; Sambrook等人,2001,Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis等人,1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu等人,1981, Gene 13:197; US 5,124,259; US 5,297,983; US 5,283,185; US 5,661,018; US 6,878,548; US 7,799,555; US 8,551,780; 和US 8,633,029。适用于B细胞的可商购获得的电穿孔技术的一个实例是Nucleofector<sup>TM</sup>转染技术。转染可以在分离的B细胞的体外培养之前或期间在存在一种或多种上述激活和/或分化因子的情况下发生。例如,在体外培养的第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38或39天转染细胞。在一些实施方案中,在体外培养的第1天、第2天或第3天转染细胞。在一些实施方案中,在第2天转染细胞。例如,在体外培养的第2天对细胞进行电穿孔,以用于递送例如质粒、转座子、微环或自复制RNA。在另一实施方案中,在体外培养的第4、5、6或7天转染细胞。在一些实施方案中,在体外培养的第

6天转染细胞。在另一实施方案中,在体外培养的第5天转染细胞。

[0166] 在一些实施方案中,细胞在激活前被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。在一些实施方案中,细胞在激活期间被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。在一些实施方案中,细胞在激活后被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。在一些实施方案中,细胞在分化之前被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。在一些实施方案中,细胞在分化期间被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。在一些实施方案中,细胞在分化后被转染或以其他方式被工程化(例如,经由转基因的靶向整合)。

[0167] 在一些实施方案中,非病毒载体被用于将DNA或RNA递送至记忆B细胞和/或浆细胞。例如,可以在不需要病毒整合系统的情况下促进记忆B细胞和/或浆细胞的转染的系统包括但不限于转座子(例如,睡美人转座子系统)、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、大范围核酸酶、小环、复制子、人工染色体(例如细菌人工染色体、哺乳动物人工染色体和酵母人工染色体)、质粒、粘粒和噬菌体。

[0168] 在一些实施方案中,使用睡美人转座子制备遗传修饰的B细胞,以在B细胞中表达治疗剂。在一些实施方案中,使用重组病毒载体制备遗传修饰的B细胞,以在B细胞中表达治疗剂。在一些实施方案中,重组病毒载体编码重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒或重组腺相关病毒。

[0169] 在一些实施方案中,也可以经由本领域已知的或下文描述的病毒载体递送此类非病毒依赖性载体系统。例如,在一些实施方案中,病毒载体(例如,逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒)被用于递送一种或多种非病毒载体(诸如例如,以下中的一种或多种:上述锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)、成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)、大范围核酸酶或能够促进靶向整合的任何其他的酶/互补载体、多核苷酸和/或多肽。因此,在一些实施方案中,细胞(例如,B细胞如记忆B细胞和/或浆细胞)可经由靶向整合方法被工程化为表达外源序列(例如,编码治疗多肽如IDUA的序列)。此类方法是本领域已知的,并且可以包括使用一种或多种核酸酶(例如ZFN、TALEN、CRISPR/Cas、大范围核酸酶)切割细胞中的内源性基因座,并将转基因施用细胞,使其整合到内源性基因座中并在细胞中表达。转基因可以包含在供体序列中,所述供体序列在核酸酶切割点处或附近整合到宿主细胞的DNA中。在一些实施方案中,通过B细胞基因组的基因编辑或通过靶向整合到编码治疗剂的多核苷酸序列的B细胞的基因组中,来制备遗传修饰的B细胞。

[0170] 在一些实施方案中,靶向整合包括锌指核酸酶介导的基因整合、CRISPR介导的基因整合或基因编辑、TALE-核酸酶介导的基因整合或大范围核酸酶介导的基因整合。在一些实施方案中,多核苷酸的靶向整合经由同源重组发生。在一些实施方案中,靶向整合包括能够在靶位点处诱导DNA切割的核酸酶的病毒载体介导的递送。在一些实施方案中,核酸酶是锌指核酸酶、Cas核酸酶、TALE-核酸酶或大范围核酸酶。

[0171] 外源性序列(例如,编码治疗多肽如IDUA的序列)的整合可以经由重组发生。如本领域技术人员将清楚的,“重组”是指两种多核苷酸之间的遗传信息交换过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)和同源重组的供体捕获。所述重组可以是同源重组。为了本公开的目的,“同源重组(HR)”是指此类交换的特定形式,其例如,在经由同源定向修复机制

修复细胞中的双链断裂期间发生。该过程利用核苷酸序列同源性,由此“供体”分子(例如,供体多核苷酸序列或包含此类序列的供体载体)被细胞的DNA修复机制用作模板,以修复“靶”分子(即经历双链断裂的分子),并且通过这些方式使遗传信息从供体转移到靶标。在HR定向整合的一些实施方案中,供体分子可以包含至少2个与基因组同源的区域(“同源臂”)。在一些实施方案中,同源臂的长度可以是例如至少50-100个碱基对。同源臂可以与其中将发生靶向整合的切割位点两侧的基因组DNA区域具有实质性的DNA同源性。供体分子的同源臂可以侧接位于要整合到靶基因组或靶DNA基因座中的DNA。染色体的断裂,然后使用质粒DNA的同源区作为模板进行修复,可能导致侧接同源臂的插入转基因转移到基因组中。参见例如,Roller等人.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA.86(22):8927-8931;Thomas等人.(1986)Cell 44(3):419-428。通过在靶区域附近故意产生双链断裂,这类同源定向靶向整合的频率可以增加高达105倍(Hockemeyer等人.(2009)Nature Biotech.27(9):851-857;Lombardo等人.(2007)Nature Biotech.25(11):1298-1306;Moehle等人.(2007)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 104(9):3055-3060;Rouet等人.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(13):6064~6068。

[0172] 根据本公开,任何能够介导基因组基因座的靶向切割从而使转基因可以整合到靶细胞的基因组中(例如,通过重组,如HR)的核酸酶都可以被用于工程化细胞(例如,记忆B细胞或浆母细胞)。

[0173] 可通过位点特异性核酸酶如锌指核酸酶(ZFN)、TAL效应子结构域核酸酶(TALEN)、大范围核酸酶,或使用具有工程化的crRNA/tract RNA(单向导RNA)的CRISPR介导的系统以引导特异性切割,来产生双链断裂(DSB)或缺口。参见,例如,Burgess(2013)Nature Reviews Genetics14:80-81;Umov等人.(2010)Nature 435(7042):646-51;第2003/0232410号;第2005/0208489号;第2005/0026157号、第2005/0064474号;第2006/0188987号、第2009/0263900号;第2009/0117617号;第2010/0047805号;第2011/0207221号;第2011/0301073号美国专利公开,以及第WO 2007/014275号国际专利公开,其公开内容通过引用整体并入本文中,用于所有目的。

[0174] 在一些实施方案中,经由锌指核酸酶介导的供体构建体的靶向整合来工程化细胞(例如,记忆B细胞或浆母细胞)。锌指核酸酶(ZFN)是一种由于通过一个或多个锌指以序列特异性方式结合DNA的“锌指DNA结合蛋白”(ZFP)(或结合结构域)与核酸酶的偶联能够以特异性识别并切割靶标核苷酸序列的酶。ZFN可以包括任何合适的切割结构域(例如,核酸酶),所述切割结构域可操作地连接到ZFP DNA结合结构域以形成工程化的ZFN,其可以促进靶标DNA序列的位点特异性切割(参见例如,Kim等人.(1996)Proc Natl Acad Sci USA 93(3):1156-1160)。例如,ZFN可以包括与FORI酶或FOK1酶的一部分连接的靶标特异性ZFP。在一些实施方案中,在ZFN介导的靶向整合方法中使用的ZFN利用两种单独的分子,每种分子包含各自与ZFP结合的FOK1酶的亚基,每种ZFP对侧接靶切割位点的DNA序列具有特异性,并且当两种ZFP与它们各自的靶标DNA位点结合时,FOK1酶亚基彼此接近并且它们结合在一起,激活切割靶标切割位点的核酸酶活性。ZFN已被用于多种生物体中的基因组修饰(例如,美国专利公开20030232410;20050208489;20050026157;20050064474;20060188987;20060063231;和国际公开WO 07/014,275,其通过引用整体并入本文中)。定制ZFP和ZFN可从例如Sigma Aldrich(St.Louis,MO)商购获得,并且可以使用此类定制ZFN常规靶向和切

割DNA的任何位置。

[0175] 在一些实施方案中,经由CRISPR介导的(例如,CRISPR/Cas)核酸酶介导的供体构建体的整合来工程化细胞(例如,记忆B细胞或浆母细胞)。CRISPR(成簇规则间隔短回文重复序列)/Cas(CRISPR相关的)核酸酶系统是一种基于细菌系统的工程化的核酸酶系统,其可用于基因组工程化。它是基于许多细菌和古菌的部分适应性免疫反应。当病毒或质粒入侵细菌时,入侵者的DNA区段通过“免疫”反应转化为CRISPR RNA(crRNA)。然后,这种crRNA通过一个部分互补的区域与另一类称为tracrRNA的RNA结合,以将Cas(例如Cas9)核酸酶引导到靶DNA中与crRNA同源的区域,称为“原间隔区(protospacer)”。Cas切割DNA,以在crRNA转录物中包含的20个核苷酸的引导序列指定的位点处在DSB处产生钝末端。Cas需要crRNA和tracrRNA进行位点特异性DNA识别和切割。现在已经对该系统进行了工程化,使得crRNA和tracrRNA可以结合成一个分子(“单向导RNA”),并且可以对单向导RNA的crRNA等效部分进行工程化,以引导Cas核酸酶靶向任何所期望序列(参见Jinek等人(2012) *Science* 337, 第816-821页;Jinek等人,(2013), *eLife* 2:e00471,和David Segal,(2013) *eLife* 2:e00563)。因此,CRISPR/Cas系统可以被工程化以在基因组中的期望靶标处产生DSB,并且DSB的修复可以受到修复抑制剂的使用的影 响,从而导致易出错修复的增加。在一些实施方案中,CRISPR/Cas核酸酶介导的整合利用II型CRISPR。II型CRISPR是表征最充分的系统之一,且其在四个连续步骤中进行靶向DNA双链断裂。首先,从CRISPR基因座转录两种非编码RNA,即前crRNA阵列和tracrRNA。其次,tracrRNA与前crRNA的重复区杂交,并介导前crRNA加工成含有单个间隔区序列的成熟crRNA。第三,成熟的crRNA:tracrRNA复合物经由crRNA上的间隔区和靶DNA上邻近原间隔区临近基序(PAM)的原间隔区之间的Watson-Crick碱基配对将Cas引导到靶DNA,这是靶标识别的额外要求。第四,Cas介导靶DNA的切割,以在原间隔区内产生双链断裂。

[0176] Cas相关的CRISPR/Cas系统包括两种RNA非编码组分:tracrRNA和前crRNA阵列,后者包含由相同的直接重复序列(DR)间隔开的核酸酶引导序列(间隔区)。为了使用CRISPR/Cas系统来完成基因组工程化,这些RNA的两种功能都必须存在(参见Cong等人,(2013) *Scienceexpress* 1/10.1126/science 1231143)。在一些实施方案中,tracrRNA和pre-crRNAs经由单独的表达构建体或作为单独的RNAs提供。在其他实施方案中,构建嵌合RNA,其中工程化的成熟crRNA(赋予靶标特异性)与tracrRNA融合(提供与Cas的相互作用),以产生嵌合cr-RNA-tracrRNA杂交体(也称为单向导RNA)。(参见Jinek同上和Cong,同上)。

[0177] 在一些实施方案中,含有crRNA和tracrRNA的单向导RNA可以被工程化以引导Cas核酸酶靶向任何期望的序列(例如,Jinek等人(2012) *Science* 337, 第816-821页,Jinek等人,(2013), *eLife* 2:e00471,David Segal,(2013) *eLife* 2:e00563)。因此,CRISPR/Cas系统可以被工程化以在基因组中的期望靶标处产生DSB。

