(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111278968 A
(43)申请公布日 2020.06.12

(21)申请号 201880069094.4

(22)申请日 2018.04.24

(30)优先权数据
PCT/GB2017/053222 2017.10.25 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2018/051073 2018.04.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/081879 EN 2019.05.02

(71)申请人 LIFT生物科学有限公司
地址 英国布莱顿

(72)发明人 亚历克斯·布莱斯
尼科·布鲁克斯

(74)专利代理机构 北京骥驰知识产权代理有限公司 11422
代理人 唐晓峰

(51)Int.Cl.
C12N 5/0787(2006.01)
A61K 35/15(2006.01)

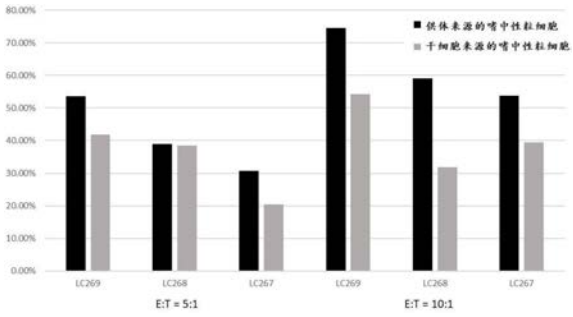
权利要求书3页 说明书43页 附图13页

(54)发明名称

肿瘤杀伤细胞

(57)摘要

本发明涉及造血细胞的体外培养物，其中所述造血细胞分化形成粒细胞，其特征在于杀伤癌细胞的能力。本发明还涉及所述粒细胞，鉴定所述造血细胞和粒细胞的方法，包含其的组合物和试剂盒，以及其用于治疗癌症的用途。



CN 111278968 A

1.一种获得适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品,并温育所述测试样品;和

b.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的癌细胞的百分数时,从所述供体的样品中获得造血细胞,其中所述对照样品包含相同类型的癌细胞株和可得自不同供体的粒细胞。

2.一种获得适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

a.将得自供体的粒细胞与癌细胞株混合形成混合物;

b.温育所述混合物;

c.测量所述测试样品中杀伤的癌细胞的百分数;

d.当所述粒细胞杀伤测试样品中至少5%的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

3.根据权利要求1或2所述的体外方法,其中所述造血细胞是造血干细胞。

4.根据权利要求1或2所述的体外方法,其中所述造血细胞是粒细胞前体细胞,例如常见的髓系祖细胞、成髓细胞、N.早幼粒细胞、N.中幼粒细胞、N.晚幼粒细胞、N.带或其组合。

5.根据权利要求1或2所述的体外方法,其中所述造血细胞是可得自供体的体细胞的诱导多能干细胞。

6.一种选择适用于治疗胰腺癌的粒细胞的体外方法,所述方法包括:

a.将粒细胞与胰腺癌细胞株混合以形成混合物;

b.温育所述混合物;

c.测量所述混合物中杀伤的胰腺癌细胞的百分数;

d.选择杀伤混合物中至少5%的胰腺癌细胞的粒细胞。

7.一种选择选择性杀伤癌细胞的粒细胞的体外方法,所述方法包括:

a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品,并温育所述测试样品;和

b.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的非癌细胞的百分数时,选择所述对癌细胞具有选择性的粒细胞,其中所述对照样品包括非癌细胞株和可得自相同供体的粒细胞。

8.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

a.测量可得自供体的粒细胞的细胞表面电荷;和

b.当与对照粒细胞相比,所述粒细胞具有更正的细胞表面电荷时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

9.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

a.测量可得自供体的样品中具有正的表面电荷的粒细胞的浓度;和

b.当所述具有正的细胞表面电荷的粒细胞的浓度大于来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正的细胞表面电荷的粒细胞的浓度时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

10.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

a.测量可得自第一供体的粒细胞的细胞表面电荷;

b.鉴定与对照粒细胞相比具有更正的细胞表面电荷的可得自所述第一供体的粒细胞;

c.测量步骤b中鉴定的粒细胞的浓度;

d.将在步骤c中测量的所述粒细胞的浓度与可得自第二(或其他)供体的粒细胞的浓度进行比较,其中与所述对照粒细胞相比,来自所述第二(或其他)供体的粒细胞具有更正的细胞表面电荷;和

e.当与可得自所述第二(或其他)供体的所述粒细胞的浓度相比,该比较鉴定出可得自所述第一供体的所述粒细胞的浓度更高时,从所述第一供体的样品获得造血细胞。

11.根据权利要求8-10中任一项所述的体外方法,其中所述粒细胞与带负电荷的纳米探针或纳米颗粒接触,优选其中所述粒细胞在所述接触后被分离。

12.根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述癌细胞株是选自以下的一种或多种:胰腺癌细胞株、肝癌细胞株、食道癌细胞株、胃癌细胞株、宫颈癌细胞株、卵巢癌细胞株、肺癌细胞株、膀胱癌细胞株、肾癌细胞株、脑癌细胞株、前列腺癌细胞株、骨髓瘤癌细胞株、非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞株、喉癌细胞株、子宫癌细胞株或乳腺癌细胞株。

13.根据前述权利要求中任一项所述的体外方法,其中所述癌细胞株是胰腺癌细胞株。

14.根据前述权利要求中任一项的体外方法,其中所述癌细胞株是胰腺导管腺癌细胞株,优选其中所述癌细胞株是PANC-1细胞株。

15.根据前述权利要求中任一项的体外方法,其中所述粒细胞是嗜中性粒细胞。

16.根据权利要求6-7或12-15中任一项所述的体外方法,还包括丢弃杀伤所述混合物中少于5%的癌细胞的粒细胞。

17.根据权利要求6-7或12-16中任一项所述的体外方法,还包括从可获得所选粒细胞的所述供体的样品中获得造血细胞。

18.造血细胞或其体外细胞培养物,其可通过权利要求1-5、8-15或17中任一项的方法获得,优选其中所述造血细胞具有带正电荷的细胞表面。

19.粒细胞或其体外细胞培养物,其可通过权利要求6-7或12-17中任一项的方法获得或分化自根据权利要求18的造血细胞或其体外细胞培养物,优选其中所述粒细胞具有带正电荷的细胞表面。

20.造血细胞的体外细胞培养物,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

a.由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势和/或密度大于1.077g/ml;和

b.杀伤癌细胞的能力。

21.药物组合物,其包含:

a.根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物,根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物或根据权利要求20所述的造血细胞体外细胞培养物;和

b.粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素;血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gln)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNFα、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合。

22.试剂盒,其包含:

a.根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物,根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物,根据权利要求20所述的造血细胞的体外细胞培养物或根据权利要求21所述的药物组合物;和

b.其在药物中使用的说明书。

23.根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求20所述的造血细胞的体外细胞培养物，根据权利要求21所述的药物组合物或根据权利要求22所述的试剂盒，用于治疗癌症。

24.根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求20所述的造血细胞的体外细胞培养物，根据权利要求21所述的药物组合物或根据权利要求22所述的试剂盒用于制备治疗癌症的药物的用途。

25.一种治疗癌症的方法，其包括：给予有需要的受试者根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求20所述的造血细胞的体外细胞培养物，或根据权利要求21所述的药物组合物。

26.根据权利要求18-25中任一项用途或方法所述用途的造血细胞或体外细胞培养物，粒细胞或其体外细胞培养物，药物组合物，或试剂盒，其中所述癌症是实体瘤癌症。

27.根据权利要求18-26中任一项用途或方法所述的造血细胞或体外细胞培养物，粒细胞或其体外细胞培养物，或药物组合物，其中所述癌症是以下的一种或多种：胰腺癌、肝癌、食道癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、脑癌、前列腺癌、骨髓瘤癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、喉癌、子宫癌或乳腺癌。

28.一种细胞库，其包含根据权利要求18所述的造血细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求19所述的粒细胞或其体外细胞培养物，根据权利要求20所述的造血细胞体外细胞培养物或根据权利要求21所述的药物组合物。

肿瘤杀伤细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及适于治疗癌症的基于细胞的疗法。

背景技术

[0002] 癌症是全球发病率和死亡率的主要原因，而发达国家的癌症发病率逐年增加。世界卫生组织表示，仅在2012年，就有大约1400万新的癌症病例(以及820万相关死亡)，预计在未来的二十年中将上升到2200万。当前的治疗策略包括外科手术、放射线和细胞毒性化学疗法的组合，然而，这些治疗中的许多最终都是无效的，并伴随着有害的副作用。

[0003] 已经评估了造血干细胞移植(HSCT)作为治疗某些癌症(例如肾细胞癌)的治疗技术的安全性和有效性。但是，由于潜在的致命安全性问题，此治疗在很大程度上仍被视为实验性治疗，由于多能干细胞不受控的增殖，接受者表现出严重移植物抗宿主病(GVHD)。因此，现需要改进的和替代的癌症疗法。

[0004] 尽管癌症发病率增加，但是已经观察到大约50-60％的人在一生中没有患上癌症。确实，在极少数情况下，有些人表现出自发的癌症消退。此观察结果导致对自发性消退个体的白细胞的研究，以及所述白细胞在白细胞输注疗法(LIFT)中的用途。

[0005] 常规LIFT使用单采血液分离术进行，以将从供体获取的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)直接转移至癌症患者。目前的方法不实用，也不能扩展用作可靠的癌症疗法。首先，粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的货架期非常有限(通常少于24小时)，使其难以储存。其次，单采血液分离术需要大约5个(非常罕见)供体才能获得所需的细胞量。第三，为了避免重复暴露引起的免疫反应，不能在后续给药中使用相同的供体，因此需要增加适当供体库。第四，现实上不能期望供体会应要求供用或愿意为LIFT过程提供无尽的粒细胞来源。第五，供体来源的粒细胞的肿瘤杀伤功效随时间变化，导致治疗结果不一致。

[0006] 迄今为止，还没有提供常规LIFT的可行替代方案，也没有提供解决相关问题的解决方案。因此，常规LIFT不可以作为可扩展的、安全的和可靠的治疗技术。

[0007] 本发明为至少一个上述问题提供了解决方案。

[0008] 本发明人惊奇地发现，可以选择能够分化为具有杀伤癌细胞能力的粒细胞的造血细胞。一旦从供体中选择此造血细胞，就可将所述细胞储存起来用于后续治疗目的或直接用作例如治疗癌症的药物。有利地，通过本发明的方法可获得的造血细胞可被永生化，从而提供可无限期地存储和/或繁殖的稳定细胞株。因此，本发明减少对多个稀有供体和/或将从供体收集的粒细胞直接转移至癌症患者的需求。因此，本发明提供可行的、可扩展的、安全和/或可靠的疗法。

[0009] 发明人首次发现，粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的肿瘤杀伤功效是遗传定义的，而不是表观遗传定义的。这在实施例19中得到证明，其显示源自从供体分离的造血细胞(例如造血干细胞)的粒细胞具有与直接从相同供体分离的成熟粒细胞相似的肿瘤杀伤功效。

[0010] 有利地，发现具有肿瘤杀伤活性高的粒细胞的供体可用作造血细胞(例如造血干细胞)的来源，此类造血细胞可分化成具有类似高肿瘤杀伤活性的粒细胞。

[0011] 有利地，此类造血细胞可储存，并用于生产大量粒细胞用以治疗癌症，从而克服了从供体中分离足够量的新鲜粒细胞的问题。

[0012] 此外，已经发现源自造血细胞的粒细胞比从供体分离的粒细胞更快地杀伤癌细胞。另外，源自造血细胞的粒细胞可能比新鲜的供体来源的粒细胞具有更好的肿瘤杀伤功效(例如针对胰腺癌细胞)。

[0013] 已知胰腺癌是最难治疗的癌症之一。然而，令人惊讶的是，本发明人成功地分离出粒细胞和分化成粒细胞的造血细胞，它们对胰腺细胞具有特别的功效。

[0014] 在一方面，本发明提供造血细胞的体外细胞培养物，其中所述造血细胞分化形成粒细胞，其特征在于：

[0015] a.由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec，例如至少1.25μm.cm/volt.sec，1.5μm.cm/volt.sec，或1.75μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势；和

[0016] b.杀伤癌细胞的能力。

[0017] 在相关方面，本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0018] a.测量可得自供体的粒细胞的表面电势；和

[0019] b.当所测量的表面电势由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec，例如至少1.25μm.cm/volt.sec，1.5μm.cm/volt.sec，或1.75μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义时，从所述供体选择造血细胞。

[0020] 如本文所用，术语“可获得(obtainable)”还涵盖术语“获得(obtained)”。

[0021] 本发明提供一种选择造血细胞的方法，其包括：测量造血细胞的表面电势；和选择能够分化为适合治疗癌症的粒细胞的造血细胞。因此，在一方面，提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0022] a.测量造血细胞的表面电势；和

[0023] b.选择表面电势比分化形成具有由小于2.0μm.cm/volt.sec(或小于1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大(例如更正)的造血细胞。

[0024] 相关方面提供造血细胞的表面电势用于选择可分化为适合治疗癌症的粒细胞的细胞的用途，其中该表面电势比分化形成由小于2.0μm.cm/volt.sec(或小于1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞的表面电势更大(例如更正)。

[0025] 本发明提供一种选择用于治疗的受试者(例如将从本文所述的药物中受益的受试者)的体外方法，所述方法包括：

[0026] a.将来自所述受试者的粒细胞与癌细胞株混合；

[0027] b.温育所述混合物；

[0028] c.测量在所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数；和

[0029] d.当来自所述受试者的粒细胞杀伤该混合物中少于5％的癌细胞时(适当地，当来自所述受试者的粒细胞杀该死混合物中少于60％，优选少于80％或90％的癌细胞时)，选择用于用本发明的造血细胞的体外细胞培养物，或粒细胞，或粒细胞的体外细胞培养物或药物组合物治疗的受试者。

[0030] 在一些实施方案中，当来自所述受试者的粒细胞杀伤该混合物中少于20％或10％的癌细胞时，选择用于用本发明的造血细胞的体外细胞培养物，或粒细胞，或粒细胞的体外细胞培养物或药物组合物治疗的受试者。优选地，当来自所述受试者的粒细胞杀伤该混合物中少于5％或1％的癌细胞时，选择用于用本发明的造血细胞的体外细胞培养物，或粒细胞，或粒细胞的体外细胞培养物或药物组合物治疗的受试者。

[0031] 体外方法也可用于监测受试者的粒细胞杀伤癌细胞的能力。

[0032] 在一方面，本发明提供一种用于获得适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0033] a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品，并温育所述测试样品；和

[0034] b.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的癌细胞的百分数时，从所述供体的样品中获得造血细胞，其中所述对照样品包含相同类型的癌细胞株和可得自不同供体的粒细胞。

[0035] 对照样品中杀伤的癌细胞的百分数可在实施本方法之前或在实施本方法的同时(优选同时)测定。

[0036] 例如，在一个实施例中，所述方法包括：

[0037] a.使癌细胞株与可得自第一供体的粒细胞接触以形成测试样品；

[0038] b.使相同类型的癌细胞株与可得自不同供体的粒细胞(例如对照粒细胞)接触以形成对照样品；

[0039] c.温育所述样品；和

[0040] d.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的癌细胞的百分数时，从所述第一供体的样品中获得造血细胞。

[0041] 在一些实施方案中，该方法可包括使用多个包含来自其他供体(例如第二、第三、第四供体等)的粒细胞的不同测试样品。

[0042] 所指的对照样品可以是来自具有不杀伤癌细胞的粒细胞(例如，在本文所述的方法中不杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)的供体的样品。在其他实施方案中，所指的对照样品可以是来自具有确实杀伤癌细胞的粒细胞(例如，在本文所述的方法中确实杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)的供体的样品，在此情况下，该方法可用于检测具有最佳肿瘤杀伤活性粒细胞的供体。在一个实施方案中，在本文所述的方法中，对照样品包含杀伤至多50％、40％、30％、20％或10％的癌细胞的粒细胞，优选地，在本文所述的方法中，对照样品包含杀伤至多5％的癌细胞的粒细胞。

[0043] 优选地，当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少5％时，获得造血细胞。在一些实施方案中，测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少10％，15％，20％，25％，30％，40％，50％，60％，70％或80％。更优选地，测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少35％。

[0044] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1，并且当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少5％，10％，15％，20％，25％，30％，40％，50％，60％，70％或80％时，获得造血细胞。更优选地，该方法包括使

用粒细胞与癌细胞的比例为5:1,并且当测试样品中杀伤的癌细胞百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少30%时,获得造血细胞。

[0045] 在一个实施方案中,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1,并且当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少5%,10%,15%,20%,25%,30%,40%,50%,60%,70%或80%时,获得造血细胞。更优选地,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1,并且当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少20%时,获得造血细胞

[0046] 在一方面,本发明提供一种获得适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括:

[0047] a.将可得自供体的粒细胞与癌细胞株混合形成混合物;

[0048] b.温育所述混合物;

[0049] c.测量所述测试样品中杀伤的癌细胞的百分数;和

[0050] d.当所述粒细胞杀伤测试样品中至少5%的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0051] 当粒细胞杀伤混合物中至少10%,20%,30%,40%或50%的癌细胞时,可从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0052] 在一个实施方案中,当粒细胞杀伤混合物中至少60%的癌细胞时,从所述供体的样品获得造血细胞。

[0053] 在一个实施方案中,当粒细胞杀伤混合物中至少70%的癌细胞时,从所述供体的样品获得造血细胞。

[0054] 优选地,当粒细胞杀伤混合物中至少80%或90%的癌细胞时,从所述供体的样品获得造血细胞。

[0055] 在一个实施方案中,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少30%的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。优选地,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少40%的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0056] 在一个实施方案中,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少45%、50%或60%(优选至少60%)的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。更优选地,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少80%的癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0057] 在一些实施方案中,癌细胞株是宫颈癌细胞株(例如HeLa)。

[0058] 在一个实施方案中,该方法包括使用粒细胞与宫颈癌细胞的比例为5:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少30%的宫颈癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。优选地,该方法包括使用粒细胞与宫颈癌细胞的比例为5:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少40%的宫颈癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0059] 在一个实施方案中,该方法包括使用粒细胞与宫颈癌细胞比例为10:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少45%,50%或60%时(优选60%)的宫颈癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。更优选地,该方法包括使用粒细胞与宫颈癌细胞的比例为10:1,并且当粒细胞杀伤混合物中至少80%的宫颈癌细胞时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0060] 在一些实施方案中，癌细胞株是胰腺癌细胞株(例如PANC-1)。

[0061] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1，并且当所述粒细胞杀伤混合物中至少50％或60％的胰腺癌细胞时，从所述供体的样品获得造血细胞。优选地，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1，并且当粒细胞杀伤混合物中至少65％或70％的胰腺癌细胞时，从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0062] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1，并且当粒细胞杀伤混合物中至少70％的胰腺癌细胞时，从所述供体的样品获得造血细胞。优选地，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1，并且当粒细胞杀伤混合物中至少80％或90％的胰腺癌细胞时，从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0063] 在一方面，提供一种选择选择性杀伤癌细胞的粒细胞的体外方法，所述方法包括：

[0064] a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品，并温育所述测试样品；和

[0065] b.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的非癌细胞的百分数时，选择对癌细胞有选择性的所述粒细胞，其中所述对照样品包含非癌细胞株和可得自相同供体的粒细胞。

[0066] 该方法优选包括进一步的步骤：当选择粒细胞时，从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0067] 对照样品中杀伤的非癌细胞的百分数可在实施本发明方法之前或与实施本发明方法同时(优选同时)测确。

[0068] 例如，在一个实施方案中，所述方法包括：

[0069] a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品；

[0070] b.使非癌细胞株与可得自相同供体的粒细胞(例如对照粒细胞)接触以形成对照样品；

[0071] c.温育所述样品；和

[0072] d.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于对照样品中杀伤的非癌细胞的百分数时，选择对癌细胞有选择性的所述粒细胞。

[0073] 在一些实施方案中，该方法可包括使用多个包含来自其他供体(例如第二、第三、第四供体等)的粒细胞的不同测试样品。

[0074] 在一个实施方案中，当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比测试样品中非癌细胞的百分数高至少2％，5％，10％，15％，20％，30％，40％或50％时，则认为粒细胞对癌细胞有选择性。

[0075] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1，并且当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少10％，20％或30％时，获得造血细胞。

[0076] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1，并且当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数比对照样品中杀伤的癌细胞的百分数高至少10％或20％时，获得造血细胞。

[0077] 优选地，在本文所述的方法中，粒细胞杀伤少于35％，25％，15％，10％，5％或1％的非癌细胞。

[0078] 在上述方法中可使用任何非癌细胞株。在一个实施方案中，非癌细胞株是上皮细胞，例如乳腺上皮细胞。优选地，非癌细胞株是MCF-12F非癌细胞株(可购自American Type Culture Collection,10801 University Boulevard.Manassas,VA 20110 USA，商品名为ATCC® CRL-10783™)。

[0079] 在一个实施方案中，提供一种选择选择性杀伤癌细胞的粒细胞的方法，所述方法包括：

[0080] a.使癌细胞株与可得自供体的粒细胞接触以形成测试样品，并温育所述测试样品；

[0081] b.在以下情况下选择所述粒细胞：

[0082] i.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于第一对照样品中杀伤的癌细胞的百分数时，其中第一对照样品包含相同类型的癌细胞株和可得自不同供体的粒细胞；和

[0083] ii.当测试样品中杀伤的癌细胞的百分数大于第二对照样品中杀伤的非癌细胞的百分数时，其中第二对照样品包含非癌细胞株和可得自(与步骤a.中的供体)相同的供体的粒细胞(例如对照粒细胞)。

[0084] 在一些实施方案中，方法可包括比较被来自不同供体的两种或更多种粒细胞(培养物)杀伤的非癌细胞的百分数，从而允许选择显示最低非癌细胞杀伤百分数的粒细胞(和供体)。

[0085] 在一方面，本发明提供一种选择适用于治疗胰腺癌的粒细胞的体外方法，所述方法包括：

[0086] a.将粒细胞与胰腺癌细胞株混合以形成混合物；

[0087] b.温育所述混合物；

[0088] c.测量所述混合物中杀伤的胰腺癌细胞的百分数；和

[0089] d.选择杀伤混合物中至少5％的胰腺癌细胞的粒细胞。

[0090] 胰腺癌细胞株可以是胰腺导管腺癌细胞株。

[0091] 粒细胞可以杀伤混合物中至少10％，20％，30％，40％或50的胰腺癌细胞。

[0092] 在一个实施方案中，所述粒细胞杀伤混合物中至少60％的胰腺癌细胞。

[0093] 在一个实施方案中，所述粒细胞杀伤混合物中至少70％的胰腺癌细胞。

[0094] 优选地，所述粒细胞杀伤混合物中至少80％或90％的胰腺癌细胞。

[0095] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1，并且粒细胞杀伤混合物中至少50％或60％的胰腺癌细胞。优选地，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1，并且粒细胞杀伤混合物中至少65％或70％的胰腺癌细胞。

[0096] 在一个实施方案中，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1，并且该粒细胞杀伤混合物中至少70％的胰腺癌细胞。优选地，该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1，并且粒细胞杀伤混合物中至少80％或90％的胰腺癌细胞。

