(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114790447 A
(43)申请公布日 2022.07.26

(21)申请号 202210388064.8
(22)申请日 2016.08.05
(30)优先权数据
62/201,990 2015.08.06 US
(62)分案原申请数据
201680046264.8 2016.08.05
(71)申请人 明尼苏达大学董事会
地址 美国明尼苏达州
申请人 北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校
阿尔布莱希特-路德维希-弗莱堡大学
圣祖德儿童研究医院
(72)发明人 B·R·布莱扎 B·H·科恩 P·J·默里 J·P·Y·廷 R·蔡瑟 J·S·米勒
(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 刘海
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C12N 5/078(2010.01)
C12N 15/87(2006.01)
A61K 35/15(2015.01)
A61P 37/06(2006.01)

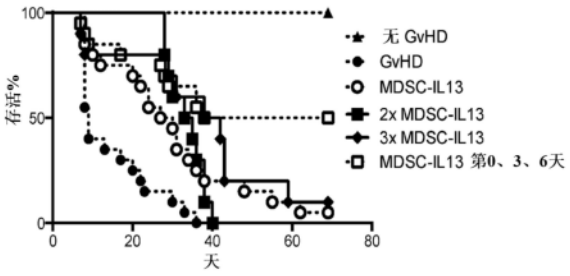
权利要求书1页 说明书14页 附图10页

(54)发明名称

调节髓源性抑制细胞的炎性小体活化用于治疗GvHD或肿瘤

(57)摘要

在一方面,本发明提供了治疗患有移植物抗宿主病(GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病风险的受试者的方法,通常包括向受试者施用与合适的对照受试者相比有效改善移植物抗宿主病的至少一种症状或临床体征的多个髓源性抑制细胞(MDSC)。在另一方面,本发明提供了治疗受试者中肿瘤的方法,通常包括向受试者施用抗肿瘤疗法,并向受试者共同施用炎性小体引发剂,其量有效地充分增加MDSC的炎性小体活化从而降低MDSC的抑制功能。



CN 114790447 A

1.一种髓源性抑制细胞(MDSC),其具有含CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)缺陷。

2.根据权利要求1所述的MDSC,其中,所述MDSC包含导致抵抗炎性小体活化的遗传修饰。

3.根据权利要求2所述的MDSC,其中,所述遗传修饰是导致ASC缺陷的对ASC基因的修饰。

4.根据权利要求2或3所述的MDSC,其中,所述MDSC是通过使用shRNA、siRNA和/或CRISPR而导致ASC缺陷。

5.包括至少一个根据权利要求1至4中任一项所述的MDSC的多个髓源性抑制细胞(MDSCs)。

6.根据权利要求5所述的多个MDSCs,其中,所述MDSC抵抗炎性小体活化,抑制或消除系统性免疫病状,阻止同种异型反应性T细胞的致敏和扩增,抑制炎症应答,禁止炎性小体活化,减少患移植物抗宿主病(GvHD)的风险,和/或改善GvHD的长期存活。

7.根据权利要求5所述的多个MDSCs,其中,所述MDSC与没有ASC缺陷的MDSC相比,在足够长的时间内保持活力和功能。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的多个MDSCs用于治疗受试者的肿瘤的用途。

9.根据权利要求1至7中任一项所述的多个MDSCs用于治疗受试者的移植物抗宿主病(GvHD)的用途。

10.根据权利要求9所述的用途,其中,所述GvHD包括急性移植物抗宿主病。

11.根据权利要求9所述的用途,其中,所述受试者需要进行淋巴造血紊乱的同种异型移植,调理方案,或MDSC疗法。

12.根据权利要求8或9所述的用途,其中,所述多个MDSCs与抑制炎性小体的药剂结合使用,以降低所述MDSC受到炎性小体活化的程度。

13.根据权利要求12所述的用途,其中,所述药剂包括MCC950或β-羟基丁酸酯。

14.根据权利要求8或9所述的用途,其中,所述用途包括多次连续施用多个MDSCs。

15.根据权利要求14所述的用途,其中,至少一次施用多个MDSCs是在先前施用多个MDSCs的至少三天之后进行。

16.根据权利要求14所述的用途,其中,所述用途包括至少三次施用多个MDSCs。

17.一种增加髓源性抑制细胞(MDSC)治疗潜力的体外方法,包括破坏细胞的含CARD的凋亡相关斑点样蛋白(ASC)基因的表达,从而获得具有改进治疗潜力的MDSC。

18.根据权利要求17所述的体外方法,其中,所述破坏步骤包括使用shRNA、siRNA和/或CRISPR进行遗传修饰。

19.根据权利要求18所述的体外方法,其中,与未修饰的MDSC相比,所述遗传修饰使MDSC抵抗炎性小体活化,并避免精氨酸酶-1活性的降低。

20.根据权利要求17所述的体外方法,其中,具有改进治疗潜力的MDSC是ASC缺陷的。

21.根据权利要求17所述的体外方法,其中,改进的治疗潜力包括抵抗炎性小体活化,抑制或消除系统性免疫病状,阻止同种异型反应性T细胞的致敏和扩增,抑制炎症应答,禁止炎性小体活化,减少患GvHD的风险,和/或改善GvHD的长期存活。

调节髓源性抑制细胞的炎性小体活化用于治疗GvHD或肿瘤

[0001] 本申请是申请号为201680046264.8,申请日为2016年8月5日,发明名称为“调节髓源性抑制细胞的炎性小体活化用于治疗GvHD或肿瘤”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2015年8月6日提交的美国临时专利申请No.62/201,990的优先权,其通过援引并入本文。

[0004] 政府基金

[0005] 本发明是在国立卫生研究院授予的R01 HL56067、AI 34495、HL1181879、R01CA156330和U19-AI067798的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

发明内容

[0006] 本公开在一方面描述了治疗患有移植物抗宿主病(graft-versus-host disease,GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病风险的受试者的方法。通常,所述方法包括向受试者施用与合适的对照受试者相比有效改善移植物抗宿主病的至少一种症状或临床体征的多个髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cell,MDSC)。

[0007] 在一些实施方式中,所述方法包括当先前施用的MDSC受到炎性小体活化时多次连续施用MDSC。

[0008] 在一些实施方式中,所述多个MDSC中的至少一部分包含引起MDSC抵抗炎性小体活化的遗传修饰。

[0009] 在一些实施方式中,所述方法包括向受试者共同施用抑制炎性小体活化的试剂。

[0010] 在另一方面,本发明描述了治疗受试者中肿瘤的方法。通常,所述方法包括向受试者施用抗肿瘤疗法并向受试者共同施用炎性小体引发剂(inciting agent),其量有效地充分增加MDSC的炎性小体活化从而降低MDSC的抑制功能(suppressor function)。

[0011] 本发明的以上概述并非意图描述本发明的每个公开的实施方式或每个实现方法(implementation)。以下的描述更具体的举例说明了实施方式。在整个申请的不同位置,通过实例列表提供指导,这些实例可以以各种组合使用。在每种情况下,所记载的列表仅用作代表性群组,不应被解释为排他性列表。

[0012] 附图简要说明

[0013] 图1、来源于骨髓(bone marrow)的MDSC-IL 13提高GvHD存活率,但在体内五天后抑制作用受损(compromised)。(A)如所示,给予经致死照射的BALB/c受体以1×10^7个C57Bl/6骨髓(仅BM),或骨髓加2×10^6个耗尽CD25的T细胞(GvHD),或骨髓、T细胞和6×10^6个MDSC-IL13(GvHD+MDSC-IL13)。Kaplan-Meier存活曲线代表四个合并(pooled)和独立实验(independent experiment)(n=40只动物/组)。GvHD对比GvHD+MDSC,$p<0.0001$。(B-C)在接受仅骨髓(无GvHD)或骨髓加T细胞(GvHD)转移5天后,从经照射的动物脾脏回收的同基因型的(congenic)($CD45.2^+$)MDSC-IL13的表面表达。数据代表每组三次重复,对于所有显示的标记$p<0.001$。(D)由CFSE稀释度标注的显示响应性T细胞(responding T cell)增殖的示意性直方图。将移植后5天来自合并脾脏的纯化MDSC-IL13以5×10^5/mL与相等数量的CFSE标

记的应答T细胞(responder T cell)、0.25μg/ml抗CD3εmAb和2.5×10^5/ml经照射的T细胞耗尽的脾细胞接种(plated)在特别配制的150μM L-精氨酸RPMI培养基中。阴影直方图显示未受刺激的对照增殖。数据代表每组三个样品和总共三个独立实验。(E)回收的显示活性的MDSC和回收的总细胞数的总结数据,门控性(gated)$CD11b^+CD45.2^+$。数据代表每组三个样品,并代表三个独立的实验。(F)如上所述移植经致死照射的Balb/c受者,或如所示的在第0天、第3天和第6天给予MDSC-IL13的三次连续输注。所有接受MDSC的小鼠表现出与GvHD相比增加的存活率,$p<0.001$。MDSC对比MDSC第0天、第3天和第6天$p<0.0001$。存活曲线代表来自两个独立实验的每组20只动物,并且代表在第0天、第7天和第14天给予多次输注的另外的实验。

[0014] 图2、在回收的MDSC中明显的炎性小体活性。(A)以来自回收的野生型或$ASC^{-/-}$MDSC-IL13的细胞裂解物的免疫印迹探测活化的p10形式的半胱天冬酶-1和β-肌动蛋白。使用ImageJ软件转换成灰度的、经拉直和经裁剪的凝胶图像,根据大小高亮突出感兴趣的泳道(lane)。(B)相对于β-肌动蛋白的半胱天冬酶-1p10印迹定量,GvHD对所有其他组,$p<0.05$。通过来自ImageJ软件(NIH)的光密度分析(densitometric analysis)在扫描的印迹上进行定量。(C)将第5天后回收的上清液的IL-1βELISA在完全RPMI培养基中接种过夜,GvHD对所有其他组,$p<0.05$。虚线表示ELISA检测的极限。所有数据代表两个独立的实验。

[0015] 图3、在MDSC中的体外炎性小体诱导导致抑制功能的丧失。通过在新鲜培养的野生型和$ASC^{-/-}$MDSC-IL13中加入0.2μg/ml LPS 3小时,随后加入2mM ATP或0.8μg/ml聚(dT)转染来进行炎性小体诱导。(A)再过1小时后收获培养物上清液并通过ELISA测定IL-1β的产生。数据代表三次独立的实验。(B)炎性小体诱导的MDSC-IL13被充分洗涤,并以1:1的比例接种于CFSE抑制测定中,数据代表门控性CFSE-标记的$CD8^+$应答T细胞,n=6个样品/组,来自两个独立实验。NLRP3表示LPS+ATP处理,AIM2表示LPS+聚(dT)处理,灰色直方图表示无MDSC增殖对照。图10中显示的门控性$CD4^+$应答T细胞。(C)如上处理,使用炎性小体诱导的MDSC-IL13的C57Bl/6→BALB/c GvHD模型的Kaplan-Meier存活曲线。MDSC对比无MDSC $p<0.0001$,MDSC对比MDSC AIM2 $p<0.0001$,MDSC对比MDSC NLRP3 $p=0.0029$。数据代表每组18只动物,由两个独立的实验组合。(D)如所示,使用由野生型或$ASC^{-/-}$小鼠产生的MDSC-IL13的GvHD的Kaplan-Meier存活曲线。数据表示在三次独立实验中每组30只动物。MDSC对无MDSC $p=0.0399$,MDSC对$ASC^{-/-}$MDSC $p=0.0006$。(E)直方图代表当移植后第5天以1:1的比例接种回收的野生型或$ASC^{-/-}$MDSC-IL13并在第3天收获时,CFSE-标记的应答T细胞分裂百分比(%divided)。当将任何单个组与从GvHD小鼠回收的野生型MDSC-IL13比较时,发现显著的p值(<0.05)。

