(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104245924 B
(45)授权公告日 2020.05.01

(21)申请号 201380021092.5

(22)申请日 2013.03.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104245924 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(30)优先权数据
61/607,033 2012.03.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.10.21

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2013/000026 2013.03.05

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2013/132477 EN 2013.09.12

(73)专利权人 塞莱克特生物疗法有限公司
地址 以色列卡法萨巴

(72)发明人 S·亚科尼 N·阿斯肯纳西

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 张春媛 阎斌斌

(51)Int.Cl.
C12N 5/0789(2010.01)
B01D 15/00(2006.01)
A61K 35/28(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

(56)对比文件
CN 101517070 A,2009.08.26,权利要求1-48.
CN 102123746 A,2011.07.13,权利要求1-10.

审查员 马骞

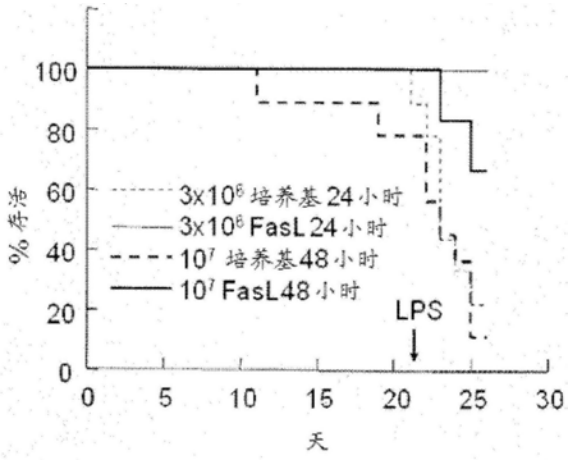
权利要求书1页 说明书27页 附图30页

(54)发明名称

用于选择抗细胞凋亡信号传导细胞的装置和方法及其用途

(57)摘要

本发明公开了适于选择对受体介导的细胞凋亡具有抗性的细胞的一种装置和一种试剂盒以及一种使用所述装置和试剂盒的方法。所述装置能够对从引入所述装置中的异源细胞群体中诱导移植物抗宿主疾病(GvHD)的成熟免疫细胞进行阴性选择。所述装置通过现货供应产品-当前并不存在的溶液来以简化和更廉价的设置实现有效的细胞选择。本发明进一步公开所述装置的用途。



CN 104245924 B

1.细胞凋亡诱导配体在制备用于预防移植物抗宿主疾病同时保留移植物抗肿瘤活性的装置或试剂盒中的用途，其中所述装置或试剂盒被制备来用于实施包括以下步骤的方法：

(a)提供包含细胞群体的样品，所述细胞群体包含HSPC和免疫细胞；

(b)使所述细胞群体与细胞凋亡诱导配体接触；

(c)收回步骤(b)的所述细胞；以及

(d)移植步骤(c)的所述细胞，

从而预防移植物抗宿主疾病同时保留移植物抗肿瘤活性，

其中所述细胞凋亡诱导配体是Fas配体。

2.如权利要求1所述的用途，其中用所述配体将所述细胞孵育2至16小时。

3.如权利要求1所述的用途，其中步骤(b)利用下述的装置来进行，所述装置包括：由生物相容性材料构成的容器以及固定至表面的生物活性细胞凋亡诱导配体，其中所述装置适用于细胞选择，并且其中所述细胞凋亡诱导配体是Fas配体。

用于选择抗细胞凋亡信号传导细胞的装置和方法及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及医疗装置领域，并且更具体来说涉及目标在于选择对细胞凋亡信号传导具有抗性的细胞的装置，使用所述装置的方法以及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 干细胞是可以分裂和分化成多种特殊细胞类型并且自我复制来产生更多干细胞的细胞。在哺乳动物中，干细胞以与胚泡的内细胞团分离的胚胎干细胞或存在于各个组织中的成体干细胞存在。在成体生物中，干细胞和祖细胞用作机体补充成体组织的修复系统。

[0004] 与依赖于外科手术介入或药物来调节生理活性的所有当前治疗不同，干细胞提供用于功能障碍的或变性的组织的替代物。因此，干细胞在替代疗法中的使用可以显著改变许多当前无法治疗的疾病的预后，恢复受损器官的功能并且校正先天性代谢病症和缺陷。这些细胞在治疗各种各样疾病中的众多临床前和临床使用说明了与干细胞扩展(成体和/或胚胎衍生)相关联的技术的重要性。

[0005] 最新发展显示包括造血干细胞和祖细胞(HSPC)以及间充质干细胞(MSC)的造血区室内的若干干细胞具有分化成免疫造血系统之外的细胞类型的能力，从而为使用这些细胞类型来用于广大范围变性病症中的组织修复和再生，终止器官衰竭和功能障碍并且可能通过细胞疗法替代器官移植创造了机会。

[0006] 干细胞的主要临床使用之一是经由造血干细胞移植(HSCT)。在这个手术中，大量细胞从供体转移到接受者体内，目标在于重建接受者的免疫和造血系统。然而在进行这些移植时，人们意识到免疫重建实际上是许多抗化疗性癌症如白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤以及许多实体瘤的最佳疗法。除了在肿瘤学中的用途之外，HSCT还有可能治愈非恶性病症如自身免疫性疾病(例如，糖尿病T1、SLE以及克罗恩病)，先天性代谢缺陷和酶缺陷、血红蛋白病或先天性和后天性免疫缺陷。HSCT已用于非癌症适应症，示出了显著的阳性结果。然而，这种手术当前被采用于危及生命的病状，因为它存在严重的毒性效应，其中最关键的是移植物抗宿主疾病(GvHD)。

[0007] 当使用这种方法来治疗癌症时，所述方法在大多数情况下在通过激进的放疗-化疗来去除免疫造血系统以便预防移入排斥的清髓性预调节之后进行。宿主的免疫造血系统在移入之前不必去除的最新发现是一个重大进步，因此将用非清髓性预调节和强度降低的调节(RIC)来替代清髓性预调节。非清髓性预调节的使用已显著(尚未充分)改善由生命器官功能障碍、移入失败以及顽固性感染引起的危及生命的情况。由于宿主的造血系统并未通过RIC去除，所以它在供体细胞移入失败的情况下可以恢复。随着时间的推移，供体移植物接管促进移植物抗肿瘤(GvT)和移植物抗自身免疫(GvA)反应的产生的过程，还另外使患者暴露于GvHD的临界发病率和死亡率。

[0008] 1型跨膜蛋白/粘附分子(作为造血干细胞的标记物的唾液黏蛋白CD34)的鉴别使得能够将CD34+细胞选择用作浓缩造血干细胞来用于移植目的的手段。CD34标记物并不存在于一些干细胞中，但却存在于各种亚型血液前体上。使用这种阳性选择方法导致了一些有益干细胞的损失。此外，所述阳性选择方法产生了干细胞和祖细胞与一些后期前体细胞

的混合细胞群体。

[0009] 这种混合细胞群体的移植降低了移植成功率[Askenasy N.等,Current Stem Cell Research and Therapy 2006;1:85-94]。因此,产生了对保留造血重建所需的所有细胞同时又丢弃引起副作用的细胞的选择方法的需求。

[0010] 与体细胞不同,已记录造血干细胞和祖细胞(HSPC)、间充质干细胞以及神经祖细胞(NP)对损伤因子如由放疗-化疗和因残留造血细胞大量死亡而释放到髓空间中的次级因子两者造成的那些损伤因子不敏感。HSPC尤其能够抵抗由肿瘤坏死因子(TNF)家族受体转导的细胞凋亡信号,相反所述HSPC用于在大多数原始祖细胞中传递生长信号。在鼠模型中,已示出造血祖细胞在损伤和应激的条件下会大幅上调若干TNF家族受体。在移植环境中,这种生理机制优于更原始的祖细胞用于细胞凋亡敏感供体细胞的移入。因此,使移植群体暴露于TNF家族细胞凋亡诱导配体如FasL、Trail、Tweak或TNF-α导致阴性地选择干细胞群体,因为对TNF家族配体诱导细胞凋亡敏感的细胞群体经历细胞凋亡并且被从移植体去除。专利申请WO2007/138597中公开了这种方法在鼠模型中的使用。

[0011] 供体移植物的组成是干细胞移植的重要参数。已示出要求阈值数量的祖细胞来确保移入。此外,一些非干细胞子集的存在大体上提高了移入的概率,这样使得异源细胞混合物的移植比纯化祖细胞的移植更有效。供体移植物内最显著的子集是($CD4^+$和$CD8^+$)T细胞,因为已证明它们能够抵抗排斥并且支持骨髓微环境内的造血祖细胞移入。然而,同种异体T细胞到部分免疫压制的接受者体内的移植支持持久的移入,这将介导可能致命的移植物抗宿主反应(GvH)或移植物抗宿主疾病(GvHD)。成熟的供体T细胞介导这种反应,而在移植后再次发育的供体T细胞对宿主具有耐受性。已针对介导GvH并支持移入的T细胞子集之间的解离做了大量努力;然而,实验证据迄今为止尚无结论。

[0012] 移植物抗宿主疾病(GvHD)包括通常处于移植后前100天内的急性期反应以及发展更为缓慢但具有同等有害后果的慢性反应。重要的是,两种反应都是在移植后数天内由成熟的供体T细胞所介导的初始炎症引发的。急性GvHD通常通过免疫压制疗法来治疗,所述免疫压制疗法对造血重建具有不利影响,然而当前并不存在用于慢性反应的有效疗法。预防GvHD的传统方法包括:使用细胞表面标记物如CD3、CD4、CD8耗尽来自供体接种物的成熟T细胞,有时还伴随B淋巴细胞。使用各种细胞表面标记物来实现更具选择性的T细胞耗尽(TCD)的巨大努力并未取得成功。

[0013] 更特殊的耗尽通过在对宿主抗原的离体敏化之后使用细胞凋亡信号消除反应性T细胞子集取得了良好的结果。用于特殊耗尽的特征在于:敏化的T细胞表达活化相关分子的所有组成成分,变得对活化诱导细胞死亡(AICD)敏感并且以较快的速率增殖。然而,这种方法的选择性消除存在若干主要障碍。首先,T细胞的敏化是重复暴露于抗原的过程,所述过程要求3至7天的离体孵育。因此,T细胞活化必须在移植前至少3天进行。其次,使快速循环的T细胞对AICD敏感的敏化和活化还诱导效应/记忆T细胞的发育和扩展,所述效应/记忆T细胞的持久的同种异体反应性可能会引发和传播GvHD。效应/记忆T细胞部分因固有的低水平的半胱天冬酶-3而对Fas交联具有相应的抗性,从而产生在输注离体培养的T细胞之后使患者倾向于出现急性和慢性GvHD的细胞凋亡抗性表型。第三,最有效的离体敏化是针对主要组织相容性复合物(MHC)的组分,所述组分的差异导致了移植环境中的重大异体反应。然而,所述GvHD反应主要是由次要组织相容性复合抗原(miHA)刺激的并且主要靶向组织特异

性抗原(TSA)。正常和异常组织表位通过由预移植调节和炎症所造成的损伤被暴露。还有待于发现用于选择性耗尽诱导GvHD的T细胞同时保留支持GvT和移植移入的细胞的子集的有效方法。

发明内容

[0014] 本发明公开了适用于选择对受体介导的细胞凋亡具有抗性的细胞的一种装置和一种试剂盒以及一种使用所述装置和试剂盒的方法。所述装置能够对从引入所述装置中的异源细胞群体中诱导移植物抗宿主疾病(GvHD)的成熟免疫细胞进行阴性地选择。所述装置通过现货供应产品-当前并不存在的溶液来以简化和更廉价的设置实现有效的细胞选择。本发明进一步公开所述装置的用途。

[0015] 根据一个方面,本发明公开一种包括由生物相容性材料制成的容器和固定至表面的生物活性细胞凋亡诱导配体的装置,其中所述装置适用于细胞选择。

[0016] 根据一个实施方案,固定了所述生物活性细胞凋亡诱导配体的所述表面是所述容器的内表面。

[0017] 根据另一个实施方案,固定了所述生物活性细胞凋亡诱导配体的所述表面是所述容器内存在的珠粒的表面。

[0018] 根据另一个实施方案,所述容器选自包括袋子、管柱、管、瓶子、小瓶以及烧瓶的组。

[0019] 根据又另一个实施方案,构成所述装置的所述生物相容性材料选自包括聚丙烯、聚苯乙烯、硅酮、聚氯乙烯或其组合的组。

[0020] 根据又另一个实施方案,所述固定的细胞凋亡诱导配体选自包括肿瘤坏死因子α(TNF-α)、Fas配体(FasL)、Trail、Tweak或其任何组合的组。

[0021] 根据另一方面,本发明公开一种用于从异源细胞群体选择抗细胞凋亡信号传导细胞的方法;所述细胞群体包含抗细胞凋亡信号传导细胞和细胞凋亡信号传导敏感细胞。所述方法包括:将包含异源细胞群体的样品引入本发明的装置中并且在所述装置内孵育所述细胞,从而从所述细胞群体选择抗细胞凋亡信号传导细胞。

[0022] 根据另一个实施方案,选择的抗细胞凋亡细胞是干细胞,所述干细胞选自包括以下的组:脐带血干细胞、动员的外周血液干细胞、骨髓干细胞、癌症干细胞以及神经干细胞。

[0023] 根据另一个实施方案,选择的抗细胞凋亡细胞是对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞。在又另一个实施方案中,对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的所述免疫细胞是T细胞。

[0024] 根据另一个实施方案,选择的抗细胞凋亡细胞是祖细胞。

[0025] 根据又另一个实施方案,所述方法中使用的所述细胞群体来源于:骨髓、祖细胞动员的外周血液或脐带血(UCB)。

[0026] 根据又另一个实施方案,在所述装置内的孵育时间是2小时至72小时。

[0027] 根据又另一方面,本发明公开一种细胞选择试剂盒,所述细胞选择试剂盒包括本发明的装置以及用于维持所述装置内细胞凋亡诱导配体的完整性和活性的溶液。根据一些实施方案,所述试剂盒进一步包括细胞凋亡诱导配体,所述细胞凋亡诱导配体选自具有肿瘤坏死因子α(TNF-α)、Fas配体(FasL)、Trail、Tweak或其任何组合的组。

[0028] 根据另一个实施方案，用于维持细胞凋亡诱导配体的完整性和活性的所述溶液是缓冲液或培养基。

[0029] 根据又另一方面，本发明公开一种使用上述装置和试剂盒的方法。所述方法是用于改善造血干细胞和祖细胞(HSPC)移植的临床效果的方法。在所述方法中，提供了包含细胞群体的样品；所述细胞群体包含干细胞和祖细胞。使所述群体与细胞凋亡诱导配体接触，并且收回剩余细胞并且将其用于移植。根据另外的实施方案，所述接触发生在本发明的装置内。

[0030] 根据另一个实施方案，所述方法中的所述细胞群体来源于：骨髓、祖细胞动员的外周血液或脐带血(UCB)。

[0031] 根据另一个实施方案，使用所述方法选择的干细胞选自包括以下的组：脐带血干细胞、动员的外周血液干细胞、骨髓干细胞、癌症干细胞以及神经干细胞。

[0032] 根据另一个实施方案，细胞群体用Fas配体(FasL)孵育21至24小时的时间段并且用肿瘤坏死因子α(TNF-α)孵育24至48小时的时间段。

[0033] 根据另一个实施方案，从所述方法收回的细胞用于自体、同种异体或单倍同一性(haploidentical)移植。

[0034] 根据另一个实施方案，所述方法中的收回的细胞进一步包含对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞。在又另一个实施方案中，对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的所述免疫细胞是T细胞。

[0035] 根据又另一方面，本发明公开另一种使用上述装置和试剂盒的方法。所述方法是用于消除包含祖细胞移植体的组合物中的恶性细胞的方法。在所述方法中，提供了包含祖细胞移植体的组合物并且然后使所述组合物与细胞凋亡诱导配体接触。根据另外的实施方案，所述接触发生在本发明的装置内。

[0036] 根据另一个实施方案，使所述组合物与细胞凋亡诱导配体Fas配体(FasL)接触约24小时的时间段。

[0037] 根据另一个实施方案，所述祖细胞移植体用作自体移植体。

[0038] 根据另一方面，本发明公开又另一种使用上述装置和试剂盒的方法。所述方法是用于预防移植物抗宿主疾病(GvHD)同时保留移植物抗肿瘤(GvT)活性的方法。在所述方法中，提供了包含细胞群体的样品，所述细胞群体包含HSPC细胞和免疫细胞。使所述群体与细胞凋亡诱导配体接触，并且收回剩余细胞并且将其用于移植。根据另外的实施方案，所述接触发生在本发明的装置内。

[0039] 根据另一个实施方案，使所述组合物与细胞凋亡诱导配体Fas配体(FasL)接触2至16小时的时间段。

[0040] 本发明的另外的实施方案、特征、优点以及适用的完整范围将从下文给出的详细描述和附图中变得清楚明白。然而，应注意，指示本发明的优选实施方案的详细描述仅是通过说明方式给出的，这是因为本领域技术人员从这一详细描述中将会清楚明白在本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

[0041] 附图简述

[0042] 图1：一组图示出了UCB细胞对受体介导的体外细胞凋亡的敏感性。(A)使UCB细胞的新鲜样品在不含趋化因子补体的培养基中孵育各个时间段(n＝35)并且使所述新鲜样品

暴露于50ng/ml FasL低聚物(n＝21)和20ng/ml TNF-α(n＝18)。细胞凋亡由单核细胞(MNC)和门控CD34+祖细胞中的膜联蛋白-V摄取来测定。(B)Fas和TNF受体在新鲜的UCB单核细胞、门控CD34+以及分离的谱系阴性(lin-)祖细胞中的表达。(C)在同源配体(n＝15-21)的影响下,在表达Fas和TNF受体的门控CD34+祖细胞中,以时间的函数测量细胞凋亡。(D)用同源配体(n＝6)孵育的,表达Fas和TNF受体的MNC和门控CD34+祖细胞中的增殖速率。增殖使用ModFit软件由CFSE稀释测量。(E)Fas和TNF受体在新鲜的UCB样品(n＝8-13)中的T细胞(CD3+)、B淋巴细胞(CD19+)以及髓样细胞(CD33+)中的表达。(F)由在FasL和TNF-α(n＝6-14)中暴露48小时的,包括单核细胞/巨噬细胞(CD14+)的谱系阳性UCB子集中的膜联蛋白-V摄取测定的细胞凋亡。

[0043] 图2:图2A是方案并且图2B至图2G是示出UCB祖细胞对受体介导的细胞凋亡具有抗性的图。(A)用两次25μg/g白消安的剂量调节NOD.CID小鼠并且在2天后将同等数量的在不同条件下孵育的UCB细胞移入所述小鼠。在12周之后,使用选择性人和鼠抗-CD45抗体测量骨髓中的人嵌合。(B)用来自同一UCB单元的50ng/ml FasL和20ng/ml TNF-α在培养基中孵育24小时之后的新鲜的UCB细胞的移入。数据表示7种不同的UCB样品。(C)用来自同一UCB单元(表示6个UCB样品)的FasL和TNFα在培养基中孵育48小时之后移入。(D)用来自同一UCB单元(表示5个UCB样品)的FasL和TNFα在培养基中孵育72小时减少了移入。(E)在培养基中用FasL和TNF-α(n＝4-7)孵育48小时之后的单核细胞(MNC)、门控$CD34^+$以及分离的谱系阴性(lin^-)祖细胞的增殖速率。(F)由碘化丙啶(n＝5-8)的核结合确定的处于细胞周期G0/G1期的有丝分裂期静止的UCB子集的分数。(G)在将10^3个UCB细胞铺在间充质干细胞层上5周之后并且随后转移到半固体甲基纤维素培养物中测定的长期培养起始细胞(LTC-IC)频率。FasL(50ng/ml)和TNF-α(20ng/ml)存在于整个培养阶段并且间隔1周就通过更换一半培养基(n＝8-13)来更新。数据表示一个UCB单元的比较性培养条件。

[0044] 图3:图3B是方案并且图3A和图3C是示出UCB细胞在死亡配体中的暴露提高体外祖细胞和骨髓体内分化的频率的图。(A)谱系标记物在含有以下的新鲜的UCB细胞中的表达:祖细胞(CD34)、T细胞(CD3)、B淋巴细胞(CD19)以及髓细胞(CD33)。活细胞的组合物在暴露于50ng/ml FasL和20ng/ml TNF-α孵育24小时和48小时之后发生改变,从而增大祖细胞(n＝17-31)的分数。(B)在孵育各个时间段之后,死亡细胞通过ficoll梯度离心来消除并且将同等数量的活细胞铺在用干细胞因子(SCF)、白细胞介素-3(IL-3)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)刺激的半固体甲基纤维素培养物内。集落形成细胞(CFU,每10^3个活细胞表达)的频率在14天之后测定。(C)在新鲜的UCB样品(对照)中和在培养基中用FasL和TNF-α(n＝12-27)孵育之后的相对CFU频率。

[0045] 图4:图4A是方案并且图4B至图4D是示出UCB细胞上的死亡配体的组合作用的图。(A)Fas的表达通过用20ng/ml TNF-α孵育24小时来刺激并且随后在存在和在不存在50ng/ml FasL的情况下将细胞另外孵育24小时。(B)在各种孵育条件(n＝6-9)下,在单核细胞(MNC)和门控$CD34^+$祖细胞中的Fas表达。(C)在补充和未补充FasL(n＝5-12)的情况下,用TNF-α孵育48小时期间Fas阳性MNC、门控$CD34^+$以及分离的谱系阴性(lin^-)祖细胞的细胞凋亡。(D)在通过ficoll离心消除死亡细胞之后增加各个孵育(n＝7-15)之后的大量细胞悬浮液中的CFU频率。

[0046] 图5:图5C是方案并且图5A、图5B以及图5D是示出死亡配体在UCB细胞的离体扩展

期间提高祖细胞频率的图。(A)$CD34^+$祖细胞在临床批准的方案下在液体培养物中免疫磁性分离和扩展3周。$CD34^+$祖细胞的分数与新鲜的UCB样品相比较在扩展期间(n＝4)增加并且在第三周最后一周培养期间补充50ng/ml FasL之后进一步增加。(B)在扩展3周(n＝4)之后培养物中$CD34^+$细胞的绝对数量标准化成10^3个总细胞。(C)将同等数量的新鲜的和扩展的UCB细胞(来自相同样品)移入到用两个25μg/g白消安剂量调节的NOD.SCID小鼠($H2K^{g7}$)体内。(D)在12周之后在骨髓和脾中测定人造血嵌合。数据表示6个独立的UCB单元,将新鲜的细胞与最后第三周培养期间用和未用FasL的扩展的祖细胞进行比较。

[0047] 图6:图6A至图6F是示出死亡受体的表达和对简单培养期间mPB细胞的细胞凋亡的敏感性的图。将冷冻保存2至7年的mPB样品解冻,去除过量的DMSO并且在存在和在不存在50ng/ml FasL和29ng/ml TNF-α的情况下将细胞孵育4小时和16小时。(A)Fas和TNF受体在单核(MNC)mPB细胞和门控$CD34^+$祖细胞中的表达(n＝7-11)。(B)Fas和TNF受体表达在谱系阳性T细胞(CD3)、B淋巴细胞(CD19)以及髓细胞(CD33)中的对比分析(n＝7-11)。(C)Fas表达在培养16小时期间在所有子集中大体上下降(n＝5-9)。(D)培养期间TNF-R2的上调在B淋巴细胞(CD19)和髓细胞(CD33)中最显著(n＝7-11)。(E)在存在和在不存在FasL和TNF-α的情况下,将解冻的mPB样品孵育4小时和16小时(n＝5-11)。由膜联蛋白-V结合测定细胞凋亡。(F)在用和未用死亡配体将解冻的mPB孵育4小时和16小时之后的门控$CD34^+$祖细胞和$CD3^+$T细胞的细胞凋亡的对比率。

[0048] 图7:图7A至7D是示出死亡配体预防冷冻保存的动员的外周血液(mPB)的移植体内的GvHD的图。(A)经受以下的NOD.SCID小鼠的存活:用两个25μg/g剂量调节并且在2天之后将1.5×10^7个mPB细胞移入所述小鼠,所述mPB细胞在培养基中用50ng/ml FasL和20ng/ml TNFα孵育4小时(每组中n＝10)。(B)来自用(n＝10)和未用(n＝7)FasL预孵育的相同mPB样品的细胞的移植后第12周,在骨髓中测量人异种嵌合。(C)在存在和在不存在FasL(n＝9)和TNFα(n＝10)的情况下,在培养基(n＝12)中孵育4小时之后解冻细胞(n＝18)的接受者在移植后三周的体重。从12周的实验点来看,针对以下各项评定移入了在培养基中并用FasL孵育的细胞的小鼠:(D)根据正常(0)和异常(1)参数评定临床评分:1.皮肤病和毛发脱落,2.虚弱程度,3.爪垫角化过度以及4.腹泻;以及(E)根据0-无浸润,1-略微浸润,2-片状浸润,3-弥漫性浸润,4-组织基础结构的恶化对肝组织结构评分。