[0097] 在一些实施方案中，癌细胞株是胰腺癌细胞株(例如PANC-1)。

[0098] 一个相关方面提供一种选择适用于治疗癌症的粒细胞的体外方法，所述方法包括：

[0099] a.将粒细胞与多种不同的癌细胞株混合以提供多种混合物；

[0100] b.温育所述混合物；

[0101] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数;和

[0102] d.当所述粒细胞杀伤混合物中至少5%的癌细胞时,选择适用于治疗与癌细胞株相同类型/亚型的癌症的粒细胞。

[0103] 有利地,此方法允许快速筛选粒细胞的杀伤多种癌症类型/亚型的能力。在一些实施方案中,然后根据粒细胞适用于治疗的癌症的类型/亚型对粒细胞进行分类。

[0104] 如本文所用,术语"类型"是指与癌细胞株相同器官或组织的癌症。例如,如果癌细胞株是胰腺导管腺癌细胞株,那么杀伤混合物中至少5%的胰腺导管腺癌细胞的粒细胞被视为适用于治疗所有胰腺癌。

[0105] 如本文所用,术语"亚型"不仅意味着癌症具有相同器官或组织,而且还意味着癌症与癌细胞株具有其他共同特征(例如,都是同一器官或组织的癌、肉瘤等)。例如,如果癌细胞株是胰导管腺癌细胞株,那么杀伤混合物中至少70%的胰导管腺癌细胞的粒细胞被视为适用于治疗所有胰导管腺癌变体。

[0106] 前述体外方法可进一步包括根据如本文所公开的表面电势(例如细胞表面电荷)来测量和/或选择粒细胞。前述体外方法可进一步包括根据如本文所公开的细胞密度(例如至少1.077g/ml)来测量和/或选择粒细胞。前述体外方法可进一步包括根据toll样受体的表达或活性;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2在所述粒细胞上的表达缺失或活性缺乏来测量和/或选择粒细胞。

[0107] 根据前述方面的体外方法可代表癌症杀伤活性(CKA)分析(如权利要求6)

[0108] 如本文所用,术语"混合"是指将一种或多种组分以任何顺序(按顺序或同时)混合在一起。在一个实施方案中,"混合"是指使第一组分与第二组分(例如粒细胞和癌细胞株)接触。

[0109] 术语"多个"是指至少两个。在一个实施方案中,"多个"是指至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。"多个"可表示至少30、40、50、60、70、80、90或100。在一个实施方案中,"多个"是指2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20。在另一个实施例中,"多个"是指30、40、50、60、70、80、90或100。

[0110] 在一个实施方案中,粒细胞可得自供体,例如人类供体。或者或另外地,粒细胞可得自患有与本发明的方法中使用的癌细胞株不同类型/亚型的癌症的受试者。有利地,发明人发现患有一种类型/亚型的癌症的受试者可具有能够杀伤不同癌症类型/亚型的癌细胞的粒细胞。这是令人惊讶的,尤其当受试者具有特别低浓度的具有杀伤已经诊断出受试者的癌症细胞的能力的粒细胞时。

[0111] 用于本发明方法中的癌细胞株可以是选自以下的一种或多种:胰腺癌细胞株、肝癌细胞株、食道癌细胞株、胃癌细胞株、宫颈癌细胞株、卵巢癌细胞株、肺癌细胞株、膀胱癌细胞株、肾癌细胞株、脑癌细胞株、前列腺癌细胞株、骨髓瘤癌细胞株、非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞株、喉癌细胞株、子宫癌细胞株或乳腺癌细胞株。

[0112] 合适的细胞株可购自American Type Culture Collection United Kingdom (U.K.),Guernsey,Ireland,Jersey and Liechtenstein,LGC Standards,Queens Road,Teddington,Middlesex,TW11 OLY,UK。例如,胰腺细胞株可以是以下的一种或多种:Capan-2,ATCC HTB-80;Panc 10.05,ATCC CRL-2547;CFPAC-1,ATCC CRL-1918;HPAF-II,ATCC CRL-1997;SW 1990,ATCC CRL-2172;BxPC-3,ATCC CRL-1687;AsPC-1,ATCC CRL-1682;

ATCC® TCP-1026™;SW1990,ATCC CRL-2172;SU.86.86,ATCCCRL-1837;BXPC-3,ATCC CRL-1687;Panc 10.05,ATCC CRL-2547;MIA-PaCa-2,ATCC CRL-1420;PANC-1,ATCC CRL-1469;或ATCC® TCP-2060™。

[0113] 优选地,癌细胞株是胰腺癌细胞株,例如PANC-1。

[0114] 在一个实施方案中,癌细胞株是宫颈癌细胞株,例如HeLa细胞。

[0115] 温育步骤可进行1小时至100小时。合适地,温育步骤可进行5小时至75小时,例如10小时至20小时。

[0116] 温育步骤可进行6小时至6天。适当地,温育步骤可进行6小时至2天,例如12小时至36小时,例如16至24小时。在一实施方案中,温育步骤进行24小时。温育步骤可在适合细胞生长和存活的任何温度下进行,例如在35℃至42℃之间的温度下,合适地在37或39℃下进行。优选地,温育步骤在37或39℃下进行24小时。优选地,温育步骤在30-40℃下进行16-24小时。

[0117] 杀伤的癌细胞的百分数可通过参考起始癌细胞的总数来测量。癌细胞的数目可使用任何合适的手段来测量,例如通过活力染色(例如锥虫蓝染色)和显微镜,或使用其他自动化工具,例如通过细胞电子传感设备,例如得自ACEA Biosciences,Inc.的RT-CES™系统(11585 Sorrento Valley Rd.,Suite 103,San Diego,CA 92121,USA)。在一些实施方案中,杀伤的癌细胞的百分数可在(例如温育癌细胞株和粒细胞的)24小时内测定。在实施本发明方法时,杀伤的癌细胞的百分数优选是杀伤的癌细胞的最大数目。

[0118] 杀伤的癌细胞的数目还可以使用ACEA Biosciences xCELLigence RTCA DP Analyzersystem®测量。xCELLigence系统是一种实时细胞分析仪,可通过测量电阻抗来连续进行无标签动态监测细胞表型变化。此类测量可以按照实施例11中的详细说明进行。所述系统可购自美国ACEA Biosciences 6779Mesa Ridge Road#100,San Diego,CA 92121 USA。

[0119] 本发明的方法可包括使用粒细胞与癌细胞的比例为至少1:1、5:1或10:1。优选地,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1。更优选地,该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1。

[0120] 本领域技术人员理解,在本发明的方法包括两个样品之间(例如“测试样品”和“对照样品”之间)的比较步骤的情况下,条件(例如方法期间的测定条件)应保持一致。例如,粒细胞与癌细胞的浓度比应相同,时间条件等也应相同。在本文中,在两个样品之间进行比较的情况下,合适地样品是等效的。例如,被比较的样品可以是相同的样品类型(例如血液)并且经受相同的处理步骤。在一些实施方案中,样品之间的唯一差异是从其获得所述样品的供体。例如,在测定具有特定性质的细胞比例的实施方案中,每个样品中的细胞总数可相同,以便可以进行适当的比较。

[0121] 在一个实施方案中,混合物包含8×10^5个粒细胞和1.5×10^4个癌细胞,或优选8×10^5个粒细胞和8×10^4个癌细胞。

[0122] 在一个实施方案中,在本文所述的方法中,粒细胞可以杀伤至少5%的癌细胞。在本文所述的方法中,粒细胞可以杀伤至少10%,20%,30%,40%或50%的癌细胞。在一个实施方案中,在本文所述的方法中,粒细胞可以杀伤至少60%的癌细胞。在一个实施方案中,

在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少70％的癌细胞。优选地，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少80％或90％的癌细胞。

[0123] 在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少30％的癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少40％的癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少45％，50％或60％(优选至少60％)的癌细胞。更优选地，在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少80％的癌细胞。

[0124] 在一些实施方案中，癌细胞株是宫颈癌细胞株(例如HeLa)。在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为5:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少30％的子宫颈癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为5:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少40％的子宫颈癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为10:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少45％，50％或60％(优选至少60％)的子宫颈癌细胞。更优选地，在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为10:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少80％的子宫颈癌细胞。

[0125] 在一些实施方案中，癌细胞株是胰腺癌细胞株(例如PANC-1)。在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少50％或60％的胰腺癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少65％或70％的胰腺癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1的实施方案中，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少70％的胰腺癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1的情况下，在本文所述的方法中，粒细胞可以杀伤至少80％或90％的胰腺癌细胞。

[0126] 优选丢弃杀伤少于5％的癌细胞的粒细胞。

[0127] 适当地，如果粒细胞杀伤至少80％，85％，90％或95％的癌细胞，则可选择该粒细胞。优选丢弃杀伤少于70％(适当地少于80％，85％，90％或95％)癌细胞的粒细胞。

[0128] 在一个实施方案中，一种选择适用于治疗癌症的粒细胞的体外方法包括：

[0129] a.将粒细胞与癌细胞株(优选胰腺癌细胞株或多种不同的癌细胞株)混合以提供混合物(一种或多种)，其中每种混合物包含8×10^5个粒细胞，和8×10^4个癌细胞；

[0130] b.在39℃下温育24小时；

[0131] c.测量所述混合物(一种或多种)中杀伤的癌细胞的百分数；

[0132] d.当所述粒细胞杀伤混合物中至少5％的癌细胞时，选择适用于治疗与癌细胞株相同类型/亚型的癌症的粒细胞。

[0133] 在一个实施方案中，根据前述方面的体外方法还可包括平行测定待受试对象的粒细胞。

[0134] 根据本发明的体外方法可进一步包括从可获得或已获得所选粒细胞的供体获得造血细胞。因此，本发明的体外方法也可构成选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法。

[0135] 在另一个实施方案中，选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法包括：

[0136] a.将可得自供体的粒细胞与多种不同的癌细胞株混合以提供多种混合物；

[0137] b.温育所述混合物；

[0138] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数；

[0139] d.当所述粒细胞杀伤混合物中至少5％的癌细胞时，从所述供体中选择适用于治疗与被所述粒细胞杀伤的癌细胞株相同类型/亚型的癌症的造血细胞。

[0140] 体外方法可进一步包括根据如本文所公开的表面电势和/或根据从其分化出的粒细胞的表面电势来测量和/或选择造血细胞。体外方法可进一步包括根据如本文所公开的细胞密度(例如至少1.077g/ml)和/或根据从其分化出的粒细胞的细胞密度(例如至少1.077g/ml)测量和/或选择造血细胞。体外方法可进一步包括根据toll样受体的表达或活性;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2在所述粒细胞上的表达缺失或活性缺乏来测量和/或选择造血细胞。

[0141] 在一方面，提供通过本发明的方法可获得(例如获得)的造血细胞。

[0142] 在一方面，提供通过本发明的方法可获得(例如获得)的粒细胞。

[0143] 根据本发明选择的造血细胞可分化为具有有利特性的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)。例如，所述粒细胞可以比直接从供体获得的粒细胞更快地杀伤癌细胞。在一个实施方案中，从本文所述的造血细胞获得的粒细胞在接触癌细胞的15小时内具有半数最大值肿瘤杀伤百分数。优选地，从本文所述的造血细胞获得的所述粒细胞在接触癌细胞的10小时内具有半数最大值肿瘤杀伤百分数。

[0144] 合适地，当在本文所述的方法中使用的粒细胞与癌细胞的比例为10:1时，获得此类值。

[0145] 如本文所用，术语“半数最大值肿瘤杀伤百分数”是指能够被粒细胞杀伤的全部癌细胞的一半。例如，如果粒细胞杀伤本文所述方法中使用的全部癌细胞的50％，则半数最大值肿瘤杀伤百分数将是该测定中使用的全部癌细胞的25％。

[0146] 在一些实施方案中，可丢弃杀伤少于2％，5％，10％，15％，20％，25％，30％，35％，40％，45％，50％，55％，60％或65％的癌细胞的粒细胞。

[0147] 本发明的体外方法可包括本文所述技术的组合以改善适合于治疗癌症的细胞的选择。例如，如果由于满足规定的密度阈值而选择多个造血细胞或粒细胞，则可评估细胞表面电势/电泳迁移率，以助于鉴定产生高CKA粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的造血细胞或选择具有改善CKA的粒细胞。有利地，此技术组合提高选择本发明的造血细胞或粒细胞的能力。此外，通过对粒细胞(例如嗜中性粒细胞)应用此类技术的组合，可以检测CKA改善的细胞，并从所述供体获得造血细胞。

[0148] 本发明还提供了一种分化方法，所述方法包括将本发明的造血细胞或根据本发明的方法可获得的造血细胞的体外细胞培养物分化为粒细胞。在相关方面，提供通过此方法可获得(例如获得)的粒细胞的体外细胞培养物。在一个实施方案中，体外细胞培养物富含具有以下的粒细胞：

[0149] a.由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec，例如至少1.25μm.cm/volt.sec、1.5μm.cm/volt.sec、或1.75μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势;和

[0150] b.杀伤癌细胞的能力。

[0151] 在一个方面，本发明提供一种药物组合物，其包含:造血细胞;和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素;血清素、维生素C、维生素

D、谷氨酰胺(Gln)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNFα、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合。

[0152] 在一个实施方案中，药物组合物包含造血细胞；和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和生长激素、和血清素、和维生素C、和维生素D、和谷氨酰胺(Gln)、和花生四烯酸、和AGE-白蛋白、和白介素、和TNFα、和Flt-3配体、和血小板生成素和胎牛血清(FBS)。

[0153] 适当地，生长激素可以是人类生长激素。组合物中包含的造血细胞通过本发明的方法可获得(例如获得)，或者可以是本发明的造血细胞的体外细胞培养物的一部分。

[0154] 在一个方面，本发明提供一种药物组合物，其包含：粒细胞；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素；血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gln)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNFα(UniProt登录号P01375)、Flt-3配体、血小板生成素(例如UniProt登录号P40225)、胎牛血清(FBS)或其组合。组合物中包含的粒细胞通过本发明的方法可获得(例如获得)。

[0155] 在一个实施方案中，药物组合物包含粒细胞；和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和生长激素、和血清素、和维生素C、和维生素D、和谷氨酰胺(Gln)、和花生四烯酸、和AGE-白蛋白、和白介素、和TNFα、和Flt-3配体、和血小板生成素和胎牛血清(FBS)。

[0156] 白介素可以是白介素3(IL-3)(例如UniProt登录号P08700)、白介素8(IL-8)(例如UniProt登录号P10145)、白介素4(IL-4)(例如UniProt登录号P05112)、白介素6(IL-6)(例如UniProt登录号P05231)、白介素18(IL-18)(例如UniProt登录号Q14116)或其组合。合适地，白介素可以是白介素-3(IL-3)、白介素8(IL-8)、白介素4(IL-4)、白介素-6(IL-6)和白介素-18(IL-18)。

[0157] 在一个实施方案中，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素、血清素、AGE-白蛋白、白介素、TNF-α、Flt-3配体或血小板生成素可以是人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素、血清素、AGE-白蛋白、白介素、TNF-α、Flt-3配体或血小板生成素。

[0158] 以上所有试剂均可购自Sino Biological Inc.(Suite B-310(以及Suite B-209,B-203),14Zhong He Street,BDA,Beijing 100176,P.R.China)。

[0159] 本发明还涉及本文所述的造血细胞、造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物、药物组合物或试剂盒，用作药物。该药物可用于治疗癌症，因此在相关方面，提供造血细胞、造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物、药物组合物或试剂盒，用于治疗癌症。还提供用于治疗癌症的相应方法，该方法包括向有需要的受试者给予本发明的造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物、药物组合物或试剂盒。

[0160] 本发明的另一方面提供了一种细胞库，其包含本发明的造血细胞、造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物或药物组合物。

[0161] 在另一方面，提供一种试剂盒，其包括：

[0162] a.本发明的造血细胞的体外细胞培养物、造血细胞、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物或药物组合物；和

[0163] b.其在药物中的使用说明书。

[0164] 如本文所用,术语“造血细胞”是指能够分化为粒细胞(优选中性白细胞)的细胞。因此,术语“造血细胞”涵盖造血干细胞以及前体细胞(例如从造血干细胞分化而来),其中所述前体细胞能够分化为粒细胞(优选嗜中性粒细胞)。前体细胞在本文中可以被称为“粒细胞前体细胞”。根据本发明的造血细胞可涉及造血干细胞、粒细胞前体细胞或其组合。优选地,如本文所用,术语“造血细胞”不包括人胚胎干细胞。在一个实施方案中,造血细胞是造血途径的细胞或其等效细胞。在一个实施方案中,造血细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)或其等效细胞。在一个实施方案中,iPSC可得自供体的体细胞。iPSC的产生是本领域中众所周知的技术,参见Yu等人(2007),Science,318:1917-1920,其教导通过引用并入本文。

[0165] 在一个实施方案中,造血细胞是核移植胚胎干细胞(NT-ESC)或其等效物。在一个实施方案中,NT-ESC可通过将来自供体的细胞核注入已去除原始细胞核的卵细胞中而获得。NT-ESC的产生是本领域公知的技术,参见Tachibana M,Amato P,Sparman M等人(2013),Cell,154(2):465-466,其教导通过引用并入本文。

[0166] 在从供体的样品获得造血细胞的一个实施方案中,所述造血细胞可从所述样品中分离。在从供体的样品获得造血细胞的另一个实施方案中,所述样品是包含体细胞的样品,且造血细胞通过诱导所述样品中的细胞(例如体细胞)的多能性以获得iPSC而获得。

[0167] 在从供体的样品获得造血细胞的另一个实施方案中,所述样品是包含体细胞的样品,且造血细胞通过将所述样品中的细胞(例如体细胞)核注射到卵细胞(例如原始核已从中除去)中以获得NT-ESC而获得。

[0168] 在一个实施方案中,造血细胞是造血干细胞。可以根据细胞表面多肽标记物选择造血干细胞,例如选自CD34(例如UniProt登录号P28906)、CD59(例如UniProt登录号P13987)、Thy1(例如UniProt登录号P04216)、CD38(例如UniProt登录号P28907)、C-kit(例如UniProt登录号P10721)和lin。在一个实施方案中,造血干细胞包含细胞表面多肽标记物$CD34^{+}$、$CD59^{+}$、$Thy1^{+}$、$CD38^{low/-}$、$C\text{-}kit^{low/-}$和lin^{-}。优选地,造血细胞表达CD34。检测所述标记物存在与否的抗体是可商购的,且可例如从BD Biosciences Europe,ebioscience,Beckman Coulter和Pharmingen获得。

[0169] 在另一个实施方案中,造血细胞是粒细胞前体细胞。粒细胞前体细胞可以是选自常见髓系祖细胞、成髓细胞、N.早幼粒细胞、N.中幼粒细胞、N.晚幼粒细胞、N.带或其组合中的一种或多种。

[0170] 造血细胞(例如,造血干细胞或粒细胞前体细胞)或细胞培养物可以分化为粒细胞。分化可使用任何合适的方法进行,例如根据Lieber等人,Blood,2004Feb1;103(3):852-9和/或Choi等人,Nat.Protoc.,2011Mar;6(3):296-313,和/或Timmins等人,Biotechnology and bioengineering.2009;104(4):832-40的方法,其通过引用并入本文。

[0171] 在一方面,本发明提供一种分化造血细胞的方法,该方法包括将所述造血细胞与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素;血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gin)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNF-α、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合混合。

[0172] 在一个实施方案中,本发明提供一种分化造血细胞的方法,该方法包括将所述造血细胞与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和生

长激素、和血清素、和维生素C、和维生素D、和谷氨酰胺(Gin)、和花生四烯酸、和AGE-白蛋白、和白介素、和TNF-α、和Flt-3配体、和血小板生成素和胎牛血清(FBS)混合。

[0173] 所述造血细胞可以是造血细胞培养物的一部分。

[0174] 在一个实施方案中,造血细胞的分化包括与一种或多种饲养细胞一起培养所述造血细胞。合适地,饲养细胞可以是OP9细胞。OP9细胞(ATCC®CRL-2749™)可购自American Type Culture Collection United Kingdom(U.K.),Guernsey,Ireland,Jersey and Liechtenstein,LGC Standards,Queens Road,Teddington,Middlesex,TW11 OLY,UK。在一个实施方案中,造血细胞可以与一种或多种饲养细胞和Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合一起培养。

[0175] 因此,在一个实施方案中,本发明的药物组合物或细胞培养物可进一步包含饲养细胞,例如OP9细胞。

[0176] 术语"粒细胞"涵盖以下细胞类型:嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞。优选地,粒细胞是嗜中性粒细胞。粒细胞可表达细胞表面多肽标记物CD11b(例如UniProt登录号P11215)和CD15。粒细胞还可产生活性氧物质(O_2^-)。

[0177] 本发明涵盖适用于治疗癌症的粒细胞。合适地,所述粒细胞包含由至少2.0μm.cm/volt.sec(合适地至少2.25μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势。在一个实施方案中,所述粒细胞包含由至少2.75μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。合适地,所述粒细胞可包含由至少3.25μm.cm/volt.sec或至少3.5μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。优选地,所述粒细胞可包含由至少3.75μm.cm/volt.sec或至少4.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。粒细胞还具有杀伤癌细胞的能力。

[0178] 或者,所述粒细胞可包含由至少1.0μm.cm/volt.sec或至少1.25μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。例如,所述粒细胞可包含由至少1.5μm.cm/volt.sec或至少1.75μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。粒细胞还具有杀伤癌细胞的能力。

[0179] "杀伤癌细胞的能力"可通过将细胞(例如粒细胞,如嗜中性粒细胞)与癌细胞混合,并测量(例如在温育之后)所述癌细胞的活力来测定。如果癌细胞不再存活(即已被杀伤),则该细胞具有杀伤癌细胞的能力。在一个实施方案中,杀伤癌细胞的能力使用本文所述的肿瘤杀伤活性(CKA)测定法测定。

[0180] 在一个实施方案中,CKA分析法包括:

[0181] a.使癌细胞株与粒细胞接触以形成测试样品(优选粒细胞与癌细胞的比例为10:1);

[0182] b.温育所述测试样品;和

[0183] c.测量所述测试样品中杀伤的癌细胞的百分数。

[0184] 在一个实施方案中,CKA分析法包括:

[0185] a.将粒细胞与癌细胞株混合以提供混合物(优选粒细胞与癌细胞的比例为10:1);

[0186] b.温育所述混合物;和

[0187] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数。

[0188] 在一个优选的实施方案中,CKA分析法包括:

[0189] a.将粒细胞与癌细胞株混合以提供混合物,其中所述混合物包含8×10^5个粒细胞

和8×10^4个癌细胞；

[0190] b.将所述混合物在39℃下温育24小时；

[0191] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数。

[0192] 在一个优选的实施方案中，CKA分析法包括：

[0193] a.将粒细胞与癌细胞株混合以提供混合物，其中所述混合物包含至少1:1(例如5:1或10:1)的粒细胞与癌细胞；

[0194] b.将所述混合物温育16-24小时(例如在30-40℃下)；

[0195] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数。

[0196] 在一个实施方案中，在本文所述的方法中，如果粒细胞杀伤至少5％的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。如果粒细胞杀伤至少10％，20％，30％，40％或50％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。在一个实施方案中，如果粒细胞杀伤至少60％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。在一个实施方案中，如果粒细胞杀伤至少70％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。优选地，如果粒细胞杀伤至少80％或90％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。

