(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115427555 A
(43)申请公布日 2022.12.02

(21)申请号 202180017317.4

(22)申请日 2021.02.26

(30)优先权数据
62/983,511 2020.02.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.08.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/019917 2021.02.26

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/174004 EN 2021.09.02

(71)申请人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪

(72)发明人 钱玉 H-H·常 X·石 J·胡 L·曹

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 吕学辰

(51)Int.Cl.
C12N 5/0789(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)

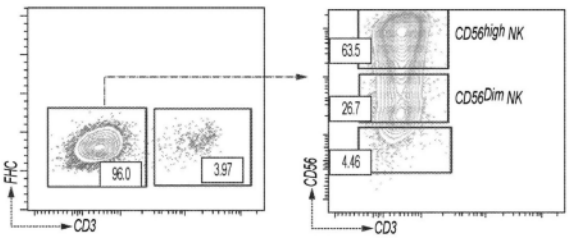
权利要求书4页 说明书37页 附图3页

(54)发明名称

由多能干细胞产生自然杀伤细胞的方法

(57)摘要

本公开尤其提供了一种由诱导性多能细胞有效地产生天然杀伤细胞的方法。所述方法包括以下步骤：(I)在培养基中培养多能干细胞以产生CD56+/CD3-免疫细胞。



CN 115427555 A

1.一种产生多能干细胞衍生的NK细胞的方法,所述方法包括:

(A)提供包含从多能干细胞衍生的造血祖细胞(HPC)的混合细胞群(HP细胞混合群),

(B)在一种或多种培养基中培养所述HP细胞混合群以产生CD56+/CD3-细胞,

其中所述方法不包括细胞分离步骤。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述方法在步骤(A)和(B)中不包括细胞分离步骤。

3.如权利要求1或2中任一项所述的方法,其中(A)中的所述HP细胞混合群包含CD34+细胞。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述HP细胞混合群中20%或更多的细胞是CD34+细胞。

5.如权利要求4所述的方法,其中20%与90%之间的所述HP细胞混合群是CD34+细胞。

6.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(B)包括

(i)在CD4/CD8诱导培养基中培养所述HP细胞混合群以产生包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-和CD4+/CD8+细胞的中间异质细胞群;以及

(ii)在NK诱导培养基中培养所述中间异质细胞群以产生所述CD56+/CD3-细胞。

7.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法不包括分离CD4+/CD8+细胞的步骤。

8.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(A)包括在HPC诱导培养基中培养多能干细胞以产生HP细胞混合群。

9.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多能干细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。

10.如权利要求8或9所述的方法,其中所述HPC诱导培养基包含至少一种化合物,所述至少一种化合物选自骨形态发生蛋白4(BMP4)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、抗坏血酸、Flt3配体(Flt3L)、血小板生成素(TPO)和TGFβ抑制剂。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述HPC诱导培养基包含浓度在5ng/mL至500ng/ml之间的BMP4。

12.如权利要求11所述的方法,其中所述BMP4的浓度为50ng/ml。

13.如权利要求10-12中任一项所述的方法,其中混合群细胞培养基包含浓度在5ng/ml至500ng/ml之间的VEGF。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述VEGF的浓度为约50ng/ml。

15.如权利要求10-14中任一项所述的方法,其中所述HPC诱导培养基包含浓度在5ng/ml至500ng/ml之间的bFGF。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述bFGF的浓度为50ng/ml。

17.如权利要求10-16中任一项所述的方法,其中所述混合群细胞培养基包含浓度在5μg/ml与500μg/ml之间的抗坏血酸。

18.如权利要求17所述的方法,其中所述抗坏血酸的浓度为50μg/ml。

19.如权利要求10-18中任一项所述的方法,其中所述HPC诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的Flt3L。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述Flt3L的浓度为50ng/ml。

21.如权利要求10-20中任一项所述的方法,其中所述HPC诱导培养基包含浓度在1ng/

ml至200ng/ml之间的TPO。

22.如权利要求21所述的方法,其中所述TPO的浓度为100ng/ml。

23.如权利要求6-22中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含至少一种化合物,所述至少一种化合物选自由以下项组成的组:抗坏血酸、干细胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制剂和SDF-1。

24.如权利要求23所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在5μg/ml至约500μg/ml之间的抗坏血酸。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述抗坏血酸的浓度为50μg/ml。

26.如权利要求23-25中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在5ng/ml至100ng/ml之间的SCF。

27.如权利要求26所述的方法,其中所述SCF的浓度为50ng/ml。

28.如权利要求23-27中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的IL-7。

29.如权利要求28所述的方法,其中所述IL-7的浓度为50ng/ml。

30.如权利要求23-29中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的Flt3L。

31.如权利要求30所述的方法,其中所述Flt3L的浓度为50ng/ml Flt3L。

32.如权利要求23-31中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至200ng/ml之间的TPO。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述TPO的浓度为100ng/ml。

34.如权利要求23-33中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在0.5μM至100μM之间的p38抑制剂。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述p38抑制剂是SB203580。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述SB203580的浓度为15μM。

37.如权利要求23-36中任一项所述的方法,其中所述CD4/CD8诱导培养基包含浓度在10ng/ml至约100ng/ml之间的SDF-1抑制剂。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述SDF-1抑制剂的浓度为30nM。

39.如权利要求6-38中任一项所述的方法,其中所述NK诱导培养基包含至少一种化合物,所述至少一种化合物选自由以下项组成的组:CD3激活剂、IL-2和IL7。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述NK诱导培养基包含浓度在1ng/ml至1 00ng/ml之间的IL-2。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述IL-2的浓度为10ng/ml。

42.如权利要求39-41中任一项所述的方法,其中所述第二诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的IL-7。

43.如权利要求42所述的方法,其中所述IL-7的浓度为10ng/ml。

44.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个培养步骤在约5%的氧气下执行。

45.如权利要求1-43中任一项所述的方法,其中每个培养步骤在大于14%的氧气下执行。

46.如权利要求1-43中任一项所述的方法,其中每个培养步骤在大气氧气下执行。

47.如权利要求1-43中任一项所述的方法,其中每个培养步骤在小于5%的氧气下执行。

48.如权利要求8-47中任一项所述的方法,其中在所述混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群持续大于10天。

49.如权利要求48所述的方法,其中在所述混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群持续11天与15天之间。

50.如权利要求49所述的方法,其中在所述混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群持续14天。

51.如权利要求9-50中任一项所述的方法,其中所述iPSC从外周血单核细胞获得。

52.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中至少约50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多的所产生的细胞是未经富集步骤的CD56+/CD3-细胞。

53.如权利要求52所述的方法,其中少于约25%的所产生的细胞是CD3+细胞。

54.如权利要求52或53所述的方法,其中通过流式细胞术确定所产生的细胞的百分比。

55.如权利要求52或53所述的方法,其中通过单细胞RNA测序(scRNAseq)确定所产生的细胞的百分比。

56.如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括分离CD56+/CD3-细胞的步骤。

57.如权利要求56所述的方法,其中通过荧光激活细胞分选(FACS)或磁分选来分离CD56+/CD3-细胞。

58.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述CD56+/CD3-免疫细胞是NK细胞。

59.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述CD56+/CD3-细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

60.如权利要求59所述的方法,其中所述分离的CD56+/CD3-细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

61.如权利要求60所述的方法,其中所述抗原是CD19。

62.如权利要求59-61中任一项所述的方法,其中所述细胞被进一步遗传修饰以表达IL-15Rα/IL-15复合物。

63.一种产生诱导性多能干细胞(iPSC)衍生的CD56+/CD3-免疫细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

(1)在包含至少一种化合物的HPC诱导培养基中培养iPSC以获得包含造血祖细胞(HPC)的异质细胞群(HP细胞混合群),所述至少一种化合物选自血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和抗坏血酸;

(2)在包含抗坏血酸、p38抑制剂和SDF-1中的一种或多种的CD4/CD8诱导培养基中培养在(1)中获得的所述HP细胞混合群,以获得中间异质细胞群;以及

(3)在包含至少一种化合物的NK诱导培养基中培养来自(2)的所述中间异质细胞群,所述至少一种化合物选自由以下项组成的组:CD3激活剂、IL-2和IL-7。

64.一种NK细胞群,所述NK细胞群使用如前述权利要求中任一项所述的方法产生。

65.一种未分选的细胞群,所述未分选的细胞群以不少于总多能干细胞衍生的CD56+免疫细胞的60%的比率包含多能干细胞衍生的CD56+/CD3-细胞。

66.如权利要求65所述的未分选的细胞群,其中少于25%的细胞是CD3+细胞。

67.如权利要求65或66所述的未分选的细胞群,其中少于5%的细胞是单核细胞。

68.如权利要求65或66所述的未分选的细胞群,其中少于5%的细胞是B细胞。

69.如权利要求65-68中任一项所述的未分选的群体,其中通过流式细胞术确定细胞百分比。

70.如权利要求65-68中任一项所述的未分选的群体,其中通过单细胞RNA测序(scRNAseq)确定细胞百分比。

71.一种治疗需要细胞疗法的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述权利要求中任一项所述的NK细胞。

72.如权利要求68所述的方法,其中所述受试者患有癌症。

73.如权利要求69所述的方法,其中所述癌症是白血病或淋巴瘤。

由多能干细胞产生自然杀伤细胞的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2021年2月28日提交的美国临时申请序列号62/983,511的优先权,该临时专利申请的公开内容通过引用特此并入。

背景技术

[0003] 自然杀伤(NK)细胞是免疫系统的细胞毒性淋巴细胞。NK细胞对癌细胞、病原体感染的细胞和以其他方式损伤的细胞具有细胞毒性。NK细胞是先天淋巴样细胞(ILC),特别是桥接免疫应答的先天和适应性臂的大颗粒状细胞毒性淋巴细胞。它们占外周血中循环淋巴细胞的10-15%。NK细胞在免疫系统内也表现出最高水平的细胞毒性活性。因此,改变的NK细胞功能或数量影响免疫系统对抗感染和癌症的功能。

[0004] NK细胞缺乏特异性细胞表面抗原受体。由于这一原因,NK细胞可以在没有在先致敏的情况下杀死癌细胞和病原体感染的细胞,使它们成为先天免疫应答的一部分。它们还通过直接影响适应性免疫应答而在肿瘤免疫监视中发挥作用。这些特征和其他特征使得NK细胞成为用于过继细胞疗法的特别有吸引力的细胞类型。

[0005] 已经描述了从祖细胞获得NK细胞的多种方案。然而,先前描述的方案是劳动密集型的并且需要多个耗时的步骤,包括细胞分离的步骤,这进而增加了产生NK细胞的制造/产生时间和金钱成本。

发明内容

[0006] 本申请尤其提供了产生CD56+/CD3-免疫细胞(即NK或NK样细胞)的改进方法。本申请至少部分基于以下令人惊讶的发现:在不需要细胞分离步骤的情况下,从衍生自多能干细胞(例如,诱导性多能干细胞(iPSC))的混合细胞群(bulk cell population)中有效且稳健地产生CD56+/CD3-免疫细胞。在本申请之前,用于诱导NK细胞的方法通常需要基于NK细胞的已知细胞谱系分离特定的细胞类型。如本文所述,本申请出乎意料地显示NK细胞可以成功地衍生自混合细胞群而无需基于谱系分离任何细胞类型。因此,该方法相对于现有的产生NK细胞的方法具有许多益处,包括例如以成本和时间有效的方式扩大和产生大量的NK细胞的能力。因此,本发明代表了细胞疗法领域的重大突破。

[0007] 通过本文所述的方法产生的iPSC衍生的CD56+/CD3-细胞(在本文中也称为“iNK细胞”)是功能性的并且可以被进一步遗传修饰,诸如通过将CAR引入靶特异性细胞群。

[0008] 在一些方面,提供了产生多能干细胞衍生的NK细胞的方法,所述方法包括:(A)提供包含从多能干细胞衍生的造血祖细胞(HPC)的混合细胞群(HP细胞混合群(HP cell bulk)),(B)在一种或多种培养基中培养所述HP细胞混合群以产生CD56+/CD3-细胞,其中所述方法不包括细胞分离步骤。

[0009] 在一些实施方案中,所述方法在步骤(A)和(B)中不包括细胞分离步骤。

[0010] 在一些实施方案中,(A)中的HP细胞混合群包含CD34+细胞。

[0011] 在一些实施方案中,HP细胞混合群中20%或更多的细胞是CD34+细胞。

[0012] 在一些实施方案中,20％与90％之间的HP细胞混合群是CD34+细胞。例如,在一些实施方案中,约30％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约40％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约50％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约60％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约70％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约80％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,约90％的HP细胞混合群是CD34+细胞。在一些实施方案中,大于70％的HP细胞混合群是CD34+细胞。

[0013] 在一些实施方案中,步骤(B)包括(i)在CD4/CD8诱导培养基中培养HP细胞混合群以产生包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-和CD4+/CD8+细胞的中间异质细胞群;和(ii)在NK诱导培养基中培养所述中间异质细胞群以产生CD56+/CD3-细胞。

[0014] 在一些实施方案中,步骤(A)包括在HPC诱导培养基中培养多能干细胞以产生HP细胞混合群。

[0015] 在一些实施方案中,所述多能干细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。

[0016] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含选自骨形态发生蛋白4(BMP4)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、抗坏血酸、Flt3配体(Flt3L)、血小板生成素(TPO)和TGFβ抑制剂的至少一种化合物或化合物的任何组合。

[0017] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在5ng/mL至500ng/ml之间的BMP4。

[0018] 在一些实施方案中,BMP4的浓度为50ng/ml。

[0019] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在5ng/ml至500ng/ml之间的VEGF。

[0020] 在一些实施方案中,VEGF的浓度为约50ng/ml。

[0021] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在5ng/ml至500ng/ml之间的bFGF。

[0022] 在一些实施方案中,bFGF的浓度为50ng/ml。

[0023] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在5μg/ml与500μg/ml之间的抗坏血酸。

[0024] 在一些实施方案中,抗坏血酸的浓度为50μg/ml。

[0025] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的Flt3L。

[0026] 在一些实施方案中,Flt3L的浓度为50ng/ml。

[0027] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含浓度在1ng/ml至200ng/ml之间的TPO。

[0028] 在一些实施方案中,TPO的浓度为100ng/ml。

[0029] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含选自由抗坏血酸、干细胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制剂和SDF-1组成的组的至少一种化合物或化合物的任何组合。因此,在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含抗坏血酸。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含SCF。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含IL-7。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含Flt3L。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含TPO。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含p38抑制剂。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含SDF-1。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含p38抑制剂和SDF-1。

[0030] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在5μg/ml至约500μg/ml之间的抗坏血酸。

[0031] 在一些实施方案中,抗坏血酸的浓度为50μg/ml。

[0032] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在5ng/ml至100ng/ml之间的SCF。

[0033] 在一些实施方案中,SCF的浓度为50ng/ml。

[0034] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的IL-7。

[0035] 在一些实施方案中,IL-7的浓度为50ng/ml。

[0036] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的Flt3L。

[0037] 在一些实施方案中,Flt3L的浓度为50ng/ml Flt3L。

[0038] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在1ng/ml至200ng/ml之间的TPO。

[0039] 在一些实施方案中,TPO的浓度为100ng/ml。

[0040] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在0.5μM至100μM之间的p38抑制剂。

[0041] 在一些实施方案中,p38抑制剂是SB203580。在一些实施方案中,p38抑制剂是BIRB796。在一些实施方案中,p38抑制剂是VX-702。在一些实施方案中,p38抑制剂是SB239063。在一些实施方案中,p38抑制剂是SB202190。在一些实施方案中,p38抑制剂是BMS 582949。

[0042] 在一些实施方案中,SB203580的浓度为15μM。

[0043] 在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含浓度在10ng/ml至约100ng/ml之间的SDF-1抑制剂。

[0044] 在一些实施方案中,SDF-1抑制剂的浓度为30nM。

[0045] 在一些实施方案中,SDF-1抑制剂的浓度为30nM并且p38抑制剂(例如SB203580)的浓度为15μM。

[0046] 在一些实施方案中,NK诱导培养基包含选自由CD3激活剂、IL-2和IL7组成的组的至少一种化合物。因此,在一些实施方案中,NK诱导培养基包含CD3激活剂。在一些实施方案中,NK诱导培养基包含IL-2。在一些实施方案中,NK诱导培养基包含IL-7。

[0047] 在一些实施方案中,NK诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的IL-2。

[0048] 在一些实施方案中,IL-2的浓度为10ng/ml。

[0049] 在一些实施方案中,NK诱导培养基包含浓度在1ng/ml至100ng/ml之间的IL-7。

[0050] 在一些实施方案中,IL-7的浓度为10ng/ml。

[0051] 在一些实施方案中,每个培养步骤在约5%的氧气下进行。

[0052] 在一些实施方案中,每个培养步骤在大于14%的氧气下进行。

[0053] 在一些实施方案中,每个培养步骤在大气氧气下进行。

[0054] 在一些实施方案中,每个培养步骤在小于5%的氧气下进行。

[0055] 在一些实施方案中,在混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群持续大于10天。

[0056] 在一些实施方案中,在混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群持续11天与15天之间。

[0057] 在一些实施方案中,在混合群细胞培养基中培养多能干细胞以获得HP细胞混合群

持续14天。

[0058] 在一些实施方案中,所述iPSC从外周血单核细胞获得。

[0059] 在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下(例如,在没有进一步分选/分离/纯化CD56+/CD3-细胞的步骤的情况下),至少约50%、55%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。因此,在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约50%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约55%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约60%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约65%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约70%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约75%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约80%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约85%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约90%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约95%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中,在没有富集步骤的情况下,至少约97%或更多的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。

[0060] 在一些实施方案中,少于约25%、20%、15%、10%或5%的所产生的细胞是CD3+细胞。

[0061] 在一些实施方案中,可以通过本领域的各种手段确定所产生的细胞的表型。例如,可以通过流式细胞术或单细胞RNA测序(scRNAseq)确定所产生的细胞的表型。

