



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102016007 B

(45)授权公告日 2019.04.19

(21)申请号 200980116566.8

(22)申请日 2009.03.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102016007 A

(43)申请公布日 2011.04.13

(30)优先权数据
61/039,835 2008.03.27 US
61/081,242 2008.07.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.11.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/038442 2009.03.26

(87)PCT国际申请的公布数据
W02009/120891 EN 2009.10.01

(73)专利权人 阿斯特利亚斯生物治疗股份公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·曾 A·S·马宗达 K·西本
A·雷迪 J·莱布罗斯基

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 余颖 崔佳佳

(51)Int.Cl.
C12N 5/071(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)

(56)对比文件
WO 2006020889 A2,2006.02.23,
审查员 王航

权利要求书1页 说明书37页 附图12页

(54)发明名称

使灵长类多能干细胞分化成为造血谱系细胞

(57)摘要

本发明提供使灵长类多能干细胞分化成为造血谱系细胞的方法。本发明还提供灵长类多能干细胞分化产生的造血谱系细胞以及利用这些细胞的方法和包含这些细胞的试剂盒。

1. 一种使灵长类多能干细胞(即pPS细胞)分化成为不成熟树突细胞的方法,包括:
 - (a) 使pPS细胞接触分化混合液,所述分化混合液包含粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、骨形态形成蛋白4(BMP-4)、血管内皮生长因子(VEGF)和干细胞因子(SCF);和
 - (b) 使步骤(a)所得细胞接触粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和白介素4(IL-4)以使所述细胞进一步分化成为不成熟树突细胞;所述pPS细胞是来自能购得的已建立的细胞系的人多能干细胞。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括使灵长类多能干细胞接触以下一种或多种:胎肝激酶配体(FLT3L)、血小板生成素(TPO)、白介素4(IL-4)和白介素3(IL-3)。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述灵长类多能干细胞是来自能购得的已建立细胞系的人胚胎干细胞。
4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在无血清条件下使灵长类多能干细胞分化成为不成熟的树突细胞。
5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在无饲养细胞条件下培养灵长类多能干细胞,使灵长类多能干细胞分化成为不成熟的树突细胞。
6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在无基质细胞条件下使灵长类多能干细胞分化成为不成熟的树突细胞。
7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括使所述不成熟的树突细胞接触成熟混合液而使不成熟树突细胞成熟。
8. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,所述成熟混合液包含以下一种或多种:肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素1 β (IL1 β)、干扰素 γ (IFN γ)、前列腺素E2(PGE2)、聚肌苷酸:聚胞苷酸(POLY I:C)、干扰素 α (IFN α)、CD40配体(CD40L)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。
9. 如权利要求7所述的方法,其特征在于,还包括使所述成熟树突细胞接触抗原。
10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述抗原是核酸分子。
11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述核酸分子是RNA分子。
12. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述抗原是肽。
13. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,还包括使所述成熟树突细胞接触射线源。

使灵长类多能干细胞分化成为造血谱系细胞

[0001] 本申请要求2008年3月27日提交的临时申请号61/039,835和2008年7月16日提交的临时申请号61/081,242的优先权,二者通过引用全文纳入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及干细胞生物学领域。

[0003] 背景

[0004] 多能干细胞能在培养中连续增殖并在合适的培养条件下分化成为所有三种原胚层:内胚层、中胚层和外胚层的代表性谱系限制性细胞类型(美国专利号5,843,780;6,200,806;7,029,913;Shablott等.,(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726;Takahashi等.,(2007)Cell 131(5):861;Yu等.,(2007)Science318:5858)。为特定谱系限制性类型细胞明确适当的生长条件将能实际上提供无限的细胞类型以供研究和治疗应用。

[0005] 能使多能干细胞分化成为造血谱系细胞将特别有用。造血谱系细胞由中胚层发育产生,包括白细胞和红细胞,二者分别构成免疫和循环系统。无限提供这些细胞将为更完全地了解免疫系统和循环系统的发育和功能提供必需的工具。也能了解调节有益和有害免疫应答的策略。

[0006] 免疫系统可提供先天或非特异性免疫应答,以及适应性或特异性免疫应答。适应性免疫应答是持久的保护性应答,大多数疫苗方案试图刺激的正是这种应答。参与适应性免疫应答的细胞包括淋巴细胞(T细胞和B细胞)以及树突状细胞(DC)。T细胞和B细胞通过特异性识别病原体上表达的抗原表位而消除靶病原体。T细胞具有专门适合靶向病毒感染细胞和肿瘤细胞的细胞毒性能。B细胞分泌的抗体能结合靶抗原并激活补体系统促进对靶标的裂解和调理作用。两种应答的特征均是记忆应答,因此有长期保护作用。DC在启动适应性免疫应答中起着至关重要的作用。它们将与主要组织相容性复合物(MHC)结合的抗原呈递给淋巴细胞,因此提供了产生适应性免疫应答的初始刺激。DC的这种迅捷提供可能是使宿主产生治疗性或预防性免疫应答的方式。

[0007] 许多研究证明DC可能是产生适应性免疫应答的载体(参见,例如Mayordomo等.,(1995)Nature Med 1:1297;Celluzi等.,(1996)J.Exp.Med.183:283;Su等.,(1998)J.Exp.Med.188:809),包括研究了用放射线照射DC的作用(参见,例如Cao等.(2004)Cell Biology International 28:223;Merrick等.,(2005)British Journal Of Cancer 92:1450;Young等.(1993)Blood 81(11):2987;Denfield等.(2001)Journal Of Leukocyte Biology 69:548;Dudda等.(2004)Journal of Investigative Dermatology 122:945)。

[0008] 树突状细胞的潜能与多能干细胞的应用前景促使众多研究人员尝试了使多能干细胞分化成为DC或它们的前体细胞(参见,例如美国专利号7,247,480;美国专利申请公布号2002/0086005;2003/0153082;2006/0275901;2006/0147432;2006/0063255;2006/0147432;Fairchild等.,(2005)International Immunopharmacology 5:13;Tacken等.,(2007)Nature Reviews Immunology7:790;Senju等.,(2007)Stem Cells 25(11):2720;Sluvkin等.,(2006)J of Immunology 176:2924;Li等.,(2001)Blood 98(2):335;Kaufman

等., (2001) Proc Natl Acad Sci 98 (19):10716; Chadwick等., (2003) Blood 102 (3):906; Zhan等., (2004) Lancet 364:163; Fairchild等., (2000) Current Biology 10:1515; Kennedy等., (2007) Blood 109 (7):2679; Ng等., (2005) Blood 106 (5):1601; Fehling等., (2003) Development 130:4217; Lu等., (2004) Blood 103 (11):4134; Zambidis等., (2005) Blood 106 (3):860; Bandi等., (2008) AIDS Research and Therapy 5:1; Pick等., (2007) Stem Cells 25:2206)。

[0009] 许多研究人员依赖基质细胞和/或饲养细胞来培养和/或使他们的干细胞分化。采用饲养细胞和基质细胞费力、费钱、费时且难以放大。一些研究人员他们的方案采用动物产品,例如动物血清。然而,采用动物产品本身伴有细胞污染动物传染因子的风险。还有其他研究人员依赖于随机或设计不佳的分化方案,导致不可预计的结果并且通常产率低。

[0010] 本领域需要从多能干细胞分化产生的造血谱系细胞和产生这些细胞的方法,这些方法应可放大、经济、有效、稳定、安全和能提供良好产率。本文所述的本发明各种实施方式符合这些需要和其它需要。

[0011] 发明概述

[0012] 在某些实施方式中,本发明提供使灵长类多能干细胞 (pPS) 体外分化成为造血谱系细胞的方法。该pPS细胞可以是适合分化成为人造血谱系细胞的人多能干细胞。所述造血谱系细胞可包括,例如不成熟的树突状细胞 (imDC)、成熟的树突细胞 (mDC)、骨髓前体细胞、单核细胞。

[0013] 在某些实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为中胚层细胞的方法。

[0014] 使pPS细胞分化成为造血谱系细胞,可包括使细胞,例如pPS细胞体外接触分化混合液,该混合液包含多种外源性细胞因子和/或细胞表面表达蛋白的多种外源性配体(包括,例如细胞因子受体的外源性配体,如能特异性结合细胞因子受体的抗体),从而使细胞群分化成为具有不同表型,例如造血谱系细胞表型的细胞,同时仍基本保持相同的基因型。合适的外源性细胞因子包括以下多种:粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、骨形态形成蛋白4 (BMP-4)、血管内皮生长因子 (VEGF)、干细胞因子 (SCF)、血小板生成素 (TPO)、胎肝激酶配体 (FLT3L)、白介素4 (IL-4) 和白介素3 (IL-3)。

[0015] 述及具有相同基因型的细胞时不是暗示不能通过遗传学人工操作这些细胞(下文描述了包括遗传学改变细胞的实施方式),或不是暗示改变极少(例如,低于整个基因组的某百分比)或可能自发产生(例如,在非编码区),而仅是提出使pPS细胞分化成为造血谱系细胞的行为本身不会导致基因型改变。亲代(未分化细胞)与其分化后代之间的遗传学相同性通常类似于同卵双生子之间所见的遗传学相同性。

