



(21) 申请号 201680073326.4

(22) 申请日 2016.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108473961 A

(43) 申请公布日 2018.08.31

(30) 优先权数据
62/251,016 2015.11.04 US
PCT/US2016/14918 2016.01.26 US
62/337,093 2016.05.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.06.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/044122 2016.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/078807 EN 2017.05.11

(73) 专利权人 菲特治疗公司
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·瓦拉梅尔 R·克拉克
R·比乔戴尔

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 王永伟 赵蓉民

(51) Int.Cl.

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

C12N 5/0786 (2010.01)

C12N 5/0781 (2010.01)

C12N 5/078 (2010.01)

C12N 5/0787 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014165825 A2, 2014.10.09

CN 103937743 A, 2014.07.23

WO 2010096746 A1, 2010.08.26

EP 2745840 A2, 2014.06.25

CN 102329769 A, 2012.01.25

林凤秋等. ESC和iPSC在输血医学上的应用
潜能.《中国输血杂志》.2012, 全文.

Chen T等. Development of hematopoietic
stem and progenitor cells from human
pluripotent stem cells.《Journal of
cellular biochemistry》.2015, 第116卷(第7
期),

审查员 倪志远

权利要求书5页 说明书79页 附图64页

(54) 发明名称

用于诱导造血细胞分化的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供使多能细胞分化成造血细胞的培养平台、细胞培养基和方法。本发明进一步提供使用本文所公开的培养平台和方法产生的多能干细胞源造血细胞, 所述培养平台和方法允许在不形成EB的情况下进行无饲养细胞的单层培养。具体地说, 本发明的多能干细胞源造血细胞包括并且不限于iHSC、永久性生血内皮细胞、造血多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞和B细胞。

1. 一种产生具有治疗特性的造血谱系细胞的方法, 包含:

a) 获得包含引入的一种或多种遗传印记的诱导多能干细胞(iPSCs), 其中所述一种或多种遗传印记包括(i) 编码重组蛋白的序列的基因组插入, 或(ii) 使内源基因表达缺失或减少的基因组插入或缺失; 和

b) 引导所述iPSCs分化成造血谱系细胞, 其中引导分化包含:

(i) 使所述iPSCs与包含BMP路径活化剂的组合物接触, 以获得中胚层细胞; 和

(ii) 使所述中胚层细胞与包含BMP路径活化剂、bFGF和WNT路径活化剂的组合物接触, 以获得具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞, 其中具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的所述中胚层细胞能够提供造血谱系细胞;

其中所述中胚层细胞和具有永久性HE潜能的所述中胚层细胞是在步骤(b) (i) 和(b) (ii) 中获得, 而不形成类胚胎体;

其中所述造血谱系细胞包含永久性生血内皮细胞、造血干细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞或B细胞; 和

其中所述造血谱系细胞保留引入并包含在所述iPSCs中的所述遗传印记。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中:

(I) 获得步骤a) 的包含引入的所述一种或多种遗传印记的所述iPSCs包含:

a) 通过在将非多能细胞重编程为所述iPSC期间或之后进行基因组编辑而将所述一种或多种遗传印记引入所述iPSC中; 或

b) 如下将所述一种或多种遗传印记引入所述iPSC:

i. 获得对供者、疾病或治疗反应具有特异性的来源特异性免疫细胞, 其中所述免疫细胞呈现能保留的治疗属性, 并且其中所述免疫细胞包含所述一种或多种遗传印记; 和

ii. 将所述来源特异性免疫细胞重编程为所述iPSC, 其中所述iPSC包含引入的遗传印记和所述来源特异性免疫细胞的能保留的治疗属性;

或,

(II) 引导所述iPSCs分化成步骤b) 的所述造血谱系细胞进一步包含:

使具有永久性HE潜能的所述中胚层细胞与包含bFGF和ROCK抑制剂的组合物接触, 以获得永久性HE细胞,

或

(III) 在步骤b) 之前, 使所述iPSCs与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触, 以接种和扩增所述iPSCs。

3. 根据权利要求2所述的方法, 进一步包括使(II) 的所述永久性HE细胞与包含以下i的组合物接触以获得造血多潜能祖细胞(MPP), 或与包含以下ii的组合物接触以获得前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞和/或T细胞, 或与包含以下iii的组合物接触以获得前NK细胞祖细胞、NK细胞祖细胞和/或NK细胞:

i. BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子, 所述生长因子和细胞因子选自由以下组成的组: TP0、IL3、GMCSF、EP0、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11; 或

ii. 选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子; 以及BMP活化剂、ROCK抑制剂、TP0、VEGF和bFGF中的一种或多种; 或

iii. 选自由SCF、Flt3L、TPO、IL7和IL15组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子以及BMP活化剂、ROCK抑制剂、VEGF和bFGF中的一种或多种。

4. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述遗传印记包含:

(a) 以下中的一种或多种: 安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶标候选物; 或促进所述iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质; 或

(b) 以下中的一种或多种: (i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白 (Tapasin)、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CIITA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少; (ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加;

其中所述来源特异性免疫细胞的所述治疗属性包含以下中的一种或多种: (i) 靶向抗原的受体表达; (ii) HLA呈递或其缺乏; (iii) 对肿瘤微环境的抗性; (iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调节; (v) 靶向特异性改善, 同时肿瘤外效应减小; (v) 对例如化学疗法等疗法的抗性; 和(vi) 改善的归巢、存留和细胞毒性。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中:

(i) 所述表面触发受体是包含T、NK、NKT、巨噬细胞和嗜中性粒细胞的所述造血谱系细胞所通用的; 或

(ii) 所述双特异性或多特异性接合体对所述通用表面触发受体具有特异性, 且对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。

6. 根据权利要求5所述的方法, 其中:

(i) 所述通用表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域; 或

(ii) 所述通用表面触发受体包含对所述双特异性或多特异性接合体具有特异性的抗原决定基; 或

(iii) 所述肿瘤特异性抗原包含CD19、CD20、CD30、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2和CEA中的一种或多种。

7. 根据权利要求1所述的方法, 进一步包含

将具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的所述中胚层细胞在包含Wnt路径促效剂的培养基中培养, 以获得永久性HE细胞;

其中相较于不使用所述Wnt路径活化剂培养, 所得永久性HE细胞:

(i) 在细胞群中的数目和百分比增加

(ii) 分化的效能增加; 和/或

(iii) HE细胞含量改善。

8. 根据权利要求7所述的方法, 具有以下特征中的至少一种:

(i) 其中所述培养基进一步包含ROCK抑制剂和选自由以下组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子: bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11; 和

(ii) 其中所述iPSCs包括未处理iPSCs。

9. 根据权利要求2所述的方法, 其中将来源特异性免疫细胞重编程包含:

a) 从对供者、疾病或治疗反应具有特异性的所选来源样品中分离出初代抗原特异性T细胞; 和

b) 对所述初代抗原特异性T细胞进行重编程,以获得iPSCs。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中分离所述初代抗原特异性T细胞进一步包含如下富集所述初代抗原特异性T细胞:

(i) 将所述初代抗原特异性T细胞与(a)表达所关注抗原的肿瘤细胞;(b)表达所关注抗原的未转化细胞;或(c)树突状细胞、胸腺上皮细胞、内皮细胞或人工抗原呈递细胞、表达所关注抗原的血浆颗粒或肽共培养,以使得识别由所述细胞表达的所关注抗原的抗原特异性T细胞能够更快地增殖;或

(ii) 使用对所关注抗原具有特异性的T细胞受体特异性结合剂分选所述初代抗原特异性T细胞,

从而获得经富集的识别所关注抗原的初代抗原特异性T细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中经分离的所述初代抗原特异性T细胞或经富集的初代抗原特异性T细胞进一步被转录因子或小分子接触,以使所述细胞恢复活力。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述遗传印记包含以下中的一种或多种:

(I) 安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶标候选物;传达二级或三级抗原特异性的细胞表面蛋白质;或促进所述iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质;

(II) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;或

(III) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述表面触发受体具有以下特征中的至少一种:

(i) 是造血谱系细胞所通用的;

(ii) 包含抗原决定基和共刺激域,其中所述抗原决定基对所述双特异性或多特异性接合体具有特异性;

(iii) 用于对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性的双特异性或多特异性接合体;和

(iv) 其中所述双特异性或多特异性接合体是

a) 造血谱系细胞类型所特有的,

b) 对包含CD3、CD16、CD64或CD89的表面受体具有特异性;

c) 与造血谱系细胞类型无关,其中所述造血谱系细胞包含通用表面触发受体,且其中所述接合体对所述通用表面触发受体具有特异性;或

d) 对一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性,所述肿瘤特异性抗原包含CD19、CD20、CD30、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2和CEA中的一种或多种,

并且其中所述造血谱系细胞包含永久性生血内皮细胞、造血干细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

14. 根据权利要求6或13所述的方法,其中所述共刺激域包含IL2。

15. 根据权利要求1所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞源前T细胞祖细胞与包含选自由SCF、F1t3L和IL7组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以获得多能干细胞源T细胞祖细胞或T细胞,其中所述组合物不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种;

其中所述多能干细胞源前T细胞祖细胞如下获得:使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与包含ROCK抑制剂和选自由VEGF、bFGF、SCF、F1t3L、TPO和IL7组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增;并且

其中所述多能干细胞源永久性生血内皮细胞如下获得:使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、选自由bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增;其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

16. 根据权利要求15所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增所述多能干细胞,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

17. 根据权利要求1所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞源前NK细胞祖细胞与包含选自由SCF、F1t3L、IL3、IL7和IL15组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以获得多能干细胞源NK细胞祖细胞或NK细胞,其中所述组合物不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种;

其中所述多能干细胞源前NK细胞祖细胞如下获得:使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增,所述生长因子和细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、F1t3L、TPO、IL3、IL7和IL15;并且

其中多能干细胞源永久性生血内皮细胞如下获得:使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、选自由bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增。

18. 根据权利要求17所述的方法,进一步包含以下中的一种或多种:

(i) 使接种的多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞、具有生血内皮细胞潜能的中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受2%到10%之间的低氧压;或

(ii) 使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增所述细胞,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

19. 根据权利要求1所述的方法,进一步包含:

使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、选自由bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以获得多能干细胞源永久性生血内皮细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增所述多能干细胞,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂;且/或使接种的多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞、具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受2%到10%之间的低氧压。

21. 根据权利要求1所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞源前HSC与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以获得多能干细胞源造血多潜能祖细胞,所述生长因子和细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EP0、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,其中所述组合物不含ROCK抑制剂;

其中所述多能干细胞源前HSC如下获得:使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增,所述生长因子和细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EP0、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11;并且

其中所述多能干细胞源永久性生血内皮细胞如下获得:使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以实现细胞分化和扩增,所述生长因子和细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EP0、IL6和IL11,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

22. 根据权利要求21所述的方法,进一步包含:

使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增所述多能干细胞,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂;且/或使接种的多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞、具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受2%到10%之间的低氧压。

23. 一种使用根据权利要求1到6中的任一项所述的方法制备细胞群、细胞系或克隆细胞中的一种或多种的方法,其中所述细胞群、细胞系或克隆细胞选自:

(i) 多能干细胞源永久性生血内皮细胞(iHE),其中所述iHE细胞系或克隆细胞是CD34+,以及CD43-、CD93-、CXCR4-、CD73-和CXCR4-CD73-中的至少一种;

(ii) 多能干细胞源多潜能祖细胞,其中所述iMPP细胞是CD34+CD45+;

(iii) 多能干细胞源T细胞祖细胞,其中所述T细胞祖细胞是CD34+CD45+CD7+或CD34-CD45+CD7+;

(iv) 多能干细胞源T细胞,其中所述T细胞是CD45+CD3+CD4+或CD45+CD3+CD8+;

(v) 多能干细胞源NK细胞祖细胞,其中所述NK细胞祖细胞是CD3-CD45+CD56+CD7+;

(vi) 多能干细胞源NK细胞,其中所述NK细胞是CD3-CD45+CD56+;

(vii) 多能干细胞源NKT,其中所述NKT细胞是CD45+Vα24Jα18+CD3+;和

(viii) 多能干细胞源B细胞,其中所述B细胞是CD45+CD19+。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中(vi)的CD3-CD45+CD56+的所述NK细胞进一步通过NKp46+、CD57+和CD16+定义。

用于诱导造血细胞分化的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年11月4日提交的美国临时申请第62/251,016号;2016年1月26日提交的国际申请第PCT/US16/14918号;和2015年5月16日提交的美国临时申请第62/337,093号的优先权,且所述申请的公开内容以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及由多能干细胞制造所有造血谱系的细胞的组合物和方法。具体地说,本发明涉及由多能干细胞(包括人诱导多能干细胞)制造所有造血谱系的细胞的改进型培养平台。

背景技术

[0004] 人诱导多能干细胞(hiPSC)技术代表一种用于治疗多种血液恶性疾病和非血液恶性疾病(包括癌症)的治疗可行造血细胞的大有前景且潜在无限的来源。为了推进hiPSC和基因组工程化hiPSC技术作为造血细胞疗法的同种异体来源的前景,必需不仅能够高效地且可再现地产生造血干细胞和祖细胞(HSCs),而且能够高效地且可再现地产生免疫效应细胞群体,包括T、B、NKT和NK淋巴细胞和其祖细胞的多种多样的亚群。

[0005] 试管内衍生具有产生淋巴细胞的潜力的HSCs因在胚胎发育期间存在至少两波暂时且空间独特的血液形成:原始造血和永久造血而复杂化。原始造血是在胚胎外卵黄囊中起始且产生了短暂有限的造血谱系,主要包括原始红细胞系和骨髓细胞,但不包括HSCs。新生HSCs只在后来的永久造血波期间、由动脉血管内的特化内皮细胞祖细胞(称为永久性生血内皮细胞(HE))呈现。永久性HE然后经历内皮细胞向造血细胞的转变而产生HSCs,然后最终迁移到骨髓中,在骨髓中,在成年生命期间,其维持多谱系造血,包括T、B、NKT和NK淋巴细胞。因此,由多能干细胞产生HSCs和淋巴效应细胞取决于通过经充分设计和验证的方法和组合物使早期胚胎造血发育的复杂阶段向既定程序准确再现的能力。

[0006] 数量有限的研究已经描述了hiPSCs在试管内向永久性HE的定向分化。hiPSCs用于治疗目的的主要障碍已经是,需要首先将此类细胞与鼠源或人源基质细胞在含有不明血清的培养基存在下共培养,以便维持多能性且诱导分化。另外,现有方案也已经使用了由以下组成的策略:培养iPSC以形成类胚胎体(EB),所述类胚胎体是异质细胞聚集体,其包含多种分化细胞,包括外胚层、中胚层和内胚层细胞。那些程序需要使多能细胞聚集,例如通过离心而形成凝块,让细胞在孔中沉降且聚集或允许在悬浮培养物中发生被动聚集和凝块形成。所形成的EBs在分化诱导培养系统中维持一定时间长度,典型地为七到十天,以便发生适当分化,然后将EBs转移到粘附培养物中以便进一步成熟,或解离成单一细胞供进行细胞类型选择,以便进入后续分化步骤。(Kennedy等人,《细胞报道(Cell Reports)》2012:1722-1735;Knorr等人,《干细胞转化医学(Stem Cells Translational Medicine)》2013(2):274-283)。举例来说,Kennedy等人教导产生EBs用于iPSCs分化,其中用胶原蛋白酶和胰蛋白酶处理多能细胞,以便刮下所述细胞以形成小聚集体,然后培养以形成EBs。EB形成已经

表明可促进多能干细胞分化,然而,形成聚集体且随后形成EBs需要密集型劳动,在这个过程中,细胞数目最低限度地增加,三维EB聚集体中的细胞内容物不一致地且不均匀地暴露于培养基因子,由此产生处于可变分化阶段的异质细胞产物,且大大阻碍了制造工艺达到高效和流线化所必需的可扩展性和再现性。

[0007] 因此,需要使干细胞分化成永久造血而不依赖于共培养或含血清培养基且不需要形成类胚胎体聚集体作为中间体的方法和组合物。

发明内容

[0008] 本发明大体上涉及用于培养干细胞且使干细胞向造血细胞命运分化的细胞培养条件、培养基、培养平台和方法。

[0009] 具体地说,本发明提供在无血清/无饲养层条件下且在可扩展的单层培养平台中,通过衍生自多能干细胞(包括hiPSCs)的永久性生血内皮细胞(HE)而不需要形成EB便产生造血细胞谱系的方法和组合物。可以根据本发明方法分化的细胞的范围为多能干细胞到专注于特定终末分化细胞和转分化细胞的祖细胞、直接转向造血命运而不经历多能中间体的多种谱系细胞。类似地,干细胞分化而产生的细胞的范围为多潜能干细胞或祖细胞到终末分化干细胞,和所有中间造血细胞谱系。

[0010] 本发明提供由多能干细胞在单层培养中分化成且扩增造血谱系细胞的方法和组合物,包含使所述多能干细胞与BMP路径活化剂和任选存在的bFGF接触。因而,无需由多能干细胞形成类胚胎体便获得且扩增多能干细胞源中胚层细胞。然后使中胚层细胞与BMP路径活化剂、bFGF和WNT路径活化剂接触,以获得具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的扩增中胚层细胞,而无需由多能干细胞形成类胚胎体。通过随后与bFGF和任选存在的ROCK抑制剂和/或WNT路径活化剂接触,具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成永久性HE细胞,在分化期间,所述永久性HE细胞还得到扩增。

[0011] 本文所提供的用于获得造血谱系细胞的方法优于EB介导的多能干细胞分化,原因在于:EB形成产生了适度到最低限度的细胞扩增;不允许单层培养,而单层培养对于需要所述细胞在群体中均匀扩增和均匀分化的许多应用来说具有重要作用;并且费力且效率低。

[0012] 本文中提供一种单层分化平台,其促进向永久性生血内皮细胞分化,从而衍生出造血干细胞和分化后代,例如T、B、NKT和NK细胞。得到证明的单层分化策略实现了增强的分化效率与大规模扩增的组合,从而能够在不同治疗应用中递送治疗上相关数目个多能干细胞源造血细胞。另外,本发明公开了使用本文所提供方法进行的单层培养产生了功能造血谱系细胞,其实现了全范围的试管内分化、活体外调节以及活体内长期造血自我更新、重构和移植。如本文所用,iPSC源造血谱系细胞包括(但不限于)永久性生血内皮细胞、造血多潜能祖细胞、造血干细胞和祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。

[0013] 本发明的一个方面提供一种用于获得多能干细胞源造血谱系细胞的培养平台,其包含:(i)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂并且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基适于由具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞;(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制

剂并且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;和(iii)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞。在一些实施例中,上述培养平台中的多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述培养平台进一步包含:(iv)包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂而不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。

[0014] 在上述培养平台的一些实施例中,所述培养平台进一步包含额外培养基:(i)包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子、但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于多能干细胞源前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞;或(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO和IL7,其中所述培养基适于多能干细胞源永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞;且这些额外培养基适于产生多能干细胞源T谱系细胞。

[0015] 在上述培养平台的一些实施例中,所述培养平台可以进一步包含:(i)包含一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组,其中所述培养基不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且适于多能干细胞源前NK细胞祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞;或(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基适于多能干细胞源永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞;且这些额外培养基适于产生多能干细胞源NK谱系细胞。

[0016] 在一个实施例中,以上提供的培养平台进一步包含:(i)包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子、但不含ROCK抑制剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:TPO、IL3、GM-CSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,其中所述培养基适于多能干细胞源前HSCs分化成造血多潜能祖细胞;(ii)包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:TPO、IL3、GM-CSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11,其中所述培养基适于多能干细胞源永久性生血内皮细胞分化成前HSCs;且这些培养基是为了产生多能干细胞源造血多潜能祖细胞而提供。

[0017] 本发明的另一方面提供分化成和扩增多能干细胞源造血细胞的组合物,所述组合物包含以下中的一种或多种:(i)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子、任选存在的Wnt路径活化剂和具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂,其中所述培养基适于由具有生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞;(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂且包含多能干细胞源中胚层细胞的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;和(iii)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF以及iPSCs的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞。

[0018] 在用于分化成和扩增多能干细胞源造血细胞的组合物的一些实施例中,所述多能

干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的造血谱系细胞中。

[0019] 在用于分化成和扩增多能干细胞源造血细胞的组合物的一些实施例中,所述组合物包含额外培养基,例如:(vi) 包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂而不含TGF β 受体/ALK抑制剂且包含多能干细胞的培养基;其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的造血谱系细胞中。

[0020] 在用于分化成和扩增多能干细胞源造血细胞的上述组合物的一些实施例中,所述组合物另外包含:(i) 包含一种或多种生长因子和选自SCF、F1t3L和IL7组成的组的细胞因子、但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且包含多能干细胞源前T细胞祖细胞的培养基,其中所述培养基适于多能干细胞源前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞;或(ii) 包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂以及多能干细胞源永久性生血内皮细胞的培养基,所述细胞因子选自以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、F1t3L、TPO和IL7,其中所述培养基适于永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞。这些额外培养基适于产生多能干细胞源T谱系细胞。

[0021] 在用于分化成和扩增多能干细胞源造血细胞的上述组合物的一个实施例中,所述组合物进一步包含一种或多种用于产生多能干细胞源造血多潜能祖细胞的培养基,其中所述培养基包含:(i) 包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子、但不含ROCK抑制剂且包含多能干细胞源前HSC的培养基,所述细胞因子选自以下组成的组:TPO、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,其中所述培养基适于前HSC分化成造血多潜能祖细胞;和/或(ii) 包含BMP活化剂、ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及多能干细胞源永久性生血内皮细胞的培养基,所述细胞因子选自以下组成的组:TPO、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、F1t3L和IL11,其中所述培养基适于永久性生血内皮细胞分化成前HSC。

[0022] 本发明的一个方面提供一种用于产生多能干细胞源T谱系细胞的培养平台,所述培养平台包含:(i) 包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增多能干细胞源中胚层细胞;(ii) 包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于由中胚层细胞获得具有永久性HE潜能的中胚层细胞;(iii) 包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子、任选存在的Wnt路径活化剂且任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂的培养基,所述细胞因子选自以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基适于由具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞;(iv) 包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂以及多能干细胞源永久性生血内皮细胞的培养基,所述细胞因子选自以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、F1t3L、TPO和IL7,其中所述培养基适于使永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞;和(v) 包含一种或多种生长因子和选自SCF、F1t3L和IL7组成的组的细胞因子、但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且包含多能干细胞源前T细胞祖细胞的培养基,其中

所述培养基适于使前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞。

[0023] 在用于产生多能干细胞源T谱系细胞的上述培养平台的一些实施例中,所述培养平台进一步包含:(vi)包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的造血谱系细胞中。

[0024] 本发明的另一方面提供一种用于产生多能干细胞源NK细胞的培养平台,所述培养平台包含:(i)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于由中胚层细胞获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子、任选存在的Wnt路径活化剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基适于由具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成永久性生血内皮细胞;(iv)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基适于使永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞;和(v)包含一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且适于使前NK细胞祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞。

[0025] 在用于产生多能干细胞源NK细胞的上述培养平台的一些实施例中,所述培养平台进一步包含:(vi)包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂且不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的多能干细胞源NK谱系细胞中。

[0026] 本发明的又一个方面提供一种用于产生多能干细胞源永久性生血内皮细胞(iHE)的培养平台,所述培养平台包含:(i)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞源中胚层细胞获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;和(iii)包含ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IL6、IL11,其中所述培养基任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂,且其中所述培养基适于由具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞。

[0027] 在用于产生多能干细胞源永久性生血内皮细胞(iHE)的培养平台的一些实施例中,所述培养平台进一步包含:(iv)包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂且不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。

[0028] 本发明的又一方面提供一种用于产生多能干细胞源造血多潜能祖细胞的培养平

台,所述培养平台包含:(i)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞分化成和扩增多能干细胞源中胚层细胞;(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于由多能干细胞源中胚层细胞获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂,其中所述培养基适于由具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞;(iv)包含BMP活化剂、ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11,其中所述培养基适于使永久性生血内皮细胞分化成前HSC;和(v)包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,其中所述培养基不含ROCK抑制剂,其中所述培养基适于使前HSC分化成造血多潜能祖细胞。在一些实施例中,所述培养平台进一步包含:(vi)包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂而不含TGF β 受体/ALK抑制剂的培养基,其中所述培养基适于接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的多能干细胞源造血细胞中。

[0029] 本发明的另一方面提供一种引导多能干细胞分化成永久性造血谱系细胞的方法,所述方法包含:(i)使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触,以起始多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;(ii)使中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的组合物接触,以起始中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的中胚层细胞,其中所述组合物任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂;(iii)使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与组合物接触,以起始具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂,所述细胞因子选自自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述组合物任选地不含TGF β 受体/ALK抑制剂;和任选地,使多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞、具有生血内皮细胞的中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受约2%到约10%之间的低氧压。

[0030] 在用于引导多能干细胞分化成造血谱系细胞的一些实施例中,所述方法进一步包含使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,其中所述组合物不含TGF β 受体/ALK抑制剂,以接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的多能干细胞源造血细胞中。

[0031] 在用于引导多能干细胞分化成造血谱系细胞的一些实施例中,多能干细胞分化成造血谱系细胞不包含产生类胚胎体且采取单层培养形式。

[0032] 在上述方法的一些实施例中,所得多能干细胞源永久性生血内皮细胞是CD34⁺。在一些实施例中,所得永久性生血内皮细胞是CD34⁺CD43⁻。在一些实施例中,永久性生血内皮细胞是CD34⁺CD43⁻CXCR4⁻CD73⁻。在一些实施例中,永久性生血内皮细胞是CD34⁺CXCR4⁻

CD73⁻。在一些实施例中,永久性生血内皮细胞是CD34⁺CD43⁻CD93⁻。在一些实施例中,永久性生血内皮细胞是CD34⁺CD93⁻。

[0033] 在上述方法的一些实施例中,所述方法进一步包含(i)使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与组合物接触,以起始所述永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂,所述细胞因子选自自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO和IL7;和任选地,(ii)使所述前T细胞祖细胞与组合物接触,以起始所述前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞,所述组合物包含一种或多种生长因子和选自自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子,但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在所述方法的一些实施例中,所述多能干细胞源T细胞祖细胞是CD34⁺CD45⁺CD7⁺。在所述方法的一些实施例中,所述多能干细胞源T细胞祖细胞是CD45⁺CD7⁺。

[0034] 在用于引导多能干细胞分化成造血谱系细胞的上述方法的又一些实施例中,所述方法进一步包含:(i)使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与组合物接触,以起始所述永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂,所述细胞因子选自自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15;和任选地,(ii)使多能干细胞源前NK细胞祖细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以起始所述前NK祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞,所述细胞因子选自自由以下组成的组:SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,所述多能干细胞源NK祖细胞是CD3⁻CD45⁺CD56⁺CD7⁺。在一些实施例中,所述多能干细胞源NK细胞是CD3⁻CD45⁺CD56⁺,且任选地进一步通过Nkp46⁺、CD57⁺和CD16⁺定义。

[0035] 本发明的另一方面提供一种用于产生多能干细胞源T谱系细胞的方法,所述方法包含:(i)使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触,以起始中胚层细胞分化成和扩增多能干细胞;(ii)使所述中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触,以起始中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的中胚层细胞;(iii)使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与组合物接触,以起始具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂,所述细胞因子选自自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂;(iv)使永久性生血内皮细胞与组合物接触,以起始所述永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞,所述组合物包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂,所述细胞因子选自自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO和IL7;和(v)使所述前T细胞祖细胞与包含一种或多种生长因子和选自自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的组合物接触,以起始所述前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞,其中所述组合物不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种;和任选地,可以使所接种的多能干细胞、中胚层细胞、具有永久性HE潜能的中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受约2%到约10%之间的低氧压。在一些实施例中,上述方法中的组II进一步包含:使iPSCs与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增多能干细胞;且/或其中多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是

iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSC。在所述方法的一些实施例中，多能干细胞分化成T细胞谱系不包含产生类胚胎体，且采取单层培养形式。

[0036] 本发明的又一个方面提供一种用于产生多能干细胞源NK谱系细胞的方法，所述方法包含：(i) 使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触，以起始多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞；(ii) 使中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触，以起始中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的中胚层细胞；(iii) 使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子、ROCK抑制剂、任选存在的Wnt路径活化剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触，以起始具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增多能干细胞源永久性生血内皮细胞，所述细胞因子选自由以下组成的组：bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11；(iv) 使多能干细胞源永久性生血内皮细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的BMP活化剂的组合物接触，以起始多能干细胞源永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞，所述细胞因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15；和(v) 使多能干细胞源前NK细胞祖细胞与组合物接触，以起始多能干细胞源前NK细胞祖细胞分化成多能干细胞源NK细胞祖细胞或NK细胞，所述组合物包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子，但不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种；和任选地，使接种的多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受约2%到约10%之间的低氧压。在一些实施例中，用于产生多能干细胞源NK谱系细胞的所述方法在组II中进一步包含使iPSCs与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触，以接种和扩增iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，用于产生多能干细胞源NK谱系细胞的方法不包含产生类胚胎体，且采取单层培养形式。

[0037] 本发明的另一方面提供一种产生多能干细胞源永久性生血内皮细胞的方法，所述方法包含：(i) 使iPSCs与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触，以起始多能干细胞分化成和扩增多能干细胞源中胚层细胞；(ii) 使多能干细胞源中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触，以起始多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞；(iii) 使具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞与组合物接触，以起始具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成和扩增多能干细胞源永久性生血内皮细胞，所述组合物包含一种或多种生长因子和细胞因子、ROCK抑制剂和任选存在的Wnt路径活化剂且任选地不含TGFβ受体/ALK抑制剂，所述细胞因子选自由以下组成的组：bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11；和任选地，使接种的多能干细胞、多能干细胞源中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受约2%到约10%之间的低氧压。在一些实施例中，用于产生多能干细胞源永久性生血内皮细胞的上述方法进一步包含：使iPSCs与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触，以接种和扩增iPSCs；且/或其中所述iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，iPSC包含一种或多种遗传印记，且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的多能干细胞源永久性生血内皮细胞中。在一些实施例中，使iPSCs分化成永久性生血内皮细胞的上述方法不包含产生类胚胎体，且采取单层培养形式。

[0038] 本发明的另一方面提供一种用于产生多能干细胞源造血谱系多潜能祖细胞的方法,包含:(i)使iPSCs与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触,以起始iPSCs分化成和扩增多能干细胞源中胚层细胞;(ii)使多能干细胞源中胚层细胞与包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触,以起始中胚层细胞分化成和扩增具有永久性HE潜能的中胚层细胞;(iii)使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的组合物接触,以起始具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞,所述细胞因子选自自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂;(iv)使永久性生血内皮细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触,以起始永久性生血内皮细胞分化成前HSC,所述细胞因子选自自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11;和(v)使前HSC与包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子、但不含ROCK抑制剂的组合物接触,以起始所述前HSC分化成造血多潜能祖细胞,所述细胞因子选自自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11;和任选地,使接种的多能干细胞、中胚层细胞和/或永久性生血内皮细胞经受约2%到约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用于产生多能干细胞源造血多潜能祖细胞的上述方法进一步包含使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂、但不含TGFβ受体/ALK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含一种或多种遗传印记,且其中iPSC中所包含的一种或多种遗传印记保留于自其分化的多能干细胞源造血多潜能祖细胞中。在一些实施例中,使用上述方法将多能干细胞分化成造血多潜能祖细胞不包含产生类胚胎体,且采取单层培养形式。

[0039] 本发明的另一个方面提供一种组合物,包含:由本文所公开的培养平台产生的一种或多种细胞群:多能干细胞源(i) CD34+永久性生血内皮细胞(iCD34),其中所述iCD34细胞具有分化成多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞和B细胞的能力,且其中所述iCD34细胞是CD34+CD43⁻; (ii) 永久性生血内皮细胞(iHE),其中所述iHE细胞是CD34⁺,以及CD43⁻、CD93⁻、CXCR4⁻、CD73⁻和CXCR4-CD73⁻中的至少一种; (iii) 多能干细胞源永久性HSCs,其中所述iHSC是CD34+CD45⁺; (iv) 造血多潜能祖细胞,其中所述iMPP细胞是CD34+CD45⁺; (v) T细胞祖细胞,其中所述T细胞祖细胞是CD34+CD45+CD7⁺或CD34-CD45+CD7⁺; (vi) T细胞,其中所述T细胞是CD45+CD3+CD4⁺或CD45+CD3+CD8⁺; (vii) NK细胞祖细胞,其中所述NK细胞祖细胞是CD45+CD56+CD7⁺; (viii) NK细胞,其中所述NK细胞是CD3-CD45+CD56⁺,且任选地进一步通过NKp46⁺、CD57⁺和CD16⁺来定义; (ix) NKT细胞,其中所述NKT细胞是CD45+Vα24Jα18+CD3⁺; 和(x) B细胞,其中所述B细胞是CD45+CD19⁺。

[0040] 本发明的又另一个方面提供使用本文所公开的方法产生的一种或多种细胞系或克隆细胞:多能干细胞源(i) CD34+永久性生血内皮细胞(iCD34),其中所述iCD34细胞具有分化成多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞和NKT细胞的能力,且其中所述iCD34细胞是CD34+CD43⁻; (ii) 永久性生血内皮细胞(iHE),其中所述iHE细胞系或克隆细胞是CD34⁺,以及CD43⁻、CD93⁻、CXCR4⁻、CD73⁻和CXCR4-CD73⁻中的至少一种; (iii) 永久性HSCs,其中所述iHSCs是CD34+CD45⁺; (iv) 造血多潜能祖细胞(iMPP),其中所述iMPP细胞是CD34+CD45⁺; (v) T细胞祖细胞,其中所述T细胞祖细胞是CD34+CD45+CD7⁺或CD34-CD45+

CD7⁺; (vi) T细胞, 其中所述T细胞是CD45+CD3+CD4⁺或CD45+CD3+CD8⁺; (vii) NK细胞祖细胞, 其中所述NK细胞祖细胞是CD45+CD56+CD7⁺; (viii) NK细胞, 其中所述NK细胞是CD3-CD45+CD56⁺, 且任选地进一步通过NKp46⁺、CD57⁺和CD16⁺来定义; (ix) NKT细胞, 其中所述NKT细胞是CD45+Va24Ja18+CD3⁺; 和 (x) B细胞, 其中所述B细胞是CD45+CD19⁺。

[0041] 本发明的另一方面提供一种通过使用所公开方法产生的一种或多种如下细胞群、细胞系或克隆细胞促进造血自我更新、重构或移植的方法: 多能干细胞源 (i) CD34⁺永久性生血内皮细胞 (iCD34), 其中所述iCD34细胞具有分化成多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞NK细胞和NKT细胞的能力, 且其中所述iCD34细胞是CD34+CD43⁻; (ii) 永久性生血内皮细胞 (iHE), 其中所述iHE细胞系或克隆细胞是CD34⁺, 以及CD43⁻、CD93⁻、CXCR4⁻、CD73⁻和CXCR4-CD73⁻中的至少一种; (iii) 永久性HSCs, 其中所述iHSCs是CD34+CD45⁺; (iv) 造血多潜能祖细胞, 其中所述iMPP细胞是CD34+CD45⁺; (v) T细胞祖细胞, 其中所述T细胞祖细胞是CD34+CD45+CD7⁺或CD34-CD45+CD7⁺; (vi) T细胞, 其中所述T细胞是CD45+CD3+CD4⁺或CD45+CD3+CD8⁺; (vii) NK细胞祖细胞, 其中所述NK细胞祖细胞是CD45+CD56+CD7⁺; (viii) NK细胞, 其中所述NK细胞是CD3-CD45+CD56⁺, 且任选地进一步通过NKp46⁺、CD57⁺和CD16⁺来定义; (ix) NKT细胞, 其中所述NKT细胞是CD45+Va24Ja18+CD3⁺; 和 (x) B细胞, 其中所述B细胞是CD45+CD19⁺。

[0042] 本发明的另一方面提供一种产生具有增强的治疗特性的造血谱系细胞的方法, 且所述方法包含: 获得包含一种或多种遗传印记的iPSCs; 和引导iPSCs分化成造血谱系细胞。定向分化的步骤进一步包含: (i) 使多能干细胞与包含BMP路径活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触, 以获得中胚层细胞; 和 (ii) 使所述中胚层细胞与包含BMP路径活化剂、bFGF和Wnt路径活化剂的组合物接触, 以获得具有永久性生血内皮细胞 (HE) 潜能的中胚层细胞, 其中具有永久性生血内皮细胞 (HE) 潜能的中胚层细胞能够提供造血谱系细胞。优选地, 在步骤 (i) 和 (ii) 中获得中胚层细胞和具有永久性HE潜能的中胚层细胞, 而不使用形成类胚胎体的步骤, 并且所得造血谱系细胞包含永久性生血内皮细胞、造血干细胞和祖细胞 (HSC)、造血多潜能祖细胞 (MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞或B细胞。此外, 造血谱系细胞保留iPSCs中所包含的遗传印记用于定向分化。

[0043] 在一些实施例中, 上述方法中的定向分化步骤进一步包含: (i) 使具有永久性HE潜能的中胚层细胞与包含bFGF和ROCK抑制剂的组合物接触以获得永久性HE细胞; (ii) 使所述永久性HE细胞与包含BMP活化剂和任选存在的ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的组合物接触, 以获得造血多潜能祖细胞 (MPP), 所述细胞因子选自由以下组成的组: TPO、IL3、GM-CSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11; (iii) 使所述永久性HE细胞与组合物接触, 以获得前T细胞祖细胞、T细胞祖细胞和/或T细胞, 所述组合物包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子, 以及任选存在的以下中的一种或多种: BMP活化剂、ROCK抑制剂、TPO、VEGF和bFGF; 或 (iv) 使所述永久性HE细胞与组合物接触, 以获得前NK细胞祖细胞、NK细胞祖细胞和/或NK细胞, 所述组合物包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、TPO、IL7和IL15组成的组的细胞因子, 以及任选存在的以下中的一种或多种: BMP活化剂、ROCK抑制剂、VEGF和bFGF。

[0044] 为了获得包含一种或多种遗传印记的iPSCs, 一种方法可以是通过在非多能细胞

重编程为iPSC期间或之后进行基因编辑而将一种或多种遗传印记引入iPSC中,其中所述遗传印记包含一种或多种基因修饰模式,且所述遗传印记是通过在iPSC基因组中进行基因组插入、缺失或取代来引入。另一方法可以是(i)通过获得具有供者、疾病或治疗反应特异性的来源特异性免疫细胞而将一种或多种遗传印记引入iPSC中,其中所述免疫细胞呈现能保留的治疗属性;(ii)使来源特异性免疫细胞重编程为iPSC;和任选存在的(iii)通过在来源特异性免疫细胞重编程为iPSC期间或之后进行基因编辑而将额外遗传印记引入步骤(ii)的iPSC中。关于来源细胞、iPSCs和或iPSC源细胞中所包含的基因修饰模式,其可以包含以下中的一种或多种:安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶标候选物;或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。

[0045] 在一些实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白(Tapasin)、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加。在一些实施例中,上述基因修饰模式保留于以下中的一种或多种中:多能干细胞源永久性HE细胞、造血多潜能祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞和B细胞。在一些实施例中,双特异性或多特异性接合体对一种或多种淋巴细胞表面受体具有特异性,并且对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。在特定实施例中,表面触发受体是造血谱系细胞(包含T、NK、NKT、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)所通用的。在某些实施例中,通用的表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域,其中所述抗抗原决定基对双特异性或多特异性接合体具有特异性。在一些实施例中,共刺激域包含IL2。在一些实施例中,淋巴细胞表面受体包含表面表现工程化模式、CD3、CD16、CD64和CD89中的一种或多种;而肿瘤特异性抗原包含CD19、CD20、CD30、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2和CEA中的一种或多种。在一些实施例中,来源特异性免疫细胞的治疗属性包含以下中的一种或多种:(i) 靶向抗原的受体表达;(ii) HLA呈递或其缺乏;(iii) 对肿瘤微环境的抗性;(iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;(iv) 靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;(v) 对例如化学疗法等治疗的抗性;和(vi) 归巢、存留和细胞毒性改善。

[0046] 本发明的又一个方面提供具有增强的治疗特性的造血谱系细胞,所述细胞包含多能干细胞中所含的相同遗传印记,所述造血谱系细胞来源于所述多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞的遗传印记包含(i) 通过在非多能细胞重编程为iPSC期间或之后在多能细胞的基因组中进行基因组插入、缺失或取代而获得的一种或多种基因修饰模式;或(ii) 具有供者、疾病或治疗反应特异性的来源特异性免疫细胞的一种或多种能保留治疗属性,且其中所述多能细胞是由来源特异性免疫细胞重编程。在一些实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶标候选物;或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。

[0047] 在一些实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白(Tapasin)、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、

TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加。在特定实施例中,表面触发受体是造血谱系细胞(包含T、NK、NKT、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)所通用的。在某些实施例中,通用的表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域,其中所述抗抗原决定基对双特异性或多特异性接合体具有特异性。在一些实施例中,共刺激域包含IL2。在又一些实施例中,造血谱系细胞包含与以下中的一种或多种有关的来源特异性免疫细胞的治疗属性:(i)靶向抗原的受体表达;(ii)HLA呈递或其缺乏;(iii)对肿瘤微环境的抗性;(iv)诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;(iv)靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;(v)对例如化学疗法等治疗的抗性;和(vi)归巢、存留和细胞毒性改善。

[0048] 在特定实施例中,双特异性或多特异性接合体对通用表面触发受体具有特异性,且对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。在一些实施例中,肿瘤特异性抗原包含CD19、CD20、CD30、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2和CEA中的一种或多种。在特定实施例中,来源特异性免疫细胞的治疗属性包含以下中的一种或多种:(i)靶向抗原的受体表达;(ii)HLA呈递或其缺乏;(iii)对肿瘤微环境的抗性;(iv)诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;(iv)靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;(v)对例如化学疗法等治疗的抗性;和(vi)归巢、存留和细胞毒性改善。

[0049] 特定实施例包含在将一种或多种遗传印记引入iPSC之前,使多能干细胞与包含MEK抑制剂、GSK3抑制剂和ROCK抑制剂的组合物接触,以接种和扩增所述细胞。

[0050] 在特定实施例中,表面触发受体是造血谱系细胞(包含T、NK、NKT、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)所通用的。在某些实施例中,通用的表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域,其中所述抗抗原决定基对双特异性或多特异性接合体具有特异性。

[0051] 在一些实施例中,共刺激域包含IL2。

[0052] 在特定实施例中,双特异性或多特异性接合体对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。

[0053] 在一些实施例中,造血谱系细胞包含永久性生血内皮细胞、造血干细胞和祖细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。在一些实施例中,T细胞包含T调控细胞(Treg)、中枢记忆T细胞(Tcm)、干细胞记忆细胞(Tscm)和/或效应子记忆T细胞(Tem)。在特定实施例中,NK细胞包含适应性NK细胞。

[0054] 在特定实施例中,造血谱系细胞包含针对表面受体的一种或多种双特异性或多特异性接合体。在一些实施例中,双特异性或多特异性接合体a)是造血谱系细胞类型所特有的,且其中所述接合体对包含CD3、CD16、CD64或CD89的表面受体具有特异性;或b)与造血谱系细胞类型无关,其中所述造血谱系细胞包含通用表面触发受体,且其中所述接合体对通用表面触发受体具有特异性。

[0055] 特定方面是关于治疗需要细胞疗法的受检者的方法,包含投与治疗上足够数目个T细胞祖细胞,所述祖细胞由诱导多能干细胞(iPSC)分化而得。在一些实施例中,受检者(i)是骨髓或干细胞移植候选者,或所述受检者已接受化学疗法或辐射疗法;(ii)已接受骨髓消融或非骨髓性化学疗法或辐射疗法;(iii)患有过度增生性病症或造血系统癌症;(iv)患有实体肿瘤;或(v)患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病;其中所投与的T细胞祖细胞使胸腺复苏且在活体内重建T细胞。在一些实施例中,治疗需要细胞疗法的受检者的方法进一

步包含投与包含双特异性或多特异性接合体的医药组合物,其中双特异性或多接合体a)是效应细胞类型所特有的,且其中所述接合体对包含CD3、CD16、CD64或CD89的表面受体具有特异性;或b)与效应细胞类型无关,且其中所述接合体对T祖细胞和由其衍生的T细胞中所包含的通用表面触发受体具有特异性。在一些实施例中,来自来源特异性免疫细胞的遗传印记包含以下中的一种或多种:(i)靶向抗原的受体表达;(ii)HLA呈递或其缺乏;(iii)对肿瘤微环境的抗性;(iv)诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;(iv)靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;(v)对例如化学疗法等治疗的抗性;和(vi)归巢、存留和细胞毒性改善。

[0056] 还提供一种医药组合物,其包含医药学上可接受的介质,和治疗特性增强的使用本文所述方法产生的造血谱系细胞中的一种或多种。治疗特性增强的这些造血谱系细胞包括永久性生血内皮细胞、造血干细胞和祖细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞或B细胞。在一些实施例中,T细胞包含T调控细胞(Treg)、中枢记忆T细胞(Tcm)、干细胞记忆细胞(Tscm)和/或效应子记忆T细胞(Tem)。在一些实施例中,NK细胞包含适应性NK细胞。另外提供上述医药组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入适于过继性细胞疗法的受检者来实现,其中所述受检者患有自体免疫病症;血液恶性疾病;实体肿瘤;癌症;或与HIV、RSV、EBV、CMV、腺病毒或BK多瘤病毒相关的感染。

[0057] 本发明的另一方面提供一种抗体组合物,其包含一种或多种对选自以下的至少一种标记具有特异性的抗体:CCR10、CD164、CD95、CD144、CD166、淋巴毒素 β 受体、CD252、CD55、CD40、CD46、CD340、CD119、CD106、CD66a/c/e、CD49d、CD45RB、DLL4、CD107a、CD116、CD324、CD123、CD49f、CD200、CD71、CD172a、CD21、CD184、CD263、CD221、Notch 4、MSC、CD97、CD319、CD69、CD338、平足蛋白(Podoplanin)、CD111、CD304、CD326、CD257、CD100、CD32、CD253、CD79b、CD33、CD83、GARP、CD183、CD357、CD31、CD165、CD102、CD146、CD49c、CD13、CD58、整合素 $\alpha 9\beta 1$ 、CD51、CD10、CD202b、CD141、CD49a、CD9、CD201、CD47、CD262、CD109、CD39、CD317、CD143、整合素 $\beta 5$ 、CD105、CD155、SSEA-4和CD 93;其中所述用于鉴别永久性生血内皮细胞。在一个实施例中,抗体组合物包含对CD93具有特异性的抗体;其中与特异性针对CD93的抗体结合的细胞具有CD34⁺、CD43⁻、CD73⁻、CXCR4⁻和CD73-CXCR4⁻表型中的一种或多种。

[0058] 本发明的又一个方面提供一种鉴别多能干细胞分化的永久性生血内皮细胞的方法,包含(i)获得经历分化的细胞群;(ii)将特异性针对CD93的抗体引入所述细胞群中;和(iii)鉴别出CD93表达水平小于1%的细胞群。在一些实施例中,经历分化的细胞群包含CD34⁺或CD34⁺CD43⁻细胞。在一些实施例中,所述方法进一步包含从经历分化的细胞群中分离出CD34⁺细胞;或从经历分化的细胞群中分离出CD34⁺CD43⁻细胞。

[0059] 另外提供一种产生多能干细胞源永久性生血内皮细胞的方法,包含:在包含Wnt路径促效剂的培养基中培养具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的多能干细胞源中胚层细胞,以获得永久性HE细胞。相较于在Wnt路径活化剂不存在下培养,在Wnt路径活化剂存在下获得永久性HE使细胞群中的HE数目和百分比增加;改善HE分化效能;且/或改善HE细胞含量。在一些实施例中,所述培养基进一步包含ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和选自自由以下组成的组的细胞因子:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,iPSC包含如上文所述的一种或多种遗传印记,是保留于多能干细胞源永久性HE中。

[0060] 本发明的特定方面是针对用本文所述方法产生的抗原特异性iPSC或衍生的造血谱系细胞。本发明的某些方面是关于包含抗原特异性iPSC或用本文所述方法产生的衍生造血谱系细胞的组合物。本发明的一些方面是关于医药组合物,其包含抗原特异性iPSC或用本文所述方法产生的衍生造血谱系细胞和医药学上可接受的介质。

[0061] 本文还提供一种产生抗原特异性诱导多能干细胞(iPSC)和衍生造血谱系细胞的方法,包含:(i)从具有供者、疾病或治疗反应特异性的所选来源中分离出初代抗原特异性T细胞;(ii)将初代抗原特异性T细胞重编程以获得多能干细胞;和(iii)引导所述多能干细胞分化成造血谱系细胞。在一些实施例中,定向分化步骤包含(i)使多能干细胞与包含BMP路径活化剂和任选存在的bFGF的组合物接触,以获得中胚层细胞;和(ii)使所述中胚层细胞与包含BMP路径活化剂、bFGF和WNT路径活化剂的组合物接触,以获得具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的中胚层细胞,而无需形成类胚胎体。在一些实施例中,经分离的初代抗原特异性T细胞如下富集:(i)将初代抗原特异性T细胞与表现所关注抗原的肿瘤细胞、未转化细胞、树突状细胞、胸腺上皮细胞、内皮细胞或人工抗原呈递细胞、血浆颗粒或表达所关注抗原的肽共培养;或使用特异性针对所关注抗原的T细胞受体特异性结合剂分选出初代抗原特异性T细胞。在一些实施例中,所述初代抗原特异性T细胞或经富集的初代抗原特异性T细胞可以使用转录因子或小分子调节以使细胞复苏。

[0062] 本发明的特定方面是针对用本文所述方法产生的抗原特异性iPSC或衍生的造血谱系细胞。本发明的某些方面是关于包含抗原特异性iPSC或用本文所述方法产生的衍生造血谱系细胞的组合物。本发明的一些方面是关于医药组合物,其包含抗原特异性iPSC或用本文所述方法产生的衍生造血谱系细胞和医药学上可接受的介质。

[0063] 在一些实施例中,用上述方法获得的抗原特异性多能干细胞可以在重编程期间或之后进一步进行基因工程改造,以通过基因组插入、缺失或取代来包括包含一种或多种基因修饰模式的遗传印记。在一些实施例中,所述基因修饰模式包含以下中的一种或多种:安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶候选物;传递二级或三级抗原特异性的细胞表面蛋白质;或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。在一些实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:(i)B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;(ii)HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加。在一些实施例中,双特异性或多特异性接合体是造血谱系细胞类型所特有的,因而,所述接合体对选自CD3、CD16、CD64或CD89的表面受体具有特异性。在一些实施例中,表面触发受体是造血谱系细胞(包含T、NK、NKT、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)所通用的。在一些实施例中,双特异性或多特异性接合体与造血谱系细胞类型无关,并且能够与包含匹配通用表面触发受体的造血谱系细胞偶联。在一些实施例中,通用表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域,其中所述抗抗原决定基对双特异性或多特异性接合体中所包含的抗原决定基具有特异性。在一些实施例中,通用表面触发受体的共刺激域包含用于同源或非同源细胞活化和/或效应细胞功能强化的完整或部分IL2。在一些实施例中,双特异性或多特异性通用接合体对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。在一些实施例中,肿瘤特异性抗原包含CD19、CD20、CD30、EGFR、HER2/

ERBB2/neu、EPCAM、EphA2和CEA中的一种或多种。在一些实施例中,双特异性或多特异性接合体对通用表面触发受体具有特异性,且对肿瘤细胞表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。

[0064] 在一些实施例中,抗原特异性iPSC源造血谱系细胞包含永久性生血内皮细胞(HE)细胞、造血干细胞和祖细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞和/或嗜中性粒细胞。

[0065] 本发明的另一方面提供一种测定诱导多能干细胞和其衍生细胞的克隆性的方法。所述通用方法包含将成熟来源T或B细胞重编程以获得诱导多能干细胞(iPSCs);和检测特异性V(D)J重组在iPSCs或由其衍生的造血谱系细胞中的存在,所述重组与用于产生iPSC的成熟T或B细胞中所包含的相同。在一些实施例中,上述方法进一步包含分离出包含与成熟来源T或B细胞相同的V(D)J重组的iPSCs或造血谱系细胞。在一些实施例中,上述方法包含在将来源细胞重编程之前,获得成熟来源T或B细胞用于重编程;和测定对成熟来源T或B细胞具有特异性的免疫球蛋白(Ig)或T细胞受体(TCR)中所包含的V(D)J重组。

[0066] 本发明的仍又一方面提供一种活体内追踪细胞疗法中的过继性细胞的方法,所述方法包含:从接受供治疗用的过继性细胞的受检者中获得血液、组织或肿瘤活检样品;分离出所述样品中的效应细胞;和测定所述效应细胞中的V(D)J重组;其中所述过继性细胞衍生自成熟来源T或B细胞重编程而得的多能干细胞;其中所述成熟来源T或B细胞包含特异性V(D)J重组;且其中与成熟来源T或B细胞相同的V(D)J重组的存在表示过继性细胞归巢、存留和/或扩增。

[0067] 还提供一种医药组合物,其包含医药学上可接受的介质,和使用上述方法所产生的抗原特异性造血谱系细胞中的一种或多种,包括永久性生血内皮细胞、造血干细胞和祖细胞(HSC)、造血多潜能祖细胞(MPP)、前T细胞祖细胞、前NK细胞祖细胞、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞或B细胞。在一些实施例中,T细胞包含T调控细胞(Treg)、中枢记忆T细胞(Tcm)、干细胞记忆细胞(Tscm)和/或效应子记忆T细胞(Tem)。在一些实施例中,NK细胞包含适应性NK细胞。另外提供上述医药组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入适于过继性细胞疗法的受检者来实现,其中所述受检者患有自体免疫病症;血液恶性疾病;实体肿瘤;癌症;或与HIV、RSV、EBV、CMV、腺病毒或BK多瘤病毒相关的感染。

[0068] 总之,本发明提供不通过由多能干细胞产生类胚胎体便能实现单层中的多能干细胞直接分化的方法和组合物,借此实现中胚层细胞、永久性HE和永久性HSCs的分化和扩增,从而能够以可扩展的可靠方式、以非常高的效率水平获得其它造血谱系细胞。

附图说明

[0069] 图1描绘了用于使诱导多能干细胞(iPSCs)造血分化成永久性生血内皮细胞(iHE)和多潜能祖细胞(iMPP)的多阶段培养方法的示意图。应注意,通过用Matrigel™替换玻璃连结蛋白,可以将培养物转变成被充分限定的。

[0070] 图2描绘了使诱导多能干细胞造血分化成T细胞祖细胞(ipro-T)和完全分化T(iT)细胞的多阶段培养方法的示意图。应注意,通过用Matrigel™替换玻璃连结蛋白,可以将培养物转变成被充分限定的。

[0071] 图3描绘了使诱导多能干细胞造血分化成NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 和完全分化NK (iNK) 细胞的多阶段培养方法的示意图。应注意,通过用Matrigel™替换玻璃连结蛋白,可以将培养物转变成被充分限定的。

[0072] 图4A-C描绘了流动式细胞测量曲线,其描绘10天时程期间的iHE出现以及iCD34和iHE细胞的输出(根据iPSC分化)。计算是基于代表性培养物而非优化培养物的快照。

[0073] 图5A-D描绘了方案的修改,包括接种密度和生长因子滴定,以改善第10天的HE输出。A) 第0天的接种密度影响第10天的HE群体。B) 第2天-第6天的BMP4浓度影响第10天的HE群体。C) 第3.75天的CHIR浓度影响第10天的HE群体。D) 第6天的接种密度影响第10天的HE群体。

[0074] 图6A-B表明第10天HE代表了具有多潜能且依赖于Notch信号传导路径的永久造血。A) 7天MPP分析期间的形态变化,和新出现的CD45造血细胞的流动式细胞测量曲线。B) iPSC源CD34+细胞在iMPP分析期间生成Notch依赖性永久性CD45+细胞。

[0075] 图7A-B描绘了低氧条件下的分化对iHE和iMPP造血祖细胞生成的影响。A) 低氧下的单层分化使iCD34阳性细胞和iHE细胞的百分比在第10天均增加。B) 第10天,低氧条件下产生的iCD34+HE细胞可以在iMPP分析中进一步分化。

[0076] 图8A-D表明分选出的第10天iCD34细胞低温保存和维持泛造血和淋巴潜能的能力。A) 低温保存的第10天iCD34细胞当解冻时能够存活且展现与新鲜iCD34+细胞相似的表型。B) 低温保存的在第10天分选出的CD34+细胞刚解冻之后的活力。C) 低温保存的在第10天分选出的iCD34+细胞能够在iMPP分析期间存活且生成CD45+造血细胞。D) 低温保存的在第10天分选出的iCD34+细胞能够存活且生成iT和iNK淋巴祖细胞。

[0077] 图9A-B表明第10天分化培养物能够在环境温度下装运整夜而不会出现HE潜能损失。A) 第7天的培养物在培育箱中维持(对照)或加以处理以便整夜装运,随后再引入培育箱中维持接下来的额外两天。然后分析培养物(均在第10天)中的iCD34和iHE细胞的存在。在整夜装运的培养物中,T型瓶含有30%培养基和70%基质或100%培养基。B) 计算细胞数目。

[0078] 图10A-C描绘了早期CD34+CD7+T细胞祖细胞和使用CD45+CD56- 筛选策略、由hiPSCs衍生的成熟CD4+和CD8+T细胞亚群。A) 早期T细胞谱系标记标示着如通过CD34+/CD7+定义的ipro-T细胞的存在。B) 成熟T细胞标记标示着如通过CD4+或CD8+细胞定义的成熟T细胞的存在。C) 5天T细胞分化,从而比较来自脐带血的CD34阳性细胞与iCD34阳性细胞产生ipro-T细胞的潜能。

[0079] 图11A-C描绘了早期CD56+CD7+CD161+NK细胞祖细胞和使用CD45+筛选策略、由hiPSCs衍生的成熟CD56+CD16+CD8+NK细胞亚群。A) 早期NK谱系标记标示着如通过CD7和CD56定义的ipro-NK细胞的存在。B) 成熟NK谱系标记标示着如通过CD57、CD16、CD94和CD56定义的成熟NK细胞的存在。C) 5天NK细胞分化,从而比较来自脐带血的CD34阳性细胞与iCD34阳性细胞产生ipro-NK细胞的潜能。

[0080] 图12A-C描绘了单层hiPSC造血分化平台,其实现了在EB形成期间未发现的可扩展扩增策略。A. hiPSCs聚集而形成类胚胎体且分化14天,随后分析CD34和43表达。B. hiPSCs作为单层接种且分化8天,随后分析CD34、CD43、CXCR4和CD73。C. 对CD34阳性细胞计数且针对单层和EB介导的造血分化,相对于时间作图。