[0197] 在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少30％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为5:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少40％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少45％，50％或60％(优选至少60％)存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。更优选地，在该方法包括使用粒细胞与癌细胞的比例为10:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少80％存在的癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。

[0198] 在一些实施方案中，癌细胞株是宫颈癌细胞株(例如HeLa)。在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为5:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少30％存在的子宫颈癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为5:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少40％存在的子宫颈癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与宫颈癌细胞的比例为10:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少45％，50％或60％(优选至少60％)存在的子宫颈癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。更优选地，在该方法包括使用粒细胞与子宫颈癌细胞的比例为10:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少80％存在的子宫颈癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。

[0199] 在一些实施方案中，癌细胞株是胰腺癌细胞株(例如PANC-1)。在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少50％或60％存在的胰腺癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为5:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少65％或70％存在的胰腺癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比率为10:1的实施方案中，如果粒细胞杀伤至少70％存在的胰腺癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。优选地，在该方法包括使用粒细胞与胰腺癌细胞的比例为10:1的情况下，如果粒细胞杀伤至少80％或90％存在的胰腺癌细胞，则可以视为其杀伤了癌细胞。

[0200] 优选丢弃杀伤少于5％的癌细胞的粒细胞。

[0201] 前述段落适用于本文所述的每种方法，并且所述公开内容可与本文所述的任何方

法结合。

[0202] 具有杀伤癌细胞的能力(“视为杀伤癌细胞”)的细胞可被定义为在本文的CKA分析法(例如上述CKA分析法)中具有至少70％或75％的CKA的细胞。合适地,所述细胞在本文的CKA分析法(例如上述CKA分析法)中可具有至少80％或90％的活性。

[0203] 具有“杀伤癌细胞的能力”(“视为杀伤癌细胞”)的细胞适用于治疗癌症。可以被分化为具有“杀伤癌细胞的能力”的细胞的造血细胞也被视为适用于治疗癌症。

[0204] 在一方面,本发明提供造血细胞的体外细胞培养物,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

[0205] a.密度为至少1.077g/ml;和

[0206] b.杀伤癌细胞的能力。

[0207] 在一方面,本发明提供造血细胞的体外细胞培养物,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

[0208] a.密度为大于1.077g/ml;和

[0209] b.杀伤癌细胞的能力。

[0210] 密度为至少1.077g/ml的粒细胞可通过实施例21中所述的方法获得。在一个实施方案中,此方法包括:

[0211] i.提供密度调节至1.077g/ml的蔗糖溶液;

[0212] ii.添加包含粒细胞的组合物;和

[0213] iii.离心粒化高密度粒细胞(例如嗜中性粒细胞)。

[0214] 密度为至少1.077g/ml的粒细胞可使用市售的试剂盒获得,例如**Histopaque®**-1077试剂盒(可购自Sigma-Aldrich,目录号10771-100ML)。

[0215] 在一些实施方案中,密度为至少1.077g/ml的粒细胞可通过Ficoll-Paque分离。通常,分离后,此粒细胞出现在1.077Ficoll-Paque培养基的底部,而较低密度的粒细胞(例如密度小于1.077g/ml的粒细胞)出现在1.077-血浆界面。

[0216] 因此,根据(以及用于)本发明的粒细胞的密度可为至少1.077g/ml,且密度小于1.077g/ml的粒细胞可被排除在本发明之外。在一些实施方案中,根据本发明的粒细胞具有至少1.077g/ml的密度和本文所述的细胞表面电势。因此,所有细胞表面电势的实施方案均等同地适用于所述粒细胞。

[0217] 优选地,粒细胞具有大于1.077g/ml的密度。

[0218] 在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.078g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.079g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.080g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.081g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.082g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度为至少1.083g/ml。优选地,粒细胞的密度为1.082g/ml或大于1.082g/ml。

[0219] 在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.084g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.083g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.082g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.081g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.080g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.079g/ml。在一个实施方案中,粒细胞的密度小于1.078g/ml。

[0220] 在一个实施方案中，粒细胞的密度为1.077g/ml至1.084g/ml(例如，密度大于1.077g/ml但小于1.084g/ml)。粒细胞的密度可为1.079g/ml至1.084g/ml，例如1.080g/ml至1.084g/ml。粒细胞的密度可为1.080g/ml至1.083g/ml，例如1.080g/ml至1.082g/ml。

[0221] 在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.077g/ml。优选地，造血细胞的密度为大于1.077g/ml。

[0222] 在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.078g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.079g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.080g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.081g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.082g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度为至少1.083g/ml。

[0223] 在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.084g/ml。在一实施方案中，造血细胞的密度小于1.083g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.082g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.081g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.080g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.079g/ml。在一个实施方案中，造血细胞的密度小于1.078g/ml。

[0224] 在一个实施方案中，造血细胞的密度为1.077g/ml至1.084g/ml(例如，密度大于1.077g/ml但小于1.084g/ml)。造血细胞的密度可为1.079g/ml至1.084g/ml，例如1.080g/ml至1.084g/ml。造血细胞的密度可为1.080g/ml至1.083g/ml，例如1.080g/ml至1.082g/ml。

[0225] 在一方面，本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0226] a.测量可得自供体的粒细胞的密度；和

[0227] b.当测得的粒细胞密度为至少1.077g/ml时，从所述供体选择造血细胞。

[0228] 本发明还提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0229] a.测量造血细胞的密度；和

[0230] b.选择密度比分化形成密度小于1.077g/ml的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大的造血细胞。

[0231] 在一方面，提供一种方法，其包括分化造血细胞的体外细胞培养物，其中所述造血细胞分化形成粒细胞，其特征在于：

[0232] a.密度至少为1.077g/ml；和

[0233] b.杀伤癌细胞的能力。

[0234] 本发明还提供可通过前述方法获得的粒细胞的体外培养物。

[0235] 在一方面，本发明提供造血细胞的体外细胞培养物，其中所述造血细胞分化形成粒细胞，其特征在于：

[0236] a.Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；和

[0237] b.杀伤癌细胞的能力。

[0238] 所述受体的存在与否可使用本领域技术人员已知的任何技术来测定。例如，本领域技术人员可以任选地将标记的抗体与FACS组合使用以检测所述受体的存在与否。

[0239] 受体活性/非活性也可使用任何已知技术测定。例如，通过检测与所述活性/非活

性相关的基因表达的变化。

[0240] 优选地，粒细胞表达toll样受体；且不表达程序性死亡1(PD-1)受体(例如UniProt登录号Q15116)；CD115(例如UniProt登录号P07333)；CD224(例如UniProt登录号P19440)；CXCR1(例如UniProt登录号P25024)；和/或CXCR2(例如UniProt登录号P25025)(优选不表达程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1和CXCR2)。

[0241] 或者或另外地，PD-1受体；CD115；CD224；CXCR1；CXCR2和CXCR2的一种或多种可以非活性形式表达，或在表达后失活。

[0242] toll样受体可以是以下的一种或多种：TLR1(例如UniProt登录号Q15399)、TLR2(例如UniProt登录号060603)、TLR3(例如UniProt登录号015455)、TLR4(例如UniProt登录号000206)、TLR5(例如UniProt登录号060602)、TLR6(例如UniProt登录号Q9Y2C9)、TLR7(例如UniProt登录号Q9NYK1)、TLR8(例如UniProt登录号Q9NR97)、TLR9(例如UniProt登录号Q9NR96)、TLR10(例如UniProt登录号Q9BXR5)和/或TLR11(例如UniProt登录号Q6R590)。优选地，toll样受体是TLR4。

[0243] 不希望受理论所束缚，发明人认为：

[0244] PD-L1在CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)上不与其受体PD-1结合和/或CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)不产生PD-L1；和/或

[0245] CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)在其表面具有活性toll样受体；和/或

[0246] CD115和CD224标记物不在CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)上表达；

[0247] CXCR1和CXCR2是CKA低的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的受体，即CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)不表达CXCR1和CXCR2，或者CXCR1和CXCR2在所述粒细胞(例如嗜中性粒细胞)中被抑制。

[0248] 在一个实施方案中，具有上述细胞表面多肽表达谱的粒细胞也具有本文所述的细胞表面电势和/或密度。

[0249] 在一方面，本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0250] a.检测toll样受体；程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2在可得自供体的粒细胞上的表达或活性；和

[0251] b.当toll样受体表达或活跃时；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2未表达或未活跃时，从所述供体选择造血细胞。

[0252] 在一方面，提供一种方法，其包括分化造血细胞的体外细胞培养物，其中所述造血细胞分化形成粒细胞，其特征在于：

[0253] a.Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；和

[0254] b.杀伤癌细胞的能力。

[0255] 本发明还提供可通过前述方法获得的粒细胞的体外培养物。

[0256] 造血细胞可以永生。本领域技术人员熟悉永生化技术，其尤其包括引入解除细胞周期调节的病毒基因(例如5E1型腺病毒基因)和端粒酶的人工表达。永生化有利地允许制备可以在体外稳定培养的细胞株。因此，在一方面，本发明提供从所选造血细胞可获得(例如获得)的永生化细胞株，以及稳定的造血细胞培养物。合适地，通过本发明的方法可获得

(例如获得)永生化细胞株或稳定的造血细胞培养物。

[0257] 参考造血细胞培养物或细胞株所用的术语“稳定”是指该细胞培养物或细胞株已经过修饰,使其比未经修饰的细胞(即从供体获得并直接进行体外细胞培养的细胞)更易于进行体外细胞培养。与未经修饰的细胞相比,所述“稳定”细胞培养物或细胞株能够经历更多轮的复制(优选延长的时间段)。

[0258] 造血细胞适当地从供体例如人类供体可获得(例如获得)。

[0259] 如本文所用,术语“供体”是指从其获得生物流体样品的受试者(合适地是人类受试者)。可从中获得造血细胞或粒细胞的任何合适的生物流体样品可用于本发明。

[0260] 因此,如本文所用,参考来自供体的样品的术语“样品”是指包含造血细胞或者可从中获得造血细胞的的任何样品(例如,在所述造血细胞为iPSC的情况下,所述样品可包含体细胞)。

[0261] 在一个实施方案中,生物流体样品(或“样品”)是血液样品,例如外周血样品。如本文所用,术语“血液”涵盖全血、血清和血浆。可以对血液进行离心以分离红细胞、白细胞和血浆。离心后,可去除单核细胞层以用于本发明。

[0262] 供体可根据以下特征中的一个或多个来选择:性别、年龄、病史和/或血型类型。在一个实施方案中,如果所述供体是雄性,则可以选择供体。在另一个实施方案中,如果所述供体是18-25岁(合适地18-24岁),则可以选择供体。合适地,如果所述供体是年龄在18-25之间(合适地18-24)的男性,则可以选择供体。不希望被理论所束缚,据信成年初期的男性更有可能产生具有杀伤癌细胞能力的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)。

[0263] 合适地,可得自(例如得自)供体的粒细胞可具有由至少2.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势和杀伤癌细胞的能力。在另一个实施方案中,可得自(例如得自)供体的粒细胞具有由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势和杀伤癌细胞的能力。

[0264] 本发明还涉及测量细胞表面电势。细胞的表面电势可使用本领域已知的任何合适技术测定。在一个实施方案中,表面电势使用电泳确定。电泳技术可通过对合适电泳介质中包含的细胞施加电压并测量细胞迁移率来进行。可使用以下医疗方案:

[0265] i.对电泳室内包含的细胞(悬浮在10mM Tris-HCl和291mM葡萄糖缓冲液中)施加200V直流电;和

[0266] ii.在施加3mA电流的同时,测量所述细胞(例如粒细胞或造血细胞)通过固定长度所花费的时间(例如通过使用显微镜,任选地连接到CCD相机)。

[0267] 电泳迁移率“μ”(以μm.cm/volt.sec为单位表示)可使用以下公式计算:

[0268] μ=ugS/I

[0269] 其中:

[0270] “u”=由步骤ii测得的电泳速度;

[0271] “g”=电泳介质的电导率;

[0272] “S”=电泳室的横截面积;和

[0273] “I”=电流。

[0274] 在一个实施方案中,电泳迁移率由以下测定:

[0275] i.将悬浮在10mM Tris-HCl和291mM葡萄糖中的造血细胞或粒细胞加入电泳室中;

[0276] ii.施加200V/3mA直流电;和

[0277] iii.测量在给定时间内所述造血细胞或粒细胞向电极行进的距离(mm);和

[0278] iv.使用以上公式计算电泳迁移率。

[0279] 电泳可在0.9%(等渗)NaCl溶液中进行。优选地,使用恒定电流(例如3mA)。

[0280] 电泳迁移率测定可以是在Johann Bauer编辑的"Cell Electrophoresis"(ISBN0-8493-8918-6 published by CRC Press,Inc.)中描述的一种,其全部内容并入本文。

[0281] 不希望被理论所束缚,据信可以分化为CKA较高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的造血细胞(例如表达CD34的造血干细胞)比相似大小和重量/密度的分化成CKA较低的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)的造血细胞(例如表达CD34的造血干细胞)带更多正电荷,因此在给定时间内向带负电荷的电极行进更远。同样,据信CKA较高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)比相似大小和重量/密度的可具有较低CKA的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)带更多正电荷,因此在给定时间向带负电荷的电极行进更远。

[0282] 优选地,细胞表面电势等于电泳迁移率,且与电泳期间给定时间内细胞行进的距离成比例。具有较高正电荷的细胞在电泳期间比带较少正电荷(或带负电荷)的细胞向电极行进更远。因此,此细胞将比带较少正电荷(或带负电荷)的细胞具有更大的电池表面电势值。细胞的表面电势可由至少2.0μm.cm/volt.sec或至少2.25μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义。适当地,细胞的表面电势可由至少2.5μm.cm/volt.sec或至少2.75μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义。适当地,细胞的表面电势可由至少3.0μm.cm/volt.sec或至少3.25μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义。优选地,细胞的表面电势可由至少3.5μm.cm/volt.sec或至少3.75μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义。更优选地,细胞的表面电势可由至少4.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义。该细胞可以是造血细胞或粒细胞。

[0283] 在一个实施方案中,本发明的造血细胞可具有由至少1.0μm.cm/volt.sec或至少1.25μm.cm/volt.sec,例如至少1.5μm.cm/volt.sec或至少1.75μm.cm/volt.sec(优选至少2.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势。在一个实施方案中,造血细胞可具有由至少2.25μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。适当地,造血细胞可具有由至少2.75μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。优选地,造血细胞可具有由至少3.25μm.cm/volt.sec或至少3.5μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。更优选地,造血细胞可具有由至少3.75μm.cm/volt.sec或至少4.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0284] 在一个实施方案中,本发明的粒细胞可具有由至少1.0μm.cm/volt.sec或至少1.25μm.cm/volt.sec,例如至少1.5μm.cm/volt.sec或至少1.75μm.cm/volt.sec(优选至少2.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势。在一个实施方案中,粒细胞可具有由至少2.25μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。适当地,粒细胞可具有由至少2.75μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。优选地,粒细胞可具有由至少3.25μm.cm/volt.sec或至少3.5μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。更优选地,粒细胞可具有由至少3.75μm.cm/volt.sec或至少4.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0285] 本发明可包括测量可得自(例如得自)供体的粒细胞的表面电势。如果表面电势由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义,则从该供体选择

造血细胞。有利地，这提供用于选择适用于治疗癌症的造血细胞的简单和/或快速和/或可靠的筛选方法。在一些实施方案中，通过所采用的方法构成快速筛选，可用于测定供体是否合适，而无需进行更复杂的测定(例如CKA分析)。随后可以例如通过将选自供体的造血细胞分化为粒细胞，并在CKA分析中测试所述粒细胞进行功能测定(例如本文所述的CKA分析)以验证筛选。可丢弃没有所需细胞表面电势和/或所需CKA的细胞。

[0286] 另外或或者，可测量造血细胞的表面电势，并且如果造血细胞的表面电势比分化成具有由小于2.0μm.cm/volt.sec(优选小于2.5μm.cm/volt.sec，更优选小于3.5μm.cm/volt.sec或4.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)；和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大，则选择该造血细胞；有利地，这允许快速筛选造血细胞以测定所述细胞是否适用于治疗癌症。因此，本发明涵盖表面电势比分化形成具有由小于2.0μm.cm/volt.sec(优选小于2.5μm.cm/volt.sec，更优选小于3.5μm.cm/volt.sec或4.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)；和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大的造血细胞。

[0287] 在一个实施方案中，丢弃不满足筛选标准(例如不具有更大的表面电势和/或具有由小于2.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势)的造血细胞。

[0288] 另外或或者，可测量造血细胞的表面电势，并且如果造血细胞的表面电势比分化形成具有由小于1.0μm.cm/volt.sec(合适地小于1.25μm.cm/volt.sec，更合适地小于1.5μm.cm/volt.sec或1.75μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)；和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大，则选择该造血细胞；因此，本发明涵盖表面电势比分化形成具有由小于1.0μm.cm/volt.sec(合适地小于1.25μm.cm/volt.sec，更合适地小于1.5μm.cm/volt.sec或1.75μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)；和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大的造血细胞。

[0289] 在一个实施方案中，丢弃不满足筛选标准(例如不具有更大的表面电势和/或具有由小于1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势)的造血细胞。

[0290] 术语“更大的表面电势”是指更正的表面电荷。

[0291] “杀伤癌细胞的能力降低”可通过在相同的实验条件下测试两个或更多个粒细胞(例如嗜中性粒细胞)并比较被杀伤的癌细胞的浓度/量来通过实验测定。“杀伤癌细胞的能力降低”可使用本文所述的方法或CKA分析法来测定。在一个实施方案中，“杀伤癌细胞的能力降低”是指细胞杀伤的癌细胞比本发明的细胞(即，如本文所定义，具有“杀伤癌细胞的能力”的细胞)少10％或20％。优选地，“杀伤癌细胞的能力降低”是指细胞杀伤的癌细胞比本发明的细胞少5％或更少。

[0292] 因此，根据此方法，适当的造血细胞表面电势值(允许选择可分化成适于治疗癌症的粒细胞的造血细胞)可根据由此获得的粒细胞的表面电势之间的相关性和/或根据杀伤癌细胞的能力凭经验确定。

[0293] 在相关方面，本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法，所述方法包括：

[0294] a.测量可得自供体的造血细胞的表面电势，其中可得自所述供体的粒细胞(例如

嗜中性粒细胞)的特征在于：

[0295] i.由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势;和

[0296] ii.杀伤癌细胞的能力;和

[0297] b.在选择造血细胞的方法中使用测得的表面电势。

[0298] “选择造血细胞的方法”可表示从已经获得表面电势测量值的相同供体或不同供体中选择造血细胞。

[0299] 在一方面,本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括：

[0300] a.测量可得自供体的粒细胞的细胞表面电荷;和

[0301] b.当与对照粒细胞相比,所述粒细胞具有更正的细胞表面电荷时,从所述供体的样品中获得造血细胞。

[0302] 对照粒细胞可具有负电荷、正电荷或中性电荷。优选地,对照粒细胞具有正电荷。优选地,对照粒细胞是不杀伤癌细胞的粒细胞(例如在本文所述的方法中不杀伤至少5％的癌细胞)。对照粒细胞优选得自与步骤a.的供体不同的供体。

[0303] 在一个实施方案中,该方法包括当与对照粒细胞相比,所述粒细胞具有带至少1％,5％,10％,20％,30％,40％,50％,60％,70％,80％,90％,100％,200％或300％更正电荷的细胞表面电荷时,从所述供体的样品获得造血细胞。

[0304] 在另一方面,本发明提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法,所述方法包括：

[0305] a.测量可得自供体的造血细胞的细胞表面电荷;和

[0306] b.当与对照造血细胞相比,所述造血细胞具有更正的细胞表面电荷时,选择所述造血细胞适用于治疗癌症。

[0307] 对照粒细胞或造血细胞的细胞表面电荷可以在实施本方法之前或与实施本方法同时(优选同时)测定。

[0308] 例如,在一个实施方案中,所述方法包括：

[0309] a.测量可得自供体的粒细胞或造血细胞的细胞表面电荷;

[0310] b.测量对照粒细胞或造血细胞的细胞表面电荷;和

[0311] c.当与所述对照粒细胞相比,所述粒细胞具有更正的细胞表面电荷时,从所述供体的样品获得造血细胞;或当与对照造血细胞相比,所述造血细胞具有更正的细胞表面电荷时,选择所述造血细胞适用于治疗癌症。

[0312] 在一些实施方案中,该方法可包括使用多个不同的包含来自其他供体(例如第二、第三、第四供体等)的粒细胞的测试样品。

[0313] 对照造血细胞可具有负电荷、正电荷或中性电荷。优选地,对照造血细胞具有正电荷。优选地,对照造血细胞是不分化成杀伤癌细胞的粒细胞的造血细胞(例如,在本文所述的方法中,所述造血细胞不分化成杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)。对照造血细胞优选得自与步骤a.的供体不同的供体。

[0314] 在一个实施方案中,该方法包括当与对照造血细胞相比,所述造血细胞具有带至少1％,5％,10％,20％,30％,40％,50％,60％,70％,80％,90％,100％,200％或300％更正

电荷的细胞表面电荷时，从所述供体的样品获得造血细胞。

[0315] 在一方面，提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0316] a.测量可得自供体的样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度；和

[0317] b.当所述具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度大于来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度时，从所述供体的样品获得造血细胞。

[0318] 所指的对照样品可以是来自供体的样品，该供体具有不杀伤癌细胞的粒细胞(例如，在本文所述的方法中，不杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)。

[0319] 在一个实施方案中，该方法包括当具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度比来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度高至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％时，从所述供体的样品获得造血细胞。优选地，当具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度比来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度高至少50％时。

[0320] 在另一方面，提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0321] a.测量可得自供体的样品中具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度；和

[0322] b.当所述具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度大于来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度时，选择适用于治疗癌症的造血细胞。

[0323] 来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞或造血细胞的浓度可在实施本方法之前或与实施本方法同时(优选同时)测定。

[0324] 例如，在一个实施例中，所述方法包括：

[0325] a.测量可得自(第一)供体的样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞或造血细胞的浓度；

[0326] b.测量来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞或造血细胞的浓度；和

[0327] c.当所述具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度大于在其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度时，从来自所述(第一)供体的样品获得造血细胞；或当来自所述(第一)供体的具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度大于其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度时，选择适用于治疗癌症的造血细胞。

[0328] 在一些实施方案中，该方法可包括使用多个不同的包含来自其他供体(例如第二、第三、第四供体等)的粒细胞的测试样品。

[0329] 所指的对照样品可以是来自供体的样品，该供体具有不分化成杀伤癌细胞的粒细胞的造血细胞(例如，在本文所述的方法中，所述造血细胞不分化成杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)。

[0330] 在一个实施方案中，该方法包括当具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度比来自不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度高至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％时，从所述供体的样品获得造血细胞。优选地，当具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度比来自

不同供体的其他方面相同的对照样品中具有正细胞表面电荷的造血细胞的浓度高至少50％时。

[0331] 在一方面，提供一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0332] a.测量可得自第一供体的粒细胞的细胞表面电荷；