[0016] 在某些实施方式中,可不用血清而实施pPS细胞体外分化成为造血谱系细胞的方法。在一些实施方式中,可不用饲养细胞而实施pPS细胞分化成为造血谱系细胞的方法。在各种实施方式中,可不用基质细胞而实施pPS细胞分化成为造血谱系细胞的方法。在某些实施方式中,可不加入外源性IL-3或不加入IL-3受体的外源性配体而实施pPS细胞分化成为造血谱系细胞的方法。

[0017] 在一些实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为imDC的方法,包括使pPS细胞接触多种外源性细胞因子,包括GM-CSF和BMP-4。所述多种外源性细胞因子还可包括以下一种或多种:VEGF、SCF、TPO、FLT3L和IL-3。在一些实施方式中,该分化混合液中也可包含

IL-4。

[0018] 在还有其它实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为mDC的方法,包括:1)使pPS细胞接触适合于pPS分化成为imDC的分化混合液,所述分化混合液包含多种外源性细胞因子和/或细胞表面表达蛋白,例如细胞因子受体的多种外源性配体,从而使pPS细胞分化成为imDC;和2)使imDC接触适合于促进imDC成熟成为mDC的成熟混合液,所述成熟混合液包含多种外源性细胞因子和/或细胞表面表达蛋白,例如细胞因子受体的外源性配体,从而使imDC分化成为mDC。所述分化混合液可包含以下多种:GM-CSF、VEGF、BMP-4、SCF、TPO、FLT3L和IL-3。所述成熟混合液可包含以下多种:肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素1 β (IL1 β)、干扰素 γ (IFN γ)、前列腺素E2 (PGE2)、聚肌苷酸:聚胞苷酸 (POLY I:C)、干扰素 α (IFN α)、CD40L和GM-CSF。

[0019] 在一个实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为mDC的方法,包括使pPS细胞接触包含BMP-4、GM-CSF、VEGF和SCF的分化混合液和合适的成熟混合液,例如包含GM-CSF、IFN γ 、TNF α 、IL1 β 和PGE2的成熟混合液。在该实施方式中,分化混合液中还可包含IL-4。

[0020] 在一些实施方式中,在pPS细胞分化成为造血谱系细胞的过程中维持分化混合液的组成不变。例如,在pPS细胞分化成为imDC的过程中,分化混合液可包含BMP-4、GM-CSF、VEGF和SCF。在一些实施方式中,分化混合液中还可包含IL-4。

[0021] 在其它实施方式中,在分化方案的过程中可改变分化混合液的组成。因此,在本发明的一些实施方式中,对于分化方案的一个或多个步骤,分化混合液可包含4种外源性细胞因子,或细胞表面蛋白的4种外源性配体,而在该分化方案的其它步骤中,分化混合液可包含3、2或1种外源性细胞因子或细胞表面蛋白的外源性配体。例如,可使细胞可依次接触以下分化混合液从而将pPS细胞分化成imDC:包含BMP-4、VEGF和SCF(该方案第一步任选包含GM-CSF)的分化混合液,包含VEGF、SCF和GM-CSF的分化混合液,包含SCF和GM-CSF的分化混合液,包含GM-CSF的分化混合液,包含GM-CSF和白介素4(IL-4)的分化混合液。然后可使imDC接触合适的成熟混合液,例如包含IFN γ 、TNF α 、IL1 β 和PGE2的成熟混合液。

[0022] 在还有其它的实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为表达CD83、CD14、MHC I、MHC II、CD11c和CD11b中一种或多种细胞的方法,包括使pPS细胞接触以下多种:GM-CSF、BMP-4、VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3和/或细胞表面蛋白的外源性配体。

[0023] 在还有进一步实施方式中,本发明提供使表达时期特异性胚胎抗原3 (SSEA3)、时期特异性胚胎抗原4 (SSEA4)和表达用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体可检测标记的细胞,体外分化成为表达以下一种或多种的细胞的方法:CD83、CD14、MHC I、MHC II、CD11c和CD11b,包括使pPS细胞接触以下多种:GM-CSF、BMP-4、VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3和/或细胞表面蛋白的外源性配体。

[0024] 在还有进一步实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为表达CD83、CD14、MHC I、MHC II、CD11c和CD11b的细胞的方法,包括使pPS细胞接触多种外源性细胞因子,包括GM-CSF和BMP-4和/或细胞表面受体的外源性配体。所述多种外源性细胞因子还可包括以下一种或多种:VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3和/或细胞表面蛋白外源性配体。细胞表面蛋白的例子可包括上述细胞因子之一的受体。

[0025] 在一些实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为表达以下一种或多种的

细胞的方法:MHC-I、MHC-II、CD83、CD205、CD11b、CCR7、CD40、CD86、CD123、CD11c,包括使pPS细胞接触:1)分化混合液,然后使1)所述的细胞接触成熟混合液。所述分化混合液可包含以下多种:GM-CSF、BMP-4 VEGF、SCF、FLT3L、TPO、IL-4和IL-3和/或细胞表面蛋白的外源性配体。所述成熟混合液可包含以下多种:GM-CSF、TNF α 、IL1 β 、IFN γ 、PGE2、POLY I:C、IFN α 和/或细胞表面蛋白的外源性配体。细胞表面蛋白的例子可包括上述细胞因子之一的受体。

[0026] 在某些实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为表达CD83的细胞的方法,包括使pPS细胞接触分化混合液和成熟混合液。所述分化混合液可包含GM-CSF和BMP-4和/或细胞表面蛋白的外源性配体。在一些实施方式中,所述分化混合液还可包含以下一种或多种:VEGF、SCF、FLT3L、TPO、IL-4和IL-3。所述成熟混合液可包含以下多种:TNF α 、IL1 β 、IFN γ 、PGE2、POLY I:C、IFN α 、CD40L和GM-CSF。在一些实施方式中,表达CD83的细胞也可表达以下一种或多种:CD86、CD14、CD11b、CD11c、CD205、MHC I和MHC II。在一些实施方式中,所述分化混合液可包含细胞表面蛋白,例如细胞因子受体的外源性配体。

[0027] 在还有其它实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为表达CD45和CD11c的细胞群的方法,包括使pPS细胞接触多种外源性细胞因子,包括GM-CSF和BMP-4和/或细胞表面受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述多种外源性细胞因子还可包括以下一种或多种:VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3和/或细胞表面蛋白的外源性配体。表达CD45的细胞可以是CD45^{高(hi)}细胞。

[0028] 在进一步的实施方式中,本发明提供使表达时期特异性胚胎抗原3 (SSEA3)、时期特异性胚胎抗原4 (SSEA4)和表达可用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体检测的标记的细胞,体外分化成为表达CD45和CD11c的细胞群的方法,包括使表达时期特异性胚胎抗原3 (SSEA3)、时期特异性胚胎抗原4 (SSEA4)和表达可用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体检测的标记的细胞,接触多种外源性细胞因子,包括GM-CSF和BMP-4和/或细胞表面受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述多种外源性细胞因子还可包括以下一种或多种:VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3和/或细胞表面蛋白的外源性配体。表达CD45的细胞可以是CD45^高细胞。

[0029] 述及表达一种或多种标记的分化细胞可包括与起始细胞群(例如,分化细胞群的相对应前体细胞群)相比,所述标记表达增加(例如,分化所致)的实施方式。

[0030] 在进一步的实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为中胚层的方法,包括使pPS细胞接触包含多种外源性细胞因子的分化混合液。所述分化混合液可包含以下多种:BMP-4、VEGF、SCF、FLT3L和GM-CSF和/或细胞表面蛋白的外源性配体。在一个实施方式中,所述分化混合液可包含BMP-4、VEGF、SCF。

[0031] 在其它实施方式中,本发明提供包含第一细胞群和第二细胞群的细胞培养物,所述第一细胞群含pPS细胞,所述第二细胞群含造血谱系细胞。造血谱系细胞可包括以下一种或多种:成血管细胞、造血干细胞、骨髓祖细胞、粒细胞单核细胞性祖细胞(granulomonocytic progenitor cell)、单核细胞、imDC和mDC。在一些实施方式中,所述细胞培养可包含多种细胞因子和/或细胞表面蛋白,例如细胞因子受体的配体。合适的外源性细胞因子可包括以下:GM-CSF、VEGF、BMP-4、SCF、FLT3L、IL-4、TPO、TNF α 、IL1 β 、IFN γ 、PGE2、POLY I:C、IFN α 。所述细胞培养还可包含外源性CD40L。在一些实施方式中,所述细胞培养可任选不包含外源性IL-3或IL-3受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述细胞培养可无

饲养细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无基质细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无血清。