[0081] 图13描绘了用于产生现货iNK和iT细胞的单层hiPSC造血分化平台的可扩展扩增

策略的示意图。计算是基于代表性培养物而非优化培养物的快照。

[0082] 图14表明hiPSC源CD34阳性细胞通过抑制CD3+T细胞存活而具有免疫调节特性。

[0083] 图15描绘了使用CD45+CD56- 筛选策略进行HE分离后第30天,由hiPSCs衍生的成熟CD4+和CD8+T细胞亚群。

[0084] 图16表明基于饲养层的悬浮培养物支持iCD34源NK细胞的成熟。

[0085] 图17表明iCD34源iNK能够响应于细胞因子刺激,以便按照类似于周边血液NK细胞的方式分泌促炎性细胞因子。

[0086] 图18表明衍生自脐带血CD34阳性细胞的原NK细胞的无基质分化比使用CD45+筛选策略的基于基质的传统分化平台更快。

[0087] 图19:iPSC源iCD34+细胞向NK细胞的无基质分化。培养板结合的DLL4支持CD56+CD7+CD161+NK细胞祖细胞的分化,而非CD11b+骨髓细胞的分化。

[0088] 图20描绘了UCB CD34+细胞向T细胞的无基质分化。

[0089] 图21描绘了iPSC源iCD34+细胞向T细胞的无基质分化。

[0090] 图22描绘了hiPSC源iCD34+细胞的移植。

[0091] 图23A-B表明iPSC源NK细胞响应于细胞刺激以分泌促炎性细胞因子且具有类似于周边血液和脐带血NK细胞的细胞毒性功能。A.iPSC源(iNK)或周边血液源(pbNK)NK细胞未经刺激(US)或按照1:1比率经饲养细胞刺激4小时,然后收集且针对CD45、CD56和TNF- α 加以染色并且通过流式细胞术加以分析。B.每2个小时评估效应子:靶细胞比率为1:1、3:1和10:1的细胞毒性功能iNK或脐带血源(CBNK)细胞,历时90个小时。

[0092] 图24描绘了将CAR-T细胞重编程为iPSCs(TiPSCs),根据对经FTV106转导的T细胞所衍生的iPSCs中的CAR(FTV106)整合进行的PCR分析,所述iPSCs保留来源T细胞的相同遗传印记。

[0093] 图25描绘了使用CD34+CD43- 筛选策略对hiPSC源CD34+细胞进行的细胞表面抗体筛选,和hiPSC源CD34+抗体筛选工作流程,其描绘三次独立分类的代表性结果。I类标记物包括hiPSC源CD34+细胞上的表达<1%的细胞表面蛋白质。II类标记物包括CD34+细胞上的表达为1%-99%的细胞表面蛋白质。III类标记物包括CD34+细胞上的表达>99%的细胞表面蛋白质。

[0094] 图26描绘了分析中所包括的针对hiPSC源CD34+细胞上表达的细胞表面蛋白质的抗人类抗体。

[0095] 图27描绘了CD34+群体内的CD93标记的表达;和CD34+细胞的CD34+CD93-和CD34+CD93+部分中的CXCR4和CD73的表达。

[0096] 图28A-B表明CD93-部分中存在CD34+群体的永久性造血潜能。A.CD34+CD93-群体10天分化成iNK细胞之后,评估CD45+造血细胞和CD45+CD7+淋巴祖细胞的绝对数目。B.另外10天的iNK分化之后,根据CD56和NKp30标记的表达来评估培养物中的iNK细胞的存在。

[0097] 图29A-B表明WNT信号传导的调节使iCD34细胞输出量改善。A.第6天细胞培养物在GSK3抑制剂CHIR99021(Wnt促效剂)或IWP2(WNT抑制剂)存在下分化。B.CHIR99021使表型CD34+CD43-CD93-HE的数目和百分比增加。

[0098] 图30A-B表明WNT信号传导的调节使iCD34细胞向泛造血和淋巴的输出量改善。A.CHIR99021使经调节的HE产生CD45+细胞增加。B.CHIR99021使经调节的HE产生NK祖细胞

增加。

[0099] 图31表明iPSC中缺失B2-微球蛋白(B2M)导致HLA I类基因的表达缺乏。

[0100] 图32A-D表明HLA I类剔除型iPSCs分化成iCD34 HE且能够进一步分化成泛造血和淋巴祖细胞。A. B2M^{-/-} iPSC和野生型iPSC分化10天而产生HE。B. B2M^{-/-} iPSCs能够按照与野生型对照相似的频率分化成CD34⁺ HE。C. B2M^{-/-} HE能够按照与野生型HE相似的效率生成CD45⁺ 泛造血祖细胞。D. B2M^{-/-} iPSC源HE细胞能够按照与野生型HE相似的效率生成iNK祖细胞。

[0101] 图33表明由B2M^{-/-} iPSC分化成的CD34⁺ CD43⁻ HE仍呈HLA I类剔除型。

[0102] 图34A-B表明iPSC上的HLA I类的调节使免疫胜任型接受者中的iPSC的存留增强。A. 经转导、经HLA修饰的iPSCs在细胞表面上表达HLA-E且维持多能表型。B. B2M^{-/-} HLA-E iPSC注射后72小时,活体内畸胎瘤荧光素成像,其表明存留相较于野生型iPSC增强。

[0103] 图35表明来自B2M^{-/-} HLA-E iPSCs的D10 (CD34⁺ CD43⁻ HE细胞) 和D17 (CD45⁺ 泛造血祖细胞) 分化细胞中保留了HLA-E表达。

[0104] 图36A-C表明HLA I类调节iPSC能够生成功能CD34⁺ HE。A. 表明B2M^{-/-} HLA-E iPSC能够按照与野生型对照相似的频率分化成CD34⁺ HE。B. 表明B2M^{-/-} HLA-E iPSC能够按照与野生型对照相当的数目分化成CD34⁺ HE。C. B2M^{-/-} HLA-E HE能够按照与野生型HE相似的效率生成CD45⁺ 泛造血祖细胞。

[0105] 图37A-B表明经基因工程改造以表达高亲和力CD16受体和41BBL共刺激分子的iPSC在分化成iCD34细胞的整个期间保持表达。A. 第0天未分化细胞;B. 第10天分化细胞。

[0106] 图38A-B表明经基因工程改造以表达CD19嵌合抗原受体(CAR)和截断的LNGFR细胞表面标记物作为CAR的共识别标志的iPSC在分化成iCD34细胞期间保持表达。A. 第0天未分化细胞;B. 第10天分化细胞。

[0107] 图39描绘了由内源TCR启动子驱动的CAR的细胞类型特异性表达,和因CAR的基因座特异性插入而引起TCR的表达和功能基因敲除。

[0108] 图40A-B描绘了现成的靶向策略用于使癌症和其它疾病靶细胞与整个效应子谱系接合。A. 由iPSCs衍生的造血效应细胞的图解说明,其中相应的谱系特异性触发分子能够与识别特定靶细胞的接合体偶联。B. 对通用接合体(特异性和谱系无关型触发分子,包含特异性抗抗原决定基接合体)进行工程改造的图解说明,所述通用接合体在所有衍生的造血细胞上受到普遍的表达。

[0109] 图41表明经基因工程改造以表达HACD16受体的iPSC在直至分化成iNK细胞的第20天期间保持表达。

具体实施方式

[0110] 本发明大体上涉及用于使干细胞向永久性造血细胞命运分化的方法和组合物。更具体地说,本发明提供一种多阶段分化平台,其中能够在发育的不同阶段诱导iPSC或iPSC源细胞呈现永久性造血表型,范围为永久性生血内皮细胞到完全分化的造血细胞,包括T细胞、B细胞、NKT细胞和NK细胞。即,本发明提供用于使细胞更容易呈现永久性造血命运(例如CD34⁺ 永久性造血干细胞)的方法和组合物。或者,本发明的方法和组合物按照可扩展的方式、通过避免形成EBs或聚集体来使未处理iPSCs生成永久性生血内皮细胞(HE)。

[0111] A. 定义

[0112] 除非另有定义, 否则本文使用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解相同的含义。为了本发明的目的, 以下术语定义如下。冠词“一 (a/an/the)”在本文中用来指所述冠词的一个或超过一个 (即, 至少一个) 语法对象。举例来说, “一成分”意味着一个成分或超过一个成分。

[0113] 替代方案 (例如“或”) 的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。

[0114] 术语“和/或”应理解为意指替代方案中的一个或两个。

[0115] 如本文所使用, 术语“约”或“大约”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度与参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度相比, 变化多达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在一个实施例中, 术语“约”或“大约”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的范围, 所述范围为参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 或 $\pm 1\%$ 。

[0116] 如本文所使用, 术语“实质上”或“基本上”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度为参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高。在一个实施例中, 术语“基本上相同”或“实质上相同”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度的范围与参考数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度大约相同。

[0117] 如本文所用, 术语“实质上不含”与“基本上不含”可互换地使用, 且当用于描述组合物 (例如细胞群或培养基) 时, 指不含所指定物质或其来源的组合物, 例如95%不含、96%不含、97%不含、98%不含、99%不含所指定物质或其来源, 或检测不到, 如通过传统方式所测量。术语组合物中“不含”或“基本上不含”某种成分或物质也意指 (1) 所述组合物中不包括任何浓度的此类成分或物质, 或 (2) 所述组合物中包括功能上呈惰性、但处于低浓度的此类成分或物质。类似含义可以应用于术语“缺乏”, 其是指组合物中缺乏特定物质或其来源。

[0118] 如本文所使用, 术语“明显的”是指容易通过一种或多种标准方法检测出的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度或事件的范围。术语“不明显的”和等效术语是指标准方法不容易检测到或检测不到的数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺度、尺寸、量、重量或长度或事件的范围。在一个实施例中, 如果一个事件发生的机会小于5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、0.001%或更短, 那么其是不明显的。

[0119] 在通篇本说明书中, 除非上下文另外要求, 否则“包含 (comprise/comprises/comprising)”一词应理解成暗指包括所述步骤或成分或一组步骤或成分, 但不排除任何其它步骤或成分或一组步骤或成分。在特定实施例中, 术语“包括”、“具有”、“含有”和“包含”同义地使用。

[0120] “由……组成”意指包括并且局限于短语“由……组成”之后的任何事物。因此, 短语“由……组成”表示所列成分为需要或必需的, 并且不能存在其它成分。

[0121] “基本上由……组成”意指包括短语后所列的任何成分, 并且局限于不干扰或影响本公开中针对所列成分所指定的活性或作用的其它成分。因此, 短语“主要由……组成”表

示所列成分为需要或必需的,但其它成分是任选存在的且视其是否影响所列成分的活性或作用而定,可以或可以不存在。

[0122] 通篇本说明书中提及“一个实施例”、“一实施例”、“特定实施例”、“相关实施例”、“某一实施例”、“额外实施例”或“另一实施例”或其组合意指结合实施例所述的具体特点、结构或特征包括于本发明的至少一个实施例中。因此,通篇本说明书中的各处出现的前述短语不一定都指同一实施例。另外,在一个或多个实施例中,具体特点、结构或特性可以任何适合方式组合。

[0123] 术语“活体外”一般是指在生物体外部发生的活动,例如在生物体外部的人工环境中、在活组织中或活组织上进行的实验或测量,优选为天然条件的改变最小。在特定实施例中,“活体外”程序涉及从生物体中获取活细胞或组织且在实验室装置中培养、通常在无菌条件下典型地培养几小时或长达约24小时,但包括长达48或72小时或更长,此视情况而定。在某些实施例中,可以收集和冷冻此类组织或细胞,且日后解冻以便进行活体外处理。持续时间长于几天的使用活细胞或组织的组织培养实验或程序典型地被视为“试管内”,但在某些实施例中,这个术语可以与活体外互换使用。

[0124] 术语“活体内”一般是指在生物体内部进行的活动。

[0125] 如本文所用,术语“原条”是指早期胚胎结构,其标志是原肠胚开始形成或三种胚层的形成:中胚层、内胚层和外胚层。

[0126] 如本文所用,术语“中胚层”是指三种胚层之一,其出现于早期胚胎发生期间且产生各种特化细胞类型,包括循环系统的血细胞、肌肉、心脏、真皮、骨骼和其它支持和结缔组织。

[0127] 如本文所用,术语“永久性生血内皮细胞”(HE)或“多能干细胞源永久性生血内皮细胞”(iHE)是指在称为内皮细胞向造血细胞转变的过程中产生造血干细胞和祖细胞的内皮细胞亚群。胚胎中的造血细胞发育依序进行:从侧板中胚层到成血管细胞到永久性生血内皮细胞和造血祖细胞。

[0128] 如本文所用,术语“造血干细胞”或“永久性造血干细胞”是指能够产生成熟骨髓和淋巴细胞类型(包括T细胞、自然杀手细胞和B细胞)的CD34⁺干细胞。

[0129] 如本文所用,术语“重编程”或“去分化”或“提高细胞效能”或“提高发育效能”是指一种提高细胞效能或使细胞脱分化成低分化状态的方法。举例来说,相较于非重编程状态下的相同细胞,细胞效能增加的细胞具有更大的发育可塑性(即,能分化成更多细胞类型)。换句话说,重编程细胞是分化状态比处于非重编程状态下的相同细胞弱的细胞。

[0130] 如本文所用,术语“分化”是未特化(“未专门化”)或弱特化细胞借以获得特化细胞(例如血细胞或肌肉细胞)的特点的过程。分化细胞或分化诱导细胞是已处在细胞谱系内的更特化(“专门化”)位置的细胞。术语“专门化”当应用于分化过程时,是指一种细胞,其在分化路径中已经行进到在正常情形下其将继续分化成特定细胞类型或细胞类型的亚群且在正常情形下其不能分化成不同细胞类型或恢复为更弱分化细胞类型的时刻。

[0131] 如本文所用,术语“分化标记基因”或“分化基因”是指其表达指示细胞(例如多能细胞)内发生细胞分化的基因。分化标记基因包括(但不限于)以下基因:FOXA2、FGF5、SOX17、XIST、NODAL、COL3A1、OTX2、DUSP6、EOMES、NR2F2、NR0B1、CXCR4、CYP2B6、GATA3、GATA4、ERBB4、GATA6、HOXC6、INHA、SMAD6、RORA、NIPBL、TNFSF11、CDH11、ZIC4、GAL、SOX3、

PITX2、APOA2、CXCL5、CER1、FOXQ1、MLL5、DPP10、GSC、PCDH10、CTCF、PCDH20、TSHZ1、MEGF10、MYC、DKK1、BMP2、LEFTY2、HES1、CDX2、GNAS、EGR1、COL3A1、TCF4、HEPH、KDR、TOX、FOXA1、LCK、PCDH7、CD1D、FOXG1、LEFTY1、TUJ1、T基因 (Brachyury)、ZIC1、GATA1、GATA2、HDAC4、HDAC5、HDAC7、HDAC9、NOTCH1、NOTCH2、NOTCH4、PAX5、RBPJ、RUNX1、STAT1和STAT3。

[0132] 如本文所用,术语“分化标记基因谱”或“分化基因谱”、“分化基因表达谱”、“分化基因表达标志”、“分化基因表达图”、“分化基因图”或“分化基因标志”是指多种分化标记基因的表达或表达水平。

[0133] 如本文所用,术语“效能”是指可进入细胞的所有发育选项的总和(即,发育效能)。连续的细胞效能包括(但不限于)分化全能细胞、多能细胞、多潜能细胞、寡能细胞、单能细胞和终末分化细胞。

[0134] 如本文所用,术语“多能”是指细胞形成身体或躯体(即,胚胎本身)的所有谱系的能力。举例来说,胚胎干细胞是一种类型的多能干细胞,其能够形成三种胚层中的每一种的细胞:外胚层、中胚层和内胚层。多能是一种连续的发育效能,范围为不能产生完整生物体的不完全或部分多能细胞(例如外胚层干细胞或EpiSC)到能够产生完整生物体的更原始、更多能细胞(例如胚胎干细胞)。

[0135] 如本文所用,术语“诱导多能干细胞”或iPSCs意指由分化的成人、新生儿或胎儿细胞产生的干细胞,所述干细胞已经诱导或改变,即,重编程为能够分化成所有三种胚层或真皮层的组织的细胞:中胚层、内胚层和外胚层。所产生的iPSCs并非指如其在自然界中被发现的那样的细胞。如本文所用的iPSCs包括基因组工程化iPSCs,或由优选供者或患者的免疫细胞重编程的iPSCs,且因此,iPSCs和/或衍生的淋巴效应细胞中包含独特的遗传印记。

[0136] 如本文所用,术语“遗传印记”是指对源细胞或iPSC的优选治疗属性有贡献的遗传或表观遗传信息,并且能保留于源细胞衍生的iPSCs和/或iPSC衍生的造血谱系细胞中。如本文所用,“源细胞”是一种可以用于通过重编程来产生iPSCs的非多能细胞,且源细胞衍生的iPSCs可以进一步分化成特定细胞类型,包括任何造血谱系细胞。源细胞衍生的iPSCs和来自其的分化细胞有时统称为“衍生细胞”,这取决于背景。如本文所用,赋予优选治疗属性的遗传印记是通过使对供者、疾病或治疗反应具有特异性的所选源细胞重编程或通过使用基因组编辑将基因修饰模式引入iPSC来并入iPSCs中。在从特别选择的供者、疾病或治疗背景所获得的源细胞的所述方面中,对优选治疗属性具有贡献的遗传印记可以包括任何背景特有的遗传或表观遗传改造,其显现能保留的表型,即优选的治疗属性,所述表型传递到所选源细胞的衍生细胞,无论潜在分子事件得到鉴别或未得到鉴别。对供者、疾病或治疗反应具有特异性的源细胞可以包含能保留于iPSCs和衍生造血谱系细胞中的遗传印记,所述遗传印记包括(但不限于)预排列的单特异性TCR,例如来自病毒特异性T细胞或恒定型自然杀手T(iNKT)细胞;能追踪且令人期望的遗传多态性,例如对编码所选供者中的高亲和力CD16受体的点突变来说为同型;和预定的HLA需求,即,所选的HLA匹配供者细胞随着群体增大而展现单倍型。如本文所用,优选治疗属性包括衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节、存活率和细胞毒性改善。优选的治疗属性还可以涉及靶向抗原的受体表达;HLA呈递或其缺乏;对肿瘤微环境的抗性;诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;对例如化学疗法等疗法的抗性。

[0137] 如本文所用,术语“增强的治疗特性”是指细胞的治疗特性相较于相同一般细胞类

型的典型免疫细胞增强。举例来说,相较于典型的、未改造的和/或天然存在的NK细胞,具有“增强的治疗特性”的NK细胞将具有增强、改善和/或强化的治疗特性。免疫细胞的治疗特性可以包括(但不限于)细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节、存活率和细胞毒性。免疫细胞的治疗特性也通过以下来显现:靶向抗原的受体表达;HLA呈递或其缺乏;对肿瘤微环境的抗性;诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减小;对例如化学疗法等疗法的抗性。

[0138] 如本文所用,术语“接合体”是指一种分子,例如融合多肽,其能够使免疫细胞(例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞)与肿瘤细胞之间形成连接;且活化所述免疫细胞。接合体的实例包括(但不限于)双特异性T细胞接合体(BiTEs)、双特异性杀手细胞接合体(BiKEs)、三特异性杀手细胞接合体,或多特异性杀手细胞接合体。

[0139] 如本文所用,术语“表面触发受体”是指一种能够触发或起始免疫反应(例如细胞毒性反应)的受体。表面触发受体可以经工程改造,且可以表达于效应细胞上,例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞上。在一些实施例中,表面触发受体促进效应细胞与特定靶细胞(例如肿瘤细胞)之间发生双特异性或多特异性抗体接合,不依赖于效应细胞的天然受体和细胞类型。使用这种方法,可以产生包含通用表面触发受体的iPSCs,且然后使此类iPSCs分化成表达所述通用表面触发受体的各种效应细胞类型的群体。“通用”意指表面触发受体能够表达于任何效应细胞中且活化任何效应细胞,不论细胞类型,且表达通用受体的所有效应细胞能够与表面触发受体可识别的具有相同抗原决定基的接合体偶联或连接,不论接合体的肿瘤结合特异性。在一些实施例中,具有相同肿瘤靶向特异性的接合体用于与通用表面触发受体偶联。在一些实施例中,具有不同肿瘤靶向特异性的接合体用于与所述通用表面触发受体偶联。因而,能够使一种或多种效应细胞类型接合,从而在一些情况下杀死一种特定类型的肿瘤细胞且在一些其它情况下杀死两种或更多种类型的肿瘤。表面触发受体通常包含用于效应细胞活化的共刺激域和对接合体的抗原决定基具有特异性的抗抗原决定基。双特异性接合体对位于一端的表面触发受体的抗抗原决定基具有特异性,且对位于另一端的肿瘤抗原具有特异性。

[0140] 如本文所用,术语“安全开关蛋白质”是指一种工程化蛋白质,其经设计以防止细胞疗法的潜在毒性或以其它方式防止不良效应。在一些情况下,安全开关蛋白质表达受到有条件的控制,以解决所移植的工程化细胞的安全问题,所述细胞已经将编码安全开关蛋白质的基因永久性地并入其基因组中。这种条件性调控可以是可变的且可能包括通过小分子介导的转译后活化和组织特异性和/或按时转录调控来进行控制。所述安全开关能够介导细胞凋亡的诱导、蛋白质合成的抑制、DNA复制、生长阻滞、转录和转录后基因调控,和/或抗体介导的耗竭。在一些情况下,所述安全开关蛋白质被外源分子(例如前药)活化,其活化时,触发治疗细胞发生细胞凋亡和/或细胞死亡。安全开关蛋白质的实例包括(但不限于)自杀基因,例如卡斯蛋白酶9、胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、B细胞CD20、经修饰的EGFR,和其任何组合。在这种策略中,在不良事件情况下投与前药被自杀基因产物活化且杀死经转导的细胞。

[0141] 如本文所用,术语“医药学活性蛋白质或肽”是指能够对生物体实现生物学和/或医药作用的蛋白质或肽。医药学活性蛋白质具有针对疾病的治愈性或姑息性特性,且可以投与以改善、减轻、缓解、逆转或减轻疾病严重度。医药学活性蛋白质还具有预防特性且用

于防止疾病发作或减轻此类疾病或病理性病状在其显现时的严重度。医药学活性蛋白质包括完整蛋白质或肽或其医药学活性片段。其还包括所述蛋白质或肽的医药学活性类似物或所述蛋白质或肽的片段的类似物。术语医药学活性蛋白质还指以协作或协同方式发挥作用以提供治疗效益的多种蛋白质或肽。医药学活性蛋白质或肽的实例包括(但不限于)受体、结合蛋白、转录和转译因子、肿瘤生长抑制蛋白质、抗体或其片段、生长因子和/或细胞因子。

[0142] 如本文所用,术语“信号传导分子”是指调节、参与、抑制、活化、减少或增加细胞信号转导的任何分子。信号转导是指分子信号以化学修饰形式传递,其通过沿着最终触发细胞中的生物化学事件的路径募集蛋白质复合物来实现。信号转导路径在所属领域中是众所周知的,且包括(但不限于)G蛋白偶联受体信号传导、酪氨酸激酶受体信号传导、整合素信号传导、TG点信号传导、配体闸选离子通道信号传导、ERK/MAPK信号传导路径、Wnt信号传导路径、cAMP依赖性路径,和IP3/DAG信号传导路径。

[0143] 如本文所用,术语“靶向模式”是指分子(例如多肽)以遗传方式并入细胞中以促进抗原和/或抗原决定基特异性,包括(但不限于) i) 抗原特异性(当其涉及独特嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)时); ii) 接合体特异性(当其涉及单克隆抗体或双特异性接合体时); iii) 靶向转化细胞; iv) 靶向癌症干细胞,和v) 在缺乏特异性抗原或表面分子的情况下的其它靶向策略。

[0144] 如本文所用,术语“医药学活性蛋白质或肽”是指能够对生物体实现生物学和/或医药作用的蛋白质或肽。医药学活性蛋白质或肽的实例包括(但不限于)抗体或其片段、生长因子和/或细胞因子。

[0145] 如本文所用,术语“信号传导分子”是指调节、参与、抑制、活化、减少或增加细胞信号转导的任何分子。信号转导是指分子信号以化学修饰形式传递,其通过沿着最终触发细胞中的生物化学事件的路径募集蛋白质复合物来实现。信号转导路径在所属领域中是众所周知的,且包括(但不限于)G蛋白偶联受体信号传导、酪氨酸激酶受体信号传导、整合素信号传导、TG点信号传导、配体闸选离子通道信号传导、ERK/MAPK信号传导路径、Wnt信号传导路径、cAMP依赖性路径,和IP3/DAG信号传导路径。

[0146] 如本文所用,与非特异性或非选择性结合相比,术语“特异性”可以用于指分子(例如受体或接合体)能够选择性地结合到靶分子。

[0147] 如本文所用,术语“过继性细胞疗法”是指一种基于细胞的免疫疗法,如本文所用,其是指自体或同种异体淋巴细胞的输注,所述淋巴细胞经鉴别为经遗传改造或未经遗传改造的T或B细胞,其在所述输注之前已在活体外扩增。

[0148] 如本文所用,“治疗上足够的量”在其含义内包括无毒性、但足够和/或有效量的其所提及的特定治疗和/或医药组合物,以提供所期望的治疗效果。所需确切量将因受检者而异,这取决于例如患者总体健康状况、患者年龄和病状分期和严重度等因素。在特定实施例中,治疗上足够的量足以和/或有效减轻、减少和/或改善与所治疗的受检者的疾病或病状相关的至少一种症状。

[0149] 如本文所用,术语“胚胎干细胞”是指胚胎囊胚的内部细胞团块中的天然存在的多能干细胞。胚胎干细胞是多能的且在发育期间生成三种初始胚层的所有衍生细胞:外胚层、内胚层和中胚层。其对胚胎外膜或胎盘没有贡献,即,并非分化全能的。

[0150] 如本文所用,术语“多潜能干细胞”是指具有分化成一种或多种胚层(外胚层、中胚层和内胚层)、但非全部三种胚层的细胞的发育潜能的细胞。因此,多潜能细胞也可以称为“部分分化细胞”。多潜能细胞在所属领域中是众所周知的,且多潜能细胞的实例包括成体干细胞,例如造血干细胞和神经干细胞。“多潜能”表示细胞可以形成指定谱系内的许多类型的细胞,而非其它谱系的细胞。举例来说,多潜能造血细胞能够形成许多不同类型的血细胞(红细胞、白细胞、血小板等),但其不能形成神经元。因此,术语“多潜能性”是指一种细胞状态,其发育潜能的程度小于分化全能和多能。

[0151] 多能干细胞的分化需要改变培养系统,例如改变培养基中的刺激剂或细胞的物理状态。大部分传统策略是使用类胚胎体(EBs)的形成作为起始谱系特异性分化的共同和关键中间步骤。EBs是三维团簇,其已表明可模拟胚胎发育,因为在其三维区域内产生多种谱系。通过分化过程,典型地为几小时到几天,简单的EBs(例如经诱发可分化的聚集多能干细胞)继续成熟且发育成囊性EB,此时,典型地进一步将其处理数日到几周以继续分化。EB形成是通过使多能干细胞彼此紧密接近地形成三维多层细胞团簇来起始,这典型地是通过若干种方法之一来实现,包括允许多能细胞在液滴中沉降、使细胞在“U”形底孔板中沉降或通过机械搅拌。为了促进EB发育,多能干细胞聚集体需要进一步分化提示,原因是多能培养维持性培养基中所维持的聚集体不形成适当EBs。因而,多能干细胞聚集体需要转移到分化培养基中,所述分化培养基向所选谱系提供诱发提示。通过在EB细胞团簇内适度增殖,基于EB的多能干细胞培养典型地引起分化细胞群(外胚层、中胚层和内胚层胚层)生成。虽然经证实可促进细胞分化,然而,EBs产生了分化状态可变的异质细胞,原因是三维结构中的细胞不一致地暴露于来自环境的分化提示。另外,EBs的产生和维持麻烦。此外,通过EB进行的细胞分化伴随适度细胞扩增,这也导致分化效率降低。

[0152] 相比之下,与“EB形成”不同的“聚集体形成”可以用于扩增多能干细胞源细胞群。举例来说,在基于聚集体的多能干细胞扩增期间,选择可维持增殖和多能性的培养基。细胞增殖通常增加聚集体的尺寸,从而形成更大聚集体,这些聚集体能够用常规的机械或酶方式解离成更小聚集体,从而维持培养物内的细胞增殖且增加细胞数目。不同于EB培养,维持培养的聚集体内所培养的细胞维持多能性标记。多能干细胞聚集体需要进一步分化提示来诱导分化。

[0153] 如本文所用,“单层分化”是关于分化方法的术语,其不同于通过三维多层细胞团簇进行的分化,即,“EB形成”。单层分化以及本文所公开的其它优点避免了分化起始需要EB形成。由于单层培养不模拟胚胎发育,例如EB形成,因此相较于EB中的所有三种胚层分化,向特定谱系的分化被认为是最少的。

[0154] 多能性能够部分地通过评估细胞的多能性特征来确定。多能性特征包括(但不限于):(i)多能干细胞形态;(ii)无限自我更新的潜能;(iii)多能干细胞标记物的表达,所述标记物包括(但不限于)SSEA1(仅小鼠)、SSEA3/4、SSEA5、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素(prominin)、CD140a、CD56、CD73、CD90、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、CD30和/或CD50;(iv)分化成所有三种体细胞谱系(外胚层、中胚层和内胚层)的能力;(v)由三种体细胞谱系组成的畸胎瘤形成;以及(vi)由来自三种体细胞谱系的细胞组成的类胚胎体的形成。

[0155] 此前已描述两种类型的多能性:“激发”或“亚稳定”的多能状态等效于后期囊胚的

外胚层干细胞(EpiSC),且“初始”或“基础”的多能状态等效于早期/植入前囊胚的内部细胞团块。尽管两种多能状态均展现如上文所述的特征,但所述初始或基础状态进一步展现;(i)雌性细胞中的X-染色体的预先不活化或再活化;(ii)在单一细胞培养期间,克隆性和存活率改善;(iii)DNA甲基化总体减少;(iv)发育调控基因启动子上的H3K27me3抑制性染色质标记沉积减少;以及(v)相对于激发状态的多能细胞,分化标记物的表达减少。通常发现细胞再编程标准方法(其中将外源多能性基因引入体细胞中,表达,且然后静默或从所得多能细胞中去除)具有多能性激发状态的特征。在标准多能细胞培养条件下,除非维持外源性转基因表达(其中观察到基础状态的特征),否则此类细胞保持激发状态。

[0156] 如本文所用,术语“多能干细胞形态”是指胚胎干细胞的经典形态特点。正常胚胎干细胞形态的特征是小圆形形状,细胞核与细胞质比率高,明显存在核仁,和典型的细胞间间距。

[0157] 如本文所用,“饲养细胞”或“饲养层”为描述一种类型的细胞的术语,其与第二类型的细胞共培养以提供所述第二类型的细胞能够生长的环境,因为饲养细胞提供支持所述第二细胞类型的生长因子和营养。饲养细胞任选地来自与其支持的细胞不同的物种。举例来说,某些类型的人类细胞,包括干细胞,可以由小鼠胚胎成纤维细胞和永生化小鼠胚胎成纤维细胞的初代培养物支持。饲养细胞当与其它细胞共培养时,可以典型地通过照射或用抗有丝分裂剂(例如丝裂霉素(mitomycin))处理来灭活,以防止其生长超出其支持的细胞。饲养细胞可以包括内皮细胞、基质细胞(例如上皮细胞或成纤维细胞),和白血病细胞。不限于前述,一种特定的饲养细胞类型可以是人类饲养层,例如人类皮肤成纤维细胞。另一饲养细胞类型可以是小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。一般来说,多种饲养细胞能够部分地用于维持多能性、向某种谱系直接分化和促进成熟为特化细胞类型,例如效应细胞。

[0158] 如本文所用,“无饲养层”(FF)环境是指一种环境,例如培养条件、细胞培养物或培养基,其基本上不含饲养层或基质细胞,和/或尚未通过培育饲养细胞加以预调节。“预调节”培养基是指饲养细胞在培养基内已培育一段时间(例如至少一天)之后所收集的培养基。预调节培养基含有多种介体物质,包括在培养基中培育的饲养细胞所分泌的生长因子和细胞因子。

[0159] 如本文所用,术语“受检者”是指任何动物,优选的是人类患者、牲畜或其它驯养动物。

[0160] “多能因子”或“重编程因子”是指一种药剂,其能够单独或与其它药剂组合来增强细胞的发育效能。多能因子包括(但不限于)能够提高细胞发育效能的多核苷酸、多肽和小分子。示例性多能因子包括例如转录因子和小分子重编程药剂。

[0161] “粘附”是指细胞附着到容器上,例如细胞在适当的培养基存在下附着到无菌塑料(或经涂布的塑料)细胞培养皿或瓶上。某些类别的细胞在培养物中不能维持或不能生长,除非其粘附到细胞培养容器上。某些类别的细胞(“非粘附细胞”)在培养物中维持和/或增殖而不发生粘附。

[0162] “培养”或“细胞培养”是指细胞在试管内环境中维持、生长和/或分化。“细胞培养基”、“培养基”(在各种情况下,为单数形式“培养基(medium)”)、“补充剂”和“培养基补充剂”是指培育细胞培养物的营养组合物。

[0163] “培育”或“维持”是指细胞在组织或身体外部(例如在无菌塑料(或经涂布的塑料)

细胞培养皿或烧瓶中)维持、繁殖(生长)和/或分化。“培育”或“维持”可以使用培养基作为有助于细胞繁殖和/或维持的营养、激素和/或其它因子来源。

[0164] 如本文所用,“解离”的细胞是指一种细胞,其与其它细胞或表面(例如培养板表面)已基本上分离或已提纯。举例来说,细胞能通过机械或酶方法从动物或组织解离。或者,试管内聚集的细胞能彼此解离,例如以酶或机械方式解离到团簇、单一细胞或单一细胞与团簇的混合物的悬浮液中。在又一个替代实施例中,粘附细胞从培养板或其它表面解离。因此,解离可以涉及中断细胞与胞外基质(ECM)和底物(例如培养表面)的相互作用,或中断细胞之间的ECM。

[0165] 如本文所用,术语“T淋巴细胞”和“T细胞”可互换使用且可以是任何T细胞,例如培养过的T细胞,例如初代T细胞,或来自培养过的T细胞系的T细胞,例如Jurkat、SupT1等,或从哺乳动物获得的T细胞。T细胞还能够由干细胞或祖细胞分化而得。T细胞可以是CD3+细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞且可以处于任何发育阶段,包括(但不限于)CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如细胞毒性T细胞)、周边血液单核细胞(PBMCs)、周边血液白细胞(PBLs)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TILs)、记忆T细胞、未处理T细胞、调控T细胞、gamma delta T细胞($\gamma\delta$ T细胞)等等。其它类型的辅助T细胞包括例如Th3(Treg)、Th17、Th9或Tfh细胞等细胞。其它类型的记忆T细胞包括例如中枢记忆T细胞(Tcm细胞)、干细胞记忆细胞(Tscm细胞)和效应子记忆T细胞(Tem细胞和TEMRA细胞)等细胞。T细胞还可以指经基因工程改造的T细胞,例如经修饰可表达T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)的T细胞。

[0166] 如本文所用,术语“未处理T细胞”或Tn是指成熟T细胞,不同于活化或记忆T细胞,所述成熟T细胞在周边内尚未遇到其同源抗原。未处理T细胞的共同特征是L-选择素(CD62L)的表面表达;缺乏活化标记物CD25、CD44或CD69;和缺乏记忆CD45RO同功异型物。它们还表达由亚单元IL-7受体- α (CD127)和共同 γ 链(CD132)组成的功能IL-7受体。在未处理状态下,T细胞被认为是静态和未分裂的,恒稳存活机制需要共同 γ 链细胞因子IL-7和IL-15。

[0167] 如本文所用,术语“中枢记忆T细胞”或Tcm是指T细胞的一个子群或亚群,相较于效应子记忆T细胞或Tem,所述子群或亚群具有较低表达或促细胞凋亡信号传导基因,例如Bid、Bnip3和Bad,且具有与运输到二级淋巴器官相关的基因的较高表达,所述基因包括CD62L、CXCR3、CCR7。

[0168] 如本文所用,术语“干记忆T细胞”或“干细胞记忆T细胞”或Tscm是指T细胞的一个子群或亚群,其能够自我更新和生成Tcm、Tem和Teff(效应子T细胞),且表达CD27和淋巴归巢分子,例如CCR7和CD62L,这是介导长期免疫的重要特性。

[0169] 如本文所用,术语“NK细胞”或“自然杀手细胞”是指周边血液淋巴细胞的一个亚群,其根据CD56或CD16的表达和T细胞受体(CD3)的缺乏来定义。如本文所提供,NK细胞还能够由干细胞或祖细胞分化而得。如本文所用,术语“适应性NK细胞”与“记忆NK细胞”可互换且是指NK细胞的一个亚群,其表型为CD3-和CD56+,表达NKG2C和CD57和任选存在的CD16,但缺乏以下一种或多种的表达:PLZF、SYK、Fc ϵ R γ 和EAT-2。在一些实施例中,分离的CD56+NK细胞亚群包含CD16、NKG2C、CD57、NKG2D、NCR配体、NKp30、NKp40、NKp46、活化和抑制性KIRs、NKG2A以及DNAM-1的表达。CD56+可以是较弱或较强的表达。

[0170] 如本文所用,术语“NKT细胞”或“自然杀手T细胞”是指局限于CD1d的T细胞,其表达T细胞受体(TCR)。不同于传统T细胞检测由传统主要组织相容(MHC)分子呈递的肽抗原,NKT细胞识别由CD1d(一种非经典MHC分子)呈递的脂质抗原。目前已识别两种类型的NKT细胞。恒定型或I型NKT细胞表达非常有限的TCR谱系:典型 α 链(人类中为Va24-J α 18)与有限范围的 β 链(人类中为V β 11)的结合。第二个NKT细胞群,称为非经典或非恒定II型NKT细胞,显示更不均匀的TCR $\alpha\beta$ 利用率。I型NKT细胞目前被认为适于免疫疗法。适应性或恒定型(I型)NKT细胞可以根据以下标记物中的至少一种或多种的表达来鉴别:TCR Va24-J α 18、V β 11、CD1d、CD3、CD4、CD8、 α GalCer、CD161和CD56。如本文所提供,NKT细胞还能够由干细胞或祖细胞分化而得。

[0171] 如本文所用,术语“B淋巴细胞”或“B细胞”可互换地使用且是指淋巴细胞的一个亚群,其根据在缺乏T细胞受体(CD3)的情况下、包含免疫球蛋白重链和轻链的B细胞受体(BCR,Ig)CD19或CD20的表达来定义。如本文所提供,B细胞还能够由干细胞或祖细胞通过定向分化而得。B细胞包含B细胞的任何亚型,且可以处于任何发育阶段,包括(但不限于)原B细胞、前B细胞、未处理B细胞、B-1B细胞、B-2B细胞、边缘区B细胞、滤泡性B细胞、记忆B细胞、成浆细胞、浆细胞、调控B细胞。

[0172] B.概述

[0173] 本发明大体上涉及一种使未处理多能细胞分化成非多能细胞或部分分化细胞(包括中胚层细胞、永久性生血内皮细胞、永久性造血干细胞或祖细胞、CD34+细胞、多潜能祖细胞(MPP)(能够分化成骨髓,包括嗜中性粒细胞祖细胞)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞)或完全分化最终造血细胞(例如T细胞、B细胞、NKT细胞或NK细胞)的多阶段方法。本发明还涉及所公开方法中使用的组合物;和使用所公开方法产生的细胞群、细胞系或克隆细胞。

[0174] 与所属领域中使用的方法相比,本发明已经避免了在iPSC分化时形成EB。如所提供,衍生自iPSC的造血谱系细胞如下获得:将克隆iPSC细胞接种于不含TGF β 的培养基中以维持其多能性处于基础或未处理状态,不通过EB形成而使单层形式的克隆iPSCs分化,且利用逐步策略将小化学分子、生长因子和细胞因子的适当组合应用于分化的早期和中期。因而,本发明能够将扩增的克隆iPSC直接转移到呈单层形式的粘附培养物中以便即刻分化而不需要由iPSC形成EB。

[0175] 本发明因此提供能够使干细胞以高效率分化成永久造血和功能造血谱系细胞的培养平台,而不使用TGF β 受体/ALK抑制剂,包括SB431532。另外,不同于此前研究,本发明还提供一种使用无饲养层、无血清条件的培养平台,所述条件支持iPSC的单层培养物直接分化,而不需要由iPSC形成EB或聚集中间体。

[0176] C.培养平台

[0177] 用于培养多能细胞的现有方法很大程度上依赖于饲养细胞或经饲养细胞预调节且含有胎牛血清的培养基;然而,此类环境可能不适用于产生供临床和治疗用途的细胞。举例来说,在此类被外来物污染的环境中培育的细胞一般被认为是不适用于人类细胞移植,因为暴露于动物组分可能存在严重的免疫排斥风险且将不明病原体传递给经治疗的患者,且可能潜在地使动物逆转录病毒再活化。使用无动物培养基的培养系统,例如本文中涵盖的无饲养层环境,有助于制造临床级细胞系,具体地说,hESC、hiPSC,和多能干细胞源HSC、T、B、NKT或NK细胞系。

[0178] 在特定实施例中,无饲养层环境基本上不含人类饲养细胞且未经饲养细胞(包括但不限于)小鼠胚胎成纤维细胞、人类成纤维细胞、角化细胞和胚胎干细胞)预调节。无饲养层细胞培养基适用于培养多能细胞、重编程细胞、多能细胞的单一细胞培养、解离和传代、多能细胞的细胞分选、基础状态的多能细胞的产生、基础状态的多能性的维持、多能细胞分化的诱导。在特定实施例中,无饲养层环境用于诱导多能性、改善重编程效率、增加或维持细胞效能和/或诱导分化。在某些实施例中,无饲养层环境另外实质上不含细胞因子和生长因子,包括bFGF。

[0179] 在本发明的一些方面中,上述iPSC分化的一个或多个阶段可以在无饲养层条件下进行。此类无饲养层条件可以采取包括(但不限于)单层培养和悬浮培养的形式。在本发明的一个实施例中,多能细胞向中胚层细胞的分化是在单层无饲养层条件下进行。在本发明的另一个实施例中,中胚层细胞向永久性生血内皮细胞的分化是在单层无饲养层条件下进行。在本发明的又一个实施例中,永久性生血内皮细胞向造血干细胞的分化是在单层无饲养层条件下进行。在本发明的一个实施例中,永久性造血干细胞向多潜能祖细胞、T细胞祖细胞或NK细胞祖细胞的分化是在无饲养层悬浮条件下进行,或在单层无饲养层条件下、随后在无饲养层悬浮条件下进行。在本发明的另一个实施例中,T细胞祖细胞向完全分化T细胞的分化,或NK细胞祖细胞向完全分化NK细胞的分化,是在无饲养层悬浮条件下进行,或在单层无饲养层条件下、随后在无饲养层悬浮条件下进行。

[0180] 任何适合的容器或细胞培养容器可以用作基础培养基和/或细胞培养补充剂中的细胞培养物的载体。在一些实施例中,然而,培养容器表面经促粘附基质/底物(例如胶原蛋白、纤连蛋白、含RGD多肽、明胶等等)涂布可促进细胞附着,且在特定实施例中,可以增强本文所公开的细胞培养基和补充剂的作用。适用于细胞培养和传代的底物在所属领域中已知且包括(但不限于)玻璃连结蛋白、明胶、层粘连蛋白、纤维结合蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、骨桥蛋白、凝血酶蛋白、天然存在的细胞系产生的基质的混合物(例如Matrigel™),和合成或人造表面,例如多元胺单层和羧基封端的单层。在一些实施例中,提供无饲养层条件包含在经基质涂布的表面上培养细胞。在一个实施例中,本文中涵盖的培养平台包含基质/底物,包含Matrigel™或玻璃连结蛋白。在培养物的一些实施例中,使用Matrigel™,且培养物从而得到完全定义。

[0181] 在本发明的一些方面中,上述iPSC分化的一个或多个阶段可以在无血清条件下进行。商业上可获得的适于细胞附着和/或诱导的无血清培养基的实例包括得自干细胞技术公司(Stem Cell Technologies)(加拿大温哥华(Vancouver,Canada))的mTeSR™1、TeSR™2或StemSpan™、得自ReproCELL(马萨诸塞州波士顿(Boston,MA))的灵长类动物ES/iPS细胞培养基、得自英杰公司(Invitrogen)(加利福尼亚州卡尔斯巴德(Carlsbad,CA))的StemPro®-34、得自英杰公司的StemPro® hESC SFM,和得自龙沙(Lonza)(瑞士巴塞尔(Basel,Switzerland))的X-VIVO™。

[0182] 在其它实施例中,培养平台中的一种或多种培养基是无饲养层环境,且任选地实质上不含细胞因子和/或生长因子。在其它实施例中,细胞培养基含有补充剂,例如血清、提取物、生长因子、激素、细胞因子等等。一般来说,培养平台包含一种或多种阶段特异性无饲养层无血清培养基,其中的每一种进一步包含以下中的一种或多种:营养/提取物、生长因子、激素、细胞因子和培养基添加剂。适合的营养/提取物可以包括例如DMEM/F-12(经杜尔

贝科氏修改的伊格尔氏培养基/营养混合物 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture) F-12), 这是一种广泛使用的基础培养基, 用于支持许多不同哺乳动物细胞的生长; KOSR (敲除式血清置换); L-glut; NEAA (非必需氨基酸)。其它培养基添加剂可以包括 (但不限于) MTG、ITS、BME、抗氧化剂 (例如抗坏血酸)。在一些实施例中, 本发明的培养基包含以下细胞因子或生长因子中的一种或多种: 表皮生长因子 (EGF)、酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、白血病抑制因子 (LIF)、肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子1 (IGF-1)、胰岛素样生长因子2 (IGF-2)、角质细胞生长因子 (KGF)、神经生长因子 (NGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF)、转化生长因子 β (TGF- β)、骨形态生成蛋白 (BMP4)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 转铁蛋白、各种介白素 (例如 IL-1 到 IL-18)、各种群落刺激因子 (例如粒细胞/巨噬细胞群落刺激因子 (GM-CSF))、各种干扰素 (例如 IFN- γ) 和对干细胞具有影响的其它细胞因子, 例如干细胞因子 (SCF) 和红细胞生成素 (EPO)。这些细胞因子可以在商业上获得, 例如得自 R&D Systems (Minneapolis, Minn.), 且可以是天然或重组的。在一些其它实施例中, 本发明的培养基包含以下中的一种或多种: 骨形态生成蛋白 (BMP4)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、血管内皮生长因子 (VEGF)、造血生长因子 (例如 SCF、GM-CSF、G-CSF、EPO、IL3、TPO、EPO)、Fms 相关酪氨酸激酶 3 配体 (Flt3L); 和一种或多种来自白血病抑制因子 (LIF) 的细胞因子 IL3、IL6、IL7、IL11、IL15。在一些实施例中, 生长因子/有丝分裂原和细胞因子的浓度具有阶段和/或细胞类型特异性, 这凭经验确定或根据已确立的细胞因子技术指导。

[0183] 一般来说, 用于分化经诱导多能细胞的技术涉及使用基于多核苷酸、多肽和/或小分子的方法直接或间接地调节特定细胞路径。细胞的发育效能可以通过例如使细胞与一种或多种调节剂接触来调节。如本文所用, “接触” 可以涉及在一种或多种因子 (例如小分子、蛋白质、肽等) 存在下培养细胞。在一些实施例中, 使细胞与一种或多种药剂接触以诱导细胞分化。此类接触可以通过例如在试管内培养期间将一种或多种药剂引入细胞来发生。因此, 接触可以通过将一种或多种药剂引入营养细胞培养基中的细胞中来发生。所述细胞可以在包含一种或多种药剂的培养基中维持足以使细胞实现所期望的分化表型的时间段。在一些其它实施例中, 当一种或多种因子通过载体引入细胞中时, 发生“接触”。在一些实施例中, 一种或多种载体是通过逆转录病毒、仙台病毒 (Sendai virus)、腺病毒、游离基因体、小环、具有表达盒的载体系统或 mRNA 引入。

[0184] 在其它实施例中, 如本文所公开的培养平台中的一种或多种阶段特异性无饲养层无血清培养基进一步包含一种或多种小分子。在一些实施例中, 所述培养平台包含细胞培养基, 所述细胞培养基包含 GSK-3 抑制剂、MEK 抑制剂、Rho 激酶 (ROCK) 抑制剂, 且不包含或不包含 TGF β /活化素信号传导路径的小分子抑制剂, 包括 (但不限于) TGF β 受体或 ALK5 抑制剂。

[0185] 本文中涵盖的培养平台通过使用自发分化减少和/或已实现基础状态的多能性的工业级或临床级多能细胞的均质群体, 还提供了多种优势。在一个实施例中, 均质 iPSC 是在包含 GSK-3 抑制剂、MEK 抑制剂和 Rho 激酶 (ROCK) 抑制剂的组合物中维持; 且所述组合物不含 TGF β 受体/ALK 抑制剂。如本文所用, 术语“均质”是指一种细胞群, 其中每个细胞与群体中的其它细胞相同或实质上相同。在一个实施例中, 如果每个细胞如本文所预期表达相同多能性标记物中的一种或多种, 例如 SSEA4 和 TRA1-81, 那么所述细胞与群体中的其它细胞相同。在一个实施例中, 如果所述细胞的至少 90%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至

少99%或更多与群体中的其它细胞相同或实质上相同,那么所述群体是均质的。

[0186] 在各种实施例中,本文中用于产生造血细胞谱系到永久性生血内皮细胞的培养平台中的细胞培养基不包含或基本上不含TGF β /活化素信号传导路径抑制剂,包括TGF β 受体(TGF β R)抑制剂和ALK5抑制剂。在一个实施例中,所述培养平台包含用于维持未处理hiPSC的接种培养基,所述培养基包含GSK-3抑制剂、MEK抑制剂和Rho激酶(ROCK)抑制剂。不希望受任何特定理论束缚,本发明人发现,虽然TGF β R/ALK5抑制剂提高了重编程效率,但是这些抑制剂抵消了多能细胞群的长期维持、品质和均质性。即,虽然抑制TGF β 路径信号传导改善了细胞重编程效率,但是这种抑制得到的缓解随后引起多能细胞群在试管内培养系统中的维持,特别是在使用无饲养细胞和单一细胞酶传代的系统中,其中优选自发分化减少且保持“基础”或“未处理”多能状态的均质多能群体。如本文所用,如根据(不限于)传代次数所度量的术语“长期”通常意指至少10、15、20、25、30、35、40、45、50次或更多次传代。如所定义,“传代”是指当细胞增殖到所期望的程度时,使细胞再分裂和接种到多个细胞培养表面或容器中的行为。另外,如本文所公开,在包含GSK3抑制剂和MEK抑制剂以及任选存在的ROCK抑制剂、但不含TGF β R/ALK5抑制剂的培养基中培养亚稳定多能细胞使多能细胞转变,以实现自发分化减少和/或实现基础状态的多能性。

[0187] 实现iPSC的基础或未处理多能性对于通过使iPSC分化而不形成EB中间体来获得造血谱系细胞也具有重要作用。另外,未处理iPSC分化成永久性HE的效率也大大受到使用单层培养而不形成EB和其聚集体的影响。在一些实施例中,培养平台包含含有ROCK抑制剂且不含或基本上不含TGF β R/ALK5抑制剂的培养基。在一些其它实施例中,培养平台包含含有GSK3抑制剂、但不含TGF β R/ALK5抑制剂的培养基,所述培养基有利于使用本文所提供的培养平台产生永久性HE和/或永久性HSC细胞。

[0188] 1. TGF β 受体/ALK抑制剂

[0189] TGF β 受体(例如ALK5)抑制剂可以包括针对TGF β 受体(例如ALK5)的抗体、TGF β 受体(例如ALK5)的显性负变异体和抑制TGF β 受体(例如ALK5)表达的反义核酸。示例性TGF β 受体/ALK5抑制剂包括(但不限于)SB431542(参见例如Inman等人,《分子药理学(Molecular Pharmacology)》62(1):65-74(2002));A-83-01,也称为3-(6-甲基-2-吡啶基)-N-苯基-4-(4-喹啉基)-1H-吡唑-1-硫代碳酰胺(参见例如Tojo等人,《癌症科学(Cancer Science)》96(11):791-800(2005)且可购自例如Tocris Bioscience);2-(3-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基)-1,5-萘啶;Wnt3a/BIO(参见例如Dalton等人,W02008/094597,其以引用的方式并入本文中);GW788388(-{4-[3-(吡啶-2-基)-1H-吡唑-4-基]吡啶-2-基}-N-(四氢-2H-吡喃-4-基)苯甲酰胺)(参见例如Gellibert等人,《医药化学杂志(Journal of Medicinal Chemistry)》49(7):2210-2221(2006));SM16(参见例如Suzuki等人,《癌症研究(Cancer Research)》67(5):2351-2359(2007));IN-1130(3-((5-(6-甲基吡啶-2-基)-4-(喹啉-6-基)-1H-咪唑-2-基)甲基)苯甲酰胺)(参见例如Kim等人,《外来物(Xenobiotica)》38(3):325-339(2008));GW6604(2-苯基-4-(3-吡啶-2-基-1H-吡唑-4-基)吡啶)(参见例如de Gouvillle等人,《药物新闻视角(Drug News Perspective)》19(2):85-90(2006));SB-505124(2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐)(参见例如DaCosta等人,《分子药理学》65(3):744-752(2004));以及嘧啶衍生物(参见例如Stiefl等人的W02008/006583中列出的那些,其以引用的方式并入本文中)。另外,虽然

不希望“ALK5抑制剂”涵盖非特异性激酶抑制剂,但应理解,“ALK5抑制剂”涵盖除抑制ALK5之外还抑制ALK4和/或ALK7的抑制剂,例如SB-431542(参见例如Inman等人,《分子药理学杂志》62(1):65-74(2002))。不希望限制本发明的范围,据信,ALK5抑制剂影响间叶细胞向上皮细胞转化/转变(MET)的过程。TGF β /活化素路径驱动上皮细胞向间叶细胞转变(EMT)。因此,抑制TGF β /活化素路径能促进MET(即,重编程)过程。

[0190] 鉴于数据表明抑制ALK5的作用,据信,抑制TGF β /活化素路径将具有抑制ALK5的类似作用。因此,TGF β /活化素路径的任何抑制剂(例如上游或下游)均能与如本文中每个段落中所述的ALK5抑制剂组合使用,或代替所述ALK5抑制剂使用。示例性TGF β /活化素路径抑制剂包括(但不限于):TGF β 受体抑制剂、SMAD 2/3磷酸化抑制剂、SMAD 2/3和SMAD 4相互作用抑制剂,以及SMAD 6和SMAD 7的活化剂/促效剂。此外,下述分类仅出于组织目的且本领域的技术人员将知道,化合物会影响路径内的一个或多个点,且因此化合物可以在超过一个所定义类别中发挥作用。

[0191] TGF β 受体(TGF β R)抑制剂可以包括针对TGF β 受体的抗体、TGF β 受体的显性负变异体和靶向TGF β 受体的siRNA或反义核酸。TGF β 受体抑制剂的特定实例包括(但不限于)SU5416;2-(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基-2-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-6-甲基吡啶盐酸盐(SB-505124);乐得力单抗(lerdelimumb)(CAT-152);美替木单抗(metelimumab)(CAT-192);GC-1008;ID11;AP-12009;AP-11014;LY550410;LY580276;LY364947;LY2109761;SB-505124;SB-431542;SD-208;SM16;NPC-30345;Ki26894;SB-203580;SD-093;格列维克(gleevec);3,5,7,2',4'-五羟基黄酮(桑色素(Morin));活化素-M108A;P144;可溶性TBR2-Fc;和靶向TGF β 受体的反义转染肿瘤细胞。(参见例如Wrzesinski等人,《临床癌症研究(Clinical Cancer Research)》13(18):5262-5270(2007);Kaminska等人,《波兰生物化学学报(Acta Biochimica Polonica)》52(2):329-337(2005);和Chang等人,《生命科学前沿(Frontiers in Bioscience)》12:4393-4401(2007))。

[0192] SMAD 2/3磷酸化抑制剂可以包括针对SMAD2或SMAD3的抗体、SMAD2或SMAD3的显性负变异体和靶向SMAD2或SMAD3的反义核酸。抑制剂的特定实例包括PD169316;SB203580;SB-431542;LY364947;A77-01;和3,5,7,2',4'-五羟基黄酮(桑色素)。(参见例如Wrzesinski,同上;Kaminska,同上;Shimanuki等人,《致癌基因(Oncogene)》26:3311-3320(2007);和Kataoka等人的EP1992360,其以引用的方式并入本文中)。

[0193] SMAD 2/3和SMAD4相互作用抑制剂可以包括针对SMAD2、SMAD3和/或smad4的抗体、SMAD2、SMAD3和/或smad4的显性负变异体和靶向SMAD2、SMAD3和/或smad4的反义核酸。SMAD 2/3和SMAD4相互作用抑制剂的特定实例包括(但不限于)Trx-SARA、Trx-xFoxH1b和Trx-Lef1。(参见例如Cui等人,《致癌基因(Oncogene)》24:3864-3874(2005)和Zhao等人,《细胞分子生物学(Molecular Biology of the Cell)》,17:3819-3831(2006))。

[0194] SMAD 6和SMAD 7的活化剂/促效剂包括(但不限于)针对SMAD 6或SMAD 7的抗体、SMAD 6或SMAD 7的显性负变异体和靶向SMAD 6或SMAD 7的反义核酸。抑制剂的特定实例包括(但不限于)Smad7-as PTO-寡核苷酸。(参见例如Miyazono等人的US6534476和Steinbrecher等人的US2005119203,两者都以引用的方式并入本文中)。

[0195] 2.WNT路径促效剂

[0196] 如本文所用,术语“Wnt信号促进剂”、“Wnt路径活化因子”、“Wnt路径活化剂”或

“Wnt路径促效剂”是指Wnt信号传导路径的促效剂,包括(但不限于)以下中的一种或多种的促效剂:Wnt1、Wnt2、Wnt2b/13、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt7c、Wnt8、Wnt8a、Wnt8b、Wnt8c、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt14、Wnt15和Wnt16。Wnt路径促效剂进一步包括(但不限于)以下多肽或其片段中的一种或多种:Dkk多肽、新月多肽、守门狗多肽(cerberus polypeptide)、轴蛋白多肽、Frzb多肽、T细胞因子多肽或显性负面杂乱多肽。