[0049] 图8:图8B是方案并且图8A、图8C、图8D以及图8E是示出暴露在死亡配体中并不会削弱抗原刺激和移植物抗肿瘤反应性的图。(A)将冷冻保存的mPB解冻并且用50ng/g FasL和20ng/g TNF-α将所述细胞孵育4小时或16小时。$CD34^+$祖细胞、T细胞($CD3^+$)、B淋巴细胞($CD19^+$)以及髓细胞($CD33^+$)在活细胞部分中的相对分布示出了这些子集对细胞凋亡的不同敏感性。(B)用死亡配体将mPB样品孵育4小时或16小时,通过ficoll离心来消除死亡细胞并且将同等数量的活细胞铺在半固体甲基纤维素培养物内。(C)集落形成活性表达为mPB细胞在培养基中并用50ng/ml FasL或20ng/ml TNF-α(每组中n＝7-11)孵育之后的集落形成细胞(CFU)频率。(D)在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中,将用50ng/g FasL孵育4小时的mPB与辐射的同种异体mPB刺激物共同孵育。由CFSE稀释测定反应者的增殖并且使用ModFit软件来量化。(E)使NOD.SCID小鼠皮下接种人结肠癌HT29并且向所述小鼠静脉输注在培养基中并用FasL预孵育4小时的3×10^7个mPB细胞。根据(mm^3＝长度×宽度$^2\times0.4$)用卡尺测量的肿瘤生长率通过输注mPB细胞降低,而不管所述细胞是否暴露于FasL。

[0050] 图9:图9A和图9E是方案并且图9B至图9D和图9F至图9H是示出细胞凋亡敏感细胞的预移植耗尽预防GvHD的图。(A-D)FasL介导消除预敏化的GvHD效应物。(A)间隔3天就用10^7个$H2K^d$脾细胞将$H2K^b$小鼠免疫两次。在第二次免疫之后三天,在培养中并用50ng/ml FasL将脾细胞(im$H2K^b$)培养24小时。(B)在培养基(n=6)中并用50ng/ml FasL(n=5)将从$H2K^d$免疫的$H2K^b$小鼠收获的脾细胞孵育24小时。在门控$CD4^+$和$CD8^+$T细胞子集中分别由膜联蛋白-V和7-AAD摄取测量细胞凋亡和死亡。(C)经过两次免疫的脾细胞显示出与第三方刺激物($H2K^k$)相比较对辐射的(3000rad)同种异体刺激物($H2K^d$)增加的反应。通过用FasL孵育24小时明显压制了异体反应,同时保持对第三方刺激物的反应性。由CFSE稀释(n=5个单独孵育)测定增殖指数。(D)在培养基中并用FasL离体孵育之后,将来自免疫的供体的活脾细胞(1.5×10^6)过继转移到经亚致命性辐射的(650rad)F1接受者体内($H2K^b\rightarrow H2K^{b/d}$)。存活差异通过在第+7天施用10μg脂多糖(LPS)(每组中n=8)来极化。(E-H)FasL介导耗尽未受刺激的供体脾细胞。(E)向经亚致命性辐射的(650rad)F1接受者($H2K^{b/d}$)输注在培养基中并用FasL预孵育24小时的半同种异体脾细胞($H2K^b$)。(F)在培养基(n-7)中并用50ng/ml FasL(n-9)将未受刺激的脾细胞孵育24小时以用于测量门控$CD4^+$和$CD8^+$T细胞子集中的细胞凋亡。(G)用和未用FasL孵育24小时的未受刺激的脾细胞($H2K^b$)对辐射的同种异体刺激物($H2K^d$)作出反应。(H)在培养基(n=10)中并用FasL(n=10)离体孵育之后,将来自未受刺激的供体的活脾细胞(1.5×10^6)过继转移到经亚致命性辐射的(650rad)F1接受者体内($H2K^b\rightarrow H2K^{b/d}$)。在第+7天,用10μg LPS(静脉)攻击小鼠。

[0051] 图10:图10A至图10E是示出Fas介导的对未受刺激的脾细胞的耗尽降低单倍同一性和同种异体免疫细胞的GvHD活性的图。向经亚致命性辐射的(650rad)F1接受者($H2K^{b/d}$)输注在培养基中并用FasL预孵育24小时的不同数量($1.5至4.5\times10^6$)的半同种异体脾细胞。(A)用和未用FasL孵育的脾细胞的接受者根据以下正常(0)和异常(1)参数来临床评分:1.皮肤病和毛发脱落,2.虚弱程度,3.爪垫角化过度以及4.腹泻。(B)用和未用FasL孵育(每组中n=5-10)的不同数量的供体脾细胞的接受者的体重损失。(C-D)在用和未用FasL孵育24小时(每组中n=6-10)之后,将3×10^6个脾细胞的单倍同一性移植体与同种异体移植体($H2K^b\rightarrow H2K^d$)相比较。在一周之后测量临床评分(C)和体重损失(D)。(E)具有T和B淋巴细胞的脾内容物在辐射之后的第一周期间(每组中n=5)逐渐减少。脂多糖(LPS)攻击的幸存者显示出对这些子集的标记的刺激(在LPS输注之后2天),所述标记的刺激通过用FasL对未受刺激的脾细胞进行预处理(n-7)来削弱。

[0052] 图11:图11C是方案并且图11A、图11B以及图11D至图11F是示出Fas交联改善NOD.SCID小鼠体内的GvHD的图。(A)在培养基中并用50ng/ml FasL孵育的脾细胞显示出不同水平的自发性细胞凋亡(淡色条)和Fas介导的细胞凋亡(暗色条)。在孵育24小时和48小时(n=7-9)之后,通过门控$CD4^+$和$CD8^+$T细胞子集上的膜联蛋白-V摄取来测量细胞凋亡。(B)活的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞、$CD4^+CD25^+$调控T细胞以及B淋巴细胞($B220^+$)在培养基中并用FasL孵育48小时之前和之后的分数分布。(C)将来自C57BL/6供体在培养基中并用50ng/ml FasL孵育的以下脾细胞输注到同种异体NOD.SCID小鼠体内($H2K^b\rightarrow H2K^{g7}$):分别预孵育24小时和48小时的$3\times10^6$个和$10^7$个原初脾细胞。(D)输注了在对照培养基(n=9)中并用50ng/ml FasL(n=10)预孵育的脾细胞的NOD.SCID小鼠的存活。通过静脉注射10μg LPS会促发致命的GvHD。在3周后根据胃肠道受累(GI)(E)和体重损失(F)评价小鼠的临床评分。

[0053] 图12:图12A是方案,图12B至图12C是图并且图12D是示出消除单倍同一性骨髓移植体内的Fas敏感的原初免疫细胞的图形图片。(A)将5×10^6个BMC(H2K^b,CD45.1)和不同数量的供体脾细胞(H2K^b、CD45.2、GFP)移入以850rad辐射的F1接受者(H2K$^{b/d}$)。在移植后3周,根据胃肠道受累(GI)和体重损失(C)来评定在培养基中并用FasL孵育48小时(每组中n=8)的脾细胞的接受者的临床评分(B)。(D)在移植后3周,处死小鼠来在组织学上针对以下各项评价在培养基中并用FasL孵育(n=5)的3×10^6个脾细胞的接受者的皮肤和肝:0-无浸润,1-略微浸润,2-片状浸润,3-弥漫性浸润,4-组织基础结构的恶化。

[0054] 图13:图13A是图和FACS扫描,图13B和图13D是FACS扫描并且图13C是示出在选择性耗尽单倍同一性骨髓移植体内的Fas敏感的原初免疫细胞之后的免疫重建的图。(A)将5×10^6个BMC(H2K^b,CD45.1)和不同数量的供体脾细胞(H2K^b、CD45.2、GFP)移入以850rad辐射的F1接受者(H2K$^{b/d}$)。在移植后3周(n=5),在外周血液中测定供体(H2K^b)和宿主(H2K$^{b/d}$)嵌合。在移植后3周将小鼠处死来确定:(B)脾重建的主要贡献来自骨髓(CD45.1,GFP$^-$),其中在这个时间点几乎已不存在输注的脾细胞(CD45.2,GFP$^+$)。数据表示5个单独的测量。(C)MLR测定中对第三方(H2K^k)辐射的刺激物(反应者:刺激物比率是1:3)的反应。从针对在培养基中并用FasL孵育(n=4)的未受刺激的脾细胞的接受者的CFSE稀释来测定增殖。(D)在移植到经亚致命性辐射的(650rad)野生型接受者之后24小时肠系膜淋巴结内的GFP$^+$供体脾细胞。数据表示4个单独的测量。

[0055] 图14:图14A、图14C以及图14E是方案并且图14B、图14D以及图14F是示出FasL介导的对未受刺激的淋巴细胞的耗尽支持造血细胞移入的图。(A)在存在和在不存在50ng/ml FasL的情况下,将全骨髓细胞(wBMC)孵育24小时,并且将2×10^6个细胞移入到经亚致命性辐射的(800rad)同种异体宿主体内(H2K^d→H2K^b)。(B)3周的外周血液嵌合并未受到使用FasL的预孵育(n=6)的影响。(C)在培养基(n=5)中并用FasL(n=6)预孵育24小时之后,向10^6个谱系阴性BMC(n=7)到辐射的(800rad)同种异体宿主的移植(H2K^d→H2K^b)补充10^6个来自F1供体(H2K$^{b/d}$)无GvHD活性的脾细胞。(D)脾细胞的添加改进了造血细胞移入,而不管是否暴露于FasL。(E)通过将5×10^5个lin$^-$BMC移植到以750rad辐射的同种异体接受者体内(H2K^d→H2K^b)(对照,n=6)来诱导混合嵌合。在10天之后,向小鼠输注同种异体(H2K^d)的10^6个淋巴细胞(DLI)。(F)与未接受淋巴细胞输注的小鼠(对照)相比较,供体嵌合水平在培养基中并用FasL预孵育24小时(n=6)的DLI之后3周上升。

[0056] 图15:图15A、图15C、图15E以及图15G是方案并且图15B、图15D、图15F以及图15H是示出FasL耗尽的未受刺激的淋巴细胞的移植保留移植物抗宿主活性的图。(A)向携带皮下同种异体(H2K^d)CT26结肠癌肿瘤的NOD.SCID小鼠(H2K^{g7})输注(在植入肿瘤后1天)来自5周龄宿主匹配的NOD供体(H2K^{g7})的1.5×10^7个脾细胞。(B)淋巴细胞的输注将压制NOD.SCID小鼠体内的肿瘤生长(n=10),而不管是否在培养基中并用FasL预孵育24小时(n-8)。(C)以亚致命性辐射(750rad)携带MHC-匹配的皮下成神经细胞瘤(Neuro-2a,H2K^a)肿瘤的H2K^{a}小鼠并且将来自同种异体供体(H2K^b)的2×10^6个谱系阴性骨髓细胞移入所述小鼠体内。(D)来自F1供体(H2K$^{b/d}$)的无GVH活性的淋巴细胞的输注对肿瘤生长不具有显著影响(n=17)。在培养基中孵育24小时的同种异体脾细胞(H2K^b)的输注降低了肿瘤生长率(n=10),但80%的小鼠因严重的GvHD而在3周内死亡。用FasL预孵育的脾细胞的输注同等减少肿瘤生长,但所有小鼠都是存活的(n=11)。(E)向经亚致命性辐射的(750rad)BALB/c小鼠输注5×10^6个同

基因($H2K^d$)骨髓细胞与2×10^5个A20成淋巴细胞瘤($H2K^d$)的混合物。在培养基中并用FasL将细胞混合物预孵育24小时。(F)在培养基中孵育的骨髓细胞和A20细胞的接受者发展成带来致命后果的弥散性肿瘤(n＝10),而用FasL预孵育的细胞的接受者将存活下来(n＝10)。(G)在培养基中并用50ng/ml FasL蛋白孵育48小时之后,用来自同基因NOD供体($H2K^{g7}$)的5×107个骨髓细胞过继转移以650rad辐射的免疫缺损的NOD.SCID小鼠($H2K^{g7}$)。在两次测量空腹血糖水平均超过200mg/dl之后认为是高血糖症。(H)在培养基中并用FasL蛋白预孵育(n＝10)的全骨髓细胞的过继转移之后的高血糖症的发展。

[0057] 发明详述

[0058] 在一个实施方案中,本发明公开一种用于选择抗细胞凋亡信号传导细胞的装置。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞选自包括以下的组:干细胞、祖细胞以及免疫细胞。在另一个实施方案中,本发明的免疫细胞是T细胞的子集。在另一个实施方案中,本发明的细胞是造血细胞。在另一个实施方案中,本发明的细胞基于表面表型例如CD34+来鉴别。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞是本发明的细胞。

[0059] 在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞对TNF-α具有抗性。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞对Fas配体具有抗性。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞对TRAIL具有抗性。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞对Tweak具有抗性。在另一个实施方案中,抗细胞凋亡信号传导细胞对TNF-α、Fas配体、TRAIL、Tweak或其任何组合具有抗性。

[0060] 在另一个实施方案中,本发明提供克服与用于鉴别干细胞或“干细胞性”的细胞染色的方法相关联的障碍和不准确性的方法和装置。在另一个实施方案中,现有技术通常提供用于鉴别干细胞的方法,其中本发明提供用于从培养物选择干细胞的手段,其中所述培养物包含包括非干细胞的各种细胞类型。在另一个实施方案中,选择在一个步骤中进行。

[0061] 在详细地解释本发明的至少一个实施方案之前,应理解本发明并不限于其在以下描述中所阐述的或通过实施例所列举的细节方面的应用。本发明能够具有其它实施方案或能够以各种方式实践或执行。此外,应理解本文中采用的措辞和术语是出于描述的目的并且不应视为具有限制性。

[0062] 在另一个实施方案中,本发明的装置包括容器,其中细胞凋亡诱导配体固定至所述容器的内表面。在另一个实施方案中,本发明的装置包括容器,其中细胞凋亡诱导配体固定至引入所述容器中的珠粒的表面。在另一个实施方案中,本发明的装置包括容器,其中细胞凋亡诱导配体固定至所述容器中含有的珠粒的表面。在另一个实施方案中,本发明的装置用于使用单个步骤选择干细胞。在另一个实施方案中,单个步骤包括在所述容器内孵育异源细胞群体。在另一个实施方案中,孵育使所述细胞群体暴露于如本文所提供的细胞凋亡配体。在另一个实施方案中,孵育导致抗细胞凋亡细胞如干细胞的存活以及细胞凋亡敏感细胞类型的细胞凋亡性死亡。

[0063] 在另一个实施方案中,选择的抗细胞凋亡细胞(如干细胞)群体用于在治疗疾病(例如但不限于:癌症、免疫疾病、抗化疗癌症或先天性或后天性免疫缺陷)的过程中的移植。在另一个实施方案中,本领域技术人员可以容易地确定本发明的抗细胞凋亡细胞的使用。

[0064] 在另一个实施方案中,所述容器由至少一种生物相容性材料构成。在另一个实施

方案中，生物相容性材料包括但不限于：聚丙烯、聚苯乙烯、硅酮、聚氯乙烯或其组合。在另一个实施方案中，生物相容性材料根据参数来选择，所述参数例如但不限于：对促进细胞凋亡诱导配体固定到所述生物相容性材料内表面或透明性的耐受性或能力。在另一个实施方案中，生物相容性材料相对于在所述疗法的接受者或受益人体内引起任何不希望的局部或系统性效应来说是惰性的，但在所述特定情况下会产生最适当的有益的细胞或组织反应，并且最优化所述疗法的临床相关表现(美国专利5,998,024、美国专利6,526,984以及美国专利4,979,959列举了生物相容性材料)。在另一个实施方案中，生物相容性材料包含涂布有促进本发明的抗细胞凋亡细胞的存活的至少一层的疏水性聚合物。

[0065] 在另一个实施方案中，所述容器是袋子。在另一个实施方案中，所述容器是管柱。在另一个实施方案中，所述容器是管。在另一个实施方案中，所述容器是瓶子。在另一个实施方案中，所述容器是小瓶。在另一个实施方案中，所述容器室烧瓶。在另一个实施方案中，所述容器是本领域已知的并且适合于所述装置的特定目标用途的任何其它接纳器。

[0066] 根据一个实施方案，所述装置包含引入了细胞群体的单个容器。在另一个实施方案中，所述容器包括通过适于将全细胞从细胞碎片和蛋白质中分离出来的过滤设备而分开的两个互锁腔室。在另一个实施方案中，将细胞群体引入到一个腔室中，在所述腔室中孵育并且在孵育之后，过滤器可以用于进一步将选择的细胞从溶液中的细胞碎片和蛋白质中分离出来。

[0067] 根据另一个实施方案，所述容器是管柱形式，其中孵育所述细胞群体，从而允许全细胞或特别是干细胞附接到所述管柱上。在另一个实施方案中，在孵育之后，将丢弃剩余的细胞碎片和蛋白质并且将所述选择的细胞与所述管柱分离。美国专利5,098,842和专利申请US2011/0256581中已列举了这种管柱的使用。

[0068] 在另一个实施方案中，将肿瘤坏死因子(TNF)家族的成员用作用于选择抗细胞凋亡细胞的细胞凋亡诱导剂。在另一个实施方案中，根据本发明使用的TNF家族的细胞凋亡诱导配体是：TNF-α、FasL、Trail(Apo2配体)或Tweak(Apo3配体)。在另一个实施方案中，促细胞凋亡剂是重组蛋白。

[0069] 在另一个实施方案中，生物活性细胞凋亡诱导配体是在其细胞凋亡诱导活性剂中具有活性同时固定至容器的内表面的配体。在另一个实施方案中，生物活性细胞凋亡诱导配体是包含能够结合各自受体并且以其固定形式诱导细胞凋亡的至少一个活性部分的TNF-α,FasL、Trail以及Tweak中的任一个。

[0070] 在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体来源于哺乳动物来源。在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体是人细胞凋亡诱导配体。在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体是啮齿类动物细胞凋亡诱导配体。

[0071] 根据另一个实施方案，所述生物活性细胞凋亡诱导配体固定至所述容器的所述内表面。在另一个实施方案中，所述生物活性细胞凋亡诱导配体固定至所述容器内的珠粒。在另一个实施方案中，所述生物活性细胞凋亡诱导配体以允许所述配体与所述容器内含有的细胞自由的相互作用的方式固定。

[0072] 本领域中已知许多用于将蛋白质固定至表面的方法。大多数固定方法涉及用适当的物质来使所述表面改性或涂布所述表面来改变表面特性或提供用于结合蛋白质的官能团。另一方面，在不改性的情况下，将蛋白质固定在裸表面上必须使用对特定表面具有特异

性的亲和性肽。在另一个实施方案中，固定通过利用与本发明的所述细胞凋亡诱导配体相容的螯合剂来实现。在另一个实施方案中，本领域技术人员可以容易地鉴别合适的螯合剂。在另一个实施方案中，螯合剂不但与本发明的所述细胞凋亡诱导配体相容而且维持其生物活性。在另一个实施方案中，螯合剂不但与本发明的所述细胞凋亡诱导配体相容而且促进其生物活性。

[0073] 在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体的固定通过以下来实现：物理吸附、His-6离子与Ni^{+}离子之间的相互作用、一对异二聚亮氨酸拉链的卷曲螺旋缔合、SH基团的化学吸附、醛与氨基之间的Schiff碱键连、转谷氨酰胺酶(TGase)的酰基转移反应、链霉亲和素-生物素之间的亲和力、FLAG与抗-FLAG抗体之间的亲和力、谷胱甘肽与GST之间的亲和力或融合了PS-亲和性肽的蛋白质至亲水性聚苯乙烯的结合(美国专利6,040,182、美国专利4,885,234、专利申请US 2010/0209945以及专利申请US 2006/0009623中列举了用于固定的各种方法)。

[0074] 在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体是全蛋白的衍生物或类似物。在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体是小有机分子。在另一个实施方案中，细胞凋亡诱导配体是全蛋白的变体、衍生物、修饰型式或截短型式。在另一个实施方案中，FasL是人FasL如SEQ ID NO:1中所阐述。在另一个实施方案中，本发明的人TNF-α包含SEQ ID NO:2。在另一个实施方案中，本发明的人Trail包含SEQ ID NO:3。在另一个实施方案中，本发明的人Tweak包含SEQ ID NO:4。

[0075] 本文公开的蛋白质通过重组或化学合成方法来产生。

[0076] 在另一个实施方案中，本文提供一种用于从异源细胞群体选择抗细胞凋亡细胞的方法，其中所述异源群体包含抗细胞凋亡信号传导细胞和细胞凋亡信号传导敏感细胞。在另一个实施方案中，所述方法包括将所述异源细胞群体引入所述装置中并且在其中进行孵育。在另一个实施方案中，所述方法包括将所述异源细胞群体引入所述装置中并且在其中进行孵育。

[0077] 在另一个实施方案中，如本文使用的术语“选择”是指异源细胞群体中仅选择的细胞存活下来的一种方法。在另一个实施方案中，存活细胞是抗细胞凋亡信号传导细胞。

[0078] 在另一个实施方案中，抗细胞凋亡信号传导细胞是干细胞。在另一个实施方案中，抗细胞凋亡信号传导细胞是对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞。在另一个实施方案中，抗细胞凋亡信号传导细胞是祖细胞。在另一个实施方案中，抗细胞凋亡信号传导细胞是干细胞、对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞、祖细胞或其任何组合。

[0079] 在另一个实施方案中，干细胞是脐带血干细胞。在另一个实施方案中，干细胞是动员的外周血液干细胞。在另一个实施方案中，干细胞是骨髓干细胞。在另一个实施方案中，干细胞是癌症干细胞。在另一个实施方案中，干细胞是神经干细胞。在另一个实施方案中，干细胞是脐带血干细胞、动员的外周血液干细胞、骨髓干细胞、癌症干细胞、神经干细胞或其组合。

[0080] 在另一个实施方案中，如本文使用的“对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞”是指在活化时免疫系统中未经历细胞凋亡的细胞。在另一个实施方案中，对活化诱导细胞死亡(AICD)不敏感的免疫细胞是非活化T细胞。

[0081] 出于治疗目的收获干细胞要求提取含有干细胞(自体的或来自供体)的组织，并且

然后使所述干细胞与若连同干细胞一起移植则可能具有有害作用的其它细胞群体分离。

[0082] 在另一个实施方案中，短语“抗细胞凋亡”是“抗受体介导的细胞凋亡”。在另一个实施方案中，本发明的细胞选择方法是一种用于对受体介导的细胞凋亡具有抗性的细胞类型的单步骤阴性选择方法。在另一个实施方案中，本发明方法允许通过一次性使用所述装置就同时分离支持临床移植结果的干细胞和免疫细胞，如下文所列举。

[0083] 根据另一个实施方案，可以用于本发明的方法的所述细胞群体来源于但不限于骨髓、脐带血(UCB)以及祖细胞动员的外周血液(mPB)。然而，本领域技术人员清楚的是，所述细胞群体还可以来源于含有抗细胞凋亡细胞的其它成体组织。在另一个实施方案中，所述细胞群体来源于胚胎组织。

[0084] 在另一个实施方案中，异源细胞群体来源于器官或组织。在另一个实施方案中，异源细胞群体来源于胚胎。在另一个实施方案中，异源细胞群体来源于包含胚胎细胞、干细胞、免疫细胞或其任何组合的组织。在另一个实施方案中，异源细胞群体来源于骨髓。在另一个实施方案中，异源细胞群体通过在骨髓基质通过活化和破坏分子锚流到外周血液(mPB)中之后通过抽吸法或单采血液成分术(apheresis)来将所述骨髓基质机械地移出来获得。在另一个实施方案中，异源细胞群体来源于外周血液。

[0085] 在另一个实施方案中，所述干细胞选自异源细胞群体。在另一个实施方案中，如本文使用的短语“异源细胞群体”是指包含如上定义的干细胞和至少一种细胞凋亡敏感细胞的细胞类型的混合物。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体来源于任何生物体。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体来源于哺乳动物来源。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体来源于人来源。

[0086] 在另一个实施方案中，所述异源细胞群体包含谱系阳性细胞和干细胞的混合物。在另一个实施方案中，如本文使用的“谱系阳性细胞”是指表达成熟细胞谱系标记物的细胞。在另一个实施方案中，成熟细胞谱系标记物是分化簇(CD)蛋白。