[0062] 在一些实施方案中,通过流式细胞术确定所产生的细胞的百分比。在一些实施方案中,通过scRNAseq确定所产生的细胞的百分比。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法还包括分离CD56+/CD3-细胞的步骤。

[0064] 在一些实施方案中,通过荧光激活细胞分选(FACS)或磁分选来分离CD56+/CD3-细胞。因此,在一些实施方案中,通过FACS分离细胞。在一些实施方案中,通过磁分选(MACS)分离细胞。

[0065] 在一些实施方案中,CD56+/CD3-免疫细胞是NK细胞。

[0066] 在一些实施方案中,CD56+/CD3-细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

[0067] 在一些实施方案中,所分离的CD56+/CD3-细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

[0068] 在一些实施方案中,所述抗原是CD19。

[0069] 在一些实施方案中,细胞被进一步遗传修饰以表达IL-15Rα/IL-15复合物。

[0070] 在一些方面,提供了产生诱导性多能干细胞(iPSC)衍生的CD56+/CD3-免疫细胞的方法,所述方法包括以下步骤:(1)在HPC诱导培养基中培养iPSC以获得包含造血祖细胞(HPC)的异质细胞群(HP细胞混合群),所述HPC诱导培养基包含选自血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和抗坏血酸中的至少一种化合物;(2)在包含抗坏

血酸、p38抑制剂和SDF-1中的一种或多种的CD4/CD8诱导培养基中培养在(1)中获得的HP细胞混合群，以获得中间异质细胞群；和(3)在包含选自由CD3激活剂、IL-2和IL-7组成的组的至少一种化合物的NK诱导培养基中培养来自(2)的中间异质细胞群。

[0071] 在一些方面，提供了NK细胞群，所述群是使用本文所述的方法产生的。

[0072] 在一些方面，提供了未分选的细胞群，所述群以不少于总多能干细胞衍生的CD56+免疫细胞的60％的比率包含多能干细胞衍生的CD56+/CD3-细胞。

[0073] 在一些实施方案中，少于25％的细胞是CD3+细胞。

[0074] 在一些实施方案中，少于5％的细胞是单核细胞。

[0075] 在一些实施方案中，少于5％的细胞是B细胞。

[0076] 在一些方面，提供了治疗需要细胞疗法的受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用本文所述的NK细胞。

[0077] 在一些实施方案中，所述受试者患有癌症。

[0078] 在一些实施方案中，所述癌症是白血病或淋巴瘤。

[0079] 在一些方面，提供了产生多能干细胞衍生的CD56+/CD3-免疫细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(I)在一种或多种培养基中培养多能干细胞以产生CD56+/CD3-免疫细胞。

[0080] 在一些实施方案中，步骤(I)包括：(A)在培养基中培养多能干细胞以产生造血祖细胞(HPC)(HP细胞混合群)；和(B)在培养基中培养步骤(A)中获得的细胞以产生CD56+/CD3-免疫细胞。

[0081] 在一些实施方案中，步骤(B)包括：(a)在培养基中培养步骤(A)中获得的细胞以产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群；和(b)在培养基中培养步骤(a)中获得的细胞以产生CD56+/CD3-免疫细胞。

[0082] 在一些实施方案中，任何先前步骤都不包括执行对包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的分离步骤。

[0083] 在一些实施方案中，所述多能干细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。

[0084] 在一些方面，提供了产生CD56+/CD3-免疫细胞的方法，所述方法包括以下步骤：(II)在培养基中培养包含造血祖细胞(HPC)的细胞(HP细胞混合群)以产生CD56+/CD3-免疫细胞。

[0085] 在一些实施方案中，步骤(II)包括：(X)在培养基中培养包含造血祖细胞(HPC)的细胞以产生CD4/CD8双阳性细胞；和(Y)在培养基中培养步骤(X)中获得的细胞以产生CD56+/CD3-免疫细胞。

[0086] 在一些实施方案中，步骤(II)不包括执行对CD4/CD8双阳性细胞的分离步骤。

[0087] 在一些实施方案中，步骤(A)包括具有至少一种化合物的培养基，所述至少一种化合物选自骨形态发生蛋白4(BMP4)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、抗坏血酸、Flt3配体(Flt3L)、血小板生成素(TPO)和TGFβ抑制剂。

[0088] 在一些实施方案中，步骤(a)或步骤(X)包括具有至少一种化合物的培养基，所述至少一种化合物选自由以下项组成的组：抗坏血酸、干细胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制剂和SDF-1。

[0089] 在一些实施方案中，步骤(b)或步骤(Y)包括具有至少一种化合物的培养基，所述至少一种化合物选自由CD3激活剂、IL-2和IL7组成的组。

[0090] 在一些实施方案中,所述方法还包括在含有IL-7和/或IL-15的培养基中培养在步骤(b)或步骤(Y)之后产生的细胞。

[0091] 在一些实施方案中,培养在约5%的氧气下进行。

[0092] 在一些实施方案中,步骤(A)持续约10天。在另一个实施方案中,步骤(A)持续约10-18天。

[0093] 在一些实施方案中,所述iPSC由外周血单核细胞产生。

[0094] 在一些实施方案中,至少约50%、55%、60%、75%、80%、85%或90%的所产生的细胞是CD56+/CD3-细胞。

[0095] 在一些实施方案中,少于约25%的所产生的细胞是CD3+细胞。

[0096] 在一些实施方案中,所述方法还包括分离CD56+/CD3-细胞的步骤。

[0097] 在一些实施方案中,通过荧光激活细胞分选(FACS)来分离CD56+/CD3-细胞。

[0098] 在一些实施方案中,所述CD56+免疫细胞是CD56+/CD3-的。

[0099] 在一些实施方案中,任何多能、多潜能或患者来源的HPC都可以与本文所述的方法一起使用。例如,在一些实施方案中,细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中,细胞是成体干细胞。各种成体干细胞是本领域已知的,并且包括例如间充质干细胞、造血干细胞、脐带衍生细胞、骨髓干细胞、脂肪干细胞等。在一些实施方案中,细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。因此,根据本文所述的方法产生的NK细胞可以由任何多能、多潜能或患者来源的HPC(诸如直接来自供体的原代HPC)制备。

[0100] 在一些实施方案中,用于产生本文所述的NK细胞的细胞在细胞分化的任何阶段被遗传修饰。在一些实施方案中,用于产生本文所述的NK细胞的细胞在多能、多潜能或单能阶段被遗传修饰。例如,在一些实施方案中,用于产生本文所述的NK细胞的细胞在多能阶段被遗传修饰。例如,细胞可以在胚胎干细胞阶段或iPSC干细胞阶段被遗传修饰。在一些实施方案中,用于产生本文所述的NK细胞的细胞在多潜能阶段被遗传修饰。例如,细胞可以在HSC阶段被遗传修饰。

[0101] 在一些实施方案中,其中所述细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

[0102] 在一些实施方案中,所分离的CD56+/CD3-细胞被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。

[0103] 在一些实施方案中,所述抗原是CD19。

[0104] 在一些实施方案中,细胞被进一步遗传修饰以表达IL-15Rα/IL-15复合物。

[0105] 在一些方面,提供了未分选的细胞群,所述细胞群以不少于总多能干细胞衍生的CD56+免疫细胞的60%的比率包含多能干细胞衍生的CD56+/CD3-细胞。

[0106] 在一些实施方案中,少于25%的细胞是CD3+细胞。

[0107] 在一些实施方案中,少于5%的细胞是单核细胞。

[0108] 在一些实施方案中,少于5%的细胞是B细胞。

[0109] 在一些方面,提供了治疗需要细胞疗法的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者施用如前述权利要求中任一项所述的多能干细胞衍生的CD56+/CD3-免疫细胞。

[0110] 在一些实施方案中,所述受试者患有癌症。

[0111] 在一些实施方案中,所述癌症是白血病或淋巴瘤。

[0112] 在本文所述的方法中使用各种培养基，包括例如HPC诱导培养基、CD4/CD8诱导培养基和NK诱导培养基。

[0113] 在一些方面，将诱导性多能细胞(iPSC)在HPC诱导培养基中培养一段时间以产生包含造血祖细胞的细胞群，该细胞群在本文中被称为HP细胞混合群。在一些实施方案中，该时间段在约10天与14天之间。在一些实施方案中，该时间段为约13天。在一些实施方案中，HPC诱导培养基包含BMP4、VEGF、bFGF、抗坏血酸、TGFβ抑制剂、干细胞因子(SCF)、血小板生成素TPO和Flt3L中的一种或多种。在一些实施方案中，从第1天至约第10天将iPSC在包含VEGF、bFGF、抗坏血酸的HPC诱导培养基中培养。在一些实施方案中，VEGF的浓度为约50ng/mL。在一些实施方案中，bFGF的浓度为约50ng/mL。在一些实施方案中，抗坏血酸的浓度为约50μg/mL。在一些实施方案中，从第1天至约第3天将iPSC在包含BMP4的HPC诱导培养基中培养。在一些实施方案中，BMP4的浓度为约50ng/mL。在一些实施方案中，从约第2天至约第3天将iPSC与TGFβ抑制剂(诸如浓度为约6μM的SB431542)一起培养。在一些实施方案中，在培养的第7-13天之间，向培养物中添加干细胞因子(SCF)、血小板生成素TPO和Flt3L中的一种或多种。在一些实施方案中，以约50ng/mL的浓度添加SCF。在一些实施方案中，以约30ng/mL的浓度添加TPO。在一些实施方案中，以约10ng/mL的浓度添加Flt3L。

[0114] 在一些方面，将HP细胞混合群在CD4/CD8诱导培养基中培养一段时间以产生包含中间异质细胞群的细胞群，所述中间异质细胞群包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-细胞和CD4+/CD8+细胞。在一些实施方案中，将HP细胞混合群在CD4/CD8诱导培养基中培养19天至22天之间。在一些实施方案中，将HP细胞混合群在CD4/CD8诱导培养基中培养约21天。在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基包含抗坏血酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi抑制剂(诸如SB203580)、SDF1a中的一种或多种。在一些实施方案中，抗坏血酸的浓度为约50μg。在一些实施方案中，SCF的浓度为50ng/mL。在一些实施方案中，TPO的浓度为约100ng/mL。在一些实施方案中，Flt3L的浓度为约50ng/mL。在一些实施方案中，IL7的浓度为约50ng/mL。在一些实施方案中，SB203580的浓度为约15μM。在一些实施方案中，SDF1a的浓度为约30nM。在一些实施方案中，在用hDLL4/RetroNectin包被的皿上培养HP细胞混合群。

[0115] 在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基包含选自由抗坏血酸、干细胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、血小板生成素(TPO)、p38抑制剂和SDF-1组成的组的至少一种化合物。在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基包含p38抑制剂。在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基包含SDF-1。在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基包含p38抑制剂和SDF-1。

[0116] 在一些方面，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-和CD4+/CD8+细胞的异质细胞群在NK诱导培养基中培养一段时间以产生包含CD56+/CD3-NK细胞的细胞群。在一些实施方案中，将异质细胞群在NK诱导培养基中培养约5-9天之间的时间段。在一些实施方案中，将细胞群培养约7天。在一些实施方案中，NK细胞诱导培养基包含IL-7、IL-2和抗CD3抗体中的一种或多种。在一些实施方案中，将异质细胞群在包含IL-7和IL-2的NK细胞诱导培养基中培养约7天。在一些实施方案中，IL-7的浓度为约10ng/mL。在一些实施方案中，IL-2的浓度为约10ng/mL。在一些实施方案中，将异质群在包含抗CD3的NK细胞诱导培养基中培养约3天的时间段。在一些实施方案中，该方法产生大于50％、60％、70％、80％、90％或95％的CD56+/CD3-细胞。因此，在一些实施方案中，该方法产生大于50％的CD56+/CD3-细

胞。在一些实施方案中，该方法产生大于60％的CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中，该方法产生大于70％的CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中，该方法产生大于80％的CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中，该方法产生大于90％的CD56+/CD3-细胞。在一些实施方案中，该方法产生大于95％的CD56+/CD3-细胞。

附图说明

[0117] 图1是显示使用本文所述的方法获得的NK细胞混合群的流式细胞术分析结果的一系列流式细胞术图。简言之，如本文所述培养iPS细胞，无需中间分离步骤。流式细胞术图显示$CD56^{high}$的CD3阴性细胞群(NK细胞混合群的大约63.5％)和$CD56^{dim}$的CD3阴性细胞群(NK细胞混合群的大约26.7％)的存在。这两种群都是NK细胞。因此，所获得的总CD56阳性、CD3阴性NK细胞群为总细胞群的大于90％。

[0118] 图2显示了使用本文所述的方法获得的NK细胞混合群的scRNA分析结果。简言之，如本文所述培养iPS细胞，无需中间分离步骤。将细胞分成四种细胞群，即单核细胞、B细胞、NK细胞和T细胞。NK细胞混合群中大约75％的细胞被鉴定为NK细胞(CD56+/CD3-细胞)，而混合细胞群中大约25％的细胞被鉴定为T细胞。本文所述的T细胞可以包括NKT细胞(CD56+/CD3+细胞)。

[0119] 图3描绘了一系列照片，其显示施用过表达萤光素酶的Nalm6细胞然后施用iNK-CAR19细胞的NSG(NOD/Shi-scid，IL-2Rγ无效)小鼠中抗肿瘤活性测定的结果。用(a)PBS缓冲液和(b)iNK-CAR细胞治疗移植Nalm6细胞的NSG小鼠，并且观察这些治疗的抗肿瘤功效。数据显示iNK-CAR细胞减少Nalm6细胞的增殖。

[0120] 定义

[0121] 施用：如本文所用，术语“施用”(“administer”、“administering”或“administration”)、“引入”(“introducing”或“introduction”)在通过导致治疗性细胞例如iPSC或HPC衍生的CD56+/CD3-免疫细胞的递送的方法或途径将此类细胞递送至受试者中的上下文中可互换使用。用于施用细胞的各种方法是本领域已知的，包括例如静脉内、局部、口服、肌内、腹膜内、鞘内、皮下或透皮。细胞可以与或不与载体一起施用。

[0122] 过继细胞疗法：如本文可互换使用的，术语“过继细胞疗法”或“过继细胞转移”或“细胞疗法”或“ACT”是指细胞(例如，使用本文所述的方法产生并施用至有需要的受试者或患者中的CD56+/CD3-细胞群)的转移。在一些实施方案中，所述细胞是使用本文所述的方法制备并另外表达CAR的CD56+/CD3-免疫细胞。

[0123] 动物：如本文所用，术语“动物”是指动物界的任何成员。在一些实施方案中，“动物”是指处于任何发育阶段的人。在一些实施方案中，“动物”是指处于任何发育阶段的非人动物。在某些实施方案中，非人动物是哺乳动物(例如，啮齿动物、小鼠、大鼠、兔、猴、狗、猫、绵羊、牛、灵长类动物和/或猪)。在一些实施方案中，动物包括但不限于哺乳动物、鸟类、爬行动物、两栖动物、鱼类、昆虫和/或蠕虫。在一些实施方案中，动物可以是转基因动物、遗传工程化动物和/或克隆。

[0124] 抗原特异性靶向结构域：“抗原特异性靶向结构域”为CAR提供结合感兴趣的靶抗原的能力。在一些实施方案中，抗原特异性靶向结构域靶向临床感兴趣的抗原，期望针对该抗原引发导致肿瘤杀伤的效应免疫应答。抗原特异性靶向结构域可以是具有特异性地识别

和结合生物分子(例如,细胞表面受体或肿瘤蛋白或其组分)的能力的任何蛋白质或肽。抗原特异性靶向结构域包括感兴趣的生物分子的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。

[0125] 说明性的抗原特异性靶向结构域包括例如抗体或抗体片段或衍生物、受体的胞外结构域、细胞表面分子/受体的配体或其受体结合结构域和肿瘤结合蛋白。

[0126] 在一些实施方案中,抗原特异性靶向结构域是或衍生自抗体。抗体衍生的靶向结构域可以是抗体的片段或抗体的一个或多个片段的基因工程化产物,该片段参与了与抗原的结合。实例包括可变区(Fv)、互补决定区(CDR)、Fab、单链抗体(scFv)、重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)和骆驼科动物抗体(VHH)。

[0127] 在一些实施方案中,结合结构域是单链抗体(scFv)。scFv可以是鼠、人或人源化scFv。

[0128] 同种异体:如本文所用的"同种异体的"是指源自与引入材料的个体相同的物种的不同动物的任何材料。当在一个或多个基因座上的基因不相同时,认为两个或更多个个体彼此是同种异体的。在一些方面,来自相同物种的多个个体的同种异体材料在遗传上可充分不同以发生抗原相互作用。

[0129] 大约或约:如本文所用,应用于一个或多个感兴趣值的术语"大约"或"约"是指与陈述的参考值相似的值。在某些实施方案中,除非另有说明或从上下文中明显看出,否则术语"大约"或"约"是指在陈述的参考值的任一方向上(大于或小于陈述的参考值)落入25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小以内的值的范围(除了这样的数将超过可能值的100%的情况外)。应当理解,当术语"约"或"大约"用于修饰陈述的参考值时,所陈述的参考值本身连同在陈述的参考值的任一侧上接近陈述的参考值的值一起涵盖在内。

[0130] 抗坏血酸或维生素C:如本文所用的"抗坏血酸"或"维生素C"是指L-抗坏血酸及其衍生物,并且"L-抗坏血酸衍生物"意指通过在活体中的酶促反应变成维生素C的衍生物。L-抗坏血酸衍生物的实例包括维生素C磷酸酯、抗坏血酸葡糖苷、抗坏血酸乙基酯、维生素C酯、抗坏血酸四己基癸酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯和抗坏血酸2-磷酸酯6-棕榈酸酯。维生素C磷酸酯的实例包括L-抗坏血酸磷酸酯的盐,诸如L-抗坏血酸磷酸酯Na和L-抗坏血酸磷酸酯Mg。在一个实施方案中,维生素C可以是抗坏血酸2-磷酸酯。