[0197] Wnt路径促效剂的非限制性实例进一步包括以下中的一种或多种:包含编码Wnt多肽的核苷酸序列的核酸、包含Wnt多肽氨基酸序列的多肽、包含编码活化Wnt受体的核苷酸序列的核酸、包含活化Wnt受体氨基酸序列的多肽、促进Wnt/ β -索炔素信号传导的小有机分子、抑制Wnt拮抗剂表达或活性的小有机分子、抑制Wnt拮抗剂表达的反义寡核苷酸、抑制Wnt拮抗剂表达的核糖核酸酶、抑制Wnt拮抗剂表达的RNAi构筑体、siRNA或shRNA、结合到且抑制Wnt拮抗剂活性的抗体、包含编码 β -索炔素多肽的核苷酸序列的核酸、包含 β -索炔素多肽氨基酸序列的多肽、包含编码Lef-1多肽的核苷酸序列的核酸,和包含Lef-1多肽氨基酸序列的多肽。

[0198] Wnt路径促效剂进一步包括GSK3抑制剂,例如包含编码显性负性GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 多肽的核苷酸序列的核酸;包含显性负性GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 多肽氨基酸序列的多肽;结合到且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达或活性的小有机分子;结合到且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达和/或活性的RNAi构筑体、siRNA或shRNA;结合到且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达的反义寡核苷酸;结合到且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达和/或活性的抗体;结合到且抑制GSK-3、GSK3 α 或GSK3 β 的表达的核糖核酸酶;以及活化 β -索炔素靶基因、效果类似于GSK-3抑制的任何GSK-3不依赖型试剂。

[0199] 3. GSK3抑制剂

[0200] GSK3抑制剂是适用于本文所涵盖的组合物中的特定示例性Wnt路径促效剂,且可以包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文所涵盖的GSK3抑制剂可以减少GSK3 α / β 表达和/或GSK3 α / β 活性。本文所涵盖的GSK3抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗GSK3抗体、显性负性GSK3变体、靶向GSK3的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0201] 其它说明性GSK3抑制剂包括(但不限于):坎帕罗酮(Kenpauillone)、1-氮杂坎帕罗酮(1-Azakenpauillone)、CHIR99021、CHIR98014、AR-A014418、CT 99021、CT20026、SB216763、AR-A014418、锂、TDZD-8、BIO、BIO-丙酮肟、(5-甲基-1H-吡唑-3-基)-(2-苯基噻唑啉-4-基)胺、吡啶并咪唑-环戊二烯基钌络合物、TDZD-8 4-苯甲基-2-甲基-1,2,4-噻二唑啉-3,5-二酮、2-巯基(3-碘苯甲基)-5-(1-吡啶基)-[1,3,4]-噁二唑、OTDZT、 α -4-二溴苯乙酮、AR-A0 144-18、3-(1-(3-羟丙基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)-4-吡啶-2-基-吡咯-2,5-二酮、TWS1 19吡咯并咪唑化合物、L803H-KEAPPAPPQSpP-NH₂或其豆蔻酰化形式、2-氯-1-(4,5-二溴-噻吩-2-基)-乙酮、GF109203X、R0318220、TDZD-8、TIBPO和OTDZT。

[0202] 在特定说明性实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99021、BIO或坎帕罗酮。

[0203] 在一个优选实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99021。

[0204] 在另一个实施例中,GSK3抑制剂是BRD0705。

[0205] 4. ERK/MEK抑制剂

[0206] 适用于本文所涵盖的组合物中的ERK/MEK抑制剂包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文所涵盖的ERK/MEK抑制剂可以减少MEK或ERK表达和/或MEK或ERK活性。本文

中涵盖的MEK/ERK抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗MEK或抗ERK抗体、显性负性MEK或ERK变体、靶向MEK或ERK的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0207] 其它说明性ERK/MEK抑制剂包括(但不限于)PD0325901、PD98059、U0126、SL327、ARRY-162、PD184161、PD184352、舒尼替尼(sunitinib)、索拉非尼(sorafenib)、凡德他尼(Vandetanib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(Axitinib)、GSK1 120212、ARRY-438162、R05126766、XL518、AZD8330、RDEA1 19、AZD6244、FR180204和PTK787。

[0208] 其它说明性MEK/ERK抑制剂包括国际公开专利申请WO 99/01426、WO 02/06213、WO 03/077914、WO 05/051301和WO2007/044084中所公开的那些化合物。

[0209] MEK/ERK抑制剂的其它说明性实例包括以下化合物:6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-e-5-甲酸(2,3-二羟基-丙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-吡喃-2-基甲基)-3H-苯并咪唑-5-甲酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;1-[6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-基]-2-羟基-乙酮;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-e-5-甲酸(2-羟基-1,1-二甲基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-(四氢-呋喃-2-基甲基)-3H-苯并咪唑-5-甲酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氟-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-e-5-甲酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(2,4-二氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-甲酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺;6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-e-5-甲酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺(在下文中称为MEK抑制剂1);2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺(在下文中称为MEK抑制剂2);4-(4-溴-2-氟苯基氨基)-N-(2-羟乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺,和其医药学上可接受的盐。

[0210] 在一个优选实施例中,MEK/ERK抑制剂是PD98059。

[0211] 5. ROCK抑制剂

[0212] Rho相关激酶(ROCK)是充当Rho激酶下游效应子的丝氨酸/苏氨酸激酶(其存在三种同功异型物:RhoA、RhoB和RhoC)。适用于本文所涵盖的组合物中的ROCK抑制剂包括(但不限于)多核苷酸、多肽和小分子。本文中涵盖的ROCK抑制剂可以减少ROCK表达和/或ROCK活性。本文所涵盖的ROCK抑制剂的说明性实例包括(但不限于)抗ROCK抗体、显性负性ROCK变体、靶向ROCK的siRNA、shRNA、miRNA和反义核酸。

[0213] 本文中涵盖的说明性ROCK抑制剂包括(但不限于):噻唑维(thiazovivin)、Y27632、法舒地尔(Fasudil)、AR122-86、Y27632 H-1152、Y-30141、Wf-536、HA-1077、羟基-HA-1077、GSK269962A、SB-772077-B、N-(4-吡啶基)-N'-(2,4,6-三氯苯基)脲、3-(4-吡啶基)-1H-吡啶和(R)-(+)-反-N-(4-吡啶基)-4-(1-氨基乙基)-环己烷甲酰胺,和美国专利第8,044,201号(其以全文引用的方式并入本文中)中所公开的ROCK抑制剂。

[0214] 在一个实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维、Y27632或吡啶特(pyrintegrin)。

[0215] 在一个优选实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维。

[0216] 本文所涵盖的组合物和细胞培养基中的小分子的量可以改变且可以根据特定培养条件优化,所述培养条件包括所使用的特定分子和组合、在培养基中培养的细胞类型以及特定应用。在一个实施例中,小分子存在于组合物中的浓度足以诱导多能性、改善重编程效率、提高或维持细胞效能或诱导或维持基础状态的多能性。

[0217] 本发明的另一方面关于本发明使用的Notch活化剂。Notch涵盖Notch受体家族的所有成员,包括(但不限于)Notch1。Notch活化剂包括(但不限于)Notch受体促效剂。Notch促效剂将结合Notch受体,且还起始或介导与Notch受体相关的信号传导事件,例如以引起Notch的胞内域裂解且易位到细胞核中。Notch活化剂包括(但不限于)Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3和DLL-4。Notch活化剂包括(但不限于)EP 2606884、US 6689744和US 5780300中所公开的那些活化剂,其公开内容以引入的方式并入本文中。在一些实施例中,可以将一种或多种Notch配体作为可溶肽引入,或固定于固体材料上。固体材料可以包括(但不限于)聚苯乙烯板或珠粒。用于固定Notch配体的珠粒可以是琼脂糖珠粒、磁珠粒和乳胶珠粒。在一个实施例中,Notch配体肽结合/固定到珠粒上。在另一个实施例中,Notch配体肽结合/固定到聚苯乙烯板的表面上。在一些实施例中,Notch配体的固定是非共价的。在一些实施例中,Notch配体肽由细胞呈递。

[0218] 本发明的又一个方面关于BMP路径活化剂,其包括以下公开中所公开的那些药剂:WO 2014011540、WO 2014062138和WO 2005117994,其公开内容以引入的方式并入本文中。本发明使用的BMP路径活化剂包括(但不限于)BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-2和BMP-4。在本发明的一个非限制性实施例中,BMP路径活化剂是BMP-4。BMPs是多功能细胞因子,其是转化生长因子- β 超家族的成员。骨形态生成蛋白(BMP)受体通过活化Smad来介导BMP信号传导。BMP配体结合到BMP受体BMPRI和BMPRII。BMPRII磷酸化之后,以下活化BMPRI。磷酸化BMPRI随后使受体活化Smad蛋白质(R-Smads)发生磷酸化,所述蛋白质与共同介体-Smad(co-Smad)结合且进入细胞核中,在细胞核中,它们调控基因表达。在一个实施例中,BMP路径活化剂是BMP4。

[0219] 本发明提供由iPSC通过从iPSCs分化的永久性HSC或通过从iPSCs分化的永久性生血内皮细胞获得造血谱系细胞的组合物,且所述方法中的每一种不包含由iPSC形成EB来实现所期望的细胞分化。

[0220] 6.hiPSC分化平台

[0221] I.iCD34平台

[0222] 本发明的一个方面提供一种使用多能干细胞获得永久性生血内皮细胞的培养平台。如本文所用,永久性生血内皮细胞是具有产生所有造血细胞的能力的致力于永久造血的生血细胞群,包括(但不限于)永久性HSCs、造血多潜能祖细胞(MPP)、T细胞祖细胞、NK细胞祖细胞、T细胞、NK细胞、NKT细胞和/或B细胞。

[0223] 在一个实施例中,使用多能干细胞(包括iPSCs)获得永久性生血内皮细胞的培养平台包含含有MEKi、GSKi和ROCKi的接种培养基。在一些实施例中,接种培养基不含或基本上不含TGF β 受体/ALK抑制剂。在一个实施例中,本发明的接种培养基中的小分子组合在表1中作为命运维持培养基(FMM)展示。培养基的组分可以表1中所示的浓度范围内的量存在于培养基中。在一个实施例中,用于获得永久性生血内皮细胞的iPSC是使用命运重编程培养基(FRM)产生的细胞系,且进一步在FMM中维持以建立和维持iPSC细胞系的基础或未处理状态,这适于如本文所公开的阶段特异性分化。如此获得的基础状态或未处理iPSC适于低温保存。在本发明中,所保存的iPSC细胞系或克隆iPSC可以接种于FMM中以便子序列分化成永久性生血内皮细胞。

[0224] 表1:接种未处理iPSC培养物以获得CD34+永久性生血内皮细胞、多潜能祖细胞、T

细胞祖细胞和NK细胞祖细胞：

[0225]	传统 hESC 培养基 (转化)	命运重编程培养基 (FRM)	命运维持培养基 (FMM)
	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
	基因敲除式血清替代物 (20%)	基因敲除式血清替代物 (20%)	基因敲除式血清替代物 (20%)
		N2	
		B27	
	谷氨酸盐	谷氨酸盐	谷氨酸盐 (1x)
[0226]	非必需氨基酸 (1x)	非必需氨基酸 (1x)	非必需氨基酸 (1x)
	β -巯基乙醇 (100 μ M)	β -巯基乙醇 (100 μ M)	β -巯基乙醇 (100 μ M)
	bFGF (0.2-50 ng/mL)	bFGF (2-500 ng/mL)	bFGF (2-500 ng/mL)
		LIF (0.2-50 ng/mL)	LIF (0.2-50 ng/mL)
		噻唑维 (0.1-25 μ M)	噻唑维 (0.1-25 μ M)
		PD0325901 (0.005-2 μ M)	PD0325901 (0.005-2 μ M)
		CHIR99021 (0.02-5 μ M)	CHIR99021 (0.02-5 μ M)
		SB431542 (0.04-10 μ M)	
	与 MEF 组合饲养细胞	无饲养层, 与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合	

[0227] 本发明的一个方面提供用于多能干细胞 (包括 iPSCs) 向中胚层分化和扩增的培养基。在一些实施例中, iPSC 是未处理 iPSC。在一个实施例中, 培养基包含 BMP 活化剂, 和任选存在的 bFGF, 和包含如表 2 所示的小分子组合的 CD34 基础培养基。在一些实施例中, 所述培养基包含细胞外基质蛋白质。在其它实施例中, 本文中的培养基包含如表 2 所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。在一些实施例中, 培养基受到完全限定, 其中用 Matrigel™ 替换玻璃连结蛋白。

[0228]	表 2: 用于由未处理 iPSC 获得中胚层的 iCD34-A 培养基	
	iCD34 基础培养基	StemPro 34
		谷氨酸盐
		非必需氨基酸
		抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
		MTG (10-2500 μ M)
	BMP4 (0.05-15 ng/ml)	
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合	

[0229] 在一个实施例中, 用于多能干细胞向中胚层分化和扩增的上述培养基进一步包含 0.2-50ng 之间的 bFGF。

[0230] 本发明的一个方面提供一种培养基, 用于由多能干细胞 (包括 iPSCs) 获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。在一些实施例中, iPSC 是未处理 iPSC。在一个实施例中, 所述培养基包含 BMP 活化剂、WNT 路径活化剂和 bFGF。在一个实施例中, Wnt 路径活化剂是 GSK3 抑制剂。在一个实施例中, 包含 GSK3 抑制剂的所述培养基只依循中胚层细胞规范应用, 以便实现永久性 HE 潜能。在一个实施例中, 包含 BMP 活化剂、GSK3 抑制剂和 bFGF 的所述培养基进一步包含含有如表 3 所示的小分子组合的 CD34 基础培养基。在一个实施例中, 上述培养基不含 TGF β 受体/ALK 抑制剂。在一些实施例中, 所述培养基包含细胞外基质蛋白质。在其它

实施例中,本文中的所述培养基包含如表3所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。在一些实施例中,所述培养基被完全限定,其中用Matrigel™替换玻璃连结蛋白。

[0231]	表 3: 用于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞的 iCD34-B 培养基	
	iCD34 基础培养基	StemPro 34
		谷氨酸盐
		非必需氨基酸
		抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
		MTG (10-2500 μ M)
	BMP4 (0.05-15ng/ml)	
	bFGF (0.2-50 ng/ml)	
	CHIR99012 (0.04-10 μ M)	
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合	

[0232] 本发明的一个方面提供一种用于由中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞的培养基。在一些实施例中,所述培养基包含ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和选自由以下组成的组的细胞因子:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11。在一个实施例中,所述培养基包含VEGF、bFGF、SCF、IL6、IL11和ROCK抑制剂,且CD34基础培养基包含如表4所示的小分子组合。在一个实施例中,包含ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组的细胞因子的所述培养基进一步包含Wnt路径活化剂、IGF和EPO中的一种或多种。在一些实施例中,用于由中胚层细胞产生永久性HE的培养基包含ROCK抑制剂、Wnt路径活化剂、VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11,以及IGF和EPO中的一种或多种。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是CHIR99021。在一个实施例中,包含VEGF、bFGF、SCF、IL6、IL11和ROCK抑制剂的所述培养基不含Wnt路径活化剂、TGF β 受体/ALK抑制剂、IGF1和EPO中的一种或多种。在其它实施例中,本文中的所述培养基包含如表4所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。

[0233]	表 4: 用于由中胚层获得永久性生血内皮细胞的 iCD34-C 培养基	
	iCD34 基础培养基	StemPro 34
		谷氨酸盐
		非必需氨基酸
		抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
		MTG (10-2500 μ M)
	VEGF (0.2-50 ng/ml)	
	bFGF (0.1-25 ng/ml)	
	SCF (1-250 ng/ml)	
	IL6 (0.2-50 ng/ml)	
[0234]	IL11 (0.2-50 ng/ml)	
	Y27632 (0.2-50 μ M)	
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合	

[0235] 本发明的一个方面提供一种用于由永久性生血内皮细胞获得多潜能祖细胞(MPP)细胞的培养平台。所述MPP能进一步分化成骨髓,包括嗜中性粒细胞祖细胞。在一个实施例中,所述培养平台包含(i)包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11,其中所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前HSC(表5)。在另一个

实施例中,包含用于使永久性生血内皮细胞分化成前HSC的培养基的培养平台进一步包含 (i) 包含BMP活化剂、TPO、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11的培养基,其中所述培养基不含ROCK抑制剂且适于使所述前HSC分化成多潜能祖细胞。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。在其它实施例中,本文中的所述培养基包含如表5所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。

[0236]	表 5: 用于由永久性 HE 获得多潜能祖细胞的 iMPP-A 培养基	
	iCD34 基础培养基	StemPro 34
		谷氨酸盐
		非必需氨基酸
		抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
		MTG (10-2500 μ M)
	VEGF (0.2-50 ng/ml)	
	bFGF (0.2-25 ng/ml)	
	SCF (1-250 ng/ml)	
	Flt3L (0.5-150 ng/ml)	
	IL6 (0.2-50 ng/ml)	
	IL11 (0.2-50 ng/ml)	
	Y27632 (0.2-50 μ M) *, 当前 HSC 分化成多潜能祖细胞时, 不包括其	
	BMP4 (0.5-150 ng/ml)	
	TPO (0.5-150 ng/ml)	
	IL3 (0.5-150 ng/ml)	
	GMCSF (0.1-25 ng/ml)	
	EPO (0.02-5 ng/ml)	
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻璃连结蛋白组合	

[0237] II.iNK/iT平台

[0238] 本发明的一个方面提供一种用于由永久性生血内皮细胞生成T细胞祖细胞或T细胞的培养平台。在一个实施例中,所述培养平台包含 (i) 包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组: VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO和IL7;其中所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞(前iproT);和/或(ii) 包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的培养基,其中所述培养基不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种,且适用于使所述前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞(表6)。在一些实施例中,使永久性HE分化成前iproT的培养基包含ROCK抑制剂、SCF、Flt3L、TPO和IL7;且不含BMP活化剂。在一些实施例中,使前iproT分化成T细胞祖细胞或T细胞的培养基包含SCF、Flt3L和IL7。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。在其它实施例中,本文中的培养基包含如表6所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。

[0239]

表 6: 用于由永久性 HE 获得前 T 细胞祖细胞的 iTC-A2 培养基	
iCD34 基础培养基	StemPro 34
	谷氨酸盐
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
Flt3L (0.2-50 ng/ml)	
IL7 (0.2-50 ng/ml)	
SCF (1-250 ng/ml)	
TPO (0.2-50 ng/ml)	
*: 不包括于 iTC-B2 中, 以便获得前 T 祖细胞到 T 细胞祖细胞或 T 细胞	BMP4 (0.5-150 ng/ml) *
	VEGF (0.2-50 ng/ml) *
	bFGF (0.1-25 ng/ml) *
	Y27632 (0.2-50 μ M) *
无饲养层, 悬浮或单层	

[0240] 本发明的一个方面提供一种用于由永久性生血内皮细胞生成NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台。在一个实施例中, 所述培养平台包含 (i) 包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基, 所述细胞因子选自自由以下组成的组: VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15, 其中所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞(前iproNK); 和/或(ii) 包含一种或多种生长因子和选自自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基, 其中所述培养基不含VEGF、bFGF、TPO、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种, 且适用于使所述前NK细胞祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞。在一些实施例中, 使永久性HE分化成前iproNK的培养基包含ROCK抑制剂、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15; 且不含BMP活化剂。在一些实施例中, 使前iproNK分化成NK祖细胞或NK细胞的培养基包含SCF、Flt3L和IL15。在一些实施例中, ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中, ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中, BMP活化剂是BMP4。在其它实施例中, 本文中的培养基包含如表7所示的浓度范围内的小分子、生长因子和/或细胞因子。

[0241]

表 7: 用于由永久性 HE 获得前 NK 细胞祖细胞的 iNK-A2 培养基	
iCD34 基础培养基	StemPro 34
	谷氨酸盐
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
SCF (1-250 ng/ml)	
Flt3L (0.2-50 ng/ml)	
TPO (0.1-25 ng/ml)	
IL7 (0.2-50 ng/ml)	
IL15 (0.4-100 ng/ml)	
IL3 (0.1-25 ng/ml)	
*: 不包括于 iNK-B2 中, 以便获得前 NK 祖细胞到 NK 祖细胞或 NK 细胞	VEGF (0.2-50 ng/ml) *
	bFGF (0.1-25 ng/ml) *
	BMP4 (0.5-150 ng/ml) *
	Y27632 (0.2-50 μ M) *
无饲养层, 悬浮, 单层	

[0242] 本发明的另一方面提供一种用于获得T细胞祖细胞或T细胞的培养平台,所述培养平台包含以下中的一种或多种:(i)包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子且不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种的培养基,所述培养基适用于使前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞;(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TP0和IL7,所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞;(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EP0、IL6和IL11,所述培养基适用于使中胚层细胞向永久性生血内皮细胞分化和扩增;(iv)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,所述培养基适用于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(v)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,所述培养基适用于由iPSC生成和扩增中胚层细胞;和(vi)包含MEKi、GSKi和ROCKi、不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述培养基适用于接种和扩增未处理iPSC。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。

[0243] 在一个实施例中,用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台包含(i)包含SCF、Flt3L和IL7、不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种的培养基,所述培养基适用于使前T细胞祖细胞分化成T细胞祖细胞或T细胞。在另一个实施例中,包含培养基(i)的用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台进一步包含(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TP0和IL7,所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前T细胞祖细胞。在另一个实施例中,包含培养基(i)和(ii)的用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台进一步包含(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子、任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EP0、IL6和IL11,其中组合物适用于使中胚层细胞向永久性生血内皮细胞分化和扩增。在再另一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)和(iii)的用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台进一步包含(iv)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,所述培养基适用于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。在又一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)、(iii)和(iv)的用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台进一步包含(v)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,所述培养基适用于由iPSC生成和扩增中胚层细胞。在另一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)的用于产生T细胞祖细胞或T细胞的培养平台进一步包含(vi)包含MEKi、GSKi和ROCKi、不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述培养基适用于接种和扩增未处理iPSC。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,培养平台中使用Notch因子产生T细胞祖细胞或T细胞。在一些实施例中,Notch

因子,包括Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3和DLL-4,可以作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。

[0244] 本发明的另一方面提供一种用于获得NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台,所述培养平台包含以下中的一种或多种:(i)包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基,其中所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且适用于使前NK细胞祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞;(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞;(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述组合物适用于由中胚层细胞向永久性生血内皮细胞分化和扩增;(iv)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,所述培养基适用于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(v)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,所述培养基适用于由iPSCs生成和扩增中胚层细胞;(vi)包含MEKi、GSKi和ROCKi、不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述培养基适用于接种和扩增未处理iPSC。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BI0。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,使用一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原进行NK成熟,所述人工抗原以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞形式引入。

[0245] 在一个实施例中,用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台包含(i)包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基,其中所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种且适用于使前NK细胞祖细胞分化成NK细胞祖细胞或NK细胞。在一些实施例中,使用一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原进行NK成熟,所述人工抗原以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞形式引入。在另一个实施例中,包含培养基(i)的用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台进一步包含(ii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7和IL15,其中所述培养基适用于使永久性生血内皮细胞分化成前NK细胞祖细胞。在另一个实施例中,包含培养基(i)和(ii)的用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台进一步包含(iii)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,且组合物适用于使中胚层细胞向永久性生血内皮细胞分化和扩增。在再另一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)和(iii)的用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台进一步包含(iv)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,所述培养基适用于获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。在又另一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)、(iii)和(iv)的用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台进一步包含(v)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,所述培养基适用于由iPSCs生成和扩增中胚层细胞。在另一个实施例

中,包含培养基(i)、(ii)、(iii)、(iv)和(v)的用于产生NK细胞祖细胞或NK细胞的培养平台进一步包含(vi)包含MEKi、GSKi和ROCKi、不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂的培养基,所述培养基适用于接种和扩增未处理iPSC。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。

[0246] 本发明的一个方面提供一种用于产生永久性生血内皮细胞的培养平台,所述培养平台包含以下中的一种或多种:(i)用于由中胚层细胞向永久性生血内皮细胞分化和扩增的培养基,所述培养基包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11;(ii)用于使中胚层细胞获得永久性生血潜能的培养基,所述培养基包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂;(iii)用于由未处理iPSC分化成和扩增中胚层细胞的培养基,所述培养基包含BMP活化剂和任选存在的bFGF;和(iv)包含MEKi、GSKi和ROCKi的未处理iPSC接种和扩增培养物,且所述接种培养物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,永久性生血内皮细胞是CD34⁺。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。

[0247] 在一个实施例中,用于获得永久性生血内皮细胞的培养平台包含(i)包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述培养基适用于由中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞。在一个实施例中,包含培养基(i)的所述培养平台进一步包含(ii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,其中所述培养基(ii)适用于使中胚层细胞获得永久性生血潜能。在另一个实施例中,包含培养基(i)和(ii)的所述培养平台进一步包含(iii)包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基,其中所述培养基(iii)适用于由未处理iPSCs分化成和扩增中胚层细胞。在又一个实施例中,包含培养基(i)、(ii)和(iii)的所述培养平台进一步包含(iv)包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基,且所述培养基(v)不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂,其中所述培养基(v)适用于接种和扩增未处理iPSC。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。

[0248] 本发明的一个方面提供一种用于产生CD34⁺永久性生血内皮细胞的培养平台,所述培养平台包含以下中的一种或多种:(i)用于由中胚层细胞分化成和扩增永久性生血内皮细胞的培养基,所述培养基包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂,所述细胞因子选自由以下组成的组:bFGF、VEGF、SCF、IGF、EPO、IL6和IL11,其中所述永久性生血内皮细胞包含CD34⁺永久性生血内皮细胞;(ii)用于使中胚层细胞获得永久性生血潜能的培养基,所述培养基包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂;(iii)用于由未处理iPSC分化成和扩增中胚层细胞的培养基,所述培养基包含BMP活化剂和任选

存在的bFGF;和(iv)包含MEKi、GSKi和ROCKi的未处理iPSC接种或扩增培养物,且所述接种培养物不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。

[0249] 本发明的一个方面提供一种用于产生中胚层细胞的培养平台,所述培养平台包含以下中的一种或多种:(i)用于由未处理iPSC分化成和扩增中胚层细胞的培养基,所述培养基包含BMP活化剂和任选存在的bFGF;和(ii)包含MEKi、GSKi和ROCKi的未处理iPSC接种或扩增培养物,且所述接种培养物不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,所有上述培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012或BIO。在一些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99012。在一些实施例中,ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632。在一些实施例中,BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,用于产生中胚层细胞的所述培养平台可以进一步包含(iii)包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的培养基,其中所述培养基用于使中胚层细胞获得永久性生血潜能。在一些实施例中,包含BMP活化剂、bFGF和GSK3抑制剂的所述培养基不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0250] C.获得永久性生血内皮细胞、多潜能祖细胞、T细胞或NK细胞祖细胞、T细胞和/或NK细胞的方法

[0251] 本发明提供一种使用包含一种或多种培养基的多阶段培养平台产生多能干细胞源永久性造血细胞的方法。所述方法适用于无饲养层条件。所述方法相较于所属领域中已知的方法,还适用于单层培养,且因而不需要EB形成或聚集体中间体,以便进行多能干细胞分化。所提供的方法产生且同时扩增多能干细胞源永久性生血内皮细胞(iHE)CD34+HE(iCD34),其能够进一步分化成多潜能祖细胞(iMPP)、自然杀手细胞祖细胞(ipro-NK)、T细胞祖细胞(ipro-T)、成熟NK细胞(iNK)和T细胞(iT)。本发明的其它方面还提供一种产生由多能干细胞源CD34+、HE、HSC和/或MPP分化的骨髓细胞的方法。

[0252] 在一个实施例中,本发明提供一种通过单层培养使多能细胞分化成和扩增造血谱系细胞的方法,包含使所述多能细胞与BMP路径活化剂和任选存在的bFGF接触,其中获得和扩增多能干细胞源中胚层细胞而不由多能干细胞形成类胚胎体;然后使所述多能干细胞源中胚层细胞与BMP路径活化剂、bFGF和WNT路径活化剂接触,以获得具有永久性生血内皮细胞(HE)潜能的经扩增的多能干细胞源中胚层细胞而不由多能干细胞形成类胚胎体。通过随后与bFGF和任选存在的ROCK抑制剂和/或WNT路径活化剂接触,具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成永久性HE细胞,在分化期间,所述永久性HE细胞还得到扩增。

[0253] 由于EB形成不引起细胞扩增,无法进行单层培养且费力且效率低,因此所提供的用于获得造血谱系细胞的方法优于EB介导的多能干细胞分化。另外,本发明公开了使用本文所提供方法的单层培养产生了功能造血谱系细胞,其实现了长期的活体内造血自我更新、重构和移植。

[0254] 如下详述,本发明提供一种通过获得永久性生血内皮细胞而由多能细胞获得造血谱系细胞的方法。具体地说,本发明提供一种引导多能细胞向造血谱系细胞分化而无需为了分化而形成EBs的方法。

[0255] I.iCD34平台

[0256] 1.衍生和扩增永久性iHE

[0257] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生永久性生血内皮细胞(iHE)的方法。一般来说,所述方法开始是第一阶段,其中接种多能干细胞且扩增。然后使多能干细胞分化成中胚层细胞,所述中胚层细胞在这个阶段中扩增。然后使扩增的中胚层群体分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层群体,然后使所述中胚层群体分化成永久性生血内皮细胞且扩增。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。本发明进一步提供一种产生和扩增永久性生血内皮细胞(iHE)的方法,包含:分化成和扩增多能干细胞源中胚层细胞,和获得具有永久性iHE潜能的中胚层细胞,然后使其分化成iHE。或者,本发明提供一种产生和扩增永久性生血内皮细胞的方法,包含使具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成永久性iHE。本文所公开的方法使用优化的单层iCD34培养平台而无需形成EB,且不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0258] 在由多能干细胞产生永久性生血内皮细胞(iHE)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使所述细胞分化成和扩增中胚层群体;(2)通过使所述中胚层群体的细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层群体分化和扩增,以使中胚层细胞获得永久性HE潜能;(3)通过使所述中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD93-。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD93阴性。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,使细胞与包含GSK3抑制剂的培养基接触只是依循中胚层细胞规范,以便实现永久性HE潜能。在一些实施例中,上述方法进一步包含使所接种的iPSC和/或中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使多能细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触来接种多能干细胞,其中多能干细胞扩增。

[0259] 在由接种的多能干细胞产生永久性生血内皮细胞(iHE)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;(2)通过使所述中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而获得具有永久性iHE潜能的中胚层细胞;(3)通过使所述中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使具有HE潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是

iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中，上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中，上述方法进一步包含利用CD34阳性进行分选。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中，上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中，所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中，Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中，上述方法进一步包含使所接种的iPSC和/或中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0260] 在由多能干细胞源中胚层细胞生成永久性生血内皮细胞(iHE)的方法的一个实施例中，所述方法包含(1)通过使中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而获得具有永久性HE潜能的中胚层细胞；(2)通过使中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而由具有永久性HE潜能的中胚层细胞分化成和扩增永久性HE细胞，所述细胞因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11。在一些实施例中，用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中，多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中，上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中，所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中，Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中，上述方法进一步包含使所述中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0261] 在使多能干细胞源中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞(iHE)潜能的方法的一个实施例中，所述方法包含使所述中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触，所述细胞因子选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组，其中所述中胚层细胞扩增。在一些实施例中，多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中，上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中，上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中，Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中，上述方法进一步包含使所述中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0262] 2. 衍生和扩增具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞

[0263] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生多能干细胞源中胚层细胞的方法。一般来说，所述方法开始是接种多能干细胞。然后使接种的多能干细胞发育成中胚层，所述中胚层进一步分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。或者，本发明提供一种产生多能干细胞源中胚层细胞的方法，包含：使接种的多能干细胞分化成中胚层，和

然后使中胚层分化成具有永久性生血潜能的中胚层细胞。本发明进一步提供一种产生具有永久性HE潜能的多能干细胞源中胚层细胞的方法,且所述方法包含使多能干细胞源中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。本文所公开的方法是利用优化的iCD34培养平台,其不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0264] 在使多能干细胞源中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞潜能的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;和(2)通过使所述中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞潜能。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使多能干细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使多能干细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触而接种所述细胞。

[0265] 在由多能干细胞源中胚层生成具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞的方法的一个实施例中,所述方法包含通过使中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使中胚层分化成永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使所述中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0266] 3.由多能干细胞衍生和扩增中胚层

[0267] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生多能干细胞源中胚层细胞的方法。一般来说,所述方法开始是第一阶段,其中接种多能干细胞,且然后在第二阶段中使接种的细胞分化成中胚层。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。本文所公开的方法是利用优化的iCD34培养平台,其不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0268] 在由多能细胞产生多能干细胞源中胚层的方法的一个实施例中,所述方法包含通过使细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使接种的多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,上述方法进一步包含使接种的iPSC经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使多能细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触而接种和扩增iPSCs。

[0269] 4.衍生造血多潜能祖细胞(iMPP)

[0270] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生多能干细胞源多潜能祖细胞(iMPP)的方法。一般来说,所述方法开始是接种多能干细胞。使接种的细胞扩增且分化成中胚层细胞。使中胚层扩增且分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,随后使

所述中胚层细胞分化成永久性生血内皮细胞。使永久性HE细胞扩增且分化成前HSC,且然后,多潜能祖细胞能够分化成骨髓细胞,包括嗜中性粒细胞祖细胞。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源多潜能祖细胞(iMPP)的方法,包含使接种的多能细胞分化成中胚层、使中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使所述中胚层细胞分化成永久性iHE,然后使所述永久性iHE分化成iMPP。本发明进一步提供一种产生多能干细胞源iMPP的方法,包含使多能干细胞源中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使中胚层细胞分化成永久性iHE,然后使所述永久性iHE分化成iMPP。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源iMPP的方法,包含使多能干细胞源中胚层细胞分化成永久性iHE,然后使所述永久性iHE分化成iMPP。另外,本发明提供一种产生多能干细胞源iMPP的方法,包含使多能干细胞源iHE分化成iMPP。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。本文所公开的方法使用优化的单层iCD34培养平台而无需形成EB,所述培养平台不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0271] 在由多能干细胞产生造血多潜能祖细胞(iMPP)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使多能细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使多能干细胞分化成和扩增中胚层细胞;(2)通过使中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞潜能;(3)通过使所述具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述中胚层细胞分化成和扩增永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11;和(4)通过使HE细胞与包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的ROCK抑制剂的培养基接触而使永久性HE细胞分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使多能干细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触而接种和扩增所述细胞。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前HSC,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前HSC的所述方法进一步包含通过使所述前HSC细胞与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述前HSC分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,且培养基不含或基本上不含ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使接种的多能干细胞、中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路

径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。

[0272] 在由多能干细胞源中胚层产生多能干细胞源多潜能祖细胞(iMPP)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使多能干细胞源中胚层细胞获得永久性生血内皮细胞潜能;(2)通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述细胞分化成和扩增永久性HE细胞,所述细胞因子选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组;(3)通过使所述永久性HE细胞与包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的ROCK抑制剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前HSC,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前HSC的所述方法进一步包含通过使所述前HSC细胞与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述前HSC分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,且培养基不含或基本上不含ROCK抑制剂。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0273] 在由具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞生成多能干细胞源多潜能祖细胞(iMPP)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子、ROCK抑制剂和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述细胞分化成和扩增永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11;和(2)通过使所述永久性HE细胞与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的ROCK抑制剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前HSC,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前HSC的所述方法进一步包含通过使所述前HSC细胞与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述前HSC分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,且培养基不含或基本上不含ROCK抑制剂。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0274] 在由多能干细胞源永久性HE细胞生成多能干细胞源多潜能祖细胞(iMPP)的方法

的一个实施例中,所述方法包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的ROCK抑制剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前HSC,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前HSC的所述方法进一步包含通过使所述前HSC细胞与包含BMP活化剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述前HSC分化成iMPP,所述细胞因子选自由以下组成的组:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11,且培养基不含或基本上不含ROCK抑制剂。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。

[0275] 5. 获得多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或T细胞-iCD34平台和iT平台

[0276] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或多能干细胞源T细胞的方法。一般来说,所述方法开始是使多能干细胞分化成且扩增中胚层细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。然后使中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。随后使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成永久性生血内皮细胞,同时在培养基中扩增所述永久性生血内皮细胞。然后使永久性HE细胞分化成前iproT,且然后分化成T细胞祖细胞(原T),其能够在相同培养基中连续地分化成T细胞。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或T细胞的方法,包含使接种的多能干细胞分化成中胚层、使中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成iHE,然后使iHE分化成T细胞祖细胞或T细胞。本发明进一步提供一种产生多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或T细胞的方法,包含使多能干细胞源中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使所述中胚层细胞分化成iHE,然后使所述iHE分化成ipro-T或T细胞。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源T细胞祖细胞或T细胞的方法,包含使具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成iHE,然后使所述iHE分化成ipro-T或T细胞。另外,本发明提供一种产生多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或T细胞的方法,包含使多能干细胞源iHE分化成ipro-T或T细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。本文所公开的方法是利用优化的iCD34培养平台,其不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,Notch因子,包括(但不限于)Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3和DLL-4,能够作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。

[0277] 在由多能干细胞生成多能干细胞源T细胞祖细胞 (ipro-T) 或T细胞 (iT) 的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使接种的多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使所述细胞分化成中胚层;(2)通过使所述中胚层的细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(3)通过使所述具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含

ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述中胚层细胞分化成永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11;和(4)通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成ipro-T或iT,所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使多能干细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触而接种和扩增所述细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproT,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TPO、IL7、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproT的所述方法进一步包含通过使所述前iproT细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproT分化成ipro-T或iT,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,上述方法包含使用一种或多种Notch因子产生多能干细胞源pro-T。在一些实施例中,所述Notch因子是Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3或DLL-4。在一些实施例中,DLL-1和DLL-4能够作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使接种的多能干细胞、中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0278] 在由多能干细胞源中胚层生成多能干细胞源T细胞祖细胞(ipro-T)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使所述中胚层的细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞;(2)通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述细胞分化成永久性HE细胞,所述细胞因子选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组;(3)通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子以及任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成ipro-T或iT,所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproT,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TPO、IL7、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproT的所述方法进一步包含通过使所述前iproT细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproT分化成ipro-T或iT,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的

一种或多种。在一些实施例中,上述方法包含使用一种或多种Notch因子产生多能干细胞源pro-T。在一些实施例中,所述Notch因子是Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3或DLL-4。在一些实施例中,DLL-1和DLL-4能够作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0279] 在由具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞生成多能干细胞源T细胞祖细胞(ipro-T)或T细胞(iT)的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述细胞分化成永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11;和(2)通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成ipro-T或iT,所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproT,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TPO、IL7、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproT的所述方法进一步包含通过使所述前iproT细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproT分化成ipro-T或iT,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,上述方法包含使用一种或多种Notch因子产生多能干细胞源pro-T。在一些实施例中,所述Notch因子是Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3或DLL-4。在一些实施例中,DLL-1和DLL-4能够作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0280] 在由多能干细胞源HE细胞生成多能干细胞源T细胞祖细胞(ipro-T)或T细胞(iT)的方法的一个实施例中,所述方法包含通过使永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述永久性HE细胞分化成ipro-T或T,所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE

细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproT,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TPO、IL7、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproT的所述方法进一步包含通过使所述前iproT细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproT分化成ipro-T或iT,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,上述方法包含使用一种或多种Notch因子产生多能干细胞源pro-T。在一些实施例中,所述Notch因子是Jag1、Jag2、DLL-1、DLL-3或DLL-4。在一些实施例中,DLL-1和DLL-4能够作为可溶肽、与珠粒结合的肽、与表面结合的肽或细胞呈递的肽引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使多能干细胞源HE细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0281] 6. 获得多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞-iCD34平台和iNK平台

[0282] 本发明的一个方面提供一种使用优化多阶段方法产生多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞 (iNK) 的方法。一般来说,在一些实施例中,所述方法开始是接种多能干细胞。使多能干细胞发育成中胚层细胞,使所述中胚层细胞扩增且随后分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞。然后使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成且扩增永久性生血内皮细胞。所述HE细胞能够分化成前iproNK,然后分化成NK细胞祖细胞(原NK),所述NK细胞祖细胞能够在相同培养基中连续分化成NK细胞。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞的方法,包含使接种的多能干细胞分化成中胚层、使中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成iHE,然后使所述iHE分化成NK细胞祖细胞。本发明进一步提供一种产生多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞的方法,包含使多能干细胞源中胚层分化成具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞,然后使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞分化成iHE,然后使所述iHE分化成ipro-NK或iNK。或者,本发明提供一种产生多能干细胞源NK细胞祖细胞或iNK的方法,包含使具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞分化成iHE,然后使所述iHE分化成ipro-NK或iNK。另外,本发明提供一种产生多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞的方法,包含使多能干细胞源iHE分化成ipro-NK或iNK。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,用于获得NK细胞祖细胞的培养平台包含通过使原NK细胞与一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原接触来得到NK细胞,其中所述人工抗原是以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞的形式引入。本文所公开的方法是利用优化的iCD34培养平台,其不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0283] 在由接种的iPSC生成多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞 (iNK) 的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使多能干细胞与包含BMP活化剂和任选存在的bFGF的培养基接触而使所述细胞分化成和扩增中胚层细胞;(2)通过使所述中胚层细胞与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层细胞获得永久性生血

内皮细胞潜能；(3) 通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的所述中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述中胚层细胞分化成和扩增永久性HE细胞，所述细胞因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11；和(4) 通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成ipro-NK或iNK，所述细胞因子选自由以下组成的组：SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15，所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中，多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproNK，所述细胞因子选自由以下组成的组：SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、IL15、VEGF和bFGF。在其它实施例中，包含使永久性HE细胞分化成前iproNK的所述方法进一步包含通过使所述前iproNK细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproNK分化成原iNK或iNK，且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中，用于获得NK细胞祖细胞的培养平台包含通过使原NK细胞与一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原接触来得到NK细胞，其中所述人工抗原是以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞的形式引入。在一个实施例中，上述方法进一步包含通过使未处理多能细胞与包含MEKi、GSKi和ROCKi的培养基接触而接种和扩增所述多能细胞。在一些实施例中，上述方法进一步包含使接种的iPSC、中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中，用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中，上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中，所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中，Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中，ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中，上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0284] 在由多能干细胞源中胚层生成多能干细胞源NK细胞祖细胞(ipro-NK)或NK细胞(iNK)的方法的一个实施例中，所述方法包含(1) 通过使中胚层与包含BMP活化剂、Wnt路径活化剂和bFGF的培养基接触而使所述中胚层分化，以获得具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞；(2) 通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的所述中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而使所述细胞分化，以获得永久性HE细胞，所述细胞因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11；和(3) 通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化，以获得ipro-NK或iNK，所述细胞因子选自由以下组成的组：SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15，所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组：VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中，多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中，上述方法进一步包含

通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproNK,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TP0、IL3、IL7、IL15、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproNK的所述方法进一步包含通过使所述前iproNK细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproNK分化成ipro-NK或iNK,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,用于获得NK细胞祖细胞的培养平台包含通过使原NK细胞与一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原接触来得到NK细胞,其中所述人工抗原是以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞的形式引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含使用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0285] 在由具有永久性生血内皮细胞潜能的多能干细胞源中胚层细胞生成多能干细胞源NK细胞祖细胞 (ipro-NK) 或NK细胞 (iNK) 的方法的一个实施例中,所述方法包含(1)通过使具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞与包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的Wnt路径活化剂的培养基接触而分化成永久性HE细胞,所述细胞因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11;和(2)通过使所述永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成ipro-NK或iNK,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15,所述任选存在的一种或多种因子选自由以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproNK,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TP0、IL3、IL7、IL15、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproNK的所述方法进一步包含通过使所述前iproNK细胞与包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproNK分化成ipro-NK或iNK,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,用于获得NK细胞祖细胞的培养平台包含通过使原NK细胞与一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原接触来得到NK细胞,其中所述人工抗原是以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞的形式引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使接种的多能干细胞、中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方

法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0286] 在由多能干细胞源HE细胞生成多能干细胞源NK细胞祖细胞(ipro-NK)或NK细胞(iNK)的方法的一个实施例中,所述方法包含通过使永久性HE细胞与包含一种或多种生长因子和细胞因子和任选存在的一种或多种因子的培养基接触而使所述永久性HE细胞分化成ipro-NK或iNK,所述细胞因子选自以下组成的组:SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15,所述任选存在的一种或多种因子选自以下组成的组:VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,上述方法进一步包含通过使永久性HE细胞与包含BMP活化剂、ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子的培养基接触而使所述HE细胞分化成前iproNK,所述细胞因子选自以下组成的组:SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL7、IL15、VEGF和bFGF。在其它实施例中,包含使永久性HE细胞分化成前iproNK的所述方法进一步包含通过使所述前iproNK细胞与包含一种或多种生长因子和选自SCF、Flt3L、IL3、IL7和IL15组成的组的细胞因子的培养基接触而使所述前iproNK分化成ipro-NK或iNK,且所述培养基不含或基本上不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种。在一些实施例中,用于获得NK细胞祖细胞的培养平台包含通过使ipro-NK细胞与一种或多种刺激NK生长、发育和成熟的人工抗原接触来得到NK细胞,其中所述人工抗原是以珠粒结合、质膜颗粒和/或抗原呈递细胞的形式引入。在一些实施例中,上述方法进一步包含使接种的多能干细胞、中胚层和/或具有永久性生血内皮细胞潜能的中胚层细胞经受约2%与约10%之间的低氧压。在一些实施例中,用上述方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包含利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93分选所得iHE细胞。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些其它实施例中,所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。在一些实施例中,所述方法中的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt路径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,ROCK抑制剂是Y27632或噻唑维。在一些实施例中,上述方法中的培养基不含或基本上不含TGFβ受体抑制剂。

[0287] 根据上述内容,本文所涵盖的培养平台提供的优势之一是培养、传代和解离单一多能细胞用于多能干细胞分化的活力和存活率增强,而无需形成EB。在一些实施例中,多能干细胞是iPSCs。在一些实施例中,iPSCs是未处理iPSCs。在一些实施例中,对iPSCs进行基因组工程改造。在一些实施例中,对来自特定供者或患者的免疫细胞的iPSCs重编程。使细胞解离成单一细胞,例如单一细胞悬浮液,能够通过酶或机械方式实现。所属领域中已知使细胞解离成单一细胞的任何酶试剂都可以用于本发明的方法中。在一个实施例中,解离试

剂选自胰蛋白酶/EDTA、TrypLE-Select、胶原蛋白酶IV和分散酶。根据本文中涵盖的方法，还可以将例如EDTA、阿库酶 (AccuMax) 或阿麦斯 (AccuMax) 等螯合剂单独或与酶试剂组合用于解离细胞。可以使解离试剂溶解于不含钙和镁的PBS中以促进解离成单一细胞。为了增强解离期间和之后的细胞存活率，在一些实施例中，添加存活促进物质，例如一种或多种生长因子、涉及细胞死亡和细胞凋亡的细胞路径的抑制剂，或条件培养基。在一个实施例中，存活促进物质是ROCK抑制剂，包括(但不限于)噻唑维。

[0288] 在一些实施例中，用于分化的iPSC包含遗传印记。在一些实施例中，多能干细胞中的遗传印记包含(i)在将非多能细胞重编程为iPSC期间或之后通过在多能细胞基因组中进行基因组插入、缺失或取代而获得的一种或多种基因修饰模式；或(ii)对供者、疾病或治疗反应具有特异性的来源特异性免疫细胞的一种或多种能保留治疗属性，且其中所述多能细胞是由来源特异性免疫细胞重编程，其中所述iPSC保留来源治疗属性，iPSC源造血谱系细胞中也包含所述来源治疗属性。在一些实施例中，基因修饰模式包含以下中的一种或多种：安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶候选物；或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。在一些其它实施例中，基因修饰模式包含以下中的一种或多种：(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少；(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、TCR或针对双特异性或多特异性接合体的表面触发受体的表达引入或增加。在一些实施例中，表面触发受体是通用的，即，与任何效应细胞类型相容，并且表达通用表面触发受体的效应细胞能够与相同的双特异性或多特异性接合体偶联，无论其细胞类型。在一些实施例中，通用表面触发受体包含抗抗原决定基和共刺激域，其中所述抗抗原决定基对双特异性或多特异性接合体中的抗原决定基具有特异性。在一些实施例中，通用表面触发受体的共刺激域包含IL2用于典型或非典型细胞活化和效应细胞功能强化。在再一些其它实施例中，造血谱系细胞包含与以下中的一种或多种有关的来源特异性免疫细胞的治疗属性：(i) 靶向抗原的受体表达；(ii) HLA呈递或其缺乏；(iii) 对肿瘤微环境的抗性；(iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调节；(iv) 靶向特异性改善，同时肿瘤外效应减少；(v) 对例如化学疗法等疗法的抗性；和(vi) 归巢、存留和细胞毒性改善。

[0289] 在一些实施例中，接合体对细胞类型具有特异性，即，接合体结合到且/或活化特定免疫细胞类型。在特定实施例中，接合体与细胞类型无关，即，接合体结合到且/或活化多种免疫细胞，例如T细胞、NK细胞、NKT细胞、B细胞、巨噬细胞或嗜中性粒细胞。

[0290] 在一些实施例中，iPSC和其衍生造血细胞包含以下中的一种或多种：B2M剔除型、HLA-E/G、PDL1、A_{2A}R、CD47、LAG3剔除型、TIM3剔除型、TAP1剔除型、TAP2剔除型、TAP相关糖蛋白剔除型、NLRC5剔除型、PD1剔除型、RFXANK剔除型、CITTA剔除型、RFX5剔除型和RFXAP剔除型。具有经修饰的HLA I类和/或II类的这些细胞对免疫检测的抗性增强，且因此呈现改善的活体内存留。此外，此类细胞能避免过继性细胞疗法中的HLA匹配的需要且从而提供通用、现成的治疗方案来源。

[0291] 在一些实施例中，iPSC和其衍生的造血细胞包含HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CAR、TCR、CD137或CD80中的一种或多种。此类细胞具有改善的免疫效应子能力。

[0292] 在一些实施例中，iPSC和其衍生的造血细胞包含表面触发受体以便与双特异性或

多特异性接合体偶联。此类细胞具有改善的肿瘤靶向特异性。

[0293] 在一些实施例中,iPSC和其衍生的造血细胞对抗原具有特异性。

[0294] 细胞培养和培养基收集技术概述于Hu等人,《现代生物技术观点(Curr.Opin.Biotechnol.)》8:148,1997;K.Kitano,《生物技术(Biotechnology)》17:73,1991;《现代生物技术观点》2:375,1991;Birch等人,《生物工艺技术(Bioprocess Technol)》19:251,1990;“畸胎癌和胚胎干细胞:一种实用方法(Teratocarcinomas and embryonic stemcells:A practical approach)”(E.J.Robertson编,IRL Press Ltd.1987);“小鼠发育技术指南(Guide to Techniques in Mouse Development)”(P.M.Wasserman等人编,Academic Press 1993);“试管内胚胎干细胞分化(Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro)”(M.V.Wiles,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》225:900,1993);“胚胎干细胞的特性和利用:应用于人类生物学和基因疗法的前景(Properties and uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy)”(P.D.Rathjen等人,1993)。干细胞分化评述于Robertson,《细胞生物学方法(Meth.Cell Biol.)》75:173,1997;和Pedersen,《生殖、生育和发育(Reprod.Fertil.Dev.)》10:31,1998。

[0295] 在本发明中,用于富集具有具体特征的细胞群的策略提供于所述方法的不同阶段。在一个实施例中,从细胞群中富集多能干细胞的方法包含通过使群体中的细胞解离且使细胞再悬浮来制备单一细胞悬浮液。解离的细胞可以再悬浮于任何适合溶液或培养基中用于维持细胞或进行细胞分选。在特定实施例中,单一多能细胞悬浮液含有GSK3抑制剂、MEK抑制剂和Rock抑制剂且缺乏TFGβ抑制剂。在某些实施例中,GSK3抑制剂是CHIR99021,MEK抑制剂是PD0325901,且/或Rock抑制剂是噻唑维。

[0296] 在一个特定实施例中,分选细胞群以积极地选择多能细胞,且/或耗乏群体中的非重编程或非多能细胞,借此获得多能细胞富集的细胞群。在一个实施例中,制备单一细胞悬浮液,且然后制备单一细胞用于分选,例如通过使用例如适当抗体针对多能性的标记物进行染色。细胞可以利用任何适合的细胞分选方法进行分选,例如利用磁珠或流式细胞术(FACS)分选。

[0297] 细胞可以基于多能性的一种或多种标记物或指示细胞分化的标记物进行分选,包括(但不限于)SSEA3/4、TRA1-60/81、TRA1-85、TRA2-54、GCTM-2、TG343、TG30、CD9、CD29、CD133/凸素、CD140a、CD56、CD73、CD105、OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、SSEA1(小鼠)、CD30、SSEA5、CD90和/或CD50的表达。在各种实施例中,细胞是基于多能性或分化的至少两种、至少三种或至少四种标记物进行分选。在某些实施例中,基于SSEA4表达,且在某些特定实施例中,是基于SSEA4与TRA1-81和/或TRA1-60组合的表达分选细胞。在某些实施例中,基于SSEA4、TRA1-81或TRA1-60和/或CD30表达分选细胞。在一个实施例中,基于SSEA4、TRA1-81和CD30分选细胞。在另一实施例中,基于SSEA4、TRA1-60和CD30分选细胞。在某些实施例中,使用分化的一种或多种表面标记物进行细胞分选包括(但不限于)CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7,以及多能标记物,例如SSEA4、TRA1-81和/或CD30。

[0298] 在一些实施例中,经历重编程的细胞群或多能细胞群中的分化细胞被耗乏。在一个实施例中,能够使经诱导以重编程的多能细胞群或细胞群中的具有分化细胞的一种或多种细胞表面标记物的细胞耗乏。分化细胞的细胞表面标记物的说明性实例包括(但不限于)

CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7。在特定实施例中，CD13用作分化细胞的表面标记物。

[0299] 在其它实施例中，细胞群经诱导以分化成所期望的谱系且耗乏多能细胞以获得正分化或已分化细胞的富集群体。在一些实施例中，分化细胞群包含已经诱导而分化成特定谱系的细胞群，例如ESCs或iPSCs。在一些实施例中，细胞群中的多能细胞可以使用上述负向细胞分选技术（“淘选”）耗乏，例如根据磁珠或基于多能性标记物的FACs分选群体中的细胞。在一些实施例中，包含分化细胞的细胞群是通过使用多能性标记物的FACs进行分选，且获得表达多能性标记物的细胞耗乏的部分。在其它实施例中，细胞群是通过基于分化标记物的FACs进行分选，以获得多能性标记物耗乏的部分，所述分化标记物例如谱系特异性标记物，包括（但不限于）CD13、CD26、CD34、CD45、CD31、CD46和CD7。在本发明的一些特定实施例中，CD13用作分化细胞的表面标记物。

[0300] D. 利用本文所提供的方法和平台产生的细胞群和细胞系

[0301] 在一些实施例中，重编程之后所培养的细胞经诱导而分化，历时至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、18、20、22、24、26、28、30、32、35、40、42或45天，或其间的任何天数。在一些实施例中，重编程之后所培养的细胞被诱导约1到42天、2到40天、2到35天、2到20天、2到10天、4到30天、约4到24天、约6到22天，或约8到约12天。在一些实施例中，所述细胞是多能干细胞，包括iPSCs。在一些实施例中，iPSCs是未处理iPSCs。在一个实施例中，富集提供了一种在相对较短时间内获得克隆多能干细胞源分化细胞群落的方法，借此改善在不同阶段产生多能干细胞源分化细胞的效率。在一个实施例中，富集提供了一种获得表达CD34的HE细胞、表达CD34的HSC细胞、T或NK细胞祖细胞和T或NK细胞的方法，借此改善产生细胞群中的每一个的效率。富集可以包含分选细胞群，以鉴别出且获得表达具体特征标记物的细胞，所述特征标记物指示分化阶段/细胞类型。在一些实施例中，所述分选是利用CD34、CD43、CD73、CXCR4和/或CD93。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性、CD43阴性和CD93阴性。在一些其它实施例中，所述分选是利用CD34阳性和CD93阴性。另一种富集方法包含使表达代表非期望细胞类型的标记物的细胞耗乏，以获得所期望细胞类型的富集群体。

[0302] 因而，本发明的一个方面提供一种组合物，其包含一种或多种以下细胞的细胞群、细胞系或克隆细胞：(i) 多能干细胞源CD34+HE细胞（iCD34），其中所述iCD34细胞具有分化成多潜能祖细胞的能力，且其中所述iCD34细胞是CD34+CD43-；(ii) 多能干细胞源永久性生血内皮细胞（iHE），其中所述iHE细胞系或克隆细胞是CD34+，和CD93-、CXCR4-、CD73-和CXCR4-CD73-中的至少一种；(iii) 多能干细胞源多潜能祖细胞（iMPP），其中所述iMPP细胞是CD34+CD45+；(v) 多能干细胞源T细胞祖细胞（ipro-T），其中所述T细胞祖细胞是CD34+CD45+CD7+；(iv) 多能干细胞源T细胞（iT），其中所述T细胞是CD45+CD4+CD3+或CD45+CD8+CD3+；(vi) 多能干细胞源NK细胞祖细胞（ipro-NK），其中所述NK细胞祖细胞是CD45+CD56+CD7+CD3-；和(vii) 多能干细胞源NK细胞（iNK），其中所述NK细胞是CD45+CD56+NKp46+。在一些实施例中，上述组合物、细胞群、细胞系或克隆细胞适于低温保存。在一些实施例中，所述组合物、细胞群、细胞系或克隆细胞适于周围储存条件的时间超过12小时、24小时、36小时、

48小时,但不长于3天、4天、5天、6天或一周。

[0303] 本发明的另一方面提供一种混合物,其包含以下中的一种或多种:多能干细胞源(i) CD34+HE细胞(iCD34),和一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(ii) 永久性生血内皮细胞(iHE),和一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(iii) 永久性HSCs,和一种或多种选自iMPP-A、iTC-A2、iTC-B2、iNK-A2和iNK-B2的培养基;(iv) 多潜能祖细胞(iMPP),和iMPP-A;(v) T细胞祖细胞(ipro-T),和一种或多种选自iTC-A2和iTC-B2的培养基;(vi) T细胞(iTC),和iTC-B2;(vii) NK细胞祖细胞(ipro-NK),和一种或多种选自iNK-A2和iNK-B2的培养基;和/或(viii) NK细胞(iNK),和iNK-B2;其中

[0304] a. iCD34-C包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和选自由bFGF、VEGF、SCF、IL6、IL11、IGF和EPO组成的组的细胞因子,和任选存在的Wnt路径活化剂;且不含TGF β 受体/ALK抑制剂;