[0032] 在还有其它实施方式中,本发明提供包含第一细胞群和第二细胞群的细胞培养物,所述第一细胞群含pPS细胞,所述第二细胞群含DC,例如mDC、imDC。在一些实施方式中,所述细胞培养可包含多种外源性细胞因子。合适的外源性细胞因子可包括:GM-CSF、VEGF、BMP-4、SCF、TPO、TNF α 、FLT3L、IL1 β 、IL-4、IFN γ 、PGE2、POLY I:C、IFN α 。所述细胞培养还可包含外源性CD40L。在一个实施方式中,本发明提供包含第一细胞群和第二细胞群和外源性BMP-4和GM-CSF的细胞培养物,所述第一细胞群含pPS细胞,所述第二细胞群含DC,例如mDC、imDC。在一些实施方式中,所述细胞培养可任选不含外源性IL-3或IL-3受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述细胞培养可无饲养细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无基质细胞。在各种实施方式中,所述细胞培养可无血清。在某些实施方式中,可用放射线照射所述细胞培养物。例如,经照射的细胞培养物可包括含有mDC的细胞培养物。经照射的细胞培养物还可包含至少一种pPS细胞。在其它实施方式中,可使细胞接触适合抑制细胞分裂的化学药物,例如化疗剂,如丝裂霉素、顺铂。

[0033] 在进一步的实施方式中,本发明提供抑制细胞培养物中细胞分裂的方法,包括使细胞培养物接触射线源或化疗剂,其中所述细胞培养物包含至少一种pPS细胞和从pPS细胞体外分化的mDC。

[0034] 在还有其它实施方式中,本发明提供制备免疫调节制品的方法,包括:1)使pPS细胞群的至少一部分细胞分化成为mDC细胞,从而获得包含mDC和至少一种pPS细胞的混合细胞群,和2)使1)所述的混合细胞群接触射线源或化疗剂从而获得免疫调节制品。该方法还可包括使含mDC的混合细胞群接触抗原,例如蛋白质或肽。所述细胞群可先与抗原接触,再接触射线。所述免疫-调节制品可刺激对抗原的免疫应答。

[0035] 在进一步的实施方式中,本发明提供制备免疫调节制品的方法,包括:1)使pPS细胞群的至少一部分细胞分化成为含imDC细胞的细胞群,从而获得包含imDC和至少一种pPS细胞的混合细胞群;2)使含imDC的细胞群接触编码抗原的核酸;3)使2)所述的细胞群接触成熟混合液,从而使imDC成熟为mDC,该细胞群包含至少一种pPS细胞,和4)使3)所述的混合细胞群接触射线源或化疗剂,从而获得免疫调节制品。所述免疫调节制品可刺激对抗原的免疫应答。

[0036] 在还有其它实施方式中,本发明提供制备免疫调节制品的方法,包括:1)使pPS细胞群的至少一部分细胞分化成为含imDC细胞的细胞群,从而获得包含mDC和至少一种pPS细胞的混合细胞群;2)使1)所述的细胞群接触成熟混合液,从而使imDC成熟为mDC,该细胞群包含至少一种pPS细胞;3)使包含mDC的细胞群接触编码抗原的核酸;和4)使3)所述的混合细胞群接触射线源或化疗剂,从而获得免疫调节制品。所述免疫调节制品可刺激对抗原的免疫应答。

[0037] 在还有其它实施方式中,本发明提供含有丝分裂性能灭活的pPS细胞体外后代mDC的免疫调节组合物。该组合物可经射线照射或用适合抑制细胞分裂的化学药物,例如丝裂霉素、顺铂处理,以灭活细胞的有丝分裂性能。在一些实施方式中,所述免疫调节组合物可包含先接触过抗原或编码抗原的核酸然后经射线照射的DC,例如mDC或imDC。所述免疫调节应答可以是刺激对该抗原的免疫应答。

[0038] 在其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原免疫应答的方法,包括:a)获得pPS细胞体外分化产生的mDC;b)使该mDC接触抗原或编码抗原的核酸分子;c)使b)所述的mDC接触射线源或适合抑制细胞分裂的化疗剂,例如丝裂霉素;d)使c)所述的mDC接触免疫活性细胞,从而刺激对抗原的免疫应答。

[0039] 在其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原免疫应答的方法,包括a)获得pPS细胞体外分化产生的imDC;b)使该imDC接触编码抗原的核酸分子;c)使该imDC接触成熟混合液(如本文所述),从而使imDC成熟为mDC;d)使c)所述的mDC接触射线源或适合抑制细胞分裂的化疗剂,例如丝裂霉素;e)使d)所述的mDC接触免疫活性细胞,从而刺激对抗原的免疫应答。

[0040] 在其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原的免疫应答的方法,包括a)使pPS细胞接触分化混合液和成熟混合液,从而使pPS分化成为mDC;b)使a)所述的mDC接触抗原或编码抗原的核酸分子;c)使b)所述的mDC接触免疫活性细胞,从而刺激对抗原的免疫应答。所述分化混合液可包含多种外源性细胞因子和/或细胞表面蛋白的多种外源性配体。所述分化混合液可包含GM-CSF、BMP-4、VEGF、SCF、FLT3L、TPO、IL-4和IL-3。所述成熟混合液可包含以下一种或多种:GM-CSF、TNF- α 、IL1 β 、IFN γ 、PGE2、POLY I:C、IFN α 。在一些实施方式中,所述细胞培养可任选不含外源性IL-3或IL-3受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述细胞培养可无饲养细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无基质细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无血清。

[0041] 在还有其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原的免疫应答的药盒,其装有:1)包含pPS细胞和DC的细胞培养物,和2)一个或多个容器。所述DC可以是mDC或imDC。所述细胞培养物可包含外源性细胞因子和/或细胞表面蛋白的外源性配体。所述外源性细胞因子和/或细胞表面蛋白的外源性配体可包括以下多种:GM-CSF、VEGF、BMP-4、SCF、FLT3L、TPO、IL-4、IL-3、TNF α 、IL1 β 、IFN γ 、PGE2、POLYI:C、IFN α 、CD40L。在一些实施方式中,所述细胞培养可任选不包含外源性IL-3或IL-3受体的外源性配体。在一些实施方式中,所述细胞培养可无饲养细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无基质细胞。在一些实施方式中,所述细胞培养可无血清。

[0042] 在还有其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原的免疫应答的药盒,其装有:1)经射线照射的pPS细胞体外后代的mDC,和2)一个或多个容器。

[0043] 在还有其它实施方式中,本发明提供刺激对抗原的免疫应答的药盒,其装有:1)有丝分裂性能灭活的pPS细胞体外后代的mDC;和2)一个或多个容器。可使mDC接触适合于抑制细胞分裂的化学药物以灭活该细胞的有丝分裂能力。抑制细胞分裂的合适化学药物包括丝裂霉素,例如丝裂霉素C。或者,可使mDC接触射线源以灭活该细胞的有丝分裂能力。

[0044] 在进一步的实施方式中,本发明提供产生有丝分裂性能灭活性抗原呈递细胞的系统,其包含:a)含有pPS细胞的第一分离细胞群和b)含有有丝分裂性能灭活的pPS细胞一部分的体外后代成熟树突细胞的第二分离细胞群。可通过射线照射或接触化疗剂灭活成熟树突细胞的有丝分裂能力。考虑可通过体外分化第一细胞群将含pPS细胞(例如,未用于制备mDC的那部分)的第一分离细胞群用于制备第二分离细胞群。

[0045] 考虑可通过取代以下pPS细胞亚组中的一个或多个来实施本发明的任何实施方式:来自能购得的已建立细胞系的人胚胎干细胞、恒河猴干细胞、绒猴干细胞、核转移干细

胞和/或诱生的多能干细胞,所有均在下文中描述。

[0046] 附图简述

[0047] 图1A是使pPS细胞分化成为mDC所用分化方案的示意图。

[0048] 图1B是用X-VIVO™10培养液培养的hES细胞的光学显微镜图像照片。

[0049] 图1C是流式细胞术显示的未分化hES所见各种标记表达水平的直方图。

[0050] 图2是胚状体和祖细胞(左下图)的显微照片。

[0051] 图3A和3B是显示细胞培养物分化期间各种转录因子的表达图。

[0052] 图3C显示流式细胞术检测的细胞培养物分化期间随时间变化的CD34和CD45表达。

[0053] 图3D是囊性胚状体的显微照片。

[0054] 图3E显示流式细胞术检测的细胞培养物分化期间随时间变化的CD13和CD14表达。

[0055] 图3F显示流式细胞术检测的CD45^高细胞群(上两幅图)和CD45^低细胞群(下两幅图)的CD14表达。

[0056] 图3G显示流式细胞术检测的CD45^高细胞群CD11c、CD11b、CD83、CD86(下两幅图)、HLA-I和HLA-II(右上图)的表达。左上图显示门控筛选的CD45高和低细胞群。