[0087] 在另一个实施方案中，本发明的方法用于进行谱系耗尽。

[0088] 在另一个实施方案中，所述异源细胞群体是组织或其一部分。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体是细胞聚集体。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体是单细胞悬浮液。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体是原代培养物。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体是细胞样品。在另一个实施方案中，所述异源细胞群体包含可用于本发明的促细胞凋亡剂的蚁群。

[0089] 根据另一个实施方案，在所述装置内的孵育持续2小时至72小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续2小时至4小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续4小时至10小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续10小时至24小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续12小时至36小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续24小时至48小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续36小时至72小时。在另一个实施方案中，在所述装置内的孵育持续48小时至72小时。

[0090] 出人意料的是，诸位发明人发现不同的孵育时间与细胞凋亡诱导配体的不同组合可能导致功能各异的临床效果。因此，孵育时间将根据具体用途，如本文以下所列举。

[0091] 根据另一个实施方案，本发明公开一种细胞选择试剂盒。在另一个实施方案中，所述试剂盒包括进一步包括用于维持细胞凋亡诱导配体的完整性和活性的溶液的本发明的

装置。在另一个实施方案中，所述试剂盒进一步包括根据本发明的方法来进行细胞选择的带有说明书的插入件。在另一个实施方案中，用于维持细胞凋亡诱导配体的完整性和活性的所述溶液是一种溶液。在另一个实施方案中，所述溶液是缓冲液或培养基，所述缓冲液或培养基允许所述细胞凋亡诱导配体具有活性，同时还维持它们的完整性和结构。在另一个实施方案中，所述溶液的成分根据所使用的细胞凋亡诱导配体来变化。在另一个实施方案中，所述溶液包含蛋白酶抑制剂。在另一个实施方案中，所述蛋白酶抑制剂选自但不限于：苯甲基磺酰氟、苄脒、胃蛋白酶抑制剂A、亮抑蛋白酶肽、抑肽酶、抗蛋白酶、EDTA、EGTA或其任何组合。在另一个实施方案中，所述溶液包含缓冲液系统，所述缓冲液系统选自但不限于：TRIS缓冲液或Glycing-NaOH(Uguw S.O.和Apte S.P.,Pharmaceutical Technology:2004年3月:86-113中列举了因蛋白质的稳定性和活性而影响缓冲液选择的不同条件)。

[0092] 在另一个实施方案中，所述溶液包含允许和/或促进细胞存活、细胞生长、细胞增殖或其任何组合的元素。在另一个实施方案中，允许和/或促进细胞存活、细胞生长、细胞增殖或其任何组合的元素包括：生长培养基、血清或抗菌剂。根据这个实施方案，所述溶液允许维持细胞在所述试剂盒的所述装置内的活力。

[0093] 在另一个实施方案中，所述溶液包含允许干细胞增殖的因子。在另一个实施方案中，允许干细胞增殖的因子选自但不限于生长因子、激素、酶或化学品。

[0094] 在另一个实施方案中，所述试剂盒进一步包括另外的细胞凋亡诱导配体，所述另外的细胞凋亡诱导配体添加至所述装置或所述溶液，从而使所述溶液选择性朝向本发明的抗细胞凋亡细胞。

[0095] 在另一个实施方案中，本发明的试剂盒为添加至细胞群体的细胞凋亡诱导配体的特性或浓度提供灵活性。根据这个实施方案，所述试剂盒包括各自含有不同的细胞凋亡诱导配体的另外的容器。试剂盒的使用者根据所需用途选择细胞凋亡诱导配体的优选组合(如本文以下所列举)，将所述配体引入到所述装置中并且允许用所述配体来孵育。

[0096] 在另一个实施方案中，除了所述细胞凋亡诱导配体之外，本发明的试剂盒还提供暂时的灵活性。如本文以下所列举，细胞凋亡诱导配体的不同组合、顺序施用或孵育时间会导致不同的临床效果。试剂盒的使用者可以选择添加细胞凋亡诱导配体的所需顺序以及各个配体在所述装置内的孵育期，从而实现选择的临床效果。

[0097] 根据另一个实施方案，本发明进一步公开一种用于改进造血干细胞和祖细胞(HSPC)移植的临床效果的方法。在另一个实施方案中，提供了包含HSPC的细胞群体。在另一个实施方案中，使所述细胞群体与本发明的装置内和在所述装置内孵育的细胞凋亡诱导配体接触。在另一个实施方案中，收回存活细胞。在另一个实施方案中，将收回的细胞移植在受试者体内。

[0098] 在另一个实施方案中，将同种异体脐带血引入到本发明的所述试剂盒的所述装置中。根据这个实施方案，将FasL固定在所述容器的内表面上。在所述装置中将血液孵育少于24小时。在孵育结束时，将TNF-α引入到所述装置中并且继续孵育24至48小时。在第二次孵育之后，从所述装置提取细胞并且将所述细胞移植到患者体内。在另一个实施方案中，在孵育结束与移植之间使用分离步骤，以便在溶液中将活细胞从细胞碎片和蛋白质中分离出来。

[0099] 在另一个实施方案中，本方法的细胞群体来源于自体移植体。在另一个实施方案

中，本方法的细胞群体来源于同种异体移植体。

[0100] 根据另一个实施方案，本发明进一步公开一种用于消除组合物中的恶性细胞的方法。在这种方法中，使所述组合物与细胞凋亡诱导配体接触并且用所述细胞凋亡诱导配体进行孵育。在另一个实施方案中，所述组合物包含祖细胞移植体。

[0101] 在另一个实施方案中，所述细胞凋亡诱导配体是FasL。在另一个实施方案中，孵育持续约24小时。诸位发明人在体内研究中已表明，出人意料的是，在约24小时内将FasL添加至含有恶性细胞的移植体会消除恶性污染物并且改进存活率(图15E至图F)。

[0102] 根据另一个实施方案，这种消除技术有可能确保来自患有亚临床恶性疾病的表面健康的供体的移植物中不存在恶性细胞。

[0103] 根据另一个实施方案，从癌症患者的骨髓中提取移植体并且将所述移植体引入到本发明的装置中。根据这个实施方案，用固定的FasL将所述移植体孵育约24小时。在孵育结束之后，将所选择的细胞返回移植到所述癌症患者体内。在另一个实施方案中，分离步骤在移植之前，以便将选择的细胞从细胞碎片和蛋白质中分离出来。

[0104] 根据另一个实施方案，本发明进一步公开一种用于预防移植物抗宿主疾病(GvHD)同时保留移植物抗肿瘤(GvT)活性的方法。根据这种方法，提供了样品。在一个实施方案中，所述样品包括细胞群体。在另一个实施方案中，所述细胞群体包含HSPC。在另一个实施方案中，所述细胞群体包含免疫细胞。在另一个实施方案中，所述细胞群体包含HSPC、免疫细胞或其组合。根据一个实施方案，使所述细胞群体与细胞凋亡诱导配体接触。在另一个实施方案中，从所述装置中收回存活细胞。在另一个实施方案中，将收回的细胞移植在受试者体内。

[0105] 根据另一个实施方案，本发明的方法使得仅选择不诱导GvHD的T细胞子集。诸位发明人出人意料地发现，在未同步进行T细胞敏化的情况下，用FasL短暂孵育2至16小时会导致GvHD效应物的有效去除(图9)。根据这个实施方案，将实现支持造血祖细胞移入的T细胞子集的存活，因为用FasL对移植的细胞的处理并不损害移入(图14)。

[0106] 在另一个实施方案中，对来自供体接种物的细胞凋亡敏感T细胞的选择性消除并不会损害强有力的移植物抗肿瘤(GvT)反应的产生。

[0107] 根据另一个实施方案，本发明的方法可以用在本领域中已知遭受较高程度GvHD的同种异体动员的外周血液移植体上。在这个实施方案中，将所述同种异体动员的外周血液移植体引入到本发明的装置中。接着用固定的FasL将所述移植体孵育2至16小时的较短时间。在孵育之后，收回剩余细胞并且将所述剩余细胞移植到患者体内。根据另一个实施方案，分离步骤可以在移植之前，以便将选择的细胞从细胞碎片和蛋白质中分离出来。

[0108] 根据另一个实施方案，本发明的方法可以用于在供体淋巴细胞输注(DLI)之前选择性耗尽未受刺激的T细胞。

[0109] 根据一些实施方案的重组表达

[0110] 在另一个实施方案中，本发明的蛋白质可以通过表达编码宿主细胞内的蛋白质的多核苷酸分子来合成，所述宿主细胞例如用核酸分子转化的微生物细胞。

[0111] DNA序列编码蛋白可以使用本领域中熟知的各种方法来与产生它们的任何细胞分离(参见例如Sambrook等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual，第三版，Cold Spring Harbor,N.Y.,(2001))。例如，编码野生型蛋白质的DNA可以使用基于已知序列的核

苷酸序列构建的特异性引物通过聚合酶链反应(PCR)由适当的微生物的基因组DNA、质粒或粘粒扩增而来。合适的技术在本领域中是熟知的,例如在美国专利号4,683,195、4,683,202、4,800,159以及4,965,188中有所描述

[0112] DNA可以在扩增之前使用本领域中已知的各种方法来从细胞提取,参见例如Marek P.M等,"Cloning and expression in Escherichia coli of Clostridium thermocellum DNA encoding p-glucosidase activity",Enzyme and Microbial Technology第9卷,第8期,1987年8月,第474至478页。

[0113] 编码蛋白质的分离的多核苷酸可以克隆到载体如pET28a质粒中。

[0114] 在编码蛋白质的多核苷酸的分离和克隆之后,可以使用本领域中已知的方法通过一个或多个碱基对处的修饰来引入一个或多个突变,所述方法例如像位点特异性诱变(参见例如Kunkel Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1985,82:488-492;Weiner等,Gene 1994,151:119-123;Ishii等,Methods Enzymol.1998,293:53-71);盒式诱变(参见例如Kegler-Ebo等,Nucleic Acids Res.1994年5月11日;22(9):1593-1599);递归整体诱变(参见例如Delagrave等,Protein Engineering 1993,6(3):327-331)以及基因位点饱和诱变(参见例如美国专利申请号2009/0130718)。

[0115] 还熟知用于将多个突变引入到多核苷酸中的方法(参见例如Michaelian等,Nucleic Acids Res.1992,20:376;Dwivedi等,Anal.Biochem.1994,221:425-428;Bhat Methods Mol.Biol.1996,57:269-277;Meetei等,Anal.Biochem.1998,264:288-291;Kim等,Biotechniques 2000,28:196-198;以及国际专利申请公开号WO03/002761A1和WO 99/25871)。

[0116] 产生具体所需序列的多核苷酸的一种替代方法是使用合成基因。编码本发明的蛋白质的多核苷酸能够以合成方式制备,例如使用亚磷酰胺方法(参见Beaucage等,Curr-Protoc Nucleic Acid Chem.2001年5月;第3章:第3.3单元;Caruthers等,Methods Enzymol.1987,154:287-313)。

[0117] 合成基因的使用允许产生包含有待表达在希望的物质(例如,大肠杆菌)中的优化的核苷酸序列的人工基因。在许多情况下,重设计基因将提供改进基因表达的手段。重写开放阅读框因遗传密码的冗余性而变得可能。因此,可能在开放阅读框中改变至多约三分之一的核苷酸并且仍然产生相同的蛋白质。例如,对于具有300个氨基酸的典型蛋白质序列来说,有10150个以上密码子组合将编码相同的蛋白质。使用优化方法如用更普遍的密码子替代很少使用的密码子可能会对由靶基因编码的蛋白质的表达水平产生巨大影响。还可以包括另外的优化如去除RNA二级结构。计算机程序可用于进行这些和其它同步优化。由于原始DNA序列中大量核苷酸发生变化,所以产生新设计基因的唯一实际方法是使用基因合成。

[0118] 因此产生的多核苷酸然后可以经受另外的操作,包括纯化、退火、连接、扩增、通过限制性内切酶消化以及克隆到适当的载体中的一种或多种。所述多核苷酸可以初始连接到克隆载体中,或直接连接到对于其在特定宿主细胞类型中的表达来说适当的表达载体中。

[0119] 本领域技术人员将容易清楚明白,多核苷酸中使用来编码将取代编码野生型酶的序列中原始存在的氨基酸的特定氨基酸的密码子应根据为了表达多核苷酸而选择的宿主细胞的已知的且偏爱的密码子用途来选择。

[0120] 技术人员将意识到核酸序列与蛋白质序列尤其是遗传密码子与这种密码子的简

并性之间的关系，并且将能够轻易地构建编码本发明的蛋白质的核酸。例如，技术人员将意识到对于蛋白质序列中的每个氨基酸取代来说，可能存在编码取代的氨基酸的一个或多个密码子。因此，将明显的是，取决于遗传密码子相对于那个特定氨基酸残基的简并性，可以根据某一变体蛋白序列来生成一个或多个核酸序列。

[0121] 本发明的多核苷酸可以包括非编码序列，包括例如非编码5'和3'序列如转录的、未翻译的序列，终止信号，核糖体结合位点，使mRNA稳定的序列，内含子以及多聚腺苷酸化信号。另外包括包含编码序列的多核苷酸，所述编码序列用于与变体蛋白尤其是标记物序列如多聚组氨酸(poly-His)标签异源的另外的氨基酸，所述变体蛋白促进融合蛋白形式的蛋白质的纯化。

[0122] 本发明的蛋白质可以产生为带标签的蛋白质，例如来促进提取和纯化。标签构建体的非限制性实例是可以通过常规方法来分离和纯化的His-Tag(六个组氨酸残基)。还可以方便地在标签部分与所关注的蛋白质序列之间包括蛋白酶水解切割位点以允许去除标签如凝血酶切割位点。

[0123] 编码本发明的蛋白质的多核苷酸可以结合到各种各样的表达载体中，所述表达载体可以转化成各种各样的宿主细胞。宿主细胞可以是原核的或真核的。

[0124] 将多核苷酸引入到宿主细胞中可以通过以下熟知的方法来实现：例如化学转化(例如，氯化钙处理)、电穿孔、偶联、转导、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、转位、显微注射、阳离子脂质介导的转染、刮擦负载(scrape loading)、弹道法引入(ballistic introduction)以及感染。

[0125] 在一些实施方案中，所述细胞是原核细胞。适当的原核宿主的代表性非限制性实例包括细菌细胞如大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的细胞。在其它实施方案中，所述细胞是真核细胞。在一些示例性实施方案中，所述细胞是真菌细胞如酵母。适当的酵母细胞的代表性非限制性实例包括酿酒酵母和毕赤氏酵母。在另外的示例性实施方案中，所述细胞是植物细胞。

[0126] 所述蛋白质可以表达在适于表达的任何载体中。适当的载体根据所选择的宿主细胞来确定。用于在大肠杆菌(例如)中表达蛋白质的载体包括但不限于pET、pK233、pT7以及λpSKF。其它表达载体系统基于β-半乳糖苷酶(pEX)、麦芽糖结合蛋白(pMAL)以及谷胱甘肽S-转移酶(pGST)。

[0127] 用所需载体转化的宿主细胞的选择可以使用涉及对非转化细胞有毒的选择培养基中的生长的标准选择方案来实现。例如，大肠杆菌可以在含有抗生素选择剂的培养基中生长；用进一步提供抗生素抗性基因的表达载体转化的细胞将在选择培养基中生长。

[0128] 在合适的宿主细胞的转化以及在适于蛋白质表达的条件下的传播之后，可以在转化细胞的细胞提取物中鉴别所需蛋白质。表达所关注的蛋白质的转化的宿主可以通过使用SDS-PAGE分析由宿主表达的蛋白质并且将凝胶与从用相同载体转化但不含有编码所关注的蛋白质的核酸序列的宿主获得的SDS-PAGE凝胶比较来鉴别。

[0129] 所关注的蛋白质还可以通过以下其它已知方法来鉴别：如使用合适的抗体的免疫印迹分析、总细胞提取物的斑点印迹、限制性蛋白水解、质谱分析以及其组合。

[0130] 所关注的蛋白质可以通过以下常规方法来分离和纯化：包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、盐分级分离、离子交换色谱法、疏水作用色谱法、凝胶渗透色谱法、亲和色谱法以及

其组合。

[0131] 所关注的分离的蛋白质可以使用本领域中已知的方法来分析它的各种特性例如特异性活性和热稳定性,所述方法中的一些在下文有所描述。

[0132] 本领域普通技术人员能够容易地确定用于执行上述程序以及其它有用方法的条件(参见例如Current Protocols in Protein Science,1995John Wiley&Sons)。

[0133] 在特定实施方案中,本发明的蛋白质可以在不存在它们的起始密码子(甲硫氨酸或缬氨酸)和/或在不存在它们的前导(信号)肽的情况下产生和/或使用来促进重组蛋白的产生和纯化。已知的是,不具有编码前导肽的序列的克隆基因将蛋白质限制于宿主细胞的细胞质内并且将促进它们的恢复(参见例如Glick,B.R.和Pasternak,J.J.(1998)在"Molecular biotechnology:Principles and applications of recombinant DNA"中,第2版,ASM Press,Washington D.C.,第109-143页)。

[0134] 根据一些实施方案的合成产生

[0135] 本发明的蛋白质可以通过蛋白质合成领域技术人员已知的任何技术来合成。对于固相蛋白质合成来说,许多技术的概述可以发现于:Stewart,J.M.和Young,J.D.(1963),"Solid Phase Peptide Synthesis,"W.H.Freeman Co.(San Francisco);以及Meienhofer,J(1973)."Hormonal Proteins and Peptides,"第2卷,第46页,Academic Press(New York)。为了查看经典溶液合成,参见Schroder,G.和Lupke,K.(1965).The Peptides,第1卷,Academic Press(New York)。

[0136] 一般来说,肽合成方法包括将一个或多个氨基酸或适当保护的氨基酸顺序添加至生长的肽链。正常来说,第一氨基酸的氨基或羧基受到合适的保护基团的保护。受保护或衍生的氨基酸然后可以在适于形成酰胺键的条件下通过添加序列中的下一个氨基酸(所述氨基酸具有一个受到适当保护的互补基团(氨基或羧基))来附接至惰性的固体支持物或用于溶液中。然后将所述保护基团从这个新添加的氨基酸残基中去除并且之后添加下一个氨基酸(受到适当保护),以此类推;传统上来说,这个过程同样以洗涤步骤结尾。在将所有所需氨基酸都连接在合适的序列中之后,顺序地或同时去除任何剩余的保护基团(以及任何固体支持物)以获得最终肽化合物。通过对这个一般程序进行简单修改,可能例如通过对保护的三肽和受到适当保护的二肽进行偶联(在手性中心不发生外消旋化的条件下),脱保护后得到五肽,以此类推来同时将一个以上氨基酸添加至生长的链。

[0137] 美国专利号6,472,505中公开了对肽合成的另外的描述。

[0138] 本领域普通技术人员在参阅以下不意图具有限制性的实施例之后将清楚明白本发明的另外的目标、优点以及新颖特征。此外,上文描述和下文权利要求部分要求保护的本发明的各个实施方案和方面中的每一个将在以下实施例中找到实验支持。

[0139] 序列

[0140]

SEQ ID No.	鉴别	序列
1	人 FasL	MQQPFNYPYPQIYWVDSSASSPWAPPGTVLPCPTSVPRRPGQ RRPPPPPPPPPLPPPPPPPPLPPLPLPP LKKRGNHSTGLCLLVMFFMVLVALVGLGLGMFQLFHLQKE LAELRESTSQMHTASSLEKQIGHPSPPPEK

[0141]

		KELRKVAHLTGKSNSRSMPLEWEDTYGIVLLSGVKYKKGGL VINETGLYFVYSKVYFRGQSCNNLPLSHK VYMRNSKYPQDLVMMEGKMMSYCTTGQMWARSSYLGAV FNLTSADHLYVNVSELSLVNFEESQTFFGLYK
2	人 TNF-α	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAG ATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRDLSLI SPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRANA LLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLF KGQGCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPE GAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSA EINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
3	人 Trail	MAMMEVQGGPSLGQTCVLIVIFTVLLQSLCVAVTYVYFTNE LKQMQDKYSKSGIACFLKEDDSYWDPNDE ESMNSPCWQVKWQLRQLVRKMILRTSEETISTVQEKQQNISP LVRERGPQRVAAHITGTRGRSNTLSSPN SKNEKALGRKINSWESSRSGHSFLSNLHLRNGELVIHEKGFY YIYSQTYFRFQEEIKENTKNDKQMVQYI YKYTSYPDPILLMKSARNSCWSKDAEYGLYSIYQGGIFELKE NDRIFVSVTNEHLIDMDHEASFFGAFLV
4	人 Tweak	MAARRSQRRRGRRGEPGTALLVPLALGLGLALACLGLLLAV VSLGSRASLSAQEPAQEELVAEEDQDPSE LNPQTEESQDPAPFLNRLVRPRRSAPKGRKTRARRAIAAHYE VHPRPGQDGAQAGVDGTVSGWEEARINS SSPLRYNRQIGEFIVTRAGLYYLYCQVHFDEGKAVYLKLDLL
		VDGVLALRCLEEFSATAASSLGPQLRLC QVSGLLALRPGSSLRIRTLPWAHLKAAPFLTYFGLFQVH

[0142] 实施例1

[0143] 脐带血细胞离体暴露在死亡配体中

[0144] 体外死亡受体活化的细胞凋亡活性

[0145] TNF超家族的主要活性是转导细胞凋亡信号。将在征得同意后从足月分娩获得的新鲜的脐带血(UCB)暴露于未补充生长因子的FasL和TNF-α的液体培养物中，持续不同的时间段。大量UCB培养物内的门控$CD34^+$祖细胞显示出随着时间的变化，细胞凋亡率降低，并且敏感度增加(图1A)，然而，通过暴露于TNF家族的死亡配体并未增强细胞凋亡细胞死亡。上文已表明对细胞凋亡信号传导不敏感是由受体在造血祖细胞内的低水平表达引起的。分析揭示出Fas和TNF受体在门控$CD34^+$和分离的lin^-祖细胞中的表达比在大量UCB群体中的低(图1B)。对表达受体的细胞的子集的更集中的评价示出对$CD34^+$祖细胞的细胞凋亡的过高的敏感度，然而，除了一个另外之外，细胞凋亡并不通过同源受体来诱导(图1C)。在TNF-α中的短期暴露(小于24小时)是表达TNF-R1和TNF-R2两者的$CD34^+$细胞的可检测的受体介导的细胞凋亡的唯一情况。这些数据表明死亡受体的表达是对液体培养物中的同步细胞凋亡尤其敏感的细胞的特征。细胞凋亡的变化可能起因于不同的增殖率，然而，对受体阳性$CD34^+$祖细胞的细胞凋亡的增加的敏感度与同样未受到同源配体的存在的影响的降低的增殖率相关联(图1D)。

[0146] 为了界定UCB细胞的哪些子集对细胞凋亡敏感，将进一步评定髓样细胞系和淋巴细胞系。虽然$CD3^+$T细胞表达高水平的Fas，但在$CD33^+$髓细胞中占主导的是TNF受体(图1E)。在所有谱系阳性子集中，TNF-R1的表达水平通常比TNF-R2高。在用死亡配体的细胞凋亡攻击中暴露48小时揭示出与在很大程度上不受配体的存在的影响的lin^-祖细胞相比，所有谱系阳性子集的过高的同步细胞凋亡率(图1F)。观察到两个显著的例外：a)与UCB嗜中性细胞对应，表达高水平TNF受体的$CD14^-CD33^+$髓细胞中的Fas介导的细胞凋亡；以及b)$CD3^+$T细胞中TNF诱导的细胞凋亡。UCB衍生T细胞对液体培养物内的细胞凋亡的抗性通过这个抗原不耐受的子集的原初性质来解释，所述抗原不耐受的子集要求刺激来敏化成AICD型阴性调控。因此，未受刺激的UCB细胞在培养物中的细胞凋亡通过CD 19^+B淋巴细胞和髓细胞($CD14^+$，$CD33^+$)的死亡，以及TNF家族受体在不同子集中的选择性细胞凋亡功能来控制。