[0178] 定制CRISPR/Cas系统可从例如Dharmacon(Lafayette,CO)商购获得,并且DNA的任何位置都可以使用这种定制的单向导RNA序列进行常规靶向和切割。可以合成用于重组的单链DNA模板(例如,经由本领域已知的和可商购获得的寡核苷酸合成方法)或在载体中提供,例如,病毒载体如AAV。在一些实施方案中,经由TALE-核酸酶(TALEN)介导的供体构建体的靶向整合来工程化细胞(例如,记忆B细胞或浆母细胞)。“TALE DNA结合结构域”或“TALE”是一种包含一个或多个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，并且与天然存在的TALE蛋白中的其他TALE重复序列表现出至少一些序列同源性。TAL效应子可以包含核定位序列、酸性转录激活结构域和串联重复的中心结构域，其中每个重复包含大约34个氨基酸，这些氨基酸是这些蛋白质的DNA结合特异性的关键（例如，Schornack S, 等人(2006) *J Plant Physiol* 163(3):256-272)。TAL效应子依赖于在包含约102bp的串联重复序列中发现的序列，并且这些重复序列通常彼此具有91%-100%的同源性（例如，Bonas等人(1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136）。这些DNA结合重复序列可以被工程化成具有新的组合和重复数量的蛋白质，以制造能够与新序列相互作用并激活非内源性报告基因表达的人工转录因子（例如，Bonas等人(1989) *Mol Gen Genet* 218:127-136）。工程化的TAL蛋白可以与FokI切割半结构域连接，以产生TAL效应结构域核酸酶融合物（TALEN），来切割靶标特异性DNA序列（例如，Christian等人(2010) *Genetics* epub 10.1534/genetics.110.120717）。

[0179] 定制TALEN可从例如Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) 商购获得，并且DNA的任何位置都可以被常规靶向和切割。

[0180] 在一些实施方案中，经由大范围核酸酶介导的供体构建体的靶向整合工程化细胞（例如，记忆B细胞或浆母细胞）。大范围核酸酶（或“归巢核酸内切酶”）是一种在大于12个碱基对的识别序列处结合并切割双链DNA的核酸内切酶。天然存在的大范围核酸酶可以是单聚的（monomelic）（例如，I-SceI）或二聚的（例如，I-CreI）。天然存在的大范围核酸酶识别15-40个碱基对的切割位点，且通常分为四个家族：LAGLIDADG家族、GIY-YIG家族、His-Cyst盒家族和HNH家族。示例性的归巢核酸内切酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-Csml、I-PanI、I-Scell、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII。它们的识别序列是已知的。还参见第5,420,032号美国专利；第6,833,252号；Belfort等人。(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388；Dujon等人。(1989) *Gene* 82:115-118；Perler等人。(1994) *Nucleic Acids Res.* 22,1125-1127；Jasin(1996) *Trends Genet.* 12:224-228；Gimble等人。(1996) *J.Mol.Biol.* 263:163-180；Argast等人。(1998) *J.Mol.Biol.* 280:345-353和新英格兰生物实验室目录。术语“大范围核酸酶”包括单体大范围核酸酶、二聚大范围核酸酶和结合形成二聚大范围核苷酸酶的单体。

[0181] 在一些实施方案中，本文所述的方法和组合物使用核酸酶，其包括工程化的（非天然存在的）归巢核酸内切酶（大范围核酸酶）。归巢核酸内切酶和大范围核酸内切酶如I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-Csml、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII的识别序列是已知的。还参见第5,420,032号美国专利；第6,833,252号美国专利；Belfort等人。(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388；Dujon等人。(1989) *Gene* 82:115-118；Perler等人。(1994) *Nucleic Acids Res.* 22,1125-1127；Jasin(1996) *Trends Genet.* 12:224-228；Gimble等人。(1996) *J.Mol.Biol.* 263:163-180；Argast等人。(1998) *J.Mol.Biol.* 280:345-353和新英格兰生物实验室目录。另外，归巢核酸内切酶和大范围核酸酶的DNA结合特异性可被工程化以结合非天然靶位点。参见例如，Chevalier等人。(2002) *Molec.Cell* 10:895-905；Epinat等人。(2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962；Ashworth等人。(2006) *Nature* 441:656-659；Paques等人。(2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66；第20070117128号美国专利公开。归巢核酸内切酶和大范围核酸内切酶的DNA结合结构域可以作为整体在核酸酶的背景下改变（即，使得核酸酶包括

同源切割结构域),或者可以与异源切割结构域融合。定制的大范围核酸酶可从例如新英格兰生物实验室(Ipswich,MA)商购获得,并且DNA的任何位置都可以被常规靶向和切割。

[0182] B细胞的工程化可以包括向B细胞施用一种或多种核酸酶(例如,ZFN、TALEN、CRISPR/Cas、大范围核酸酶),例如经由编码核酸酶的一种或多种载体,使得包含所编码的核酸酶的载体被B细胞摄取。载体可以是病毒载体。

[0183] 在一些实施方案中,核酸酶切割细胞(例如,记忆B细胞或浆细胞)中的特定内源性基因座(例如,安全港基因或目标基因座),并施用一种或多种外源(供体)序列(例如,转基因)(例如,包含这些外源性序列的一种或多种载体)。核酸酶可以在靶DNA中诱导双链(DSB)或单链断裂(缺口)。在一些实施方案中,可以经由同源性定向修复(HDR)、非同源性修复制(例如,NHEJ介导的末端捕获)或在转基因整合到细胞基因组中的位点处插入和/或缺失核苷酸(例如,内源性序列)来进行供体转基因的靶向插入。

[0184] 在一些实施方案中,转染B细胞的方法包括在B细胞与载体接触之前对B细胞进行电穿孔。在一些实施方案中,在体外培养的第1、2、3、4、5、6、7、8或9天对细胞进行电穿孔。在一些实施方案中,在体外培养的第2天对细胞进行电穿孔以用于递送质粒。在一些实施方案中,在体外培养的第1、2、3、4、5、6、7、8或9天使用转座子转染细胞。在一些实施方案中,在体外培养的第1、2、3、4、5、6、7、8或9天使用微环转染细胞。在一些实施方案中,睡美人转座子的电穿孔发生在体外培养的第2天。

[0185] 在一些实施方案中,在足以转染B细胞的至少一部分的条件下,使B细胞与包含与启动子可操作地连接的目标核酸的载体接触。在一些实施方案中,在足以转染至少5%的B细胞的条件下,使B细胞与包含与启动子可操作地连接的目标核酸的载体接触。在一些实施方案中,在足以转染至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的B细胞的条件下,使B细胞与载体接触。在一些实施方案中,转染如本文所述体外培养的B细胞,在这种情况下,将培养的B细胞与如本文所描述的载体在足以转染至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的B细胞的条件下接触。

[0186] 病毒载体可用于转导记忆B细胞和/或浆细胞。病毒载体的实例包括但不限于基于腺病毒的载体、基于腺相关病毒(AAV)的载体、逆转录病毒载体、逆转录-腺病毒载体和衍生自单纯疱疹病毒(HSV)的载体,包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒型HSV(参见例如,Krisky, Gene Ther. 5:1517-30, 1998; Pfeifer, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211, 2001, 其每一项均通过引用整体并入本文中)。在一些实施方案中,在体外培养的第1、2、3、4、5、6、7、8或9天用病毒载体(例如慢病毒载体)转导细胞。在一些实施方案中,在体外培养的第5天用病毒载体转导细胞。在一些实施方案中,病毒载体是慢病毒。在一些实施方案中,在体外培养的第1天用麻疹病毒假型慢病毒转导细胞。

[0187] 在一些实施方案中,使用本领域已知的各种技术中的任一种用逆转录病毒载体转导B细胞(参见例如, Science 1996年4月12日272:263-267; Blood 2007, 99:2342-2350; Blood 2009, 113:1422-1431; Blood 2009年10月8日; 114(15):3173-80; Blood. 2003; 101(6):2167-2174; Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, New York, N.Y. (2009))。B细胞的病毒转导的另外的描述可

在WO 2011/085247和WO 2014/152832中找到,其每一项均通过引用整体并入本文中。

[0188] 例如,可在IMDM培养基或RPMI 1640 (GibcoBRL Invitrogen, Auckland, New Zealand)或本文所述的其他合适培养基中分离和培养来自供体的PBMC、B或T淋巴细胞以及其他B细胞癌症细胞如(B-CLL),所述培养基中无血清或补充有血清(例如,5%-10% FCS、人AB血清和血清替代品)和青霉素/链霉素和/或其他合适的补充剂,如转铁蛋白和/或胰岛素。在一些实施方案中,将细胞以 $1 \times 10^5$ 个细胞接种在48孔板中,并以各种剂量添加浓缩的载体,这些剂量可由本领域技术人员使用常规方法进行常规优化。在一实施方案中,将B细胞转移到RPMI中的MS5细胞单层,RPMI补充有10% AB血清、5% FCS、50ng/ml rhSCF、10ng/ml rhIL-15和5ng/ml rhIL-2,并根据需要定期更新培养基。如本领域技术人员所认识到的,可以根据需要使用其他合适的培养基和补充剂。

[0189] 一些实施方案涉及逆转录病毒载体或衍生自逆转录病毒的载体的用途。“逆转录病毒”是能够感染动物细胞的包膜RNA病毒,且其在感染的早期利用酶逆转录酶,以从其RNA基因组中产生DNA拷贝,后者随后通常被整合到宿主基因组中。逆转录病毒载体的实例Moloney鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体、基于鼠干细胞病毒的逆转录病毒载体,其在靶细胞(如造血前体细胞)及其分化的后代中提供长期稳定表达(参见例如,Hawley等人,PNAS USA 93:10297-10302,1996;Keller等人,Blood92:877-887,1998)、杂交载体(参见例如,Choi等人,Stem Cells 19:236-246,2001),以及复杂的逆转录病毒衍生的载体,如慢病毒载体。

[0190] 在一些实施方案中,在足以转导至少一部分B细胞的条件下,使B细胞与包含与启动子可操作地连接的目标核酸的逆转录病毒载体接触。在一实施方案中,在足以转导至少2%的B细胞的条件下,使B细胞与包含与启动子可操作地连接的目标核酸的逆转录病毒载体接触。在一些实施方案中,使B细胞在足以转导至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的静息B细胞的条件下与载体接触。在一些实施方案中,如本文所述体外培养的分化和激活的B细胞被转导,在这种情况下,在足以转导至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%的分化和激活的B细胞的条件下,使分化/激活的B细胞与本文所述的载体接触。

[0191] 在一些实施方案中,在转导之前,以技术人员已知的适当浓度用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus Aureus*)Cowan(SAC;Calbiochem,圣地亚哥,CA)和/或IL-2预刺激细胞,并常规优化。可以使用技术人员已知并且如本文所述的其他B细胞激活因子(例如,PMA)。

[0192] 如上文所示,一些实施方案采用慢病毒载体。术语“慢病毒”是指能够感染分裂细胞和非分裂细胞的复杂逆转录病毒的属。慢病毒的例子包括HIV(人类免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型)、visna maedi、山羊关节炎-脑炎病毒、马传染性贫血病毒、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猴免疫缺陷病毒(SIV)。慢病毒载体可以来源于这些慢病毒中的任何一种或多种(参见例如,Evans等人,Hum Gene Ther.10:1479-1489,1999;Case等人,PNAS USA 96:2988-2993,1999;Uchida等人,PNAS USA95:1 1939-1 1944,1998;Miyoshi等人,Science 283:682-686,1999;Sutton等人,J Virol 72:5781 -5788,1998;和Frecha等人,Blood.1 12:4843-52,2008,其中每一项均通过引用整体并入本文中)。

