



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101878034 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 200880118399. 6

(22) 申请日 2008. 09. 29

(30) 优先权数据

60/995, 763 2007. 09. 28 US

61/090, 555 2008. 08. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/011251 2008. 09. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/045360 EN 2009. 04. 09

(73) 专利权人 细胞基因细胞疗法公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 晓奎·张

瓦内萨·A·沃斯基纳里安-贝尔斯

琳·康 尼拉弗·迪利普·帕德里亚

(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 武晶晶 郑霞

(51) Int. Cl.

C12N 5/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 7045148 B2, 2006. 05. 16, 说明书全文.

US 7255879 B2, 2007. 08. 14, 说明书全文.

CN 1493687 A, 2004. 05. 05, 说明书全文.

Gong JH etc.. 《Characterization of a human cell line(NK - 92)with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells》. 《Leukemia》.1994, 第8卷(第4期), 652-658.

E. Takahashi etc. 《Induction of CD16(+) CD56(bright) NK cells with antitumor cytotoxicity not only from CD16(-) CD56(bright) NK cells but also from CD16(-)CD56(dim) NK cells》. 《Scandinavian Journal of Immunology》.2007, 第65卷(第2期), 126-138.

审查员 杨莹跃

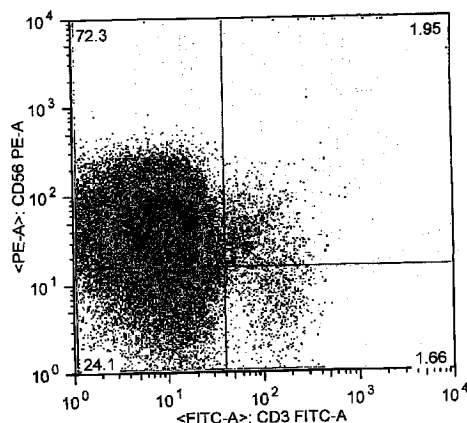
权利要求书3页 说明书67页 附图12页

(54) 发明名称

使用人胎盘灌洗液和来自胎盘的中间体自然杀伤细胞的肿瘤抑制

(57) 摘要

本发明提供了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和来自胎盘的中间体自然杀伤(PINK)细胞及其组合。本发明还提供了包含胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和来自胎盘的中间体自然杀伤细胞及其组合的组合物,以及使用胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和来自胎盘的中间体自然杀伤细胞及其组合抑制肿瘤细胞、癌细胞等的生长或增殖的方法和治疗具有肿瘤细胞的个体的方法。在一个优选的实施方案中,所述组合物包含:分离的CD56⁺、CD16⁺自然杀伤细胞。



1. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,该方法包括将所述肿瘤细胞与众多 CD56⁺、CD16⁻ 胎盘来源自然杀伤细胞体外接触。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴瘤 (CML) 细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞、或成视网膜细胞瘤细胞。

3. 权利要求 1 的方法,其中与外周血液自然杀伤细胞相比,所述自然杀伤细胞以可检测的更高水平表达以下微小 RNA 中的一种或多种:hsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618、和 / 或 hsa-miR-99a。

4. 权利要求 1 的方法,其中将所述自然杀伤细胞与一定量的免疫调节化合物接触一段时间,所述量和所述时间足以使得所述自然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物的等量的自然杀伤细胞相比表达可检测的更多的粒酶 B。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述免疫调节化合物为来那度胺或 pomalidomide。

6. 权利要求 1 的方法,其中将所述自然杀伤细胞与一定量的免疫调节化合物接触一段时间,所述量和所述时间足以使得所述自然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物的等量的自然杀伤细胞相比显示出对所述肿瘤细胞的可检测的更高的细胞毒性。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述免疫调节化合物为来那度胺或 pomalidomide。

8. 权利要求 4 或权利要求 6 的方法,其中所述自然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物的等量的自然杀伤细胞相比,以更高水平表达 BAX、CCL5、CCR5、CSF2、FAS、GUSB、IL2RA、或 TNFRSF18 中的一种或多种。

9. 权利要求 4 或权利要求 6 的方法,其中所述自然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物的等量的自然杀伤细胞相比,以更高水平表达 ACTB、BAX、CCL2、CCL3、CCL5、CCR5、CSF1、CSF2、ECE1、FAS、GNLY、GUSB、GZMB、IL1A、IL2RA、IL8、IL10、LTA、PRF1、PTGS2、SKI、和 TBX21 中的一种或多种。

10. 权利要求 1 所述的方法,其中所述自然杀伤细胞表达以下蛋白中的一种或多种: 氨肽酶 N 蛋白、载脂蛋白 E 蛋白、Atrophin-1 相互作用蛋白 1、innexin inx-3 蛋白、整联蛋白 α -2 前体蛋白、整联蛋白 β -5 前体蛋白、肥大细胞表面糖蛋白 GP49B 前体蛋白、或 ryanodine 受体 1 蛋白;且不表达以下蛋白中的一种或多种:成纤维细胞生长因子受体 4 前体蛋白、免疫-相关的核苷酸 4-样蛋白、整联蛋白 α -L 前体蛋白、整联蛋白 β -2 前体蛋白、整联蛋白 β -4 前体蛋白、膜-结合的溶解性胞壁质转糖酶 D 前体蛋白、oxysterol 结合蛋白相关蛋白 8、或穿孔素 1 前体 1 蛋白。

11. 一种抑制肿瘤细胞增殖的方法,该方法包括将所述肿瘤细胞与混合的自然杀伤细胞体外接触,其中所述混合的自然杀伤细胞包含从胎盘灌洗液分离的 CD56⁺、CD16⁻ 胎盘来源自然杀伤细胞和从脐带血分离的自然杀伤细胞,其中所述脐带血分离自从中获得所述胎盘灌洗液的所述胎盘。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T

细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴瘤 (CML) 细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞、或成视网膜细胞瘤细胞。

13. 权利要求 11 的方法, 其中所述混合的自然杀伤细胞包含:

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更低数量的 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}KIR2DL2/L3^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更低数量的 $CD3^{-}CD56^{+}Nkp46^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}Nkp30^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}2B4^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}CD94^{+}$ 自然杀伤细胞。

14. 权利要求 13 的方法, 其中所述自然杀伤细胞没有经过培养。

15. 权利要求 11 的方法, 其中所述混合的自然杀伤细胞包含:

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更低数量的 $CD3^{-}CD56^{+}KIR2DL2/L3^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}Nkp46^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}Nkp44^{+}$ 自然杀伤细胞;

与来自外周血液的等量的自然杀伤细胞相比, 可检测的更高数量的 $CD3^{-}CD56^{+}Nkp30^{+}$ 自然杀伤细胞。

16. 权利要求 15 的方法, 其中所述自然杀伤细胞经过培养。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述自然杀伤细胞已经被培养约 21 天。

18. 一种组合物, 其包含分离的 $CD56^{+}$ 、 $CD16^{-}$ 自然杀伤细胞, 其中所述自然杀伤细胞是从胎盘灌洗液分离的, 且其中所述自然杀伤细胞包含所述组合物中至少 50% 的细胞。

19. 权利要求 18 的组合物, 其中所述自然杀伤细胞包含所述组合物中至少 80% 的细胞。

20. 权利要求 18 的组合物, 其中所述组合物包含分离的 $CD56^{+}$ 、 $CD16^{+}$ 自然杀伤细胞。

21. 权利要求 18 的组合物, 其中所述 $CD56^{+}$ 、 $CD16^{+}$ 自然杀伤细胞与所述 $CD56^{+}$ 、 $CD16^{-}$ 自然杀伤细胞来自不同的个体。

22. 权利要求 18 的组合物, 其中所述自然杀伤细胞来自单个个体。

23. 权利要求 18 的组合物, 其中所述分离的自然杀伤细胞包含来自至少两个不同个体

的自然杀伤细胞。

24. 权利要求 18 的组合物,该组合物包含分离的胎盘灌洗液。

25. 权利要求 24 的组合物,其中所述胎盘灌洗液与所述自然杀伤细胞来自相同的个体。

26. 权利要求 24 的组合物,其中所述胎盘灌洗液包含与所述自然杀伤细胞来自不同个体的胎盘灌洗液。

27. 权利要求 18 的组合物,该组合物包含分离的胎盘灌洗液细胞。

28. 权利要求 27 的组合物,其中所述胎盘灌洗液细胞与所述自然杀伤细胞来自相同的个体。

29. 权利要求 27 的组合物,其中所述胎盘灌洗液细胞与所述自然杀伤细胞来自不同的个体。

30. 权利要求 18 的组合物,该组合物包含分离的胎盘灌洗液和分离的胎盘灌洗液细胞,其中所述分离的灌洗液和所述分离的胎盘灌洗液细胞来自不同的个体。

31. 权利要求 24 的组合物,其中所述胎盘灌洗液包含来自至少两个个体的胎盘灌洗液。

32. 权利要求 27 的组合物,其中所述分离的胎盘灌洗液细胞来自至少两个个体。

33. 权利要求 18 的组合物,其中与外周血液自然杀伤细胞相比,所述自然杀伤细胞以可检测的更高水平表达以下微小 RNA 中的一种或多种:hsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618、或 hsa-miR-99a。

34. 权利要求 18 的组合物,其中所述自然杀伤细胞表达以下蛋白中的一种或多种:氨肽酶 N 蛋白、载脂蛋白 E 蛋白、Atrophin-1 相互作用蛋白 1、innexin inx-3 蛋白、整联蛋白 α -2 前体蛋白、整联蛋白 β -5 前体蛋白、肥大细胞表面糖蛋白 GP49B 前体蛋白、或 ryanodine 受体 1 蛋白;且不表达以下蛋白中的一种或多种:成纤维细胞生长因子受体 4 前体蛋白、免疫-相关的核苷酸 4-样蛋白、整联蛋白 α -L 前体蛋白、整联蛋白 β -2 前体蛋白、整联蛋白 β -4 前体蛋白、膜-结合的溶解性胞壁质转糖酶 D 前体蛋白、oxysterol 结合蛋白相关蛋白 8、或穿孔素 1 前体 1 蛋白。

使用人胎盘灌洗液和人来自胎盘的中间体自然杀伤细胞的 肿瘤抑制

[0001] 本申请要求于2008年9月28日提交的美国临时专利申请号60/995,763和于2008年8月21日提交的美国临时专利申请号61/090,555的优先权,所述申请的全部内容通过参考纳入本文。

1. 发明领域

[0002] 本发明提供了通过将肿瘤细胞与胎盘灌洗液、来自胎盘的细胞、来自胎盘(例如来自胎盘灌洗液)的自然杀伤细胞、和/或包含来自胎盘(例如来自胎盘灌洗液)的自然杀伤细胞和来自脐带血的自然杀伤细胞的混合自然杀伤细胞接触来抑制肿瘤细胞生长或增殖的方法。本发明还提供了从胎盘,例如从胎盘灌洗液(例如人胎盘灌洗液),来制备独特自然杀伤细胞群的方法。进一步地,本发明提供了使用胎盘灌洗液及其中的自然杀伤细胞抑制肿瘤细胞增殖的方法。

2. 背景技术

[0003] 胎盘灌洗液包含通过下述方式获得的胎盘细胞群:使灌洗溶液流经胎盘血管系统,并从所述血管系统、从所述胎盘的母体面、或从两者收集灌洗液体。灌洗哺乳动物胎盘的方法描述在例如美国专利号7,045,146和美国专利号7,255,879中。通过灌洗获得的胎盘细胞群是异源性的,包含造血细胞(CD34⁺)、有核细胞例如粒细胞、单核细胞和巨噬细胞、小百分比(少于1%)的组织培养基质-粘附的胎盘干细胞和自然杀伤细胞。至今还无人描述胎盘灌洗液或来自灌洗液的胎盘细胞群在抑制肿瘤细胞增殖中的用途。

[0004] 自然杀伤(NK)细胞是构成先天免疫系统的主要组分的细胞毒性淋巴细胞。在人体中,NK细胞不表达T-细胞抗原受体(TCR)、CD3或表面免疫球蛋白(Ig)B细胞受体,但通常表达表面标记物CD16(Fc γ RIII)和CD56。NK细胞是细胞毒性的;其细胞质中的小颗粒包含特殊蛋白质如穿孔素和被称为粒酶的蛋白酶。当在非常接近于待杀死的细胞周围释放时,穿孔素在靶细胞的细胞膜中形成孔,粒酶和相关分子可以通过所述孔进入,诱导细胞凋亡。一种粒酶,粒酶B(也被称为粒酶2和细胞毒性T-淋巴细胞-结合的丝氨酸酯酶1),是在细胞介导免疫应答中快速诱导靶细胞细胞凋亡的一种重要的丝氨酸蛋白酶。

[0005] NK细胞响应干扰素或巨噬细胞-衍生的细胞因子而被活化。活化的NK细胞被称为淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞。NK细胞具有两类表面受体,标记为“活化受体”和“抑制受体”,它们控制细胞的细胞毒活性。

[0006] 除了其它活性,NK细胞在宿主的肿瘤排异反应中起作用。因为癌细胞具有降低的或没有I型MHC表达,它们可以成为NK细胞的靶点。大量临床数据表明从PBMC或骨髓分离的人NK细胞的单倍体相合移植可介导强烈的抗白血病效应,而不会产生可检测的移植抗宿主病(GVHD)。参见Ruggeri等人,Science 295:2097-2100(2002)。自然杀伤细胞可由缺乏或呈现低水平的主要组织相容性复合体(MHC)蛋白的细胞活化。活化的和扩增的NK细胞和LAK细胞已被用于对患有晚期癌症的患者的离体治疗和体内治疗,并在骨髓相关

疾病（例如白血病）、乳腺癌、和某些类型的淋巴瘤的治疗中取得了一定的成功。LAK 细胞治疗要求患者首先接受 IL-2，接着接受白细胞分离法，然后在 IL-2 的存在下，将收集的自体血细胞离体培育和培养几天。LAK 细胞必须与相对高剂量的 IL-2 一起重新输注，以完成治疗。该净化治疗（purging treatment）价格昂贵且可能引起严重的副作用。这些副作用包含体液滞留、肺水肿、血压降低和高热。

[0007] 尽管 NK 细胞在杀死肿瘤细胞和病毒感染的细胞中具有有利的性质，处理它们和将它们用于免疫治疗仍然很难，主要原因在于在培养和扩增期间，很难保持它们的肿瘤靶向和杀死肿瘤的能力。因而，本领域存在对自然杀伤细胞的易用供给的需要。

[0008] 3. 发明概述

[0009] 本发明提供了胎盘灌洗液；来自胎盘灌洗液的细胞，例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞；胎盘灌洗液细胞和脐带血细胞的组合；和 / 或来自胎盘的自然杀伤细胞，例如来自胎盘灌洗液的自然杀伤细胞或通过消化胎盘组织获得的自然杀伤细胞在抑制肿瘤细胞增殖中的用途。

[0010] 在一个方面，本发明提供一种抑制肿瘤细胞或肿瘤细胞群增殖的方法，该方法包括将所述肿瘤细胞或肿瘤细胞群与人胎盘灌洗液接触。在该方法的具体实施方案中，所述肿瘤细胞为血癌细胞。在另一具体实施方案中，所述肿瘤细胞为多个血癌细胞。在另一具体实施方案中，所述肿瘤细胞为实体瘤细胞。在另一具体实施方案中，所述肿瘤细胞为多个实体瘤细胞。在另一实施方案中，所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴瘤（CML）细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病（CML）细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、成视网膜细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。在另一具体实施方案中，所述接触在体外进行。在另一具体实施方案中，所述接触在体内进行。在更具体的实施方案中，所述体内接触在人体中进行。

[0011] 在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液为已流经胎盘血管系统（例如仅流经胎盘血管系统）的灌洗液。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液已流经胎盘血管系统，且是从胎盘的母体面收集的。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液中所有的或基本上所有的（例如大于 90%、95%、98% 或 99%）的细胞是胎儿细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液包含胎儿细胞和母体细胞。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液中的胎儿细胞包含少于约 90%、80%、70%、60% 或 50% 的所述灌洗液中的细胞。在另一具体实施方案中，所述灌洗液是通过用 0.9% NaCl 溶液流经胎盘血管系统获得的。在另一具体实施方案中，所述灌洗液包含培养基。在另一具体实施方案中，所述灌洗液已经过处理除去了大量红细胞。

[0012] 在另一方面，本发明提供了一种抑制肿瘤细胞或多个肿瘤细胞增殖的方法，该方法包括将所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与众多胎盘灌洗液细胞接触。在另一具体实施方案中，所述众多胎盘灌洗液细胞是或包含来自胎盘灌洗液的所有有核细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液或胎盘灌洗液细胞（例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞）已经过处理除去了至少一类细胞。在另一具体实施方案中，所述接触在体外进行。在另一具体实施方案中，所述接触在体内进行。在更具体的实施方案中，所述体内接触在哺乳动物（例如人类）中进行。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液细胞已经过处理从而富集了至

少一类细胞,例如 CD56⁺ 细胞。在另一具体实施方案中,所述胎盘灌洗液细胞为 CD56⁺ 胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述 CD56⁺ 细胞为 CD56⁺CD16⁻ 自然杀伤细胞,例如胎盘中间体自然杀伤 (PINK) 细胞,所述细胞例如从胎盘灌洗液细胞获得,或从通过机械破坏或酶破坏胎盘组织获得的胎盘细胞中获得。在另一具体实施方案中,所述 CD56⁺ 细胞通过 CD56- 偶联微珠选择。在另一具体实施方案中,所述 CD56⁺ 细胞包含的细胞与等量的 CD56⁺CD16⁺ 自然杀伤细胞相比,显示出可检测的更低的 NKG2D、NKp46 或 CD94 的表达。在另一具体实施方案中,所述 PINK 细胞为 CD3⁻。在更具体的实施方案中,在所述胎盘灌洗液细胞中的至少 50% 的细胞是所述 CD56⁺ 细胞。在更具体的实施方案中,其中所述 CD56⁺ 细胞为至少 50% 的所述胎盘灌洗液细胞,所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴 (CML) 细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、成视网膜细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。在具体实施方案中,所述接触为体外接触。在另一实施方案中,所述接触为体内接触,例如在哺乳动物 (例如人体) 中。

[0013] 在另一个方面,本发明提供一种抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞增殖的方法,该方法包括将所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与众多来自胎盘的天然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 接触。在具体实施方案中,所述来自胎盘的天然杀伤细胞为从胎盘灌洗液获得的天然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,所述天然杀伤细胞为通过物理破坏和 / 或酶消化胎盘组织获得的天然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,所述天然杀伤细胞为 CD56⁺CD16⁻ 天然杀伤细胞,例如 PINK 细胞。在另一具体实施方案中,所述天然杀伤细胞通过 CD56- 偶联微珠从例如胎盘灌洗液细胞或通过物理破坏和 / 或酶消化胎盘组织获得的细胞中选择。在另一具体实施方案中,所述天然杀伤细胞为 CD3⁻。在具体实施方案中,所述众多天然杀伤细胞为包含该天然杀伤细胞的细胞群中的至少 80% 的细胞。在另一具体实施方案中,所述接触在体外进行。在另一具体实施方案中,所述接触在体内进行。在更具体的实施方案中,所述体内接触在哺乳动物 (例如人类) 中进行。

[0014] 在所述方法的另一具体实施方案中,所述众多天然杀伤细胞包含的细胞与等量的 CD56⁺CD16⁺ 天然杀伤细胞相比,显示出可检测的更低的 NKG2D、NKp46 或 CD94 的表达。在另一具体实施方案中,与外周血液天然杀伤细胞相比,所述众多天然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 以可检测的更高的水平表达以下一种或多种微小 RNA :hsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618 和 / 或 hsa-miR-99a。

[0015] 在另一具体实施方案中,将所述众多天然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 与一定量的免疫调节化合物接触一段时间,所述量和所述时间足以使得所述众多天然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物的等量的所述天然杀伤细胞相比,表达可检测的更多的粒酶 B。在更具体的实施方案中,所述免疫调节化合物为来那度胺或 pomalidomide (3- 氨基 -N-(2, 6- 二氧化 -3- 哌啶基) 邻苯二甲酰亚胺)。在另一具体实施方案中,将所述众多天然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 与一定量的免疫调节化合物接触一段时间,所述量和所述时间足以使得所述天然杀伤细胞与没有接触所述免疫调节化合物 (例如来那度胺或 pomalidomide) 的

等量的所述自然杀伤细胞相比,显示出针对所述肿瘤细胞的可检测的更高的细胞毒性。在另一具体实施方案中,与没有接触所述免疫调节化合物的等量的所述自然杀伤细胞相比,所述众多自然杀伤细胞(例如 PINK 细胞)以更高水平表达 BAX、CCL5、CCR5、CSF2、FAS、GUSB、IL2RA 或 TNFRSF18 中的一种或多种。在另一具体实施方案中,与没有接触所述免疫调节化合物的等量的所述自然杀伤细胞相比,所述众多自然杀伤细胞(例如 PINK 细胞)以更高水平表达 ACTB、BAX、CCL2、CCL3、CCL5、CCR5、CSF1、CSF2、ECE1、FAS、GNLY、GUSB、GZMB、IL1A、IL2RA、IL8、IL10、LTA、PRF1、PTGS2、SKI 和 TBX21 中的一种或多种。

[0016] 在另一实施方案中,将来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一来源(例如胎盘血和/或脐带血)的天然杀伤细胞混合,例如以形成混合的天然杀伤细胞。本文使用的短语“来自胎盘的天然杀伤细胞”不包含来自脐带血或胎盘血的天然杀伤细胞。在更具体的实施方案中,来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一来源的天然杀伤细胞的混合比例为约 100 : 1、95 : 5、90 : 10、85 : 15、80 : 20、75 : 25、70 : 30、65 : 35、60 : 40、55 : 45、50 : 50、45 : 55、40 : 60、35 : 65、30 : 70、25 : 75、20 : 80、15 : 85、10 : 90、5 : 95、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、65 : 1、60 : 1、55 : 1、50 : 1、45 : 1、40 : 1、35 : 1、30 : 1、25 : 1、20 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1、1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、1 : 60、1 : 65、1 : 70、1 : 75、1 : 80、1 : 85、1 : 90、1 : 95、1 : 100 等。

[0017] 在具体实施方案中,所述混合的天然杀伤细胞没有进行培养,且其包含:与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺CD16⁻天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更低数量的 CD3⁻CD56⁺CD16⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更低数量的 CD3⁻CD56⁺NKp46⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺NKp30⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺2B4⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺CD94⁺天然杀伤细胞。在其它具体实施方案中,所述混合的天然杀伤细胞没有进行培养,且其包含:与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测更低数量的 CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/L3⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺NKp46⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺NKp44⁺天然杀伤细胞;与来自外周血液的等量的天然杀伤细胞相比,可检测的更高数量的 CD3⁻CD56⁺NKp30⁺天然杀伤细胞。

[0018] 在任一上述方法的具体实施方案中,所述肿瘤细胞为实体瘤细胞。在另一具体实施方案中,所述肿瘤细胞为液体肿瘤细胞,例如血液肿瘤细胞。在更具体的实施方案中,所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴瘤(CML)细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病(CML)细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、成视网膜细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。

[0019] 在另一方面,本发明提供了一种组合物,其包含分离的胎盘 CD56⁺、CD16⁻天然杀伤

细胞（例如 PINK 细胞）。在一具体实施方案中，所述胎盘自然杀伤细胞是从胎盘灌洗液中分离的。在另一具体实施方案中，所述胎盘自然杀伤细胞是通过物理破坏和 / 或酶消化胎盘组织从胎盘中分离的。在另一具体实施方案中，所述自然杀伤细胞包含所述组合物中至少 50% 的细胞。在具体实施方案中，所述自然杀伤细胞包含所述组合物中至少 80% 的细胞。在另一具体实施方案中，所述组合物包含分离的 CD56⁺、CD16⁺ 自然杀伤细胞。在更具体的实施方案中，所述 CD56⁺、CD16⁺ 自然杀伤细胞来自与所述 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞不同的个体。在另一具体实施方案中，所述分离的 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞来自单个个体。在更具体的实施方案中，所述分离的 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞包含来自至少两个不同个体的自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘自然杀伤细胞（例如所述 PINK 细胞）被扩增。

[0020] 在更具体的实施方案中，所述组合物包含胎盘自然杀伤细胞和来自另一来源的自然杀伤细胞。在具体实施方案中，所述其它来源为脐带血和 / 或脐带血。在另一具体实施方案中，所述其它来源为外周血液。在更具体的实施方案中，来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一来源的天然杀伤细胞的混合比例为约 100 : 1、95 : 5、90 : 10、85 : 15、80 : 20、75 : 25、70 : 30、65 : 35、60 : 40、55 : 45、50 : 50、45 : 55、40 : 60、35 : 65、30 : 70、25 : 75、20 : 80、15 : 85、10 : 90、5 : 95、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、65 : 1、60 : 1、55 : 1、50 : 1、45 : 1、40 : 1、35 : 1、30 : 1、25 : 1、20 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1、1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、1 : 60、1 : 65、1 : 70、1 : 75、1 : 80、1 : 85、1 : 90、1 : 95、1 : 100 等。

[0021] 在另一具体实施方案中，所述组合物包含分离的胎盘灌洗液。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液与所述天然杀伤细胞来自相同的个体。在另一更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液包含来自与所述天然杀伤细胞不同个体的胎盘灌洗液。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液中所有的或基本上所有的（例如大于 90%、95%、98% 或 99%）的细胞为胎儿细胞。在另一具体实施方案中，所述胎盘灌洗液包含胎儿细胞和母体细胞。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液中的胎儿细胞包含少于约 90%、80%、70%、60% 或 50% 的所述灌洗液中的细胞。在另一具体实施方案中，所述灌洗液是通过用 0.9% NaCl 溶液流经胎盘血管系统而获得的。在另一具体实施方案中，所述灌洗液包含培养基。在另一具体实施方案中，所述灌洗液已经处理除去了众多红细胞。

[0022] 在另一具体实施方案中，所述组合物包含胎盘灌洗液细胞。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液细胞与所述天然杀伤细胞来自相同的个体。在另一更具体实施方案中，所述胎盘灌洗液细胞与所述天然杀伤细胞来自不同的个体。在另一具体实施方案中，所述组合物包含分离的胎盘灌洗液和分离的胎盘灌洗液细胞，其中所述分离的灌洗液和所述分离的胎盘灌洗液细胞来自不同的个体。在任一上述包含胎盘灌洗液的实施方案中的另一更具体实施方案中，所述胎盘灌洗液包含来自至少两个个体的胎盘灌洗液。在任一上述包含胎盘灌洗液细胞的实施方案中的另一更具体实施方案中，所述分离的胎盘灌洗液细胞来自至少两个个体。所述组合物可另外包含分离的 PINK 细胞，其中所述 PINK 细胞与所述胎盘灌洗液或所述灌洗液细胞来自不同的个体。

[0023] 在另一方面，本发明提供了一种分离胎盘天然杀伤细胞的方法，该方法包括获得

众多胎盘细胞,和从所述众多胎盘细胞分离自然杀伤细胞。在具体实施方案中,所述胎盘细胞是或包含胎盘灌洗液细胞,例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞。在另一具体实施方案中,所述众多胎盘细胞是或包含通过机械破坏和 / 或酶消化胎盘组织获得的胎盘细胞。在另一实施方案中,所述分离是使用一种或多种抗体进行的。在更具体的实施方案中,所述一种或多种抗体包含一种或多种针对 CD3、CD16 或 CD56 的抗体。在更具体的实施方案中,所述分离包括在所述众多胎盘细胞中将 CD56⁺ 细胞与 CD56⁻ 细胞分离。在更具体的实施方案中,所述分离包括将 CD56⁺、CD16⁻ 胎盘细胞与 CD56⁻ 或 CD16⁺ 胎盘细胞分离。在更具体的实施方案中,所述分离包括将 CD56⁺、CD16⁻、CD3⁻ 胎盘细胞与 CD56⁻、CD16⁺ 或 CD3⁺ 胎盘细胞分离。在另一实施方案中,所述分离胎盘自然杀伤细胞的方法产生的胎盘细胞群的至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或至少 99% 细胞是 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞。

[0024] 在上述方法的某些实施方案中,所述胎盘灌洗液细胞已经在培养基中扩增。在各种实施方案中,所述细胞扩增了至少、大约或不超过 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 天。在具体实施方案中,所述胎盘灌洗液细胞已经在滋养层的存在下和 / 或在至少一种细胞因子的存在下扩增。在更具体的实施方案中,所述滋养层包含 K562 细胞或外周血液单核细胞。在另一更具体实施方案中,所述至少一种细胞因子是白细胞介素 -2。

[0025] 3. 1. 定义

[0026] 本文使用的“混合的自然杀伤细胞”是例如来自匹配的脐带和人胎盘灌洗液的自然杀伤细胞,其中胎盘灌洗液与脐带血获自相同的胎盘。分别或同时分离来自两者的自然杀伤细胞,并将其混合。

[0027] 本文使用的“PINK”和“PINK 细胞”指胎盘中间体自然杀伤细胞,其是从人胎盘(例如人胎盘灌洗液或已被机械破坏和 / 或酶破坏的胎盘组织)获得的。所述细胞为 CD56⁺ 和 CD16⁻,例如可通过流式细胞术,例如使用针对 CD56 和 CD 16 的抗体荧光激活细胞分类术测定。PINK 细胞不是从脐带血或外周血液获得的。

[0028] 本文使用的“胎盘灌洗液”指已流经至少一部分胎盘(例如人胎盘)例如流经胎盘血管系统的灌洗溶液,其包含灌洗溶液在流经胎盘期间收集的众多细胞。

[0029] 本文使用的“胎盘灌洗液细胞”指从胎盘灌洗液分离或可从其中分离的有核细胞(例如所有有核细胞)。

[0030] 本文使用的“肿瘤细胞抑制”、“肿瘤细胞增殖的抑制”等包括例如通过将肿瘤细胞群与 PINK 细胞、包含 PINK 细胞的细胞群、混合的自然杀伤细胞、包含混合的自然杀伤细胞的细胞群、人胎盘灌洗液等接触,例如通过杀死所述肿瘤细胞群中的一个或多个肿瘤细胞,来减缓肿瘤细胞群的生长。

[0031] 4. 附图简要说明

[0032] 图 1 显示了对于从人胎盘灌洗液(HPP)中通过 CD56 微珠选择的细胞,使用抗 -CD3 抗体和抗 -CD56 抗体的流式细胞术结果。大部分的分离细胞是 CD56⁺CD3⁻。

[0033] 图 2 描述了在 24 小时培养期间,PINK 细胞和 / 或肿瘤细胞的细胞因子的生成。图 2A 描述了单独或在 KG-1a 肿瘤细胞的存在下,来自胎盘灌洗液的中间体自然杀伤细胞(PINK)对干扰素 γ (IFN) 的分泌。PINK 细胞和 KG-1a 细胞单独或按 1 : 1 的比例混合培

养。Y 轴:培养物生成的 IFN γ 的皮克数。图 2B 描述了 PINK 细胞单独或在 KG-1a 肿瘤细胞的存在下对粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的分泌。PINK 细胞和 KG-1a 细胞单独或按 1 : 1 的比例混合培养。Y 轴:培养物生成的 GM-CSF 的皮克数。

[0034] 图 3 描述了在 PINK 细胞与肿瘤细胞以 1 : 1、5 : 1、10 : 1 或 20 : 1 的比例进行的 24 小时共同培养中, PINK 细胞对 KG-1a 肿瘤细胞的细胞毒性。X 轴: PINK 细胞与肿瘤细胞的比例。Y 轴: 相对于没有 PINK 细胞的肿瘤细胞的肿瘤细胞死亡百分数。

[0035] 图 4 描述了培养了 21 天的胎盘 NK 细胞和外周血液 (PB) NK 细胞对 K562 细胞的细胞毒性。误差柱代表 4 个单位的培养的胎盘 NK 细胞或 3 个单位的培养的外周血液 NK 细胞的标准偏差。

[0036] 图 5 描述了在 HPP 细胞与肿瘤细胞以 1 : 1、5 : 1、10 : 1 或 20 : 1 的比例进行的 24 小时共同培养中, 从胎盘获得的全部人胎盘灌洗液对 KG-1a 肿瘤细胞的细胞毒性。X 轴: HPP 细胞与肿瘤细胞的比例。Y 轴: 相对于没有 HPP 细胞的肿瘤细胞的肿瘤细胞死亡百分数。

[0037] 图 6 描述了在 HPP 细胞或 UCB 细胞与肿瘤细胞以 100 : 1、50 : 1、25 : 1、12.5 : 1、6.25 : 1、3.12 : 1、1.56 : 1 或 0.78 : 1 的系列稀释进行的 48 小时共同培养中, 从胎盘和脐带血获得的全部人胎盘灌洗液对 KG-1a 肿瘤细胞的细胞毒性。X 轴: HPP 细胞或脐带细胞与肿瘤细胞的比例。Y 轴: 在 48 小时后相对于没有 HPP 细胞或脐带细胞的肿瘤细胞的肿瘤细胞死亡百分数。