[0147] SCID种群重建细胞和长期培养起始细胞对受体介导的细胞凋亡具有抗性

[0148] 若干替代测定被采用来评价逐步定向祖细胞的功能，所述替代测定包括SCID种群重建细胞(SRC)、长期起始细胞(LTC-IC)以及短期集落测定。SRC活性部分与人重建细胞相容并且用于样品内最原始祖细胞的替代功能测定。使用移植之前用和未用FasL和TNF-α孵育的同等起始数量的细胞，因为异种嵌合水平的较大变化性使得无法精确评价增强的移入(图2A)。SRC功能在移植之前在FasL和TNF-α中暴露24至48小时之后被保存下来(图2B至图2D)，从而表明最原始的造血前体对液体培养物中的同步的且受体介导的细胞凋亡不敏感。延长的离体孵育与人造血祖细胞的移入能力的缺失相关联，而不管是否存在FasL和TNF-α(图2E)。UCB细胞在补充有趋化因子和生长因子的液体培养基中的延长的离体孵育与表型的显著变化相关联并且已知所述延长的离体孵育会减少免疫缺损的小鼠体内的细胞清理(cell horning)和移入。然而，与将不充分的SRC移入归因于通过死亡配体进行的受体介导的细胞凋亡的先前研究不同，延长的培养的不利影响在很大程度上取决于膜死亡受体的活化。

[0149] 在延长的离体培养期之后不充分的人细胞移入与细胞周期G0/G1期的增殖和排出相关联。UCB细胞、$CD34^+$以及lin^-祖细胞的增殖率(图2E)和细胞周期阶段(图2F)两者在孵育

48小时之后均不受FasL和TNF-α的存在的影响。在存在死亡配体下保存大量有丝分裂期静止的祖细胞解释了同等水平的SRC移入，所述移入SRC受限于处于G0/G1的细胞。

[0150] 用于造血祖细胞活性的替代的离体测定包括间充质细胞的长期培养(LTC-IC)，这表示比集落更原始的子集通过半固体甲基纤维素培养物中的定向祖细胞来形成。在长期培养的整个5周时间期间在对基质细胞有毒的浓度的FasL和TNF-α中的暴露并未影响LTC-IC活性(图2G)，与$CD34^+$和lin^-祖细胞对Fas和TNF受体介导的细胞凋亡信号传导的总抗性相一致。因此，尽管在死亡配体中的暴露的期间因各个UCB子集对细胞凋亡的固有的不同的敏感度引起了对活子集的组合物的显著调节，但最原始祖细胞的SRC和LTC-IC活性被保存下来，从而反映出对受体介导的细胞凋亡的抗性。

[0151] 通过消除死亡细胞富集髓样祖细胞

[0152] 对UCB细胞的各个子集的同步的且受体诱导的细胞凋亡的固有敏感度会导致离体孵育之后活细胞的组合物的显著变化。例如，在用有毒剂量FasL孵育48小时之后，活的谱系阴性细胞出现显著富集，而用TNF-α孵育导致活的髓细胞的相对富集(图3A)。据推测，在暴露于死亡配体之后祖细胞中的富集将增强半固体培养物内的集落活性。集落形成单元(CFU)频率的变化可以在通过ficoll沉降并且将同等数量的活的UCB细胞铺在用干细胞因子(SCF)、白细胞介素-3(IL-3)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)刺激的半固体甲基纤维素培养物(图3B)内来去除死亡细胞之后进行评价。与成熟的UCB细胞的主要细胞凋亡相一致，CFU-GM频率在FasL和TNF-α中暴露48小时之后在对照培养物中分别从1:143增加至1:37和1:31(图3C)。虽然在孵育48小时之后观察到了最大富集，但超过这个时段的延长的离体培养对定向髓样祖细胞的功能产生有害后果。这个测定揭示出对UCB样品内的非祖细胞的受体介导的选择性消除，但类似的总细胞凋亡率会使CFU-GM频率增加4至5倍。

[0153] TNF家族受体之间的串扰(Cross-talk)不会敏化到细胞凋亡

[0154] TNF家族受体/配体相互作用的特征在于部分同源物但不同的受体活化特异性。大多数配体结合若干同源受体，然而，并不存在受体通过若干配体的已知的交叉活化。这个家族内的串扰因此通过响应于另一个TNF家族受体的活化而诱导上调受体来介导。串扰的最知名的实例是在TNF受体在$CD34^+$祖细胞中活化之后诱导的Fas表达。为了确定TNF诱导的Fas表达是否将UCB细胞敏化到细胞凋亡，首先将细胞暴露于TNF-α并且然后暴露于FasL(图4A)，从而导致对Fas受体的显著上调(图4B)。虽然Fas^+细胞在第二天培养期间通过暴露于FasL诱导到细胞凋亡，但UCB细胞、门控$CD34^+$以及分离的lin^-祖细胞相对来说受到了TNF-α的存在的保护(图4C)，从而表明Fas表达的上调与对细胞凋亡的敏感性是无关的。通过配体介导消除细胞凋亡敏感细胞进行的祖细胞富集的功能测定示出联合暴露于FasL和TNF-α会增加CFU-GM频率(图4D)并且相一致地，将UCB细胞联合暴露于两种配体并不会损害SRC体内活性(未示出)。这些数据记录了造血祖细胞对通过两个独立路径进行的细胞凋亡信号转导、它们的联合活化以及TNF家族受体之间的串扰的抗性。

[0155] 在UCB细胞的离体扩展期间耗尽分化细胞

[0156] 脐带血是在激进的放射化学疗法之后用于重建免疫造血系统的造血祖细胞的优质来源，然而，具有两个重大缺点：细胞数量小以及移入缓慢。为了克服这些限制，已开发出在移植之前离体扩展UCB细胞的多种方法。细胞在数值上扩展并且祖细胞变得活化，从而提高造血重建的质量。据推测，将细胞培养物暴露于TNF家族配体将通过限制分化细胞的集落

扩展来将相对优势赋予更原始的祖细胞，所述限制并不会显著影响移入的效率。使用增加$CD34^+$祖细胞的分数(图5A)和绝对数量(图5B)的标准扩展方案，在第三周最后一周离体培养期间补充FasL会导致$CD34^+$子集的进一步显著扩展。为了确定SRC(用于人造血祖细胞的最原始测定)的频率和功能，将来自同一UCB单元的同等数量UCB细胞移入到用白消安调节的免疫缺损的NOD.SCID小鼠体内(图5C)。在第三周培养期间暴露于FasL会导致同等和/或更高水平的人造血异种嵌合(图5D)，从而突出祖细胞的功能得到改进。各个小鼠体内移入的较大变化性使得无法准确地确定增加数量的扩展的$CD34^+$祖细胞的良好功能性。因此，选择性耗尽细胞凋亡敏感细胞是增加用于移植的离体扩展的UCB祖细胞的分数和数量的有效方式。

[0157] 实施例2

[0158] 动员的外周血液细胞离体暴露在死亡配体中

[0159] 体外死亡受体活化的细胞凋亡活性

[0160] 用于移植的造血祖细胞的普遍来源是在用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或c-kit和CXCR4拮抗剂动员之后的外周血液。随后通过单采血液成分术从外周血液收集动员的单核细胞，所述单核细胞含有大量$CD34^+$祖细胞。从外周血液收获的细胞通常是活化的，因此暴露于死亡配体用于选择性耗尽的时期明显较短。与针对UCB细胞所呈现的数据的另一个区别是使用冷冻保存的mPB样品，所述样品的解冻与细胞的15％至25％的细胞凋亡死亡相关联。Fas表达在约25％的$CD34^+$祖细胞(图6A)以及大部分B淋巴细胞和髓细胞(50％至65％，图6B)中。TNF受体主要表达在谱系阳性mPB细胞中，其中主要表达是TNF-R1。在简短的培养之后，Fas表达下降(图6C)，而所有子集显示出TNF-R2的显著上调(图6D)。这些数据揭示出死亡受体表达在解冻的mPB细胞内的动态变化，所述动态变化在一方面受到Fas^+细胞的死亡的影响并且在另一方面受到TNF-R2的上调的影响。

[0161] 虽然25％至45％的谱系阳性细胞在离体孵育4小时内是细胞凋亡的，但这些细胞的60％至90％在孵育16小时内被诱导到细胞凋亡(图6E)。FasL和TNF-α的存在并不会显著衰减培养基中观察到的谱系阳性细胞的高细胞凋亡率。UCB细胞的最显著变化是动员的外周血液(mPB)内，在较短时间内通过配体诱导到细胞凋亡的活化的$CD3^+$T细胞子集。对受体介导的细胞凋亡的这些相对敏感性会导致活细胞的组合物的显著变化，其中在孵育4小时之后T细胞显著减少并且在孵育16小时之后B淋巴细胞和髓细胞显著减少。在两个时间点上，将选择性耗尽$CD3^+$T细胞，从而使具有$CD34^+$祖细胞的活的部分富集起来(图6F)。因此，用死亡配体短暂地孵育动员的外周血液会耗尽成熟细胞的子集并且使冷冻保存的mPB样品内的祖细胞富集起来。

[0162] 耗尽对Fas交联敏感的mPB衍生的T细胞会改善移植物抗宿主疾病

[0163] mPB细胞移植体内发病的最显著的病因是GvHD，这是外周血液内T细胞的活化的固有状态的结果。为了评定FasL对异种GvHD的影响，将来自同一单元的暴露于和未暴露于配体的1.5×10^7个活的mPB移入NOD.SCID小鼠体内。用FasL预孵育4小时会使所有小鼠存活，而在培养基中孵育会引起三分之一的接受者的死亡(图7A)。幸存者显示出相似水平的人造血嵌合(图7B)，从而再次证明mPB内的SRC对Fas介导的细胞凋亡具有抗性。严重的GvHD是用培养基中孵育的mPB接种的小鼠死亡的病因，如由严重的体重损失(图7C)、临床评分(图7D)以及肝组织学(图7E)确定。存活和异种GvHD的所有这些特征通过使mPB细胞短暂地暴露于

FasL来缓解。此外，从功能测定明显的是，尽管总细胞凋亡率明显相似，但配体的存在会影响谱系阳性mPB细胞的不同子集。

[0164] 暴露于死亡配体增加了髓样祖细胞的频率

[0165] mPB培养物内活的子集的组合物在简短的孵育之后反映出mPB衍生的免疫细胞对由Fas和TNF受体介导的细胞凋亡的不同敏感性。细胞的相对分布与孵育4小时期间$CD3^+$T细胞对细胞凋亡的高敏感性以及更长的孵育时间期间$CD19^+$B淋巴细胞和$CD33^+$髓细胞的随后死亡相一致(图8A)。这些变化表明mPB样品的祖细胞的频率可以通过用死亡配体简短孵育并且消除死亡细胞来增加(图8B)。暴露于FasL和TNF-α会导致髓样祖细胞的4倍富集，从而使在培养基中孵育之后观察到的富集加倍(图8C)。与UCB细胞相似，暴露于死亡配体会导致增加的CFU频率，然而，与UCB细胞不同的是，mPB在死亡配体中得到暴露时间更短。这些数据补充了所提出的功能性消除GvHD效应物的效率和安全性，从而示出细胞凋亡不敏感的祖细胞被显著富集。

[0166] 暴露于FasL的预移植并不损害免疫和移植物抗肿瘤反应性

[0167] 使用选择性T细胞耗尽来预防和降低GvHD严重程度的实验中的关键问题是移植物是否保留引起强有力的移植物抗肿瘤反应的能力。尽管组合物中存在这些变化，但在培养基中并用FasL孵育的mPB保存了抵抗辐射的同种异体人mPB刺激物的反应性(图8D)。相一致的是，暴露于和未暴露于FasL的mPB的接种对携带皮下HT29人结肠癌肿瘤的免疫缺损的小鼠体内的肿瘤生长压制具有类似的效果(图8E)。因此，暴露于FasL的未受刺激的冷冻保存的mPB细胞压制致命GvHD，促进移入并且保留GvT反应性。

[0168] 实施例3

[0169] T细胞的预移植耗尽预防致命GvHD

[0170] 通过离体选择性耗尽宿主敏化T细胞来预防致命GvHD

[0171] 物理耗尽来自供体接种物的T细胞以及FasL介导消除宿主反应性T细胞能可靠地预防GVHD。单倍同一性鼠移植体(父母到子女)代表极高风险的GvHD，特征在于高死亡水平。在第一阶段，实验使用以下进行概述：在对宿主抗原敏化之后，通过细胞凋亡信号来耗尽T细胞。抗原特异性体外敏化2至3天引起对同时上调Fas及其同源配体的反应性T细胞的T细胞受体(TCR)-介导的刺激，从而导致细胞凋亡级联与保护性抗细胞凋亡机制的下调的同时执行。为了将这个程序与使用未延长离体孵育的细胞凋亡配体中的简短暴露的测试方法进行比较，将对供体预免疫来对抗宿主体内抗原(图9A)。正如所预期的，使敏化的脾细胞暴露于FasL在$CD4^+$和$CD8^+$T细胞两者中诱导了显著的细胞凋亡(图9B)。敏化的功效可从以下看出：与第三方($H2K^k$)抗原相比较，从用BALB/c淋巴细胞($H2K^d$)免疫来对抗刺激的$H2K^d$同种异体抗原的B6小鼠($H2K^b$)收获的淋巴细胞的更强的增殖反应(图9C)。这些反应在将反应者在对照培养基中简短(24小时)孵育之后仍将保持，然而添加FasL会降低预敏化的脾细胞对$H2K^d$刺激物的反应性。对第三方$H2K^k$抗原的反应被保存下来。

[0172] 为了评价FasL暴露对敏化的脾细胞引起GvHD的能力的影响，将来自$H2K^d$免疫的$H2K^b$亲本供体的活细胞过继转移到经亚致命性辐射的单倍同一性F1接受者体内($H2K^b \rightarrow H2K^{b/d}$)。输注对照培养基中孵育的预敏化的脾细胞会引起严重的GvHD，从而在引起所有小鼠死亡的脂多糖(LPS)攻击之后变得同样致命(图9D)。LPS攻击引起炎性细胞因子的强有力的免疫活化和释放，从而使正在进行的最大GvHD反应加剧并且促发死亡。对比之下，在输注

之前用FasL对来自预敏化的供体的脾细胞进行离体孵育会使50％的小鼠存活下来，甚至是在施用LPS之后的情况下。这个体内模型证实先前研究示出同种异体抗原驱动淋巴细胞刺激会完善可以使用促细胞凋亡剂特异性消除的GVHD引起的效应物细胞群体。

[0173] 通过离体选择性耗尽未受刺激的T细胞来预防致命GvHD

[0174] 我们推测，将供体淋巴细胞以预移植方式暴露于宿主抗原可能会增强T细胞刺激，并且这些异体反应可能会因培养物内生成的一些效应/记忆淋巴细胞子集对Fas介导的细胞凋亡的有限敏感性或因Fas交联无法完全消除所有同种异体反应性T细胞而持续下去。此外，将这种预敏化方法临床采用于人供体：宿主对可能相当具有挑战性。在同种异体反应性T细胞的FasL选择的更简单和更可靠的模型的研究中，将对孵育技术进行修改来使用先前并未暴露于接受者同种异体抗原的原初供体细胞(图9E)。在新方法中，在先前或同时未暴露于宿主抗原的情况下并且在不存在增殖刺激物下，通过暴露于含有FasL的培养基中来离体耗尽原初脾细胞。FasL增加了原初$CD4^+$和$CD8^+$T细胞的细胞凋亡(图9F)，然而，异体反应却保存在随后受到体外刺激的活细胞内(图9G)。因此，将未受刺激的脾细胞暴露于FasL保存了细胞凋亡不敏感细胞对同种异体抗原作出反应的能力。

[0175] 为了评定离体消除未受刺激的淋巴细胞的影响，将活淋巴细胞输注到经亚致命性辐射的单倍同一性F1接受者体内($H2K^b$-GFP→$H2K^{b/d}$)。在培养基中孵育的未敏化的淋巴细胞是致命GvHD的不太强效的介体，因此LPS用于诱导细胞因子风暴并且使供体淋巴细胞的活性极化。LPS攻击之后经过FasL预处理的未受刺激的脾细胞的接受者的70％存活优于离体耗尽宿主刺激的脾细胞的接受者的存活，而对照培养基中孵育的脾细胞的所有接受者体内都将促发致命的GvHD(图9H)。因此，在先前未暴露于宿主抗原的情况下，用FasL对供体淋巴细胞进行处理将预防高风险关联F1杂种急性GVHD模型中的致命GvHD(包括LPS攻击)。

[0176] GvHD预防的定量和定性方面

[0177] 在对照培养基中孵育之后过继转移活淋巴细胞会在经亚致命性辐射的单倍同一性F1接受者体内引起明显的GvHD，所述GvHD可通过使用FasL的供体细胞预孵育来削弱(图10A)。剂量依赖性体重减轻是培养基中孵育的单倍同一性脾细胞的接受者体内递增的GVHD严重程度的证据(图10B)。对比之下，输注了已用FasL预孵育的原初亲本脾细胞的F1杂种小鼠的体重损失显著减少，这与GvHD严重程度的改善相一致。单倍同一性移植体($H2K^b$→$H2K^{b/d}$)内的临床GvHD评分(图10C)和体重损失(图10D)超出同种异体小鼠组合($H2K^b$→$H2K^d$)中观察到的那些，并且相一致的是，用FasL进行预孵育的保护性效果比同种异体移植体内的GvHD预防更有效。值得注意的是，1.5×10^6至5×10^6个T细胞在小鼠体内的过继转移与60×10^6至200×10^6个T细胞/kg的剂量在人体内的过继转移是等效的，而通过表型T细胞耗尽来预防GvHD的安全阈值是单倍同一性移植体内的0.02×10^6个T细胞/kg。

[0178] 为了评价不同实验组内幸存者的免疫曲线差异，将在LPS攻击之前和之后2天评定脾的组成(图10E)。所有T和B细胞子集在经亚致命性辐射之后的第一周期间减少，而不管是否过继转移脾细胞。对照培养集中孵育的淋巴细胞的接受者对LPS的反应是脾的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞以及B淋巴细胞的突增($p<0.001$)，所述反应在经过FasL预处理的脾细胞的接受者体内是显著衰减的($p<0.001$)。与未分级的脾细胞相比较，使用纯化T细胞的这些实验的重复示出了类似的结果(未示出数据)。

[0179] NOD.SCID小鼠体内对GvHD的刺激确定在死亡配体中离体暴露的时间

[0180] 通过选择性耗尽未受刺激的供体T细胞来预防GvHD对涉及两个可能的机制提出了疑问。首先，部分免疫和亚致命性辐射诱导的髓耗尽表明残余的宿主免疫元素可能成功地发挥作用来抵抗FasL耗尽的供体T细胞，从而导致对GvHD的压制。其次，用全身辐射调节诱导对GvHD的传入臂起到重要作用的组织损伤。为了评定这两个机制，在未进行预移植调节的情况下将疾病诱导到缺乏淋巴细胞的NOD.SCID小鼠体内。未受刺激的脾细胞在FasL中暴露24小时和48小时会引发显著的细胞凋亡(图11A)，其中$CD4^+$和$CD8^+$活的T细胞的部分相应减少(图11B)。

[0181] 在一系列校正实验之后，在含有FasL的培养基中分别离体孵育24小时或48小时之后，向NOD.SCID小鼠输注3×10^6或10^7个原初同种异体脾细胞($H2K^b\rightarrow H2K^{g7}$)(图11C)。输注培养基中孵育的脾细胞在较高剂量下会引起约20％的死亡率，并且在施用LPS攻击之后记录严重的死亡率(图11D)。FasL孵育对供体淋巴细胞介导的致命GvHD的保护性效果再次通过LPS注射之后小鼠的更佳的存活来突出(图11D)。这种保护性效果伴随着临床评分(图11E)和体重损失的显著提高(图11F)。在不存在有效的残余宿主免疫性下并且在未预处理宿主因子如调节诱导的组织损伤的情况下预防NOD.SCID小鼠体内的GvHD突出GvHD主要起因于通过使未受刺激的淋巴细胞暴露于FasL来进行的对供体T细胞接种物的调节。

[0182] 实施例4

[0183] 离体选择性耗尽未受刺激的淋巴细胞对造血细胞移入的影响

[0184] 耗尽Fas敏感原初脾细胞缓解了骨髓移植体内的GVHD

[0185] 为了使类似GvH的模型的发现延伸到移植环境，将在经历单倍同一性BMT连同供体淋巴细胞输注的小鼠体内评定Fas介导耗尽宿主原初细胞的影响(图12A)。接受5×10^6个单倍同一性BMC连同150、300以及450万对照培养基中预孵育的脾细胞($H2K^b\rightarrow H2K^{b/d}$)的辐射的F1接受者显现出严重的GvHD(图12B)和显著的10％至15％的体重损失(图12C)。GvHD的临床评分通过耳朵皮肤和肝物质的组织学分析来确证(图12D)。用FasL将输注的原初脾细胞预孵育24小时降低了临床GvHD评分($p<0.005$)，削弱了体重损失($p<0.005$)并且减少了受影响的靶器官内的淋巴细胞浸润($p<0.005$)。然而，残余的低级GvHD活性却在输注3×10^6至4.5×10^6个FasL预处理的单倍同一性脾细胞之后继续保持。值得一提的是，这种剂量的T细胞与4×10^7至6×10^7个T细胞/Kg的剂量对应，所述剂量是在来自匹配不相关供体的未处理的同种异体全骨髓移植体内经常施用的T细胞的数量。

[0186] 在单倍同一性BMT和细胞凋亡敏感细胞的选择性耗尽之后的免疫-造血重建

[0187] GvHD削弱移植物功能并且完全消除接受者免疫反应。为了确定Fas敏感供体脾细胞的耗尽如何影响移植之后的免疫-造血重建，将针对宿主评定移入的供体淋巴细胞的存活、嵌合以及对不相关抗原的免疫反应性。与FasL预处理的脾细胞的接受者相比较，最高剂量(4.5×10^6)的对照培养基中预孵育的未处理的供体脾细胞的接受者在移植后3周和6周显示出降低水平的嵌合(图13A)，从而证明对供体淋巴细胞的预处理消除了未处理细胞的移植物压制作用。

[0188] 由于在移植时输注的成熟的淋巴细胞与用于外周稳态扩展的骨髓移植物所生成的淋巴细胞竞争并且影响净淋巴细胞数量，所以将检测FasL处理的淋巴细胞输注对淋巴重建的影响。微小的CD45抗原差异(CD45.1对CD45.2)用于区分移植后数周期间接受者体内的输注的脾细胞与BMC移植物衍生的T细胞。尽管事实是F1接受者不排斥亲本免疫细胞，但在

移植后3周，在接受者的外周淋巴器官内几乎检测不到输注的脾细胞($H2K^b$，$CD45.2^+GFP^+$)，而不管它们是用FasL孵育还是用对照培养基孵育(图13B)。从定性上来讲，对照和FasL预处理的脾细胞的接受者如对嵌合小鼠所预期显示出对供体抗原和宿主抗原两者的无反应性，并且对第三方($H2K^k$)抗原反应同样良好(图13C)。因此，用FasL对淋巴细胞进行离体处理似乎不会影响移植后的定量和功能性免疫重建两者，而且GvHD的预防会改进供体细胞移入。

[0189] 我们疑惑的是，通过用FasL预孵育未受刺激的淋巴细胞来预防GvHD是否是由细胞的受损的导航能力引起的。这个可能性通过将活脾细胞输注到经亚致命性辐射的F1接受者体内($H2K^b$-GFP→$H2K^{b/d}$)并且证明淋巴细胞在输注24小时之后归属于接受者的脾和肠系膜淋巴结来评定，而不管细胞是预暴露于FasL还是预暴露于对照培养基(图13D)。这些数据证明淋巴细胞的预暴露会耗尽潜在的GvHD效应物而不损害它们的导航能力。

[0190] 造血细胞在死亡配体中的暴露改进移入

[0191] 耗尽来自造血移植物的所有T细胞会去除移入促进细胞，从而要求补偿性输注大剂量的干细胞。用FasL将移植物预孵育24小时(图14A)并不会影响通过将2×10^6个同种异体($H2K^d$→$H2K^b$)全BMC移植到辐射的宿主体内(图14B)诱导的供体嵌合的水平。因此，在异源全BMC群体在移植之前暴露于死亡配体时移入并不会失效。

[0192] T细胞通过两个机制来支持造血祖细胞移入：a)供体T细胞可以通过残余的供体免疫性来抵抗移植物排斥，以及b)T细胞与骨髓中的接种位点处的祖细胞共存并且通过未鉴别的非免疫原性机制来支持移入。为了确定耗尽细胞凋亡敏感T细胞来预防排斥是否还消除移入促进细胞，将10^6个活的未处理的$H2K^d$ lin^-祖细胞移入到辐射的$H2K^b$小鼠体内。在这个模型中，使用了不含GvHD活性的来自F1供体($H2K^{b/d}$)的脾细胞。在对照培养基中或用FasL孵育之后输注10^6个活的F1脾细胞提高了供体嵌合的水平(图14C)，从而证明耗尽Fas敏感脾细胞并不会消除促进HSPC移入的细胞。