[0016] 图4、MDSC中的炎性小体诱导与Arg1表达缺失有关。如所示,对MDSC-IL13诱导NLRP3或AIM2炎性小体,充分洗涤并在完全培养基中重新接种过夜。(A)细胞相关的Arg1对野生型的酶活性或(B)$ASC^{-/-}$MDSC,标准化为总细胞数量。数据从两个独立的实验合并。MDSC由YFP-Arg1转基因小鼠产生,随后在体外诱导炎性小体并在完全培养基中重新接种。(C)额外培养2天后,CD11b-门控性MDSC的YFP荧光表示为代表性直方图(阴影直方图表示未刺激的YARG骨髓)和(D)%YFP^+的汇总数据。(E)从仅用骨髓(无GvHD)或骨髓加全T细胞(GvHD)的第5天移植动物中回收MDSC-IL13的YFP检测。YARG骨髓(YFP-Arg1骨髓)表示基线YFP荧光。(F)在体块(bulk)MDSC-IL13或分选的粒细胞Ly6G+C+(Ly6G+)和单核细胞Ly6C+亚群的

NLRP3(ATP+LPS)炎性小体活化之前和之后的IL-1β产生。(G)在以1:1的比率分选的粒细胞(Ly6G+)或MDSC-IL13的单核细胞(Ly6C+)亚群存在下的抗CD3ε驱动的CD8+B6 T细胞应答的CFSE增殖。(H)体块MDSC-IL13和分选的粒细胞(Ly6G+)或单核细胞(Ly6C+)亚群的细胞相关精氨酸酶生物活性。虚线表示Arg1缺陷型脾细胞的背景活性。有关MDSC子集(subset)的数据代表3个独立实验。

[0017] 图5、人类MDSC的炎性小体诱导干扰其抑制功能。人类MDSC由供体PBMC产生。(A)经处理3小时的来自MDSC的上清液的IL-1βELISA用0.2μg/ml LPS处理3小时,然后在收获之前用2mM ATP处理1小时。数据代表n=2个实验。(B)由实线表示CellTrace Violet(Life Technologies,Carlsbad,CA)标记的在来自无关供体的培养的人MDSC的存在下应答PBMC的代表性直方图。虚线表示无MDSC增殖对照,灰色直方图标示仅PBMC(无CD3ε或MDSC)。无刺激(No Stim)代表针对MDSC的没有抗CD3ε的同种异型应答(allo-response)。刺激(Stim)表示加入抗CD3ε微珠(2:1)+IL-2(100U/ml)以证明T细胞活化的MDSC抑制。Stim+Infl.Tx'd表示在抗CD3ε微珠+IL-2接种前,MDSC已经被处理用于炎性小体活化。(C)汇总数据显示响应的CD8和CD4T细胞的分裂百分比。数据代表来自三个不相关的PBMC供体的应答,并且代表两个独立实验。

[0018] 图6、回收的MDSC-IL13的扩展表型。在转移给接受仅骨髓(无GvHD)或骨髓加T细胞(GvHD)的经照射的动物5天后,从脾脏回收的同基因型(CD45.2+)MDSC-IL13的表面表达。数据代表每组三次重复,对于显示的所有标记,p=ns(>0.05)。数据代表两个独立实验。

[0019] 图7、CD45.2+MDSC-IL13回收。(A)显示富集之前和之后的合并脾细胞的$CD45.2^{+}$频率的代表性的流图(flow plot)。底部的图表示上图中标明的门控性细胞(CD45.2+CD45.1-ve)。(B)来自无GvHD和GvHD组的MDSC-IL13(CD45.2+)的富集效力。数据代表三个独立实验,每组n=3。

[0020] 图8、高剂量MDSC-IL13。显示在GvHD模型中增加的MDSC-IL13第0天剂量的作用的Kaplan-Meier存活图。为了区分2×和3×MDSC治疗组,图1F中已经显示的数据由虚线和稍小的符号表示。数据表示两个独立实验的组合,对于2×和3×剂量,每组n=10。所有接受MDSC的小鼠表现出比GvHD增加的存活率$p<0.001$。1×、2×或3×第0天剂量的MDSC-IL13彼此没有显著差异。

[0021] 图9、MDSC-IL13第0天输注表型。在输注之前的收获日(+4天培养物),野生型B6(阴影)和ASC ko(粗体)MDSC-IL13的所示标记的表面表达。数据代表至少三个独立的实验。

[0022] 图10、ASC依赖性炎症小体诱导CD4应答T细胞抑制的丧失。如图3B所示,野生型(wt)或ASC ko MDSC-IL13如所示进行处理,并充分洗涤,然后以1:1的比率施加至CFSE T细胞增殖测定。显示来自两个独立实验的门控性CD4+应答T细胞的代表性图。

具体实施方式

[0023] 在一方面,本公开描述了改善髓源性抑制细胞(MDSC)用于抑制移植物抗宿主病(GvHD)的用途的方法。通常,所述方法涉及将MDSC的使用与至少一种限制体内MDSC炎性小体活化的方法组合。

[0024] 髓源性抑制细胞(MDSC)是参与抑制正在发生的炎症应答的天然存在的免疫调节性细胞群。在体外,由骨髓产生的MDSC可以提高移植物抗宿主病(GvHD)急性模型的存活率。

然而,供体MDSC输注(infusion)只能部分改善GvHD致死率。为了提高MDSC疗法的潜在治疗益处并最终达到存活的结果,本公开描述了在急性GvHD(aGvHD)情况下,移植后MDSC的命运(fate)的调查。将转移到经致死照射的同种异型供体的造血移植物的受体暴露于与aGvHD相关的强烈(intense)炎症环境中,这可以直接破坏MDSC的抑制能力。在GvHD炎症条件下,MDSC可失去抑制功能(suppressor function),并且因此失去它们抑制GvHD致死性的潜力。即使短暂的体外暴露于炎性小体活化介质可以使培养的小鼠和人源的MDSC的抑制潜力无效。与炎性小体的作用一致,与野生型供体MDSC相比,在装配炎性小体复合体的衔接子ASC(含有CARD的凋亡相关斑点状蛋白)中具有缺陷的供体MDSC赋予了发展有GvHD的小鼠的存活改善。这些数据表明了当MDSC作为抑制GvHD和其他系统性炎症的治疗手段的用途与限制体内MDSC炎性小体活化的方法的手段相结合时可以更有效,从而使MDSC保持其抑制潜力。

[0025] 例如,同种异型造血细胞移植(allogeneic hematopoietic cell transplantation,aHCT)对于包括白血病和淋巴瘤的多种血液疾病而言是潜在的治愈性疗法。移植物抗宿主病(GvHD)的发病和死亡的风险仍然是广泛使用同种异型移植治疗许多疾病的障碍,所述疾病包括,例如恶性和非恶性淋巴造血紊乱。靶向细胞免疫治疗作为aHCT的辅助手段可以控制GvHD,同时还通过高度靶向和内部自我调节来减少与调理方案(conditioning regimens)相关的副作用。髓源性抑制细胞(Myeloid-derived suppressor cell,MDSC),被广泛地定义为具有抑制能力的骨髓谱系细胞(myeloid lineage cell),与肿瘤、创伤和感染的病状(pathology)一同出现。MDSC从骨髓(BM)的重新产生响应于炎症和生长因子释放(例如,GM-CSF,G-CSF)。

[0026] MDSC可以通过独特的机制抑制系统性免疫病状,所述机制包括局部氨基酸匮乏(local amino acid deprivation)、一氧化氮、前列腺素E2、抗炎症细胞因子、活性氧以及促进调节性T细胞(Tregs)。用白细胞介素-13(IL-13)温育的来源于骨髓的MDSC培养物通过L-精氨酸的精氨酸酶1-依赖性消耗而抑制aGvHD,其继而抑制同种异型T细胞应答。

[0027] 急性GVHD(aGVHD)通常被描述为具有三个阶段:移植调理(transplant conditioning)、供体T细胞致敏(priming)和效应期组织凋亡。调理方案和高频快速致敏同种异型特定的供体T细胞导致强烈的系统性炎症。由于aGvHD扩展了有能力攻击接受者的供体T细胞,所以抑制致死性的有效方法涉及在移植后早期,当炎症加重时并且同种异型反应性(alloreactive)T细胞在加重器官损伤、放大炎症应答时挫伤(dampen)T细胞。因此,要供体MDSC提供有效的治疗,这些细胞必须保持活性并且在足够长的时间段内发挥功能,以阻止同种异型反应性T细胞的致敏和扩增。

[0028] 炎性小体是一种作为先天免疫感应通路的下游组分的多分子复合物。与炎性小体活化相关的因素包括,例如,来源于死亡的和濒临死亡的细胞的细菌产物与危险相关分子(danger-associated molecules,DAMP)的肠相关泄露。为了活化炎性小体,起始信号汇集并导致衔接蛋白ASC(含有CARD的细胞凋亡相关斑点状蛋白)介导的促半胱天冬酶-1(pro-caspase-1)自催化切割,并最终切成并输出活性IL-1β或IL-18。不同炎性小体涉及到的分子根据活化信号的来源和与ASC聚结的上游分子的不同而变化。例如,AIM2样受体(ALR)家族炎性小体可以通过将胞质dsDNA结合到AIM2(骨髓瘤2中不存在)而启动,而NLRP3(NOD样受体家族,含有3的pyrin结构域)炎性小体被微生物和宿主危险信号活化,并且细胞外ATP含量发生变化。

[0029] 本公开说明了单次早期移植后MDSC输注瞬时抑制但不消除致死GvHD的小鼠模型中的GvHD。数据证实,GvHD的炎症驱使MDSC朝向炎症小体活化状态发展,其对于GvHD小鼠中的MDSC抑制功能是相反的。然而,相对于对照MDSC治疗,通过遗传改变供体MDSC来禁止(disable)炎性小体活化可以增加GvHD存活。此外,人类MDSC中也有相同的途径。总之,这些新的信息可以改善MDSC的治疗应用。

[0030] GvHD情景下的MDSC经历快速分化为$CD11c^{+}$经活化的表型

[0031] 用培养的新鲜骨髓(BM)与细胞因子生长因子GM-CSF和G-CSF在四天内生产MDSC。在用IL-4或IL-13收获之前24小时,培养的MDSC的活化刺激了精氨酸酶-1的表达,并且在体外和在GvHD的环境下促进T细胞的功能性抑制。为了证明MDSC-IL13在延长小鼠aGvHD模型的存活中是有效的,在存在或不存在MDSC-IL13的情况下,将经致死照射的BALB/c受体给予同种异型C57Bl/6骨髓加上耗尽CD25的T细胞,以诱导aGvHD,在第0天进行细胞治疗。T细胞诱导aGvHD,导致24.5天的平均存活时间。然而,接受MDSC-IL13疗法的动物已经将存活期延长至了47.5天(图1A)。尽管临床结果得到改善,但大部分经治疗的动物至第100天之前死于GvHD诱导的死亡,表明病状被减少或延迟,但未被消除。为了研究与aGvHD相关的病症如何能直接改变MDSC功能,将具有同源$CD45.2^{+}$MDSC-IL13的骨髓或骨髓加T细胞(GvHD病况)给予$CD45.1^{+}$动物,然后在移植后第5天处死,来检查回收的MDSC的表型和功能。

[0032] 表型上,从仅接受调理加上骨髓的经移植的动物回收的MDSC维持了未成熟的$CD11c^{lo}$、$MHCII^{lo}$、$F4/80^{int}$外观(图1B和图1C)。然而,MDSC-IL13转移到经历GvHD病症的动物($CD8^{+}CD4^{+}$T细胞,CD25-)上调CD11c和MHC II类,活化的髓样细胞的特征。F4/80的表达也有增加,表明作为正在发生的由同种反应性T细胞促成的炎症环境的应答,活化和分化迅速发生(图1B和图1C)。共刺激和活化的其他标记保持不变(图6)。为了测量经回收的MDSC的功能状态,将离体分离的MDSC与抗-CD3ε经mAb活化的CFSE标记的T细胞共同培养。从第5天开始仅移植骨髓的动物的MDSC-IL13受到高度抑制(图1D,无GvHD)。相比之下,在从GvHD动物回收的MDSC-IL13存在的情况下T细胞应答相对于无MDSC对照组在总体增殖中仅显示了略有下降(图1D),表明了在GvHD接受者中MDSC的抑制细胞功能的丧失。