[0131] 混合细胞群:术语"混合细胞群"、"混合细胞(bulk cell)"等是指异质细胞群。在一些实施方案中,混合细胞群包含造血细胞。在一些实施方案中,混合细胞群可以从多能细胞(例如诱导性多能干细胞)获得。在一些实施方案中,从供体组织(包括例如血液)获得混合细胞群。

[0132] CD4/CD8诱导培养基:如本文所用的术语CD4/CD8诱导培养基是指用于获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4+/CD8+细胞、CD4+/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞的细胞群的细胞培养基。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基用于将HP细胞混合群分化成包含CD4-/CD8-细胞、CD4+/CD8+细胞、CD4+/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞的细胞群。在一些实施方案中,CD4/CD8诱导培养基包含抗坏血酸、SCF、TPO、Flt3L、IL7、p38MAPKi抑制剂(诸如SB203580)和SDF1a中的一种或多种或全部。

[0133] 嵌合抗原受体(CAR):如本文所用,术语"嵌合抗原受体"或"CAR"工程化受体可以

赋予细胞(例如NK细胞、T细胞(诸如幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或它们的组合))抗原特异性。CAR也被称为人工T细胞受体、嵌合T细胞受体或嵌合免疫受体。在一些实施方案中,本发明的CAR包含抗原特异性靶向结构域、胞外结构域、跨膜结构域,任选地一个或多个共刺激结构域和胞内信号传导结构域。在本文所述的一些实施方案中,将CAR引入使用本文所述的方法制备的CD56+/CD3-免疫细胞(例如,NK或NK样细胞)中,从而重新定向对期望的细胞表面抗原或MHC-肽复合物的特异性。这些合成受体通常含有靶结合结构域,该靶结合结构域通过单个融合分子中的柔性接头与一个或多个信号传导结构域缔合。靶结合结构域用于将免疫细胞(例如,CD56+/CD3+免疫细胞)导向病理细胞(例如,癌细胞)表面上的特异性靶标,并且信号传导结构域含有用于免疫细胞(例如,CD56+/CD3-免疫细胞)激活和增殖的分子机器。通常穿过免疫细胞(例如,CD56+/CD3-细胞)膜(即,形成跨膜结构域)的柔性接头允许CAR的靶结合结构域的细胞膜展示。CAR已经成功地允许免疫细胞针对在来自各种恶性肿瘤(包括淋巴瘤和实体瘤)的肿瘤细胞表面上表达的抗原重新定向(Gross等人,(1989)Transplant Proc.,21(1 Pt 1):127-30;Jena等人,(2010)Blood,116(7):1035-44)。CAR的胞外结合结构域可以由从融合鼠或人源化单克隆抗体的可变重链和轻链区来源的单链可变片段(scFv)构成。在一些实施方案中,胞外结合结构域包含单结构域抗体。可替代地,可以使用衍生自Fab'(而不是抗体,例如从Fab文库获得)的scFv。在各种实施方案中,该scFv与跨膜结构域融合,然后与胞内信号传导结构域融合。已经开发了至少三代CAR。第一代CAR包含与从CD3ζ或Fc受体γ链的胞质区衍生的信号传导结构域连接的靶结合结构域。第一代CAR被证明成功地将免疫细胞重定向到所选的靶标,但它们不能在体内提供延长的扩增和抗肿瘤活性。第二代和第三代CAR已经集中于通过包括共刺激分子诸如CD28、OX-40(CD134)和4-1BB(CD137)来增强经修饰的细胞存活和增加增殖。

[0134] 培养:术语“培养(culture)”或“细胞培养物”或“培养(culturing)”是指细胞在体外环境中的维持、生长和/或分化。在本文所述的各种方法中,在帮助或促进一种类型的细胞生长或分化为不同类型的细胞的特定细胞培养基(medium)(或在复数情况下的“培养基(media)”)中培养细胞。例如,在本文所述的某些实施方案中,在细胞培养基中培养iPSC导致总细胞群中至少20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%的细胞变成CD34+细胞(即HPC)。在本文所述的一些实施方案中,培养含有至少20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%30%HPC的细胞群产生包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-和CD4+/CD8+细胞的细胞群。在又其他实施方案中,培养含有CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8-和CD4+/CD8+细胞的细胞群产生富集的CD56+/CD3-细胞群(即,总细胞群中至少50%的细胞是CD56+/CD3-)。细胞培养基充当营养素、激素和/或有助于增殖和/或维持细胞的其他因子的来源。

[0135] 分化:术语“分化”、“诱导”、“转化”、“衍生”等是指一种表型的细胞改变为另一种表型的细胞的过程。

[0136] 工程化:如本文所用的术语“工程化”描述已经被设计或修饰的和/或其存在和产生需要干预和/或活性的多核苷酸、多肽或细胞。例如,有意设计成引起特定效应并且不同于相同类型的天然存在的细胞的效应的工程化细胞。在一些实施方案中,工程化细胞是使用本文所述的方法衍生自iPSC或HPC的CD56+/CD3-细胞,并且还表达嵌合抗原受体。

[0137] 富集:如本文所用的关于特定细胞类型的术语“富集的”意指细胞群具有如通过流

式细胞术或其他分析方法确定的在细胞群内至少20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％或90％的特定细胞类型。

[0138] 离体：如本文所用，术语“离体”意指其中细胞从活生物体中移出并在生物体外(例如，在试管中、在培养袋中、在生物反应器中)繁殖的过程。

[0139] 功能性等同物或衍生物：如本文所用，术语“功能性等同物”或“功能性衍生物”在氨基酸序列的功能性衍生物的上下文中表示保留与原始序列基本上相似的生物活性(功能或结构)的分子。功能性衍生物或等同物可以是天然衍生物或合成制备的。示例性功能性衍生物包括具有一个或多个氨基酸的取代、缺失或添加的氨基酸序列，条件是蛋白质的生物活性是保守的。取代氨基酸理想地具有与被取代的氨基酸相似的化学-物理特性。理想的类似化学-物理特性包括电荷、体积、疏水性、亲水性等的相似性。

[0140] 造血祖细胞：术语“造血祖细胞”或“HPC”是指CD34+细胞，其定向于造血谱系但能够进一步造血分化并且包括造血干细胞、多能造血干细胞、普通骨髓祖细胞、巨核细胞祖细胞、红细胞祖细胞和淋巴祖细胞。

[0141] HPC混合群(HPC bulk)：术语“HPC混合群”，“造血祖细胞混合群”或“HP细胞混合群”意指包含造血祖细胞的异源细胞群。在一些实施方案中，HPC混合群衍生自iPSC。在一些实施方案中，HPC混合群来源于血液。

[0142] HPC衍生的NK细胞：术语“HPC衍生的NK细胞”意指在细胞培养基中培养后从HPC混合群获得的CD56+/CD3-免疫细胞(例如NK或NK样细胞)。

[0143] HPC诱导培养基：如本文所用的术语HPC诱导培养基是指用于从起始细胞群产生包含造血细胞的细胞群的培养基。在一些实施方案中，起始细胞群是iPSC。在一些实施方案中，HPC诱导培养基包含BMP4、VEGF、bFGF、抗坏血酸、TGFβ抑制剂、干细胞因子(SCF)、血小板生成素TPO和Flt3L中的一种或多种。

[0144] 免疫细胞：如本文所用，术语“免疫细胞”(“immune cell”或“immune cells”)是指免疫系统的细胞，包括但不限于T细胞、NK细胞、T/NK细胞、树突细胞、巨噬细胞、B细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞以及它们的任何组合。在各种实施方案中，使用本文所述的方法产生的免疫细胞是NK细胞，表征为CD56+/CD3-细胞。

[0145] 诱导性多能干细胞(iPSC)：如本文所用，术语“诱导性多能干细胞”或“iPSC”是指例如通过诱导一种或多种基因(包括POU4F1/OCT4(基因ID;5460)组合但不限于SOX2(基因ID;6657)、KLF4(基因ID;9314)、cMYC(基因ID;4609)、NANOG(基因ID;79923)、LIN28/LIN28A(基因ID;79727))的表达人工地衍生(例如，诱导)自非多能细胞(通常成年体细胞)的多能干细胞。干细胞可以在任何阶段用标记或基因进行遗传修饰，从而使标记或基因进入培养的任何阶段。所述标记可以用于在培养的任何阶段纯化或富集分化或未分化的干细胞群。

[0146] 诱导培养基：术语“诱导培养基”通常是指用于将细胞群从第一细胞表型分化为第二细胞表型的细胞培养基。在一些实施方案中，第一细胞表型和第二细胞表型包含异质细胞群。在一些实施方案中，第一细胞表型包含异质细胞群。在一些实施方案中，第二细胞表型包含异质细胞群。在一些实施方案中，诱导培养基用于将异质细胞群分化为基本上同质的细胞群。

[0147] 体外：如本文所用，术语“体外”是指在人工环境中(例如，在试管或反应容器中、在

细胞培养物中等)而不是在多细胞生物体内发生的事件。

[0148] 体内:如本文所用,术语“体内”是指在多细胞生物体诸如人和非人动物内发生的事件。在基于细胞的系统的上下文中,该术语可用于指在活细胞内(而不是例如在体外系统中)发生的事件。

[0149] 分离步骤:如本文所用的术语“分离步骤”或“细胞分离步骤”意指从细胞混合物中分离特定细胞类型的步骤。从细胞混合物中分离特定细胞类型的各种方法是本领域已知的,并且包括例如荧光激活细胞分选(FACS)和基于磁珠的分选策略诸如磁激活细胞分选(MACS)。

[0150] 自然杀伤(NK)细胞:如本文所用,“天然杀伤细胞”或NK细胞是由其标记表达和功能/活性定义的淋巴样细胞。例如,在人中,NK细胞表达CD56。在另外的实施方案中,此类NK细胞可以表达CD56和CD16。在另一个实例中,此类NK细胞可以是CD56+/CD3-细胞。NK细胞可以表达可变水平的CD56。例如,NK细胞可以是“$CD56^{high}$”,这意味着NK细胞表达高水平的CD56,如通过本领域的方法评估的,例如通过流式细胞术评估的。作为另一个实例,NK细胞可以是“$CD56^{dim}$”,这意味着NK细胞表达低但可检测水平的CD56,如通过本领域的方法评估的,例如通过流式细胞术评估的。

[0151] NK诱导培养基:在一些实施方案中,术语“NK诱导培养基”是指用于产生包含CD56+/CD3-细胞的细胞群的细胞培养基。在一些实施方案中,NK细胞诱导培养基包含IL-7、IL-2和抗CD3抗体中的一种或多种。

[0152] iPS NK细胞:如本文所用,“iPS NK细胞”是iPSC衍生的NK细胞,例如衍生自iPSC作为起始材料的NK细胞。这样的iPS NK细胞表达CD56。在另外的实施方案中,此类iPS NK细胞可以表达CD56和CD16。在另一个实例中,此类iPS NK细胞可以表达CD56并且是CD3-(CD56+/CD3-)的。iPS NK细胞在本文中也被称为“iNK细胞”。

[0153] T细胞:如本文所用的“T细胞”是由其标记表达和功能/活性定义的淋巴样细胞。例如,在人中,T细胞表达CD3。CD56+/CD3+细胞被称为NKT细胞。

[0154] “单链Fv抗体”或“scFv”是指包含直接或通过肽接头序列彼此连接的轻链可变区和重链可变区的工程化抗体。

[0155] 受试者:如本文所用,术语“受试者”是指人或任何非人动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括出生前和出生后形式。在许多实施方案中,受试者是人类。受试者可以是患者,其是指提供给医疗提供者用于诊断或治疗疾病的人。术语“受试者”在本文中可与“个体”或“患者”互换使用。受试者可以患有或易患疾病或障碍,但可显示或可不显示该疾病或障碍的症状。

[0156] 患有:“患有”疾病、障碍和/或病症的个体已被诊断具有或显示该疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状。所述疾病可以包括癌症,例如淋巴瘤和白血病。

[0157] 治疗有效量的:如本文所用,术语治疗剂(例如,细胞疗法)的“治疗有效量”意指当施用于患有或易患疾病、障碍和/或病症的受试者时足以治疗、诊断、预防疾病、障碍和/或病症和/或延迟其症状的发作的量(例如,一定数量的细胞或富集一定百分比的一种或多种特定类型的细胞的细胞群)。本领域普通技术人员将理解,治疗有效量通常经由包含至少一个单位剂量的给药方案施用。在一些实施方案中,本文所述的CD56+/CD3-细胞被修饰以表达一种或多种转基因。在一些实施方案中,本文所述的CD56+/CD3-细胞被修饰以表达嵌合

抗原受体,例如CD19。在一些实施方案中,将约1亿至9亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,将约1亿至7亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,将约1亿至5亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,将约2亿至9亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,将约2亿至7亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。在一些实施方案中,将约2亿至5亿个之间的本文所述的CD56+/CD3-细胞施用于有需要的受试者。

[0158] 治疗:如本文所用,术语“治疗”是指用于部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟特定疾病、障碍和/或病症的一种或多种症状或特征发作、降低其严重程度和/或降低其发生率的任何方法。可向未表现出疾病迹象和/或仅表现出疾病早期迹象的受试者施用治疗,以降低发展与该疾病相关的病理学的风险。

[0159] 本文中通过端点表述的数值范围包括该范围内包含的所有数值和分数(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.9、4和5)。还应当理解,所有的数值及其分数被假定为由术语“约”修饰。

[0160] 本发明的各个方面在以下部分中详细描述。这些部分的使用并不意味着限制本发明。每个部分可以应用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。如本文所用,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括单数和复数指示物,除非上下文另有明确说明。

[0161] 本发明的各个方面在以下部分中详细描述。这些部分的使用并不意味着限制本发明。每个部分可以应用于本发明的任何方面。在本申请中,除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。

具体实施方式

[0162] 本公开提供了从多能细胞诸如iPS细胞或造血祖细胞(HPC)产生NK细胞的方法。从iPSC产生的NK细胞在本文中被称为iPS衍生的NK细胞、iPS NK细胞或iNK细胞。本公开提供了细胞培养方法,其中祖细胞诸如iPSC或HPC可以高效率地分化为NK细胞或iPS NK细胞,而不需要分离步骤。本公开还显示,所获得的iPS NK细胞是功能性的并且可以例如通过引入嵌合抗原受体(CAR)进一步进行遗传修饰,用于治疗各种疾病或障碍,诸如癌症。

[0163] 下文更详细地描述了产生CD56+/CD3-细胞(NK细胞)的各种方法。

[0164] 从多能细胞产生NK或iPS衍生的NK细胞而无需分离步骤的方法

[0165] 在一些实施方案中,提供了产生NK细胞或iPS衍生的NK细胞的方法,该方法不需要分离步骤。

[0166] 培养方法的概述

[0167] 本文提供的方法允许产生CD56+/CD3-细胞而无需任何中间分离步骤。在一些实施方案中,所述方法包括在HPC诱导培养基中培养多能干细胞,诸如iPSC,以获得包含造血细胞(HPC)的细胞群(HP细胞混合群)。随后在CD4/CD8诱导培养基中培养HP细胞混合群而不执行分离步骤,以获得包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群。在一些实施方案中,包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群还包含CD4+/CD8-细胞、CD4-/CD8-细胞和CD4-/CD8+细胞。随后是不执行分离步骤的后续培养期,其中在NK诱导培养基中培养细胞以获得富集CD56+/CD3-免疫细胞

的群体。因此,在一些实施方案中,产生CD56+/CD3-细胞的方法包括:1)在HPC诱导培养基中培养多能细胞以获得包含造血细胞的群体(HP细胞混合群);2)在CD4/CD8诱导培养基中培养HP细胞混合群以获得包含CD4+/CD8-细胞、CD4-/CD8-细胞和CD4-/CD8+细胞的细胞群;和3)在NK诱导培养基中培养包含CD4+/CD8-细胞、CD4-/CD8-细胞和CD4-/CD8+细胞的细胞群一段时间以获得CD56+/CD3-细胞。

[0168] 在一些实施方案中,产生NK细胞或iPS NK细胞的方法包括培养包含造血祖细胞的细胞(例如,HP细胞混合群)以产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群,随后是不执行分离步骤的后续培养期,其中在培养基中培养细胞群以获得富集CD56+/CD3-免疫细胞的群体。在一些实施方案中,产生多能干细胞衍生的CD56+/CD3-免疫细胞的方法包括在一种或多种培养基中培养多能干细胞。在一些实施方案中,产生CD56+/CD3-免疫细胞的方法包括在一种或多种培养基中培养造血祖细胞。在一些实施方案中,产生CD56+/CD3-免疫细胞的方法包括在一种或多种培养基中培养包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞混合物或细胞群。在一些实施方案中,随后可以通过本领域已知的任何合适的方法(例如通过FACS分选或基于磁珠的分离技术)分离富集CD56+/CD3-免疫细胞的群体。在一个实施方案中,iPS细胞可以在约4-8周、5-7周或6周左右内分化为iPS NK细胞。因此,在一些实施方案中,所述iPS细胞可以在约4-8周内分化为NK细胞。在一些实施方案中,所述iPS细胞可以在约5-7周内分化为NK细胞。在一些实施方案中,所述IPS细胞可以在约6周内分化为NK细胞。

[0169] 可以通过本领域已知的各种方法评估细胞分化过程。例如,在一些实施方案中,可以通过获得培养细胞的样品并使培养细胞的样品经受一种或多种分析方法以确定细胞的细胞表型来评估培养的细胞的细胞分化。确定细胞表型的已知方法包括例如流式细胞术和免疫荧光成像。任何合适的取样和表型分型都可以与本文所述的细胞培养方法一起使用以确定细胞分化过程的进展。在一些实施方案中,本文所述的方法包括在给定时间确定细胞表型的一个或多个取样步骤。