[0038] 图 7 描述了在 HPP 细胞与肿瘤细胞以 100 : 1、50 : 1、25 : 1、12.5 : 1、6.25 : 1、3.12 : 1、1.57 : 1 或 0.78 : 1 的系列稀释进行的 48 小时共同培养中, 从胎盘获得的全部人胎盘灌洗液对 KG-1a 肿瘤细胞的细胞毒性。使用收集的灌洗液或经 100U/ml 或 1000U/ml 白细胞介素 -2 (IL-2) 刺激 24 小时的灌洗液。X 轴: HPP 细胞与肿瘤细胞的比例。Y 轴: 在 48 小时后相对于没有 HPP 细胞的肿瘤细胞的肿瘤细胞死亡百分数。

[0039] 图 8 描述了在 HPP 或 UCB 细胞与肿瘤细胞以 50 : 1 的比例进行培养后, 人胎盘灌洗液对一组肿瘤细胞系的细胞毒性作用。图 8A: 共同培养 24 小时。图 8B: 共同培养 48 小时。X 轴: 测试的肿瘤细胞系。Y 轴: 共同培养后相对于不存在肿瘤细胞的肿瘤细胞数的肿瘤细胞死亡百分数。

[0040] 图 9 描述了 HPP 细胞与肿瘤细胞的按不同比例下, 与 KG-1a 肿瘤细胞共同培养的 HPP 细胞的 IFN γ 生成。X 轴: 实验条件, 包括 HPP 细胞与肿瘤细胞的比例, Y 轴: 在 24 小时共培养后每毫升的 IFN γ 水平。

[0041] 图 10 与一组肿瘤细胞共同培养的 HPP 或 UCB 细胞对 IFN γ 的生成。将 HPP 或 UCB 细胞与肿瘤细胞系按照 50 : 1 的比例共同培养 24 小时 (图 10A) 或 48 小时 (图 10B)。通过 Luminex 试验 (HCYTO-60K-03, Millipore) 测定 IFN γ 水平。X 轴: 测试的肿瘤细胞系。Y 轴: 与不存在肿瘤细胞下生成的 IFN γ 的皮克数相比, HPP 或 UCB 细胞生成的 IFN γ 的皮克数。

[0042] 图 11 描述了当向患有 KG-1 细胞肿瘤 (体积约为 332mm³) 的小鼠施用 2×10^7 个人胎盘灌洗液 (HPP) 细胞时肿瘤尺寸的减小。瘤内——将 HPP 细胞直接注射到皮下肿瘤部位。IV——静脉内施用 HPP 细胞。对照——仅施用运载体。肿瘤体积以 mm³ 计。

[0043] 5. 详细说明

[0044] 本发明提供了从胎盘获得的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘灌洗液衍生的自然杀伤 (“PINK”) 细胞在抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞生长或增殖中的用途。特别地, 本发明提供了从胎盘灌洗液 (例如人胎盘灌洗液) 分离的或从机械破坏和 / 或酶破坏的胎盘组织分离的自然杀伤 (NK) 细胞和 NK 细胞群、获得 NK 细胞的方法、和使用所述细胞的方法。本发明还提供了包含自然杀伤细胞的细胞群, 例如胎盘细胞群。获得胎盘灌洗液和从胎盘灌洗液获得细胞的方法描述在下述部分 5.1 中。来自胎盘灌洗液的自然杀伤细胞和获得所述细胞的方法描述在下述部分 5.2 中。使用胎盘灌洗液、来自胎盘灌洗液的细胞来自或胎盘灌洗液的自然杀伤细胞 (例如中间体自然杀伤细胞) 抑制肿瘤细胞增殖的方法描述在下述部分 5.3 中。

[0045] 5.1. 胎盘灌洗液

[0046] 5.1.1. 细胞采集组合物

[0047] 本发明提供的胎盘灌洗液、灌洗液细胞和来自胎盘灌洗液的自然杀伤细胞可以通过使用胎盘细胞采集组合物灌洗哺乳动物例如人分娩后的胎盘来收集。可以通过使用任何生理学可接受的溶液 (例如盐溶液、培养基或更复杂的细胞采集组合物) 灌洗胎盘来从胎盘收集灌洗液。适于灌洗胎盘、和适于收集和保存灌洗液细胞 (例如所有有核胎盘灌洗液细胞或 PINK 细胞) 的细胞采集组合物详细描述在相关美国申请公开号 2007/0190042 中, 该申请的全部内容通过参考纳入本文。

[0048] 所述细胞采集组合物可以包含适于收集和 / 或培养干细胞的任何生理学可接受的溶液, 例如盐溶液 (例如磷酸盐缓冲盐水、Kreb' s 溶液、改良的 Kreb' s 溶液、Eagles' s 溶液、0.9% NaCl 等)、培养基 (例如 DMEM、H. DMEM 等) 等。

[0049] 所述细胞采集组合物可以包含一种或多种易于保存胎盘细胞的组分, 所述保存即自收集时至培养时, 防止胎盘细胞死亡、或延迟胎盘细胞死亡、减少死亡的细胞群中胎盘细胞的数量等。这些组分可以是例如细胞凋亡抑制剂 (例如半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂或 JNK 抑制剂); 血管扩张药 (例如硫酸镁、抗高血压药、心房利钠肽 (ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普钠、胍屈嗪、三磷酸腺苷、腺苷、吡咯美辛或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等); 坏死抑制剂 (例如 2-(1H- 吡咯 -3- 基) -3- 戊基氨基 - 马来酰亚胺、吡咯烷二硫代氨基甲酸酯或氯硝西洋); TNF- α 抑制剂; 和 / 或载氧全氟化碳 (例如全氟辛基溴、全氟癸基溴等)。

[0050] 所述细胞采集组合物可以包含一种或多种组织降解酶, 例如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、透明质酸酶、RNase 或 DNase 等。这些酶包括但不限于胶原酶 (例如胶原酶 I、II、III 或 IV, 来自溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) 的胶原酶等); 分散酶; 嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶等。

[0051] 所述细胞采集组合物可以包含杀菌或抑菌有效量的抗生素。在某些非限制性实施方案中, 所述抗生素是大环内酯类 (例如妥布霉素)、头孢菌素类 (例如头孢氨苄、头孢霉素定、头孢呋辛、头孢丙烯、头孢克洛、头孢克肟或头孢羟氨苄)、克拉霉素、红霉素、青霉素 (例如青霉素 V) 或喹诺酮类 (例如氧氟沙星、环丙沙星或诺氟沙星)、四环素、链霉素等。在特别实施方案中, 所述抗生素具有抗革兰氏阳性 (+) 和 / 或革兰氏阴性 (-) 细菌 (例如绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等) 的活性。

[0052] 所述细胞采集组合物还可包含一种或多种下述化合物：腺苷（约 1mM 至约 50mM）；D- 葡萄糖（约 20mM 至约 100mM）；镁离子（约 1mM 至约 50mM）；分子量大于 20,000 道尔顿的大分子，在一实施方案中，其以足够保持内皮完整性和细胞生存力的量存在（例如，合成的或天然存在的胶体、多糖例如葡聚糖或聚乙二醇，以约 25g/l 至约 100g/l、或约 40g/l 至约 60g/l 存在）；抗氧化剂（例如丁羟茴醚、丁羟甲苯、谷胱甘肽、维生素 C 或维生素 E，以约 25 μ M 至约 100 μ M 存在）；还原剂（例如 N- 乙酰半胱氨酸，以约 0.1mM 至约 5mM 存在）；防止钙进入细胞的试剂（例如维拉帕米，以约 2 μ M 至约 25 μ M 存在）；硝化甘油（例如，约 0.05g/l 至约 0.2g/l）；抗凝血药，在一个实施方案中，以足以帮助防止残余血液凝固的量存在（例如肝素或水蛭素，以约 1000 单位 /l 至约 100,000 单位 /l 的浓度存在）；或包含阿米洛利的化合物（例如阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、环六亚甲基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利，以约 1.0 μ M 至约 5 μ M 存在）。

[0053] 5.1.2. 胎盘的收集和处理

[0054] 通常，在出生后胎盘娩出后立即回收人胎盘。在优选实施方案中，在患者签署知情同意书以及在获取患者的全部病史并将其与所述胎盘关联后，回收患者的胎盘。优选地，在产后继续跟踪病史。这样的病史可用于调整所述胎盘或从其中获得的细胞的后续使用。例如，根据病史，人胎盘细胞可用于对与所述胎盘相关的婴儿、或该婴儿的父母、同胞或其它亲属的个性化用药。

[0055] 在回收灌洗液之前，除去脐带血和胎盘血。在某些实施方案中，在产后，回收胎盘中的脐带血。可对所述胎盘进行常规的脐带血回收处理。典型地，使用针或插管，借助于重力来给胎盘排水（参见，例如 Anderson, 美国专利号 5,372,581 ;Hessel 等人, 美国专利号 5,415,665）。通常将所述针或插管置于脐静脉中，可以轻轻按摩胎盘以帮助将脐带血排出胎盘。这样的脐带血回收可以商业化进行，例如 LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord BloodRegistry and CryoCell。优选地，所述胎盘依靠重力排空而无需进一步处理，由此在回收脐带血期间对组织破坏最小化。

[0056] 典型地，将胎盘从产房或分娩房转运到另外的地点（例如实验室）以回收脐带血和收集灌洗液。胎盘优选地在无菌隔热的转运装置（将胎盘温度保持在 20-28℃ 之间）中转运，例如将夹住近端脐带的胎盘置于无菌自封塑料袋中，然后将其放置到绝热容器中。在另一实施方案中，将胎盘在基本上如美国专利号 7,147,626 所述的脐带血收集试剂盒中转运。优选地，在产后四至二十四小时将胎盘递送到实验室。在某些实施方案中，在脐带血回收之前，夹住近端脐带，优选地在插入到胎盘盘的 4-5cm（厘米）以内处夹住近端脐带。在其它实施方案中，在回收脐带血之后但在进一步处理胎盘之前，夹住近端脐带。

[0057] 在收集灌洗液之前，可以将胎盘贮存在无菌条件和在室温或 5 至 25℃（摄氏温度）下。胎盘可被贮存超过四十八个小时，优选地贮存四至二十四小时，之后灌洗胎盘以除去任何残留脐带血。胎盘优选地贮存在 5℃ 至 25℃（摄氏温度）的抗凝血溶液中。合适的抗凝血溶液是本领域所熟知的。例如，可以使用肝素或华法林钠的溶液。在优选实施方案中，所述抗凝血溶液包含肝素溶液（例如，在 1 : 1000 溶液中 1% w/w）。在收集胎盘灌洗液之前，无血胎盘优选地贮存不超过 36 小时。

[0058] 5.1.3. 胎盘的灌洗

[0059] 灌洗哺乳动物胎盘的方法公开在例如 Hariri 的美国专利号 7,045,148 和

7. 255, 879、以及题为“Improved Composition for Collecting and Preserving Organs (采集和保存器官的改进的组合物)”的和美国申请公开号 2007/0190042 中,所述专利和专利申请的全部内容通过参考纳入本文。

[0060] 可以通过使灌洗溶液(例如盐溶液、培养基或上述的细胞采集组合物)流经胎盘血管系统来获得灌洗液。在一个实施方案中,通过使灌洗溶液流经脐动脉和脐静脉中的任意一个或两者来灌洗哺乳动物的胎盘。可以利用例如向胎盘内的重力流来实现灌洗溶液经过胎盘的流动。优选地,使用泵例如蠕动泵迫使灌洗溶液经过胎盘。可以用与无菌连接装置(例如无菌管)连接的插管(例如 TEFLON®或塑料插管)对脐静脉插管。所述无菌连接装置连接灌洗歧管。

[0061] 在准备灌洗时,优选地以脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式来定位胎盘。可以通过使灌洗溶液流经胎盘血管系统,或者流经胎盘血管系统和周围组织来灌洗胎盘。在一个实施方案中,脐动脉和脐静脉同时连接移液器,该移液器经由弹性连接体连接到灌洗溶液储库。灌洗溶液流入脐静脉和脐动脉。所述灌洗溶液从血管流出和/或穿过血管壁进入胎盘的周围组织,并从妊娠期间连接母亲子宫的胎盘表面将其收集到合适的开放器皿中。也可以通过脐带开口引入灌洗溶液,并允许其从与母体子宫壁相连的胎盘壁中的开口流出或渗滤出。在另一实施方案中,灌洗溶液流经脐静脉并从脐动脉收集,或其流经脐动脉而从脐静脉收集,即,灌洗溶液只流经胎盘血管系统(胎儿组织)。

[0062] 在一个实施方案中,例如,脐动脉和脐静脉同时连接例如移液器,该移液器经由弹性连接体连接到灌洗溶液储库。灌洗溶液流入脐静脉和脐动脉。所述灌洗溶液从血管流出和/或穿过血管壁进入胎盘的周围组织,并从妊娠期间连接母亲子宫的胎盘表面将其收集到合适的开口器皿中。也可以通过脐带开口引入灌洗溶液,并允许其从与母体子宫壁相连的胎盘壁中的开口流出或渗滤出。用该方法(其可以称为“锅”法)收集的胎盘细胞典型地是胎儿细胞和母体细胞的混合物。

[0063] 在另一实施方案中,灌洗溶液流经脐静脉并从脐动脉收集,或流经脐动脉并从脐静脉收集。用该方法(其可以称为“闭路”法)收集的胎盘细胞典型地几乎仅仅是胎儿细胞。

[0064] 在一个实施方案中,所述闭路灌洗法可以如下进行。在分娩后约 48 小时之内获得分娩后的胎盘。夹住脐带,并在夹钳上方切下脐带。可以丢弃脐带,或者可以处理脐带以回收例如脐带干细胞,和/或处理脐带膜以制备生物材料。在灌洗期间,可以保留羊膜,或者例如使用手指钝剥离将羊膜与绒毛膜分离。如果羊膜与绒毛膜在灌洗前分离,例如可以弃去羊膜,或处理羊膜以获得干细胞(例如通过酶消化)、或制备例如羊膜生物材料(例如在美国申请公开号 2004/0048796 中描述的生物材料)。在例如使用消毒纱布清洗胎盘的所有可见血块和残余血液后,暴露出脐带血管,例如通过部分切开脐带膜以暴露脐带的横截面。例如,通过推进封闭的鳄鱼夹进入各血管的切口末端,识别和打开血管。然后,将连接灌洗装置或蠕动泵的装置(例如塑料管)插入到每个胎盘动脉中。所述泵可以是适用于所述目的的任何泵,例如蠕动泵。然后,将连接收集储库(例如血袋,例如 250mL 的收集袋)的塑料管插入到胎盘静脉中。或者,将连接泵的管插入到胎盘静脉中,并且将连接储库的管插入到胎盘的一个或两个动脉中。然后,用一定体积的灌洗溶液(例如约 750ml 灌洗溶液)灌洗胎盘。接着,例如通过离心收集灌洗液中的细胞。

[0065] 在一个实施方案中,在灌洗期间夹住近端脐带,更优选地,在脐带插入到胎盘盘体的 4-5cm(厘米)之内夹住脐带。

[0066] 通常,在排血过程中,哺乳动物胎盘灌洗流体的第一批采集物被脐带血和/或胎盘血的残留红细胞着色。随着灌洗的进行以及胎盘的残留脐带血细胞被洗净,所述灌洗流体进一步变成无色。通常,30 至 100mL 的灌洗流体足以初步冲洗胎盘中的血液,但可以根据观察结果,使用更多或更少的灌洗流体。

[0067] 用于灌洗胎盘的灌洗液体的体积可以根据待收集的胎盘细胞数量、胎盘尺寸、由单个胎盘形成的采集物的数量等变化。在各种实施方案中,灌洗液体的体积可以为 50mL 至 5000mL、50mL 至 4000mL、50mL 至 3000mL、100mL 至 2000mL、250mL 至 2000mL、500mL 至 2000mL、或 750mL 至 2000mL。典型地,在排血后,用 700-800mL 的灌洗液体灌洗胎盘。

[0068] 可以在几个小时或几天期间,多次灌洗胎盘。当灌洗胎盘多次时,可将胎盘置于容器或其它合适的器皿中,在无菌条件下保持或培养,并用细胞采集组合物或标准灌洗溶液灌洗(例如,生理盐水溶液例如磷酸盐缓冲盐水(“PBS”),其含有或不含抗凝血剂(例如肝素、华法林钠、香豆素、双香豆素),和/或含有或不含抗微生物剂(例如 β -巯基乙醇(0.1mM);抗生素例如链霉素(例如 40-100 μ g/ml)、青霉素(例如 40U/ml)、两性霉素 B(例如 0.5 μ g/ml))。在一个实施方案中,将分离的胎盘保持或培养一段时间而不收集灌洗液,因此在灌洗和收集灌洗液之前,保持或培养胎盘 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小时、或 2 或 3 或更多天。可以一次或更多次地保持经灌洗的胎盘例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或更多个小时,并用例如 700-800mL 的灌洗液体再次灌洗。可以灌洗胎盘 1、2、3、4、5 或更多次,例如每 1、2、3、4、5 或 6 个小时一次。在优选的实施方案中,重复灌洗胎盘和收集灌洗溶液(例如胎盘细胞采集组合物),直到回收的有核细胞数量低于 100 个细胞/ml。可以进一步分别处理不同时间点的灌洗液,以回收时间依赖性细胞群,例如所有有核细胞。也可以汇总不同时间点的灌洗液。

[0069] 5.1.4. 胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞

[0070] 胎盘灌洗液包含细胞的异源采集物。典型地,在使用之前,去除胎盘灌洗液中的红细胞。这样的去除可以通过分离红细胞与有核血细胞的已知方法进行。在某些实施方案中,冷冻保存灌洗液或灌洗液细胞。在某些其它实施方案中,胎盘灌洗液或灌洗液细胞仅包含胎儿细胞或包含胎儿细胞和母体细胞的组合。

[0071] 典型地,来自单次胎盘灌洗的胎盘灌洗液包含约 1 亿至约 5 亿个有核细胞。在某些实施方案中,所述胎盘灌洗液或灌洗液细胞包含 CD34⁺ 细胞,例如造血干细胞或祖细胞。在更具体的实施方案中,这些细胞可以包含 CD34⁺CD45⁻ 干细胞或祖细胞、CD34⁺CD45⁺ 干细胞或祖细胞、骨髓祖细胞、淋巴祖细胞和/或红系祖细胞。在其它的实施方案中,胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞包含粘附性胎盘干细胞,例如 CD34⁺ 干细胞。在其它实施方案中,所述胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞包含例如内皮祖细胞、骨祖细胞和自然杀伤细胞。在某些实施方案中,从胎盘收集并去除红细胞的胎盘灌洗液,或从这样的灌洗液分离的灌洗液细胞,包含约 6-7% 的自然杀伤细胞(CD3⁻、CD56⁺);约 21-22% 的 T 细胞(CD3⁺);约 6-7% 的 B 细胞(CD19⁺);约 1-2% 的内皮祖细胞(CD34⁺、CD31⁺);约 2-3% 的神经祖细胞(巢蛋白⁺);约 2-5% 的造血祖细胞(CD34⁺);和约 0.5-1.5% 的粘附性胎盘干细胞(例如 CD34⁺、CD117⁻、

CD105⁺ 和 CD44⁺), 如通过流式细胞术, 例如通过 FACS 分析所测定的。

[0072] 5. 2. 破坏和消化胎盘组织以获得 PINK 细胞

[0073] 胎盘自然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 可以从已经机械破坏和 / 或酶破坏的胎盘组织获得。

[0074] 可以使用一种或多种组织降解酶 (例如金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、中性蛋白酶、RNase 或 DNase 等) 破坏胎盘组织。这样的酶包括但不限于胶原酶 (例如胶原酶 I、II、III 或 IV, 来自溶组织梭菌的胶原酶等)、分散酶、嗜热菌蛋白酶、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、LIBERASE、透明质酸酶等。典型地, 在消化后, 使消化的组织穿过滤网或滤器以除去部分消化的细胞簇, 留下基本上单细胞的悬浮液。

[0075] 在获得胎盘细胞的悬浮液后, 可以使用例如针对 CD3 和 CD56 的抗体分离自然杀伤细胞。在具体实施方案中, 通过如下方法分离胎盘自然杀伤细胞: 选择 CD56⁺ 细胞以形成第一细胞群; 将所述第一细胞群与 CD3 和 / 或 CD16 特异性抗体接触; 从所述第一细胞群中除去 CD3⁺ 或 CD56⁺ 细胞, 由此形成第二细胞群, 其基本上是 CD56⁺ 和 CD3⁻, CD56⁺ 和 CD16⁻, 或 CD56⁺、CD3⁻ 和 CD16⁻ 细胞。

[0076] 在一个实施方案中, 使用磁珠从胎盘细胞的悬浮液中分离胎盘自然杀伤细胞。所述细胞可以使用例如磁性激活细胞分类 (MACS) 技术来分离, 该技术是基于颗粒结合磁珠 (例如约 0.5-100 μ m 直径) 的能力分离颗粒的方法, 所述磁珠包含一种或多种特定抗体, 例如抗 -CD56 抗体。对所述磁性微球可以进行多种有用的修饰, 包括共价添加特异性识别特定的细胞表面分子或半抗原的抗体。然后, 将所述珠与细胞混合以允许结合。然后, 使细胞经过磁场以分离出具有特定细胞表面标记物的细胞。在一个实施方案中, 随后可以分离这些细胞, 并将其与偶联了针对另一种细胞表面标记物的抗体的磁珠再混合。将所述细胞再次经过磁场, 分离同时结合两种抗体的细胞。随后, 可以将这些细胞稀释到单独的皿中, 例如用于克隆分离的微量滴定皿。

[0077] 5. 3. 胎盘自然杀伤细胞

[0078] 在一方面, 本发明提供了可从胎盘 (例如从胎盘灌洗液、和 / 或经机械破坏和 / 或酶破坏的胎盘组织) 获得的自然杀伤细胞以及包含这样的自然杀伤细胞的组合物的分离、表征和用途。在具体实施方案中, 所述胎盘自然杀伤细胞为“胎盘中间体自然杀伤细胞”或“PINK”细胞, 其被表征为 CD56⁺CD16⁻, 即呈现 CD56 细胞标记物且缺乏 CD16 细胞标记物, 例如, 如上所述通过流式细胞术, 例如使用抗 CD16 和 CD56 的抗体的荧光激活细胞分类术所测定的。因而, 本发明提供了分离的 PINK 细胞和分离的众多 PINK 细胞。本发明还提供了分离的众多细胞, 其包含 CD56⁺CD16⁻PINK 细胞与 CD56⁺CD16⁺ 自然杀伤细胞的组合。在更具具体实施方案中, 所述 CD56⁺CD16⁺ 自然杀伤细胞可以从胎盘、或另一来源 (例如外周血液、脐带血、骨髓等) 中分离。因而, 在各种其它实施方案中, PINK 细胞可以与 CD56⁺CD16⁺ 自然杀伤细胞例如以约 1 : 10、2 : 9、3 : 8、4 : 7 : 5 : 6、6 : 5、7 : 4、8 : 3、9 : 2、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1 或约 9 : 1 的比例混合。本文使用的“分离的”指所述细胞以从其正常环境例如胎盘中移出。

[0079] 在某些实施方案中, 所述 PINK 细胞是 CD3⁻。

[0080] 在其它实施方案中, 所述 PINK 细胞不呈现完全成熟的自然杀伤细胞所呈现的一

种或多种细胞标记物（例如 CD16），或者相对于完全成熟的自然杀伤细胞以可检测的更低的水平呈现这样的一种或多种标记物，或者呈现出与自然杀伤细胞前体相关但与完全成熟的自然杀伤细胞无关的一种或多种细胞标记物。在具体实施方案中，与完全成熟的 NK 细胞相比，本文提供的 PINK 细胞以可检测的更低的水平表达 NKG2D、CD94 和 / 或 NKp46。在另一具体实施方案中，本文提供的众多 PINK 细胞与等量的完全成熟的 NK 细胞相比以可检测的更低的水平表达全部 NKG2D、CD94 和 / 或 NKp46。

[0081] 在某些实施方案中，与外周血液自然杀伤细胞相比，PINK 细胞以可检测的更高的水平表达以下一种或多种微小 RNA：hsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618 和 / 或 hsa-miR-99a。

[0082] 在某些实施方案中，所述胎盘自然杀伤细胞（例如 PINK 细胞）已在培养基中扩增。在某些其它实施方案中，所述胎盘灌洗液细胞已在培养基中扩增。在具体实施方案中，所述胎盘灌洗液细胞已在滋养层的存在下和 / 或在至少一种细胞因子的存在下扩增。在更具体的实施方案中，所述滋养层包含 K562 细胞或外周血液单核细胞。在另一更具体的实施方案中，所述至少一种细胞因子为白细胞介素 -2。

[0083] 在另一实施方案中，本文提供了分离的众多 PINK 细胞（例如细胞群）。在另一具体实施方案中，通过从胎盘灌洗液中用 CD56⁻ 微珠分离细胞生成分离的细胞群。在各种具体实施方案中，所述群包含至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或至少约 99% 的 PINK 细胞。在另一实施方案中，众多 PINK 细胞包含没有经过扩增的 PINK 细胞，或由其组成；例如，从胎盘灌洗液收集的。在另一实施方案中，众多 PINK 细胞包含经过扩增的 PINK 细胞，或由其组成。扩增自然杀伤细胞的方法描述在例如 Ohno 等人的美国专利申请公开号 2003/0157713 中；也可参见 Yssel 等人，J. Immunol. Methods 72(1)：219-227(1984) 和 Litwin 等人，J. Exp. Med. 178(4)：1321-1326(1993)，以及在下述实施例 1 中对自然杀伤细胞扩增的描述。

[0084] 在其它实施方案中，所述分离的众多 PINK 细胞不呈现完全成熟的自然杀伤细胞所呈现的一种或多种细胞标记物（例如 CD16），或者相对于完全成熟的自然杀伤细胞以可检测的更低的水平呈现这样的一种或多种标记物，或者呈现出与自然杀伤细胞前体相关但与完全成熟的自然杀伤细胞无关的一种或多种细胞标记物。在具体实施方案中，与完全成熟的 NK 细胞相比，本文提供的 PINK 细胞以可检测的更低的水平表达 NKG2D、CD94 和 / 或 NKp46。在另一具体实施方案中，本文提供的众多 PINK 细胞与等量的完全成熟的 NK 细胞相比以可检测的更低的水平表达全部 NKG2D、CD94 和 / 或 NKp46。

[0085] 在某些实施方案中，与外周血液自然杀伤细胞相比，PINK 细胞群以可检测的更高的水平表达以下一种或多种微小 RNA：hsa-miR-100、hsa-miR-127、hsa-miR-211、hsa-miR-302c、hsa-miR-326、hsa-miR-337、hsa-miR-497、hsa-miR-512-3p、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-517b、hsa-miR-517c、hsa-miR-518a、hsa-miR-518e、hsa-miR-519d、hsa-miR-520g、hsa-miR-520h、hsa-miR-564、hsa-miR-566、hsa-miR-618 和 / 或 hsa-miR-99a。在另一具体实施方案中，与等量的外周血液自然杀伤细胞相比，PINK 细

胞群表达可检测的更高量的粒酶 B。

[0086] 在其它实施方案中,本文提供的 PINK 细胞已在培养基中扩增。在具体实施方案中,PINK 细胞已经过培养(例如在培养基中扩增)至少、大约、或至多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27 或 28 天。在具体实施方案中,所述 PINK 细胞培养了约 21 天。

[0087] 在另一实施方案中,本文提供了一种包含 PINK 细胞的分离的细胞群,例如胎盘细胞群。在具体实施方案中,所述分离的细胞群为来自胎盘灌洗液的所有有核细胞(例如胎盘灌洗液细胞),其包含自体的、分离的 PINK 细胞。在另一具体实施方案中,所述细胞群是通过从胎盘灌洗液中使用 CD56⁺ 微珠分离细胞而生成的分离的细胞群。在各种具体实施方案中,所述群包含至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或至少约 99% 的 PINK 细胞。

[0088] 因为分娩后的胎盘包含来自胎儿和来自母亲的组织和细胞,根据收集的方法,胎盘灌洗液可以仅包含胎儿细胞,或基本上主要包含胎儿细胞(例如大于约 90%、95%、98% 或 99%),或者可以包含胎儿细胞和母体细胞的混合物(例如,胎儿细胞包含少于约 90%、80%、70%、60%、或 50% 的灌洗液的所有有核细胞)。在一个实施方案中,所述 PINK 细胞仅源自胎儿胎盘细胞,例如闭路灌洗胎盘获得的细胞(见上),其中所述灌洗产生包含基本上大多数或仅包含胎儿胎盘细胞的灌洗液。在另一实施方案中,所述 PINK 细胞源于胎儿细胞和母体细胞,例如通过所述锅法(见上)灌洗获得的细胞,其中所述灌洗产生包含胎儿和母体胎盘细胞混合物的灌洗液。因而,在一个实施方案中,本发明提供了来自胎盘的中间体自然杀伤细胞群,其中基本上大多数具有胎儿基因型。在另一实施方案中,本文提供了来自胎盘的中间体自然杀伤细胞群,其包含具有胎儿基因型的自然杀伤细胞和具有母亲表型的自然杀伤细胞。

[0089] 本文还提供了来自胎盘的中间体自然杀伤细胞群,其包含来自非胎盘来源的自然杀伤细胞。例如,在一个实施方案中,本文提供了 PINK 细胞群,其还包含来自脐带血、外周血液、骨髓或前述两种或多种组合的自然杀伤细胞。包含 PINK 细胞和来自非胎盘来源的自然杀伤细胞的自然杀伤细胞群可以包含例如如下比例的细胞:约 1 : 10、2 : 9、3 : 8、4 : 7、5 : 6、6 : 5、7 : 4、8 : 3、9 : 2、10 : 1、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、100 : 1、95 : 5、90 : 10、85 : 15、80 : 20、75 : 25、70 : 30、65 : 35、60 : 40、55 : 45、50 : 50、45 : 55、40 : 60、35 : 65、30 : 70、25 : 75、20 : 80、15 : 85、10 : 90、5 : 95、100 : 1、95 : 1、90 : 1、85 : 1、80 : 1、75 : 1、70 : 1、65 : 1、60 : 1、55 : 1、50 : 1、45 : 1、40 : 1、35 : 1、30 : 1、25 : 1、20 : 1、15 : 1、10 : 1、5 : 1、1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20、1 : 25、1 : 30、1 : 35、1 : 40、1 : 45、1 : 50、1 : 55、1 : 60、1 : 65、1 : 70、1 : 75、1 : 80、1 : 85、1 : 90、1 : 95 或约 1 : 100 等。

[0090] 本发明进一步提供了脐带血和分离的 PINK 细胞的组合。在各种实施方案中,脐带血与 PINK 细胞的混合比例为每毫升脐带血约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、或 5×10^8 或更多个 PINK 细胞。

[0091] 本发明还提供分离 PINK 细胞的方法。在一个实施方案中,通过如下方法收集 PINK 细胞:获得胎盘灌洗液,然后将所述胎盘灌洗液与特异性结合 CD56⁺ 细胞的组分例如

抗 CD56 的抗体接触,之后基于所述结合分离 CD56⁺ 细胞,形成 CD56⁺ 细胞群。所述 CD56⁺ 细胞群包含分离的自然杀伤细胞群。在具体实施方案中,将 CD56⁺ 细胞与特异性结合 CD16⁺ 细胞的组分例如抗 CD16 的抗体,并从 CD56⁺ 细胞群中排除 CD16⁺ 细胞。在另一具体实施方案中,还从所述 CD56⁺ 细胞群中排除了 CD3⁺ 细胞。

[0092] 在一个实施方案中,从胎盘灌洗液如下获得 PINK 细胞。将分娩后的人胎盘排血,并例如用约 200-800mL 的灌洗溶液仅灌洗流过胎盘血管系统。在具体实施方案中,在所述灌洗之前,去除所述胎盘的脐带血,并例如用灌洗溶液冲洗胎盘血管系统除去残余血液。收集灌洗液,并且处理除去任何残留的红细胞。在灌洗液的所有有核细胞中的自然杀伤细胞可以基于 CD56 和 CD16 的表达来分离。在某些实施方案中,PINK 细胞的分离包括使用针对 CD56 的抗体分离,其中分离的细胞为 CD56⁺。在另一实施方案中,PINK 细胞的分离包括使用针对 CD16 的抗体分离,其中分离的细胞为 CD16⁻。在另一实施方案中,PINK 细胞的分离包括使用针对 CD56 的抗体分离,并且使用针对 CD16 的抗体排除众多非 -PINK 细胞,其中分离的细胞包含 CD56⁺、CD16⁻ 细胞。

[0093] 细胞分离可以通过本领域已知的任何方法来实现,例如荧光激活细胞分类术 (FACS),或者优选地使用偶联特定抗体的微珠的磁性细胞分类术。可以使用例如 AUTOMACS™ Separator (Miltenyi) 进行磁性细胞分离和并实现自动化。

[0094] 在另一方面,本发明提供了一种分离胎盘自然杀伤细胞的方法,该方法包括获得众多胎盘细胞,从所述众多胎盘细胞中分离自然杀伤细胞。在具体实施方案中,所述胎盘细胞是或包含胎盘灌洗液细胞,例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞。在另一具体实施方案中,所述众多胎盘细胞是或包含通过机械消化和 / 或酶消化胎盘组织获得的胎盘细胞。在另一实施方案中,使用一种或多种抗体进行所述分离。在更具体的实施方案中,所述一种或多种抗体包含一种或多种针对 CD3、CD16 或 CD56 的抗体。在更具体的实施方案中,所述分离包括在所述众多胎盘细胞中将 CD56⁺ 细胞与 CD56⁻ 细胞分离。在更具体的实施方案中,所述分离包括将 CD56⁺、CD16⁻ 胎盘细胞,例如胎盘自然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞),与 CD56⁻ 或 CD16⁺ 胎盘细胞分离。在更具体的实施方案中,所述分离包括将 CD56⁺、CD16⁻、CD3⁻ 胎盘细胞与 CD56⁺、CD16⁺ 或 CD3⁺ 胎盘细胞分离。在另一实施方案中,所述分离胎盘自然杀伤细胞的方法生成的胎盘细胞群中至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或至少 99% 的细胞是 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞。

