



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109310710 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201680074724.8

(22)申请日 2016.10.14

(30)优先权数据

62/242,246 2015.10.15 US

62/272,984 2015.12.30 US

62/403,571 2016.10.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/056988 2016.10.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/066530 EN 2017.04.20

(71)申请人 细胞结构公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 张晓奎 I·迪朱瑞蒂克 康林

V·沃斯基纳里安-伯塞

B·斯陶特 R·J·哈里里

W·霍夫加尔特纳 J·艾丁格

E·劳 V·简科维克

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.

A61K 35/17(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

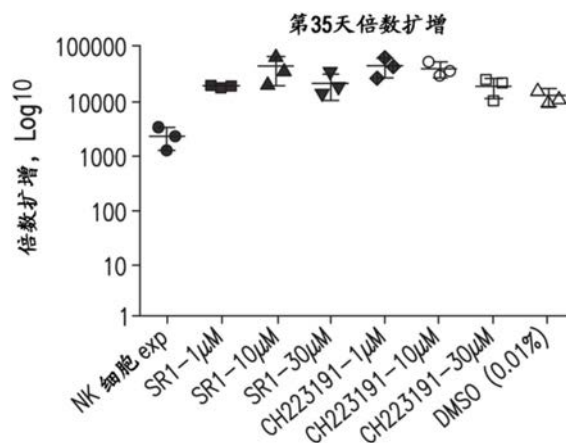
C12N 5/0783(2006.01)

(54)发明名称

自然杀伤细胞和ILC3细胞及其用途

(57)摘要

本文提供了使用包含干细胞动员因子的培养基利用三阶段扩增和分化方法产生天然杀伤(NK)细胞和/或ILC3细胞的方法。本文还提供了使用通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞及NK细胞和/或ILC3细胞群体抑制肿瘤细胞增殖的方法,以及治疗患有癌症或病毒感染的个体的方法,其包括将通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞及NK细胞和/或ILC3细胞群体施用于患有癌症或病毒感染的个体。



1. 一种产生包含自然杀伤细胞的细胞群体的方法,其包括以下步骤:

(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;

(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体;和

(c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和低分子量肝素 (LMWH) 每一种的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体;

其中所述第三细胞群体包含自然杀伤细胞,其中所述自然杀伤细胞是CD56+, CD3-, 和其中至少80%的所述自然杀伤细胞是存活的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第三细胞群体包含CD94+或CD16+的自然杀伤细胞。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第三细胞群体包含CD94-或CD16-的自然杀伤细胞。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第三细胞群体包含CD94+和CD16+的自然杀伤细胞。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第三细胞群体包含CD94-和CD16-的自然杀伤细胞。

6. 一种产生包含自然杀伤细胞的细胞群体的方法,其包括以下步骤:

(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;

(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体;和

(c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体;

其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述第三培养基缺乏干细胞因子 (SCF)。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述第三培养基缺乏LMWH。

9. 根据权利要求7所述的方法,包括 (d) 从所述第三细胞群体分离CD11a+细胞以产生第四细胞群体的进一步的步骤;

其中所述第四细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。

10. 根据权利要求6-9中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞表达穿孔素和EOMES。

11. 根据权利要求6-10中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞不表达ROR γ t或IL1R1。

12. 一种产生包含ILC3细胞的细胞群体的方法,其包括以下步骤:

(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;

(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体;和

(c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体；

其中该第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。

13. 根据权利要求12所述的方法，其中所述第三培养基包含干细胞动员剂。

14. 根据权利要求12所述的方法，其中所述第三培养基包含SCF。

15. 根据权利要求12所述的方法，其中所述第三培养基包含干细胞动员剂和SCF。

16. 一种产生包含ILC3细胞的细胞群体的方法，其包括以下步骤：

(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体；

(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体；

(c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH每一种的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体；和

(d) 从所述第三细胞群体中分离CD11a-细胞以产生第四种细胞群体；

其中所述第四细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。

17. 根据权利要求12-16中任一项所述的方法，其中所述ILC3细胞表达ROR γ t和IL1R1。

18. 根据权利要求12-17中任一项所述的方法，其中所述ILC3细胞不表达穿孔素或EOMES。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法，其中所述第三培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是哺乳动物细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是人类细胞。

22. 根据权利要求20所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是灵长类细胞。

23. 根据权利要求20所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是犬类细胞。

24. 根据权利要求20所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是啮齿动物细胞。

25. 根据权利要求20所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是来自除人、灵长类、犬类或啮齿动物以外的哺乳动物的细胞。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是CD34+造血干细胞。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是胎盘细胞。

28. 根据权利要求27所述的方法，其中所述胎盘细胞获自或可获自人胎盘灌流液。

29. 根据权利要求27所述的方法，其中所述胎盘细胞获自或可获自从人胎盘灌流液分离的有核细胞。

30. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞获自脐带血或可从脐带血获得。

31. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法，其中所述造血干细胞或祖细胞是胎儿肝细胞。

32. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法, 其中所述造血干细胞或祖细胞是动员的外周血细胞。

33. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法, 其中所述造血干细胞或祖细胞是骨髓细胞。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述Tpo以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第一培养基中。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述Tpo以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在于所述第一培养基中。

36. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述Tpo以约25ng/mL的浓度存在于所述第一培养基中。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法, 其中所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第二培养基中。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述IL-15以10ng/mL至30ng/mL的浓度存在于所述第二培养基中。

39. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述IL-15以约20ng/mL的浓度存在于所述第二培养基中。

40. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法, 其中所述IL-2以10U/mL至10,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中, 且所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。

41. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法, 其中所述IL-2以300U/mL至3,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中, 和所述IL-15以10ng/mL至30ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。

42. 根据权利要求1-39中任一项所述的方法, 其中所述IL-2以约1,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中, 且所述IL-15以约20ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。

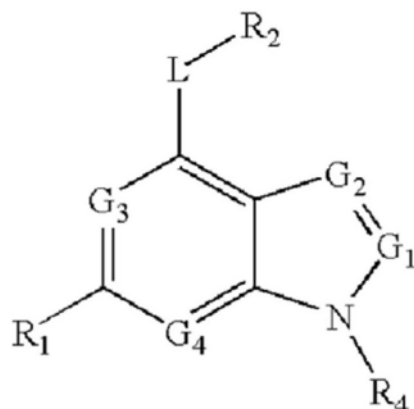
43. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法, 其中所述Tpo、IL-2和IL-15不包含在所述第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分内。

44. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法, 其中所述Tpo、IL-2和IL-15不包含在血清内。

45. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法, 其中所述干细胞动员剂是芳烃受体抑制剂。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述芳烃受体抑制剂是白藜芦醇。

47. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述芳烃受体抑制剂是下式的化合物或其盐:



其中：

G₁选自N和CR₃；

G₂、G₃和G₄独立地选自CH和N；条件是G₃和G₄中至少一个是N；条件是G₁和G₂不都是N；

L选自-NR_{5a}(CH₂)₀₋₃-、-NR_{5a}CH(C(O)OCH₃)CH₂-、-NR_{5a}(CH₂)₂R_{5b}-、-NR_{5a}(CH₂)₂S-、-NR_{5a}CH₂CH(CH₃)CH₂-、-NR_{5a}CH₂CH(OH)-和-NR_{5a}CH(CH₃)CH₂-；其中R_{5a}和R_{5b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基；

R₁选自氢、苯基、苯硫基、呋喃基、1H-苯并咪唑基、异喹啉基、1H-咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、1H-吡唑基、吡啶基、1H-咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、1H-吡咯基和噻唑基；其中所述R₁的苯基、苯硫基、呋喃基、1H-苯并咪唑基、异喹啉基、1H-咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、1H-吡唑基、吡啶基、1H-咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、1H-吡咯基或噻唑基可任选地被独立地选自氰基、羟基、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、卤素、卤素取代的C₁₋₄烷基、卤素取代的C₁₋₄烷氧基、羟基、氨基、-C(O)R_{8a}、-S(O)₀₋₂R_{8a}、-C(O)OR_{8a}和-C(O)R_{8a}R_{8b}中的1至3个基团取代；其中R_{8a}和R_{8b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基；条件是R₁和R₃不都是氢；

R₂选自-S(O)₂NR_{6a}R_{6b}、-NR_{9a}C(O)R_{9b}、-NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}、苯基、1H-吡咯并吡啶-3-基、1H-吡啶基、苯硫基、吡啶基、1H-1,2,4-三唑基、2-氧代咪唑烷基、1H-吡唑基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基和1H-吡唑基；其中R_{6a}、R_{6b}和R_{6c}独立地选自氢和C₁₋₄烷基；其中所述R₂的苯基、1H-吡咯并吡啶-3-基、1H-吡啶基、苯硫基、吡啶基、1H-1,2,4-三唑基、2-氧代咪唑烷基、1H-吡唑基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基或1H-吡唑基可任选地被独立地选自羟基、卤素、甲基、甲氧基、氨基、-O(CH₂)_nNR_{7a}R_{7b}、-S(O)₂NR_{7a}R_{7b}、-OS(O)₂NR_{7a}R_{7b}和-NR_{7a}S(O)₂R_{7b}中的1至3个基团取代；其中R_{7a}和R_{7b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基；

R₃选自氢、C₁₋₄烷基和联苯基；和

R₄选自C₁₋₁₀烷基、丙-1-烯-2-基、环己基、环丙基、2-(2-氧代吡咯烷-1-基)乙基、氧杂环丁烷-3-基、二苯甲基、四氢-2H-吡喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基、苯基、四氢呋喃-3-基、苄基、(4-戊基苯基)(苯基)甲基和1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基；其中所述烷基、环丙基、环己基、2-(2-氧代吡咯烷-1-基)乙基、氧杂环丁烷-3-基、氧杂环丁烷-2-基、二苯甲基、四氢-2H-吡喃-2-基、四氢-2H-吡喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基、苯基、四氢呋喃-3-基、四氢呋喃-2-基、苄基、(4-戊基苯基)(苯基)甲基或1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基可以任选地被独立地选自羟基、C₁₋₄烷基和卤素-取代的C₁₋₄烷基的1至3个基团取代。

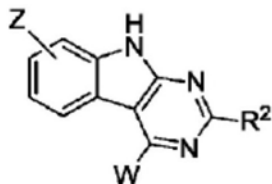
48. 根据权利要求45所述的方法，其中所述芳烃受体抑制剂是StemRegenin-1 (SR-1)

(4-(2-(2-(苯并[b]噻吩-3-基)-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基氨基)乙基)苯酚)。

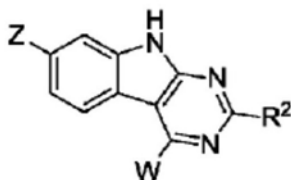
49. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述芳烃受体抑制剂是化合物CH223191 (1-甲基-N-[2-甲基-4-[2-(2-甲基苯基)二氮烯基]苯基-1H-吡唑-5-甲酰胺)。

50. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法, 其中所述干细胞动员剂是嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物。

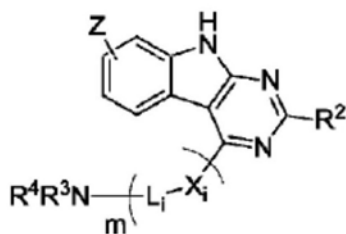
51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物是以下的一种或多种:



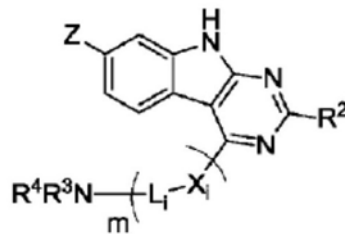
I



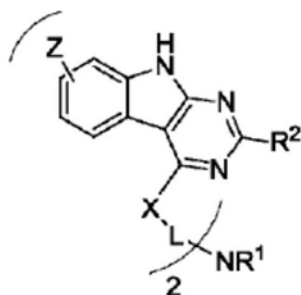
II



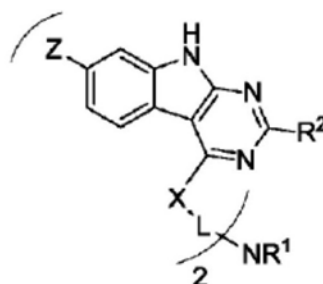
III



IV



V



VI

或其盐或前药, 其中:

Z是

- 1) -P(O)(OR<1>)(OR<1>),
- 2) -C(O)OR<1>,
- 3) -C(O)NHR<1>,
- 4) -C(O)N(R)R<1>,
- 5) -C(O)R<1>,
- 6) -CN,
- 7) -SR,
- 8) -S(O)2NH2,

- 9) $-S(0) 2NHR<1>$,
 - 10) $-S(0) 2N(R) R<1>$,
 - 11) $-S(0) R<1>$,
 - 12) $-S(0) 2R<1>$,
 - 13) $-L$,
 - 14) 苄基, 任选地被1、2或3个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代,
 - 15) $-L$ -杂芳基, 任选地被连接在 L 和杂芳基基团的任一或两者上的一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代,
 - 16) $-L$ -杂环基, 任选地被连接在 L 和杂环基基团的任一或两者上的一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代,
 - 17) $-L$ -芳基, 任选地被连接在 L 和杂芳基基团的任一或两者上的一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代,
 - 18) 杂芳基, 任选地被一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代, 或
 - 19) 芳基, 任选地被一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代基取代,
- 和其中每个取代基任选地连接于 L 基团, 如果其还不存在, 和其中当 $R<A>$ 和 $R<1>$ 与氮原子连接, 任选地它们与氮原子连接在一起以形成3至7元环, 该3至7元环任选地包含一个或多个选自 N 、 O 和 S 的其他杂原子, 任选地其被一个或多个 $R<A>$ 或 $R<1>$ 取代;

W 是

- 1) $-H$,
- 2) 卤素,
- 3) $-OR<1>$,
- 4) $-L-OH$,
- 5) $-L-OR<1>$,
- 6) $-SR<1>$,
- 7) $-CN$,
- 8) $-P(0) (OR<1>) (OR<1>)$,
- 9) $-NHR<1>$,
- 10) $-N(R<1>) R<1>$,
- 11) $-L-NH_2$,
- 12) $-L-NHR<1>$,
- 13) $-L-N(R<1>) R<1>$,
- 14) $-L-SR<1>$,
- 15) $-L-S(0) R<1>$,
- 16) $-L-S(0) 2R<1>$,
- 17) $-L-P(0) (OR<1>) (OR<1>)$,
- 18) $-C(0) OR<1>$,
- 19) $-C(0) NH_2$,
- 20) $-C(0) NHR<1>$,
- 21) $-C(0) N(R<1>) R<1>$,

- 22) $-\text{NHC}(0) \text{R}<1>$,
- 23) $-\text{NR1C}(0) \text{R}<1>$, $-\text{NHC}(0) \text{OR}<1>$,
- $-\text{NR1C}(0) \text{OR}<1>$,
- $-\text{OC}(0) \text{NH}_2$,
- $-\text{OC}(0) \text{NHR}<1>$,
- $-\text{OC}(0) \text{N}(\text{R}) \text{R}<1>$,
- $-\text{OC}(0) \text{R}<1>$,
- $-\text{C}(0) \text{R}<1>$,
- $-\text{NHC}(0) \text{NH}_2$,
- $-\text{NHC}(0) \text{NHR}<1>$,
- $-\text{NHC}(0) \text{N}(\text{R}) \text{R}<1>$,
- $-\text{NRC}(0) \text{NH}_2$,
- $-\text{NRC}(0) \text{NHR}<1>$,
- $-\text{NRC}(0) \text{N}(\text{R}) \text{R}<1>$,
- $-\text{NHS}(0) 2\text{R}<1>$,
- $-\text{NRS}(0) 2\text{R}<1>$,
- $-\text{S}(0) 2\text{NH}_2$,
- $-\text{S}(0) 2\text{NHR}<1>$,
- $-\text{S}(0) 2\text{N}(\text{R}) \text{R}<1>$,
- $-\text{S}(0) \text{R}<1>$,
- $-\text{S}(0) 2\text{R}<1>$,
- $-\text{OS}(0) 2\text{R}_1$,
- $-\text{S}(0) 2\text{OR}<1>$,
- 苄基, 任选地被1、2或3个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- L-杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- L-杂环基, 其任选地被连接在L和杂环基团任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- L-芳基, 其任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- $-\text{L}-\text{NR}<1>(\text{R}<1>)$,
- $-\text{L}-2\text{NR}<1>$,
- $-\text{L}-(\text{N}(\text{R}_1)-\text{L})_n-\text{N}(\text{R}_1) \text{R}_1$, $-\text{L}-(\text{N}(\text{R}<1>)-\text{L})_n$ -杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- $-\text{L}-(\text{N}(\text{R}<1>)-\text{L})_n$ -杂环基, 其任选地被连接在L和杂环基任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- $-\text{L}-(\text{N}(\text{R}<1>)-\text{L})_n$ -芳基, 其任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个 $\text{R}<\text{A}>$ 或 $\text{R}<1>$ 取代基取代,
- $-\text{O}-\text{L}-\text{N}(\text{R}) \text{R}<1>$,

-O-L-杂芳基,任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-O-L-杂环基,任选地被连接在L和杂环基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-O-L-芳基,任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-O-L) 2-NR<1>,

-O-L (N (R) -L) _n-N (R) R<1>,

-O-L- (N (R<1>) -L) _n-杂芳基,任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-O-L- (N (R<1>) -L) _n-杂环基,任选地被连接在L和杂环基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-O-L- (N (R<1>) -L) _n-芳基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-S-L-杂芳基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-S-L-杂环基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-S-L-芳基,任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

-S-L) 2NR1,

-S-L- (N (R1) -L) ^{''}-N (R1) R1,

-S-L- (N (R<1>) -L) _n-杂芳基,任选地被一个或多个R<A>取代基取代,-S-L- (N (R<1>) -L) _n-杂环基,任选地被一个或多个R<A>取代基取代,-S-L- (N (R<1>) -L) _n-芳基,任选地被一个或多个R<A>取代基取代,

-NR<1> (R<1>),

- (N (R1) -L) _n-N (R1) R1,

-N (R1) L) 2-NR1,

76) - (N (R1) -L) ^{''}-N (R1) RA,

77) - (N (R<1>) -L) _n-杂芳基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

78) - (N (R<1>) -L) _n-杂环基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

79) - (N (R<1>) -L) _n-芳基,任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,

80) -杂芳基,任选地被一个或多个R<A>取代基取代,或者

81) -芳基,任选地被一个或多个R<A>取代基取代,

和其中每个取代基任选地连接于L基团,如果其还不存在,和其中当两个R<1>取代基存在于相同的氮原子上时,则每个R<1>取代基独立地选自之后描述的R<1>值的列表,

和其中n是等于0、1、2、3、4或5任一的整数,

和其中当 (R<1>) 和R<1>与氮原子连接时,任选地它们与所述氮原子连接在一起以形成3至7元环,所述3至7元环任选地包含一个或多个选自N、O和S的其它的杂原子,任选地该环被一个或多个R<1>或R<A>取代;

L是

1) -C1-6烷基,

- 2) -C2-6烯基,
- 3) -C2-6炔基,
- 4) -C3-7环烷基,
- 5) -C3-7环烯基,
- 6) 杂环基,
- 7) -C1-6烷基-C3-7环烷基,
- 8) -C1-6烷基-杂环基,
- 9) 芳基,或
- 10) 杂芳基,

和其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、芳基和杂芳基基团各自独立地任选地被一个或两个R<A>取代基取代;

R1是

- 1) -H,
- 2) -C1-6烷基,
- 3) -C2-6烯基,
- 4) -C2-6炔基,
- 5) -C3-7环烷基,
- 6) -C3-7环烯基,
- 7) -C1-5全氟基,
- 8) -杂环基,
- 9) -芳基,
- 10) -杂芳基,
- 11) -苄基,或
- 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酰基,

和其中该烷基、烯基、炔基、环烯基、全氟烷基、杂环基、芳基、杂芳基和苄基基团各自独立地任选被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代;

R2是

- 1) -H,
- 2) -C1-6烷基,
- 3) -SR,
- 4) -C(0)R1,
- 5) -S(0)R1,
- 6) -S(0)2R<1>,
- 7) -苄基,任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代,
- 8) -L-杂芳基,任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- 9) -L-杂环基,任选地被连接在L和杂环基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- 10) -L-芳基,任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取

代基取代，

11)-杂芳基，其任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代，或者

12)-芳基，其任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代，和其中每个取代基任选地连接到L基团，如果其还不存在；

R<A>是

1)-卤素，

2)-CF₃，

3)-OH，

4)-OR<1>，

5)-L-OH，

6)-L-OR<1>，

7)-OCF₃，

8)-SH，

9)-SR₁，

10)-CN，

11)-NO₂，

12)-NH₂，

13)-NHR<1>，

14)-NR<1>R<1>，

15)-L-NH₂，

16)-L-NHR<1>，

17)-L-NR<4>R<1>，

18)-L-SR<1>，

19)-L-S(0)R<1>，

20)-L-S(0)2R<1>，

21)-C(0)OH，

22)-C(0)OR<1>，

23)-C(0)NH₂，

24)-C(0)NHR<1>，

25)-C(0)N(R<1>)R<1>，

26)-NHC(0)R<1>，

27)-NR₁C(0)R<1>，

28)-NHC(0)OR<1>，

29)-NR₁C(0)OR<1>，

30)-OC(0)NH₂，

31)-OC(0)NHR<1>，

32)-OC(0)N(R)R<1>，

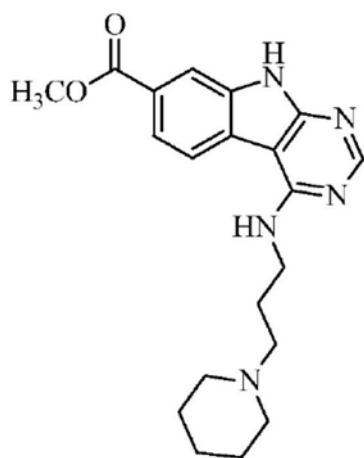
33)-OC(0)R<1>，

34)-C(0)R₁，

- 35) -NHC (0) NH₂,
- 36) -NHC (0) NHR₁,
- 37) -NHC (0) N (R) R<1>
- 38) -NRC (0) NH₂,
- 39) -NRC (0) NHR<1> ,
- 40) -NR₁C (0) N (R₁) R₁,
- 41) -NHS (0) 2R<1> ,
- 42) -NRS (0) 2R<1> ,
- 43) -S (0) 2NH₂,
- 44) -S (0) 2NHR<1>
- 45) -S (0) 2N (R) R<1>
- 46) -S (0) R<1>
- 47) -S (0) 2R<1> ,
- 48) -OS (0) 2R<1> ,
- 49) -S (0) 2OR<1> ,
- 50) -苄基,
- 51) -N₃,或
- 52) -C (-N=N-) (CF₃) ,

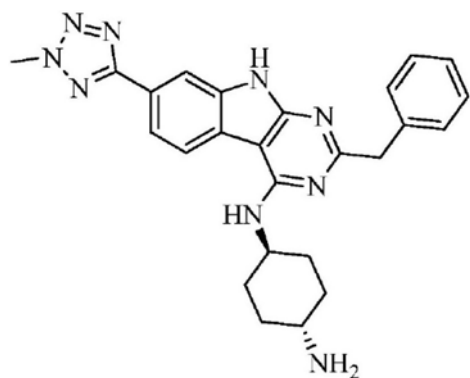
和其中该苄基基团任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代。

52. 根据权利要求50所述的方法,其中所述嘧啶并(4,5-b)吡咯衍生物具有化学结构:



(UM729)。

53. 根据权利要求50所述的方法,其中所述嘧啶并(4,5-b)吡咯衍生物具有化学结构:



(UM171)。

54. 根据权利要求1-53中任一项所述的方法,其中所述第一培养基另外包含LMWH、F1t-3配体(F1t-3L)、干细胞因子(SCF)、IL-6、IL-7、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)中的一种或多种。

55. 根据权利要求1-54中任一项所述的方法,其中所述第一培养基不包含LMWH。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述第一培养基不包含脱硫酸糖胺聚糖。

57. 根据权利要求54所述的方法,其中所述第一培养基包含LMWH、F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。

58. 根据权利要求55或56所述的方法,其中所述第一培养基包含F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。

59. 根据权利要求54或权利要求57所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。

60. 根据权利要求54或权利要求57所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于所述第一培养基中;F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL到0.30ng/mL的浓度出现;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。

61. 根据权利要求54或权利要求57所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述LMWH以约4.5U/mL的浓度存在于所述第一培养基中;F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。

62. 根据权利要求55或权利要求58所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。

63. 根据权利要求55或权利要求58所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至

0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。

64. 根据权利要求55或权利要求58所述的方法,其中在所述第一培养基中,所述F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述第二培养基另外包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法,其中所述第二培养基不包含LMWH。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述第二培养基不包含脱硫酸糖胺聚糖。

68. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法,其中所述第二培养基另外包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。

69. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中所述第二培养基另外包含F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。

70. 根据权利要求65或权利要求68所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。

71. 根据权利要求65或权利要求68所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于所述第二培养基中;F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。

72. 根据权利要求65或权利要求68所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述LMWH以约4.5U/mL的浓度存在于所述第二培养基中;F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。

73. 根据权利要求66或权利要求69所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。

74. 根据权利要求66或权利要求69所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。

75. 根据权利要求66或权利要求69所述的方法,其中在所述第二培养基中,所述F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。

76. 根据权利要求1-75中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基另外包含IL-6、IL-7、G-CSF或GM-CSF中的一种或多种。

77. 根据权利要求76所述的方法, 其中所述第三培养基包含IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。

78. 根据权利要求76或权利要求77所述的方法, 其中在所述第三培养基中, 所述IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在; IL-7以1ng/mL到50ng/mL的浓度存在; G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在; 和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。

79. 根据权利要求76或权利要求77所述的方法, 其中在所述第三培养基中, 所述IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在; IL-7以20ng/mL到30ng/mL的浓度存在; G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在; 和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。

80. 根据权利要求76或权利要求77所述的方法, 其中在所述第三培养基中, 所述IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在; IL-7以约20ng/mL的浓度存在; G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在; 和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。

81. 根据权利要求6-11和19-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含100ng/mL IL-7、1000ng/mL IL-2、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1并缺乏SCF。

82. 根据权利要求6-11和19-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含20ng/mL IL-7、1000ng/mL IL-2、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1并缺乏SCF。

83. 根据权利要求6-11和19-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含20ng/mL IL-7、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1并缺乏SCF。

84. 根据权利要求12-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含100ng/mL IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15并缺乏SR1。

85. 根据权利要求12-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15并缺乏SR1。

86. 根据权利要求12-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15并缺乏SR1。

87. 根据权利要求12-33中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF和1000ng/mL IL-2并缺乏SR1。

88. 根据权利要求54-87中任一项所述的方法, 其中所述LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在所述第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分中。

89. 根据权利要求54-87中任一项的方法, 其中所述LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在血清内。

90. 根据权利要求1-89中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含人血清-AB。

91. 根据权利要求90所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含1%至20%的人血清-AB。

92. 根据权利要求90所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含5%至15%的人血清-AB。

93. 根据权利要求90所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含约10%的人血清-AB。

94. 根据权利要求1-93中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含2-巯基乙醇。

95. 根据权利要求1-94中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含庆大霉素。

96. 根据权利要求1-95中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第一培养基中培养所述造血干细胞7-13天。

97. 根据权利要求96所述的方法, 其中所述方法包括在所述第一培养基中培养所述造血干细胞8-12天。

98. 根据权利要求96所述的方法, 其中所述方法包括在所述第一培养基中培养所述造血干细胞约10天。

99. 根据权利要求1-95中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第二培养基中培养所述第一细胞群体2-6天。

100. 根据权利要求1-95中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第二培养基中培养所述第一细胞群体3-5天。

101. 根据权利要求1-95中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第二培养基中培养所述第一细胞群体约4天。

102. 根据权利要求1-101中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第三培养基中培养所述第二细胞群体10-30天。

103. 根据权利要求1-101中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第三培养基中培养所述第二细胞群体15-25天。

104. 根据权利要求1-101中任一项所述的方法, 其中所述方法包括在所述第三培养基中培养所述第二细胞群体约21天。

105. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法, 其中在所述第一培养基、第二培养基和第三培养基中的所述培养全部在静态培养条件下进行。

106. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法, 其中在所述第一培养基、第二培养基或第三培养基的至少一个中的所述培养是在旋转瓶中进行。

107. 根据权利要求1-104中任一项所述的方法, 其中在所述第一培养基和所述第二培养基中的所述培养是在静态培养条件下进行, 且在所述第三培养基中的所述培养在旋转瓶中进行。

108. 根据权利要求1-107中任一项所述的方法, 其中所述造血细胞最初以 1×10^4 到 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第一培养基中。

109. 根据权利要求108所述的方法, 其中所述造血细胞最初以约 3×10^4 个细胞/mL接种到所述第一培养基中。

110. 根据权利要求1-109中任一项所述的方法, 其中所述第一细胞群体最初以从 5×10^4 至 5×10^5 个细胞/mL接种至所述第二培养基中。

111. 根据权利要求110中任一项所述的方法, 其中所述第一细胞群体最初以约 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第二培养基中。

112. 根据权利要求1-111中任一项所述的方法, 其中所述第二细胞群体最初以 1×10^5 至 5×10^6 个细胞/mL接种至所述第三培养基中。

113. 根据权利要求112所述的方法, 其中所述第二细胞群体最初以 1×10^5 到 1×10^6 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。

114. 根据权利要求112所述的方法, 其中所述第二细胞群体最初以约 5×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。

115. 根据权利要求112所述的方法, 其中所述第二细胞群体最初以约 3×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。

116. 根据权利要求1-11、19-83和88-115中任一项所述的方法, 其中与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比, 所述方法产生多至少5000倍的自然杀伤细胞。

117. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述方法产生多至少10,000倍的自然杀伤细胞。

118. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述方法产生多至少50,000倍的自然杀伤细胞。

119. 根据权利要求116所述的方法, 其中所述方法产生多至少75,000倍的自然杀伤细胞。

120. 根据权利要求12-80和84-115中任一项所述的方法, 其中与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比, 所述方法产生多至少5000倍的ILC3细胞。

121. 根据权利要求120所述的方法, 其中所述方法产生多至少10,000倍的ILC3细胞。

122. 根据权利要求120所述的方法, 其中所述方法产生多至少50,000倍的ILC3细胞。

123. 根据权利要求120所述的方法, 其中所述方法产生多至少75,000倍的ILC3细胞。

124. 根据权利要求1-5、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少20%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

125. 根据权利要求1-5、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少40%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

126. 根据权利要求1-5、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少60%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

127. 根据权利要求1-5、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少80%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

128. 根据权利要求1-11、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

129. 根据权利要求1-11、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

130. 根据权利要求1-11、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

131. 根据权利要求1-11、19-83和88-119中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

132. 根据权利要求12-80、84-115和120-123中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。

133. 根据权利要求12-80、84-115和120-123中任一项所述的方法, 其中所述方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。

134. 根据权利要求12-80、84-115和120-123中任一项所述的方法,其中所述方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。

135. 根据权利要求12-80、84-115和120-123中任一项所述的方法,其中所述方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的自然杀伤细胞。

136. 根据权利要求1-11、19-83、88-119和124-131中任一项所述的方法,其中当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共同培养时,所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少20%的细胞毒性。

137. 根据权利要求136所述的方法,其中所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少35%的细胞毒性。

138. 根据权利要求136所述的方法,其中所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少45%的细胞毒性。

139. 根据权利要求136所述的方法,其中所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少60%的细胞毒性。

140. 根据权利要求136所述的方法,其中所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少75%的细胞毒性。

141. 根据权利要求12-80、84-115、120-123和132-135中任一项所述的方法,其中当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少20%的细胞毒性。

142. 根据权利要求141所述的方法,其中所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少35%的细胞毒性。

143. 根据权利要求141所述的方法,其中所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少45%的细胞毒性。

144. 根据权利要求141所述的方法,其中所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少60%的细胞毒性。

145. 根据权利要求141所述的方法,其中所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少75%的细胞毒性。

146. 根据权利要求1-5、19-83、88-119、124-131和136-140中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞的存活力通过7-氨基放线菌素D (7AAD) 染色来测定。

147. 根据权利要求1-5、19-83、88-119、124-131和136-140中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞的存活力通过膜联蛋白-V染色来测定。

148. 根据权利要求1-5、19-83、88-119、124-131和136-140中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞的存活力通过7AAD染色和膜联蛋白-V染色两者来测定。

149. 根据权利要求1-5、19-83、88-119、124-131和136-140中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞的存活力通过台盼蓝染色来测定。

150. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法,另外包括在步骤(c)或步骤(d)之后冷冻保存所述细胞群体。

151. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法,另外包括在步骤(c)之后冷冻保存所述细胞群体。

152. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法,其中所述第一培养基和/或所述第二培

培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。

153. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法, 其中所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。

154. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 且所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。

155. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基都不包含脱硫酸糖胺聚糖。

156. 根据权利要求1-149中任一项所述的方法, 其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含肝素。

157. 根据权利要求156所述的方法, 其中所述肝素是低分子量肝素 (LMWH)。

158. 根据权利要求1-5、19-83、88-119、124-131、136-140和146-149中任一项所述的方法, 另外包括在步骤(c) 或步骤(d) 之后冷冻保存所述自然杀伤细胞。

159. 通过权利要求1-5、19-83、88-119、124-131、136-140和146-149中任一项所述的方法产生的自然杀伤细胞群体。

160. 一种包含自然杀伤细胞的细胞群体, 其中所述细胞群体通过权利要求1-5、19-83、88-119、124-131、136-140和146-149中任一项所述的方法产生。

161. 通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生的ILC3细胞群体。

162. 一种包含ILC3细胞的细胞群体, 其中所述细胞群体通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生。

163. 一种细胞群体, 其包含权利要求1-8和10-15中任一项所述的第三细胞群体。

164. 一种细胞群体, 其包含权利要求9或权利要求16所述的第四细胞群体。

165. 一种抑制肿瘤细胞的增殖的方法, 其包括使所述肿瘤细胞与多个自然杀伤细胞接触, 其中所述自然杀伤细胞通过权利要求1-5、19-83、88-119、124-131、136-140和146-149中任一项所述的方法产生。

166. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述接触在体外发生。

167. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述接触在体内发生。

168. 根据权利要求167所述的方法, 其中所述接触在人类个体中发生。

169. 根据权利要求167所述的方法, 其中所述方法包括向所述个体施用所述自然杀伤细胞。

170. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。

171. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是急性髓性白血病 (AML) 细胞。

172. 根据权利要求171所述的方法, 其中所述个体具有复发/难治性AML。

173. 根据权利要求171所述的方法, 其中所述个体具有至少一种抗AML的非先天淋巴样细胞 (ILC) 治疗失败的AML。

174. 根据权利要求165所述的方法, 其中所述个体是65岁或更大, 且处于第一缓解期。

175. 根据权利要求165-168中任一项所述的方法, 其中在施用所述自然杀伤细胞之前,

所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理。

176. 根据权利要求159-163中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。

177. 根据权利要求159-163中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤 (CML) 细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞,结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。

178. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。

179. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是肝肿瘤细胞。

180. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是肺肿瘤细胞。

181. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是胰腺肿瘤细胞。

182. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是肾肿瘤细胞。

183. 根据权利要求165-169中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 细胞。

184. 根据权利要求165-183中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞与抗CD33抗体一起施用。

185. 根据权利要求165-183中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞与抗CD20抗体一起施用。

186. 根据权利要求165-183中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞与抗CD138抗体一起施用。

187. 根据权利要求165-183中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞与抗CD32抗体一起施用。

188. 根据权利要求165-187中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞在所述接触或所述施用之前已经冷冻保存。

189. 根据权利要求165-187中任一项所述的方法,其中所述自然杀伤细胞在所述接触或所述施用之前未冷冻保存。

190. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,其包括使所述肿瘤细胞与多个ILC3细胞接触,其中所述ILC3细胞通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生。

191. 根据权利要求190所述的方法,其中所述接触在体外发生。

192. 根据权利要求190所述的方法,其中所述接触在体内发生。

193. 根据权利要求192所述的方法,其中所述接触在人类个体中发生。

194. 根据权利要求192所述的方法,其中所述方法包括向所述个体施用所述自然杀伤细胞。

195. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。

196. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法,其中所述肿瘤细胞是急性髓性白血病 (AML) 细胞。

197. 根据权利要求196所述的方法,其中所述个体具有复发/难治性AML。

198. 根据权利要求196所述的方法, 其中所述个体具有至少一种针对AML的非先天淋巴样细胞 (ILC) 治疗失败的AML。

199. 根据权利要求196所述的方法, 其中所述个体为65岁或更大, 且处于第一缓解期。

200. 根据权利要求196-199中任一项所述的方法, 其中所述个体在施用所述ILC3细胞之前已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理。

201. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。

202. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤 (CML) 细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。

203. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。

204. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是肝肿瘤细胞。

205. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是肺肿瘤细胞。

206. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是胰腺肿瘤细胞。

207. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是肾肿瘤细胞。

208. 根据权利要求190-194中任一项所述的方法, 其中所述肿瘤细胞是多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 细胞。

209. 根据权利要求190-208中任一项所述的方法, 其中所述自然杀伤细胞与抗CD33抗体一起施用。

210. 根据权利要求190-208中任一项所述的方法, 其中所述自然杀伤细胞与抗CD20抗体一起施用。

211. 根据权利要求190-208中任一项所述的方法, 其中所述自然杀伤细胞与抗CD138抗体一起施用。

212. 根据权利要求190-208中任一项所述的方法, 其中所述自然杀伤细胞与抗CD32抗体一起施用。

213. 根据权利要求190-212中任一项所述的方法, 其中所述ILC3细胞在所述接触或所述施用之前已经冷冻保存。

214. 根据权利要求190-212中任一项所述的方法, 其中所述ILC3细胞在所述接触或所述施用之前未冷冻保存。一种在化疗后修复胃肠道的方法, 其包括向个体施用多个ILC3细胞, 其中该ILC3细胞通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生。

215. 一种针对放射保护个体的方法, 其包括向个体施用多个ILC3细胞, 其中该ILC3细胞通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生。

216. 根据权利要求210所述的方法, 其中所述ILC3细胞用作骨髓移植的辅助物。

217. 一种重建个体的胸腺的方法, 其包括向个体施用多个ILC3细胞, 其中该ILC3细胞通过权利要求12-80、84-115、120-123、132-135和141-145中任一项所述的方法产生。

218. 一种自然杀伤细胞群体, 其是CD56+CD3-CD117+CD11a+, 其中所述自然杀伤细胞表达穿孔素和/或EOMES, 且不表达ROR γ t、芳基羟受体和IL1R1中的一种或多种。

219. 根据权利要求219所述的群体,其中所述自然杀伤细胞表达穿孔素和EOMES,且不表达ROR γ t、芳基烃受体或IL1R1中的任一种。

220. 根据权利要求219或220所述的群体,其中所述自然杀伤细胞另外表达T-bet、GZMB、NKp46、NKp30和NKG2D。

221. 根据权利要求219-221中任一项所述的群体,其中所述自然杀伤细胞表达CD94。

222. 根据权利要求219-221中任一项所述的群体,其中所述自然杀伤细胞不表达CD94。

223. 一种ILC3细胞群体,其为CD56+CD3-CD117+CD11a-,其中所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1中的一种或多种,且不表达CD94、穿孔素和EOMES中的一种或多种。

224. 根据权利要求224所述的群体,其中所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1,且不表达CD94、穿孔素或EOMES中的任何一种。

225. 根据权利要求224或225所述的群体,其中所述ILC3细胞另外表达CD226和/或2B4。

226. 根据权利要求224-226中任一项所述的群体,其中所述ILC3细胞另外表达IL-22、TNF α 和DNAM-1中的一种或多种。

227. 根据权利要求224-227中任一项所述的群体,其中所述ILC3细胞表达CD226、2B4、IL-22、TNF α 和DNAM-1。

228. 一种产生包含自然杀伤细胞和ILC3细胞的细胞群体的方法,其包括以下步骤:

(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;

(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体;

(c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的每一种的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体;和

(d) 从所述第三细胞群体分离CD11a+细胞和CD11a-细胞;和

(e) 以50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率将CD11a+细胞与CD11a-细胞组合以产生第四细胞群体。

229. 根据权利要求229所述的方法,其中所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏LIF和/或MIP-1 α 。

230. 根据权利要求229所述的方法,其中所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt-3L。

231. 根据权利要求229所述的方法,其中所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。

232. 根据权利要求229-232中任一项所述的方法,其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含脱硫酸糖胺聚糖。

233. 根据权利要求229-232中任一项所述的方法,其中所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含肝素。

234. 根据权利要求234所述的方法,其中所述肝素是低分子量肝素(LMWH)。

235. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a+细胞和CD11a-细胞以50:1的比率组合。

236. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a+细胞和CD11a-细胞以20:1的比率组合。

237. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以10:1的比率组合。

238. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以5:1的比率组合。

239. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:1的比率组合。

240. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:5的比率组合。

241. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:10的比率组合。

242. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:20的比率组合。

243. 根据权利要求229所述的第四细胞群体,其中所述CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:50的比率组合。

自然杀伤细胞和ILC3细胞及其用途

[0001] 本申请要求于2015年10月15日提交的美国临时专利申请第62/242,246号、于2015年12月30日提交的美国临时专利申请第62/272,984号和于2016年10月3日提交的美国临时专利申请第62/403,571号的权益,其中每一篇的全部公开内容通过引用并入本文。

1. 技术领域

[0002] 本文提供了在包含干细胞动员因子的培养基中从造血干细胞或祖细胞群体产生自然杀伤(NK)细胞和/或ILC3细胞群体的方法,例如在包含干细胞动员因子的培养基中从来自胎盘细胞(例如来自胎盘灌流液,例如人胎盘灌流液)或其他组织(例如,脐带血或外周血)的造血干细胞或祖细胞起始的产生NK细胞和/或ILC3细胞的三阶段方法。本文进一步提供了使用本文所述的胎盘灌流液、NK细胞和/或ILC3细胞和/或NK祖细胞,以例如抑制肿瘤细胞增殖或抑制病原体感染(例如,病毒感染)的方法。在某些实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞和/或NK祖细胞与一种或多种免疫调节化合物联合使用和/或用一种或多种免疫调节化合物治疗。

2. 背景技术

[0003] 自然杀伤(NK)细胞是构成先天免疫系统的主要成分的细胞毒性淋巴细胞。

[0004] NK细胞响应于干扰素或巨噬细胞衍生的细胞因子而激活。NK细胞的细胞毒性活性很大程度上受两种类型的表面受体调节,它们可被认为是“激活性受体”或“抑制性受体”,尽管一些受体如CD94和2B4(CD244)可以根据配体相互作用以任一方式工作。

[0005] 在其他活性中,NK细胞在宿主对肿瘤的排斥中发挥作用,并显示出能够杀死病毒感染的细胞。自然杀伤细胞可以通过缺乏或显示降低水平的主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的细胞而被激活。具有改变的或降低水平的自身I类MHC表达的癌细胞导致NK细胞敏感性的诱导。来自外周血的激活和扩增NK细胞以及在某些情况下的LAK细胞已用于具有晚期癌症的患者的离体疗法和体内治疗,其中一些针对骨髓相关疾病,例如白血病;乳腺癌;和某些类型的淋巴瘤获得成功。

[0006] 尽管NK细胞具有杀死肿瘤细胞和病毒感染细胞的有利特性,但本领域仍然需要开发有效的方法来产生和扩增保留杀肿瘤功能的自然杀伤细胞。

[0007] NK细胞是先天淋巴样细胞(ILC)。先天淋巴样细胞通过其依赖于转录因子ID2进行发育的依赖性而相关。一种类型的ILC(称为ILC3细胞)在文献中被描述为表达ROR γ t并产生IL-22,以及在成体的免疫应答中发挥作用,而没有表现出细胞毒性效应,如穿孔素、颗粒酶和死亡受体(Montaldo等,2014,Immunity 41:988-1000;Killig等,2014,Front.Immunol.5:142;Withers等,2012,J.Immunol.189(5):2094-2098)。

3. 发明内容

[0008] 本文提供了扩增和分化细胞(例如造血细胞,例如造血干细胞,例如CD34+造血干细胞)以产生自然杀伤(NK)细胞和/或ILC3细胞的方法。

[0009] 在一个方面,本文提供了包括如本文所述的三个阶段的产生NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的方法(且本文中称为“三阶段方法”)。由本文提供的三阶段方法产生的自然杀伤细胞和/或ILC3细胞在本文中被称为“通过三阶段方法产生的NK细胞”、“通过三阶段方法产生的ILC3细胞”或“通过三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞”。在某些实施方案中,所述方法包括一个或多个的另外的步骤或中间步骤。在某些实施方案中,所述方法不包括在其中使细胞接触(或培养)的任何第四或中间步骤。

[0010] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞,例如CD34+干细胞或祖细胞,以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和随后在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和低分子量肝素(LMWH)的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中所述第三细胞群体包含自然杀伤细胞,其是CD56+,CD3-,和其中至少70%,例如80%的自然杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD16-的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94+或CD16+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94-或CD16-的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94+和CD16+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94-和CD16-的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基和第三培养基中的至少一种、两种或全部三种不是培养基GBGM®。在某些实施方案中,第三培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在某些实施方案中,第三培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。

[0011] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0012] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞因子(SCF)和LMWH每一种的第

三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0013] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏SCF、干细胞动员剂和LMWH每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0014] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a+细胞以产生第四细胞群体;其中所述第四细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0015] 在某些实施方案中,所述自然杀伤细胞表达穿孔素和脱中胚蛋白(eomesodermin, EOMES)。在某些实施方案中,所述自然杀伤细胞不表达RAR相关孤儿受体 γ (ROR γ t)或白细胞介素-1受体1(IL1R1)。

[0016] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1

α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0017] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含干细胞动员剂、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0018] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0019] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含干细胞动员剂、SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0020] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH每一种的第三培

培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a-细胞,以产生第四细胞群体;其中所述第四细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0021] 在某些实施方案中,所述ILC3细胞表达ROR γ t和IL1R1。在某些实施方案中,所述ILC3细胞不表达穿孔素或EOMES。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。

[0022] 在某些实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是哺乳动物细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是人类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是灵长类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是犬类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是啮齿动物细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是来自除人、灵长类动物、犬类或啮齿动物以外的哺乳动物的细胞。

[0023] 在某些方面,在第一培养基中培养的造血干细胞或祖细胞是CD34⁺干细胞或祖细胞。在某些方面,该造血干细胞或祖细胞是胎盘造血干细胞或祖细胞。在某些方面,该胎盘造血干细胞或祖细胞获自胎盘灌流液或可从胎盘灌流液获得(例如,获自或可获自来自胎盘灌流液的分离的有核细胞)。在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞获自脐带血或可从脐带血获得。在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞是胎儿肝细胞。在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞是动员的外周血细胞。在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞是骨髓细胞。

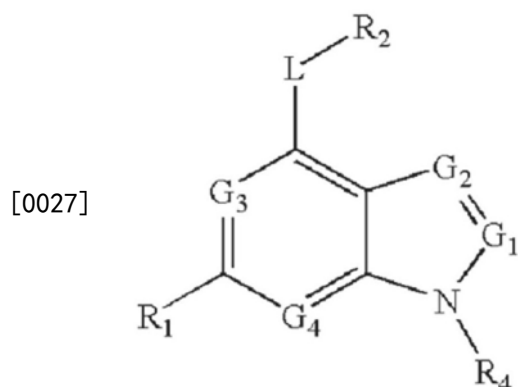
[0024] 在某些方面,用于三阶段方法中的所述第一培养基包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)。在某些方面,用于三阶段方法的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo以外,还包含低分子量肝素(LMWH)、Flt-3配体(Flt-3L)、干细胞因子(SCF)、IL-6、IL-7、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)中的一种或多种。在某些方面,所述第一培养基不包含添加的LMWH。在某些方面,所述第一培养基不包含添加的脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,所述第一培养基不包含LMWH。在某些方面,所述第一培养基不包含脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,用于三阶段方法中的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo之外,还包含LMWH、Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,用于三阶段方法的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo之外,还包含Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,所述Tpo以1ng/mL至100ng/mL、1ng/mL至50ng/mL、20ng/mL至30ng/mL或者约25ng/mL的浓度存在于第一培养基中。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;Flt-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,Flt-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在;

F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以约4.5U/mL的浓度存在;F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些实施方案中,所述第一培养基不是GBGM®。

[0025] 在某些方面,用于三阶段方法中的所述第二培养基包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15),且缺乏Tpo。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。在某些方面,该第二培养基不包含添加的LMWH。在某些方面,该第二培养基不包含添加的脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,该第二培养基不包含LMWH。在某些方面,该第二培养基不包含脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL、10ng/mL至30ng/mL或约20ng/mL的浓度存在于所述第二培养基中。在某些方面,在所述第二培养基中,LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于第二培养基中;F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF的存在浓度为0.20ng/mL至0.30ng/mL;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于第二培养基中;F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-

CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以约4.5U/mL的浓度存在于第二培养基中;Flt-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,Flt-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些实施方案中,所述第二培养基不是GBGM®。

[0026] 在某些方面,存在于所述第一培养基、所述第二培养基或所述第一和第二培养基中的干细胞动员因子是芳烃受体抑制剂,例如芳烃受体拮抗剂。在某些方面,所述芳烃受体抑制剂是白藜芦醇。在某些方面,所述芳烃受体抑制剂是下式的化合物或其盐:



[0028] 其中:

[0029] G_1 选自N和CR₃;

[0030] G_2 、 G_3 和 G_4 独立地选自CH和N;条件是 G_3 和 G_4 中至少一个是N;条件是 G_1 和 G_2 不都是N;

[0031] L选自-NR_{5a}(CH₂)₀₋₃-、-NR_{5a}CH(C(O)OCH₃)CH₂-、-NR_{5a}(CH₂)₂R_{5b}-、-NR_{5a}(CH₂)₂S-、-NR_{5a}CH₂CH(CH₃)CH₂-、-NR_{5a}CH₂CH(OH)-和-NR_{5a}CH(CH₃)CH₂-;其中R_{5a}和R_{5b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基;

[0032] R₁选自氢、苯基、苯硫基、呋喃基、1H-苯并咪唑基、异喹啉基、1H-咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、1H-吡唑基、吡啶基、1H-咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、1H-吡咯基和噻唑基;其中所述R₁的苯基、苯硫基、呋喃基、1H-苯并咪唑基、异喹啉基、1H-咪唑并吡啶基、苯并噻吩基、嘧啶基、1H-吡唑基、吡啶基、1H-咪唑基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、1H-吡咯基或噻唑基可任选地被独立地选自氰基、羟基、C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基、卤素、卤素取代的C₁₋₄烷基、卤素取代的C₁₋₄烷氧基、羟基、氨基、-C(O)R_{8a}、-S(O)₀₋₂R_{8a}、-C(O)OR_{8a}和-C(O)R_{8a}R_{8b}的1至3个基团取代;其中R_{8a}和R_{8b}独立地选自氢和C₁₋₄烷基;条件是R₁和R₃不都是氢;

[0033] R₂选自-S(O)₂NR_{6a}R_{6b}、-NR_{9a}C(O)R_{9b}、-NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}、苯基、1H-吡咯并吡啶-3-基、1H-吡啶基、苯硫基、吡啶基、1H-1,2,4-三唑基、2-氧代咪唑烷基、1H-吡唑基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基和1H-咪唑基;其中R_{6a}、R_{6b}和R_{6c}独立地选自氢和C₁₋₄烷基;其中所述R₂的苯基、1H-吡咯并吡啶-3-基、1H-吡啶基、苯硫基、吡啶基、1H-1,2,4-三唑基、2-氧代咪唑烷基、1H-吡唑基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基或1H-咪唑基任选地被独立地选自羟基、卤素、甲基、甲氧基、氨基、-O(CH₂)_nNR_{7a}R_{7b}、-S(O)₂NR_{7a}R_{7b}、-OS(O)₂NR_{7a}R_{7b}和-NR_{7a}S(O)₂R_{7b}的1

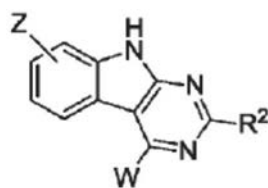
至3个基团取代;其中 R_{7a} 和 R_{7b} 独立地选自氢和 C_{1-4} 烷基;

[0034] R_3 选自氢、 C_{1-4} 烷基和联苯基;和

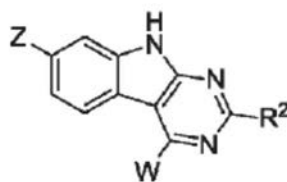
[0035] R_4 选自 C_{1-10} 烷基、丙-1-烯-2-基、环己基、环丙基、2-(2-氧代吡咯烷-1-基)乙基、氧杂环丁烷-3-基、二苯甲基、四氢-2H-吡喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基、苯基、四氢呋喃-3-基、苄基、(4-戊基苯基)(苯基)甲基和1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基;其中所述烷基、环丙基、环己基、2-(2-氧代吡咯烷-1-基)乙基、氧杂环丁烷-3-基、氧杂环丁烷-2-基、二苯甲基、四氢-2H-吡喃-2-基、四氢-2H-吡喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基、苯基、四氢呋喃-3-基、四氢呋喃-2-基、苄基、(4-戊基苯基)(苯基)甲基或1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基可以任选地被独立地选自羟基、 C_{1-4} 烷基和卤素-取代的 C_{1-4} 烷基的1至3个基团取代。

[0036] 在某些方面,所述芳烃受体抑制剂是StemRegenin-1 (SR-1) (4-(2-(2-(苯并[b]噻吩-3-基)-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基氨基)乙基)苯酚)。在某些方面,所述芳烃受体抑制剂是化合物CH223191 (1-甲基-N-[2-甲基-4-[2-(2-甲基苯基)二氮烯基]苯基-1H-吡唑-5-甲酰胺)。

[0037] 在某些方面,存在于所述第一培养基、所述第二培养基或所述第一和第二培养基中的干细胞动员因子是嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物。在某些方面,所述嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物是以下一种或多种:

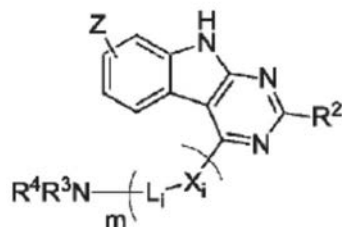


I

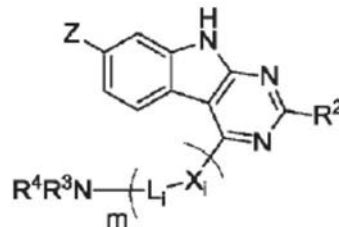


II

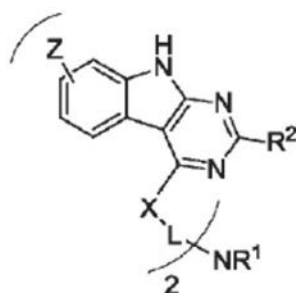
[0038]



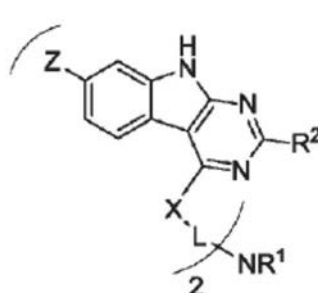
III



IV



V



VI

[0039] 或其盐或前药,其中:

[0040] Z是

- [0041] 1) -P(0) (OR<1>) (OR<1>) ,
- [0042] 2) -C(0) OR<1> ,
- [0043] 3) -C(0) NHR<1> ,
- [0044] 4) -C(0) N(R) R<1> ,
- [0045] 5) -C(0) R<1> ,
- [0046] 6) -CN ,
- [0047] 7) -SR ,
- [0048] 8) -S(0) 2NH₂ ,
- [0049] 9) -S(0) 2NHR<1> ,
- [0050] 10) -S(0) 2N(R) R<1> ,
- [0051] 11) -S(0) R<1> ,
- [0052] 12) -S(0) 2R<1> ,
- [0053] 13) -L ,
- [0054] 14) -苄基, 任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0055] 15) -L-杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团中任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0056] 16) -L-杂环基, 任选地被连接在L和杂环基基团中任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0057] 17) -L-芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团中任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0058] 18) -杂芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代, 或
- [0059] 19) -芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0060] 和其中每个取代基任选地连接于L基团(如果其还不存在), 和其中当(R<A>)和R<1>与氮原子连接时, 任选地它们与氮原子连接在一起以形成3至7元环, 其任选地包含选自N、O和S的一个或多个其他杂原子, 任选地其被一个或多个R<A>或R<1>取代;
- [0061] W是
- [0062] 1) -H ,
- [0063] 2) -卤素 ,
- [0064] 3) -OR<1> ,
- [0065] 4) -L-OH ,
- [0066] 5) -L-OR<1> ,
- [0067] 6) -SR<1> ,
- [0068] 7) -CN ,
- [0069] 8) -P(0) (OR<1>) (OR<1>) ,
- [0070] 9) -NHR<1> ,
- [0071] 10) -N(R<1>) R<1> ,
- [0072] 11) -L-NH₂ ,
- [0073] 12) -L-NHR<1> ,
- [0074] 13) -L-N(R<1>) R<1> ,