[0170] iPSC至HP细胞混合群的概述

[0171] 在一些实施方案中,将多能细胞诸如iPSC在HPC诱导培养基中培养以产生包含HP细胞混合群的群体。在一些实施方案中,在HPC诱导培养基中培养iPSC以获得HPC细胞混合群包括在HPC诱导培养基中培养iPSC。HPC诱导培养基可以包含允许产生HP细胞混合群的各种组分。在一些实施方案中,HPC诱导培养基包含选自骨形态发生蛋白4(BMP4)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、抗坏血酸、ROCK抑制剂、GSK3抑制剂、干细胞因子(SCF)、血小板生成素(TPO)、Flt3L和TGFβ抑制剂的至少一种或多种化合物。因此,在一些实施方案中,从iPSC诱导HPC的HPC诱导培养基包含BMP4。在一些实施方案中,从iPSC诱导HPC的培养基包含VEGF。在一些实施方案中,从iPSC诱导HPC的培养基包含bFGF。在一些实施方案中,从iPSC诱导HPC的培养基包含TGFβ。

[0172] 将iPSC在HPC诱导培养基中培养足以产生HP细胞混合群的一个时间段。在一些实施方案中,将iPSC在HPC诱导培养基中培养约7-21天之间、或10-18天之间或14天左右的时间段。在一些实施方案中,将iPSC在HPC诱导培养基中培养约13天的时间段。

[0173] 在一些实施方案中,在低氧条件(例如约3%、4%、5%或6%的O_2)下培养细胞。因此,在一些实施方案中,在约3%O_2下培养细胞。在一些实施方案中,在约4%O_2下培养细胞。在一些实施方案中,在约5%O_2下培养细胞。在一些实施方案中,在约6%O_2下培养细胞。

[0174] HP细胞混合群至CD4/CD8的概述

[0175] 在一些实施方案中，将HPC细胞混合群或以其他方式获得的HPC(例如从人供体分离的原代HPC或从其他干细胞来源/类型分化的(诸如胚胎干细胞衍生的)HPC)在培养基中进一步培养而无需任何中间分离步骤，以获得包含CD4/CD8双阳性(DP)细胞的细胞群。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群或以其他方式获得的HPC(例如从人供体分离的原代HPC或从其他干细胞来源/类型分化的(诸如胚胎干细胞衍生的)HPC)在培养基中进一步培养而无需任何中间分离步骤，以获得包含CD4+/CD8细胞的细胞群。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群或以其他方式获得的HPC(例如从人供体分离的原代HPC或从其他干细胞来源/类型分化的(诸如胚胎干细胞衍生的)HPC)在培养基中进一步培养而无需任何中间分离步骤，以获得包含CD4-/CD8-细胞的细胞群。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群或以其他方式获得的HPC(例如从人供体分离的原代HPC或从其他干细胞来源/类型分化的(诸如胚胎干细胞衍生的)HPC)在培养基中进一步培养而无需任何中间分离步骤，以获得包含CD4-/CD8+细胞的细胞群。应当理解，通过该方法获得的细胞群包括CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞。细胞群包括例如淋巴细胞。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在具有选自由抗坏血酸、干细胞因子(SCF)、IL-7、Flt3L、TPO、纤连蛋白或其变体、Notch配体(例如，Jag-1、Jag-2、DLL-1、DLL-3、DLL-4)、p38抑制剂和SDF-1组成的组的至少一种化合物的CD4/CD8诱导培养基中培养，以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。因此，在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含抗坏血酸的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含SCF的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含IL-7的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含Flt3L的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含p38抑制剂的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。在一些实施方案中，将HPC细胞混合群在包含SDF-1的CD4/CD8诱导培养基中培养以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体。

[0176] 培养期持续适合于获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群的时间。在一些实施方案中，培养HP细胞混合群体以获得包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群为约2-6周;3-5周或3周左右。因此，在一些实施方案中，细胞培养期持续约2-6周。在一些实施方案中，细胞培养期持续约3-5周。在一些实施方案中，细胞培养期持续约3周。

[0177] 在一些实施方案中，在低氧条件(例如约3％、4％、5％或6％的O_2)下培养细胞。因此，在一些实施方案中，在低氧条件(例如约3％O_2)下培养细胞。在一些实施方案中，在低氧条件(例如约4％O_2)下培养细胞。在一些实施方案中，在低氧条件(例如约5％O_2)下培养细胞。在一些实施方案中，在低氧条件(例如约6％O_2)下培养细胞。

[0178] CD4/CD8细胞至CD56+/CD3-细胞的概述

[0179] 可以将如上所述包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群在细胞培养基中进一步培养以获得CD56+/CD3-细胞群。在一些实施方案中，所述培养基是NK诱导培养基。在一些实施方案中，NK诱导培养基包含IL-7、IL-2和抗CD3抗体中的一种或多种。

[0180] 在一些实施方案中，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群在培养基中进一步培养而无需中间分离步骤，以获得富集CD56+/CD3-细胞的细胞群。此类CD56+细胞包括例如自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体在包含CD3激活剂、IL-2和/或IL-7的培养基中培养。因此，在一些实施方案中，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体在包含CD3激活剂的培养基中培养。CD3激活剂是本领域已知的，并且包括例如结合CD3和/或CD28表面配体的抗体复合物。CD3激活剂包括例如抗CD3抗体，或者可以使用与其结合的片段。在一些实施方案中，当使用抗CD3抗体时，抗CD3抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。在一些实施方案中，抗CD3抗体是多克隆抗体。在一些实施方案中，抗CD3抗体是单克隆抗体。抗体可以属于IgG、IgA、IgM、IgD、IgE或IgG中的任何免疫球蛋白类别。可以使用各种种类的抗CD3抗体，包括例如可以使用从OKT3克隆或UCHT1克隆产生的抗体。抗CD3抗体在培养基中的浓度为例如10ng/ml-1000ng/ml之间。

[0181] 在一些实施方案中，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体在包含IL-2的培养基中培养。在一些实施方案中，将包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的群体在包含IL-7的培养基中培养。在一些实施方案中，在低氧条件(例如约3％、4％、5％或6％的O_2)下培养细胞。因此，在一些实施方案中，在约3％O_2下培养细胞。在一些实施方案中，在约4％O_2下培养细胞。在一些实施方案中，在约5％O_2下培养细胞。在一些实施方案中，在约6％O_2下培养细胞。

[0182] 包含CD56+细胞的细胞群可以在NK诱导培养基中进一步培养以富集CD56+/CD3-细胞群。在一些实施方案中，将包含CD56+细胞的细胞群在包含IL-7和/或IL-15的NK诱导培养基中培养以进一步富集CD56+细胞。因此，在一些实施方案中，将包含CD56+细胞的细胞群在包含IL-7的NK诱导培养基中培养。在一些实施方案中，将包含CD56+细胞的细胞群在包含IL-15的NK诱导培养基中培养。在一些实施方案中，在低氧条件(例如约3％、4％、5％或6％的O_2)下培养细胞。在一些实施方案中，所产生的CD56+/CD3-细胞是NK细胞。所产生的CD56+/CD3-NK细胞的百分比为至少约50％、55％、60％、75％、80％、85％、90％、95％或大于95％％。因此，在一些实施方案中，所述方法产生至少约50％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约55％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约60％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约65％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约70％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约75％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约80％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约85％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约90％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生至少约95％的CD56+/CD3-NK细胞。在一些实施方案中，所述方法产生超过95％的CD56+/CD3-NK细胞。

[0183] 在一些实施方案中，通过该培养方法产生的细胞的约5％、10、15％、20％、25％或约30％是CD3+T细胞。在一些实施方案中，少于5％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约5％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约10％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约15％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约20％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约25％的所产生的细胞是CD3+T细胞。在一些实施方案中，约30％的所产生的细胞是CD3+T细胞。

[0184] 在一些实施方案中，通过本领域已知的方法分离富集CD56+/CD3-细胞的群体。此类方法包括例如基于流式细胞术(FACS)的分选方法和基于磁珠的分选方法(MACS)。

[0185] 在一些实施方案中，从包含CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞、CD4+/CD8+细胞和CD4+/CD8细胞的群体获得CD56+/CD3-NK细胞的培养期为约4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天或18天。在一些实施方案中，培养期为约7天。

[0186] 在一些实施方案中，富集的CD56+细胞群包含NK细胞。在一些实施方案中，富集的CD56+细胞包含CD3-细胞。在一些实施方案中，富集的CD56+细胞包含CD3+细胞。

[0187] 用于分化为CD56+/CD3-细胞的合适的多能细胞

[0188] 在一些实施方案中，任何多能、多潜能或患者来源的HPC都可以与本文所述的方法一起使用。例如，在一些实施方案中，细胞是胚胎干细胞。在一些实施方案中，细胞是成体干细胞。各种成体干细胞是本领域已知的，并且包括例如间充质干细胞、造血干细胞、脐带衍生细胞、骨髓干细胞、脂肪干细胞等。在一些实施方案中，细胞是诱导性多能干细胞(iPSC)。因此，根据本文所述的方法产生的NK细胞可以由任何多能、多潜能或患者来源的HPC(诸如直接来自供体的原代HPC)制备。

[0189] 在一些实施方案中，多能细胞包括例如胚胎干(ES)细胞、从通过核移植获得的克隆胚胎衍生的胚胎干细胞(ntES细胞)、种系干细胞(“GS细胞”)、胚胎生殖细胞(“EG细胞”)、iPS细胞和从培养的成纤维细胞或骨髓干细胞衍生的多能细胞(Muse细胞)。在一些实施方案中，所述iPS细胞可以源自健康个体的外周血单核细胞。用于产生iPS细胞的方法是本领域已知的。这些细胞可以通过将重新编程因子引入任意体细胞而产生。本文的重新编程因子的实例包括基因诸如Oct3/4、Sox2、Soxl、Sox3、Sox15、Soxl 7、Kif 4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tell、β-连环蛋白、Lin28b、Salll、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3和Glisl及其基因产物。这些重新编程因子可以单独使用，或者这些中的两个或更多个可以组合使用。重新编程因子的组合的实例包括描述于以下文献中的那些：WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612；Huangfu D等人(2008)，Nat.Biotechnol.，26:795-797；Shi Y等人(2008)，Cell Stem Cell，2:525-528；Eminli S等人(2008)，Stem Cells.26:2467-2474；Eluangfu D等人(2008)，Nat.Biotechnol.26:1269-1275；Shi Y等人(2008)，Cell Stem Cell，3,568-574；Zhao Y等人(2008)，Cell Stem Cell，3:475-479；Marson A，(2008)，Cell Stem Cell，3，

132-135;Feng B等人(2009),Nat.Cell Biol.11:197-203;R.L.Judson等人,(2009),Nat.Biotechnol.,27:459-461;Lyssiotis CA等人(2009),Proc Natl Acad Sci USA.106:8912-8917;Kim J等人(2009),Nature.461:649-643;Ichida J K等人(2009),Cell Stem Cell.5:491-503;Heng JC等人(2010),Cell Stem Cell.6:167-74;Han J等人(2010),Nature.463:1096-100;Mali P等人(2010),Stem Cells.28:713-720;以及Maekawa M等人(2011),Nature.474:225-9。

[0190] iPSC可以从任何合适的组织获得。在一些实施方案中,所述iPSC从外周血单核细胞获得。

[0191] 造血祖细胞(HPC)是能够分化成血细胞诸如淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、红细胞和巨核细胞的细胞。造血祖细胞或造血干细胞可以基于例如CD34和/或CD43表面抗原的存在来鉴定。

[0192] 在一些实施方案中,用于产生本文所述的CD56+/CD3-NK细胞的细胞在细胞分化的任何阶段被遗传修饰。在一些实施方案中,CD56+/CD3-NK细胞被遗传修饰以包括期望的嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)或其他工程化蛋白质。

[0193] 在一些实施方案中,用于产生本文所述的CD56+/CD3-NK细胞的细胞在多能、多潜能或单能阶段被遗传修饰。例如,在一些实施方案中,用于产生本文所述的CD56+/CD3-NK细胞的细胞在多能阶段被遗传修饰。例如,细胞可以在胚胎干细胞阶段或iPSC干细胞阶段被遗传修饰。在一些实施方案中,用于产生本文所述的CD56+/CD3-NK细胞的细胞在多能阶段被遗传修饰。例如,可以在造血干细胞(HSC)阶段对细胞进行遗传修饰。

[0194] 培养条件-iPSC至HPC细胞混合群

[0195] 在一些实施方案中,可以通过向用于培养动物细胞的基础培养基中添加维生素C来制备用于从iPSC产生造血祖细胞的培养基(即HPC诱导培养基)。基础培养基的实例包括伊可夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)、培养基199、伊格尔最低必需培养基(Eagle's Minimum Essential Medium,EMEM)、αMEM培养基、达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM),Ham's F12培养基、RPMI 1640培养基、费歇尔培养基(Fischer's medium)和神经基础培养基(Life Technologies)以及这些培养基中两种或更多种的混合物。在一些实施方案中,培养基含有血清。在一些实施方案中,培养基是无血清的。

[0196] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基可以包括StemPro™-34。StemPro™-34是无血清培养基,其被配制成支持培养物中人造血细胞的发育。

[0197] 如有必要,在一些实施方案中,HPC诱导培养基还可以含有一种或多种物质,诸如白蛋白、人胰岛素、人转铁蛋白、硒或亚硒酸钠、脂肪酸、微量元素、2-巯基乙醇、硫代甘油、α-一硫代甘油、脂质、氨基酸、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐和细胞因子。

[0198] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基包括含有血清、胰岛素、转铁蛋白、硒、硫代甘油或α-一硫代甘油、L-谷氨酰胺和抗坏血酸的IMDM培养基。

[0199] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起骨形态发生蛋白4(BMP4)信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于BMP4。

[0200] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起血管上皮生长因子(VEGF)信号传导

途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于VEGF。

[0201] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起成纤维细胞生长因子(FGF)途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于bFGF和FGF2。

[0202] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起干细胞因子/kit信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于SCF。

[0203] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起Flt3配体信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于Flt3配体(Flt3L)。

[0204] 在一些实施方案中,HPC诱导培养基含有引起血小板生成素信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于TPO。

[0205] TGFβ抑制剂是干扰TGFβ家族的信号转导的小分子抑制剂,并且包括例如SB431542、SB202190(两者R.K.Lindemann等人,Mol.Cancer 2:20(2003))、SB505124(GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208(Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276(Lilly Research Laboratories)等。

[0206] SB431542是转化生长因子β(TGFβ)超家族I型激活素受体样激酶(ALK)受体ALK4、ALK5和ALK7的有效且特异性的抑制剂。

[0207] 例如,当TGFβ抑制剂为SB431542时,其在培养基中的浓度优选为0.5μM-100μM。

[0208] 用于产生HP细胞混合群的HPC诱导培养基可以进一步补充有细胞因子,所述细胞因子选自由以下项组成的组:BMP4(骨形态发生蛋白4)、VEGF(血管内皮生长因子)、bFGF(碱性成纤维细胞生长因子)、SCF(干细胞因子)、TPO(血小板生成素)和Flt3L(Flt3配体)。

[0209] 在一个实施方案中,HPC诱导培养基可以包含补充有人胰岛素(约10μg/ml)、人转铁蛋白(约5.5μg/ml)、亚硒酸钠(约6.7ng/ml)、L-谷氨酰胺(约2mM)、α-一硫代甘油(约0.4mM)和SB431542(约6μM)的StemPro34。

[0210] 在一些实施方案中,可以在培养期内每四天、每三天、每两天或每天添加维生素C。向培养基中添加维生素C可以按与约5μg/ml至约500μg/ml对应的量来执行。在一些实施方案中,维生素C以约5μg/ml、10μg/ml、25μg/ml、50μg/ml、100μg/ml、200μg/ml、300μg/ml、400μg/ml或500μg/ml存在于培养基中。

[0211] 在本说明书中,“维生素C”意指L-抗坏血酸及其衍生物,并且“L-抗坏血酸衍生物”意指通过在活体中的酶促反应变成维生素C的衍生物。L-抗坏血酸衍生物的实例包括维生素C磷酸酯(例如抗坏血酸2-磷酸酯)、抗坏血酸葡糖苷、抗坏血酸乙基酯、维生素C酯、抗坏血酸四己基癸酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯和抗坏血酸2-磷酸酯6-棕榈酸酯。优选的是维生素C磷酸酯。维生素C磷酸酯(例如抗坏血酸2-磷酸酯)的实例包括L-抗坏血酸磷酸酯的盐,诸如L-抗坏血酸磷酸酯Na和L-抗坏血酸磷酸酯Mg。

[0212] 在一些实施方案中,当引起骨形态发生蛋白4(BMP4)信号传导途径的信号转导的物质是BMP4时,用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的BMP4的浓度为约5ng/ml至500ng/ml,例如5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、300ng/ml、350ng/ml、400ng/ml、450ng/ml或500ng/ml。

[0213] 在一些实施方案中,当引起血管上皮生长因子(VEGF)信号传导途径的信号转导的物质是VEGF时,用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的VEGF的浓度为约5ng/ml至

500ng/ml，例如约5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、300ng/ml、350ng/ml、400ng/ml、450ng/ml或500ng/ml。

[0214] 在一些实施方案中，当引起成纤维细胞生长因子(FGF)途径的信号转导的物质是bFGF时，用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的bFGF的浓度为约5ng/ml至500ng/ml，例如5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、300ng/ml、350ng/ml、400ng/ml、450ng/ml或500ng/ml。

[0215] 在一些实施方案中，当引起干细胞因子/kit信号传导途径的信号转导的物质是SCR时，用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的SCF的浓度为约5ng/ml至100ng/ml，例如5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。

[0216] 在一些实施方案中，当引起Flt3配体信号传导途径的信号转导的物质是Flt3L时，用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的Flt3L的浓度为约1ng/ml至100ng/ml，例如1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml或100ng/ml。