[0095] 5.4. 来自匹配的灌洗液和脐带血的胎盘自然杀伤细胞

[0096] 本发明进一步提供了从匹配单元的胎盘灌洗液和脐带血的组合获得的和可获得的自然杀伤细胞,本文称为混合的自然杀伤细胞。本文使用的“匹配单元”表示,NK 细胞从胎盘灌洗液细胞和脐带血细胞获得,其中所述脐带血细胞从胎盘的脐带血获得,所述胎盘灌洗液也获自所述胎盘,即所述胎盘灌洗液细胞和脐带血细胞以及从其中各自得到的自然杀伤细胞都来自相同的个体。

[0097] 在某些实施方案中,混合的胎盘杀伤细胞仅包含、或基本上仅包含 CD56⁺ 和 CD16⁻ 的自然杀伤细胞。在某些其它实施方案中,混合的胎盘杀伤细胞包含 CD56⁺ 和 CD16⁻ 的 NK 细胞以及 CD56⁺ 和 CD16⁺ 的 NK 细胞。在某些具体实施方案中,所述混合的胎盘杀伤细胞包含至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99.5% 的 CD56⁺CD16⁻ 自然杀伤细胞 (PINK 细胞)。

[0098] 在一个实施方案中,所述混合的自然杀伤细胞未经培养。在具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更高数量的 $CD3^-CD56^+CD16^-$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+CD16^-$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更高数量的 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+2B4^+$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+CD94^+$ 自然杀伤细胞。

[0099] 在另一实施方案中,所述混合的自然杀伤细胞已经培养例如 21 天。在具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更低数量的 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中,所述混合的自然杀伤细胞未经培养。在另一具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更高数量的 $CD3^-CD56^+NKp44^+$ 自然杀伤细胞。在具体实施方案中,与来自外周血液的等量自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞包含可检测的更高数量的 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 自然杀伤细胞。

[0100] 在另一实施方案中,与等量的外周血液自然杀伤细胞相比,所述混合的自然杀伤细胞表达可检测的更高量的粒酶 B。

[0101] 本发明进一步提供了脐带血和混合的自然杀伤细胞的组合。在各种实施方案中,脐带血与混合的自然杀伤细胞的混合比例为每毫升脐带血约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 个混合的自然杀伤细胞。

[0102] 5.5. 灌洗液 / 细胞组合

[0103] 除了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和胎盘自然杀伤细胞(例如胎盘中间体自然杀伤细胞)之外,本发明还提供了包含所述灌洗液或细胞的组合物,其用于抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖。

[0104] 5.5.1. 胎盘灌洗液、灌洗液细胞和来自胎盘的中间体自然杀伤细胞的组合

[0105] 本发明进一步提供了组合物,其包含在以上 5.1、5.3 或 5.4 部分中描述的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞的组合。在一个实施方案中,例如,本发明提供了一定体积的胎盘灌洗液,其中补充了众多胎盘灌洗液细胞和 / 或众多胎盘自然杀伤细胞,例如从胎盘灌洗液细胞、或经机械破坏或酶破坏的胎盘组织获得的胎盘中间体自然杀伤细胞。在具体实施方案中,例如每毫升胎盘灌洗液补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞。在另一实施方案中,众多胎盘灌洗液细胞补充了胎盘灌洗液、胎盘中间体自然杀伤细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞。在另一实施方案中,众多胎盘中间体自然杀伤细胞补充了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细

胞和 / 或混合的自然杀伤细胞。在某些实施方案中,当灌洗液被用于补充时,灌洗液的体积是、大于或小于细胞(溶液中)加灌洗液总体积的约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或 1%。在某些其它实施方案中,当胎盘灌洗液细胞与众多 PINK 细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞混合时,所述胎盘灌洗液细胞通常包含大约、大于约或小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或 1%的细胞总数。在某些其它实施方案中,当 PINK 细胞与众多胎盘灌洗液细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞混合时,所述 PINK 细胞通常包含大约、大于约或小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或 1%的细胞总数。在某些其它实施方案中,当混合的自然杀伤细胞与 PINK 细胞和 / 或胎盘灌洗液细胞混合时,所述混合的自然杀伤细胞通常包含大约、大于约或小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或 1%的细胞总数。在某些其它实施方案中,当 PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞或胎盘灌洗液细胞被用于补充胎盘灌洗液时,其中悬浮了细胞的溶液(例如盐溶液、培养基等)的体积包含灌洗液加细胞总体积的大约、大于约、或小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或 1%,其中在补充前,PINK 细胞以每毫升约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个细胞悬浮。

[0106] 在其它实施方案中,任一上述组合都随后与脐带血或来自脐带血的有核细胞混合。

[0107] 本发明进一步提供了汇总的胎盘灌洗液,其从两种或多种来源(例如两个或多个胎盘)获得,并混合(例如汇总)。这样的汇总的灌洗液可以包含大约等体积的来自各来源的灌洗液,或可以包含不同体积的来自各来源的灌洗液。来自各来源的相对体积可以随机地选择,或可基于例如一种或多种细胞因素(例如细胞因子、生长因子、激素等)的浓度或数量、来自各来源的灌洗液中胎盘细胞的数量、或来自各来源的灌洗液的其它特征选择。来自相同胎盘的多次灌洗的灌洗液可以类似地汇总。

[0108] 类似地,本发明提供了胎盘灌洗液细胞和来自胎盘的中间体自然杀伤细胞,其从两个或多个来源(例如两个或多个胎盘)获得并汇总。这样的汇总的细胞可以包含大约等量的来自两个或多个来源的细胞,或不同数量的来自一个或多个汇总来源的细胞。来自各来源的细胞的相对量可以基于例如待汇总的细胞中一种或多种特定细胞类型的数量,例如 CD34⁺ 细胞的数量、CD56⁺ 细胞的数量等来选择。

[0109] 汇总库(Pool)可包含例如补充了胎盘灌洗液细胞的胎盘灌洗液;补充了来自胎盘的中间体自然杀伤(PINK)细胞的胎盘灌洗液;同时补充了胎盘灌洗液细胞和 PINK 细胞的胎盘灌洗液;补充了胎盘灌洗液的胎盘灌洗液细胞;补充了 PINK 细胞的胎盘灌洗液细胞;同时补充了胎盘灌洗液和 PINK 细胞的胎盘灌洗液细胞;补充了胎盘灌洗液的 PINK 细胞;补充了胎盘灌洗液细胞的 PINK 细胞;或同时补充了胎盘灌洗液细胞和胎盘灌洗液的 PINK 细胞。

[0110] 本发明进一步提供了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和胎盘中间体自然杀伤细胞,及其汇总库或其组合,已经对其进行了测试以确定从例如给定量的胎盘灌洗液或 PINK 细胞或给定体积的灌洗液预期可产生的肿瘤抑制(即效力)的程度或量。例如,在所述肿瘤细胞将增殖的条件下,将已知数量的肿瘤细胞与等分试样或样本量的细胞接触,并且将胎

盘灌洗液、灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞或其组合存在时肿瘤细胞随时间（例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 周，或更长时间）的增殖速率与在不存在灌洗液、灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞或其组合时等量肿瘤细胞的增殖速率进行比较。胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞，或其组合或汇总库的效力可以表示为例如以约 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 等抑制肿瘤细胞生长所需的细胞数量或溶液体积。

[0111] 在某些实施方案中，胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 PINK 细胞作为药物级可施用单位提供。这样的单位可以以离散的体积提供，例如 100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL 等。也可以提供这样的单位使得其包含规定量的例如胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞或两者，例如 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个细胞 / 毫升，或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个细胞 / 单位。可以提供这样的单位以包含规定量的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞中的任何两种或所有三种。

[0112] 在胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞的上述组合中，胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞中的任一种、任两种或所有三种可以是接受者自体的（即，从接受者获得）、或与接受者同源的（即，从除所述接受者之外的至少一个其它个体获得）。

[0113] PINK 细胞、胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘灌洗液的任何上述组合或汇总库可以包含来自例如胎盘灌洗液、外周血液、脐带血、骨髓等的 $CD56^+CD16^+$ 自然杀伤细胞。在具体实施方案中，所述组合包含大约、至少约、或至多约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个这样的自然杀伤细胞 / 毫升，或者 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个细胞 / 单位。可以使用从自然来源分离的所述 $CD56^+CD16^+$ 自然杀伤细胞，或者可以在扩增所述 $CD56^+CD16^+$ 自然杀伤细胞之后将其包含在一种上述组合或汇总库中。所述 $CD56^+CD16^+NK$ 细胞可以是自体的（即，从与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞相同的个体获得的；或者从接受者获得的）或同源的（即，来源于与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞不同的个体；或者来源于非接受者的个体）。

[0114] 优选地，标记每个单位以说明细胞体积、数量，细胞类型，该单位是否已富集了特定类型的细胞，和 / 或该单位中给定数量的细胞的效力，或对特定类型的肿瘤细胞的增殖产生可测量抑制的所述单位的给定毫升数。

[0115] 本发明还提供了仅包含胎盘中间体自然杀伤细胞、或包含胎盘中间体自然杀伤细胞与胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘灌洗液组合的组合物。因而，在另一方面，本发明提供了包含分离的 $CD56^+$ 、 $CD16^-$ 自然杀伤细胞的组合物，其中所述自然杀伤细胞从胎盘灌洗液分离，且其中所述自然杀伤细胞包含至少 50% 的所述组合物中的细胞。在具体实施方案中，所述自然杀伤细胞包含至少 80% 的所述组合物中的细胞。在另一具体实施方案中，所述组合物包含分离的 $CD56^+$ 、 $CD16^+$ 自然杀伤细胞。在更具体的实施方案中，所述 $CD56^+$ 、 $CD16^+$ 自然杀伤细胞与所述 $CD56^+$ 、 $CD16^-$ 自然杀伤细胞来自不同的个体。在另一具体实施方案中，所述自然杀伤细胞来自单个单体。在更具体的实施方案中，所述分离的自然杀伤细胞包含来自至少两个不同个体的自然杀伤细胞。在另一具体实施方案中，所述组合物包含分离的胎盘灌洗液。在更具体的实施方案中，所述胎盘灌洗液与所述自然杀伤细胞来自相同的个体。在

另一更具体的实施方案中,所述胎盘灌洗液包含的胎盘灌洗液与所述自然杀伤细胞来自不同个体。在另一具体实施方案中,所述组合物包含胎盘灌洗液细胞。在更具体的实施方案中,所述胎盘灌洗液细胞与所述自然杀伤细胞来自相同的个体。在另一更具体的实施方案中,所述胎盘灌洗液细胞与所述自然杀伤细胞来自不同的个体。在另一具体实施方案中,所述组合物还包含分离的胎盘灌洗液和分离的胎盘灌洗液细胞,其中所述分离的灌洗液和所述分离的胎盘灌洗液细胞来自不同的个体。在包含胎盘灌洗液的任一上述实施方案的另一更具体的实施方案中,所述胎盘灌洗液包含来自至少两个个体的胎盘灌洗液。在包含胎盘灌洗液细胞的任一上述实施方案的另一更具体的实施方案中,所述分离的胎盘灌洗液细胞来自至少两个个体。

[0116] 5.5.2. 包含粘附性胎盘干细胞的组合物

[0117] 在其它实施方案中,所述胎盘灌洗液、众多胎盘灌洗液细胞和 / 或众多 PINK 细胞或任意前述的组合或汇总库补充了粘附性胎盘干细胞。这样的干细胞描述在例如 Hariri 的美国专利号 7,045,148 和 7,255,879 中。粘附性胎盘干细胞不是滋养细胞。

[0118] 所述胎盘灌洗液、众多胎盘灌洗液细胞和 / 或众多 PINK 细胞、或任意前述的组合或汇总库可以补充例如 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个细胞 / 毫升,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 、 5×10^{11} 或更多个粘附性胎盘细胞。在所述组合中的粘附性胎盘干细胞可以是例如已经培养发生例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38 或 40 次群体倍增或更多的粘附性胎盘干细胞。

[0119] 当在原始培养中或在细胞培养中培养时,粘附性胎盘干细胞粘附组织培养基质,例如组织培养容器表面(例如组织培养塑料)。培养中的粘附性胎盘干细胞通常具有成纤维样、星形外观,具有从中央细胞体延伸出的若干胞质突。然而,在相同条件下,粘附性胎盘干细胞与培养的成纤维细胞在形态学上是可区分的,因为胎盘干细胞比成纤维细胞显示出更多数量的此类突起。在形态学上,胎盘干细胞也可和造血干细胞相区分,培养中的造血干细胞通常呈现更圆或卵圆的形态学。

[0120] 可用于本文提供的组合物和方法的粘附性胎盘干细胞和胎盘干细胞群表达众多标记物,这些标记物可被用于鉴别和 / 或分离所述干细胞或包含所述干细胞的细胞群。可用于本文提供的组合物和方法中的粘附性胎盘干细胞和粘附性干细胞群包括干细胞和直接从胎盘或其任何部分(例如,羊膜、绒毛膜、羊膜-绒毛膜板、胎盘母面绒毛小叶、脐带等)获得的含有干细胞的细胞群。在一个实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞群是在培养中的粘附性胎盘干细胞群,例如在容器(例如袋)中的细胞群。

[0121] 粘附性胎盘干细胞通常表达标记物 CD73、CD105、CD200、HLA-G 和 / 或 OCT-4,而不表达 CD34、CD38 或 CD45。粘附性胎盘干细胞也可以表达 HLA-ABC(MHC-1) 和 HLA-DR。这些标记物可用于鉴别粘附性胎盘干细胞,并将胎盘干细胞与其它干细胞类型相区分。因为胎盘干细胞可以表达 CD73 和 CD105,它们可以具有间充质干细胞样特征。然而,因为所述粘附性胎盘干细胞可以表达 CD200 和 HLA-G(一种胎儿特异性标记物),它们可以与既不表达 CD200 也不表达 HLA-G 的间充质干细胞(例如来自骨髓的间充质干细胞)相区分。同样地,CD34、CD38 和 / 或 CD45 表达的缺乏确定所述粘附性胎盘干细胞不是造血干细胞。

[0122] 在一个实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $CD200^+$ 、 $HLA-G^+$ 的,其中所述干细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。在具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在更具体的实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一实施方案中,当在允许胚样体形成的条件下培养时,所述粘附性干细胞生成一个或多个胚样体。

[0123] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 的,其中所述干细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。在所述群的具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $HLA-G^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在更具体的实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 和 $HLA-G^+$ 的。在另一具体实施方案中,当在允许胚样体形成的条件下培养时,所述粘附性胎盘干细胞生成一个或多个胚样体。

[0124] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $CD200^+$ 、 $OCT-4^+$ 的,其中所述干细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。在具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $HLA-G^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的。在另一具体实施方案中,当在允许胚样体的形成条件下培养时,所述粘附性胎盘干细胞生成一个或多个胚样体。

[0125] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 和 $HLA-G^+$ 的,其中所述粘附性干细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。在上述多个方案的具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $OCT-4^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD200^+$ 的。在更具体的实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 、 $CD45^-$ 、 $OCT-4^+$ 和 $CD200^+$ 的。

[0126] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 干细胞,其中当在允许胚样体形成的条件下时,所述干细胞生成一个或多个胚样体,并且其中所述粘附性干细胞可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。在具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在具体实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $OCT-4^+$ 的。在更具体的实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $OCT-4^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。

[0127] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 $OCT-4^+$ 干细胞,其中当在允许胚样体形成的条件下培养时,所述干细胞生成一个或多个胚样体,并且其中所述干细胞已经被证实可检测地抑制癌细胞增殖或肿瘤生长。

[0128] 在各种实施方案中,至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95% 的所述分离的胎盘细胞是 $OCT4^+$ 干细胞。在上述群的具体实施方案中,所述干细胞是 $CD73^+$ 和 $CD105^+$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 或 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述干细胞是 $CD200^+$ 的。在更具体的实施方案中,所述粘附性干细胞也是 $CD73^+$ 、 $CD105^+$ 、 $CD200^+$ 、 $CD34^-$ 、 $CD38^-$ 和 $CD45^-$ 的。在另一具体实施方案中,所述群已经过扩增,例如已传代至少一次、至少三次、至少五次、至

少 10 次、至少 15 次或至少 20 次。

[0129] 在任意上述实施方案的更具体的实施方案中,所述粘附性胎盘细胞表达 ABC-p(一种胎盘-特异性 ABC 转运蛋白;参见,例如 Allikmets 等人, CancerRes. 58(23): 5337-9(1998))。

[0130] 在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞是 CD29⁺、CD44⁺、CD73⁺、CD90⁺、CD105⁺、CD200⁺、CD34⁻ 和 CD133⁻ 的。在另一实施方案中,所述粘附性胎盘干细胞、胎盘干细胞组成性分泌 IL-6、IL-8 和单核细胞趋化蛋白 (MCP-1)。

[0131] 每种上述提及的胎盘干细胞可以包含从哺乳动物胎盘直接获得和分离的胎盘干细胞,或已经过培养和传代至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30 或更多次的胎盘干细胞,或其组合。肿瘤细胞抑制性的大量上述粘附性胎盘干细胞可以包含大约、至少或不超过 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个粘附性胎盘干细胞。

[0132] 5.5.3. 包含胎盘干细胞条件培养基的组合物

[0133] 本发明还提供了包含 PINK 细胞、胎盘灌洗液和 / 或胎盘灌洗液以及另外的条件培养基的肿瘤-抑制性组合物的用途。粘附性胎盘干细胞、胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘中间体自然杀伤细胞可用于生成肿瘤细胞抑制性的条件培养基,即包含干细胞分泌或排出的一种或多种生物分子的培养基,其对众多的一种或多种类型的免疫细胞具有可检测的肿瘤细胞抑制作用。在各种实施方案中,所述条件培养基包含胎盘细胞(例如干细胞、胎盘灌洗液细胞、PINK 细胞)已在其中生长了至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或更多天的培养基。在其它实施方案中,所述条件培养基包含胎盘细胞已在其中生长至至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 汇合或直至 100% 汇合的培养基。这样的条件培养基可用于支持独立的胎盘细胞群或另一类型的细胞群的培养。在另一实施方案中,本文提供的条件培养基包含粘附性胎盘干细胞和非胎盘干细胞已在其中经过培养的培养基。

[0134] 这样的条件培养基可以与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘中间体自然杀伤细胞中的任一种或任意组合混合以形成肿瘤细胞抑制性组合物。在某些实施方案中,所述组合物包含小于一半体积的条件培养基,例如大约或小于约 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2% 或 1% 体积。

[0135] 因而,在一个实施方案中,本发明提供了一种包含来自胎盘干细胞培养的培养基,其中所述胎盘干细胞 (a) 粘附于基质; (b) 表达 CD200 和 HLA-G, 或表达 CD73、CD105 和 CD200, 或表达 CD200 和 OCT-4, 或表达 CD73、CD105 和 HLA-G, 或表达 CD73 和 CD105 且当在允许胚样体形成的条件下培养包含所述胎盘干细胞的胎盘细胞群时促进所述群中形成一个或多个胚样体,或者表达 OCT-4 且当在允许胚样体形成的条件下培养包含所述胎盘干细胞的胎盘细胞群时促进所述群中形成一个或多个胚样体; 和 (c) 可检测地抑制肿瘤细胞或肿瘤细胞群的生长或增殖。在具体实施方案中,所述组合物进一步包含众多所述胎盘干细胞。在另一具体实施方案中,所述组合物包含众多非胎盘细胞。在更具体的实施方案中,所述非胎盘细胞包含 CD34⁺ 细胞,例如造血祖细胞(例如外周血液造血祖细胞、脐带血造血祖细胞或胎盘血造血祖细胞)。所述非胎盘细胞也可以包含其它干细胞,例如间充质干细胞(例如来自骨髓的间充质干细胞)。所述非胎盘细胞也可以是一种或多种类型成年细胞或细胞系。在另一具体实施方案中,所述组合物包含抗增殖试剂,例如抗 -MIP-1 α 或抗 -MIP-1 β

抗体。

[0136] 在具体实施方案中, 胎盘细胞 - 条件化的培养基或上清液是从与众多肿瘤细胞共培养的众多胎盘干细胞得到的, 所述胎盘干细胞与肿瘤细胞的比例为约 1 : 1、约 2 : 1、约 3 : 1、约 4 : 1 或约 5 : 1。例如, 所述条件化的培养基或上清液可以从包含约 1×10^5 个胎盘干细胞、约 1×10^6 个胎盘干细胞、约 1×10^7 个胎盘干细胞或约 1×10^8 个胎盘干细胞或更多个胎盘干细胞的培养物中得到的。在另一具体实施方案中, 所述条件化的培养基或上清液是从包含如下细胞的共同培养物中得到的: 约 1×10^5 至约 5×10^5 个胎盘干细胞和约 1×10^5 个肿瘤细胞; 约 1×10^6 至约 5×10^6 个胎盘干细胞和约 1×10^6 个肿瘤细胞; 约 1×10^7 至约 5×10^7 个胎盘干细胞和约 1×10^7 个肿瘤细胞; 或约 1×10^8 至约 5×10^8 个胎盘干细胞和约 1×10^8 个肿瘤细胞。

[0137] 在具体实施方案中, 适于施用至 70kg 个体的条件培养基包含的上清液是被约 200mL 培养基中的约 7 千万个胎盘干细胞条件化的。

[0138] 可以浓缩条件培养基以制备可施用的药物级产品。例如, 通过除去水 (例如通过蒸发、冷冻干燥等), 可将培养基浓缩至约 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10% 或更少。在具体实施方案中, 例如, 来自约 7 千万胎盘的 200mL 条件培养基可被浓缩至约 180mL、160mL、140mL、120mL、100mL、80mL、60mL、40mL、20mL 或更少的体积。所述条件培养基也可以例如通过蒸发、冷冻干燥等手段基本上干燥成例如粉末。

[0139] 5.6. 灌洗液和胎盘细胞的保存

[0140] 胎盘灌洗液或胎盘细胞, 例如灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 PINK 细胞可以保存, 即放置在允许长期储存的条件下, 或放置在抑制细胞死亡 (例如因凋亡或坏死而死亡) 的条件下。

[0141] 胎盘灌洗液可以通过使胎盘细胞组合物流经至少一部分胎盘 (例如流经胎盘血管系统) 而生成。所述胎盘细胞采集组合物包含一种或多种能够保存包含在灌洗液内的细胞的化合物。这样的胎盘细胞采集组合物在上述部分 5.1 中描述, 例如包含细胞凋亡抑制剂、坏死抑制剂和 / 或载氧全氟化碳的组合物, 如在 2006 年 12 月 28 日提交的题为 “Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition (采集和保存胎盘的改进组合物和使用该组合物的方法)” 的相关美国申请号 11/648,812 中所述。在一个实施方案中, 流经胎盘或胎盘组织的胎盘细胞采集组合物是可用于下述部分 5.4 中描述的方法的胎盘灌洗液。

[0142] 在一个实施方案中, 通过将细胞与包含细胞凋亡抑制剂和载氧全氟化碳的胎盘细胞采集组合物接触, 从哺乳动物 (例如人) 分娩后的胎盘收集胎盘灌洗液和 / 或胎盘细胞, 其中和没有与细胞凋亡抑制剂接触的干细胞群相比, 所述细胞凋亡抑制剂存在的量和时间足以减少或预防干细胞群的细胞凋亡。例如, 可以用胎盘细胞采集组合物灌洗所述胎盘并从中分离胎盘细胞 (例如所有有核胎盘细胞)。在具体实施方案中, 细胞凋亡抑制剂是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂。在另一具体实施方案中, 所述细胞凋亡抑制剂为 JNK 抑制剂。在更具体的实施方案中, 所述 JNK 抑制剂不能调节所述干细胞的分化或增殖。在另一实施方案中, 所述胎盘细胞采集组合物在分离相中包含所述细胞凋亡抑制剂和所述载氧全氟化碳。在另一实施方案中, 所述胎盘细胞采集组合物在乳液中包含的所述细胞凋亡抑制剂和所述载氧全氟化碳。在另一实施方案中, 所述胎盘细胞采集组合物还包含乳化剂, 例如卵磷

脂。在另一实施方案中,在接触胎盘细胞时,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳为约 0℃ 至约 25℃ 之间。在另一更具体的实施方案中,在接触胎盘细胞时,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在约 2℃ 至 10℃ 之间、或约 2℃ 至约 5℃ 之间。在另一更具体的实施方案中,所述接触在转运所述干细胞群期间进行。在另一更具体的实施方案中,所述接触在冷冻和解冻所述干细胞群期间进行。

[0143] 在另一实施方案中,可以通过将所述灌洗液和 / 或细胞与细胞凋亡抑制剂和器官 - 保存化合物接触来收集和保存胎盘灌洗液和 / 或胎盘细胞,其中与没有和所述细胞凋亡抑制剂接触的灌洗液或胎盘细胞相比,所述细胞凋亡抑制剂存在的量和时间足以减少或预防所述细胞的凋亡。

[0144] 在具体实施方案中,所述器官 - 保存化合物为 UW 溶液(描述在美国专利号 4,798,824 中;也称为 VIASPAN™;也可参见 Southard 等人,Transplantation 49(2): 251-257(1990) 或描述在 Stern 等人,美国专利号 5,552,267 中的溶液。在另一实施方案中,所述器官 - 保存组合物为羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖或其组合。在另一实施方案中,所述胎盘细胞采集组合物还在两相中或作为乳液包含载氧全氟化碳。

[0145] 在所述方法的另一实施方案中,在灌洗期间,将胎盘灌洗液和 / 或胎盘细胞与包含细胞凋亡抑制剂和载氧全氟化碳、器官 - 保存化合物、或其组合的胎盘细胞采集组合物接触。在另一实施方案中,在通过灌洗进行收集之后,将胎盘细胞与所述干细胞采集组合物接触。

[0146] 典型地,在胎盘细胞收集、富集和分离期间,优选地减少或消除由于缺氧和机械应力引起的细胞应激。因此,在所述方法的另一实施方案中,在所述保存期间,在收集、富集或分离期间,胎盘灌洗液、胎盘细胞或胎盘细胞群暴露于缺氧状态下少于六小时,其中缺氧状态为氧浓度低于正常血氧浓度。在更具体的实施方案中,在所述保存期间,所述胎盘细胞群暴露于所述缺氧状态下少于两小时。在另一更具体的实施方案中,在收集、富集或分离期间,将所述胎盘细胞群暴露于所述缺氧状态少于一小时、或少于三十分钟、或不暴露于缺氧状态下。在另一具体实施方案中,在收集、富集或分离期间,所述胎盘细胞群不暴露于剪切应力下。

[0147] 本文提供的胎盘细胞可以冷冻保存在例如在小容器(例如安瓿)中的冷冻保存培养基中。合适的冷冻保存培养基包括但不限于培养基,包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基,例如市售的细胞冷冻培养基,例如 C2695、C2639 或 C6039(Sigma)。冷冻保存培养基优选地包含浓度为例如约 10% (v/v) 的 DMSO(二甲亚砜)。冷冻保存培养基可以包含另外的试剂,例如甲基纤维素和 / 或甘油。在冷冻保存期间,优选地将胎盘细胞以约 1℃ / 分钟冷却。优选的冷冻保存温度为约 -80℃ 至约 -180℃,优选地约 -125℃ 至约 -140℃。在解冻使用之间,可以将冷冻保存的胎盘细胞转移到液氮中。在某些实施方案中,例如,一旦安瓿达到约 -90℃,将其转移到液氮贮存区。冷冻保存的细胞优选地在约 25℃ 至约 40℃ 的温度下解冻,优选地在约 37℃ 的温度解冻。

[0148] 5.7. 胎盘灌洗液、PINK 细胞和混合的胎盘自然杀伤细胞抑制肿瘤细胞生长的用途

[0149] 本发明还提供了使用胎盘灌洗液、从胎盘灌洗液分离的细胞、分离的混合自然杀伤细胞或分离的胎盘自然杀伤细胞(例如来自胎盘的中间体自然杀伤细胞)抑制肿瘤细胞

生长（例如增殖）的方法。

[0150] 在一个实施方案中，本发明提供一种抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞增殖的方法，该方法包括将肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、分离的混合自然杀伤细胞和 / 或 PINK 细胞接触，使得与没有和胎盘灌洗液、灌洗液细胞、分离的混合自然杀伤细胞和 / 或 PINK 细胞接触的同样类型肿瘤细胞或众多肿瘤细胞相比，所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖可检测地减少了。

[0151] 在一个实施方案中，本文使用的“接触”包含在胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞（例如胎盘中间体自然杀伤细胞）和 / 或分离的混合自然杀伤细胞以及肿瘤细胞或众多肿瘤细胞之间的直接物理接触，例如细胞 - 细胞接触。在另一实施方案中，“接触”包含存在于相同的物理空间中，例如将胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞（例如胎盘中间体自然杀伤细胞）和 / 或分离的混合自然杀伤细胞与肿瘤细胞或众多肿瘤细胞置于相同的容器中，例如培养皿（多孔板）中。在另一实施方案中，将胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、混合自然杀伤细胞或胎盘中间体自然杀伤细胞与肿瘤细胞或众多肿瘤细胞“接触”是通过例如将所述胎盘灌洗液或细胞（例如胎盘灌洗液细胞）、混合的自然杀伤细胞或胎盘中间体自然杀伤细胞注射或输注到个体中完成的，所述个体例如包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的人，例如癌症患者。

[0152] 在某些实施方案中，将胎盘灌洗液以能对包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体（例如癌症患者）产生可检测的治疗益处的任何量使用。在某些其它实施方案中，将胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞以能对包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体（例如癌症患者）产生可检测的治疗益处的任何量使用。因而，在另一实施方案中，本发明提供了一种抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞增殖的方法，该方法包括在个体内将肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或来自胎盘的中间体自然杀伤细胞或众多 PINK 细胞接触，使得所述接触对所述个体有可检测的或可证实的治疗益处。

[0153] 本文使用的“治疗益处”包括但不限于例如减小肿瘤的尺寸；减轻或终止肿瘤的扩张；减少每单位体积的组织样品例如血样中的癌细胞数量；临床上改善所述个体患有的具体癌症的任何症状，减轻或终止所述个体患有的具体癌症的任何症状的恶化等。实现任一项或多项这样的治疗益处的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或 PINK 细胞的接触被称作是治疗有益的。

[0154] 在某些实施方案中，将胎盘灌洗液细胞，例如来自胎盘灌洗液的有核细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或胎盘中间体自然杀伤细胞以能对包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体（例如癌症患者）产生可检测的治疗益处的任何量或数量使用。可以将胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或胎盘自然杀伤细胞（例如胎盘中间体自然杀伤细胞）以一定的细胞数量施用至这样的个体，例如可以向所述个体施用大约、至少约或至多约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 或 5×10^{10} 个胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或自然杀伤细胞。在其它实施方案中，可以将胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或来自胎盘的中间体自然杀伤细胞以一定的细胞数量施用至这样的个体，例如可以向所述个体施用大约、至少约或至多约 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 或 5×10^{10} 个胎盘灌

洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或自然杀伤细胞 / 每千克个体。可以根据胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘自然杀伤细胞 (例如胎盘中间体自然杀伤细胞) 与所述个体中肿瘤细胞的近似比例向这样的个体施用胎盘灌洗液细胞和 / 或来自胎盘的中间体自然杀伤细胞。例如, 可以将胎盘灌洗液细胞和 / 或胎盘自然杀伤细胞 (例如胎盘中间体自然杀伤细胞) 与个体的肿瘤细胞数以大约、至少约或至多约 1 : 1、1 : 1.3 : 1.4 : 1.5 : 1.6 : 1.7 : 1.8 : 1.9 : 1.10 : 1.15 : 1.20 : 1.25 : 1.30 : 1.35 : 1.40 : 1.45 : 1.50 : 1.55 : 1.60 : 1.65 : 1.70 : 1.75 : 1.80 : 1.85 : 1.90 : 1.95 : 1 或 100 : 1 的比例施用至所述个体。在这样的个体中的肿瘤细胞的数量可以例如通过对来自所述个体的组织样品 (例如血样、活组织检查等) 中的肿瘤细胞计数来估计。在具体实施方案中, 例如, 对于实体瘤, 所述计数与对所述肿瘤成像以获得近似肿瘤体积结合进行。

[0155] 本发明进一步提供一种使用胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或来自胎盘的中间体自然杀伤细胞的组合抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞增殖的方法。在各种实施方案中, 本发明提供了一种抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞增殖的方法, 该方法包括将所述肿瘤细胞与如下物质接触: 补充了众多胎盘灌洗液细胞或 PINK 细胞的胎盘灌洗液; 补充了胎盘灌洗液或众多 PINK 细胞的胎盘灌洗液细胞; 补充了胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞的 PINK 细胞; 众多 PINK 细胞和众多混合的自然杀伤细胞; 众多混合的自然杀伤细胞和众多胎盘灌洗液细胞; 补充了混合的自然杀伤细胞的胎盘灌洗液; 或胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 PINK 细胞全部的组合。