[0193] 有文献表明,静息T细胞和B细胞可以通过携带大多数HIV辅助蛋白(vif、vpr、vpu和nef)的VSVG包被的LV转导(参见例如,Frecha等人,2010Mol. Therapy 18:1748)。在某些实施方案中,逆转录病毒载体包含来自慢病毒基因组(如HIV基因组或SIV基因组)的某些最小序列。慢病毒的基因组通常被组织到5'长末端重复序列(LTR)区、gag基因、pol基因、env基因、附属基因(例如nef、vif、vpr、vpu、tat、rev)和3'LTR区中。病毒LTR分为三个区域,称为U3、R(重复)和U5。U3区包含增强子和启动子元件,U5区包含多腺苷酸化信号,且R区分隔U3和U5区。R区的转录序列出现在病毒RNA的5'和3'端处(参见例如,“RNA Viruses: A Practical Approach”(Alan J. Cann,编辑,Oxford University Press,2000); Narayan, J. Gen. Virology. 70:1617-1639,1989; Fields等人, Fundamental Virology Raven Press,1990; Miyoshi等人, J Virol. 72:8150-7,1998; 和第6,013,516号美国专利,其每一项均通过引用整体并入本文中)。慢病毒载体可以包含慢病毒基因组的这些元件中的任何一个或多个,以根据需要调节载体的活性,或者,它们可以在这些元件中的一个或几个中包含缺失、插入、取代或突变,诸如以减少慢病毒复制的病理学影响,或者将慢病毒载体限制为单轮感染。

[0194] 通常,最小逆转录病毒载体包括某些5'LTR和3'LTR序列、一个或多个目标基因(待在靶细胞中表达)、一个或多个启动子,以及用于包装RNA的顺式作用序列。如本文所述和本领域已知的,可以包括其他调控序列。病毒载体通常被克隆到质粒中,该质粒可以被转染到包装细胞系,如真核细胞(例如293-HEK)中,并且通常还包括用于在细菌中复制质粒的序列。

[0195] 在某些实施方案中,病毒载体包含来自逆转录病毒如慢病毒的5'和/或3'LTR的序列。LTR序列可以是来自任何物种的任何慢病毒的LTR序列。例如,它们可以是来自HIV、SIV、FIV或BIV的LTR序列。优选地,LTR序列是HIV LTR序列。在某些实施方案中,病毒载体包含来自慢病毒的5'LTR的R和U5序列以及来自慢病毒的失活或“自失活”的3'LTR。“自失活3'LTR”是一种3'长末端重复序列(LTR),其含有突变、取代或缺失,可以阻止LTR序列驱动下游基因的表达。来自3'LTR的U3区的拷贝作为在整合的原病毒中产生两种LTR的模板。因此,当具有失活或缺失或突变的3'LTR整合为原病毒的5'LTR时,不可能从5'LTR转录。这消除了病毒增强子/启动子和任何内部增强子/激活子之间的竞争。例如,在Zufferey等人, J Virol. 72: 9873-9880,1998; Miyoshi等人, J Virol. 72:8150-8157,1998; 和Iwakuma等人, J Virol. 261:120-132,1999中描述了自失活3'LTR,其每一项均通过引用整体并入本文中。可通过本领域已知的任何方法产生自失活的3'LTR。在某些实施方案中,3'LTR的U3元件含有其增强子序列的缺失,优选TATA盒、Sp1和/或NF- $\kappa$ B位点。作为自失活3'LTR的结果,整合到宿主细胞基因组中的原病毒将包含失活的5'LTR。

[0196] 本文提供的载体通常包含编码期望在一个或多个靶细胞中表达的蛋白质(或其他分子,如siRNA)的基因。在病毒载体中,目标基因优选位于5'LTR和3'LTR序列之间。此外,目标基因优选与其他遗传元件(例如转录调节序列,如启动子和/或增强子)具有功能关系,以在将该基因掺入靶细胞中后即以特定方式调节目标基因的表达。在某些实施方案中,有用的转录调控序列是在时间和空间上相对于活性高度调控的那些。

[0197] 在一些实施方案中,可以引入一个或多个另外的基因作为安全措施,主要是为了允许在异质群体(如在人类对象)中,选择性杀伤转染的靶细胞。在一些实施方案中,所选择

的基因是胸苷激酶基因 (TK), 其表达使靶细胞对药物更昔洛韦的作用敏感。在一些实施方案中, 自杀基因是由二聚化药物激活的半胱氨酸蛋白酶9自杀基因 (参见例如, Tey等人, *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 13:913-924, 2007)。在某些实施方案中, 编码标记蛋白的基因可以放置在病毒或非病毒载体中的主要基因之前或之后, 以允许鉴定和/或选择表达所期望蛋白的细胞。某些实施方案结合荧光标记蛋白 (如绿色荧光蛋白 (GFP) 或红色荧光蛋白 (RFP)) 以及目标主要基因。如果包括一个或多个另外的报告基因, 还可以包括IRES序列或2A元件, 将目标主要基因与报告基因和/或任何其他目标基因分离。

[0198] 某些实施方案可以采用编码一种或多种选择性标志物的基因。实例包括在真核细胞或原核细胞中有效的选择性标志物, 如编码在选择性培养基中生长的转化宿主细胞存活或生长所需因子的耐药性基因。示例性选择基因编码赋予对抗生素或其他毒素的耐受性的蛋白质, 例如G418、潮霉素B、嘌呤霉素、博莱霉素、乌本苷 (ouabain)、杀稻瘟素 (blasticin)、氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素、补体营养缺陷型缺乏, 或供应可存在于单独的质粒上, 并通过与病毒载体共转染引入。在一实施方案中, 该基因编码赋予甲氨蝶呤抗性的突变二氢叶酸还原酶 (DHFR)。某些其他的实施方案可采用编码一种或细胞表面受体的基因, 所述细胞表面受体可用于标记和检测或纯化转染的细胞 (例如, 低亲和力神经生长因子受体 (LNGFR) 或其他可用作转导标记系统的此类受体。参见例如, Lauer等人., *Cancer Gene Ther.* 2000年3月; 7(3): 430-7。

[0199] 某些病毒载体 (如逆转录病毒载体) 采用一种或多种异源启动子、增强子, 或两者。在一些实施方案中, 来自逆转录病毒或慢病毒5' LTR的U3序列可以被病毒构建体中的启动子或增强子序列取代。某些实施方案采用“内部”启动子/增强子, 其位于病毒载体的5' LTR和3' LTR序列之间, 并且可操作地连接到目标基因。

[0200] “功能关系”和“可操作地连接”意指, 但不限于, 基因相对于启动子和/或增强子处于正确的位置和方向, 从而当启动子和/或增强子与适当的调节分子接触时, 基因的表达将受到影响。可以使用任何增强子/启动子组合, 其调节 (例如, 增加、减少) 病毒RNA基因组在包装细胞系中的表达、调节所选择的目标基因在受感染的靶细胞中的表达或两者。

[0201] 启动子是由允许聚合酶结合和转录发生的DNA序列形成的表达控制元件。启动子是位于所选目标基因起始密码子上游 (5') 的未翻译序列 (通常在约100-1000bp之间), 并控制编码与其可操作连接的多核苷酸序列的转录和翻译。启动子可以是诱导型的或组成型的。诱导型启动子启动在其控制下的DNA转录水平的增加, 以响应培养条件的一些变化 (如温度的变化)。启动子可以是单向的或双向的。双向启动子可用于共表达两个基因, 例如目标基因和选择标记。可替代地, 可以利用双向启动子配置, 其包括两个启动子, 每个启动子在同一载体中以相反的方向控制不同基因的表达。

[0202] 本领域已知多种启动子, 以及将启动子可操作地连接到多核苷酸编码序列的方法。天然启动子序列和许多异源启动子都可以用于指导所选择的目标基因的表达。某些实施方案采用异源启动子, 因为与天然启动子相比, 它们通常允许所需蛋白质的更大转录和更高产量。

[0203] 某些实施方案可以采用异源病毒启动子。此类启动子的实例包括从病毒, 如多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒和猿猴病毒40 (SV40) 的基因组获得的那些启动子。某些实施方案可以采用异源哺乳动

物启动子,如肌动蛋白启动子、免疫球蛋白启动子、热休克启动子或与目标基因的天然序列相关的启动子。通常,启动子与靶细胞(如激活的B淋巴细胞、血浆B细胞、记忆B细胞或其他淋巴细胞靶细胞)相容。

[0204] 某些实施方案可以采用RNA聚合酶II和III启动子中的一种或多种。RNA聚合酶III启动子的合适选择可以在例如Paule和White, *Nucleic Acids Research.*, 第28卷, 第1283-1298页, 2000中找到,其通过引用整体并入本文中。RNA聚合酶II和III启动子还包括任何合成或工程化的DNA片段,其可以分别引导RNA聚合酶II或III,以转录其下游RNA编码序列。此外,用作病毒载体的一部分的一种或多种RNA聚合酶II或III (Pol II或III) 启动子可以是诱导型的。任何合适的诱导型Pol II或III启动子都可以与本文所述的方法一起使用。示例性的Pol II或III启动子包括Ohkawa和Taira, *Human Gene Therapy*, 第11卷, 第577-585页, 2000;和Meissner等人, *Nucleic Acids Research*, 第29卷, 第1672-1682页, 2001中提供的四环素响应启动子,其中每项均通过引用整体并入本文中。

[0205] 可使用的组成型启动子的非限制性实例包括泛素启动子、CMV启动子(参见例如Karasuyama等人, *J. Exp. Med.* 169:13, 1989)、 $\beta$ -肌动蛋白(参见例如,Gunning等人, *PNAS USA* 84:4831-4835, 1987)、延长因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) 启动子、CAG启动子和pgk启动子(参见例如,Adra等人, *Gene* 60:65-74, 1987); Singer-Sam等人, *Gene* 32:409-417, 1984;和Dobson等人, *Nucleic Acids Res.* 10:2635-2637, 1982, 其中每项均通过引用并入本文中)。组织特异性启动子的非限制性实例包括lck启动子(参见例如,Garvin等人, *Mol. Cell Biol.* 8:3058-3064, 1988;和Takadera等人, *Mol. Cell Biol.* 9:2173-2180, 1989)、肌细胞生成素启动子(Yee等人, *Genes and Development* 7:1277-1289, 1993)和thyl启动子(参见例如,Gundersen等人, *Gene* 113:207-214, 1992)。

[0206] 启动子另外的实例包括泛素-C启动子、人 $\mu$ 重链启动子或Ig重链启动子(例如, MH)和人K轻链启动子或Ig轻链启动子(例如, EEK), 它们在B淋巴细胞中具有功能。MH启动子包含人 $\mu$ 重链启动子,其前面是两侧为基质结合区的iE $\mu$ 增强子,且EEK启动子包含位于内含子增强子(iEK)前面的 $\kappa$ 轻链启动子、基质相关区和3'增强子(3EK) (参见例如,Luo等人, *Blood* 113:1422-1431, 2009, 和第2010/0203630号美国专利申请公开)。因此,某些实施方案可以采用这些启动子或增强子元件中的一种或多种。

[0207] 在一些实施方案中,一个启动子驱动选择性标记的表达,且第二启动子驱动目标基因的表达。例如,在一实施方案中,EF-1 $\alpha$ 启动子驱动选择标记(例如,DHFR)的产生,并且小型CAG启动子(参见例如,Fan等人, *Human Gene Therapy* 10:2273-2285, 1999)驱动目标基因(例如, IDUA)的表达。如上所述,某些实施方案采用增强子元件(如内部增强子)以增加目标基因的表达。增强子是DNA的顺式作用元件,通常长度约为10-300bp,其作用于启动子以增加后者的转录。增强子序列可来源于哺乳动物基因(例如,球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白、胰岛素),如增强子、内含子增强子和3'增强子。还包括来自真核病毒的增强子,包括复制起点晚期侧(late side)的SV40增强子(bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。增强子可以在抗原特异性多核苷酸序列的5'或3'位置处剪接到载体中,但优选位于启动子的5'位点。本领域技术人员将基于期望的表达模式(partem)来选择合适的增强子。

[0208] 在一些实施方案中,选择启动子以允许基因的诱导型表达。本领域已知许多用于诱导型表达的系统,其包括四环素响应系统和lac操作子-阻遏物系统。还可以设想启动子的组合可以用于获得所需的目标基因表达。本领域技术人员将能够基于所期望的基因在生物体和/或目标靶细胞中的表达模式来选择启动子。