- [0075] 14) -L-SR<1> ,
- [0076] 15) -L-S (0) R<1> ,
- [0077] 16) -L-S (0) 2R<1> ,
- [0078] 17) -L-P (0) (OR<1>) (OR<1>) ,
- [0079] 18) -C (0) OR<1> ,
- [0080] 19) -C (0) NH₂ ,
- [0081] 20) -C (0) NHR<1> ,
- [0082] 21) -C (0) N (R<1>) R<1> ,
- [0083] 22) -NHC (0) R<1> ,
- [0084] 23) -NR₁C (0) R<1> , -NHC (0) OR<1> ,
- [0085] -NR₁C (0) OR<1> ,
- [0086] -OC (0) NH₂ ,
- [0087] -OC (0) NHR<1> ,
- [0088] -OC (0) N (R) R<1> ,
- [0089] -OC (0) R<1> ,
- [0090] -C (0) R<1> ,
- [0091] -NHC (0) NH₂ ,
- [0092] -NHC (0) NHR<1> ,
- [0093] -NHC (0) N (R) R<1> ,
- [0094] -NRC (0) NH₂ ,
- [0095] -NRC (0) NHR<1> ,
- [0096] -NRC (0) N (R) R<1> ,
- [0097] -NHS (0) 2R<1> ,
- [0098] -NRS (0) 2R<1> ,
- [0099] -S (0) 2NH₂ ,
- [0100] -S (0) 2NHR<1> ,
- [0101] -S (0) 2N (R) R<1> ,
- [0102] -S (0) R<1> ,
- [0103] -S (0) 2R<1> ,
- [0104] -OS (0) 2R₁ ,
- [0105] -S (0) 2OR<1> ,
- [0106] -苄基, 任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0107] -L-杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0108] -L-杂环基, 其任选地被连接在L和杂环基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0109] -L-芳基, 其任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0110] -L-NR<1> (R<1>) ,

- [0111] $-L-$ $2NR<1>$,
- [0112] $-L-(N(R1)-L)_n-N(R1)R1$, $-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0113] $-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂环基, 其任选地被连接在L和杂环基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0114] $-L-(N(R<1>)-L)_n$ -芳基, 其任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0115] $-O-L-N(R)R<1>$,
- [0116] $-O-L$ -杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0117] $-O-L$ -杂环基, 任选地被连接在L和杂环基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0118] $-O-L$ -芳基, 任选地被连接在L和芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0119] $-O-L) 2-NR<1>$
- [0120] $-O-L(N(R)-L)_n-N(R)R<1>$,
- [0121] $-O-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团任一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0122] $-O-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂环基, 其任选地被连接在L和杂环基基团之一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0123] $-O-L-(N(R<1>)-L)_n$ -芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0124] $-S-L$ -杂芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0125] $-S-L$ -杂环基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0126] $-S-L$ -芳基, 任选地被连接在L和芳基基团之一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0127] $-S-L) 2NR1$,
- [0128] $-S-L-(N(R1)-L)''-N(R1)R1$,
- [0129] $-S-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂芳基, 任选地被一个或多个R<A>取代基取代, $-S-L-(N(R<1>)-L)_n$ -杂环基, 任选地被一个或多个R<A>取代基取代, $-S-L-(N(R<1>)-L)_n$ -芳基, 任选地被一个或多个R<A>取代基取代,
- [0130] $-NR<1>(R<1>)$,
- [0131] $-(N(R1)-L)_n-N(R1)R1$,
- [0132] $-N(R1)L) 2-NR1$,
- [0133] 76) $-(N(R1)-L)''-N(R1)RA$,
- [0134] 77) $-(N(R<1>)-L)_n$ -杂芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0135] 78) $-(N(R<1>)-L)_n$ -杂环基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0136] 79) $-(N(R<1>)-L)_n$ -芳基, 任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0137] 80) -杂芳基, 任选地被一个或多个R<A>取代基取代, 或者
- [0138] 81) -芳基, 任选地被一个或多个R<A>取代基取代,

[0139] 和其中每个取代基任选地与L基团(如果其还不存在)连接,和其中当两个R<1>取代基存在于相同的氮原子上时,则每个R<1>取代基独立地选自之后描述的R<1>值的列表,

[0140] 和其中n是等于0、1、2、3、4或5中任一的整数,

[0141] 和其中当(R<1>)和R<1>与氮原子连接时,任选地它们与氮原子连接在一起以形成3至7元环,所述3至7元环任选地包含一个或多个选自N、O和S的其它的杂原子,任选地该环被一个或多个R<1>或R<A>取代;

[0142] L是

[0143] 1) -C1-6烷基,

[0144] 2) -C2-6烯基,

[0145] 3) -C2-6炔基,

[0146] 4) -C3-7环烷基,

[0147] 5) -C3-7环烯基,

[0148] 6) 杂环基,

[0149] 7) -C1-6烷基-C3-7环烷基,

[0150] 8) -C1-6烷基-杂环基,

[0151] 9) 芳基,或

[0152] 10) 杂芳基,

[0153] 和其中所述烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、杂环基、芳基和杂芳基基团各自独立地任选被一个或两个R<A>取代基取代;

[0154] R1是

[0155] 1) -H,

[0156] 2) -C1-6烷基,

[0157] 3) -C2-6烯基,

[0158] 4) -C2-6炔基,

[0159] 5) -C3-7环烷基,

[0160] 6) -C3-7环烯基,

[0161] 7) -C1-5全氟基,

[0162] 8) -杂环基,

[0163] 9) -芳基,

[0164] 10) -杂芳基,

[0165] 11) -苄基,或

[0166] 12) 5-[(3aS,4S,6aR) -2-氧代六氢-1H-噻吩并[3,4-d]咪唑-4-基]戊酰基,

[0167] 和其中该烷基、烯基、炔基、环烯基、全氟烷基、杂环基、芳基、杂芳基和苄基各自独立地任选被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代;

[0168] R2是

[0169] 1) -H,

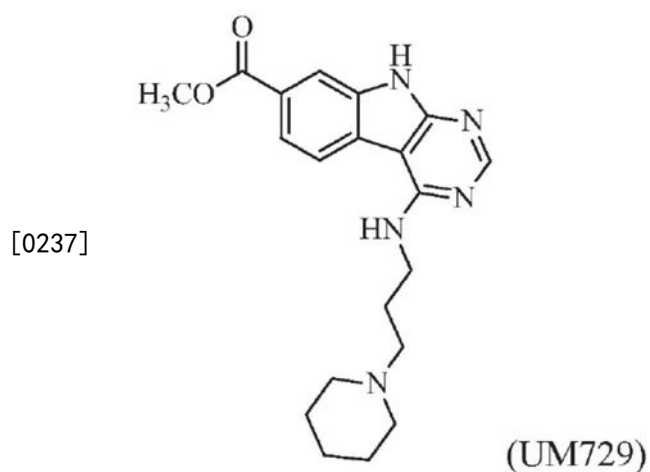
[0170] 2) -C1-6烷基,

[0171] 3) -SR,

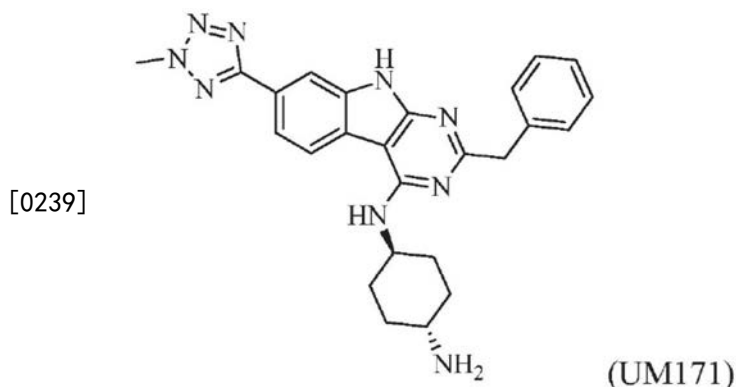
[0172] 4) -C(O) R1,

- [0173] 5) -S (0) R₁,
- [0174] 6) -S (0) 2R<1> ,
- [0175] 7) -苄基, 任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0176] 8) -L-杂芳基, 任选地被连接在L和杂芳基基团之一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0177] 9) -L-杂环基, 任选地被连接在L和杂环基基团之一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0178] 10) -L-芳基, 任选地被连接在L和芳基基团之一或两者上的一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0179] 11) -杂芳基, 其任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代, 或者
- [0180] 12) -芳基, 其任选地被一个或多个R<A>或R<1>取代基取代,
- [0181] 和其中每个取代基任选地连接到L基团 (如果其还不存在);
- [0182] R<A>是
- [0183] 1) -卤素,
- [0184] 2) -CF₃,
- [0185] 3) -OH,
- [0186] 4) -OR<1> ,
- [0187] 5) -L-OH,
- [0188] 6) -L-OR<1> ,
- [0189] 7) -OCF₃,
- [0190] 8) -SH,
- [0191] 9) -SR₁,
- [0192] 10) -CN,
- [0193] 11) -NO₂,
- [0194] 12) -NH₂,
- [0195] 13) -NHR<1> ,
- [0196] 14) -NR<1>R<1> ,
- [0197] 15) -L-NH₂,
- [0198] 16) -L-NHR<1> ,
- [0199] 17) -L-NR<4>R<1> ,
- [0200] 18) -L-SR<1> ,
- [0201] 19) -L-S (0) R<1> ,
- [0202] 20) -L-S (0) 2R<1> ,
- [0203] 21) -C (0) OH,
- [0204] 22) -C (0) OR<1> ,
- [0205] 23) -C (0) NH₂,
- [0206] 24) -C (0) NHR<1> ,
- [0207] 25) -C (0) N (R<1>) R<1> ,
- [0208] 26) -NHC (0) R<1> ,

- [0209] 27) -NR1C (0) R<1> ,
[0210] 28) -NHC (0) OR<1> ,
[0211] 29) -NR1C (0) OR<1> ,
[0212] 30) -OC (0) NH2 ,
[0213] 31) -OC (0) NHR<1> ,
[0214] 32) -OC (0) N (R) R<1> ,
[0215] 33) -OC (0) R<1> ,
[0216] 34) -C (0) R1 ,
[0217] 35) -NHC (0) NH2 ,
[0218] 36) -NHC (0) NHR1 ,
[0219] 37) -NHC (0) N (R) R<1> ,
[0220] 38) -NRC (0) NH2 ,
[0221] 39) -NRC (0) NHR<1> ,
[0222] 40) -NR1C (0) N (R1) R1 ,
[0223] 41) -NHS (0) 2R<1> ,
[0224] 42) -NRS (0) 2R<1> ,
[0225] 43) -S (0) 2NH2 ,
[0226] 44) -S (0) 2NHR<1> ,
[0227] 45) -S (0) 2N (R) R<1> ,
[0228] 46) -S (0) R<1> ,
[0229] 47) -S (0) 2R<1> ,
[0230] 48) -OS (0) 2R<1> ,
[0231] 49) -S (0) 2OR<1> ,
[0232] 50) -苄基 ,
[0233] 51) -N3 ,或
[0234] 52) -C (-N=N-) (CF3) ,
[0235] 和其中苄基基团任选地被1、2或3个R<A>或R<1>取代基取代。
[0236] 在某些方面,所述嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物具有化学结构:



- [0238] 在某些方面,所述嘧啶并(4,5-b)吡啶衍生物具有化学结构:



[0240] 在某些方面,用于三阶段方法中的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的第三培养基除了IL-2和IL-15之外,还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF或GM-CSF中的一种或多种。在某些方面,用于三阶段方法的第三培养基除了IL-2和IL-15之外,还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,所述IL-2以10U/mL至10,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以100U/mL至10,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以300U/mL至3,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以10ng/mL至30ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以约1,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以约20ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以约22ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约20ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些实施方案中,所述第三培养基不是GBGM®。

[0241] 在某些方面,该第三培养基包含100ng/mL IL-7、1000ng/mL IL-2、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,该第三培养基包含20ng/mL IL-7、1000ng/mL IL-2、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,该第三培养基包含20ng/mL IL-7、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,该第三培养基包含100ng/mL IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,该第三培养基包含22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,该第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,该第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF和1000ng/mL IL-2且缺乏SR1。

[0242] 在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述

第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,该第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0243] 通常,特别叙述的培养基成分不是指所述培养基的未限定组分中的可能组分,例如血清。例如,所述TPO、IL-2和IL-15不包含在该第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分中,例如所述TPO、IL-2和IL-15不包含在血清内。此外,所述LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在该第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分中,例如所述LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在血清内。

[0244] 在某些方面,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含人血清-AB。在某些方面,任何的所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含1%至20%的人血清-AB,5%至15%的人血清-AB,或约2.5或10%的人血清-AB。

[0245] 在某些方面,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含2-巯基乙醇。在某些方面,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基中任一种包含庆大霉素。

[0246] 在某些实施方案中,在本文所描述的三阶段方法中,在所述第二培养基中的所述培养之前,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在某些实施方案中,在所述第三培养基中的所述培养之前,将细胞在所述第二培养基中培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在某些实施方案中,细胞在所述第三培养基中培养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或30天,或超过30天。

[0247] 在一个实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养7-13天以产生第一细胞群体;所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养2-6天以产生第二细胞群体;和所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养10-30天,即细胞培养总共19-49天。

[0248] 在一个实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养8-12天以产生第一细胞群体;所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养3-5天以产生第二细胞群体;和所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养15-25天,即细胞培养共26-42天。

[0249] 在具体的实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养约10天以产生第一细胞群体;所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养约4天以产生第二细胞群体;和所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养约21天,即细胞培养总共约35天。

[0250] 在某些方面,在所述第一培养基、第二培养基和第三培养基中的所述培养均在静态培养条件下进行,例如在培养皿或培养瓶中进行。在某些方面,在所述第一培养基、第二培养基或第三培养基的至少一种中的所述培养在旋转瓶(spinner flask)中进行。在某些方面,在所述第一培养基和所述第二培养基中的所述培养在静态培养条件下进行,和在所述第三培养基中的所述培养在旋转瓶中进行。

[0251] 在某些方面,所述培养在旋转瓶中进行。在其它方面,所述培养在G-Rex装置中进行。而在其他方面,所述培养在WAVE生物反应器中进行。

[0252] 在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞最初以 1×10^4 到 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第一培养基中。在特定的方面,所述造血干细胞或祖细胞最初以约 3×10^4 个细胞/mL接种

到所述第一培养基中。

[0253] 在某些方面,所述第一细胞群体最初以 5×10^4 至 5×10^5 个细胞/mL接种至所述第二培养基中。在一个具体的方面,所述第一细胞群体最初以约 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第二培养基中。

[0254] 在某些方面,所述第二细胞群体最初以 1×10^5 至 5×10^6 个细胞/mL接种至所述第三培养基中。在某些方面,所述第二细胞群体最初以 1×10^5 到 1×10^6 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在一个具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 5×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在更具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 5×10^5 个细胞/mL在旋转瓶中接种到所述第三培养基中。在一个具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 3×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在更具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 3×10^5 个细胞/mL在静态培养物中接种到所述第三培养基中。

[0255] 在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,本文所公开的三阶段方法产生多至少5000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少10,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少50,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少75,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过7-氨基放线菌素D (7AAD) 染色来测定。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过膜联蛋白-V染色测定。在特定的方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过7-AAD染色和膜联蛋白-V染色两者来测定。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力由台盼蓝染色测定。

[0256] 在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,本文公开的三阶段方法产生多至少5000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少10,000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少50,000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少75,000倍的ILC3细胞。

[0257] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少70%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少75%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

[0258] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

[0259] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的自然杀伤细胞。

[0260] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少20%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,该自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少35%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,该自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少45%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,该自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少60%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少75%的细胞毒性。

[0261] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生ILC3细胞,当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少20%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少35%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少45%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少60%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,当所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比率在体外共培养时,所述ILC3细胞对所述K562细胞表现出至少75%的细胞毒性。

[0262] 在某些方面,在所述第三培养步骤之后,将所述第三细胞群体(例如,所述自然杀伤细胞群体)冷冻保存。在某些方面,在所述第四培养步骤之后,将所述第四细胞群体(例如,所述自然杀伤细胞群体)冷冻保存。

[0263] 在某些方面,本文提供了包含自然杀伤细胞(即通过本文所述的三阶段方法产生的自然杀伤细胞)的细胞群体。因此,本文提供了通过本文描述的三阶段方法产生的分离的自然杀伤细胞群体。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少20%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少40%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少60%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少80%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在具体的实施方案中,自然杀伤细胞群体被配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合在体内的人使用。

[0264] 在某些方面,本文提供了包含ILC3细胞(即通过本文描述的三阶段方法产生的自然杀伤细胞)的细胞群体。在具体的实施方案中,将包含ILC3细胞的细胞群体配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合在体内的人使用。

[0265] 在一个实施方案中,本文提供了分离的NK祖细胞群体,其中所述NK祖细胞根据本文所述的三阶段方法产生。在具体的实施方案中,将NK祖细胞群体配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合在体内的人使用。

[0266] 在另一个实施方案中,本文提供了分离的成熟NK细胞群体,其中所述成熟NK细胞根据本文所述的三阶段方法产生。在具体的实施方案中,将成熟的NK细胞群体配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合于在体内的人使用。

[0267] 在另一个实施方案中,本文提供了分离的ILC3群体,其中所述ILC3细胞根据本文所述的三阶段方法产生。在具体的实施方案中,将分离的ILC3群体配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合在体内的人使用。

[0268] 在另一个实施方案中,本文提供了细胞群体,其中所述细胞群体是通过本文所述方法产生的第三细胞群体。在另一个实施方案中,本文提供了细胞群体,其中所述细胞群体是通过本文所述的方法产生的第四细胞群体。

[0269] 在另一个实施方案中,本文提供了分离的NK细胞群体,其中所述NK细胞是活化的,其中所述激活的NK细胞根据本文所述的三阶段方法产生。在具体的实施方案中,将分离的NK群体配制成适合于体内使用的药物组合物,例如适合在体内的人使用。

[0270] 因此,在另一方面,本文提供了使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体抑制肿瘤细胞增殖,治疗病毒感染或治疗癌症(例如血液癌症和实体肿瘤)的用途。在某些实施方案中,NK细胞群体与免疫调节化合物(例如,本文所述的免疫调节化合物)或沙利度胺接触或组合使用。在某些实施方案中,NK细胞群体用免疫调节化合物(例如,本文所述的免疫调节化合物)或沙利度胺处理或与其组合使用。

[0271] 在一个具体的实施方案中,所述癌症是实体肿瘤。在另一个实施方案中,所述癌症是血液癌症。在具体的实施方案中,癌症是成胶质细胞瘤、原发性导管癌、白血病、急性T细胞白血病、慢性骨髓性淋巴瘤(CML)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、肺癌、结肠腺癌、组织细胞性淋巴瘤、结肠直肠癌、结肠直肠腺癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤或视网膜母细胞瘤。在更具体的实施方案中,癌症是AML。在更具体的实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤。

[0272] 在另一个具体的实施方案中,NK细胞群体由其产生的造血细胞,例如造血干细胞或祖细胞,从胎盘灌流液、脐带血或外周血获得。在一个实施方案中,NK细胞群体由其产生的造血细胞(例如造血干细胞或祖细胞)从胎盘获得,例如从胎盘灌流液获得。在一个实施方案中,NK细胞群体由其产生的造血细胞(例如造血干细胞或祖细胞)不是从脐带血获得的。在一个实施方案中,NK细胞群体由其产生的造血细胞,例如造血干细胞或祖细胞,不是从外周血获得的。在另一个具体的实施方案中,NK细胞群体由其产生的造血细胞(例如造血干细胞或祖细胞)是来自胎盘灌流液和脐带血(例如来自与灌流液相同胎盘的脐带血)的组合细胞。在另一个具体的实施方案中,所述脐带血从所述胎盘灌流液由其获得的胎盘之外的胎盘分离。在某些实施方案中,组合细胞可通过合并或组合脐带血和胎盘灌流液而获得。在某些实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:

50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的体积比率组合以获得组合细胞。在一个具体的实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1至1:10、5:1至1:5或3:1至1:3的比率组合。在另一个具体实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5或1:10的比率组合。在更具体的实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以8.5:1.5 (85%:15%)的比率组合。

[0273] 在某些实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合,如通过总有核细胞(TNC)含量所测定的,以获得组合细胞。在一个具体的实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1至1:10、5:1至1:5或3:1至1:3的比率组合。在另一个具体实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5或1:10的比率组合。

[0274] 因此,在一个实施方案中,本文提供了治疗患有癌症或病毒感染的个体的方法,其包括向所述个体施用有效量的来自使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体的细胞。在某些实施方案中,癌症是实体肿瘤。在某些实施方案中,癌症是血液癌症。在具体的实施方案中,血液癌症是白血病。在另一个具体实施方案中,血液癌症是淋巴瘤。在另一个具体实施方案中,血液癌症是急性髓性白血病。在另一个具体实施方案中,血液癌症是慢性淋巴细胞性白血病。在另一个具体实施方案中,血液癌症是慢性髓性白血病。在某些方面,所述自然杀伤细胞在所述接触或所述施用之前已经冷冻保存。在其他方面,所述自然杀伤细胞在所述接触或所述施用之前未冷冻保存。

[0275] 在一个具体的实施方案中,在所述施用前,用免疫调节化合物(例如,本文描述的免疫调节化合物)或沙利度胺处理使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体。在一个具体的实施方案中,在所述施用之前,用IL2和IL12和IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或者IL2和IL15和IL18处理使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体。在另一个具体的实施方案中,在所述施用之前,用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种预处理使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体。在另一个具体的实施方案中,所述方法包括向个体施用(1)使用本文所述的三阶段方法产生的有效量的分离的NK细胞群体;和(2)有效量的免疫调节化合物或沙利度胺。在这种情况下“有效量”是指与未施用所述NK细胞群体和任选的免疫调节化合物或沙利度胺的具有所述癌症或所述感染的个体相比,导致所述癌症或所述感染的一种或多种症状可检测的改善的NK细胞群体中的细胞及任选的免疫调节化合物或沙利度胺的量。在一个具体的实施方案中,所述免疫调节化合物是来那度胺或泊马度胺。在另一个实施方案中,该方法另外包括向个体施用抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0276] 在另一个实施方案中,本文提供了抑制肿瘤细胞增殖的方法,其包括使治疗有效量的NK细胞群体与肿瘤细胞邻近,例如使肿瘤细胞与NK细胞群体中的细胞接触。在下文中,除非另有说明,否则术语“邻近”指足够接近以诱发期望的结果;例如在某些实施方案中,术语邻近是指接触。在某些实施方案中,所述接触在体外发生。在某些实施方案中,所述接触离体发生。在其他实施方案中,所述接触在体内发生。在抑制肿瘤细胞增殖的方法中可以使

用多个NK细胞,该方法包括使治疗有效量的NK细胞群体邻近肿瘤细胞,例如使肿瘤细胞与NK细胞群体中的细胞接触。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤(CML)细胞、慢性髓性白血病(CML)细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。

[0277] 在一个实施方案中,本文提供了用于抑制肿瘤细胞增殖的方法中的多个自然杀伤细胞,所述方法包括使肿瘤细胞与该多个自然杀伤细胞接触,其中自然杀伤细胞由本文描述的方法产生。在某些实施方案中,所述接触发生在人类个体中。在某些实施方案中,所述方法包括将所述自然杀伤细胞施用给所述个体。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是急性髓性白血病(AML)细胞。在某些实施方案中,所述个体具有复发/难治性AML。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非先天淋巴样细胞(ILC)治疗失败的AML。在某些实施方案中,所述个体是65岁或更大,且处于第一缓解期。在某些实施方案中,在施用所述NK细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理(conditioned)。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤(CML)细胞、慢性髓性白血病(CML)细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞、肝肿瘤细胞、肺肿瘤细胞、胰腺肿瘤细胞、肾肿瘤细胞或多形性成胶质细胞瘤(GBM)细胞。在某些实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗CD33抗体、抗CD20抗体、抗CD138抗体或抗CD32抗体一起施用。在某些实施方案中,所述NK细胞在所述接触或所述施用之前已经冷冻保存或未被冷冻保存。

[0278] 分离的NK细胞群体或其药物组合物的施用可以是全身性的或局部的。在具体的实施方案中,施用是肠胃外的。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞群体或其药物组合物是通过注射、输注、静脉内(IV)施用、股骨内施用(intrafemoral administration)或瘤内施用。在具体的实施方案中,将分离的NK细胞群体或其药物组合物施用于受试者用装置、基质或支架进行。在具体的实施方案中,通过注射向受试者施用分离的NK细胞群体或其药物组合物。在具体的实施方案中,通过导管将分离的NK细胞群体或其药物组合物施用于受试者。在具体的实施方案中,NK细胞的注射是局部注射。在更具体的实施方案中,局部注射直接进入到实体肿瘤(例如,肉瘤)中。在具体的实施方案中,通过注射器注射向受试者施用分离的NK细胞群体或其药物组合物。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞群体或其药物组合物是通过引导递送。在具体的实施方案中,通过注射将分离的NK细胞群体或其药物组合物施用于受试者通过腹腔镜检查、内窥镜检查、超声波、计算机断层摄影术、磁共振或放射学辅助。

[0279] 在一个具体的实施方案中,在所述接触或形成邻近之前,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体已经用免疫调节化合物(例如,本文以文所述的免疫调节化合物)或沙利度胺和/或IL2和IL12和IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或者IL2和IL15和IL18处理。在另一个具体的实施方案中,在所述接触或形成邻近之

前,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体已经用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种进行处理。在另一个具体实施方案中,有效量的免疫调节化合物(例如,本文以下所述的免疫调节化合物)或沙利度胺另外地与肿瘤细胞邻近,例如使肿瘤细胞与免疫调节化合物或沙利度胺接触。该情况中的“有效量”是指,与相同数量的未接触或邻近NK细胞群体中的细胞和任选地免疫调节化合物或沙利度胺的肿瘤细胞相比,导致所述肿瘤细胞的可检测抑制的NK细胞群体中的细胞和任选地免疫调节化合物或沙利度胺的量。在另一个具体实施方案中,该方法还包括使有效量的抗癌化合物(例如,下述抗癌化合物)邻近肿瘤细胞,例如使肿瘤细胞与抗癌化合物接触。

[0280] 在该方法的具体实施方案中,肿瘤细胞是血液癌细胞。在另一个具体实施方案中,肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在另一个实施方案中,肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤(CML)细胞、急性髓性白血病细胞(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)细胞、成胶质细胞瘤细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、结直肠癌细胞、前列腺癌细胞或结肠直肠癌细胞。在更具体的实施方案中,肿瘤细胞是AML细胞。在更具体的实施方案中,肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。在另一个具体实施方案中,所述接触或邻近体外发生。在另一个具体的实施方案中,所述接触或邻近离体发生。在另一个具体的实施方案中,所述接触或邻近在体内发生。在更具体的实施方案中,所述体内接触或邻近在人体内发生。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是肝肿瘤细胞。在一个具体实施方案中,所述肿瘤细胞是肺肿瘤细胞。在一个具体实施方案中,所述肿瘤细胞是胰腺肿瘤细胞。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是肾肿瘤细胞。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是多形性成胶质细胞瘤(GBM)细胞。在一个具体实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗CD33抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗CD20抗体一起施用。在一个具体实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗CD138抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞与抗CD32抗体一起施用。

[0281] 在另一方面,本文提供了治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法,其包括向个体施用(1)来那度胺;(2)美法仑;和(3)NK细胞,其中所述NK细胞有效地治疗所述个体中的多发性骨髓瘤。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或从脐带血造血细胞(例如,造血干细胞)产生的NK细胞。在另一个实施方案中,所述NK细胞通过本文所述的用于产生NK细胞的任何方法产生,例如使用三阶段方法产生NK细胞群体。在另一个实施方案中,所述NK细胞在所述施用之前已经扩增。在另一个实施方案中,所述来那度胺,美法仑和/或NK细胞彼此单独施用。在治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法的某些具体实施方案中,所述NK细胞群体通过如本文所述的三阶段方法产生。

[0282] 在另一方面,本文提供了治疗患有急性髓性白血病(AML)的个体的方法,其包括向个体施用NK细胞(任选地通过用IL2和IL12和IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或者IL2和IL15和IL18预处理而活化),其中所述NK细胞有效地治疗所述个体中的AML。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体在所述施用之前已经用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种进行预处理。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或从脐带血造血细胞(例如,造血干细胞)产生的NK

细胞。在另一个实施方案中,通过本文所述的用于产生NK细胞的任何方法产生所述NK细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生NK细胞群体。在患有AML个体的治疗方法的某些具体实施方案中,通过如本文所述的三阶段方法产生所述NK细胞群体。在一个特定的实施方案中,通过前述方法治疗的AML包括难治性AML、预后不良AML或儿童期AML。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非自然杀伤细胞或非天然淋巴细胞治疗失败的AML。在具体的实施方案中,所述个体是65岁或更大,且处于第一缓解期。在具体的实施方案中,在施用所述自然杀伤细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理。在另一方面,本文提供治疗患有慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的个体的方法,其包括向个体施用治疗有效剂量的 (1) 来那度胺; (2) 美法仑; (3) 氟达拉滨; 和 (4) NK细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体,其中所述NK细胞有效地治疗所述个体中的所述CLL。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或从脐带血造血细胞 (例如,造血干细胞) 产生的NK细胞。在另一个实施方案中,通过本文所述的用于产生NK细胞的任何方法产生所述NK细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生NK细胞群体。在任何上述方法的具体实施方案中,将所述来那度胺、美法仑、氟达拉滨和扩增的NK细胞分别施用于所述个体。在患有CLL的个体的治疗方法的某些具体实施方案中,通过本文所述三阶段方法产生所述NK细胞群体。

[0283] 在另一个实施方案中,本文提供了抑制肿瘤细胞增殖的方法,其包括使治疗有效量的ILC3细胞群体与肿瘤细胞邻近,例如使肿瘤细胞与ILC3细胞群体中的细胞接触。在下文中,除非另有说明,否则术语“邻近”指足够接近以诱发期望的结果;例如在某些实施方案中,术语邻近是指接触。在某些实施方案中,所述接触在体外发生。在某些实施方案中,所述接触在活体外发生。在其他实施方案中,所述接触在体内发生。多个ILC3细胞可用于抑制肿瘤细胞增殖的方法中,该方法包括使治疗有效量的ILC3细胞群体与肿瘤细胞邻近,例如使肿瘤细胞与ILC3细胞群体中的细胞接触。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤 (CML) 细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞,肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。

[0284] 在一个实施方案中,本文提供了用于抑制肿瘤细胞增殖的方法中的多个ILC3细胞,该方法包括使肿瘤细胞与多个ILC3细胞接触,其中ILC3细胞通过本文所述的方法产生。在某些实施方案中,所述接触发生在人类个体中。在某些实施方案中,所述方法包括向所述个体施用所述ILC3细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是急性髓性白血病 (AML) 细胞。在某些实施方案中,所述个体具有复发/难治性AML。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非先天淋巴样细胞 (ILC) 治疗失败的AML。在某些实施方案中,所述个体是65岁或更大,且处于第一缓解期。在某些实施方案中,在施用所述ILC3细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是乳腺癌细胞、头颈癌细胞或肉瘤细胞。在某些实施方案中,所述肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤 (CML) 细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞或成视网膜细胞瘤细胞。在某些实施方案

中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞、肝肿瘤细胞、肺肿瘤细胞、胰腺肿瘤细胞、肾肿瘤细胞或多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 细胞。在某些实施方案中,所述 ILC3 细胞与抗 CD33 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD138 抗体或抗 CD32 抗体一起施用。在某些实施方案中,所述 ILC3 细胞在所述接触或所述施用之前已经冷冻保存或未冷冻保存。

[0285] 分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物的施用可以是全身性的或局部的。在具体的实施方案中,施用是肠胃外的。在具体的实施方案中,通过注射、输注、静脉内 (IV) 施用、股骨内施用或瘤内施用向个体施用分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物。在具体的实施方案中,将分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物施用于受试者是用装置、基质或支架进行的。在具体的实施方案中,通过注射向受试者施用分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物。在具体的实施方案中,经由导管向受试者施用分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物。在具体的实施方案中,ILC3 细胞的注射是局部注射。在更具体的实施方案中,局部注射直接进入到实体肿瘤 (例如,肉瘤) 中。在具体的实施方案中,通过注射器经注射将分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物施用于受试者。在具体的实施方案中,经由引导递送向受试者施用分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物。在具体实施方案中,通过腹腔镜检查、内窥镜检查、超声波、计算机断层摄影术、磁共振或放射学辅助将分离的 ILC3 细胞群体或其药物组合物通过注射施用于受试者。

[0286] 在一个具体实施方案中,在所述接触或邻近之前,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的 ILC3 细胞群体已用免疫调节化合物 (例如,本文以下所述的免疫调节化合物) 或沙利度胺和/或 IL2 和 IL12 和 IL18、IL12 和 IL15、IL12 和 IL18、IL2 和 IL12 和 IL15 和 IL18 或者 IL2 和 IL15 和 IL18 处理。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的 NK 细胞群体在所述接触或邻近之前已经用 IL2、IL12、IL18 或 IL15 中的一种或多种进行处理。在另一个具体实施方案中,有效量的免疫调节化合物 (例如,本文以下所述的免疫调节化合物) 或沙利度胺另外与肿瘤细胞邻近,例如使肿瘤细胞与免疫调节化合物或沙利度胺接触。在这一情况中的“有效量”意指,与相同数量的未接触或邻近 ILC3 细胞群体中的细胞和任选地免疫调节化合物或沙利度胺的肿瘤细胞相比,导致所述肿瘤细胞的可检测抑制的 ILC3 细胞群体中的细胞和任选地免疫调节化合物或沙利度胺的量。在另一个具体实施方案中,该方法还包括使有效量的抗癌化合物 (例如,下述抗癌化合物) 邻近肿瘤细胞,例如使肿瘤细胞与抗癌化合物接触。

[0287] 在该方法的具体实施方案中,肿瘤细胞是血液癌细胞。在另一个具体实施方案中,肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在另一个实施方案中,肿瘤细胞是原发导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性骨髓性淋巴瘤 (CML) 细胞、急性髓性白血病细胞 (AML)、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、成胶质细胞瘤细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、视网膜母细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞、前列腺癌细胞或结肠直肠癌细胞。在另一个具体实施方案中,所述接触或邻近在体外发生。在另一个具体的实施方案中,所述接触或邻近在活体外发生。在另一个具体的实施方案中,所述接触或邻近在体内发生。在更具体的实施方案中,所述体内接触或邻近发生在人体内。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是肝肿瘤细胞。在一个具体实施方案中,所述肿瘤细胞是肺肿瘤细胞。在一个具体实施方案中,所述肿瘤细胞是胰腺肿瘤细胞。在一个具体的实施方案中,所述肿瘤细胞是肾肿瘤细胞。在一个具

体的实施方案中,所述肿瘤细胞是多形性成胶质细胞瘤 (GBM) 细胞。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞与抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞与抗CD33抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞与抗CD20抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞与抗CD138抗体一起施用。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞与抗CD32抗体一起施用。

[0288] 在另一方面,本文提供了治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法,其包括向个体施用 (1) 来那度胺; (2) 美法仑; 和 (3) ILC3细胞,其中所述ILC3细胞有效在治疗所述个体中的多发性骨髓瘤。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞是脐带血ILC3细胞或从脐带血造血细胞 (例如,造血干细胞) 产生的ILC3细胞。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞通过本文所述的用于产生ILC3细胞的任何方法产生,例如使用三阶段方法产生ILC3细胞群体。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞在所述施用之前已经扩增。在另一个实施方案中,所述来那度胺、美法仑和/或ILC3细胞彼此单独施用。在患多发性骨髓瘤个体的治疗方法的某些具体实施方案中,通过如本文所述的三阶段方法产生所述ILC3细胞群体。

[0289] 在另一方面,本文提供了治疗患有急性髓性白血病 (AML) 的个体的方法,包括向个体施用ILC3细胞 (任选地通过用IL2和IL12和IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或者IL2和IL15和IL18预处理激活的), 其中所述ILC3细胞有效地治疗所述个体中的AML。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体在所述施用之前已经用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种进行了预处理。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞是脐带血ILC3细胞或从脐带血造血细胞 (例如,造血干细胞) 产生的ILC3细胞。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞通过本文所述的用于产生ILC3细胞的任何方法产生,例如使用如本文所述的三阶段方法产生ILC3细胞群体。在患AML个体的治疗方法的某些具体实施方案中,所述ILC3细胞群体通过如本文所述的三阶段方法产生。在特定的实施方案中,待通过前述方法治疗的AML包括难治性AML、预后不良AML或儿童期AML。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非ALC3或非先天性淋巴样细胞治疗无效的AML。在具体的实施方案中,所述个体是65岁或更大,和处于第一缓解期。在具体的实施方案中,在施用所述ILC3细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行调理。在另一方面,本文提供治疗患有慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 的个体的方法,其包括向个体施用治疗有效剂量的 (1) 来那度胺; (2) 美法仑; (3) 氟达拉滨; 和 (4) ILC3细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体,其中所述ILC3细胞有效地治疗所述个体中的所述CLL。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞是脐带血ILC3细胞或从脐带血造血细胞 (例如,造血干细胞) 产生的ILC3细胞。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞通过本文描述的用于产生ILC3细胞的任何方法产生,例如使用本文所述的三阶段方法产生ILC3细胞群体。在任何上述方法的具体实施方案中,所述来那度胺、美法仑、氟达拉滨和扩增的ILC3细胞分别施用于所述个体。在患CLL个体的治疗方法的某些具体实施方案中,通过如本文所述的三阶段方法产生所述ILC3细胞群体。

[0290] 在某些实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体被冷冻保存,例如使用本文所述的方法冷冻保存。在某些实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体在冷冻保存介质 (例如,本文所述的冷冻保存介质) 中冷冻保存。在具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的NK祖细胞群体和/或NK细胞群体的冷冻保存

包括(1)制备包含使用本文所述的三阶段方法产生的NK祖细胞群体和/或NK细胞群体的细胞悬液溶液；(2)向来自步骤(1)的细胞悬液中加入冷冻保存介质以得到冷冻保存的细胞悬液；(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品；和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。

[0291] 在上述治疗或肿瘤抑制方法的某些实施方案中,通过本文描述的三阶段方法产生的NK细胞群体与其他自然杀伤细胞组合,例如从胎盘灌流液、脐带血或外周血分离的或通过不同的方法从造血细胞产生的自然杀伤细胞。在具体的实施方案中,自然杀伤细胞群体与来自另一来源的或通过不同的方法制备的自然杀伤细胞以约100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合。

[0292] 在某些实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体被冷冻保存,例如使用本文所述的方法冷冻保存。在某些实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体在冷冻保存介质(例如,本文所述的冷冻保存介质)中冷冻保存。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3祖细胞群体和/或ILC3细胞群体的冷冻保存包括(1)制备包含使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3祖细胞群体和/或ILC3细胞群体的细胞悬液溶液；(2)向来自步骤(1)的细胞悬液中加入冷冻保存介质以得到冷冻保存的细胞悬液；(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品；和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。

[0293] 在上述治疗或肿瘤抑制方法的某些实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体与其他ILC3细胞组合,例如从胎盘灌流液、脐带血或外周血分离的ILC3细胞,或通过不同的方法从造血细胞产生的ILC3细胞。在具体的实施方案中,ILC3细胞群体与来自另一来源的或通过不同方法制备的ILC3细胞以约100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合。

[0294] 在另一方面,本文提供了在化疗后修复胃肠道的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。在化疗后胃肠道修复的方法中,可以使用多个ILC3细胞,该方法包括对个体施用多个ILC3细胞,其中ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。

[0295] 在另一方面,本文提供针对放射保护个体的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。多个ILC3细胞可用于针对放射保护个体的方法,所述方法包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。在该方法的某些方面,所述ILC3细胞用作骨髓移植的辅助物。

[0296] 在另一方面,本文提供重建个体的胸腺的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。多个ILC3细胞可以用于重建个体胸腺

的方法,所述方法包括向个体施用多个ILC3细胞,其中ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。

[0297] 在另一方面,本文提供了包含通过本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞的组合物。在一个具体实施方案中,所述NK细胞从造血细胞产生,例如从胎盘灌流液、脐带血和/或外周血分离的造血干细胞或祖细胞。在另一个具体实施方案中,所述NK细胞占到组合物中至少70%的细胞。在另一个具体实施方案中,所述NK细胞至少占到组合物中80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞。在某些实施方案中,所述组合物中至少80%、82%、84%、86%、88%或90%的NK细胞是CD3⁻和CD56⁺。在某些实施方案中,所述组合物中至少65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%或90%的NK细胞是CD16⁻。在某些实施方案中,所述组合物中至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%的NK细胞是CD94⁺。

[0298] 在某些方面,本文提供了为CD56+CD3-CD117+CD11a+的自然杀伤细胞群体,其中所述自然杀伤细胞表达穿孔素和/或EOMES,且不表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1。在某些方面,所述自然杀伤细胞表达穿孔素和EOMES,且不表达ROR γ t、芳基烃受体或IL1R1中任一种。在某些方面,所述自然杀伤细胞另外表达T-bet、GZMB、NKp46、NKp30和NKG2D。在某些方面,所述自然杀伤细胞表达CD94。在某些方面,所述自然杀伤细胞不表达CD94。

[0299] 在某些方面,本文提供了为CD56+CD3-CD117+CD11a-的ILC3细胞群体,其中所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1中的一种或多种,且不表达CD94、穿孔素和EOMES中的一种或多种。在某些方面,所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1,且不表达CD94、穿孔素或EOMES中的任何一种。在某些方面,所述ILC3细胞另外表达CD226和/或2B4。在某些方面,所述ILC3细胞另外表达IL-22、TNF α 和DNAM-1中的一种或多种。在某些方面,所述ILC3细胞表达CD226、2B4、IL-22、TNF α 和DNAM-1。

[0300] 在某些方面,本文提供了产生包含自然杀伤细胞和ILC3细胞的细胞群体的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a+细胞和CD11a-细胞;和(e)以50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率使CD11a+细胞与CD11a-细胞结合以产生第四细胞群体。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以50:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以20:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以10:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,将CD11a+细胞和CD11a-细胞以5:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,将CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群

体中,CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:5的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:10的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:20的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞以1:50的比率组合。

[0301] 在某些方面,所述群体中的多个NK细胞与外周血自然杀伤细胞相比以可检测地高的水平表达microRNAs dme-miR-7、hsa-let-7a、hsa-let-7c、hsa-let-7e、hsa-let-7g、hsa-miR-103、hsa-miR-106a、hsa-miR-10b、hsa-miR-1183、hsa-miR-124、hsa-miR-1247、hsa-miR-1248、hsa-miR-1255A、hsa-miR-126、hsa-miR-140-3p、hsa-miR-144、hsa-miR-151-3p、hsa-miR-155、hsa-miR-15a、hsa-miR-16、hsa-miR-17、hsa-miR-181a、hsa-miR-182、hsa-miR-192、hsa-miR-199a-3p、hsa-miR-200a、hsa-miR-20a、hsa-miR-214、hsa-miR-221、hsa-miR-29a、hsa-miR-29b、hsa-miR-30b、hsa-miR-30c、hsa-miR-31、hsa-miR-335、hsa-miR-374b、hsa-miR-454、hsa-miR-484、hsa-miR-513C、hsa-miR-516-3p、hsa-miR-520h、hsa-miR-548K、hsa-miR-548P、hsa-miR-600、hsa-miR-641、hsa-miR-643、hsa-miR-874、hsa-miR-875-5p和hsa-miR-92a-2中的一种或多种。在某些方面,所述群体中的多个NK细胞与外周血自然杀伤细胞相比可检测地低的水平表达microRNAs miR188-5p、miR-339-5p、miR-19a、miR-34c、miR-18a、miR-500、miR-22、miR-222、miR-7a、miR-532-3p、miR-223、miR-26b、miR-26a、miR-191、miR-181d、miR-322和miR342-3p2中的一种或多种。在某些方面,所述群体中的多个NK细胞以与外周血自然杀伤细胞等同的水平表达microRNAs miR-181a、miR-30b和miR30c中的一种或多种。

[0302] 在一个具体的实施方案中,所述NK细胞来自单一个体,即所述造血干细胞和祖细胞来自单一个体。在更具体的实施方案中,所述NK细胞包含来自至少两个不同个体的自然杀伤细胞,即所述造血干细胞和祖细胞来自至少两个不同的个体。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞来自与NK细胞打算用以治疗的个体不同的个体,即所述造血干细胞和祖细胞来自与NK细胞打算用以治疗的个体不同的个体。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞接触或邻近免疫调节化合物或沙利度胺,其量和时间足以使所述NK细胞与相当数量的未与所述免疫调节化合物或沙利度胺接触或邻近的自然杀伤细胞(即NK细胞)相比表达可检测地更多的颗粒酶B或穿孔素。在另一个具体实施方案中,包含所述NK细胞的组合物另外包含免疫调节化合物或沙利度胺。在某些实施方案中,免疫调节化合物是下述化合物,例如氨基取代的异吲哚啉化合物。在某些实施方案中,免疫调节化合物是来那度胺。在某些实施方案中,免疫调节化合物是泊马度胺。

[0303] 在另一个具体实施方案中,包含所述NK细胞的组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如一种或多种下述抗癌化合物。

[0304] 在更具体的实施方案中,组合物包含通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和来自另一来源的或通过另一方法制备的自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述另一来源是胎盘血和/或脐带血。在另一个具体实施方案中,所述另一来源是外周血。在更具体的实施方案中,NK细胞与来自另一来源的或通过另一种方法制备的自然杀伤细胞以约100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、

1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合。

[0305] 在另一具体实施方案中,组合物包含使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞以及分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液来自与所述NK细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液包含来自与所述NK细胞不同的个体的胎盘灌流液。在另一个具体的实施方案中,所述胎盘灌流液中的全部或基本上全部(例如,大于90%、95%、98%或99%)的细胞是胎儿细胞。在另一个具体的实施方案中,该胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞包含胎儿和母体细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液中的胎儿细胞包含所述灌流液中的少于约90%、80%、70%、60%或50%的细胞。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液通过使0.9%的NaCl溶液通过胎盘脉管系统获得。在另一个具体实施方案中,所述灌流液包含培养基。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液已经处理以除去红细胞。在另一具体实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物,例如下述免疫调节化合物,例如氨基取代的异吲哚啉化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0306] 在另一个具体的实施方案中,组合物包含使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞不同的个体。在另一具体实施方案中,组合物包含分离的胎盘灌流液和分离的胎盘灌流液细胞,其中所述分离的灌流液和所述分离的胎盘灌流液细胞来自不同的个体。在包含胎盘灌流液的任何上述实施方案的任何一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液包含来自至少两个个体的胎盘灌流液。在包含胎盘灌流液细胞的任何上述实施方案的另一个更具体的实施方案中,所述分离的胎盘灌流液细胞来自至少两个个体。在另一个具体的实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0307] 另一方面,本文提供了组合物,例如药物组合物,其包含分离的NK细胞群体,例如通过本文所述的三阶段方法的任何实施方案产生的。在一个具体的实施方案中,所述分离的NK细胞群体从造血细胞产生,例如从胎盘(例如,从胎盘灌流液)、脐带血和/或外周血分离的造血干细胞或祖细胞。在另一个具体实施方案中,所述分离的NK细胞群体包含组合物中至少70%的细胞。在另一个具体实施方案中,所述分离的NK细胞群体包含组合物中至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞。在另一个具体实施方案中,所述NK细胞包含组合物中至少70%的细胞。在某些实施方案中,所述组合物中至少80%、82%、84%、86%、88%或90%的NK细胞是CD3⁻和CD56⁺。在某些实施方案中,所述组合物中至少65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%或90%的NK细胞是CD16⁻。在某些实施方案中,所述组合物中至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或60%的NK细胞是CD94⁺。

[0308] 在另一个具体的实施方案中,所述组合物中的所述分离的NK细胞来自单一个体,即所述造血干细胞和祖细胞来自单一个体。在更具体的实施方案中,所述分离的NK细胞包含来自至少两个不同个体的NK细胞,即所述造血干细胞和祖细胞来自至少两个不同的个体。在另一个具体的实施方案中,所述组合物中的所述分离的NK细胞来自与打算用NK细胞

治疗的个体不同的个体,即所述造血干细胞和祖细胞来自与打算用NK细胞治疗的个体不同的个体。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞接触或邻近免疫调节化合物或沙利度胺,其量和时间足以使所述NK细胞与相当数量的未与所述免疫调节化合物或沙利度胺接触或邻近的自然杀伤细胞(即,NK细胞)相比表达可检测地更多的颗粒酶B或穿孔素。在另一个具体的实施方案中,所述组合物还包含免疫调节化合物或沙利度胺。在某些实施方案中,免疫调节化合物是下述化合物。

[0309] 在另一个具体实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0310] 在更具体的实施方案中,组合物包含来自另一来源的或通过另一种方法制备的NK细胞。在一个具体的实施方案中,所述其他来源是胎盘血和/或脐带血。在另一个具体实施方案中,所述其他来源是外周血。在更具体的实施方案中,所述组合物中的NK细胞群体与来自另一来源的或通过另一种方法制备的NK细胞以约100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合。

[0311] 在另一个具体实施方案中,组合物包含NK细胞群体和分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液来自与所述NK细胞群体相同的个体。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液包含来自与所述NK细胞群体不同的个体的胎盘灌流液。在另一个具体的实施方案中,所述胎盘灌流液中全部或基本上全部(例如,大于90%、95%、98%或99%)的细胞是胎儿细胞。在另一个具体的实施方案中,胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞包含胎儿和母体细胞。在更具体的实施方案中,胎儿细胞包含小于约90%、80%、70%、60%或50%的所述胎盘灌流液中的细胞。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液通过使0.9%的NaCl溶液通过胎盘脉管系统获得。在另一个具体实施方案中,所述灌流液包含培养基。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液经过处理以除去红细胞。在另一具体实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物,例如下述免疫调节化合物,例如氨基取代的异唑啉化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0312] 在另一个具体实施方案中,组合物包含NK细胞群体和胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞群体相同的个体。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞群体不同的个体。在另一具体实施方案中,组合物包含分离的胎盘灌流液和分离的胎盘灌流液细胞,其中所述分离的灌流液和所述分离的胎盘灌流液细胞来自不同的个体。在包含胎盘灌流液的任何上述实施方案的另一更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液包含来自至少两个个体的胎盘灌流液。在包含胎盘灌流液细胞的任何上述实施方案的另一个更具体的实施方案中,所述分离的胎盘灌流液细胞来自至少两个个体。在另一个具体的实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0313] 3.1.术语

[0314] 如本文所用,术语“免疫调节化合物”和“IMiDTM”不包括沙利度胺。

[0315] 如本文所用,“来那度胺”意指3-(4'-氨基异吲哚啉-1'-酮)-1-哌啶-2,6-二酮(化学文摘服务名称)或2,6-哌啶二酮,3-(4-氨基-1,3-二氢-1-氧代-2H-异吲哚-2-基)-(国际理论与应用化学联合会(IUPAC)名称)。如本文所用,“泊马度胺”是指4-氨基-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)异吲哚-1,3-二酮。

[0316] 如本文所使用的,当涉及细胞时,“多潜能的”意指细胞具有分化成另一细胞类型的细胞的能力。在某些实施方案中,“多潜能细胞”是具有生长成哺乳动物身体的大约260种细胞类型的细胞子集的能力的细胞。与多能细胞不同,多潜能细胞不具有形成所有细胞类型的能力。

[0317] 如本文所用,“饲养细胞”是指与第二类型细胞共培养以提供其中第二类型的细胞可在其中保持并也许增殖的环境的一种类型的细胞。不受任何理论的限制,饲养细胞可以向靶细胞提供,例如,肽、多肽、电信号、有机分子(例如,类固醇)、核酸分子、生长因子(例如,bFGF)、其它因子(例如,细胞因子)和代谢营养物质。在某些实施方案中,饲养细胞以单层生长。

[0318] 如本文所用,使用本文所述方法产生的“自然杀伤细胞”或“NK细胞”(无进一步修饰)包括来自任何组织来源的自然杀伤细胞。

[0319] 如本文所用,使用本文所述方法产生的“ILC3细胞”(无进一步修饰)包括来自任何组织来源的ILC3细胞。

[0320] 如本文所用,“胎盘灌流液”是指已通过胎盘(例如人胎盘)的至少部分,例如通过胎盘脉管系统的灌注溶液,且包括通过灌注溶液在流经胎盘过程中收集的多个细胞。

[0321] 如本文所用,“胎盘灌流液细胞”是指分离自或可分离自胎盘灌流液的有核细胞,例如总有核细胞。

[0322] 如本文所用,“肿瘤细胞抑制”、“肿瘤细胞增殖抑制”等包括减缓肿瘤细胞群体的生长,例如通过杀死所述肿瘤细胞群体中的一个或多个肿瘤细胞,例如通过使例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞或NK细胞群体接触或使其邻近肿瘤细胞群体,例如使肿瘤细胞群体与使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞或NK细胞群体接触。在某些实施方案中,所述接触在体外或活体外发生。在其他实施方案中,所述接触在体内发生。

[0323] 如本文所用,术语“造血细胞”包括造血干细胞和造血祖细胞。

[0324] 如本文所用,“未限定组分”是培养基领域中的技术术语,其是指其成分通常未给出或定量的组分。“未限定组分”的实例包括但不限于血清例如人血清(例如人血清AB)和胎儿血清(例如胎牛血清或小牛血清)。

[0325] 如本文所用,当用于指示特定细胞标志物的存在时,“+”意指细胞标志物相对于同型对照可检测地存在于荧光激活细胞分选中;或者在定量或半定量RT-PCR中可检测地高于背景。

[0326] 如本文所用,当用于指示特定细胞标志物的存在时,“-”意指细胞标志物相对于同型对照不是可检测地存在于荧光激活细胞分选中;或者在定量或半定量RT-PCR中不是可检测地高于背景。

4.附图说明

[0327] 图1A-C:与先前的NK细胞扩增培养基(“NK细胞exp”)或二甲基亚砜(DMSO)相比较,对于使用1 μ M、10 μ M和30 μ M的StemRegenin-1(SR-1)或CH223191的三阶段方法,对(A)倍数扩增,(B)细胞纯度(CD56+CD3-),和(C)10:1(E:T)比率的NK细胞对K562细胞的细胞毒性的作用。

[0328] 图2:通过三阶段方法产生的CD3-CD56+门控细胞的多色流式细胞分析,显示CD11a和天然细胞毒性受体Nkp30、c-凝集素受体NKG2D、DNAM-1、2B4、溶细胞介质穿孔素和颗粒酶B及EOMES(NK细胞成熟和细胞溶解功能的调节剂)的表达。

[0329] 图3:35天三阶段NK细胞(n=10)针对肿瘤细胞系K562(CML),HL-60(AML)和RPMI8226(多发性骨髓瘤)的细胞毒性。裂解以10:1效应物-靶标比率测量。

[0330] 图4:比较FITC同种型对照细胞与三阶段NK细胞的穿孔素(顶部)(一种细胞溶解介质)和CD107(底部)(一种脱粒标志物)表达的多色流式细胞分析。

[0331] 图5:当与K562(CML)细胞以1:1比率共培养24小时时三阶段NK细胞的细胞因子产生(n=11)。

[0332] 图6A-B:通过63x放大的三阶段NK细胞和K562(CML)(A)和RPMI8226(多发性骨髓瘤)(B)细胞在1:1的效应物-靶标下孵育15分钟后的共焦成像捕获的具有穿孔素极化的F-肌动蛋白免疫学突触的形成。细胞用甲醛固定,且F-肌动蛋白用Alexa-488缀合的鬼笔环肽染色,并且用穿孔素抗体然后用Alexa Fluor 555染料缀合的山羊抗兔二抗进行共染色。肿瘤靶细胞也用细胞追踪紫色染料染色。箭头表示NK细胞、穿孔素和靶细胞。

[0333] 图7:三阶段NK细胞(n=3)对肿瘤细胞系K562(CML)、HL-60(AML)和RPMI8226(多发性骨髓瘤)的细胞毒性。在各种效应物-靶标比率下测量裂解。

[0334] 图8:在用肿瘤细胞(K562或HL-60)或佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸盐加离子霉素(PMA)刺激后,在三阶段NK细胞(n=4)中的CD107a表达。CD107a表达是脱粒的标志。显示了四位供体的结果。

[0335] 图9:用肿瘤细胞(K562、HL-60或RPMI8226)或佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸盐加离子霉素(PMA)刺激后三阶段NK细胞(n=3)中的IFN γ 分泌。显示了来自三位供体的结果。

[0336] 图10:3:1的效应物-靶标比率下三阶段NK细胞(n=2)针对初代AML靶细胞(A1、A2和KG1a)的细胞溶解活性。显示孵育24小时的结果。显示了来自两位供体的结果。

[0337] 图11:与用HL-60(AML)肿瘤细胞系刺激相比,用原代AML靶细胞(AML1-4,和KG1a)刺激后三阶段NK细胞(n=5)中的IFN γ 分泌。显示了来自五位供体的结果。为了便于比较而添加方框。

[0338] 图12:通过三阶段方法产生的CD3-CD56+门控细胞的多色流式细胞分析,显示CD11a和CD117的表达。方框中显示了两个细胞亚集CD11a+和CD11a-。

[0339] 图13:来自图12的CD11a+(右)和CD11a-(左)细胞的多色流式细胞分析,显示CD56和CD94的表达。

[0340] 图14:来自图12的CD11a+(顶部)和CD11a-(底部)细胞的多色流式细胞分析,显示每个亚集的穿孔素、EOMES、ROR γ t和IL1R1的表达水平。

[0341] 图15:如通过流式细胞术测定的,表达穿孔素、颗粒酶B、EOMES、T-bet、IL1R1、ROR γ t和AHR的CD11a+和CD11a-三阶段细胞的百分比定量。显示在四个供体上的结果。

[0342] 图16:通过流式细胞术测定的,在用细胞因子刺激时表达IFN γ 、GM-CSF、IL-22、IL-8和TNF α 的CD11a⁺和CD11a⁻三阶段细胞的百分比定量。显示在四个供体上的结果。图中的条从左至右表示如下的表达:i) 无刺激,ii) 用PMA和离子霉素刺激(PMAi), (iii) 用PMAi和IL23刺激, (iv) 用IL12和IL18刺激,以及(v) 用IL1b和IL23刺激。