[0217] 在一些实施方案中，当引起血小板生成素信号传导途径的信号转导的物质是TPO时，用于产生造血祖细胞的HPC诱导培养基中的TPO的浓度为约1ng/ml至200ng/ml，例如1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100、125ng/ml、150ng/ml、175ng/ml或200ng/ml。

[0218] 在一些实施方案中，可以通过贴壁培养或悬浮培养来培养多能干细胞。在贴壁培养的情况下，培养可以在用包被剂包被的培养容器中执行，和/或可以与其他细胞一起共培养。用于共培养的其他细胞的实例包括C3H10T1/2(Takayama N.等人J Exp Med.2817-2830,2010)和源自不同物种的基质细胞(Niwa A等人J Cell Physiol.2009Nov;221(2):367-77)。包被剂的实例包括Matrigel(Nivea A等人PLoS One.6(7):e22261,2011)、iMatrix 511(Miyazaki T等人Nature Communication 2012;3:1236)、明胶、胶原、弹性蛋白等；葡糖胺聚糖和蛋白聚糖诸如透明质酸，硫酸软骨素等；细胞粘附蛋白诸如纤连蛋白或其变体、玻连蛋白、层粘连蛋白等等。悬浮培养的方法的实例包括在Chadwick等人Blood 2003,102:906-15;Vijayaragavan等人Cell Stem Cell 2009,4:248-62;以及Saeki等人Stem Cells 2009,27:59-67中所述的方法。

[0219] 在一些实施方案中，HP细胞混合群也可以由通过培养多能干细胞获得的网状结构(也被称为ES囊或iPS囊)制备。本文的“网状结构”是来源于多能干细胞的三维囊形结构(在内部具有间隙)。该结构由内皮细胞群等形成，并且在内部含有造血祖细胞。

[0220] 在一些实施方案中，用于产生HP细胞混合群的培养物的温度条件为约37℃至约42℃。在一些实施方案中，温度为例如约37℃至约42℃，优选约37℃至约39℃。培养期可以由本领域技术人员通过从细胞培养物获得用于表型分析的样品来监测造血祖细胞和/或类似物的数量而适当地确定。本领域已知与细胞样品的表型分析相关的各种种类的方法，并且包括例如流式细胞术和免疫荧光方法。

[0221] 获得HP细胞混合群的培养期可以变化，并且包括例如6天与14天之间。培养期的实例包括至少6天、不少于7天、不少于8天、不少于9天、不少于10天、不少于11天、不少于12天、不少于13天和不少于14天。在一些实施方案中，培养期持续六天。在一些实施方案中，培养期为7天。在一些实施方案中，培养期为8天。在一些实施方案中，培养期为9天。在一些实施方案中，培养期为10天。在一些实施方案中，培养期为10天。在一些实施方案中，培养期为11天。在一些实施方案中，培养期为12天。在一些实施方案中，培养期为13天。在一些实施方案中，培养期为14天。在一些实施方案中，培养期持续大于14天。培养可以在低氧条件下执行。低氧条件的实例包括15％、10％、9％、8％、7％、6％、5％、4％、3％或更低。培养基更换的频率可以由本领域技术人员确定。在一些实施方案中，可以在每2天后更换培养基。在一些其他实施方案中，可以在每3天后更换培养基。在一些实施方案中，每天更换培养基。

[0222] 在一些实施方案中，用于产生HP细胞混合群的培养通过组合一种或多种上述条件来执行。例如，在一些实施方案中，从iPSC获得HP细胞混合群的方法包括：(i)在补充有维生素C的基础培养基中在低氧条件下在C3H10T1/2上培养多能干细胞；和(ii)向(1)的培养液体中进一步添加VEGF、SCF和Flt3L，并且在正常氧气条件下培养细胞。执行步骤(i)的时期为至少不少于六天，优选不少于七天，更优选七天。执行步骤(ii)的时期为至少不少于六天、不少于七天和持续七天。

[0223] 在一些实施方案中，可以在进一步使用之前分离在HP细胞混合群中获得的造血祖细胞。在一些其他实施方案中，所获得的造血祖细胞可以用作还含有其他细胞种类(HP细胞混合群)的细胞群。HP细胞混合群是未分离的细胞制备物。在一些实施方案中，所述方法不包括分离步骤。

[0224] 培养条件-HP细胞混合群至CD4/CD8细胞

[0225] 在一些实施方案中，CD4/CD8诱导培养基产生包含CD4+/CD8+、CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群。“CD4/CD8双阳性细胞”(DP细胞)意指表达CD4和CD8两者的细胞。CD4/CD8双阳性细胞可以被鉴定为CD4、CD8、CD3和CD45阳性的细胞。“CD4/CD8双阴性细胞”(DN细胞)意指不表达CD4-和CD8-两者的细胞。“CD4-/CD8+细胞”意指不表达CD4-但表达CD8+的细胞。“CD4+/CD8-细胞”意指表达CD4但不表达CD8的细胞。

[0226] 在一些实施方案中，可以诱导包含CD4+/CD8+细胞、CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群分化成CD56+/CD3-细胞。

[0227] 在一些实施方案中，可以通过包括在补充有维生素C的培养基中培养造血祖细胞或HP细胞混合群的步骤的方法产生包含CD4/CD8双阳性细胞以及其他细胞的细胞群。添加到基础培养基中的维生素C与上述对HP细胞混合群的诱导相同。

[0228] 在一些实施方案中，用于从HP细胞混合群中产生包含CD4+/CD8+、CD4-/CD8-细胞、CD4-/CD8+细胞和CD4+/CD8-细胞的细胞群的培养基是CD4/CD8诱导培养基。在一些实施方案中，可以通过向用于培养动物细胞的基础培养基中添加维生素C来制备CD4/CD8诱导培养基。基础培养基的实例包括伊可夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium，IMDM)、培养基199、伊格尔最低必需培养基(Eagle's Minimum Essential Medium，EMEM)、αMEM培养基(Thermo Fisher Scientific(Gibco))、达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium，DMEM)，Ham's F12培养基、RPMI 1640培养基、费歇尔培养基(Fischer's medium)和神经基础培养基(Life Technologies)

以及这些培养基中两种或更多种的混合物。培养基可以含有血清,或者可以不含血清。

[0229] 如果需要,基础培养基还可以含有一种或多种物质,诸如白蛋白、人胰岛素、人转铁蛋白、硒、亚硒酸钠、脂肪酸、微量元素、2-巯基乙醇、硫代甘油、脂质、氨基酸、L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐和细胞因子。

[0230] 用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞以及其他细胞的细胞群的CD4/CD8诱导培养基可以进一步补充有细胞因子,所述细胞因子选自由以下项组成的组:抗坏血酸、SCF、IL-7、Flt3L、TPO、纤连蛋白或其变体、Notch配体、p38抑制剂和SDF-1。

[0231] 在一些实施方案中,可以在培养期内每四天、每三天、每两天或每天添加维生素C。向培养基中添加维生素C可以按与约5μg/ml至约500μg/ml对应的量来执行。在一些实施方案中,维生素C以约5μg/ml、10μg/ml、25μg/ml、50μg/ml、100μg/ml、200μg/ml、300μg/ml、400μg/ml或500μg/ml存在于培养基中。

[0232] 在一些实施方案中,基础培养基含有引起干细胞因子/kit信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于SCF。

[0233] 在一些实施方案中,基础培养基含有引起Flt3配体信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于Flt3配体(Flt3L)。

[0234] 在一些实施方案中,基础培养基含有引起血小板生成素信号传导途径的信号转导的一种或多种物质。此类物质包括但不限于TPO。

[0235] 在一些实施方案中,基础培养基含有一种或多种p38抑制剂,其为p38α和p38β的抑制剂,其进而又抑制MAPKAP激酶-2和热休克蛋白27的下游激活。用于本发明的p38化学抑制剂的实例包括但不限于SB203580(4-(4-氟苯基)-2-(4-甲基磺酰苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)及其衍生物、SB202190(4-(4-氟苯基)-2-(4-羟基苯基)-5-(4-吡啶基)-1H-咪唑)及其衍生物、SB239063(反式-4-[4-(4-氟苯基)-5-(2-甲氧基-4-嘧啶基)-1H-咪唑-1-基]环己醇)及其衍生物、SB220025及其衍生物、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SCIO-469、SCIO-323、VX-702和FR167653。这些化合物可商购获得,并且例如SB203580、SB202190、SC239063、SB220025和PD169316可从Calbiochem获得并且SCIO-469和SCIO-323可从Scios获得等。p38抑制剂的其他实例包括p38的显性阴性突变体,其包括p38T180A、p38Y182F等,p38T180A是通过将位于p38的DNA结合区中的180位苏氨酸点突变为丙氨酸而获得的,p38Y182F是通过将人和小鼠中的p38的182位酪氨酸点突变为苯丙氨酸而获得的。p38抑制剂以例如约0.5μM-约50μM包含在培养基中。

[0236] 在一些实施方案中,基础培养基含有SDF-1。

[0237] 在一些实施方案中,SDF-1不仅可以是SDF-1α或其成熟形式,而且还可以是同种型诸如SDF-1β、SDF-1γ、SDF-1δ、SDF-1ε、SDF-1Φ等或其成熟形式或者这些以任何比例的混合物等。优选地,使用SDF-1α。SDF-1有时被称为CXCL-12或PBSF。

[0238] 在一些实施方案中,SDF-1的氨基酸序列中的一个或几个氨基酸可以被取代、缺失和/或添加,只要其具有作为趋化因子的活性,并且类似地,糖链可以被取代、缺失和/或添加。只要保持至少4个半胱氨酸残基(人SDF-1α中的Cys30,Cys32,Cys55和Cys71)并且与天然物质的氨基酸序列表现出不低于90%的同一性,则氨基酸突变是可接受的。SDF-1可以获得自哺乳动物,例如人或非人哺乳动物,诸如猴、绵羊、牛、马、猪、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。

例如，作为GenBank登录号：NP_954637注册的蛋白质可以被用作人SDF-1α，并且作为GenBank登录号：NP_000600注册的蛋白质可以被用作SDF-1β。在一些实施方案中，当引起Flt3配体信号传导途径的信号转导的物质是Flt3L时，用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的培养基中的Flt3L的浓度为约1ng/ml至100ng/ml，例如1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。

[0239] 在一些实施方案中，当引起干细胞因子/kit信号传导途径的信号转导的物质是SCF时，SCF被用于在与上述相同的条件下产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群。

[0240] 在一些实施方案中，当引起血小板生成素信号传导途径的信号转导的物质是TPO时，TPO被用于在与上述相同的条件下产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群。

[0241] 用于本发明的纤连蛋白或其变体没有特别限制，只要其是能够结合CD3阳性细胞的分子即可。纤连蛋白的变体没有特别限制，只要其是能够结合CD3阳性细胞表面上的VLA-5和VLA-4的分子即可并且其实例包括RetroNectin。纤连蛋白及其变体可以以任何形式存在于培养基中。例如，它们可以在培养期间包含在培养基中，或者可以固定在培养容器上，并且优选固定在培养容器上。

[0242] 当培养基中含有纤连蛋白或其变体时，纤连蛋白或其变体的浓度下限可以不低于10ng/ml，优选不低于100ng/ml，并且上限可以不高于10000μg/ml，优选不高于1000μg/ml。

[0243] 在一些实施方案中，用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的培养基中的IL-7的浓度为约1ng/ml至100ng/ml，例如1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。

[0244] SDF-1可商购获得，从自然界纯化，或通过肽合成或基因工程化技术产生。SDF-1以例如约10ng/ml至约100ng/ml范围包含在培养基中。此外，也可以使用具有SDF-1样活性的SDF-1替代物代替SDF-1。这种SDF-1替代物的实例包括CXCR4激动剂，并且具有CXCR4激动剂活性的低分子量化合物等可以代替SDF-1添加到培养基中。

[0245] 在一些实施方案中，当SDF-1为SDF1α时，用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的培养基中的SDF-1α的浓度为约1nM至100nM，例如1nM、2nM、3nM、4nM、5nM、6nM、7nM、8nM、9nM、10nM、20nM、30nM、40nM、50nM、60nM、70nM、80nM、90nM或100nM。

[0246] 在一些实施方案中，当p38抑制剂是SB203580时，用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的培养基中的SB203580的浓度为约0.5μM至100μM，例如0.5μM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、30μM、40μM、或50μM、60μM、70μM、80μM、90μM或100μM。

[0247] 在一些实施方案中，用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的基础培养基包括αMEM培养基，其补充有约15％FBS、约4mM L-谷氨酰胺、约100U/ml青霉素、约100μg/ml链霉素、约55μM2-巯基乙醇、约50μg/ml抗坏血酸2-磷酸酯、约10μg/ml人胰岛素、约5.5μg/ml人转铁蛋白、约6.7ng/ml亚硒酸钠、约50ng/ml SCF、约50ng/ml IL-7、约50ng/ml Flt3L、约100ng/ml TPO、约15μM SB203580、约30nM SDF-1α。

[0248] 在包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的产生中，可以通过贴壁培养或悬浮培养来培养造血祖细胞。在一些实施方案中，用DLL1或DLL4、或者DLL4或DLL1和Fc等的融合蛋白包

被培养容器/皿。DLL1或DLL4可以是重组人(rh)-DLL1或rh-DLL4。在一些实施方案中,用rh-DLL4/Fc嵌合体(Sino Biological)和RetroNectin(Takara Bio Inc)包被培养容器/皿。在贴壁培养的情况下,可以使用包被的培养容器,和/或造血祖细胞可以与饲养细胞和/或类似物一起共培养。用于共培养的饲养细胞的实例包括骨髓基质细胞系OP9细胞(可从Riken BioResource Center获得)。OP9细胞可以优选是OP-DL1细胞,其持续表达Dll1(Holmes R I and Zuniga-Pflucker JC.Cold Spring Harb Protoc.2009(2))。在一些实施方案中,在OP9细胞被用作饲养细胞的情况下,可以将单独制备的Dll1或者Dll1和Fc等的融合蛋白添加到培养基中以进行共培养。在一些实施方案中,Dll1可以包括由具有NCBI登录号NM#005618(在人的情况下)或NCBI登录号NM#007865(在小鼠的情况下)的核苷酸序列的基因编码的蛋白质;以及与这些蛋白质具有高序列同一性(例如,具有不小于90%的序列同一性)并且具有等同功能的天然存在的突变体。在饲养细胞用于产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的情况下,可以在培养期间适当地替换饲养细胞。饲养细胞的替换可以通过将培养的受试细胞转移到预先铺板的饲养细胞上来执行。替换可以每五天、每四天、每三天或每两天执行一次。

[0249] 在一些实施方案中,用于HP细胞混合群培养以产生包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群的培养温度条件为约37℃至约42℃和约37℃至约39℃。在一些实施方案中,培养可以在低氧条件下执行。低氧条件的实例包括15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%和低于这些的氧气浓度。培养期可以由本领域技术人员通过监测包括CD4/CD8双阳性细胞和/或类似物的不同类型的细胞的数量来适当地确定。培养期的实例包括不少于10天、不少于12天、不少于14天、不少于16天、不少于18天、不少于20天、不少于21天、不少于23天、不少于25天、不少于28天、不少于30天、不少于35天或不少于42天。在一些其他实施方案中,从培养获得的CD4/CD8双阳性细胞是还含有其他细胞种类的细胞群(DP细胞混合群)。

[0250] 在从包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群中分离特定细胞类型(例如,CD4-/CD8+细胞)的群体的情况下,根据所分离的细胞类型,可以使用包括但不限于CD4、CD8、CD3和CD45的任何一种指标来执行分离。分离方法可以是本领域技术人员熟知的方法,例如,其中细胞用特定抗体(例如,CD4、CD8、CD3或CD45抗体)标记,然后使用流式细胞仪分离的方法,或者其中使用固定有所需抗原的亲和柱等纯化细胞的方法。

[0251] 从包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群中诱导CD56+/CD3-细胞的步骤

[0252] 在一些实施方案中,NK细胞是CD56+/CD3-免疫细胞。

[0253] 在一些实施方案中,通过包括在补充有维生素C的培养基中培养包含CD4/CD8双阳性细胞的细胞群或DP细胞混合群的步骤的方法产生NK细胞。在一些实施方案中,NK诱导培养基用于产生CD56+/CD3-细胞。

[0254] 在一些实施方案中,通过向用于培养动物细胞的基础培养基中添加维生素C来制备培养基。基础培养基的实例包括伊可夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)、培养基199、伊格尔最低必需培养基(Eagle's Minimum Essential Medium,EMEM)、αMEM培养基、达尔伯克改良的伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium,DMEM),Ham's F12培养基、RPMI 1640培养基、费歇尔培养基(Fischer's medium)和神经基础培养基(Life Technologies)以及这些培养基中两种或更多种的混合物。在一些实施方案中,培养基含有血清。在一些实施方案中,培养基是无血清

的。如果需要，基础培养基还可以含有一种或多种物质，诸如白蛋白、人胰岛素、人转铁蛋白、硒或亚硒酸钠、脂肪酸、微量元素、2-巯基乙醇、硫代甘油、脂质、氨基酸、谷氨酰胺、非必需氨基酸、维生素、生长因子、低分子量化合物、抗生素、抗氧化剂、丙酮酸、缓冲剂、无机盐和细胞因子。

[0255] 在一些实施方案中，用于产生CD56阳性NK细胞的培养基还含有抗CD3抗体(UCHT1)和细胞因子。合适的细胞因子的实例包括IL-2和IL-7。

[0256] CD3抗体不受限制，只要其特异性识别CD3即可。在一些实施方案中，CD3抗体在NK诱导培养基中的浓度为约10ng/ml至1000ng/ml，例如10ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800rig/ml、900ng/ml或1000ng/ml。