[0305] b. iMPP-A包含BMP活化剂、ROCK抑制剂,和一种或多种生长因子和选自由以下组成的组的细胞因子:TP0、IL3、GMCSF、EPO、bFGF、VEGF、SCF、IL6、Flt3L和IL11;

[0306] c. iTC-A2包含ROCK抑制剂、一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、TP0和IL7组成的组的细胞因子;和任选存在的BMP活化剂;

[0307] d. iTC-B2包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L和IL7组成的组的细胞因子;其中所述组合物不含VEGF、bFGF、BMP活化剂和ROCK抑制剂中的一种或多种;

[0308] e. iNK-A2包含ROCK抑制剂和一种或多种生长因子和细胞因子以及任选存在的BMP活化剂,所述细胞因子选自由以下组成的组:SCF、Flt3L、TP0、IL3、IL7和IL15,且

[0309] f. iNK-B2包含一种或多种生长因子和选自由SCF、Flt3L、IL7和IL15组成的组的细胞因子。

[0310] E. iPSC源免疫细胞的治疗用途

[0311] 本发明提供一种组合物,其包含经分离的免疫细胞群或亚群,所述免疫细胞群或亚群已使用如公开的方法和组合物由iPSC衍生,其中所述免疫细胞适用于基于细胞的过继性疗法。在一个实施例中,经分离的免疫细胞群或亚群包含iPSC衍生的HSC细胞。在一个实施例中,经分离的免疫细胞群或亚群包含iPSC衍生的T细胞。在一个实施例中,经分离的免疫细胞群或亚群包含iPSC衍生的HSC细胞。在一些实施例中,iPSC衍生的免疫细胞在活体外进一步调节以改善治疗潜能。在一个实施例中,已衍生自iPSC的经分离的免疫细胞群或亚群包含数目或比率增加的未处理T细胞、干细胞记忆T细胞和/或中枢记忆T细胞。在一个实施例中,已衍生自iPSC的经分离的免疫细胞群或亚群包含数目或比率增加的I型NKT细胞。在另一个实施例中,已衍生自iPSC的经分离的免疫细胞群或亚群包含数目或比率增加的适应性NK细胞。在一些实施例中,衍生自iPSC的经分离的HSC细胞、T细胞或NK细胞群或亚群是同种异体的。在一些其它实施例中,衍生自iPSC的经分离的HSC细胞、T细胞或NK细胞群或亚群是自生的。

[0312] 在一些实施例中,分化用的iPSC包含传递效应细胞的所期望治疗属性的遗传印记,所述遗传印记在衍生自所述iPSC的分化造血细胞中保留且发挥作用。

[0313] 在一些实施例中,多能干细胞中的遗传印记包含(i) 在将非多能细胞重编程为iPSC期间或之后通过在多能细胞基因组中进行基因组插入、缺失或取代而获得的一种或多

种基因修饰模式;或(ii)对供者、疾病或治疗反应具有特异性的来源特异性免疫细胞的一种或多种能保留治疗属性,且其中所述多能细胞是由来源特异性免疫细胞重编程,其中所述iPSC保留来源治疗属性,iPSC源造血谱系细胞中也包含所述来源治疗属性。

[0314] 在一些实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶标候选物;或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。在一些其它实施例中,基因修饰模式包含以下中的一种或多种:(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;(ii) HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A2AR、CAR、TCR或与双特异性或多特异性接合体偶联的表面触发受体的表达引入或增加。

[0315] 在再一些其它实施例中,造血谱系细胞包含与以下中的一种或多种有关的来源特异性免疫细胞的治疗属性:(i) 靶向抗原的受体表达;(ii) HLA呈递或其缺乏;(iii) 对肿瘤微环境的抗性;(iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调节;(iv) 靶向特异性改善,同时肿瘤外效应减少;(v) 对例如化学疗法等疗法的抗性;和(vi) 归巢、存留和细胞毒性改善。

[0316] 在一些实施例中,iPSC和其衍生造血细胞包含以下中的一种或多种:B2M剔除型、HLA-E/G、PDL1、A_{2A}R、CD47、LAG3剔除型、TIM3剔除型、TAP1剔除型、TAP2剔除型、TAP相关糖蛋白剔除型、NLRC5剔除型、PD1剔除型、RFXANK剔除型、CITTA剔除型、RFX5剔除型和RFXAP剔除型。具有经修饰的HLA I类和/或II类的这些细胞对免疫检测的抗性增强,且因此呈现改善的活体内存留。此外,此类细胞能避免过继性细胞疗法中的HLA匹配的需要且从而提供通用、现成的治疗方案来源。

[0317] 在一些实施例中,iPSC和其衍生的造血细胞包含HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CAR、TCR、CD137或CD80中的一种或多种。此类细胞具有改善的免疫效应子能力。

[0318] 在一些实施例中,iPSC和其衍生的造血细胞对抗原具有特异性。

[0319] 多种疾病可以通过将本发明的免疫细胞引入适于过继性细胞疗法的受检者而得到改善。疾病实例包括多种自体免疫病症,包括(但不限于)斑秃、自体免疫溶血性贫血、自体免疫肝炎、皮炎、糖尿病(1型)、青少年特发性关节炎的一些形式、肾小球肾炎、格雷夫斯病(Graves'disease)、吉兰-巴雷综合症(Guillain-Barrésyndrome)、特发性血小板减少性紫癜、重症肌无力、心肌炎的一些形式、多发性硬化症、天疱疮/类天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多发性肌炎、原发性胆汁性肝硬化、牛皮癣、类风湿性关节炎、硬皮病/全身性硬化症、休格连氏综合症、全身红斑狼疮、甲状腺炎的一些形式、葡萄膜炎的一些形式、白斑病、肉芽肿性多血管炎(韦格纳氏病(Wegener's));血液恶性疾病,包括(但不限于)急性和慢性白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和骨髓发育不良综合症;实体肿瘤,包括(但不限于)脑、前列腺、乳房、肺、结肠、子宫、皮肤、肝脏、骨骼、胰脏、卵巢、睾丸、膀胱、肾脏、头、颈、胃、子宫颈、直肠、喉或食道的肿瘤;和感染,包括(但不限于)HIV-(人类免疫缺陷病毒)、RSV-(呼吸道合胞体病毒)、EBV-(埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus))、CMV-(细胞巨大病毒)、腺病毒相关病症和BK多瘤病毒相关病症。

[0320] 本发明的特定实施例是关于通过向有需要的受检者投与包含本文所述的任何细胞的组合物来治疗所述受检者的方法。在特定实施例中,术语“治疗”等在本文中通常用于指获得所期望的药理学和/或生理学作用。对于疾病和/或可归因于所述疾病的不良影响,

所述作用就完全或部分防止疾病来说,可以是预防的,且/或就部分或完全治愈来说,可以是治疗的。如本文所用,“治疗”涵盖对哺乳动物疾病的任何治疗,且包括:防止可能易患所述疾病、但尚未被诊断患有其的受检者发生所述疾病;抑制所述疾病,即,阻滞其发展;或缓解所述疾病,即,引起所述疾病消退。治疗剂或组合物可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后投与。对正进行的疾病的治疗尤其受到关注,其中治疗使患者的不良临床症状稳定或减少。

[0321] 在特定实施例中,受检者患有能够通过细胞疗法治疗、减轻和/或改善的疾病、病状和/或损伤。一些实施例预期需要细胞疗法的受检者是患有损伤、疾病或病状的受检者,其中细胞疗法(例如将细胞材料投与所述受检者的疗法)能够治疗、减轻、改善和/或降低与所述损伤、疾病或病状相关的至少一种症状的严重度。某些实施例预期需要细胞疗法的受检者包括(但不限于)骨髓或干细胞移植候选者、已接受化学疗法或照射疗法的受检者、患有或处于产生过度增生性病征或癌症(例如过度增生性病征或造血系统癌症)的风险下的受检者、患有肿瘤或处于产生肿瘤(例如实体肿瘤)的风险下的受检者、出现病毒感染或与病毒感染相关的疾病或处于病毒感染或与病毒感染相关的疾病的风险下的受检者。

[0322] 相应地,本发明进一步提供医药组合物,其包含通过本文所公开的方法和组合物制备的多能细胞源造血谱系细胞,其中所述医药组合物进一步包含医药学上可接受的介质。在一个实施例中,医药组合物包含通过本文所公开的方法和组合物制备的多能细胞源T细胞。在一个实施例中,医药组合物包含通过本文所公开的方法和组合物制备的多能细胞源NK细胞。在一个实施例中,医药组合物包含通过本文所公开的方法和组合物制备的多能细胞源CD34⁺HE细胞。在一个实施例中,医药组合物包含通过本文所公开的方法和组合物制备的多能细胞源HSCs。

[0323] 另外,提供上述医药组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入适于过继性细胞疗法的受检者来实现,其中所述受检者患有自体免疫病症;血液恶性疾病;实体肿瘤;或与HIV、RSV、EBV、CMV、腺病毒或BK多瘤病毒相关的感染。

[0324] 经分离的多能干细胞源造血谱系细胞可以具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs。在一些实施例中,经分离的多能干细胞源造血谱系细胞具有约95%到约100% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs。在一些实施例中,本发明提供具有经提纯的T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs的医药组合物,例如具有约95% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs的经分离群体的组合物,以治疗需要细胞疗法的受检者。

[0325] 在一些实施例中,医药组合物包括经分离的多能干细胞源造血谱系细胞群,其中群体具有小于约0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%或30% iPSC源T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs。在一些实施例中,经分离的衍生造血谱系细胞群可以具有超过约0.1%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%或30% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs。在其它实施例中,经分离的衍生造血谱系细胞群可以具有约0.1%到约1%、约1%到约3%、约3%到约5%、约10%-约15%、约15%-20%、约20%-25%、约25%-30%、约30%-35%、约35%-40%、约40%-45%、约45%-50%、约60%-70%、约70%-80%、约80%-90%、约90%-95%,或约95%到约100% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34⁺HE细胞或HSCs。

[0326] 在特定实施例中,衍生的造血谱系细胞可以具有约0.1%、约1%、约3%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%、约99%或约100% T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD34+HE细胞或HSCs。

[0327] 如所属领域的技术人员将理解,自体与同种异体免疫细胞均可以用于细胞疗法。自体细胞疗法能够减少感染、降低GvHD概率和加快免疫重构。同种异体细胞疗法能够具有免疫介导的移植物抗恶性疾病(GVM)作用,和较低的复发率。基于需要细胞疗法的患者或受检者的特定条件,所属领域的技术人员能够确定投与哪一种特定类型的疗法。

[0328] 在特定实施例中,本发明医药组合物中的衍生造血谱系细胞相对于受检者来说是同种异体的。在特定实施例中,本发明医药调配物中的衍生造血谱系细胞相对于受检者来说是自体的。对于自体移植来说,衍生造血谱系细胞的经分离群体相对于患者是完全或部分HLA匹配的。在另一个实施例中,衍生的造血谱系细胞相对于受检者并非HLA匹配的。

[0329] 在一些实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是至少 0.1×10^5 个细胞、至少 0.5×10^5 个细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 5×10^5 个细胞、至少 10×10^5 个细胞、至少 0.5×10^6 个细胞、至少 0.75×10^6 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 1.25×10^6 个细胞、至少 1.5×10^6 个细胞、至少 1.75×10^6 个细胞、至少 2×10^6 个细胞、至少 2.5×10^6 个细胞、至少 3×10^6 个细胞、至少 4×10^6 个细胞、至少 5×10^6 个细胞、至少 10×10^6 个细胞、至少 15×10^6 个细胞、至少 20×10^6 个细胞、至少 25×10^6 个细胞或至少 30×10^6 个细胞。

[0330] 在一些实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是约 0.1×10^5 个细胞到约 10×10^5 个细胞;约 0.5×10^6 个细胞到约 5×10^6 个细胞;约 1×10^6 个细胞到约 3×10^6 个细胞;约 1.5×10^6 个细胞到约 2.5×10^6 个细胞;或约 2×10^6 个细胞到约 2.5×10^6 个细胞。

[0331] 在一些实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是约 1×10^6 个细胞到约 3×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞到约 5×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞到约 10×10^6 个细胞;约 10×10^6 个细胞到约 20×10^6 个细胞;约 10×10^6 个细胞到约 30×10^6 个细胞;或约 20×10^6 个细胞到约 30×10^6 个细胞。

[0332] 在一些其它实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是约 $1 \times$ 个细胞到约 30×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞到约 20×10^6 个细胞;约 1.0×10^6 个细胞到约 10×10^6 个细胞;约 2.0×10^6 个细胞到约 30×10^6 个细胞;约 2.0×10^6 个细胞到约 20×10^6 个细胞;或约 2.0×10^6 个细胞到约 10×10^6 个细胞。

[0333] 在又其它实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是约 1×10^6 个细胞、约 2×10^6 个细胞、约 5×10^6 个细胞、约 7×10^6 个细胞、约 10×10^6 个细胞、约 15×10^6 个细胞、约 17×10^6 个细胞、约 20×10^6 个细胞、约 25×10^6 个细胞或约 30×10^6 个细胞。

[0334] 在一个实施例中,医药组合物中的衍生造血谱系细胞的数目是部分或单一脐带血中的免疫细胞数目,或是至少 0.1×10^5 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^5 个细胞/kg体重、至少 1×10^5 个细胞/kg体重、至少 5×10^5 个细胞/kg体重、至少 10×10^5 个细胞/kg体重、至少 0.5×10^6 个细胞/kg体重、至少 0.75×10^6 个细胞/kg体重、至少 1×10^6 个细胞/kg体重、至少 1.25×10^6 个细胞/kg体重、至少 1.5×10^6 个细胞/kg体重、至少 1.75×10^6 个细胞/kg体重、至少 2×10^6 个细胞/kg体重、至少 2.5×10^6 个细胞/kg体重、至少 3×10^6 个细胞/kg体重、至少 4×10^6 个细胞/kg体重、至少 5×10^6 个细胞/kg体重、至少 10×10^6 个细胞/kg体重、至少 15×10^6 个细

胞/kg体重、至少 20×10^6 个细胞/kg体重、至少 25×10^6 个细胞/kg体重或至少 30×10^6 个细胞/kg体重。

[0335] 本发明提供的衍生造血谱系细胞能够投与受检者而无需在投与之前,在活体外或试管内扩增。在特定实施例中,经分离的衍生造血谱系细胞群是在活体外使用一种或多种试剂调节和处理以获得治疗潜能改善的免疫细胞。可以洗涤经调节之衍生造血谱系细胞群以去除处理剂,且将改善的群体投与患者而不在试管内进一步扩增所述群体。

[0336] 在其它实施例中,本发明提供一种经分离的衍生造血谱系细胞群,将其扩增之后,用一种或多种试剂调节经分离的T淋巴细胞群或亚群。经分离的衍生造血谱系细胞群可以重组产生,以表达TCR、CAR或其它蛋白质。

[0337] 对于经基因工程改造的表达重组TCR或CAR的衍生造血谱系细胞来说,不论对细胞进行基因修饰之前或之后,都能够使用如以下文献中所述的方法对所述细胞进行活化和扩增:例如美国专利6,352,694;6,534,055;6,905,680;6,692,964;5,858,358;6,887,466;6,905,681;7,144,575;7,067,318;7,172,869;7,232,566;7,175,843;5,883,223;6,905,874;6,797,514;6,867,041;和美国专利申请公开第20060121005号。

[0338] 在某些实施例中,可以利用不同方案向衍生的造血谱系细胞提供主要刺激信号和共刺激信号。举例来说,提供每种信号的试剂可以存在于溶液中或与表面偶联。当与表面偶联时,可以使试剂与相同表面偶联(即,“顺式”形成)或与个别表面偶联(即,“反式”形成)。或者,一种试剂可以与表面偶联且另一种试剂存在于溶液中。在一个实施例中,提供共刺激信号的试剂可以结合到细胞表面且提供主要活化信号的试剂存在于溶液中或与表面偶联。在某些实施例中,两种试剂均可以存在于溶液中。在另一个实施例中,所述试剂可以采取可溶形式,且然后与表面交联,例如表达Fc受体的细胞或将结合到所述试剂的抗体或其它结合剂,例如美国专利申请公开第20040101519号和第20060034810号中关于人工抗原呈递细胞(aAPCs)所公开的内容,预期所述人工抗原呈递细胞在本发明中用于活化和扩增T淋巴细胞。

[0339] 包含本发明的衍生造血谱系细胞群的组合物可以是无菌的,且可以适于和备好投与(即,可以在不经任何进一步处理的情况下投与)人类患者。在一些实施例中,所述治疗组合物备好输注至患者。备好投与的基于细胞的组合物意指所述组合物在移植或投与受检者之前不需要任何进一步处理或操作。

[0340] 适合投与患者的治疗上可接受的无菌组合物可以包括一种或多种医药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂(例如医药学上可接受的介质,例如细胞培养基),或医药学上可接受的其它组分。医药学上可接受的载剂和/或稀释剂部分地由所投与的特定组合物以及用于投与治疗组合物的特定方法决定。因此,本发明的治疗组合物存在多种适合的配方(参见例如《雷明顿氏医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第17版,1985,其公开内容以全文引用的方式并入本文)。

[0341] 在特定实施例中,具有经分离的衍生造血谱系细胞群的治疗细胞组合物也具有医药学上可接受的细胞培养基。包含如本文所公开的衍生造血谱系细胞群的治疗组合物可以单独地利用肠内或肠胃外投药方法投与,或其它适合的化合物组合来投与以实现所期望的治疗目标。

[0342] 医药学上可接受的载剂和/或稀释剂必须具有足够高的纯度和足够低的毒性,以

使其适合投与所治疗的人类受检者。另外应该维持或增强治疗组合物的稳定性。医药学上可接受的载剂可以是液体或固体且根据预定的计划投药方式进行选择,以便在与本发明的治疗组合物中的其它组分合并时提供所期望的松密度、稠度等。举例来说,医药学上可接受的载剂可以是(不限于)粘合剂(例如预胶凝化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素等)、填充剂(例如乳糖和其它糖类、微晶纤维素、果胶、明胶、硫酸钙、乙基纤维素、聚丙烯酸酯、磷酸氢钙等)、润滑剂(例如硬脂酸镁、滑石、二氧化硅、胶状二氧化硅、硬脂酸、硬脂酸金属盐、氢化植物油、玉米淀粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠等)、崩解剂(例如淀粉、乙醇酸淀粉钠等),或润湿剂(例如月桂基硫酸钠等)。适用于本发明组合物的医药学上可接受的其它载剂包括(但不限于)水、盐溶液、乙醇、聚乙二醇、明胶、直链淀粉、硬脂酸镁、滑石、硅酸、粘性石蜡、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮等等。

[0343] 此类载剂溶液也可以含有缓冲液、稀释剂和其它适合添加剂。缓冲液是指其化学组成使酸或碱中和而使PH不发生显著变化的溶液或液体。本发明设想的缓冲液实例包括(但不限于)杜尔贝科氏磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)、林格氏溶液(Ringer's solution)、5%右旋糖水溶液(D5W)、标准/生理盐水(0.9%NaCl)。

[0344] 医药学上可接受的这些载剂和/或稀释剂可以按照足以使治疗组合物的PH维持在约3与约10之间的量存在。因而,缓冲剂可以占总组合物的高达约5%(重量/重量)。治疗组合物中还可以包括电解质,例如(但不限于)氯化钠和氯化钾。在一个方面中,治疗组合物的PH在约4到约10范围内。或者,治疗组合物的PH在约5到约9范围内、在约6到约9范围内或在约6.5到约8范围内。在另一个实施例中,治疗组合物包括PH在所述PH范围之一中的缓冲液。在另一个实施例中,治疗组合物具有约7的PH。或者,治疗组合物具有约6.8到约7.4范围内的PH。在再另一个实施例中,治疗组合物具有约7.4的PH。

[0345] 本发明的无菌组合物可以是存在于医药学上可接受的无毒介质中的无菌溶液或悬浮液。悬浮可以是指非粘附条件,其中细胞不附着到固体载体。举例来说,可以搅拌悬浮液中维持的细胞且使其不粘附到载体,例如培养皿。

[0346] 悬浮液是分散液(混合物),其中精细分裂的物质与另一种物质合并,其中形成体经如此精细分裂且混合以致其不能快速沉降。可以使用媒剂(例如液体介质,包括溶液)制备悬浮液。在一些实施例中,本发明的治疗组合物是悬浮液,其中干细胞和/或祖细胞分散于可接受的液体介质或溶液内,例如生理盐水或无血清培养基,且不附着到固体载体。在日常生活中,最常见的悬浮液是固体于液态水中的那些悬浮液。能使用的可接受的稀释剂(例如媒剂和溶剂)是水、林格氏溶液、等张氯化钠(生理盐水)溶液和无血清细胞培养基。在一些实施例中,使用高张溶液制备悬浮液。另外,传统上使用无菌不挥发油作为溶剂或悬浮介质。在肠胃外施药中,特别适合的媒剂由溶液(优选油或水溶液)以及悬浮液、乳液或植入物组成。水性悬浮液可以含有提高悬浮液粘度的物质,包括例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇和/或聚葡萄糖。在一些实施例中,输注溶液相对于受检者组织来说具有等张性。在一些实施例中,输注溶液相对于受检者组织来说具有高张性。

[0347] 医药学上可接受的载剂、稀释剂和构成本发明的即投型医药组合物的其它组分衍生自允许治疗组合物在临床疗法中使用的美国医药级试剂。典型地,这些成品试剂,包括任何介质、溶液或医药学上可接受的其它载剂和/或稀释剂,按照所属领域中的传统方式灭菌,例如过滤灭菌,且在使用前,针对多种非期望的污染物(例如霉菌菌、内毒素或病毒污

染)加以测试。在一个实施例中,医药学上可接受的载剂基本上不含人类或动物来源的天然蛋白质,且适合于储存医药组合物中的细胞群,包括造血干细胞和祖细胞。所述医药组合物旨在投与人类患者,且因此基本上不含细胞培养组分,例如牛血清白蛋白、马血清和胎牛血清。

[0348] 本发明还部分地提供医药学上可接受的细胞培养基在本发明的特定组合物和/或培养物中的用途。此类组合物适合投与人类受检者。一般来说,支持本发明的衍生造血谱系细胞维持、生长和/或健康的任何培养基适用作医药学细胞培养基。在特定实施例中,医药学上可接受的细胞培养基是无血清且/或无饲养层的培养基。

[0349] 所述医药组合物可以具有适于储存经调节且经分离的衍生造血谱系细胞群的无血清培养基。在各种实施例中,无血清培养基是非动物的,且可以任选地是不含蛋白质。任选地,所述培养基可以含有生物医药学上可接受的重组蛋白。非动物培养基是指其中所述组分来源于非动物来源的培养基。重组蛋白置换非动物培养基中的原生动动物蛋白且营养获自合成、植物或微生物来源。相比之下,无蛋白质培养基定义为基本上不含蛋白质。

[0350] 所属领域的技术人员将了解,上述培养基实例具有说明性且决不限适用于本发明的培养基配方,存在许多已知的且可供所属领域的技术人员使用的适合培养基。

[0351] 所述医药组合物基本上不含霉菌、内毒素和微生物污染。在特定实施例中,治疗组合物含有低于约10、5、4、3、2、1、0.1或0.05 μ g/ml的牛血清白蛋白。

[0352] 关于霉菌和微生物污染,如本文所用,“基本上不含”意指所属领域的技术人员已知的公认测试读数为阴性。举例来说,使用适当的阳性和阴性对照,通过将治疗组合物样品在肉汤培养基中传代培养且在第1天、第3天、第7天和第14天分配于37 $^{\circ}$ C琼脂板上来确定霉菌污染。在100倍显微镜下,比较样品外形与阳性和阴性对照组的外形。另外,将指示细胞培养物的接种体培育3天和5天且通过落射荧光显微镜、在600倍下、使用DNA结合的荧光染料检查霉菌的存在。如果琼脂和/或肉汤培养基程序和指示细胞培养程序表明不存在霉菌污染证据,那么所述样品被认为是令人满意的。

[0353] 有机溶剂或适合的有机溶剂一般是指含碳液体或气体,其溶解固体、液体或气态溶质,从而产生溶液。适合的有机溶剂是适于活体外投与哺乳动物细胞或与哺乳动物细胞一起培育的有机溶剂,其也能适于活体内投与受检者,例如在活体外条件(例如细胞培养)下或活体内条件下、在所选浓度下、在培育或投药期间使毒性或其它抑制作用最小的有机溶剂。适合有机溶剂对于本文所述药剂的储存稳定性和操作来说也应该是适当的。

[0354] 适合有机溶剂的实例包括(但不限于)二甲亚砜(DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲氧基乙烷(DME)和二甲基乙酰胺,包括其混合物或组合。在某些实施例中,组合物或有机溶剂基本上不含乙酸甲酯,这意味着组合物或溶剂中仅存在痕量(优选检测不到的量)的乙酸甲酯(例如根据高压液相色谱(HPLC)、气相色谱(GC)等所测量)。

[0355] 不含内毒素的容器或组合物意指所述容器或组合物含有至多痕量(即,对受检者无不良生理学作用的量)的内毒素或检测不到的量的内毒素。细胞“基本上不含内毒素”意指每剂量细胞中存在较少的内毒素,其已被FDA允许用于生物,总内毒素为每天每公斤体重5EU,对于平均70kg的人来说,是每总细胞剂量350EU。

[0356] 在一个实施例中,不含内毒素的容器和/或组合物不含至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%内毒素。内毒素是与某些细菌(典型地,革兰氏阴性细菌

(gram-negative bacteria)) 相关的毒素,但内毒素可以发现于革兰氏阳性细菌中,例如单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)。最流行的内毒素是发现于多种革兰氏阴性细菌外膜中的脂多糖 (LPS) 或脂寡糖 (LOS),其代表这些细菌致病能力的重要病原性特点。少量内毒素在人体中会产生发热、降低血压,以及活化炎症和凝血,以及其它不良生理学作用。因此,通常希望从药品容器中去掉大部分或所有痕量内毒素,因为至少量也会对人体产生不良作用。可以使用所属领域中已知的方法从容器中去掉内毒素,例如,可以将容器在HEPA过滤式洗涤设备中用不含内毒素的水清洁,在250℃去除热原质,且在位于100/10类无尘室(例如100类无尘室在一立方英尺的空气中含有不超过100个大于半微米的颗粒)内部的HEPA过滤式工作站中清洁包装。

[0357] 实例

[0358] 以下实例是为了说明,而非为了限制而提供。

[0359] 实例1-hiPSC产生和维持

[0360] 使用不同因子组合,包括(但不限于)OCT4/SOX2/LargeT、OCT4/SOX2或OCT4/SOX2/NANOG/LargeT,在含有ROCK、MEK、GSK3路径和TGFβ受体抑制剂的重编程培养基存在下,诱导体细胞(包括成纤维细胞和血细胞)向多能状态重编程(Valamehr等人,《科学报道 (Sci Rep.)》2012;2:213)。诱导十四天后,将重编程群体转移到维持培养基中,所述维持培养基含有ROCK、GSK3和MEK路径抑制剂、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)以及白血病抑制因子(LIF)(Valamehr等人,《干细胞报道 (Stem Cell Reports)》2014,2(3):366-381)。细胞无限地保持于维持培养基中。

[0361] 诱导约三周后,将重编程群体分选至96孔板的个别孔中。表征所选克隆系且选择代表未处理hiPSCs的完全重编程克隆系用于分化研究(Valamehr等人,《干细胞报道》2014,2(3):366-381)。为了测定维持期间和分化后的未分化细胞百分比,对SSEA4、TRA181和CD30的共表面表达进行流式细胞术分析。

[0362] 在体细胞重编程期间或之后,还能使用例如美国申请第62/251,032号和第62/337,258号中所公开的方法产生基因组经工程改造的iPSCs,所述美国申请以全文引用的方式并入本文。

[0363] 另外,可以获得由优选供者或患者的所选体细胞(包括免疫系统细胞,例如T细胞)重编程的hiPSC,所述hiPSC具有有助于治疗多种疾病(包括癌症)的独特属性且/或能够分化成具有相同独特属性的淋巴效应细胞。

[0364] 实例2-使用iCD34培养平台进行的造血分化和鉴别具有移植潜能的HE群体

[0365] iCD34平台是造血谱系细胞分化用的优化系统。为了引发向造血谱系分化,第0天(D 0)将hiPSCs作为单层接种于维持培养基中且让其粘附和扩增约24小时。此时,在D1,移出维持培养基且用不含维持因子的基础培养基置换。在大约D2,通过将所述培养基转换为iCD34-A来引发造血分化(参见图1)。如图1中所说明,在D3用生长因子bFGF补充培养基且随后转换为iCD34-B培养基用于分化。维持单层直至大约D5-D6,此时,它们解离成单一细胞且作为低密度单层接种于iCD34-C培养基中直至分化至大约D10。从大约D2造血分化开始维持低氧压(2-10%O₂),直至分化大约D10。

[0366] 在培养过程期间,根据单层解离成单一细胞和对CD34和任选存在的CD43、CD45、CXCR4、CD73和/或CD93的表面标记物表达进行的分析,监测向造血谱系的定向分化(图4A)。

在分化大约D8,根据细胞表面表达标志CD34+观察代表HE的细胞群的外形。在CD34+细胞中还观察到CD43-CXCR4-CD73-。维持CD34+群体直至大约D10(图4A)。在D10(这个时间点可以缩短到约D9或延长到约D12),使细胞解离成单一细胞且使用BD FACS Aria、根据FACS分选出CD34+HE群体用于进一步分析和功能评估。图4A呈现示例性造血输出能力:单一iPSC的每次输入产生了总计463个CD34+细胞和41个CD34+CD43-CXCR4-CD73-细胞,展现至少2.5%的向永久性HE细胞的转化率(图4A)。

[0367] 为了展现hiPSC源iHE的移植潜能,第10天分选出CD34+细胞且在iMPP分析中培养7天,如上文所述。培养总共17天(iCD34 10天加iMPP 7天)之后,通过眼眶后注射将约400,000个细胞注射到NSG中。200,000个脐带血CD34+细胞作为对照注射到个别小鼠中。图22展现移植CD34阳性细胞的5周重构,如根据小鼠周边血液中存在表达人类CD45标记物的细胞所发现。

[0368] 实例3-通过小分子、细胞因子和接种密度调节来优化HE产生

[0369] 为了优化hiPSCs在分化大约10天之后高效产生HE,检查若干参数。通过在matrigel™涂布的6孔培养皿上接种数目增加的每孔 7.5×10^4 个到每孔 1.5×10^5 个hiPSCs且然后在约D10分析CD34+HE群体的产生来评估分化D0的最优单层接种密度。图5A表明增加细胞接种密度使CD34+细胞总百分比增加,但使CXCR4-CD73-HE亚群减少。尽管存在此减少,但单层分化10天之后,hiPSCs向HE的最高转化率是在每孔 1.5×10^5 的最高接种密度下测试的(图4C)。

[0370] 通过在分化约D2到约D6用浓度增加的0ng/ml到30ng/ml范围内的BMP4处理培养物来评估造血分化初始阶段期间的BMP4调节浓度对HE产生的影响。通过检测CD34+HE群体来评估D10的HE产生。图5B表明在低于阈值BMP4浓度的情况下,D2到D6增加BMP4浓度使HE群体在D10增加,表明最优浓度为约3ng/mL。

[0371] Wnt路径活化剂CHIR99021负责诱导hiPSCs的永久性造血程序。通过约D3.75到约D6用浓度增加的CHIR处理培养物来评估CHIR在造血分化方案的诱导期期间的调节作用。图5C表明虽然增加CHIR99021浓度使CD34+细胞总百分比增加,但其却使HE亚群百分比减少,其中CHIR99021的最优浓度是约1 μ M。

[0372] 在定向分化方案的D6,将单层培养物解离成单一细胞且作为单层再接种用于进一步分化成HE。D6的接种密度表明可影响HE产生,如图5D中所展现,其中细胞浓度从 1.5×10^5 减少到 7.4×10^4 使HE群体百分比增加。

[0373] 实例4-根据Notch依赖性造血和MPP分化来确定HE的造血潜能

[0374] 为了证明hiPSC源永久性群体HE的造血潜能,使用FACS分选出细胞且评估其经历内皮细胞向造血细胞转变以产生CD45+造血祖细胞的能力,如图1的多潜能祖细胞分析(iMPP)中所述。将约30,000个CD34+HE细胞作为单层接种于iMPP-A培养基中且进一步培养6-8天。图6A说明了单层培养物的表型变化,其中出现圆形造血细胞,且流动式细胞测量术染色鉴别出在6-8天培养期间存在CD45+。

[0375] 为了评估定向分化方案的D10所产生的HE群体是否呈现永久性HE,在持续时间为7-9天的iMPP分析中,用Notch路径抑制剂 γ 分泌酶抑制剂(γ SI)处理分选出的CD34+HE细胞。每2天将新鲜 γ SI添加到iMPP-A培养基中。约8天之后,利用流式细胞术评估单层培养物中CD45+造血细胞的出现。相较于媒剂对照组,在经 γ SI处理的培养物中发现CD45+细胞显

著减少,证明对Notch信号传导路径的依赖性和因此存在永久性HE(图6B)。

[0376] 实例5-通过操控氧气条件来优化HE和iMPP产生

[0377] 为了评估氧气环境是否影响永久性HE和iMPP造血祖细胞的产生,如图1中所述,使hiPSCs在常氧(21%O₂)或低氧(5%O₂)条件下分化。在分化大约D10,利用流式细胞术对单层计数和评估CD34+HE群体的存在。如图7A中所见,在低氧条件下分化使得CD34+HE产生量增加。为了证实在低氧条件下产生的HE保持产生CD45+造血祖细胞的潜能,利用FACS从常氧和低氧分化条件下分离出CD34+细胞且利用iMPP分析进行评估。在两种条件下产生的HE具有等效的iMPP潜能,这表明低氧条件下的造血分化使永久性HE输出增加(图7B)。

[0378] 实例6-第8天分化培养物和HE的低温保存

[0379] 在直接分化方案的大约D10,使完整培养物解离,以评估其在补充有10%DMSO的培养基中在低温保存8天之后维持造血潜能的能力。使解冻的细胞再悬浮且随后在如图1中所述的iMPP-A培养基中培养7天,随后进行流动分析。如图8A中所见,低温保存的D10细胞在冷冻/解冻过程中存活且具有与未冷冻对照组类似的造血潜能,如根据CD45+细胞的存在所发现。

[0380] 评估分选出的CD34+细胞在低温保存之后维持造血潜能的能力。将在低氧条件下产生的D10 iCD34分离出来且在如图1中所述的iMPP分析中直接接种,或在iMPP-A培养基中低温保存7天,且然后解冻且在iMPP分析中接种。如图8中所见,低温保存的第10天iCD34细胞在解冻时能够存活且展现与新鲜iCD34+细胞类似的表型(图8A)。低温保存的第10天CD34+分选细胞在刚解冻之后的活力高于70%(图8B)。还表明低温保存的第10天iCD34+分选细胞在iMPP分析期间能够存活且产生CD45+造血细胞(图8C),且能够产生iT和iNK淋巴祖细胞(图8D)。这种低温保存方法适用于第6-12天之间的中间细胞,或导向分化期间的其它下游细胞,所述细胞包括iHSC、iMPP、前iproT、前iproNK、ipro-T、ipro-NK、T细胞、NK细胞、NKT细胞和B细胞。

[0381] 实例7-第8天分化培养物在整夜装运之后的恢复

[0382] 使得自6孔板的第6天分化培养物按照每瓶200,000个细胞的接种密度在T25培养瓶中传代且然后在第8天填满培养基且在Styrofoam盒中保持整夜,以评估直接装运新鲜细胞而不需要低温保存的可行性。起初在37℃水浴中保持的冷包只要可能,也添加到聚苯乙烯泡沫盒中以便保持37℃温度。测试两种培养基组成,以及在37℃培育箱中保持的对照烧瓶:具有30%浓度的细胞因子和形态发生素(第8天的步骤中使用)的烧瓶和具有100%浓度的烧瓶。第9天,从盒中移出烧瓶,培养基用10mL的第8天培养基置换,同时将新盖子放在烧瓶上且允许恢复,随后在第10天加以处理以便针对CD34+HE群体的存在进行流动分析。如图9中所见,HE的总体输出在所有条件之间是类似的,这证明新鲜整夜装运第8天培养物作为传递HE细胞的有效方式的可行性。这种新鲜装运和操控方法不影响在导向分化期间获得的其它中间细胞的分化能力,所述细胞包括iHSC、iMPP、前iproT、前iproNK、ipro-T和ipro-NK。新鲜装运还适用于iPSC源T细胞、NK细胞、NKT细胞或B细胞。

[0383] 实例8-使用表达DLL4的基质细胞使HE向成熟T和NK淋巴谱系分化的连续性

[0384] 使分选出的CD34+HE细胞向T和NK淋巴谱系进一步分化。对于T细胞来说,分选后,将HE细胞转移到低附着组织培养板中的iTc-A2无血清分化培养基中,所述培养基包含ROCK抑制剂、SCF、Flt3L、TPO和IL7(图2)。5天之后,将所述细胞转移到粘附培养物中以完成T细

胞分化,所述粘附培养物在含有SCF、Flt3L和IL7的iTc-B2分化培养基中含有表达DLL4的基质细胞。培养约10天(HE分离后)之后,根据细胞表面标记物CD34和CD7的共表达来评估细胞培养物中的T细胞祖细胞的产生。进一步分化约15-20天之后,这些CD34+CD7+T细胞祖细胞生成了独特的成熟T细胞群,如根据CD4和CD8的表达所发现。图10描绘了第10天HE群体生成早期T细胞祖细胞(图10A)和成熟T细胞(图10B)亚群的试管内分化能力,此根据对共培养物中所产生的CD45+CD56-群体的分析。图15描绘了第10天HE群体生成成熟T细胞亚群的试管内分化能力,此根据在培养约30天(HE分离后)之后共培养物中所产生的CD45+CD56-群体的分析。

[0385] 对于NK细胞来说,分选后,使HE细胞在低附着组织培养板上、在含有SCF、TPO、Flt3L、IL3、IL15和IL7的iNK-A2无血清分化培养基中培养(图3)。5天之后,将所述细胞转移到粘附培养物中以完成NK细胞分化,所述粘附培养物在含有SCF、IL3、IL15、Flt3L和IL7的iNK-B2分化培养基中含有表达DLL4的基质细胞。培养约10-15天(HE分离后)之后,评估细胞培养物中的NK细胞祖细胞产生情况,随后再培养10-15天之后,评估成熟NK亚群。CD56和CD161(NKR-P1A)是在早期NK细胞发育期间表达的第一细胞表面标记物,随后是CD16、KIR、CD8和NKG2D(CD314)在较晚成熟NK细胞亚群上表达。图11描绘了第10天HE群体生成早期NK细胞祖细胞和成熟NK细胞亚群的试管内分化能力,此根据对共培养物中所产生的CD45+群体的分析。

[0386] 增强NK细胞祖细胞成熟的一种替代方法是在悬浮培养物中与饲养细胞共培养。将第20天iNK细胞从DLL4-基质细胞培养物中转移到基于饲养层的悬浮培养物中另外培养12天,所述悬浮培养物的iNK-B2培养基含有SCF、IL15、Flt3L和IL7。图16描绘了第10天HE群体使用饲养层悬浮培养生成成熟NK细胞亚群的试管内分化能力,此根据对基质和基于饲养层共培养物中所产生的CD45+群体的分析(相较于周边血液源NK细胞)。使hiPSC源CD34+细胞向NK细胞谱系分化20天且然后放入悬浮培养物中供进一步成熟。成熟NK谱系标记物鉴别成熟NK细胞的存在,如根据CD56、CD122、NKp30、CD94、CD16、NKG2D和KIR所定义。

[0387] 实例9-单层hiPSC造血分化平台实现了高度可扩展的扩增策略

[0388] 将如图1-3中所述在定义的无血清和无饲养层培养物中作为单层接种且向造血细胞分化的hiPSCs与聚集形成类胚胎体以引发造血分化的hiPSCs计划(Kennedy等人,《细胞报道(Cell Reports)》2012:1722-1735)进行比较。两种培养组均使用100,000个hiPSCs作为初始启动数目。在造血分化过程期间,按常规方式进行细胞计数和表型评估,以展现每种系统的扩增潜能。如图12所示,截至分化第6天,在单层培养物中检测到大量CD34阳性细胞:逾2百万个CD34+细胞,而在EB形式中,未检测到CD34阳性细胞。分化第8天,单层形式已经产生了约2.4百万个细胞,而在EB形式中只检测到约100,000个CD34阳性细胞,尽管作为起始材料的iPSCs数目大致相同,但呈现出约24倍的差异。另外,在评估时,虽然单层形式只产生了CD34+CD43-细胞(表示永久造血),但是EB形式产生了多数CD34+CD43+细胞(表示原始造血)(Kennedy等人,2012)。图13进一步说明了如本文所公开的用于产生现货iNK和iT细胞的单层hiPSC造血分化平台的可扩展扩增。本文所提供的多能细胞克隆扩增平台进一步确保了现货可扩展性,例如从单一多能细胞克隆系到约一百万小瓶的治疗剂量,其各具有不少于 10^6 个具有治疗功能的NK或T细胞。如所公开的克隆扩增进一步提供了广泛的均质性且因此确保了产品一致性、品质控制和品质保证。在一些实施例中,单一多能细胞克隆系含有所

期望的遗传印记,所述遗传印记是通过在重编程期间或之后进行基因工程改造而获得,或从多能细胞最初所来源的供者特异性来源细胞中保留。

[0389] 实例10-iCD34+细胞在抑制活化T细胞扩增方面的免疫调控特性

[0390] 为了确定hiPSC源CD34阳性细胞(iCD34;CD34+CD43-)的免疫调控能力,将第10天CD34分选细胞与活化的周边血液源CD3表达T细胞按照1:1比率在iMPP-A培养基中共培养。在37℃培育5天之后,将共培养物与计数珠粒混合且通过流式细胞术分析以测定每个样品中的T细胞绝对数。图14描绘了hiPSC源CD34+细胞的免疫调控潜能,如通过比较共培养物与含有单独CD3+T细胞的培养物所发现。与hiPSC源CD34+细胞共培养的CD3+T细胞的细胞存活率降低,而培养物中的CD34+细胞总数不受影响(图14)。

[0391] 实例11-通过细胞因子诱导的活化来确定iNK细胞功能,如根据细胞因子释放和脱颗粒所发现

[0392] 为了展现hiPSC源成熟iNK细胞的功能,将第20天(HE分离之后)iNK细胞转移到基于饲养层的悬浮培养物中维持另外10天,所述悬浮培养物的iNK-B2培养基含有SCF、IL15、IL7和Flt3L。另外培养10天之后,用IL12和IL18刺激iNK细胞以诱导iNK细胞活化。iCD34源iNK响应于细胞因子刺激且按照类似于周边血液NK细胞的方式分泌促炎性细胞因子。图17描绘了相较于使用相同基质和饲养层悬浮共培养物所产生的脐带血源NK细胞以及周边血液源NK细胞,iNK细胞的活化,如基于CD45+CD56+筛选策略、根据CD107A(代表脱颗粒的细胞表面标记物)的表达和干扰素 γ 的细胞内染色所发现。

[0393] 实例12-建立无饲养层分化培养物以便产生T和NK细胞

[0394] 使用不包括基质细胞的无饲养层分化平台进一步优化上述T和NK淋巴分化平台以便产生脐带血源和hiPSC源iT和iNK祖细胞。

[0395] 对于NK细胞来说,将富集的脐带血CD34+细胞接种于培养板的iNK-A2无血清分化培养基中,所述培养基含有SCF、Flt3L、TPO、IL3、IL15和IL7且含有DLL4蛋白质或对照蛋白质。5天之后,维持iNK-B2培养基以完成NK细胞分化。培养约10-15天之后,评估培养物中的NK细胞祖细胞产生和骨髓细胞的缺乏。CD56、CD7和CD161是在NK细胞发育期间表达的第一细胞表面标记物。CD11b和CD14是在骨髓细胞亚群上所表达的细胞表面标记物。图18描绘脐带血CD34+细胞向NK细胞的无基质分化。已表明,相较于基于基质的培养物和不含基质的对照培养物,培养板结合的DLL4支持CD56+CD7+CD161+NK细胞祖细胞更快速和高效分化,且脐带血CD34+细胞在表达DLL4的无基质分化平台中生成早期NK细胞祖细胞(原NK)的试管内分化能力类似于(就表型来说)利用CD45+筛选策略的基于基质的分化平台。早期NK谱系标记物鉴别ipro-NK细胞的存在(如根据CD56、CD7和CD161所定义)和骨髓标记物CD11b和CD14的缺乏。

[0396] 为了展现hiPSC源HE细胞在无基质分化平台中生成iNK细胞祖细胞的能力,将第10天CD34+iHE分选细胞在含有DLL4蛋白质或对照蛋白质的培养物的iNK-A2培养基中培养。然后使hiPSC源CD34+细胞向NK细胞谱系分化20天且然后放入悬浮培养物中供进一步成熟。图19说明hiPSC源iHE生成iNK细胞祖细胞的能力,如使用CD45+筛选策略、根据CD56、CD161和CD94的表达所发现。培养板结合的DLL4支持CD56+CD7+CD161+NK细胞祖细胞的分化,而非CD11b+骨髓细胞的分化。5天之后,维持iNK-B2培养基以完成NK细胞分化。用于鉴别成熟NK细胞的存在标记物包括CD56、CD122、NKp30、CD94、CD16、NKG2D和KIR。

[0397] 对于T细胞来说,将从脐带血中富集的CD34⁺细胞接种于含有DLL4蛋白质或对照蛋白质的培养物的iT-A2培养基中。5天之后,维持iT-B2培养基以便产生T细胞祖细胞(proT)。培养约10-15天之后,根据细胞表面标记物CD34和CD7的共表达来评估培养物中的T细胞祖细胞的产生。图20描绘了CD34⁺脐带血细胞在利用CD45⁺筛选策略的表达DLL4的无基质分化平台中生成T细胞祖细胞的能力。已表明衍生自脐带血CD34⁺阳性细胞的proT细胞的无基质分化比使用CD45⁺CD56⁻筛选策略的基于基质的分化平台更快。早期T谱系标记物鉴别proT细胞的存在,如根据CD34、CD5和CD7所定义。

[0398] 为了展现hiPSC源HE细胞在无基质平台中生成iT细胞的能力,将第10天CD34⁺iHE分选细胞在含有DLL4蛋白质或对照蛋白质的培养物的iT-A2培养基中培养。图21说明hiPSC源iHE生成iT祖细胞的能力,如根据CD45和CD7的表达所发现。

[0399] 实例13-iPSC源iNK响应于细胞刺激以分泌促炎性细胞因子且具有类似于周边血液和脐带血NK细胞的细胞毒性功能

[0400] iPSC源(iNK)或周边血液源(pbNK)NK细胞未经刺激(US)或用饲养细胞按1:1比率刺激4小时。在共培养期期间包括GolgiStop(BD Biosciences)和Alexa-Fluor 647结合的抗CD107a抗体(Biolegend)。四小时之后,收集细胞且针对CD45、CD56和TNF- α 加以染色且通过流式细胞术分析(图23A)。为了评估细胞毒性功能,将iNK或脐带血源(CBNK)细胞与CFSE标记的靶细胞按照1:1、3:1和10:1的效应子:靶比率共培养90小时。靶细胞的量化每2小时使用Incucyte ZOOM细胞分析系统进行分析(图23B)。已表明,使用本文所提供平台由iPSC(iNK)衍生的NK细胞响应于细胞刺激而分泌促炎性细胞因子,包括(但不限于)TNF α ,且具有类似于周边血液和脐带血NK细胞的细胞毒性功能。

[0401] 实例14-iPSC源T细胞祖细胞使胸腺恢复活力且活体内重构T细胞

[0402] hiPSC源ipro-T细胞已表明能够作为功能T细胞祖细胞向免疫功能不全的NSG接受小鼠的胸腺归巢、定殖和分化。第10天(CD34⁺HE分离后)CD34⁺CD7⁺ipro-T细胞通过FACS分离且肝内注射至新生(出生之后第2-5天)NSG小鼠内。注射后第8周,通过流式细胞术、根据人类CD45⁺CD4⁺CD8⁻双阴性(DN)、CD45⁺CD4⁺CD8⁺双阳性(DP)、CD45⁺CD4⁺CD8⁻或CD45⁺CD4⁺CD8⁺单一阳性(SP)T细胞亚群的表达来分析小鼠的胸腺移植。另外,评估单一阳性T细胞中的TCR、CD3、CD27和CCR7的表达,以评估其原生和成熟状态。抗CD3/CD28刺激之后,通过监测增殖能力和CD25活化标记物表达的上调来评估成熟单一阳性T细胞的功能。

[0403] 胸腺细胞与胸腺上皮细胞(TECs)之间存在关键的相互作用,其能够产生和改善使胸腺恢复活力的胸腺环境。评估第10天CD34⁺CD7⁺hiPSC-源ipro-T细胞对胸腺功能的影响。如上所述,将FACS分选的ipro-T细胞肝内注射至新生NSG接受小鼠中。如下对对照小鼠(未注射)或ipro-T注射小鼠的胸腺进行注射后8-10周免疫组织学分析:用细胞角蛋白5(K5)和抗细胞角蛋白8(K8)染色,以鉴别胸腺皮层、髓质和所定义皮髓质边界的形成。在缺乏ipro-T细胞的情况下,预期上皮细胞呈现杂乱结构。另外,评估将淋巴祖细胞募集到胸腺所必需的关键TEC源趋化因子CC19、CCL21和CCL25的表达。最后,RANK配体(RANKL;核因子 κ 配体的受体活化剂)在ipro-T细胞上的表达和RANK在TECs上的表达(影响TEC成熟的相互作用)表示胸腺恢复活力的增强。

[0404] 实例15-iPSC源iT细胞响应于细胞刺激且以成熟T细胞形式呈现VDJ重组

[0405] 为了展现hiPSC源iT细胞的功能,第35天(CD34⁺HE分离之后)iT细胞用细胞追踪紫

(Cell Tracker Violet)处理以监测细胞增殖,且然后用抗CD3/CD28珠粒刺激7天以诱导iT细胞活化和增殖。iCD34源iT细胞按照类似于脐带血源T细胞和周边血液T细胞的方式响应于CD3/CD28刺激。iT细胞的活化是基于CD45+CD3+筛选策略、根据CD25和CD62L(指示活化的表面标记物)的表达和干扰素 γ 的细胞内染色来展示。其的活化引起增殖,如根据细胞追踪紫在细胞分裂期间的耗乏所发现。

[0406] 为了进一步表征hiPSC源iT细胞发育程度,分析第35天iT细胞中的T细胞受体基因座重组。分析第35天CD3+分选细胞的基因组DNA中的TCR Db2-Jb2重排的存在,所述重排指示内源T细胞受体基因座的重排。指示多克隆Db2-Jb2重排的多种PCR产物类似于在衍生自脐带血CD34+HSCs的T细胞中所观察到的产物。

[0407] 实例16-根据永久性生血内皮细胞的新颖标记物进行的细胞表面抗体筛检

[0408] 细胞标记物充当有助于鉴别细胞和对细胞进行分类的标志。大部分标记物是细胞质膜内的分子或抗原。许多表面标记物是根据特异性抗体所识别的其分化簇(CD)来分类。一般来说,特定的标记物组合是不同细胞类型所独有的。

[0409] 在多能干细胞通过中胚层源内皮细胞发生试管内分化期间,非均质的内皮细胞获得动脉、静脉和生血命运,且形成在表型上和功能上特化的相应亚型内皮细胞。这些细胞亚型是在封闭空间和时间内形成,且目前主要通过基因表达谱分析、根据细胞标记物的缺乏来区分。造血细胞是由一种独特的内皮细胞群(已知为生血内皮细胞(HE))通过内皮细胞向造血细胞转变(EHT)而产生。EHT代表一种连续过程,其中具有内皮细胞特征的细胞逐渐获得造血细胞形态和表型。鉴别出对HE细胞亚型具有特异性的标记物将大大改善分离具有所期望品质和纯度的早期细胞群以便随后进行造血细胞分化的效率。因此,期望可区分所有这些不同细胞谱系的其它潜在独特标记物。

[0410] 为了鉴别出用于富集具有生成造血细胞的能力的CD34+和HE细胞的其它标记物,使用所述方法和组合物、使用本文所公开的平台、组合物和方法将hiPSCs作为单层接种且使其向造血细胞分化。

[0411] 对于CD34+细胞来说,在hiPSC分化的第10天,将CD34+CD43-细胞用抗人类抗体染色且利用流式细胞术进行分析(图25)。分析中所包括的抗人类抗体列举于图26中。如图25中所示,I类标记物包括hiPSC源CD34+细胞上的表达<1%的细胞表面蛋白质。II类标记物包括CD34+细胞上的表达为1%-99%的细胞表面蛋白质。III类标记物包括CD34+细胞上的表达>99%的细胞表面蛋白质。iCD34+群体中的标记物表达水平展现于图26中。II类标记物鉴别可以在具有造血潜能的iCD34+细胞上表达的细胞表面蛋白质。

[0412] 在这个分析中,如果标记物在所选群体中展现至少1%表达,那么其被视为阳性。如果标记物在所选群体上展现小于1%表达,那么其被视为阴性。阳性标记物的表达水平还能够基于染色的平均荧光强度(MFI)进行量化或分类。此用对数尺度的数值描绘。如本文所用,视为高或亮的标记物具有约 10^4 - 10^5 的MFI。视为中等或中的标记物具有约 10^2 - 10^4 的MFI。视为低或暗淡的标记物具有约 10^1 - 10^2 的MFI。

[0413] 在II类候选标记物中,CD34+CD43-群体内的CD93标记物的表达展示于图27中。分离出CD34+CD93-和CD34+CD93+群体且随后根据CXCR4和CD73的表达进行分析。已确定CD34+CD93-群体含有大部分CXCR4-CD73-群体,其代表所关注的永久性HE细胞群。然而,此前已鉴别出CD93的鼠类同源物的表达(而非其缺乏)是早期淋巴造血祖细胞的潜在标记物(Yamane

T等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》2009;106(22):8953-8958)。

[0414] 为了进一步确定由CD93表达或其缺乏表示的永久性造血潜能,通过FACS分离出第10天CD34+CD43-CD93-和CD34+CD43-CD93+部分且接种于iNK分化培养物iNK-A2和iNK-B2中,如本文所公开。分化10天之后,评估CD45+造血细胞和CD45+CD7+淋巴祖细胞的绝对数目(图28A)。另外10天的iNK分化之后,根据CD56和NKp30标记物的表达来评估培养物中的iNK细胞的存在。已经表明CD34+群体的永久性造血潜能可在CD93-部分中得到富集(图28B)。因而,CD34+CD93-细胞代表iPSC向造血细胞定向分化的早期阶段中的永久性HE群体;且CD93的表达可以用作CD73或CD73/CXCR4的替代标记物以鉴别HE亚群。

[0415] 基于iPSC分化第10天的CD34+群体中所存在的CD34+CD93-细胞部分的百分比,我们估算出第10天或更早时CD34+群体中的永久性HE的百分比是大约30%或更小。因而,在使用第10天CD34+群体的本文筛选中具有约1%到约30%表达的阳性或阴性标记物也适用于鉴别永久性HE亚群(图26)。因而,用于鉴别CD34+群体中的永久性HE的阳性标记物包括:CCR10、CD164、CD95、CD144、CD166、淋巴毒素β受体、CD252、CD55、CD40、CD46、CD340、CD119、CD106、CD66a/c/e、CD49d、CD45RB、DLL4、CD107a、CD116、CD324、CD123、CD49f、CD200、CD71、CD172a、CD21、CD184、CD263、CD221、Notch 4、MSC、CD97、CD319、CD69、CD338、平足蛋白、CD111、CD304、CD326、CD257、CD100、CD32、CD253、CD79b、CD33、CD83、GARP、CD183和CD357。或者,用于鉴别CD34+群体中的永久性HE的类似于CD93的其它阴性标记物包括:CD31、CD165、CD102、CD146、CD49c、CD13、CD58、整合素α9β1、CD51、CD10、CD202b、CD141、CD49a、CD9、CD201、CD47、CD262、CD109、CD39、CD317、CD143、整合素β5、CD105、CD155和SSEA-4。

[0416] 实例17-WNT信号传导的调节使iPSC源iCD34(永久性HE)的输出和效能改善

[0417] 为了优化hiPSCs在定向分化10天之后高效生成永久性HE,检查调节WNT信号传导路径的作用。分化第6天,使细胞培养物在GSK3抑制剂CHIR99021(一种Wnt促效剂)或IWP2(一种WNT抑制剂)存在下分化(图29A)。第10天分析CD34+CD43-CD93-HE的产生。图29B表明用IWP2抑制WNT路径在第10天不影响表型HE的百分比,如通过流式细胞术所发现,然而,其引起HE细胞数目总体减少(图29B)。反之,虽然用CHIR99021活化WNT路径引起CD34+CD43-细胞的百分比稍微降低,但是其使表型CD34+CD43-CD93-HE的数目和百分比增加大约2-3倍且改善HE细胞含量,即,增加总HE细胞数目且因此增强HE增殖。

[0418] 为了确定经WNT调节的HE的效能,分别评估未处理的HE、经IWP2处理的HE和经CHIR99021处理的HE的泛造血和淋巴潜能。通过FACS分离出第10天CD34+CD43-细胞且接种于如本文所提供的MPP分化和iNK分化培养物中。图30A表明MPP分化7天之后,经CHIR99021调节的HE展现增强的造血效能,如根据CD45+细胞的存在增加约5-6倍所指示。图30B表明iNK分化20天之后,经CHIR99021处理的HE展现增加的淋巴容量,如根据CD56+CD7+NK祖细胞的存在增加约5-6倍所示。

[0419] 实例18-具有基因修饰或供者属性的iPSC,其用于产生供免疫疗法用的具有增强的特性的造血细胞

[0420] 优选用于治疗多种疾病的独特属性可以来自所选供者源细胞,包括免疫系统细胞,例如T细胞。供者属性包括能够通过分化后代传递的遗传印记,所述遗传印记可以包括(但不限于)预排列的单特异性TCR,例如来自病毒特异性T细胞或恒定型天然杀手T(iNKT)细胞;可追踪的且所期望的遗传多态性,例如对于编码所选供者中的高亲和力CD16受体的