[0343] 图17:通过三阶段方法产生的CD3-CD56⁺门控细胞的多色流式细胞分析,显示与NKp46、NKp30和NKG2D对比的CD11a的表达。

[0344] 图18:通过三阶段方法产生的CD3-CD56⁺门控细胞的多色流式细胞分析,显示与CD226 (DNAM-1) 和CD244 (2B4) 对比的CD11a的表达。

[0345] 图19:通过三阶段方法产生的CD3-CD56⁺门控细胞的多色流式细胞分析,显示与CD16、NKG2A和KIRs相比的CD11a的表达。

[0346] 图20A-D:如通过流式细胞术所测量的,表达(A) CD56和(B) CD14/15的三阶段细胞的百分比,和表达(C) ROR γ t和(D) 穿孔素的CD56⁺三阶段细胞的百分比,其使用来自表6的指示的第三培养基条件。来自两个供体的结果对于各条件显示为相邻的条。

[0347] 图21A-C:在存在K562细胞的情况下使用FACS在(A) CD11a⁺和(B) CD11a⁻细胞亚群中的CD107a表达。(C) 中的曲线图显示了四个CD56⁺CD3⁻三阶段NK细胞群体的结果。

[0348] 图22:三阶段NK细胞的CD56⁺CD3⁻群体的CD11a⁺(阳性) 和CD11a⁻(阴性) 亚群对K562细胞的细胞毒性。效应物与靶细胞的比率在x轴上显示。

[0349] 图23:在存在和不存在K562靶细胞和CD11a阳性和阴性效应细胞的共培养(效应物-靶的1:1比率) 的情况下进行的细胞因子分泌分析。对于阳性和阴性细胞亚群的左侧条指示在不存在K562细胞时的分泌,而对于阳性和阴性细胞亚群的右侧条指示在K562细胞存在下的分泌。

5. 具体实施方式

[0350] 本文提供了从造血细胞(例如,造血干细胞或祖细胞)产生和扩增NK细胞和/或ILC3细胞的新方法。本文还提供了从造血细胞(例如,造血干细胞或祖细胞)产生NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的方法,例如三阶段方法。用于产生NK细胞和/或ILC3细胞以及NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的造血细胞(例如,CD34⁺造血干细胞)可以从任何来源获得,例如但不限于胎盘、脐带脐带血、胎盘血、外周血、脾脏或肝脏。在某些实施方案中,NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞群体和/或ILC3细胞群体由扩增的造血细胞例如造血干细胞和/或造血祖细胞产生。在一个实施方案中,从这样的细胞的来源(例如,胎盘),例如从胎盘灌流液、脐带血、胎盘血、外周血、脾脏、肝脏(例如,胎儿肝脏)和/或骨髓收集造血细胞。

[0351] 用于产生NK细胞和/或ILC3细胞以及NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的造血细胞可以从任何动物物种获得。在某些实施方案中,造血干细胞或祖细胞是哺乳动物细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是人类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是灵长类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是犬类细胞。在具体的实施方案中,所述造血干细胞或祖细胞是啮齿动物细胞。

[0352] 5.1. 造血细胞

[0353] 可用于本文公开的方法中的造血细胞可以是能够分化成NK细胞和/或ILC3细胞的任何造血细胞,例如前体细胞、造血祖细胞、造血干细胞等。造血细胞可以获自组织来源,例

如骨髓、脐带血、胎盘血、外周血、肝等或其组合。造血细胞可以从胎盘获得。在一个具体的实施方案中,造血细胞从胎盘灌流液获得。在一个实施方案中,造血细胞不是从脐带血获得的。在一个实施方案中,造血细胞不是从外周血获得的。来自胎盘灌流液的造血细胞可以包含胎儿和母体造血细胞的混合物,例如其中母体细胞占造血细胞总数的5%以上的混合物。在某些实施方案中,来自胎盘灌流液的造血细胞包含至少约90%、95%、98%、99%或99.5%的胎儿细胞。

[0354] 在另一个具体的实施方案中,从其中产生使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的造血细胞,例如造血干细胞或祖细胞,获自胎盘灌流液、脐带血、胎儿肝脏、动员的外周血或骨髓。在另一个具体的实施方案中,从其中产生使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的造血细胞,例如造血干细胞或祖细胞是来自胎盘灌流液和脐带血(例如来自与灌流液相同的胎盘的脐带血)的组合细胞。在另一个具体的实施方案中,所述脐带血从所述胎盘灌流液从其中获得的胎盘以外的胎盘分离。在某些实施方案中,组合细胞可通过合并或组合脐带血和胎盘灌流液而获得。在某些实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的体积比组合以获得组合细胞。在一个具体的实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1至1:10、5:1至1:5或3:1至1:3的比率混合。在另一个具体实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5或1:10的比率组合。在更具体的实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以8.5:1.5(85%:15%)的比率混合。

[0355] 在某些实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以通过总有核细胞(TNC)含量的100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合以获得组合细胞。在一个具体实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1至1:10、5:1至1:5或3:1至1:3的比率组合。在另一个具体实施方案中,脐带血和胎盘灌流液以10:1、5:1、3:1、1:1、1:3、1:5或1:10的比率混合。

[0356] 在另一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的所述NK细胞群体和/或ILC3细胞群体从其中产生的造血细胞(例如造血干细胞或祖细胞)来自脐带血和胎盘灌流液,但是其中所述脐带血从所述胎盘灌流液从其中获得的胎盘以外的胎盘分离。

[0357] 在某些实施方案中,造血细胞是CD34⁺细胞。在具体的实施方案中,用于本文公开的方法的造血细胞是CD34⁺CD38⁺或CD34⁺CD38⁻。在更具体的实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD38⁻Lin⁻;在另一个具体实施方案中,造血细胞是CD2⁻、CD3⁻、CD11b⁻、CD11c⁻、CD14⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD24⁻、CD56⁻、CD66b⁻和/或血型糖蛋白A⁻中的一种或多种。在另一具体实施方案中,造血细胞为CD2⁻、CD3⁻、CD11b⁻、CD11c⁻、CD14⁻、CD16⁻、CD19⁻、CD24⁻、CD56⁻、CD66b⁻和血型糖蛋白A⁻。在另一个更具体的实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻。在另一个更具体的

实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD38⁻CD33⁻CD117⁻CD235⁻CD36⁻。

[0358] 在另一个实施方案中,造血细胞是CD45⁺。在另一个具体实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD45⁺。在另一个实施方案中,造血细胞是Thy-1⁺。在具体的实施方案中,造血细胞是CD34⁺Thy-1⁺。在另一个实施方案中,造血细胞是CD133⁺。在具体的实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD133⁺或CD133⁺Thy-1⁺。在另一个具体实施方案中,CD34⁺造血细胞是CXCR4⁺。在另一个具体实施方案中,CD34⁺造血细胞是CXCR4⁻。在另一个实施方案中,造血细胞对于KDR(血管生长因子受体2)是阳性的。在具体实施方案中,造血细胞是CD34⁺KDR⁺、CD133⁺KDR⁺或Thy-1⁺KDR⁺。在某些其他实施方案中,造血细胞对于醛脱氢酶(ALDH⁺)是阳性的,例如细胞是CD34⁺ALDH⁺。

[0359] 在某些其他的实施方案中,该CD34⁺细胞是CD45⁻。在具体实施方案中,该CD34⁺细胞,例如CD34⁺,CD45⁻细胞表达miRNAs hsa-miR-380、hsa-miR-512、hsa-miR-517、hsa-miR-518c、hsa-miR-519b、hsa-miR-520a、hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和/或hsa-miR-618中的一种或多种或者全部。

[0360] 在某些实施方案中,造血细胞是CD34⁻。

[0361] 造血细胞也可能缺乏某些指示谱系定型的标志物或者缺乏发育天性(development naiveté)。例如,在另一个实施方案中,造血细胞是HLA-DR⁻。在具体实施方案中,造血细胞是CD34⁺HLA-DR⁻、CD133⁺HLA-DR⁻、Thy-1⁺HLA-DR⁻或ALDH⁺HLA-DR⁻。在另一个实施方案中,造血细胞对一种或多种或全部谱系标志物CD2、CD3、CD11b、CD11c、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b和血型糖蛋白A为阴性。

[0362] 因此,基于指示未分化状态的标志物的存在或者基于指示至少一些谱系分化已发生的谱系标志物的不存在,可以选择用于本文公开的方法中的造血细胞。以下详细讨论基于特定标志物的存在或不存在分离细胞(包括造血细胞)的方法。

[0363] 本文提供的方法中使用的造血细胞可以是基本上同质的群体,例如包含来自单一组织来源的至少约95%、至少约98%或至少约99%的造血细胞的群体,或包含表现出相同的造血细胞相关细胞标志物的造血细胞的群体。例如,在各种实施方案中,造血细胞可包含来自骨髓、脐带血、胎盘血、外周血或胎盘(例如,胎盘灌流液)的至少约95%、98%或99%的造血细胞。

[0364] 本文提供的方法中使用的造血细胞可以获得自单一个体,例如来自单个胎盘,或来自多个个体,例如可以被合并。在造血细胞从多个个体获得并合并的情况下,造血细胞可以从相同的组织来源获得。因此,在各种实施方案中,合并的造血细胞全部来自胎盘(例如,胎盘灌流液),全部来自胎盘血,全部来自脐带血,全部来自外周血等。

[0365] 在某些实施方案中,本文公开的方法中使用的造血细胞可以包含来自两个或更多个组织来源的造血细胞。例如,在某些实施方案中,当来自两个或更多个来源的造血细胞被组合用于本文的方法中时,用于使用本文所述的三阶段方法产生自然杀伤细胞的多个造血细胞包含来自胎盘(例如,胎盘灌流液)的造血细胞。在各种实施方案中,用于产生使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体和/或ILC3细胞群体的造血细胞包含来自胎盘和来自脐带血;来自胎盘和外周血;来自胎盘和胎盘血,或胎盘和骨髓的造血细胞。在一个实施方案中,造血细胞包含与来自脐带血的造血细胞组合的来自胎盘灌流液的造血细胞,其中脐带血和胎盘来自相同个体,即其中灌流液和脐带血匹配。在其中造血细胞包含来自两个组

织来源的造血细胞的实施方案中,来自该来源的造血细胞可以以例如1:10、2:9、3:8、4:7、5:6、6:5、7:4、8:3、9:2、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1或9:1的比率组合。

[0366] 5.1.1. 胎盘造血干细胞

[0367] 在某些实施方案中,本文提供的方法中使用的造血细胞是胎盘造血细胞。在一个实施方案中,胎盘造血细胞是CD34⁺。在一个具体的实施方案中,胎盘造血细胞主要(例如,至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%)是CD34⁺CD38⁻细胞。在另一具体实施方案中,胎盘造血细胞主要(例如,至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%)是CD34⁺CD38⁺细胞。胎盘造血细胞可以通过本领域技术人员已知的任何方式(例如,通过灌注)从产后哺乳动物(例如,人)胎盘获得。

[0368] 在另一个实施方案中,胎盘造血细胞是CD45⁻。在一个具体实施方案中,造血细胞是CD34⁺CD45⁻。在另一个具体实施方案中,胎盘造血细胞是CD34⁺D45⁺。

[0369] 5.2. 自然杀伤细胞和/或ILC3细胞及自然杀伤细胞和/或ILC3细胞群体的产生

[0370] 通过本发明的方法产生NK细胞和/或ILC3细胞及NK细胞和/或ILC3细胞群体包括扩增造血细胞群体。在细胞扩增期间,造血细胞群体内的多个造血细胞分化成NK细胞和/或ILC3细胞。在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞(例如,CD34⁺干细胞或祖细胞)以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和随后在包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中第三细胞群体包含为CD56⁺,CD3⁻的自然杀伤细胞,和其中至少70%,例如至少80%的自然杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD16⁻的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94⁺或CD16⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94⁻或CD16⁻的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94⁺和CD16⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,这样的自然杀伤细胞包含为CD94⁻和CD16⁻的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0371] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1

α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0372] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞因子(SCF)和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0373] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏SCF、干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0374] 在一个方面,本文提供了产生NK细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a⁺细胞以产生第四细胞群体;其中第四细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁺的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0375] 在任何上述实施方案的某些实施方案中,所述自然杀伤细胞表达穿孔素和EOMES。在某些实施方案中,所述自然杀伤细胞不表达ROR γ t或IL1R1。

[0376] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和

血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; 和 (c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。

[0377] 在一个方面, 本文提供了产生ILC3细胞的方法, 其包括 (a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; 和 (c) 在包含干细胞动员剂、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。

[0378] 在一个方面, 本文提供了产生ILC3细胞的方法, 其包括 (a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; 和 (c) 在包含SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。

[0379] 在一个方面, 本文提供了产生ILC3细胞的方法, 其包括 (a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; 和 (c) 在包含干细胞动员剂、SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝

素。

[0380] 在一个方面,本文提供了产生ILC3细胞的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a⁻细胞或除去CD11a⁺细胞以产生第四细胞群体;其中所述第四细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0381] 在某些实施方案中,所述ILC3细胞表达ROR γ t和IL1R1。在某些实施方案中,所述ILC3细胞不表达穿孔素或EOMES。

[0382] 5.2.1. 使用三阶段方法产生NK细胞和/或ILC3细胞群体

[0383] 在一个实施方案中,本文提供了产生NK细胞和/或ILC3细胞群体的三阶段方法。在某些实施方案中,如本文所述,扩增和分化造血细胞以根据本文所述的三阶段方法产生NK细胞和/或ILC3细胞群体的方法包括将包含所述造血细胞的细胞群体维持在约 2×10^4 和约 6×10^6 个细胞/毫升之间。在某些方面,所述造血干细胞或祖细胞最初以 1×10^4 到 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第一培养基中。在具体方面,所述造血干细胞或祖细胞最初以约 3×10^4 个细胞/mL接种到所述第一培养基中。

[0384] 在某些方面,所述第一细胞群体最初以 5×10^4 到 5×10^5 个细胞/mL接种到所述第二培养基中。在一个具体的方面,所述第一细胞群体最初以约 1×10^5 个细胞/mL接种到所述第二培养基中。

[0385] 在某些方面,所述第二细胞群体最初以 1×10^5 至 5×10^6 个细胞/mL接种至所述第三培养基中。在某些方面,所述第二细胞群体最初以 1×10^5 至 1×10^6 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在一个具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 5×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在更具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 5×10^5 个细胞/mL在旋转瓶中接种到所述第三培养基中。在一个具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 3×10^5 个细胞/mL接种到所述第三培养基中。在更具体的方面,所述第二细胞群体最初以约 3×10^5 个细胞/mL在静态培养中接种到所述第三培养基中。

[0386] 在某些实施方案中,该三阶段方法包括第一阶段(“阶段1”),其包括在第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞(例如,CD34⁺干细胞或祖细胞)指定时间段,例如如本文所述,以产生第一细胞群体。在某些实施方案中,第一培养基包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)。在某些实施方案中,除了干细胞动员剂和Tpo之外,第一培养基还包含LMWH、Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。在一个具体的实施方案中,除了干细胞动员剂和Tpo之外,第一培养基包含包含LMWH、Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体实施方案中,第一培养基缺乏添加的LMWH。在具体的实施方案中,第一培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在具体的实施方案中,第一培养基缺乏LMWH。在具体的实施方

案中,第一培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。在具体的实施方案中,除了干细胞动员剂和Tpo之外,第一培养基还包含F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体的实施方案中,第一培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)、巨噬细胞抑制蛋白-1 α (MIP-1 α)或两者。

[0387] 在某些实施方案中,随后,在“阶段2”中,将所述细胞在第二培养基中培养指定时间段,例如,如本文所述,以产生第二细胞群体。在某些实施方案中,第二培养基包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15),且缺乏Tpo。在某些实施方案中,除了干细胞动员剂和IL-15之外,第二培养基还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。在某些实施方案中,除了干细胞动员剂和IL-15之外,第二培养基还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体实施方案中,第二培养基缺乏添加的LMWH。在一个具体的实施方案中,第二培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在一个具体的实施方案中,第二种培养基缺乏肝素,例如LMWH。在具体的实施方案中,第二培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。在某些实施方案中,除了干细胞动员剂和IL-15之外,第二培养基还包含F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体的实施方案中,第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)、巨噬细胞抑制蛋白-1 α (MIP-1 α)或两者。

[0388] 在某些实施方案中,随后,在“阶段3”中,将所述细胞在第三培养基中培养指定的时间段,例如如本文所述,以产生第三细胞群体,例如自然杀伤细胞。在某些实施方案中,第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH。在某些实施方案中,除了IL-2和IL-15之外,第三培养基还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。在某些实施方案中,除了IL-2和IL-15之外,第三培养基还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体实施方案中,第一培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和F1t3L中的一种、两种或全部三种。在具体的实施方案中,第三培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在具体的实施方案中,第三培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。在具体的实施方案中,第三种培养基缺乏肝素,例如LMWH。

[0389] 在一个具体的实施方案中,三阶段方法用于产生NK细胞和/或ILC3细胞群体。在某些实施方案中,三阶段方法在不存在基质饲养细胞支持物的情况下进行。在某些实施方案中,三阶段方法在不存在外源添加的类固醇(例如,可的松、氢化可的松或其衍生物)的情况下进行。

[0390] 在某些方面,用于三阶段方法的所述第一培养基包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)。在某些方面,用于三阶段方法的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo以外,还包含低分子量肝素(LMWH)、F1t-3配体(F1t-3L)、干细胞因子(SCF)、IL-6、IL-7、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)中的一种或多种。在某些方面,用于三阶段方法的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo之外,还包含LMWH、F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,用于三阶段方法的第一培养基除了干细胞动员剂和Tpo之外,还包含F1t-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在具体的方面,第一培养基缺乏添加的LMWH。在具体的方面,第一培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在具体的方面,第一培养基缺乏LMWH。在具体的方面,第一培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,所述Tpo以1ng/mL至100ng/mL、1ng/mL至50ng/mL、20ng/mL至30ng/mL或者约25ng/mL的浓度存在于第一培养基中。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以

0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,F1t-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在;F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,F1t-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,LMWH以约4.5U/mL的浓度存在;F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第一培养基中,F1t-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些实施方案中,所述第一培养基另外包含以下一种或多种:抗生素如庆大霉素;抗氧化剂如转铁蛋白、胰岛素和/或β-巯基乙醇;亚硒酸钠;抗坏血酸;乙醇胺;和谷胱甘肽。在某些实施方案中,提供第一培养基的基质的培养基是本领域技术人员已知的细胞/组织培养基,例如市售细胞/组织培养基,如SCGM™、STEMMACS™、GBGM®、AIM-V®、X-VIVO™ 10、X-VIVO™ 15、OPTIMIZER、STEMSPAN® H3000、CELLGRO COMPLETE™、DMEM:Ham's F12("F12") (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult™ H5100、IMDM和/或RPMI-1640;或者是包括通常包含在已知细胞/组织培养基中的组分的培养基,例如包含在GBGM®、AIM-V®、X-VIVO™ 10、X-VIVO™ 15、OPTIMIZER、STEMSPAN® H3000、CELLGRO COMPLETE™、DMEM:Ham's F12("F12") (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult™ H5100、IMDM和/或RPMI-1640中的成分。在某些实施方案中,所述第一培养基不是GBGM®。在任何上述实施方案的具体实施方案中,第一培养基缺乏LIF、MIP-1a或两者。

[0391] 在某些方面,用于三阶段方法的所述第二培养基包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15),且缺乏Tpo。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的一种或多种。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,用于三阶段方法的第二培养基除了干细胞动员剂和IL-15之外,还包含F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在特定方面,第二培养基缺乏添加的LMWH。在具体的方面,第二培养基缺乏添加的脱硫酸糖胺聚糖。在具体方面,第二培养基缺乏LMWH。在具体方面,第二培养基缺乏脱硫酸糖胺聚糖。在某些方面,所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL、10ng/mL至30ng/mL或约20ng/mL的浓度存在于

所述第二培养基中。在某些方面,在所述第二培养基中,LMWH以1U/mL至10U/mL的浓度存在;Flt-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在所述第二培养基中,Flt-3L以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于第二培养基中;Flt-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,Flt-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以4U/mL至5U/mL的浓度存在于第二培养基中;Flt-3L以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,LMWH以约4.5U/mL的浓度存在于第二培养基中;Flt-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些方面,在第二培养基中,Flt-3L以约25ng/mL的浓度存在;SCF以约27ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约25ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些实施方案中,所述第二培养基另外包含以下一种或多种:抗生素如庆大霉素;抗氧化剂如转铁蛋白、胰岛素和/或β-巯基乙醇;亚硒酸钠;抗坏血酸;乙醇胺;和谷胱甘肽。在某些实施方案中,提供第二种培养基的基质的培养基是本领域技术人员已知的细胞/组织培养基,例如市售细胞/组织培养基如SCGM™、STEMMACS™、**GBGM®**、**AIM-V®**、X-VIVO™ 10、X-VIVO™ 15、OPTIMIZER、**STEMSPAN®** H3000、CELLGRO COMPLETE™、DMEM:Ham's F12("F12") (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult™ H5100、IMDM和/或RPMI-1640;或者是包括通常包含在已知细胞/组织培养基中的组分的培养基,例如包含在**GBGM®**、**AIM-V®**、X-VIVO™ 10、X-VIVO™ 15、OPTIMIZER、**STEMSPAN®** H3000、CELLGRO COMPLETE™、DMEM:Ham's F12("F12") (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、Advanced DMEM(Gibco)、EL08-1D2、Myelocult™ H5100、IMDM和/或RPMI-1640中的组分。在某些实施方案中,所述第二培养基不是**GBGM®**。在任何上述实施方案的具体实施方案中,第一培养基缺乏LIF、MIP-1a或两者。

[0392] 在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏SCF和LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏SCF、干细胞动员剂和LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含干细胞动员剂、IL-2和IL-15,且缺乏LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含SCF、IL-2和IL-15,且缺乏LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的所述第三培养基包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH。在某些方面,用于三阶段方法的第三培养基除了IL-2和IL-15之外,还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF或GM-CSF中的一种或多种。在某些方面,用于三阶段方法的第三培养基除了IL-2和IL-15之外,还包含SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和GM-CSF中的每一种。在某些方面,所述IL-2以10U/mL至10,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以100U/mL至10,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以300U/mL至3,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以10ng/mL至30ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,所述IL-2以约1,000U/mL的浓度存在于所述第三培养基中,和所述IL-15以约20ng/mL的浓度存在于所述第三培养基中。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;IL-6以0.01ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在;IL-7以1ng/mL至50ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.01ng/mL至0.50ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.1ng/mL的浓度存在。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;IL-6以0.04ng/mL至0.06ng/mL的浓度存在;IL-7以20ng/mL至30ng/mL的浓度存在;G-CSF以0.20ng/mL至0.30ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以0.005ng/mL至0.5ng/mL的浓度存在。在某些方面,在所述第三培养基中,SCF以约22ng/mL的浓度存在;IL-6以约0.05ng/mL的浓度存在;IL-7以约20ng/mL的浓度存在;G-CSF以约0.25ng/mL的浓度存在;和GM-CSF以约0.01ng/mL的浓度存在。在某些方面,第三培养基包含100ng/mL的IL-7、1000ng/mL的IL-2、20ng/mL的IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,第三培养基包含20ng/mL的IL-7、1000ng/mL的IL-2、20ng/mL的IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,第三培养基包含20ng/mL的IL-7、20ng/mL IL-15和10 μ M SR1且缺乏SCF。在某些方面,第三培养基包含100ng/mL的IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,第三培养基包含22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF、1000ng/mL IL-2和20ng/mL IL-15且缺乏SR1。在某些方面,第三培养基包含20ng/mL IL-7、22ng/mL SCF和1000ng/mL IL-2且缺乏SR1。在任何上述实施方案的具体实施方案中,第一培养基缺乏LIF、MIP-1 α ,Flt-3L中的一种、两种或全部三种。

[0393] 在某些实施方案中,所述第三培养基另外包含以下一种或多种:抗生素如庆大霉素;抗氧化剂如转铁蛋白、胰岛素和/或 β -巯基乙醇;亚硒酸钠;抗坏血酸;乙醇胺;和谷胱甘肽。在某些实施方案中,提供第三种培养基的基质的培养基是本领域技术人员已知的细胞/组织培养基,例如,市售细胞/组织培养基,如SCGMTM、STEMMACSTM、

GBGM®、**AIM-V®**、**X-VIVO™** 10、**X-VIVO™** 15、**OPTIMIZER**、**STEMSPAN®** H3000、**CELLGRO COMPLETE™**、**DMEM:Ham's F12("F 12")** (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、**Advanced DMEM(Gibco)**、**EL08-1D2**、**Myelocult™** H5100、**IMDM**和/或**RPMI-1640**;或者是包括通常包含在已知细胞/组织培养基中的组分的培养基,例如包含在**GBGM®**、**AIM-V®**、**X-VIVO™** 10、**X-VIVO™**15、**OPTIMIZER**、**STEMSPAN®** H3000、**CELLGRO COMPLETE™**、**DMEM:Ham's F 12("F 12")** (例如2:1比率,或高葡萄糖或低葡萄糖DMEM)、**Advanced DMEM(Gibco)**、**EL08-1D2**、**Myelocult™** H5100、**IMDM**和/或**RPMI-1640**中的组分。在某些实施方案中,所述第三培养基不是**GBGM®**。

[0394] 通常,特别叙述的培养基组分不是指所述培养基的未限定组分中的可能成分。例如,所述TP0、IL-2和IL-15不包含在第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分中,例如,所述TP0、IL-2和IL-15不包含在血清内。此外,所述LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在第一培养基、第二培养基或第三培养基的未限定组分中,例如,所述LMWH、F1t-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF和/或GM-CSF不包含在血清内。

[0395] 在某些方面,所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含人血清-AB。在某些方面,任何所述第一培养基、第二培养基或第三培养基包含1%至20%的人血清-AB、5%至15%的人血清-AB或约2、5或10%的人血清-AB。

[0396] 在某些实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在某些实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将细胞在所述第二培养基中培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20天。在某些实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,将细胞在所述第三培养基中培养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或30天,或培养超过30天。

[0397] 在一个具体的实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,在所述第二培养基中的所述培养之前,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养7-13天以产生第一细胞群体;在所述第三培养基中的所述培养之前,将所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养2-6天以产生第二细胞群体;和将所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养10-30天,即细胞总共培养19-49天。

[0398] 在一个具体的实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,在本文所述的三阶段方法中,在所述第二培养基中的所述培养之前,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养8-12天以产生第一细胞群体;在所述第三培养基中的所述培养之前,将所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养3-5天以产生第二细胞群体;和将所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养15-25天,即细胞培养共26-42天。

[0399] 在一个具体的实施方案中,在本文所述的三阶段方法中,在所述第二培养基中的所述培养之前,将所述造血干细胞或祖细胞在所述第一培养基中培养约10天以产生第一细胞群体;在所述第三培养基中的所述培养之前,将所述第一细胞群体在所述第二培养基中培养约4天以产生第二细胞群体;和将所述第二细胞群体在所述第三培养基中培养约21天,即细胞培养总共约35天。

[0400] 在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,本文公开的三阶段方法产生多至少5000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一

培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少10,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少50,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少75,000倍的自然杀伤细胞。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过7-氨基放线菌素D (7AAD) 染色来测定。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过膜联蛋白-V染色测定。在具体的方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过7-AAD染色和膜联蛋白-V染色两者来测定。在某些方面,所述自然杀伤细胞的存活力通过台盼蓝染色测定。

[0401] 在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,本文公开的三阶段方法产生多至少5000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少10,000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少50,000倍的ILC3细胞。在某些方面,与最初接种到所述第一培养基中的造血干细胞的数量相比,所述三阶段方法产生多至少75,000倍的ILC3细胞。

[0402] 在某些方面,该三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少70%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,该三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

[0403] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a+自然杀伤细胞的自然杀伤细胞。

[0404] 在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少20%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少40%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少60%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的ILC3细胞。在某些方面,本文公开的三阶段方法产生包含至少80%的CD56+CD3-CD11a-ILC3细胞的自然杀伤细胞。

[0405] 在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,当所述自然杀伤细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,对所述K562细胞表现出至少20%细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,该自然杀伤细胞对所述K562细胞表现出至少35%细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少45%细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少60%细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生自然杀伤细胞,所述自然杀伤细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞

胞表现出至少75%的细胞毒性。

[0406] 在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,所述ILC3细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少20%的细胞毒性的。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,所述ILC3细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少35%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,所述ILC3细胞和K562细胞以10:1的比例在体外或离体共培养时,其对所述K562细胞表现出至少45%细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,所述ILC3细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少60%的细胞毒性。在某些方面,该三阶段方法产生ILC3细胞,所述ILC3细胞和K562细胞在体外或离体以10:1的比率共培养时,其对所述K562细胞表现出至少75%的细胞毒性。

[0407] 在某些方面,在所述第三培养步骤之后,将所述第三细胞群体,例如所述自然杀伤细胞和/或ILC3细胞群体冷冻保存。在某些方面,在所述第四步骤之后,将所述第四细胞群体,例如所述自然杀伤细胞和/或ILC3细胞群体冷冻保存。

[0408] 在某些方面,本文提供了包含自然杀伤细胞的细胞群体,即通过本文所述的三阶段方法产生的自然杀伤细胞。因此,本文提供了通过本文描述的三阶段方法产生的分离的自然杀伤细胞群体。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少20%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少40%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少60%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少80%的CD56+CD3-自然杀伤细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少60%的CD16-细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少80%的CD16-细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少20%的CD94+细胞。在一个具体的实施方案中,所述自然杀伤细胞群体包含至少40%的CD94+细胞。

[0409] 在某些方面,本文提供了为CD56+CD3-CD117+CD11a+的自然杀伤细胞群体,其中所述自然杀伤细胞表达穿孔素和/或EOMES,且不表达ROR γ t、芳基烃受体(AHR)和IL1R1中的一个或多个。在某些方面,所述自然杀伤细胞表达穿孔素和EOMES,且不表达ROR γ t、芳基烃受体或IL1R1任一种。在某些方面,所述自然杀伤细胞另外表达T-bet、GZMB、NKp46、NKp30和NKG2D。在某些方面,所述自然杀伤细胞表达CD94。在某些方面,所述自然杀伤细胞不表达CD94。

[0410] 在某些方面,本文提供了为CD56+CD3-CD117+CD11a-的ILC3细胞群体,其中所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1中的一种或多种,且不表达CD94、穿孔素和EOMES中的一种或多种。在某些方面,所述ILC3细胞表达ROR γ t、芳基烃受体和IL1R1,且不表达CD94、穿孔素或EOMES中的任何一种。在某些方面,所述ILC3细胞另外表达CD226和/或2B4。在某些方面,所述ILC3细胞另外表达IL-22、TNF α 和DNAM-1中的一种或多种。在某些方面,所述ILC3细胞表达CD226、2B4、IL-22、TNF α 和DNAM-1。

[0411] 在某些方面,本文提供了产生包含自然杀伤细胞和ILC3细胞的细胞群体的方法,其包括(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干

细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体分离CD11a+细胞和CD11a-细胞;和(e)以50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率将CD11a+细胞与CD11a-细胞组合以产生第四细胞群体。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以50:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以20:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以10:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以5:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:1的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:5的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:10的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:20的比率组合。在某些方面,在第四细胞群体中,CD11a+细胞和CD11a-细胞以1:50的比率组合。

[0412] 5.3. 干细胞动员因子

[0413] 5.3.1. 化学定义

[0414] 为了便于理解本文阐述的干细胞动员因子的公开内容,下面定义了许多术语。

[0415] 一般而言,本文使用的命名法和本文所述的生物学、细胞生物学、生物化学、有机化学、药物化学和药理学的实验室程序是本领域众所周知的和常用的那些。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语通常具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0416] 术语“约”或“近似”是指由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差,其部分取决于如何测量或确定该值。在某些实施方案中,术语“约”或“近似”是指在1、2、3或4个标准偏差内。在某些实施方案中,术语“约”或“近似”是指在给定值或范围的50%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.05%内。

[0417] 术语“芳基烃受体”或“AHR”是指人中AHR基因编码的蛋白质或其变体(例如,参见GenBank登录号P35869.2和AAH70080.1)。

[0418] 术语“芳基烃受体拮抗剂”、“AHR拮抗剂”、“芳基烃受体抑制剂”或“AHR抑制剂”是指下调或降低芳基烃受体活性的化合物。

[0419] 术语“烷基”是指直链或支链的饱和一价烃基,其中该烷基任选地被一个或多个的如本文所述的取代基Q取代。除非另有说明,术语“烷基”还包括直链和支链烷基。在某些实施方案中,烷基为具有1至20个(C₁₋₂₀)、1至15个(C₁₋₁₅)、1至10个(C₁₋₁₀)或1至6个(C₁₋₆)碳原子的直链饱和单价烃基,或3至20(C₃₋₂₀)、3至15(C₃₋₁₅)、3至10(C₃₋₁₀)或3至6(C₃₋₆)个碳原子的支链饱和一价烃基。如本文所用,直链C₁₋₆和支链C₃₋₆烷基也称为“低烷基”。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基(包括所有异构形式)、正丙基、异丙基、丁基(包括所有异构形式)、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基(包括所有异构形式)和己基(包括所有异构形

式)。例如, C_{1-6} 烷基是指1至6个碳原子的直链饱和单价烃基或3至6个碳原子的支链饱和单价烃基。

[0420] 术语“亚烷基”是指直链或支链饱和二价烃基,其中亚烷基任选地被一个或多个的如本文所述的取代基Q取代。例如, C_{1-6} 亚烷基是指1至6个碳原子的直链饱和二价烃基或3至6个碳原子的支链饱和二价烃基。在某些实施方案中,亚烷基为具有1至20 (C_{1-20})、1至15 (C_{1-15})、1至10 (C_{1-10}) 或1至6 (C_{1-6}) 个碳原子的直链饱和二价烃基或3至20 (C_{3-20})、3至15 (C_{3-15})、3至10 (C_{3-10}) 或3至6 (C_{3-6}) 个碳原子的支链饱和二价烃基。如本文所用,直链 C_{1-6} 和支链 C_{3-6} 亚烷基也被称为“低级亚烷基”。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基(包括所有异构体形式)、亚正丙基、亚异丙基、亚丁基(包括所有异构体形式)、亚正丁基、亚异丁基、亚叔丁基、亚戊基(包括所有异构形式)和亚己基(包括所有异构形式)。

[0421] 术语“烯基”是指直链或支链的一价烃基,其包含一个或多个的(在一个实施方案中,1、2、3、4或5个,在另一个实施方案中,一个)碳-碳双键。烯基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。如本领域普通技术人员所理解的,术语“烯基”还包括具有“顺式”和“反式”构型或可选地“Z”和“E”构型的基团。如本文所用,除非另有说明,否则术语“烯基”涵盖直链和支链烯基。例如, C_{2-6} 烯基是指2至6个碳原子的直链不饱和单价烃基或3至6个碳原子的支链不饱和单价烃基。在某些实施方案中,烯基为2至20 (C_{2-20})、2至15 (C_{2-15})、2至10 (C_{2-10}) 或2至6 (C_{2-6}) 个碳原子的直链一价烃基,或者3至20 (C_{3-20})、3至15 (C_{3-15})、3至10 (C_{3-10}) 或3至6 (C_{3-6}) 个碳原子的支链一价烃基。烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯-1-基、丙烯-2-基、烯丙基、丁烯基和4-甲基丁烯基。

[0422] 术语“亚烯基”是指直链或支链的二价烃基,其含有一个或多个(在一个实施方案中,一个至五个,在另一个实施方案中,一个)碳-碳双键。亚烯基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。如本领域普通技术人员所理解的,术语“亚烯基”包括具有“顺式”或“反式”构型或其混合物,或者可选地“Z”或“E”构型或其混合物的基团。例如, C_{2-6} 亚烯基是指2至6个碳原子的直链不饱和二价烃基或3至6个碳原子的支链不饱和二价烃基。在某些实施方案中,亚烯基是2至20 (C_{2-20})、2至15 (C_{2-15})、2至10 (C_{2-10}) 或2至6 (C_{2-6}) 个碳原子的直链二价烃基,或3至20 (C_{3-20})、3至15 (C_{3-15})、3至10 (C_{3-10}) 或3至6 (C_{3-6}) 个碳原子的支链二价烃基。亚烯基的实例包括但不限于亚乙烯基、亚烯丙基、亚丙烯基、亚丁烯基和4-甲基亚丁烯基。

[0423] 术语“炔基”是指直链或支链的一价烃基,其包含一个或多个(在一个实施方案中,1、2、3、4或5个,在另一个实施方案中,一个)碳-碳三键。炔基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。除非另有说明,术语“炔基”还包括直链和支链炔基。在某些实施方案中,炔基是2至20 (C_{2-20})、2至15 (C_{2-15})、2至10 (C_{2-10}) 或2至6 (C_{2-6}) 个碳原子的直链一价烃基,或3至20 (C_{3-20})、3至15 (C_{3-15})、3至10 (C_{3-10}) 或3至6 (C_{3-6}) 个碳原子的支链单价烃基。炔基的实例包括但不限于乙炔基 ($-C\equiv CH$) 和炔丙基 ($-CH_2C\equiv CH$)。例如, C_{2-6} 炔基是指2至6个碳原子的直链不饱和单价烃基或3至6个碳原子的支链不饱和单价烃基。

[0424] 术语“亚炔基”是指直链或支链的二价烃基,其含有一个或多个(在一个实施方案中,一个至五个,在另一个实施方案中,一个)碳-碳三键。亚炔基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。例如, C_{2-6} 亚炔基是指2至6个碳原子的直链不饱和二价烃基或3至6个碳原子的支链不饱和二价烃基。在某些实施方案中,亚炔基是2至20 (C_{2-20})、2至15 (C_{2-15})、

2至10 (C₂₋₁₀) 或2至6 (C₂₋₆) 个碳原子的直链二价烃基,或3至20 (C₃₋₂₀)、3至15 (C₃₋₁₅)、3至10 (C₃₋₁₀) 或3至6 (C₃₋₆) 个碳原子的支链二价烃基。亚炔基的实例包括但不限于亚乙炔基、亚丙炔基 (包括所有异构体形式,例如1-亚丙炔基和亚炔丙基)、亚丁炔基 (包括所有异构体形式,例如1-丁炔-1-亚基和2-丁炔-1-亚基)、亚戊炔基 (包括所有异构体形式,例如1-戊炔-1-亚基和1-甲基-2-丁炔-1-亚基) 和亚己炔基 (包括所有异构体形式,例如1-己炔-1-亚基)。

[0425] 术语“环烷基”是指任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的环状饱和或非芳族不饱和的,桥接的或非桥接的一价烃基。在某些实施方案中,所述环烷基是环状饱和的桥接或非桥接的一价烃基。在某些实施方案中,环烷基具有3至20 (C₃₋₂₀)、3至15 (C₃₋₁₅)、3至10 (C₃₋₁₀) 或3至7 (C₃₋₇) 个碳原子。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、双环[2.1.1]己基、双环[2.2.1]庚基、十氢萘基和金刚烷基。

[0426] 术语“亚环烷基”是指环状二价烃基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在一个实施方案中,环烷基是饱和或不饱和的但非芳族的,和/或桥接的和/或非桥接的,和/或稠合的双环基团。在某些实施方案中,亚环烷基具有3至20 (C₃₋₂₀)、3至15 (C₃₋₁₅)、3至10 (C₃₋₁₀) 或3至7 (C₃₋₇) 个碳原子。亚环烷基的实例包括但不限于亚环丙基 (例如,1,1-亚环丙基和1,2-亚环丙基)、亚环丁基 (例如,1,1-亚环丁基、1,2-亚环丁基或1,3-亚环丁基)、亚环戊基 (例如,1,1-亚环戊基、1,2-亚环戊基或1,3-亚环戊基)、亚环己基 (例如,1,1-亚环己基、1,2-亚环己基、1,3-亚环己基或1,4-亚环己基)、亚环庚基 (例如,1,1-亚环庚基、1,2-亚环庚基、1,3-亚环庚基或1,4-亚环庚基)、亚萘烷基和亚金刚烷基。

[0427] 术语“芳基”是指含有至少一个芳族烃环的单环芳族碳环基团和/或多环一价芳族碳环基团。在某些实施方案中,芳基具有6至20个 (C₆₋₂₀)、6至15个 (C₆₋₁₅) 或6至10个 (C₆₋₁₀) 环原子。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、茛基、萘基、蒽基、菲基、芘基、联苯基和三联苯基。在某些实施方案中,术语“芳基”是指二环或三环碳环,其中一个环是芳香族的和其中的其它环可以是饱和的、部分不饱和的或芳族的,例如二氢萘基、茛基、茛满基或四氢萘基 (四氢化萘基)。该芳基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0428] 术语“亚芳基”是指含有至少一个芳族碳环的二价单环芳族基团和/或二价多环芳族基团。在某些实施方案中,亚芳基具有6至20个 (C₆₋₂₀)、6至15个 (C₆₋₁₅) 或6至10个 (C₆₋₁₀) 环原子。亚芳基的实例包括但不限于亚苯基、亚萘基、亚茛基、亚萘基、亚蒽基、亚菲基、亚芘基、亚联苯基和亚三联苯基。亚芳基也指双环或三环碳环,其中一个环是芳族的,且其它环可以是饱和的、部分不饱和的或芳族的,例如二氢亚萘基、亚茛基、亚茛满基或四氢亚萘基 (亚四氢萘基)。亚芳基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0429] 术语“芳烷基”或“芳基烷基”是指被一个或多个的芳基取代的单价烷基。在某些实施方案中,芳烷基具有7至30 (C₇₋₃₀)、7至20 (C₇₋₂₀) 或7至16 (C₇₋₁₆) 个碳原子。芳烷基的实例包括但不限于苄基、1-苯基乙基、2-苯基乙基和3-苯基丙基。芳烷基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0430] 术语“杂芳基”是指含有至少一个芳族环的一价单环芳族基团或一价多环芳族基团,其中至少一个芳族环在环中含有一个或多个杂原子,杂原子各自独立地选自O、S、N和P。为清楚起见,本文使用的术语“芳基”和“杂芳基”是相互排斥的,即“芳基”基团不包括“杂芳基”基团,反之亦然。杂芳基通过其芳族环与分子的其余部分键合。杂芳基的每个环可以含

有一个或两个O原子、一个或两个S原子、一个至四个N原子和/或一个或两个P原子，条件是每个环中杂原子的总数为四个或更少，和每个环含有至少一个碳原子。在某些实施方案中，杂芳基具有5至20、5至15或5至10个环原子。单环杂芳基的实例包括但不限于呋喃基、咪唑基、异噻唑基、异噁唑基、噁二唑基、噁二唑基、噁唑基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、噻二唑基、噻唑基、噻吩基、四唑基、三嗪基和三唑基。双环杂芳基的实例包括但不限于苯并呋喃基、苯并咪唑基、苯并异噻唑基、苯并吡喃基、苯并噻二唑基、苯并噻唑基、苯并噻吩基、苯并三唑基、苯并噁唑基、呋喃并吡啶基、咪唑并吡啶基、咪唑并噻唑基、吲哚基、吲哚基、吲唑基、异苯并呋喃基、异苯并噻吩基、异吲哚基、异喹啉基、异噻唑基、萘啶基、噁唑并吡啶基、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡啶并吡啶基、吡咯并吡啶基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噻二唑并嘧啶基和噻吩并吡啶基。三环杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、苯并吲哚基、咔唑基、二苯并呋喃基、卟啶基、菲咯啉基、菲啶基、吩吡嗪基(phenarsazinyl)、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基和氧杂蒽基。杂芳基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0431] 术语“亚杂芳基”是指含有至少一个芳族环的二价单环芳族基团或二价多环芳族基团,其中至少一个芳族环在环中含有一个或多个的独立地选自O、S和N的杂原子。为了清楚起见,这里使用的术语“亚芳基”和“亚杂芳基”是相互排斥的,即“亚芳基”基团不包括“亚杂芳基”基团,反之亦然。亚杂芳基通过其芳族环与分子的其余部分键合。亚杂芳基的每个环可以含有一个或两个O原子、一个或两个S原子和/或一个至四个N原子,条件是每个环中的杂原子的总数是四个或更少,和每个环含有至少一个碳原子。在某些实施方案中,亚杂芳基具有5至20、5至15或5至10个环原子。单环亚杂芳基的实例包括但不限于亚呋喃基、亚咪唑基、亚异噻唑基、亚异噁唑基、亚噁二唑基、亚噁二唑基、亚噁唑基、亚吡嗪基、亚吡唑基、亚哒嗪基、亚吡啶基、亚嘧啶基、亚吡咯基、亚噻二唑基、亚噻唑基、亚噻吩基、亚四唑基、亚三嗪基和亚三唑基。双环亚杂芳基的实例包括,但不限于亚苯并呋喃基、亚苯并咪唑基、亚苯并异噻唑基、亚苯并吡喃基、亚苯并噻二唑基、亚苯并噻唑基、亚苯并噻吩基、亚苯并三唑基、亚苯并噁唑基、亚呋喃并吡啶基、亚咪唑并吡啶基、亚咪唑并噻唑基、亚吡嗪基、亚吡唑基、亚异苯并呋喃基、亚异苯并噻吩基、亚异吡啶基、亚异喹啉基、亚异噻唑基、亚蔡啶基、亚噁唑并吡啶基、亚酞嗪基、亚蝶啶基、亚嘌呤基、亚吡啶并吡啶基、亚吡咯并吡啶基、亚喹啉基、亚喹喔啉基、亚喹唑啉基、亚噻二唑并嘧啶基和亚噻吩并吡啶基。三环亚杂芳基的实例包括,但不限于亚吡啶基、亚苯并吡啶基、亚呋喃基、亚二苯并呋喃基、亚啞啶基、亚菲咯啉基、亚菲啶基、亚吩砒嗪基(phenarsazinylene)、亚吩嗪基、亚吩噻嗪基、亚吩噁嗪基和亚氧杂蒽基。亚杂芳基任选地被一个或多个的如本文所述的取代基Q取代。

[0432] 术语“杂环基”或“杂环的”是指含有至少一个非芳族环的一价单环非芳族环系统或单价多环环系统, 其中一个或多个非芳族环原子是杂原子, 其每一个独立地选自O、S、N和P; 而其余的环原子是碳原子。在某些实施方案中, 杂环基或杂环基团具有3至20、3至15、3至10、3至8、4至7或5至6个环原子。杂环基通过其非芳族环与分子的其余部分键合。在某些实施方案中, 杂环基是单环、二环、三环或四环环系统, 其可以是螺环、稠合环或桥连环, 和其中氮或硫原子可以任选地被氧化, 氮原子可以任选地被季铵化, 和一些环可以部分或完全饱和, 或是芳族的。杂环基可以在导致产生稳定化合物的任何杂原子或碳原子处与主结构连接。杂环基的实例包括, 但不限于氮杂莖基、苯并二噁烷基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并呋

喃酮基、苯并吡喃酮基、苯并吡喃基、苯并四氢呋喃基、苯并四氢噻吩基、苯并噻喃基、苯并噁唞基、 β -呋啉基、苯并二氢吡喃基、苯并吡喃酮基、邻二氮杂萘基、香豆素基、十氢异喹啉基、二氢苯并异噻唞基、二氢苯并异噁唞基、二氢呋喃基、二氢异吲哚基、二氢吡喃基、二氢吡啶基、二氢吡嗪基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氧戊环基、1,4-二噻烷基、呋喃酮基、咪唑烷基、咪唑啉基、二氢吲哚基、异苯并四氢呋喃基、异苯并四氢噻吩基、异苯并二氢吡喃基、异香豆素基、异二氢吲哚基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、噁唑烷酮基、噁唑烷基、环氧乙烷基、哌嗪基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡唑烷基、吡唑啉基、吡咯烷基、吡咯啉基、奎宁环基、四氢呋喃基、四氢异喹啉基、四氢吡喃基、四氢噻吩基、硫代吗啉基、噻唑烷基、四氢喹啉基和1,3,5-三噻烷基(trithianyl)。杂环基任选地被一个或多个的如本文所述的取代基Q取代。

[0433] 术语“亚杂环基”是指含有至少一个非芳族环的二价单环非芳族环系统或二价多环环系统,其中一个或多个非芳族环原子是独立地选自O、S和N杂原子;而其余的环原子是碳原子。在某些实施方案中,亚杂环基具有3至20、3至15、3至10、3至8、4至7或5至6个环原子。在某些实施方案中,亚杂环基是单环、二环、三环或四环环系统,其可以稠合的或桥连的,和其中氮或硫原子可以任选地被氧化,氮原子可以任选地被季铵化,和一些环可以是部分或完全饱和的,或是芳族的。亚杂环基可以在导致产生稳定的化合物的任何杂原子或碳原子处与主结构连接。这样的亚杂环基的实例包括但不限于,亚氮杂萘基、亚苯并二噁烷基、亚苯并二氧杂环戊烯基、亚苯并呋喃酮基、亚苯并吡喃酮基、亚苯并吡喃基、亚苯并四氢呋喃基、亚苯并四氢噻吩基、亚苯并噻喃基、亚苯并噁嗪基、β-亚吡啶基、亚色满基、亚苯并色酮基、亚邻二氮杂萘基、亚香豆素基、亚十氢异喹啉基、亚二氢苯并异噻嗪基、亚二氢苯并异噁嗪基、亚二氢呋喃基、亚二氢异吲哚基、亚二氢吡喃基、亚二氢吡啶基、亚二氢吡嗪基、亚二氢吡啶基、亚二氢嘧啶基、亚二氢吡咯基、亚二氧戊环基、1,4-亚二噻烷基、亚呋喃酮基、亚咪唑烷基、亚咪唑啉基、亚二氢吲哚基、亚异苯并四氢呋喃基、亚异苯并四氢噻吩基、亚异苯并二氢吡喃基、亚异香豆素基、亚异二氢吲哚基、亚异噻唑烷基、亚异噁唑烷基、亚吗啉基、亚八氢吲哚基、亚八氢异吲哚基、亚噁唑烷酮基、亚噁唑烷基、亚环氧乙烷基、亚哌嗪基、亚哌啶基、4-亚哌啶酮基、亚吡唑烷基、亚吡唑啉基、亚吡咯烷基、亚吡咯啉基、亚奎宁环基、亚四氢呋喃基、亚四氢异喹啉基、亚四氢吡喃基、亚四氢噻吩基、亚硫代吗啉基、亚噻唑烷基、亚四氢喹啉基和1,3,5-亚三噻烷基(trithianylene)。亚杂环基任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0434] 术语“卤素”、“卤化物”或“卤代”是指氟、氯、溴和/或碘。

[0435] 术语“卤代烷基”是指被一个或多个(在一个实施方案中,为1、2或3个)卤素基团取代的烷基,其中烷基如本文所定义。卤代烷基任选地被一个或多个的如本文所述的取代基Q取代。

[0436] 术语“烷氧基”是指-O-烷基,其中烷基如本文所定义。

[0437] 术语“卤代烷氧基”是指-O-卤代烷基,其中卤代烷基如本文所定义。

[0438] 术语“任选被取代的”旨在表示基团或取代基,例如烷基、亚烷基、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、环烷基、亚环烷基、芳基、亚芳基、芳烷基(例如,苄基)、杂芳基、亚杂芳基、杂环基和亚杂环基基团,可以被一个或多个取代基Q取代,其中每一个独立地选自于,例如,(a) 氧代(=O)、氰基(-CN)、卤素和硝基(-NO₂);(b) C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀环烷基、

C₆₋₁₄芳基、C₇₋₁₅芳烷基、杂芳基和杂环基,其各自进一步任选地被一个或多个(在一个实施方案中,一个、两个、三个、四个或五个)取代基Q^a取代;和(c) -C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)NR^bR^c、-C(NR^a)NR^bR^c、-OR^a、-OC(O)R^a、-OC(O)OR^a、-OC(O)R^bR^c、-OC(=NR^a)NR^bR^c、-OS(O)R^a、-OS(O)₂R^a、-OS(O)NR^bR^c、-OS(O)₂NR^bR^c、-NR^bR^c、-NR^aC(O)R^d、-NR^aC(O)OR^d、-NR^aC(O)NR^bR^c、-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c、-NR^aS(O)R^d、-NR^aS(O)₂R^d、-NR^aS(O)R^bR^c、-NR^aS(O)₂NR^bR^c、-P(O)R^aR^d、-P(O)(OR^a)R^d、-P(O)(OR^a)(OR^d)、-SR^a、-S(O)R^a、-S(O)₂R^a、-S(O)NR^bR^c和-S(O)₂NR^bR^c,其中每个R^a、R^b、R^c和R^d独立地为(i)氢;(ii)C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀环烷基、C₆₋₁₄芳基、C₇₋₁₅芳烷基、杂芳基或杂环基,其各自任选地被一个或多个(在一个实施方案中,一个、两个、三个或四个)取代基Q^a取代;或(iii)R^b和R^c与它们所连接的N原子一起形成杂芳基或杂环基,其各自任选地被一个或多个(在一个实施方案中,1、2、3或4个)取代基Q^a取代。如本文所用,除非另有说明,否则本文所述的可被取代的所有基团是“任选取代的”。

[0439] 在一个实施方案中,每个取代基Q^a独立地选自于(a)氧代、氰基、卤素和硝基;和(b)C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀环烷基、C₆₋₁₄芳基、C₇₋₁₅芳烷基、杂芳基和杂环基;和(c) -C(O)R^e、-C(O)OR^e、-C(O)NR^fR^g、-C(NR^e)NR^fR^g、-OR^e、-OC(O)R^e、-OC(O)OR^e、-OC(O)NR^fR^g、-OC(=NR^e)NR^fR^g、-OS(O)R^e、-OS(O)₂R^e、-OS(O)NR^fR^g、-OS(O)₂NR^fR^g、-NR^fR^g、-NR^eC(O)R^h、-NR^eC(O)OR^h、-NR^eC(O)NR^fR^g、-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g、-NR^eS(O)R^h、-NR^eS(O)₂R^h、-NR^eS(O)NR^fR^g、-NR^eS(O)₂NR^fR^g、-P(O)R^eR^h、-P(O)(OR^e)R^h、-P(O)(OR^e)(OR^h)、-SR^e、-S(O)R^e、-S(O)₂R^e、-S(O)NR^fR^g和-S(O)₂NR^fR^g;其中每个R^e、R^f、R^g和R^h独立地为(i)氢、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀环烷基、C₆₋₁₄芳基、C₇₋₁₅芳烷基、杂芳基或杂环基;或(ii)R^f和R^g与它们所连接的N原子一起形成杂芳基或杂环基。

[0440] 在某些实施方案中,“光学活性的”和“对映体活性的”是指分子的集合,其具有不小于约50%、不小于约70%、不小于约80%、不小于约90%、不小于约91%、不小于约92%、不小于约93%、不小于约94%、不小于约95%、不小于约96%、不小于约97%、不小于约98%、不小于约99%、不小于约99.5%或不小于约99.8%的对映体过量。在某些实施方案中,基于所讨论的两种对映异构体的总重量,所述化合物包含约95%或更多的所需对映异构体和约5%或更少的次优选对映异构体。

[0441] 在描述光学活性化合物时,前缀R和S用于表示光学活性化合物关于其手性中心的绝对构型。(+)和(-)用于表示光学活性化合物的旋光性,即其中光学活性化合物使偏振光平面旋转的方向。(-)前缀表示光学活性化合物是左旋的,即该化合物使偏振光的平面向左或逆时针旋转。(+)前缀表示光学活性化合物是右旋的,也就是说,该化合物使偏振光的平面向右或顺时针旋转。然而,旋光性符号(+)和(-)与化合物的绝对构型R和S无关。

[0442] 术语“同位素变体”是指在构成这种化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的同位素的化合物。在某些实施方案中,化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一种或多种同位素,包括但不限于氢(¹H)、氘(²H)、氚(³H)、碳-11(¹¹C)、碳-12(¹²C)、碳-13(¹³C)、碳-14(¹⁴C)、氮-13(¹³N)、氮-14(¹⁴N)、氮-15(¹⁵N)、氧-14(¹⁴O)、氧-15(¹⁵O)、氧-16(¹⁶O)、氧-17(¹⁷O)、氧-18(¹⁸O)、氟-17(¹⁷F)、氟-18(¹⁸F)、磷-31(³¹P)、磷-32(³²P)、磷-33(³³P)、硫-32(³²S)、硫-33(³³S)、硫-34(³⁴S)、硫-35(³⁵S)、硫-36(³⁶S)、氯-35(³⁵Cl)、氯-36(³⁶Cl)、氯-37(³⁷Cl)、溴-79(⁷⁹Br)、溴-81(⁸¹Br)、碘-123(¹²³I)、碘-125(¹²⁵I)、碘-127(¹²⁷I)、碘-129(¹²⁹I)和碘-131(¹³¹I)。在某些实施方案中,化合物的“同位素变体”为稳定形式,即非放射性的。在