[0033] 对丧失体内MDSC抑制的一种解释可能是受损的抑制性细胞的存活。通过连续抑制外源半胱天冬酶-8和内源线粒体死亡途径来维持MDSC活性。操作这些途径中的任何一个都可能导致MDSC活性的快速下降和随之而来的抑制的下降。研究了接受脾脏转移后转移细胞的数量和活性。当在第5天观察总$CD45.2^{+}CD11b^{+}$细胞数量或活性时,观察到仅骨髓和GvHD病况之间没有显著差异(图1E)。这些数据表明,MDSC-LI13在移植后的有限时间内使aGvHD减少,并且MDSC-IL13随后在GvHD病况下丧失抑制功能,导致治疗益处不能维持。

[0034] 多次MDSC-IL13输注可改善GvHD的长期存活

[0035] 在GvHD诱导期间,在移植时将MDSC-IL13与T细胞的比例从3:1增加至6:1(2×)或9:1(3×)并不显著增加总体存活(图8)。相比之下,重复剂量的新鲜培养的MDSC-IL13在aGvHD期间T细胞致敏的周边移植(peri-transplant)期间促进和/或维持抑制性环境。在移植后第0天、第3天和第6天三次输注给予培养的MDSC-IL13,总计MDSC-T细胞比例为9:1。与在第0天给予MDSC-IL13单次输注时<10%的长期存活者相比,多次MDSC-IL13输注促进了长期存活者群体(50%)(图1F)。观察到重复的输注新鲜培养的MDSC-IL13增加存活,其支持在诱导aGvHD期间发现的强烈的炎症环境不影响MDSC持久性或活性而是改变宿主环境以使得

转移的MDSC-IL13随着时间的推移有效减少抑制的假设。

[0036] 相关的转化为IL-1β的生产、炎性小体活化

[0037] 宿主NLRP3炎性小体活动可以加剧小鼠模型中的GvHD。此外,GvHD患者可以表现出与炎性小体相关的血清半胱天冬酶-1和IL-1β的水平增加。此外,当暴露于某些化学治疗剂时,MDSC容易产生IL-1β,导致改变的抗肿瘤应答。用在GvHD病况下5天后回收的MDSC-IL13细胞裂解物来探测经处理的p10形式的半胱天冬酶-1(炎性小体活动的上游介质)。免疫印迹(Western blot)分析显示从GvHD病况回收的半胱天冬酶-1中的MDSC-IL13相比于从仅骨髓的移植对照接受者回收的MDSC-IL13有增加的量(图2A和图2B)。当回收的MDSC-IL13被放置在完全培养基中过夜培养时,发现MDSC转化为炎性小体活化的进一步证据;上清液的分析显示从GvHD病况增加的IL-1β(图2C)。这些数据建立了在aGvHD病症背景下MDSC-IL13和炎性小体活动的关联。

[0038] MDSC-IL13体外诱导IL-1β涉及ASC

[0039] IL-1β可直接干扰Treg介导的T效应细胞功能的抑制和促进。为了进一步研究炎性小体活化和IL-1β生产所扮演的角色(role),检测了培养的MDSC-IL13的体外炎性小体诱导。NLRP3和AIM2代表了炎性小体的两个主要家族,其中各种信号可以加强炎性小体级联,但是衔接蛋白ASC可能是炎性小体完全活化所需的常见组分。使用野生型和$ASC^{-/-}$($Pycard^{-/-}$)骨髓来产生MDSC-IL13,以测试它们是否可以诱导炎性小体活动。在转移时,$ASC^{-/-}$MDSC-IL13具有与野生型MDSC-IL13相似的表型(图9)。通过将MDSC-IL13与LPS温育3小时然后用ATP温育来测试NLRP3炎性小体,而使用LPS接着用聚(dT)转染引入AIM2炎性小体。在第二级刺激后仅一小时,在来自野生型MDSC-IL13的培养上清液中检测到IL-1β(图3A)。然而,$ASC^{-/-}$MDSC-IL13没有产生可检测到的IL-1β,证明MDSC-IL13能够快速响应其环境中的变化,从而以ASC依赖性方式产生促炎介质IL-1β。此外,MDSC-IL13的炎性小体诱导可以改变其抑制能力。按照相同的程序在仅四小时内诱导炎性小体,然后将MDSC-IL13充分洗涤并铺在T细胞增殖的体外抑制测定中以抗CD3ε刺激。体外炎性小体诱导降低了MDSC-IL13在功能上抑制应答$CD8^+$(图3B)和$CD4^+$(图10)T细胞的能力。此外,这种效应还取决于ASC,支持炎性小体活化与抑制功能相关联而不是例如受损的活性和/或其他成熟因子的假说。

[0040] 炎性小体诱导降低MDSC-IL13在GvHD中的功效

[0041] 如上处理体外培养的MDSC-IL13以活化NLRP3或AIM2炎性小体,随后在转移至aGvHD模型之前进行充分洗涤。如在体外抑制中所见,与对照MDSC-IL13疗法相比,MDSC-IL13的炎性小体活化降低了GvHD的存活益处,这显著增加了GvHD存活($p<0.0001$,图3C)。

[0042] 由于在aGvHD的情景中涉及在治疗转移后MDSC-IL13转化为成熟的、经炎性小体活化的状态,使用在基因上不能活化炎性小体的MDSC-IL13可能更好地保持功能并进一步提高GvHD存活率。事实上,相对于野生型MDSC-IL13($p=0.0006$),$ASC^{-/-}$MDSC-IL13的受体的存活率有了进一步提高,两者均显著优于无MDSC组(图3D)。此外,与野生型MDSC-IL13相比,从转移后五天的GvHD动物回收的$ASC^{-/-}$MDSC-IL13具有增加的T细胞抑制能力(图3E)。这些发现共同直接暗示在GvHD病况下MDSC-IL13内在(intrinsic)炎性小体活化在限制MDSC细胞疗法的功效方面发挥作用。

[0043] MDSC-IL13介导的GvHD抑制的机制是精氨酸酶-1(arg1)活性,其直接破坏T细胞反

应性并促进GvHD存活。测量在炎性小体诱导之后的MDSC-IL3的arg1酶的生物活性以确定arg1活性是否随着炎性小体诱导而降低。当NLRP3或AIM2炎性小体被诱导时，发现以mRNA(未显示)或生物酶活性测量的arg1活性的显著下降。在$ASC^{-/-}$MDSC中，尽管有趋势，但类似的下降并不明显，表明这些通路可能不直接相关。为了进一步研究arg1活性，使用YFP-Arg1转基因动物(YARG，其中arg1表达与黄色荧光蛋白(YFP)连接)，使得能够快速测定相关表达的损失。IL-13容易上调YFP荧光，而IFNγ(其诱导表达iNOS的MDSC)没有增加YFP荧光(图4C和图4D)。如上所述，通过NLRP3或AIM2途径的炎性小体诱导导致了YFP荧光同时的丧失，表明arg1表达已伴随炎性小体诱导条件而停止。最后，从YARG转基因动物产生的MDSC-IL13被应用于移植模型，给予仅骨髓或骨髓加上GvHD病况的完整T细胞。来源于从仅骨髓五天后回收的MDSC的YFP荧光相比培养后立即表达有所降低，但仍然容易从背景检测到(图4E)。然而，在从GvHD动物回收的MDSC-IL13中，YFP不再被检测到，降低到在未受刺激的骨髓中看到的背景水平。这些结果进一步支持了GvHD期间arg1表达的丧失和炎性小体活性之间的联系。

[0044] MDSC通常被定义为异质性的，在小鼠系统中描述的两个亚群是粒细胞($Ly6G^{+}$)和单核细胞($Ly6C^{+}G^{-}$)。评估每个亚群以确定其是否具有与炎性小体活化相似的能力以及抑制能力如何受到差异性影响。来自培养的骨髓的MDSC-IL13是>90％Ly6C+(图9)，并且基于Ly6G表达进行分类。NLRP3炎性小体活化条件导致了$Ly6C^{+}G^{-}$单核细胞和$Ly6G^{+}$粒细胞亚群中等同的IL1β产生水平(图4F)。然而，当应用于独立于炎性小体活化的体外抑制测定时，抑制能力实际上完全包含于$Ly6C^{+}G^{-}$亚群内(图4G)。进一步的，arg1生物活性与单核细胞亚型有关(图4H)。总之，这些数据表明，GvHD小鼠中抑制能力的丧失与炎性小体活性相关，而不是由于向$Ly6G^{+}$的转变或IL1β产生能力的差异。因此，相对于无GvHD组，$Ly6C^{+}G^{-}$亚型在GvHD组相对较高的频率不能解释体内抑制能力的丧失。

[0045] 人工培养的MDSC在其炎性小体被活化时失去功能。

[0046] 如先前所述(Lechner等人，2010，J Immunol 185(4):2273-2284)，从人外周血单核细胞(PBMC)产生MDSC。这些MDSC被用以研究人类MDSC可能具有如在小鼠MDSC发现的对于炎性小体活化的功能丧失相似的预处理(pre-disposition)。富集骨髓标志物CD33的人类PBMC用GM-CSF和IL-6培养七天。在这些条件下，人类PBMC抑制了不相关的应答PBMC(responder PBMC)的抗-CD3εmAb驱动的增殖。通过先后添加LPS和ATP以吸引NLRP3炎性小体，证实了人MDSC能够响应炎性小体活化条件。需要LPS和ATP来驱动MDSC产生IL-1β(图4A)。接下来，将炎性小体活化的MDSC加入到抗-CD3εmAb驱动的PBMC增殖测定中。如在小鼠系统中，暴露于炎性小体活化组分的MDSC丧失了伴随IL-1β产生的抑制。

[0047] 因此，同种反应性T细胞是促进临床GvHD发病率和死亡率的因素，使用调节性细胞的疗法可能是控制它们的可行策略。MDSC可以在较短时间内从正常骨髓产生，并能有效抑制GvHD、自身免疫和同种异型移植排斥反应(allo-graft rejection)。本公开报道了由细胞因子IL-13活化的MDSC产生arg1，其反而使得MDSC抑制GvHD。然而，在具有完全MHC错配的严格GvHD模型中，MDSC疗法促进延长的存活，但未能最终保护大多数动物免于致死的GvHD。本公开进一步说明过继性转移的MDSC的内在的炎性小体活化限制了其在体内的功效。培养的MDSC能够以ASC依赖的方式快速应答以产生大量的IL-1β，导致体外抑制的相关丧失。此外，在体内转移后不久，在aGvHD情况下的MDSC转化为成熟的$CD11c^{+}$表型并且表现出离体的

抑制能力丧失。与非GvHD病况下的对照组相比，这些MDSC在放置过夜的培养物中具有增加的半胱天冬酶-1p10的量(炎症小体活化的指标)，并分泌IL-1β。

[0048] 相比之下，当使用$ASC^{-/-}$MDSC-IL13在基因上禁止炎性小体活化时，与野生型MDSC-IL13移植受体相比，GvHD存活得到改善，回收的$ASC^{-/-}$MDSC-IL13保持更好的离体抑制能力。改变MDSC对炎性小体活化/转化易感性的其他方法可以包括ACS或其他炎性小体相关基因(例如NLRP3、AIM2、半胱天冬酶-1)的基因敲除。可以使用例如sh/siRNA、TALEN、大型核酸酶(meganuclease)、megaTALEN和/或CRISPER技术和/或定点诱导获得基因敲除。

[0049] 骨髓细胞参与启动和塑造促炎症和抗炎症方向的免疫应答，并显示出显著的可塑性。这种适应性可能既是祝福也是诅咒，因为它允许在体外快速的由正常骨髓产生高度抑制的细胞，但也允许在转移到严重炎症环境(例如aGvHD)时看到暂时的功效。虽然MDSC被描述为本质上是异质性的，并且表型标记并不总是在疾病模型或物种之间翻译(translate)，但是炎性小体活化途径似乎是高度保守的。在本公开报道的数据中，由小鼠骨髓或人类PBMC产生的MDSC容易活化炎性小体，导致与抑制功能丧失相关的IL-1β的产生。患有aGvHD的患者可以显示经切割的半胱天冬酶-1和增加的IL-1β，进一步支持GvHD与炎性小体活化相关的结论。MDSC几乎无处不在的与已存在的肿瘤相关，并且可以积极的干扰免疫治疗干预。肿瘤诱导的和GvHD诱导的MDSC的炎性小体活化之间的一个区别在于与GvHD的强烈的全身性炎症反应相反，肿瘤相关的MDSC发生在慢性局部炎症环境中。