点突变来说为同型;和预定的HLA需求,即,所选的HLA匹配供者细胞随着群体覆盖率增加而展现单倍型。另外,在细胞疗法期间,为了改善疾病结果,期望经基因修饰的细胞具有新的或增强的治疗特性。然而,不清楚在iPSC或其来源细胞的层面上存在的任何供者属性或基因工程模式是否由于任何数目个原因而能够得到保持且在衍生自iPSCs的分化细胞中保留功能,所述原因的范围为基因静默、mRNA降解、基因突变、不当蛋白质运输和裂解、分化潜能降低,和异质群体中的细胞生长被遏制。本文中已展现一种产生iPSC源效应细胞的方法,所述效应细胞包含来源于来源特异性体细胞的iPSCs所保留的遗传印记,或使用所公开的本发明分化平台和组合物、通过定向分化、经由基因编辑而得到的遗传印记。这些分化细胞表明已保留存在于iPSCs或其原始来源亲代群体中的遗传印记,且更易恢复活力,增殖和存活能力增强。另外,当以诱导多能干细胞形式存在时,具有所期望属性的优选来源细胞能够无限地维持于纯/克隆群体中,其能扩增且能容易分化成具有再现性和改善的功效的所选效应细胞类型,包括T、NK、NKT、CD34、T祖细胞和NK祖细胞。

[0421] 还如本文所说明,本发明所提供的分化平台获得的效应细胞的一些期望属性,例如,活体内细胞存留,也可以通过小分子调节来获得,所述小分子调节允许用于同种异体移植的所述细胞不被患者免疫细胞识别或摧毁。

[0422] 关于本文所提供的分化方法,优选细胞来源(供者、患者、疾病或病状特异性)的已知独特印记特点也能充当克隆性标记物或用于克隆检测重编程iPSCs和处于不同分化阶段的中间细胞,以及利用所选印记标记物进行试管内或活体内追踪。这些标记物包含一个或多个DNA重排,例如VDJ重组,和/或转基因插入位点。

[0423] 1.HLA I类剔除型iPSCs分化成iCD34 HE且能进一步分化成泛造血和淋巴祖细胞

[0424] 为了改善iPSC源效应淋巴细胞的免疫抗性和存留,检查HLA I类缺失的影响。iPSC中的B2微球蛋白(B2M)的缺失引起HLA I类(HLA-A、B和C)表达的缺乏,如图31中所见。我们此前已展示B2M^{-/-}-iPSC系能够避免T细胞介导的杀死,同时不诱导NK细胞识别,这表明通用的供者/接受者相容性hiPSC克隆系在试管内和活体内均具有改善的存留(数据未展示)。

[0425] 然后使用如本文所公开的分化平台和方法评估B2M缺失对iPSC分化能力的影响。使B2M^{-/-}-iPSC和野生型iPSC分化10天以产生HE且通过流式细胞术分析CD34+CD43-HE细胞的表达。图32A和32B表明B2M^{-/-}-iPSCs能按照与野生型对照相似的频率分化成CD34+HE。图33表明由B2M^{-/-}-iPSC分化成的CD34+CD43-HE仍呈HLA I类剔除型。

[0426] 为了证明B2M^{-/-}-iPSC源HE的造血潜能,使用FACS分选出细胞且评估其经历内皮细胞向造血细胞转变以产生CD45+造血祖细胞的能力,如图1的多潜能祖细胞分析(iMPP)中所述。图32C说明B2M^{-/-}-HE能够按照与野生型HE相似的效率生成CD45+泛造血祖细胞。

[0427] 最后,评估B2M^{-/-}-iPSC源HE的淋巴潜能。FACS分选的CD34+CD43-HE细胞进一步向NK细胞祖细胞分化,如图3中所述。分化约10天之后,使用流式细胞术、基于CD45+筛选策略、根据CD56和CD7的表达来评估培养物中的NK祖细胞的存在(图32D)。相较于野生型iPSC源HE,B2M^{-/-}-iPSC源HE已表明具有生成iNK祖细胞细胞的等效能力。

[0428] 这个实例说明,iPSC的分化潜能不受通过基因组编辑而保留的其遗传印记的影响,本文所公开的分化平台能够使有遗传印记的iPSCs按照与不含遗传印记的iPSCs类似的水平分化,且iPSC的遗传印记保留于其分化细胞中。

[0429] 2.HLA I类对iPSC的调节和经调节的iPSC的分化,以增强iPSC和其衍生细胞在免

疫胜任接受者中的存留

[0430] 为了进一步改善经HLA I类修饰的iPSCs (B2M^{-/-}-iPSCs或经HLA I修饰的iPSCs)的免疫抗性和存留,将B2M^{-/-}-iPSCs用含有HLA-E/B2M融合蛋白的慢病毒转导。利用流式细胞术,根据多能性标记物TRA-181和SSEA4以及HLA-E的表达来评估经HLA I修饰的经转导iPSCs (B2M^{-/-}-HLA-E iPSCs)的品质(即,多能性状态)。图34A表明经HLA I修饰的经转导iPSCs在细胞表面上表达HLA-E且维持多能表型。

[0431] 为了确定经HLA I修饰的经转导iPSC是否具有增强的活体内存留,在畸胎瘤分析中将荧光素化野生型iPSCs和B2M^{-/-}-HLA-E iPSCs皮下注射到免疫胜任型C57BL/6接受者的相对侧腹中。每天通过IVIS成像,配合荧光素注射(以使正形成的畸胎瘤可视化)来分析小鼠。图34B证明,注射后第72小时,B2M^{-/-}-HLA-E iPSCs展示增强的定量存留,为野生型iPSC的约6倍。图34B中还展现了三只代表性小鼠,其描绘了B2M^{-/-}-HLA-E iPSC畸胎瘤的荧光素成像增强。

[0432] 为了评估经HLA I修饰的经调节iPSCs的分化能力,使B2M^{-/-}-HLA-E和野生型iPSCs分化10天以产生HE且通过流式细胞术分析CD34+CD43-HE细胞的表达。图35表明得自B2M^{-/-}-HLA-E iPSCs的D10 (CD34+CD43-HE细胞)和D17 (iMPP分析中产生的CD45+造血祖细胞)分化细胞中均保留了HLA-E表达。图36A和图36B表明B2M^{-/-}-HLA-E iPSC能够按照与野生型对照相似的频率分化成CD34+HE。为了证明B2M^{-/-}-HLA-E iPSC源HE的造血潜能,使用FACS分选出细胞且评估其经历内皮细胞向造血细胞转变以产生CD45+造血祖细胞的能力,如图1的多潜能祖细胞分析(iMPP)中所述。图36C说明B2M^{-/-}-HLA-E HE能够按照与野生型HE相似的效率生成CD45+造血祖细胞。因而,由具有相同遗传印记的iPSCs分化的衍生细胞中保留了B2M^{-/-}-HLA-E所传达的免疫抗性。包含B2M^{-/-}-HLA-E的HE细胞表明具有增强的存留。当使用HLA-G代替HLA-E时,观察到存留出现类似的改善。另外,为了进一步增强经HLA I类修饰的iPSCs的活体内存留,应用可避免裂解的HLA-E或HLA-G的经修饰形式。

[0433] 3. 通过靶向外源分子的表达和/或内源基因的修饰来产生具有增强的特性的iPSCs和衍生细胞

[0434] 在iPSC层面经修饰或调节的分子可以用于增强使用通过本发明分化平台所得的衍生淋巴细胞的免疫疗法的期望特性。这些分子可以包括安全开关蛋白质、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、医药学活性蛋白质和肽、药物靶候选物;或促进iPSCs或其衍生细胞移植、运输、归巢、活力、自我更新、存留、免疫反应调控和调节和/或存活的蛋白质。除B2M/HLA-I和HLA-E/G之外,对期望特性有贡献的靶向分子进一步包括(但不限于)CD16受体和41BBL共刺激分子、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR(嵌合抗原受体)、TCR(T细胞受体)、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5、RFXAP,和用于与双特异性或多特异性接合体偶联的表面触发受体。更具体地说,iPSC中的靶向分子的基因修饰包括以下中的一种或多种:B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、PD1、LAG3、TIM3、RFXANK、CITTA、RFX5或RFXAP的缺失或表达减少;HLA-E、HLA-G、HACD16、41BBL、CD3、CD4、CD8、CD47、CD137、CD80、PDL1、A_{2A}R、CAR、TCR或用于与双特异性或多特异性接合体偶联的表面触发受体的表达引入或增加。靶向分子的表达增加或减少可以是持久的、短暂的、按时的或可诱导的,且可以通过内源或外源启动子控制。

[0435] 为了优化iPSC源淋巴效应细胞,可以使用所属领域中已知的多种递送方法将期望

模式引入iPSC中。在这个示例性说明中,iPSCs用含有不可裂解高亲和力CD16受体(HACD16)和41BBL共刺激分子的慢病毒转导以产生细胞毒性增强的iPSC和衍生细胞。图37A通过流式细胞分析展现慢病毒转导之后,iPSC表面上的HACD16和41BBL的高效表达。图37B展现使用本文所提供的平台分化10天之后,HACD16表达和41BBL表达得到维持且干扰iPSC产生CD34+HE细胞的能力。另外,图41展现通过使用CD45+筛选策略,HACD16的表达得到维持且干扰iPSC产生第10天CD56+iNK细胞的能力。

[0436] iPSC源效应细胞(包括T、NK、NKT细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)的细胞介导细胞毒性可以通过与双特异性或多特异性接合体偶联来进一步增强,所述接合体能够使效应细胞再导向靶肿瘤细胞。一般来说,双特异性或多特异性接合体的构思集中于使用双特异性或多特异性抗体使效应细胞再靶向特定肿瘤细胞,所述双特异性或多特异性抗体同时靶向肿瘤相关抗原和效应细胞表面上的活化受体。这种双特异性结合还刺激了效应细胞功能,引起有效的效应细胞活化且最终摧毁肿瘤细胞。由于效应细胞活化和肿瘤细胞杀死只在效应细胞和靶细胞通过双特异性接合体交联时才发生,因此其提供了安全控制机制。另外,通过这种再靶向接合体,绕过了主要组织相容性复合体(MHC)限制的活化。

[0437] 双特异性接合体介导的效应细胞再靶向涉及效应细胞一侧的表面受体的偶联。天然存在的表面受体包括(但不限于)分别在T细胞、NKT细胞、NK细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞上表达的CD3、FcγRIII (CD16)、FcγRI (CD64) 和FcαR (CD89) (图40A)。另外,可以引入在效应细胞表面上表达的经工程改造的表面触发受体以便再靶向接合体偶联。与天然受体和细胞类型无关,经基因工程改造的表面触发受体促进了效应细胞与特定靶细胞之间的双特异性或多特异性抗体接合。使用这种方法,可以产生包含通用表面触发受体的iPSCs,且然后使此类iPSCs分化成表达所述通用表面触发受体的各种效应细胞类型的群体。在细胞疗法期间,可以使用一种或多种类型的效应细胞,其都能够通过靶向一种或多种肿瘤细胞的通用表面触发受体(图40B)与相同的双特异性或多特异性接合体偶联。通用触发受体可以使用美国申请第62/366,503号所述的方法、通过基因组编辑来引入iPSC中。一般来说,经工程改造的通用表面触发受体含有抗抗原决定基和共刺激域。表面触发受体的抗抗原决定基引导表达所述受体的任何效应细胞与在一个末端具有匹配抗原决定基的双特异性或多特异性接合体偶联。接合体的位于另一末端的靶向特异性将偶联的效应细胞导向一种或多种类型的具有特异性抗原的肿瘤细胞以便杀死。对于通用表面触发受体来说,在一个实例中,所述共刺激域可以包含IL2蛋白质或其一部分,以实现典型或非典型的细胞活化和/或增强效应细胞功能,不论效应细胞类型。

[0438] 在肿瘤细胞一侧,可用于双特异性接合体偶联的已确定肿瘤相关抗原包括(但不限于)血液恶性疾病的CD19、CD20或CD30;实体肿瘤的EGFR(表皮生长因子受体)、HER2/ERBB2/neu(人类表皮生长因子受体2)、EPCAM(上皮细胞粘附分子)、EphA2(产生红细胞生成素的肝细胞癌A2)和CEA(癌胚抗原)。另外,表面双特异性抗体/接合体可以进一步包含其它特点,例如经生物素标记的蛋白质以增强双特异性接合和结合;表面膜锚定域用于长期的表面呈递;共刺激域以在双特异性相互作用后增强信号传导;以及实现接合体的可诱导或按时表达控制的接通和断开机制。

[0439] 双特异性或多特异性接合体可识别的不同类型的iPSC源效应细胞(包括T细胞、NK细胞、NKT细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞)可以个别地或组合地应用于癌症免疫疗法中,以

便在接合体特异性偶联到肿瘤标靶后靶向一种或多种液体和实体肿瘤。

[0440] 4. 保留CAR的CAR-T源iPSC的分化

[0441] 嵌合抗原受体 (CARs) 是工程化跨膜受体, 其用于向免疫效应细胞 (例如T或NK细胞) 施加特异性。CARs是典型地由以下组成的融合蛋白: 提供抗原识别的衍生自单克隆抗体的单链可变片段 (scFV); 和向免疫效应细胞提供活化信号的细胞内信号传导域的组合物。由于CAR免疫效应细胞能够进行工程改造而识别任何肿瘤相关抗原且从而使经工程改造的免疫效应细胞只靶向肿瘤细胞而无需HLA匹配, 因此CARs保持了作为有效通用癌症免疫疗法的巨大潜能。

[0442] 我们已经表明CAR-T细胞重编程成iPSCs保留了源细胞的相同遗传印记, 即, 相同嵌合抗原受体 (图24)。经基因工程改造以表达CD19嵌合抗原受体 (CAR) 和截断的LNGFR细胞表面标记物作为CAR的共识别标志的iPSC在分化成iCD34细胞期间保持表达 (图38)。因此, 使用本发明所公开的分化平台、方法和组合物, 能够使具有有所期望遗传印记的iPSCs分化成保留iPSCs和其来源免疫细胞中所含的相同遗传印记的多种免疫细胞类型。

[0443] 本文还提供由包含位于内源TCR基因座的CAR的iPSC分化而得的衍生T细胞。在T细胞层面上实现CAR的基因座特异性插入, 随后使所述T细胞重编程为包含CAR的靶向插入的iPSC。或者, CAR的基因座特异性插入可以在iPSC层面上发生。由于仅存在一个表达性TCR基因座, 因此具有表达性的CAR插入的拷贝数是通过基因座特异性插入来控制。另外, 将CAR插入TCR的恒定区中。TCR恒定区的截断引起TCR基因敲除, 从而消除了细胞疗法中的HLA匹配需要。此外, CAR表达是通过TCR内源启动子控制, 且因此与TCR处于相同水平和相同发育阶段。模拟内源TCR的可控CAR表达避免了在iPSC分化过程中对分化效能的潜在影响。图40表明CAR的表达水平类似于亲代系的TCR表达, 且工程化细胞系中的TCR的表达和功能均消除。然后使工程化T细胞重编程为iPSC, 随后使iPSC分化成表达CAR的T细胞, 所述T细胞的TCR剔除。

[0444] 5. 使用含有供者、疾病或病状特异性遗传印记的iPSCs产生具有增强的特性的淋巴效应细胞

[0445] 考虑到本发明所公开的分化平台, 除通过iPSCs的基因组编辑对遗传印记进行导向整合之外, 基于iPSC的细胞疗法中还可以使用存在于特定供者、疾病或病状的免疫细胞中的遗传印记 (例如治疗响应)。来源于所选来源的免疫细胞 (例如T细胞) 中的某些遗传印记转变为在治疗多种疾病中优选的独特属性。这些优选属性包括 (但不限于) 独特的靶向抗原的受体表达; 独特的HLA呈递或其缺乏; 对肿瘤微环境的抗性; 诱导旁观者免疫细胞和免疫调节; 靶向特异性改善, 同时肿瘤外效应减小; 对例如化学疗法等疗法的抗性; 改善的归巢、存留和细胞毒性。有遗传印记的免疫细胞可以从优选来源收集, 且使用例如PCT/US2011/065900中所公开的方法重编程为诱导多能干细胞, 优选基础状态的多能性。

[0446] 因而, 本文还提供由特定供者或患者的抗原特异性T淋巴细胞产生诱导多能干细胞 (iPSC)、祖细胞T细胞或重新恢复活力的T细胞的途径、方法和实用性。所述供者可以是健康的, 患有疾病病状, 或可以对治疗敏感或有抗性。举例来说, 经包含程序化/调节/工程化T细胞的细胞群治疗且因此经历疾病消除的患者预期已通过疾病消除而让所述T细胞的有效亚群得到天然选择和扩增, 因为所述T细胞的有效亚群具有使其供者特异性印记所传达的疾病负荷消除的优势。通过从疾病消除之后的供者获得这些T细胞且将其重编程为

iPSCs, 可以产生无限量的T细胞, 所述T细胞具有所期望的疾病消除相关印记。

[0447] 与供者或患者源T细胞饲养细胞群相关的抗原特异性在iPSC衍生、脱分化和后续分化期间得到维持。此类衍生细胞可以进一步修饰以增强安全、功效、存留或特异性。

[0448] 为了执行所述方法, 首先从所选供者中分离出初代抗原特异性T细胞。所述供者可以是健康的, 患有疾病病状, 或可以对治疗敏感或有抗性。然后任选地利用各种方法对经分离的初代抗原特异性细胞进行富集, 例如: 通过将多克隆T细胞与表达所关注抗原的肿瘤细胞或携带所关注抗原的未转化细胞在容许培养基中共培养, 使得抗原特异性T细胞增殖比不识别表达所关注抗原的细胞的T细胞快。还可以如下富集经分离的初代抗原特异性细胞: 将多克隆T细胞在容许培养基中与树突状细胞、胸腺上皮细胞、内皮细胞或人工抗原呈递细胞或表达或编码所关注抗原的血浆颗粒或肽共培养, 使得抗原特异性T细胞增殖比不识别表达所关注抗原的细胞的T细胞快。还可以通过免疫荧光或免疫磁性分选方法、使用T细胞受体特异性可逆HLA多聚体(streptamers)或T细胞受体特异性融合肽或抗体或其它大分子结合剂富集经分离的初代抗原特异性细胞。在一个实例中, T细胞受体特异性可逆HLA多聚体靶向睾丸癌(CT)抗原。另外, 经分离的初代抗原特异性细胞可以使用一种或多种包括转录因子和小分子的试剂调节或重新恢复活力。

[0449] 接着, 使用例如PCT/US2011/065900中所公开的方法, 由经分离和/或经富集的初代抗原特异性T细胞生成诱导多能干细胞(iPSCs), 优选基础状态的多能性。可以通过引入能持久、短暂、按时或可诱导的转基因对衍生自初代抗原特异性T细胞的iPSC进行遗传编辑, 以含有二级或三级抗原特异性, 或与安全、功效和存留有关的活化或抑制模式。

[0450] 然后使用本发明分化平台、方法和组合物将经历或未经基因编辑的iPSCs培养、扩增且分化成iPSC源抗原特异性T细胞群。iPSC源抗原特异性T细胞包含的亚群尤其包括TSCM、TCM和/或调控T细胞。优选地, 与供者或患者源初代抗原特异性T细胞相关的抗原特异性不仅在iPSC衍生或脱分化期间, 而且在后续分化期间得到维持和保留。

[0451] 可以在iPSC或iPSC源T细胞的层面上进一步修饰iPSC源抗原特异性T细胞以增强安全、功效、存留或特异性。举例来说, iPSC源抗原特异性T细胞是通过编码T细胞受体或嵌合抗原受体的转基因的表达来强化。或者, iPSC源抗原特异性T细胞是通过编码一种或多种细胞因子受体的转基因的表达来强化。另外, 通过对存留、细胞剂量需求或安全转换有贡献的转基因的表达来强化iPSC源抗原特异性T细胞。或者, 通过编码一种或多种共刺激分子(包括CD137或CD80)的转基因的表达来强化iPSC源抗原特异性T细胞。通过人类白细胞抗原的表达的缺失、插入或减少来强化iPSC源抗原特异性T细胞。通过包括(但不限于)PD1、LAG3和TIM3的检查点分子的表达的缺失或减少来强化iPSC源抗原特异性T细胞。通过表达CD3、CD8和/或CD4来强化iPSC源抗原特异性T细胞。iPSC源抗原特异性T细胞中的相关分子的表达修改可以是持久的、短暂的、按时的或可诱导的。

[0452] 经历或未经基因强化的上述iPSC源抗原特异性T细胞适合于过继性细胞转移以治疗多种疾病或病状, 包括(但不限于)自体免疫病症、血液恶性疾病、实体肿瘤、癌症或感染。为了治疗血液恶性疾病或实体肿瘤, iPSC源抗原特异性T细胞可以在涉及抗肿瘤药剂或造血干细胞移植程序的其它疗法之前、期间或之后转移。

[0453] 6. 遗传印记充当克隆性标记物或克隆检测iPSCs和其衍生细胞的标记物

[0454] 基于诱导多能干细胞(iPSC)的疗法作为有效治疗罹患多种疾病的患者的选项正

受到关注。然而,考虑到iPSCs和其衍生细胞的非均质性质,因此产生和使用基于iPSC的疗法的技术实用性仍是解决此类产物的一致性和安全问题。目前使用的方法包括单一细胞分选和选殖,以及通过限制稀释法克隆,所有这些方法都是费力的、低效的且通常不成功,尤其是既定群体中存在巨大的异质性时。本文提供一种使用遗传印记表征iPSC源细胞群的克隆性的新技术,所述遗传印记能在使用本发明所公开的分化平台、方法和组合物所进行的任何中间分化阶段保留。

[0455] T和B淋巴细胞在哺乳动物细胞群中独特之处在于,在正常成熟期间,它们凭借V(D)J重组经历了特定的且不可逆的基因组序列变异,这个过程也称为体细胞重排。这是独特的基因重组机制,其仅在T和B细胞成熟的早期期间、在产生淋巴细胞时发生。所述过程产生了高度多样化谱系的抗体/免疫球蛋白(Igs)和T细胞受体(TCRs),其分别发现于B细胞和T细胞上。V(D)J重组发生于初级淋巴器官(对于B细胞为骨髓且对于T细胞为胸腺)且按照几乎随机的方式重排可变区段(V)、连接区段(J)和一些情况下的多样性(D)基因区段。所述过程最终在中Igs和TCR的抗原结合区中产生新颖的氨基酸序列,其允许识别来自几乎所有病原体的抗原,包括细菌、病毒、寄生虫和蠕虫,以及如癌症中所见的“变异的自身细胞”。 α/β TCR受体的独特多样性估计存在超过 $2E7$ 个独特组合且免疫球蛋白多样性估计存在超过 $1E11$ 个独特组合。

[0456] 鉴于在B和T细胞成熟期间发生的基因重排的永久性,因此衍生自此类细胞的iPSC群体将包含含有Ig和TCR序列的iPSCs,所述Ig和TCR序列是个别初始淋巴细胞所独有的。因此,通过对衍生自成熟淋巴细胞的iPSC的假定克隆群体中的特异性TCR或Ig基因的测序或同源性比较,能够确定所述群体是否真正克隆或未克隆。类似地,在使用本发明平台和方法使有印记的iPSC分化之后,还能够通过对iPSC源分化细胞中所保留的体细胞重排进行基因测序或同源性比较来评估分化后代的克隆性。经鉴别的体细胞重排还能够用于活体内追踪过继性细胞归巢、存留和扩增,此通过对患者血液、组织或肿瘤活检切片进行取样和分析独特基因重组标志,和使所述标志与初始T细胞群、衍生iPSC和iPSC分化细胞类型中的体细胞重排进行匹配,以便作出相应评估,从而解决与治疗功效和调控顺应性有关的一致性和安全问题。

[0457] 所属领域的技术人员将容易了解,本文所述的方法、组合物和产物代表示例性实施例,且不希望限制本发明的范围。对于所属领域的技术人员显而易见的是,可以对本文所公开的本公开进行各种更替和润饰而不脱离本发明的范围和精神。

[0458] 本说明书中提到的所有专利和公开都表现出本发明所属领域的技术人员的技能水平。所有专利和公开均以引用的方式并入,其引用程度就如同每一个别公开被特别地且个别地指示以引用方式并入一般。

[0459] 本文说明性描述的本公开可以在本文未特别公开的任何成分、限制不存在的情况下适当地实施。因此,例如,在本文中的每一种情况下,术语“包含”、“主要由……组成”和“由……组成”中的任一个可以用其它两个术语中的任一个替换。已使用的术语和表述是作为描述而非限制的术语使用,且使用这类术语及表述时,不希望排除所示和所述特点的任何等效物或其一部分,而是应认识到,在所要求的本公开的范围内可以存在各种润饰。因此,应理解,虽然本公开已通过优选实施例和任选存在的特点进行特别地公开,但所属领域的技术人员可以对本文中所公开的观点进行润饰和变更,且这类润饰和变更被视为属于如