[0209] 某些病毒载体含有顺式作用的包装序列,以促进基因组病毒RNA掺入病毒颗粒中。实例包括psi序列。此类顺式作用序列是本领域已知的。在某些实施方案中,本文所述的病毒载体可以表达两个或更多个基因,这可以例如通过掺入可操作地连接到第一基因之外的每个单独的基因的内部启动子、通过掺入促进共表达的元件,如内部核糖体进入序列(IRES)元件(第4,937,190号美国专利,通过引用并入本文中)或2A元件,或两者来实现。仅通过示例方式,当单个载体包含编码具有所需特异性的免疫球蛋白分子的每条链的序列时,可以使用IRES或2A元件。例如,第一编码区(编码重链或轻链)可以直接位于启动子的下游,且第二编码区(编码另一条链)可以位于第一编码区的下游,IRES或2A元件位于第一和第二编码区之间,优选直接在第二编码区之前。在一些实施方案中,IRES或2A元件用于共表达不相关的基因,如报告基因、选择性标志物或增强免疫功能的基因。可使用的IRES序列的实例包括但不限于脑脊髓炎病毒(EMCV)、口蹄疫病毒(FMDV)、Theiler鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)、人鼻病毒(HRV)、柯萨奇病毒(CSV)、脊髓灰质炎病毒(POLIO)、甲型肝炎病毒(HAV)、丙型肝炎病毒(HCV)和瘟病毒(Pestiviruses)(例如,猪瘟病毒(HOCV)和牛病毒性腹泻病毒(BVDV))的IRES元件(参见例如,Le等人,Virus Genes 12:135-147,1996;和Le等人,Nuc.Acids Res.25:362-369,1997,其中每项均通过引用整体并入本文中)。2A元件的一个实例包括来自口蹄疫病毒的F2A序列。

[0210] 在一些实施方案中,本文提供的载体还含有另外的遗传元素以获得所期望的结果。例如,某些病毒载体可以包括促进病毒基因组核进入靶细胞中的信号(如HIV-1flap信号)。作为进一步的实例,某些病毒载体可以包括促进靶细胞中原病毒整合位点的表征的元件,如tRNA<sup>amber</sup>抑制序列。某些病毒载体可能含有一种或多种遗传元件,其被设计为增强目标基因的表达。例如,可以将土拨鼠肝炎病毒应答元件(WRE)放入构建体中(参见例如,Zufferey等人,J.Virol.74:3668-3681,1999;和Deglon等人,Hum.Gene Ther.11:179-190,2000,其中每项均通过引用整体并入本文中)。作为另一个例子,鸡 $\beta$ -球蛋白绝缘子也可以包括在构建体中。由于甲基化和异染色质化效应,该元件已被证明可以减少靶细胞中整合DNA沉默的机会。另外,绝缘子可以保护内部增强子、启动子和外源基因免受染色体上整合位点周围DNA的阳性或阴性位置效应的影响。某些实施方案采用了这些遗传元件中的每一种。在另一实施方案中,本文提供的病毒载体还可以含有普遍存在的染色质开放元件(UCOE)以增加表达(参见例如,Zhang F等人,Molecular Therapy:The journal of the American Society of Gene Therapy,2010年9月;18(9):1640-9.)。

[0211] 在一些实施方案中,本文提供的病毒载体(例如逆转录病毒、慢病毒)是具有一种或多种选定的病毒糖蛋白或包膜蛋白的“伪型”,主要靶向选定的细胞类型。伪分型通常是指将一种或多种异源病毒糖蛋白掺入到细胞表面病毒颗粒上,通常允许病毒颗粒感染与其正常靶细胞不同的选定细胞。“异源”元件来源于除病毒载体的RNA基因组所来源的病毒外的病毒。通常,病毒载体的糖蛋白编码区已经被遗传改变,如通过缺失来阻止其自身糖蛋白的表达。仅通过示例的方式,来自HIV衍生的慢病毒载体的包膜糖蛋白gp41和/或gp120通常

在用异源病毒糖蛋白进行伪分型之前缺失。

[0212] 在一些实施方案中,病毒载体是具有靶向B淋巴细胞的异源病毒糖蛋白的伪型。在一些实施方案中,病毒糖蛋白允许静息或静止的B淋巴细胞的选择性感染或转导。在一些实施方案中,病毒糖蛋白允许B淋巴细胞浆细胞、浆母细胞和激活的B细胞的选择性感染。在一些实施方案中,病毒糖蛋白允许静止的B淋巴细胞、浆母细胞、浆细胞和激活的B细胞的感染或转导。在一些实施方案中,病毒糖蛋白允许B细胞慢性淋巴细胞白血病细胞的感染。在一实施方案中,病毒载体是用VSV-G伪分型的。在一些实施方案中,异源病毒糖蛋白衍生自麻疹病毒,如Edmonton麻疹病毒的糖蛋白。在一些实施方案中,伪型麻疹病毒糖蛋白血凝素(H)、融合蛋白(F)或两者(参见例如, Frecha等人, Blood.1 12:4843-52, 2008; 和Frecha等人, Blood.1 14:3173-80, 2009, 其中每项均通过引用整体并入本文中)。在一些实施方案中,病毒载体是用长臂猿白血病病毒(GALV)伪分型的。在一些实施方案中,病毒载体是用猫内源性逆转录病毒(RD114)伪分型的。在一些实施方案中,病毒载体是用狒狒内源性逆转录病毒(BaEV)伪分型的。在一些实施方案中,病毒载体是用鼠白血病病毒(MLV)伪分型的。在一些实施方案中,病毒载体包含嵌入的抗体结合结构域,如一个或多个可变区(例如,重链和轻链可变区),其用于将载体靶向特定细胞类型。

[0213] 病毒载体的产生可以使用本领域已知的任何合适的遗传工程化技术来完成,包括但不限于限制性内切核酸酶消化、连接、转化、质粒纯化、PCR扩增和DNA测序的标准技术,例如描述于Sambrook等人.(Molecular Cloning:ALaboratory Manual.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.(1989))、Coffin等人.(Retroviruses.Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.(1997))和“RNAViruses:APractical Approach”(Alan J.Cann,编辑,Oxford University Press,(2000))。

[0214] 本领域已知的任何多种方法都可以用于产生合适的逆转录病毒颗粒,其基因组包含病毒载体的RNA拷贝。作为一种方法,可以将病毒载体引入包装细胞系中,该包装细胞系将基于病毒载体的病毒基因组RNA包装成具有所期望靶细胞特异性的病毒颗粒。包装细胞系通常反式提供将病毒基因组RNA包装成病毒颗粒并感染靶细胞所需的病毒蛋白,包括结构gag蛋白、酶促pol蛋白和包膜糖蛋白。

[0215] 在一些实施方案中,包装细胞系稳定地表达某些必要或所需的病毒蛋白(例如,gag、pol)(参见例如,第6,218,181号美国专利,通过引用并入本文中)。在一些实施方案中,用质粒瞬时转染包装细胞系,所述质粒编码某些必要或所需的病毒蛋白(例如,gag、pol、糖蛋白),包括本文所述的麻疹病毒糖蛋白序列。在一些实施方案中,包装细胞系稳定表达gag和pol序列,然后用编码病毒载体的质粒和编码糖蛋白的质粒转染细胞系。在引入所需质粒之后,收集病毒颗粒并进行相应的处理,如通过超速离心以获得浓缩的病毒颗粒储备。示例性的包装细胞系包括293(ATCC CCL X)、HeLa(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞系。

[0216] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1相同的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞包含具有与SEQ ID NO:1至少约85%相同,或与SEQ ID NO:1至少约90%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%相同的序列的多核苷酸。

[0217] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在开始培养后的第2天或第3天进行工程化。在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞使用包括电穿孔在内的方法进行工程化。在一些实施

方案中,收获遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第4天、第5天、第6天或第7天施用于对象。在一些实施方案中,收获遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第8天或更晚施用于对象。在一些实施方案中,收获遗传修饰的B细胞,以用于在工程化后的培养第10天或更早施用于对象。

[0218] 在一些实施方案中,收获的遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子。在一些实施方案中,在确定遗传修饰的B细胞不产生显著水平的炎症性细胞因子的培养时间点收获遗传修饰的B细胞。

[0219] 在一些实施方案中,使B细胞与一种或多种B细胞激活因子接触,例如已知激活和/或分化B细胞的多种细胞因子、生长因子或细胞系中的任何一种(参见例如,Fluckiger等人.Blood 1998 92:4509-4520;Luo,等人,Blood 2009 113:1422-1431)。此类因子可选自但不限于IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34和IL-35、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\delta$ 、C型趋化因子XCL1和XCL2、C-C型趋化因子(迄今为止包括CCL1-CCL28)和CXC型趋化因子(迄今为止包括CXCL1-CXCL17),以及TNF超家族的成员(例如,TNF- $\alpha$ 、4-1BB配体、B细胞激活因子(BLyS)、FAS配体、sCD40L(包括sCD40L的多聚体形式;例如,组氨酸标记的可溶性重组CD40L与抗多组氨酸mAb组合以将多种sCD40L分子分组在一起)、淋巴毒素、OX40L、RANKL、TRAIL)、CpG和其他toll样受体激动剂。

[0220] B细胞激活因子可以以各种浓度添加到体外细胞培养物中,以实现所需的结果(例如扩增或分化)。在一些实施方案中,B细胞激活因子用于扩增培养物中的B细胞。在一些实施方案中,B细胞激活因子用于分化培养物中的B细胞。在一些实施方案中,B细胞激活因子用于扩增和分化培养物中的B细胞。在一些实施方案中,以相同的浓度提供B细胞激活因子以用于扩增和分化。在一些实施方案中,以用于扩增的第一浓度和用于分化的第二浓度提供B细胞激活因子。可以设想,B细胞激活因子可以1)用于扩增B细胞且不用于分化B细胞,2)用于分化B细胞且不用于扩增B细胞,或3)用于扩增和分化B细胞。

[0221] 例如,用选自CD40L、IL-2、IL-4和IL-10中的一种或多种B细胞激活因子培养B细胞,以用于扩增B细胞。在一些实施方案中,用0.25-5.0 $\mu$ g/ml CD40L培养B细胞。在一些实施方案中,CD40L的浓度为0.5 $\mu$ g/ml。在一实施方案中,交联剂(如与HIS标记的CD40L组合的抗HIS抗体)用于产生CD40L的多聚体。在一些实施方案中,CD40L的分子使用蛋白质多聚化结构域(例如IgG的Fc区或亮氨酸拉链结构域)共价连接或保持在一起。在一些实施方案中,CD40L与珠缀合。在一实施方案中,CD40L是从饲养细胞中表达的。在一些实施方案中,用1-10ng/ml IL-2培养B细胞。在一些实施方案中,IL-2的浓度为5ng/ml。在一实施方案中,用1-10ng/ml IL-4培养B细胞。在一些实施方案中,IL-4的浓度为2ng/ml。在一些实施方案中,用10-100ng/ml IL-10培养B细胞。在一些实施方案中,IL-10的浓度为40ng/ml。

[0222] 在一些实施方案中,用选自CD40L、IL-2、IL-4、IL-10、IL-15和IL-21的一种或多种B细胞激活因子培养B细胞,以用于扩增B细胞。在一些实施方案中,用0.25-5.0 $\mu$ g/ml CD40L培养B细胞。在一些实施方案中,CD40L的浓度为0.5 $\mu$ g/ml。在一些实施方案中,交联剂(如与HIS标记的CD40L组合的抗HIS抗体)用于产生CD40L的多聚体。在一些实施方案中,CD40L的分子使用蛋白质多聚化结构域(例如IgG的Fc区或亮氨酸拉链结构域)共价连接或保持在一