[0057] 图4A显示imDC诸标记的流式细胞术直方图分析。

[0058] 图4B显示mDC诸标记的流式细胞术直方图分析。

[0059] 图4C是显示分化细胞培养物转录因子表达随时间变化的图。

[0060] 图4D是DC细胞集落的显微照片。

[0061] 图4E是用May Grunwald染料染色的DC的显微照片。

[0062] 图5A显示流式细胞术对树突细胞的门控筛选(R1)(上图),显示门控筛选的树突细胞群可摄取模型抗原DQ-OVA并蛋白水解切割加工(下图)。

[0063] 图5B显示DC可加工并呈递腮腺炎抗原诱导T淋巴细胞产生IFN γ 。

[0064] 图6A-C比较了imDC和mDC所产生的细胞因子概况。

[0065] 图6D显示对MIP3 β 应答中的DC迁移。

[0066] 图7A显示mDC能在混合淋巴细胞反应(MLR)中刺激同种细胞。

[0067] 图7B显示在对HLA-A2呈递的CMV肽抗原应答中mDC(ES-DC)能刺激效应T细胞分泌IFN- γ 。

[0068] 图7C显示在对HLA-A2呈递的CMV肽应答中mDC(ES-DC)导致CFSE标记T淋巴细胞增殖的流式细胞术分析。

[0069] 图8显示在对HLA-A2呈递的hTERT肽抗原应答中mDC(hES-DC)能刺激效应T细胞分泌IFN- γ 。

[0070] 图9显示在对HLA-A2呈递的hTERT肽应答中mDC导致CFSE标记T淋巴细胞增殖的流式细胞术分析。

[0071] 图10比较用或不用肽抗原脉冲、经射线照射的mDC(hES-DC)与未经-射线照射的mDC(hES-DC)所刺激的抗原特异性T细胞应答。

[0072] 图11比较在对趋化配体MIP3 β 的应答中,射线照射mDC(hES-DC)与未-射线照射mDC(hES-DC)的细胞迁移。

[0073] 图12比较用X-Vivo-10或mTeSR™培养液培养的hES细胞的mDC产率。

[0074] 图13比较体外hES细胞分化的用Cellgro™或X Vivo-15培养液培养的成熟DC表达

的表面标记。

[0075] 图14比较用Cellgro™或X-Vivo-15培养的hES衍生mDC的细胞迁移。

[0076] 图15比较用加或不加外源性IL-4的Cellgro™或X-Vivo-15培养液培养的hESC衍生DC的IL-12产量。

[0077] 图16比较与GFP转染的mDC;与hTERT-LAMP转染的mDSC共同培养的TERT特异性T细胞以及单独的T细胞(不与mDC细胞共同培养)的IFN γ 产量。

[0078] 定义

[0079] 本文所用的大约,指含量或数值的平均值+/-所述含量或数值的5%。

[0080] 本文所用的细胞培养物,指体外随时间变化培养出的多个细胞。细胞培养物可源自多个pPS细胞或单个pPS细胞,可包括一个或多个起源细胞的所有后代,而无论1)细胞培养物在其生命期所经历的传代次数或分裂次数;和2)培养物在其生命期一个或多个细胞的表型的任何改变(例如,培养物中一个或多个pPS细胞分化所致的改变)。因此,本文所用的细胞培养物始于用至少一个pPS细胞初始接种一种或多种合适容器产生的细胞,终于原始奠基细胞的最后存活后代细胞的收集或死亡。用原始奠基细胞的后代接种一个或多个额外的培养容器产生的细胞也视作原始细胞培养物的一部分。

[0081] 本文所用的细胞因子,指细胞分泌的能影响另一细胞或同一细胞或二者行为的分子。

[0082] 本文所用的术语“胚状体”,指包含未分化、分化和部分分化细胞的非均质细胞集落,见于悬浮培养的或聚集的灵长类非特异性方式分化的多能干细胞。

[0083] 本文所用的“胚胎干细胞”(ES),包括建立的具有ES细胞表型特征的细胞系,和此类细胞系的后代,该后代仍能产生具有3个胚层各自表型性状的后代细胞。ES细胞可以是来自能购得的已建立细胞系的人ES细胞(hES)。

[0084] 本文所用的外源性,指加入系统例如细胞培养物中的物质。所述物质可以通过手工加入系统。

[0085] 本文所用的“饲养细胞”,指与pPS细胞共同培养能支持pPS细胞的非pPS细胞。所述支持包括通过为pPS细胞培养物提供一种或多种细胞因子而促进pPS细胞培养物的生长和维持,使pPS细胞维持在基本上未分化的状态。饲养细胞可具有不同于pPS细胞的基因组或与pPS细胞相同的基因组,可源自非灵长类动物,例如小鼠,或可以是灵长类例如人来源。饲养细胞的例子包括具有结缔组织表型的细胞,例如鼠成纤维细胞、人成纤维细胞。

[0086] 本文所用的“无饲养细胞”,指所述及的组合物不加入饲养细胞的情况。为明确起见,术语无饲养细胞包括以下情况:传代的灵长类多能干细胞培养物可能(本身)包含一些饲养细胞但不是加入的饲养细胞,甚至第一培养物的一些饲养细胞可存在于第二培养物中。

[0087] 本文所用的造血谱系细胞,指pPS细胞体外分化产生的细胞和/或它们的后代,可包括以下一种或多种:成血管细胞、造血干细胞、普通淋巴祖细胞、淋巴细胞、普通骨髓祖细胞(CMP)、粒细胞单核细胞性祖细胞(GMP)、单核细胞、巨噬细胞、imDC和mDC。

[0088] 本文所用的免疫活性细胞,指能对抗原应答的细胞。所述应答包括,例如对抗原应答产生细胞增殖、对抗原应答分泌一种或多种细胞因子、对抗原应答表达一种或多种转录因子。免疫活性细胞的例子包括淋巴细胞。

[0089] 本文所用的灵长类多能干细胞的体外后代,指从多能状态体外分化成为非多能状态的细胞,例如不成熟的DC、成熟的DC。

[0090] 本文所用的“灵长类多能干细胞”(pPS),指在合适条件下能产生所有3种胚层(内胚层、中胚层和外胚层)衍生的不同类型细胞后代的灵长动物细胞。pPS细胞能在8-12周龄SCID小鼠中形成畸胎瘤和/或在组织培养物中形成可鉴定的所有3种胚层的细胞。灵长类多能干细胞的定义包括各种类型的胚胎细胞,包括来自能购得的已建立细胞系的人胚胎干(hES)细胞;其它灵长类的胚胎干细胞,例如恒河猴干细胞(参见,例如Thomson等.,(1995) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:7844)、狨猴干细胞(参见,例如(1996) Thomson等., Biol.Reprod.55:254)、核移植技术产生的干细胞以及诱生的多能干细胞(参见,例如Yu等.,(2007) Science 318:5858;Takahashi等.,(2007) Cell 131(5):861)。

[0091] 本文所用“未分化的灵长类多能干细胞”,指这种灵长类多能干细胞的实质性部分和其衍生的细胞群表现为未分化细胞形态学特征的细胞培养物。应该知道这种细胞群内未分化细胞的集落围绕有部分分化的邻近细胞。

[0092] 本文所用的“遗传改变的”或“遗传转化的”,指通过合适的人工操作方法将多核苷酸转化入细胞,或者该细胞是原始细胞继承该多核苷酸而改变的后代。所述多核苷酸常包含编码感兴趣蛋白质的可转录序列,能使细胞表达更高水平的蛋白质,或可包含编码诸如siRNA或反义RNA等分子的序列,这类分子能影响蛋白质的表达(未修饰细胞表达的蛋白或引入另一多核苷酸序列表达的蛋白)但本身不编码蛋白质。如果被改变细胞的后代具有相同的改变,则称这种遗传改变是“可继承的”。

[0093] 本文所用的无血清,指不加入动物血清,例如胎牛血清、小牛血清、马血清,也不加入可商品化购得的血清替代品如B-27的组织培养生长条件。无血清包括,例如培养液可包含人白蛋白、人转铁蛋白和重组人胰岛素。

[0094] 本文所用的自发分化的pPS细胞,指培养的pPS细胞随机和自发分化成为非-pPS表型,即表达了pPS细胞不表达的一种或多种标记和/或不表达pPS细胞表达的一种或多种标记的pPS细胞。

[0095] 本文所用的基质细胞,指与另一细胞群,例如pPS细胞群共同培养时,能通过提供一种或多种细胞因子促进pPS细胞群分化成为所需表型,例如造血谱系细胞的一种细胞。基质细胞可以衍生自哺乳动物的骨髓。OP9和S17细胞是基质细胞的例子。

[0096] 本文所用的无基质细胞,表示不将基质细胞或基质细胞条件化培养液加入培养的未分化pPS细胞中或培养的分化成为造血谱系细胞的pPS细胞中,。

[0097] MHC-I和HLA-I可互换使用,MHC-II和HLA-II一样。

[0098] 发明详述

[0099] 在某些实施方式中,本发明提供使pPS细胞体外分化成为造血谱系细胞的改进方法。因此,本发明某些实施方式提供了适合使pPS细胞分化成为造血谱系细胞,例如DC(包括imDC和mDC)所需要的最小数量外源性因子(例如细胞因子)的明确条件。在一些实施方式中,本发明使pPS细胞接触的分化混合液包含最低数量的外源性细胞因子,例如不多于7种、不多于6种、不多于5种、不多于4种、不多于3种外源性细胞因子,而能产生造血谱系细胞。在一个实施方式中,所述明确条件提供的分化混合液包含不多于4种添加的外源性细胞因子,例如BMP-4、GM-CSF、SCF和VEGF。在其它实施方式中,所述明确条件提供的分化混合液包含