所附权利要求书限定的本发明范围内。

用于CD34+生血内皮细胞（HE）和多潜能祖细胞（MPP）的平台

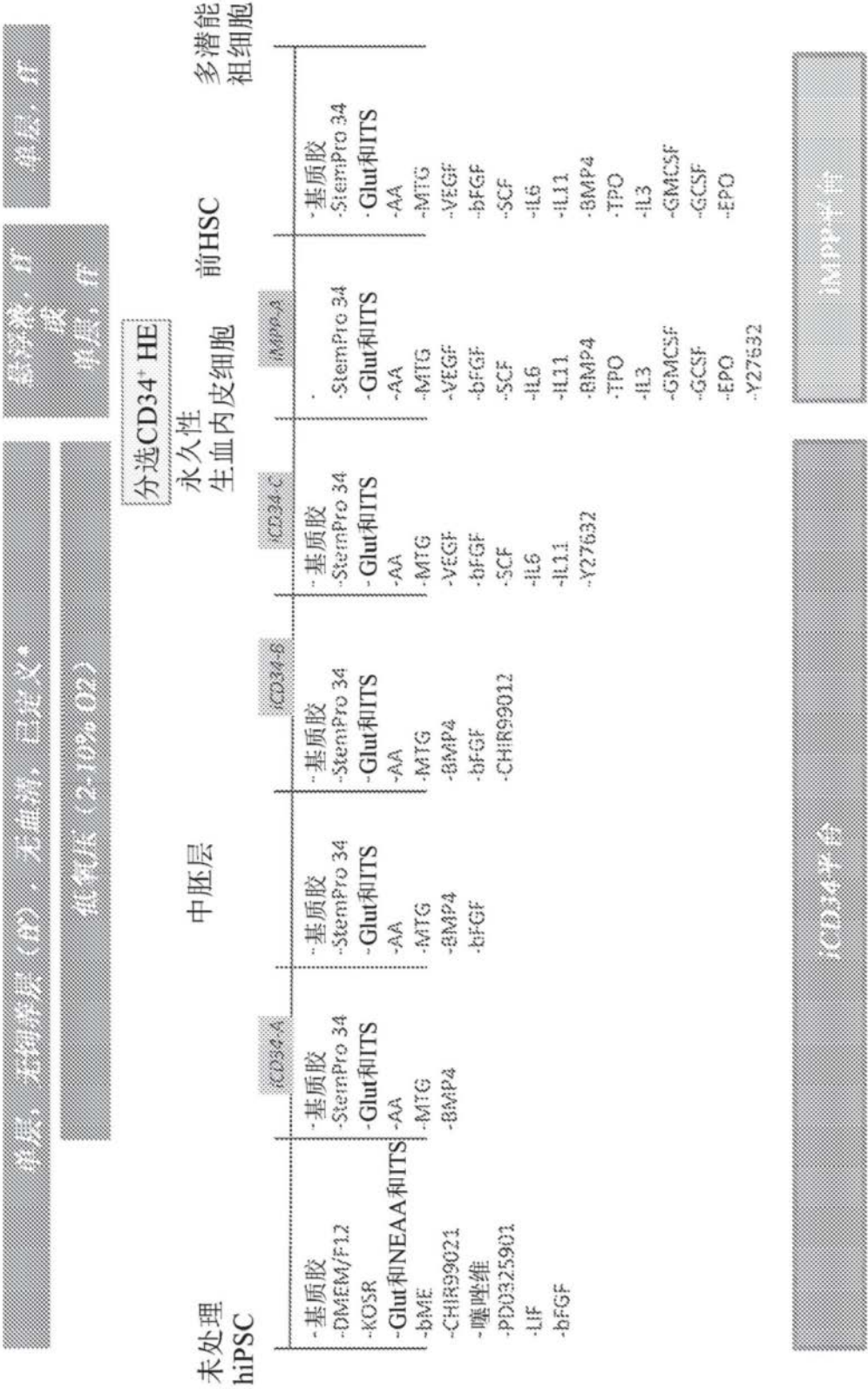


图1

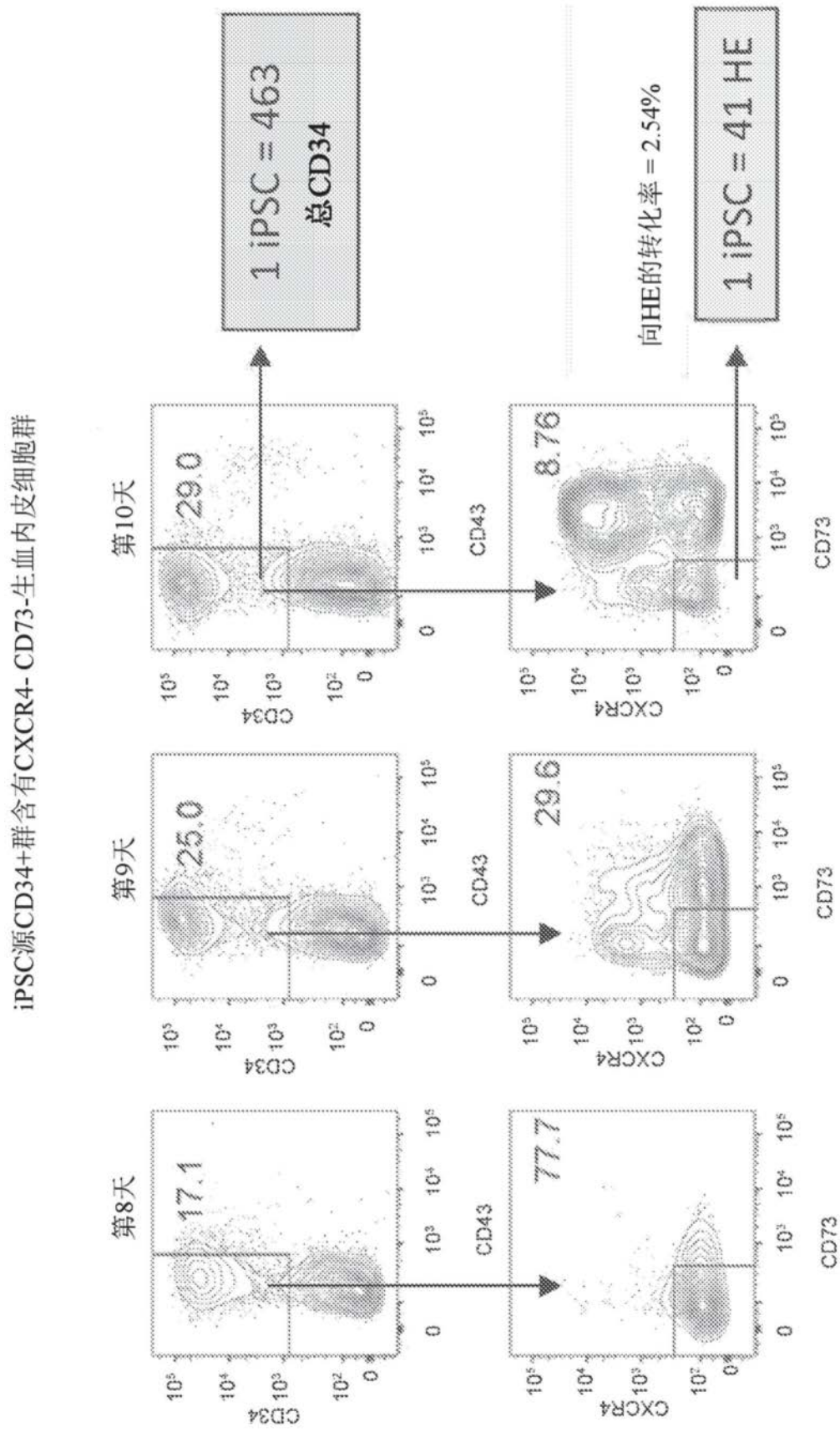


图4A

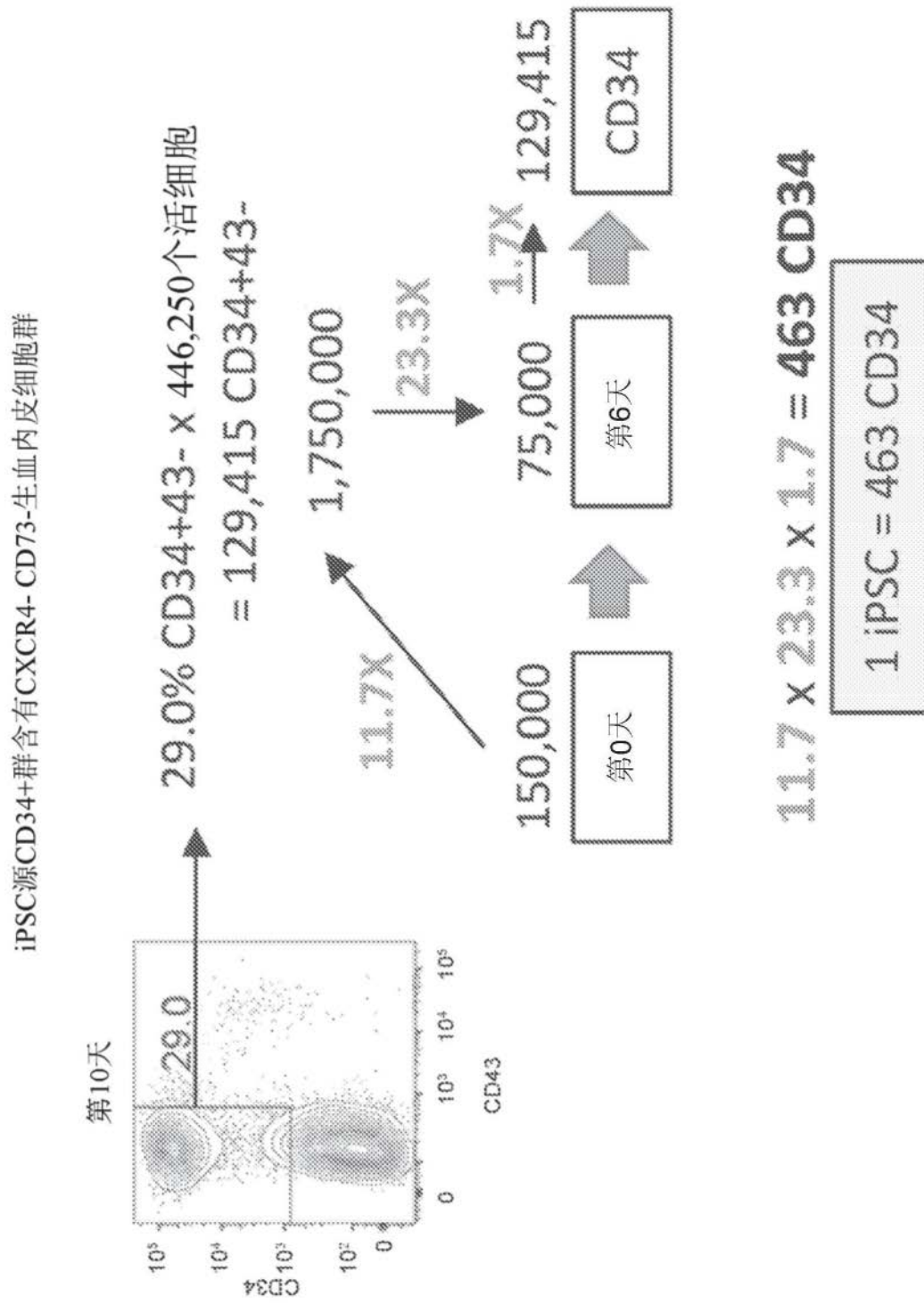


图4B

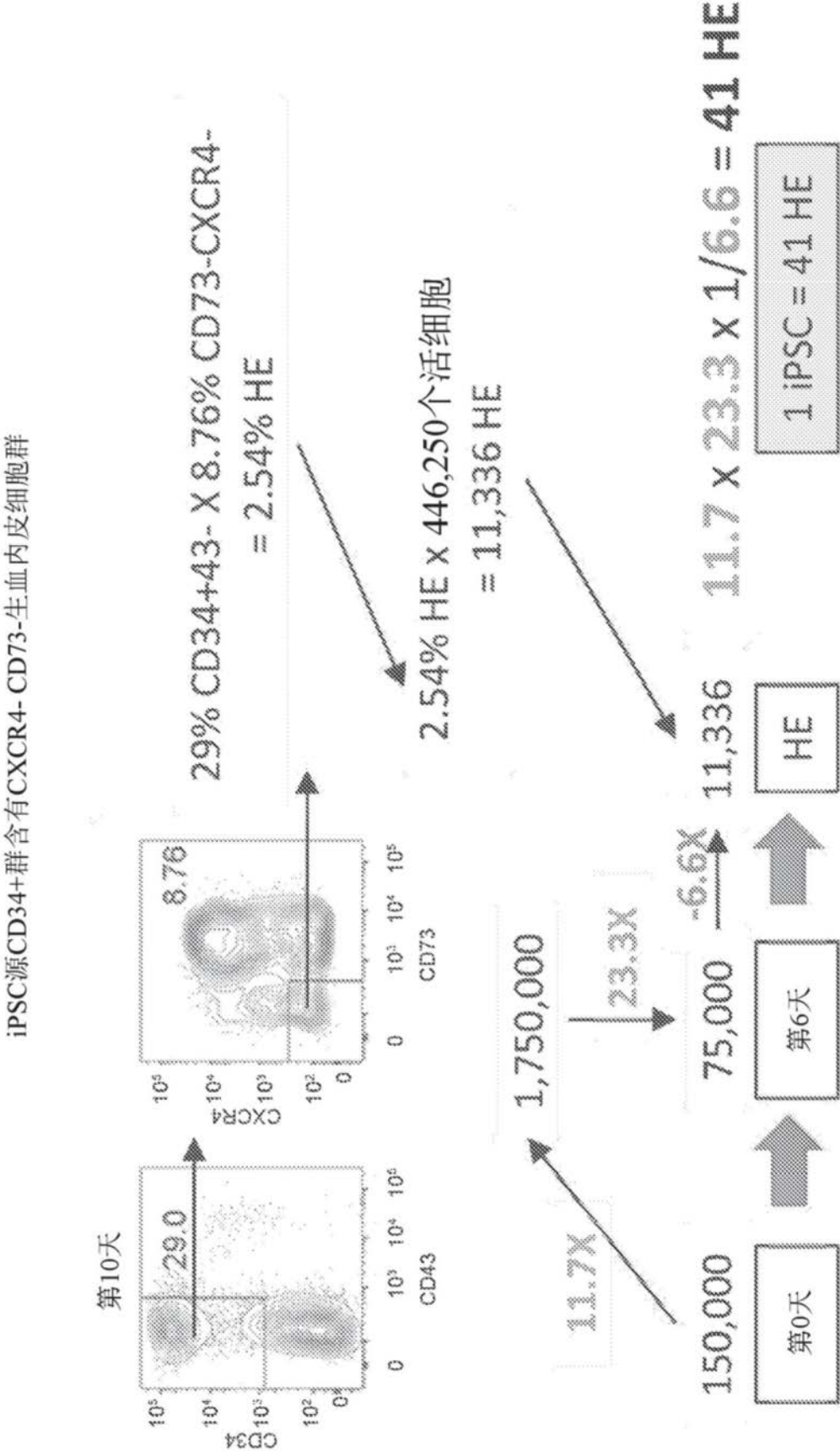


图4C

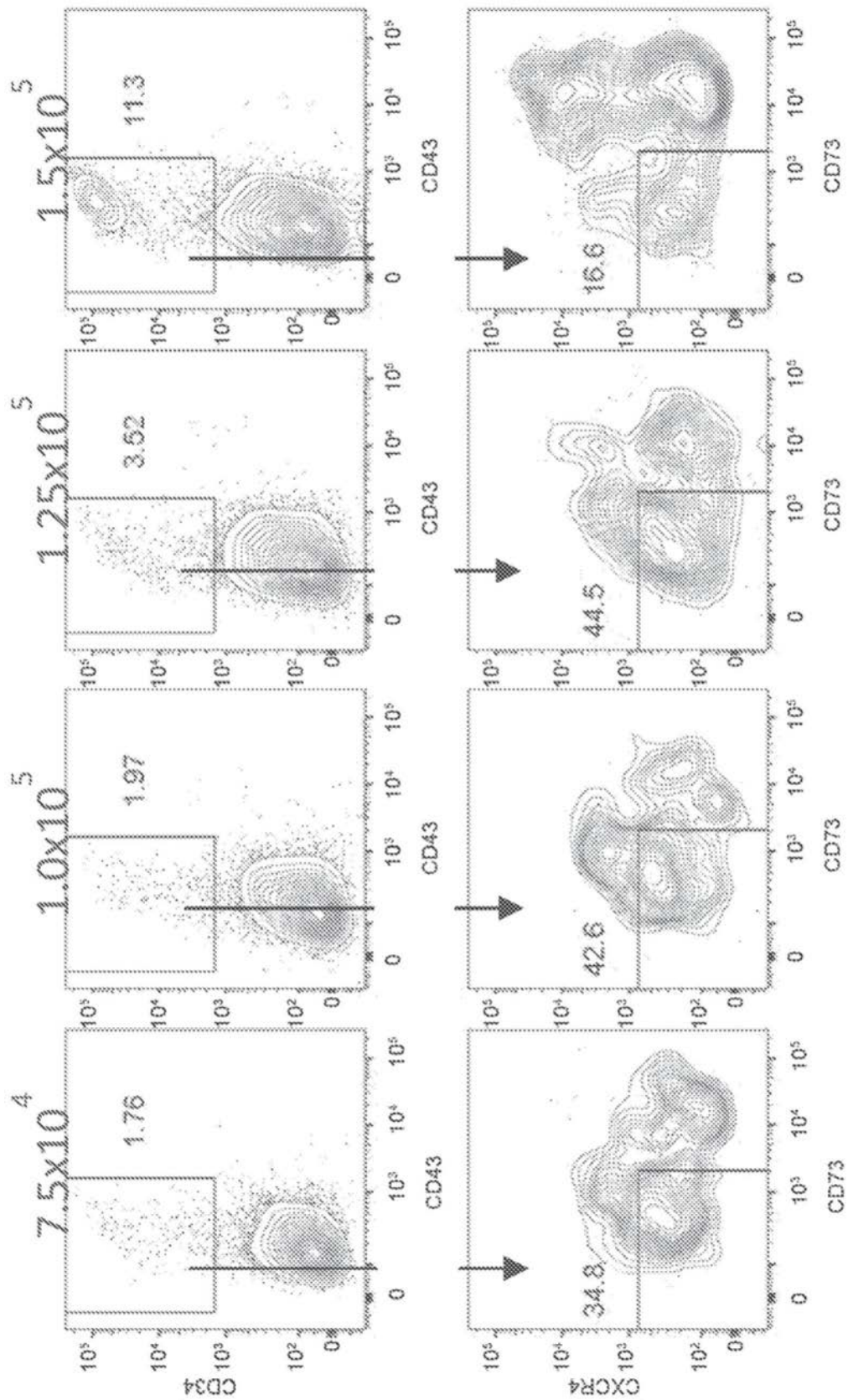


图5A

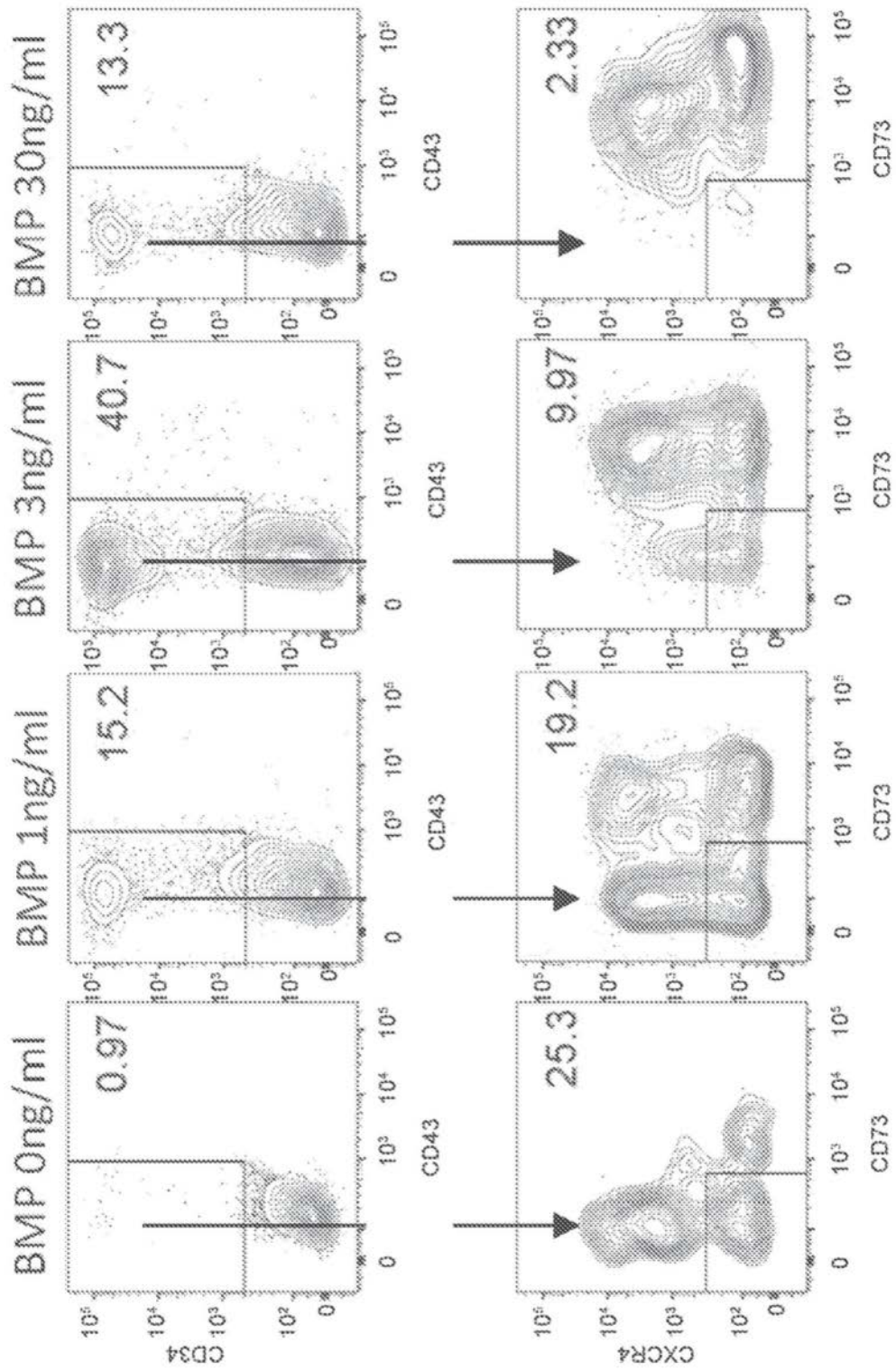


图5B

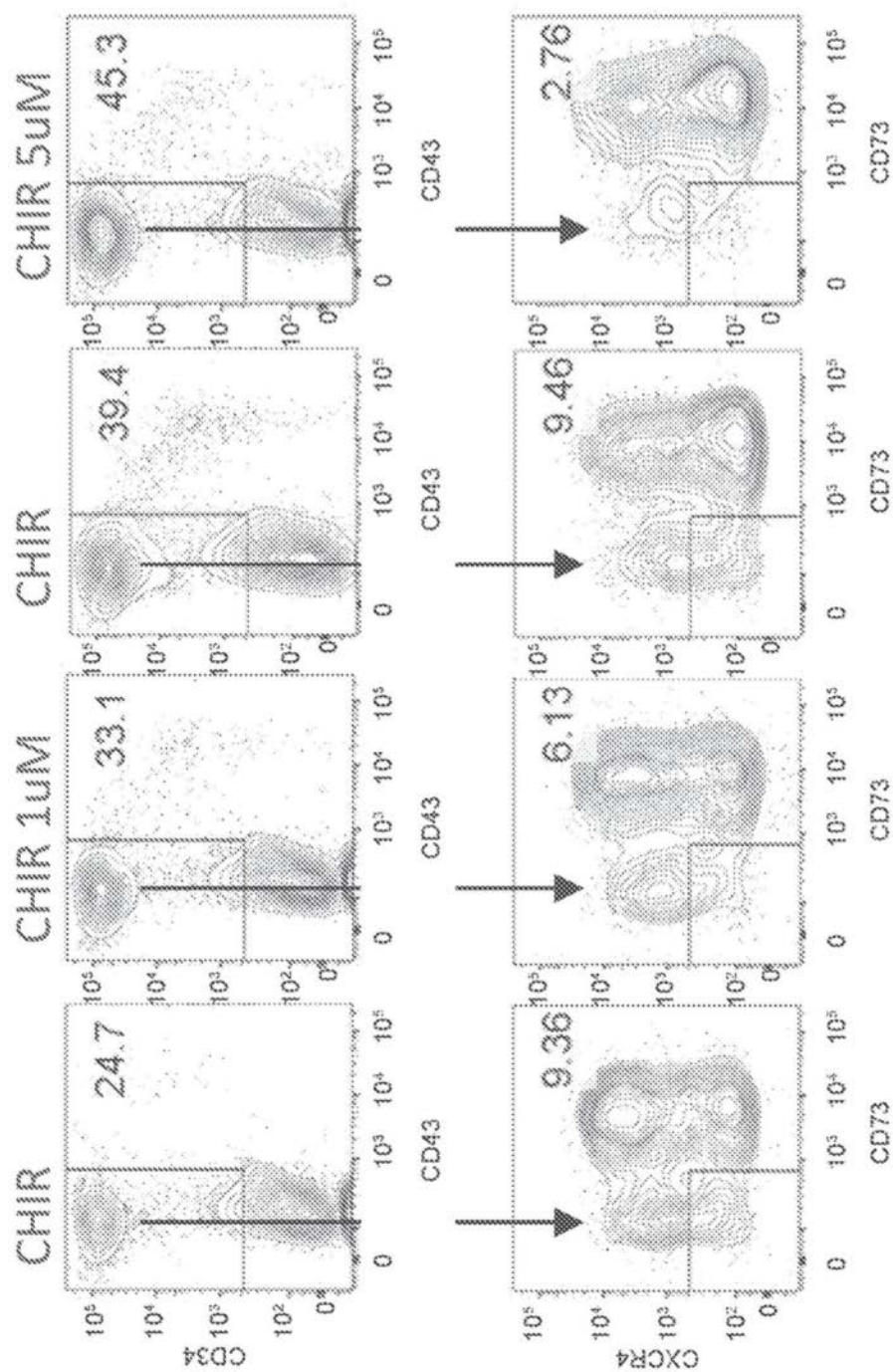


图5C

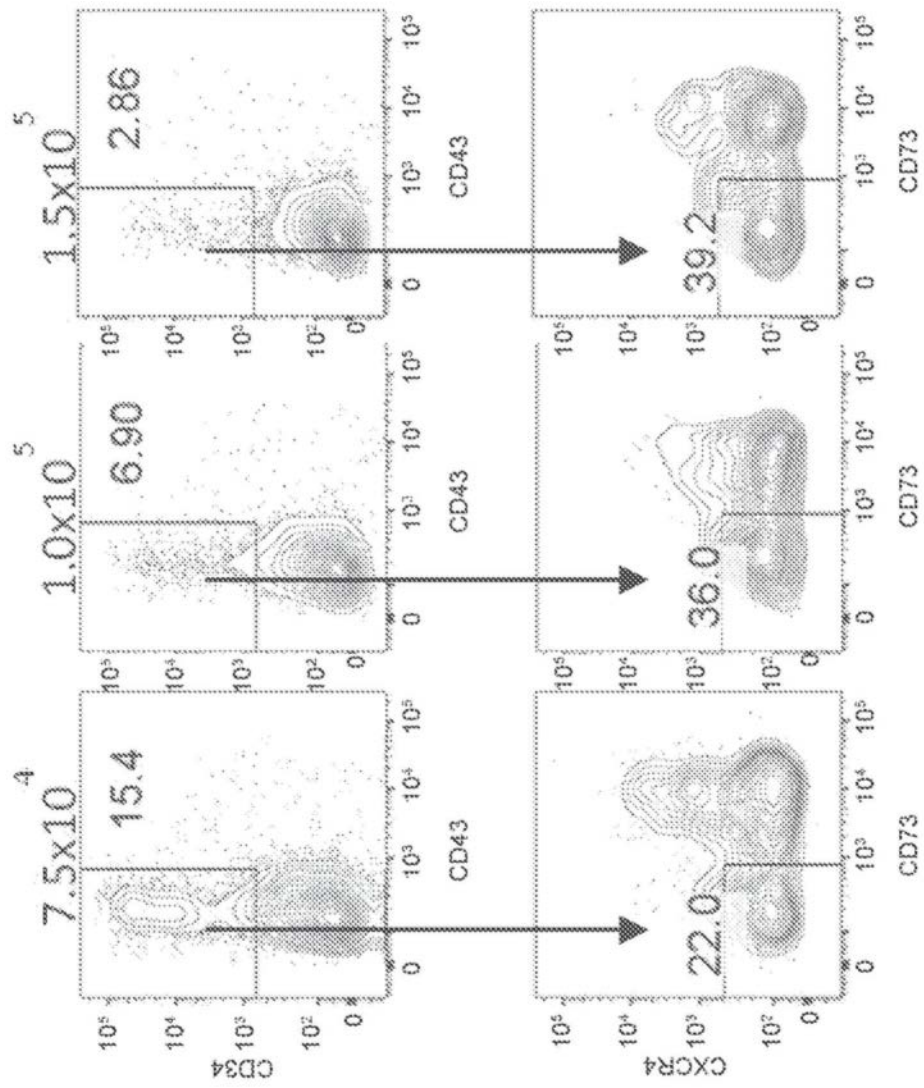


图5D

iCD34细胞是多潜能的且呈现永久性造血状态。

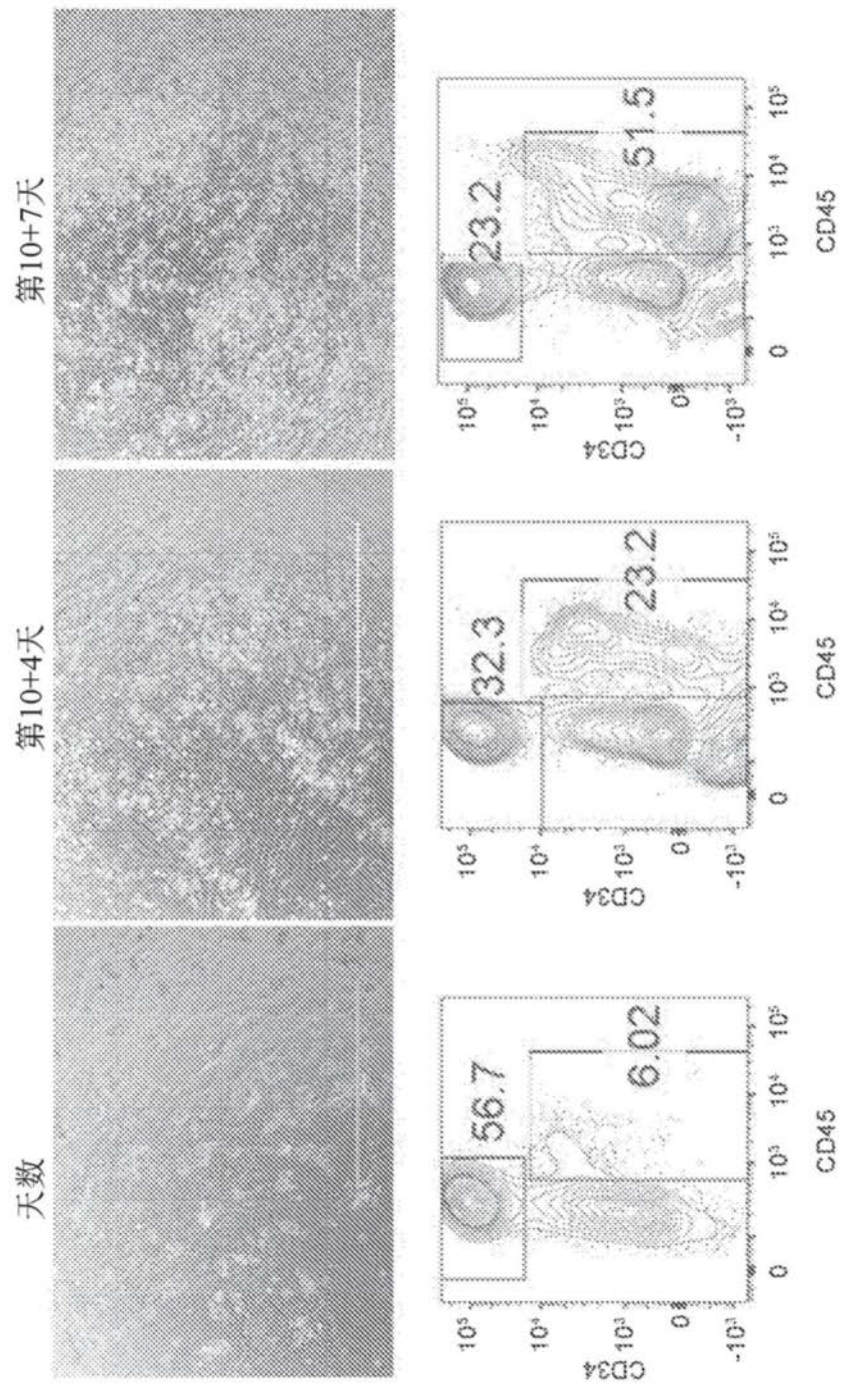


图6A

iCD34细胞是多潜能的且呈现永久性造血状态。

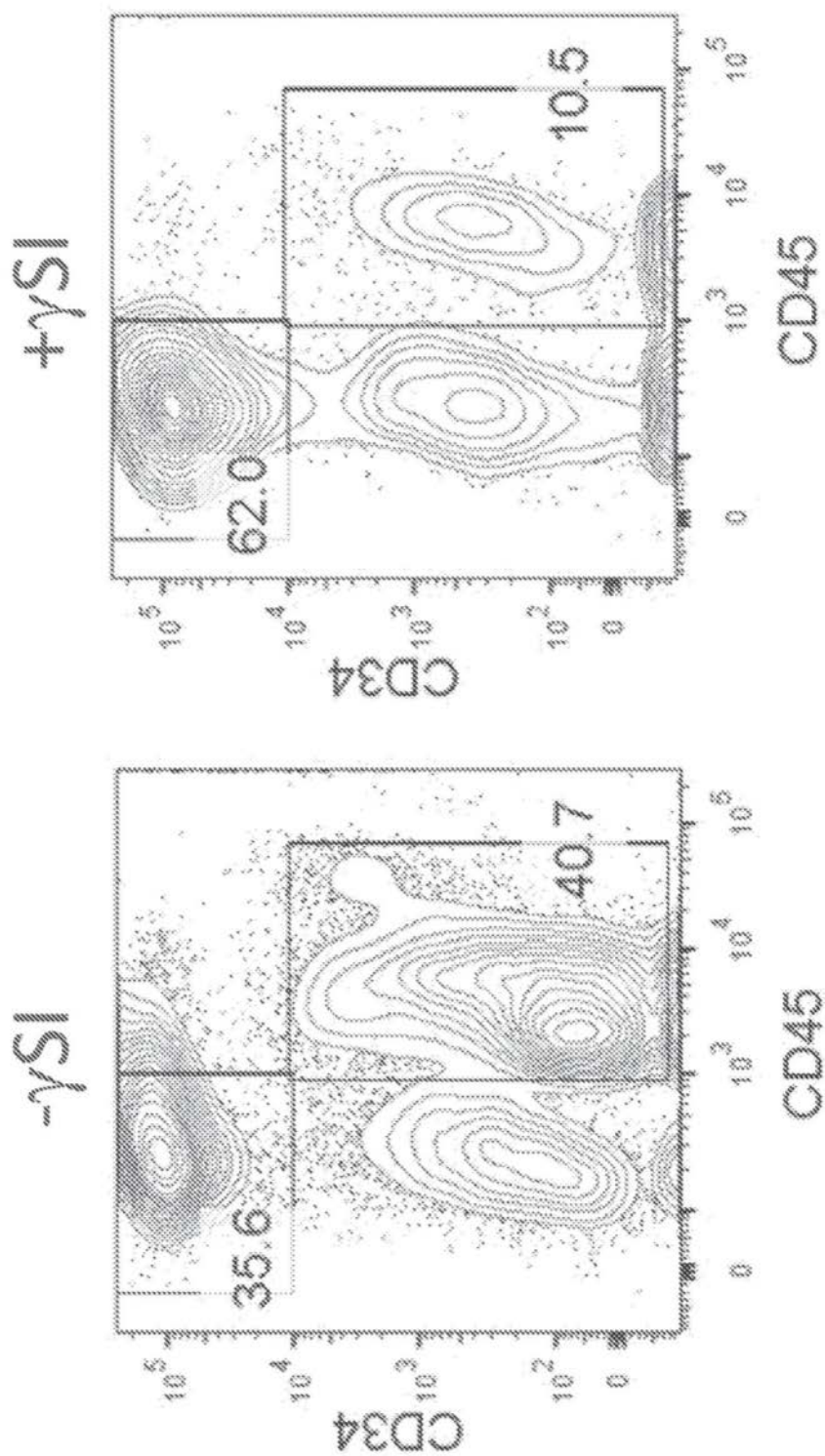


图6B

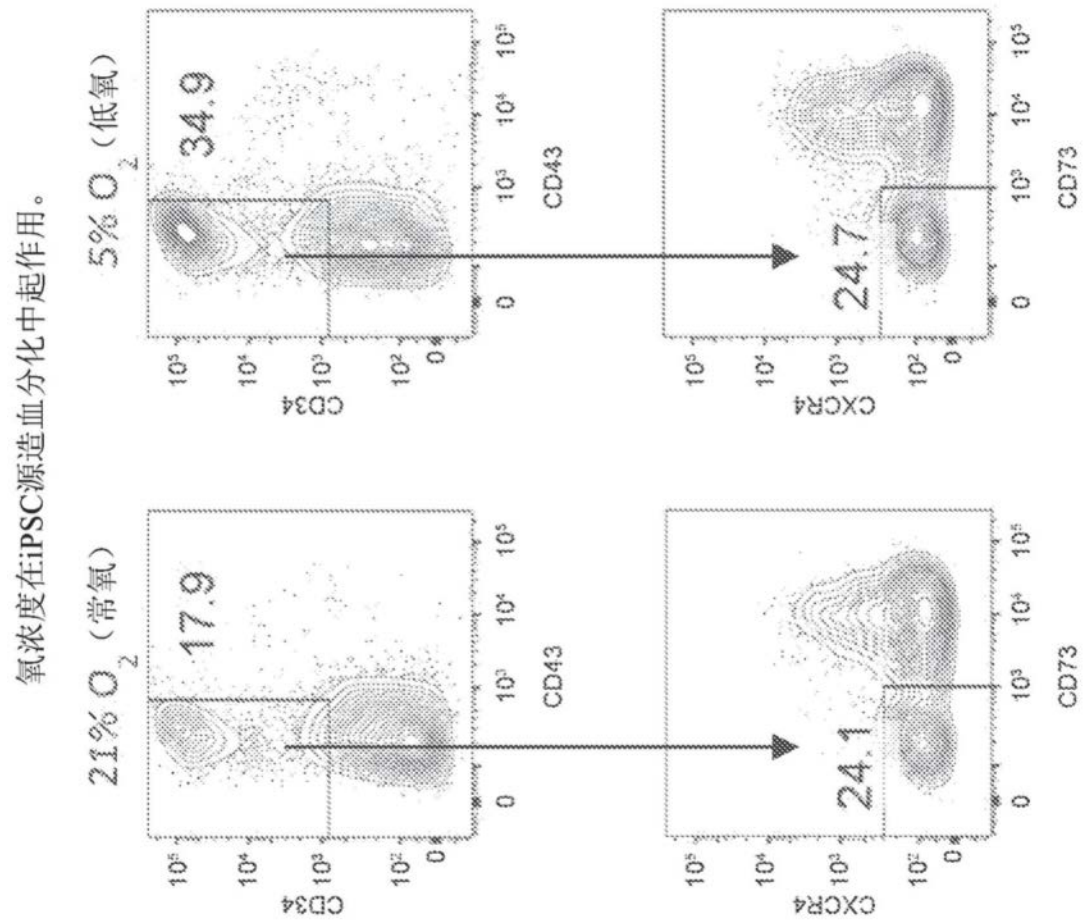


图7A

氧浓度在iPSC源造血分化中起作用。

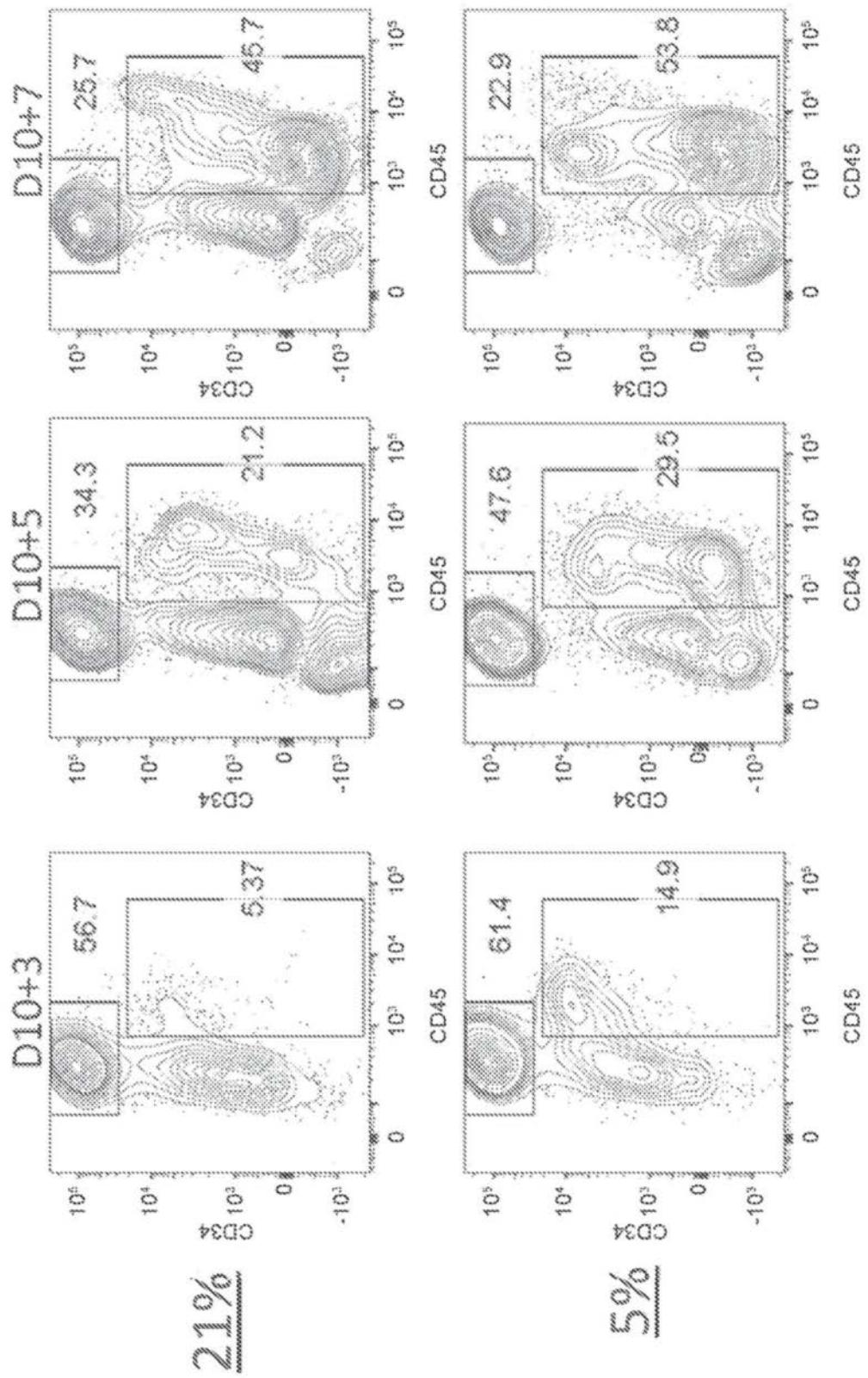


图7B

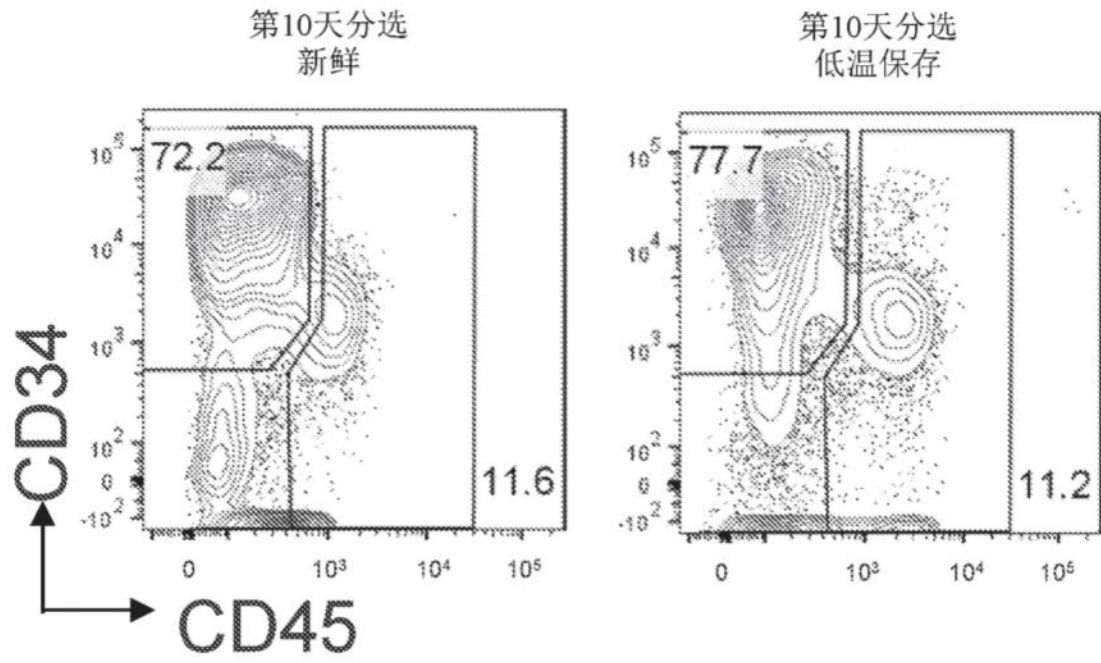


图8A

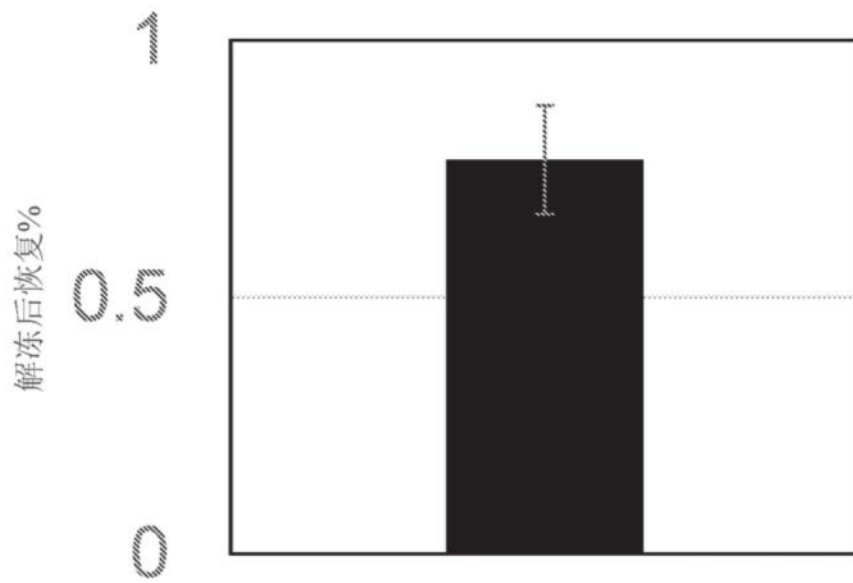


图8B

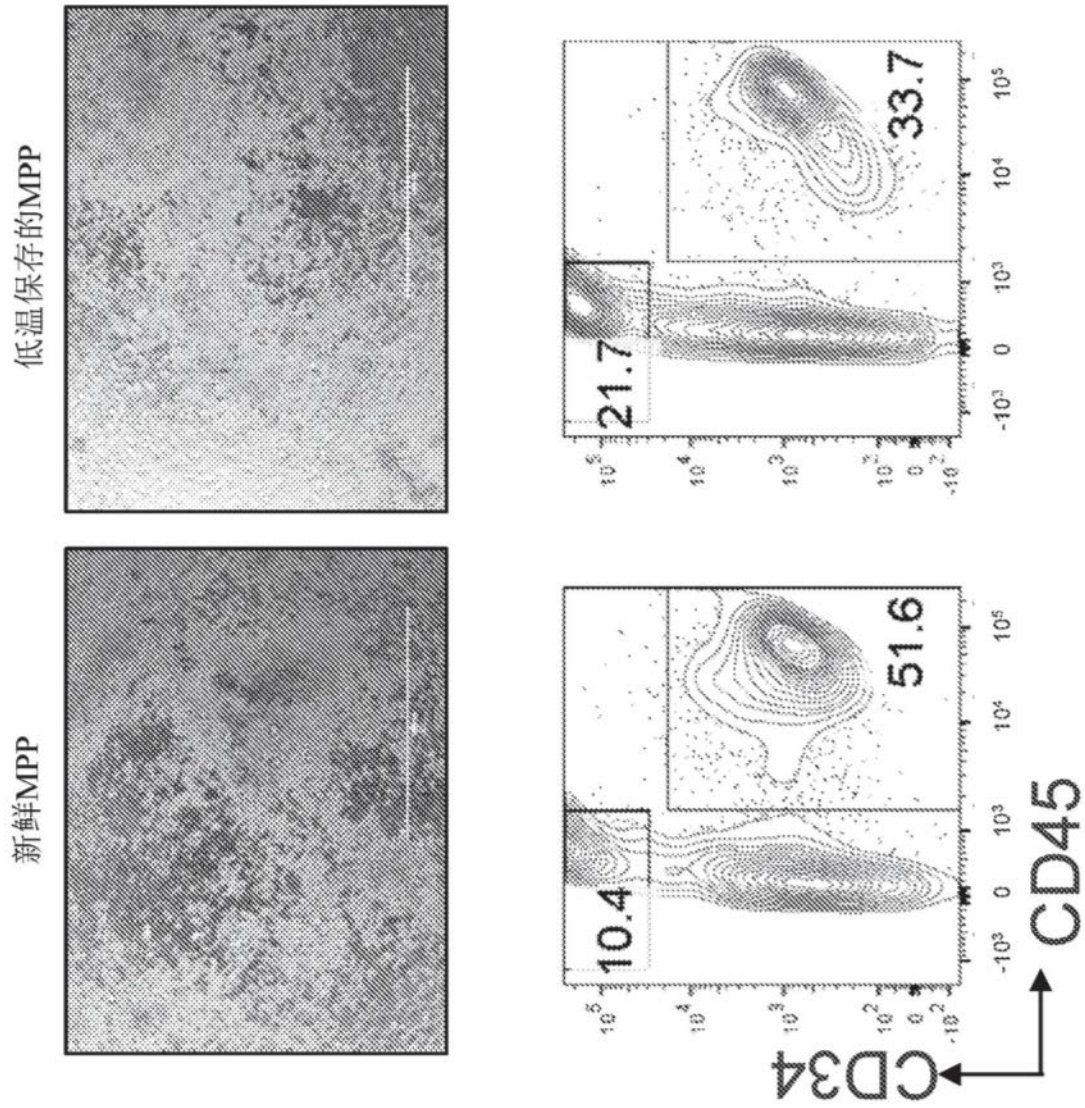


图8C

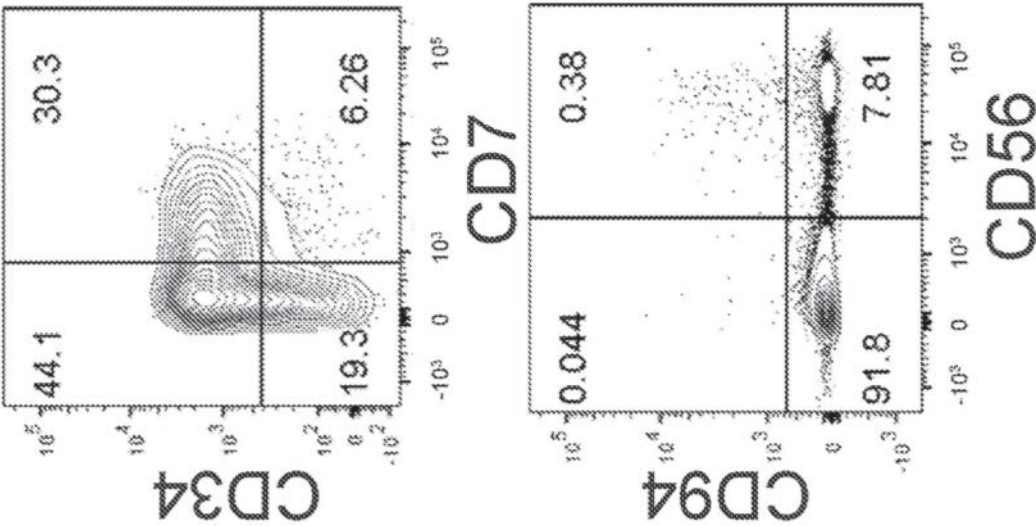


图8D

第8天分化培养物能整夜装运，在交货后产生iCD34和iHE细胞。

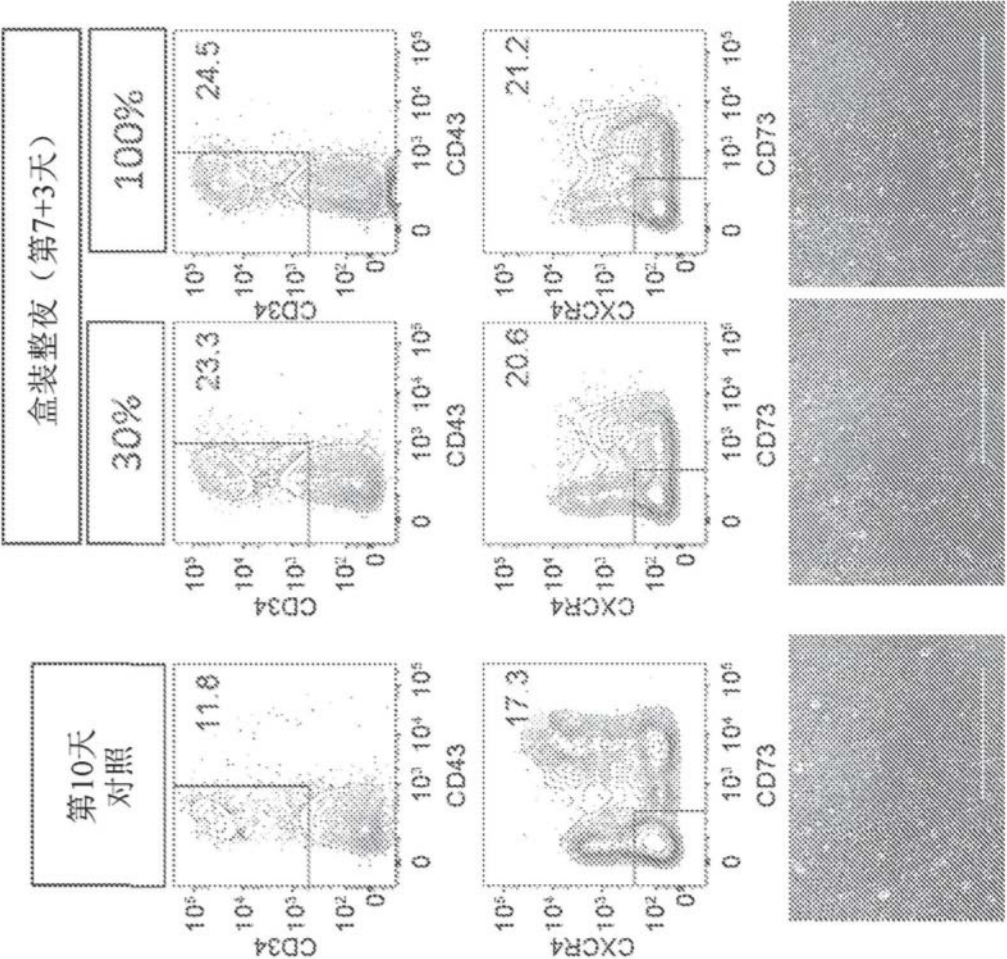


图9A

第8天分化培养物能整夜装运，在交货后产生iCD34和iHE细胞。

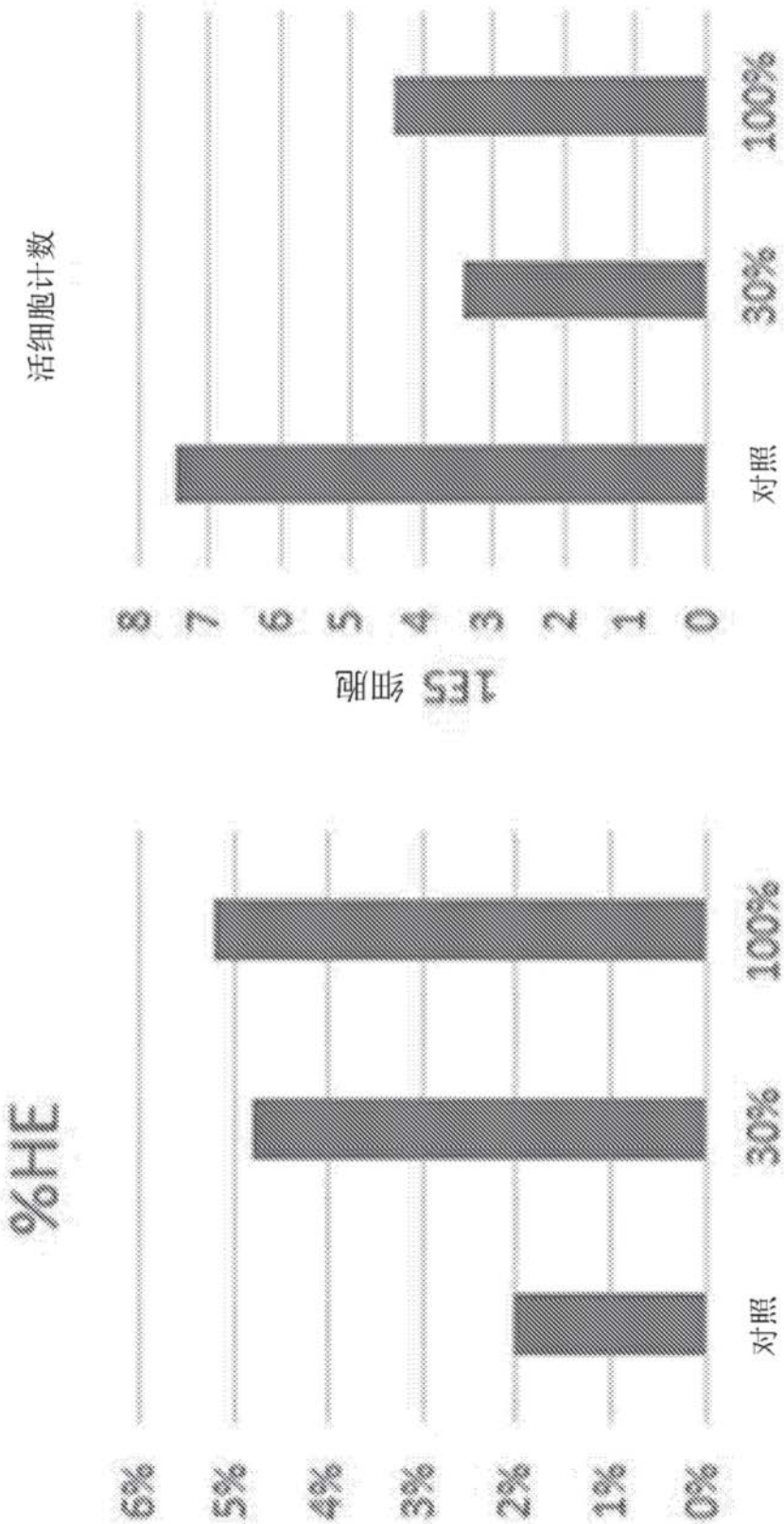


图9B

iPSC源iCD34向T细胞分化。

早期T细胞谱系标记物

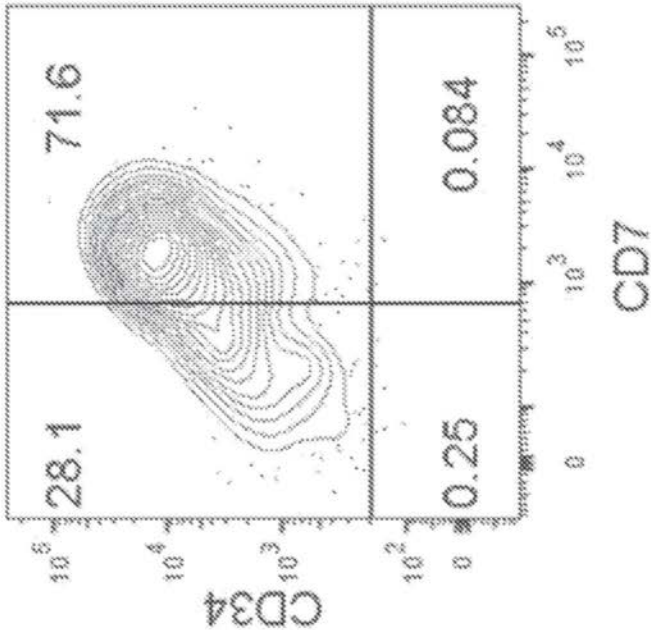


图10A

成熟T细胞谱系标记物

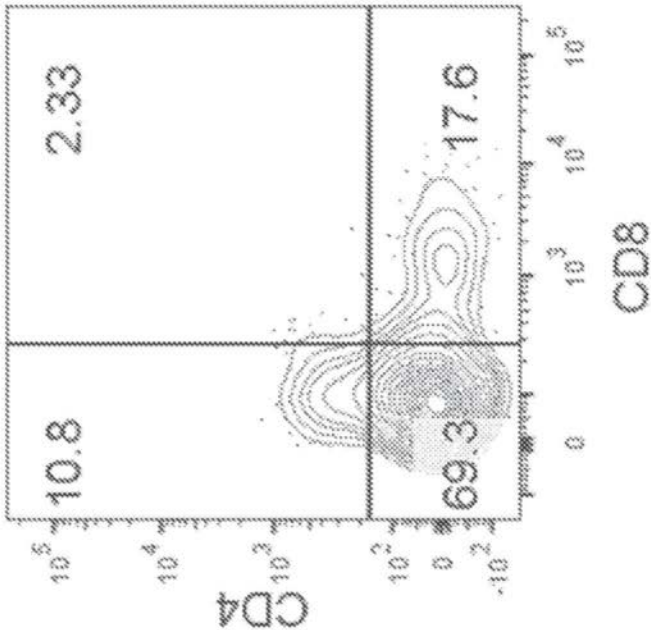


图10B

iPSC源iCD34向T细胞分化。

第5天：UCB CD34⁺细胞对iCD34⁺细胞

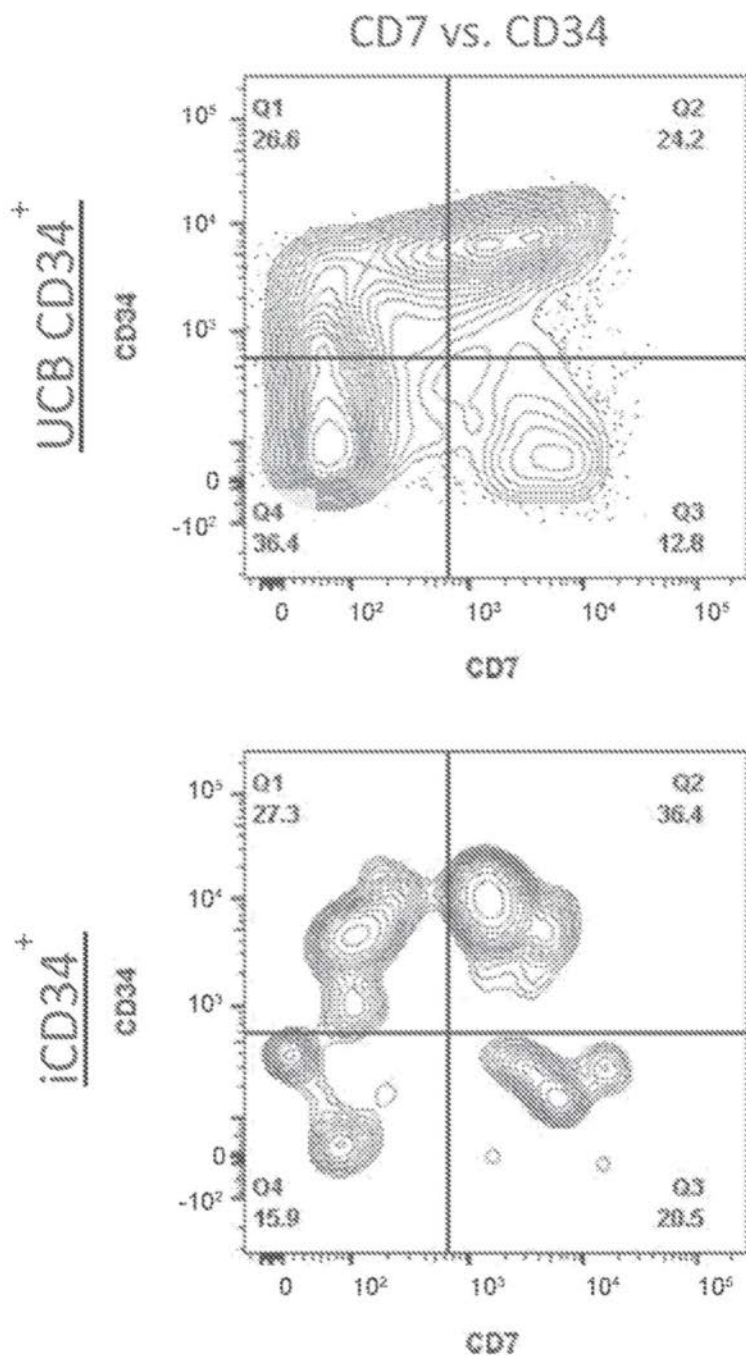


图10C

iPSC源iCD34向NK细胞分化。

早期NK谱系标记物

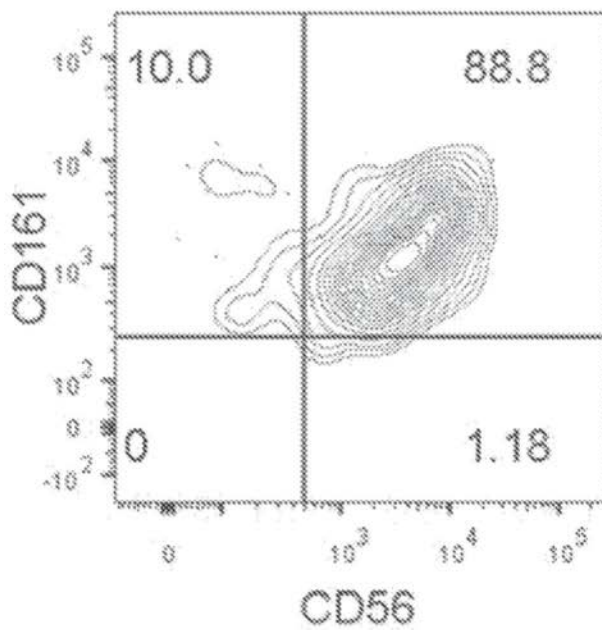
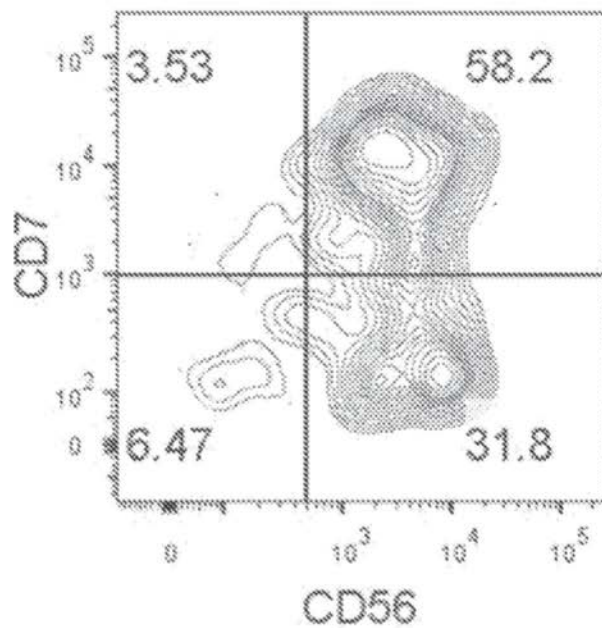


图11A

iPSC源iCD34向NK细胞分化。

成熟NK谱系标记物

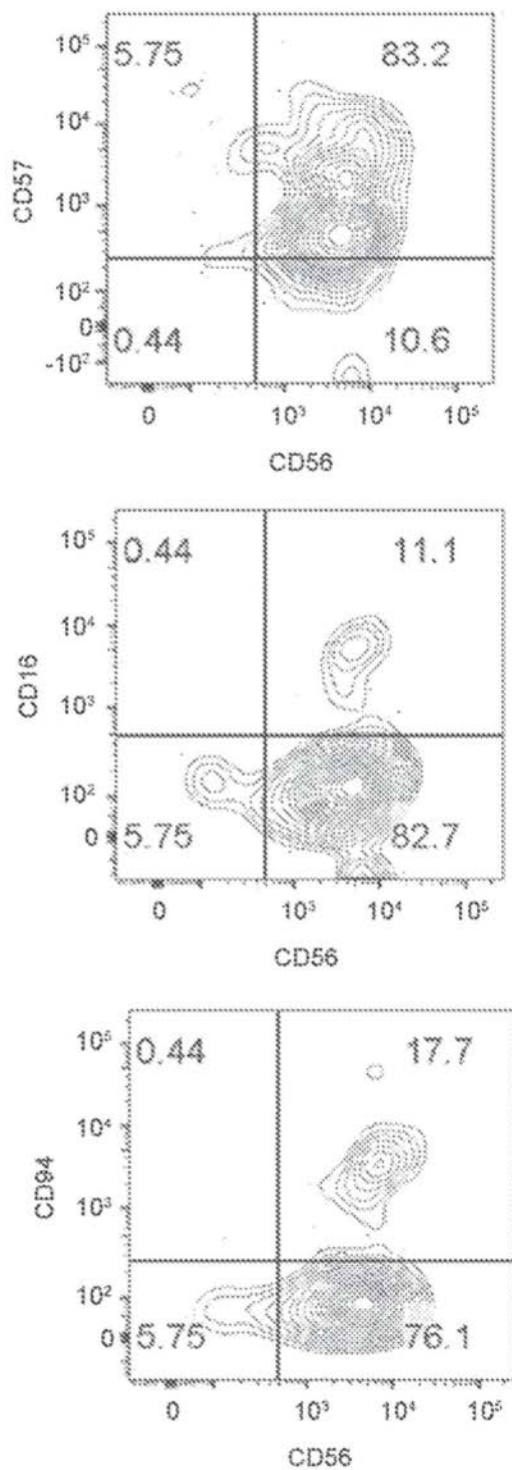


图11B

iPSC源iCD34向NK细胞分化。

第5天: UCB CD34⁺细胞对iCD34⁺细胞

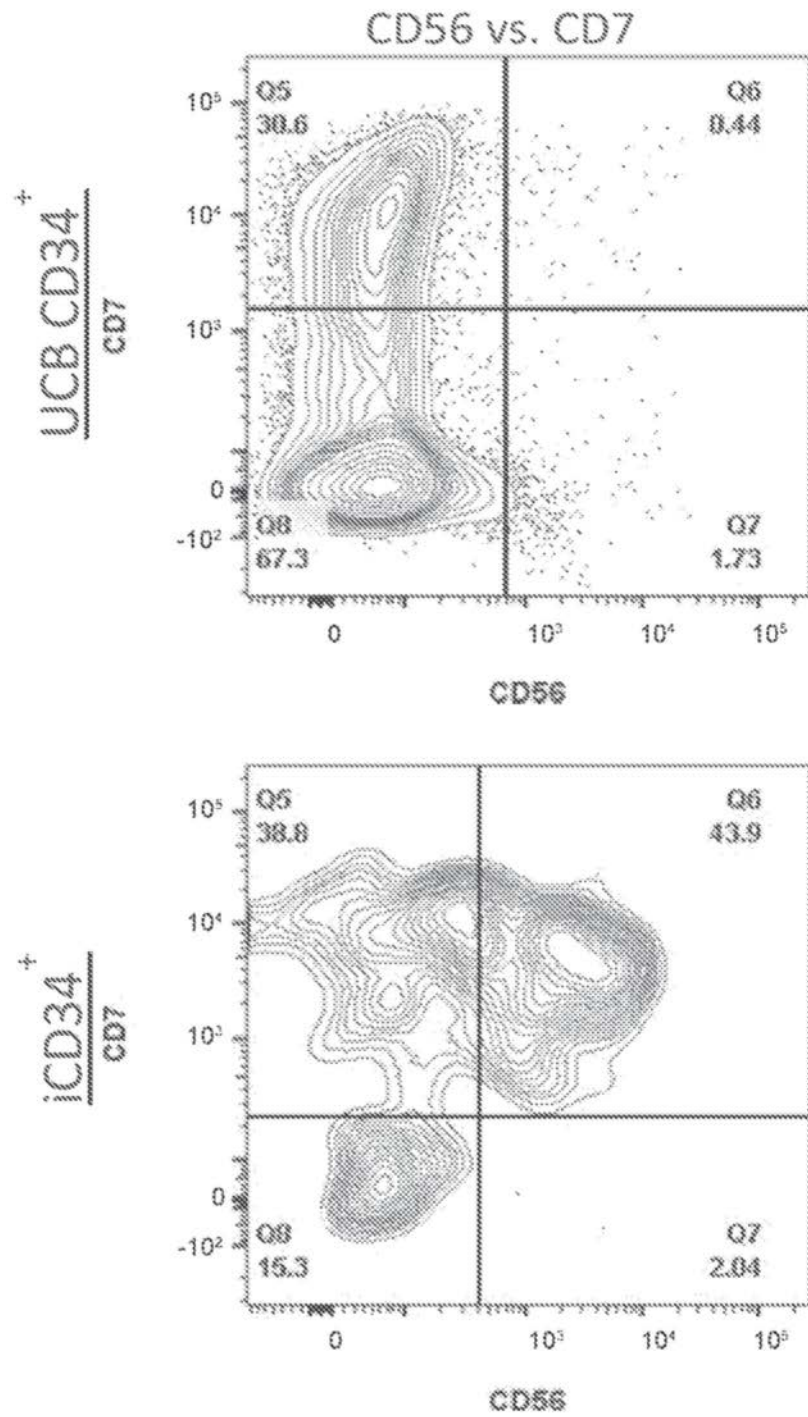


图11C

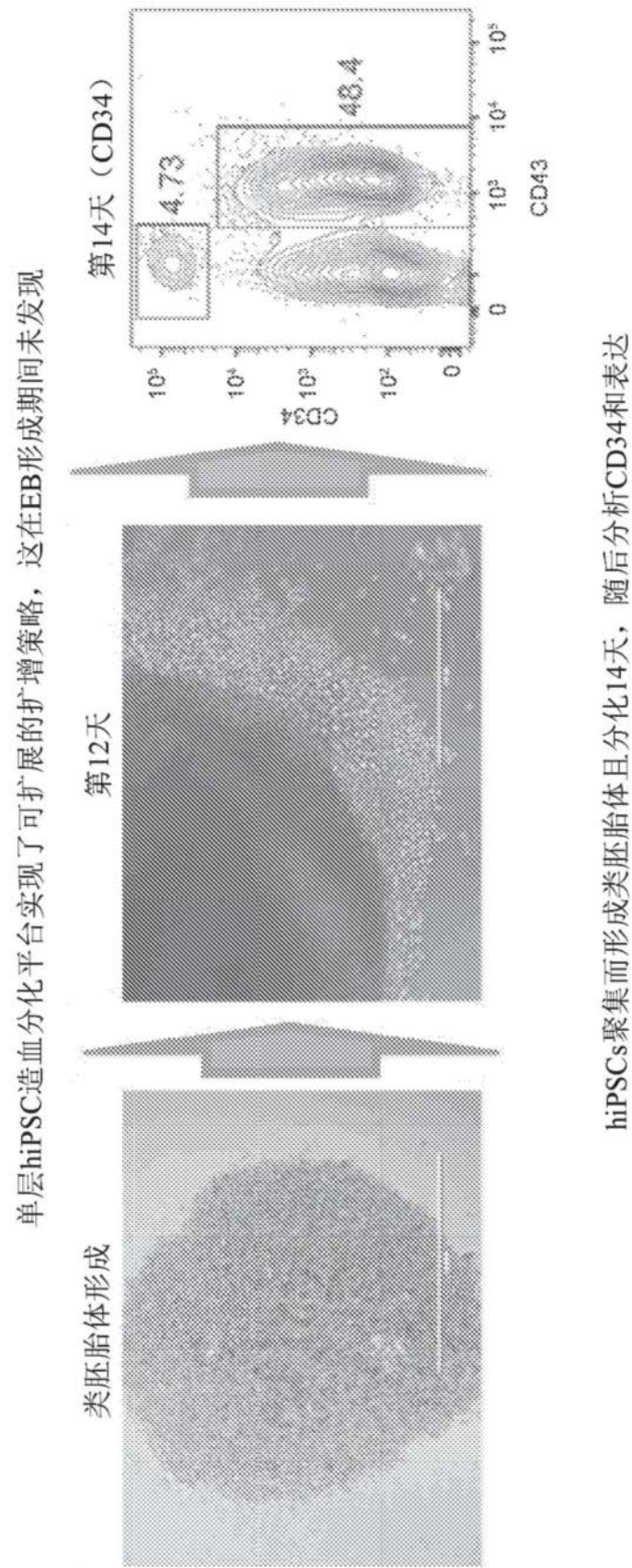


图12A

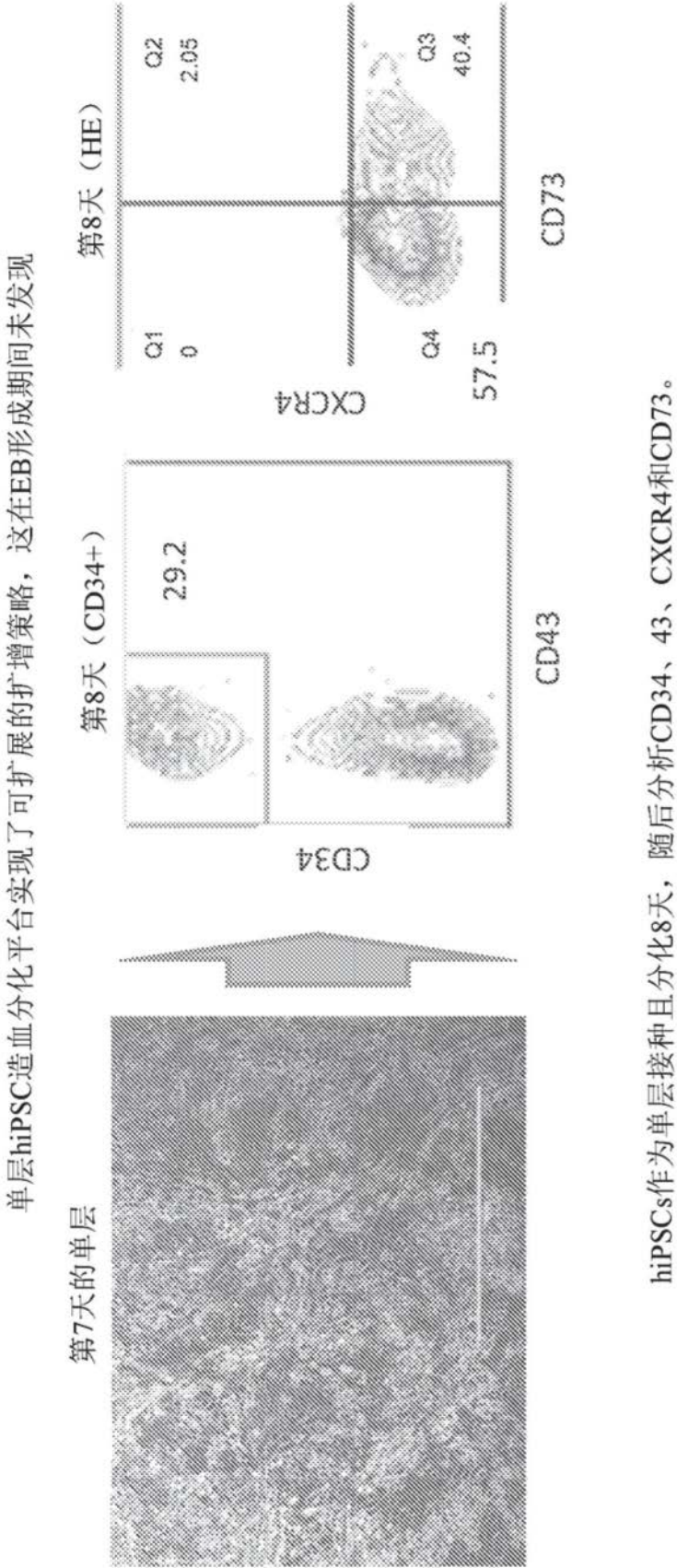
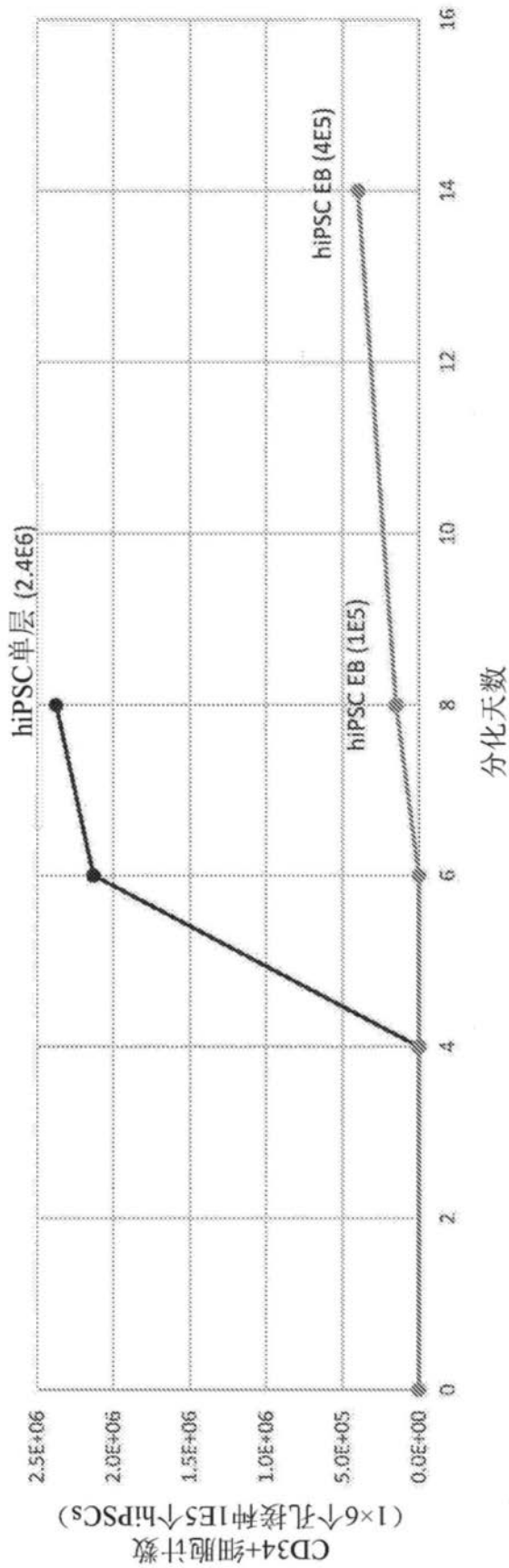