起。在一些实施方案中,CD40L与珠缀合。在一实施方案中,CD40L是从饲养细胞中表达的。在一实施方案中,用1-10ng/ml IL-2培养B细胞。在一些实施方案中,IL-2的浓度为5ng/ml。在一些实施方案中,用1-10ng/ml IL-4培养B细胞。在一些实施方案中,IL-4的浓度为2ng/ml。在一实施方案中,用10-100ng/ml IL-10培养B细胞。在一些实施方案中,IL-10的浓度为40ng/ml。在一实施方案中,用50-150ng/ml IL-15培养B细胞。在一些实施方案中,IL-15的浓度为100ng/ml。在一些实施方案中,用50-150ng/ml IL-21培养B细胞。在一些实施方案中,IL-21的浓度为100ng/ml。在一些实施方案中,用CD40L、IL-2、IL-4、IL-10、IL-15和IL-21培养B细胞,以用于扩增B细胞。

[0223] 在一些实施方案中,在工程化前和工程化后的整个培养期,使遗传修饰的B细胞在包含IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、IL-31和多聚化的CD40配体中的每种的培养系统中生长。在一些实施方案中,多聚化的CD40配体是使用抗his抗体多聚化的HIS标记的CD40配体。

[0224] 例如,在一实施方案中,用B细胞激活因子CD40L、IL-2、IL-4、IL-10、IL-15和IL-21培养B细胞或扩增B细胞,其中CD40L与交联剂交联,以产生CD40L的多聚体。可以在整个培养期(例如,7天培养期)维持此类培养系统,其中B细胞被转染或以其他方式工程化以表达目标转基因(例如,外源多肽,诸如例如, IDUA)。

[0225] 在另一实例中,用选自CD40L、IFN- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-10、IL-15、IL-21和P类CpG寡脱氧核苷酸(p-ODN)的一种或多种B细胞激活因子培养B细胞,以用于分化B细胞。在一些实施方案中,用25-75ng/ml CD40L培养B细胞。在一些实施方案中,CD40L的浓度为50ng/ml。在一些实施方案中,用250-750U/ml IFN- $\alpha$ 培养B细胞。在一些实施方案中,IFN- $\alpha$ 的浓度为500U/ml。在一些实施方案中,用5-50U/ml IL-2培养B细胞。在一些实施方案中,IL-2的浓度为20U/ml。在一些实施方案中,用25-75ng/ml IL-6培养B细胞。在一些实施方案中,IL-6的浓度为50ng/ml。在一实施方案中,用10-100ng/ml IL-10培养B细胞。在一些实施方案中,IL-10的浓度为50ng/ml。在一些实施方案中,用1-20ng/ml IL-15培养B细胞。在一实施方案中,IL-15的浓度为10ng/ml。在一些实施方案中,用10-100ng/ml IL-21培养B细胞。在一些实施方案中,IL-21的浓度为50ng/ml。在一实施方案中,用1-50 $\mu$ g/ml p-ODN培养B细胞。在一些实施方案中,p-ODN的浓度为10 $\mu$ g/ml。

[0226] 在一些实施方案中,在饲养细胞上接触或培养B细胞。在一些实施方案中,饲养细胞是基质细胞系,例如鼠基质细胞系S17或MS5。在一些实施方案中,在表达CD40配体(CD40L、CD154)的成纤维细胞存在下,用一种或多种B细胞激活因子细胞因子如IL-10和IL-4培养分离的CD19<sup>+</sup>细胞。在一些实施方案中,CD40L被提供为结合到表面,如组织培养板或珠。在一些实施方案中,在存在或不存在饲养细胞的情况下,用CD40L和选自IL-10、IL-4、IL-7、p-ODN、CpG DNA、IL-2、IL-15、IL6、IL-21和IFN- $\alpha$ 的一种或多种细胞因子或因子培养纯化的B细胞。

[0227] 在一些实施方案中,通过转染到B细胞或其他饲养细胞中来提供B细胞激活因子。在这种情况下,可以使用促进B细胞分化为抗体分泌细胞的一种或多种因子和/或促进抗体产生细胞寿命的一种或者多种因子。此类因子包括例如B1 imp-1、TRF4、抗凋亡因子如Bcl-1或Bcl5,或CD40受体的组成型活性突变体。此外,促进下游信号传导分子表达的因子,如TNF受体相关因子(TRAF)也可用于B细胞的激活/分化。在这方面,TNF受体超家族的细胞激活、细胞存活和抗凋亡功能主要由TRAF1-6介导(参见例如,R.H.Arch等人,Genes Dev.12

(1998),第2821-2830页)。TRAF信号传导的下游效应物包括NF-KB和AP-1家族中的转录因子,它们可以启动参与细胞和免疫功能各个方面的基因。此外,NF-κ B和AP-1的激活已被证明经由抗凋亡基因的转录提供细胞凋亡保护。

[0228] 在一些实施方案中,Epstein Barr病毒(EBV)衍生的蛋白质用于B细胞的激活和/或分化,或促进抗体产生细胞的寿命。EBV衍生的蛋白质包括但不限于EBNA-1、EBNA-2、EBNA-3、LMP-1、LMP-2、EBER、miRNAs、EBV-EA、EBV-MA、EBV-VCA和EBV-AN。

[0229] 在一些实施方案中,使用本文提供的方法使B细胞与B细胞激活因子接触,除其他外,还导致细胞增殖(即扩增)、IgM+细胞表面表型调节为与激活的成熟B细胞一致的表型、Ig的分泌和同种型转换。CD19+B细胞可以使用已知的和可商购获得的细胞分离试剂盒,如MiniMACS™细胞分离系统(Miltenyi Biotech,Bergisch Gladbach,德国)进行分离。在某些实施方案中,CD40L成纤维细胞在用于本文所述的方法之前被辐照。在一实施方案中,在IL-3、IL-7、Flt3配体、血小板生成素、SCF、IL-2、IL-10、G-CSF和CpG中的一种或多种存在下培养B细胞。在一些实施方案中,所述方法包括在一种或多种前述因子的存在下,结合转化的基质细胞(例如,MS5)培养B细胞,所述基质细胞提供低水平的锚定CD40L和/或结合到板或珠的CD40L。

[0230] 如上文讨论的,B细胞激活因子诱导B细胞的扩增、增殖或分化。因此,使B细胞与上面列出的一种或多种B细胞激活因子接触,以获得扩增的细胞群。可以在转染前扩增细胞群。可替代地,或另外,可以在转染后扩增细胞群。在一实施方案中,扩增B细胞群包括用IL-2、IL-4、IL-10和CD40L培养细胞(参见例如,Neron等人.PLoS ONE,20127(12):e51946)。在一实施方案中,扩增B细胞群包括用IL-2、IL-10、CpG和CD40L培养细胞。在一实施方案中,扩增B细胞群包括用IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、IL-21和CD40L培养细胞。在一实施方案中,扩增B细胞群包括用IL-2、IL-4、IL-10、IL-15、IL-21和多聚化CD40L培养细胞。

[0231] 在一些实施方案中,B细胞群的扩增通过添加到细胞培养物中的小分子化合物诱导和/或增强。例如,与CD40结合并二聚化CD40的化合物可用于触发CD40信号传导通路。

[0232] 如技术人员所知,可在本方法中使用各种培养基中的任何一种(参见例如,Current Protocols in Cell Culture,2000-2009,John Wiley&Sons,Inc.)。在一些实施方案中,用于本文所述方法的培养基包括但不限于Iscove改良Dulbecco培养基(有或没有胎牛或其他合适的血清)。示例性培养基还包括但不限于IMDM、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15和X-Vivo 20。在一些实施方案中,培养基可包含表面活性剂、抗体、血浆制品(plasmanate)或还原剂(例如N-乙酰-半胱氨酸、2-巯基乙醇)、一种或多种抗生素和/或添加剂,如胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠和环孢菌素。在一些实施方案中,还可以使用IL-6、可溶性CD40L和交联增强剂。

[0233] 将B细胞在条件和足够的时期下培养,以实现所期望的分化和/或激活。在一些实施方案中,将B细胞在条件下和足够的时期下培养,使得10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或甚至100%的B细胞根据需要分化和/或激活。在一些实施方案中,B细胞被激活并分化为浆母细胞和浆细胞的混合群体。如技术人员所认识到的,浆母细胞和浆细胞可以通过使用本文其他地方所述的标准流式细胞术方法的细胞表面蛋白表达模式来鉴定,如CD38、CD78、IL-6R、CD27<sup>高</sup>和CD138中的一种或多种的表达和/或CD19、CD20和CD45中的一种或多种的表达的缺乏或降低。如技

术人员所理解的,记忆B细胞通常是CD20+CD19+CD27+CD38-,而早期浆母细胞是CD20-CD 19+CD27++CD38++。在一实施方案中,使用本文所述方法培养的细胞是CD20-、CD38+、CD138-。在另一实施方案中,细胞具有CD20-、CD38+、CD138+的表型。在某些实施方案中,将细胞培养1-7天。在进一步的实施方案中,将细胞培养7天、14天、21天或更长时间。因此,细胞可以在适当的条件下培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29天或更多天。细胞被重新接种,并且可以使用本领域已知的技术根据需要添加或改变培养基和补充剂。

[0234] 在一些实施方案中,将B细胞在条件和足够的时期下培养,使得至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的细胞分化和激活,以产生Ig和/或表达转基因。

[0235] 可以通过诸如将H-尿苷掺入RNA中(随着B细胞分化,RNA合成增加)的技术或通过测量与细胞增殖相关的DNA合成的H-胸苷掺入来测量B细胞激活的诱导。在一些实施方案中,可以将白细胞介素-4(IL-4)以适当的浓度(例如,约10ng/ml)添加到培养基中,以用于增强B细胞增殖。

[0236] 可替代地,将B细胞激活作为免疫球蛋白分泌的函数进行测量。例如,将CD40L与IL-4(例如,10ng/ml)和IL-5(例如,5ng/ml)或其他激活B细胞的细胞因子一起添加到静息B细胞中。流式细胞术也可用于测量激活B细胞典型的细胞表面标志物。参见例如,Civin CI, Loken MR, Int'l J. Cell Cloning 987;5:1-16;Loken, MR, 等人, Flow Cytometry Characterization of Erythroid, Lymphoid and Monomyeloid Lineages in Normal Human Bone Marrow, Flow Cytometry in Hematology, Laerum OD, Bjerksnes R. 编辑, Academic Press, New York 1992; 第31-42页; 和 LeBein TW, et al, Leukemia 1990;4: 354-358。

[0237] 在培养适当的时期后,如从2、3、4、5、6、7、8、9天或更多天,通常在3天左右,可以添加额外体积的培养基。如Noelle等人,(1991) J. Immunol. 146:1118-1124中所述,可以在IgM和IgG1的培养和定量期间的不同时间收获来自单独培养物的上清液。在一些实施方案中,收获培养物,并使用流式细胞术、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、ELISPOT或本领域已知的其他测定法测量目标转基因的表达。在一些实施方案中,ELISA用于测量抗体同种型产生,例如IgM或目标转基因的产物。在一些实施方案中,使用可商购获得的抗体(如山羊抗人IgG)作为捕获抗体进行IgG测定,然后使用各种合适的检测试剂,如生物素化的山羊抗人Ig、链霉亲和素和素碱性磷酸酶和底物中的任何一种进行检测。

[0238] 在某些实施方案中,将B细胞在条件下和足够的时期下培养,使得细胞数量是培养开始时B细胞数量的1、10、25、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000倍或更多。在一些实施方案中,细胞的数量是培养开始时B细胞数量的10-1000倍大,包括其中的连续整数。例如,扩增的B细胞群比初始分离的B细胞群大至少10倍。在另一实施方案中,扩增的B细胞群比初始分离的B细胞群大至少100倍。在一些实施方案中,扩增的B细胞群比初始分离的B细胞群大至少500倍。

[0239] 在一些实施方案中,方法包括在施用于对象之前扩增遗传修饰的B细胞。

[0240] 在一些实施方案中,在施用于对象之前,评估工程化的B细胞群的多克隆性。确保最终细胞产物的多克隆性是一项重要的安全参数。具体而言,优势克隆的出现被认为可能