[0333] b.鉴定当与对照粒细胞相比具有更正细胞表面电荷的可得自所述第一供体的粒细胞；

[0334] c.测量在步骤b中鉴定出的粒细胞的浓度；

[0335] d.将在步骤c中测量的所述粒细胞的浓度与可得自第二(或其他)供体的粒细胞的浓度进行比较，其中与所述对照的粒细胞相比，来自所述第二(或其他)供体的粒细胞具有更正的细胞表面电荷；和

[0336] e.当比较鉴定出与可得自所述第二(或其他)供体的所述粒细胞的浓度相比，可得自所述第一供体的所述粒细胞的浓度更高时，从所述第一供体的样品获得造血细胞。

[0337] 在一个实施方案中，在步骤d中比较的可得自第一供体的粒细胞和可得自第二供体的粒细胞具有等效的细胞表面电荷。

[0338] 对照粒细胞可具有负电荷、正电荷或中性电荷。优选地，对照粒细胞具有正电荷。优选地，对照粒细胞是不杀伤癌细胞的粒细胞(例如在本文所述的方法中，不杀伤至少5％的癌细胞)。对照粒细胞优选得自与步骤a.的供体不同的供体。

[0339] 在一个实施方案中，与对照粒细胞相比，可得自所述第一供体的粒细胞具有带至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％更正电荷的细胞表面电荷。

[0340] 在一个实施方案中，该比较鉴定出可得自所述第一供体的所述粒细胞的浓度比可得自所述第二(或其他)供体的所述粒细胞的浓度高至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％。优选高至少50％。

[0341] 在一方面，提供一种用于选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0342] a.测量可得自第一供体的造血细胞的细胞表面电荷；

[0343] b.鉴定出与对照造血细胞相比具有更高细胞表面电荷的可得自所述第一供体的造血细胞；

[0344] c.测量在步骤b中鉴定出的造血细胞的浓度；

[0345] d.将在步骤c中测量的所述造血细胞的浓度与可得自第二(或其他)供体的造血细胞的浓度进行比较，其中与所述对照的造血细胞相比，来自所述第二(或其他)供体的造血细胞具有更正的细胞表面电荷；和

[0346] e.当与可得自所述第二(或其他)供体的所述造血细胞的浓度相比，该比较鉴定出可得自所述第一供体的所述造血细胞的浓度更高时，从所述第一供体的样品选择适用于治疗癌症的造血细胞。

[0347] 在一个实施方案中，在步骤d中比较的可得自第一供体的造血细胞和可得自第二供体的造血细胞具有等效的细胞表面电荷。

[0348] 对照粒细胞或造血细胞的细胞表面电荷可以在实施本方法之前或与实施本方法同时(优选同时)测定。

[0349] 对照造血细胞可具有负电荷、正电荷或中性电荷。优选地，对照造血细胞具有正电荷。优选地，对照造血细胞是不分化为杀伤癌细胞的粒细胞的造血细胞(例如，在本文所述的方法中，所述造血细胞不分化成杀伤至少5％的癌细胞的粒细胞)。对照造血细胞优选得自与步骤a.的供体不同的供体。

[0350] 在一个实施方案中，与对照造血细胞相比，可得自所述第一供体的造血细胞具有带至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％更正电荷的细胞表面电荷。

[0351] 在一个实施方案中，该比较鉴定出可得自所述第一供体的所述造血细胞的浓度比可得自所述第二(或其他)供体的所述造血细胞的浓度高至少1％，5％，10％，20％，30％，40％，50％，60％，70％，80％，90％，100％，200％或300％。优选高至少50％。

[0352] 在一些实施方案中，其他供体可以是第三、第四、第五或第六供体。

[0353] 在一个实施方案中，测量细胞表面电荷包括使粒细胞或造血细胞与带正电荷的工具(means)和带负电荷的工具(例如纳米颗粒)接触，其中所述粒细胞或造血细胞与带正电荷的工具的优先结合表明细胞表面带负电荷，而粒细胞或造血细胞与带负电的工具的优先结合表明细胞表面带正电。

[0354] 在一个实施方案中，当粒细胞或造血细胞可以被带负电荷的工具结合而不被带正电荷的工具结合时，其具有正细胞表面电荷。在一个实施方案中，当粒细胞或造血细胞可以被带正电荷的工具结合而不被带负电荷的工具结合时，其具有负细胞表面电荷。

[0355] 此带负电荷和/或带正电荷的工具也可用于测量样品中粒细胞或造血细胞的浓度。

[0356] 带正电荷的工具可以是带正电荷的颗粒、纳米探针或纳米颗粒或阳离子交换介质。

[0357] 在一方面，本发明涉及通过所述电荷的方式分离包含(更)正细胞表面电荷的粒细胞或造血细胞。例如，所述细胞可使用带负电荷的工具(例如带负电荷的颗粒、纳米探针或纳米颗粒，或阴离子交换介质)来分离。此类技术可用于在前述实施方式中测量粒细胞的细胞表面电荷或具有正细胞表面电荷的粒细胞的浓度。

[0358] 可以从带负电荷、带中性电荷或带较少正电荷的粒细胞或造血细胞中分离细胞。

[0359] 在一个实施方案中，带正电荷或带负电荷的工具(例如纳米颗粒)可通过荧光检测。在另一个实施方案中，带正电荷或带负电荷的工具(例如纳米颗粒)可以通过磁性方式捕获，从而可分离与所述工具相互作用的细胞。

[0360] 合适的纳米颗粒可通过将超顺磁性氧化铁(II，III)(Fe_3O_4)纳米颗粒(NP)与原硅酸四乙酯(TEOS)和氢氧化铵(NH4OH)反应，然后与(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)缀合以在NP的表面上形成二氧化硅(SiO_2)壳薄层来制备。异硫氰酸荧光素(FITC)可嵌入SiO_2壳中，从而暴露Si键连羟基(SiO_2-OH)并产生负表面电荷。支化的聚乙烯亚胺(PEI)分子不仅可用于以非共价方式覆盖SiO_2-OH基，而且可用于暴露带有正电荷的其他胺基。

[0361] 因此，在一个实施方案中，带负电荷的纳米颗粒通过将Fe_3O_4纳米颗粒与原硅酸四乙酯(TEOS)和氢氧化铵(NH_4OH)反应，然后与APTES缀合以在纳米颗粒表面上形成SiO_2壳薄层，并将FITC嵌入SiO_2壳中，从而暴露SiO_2-OH基(产生负表面电荷)来制备。

[0362] 在另一个实施方案中，带正电荷的纳米颗粒通过使带负电荷的纳米颗粒(如本文

所述)与PEI分子接触(例如以暴露带有正电荷的其他胺基)来制备。

[0363] 在一个实施方案中,带负电荷的工具(例如纳米颗粒)可具有至少-5mV,-10mV,-20mV,-30mV或-40mV的负表面电荷。优选地,带负电荷的工具(例如纳米颗粒)可具有至少-35mV的负表面电荷。

[0364] 在一个实施方案中,带正电荷的工具(例如纳米颗粒)可具有至少+5mV,+10mV,+20mV,+30mV或+40mV的正表面电荷。优选地,带正电荷的工具(例如纳米颗粒)可具有至少+35mV的正表面电荷。

[0365] 所述带正电荷或带负电荷的工具(例如纳米粒子)的表面电荷可表示带正电荷或带负电荷的工具(例如纳米粒子)的表面ζ电势。表面ζ电势可使用动态光散射粒度分析仪(例如英国Malvern的Zetasizer Nano-ZS90)来测量。

[0366] 令人惊讶的是,细胞表面电荷可用于选择(癌症杀伤活性高的)粒细胞和相关的造血细胞。60年来一直保持所有哺乳动物细胞带负电荷,并且这对于个体之间的相同细胞类型是一致的。不希望被理论所束缚,本发明人认为,当前接受的粒细胞为正的理论是由于用于分析细胞表面电荷的技术的局限性(例如丢失诸如Na+、Ca+等可溶离子)而引起的。本发明人认为,粒细胞上的正电荷可由人嗜中性粒细胞肽(HNP)提供,其是人嗜中性粒细胞中最丰富的蛋白质。HNP含有富含精氨酸、赖氨酸和半胱氨酸的20-40个氨基酸,从而使该肽带正电荷,并称为"阳离子肽"。HNP具有两亲折叠的棒状结构,其一侧为疏水性,另一侧为亲水性且带正电荷。据信HNP的主要靶标是癌细胞上带负电荷的脂质双层膜。HNP的激活机制是中和肽前体中正电荷的带负电荷的前导肽的裂解。在靶细胞上,成熟的两亲性HNP发挥两个主要的效应子作用。首先,HNP在靶细胞的质膜上形成桶状孔。单体HNP的疏水侧与靶标双层膜的疏水部分对齐,而HNP的亲水侧与其他类似排列的HNP形成亲水孔。这些孔引起靶癌细胞的肿胀和破裂(细胞溶解)。其次,HNP一旦进入含有线粒体的靶细胞的细胞质,就可以结合并中和带负电荷的线粒体外膜,导致线粒体跨膜电势的耗散,这是触发快速凋亡的众所周知的机制。因此,本发明人认为具有更正的细胞电荷的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)含有更多的HNP,因此具有更高的肿瘤杀伤活性。

[0367] 在一个实施方案中,通过前述方法获得的粒细胞可通过本文所述的肿瘤杀伤测定或方法进行功能测定。

[0368] 本文所述的细胞可以是细胞培养物(例如体外细胞培养物)的一部分。细胞培养物可包含多种不同的细胞类型(例如,除造血细胞或粒细胞外)。

[0369] 在一个实施方案中,细胞培养物是造血细胞的体外细胞培养物。细胞培养物可富含分化形成粒细胞的造血细胞,所述粒细胞的特征在于由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势;和杀伤癌细胞的能力。或者或另外,细胞培养物可富含分化形成粒细胞的造血细胞,所述粒细胞具有:至少1.077g/ml的密度;和杀伤癌细胞的能力。或者或另外,细胞培养物可富含分化形成粒细胞的造血细胞,所述粒细胞具有Toll样受体的表达或活性;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2的表达缺失或非活性;和杀伤癌细胞的能力。

[0370] 在一个实施方案中,术语"富含造血细胞"是指本文所述(例如通过本发明方法所选择)的造血细胞占细胞培养物中包含的全部造血细胞(优选全部细胞)的至少70%,75%,80%,85%,90%或95%。

[0371] 在一个实施方案中，术语“富含造血细胞”是指分化形成粒细胞的造血细胞，其特征在于：

[0372] (i)由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势；或者

[0373] (ii)密度为至少1.077g/ml；或者

[0374] (iii)Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；以及

[0375] 杀伤癌细胞的能力，占细胞培养物中包含的全部造血细胞(优选全部细胞)的至少70％，75％，80％，85％，90％或95％。

[0376] 在另一个实施方案中，细胞培养物是粒细胞的体外细胞培养物。所述粒细胞可通过分化本发明的造血细胞而获得。粒细胞的体外细胞培养可富含具有由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势；和杀伤癌细胞的能力的粒细胞。或者或另外，细胞培养物可富含具有至少1.077g/ml的密度；和杀伤癌细胞的能力的粒细胞。或者或另外，细胞培养物可富含具有Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；以及杀伤癌细胞的能力的粒细胞。

[0377] 在一个实施方案中，术语“富含粒细胞”是指本文所述(例如通过本发明方法所选择)的粒细胞占细胞培养物中包含的全部粒细胞(优选全部细胞)的至少70％，75％，80％，85％，90％或95％。

[0378] 在一个实施方案中，术语“富含粒细胞”是指具有以下特征的粒细胞：

[0379] (i)由至少2.0μm.cm/volt.sec(或至少1.0μm.cm/volt.sec)的电泳迁移率定义的表面电势；或者

[0380] (ii)密度为至少1.077g/ml；或者

[0381] (iii)Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；以及

[0382] 杀伤癌细胞的能力，占细胞培养物中包含的全部粒细胞(优选全部细胞)的至少70％，75％，80％，85％，90％或95％。

[0383] 本发明的细胞、细胞培养物或药物组合物可进行一个或多个其他处理步骤，例如低温冷冻。其他处理步骤可包括将所述细胞、细胞培养物或药物组合物与保存介质例如低温保存介质混合。

[0384] 本发明可进一步包括将本发明的细胞、细胞培养物或药物组合物存储在细胞库中，因此，在相关方面，提供一种包含细胞、细胞培养物或药物组合物的细胞库。如本文所用，术语“细胞库”是指在适当的条件下将细胞维持在细胞活力的存储设施。例如，细胞可以代谢休眠状态(例如低温冷冻)存储。适当地，对包含在细胞库中的细胞进行分类以进行适当的检索(例如，根据血型和/或人白细胞抗原(HLA)类型)。在一个实施方案中，可根据细胞(或从中分化出的细胞)杀伤的癌症类型对细胞进行分类。当细胞库是粒细胞细胞库时，可使用本发明的造血细胞来补充所述细胞库。在一些实施方案中，可存储得自供体的造血细胞或粒细胞，然后将其给予所述供体(例如，如果所述供体被诊断出患有癌症)，从而构成个性化药物。

[0385] 本发明的细胞或细胞培养物可根据其下游应用(例如储存在细胞库中或用于治疗)以任何合适的方式配制。

[0386] 因此,本发明的一个方面提供一种细胞库,其包含本发明的造血细胞的体外细胞培养物或其体外细胞培养物、粒细胞或其体外细胞培养物或药物组合物。

[0387] 在一个实施方案中,将本发明的细胞或细胞培养物配制成药物组合物,其包含本发明的细胞或细胞培养物和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素;血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gin)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNF-α、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合。

[0388] 在一个实施方案中,将本发明的细胞或细胞培养物配制成药物组合物,其包含本发明的细胞或细胞培养物与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和生长激素、和血清素、和维生素C、和维生素D、和谷氨酰胺(Gin)、和花生四烯酸、和AGE-白蛋白、和白介素、和TNF-α、和Flt-3配体、和血小板生成素和胎牛血清(FBS)。

[0389] 在一个实施方案中,细胞、细胞培养物或药物组合物与药学上可接受的载体一起配制。如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指可静脉内、动脉内、腹膜内、肿瘤内、鞘内或其组合(优选静脉内)给予受试者(例如患者)的载体。因此,在一个实施方案中,药学上可接受的载体是可注射载体,例如无菌生理盐水溶液。

[0390] 本发明提供用于药物的细胞、细胞培养物、药物组合物和试剂盒。例如,提供用作药物的造血细胞、造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物、本发明的药物组合物或试剂盒。该药物在癌症的治疗中尤其有用。

[0391] 在一个实施方案中,癌症是实体瘤癌症。术语“实体瘤癌症”是指不含有囊肿或液体包裹体的异常恶性组织块。实体瘤癌症的实例包括癌、肉瘤和淋巴瘤。

[0392] 实体瘤癌症可以是癌。癌可选自腺癌、基底细胞癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、肾细胞癌、原位导管癌(DCIS)、浸润性导管癌、间变性癌、大细胞癌、小细胞癌或其组合。癌也可选自上皮肿瘤、鳞状细胞瘤、鳞状细胞癌、基底细胞瘤、基底细胞癌、移行细胞癌、腺癌(例如未另行规定的腺癌(NOS)、皮革状胃、子宫内膜癌、胆管癌、肝细胞癌NOS、腺样囊性癌、肾细胞癌、Grawitz瘤)、附件和皮肤附件肿瘤、粘液表皮样肿瘤、囊性粘液和浆液性肿瘤、导管小叶和髓样肿瘤、腺泡细胞瘤或复杂上皮肿瘤。

[0393] 或者,实体瘤癌症可以是肉瘤。肉瘤可选自阿斯金瘤、葡萄状肉瘤、软骨肉瘤、尤因瘤、恶性血管内皮瘤、恶性神经鞘瘤、骨肉瘤或软组织肉瘤(包括肺泡软组织肉瘤、血管肉瘤、叶状囊肉瘤、隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP)、硬纤维瘤、增生性小圆细胞瘤、上皮样肉瘤、骨外软骨肉瘤、骨外骨肉瘤、纤维肉瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、血管外皮细胞瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、恶性纤维瘤组织细胞瘤、未分化多形性肉瘤、恶性周围神经鞘瘤(MPNST)、神经纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和滑膜肉瘤)。

[0394] 或者,实体瘤可以是淋巴瘤,例如B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、NK细胞淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤。

[0395] 在一个实施方案中,本发明的造血细胞体外细胞培养物、造血细胞、粒细胞的体外细胞培养物、粒细胞、药物组合物或试剂盒用于治疗以下的一种或多种:胰腺癌、肝癌、食管癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、脑癌、前列腺癌、骨髓瘤癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、喉癌、子宫癌或乳腺癌。

[0396] 优选地，本发明的造血细胞体外细胞培养物、造血细胞、粒细胞的体外细胞培养物、粒细胞、药物组合物或试剂盒用于治疗胰腺癌。胰腺癌可以是胰腺实体瘤癌，例如胰腺腺癌(例如胰腺导管腺癌)。

[0397] 本文中对“癌细胞”的提及(例如在“杀伤癌细胞的能力”的上下文中)可表示任何上述癌症的癌细胞。合适地，“癌细胞”可以是实体瘤癌细胞，例如胰腺癌细胞。

[0398] 在一方面，本发明提供一种治疗癌症的方法，所述方法包括：

[0399] a.通过本文所述的方法获得粒细胞或造血细胞；和

[0400] b.将所述粒细胞或造血细胞给予受试者。

[0401] 在一些实施方案中，造血细胞可以在给药前分化成粒细胞。

[0402] 在一个实施方案中，将本发明的造血细胞体外细胞培养物、造血细胞、粒细胞的体外细胞培养物、粒细胞、药物组合物或试剂盒给予受试者(例如患有癌症的受试者)。在给药之前，药物(例如包含造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞的体外细胞培养物或本发明的药物组合物)与待治疗的受试者之间可能存在匹配步骤。匹配可根据源自造血细胞或粒细胞来源的供体的数据，以及得自待受试对象的相似数据。匹配可根据血型、人白细胞抗原(HLA)类型相似性或其组合来实现。

[0403] 典型的治疗方案可包括给予受试者10^6、10^7、10^8或10^9个细胞，或最多10^{12}、10^{13}或10^{14}个细胞。在一个实施方案中，治疗方案包括给予受试者至少1×10^9个细胞的剂量。适当地，治疗方案可包括给予受试者至少2×10^9个细胞或至少5×10^9个细胞的剂量。在一个实施方案中，治疗方案可包括给予受试者至少1×10^{10}个细胞或至少5×10^{10}个细胞的剂量。可将至少1×10^{11}或至少2×10^{11}个细胞给予受试者。在一些实施方案中，将1×10^9至3×10^{11}或1×10^{10}至3×10^{11}个细胞给予受试者。适当地，将5×10^{10}至2.5×10^{11}个细胞给予受试者。

[0404] 受试对象每周可给药一次、两次、三次、四次、五次或六次。或者，受试者可每天给药(例如每天一次或两次)。在其他实施方案中，受试者可每周或每两周给药一次。优选地，给药是每周一次。本领域技术人员将了解，剂量可根据受试者的需要和药物的功效来调整。例如，在药物高度有效的情况下，可以降低剂量。

[0405] 在一个实施方案中，受试对象每周(例如每周一次)给予至少2×10^9个细胞或至少2×10^{10}个细胞。适当地，受试对象可每周给予至少1×10^{11}或至少2×10^{11}个细胞。

[0406] 治疗期限可根据受试者对治疗的反应和/或癌症的类型和/或严重性来改变。例如，受试对象可给药至少1周或2周。适当地，受试对象可给药至少3周或4周。在一个实施方案中，受试对象可给药至少5周或6周，合适地至少7周或8周。

[0407] 在一个实施方案中，受试对象给与至少2×10^9个细胞4-8周，其中所述细胞每周给药一次。合适地，受试对象给与至少2×10^9个细胞(优选至少2×10^{10}或2×10^{11}个细胞)8周，其中所述细胞每周给药一次。

[0408] 给药可通过任何合适的技术或途径进行，包括但不限于静脉内注射、动脉内注射、腹膜内注射、向肿瘤切除腔内注射、鞘内注射或其组合。合适地，药物可以静脉内给药。

[0409] 白细胞生长因子可以与本发明的药物一起给药。给药可以是顺序的或同时的(适当地同时)。合适的白细胞生长因子可包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素；血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gin)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNF-α、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合。适当

地,白细胞生长因子可包括粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和生长激素、和血清素、和维生素C、和维生素D、和谷氨酰胺(Gin)、和花生四烯酸、和AGE-白蛋白、和白介素、和TNF-α、和Flt-3配体、和血小板生成素和胎牛血清(FBS)。前述的特定实例包括但不限于**LEUKINE®** 品牌的沙格司亭(sargramostim),**NEUPOGEN®** 品牌的非格司亭(filgrastim),和NEULAST**A®**品牌的5-PEG非格司亭(5PEG-filgrastim)。

[0410] 当药物是造血细胞(例如造血细胞培养物)时,该药物可与粒细胞集落刺激因子;和生长激素;和血清素;和白介素一起给药(例如顺序或同时,优选同时)。在一个实施方案中,将粒细胞前体细胞(例如粒细胞前体细胞培养物)与粒细胞集落刺激因子;和生长激素;和血清素;和白介素一起给药(例如顺序或同时,优选同时)。

[0411] 本发明还提供一种试剂盒,其包含造血细胞的体外细胞培养物、粒细胞、粒细胞的体外细胞培养物或本发明的药物组合物;以及其在药物中的使用说明书。适当地,该说明书可以是其在治疗前述实施方案任一项中所述癌症的用途。在一些实施方案中,说明书还详述了合适的剂量方案(例如,如前述实施方案中所述)。在一个实施方案中,说明书是关于所述试剂盒在治疗癌症,优选胰腺癌中的用途。

[0412] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY,20ED.,John Wiley and Sons,New York(1994),和Hale&Marham,THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY,Harper Perennial,NY(1991)向技术人员提供本发明中使用的许多术语的通用词典。

[0413] 本发明内容不受本文公开的示例性方法和材料的限制,并且与本文所述的那些方法或材料类似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明内容的实施方案的实践或测试中。数字范围包括定义范围的数字。

[0414] 本文提供的标题不是本发明的各个方面或实施方案的限制。

[0415] 其他术语的定义可能在整个说明书中出现。在更详细地描述示例性实施方案之前,应当理解,本发明不限于所描述的特定实施方案,并且因此可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而无意于限制本发明,因为本发明内容的范围仅由所附权利要求书限定。

[0416] 在提供值的范围的情况下,应理解的是,除非上下文另有明确指出,否则该范围的上限和下限之间的每一个中间值,至下限单位的十分之一,也被具体公开。在所述范围内的任何所述值或中间值与该所述范围内的任何其他所述值或中间值之间的每个较小范围涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在该范围内或排除在该范围内,并且在上下限的任何一个、两个都不或两个都包括在较小范围内的每个范围也涵盖在本发明内,但以本发明中任何明确排除的限制为准。规定范围。在所述范围包括一个或两个限制的情况下,排除那些包括的限制中的一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0417] 必须注意的是,如本文和所附权利要求书中所使用的,单数形式的“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文另有明确指出。因此,例如,提及“造血细胞”包括多种此类候选试剂,并且提及“该造血细胞”包括提及一种或多种造血细胞及其本领域技术人员已知的等同物,等等。