图12B

单层hiPSC造血分化平台实现了可扩展的扩增策略，这在EB形成期间未发现



对CD34阳性细胞进行计数且针对单层和EB介导造血分化、相对于时间作图。

图12C

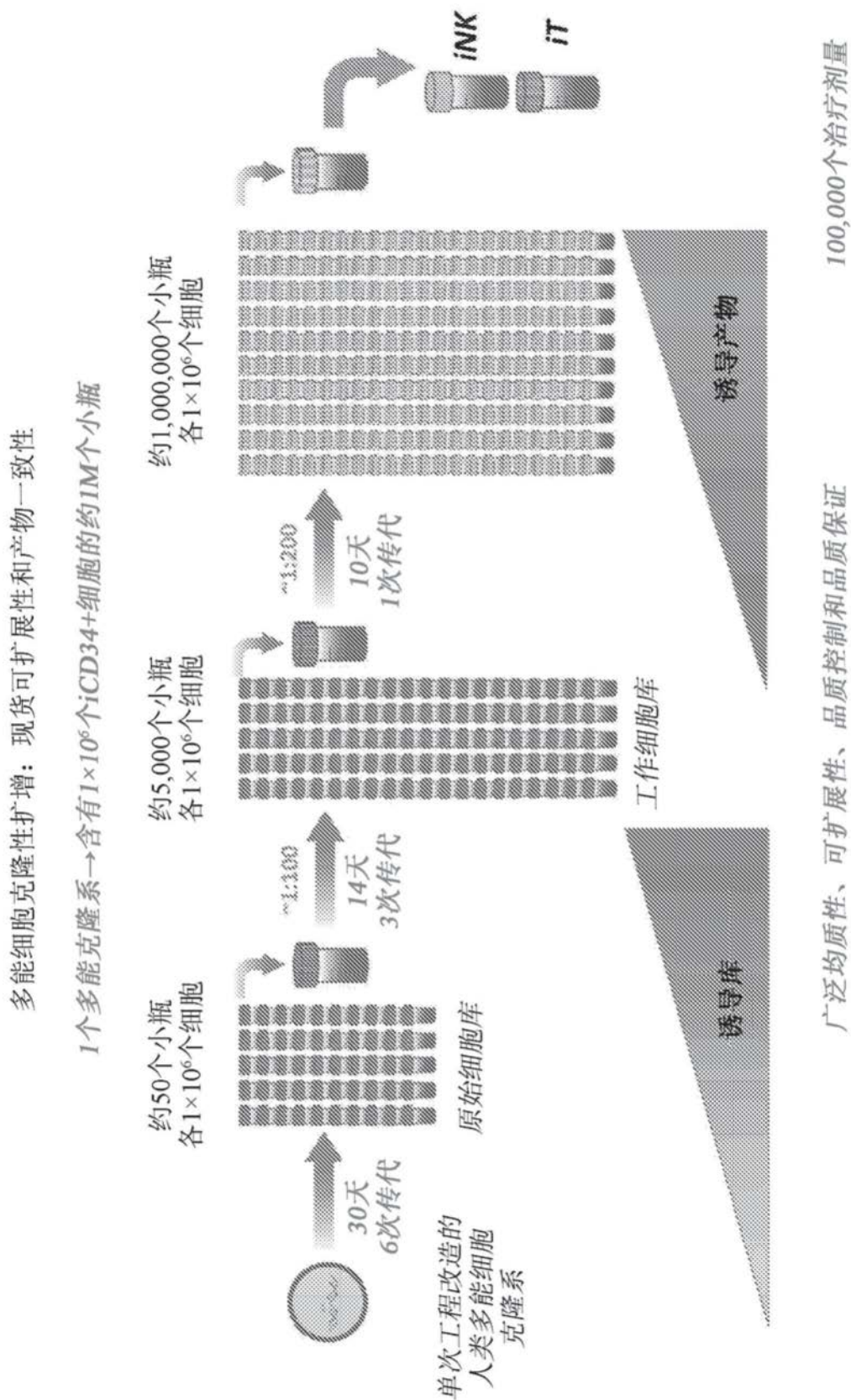


图13

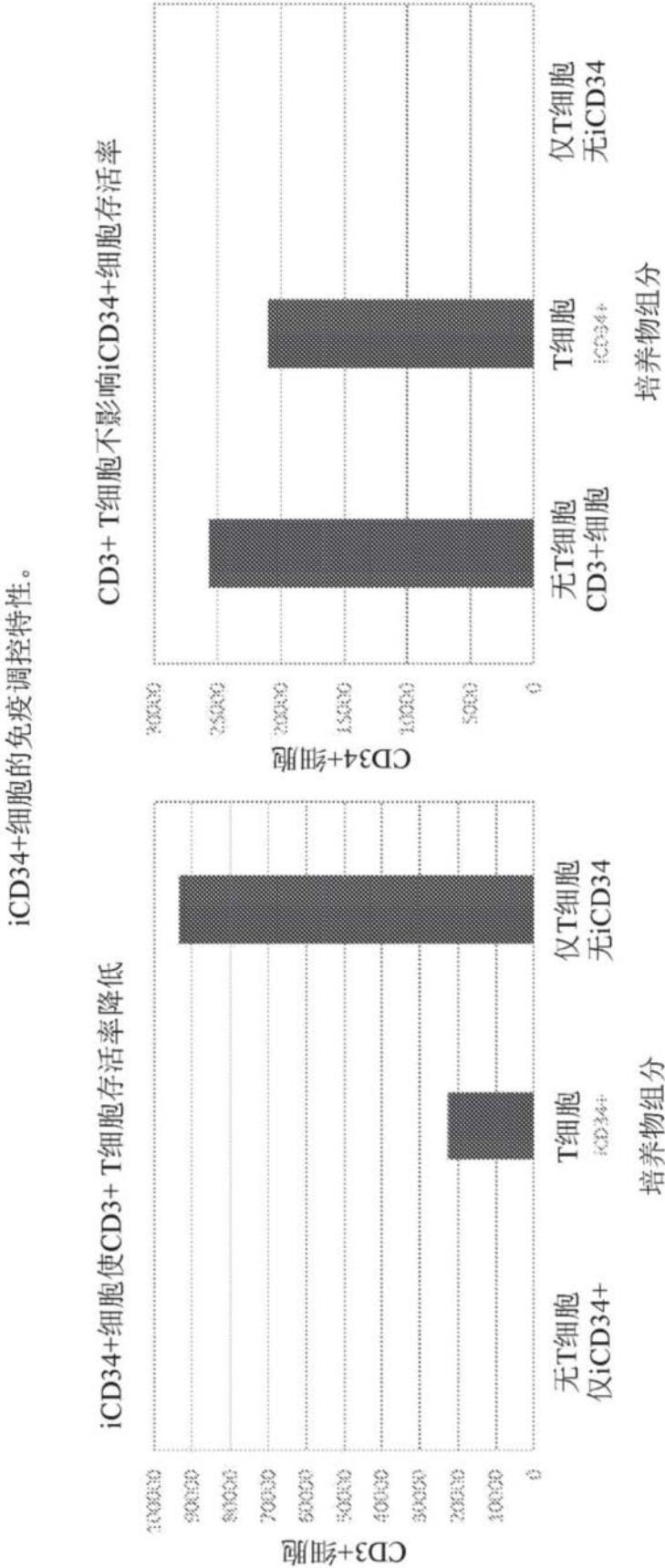


图14

iPSC源iCD34细胞向T细胞分化。

成熟T谱系标记物

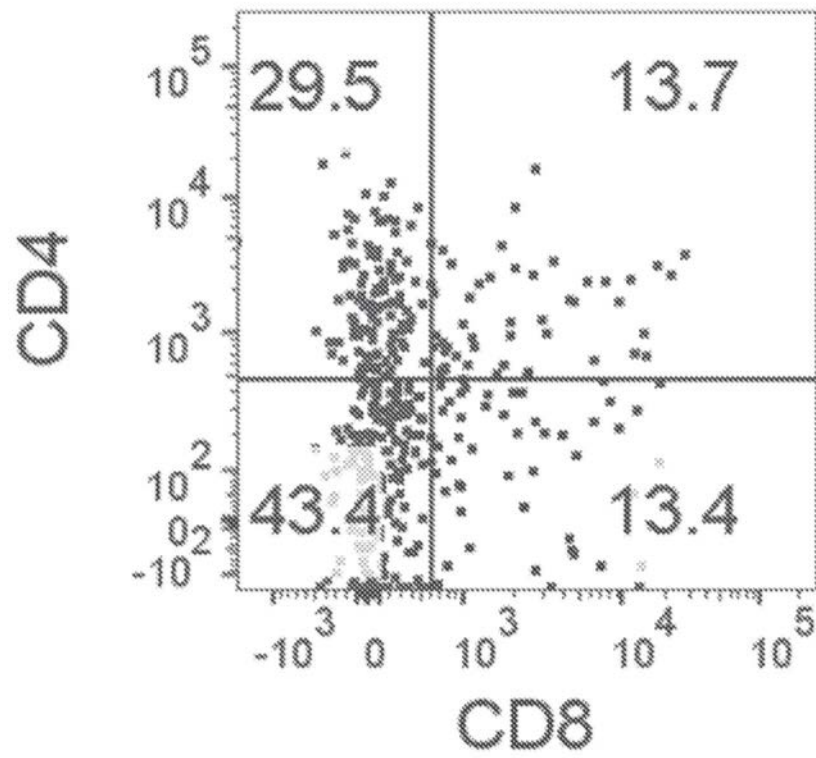


图15

基于饲养层的悬液培养支持iCD34源NK细胞的成熟。

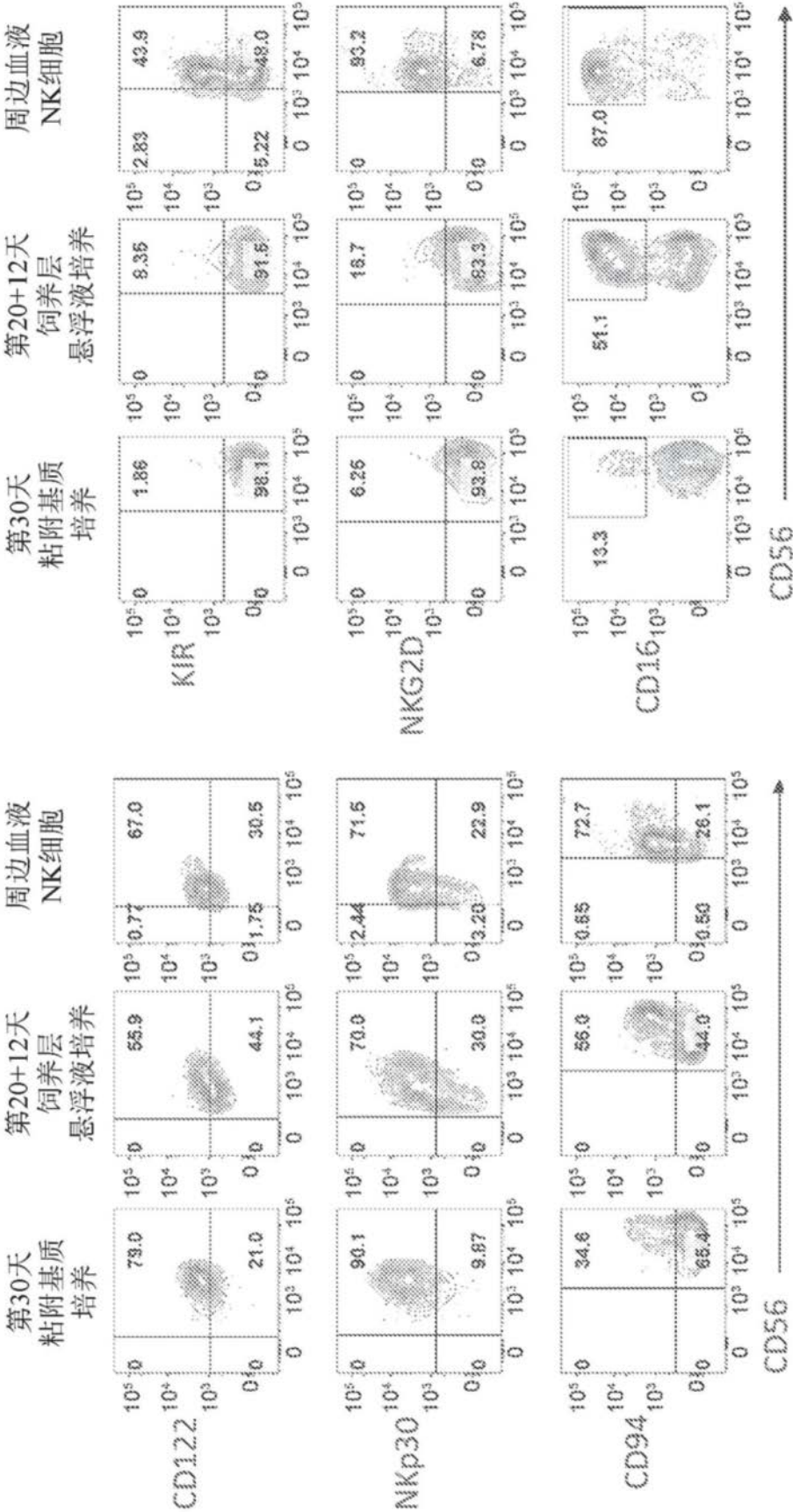


图16

iCD34源NK响应于细胞介素刺激而按照与周边血液NK细胞相似的方式分泌促炎性细胞介素。

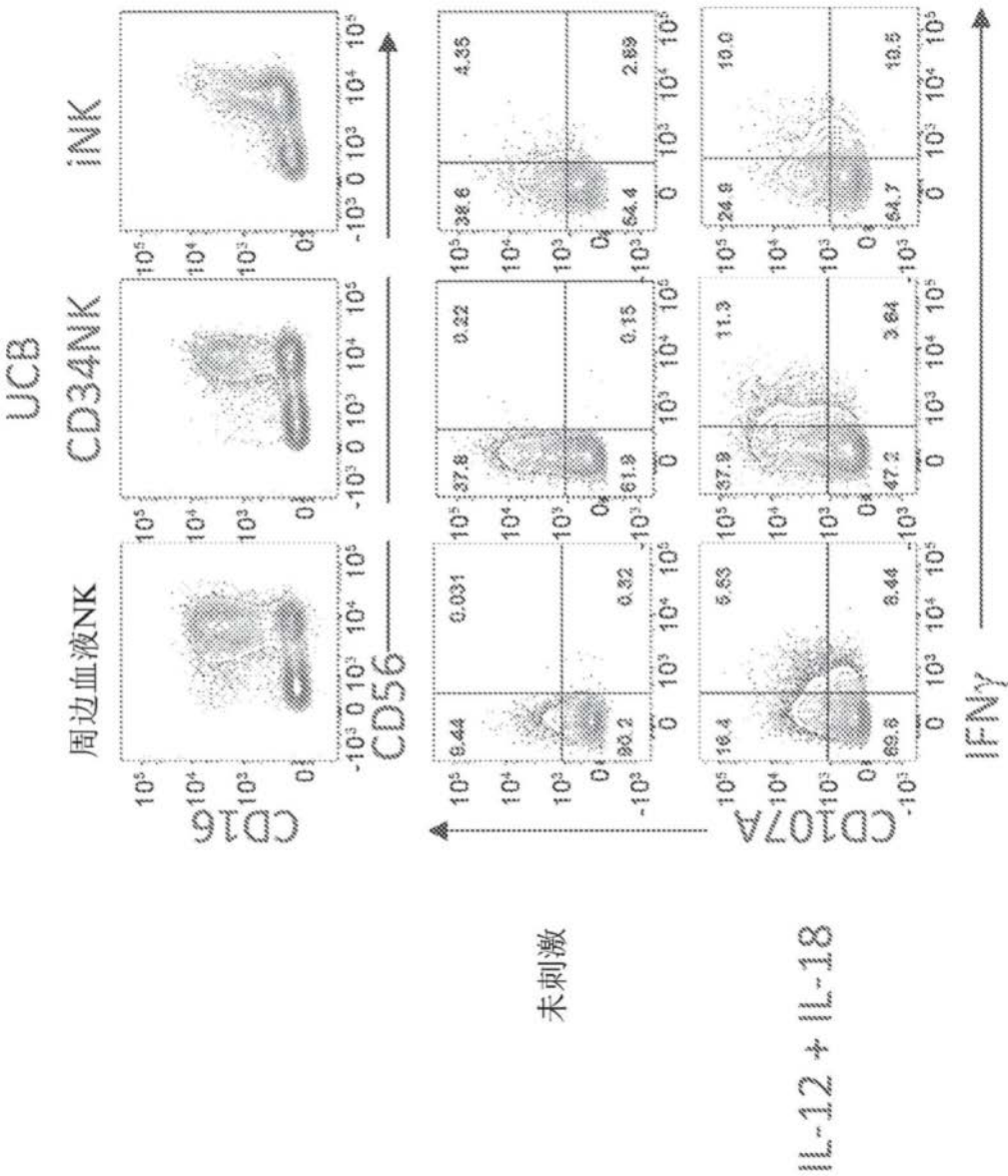


图17

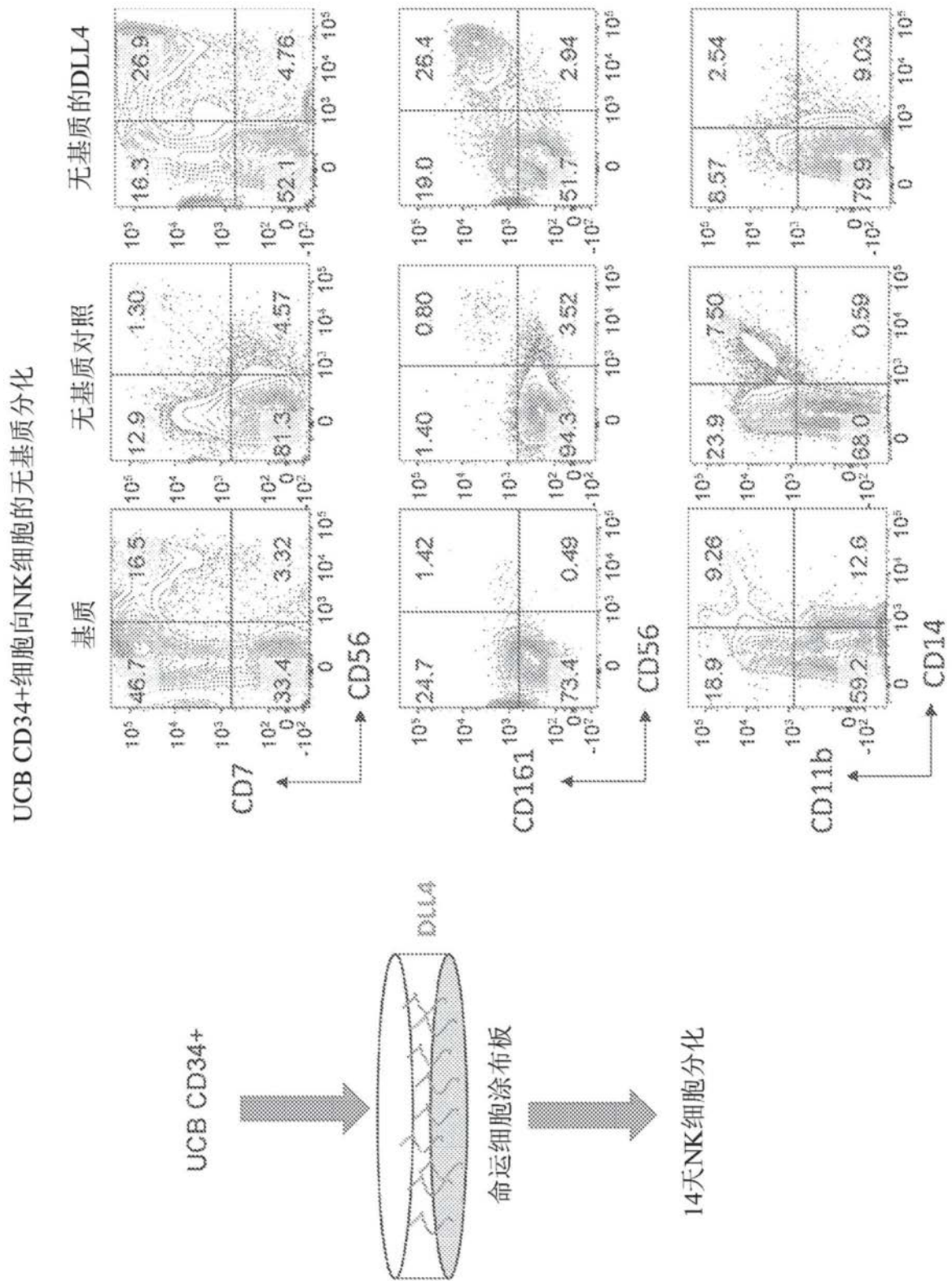


图18

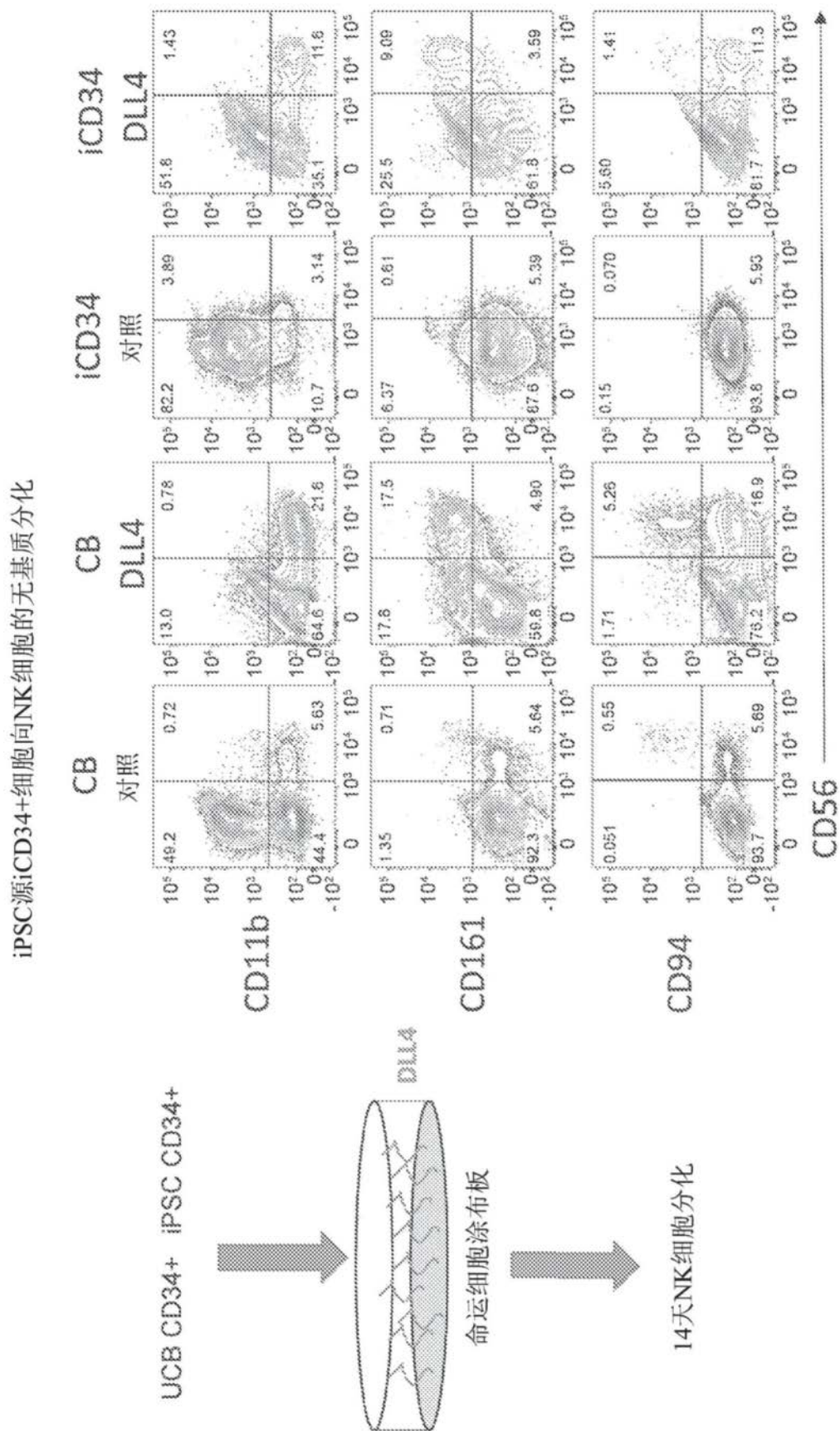


图19

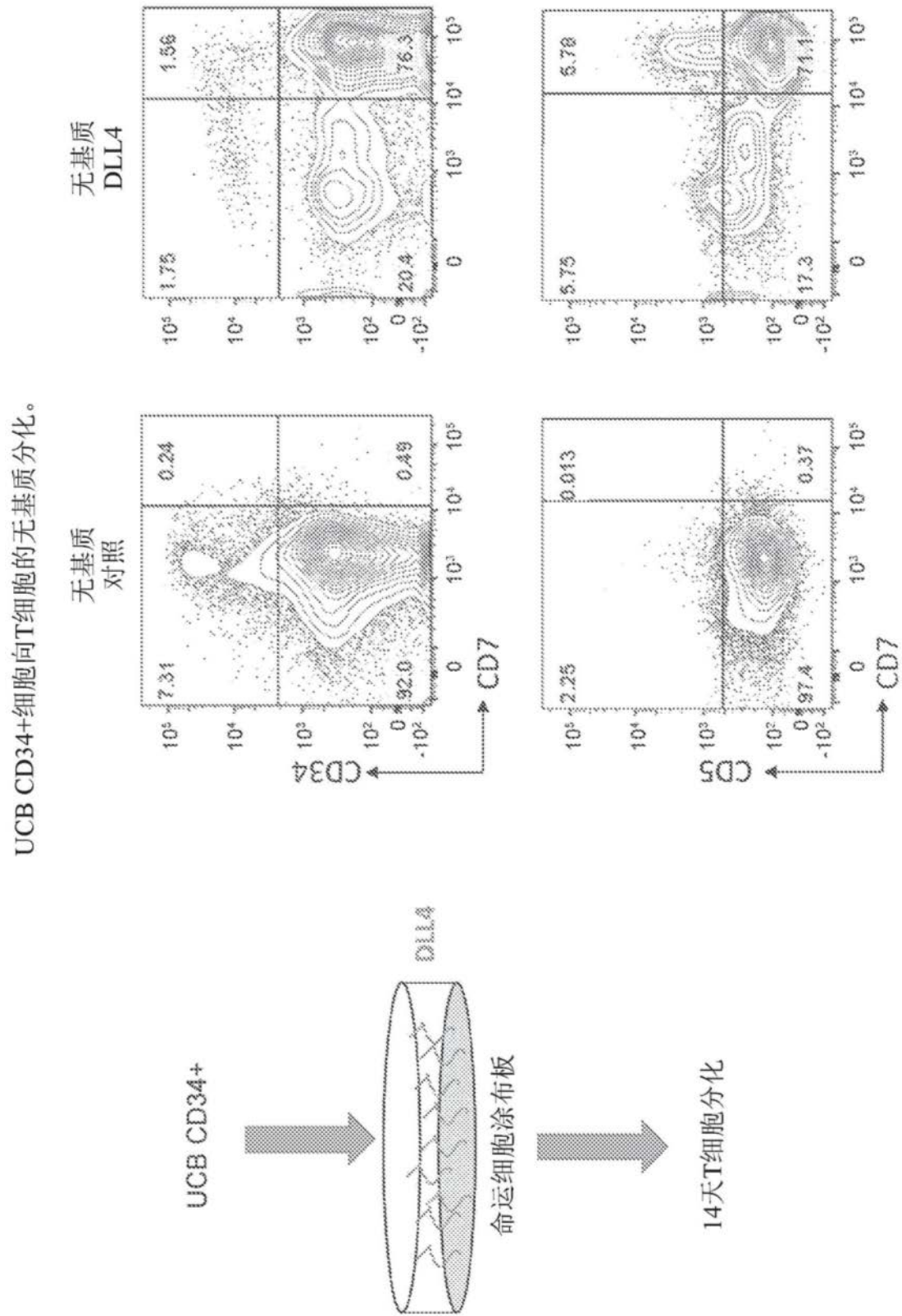


图20

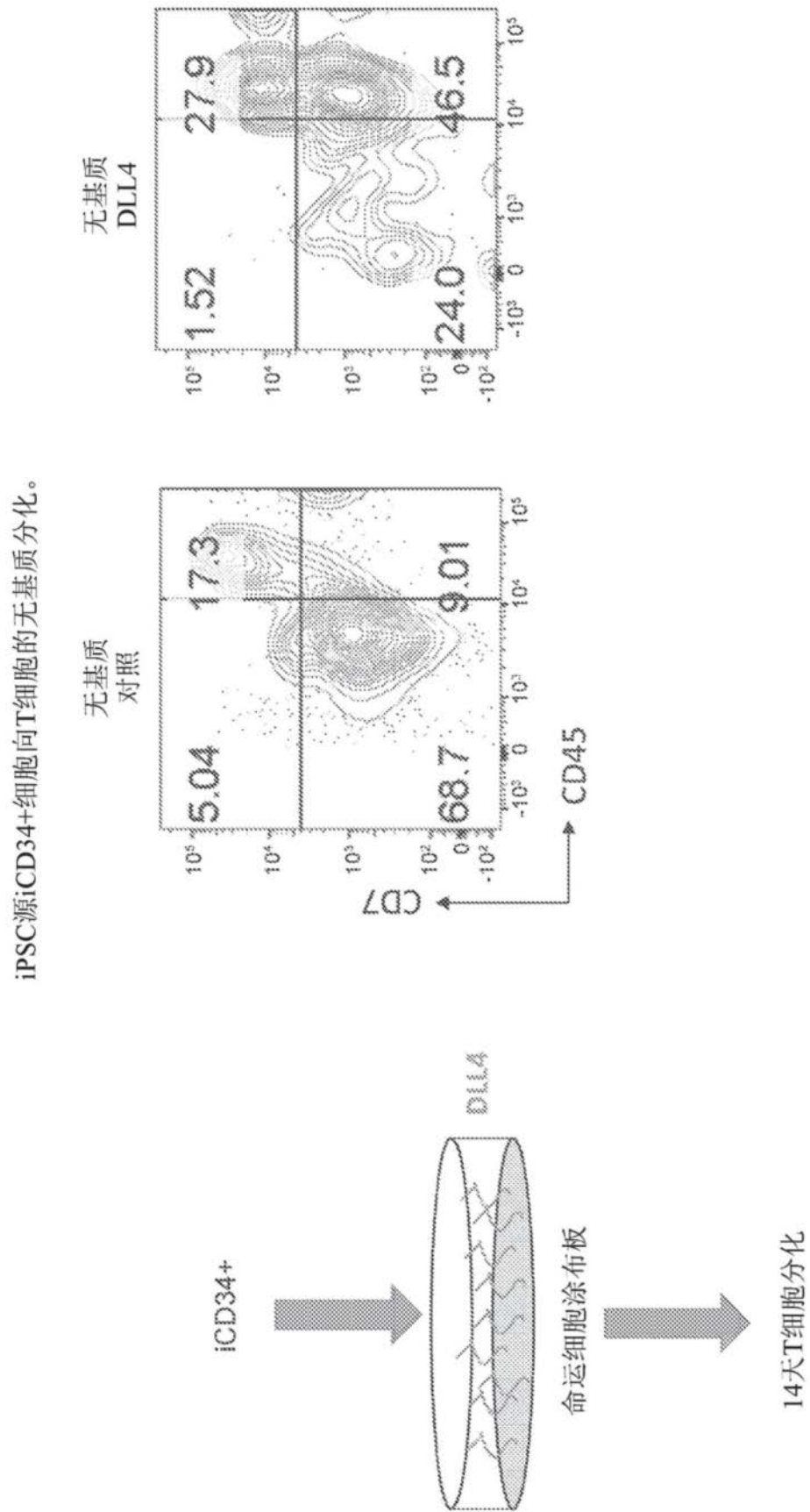


图21

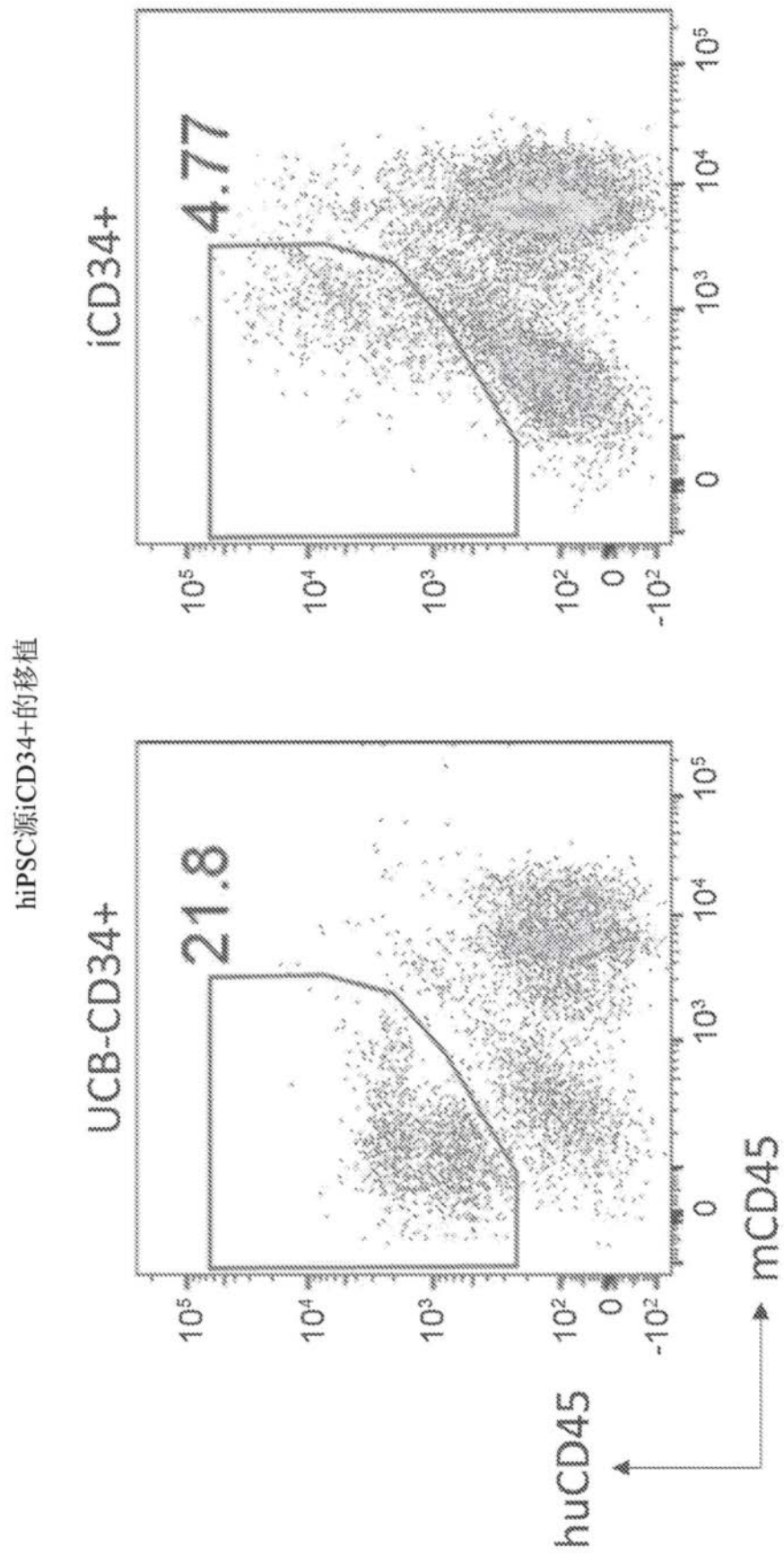


图22

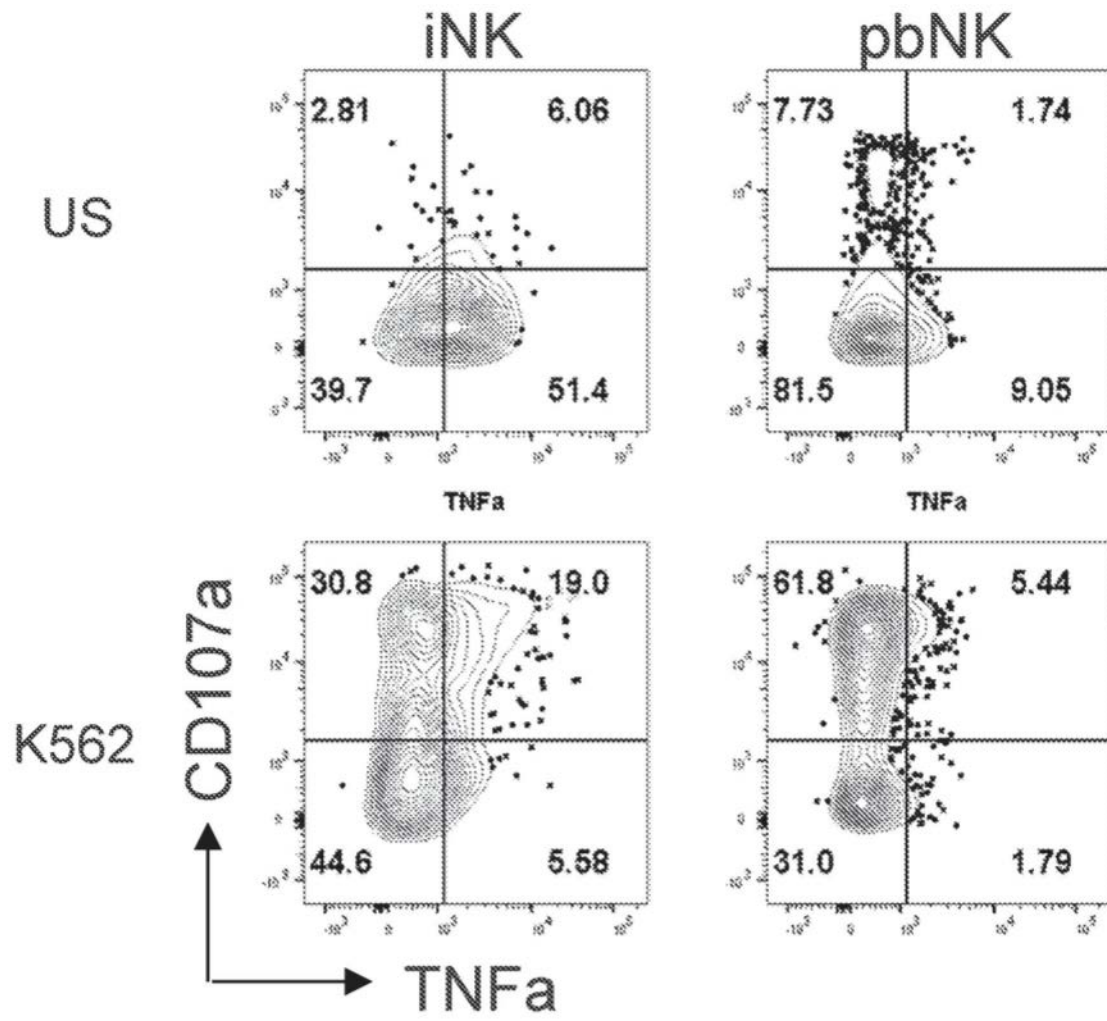


图23A

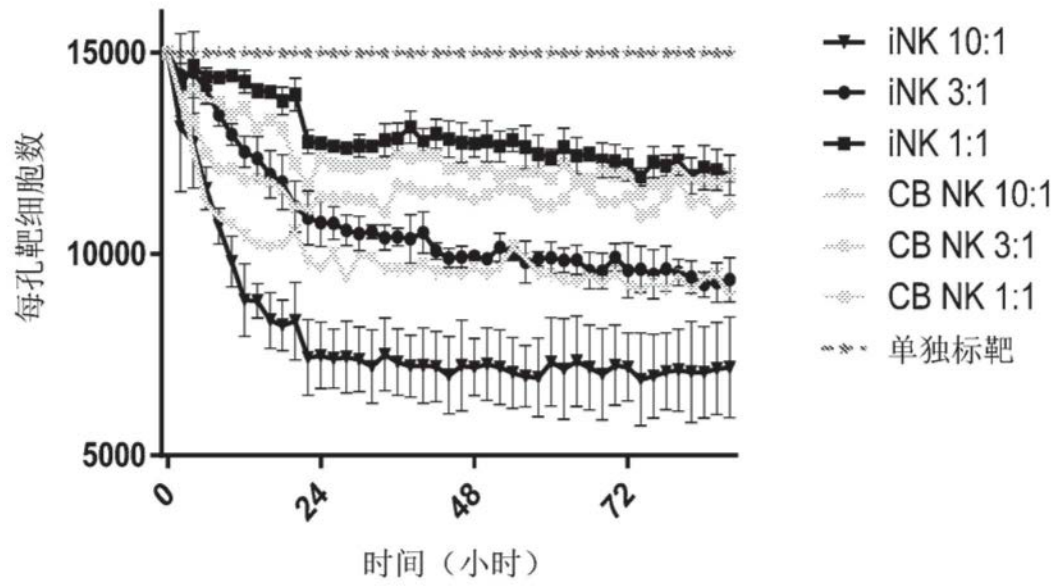


图23B

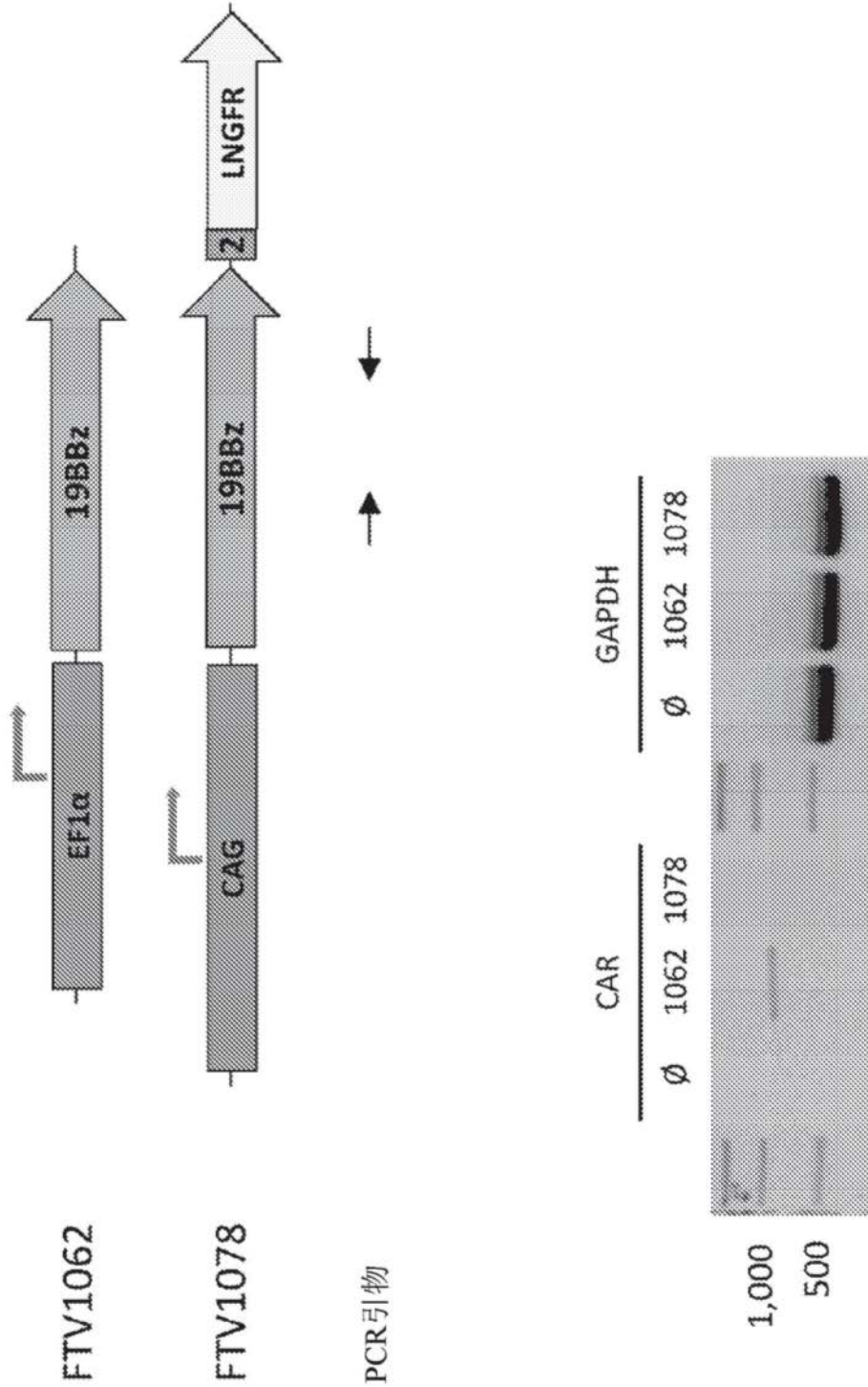


图24

名称	克隆系	CD34+ CD43- 标记物+	CD34+ CD43- 标记物	名称	克隆系	CD34+ CD43- 标记物	CD34+ CD43- 标记物	名称	克隆系	CD34+ CD43- 标记物	CD34+ CD43- 标记物
CD61	VI-PL2	0.2	99.8	CD170	1A5	0.1	99.8	CD38	HiT2	0.048	99.9
CD158a/h	HP-MA4	0.2	99.3	CD200R	OX-108	0.1	99.8	CD148	A3	0.048	99.8
CD161	HP-3G10	0.2	99.8	整合素 β 7	58XB4	0.098	99.9	CLEC9A	8F9	0.048	99.9
CD205	HD30	0.2	99.8	CD255	整合素 β 7	0.098	99.9	CD85	17G10.2	0.046	99.8
CD255	CDL-1	0.2	99.7	Notch1	MHN1-519	0.092	99.9	CD3	HiT3a	0.045	99.8
CD300F	UP-D2	0.2	99.4	整合素 β 7	整合素 β 7	0.091	99.8	CD131	1C1	0.045	99.9
TCR V β 23	qHUT7	0.2	99.8	CD255	整合素 β 7	0.089	99.9	整合素 β 7	MHN1-519	0.045	99.9
CD62E	HAE-1f	0.19	99.7	CD180	MHR73-11	0.087	99.9	CD85	MKT5.1	0.044	99.8
CD213a2	SHM38	0.19	99.6	N/A	2H3	0.085	99.9	CD229	Hiy-9.1.25	0.044	100
CD258	T5-39	0.19	99.7	CD284	HTA125	0.084	99.9	CD35	E11	0.042	99.9
CD45RO	UCHL1	0.18	99.7	CD314	1D11	0.082	99.9	CD235ab	HiR2	0.042	99.9
CD132	TUGH4	0.18	99.7	CD272	MHN26	0.082	99.8	CD360	2G1-K12	0.042	99.9
CD85h	24	0.17	99.7	CD179a	HSL96	0.081	99.9	CD27	O323	0.038	100
N/A	DY12	0.17	99.7	整合素 β 7	整合素 β 7	0.081	99.9	Pre-BCR	HSL2	0.035	99.9
SSSEA-1	MC-480	0.17	99.8	CD303	201A	0.08	99.8	CD127	A019D5	0.034	99.9
CD20	2H7	0.16	99.8	CD7	CD7-6B7	0.079	99.8	CD282	TL2.1	0.033	99.9
CD26	BASb	0.16	99.6	CD135	BV10A4H2	0.078	99.8	CD158e1	DX9	0.032	100
CD117	104D2	0.16	99.5	CD52	HI186	0.077	99.8	CD300e	UP-H2	0.032	99.7
CD273	24F.10C12	0.16	99.8	CD318	CUB1	0.077	99.9	HLA-G	87G	0.032	99.9
CD66b	G10F5	0.15	99.7	CD351	TXD1	0.077	99.9	CD334	4FR6D3	0.031	100
CD70	113-16	0.15	99.8	CD172g	LSB2.20	0.073	99.9	CD126	UV4	0.03	99.9
CD85k	ZM4.1	0.14	99.8	CD203c	NP4D6	0.073	99.8	CD140a	16A1	0.03	100
CD88	55/1	0.14	99.7	整合素 β 7	整合素 β 7	0.072	99.9	erbB3	184C3	0.029	99.9
Siglec-8	7C9	0.14	99.9	CD11a	Hi111	0.071	99.8	Siglec-10	5G6	0.029	99.9
IgG2a, Ctrl	MOPC-173	0.14	99.7	CD15	W6D3	0.071	99.9	CD14	M5E2	0.028	99.9
CD129	AH9R7	0.13	99.7	TCR V β 2	B6	0.071	99.9	CD193	5E8	0.028	99.9
CD163	GHI/61	0.13	99.8	CD41	HIP8	0.069	99.9	DLL1	MHD1-314	0.028	100
CD209	9E9A8	0.13	99.8	CD254	MHN24	0.069	99.8	CD11c	3.9	0.027	99.9
LAP	TW4-6H10	0.13	99.7	IgG1, Ctrl	RTK2071	0.068	99.9	CD137	4B4-1	0.027	99.9
CD114	LMM741	0.12	99.8	CD18	TS1/18	0.067	99.9	CD286	TLR6.127	0.027	99.9
C3aR	413D12	0.12	99.9	TCR V α 7.2	3C10	0.067	99.9	CD325	8C11	0.027	99.8
C3aR	hC3aRZ8	0.12	99.7	CD328	6-434	0.061	99.9	CLEC12A	SOC1	0.027	99.9
IgD	IA6-2	0.12	99.9	IgG3, Ctrl	MG3-35	0.06	99.9	DOR	DOR7D2A4	0.026	100
Mac-2	Gal397	0.12	99.8	IgG, Ctrl	HTK888	0.059	99.9	CD8a	HiT8a	0.025	100
IgG2b, Ctrl	MPC-11	0.12	99.9	CD182	5E8/CXCR2	0.058	99.8	CD86	IT2.2	0.024	100
CD1b	SN13 (K5-188)	0.11	99.8	空白	空白	0.057	99.9	CD11b	CBRM1/5	0.023	99.9
CD57	HCD57	0.11	99.8	CD4	RPA-T4	0.056	99.9	CD290	3C10C5	0.023	99.9
CD178	NOK-1	0.11	99.7	CD25	8C96	0.056	99.9	CD268	11C1	0.022	100
CD355	C24.1	0.11	99.9	CD30	Bv88	0.053	99.9	CD45	Hi30	0.021	100
IgG1, Ctrl	MOPC-21	0.11	99.8	CD150	A12 (T04)	0.052	99.9	CD45RA	Hi100	0.02	99.8
CD36	5-271	0.1	99.8	CD152	L3D10	0.051	99.9	CD172b	84B6	0.019	100
CD96	NK92.39	0.1	99.9	IL-28RA	MHLCH2a	0.051	99.9	CD1c	IL161	0	100
CD122	TU27	0.1	99.9	TRA-1-60-R	TRA-1-60-R	0.049	100	CD2	RPA-2.10	0	100

图26(续)