[0156] 在一个具体实施方案中, 例如, 肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被补充了众多胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或众多胎盘中间体自然杀伤细胞的胎盘灌洗液所抑制。在具体实施方案中, 例如每毫升的胎盘灌洗液补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 或更多个胎盘灌洗液细胞或胎盘中间体自然杀伤细胞。在其它具体实施方案中, 胎盘灌洗液, 例如一单元 (即, 来自单个胎盘的收集物) 或约 100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000mL 的灌洗液补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个 PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或胎盘灌洗液细胞 / 毫升, 或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个 PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或胎盘灌洗液细胞。

[0157] 在另一具体实施方案中, 肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被补充了胎盘灌洗液、混合的自然杀伤细胞和 / 或众多胎盘中间体自然杀伤细胞的众多胎盘灌洗液细胞所抑制。在更具体实施方案中, 约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘灌洗液细胞 / 毫升, 或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘灌洗液细胞补充了大约、或至少约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个 PINK 细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞 / 毫升, 或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} > 更多个 PINK 细胞。在其它更具体实施方案中, 约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘灌洗液细胞、PINK 细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞 / 毫升, 或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、

5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘灌洗液细胞补充了大约、或至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000mL 的灌洗液或约 1 单元的灌洗液。

[0158] 在另一具体实施方案中,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被补充了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞的众多胎盘中间体自然杀伤细胞所抑制。在更具具体实施方案中,约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘中间体自然杀伤细胞,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个 PINK 细胞补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘灌洗液细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞 / 毫升,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘灌洗液细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞。在其它更具具体实施方案中,约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个胎盘灌洗液细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞 / 毫升,或 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个胎盘中间体自然杀伤细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞补充了大约、或至少约 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950 或 1000mL 的灌洗液或约 1 单元的灌洗液。

[0159] 在另一具体实施方案中,通过将肿瘤细胞与补充了粘附性胎盘干细胞的胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞和 / 或混合的自然杀伤细胞接触来抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖。在具体实施方案中,所述胎盘灌洗液、灌洗液细胞或 PINK 细胞补充了约 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 或更多个粘附性胎盘干细胞 / 毫升,或者 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 、 1×10^{10} 、 5×10^{10} 、 1×10^{11} 或更多个粘附性胎盘干细胞。

[0160] 在另一实施方案中,通过将肿瘤细胞与补充了粘附性胎盘干细胞 - 条件培养基的胎盘灌洗液、灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或 PINK 细胞接触来抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖,例如每单位灌洗液、灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞和 / 或 PINK 细胞,或每 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10} 个细胞补充了 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.1、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10mL 的干细胞条件化培养基。

[0161] 在其它实施方案中,所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞(例如 PINK 细胞)、混合的自然杀伤细胞,及包含它们的组合和汇总库按其最初获得的形式使用,即灌洗液是灌洗期间获得的,胎盘灌洗液细胞是从这样的灌洗液分离的,混合的自然杀伤细胞是从这样的灌洗液和匹配的脐带血得到的,或 PINK 细胞是从这样的灌洗液或这样的胎盘灌洗液细胞分离的。在其它实施方案中,所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK 细胞及它们的组合和汇总库在使用前经过处理。例如,胎盘灌洗液可以以其从胎盘收集的原始的、未经处理的形式被使用。胎盘灌洗液也可以在使用前被处理,例如通过阴性选择一种或多种类型的细胞,通过脱水减小体积;冻干和再水合等方式进行处理。类似地,灌洗液细胞

群可以以其最初从胎盘灌洗液分离的形式（如从胎盘灌洗液分离的所有有核细胞）被使用，或者可以经过处理以例如除去一种或多种细胞类型（例如红细胞）。PINK 细胞可以以其最初从胎盘灌洗液分离（例如使用 CD56 微珠分离）的形式被使用，或者可以经过处理例如以除去一种或多种非杀伤细胞类型。

[0162] 在另一实施方案中，本发明提供一种抑制肿瘤细胞增殖的方法，该方法包括将用肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞或包含它们的汇总库或组合接触，其中在所述接触之前，所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞或包含它们的汇总库或组合已经与白细胞介素 -2 (IL-2) 接触了一段时间。在某些实施方案中，在所述接触之前，所述一段时间为大约、至少或至多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46 或 48 小时。

[0163] 可以在抗癌治疗疗程中，向患有癌症的个体、或具有肿瘤细胞的个体施用一次所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞或它们的汇总库和 / 或组合，或者可以施用多次，例如在治疗期间，每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22 或 23 小时施用一次，或每 1、2、3、4、5、6 或 7 天施用一次，或每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多周施用一次。可以施用所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、包含它们的汇总库和 / 或组合，而不用考虑在过去是否曾向患有癌症或具有肿瘤细胞的人施用过所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、包含它们的汇总库和 / 或组合。因而，本文提供的方法包括向患有癌症或具有肿瘤细胞的人施用胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、包含它们的汇总库和 / 或组合的任一种组合。

[0164] 在具体实施方案中，所述肿瘤细胞为血癌细胞。在各种具体实施方案中，所述肿瘤细胞为原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性 T 细胞白血病细胞、慢性髓细胞样淋巴瘤 (CML) 细胞、急性髓性白血病细胞、慢性髓性白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、多发性骨髓瘤细胞、成视网膜细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠癌细胞。

[0165] 所述胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、混合的自然杀伤细胞、包含它们的汇总库和 / 或组合可以属于包括一种或多种其它抗癌剂的抗癌治疗方案的一部分。这些抗癌剂是本领域熟知的。除了所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK 细胞、包含它们的汇总库和 / 或组合之外，可以向患有癌症的个体施用的具体抗癌剂包括但不限于：阿西维辛；阿柔比星；阿考达唑盐酸盐；阿克罗宁；阿多来新；阿地白介素；六甲蜜胺；安波霉素；阿美蕙醌乙酸盐；安吡啶；阿那曲唑；安曲霉素；门冬酰胺酶；曲林菌素；阿扎胞苷；阿扎替派；阿佐霉素；巴马司他；苯佐替派；比卡鲁胺；比生群盐酸盐；二甲磺酸双奈法德；比折来新；硫酸博来霉素；布喹那钠；溴匹立明；白消安；放线菌素 C；卡普罗酮；卡醋胺；卡贝替姆；卡铂；卡氮芥；盐酸卡柔比星；卡折来新；西地芬戈；塞来考昔 (COX-2 抑制剂)；苯丁酸氮芥；西罗霉素；顺铂；克拉屈滨；甲磺酸克立那托；环磷酰胺；阿糖胞苷；达卡巴嗪；更生霉素；盐酸柔红霉素；地西他滨；右奥马铂；地扎呱宁；甲磺酸地扎呱宁；地吡醌；多西他赛；多柔比星；盐酸多柔比星；屈洛昔芬；柠檬酸屈洛昔芬；丙酸屈他雄酮；达佐霉素；依达曲沙；盐酸依氟鸟氨酸；依沙芦星；恩洛铂；恩普氨酯；依匹哌啶；盐酸表柔比星；厄布洛唑；盐酸依索比星；雌莫司汀；雌莫司汀磷酸钠；依他硝唑；依托泊苷；磷酸依托泊苷；氯苯乙嘧啶；盐酸法吡啶；法扎拉滨；芬维 A 胺；氟尿苷；磷酸氟达拉滨；氟尿嘧啶；氟西他滨；磷喹酮；福司曲

星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;伊达比星盐酸盐;异环磷酰胺;伊莫福新;异丙铂;依立替康;盐酸依立替康;乙酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;环己亚硝脲;盐酸洛索萘醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;美诺立尔;疏嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啉;美妥替派;米丁度胺;米托卡星;丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托萘醌;麦考酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;紫杉醇;培门冬酶;佩里霉素;戊氮芥;培洛霉素硫酸盐;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;吡罗萘醌盐酸盐;普卡霉素;普洛美坦;吡菲尔钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸甲基苄肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋喃菌素;利波腺苷;沙芬戈;沙芬戈盐酸盐;司莫司汀;二甲二苯四氮烯;sparfosate 钠;司帕霉素;盐酸锗螺胺;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链佐星;磺氯苯脲;他利霉素;tecogalan 钠;泰索帝;替加氟;盐酸替洛萘醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑呋林;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;乙酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;妥布氯唑盐酸盐;尿嘧啶氮芥;尿烷亚胺;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗辛;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;和盐酸佐柔比星。

[0166] 其它抗癌药物包括但不限于:20-表-1,25-二羟维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;2,4-二氯苯氧乙酸;氨磷汀;氨基乙酰丙酸;氨柔比星;安吖啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背侧发育形态发生蛋白-1;抗雄激素药,前列腺癌;抗雌激素药;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;细胞凋亡基因调节剂;细胞凋亡调节剂;无嘌呤酸;阿糖-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin 3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟吩;苯甲酰星孢素; β 内酰胺衍生物; β -alethine;亚阿克拉霉素B;白桦脂酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双氮丙啶基精胺;双奈法德;bistratene A;比折来新;breflate;溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸亚砷胺;卡泊三醇;抑激酶素C;喜树碱衍生物;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧基酰胺基三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);澳粟精胺;杀菌肽B;西曲瑞克;chlorlins;氯喹啉磺酰胺;西卡前列素;顺卞啉;克拉屈滨;克罗米芬类似物;克霉唑;collismycin A;collismycin B;考布他汀A4;考布他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托;缩酚酸肽8;缩酚酸肽A衍生物;curacin A;cyclopentantraquinones;cycloplatan;cypemycin;阿糖胞苷十八烷基磷酸钠;细胞溶解因子;cytostatin;达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B(dehydrodidemnin B);地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吖醌;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺(diethylnorspermine);二氢-5-氮胞苷;二氢紫杉醇,9-;dioxamycin;二苯基螺莫司汀;多西他赛;二十二烷醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;多柔比星;屈洛昔芬;屈大麻酚;倍癌霉素SA;依布硒啉;依考莫司汀;依地福新;依决可单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;依立雄胺;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西

美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维 A 胺;非格司亭;非那司提;黄酮类抗肿瘤药;氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;盐酸 fluorodaunorunicin;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;钆替沙林;硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;heregulin;六亚甲基双乙酸胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;伊马替尼(例如 GLEEVEC®);咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1 受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白细胞介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯苦醇,4-;伊罗普拉;伊索拉定;isobengazole;isohomohalicondrinB;伊他司琼;jasplakinolide;kahalalide F;三醋酸片螺素-N;兰瑞肽;leinamycin;来格司亭;硫酸蘑菇多糖;leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+黄体酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性聚胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂类化合物;lissoclinamide 7;洛铂;胍乙基磷酸丝氨酸;洛美曲索;氯尼达明;洛索萘醌;洛索立宾;勒托替康;德卟啉钬(lutetium texaphyrin);lysofylline;裂解肽;美坦辛;制苷糖酶素 A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白(maspin);基质溶解素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF 抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;米托胍脞;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;mitotoxin 成纤维细胞生长因子-皂草素蛋白;米托蒽醌;莫法罗汀;莫拉司亭;爱必妥,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质 A+ 分支杆菌细胞壁 sk;莫哌达醇;芥子类抗癌剂;印度洋海绵(mycaperoxide)B;分支杆菌细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰基地那林;N-取代的苯甲酰胺;那法瑞林;那瑞替喷;纳洛酮+喷他佐辛;napavin;naphterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;尼鲁米特;nisamycin;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;奥利默森(GENASENSE®);O⁶-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;奥坦西隆;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导物;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;棕榈酰根霉素;帕米磷酸;人参三醇;帕诺米芬;菌铁素;帕折普汀;培门冬酶;培得星;戊聚糖多硫酸钠;喷司他丁;pentrozole;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏子醇;苯连氮霉素;乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;溶血性链球菌制剂;盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原活化因子抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;卟菲尔钠;泊非霉素;泼尼松;丙基二吡啶酮;前列腺素 J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白 A 的免疫调节剂;蛋白激酶 C 抑制剂;微藻蛋白激酶 C 抑制剂;蛋白质酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;紫红素;吡唑啉吡啶;吡多酸化血红蛋白聚乙二醇偶联物;raf 拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras-法呢基蛋白转移酶抑制剂;ras 抑制剂;ras-GAP 抑制剂;脱甲基瑞替普汀;依替磷酸铼 Re 186;根霉素;核酶;RII 维甲酰胺;rohitukine;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;肉芝软珊瑚醇(sarcophytol)A;沙格司亭;Sdi 1 模拟物;司莫司汀;衰老衍生抑制剂 1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯基乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;穗霉素 D;螺莫司汀;脾脏五肽;海绵抑制素 1;角鲨胺;stipiamide;溶基质蛋白酶抑制剂;sulfinosine;超活性血管活性肠肽拮抗剂;suradista;苏拉明;八氢吡啶三醇;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替尼泊苷;十氧化四氯(tetrachlorodecaoxide);tetrazomine;

thaliblastine; 噻可拉林; 血小板生成素; 血小板生成素模拟物; 胸腺法新; 胸腺生成素受体激动剂; 噻可拉林; 促甲状腺激素; 锡乙基初紫红素; 替拉扎明; 二氯二茂钛; topsentin; 托瑞米芬; 翻译抑制剂; 维甲酸; 三乙酰尿苷; 曲西立滨; 三甲曲沙; 曲普瑞林; 托烷司琼; 妥罗雄豚; 酪氨酸激酶抑制剂; 酪氨酸磷酸化抑制剂; UBC 抑制剂; 乌苯美司; 来自泌尿生殖窦的生长抑制因子; 尿激酶受体拮抗剂; 伐普肽; variolin B; 维拉雷琐; 藜芦胺; verdins; 维替泊芬; 长春瑞滨; vinxaltine; 牡荆碱; 伏氯唑; 扎诺特隆; 亚苄维 C 和净司他丁斯酯。

[0167] 5.8. 用免疫调节化合物处理自然杀伤细胞

[0168] 本文其它部分所述的分离的自然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞或混合的自然杀伤细胞) 可以用免疫调节化合物处理, 例如与免疫调节化合物接触, 以增强所述细胞的抗肿瘤活性。因此, 本发明提供了一种增强自然杀伤细胞对肿瘤细胞的细胞毒性的方法, 该方法包括将所述自然杀伤细胞与一定浓度的免疫调节化合物接触一段时间, 与没有与所述免疫调节化合物接触的自然杀伤细胞相比, 所述浓度和时间足以使所述自然杀伤细胞表现出对肿瘤细胞增强的细胞毒性。在另一实施方案中, 本发明提供了一种增加自然杀伤细胞中粒酶 B 表达的方法, 该方法包括将所述自然杀伤细胞与一定浓度的免疫调节化合物接触一段时间, 与没有与所述免疫调节化合物接触的自然杀伤细胞相比, 所述浓度和时间足以使所述自然杀伤细胞表现出增加的粒酶 B 的表达。所述免疫调节化合物可以是如下所述的任一种化合物, 例如来那度胺或 pomalidomide。

[0169] 本发明还提供了一种增强自然杀伤细胞群 (例如 PINK 细胞群或混合的自然杀伤细胞群) 对众多肿瘤细胞的细胞毒性的方法, 该方法包括将所述自然杀伤细胞群与一定浓度的免疫调节化合物接触一段时间, 与没有与所述免疫调节化合物接触的等量自然杀伤细胞群相比, 所述浓度和时间足以使所述自然杀伤细胞群表现出对所述众多肿瘤细胞可检测的增强的细胞毒性。在另一实施方案中, 本发明提供了一种增加自然杀伤细胞群中粒酶 B 表达的方法, 该方法包括将所述自然杀伤细胞群与一定浓度的免疫调节化合物接触一段时间, 与没有与所述免疫调节化合物接触的等量自然杀伤细胞群相比, 所述浓度和时间足以使所述自然杀伤细胞群表达可检测的增多量的粒酶 B。在具体实施方案中, 所述自然杀伤细胞群包含在胎盘灌洗液细胞 (例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞) 内。

[0170] 在上述实施方案的具体实施方案中, 所述自然杀伤细胞是 CD56⁺、CD16⁻ 胎盘中间体自然杀伤细胞 (PINK 细胞)。在上述实施方案的另一具体实施方案中, 所述自然杀伤细胞为混合的自然杀伤细胞, 即来自匹配的胎盘灌洗液和脐带血的自然杀伤细胞。

[0171] 在另一具体实施方案中, 与没有与所述免疫调节化合物接触的等量所述自然杀伤细胞相比, 与所述免疫调节化合物接触的所述众多自然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞或混合的自然杀伤细胞) 以更高水平表达 BAX、CCL5、CCR5、CSF2、FAS、GUSB、IL2RA 或 TNFRSF18 中的一种或多种。在另一具体实施方案中, 与没有和所述免疫调节化合物接触的等量所述自然杀伤细胞相比, 与所述免疫调节化合物接触的所述众多自然杀伤细胞 (例如 PINK 细胞) 以更高水平表达 ACTB、BAX、CCL2、CCL3、CCL5、CCR5、CSF1、CSF2、ECE1、FAS、GNLY、GUSB、GZMB、IL1A、IL2RA、IL8、IL10、LTA、PRF1、PTGS2、SKI 和 TBX21 中的一种或多种。

[0172] 本发明还提供了一种增强人胎盘灌洗液细胞群 (例如来自胎盘灌洗液的所有有核细胞群) 对众多肿瘤细胞的细胞毒性的方法, 该方法包括将所述胎盘灌洗液细胞与一定

浓度的免疫调节化合物接触一段时间,与没有和所述免疫调节化合物接触的等量胎盘灌洗液细胞相比,所述浓度和时间足以使所述胎盘灌洗液细胞表现出对所述众多肿瘤细胞的可检测的增强的细胞毒性。在另一实施方案中,本发明提供了一种增加胎盘灌洗液细胞群中粒酶 B 表达的方法,该方法包括将所述胎盘灌洗液细胞群与一定浓度的免疫调节化合物接触一段时间,与没有与所述免疫调节化合物接触的等量胎盘灌洗液细胞相比,所述浓度和时间足以使所述胎盘灌洗液细胞群表达可检测的增多量的粒酶 B。

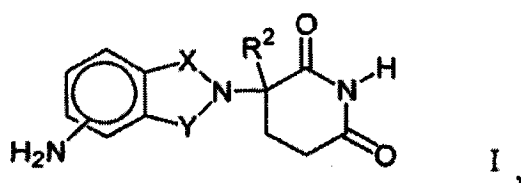
[0173] 免疫调节化合物可以是商业上购买的或根据本文提及的专利或专利公开物中描述的方法制备的,所有这些专利或专利公开物通过参考纳入本文。进一步地,可以不对称合成或者使用已知拆分试剂或手性柱以及其它标准合成有机化学技术拆分得到光学纯的组分。免疫调节化合物可以是外消旋的、立体异构富集的或立体异构纯的,并且可以包含其药学可接受的盐、溶剂化物及前药。

[0174] 除非另有说明,本文使用的术语“免疫调节化合物”包含显著地抑制 TNF α 、LPS 诱导的单核细胞 IL-1B 和 IL-12,且部分地抑制 IL-6 生成的有机小分子。在具体实例中,所述免疫调节化合物为来那度胺、pomalidomide 或沙立度胺。

[0175] 免疫调节化合物的具体实例包括但不限于:取代的苯乙烯的氰基和羧基衍生物,例如在美国专利号 5,929,117 中公开的那些;1-氧代-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异二氢吡啶和 1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异二氢吡啶,例如在美国专利号 5,874,448 和 5,955,476 中公开的那些;在美国专利号 5,798,368 中描述的四取代的 2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异二氢吡啶;1-氧代和 1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异二氢吡啶(例如,沙立度胺的 4-甲基衍生物),包括但不限于在美国专利号 5,635,517、6,476,052、6,555,554 和 6,403,613 中公开的那些;在美国专利号 6,380,239 中描述的在二氢吡啶环的 4-或 5-位发生取代的 1-氧代和 1,3-二氧化异二氢吡啶(例如,4-(4-氨基-1,3-二氧化异二氢吡啶-2-基)-4-氨基甲酰基丁酸);在美国专利号 6,458,810 中描述的在 2-位用 2,6-二氧化-3-羟基哌啶-5-基取代的异二氢吡啶-1-酮和异二氢吡啶-1,3-二酮(例如,2-(2,6-二氧化-3-羟基-5-氟代哌啶-5-基)-4-氨基异二氢吡啶-1-酮);在美国专利号 5,698,579 和 5,877,200 中公开的一类非多肽环酰胺;氨基沙立度胺及氨基沙立度胺的类似物、水解产物、代谢产物、衍生物和前体,和取代的 2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)邻苯二甲酰亚胺和取代的 2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧异吡啶,例如在美国专利号 6,281,230 和 6,316,471 中描述的那些;以及异吡啶-酰亚胺化合物,例如在美国专利公开号 2003/0045552 A1、美国专利号 7,091,353 和 WO 02/059106 中描述的那些。本文提及的每个专利和专利申请的全部内容通过参考纳入本文。免疫调节化合物不包含沙立度胺。

[0176] 在某些实施方案中,所述免疫调节化合物是在苯环上发生氨基取代的 1-氧代-和 1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异二氢吡啶,如在美国专利号 5,635,517 中所描述的,该专利的全部内容通过参考纳入本文。这些化合物具有结构 I:

[0177]



[0178] 其中 X 和 Y 之一是 C = O, X 和 Y 中的另一个为 C = O 或 CH₂, 且 R² 是氢或低级烷基, 特别是甲基。具体的免疫调节化合物包括但不限于:

[0179] 1-氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-4-氨基异二氢吡咯;

[0180] 1-氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-5-氨基异二氢吡咯;

[0181] 1-氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-6-氨基异二氢吡咯;

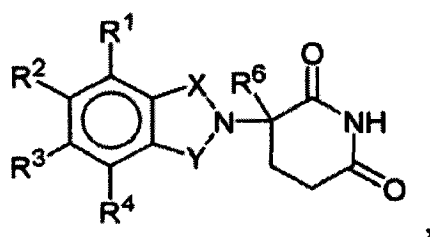
[0182] 1-氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-7-氨基异二氢吡咯;

[0183] 1,3-二氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-4-氨基异二氢吡咯;

[0184] 1,3-二氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-5-氨基异二氢吡咯;

[0185] 其它具体免疫调节化合物属于一类取代的 2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)邻苯二甲酰亚胺和取代的 2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-1-氧代异吡咯, 例如在美国专利号 6, 281, 230、6, 316, 471、6, 335, 349、和 6, 476, 052, 以及 WO 98/03502 中描述的那些, 每专利和专利公开物均通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式:

[0186]



[0187] 其中:

[0188] X 和 Y 之一是 C = O, 且 X 和 Y 中的另一个是 C = O 或 CH₂;

[0189] (i) 各 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 彼此独立地是卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、或 1 至 4 个碳原子的烷氧基, 或 (ii) R¹、R²、R³ 和 R⁴ 中的一个是 -NHR⁵, 且 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 中其余的是氢;

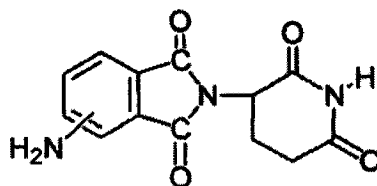
[0190] R⁵ 是氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基;

[0191] R⁶ 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、苄基或卤素;

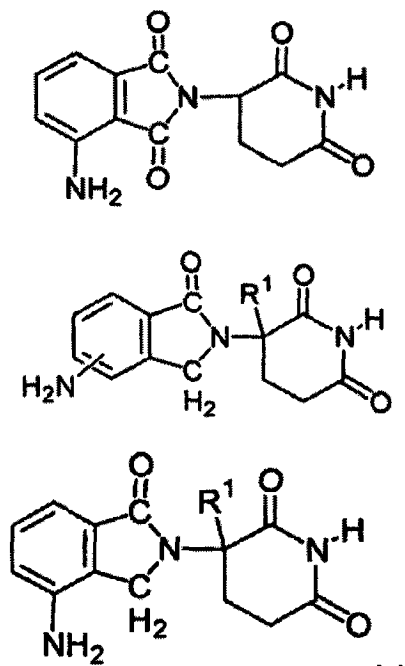
[0192] 条件是如果 X 和 Y 是 C = O, 且 (i) 各 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 是氟或 (ii) R¹、R²、R³ 或 R⁴ 中的一个是氨基, 则 R⁶ 不为氢。

[0193] 这类的代表性化合物具有下式:

[0194]



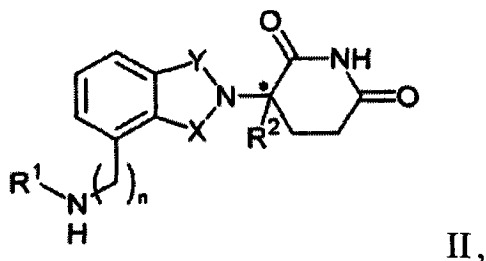
[0195]



[0196] 其中 R^1 是氢或甲基。在单独的实施方案中,包含了这些化合物的对映体纯的形式(例如光学纯的(R)或(S)对映异构体)的用途。

[0197] 其它具体免疫调节化合物属于公开在美国专利申请公开号 US2003/0096841 和 US 2003/0045552 和 WO 02/059106 中的一类异吲哚-酰亚胺,各专利和专利公开物通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式 II:

[0198]



[0199] 及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋体和立体异构体的混合物,其中:

[0200] X 和 Y 中的一个为 $C=O$,且 X 和 Y 中的另一个为 CH_2 或 $C=O$;

[0201] R^1 是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、 (C_0-C_4) 烷基- (C_1-C_6) 杂环烷基、 (C_0-C_4) 烷基- (C_2-C_5) 杂芳基、 $C(O)R^3$ 、 $C(S)R^3$ 、 $C(O)OR^4$ 、 (C_1-C_8) 烷基- $N(R^6)_2$ 、 (C_1-C_8) 烷基- OR^5 、 (C_1-C_8) 烷基- $C(O)OR^5$ 、 $C(O)NHR^3$ 、 $C(S)NHR^3$ 、 $C(O)NR^3R^{3'}$ 、 $C(S)NR^3R^{3'}$ 、或 (C_1-C_8) 烷基- $O(CO)R^5$;

[0202] R^2 是 H、F、苄基、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、或 (C_2-C_8) 炔基;

[0203] R^3 和 $R^{3'}$ 独立地是 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、 (C_0-C_4) 烷基- (C_1-C_6) 杂环烷基、 (C_0-C_4) 烷基- (C_2-C_5) 杂芳基、 (C_0-C_8) 烷基- $N(R^6)_2$ 、 (C_1-C_8) 烷基- OR^5 、 (C_1-C_8) 烷基- $C(O)OR^5$ 、 (C_1-C_8) 烷基- $O(CO)R^5$ 、或 $C(O)OR^5$;

[0204] R^4 是 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、 (C_1-C_4) 烷基- OR^5 、苄基、芳基、 (C_0-C_4) 烷基- (C_1-C_6) 杂环烷基、或 (C_0-C_4) 烷基- (C_2-C_5) 杂芳基;

[0205] R^5 是 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、或 (C_2-C_5) 杂芳基；

[0206] R^6 每次出现时独立地是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、 (C_2-C_5) 杂芳基、或 (C_0-C_8) 烷基 $-C(O)O-R^5$ ，或多个 R^6 基团可以连接形成杂环烷基基团；

[0207] n 是 0 或 1；和

[0208] * 代表手性 - 碳中心。

[0209] 在式 II 的具体化合物中，当 n 是 0 时，则 R^1 是 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_1-C_6)$ 杂环烷基、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_2-C_5)$ 杂芳基、 $C(O)R^3$ 、 $C(O)OR^4$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-N(R^6)_2$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-OR^5$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-C(O)OR^5$ 、 $C(S)NHR^3$ 、或 (C_1-C_8) 烷基 $-O(CO)R^5$ ；

[0210] R^2 是 H、或 (C_1-C_8) 烷基；且

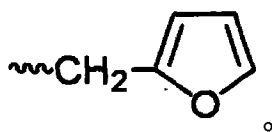
[0211] R^3 是 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_1-C_6)$ 杂环烷基、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_2-C_5)$ 杂芳基、 (C_5-C_8) 烷基 $-N(R^6)_2$ ； (C_0-C_8) 烷基 $-NH-C(O)O-R^5$ ； (C_1-C_8) 烷基 $-OR^5$ ， (C_1-C_8) 烷基 $-C(O)OR^5$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-O(CO)R^5$ 或 $-C(O)OR^5$ ；且其它变量具有相同的定义。

[0212] 在式 II 的其它具体化合物中， R^2 是 H、或 (C_1-C_4) 烷基。

[0213] 在式 II 的其它具体化合物中， R^1 是 (C_1-C_8) 烷基、或苄基。

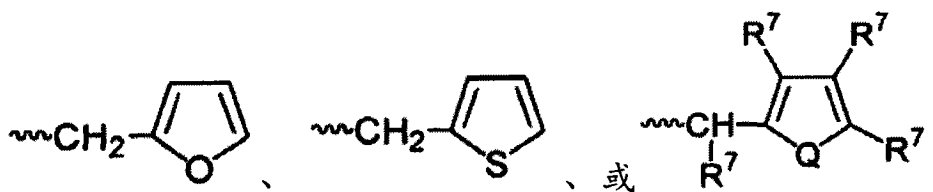
[0214] 在式 II 的其它具体化合物中， R^1 是 H、 (C_1-C_8) 烷基、苄基、 CH_2OCH_3 、 $CH_2CH_2OCH_3$ 、或

[0215]



[0216] 在式 II 化合物的另一实施方案中， R^1 是

[0217]



[0218] 其中 Q 是 O 或 S， R^7 每次出现时独立地是 H、 (C_1-C_8) 烷基、 (C_3-C_7) 环烷基、 (C_2-C_8) 烯基、 (C_2-C_8) 炔基、苄基、芳基、卤素、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_1-C_6)$ 杂环烷基、 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_2-C_5)$ 杂芳基、 (C_0-C_8) 烷基 $-N(R^6)_2$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-OR^5$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-C(O)OR^5$ 、 (C_1-C_8) 烷基 $-O(CO)R^5$ 、或 $C(O)OR^5$ ，或相邻出现的 R^7 可以结合在一起形成双环烷基或芳环。

[0219] 在式 II 的其它具体化合物中， R^1 是 $C(O)R^3$ 。

[0220] 在式 II 的其它具体化合物中， R^3 是 (C_0-C_4) 烷基 $-(C_2-C_5)$ 杂芳基、 (C_1-C_8) 烷基、芳基、或 (C_0-C_4) 烷基 $-OR^5$ 。

[0221] 在式 II 的其它具体化合物中，杂芳基是吡啶基、呋喃基、或噻吩基。

[0222] 在式 II 的其它具体化合物中， R^1 是 $C(O)OR^4$ 。

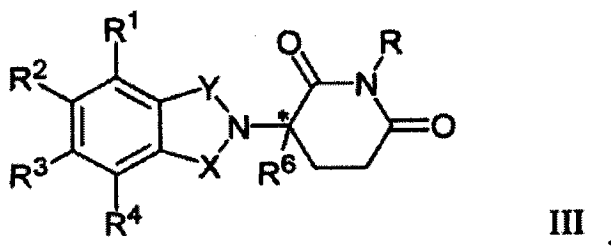
[0223] 在式 II 的其它具体化合物中， $C(O)NHC(O)$ 的 H 可以被 (C_1-C_4) 烷基、芳基、或苄基代替。

[0224] 该类型中的化合物的进一步实例包括但不限于：[2-(2,6-二氧代-哌

啉-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基甲基]-酰胺;(2-(2,6-二氧代-哌啉-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基甲基)-氨基甲酸叔丁酯;4-(氨基甲基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-异二氢吲哚-1,3-二酮;N-(2-(2,6-二氧代-哌啉-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-4-基甲基)-乙酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}环丙基-甲酰胺;2-氯-N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}乙酰胺;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)-3-吡啶基甲酰胺;3-{1-氧代-4-(苄基氨基)异二氢吲哚-2-基}哌啉-2,6-二酮;2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-4-(苄基氨基)异二氢吲哚-1,3-二酮;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}丙酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}-3-吡啶基甲酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}庚酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)甲基}-2-呋喃基甲酰胺;{N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)氨基甲酰基}乙酸甲酯;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)戊酰胺;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基)-2-噻吩基甲酰胺;N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基]甲基}(丁基氨基)甲酰胺;N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基]甲基}(辛基氨基)甲酰胺;和N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啉基))-1,3-二氧代异二氢吲哚-4-基]甲基}(苄基氨基)甲酰胺。

[0225] 其它具体免疫调节化合物属于在美国专利申请公开号 2002/0045643、国际公开号 WO 98/54170 和美国专利号 6,395,7546 中公开的一类异吲哚-酰亚胺,各专利和专利公开物均通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式 III:

[0226]



[0227] 及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋体和立体异构体的混合物,其中:

[0228] X 和 Y 中的一个为 C=O,且 X 和 Y 中的另一个为 CH₂ 或 C=O;

[0229] R 是 H、或 CH₂OCOR';

[0230] (i) 各 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 彼此独立地为卤素、1 至 4 个碳原子的烷基,或 1 至 4 个碳原子的烷氧基,或 (ii) R¹、R²、R³ 或 R⁴ 中一个是硝基或 -NHR⁵,且 R¹、R²、R³ 或 R⁴ 中其余的是氢;

[0231] R⁵ 是氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基;