不多于3种添加的外源性细胞因子,例如a) BMP-4、GM-CSF、SCF; b) BMP-4、GM-CSF、VEGF。在一些实施方式中,可用各细胞因子受体的配体取代各细胞因子和/或除各细胞因子外再提供这类配体。在造血细胞是imDC的实施方式中,所述分化混合液还可包含IL-4。可使imDC进一步接触成熟混合液而产生mDC。

[0100] 在一些实施方式中,本发明提供的简化培养条件能使pPS细胞分化成为造血谱系细胞,例如DC。简化的培养条件包括用无血清、无饲养细胞、无基质细胞和任选不加入外源性IL-3的组织培养液使pPS细胞分化成为DC。可将pPS直接接种在合适的固体表面上无需形成胚状体(embryo body) (EB)从而使pPS分化成为造血谱系细胞。这些简化的培养条件消除了接触传染因子的风险,还提供更快速而廉价的方法获得数量足够的治疗和研究用的imDC细胞。

[0101] 分化pPS细胞的方法

[0102] 使pPS细胞分化成为造血谱系细胞的起始材料包括用无血清、无饲养细胞和无基质细胞培养的pPS细胞。无饲养细胞和无血清培养pPS细胞的条件描述参见,例如Xu等., (2001) Nat Biotechnol 19:971; Li等., (2005) Biotechnol Bioeng 91:688。在一些实施方式中,优选在适合形成细胞聚集体,例如胚状体(EB)的条件下培养pPS细胞。形成的EB描述参见,例如美国专利公布号2006/0063255和PCT公布号WO 01/51616。简言之,用胶原酶处理收集未分化的pPS细胞,解离成细胞集群或细胞条带,在非粘附细胞培养板中传代成聚集体。收集的pPS细胞可包含某些自发性分化的细胞。考虑到自发性分化的细胞数量可能随细胞形成EB后分化成为造血谱系细胞而逐渐减少。可用合适的培养液,例如X-VIVO 10; X-VIVO 15培养这种聚集体。在EB形成前后可用无饲养细胞、无血清和无基质细胞的培养液培养pPS细胞。

[0103] 在其它实施方式中,可跳过EB形成步骤。因此,可将pPS细胞直接接种在合适支持物上,例如组织培养瓶或孔中,用含分化混合液的培养液培养。

[0104] 在各种实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为造血谱系和/或中胚层细胞的方法。造血谱系细胞可包括imDC。在一些实施方式中,本发明提供的分化混合液包含多种适合使pPS细胞分化成为造血谱系细胞的外源性添加细胞因子,例如BMP-4和GM-CSF。示范性的分化混合液可包含以下任一种:a) BMP-4、GM-CSF、VEGF、SCF、FLT3L、TPO和IL-3; b) BMP-4、GM-CSF、VEGF、SCF和FLT3L; c) BMP-4、GM-CSF、VEGF和SCF; d) BMP-4、GM-CSF、SCF; 和e) BMP-4、GM-CSF、VEGF。在某些实施方式中,除上述细胞因子外可采用IL-4。在一些实施方式中,可用一种或多种细胞因子受体的配体替代细胞因子,或除细胞因子外,可采用一种或多种细胞因子受体的配体。

[0105] 也已发现可通过调节细胞接触分化混合液的时间量来获得各种造血谱系细胞。在本发明的一些实施方式中,用分化混合液培养pPS细胞约5天以使该细胞分化成为包含中胚层细胞的培养物。在本发明的另一实施方式中,用分化混合液培养pPS细胞约10天以使该细胞分化成为包含造血干细胞的培养物。在本发明的还有另一实施方式中,用分化混合液培养pPS细胞约15天以使该细胞分化成为包含普通骨髓祖细胞的培养物。在本发明的还有另一实施方式中,用分化混合液培养pPS细胞约20天以使该细胞分化成为包含粒细胞单核细胞性祖细胞的培养物。在本发明的还有另一实施方式中,用分化混合液培养pPS细胞约25天以使该细胞分化成为包含单核细胞的培养物。在本发明的进一步实施方式中,用分化混合

液培养pPS细胞约30天以使该细胞分化成为包含imDC的培养物。

[0106] 本发明的一些实施方式通过使imDC接触包含多种外源性细胞因子的合适成熟混合液而使imDC成熟成为mDC。所述成熟混合液可包含GM-CSF。合适的成熟混合液的例子包含以下任一种：a) GM-CSF、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 和PGE2；b) GM-CSF、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、PGE2和CD40L；c) GM-CSF、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、PGE2、POLY I:C和IFN α ；d) GM-CSF、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、POLY I:C和IFN α ；e) GM-CSF、TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 、POLY I:C、IFN α 和CD40L；f) TNF α 、IL-1 β 、PGE2和IL-6；g) GM-CSF、IL-1 β 、PGE2和IFN γ ；h) GM-CSF、TNF α 、PGE2和IFN γ ；i) GM-CSF、IL-1 β 、IFN γ 和CD40L。在一些实施方式中，可用一种或多种细胞因子受体的配体替代细胞因子，或除细胞因子外，可采用一种或多种细胞因子受体的配体。可采用本领域已知的其它方法使imDC成熟为mDC。例子包括使imDC接触脂多糖(LPS)，使这种imDC接触含CpG的寡核苷酸，再将这种imDC注射入对象的炎症区域中。

[0107] 可在成熟混合液存在下培养imDC至少约12-15小时、至少约1天、至少约2天、至少约3天以产生mDC。在一些实施方式中，可在成熟混合液存在下培养imDC至少约24小时以产生mDC。在其它实施方式中，可在成熟混合液存在下培养该imDC约48小时以产生mDC。

[0108] mDC可表达一种或多种标记，例如CD83、CD86、MHC I和MHC II，但不表达CD14，具有类似于体内分化的成熟DC的功能特性。所述功能特性包括能加工和呈递抗原给免疫活性细胞。加工和呈递抗原包括，例如靶蛋白的蛋白水解以及表达和加工编码靶抗原的核酸。mDC还能在外周和淋巴组织中迁移。因此，在对合适的刺激，例如MIP3 β 的应答中，可诱导本发明pPS细胞分化产生的mDC迁移。mDC可分泌一种或多种细胞因子，例如一种或多种促炎细胞因子。本发明DC分泌的示范性细胞因子包括IL-12、IL-10和IL-6。

[0109] 本文所述的本发明各种实施方式提供使pPS细胞分化成为DC的方法。考虑这些方法还可包括有丝分裂性能灭活的各类细胞，包括分化细胞群中的不良pPS细胞以及按照下述方法制备的细胞(例如，任何造血谱系细胞，包括mDC和imDC)。因此，本发明的一些实施方式可包括使DC细胞接触蛋白质或肽抗原或编码抗原的核酸，和使DC，例如mDC接触适合抑制细胞分裂的射线源或化疗剂。优选使mDC接触射线源或化疗剂，其中所述mDC包含在含有至少一种pPS细胞的细胞群中。用射线照射细胞或用化疗剂处理细胞能抑制细胞分裂同时保留mDC的功能。此外，用射线源或化疗剂处理细胞可最大程度减少细胞群中存在pPS细胞所导致的不良作用。

[0110] 在一些实施方式中，本发明提供使pPS细胞分化成为中胚层的方法，包括使pPS细胞接触包含多种外源性细胞因子，例如BMP-4、VEGF、SCF和任选的GM-CSF的分化混合液，培养该细胞至少一天，从而使pPS细胞分化成为中胚层。在一些实施方式中，可用分化混合液培养细胞至少约2天、至少约3天、至少约4天、至少约5天，使pPS细胞分化成为中胚层。在某些实施方式中，可用分化混合液培养细胞至少约5天，使pPS细胞分化成为中胚层。在一些实施方式中，所述分化混合液还任选包含以下一种或多种：FLT3L、TPO、IL-4和IL-3。所述中胚层细胞可表达中胚层细胞表达的一种或多种因子或标记。例如，中胚层相关转录因子Brachyury的表达增加和pPS相关转录因子Oct4和Tra-160的表达降低，可表明pPS细胞已分化成为中胚层细胞。在分化混合液存在下继续培养此培养物可促进中胚层细胞进一步分化成为，例如造血谱系的细胞。因此，在一些实施方式中，可在分化混合液存在下培养细胞适当时间使除中胚层细胞外的细胞分化成为其它造血谱系细胞。例如，可用本文所述的分化

混合液培养细胞至少约6天、至少约7天、至少约8天、至少约9天、至少约10天,使pPS细胞分化成为造血干细胞。该细胞可表达造血干细胞表达的一种或多种标记。合适的标记包括CD45、CD34和HoxB4。在进一步的实施方式中,可用本文所述的分化混合液培养细胞至少约22天、至少约23天、至少约24天、至少约25天、至少约26天、至少约27天、至少约28天,使pPS细胞分化成为单核细胞。该细胞可表达单核细胞表达的一种或多种标记。合适的标记包括CD14、CD45和CD11c。在还要进一步的实施方式中,可用本文所述的分化混合液培养细胞至少约20天、至少约23天、至少约25天、至少约30天、至少约31天、至少约32天、至少约33天,使pPS细胞分化成为imDC。该细胞可表达imDC表达的一种或多种标记。合适的标记包括CD86、CD83和MHC II。