[0050] 因为GVHD活化的MDSC分泌IL-1β，所以这种MDSC可能导致GVHD致死过程。IL-1β具有多向性的效应，取决于产生它的细胞、周围微环境的状态和暂时的表达(temporal expression)，但是通常被认为是促炎性的并且在一些情况下被认为是反调控(counter-regulatory)的。当将从+5天的GvHD移植受体回收的MDSC-IL13细胞应用于体外抑制测定时，虽然增殖的T细胞经历较少的细胞分裂，但是T细胞增殖的比例与没有MDSC的对照相比没有差异，这表明一些抑制能力依然存在。这些数据表明，GVHD活化的MDSC-IL13没有直接驱动GVHD致死性，这与MDSC-IL13处理的受体的存活曲线与没有MDSC的对照的存活曲线相平行，在2-3周延迟后。在过继转移过程中，促进MDSC-IL13所赋予的存活益处的精氨酸酶-1表达在炎性小体活化的MDSC中被抑制，潜在的解释了供体MDSC抑制的丧失。

[0051] 炎症小体介质(inflammasome mediator)的NLR家族(如NLRP3)是在GvHD病况下促进炎性小体转化的候选者，因为在调理后发现ATP和相关的危险信号并且可以参与增强GvHD。已经在放疗和化疗诱导方案中证实了在GvHD情景下NLRP3炎症小体活化，其导致了组织损伤和危险相关分子模式(DAMP)的释放。过继转移的MDSC也可能易受炎性小体诱导，相同的介质可能有助于体内活化。选择性靶向NLRP3炎性小体的试剂可以促进抑制宿主内和注入的供体MDSC中炎性小体活化的双重目的。例如，小分子抑制剂MCC950和在代谢应激下产生的酮，β-羟基丁酸酯(BHB)已经显示对抑制NLPR3活化和NLRP3介导的疾病的特异性。或者，病毒和细菌产物如dsDNA也可以是GvHD和炎性小体的AIM2样受体家族的有力驱动者。尽管GvHD进展(development)不依赖于宿主MyD88/TRIF途径活性，但是从由辐射和GvHD诱导的损伤而死亡/濒死的细胞释放的dsDNA可能在某些条件下放大致死率。

[0052] 总之，本公开中报道的数据表明，通过降低GvHD的炎性环境程度抑制MDSC经历炎性小体活化的程度，可以增加供体MDSC的治疗潜力。通过基因改变(例如，基因表达敲除、sh/siRNA/大型核酸酶、megaTAL、CRISPER)或经由药理学抑制(MCC950/BHB)预处理MDSC细

胞疗法以特异性抑制炎性小体活化是用于内在维持MDSC功能的方法。此外，药物治疗或MDSC特异性体内靶向递送可调节炎性小体形成或功能的药物和试剂，其调节在患者中导致所述患者炎性小体活化的(在移植之前、期间和/或之后)引发因子(inciting factors)，也可减少MDSC细胞治疗的炎性小体转化，并且有预防宿主来源的炎性小体活性的附加益处，证明了其与GvHD的严重程度的增加有关。

[0053] 相反的，在通常与肿瘤生长有关的长期发炎的环境中，MDSC的重新产生和炎性小体活性通常是共同关联的。这种MDSC抑制可能降低或消除化学疗法、放射疗法、手术和/或使用药物、抗体/蛋白质的免疫疗法和/或细胞疗法的功效。这里介绍的结果表明MDSC功能直接受损与急性GvHD相关的炎性小体活动表明炎症程度影响MDSC功能支持。因此，可以通过加强局部或系统性炎性小体活性，以去除/消除肿瘤相关的MDSC为目的，进一步促进例如上文刚刚列举的旨在根除肿瘤的抗肿瘤疗法。

[0054] 该领域最新的技术最初表明炎性小体慢性活化会增加MDSC抑制功能。然而，我们在GvHD中的发现表明炎性小体高水平活化逆转了MDSC抑制能力。因此，逆转肿瘤中MDSC抑制的新方法可以涉及使用以下手段活化肿瘤内的MDSC，例如，提供激励剂例如尿酸、ATP、刺激Toll样受体的试剂、DNA、RNA和/或能够上调炎性小体功能的其他试剂。

[0055] 因此，在一方面，本公开描述了治疗患有移植物抗宿主病(GvHD)的或有罹患移植物抗宿主病(GvHD)风险的受试者的方法。通常，所述方法包括向受试者施用与合适对照受试者相比有效改善移植物抗宿主病的至少一种症状或临床体征的量的多个MDSC。

[0056] 如本文所用，术语“治疗(treat)”或其变化形式是指在任何程度上减轻、限制发展、改善或解决与GvHD相关的症状或临床体征。“治疗(treatment)”可能是治疗性或预防性的。“治疗性(therapeutic)”及其变体是指改善与GvHD相关的一种或更多种现有症状或临床体征的治疗。“预防性(prophylactic)”及其变体是指在任何程度上限制GvHD症状或临床体征的发展和/或出现的治疗。通常，在GvHD出现在受试者中之后开始“治疗性”治疗，而在GvHD出现在受试者中之前开始“预防性”治疗。如本文所用，“症状(symptom)”是指GvHD的任何主观证据，而“体征(sign)”或“临床体征(clinical sign)”是指与GvHD相关的客观物理发现，其能够被患者以外的人发现。

[0057] 此外，“有……风险(at risk)”一词是指可能或可能不会真正具有所述风险的受试者。因此，例如，“有”发展GvHD“风险”(“at risk”for developing GvHD)的受试者是与缺少一种或更多种症候的个体相比，具有一种或更多种增加的具有或发展GvHD的风险的症候(indicia)的受试者，无论所述受试者是否表现出具有或发展GvHD的症状或临床征兆。

[0058] 在一些实施方式中，所述方法可以包括重复施用MDSC以取代先前施用的MDSC，因为先前施用的MDSC经历炎性小体活化并且其抑制同种异型T细胞的能力变得较低。也就是说，依次重新施用MDSC可以用尚未活化其炎性小体功能的新MDSC来补充在炎症环境中失去抑制作用的MDSC群体。

[0059] 在一些实施方式中，所述治疗可以包括至少两次施用MDSC，例如，至少三次施用、至少五次施用、至少十次施用、至少十五次施用、至少二十次施用、至少二十五次施用或至少五十次施用。在一些实施方式中，所述治疗可以包括最多不超过五十次施用MDSC，例如，不超过四十次施用、不超过三十次施用、不超过二十次施用、不超过十次施用或不超过五次施用。在一些实施方式中，所述治疗可以包括一系列具有由以上列出的任何最少的施用次

数和以上列出的任何比最少的施用次数多的最多的施用次数为终点而限定的施用。因此，在一个示例性实施方式中，治疗可以包括三次至五次施用MDSC。

[0060] 在一些实施方式中，MDSC的连续施用可以以至少24小时的最小间隔分开，例如至少两天、至少三天、至少七天、至少14天、至少30天或者至少90天。在一些实施方式中，MDSC的连续施用可以以最大不超过一年、不超过六个月、不超过90天、不超过60天、不超过30天或不超过14天的间隔分开。在一些实施方式中，MDSC的连续施用可以通过特征为如下范围的间隔分开，所述范围具有由以上列出的任何最小施用间隔和比最小施用间隔大的最大施用间隔施限定的端点。因此，在一个示例性实施方式中，治疗可以包括以至少每天一次至最多每隔一天一次的间隔施用的MDSC。

[0061] 在一些情况下，至少一部分MDSC可以被处理和/或包括导致MDSC抵抗炎性小体活化的遗传修饰。在一些情况下，MDSC可以用例如导致MDSC抵抗炎性小体活化的药物、sh/siRNA和/或CRISPR来预处理。导致MDSC抵抗炎性小体活化的示例性遗传修饰可以包括在含有CARD(ASC)的细胞凋亡相关斑点状蛋白中的缺陷。

[0062] 在一些实施方式中，通过用抑制炎性小体的药剂在MDSC输注过程中和/或之后进一步治疗受试者并由此降低输注的MDSC经历炎性小体活化的程度，可以获得相似的效果。抑制炎性小体的示例性手段可以包括直接抑制炎性小体的药剂。其他方法可涉及使用靶向和/或至少部分中和炎性小体引发剂的试剂。示例性的炎性小体引发剂包括例如尿酸、ATP、刺激Toll样受体的试剂、DNA、RNA和/或可以上调炎性小体功能的其他试剂。

[0063] 无论是预防性的还是治疗性的，疗法(therapy)可以以至少一周的最短持续时间施用，例如至少两周、至少一个月、至少三个月、至少六个月或至少一年。所述疗法可以以最多不超过20年的最长持续时间施用，例如不超过10年、不超过五年、不超过两年、不超过一年、不超过九个月、不超过六个月、不超过三个月、不超过两个月，不超过一个月，不超过两周。疗法可以持续一段时间，其特征在于具有以上列出的任何最短持续时间和上面列出的大于最短持续时间的任何最长持续时间为终点的范围。因此，在示例性实施方式中，所述疗法可以具有从一周到两周的持续时间。

[0064] MDSC可配制成包含药学上可接受的载体的药物组合物。如本文所用，“载体(carrier)”包括任何溶剂、分散介质、载媒(vehicle)、包衣、稀释剂、抗菌剂和/或抗真菌剂、等渗剂、吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。这种用于药物活性物质的介质和/或试剂的使用在本领域中是公知的。除了任何常规的介质或试剂与活性成分不相容之外，其在治疗组合物中的用途也被考虑到。补充活性成分也可以掺入组合物中。如本文所用，“药学上可接受的”是指不是生物学上或其他方面不希望的材料，即该材料可以与MDSC一起施用给个体而不引起任何不希望的生物效应或以有害的方式与在包含它的药物组合物中的任何其它组分相互作用。

[0065] 所述药物组合物可以以适合于优选施用途径的多种形式配制。因此，组合物可以通过已知途径施用，包括例如肠胃外(例如，皮内、经皮、皮下、肌内、静脉内、腹膜内等)施用途径。

[0066] 因此，可以以任何合适的形式提供MDSC，包括但不限于溶液、悬浮液、乳液或任何形式的混合物。该组合物可以与任何药学上可接受的赋形剂、载体(carrier)或载媒(vehicle)一起以制剂形式递送。

[0067] 制剂可以方便地以单位剂量形式提供，并且可以通过药学领域公知的方法制备。用药学上可接受的载体制备组合物的方法包括使MDSC与构成一种或多种辅助成分的载体结合的步骤。通常，可以通过将活性化合物与液体载体，细碎的固体载体或两者均匀和/或紧密地结合在一起来制备制剂，然后，如果需要，将产品成形为所需的制剂。

[0068] 所施用的MDSC的量可以根据各种因素而变化，所述因素包括但不限于受试者的重量、身体状况和/或年龄和/或施用途径。因此，包含在给定单位剂型中的MDSC的绝对量可以在很宽的范围内变化，并且取决于诸如受试者的种属、年龄、重量和身体状况和/或施用方法的因素。因此，一般性的列出对所有MDSC的应用都有效的量是不实际的。然而，本领域的普通技术人员可以适当考虑(due consideration)这些因素而容易地确定适当的量。

[0069] 在一些实施方式中，MDSC的单次施用可以包括至少10^5个MDSC，例如至少10^6个MDSC、至少10^7个MDSC、至少10^8个MDSC、至少10^9个MDSC、至少10^{10}个MDSC、至少10^{11}个MDSC或至少10^{12}个MDSC。在一些实施方式中，MDSC的单次施用可以包括最多不超过10^{13}个MDSC，例如不超过10^{12}个MDSC、不超过10^{11}个MDSC、不超过10^{10}个MDSC、不超过10^9个MDSC、不超过10^8个MDSC、不超过10^7个MDSC或不超过10^6个MDSC。在一些实施方式中，单次施用MDSC可以包括大量MDSC，其特征在于具有由以上列出的任何最小数量的MDSC和上面列出的任何大于MDSC的最小数量的最大数量的MDSC为限定的端点。因此，在一个示例性实施方式中，MDSC的单次施用可以包括10^7个MDSC到10^{10}个MDSC的范围。在另一个示例性实施方式中，MDSC的单次施用可以包括4×10^7个MDSC至5×10^8个MDSC的一系列。