某些实施方案中,化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一种或多种同位素,包括但不限于氢(^1H)、氘(^2H)、碳-12(^{12}C)、碳-13(^{13}C)、氮-14(^{14}N)、氮-15(^{15}N)、氧-16(^{16}O)、氧-17(^{17}O)、氧-18(^{18}O)、氟-17(^{17}F)、磷-31(^{31}P)、硫-32(^{32}S)、硫-33(^{33}S)、硫-34(^{34}S)、硫-36(^{36}S)、氯-35(^{35}Cl)、氯-37(^{37}Cl)、溴-79(^{79}Br)、溴-81(^{81}Br)和碘-127(^{127}I)。在某些实施方案中,化合物的“同位素变体”处于不稳定形式,即放射性的。在某些实施方案中,化合物的“同位素变体”含有非天然比例的一种或多种同位素,包括但不限于氚(^3H)、碳-11(^{11}C)、碳-14(^{14}C)、氮-13(^{13}N)、氧-14(^{14}O)、氧-15(^{15}O)、氟-18(^{18}F)、磷-32(^{32}P)、磷-33(^{33}P)、硫-35(^{35}S)、氯-36(^{36}Cl)、碘-123(^{123}I)、碘-125(^{125}I)、碘-129(^{129}I)和碘-131(^{131}I)。应该理解,在本文提供的化合物中,例如任何氢可以是 ^2H ,或者例如任何碳可以是 ^{13}C ,或者例如任何氮可以是 ^{15}N ,或者例如任何氧可以是 ^{18}O ,其中根据技术人员的判断是可行的。在某些实施方案中,化合物的“同位素变体”含有非天然比例的氘(D)。

[0443] 术语“溶剂合物”是指由一个或多个溶质分子(例如本文提供的化合物)和一个或多个溶剂分子(其以化学计量或非化学计量的量存在)形成的复合物或聚集体。合适的溶剂包括但不限于水、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇和乙酸。在某些实施方案中,溶剂是药学上可接受的。在一个实施方案中,复合物或聚集体是结晶形式。在另一个实施方案中,复合物或聚集体为非晶形式。当溶剂是水时,溶剂化物是水合物。水合物的实例包括但不限于半水合物、一水合物、二水合物、三水合物、四水合物和五水合物。

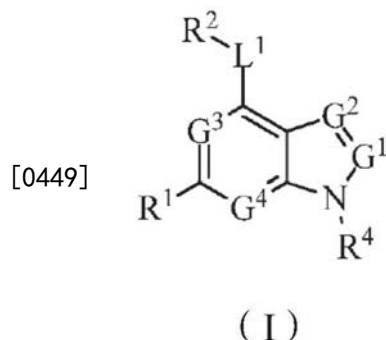
[0444] 短语“对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或其同位素变体;或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药”具有与短语“(i) 本文所指的化合物的对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体;(ii) 本文所指的化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;或(iii) 本文所指的化合物的对映异构体、对映异构体混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体的药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药”相同的含义。

[0445] 5.3.2. 干细胞动员化合物

[0446] 在一个实施方案中,干细胞动员化合物是芳基烃受体抑制剂,例如芳基烃受体拮抗剂。

[0447] 在另一个实施方案中,所述干细胞动员化合物是5,6-稠合的杂芳基化合物,包括但不限于美国专利申请公开号2010/0183564、2014/0023626和2014/0114070中描述的那些化合物,其中每一个的公开内容通过引用整体并入本文。

[0448] 而在另一个实施方案中,干细胞动员化合物是式I的化合物:



[0450] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或

同位素变体;或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;其中:

[0451] G^1 是N和 CR^3 ;

[0452] G^2 、 G^3 和 G^4 各自独立地为CH和N;条件是 G^3 和 G^4 中的至少一个是N,和 G^1 和 G^2 中的至少一个不是N;

[0453] L^1 是 $-NR^{1a}-$ 、 $-NR^{1a}(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-NR^{1a}CH(C(O)OCH_3)CH_2-$ 、 $-NR^{1a}(CH_2)_2NR^{1c}-$ 、 $-NR^{1a}(CH_2)_2S-$ 、 $-NR^{1a}CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 、 $-NR^{1a}CH_2CH(OH)-$ 或 $-NR^{1a}CH(CH_3)CH_2-$;

[0454] R^1 是(i)氢;或(ii)各自任选地被一个、两个或三个取代基取代的苯基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻吩基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯烷基、吡嗪基、哒嗪基、苯并咪唑基、异喹啉基、咪唑并吡啶基或苯并噻吩基,其中每个取代基独立地为氰基、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{1-4} 卤代烷氧基、羟基、氨基、 $-C(O)R^{1a}$ 、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-SR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1a}$ 或 $-S(O)_2R^{1a}$;

[0455] R^2 是(i) $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$ 、 $-NR^{1c}C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 或 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$;或(ii)苯基、吡咯并吡啶-3-基、吲哚基、噻吩基、吡啶基、1,2,4-三唑基、2-氧代咪唑烷基、吡唑基、2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基或吲唑基,其各自任选地被一个、两个或三个取代基取代,其中每个取代基独立地为羟基、卤素、甲基、甲氧基、氨基、 $-O(CH_2)_{1-3}NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-OS(O)_2NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}S(O)_2R^{1b}$ 或 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$;

[0456] R^3 是氢、 C_{1-4} 烷基或联苯基;条件是 R^1 和 R^3 中的至少一个不是氢;

[0457] R^4 是 C_{1-10} 烷基、丙-1-烯-2-基、环己基、环丙基、2-(2-氧代吡咯烷-1-基)乙基、氧杂环丁烷-3-基、二苯甲基、四氢-2H-吡喃-3-基、四氢-2H-吡喃-4-基、苯基、四氢呋喃-3-基、苄基、(4-戊基苯基)(苯基)甲基或1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)乙基,其各自任选地被一个、两个或三个取代基取代,其中每个取代基独立地为羟基、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 卤代烷基;和

[0458] 每个 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 独立地为氢或 C_{1-4} 烷基;或者 R^{1a} 和 R^{1b} 与它们所连接的N原子一起形成杂环基。

[0459] 在一个实施方案中,在式I中, G^1 是 CR^3 ,在一个实施方案中,是CH; G^2 、 G^3 和 G^4 各自为N;和 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 L^1 各自如本文所定义。

[0460] 在另一个实施方案中,在式I中, G^1 、 G^3 和 G^4 各自是N; G^2 是CH;和 R^1 、 R^2 、 R^4 和 L^1 各自如本文所定义。

[0461] 而在另一个实施方案中,在式I中, G^1 是 CR^3 ,在一个实施方案中,是CH; G^2 和 G^3 各自为N; G^4 是CH;和 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 L^1 各自如本文所定义。

[0462] 在又一个实施方案中,在式I中, G^1 是 CR^3 ,在一个实施方案中,是CH; G^2 和 G^4 各自为N; G^3 是CH;和 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 L^1 各自如本文所定义。

[0463] 在又一个实施方案中,在式I中, G^1 是 CR^3 ,在一个实施方案中,是CH; G^2 是CH; G^3 和 G^4 各自为N;和 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 L^1 各自如本文所定义。

[0464] 在更多的实施方案中,在式I中,

[0465] G^1 是CH;

[0466] G^2 、 G^3 和 G^4 各自为N;

[0467] R^1 是任选地被1、2或3个取代基取代的苯并噻吩基,其中所述取代基各自独立地为氰基、卤素、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 C_{1-4} 卤代烷基、 C_{1-4} 卤代烷氧基、羟基、氨基、 $-C(O)R^{1a}$ 、 $-C(O)$

OR^{1a} 、 $-C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-SR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1a}$ 或 $-S(O)_2R^{1a}$;

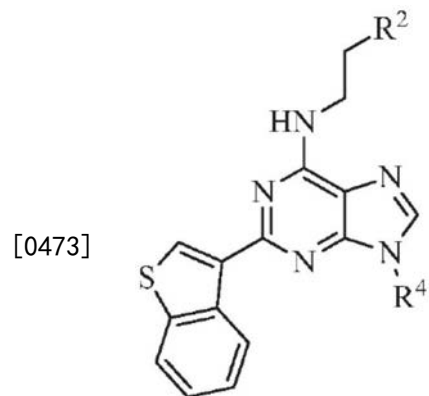
[0468] R^2 是苯基,其任选地被一个、两个或三个取代基取代,所述取代基各自独立地为羟基、卤素、甲基、甲氧基、氨基、 $-O(CH_2)_{1-3}NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-OS(O)_2NR^{1a}R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}S(O)_2R^{1b}$ 或 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$;

[0469] R^4 为 C_{1-10} 烷基,其任选地被一个、两个或三个取代基取代,所述取代基各自独立地为羟基、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 卤代烷基;

[0470] L^1 是 $-NR^{1a}(CH_2)_2-$;和

[0471] R^{1a} 和 R^{1b} 各自如本文所定义。

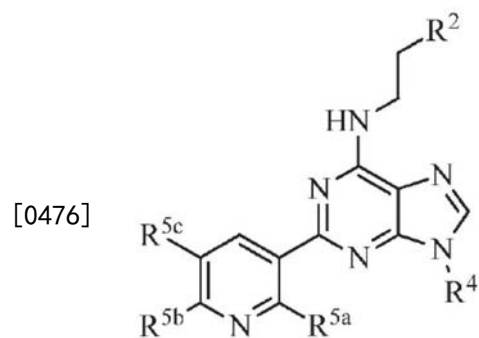
[0472] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是式II的化合物:



(II)

[0474] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体;或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;其中 R^2 和 R^4 各自如本文所定义。

[0475] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是式III的化合物:

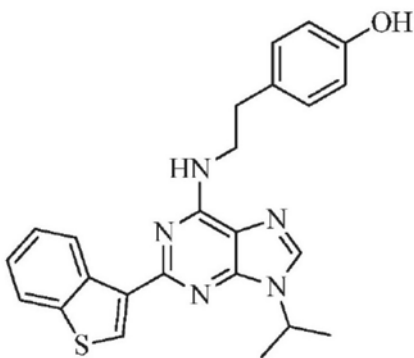


(III)

[0477] 或其对映异构体、对映异构体混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体;或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;其中 R^2 和 R^4 各自如本文所定义;和 R^{5a} 、 R^{5b} 和 R^{5c} 各自独立地为氢、氰基、甲基、卤素、三氟甲基或 $-SO_2CH_3$ 。

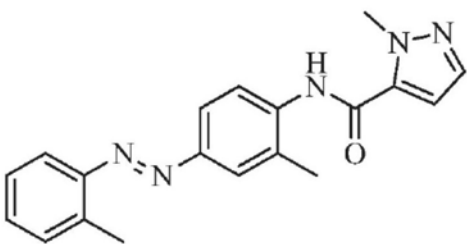
[0478] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是4-(2-(2-(苯并[b]噻吩-3-基)-9-异丙基-9H-嘌呤-6-基氨基)乙基)苯酚。在某些实施方案中,干细胞动员化合物是StemRegenin-1 (SR-1),其具有以下结构:

[0479]



[0480] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是1-甲基-N-(2-甲基-4-(2-(2-甲基苯基)二氮烯基)苯基)-1H-吡唑-5-甲酰胺。在某些实施方案中,干细胞动员化合物是CH223191,具有以下结构:

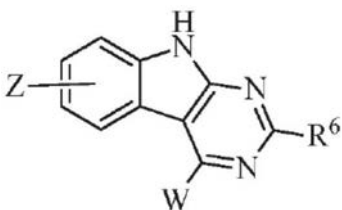
[0481]



[0482] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是嘧啶并(4,5-b)吡咯。

[0483] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是式IV的化合物:

[0484]



(IV)

[0485] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体;或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药;其中:

[0486] Z为氰基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₁₀环烷基、C₆₋₁₄芳基、C₇₋₁₅芳烷基、苄基、杂芳基、杂环基、-L-C₆₋₁₄芳基、-L-杂芳基、-L-杂环基、-C(O)R^{1a}、-C(O)OR^{1a}、-C(O)NHR^{1a}、-C(O)N(R^{1a})R^{1b}、-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})、-SR^{1a}、-S(O)R^{1a}、-S(O)₂R^{1a}、-S(O)₂NH₂、-S(O)₂NHR^{1a}或-S(O)₂N(R^{1a})R^{1b};

[0487] W为氢、卤素、氰基、C₆₋₁₄芳基、苄基、杂芳基、杂环基、-L-C₆₋₁₄芳基、-L-杂芳基、-L-杂环基、-L-OH、-L-OR^{1a}、-L-NH₂、-L-NHR^{1a}、-L-N(R^{1a})R^{1b}、-L-SR^{1a}、-L-S(O)R^{1a}、-L-S(O)₂R^{1a}、-L-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})、-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}、-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基、-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基、-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基、-O-L-N(R^{1a})R^{1b}、-O-L-C₆₋₁₄芳基、-O-L-杂芳基、-O-L-杂环基、-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}、-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基、-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基、-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基、-S-L-N(R^{1a})R^{1b}、-S-L-C₆₋₁₄芳基、-S-L-杂芳基、-S-L-杂环基、-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}、-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基、-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基、-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基、-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}、-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基、-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基、-

$C-(O)R^{1a}$ 、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR^{1a}$ 、 $-C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-NHR^{1a}$ 、 $N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-NHC(O)R^{1a}$ 、 $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$ 、 $-NHC(O)OR^{1a}$ 、 $-NR^{1a}C(O)OR^{1c}$ 、 $-NHC(O)NH_2$ 、 $-NHC(O)NHR^{1a}$ 、 $-NHC(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-NR^{1a}C(O)H_2$ 、 $-NR^{1c}C(O)NHR^{1a}$ 、 $-NR^{1c}C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-NHS(O)_2R^{1a}$ 、 $-NR^{1c}(O)_2R^{1a}$ 、 $-OR^{1a}$ 、 $-OC(O)R^{1a}$ 、 $-OC(O)OR^{1a}$ 、 $-OC(O)NH_2$ 、 $-OC(O)NHR^{1a}$ 、 $-OC(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-OS(O)_2R^{1a}$ 、 $-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})$ 、 $-SR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1a}$ 、 $-S(O)_2R^{1a}$ 、 $-S(O)_2NH_2$ 、 $-S(O)_2NHR^{1a}$ 、 $-S(O)_2N(R^{1a})R^{1b}$ 或 $-S(O)_2OR^{1a}$;

[0488] 每个L独立地为 C_{1-6} 亚烷基、 C_{2-6} 亚烯基、 C_{2-6} 亚炔基、 C_{3-7} 亚环烷基、 C_{6-14} 亚芳基、亚杂芳基、亚杂环基、 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-7} 亚环烷基或 C_{1-6} 亚烷基-亚杂环基;

[0489] R^6 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{6-14} 芳基、苄基、杂芳基、 $-C(O)R^{1a}$ 、 $-SR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1a}$ 、 $-S(O)_2R^{1a}$ 、 $-L-C_{6-14}$ 芳基、 $-L$ -杂芳基或 $-L$ -杂环基;

[0490] 每个n独立地是整数1、2、3、4或5;和

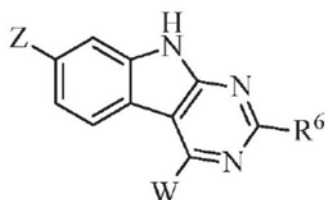
[0491] 每个 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 独立地是(i)氢;(ii) C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{6-14} 芳基、 C_{7-15} 芳烷基、杂芳基或杂环基;或(iii) R^{1a} 和 R^{1b} 与它们所连接的N原子一起形成杂环基;

[0492] 其中每个烷基、亚烷基、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、环烷基、亚环烷基、芳基、苄基、亚芳基、杂芳基、亚杂芳基、杂环基和亚杂环基任选地被一个或多个(在一个实施方案中,一个、两个、三个或四个)取代基Q取代,其中每个取代基Q独立地选自(a)氧代、氰基、卤素和硝基;(b) C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{6-14} 芳基、 C_{7-15} 芳烷基、杂芳基和杂环基,其各自进一步任选地被一个或多个(在一个实施方案中,一个、两个、三个或四个)取代基 Q^a 取代;和(c) $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-C(O)NR^bR^c$ 、 $-C(NR^a)NR^bR^c$ 、 $-OR^a$ 、 $-OC(O)R^a$ 、 $-OC(O)OR^a$ 、 $-OC(O)NR^bR^c$ 、 $-OC(=NR^a)NR^bR^c$ 、 $-OS(O)R^a$ 、 $-OS(O)_2R^a$ 、 $-OS(O)NR^bR^c$ 、 $-OS(O)_2NR^bR^c$ 、 $-NR^bR^c$ 、 $-NR^aC(O)R^d$ 、 $-NR^aC(O)OR^d$ 、 $-NR^aC(O)R^bR^c$ 、 $-NR^aC(=NR^d)NR^bR^c$ 、 $-NR^aS(O)R^d$ 、 $-NR^aS(O)_2R^d$ 、 $-NR^aS(O)R^bR^c$ 、 $-NR^aS(O)_2NR^bR^c$ 、 $-SR^a$ 、 $-S(O)R^a$ 、 $-S(O)_2R^a$ 、 $-S(O)NR^bR^c$ 和 $-S(O)_2NR^bR^c$,其中每个 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 独立地是(i)氢;(ii) C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{6-14} 芳基、 C_{7-15} 芳烷基、杂芳基或杂环基,其各自进一步任选地被一个或多个(在一个实施方案中,一个、两个、三个或四个)取代基 Q^a 取代;或(iii) R^b 和 R^c 与它们所连接的N原子一起形成杂环基,其进一步任选地被一个或多个(在一个实施方案中,1、2、3或4个)取代基 Q^a 取代;

[0493] 其中每个 Q^a 独立地选自(a)氧代、氰基、卤素和硝基;(b) C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{6-14} 芳基、 C_{7-15} 芳烷基、杂芳基和杂环基;和(c) $-C(O)R^e$ 、 $-C(O)OR^e$ 、 $-C(O)NR^fR^g$ 、 $-C(NR^e)NR^fR^g$ 、 $-OR^e$ 、 $-OC(O)R^e$ 、 $-OC(O)OR^e$ 、 $-OC(O)NR^fR^g$ 、 $-OC(=NR^e)NR^fR^g$ 、 $-OS(O)R^e$ 、 $-OS(O)_2R^e$ 、 $-OS(O)NR^fR^g$ 、 $-OS(O)_2NR^fR^g$ 、 $-NR^fR^g$ 、 $-NR^eC(O)R^h$ 、 $-NR^eC(O)OR^h$ 、 $-NR^eC(O)NR^fR^g$ 、 $-NR^eC(=NR^h)NR^fR^g$ 、 $-NR^eS(O)R^h$ 、 $-NR^eS(O)_2R^h$ 、 $-NR^eS(O)NR^fR^g$ 、 $-NR^eS(O)_2NR^fR^g$ 、 $-SR^e$ 、 $-S(O)R^e$ 、 $-S(O)_2R^e$ 、 $-S(O)NR^fR^g$ 和 $-S(O)_2R^fR^g$;其中每个 R^e 、 R^f 、 R^g 和 R^h 独立地是(i)氢;(ii) C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{6-14} 芳基、 C_{7-15} 芳烷基、杂芳基或杂环基;或(iii) R^f 和 R^g 与它们所连接的N原子一起形成杂环基。

[0494] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是式V的化合物:

[0495]



(V)

[0496] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体；或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药；其中 R^6 、W和Z各自如本文所定义。

[0497] 在一个实施方案中，在式IV或V中，

[0498] Z是氰基、杂芳基或 $-C(O)OR^{1a}$ ；

[0499] W为杂环基、-L-杂环基、-O-L-杂环基、 $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-(N(R^{1c})-L)_n$ -杂环基、 $-NHR^{1a}$ 或 $-N(R^{1a})R^{1b}$ ；

[0500] 每个L独立地为 C_{1-6} 亚烷基或 C_{3-7} 亚环烷基；

[0501] R^6 是氢、 C_{1-6} 烷基、苄基、 $-C(O)R^{1a}$ 、-L- C_{6-14} 芳基或-L-杂芳基；

[0502] 每个n独立地为1的整数；和

[0503] R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 各自如本文所定义；

[0504] 其中每个烷基、亚烷基、亚环烷基、芳基、苄基、杂芳基和杂环基任选地被一个或多个的如本文所定义的取代基Q取代。

[0505] 在另一个实施方案中，在式IV或V中，

[0506] Z为氰基、5-元杂芳基或 $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基；

[0507] W为杂环基、-L-杂环基、-O-L-杂环基、 $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-(N(R^{1c})-L)_n$ -杂环基、 $-NHR^{1a}$ 或 $-N(R^{1a})R^{1b}$ ；

[0508] 每个L独立地为 C_{1-6} 亚烷基或 C_{3-7} 亚环烷基；

[0509] R^6 是氢、甲基、苄基、-L- C_{6-14} 芳基或-L-杂芳基；

[0510] 每个n独立地为1的整数；和

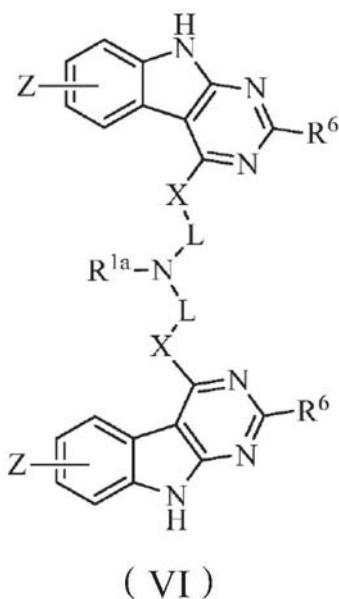
[0511] R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 各自如本文所定义；

[0512] 其中每个亚烷基、亚环烷基、芳基、苄基、杂芳基和杂环基任选地被一个或多个的如本文所定义的取代基Q取代。

[0513] 在一个实施方案中，在式IV或V中，W是 $-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-O-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-S-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 、 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 或 $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ ；和 R^6 、 R^{1a} 、 R^{1b} 、 R^{1c} 、L和Z各自如本文所定义。

[0514] 在又一个实施方案中，干细胞动员化合物是式VI的化合物：

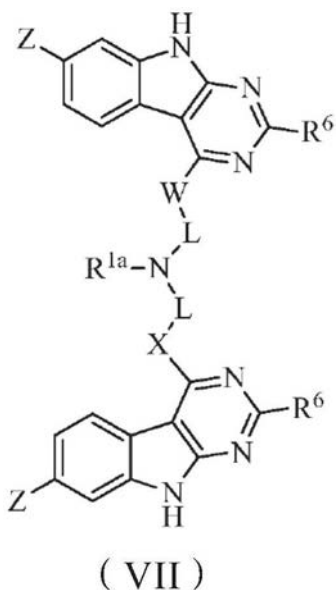
[0515]



[0516] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体；或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药；其中X是键、O、S或R^{1c}；和R^{1a}、R^{1c}、R⁶、L和Z各自如本文所定义。

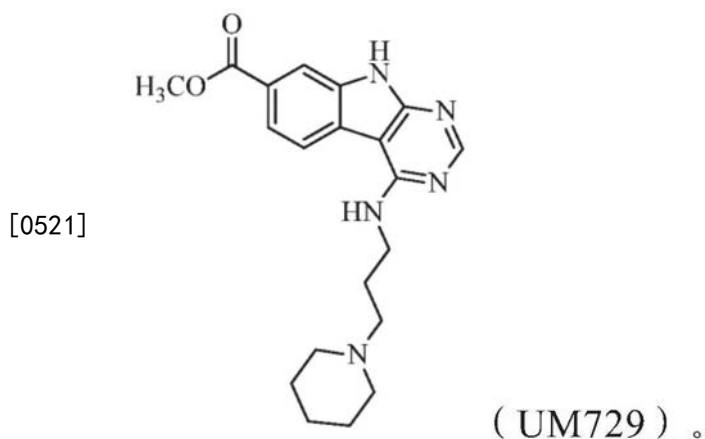
[0517] 在又一个实施方案中，干细胞动员化合物是式VII的化合物：

[0518]

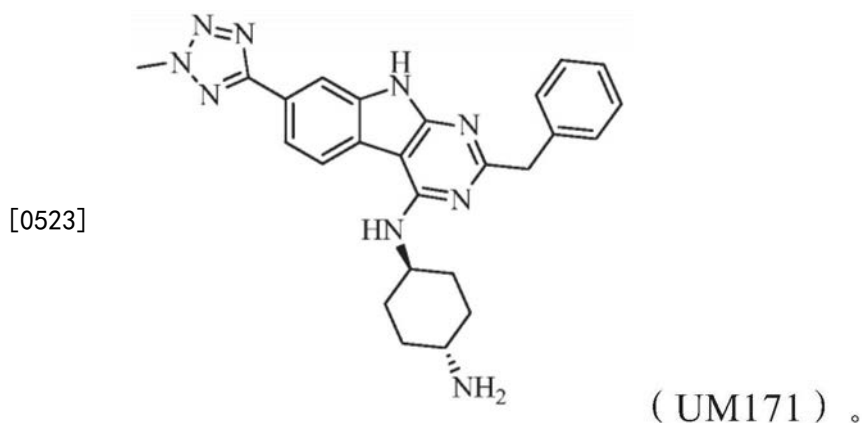


[0519] 或其对映异构体、对映异构体的混合物、两种或更多种非对映异构体的混合物或同位素变体；或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药；其中R^{1a}、R⁶、L、X和Z各自如本文所定义。

[0520] 在又一个实施方案中，干细胞动员化合物是具有以下结构的化合物：



[0522] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是具有以下结构的化合物:



[0524] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是白藜芦醇、四亚乙基五胺 (TEPA)、 α -萘黄酮、3'-甲氧基-4'-硝基黄酮、3,4-二甲氧基黄酮、4',5,7-三羟基黄酮 (芹菜素)、6-甲基-1,3,8-三氯二苯并呋喃、表没食子儿茶素或表没食子儿茶素没食子酸酯。

[0525] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是白藜芦醇。在某些实施方案中,干细胞动员化合物是 (Z)-白藜芦醇。在某些实施方案中,干细胞动员化合物是 (E)-白藜芦醇。

[0526] 在又一个实施方案中,干细胞动员化合物是四亚乙基五胺 (TEPA)。

[0527] 本文所述的所有化合物可商购获得或可根据本文公开的专利或专利公开中描述的方法制备。此外,可以使用已知的拆分剂或手性柱以及其他标准的合成有机化学技术来不对称地合成或拆分光学纯的化合物。关于干细胞动员化合物、它们的制备和使用的其他信息可以在例如美国专利申请公开号2010/0183564、2014/0023626和2014/0114070;以及 Kim等, Mol. Pharmacol, 2006, 69, 1871-1878中找到;其中每一个的公开内容通过引用整体并入本文。

[0528] 本文提供的式 (例如,式I至VII) 中的基团或变量 G^1 、 G^2 、 G^3 、 G^4 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^{5a} 、 R^{5b} 、 R^{5c} 、 R^6 、X、L、 L^1 、X、W、Z和n在本文所述的实施方案中进一步定义。在此提供的用于这样的组和/或变量的实施方案的所有组合都在本公开的范围內。

[0529] 在某些实施方案中, G^1 是N。在某些实施方案中, G^1 是 CR^3 ,其中 R^3 如本文所定义。在某些实施方案中, G^1 是CH。

[0530] 在某些实施方案中, G^2 是N。在某些实施方案中, G^2 是CH。

[0531] 在某些实施方案中, G^3 是N。在某些实施方案中, G^3 是CH。

[0532] 在某些实施方案中, G^4 是 N。在某些实施方案中, G^4 是 CH。

[0533] 在某些实施方案中, R^1 是氢。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的苯基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的呋喃基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的吡咯基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的咪唑基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的噻吩基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的噻唑基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的吡啶基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的嘧啶基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的吡咯烷基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的吡嗪基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的哒嗪基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的苯并咪唑基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的异喹啉基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的咪唑并吡啶基。在某些实施方案中, R^1 是如本文所述任选地被取代的苯并噻吩基。

[0534] 在某些实施方案中, R^2 是 $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$, 其中 R^{1a} 和 R^{1c} 各自如本文所定义。在某些实施方案中, R^2 为 $-NR^{1c}C(O)NR^{1a}R^{1b}$, 其中 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 各自如本文所定义。在某些实施方案中, R^2 是 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$, 其中 R^{1a} 和 R^{1b} 各自如本文所定义。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的苯基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的吡咯并吡啶-3-基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的吡啶基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的噻吩基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的吡啶基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的 1,2,4-三唑基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的 2-氧代咪唑烷基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的吡唑基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的 2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并咪唑基。在某些实施方案中, R^2 是如本文所述任选地被取代的吡唑基。

[0535] 在某些实施方案中, R^3 是氢。在某些实施方案中, R^3 是任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施方案中, R^3 为联苯基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。

[0536] 在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的 C_{1-10} 烷基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的丙-1-烯-2-基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的环己基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的环丙基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的 2-(2-氧代吡咯烷-1-基) 乙基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的氧杂环丁烷-3-基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的二苯甲基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的四氢-2H-吡喃-3-基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的四氢-2H-吡喃-4-基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的苯基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的四氢呋喃-3-基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的苄基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的 (4-戊基苯基) (苯基) 甲基。在某些实施方案中, R^4 是如本文所述任选地被取代的 1-(1-(2-氧代-6,9,12-三氧杂-3-氮杂十四烷-14-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基) 乙基。

[0537] 在某些实施方案中, L^1 是 $-NR^{1a}-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是-

$\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_{1-3}-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3)\text{CH}_2-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{1c}-$, 其中 R^{1a} 和 R^{1c} 各自如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_2\text{S}-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, L^1 是 $-\text{NR}^{1a}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。

[0538] 在某些实施方案中, R^{5a} 是氢。在某些实施方案中, R^{5a} 是氰基。在某些实施方案中, R^{5a} 是甲基。在某些实施方案中, R^{5a} 是卤素。在某些实施方案中, R^{5a} 是氟、氯或溴。在某些实施方案中, R^{5a} 是三氟甲基。在某些实施方案中, R^{5a} 是 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 。

[0539] 在某些实施方案中, R^{5b} 是氢。在某些实施方案中, R^{5b} 是氰基。在某些实施方案中, R^{5b} 是甲基。在某些实施方案中, R^{5b} 是卤素。在某些实施方案中, R^{5b} 是氟、氯或溴。在某些实施方案中, R^{5b} 是三氟甲基。在某些实施方案中, R^{5b} 是 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 。

[0540] 在某些实施方案中, R^{5c} 是氢。在某些实施方案中, R^{5c} 是氰基。在某些实施方案中, R^{5c} 是甲基。在某些实施方案中, R^{5c} 是卤素。在某些实施方案中, R^{5c} 是氟、氯或溴。在某些实施方案中, R^{5c} 是三氟甲基。在某些实施方案中, R^{5c} 是 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 。

[0541] 在某些实施方案中, L 为 C_{1-6} 亚烷基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 是亚乙基、亚丙基或亚丁基, 各自任选地被一个或多个的如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为 C_{2-6} 亚烯基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 是 C_{2-6} 亚炔基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为 C_{3-7} 亚环烷基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 是亚环己基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为 C_{6-14} 亚芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为亚杂芳基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 是亚杂环基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为 C_{1-6} 亚烷基- C_{3-7} 亚环烷基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, L 为 C_{1-6} 亚烷基-亚杂环基, 任选地被一个或多个的如本文所述的取代基 Q 取代。

[0542] 在某些实施方案中, R^6 是氢。在某些实施方案中, R^6 是 C_{1-6} 烷基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, R^6 是甲基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, R^6 是 C_{6-14} 芳基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, R^6 是苄基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, R^6 是杂芳基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{1a}$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{SR}^{1a}$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{1a}$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^{1a}$, 其中 R^{1a} 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{L}-\text{C}_{6-14}$ 芳基, 其中 L 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是 $-\text{L}$ -杂芳基, 其中 L 如本文所定义。在某些实施方案中, R^6 是或 $-\text{L}$ -杂环基, 其中 L 如本文所定义。

[0543] 在某些实施方案中, W 是氢。在某些实施方案中, W 是卤素。在某些实施方案中, W 是氰基。在某些实施方案中, W 为 C_{6-14} 芳基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某些实施方案中, W 为苄基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基 Q 取代。在某

些实施方案中, W为杂芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中, W为杂环基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。

[0544] 在某些实施方案中, W为-L-C₆₋₁₄芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W是-L-杂芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-L-杂环基, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-OH, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W是-L-OR^{1a}, 其中R^{1a}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-NH₂, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-NHR^{1a}, 其中R^{1a}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-SR^{1a}, 其中R^{1a}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-S(O)R^{1a}, 其中R^{1a}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-L-S(O)₂R^{1a}, 其中R^{1a}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W是-L-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c}), 其中R^{1a}、R^{1c}和L各自如本文所定义。

[0545] 在某些实施方案中, W为-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。

[0546] 在某些实施方案中, W为-O-L-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-O-L-C₆₋₁₄芳基, 其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-O-L-杂芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-O-L-杂环基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。

[0547] 在某些实施方案中, W是-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。

[0548] 在某些实施方案中, W为-S-L-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}和L各自如本文所定义。在某些实施方案中, W为-S-L-C₆₋₁₄芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-S-L-杂芳基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。在某些实施方案中, W为-S-L-杂环基, 任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代, 其中L如本文所定义。

[0549] 在某些实施方案中, W为-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, 其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中, W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基, 其中R^{1c}、L和n各自如

本文所定义。在某些实施方案中，W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基，其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。

[0550] 在某些实施方案中，W是-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}、R^{1b}、R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄芳基，其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-(N(R^{1c})-L)_n-杂芳基，其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的-(N(R^{1c})-L)_n-杂环基，其中R^{1c}、L和n各自如本文所定义。

[0551] 在某些实施方案中，W为-C(O)R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-C(O)OR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-C(O)NH₂。在某些实施方案中，W是-C(O)NHR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-C(O)N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHC(O)R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NR^{1a}C(O)R^{1c}，其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHC(O)OR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NR^{1a}C(O)OR^{1c}，其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHC(O)NH₂。在某些实施方案中，W是-NHC(O)NHR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHC(O)N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NR^{1a}C(O)NH₂，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-R^{1c}(O)NHR^{1a}，其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W为-NR^{1c}C(O)N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}、R^{1b}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NHS(O)₂R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-NR^{1c}S(O)₂R^{1a}，其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-OR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-OC(O)R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-OC(O)OR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-OC(O)NH₂。在某些实施方案中，W是-OC(O)NHR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-OC(O)N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W为-OS(O)₂R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})，其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-SR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-S(O)R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-S(O)₂R^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-S(O)₂NH₂。在某些实施方案中，W是-S(O)₂NHR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中，W是-S(O)₂N(R^{1a})R^{1b}，其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中，W是-S(O)₂QR^{1a}，其中R^{1a}如本文所定义。

[0552] 在某些实施方案中，Z是氰基。在某些实施方案中，Z为C₁₋₆烷基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z为C₂₋₆烯基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z为C₂₋₆炔基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z为C₃₋₁₀环烷基，任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z为C₆₋₁₄芳基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z是C₇₋₁₅芳烷基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z是苄基，其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中，Z为杂芳基，任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某

些实施方案中,Z为任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代的5元杂芳基。在某些实施方案中,Z是四唑基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中,Z为1,2,4-噁二唑基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中,Z为杂环基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代。在某些实施方案中,Z为-L-C₆₋₁₄芳基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代,其中L如本文所定义。在某些实施方案中,Z为-L-杂芳基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代,其中L如本文所定义。在某些实施方案中,Z为-L-杂环基,其任选地被一个或多个如本文所述的取代基Q取代,其中L如本文所定义。

[0553] 在某些实施方案中,Z是-C(O)R^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-C(O)OR^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z为-C(O)OC₁₋₆烷基,其中所述烷基任选地被一个或多个如本文所定义的取代基Q取代。在某些实施方案中,Z是-C(O)OCH₃。在某些实施方案中,Z是-C(O)NHR^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-C(O)N(R^{1a})R^{1b},其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c}),其中R^{1a}和R^{1c}各自如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-SR^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-S(O)R^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-S(O)₂R^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-S(O)₂NH₂。在某些实施方案中,Z是-S(O)₂NHR^{1a},其中R^{1a}如本文所定义。在某些实施方案中,Z是-S(O)₂N(R^{1a})R^{1b},其中R^{1a}和R^{1b}各自如本文所定义。

[0554] 在某些实施方案中,X是键。在某些实施方案中,X是O。在某些实施方案中,X是S。在某些实施方案中,X是NR^{1c},其中R^{1c}如本文所定义。

[0555] 在某些实施方案中,n是1。在某些实施方案中,n是2。在某些实施方案中,n是3。在某些实施方案中,n是4。在某些实施方案中,n是5。

[0556] 在某些实施方案中,本文提供的化合物显示出作为AHR的拮抗剂的活性。

[0557] 本文提供的化合物可以是对映体纯的,例如单一对映异构体或单一非对映异构体,或者可以是立体异构混合物,例如对映异构体的混合物,例如两种对映异构体的外消旋混合物;或两种或更多种非对映异构体的混合物。因此,本领域技术人员将认识到,对于经历体内差向异构化的化合物,其(R)形式的化合物的施用等同于施用其(S)形式的化合物。用于制备/分离单个对映异构体的常规技术包括从合适的光学纯前体合成,从手性原料不对称合成或拆分对映异构体混合物,例如手性色谱法、重结晶、拆分、非对映异构盐形成或衍生成非对映体加合物和然后分离。

[0558] 5.4.NK细胞的分离

[0559] 分离自然杀伤细胞的方法是本领域已知的,且可以用于分离自然杀伤细胞,例如使用本文描述的三阶段方法产生的NK细胞。例如,在一个实施方案中,NK细胞可以例如通过使用抗CD56和CD3的抗体染色细胞,并选择CD56⁺CD3⁻细胞分离或富集。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,NK细胞是CD56⁺CD3⁻细胞富集的。可以使用市售试剂盒,例如NK细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec),分离NK细胞,例如使用本文描述的三阶段方法产生的细胞。也可通过移除包含NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的细胞)的细胞群体中NK细胞以外的细胞来分离或富集NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的细胞)。例如,NK细胞(例如使用本文描述的三阶段方法产生的细胞)可以通过使用例如针对CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD123、HLA DR和/或CD235a(血型

糖蛋白A)中的一种或多种的抗体来耗尽显示非NK细胞标志物的细胞而分离或富集。可以使用市售的试剂盒例如,NK细胞阴性分离试剂盒(Dynal Biotech)进行阴性分离。可以另外分选通过这些方法分离的细胞,例如,以分离CD11a⁺和CD11a⁻细胞和/或CD117⁺和CD117⁻细胞,和/或CD16⁺和CD16⁻细胞,和/或CD94⁺和CD94⁻。在某些实施方案中,细胞(例如通过本文描述的三步法产生的细胞)被分选以分离CD11a⁺和CD11a⁻细胞。在具体的实施方案中,分离CD11a⁺细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD11a⁺细胞富集的。在具体的实施方案中,分离CD11a⁻细胞。在某些实施方案中,与使用本文所述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD11a⁻细胞富集的。在某些实施方案中,分选细胞以分离CD117⁺和CD117⁻细胞。在具体的实施方案中,分离CD117⁺细胞。在某些实施方案中,与使用本文所述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD117⁺细胞富集的。在具体的实施方案中,分离CD117⁻细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD117⁻细胞富集的。在某些实施方案中,细胞被分选以分离CD16⁺和CD16⁻细胞。在具体实施方案中,分离CD16⁺细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD16⁺细胞富集的。在具体的实施方案中,分离CD16⁻细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD16⁻细胞富集的。在某些实施方案中,细胞被分选以分离CD94⁺和CD94⁻细胞。在具体实施方案中,分离CD94⁺细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD94⁺细胞富集的。在具体的实施方案中,分离CD94⁻细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,细胞是CD94⁻细胞富集的。在某些实施方案中,使用磁性分离进行分离。在某些实施方案中,使用流式细胞术进行分离。

[0560] 分离ILC3细胞的方法是本领域已知的,且可以用于分离ILC3细胞,例如使用本文描述的三阶段方法产生的ILC3细胞。例如,ILC3细胞可以被分离或富集,例如在一个实施方案中通过用针对CD56、CD3和CD11a的抗体染色细胞并选择CD56⁺CD3⁻CD11a⁻细胞来分离或富集。也可通过移除包含ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的细胞)的细胞群体中ILC3细胞以外的细胞来分离或富集ILC3细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的细胞。例如,使用例如针对CD3、CD4、CD11a、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD94、CD123、ULA DR和/或CD235a(血型糖蛋白A)中的一种或多种的抗体,可以通过耗尽显示非ILC3细胞标志物的细胞来分离或富集ILC3细胞,例如使用本文描述的三阶段方法产生的细胞。通过这些方法分离的细胞可以另外被分选,例如以分离CD117⁺和CD117⁻细胞。NK细胞可以被分离或富集,例如在一个实施方案中通过用针对CD56、CD3、CD94和CD11a的抗体染色细胞,并选择CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺细胞来分离或富集。还可以通过除去包含NK细胞(例如,使用本文描述的三阶段方法产生的细胞)的细胞群体中除NK细胞以外的细胞来分离或富集NK细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的细胞。在某些实施方案中,与使用本文所述的三阶段方法产生的总细胞相比,NK细胞是CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺细胞富集的。

[0561] 在一个实施方案中,通过选择CD56⁺CD3⁻CD11a⁻细胞来分离或富集ILC3细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,ILC3细胞是CD56⁺CD3⁻CD11a⁻细胞富集的。在一个实施方案中,通过选择CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺细胞来分离或富集ILC3细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,ILC3细胞是CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺细胞富集的。在一个实施方案中,通过选择CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺

CDIL1R1⁺细胞来分离或富集ILC3细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,ILC3细胞是CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺CDIL1R1⁺细胞富集的。

[0562] 在一个实施方案中,通过选择CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺细胞来分离或富集NK细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,NK细胞是CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺细胞富集的。在一个实施方案中,通过选择CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺CD117⁻分离或富集NK细胞。在某些实施方案中,与使用本文描述的三阶段方法产生的总细胞相比,NK细胞是CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺CD117⁻细胞富集的。

[0563] 细胞分离可以通过例如流式细胞术、荧光激活细胞分选 (FACS) 来完成,或者在一个实施方案中,使用与特异性抗体偶联的微珠的磁性细胞分选来完成。例如,可以使用磁性激活细胞分选 (MACS) 技术来分离细胞,MACS技术是基于其结合包含一种或多种特异性抗体(例如,抗CD56抗体)的磁珠(例如,约0.5-100 μ m直径)的能力来分离颗粒的方法。磁性细胞分离可以使用例如AUTOMACS™分离器(Miltenyi)执行和自动化。可以在磁性微球上进行各种有用的修饰,其中包括共价添加特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。然后将珠与细胞混合以使其结合。然后使细胞通过磁场以分离出具有特定细胞表面标志物的细胞。在一个实施方案中,然后将这些细胞分离并与偶联于针对另外的细胞表面标志物的抗体的磁珠重新混合。细胞再次通过磁场,从而分离结合两种抗体的细胞。然后将这些细胞稀释到单独的培养皿中,例如用于克隆分离的微量滴定盘。

[0564] 5.5. 胎盘灌流液

[0565] NK细胞和/或ILC3细胞,例如根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体,可以从造血细胞产生,例如来自任何来源(例如,胎盘组织、胎盘灌流液、脐带血、胎盘血、外周血、脾脏、肝脏等)的造血干细胞或祖细胞。在某些实施方案中,造血干细胞是来自胎盘灌流液和来自用于产生胎盘灌流液的相同胎盘的脐带血的组合造血干细胞。包含胎盘灌流液细胞的胎盘灌流液可通过,例如,第7,045,148号和第7,468,276号美国专利以及美国专利申请公开号2009/0104164中公开的方法获得,其公开内容在此通过引用整体并入。

[0566] 5.5.1. 细胞收集组合物

[0567] 可以从其分离造血干细胞或祖细胞的或可用于肿瘤抑制或治疗具有肿瘤细胞、癌症或病毒感染的个体(例如与NK细胞和/或ILC3细胞(例如根据本文提供的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体)组合)的胎盘灌流液和灌流液细胞可以通过使用胎盘细胞收集组合物灌注哺乳动物(例如人类)产后胎盘来收集。可通过用任何生理上可接受的溶液(例如盐溶液、培养基或更复杂的细胞收集组合物)灌注胎盘来从胎盘收集灌流液。在美国申请公开号2007/0190042中详细描述了适合于灌注胎盘并收集和保存灌流液细胞的细胞收集组合物,其通过引用整体并入本文。

[0568] 细胞收集组合物可以包含适合于干细胞的收集和/或培养的任何生理上可接受的溶液,例如盐溶液(例如磷酸盐缓冲盐水、Kreb's溶液、改进的Kreb's溶液、Eagle's溶液、0.9%NaCl等)、培养基(例如,DMEM、H.DMEM等)等等。

[0569] 该细胞收集组合物可以包含倾向于保存胎盘细胞,即从收集时间到培养时间,防止胎盘细胞死亡或延迟胎盘细胞死亡,减少死亡的细胞群体中胎盘细胞的数量的一种或多种组分。这样的组分可以是,例如细胞凋亡抑制剂(例如,半胱天冬酶抑制剂或JNK抑制剂);

血管扩张剂(例如,硫酸镁、抗高血压药、心钠素(AMP)、促肾上腺皮质激素、肾上腺皮质激素释放激素、硝普钠、胍苯哒嗪、三磷酸腺苷、腺苷、吡咯美辛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等);坏死抑制剂(例如,2-(1H-吡啶-3-基)-3-戊基氨基-马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐酸或氯硝西泮);TNF- α 抑制剂;和/或载氧的全氟化碳(例如,全氟辛基溴、全氟癸基溴等)。

[0570] 细胞收集组合物可包含一种或多种组织降解酶,例如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、透明质酸酶、RNA酶或DNA酶等。这样的酶包括但不限于胶原酶(例如,胶原酶I、II、III或IV,来自溶组织梭菌的胶原酶等);分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE,透明质酸酶等。

[0571] 细胞收集组合物可以包含杀菌或抑菌有效量的抗生素。在某些非限制性实施方案中,抗生素是大环内酯(例如,妥布霉素)、头孢菌素(例如,头孢氨苄、头孢拉定、头孢呋辛、头孢罗齐、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉霉素、红霉素、青霉素(例如,青霉素V)或喹诺酮(例如,氧氟沙星、环丙沙星或诺氟沙星)、四环素、链霉素等。在特定的实施方案中,抗生素对革兰氏阳性菌(+)和/或革兰氏阴性菌(-)(例如铜绿假单胞菌,金黄色葡萄球菌等)是活性的。

[0572] 细胞收集组合物还可以包含一种或多种下列化合物:腺苷(约1mM至约50mM);D-葡萄糖(约20mM至约100mM);镁离子(约1mM至约50mM);分子量大于20,000道尔顿的大分子,在一个实施方案中,以足以维持内皮完整性和细胞活力的量存在(例如,合成或天然存在的胶体、多糖如葡聚糖或聚乙二醇,以约25g/l至约100g/l,或约40g/l至约60g/l存在);抗氧化剂(例如,以约25 μ M至约100 μ M存在的丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素C或维生素E);还原剂(例如,以约0.1mM至约5mM存在的N-乙酰半胱氨酸);防止钙进入细胞的试剂(例如,维拉帕米以约2 μ M至约25 μ M存在);硝酸甘油(例如,约0.05g/L至约0.2g/L);抗凝剂,在一个实施方案中,其存在量足以帮助防止残余血液凝结(例如,以约1000单位/l至约100,000单位/l的浓度存在的肝素或水蛭素);或含阿米洛利的化合物(例如,以约1.0 μ M至约5 μ M存在的阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、六亚甲基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利)。

[0573] 5.5.2. 胎盘的采集和处理

[0574] 一般来说,人胎盘在出生分娩后不久被回收。在一个实施方案中,在知情同意后和在取得患者完整病历和与胎盘相关联之后从患者回收胎盘。在一个实施方案中,病史在分娩后继续。

[0575] 在回收灌流液之前,除去脐带血和胎盘血。在某些实施方案中,在分娩后,胎盘中的脐带血被回收。胎盘可以接受常规脐带血回收过程。典型地,使用针或套管借助重力使胎盘放血(参见,例如Anderson,第5,372,581号美国专利;Hessel等,第5,415,665号美国专利)。通常将针或套管放置在脐静脉中,和胎盘可以轻轻地按摩以帮助从胎盘排出脐带血。这种脐带血回收可以在商业上进行,例如LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell。在一个实施方案中,胎盘在没有进一步操作的情况下通过重力排出以最小化脐带血回收期间的组织破坏。

[0576] 通常,将胎盘从分娩室或产房运送到另一位置,例如实验室,以回收脐带血和收集灌流液。胎盘可以在无菌的、绝热的运输装置(将胎盘的温度保持在20-28 $^{\circ}$ C之间)中运输,例如通过将带有夹紧的近端脐带的胎盘置于无菌拉链锁塑料袋中,该塑料袋然后放入绝热

容器中。在另一个实施方案中,基本上如美国专利号7,147,626中所述,胎盘在脐带血采集试剂盒中运输。在一个实施方案中,胎盘在分娩后四至二十四小时输送至实验室。在某些实施方案中,在脐带血回收之前,将近侧脐带夹紧,例如胎盘中插入的4-5cm(厘米)内。在其他实施方案中,在脐带血回收之后但在胎盘进一步处理之前,夹紧近侧脐带。

[0577] 在收集灌流液之前,胎盘可以在无菌条件下和在室温下或在5至25℃(摄氏度)的温度下储存。胎盘可以储存超过四十八小时的时间,或者在灌注胎盘以除去任何残留脐带血之前储存四至二十四小时的时间。胎盘可以在5℃至25℃(摄氏)的温度下储存在抗凝血剂溶液中。适合的抗凝血剂溶液在本领域中是众所周知的。例如,可以使用肝素或华法林钠的溶液。在一个实施方案中,抗凝剂溶液包含肝素溶液(例如,在1:1000溶液中1%w/w)。在一些实施方案中,在收集胎盘灌流液之前,放血的胎盘储存不超过36小时。

[0578] 5.5.3. 胎盘灌注

[0579] 灌注哺乳动物胎盘和获得胎盘灌流液的方法公开于,例如Hariri,美国专利号7,045,148和7,255,879以及美国专利申请公开号2009/0104164、2007/0190042和20070275362(以美国专利号8,057,788授权)这些的公开内容在此全部引入作为参考。

[0580] 可以通过使灌注溶液(例如上述盐水溶液、培养基或细胞收集组合)通过胎盘脉管系统来获得灌流液。在一个实施方案中,通过使灌注溶液通过脐动脉和脐静脉中任一者或两者来灌注哺乳动物胎盘。灌注溶液通过胎盘的流动可以使用例如重力流入胎盘来完成。例如,使用泵(例如,蠕动泵)将灌注溶液强制通过胎盘。例如可以用连接至无菌连接设备(例如,无菌管)的套管(例如TEFLON®或塑料套管)向脐静脉进行插管。无菌连接装置连接到灌注歧管。

[0581] 在准备灌注时,胎盘可以以脐动脉和脐静脉位于胎盘的最高点的方式定位。可通过使灌注溶液通过胎盘脉管系统或通过胎盘脉管系统和周围组织来灌注胎盘。在一个实施方案中,脐动脉和脐静脉同时连接到移液管,移液管经由柔性连接器连接到灌注溶液的储器。灌流液通入脐静脉和动脉。灌注溶液从血管壁流出和/或穿过血管壁进入胎盘的周围组织,和从妊娠期间附着于母体子宫的胎盘表面收集在合适的开放容器中。灌注溶液也可以通过脐带开口引入,并允许流出或渗出与母体子宫壁接合的胎盘壁中的开口。在另一个实施方案中,灌注溶液通过脐静脉并从脐动脉采集,或通过脐动脉并从脐静脉采集,即仅通过胎盘脉管系统(胎儿组织)。

[0582] 在一个实施方案中,例如,脐动脉和脐静脉同时连接到,例如通过柔性连接器连接到灌注溶液的储存器的移液管。灌流溶液通入脐静脉和动脉。灌注溶液从血管壁流出和/或穿过血管壁进入胎盘的周围组织,和从妊娠期间附着于母体子宫的胎盘表面收集在合适的开放容器中。灌注溶液也可以通过脐带开口引入,并允许流出或渗出与母体子宫壁接合的胎盘壁中的开口。通过这种方法,其可以称为“淘洗(pan)”方法,收集的胎盘细胞通常是胎儿和母体细胞的混合物。

[0583] 在另一个实施方案中,使灌注溶液通过脐静脉并从脐动脉采集,或通过脐动脉并从脐静脉采集。通过这种方法,其可以被称为“闭路”方法,收集的胎盘细胞通常几乎都是胎儿的。

[0584] 在一个实施方案中,闭路灌注方法可以如下进行。产后约48小时内获得产后胎盘。脐带被夹紧并在夹钳上方剪断。脐带可以被丢弃,或者可以被处理以回收例如脐带干细胞,

和/或处理脐带膜用于生产生物材料。羊膜可以在灌注期间保留,或者可以从绒毛膜分离,例如使用手指钝性分离。如果羊膜在灌注之前与绒毛膜分离,则它可以例如丢弃或加工,例如通过酶消化以获得干细胞,或者产生例如羊膜生物材料,例如在美国申请公开号2004/0048796中所述的生物材料。在例如使用无菌纱布清洁胎盘的所有可见的血块和残余血液之后,例如通过部分切割脐带膜以暴露脐带的横截面来暴露脐带血管。例如通过推进闭合的鳄鱼夹通过各个血管的切割端来确定和打开血管。然后将器械(例如,连接到灌注装置或蠕动泵的塑料管)插入每个胎盘动脉中。该泵可以是任何适用于该目的的泵,例如,蠕动泵。然后将连接到无菌收集储器(例如血液袋,诸如250mL的收集袋)的塑料管插入胎盘静脉中。或者,将连接到泵的管插入胎盘静脉中,并将通到收集储存器的管插入一个或两个胎盘动脉中。然后用一定体积的灌注溶液(例如,约750ml灌注溶液)灌注胎盘。然后收集灌流液中的细胞,例如通过离心。

[0585] 在一个实施方案中,近端脐带在灌注期间被夹紧,和更具体地,可以在脐带插入胎盘中的4-5cm(厘米)内被夹紧。

[0586] 在放血过程中从哺乳动物胎盘第一次收集的灌流液通常被脐带血和/或胎盘血的残余红血细胞着色。随着灌注的进行,灌流液变得更加无色,和残留的脐带血细胞从胎盘中被冲走。通常30至100mL的灌流液足以初始从胎盘冲洗血液,但根据观察的结果,可以使用更多或更少的灌流液。

[0587] 在某些实施方案中,在灌注之前(例如,通过重力引流)将脐带血从胎盘移除,但胎盘未用溶液冲洗(例如,灌注)以移除残余血液。在某些实施方案中,在灌注之前(例如,通过重力引流)将脐带血从胎盘移除,和用溶液冲洗(例如,灌注)胎盘以去除残余血液。

[0588] 用于灌注胎盘的灌流液的量可以根据要采集的胎盘细胞的数量、胎盘的尺寸、待从单个胎盘进行的采集的次数等而变化。在各种实施方案中,灌流液体的量可为50mL至5000mL、50mL至4000mL、50mL至3000mL、100mL至2000mL、250mL至2000mL、500mL至2000mL或750mL至2000mL。通常,放血后,用700-800mL灌流液灌注胎盘。

[0589] 胎盘可以在数小时或数天的时间内灌注多次。在胎盘多次灌注的情况下,可将其在无菌条件下维持或培养于容器或其他合适的器皿中,并用细胞收集组合物灌注或用标准灌注溶液(例如,生理盐水溶液,例如磷酸盐缓冲盐水(“PBS”),其具有或不具有抗凝剂(例如,肝素、华法林钠、香豆素、双羟基香豆素)和/或含或不含抗微生物剂(例如, β -巯基乙醇(0.1mM));抗生素例如链霉素(例如40-100 μ g/ml)、青霉素(例如40U/ml)、两性霉素B(例如0.5 μ g/ml))灌注。在一个实施方案中,将分离的胎盘维持或培养一段时间而不收集灌流液,使得在灌注和收集灌流液之前,所述胎盘维持或培养1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时,或者2或3天或更多天。可以维持灌注的胎盘一个或多个的额外的时间,例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或更多小时,并用例如700-800mL灌流液灌注第二次。胎盘可被灌注1、2、3、4、5或更多次,例如每1、2、3、4、5或6小时一次。在一个实施方案中,重复胎盘的灌注和灌注溶液(例如,胎盘细胞收集组合物)的收集,直到回收的有核细胞的数量降至100个细胞/ml以下。不同时间点的灌流液可以进一步单独处理以回收时间依赖性的细胞群体,例如总有核细胞。也可以合并不同时间点的灌流液。

[0590] 5.5.4. 胎盘灌流液和胎盘灌流液细胞

[0591] 通常,来自单一胎盘灌注的胎盘灌流液包含约1亿至约5亿个有核细胞,包括造血细胞,其中可以通过本文公开的方法从该造血细胞产生NK细胞和/或ILC3细胞(例如,根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞)。在某些实施方案中,胎盘灌流液或灌流液细胞包含CD34⁺细胞,例如造血干细胞或祖细胞。在更具体的实施方案中,这样的细胞可以包含CD34⁺CD45⁻干细胞或祖细胞、CD34⁺CD45⁺干细胞或祖细胞等。在某些实施方案中,在从其分离造血细胞之前,灌流液或灌流液细胞被冷冻保存。在某些其他实施方案中,胎盘灌流液包含或灌流液细胞仅包含胎儿细胞或胎儿细胞与母体细胞的组合。

[0592] 5.6.NK细胞

[0593] 5.6.1.通过三阶段方法产生的NK细胞

[0594] 在另一个实施方案中,本文提供了分离的NK细胞群体,其中所述NK细胞根据上述三阶段方法产生。

[0595] 在一个实施方案中,本文提供的是通过本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体,其中所述NK细胞群体包含比通过本文所述的三阶段方法产生的NK祖细胞群体(例如,用相同的三阶段方法产生的NK祖细胞群体,除了用于产生NK祖细胞群体的第三培养步骤比用于产生NK细胞群体的第三培养步骤的持续时间短)更大百分比的CD3⁻CD56⁺细胞。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞群体包含约70%或更多(在一些实施方案中,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的CD3⁻CD56⁺细胞。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞群体包含不少于80%、85%、90%、95%、98%或99%的CD3⁻CD56⁺细胞。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞群体包含70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%或95%-99%之间的CD3⁻CD56⁺细胞。