[0111] 在某些实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为造血谱系细胞的方法,包括使pPS细胞接触一种或多种分化混合液,从而使pPS细胞分化成为一种或多种造血谱系类型细胞。该方法包括多个步骤,其中一个或多个步骤可导致造血谱系中间类型细胞的分化。本发明不仅考虑执行下述所有步骤,而且考虑执行一个或多个步骤以获得所需的造血谱系中间或前体类型细胞。

[0112] 在一些实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为中胚层的方法,包括:1)使pPS细胞接触包含BMP-4、VEGF、SCF和任选的GM-CSF的第一分化混合液,从而使pPS细胞分化成为中胚层细胞。用该分化混合液培养细胞约1-5天。在下一步的实施方式中,使步骤1)所述的中胚层细胞接触包含VEGF、SCF、GM-CSF的第二分化混合液,从而使中胚层细胞分化成为造血干细胞。可用该分化混合液培养细胞约1-5天。在进一步的实施方式中,可通过使造血干细胞接触包含GM-CSF的分化混合液而使该造血干细胞进一步分化成为普通骨髓祖(CMP)细胞。该步骤的分化混合液还可包含SCF。可用该分化混合液培养细胞约1-10天。在一些实施方式中,可通过使CMP接触包含GM-CSF的第三分化混合液而使CMP进一步分化成为普通粒细胞/单核细胞性祖(GMP)细胞。可用该分化混合液培养细胞约1-5天。在进一步的实施方式中,可通过使GMP接触包含GM-CSF的分化混合液使GMP进一步分化成为单核细胞。可用该分化混合液培养细胞约1-10天。在还要进一步的实施方式中,可通过使单核细胞接触包含GM-CSF和IL-14的分化混合液使单核细胞进一步分化成为imDC。可用该分化混合液培养细胞约1-5天。在还要进一步的实施方式中,可通过使imDC接触任何成熟混合液而使imDC成熟成为mDC。可用该成熟混合液培养细胞约12-72小时。在一些实施方式中,可用该成熟混合液培养细胞约24小时。在其它实施方式中,可用该成熟混合液培养细胞约48小时。

[0113] 在还有其它实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为imDC的方法,包括使pPS细胞接触包含以下的分化混合液:1)约10ng/ml-约75ng/ml的BMP-4;和2)约25ng/ml-约75ng/ml的GM-CSF。

[0114] 在还有其它实施方式中,本发明提供使pPS细胞分化成为imDC的方法,包括使pPS细胞接触包含以下的分化混合液:1)约10ng/ml-约75ng/ml的BMP-4;2)约25ng/ml-约75ng/ml的VEGF;3)约5ng/ml-约50ng/ml的SCF;和4)约25ng/ml-约75ng/ml的GM-CSF。

[0115] 在另一实施方式中,本发明提供富集骨髓祖细胞群的方法,包括分离包含CD45+高细胞群和CD45+低细胞群的细胞培养物中的CD45+高细胞群。在进一步的实施方式中,本发明提供分离粒细胞性祖细胞的方法,包括分离包含CD45+高细胞群和CD45+低细胞群的细胞培养物中的CD45+低细胞群。高和低是相对术语。因此,可采用本领域已知的任何试验检测,

例如用荧光检测器,如荧光活化细胞分选仪(FACS)检测免疫荧光,CD45+低细胞群可指CD45表达幅度是背景约1-2个数量级的细胞,而CD45+高细胞可指CD45表达幅度高于背景以上2个数量级的细胞。可采用本领域已知任何方法分离的靶细胞群。例如,可采用可商品化购得的(FACS)分离细胞群。在一些实施方式中,可根据用标记配体染色的标记物荧光强度分离细胞。作标记的配体可直接或借助人工连接于细胞的另一配体而间接连接于细胞。可根据细胞分选仪的前向和侧向散射(forward and side scatter),依据大小和密度分离细胞群。例如,可用细胞分选仪,依据大小和粒度分离CD45+高与CD45+低细胞群。

[0116] 可采用实施本发明各种实施方式所用的任何合适的最终工作浓度的细胞因子组合以获得所需效果。例如,可采用浓度约1ng/ml-约120ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约10ng/ml-约80ng/ml;约25ng/ml-约75ng/ml;约30ng/ml-约60ng/ml的BMP-4。本发明的一些实施方式采用浓度约50ng/ml的BMP-4。可采用浓度约1ng/ml-约120ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约20ng/ml-约80ng/ml;约25ng/ml约75ng/ml;约30ng/ml-约60ng/ml的VEGF。本发明的一些实施方式采用约50ng/ml的VEGF。可采用浓度约1ng/ml-约120ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约20ng/ml-约80ng/ml;约25ng/ml约75ng/ml;约30ng/ml-约60ng/ml的GM-CSF。本发明的一些实施方式采用约50ng/ml的GM-CSF。可采用浓度约1ng/ml-约350ng/ml;约5ng/ml-约300ng/ml;约10ng/ml-约250ng/ml;约15ng/ml约200ng/ml;约20ng/ml-约150ng/ml的SCF。本发明的一些实施方式可采用约20ng/ml的SCF。可以约1ng/ml-约350ng/ml;约5ng/ml-约300ng/ml;约10ng/ml-约250ng/ml;约15ng/ml约200ng/ml;约20ng/ml-约150ng/ml的FLT3L。本发明的一些实施方式采用约20ng/ml的FLT3L。可采用浓度约1ng/ml-约80ng/ml;约5ng/ml-约75ng/ml;约10ng/ml-约50ng/ml;约20ng/ml约40ng/ml的IL-3。本发明的一些实施方式采用约25ng/ml的IL-3。可采用浓度约1ng/ml-约150ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约10ng/ml-约80ng/ml;约20ng/ml约60ng/ml的TPO。本发明的一些实施方式采用约20ng/ml的TPO。可采用浓度约1ng/ml-约120ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约20ng/ml-约80ng/ml;约25ng/ml约75ng/ml;约30ng/ml-约60ng/ml的IL-4。本发明的一些实施方式采用约50ng/ml的IL-4。

[0117] 本发明的一些实施方式采用包含多种细胞因子的成熟混合液使imDC成熟为mDC。所述成熟混合液各细胞因子组分的最终合适工作浓度可包括能使imDC有效成熟为mDC的任何浓度。例如,可采用浓度约1ng/ml-约150ng/ml;约5ng/ml-约100ng/ml;约10ng/ml-约100ng/ml;约15ng/ml约80ng/ml;约20ng/ml-约60ng/ml的IFN γ 。本发明的一些实施方式采用约25ng/ml的IFN γ 。本发明的其它实施方式采用约10ng/ml的FN γ 。本发明的其它实施方式采用约5ng/ml的IFN γ 。可采用浓度约1ng/ml-约200ng/ml;约10ng/ml-约150ng/ml;约20ng/ml-约100ng/ml;约30ng/ml约80ng/ml;约40ng/ml-约75ng/ml的TNF α 。本发明的一些实施方式采用约10ng/ml的TNF α 。可采用浓度约1ng/ml-约200ng/ml;约5ng/ml-约150ng/ml;约8ng/ml-约75ng/ml;约10ng/ml约50ng/ml的IL-1 β 。本发明的一些实施方式可采用约10ng/ml的IL-1 β 。可采用浓度约0.1ug/ml-约150ug/ml;约0.5ug/ml-约100ug/ml;约0.8ug/ml-约75ug/ml;约1ug/ml约50ug/ml的PGE2。本发明的一些实施方式采用约1ug/ml的PGE2。可采用浓度约1ug/ml-约50ug/ml;约5ug/ml-约40ug/ml;约10ug/ml-约30ug/ml;约15ug/ml约25ug/ml的Poly I:C。本发明的一些实施方式采用约20ug/ml的Poly I:C。

[0118] 在某些实施方式中,本发明使pPS细胞分化成为造血谱系细胞,其中至少约10%、

至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%的细胞表达造血谱系细胞表达的一种或多种标记或因子。

[0119] 包含灵长类多能干细胞和它们的分化后代的细胞培养物

[0120] 在某些实施方式中,本发明提供包含第一细胞群和第二细胞群的细胞培养物,所述第一细胞群包含pPS细胞,所述第二细胞群包含造血谱系细胞和/或中胚层细胞。有助于pPS细胞分化成为靶细胞类型,例如中胚层细胞、骨髓祖细胞、单核细胞、树突细胞等的特定培养条件可导致培养物产生造血谱系细胞和/或中胚层细胞。这种培养条件包括提供一种或多种分化混合液(如下所述),在一些实施方式中提供成熟混合液(如下所述)。细胞培养物可不含以下一种或多种:饲养细胞、基质细胞、动物血清和/或可商品化购得的血清替代物品(例如B27)和外源性IL-3。