[0193] 供体脾细胞在死亡配体中的预暴露保存了延迟的供体淋巴细胞输注的移入支持活性

[0194] 移植后输注供体淋巴细胞(DLI)是提高供体嵌合，增强对感染的反应性并且促进移植物抗肿瘤反应的有效方法。虽然延迟的DLI耐受更佳并且引起比造血移植时将淋巴细胞输注到调节的接受者体内更少的GvHD，但所述淋巴细胞却具有加重GvHD的严重程度的能力。混合嵌合模型中的延迟的供体淋巴细胞输注(图14E)能有效提高供体嵌合的水平，而不管淋巴细胞是否预移植暴露于FasL(图14F)。因此，耗尽Fas敏感的未受刺激的淋巴细胞并不会损害移植后DLI的功效。

[0195] FasL缓解GVHD而不损害GVT

[0196] 为治疗恶性疾病而进行的干细胞移植的总体成功可能取决于移植物抗肿瘤(GvT)效果。大量耗尽T细胞(离体或通过施用强有力的体内免疫压制)在多种临床情况下可以削弱GvT效果并且增加移植后复发率。将在两个实验模型中检测FasL孵育是否会消除GvT效果，同时对GvHD产生有益影响。在第一个模型中，评定了针对同种异体肿瘤的FasL介导的耗尽之后的宿主匹配的淋巴细胞的GvT反应性的保存。将CT26结肠癌细胞($H2K^d$)植入到过继转移了来自NOD(免疫活性)供体($H2K^{g7}$，图15A)的1.5×10^7个脾细胞的NOD.SCID小鼠体内($H2K^{g7}$)。用FasL预孵育24小时的脾细胞与在对照培养基中孵育的脾细胞相比较在相似的程度上压制肿瘤植入物的生长(图15B)，从而证实用FasL孵育会保存淋巴细胞介导的GvT反应

性。在第二模型中，对携带MHC匹配的成神经细胞瘤肿(Neuro-2a，$H2K^a$)瘤的小鼠进行亚致命性辐射并且将来自同种异体供体($H2K^b$，图15C)的2×10^6个lin^-祖细胞移入其中。输注来自F1供体($H2K^{b/d}$)的将肿瘤认作自体的淋巴细胞对肿瘤生长不具有显著的影响(图15D)。在变化方面来说，输注同种异体脾细胞($H2K^b$)会降低肿瘤生长率，然而，80％的小鼠因严重的GvHD而在3周内死亡。对未受刺激的供体脾细胞($H2K^{b-}$)的Fas介导的离体耗尽示出了同等的肿瘤压制效果，同时缓解了致命GvHD，并且所有小鼠在实验结束时都存活下来。这些数据证实GVHD并非是GvT效果的先决条件，因此GvHD的预防并不会损害选择性耗尽的淋巴细胞的抗肿瘤活性。

[0197] FasL介导的恶性细胞的突增

[0198] 尽管在激进的放射化学疗法之后的自体移植具有显著优点和安全性，但残余恶性细胞对移植物的污染是疾病复发的危险因素。为了评价这个可能性，以对同基因BALB/c小鼠致命的剂量向小鼠输注骨髓细胞和A20B细胞淋巴细胞的混合物(图15E)。虽然输注在培养基中孵育的细胞混合物导致80％的接受者在4周内死亡，但输注了暴露于FasL的移植物的所有小鼠在此期间却存活(图15F)。这些数据记录了用死亡配体短期孵育来耗尽来自造血移植物的细胞凋亡敏感恶性细胞的功效。

[0199] Fas敏感细胞的耗尽预防自体移植体内的自身免疫性的过继转移

[0200] 1型糖尿病是破坏Langerhans胰岛内产生胰岛素的β-细胞的自身免疫反应。这种病症通常在非肥胖的糖尿病小鼠(NOD)体内建立模型，其中30周龄雌性的发病率高于80％。自身免疫糖尿病通过T细胞过继转移，但通过全骨髓细胞的移植进行并没有那么有效。初步实验确定由5×10^7个骨髓细胞将疾病转移到约50％的经亚致命性辐射的NOD.SCID小鼠体内(图15G)，所有菌株均携带相同的单倍型($H2K^{g7}$)。此外，NOD.SCID小鼠不排斥供体细胞，因为它们缺乏有效的T和B淋巴细胞。虽然过继转移在培养基中孵育48小时的BMC能有效转移疾病，但暴露于FasL的BMC的接受者都未显示出高血糖症(图15H)。因此，将造血细胞暴露于死亡配体会离体消除具有自身免疫反应性的细胞。

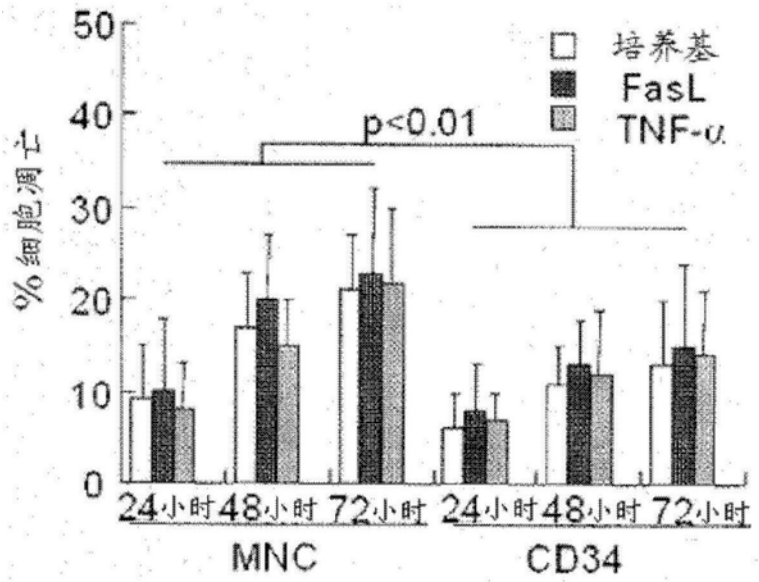

50
40
30
20
10
0
% 细胞凋亡
培养基
FasL
TNF-α
p<0.01
24小时 48小时 72小时
24小时 48小时 72小时
MNC
CD34

图1A

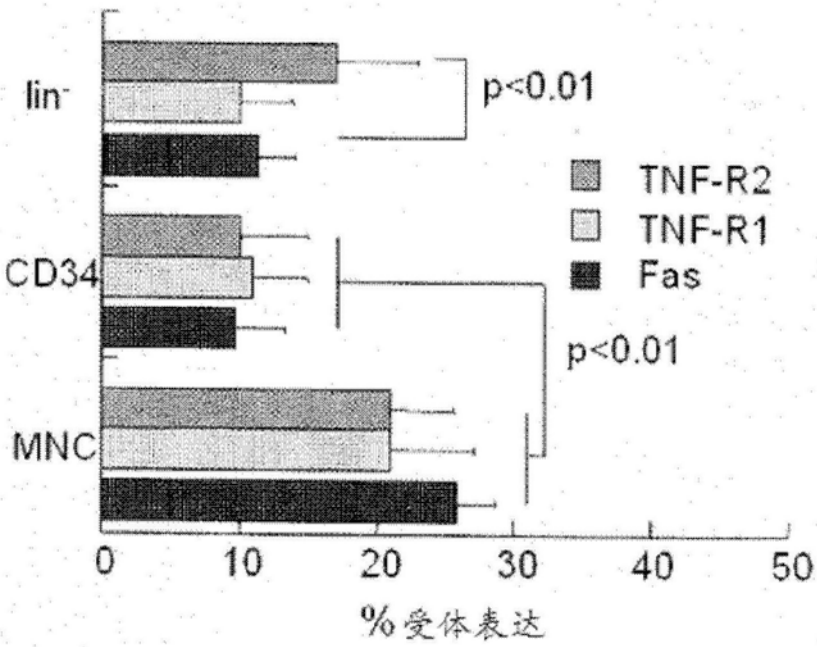

lin-
CD34
MNC
p<0.01
p<0.01
TNF-R2
TNF-R1
Fas
0
10
20
30
40
50
% 受体表达

图1B

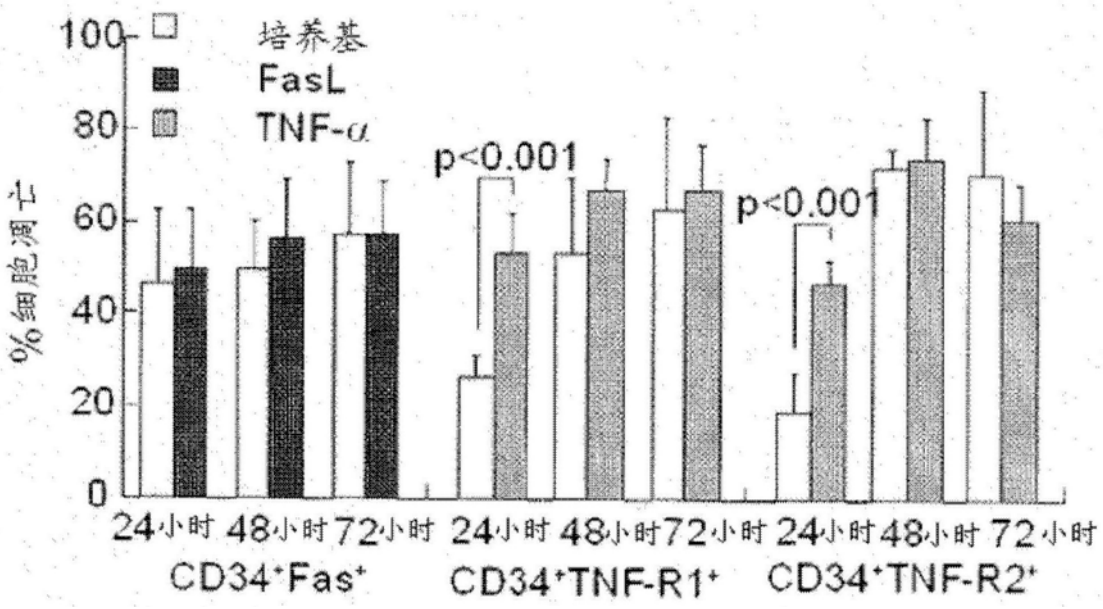

100
80
60
40
20
0
%细胞凋亡
培养基
FasL
TNF-α
p<0.001
p<0.001
24小时 48小时 72小时 24小时 48小时 72小时 24小时 48小时 72小时
CD34+Fas+
CD34+TNF-R1+
CD34+TNF-R2+

图1C

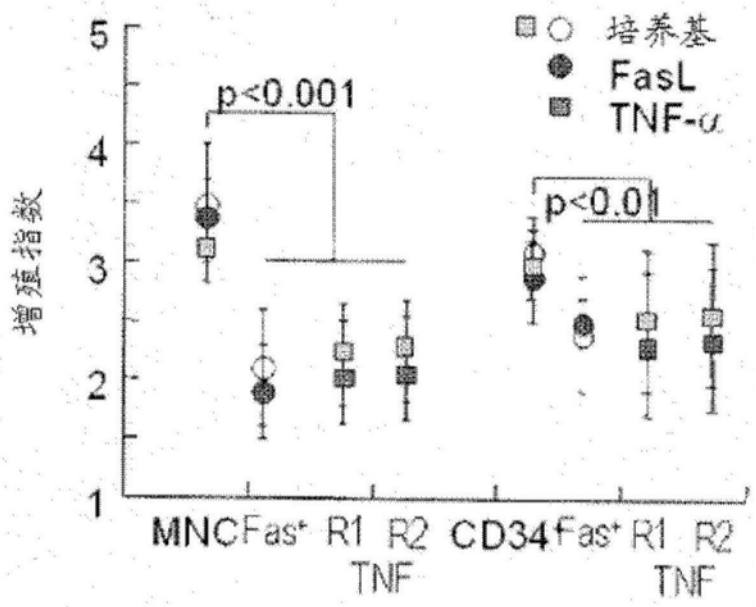

5
4
3
2
1
增殖指数
培养基
FasL
TNF-α
p<0.001
p<0.0
MNC Fas+ R1 R2 CD34 Fas+ R1 R2
TNF
TNF

图1D

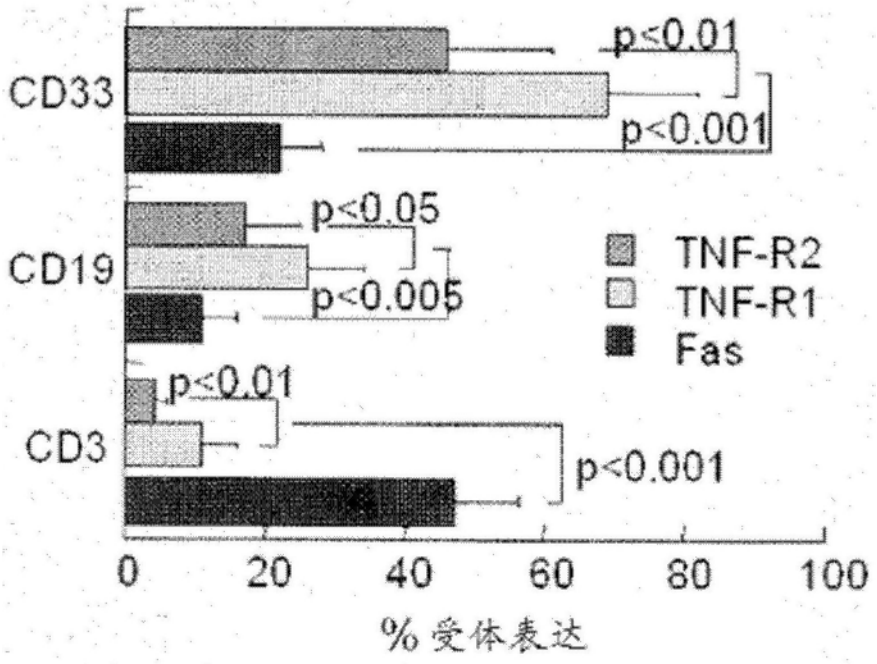

CD33
CD19
CD3
p≤0.01
p<0.001
p≤0.05
p<0.005
p≤0.01
p<0.001
TNF-R2
TNF-R1
Fas
0
20
40
60
80
100
% 受体表达

图1E

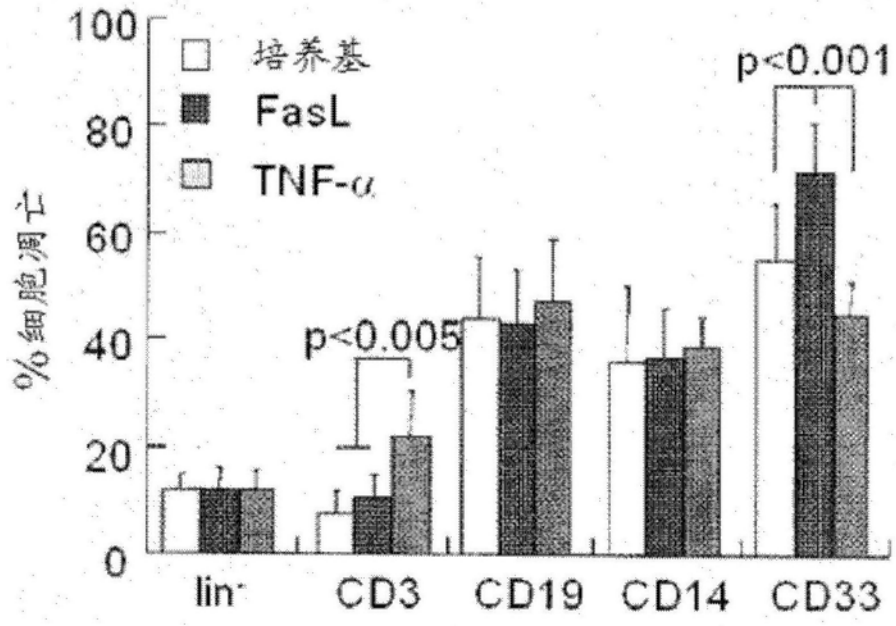

100
80
60
40
20
0
% 细胞凋亡
培养基
FasL
TNF-α
p<0.005
p<0.001
lin-
CD3
CD19
CD14
CD33

图1F

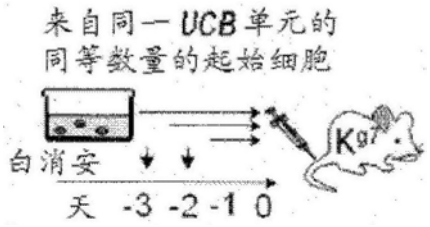

来自同一UCB单元的
同等数量的起始细胞
白消安
天 -3 -2 -1 0

图2A

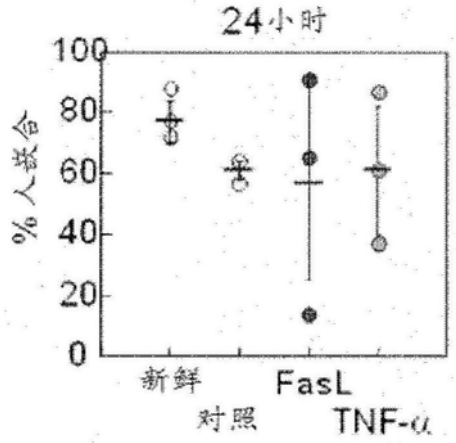

24小时
% 人嵌合
100
80
60
40
20
0
新鲜
对照
FasL
TNF-α

图2B

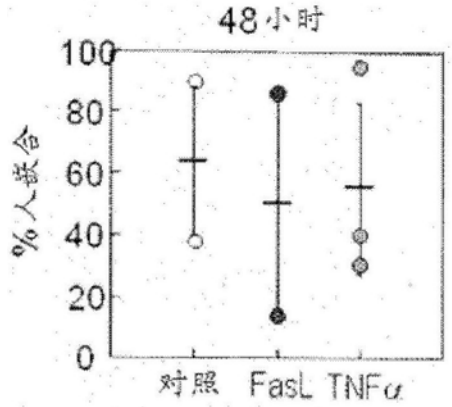

48小时
% 人嵌合
100
80
60
40
20
0
对照
FasL
TNFα

图2C

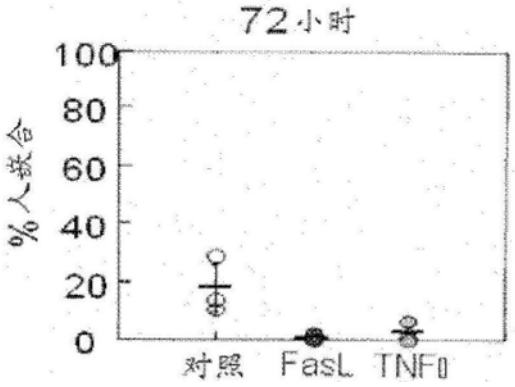

72小时
100
80
60
40
20
0
%人获合
对照
FasL
TNFα

图2D

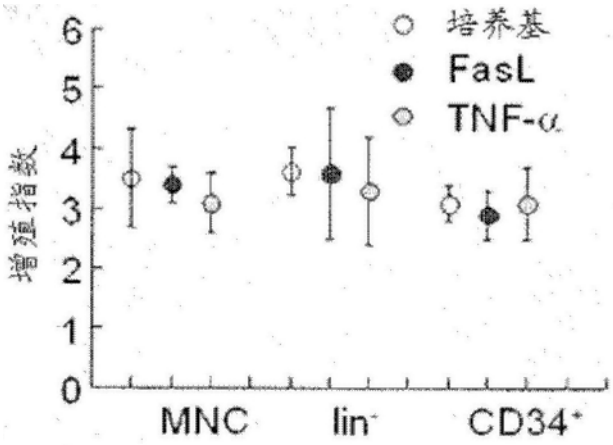

6
5
4
3
2
1
0
增殖指数
培养基
FasL
TNF-α
MNC
lin⁻
CD34⁺

图2E

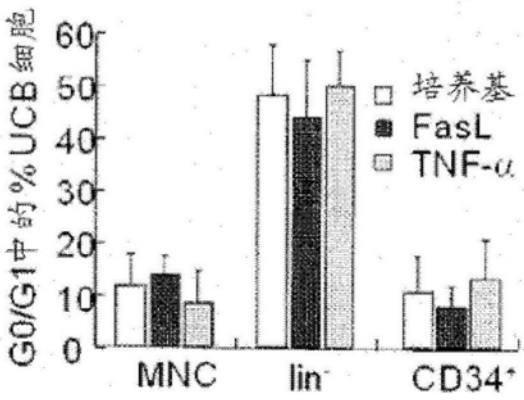

60
50
40
30
20
10
0
G0/G1中的%UCB细胞
培养基
FasL
TNF-α
MNC
lin⁻
CD34⁺

图2F

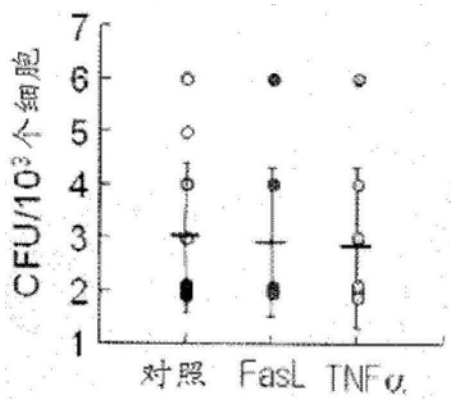

CFU/10³个细胞
7
6
5
4
3
2
1
对照
FasL
TNFα

图2G

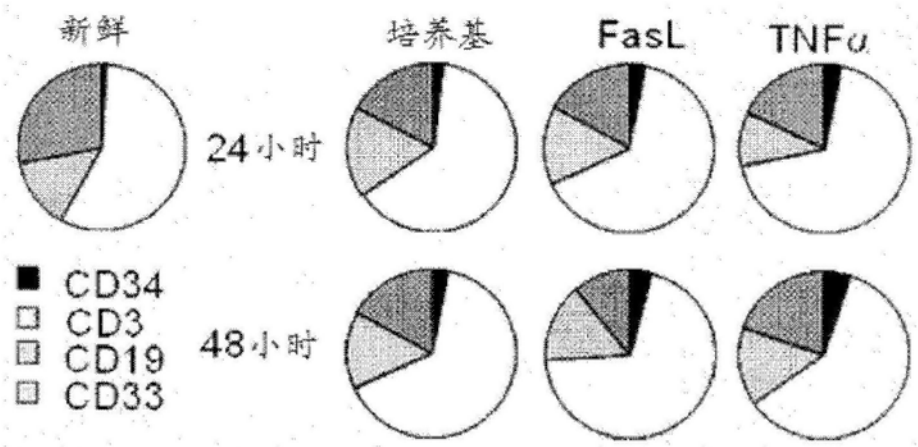

新鲜
培养基
FasL
TNFα
24小时
48小时
CD34
CD3
CD19
CD33

图3A


24至72
小时
配体
ficoll
甲基纤维素

图3B

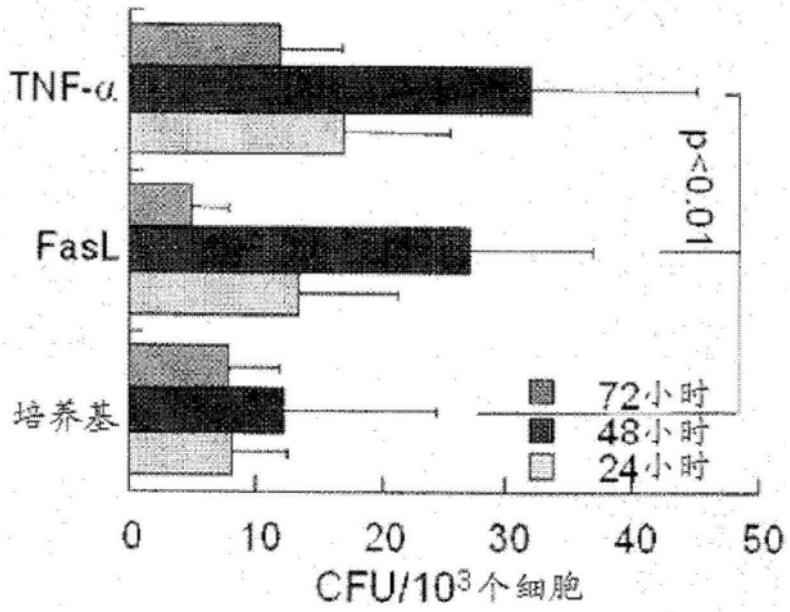

TNF-α
FasL
培养基
p^0.01
72小时
48小时
24小时
0
10
20
30
40
50
CFU/10³个细胞

图3C

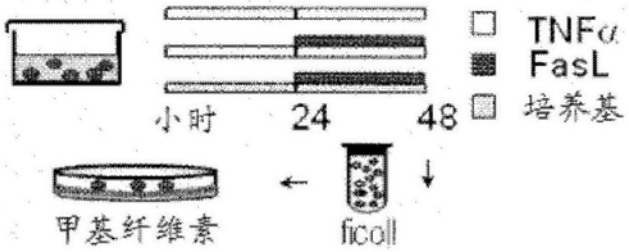

TNFα
FasL
培养基
小时
24
48
甲基纤维素
ficoll

图4A

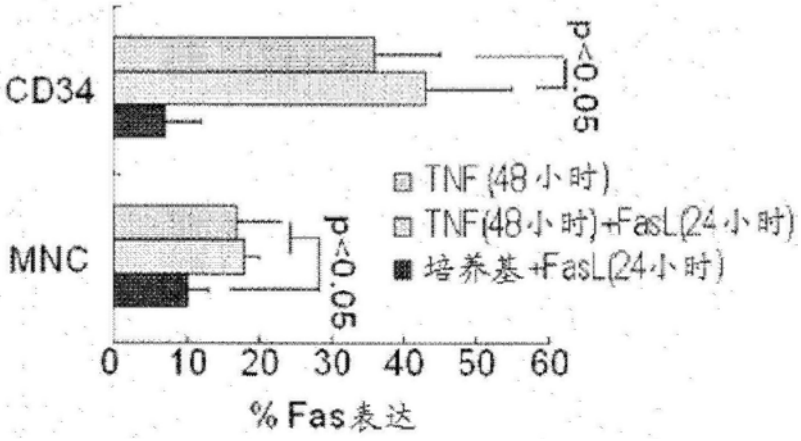

CD34
MNC
p^0.05
p^0.05
TNF(48小时)
TNF(48小时)+FasL(24小时)
培养基+FasL(24小时)
0
10
20
30
40
50
60
%Fas表达