有助于体内肿瘤发生或自身免疫疾病。多克隆性可以通过本领域已知的或本文所述的任何方式进行评估。例如,在一些实施方案中,通过对工程化的B细胞群中表达的B细胞受体进行测序(例如,通过深度测序)来评估多克隆性。由于B细胞受体在B细胞发育过程中发生变化,使其在B细胞之间独一无二,因此该方法允许量化有多少细胞共用相同的B细胞受体序列(意味着它们是克隆的)。因此,在一些实施方案中,表达相同B细胞受体序列的工程化的B细胞群中的B细胞越多,该群体的克隆性就越强,并因此,该群体对对象施用的安全性就越低。相反,在一些实施方案中,表达相同B细胞受体序列的工程化的B细胞群中的B细胞越少,该群体的克隆性(即多克隆)越低,并因此,该群体对对象的施用越安全。

[0241] 在一些实施方案中,在施用于对象之前,评估工程化的B细胞群的多克隆性。确保最终细胞产物的多克隆性是一项重要的安全参数。具体而言,优势克隆的出现被认为可能有助于体内肿瘤发生或自身免疫疾病。多克隆性可以通过本领域已知的或本文所述的任何方式进行评估。例如,在一些实施方案中,通过对工程化的B细胞群中表达的B细胞受体进行测序(例如,通过深度测序)来评估多克隆性。由于B细胞受体在B细胞发育过程中发生变化,使其在B细胞之间独一无二,因此该方法允许量化有多少细胞共用相同的B细胞受体序列(意味着它们是克隆的)。因此,在一些实施方案中,表达相同B细胞受体序列的工程化的B细胞群中的B细胞越多,该群体的克隆性就越强,并因此,该群体对对象施用的安全性就越低。相反,在一些实施方案中,表达相同B细胞受体序列的工程化的B细胞群中的B细胞越少,该群体的克隆性(即多克隆)越低,并因此,该群体对对象的施用越安全。

[0242] 在一些实施方案中,工程化的B细胞在它们被确定为具有足够多克隆性后被施用于对象。例如,在确定最终群体中没有特定的B细胞克隆包含总B细胞群体的超过约0.2%之后,可以将工程化的B细胞施用于对象。在确定最终群体中没有特定的B细胞克隆包含总B细胞群的超过约0.1%之后,或超过总B细胞群的超过约0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%或约0.04%之后,可以将工程化的B细胞施用于对象。在特定实施方案中,在确定最终群体中没有特定的B细胞克隆包含总B细胞群的超过约0.03%之后,将工程化的B细胞(例如,其产生IDUA)施用于对象。

[0243] 在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体显示高程度的多克隆性。在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆少于总B细胞群的0.2%。在一些实施方案中,扩增的遗传修饰的B细胞的最终群体中的任何特定B细胞克隆包含少于总B细胞群的0.05%。

[0244] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞包含编码对甲氨蝶呤具有增强的抗性的人DHFR基因的多核苷酸。在一些实施方案中,对甲氨蝶呤具有增强的抗性的人DHFR基因在氨基酸22处包含亮氨酸至酪氨酸的取代,并且在氨基酸31处包含苯丙氨酸至丝氨酸的取代。在一些实施方案中,方法包括在收获以用于施用之前用甲氨蝶呤处理遗传修饰的B细胞。在一些实施方案中,甲氨蝶呤处理为100nM至300nM。在一些实施方案中,甲氨蝶呤处理为200nM。

[0245] 在一些实施方案中,遗传修饰的B细胞在施用于对象之后在中枢神经系统(CNS)内的各组织中穿行。在一些实施方案中,向对象施用遗传修饰的B细胞导致对象不同组织中糖胺聚糖(GAG)的降低。在一些实施方案中,向对象施用遗传修饰的B细胞导致中枢神经系统(CNS)内的组织中GAG的降低。

[0246] 本文中提及的所有出版物和专利均通过引用整体并入本文中,就像每个单独的出版物或专利被明确地且单独地指示通过引用并入本文中一样。在冲突的情况下,本申请,包括本文中的任何定义,将支配。然而,提及本文引用的任何参考文献、文章、出版物、专利、专利出版物和专利申请,不会也不应被视为承认或任何形式的暗示它们构成有效的现有技术或形成世界上任何国家的公知常识的一部分。

[0247] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,且不得解释为限制所描述的主题。

[0248] 虽然已经示出和描述了示例性实施方案,但是应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以在其中进行各种改变。

## 实施例

[0249] 现在参照以下实施例来描述本公开内容。提供这些实施例仅是为了说明的目的,并且本公开决不应被解释为限于这些实施例,而是应该被解释为包括由于本文所提供的教导而变得明显的任何和所有变化。

[0250] 在没有进一步描述的情况下,据信本领域普通技术人员可以使用前面的描述和下面的说明性实例来制造和利用本公开的方法,并实践所要求保护的方法。因此,以下工作实例具体指出了本公开的实施方案,并且不应被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0251] 现在描述这些实验中采用的材料和方法。

实施例1:经由直接注射到脑脊液中向中枢神经系统施用工程化的B细胞背景

[0252] I型黏多糖贮积症(MPSI)是一种溶酶体储存疾病,由酶 $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶(IDUA)的缺乏引起。IDUA催化糖胺聚糖(GAG)硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素在体内的分解。缺乏IDUA会导致GAG在包括大脑在内的所有组织中积聚。

[0253] 目前的治疗方法包括造血干细胞移植和酶替代。两者都恢复了全身IDUA活性,并降低了外围积累的GAG水平。尽管这些治疗显著延长了预期寿命并提高了生活质量,但疾病负担仍然很大。特别是认知障碍被证明对治疗具有耐受性,因此有必要开发直接靶向CNS的疗法。

[0254] NSG-MPSI小鼠是免疫缺陷型的,且缺乏IDUA表达。小鼠概括了人类MPSI的许多表现,包括缺乏IDUA活性和高GAG水平。

[0255] 为了特别解决CNS中IDUA的缺乏,将遗传工程化以表达IDUA的人类B细胞引入动物的侧脑中。

### 方法

[0256] 用 $2 \times 10^5$ 个ISP-001B细胞经ICV(一个侧脑室)注射NSG-MPSI小鼠(4月龄, $n=6$ )。在注射后第1天( $n=1$ )、第7天( $n=1$ )、第28天( $n=2$ )和第42天( $n=4$ )将小鼠安乐死。未处理的NSG-MPSI小鼠( $n=2$ )用作阴性对照。分析脑组织的IDUA活性和GAG水平。对于IDUA酶测定,裂解脑组织,并在使用4-甲基伞形酮基- $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸苷(4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -L-iduronide)作为底物(Glycosynth, England)的荧光测定中测定IDUA活性。使用Pierce测定系统测定组织裂解物的蛋白质浓度。IDUA活性记录为nmol/h/mg蛋白质。对于GAG测定,使用Blyscan™硫酸化糖胺聚糖测定试剂盒(Bicolor Life Science Assays; Accurate Chemical)测定脑裂解物。组织GAG含量以微克GAG/毫克蛋白质为单位进行报告。

### 结果

[0257] 使用荧光法测定全脑提取物的IDUA活性(图1)。与对照动物相比,我们在处理动物中观察到显著的IDUA活性。ICV注射后7天酶活性最高,但在第28天和第42天仍能检测到。

[0258] 对全脑提取物的GAG水平进行了测定(图2)。与对照动物相比,所有处理动物脑组织中的GAG水平都较低。注射后一天的水平最低,但在研究持续期间保持低于在对照动物中观察到的那些水平。

### 讨论

[0259] 这项研究证明了通过输注入脑脊液(CSF)中,在这种情况下,通过ICV注射,将治疗B细胞递送到CNS。IDUA的分泌在注射后一周达到峰值,但在研究持续期间(六周)保持可检测到IDUA水平。IDUA的存在也反映在大脑中GAG水平的显著降低中。

### 实施例2:通过脑室内注射将经修饰的人B细胞异种过继转移到小鼠中方法

[0260] 按照标准方案,用LUC对人B细胞进行转座。用从同一供体分离的 $3 \times 10^6$ 个CD4<sup>+</sup>T细胞对NSG小鼠( $n=4$ ,雌性)进行腹腔注射。在用T细胞预处理一周后,在小鼠的两个侧脑室中注射LUC转座的人B细胞( $4 \times 10^5$ 个/脑室)。通过生物发光成像(IVIS)每两周监测一次B细胞的植入。研究在第16天(B细胞注射后)结束。

### 结果

[0261] 在B细胞注射后2天(2/26/2021)开始对小鼠进行成像,之后每两周进行一次。未发现不良反应。

[0262] 结果如图3和图4所示。在所有动物中都检测到发光信号,然而,在不同的时间点和不同的强度下检测到。小鼠1总体上显示出最低的信号,在注射后13天具有最高的信号。除第一次成像外,小鼠2在所有动物中显示出最高的信号。信号在第13天增加至最高水平,之后其有所下降。动物3在整个研究中显示出发光的稳定增加,且小鼠4在第6天的初始下降后显示出发光稳定增加。所有动物中的发光信号似乎都局限于脑室,尽管小鼠2在第13天在脾脏区域中显示出一些信号。

### 讨论

[0263] 在整个研究过程中,在囊泡区域中都检测到发光信号,表明B细胞成功植入。该信号显示出动物间的变异性,但似乎随着时间的推移而增加,表明B细胞的扩增。该实验证明,在至CNS的脑室内(ICV)施用后,人类B细胞可以成功植入侧脑室中。

## 序列表

- <110> 益缪索夫特公司(Immunosoft Corporation)  
 克里斯蒂安·S·哈姆佩(Hampe, Christiane S.)
- <120> 施用遗传修饰的B细胞以用于治疗剂的体内递送的方法
- <130> IMCO-009/01W0 312423-2066
- <150> US 63/107,992
- <151> 2020-10-30
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 7322
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 实验室制备 - 质粒构建体pKT2/EEK-IDUA-DHFR
- <400> 1

```

cctggatcca gatccctata cagttgaagt cggaagtta catacactta agttggagtc      60
attaaaactc gtttttcaac tactccacaa atttcttggt aacaacaat agttttggca      120
agtcagttag gacatctact ttgtgcatga cacaagtcatt ttttccaaca attgttttaca    180
gacagattat ttcacttata attcactgta tcacaattcc agtgggtcag aagttttacat    240
acactaagtt gactgtgcct ttaaacagct tggaagctgc gcactaggca agttaactaa     300
ctcctctgaa tgtcagtatt tccatctgta agatgaacac agtggggctc caattccata     360
ccacatttgt agaggtttta ctgtgtttaa aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga     420
aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca     480
aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt     540
gtggtttgtc caaactcadc aatgtatctt atcatgtctg gccagctaga gcggccgctt     600
aatcattctt ctcatatact tcaaatttgt acttaatgcc tttctctcc tggacatcag     660
agagaacacc tgggtattct ggcagaagtt tatatttctc caaatcaatt tctggaaaaa     720
acgtgtcact ttcaaagtct tgcgatgcc ttgtcacaaa tagtttaaga tggcctgggt     780
gattcatggc ttcttataa acagaactgc caccaactat ccagaccatg tctactttat     840
ttgctaattc tggttgttca gtaagtttta aggcatcadc tagacttctg gaaagaaaat     900
gagctccttg tggaggttcc ttgagttctc tgctgagaac taaattaatt ctacccttta     960
aaggtcgatt cttctcagga atggagaacc aggtcttctt acccataatc accagattct    1020
gtttaccttc tactgaagag gttgtggtea ttctctggaa atatctggat tcattctctga    1080
gcggtggcca gggatagtc cegttcttgc cgatgcccatt gttctgggac acagcgacga    1140
tgcagtttag cgaaccaacc atgatggaag ctactgtaca ccaacctgtc aggagaggaa    1200
agagaagaag gttagtacaa ttgtctaggg ctgcagggtt catagtgcc cttttctctgc    1260
actgccccat ctctgccc ccttttccc ggcatagaca gtcagtgact taccaaactc    1320