[0121] 在一些实施方式中,所述第二细胞群包含中胚层细胞。发育中,中胚层位于外胚层和内胚层之间。结缔组织、骨、软骨、肌肉、造血谱系细胞、血液和血管、淋巴系统、淋巴器官、脊索、胸膜、心包、腹膜、肾脏和生殖腺均源自中胚层。中胚层细胞可表达各种标记,包括表达转录因子brachyury。与分化成为中胚层细胞之前的pPS细胞相比,brachyury的表达水平增加约3-6倍。中胚层的其它标记包括goosecoid。Goosecoid是蛋白质的成对(PRD)同源框家族的bicoid亚家族。编码的蛋白质起着转录因子作用,可以自身调节。

[0122] 在其它实施方式中,造血谱系细胞包括成造血母细胞。造血母细胞能进一步分化成为各种类型的淋巴样细胞、各种类型的骨髓细胞以及内皮细胞。造血母细胞可表达CD34和CD133。Loges等.,(2004).Stem Cells and Development 13(1):229。造血母细胞的其它标记包括Flk-1,它是一种激酶插入结构域受体。

[0123] 在还有其它实施方式中,造血谱系细胞可包含造血干细胞。造血干细胞能分化成为血液中所见的任何类型细胞,包括淋巴样细胞(其后代包括T细胞和B淋巴细胞)和骨髓细胞(其后代包括各种类型的粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、DC、巨核细胞、血小板、成红细胞和红细胞)。造血干细胞的标记可包括CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{低/-}、C-kit/CD117^低。在本发明的某些实施方式中,表达至少一种造血干细胞相关标记的细胞的百分比为约1%-约20%、约5%-约17%、约10%-约15%。在本发明的一些实施方式中,所述细胞培养物中约15%的细胞表达至少一种造血干细胞相关标记。

[0124] 在另一实施方式中,造血谱系细胞可包括普通骨髓祖细胞。骨髓祖细胞在合适的培养条件下可分化成为各种骨髓细胞,包括粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、DC、巨核细胞/红细胞祖细胞。骨髓祖细胞的标记可包括CD13、CD34、IL-3R α (CD123)和CD45RA。在本发明的某些实施方式中,表达至少一种骨髓祖细胞相关标记的细胞的百分比为约1%-约50%、约5%-约45%、约6%-约38%。在本发明的一些实施方式中,所述细胞培养物中约35%的细胞表达至少一种骨髓祖细胞相关标记。

[0125] 在还有其它实施方式中,造血谱系细胞可包括粒细胞单核细胞性祖细胞。粒细胞单核细胞性祖细胞可在合适条件下分化成为粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和DC。粒细胞单核细胞性祖细胞的标记可包括CD64(EP0708336)。

[0126] 在进一步的实施方式中,造血谱系细胞可包括单核细胞。在合适的培养条件下,单

核细胞可分化成为DC、巨噬细胞和粒细胞。单核细胞的标记可包括CD14、CD45^高、CD11a、CD11b和CD15。单核细胞形态(特征)包括存在大的双叶核。在本发明的某些实施方式中,表达至少一种单核细胞相关标记的细胞的百分比是约1%-约75%、约5%-约70%、约10%-约65%。在本发明的一些实施方式中,所述细胞培养物中约65%的细胞表达至少一种单核细胞相关标记。

[0127] 在还有进一步的实施方式中,造血谱系细胞可包括imDC。imDC能摄取并加工抗原。在合适的培养条件下,imDC可经历成熟而变为适合将抗原呈递给免疫活性细胞的mDC。imDC的标记包括CD11c^高、CD11b、MHC I、MHC II^低、CD14^{-/低}、CD205⁻和CD83^低。在本发明的某些实施方式中,表达至少一种imDC相关标记的细胞的百分比是约10%-约99%、约20%-约99%。在本发明的某些实施方式中,所述细胞培养物中至少约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%的细胞表达至少一种imDC相关标记。

[0128] 在还有其它实施方式中,造血谱系细胞可包括mDC。mDC能在对合适的刺激(例如MIP3β)的应答中迁移并将抗原呈递给免疫活性细胞,例如T淋巴细胞。mDC具有不同的形态学特征,包括存在从细胞发散的分支状突起或树突。mDC的标记可包括CD83、CCR7、CD11c^高、CD205、CD86、CD40、MHC I、MHC II和CD14⁻。在本发明的某些实施方式中,表达至少一种mDC相关标记的细胞的百分比是约10%-约99%、约20%-约99%。在本发明的某些实施方式中,所述细胞培养物中至少约90%、约80%、约70%、约60%、约50%、约40%、约30%、约20%、约10%的细胞表达至少一种mDC相关标记。

[0129] 可采用合适的免疫学技术,例如用于检测细胞表面标记的流式免疫细胞术或亲和吸附、用于检测胞内或细胞表面标记的免疫细胞化学(例如,固定细胞或组织切片的)、用于细胞提取物的蛋白质印迹分析和细胞提取物或分泌入培养液的细胞产物的酶联免疫试验,来检测组织特异性标记。如果在标准免疫细胞化学或流式细胞术试验中,任选在细胞固定后并任选用标记的第二抗体检测有明显可检测量的抗体结合某抗原,则称该抗原的表达是抗体可检测的。

[0130] 也可通过Northern印迹分析、斑点印迹杂交分析或用公众可获得的序列数据(GenBank),在标准扩增方法中用序列-特异性引物作逆转录酶引发聚合酶链式反应(RT-PCR),检测组织特异性基因表达的mRNA产物水平。如果蛋白质或mRNA水平超过未分化灵长类多能干细胞至少约2-倍、约10-或约50-倍,则认为组织特异性标记表达为阳性。

[0131] 也可通过Northern印迹分析、斑点印迹杂交分析或在标准扩增方法中用序列-特异性引物作逆转录酶引发的聚合酶链式反应(RT-PCR),检测组织特异性基因表达的mRNA产物水平。进一步的细节见美国专利号5,843,780。可从公开数据库,例如GenBank获得本文所列特定标记的序列数据。如果在典型的受控实验中按照标准方法对细胞样品实施本文所述试验产生明确的可辨别杂交或扩增产物,则称可根据该试验检测表达的mRNA水平。如果蛋白质或mRNA水平超过未分化灵长类多能干细胞的至少约2-倍、约10-或约50-倍,则称组织特异性标记表达为阳性。

[0132] 一旦在所需表型的细胞的表面上鉴定到这些标记,可将它们用于免疫选择以使用免疫淘选或抗体介导的FACS等技术进一步富集细胞群。

[0133] 射线照射pPS细胞分化产生的DC

[0134] 本发明考虑用射线照射包含pPS细胞体外分化产生的mDC或imDC的细胞群,即pPS

细胞的体外后代的细胞群的方法以及包含pPS细胞体外分化产生的mDC或imDC的经照射的细胞培养物。本发明的其它实施方式考虑经照射的免疫调节制品及其制备方法以及用包含mDC的经照射的细胞群刺激免疫应答的方法。本发明还有其它实施方式考虑装有经射线照射mDC的试剂盒。

[0135] pPS细胞分化产生的经过照射的mDC抑制了任何细胞进一步的分裂,从而消除了未完全分化成为mDC的细胞(例如,pPS细胞)所导致的风险,例如形成畸胎瘤的风险。经照射的mDC可以保持未经照射DC(例如PBMC衍生DC)的功能特性,因此,经照射的mDC仍能加工和呈递抗原给免疫活性细胞并导致该细胞对呈递的抗原应答反应。经照射的mDC在对趋化刺激的应答反应中也能维持迁移能力。此外,经照射的mDC还能继续表达在mDC(例如PBMC衍生mDC)上所见的标记。这些标记包括HLA-II、HLA-I和CD83。还考虑本发明的mDC可先接触抗原或编码抗原的核酸,再接触射线源。

[0136] 在一些实施方式中,可使mDC接触抗原,例如蛋白质或肽,然后经射线照射。在其它实施方式中,可使mDC接触(例如电穿孔或采用任何其它合适的转染方法接触)核酸,例如RNA分子,然后经射线照射。在一些实施方式中,可使细胞接触核酸,然后静置约24小时(例如,37°C和5%CO₂)。然后将细胞置于合适的冷冻介质中(例如,含DMSO的介质),约-80°C冷冻。然后可照射冷冻的细胞(例如,在干冰上),随后冻存(例如在液氮中)直至将来需要使用时。

[0137] 可采用任何合适的射线源照射本发明的mDC。在一个实施方式中,射线源可以是电离射线源。例如,X-射线可提供合适的射线源。适合的其它类型射线包括紫外线照射,例如γ射线。

[0138] 可照射包含pPS细胞体外分化产生的mDC细胞群适当长的时间,例如从而抑制细胞分裂。可凭经验优化射线剂量、细胞群大小和暴露时间等参数,然后培养照射后的细胞并检测细胞是否继续分裂。可用血球计数器,通过手工计数细胞来检测细胞分裂。或用自动细胞计数器。