[0418] 本文讨论的出版物仅是出于其在本申请的提交日期之前公开而提供。本文中的任

何内容均不应解释为承认此类出版物构成了所附权利要求的现有技术。

[0419] 现在将参考以下附图和实施例仅以举例的方式描述本发明。

[0420] 附图

[0421] 现在将参考附图仅以举例的方式描述本发明的实施方案，在附图中：

[0422] 图1显示来自不同供体的供体来源的嗜中性粒细胞(DDN)在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果(MTT分析)。供体之间的CKA差异水平维持在较高的效应子:靶细胞比率。效应子:DDN;靶标:HeLa细胞。

[0423] 图2显示来自不同供体的三个CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞群体在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的干细胞来源的嗜中性粒细胞具有不同的CKA。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞和PANC-1(胰腺癌)。

[0424] 图3显示来自不同供体的供体来源的嗜中性粒细胞(DDN)在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果(xCELLigence测定)。供体之间的CKA差异水平维持在较高的效应子:靶细胞比率。效应子:DDN;靶标:HeLa细胞。

[0425] 图4显示新鲜的供体来源的嗜中性粒细胞对不同癌细胞类型在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的DDN具有不同的CKA，并且对胰腺癌细胞具有更高的CKA。效应子:DDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)。

[0426] 图5显示供体来源的嗜中性粒细胞与非癌细胞相比在不同效应子与靶细胞比率下对癌细胞类型的选择性细胞毒性。结果表明，杀伤癌细胞的DDN对非癌细胞的影响最小，证实了选择性。效应子:DDN;靶标:HeLa细胞(子宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)和MCF-12F(非癌细胞，正常乳腺上皮)。

[0427] 图6显示来自五种不同培养物CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞群体(源自脐带血干细胞)在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果通过MTT测定法产生，并证明离体产生的嗜中性粒细胞具有不同的CKA。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞。

[0428] 图7显示三种源自CD34+干细胞的嗜中性粒细胞群体对不同癌细胞类型在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的SCDN具有不同的CKA，并且对胰腺癌细胞具有更高的CKA。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)。

[0429] 图8显示来自不同供体的三个CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞群体在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的干细胞来源的嗜中性粒细胞具有不同的CKA。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)。

[0430] 图9显示来自不同供体(LC267、LC268、LC269)的三个CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞群体在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的干细胞来源的嗜中性粒细胞具有选择性细胞毒性。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)、PANC-1细胞(胰腺癌)和MCF-12F细胞(非癌细胞，正常乳腺上皮细胞)。

[0431] 图10显示来自不同供体(LC252、LC253、LC254)的三个CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞群体在不同效应子与靶细胞比率下的细胞毒性结果。结果表明，来自不同供体的干细胞来源的嗜中性粒细胞具有选择性细胞毒性。效应子:SCDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)、PANC-1细胞(胰腺癌)和MCF-12F细胞(非癌细胞，正常乳腺上皮细胞)。

[0432] 图11显示三种CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞培养物的细胞毒性结果，以及来

自相同供体的供体来源的嗜中性粒细胞的细胞毒性结果，在不同效应子与靶细胞比例下。来自相同供体的SCDN和DDN具有相似的CKA水平。对于供体LC253，DDN和SCDN之间的相似CKA关系在不同效应子与靶细胞比率下被维持。效应子:SCDN和DDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)。

[0433] 图12显示三种CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞培养物的细胞毒性结果，以及来自相同供体的供体来源的嗜中性粒细胞的细胞毒性结果，在不同效应子与靶细胞比例下。SCDN和DDN具有相似的CKA水平。对于供体LC253，DDN和SCDN之间的相同CKA关系在不同效应子与靶细胞比率下被维持。效应子:SCDN和DDN;靶标:HeLa细胞(宫颈癌)。

[0434] 图13显示自然来源和干细胞来源的嗜中性粒细胞随时间的细胞毒性的比较。DDN和SCDN之间维持最高的CKA(供体LC269)。效应子:SCDN和DDN(三种不同的SCDN和DDN培养物);靶标:HeLa细胞(宫颈癌)。

实施例

[0435] 实施例1

[0436] 招募供体

[0437] 根据在实施例2所述的CKA分析中具有表现出高水平的肿瘤杀伤活性(CKA)的嗜中性粒细胞的可能性来预选供体。预选标准包括：

[0438] -没有影响提供同意书或样本采集的严重医学或精神疾病；

[0439] -没有针对治疗的癌症的个人或家族史；

[0440] -在采样日期前三个月内没有化疗或放疗史；

[0441] -年龄在18岁至24岁；

[0442] -任选地，雄性(不希望被理论所束缚，来自雄性的嗜中性粒细胞据信在CKA分析中测试时表现出最高CKA水平)；和

[0443] -任选地，血型O或恒河猴阴性。

[0444] 通过从供体抽取约18ml的人血来收集白细胞(WBC)。将血液分为三个BD Vacutainer™CPT管，并在175xg下于23℃离心35分钟。收集单核细胞(MN)层，并将其转移到15ml锥形管中。将MN细胞在420xg下于23℃离心5分钟，并用10ml Dulbecco's Modified Eagle培养基(DMED)(Invitrogen,Carlsbad,CA)+10％胎牛血清(FBS)(Sigma.St.Louis,MO)洗涤。将细胞计数并重悬于培养基中至终浓度为1.6×10^6细胞/ml。

[0445] 实施例2

[0446] 在CKA分析中测试提取的粒细胞的CKA

[0447] 在T25烧瓶中在DMEM+10％FBS中培养细胞至80％融合。在T75cm^2细胞培养瓶中，在补充有以下成分的DMEM中，在37℃，8％CO_2下生长并维持细胞株:10％体积/体积FBS、青霉素(Sigma.St.Louis,MO)、链霉素(Sigma.St.Louis,MO)和补充的L-谷氨酰胺(Sigma.St.Louis,MO)。将培养的胰腺癌细胞(例如Capan-2,ATCCHTB-80;Panc 10.05,ATCC CRL-2547;CFPAC-1,ATCC CRL-1918;HPAF-II,ATCC CRL-1997;SW1990,ATCC CRL-2172;BxPC-3,ATCC CRL-1687;AsPC-1,ATCC CRL-1682;ATCC® TCP-1026™;SW1990,ATCC CRL-2172;SU.86.86,ATCC CRL-1837;BXPC-3,ATCC CRL-1687;Panc10.05,ATCC CRL-2547;MIA-PaCa-2,ATCC CRL-1420;PANC-1,ATCC CRL-1469;或ATCC® TCP-2060™可购自the American Type Culture Collection-United Kingdom(U.K.),Guernsey,Ireland,Jersey

and Liechtenstein,LGC Standards,Queens Road,Teddington,Middlesex TW11 OLY,UK)在培养瓶中达到70％的表面融合度之前进行分裂和传代。

[0448] 细胞用胰蛋白酶消化、收获并用锥虫蓝计数。将测定板(24孔)在24孔平底板中每孔接种8×10^4个胰腺癌细胞(例如胰管腺癌细胞)。将板在37℃下,5％CO_2中温育24小时。细胞用2.5μM CellTracker™Green标记45分钟。将新鲜的培养基加入细胞中,然后将其返回到CO_2培养箱中。

[0449] CKA分析通过将500μl的MN细胞悬浮液(8×10^5粒细胞)加入其中胰腺癌细胞生长24小时的每个孔中来进行。将细胞混合并放置在39℃,5％CO_2的培养箱中24小时。温育24小时后,通过胰蛋白酶消化收获细胞并离心。将细胞重悬于100μl冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,随后添加125μl 0.4％锥虫蓝。细胞在显微镜下计数(使用相差显微镜和荧光显微镜)。

[0450] 在分析中能够杀伤至少70％或至少80％的癌细胞(即分别具有至少70％的CKA或80％的CKA)的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)被视为尤其适用于治疗癌症。

[0451] 实施例3

[0452] 测试造血细胞和嗜中性粒细胞的表面电势

[0453] 电泳用于通过测量电泳迁移率来研究造血细胞(例如造血干细胞和/或前体细胞)和嗜中性粒细胞的表面电势变化。通过机械分离和从培养底物收集来从培养物中收集悬浮的细胞。将收集的细胞重新分配到含有10mM Tris-HCl和291mM葡萄糖的电泳缓冲液中,然后引入矩形玻璃电泳室中。跨电泳室施加200VDC。细胞的电泳速度u通过在带有CCD相机的显微镜下记录细胞经过3mA固定长度所需的时间来测量。电泳迁移率μ通过μ＝ugS/l计算,其中g是介质的电导率,S是电泳室的横截面积,l是电流。对于每种条件,通常至少进行9次读数以计算细胞电泳迁移率。

[0454] 实施例4

[0455] 从外周血中提取造血干细胞

[0456] 在同意后,向供体给予粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和/或粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),例如Neupogen®(购自Amgen Inc.USA)以助于收获外周造血干细胞,而对供体的不适感降至最低。细胞表面多肽标记物用于鉴定长效多能干细胞。合适的标记物可包括CD 34^+、$CD59^+$、$Thy1^+$、$CD38^{low/-}$、$C\text{-}kit^{-/low}$、and lin^-。

[0457] 实施例5

[0458] 造血细胞的扩增和分化

[0459] 使用上清液生长因子悬浮液刺激造血细胞(例如造血干细胞),以发育更多的干细胞或分化成前体细胞(例如骨髓或粒细胞祖细胞)或粒细胞。合适的嗜中性粒细胞合成方法公开于Lieber等人,Blood,2004Feb 1;103(3):852-9,和Choi等人,Nat.Protoc.,2011Mar;6(3):296-313。

[0460] 该医疗方案包括四个主要阶段:

[0461] -造血细胞的培养和增殖;

[0462] -用高剂量的粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、人生长激素(HGH);血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gin)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素3(IL-3)、白介素8(IL-8)、白介素4(IL-4)、白介素6(IL-6)、白介素18(IL-18)、TNF-α、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合短期扩增多能骨髓祖细胞;和

[0463] -骨髓祖细胞定向分化为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、树突状细胞(DC)、朗格汉斯细胞(LC)、巨噬细胞和破骨细胞。

[0464] 实施例6

[0465] 制备细胞库

[0466] 将造血干细胞、粒细胞前体细胞和由此获得的粒细胞低温冷冻并储存在适当的细胞库中。

[0467] 实施例7

[0468] 在患者中用于治疗实体瘤

[0469] 根据癌症患者的癌症类型、血型(ABO、恒河猴和HLA)和/或遗传学,将储存的造血细胞(例如从中获得的造血干细胞或粒细胞前体细胞)和从中分化的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)与癌症患者相匹配。还可以根据人类白细胞抗原(HLA)相似性来匹配患者。

[0470] 患者使用以下方法治疗:

[0471] -向患者静脉输注造血细胞(包括造血干细胞和粒细胞前体细胞)以及粒细胞集落刺激因子、人类生长激素、血清素和白介素;或者

[0472] -将刺激的粒细胞前体细胞(可从造血干细胞获得)静脉输注到患者体内。不希望被理论所束缚,据信在体内CKA分析中,所述细胞自然分化为CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞);或者

[0473] -在CKA分析中直接IV输注已经从造血细胞(例如造血干细胞)分化的CKA高的粒细胞(例如嗜中性粒细胞)。

[0474] 通常,细胞每周输注一次,持续8周,每周输注$2x10^{11}$的细胞。监测治疗的进程并相应调整剂量。

[0475] 实施例8

[0476] 胰腺癌患者的治疗

[0477] 玛丽在69岁时被诊断出患有转移性胰腺导管腺癌(PDAC)。手术已不再是一种选择(无法切除),吉西他滨(gemcitabine)不足以预防疾病的进展,而紫杉醇(白蛋白结合型)(Abraxane)或Folfirinox则不适合她的肿瘤科医生的推荐,因为其副作用使她无法享受与家人在一起的时间。玛丽的预后生存期为3-6个月,她迫切希望能长寿到足以见到她的新孙子。

[0478] 玛丽受邀尝试白细胞输注疗法(LIFT)。为了评估该疗法的潜在适用性,医院从玛丽那里提取了20毫升血液,并将其送去用肿瘤杀伤活性测定法分析,该测定法鉴定出她的粒细胞的胰腺癌杀伤活性低于5%。如此低的读数表明,她自身的先天免疫系统不足以抵抗她的癌症,如果不能改善体内粒细胞的功效,其将杀伤她。

[0479] 玛丽的患者笔记和化验结果用于寻找合适的肿瘤杀伤粒细胞匹配。玛丽是A血型。玛丽的资料使用细胞库的细胞数据库进行处理,并鉴定出合适的粒细胞(在低温冷冻之前,其在实施例2的肿瘤杀灭活性测定中表现出70-90%的肿瘤杀灭活性(CKA))。低温冷冻的粒细胞有助于保存CKA,因此无需进一步测试即可将细胞直接发送到医院(The Royal Marsden)。玛丽定于那周她的首次治疗。医院适当存放该细胞。12月13日,玛丽在严密的监督下首次输注$2x10^{9}$个具有CKA的粒细胞。3天后,玛丽被邀请回医院,在那里接受了超声扫描,其显示出明显的肿瘤溶解,没有肿瘤溶解综合征的迹象。医疗小组决定在连续3个疗程

中逐渐增加粒细胞剂量，直到达到2×10^{11}。

[0480] 1月17日进行超声检查；在4周4个疗程结束后1周，肿瘤完全破坏并转化为瘢痕组织，愈合良好。取20毫升玛丽的血液：i)在进行活检的同时评估她血液中转移性癌细胞的存在(以确认癌症已完全清除)；和ii)测试玛丽粒细胞的肿瘤杀伤活性(以表明缓解的风险)。玛丽第一个月接受定期检查，然后是六个月一次。

[0481] 两年后，在玛丽的胰腺上发现了新的肿瘤。她的临床医生通过放射疗法治疗肿瘤，并给予单次高剂量的LIFT来确保破坏血液中可能存在的任何癌细胞。玛丽享受着回馈给她的生活，以及她看到的家庭成长。

[0482] 治疗后，刺激来自细胞库的造血细胞(例如造血干细胞)以产生更多的粒细胞(具有使用实施例2的分析所测试的期望CKA)以补充储备。因此，确保了用于类似患者情况的所需粒细胞的充足储备。

[0483] 实施例9

[0484] MTT“CKA分析”

[0485] MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)，一种黄色的带正电荷的四唑，易于穿透活性真核细胞。具有活性代谢的活性细胞通过NAD(P)H依赖性氧化还原酶线粒体酶将MTT转化为紫色的甲臜(formazan)产物(1(E,Z)-5-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-1,3-二苯基甲臜)，最大吸光度接近570nm。当细胞死亡时，其失去将MTT转化成甲臜的能力，因此颜色形成仅是活性细胞的有用和方便的标记。添加增溶溶液以将不溶的紫色甲臜产物溶解为有色溶液。此有色溶液的吸光度可通过用分光光度计在波长570nm下进行测定来定量。从570nm波长的吸收中减去690nm参考波长的吸收。因此，MTT法被用来测量剩余的活细胞数量，以测定肿瘤杀伤活性(CKA)-对癌细胞的细胞毒性。

[0486] Hela靶细胞的制备方法

[0487] 第一天：

[0488] 1)培养HeLa细胞(一种强大的子宫颈癌细胞)，并当其达到对数期时，对其进行收获

[0489] 2)将10000个HeLa细胞(靶细胞)以100uL的最终体积加入96平底板的每个孔中

[0490] 3)在添加白细胞(效应细胞)之前，将靶细胞粘附过夜，并一式三份设置所有实验条件：

[0491] 第2天：

[0492] 4)将效应细胞以不同比例(例如，效应细胞与靶细胞的比例为1:1、5:1、10:1、50:1)加入靶细胞中。

[0493] 5)将细胞在37℃下温育16-24小时。

[0494] 6)还将单独的靶细胞和Triton X存在下的靶细胞分别铺板一式三份作为对照0％和100％细胞毒性。

[0495] 在所需温育时间后：

[0496] 1)用PBS洗涤孔两次以去除效应细胞和死靶细胞

[0497] 2)通过用培养基溶解试剂盒溶液10次来制备MTT溶液，即：对于100孔：取1000uL(1mL)MTT原液(试剂盒中提供)并加入9000uL(9mL)培养基(RPMI-1640)

[0498] 3)加入100ul/孔在步骤2中制备的MTT溶液

[0499] 4)将此温育4小时

[0500] 5)从所有孔中除去MTT溶液,并添加100ul/孔的溶剂(试剂盒中提供)。

[0501] 6)当需要时,甲臜晶体通过移液溶解,并在570和690nm下读取板。从570nm下测得的吸光度减去690nm下测得的本底吸光度。

[0502] 证明供体嗜中性粒细胞中的可变CKA

[0503] 选择来自匿名献血者的白细胞锥,并通过Ficol I-Hypaque分离法分离嗜中性粒细胞(Oh H,Siano B,Diamond S.Neutrophil Isolation Protocol.Journal of Visualized Experiments:JoVE.2008;(17):745)。这些嗜中性粒细胞在上述MTT分析中以效应子与靶细胞的比例为1:1和5:1的比例使用。

[0504] 图1显示MTT记录的不同供体的细胞毒性百分数。在比例为1:1和5:1下供体之间有差异。总之,MTT分析能够证明来自不同供体的嗜中性粒细胞之间CKA的差异。

[0505] 实施例10

[0506] 证明干细胞来源的嗜中性粒细胞的CKA

[0507] 从CD34+干细胞培养嗜中性粒细胞

[0508] 我们使用Timmins NE,Palfreyman E,Marturana F,Dietairair S,Luikenga S,Lopez G等人所述的方法,从表达CD34蛋白的脐带血来源的干细胞培养嗜中性粒细胞。临床规模从造血祖细胞离体生产嗜中性粒细胞。Biotechnology and bioengineering.2009;104(4):832-40。

[0509] 通过荧光激活细胞分选术(FACS),使用CD11b+和CD15标记测试所得培养物中嗜中性粒细胞的含量。我们还通过使用硝基蓝四唑(NBT)测定法测量了活性氧样品(ROS)的产生,更具体地说是超氧阴离子(O_2-)的产生(试剂盒和方案可从Sigma-Aldrich商购获得,目录号840W-1KT)。

[0510] 由于根据干细胞来源的嗜中性粒细胞的年龄发现了ROS活性的差异(数据未显示),因此我们在同一天列举了三批干细胞以保持一致性/可比性。表1列出了FACS来源的CD11b+和CD15+细胞比例的计数结果。

[0511] 表1:CD11b+/CD15+阳性嗜中性粒细胞的百分数

[0512]

FACS, 26.09.2017	CD11b+ CD15+ (所有细胞的%)	CD34+ (所有细胞的%)
CD34+ 14.09.2017 批次 008A (培养 12 天)	77.8	4.45
CD34+ 14.09.2017 批次 709A (培养 12 天)	76.0	5.1
CD34+ 14.09.2017 915 (培养 12 天)	69.2	10.0

[0513] 证明CD34+来源的嗜中性粒细胞的CKA

[0514] 在使用HeLa靶细胞的CKA MTT分析中,将源自干细胞的嗜中性粒细胞(批次008A,709A和915)用作效应细胞(参见实施例9)。效应子与靶细胞的比率基于CD11b+/CD15+。结果

总结在图2中，该结果表明CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞在HeLa细胞CKA分析中显示出细胞毒性，并且不同供体之间的结果也不同。尽管与其他批次同时制备并以相同方式培养，但批次008A的细胞毒性始终低于批次915和709A，效应子与靶标比例最高达到10:1。

[0515] 结果表明，来自不同供体的干细胞可以：a)在体外分化产生显示出肿瘤杀伤能力的嗜中性粒细胞，并且b)此肿瘤杀伤活性因源供体而异。

[0516] 结果支持以下事实：先天免疫系统的肿瘤杀伤活性(CKA)因个体而异，并且通过白细胞锥直接从供体获取的嗜中性粒细胞中看到的CKA的先天变异也显示在供体的干细胞中。通过选择具有先天免疫系统的高肿瘤杀伤能力的供体，并使用其造血细胞(即造血干细胞)进行离体扩增和分化，可以建立具有高肿瘤杀伤活性的白细胞的细胞库，用于癌症的治疗。

[0517] 实施例11

[0518] xCELLigence“CKA分析”

[0519] 使用了ACEA Biosciences xCELLigence RTCA DP分析仪**系统®**，并遵循了制造商的说明。xCELLigence系统是一种实时细胞分析仪，可通过测量电阻抗来连续进行无标签动态监测细胞表型变化。该系统使用集成在组织培养E-板每个孔底部的交叉金微电极来测量阻抗。阻抗测量值显示为细胞指数(CI)值，提供有关细胞生物学状态(包括活力)的定量信息。基于阻抗的细胞活力监测与细胞数量和基于MTT的读数相关。当中性粒细胞用于诱导细胞毒性作用时，基于阻抗的细胞活力测量的动力学方面提供了必要的时间信息。特别是，xCELLigence系统还可以确定嗜中性粒细胞在细胞毒性和细胞死亡试验中达到最大效果(需要此类数据时)的最佳时间点，如最低CI值所示。通常，在16孔板的底部放置6000个癌细胞(HeLa或PANC-1)或健康的非癌细胞(MCF-12F)(系统最多可以同时读取3个板)。在将细胞添加到孔中后的最初几个小时，阻抗会迅速增加。这是由于细胞从悬浮液中掉出，沉积到电极上并形成粘着斑所致。如果最初添加的细胞数量很少，并且孔底部没有空隙，则细胞会增殖，导致CI逐渐但稳定地增加。当细胞达到融合点时，CI值趋于稳定，这反映了一个事实，即大容量介质可接触的电极表面积不再改变。在这一点，称为“归一化点”，添加嗜中性粒细胞(通常以不同的效应子:靶标比率)。使用简单的公式即可轻松计算细胞溶解百分数：细胞溶解百分数＝((细胞指数$_{无效应子}$-细胞指数$_{效应子}$)/细胞指数$_{无效应子}$)×100。

[0520] 该测定通常进行长达70小时，并用于产生实施例12-20中所示的结果。实施例12-19中给出的结果是在每种细胞类型的测定过程中达到的最大细胞溶解百分数。

[0521] 图3-13所示的比率是效应子(例如嗜中性粒细胞)与靶标(例如癌细胞)的比率。通常使用嗜中性粒细胞与癌细胞的比例为5:1或10:1。

[0522] 实施例12

[0523] 证明供体来源的嗜中性粒细胞的可变CKA

[0524] 图3显示通过xCELLigence分析记录的针对不同供体的最大细胞毒性百分数。该测定还显示在比例1:1和5:1(中性粒细胞与HeLa细胞的比例)下供体之间的差异。总之，xCELLigence分析还能够证明来自不同供体的嗜中性粒细胞之间的CKA差异，并且在不同的粒细胞与癌细胞比例之间是一致的。

[0525] 该测定进行长达40小时。

[0526] 实施例13

[0527] 证明供体来源的嗜中性粒细胞在不同癌细胞类型上的CKA

[0528] 测试了从五个不同供体分离的嗜中性粒细胞针对HeLa细胞(宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)的CKA。