[0232] R⁶ 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、苯基、氯、或氟;

[0233] R' 是 R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹);

[0234] R⁷ 间-亚苯基、或对-亚苯基、或 -(C_nH_{2n})-,其中 n 具有 0 至 4 的值;

[0235] 各 R⁸ 和 R⁹ 彼此独立地为氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基,或 R⁸ 和 R⁹ 结合在一起是四

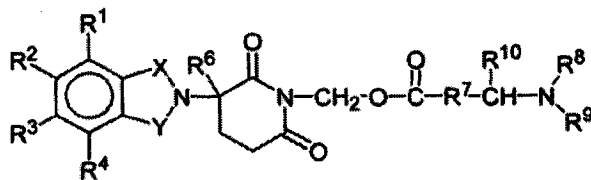
亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^1\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 其中 X^1 是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 或 $-\text{NH}-$;

[0236] R^{10} 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、或苯基; 且

[0237] * 代表手性碳中心。

[0238] 其它代表性的化合物具有下式:

[0239]



[0240] 其中:

[0241] X 和 Y 中的一个为 $\text{C}=\text{O}$, 且 X 和 Y 中的另一个为 $\text{C}=\text{O}$ 或 CH_2 ;

[0242] (i) 各 R^1 、 R^2 、 R^3 或 R^4 彼此独立地为卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、或 1 至 4 个碳原子的烷氧基, 或 (ii) R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的一个为 $-\text{NHR}^5$, 且 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中其余的是氢;

[0243] R^5 是氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基;

[0244] R^6 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、苯基、氯、或氟;

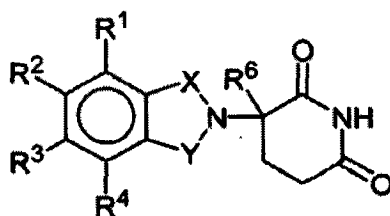
[0245] R^7 是间-亚苯基、或对-亚苯基、或 $-(\text{C}_n\text{H}_{2n})-$, 其中 n 具有 0 至 4 的值;

[0246] 各 R^8 和 R^9 彼此独立地为氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基, 或 R^8 和 R^9 结合在一起是四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、或 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}^1\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 其中 X^1 是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、或 $-\text{NH}-$;

[0247] R^{10} 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、或苯基。

[0248] 其它代表性的化合物具有下式:

[0249]



[0250] 其中:

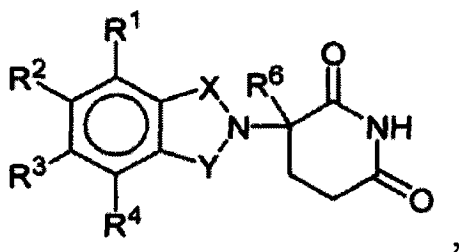
[0251] X 和 Y 中的一个为 $\text{C}=\text{O}$, 且 X 和 Y 中的另一个为 $\text{C}=\text{O}$ 或 CH_2 ;

[0252] (i) 各 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 彼此独立地为卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、或 1 至 4 个碳原子的烷氧基, 或 (ii) R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的一个为硝基或被保护的氨基, 且 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中其余的是氢; 且

[0253] R^6 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、苯基、氯、或氟;

[0254] 其它代表性的化合物具有下式:

[0255]



[0256] 其中：

[0257] X 和 Y 中的一个是 C = O, 且 X 和 Y 中的另一个是 C = O 或 CH₂；

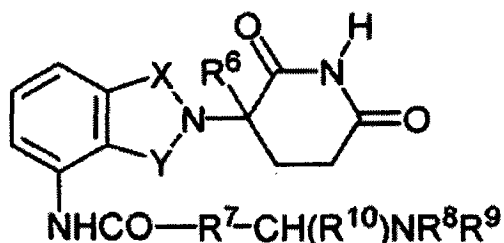
[0258] (i) 各 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 彼此独立地是卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、或 1 至 4 个碳原子的烷氧基, 或 (ii) R¹、R²、R³ 和 R⁴ 中的一个是 -NHR⁵, 且 R¹、R²、R³ 和 R⁴ 中其余的是氢；

[0259] R⁵ 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、或 CO-R⁷-CH(R¹⁰)NR⁸R⁹, 其中每个 R⁷、R⁸、R⁹ 和 R¹⁰ 如本文所定义；且

[0260] R⁶ 是 1 至 8 个碳原子的烷基、苯基、氯、或氟。

[0261] 所述化合物的具体实例具有下式：

[0262]



[0263] 其中：

[0264] X 和 Y 中的一个 C = O, 且 X 和 Y 中的另一个是 C = O 或 CH₂；

[0265] R⁶ 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、苯基、氯或氟；

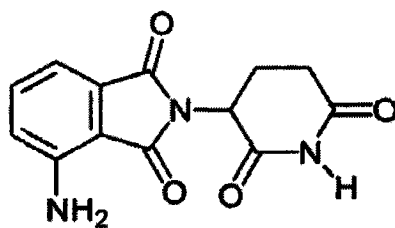
[0266] R⁷ 是间-亚苯基、对-亚苯基、或 -(C_nH_{2n})-, 其中 n 具有 0 至 4 的值；

[0267] 各 R⁸ 和 R⁹ 彼此独立地是氢、或 1 至 8 个碳原子的烷基, 或 R⁸ 和 R⁹ 结合在一起是四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基、或 -CH₂CH₂X¹CH₂CH₂-, 其中 X¹ 是 -O-、-S-、或 -NH-；且

[0268] R¹⁰ 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、或苯基。

[0269] 最优选的免疫调节化合物是 4-(氨基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-异二氢吲哚-1,3-二酮和 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮。所述化合物可以经由标准的合成方法(参见例如美国专利号 5,635,517,通过参考纳入本文)获得。所述化合物可从 Celgene Corporation, Warren, NJ 获得。4-(氨基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-异二氢吲哚-1,3-二酮具有如下化学结构：

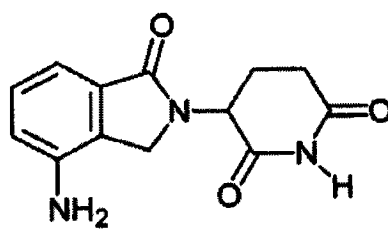
[0270]



[0271] 化合物 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮具有

如下化学结构：

[0272]



[0273] 在另一实施方案中，具体免疫调节化合物包含 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的多晶型，例如晶型 A、B、C、D、E、F、G 和 H，其公开在美国公开号 US 2005/0096351 A1 中，该申请通过参考纳入本文。例如，3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型 A 是可从非水溶剂系统获得的非溶剂化的结晶材料。晶型 A 的 X 射线粉末衍射图包含在约 8、14.5、16、17.5、20.5、24 和 26 度 2θ 处的显著峰，和具有约 270℃ 的差示扫描量热法熔融温度峰值。晶型 A 为弱吸湿性的或非吸湿性的，且似乎是迄今为止发现的 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的热力学最稳定的无水晶型。

[0274] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型 B 是半水合的结晶材料，其可以从各种溶剂系统中获得，所述溶剂系统包括但不限于己烷、甲苯和水。晶型 B 的 X 射线粉末衍射图包含在约 16、18、22 和 27 度 2θ 处的显著峰，且其 DSC 曲线在约 146℃ 和 268℃ 吸热，所述约 146℃ 和 268℃ 温度通过热台显微镜试验鉴定为脱水和熔融温度。互变研究显示晶型 B 在水性溶剂系统中转变成晶型 E，且在丙酮及其它无水体系中转变成其它形式。

[0275] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型 C 是半溶剂化的结晶材料，其可以从多种溶剂（例如但不限于丙酮）中获得。晶型 C 的 X 射线粉末衍射图包含在约 15.5 和 25 度 2θ 处的显著峰，和具有约 269℃ 的差示扫描量热法熔融温度峰值。晶型 C 在低于约 85% 的 RH 时是非吸湿性的，但可以在较高相对湿度下可转变成晶型 B。

[0276] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型 D 是从乙腈和水的混合物中制备的结晶的、溶剂化的多晶型物。晶型 D 的 X 射线粉末衍射图包含在约 27 和 28 度 2θ 处的显著峰，且具有约 270℃ 的差示扫描量热法熔融温度峰值。晶型 D 为弱吸湿性的或非吸湿性的，但是当在较高相对湿度下，其通常将转变成晶型 B。

[0277] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型 E 是二水合的结晶材料，其可以通过将 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮在水中制浆并在具有约 9 : 1 比例的丙酮 : 水的溶剂系统中缓慢蒸发 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮而获得。晶型 E 的 X 射线粉末衍射图包含在约 20、24.5 和 29 度 2θ 处的显著峰，和具有约 269℃ 的差示扫描量热法熔融温度峰值。晶型 E 可以在丙酮溶剂系统中转变成晶型 C，且可在 THF 溶剂系统中转变成晶型 G。在水性溶剂系统中，晶型 E 似乎是最稳定的形式。对晶型 E 进行的去溶剂化试验表明，当在约 125℃ 加热约五分钟后，晶型 E 可以转变成晶型 B。当在 175℃ 加热约五分钟后，晶型 B 可以转变成晶型 F。

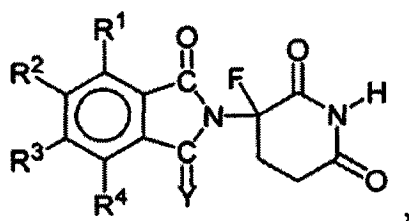
[0278] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型F是非溶剂化的结晶物质,其可以通过使晶型E脱水获得。晶型F的X射线粉末衍射图包含在约19、19.5和25度 2θ 处的显著峰,且具有约269℃的差示扫描量热法熔融温度峰值。

[0279] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型G是非溶剂化的结晶物质,其可以通过将晶型B和E在溶剂中制浆而获得,所述溶剂例如但不限于四氢呋喃(THF)。晶型G的X射线粉末衍射图包含在约21、23和24.5度 2θ 处的显著峰,且具有约267℃的差示扫描量热法熔融温度峰值。

[0280] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的晶型H是部分水合的(约0.25摩尔)结晶材料,其可以通过将晶型E暴露于0%相对湿度而获得。晶型H的X射线粉末衍射图包含在约15、26和31度 2θ 处的显著峰,且具有约269℃的差示扫描量热法熔融温度峰值。

[0281] 可用于本发明提供的方法的其它具体免疫调节化合物包括但不限于1-氧代-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异二氢吲哚和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异二氢吲哚,例如在美国专利号5,874,448和5,955,476中描述的那些,各专利通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式:

[0282]

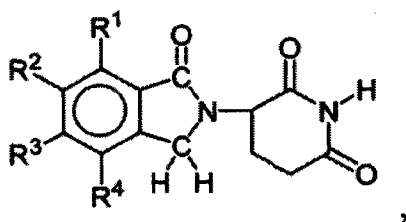


[0283] 其中Y为氧或H₂,且

[0284] 各R¹、R²、R³和R⁴彼此独立地为氢、卤素、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基,或氨基。

[0285] 可用于本发明提供的方法的其它具体免疫调节化合物包括但不限于在美国专利号5,798,368中描述的四取代的2-(2,6-二氧化-哌啶-3-基)-1-氧代异二氢吲哚,该专利通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式:

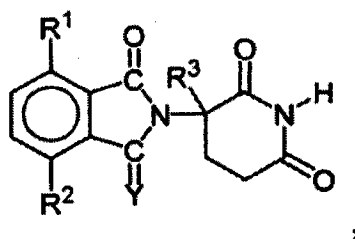
[0286]



[0287] 其中各R¹、R²、R³和R⁴彼此独立地为卤素、1至4个碳原子的烷基、或1至4个碳原子的烷氧基。

[0288] 可用于本发明提供的方法的其它具体免疫调节化合物包括但不限于在美国专利号6,403,613中描述的1-氧代和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异二氢吲哚,该专利通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式:

[0289]



[0290] 其中：

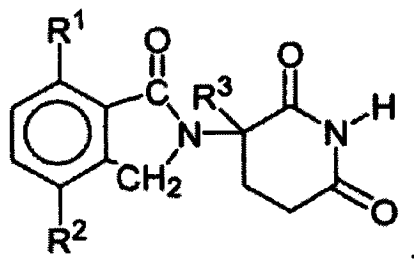
[0291] Y 为氧或 H₂，

[0292] R¹ 和 R² 中的第一个为卤素、烷基、烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，R¹ 和 R² 中的第二个（独立于第一个）是氢、卤素、烷基、烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，且

[0293] R³ 为氢、烷基、或苄基。

[0294] 所述化合物的具体实例具有下式：

[0295]



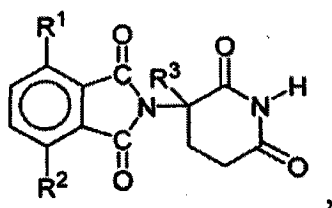
[0296] 其中 R¹ 和 R² 中的第一个为卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、1 至 4 个碳原子的烷氧基、其中各烷基具有 1 至 4 个碳原子的二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，

[0297] R¹ 和 R² 中的第二个（独立于第一个）是氢、卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、1 至 4 个碳原子的烷氧基、其中烷基具有 1 至 4 个碳原子的烷基氨基、其中各烷基具有 1 至 4 个碳原子的二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，且

[0298] R³ 为氢、1 至 4 个碳原子的烷基、或苄基。具体实例包括但不限于 1-氧代-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-4-甲基异二氢吡啶。

[0299] 可用于在本发明提供的方法的其它化合物具有下式：

[0300]



[0301] 其中 R¹ 和 R² 中的第一个为卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、1 至 4 个碳原子的烷氧基、其中各烷基具有 1 至 4 个碳原子的二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，

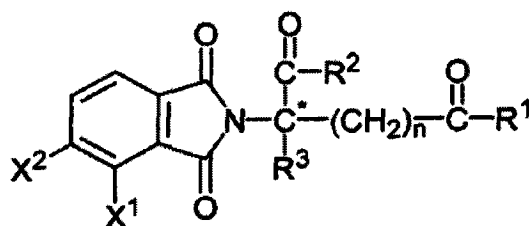
[0302] R¹ 和 R² 中的第二个（独立于第一个）是氢、卤素、1 至 4 个碳原子的烷基、1 至 4 个碳原子的烷氧基、其中烷基具有 1 至 4 个碳原子的烷基氨基、其中各烷基具有 1 至 4 个碳原子的二烷基氨基、氰基、或氨基甲酰基，且

[0303] R³ 为氢、1 至 4 个碳原子的烷基、或苄基。

[0304] 可用于本发明提供的方法的其它具体免疫调节化合物包括但不限于在美国专利

号 6, 380, 239 和美国申请公开号 2006/0084815 中描述的在二氢吲哚环的 4- 或 5- 位发生取代的 1- 氧代和 1,3- 二氧代异二氢吲哚, 所述专利和专利公开物通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式:

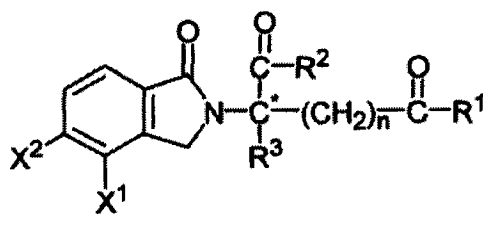
[0305]



[0306] 其中, 指明为 C* 的碳原子构成手性中心 (当 n 不为零且 R¹ 与 R² 不同时); X¹ 和 X² 中的一个为氨基、硝基、一至六个碳的烷基、或 NH-Z, 且 X¹ 或 X² 中的另一个为氢; 各 R¹ 和 R² 彼此独立地是羟基或 NH-Z; R³ 是氢、一至六个碳的烷基、卤素、或卤代烷基; Z 为氢、芳基、一至六个碳的烷基、甲酰基、或一至六个碳的酰基; 且 n 具有为 0、1 或 2 的值; 条件是如果 X¹ 是氨基, 且 n 是 1 或 2, 则 R¹ 和 R² 不同时是羟基; 及其盐。

[0307] 可用于本发明提供的方法的进一步的化合物具有下式:

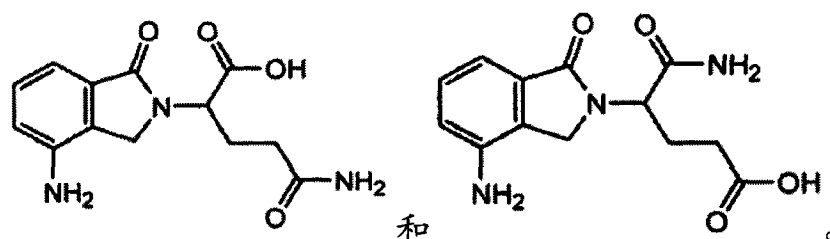
[0308]



[0309] 其中, 当 n 不是零且 R¹ 与 R² 不同时, 指明为 C* 的碳原子构成手性中心; X¹ 和 X² 中的一个为氨基、硝基、一至六个碳的烷基、或 NH-Z, 且 X¹ 或 X² 中的另一个为氢; 各 R¹ 和 R² 彼此独立地是羟基、或 NH-Z; R³ 是一至六个碳的烷基、卤素、或氢; Z 是氢、芳基、或一至六个碳的烷基或酰基; 且 n 具有 0、1 或 2 的值。

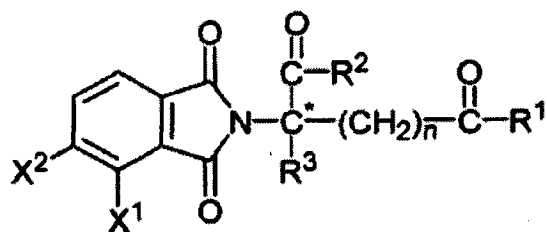
[0310] 可用于本发明提供的方法的化合物的具体实例包括但不限于分别具有如下结构的 2-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-4-氨基甲酰基丁酸和 4-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-4-氨基甲酰基-丁酸, 及其药学上可接受的盐、溶剂化物、前药和立体异构体:

[0311]



[0312] 其它代表性的化合物具有下式:

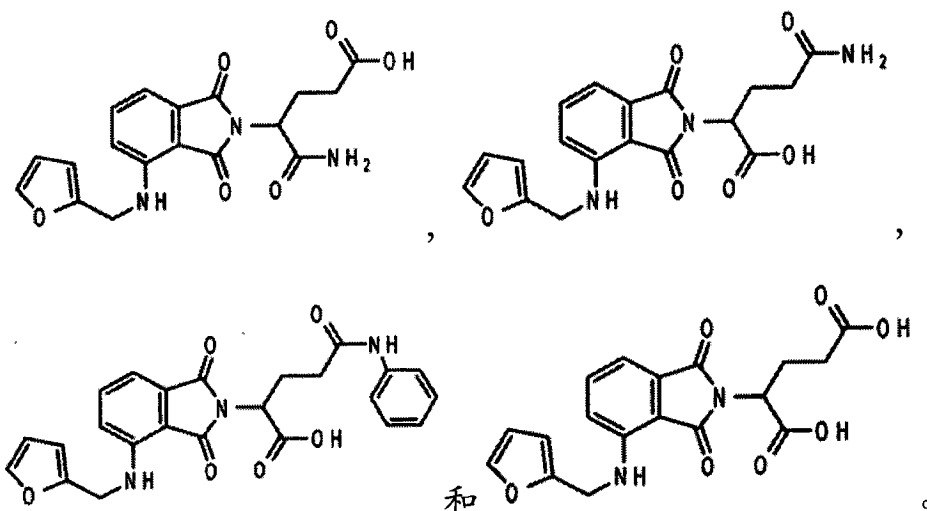
[0313]



[0314] 其中,当 n 不是零且 R^1 与 R^2 不同时,指明为 C^* 的碳原子构成手性中心; X^1 和 X^2 中的一个为氨基、硝基、一至六个碳的烷基、或 $NH-Z$,且 X^1 或 X^2 中的另一个是氢;各 R^1 和 R^2 彼此独立地是羟基、或 $NH-Z$; R^3 是一至六个碳的烷基、卤素、或氢; Z 是氢、芳基、或一至六个碳的烷基或酰基;且 n 具有 0、1 或 2 的值;及其盐。

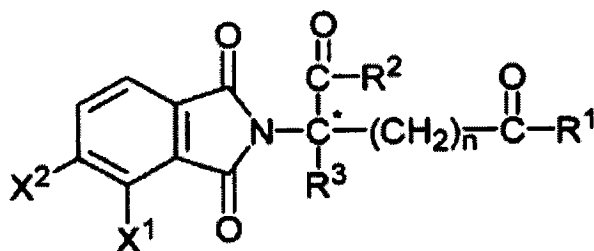
[0315] 具体实例包括但不限于分别具有如下结构的 4-氨基甲酰基-4-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧化-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-丁酸、4-氨基甲酰基-2-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧化-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-丁酸、2-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧化-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-4-苯基氨基甲酰基-丁酸、和 2-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧化-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-戊二酸,及其药学上可接受的盐、溶剂化物、前药和立体异构体:

[0316]



[0317] 所述化合物的其它具体实例具有下式:

[0318]



[0319] 其中 X^1 和 X^2 中的一个为硝基、或 $NH-Z$,且 X^1 或 X^2 中的另一个是氢;

[0320] 各 R^1 和 R^2 彼此独立地是羟基、或 $NH-Z$;

[0321] R^3 是一至六个碳的烷基、卤素、或氢;

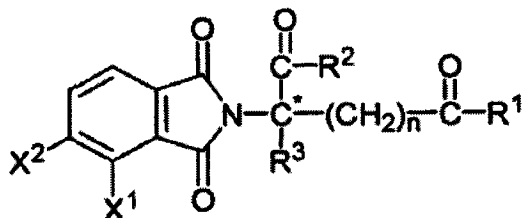
[0322] Z 是氢、苯基、一至六个碳的酰基、或一至六个碳的烷基;且

[0323] n 具有 0、1 或 2 的值；

[0324] 条件是如果 X^1 和 X^2 中的一个为硝基，且 n 是 1 或 2，则 R^1 和 R^2 不是羟基；和

[0325] 如果 $-\text{COR}^2$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COR}^1$ 不同，指明为 C^* 的碳原子构成手性中心。其它代表性的化合物具有下式：

[0326]



[0327] 其中 X^1 和 X^2 中的一个是一至六个碳的烷基；

[0328] 各 R^1 和 R^2 彼此独立地是羟基、或 NH-Z ；

[0329] R^3 是一至六个碳原子的烷基、卤素、或氢；

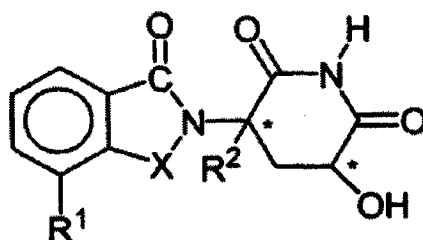
[0330] Z 是氢、苯基、一至六个碳的酰基、或一至六个碳的烷基；且

[0331] n 具有 0、1 或 2 的值；且

[0332] 如果 $-\text{COR}^2$ 和 $-(\text{CH}_2)_n-\text{COR}^1$ 不同，指明为 C^* 的碳原子构成手性中心。

[0333] 其它具体免疫调节化合物包括但不限于在美国专利号 6,458,810 中描述的在 2- 位用 2,6- 二氧化 -3- 羟基哌啶 -5- 基取代的异二氢吡啶 -1- 酮和异二氢吡啶 -1,3- 二酮，该专利通过参考纳入本文。代表性的化合物具有下式：

[0334]



[0335] 其中：

[0336] 指明为 C^* 的碳原子构成手性中心；

[0337] X 是 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、或 $-\text{CH}_2-$ ；

[0338] R^1 是 1 至 8 个碳原子的烷基、或 $-\text{NHR}^3$ ；

[0339] R^2 是氢、1 至 8 个碳原子的烷基、或卤素；且

[0340] R^3 是：

[0341] 氢，

[0342] 1 至 8 个碳原子的烷基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基取代，

[0343] 3 至 18 个碳原子的环烷基，

[0344] 苯基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷基、1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基取代，

[0345] 苄基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷基、1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基、或 $-\text{COR}^4$ 取代，其中：

[0346] R^4 是：

[0347] 氢，

[0348] 1 至 8 个碳原子的烷基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基取代，

[0349] 3 至 18 个碳原子的环烷基，

[0350] 苯基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷基、1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基取代，或

[0351] 苄基，未取代，或被 1 至 8 个碳原子的烷基、1 至 8 个碳原子的烷氧基、卤素、氨基、或 1 至 4 个碳原子的烷基氨基取代。

[0352] 本发明提供的化合物可以是商业购买的或根据在本文公开的专利或专利公开物中描述的方法制备。进一步地，可以不对称合成或者使用已知的拆分试剂或手性柱以及其它标准合成有机化学技术拆分获得光学纯的化合物。

[0353] 各种免疫调节化合物包含一个或多个手性中心，且可以作为对映异构体的外消旋混合物或非对映异构体的混合物存在。本发明涵盖这些化合物的立体异构纯形式的用途，以及这些形式的混合物的用途。例如，在本发明提供的方法和组合物中可以使用包含等量或不等量特定免疫调节化合物的对映异构体的混合物。这些异构体可以是不对称合成的或者使用标准技术例如手性柱或手性拆分剂拆分的。参见，例如 Jacques, J., 等人, Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley-Interscience, New York, 1981); Wilen, S. H. 等人, Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E. L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); 和 Wilen, S. H., Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E. L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972)。

[0354] 应当注意，如果图示的结构和给予该结构的名称之间存在差异，以图示的结构为重。另外，如果结构或一部分结构的立体化学没有用例如加粗线或虚线表示，则该结构或部分结构应当解释为包含其所有立体异构体。

[0355] 5.9. PINK 细胞、人胎盘灌洗液或混合的自然杀伤细胞的施用

[0356] 可以通过本领域已知适于施用活细胞的任何医学可接受的途径，将 PINK 细胞、人胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞、包含这些细胞的细胞群、或其组合施用至个体，例如具有肿瘤细胞的个体，例如癌症患者。在各种实施方案中，本发明提供的细胞可以通过外科手术植入、注射、输注（例如经由导管或注射器）、或以其它方式，直接或间接施用至需要修复或加强的部位。在一个实施方案中，将所述细胞静脉内施用至个体。在另一实施方案中，将所述细胞施用至个体的肿瘤（例如实体瘤）部位。在其中个体在超过一个部位具有肿瘤的具体实施方案中，将所述细胞施用至至少两个或所有的肿瘤部位。在某些其它实施方案中，本发明提供的细胞或包含这些细胞的组合物被口服、鼻腔、动脉内、肠胃外、眼内、肌内、皮下、腹膜内、脑内、心室内、脑室内、鞘内、脑池内、脊椎内和 / 或脊椎旁施用。在某些具体实施方案中，所述细胞经由带有或者没有泵装置的颅内或脊柱内针和 / 或导管递送。

[0357] 所述 PINK 细胞、人胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞、或其组合，或包含这些细胞的细胞群可以作为组合物（例如包含所述细胞的基质、水凝胶、支架等）施用至个体。

[0358] 在一个实施方案中，将本发明提供的细胞接种在天然基质（例如胎盘生物材料例

如羊膜材料)上。这样的羊膜材料可以是例如直接从哺乳动物胎盘解剖出的羊膜;经固定或热处理的羊膜、基本上干燥(即 $< 20\% \text{H}_2\text{O}$)的羊膜、绒毛膜、基本上干燥的绒毛膜、基本上干燥的羊膜和绒毛膜等。可以在其上接种胎盘的优选的胎盘生物材料描述在 Hariri 的美国申请公开号 2004/0048796 中,该专利申请的全部公开内容通过参考纳入本文。

[0359] 在另一实施方案中,将所述 PINK 细胞、人胎盘灌洗液细胞、混合的自然杀伤细胞、或其组合,或包含这些细胞的细胞群悬浮在适于例如注射的水凝胶溶液中。用于这些组合物的合适的水凝胶包含自组装肽,例如 RAD 16。在一个实施方案中,可允许包含所述细胞的水凝胶溶液硬化,例如在模中硬化,以形成用于植入的、具有细胞分散在其中的基质。也可以培养这些基质中的细胞,使得所述细胞在植入前有丝分裂扩增。所述水凝胶可以是例如有机聚合物(天然的或合成的),其通过共价键、离子键、或氢键交联以形成三维开放-晶格结构,其俘获水分子形成凝胶。形成水凝胶的材料包含多糖,例如海藻酸及其盐、肽、聚磷腓和聚丙烯酸酯,其通过离子交联;或嵌段聚合物,例如聚氧化乙烯-聚丙二醇嵌段共聚物,其分别通过温度或 pH 交联。在某些实施方案中,本发明的水凝胶或基质是可生物降解的。

[0360] 在本发明的某些实施方案中,所述制剂包含原位可聚合的凝胶(参见,例如美国专利申请公布 2002/0022676;Anseth 等人, *J. Control Release*, 78(1-3):199-209(2002); Wang 等人, *Biomaterials*, 24(22):3969-80(2003))。

[0361] 在某些实施方案中,所述聚合物至少部分地可溶于水性溶液(例如水、缓冲盐溶液或水性醇溶液)中,所述聚合物具有带电侧基或其一价离子盐。具有可以与阳离子反应的酸性侧基的聚合物的实例为聚(磷腓)(poly(phosphazenes))、聚(丙烯酸)、聚(甲基丙烯酸)、丙烯酸和甲基丙烯酸的共聚物、聚(乙酸乙烯酯)、和磺化聚合物例如磺化聚苯乙烯。也可以使用通过丙烯酸或甲基丙烯酸和乙烯醚单体或聚合物反应形成的具有酸性侧基的共聚物。酸性基团的实例是羧酸基、磺酸基、卤化(优选氟化)醇基、酚 OH 基和酸性 OH 基。

[0362] 本发明的胎盘干细胞或其共同培养物可以被接种在三维框架(framework)或支架上,或植入体内。这样的框架可以与刺激组织形成或以其它方式加强或改善本发明实施的任何一种或多种生长因子、细胞、药物或其它组分联合植入。

[0363] 可用于本发明的支架的实例包括无纺垫、多孔泡沫、或自组装肽。无纺垫可以使用由合成的易吸收的乙醇酸和乳酸的共聚物(例如 PGA/PLA)(VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N. J.)制成的纤维形成。也可以使用通过例如冷冻干燥或冻干等方法形成的由例如聚(ϵ -己内酯)/聚(乙醇酸)(PCL/PGA)共聚物组成的泡沫(参见,例如美国专利号 6,355,699)作为支架。

[0364] 本发明的胎盘干细胞也可被接种在生理学可接受的陶瓷材料上或与其接触,所述生理学可接受的陶瓷材料包括但不限于磷酸一钙、磷酸二钙、磷酸三钙、 α -磷酸三钙、 β -磷酸三钙、和磷酸四钙、羟基磷灰石、氟磷灰石、硫酸钙、氟化钙、氧化钙、碳酸钙、磷酸钙镁、生物学活性玻璃例如 BIOGLASS®及其混合物。目前市售的多孔生物相容性陶瓷材料包括 SURGIBONE®(CanMedica Corp., Canada)、ENDO BON®(Merck Biomaterial France, France)、CEROS®(Mathys, AG, Bettlach, Switzerland)、和矿化的胶原骨移植产品例如 HEALOS(TM)(DePuy, Inc., Raynham, MA)和 VITOSS®, RHAKOSS™及 CORTOSS®(Orthovita,

Malvern, Pa.)。所述框架可以是天然和 / 或合成材料的混合物、掺合物或复合物。

[0365] 在另一实施方案中, 胎盘干细胞可被接种在毡上或与其接触, 所述毡可以是例如由生物可吸收材料 (例如 PGA、PLA、PCL 共聚物或掺合物, 或透明质酸) 制成的复丝组成。

[0366] 在另一实施方案中, 本发明的胎盘干细胞可被接种在泡沫支架上, 所述泡沫支架可以是复合结构。可以将这样的泡沫支架模压成有用的形状, 例如待修复、替代或增强的一部分体内特定结构的形状。在某些实施方案中, 例如用 0.1M 乙酸处理所述框架, 接着在聚赖氨酸、PBS 和 / 或胶原中培养, 之后接种本发明的细胞以增强细胞粘附。可以通过如下方法修饰基质的外表面以改善细胞粘附或生长和组织分化, 例如血浆-包涂基质, 或加入一种或多种蛋白 (例如胶原、弹性纤维、网状纤维)、糖蛋白、糖胺聚糖 (例如硫酸肝素、软骨素-4-硫酸盐、软骨素-6-硫酸盐、硫酸皮肤素、硫酸角蛋白等)、细胞基质和 / 或其它材料 (例如但不限于明胶、海藻酸盐、琼脂、琼脂糖和植物胶等)。

[0367] 在某些实施方案中, 所述支架包含使其不形成血栓的材料, 或经所述材料处理。这些处理和材料也可以促进和维持内皮生长、迁移和细胞外基质沉积。这些材料和处理的实例包括但不限于天然材料, 例如基底膜蛋白 (例如层粘连蛋白和 IV 型胶原)、合成材料 (例如 EPTFE)、和分段的聚氨酯脲硅酮 (例如 PURSPAN™ (The Polymer Technology Group, Inc., Berkeley, Calif.))。所述支架也可以包含抗血栓形成剂, 例如肝素; 也可以在用胎盘干细胞接种前, 处理所述支架以改变表面电荷 (例如用血浆包涂)。