[0257] 在一些实施方案中，将维生素C用于在与上述相同的条件下产生CD56阳性K细胞。

[0258] 在一些实施方案中，用于产生CD56阳性NK细胞的NK诱导培养基中的IL-2的浓度为约1U/ml至1000U/ml，例如约1U/ml、5U/ml、10U/ml、20U/ml、30U/ml、40U/ml、50U/ml、60U/ml、70U/ml、80U/ml、90U/ml、100U/ml、500U/ml或1000U/ml。在一些实施方案中，用于产生CD56阳性NK细胞的NK诱导培养基中的IL-2的浓度为约1ng/ml至100ng/ml，例如1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。

[0259] 在一些实施方案中，用于产生CD56阳性NK细胞的NK诱导培养基中的IL-7的浓度为约1ng/ml至100ng/ml，例如1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml或100ng/ml。

[0260] 在一些实施方案中，用于培养包含CD4/CD8双阳性细胞的群体以产生CD56阳性NK细胞的培养温度条件为约37℃至约42℃或约37℃至约39℃。培养期可以由本领域技术人员通过监测CD56阳性NK细胞和/或类似物的数量适当地确定。培养的天数没有限制，只要可以获得CD56阳性NK细胞即可。培养期的实例包括至少不少于1天、不少于2天、不少于3天、不少于4天、不少于5天、不少于6天或不少于7天。

[0261] 在一些实施方案中，可以在进一步使用之前分离所获得的CD56+NK细胞。在一些其他实施方案中，所获得的CD56阳性NK细胞可以用作还含有其他细胞种类(包括T细胞(NK细胞混合群))的细胞群。

[0262] 在一些实施方案中，NK细胞混合群可以包含50％、55％、60％、75％、80％、85％、90％或超过90％的NK细胞。在一些实施方案中，NK细胞混合群包含约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或50％的T细胞。在一些实施方案中，NK细胞混合群包含约75％的CD56+/CD3-NK细胞和约25％的CD56+/CD3+T细胞。在一些实施方案中，NK细胞混合群还可以包含B细胞和单核细胞。

[0263] 在分离CD56+NK细胞的情况下，分离方法可以是本领域技术人员熟知的方法，例如，其中细胞用抗CD56抗体和抗CD3抗体标记，然后使用流式细胞仪(荧光激活细胞分选)分离的方法，或者其中使用固定有所需抗原的亲和柱等纯化细胞的方法。

[0264] 在一些实施方案中，CD56阳性NK细胞是CD56+/CD3+。在一些实施方案中，CD56阳性NK细胞是CD56+/CD3-。

[0265] CAR-NK细胞制备

[0266] 在一些实施方案中,NK细胞被工程化以包含一个或多个转基因。例如,NK细胞可以被基因工程化以表达肿瘤导向的嵌合抗原受体(CAR),从而产生抗肿瘤效应细胞。在一个实例中,NK细胞或iPS NK细胞可以被工程化以表达CAR。在一些实施方案中,至NK细胞的细胞前体被工程化以表达CAR。例如,在一些实施方案中,iPS细胞被工程化以表达CAR。在一些实施方案中,HP细胞混合群中的细胞被工程化以表达CAR。在一些实施方案中,NK细胞被工程化以表达CAR。此外,在一些实施方案中,这些转基因受体可以针对非蛋白衍生的肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,NK细胞或iPS NK细胞被修饰以包含至少一种CAR。在一些实施方案中,单个CAR靶向两种或更多种抗原。

[0267] 在一些实施方案中,iNK细胞包括嵌合的、非天然的和工程化的受体。在一些实施方案中,工程化嵌合抗原受体(CAR)具有一种、两种、三种、四种或更多种组分,并且在一些实施方案中,一种或多种组分促进淋巴细胞靶向或结合一种或多种包含肿瘤抗原的癌细胞。

[0268] 在一些实施方案中,CAR通常包含含有至少一个胞外配体结合结构域的至少一种跨膜多肽和含有至少一个胞内信号传导结构域的一种跨膜多肽;从而所述多肽装配在一起形成嵌合抗原受体。

[0269] 如本文所用的术语“胞外配体结合结构域”被定义为能够结合配体的寡肽或多肽。优选地,该结构域将能够与细胞表面分子相互作用。例如,可以选择胞外配体结合结构域以识别充当与特定疾病状态相关的靶细胞上的细胞表面标记的配体。

[0270] 特别地,胞外配体结合结构域可以包含从针对靶抗原的抗体衍生的抗原结合结构域。

[0271] 在一些实施方案中,NK细胞或iPS NK细胞可以被遗传修饰以表达一种或多种嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,CAR包含靶向选自以下中的一种或多种的肿瘤抗原的胞外配体结合结构域:CD44、CD19、CD20、CD22、CD23、CD30、CD89、CD123、CS-1、ROR1、间皮素、c-Met、PSMA、Her2、GD-2、CEA、MAGE A3 TCR、EGFR、HER2/ERBB2/neu、EPCAM、EphA2、CEA、BCMA。在一些实施方案中,肿瘤抗原是CD19。

[0272] 在一些实施方案中,胞外配体结合结构域是单链抗体片段(scFv),其包含通过柔性接头连接的靶抗原特异性单克隆抗体的轻链(VL)和重链(VH)可变片段。

[0273] 在一些实施方案中,CAR包含跨膜结构域。在一些实施方案中,跨膜结构域还包含在胞外配体结合结构域与跨膜结构域之间的茎区。本文所用的术语“茎区”通常意指起到将跨膜结构域与胞外配体结合结构域连接的作用的任何寡肽或多肽。特别地,茎区用于为胞外配体结合结构域提供更大的灵活性和可接近性。茎区可以包含至多300个氨基酸、10个至100个氨基酸和/或25个至50个氨基酸。茎区可以衍生自天然存在的分子的全部或部分,诸如衍生自CD8、CD4或CD28的胞外区的全部或部分或衍生自抗体恒定区的全部或部分。可替代地,茎区可以是与天然存在的茎序列对应的合成序列,或者可以是完全合成的茎序列。在优选的实施方案中,所述茎区是人CD8α链的一部分。

[0274] 在一些实施方案中,CAR包含信号转导结构域或胞内信号传导结构域,其在胞外配体结合结构域结合靶标后有助于胞内信号传导,导致iPS NK细胞的激活和免疫应答。术语“信号转导结构域”是指转导效应子信号功能信号并指导细胞执行特定功能的蛋白质部分。在一些实施方案中,iPS NK细胞具有包含信号转导结构域的CAR。

[0275] 在一些实施方案中，iPS NK细胞被遗传修饰以表达IL-15Rα/IL-15复合物。

[0276] 在一些实施方案中，跨膜多肽包含在免疫细胞表面表达的能力，例如在iPS NK细胞上表达的能力，以及一起相互作用以指导免疫细胞针对预定靶细胞的细胞应答的能力。包含胞外配体结合结构域和/或信号转导结构域的CAR的不同跨膜多肽一起相互作用以参与在与靶配体结合后的信号转导并诱导免疫应答。跨膜结构域可以来源于天然来源或合成来源。跨膜结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。

[0277] 在一些实施方案中，对NK细胞进行遗传修饰以表达CAR可以包括以下步骤：(1)合成与特定CAR对应的基因；(2)制备含有与CAR对应的基因的载体；和(3)用含有CAR基因的载体转导CD56+NK细胞。

[0278] 编码CAR的表达载体可以作为一种或多种DNA分子或构建体引入，其中可以存在将允许选择含有构建体的宿主细胞的至少一种标记。

[0279] 构建体可以用常规方式制备，其中基因和调控区可以酌情分离，连接，在适当的克隆宿主中克隆，通过限制性酶切或测序或其他方便的手段来分析。特别地，使用PCR，可以分离包含功能单位的全部或部分的单个片段，其中可以酌情使用“引物修复”、连接、体外诱变等引入一个或多个突变。构建体一旦完成并证明具有合适的序列，就可以通过任何方便的手段引入CTL中。可以将构建体整合并包装到非复制的缺陷型病毒基因组(如腺病毒、腺伴随病毒(AAV)或单纯疱疹病毒(HSV)或其他，包括逆转录病毒载体或慢病毒载体)中，用于感染或转导到细胞中。如果需要，构建体可以包括用于转染的病毒序列。可替代地，可以通过融合、电穿孔、生物弹、转染、脂质转染等引入构建体。宿主细胞可以在引入构建体之前在培养物中生长和扩增，然后进行适当的处理以引入构建体并整合构建体。然后扩增并通过构建体中存在的标记筛选细胞。可以成功使用的各种标记包括hprt、新霉素抗性、胸苷激酶、潮霉素抗性等。

[0280] 在一些情况下，在希望在特定基因座整合构建体的情况下，可以具有用于同源重组的靶位点。例如，可以使用本领域已知用于同源重组的材料和方法敲除内源基因并用由构建体编码的基因替换它(在相同的基因座或其他地方)。对于同源重组，可以使用.OMEGA.或O-载体。

[0281] 构建体可以作为编码至少CAR和任选地另一个基因的单个DNA分子或具有一个或多个基因的不同DNA分子引入。其他基因包括例如编码治疗性分子或自杀基因的基因。可以同时或连续引入构建体，每个构建体具有相同或不同的标记。

[0282] 它们可以用于制备构建体DNA的储备液和用于进行转染的、含有用于在原核生物或真核生物中表达的有用元件诸如细菌或酵母复制起点、可选择的和/或可扩增的标记、启动子/增强子元件等的载体是本领域熟知的，并且许多是可商购获得的。

[0283] 使用方法

[0284] 根据本发明的细胞可以用于在有需要的患者中治疗癌症、病毒感染或自身免疫性障碍。在另一个实施方案中，根据本发明的所述分离的细胞可以用于制造用于在有需要的患者中治疗癌症、自身免疫性障碍的病毒感染的药物。

[0285] 本发明依赖于用于治疗有需要的患者的方法，所述方法包括以下步骤中的至少一个：(a)提供根据本发明的嵌合抗原受体细胞，和(b)将所述细胞施用于所述患者。

[0286] 所述治疗可以是改善性的、治愈性的或预防性的。它可以是自体免疫疗法的一部

分或同种异体免疫疗法治疗的一部分。自体的意指用于治疗患者的细胞、细胞系或细胞群来源于所述患者或来源于人白细胞抗原(HLA)相容的供体。同种异体的意指用于治疗患者的细胞或细胞群不是来源于所述患者,而是来源于供体。

[0287] 在一些实施方案中,所述细胞是同种异体的。在一些实施方案中,所述细胞是自体的。

[0288] 治疗可以用于治疗被诊断患有癌症、病毒感染、自身免疫性障碍或移植物抗宿主病(GvHD)的患者。可以治疗的癌症包括未血管化的或尚未充分血管化的肿瘤以及血管化的肿瘤。癌症可以包括非实体瘤(诸如血液肿瘤,例如白血病和淋巴瘤)或可以包括实体瘤。用本发明的CAR治疗的癌症类型包括但不限于癌、胚细胞瘤和肉瘤、和某些白血病或淋巴恶性肿瘤、良性和恶性肿瘤、和恶性肿瘤(例如肉瘤、癌和黑素瘤)。还包括成人肿瘤/癌症和儿科肿瘤/癌症。

[0289] 在一些实施方案中,治疗与一种或多种对抗癌症的疗法组合,所述一种或多种对抗癌症的疗法选自以下组:抗体疗法、化学疗法、细胞因子疗法、树突细胞疗法、基因疗法、激素疗法、激光疗法和放射疗法。

[0290] 在一些实施方案中,所述治疗可以施用于经历免疫抑制治疗的患者。

[0291] 在另外的实施方案中,将细胞组合物与一种或多种另外的疗法组合施用于患者。例如,在一些实施方案中,将细胞组合物与骨髓移植、使用化疗剂诸如氟达拉滨的T细胞消融疗法、外线束放射疗法(XRT)、环磷酰胺或抗体诸如OKT3或CAM PATH组合(例如之前、同时或之后)施用于患者。在另一个实施方案中,本发明的细胞组合物在B细胞消融疗法(诸如与CD20反应的药剂(例如Rituxan))后施用。例如,在一个实施方案中,受试者可以经历高剂量化学疗法的标准治疗,然后进行外周血干细胞移植。在某些实施方案中,移植后,受试者接受本发明的扩增的免疫细胞的输注。在另外的实施方案中,在手术之前或之后施用扩增的细胞。通过在此描述的任何一种方法获得的所述经修饰的细胞可以在本发明的特定方面中用于治疗有需要对抗宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD)的患者;因此,本发明的范围包括治疗有需要对抗宿主抗移植物(HvG)排斥和移植物抗宿主病(GvHD)的患者的方法,所述方法包括通过向所述患者施用有效量的包含失活TCRα和/或TCRβ基因的修饰细胞来治疗所述患者。

[0292] 细胞的施用

[0293] 在一些实施方案中,可以通过多种方式将细胞引入宿主生物体(例如哺乳动物)中。在特定的实施方案中,细胞可以被引入到肿瘤部位,尽管在替代实施方案中,细胞珩磨癌症或被修饰以珩磨癌症。使用的细胞的数量将取决于多种情况:引入的目的、细胞的寿命、所使用的方案(例如施用的次数)、细胞增殖的能力、重组构建体的稳定性等。细胞可以作为分散体施用,通常在感兴趣的部位处或附近注射。细胞可以在生理上可接受的培养基中。在一个实例中,本发明的NK细胞或iPS NK细胞可以表达一种或多种CAR、TCR或任何其他工程化蛋白质或多肽结构域,诸如高亲和力CD16。在一些实施方案中,所述细胞被包封以抑制免疫识别并且被置于肿瘤部位处。

[0294] 可以根据需要施用细胞。根据所需的反应、施用方式、细胞寿命、存在的细胞数,可以使用各种方案。施用次数将至少部分取决于上述因素。

[0295] 根据本发明的细胞或细胞群的施用可以通过任何方便的方式执行,所述任何方便

的方式包括通过气溶胶吸入、注射、摄入、输液、植入或移植。本文所述的组合物可以皮下地、皮内地、瘤内地、结节内地、髓内地、肌内地、通过静脉内或淋巴管内注射或腹膜内地施用于患者。在一个实施方案中，本发明的细胞组合物优选地通过静脉内注射施用。

[0296] 基于核酸的表达系统

[0297] 在一些实施方案中，本发明的NK细胞或iPS NK细胞被工程化以表达一种或多种CAR、TCR或任何其他工程化蛋白质或多肽结构域，诸如高亲和力CD16或CD19。产生包含这些多肽的表达载体的重组技术是本领域熟知的，并在下面概括地描述。

[0298] 载体

[0299] 术语“载体”用于指载体核酸分子，向其中可以插入核酸序列以引入它可以被复制的细胞中。核酸序列可以是“外源的”，这意味着它对于载体所引入的细胞是外源的，或者该序列与细胞中的序列同源，但位于宿主细胞核酸中通常未发现该序列的位置。载体包括质粒、粘粒、病毒(噬菌体、动物病毒和植物病毒)和人工染色体(例如YAC)。本领域技术人员将可以通过标准重组技术很好地构建载体(参见例如Maniatis等人，1988和Ausubel等人，1994，两者均通过引用并入本文)。

[0300] 术语“表达载体”是指包含编码能够被转录的RNA的核酸的任何类型的遗传构建体。在一些情况下，RNA分子然后被翻译成蛋白质、多肽或肽。在其他情况下，这些序列不被翻译，例如在反义分子或核酶的产生中。表达载体可以含有多种“控制序列”，其是指在特定宿主细胞中转录和可能翻译可操作地连接的编码序列所必需的核酸序列。除了管理转录和翻译的控制序列外，载体和表达载体还可以含有还具有其他功能的核酸序列，并且如下文所述。

[0301] 启动子和增强子

[0302] “启动子”是控制序列，其为控制转录起始和速率的核酸序列的区域。它可以含有调节蛋白和分子(诸如RNA聚合酶和其他转录因子)可以结合以启动核酸序列的特异性转录的遗传元件。短语“可操作地定位”、“可操作地连接”、“在……的控制下”和“在……的转录控制下”意指启动子相对于核酸序列处于正确的功能位置和/或方向上以控制该序列的转录起始和/或表达。

[0303] 启动子通常包含用于定位RNA合成的起始位点的序列。最著名的实例是TATA盒，但在一些缺少TATA盒的启动子中，例如，哺乳动物末端脱氧核苷酸转移酶基因的启动子和SV40晚期基因的启动子，覆盖起始位点本身的离散元件有助于固定起始位置。另外的启动子元件调节转录起始的频率。通常，这些位于起始位点上游30 110bp的区域，尽管已经显示许多启动子还含有起始位点下游的功能元件。为了使编码序列“处于”启动子“的控制下”，将转录阅读框的转录起始位点的5’端定位在所选启动子的“下游”(即3’)。“上游”启动子刺激DNA的转录并促进所编码RNA的表达。

[0304] 在启动子元件之间的间隔区经常是柔性的，因此当元件相对于彼此反转或移动时，启动子功能被保留。在tk启动子中，在活性开始下降之前，在启动子元件之间的间隔区可以增加到相隔50bp。取决于启动子，似乎单个元件可以协同或独立地起作用以激活转录。启动子可以或可以不与“增强子”结合使用，“增强子”是指参与核酸序列的转录激活的顺式作用调节序列。

[0305] 启动子可以是与核酸序列天然相关的启动子，如可以通过分离位于编码区段和/

或外显子上游的5撇'非编码序列而获得。这种启动子可以被称为“内源的”。类似地，增强子可以是与位于该序列下游或上游的核酸序列天然地相关的增强子。可替代地，某些优点将通过将编码核酸区段定位于重组或异源启动子的控制下来获得，所述重组或异源启动子是指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的启动子。重组或异源增强子也指在其天然环境中通常不与核酸序列相关的增强子。此类启动子或增强子可以包括其他基因的启动子或增强子，和从任何其他病毒或原核或真核细胞分离的启动子或增强子，和非“天然存在的”(即含有不同转录调节区的不同元件和/或改变表达的突变的)启动子或增强子。例如，在重组DNA构建中最常用的启动子包括内酰胺酶(青霉素酶)、乳糖和色氨酸(trp)启动子系统。除了合成产生启动子和增强子的核酸序列外，还可以使用重组克隆和/或核酸扩增技术(包括PCR.TM.)结合本文所公开的组合物来产生序列(参见美国专利号4,683,202和5,928,906，各自通过引用并入本文)。此外，预期还可以使用指导序列在非核细胞器(诸如线粒体、叶绿体等)内的转录和/或表达的控制序列。