[0070] 在另一方面，本公开描述了治疗肿瘤的方法。通常，该方法包括增加MDSC的炎性小体活化，其足以使肿瘤附近的MDSC的抑制功能失效。在一些情况下，增加炎性小体活化可以包括提供至少一种炎性小体引发剂例如尿酸、ATP、刺激Toll样受体的试剂、DNA、RNA和/或可以上调炎性小体的功能的其它试剂。

[0071] 炎性小体引发剂可与用于根除肿瘤的常规抗肿瘤疗法(例如化学疗法、放射疗法、手术和/或用药物、抗体/蛋白质的免疫疗法、疫苗和/或细胞疗法)共同施用。如本文所用，“共同施用”是指所施用的组合的两种或更多种组分，其组合的治疗或预防效果可以大于单独施用的任一组分的治疗或预防效果。两种组分可以同时或顺序共同施用。同时共同施用的组分可以以一种或更多种药物组合物提供。两种或更多种组分的连续共同施用包括施用组分以使得每种组分可以同时存在于治疗部位的情况。或者，两种组分的连续共同施用可以包括其中至少一种组分已经从治疗部位清除的情况，但是施用组分的至少一种细胞作用(例如，细胞因子产生、某些细胞群的激活等)在治疗部位持续存在，直到将一种或多种另外的组分施用于治疗部位。因此，共同施用的组合可以在某些情况下包括彼此从不以化学混合物存在的组分。

[0072] 在一些情况下，抗肿瘤疗法可以以疗法已经接受监管批准的相同剂量和频率进行施用。在其他情况下，抗肿瘤疗法可以以在临床或临床前研究中评估的相同剂量和频率进行施用。可以根据需要改变剂量和/或频率以在与炎性引发剂共同施用时达到期望水平的抗肿瘤效果。因此，可以使用标准/已知的剂量方案和/或根据需要定制剂量。

[0073] 类似地，炎性小体引发剂可以以任何合适的形式配制。此外，例如，炎性小体引发剂可以以它可能已经接受监管批准的相同剂量和频率给药。在其他情况下，炎性小体引发剂可以以临床或临床前研究中可能正在评估的相同剂量和频率施用。可以根据需要改变剂

量和/或频率以达到所需水平的炎性小体引发剂。因此，可以使用标准/已知的剂量方案和/或根据需要定制剂量。

[0074] 在前面的说明和下面的权利要求中，术语“和/或”是指列出的元素中的一个或全部或列出的元素中的任何两个或更多个的组合；术语“comprises”，“comprising”及其变体应被解释为开放式的，即，附加元素或步骤是可选的并且可以存在也可以不存在；除非另外指明，否则“a”，“an”，“the”和“at least one”可互换使用并且意指一个或多于一个；并且通过端点定义的数值范围的描述包括包含在该范围内的所有数字(例如，1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0075] 在前面的描述中，为了清楚起见可以分别地描述特定实施方式。除非另外明确指出特定实施方式的特征与另一实施方式的特征不兼容，否则某些实施方式可以包括如本文所述的与一个或更多个实施方式相关且兼容的特征的组合。

[0076] 对于本文所公开的包括分离的步骤的任何方法，这些步骤可以以任何可行的顺序进行。并且，视情况而定，两个或更多个步骤的任何组合可以同时进行。

[0077] 通过以下实施例来说明本发明。应该理解的是，根据本文所阐述的本发明的范围和精神，将广泛地解释具体实例、材料、量和程序。

[0078] 实施例

[0079] 小鼠

[0080] 从国立癌症研究所购买6-8周龄雌性BALB/c(H2^{d})、C57BL/6NCr(H2^{b})和B6-Ly5.2/Cr(B6-CD45.1^{+},H2^{b})小鼠。先前已经描述了在C57Bl/6基因背景下的ASC敲除小鼠(Mariathasan等人，2004Nature 430(6996):213-218)和YFP-Arg1(YARG)小鼠(Reese等人，2007.Nature 447(7140):92-96)。所有小鼠被饲养并居住在根据明尼苏达大学机构动物护理和使用委员会批准的方案的特定的无病原体微隔离笼设施中。

[0081] MDSC产生

[0082] 通过在加10％胎牛血清、50μM 2-巯基乙醛、10mM HEPES、1mM丙酮酸钠、100U/mL青霉素、100mg/mL链霉素和补充的氨基酸(L-谷氨酰胺、L-精氨酸和L-天冬酰胺各1.5mM)的Dulbecco改良Eagle培养基中以3×10^{5}细胞/mL培养C57Bl/6骨髓产生了小鼠MDSC。添加了100ng/mL粒细胞集落刺激因子(G-CSF/Neupogen，Amgen Inc.，Thousand Oaks，CA)和2.5ng/mL小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF，R&D Systems，Inc.，Minneapolis，MN)，并将培养物以37℃，10％CO_2温育4天。在第3天，加入40ng/mL重组小鼠IL-13(R&D Systems，Inc.，Minneapolis，MN)用于精氨酸酶-1诱导，或者以相同的浓度添加IFNγ。在第4天通过温和地除去70％的培养上清液来收获MDSC。然后收集剩余的培养基和松散粘附的细胞，然后加入胰蛋白酶/EDTA。在37℃10分钟后，将平板轻轻刮擦并洗涤以收集剩余细胞，当与轻微粘性细胞汇集时，导致CD11b^{+}回收>92％。对于炎性小体诱导，在第4天将LPS(0.2μg/ml)加入到培养物中。3小时后，为了刺激NLRP3炎性小体，在洗涤和分析上清液或过继转移之前，加入2mM ATP一小时，或者对于ATI2炎性小体活化，按照制造商的说明书(Invitrogen Corp.，Carlsbad，CA)，使用Lipofectamine 2000试剂加入聚(dT)一小时。

[0083] 通过使用Histopaque梯度(Sigma-Aldrich，St.Louis，MO)离心从由Memorial Blood Center(Minneapolis，MN)获得的成人血液分离的正常供体PBMC产生人MDSC。如先前所述(Lechner等，2010J Immunol 185(4):2273-2284)进行体外产生，其通过先前CD33^{+}骨

髓富集进行修饰,其使用Miltenyi MAC系统根据说明书进行。在第7天收获培养物用于炎性小体诱导,接着如先前所述(Hippen等人,2008.Blood 112(7):2847-2857)进行抑制测定中的洗涤和铺板。人类血库样本是通过明尼苏达大学研究人员使用研究委员会批准的指南获得的。

[0084] GvHD

[0085] 在第0天或如指示的输注1×10^7个C57Bl/6供体骨髓、2×10^6个淋巴结纯化的耗尽CD25的C57Bl/6T细胞、和6×10^6个培养的C57Bl/6MDSC-IL13的一天前用700cGy全身照射致死照射BALB/c受体。使用阴性细胞分离系统(EASYSEP,Stemcell Technologies Inc.,Vancouver,Canada)和根据制造商的说明书对CD19、B220、CD11b、CD11c、NK1.1、γδTCR和CD25的经生物素化的抗体进行T细胞富集。每天监测小鼠的存活。

[0086] MDSC离体回收

[0087] 如所述将由$CD45.2^+$(B6或ASC ko)同源供体产生的MDSC-IL13转移至$CD45.1^+$受体。移植后五天,每个样品合并来自3-4名受体的脾脏(n=每组3个样品),以增加回收并助于(facilitate)功能测定。根据制造商的说明,使用RAPIDSPHERE EASYSEP方法(Stemcell Technologies Inc.,Vancouver,Canada)和抗CD45.1-生物素化的抗体通过耗尽宿主和供体T细胞来分离CD45.2+(MDSC-IL13),导致>80%的CD45.2+MDSC-IL13回收(图7)。

[0088] 粒细胞(Ly6G+)和单核细胞(Ly6C+G-ve)亚群的MDSC-IL13分选

[0089] 使用APC缀合的抗Ly6G(克隆1A8)抗体批量标记MDSC-IL13培养物,随后进行抗APC微珠标记并将其应用于Miltenyi MACs LS柱以根据制造商的说明进行基于Ly6G+的表达分离。这导致粒细胞和单核细胞亚群的有效分选,然后用于进一步分析。

[0090] 流式细胞术和抑制测定

[0091] 在BD LSRFortessa上进行流式细胞术数据采集,并使用FlowJo软件(FlowJo,LLC,Ashland,OR)进行分析。对于小鼠抑制测定,响应性T细胞用3.5μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色并在第3天分析前用0.25μg/ml抗-CD3ε温育。在人MDSC抑制测定中,用CELLTRACE Violet(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)标记应答PBMC并用抗CD3εmAb包被的珠子(DYNAL,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA;比例2:1)加100U/ml huIL-2进行刺激;在第4天收集样品。

[0092] ELISA、免疫印迹和精氨酸酶测定

[0093] 分别使用BD OptEIA ELISA组按照制造商的说明书(BD Biosciences,San Jose,CA)来评估小鼠和人培养物上清液中的IL-1β。对于蛋白质印迹,将纯化的MDSC洗涤并重悬于含有RIPA、蛋白酶(Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Dallas,TX)和磷酸酶(Sigma-Aldrich,St,Louis,MO)抑制剂混合物的裂解缓冲液中,然后快速冷冻。将4μg来自细胞裂解物的蛋白质在4-12%SDS-PAGE凝胶(Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA)中分级分离(fractionated),转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(GE Healthcare Co.,Little Chalfont,United Kingdom)上,使用抗-切割的半胱天冬酶-1p10兔mAb(sc-514,Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Dallas,TX;1:500)探测切割的半胱天冬酶-1的检测。使用的二级抗体是用于检测抗-切割的半胱天冬酶-1抗体的HRP-缀合的抗-兔抗体(Cell Signaling Technology,Inc.,Danvers,MA)(1:10,000)和用于检测抗-β-肌动蛋白Ab的HRP缀合的抗小鼠抗体(1:2750)。使用ImageJ软件(国立卫生研究院,Bethesda,MD)估计免疫印迹条带的相

对定量。使用QuantiChrom精氨酸酶测定试剂盒(Bioassay Systems LLC,Hayward,CA)测定精氨酸酶-1活性。将样品标准化至每个样品4×10^5个细胞,洗涤、沉淀并重悬于100μl含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中,然后根据制造商的说明进行测定。

[0094] 统计分析

[0095] 存活研究由Kaplan-Meier存活曲线表示,使用对数级统计确定统计学比较。Student's t-检验(Student's t-test)用于体外采集数据(Prism软件,GraphPad Software,Inc.,LaJolla,CA)的统计分析。$p<0.05$被定义为统计学显著的。

[0096] 此处引用的所有专利、专利申请和出版物以及电子可用材料(包括例如GenBank和RefSeq中提交的核苷酸序列,以及例如SwissProt、PIR、PRF、PDB中提交的氨基酸序列以及来自GenBank和RefSeq中注释的编码区域的翻译)的全部公开通过援引整体并入本文。如果本申请的公开内容与通过援引并入本文的任何文件的公开内容之间存在任何不一致,则以本申请的公开内容为准。前面的详细描述和实施例仅仅是为了清楚的理解而给出的。不能从中理解出不必要的限制。本发明不限于所示和所述的确切细节,对于本领域技术人员显而易见的变化将被包括在由权利要求限定的本发明内。

[0097] 除非另外指明,否则说明书和权利要求中使用的表示组分、分子量等的数量的所有数字应理解为在所有情况下均被术语"约"修饰。因此,除非另有相反的指示,本说明书和权利要求中阐述的数值参数是近似值,其可根据通过本发明所期望获得的特性而变化。在最低限度,并且不试图以等同原则限制权利要求的范围,每个数值参数应当至少根据所报道的有效数字的数目和通过应用普通舍入技术解释。