6. 实施例

[0368] 6.1. 实施例 1: 来自胎盘灌洗液和脐带血的胎盘中间体自然杀伤细胞的表征

[0369] 本实施例说明了来自人胎盘灌洗液的自然杀伤细胞的分离和培养。

[0370] 胎盘自然杀伤细胞的分离。使用 CD56⁻ 偶联的微珠, 从 8 个单元的人胎盘灌洗液 (HPP) 和 4 个单元的脐带血 (UCB) 中分离自然杀伤细胞。通过磁珠选择 (Miltenyi Biotec) 进行 PINK 细胞的分离。将分娩后的胎盘排血, 并用约 200 至约 750mL 的灌洗溶液 (0.9% NaCl 注射溶液, USP 级 (目录号 68200-804, VWR)) 灌洗。收集未处理的灌洗液, 并处理以除去红细胞。用荧光激活细胞分类 (FACS) 缓冲液 (RPMI 1640, 不含酚红, 加入 5% FBS) 洗涤来自 HPP 或 UCB 的单核细胞一次, 然后以 1500rpm 离心 6 分钟。计数细胞数量, 将细胞沉淀以 10^7 个总细胞 / 80 μ L 缓冲液重悬, 并加入 20 μ L 的 CD3 Microbeads (目录号 130-050-101, Miltenyi)。均匀混合所述系统, 并在 4-8°C 下培养 15 分钟。向每 10^7 个总细胞加入 1-2mL 缓冲液, 然后以 300g 离心该混合物 10 分钟。完全吸除上清液。将细胞沉淀重悬为 10^8 个细胞 / 500 μ L 缓冲液, 并准备进行磁分离。将 LS 柱 (Miltenyi Biotec) 置于 MIDIMACS™ 细胞分离器 (Miltenyi Biotec) 的磁场中, 用 3mL 的缓冲液洗涤所述柱, 并将细胞 / 微珠悬浮液加样至所述柱。使用 2×3mL 的洗涤缓冲液, 收集流过所述柱且包含自然杀伤细胞的未标记的 CD3⁻ 细胞。计数 CD3⁻ 细胞, 洗涤一次, 然后用 CD56 微珠 (目录号: 130-050-401, Miltenyi) 染色, 并使用与上述 CD3 微珠分离相同的方案分离所述细胞。由此收集了 CD56⁺CD3⁻ 群并用于进一步分析。HPP 中的自然杀伤细胞的百分比范围为 3.52 至 11.6 (中值 6.04, 平均 5.22), UCB 中的自然杀伤细胞的百分比范围为 1.06 至 8.44 (中值: 3.42, 平均: 4.2)。对来自 HPP 的自然杀伤细胞的 CD56 微珠选择产生约 80% 纯的群。参见图 1。在整个 CD56⁺、CD3⁻ 自然杀伤细胞群中, 来自 HPP 的 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞 (即 PINK 细胞) 的百分比

范围为 56.6 至 87.2 (中值 74.2, 平均 65.5), 来自 UCB 的 CD56⁺、CD16⁻ 自然杀伤细胞 (即 PINK 细胞) 的百分比范围为 53.7 至 96.6 (中值 72.8)。来自 HPP 的 CD56⁺、CD16⁺ 自然杀伤细胞的百分比范围为 12.8 至 43.3 (中值 25.8, 平均 34.5), 来自 UCB 的 CD56⁺、CD16⁺ 自然杀伤细胞的百分比范围为 3.4 至 46.3 (中值 27.3, 平均 33.4)。

[0371] 在其它试验中, 使用靶向人血细胞的细胞表面抗原 (CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD123、HLA-DR、血型糖蛋白 A) 的磁性阴性选择试剂盒分离自然杀伤细胞。将 HPP 和 UCB 低温保存单元解冻, 并按与解冻培养基 (RPMI Media 1640 (目录号 22400, Gibco) 和 20% 的热灭活的胎牛血清 (目录号 SH30070.03, Hyclone)) 1 : 1 的比例稀释, 并以 1500rpm 离心 8 分钟。去除上清液, 并用氯化铵处理以进一步去除红细胞; 将各单元重悬在约 30mL 冰冷的 FACS 缓冲液 (RPMI 1640, 不含酚红, 加入 5% FBS) 中, 接着加入 60mL 冰冷的氯化铵 (目录号 07850, Stem Cell), 涡旋所述溶液, 然后在冰上培育 5 分钟。然后, 用 FACS 缓冲液洗涤单核细胞 3 次, 接着以 1500rpm 离心 8 分钟。计数细胞数, 将细胞沉淀以 5×10^7 个活细胞 /ml 重悬在 RoboSep 缓冲液中 (目录号 20104, Stem Cell) 中, 并向细胞悬浮液中加入 0.1mg/mL 的 DNA 酶 I 溶液 (目录号 07900, Stem Cell), 用移液器轻轻地混合, 并在室温下培育 15 分钟, 之后分离。通过用 40 μ m 尼龙滤网 (目录号 352340, BD Falcon) 过滤, 从所述细胞悬浮液中除去细胞团, 之后进行分离。使用包括 EasySep 阴性选择人 NK 细胞富集鸡尾酒和 EasySep 磁微粒子的人 NK 细胞富集试剂盒 (目录号 19055, Stem Cell), 用装置 Robosep (目录号 20000, Stem Cell) 和程序 “Human NK Negative Selection 19055 and high recover” (加入 50 μ L/mL 混合物, 加入 100 μ L/mL 微粒子, 培育 10 分钟和 5 分钟, 进行 1×2.5 分钟的分离) 进行自动分离。由此收集 CD56⁺CD3⁻ 群并用于进一步分析。

[0372] 自然杀伤细胞的扩增。通常, 如下扩增自然杀伤细胞。基于 Yssel 等人, J. Immunol. Methods 72(1) : 219-227 (1984) 和 Litwin 等人, J. Exp. Med. 178(4) : 1321-1326 (1993) 中描述的方案的改进, 制备用于自然杀伤细胞培养的初始培养基。简而言之, 初始培养基包含具有 10% FCS (Hyclone) 的 IMDM (Invitrogen), 其包含以下终浓度的试剂: 35 μ g/ml 转铁蛋白 (Sigma-Aldrich)、5 μ g/ml 胰岛素 (Sigma-Aldrich)、 2×10^{-5} M 乙醇胺 (Sigma-Aldrich)、1 μ g/ml 油酸 (Sigma-Aldrich)、1 μ g/ml 亚油酸 (Sigma-Aldrich)、0.2 μ g/ml 棕榈酸 (Sigma-Aldrich)、2.5 μ g/ml BSA (Sigma-Aldrich) 和 0.1 μ g/ml 植物凝集素 (PHA-P, Sigma-Aldrich)。将 CD56⁺CD3⁻ NK 细胞以 2.5×10^5 个活细胞 /mL 初始培养基 (加入 200iu/mL 的 IL-2 (R&D Systems)) 重悬在细胞培养物处理的 24 孔板或 T 烧瓶中。将丝裂霉素 C- 处理的异体 PBMC 和 K562 细胞 (慢性粒性白血病细胞系) 作为滋养细胞加入到初始培养基中, 最终浓度为 1×10^6 /mL。在 5% CO₂ 中, 于 37°C 下, 培养 NK 细胞 5-6 天。在 5-6 天后, 每 3-4 天向所述培养物中加入等体积的维持培养基 (含有 10% FCS、2% HumanAB 血清、抗生素、L- 谷氨酰胺和 400 单位 IL-2/mL 的 IMDM)。在第 21 天, 收集 NK 细胞。

[0373] 来自胎盘的中间体自然杀伤细胞的表征。将供体匹配的 HPP 和 CB 解冻, 用 FACS 缓冲液 (含有 5% FBS 的 RPMI-1640) 洗涤所述细胞。然后, 按照制造商的说明, 使用 ROBOSEP® 磁分离系统 (StemCell Technologies) 用 CD56 微珠富集自然杀伤细胞。用下述抗体 (BD Bioscience, 如果没有另外说明的话) 对 CD56 富集的自然杀伤细胞群进行染色以进行免疫表型的表征: 偶联 PE-Cy-7 的抗 -CD56、抗 -CD3APC Cy7、抗 -CD 16FITC、抗 -NKG2D APC、

抗-NKp46APC、抗-CD94PE(R&D)、抗-NKB1PE、和抗-KIR-NKAT2PE。在NK祖细胞中, NKG2D和NKp46为不存在的标记物,或显示出表达减少,但在完全分化的NK细胞中存在NKG2D和NKp46。参见Freud等人,“Evidence forDiscrete States of Human Natural Killer Cell Differentiation In Vivo”, J.Exp.Med. 203(4):1033-1043(2006);Eagle & Trowsdale, “Promiscuity and the SingleReceptor:NKG2D”,Nature Reviews Immunology Published online,2007年8月3日;Walzer等人,“Natural Killer Cells:From CD3⁻NKp46⁺to Post-GenomicsMeta-Analyses”,Curr.Opinion Immunol.19:365-372(2007)。如表1所示,在来自HPP的富集的CD56⁺细胞群和来自脐带血(CB)的HLA-匹配的CD56⁺细胞群之间,KIR3DL1、KIR2DL2/L3、NKG2D、NKp46和CD94的表达没有显著地不同。

[0374] 表1. 具有某些标记物组合的NK细胞的百分数。3个样品的平均值。

	平均值(%)		P 值
	CB	HPP	
CD3 ⁻ CD56 ⁺	0.6	0.7	0.799
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	53.9	58.7	0.544
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	46.1	41.3	0.544
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR3DL1 ⁺	5.8	7.3	0.762
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR2DL2/L3 ⁺	10.7	9.9	0.89
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D ⁺	60.3	58.5	0.865
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD94 ⁺	74.6	76.8	0.839

[0376] 6.2. 实施例2:来自混合的胎盘灌洗液和脐带血的胎盘中间体自然杀伤细胞的表征

[0377] 混合脐带血和胎盘灌洗液的供体匹配的单核细胞(混合体),并用FACS缓冲液(含有5%FBS的RPMI-1640)洗涤一次,并使用表2中列出的抗体,在BDFACSCanto(BD Biosciences)上进行免疫表型表征。用FlowJo软件(Tree Star)分析数据。

[0378] 表2:在免疫表型表征中使用的抗体列表

[0379]

项目	销售商	目录号
FITC 抗-人 CD3	BD Bioscience	555332
FITC 抗-人 CD3	Miltenyi	130-080-401
APC-Cy7 抗-人 CD3	BD Bioscience	557832
FITC 抗-人 CD16	BD Bioscience	555406
PE-Cy5 抗-人 CD16	BD Bioscience	555408

PE 抗 - 人 CD56	BD Bioscience	555516
PE 抗 - 人 CD56	Miltenyi	130-090-755
PE-CY5 抗 - 人 CD56	BD Bioscience	555517
PE-Cy7 抗 - 人 CD56	BD Bioscience	557747
PE 抗 - 人 CD94	R&D	FAB-1058P
PE 抗 - 人 KIR-NKAT2(2DL2/L3)	BD Bioscience	556071
PE 抗 - 人 NKb1(3DL1)	BD Bioscience	555967
APC 抗 - 人 NKG2D	BD Bioscience	558071
APC 抗 - 人 NKp46	BD Bioscience	558051
PE 抗 - 人 CD226	BD Bioscience	559789
PE 抗 - 人 NKp44	BD Bioscience	558563
PE 抗 - 人 NKp30	BD Bioscience	558407
PE 抗 - 人 2B4	BD Bioscience	550816
同型 FITC 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340755
同型 FITC 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	556577
同型 PE 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340761
同型 PE 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	555743
同型 PerCP 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340762
同型 PE-Cy5 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	555744
同型 APC 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340754
同型 APC 小鼠 IgG2a	BD Bioscience	555576
同型 APC-Cy7 小鼠 IgG1	BD Bioscience	348802
同型 PE-Cy7 小鼠 IgG1	BD Bioscience	348798

[0380] 胎盘 NK 细胞和外周血液 (PB)NK 细胞的免疫表型的表征。将 NK 细胞分成两个主要的组 :CD56⁺CD16⁺NK 细胞和 CD56⁺CD16⁻细胞。CD56⁺CD16⁺NK 细胞具有大量溶细胞颗粒且高

度表达 CD16, 因此, 能够激发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。相反, CD56⁺CD16⁻NK 细胞具有非常少的溶细胞颗粒, 低水平表达或不表达 CD16, 但在活化时能够生成细胞因子和趋化因子。每种 NK 细胞显示出活化和抑制受体的不同组合, 所述受体包括杀伤免疫球蛋白样受体 (KIR, 例如 KIR3DL1 和 KIR2DL2/3)、自然细胞毒性受体 NCR (例如 NKp30、NKp44 和 NKp46)、杀伤细胞凝集素样受体 (KLR; 例如 CD94、NKG2D)、2B4 和 CD226。

[0381] 使用针对特定 NK 受体的荧光偶联的单克隆抗体对胎盘 NK 和外周血液 NK 细胞进行 FACS 分析。在表征的 11 个 NK 亚组中, 在胎盘 NK 和外周血液 NK 细胞之间, 11 个 NK 亚组的七个亚组 (CD3⁻CD56⁺CD16⁻、CD3⁻CD56⁺CD16⁺、CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/3⁺、CD3⁻CD56⁺NKp46⁺、CD3⁻CD56⁺NKp30⁺、CD3⁻CD56⁺2B4⁺、和 CD3⁻CD56⁺CD94⁺) 中的细胞数显示出显著性差异 ($p < 0.05$) (相当于 64% 的差异) (表 3A; 也可参见表 3B 和 3C)。

[0382] 表 3A. 在 16 个单元的混合的供体 - 匹配的脐带血和人胎盘灌洗液 (混合体) 和 13 个单元的外周血液 (PB) 中 CD3⁻CD56⁺NK 细胞的表型表征。使用双样本 t- 检验来确定胎盘和外周血液单位中的群均值是否相等。

[0383]

	混合体 (16 个单位)	PB(13 个单位)	
表面标记物	平均值%	平均值%	P 值
CD3 ⁻ CD56 ⁺	2.2	2.4	0.728
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	60.9	21.4	0.000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	39.1	78.6	0.000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR3DL1	12.3	7.1	0.099
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR2DL2/L3	21.9	9.5	0.004
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D	42.1	29.9	0.126
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp46	7.0	18.9	0.011
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD226	16.0	26.7	0.135
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp44	9.5	4.9	0.073
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp30	39.1	19.0	0.006
CD3 ⁻ CD56 ⁺ 2B4	11.1	4.5	0.019
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD94	71.3	26.2	0.000

[0384] 表 3B 和 3C 显示了独立的试验中, 在 16 个单元的混合的供体 - 匹配的脐带血和人胎盘灌洗液 (混合体) 和 13 个单元的外周血液 (PB) 中的 CD3⁻CD56⁺CD16⁻ 和 CD3⁻CD56⁺CD16⁺NK

细胞的表型表征。

[0385] 表 3B

[0386]

	混合体	PB	
表面标记物	平均值%	平均值%	P 值
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻	62.3	14.1	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ KIR3DL1	7.8	1.5	0.004
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NKG2D	43.5	42.7	0.941
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ KIR2DL2/L3	13.6	2.4	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NKp46	6.7	43.6	0.001
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ CD94	69.8	48.5	0.057
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ CD226	7.6	4.9	0.068
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NKp44	3.4	0.6	0.076
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ NKp30	46.7	22.0	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁻ 2B4	3.7	0.5	0.078

[0387] 表 3C

[0388]

	混合体	PB	
表面标记物	平均值%	平均值%	P 值
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	37.7	85.9	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ KIR3DL1	21.5	8.9	0.014
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NKG2D	42.1	28.5	0.066
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ KIR2DL2/L3	34.5	12.1	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NKp46	10.4	14.5	0.242
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD94	72.9	23.8	0.000
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD226	35.5	32.6	0.347

[0389]

CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NKp44	22.6	6.4	0.016
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ NKp30	45.7	19.7	0.000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺ 2B4	31.2	6.1	0.008

[0390] 60.9%的胎盘 NK 细胞是 CD56⁺CD16⁻ (来自胎盘的中间体自然杀伤 (PINK) 细胞), 而仅仅 21.4%的外周血液 NK 细胞是 CD56⁺CD16⁻ 的。在培养 21 天后, 在胎盘和外周血液 NK 细胞之间, 11 个 NK 亚组中的四个亚组 (CD3⁻CD56⁺KIR2DL2/3⁺、CD3⁻CD56⁺NKp46⁺、CD3⁻CD56⁺NKp44⁺ 和 CD3⁻CD56⁺NKp30⁺) 的百分比显示出显著性差异 ($p < 0.05$) (表 4)。

[0391] 表 4 来源于 12 个单元的混合的供体 - 匹配的脐带血和人胎盘灌洗液 (混合体) 和 9 个单元的外周血液 (PB) 的 21 天培养的 NK 细胞的表型表征。使用双样本 t- 检验来确定组合和外周血液单位中的群均值是否相等。

[0392]

	混合体 (16 个单位)	PB(13 个单位)	
表面标记物	平均值%	平均值%	P 值
CD3 ⁻ CD56 ⁺	2.2	2.4	0.728
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	60.9	21.4	0.000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	39.1	78.6	0.000
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR3DL1	12.3	7.1	0.099
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR2DL2/L3	21.9	9.5	0.004
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D	42.1	29.9	0.126
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp46	7.0	18.9	0.011
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD226	16.0	26.7	0.135
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp44	9.5	4.9	0.073
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp30	39.1	19.0	0.006
CD3 ⁻ CD56 ⁺ 2B4	11.1	4.5	0.019
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD94	71.3	26.2	0.000

[0393] 另外, 在独立试验中确定, 在培养 21 天后, 胎盘和外周血液 NK 细胞表现出独特的细胞因子特征, 特别是对于 IL-8, 如通过 Luminex 所测定 (表 5)。

[0394] 表 5

[0395]

细胞因子	PB(pg/mL)	混合体 (pg/mL)
IL-13	1.26	1.89
IL-8	6.61	15.77
IL-10	1.26	2.23
TNF α	0.28	0.34
Mcp-1	10.49	11.32

[0396] 胎盘 NK 细胞和外周血液 NK 细胞的微小 RNA 表征。使用 MIRVANA™ miRNA 分离试剂盒 (Ambion, 目录号 1560) 从分离的或扩增的 NK 细胞制备微小 RNA (miRNA)。NK 细胞 (0.5 至 1.5×10^6 个细胞) 在变性的裂解缓冲液中裂解。接着, 对样品进行酸-苯酚+氯仿抽提以分离高度富集小 RNA 的 RNA。加入 100% 的乙醇以使样品含有 25% 的乙醇。当该裂解产物/乙醇混合物穿过玻璃纤维滤器时, 大的 RNA 无法移动, 而小 RNA 被收集在滤液中。然后, 将滤液的乙醇浓度增加至 55%。使该混合物穿过第二个玻璃纤维滤器, 在此, 小 RNA 变得无法移动。洗涤该 RNA 若干次, 用低离子强度溶液洗脱。通过测量其在 260 和 280nm 的吸光度来测定回收的小 RNA 的浓度和纯度。

[0397] 表 6 中显示了被发现是 PINK 细胞所特有的 miRNA。发现一种 miRNA (命名为 hsa-miR-199b) 是外周血液 NK 细胞所特有的。

[0398] 表 6. 经由 qRT-PCR 对 pINK 细胞和 PB NK 细胞的 miRNA 表征

[0399]

miRNA ID	Sanger 录入号	序列
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aaccguagauccgaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggaucgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uuccuuuugucauccuucgcu
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucugggcccuuccuccag
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucauagcugagguc

hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucuccaaaagaaagcacuuucug
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcaucccuuuagaguguu
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcauccuuuuagagugu
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuuuccuuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuuuccuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccuccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaaagugcuucccuuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaaagugcuucccuuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc
hsa-miR-566	MIMAT0003230	gggcgcugugaucccaac
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aaccgguagaucggaucuuugug

[0400] 经培养的胎盘 NK 细胞和未培养的 NK 细胞的免疫表型的表征。通过大量免疫表型研究和细胞毒性试验来评价经培养的 PINK 细胞的整体性质。为了测定扩增的 NK 细胞的表型,分析了 NK 受体 (NKR) 例如 KIR、NKG2D、NKp46、NKp44、和 2B4 的表达。通过用 PKH26 标记肿瘤细胞 (K562 细胞),然后将其与 PINK 细胞共同培养 4 小时来进行细胞毒性试验。从第 0 天至第 21 天, NKG2D 的表达从 $60.9\% \pm 4.8\%$ 增加至 $86\% \pm 17.4\%$ (p 值为 0.024); NKp46 的表达从 $10.5\% \pm 5.4\%$ 增加至 $82.8\% \pm 9.0\%$ (p 值为 0.00002); NKp44 的表达从 $9.6\% \pm 6.5\%$ 增加至 $51.6\% \pm 27.5\%$ (p 值为 0.022); 且 2B4 的表达从 $13.0\% \pm 7.1\%$ 减少至 $0.65\% \pm 0.5\%$ (p 值为 0.009%) (表 7)。在这些培养条件下,在 21 天的扩增期间,抑制性 KIR,包括 KIR3DL1 (杀伤细胞免疫球蛋白样受体,三个结构域,长胞质尾 1,抑制性受体) 和 KIR2DL2/L3 (杀伤细胞免疫球蛋白样受体,两个结构域,长胞质尾 2 和长胞质尾 3;抑制性受体) 保持不受影响。NKR 表达的变化进一步与针对 K562 细胞的溶细胞活性在第 21 天相比于第 14 天的显著增加相关 ($63\% \pm 15\%$ 对 $45\% \pm 4\%$, p 值为 0.0004)。这些发现带来了对于 NK 细胞中与 NK 细胞的细胞毒活性密切相关的推定标记物的鉴别。

[0401] 表 7. 在 21 天培养前后 pINK 细胞的表型表征。计算了 5 个供体的群均值的标准偏差 (Stdev)。

[0402]

	第 0 天		第 21 天	
	平均值%	标准偏差	平均值%	标准偏差
CD3 ⁻ CD56 ⁺	2.9	1.1	85.5	8.6
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁻	62.6	20.2	27.8	8.3
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD16 ⁺	37.4	20.2	72.2	8.3
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR3DL1 ⁺	22.7	4.2	20.0	16.7
CD3 ⁻ CD56 ⁺ KIR2DL2/L3 ⁺	28.4	4.2	29.6	6.4
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D ⁺	60.9	4.8	86.0	17.4
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp46 ⁺	10.5	5.4	82.8	8.9
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD226 ⁺	19.5	7.4	14.1	13.3
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp44 ⁺	9.6	6.5	51.6	27.5
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKp30 ⁺	58.9	7.0	76.5	19.4
CD3 ⁻ CD56 ⁺ 2B4 ⁺	13.0	7.1	0.6	0.5
CD3 ⁻ CD56 ⁺ CD94 ⁺	79.7	4.9	63.9	19.4

[0403] 用基于脂质的蛋白固定技术和线性离子俘获 LC/MS 对经培养的胎盘 NK 细胞和经培养的外周血液 NK 细胞的膜蛋白组学进行表征。膜蛋白纯化:在细胞裂解之前,将培养 21 天的来自混合的胎盘灌洗液和脐带血细胞的胎盘自然杀伤细胞及 PB 的 NK 细胞与蛋白酶抑制剂混合物溶液 (P8340, SigmaAldrich, St. Louis, MO ;包含 4-(2-氨基乙基) 苯磺酰氟 (AEBSF)、胃酶抑素 A、E-64、抑氨肽酶素 b、亮肽素和抑酶肽,不含金属螯合剂) 培育 15 分钟。然后,通过加入 10mM HCl 溶液而不加入去污剂,裂解所述细胞,并且以 400g 离心 10 分钟至沉淀,并除去细胞核。将去核后的上清液转移到超离心管中,并且以 100,000g 在具有 T-1270 转子的 WX80 超离心机 (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC) 上离心 150 分钟,产生膜蛋白沉淀。

[0404] 蛋白脂质体的生成、固定和消化:使用 NANOXIS[®] 缓冲液 (10mM Tris, 300mM NaCl, pH 8) 洗涤所述膜蛋白沉淀若干次。将膜蛋白沉淀悬浮在 1.5mL NANOXIS[®] 缓冲液中,并在冰上使用 VIBRA-CELL(TM) VC505 超声处理器 (Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT) 尖端超声 20 分钟。通过用 FM1-43 染料染色 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和用荧光显微镜观察来测定所述蛋白脂肪体的大小。通过 BCA 试验 (Thermo Scientific) 来确定所述蛋白脂质体悬浮液的蛋白浓度。然后,使用标准移液器吸头将该蛋白脂质体注射至 LPI(TM) FlowCell (Nanoxis AB, Gothenburg, Sweden) 上,使其无法移动 1 小时。在无法移动后,进行一系列洗涤步骤,将胰蛋白酶 (Princeton Separations, Adelphi, NJ) 以 5 μg/ml 直接注射至 LPI(TM) Flow Cell 上。在 37℃ 下,培养小片过夜。之后,从该小片洗脱胰蛋白酶消化后的肽,然后使用 Sep-Pak 柱 (Waters Corporation, Milford, MA) 脱盐。

[0405] 强阳离子交换 (SCX) 分馏:将胰蛋白酶消化后的肽重新配制在 0.1% 的甲酸 / 水溶液中,并加样至强阳离子交换 (SCX) TOP-TIP[™] 柱 (PolyLC, Columbia, MD) 上,用 30 μm

的 polysufoETHYL aspartamide SCX 填充材料装填移液器吸头。使用甲酸铵缓冲液, pH 2.8(10mM-500mM) 的阶跃梯度从 SCX TOP TIP™ 洗脱肽。使用 speed-vac 系统干燥各 SCX 馏分,并用 5%的乙腈、0.1%的甲酸重配以准备用于下游 LC/MS 分析。

[0406] LTQ 线性离子俘获 LC/MS/MS 分析:使用 180 分钟的梯度(缓冲液 A:水,0.1%甲酸;缓冲液 B:乙腈,0.1%甲酸),在 0.2mm×150mm 3 μm 的**200Å** MAGIC C18 柱(Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA) 上分离各 SCX 馏分,所述柱直接连接到轴向去溶剂化真空辅助纳米毛细电喷雾电离(ADVANCE)源(Michrom Bioresources, Inc.)。所述 ADVANCE 源达到了与常规纳米 ESI 相当的灵敏度,但其以相对较高的流速 3 μL/分钟运行。在 LTQ 线性离子阱质谱仪(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 上分析洗脱的肽,所述质谱仪在每次全扫描质谱后进行十次数据依赖性的 MS/MS 扫描。

[0407] 生物信息学:在 SORCERER™ SOLO™ 工作站(Sage-N Research, San Jose, CA) 上使用 SEQUEST 算法工具,在 IPI 人类数据库中对六个原始文件(对应于从各肿瘤细胞系(AML, CML) 收集的 6 种盐馏分)进行单次检索。规定肽质量允差为 1.2amu,规定甲硫氨酸的氧化为差异修饰(differential modification),且规定氨基甲酰基甲基化为静态修饰(static modification)。使用 Trans-Proteomic Pipeline(TPP) 的 Scaffold 软件工具来整理和解析膜蛋白质组学数据。如果蛋白被确定为 95%肽概率、95%蛋白概率和 1 个特有的肽,则进行蛋白分析。使用公司内部研发的常规 Perl 程序进行膜蛋白质组学数据集之间的比较。

[0408] 分析显示,相对于从外周血液 NK 细胞鉴定出的膜蛋白,从经培养的胎盘 NK 细胞鉴定出的 8 个膜蛋白是特有的。参见表 8。进一步,相对于经培养的胎盘 NK 细胞,从外周血液 NK 细胞鉴定出特有的 8 个膜蛋白。参见表 8。发现仅有 10 个鉴定出的膜蛋白是经培养的胎盘 NK 细胞和外周血液 NK 细胞共有的。

[0409] 表 8

[0410]

胎盘 NK 细胞的特异性蛋白	PB NK 细胞的特异性蛋白
氨肽酶 N	成纤维细胞生长因子受体 4 前体
载脂蛋白 E	免疫-相关的核苷酸 4-样 1 蛋白
Atrophin-1 相互作用蛋白 1	整联蛋白 α-L 前体
Innexin inx-3	整联蛋白 β-2 前体
整联蛋白 α-2 前体	整联蛋白 β-4 前体
整联蛋白 β-5 前体	膜-结合的溶解性胞壁质转糖酶 D 前体
肥大细胞表面糖蛋白 GP49B 前体	Oxysterol 结合蛋白相关蛋白 8
Ryanodine 受体 1	穿孔素 1 前体

[0411] 6.3. 实施例 3:自然杀伤细胞对肿瘤细胞的细胞毒性

[0412] 该实施例证实了胎盘中间体自然杀伤细胞对肿瘤细胞有细胞毒性。如在细胞毒性试验和 NK 细胞的细胞因子分泌 Luminex 分析中所证实的,来自 HPP 的 PINK 细胞对急性髓性白血病细胞有细胞毒性。

[0413] 在细胞因子分泌试验中,将来自 HPP 的 CD56 微珠富集的 NK 细胞与 KG-1a 急性髓性白血病细胞按照 1 : 1 的比例混合。在培养 24 小时后,收集上清液,并对其进行 IFN- γ 和 GM-CSF 分泌的 Luminex 分析。如图 2 所示,在将 CD56⁺ 富集的 HPP 细胞与 KG-1a 细胞共同培养 24 小时后,观察到 IFN- γ 和 GM-CSF 的水平增加。

[0414] PINK 细胞的细胞毒性

[0415] 在使用 PINK 细胞的细胞毒性试验中,用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯 (CFSE) 标记靶肿瘤细胞。CFSE 是一种对细胞无毒的活体染料,且其在细胞分裂期间可分配至子细胞中。随后将所述细胞置于 96-孔 U 型底组织培养板中,并在补充了 10% FBS 的 RPMI 1640 中,按照 20 : 1、10 : 1、5 : 1 和 1 : 1 的效应细胞 - 靶细胞 (E : T) 比例,将所述细胞与新鲜分离的 CD56⁺CD16⁻PINK 细胞共同培养。在 4 小时的培养时间之后,收集细胞,并通过流式细胞术检测 CFSE 的存在。使用从不含 NK 细胞的培养物中回收的靶细胞数作为参考。细胞毒性定义为 : $(1 - \text{CFSE}_{\text{样品}} / \text{CFSE}_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。在 20 : 1 比例观察到显著的肿瘤细胞细胞毒性。参见图 3。

[0416] 肿瘤细胞对经培养的 PINK 细胞的易感性

[0417] 乳酸脱氢酶 (LDH) - 释放试验。使用 CYTOTOX 96 [®] 细胞毒性比色试验试剂盒 (Promega, 目录号 G1780) 进行该 LDH - 释放试验。在该试验中,经培养的 NK 细胞 (包含源自匹配的 HPP/UCB 的 CD56⁺CD16⁻ 细胞和 CD56⁺CD16⁺ 细胞的组合) 为效应细胞,肿瘤细胞为靶细胞。将效应细胞和靶细胞置于 96-孔 U 型底组织培养板中,并在补充了 2% 人 AB 血清 (Gemini, 目录号 100-512) 的不含酚红的 100 μ l RPMI 1640 (Invitrogen, 目录号 11835-030) 中,按照各种效应细胞 - 靶细胞 (E : T) 比例进行培养。在 5% CO₂ 中,于 37°C 培育培养物 4 小时。在培育后,将 50 μ l 上清液转移到酶标板中,按照制造商的要求检测 LDH 活性,并在 ELISA 读板仪 (Synergy HT, Biotek) 中测量在 490nm 的吸收。根据下述等式计算细胞毒性程度 : % 细胞毒性 = (样品 - 效应细胞自发的 - 靶细胞自发的) / (靶细胞的最大值 - 靶细胞自发的) $\times$ 100。

[0418] 某些肿瘤类型可较其它肿瘤类型对 NK 细胞更具响应性。为了分析肿瘤细胞对培养的 PINK 细胞的易感性,在 LDH 释放试验中,分析与 PINK 细胞共同培养的十二种不同肿瘤细胞系。所述 12 种肿瘤细胞系包括人慢性髓性白血病 (CML)、淋巴瘤、成视网膜细胞瘤 (RB)、和多发性骨髓瘤 (MM) (表 9)。在共同培养 4 小时后,通过 LDH 释放试验来测量 NK 细胞的细胞毒性。

[0419] 表 9. ATCC 肿瘤细胞系

[0420]

名称	描述
CCRF-CEM	人白血病
KG-1	人急性髓细胞样白血病

[0421]

KG-1A	人急性髓细胞样白血病
K562	人慢性髓细胞样白血病
KU812	人慢性髓细胞样白血病
U-937	人组织细胞性淋巴瘤
WERI-RB-1	人成视网膜细胞瘤
HCC2218	人乳腺癌
RPMI 8226	人多发性骨髓瘤
HCT116	人结肠直肠癌
HT29	人结肠直肠腺癌
U266	人多发性骨髓瘤

[0422] 按照 10 : 1 的效应细胞对靶细胞 (E : T) 比例,观察到经培养的 PINK 细胞对以下细胞具有显著细胞毒性 :对 K562 细胞 (CML) 为 $88.6\% \pm 5.6\%$;对 U937 细胞 (淋巴瘤) 为 $89.2\% \pm 9.8\%$;对 WERI-RB-1 细胞 (RB) 为 $73.3\% \pm 11.8\%$;对 RPMI8226 细胞 (MM) 为 $61.3\% \pm 1.3\%$;和对 U266 细胞 (MM) 为 $57.4\% \pm 4.7\%$ (表 10)。