[0306] 自然地，重要的是使用启动子和/或增强子，其有效地指导DNA区段在选择用于表达的细胞器、细胞类型、组织、器官或生物体中的表达。分子生物学领域的技术人员通常知道用于蛋白质表达的启动子、增强子和细胞类型组合的用途(参见例如Sambrook等人1989，通过引用并入本文)。所用的启动子可以是组成型的、组织特异性的、诱导型的和/或在适当的条件下可用于指导引入的DNA区段的高水平表达，诸如在重组蛋白和/或肽的大规模产生中是有利的。启动子可以是异源的或内源的。

[0307] 另外，任何启动子/增强子组合也都可以用于驱动表达。使用T3、T7或SP6胞质表达系统是另一个可能的实施方案。如果提供合适的细菌聚合酶作为递送复合物的一部分或作为另外的基因表达构建体，真核细胞可以支持从某些细菌启动子的胞质转录。

[0308] 组织特异性启动子或元件的鉴定以及表征它们的活性的测定是本领域技术人员熟知的。

[0309] 编码序列的有效翻译也可能需要特定的起始信号。这些信号包括ATG起始密码子或相邻序列。可能需要提供外源翻译控制信号，包括ATG起始密码子。本领域普通技术人员将能够容易地确定这一点并提供必要的信号。

[0310] 在本发明的某些实施方案中，使用内部核糖体进入位点(IRES)元件来产生多基因或多顺反子信息，并且这些可以用于本发明。

[0311] 载体可以包括多克隆位点(MCS)，其是含有多个限制性酶切位点的核酸区域，所述限制性酶切位点中的任何一个都可以结合标准重组技术用于消化载体。“限制性酶消化”是指用仅在核酸分子的特定位置起作用的酶催化切割核酸分子。这些限制性酶中的许多是可商购获得的。此类酶的使用是本领域技术人员广泛理解的。通常，使用在MCS内切割的限制性酶将载体线性化或片段化以使外源序列能够与载体连接。“连接”是指在两个核酸片段之间形成磷酸二酯键的过程，这两个核酸片段可以彼此相邻或不相邻。涉及限制性酶和连接反应的技术是重组技术领域的技术人员熟知的。

[0312] 也可以使用剪接位点、终止信号、复制起点和选择标记。

[0313] 质粒载体

[0314] 在某些实施方案中，预期质粒载体用于转化宿主细胞。一般来讲，含有从与宿主细胞相容的物种来源的复制子和控制序列的质粒载体与这些宿主结合使用。载体通常携带复

制位点、以及能够在转化细胞中提供表型选择的标记序列。在非限制性实例中，通常使用来源于大肠杆菌物种的质粒pBR322的衍生物转化大肠杆菌(E.coli)。pBR322含有氨苄青霉素和四环素抗性的基因，因此提供了鉴定转化细胞的简便方法。pBR质粒或其他微生物质粒或噬菌体还必须含有或被修饰成含有例如可以被微生物有机体用于表达其自身蛋白的启动子。

[0315] 此外，含有与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体可以用作与这些宿主相关的转化载体。例如，噬菌体λGEM.TM.11可以用于制备重组噬菌体载体，其可以用于转化宿主细胞，例如大肠杆菌LE392。

[0316] 进一步有用的质粒载体包括pIN载体(Inouye等人，1985)；和pGEX载体，用于产生谷胱甘肽S转移酶(GST)可溶性融合蛋白供以后纯化和分离或切割。其他合适的融合蛋白是与半乳糖苷酶、泛素等的那些融合蛋白。

[0317] 包含表达载体的细菌宿主细胞(例如大肠杆菌)在多种合适的培养基中的任一种(例如LB)中生长。如本领域技术人员所理解的，通过使宿主细胞与对某些启动子具有特异性的药剂接触，例如通过向培养基中添加IPTG或通过将孵育切换至更高温度，可以诱导某些载体中的重组蛋白的表达。再培养细菌一段时间(通常在2小时与24小时之间)后，通过离心收集细胞并洗涤以除去残余培养基。

[0318] 病毒载体

[0319] 某些病毒通过受体介导的胞吞作用感染细胞或进入细胞并且整合到宿主细胞基因组中并稳定且有效地表达病毒基因的能力已经使得它们成为将外源核酸转移到细胞(例如哺乳动物细胞)中的有吸引力的候选物。本发明的组分可以是编码一种或多种CAR、TCR或任何其他工程化蛋白质或多肽结构域诸如本发明的高亲和力CD16的病毒载体。可以用于递送本发明的核酸的病毒载体的非限制性实例描述如下。

[0320] 腺病毒载体

[0321] 递送核酸的具体方法涉及使用腺病毒表达载体。尽管已知腺病毒载体整合到基因组DNA中的能力低，但是由这些载体提供的高效基因转移抵消了该特征。“腺病毒表达载体”意指包括含有足以(a)支持构建体的包装和(b)最终表达已在其中克隆的组织或细胞特异性构建体的腺病毒序列的那些构建体。已知的遗传组织或腺病毒(一种36kb的线性双链DNA病毒)允许用至多7kb的外源序列取代大部分腺病毒DNA(Grunhaus和Horwitz，1992)。

[0322] AAV载体

[0323] 可以使用腺病毒辅助转染将核酸引入细胞中。已经报道在使用腺病毒偶联系统的细胞系统中的转染效率增加(Kelleher和Vos，1994；Cotten等人，1992；Curiel，1994)。腺伴随病毒(AAV)是用于本发明的细胞的有吸引力的载体系统，因为其具有高整合频率并且其可以感染非分裂细胞，因此使得它可用于例如在组织培养中(Muzyczka，1992)或体内将基因递送到哺乳动物细胞中。AAV的感染性具有广泛的宿主范围(Tratschin等人，1984；Laughlin等人，1986；Lebkowski等人，1988；McLaughlin等人，1988)。关于rAAV载体的产生和使用的细节描述于美国专利号5,139,941和4,797,368，各自通过引用并入本文。

[0324] 逆转录病毒载体

[0325] 逆转录病毒可用作递送载体，因为它们能够将它们的基因整合到宿主基因组中，转移大量的外源遗传物质，感染广谱的物种和细胞类型并被包装在特殊的细胞系中

(Miller,1992)。

[0326] 为了构建逆转录病毒载体,将核酸(例如编码所需序列的核酸)插入到病毒基因组中代替某些病毒序列以产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒体,构建了含有gag、pol和env基因但不含LTR和包装组分的包装细胞系(Mann等人,1983)。当将含有cDNA的重组质粒与逆转录病毒LTR和包装序列一起引入特定细胞系中(例如,通过例如磷酸钙沉淀)时,包装序列允许重组质粒的RNA转录物包装成病毒颗粒,然后将其分泌到培养基中(Nicolas和Rubenstein,1988;Temin,1986;Mann等人,1983)。然后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地浓缩并且用于基因转移。逆转录病毒载体能够感染多种细胞类型。然而,整合和稳定表达需要宿主细胞分裂(Paskind等人,1975)。

[0327] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,除了常见的逆转录病毒基因gag、pol和env外,其还含有具有调节或结构功能的其他基因。慢病毒载体是本领域熟知的(参见例如,Naldini等人,1996;Zufferey等人,1997;Blomer等人,1997;美国专利号6,013,516和5,994,136)。慢病毒的一些实例包括人免疫缺陷病毒:HIV-1、HIV-2和猿猴免疫缺陷病毒:SIV。慢病毒载体已经通过多重衰减HIV毒力基因而产生,例如基因env、vif、vpr、vpu和nef被缺失,使得载体在生物学上是安全的。

[0328] 重组慢病毒载体能够感染非分裂细胞,并且可以用于体内和离体基因转移以及核酸序列的表达。例如,美国专利号5,994,136(通过引用并入本文)中描述了能够感染非分裂细胞的重组慢病毒,其中用携带包装功能(即gag、pol和env以及rev和tat)的两种或更多种载体转染合适的宿主细胞。可以通过包膜蛋白与抗体或特定配体的连接靶向重组病毒,用于靶向特定细胞类型的受体。通过将感兴趣的序列(包括调节区)与编码特定靶细胞上受体的配体的另一个基因一起插入病毒载体中,例如,载体现在是靶特异性的。

[0329] 组合疗法

[0330] 在本发明的某些实施方案中,将用于临床方面的本发明的方法与有效治疗过度增殖性疾病的其他药剂诸如抗癌剂组合。“抗癌”剂能够负面影响受试者中的癌症,例如,通过杀死癌细胞、诱导癌细胞中的细胞凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低转移的发生率或数量、缩小肿瘤尺寸、抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展或增加患有癌症的受试者的寿命。更一般地,这些其他组合物将以有效杀死细胞或抑制细胞增殖的组合量提供。该过程可以涉及使癌细胞同时与表达构建体和药剂或多种因子接触。这可以通过使细胞与包含两种药剂的单一组合物或药物制剂接触,或通过使细胞同时与两种不同的组合物或制剂接触来实现,其中一种组合物包含表达构建体,而另一种组合物包含第二种药剂。

[0331] 肿瘤细胞对化学疗法和放射疗法剂的抗性代表临床肿瘤学中的主要问题。当前癌症研究的一个目标是找到通过将化学疗法和放射疗法与其他疗法组合来改善化学疗法和放射疗法的功效的方式。在本发明的上下文中,预期细胞疗法可以类似地与化学疗法、放射疗法或免疫治疗干预以及促凋亡或细胞周期调节剂结合使用。

[0332] 可替代地,疗法可以在其他药剂治疗之前或之后间隔数分钟至数周的范围。在其中将其他药剂和本发明单独施用于个体的实施方案中,通常将确保在每次递送的时间之间不超过显著的时间段,使得药剂和本发明疗法将仍然能够对细胞发挥有利的组合效应。在此类情况下,预期可以在彼此约12-24小时内、更优选地在彼此约6-12小时内以两种形式接

触细胞。然而，在一些情形中，可能需要显著延长治疗的时间段，其中在各次施用之间经过数天(2天、3天、4天、5天、6天或7天)至数周(1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周或8周)。

[0333] 在一些实施方案中，根据需要重复治疗周期。还预期各种标准疗法以及手术干预可以与本发明的细胞疗法组合施用。

[0334] 化学疗法

[0335] 癌症疗法还包括与基于化学和放射的治疗两者的多种组合疗法。组合化学疗法包括例如白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、六甲蜜胺、多西他赛、赫赛汀、甲氨蝶呤、诺消灵、诺雷德、顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、硝基脲(nitrosurea)、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、泰素、吉西他滨、诺维本、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶、长春花新碱、长春碱和甲氨蝶呤、或前述的任何类似物或衍生物变体以及它们的组合。

[0336] 在具体的实施方案中，将个体的化学疗法与本发明结合使用，例如在施用本发明之前、期间和/或之后。

[0337] 放射疗法

[0338] 引起DNA损伤并已经广泛使用的其他因素包括通常称为以下的那些：γ射线、X射线和/或定向递送放射性同位素至肿瘤细胞。也考虑了其他形式的DNA损伤因子，诸如微波和UV照射。所有这些因素最有可能对DNA、对DNA前体、对DNA的复制和修复以及对染色体的装配和维持产生广泛的损伤。X射线的剂量范围从50至200伦琴的日剂量持续延长的时间段(3至4周)到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大，并且取决于同位素的半衰期、所发射的辐射强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

[0339] 当应用于细胞时，术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述将治疗性构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或与靶细胞直接并置的过程。为了实现细胞杀伤或停滞，将两种药剂以有效杀死细胞或防止其分裂的组合量递送至细胞。

[0340] 免疫疗法

[0341] 免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的一些标记具有特异性的抗体。单独的抗体可以作为疗法的效应物，或者其可以募集其他细胞以实际地实现细胞杀伤。抗体也可以与药物或毒素(化学疗法药、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合，并且仅用作靶向剂。可替代地，效应物可以是携带与肿瘤细胞靶标直接或间接相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0342] 因此，除了本文所述的本发明疗法之外的免疫疗法可以与本发明细胞疗法结合用作组合疗法的一部分。下面论述组合疗法的一般方法。通常，肿瘤细胞必须带有一些适于靶向(即不存在于大多数其他细胞上)的标记。存在许多肿瘤标记，并且在本发明的上下文中，这些标记中的任何一种标记都可以适用于靶向。常见的肿瘤标记包括PD-1、PD-L1、CTLA4、癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿肿瘤相关抗原、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155。

[0343] 基因

[0344] 在又另一个实施方案中，第二治疗是基因疗法，其中治疗性多核苷酸在本发明临床实施方案之前、之后或同时施用。本发明涵盖多种表达产物，包括细胞增殖诱导剂、细胞增殖抑制剂或程序性细胞死亡调节剂。

[0345] 手术

[0346] 大约60％的癌症个体将接受一些类型的手术，包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术是可以与其他疗法结合使用的癌症治疗，诸如本发明的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。

[0347] 治愈性手术包括切除，其中癌组织的全部或部分被物理去除、切除和/或破坏。肿瘤切除是指至少部分肿瘤的物理切除。除了肿瘤切除外，手术治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微镜控制的手术(Mohs外科手术)。还预期本发明可以与除去浅表癌症、初期癌或附带量的正常组织结合使用。

[0348] 在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤时，可以在体内形成空腔。治疗可以通过灌注、直接注射或局部施用具有另外的抗癌疗法的区域来完成。这种治疗可以例如每1、2、3、4、5、6或7天、或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复一次。这些治疗也可以是不同的剂量。

[0349] 实施例

[0350] 本发明的其他特征、目的和优点在以下实施例中是显而易见的。然而，应当理解，这些实施例虽然指示本发明的实施方案，但仅以说明而不是限制的方式给出。对于本领域技术人员而言，本发明的范围内的各种变化和修改将从实施例中变得显而易见。

[0351] 实施例1.iPS细胞向HP细胞混合群的分化

[0352] FfI-01s04株(一种iPS细胞株)来源于健康个体的外周血单核细胞。将分散在StemFit完全培养基中的FfI-01s04细胞以$6x10^5$个细胞/孔接种在低氧(5％O_2)条件下的超低粘附处理的6孔板中(“第0天”)。StemFit完全培养基包括10μM CHIR99021和50μM Y-27632。第二天(即，第1天)，将FfI-01s04细胞分散在含有BMP4(50ng/ml)、VEGF(50ng/ml)、bFGF(50ng/ml)和抗坏血酸2-磷酸酯(50μg/ml)的造血祖细胞(HPC)分化培养基中。HPC诱导培养基包括补充有人胰岛素(10μg/ml)、人转铁蛋白(5.5μg/ml)、亚硒酸钠(6.7ng/ml)、L-谷氨酰胺(2mM)和α-一硫代甘油(0.4mM)的StemPro34。在第2天，将SB431542(在培养基中为6μM)添加到培养基(即含有细胞的HPC分化培养基)中，并将细胞培养2天。在第4天，将细胞再分散于含有VEGF(50ng/ml)、bFGF(50ng/ml)、SCF(50ng/ml)和抗坏血酸2-磷酸酯(50μg/ml)的另一种培养基中，并且再培养3天。在第7天，将细胞暴露于含有VEGF(50ng/ml)、bFGF(50ng/ml)、SCF(50ng/ml)、抗坏血酸2-磷酸酯(50μg/ml)、TPO(30ng/ml)和Flt3L(10ng/ml)的另一种培养基，并且使用该培养基再培养7天。在这7天的培养期内每2-3天更换一次培养基。

[0353] 实施例2.HP细胞混合群分化成包含CD4/CD8细胞的群体在第14天，将从实施例1获得的未经历任何细胞分离的细胞群(“HP细胞混合群”)以$3.12x10^6$个细胞/皿接种在15cm皿中，并且在5％O_2下在37℃下培养。注意，可以使用各种接种密度，并且前述接种密度是一个实施方案。用rh-DLL4/Fc嵌合体(Sino Biological)和RetroNectin(Takara Bio Inc)包被每个15cm皿。在该培养期内每2-3天更换一次培养基。使用补充有15％FBS、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100μg/ml链霉素、55μM 2-巯基乙醇、50μg/ml抗坏血酸2-磷酸酯、10μg/

ml人胰岛素、5.5μg/ml人转铁蛋白、6.7ng/ml亚硒酸钠、50ng/ml SCF、50ng/ml IL-7、50ng/ml Flt3L、100ng/ml TPO、15μM SB203580、30nM SDF-1α的MEMα(Thermo Fisher Scientific(Gibco))作为培养基来培养这些细胞。在第21天,将细胞传代到新的用hDLL4/RetroNectin新鲜包被的15cm皿中。在第28天,将细胞进一步传代到新的用hDLL4/RetroNectin新鲜包被的15cm皿中。在第35天,收获所有细胞,其中包括CD4/CD8细胞("DP细胞混合群")。

[0354] 实施例3.DP细胞混合群向NK细胞混合群的分化

[0355] 在第35天,将DP细胞混合群(即从实施例2获得的未经历任何细胞分离的细胞)以$1x10^6$个细胞/孔接种在48孔板中,并且在5%CO_2、37℃下培养三天。使用补充有15%FBS、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100ng/ml链霉素、50μg/ml抗坏血酸2-磷酸酯、10μg/ml人胰岛素、5.5μg/ml人转铁蛋白、6.7ng/ml亚硒酸钠、500ng/ml抗CD3抗体(UCHT1)、10ng/ml IL-2和10ng/ml IL-7的MEMα培养基作为培养基。在第38天,将细胞分散在另一种补充有15%FBS、4mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素、100ng/ml链霉素、50μg/ml抗坏血酸2-磷酸酯、10μg/ml人胰岛素、5.5μg/ml人转铁蛋白、6.7ng/ml亚硒酸钠、10ng/ml IL-2和10ng/ml IL-7的MEMα培养基(其用作培养基)中。在第42天,收集所有细胞,包括NK细胞("NK细胞混合群")。