[0529] 图4显示通过CKA分析法(xCELLigence测定法)记录的针对每种癌细胞类型和不同供体的最大细胞毒性百分数。针对胰腺癌细胞的细胞毒性百分数更高,这令人惊讶,因为胰腺癌通常是最难治疗的癌症之一。同样,来自不同供体的供体来源的嗜中性粒细胞(DDN)也显示出不同的CKA。

[0530] 实施例14

[0531] 证明供体来源的嗜中性粒细胞CKA对癌细胞的选择性

[0532] 测试了从五个不同供体分离的嗜中性粒细胞针对HeLa细胞(宫颈癌)、PANC-1细胞(胰腺癌)以及非癌MCF-12F细胞(正常乳腺上皮细胞)的CKA。

[0533] 图5显示了通过CKA分析法(xCELLigence测定法)记录的来自每个供体的嗜中性粒细胞针对HeLa和PANC-1癌细胞株相对于MCF-12F非癌细胞株的最大细胞毒性百分数。有利地,DDN对癌细胞具有高度选择性,显示对非癌细胞的影响最小。

[0534] 实施例15

[0535] 从CD34+干细胞培养嗜中性粒细胞

[0536] 表2显示从脐带血来源的干细胞培养嗜中性粒细胞的进一步结果,该结果表明嗜中性粒细胞可以由从脐带血中分离的CD34+造血干细胞产生。CD34+是造血干细胞标记物。CD11b和CD15是成熟的嗜中性粒细胞标记物。

[0537] 表2:CD11b+/CD15+阳性嗜中性粒细胞的百分数

[0538]

	培养天数	FACS 结果		培养天数	FACS 结果	
		CD34+	CD11b+/CD15+		CD34+	CD11b+/CD15+
批次 1	14	1.32%	61%	18	0.94%	74.3%

[0539]

批次 2	8	4.21%	40.3%	12	3%	60.3%

[0540] 实施例16

[0541] 证明CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞(SCDN)的CKA

[0542] 通过xCELLigence测定获得了CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞的进一步种群的结果(图6),并且与如上所述通过MTT分析获得的结果一致。再次显示SCDN(离体产生)具有不同的CKA,其中培养物5表示低CKA嗜中性粒细胞,培养物1表示高CKA嗜中性粒细胞。

[0543] 实施例17

[0544] 证明干细胞来源的嗜中性粒细胞在不同癌细胞类型上的CKA

[0545] 测试从三个不同供体分离的CD34+干细胞来源的嗜中性粒细胞针对HeLa细胞(宫颈癌)和PANC-1细胞(胰腺癌)的CKA。

[0546] 图7显示通过CKA分析法(xCELLigence测定法)记录的针对每种癌细胞类型以及供体LC267、LC268和LC269的最大细胞毒性百分数。类似于针对DDN获得的结果(参见实施例14),针对胰腺癌细胞的细胞毒性百分数高于针对HeLa细胞观察到的百分数(在5:1和10:1的效应子与靶细胞比率下)。还显示来自不同供体的SCDN具有不同的CKA。该测定进行长达

45小时。

[0547] 对于从供体LC252、LC253和LC254获得的SCDN，获得了相似的结果(图8)。

[0548] 实施例18

[0549] 证明干细胞来源的嗜中性粒细胞CKA对癌细胞的选择性

[0550] 测试了来自三个不同供体的CD34+干细胞的嗜中性粒细胞针对HeLa细胞(子宫颈癌)、PANC-1细胞(胰腺癌)以及非癌MCF-12F细胞(正常乳腺上皮细胞)的CKA。图9显示针对供体LC267、LC268和LC269的每种癌细胞类型和非癌细胞类型，通过CKA分析(xCELLigence测定，进行长达45小时)记录的最大细胞毒性百分数。有利地，SCDN对癌细胞具有高度选择性，显示对非癌细胞的影响最小。与显示相同供体的DDN的图3相似，来自供体LC269的SCDN的CKA最高，LC268次之，而LC267的CKA最低。因此，可以得出结论，CKA是遗传定义的特征，而不是表观遗传定义的特征。

[0551] 对于供体LC252、LC253和LC254的SCDN，获得了相似的结果(图10)。

[0552] 实施例19

[0553] 证明嗜中性粒细胞的CKA是基因编码的

[0554] 测试了从三个不同供体(DDN)分离的嗜中性粒细胞，以及源自相同供体的CD34+干细胞的SCDN的CKA。

[0555] 图11显示对于供体LC252、LC253和LC254的DDN和SCDN，通过CKA分析(xCELLigence测定，进行长达50小时)针对HeLa细胞记录的最大细胞毒性百分数。令人惊讶的是，SCDN显示与来自相同供体的DDN非常相似的CKA，再次证明CKA是在遗传水平编码的。与图10相似，供体LC253提供具有最高CKA的嗜中性粒细胞(和SCDN)，而供体LC252和LC254提供较低CKA的嗜中性粒细胞(和SCDN)。

[0556] 这证明发现具有高CKA的嗜中性粒细胞(例如DDN)的供体也可用作可以分化为相似高CKA的嗜中性粒细胞(例如SCDN)的CD34+干细胞的来源。

[0557] 对于供体LC267、LC268和LC269的SCDN，获得相似的结果(图12，进行长达45小时)。

[0558] 实施例20

[0559] 证明SCDN比DDN更快速地杀伤癌细胞

[0560] 测定供体LC267、LC268和LC269的SCDN和DDN的CKA长达45小时。该测定根据实施例11进行。

[0561] 令人惊讶的是，结果(图13)显示，SCDN比来自相同供体的DDN更快速地杀伤癌细胞。供体LC269的SCDN显示特别快速的肿瘤杀伤功效，在约18小时内杀伤约50％的癌细胞(与DDN的35％相比)，SCDN的半数最大杀伤发生在10小时内(与此相比，DDN在此时间的杀伤率可忽略不计)。

[0562] 实施例21

[0563] 高密度嗜中性粒细胞的分离

[0564] 10ml肝素化(20U/ml)人血与等体积的3％右旋糖酐T500在盐水中混合，并在室温下温育30分钟以沉淀红细胞。用10ml蔗糖1.077g/ml配制50ml锥形聚丙烯管，并缓慢地分层，其中富含白细胞的上清液在1.077g/ml蔗糖层上，然后在室温下在没有制动的情况下以400xg离心30分钟。高密度嗜中性粒细胞(HDN)出现在颗粒中。低密度嗜中性粒细胞(LDN)在1.077g/ml蔗糖层与血浆界面处与单核细胞和淋巴细胞共纯化。

[0565] HDN可在本文所述的CKA分析中测试。造血细胞合适地得自具有HDN的供体。

[0566] 实施例22

[0567] 诱导多能干细胞(iPSC)分化为具有高CKA的嗜中性粒细胞

[0568] 鉴定包含具有高CKA的嗜中性粒细胞的供体。从供体中分离出体细胞(例如成纤维细胞),并用于建立iPSC的培养。iPSC分化为成熟的嗜中性粒细胞,例如使用Sweeney CL,Merling RK,Choi U,Priel DB,Kuhns DB,Wang H and Malech HL,Generation of functionally mature neutrophils from induced pluripotent stem cells.Neutrophil Methods and Protocols,Methods in Molecular Biology.2014;1124:189-206,以及Sweeney et al(2016),Stem Cells,34(6),1513-1526中所述的方案(其教导通过引用并入本文)。

[0569] 所得的成熟嗜中性粒细胞显示与来自相同供体的HSC的DDN和SCDN具有相似的CKA水平(通过MTT和xCELLigence测定法测试)。

[0570] 随后将成熟的嗜中性粒细胞注入iPSC最初来源的供体中,并且不会引起任何免疫反应。

[0571] 以上说明书中提及的所有出版物均通过引用并入本文。在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的所描述的方法和系统的各种修改和变化对本领域技术人员将是显而易见的。尽管本发明已经结合特定的优选实施方案进行描述,但是应当理解,要求保护的本发明不应不适当地限制于这些特定的实施方案。实际上,对于生物化学和生物技术或相关领域的技术人员来说显而易见的是,所描述的用于实施本发明的具体实施方案的各种修改旨在以下权利要求的范围内。

[0572] 条款

[0573] 1.造血细胞的体外细胞培养物,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

[0574] a.由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势;和

[0575] b.杀伤癌细胞的能力。

[0576] 2.造血细胞的体外细胞培养,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

[0577] a.密度为至少1.077g/ml;和

[0578] b.杀伤癌细胞的能力。

[0579] 3.造血细胞的体外细胞培养,其中所述造血细胞分化形成粒细胞,其特征在于:

[0580] a.Toll样受体的表达或活性;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2的表达缺失或非活性;和

[0581] b.杀伤癌细胞的能力。

[0582] 4.根据条款1的体外细胞培养物,其中造血细胞分化形成粒细胞,其进一步特征在于:

[0583] a.密度为至少1.077g/ml;和/或

[0584] b.Toll样受体的表达或活性;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2的表达缺失或非活性。

[0585] 5.根据条款3或4的体外细胞培养物,其中粒细胞的特征在于Toll样受体的表达或活性;和程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2的表达缺失或非活性。

[0586] 6.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中细胞培养物富含造血细胞。

[0587] 7.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中体外细胞培养物中至少70%的细胞是造血细胞。

[0588] 8.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中造血细胞可得自供体,优选人供体。

[0589] 9.根据条款8的体外细胞培养物,其中供体是雄性供体。

[0590] 10.根据条款8或9的体外细胞培养物,其中供体年龄为18至25岁。

[0591] 11.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中造血细胞的表面电势大于分化形成具有由小于1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞和/或与条款1、2或3中定义的特征b相比,杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞。

[0592] 12.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中造血细胞具有由至少1.0μm.cm/volt.sec或至少2.0μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0593] 13.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中粒细胞具有由至少2.0μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0594] 14.根据前述条款中任一项的体外细胞培养物,其中粒细胞是嗜中性粒细胞。

[0595] 15.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法,所述方法包括:

[0596] a.测量可得自供体的粒细胞的表面电势;和

[0597] b.当所测量的表面电势由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义时,从所述供体选择造血细胞。

[0598] 16.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法,所述方法包括:

[0599] a.测量可得自供体的粒细胞的密度;和

[0600] b.当测得的粒细胞的密度为至少1.077g/ml时,从所述供体中选择造血细胞。

[0601] 17.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法,所述方法包括:

[0602] a.检测toll样受体;程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2在可得自供体的粒细胞上的表达或活性;和

[0603] b.当toll样受体表达或活跃时;和/或程序性死亡1(PD-1)受体;CD115;CD224;CXCR1;和/或CXCR2未表达或未活跃时,从所述供体选择造血细胞。

[0604] 18.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法,所述方法包括:

[0605] a.测量造血细胞的表面电势;和

[0606] b.选择表面电势比分化形成具有由小于1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大的造血细胞。

[0607] 19.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的方法,所述方法包括:

[0608] a.测量造血细胞的密度;和

[0609] b.选择密度比分化形成密度小于1.077g/ml的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞更大的造血细胞。

[0610] 20.根据条款15-19中任一项的方法,其中造血细胞具有由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0611] 21.根据条款15-20中任一项的方法，其中造血细胞具有由至少2.0μm.cm/volt.sec或至少2.5μm.cm/volt.sec或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0612] 22.根据条款15-21中任一项的方法，其中表面电势通过电泳测定。

[0613] 23.根据条款15-22中任一项的方法，还包括丢弃在条款15-19中任一项的步骤b中未选择的造血细胞。

[0614] 24.根据条款15-23中任一项的方法，其中造血细胞是造血干细胞。

[0615] 25.根据条款15-24中任一项的方法，其中造血细胞是粒细胞前体细胞，例如常见的髓系祖细胞、成髓细胞、N.早幼粒细胞、N.中幼粒细胞、N.晚幼粒细胞、N.带或其组合。

[0616] 26.根据条款15-25中任一项的方法，其中粒细胞是嗜中性粒细胞。

[0617] 27.根据条款15-26中任一项的方法，还包括将造血细胞分化为粒细胞。

[0618] 28.根据条款16-27中任一项的方法，其中造血细胞可得自供体，优选人供体。

[0619] 29.根据条款15-28中任一项的方法，其中供体是雄性供体。

[0620] 30.根据条款15-29中任一项的方法，其中供体年龄为18至25岁。

[0621] 31.一种选择适用于治疗癌症的造血细胞的体外方法，所述方法包括：

[0622] a.将得自供体的粒细胞与细胞株混合形成混合物；

[0623] b.温育所述混合物；

[0624] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数；和

[0625] d.当所述粒细胞杀伤混合物中至少70％的癌细胞时，从所述供体选择造血细胞。

[0626] 32.造血细胞的表面电势用于选择可分化为适合治疗癌症的粒细胞的细胞的用途，其中该表面电势大于分化形成具有由小于1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势的粒细胞和/或杀伤癌细胞的能力降低的其他方面相同的造血细胞的表面电势。

[0627] 33.根据条款32的用途，其中造血细胞具有由至少1.0μm.cm/volt.sec，或2.0μm.cm/volt.sec，或至少2.5μm.cm/volt.sec，或至少3.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势。

[0628] 34.一种选择适用于治疗胰腺癌的粒细胞的体外方法，所述方法包括：

[0629] a.将粒细胞与胰腺癌细胞株混合以形成混合物；

[0630] b.温育所述混合物；

[0631] c.测量所述混合物中杀伤的胰腺癌细胞的百分数；

[0632] d.选择杀伤混合物中至少70％的胰腺癌细胞的粒细胞。

[0633] 35.根据条款34的体外方法，其中胰腺癌细胞株是胰导管腺癌细胞株。

[0634] 36.一种选择适用于治疗癌症的粒细胞的体外方法，所述方法包括：

[0635] a.将粒细胞与多种不同的癌细胞株混合以提供多种混合物；

[0636] b.温育所述混合物；

[0637] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数；和

[0638] d.当所述粒细胞杀伤混合物中至少70％的癌细胞时，选择适用于治疗与癌细胞株相同类型/亚型的癌症的粒细胞。

[0639] 37.根据条款34-36中任一项的体外方法，其进一步包括丢弃杀伤混合物中少于70％的癌细胞的粒细胞。

[0640] 38.根据条款34-37中任一项的体外方法，其中粒细胞可得自供体，优选人供体。

[0641] 39.根据条款34-38中任一项的体外方法，其中粒细胞可得自患有与所述方法中使用的癌细胞株不同类型/亚型的癌症的受试者。

[0642] 40.根据条款34-39中任一项的体外方法，其中癌细胞株选自以下的一种或多种：胰腺癌细胞株、肝癌细胞株、食道癌细胞株、胃癌细胞株、宫颈癌细胞株、卵巢癌细胞株、肺癌细胞株、膀胱癌细胞株、肾癌细胞株、脑癌细胞株、前列腺癌细胞株、骨髓瘤癌细胞株、非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞株、喉癌细胞株、子宫癌细胞株或乳腺癌细胞株。

[0643] 41.根据条款38-40中任一项的体外方法，还包括从可获得所选粒细胞的供体获得造血细胞。

[0644] 42.一种粒细胞，其可通过根据条款34-41中任一项的方法获得。

[0645] 43.一种方法，包括将根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物或根据条款15-31中任一项的方法可获得的造血细胞分化为粒细胞。

[0646] 44.一种粒细胞的体外细胞培养物，其可通过条款43的方法获得，其中所述细胞培养物富含具有以下的粒细胞：

[0647] a.由至少1.0μm.cm/volt.sec的电泳迁移率定义的表面电势；和

[0648] b.杀伤癌细胞的能力。

[0649] 45.一种粒细胞的体外细胞培养物，其可通过条款43的方法获得，其中所述细胞培养物富含具有以下的粒细胞：

[0650] a.密度为至少1.077g/ml；和

[0651] b.杀伤癌细胞的能力。

[0652] 46.一种粒细胞的体外细胞培养物，其可通过条款43的方法获得，其中所述细胞培养物富含具有以下的粒细胞：

[0653] a.Toll样受体的表达或活性；和/或程序性死亡1(PD-1)受体；CD115；CD224；CXCR1；和/或CXCR2的表达缺失或非活性；和

[0654] b.杀伤癌细胞的能力。

[0655] 47.一种药物组合物，其包含：

[0656] a.造血细胞或粒细胞；和

[0657] b.粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、生长激素；血清素、维生素C、维生素D、谷氨酰胺(Gln)、花生四烯酸、AGE-白蛋白、白介素、TNFα、Flt-3配体、血小板生成素、胎牛血清(FBS)或其组合。

[0658] 48.根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物，用于治疗癌症。

[0659] 49.根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0660] 50.一种治疗癌症的方法，其包括：给予有需要的受试者根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物。

[0661] 51.根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物，根据条款48-50中任一项的用途，用途或方法，其中癌症是实体瘤癌症。

[0662] 52.根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物，根据条款48-50中任一项的用途，用途或方法，其中癌症是以下的一种或多种：胰腺癌、肝癌、食道癌、胃癌、宫颈癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、脑癌、前列腺癌、骨髓瘤癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、喉癌、子宫癌或乳腺癌。

[0663] 53.一种选择用于用根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物治疗的受试者的体外方法，所述方法包括：

[0664] a.将来自所述受试者的粒细胞与癌细胞株混合；

[0665] b.温育所述混合物；

[0666] c.测量所述混合物中杀伤的癌细胞的百分数；和

[0667] d.当来自所述受试者的粒细胞杀伤混合物中少于70％的癌细胞时，选择用于用根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物治疗的受试者。

[0668] 54.根据条款53的体外方法，其中如果来自所述受试者的粒细胞杀伤混合物中小于50％或小于25％(优选小于10％或5％)的癌细胞时，则选择该受试者进行治疗。

[0669] 55.一种细胞库，其包含根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物。

[0670] 56.试剂盒，其包含：

[0671] a.根据条款1-14中任一项的造血细胞的体外细胞培养物，或根据条款42的粒细胞，或根据条款44-46的粒细胞的体外细胞培养物，或根据条款47的药物组合物；和

[0672] b.其在药物中使用的说明书。

[0673] 57.根据条款56的试剂盒，其中所述说明书是关于其在治疗癌症，优选胰腺癌中的用途。

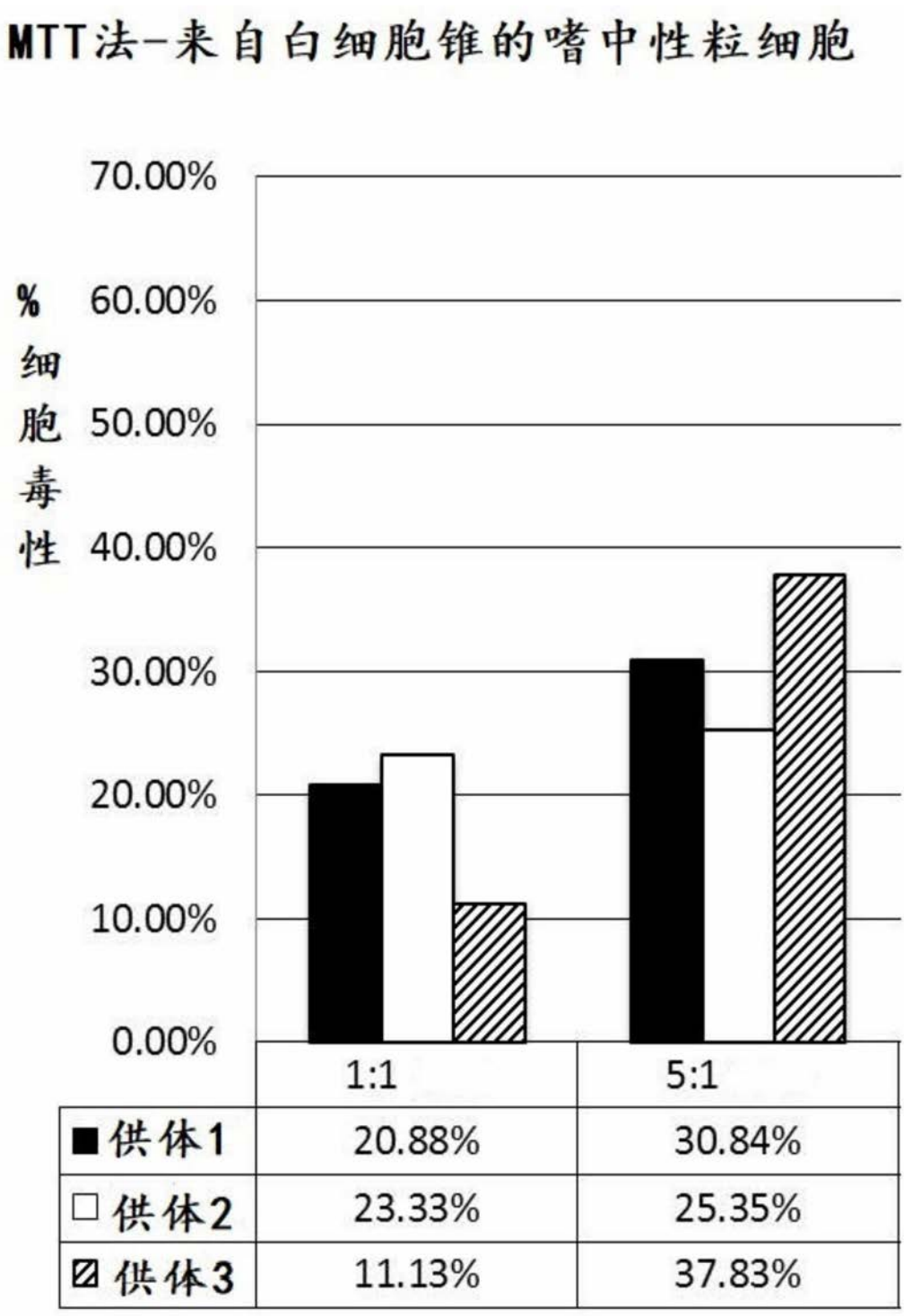
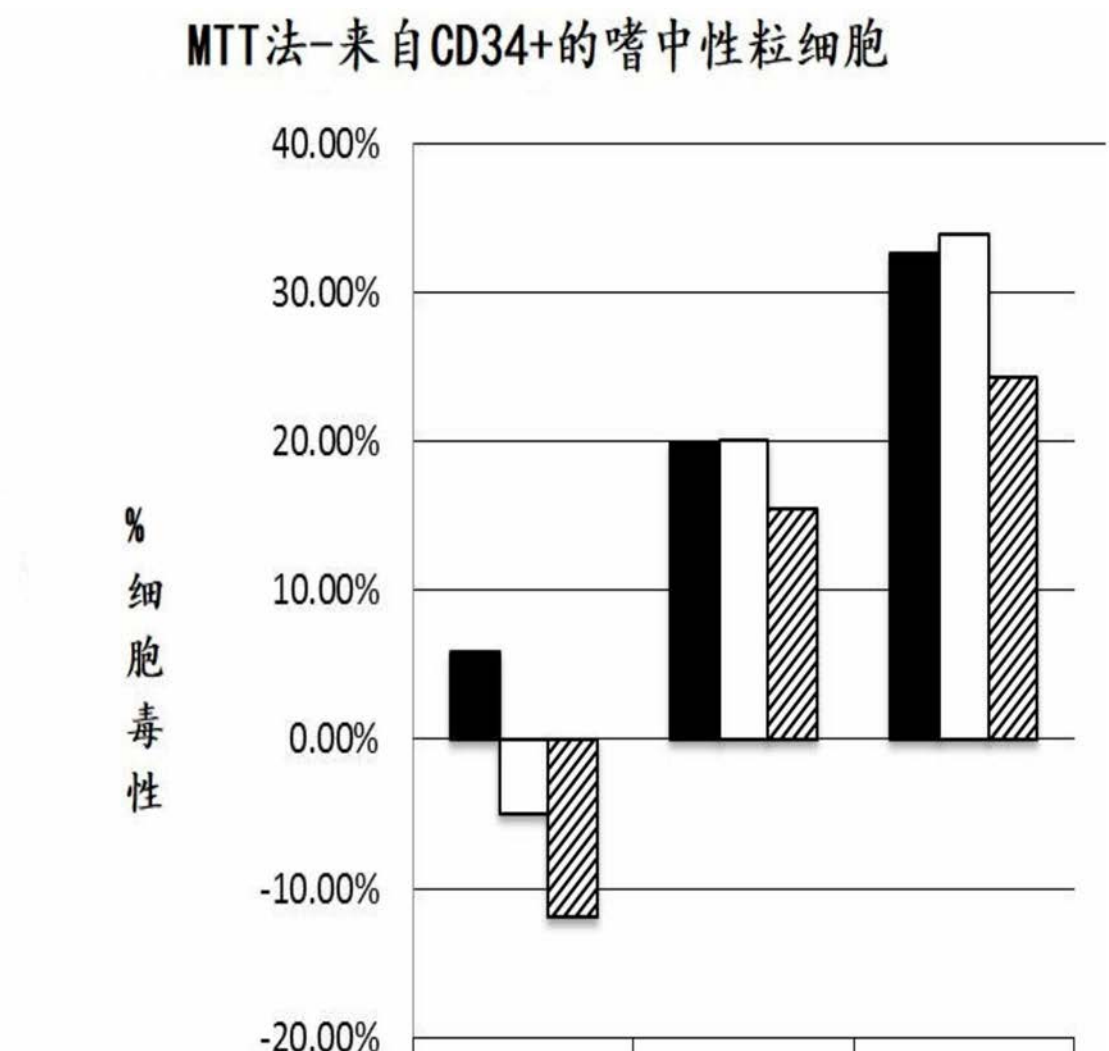