图4B

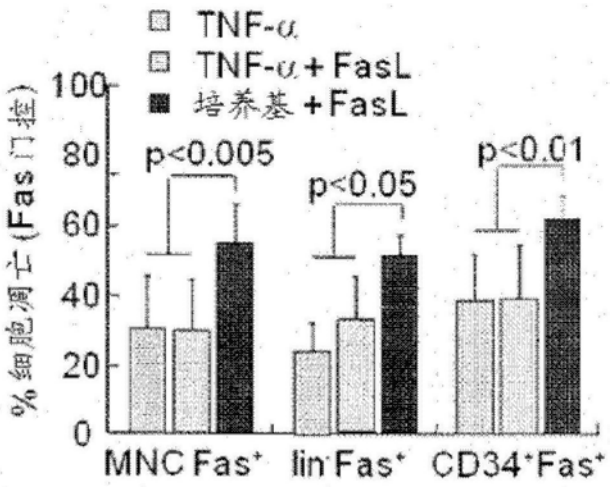

TNF-α
TNF-α+FasL
培养基+FasL
% 细胞凋亡(Fas门控)
100
80
60
40
20
0
p<0.005
p<0.05
p<0.01
MNC Fas+
lin- Fas+
CD34+Fas+

图4C

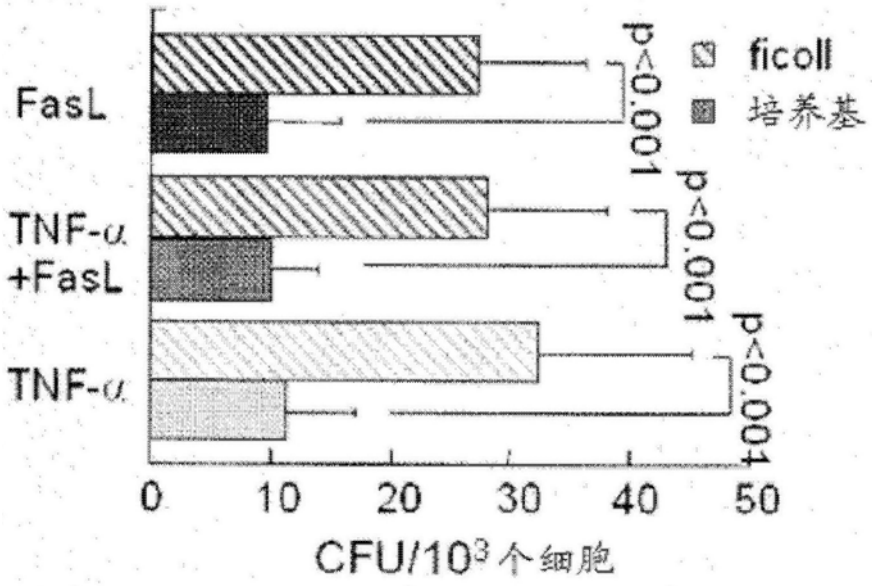

FasL
TNF-α
+FasL
TNF-α
ficoll
培养基
p<0.001
p<0.001
p<0.001
0
10
20
30
40
50
CFU/10³个细胞

图4D

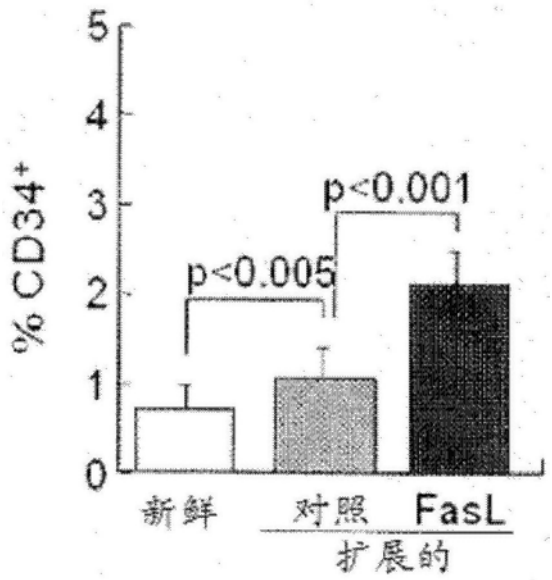

% CD34+
5
4
3
2
1
0
p<0.001
p<0.005
新鲜
对照
FasL
扩展的

图5A

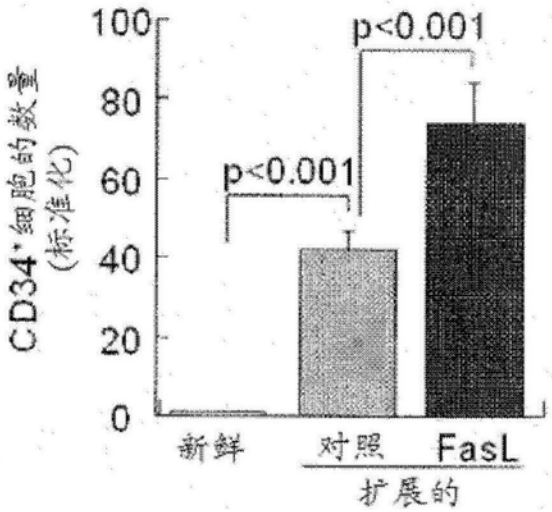

CD34+细胞的数量
(标准化)
100
80
60
40
20
0
p<0.001
p<0.001
新鲜
对照
FasL
扩展的

图5B

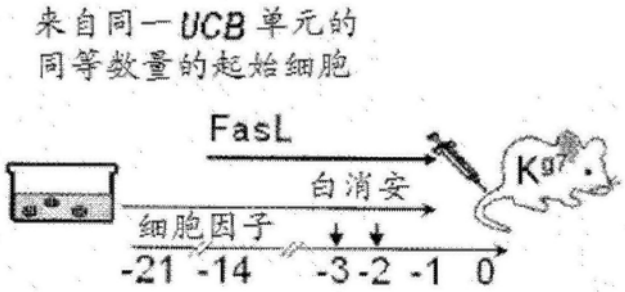

来自同一UCB单元的
同等数量的起始细胞
FasL
白消安
细胞因子
-21 -14 -3 -2 -1 0

图5C

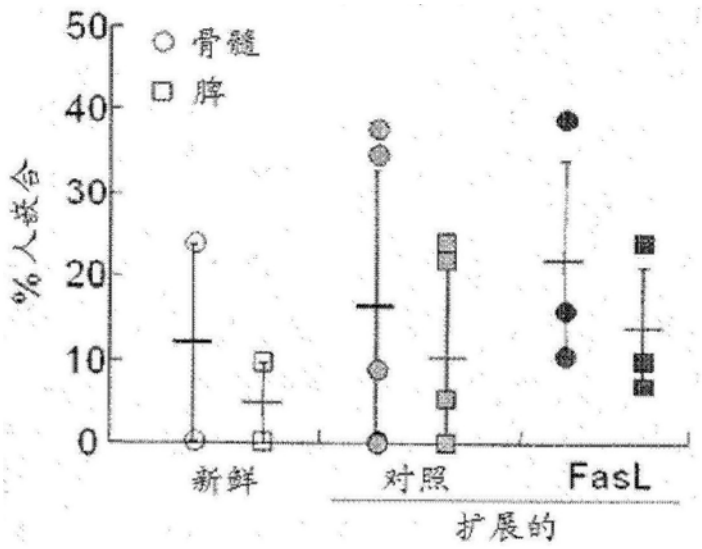

50
40
30
20
10
0
骨髓
脾
%人嵌合
新鲜
对照
FasL
扩展的

图5D

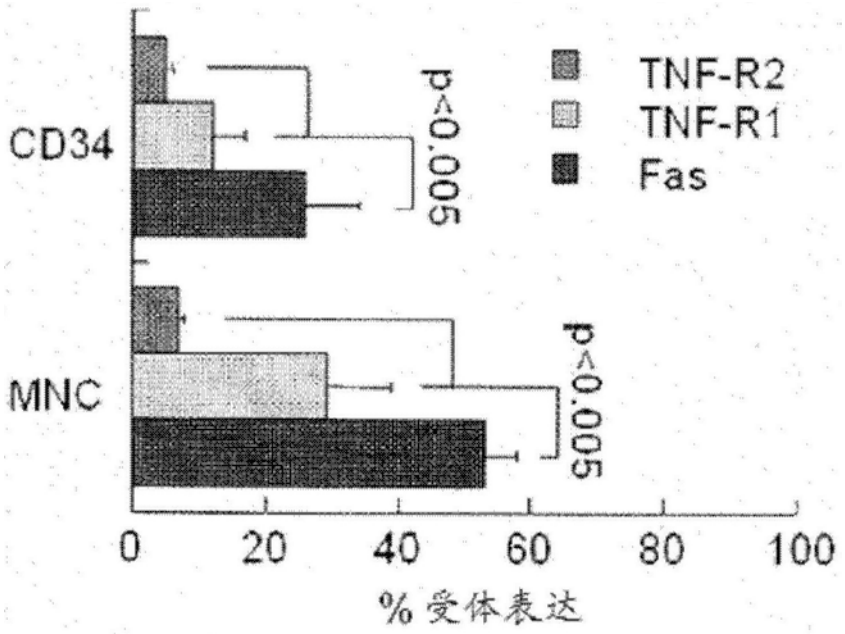

CD34
MNC
p<0.005
p<0.005
TNF-R2
TNF-R1
Fas
0
20
40
60
80
100
%受体表达

图6A

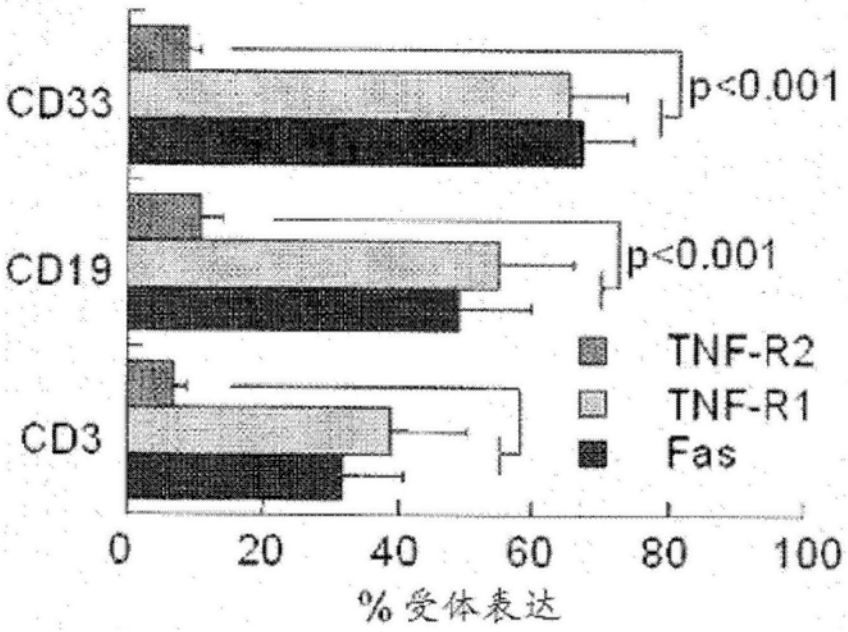

CD33
CD19
CD3
p<0.001
p<0.001
TNF-R2
TNF-R1
Fas
0
20
40
60
80
100
% 受体表达

图6B

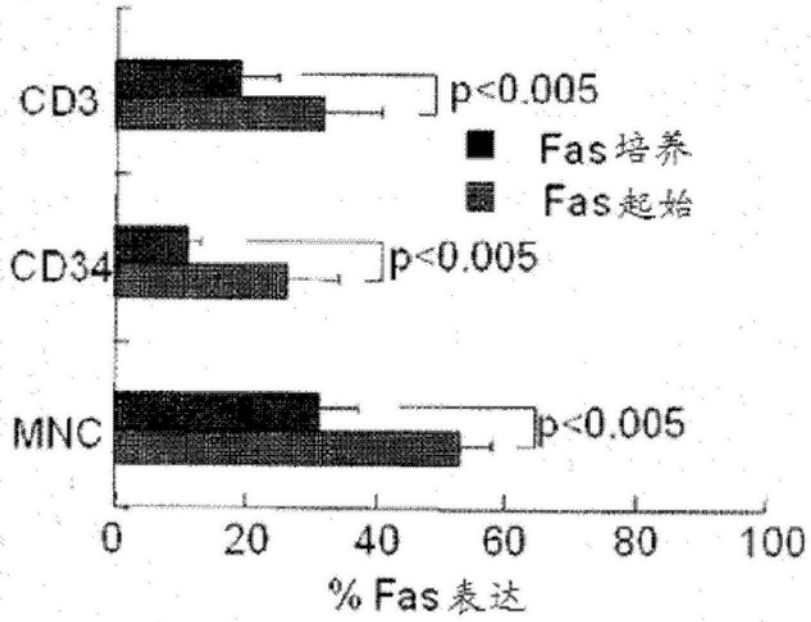

CD3
CD34
MNC
p<0.005
p<0.005
p<0.005
Fas培养
Fas起始
0
20
40
60
80
100
% Fas表达

图6C

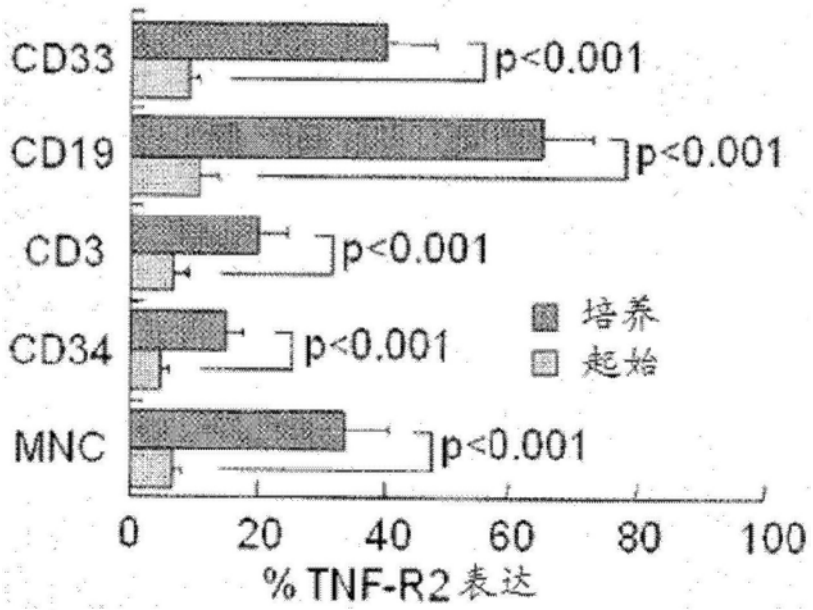

CD33
CD19
CD3
CD34
MNC
p<0.001
p<0.001
p<0.001
p<0.001
p<0.001
培养
起始
0
20
40
60
80
100
% TNF-R2 表达

图6D

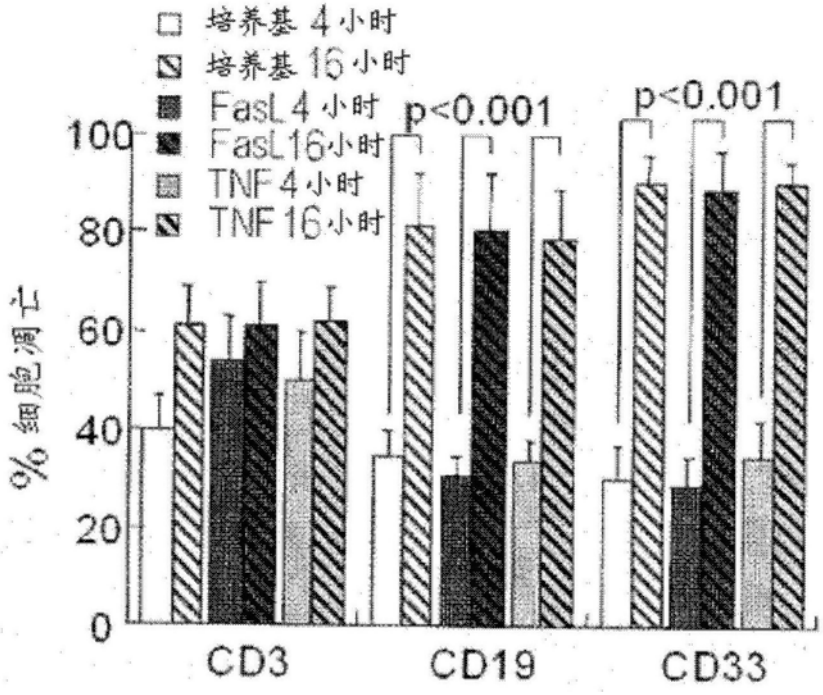

培养基 4 小时
培养基 16 小时
FasL 4 小时
FasL16小时
TNF 4 小时
TNF 16 小时
p<0.001
p<0.001
% 细胞凋亡
100
80
60
40
20
0
CD3
CD19
CD33

图6E

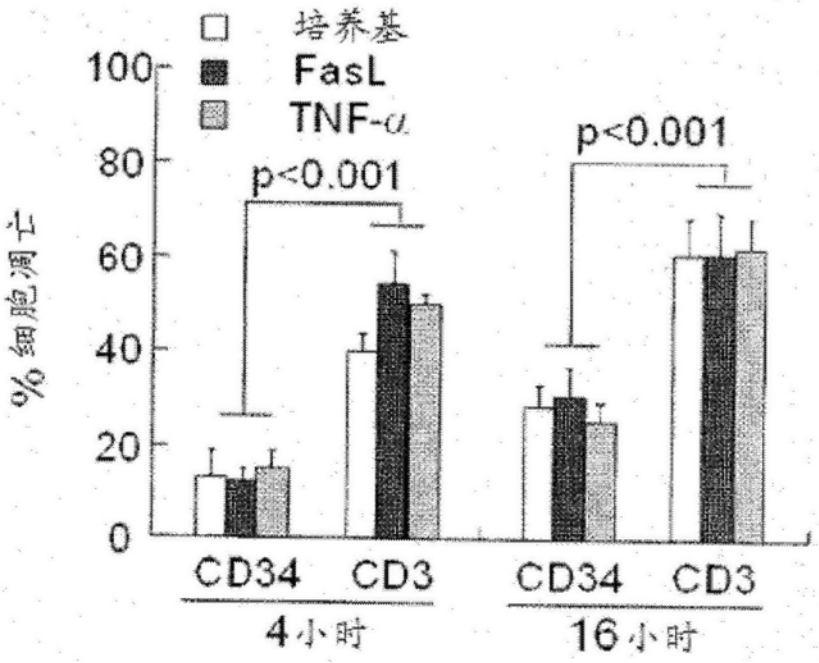

培养基
FasL
TNF-α
% 细胞凋亡
100
80
60
40
20
0
p<0.001
p<0.001
CD34
CD3
CD34
CD3
4小时
16小时