[0356] 实施例4.流式细胞术分析

[0357] 然后用表1中列出的一组抗体将NK细胞混合群进行染色,并通过流式细胞术进行分析。如图1所示,一部分CD3阴性NK细胞混合群表达CD56("CD56阳性免疫细胞")。图1.CD56阳性和CD3阴性免疫细胞是自然杀伤细胞(NK细胞)。因此,从衍生自iPS细胞(FfI-01s04株)的HP细胞混合群制备CD56阳性和CD3阴性免疫细胞。在上述方法中获得的表达CD56的细胞有时被称为iPS NK细胞。用于流式细胞术的抗体如表1所示。

[0358] 表1:

[0359]

抗CD3抗体	CD3 BioLegend APC/Cy7
抗CD56抗体	CD56 Biolegend PE

[0360] 实施例5.单细胞RNA序列(scRNAseq)分析

[0361] 为了鉴定NK细胞混合群(即,实施例3中获得的细胞)中的不同细胞类型,应用非线性降维技术(基于单细胞RNA-seq(scRNAseq)的均匀流形近似和投影(UMAP))。

[0362] 来自NK细胞混合群的数万个细胞在Genewiz的IIumina NextSeq500上进行单细胞RNA测序。使用SingleR算法和手动聚类标记,在PBMC样品中将事件分为四个广泛的细胞群-单核细胞、B细胞、NK细胞和T细胞。将从10X Genomics自由获得的PBMC数据集用作数据分析的对照。

[0363] 如图2所示,NK细胞混合群中约75%的细胞被鉴定为NK细胞,而NK细胞混合群中约25%的细胞被鉴定为T细胞。因此,基于通过单细胞RNA测序获得的mRNA谱分析,NK细胞混合群包括NK细胞和T细胞两者。

[0364] 实施例6.CAR-NK细胞制备

[0365] NK细胞被进一步修饰以表达一种或多种CAR。NK细胞的修饰包括以下步骤:(1)合成抗CD19 CAR基因和IL-15Rα/IL-15基因;(2)制备含有抗CD19 CAR基因和IL-15Rα/IL-15基因的逆转录病毒载体;和(3)用含有抗CD19 CAR基因和IL-15Rα/IL-15基因的逆转录病毒载体转导NK细胞。

[0366] CAR/IL15-NK细胞制备

[0367] 通过合成寡肽制备抗CD19 CAR基因,所述寡肽被设计为从N末端排列,如表2所示。

[0368] 表2:

[0369]

从N末端开始的序列	基因	氨基酸数目
1	免疫球蛋白重链前导序列	22
2	抗CD19抗体(FMC60)的轻链中的可变结构域	104
3	GGGGS接头	15
4	抗CD19抗体(FMC60)的重链中的可变结构域	120
5	CD8衍生的序列(含有跨膜结构域)	83
6	4-1BB的胞内结构域	47
7	CD3ζ的胞内结构域	112

[0370] 根据WO2014/153270(通过引用将其全文并入本文)构建抗CD19CAR。

[0371] 制备IL-15Rα/IL-15基因

[0372] 通过合成设计成从N末端排列的寡肽制备IL-15Rα/IL-15基因。根据以下文献构建IL-15Rα/IL-15:Mortier等人,2006,The Journal of Biological Chemistry,第281卷第3期,第1612-1619页,2006年1月20日;Chertova等人,The Journal of Biological Chemistry,第288卷第25期,第18093-18103页,2013年6月21日;以及Rowley等人,Eur J Immunol,2009年2月;39(2):491-506,其各自通过引用将其全文并入。

[0373] 表4:

[0374]

从N末端开始的序列	基因	氨基酸数目
1	人IL-2的前导序列	23
2	人IL-15的C端序列	114
3	GGGGS接头	24
4	人IL-15RA的C端序列	239

[0375] 含有抗CD19 CAR基因的逆转录病毒载体的制备

[0376] 将抗CD19 CAR基因掺入pMY逆转录病毒载体的多克隆位点。使用用于逆转录病毒载体产生的FRY-RD18细胞来产生逆转录病毒载体。

[0377] 含有IL-15Rα/IL-15基因的逆转录病毒载体的制备

[0378] 将IL-15Rα/IL-15基因掺入另一种pMY逆转录病毒载体的多克隆位点。使用用于逆转录病毒载体产生的FRY-RD18细胞来产生逆转录病毒载体。

[0379] 将抗CD19 CAR基因和IL-15Rα/IL-15基因转导到iPS NK细胞中

[0380] 用含有抗CD19 CAR基因的逆转录病毒载体和用含有IL-15Rα/IL-15基因的逆转录

病毒载体转导iPS NK细胞以产生表达抗CD19 CAR的iPS NK细胞(“iNK-CAR19”)。

[0381] 实施例7.iNK-CAR19的体内抗肿瘤活性

[0382] 将表达萤光素酶的Nalm6细胞(ATCC;癌细胞)($5x10^5$个细胞)通过尾静脉移植到NOD/Shi-scid、IL-2Rγ无效小鼠(“NSG小鼠”)中。4-5周龄的雄性NSG小鼠来自The Jackson Laboratory。Nalm6细胞移植后四天,将分散在0.2ml PBS中的iNK-CAR19($1x10^7$个细胞)或仅0.2ml无细胞的PBS通过尾静脉施用于Nalm6移植的NSG小鼠。在施用iNK-CAR19细胞或PBS之后,通过尾静脉向小鼠施用萤光素。使用IVIS成像系统(PerkinElmer)测量萤光素酶活性70天以上。

[0383] 图3显示未治疗的(仅用缓冲液治疗的)和iNK-CAR19细胞治疗的Nalm6移植的NSG小鼠的抗肿瘤功效。仅仅在三天后,在用D-PBS缓冲液治疗的所有小鼠中检测到发光。相反,直到施用后28天,在其他小鼠(用原代CAR T细胞或iNK-CAR细胞治疗的)中没有检测到发光,并且在用iNK-CAR19细胞治疗的一只小鼠中甚至在治疗后70天也没有检测到发光。因此,iNK-CAR19细胞清楚地展示针对Nalm6癌细胞的增强的毒性。

[0384] 等效方案和范围

[0385] 本领域技术人员仅使用常规试验将认识到或能够确定本文所述的发明的具体实施方案的很多等效方案。本发明的范围并不旨在局限于以上描述,而是如以下权利要求中所阐述。

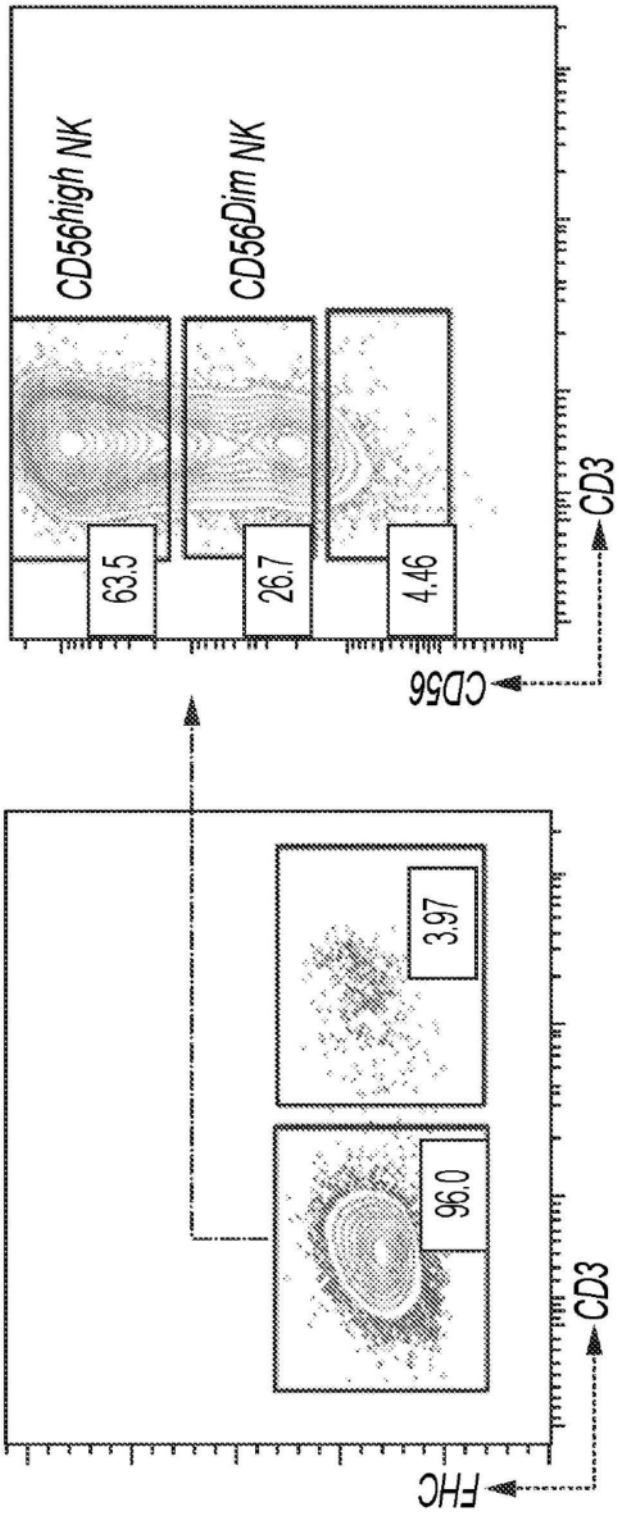


图1

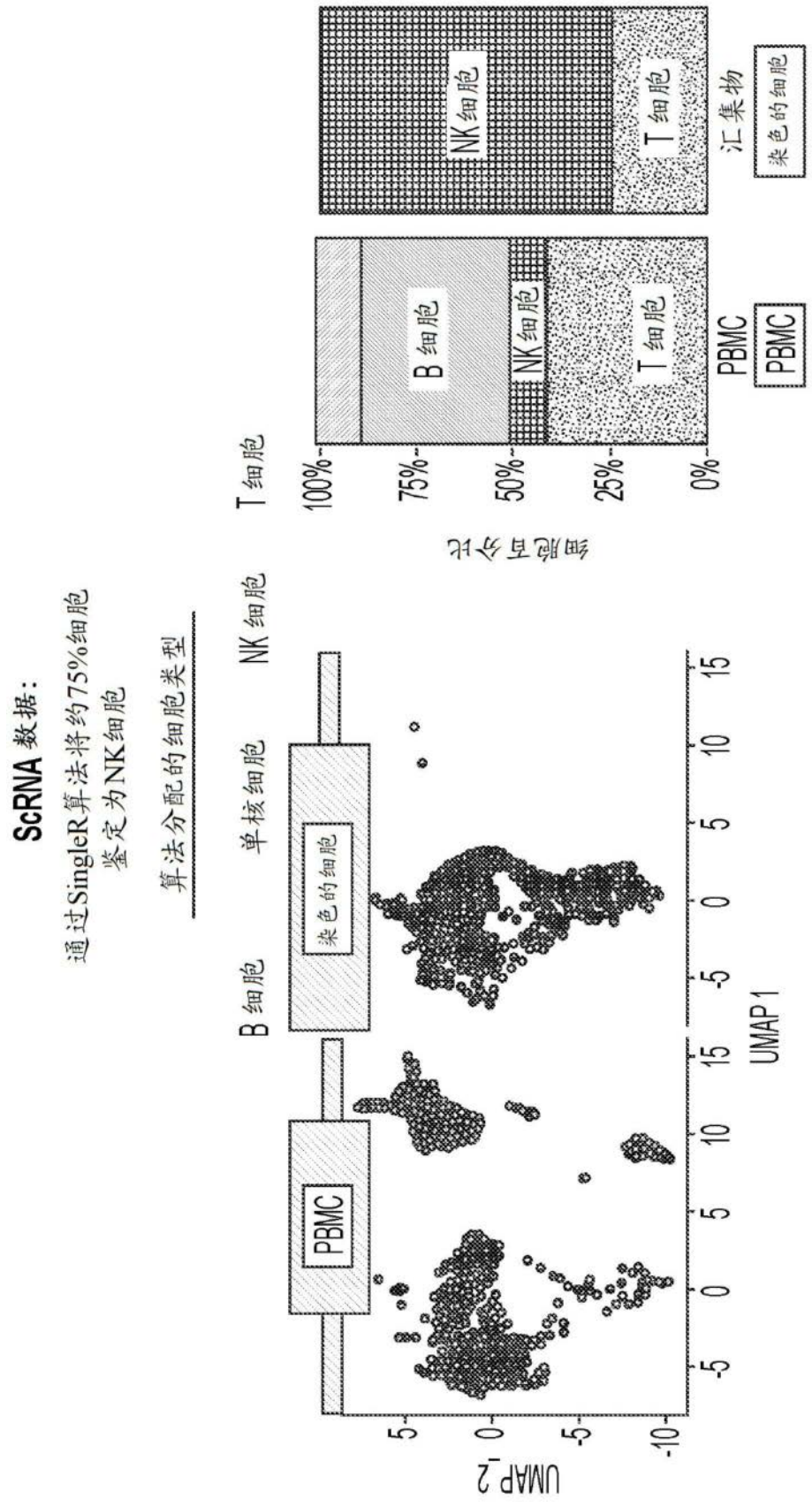

ScRNA 数据：
通过SingleR算法将约75%细胞
鉴定为NK细胞
算法分配的细胞类型
B 细胞
单核细胞
NK 细胞
T 细胞
染色的细胞
PBMC
UMAP_2
UMAP 1
细胞百分比
100%
75%
50%
25%
0%
B 细胞
NK细胞
T 细胞
PBMC
PBMC
NK细胞
T 细胞
汇集物
染色的细胞

图2

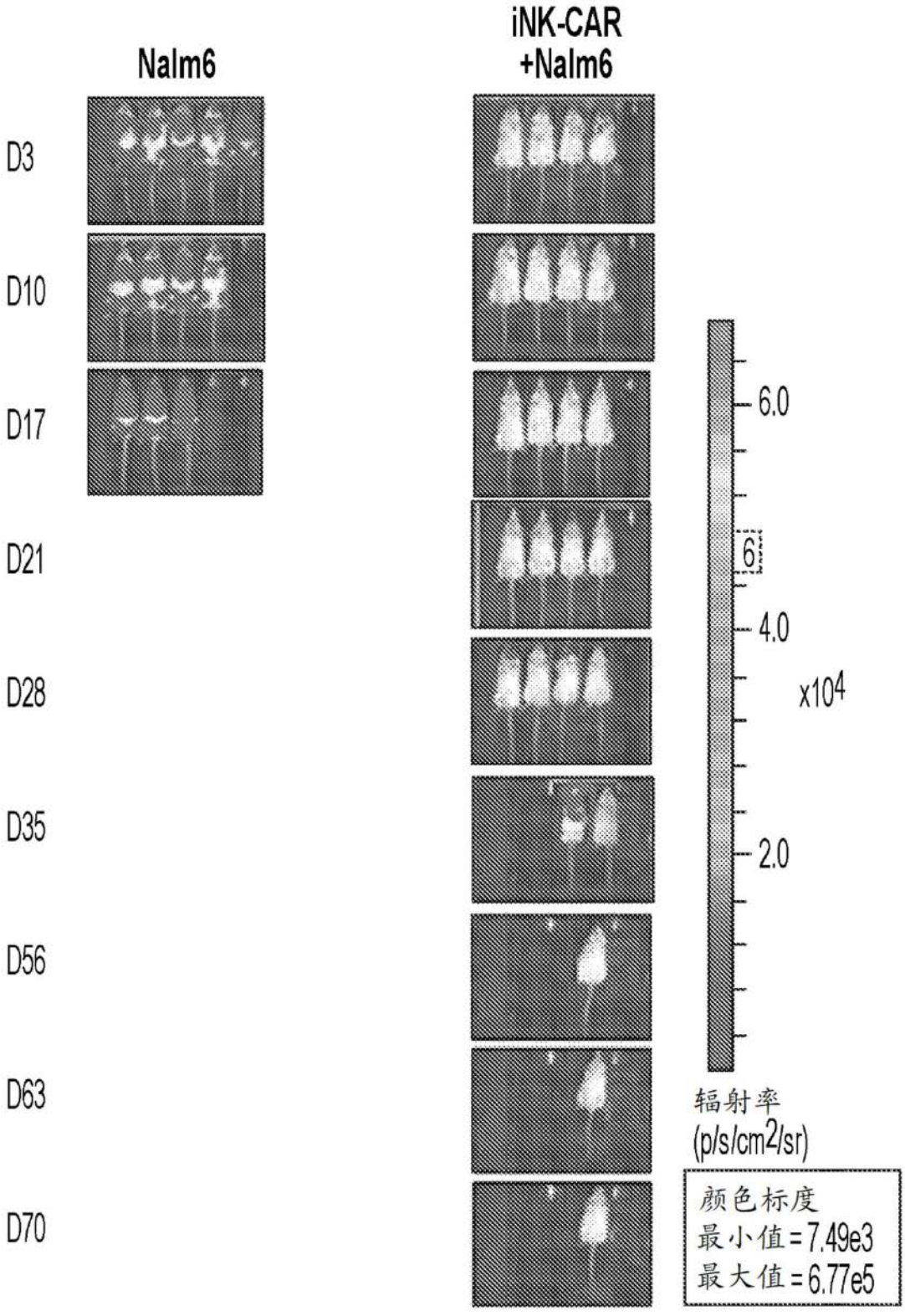

Nalm6
iNK-CAR
+Nalm6
D3
D10
D17
D21
D28
D35
D56
D63
D70
6.0
6
4.0
x10^4
2.0
辐射率
(p/s/cm2/sr)
颜色标度
最小值=7.49e3
最大值=6.77e5

图3