[0098] 尽管阐述本发明广泛范围的数值范围和参数是近似值,但具体实施例中列出的数值是尽可能精确地报道的。然而,所有的数值固有地包含一个由在它们各自的测试测量中发现的标准偏差产生的范围。

[0099] 所有的标题都是为了读者的方便,除非特别说明,不应该用来限制标题后面的文字的意思。

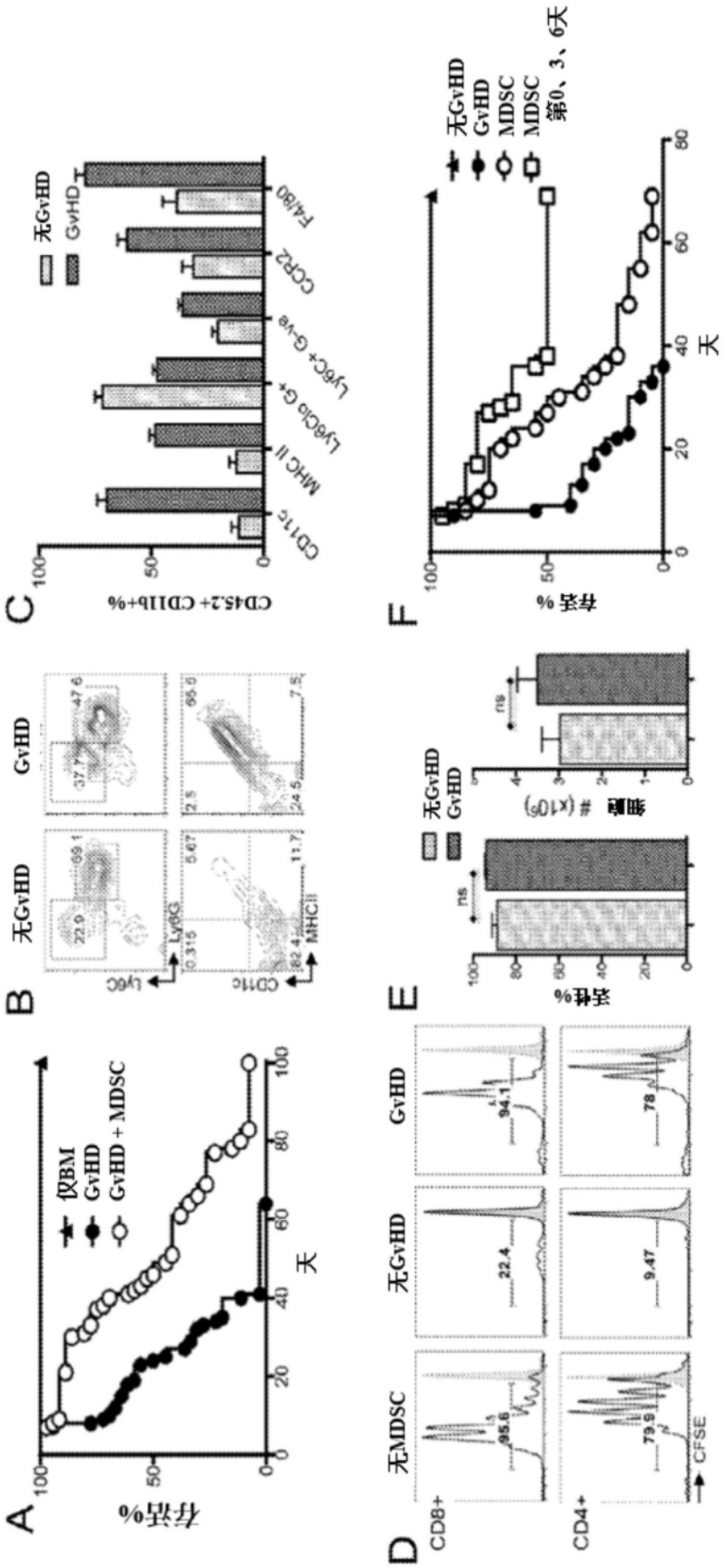

A
存活%
天
仅BM
GvHD
GvHD + MDSC
B
无GvHD
GvHD
Ly6C
CD11c
MHCII
C
CD45.2+ CD11b+%
无GvHD
GvHD
CD11c
MHC II
Ly6Clo G+
Ly6C+ G-ve
CCR2
F4/80
D
无MDSC
无GvHD
GvHD
CD8+
CD4+
CFSE
E
无GvHD
GvHD
活性%
细胞 # (x10^5)
ns
F
无GvHD
GvHD
MDSC
MDSC
第0、3、6天
存活 %
天

图1

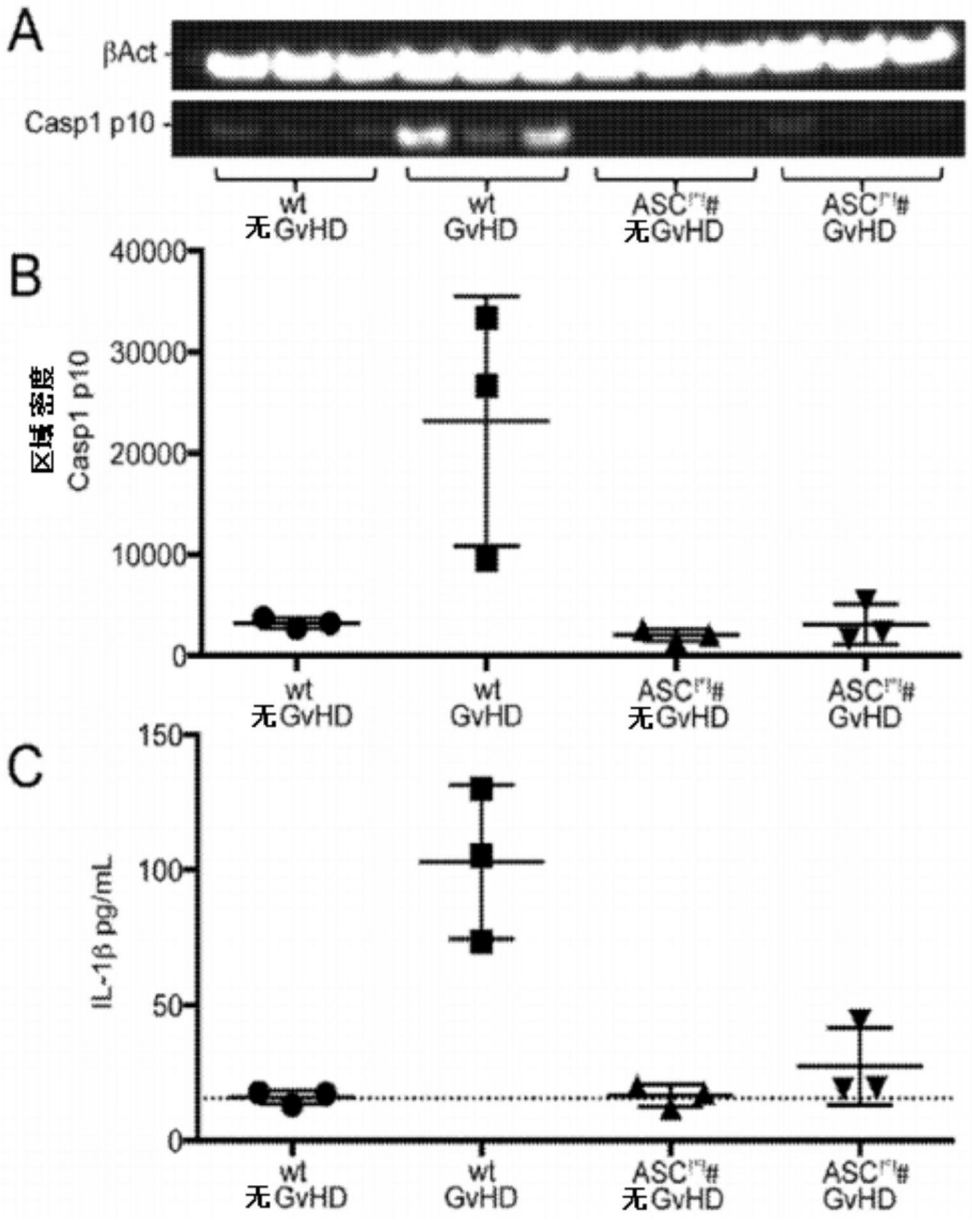

A
βAct
Casp1 p10
wt
无GvHD
wt
GvHD
ASC[fl]#
无GvHD
ASC[fl]#
GvHD
B
区域密度
Casp1 p10
40000
30000
20000
10000
0
C
IL-1β pg/mL
150
100
50
0

图2

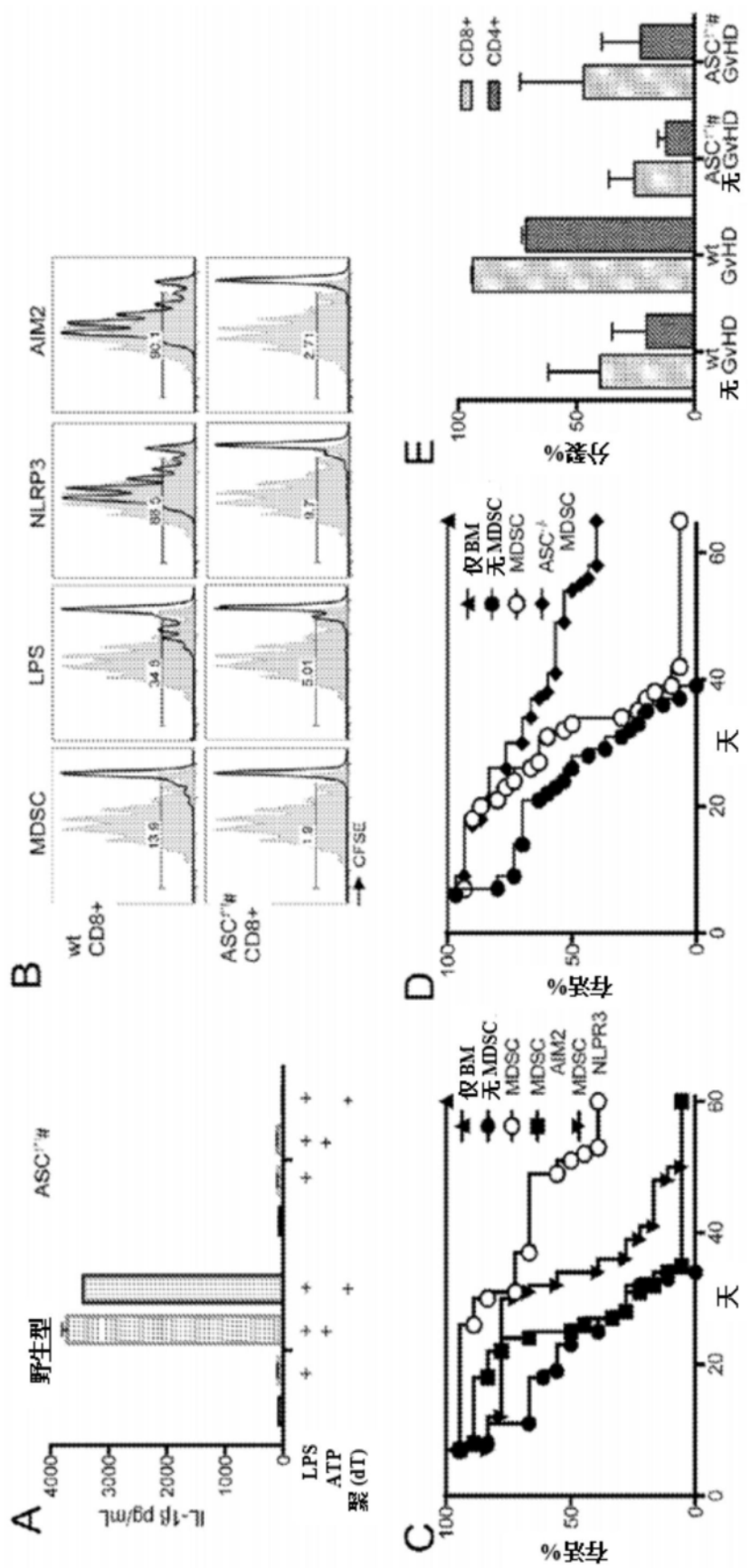

A
野生型
ASC-/-#
IL-1β pg/mL
4000
3000
2000
1000
0
LPS
ATP
聚(dT)
B
MDSC
LPS
NLRP3
AIM2
wt CD8+
ASC-/-# CD8+
13.9
34.9
88.5
90.1
1.9
5.01
9.7
2.71
CFSE
C
存活%
仅BM
无MDSC
MDSC
MDSC AIM2
MDSC NLPR3
天
D
存活%
仅BM
无MDSC
MDSC
ASC-/- MDSC
天
E
分裂%
CD8+
CD4+
wt 无GvHD
wt GvHD
ASC-/-# 无GvHD
ASC-/-# GvHD