图6F

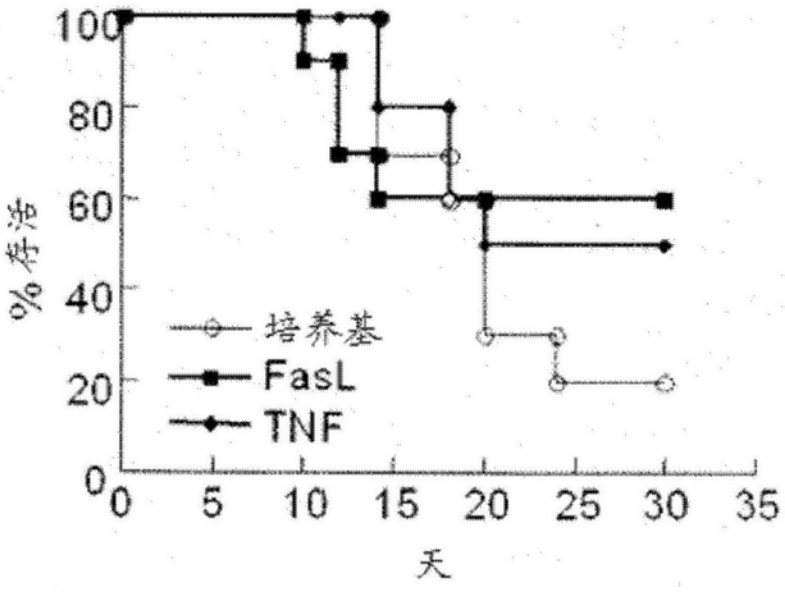

% 存活
100
80
60
40
20
0
培养基
FasL
TNF
0
5
10
15
20
25
30
35
天

图7A

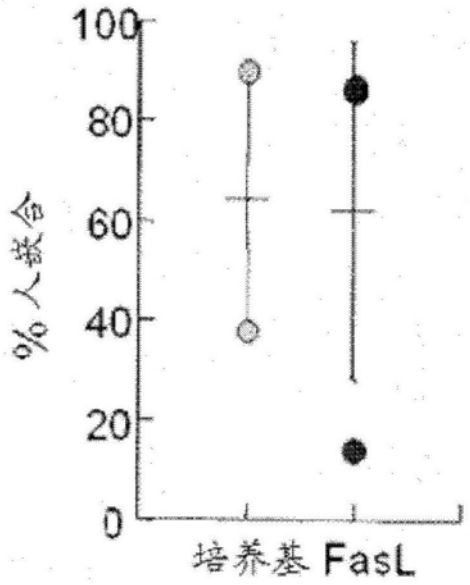

100
80
60
40
20
0
% 人获合
培养基 FasL

图7B

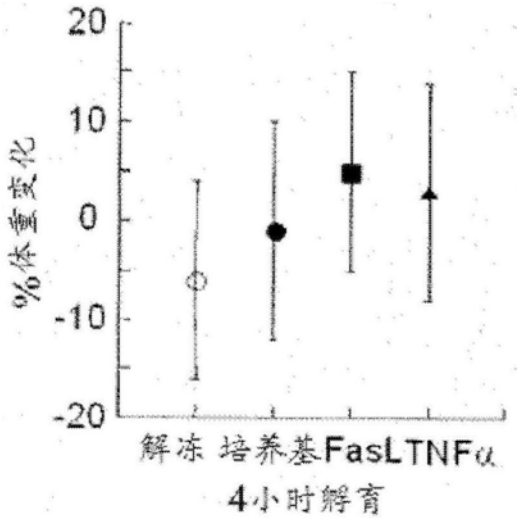

20
10
0
-10
-20
% 体重变化
解冻 培养基FasLTNFα
4小时孵育

图7C

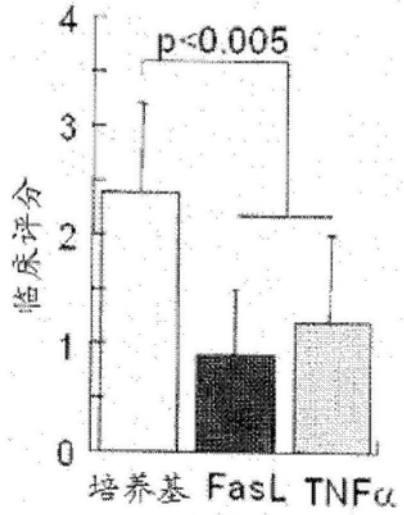

p<0.005
4
3
2
1
0
临床评分
培养基
FasL
TNFα

图7D

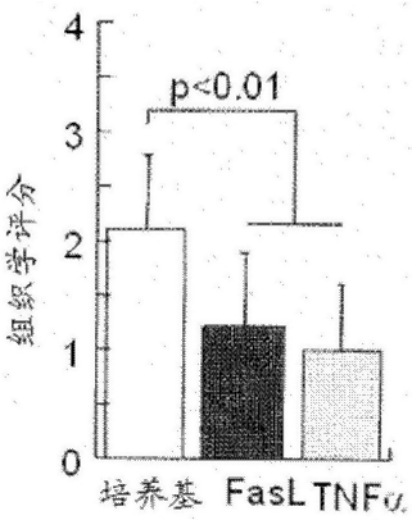

p<0.01
4
3
2
1
0
组织学评分
培养基
FasL
TNFα

图7E

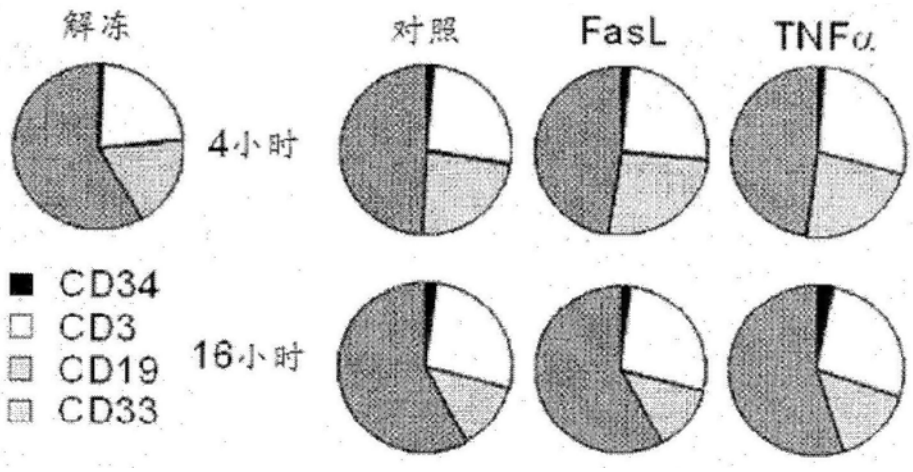

解冻
对照
FasL
TNFα
4小时
16小时
CD34
CD3
CD19
CD33

图8A

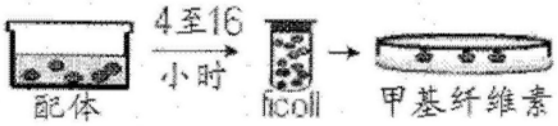

4至16
小时
配体
ficoll
甲基纤维素

图8B

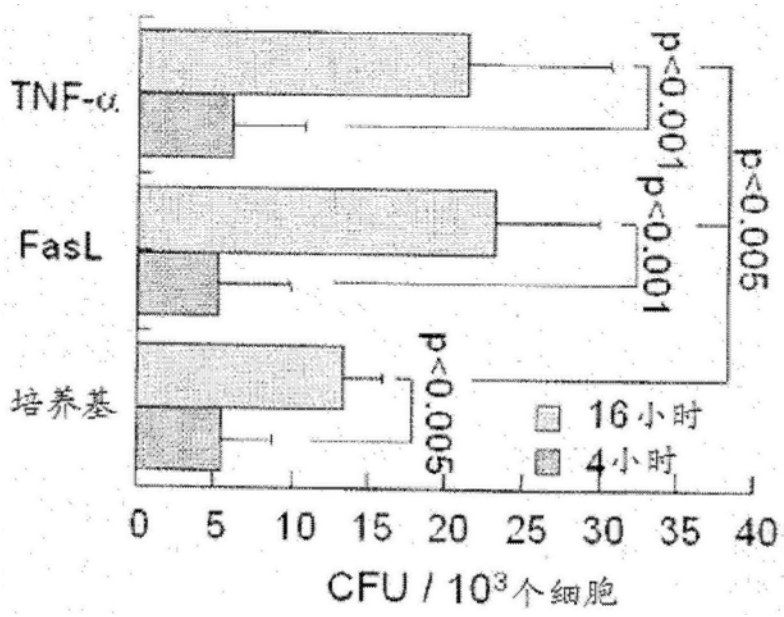

TNF-α
FasL
培养基
p^0.001
p^0.001
p^0.005
p^0.005
16小时
4小时
0 5 10 15 20 25 30 35 40
CFU / 10³个细胞

图8C

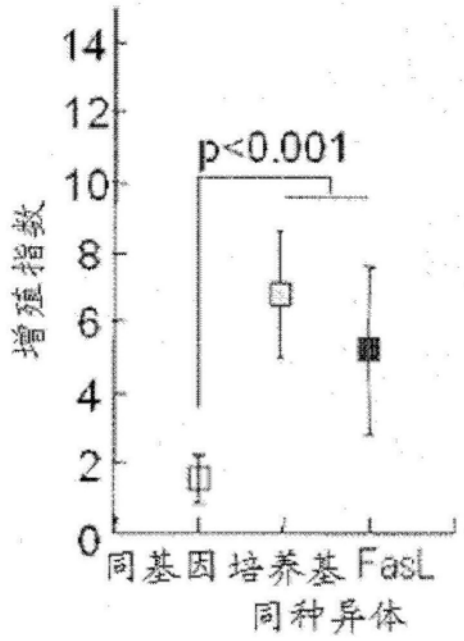

14
12
10
8
6
4
2
0
p<0.001
增殖指数
同基因
培养基
FasL
同种异体

图8D

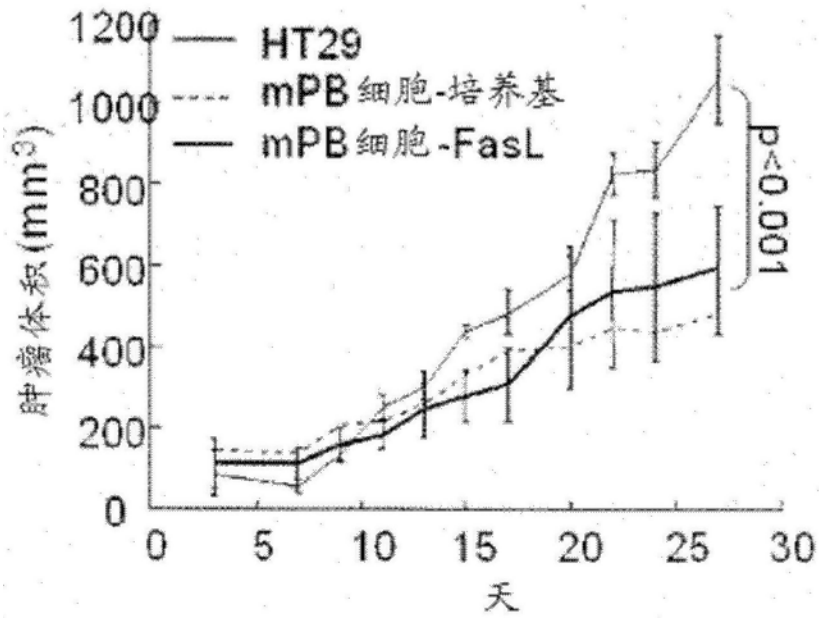

1200
1000
800
600
400
200
0
HT29
mPB细胞-培养基
mPB细胞-FasL
肿瘤体积(mm³)
p<0.001
0
5
10
15
20
25
30
天

图8E


H2K
H2K
imH2K
T细胞
H2K
LPS

图9A

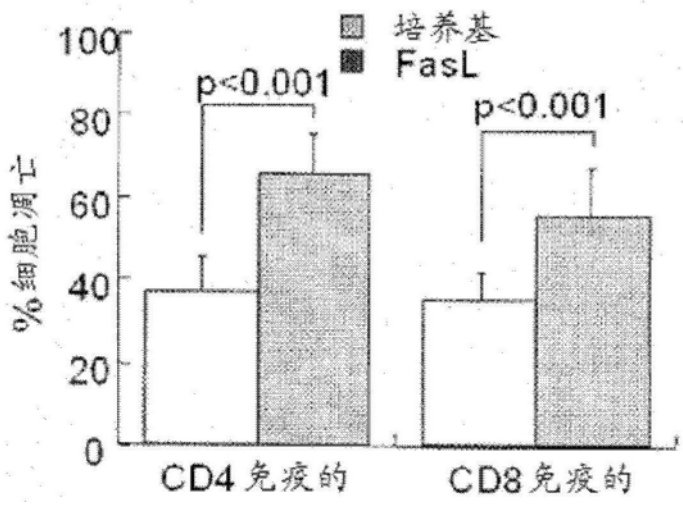

培养基
FasL
p<0.001
p<0.001
%细胞凋亡
100
80
60
40
20
0
CD4 免疫的
CD8 免疫的

图9B

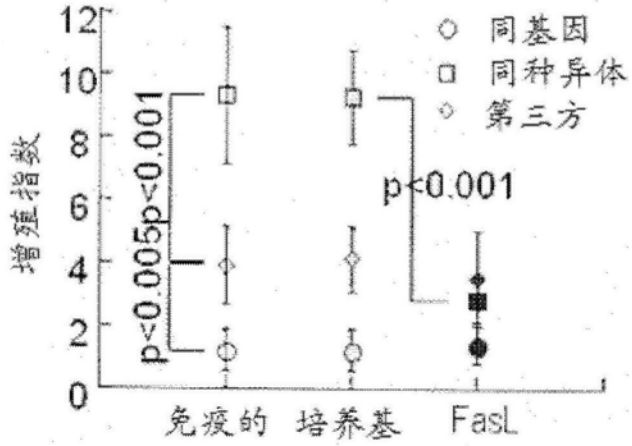

同基因
同种异体
第三方
p<0.001
p<0.005
p<0.001
增殖指数
12
10
8
6
4
2
0
免疫的
培养基
FasL

图9C

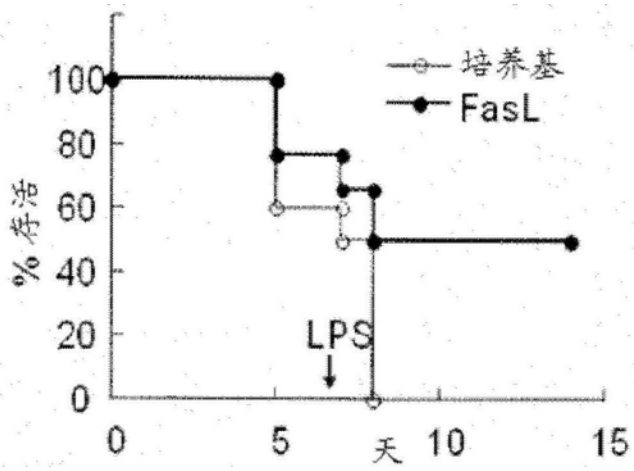

培养基
FasL
% 存活
100
80
60
40
20
0
LPS
0
5
天
10
15

图9D

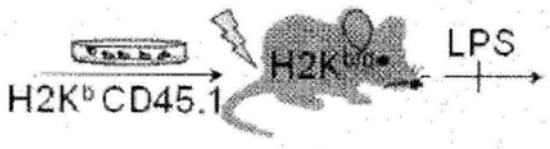

H2K^b CD45.1
H2K^bd
LPS

图9E

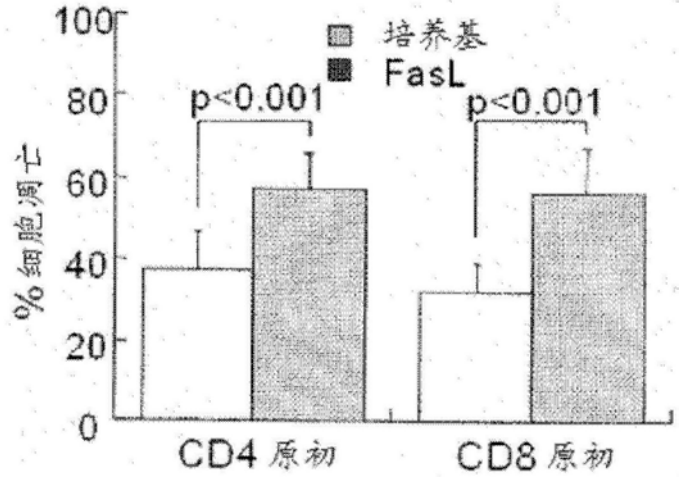

100
80
60
40
20
0
% 细胞凋亡
培养基
FasL
p<0.001
p<0.001
CD4 原初
CD8 原初

图9F

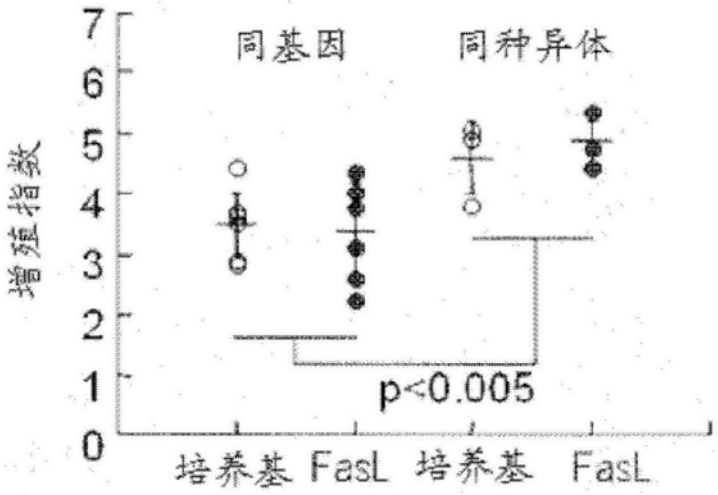

7
6
5
4
3
2
1
0
增殖指数
同基因
同种异体
p<0.005
培养基 FasL 培养基 FasL

图9G

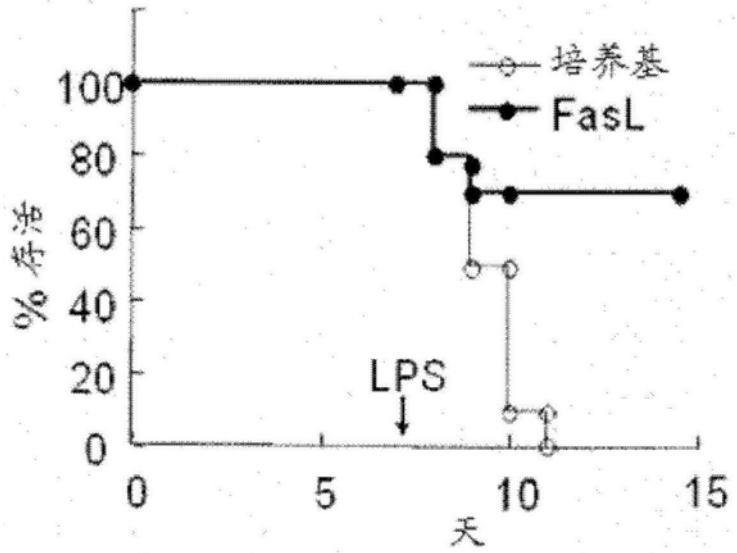

培养基
FasL
100
80
60
40
20
0
% 存活
LPS
0
5
10
15
天

图9H

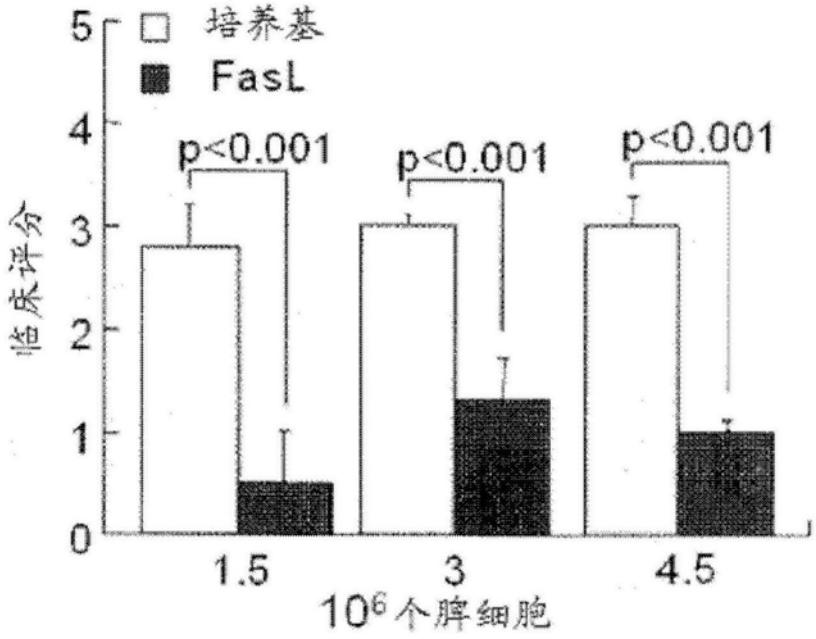

培养基
FasL
5
4
3
2
1
0
临床评分
p<0.001
p<0.001
p<0.001
1.5
3
4.5
10⁶个脾细胞

图10A

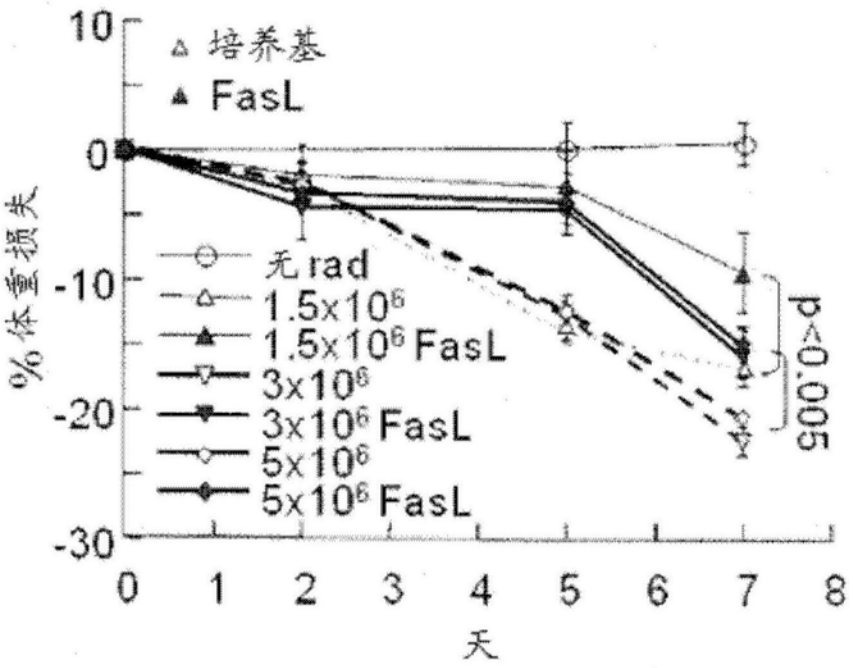

10
0
-10
-20
-30
% 体重损失
△ 培养基
▲ FasL
无 rad
1.5x10⁶
1.5x10⁶ FasL
3x10⁶
3x10⁶ FasL
5x10⁶
5x10⁶ FasL
p<0.005
0 1 2 3 4 5 6 7 8
天

图10B

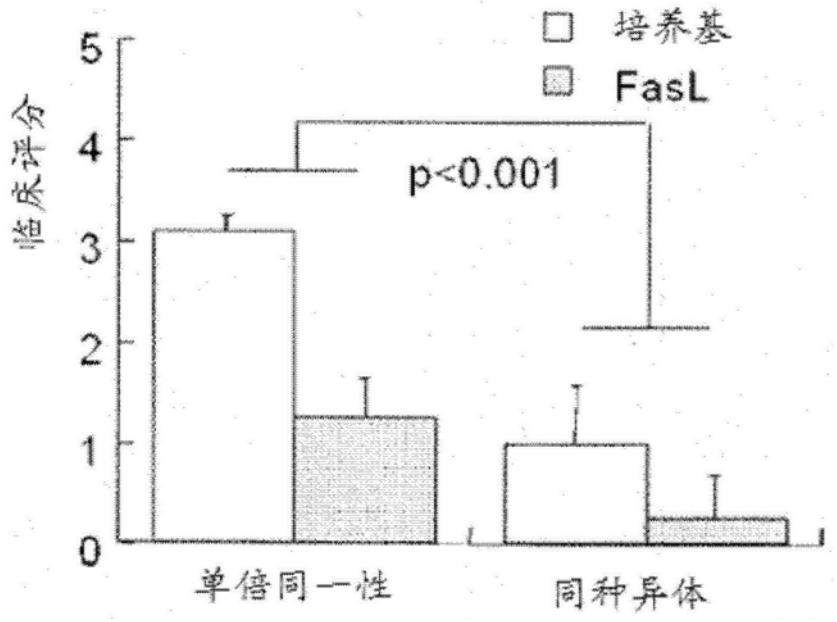

5
4
3
2
1
0
临床评分
□ 培养基
▨ FasL
p<0.001
单倍同一性
同种异体

图10C

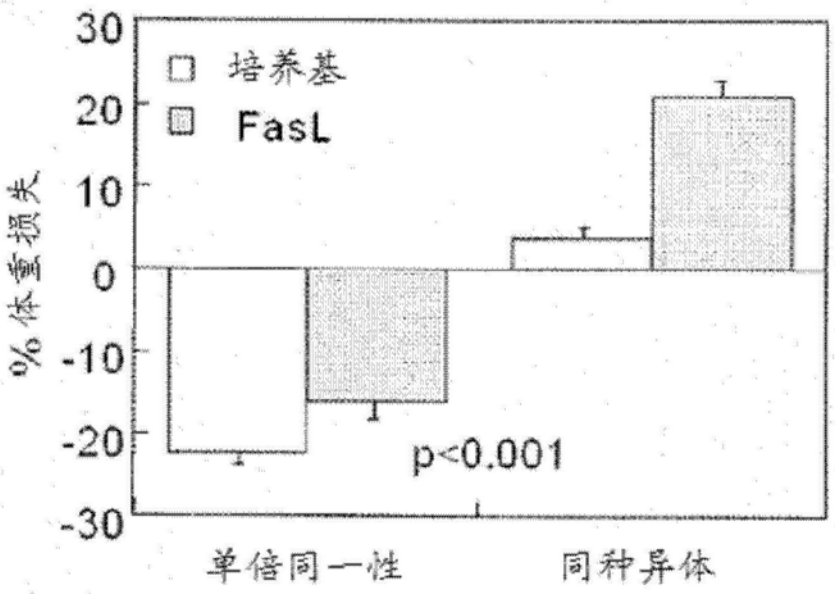

30
20
10
0
-10
-20
-30
% 体重损失
培养基
FasL
p<0.001
单倍同一性
同种异体

图10D

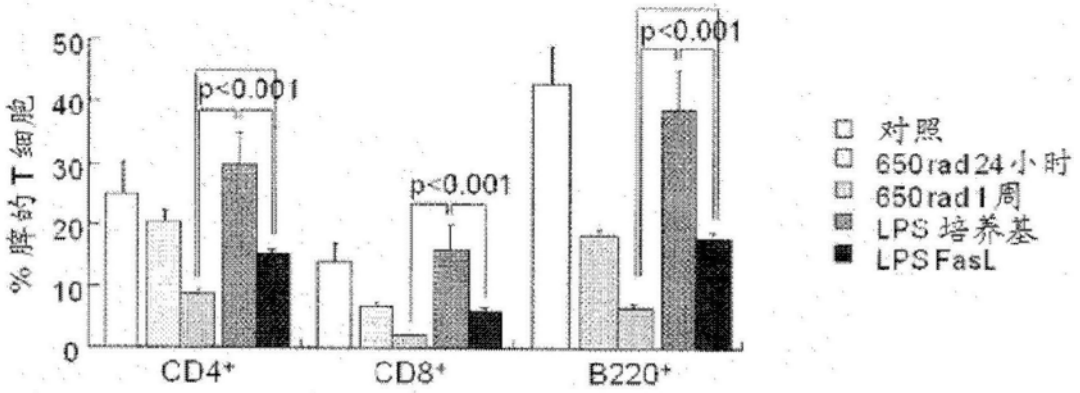

50
40
30
20
10
0
% 脾的 T 细胞
p<0.001
p<0.001
p<0.001
CD4+
CD8+
B220+
对照
650rad 24 小时
650rad 1 周
LPS 培养基
LPS FasL