[0596] 在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是NKp46⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD16⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD16⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD94⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD94⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD11a⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是NKp30⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD161⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是DNAM-1⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述NK细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是T-bet⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。

[0597] 在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含为CD117⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含为NKG2D⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含为NKp44⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含为CD244⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含表达穿孔素的细胞。在一个实施方案中,通过本文描述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含表达EOMES的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含表达粒酶B的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体包含分泌

IFN γ 、GM-CSF和/或TNF α 的细胞。

[0598] 5.7. ILC3细胞

[0599] 5.7.1. 三阶段方法产生的ILC3细胞

[0600] 在另一个实施方案中,本文提供了分离的ILC3细胞群体,其中所述ILC3细胞根据上述三阶段方法产生。

[0601] 在一个实施方案中,本文提供了通过本文所述的三阶段方法产生的分离的ILC3细胞群体,其中所述ILC3细胞群体包含比由三阶段方法产生的ILC3祖细胞群体(例如通过相同的三阶段方法产生的ILC3祖细胞群体,不同之处在于用于产生ILC3祖细胞群体的第三培养步骤的持续时间比用于产生ILC3细胞群体的第三培养步骤的持续时间短)更高百分比的CD3⁻CD56⁺细胞。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞群体包含约70%或更多(在一些实施方案中,75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的CD3⁻CD56⁺细胞。在另一个具体实施方案中,所述ILC3细胞群体包含不少于80%、85%、90%、95%、98%或99%的CD3⁻CD56⁺细胞。在另一具体实施方案中,所述ILC3细胞群体包含70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%或95%-99%的CD3⁻CD56⁺细胞。

[0602] 在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是NKp46⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD16⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是IL1R1⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD94⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是ROR γ t⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是CD11a⁻的CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述ILC3细胞群体中的所述CD3⁻CD56⁺细胞包含另外是T-bet⁺的CD3⁻CD56⁺细胞。

[0603] 在一个实施方案中,通过本文描述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含为CD117⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含为NKG2D⁻的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含为NKp30⁻的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含为CD244⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含为DNAM-1⁺的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含表达AHR的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含不表达穿孔素的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含不表达EOMES的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含不表达颗粒酶B的细胞。在一个实施方案中,通过本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体包含分泌IL-22和/或IL-8的细胞。

[0604] 在某些方面,通过本文所述的三阶段方法产生的细胞群体包含50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为50:1的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为20:1的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为10:1的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为5:1的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些

方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:1的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为1:5的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为1:10的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的细胞群体包含比率为1:20的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:50的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。

[0605] 在某些方面,本文描述的细胞群体通过将CD11a⁺细胞与CD11a⁻细胞以50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率组合而产生以产生组合的细胞群体。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以50:1的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以20:1的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以10:1的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以5:1的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以1:1的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以1:5的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以1:10的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:20的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:50的比率组合的CD11a⁺细胞和CD11a⁻细胞。

[0606] 在某些方面,通过本文所述的三阶段方法产生的细胞群体包含比率为50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为50:1的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为20:1的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为10:1的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为5:1的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:1的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:5的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:10的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:20的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的细胞群体包含比率为1:50的NK细胞和ILC3细胞。

[0607] 在某些方面,本文所述的细胞群体通过将NK细胞与ILC3细胞以50:1、40:1、30:1、20:1、10:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40或1:50的比率组合来产生以产生组合的细胞群体。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以50:1的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以20:1的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以10:1的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文描述的组细胞群体包含以5:1的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:1的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:5的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:10的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:20的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。在某些方面,本文所述的组细胞群体包含以1:50的比率组合的NK细胞和ILC3细胞。

[0608] 5.8. 与胎盘灌流液组合的NK细胞和/或ILC3细胞

[0609] 本文进一步提供了与胎盘灌流液、胎盘灌流液细胞和/或贴壁胎盘细胞组合包含根据本文所述的三阶段方法的NK细胞和/或ILC3细胞的组合物,例如用于抑制肿瘤细胞或多个肿瘤细胞的增殖。

[0610] 5.8.1.NK细胞和/或ILC3细胞与灌流液或灌流液细胞的组合

[0611] 本文进一步提供了包含根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体及胎盘灌流液和/或胎盘灌流液细胞的组合的组合物。在一个实施方案中,例如,本文提供了补充有使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞的一定体积的胎盘灌流液。在补充有NK细胞和ILC3细胞的一定体积的胎盘灌流液的具体实施方案中,NK细胞和ILC3细胞以如本文所述的比率存在。在具体的实施方案中,例如,每毫升胎盘灌流液补充有约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞。在另一个实施方案中,胎盘灌流液细胞补充有使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞。在某些其他实施方案中,当胎盘灌流液细胞与使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞组合时,该胎盘灌流液细胞通常占细胞总数的大约、大于大约或小于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%。在某些其他实施方案中,当使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞与多个胎盘灌流液细胞和/或组合的自然杀伤细胞组合时,该NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞群体通常占大约、大于大约或少于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%的细胞总数。在某些其他实施方案中,当使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞用于补充胎盘灌流液时,细胞悬浮于其中的溶液(例如,盐溶液、培养基等)的体积包含大约、大于大约或小于大约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%的灌流液加细胞的总体积,其中NK细胞和/或ILC3细胞在补充前被悬浮于约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多细胞/毫升。

[0612] 在其他实施方案中,任何上述细胞组合随之与脐带血或来自脐带血的有核细胞组合。

[0613] 本文进一步提供了从两个或更多个来源(例如,两个或更多个胎盘)获得并结合(例如,合并)的合并胎盘灌流液。这种合并的灌流液可以包含来自每个来源的大致相等体积的灌流液,或者可以包含来自每个来源的不同体积。可以随机选择来自每个来源的相对体积,或者可以基于例如一种或多种细胞因子(例如,细胞因子、生长因子、激素等)的浓度或量;来自每个来源的灌流液中胎盘细胞的数量;或来自每个来源的灌流液的其他特征。来自同一胎盘的多次灌注的灌流液可以类似地合并。

[0614] 类似地,本文提供了胎盘灌流液细胞和胎盘来源的中间自然杀伤细胞,其从两个或更多个来源(例如,两个或更多个胎盘)获得并合并。这种合并的细胞可以包含来自两个或更多个来源的大致相同数量的细胞,或来自一个或多个合并来源的不同数量的细胞。可以基于例如待合并的细胞中一种或多种特定细胞类型的数量,例如CD34⁺细胞的数量等,来选择来自每个来源的细胞的相对数量。

[0615] 本文进一步提供了使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,以及这些细胞与胎盘灌流液和/或胎盘灌流液细胞的组合,其已经被测定以确定从例如给定数量的NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体或给定体积的灌流液预期的肿瘤抑制

的程度或量(即,效力)。例如,使等分或样品数量的细胞在其中肿瘤细胞另外可以增殖的条件下与已知数量的肿瘤细胞接触或接近,和将存在胎盘灌流液、灌流液细胞、胎盘自然杀伤细胞或其组合的情况下肿瘤细胞随时间(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10周或更长时间)的增殖速率与等同数量的肿瘤细胞在不存在灌流液、灌流液细胞、胎盘自然杀伤细胞或其组合的情况下的增殖相比较。细胞的效力可以表示为,例如抑制肿瘤细胞生长(例如约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%等)所需的细胞数量或溶液体积。

[0616] 在某些实施方案中,使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞作为药物级可施用单元提供。这样的单元可以以离散的体积提供,例如15mL、20mL、25mL、30mL、35mL、40mL、45mL、50mL、55mL、60mL、65mL、70mL、75mL、80mL、85mL、90mL、95mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL等。可以提供这样的单元以包含指定数量的细胞,例如NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体,其与其他NK细胞和/或ILC3细胞或者灌流液细胞组合,例如, 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多细胞每毫升或者 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多细胞每单位。在具体的实施方案中,该单元可以包含大约、最少大约或者最多大约每毫升 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 或更多的NK细胞,或者每单元 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多的细胞。可提供这样的单元以包含指定数量的NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体和/或任何其他细胞。

[0617] 在上述实施方案中,NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体,或者NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体与其他NK细胞和/或ILC3细胞、灌流液细胞或灌流液的组合可以是接受者自体的(即从接受者获得)、接受者同种异体的(即从所述接受者以外的至少一个其他个体获得)。

[0618] 在某些实施方案中,每个单元的细胞被标记以指定以下一个或多个:体积、细胞数量、细胞类型、单元是否已经对于特定类型的细胞被富集和/或单元中或单元的给定毫升数中给定数量的细胞的效力,即单元中的细胞是否引起特定的一个或多个类型的肿瘤细胞的增殖的可测量的抑制。

[0619] 5.8.2.NK细胞和/或ILC3细胞与贴壁胎盘干细胞的组合

[0620] 在其他实施方案中,使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体(单独或与胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞组合)补充有分离的贴壁胎盘细胞,例如胎盘干细胞和胎盘多能细胞,如,例如,Hariri的7,045,148和7,255,879号美国专利以及美国专利申请公开号2007/0275362中所描述的,其公开内容在此通过引用整体并入。在具体的实施方案中,NK细胞和ILC3细胞,NK细胞和ILC3细胞以如本文所述的比率存在。“贴壁胎盘细胞”是指细胞粘附于组织培养表面,例如组织培养塑料。可用于本文公开的组合物和方法中的贴壁胎盘细胞通常不是滋养层细胞、胚胎生殖细胞或胚胎干细胞。

[0621] 使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,例如,NK细胞和/或ILC3细胞群体(单独或与胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞组合)可以补充有,例如每毫升 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多的贴壁胎盘细胞,

或者 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多的贴壁胎盘细胞。组合中的贴壁胎盘细胞可以是,例如已经培养了例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38或40次群体倍增,或更多的贴壁胎盘细胞。

[0622] 当在原代培养物中培养或在细胞培养物中扩增时,分离的贴壁胎盘细胞粘附至组织培养基质,例如组织培养容器表面(例如组织培养塑料)。培养中的贴壁胎盘细胞呈现出大致成纤维细胞样、星状外观,具有从中央细胞体延伸的多个细胞质突起。然而,贴壁胎盘细胞与在相同条件下培养的成纤维细胞在形态上可区分,因为贴壁胎盘细胞显示出比成纤维细胞更多数量的此类突起。形态上,贴壁胎盘细胞也可与造血干细胞区分开来,造血干细胞通常在培养中呈现更圆形的或鹅卵石形态。

[0623] 可用于本文提供的组合物和方法的分离的贴壁胎盘细胞和贴壁胎盘细胞群体表达可用于鉴定和/或分离细胞或包含贴壁胎盘细胞的细胞群体的多种标志物。可用于本文提供的组合物和方法中的贴壁胎盘细胞和贴壁胎盘细胞群体包括直接从胎盘或其任何部分(例如,羊膜、绒毛膜、羊膜-绒毛膜板、胎盘子叶、脐带等)获得的贴壁胎盘细胞和含贴壁胎盘细胞的细胞群体。在一个实施方案中,该贴壁胎盘干细胞群体是培物中(例如容器,例如袋中的群体)的贴壁胎盘干细胞的群体(即,两个或更多个)。

[0624] 贴壁胎盘细胞通常表达标志物CD73、CD105和CD200和/或OCT-4,且不表达CD34、CD38或CD45。贴壁胎盘干细胞也可以表达HLA-ABC(MHC-1)和HLA-DR。这些标志物可用于鉴别贴壁胎盘细胞,并将贴壁胎盘细胞与其他细胞类型区分开来。由于贴壁胎盘细胞可以表达CD73和CD105,它们可以具有间充质干细胞样特征。缺乏CD34、CD38和/或CD45的表达将贴壁胎盘干细胞鉴定为非造血干细胞。

[0625] 在某些实施方案中,本文所述的分离的贴壁胎盘细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。

[0626] 在某些实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是分离的胎盘干细胞。在某些其他实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是分离的胎盘多能细胞。在一个具体实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是通过流式细胞术检测的CD34⁻、CD10⁺和CD105⁺。在更具体的实施方案中,该分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞是胎盘干细胞。在另一个更具体的实施方案中,该分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盘细胞是多能贴壁胎盘细胞。在另一具体实施方案中,该分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盘细胞具有分化成神经细胞表型、成骨表型的细胞或软骨形成表型的细胞的潜能。在更具体的实施方案中,该分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD200⁺。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD90⁺或CD45⁻。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD90⁺或CD45⁻。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,该分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺贴壁胎盘细胞另外是CD90⁺和CD45⁻。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,该CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD90⁺、CD45⁻贴壁胎盘细胞另外是CD80⁻和CD86⁻。

[0627] 在一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是CD200⁺、HLA-G⁺。在一个具体的实施方

案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD73⁺和CD105⁺。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻。在更具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺和CD105⁺。在另一个实施方案中,当在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的贴壁胎盘细胞产生一个或多个胚状体样体。

[0628] 在另一个实施方案中,该分离的贴壁胎盘细胞是CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺。在所述群体的具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是HLA-G⁺。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。在一个更具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻和HLA-G⁺。在另一个具体的实施方案中,当在允许胚状体样体形成的条件下培养时,所述分离的贴壁胎盘细胞产生一个或多个胚状体样体。

[0629] 在另一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是CD200⁺、OCT-4⁺。在一个具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD73⁺和CD105⁺。在另一个具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是HLA-G⁺。在另一个具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。在一个更具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺。在另一个具体的实施方案中,当在允许胚状体样体形成的条件下培养时,分离的贴壁胎盘细胞也产生一个或多个胚状体样体。

[0630] 在另一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是CD73⁺、CD105⁺和HLA-G⁺。在一个具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。在另一个具体的实施方案中,所述贴壁干细胞也是OCT-4⁺。在另一个具体实施方案中,所述贴壁干细胞也是CD200⁺。在更具体的实施方案中,所述贴壁干细胞也是CD34⁻、CD38⁻、CD45⁻、OCT-4⁺和CD200⁺。

[0631] 在另一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是CD73⁺、CD105⁺干细胞,其中所述细胞在允许胚状体样体形成的条件下产生一个或多个胚状体样体。在一个具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻。在另一具体实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。在另一个具体实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞也是OCT-4⁺。在更具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是OCT-4⁺、CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。

[0632] 在另一个实施方案中,贴壁胎盘干细胞是OCT-4⁺干细胞,其中所述贴壁胎盘干细胞在允许胚状体样体形成的条件下培养时产生一个或多个胚状体样体,和其中所述干细胞已被鉴定为可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。

[0633] 在各种实施方案中,至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%的所述分离的贴壁胎盘细胞是OCT-4⁺。在上述群体的具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD73⁺和CD105⁺。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD34⁻、CD38⁻或CD45⁻。在另一具体实施方案中,所述干细胞是CD200⁺。在一个更具体的实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞也是CD73⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻、CD38⁻和CD45⁻。在另一具体实施方案中,所述分离的贴壁胎盘细胞已经扩增,例如传代至少一次、至少三次、至少五次、至少10次、至少15次或至少20次。

[0634] 在任何上述实施方案的更具体的实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞表达ABC-p(一种胎盘特异性ABC转运蛋白;参见例如Allikmets等,Cancer Res.58(23):5337-9(1998))。

[0635] 在另一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、

CD200⁺、CD34⁻和CD133⁻。在另一个实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞组成性地分泌IL-6、IL-8和单核细胞趋化蛋白(MCP-1)。

[0636] 每种上述分离的贴壁胎盘细胞可以包含从哺乳动物胎盘直接获得和分离的细胞,或已经培养并传代至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30或更多次的细胞或其组合。上文所述的分离的肿瘤细胞抑制的多个分离的贴壁胎盘细胞可包含大约、至少或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个分离的贴壁胎盘细胞。

[0637] 5.8.3. 包含贴壁胎盘细胞条件培养基的组合物

[0638] 本文还提供了包含使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体)以及另外的条件培养基的组合物的用途,其中所述组合物是肿瘤抑制的,或有效治疗癌症或病毒感染。在具体的实施方案中,NK细胞和ILC3细胞以如本文所述的比率存在。如本文所述的贴壁胎盘细胞可用于产生条件培养基,其是肿瘤细胞抑制性的、抗癌或抗病毒的,即包含一种或多种由细胞分泌或排出的具有可检测的肿瘤细胞抑制效应、抗癌作用或抗病毒作用的生物分子的培养基。在各种实施方案中,条件培养基包括细胞已在其中增殖(即已经培养)至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或更多天的培养基。在其他实施方案中,条件培养基包括其中这样的细胞已经生长到至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%汇合或高达100%汇合的培养基。这种条件培养基可用于支持单独的细胞群体(例如,胎盘细胞或另一种类的细胞)的培养。在另一个实施方案中,本文提供的条件培养基包括其中已经培养了分离的贴壁胎盘细胞(例如,分离的贴壁胎盘干细胞或分离的贴壁胎盘多能细胞)和除分离的贴壁胎盘细胞以外的细胞(例如,非胎盘干细胞或多能细胞)的培养基。

[0639] 这样的条件培养基可以与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞、胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞中的任一种或其任何组合相组合以形成肿瘤细胞抑制的、抗癌或抗病毒的组合物。在某些实施方案中,组合物包含少于一半体积的条件培养基,例如约或少于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%体积。

[0640] 因此,在一个实施方案中,本文提供了包含使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞和来自分离的贴壁胎盘细胞培养物的培养基的组合物,其中所述分离的贴壁胎盘细胞(a)粘附到基底;(b)为CD34⁻、CD10⁺和CD105⁺;其中所述组合物可检测地抑制肿瘤细胞的生长或增殖,或者是抗癌或抗病毒的。在一个具体实施方案中,分离的贴壁胎盘细胞是CD34⁻、CD10⁺和CD105⁺,如通过流式细胞术检测的。在更具体的实施方案中,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞是胎盘干细胞。在另一个更具体的实施方案中,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盘细胞是多能贴壁胎盘细胞。在另一个具体的实施方案中,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺胎盘细胞具有分化成神经元表型的细胞、成骨表型的细胞或软骨形成表型的细胞的潜能。在更具体的实施方案中,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD200⁺。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD90⁺或CD45⁻。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,分离的CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺贴壁胎盘细胞另外是CD90⁺或CD45⁻。在另一个更具体的实施方案中,CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺贴壁胎盘细胞另外是

CD90⁺和CD45⁻,如通过流式细胞术检测的。在另一个更具体的实施方案中,如通过流式细胞术检测的,CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD90⁺、CD45⁻贴壁胎盘细胞另外是CD80⁻和CD86⁻。

[0641] 在另一个实施方案中,本文提供的组合物包含使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞和来自分离的贴壁胎盘细胞培养物的培养基,其中所述分离的贴壁胎盘细胞(a)粘附于基底;和(b)表达CD200和HLA-G,或者表达CD73、CD105和CD200,或者表达CD200和OCT-4,或者表达CD73、CD105和HLA-G,或者表达CD73和CD105,且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群体在允许胚状体样体形成的条件下培养时促进所述群体中一种或多种胚状体样体的形成,或者表达OCT-4,且当包含胎盘干细胞的胎盘细胞群体在允许形成胚状体样体的条件下培养时,促进所述群体中一种或多种胚状体样体的形成;其中所述组合物可检测地抑制肿瘤细胞的生长或增殖,或者是抗癌或抗病毒的。在具体的实施方案中,组合物还包含多个所述分离的胎盘贴壁细胞。在另一具体实施方案中,组合物包含多个非胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述非胎盘细胞包含CD34⁺细胞,例如造血祖细胞,如外周血造血祖细胞、脐带血造血祖细胞或胎盘血造血祖细胞。非胎盘细胞还可以包含干细胞,例如间充质干细胞,例如骨髓来源的间充质干细胞。非胎盘细胞也可以是一种或多种类型的成体细胞或细胞系。在另一具体实施方案中,组合物包含抗增殖剂,例如抗MIP-1 α 或抗-MIP-1 β 抗体。

[0642] 在一个具体的实施方案中,由上述细胞或细胞组合之一条件化的培养基从多个分离的贴壁胎盘细胞获得,其中所述贴壁胎盘细胞与多个肿瘤细胞以分离的贴壁胎盘细胞对肿瘤细胞的约1:1、约2:1、约3:1、约4:1或约5:1的比率共培养。例如,条件培养基或上清液可以从包含约 1×10^5 个分离的贴壁胎盘细胞,约 1×10^6 个分离的贴壁胎盘细胞,约 1×10^7 个分离的贴壁胎盘细胞或约 1×10^8 个分离的贴壁胎盘细胞或更多分离的贴壁胎盘细胞的培养物获得。在另一个具体的实施方案中,条件培养基或上清液得自包含约 1×10^5 至约 5×10^5 个分离的贴壁胎盘细胞和约 1×10^5 个肿瘤细胞;约 1×10^6 至约 5×10^6 个分离的贴壁胎盘细胞和约 1×10^6 个肿瘤细胞;约 1×10^7 至约 5×10^7 个分离的贴壁胎盘细胞和约 1×10^7 个肿瘤细胞;或约 1×10^8 至约 5×10^8 个分离的贴壁胎盘细胞和约 1×10^8 个肿瘤细胞的共培养物。

[0643] 5.9.细胞的保存

[0644] 细胞,例如使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体,或包含造血干细胞或祖细胞的胎盘灌流液细胞可以被保存,即置于允许长期储存的条件下,或者在抑制通过例如凋亡或坏死的细胞死亡条件下。

[0645] 胎盘灌流液可通过使细胞收集组合物经过胎盘的至少一部分,例如经过胎盘脉管系统而产生。细胞收集组合物包含一种或多种起保护灌流液中所含细胞的作用的化合物。这样的胎盘细胞收集组合物可以包含细胞凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或载氧全氟化碳,如相关美国申请公开号20070190042中所述,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0646] 在一个实施方案中,通过使灌流液或细胞群体与包含凋亡抑制剂和载氧全氟化碳的细胞收集组合物接近,从哺乳动物(例如人类)产后胎盘收集灌流液或胎盘细胞群体,其中所述凋亡抑制剂的存在量和时间足以与未与凋亡抑制剂接触或接近的细胞群体相比,减少或预防胎盘细胞群体(例如,贴壁胎盘细胞,例如胎盘干细胞或胎盘多能细胞)中的细胞凋亡。例如,可以用细胞收集组合物灌注胎盘,且从其中分离胎盘细胞,例如总有核胎盘细胞。在一个具体的实施方案中,凋亡抑制剂是半胱天冬酶抑制剂。在另一个具体的实施方案

中,所述细胞凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在更具体的实施方案中,所述JNK抑制剂不调节贴壁胎盘细胞(例如贴壁胎盘干细胞或贴壁胎盘多能细胞)的分化或增殖。在另一个实施方案中,细胞收集组合物包含处于分离相中的所述凋亡抑制剂和所述载氧全氟化碳。在另一个实施方案中,细胞收集组合物包含乳液中的所述凋亡抑制剂和所述载氧全氟化碳。在另一个实施方案中,细胞收集组合物另外包含乳化剂,例如卵磷脂。在另一个实施方案中,在使胎盘细胞接近细胞收集组合物时,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在约0℃至约25℃之间。在另一个更具体的实施方案中,在使胎盘细胞接近细胞收集组合物时,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在约2℃和10℃之间,或在约2℃和约5℃之间。在另一个更具体的实施方案中,所述接近是在所述细胞群体的运输过程中进行的。在另一个更具体的实施方案中,所述接近在所述细胞群体的冷冻和解冻过程中进行。

[0647] 在另一个实施方案中,可通过使灌流液和/或细胞接近凋亡抑制剂和器官保存化合物来收集和保存胎盘灌流液和/或胎盘细胞,其中与未与凋亡抑制剂接触或接近的灌流液或胎盘细胞相比,所述凋亡抑制剂的存在量和时间足以减少或防止细胞凋亡。在一个具体的实施方案中,器官保存化合物是UW溶液(描述于美国专利号4,798,824中;也称为VIASPAN™;也参见Southard等人,Transplantation 49(2):251-257(1990))或在Stern等的5,552,267号美国专利中所描述的溶液,其全部公开内容通过引用而引入。在另一个实施方案中,所述器官保存组合物是羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖或它们的组合。在另一实施方案中,该胎盘细胞收集组合物另外包含两相中或作为乳液的载氧全氟化碳。

[0648] 在该方法的另一个实施方案中,胎盘细胞在灌注期间与包含凋亡抑制剂和载氧全氟化碳、器官保存化合物或其组合的细胞收集组合物接近。在另一个实施方案中,在通过灌注收集后使胎盘细胞与所述细胞收集化合物接近。

[0649] 通常,在胎盘细胞收集、富集和分离期间,优选使由于缺氧和机械应力引起的细胞应激最小化或消除。因此,在该方法的另一个实施方案中,在所述保存过程中,在收集、富集或分离期间胎盘灌流液或胎盘细胞群体暴露于低氧条件少于6小时,其中低氧条件是氧浓度低于正常血氧浓度。在更具体的实施方案中,所述灌流液或胎盘细胞群体在所述保存期间暴露于所述缺氧条件少于两个小时。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘细胞群体在收集、富集或分离期间暴露于所述缺氧条件少于1小时或少于30分钟,或不暴露于低氧条件。在另一个具体实施方案中,所述胎盘细胞群体在收集、富集或分离期间不暴露于剪切应力。

[0650] 可将细胞,例如胎盘灌流液细胞,造血细胞(例如CD34+造血干细胞);使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞;本文提供的分离的贴壁胎盘细胞可以冷冻保存,例如在小容器(例如,安瓿或隔膜小瓶)中的冷冻保存培养基中。在某些实施方案中,本文提供的细胞以约 1×10^4 – 5×10^8 个细胞/mL的浓度冷冻保存。在具体的实施方案中,本文提供的细胞以约 1×10^6 – 1.5×10^7 个细胞/mL的浓度冷冻保存。在更具体的实施方案中,本文提供的细胞以约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 1.5×10^7 个细胞/mL的浓度冷冻保存。

[0651] 合适的冷冻保存培养基包括但不限于生理盐水、培养基,包括例如,生长培养基或细胞冷冻培养基,例如市售细胞冷冻培养基,例如C2695、C2639或C6039(Sigma);CryoStor® CS2、CryoStor® CS5或CryoStor® CS10(BioLife Solutions)。在一

个实施方案中,冷冻保存培养基包含浓度为例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10% (v/v) 的DMSO (二甲基亚砷)。冷冻保存培养基可以包含其他试剂,例如甲基纤维素、葡聚糖、白蛋白(例如人血清白蛋白)、海藻糖和/或甘油。在某些实施方案中,冷冻保存培养基包含约1%-10% DMSO,约25%-75%右旋糖酐和/或约20-60%人血清白蛋白(HSA)。在某些实施方案中,冷冻保存培养基包含约1%-10%的DMSO,约25%-75%海藻糖和/或约20-60%人HSA。在一个具体的实施方案中,冷冻保存培养基包含5%的DMSO、55%的葡聚糖和40%的HSA。在更具体的实施方案中,冷冻保存培养基包含5%的DMSO、55%葡聚糖(10%w/v,生理盐水中)和40%的HSA。在另一个具体实施方案中,冷冻保存培养基包含5%的DMSO、55%海藻糖和40%的HSA。在更具体的实施方案中,冷冻保存培养基包含5%的DMSO、55%海藻糖(10%w/v,生理盐水中)和40%的HSA。在另一个具体实施方案中,冷冻保存培养基包含CryoStor® CS5。在另一个具体实施方案中,冷冻保存培养基包含CryoStor® CS10。

[0652] 本文提供的细胞可以通过多种方法中的任何一种以及在细胞培养、扩增或分化的任何阶段进行冷冻保存。例如,本文提供的细胞可以在从原始组织或器官(例如胎盘灌流液或脐带血)分离后立即冷冻保存,或者在以上概述方法的第一步、第二步或第三步期间或之后进行冷冻保存。在某些实施方案中,将造血细胞(例如,造血干细胞或祖细胞)从原始组织或器官分离后约1、5、10、15、20、30、45分钟内或在约1、2、4、6、10、12、18、20或24小时内冷冻保存。在某些实施方案中,所述细胞在从原始组织或器官分离后1天、2天或3天内冷冻保存。在某些实施方案中,将所述细胞在如上所述的第一培养基中培养约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或28天之后冷冻保存。在一些实施方案中,将所述细胞在如上所述的第一培养基中培养约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或28天,并如上所述在第二培养基中培养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或28天后冷冻保存。在一些实施方案中,当使用本文所述的三阶段方法制备NK细胞时,将所述细胞在第一培养基中培养约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天后;和/或在第二培养基中培养约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天后;和/或在第三培养基中培养约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25天后冷冻保存。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法制备NK细胞和/或ILC3细胞,并将所述细胞在第一培养基中培养10天后;在第二种培养基中培养4天后;和在第三培养基中培养21天后冷冻保存。

[0653] 在一个方面,本文提供了冷冻保存NK细胞和/或ILC3细胞群体,例如通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞的方法。在一个实施方案中,所述方法包括:在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞,例如CD34⁺干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和随后在包含IL-2和IL-15,且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中所述第三细胞群体包含自然杀伤细胞,其是CD56⁺、CD3⁻、CD16⁻或CD16⁺及CD94⁺或CD94⁻,和其中至少70%或至少80%的自然杀伤细胞是活的,和接下来在冷冻保存介质中冷冻保存该NK细胞。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养

基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中,所述冷冻保存步骤还包括(1)制备细胞悬液溶液;(2)向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液;(3)冷却来自步骤(2)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品;和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中,该方法不包括中间步骤。

[0654] 在一个实施方案中,所述方法包括:(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞,和接下来将所述NK细胞在冷冻保存基质中冷冻保存。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中,所述冷冻保存步骤还包括(1)制备细胞悬液溶液;(2)向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液;(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品;和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中,该方法不包括中间步骤。

[0655] 在一个实施方案中,所述方法包括:(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;和(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞因子(SCF)和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体,以产生第三细胞群体;其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞,和接下来将所述NK细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中,所述冷冻保存步骤还包括(1)制备细胞悬液溶液;(2)向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存培养基以获得冷冻保存的细胞悬液;(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品;和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中,该方法不包括中间步骤。

[0656] 在一个实施方案中,所述方法包括:(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动

员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; (c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏SCF、干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞, 和接下来将所述NK细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中, 所述冷冻保存步骤还包括 (1) 制备细胞悬液溶液; (2) 向来自步骤 (1) 的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液; (3) 冷却来自步骤 (3) 的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品; 和 (4) 将冷冻保存的样品存储在-80°C以下。在某些实施方案中, 该方法不包括中间步骤。

[0657] 在一个实施方案中, 所述方法包括: (a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; (c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 和 (d) 从第三细胞群体分离CD11a+细胞以产生第四细胞群体; 其中所述第四细胞群体包含作为CD56+、CD3-和CD11a+的自然杀伤细胞, 和接下来将所述NK细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中, 所述冷冻保存步骤还包括 (1) 制备细胞悬液溶液; (2) 向来自步骤 (1) 的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液; (3) 冷却来自步骤 (3) 的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品; 和 (4) 将冷冻保存的样品存储在-80°C以下。在某些实施方案中, 该方法不包括中间步骤。

[0658] 在一个实施方案中, 所述方法包括: (a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素 (Tpo) 的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体; (b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15 (IL-15) 且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体; 和 (c) 在包含IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体; 其中所述第三细胞群体包含为CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞, 和接下来将所述ILC3细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中, 所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子 (LIF) 和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中, 所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体 (Flt-3L)。在具体的实施方案中, 所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α , 和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中, 第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素, 例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中, 所述冷冻保存步骤还包括 (1) 制备细胞

悬液溶液；(2) 向来自步骤(1)的细胞悬液中加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液；(3) 冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品；和(4) 将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中，该方法不包括中间步骤。

[0659] 在一个实施方案中，所述方法包括：(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体；(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体；和(c) 在包含干细胞动员剂、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体；其中所述第三细胞群体包含是CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞，和接下来将所述ILC3细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中，所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中，所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中，所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ，和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中，第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素，例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中，所述冷冻保存步骤还包括(1) 制备细胞悬液溶液；(2) 向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存培养基以获得冷冻保存的细胞悬液；(3) 冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品；和(4) 将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中，该方法不包括中间步骤。

[0660] 在一个实施方案中，所述方法包括：(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体；(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体；和(c) 在包含SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体；其中所述第三细胞群体包含是CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞，和接下来将所述ILC3细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中，所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中，所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中，所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ，和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中，第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素，例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中，所述冷冻保存步骤还包括(1) 制备细胞悬液溶液；(2) 向来自步骤(1)的细胞悬液中加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液；(3) 冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品；和(4) 将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中，该方法不包括中间步骤。

[0661] 在一个实施方案中，所述方法包括：(a) 在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体；(b) 在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体；和(c) 在包含干细胞动员剂、SCF、IL-2和IL-15且缺乏LMWH的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体；其中所述第三细胞群体包含是CD56+、CD3-和CD11a-的ILC3细胞，和接下来将所述ILC3细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中，所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中，所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体

(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中,所述冷冻保存步骤还包括(1)制备细胞悬液溶液;(2)向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液;(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品;和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中,该方法不包括中间步骤。

[0662] 在一个实施方案中,所述方法包括:(a)在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体;(b)在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养第一细胞群体以产生第二细胞群体;(c)在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH中每一种的第三培养基中培养第二细胞群体以产生第三细胞群体;和(d)从第三细胞群体中分离CD11a⁻细胞以产生第四细胞群体;其中所述第四细胞群体包含是CD56⁺、CD3⁻和CD11a⁻的ILC3细胞,和接下来将所述ILC3细胞在冷冻保存介质中冷冻保存。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。在一个具体实施方案中,所述冷冻保存步骤还包括(1)制备细胞悬液溶液;(2)向来自步骤(1)的细胞悬液加入冷冻保存介质以获得冷冻保存的细胞悬液;(3)冷却来自步骤(3)的冷冻保存的细胞悬液以获得冷冻保存的样品;和(4)将冷冻保存的样品存储在-80℃以下。在某些实施方案中,该方法不包括中间步骤。

[0663] 本文提供的细胞可在受控速率冷冻机中冷冻,例如在冷冻保存期间以约0.1、0.3、0.5、1或2℃/分钟冷却。在一个实施方案中,冷冻保存为约-80℃至约-180℃,或约-125℃至约-140℃。冷冻保存的细胞可以在解冻使用前转移到液氮中。在一些实施方案中,例如,一旦安瓿达到约-90℃,它们被转移到液氮储存区域。冷冻保存的细胞可以在约25℃至约40℃的温度下解冻,更具体地可以解冻至约37℃的温度。在某些实施方案中,冷冻保存的细胞在冷冻保存约1、2、4、6、10、12、18、20或24小时,或者约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或28天后解冻。在某些实施方案中,冷冻保存的细胞在冷冻保存约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或28个月后解冻。在某些实施方案中,冷冻保存的细胞在冷冻保存约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年后解冻。

[0664] 合适的解冻介质包括但不限于生理盐水、plasmalyte培养基,包括例如生长培养基,例如RPMI培养基。在某些实施方案中,解冻介质包含一种或多种培养基补充剂(例如营养素、细胞因子和/或因子)。适用于本文提供的解冻细胞的培养基补充剂包括,例如但不限于,血清如人血清AB、胎牛血清(FBS)或小牛血清(FCS)、维生素、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、氨基酸(例如,L-谷氨酰胺)、脂肪酸(例如,油酸、亚油酸或棕榈酸)、胰岛素(例如,重组人胰岛素)、转铁蛋白(铁饱和人转铁蛋白)、 β -巯基乙醇、干细胞因子(SCF)、Fms样酪氨酸激酶3配体(Flt3-L)、细胞因子如白介素-2(IL-2)、白细胞介素-7(IL-7)、白细胞介素-15(IL-15)、血小板生成素(Tpo)或肝素。在一个具体的实施方案中,用于本文提供的

方法的解冻介质包含RPMI。在另一个具体实施方案中,所述解冻介质包含plasmalyte。在另一具体实施方案中,所述解冻介质包含约0.5-20%的FBS。在另一具体实施方案中,所述解冻介质包含约1、2、5、10、15或20%的FBS。在另一个具体实施方案中,所述解冻介质包含约0.5%-20%的HSA。在另一个具体实施方案中,所述解冻介质包含约1、2.5、5、10、15或20%的HSA。在更具体的实施方案中,所述解冻介质包含RPMI和约10%的FBS。在另一个更具体的实施方案中,所述解冻介质包含plasmalyte和约5%的HSA。

[0665] 本文提供的冷冻保存方法可以优化以允许长期储存,或在抑制通过例如凋亡或坏死的细胞死亡的条件下。在一个实施方案中,解冻后细胞包含大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%的活细胞,如由例如自动细胞计数器或台盼蓝方法确定的。在另一个实施方案中,解冻后细胞包含约0.5%、1%、5%、10%、15%、20%或25%的死细胞。在另一个实施方案中,解冻后细胞包含约0.5%、1%、5%、10%、15%、20%或25%的早期凋亡细胞。在另一个实施方案中,大约0.5%、1%、5%、10%、15%或20%的解冻后细胞在被解冻后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或28天后发生凋亡,例如通过细胞凋亡测定法(例如,T0-PRO3或AnnV/PI凋亡测定试剂盒)测定的。在某些实施方案中,解冻后细胞在使用本文提供的方法培养、扩增或分化后,再冷冻保存。

[0666] 5.10. 包含NK细胞和/或ILC3细胞的组合物

[0667] 5.10.1. 使用三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞

[0668] 在一些实施方案中,本文提供了包含使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体的组合物,例如药物组合物。在一个具体的实施方案中,所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体由造血细胞(例如,从胎盘灌流液、脐带血和/或外周血分离的造血干细胞或祖细胞)产生。在另一个具体的实施方案中,所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体包含组合物中至少50%的细胞。在另一个具体的实施方案中,所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体,例如CD3⁻CD56⁺细胞,占组合物中至少80%、85%、90%、95%、98%或99%的细胞。某些实施方案中,所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体中不超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%的细胞是CD3⁻CD56⁺细胞。在某些实施方案中,所述CD3⁻CD56⁺细胞是CD16⁻。

[0669] 使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体可以配制成用于体内使用的药物组合物。此类药物组合物包含药学上可接受的载体(例如,生理盐水溶液或其他公认的生理上可接受的用于体内施用的溶液)中的NK细胞和/或ILC3细胞群体。本发明的药物组合物可以包含本文其它地方描述的任何NK细胞和/或ILC3细胞群体。

[0670] 本发明的药物组合物包含含有50%或更多活细胞(即群体中至少50%的细胞是功能性的或活的)的细胞群体。优选地,群体中至少60%的细胞是活的。更优选地,药物组合物中的群体中至少70%、80%、90%、95%或99%的细胞是活的。

[0671] 本发明的药物组合物可以包含一种或多种化合物,其例如便于植入的;稳定剂如白蛋白、葡聚糖40、明胶、羟乙基淀粉等。

[0672] 当配制成可注射溶液时,在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含约1.25%的HSA和约2.5%的葡聚糖。可以使用适用于施用细胞产物的其他可注射制剂。

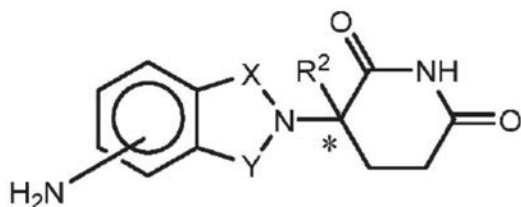
[0673] 在一个实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于全身或局部施

用。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于肠胃外给药。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于注射、输注、静脉内(IV)施用、股骨内施用或瘤内施用。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适合于通过装置、基质或支架施用。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于注射。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适合于通过导管施用。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于局部注射。在更具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适合于直接局部注射到实体肿瘤(例如肉瘤)中。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适用于通过注射器注射。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适合于通过导引递送施用。在具体的实施方案中,本文提供的组合物(例如药物组合物)适合于通过腹腔镜检查、内窥镜检查、超声波、计算机断层摄影术、磁共振或放射学辅助的注射。

[0674] 在某些实施方案中,包含使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞的本文提供的组合物(例如药物组合物)作为药物级可施用单元提供。这样的单元可以以离散体积提供,例如15mL、20mL、25mL、30mL、35mL、40mL、45mL、50mL、55mL、60mL、65mL、70mL、75mL、80mL、85mL、90mL、95mL、100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL等。可以提供这样的单元以包含特定数量的细胞,例如NK细胞和/或ILC3细胞,例如 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多细胞/毫升,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 个或更多个细胞/单元。在具体的实施方案中,该单元可以包含约、至少约或至多约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 或更多的NK细胞和/或ILC3细胞每毫升,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个细胞/单元。可提供这样的单元以含有特定数量的NK细胞和/或ILC3细胞或者NK细胞和/或ILC3细胞群体和/或任何其他细胞。在具体的实施方案中,NK细胞和ILC3细胞以本文提供的比率存在。

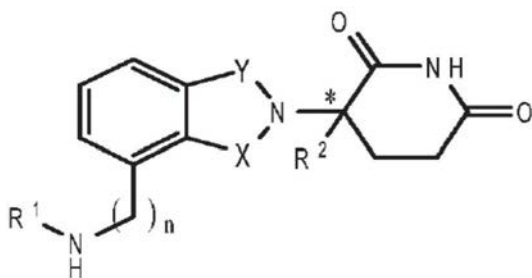
[0675] 在另一个具体的实施方案中,所述组合物中的所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞来自单一个体。在更具体的实施方案中,所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞包含来自至少两个不同个体的NK细胞和/或ILC3细胞。在另一个具体的实施方案中,所述组合物中的所述分离的NK细胞和/或ILC3细胞来自与打算用NK细胞和/或ILC3细胞进行治疗的个体不同的个体。在另一个具体的实施方案中,所述NK细胞已经接触或接近免疫调节化合物或沙利度胺,其量和时间足以使所述NK细胞比同等数量的自然杀伤细胞(即不与所述免疫调节化合物或沙利度胺接触或接近的NK细胞)表达可检测地更多的颗粒酶B或穿孔素。在另一个具体的实施方案中,所述组合物还包含免疫调节化合物或沙利度胺。在某些实施方案中,免疫调节化合物是下述化合物。参见例如,7,498,171号美国专利,其公开内容在此通过引用整体并入。在某些实施方案中,免疫调节化合物是氨基取代的异吲哚啉。在一个实施方案中,免疫调节化合物是3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮;3-(4'-氨基isolidoline-1'-酮)-1-哌啶-2,6-二酮;4-(氨基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-异吲哚啉-1,3-二酮;或4-氨基-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)异吲哚啉-1,3-二酮。在另一个实施方案中,免疫调节化合物是泊马度胺或来那度胺。在另一个实施方案中,所述免疫调节化合物是具有以下结构的化合物:

[0676]



[0677] 其中X和Y中的一个是C=O, X和Y中的另一个是C=O或CH₂, 和R²是氢或低级烷基, 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋物或立体异构体的混合物。在另一个实施方案中, 所述免疫调节化合物是具有以下结构的化合物:

[0678]



[0679] 其中X和Y中的一个为C=O和另一个为CH₂或C=O;

[0680] R¹是H、(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₇) 环烷基、(C₂-C₈) 烯基、(C₂-C₈) 炔基、苄基、芳基、(C₀-C₄) 烷基-(C₁-C₆) 杂环烷基、(C₀-C₄) 烷基-(C₂-C₅) 杂芳基、C(O)R³、C(S)³、C(O)OR⁴、(C₁-C₈) 烷基-N(R⁶)₂、(C₁-C₈) 烷基-OR⁵、(C₁-C₈) 烷基-C(O)OR⁵、C(O)NHR³、C(S)NHR³、C(O)NR³R^{3'}、C(S)NR³R^{3'}或(C₁-C₈) 烷基-O(CO)R⁵;

[0681] R²是H、F、苄基、(C₁-C₈) 烷基、(C₂-C₈) 烯基或(C₂-C₈) 炔基;

[0682] R³和R^{3'}独立地是(C₁-C₈) 烷基、(C₃-C₇) 环烷基、(C₂-C₈) 烯基、(C₂-C₈) 炔基、苄基、芳基、(C₀-C₄) 烷基-(C₁-C₆) 杂环烷基、(C₀-C₄) 烷基-(C₂-C₅) 杂芳基、(C₀-C₈) 烷基-N(R⁶)₂、(C₁-C₈) 烷基-OR⁵、(C₁-C₈) 烷基-C(O)OR⁵、(C₁-C₈) 烷基-O(CO)R⁵或C(O)OR⁵;

[0683] R⁴是(C₁-C₈) 烷基、(C₂-C₈) 烯基、(C₂-C₈) 炔基、(C₁-C₄) 烷基-OR⁵、苄基、芳基、(C₀-C₄) 烷基-(C₁-C₆) 杂环烷基或(C₀-C₄) 烷基-(C₂-C₅) 杂芳基;

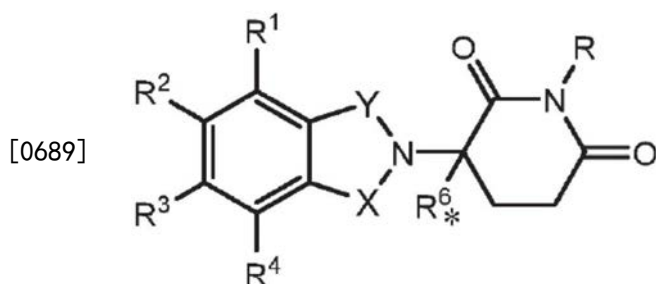
[0684] R⁵是(C₁-C₈) 烷基、(C₂-C₈) 烯基、(C₂-C₈) 炔基、苄基、芳基或(C₂-C₅) 杂芳基;

[0685] 每次出现的R⁶独立地是H、(C₁-C₈) 烷基、(C₂-C₈) 烯基、(C₂-C₈) 炔基、苄基、芳基、(C₂-C₅) 杂芳基或(C₀-C₈) 烷基-C(O)O-R⁵或R⁶基团可以连接以形成杂环烷基基团;

[0686] n是0或1; 和

[0687] *表示手性碳中心;

[0688] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋物或立体异构体的混合物。在另一个实施方案中, 所述免疫调节化合物是具有以下结构的化合物:



[0690] 其中

[0691] X和Y中的一个为C=O, 和另一个为CH₂或C=O;

[0692] R是H或CH₂OCOR';

[0693] (i) R¹、R²、R³或R⁴中的每一个彼此独立地为卤素、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基, 或(ii) R¹、R²、R³或R⁴中的一个为硝基或-NHR⁵和R¹、R²、R³或R⁴中其余的是氢;

[0694] R⁵是氢或1至8个碳的烷基

[0695] R⁶是氢、1至8个碳原子的烷基、苯并、氯或氟;

[0696] R'是R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

[0697] R⁷是间亚苯基或对亚苯基或-(C_nH_{2n})-, 其中n的值为0至4;

[0698] R⁸和R⁹各自独立地为氢或1-8个碳原子的烷基, 或R⁸和R⁹一起为四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基或-CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-, 其中X₁为-O-、-S-或-NH-;

[0699] R¹⁰是氢、1至8个碳原子的烷基或苯基;

[0700] *表示手性碳中心;

[0701] 或其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋物或立体异构体的混合物。

[0702] 在另一个具体实施方案中, 组合物另外包含一种或多种抗癌化合物, 例如下述一种或多种抗癌化合物。

[0703] 在更具体的实施方案中, 组合物包含来自另一来源或通过另一种方法制备的NK细胞和/或ILC3细胞。在一个具体的实施方案中, 所述其他来源是胎盘血和/或脐带血。在另一个具体实施方案中, 所述其他来源是外周血。在更具体的实施方案中, 所述组合物中的NK细胞和/或ILC3细胞群体与来自另一来源或通过另一方法制备的NK细胞和/或ILC3细胞以约100:1、95:5、90:10、85:15、80:20、75:25、70:30、65:35、60:40、55:45、50:50、45:55、40:60、35:65、30:70、25:75、20:80、15:85、10:90、5:95、100:1、95:1、90:1、85:1、80:1、75:1、70:1、65:1、60:1、55:1、50:1、45:1、40:1、35:1、30:1、25:1、20:1、15:1、10:1、5:1、1:1、1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、1:50、1:55、1:60、1:65、1:70、1:75、1:80、1:85、1:90、1:95、1:100等的比率组合。

[0704] 在另一具体实施方案中, 组合物包含使用本文所述三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体以及分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中, 所述胎盘灌流液来自与所述NK细胞和/或ILC3细胞群体相同的个体。在另一个更具体的实施方案中, 所述胎盘灌流液包含来自与所述NK细胞和/或ILC3细胞群体不同的个体的胎盘灌流液。在另一个具体的实施方案中, 所述胎盘灌流液中全部或基本上全部(例如, 大于90%、95%、98%或99%)的细胞是胎儿细胞。在另一个具体的实施方案中, 胎盘灌流液或胎盘灌流液细胞包含胎儿和母体细胞。在更具体的实施方案中, 所述胎盘灌流液中的胎儿细

胞占所述灌流液中小于约90%、80%、70%、60%或50%的细胞。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液通过使0.9%的NaCl溶液通过胎盘脉管系统获得。在另一个具体实施方案中,所述灌流液包含培养基。在另一个具体的实施方案中,所述灌流液已经过处理以除去红细胞。在另一具体实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物,例如下述免疫调节化合物,例如氨基取代的异吲哚啉化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0705] 在另一具体实施方案中,组合物包含NK细胞和/或ILC3细胞群体和胎盘灌流液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞和/或ILC3细胞群体相同的个体。在另一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液细胞来自与所述NK细胞和/或ILC3细胞群体不同的个体。在另一具体实施方案中,组合物包含分离的胎盘灌流液和分离的胎盘灌流液细胞,其中所述分离的灌流液和所述分离的胎盘灌流液细胞来自不同的个体。在包含胎盘灌流液的任何上述实施方案的任何一个更具体的实施方案中,所述胎盘灌流液包含来自至少两个个体的胎盘灌流液。在任何包含胎盘灌流液细胞的上述实施方案的另一个更具体的实施方案中,所述分离的胎盘灌流液细胞来自至少两个个体。在另一个具体的实施方案中,所述组合物包含免疫调节化合物。在另一个具体的实施方案中,组合物另外包含一种或多种抗癌化合物,例如下述的一种或多种抗癌化合物。

[0706] 5.11. 使用三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞的用途

[0707] 本文提供的使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,例如根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,可以用于治疗患有癌症的个体(例如具有实体肿瘤细胞和/或血液癌细胞的个体)或具有病毒感染的个体的方法。在一些这样的实施方案中,使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞的有效剂量范围在 1×10^4 至 5×10^4 、 5×10^4 至 1×10^5 、 1×10^5 至 5×10^5 、 5×10^5 至 1×10^6 、 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 ,或更多细胞/千克体重。使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞也可以用于抑制肿瘤细胞增殖的方法中。

[0708] 5.11.1. 治疗患有癌症的个体

[0709] 在一个实施方案中,本文提供治疗患有癌症(例如血癌或实体肿瘤)的个体的方法,包括向所述个体施用治疗有效量的使用本文所述的方法产生的NK细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体。在一个实施方案中,本文提供治疗患有癌症(例如血癌或实体肿瘤)的个体的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的使用本文所述的方法产生的ILC3细胞,例如使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体。在某些实施方案中,个体具有自然杀伤细胞的缺陷,例如缺乏对个体的癌症活性的NK细胞。在一个具体的实施方案中,该方法另外包括向所述个体施用分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞,例如治疗有效量的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞。在另一个具体的实施方案中,该方法包括向所述个体另外施用有效量的免疫调节化合物,例如上述免疫调节化合物或沙利度胺。如本文所用,“有效量”是,例如导致个体所患的癌症的一种或多种症状的可检测改善、减缓其进展或消除的量。

[0710] 分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物的施用可以是系统的或局部的。在具体的实施方案中,施用是肠胃外的。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过注射、输注、静脉内(IV)施用、股骨内施用

或肿瘤内施用。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是用装置、基质或支架进行的。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过注射。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过导管。在具体的实施方案中,NK细胞和/或ILC3细胞的注射是局部注射。在更具体的实施方案中,局部注射直接进入实体肿瘤(例如肉瘤)。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过注射器注射。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过引导递送。在具体的实施方案中,通过注射向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物通过腹腔镜检查、内窥镜检查、超声波、计算机断层扫描、磁共振或放射学辅助。

[0711] 在一个具体的实施方案中,癌症是血液癌症,例如白血病或淋巴瘤。在更具体的实施方案中,癌症是急性白血病,例如急性T细胞白血病,急性髓性白血病(AML)、急性早幼粒细胞白血病、急性髓母细胞性白血病、急性成巨核细胞性白血病、前体B急性淋巴母细胞性白血病、前体T急性淋巴母细胞性白血病、伯基特白血病(伯基特淋巴瘤)或急性双表型白血病;慢性白血病,例如慢性髓样淋巴瘤、慢性髓细胞性白血病(CML)、慢性单核细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤或B细胞幼淋巴细胞性白血病;毛细胞淋巴瘤;T细胞幼淋巴细胞白血病;或淋巴瘤,例如组织细胞性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤(例如瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症)、脾边缘区淋巴瘤、浆细胞瘤(例如浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积疾病或重链病)、结外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT淋巴瘤)、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤(MZL)、滤泡淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病、侵袭性NK细胞白血病、成人T细胞白血病/淋巴瘤、结外NK/T细胞淋巴瘤、鼻型、肠病型T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、母细胞NK细胞淋巴瘤、蕈样霉菌病(Sezary综合征)、原发性皮肤CD30阳性T细胞淋巴增殖性疾病(例如,原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤或淋巴瘤样丘疹病)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、未指定的间变性大细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或结节性淋巴细胞为主型霍奇金淋巴瘤。在另一个具体实施方案中,癌症是多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合征。

[0712] 在某些其他具体的实施方案中,癌症是实体肿瘤,例如癌瘤,例如腺癌、肾上腺皮质癌、结肠腺癌、结肠直肠腺癌、结直肠癌、导管细胞癌、肺癌、甲状腺癌、鼻咽癌、黑素瘤(例如恶性黑素瘤)、非黑素瘤皮肤癌或未指定的癌瘤;硬纤维瘤;促结缔组织小圆细胞肿瘤;内分泌肿瘤;尤因肉瘤;生殖细胞肿瘤(例如睾丸癌、卵巢癌、绒毛膜癌、内胚窦瘤、生殖细胞瘤等);肝母细胞瘤;肝细胞癌;神经母细胞瘤;非横纹肌肉瘤软组织肉瘤;骨肉瘤;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;或肾母细胞瘤。在另一个实施方案中,实体肿瘤是胰腺癌或乳腺癌。在其他实施方案中,实体肿瘤是听神经瘤;星形细胞瘤(例如I级毛细胞性星形细胞瘤,II级低级别星形细胞瘤;III级间变性星形细胞瘤;或IV级多形性成胶质细胞瘤);脊索瘤;颅咽管瘤;神经胶质瘤(例如,脑干胶质瘤;室管膜瘤;混合神经胶质瘤;视神经胶质瘤;或室管膜下层瘤);胶质母细胞瘤;髓母细胞瘤;脑膜瘤;转移性脑肿瘤;少突胶质细胞瘤;松果体母细胞瘤;垂体瘤;原始神经外胚层肿瘤;或神经鞘瘤。在另一个实施方案中,癌症是前列腺癌。在另一个实施方案中,癌症是肝癌。在另一个实施方案中,癌症是肺癌。在另一个实施方案中,

癌症是肾癌。

[0713] 在某些实施方案中,患有癌症(例如血液癌症或实体肿瘤)的个体,例如具有自然杀伤细胞缺陷的个体,是在所述施用之前已经接受了骨髓移植的个体。在某些实施方案中,骨髓移植是在所述癌症的治疗中。在某些其他实施方案中,骨髓移植是在除所述癌症之外的病症的治疗中。在某些实施方案中,除了所述骨髓移植之外,个体还接受免疫抑制剂。在某些实施方案中,已经进行骨髓移植的个体在所述施用时表现出移植物抗宿主病(GVHD)的一种或多种症状。在某些其他实施方案中,在GVHD的症状已经显现之前,向已经进行骨髓移植的个体施用所述细胞。

[0714] 在某些具体的实施方案中,在所述施用之前,患有癌症(例如血液癌症)的个体已经接受至少一剂TNF α 抑制剂,例如**ETANERCEPT®** (Enbrel)。在具体的实施方案中,所述个体在所述癌症的诊断的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月内接受所述剂量的TNF α 抑制剂。在一个具体的实施方案中,接受一剂TNF α 抑制剂的个体表现出急性髓性白血病。在更具体的实施方案中,接受一剂TNF α 抑制剂并表现出急性髓性白血病的个体进一步表现出血细胞中染色体5长臂的缺失。在另一个实施方案中,患有癌症(例如血液癌症)的个体显示费城染色体。

[0715] 在某些其他实施方案中,所述个体中的癌症(例如血液癌症或实体肿瘤)对一种或多种抗癌药物是难治的。在具体的实施方案中,癌症对**GLEEVEC®** (甲磺酸伊马替尼)是难治的。