图3

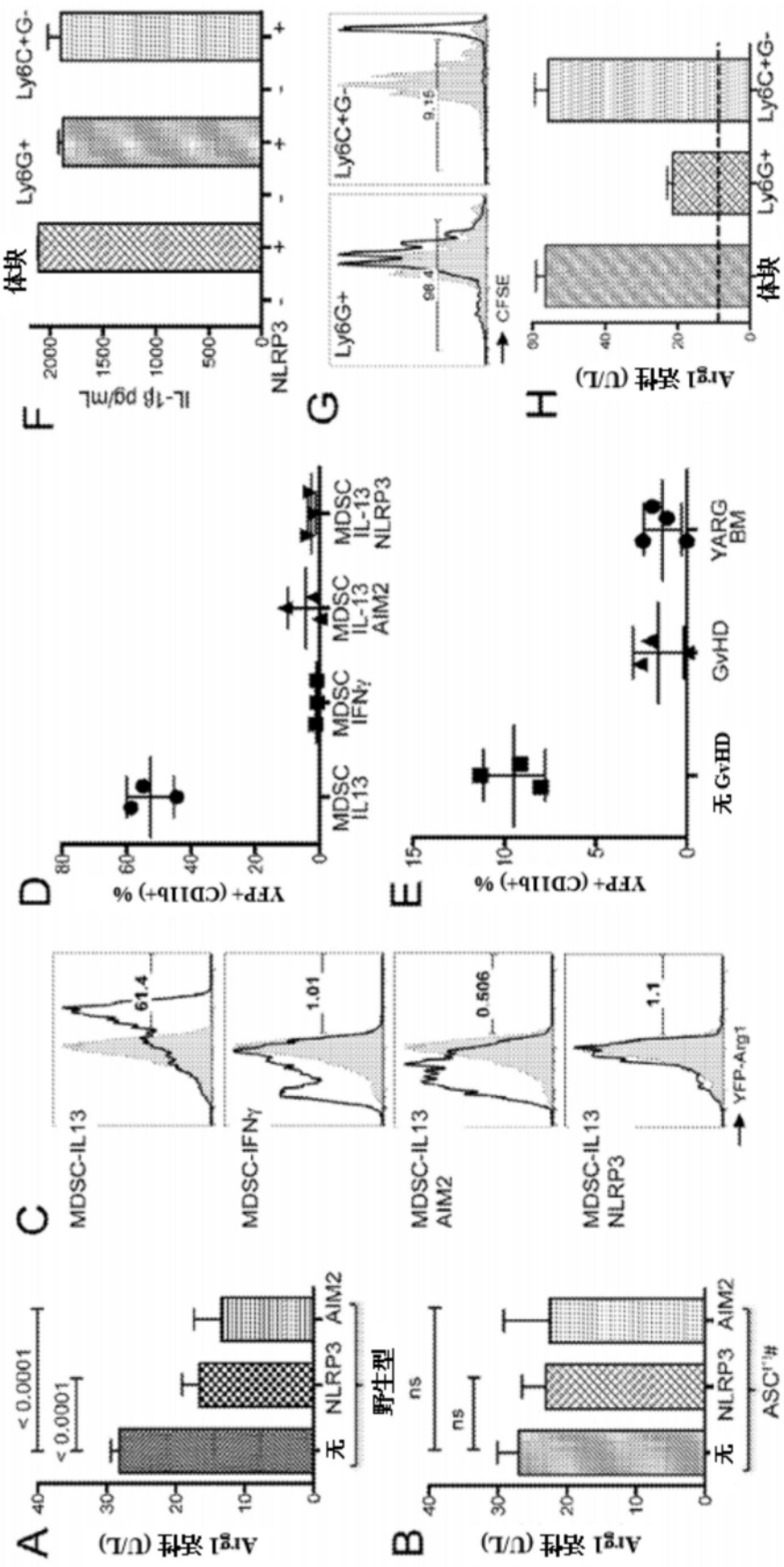

A
Arg1 活性 (U/L)
< 0.0001
< 0.0001
无
NLRP3
AIM2
野生型
B
Arg1 活性 (U/L)
ns
ns
无
NLRP3
AIM2
ASC-/-
C
MDSC-IL13
61.4
MDSC-IFNγ
1.01
MDSC-IL13
AIM2
0.506
MDSC-IL13
NLRP3
1.1
YFP-Arg1
D
YFP+ (CD11b+) %
MDSC IL13
MDSC IFNγ
MDSC IL-13 AIM2
MDSC IL-13 NLRP3
E
YFP+ (CD11b+) %
无 GvHD
GvHD
YARG BM
F
体块
Ly6G+
Ly6C+G-
IL-1β pg/mL
NLRP3
G
Ly6G+
Ly6C+G-
98.4
9.15
CFSE
H
Arg1 活性 (U/L)
体块
Ly6G+
Ly6C+G-

图4

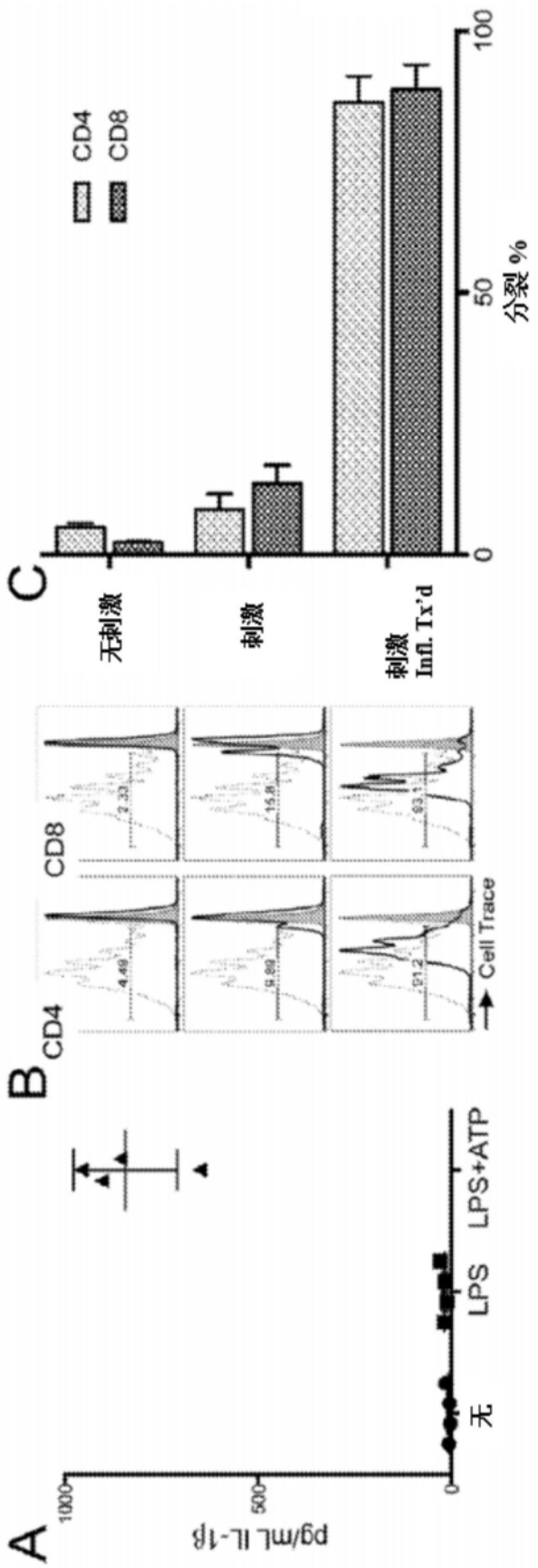

A
pg/mL IL-1β
1000
500
0
无
LPS
LPS+ATP
B
CD4
CD8
4.49
2.33
5.89
15.8
21.2
93.1
Cell Trace
C
CD4
CD8
无刺激
刺激
刺激
Infl. Tx'd
0
50
100
分裂 %