图10E

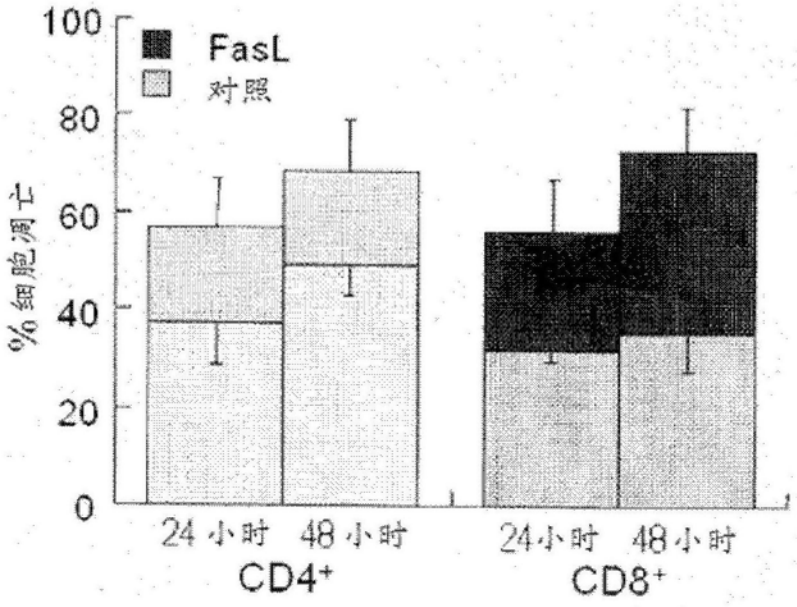


图11A

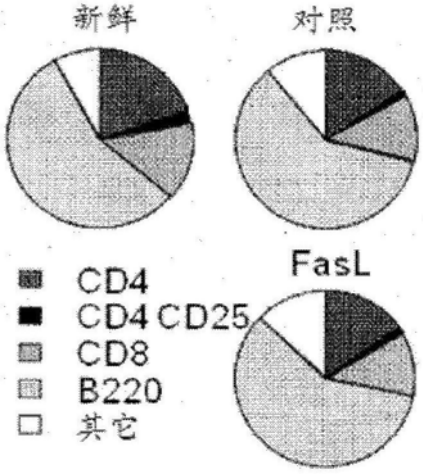


图11B

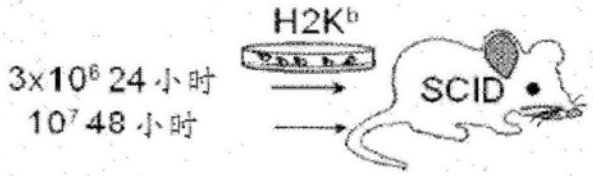


图11C

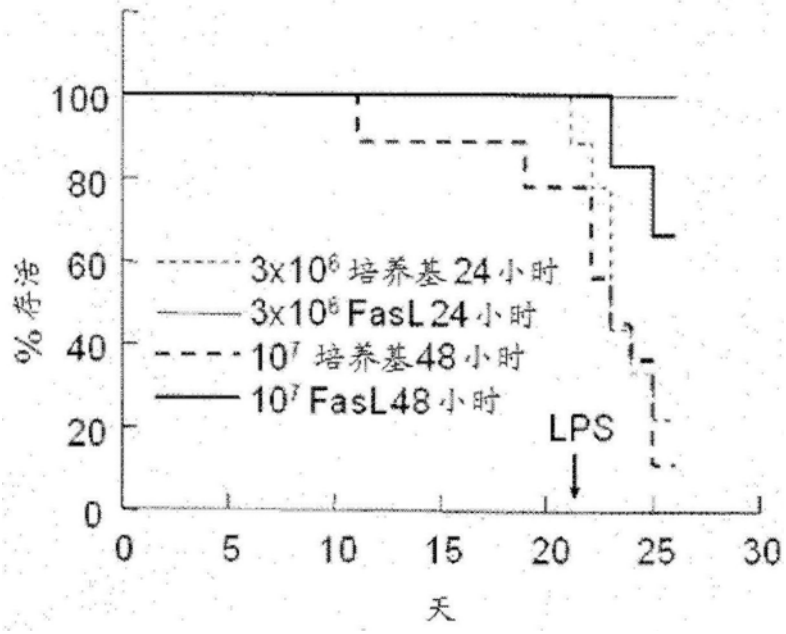

100
80
60
40
20
0
% 存活
3x10⁶ 培养基 24 小时
3x10⁶ FasL 24 小时
10⁷ 培养基 48 小时
10⁷ FasL 48 小时
LPS
0
5
10
15
20
25
30
天

图11D

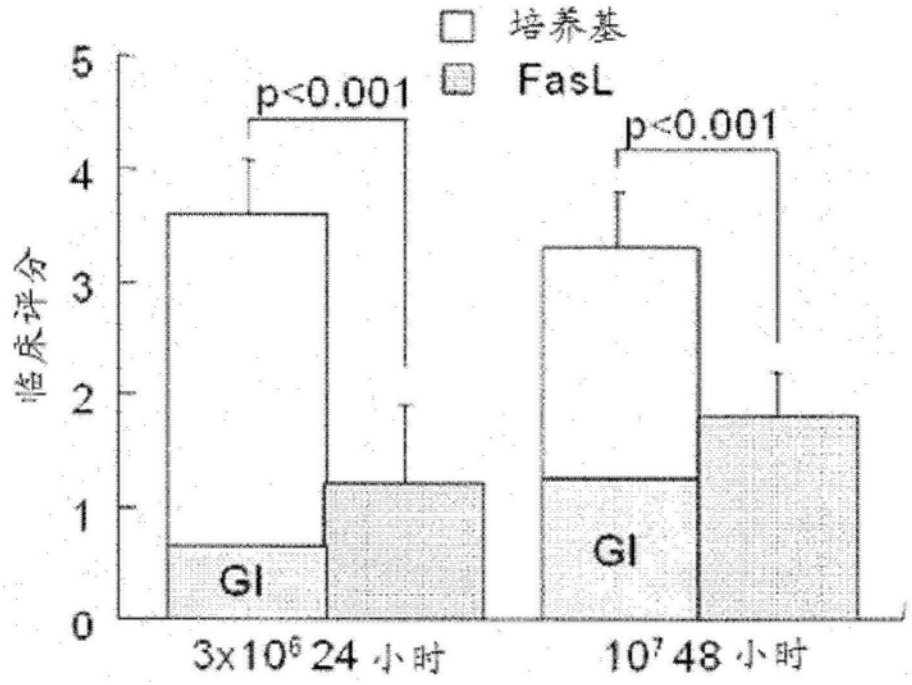

培养基
FasL
p<0.001
p<0.001
临床评分
5
4
3
2
1
0
GI
GI
3x10⁶ 24 小时
10⁷ 48 小时

图11E

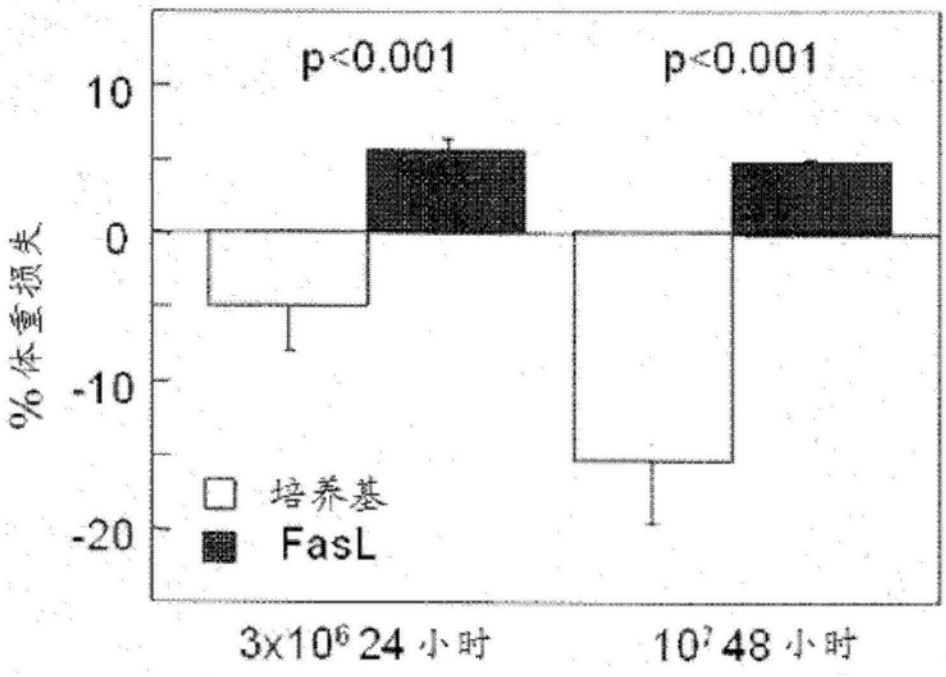


图11F

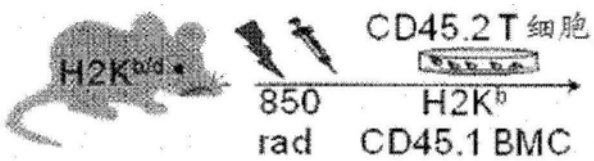


图12A

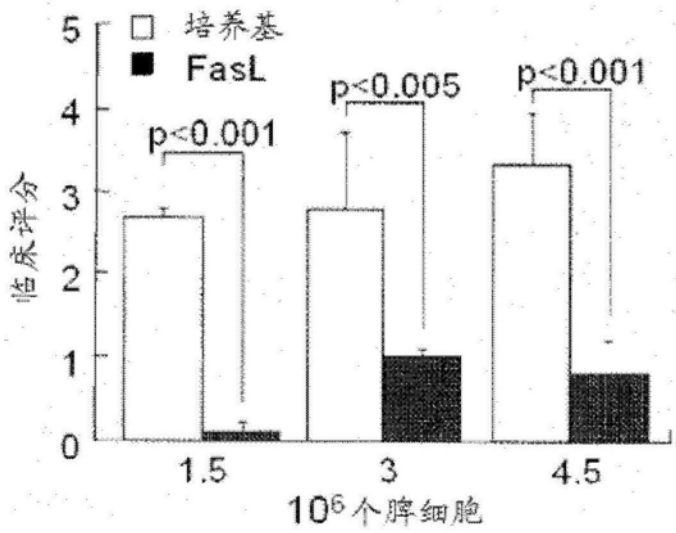


图12B

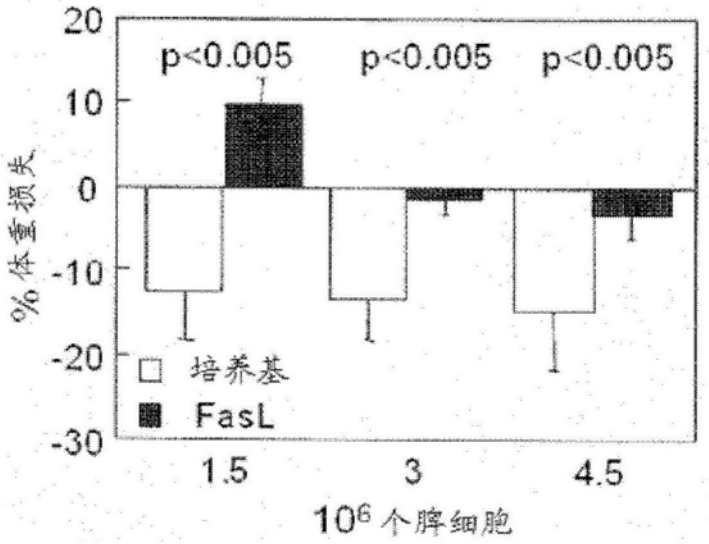

20
10
0
-10
-20
-30
%体重损失
p<0.005
p<0.005
p<0.005
培养基
FasL
1.5
3
4.5
10⁶个脾细胞

图12C

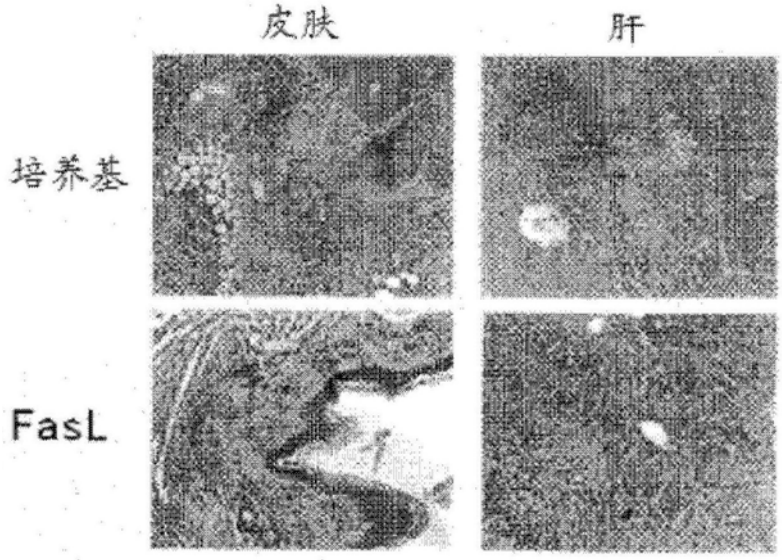

皮肤
肝
培养基
FasL

图12D

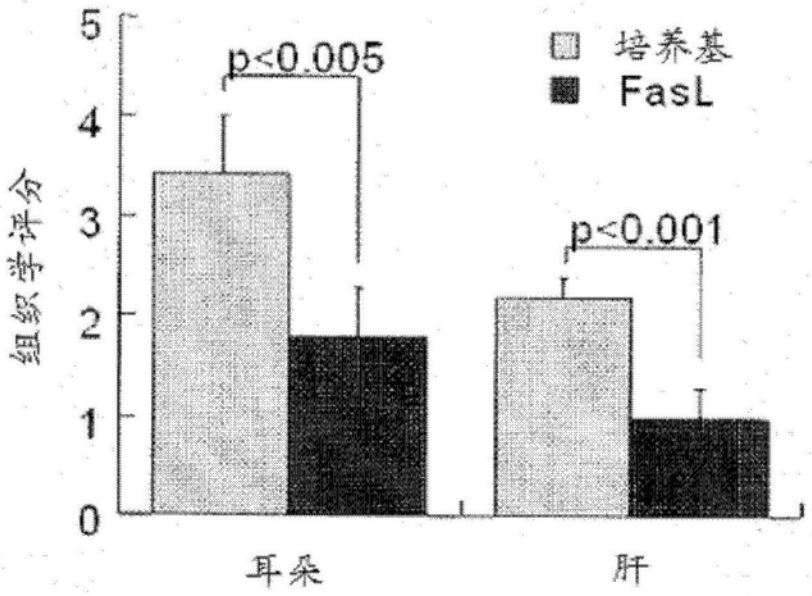

5
4
3
2
1
0
组织学评分
p<0.005
p<0.001
培养基
FasL
耳朵
肝

图12E

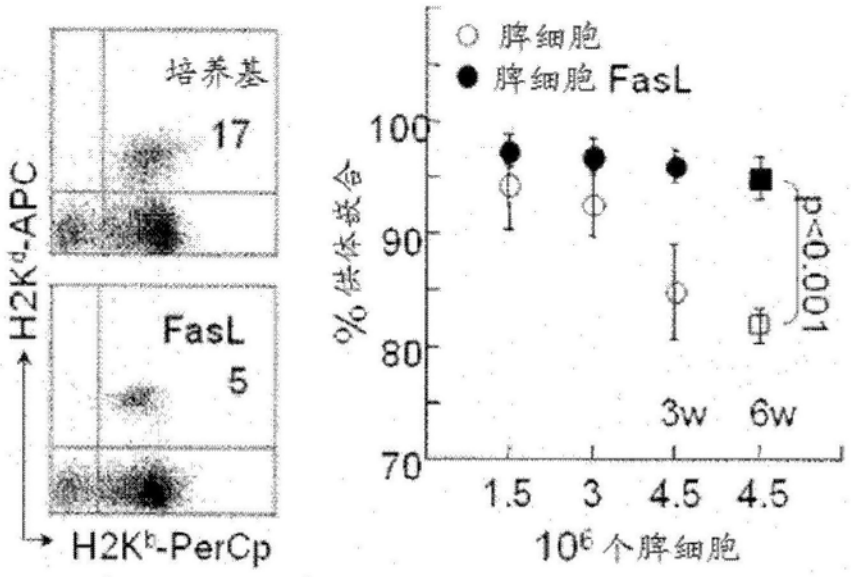

培养基
17
FasL
5
H2K^d-APC
H2K^b-PerCp
脾细胞
脾细胞 FasL
100
90
80
70
% 供体嵌合
p<0.001
3w
6w
1.5
3
4.5
4.5
10^6 个脾细胞

图13A

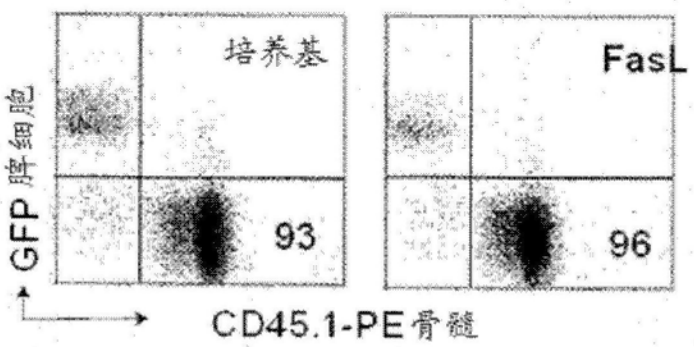


图13B

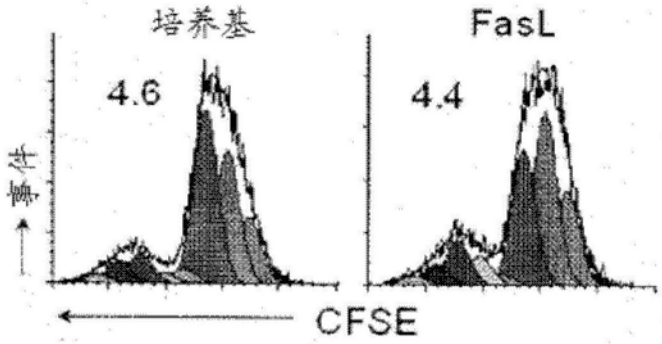


图13C

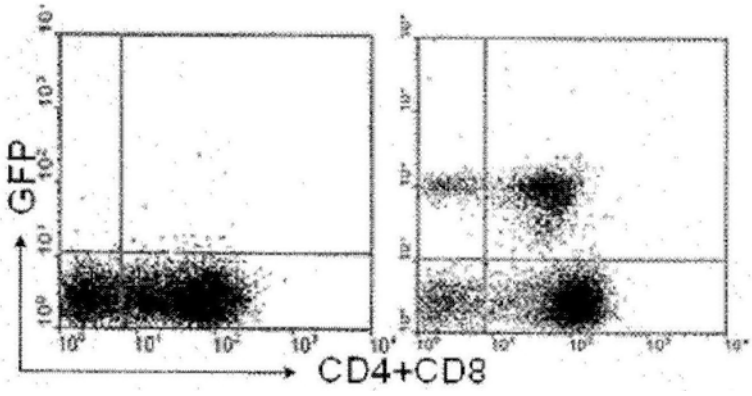


图13D

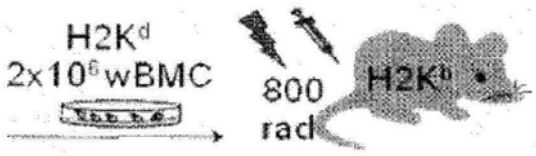


图14A

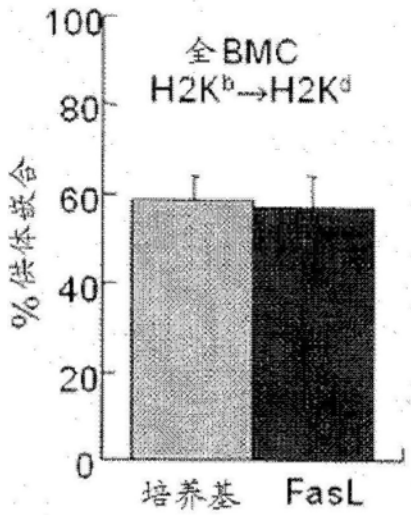


图14B

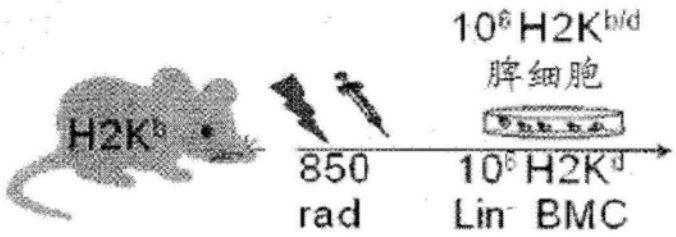


图14C

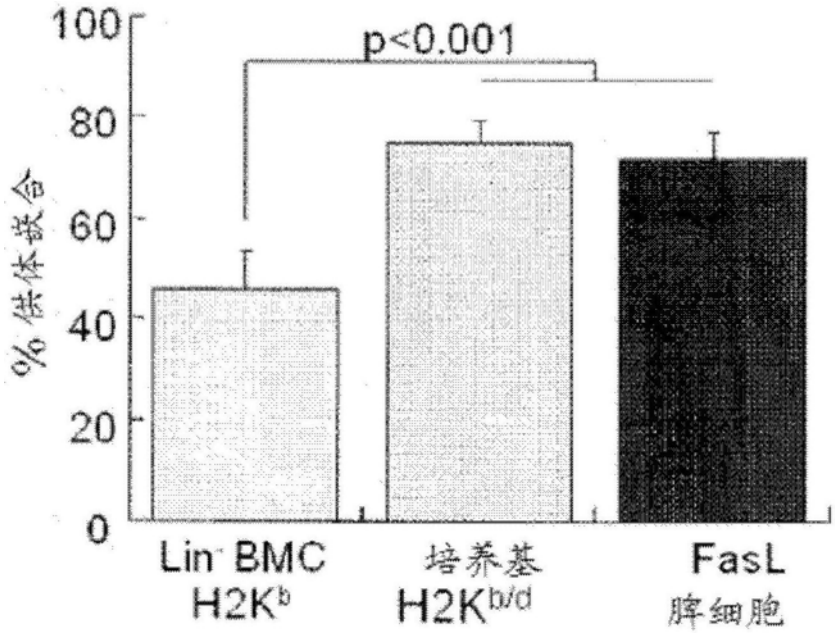


图14D


H2K^{d}lin$^-$BMC
H2K^b
H2K^{d}DLI
天-1
0
10

图14E

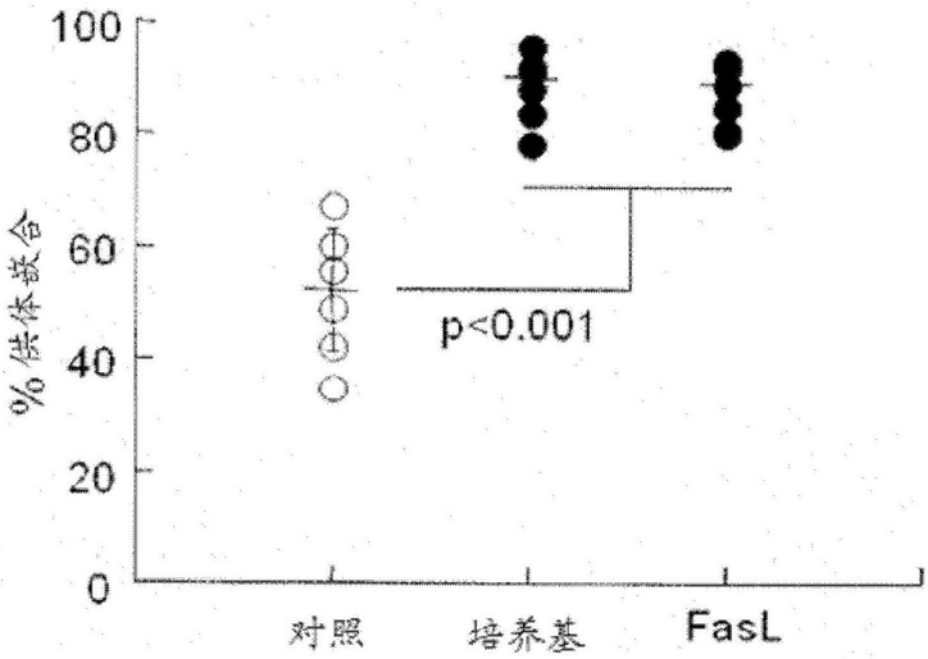

100
80
60
40
20
0
% 供体嵌合
p<0.001
对照
培养基
FasL

图14F