```

acaggagggga	gaaggcagaa	gcttgaatgt	tcacagagac	tactgcactt	atatatggtt	1380
ctccccacc	ctggggaaaa	aggtggagcc	agtacaccac	atcactttcc	cagtttacc	1440
aagccccacc	ttctctaggc	accagttaa	ttgccaccc	ctcccccaa	cttctcagg	1500
actgtgggcc	atgtgctctc	tgcccactga	ggggcactca	gccctcaagc	atgctcttct	1560
ccactagtca	cccctattga	ccttatgtat	gtgccaataa	tgggaaaaac	ccattgactc	1620
acccccctatt	gaccttttgt	actgggcaaa	acccaatgga	aagtccttat	tgactcagtg	1680
tacttggctc	caatgggact	ttcctgttga	ttggcgcgcc	cgggggatcc	agtttggtta	1740
attaaaccgg	tgagtttcat	ggttacttgc	ctgagaagat	taaaaaaagt	aatgctacct	1800
tatgaggggag	agtcccagg	accaagatag	caactgtcat	agcaaccgtc	acactgcttt	1860
ggtcaaggag	aagacccttt	ggggaactga	aaacagaacc	ttgagcaca	ctgttgcttt	1920
cgctcccatc	ctcctccaac	agggtgggt	ggagcactcc	acacccttcc	accggtcgta	1980
cggtcagcc	agagtaaaaa	tcacacccat	gacctggcca	ctgagggctt	gatcaattca	2040
ctttgaattt	ggcattaaat	accattaagg	tatattaact	gattttaaaa	taagatatat	2100
tcgtgaccat	gtttttaact	ttcaaaaatg	tagctgccag	tgtgtgattt	tatttcagtt	2160
gtacaaaata	tctaaaccta	tagcaatgtg	attaataaaa	acttaaacat	attttccagt	2220
accttaattc	tgtgatagga	aaattttaat	ctgagtattt	taatttcata	atctctaaaa	2280
tagtttaatg	atttgtcatt	gtgttgctgt	cgtttacc	agctgatctc	aaaagtgata	2340
tttaaggaga	ttattttggt	ctgcaacaac	ttgatagggc	tcagcctctc	ccaccaacg	2400
ggtggaatcc	cccagagggg	gatttccaag	aggccacctg	gcagttgctg	agggtcagaa	2460
gtgaagctag	ccacttcctc	ttaggcaggt	ggccaagatt	acagttgacc	cgtacgtgca	2520
gctgtgccca	gcctgcccc	tcccctgctc	atttgcattg	tcccagagca	caacctcctg	2580
ccctgaagcc	ttattaatag	gctggtcaca	cttgtgcag	gagtcagact	cagtcaggac	2640
acagctctag	agtcgagaat	tcggccatgc	gtcccctg	cccccgccc	gcgctgctgg	2700
cgctcctggc	ctcgtcctg	gccgcgccc	cggtggccc	ggccgaggcc	ccgcacctgg	2760
tgcaggtgga	cgcgccccg	gcgctgtggc	cctgcggcg	cttctggagg	agcacaggct	2820
tctgcccc	gctgccacac	agccaggctg	accagtacgt	cctcagctgg	gaccagcagc	2880
tcaacctcgc	ctatgtgggc	gccgtccctc	accgcggcat	caagcaggtc	cggaccact	2940
ggctgctgga	gcttgtcacc	accaggggg	ccactggacg	ggcctgagc	tacaacttca	3000
cccacctgga	cgggtacctg	gaccttctca	gggagaacca	gctcctcca	gggtttgagc	3060
tgatgggcag	cgctcgggc	cacttactg	actttgagga	caagcagcag	gtgtttgagt	3120
ggaaggactt	ggtctccagc	ctggccagga	gatacatcgg	taggtacgga	ctggcgcattg	3180
tttccaagtg	gaacttcgag	acgtggaatg	agccagacca	ccacgacttt	gacaacgtct	3240
ccatgaccat	gcaaggett	ctgaactact	acgatgctg	ctcggagggt	ctgcgcgccg	3300
ccagccccgc	cctgcggctg	ggaggcccc	gcgactcctt	ccacaccca	ccgcgatccc	3360
cgctgagctg	ggcctcctg	cgccactgcc	acgacgtac	caacttcttc	actggggagg	3420
cgggcgtg	gctggactac	atctccctc	acaggaagg	tgcgcgcagc	tccatctcca	3480
tctggagca	ggagaaggtc	gtcgcgcagc	agatccggca	gctcttccc	aagtctcgg	3540
acacccccat	ttacaacgac	gaggcggacc	cgctggtggg	ctggtccctg	ccacagccgt	3600
ggagggcgga	cgtgacctac	gcggccatgg	tggtgaaggt	catcgcgcag	catcagaacc	3660

tgctactggc	caacaccacc	tccgccttcc	cctacgcgct	cctgagcaac	gacaatgcct	3720
tcctgagcta	ccaccgcac	cccttcgcgc	agcgcacgct	caccgcgcgc	ttccaggtca	3780
acaacacccg	cccgccgcac	gtgcagctgt	tgcgcaagcc	ggtgctcacg	gccatggggc	3840
tgctggcgct	gctggatgag	gagcagctct	gggccgaagt	gtcgcaggcc	gggaccgtcc	3900
tggacagcaa	ccacacggtg	ggcgtcctgg	ccagcgccea	ccgccccag	ggccccggccg	3960
acgcctggcg	cgccgcggtg	ctgatctacg	cgagcgacga	caccgcgcc	cacccaacc	4020
gcagcgtcgc	ggtgacctg	cggtcgcgcg	gggtgcccc	cgccccggg	ctggtctacg	4080
tcacgcgcta	cctggacaac	gggctctgca	gccccgacgg	cgagtggcgg	cgcttgggcc	4140
ggccccgtctt	ccccacggca	gagcagttcc	ggcgcacg	cgcggtgag	gacccggtgg	4200
ccgcggcgcc	ccgcccccta	cccgcggcg	gccgctgac	cctgcgcccc	gcgctgcggc	4260
tgccgtcgct	tttctgggtg	cacgtgtgtg	cgccccca	gaagccgcc	gggcaggtca	4320
cgcggtccg	cgccctgcc	ctgaccaag	ggcagctggt	tctggtctgg	tcggatgaac	4380
acgtgggctc	caagtgcctg	tggacatac	agatccagtt	ctctcaggac	ggtaaggcgt	4440
acacccccgt	cagcaggaag	ccatcgacct	tcaacctctt	tgtgttcagc	ccagacacag	4500
gtgctgtctc	tggctcctac	cgagttcgag	cctggacta	ctgggcccga	ccaggcccc	4560
tctcggacc	tgtgccgtac	ctggaggtcc	ctgtgccaag	aggccccca	tccccgggca	4620
atccatgagc	ctgtgctgag	ccccagtg	atcctctaga	gtcgagaatt	cactcctcag	4680
gtgcaggctg	cctatcagaa	ggtggtggct	ggtgtggcca	atgccctggc	tcacaaatac	4740
cactgagatc	ttttccctc	tgccaaaaat	tatggggaca	tcatgaagcc	ccttgagcat	4800
ctgacttctg	gctaataaag	gaaatttatt	ttcattgcaa	tagtgtgttg	gaattttttg	4860
tgtctctcac	tcggaaggac	atatgggagg	gcaaatcatt	taaaacatca	gaatgagtat	4920
ttggtttaga	gtttggcaac	atatgccata	tgctggctgc	catgaacaaa	ggtggctata	4980
aagaggtcat	cagtatatga	aacagcccc	tgctgtccat	tccttattcc	atagaaaagc	5040
cttgacttga	ggttagattt	ttttatatt	ttgtttgtg	ttattttttt	ctttaacatc	5100
cctaaaattt	tccttacatg	ttttactagc	cagatttttc	ctcctctcct	gactactccc	5160
agtcatagct	gtccctcttc	tcttatgaag	atccctcgac	ctgcataccg	gtcaagctag	5220
cgatatcaat	taaccctcac	taaagggaga	ccaagttaa	caatttaaag	gcaatgctac	5280
caaatactaa	ttgagtgtat	gtaaacttct	gacccactgg	gaatgtgatg	aaagaaataa	5340
aagctgaaat	gaatcattct	ctctactatt	attctgatat	ttcacattct	taaaataaag	5400
tggatgacct	aactgacct	agacagggaa	ttttactag	gattaaatgt	caggaattgt	5460
gaaaaagtga	gtttaaatgt	atttggctaa	ggtgtatgta	aacttccgac	ttcaactgta	5520
taggatctg	gtaccattta	aatctgttcc	gcttctctgc	tactgactc	gctgcgctcg	5580
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cgtaatac	gttatccaca	5640
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	5700
cgtaaaaagg	ccgcgttget	ggcgtttttc	cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	5760
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcag	gactataaag	ataccagggc	5820
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgccgct	taccggatac	5880
ctgtccgct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	5940
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	6000

cccgaccgct	gcgcccttacc	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccggg	aagacacgac	6060
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	6120
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtatttggg	6180
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttacctc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	6240
aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggttt	ttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	6300
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	6360
gaaaactcac	gttaagggat	tttggtcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	6420
ctttttgcca	gtgttacaac	caattaacca	attctgatta	gaaaaactca	tcgagcatca	6480
aatgaaactg	caattttatc	atatcaggat	tatcaatacc	atatttttga	aaaagccggt	6540
tctgtaatga	aggagaaaa	tcaccgagc	agttccatag	gatggcaaga	tcttggtatc	6600
ggtctgcgat	tccgactcgt	ccaacatcaa	tacaacctat	taatttcccc	tcgtcaaaaa	6660
taaggttacc	aagtgagaaa	tcacatgag	tgacgactga	atccggtgag	aatggcaaaa	6720
gtttatgcat	ttctttccag	acttgttcaa	cagccagcc	attacgctcg	tcatcaaaat	6780
cactcgcacc	aaccaaaccg	ttattcattc	gtgattgcgc	ctgagcgaga	cgaaatacgc	6840
gatcgtggt	aaaaggacaa	ttacaacag	gaatcgaatg	caaccggcgc	aggaactg	6900
ccagcgcacc	aacaatattt	tcacctgaat	caggatattc	ttctaatacc	tggaatgctg	6960
tttttccggg	gatcgcagtg	gtgagtaacc	atgcatcacc	aggagtacgg	ataaaatgct	7020
tgatggtcgg	aagaggcata	aattccgtca	gccagtttag	tctgaccacc	tcactgttaa	7080
catcattggc	aacgctacct	ttgccatggt	tcagaaacaa	ctctggcgca	tcgggcttcc	7140
catacaagcg	atagattgtc	gcacctgatt	gcccacatt	atcgcgagcc	catttatacc	7200
catataaatc	agcatccatg	ttggaattta	atcgcggcct	cgacgtttcc	cgttgaaatg	7260
ggctcataac	acccttgta	ttactgttta	tgtaagcaga	cagttttatt	gttcatgatg	7320
ca						7322