图5

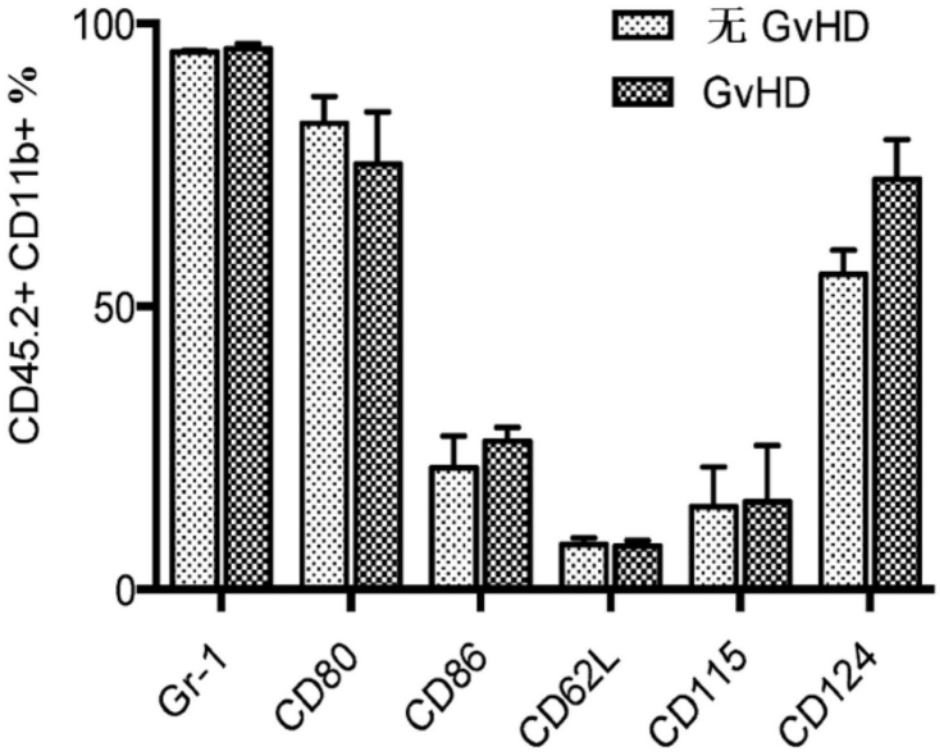

100
50
0
CD45.2+ CD11b+ %
无 GvHD
GvHD
Gr-1
CD80
CD86
CD62L
CD115
CD124

图6

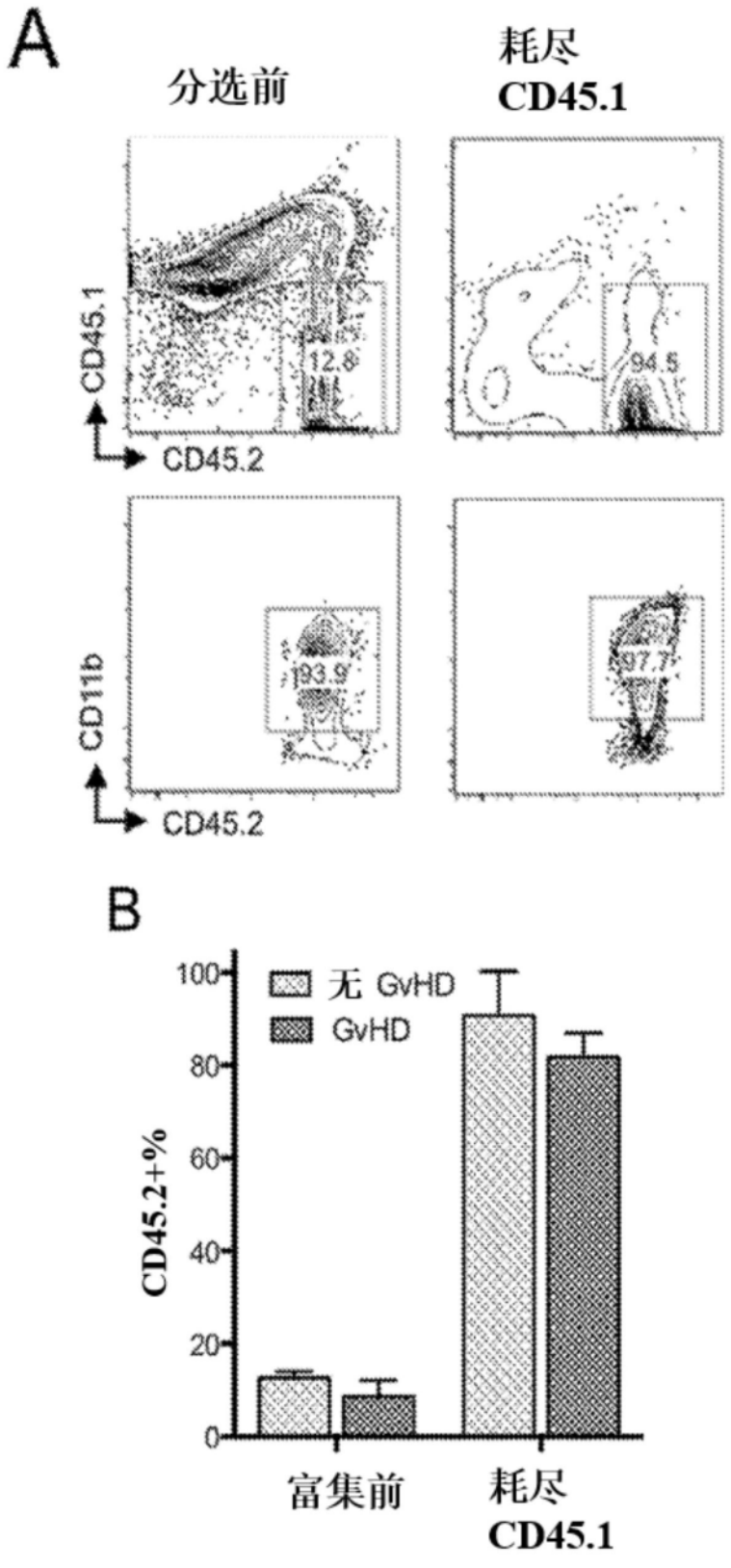

A
分选前
耗尽
CD45.1
CD45.1
CD45.2
12.8
94.5
CD11b
CD45.2
93.9
97.7
B
100
80
60
40
20
0
CD45.2+%
无 GvHD
GvHD
富集前
耗尽
CD45.1

图7

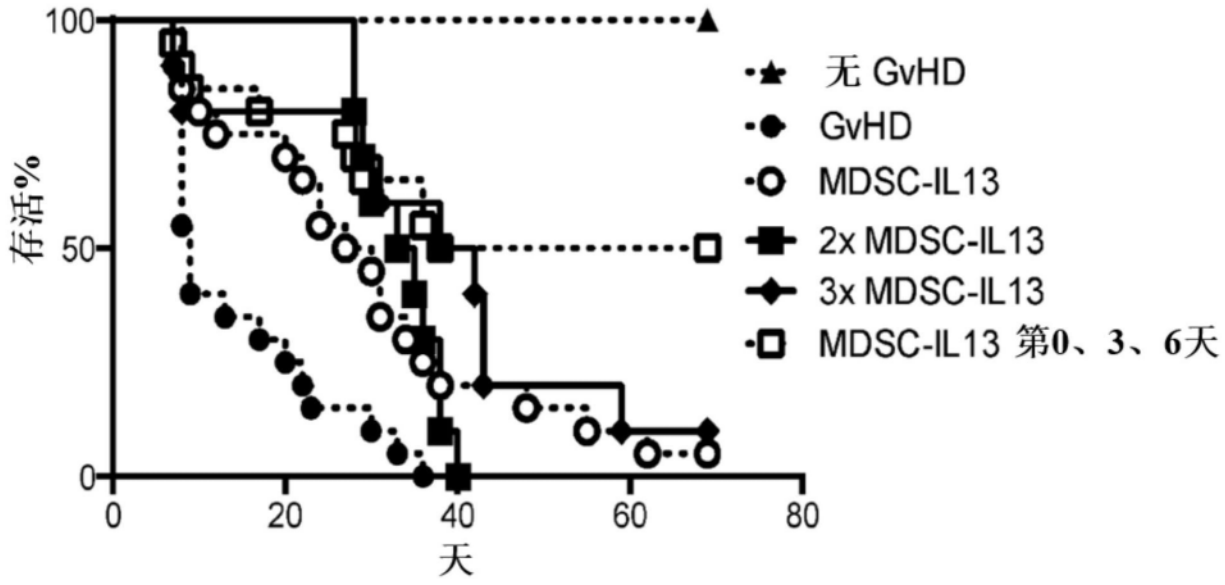

100
50
0
存活%
0
20
40
60
80
天
无 GvHD
GvHD
MDSC-IL13
2x MDSC-IL13
3x MDSC-IL13
MDSC-IL13 第0、3、6天

图8

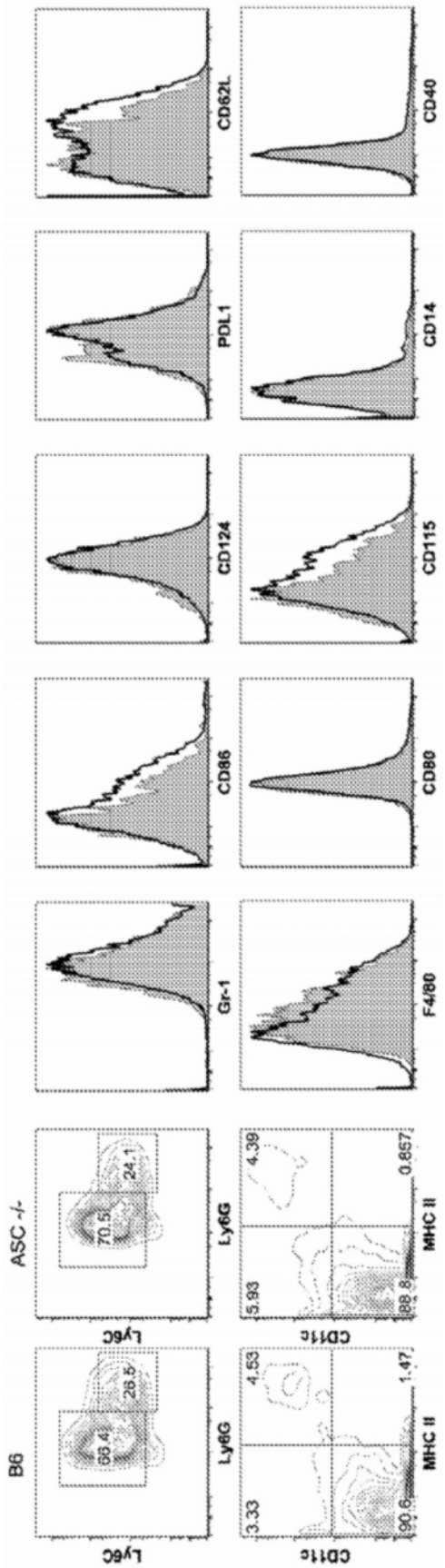

B6
ASC -/-
Ly6C
Ly6G
CD11c
MHC II
66.4
28.5
3.33
4.53
1.47
70.5
24.1
5.93
4.39
0.857
Gr-1
F4/80
CD86
CD80
CD124
CD115
PDL1
CD14
CD62L
CD40

图9

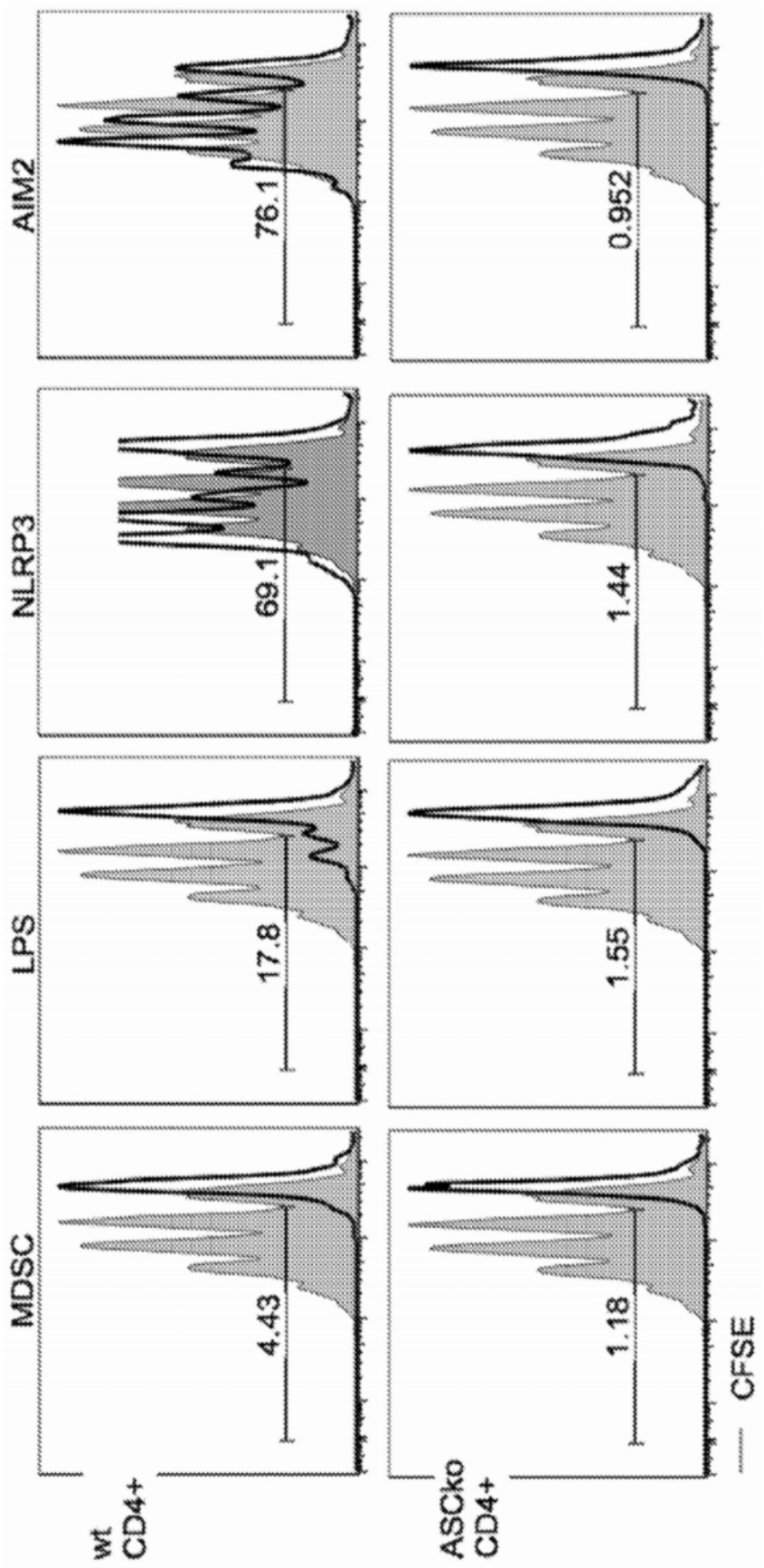

MDSC
LPS
NLRP3
AIM2
4.43
17.8
69.1
76.1
1.18
1.55
1.44
0.952
wt CD4+
ASCko CD4+
CFSE

图10