[0716] 在某些实施方案中,所述个体中的癌症(例如血液癌症)对至少一种抗癌药物有反应;在这个实施方案中,胎盘灌流液、分离的胎盘灌流液细胞、分离的自然杀伤细胞(例如胎盘自然杀伤细胞,例如胎盘衍生的中间自然杀伤细胞,分离的组合自然杀伤细胞)或本文所述的NK细胞,和/或其组合,和任选的免疫调节化合物作为辅助治疗或作为与所述抗癌药物的联合疗法加入。在某些其他实施方案中,已经用至少一种抗癌药物治疗患有癌症(例如血液癌症)的个体,和在所述施用之前已复发。在某些实施方案中,待治疗的个体患有难治性癌症。在一个实施方案中,用本文所述细胞的癌症治疗方法防止(例如预防或延迟)癌症复发。在一个实施方案中,本文所述的癌症治疗方法导致癌症缓解1个月或更久,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月或更久,1年或更久,2年或更久,3年或更久,或者4年或更久。

[0717] 在一个实施方案中,本文提供治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法,其包括向个体施用(1)来那度胺;(2)美法仑;和(3)NK细胞,其中所述NK细胞有效治疗所述个体中的多发性骨髓瘤。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或从脐血造血细胞(例如造血干细胞)产生的NK细胞。在另一个实施方案中,所述NK细胞已通过本文所述的用于产生NK细胞的三阶段方法产生。在另一个实施方案中,所述来那度胺、美法仑和/或NK细胞彼此分开施用。在治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法的某些具体实施方案中,所述NK细胞通过包括以下步骤的方法产生:在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞(例如CD34⁺干细胞或祖细胞)以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和随后在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中所述第三细胞群体包含是CD56⁺、CD3⁻、CD16⁻或CD16⁺及CD94⁺或CD94⁻的自然杀伤细胞,和其中至少70%或至少80%的自然

杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0718] 在另一个实施方案中,本文提供治疗患有急性髓性白血病(AML)的个体的方法,其包括向个体施用NK细胞(任选通过用单独的IL2或单独的IL-15、IL2和IL12和IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或IL2和IL15和IL18预处理而激活的),其中所述NK细胞有效治疗所述个体中的AML。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的分离的NK细胞群体在所述施用之前已经用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种进行预处理。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或从脐血造血细胞(例如造血干细胞)产生的NK细胞。在另一个实施方案中,所述NK细胞已通过本文所述的用于产生NK细胞的三阶段方法产生。在治疗患有AML的个体的方法的某些具体实施方案中,所述NK细胞是通过本文所述的三阶段方法产生。在一个具体的实施方案中,待通过前述方法治疗的AML包括难治性AML、预后不良AML或儿童AML。本领域已知的用于施用NK细胞以治疗难治性AML、预后不良AML或儿童AML的方法可适用于此目的;参见例如Miller等,2005,Blood 105:3051-3057;Rubnitz等,2010,J Clin Oncol.28:955-959,其中各自的全部内容通过引用并入本文。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非自然杀伤细胞治疗失败的AML。在具体的实施方案中,所述个体是65岁或更大,和处于第一缓解期。在具体的实施方案中,在施用所述自然杀伤细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行了调理。

[0719] 在一个实施方案中,本文提供治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法,其包括向个体施用(1)来那度胺;(2)美法仑;和(3)ILC3细胞,其中所述ILC3细胞有效治疗所述个体中的多发性骨髓瘤。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞是脐带血ILC3细胞或由脐带血造血细胞(例如造血干细胞)产生的ILC3细胞。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞已通过本文所述的用于产生ILC3细胞的三阶段方法产生。在另一个实施方案中,所述来那度胺、美法仑和/或ILC3细胞彼此分开施用。在治疗患有多发性骨髓瘤的个体的方法的某些具体实施方案中,所述ILC3细胞通过包括以下步骤的方法产生:在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞(例如CD34+干细胞或祖细胞)以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和然后在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中所述第三细胞群体包含是CD56+、CD3-、CD16-或CD16+和是CD94+或CD94-的自然杀伤细胞,和其中至少70%或至少80%的自然杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0720] 在另一个实施方案中,本文提供治疗患有急性髓性白血病(AML)的个体的方法,其包括向个体施用ILC3细胞(任选地通过用IL2和IL12以及IL18、IL12和IL15、IL12和IL18、IL2和IL12和IL15和IL18或者IL2和IL15和IL18预处理来激活的),其中所述ILC3细胞有效治疗所述个体中的AML。在一个具体的实施方案中,使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体已在所述施用之前用IL2、IL12、IL18或IL15中的一种或多种预处理。在一个具体的实施方案中,所述ILC3细胞是脐带血ILC3细胞或由脐带血造血细胞(例如造血干细胞)产生的ILC3细胞。在另一个实施方案中,所述ILC3细胞已通过本文所述的用于产生ILC3细胞的三阶段方法产生。在治疗具有AML个体的方法的某些具体实施方案中,通过如本文所述的三阶段方法产生所述ILC3细胞。在一个具体的实施方案中,通过前述方法治疗的AML包括难治性AML、预后不良AML或儿童AML。本领域已知用于施用ILC3细胞以治疗难治性AML、预后不良AML或儿童AML的方法可适用于此目的;参见例如Miller等,2005,Blood 105:3051-3057;Rubnitz等,2010,J Clin Oncol.28:955-959,其中各自的全部内容通过引用并入本文。在某些实施方案中,所述个体患有至少一种针对AML的非自然杀伤细胞治疗失败的AML。在具体的实施方案中,所述个体是65岁或更大,和处于第一缓解期。在具体的实施方案中,在施用所述自然杀伤细胞之前,所述个体已经用氟达拉滨、阿糖胞苷或两者进行了调理。

[0721] 在治疗患有AML个体的方法的其他具体实施方案中,所述NK细胞通过包括以下步骤的方法产生:在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞(例如CD34⁺干细胞或祖细胞)以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和随后在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中第三细胞群体包含为CD56⁺、CD3⁻、CD16⁻或CD16⁺和为CD94⁺或CD94⁻的自然杀伤细胞,和其中至少70%或至少80%的自然杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中,所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中,所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中,所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ,和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt-3L。在某些实施方案中,第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素,例如低分子量肝素。

[0722] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗患有慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的个体的方法,其中包括向个体施用治疗有效剂量的(1)来那度胺;(2)美法仑;(3)氟达拉滨;和(4)NK细胞,例如通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞,其中所述NK细胞有效治疗所述个体中的所述CLL。在一个具体的实施方案中,所述NK细胞是脐带血NK细胞或由脐带血造血干细胞产生的NK细胞。在另一个实施方案中,所述NK细胞已通过本文所述的用于产生NK细胞的三阶段方法产生。在任何上述方法的具体实施方案中,将所述来那度胺、美法仑、氟达拉滨和扩增的NK细胞分别施用于所述个体。在治疗患有CLL的个体的方法的某些具体实施方案中,所述NK细胞通过包括以下步骤的方法产生:在包含干细胞动员剂和血小板生成素(Tpo)的第一培养基中培养造血干细胞或祖细胞,例如CD34⁺干细胞或祖细胞以产生第一细胞群体,随后在包含干细胞动员剂和白细胞介素-15(IL-15)且缺乏Tpo的第二培养基中培养所述第一细胞群体以产生第二细胞群体,和然后在包含IL-2和IL-15且缺乏干细胞动员剂和LMWH的第三培养基中培养所述第二细胞群体以产生第三细胞群体,其中所述第三细胞

群体包含是CD56+、CD3-，CD16-或CD16+和CD94+或CD94-的自然杀伤细胞，和其中至少70%或至少80%的自然杀伤细胞是存活的。在某些实施方案中，所述第一培养基和/或所述第二培养基缺乏白血病抑制因子(LIF)和/或巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α)。在某些实施方案中，所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和FMS样酪氨酸激酶-3配体(Flt-3L)。在具体的实施方案中，所述第一培养基和所述第二培养基缺乏LIF和MIP-1 α ，和所述第三培养基缺乏LIF、MIP-1 α 和Flt3L。在某些实施方案中，第一培养基、第二培养基或第三培养基均不包含肝素，例如低分子量肝素。

[0723] 5.11.2.抑制肿瘤细胞增殖

[0724] 本文进一步提供了抑制肿瘤细胞增殖的方法，其包括将使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)接近肿瘤细胞，例如将肿瘤细胞与使用本文所述的方法产生的NK细胞相接触。因此可以在抑制肿瘤细胞增殖的方法中使用多个NK细胞，包括使治疗有效量的NK细胞群体接近肿瘤细胞，例如使肿瘤细胞与NK细胞群体中的细胞接触。任选地，使分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞接近肿瘤细胞和/或使用本文所述的方法产生的NK细胞。在另一个具体的实施方案中，另外将免疫调节化合物(例如上述免疫调节化合物)或沙利度胺与肿瘤细胞和/或使用本文所述方法产生的NK细胞接近，使得与相同类型的但没有与使用本文所述的方法产生的NK细胞接近的肿瘤细胞相比，该肿瘤细胞的增殖可检测地减少。任选地，将分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞接近肿瘤细胞和/或已经接触或接近免疫调节化合物的使用本文所述的方法产生的NK细胞。

[0725] 本文还提供了抑制肿瘤细胞增殖的方法，其包括使得使用本文所述的方法产生的ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)接近肿瘤细胞，例如使肿瘤细胞与使用本文所述的方法产生的ILC3细胞接触。因此，多个ILC3细胞可以用于抑制肿瘤细胞增殖的方法中，其包括使治疗有效量的ILC3细胞群体与肿瘤细胞接近，例如使肿瘤细胞与ILC3细胞群体中的细胞接触。任选地，使分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞接近肿瘤细胞和/或使用本文所述方法产生的ILC3细胞。在另一具体实施方案中，另外使免疫调节化合物(例如上述免疫调节化合物)或沙利度胺与肿瘤细胞和/或使用本文所述方法产生的ILC3细胞接近，使得肿瘤细胞的增殖与相同类型而没有与使用本文所述的方法产生的ILC3细胞接近的肿瘤细胞相比可检测地减少。任选地，使分离的胎盘灌流液或分离的胎盘灌流液细胞接近肿瘤细胞和/或已经使其接触或接近免疫调节化合物的使用本文所述的方法产生的ILC3细胞。

[0726] 如本文所用，在某些实施方案中，关于细胞的“接触”或“使其接近”在一个实施方案中涵盖在胎盘灌流液、胎盘灌流液细胞、天然杀伤细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)、ILC3细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)和/或分离的组合自然杀伤细胞与肿瘤细胞之间的直接物理(例如细胞-细胞)接触。在另一个实施方案中，“接触”包括存在于相同的物理空间中，例如胎盘灌流液、胎盘灌流液细胞、自然杀伤细胞(例如胎盘中间自然杀伤细胞)、本文所述的自然杀伤细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)、本文描述的ILC3细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)和/或分离的组合自然杀伤细胞被置于与肿瘤细胞相同的容器(例如培养皿、多孔板)中。在另一个实施方案中，使胎盘灌流液、胎盘灌流液细胞、组合自然杀伤

细胞、胎盘中自然杀伤细胞或本文所述的自然杀伤细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)或本文所述的ILC3细胞(例如根据本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)与肿瘤细胞“接触”例如通过注射或输注胎盘灌流液或细胞,例如胎盘灌流液细胞、组合自然杀伤细胞、自然杀伤细胞(例如胎盘中自然杀伤细胞)或ILC3细胞进入包含肿瘤细胞的个体(例如人,例如癌症患者)中来完成。在免疫调节化合物和/或沙利度胺的情况下,“接触”是指例如细胞和免疫调节化合物和/或沙利度胺直接彼此物理接触,或者置于相同的物理体积(例如,细胞培养容器或个体)内。

[0727] 在具体的实施方案中,肿瘤细胞是血癌细胞,例如白血病细胞或淋巴瘤细胞。在更具体的实施方案中,癌症是急性白血病,例如急性T细胞白血病细胞、急性髓性白血病(AML)细胞、急性早幼粒细胞白血病细胞、急性髓细胞白血病细胞、急性成巨核细胞白血病细胞、前体B急性淋巴母细胞白血病细胞、前体T急性淋巴母细胞白血病细胞、伯基特氏白血病(伯基特氏淋巴瘤)细胞或急性双表型白血病细胞;慢性白血病细胞,例如,慢性髓性淋巴瘤细胞、慢性骨髓性白血病(CML)细胞、慢性单核细胞白血病细胞、慢性淋巴细胞白血病(CLL)/小淋巴细胞淋巴瘤细胞或B细胞幼淋巴细胞白血病细胞;毛细胞淋巴瘤细胞;T细胞幼淋巴细胞白血病细胞;或淋巴瘤细胞、例如组织细胞性淋巴瘤细胞、淋巴浆细胞性淋巴瘤细胞(例如瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症细胞)、脾边缘区淋巴瘤细胞、浆细胞瘤细胞(例如浆细胞骨髓瘤细胞、浆细胞瘤细胞、单克隆免疫球蛋白沉积疾病或重链病)、结外边缘区B细胞淋巴瘤(MALT淋巴瘤)细胞、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)细胞、滤泡淋巴瘤细胞、套细胞淋巴瘤细胞、弥漫性大B细胞淋巴瘤细胞、纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤细胞、血管内大B细胞淋巴瘤细胞、原发性渗出淋巴瘤细胞、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病细胞、侵袭性NK细胞白血病细胞、成人T细胞白血病/淋巴瘤细胞、结外NK/T细胞淋巴瘤-鼻型细胞、肠病型-T细胞淋巴瘤细胞、肝脾T细胞淋巴瘤细胞、母细胞性NK细胞淋巴瘤细胞、蕈样霉菌病(Sezaiy综合症)、原发性皮肤CD30阳性T细胞淋巴瘤组织增殖性疾病(例如,原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤或淋巴瘤样丘疹病)细胞、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤细胞、外周T细胞淋巴瘤-未指定细胞、间变性大细胞淋巴瘤细胞、霍奇金淋巴瘤细胞或结节性淋巴细胞为主的霍奇金淋巴瘤细胞。在另一个具体的实施方案中,肿瘤细胞是多发性骨髓瘤细胞或骨髓增生异常综合征细胞。

[0728] 在具体的实施方案中,肿瘤细胞是实体肿瘤细胞,例如癌瘤细胞,例如腺癌细胞、肾上腺皮质癌细胞、结肠腺癌细胞、结肠直肠腺癌细胞、结肠直肠癌细胞、导管细胞癌细胞、肺癌细胞、甲状腺癌细胞、鼻咽癌细胞、黑素瘤细胞(例如恶性黑素瘤细胞)、非黑素瘤皮肤癌细胞或未分类癌细胞;硬纤维瘤细胞;促结缔组织增生的小圆细胞肿瘤细胞;内分泌肿瘤细胞;尤因肉瘤细胞;生殖细胞肿瘤细胞(例如睾丸癌细胞、卵巢癌细胞、绒毛膜癌细胞、内胚窦瘤细胞、生殖细胞瘤细胞等);肝母细胞瘤细胞;肝细胞癌细胞;成神经细胞瘤细胞;非横纹肌肉瘤软组织肉瘤细胞;骨肉瘤细胞;成视网膜细胞瘤细胞;横纹肌肉瘤细胞;或肾母细胞瘤细胞。在另一个实施方案中,肿瘤细胞是胰腺癌细胞或乳腺癌细胞。在其他实施方案中,实体肿瘤细胞是听神经瘤细胞;星形细胞瘤细胞(例如,I级毛细胞星形细胞瘤细胞,II级低级星形细胞瘤细胞;III级间变性星形细胞瘤细胞;或IV级多形性成胶质细胞瘤细胞);脊索瘤细胞;颅咽管瘤细胞;神经胶质瘤细胞(例如,脑干神经胶质瘤细胞;室管膜瘤细胞;混合神经胶质瘤细胞;视神经胶质瘤细胞;或室管膜下细胞);成胶质细胞瘤细胞;髓母细胞

瘤细胞;脑膜瘤细胞;转移性脑肿瘤细胞;少突胶质细胞瘤;松果体细胞瘤细胞;垂体瘤细胞;原始神经外胚层肿瘤细胞;或神经鞘瘤细胞。在另一个实施方案中,肿瘤细胞是前列腺癌细胞。

[0729] 如本文所用,“治疗有益的”和“治疗有益效果”包括但不限于,例如肿瘤大小的减小;减少或停止肿瘤的扩增;减少或预防转移性疾病;每单位体积的组织样品(例如血液样品)中癌细胞数量的减少;所述个体具有的特定癌症或肿瘤的任何症状的临床改善,个体具有的特定癌症的任何症状的恶化减轻或停止恶化等等。

[0730] 5.11.3. 使用NK细胞和/或ILC3细胞和其他抗癌剂治疗癌症

[0731] 利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体可以是包括一种或多种其他抗癌剂的抗癌治疗方案的部分。同样地,利用使用本文所述的方法产生的ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)治疗患有癌症的个体可以是包括一种或多种其他抗癌剂的抗癌治疗方案的部分。另外地或可选地,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞治疗患有癌症的个体可用于补充包含一种或多种其他抗癌剂的抗癌疗法。此类抗癌剂在本领域中是公知的,且包括抗炎剂、免疫调节剂、细胞毒性剂、癌症疫苗、化疗剂、HDAC抑制剂(例如,HDAC6i (ACY-241)) 和siRNA。除了使用本文所述的方法产生的NK细胞和任选的灌流液、灌流液细胞、使用本文所述的方法产生的NK细胞之外的自然杀伤细胞之外,还可以施用于患有癌症的个体(例如具有肿瘤细胞的个体)的特定抗癌剂包括但不限于:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿索达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿霉素;氟尿嘧啶(adrucil);阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美坦醌;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天冬酰胺酶(例如,来自*Erwinia chrysani*; *Erwinase*);曲林菌素;阿瓦斯丁(贝伐单抗);阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德(bisnafide dimesylate);比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素;卡普唑酮;卡替胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;塞来考昔(COX-2抑制剂);柔红霉素(Cerubidine);苯丁酸氮芥;西罗里霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克里斯托(crisnatol mesylate);环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吡啶;多西他赛;亚德里亚霉素;盐酸阿霉素;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;爱施巴(Elspar);恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸阿柔比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝;依托泊苷;依托泊苷磷酸盐;凡毕复(Etopophos);埃托宁;法倔唑盐酸盐;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;氟达拉滨磷酸盐;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福斯曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;去甲柔毛霉素(Idamycin);盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;异丙铂;伊立替康;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;利罗唑盐酸盐;洛美曲索钠;洛莫司汀;洛索萸酮盐酸盐;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美乌替派;米丁度胺;米托卡星;丝裂红素(mitocromin);米托洁林;丝裂马菌素;丝裂霉素;米托司培;米托坦;米托萸醌盐酸盐;霉酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗萸醌;普卡霉素;普洛美坦;吡菲尔钠;紫菜霉素;泼尼莫司汀;丙卡巴嗪盐酸盐;阿地白介

素 (Proleukin); 巯基嘌呤 (Purinethol); 嘌呤霉素; 嘌呤霉素盐酸盐; 吡唑呋喃; 甲氨蝶呤 (Rheumatrex); 利波腺苷; 沙芬戈; 盐酸沙芬戈; 司莫司汀; 辛曲秦; 磷乙酰天冬氨酸钠 (sparfosate sodium); 稀疏霉素; 盐酸螺旋锗; 螺莫司汀; 螺铂; 链黑菌素; 链脲佐菌素; 磺氯苯脲; Tabloid; 他利霉素; 替可加兰钠; 泰索帝; 替加氟; 盐酸替罗葱醌; 替莫泊芬; 替尼泊苷; 替罗昔隆; 鞣内酯; 硫咪嘌呤; 硫鸟嘌呤; 塞替派; 噻唑呋林; 替拉扎明; Toposar; 托瑞米芬柠檬酸盐; 醋酸曲托龙; 甲氨蝶呤 (Trexall); 磷酸曲西立滨; 三甲曲沙; 葡糖醛酸三甲曲沙; 曲普瑞林; 盐酸妥布氯唑; 乌拉莫司汀 (uracil mustard); 乌瑞替派; 伐普肽; 维替泊芬; 硫酸长春碱; 硫酸长春新碱; 长春地辛; 硫酸长春地辛; 硫酸长春新碱; 硫酸长春甘酯; 硫酸长春瑞林; 酒石酸长春瑞滨; 硫酸长春罗定; 硫酸长春利定; 伏氯唑; 折尼铂; 净司他丁; 和盐酸佐柔比星。

[0732] 其他抗癌药物包括但不限于: 20-表-1, 25-二羟基维生素D3; 5-氮杂胞苷; 5-乙炔基尿嘧啶; 阿比特龙; 阿柔比星; 酰基富烯 (acylfulvene); 腺环戊醇 (adecypenol); 阿多来新; 阿地白介素; ALL-TK拮抗剂; 六甲蜜胺; 氮莫司汀; 艾美多 (amidox); 氨磷汀; 氨基乙酰丙酸; 氨柔比星; 安吡啶; 阿那格雷; 阿那曲唑; 穿心莲内酯; 血管生成抑制剂; 拮抗剂D; 拮抗剂G; 安雷利克斯; 抗背形态形成蛋白-1; 抗雄激素, 前列腺癌; 抗雌激素; 抗癌酮; 反义寡核苷酸; 阿非迪霉素甘氨酸盐; 凋亡基因调节剂; 凋亡调节剂; 脱嘌呤酸; ara-CDP-DL-PTBA; 精氨酸脱氨酶; 奥沙那宁 (asulacriner); 阿他美坦; 阿莫司汀 (atrimustine); 乌司他丁 (axinastatin) 1; 乌司他丁2; 乌司他丁3; 阿扎司琼; 阿扎毒素 (azatoxin); 重氮酪氨酸; 浆果赤霉素III衍生物; 班兰诺 (balanol); 巴马司他; BCR/ABL拮抗剂; 苯并二氢卟吩 (benzochlorins); 苯甲酰基星形孢菌素 (benzoylstauroporine); β -内酰胺衍生物; β -阿立辛 (β -alethine); β -可来霉素B (betaclamycin B); 桦木酸; bFGF抑制剂; 比卡鲁胺; 比生群; 双氮丙啶基精胺 (bisaziridinylspermine); 双奈法德; Bistratene A; 比折来新; 比锐来特 (breflate); 溴匹立明; 布度钛; 丁硫氨酸亚砷胺; 卡泊三醇; 卡弗他丁 (calphostin) C; 依立替康 (camptosar) (也称Campto; 伊立替康) 喜树碱衍生物; 卡培他滨; 甲酰胺-氨基-三唑; 羧基酰胺三唑; CaRest M3; CARN 700; 软骨衍生的抑制剂; 卡折来新; 酪蛋白激酶抑制剂 (ICOS); 果树精胺; CC-122; CC-220; CC-486; 杀菌肽B; 西曲瑞克; 二氢卟吩 (chlorins); 氯喹啉磺酰胺; 西卡前列素; 顺式卟啉; 克拉屈滨; 克罗米芬类似物; 克霉唑; 克立霉素 (collismycin) A; 克立霉素B; 考布他汀A4; 考布他汀类似物; 康纳京尼 (conagenin); 卡那贝西汀 (crambesidin 816); 克雷斯托 (crisnatol); 念珠藻素 (cryptophycin) 8; 念珠藻素A衍生物; 卡拉新 (curacin) A; 环戊葱醌 (cyclopentantraquinones); 环普兰姆 (cycloplatam); 西匹霉素 (cypemycin); 阿糖胞苷烷磷酸酯 (cytarabine ocfosfate); 细胞溶解因子; 磷酸己烷雌酚 (cytostatin); 达昔单抗 (dacliximab); 地西他滨; 脱氢膜海鞘素 (dehydrodidemnin) B; 地洛瑞林; 地塞米松; 右异环磷酰胺 (dexifosfamide); 右丙亚胺; 右维拉帕米 (dexverapamil); 亚丝醌 (diaziquone); 膜海鞘素 (didemnin) B; 地多西 (didox); 二乙基降精胺 (diethylnorspermine); 二氢-5-氮杂胞苷; 9-二氢紫杉醇; 二恶霉素 (dioxamycin); 二苯基螺莫司汀; 多西他赛; 二十二烷醇; 多拉司琼; 脱氧氟尿苷; 多柔比星; 屈洛昔芬; 屈大麻酚; 杜洛霉素SA; 依布硒啉; 依考莫司汀; 依地福新; 依决洛单抗; 依氟鸟氨酸; 榄香烯; 乙嘧替氟; 表柔比星; 依立雄胺; 雌莫司汀类似物; 雌激素激动剂; 雌激素拮抗剂; 依他硝唑; 依托泊苷磷酸盐; 依西美坦; 法倔唑; 法扎拉滨; 芬维A胺; 非格司亭; 非那雄

胺;夫拉平度;氟卓斯汀(flezelastine);夫斯特隆(fluasterone);氟达拉滨(例如 Fludara);盐酸氟道诺霉素;福酚美克(forfenimex);福美坦;福司曲星(fostriecin);福莫司汀;钆特沙弗林;硝酸镓;加洛他滨(galocitabine);加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;和普苏姆(hepsulfam);heregulin;六甲撑二乙酰胺;高三尖杉酯碱(HHT, omecetaxine mepesuccinate);金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;碘昔芬;伊决孟酮(idramantone);伊莫福新;伊洛马司他(ilomastat);伊马替尼(例如GLEEVEC®),咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白细胞介素;碘苄胍(iobenguane);碘阿霉素(iododoxorubicin);4-甘薯醇(ipomeanol,4-);伊罗普拉(iroplact);伊索拉定;异苯胍唑(isobengazole);异高芽孢杆菌素(isohomohalicondrin)B;伊他司琼(itasetron);jasplakinolide;kahalalide F;三乙酸片螺素-N;兰乐肽;leinamycin;来格司亭;香菇多糖硫酸酯;leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+黄体酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;立索克林酰胺(lissoclinamide)7;洛铂;蚯蚓磷脂(lombricine);洛美曲索;氯尼达明;洛索蒽醌;洛索立宾;勒托替康;镧德卟啉(lutetium texaphyrin);立索茶碱(lysofylline);裂解肽;美坦辛(maitansine);麦洛坦汀(mannostatin)A;马马司他;马索罗酚;马司非(maspin);基质溶解素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔(menogaril);麦尔巴隆(merbarone);美替瑞林(meterelin);甲硫氨酸酶;胃复安;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭(mirimostim);米托胍脲(mitoguazone);二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺(mitonaftide);刺尾鱼毒素成纤维细胞生长因子-皂草素(mitotoxin fibroblast growth factor-saporin);米托蒽醌;莫法罗汀(mofarotene);莫拉司亭;抗EGFR抗体(例如,爱必妥(西妥昔单抗));抗CD19抗体;抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗);抗CS-1抗体(例如,埃罗妥珠单抗(elotuzumab) (BMS/AbbVie));抗CD38抗体(例如,达托木单抗(Genmab/Janssen Biotech);抗CD138抗体(例如,吡达昔单抗(Biotest AG Dreieich));抗PD-1抗体;抗PD-L1抗体(例如,durvalumab (AstraZeneca));抗NKG2A抗体(例如,monalizumab (IPH2201;Innate Pharma));抗DLL4抗体(例如,demcizumab (Oncomed/Celgene));抗DLL4和抗VEGF双特异性抗体;抗RSP03抗体;抗-TIGIT抗体;ICOS激动剂抗体;抗-disialoganglioside (GD2) 抗体(例如,单克隆抗体3F8或ch14.18);抗ErbB2抗体(例如,赫赛汀);人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;单哌潘生丁;氮芥类抗癌剂;美卡普罗(mycaperoxide)B;分枝杆菌细胞壁提取物;美瑞泡仁(myriaporone);N-乙酰地那林;N-取代苯甲酰胺;那法瑞林;纳格瑞替(nagrestip);纳洛酮+喷他佐辛;纳普维(napavin)、萘特非(naphterpin);那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈瑞膦酸;尼鲁米特;丽沙霉素(nisamycin);一氧化氮调节剂;氮氧化物抗氧化剂;硝普林;奥利默森(GENASENSE®);0⁶-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;奥克恩(okicenone);寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;奥坦西隆;奥拉新(oracin);口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂(例如,Floxatin);厄诺霉素(oxaunomycin);紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;帕诺明(palauamine);十六酰基根霉素(palmitoylrhizoxin);帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬(panomifene);帕拉贝新(parabactin);帕折普汀(pazelliptine);培门冬酶;皮地新(peldesine);戊聚糖多硫酸钠;喷司他丁;pentrozone;全氟溴烷;培磷酰胺(perfosfamide);紫苏醇;苯连氮霉素(phenazinomycin);苯基乙酸酯;

磷酸酶抑制剂;溶链球制剂;盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;普来司汀(placetin)A;普来司汀B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺复合物;吡菲尔钠;泊非罗霉素;强的松;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂,微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;羟基茜草素;吡唑啉吡啶(pyrazoloacridine);吡哆酰基化血红蛋白聚氧乙烯偶联物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;铼Re 186依替膦酸;根霉素;核酶;RII视黄酰胺;罗希吐碱(rohitukine);罗莫肽(romurtide);罗喹美克;鲁滨吉隆(rubiginone)B1;鲁泊塞(ruboxyl);沙芬戈(safingol);圣特平(saintopin);SarCNU;肌肉叶绿醇(sarcophytol)A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生抑制剂1;正义寡核苷酸;信号转导抑制剂;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;索佛罗(solverol);生长调节素结合蛋白;索纳明(sonermin);斯帕磷酸;斯皮卡霉素(Spicamycin)D;螺莫司汀(spiromustine);斯耐潘定(splenopentin);海绵抑制素1;角鲨胺;斯替皮米德(stipiamide);溶基质素抑制剂;索非罗新(sulfinosine);超活性血管活性肠肽拮抗剂;磺化偏端霉素(suradista);苏拉明;苦马豆素;他莫司汀(tallimustine);他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀(tauromustine);他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;碲吡喃(tellurapyrylium);端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替尼泊苷;四氯十氧化物(tetrachlorodecaoxide);替唑明(tetrazomine);噻立拉斯汀(thaliblastine);噻可拉林(thiocoraline);血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;促胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南(thymotrinan);促甲状腺激素;锡乙基初叶啉(tin ethyl etiopurpurin);替拉扎明;二氯化二茂钛;托普升替(topsentin);托瑞米芬;翻译抑制剂;维生素A酸;三乙酰尿苷;曲西立滨;曲美沙特;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄豚(turosteride);酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂;UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦来源的生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;凡瑞林(variolin)B;维克替比(Vectibix)(帕尼单抗)维拉雷琐(velaresol);凡拉明(veramine);凡啉(verdins);维替泊芬;长春瑞滨;维萨汀(vinxaltine);维他欣(vitaxin);伏氯唑;Welcovorin(亚叶酸);希罗达(卡培他滨);扎诺特隆;折尼铂;亚苾维C(zilasorb);和净司他丁斯酯。

[0733] 利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体可以是抗癌治疗方案的部分,所述抗癌疗法方案包括一种或多种免疫检查点调节剂。在某些实施方案中,免疫检查点调节剂调节免疫检查点分子如CD28、OX40、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体相关蛋白(GITR)、CD137(4-1BB)、CD27、疱疹病毒进入介体(HVEM)、T细胞免疫球蛋白和含粘蛋白结构域-3(TIM-3)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(CTLA-4)、T细胞活化的V结构域免疫球蛋白抑制剂(VISTA)、B和T淋巴细胞衰减剂(BTLA)、PD-1和/或PD-L1。在某些实施方案中,免疫检查点分子是抗体或其抗原结合片段。

[0734] 在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是免疫检查点分子的激动剂。在某些实施方案中,免疫检查点分子是CD28、OX40、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体相关蛋白(GITR)、CD137(4-1BB)、CD27、ICOS(CD278);诱导性T细胞共刺激剂和/或疱疹病毒进入介体(HVEM)。在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是抗体或其抗原结合片段。

[0735] 在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是免疫检查点分子的拮抗剂。在某些实施

方案中,免疫检查点分子是T细胞免疫球蛋白和含粘蛋白结构域-3 (TIM-3)、淋巴细胞活化基因3 (LAG-3)、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4 (CTLA-4)、T细胞活化的V域免疫球蛋白抑制剂 (VISTA)、B和T淋巴细胞衰减剂 (BTLA)、PD-1和/或PD-L1。在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是抗体或其抗原结合片段。

[0736] 在某些实施方案中,免疫检查点调节剂是抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合PD-1。在某些实施方案中,结合PD-1的抗体或其抗体结合片段是纳武单抗 (nivolumab) (**OPDIVO®** BMS-936558,MDX-1106,ONO-4538;Bristol-Myers Squibb,Ono Pharmaceuticals,Inc.)、派姆单抗 (pembrolizumab) (**KEYTRUDA®**,lambrolizumab,MK-3475;Merck)、pidilizumab (CT-011;Curetech,Medivation);MEDI0680 (AMP-514;MedImmune,AstraZeneca);PDR-001 (Novartis)、SHR1210或INCSHR1210;Incyte,Jiangsu Hengrui)。在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段结合PD-L1。在某些实施方案中,结合PD-L1的抗体或其抗体结合片段是durvalumab (MEDI4736;MedImmune,AstraZeneca)、BMS-936559 (MDX-1105;Bristol-Myers Squibb)、avelumab (MSB0010718C;Merck Serono,Pfizer),或atezolizumab (MPDL-3280A;Genentech,Roche)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合LAG-3。在某些实施方案中,结合LAG-3的抗体或其抗体结合片段是BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb)、GSK2831781 (GlaxoSmithKline) 或LAG525 (Novartis)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合CTLA-4。在某些实施方案中,结合CTLA-4的抗体或其抗体结合片段是伊匹单抗 (YERVOY™,BMS-734016,MDX010,MDX-101;Bristol-Myers Squibb) 或tremelimumab (CP-675,206;MedImmune,AstraZeneca)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合OX40。在某些实施方案中,结合OX40的抗体或其抗体结合片段是MEDI6469 (MedImmune,AstraZeneca)、MEDI0562 (MedImmune,AstraZeneca) 或KHK4083 (Kyowa Hakko Kirin)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合GITR。在某些实施方案中,结合GITR的抗体或其抗体结合片段是TRX518 (Leap Therapeutics) 或MEDI1873 (MedImmune,AstraZeneca)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合CD137 (4-1BB)。在某些实施方案中,结合CD137 (4-1BB) 的抗体或其抗体结合片段是PF-2566 (PF-05082566;Pfizer) 或urelumab (BMS-663513;Bristol-Myers Squibb)。在某些实施方案中,抗体或其抗体结合片段结合CD27。在某些实施方案中,结合CD27的抗体或其抗体结合片段是varilumab (CDX-1127;Celldex Therapies)。

[0737] 在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞 (例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体) 治疗患有癌症的个体是包含来那度胺或泊马度胺的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞 (例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体) 治疗患有癌症的个体是包含HDAC抑制剂的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞 (例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体) 治疗患有癌症的个体是包括抗CS-1抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞 (例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体) 治疗患有癌症的个体是包括抗CD38抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞 (例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体) 治疗患有癌症的个体是包括抗CD138抗体的抗癌治疗方

案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗PD-1抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗PD-L1抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗NKG2A抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗;**RITUXAN®**)的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括CC-122的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括CC-220的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗DLL4抗体(例如,demcizumab)的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗DLL4和抗VEGF双特异性抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗RSP03抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括抗TIGIT抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括ICOS激动剂抗体的抗癌治疗方案的部分。在某些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)治疗患有癌症的个体是包括高三尖杉酯碱(例如,omacetaxine mepesuccinate)的抗癌治疗方案的部分。

[0738] 在一些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的NK细胞治疗患有癌症的个体是用于抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗癌治疗方案的部分。在一些实施方案中,利用使用本文所述的方法产生的ILC3细胞治疗患有癌症的个体是抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗癌治疗方案的部分。在一个实施方案中,ADCC方案包括与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞组合施用一种或多种抗体(例如前述段落中描述的抗体)。可以使用这样的ADCC方法治疗几种类型的癌症,包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)或其他B细胞恶性肿瘤(淋巴瘤和白血病)、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌和头颈癌。在具体的实施方案中,ADCC治疗包括施用一种或多种以下抗体:抗EGFR抗体(例如,爱必妥(西妥昔单抗))、抗CD19抗体、抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)、抗-双唾液酸神经节苷脂(GD2)抗体(例如,单克隆抗体3F8或ch14.18)或抗ErbB2抗体(例如,赫赛汀)与使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞组合。在一个实施方案中,ADCC方案包括与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞联合施用抗CD33抗体。在一个实施方案中,ADCC方案包括与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞联合施用抗CD20抗体。在一个实

施方案中,ADCC方案包括与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞联合施用抗CD138抗体。在一个实施方案中,ADCC方案包括与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞联合施用抗CD32抗体。

[0739] 5.11.4. 病毒感染的治疗

[0740] 在另一个实施方案中,本文提供了治疗患有病毒感染的个体的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的使用本文所述方法产生的NK细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体)。在另一个实施方案中,本文提供了治疗患有病毒感染的个体的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的使用本文所述方法产生的ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的ILC3细胞群体)。在某些实施方案中,个体具有自然杀伤细胞的缺陷,例如缺乏具有抗个体的病毒感染的活性的NK细胞或其他先天淋巴细胞。在某些具体的实施方案中,所述施用另外包括向个体施用一种或多种分离的胎盘灌流液、分离的胎盘灌流液细胞、分离的自然杀伤细胞(例如胎盘自然杀伤细胞,例如胎盘衍生的中间自然杀伤细胞,分离的组合自然杀伤细胞)和/或其组合。在某些具体的实施方案中,使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞在所述施用之前接触或接近免疫调节化合物(例如上述免疫调节化合物)或沙利度胺。在某些其他具体实施方案中,除了使用本文所述的方法产生的所述NK细胞和/或ILC3细胞外,所述施用包括向所述个体施用免疫调节化合物(例如上述免疫调节化合物)或沙利度胺,其中所述量为例如导致所述病毒感染的一种或多种症状的可检测的改善、减缓其进程或消除所述病毒感染的一种或多种症状的量。在具体的实施方案中,病毒感染是由腺病毒科、微小核糖核酸病毒科、疱疹病毒科、肝脱氧核糖核酸病毒科、黄病毒科、逆转录病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、乳头瘤病毒科、弹状病毒科或披膜病毒科的病毒感染。在更具体的实施方案中,所述病毒是人类免疫缺陷病毒(HIV)、柯萨奇病毒、甲型肝炎病毒(HAV)、脊髓灰质炎病毒、埃-巴二氏病毒(EBV)、1型单纯疱疹(HSV1)、2型单纯疱疹病毒(HSV2)、人巨细胞病毒(CMV)、8型人疱疹病毒(HHV8)、带状疱疹病毒(水痘带状疱疹病毒(VZV)或shingles病毒)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、丁型肝炎病毒(HDV)、戊型肝炎病毒(HEV)、流感病毒(例如,甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒或托高土病毒(thogotovirus))、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、乳头瘤病毒,狂犬病毒或风疹病毒。

[0741] 在其他更具体的实施方案中,所述病毒是腺病毒种A,血清型12、18或31;腺病毒种B,血清型3、7、11、14、16、34、35或50;腺病毒种C,血清型1、2、5或6;种D,血清型8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、33、36、37、38、39、42、43、44、45、46、47、48、49或51;种E,血清型4;或种F,血清型40或41。

[0742] 在某些其他更具体的实施方案中,所述病毒是Apoi病毒(APOIV)、Aroa病毒(AROAV)、巴贾病毒(BAGV)、斑齐病毒(BANV)、博博衣病毒(BOUV)、Cacipacore病毒(CPCV)、卡勒岛病(CIV)、Cowbone Ridge病毒(CRV)、登革热病毒(DENV)、埃杰山病毒(EHV)、Gadgets Gully病毒(GGYV)、伊列乌斯病毒(ILHV)、以色列火鸡脑膜脑脊髓炎病毒(ITV)、日本脑炎病毒(JEV)、朱格拉病毒(JUGV)、朱蒂亚帕病毒(JUTV)、凯丹姆病毒(KADV)、凯多各病毒(KEDV)、科科贝拉病毒(KOKV)、科坦戈病毒(KOUV)、科萨努尔森林病病毒(KFDV)、兰加特病毒(LGTV)、Meaban病毒(MEAV)、摩多克病毒(MODV)、蒙大纳鼠耳蝠白质脑炎病毒(MMLV)、墨莱溪谷脑炎病毒(MVEV)、Ntaya病毒(NTAV)、鄂木斯克出血热病毒(OHFV)、波瓦桑病毒

(POWV)、里约布拉沃病毒(RBV)、皇家农场病毒(RFV)、Saboya病毒(SABV)、圣路易斯脑炎病毒(SLEV)、Sal Vieja病毒(SVV)、San Perlita病毒(SPV)、索马里滋里夫病毒(SREV)、Sepik病毒(SEPV)、Tembusu病毒(TMUV)、蜚传脑炎病毒(TBEV)、Tyuleniy病毒(TYUV)、乌干达S病毒(UGSV)、Usutu病毒(USUV)、Wesselsbron病毒(WESSV)、西尼罗病毒(WNV)、雅温得病毒(YAOV)、黄热病病毒(YFV)、Yokose病毒(YOKV)或寨卡病毒(ZIKV)。

[0743] 在其他实施方案中,将使用本文所述的方法产生的NK细胞和任选的胎盘灌流液和/或灌流液细胞作为包括一种或多种其他抗病毒剂的抗病毒治疗方案的部分施用于患有病毒感染的个体。可以施用于患有病毒感染的个体的特定抗病毒剂包括但不限于:咪喹莫特、普达非洛、盾叶鬼臼树脂、干扰素 α (IFN α)、reticolos、壬苯醇醚-9、阿昔洛韦、泛昔洛韦、伐昔洛韦、更昔洛韦、西多福韦;金刚烷胺、金刚乙胺;利巴韦林;扎那马韦和奥塞洛韦;蛋白酶抑制剂如茚地那韦、奈非那韦、利托那韦或沙奎那韦;核苷逆转录酶抑制剂,例如双脱氧腺苷、拉米夫定、司他夫定、扎西他滨或齐多夫定;和非核苷逆转录酶抑制剂如奈韦拉平或依法韦仑。

[0744] 5.11.5. ILC3细胞的其他治疗用途

[0745] 本文提供了可用于本文提供的所有方法的ILC3细胞。在以下方面中公开了其中可以使用ILC3细胞的示例性方法。

[0746] 另一方面,本文提供了在化疗后修复胃肠道的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。

[0747] 另一方面,本文提供针对辐射保护个体的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。在某些方面,所述ILC3细胞用作骨髓移植的辅助物。

[0748] 在另一方面,本文提供了重建个体胸腺的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。

[0749] 另一方面,本文提供了促进对个体中病原体的保护性免疫的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞通过本文所述的三阶段方法产生。在某些方面,执行促进对病原体的保护性免疫以治疗肠道感染。在某些方面,执行促进对病原体的保护性免疫以防止肠道感染。在某些方面,该肠道感染是鼠柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)。

[0750] 另一方面,本文提供了肿瘤排斥的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞已通过本文所述的三阶段方法产生。

[0751] 另一方面,本文提供维持器官形成期间的组织完整性的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞已通过本文所述的三阶段方法产生。

[0752] 另一方面,本文提供了组织修复的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞已通过本文所述的三阶段方法产生。

[0753] 另一方面,本文提供了炎症调控的方法,其包括向个体施用多个ILC3细胞,其中所述ILC3细胞已通过本文所述的三阶段方法产生。

[0754] 5.11.6. 施用

[0755] 测定细胞(例如,胎盘灌流液细胞(例如来自胎盘灌流液的有核细胞)、合并的自然杀伤细胞、ILC3细胞和/或分离的自然杀伤细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞群体))的数量和测定免疫调节化合物(例如免疫调节化合物)或沙利度胺的量可以彼

此独立地进行。

[0756] 分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物的施用可以是全身或局部的。在具体的实施方案中,施用是肠胃外的。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过注射、输注、静脉内(IV)施用、股骨内施用或肿瘤内施用。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是利用装置、基质或支架进行的。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过注射。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过导管。在具体的实施方案中,NK细胞和/或ILC3细胞的注射是局部注射。在更具体的实施方案中,局部注射是直接进入实体肿瘤(例如,肉瘤)。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过采用注射器的注射。在具体的实施方案中,向受试者施用分离的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其药物组合物是通过引导递送。在具体的实施方案中,通过腹腔镜检查、内窥镜检查、超声波、计算机断层扫描、磁共振或放射学辅助将NK细胞和/或分离的ILC3细胞群体或其药物组合物通过注射施用于受试者。

[0757] 5.11.6.1.细胞的施用

[0758] 在某些实施方案中,采用了使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体),例如施用给个体,其任何量或数量导致对个体有可检测的治疗益处,例如有效量,其中个体具有病毒感染、癌症或肿瘤细胞,例如具有肿瘤细胞、实体肿瘤或血液癌症的个体,例如癌症患者。这样的细胞可以按照细胞的绝对数量施用于这样的个体,例如,所述个体可以施用约、至少约或至多约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} 个使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞。在其他实施方案中,使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞可以按照相对细胞数量施用于这样的个体,例如,所述个体可以施用约、至少约或至多约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 或 1×10^{11} 个使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞/千克个体体重。在其他实施方案中,使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞可以按照相对细胞数量施用于这样的个体,例如,所述个体可以施用约、至少约或至多约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞/千克个体体重。使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞可以根据使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞和任选的胎盘灌流液细胞和/或使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞以外的自然杀伤细胞的数量与所述个体中的肿瘤细胞数量(例如,估计数量)之间的近似比率施用于这样的个体。例如,使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞可以以约、至少约或至多约1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、45:1、50:1、55:1、60:1、65:1、70:1、75:1、80:1、85:1、90:1、95:1或100:1的与个体中肿瘤细胞数量的比率施用于所述个体。可以通过例如计数来自个体的组织样品(例如血液样品,活组织检查等)中的肿瘤细胞数目来估计这样的个体中肿瘤细胞的数量。在具体的实施方案中,例如,对于实体肿瘤,所述计数是与一个或多个肿瘤的成像结合进行的,以获得近似的肿瘤体积。在一个具体的实施方案中,除了使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞、任选地

胎盘灌流液细胞和/或使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞以外的自然杀伤细胞之外,向个体施用免疫调节化合物或沙利度胺,例如有效量的免疫调节化合物或沙利度胺。

[0759] 在某些实施方案中,抑制(例如,个体中)肿瘤细胞增殖的方法,治疗具有个体的自然杀伤细胞缺陷的个体的方法,或治疗患有病毒感染的个体的方法,或治疗患有癌症的个体(例如具有肿瘤细胞、血液癌症或实体肿瘤的个体)的方法包括使肿瘤细胞接近或向所述个体施用使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞和一种或多种胎盘灌流液和/或胎盘灌流液细胞的组合。在具体的实施方案中,该方法另外包括使肿瘤细胞接近或向个体施用免疫调节化合物或沙利度胺。

[0760] 在一个具体的实施方案中,例如,治疗具有个体自然杀伤细胞的缺陷的个体(例如,NK细胞数量或NK细胞对癌症、肿瘤或病毒性感染细胞的反应性的缺陷),或治疗患有癌症或病毒感染的个体或抑制肿瘤细胞增殖包括使所述肿瘤细胞接近或向所述个体施用使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,其补充有分离的胎盘灌流液细胞或胎盘灌流液。在具体的实施方案中,每毫升约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多的使用本文所述的方法产生的NK细胞或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多的使用本文所述的方法产生的NK细胞补充有约或至少约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多的分离的胎盘灌流液细胞/毫升,或者 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多的分离的胎盘灌流液细胞。在其他更具体的实施方案中,约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多的使用本文所述的方法产生的NK细胞或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多的使用本文所述的方法产生的NK细胞补充有约或至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000mL灌流液,或约1单位的灌流液。

[0761] 在另一个具体的实施方案中,治疗具有个体的自然杀伤细胞缺陷的个体,治疗患有癌症的个体,治疗患有病毒感染的个体或抑制肿瘤细胞增殖包括使肿瘤细胞接近或向个体施用使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞,其中所述细胞补充有贴壁胎盘细胞,例如贴壁胎盘干细胞或多能细胞,例如CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺组织培养塑料贴壁胎盘细胞。在具体实施方案中,使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞补充有每毫升约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多的贴壁胎盘干细胞或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多贴壁胎盘细胞,例如贴壁胎盘干细胞或多能细胞。

[0762] 在另一个具体的实施方案中,治疗具有个体的自然杀伤细胞缺陷的个体,治疗患有癌症的个体,治疗患有病毒感染的个体或抑制肿瘤细胞增殖使用免疫调节化合物或沙利度胺与使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞组合进行,其中所述细胞补充有

条件培养基,例如由CD34⁻、CD10⁺、CD105⁺、CD200⁺组织培养塑料贴壁胎盘细胞条件化的培养基,例如每单位灌流液或每10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰或10¹¹个使用本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.1、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mL的干细胞条件培养基。在某些实施方案中,组织培养塑料贴壁胎盘细胞是在美国专利号7,468,276和8,057,788中描述的多能贴壁胎盘细胞,其公开内容以引用的方式整体并入本文。在另一具体实施方案中,所述方法另外包括使肿瘤细胞接近或向个体施用免疫调节化合物或沙利度胺。

[0763] 在另一个具体的实施方案中,治疗具有个体的自然杀伤细胞缺陷的个体,治疗患有癌症的个体,治疗患有病毒感染的个体或抑制肿瘤细胞增殖(其中使用本文所述的方法产生的所述NK细胞和/或ILC3细胞补充有胎盘灌流液细胞),在所述接近之前,使灌流液细胞与白细胞介素-2(IL-2)接近一段时间。在某些实施方案中,所述时间段为所述接近之前约、至少或至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46或48小时。

[0764] 使用本文所述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞及任选地灌注液或灌注液细胞可以在抗癌治疗期间一次性施用于患有病毒感染的个体、患有癌症的个体或具有肿瘤细胞的个体;或可以多次施用,例如治疗期间每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时一次,或每1、2、3、4、5、6或7天一次,或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、36或更多周一次。在使用细胞和免疫调节化合物或沙利度胺的实施方案中,免疫调节化合物或沙利度胺以及细胞或灌流液可一起施用于个体,例如在相同的制剂中;分开地施用,例如以分开的制剂,大致同时;或可以单独施用,例如,以不同的给药时间表或在一天中的不同时间施用。类似地,在使用细胞和抗病毒化合物或抗癌化合物的实施方案中,抗病毒化合物或抗癌化合物以及细胞或灌流液可一起施用于个体,例如在相同的制剂中;分开地,例如以分开的制剂,大致同时;或可以单独地施用,例如,以不同的给药时间表或在一天中的不同时间施用。可以施用使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞以及灌注液或灌注液细胞,而不管在过去是否已经向个体施用过使用本文描述的方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞、灌流液或灌流液细胞。

[0765] 6. 试剂盒

[0766] 本文提供了包含一个或多个的容器的药物包装或试剂盒,所述容器填充有一种或多种本文所述组合物,例如包含通过本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞(例如使用本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体)的组合物。任选地与这样的容器相关联的可以由管理药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,该通告反映了政府机构关于用于人类施用的制造、使用或销售的批准。

[0767] 本文涵盖的试剂盒可根据本文所述的方法使用,例如抑制肿瘤细胞生长的方法和/或治疗癌症(例如血液癌症)的方法和/或治疗病毒感染的方法。在一个实施方案中,试剂盒包含在一个或多个的容器中的通过本文所述方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞或其组合物。在具体的实施方案中,本文提供了包含通过本文所述的三阶段方法产生的NK细胞和/或ILC3细胞群体或其组合物的试剂盒。

[0768] 7. 实施例

[0769] 7.1. 实施例1:从造血干细胞或祖细胞产生天然杀伤细胞的三阶段方法

[0770] 将CD34⁺细胞在以下培养基制剂中培养指定的天数,取细胞等分试样用于评估细胞计数、细胞活力、自然杀伤细胞分化的表征和功能评估。

[0771] 阶段1培养基:90%的干细胞生长培养基(SCGM)(CellGro®),10%的人血清-AB,补充有4.5U/mL低分子量肝素(LMWH),25ng/mL重组人类血小板生成素(TPO),25ng/mL重组人类F1t3L,27ng/mL重组人类干细胞因子(SCF),25ng/mL重组人IL-7,0.05ng/mL重组人IL-6(500倍),0.25ng/mL重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(50倍),0.01ng/mL重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(500倍),0.10%庆大霉素和1至10 μ m的StemRegenin-1(SR-1)。

[0772] 阶段2培养基:90%SCGM,10%人血清-AB,补充有4.5U/mL低分子量肝素(LMWH),25ng/mL重组人F1t3L,27ng/mL重组人SCF,25ng/mL重组人IL-7,20ng/mL重组人IL-15,0.05ng/mL重组人IL-6(500倍),0.25ng/mL重组人G-CSF(50倍),0.01ng/mL重组人GM-CSF(500倍),0.10%庆大霉素和1至10 μ m SR1。

[0773] 阶段3培养基:90%的STEMMACS™,10%人血清-AB,0.025mM 2-巯基乙醇(55mM),补充有22ng/mL重组人SCF,1000U/mL重组人IL-2,20ng/mL重组人IL-7,20ng/mL重组人IL-15,0.05ng/mL重组人IL-6(500倍),0.25ng/mL重组人G-CSF(50倍),0.01ng/mL重组人GM-CSF(500倍)和0.10%庆大霉素。

[0774] 在第0天将细胞以 3×10^4 个细胞/mL接种至阶段1培养基中,和通过CD34⁺和CD45⁺计数测试细胞的纯度和通过7AAD染色测试细胞存活力。在第5天,对细胞进行计数并用阶段1培养基接种至浓度 1×10^5 细胞/mL。在第7天,对细胞进行计数并用阶段1培养基接种至浓度 1×10^5 细胞/mL。

[0775] 在第10天,对细胞进行计数并在阶段2培养基中接种至浓度 1×10^5 个细胞/mL。在第12天,对细胞进行计数并在阶段2培养基中接种至 3×10^5 细胞/mL的浓度。

[0776] 或者,至第14天使用以下方案:在第0天在第1阶段培养基中以 7.5×10^3 个细胞/mL接种细胞,通过CD34⁺和CD45⁺计数测试细胞的纯度和通过7AAD染色测试细胞的存活力。在第7天,对细胞进行计数并用阶段1培养基接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。在第9天,对细胞进行计数并用阶段2培养基接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。在第12天,对细胞进行计数并在阶段2培养基中接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。

[0777] 对于旋转瓶中的动态分化,在第14天,将细胞离心以浓缩,计数和在阶段3培养基中接种至 5×10^5 个细胞/mL的浓度。在第17天,将细胞离心,计数并在阶段3培养基中接种至 7.5×10^5 个细胞/mL的浓度。在第21天,将细胞离心,计数,对CD56、CD3、CD16和CD94进行表型分析,通过7AAD染色测定存活力,并且在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在第24天,计数细胞并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。从第25天到第27天,以5毫升/天的体积添加阶段3培养基。在第28天,对细胞进行计数并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在第31天,计数细胞并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。从第32天到第34天,以每天5毫升的体积添加阶段3培养基。在第35天,收获细胞,计数,表型分析并测定细胞毒性。

[0778] 对于静态分化,在第14天,将细胞离心以浓缩,计数并在阶段3培养基中接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。在第17天,对细胞进行计数并在阶段3培养基中接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。在第19天,对细胞进行计数并在阶段3培养基中接种至 3×10^5 个细胞/mL的浓度。

在第21天,将细胞离心,计数,对CD56、CD3、CD16和CD94进行表型分析,通过7AAD染色测定存活力,并且在阶段3培养基中接种至 5×10^6 个细胞/mL的浓度。在第24天,将细胞离心,计数并在阶段3培养基中接种至 7.5×10^6 个细胞/mL的浓度。在第26天,对细胞进行计数并在阶段3培养基中接种至 7.5×10^6 个细胞/mL的浓度。在第28天,对细胞进行计数并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在第31天,将细胞离心,计数并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在第33天,将细胞离心,计数并在阶段3培养基中接种至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。在第35天,收获细胞,计数,表型分析并测定细胞毒性。

[0779] 为了收获,将细胞以400xg离心7分钟,然后将沉淀物悬浮于等体积的Plasmalyte A中。以400xg离心悬浮液7分钟,并将所得沉淀以目标细胞浓度悬浮于10%的HSA (w/v), 60%的Plasmalyte A (v/v) 中。然后将细胞通过70μm筛网过滤,填充最终容器,测试等分细胞的存活力、细胞毒性、纯度和细胞计数,并将其余部分包装。

[0780] 7.2. 实施例2:三阶段方法中SR-1和CH223191的浓度的评价

[0781] 使用上面实施例1中概述的三阶段方法,以1μM、10μM和30μM的浓度作为阶段1和阶段2培养基的组分评估了Stemregenin-1 (SR-1)。还评估了三阶段方法中相同浓度的CH223191。10μM的SR-1导致比其他两种测试浓度更高的细胞毒性。对于在10μM和1μM浓度下的SR-1和CH223191观察到,对10:1 (E:T) 比率下的K562细胞的倍数扩增、细胞纯度 (CD56+ CD3-) 和细胞毒性的相当效果 (图1A-C)。对于第7天和第14天的CD34表达,SR-1和CH223191两者也显示类似的作用和趋势。

[0782] 7.3. 实施例3:三阶段NK细胞的表征

[0783] 方法

[0784] 如实施例1所述,在细胞因子 (包括血小板生成素、SCF、Flt3配体、IL-7、IL-15和IL-2) 存在的情况下培养UCB CD34+细胞35天以产生三阶段NK细胞。将多色流式细胞术用于测定三阶段NK细胞的表型特征。评估了使用35个NK亚型和其他表面标志物的11个6-标志物组 (参见表1)。

[0785] 表1. 用于评估三阶段NK细胞的表型特征的表面标志物 (包括35个NK亚型表面标志物)。

[0786]

表面标志物			
CD16	NKB1 (KIR3DL1)	NKG2C	CD7
CD56	KIR2DL3	CCR5 (CD195)	NKp80

[0787]