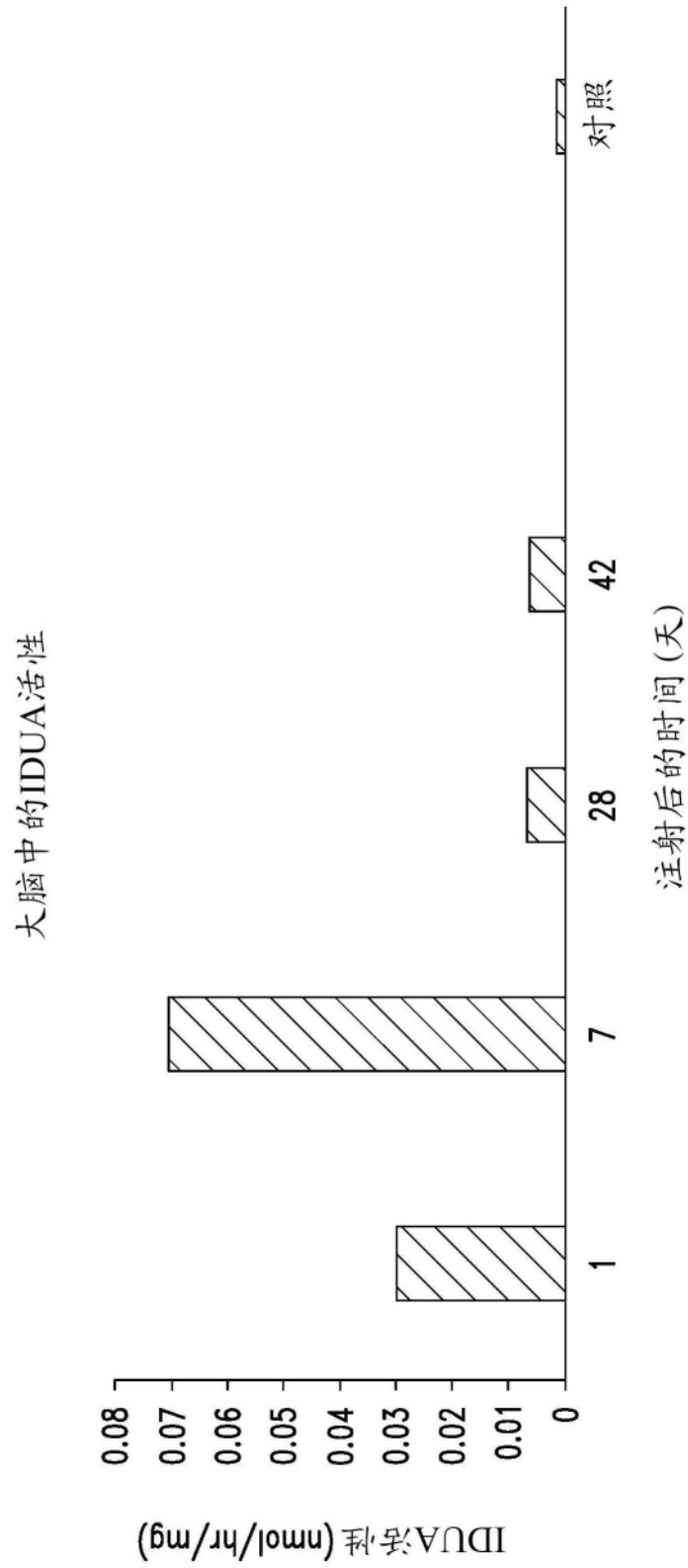


图1

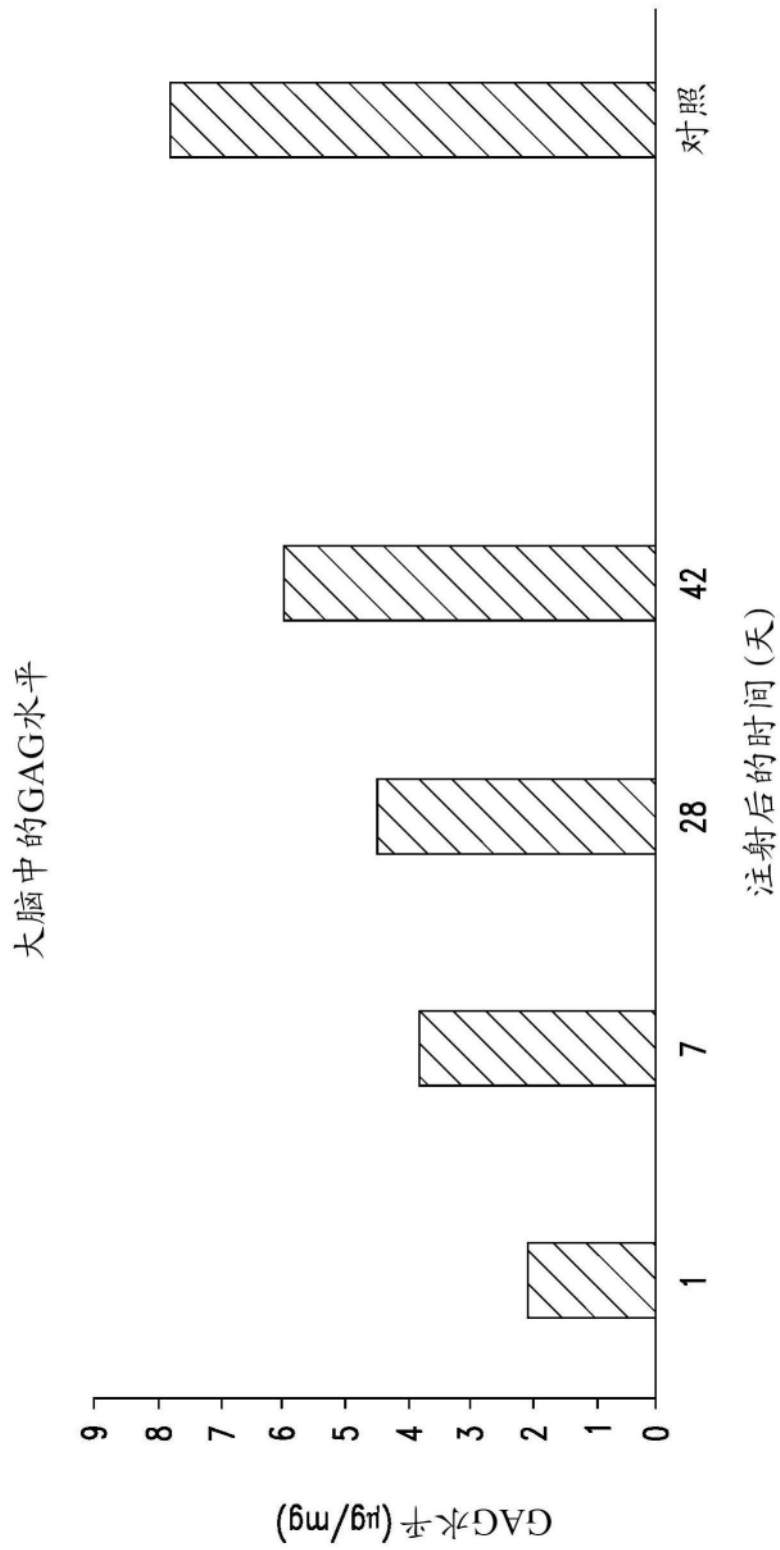


图2

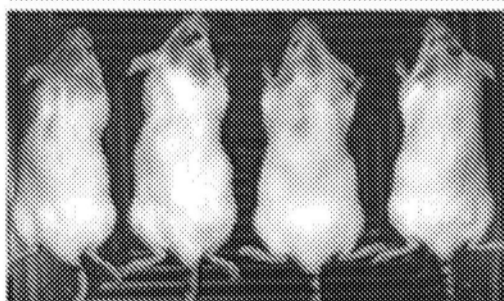
02/26/2021



03/02/2021



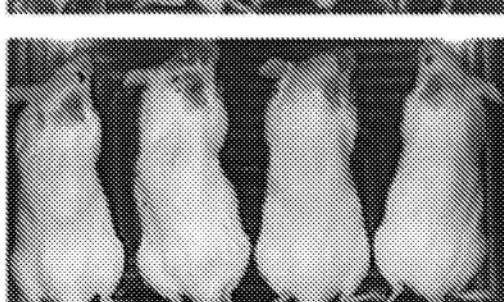
03/05/2021



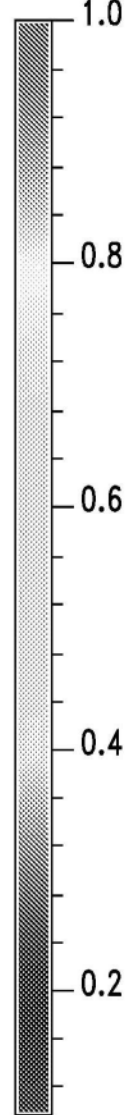
03/09/2021



03/12/2021



发光



辐射亮度  
(p/sec/cm<sup>2</sup>/sr)

色标  
最小=1.00e4  
最大=1.00e5

图3

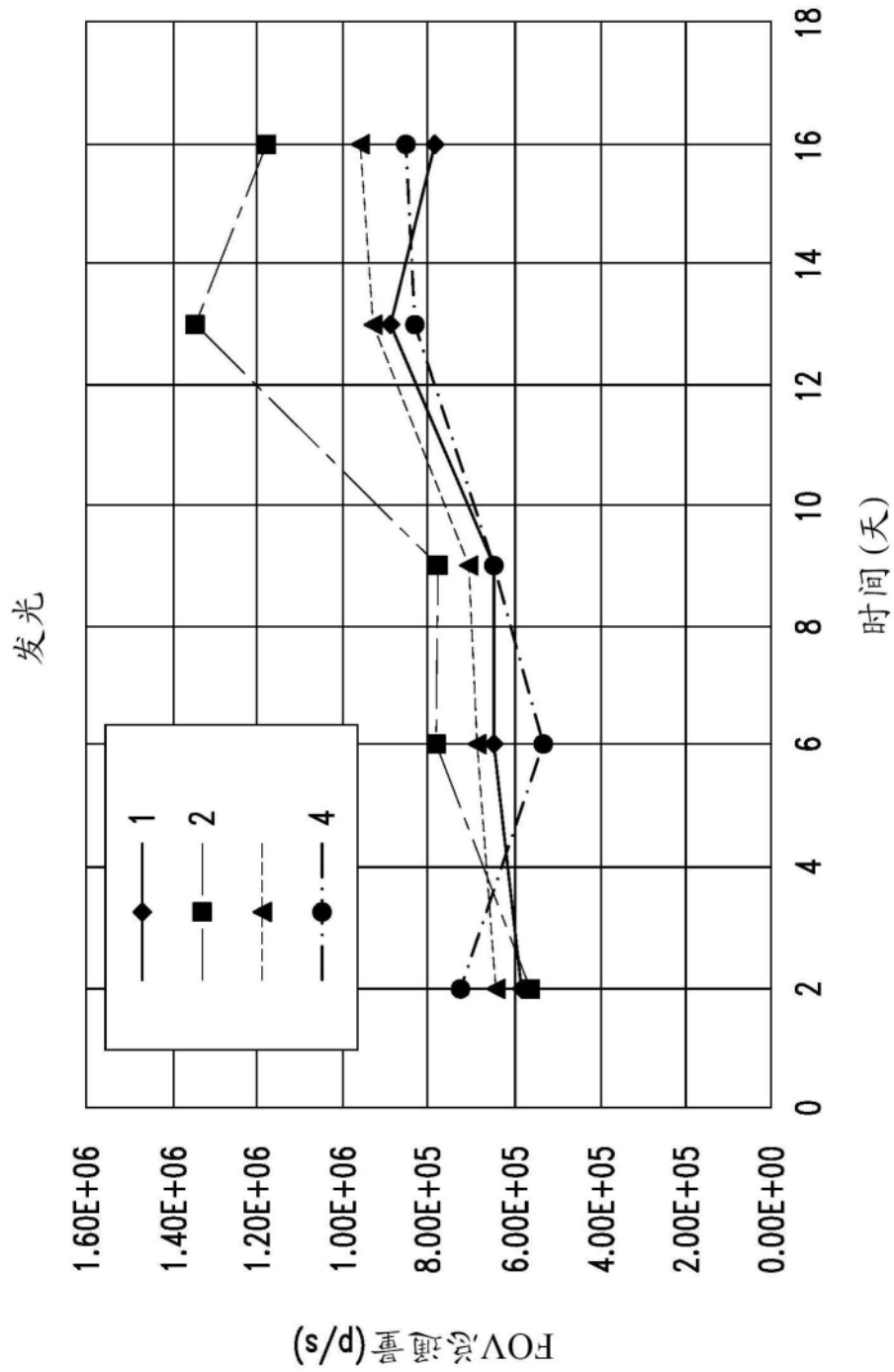


图4