[0423] 表 10. 肿瘤细胞对经培养的 PINK 细胞的差异易感性。计算 3 个供体的平均细胞毒性的平均数标准误差 (S. E. M.)。

[0424]

细胞系	%细胞毒性	S. E. M
CCRF-CEM	7.6	1.2
KG-1	20.5	1.5
KG-1a	60.0	3.2
K562	88.6	5.6
KU812	40.3	8.2
U-937	89.2	9.8
WERI-RB-1	73.3	11.8
RPMI8226	61.3	1.3

U266	57.4	4.7
HCT-116	61.0	5.1
HCC2218	14.8	3.7
HT29	45.6	6.0

[0425] 用来那度胺和 Pomalidomide 处理增强了 PINK 细胞的细胞毒性

[0426] RNA 的分离和纯化。使用 RNAQUEOUS[®]-4PCR 试剂盒 (Ambion, 目录号 AM1914) 从分离的或扩增的 NK 细胞制备 RNA。简言之, 在胍盐裂解溶液中裂解 NK 细胞 (0.5 至 1.5×10^6 个细胞)。随后将样品裂解物与乙醇溶液混合, 并使其通过基于二氧化硅的滤器, 该滤器选择性地和定量地结合 mRNA 和更大的核糖体 RNA; 而不定量结合非常小的 RNA, 例如 tRNA 和 5S 核糖体 RNA。随后洗涤滤器以除去残留的 DNA、蛋白及其它污染物, 用包含痕量 EDTA (用于螯合重金属) 而不含核酸酶的水洗脱 RNA。将二氧化硅滤器放在小柱中, 将该小柱安装到由试剂盒提供的不含 RNase 的微离心管中。通过离心或真空压力使样品裂解物、洗涤溶液和洗脱溶液通过所述滤器。在从滤器洗脱后, 用所述试剂盒提供的超高纯的 DNase 1 处理 RNA, 以除去痕量的 DNA。最后, 通过也由所述试剂盒提供的试剂除去 DNase 和二价阳离子。通过测定其在 260nm 和 280nm 的吸光度来确定回收的 RNA 的浓度和纯度。

[0427] 定量实时 (q RT-PCR) 分析。可将分离的 RNA 用于使用 TAQMAN[®] 反转录试剂 (Applied Biosystems, 目录号 N8080234) 的 cDNA 合成, 随后使用人免疫阵列 (Applied Biosystems, 目录号 4370573) 和人微小 RNA 阵列 (Applied Biosystems, 目录号 4384792) 通过 7900HT 快速实时 PCR 系统进行实时 PCR 分析。

[0428] 来那度胺和 pomalidomide 是沙立度胺的化学类似物, 其具有增强的抗癌和抗炎活性。为了研究来那度胺和 pomalidomide 是否可以增强 PINK 细胞的细胞毒性, 用来那度胺或 pomalidomide 预处理离体培养的 (第 19 天) PINK 细胞, 接着将所述细胞与靶标结肠直肠癌细胞系 HCT-116 共同培养。经来那度胺处理的 NK 细胞表现出 42.1% 的细胞毒性, 经 pomalidomide 处理的 NK 细胞显示出 47.4% 的细胞毒性, 而作为对照的未经处理的 PINK 细胞仅仅显示出 24.3% 的细胞毒性。

[0429] 定量实时 PCR (qRT-PCR) 和流式细胞术分析显示, pomalidomide 激发的 NK 细胞细胞毒性的增强与粒酶 B (GZMB) 的基因表达增加 (增加 $60\% \pm 1.7\%$) (表 11) 和 GZMB- 阳性 NK 细胞的百分数增加 (增加 25%) 有关。另外, 在经来那度胺 (增加 $232\% \pm 1.6\%$) 和 pomalidomide (增加 $396\% \pm 0.3\%$) - 处理的 PINK 细胞中, GM-CSF 的表达增加 (表 11A、11B)。

[0430] 表 11A, 11B. 与未经处理的细胞相比, 经来那度胺和 pomalidomide 处理的培养的 PINK 细胞的 qRT-PCT 分析。11A: 对于所列基因, 经来那度胺处理的和未经来那度胺处理的样品之间基因表达的倍数变化。使用配对 t- 检验来确定在经来那度胺处理的和未经来那度胺处理的样品中的倍数变化是否相等。11B: 对于所列 25 个基因, 经 pomalidomide 处理的和未经 pomalidomide 处理的样品之间基因表达的倍数变化。使用配对 t- 检验来确定在经处理的和未经处理的样品中的变化倍数是否相等。

[0431] 表 11A

[0432]

	运载体	来那度胺	运载体 - 标准偏差	来那度胺 - 标准偏差	P 值
BAX	1	1.39	0.06	0.02	0.05
CCL5	1	1.24	0.11	0.07	0.04
CCR5	1	0.9	0.07	0.08	0.02
CD68	1	4.04	0.05	0.13	0.01
CD8A	1	1.3	0.01	0.02	0.02
CSF2	1	2.32	0.14	0.02	0.02
FAS	1	1.11	0.02	0.04	0.04
GUSB	1	1.13	0.04	0.07	0.05
IL2RA	1	1.26	0.03	0.01	0.03
TNFRSF18	1	0.7	0.1	0.16	0.04

[0433] BAX-BCL2- 相关 X 蛋白

[0434] CCL5- 趋化因子 (C-C 基序) 配体 5

[0435] CCR5- 趋化因子 (C-C 基序) 受体 5

[0436] CSF2- 集落刺激因子 2 (粒细胞 - 巨噬细胞)

[0437] FAS-TNF 受体超家族, 成员 6

[0438] GUSB- 葡糖醛酸糖苷酶 β [0439] IL2RA- α 白细胞介素 2 受体

[0440] TNFRSF18- 肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 18

[0441] 表 11B

[0442]

	运载体	pomalidomide	运载体 - 标准偏差	pomalidomide- 标准偏差	P 值
ACTB	1	0.77	0.01	0	0.01

BAX	1	2.23	0.06	0	0.01
CCL2	1	5.46	0.01	0.37	0.02
CCL3	1	2.2	0.04	0.16	0.02
CCL5	1	1.78	0.11	0.04	0.02
CCR5	1	0.68	0.07	0	0.05
CD68	1	8.74	0.05	0.19	0
CD80	1	1.59	0.13	0.19	0.02
CD8A	1	2.39	0.01	0.08	0.01
CSF1	1	1.41	0.07	0.05	0.01
CSF2	1	3.96	0.14	0	0.01
ECE1	1	1.56	0.06	0.12	0.02
FAS	1	1.34	0.02	0.03	0.01
GNLY	1.01	1.96	0.18	0.02	0.05
GUSB	1	1.76	0.04	0.01	0.01
GZMB	1	1.59	0.06	0.02	0.03
IL10	1.02	1.52	0.31	0.22	0.04
IL1A	1.01	2.61	0.19	0.12	0.01
IL2RA	1	1.58	0.03	0.06	0.01
IL8	1	1.62	0.04	0.06	0.04
LTA	1	2.88	0.02	0.21	0.02
PRF1	1	1.17	0.07	0.1	0.05
PTGS2	1	1.68	0.01	0.05	0.02
SKI	1	1.96	0.04	0.02	0.01

TBX21	1. 01	2. 05	0. 14	0. 2	0. 01
-------	-------	-------	-------	------	-------

- [0443] ACTB- β -肌动蛋白
- [0444] BAX-BCL2- 相关 X 蛋白
- [0445] CCL2- 趋化因子 (C-C 基序) 配体 2
- [0446] CCL3- 趋化因子 (C-C 基序) 配体 3
- [0447] CCL5- 趋化因子 (C-C 基序) 配体 5
- [0448] CCR5- 趋化因子 (C-C 基序) 受体 5
- [0449] CSF1- 集落刺激因子 1 (巨噬细胞)
- [0450] CSF2- 集落刺激因子 2 (粒细胞 - 巨噬细胞)
- [0451] ECE11- 内皮素转化酶 1
- [0452] FAS-TNF 受体超家族, 成员 6
- [0453] GNLY- 粒溶素
- [0454] GUSB- 葡糖醛酸糖苷酶 - β
- [0455] GZMB- 粒酶 B (粒酶 2, 细胞毒性 T- 淋巴细胞 - 相关丝氨酸酯酶 1)
- [0456] IL1A- α 白细胞介素 1
- [0457] IL2RA- 白细胞介素 2 受体 - α
- [0458] IL8- 白细胞介素 8
- [0459] IL10- 白细胞介素 10
- [0460] LTA- 淋巴细胞毒性 α (TNF 超家族, 成员 1)
- [0461] PRF1- 穿孔素 1 (成孔蛋白)
- [0462] PTGS2- 前列腺素 - 内过氧化物合酶 2 (前列腺素 G/H 合成酶和环氧合酶)
- [0463] SKI-v-ski 肉瘤病毒癌基因同系物 (鸟类的)
- [0464] TBX21-T-box 21
- [0465] 混合的自然杀伤细胞的细胞毒性
- [0466] 在独立的细胞毒性试验中, 经培养的来源于供体匹配的脐带血和胎盘灌洗液的 NK 细胞为效应细胞, 而肿瘤细胞为靶细胞。用 PKH26 (Sigma-Aldrich 目录号 PKH26-GL) 标记肿瘤细胞 (参见, 例如 Lee-MacAry 等人, J. Immunol. Meth. 252(1-2):83-92(2001)), PKH26 由于其亲脂性脂肪族残基而插入到细胞质膜中, 随后将所述肿瘤细胞置于 96- 孔 U 型底组织培养板中, 在 200 μ l 补充了 10% FBS 的 RPMI 1640 中, 按照各种效应细胞 - 靶细胞 (E : T) 比例, 与经培养的 NK 细胞共同培养。在 5% CO₂ 中, 于 37°C 培育该培养物 4 小时。在培育后, 收集细胞, 并将 T0-PR0-3 (Invitrogen 目录号 T3605), 一种膜不可渗透的 DNA 染色剂, 加入到培养物中至最终浓度为 1 μ M, 随后使用 BD FACSCanto 进行 FACS 分析。细胞毒性可以表示为死细胞 (PKH26⁺T0-PR0-3⁺) 在全部 PKH26⁺ 靶肿瘤细胞内的百分数。
- [0467] 在该细胞毒性试验中, 用 PKH26 标记人慢性髓细胞样淋巴瘤 (CML) K562 细胞, PKH26 插入到细胞质膜中, 并将所述 K562 细胞置于 96- 孔 U 型底组织培养板中。在补充了 10% v/v FBS 的 RPMI 1640 中, 按照 10 : 1、5 : 1、2.5 : 1 和 1.25 : 1 的效应细胞与靶细胞 (E : T) 比例, 将培养了 21 天的胎盘 (混合体) 或外周血液 NK 细胞与 K562 细胞混合。在 4 小时的培育时间后, 收集细胞, 将 T0-PR0-3 加入到细胞培养物中, 接着用流式细胞术测

定 PKH26 和 TO-PRO-3 的存在。细胞毒性表示为 PKH26⁺TO-PRO-3⁺ 死细胞在全部 PKH26⁺ 靶肿瘤细胞内的百分数。在测试的所有 E : T 比例下, 胎盘 NK 细胞和外周血液 NK 细胞都显示出对 K562 细胞的明显毒性 (图 4)。在两个 E : T 比例 (10 : 1 和 5 : 1) 下, 观察到胎盘 NK 细胞对 K562 细胞的毒性显著高于外周血液 NK 细胞对 K562 细胞的毒性 (图 4)。

[0468] 6. 4. 实施例 4 : 人胎盘灌洗液对肿瘤细胞的细胞毒性

[0469] 本实施例证实了人胎盘灌洗液细胞对肿瘤细胞具有细胞毒性, 且来自 HPP 的所有有核细胞 (TNC-HPP) 对 KG-1a 的细胞毒性高于来自匹配的 UCB 的 TNC 的细胞毒性。将来自 HPP 或脐带血 (UCB) 的所有有核细胞与 KG-1a 细胞按照 1 : 1、5 : 1、10 : 1、20 : 1 或 100 : 1 的比例混合。在培育 24 小时或 48 小时后, 收集细胞, 并通过 FACS 分析 (BD FACSCanto, BD Bioscience) 检测 CFSE 的存在。使用单独培养的肿瘤细胞作为对照。细胞毒性定义为 : $(1 - \text{CFSE}_{\text{样品}} / \text{CFSE}_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。在 100 : 1 的比例下, 显示出显著的细胞毒性。参见图 5。

[0470] 在独立的实验中, 比较来自 HPP 的所有有核细胞的细胞毒性与来自脐带血的所有有核细胞的细胞毒性。按照 0.78 : 1、1.56 : 1、3.12 : 1、6.25 : 1、12.5 : 1、25 : 1、50 : 1 或 100 : 1 的比例, 将匹配的 TNC-HPP 或 UCB 与 KG-1a 细胞混合。在所有比例下, TNC-HPP 始终显示出较 UCB 更高的细胞毒性。参见图 6。

[0471] 在另一实验中, 在与 KG-1a 细胞培育 24 小时之前, 用 100U/mL 或 1000U/mL 的 IL-2 刺激 TNC-HPP, 同时使用 RPMI 培养基培养的 HPP 作为对照。在 6.25NK 细胞 /KG-1a 细胞及以上的比例下, IL-2 似乎增强了 TNC-HPP 的细胞毒性。参见图 7。

[0472] 如表 12 所示, 使用更广泛的肿瘤细胞类型, 使用 5×10^5 个 HPP 细胞和 1×10^4 个肿瘤细胞重复该实验。

[0473] 表 12 : 用来测量胎盘灌洗液细胞毒性作用的肿瘤细胞

[0474]

HCC2218	人原发性导管癌
CCRF-CEM	人白血病
J. RT3-T3.5	人急性 T 细胞白血病
K526	人慢性髓细胞样淋巴瘤 (CML)
KG-1	人急性髓性白血病
KG-1a	人急性髓性白血病 (AML)
KU812	人白血病 (CML)
NCI-H1417	人肺癌
SNU-CI	人结肠腺癌
U-937	人组织细胞性淋巴瘤

WERI-RB-1	人成视网膜细胞瘤
HCT-116	人结肠癌
HT-29	人结肠直肠腺癌
U266	人骨髓瘤

[0475] 当按照 50 : 1 的比例共同培养 HPP 细胞和肿瘤细胞 24 小时或 48 小时后, HPP 细胞显示出对肿瘤细胞的明显毒性。对于这两个时间段, 共同培养都引起超过 50% 的肿瘤细胞死亡。参见图 8A 和 8B。

[0476] 6. 5. 实施例 5 : 人胎盘灌洗液细胞在暴露于肿瘤细胞期间细胞因子的生成

[0477] 为了确定负责介导 HPP 细胞的抗白血病作用的主要作用机制, 使用多重 Luminex 试验, 在不同时间点对与肿瘤细胞系共同培养的 HPP 细胞的细胞因子释放特征进行了分析, 并将其与 UCB 细胞的细胞因子释放特征进行了比较。

[0478] 对培养后收集的上清液进行 Luminex 试验, 以确定 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF (目录号 HCYT0-60K-03, Millipore) 的浓度。这三种细胞因子与 NK 细胞毒性有关 (参见, 例如 Imai 等人, Blood 2005. 106(1) : 376-83)。使用 Applied Biosystems FAST 7900HT 仪器和引物, 进行定量 RT-PCR, 以检测 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 的表达。培养条件与上述的共同培养细胞毒性试验的条件相同。使用 Luminex 试验来确定细胞因子的浓度。

[0479] 确定与肿瘤细胞共同培养的 HPP 细胞对 IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 的分泌显著地高于 UCB 细胞的分泌。在一个实验中, 在存在或不存在 100U 的 IL-2 的情况下, 按照 0.78 : 1、1.56 : 1、3.12 : 1、6.25 : 1、12.5 : 1、25 : 1、50 : 1 或 100 : 1 的比例, 将 HPP 细胞与 KG-1a 细胞混合。与不存在 IL-2 相比, 在 IL-2 的存在下, TNC-HPP 显示出 IFN- γ 生成的持续增加。确定在 24 小时, IFN- γ 的水平增加了约 5-26 倍 (中值 : 16 倍); 在 48 小时, 增加了约 3-65 倍 (中值 : 27 倍), 其与细胞毒性研究得到的结果一致。参见图 9。

[0480] 在另一个实验中, 在与 KG-1a 细胞培育 24 小时之前, 用 100U/mL 或 1000U/mL IL-2 刺激 TNC-HPP, 同时使用 RPMI 培养基培养的 HPP 作为对照。在与 KG-1a 细胞共同培育之前, 在存在或不存在 IL-2 的情况下, 培养 HPP 或匹配的 UCB 细胞 24 小时。在与 K562 和 KG-1a 共同培养 48 小时的 HPP 细胞中, IFN- γ 的分泌增加最多。当用 100U/ml IL-2 处理 HPP 细胞时, 在第 24 小时和 48 小时, HPP 细胞对 KG-1a 的细胞毒性增加。当用 IL-2 处理时, HPP 细胞中 IFN- γ 的分泌水平高于匹配的 UCB 细胞。通过对来自匹配的 HPP 和 UCB 的细胞的 RT-PCR 分析确认了更高的 IFN- γ 表达。这些结果表明与 UCB 细胞相比, HPP 细胞显示出更高的抗白血病活性, 并且该更高的活性与 IFN- γ 生成的显著增加有关。

[0481] 使用表 1 中列出的肿瘤细胞系对与一组肿瘤细胞系共同培养期间 HPP 细胞和脐带血细胞中的 IFN- γ 生成进行分析。按照 50 : 1 的比例, 使用 10^4 个肿瘤细胞和 5×10^5 个 HPP 细胞共同培养 HPP 细胞和肿瘤细胞 24 小时或 48 小时。对于 CCRF-CEM、J. RT3-T3.5、K562、KG1、KG-1a、KU812、NC1-H1417、U-937 和 WER1-RB-1 细胞系, 在共同培养 24 小时时, HPP 细胞的 IFN- γ 生成的增加超过了与这些细胞系共同培养相同时间的脐带血细胞。参见图 10A。在共同培养 48 小时时, 对于所有的肿瘤细胞系, HPP 细胞的 IFN- γ 生成的增加

超过脐带血。参见图 10B。在所有肿瘤细胞系中,在 24 小时和 48 小时,K562 细胞均诱导了 HPP 细胞中 IFN- γ 生成的最大增加。对于 TNF- α 和 GM-CSF,观察到类似的结果。

[0482] 细胞周期分析证实,与单独培养的 KG-1a 细胞相比,当与 HPP 共同培养时,处于 S 期的 KG-1a 的百分比降低 30%。使用 HPP 的不同富集部分进行的进一步共同培养实验证实,HPP 的抗白血病活性极大地归因于高浓度的特有的未成熟自然杀伤细胞,所述未成熟自然杀伤细胞的特征为高水平表达 CD56⁺,而不表达 CD16。

[0483] 6.6. 实施例 6:人胎盘灌洗液细胞在体内对肿瘤细胞增殖的抑制

[0484] 6.6.1. 材料和方法

[0485] 本实施例通过使用 NOD/SCID 小鼠异种移植肿瘤模型证实了人胎盘灌洗液在体内对肿瘤细胞的功效。

[0486] KG-1 细胞的培养。将 KG-1 细胞保持在 37℃ 下,在 95% 空气 /5% CO₂ 和 100% 湿度下的 Iscove's 改良的 Dulbecco's 培养基中,该培养基补充了 20% 的胎牛血清 (生长培养基)。每隔一天更换所述培养物中的培养基,每周将细胞传代。KG-1 细胞呈悬浮生长。因此,为了更换培养基或将细胞传代,将细胞悬浮液收集在离心管中,并且在 SORVALL® HERAEUS® 转子 (零件号 75006434) 中以 2,000rpm 离心 10 分钟。弃去上清液,并将合适量的细胞沉淀重悬在生长培养基中继续培养。

[0487] 用于植入的 KG-1 细胞制剂。为了将细胞植入小鼠,如上所述通过离心收集细胞。收集细胞沉淀,并将其重悬在磷酸盐缓冲盐水中。为了确定待植入到小鼠的细胞数量,使用血细胞计数器对等分试样的细胞悬浮液进行计数。使用台盼蓝染料排除悬浮液中的死细胞。

[0488] 用于植入的 HPP 细胞制剂。为了 HPP 的贮存和解冻,将接收的样品冷冻在良好条件下的干燥运送容器中。将所述单位贮存在干燥的运送容器中,直到 2007 年 2 月 7 日解冻。在解冻当天,从冷冻干燥器中取出 HPP 单元 (每次一个),放置到自封口塑料袋中。然后,将该袋放到 37℃ 水浴中,轻轻摇晃,直到大部分解冻 (袋中仍存留小冷冻块)。随后从水浴中取出所述袋,从自封口袋中取出所述单元,并轻轻倒置该单元直到完全解冻。随后将该单元放入层流净化罩中,通过用 70% 的乙醇喷雾对血袋的外表面进行灭菌。使用无菌剪刀剪开血袋,用无菌移液器将细胞转移到无菌的 50ml 锥形管 (每个 HPP 单位 1 管;每个 UCB 单位 2 管) 中。接着,将 10mL 解冻缓冲液 (2.5% 人白蛋白,5% 葡聚糖 40) 慢慢地加入到每个管中,轻轻地混合 (在 2.2-2.9 分钟期间)。然后,用 10mL 解冻缓冲液冲洗每个血袋,随后将该冲洗缓冲液慢慢地加入到 50ml 的锥形管中 (在 0.7-1.3 分钟期间)。

[0489] 在解冻后,在离心前将每个单位贮存在湿冰上。将所有的管离心 10 分钟 (440×g, 10℃),使用无菌移液器吸出上清液,通过振摇所述管轻轻地打散沉淀。将 1ml 等分试样的运载体 (PBS+1% 胎牛血清) 加入到一个管中,并通过轻轻地旋转混合所述管。使用 2ml 移液器,将内含物转移到第二个管中,接着转移到第三个管,之后转移到第四个管。用 0.2ml 稀缓冲液洗涤空管。

[0490] 为了细胞计数,将 25 μ l 等分试样转移到在冰上的 15ml 锥形管中,该管中含有 975 μ l 运载体。然后,通过加入 4ml 冷的氯化铵裂解试剂并在冰上培育 10 分钟来裂解红细胞。在培育后,将 5ml 的冷 PBS 加入到每个管中,离心所述管 (10min, 400×g, 10℃)。在 RBC 裂解后,通过血细胞计数器对细胞进行计数,使用台盼蓝评价生存力。计数结果针对稀

释进行校正并除以裂解因子 (0.46), 以估计在 RBC 裂解之前存在的细胞数。

[0491] 对于 HPP 剂量配制, 在计数后, 通过加入运载体将 HPP 细胞稀释至 1×10^8 个细胞 / ml。然后将 HPP 细胞贮存在冰上, 直到填充注射器。从解冻第一个单位到完成剂量配制之间的间隔时间少于 3 小时。

[0492] 在填充注射器之前, 留出 50 μ l 等分试样的给药材料, 用于通过如上所述的计数进行给药后的验证。在给药后, 评价剩余给药材料以进行给药验证。

[0493] 研究设计。在第 1 天, 将 5 百万个活 KG-1 细胞 S/C 植入到二十四只 NOD/SCID 雄性小鼠 (Jackson Laboratories) 的侧腹区域。分开所述小鼠, 使得四至五只小鼠饲养在具有木屑床的小分离笼系统中。随意提供无菌的啮齿类动物饲料和水。每周两次严格地监测小鼠的肿瘤生长。在第 25 天, 观察到第一个可测量的肿瘤。然后, 每周一次记录体重, 并每周两次用测径器记录肿瘤测量结果。在植入后第 52 天, 将动物随机分成三个独立的组, 肿瘤体积平均为约 300-350mm³。参见下表 13。第一组由具有平均肿瘤体积为 312mm³ 的四只对照小鼠组成。这些小鼠中, 两只静脉内 (IV)、两只动脉内 (IT) 分别植入 200 μ l 和 50 μ l 运载体溶液。具有平均肿瘤体积 345mm³ 的第二组由静脉内植入 200 μ l HPP 细胞 / 小鼠 (2×10^7 个细胞) 的四只小鼠组成。IT 植入 50 μ l HPP 细胞 / 小鼠的最后一组也由具有平均肿瘤体积 332mm³ 的四只小鼠组成。

[0494] 表 13 : 用于体内肿瘤抑制试验的实验组

[0495]

动物#	HPP 处理组	在 HPP 植入当天的肿瘤 体积
第一组(对照)		
1	IV 1	457
2	IV 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	平均值:	312
第二组(IV 细胞植入)		
5	1	466

[0496]

6	2	209
7	3	217
8	4	487
	平均值:	345
第三组(IT 细胞植入)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	平均值:	332
IV-植入 200 μ l; IT-植入 50 μ l		

[0497] 在第 66 天,植入 HPP 细胞后 14 天,由于肿瘤体积过大而终止研究。

[0498] 6.6.2. 结果

[0499] 测量肿瘤体积 (TV) 直到第 66 天 (HPP- 细胞植入后第 14 天),此时对照组的 TV 达到平均 2921mm^3 。在研究结束时,IV 处理组的平均 TV 为 2076mm^3 ,IT 组的 TV 为 2705mm^3 。关于处理后 TV 的增加%,与对照组相比,IT 组显示出对肿瘤生长 20%的中度抑制,而 IV 组显示出对肿瘤生长超过 35%的抑制。IT 组的抑制是可证实的。参见图 11。

[0500] 等同物:

[0501] 本发明不受限于本文所描述的具体实施方案的范围。实际上,除了描述的那些外,根据以上描述和附图,对本发明进行的各种改变对于本领域的技术人员来说是显而易见的。这样的改变落在所附权利要求的范围内。

[0502] 本文引用的所有参考文献通过参考完整纳入本文,且为了所有的目的以相同程度纳入本文,就如同各单独的出版物、专利或专利申请被特别地且单独地指明为了所有目的通过参考完整纳入本文一样。对任何出版物的引用针对其在本申请日之前的公开内容,而不应认为是承认是本发明由于在先发明而不能享有该出版物之前的日期。