7AAD	CD11a	CXCR3 (CD183)	CD44
CD94	CD122 (IL-2Rb)	NKp30	CD85j (LIR1, ILT2)
NKp46	CD62L	NKG2A	CRACC
CD3	CD117	CD2	CD14
KIR2DL4 (CD158d)	CCL3 (MIP1a)	CD27	CD45
CD25	CD226	CD57	HLA-ABC
NKG2D	CD161	CD96	CD19
CD69	CD11b	CXCR4 (CD184)	
KIR2DL1	CD	132	2B4 (CD244)
	NKp44		

[0788] 通过将三阶段NK细胞与肿瘤细胞系共培养4小时来进行细胞毒性测定。此外,收集上清液来分析分泌的穿孔素、颗粒酶和细胞因子。

[0789] 为了进一步研究细胞溶解活性,监测免疫突触形成。用CellTracker Violet (Life Technology) 标记NK敏感的靶细胞 (K562, 慢性骨髓性白血病细胞)。通过在37℃下在盖玻片上的培养基中悬浮等体积和细胞数量的NK效应细胞 (1×10^6 /ml) 和靶细胞15分钟而形成NK细胞/靶细胞偶联物。然后将细胞用3%无甲醇的甲醛固定并透化。用Alexa-488偶联的鬼笔环肽 (Life Technology) 染色F-肌动蛋白。对于与F-肌动蛋白共染色的穿孔素、CD2或LFA-1抗体,将载玻片与第一抗体孵育1小时,然后加入Alexa Fluor 555染料偶联的山羊抗兔第二抗体 (Life Technology)。使用配备有2HyD检测器的具有反向DMI 6000显微镜的Leica SP8 LIAchroics Compact Unit进行共焦成像。

[0790] 结果

[0791] 使用实施例1中描述的培养方法,常规获得高纯度 ($88.3\% \pm 6.3\%$) 的CD3-CD56+ NK细胞群体。三阶段NK细胞表现出发育中间免疫表型,由CD16和KIR的低/阴表达证明。三阶段NK细胞表达天然细胞毒性受体 (NKp30、NKp46和NKp44)、c-凝集素受体 (CD94、NKG2D和CD161)、DNAM-1、2B4、CD117和CD11a (图2)。在三阶段NK细胞中也检测到细胞溶解介质 (穿孔素和颗粒酶) 和EOMES (NK细胞成熟和细胞溶解功能的调节剂) (图2)。

[0792] 三阶段NK细胞在体外表现出对血液肿瘤细胞系的细胞毒性。在10:1的效应细胞与靶细胞比率下,三阶段NK细胞对细胞系发挥裂解作用,包括CML (K562, $70.3\% \pm 14.8\%$), AML (HL-60, $31.0\% \pm 17.8\%$) 和多发性骨髓瘤 (RPMI8266, $32.4\% \pm 19.5\%$) (图3)。三阶段NK细胞也表现出高穿孔素产生和高度颗粒化 (图4)。当与K562细胞以1:1的比率共培养24小时,三阶段NK细胞产生功能性细胞因子,包括IFN γ 、TNF α 和GM-CSF (图5和表2)。

[0793] 表2. 当与K562以1:1共培养24小时时,三阶段NK细胞产生功能性细胞因子。

[0794]

	1:1 的 E:T 下的平均值 (pg/mL) (n=11), 针对 K562	范围 (最小, 最大)(n=11)
穿孔素	3933.09	423, 11058
颗粒酶 B	1976.35	46.80, 4281
IFN- γ	1323.20	12.55, 4251.06
GMCSF	1471.64	116.00, 4362.00
IL10	3.95	2.6, 6.33
颗粒酶-A	32065.73	820, 74697
TNF-A	482.90	16.62, 1841.00
MCP-1	1671.63	2.96, 6042
细胞毒性(10:1)	66.99%	52.79%, 79.76%
细胞毒性(2.5:1)	43.63%	18.46%, 76.94%

[0795] 在1:1的效应-靶细胞(E:T)比率下,共焦成像显示三阶段NK细胞,其在与肿瘤细胞接触时形成具有穿孔素极化的F-肌动蛋白免疫学突触(图6A-B),表明高细胞溶解活性。

[0796] 此外,在抗CD20(利妥昔单抗,10 μ g/mL)的存在下,三阶段NK细胞针对Daudi细胞(伯基特氏淋巴瘤,对NK杀伤有抗性的淋巴母细胞系)的细胞毒性从7.3% $\pm$ 8.0%升高至35.1% $\pm$ 5.7%,表明有效的抗体依赖性细胞介导细胞毒性(ADCC)。

[0797] 7.4. 实施例4:三阶段NK细胞的进一步表征

[0798] 如图7所示,检验了在各种效应-靶比率下,三阶段NK细胞针对CML、AML和多发性骨髓瘤细胞(分别为K562、HL-60和RPMI8226)的细胞毒性。在K562、HL60或PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)存在的情况下,观察到不同的CD107a表达水平,这是脱粒的指标(图8)。同样,当与K562和HL60细胞系共培养时,或在PMA刺激时,观察到三阶段NK细胞的IFN γ 产生的增加(图9)。在孵育24小时后,在效应-靶比率为3:1的原代AML靶存在下观察到高达40%的特异性裂解,且观察到AML靶细胞对NK杀伤的差异易感性(图10)。在肿瘤细胞系和原代靶细胞上观察到了广泛的IFN γ 产生水平,以及三阶段NK细胞和原代AML靶细胞的供体变异(图11)。

[0799] 如表3所示,三阶段NK细胞显示在各种肿瘤细胞系或原代AML靶细胞(AML1-4)存在下产生各种细胞溶解酶和细胞因子。

[0800] 表3. 在1:1的效应-靶比率显示针对各种原代和肿瘤细胞的平均细胞因子分泌(pg/1 $\times$ 10⁶个细胞)。

[0801]

pg/1E6	NK + K562	NK + HL-60	NK + KG1a	NK + RPMI	NK + AML1	NK + AML2	NK + AML3	NK + AML4	NK + PMA
N=	5	5	2	3	2	2	3	3	5
穿孔素	4292	3430	2787	30	419	596	1462	1662	8466
IFNG	750	71	6	2	5	148	4	70	26601
颗粒酶-A	49192	36560	23867	274	10241	12003	51316	71886	147792

[0802]

颗粒酶-B	8858	6638	1276	2	1015	1699	1071	2123	22606
GMCSF	1920	434	46	4	16	646	50	1311	70340
TNF-A	5272	2110	30	17	46	306	138	554	7564
MCP-1	1739	37004	146	153	131	1173	173	466	3811

[0803] 总之,三阶段NK细胞在各种肿瘤细胞系中表现出细胞溶解活性,在与肿瘤细胞接触时以及在通过PMA激活时表现出脱粒能力,和当与肿瘤细胞共培养或通过PMA激活时分泌IFN γ 、穿孔素、颗粒酶A和颗粒酶B。此外,三阶段NK细胞以3:1的效应-靶比率显示针对原代AML靶的24小时细胞溶解活性,并显示了分泌针对原代AML细胞的IFN γ 的能力。

[0804] 7.5. 实施例5:两个三阶段NK细胞群体

[0805] 使用FACS,在CD11a对CD117图上评估三阶段NK细胞的CD56+CD3-群体,从而显示两个细胞群体(图12)。CD11a-组分(ILC3)显示为CD94-,和CD11a+组分(NK)显示含有CD94-和CD94+细胞两者(图13)。此外,CD11a-和CD11a+细胞可以基于其穿孔素、脱中胚蛋白(EOMES)、RAR相关孤儿受体 γ t (ROR γ t) 和白细胞介素-1受体1(IL1R1)的表达区分,CD11a+细胞表达穿孔素和EOMES而不表达ROR γ t和IL1R1,以及CD11a-细胞表达ROR γ t和IL1R1但不表达穿孔素和EOMES(图14)。在供体间显示穿孔素、颗粒酶B、EOMES、T-bet、IL1R1、ROR γ t和芳基羟受体(AHR)的一致表达模式,CD11a+细胞主要表达穿孔素、颗粒酶B、EOMES和T-bet,以及CD11a-细胞表达IL1R1、ROR γ t和AHR(图15)。CD11a+群体为假设是传统的NK细胞,而CD11a-群体被假设为ILC3细胞。

[0806] 为了对这两个群体进行功能分析,使用ICCS(细胞内细胞因子染色)测定来检测三阶段NK细胞中的细胞因子表达。用1) PMA+离子霉素,IFN γ 的触发剂,2) PMA+离子霉素和IL-23(以检测IL-22)和3) 细胞因子IL-12+IL-18和IL1b/IL-23以分别触发CD11a+和CD11a-细胞,进行刺激6小时。以下细胞因子然后在CD56/CD3/CD117/CD11a/CD94表达的背景下分析: NK特异性的IFN γ 、GM-CSF、TNF α ,和ILC3特异性的IL-22和IL-8。确定CD11a+细胞表达IFN γ 和GM-CSF,其中CD11a-细胞表达IL-22和IL-8(图16)。CD11a+细胞和CD11a-细胞均表达TNF α (图16)。此外,显示GM-CSF和IL-22/IL-8表达是相互排斥的,且TNF α 可以与IL-22和IL-8共表达(图16)。

[0807] 还测定了三阶段NK亚群中激活受体的表达。发现主要NK激活受体NKp46、NKp30和

NKG2D仅在CD11a⁺细胞中表达(图17)。CD226(DNAM-1)和2B4(CD244)能够在CD11a⁺细胞上表达(图18)。CD16和KIR的表达是低的,并限于CD94⁺细胞(图19)。对于一些供体,这些激活受体在三阶段NK细胞中的总表达总结于表4中。

[0808] 表4.来自各种供体的三阶段NK细胞中激活受体的总表达

[0809]

%总细胞	NKp30 ⁺	NKp46 ⁺	NKG2D ⁺	DNAM-1 ⁺	2B4 ⁺	NKG2A ⁺	CD16 ⁺
供体1	12.5	7.5	8.8	14.1	33.8	6.9	2.6
供体2	24.2	19.2	23.2	36.2		12	2.2
供体3	13.8	10.6	12.2	30.3		9.6	2.3
供体4	23.6	19.0	24.0	29.2	25.5	12.0	3.4
供体5	35.5	27.6	33.9	47.5	33.2	16.3	8.8

[0810] 存在于三阶段NK细胞中的CD11a⁺细胞重演了先前针对ILC3细胞描述的表达模式,分别例如针对ROR γ t和AHR,以及刺激后的IL-22分泌。然而,在三阶段细胞中发现的CD11a⁺ (“ILC3”)细胞群体具有先前没有针对ILC3细胞描述的特征,例如T-bet、TNF α 、DNAM-1和2B4的表达。

[0811] 7.6.实施例6:两个三阶段NK细胞群体的功能评估

[0812] 方法

[0813] 按照制造商提供的方案,通过FITC选择试剂盒(Stem Cell,目录号18552)对三阶段NK细胞(CD3⁺CD56⁺)进行CD11a⁺或CD94⁺细胞的富集。富集后,通过CD56-PerCP(BD Pharmingen,目录号560842)、CD3-APC-H7(BD Pharmingen,目录号560176)、CD11a-FITC(BD Pharmingen,目录号555383)或CD94-FITC(BD Pharmingen,目录号555388)评估选择的群体的纯度。如所示的,通过在不同的E(效应):T(靶)比率下针对K562的4小时细胞毒性分析来测试选定群体的细胞毒性活性。简而言之,将K562细胞用PKH26(Sigma-Aldrich,目录号PKH26-GL)标记,置于96孔U形底组织培养板中并与不同E:T比率的NK细胞在补充有10%FBS的200 μ L RPMI1640中一起温育,如所指示的。在37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂中孵育4小时后,收获细胞并以1 μ M终浓度将TO-PRO-3(Invitrogen,Cat#T3605)加入到培养物中,接着使用BD FACSCanto II进行FACS分析。细胞毒性表示为总PKH26⁺靶肿瘤细胞内死亡细胞(PKH26⁺TO-PRO-3⁺)的百分比。

[0814] 结果和讨论

[0815] 如表5所示,用富集过程获得98%纯度的CD11a⁺或91%的CD94⁺细胞。在E:T比率为2.5:1时CD11a⁺群体显示出对K562的最高细胞毒性(67.4%),而未分级的三级NK细胞显示61.3%的细胞毒性,和CD11a⁺细胞显示36.0%的细胞毒性。

[0816] 表5.富集后CD11a/CD94的纯度

[0817]

细胞分级	CD94%	CD11a%
总	13.1	19
CD94 ⁺ 组分	91.4	
CD11a ⁺ 组分		97.9
CD11a ⁺ 组分		7.48

[0818] 这些结果显示NK富集的CD11a+CD3-CD56+细胞显示出对K562细胞的高细胞毒性，和当与未分级的细胞或NK富集的细胞相比时，ILC3富集的CD11a-CD3-CD56+细胞在较低水平下也显示细胞溶解活性。与先前描述的ILC3细胞相比，由CD11a-CD3-CD56+细胞群体显示的细胞毒性是三阶段ILC3细胞的另一独特性质。

[0819] 7.7. 实施例7:变化的细胞因子浓度对三阶段NK细胞的纯度和活性的影响

[0820] 评估总共15种不同条件以确定实施例1的第三培养基的不同组分对三阶段NK细胞中发现的两个 (CD11a+和CD11a-) 群体的影响。表6总结了测试的不同条件。

[0821] 表6. 具有不同的第三培养基组分的十五种条件。

[0822]

	条件#	IL-7 (ng/ml)	SCF (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	SR1	IL-15 (ng/ml)
1	1a	100	22	1000	0uM	20
2	1b	100	22	1000	10uM	20
3	2a	100	0	1000	0uM	20
4	2b	100	0	1000	10uM	20
5	3a	20	22	1000	0uM	20
6	3b	20	22	1000	10uM	20
7	4a	20	0	1000	0uM	20
8	4b	20	0	1000	10uM	20
9	5a	0	22	1000	0uM	20
10	6a	0	0	1000	0uM	20
11	7a	20	22	0	0uM	20
12	7b	20	22	0	10uM	20
13	8a	20	0	0	0uM	20
14	8b	20	0	0	10uM	20
15	9a	20	22	1000	0uM	0

[0823] 在第0、7、14、21、28和35天利用流式细胞分析组 (表7) 进行评估，包括细胞表面标志物CD56、CD3、CD117、CD94、IL1R1、CD11a、CD34和CD14/CD15和细胞内标志物ROR γ t、AHR和穿孔素。

[0824] 表7. 用于流式细胞评估的抗体组。

[0825]

荧光团	抗体
APCCy7	CD56
AmCyan	存活力/CD3

BV605	CD117
PerCPCy5.5	CD94
AF700	IL1R1
PECY7	CD11a
BV421	CD34
BV711	CD14+CD15
APC	ROR γ t
PE	AHR
FITC	穿孔素

[0826] 图20A-D中显示了第28天的表达数据。表8中可以发现15种条件的结果概要。

[0827] 表8. 第三培养基的不同组分对三阶段NK细胞中发现的两个 (CD11a+和CD11a-) 群体的影响。

[0828]

条件						供体 1 的第 28 天结果			供体 2 的第 28 天结果		
#	IL-7 (ng/ml)	SCF (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	IL-15 (ng/ml)	SR1	%CD56+	CD56+的 %RORgt+	CD56+的 %穿孔素+	%CD56+	CD56+的 %RORgt+	CD56+的 %穿孔素+
1a	100	22	1000	20	0uM	67	77	4	55	75	14
1b	100	22	1000	20	10uM	27	53	26	19	21	71
2a	100	0	1000	20	0uM	37	42	27	14	19	66
2b	100	0	1000	20	10uM	22	7	79	16	4	88
3a	20	22	1000	20	0uM	54	70	8	53	65	15
3b	20	22	1000	20	10uM	27	54	31	24	38	52
4a	20	0	1000	20	0uM	40	41	37	11	17	68
4b	20	0	1000	20	10uM	27	10	77	20	3	93
5a	0	22	1000	20	0uM	50	66	10	32	63	27

[0829]

6a	0	0	1000	20	0uM	22	37	41	11	14	74
7a	20	22	0	20	0uM	50	60	10	44	53	28
7b	20	22	0	20	10uM	27	53	31	18	41	49
8a	20	0	0	20	0uM	43	55	20	13	16	60
8b	20	0	0	20	10uM	26	7	75	14	3	86
9a	20	22	1000	0	0uM	67	64	3	57	78	10

[0830] 总之,发现第三培养基中的低SCF和第三培养基中SR1的存在有利于NK (CD11a+) 细胞产生,而发现第三培养基中SR1的缺失有利于ILC3 (CD11a-) 细胞产生。

[0831] 7.8. 实施例8:三阶段NK细胞的两个群体的附加表征和功能评估

[0832] 使用FACS,在CD11a对CD117图上评估三阶段NK细胞的CD56+CD3-群体,并显示两个细胞群体(CD11a组分-和CD11a+组分)在K562细胞存在下可通过CD107a表达区分(图21A-B)。CD11a+组分显示能够脱粒,如通过在K562细胞存在下显著更高的CD107a+组分所测量的(图21C)。

[0833] 构成三阶段NK细胞的CD56+CD3-群体的81%分数的CD11a+细胞和构成三个阶段NK细胞的CD56+CD3-群体的5%分数的CD11a-细胞测试对K562细胞的细胞毒性(图22)。富集CD11a+的群体表现出比CD11a-富集群体更高的K562细胞毒性,尤其是在更高的效应-靶细胞比率下(图22)。

[0834] 然后通过以1:1的效应:靶比率与K562靶细胞和分别作为效应细胞的CD11a阳性和阴性细胞过夜共培养进行细胞因子分泌分析。然后收集上清液并通过多重进行分析。在存在和不存在K562细胞的情况下,可以通过其某些测试的细胞因子(包括颗粒酶A、颗粒酶B、IFN- γ 、TNF α 、穿孔素、GM-CSF和IL-2)的表达来区分CD11a-和CD11a+细胞(表9和图23)。发现细胞因子IL-17A、IL-22、TNF β 和IL-10处于低水平下或低于检测水平(表9)。

[0835]

表 9. 在存在和不存在 K562 靶细胞的情况下，CD11a 阳性和阴性细胞的细胞因子分泌分析。

		GzA (pg/mL)	GzB (ng/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF α (pg/mL)	Perf (pg/mL)	GM- CSF (ng/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-22 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	TNF β (pg/mL)
CD11a-	仅 NK	32233	282.62	1.65	低于	106.45	502.87	低于	低于	低于	141.87	24.64
CD11a+	仅 NK	23322	3182	19.78	3	46.62	2021	0.21	低于	低于	681.98	低于
CD11a-	NK+ K562 1:1	16034	236.17	1.99	低于	71.63	382.37	0.19	低于	低于	99.25	23.47
CD11a+	NK+ K562 1:1	30648	6632	1169	2.43	711.62	2133	4.31	低于	低于	417.45	25.47

[0836] 表10提供了如上所表征的CD11a阳性和阴性细胞的概述。

[0837] 表10.CD11a阳性和阴性细胞表征的概述。

[0838]

	CD11a+	CD11a-
表型		
表面标志物	CD56+CD3-CD94+	CD56+CD3-CD117+ILR1+
细胞内	穿孔素+ 颗粒酶+ IFN-γ+	
转录标志物	T-bet+ EOMES+	RORγt+ AHR+
功能		
细胞毒性	高	低
脱粒	是	低
细胞因子分泌	颗粒酶 A 颗粒酶 B IFN-γ TNFα（低） 穿孔素 GM-SCF IL-2	颗粒酶 A 颗粒酶 B TNFα（低） 穿孔素 IL-2

[0839] 等同：

[0840] 本发明的范围不受在此描述的特定实施方案的限制。实际上，根据前面的描述和附图，除了所描述的那些之外，本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。这些修改旨在落入所附权利要求的范围内。

[0841] 本文引用的所有参考文献的全部内容以及出于所有目的通过引用并入本文，其程度如同为了所有目的将每个单独的出版物、专利或专利申请具体地和单独地指出通过引用而整体并入。任何出版物的引用是为了在提交日期之前公开，和不应该被解释为承认本发明由于先前的发明而无权先于这种出版物。