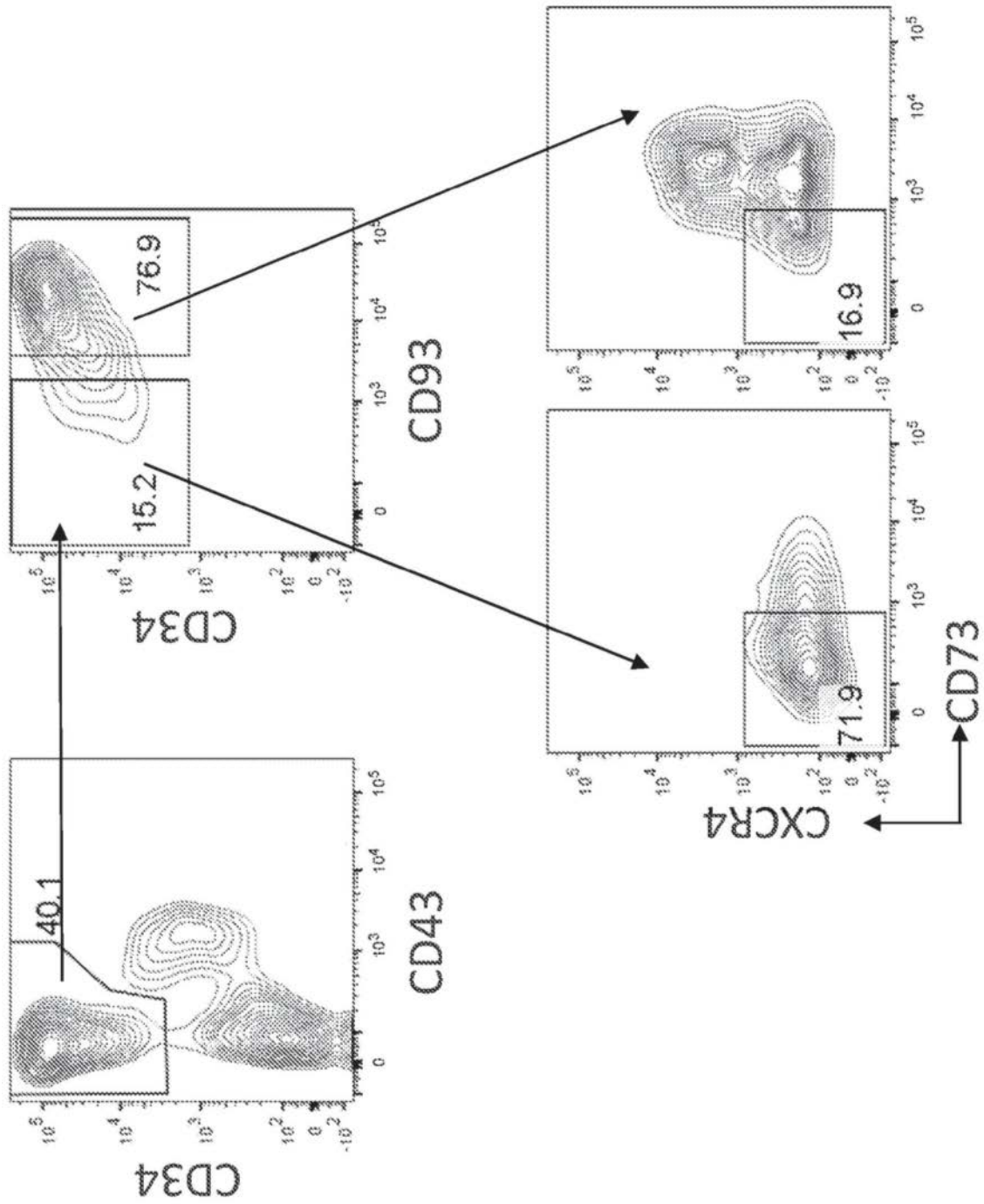


图27

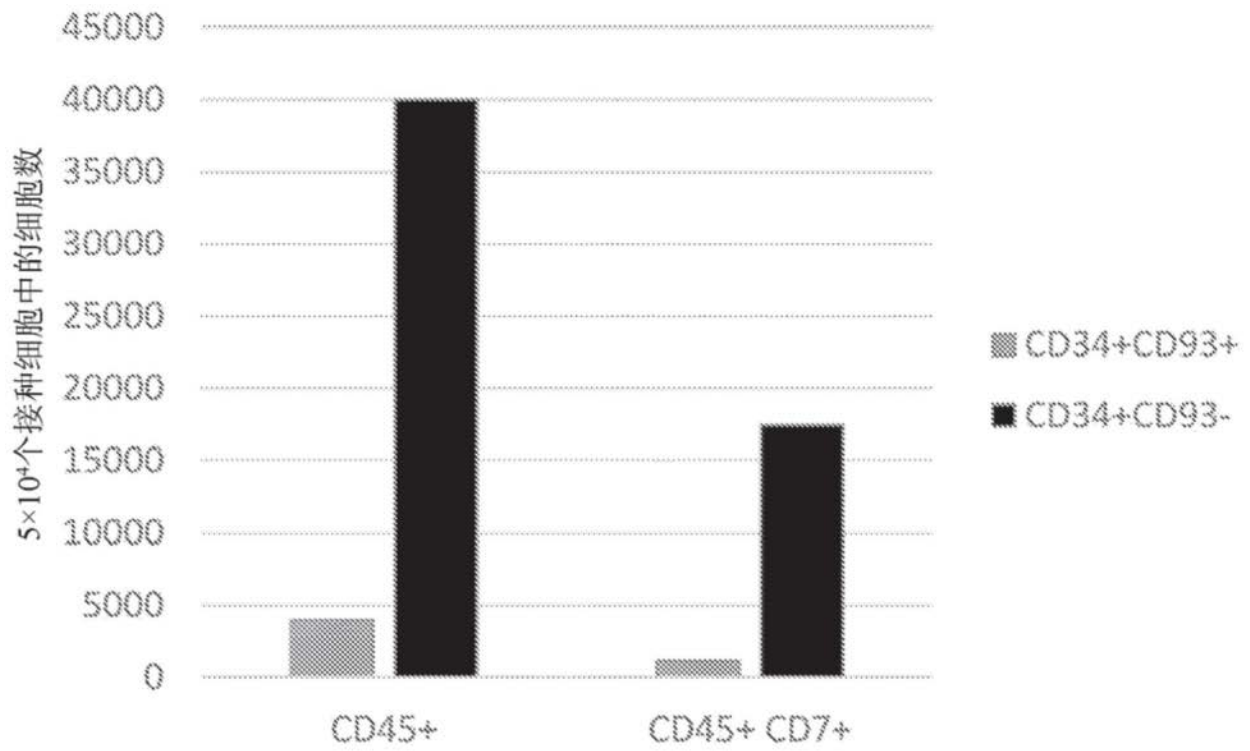


图28A

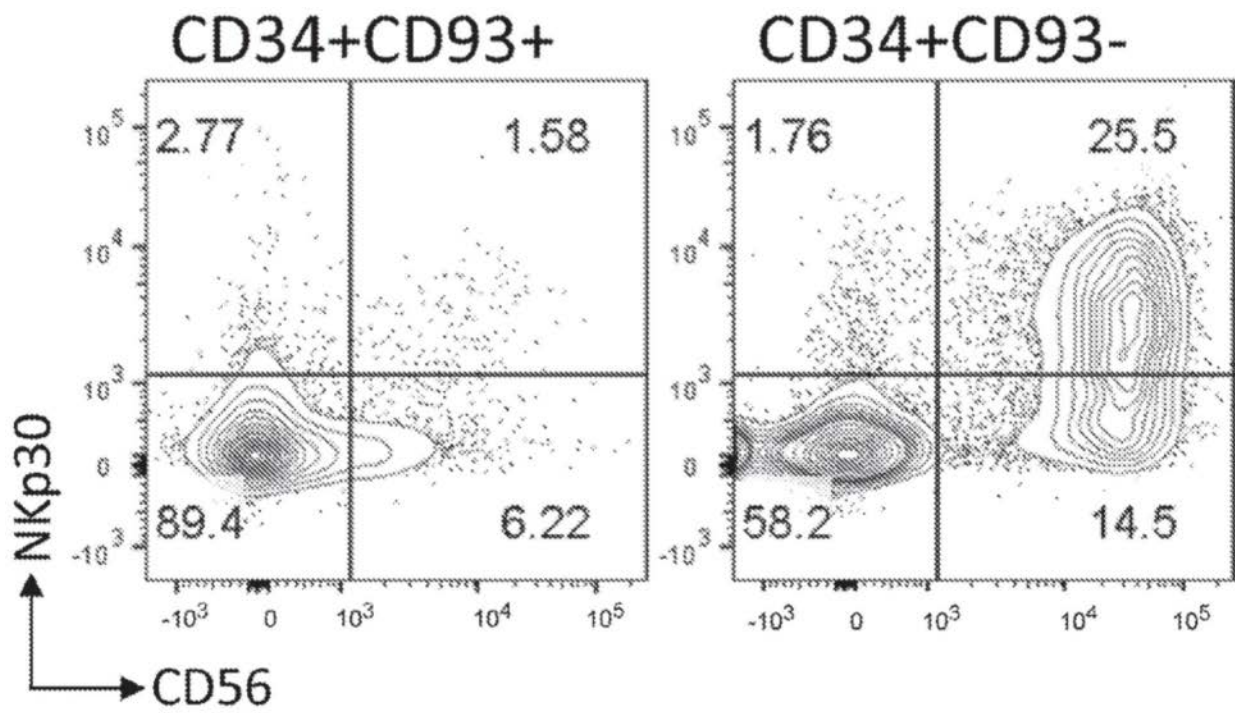


图28B

对WNT信号传导的调节使iCD34细胞的输出改善

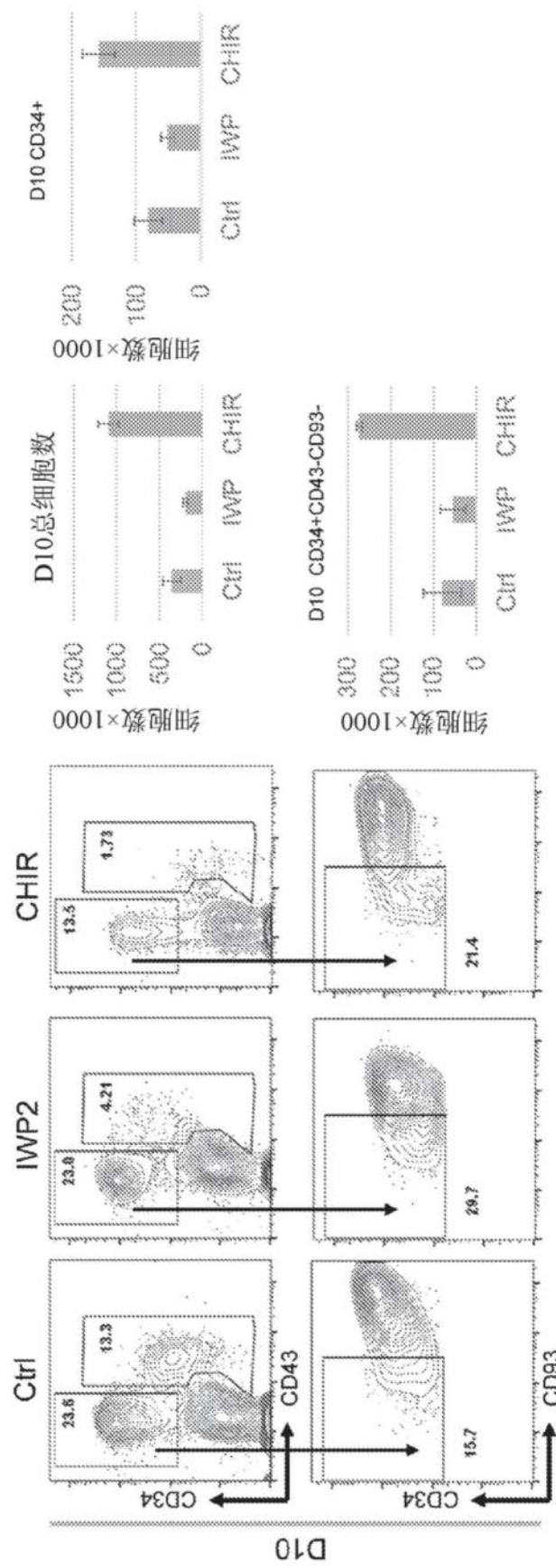


图29A

图29B

对WNT信号传导的调节使iCD34细胞向造血和淋巴的输出改善

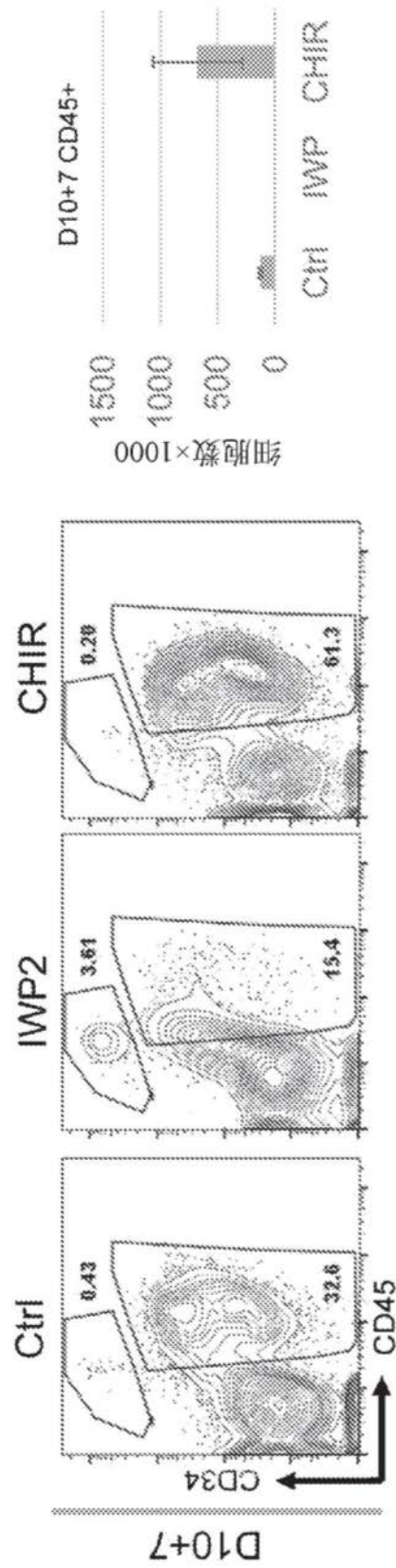


图30A

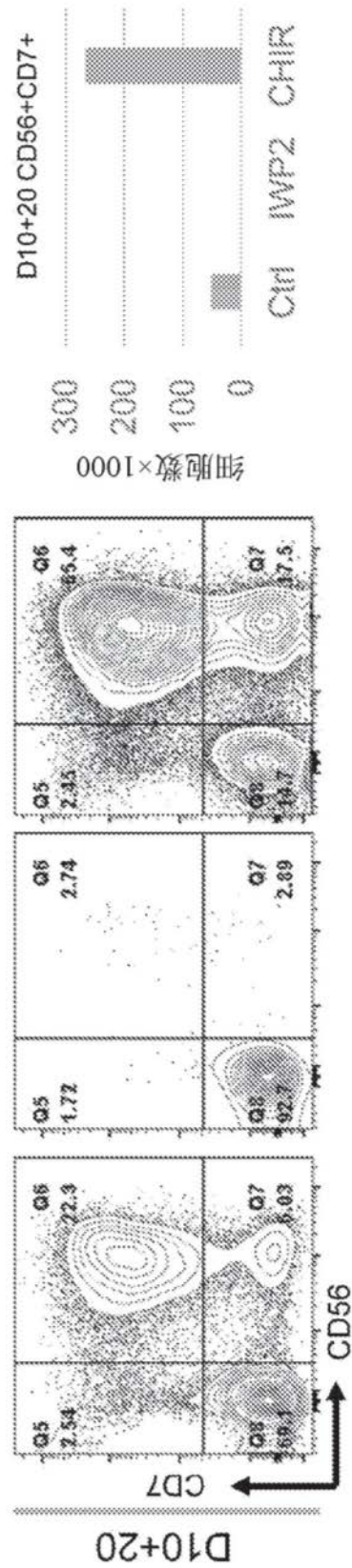


图30B

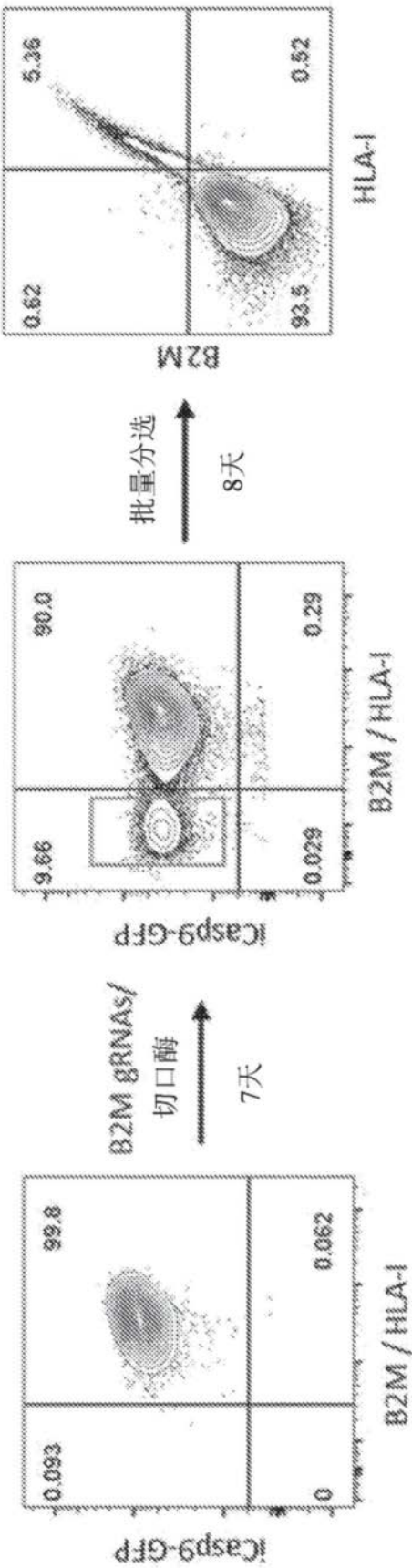


图31

HLA I类剔除型iPSCs分化成iCD34⁺ HE且能进一步
分化成泛造血和淋巴祖细胞

第10天

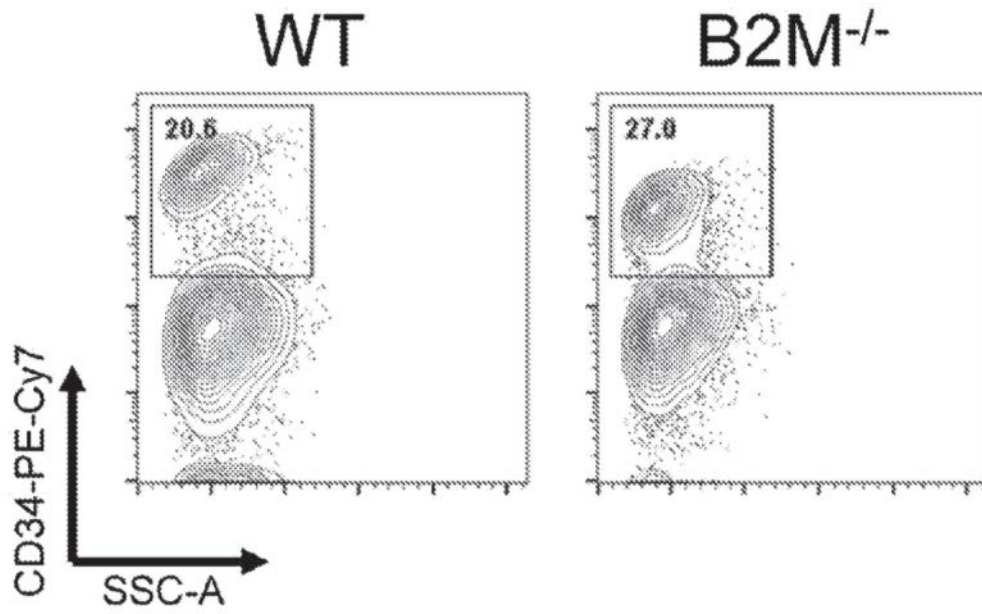


图32A

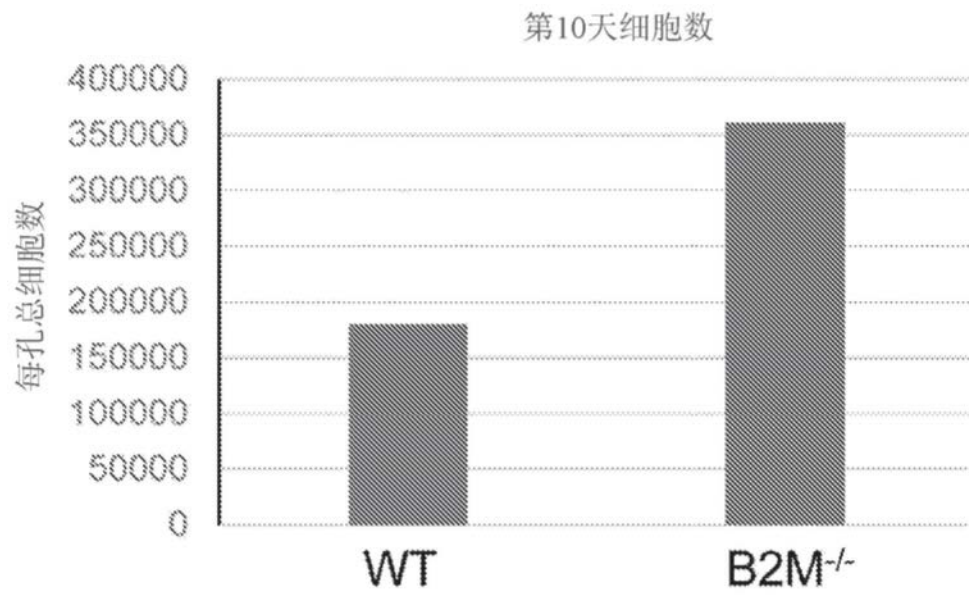


图32B

HLA I类别除型iPSCs分化成iCD34⁺ HE且能进一步分化成
泛造血和淋巴祖细胞

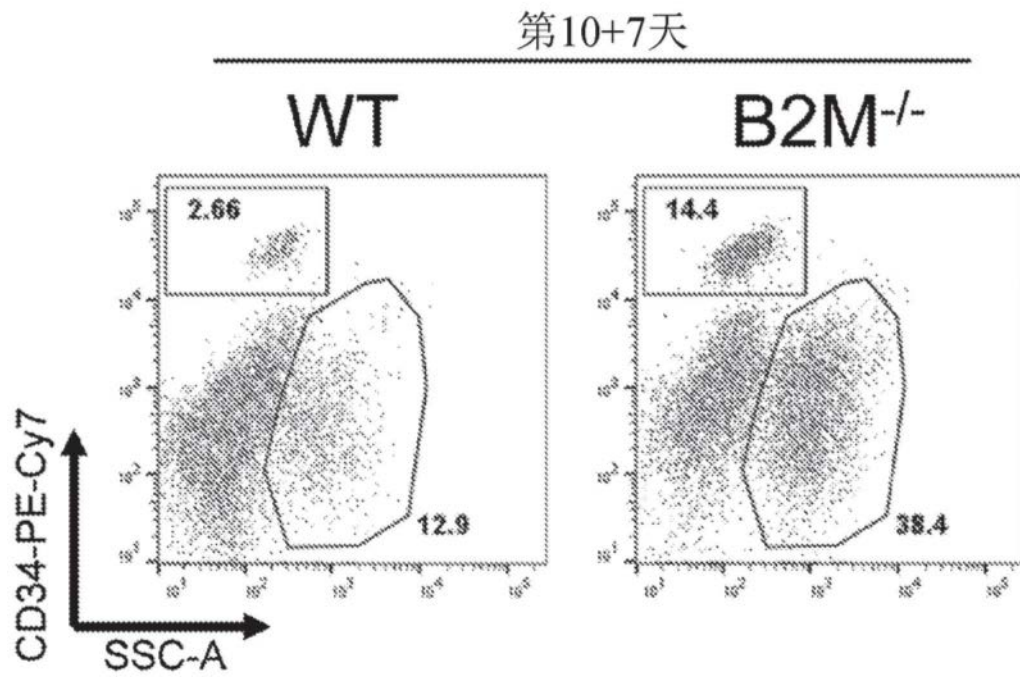


图32C

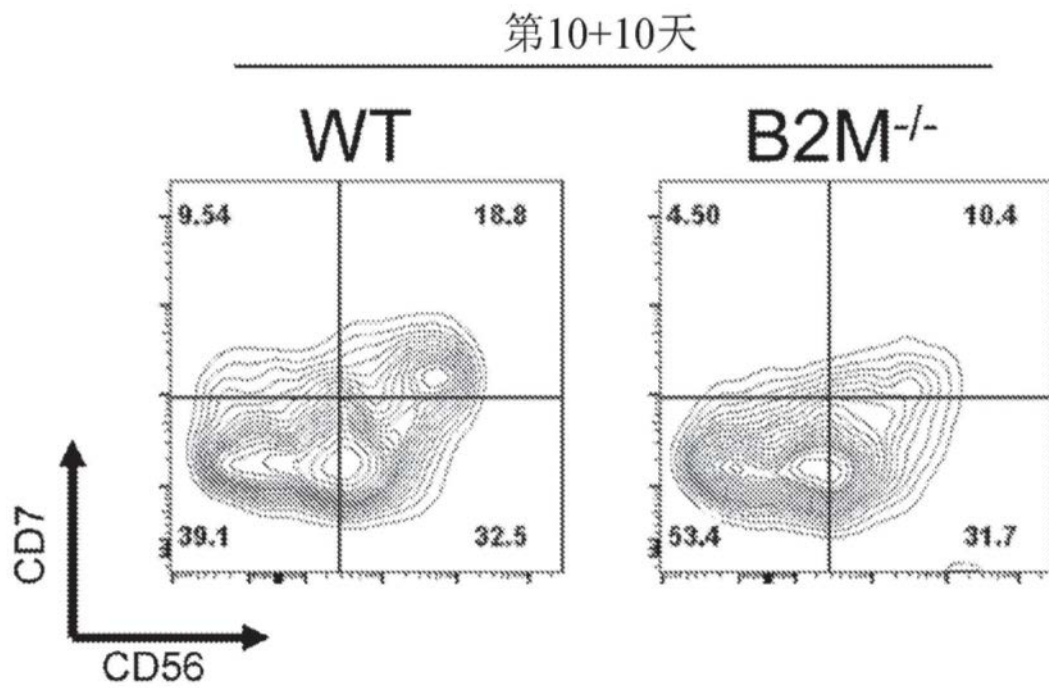


图32D

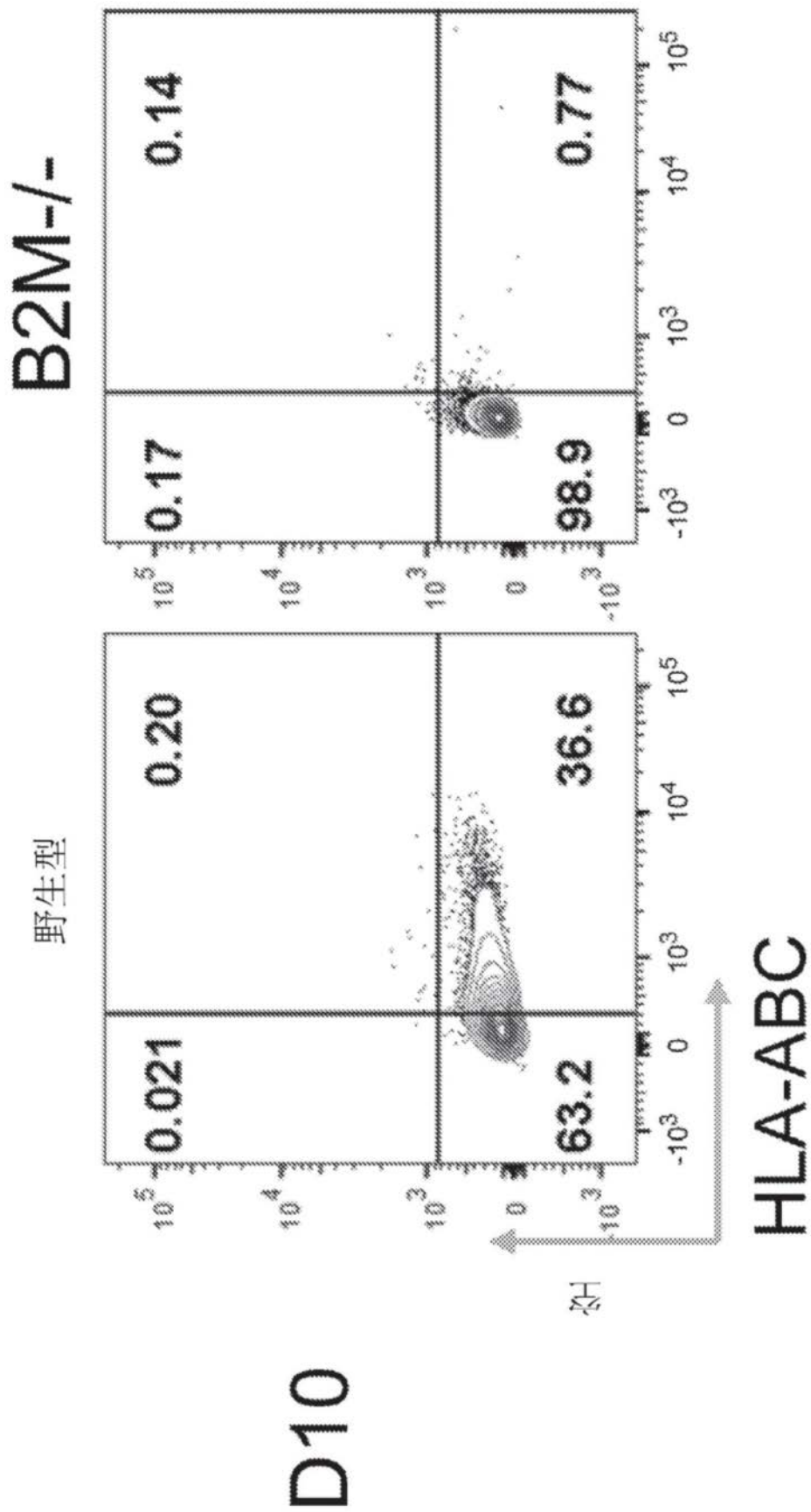


图33

HLA I类对iPSC的调节使iPSC在免疫胜任接受者中的存留增强

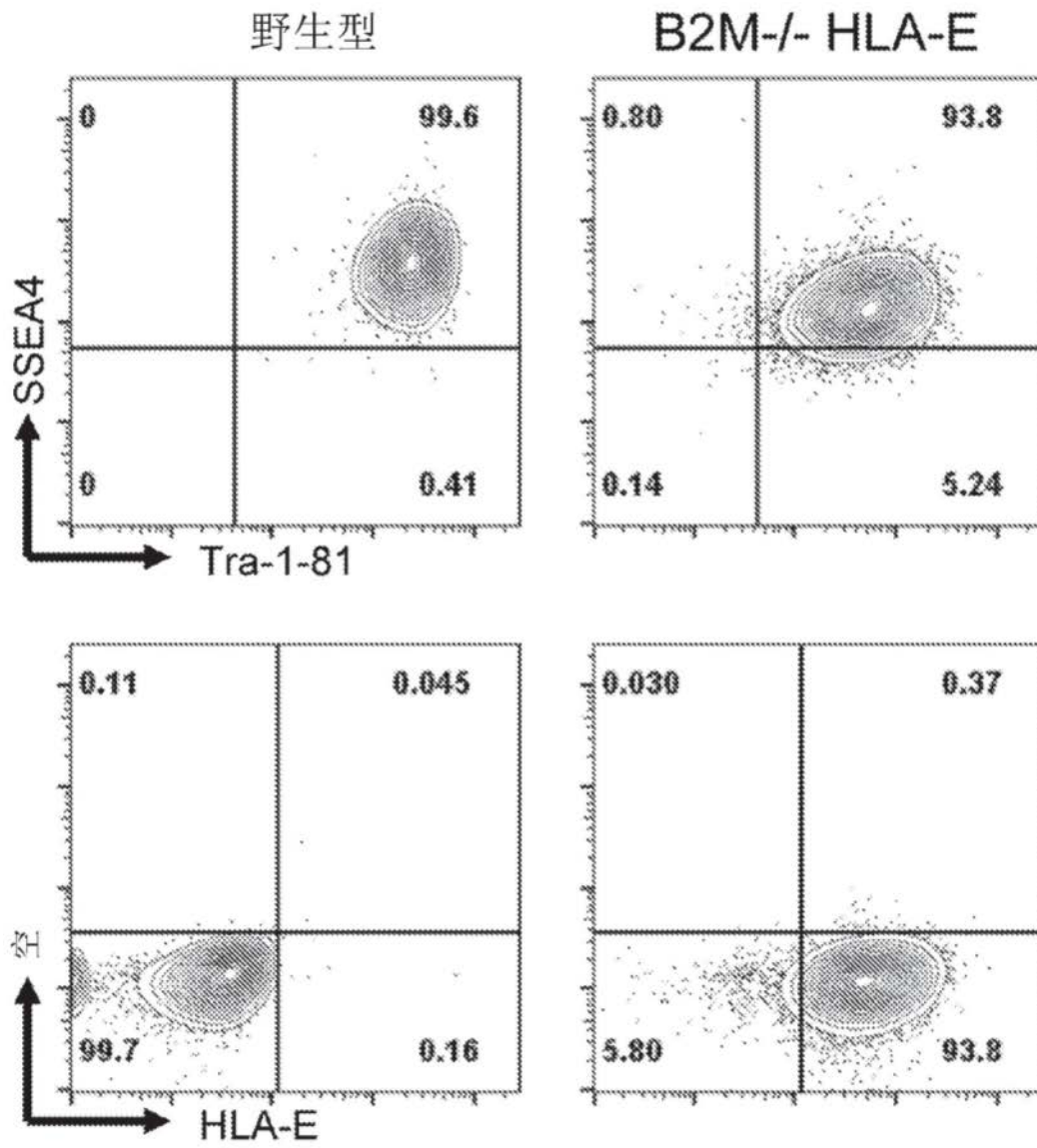


图34A

HLA I类对iPSC的调节使iPSC在免疫胜任接受者中的存留增强

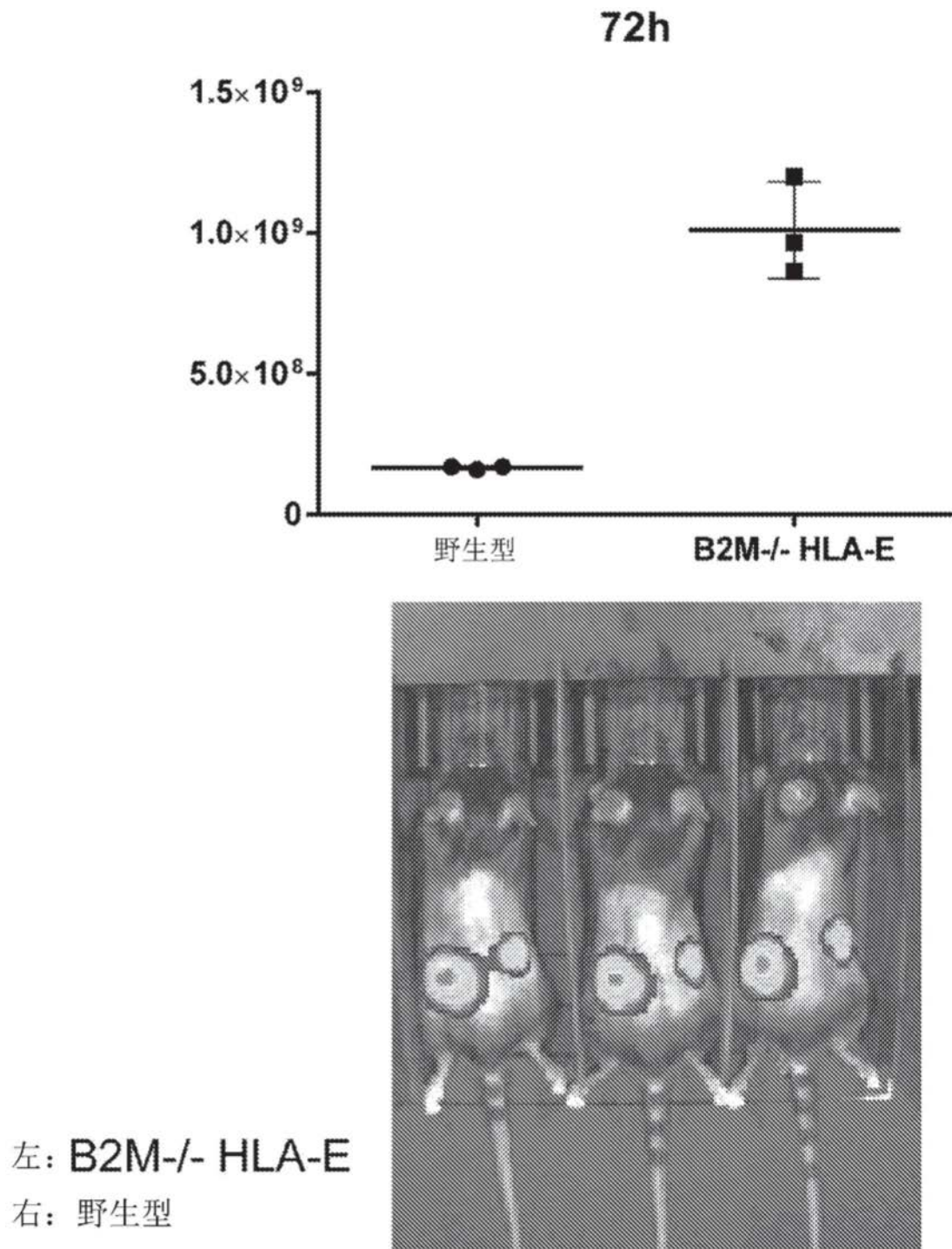


图34B

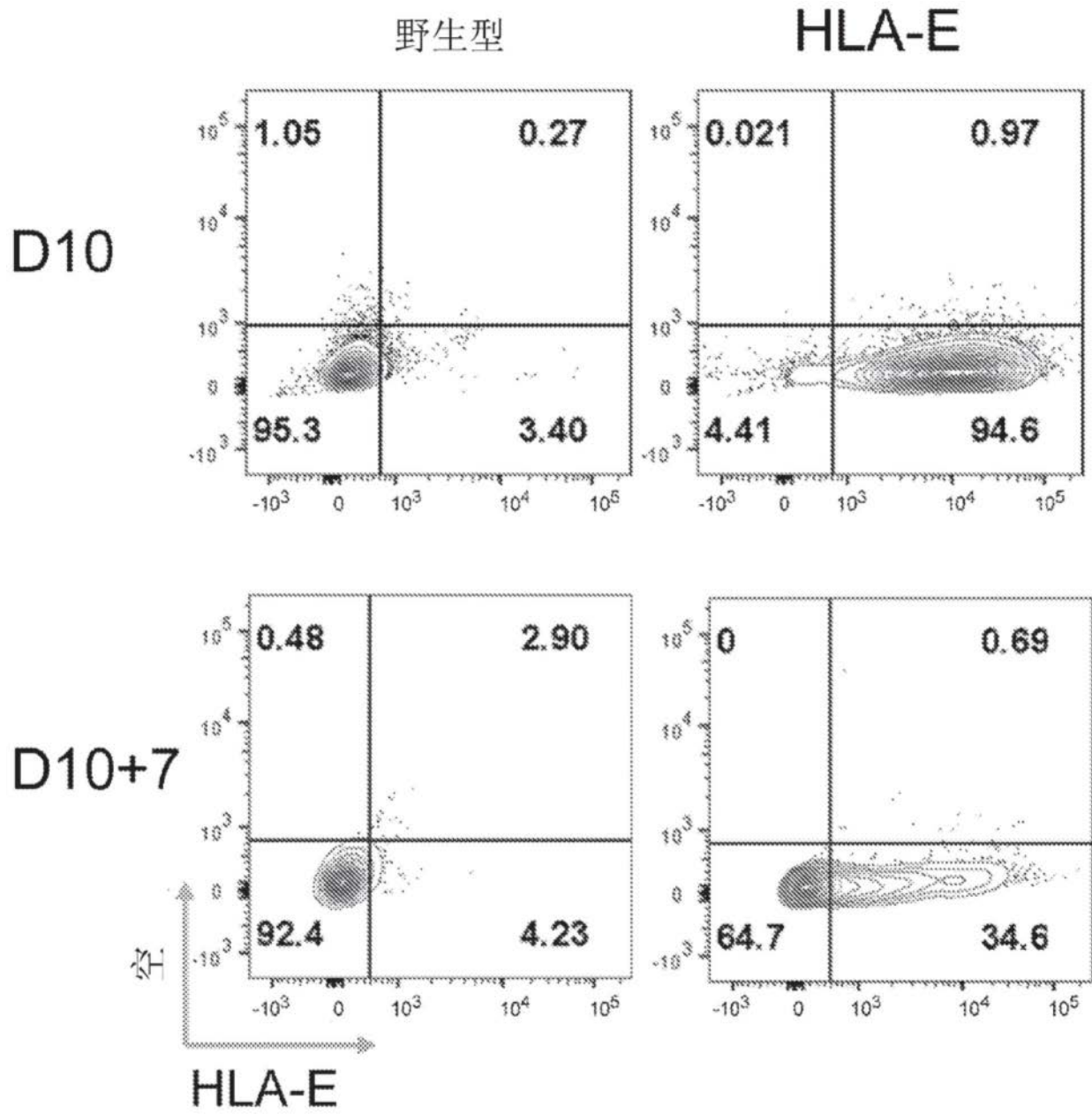


图35

经HLA I类调节的iPSC能生成功能性CD34⁺ HE

第10天

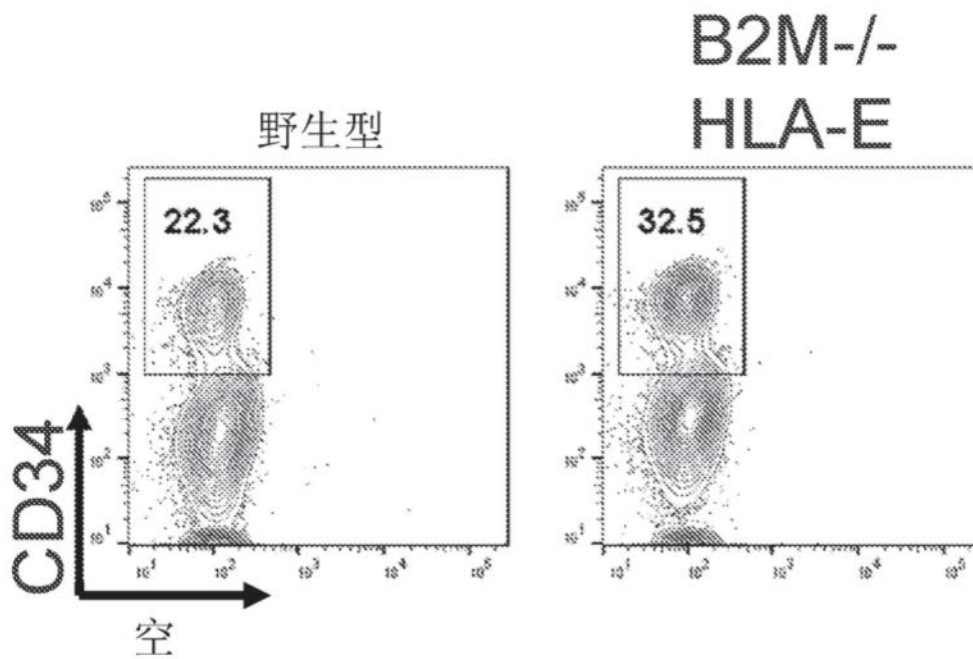


图36A

D10总细胞数

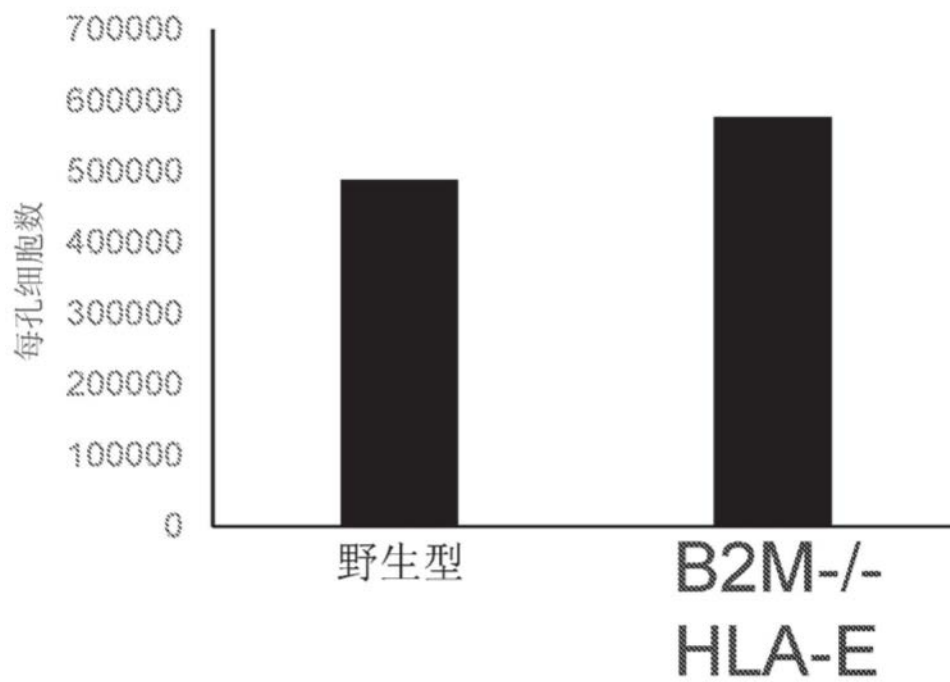


图36B

经HLA I类调节的iPSC能生成功能性CD34+ HE

第10+7天

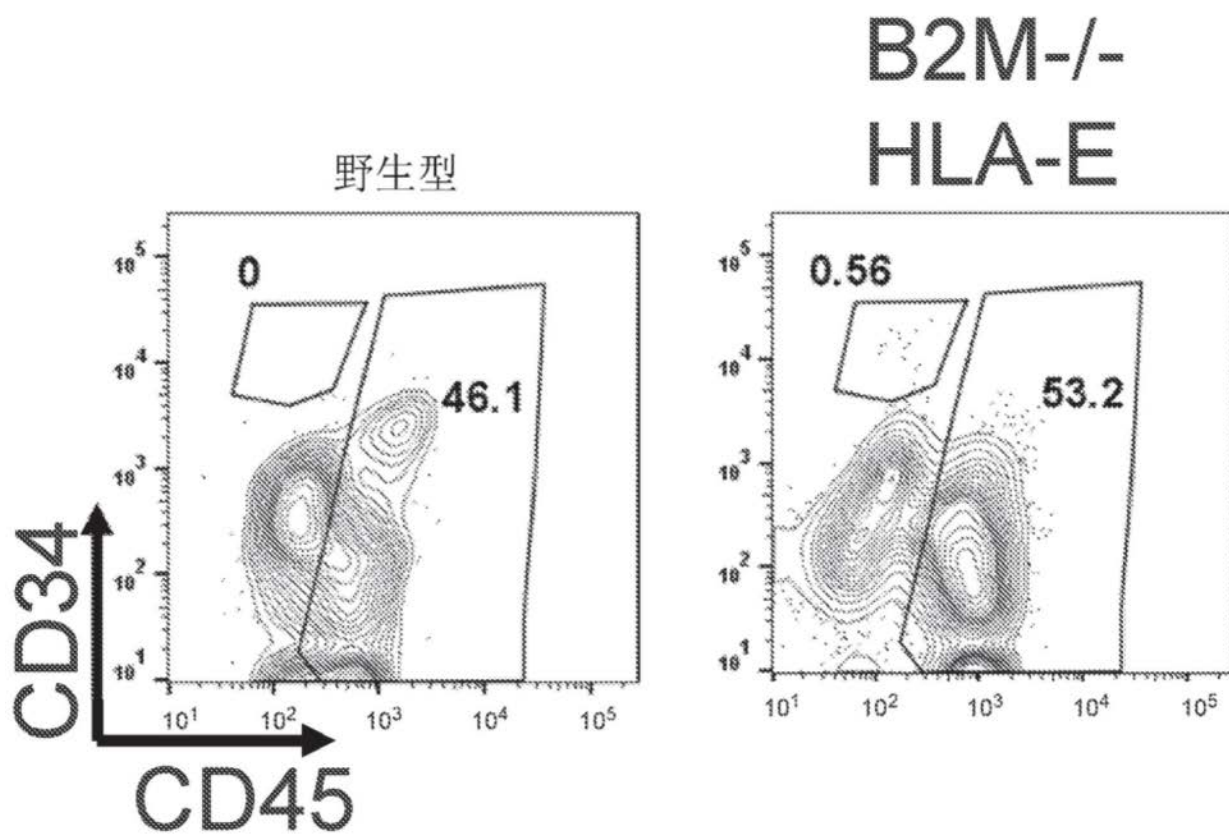


图36C

经基因工程改造以表达高亲和力CD16受体和41BBL共刺激分子的iPSC在向iCD34细胞分化期间保持表达

第0天

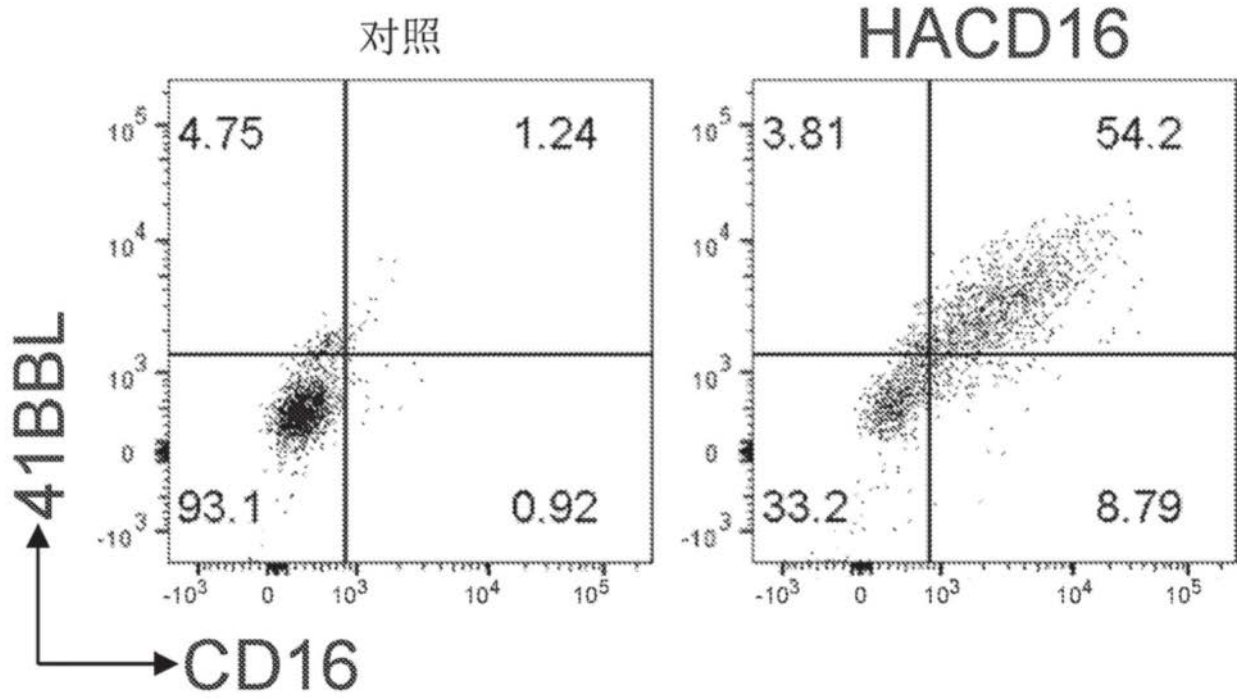


图37A

经基因工程改造以表达高亲和力CD16受体和41BBL共刺激分子的
iPSC在向iCD34细胞分化期间保持表达

第10天

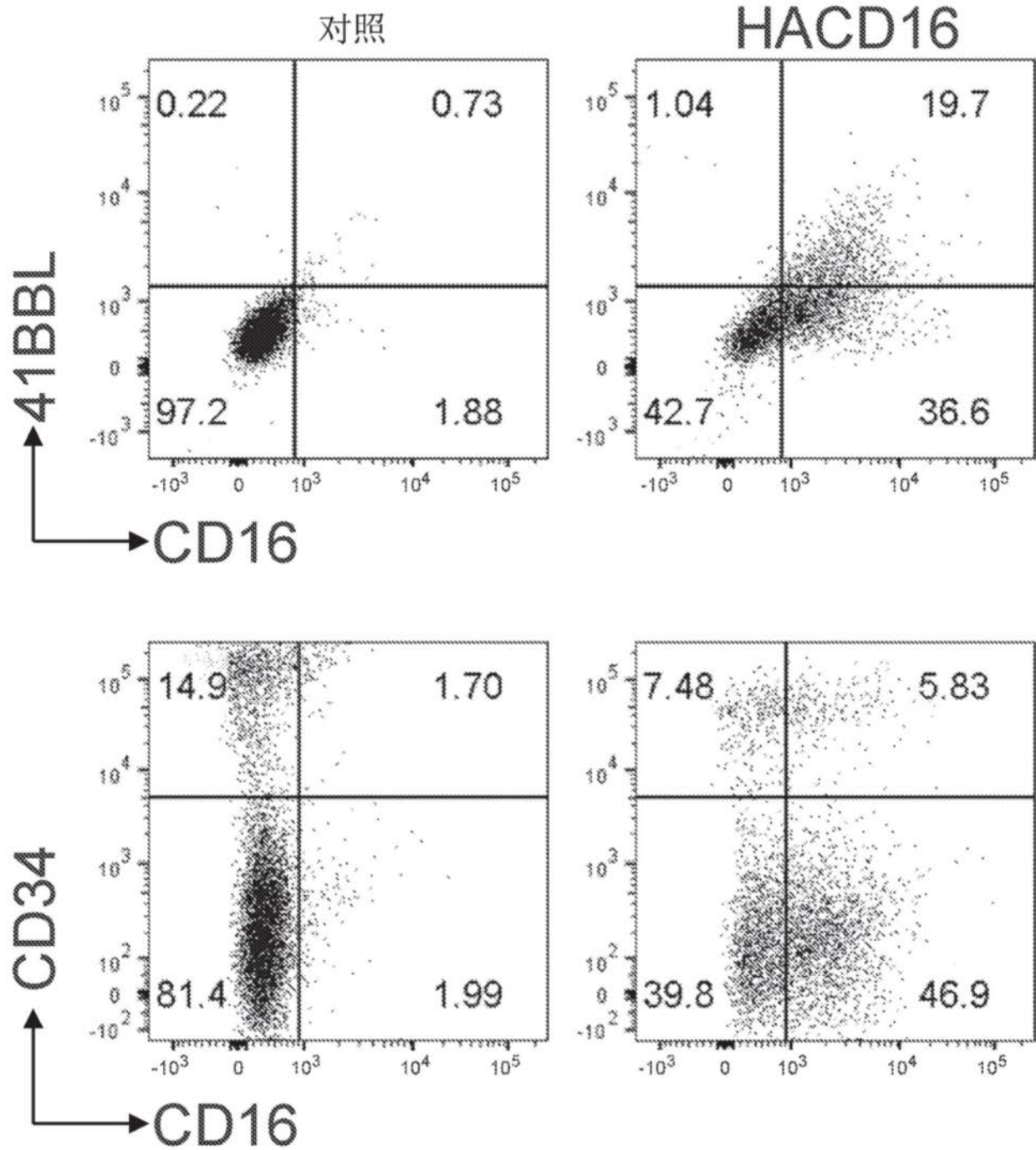


图37B

CAR-T源iPSC保留CAR

第0天

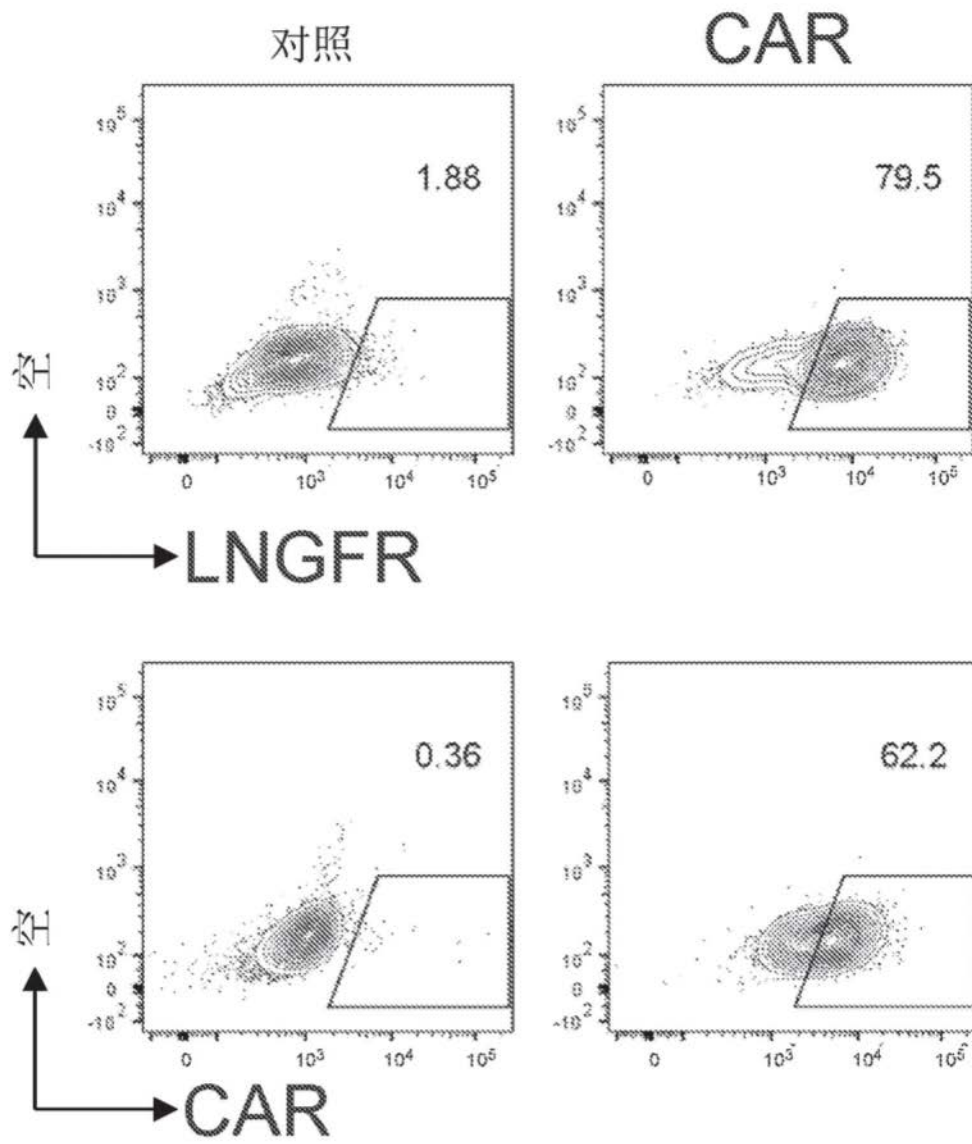


图38A

CAR-T源iPSC保留CAR

第10天

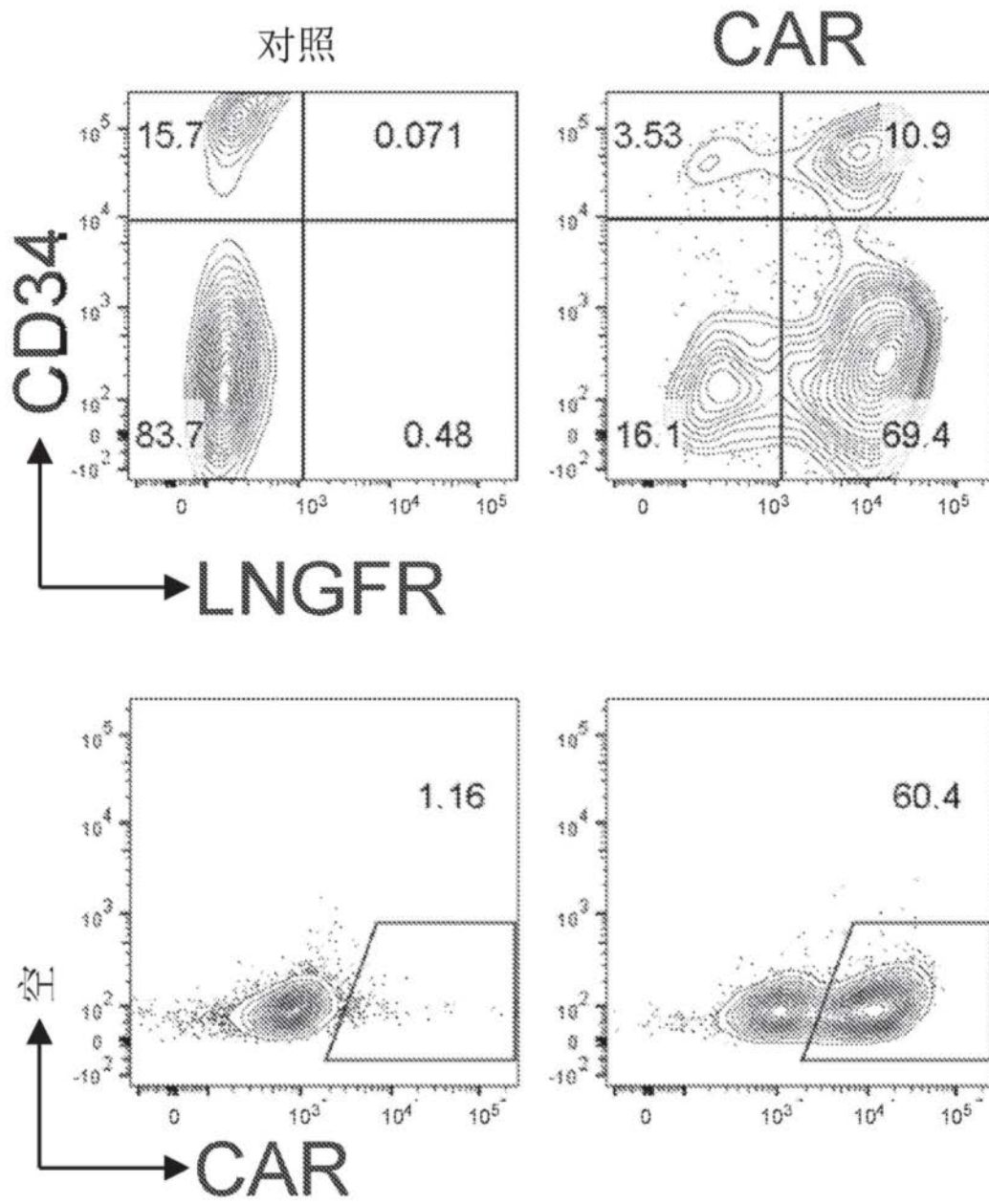


图38B

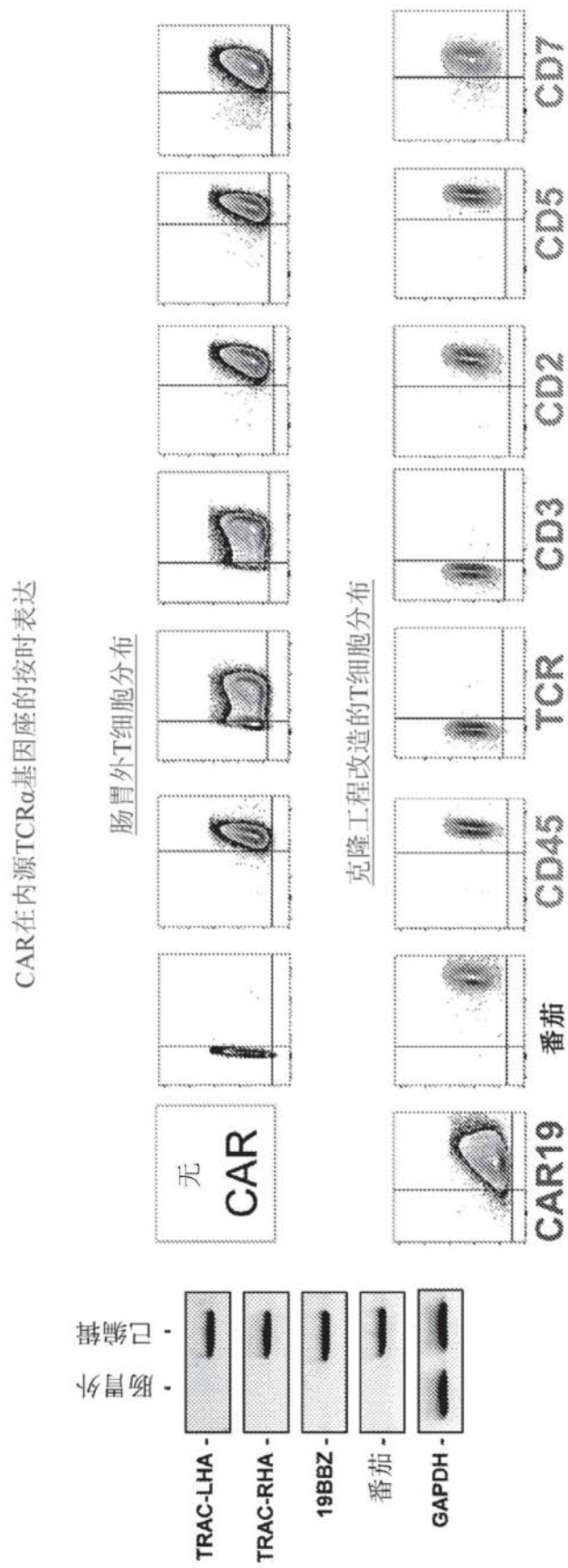


图39

用于使癌症和其它疾病与完整效应子系谱衔接的现成靶向策略

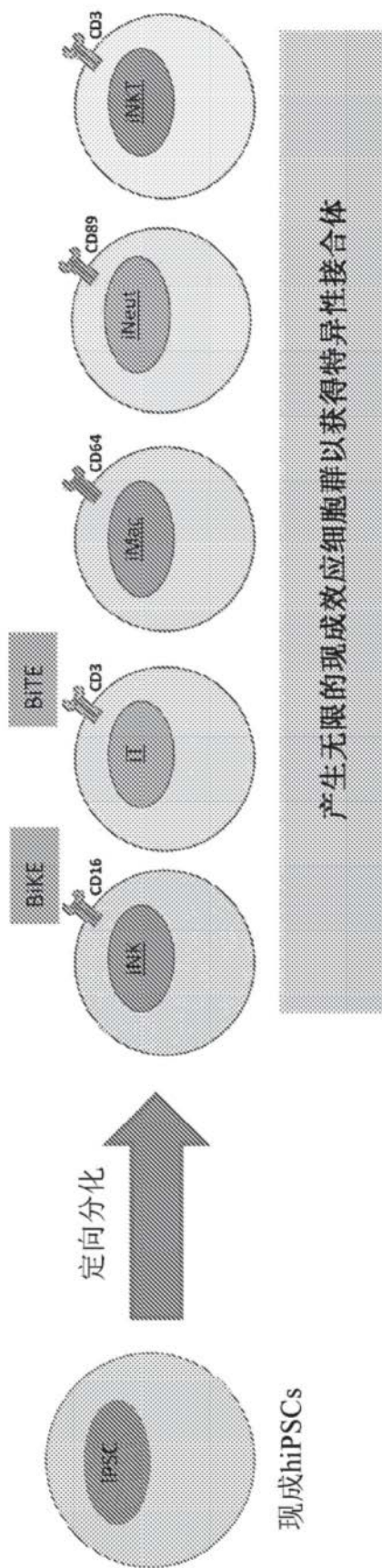


图40A

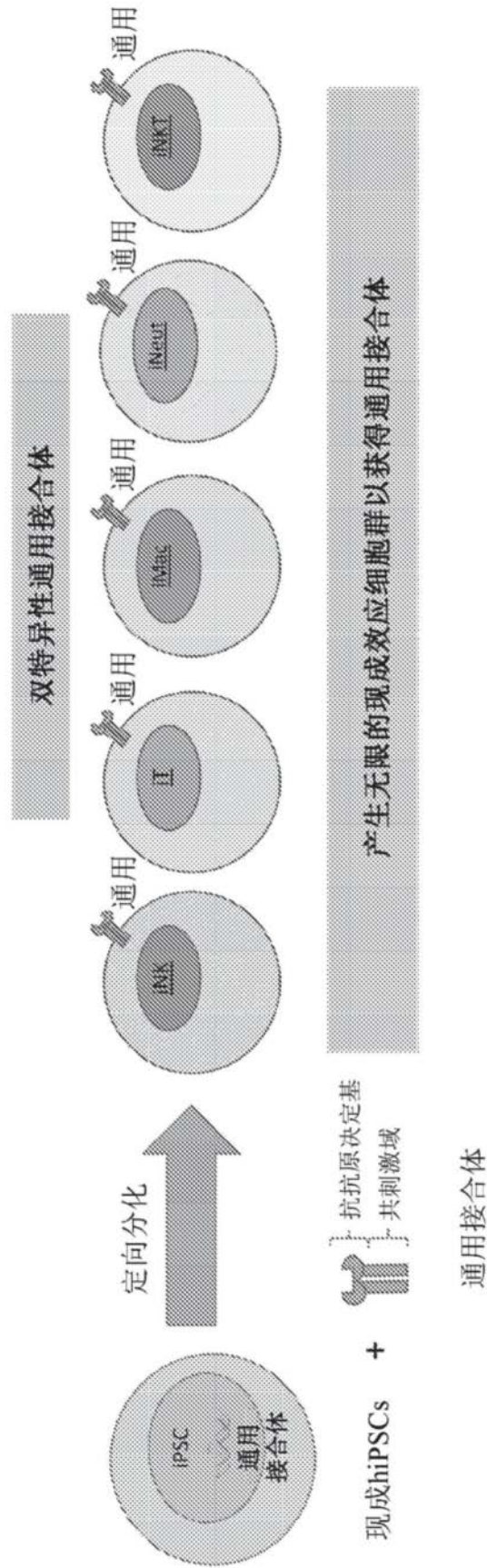


图40B

在iNK分化期间，HACD16 iPSC维持CD16表达

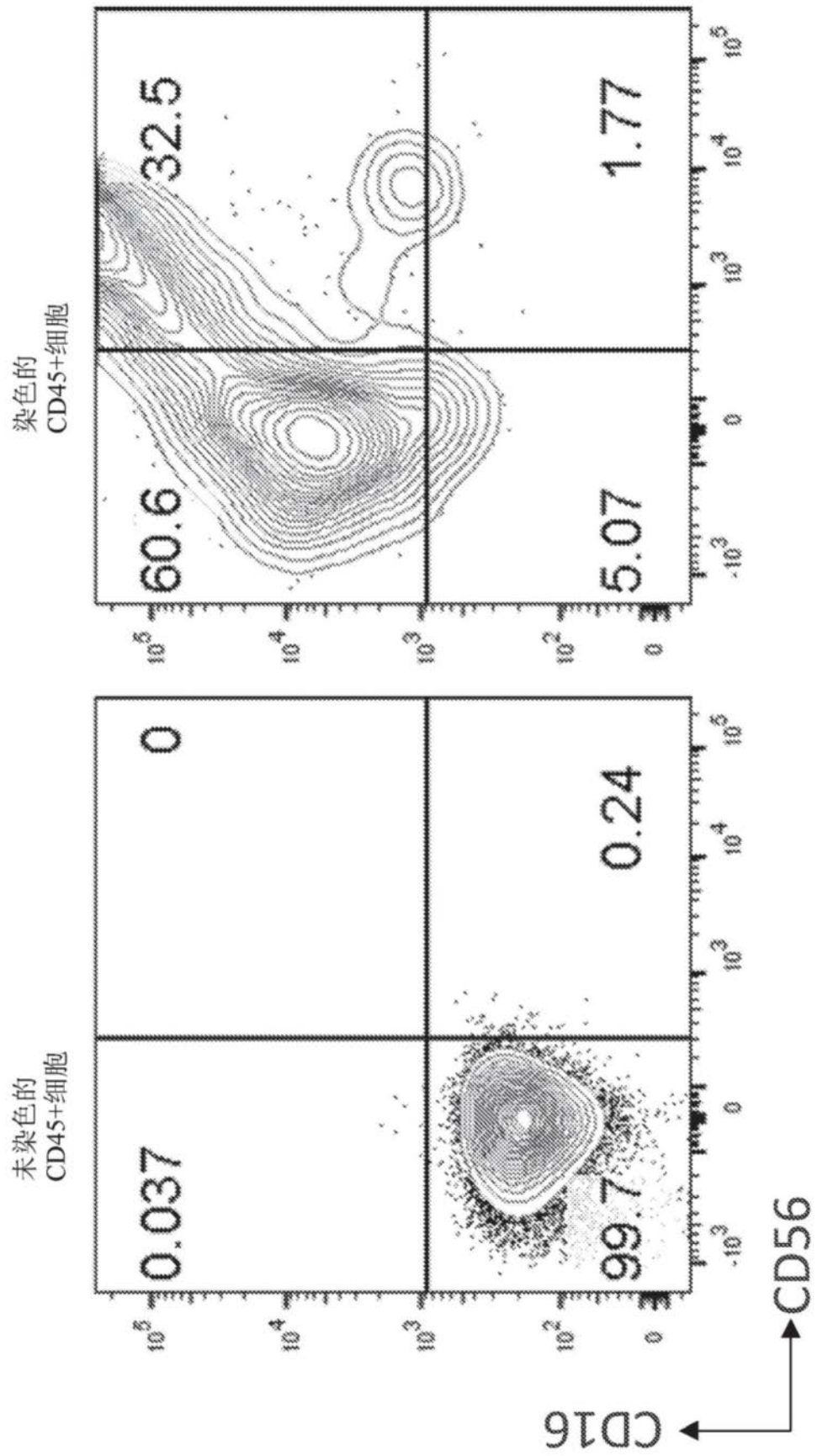


图41