MTT法-来自白细胞锥的嗜中性粒细胞
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
% 细胞毒性
1:1
5:1
■供体1 20.88% 30.84%
□供体2 23.33% 25.35%
▨供体3 11.13% 37.83%

图1



	1:1	5:1	10:1
■嗜中性粒细胞 14/09 915	5.81%	19.87%	32.54%
□嗜中性粒细胞14/09 709A	-4.98%	20.01%	33.87%
▨嗜中性粒细胞14/09 008A	-11.94%	15.42%	24.33%

图2

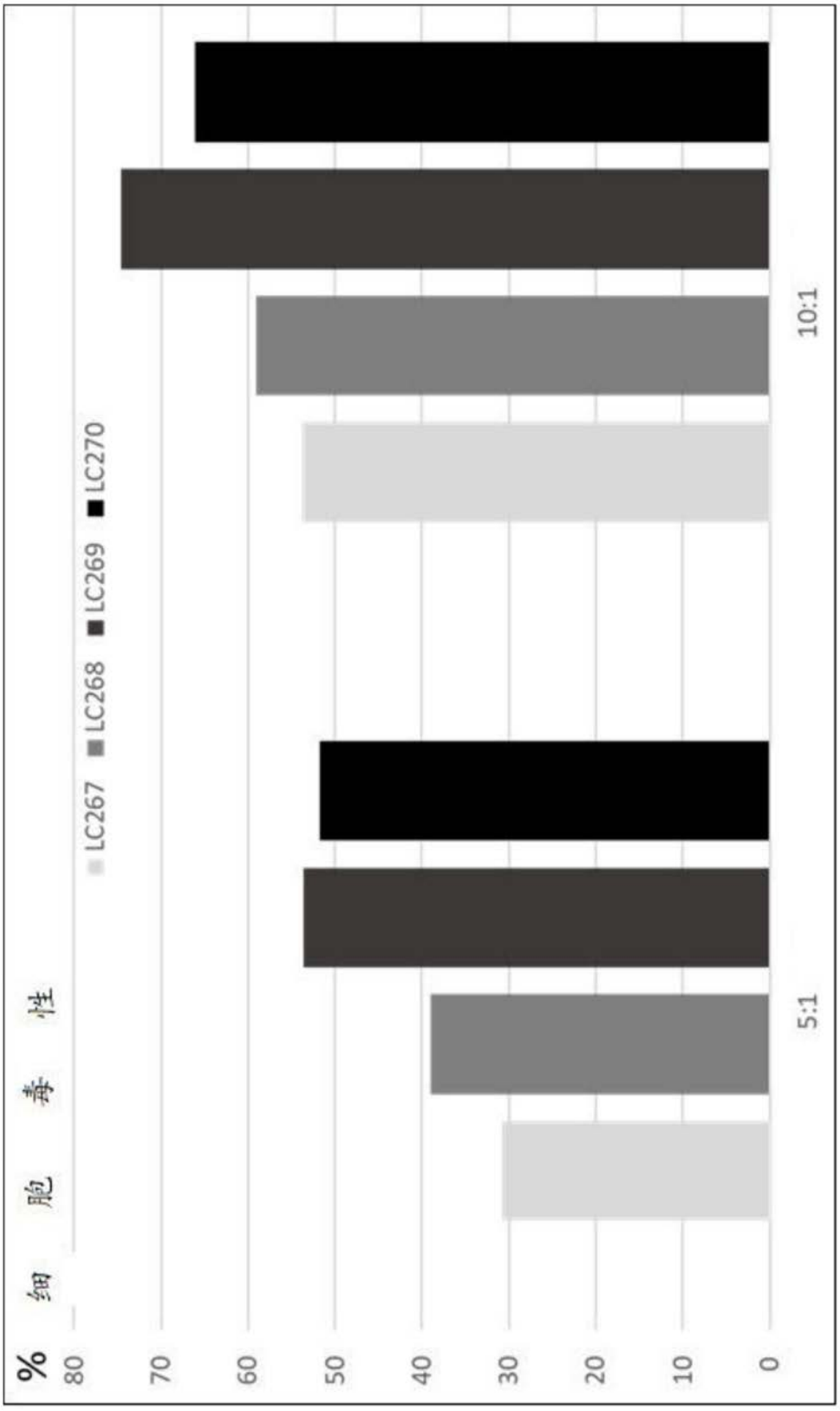


图3

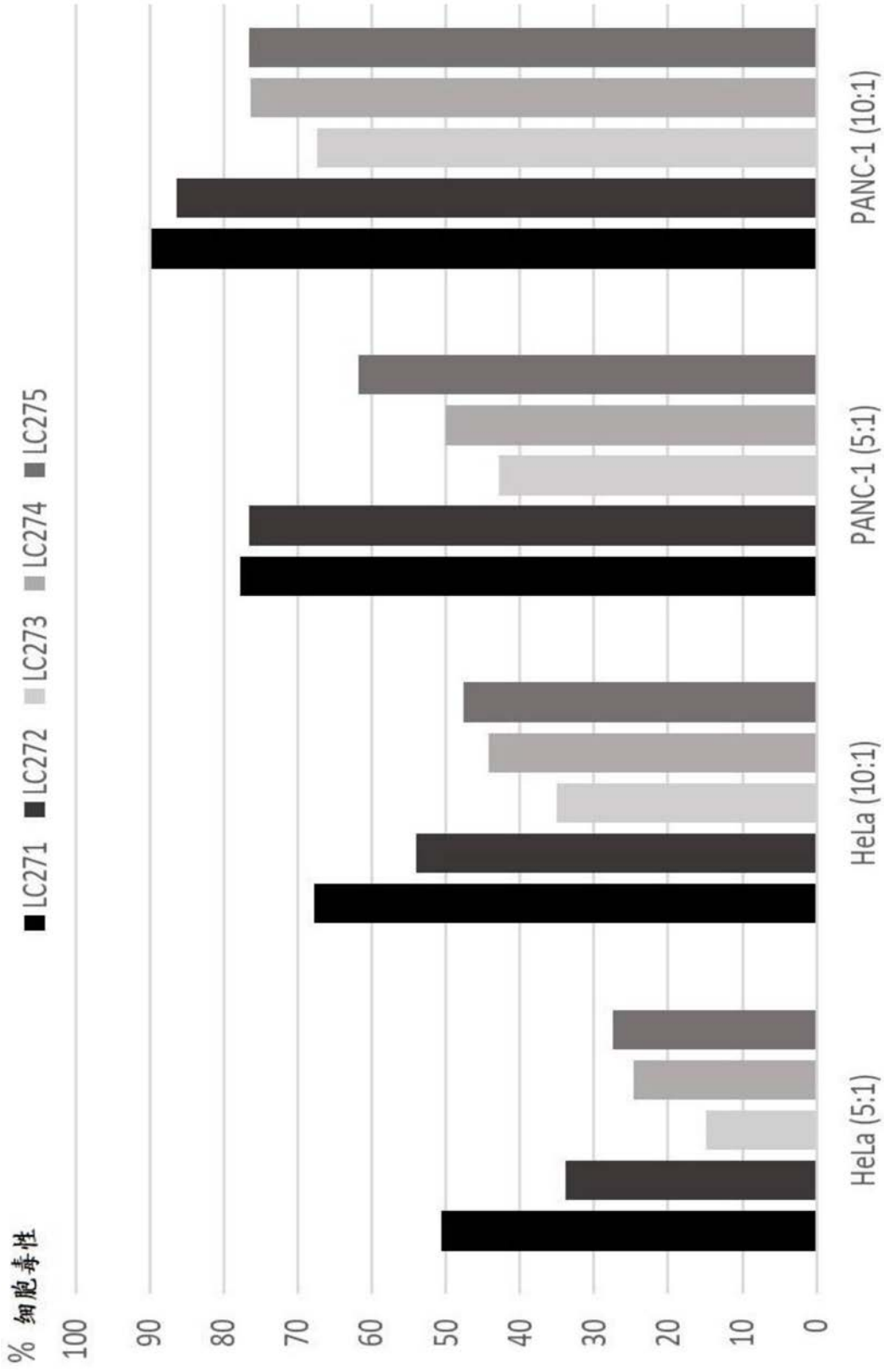

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC271
LC272
LC273
LC274
LC275
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)

图4

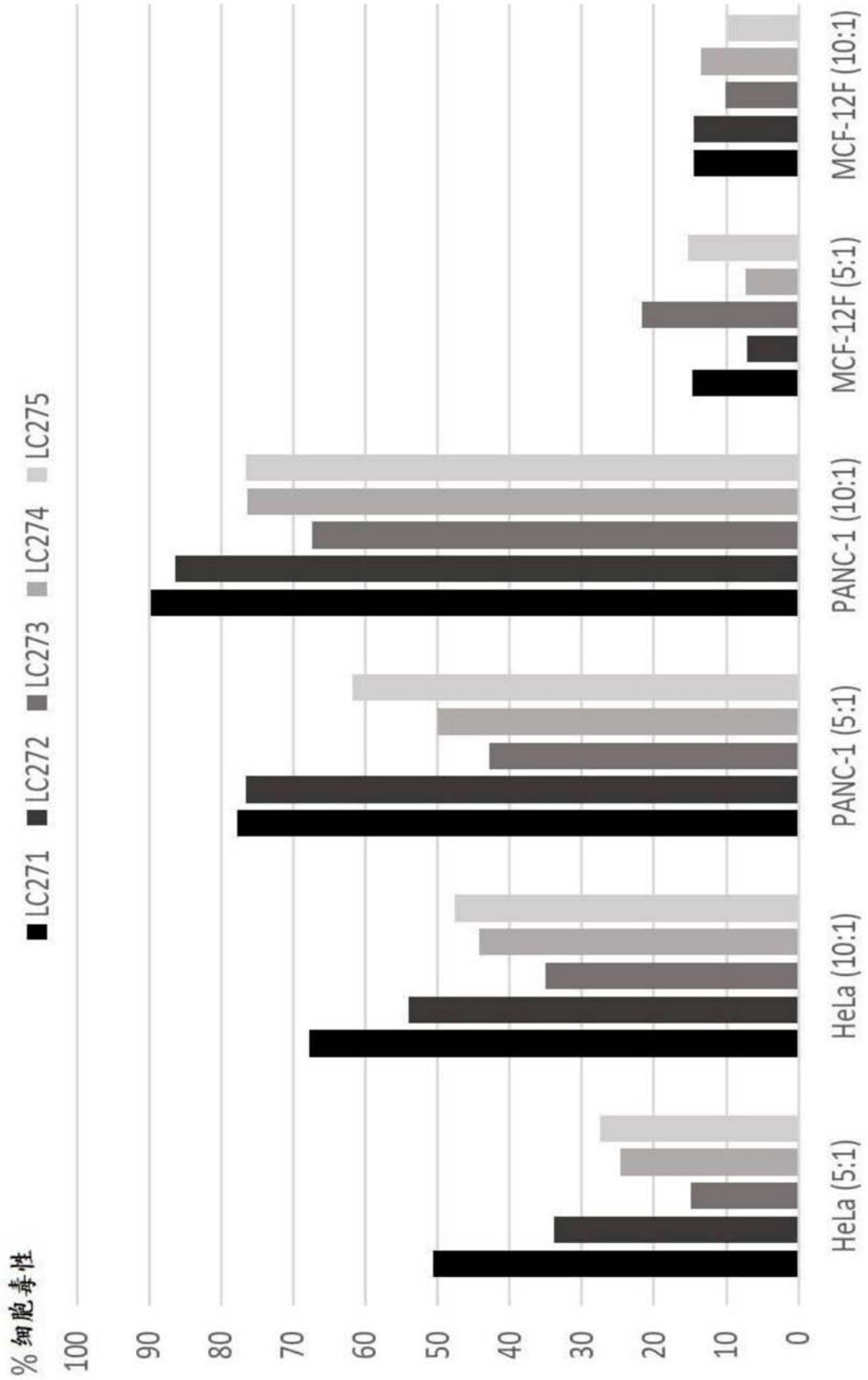

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC271
LC272
LC273
LC274
LC275
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)
MCF-12F (5:1)
MCF-12F (10:1)

图5

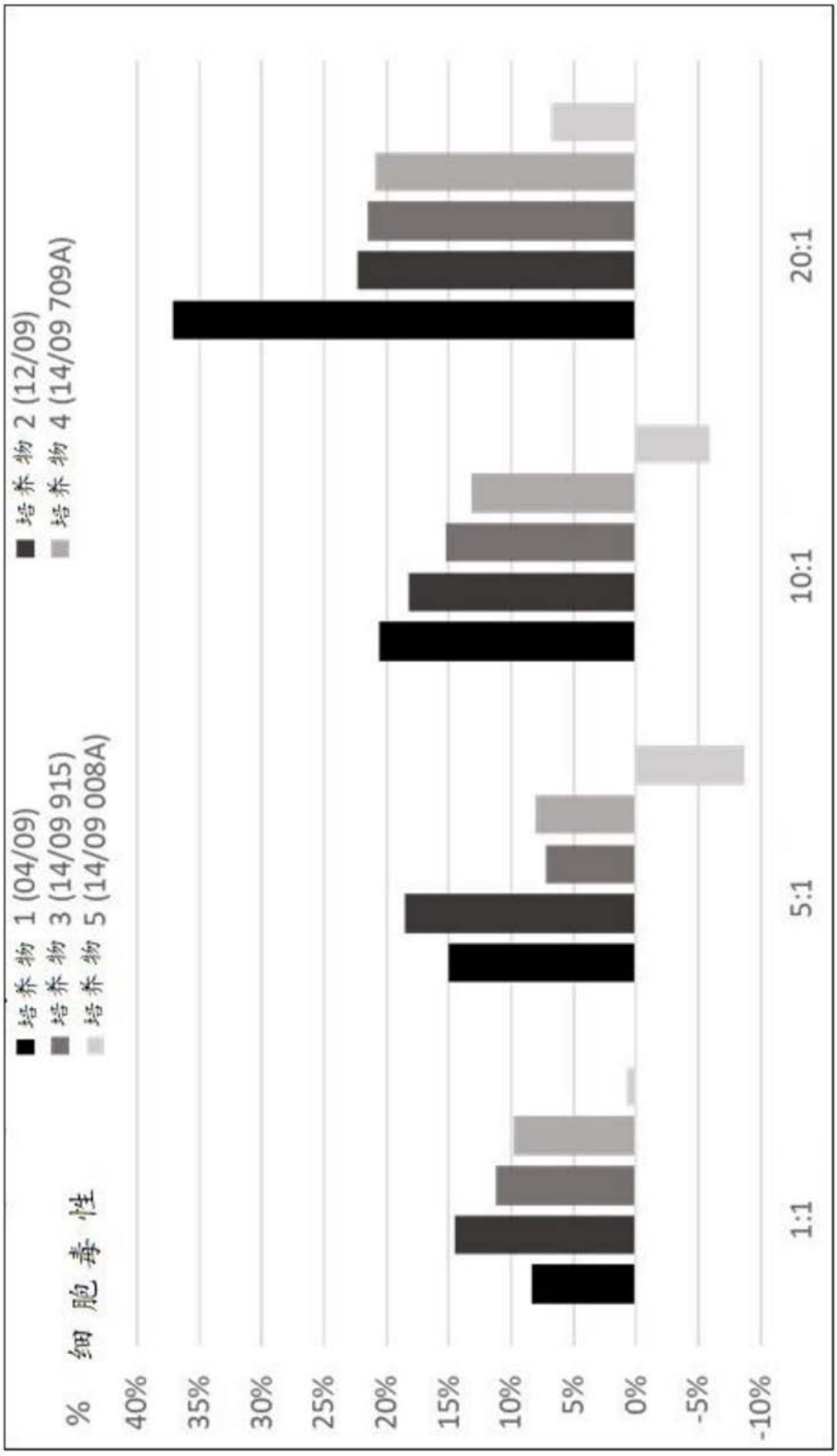

% 细胞毒性
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
-5%
-10%
1:1
5:1
10:1
20:1
培养物 1 (04/09)
培养物 3 (14/09 915)
培养物 5 (14/09 008A)
培养物 2 (12/09)
培养物 4 (14/09 709A)

图6

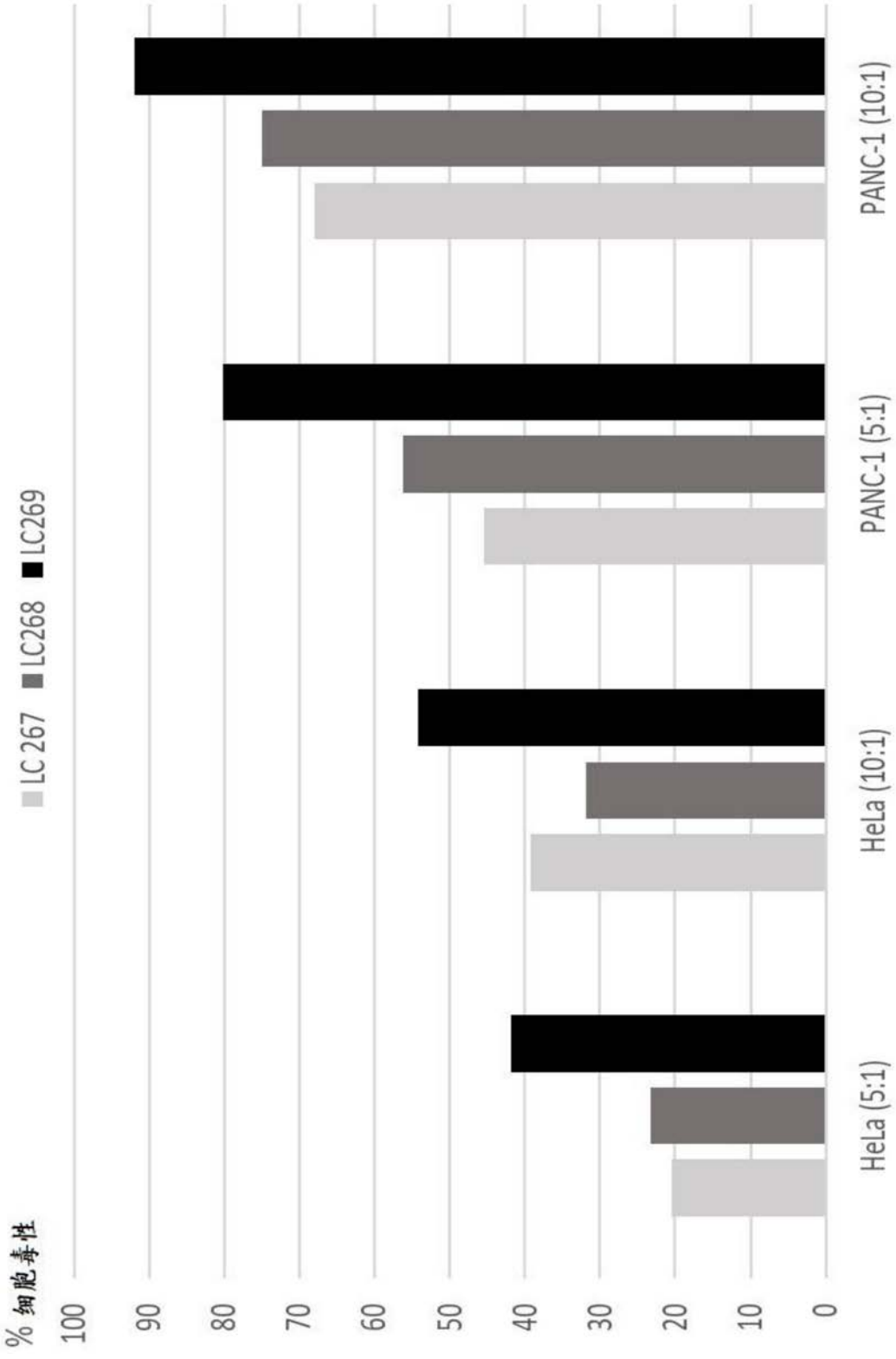

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC 267
LC268
LC269
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)