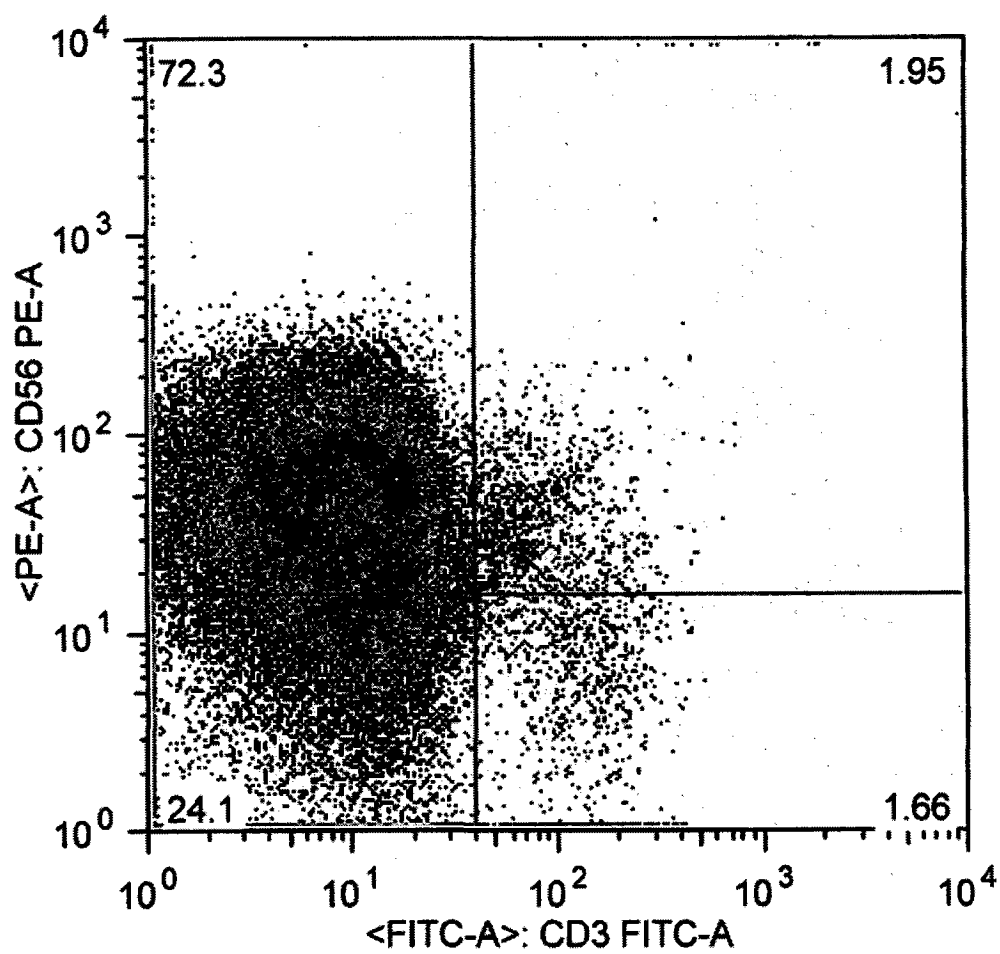


图 1

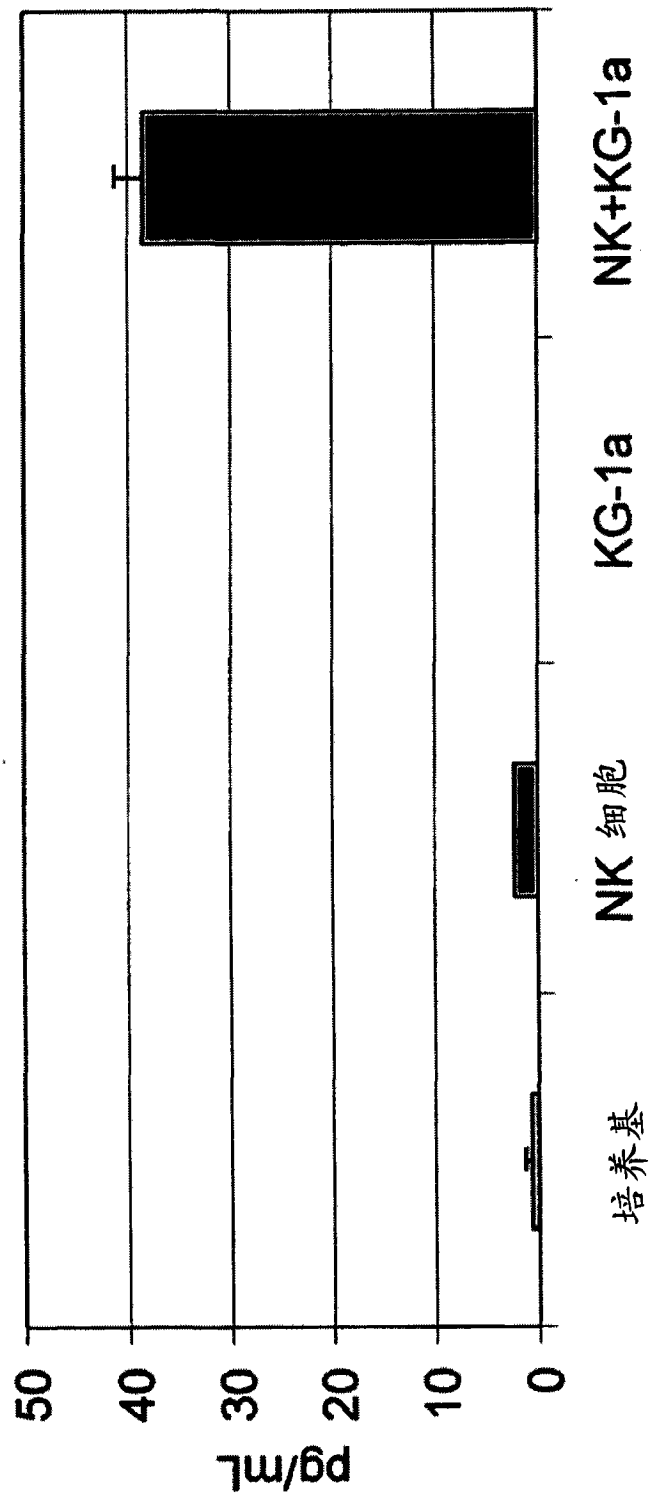


图 2A

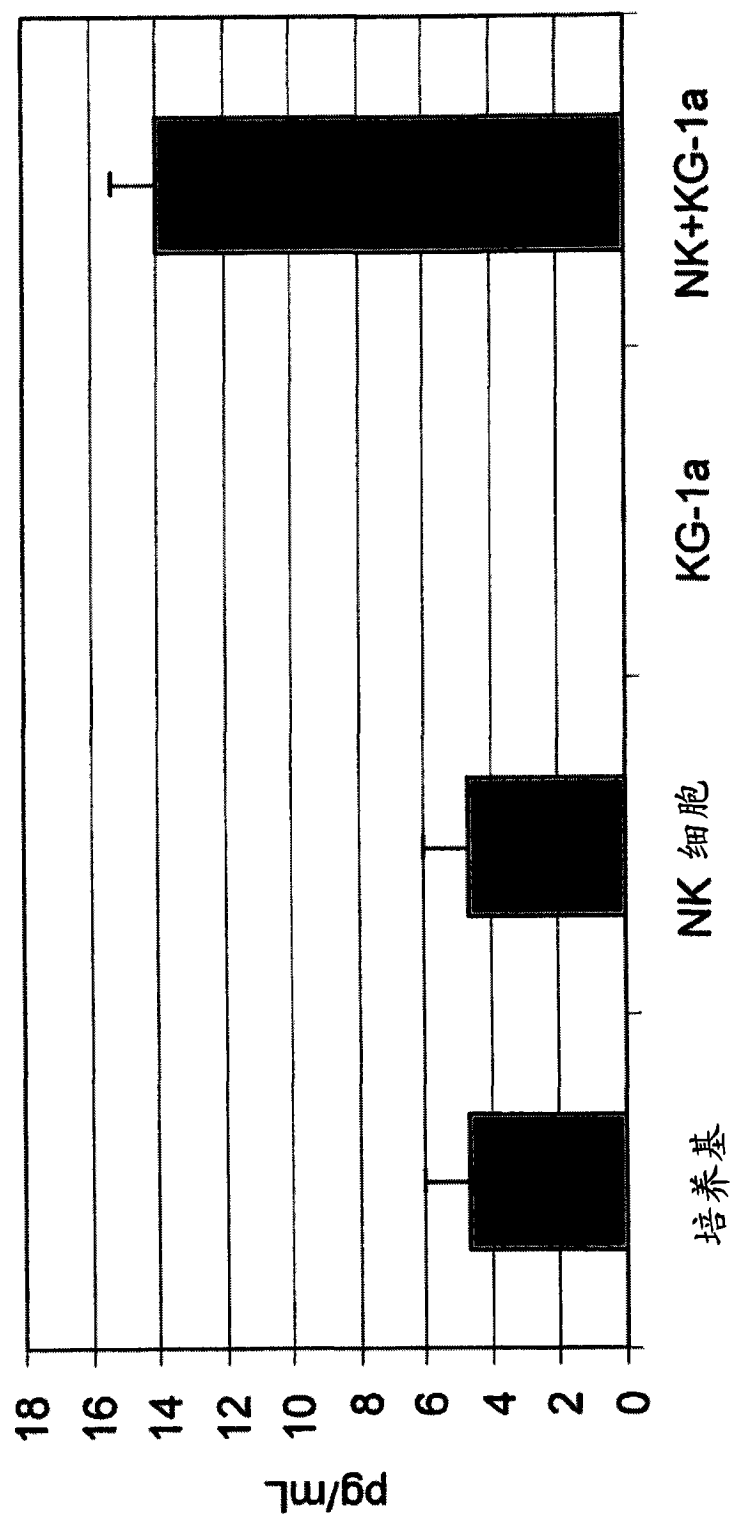


图 2B

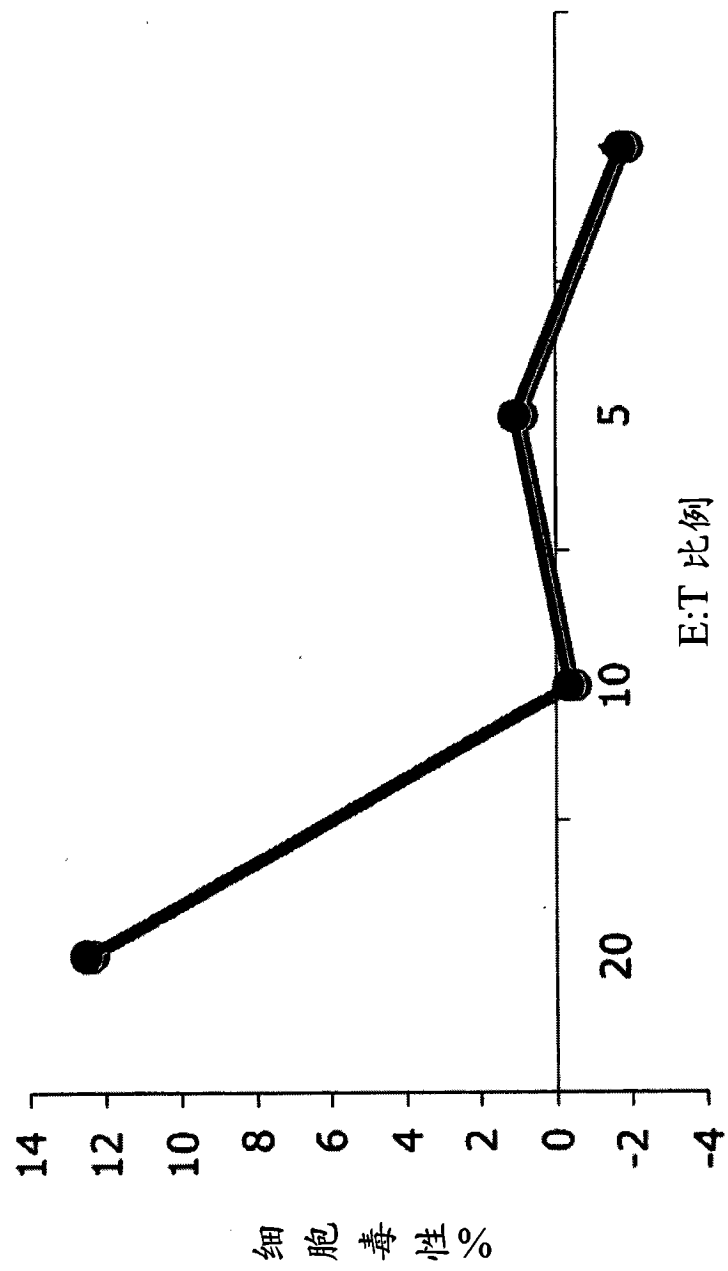


图 3

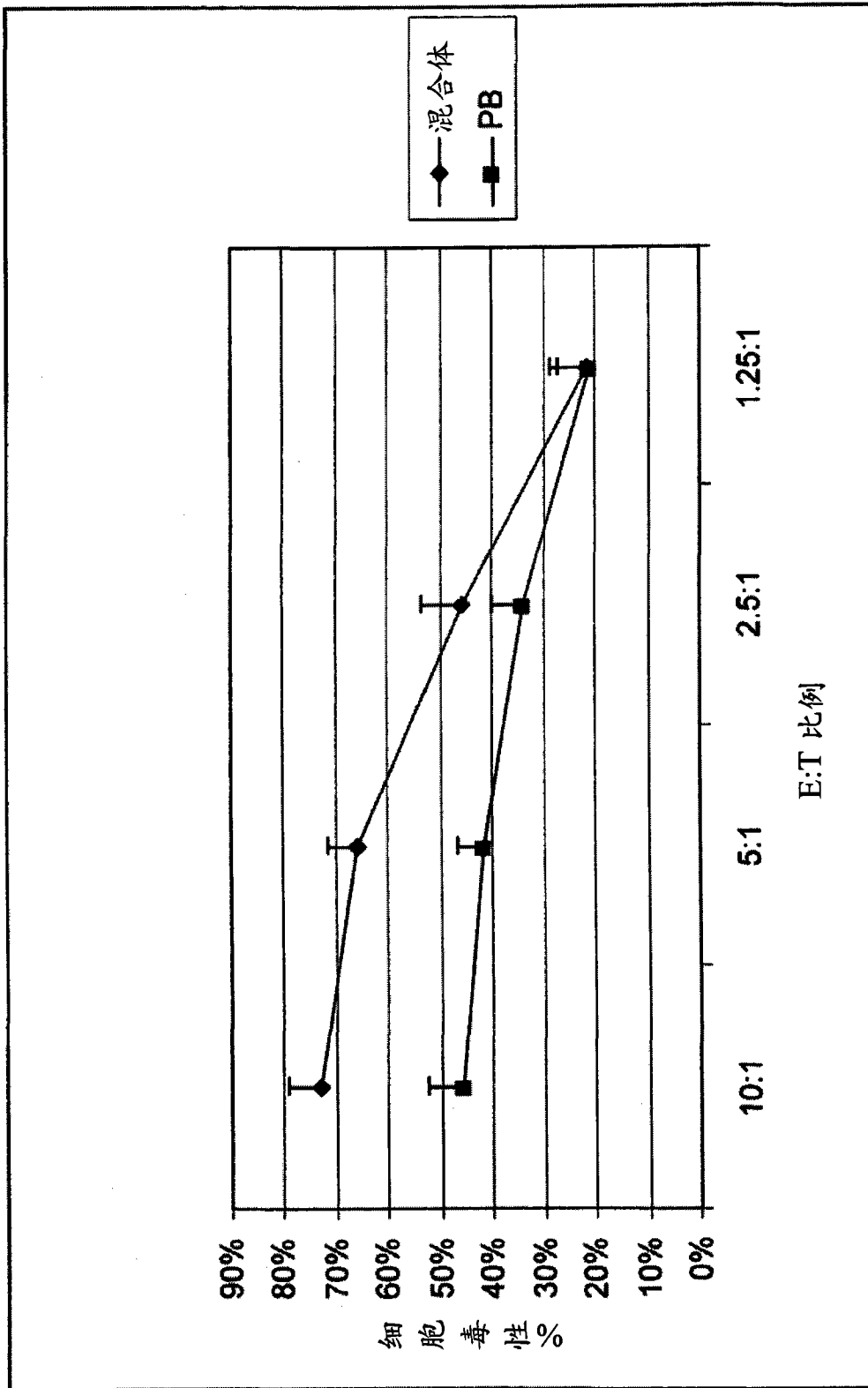


图 4

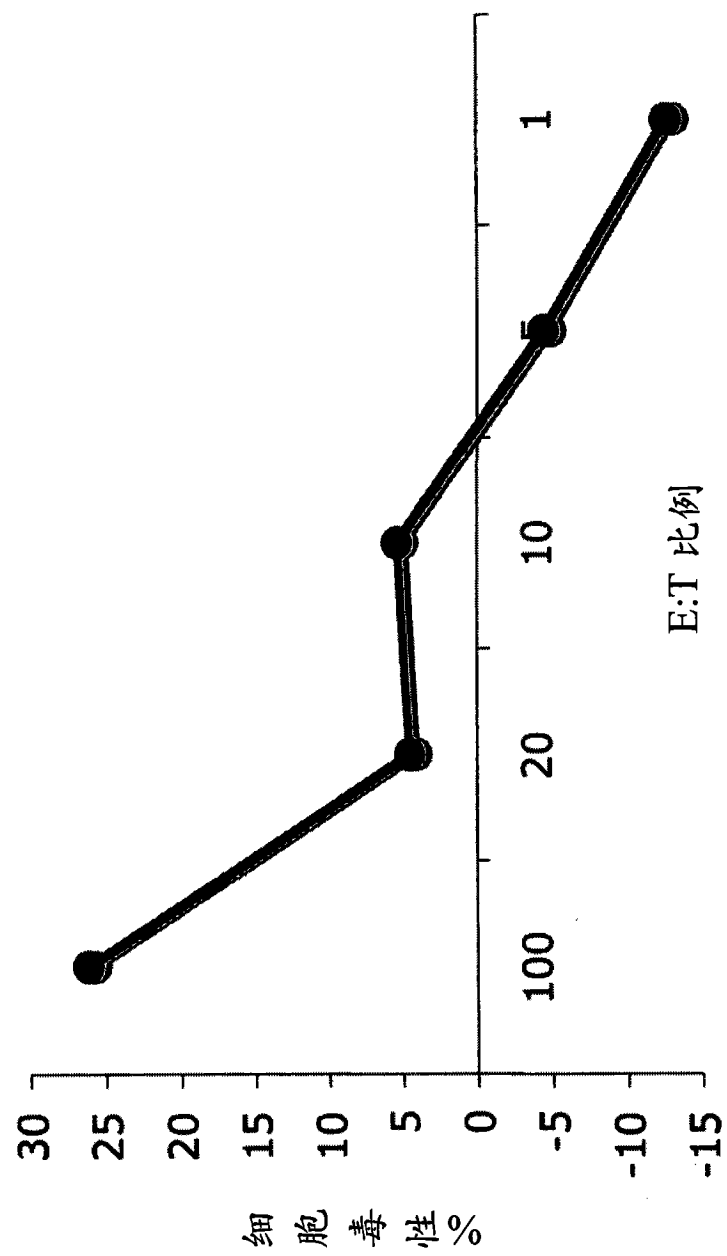


图 5

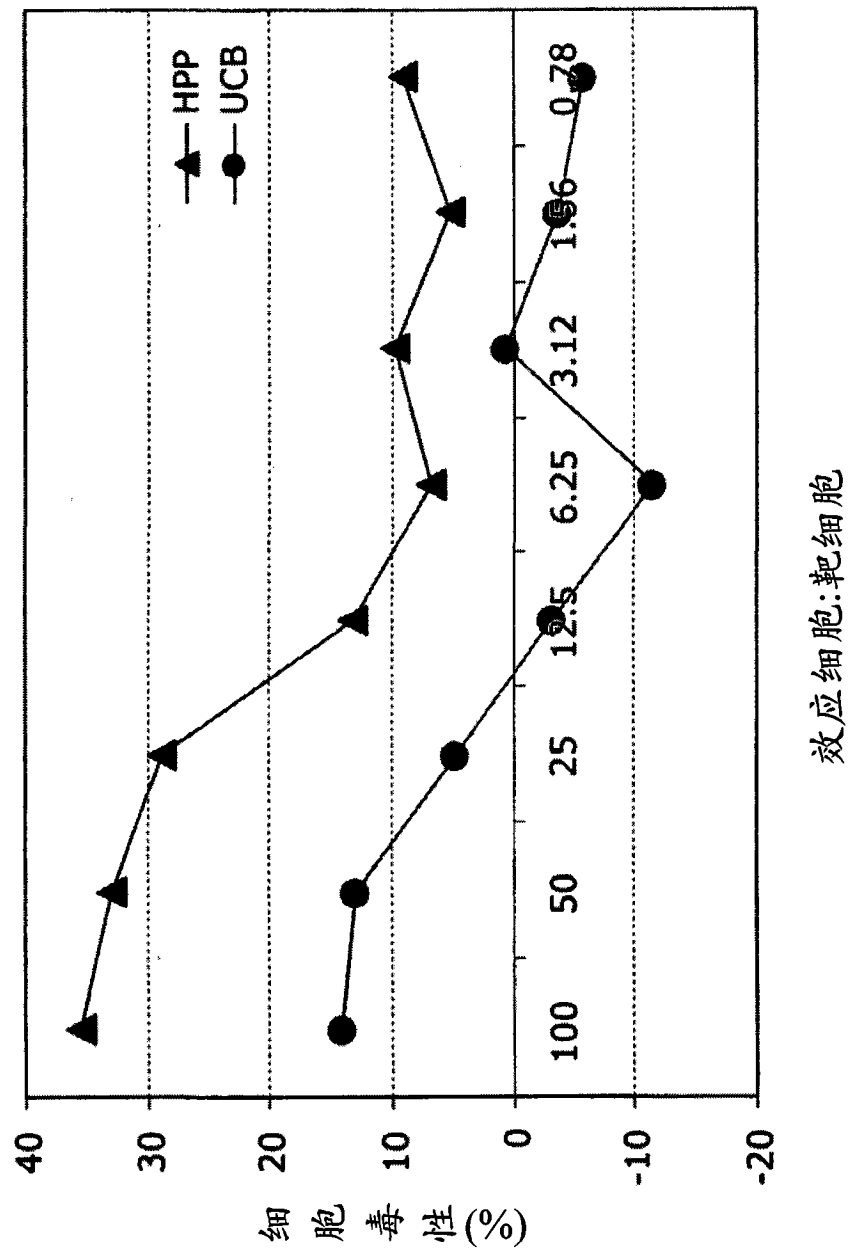


图 6

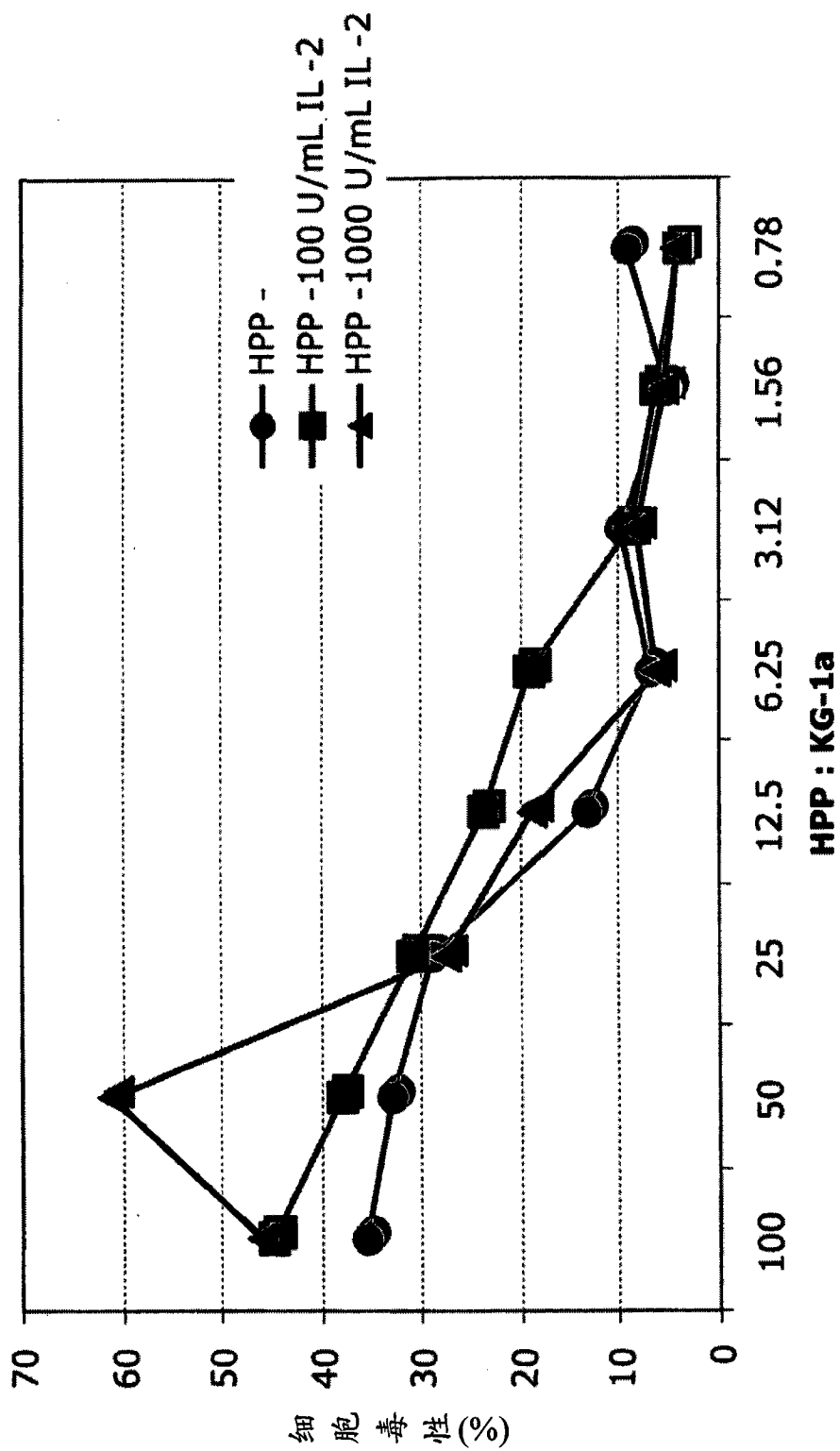


图 7

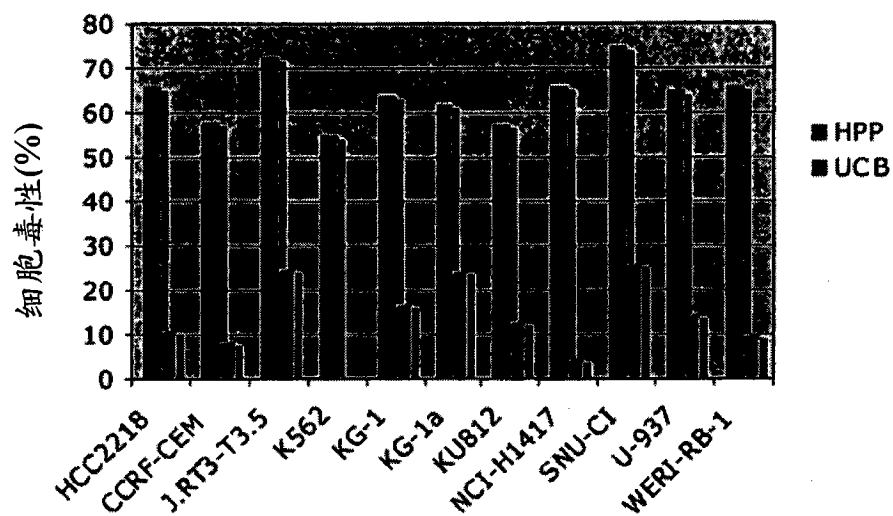
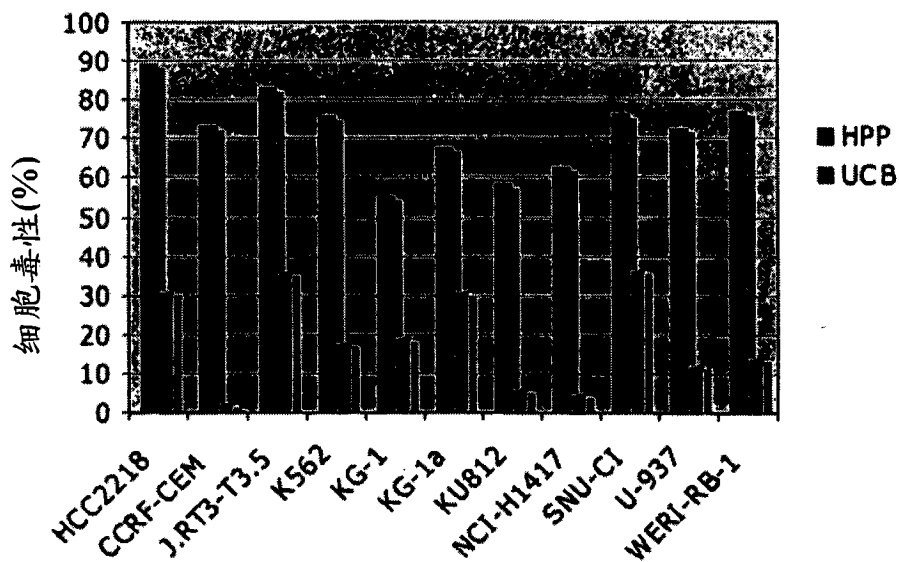
A**B**

图 8A, 8B

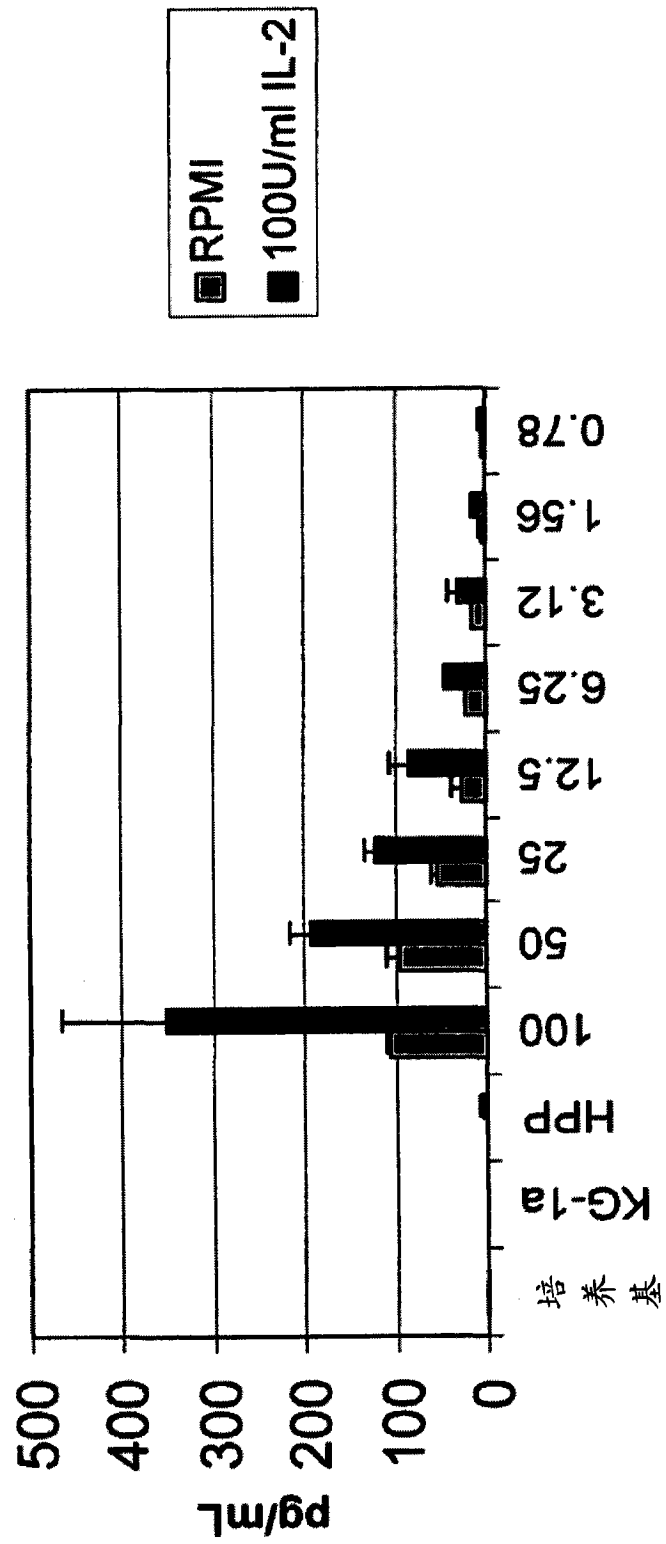
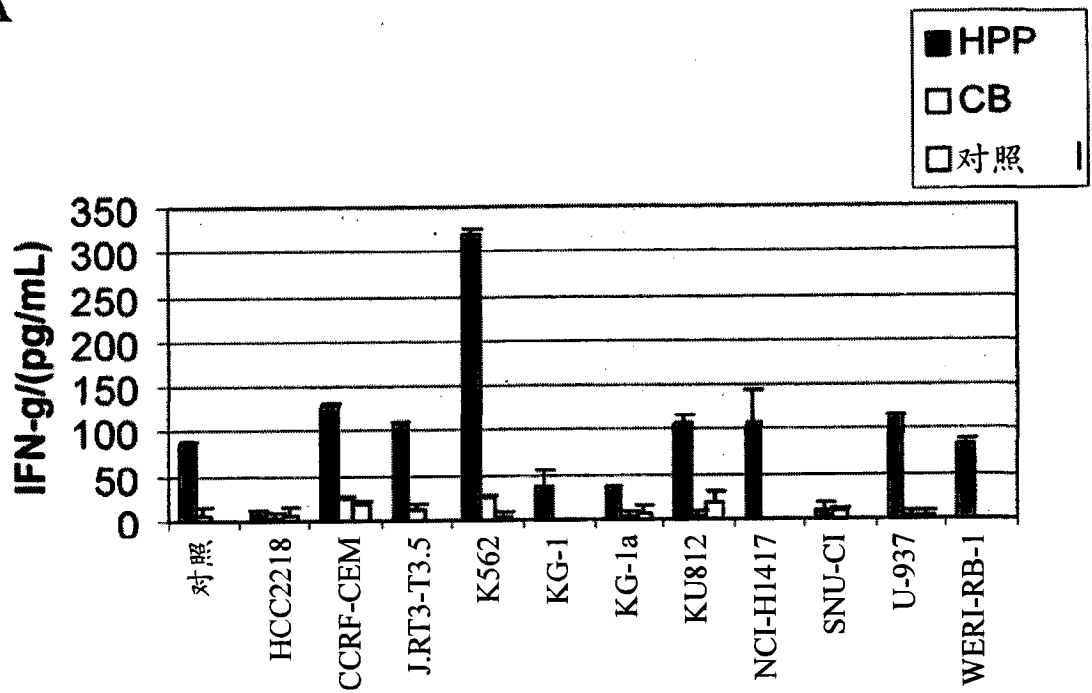


图 9

A



B

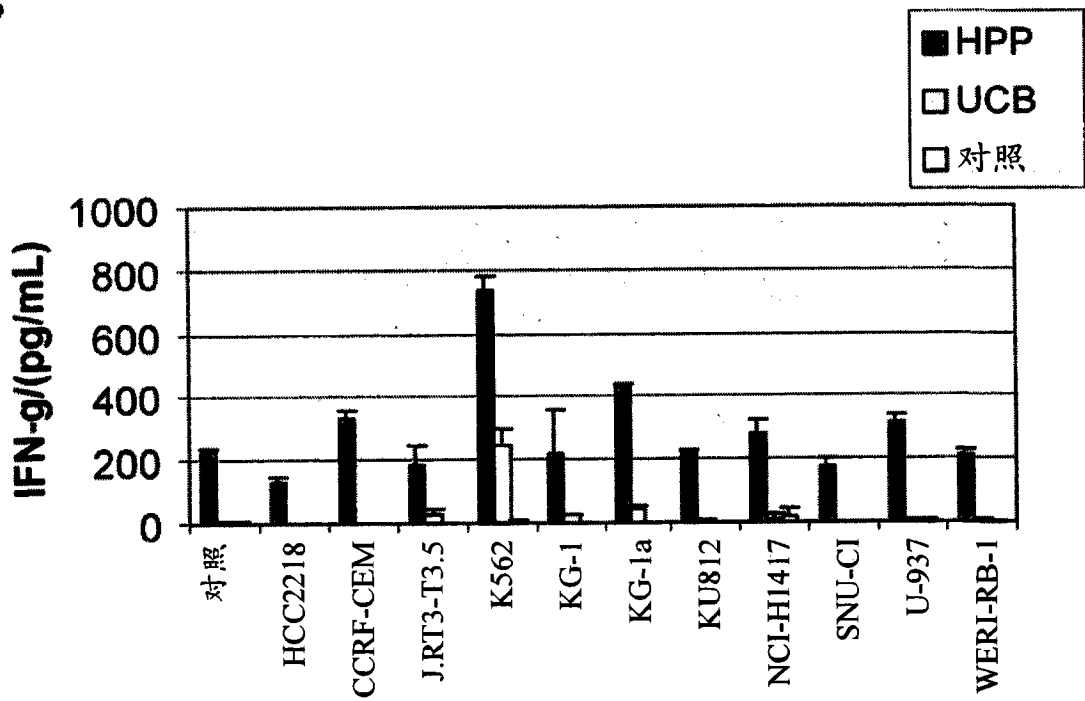


图 10A, 10B

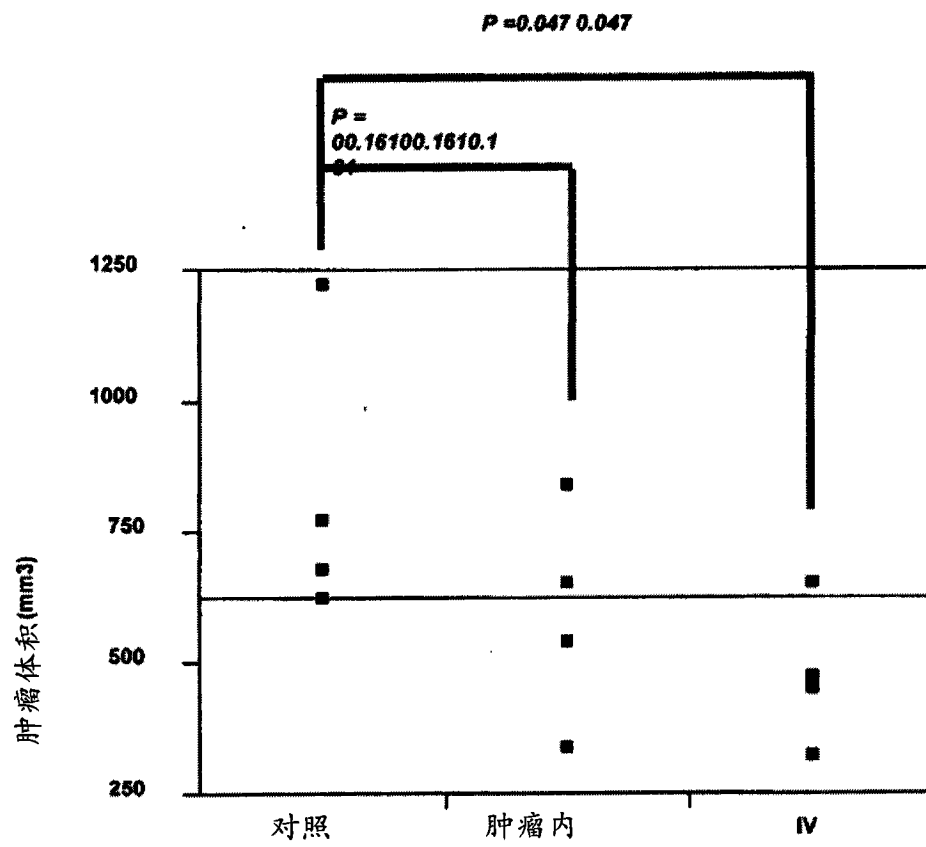


图 11