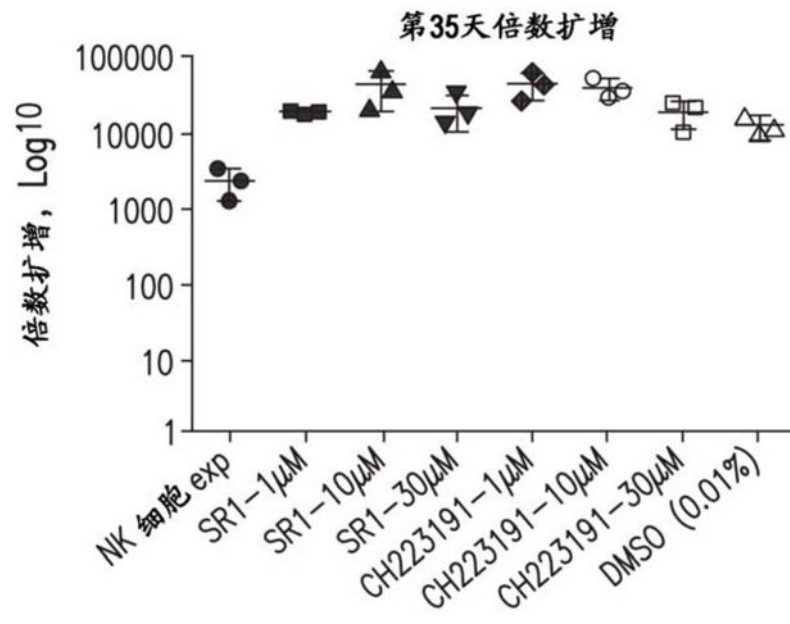


图1A

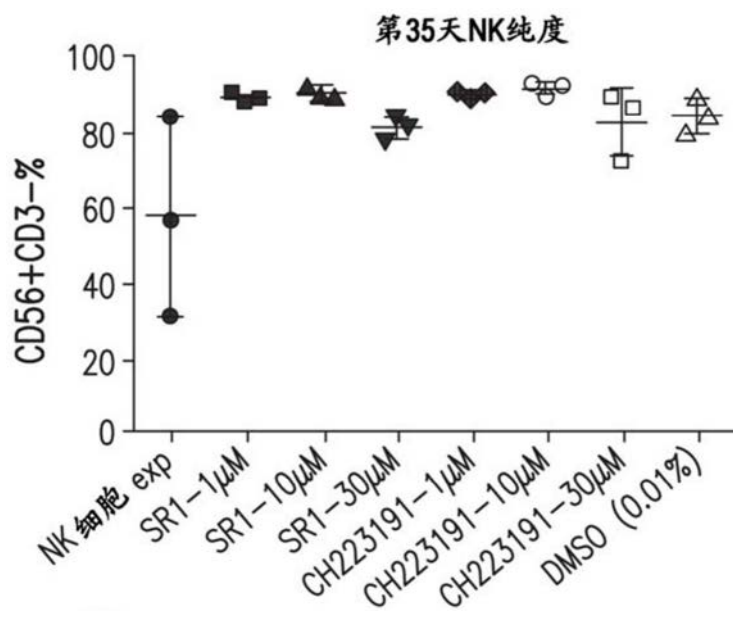


图1B

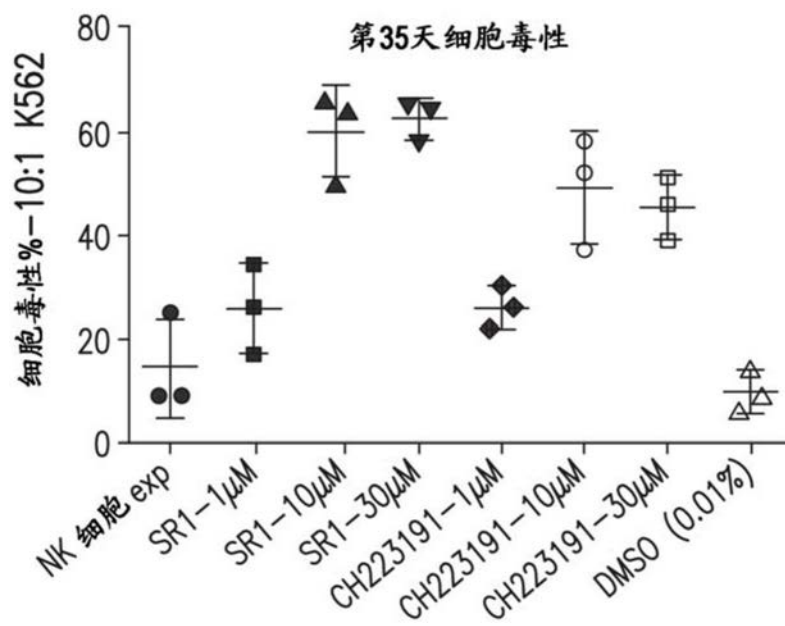


图1C

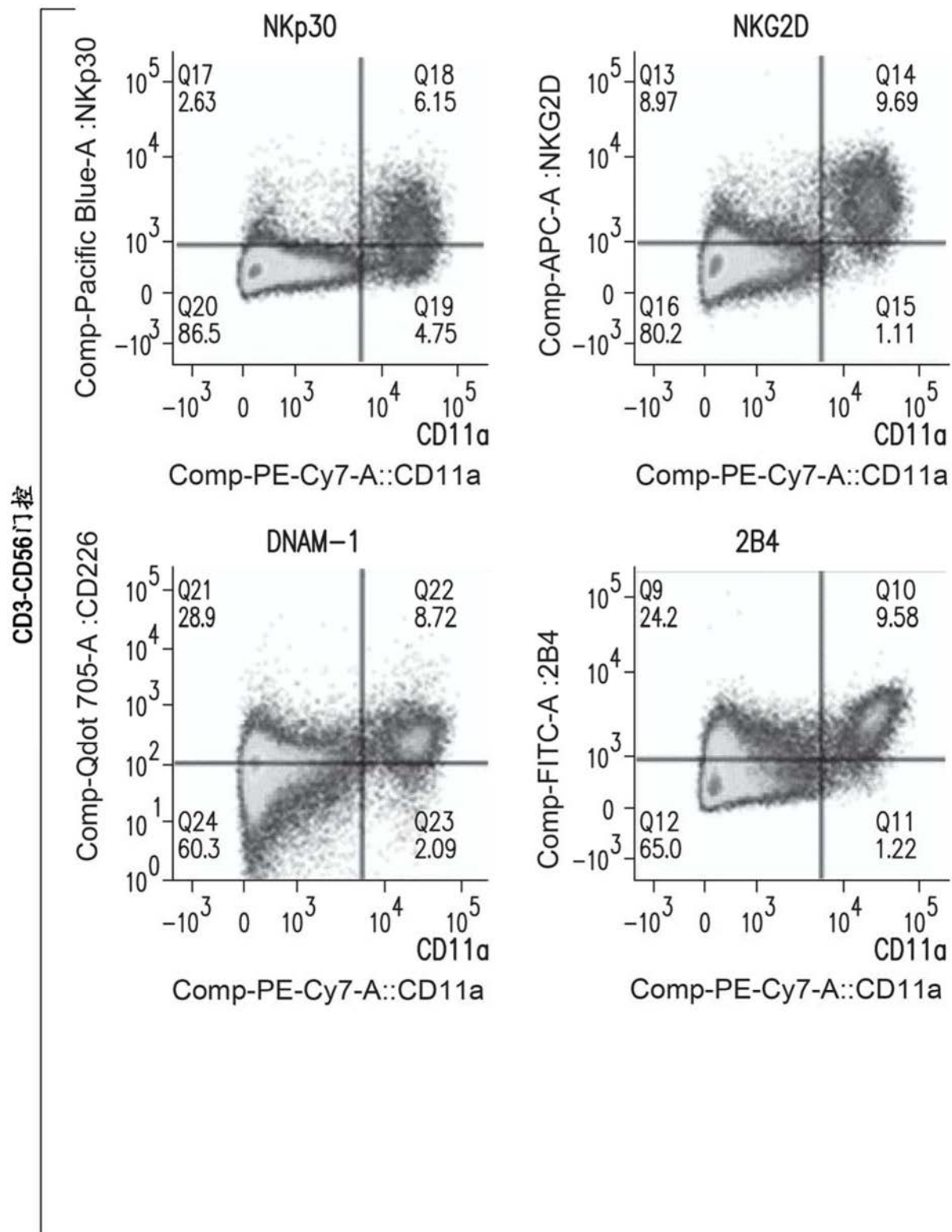


图2

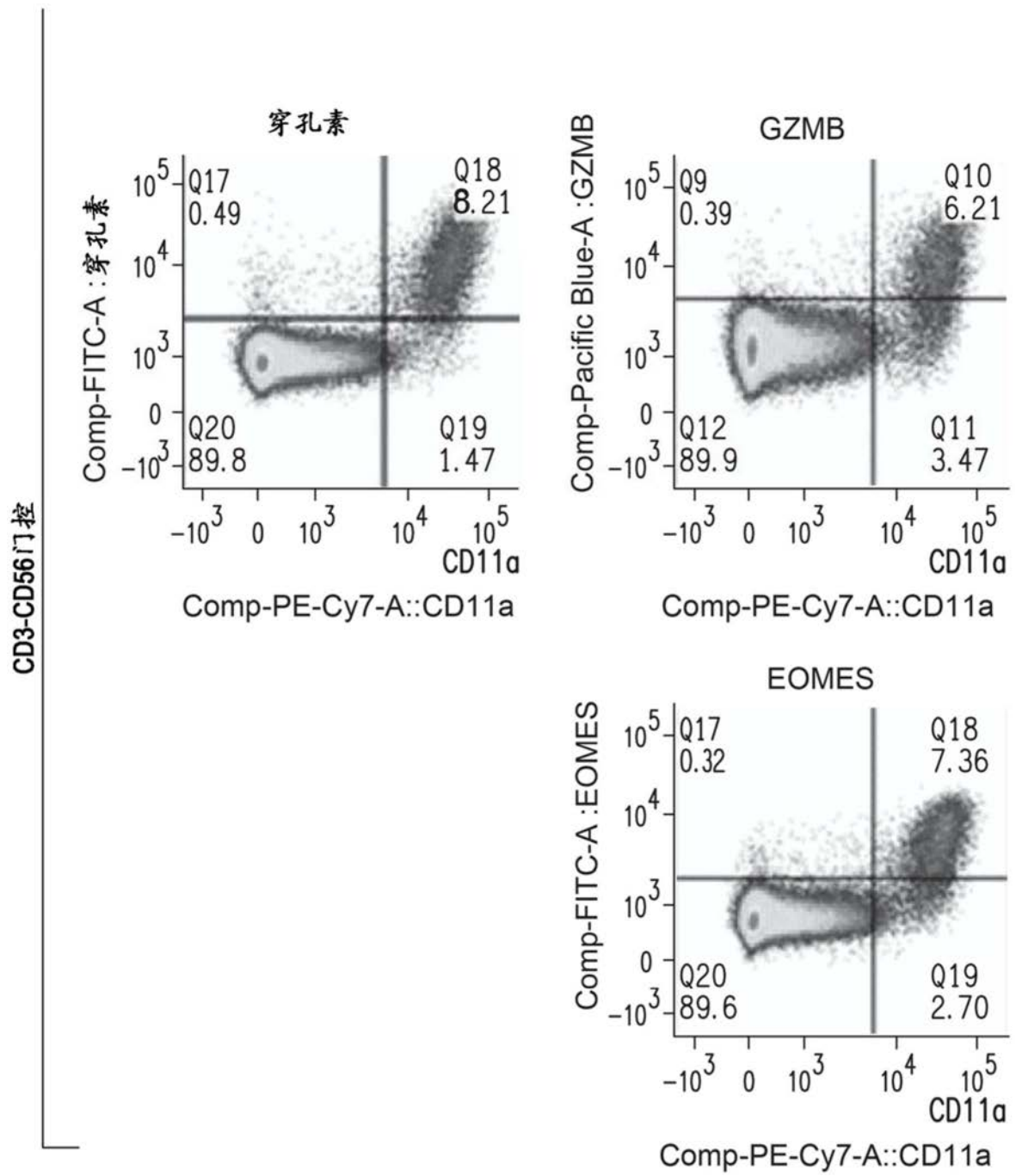


图2续

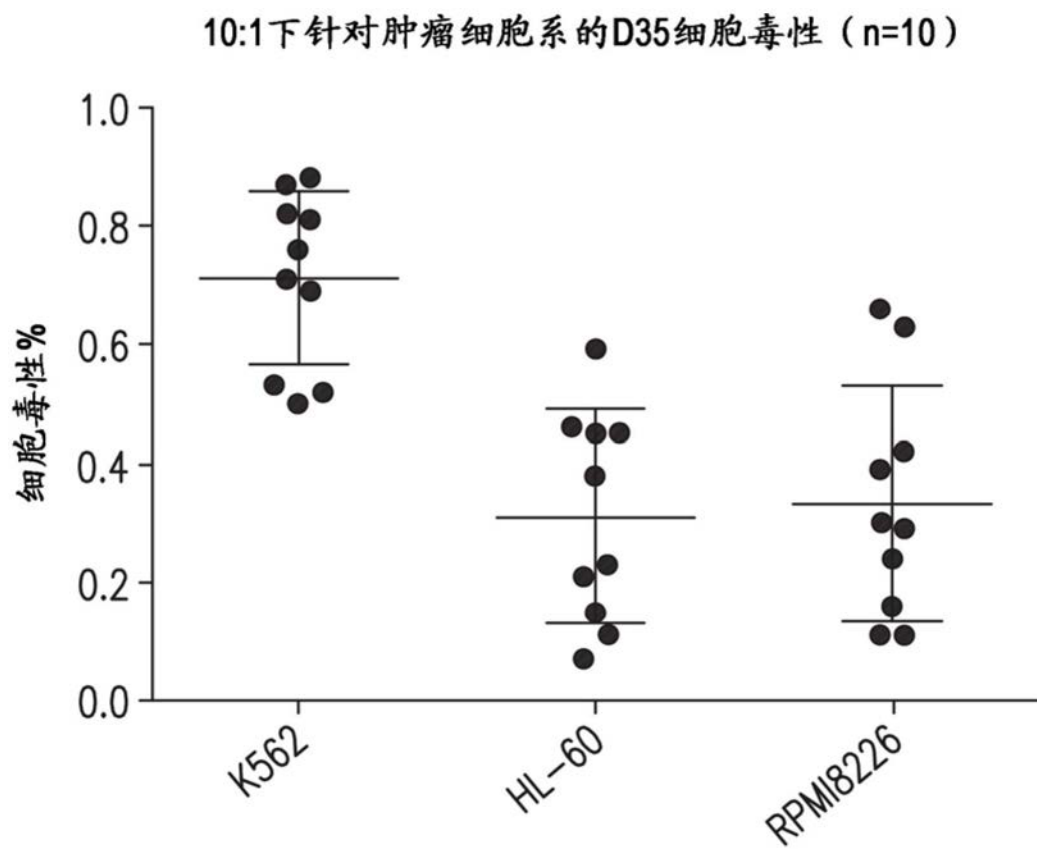


图3

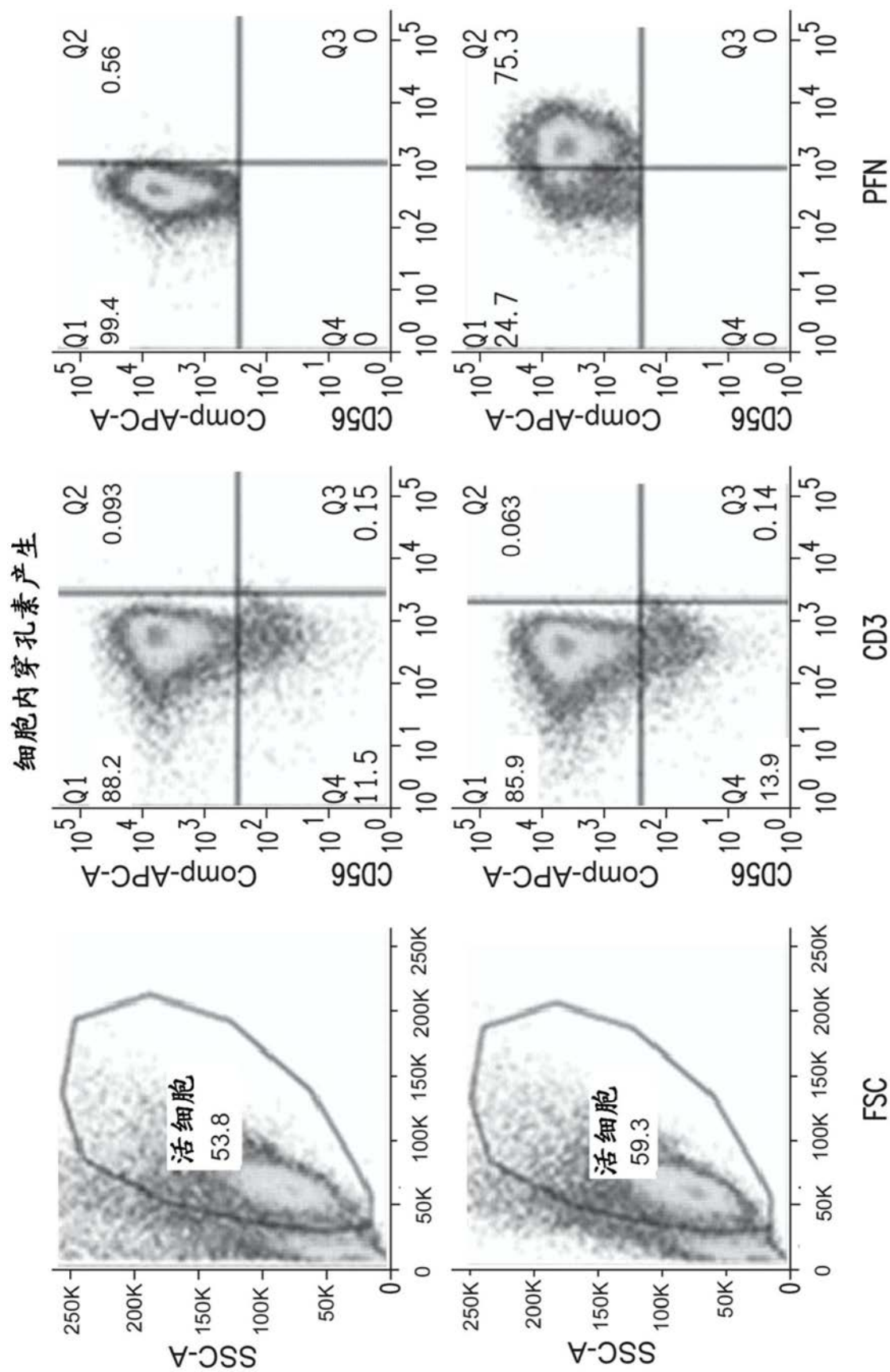


图4

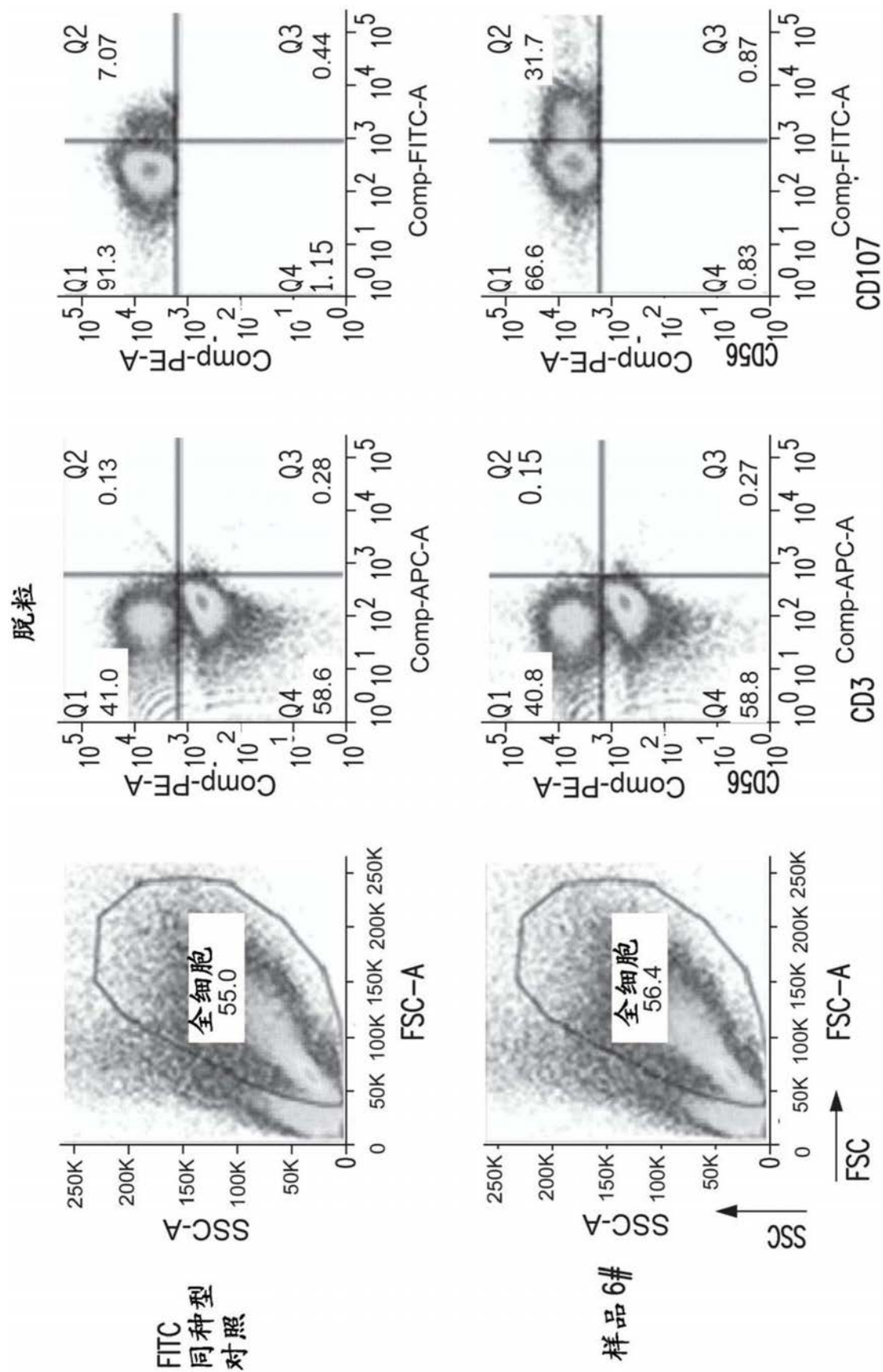


图4续

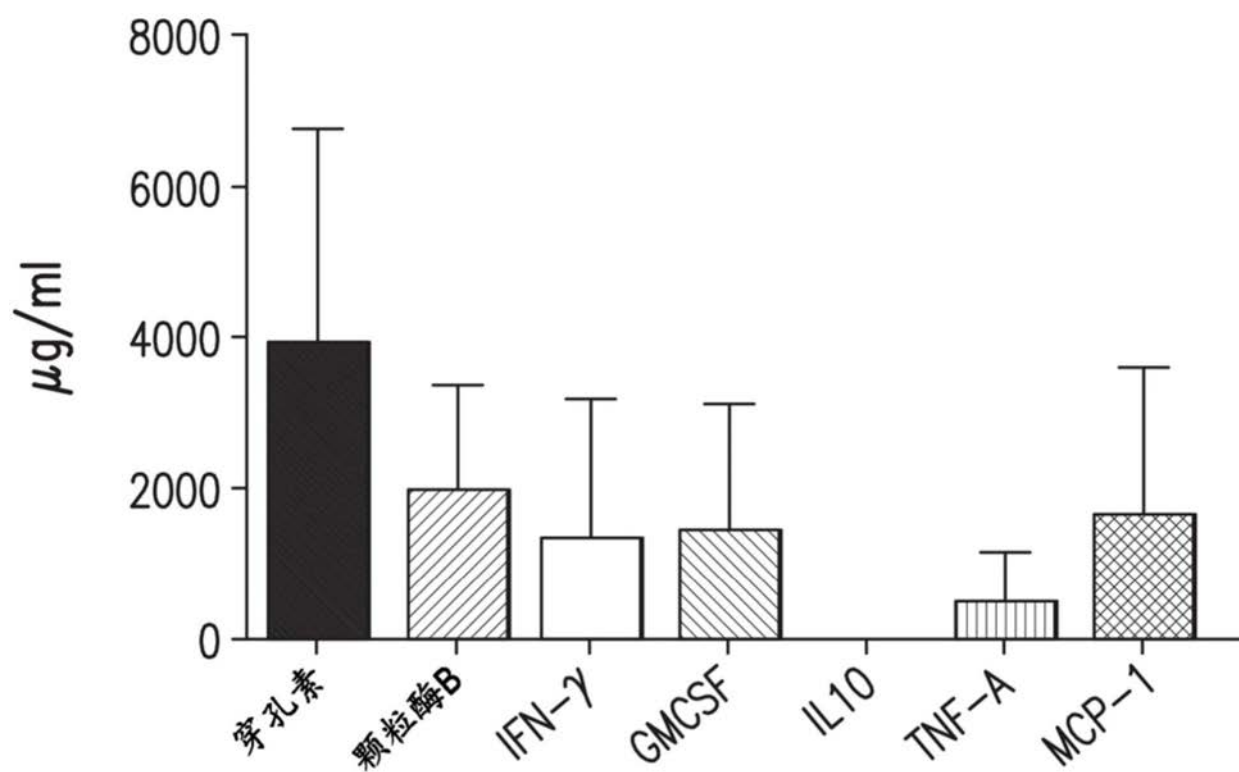


图5

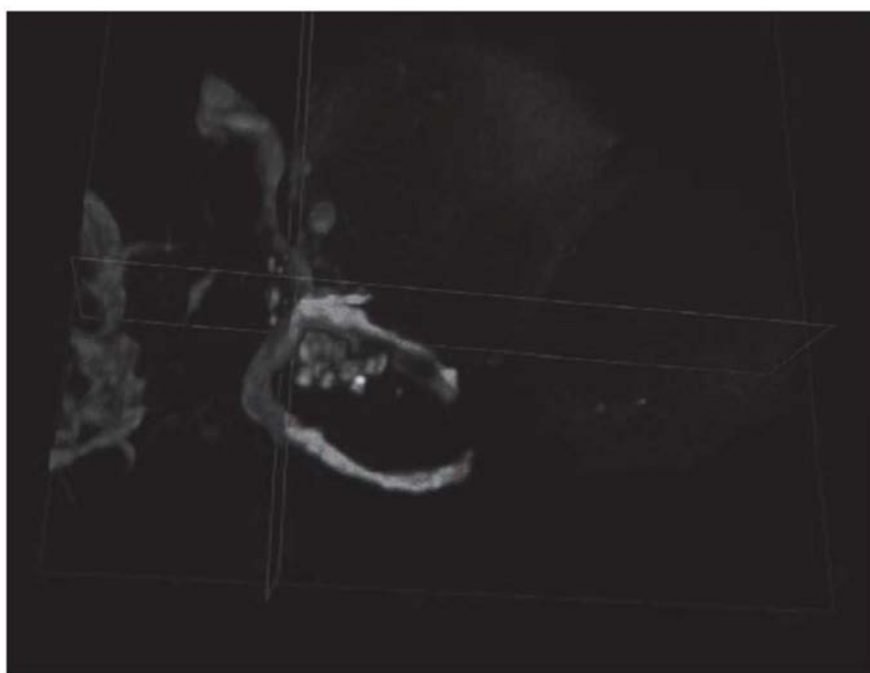


图6A

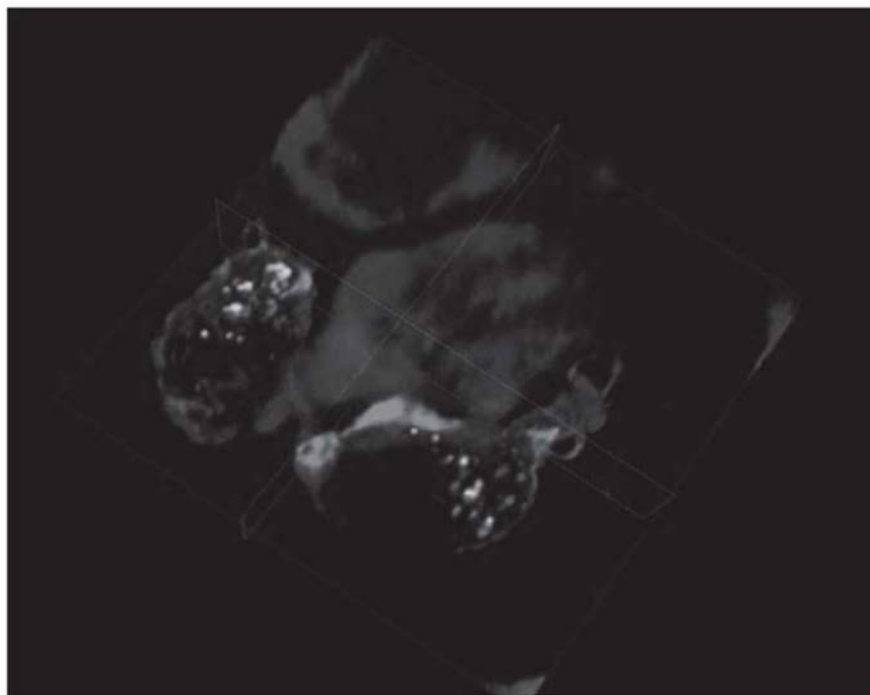


图6B

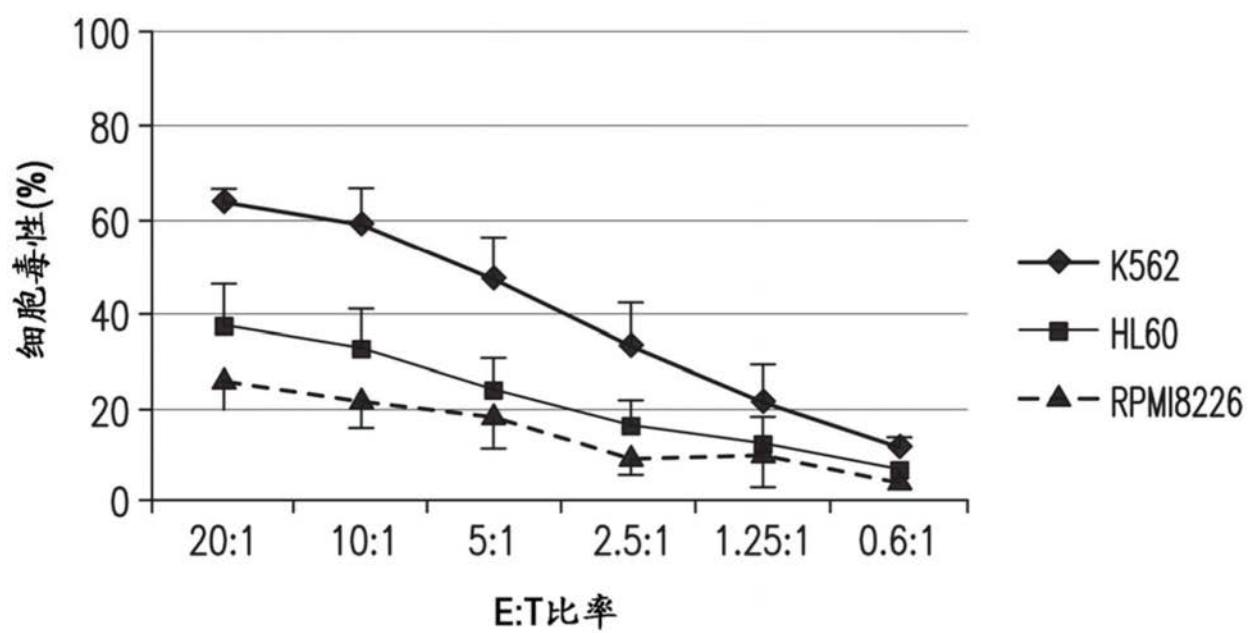


图7

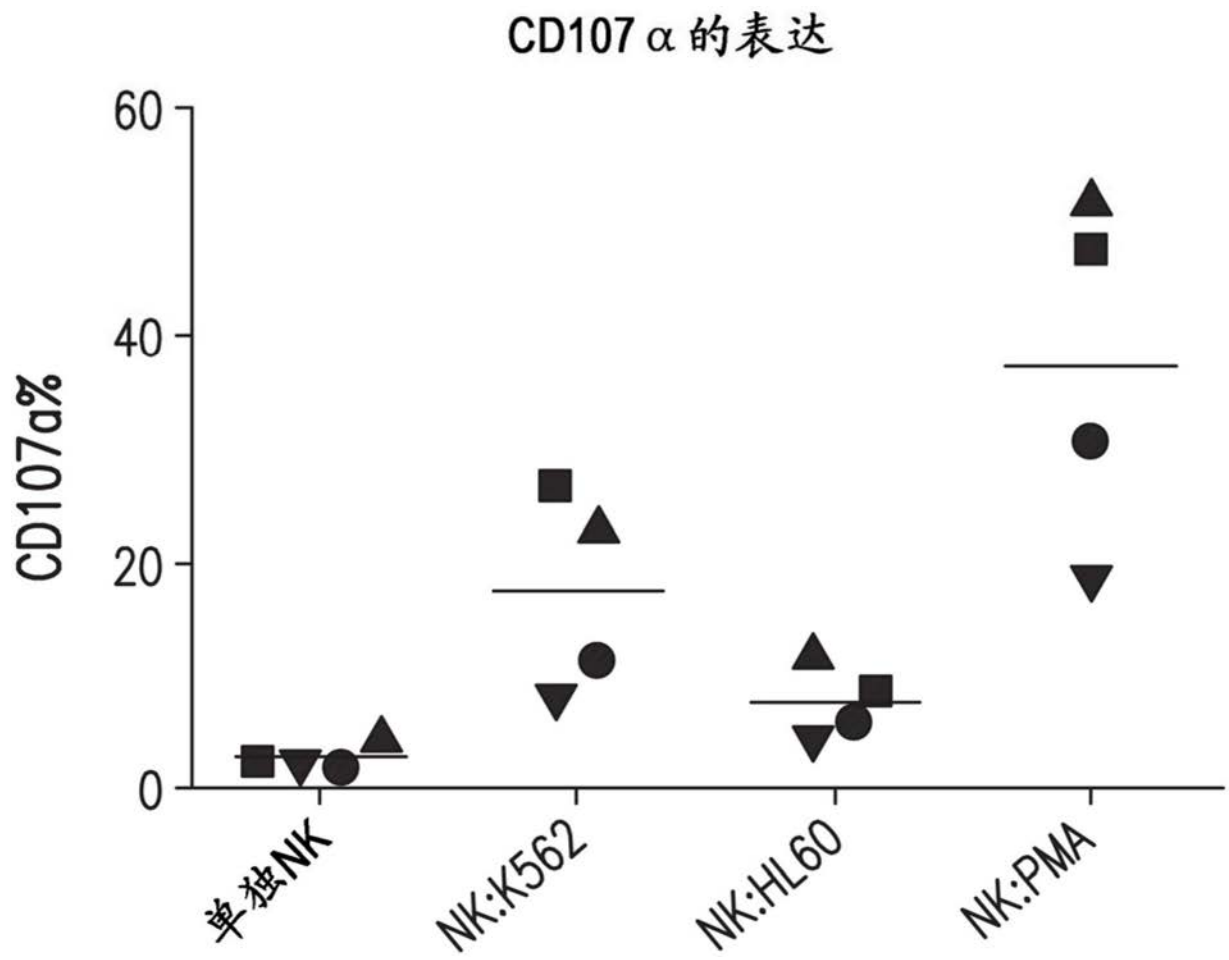


图8

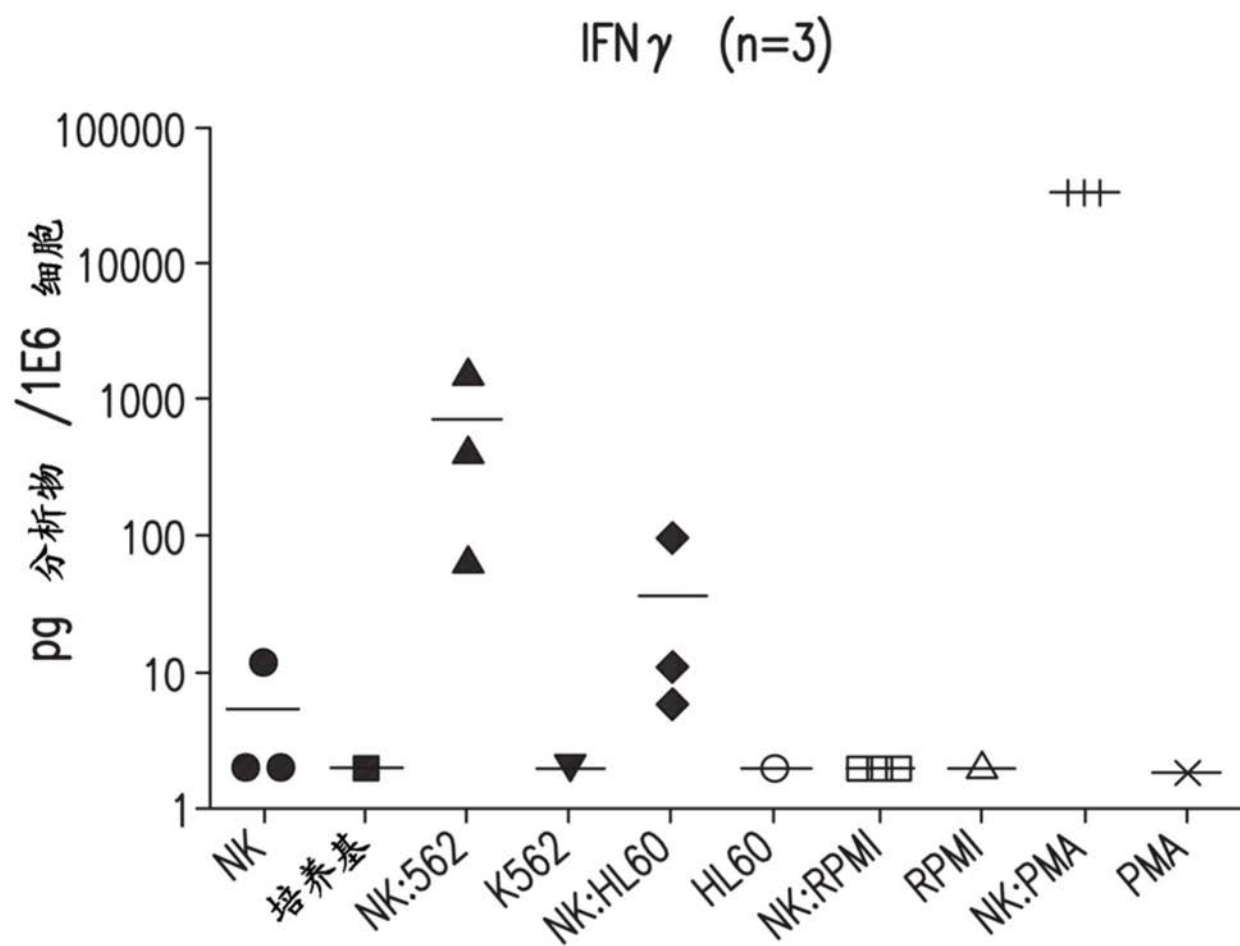


图9

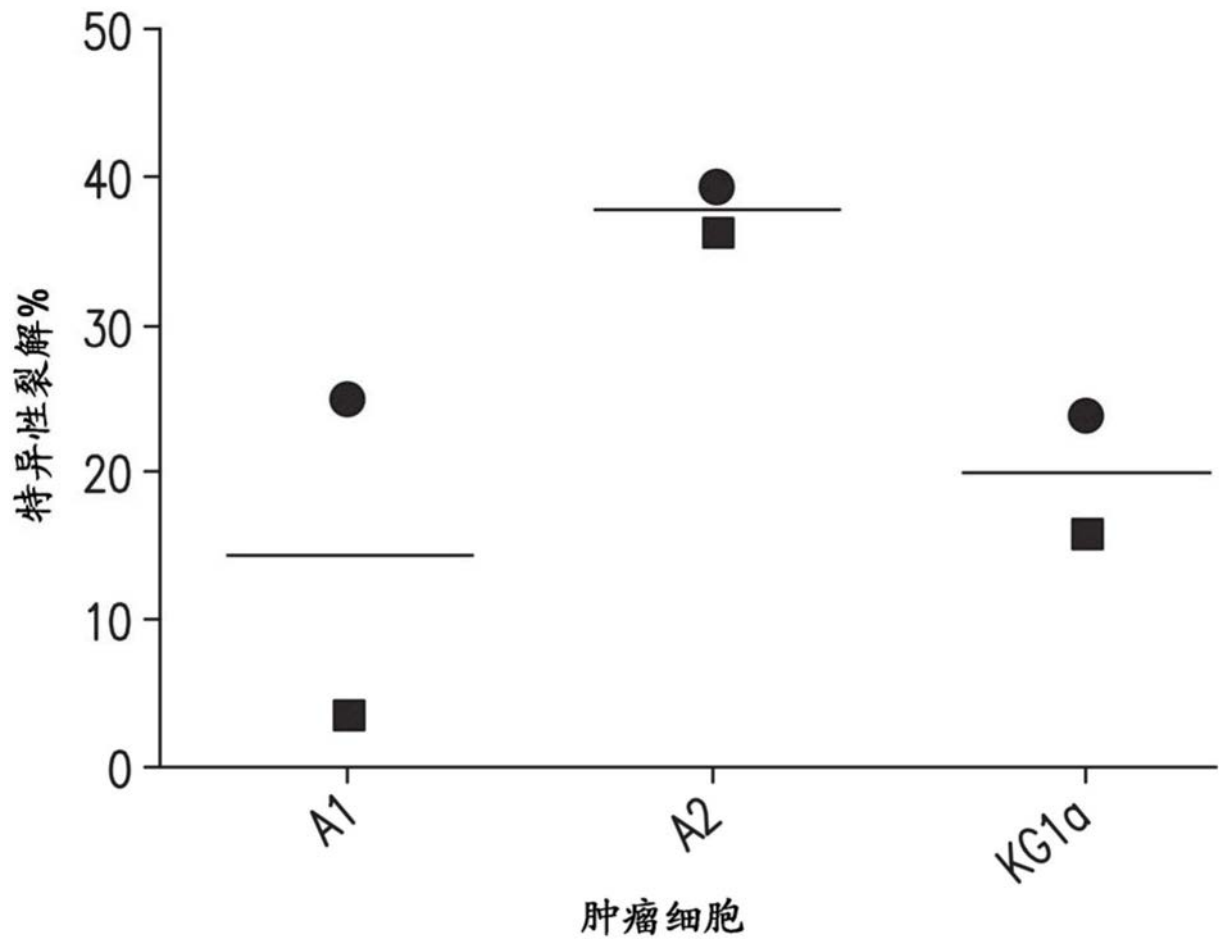


图10

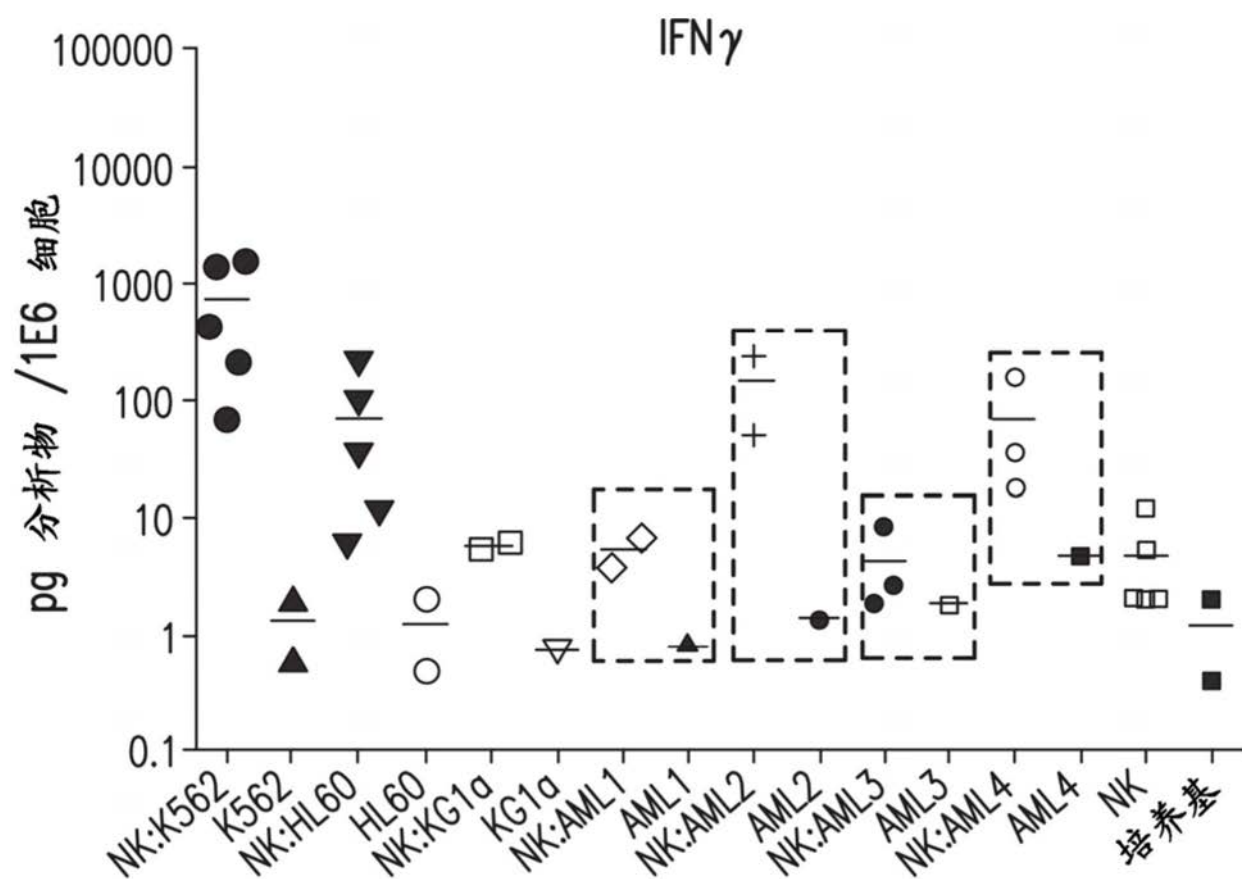


图11

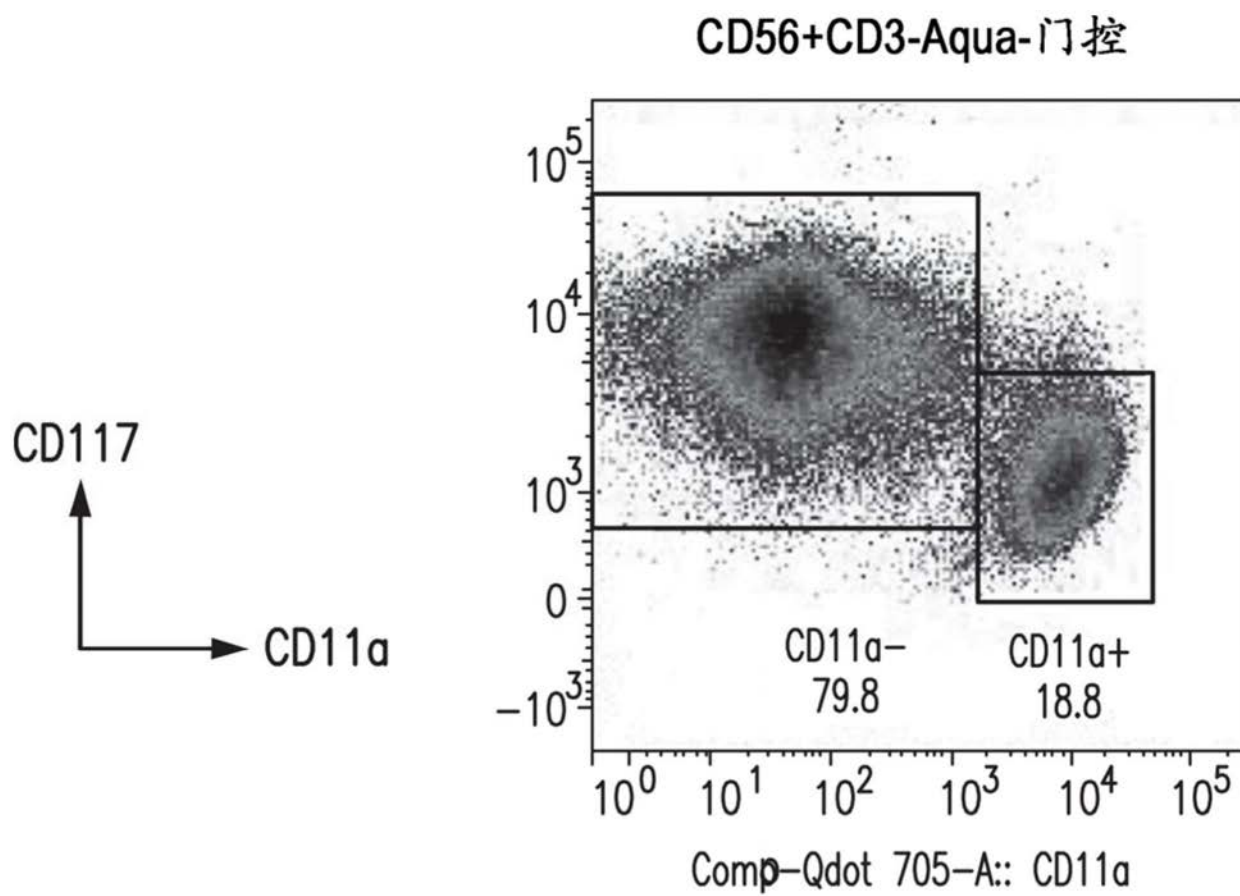


图12

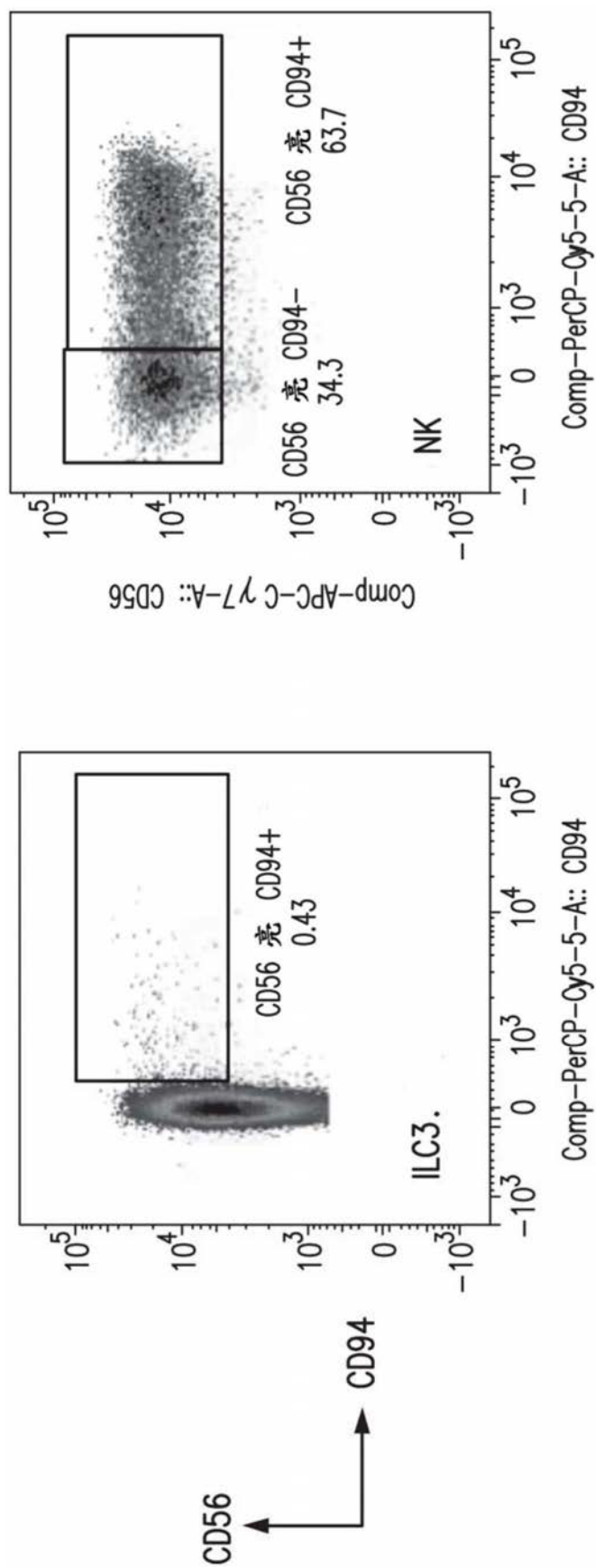


图13

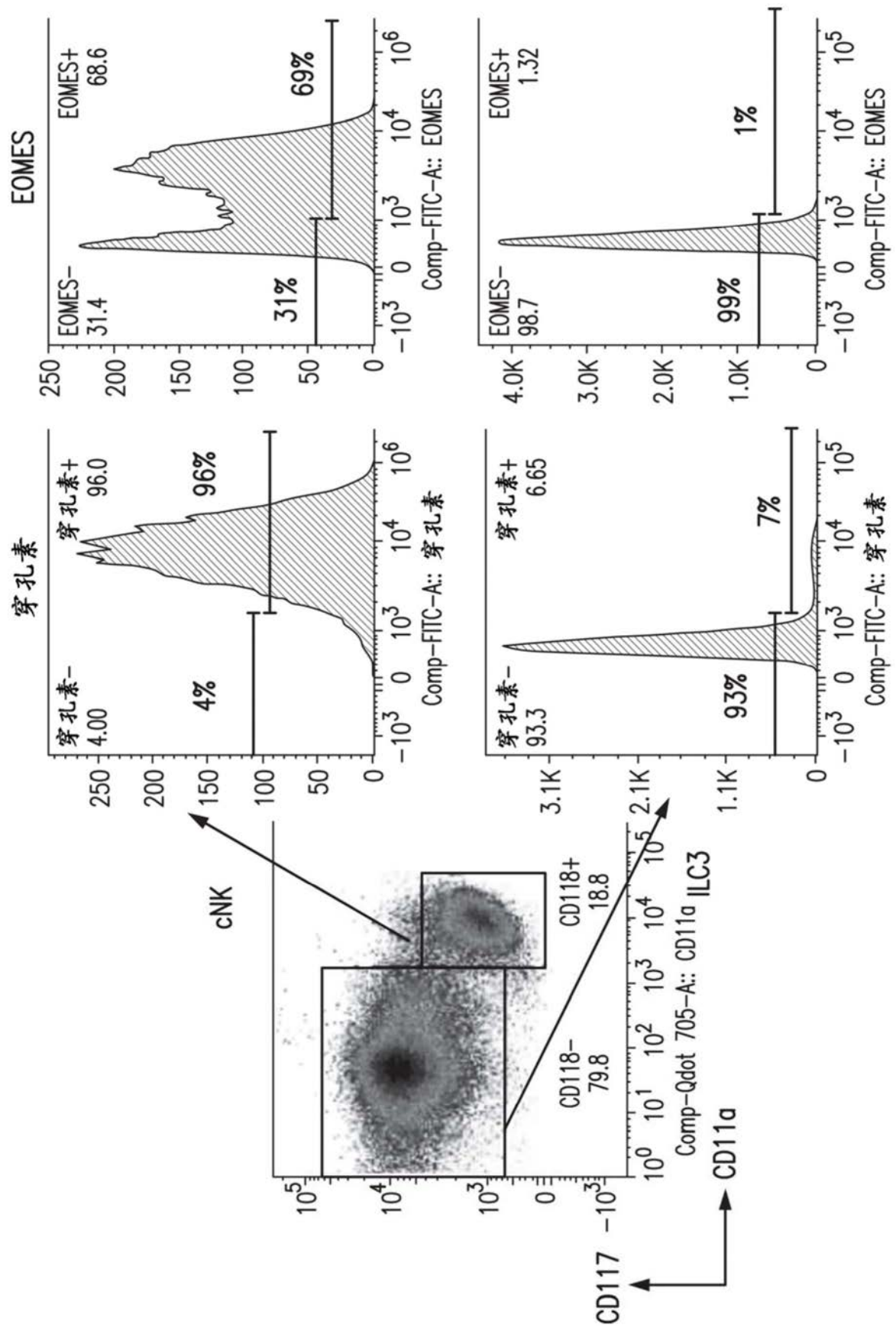


图14

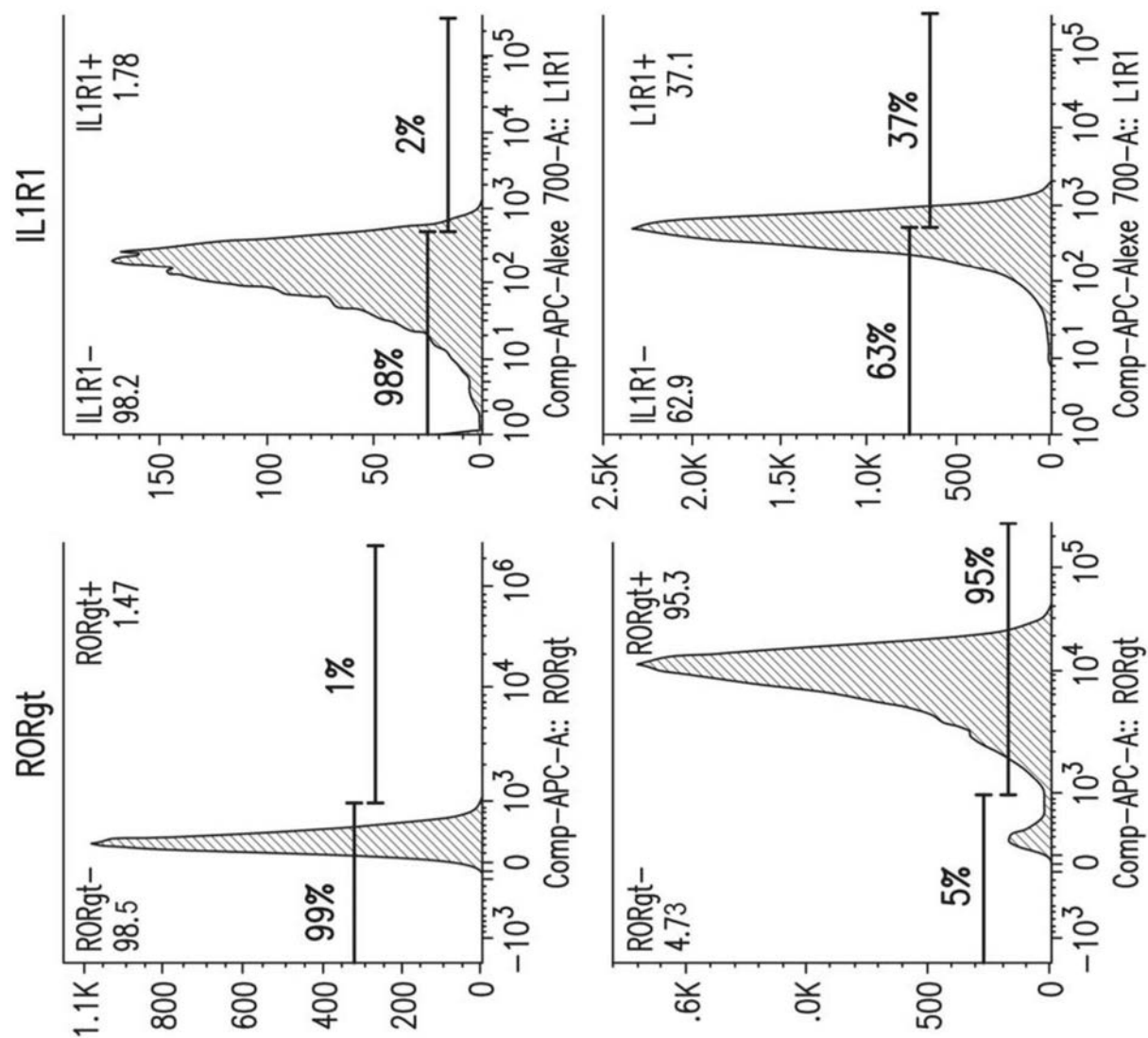


图14 (续)

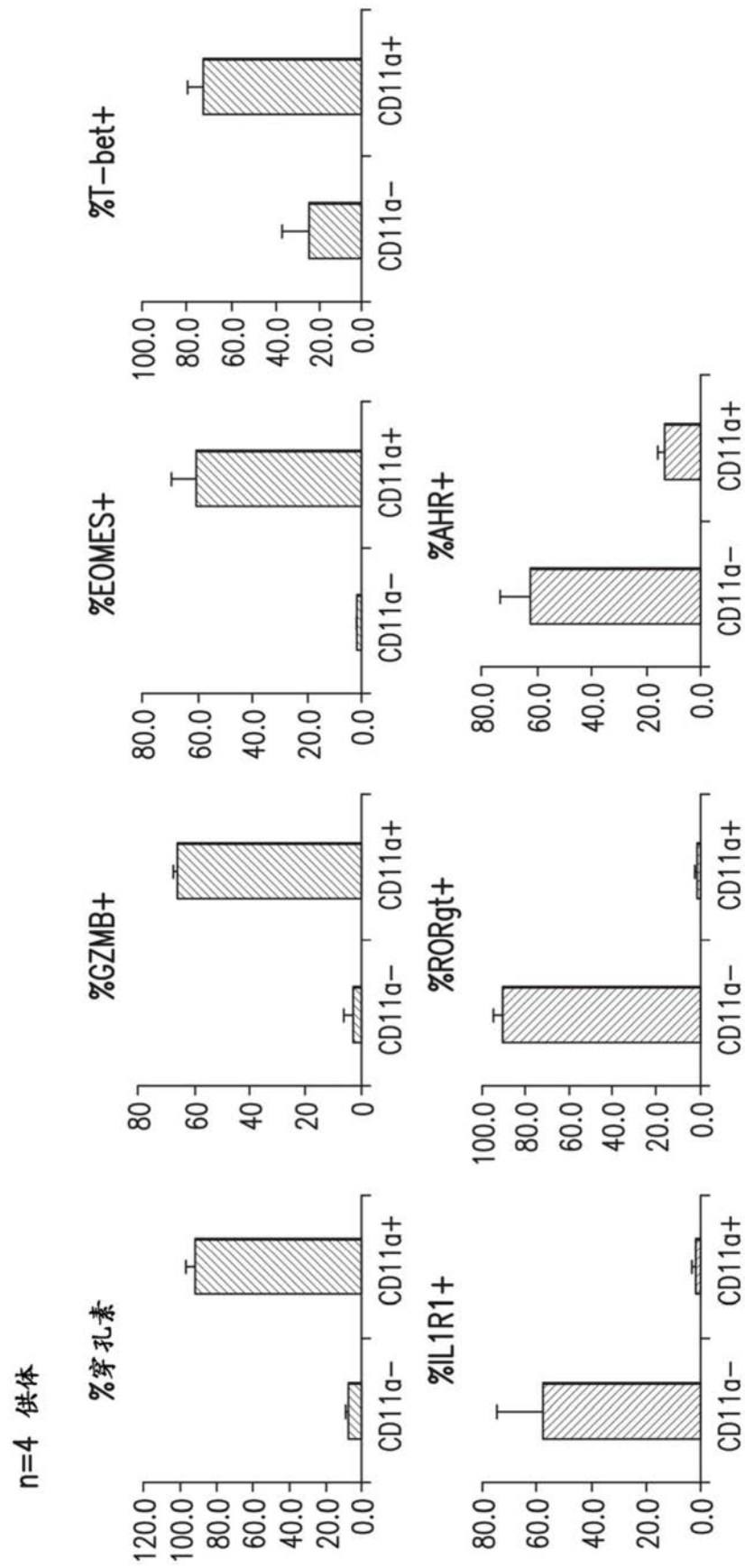


图15

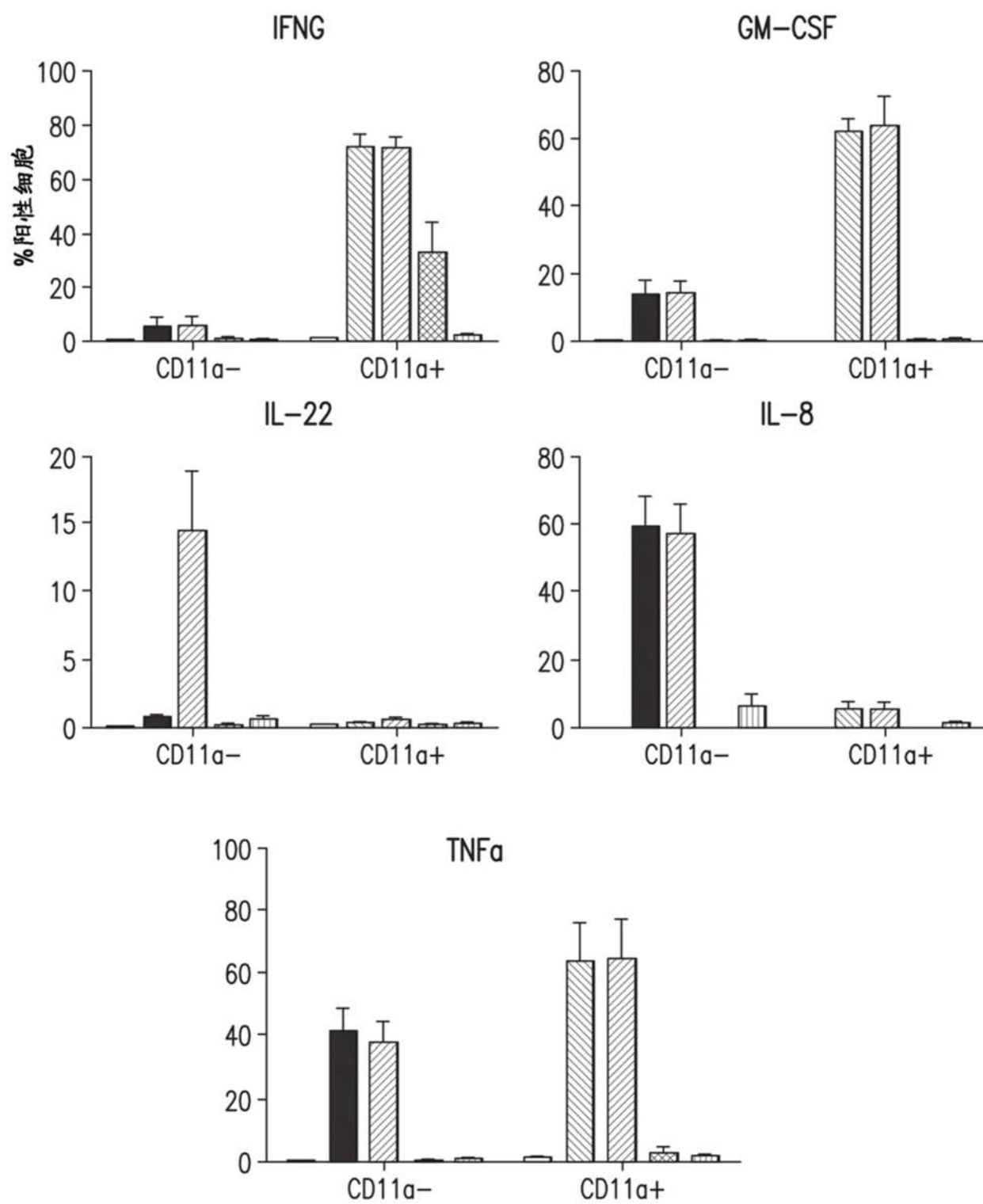


图16

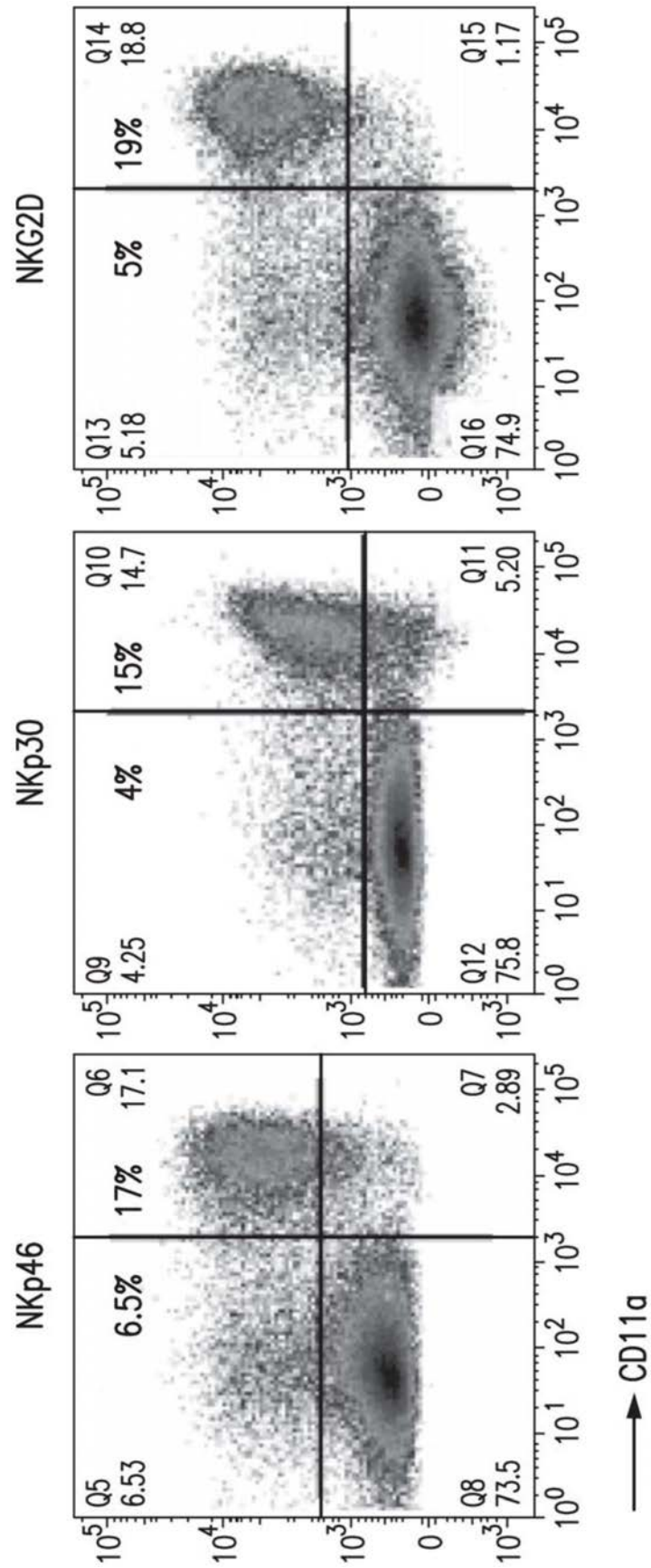


图17

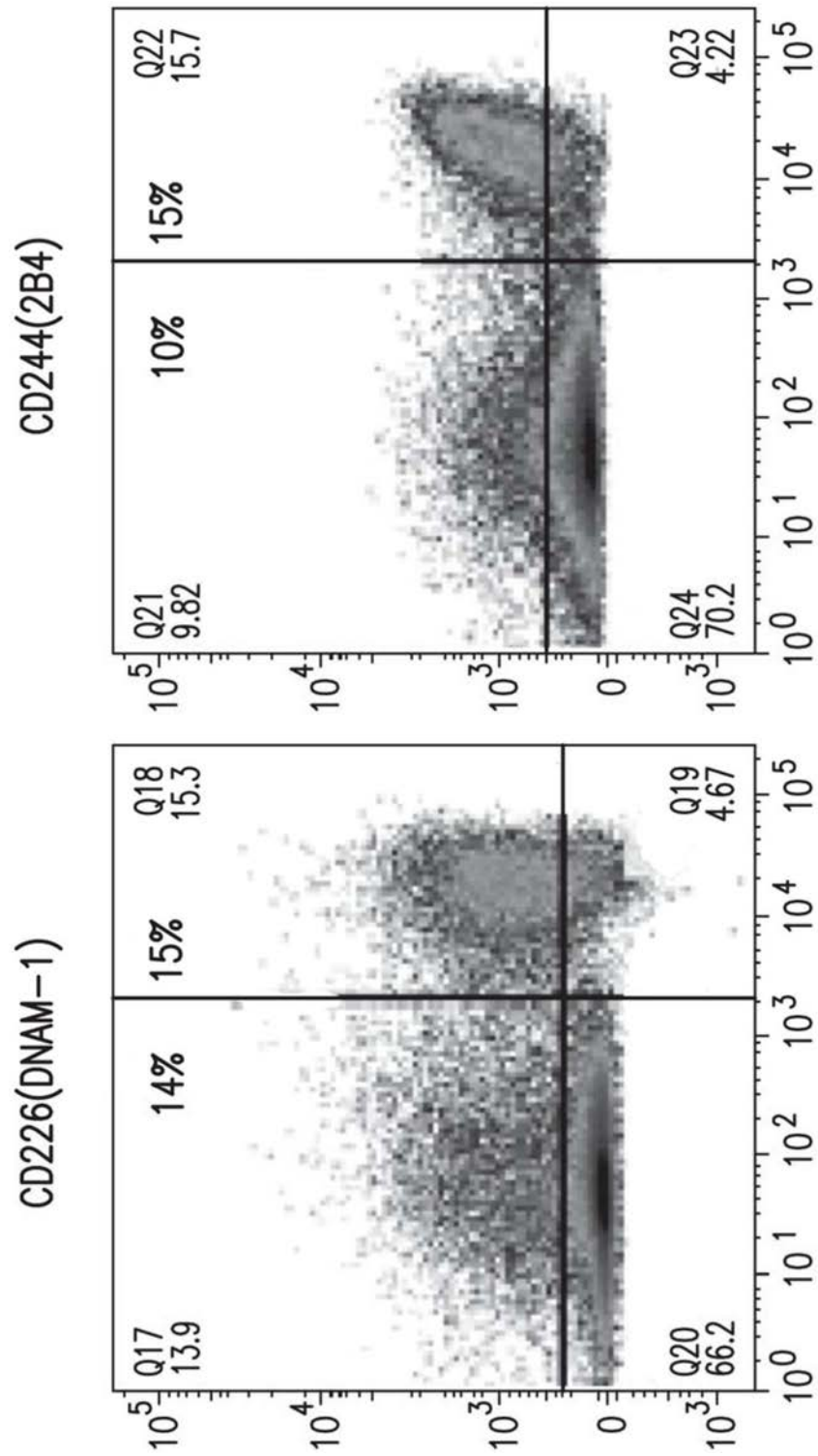


图18

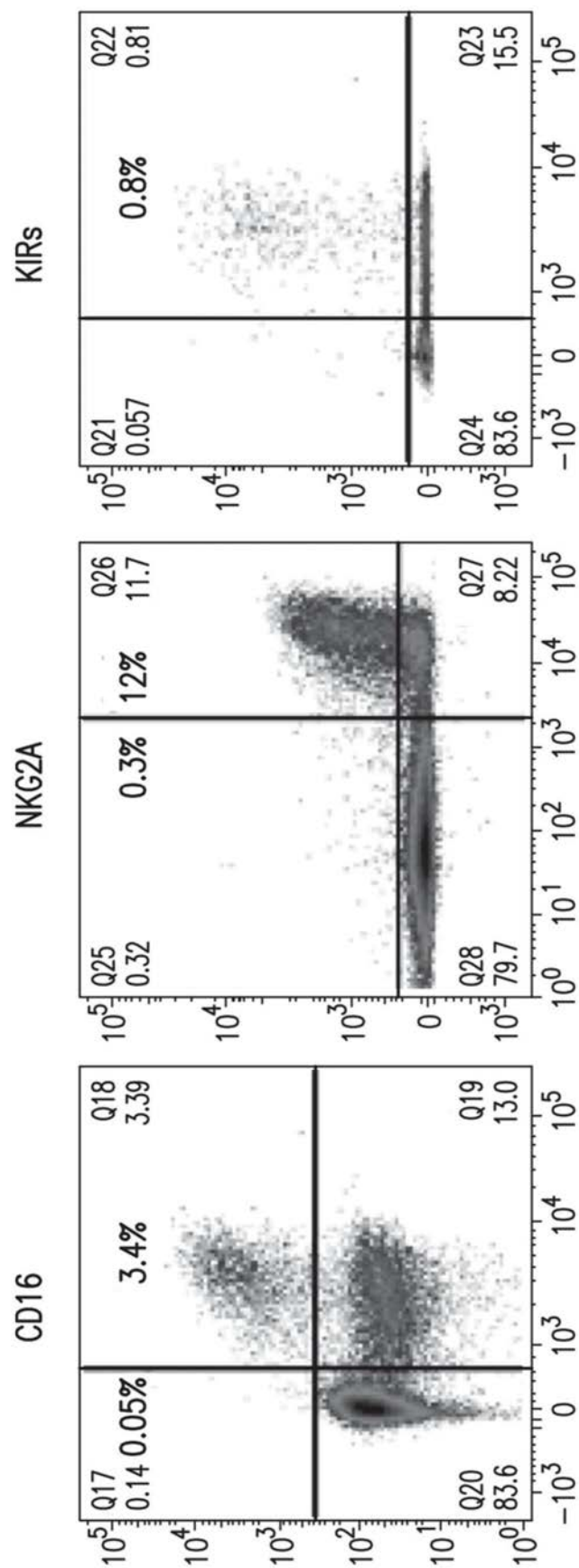


图19

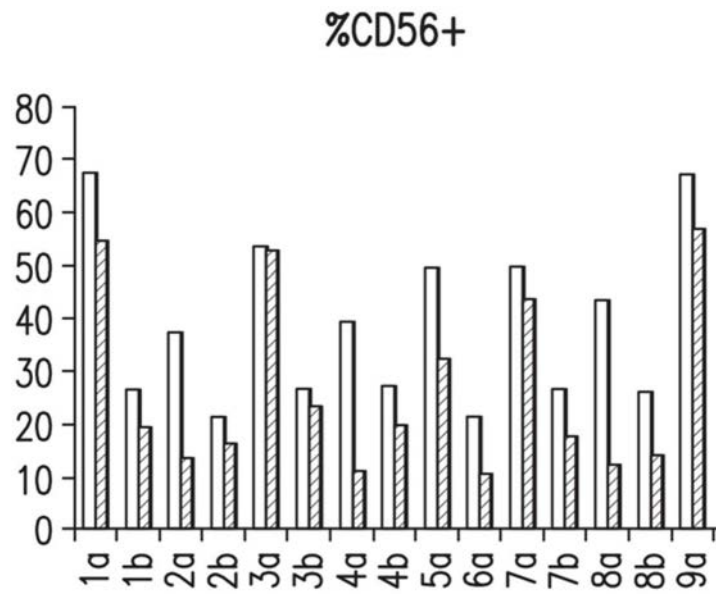


图20A

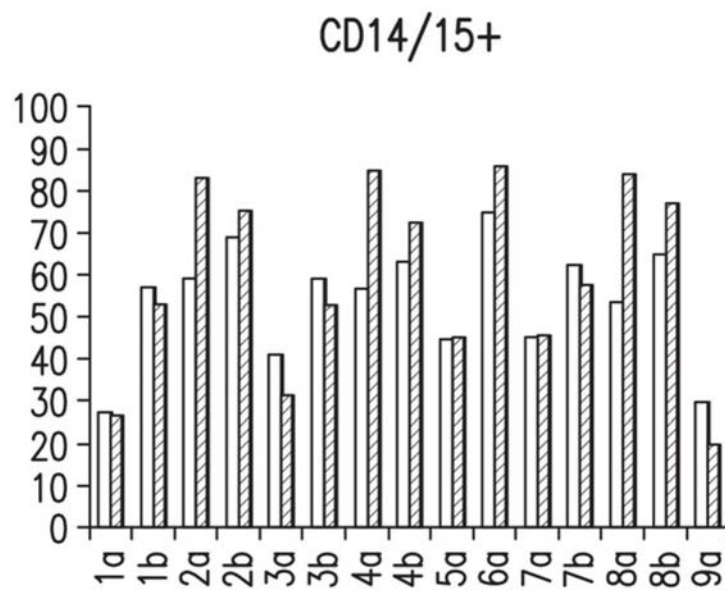


图20B

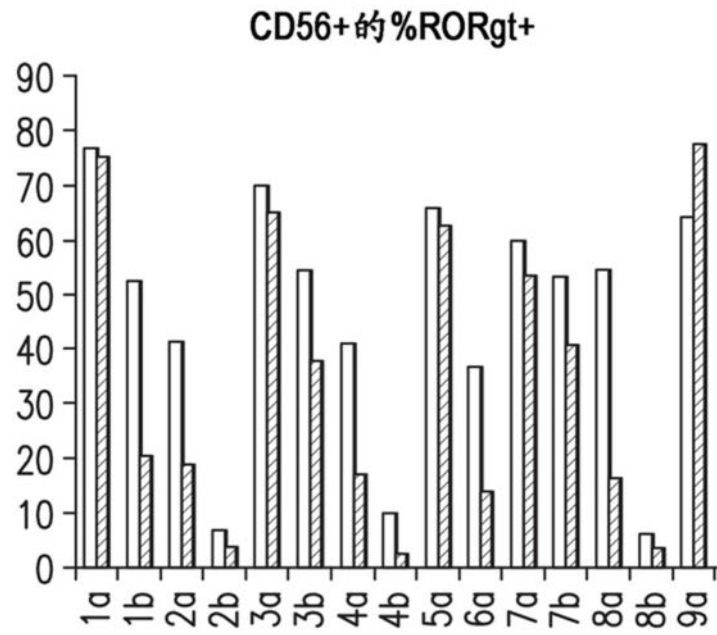


图20C

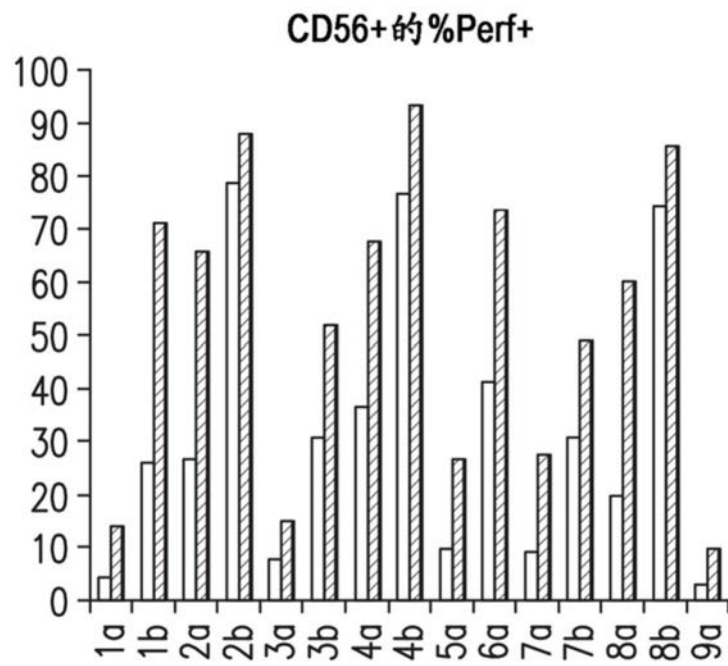


图20D

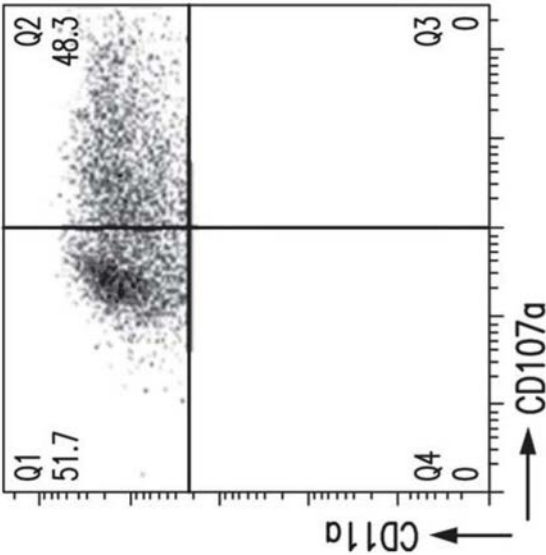


图21A

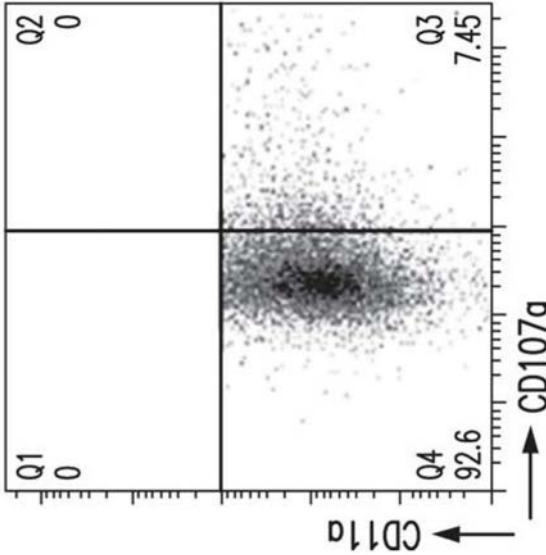


图21B

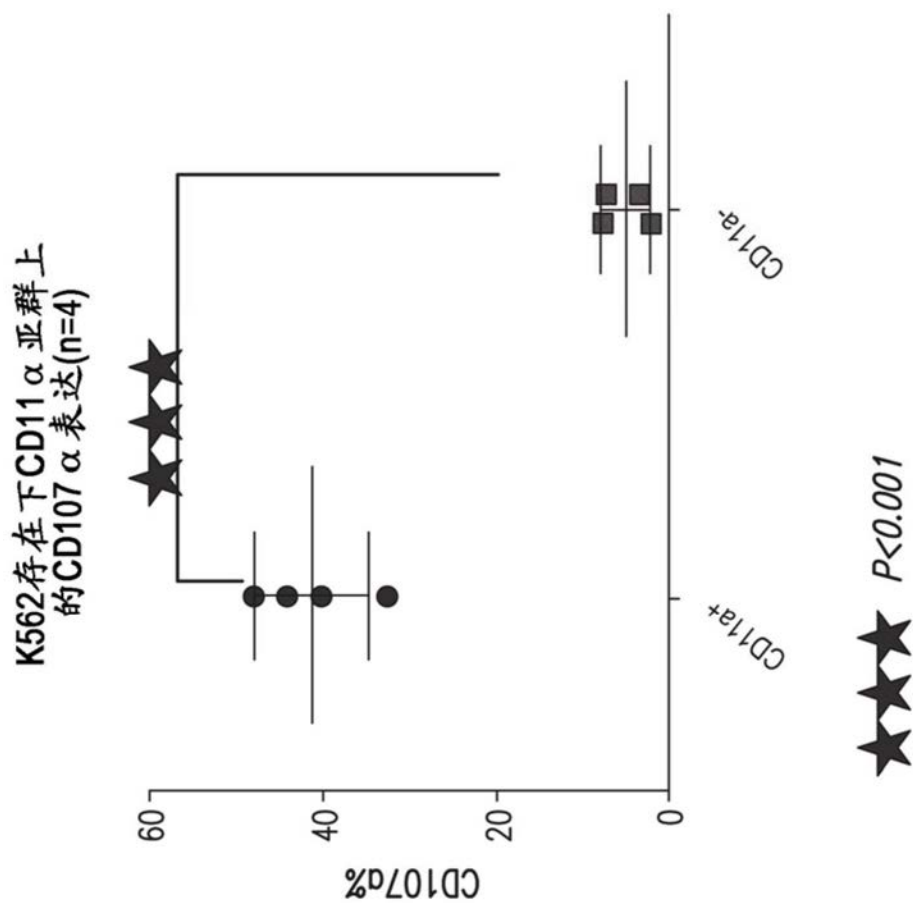


图21C

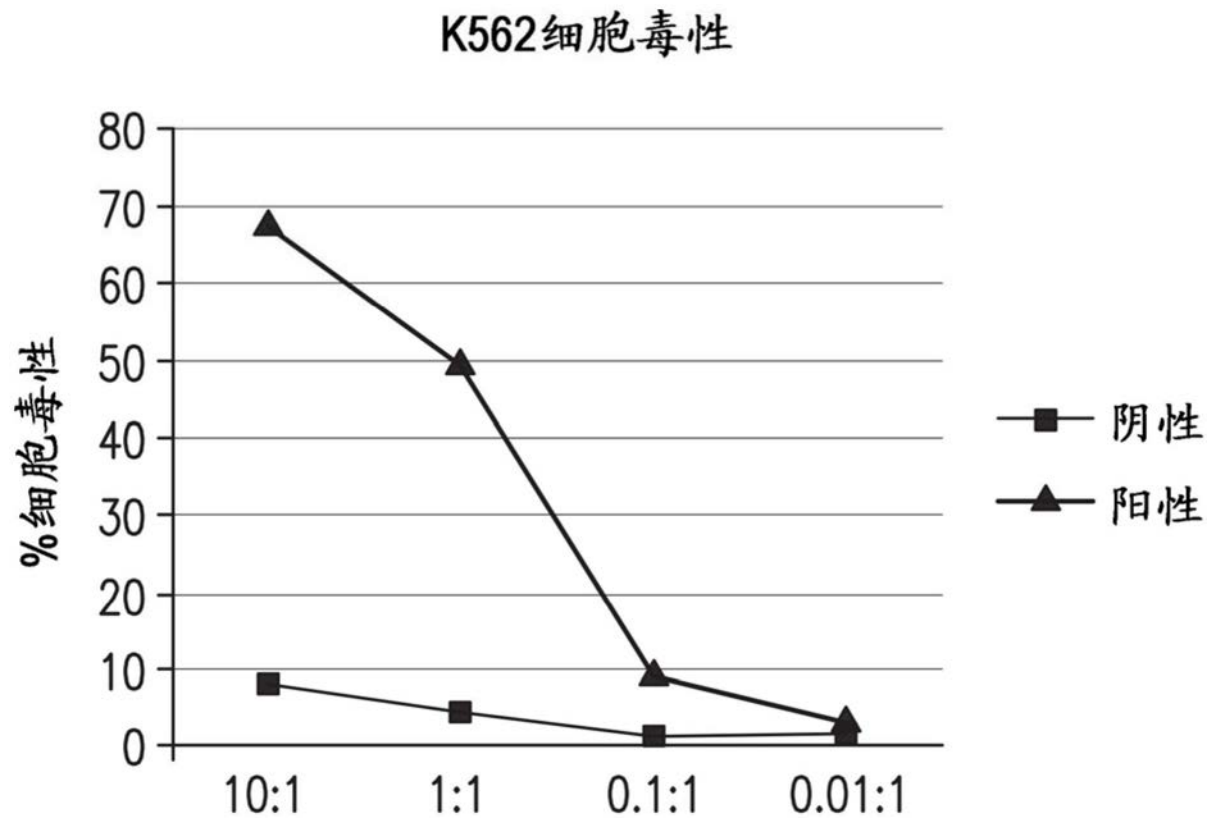


图22

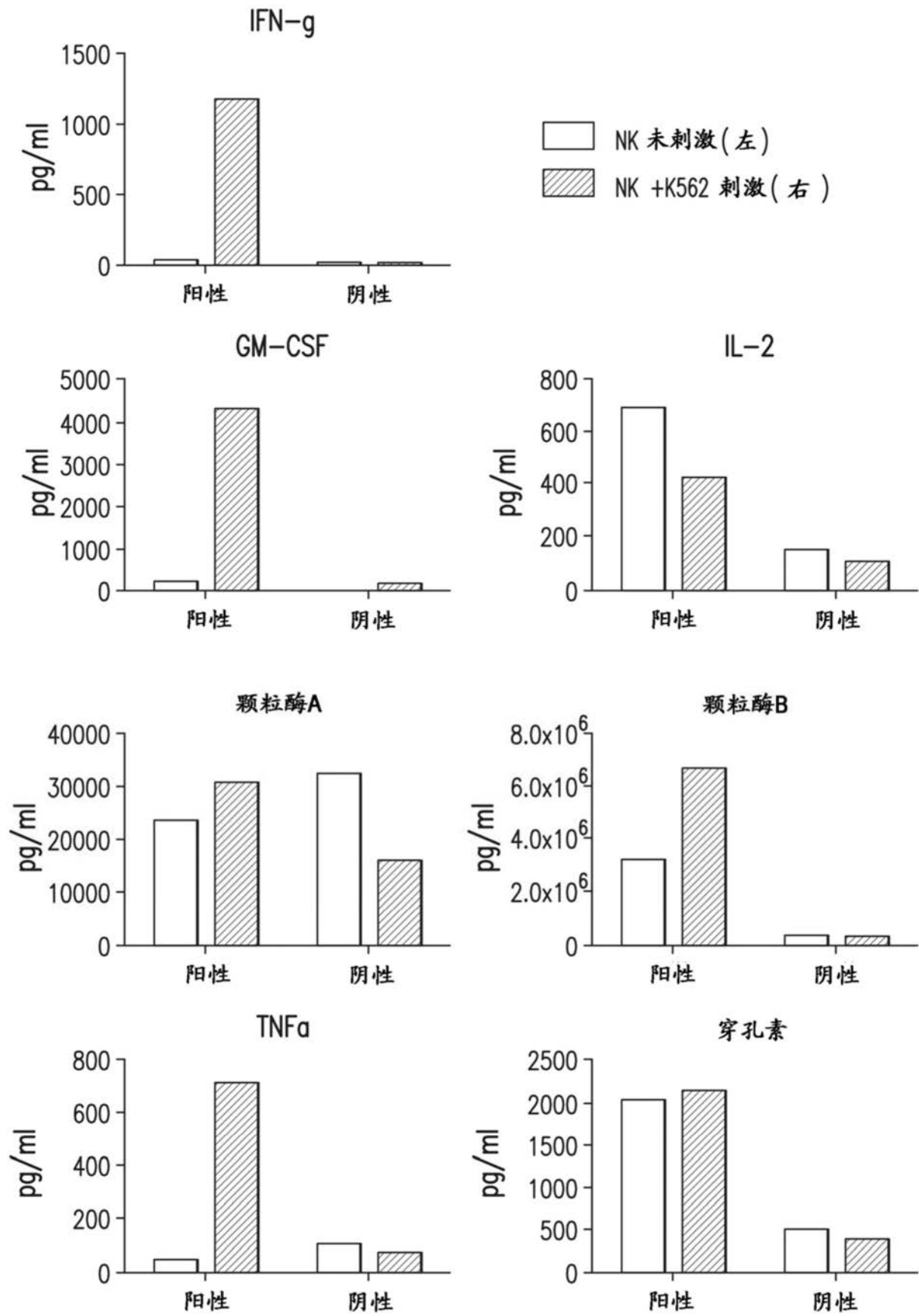


图23