图7

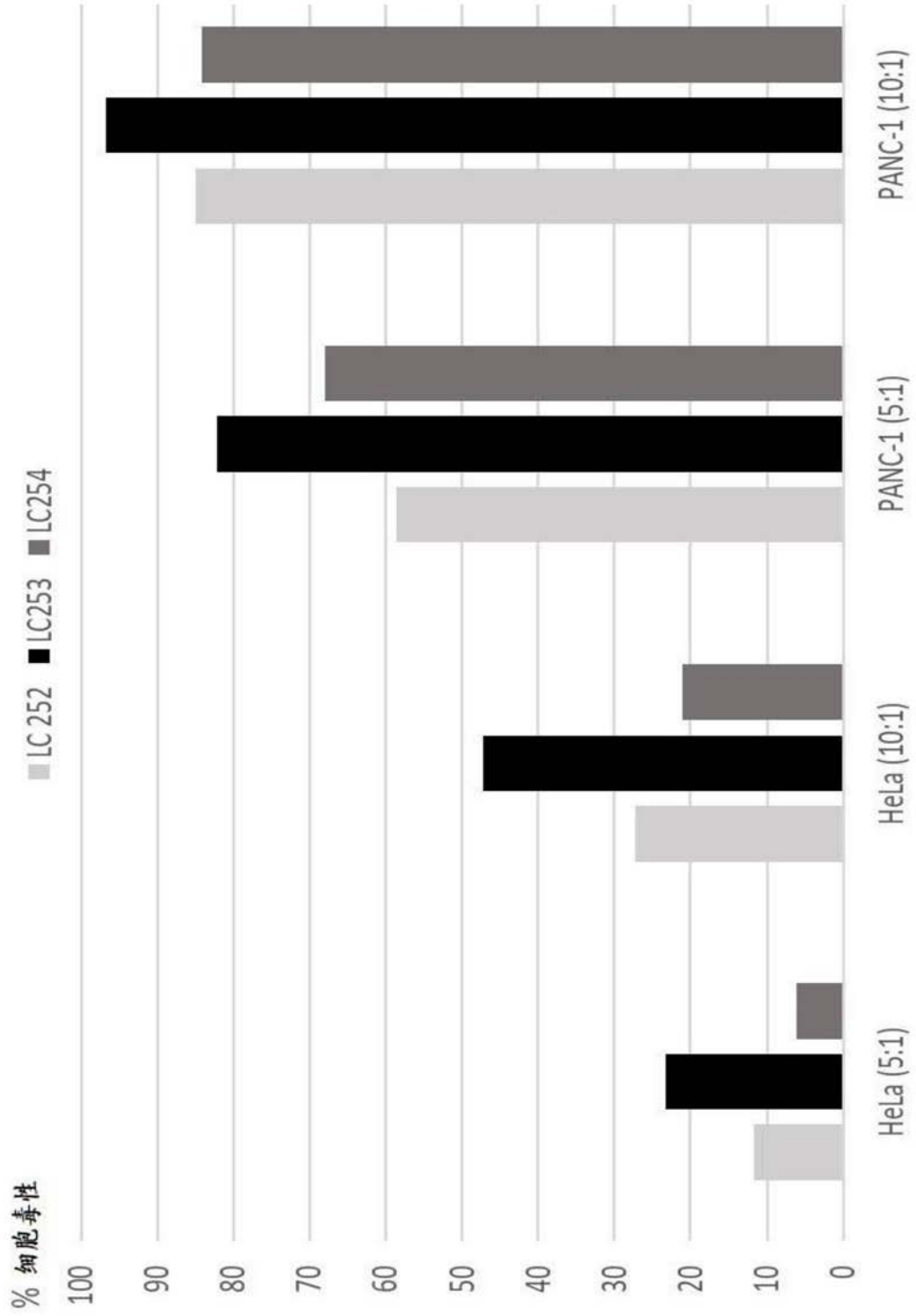

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC 252
LC253
LC254
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)

图8

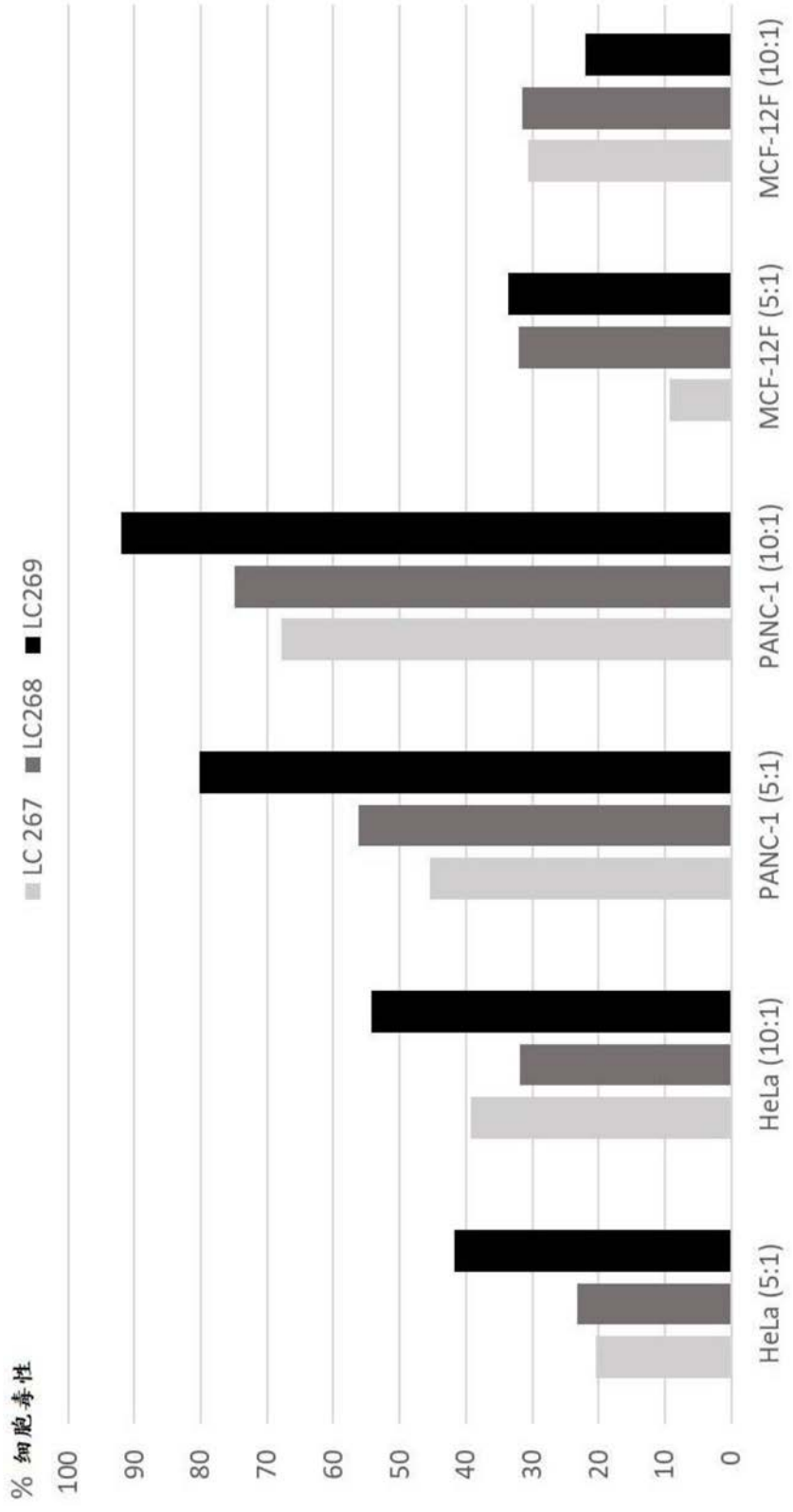

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC 267
LC268
LC269
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)
MCF-12F (5:1)
MCF-12F (10:1)

图9

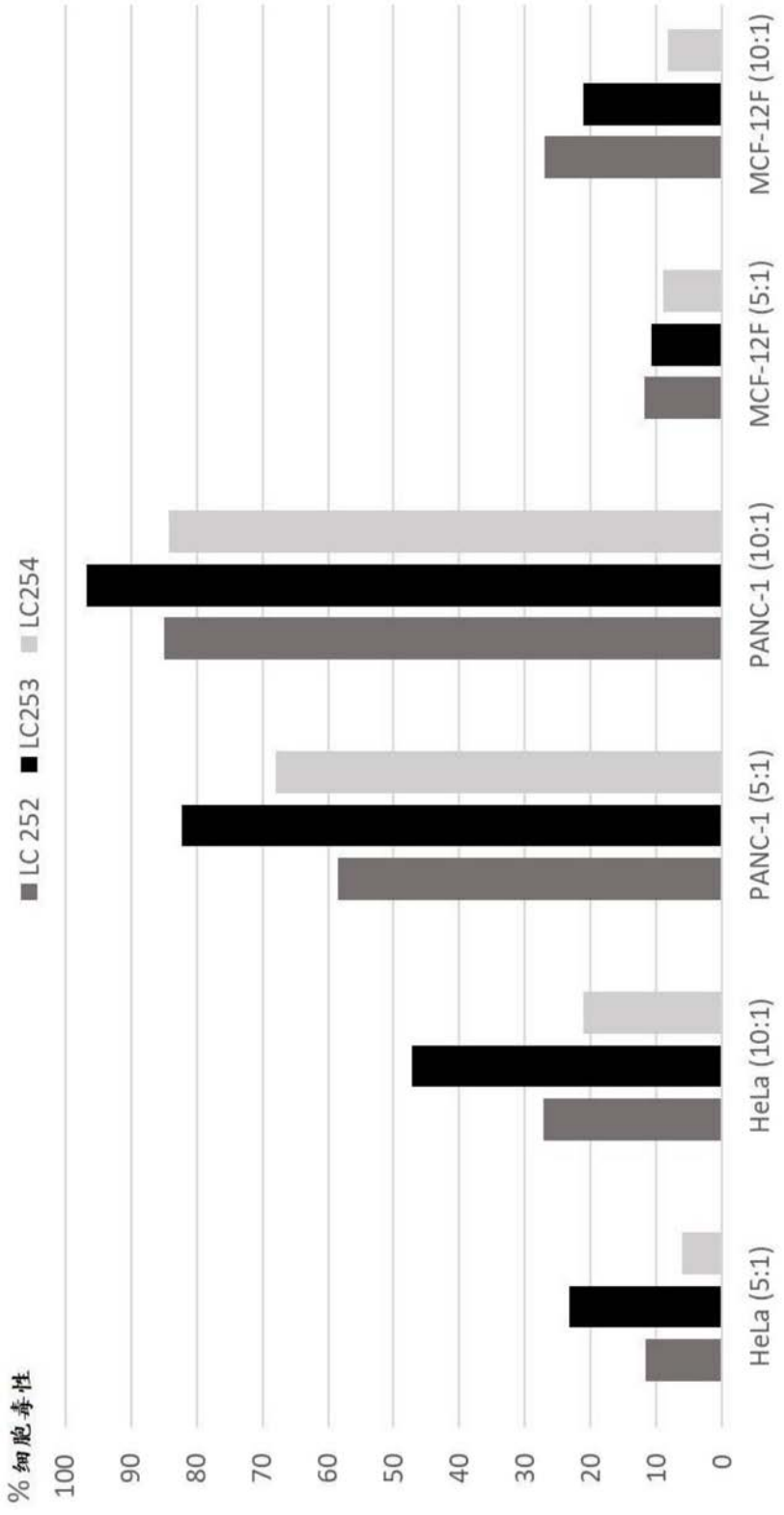

% 细胞毒性
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
LC 252
LC253
LC254
HeLa (5:1)
HeLa (10:1)
PANC-1 (5:1)
PANC-1 (10:1)
MCF-12F (5:1)
MCF-12F (10:1)

图10

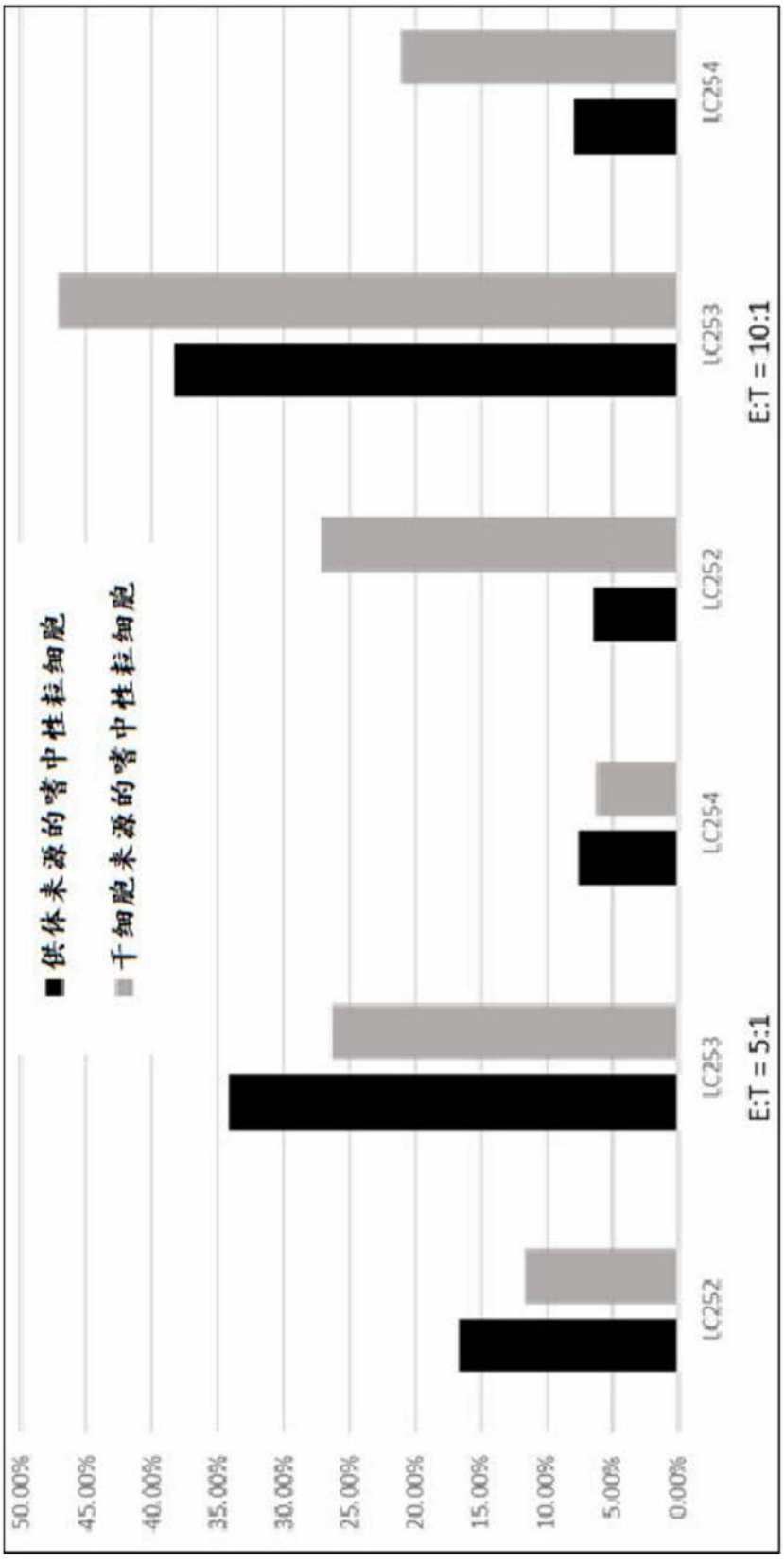

50.00%
45.00%
40.00%
35.00%
30.00%
25.00%
20.00%
15.00%
10.00%
5.00%
0.00%
■供体来源的嗜中性粒细胞
■千细胞来源的嗜中性粒细胞
LC252
LC253
LC254
E:T = 5:1
LC252
LC253
LC254
E:T = 10:1

图11

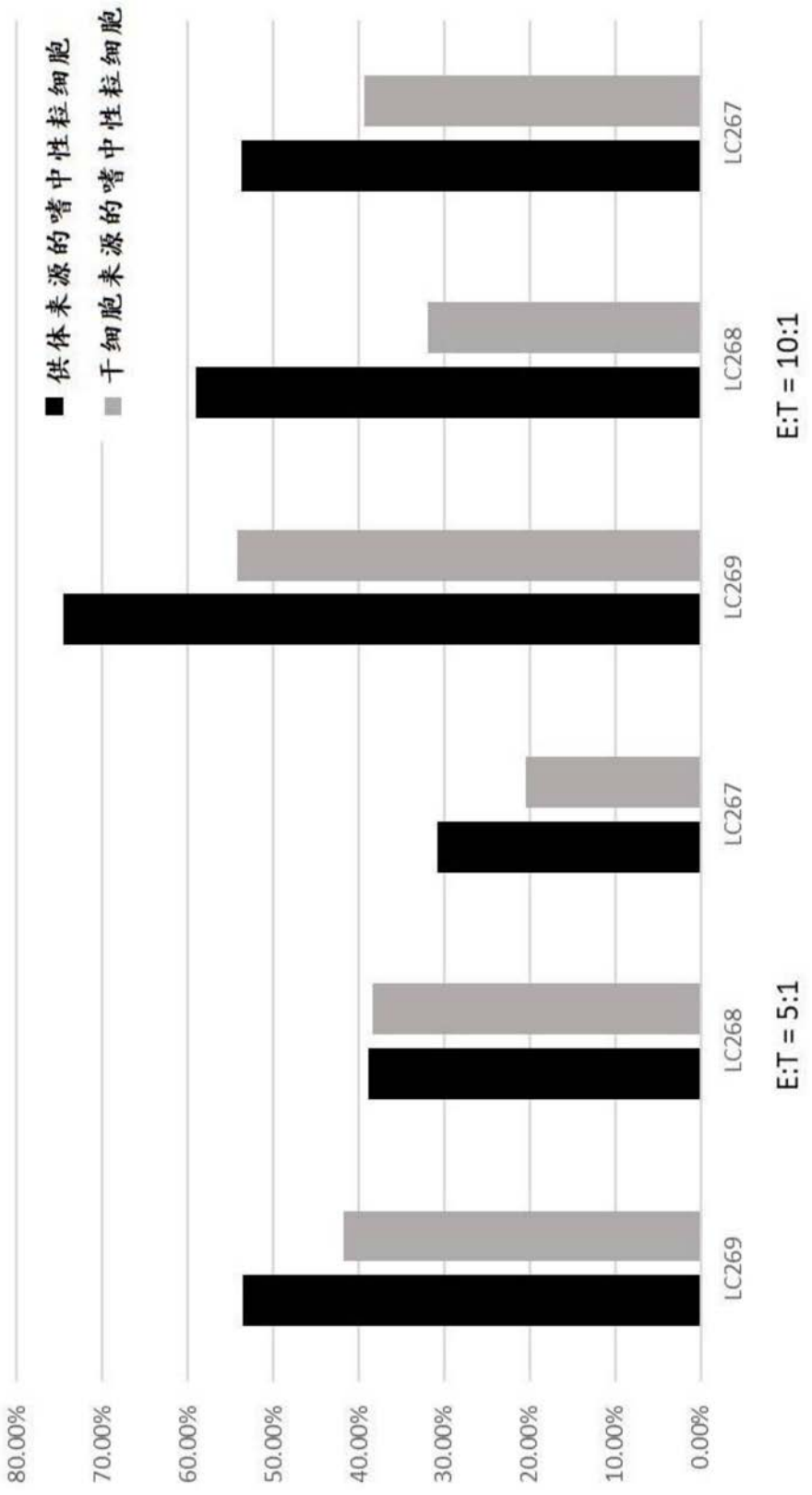

供体来源的嗜中性粒细胞
干细胞来源的嗜中性粒细胞
80.00%
70.00%
60.00%
50.00%
40.00%
30.00%
20.00%
10.00%
0.00%
LC269
LC268
LC267
E:T = 5:1
LC269
LC268
LC267
E:T = 10:1

图12

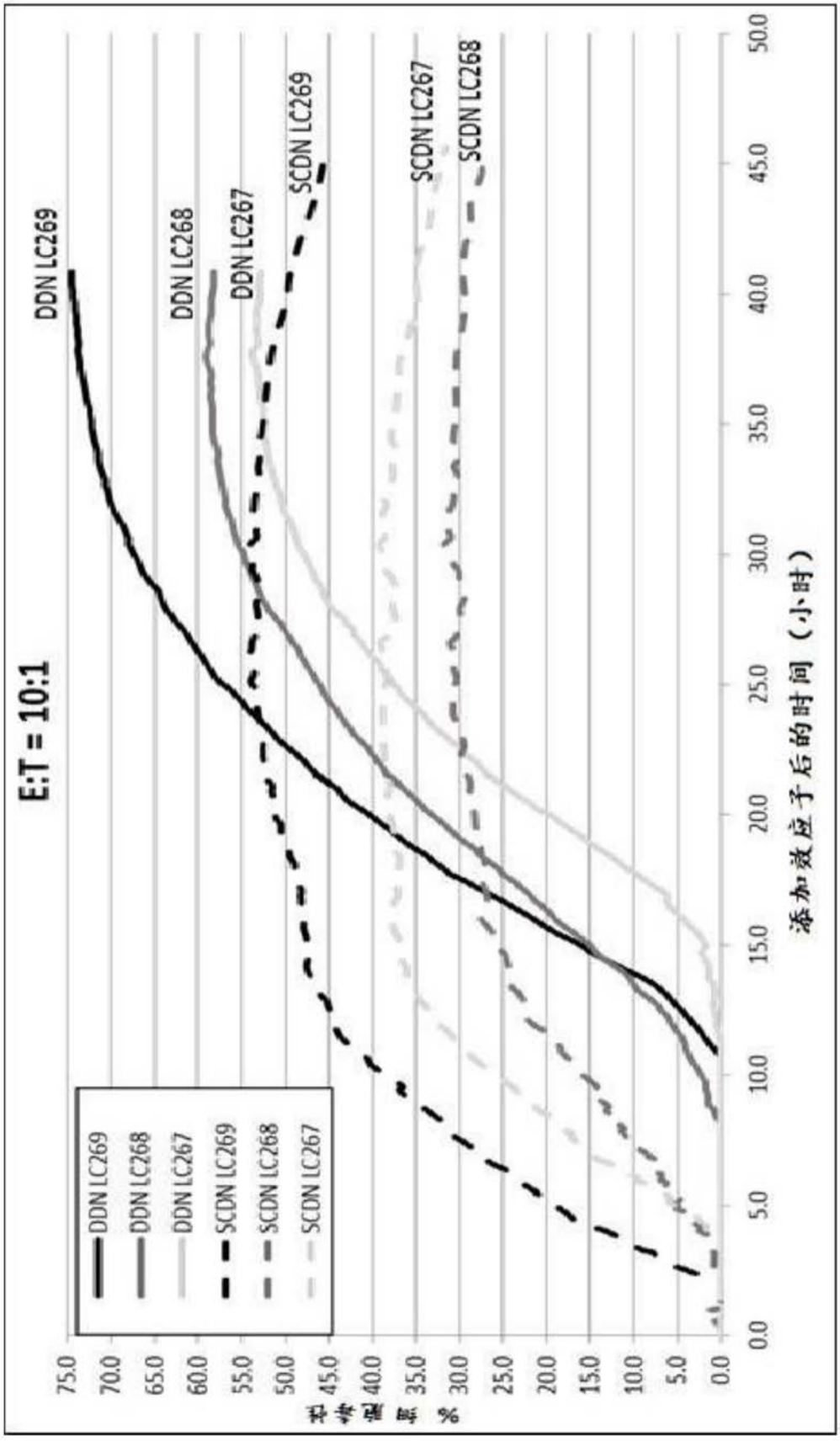

E:T = 10:1
DDN LC269
DDN LC268
DDN LC267
SCDN LC269
SCDN LC268
SCDN LC267
添加效应子后的时间（小时）
%
75.0
70.0
65.0
60.0
55.0
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0

图13