[0139] 当射线源是X-射线时,合适的射线剂量范围可以是约300rad-约3500rad;约400rad-约3000rad;约500rad-约2500rad;约500rad-约2000rad;约400rad-约1500rad。在一个实施方式中,将约2000rad射线施加于包含mDC的细胞群。在另一实施方式中,将约1500rad射线施加于包含mDC的细胞群。在进一步的实施方式中,将约1000rad射线施加于包含mDC的细胞群。在还有另一实施方式中,将约500rad射线施加于包含mDC的细胞群。

[0140] 如果射线源是紫外线,合适的剂量范围可以是约10J/m²-约3,000J/m²;约20J/m²-约2,000J/m²;约25J/m²-约1,500J/m²;约30J/m²-约500J/m²;约50J/m²-约200J/m²。在一些实施方式中,采用约50J/m²。在其它实施方式中,采用约100J/m²。在其它实施方式中,采用约200J/m²。在还有其它实施方式中,采用约300J/m²。在还有其它实施方式中,采用约500J/m²。

[0141] 如果射线源是X-射线,可先将细胞悬浮于合适的培养液或缓冲液中,再暴露于射线源。合适的培养液包括用于干细胞培养或分化的任何可商品化购得的培养液。例如,可采用加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司(Invitrogen,Carlsbad,CA)的AIM V培养液。合适的缓冲液可包括等渗缓冲液,例如PBS。所用培养液的体积取决于待照射细胞群的大小。对于约3.0x10⁵-约4.0x10⁵个细胞的细胞群,合适体积为约5-20ml培养液或缓冲液。在一个实施方式中,可采用约15ml培养液或缓冲液。

[0142] 如果射线源是紫外光,可使细胞附着于基材,例如组织培养瓶壁培养,再暴露于射线源。暴露射线期间可将细胞维持在合适缓冲液或培养液中。

[0143] 在一个实施方式中,用约2000rad的X-射线照射约 3.0×10^5 个细胞到约 4.0×10^5 个细胞的细胞群。在另一实施方式中,用约1500rad的X-射线照射约 3.0×10^5 个细胞到约 4.0×10^5 个细胞的细胞群。在还有另一实施方式中,用约1000rad的X-射线照射约 3.0×10^5 个细胞到约 4.0×10^5 个细胞的细胞群。在还有另一实施方式中,用约500rad的X-射线照射约 3.0×10^5 个细胞到约 4.0×10^5 个细胞的细胞群。所述细胞可包含pPS细胞体外分化产生的mDC。

[0144] 还考虑可用适合抑制细胞分裂的化学试剂取代射线源。因此,可使包含pPS细胞体外分化产生的mDC的细胞群接触适合抑制细胞分裂的化学试剂。合适化学试剂的例子包括化疗剂,例如丝裂霉素C和顺铂。其它合适的化学试剂可包括以下:阿糖胞苷、氟-脱氧尿苷和尿苷的一种或多种。

[0145] 产生树突细胞的系统

[0146] 在某些实施方式中,本发明考虑体外产生成熟树突细胞的系统,其包含a) 含pPS细胞的第一分离细胞群和b) 含成熟树突细胞的第二分离细胞群,所述树突细胞是第一细胞群一部分细胞的体外后代。

[0147] 在其它实施方式中,本发明考虑产生有丝分裂性能灭活的抗原呈递细胞的系统,其包含a) 含pPS细胞的第一分离细胞群和b) 含有丝分裂性能灭活的成熟树突细胞的第二分离细胞群,所述树突细胞是第一分离细胞群一部分细胞的体外后代。

[0148] 可使一部分pPS细胞体外分化成为mDC,可保存包含pPS细胞的第一分离细胞群的一部分细胞用于体外分化第一细胞群来制备更多的第二分离细胞群。该系统考虑了含pPS细胞的第一细胞群包含可用本文所述方法分化成为DC的细胞群的那部分细胞和细胞群中保存的供将来使用的那部分细胞,例如培养物中维持于未分化状态的或 -80°C 或液氮中等份冻存(在合适培养液中)的细胞。由于能在培养中无限复制未分化(多能)状态的pPS细胞,该系统提供了用本文所述方法无限产生和提供分化的DC细胞的方法。此外,由于体外培养pPS细胞也可分化复制产生DC,例如imDC,该系统提供了能产生额外DC的第二细胞群。因此,该系统提供了连续产生大量均匀产物,例如DC的方法。该系统还可包括下文所述有丝分裂性能灭活的一群或两群细胞的实施方式。

[0149] 本文描述了含pPS细胞的第一细胞群和含DC细胞的第二细胞群二者的特征性标记和形态。所述DC细胞可以是载有感兴趣抗原,例如肿瘤抗原(如hTERT)的mDC。可按照本发明用射线照射此DC细胞以产生有丝分裂性能灭活的细胞,从而消除含该DC的第二细胞群中可能存在pPS细胞的潜在风险。在某些实施方式中,至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%的mDC可表达选自CD83、CD86、MHC II或CCR7的一种或多种标记。

[0150] 试剂盒

[0151] 在某些实施方式中,本发明提供刺激免疫应答的试剂盒。在一个实施方式中,所述试剂盒装有包含pPS细胞和DC细胞培养物的一个或多个容器。所述试剂盒可任选装有以下一种或多种:a) 刺激免疫应答的说明书;b) 培养DC的说明书;c) 成熟混合液,其提供的DC是imDC;c) 一个或多个合适的培养容器;d) 刺激免疫应答的一种或多种抗原;e) 一种或多种免疫活性细胞;和f) 检测所刺激免疫应答的合适试剂。所述试剂盒可用于体外或体内刺激免

疫应答。所述DC可以是imDC或mDC。在一些实施方式中,提供冷冻的DC。可用液氮冷冻细胞,约-140℃保存。或者,可在包装后,例如在约4℃冷藏保存DC。可预先混合成熟混合液,或将其组分各自分别包装。提供的抗原可以是蛋白质或肽或核酸,例如编码抗原的DNA、RNA。所述试剂盒还可提供用抗原加载DC的说明书。加载指使DC接触抗原,从而将其呈递给免疫活性细胞。所述试剂盒还可装有:培养DC、使DC接触抗原、使DC接触免疫活性细胞的说明书。检测所刺激免疫应答的合适试剂包括检测细胞增殖的³H胸苷,检测对抗原产生免疫应答期间分泌的细胞因子,例如IL-2、IFN的抗体。

[0152] 在另一实施方式中,所述试剂盒可装有pPS细胞体外分化产生的经照射的mDC和一个或多个容器。所述试剂盒可任选装有以下一种或多种:a) 刺激免疫应答的说明书;b) 一种或多种预加载的抗原以供刺激免疫应答;c) 一种或多种免疫活性细胞;和d) 检测所刺激免疫应答的合适试剂。所述药盒可用于体外或体内刺激免疫应答。提供的预加载抗原可以是蛋白质或肽或核酸,例如编码抗原的DNA、RNA。加载指使DC接触抗原,从而将其呈递给免疫活性细胞。检测所刺激免疫应答的合适试剂可包括检测细胞增殖的³H胸苷,检测对抗原产生免疫应答期间分泌的细胞因子,例如IL-2、IFN的抗体。在其它实施方式中,本发明提供上述药盒,其中用化学处理的mDC取代经照射的mDC。化学处理的mDC可以是已与适合抑制细胞分裂的化学试剂接触的mDC。合适的化学试剂包括丝裂霉素,例如丝裂霉素C。

[0153] ES-分化的造血谱系细胞的用途

[0154] 本发明提供大量产生造血和/或中胚层谱系细胞的方法。这些细胞群可用于许多重要的研究、开发和商品化目的。

[0155] 筛选

[0156] 可利用商品化购得的本发明细胞来筛选能影响此类细胞其及各种后代的特征的因子(例如溶剂、小分子药物、肽、寡核苷酸)或环境条件(例如培养条件或操作)。所述特征包括细胞的表型或功能特征。

[0157] 在一些方面,可用pPS细胞(未分化或分化的)来筛选能促进其成熟为晚期造血祖细胞或终末分化细胞的因子,或能促进此类细胞增殖和维持长期培养的因子。例如,通过将候选的成熟因子或生长因子加入不同孔中的细胞来测试它们,然后按照进一步培养和使用这类细胞所需的标准测定所导致的任何表型改变。

[0158] 本发明的其它筛选应用涉及检验药理学化合物对造血谱系细胞和/或中胚层细胞的作用。进行筛选是因为这类化合物设计成对细胞具有药理学作用,或因为设计的具有其它作用的化合物可能对该组织类型的细胞具有非想要的副作用。其它筛选应用包括筛选化合物的致癌性或其它毒性作用。可用本发明的任何祖细胞或终末分化细胞进行筛选以确定靶化合物对靶细胞具有有益还是有害作用。

[0159] 读者通常可参考标准教科书*In vitro Methods in Pharmaceutical Research* (药物研究的体外方法),学术出版社(Academic Press),1997。评估候选药理学化合物的活性通常包括混合本发明细胞与单独的候选化合物或其它药物组合。研究人员测定该化合物导致的细胞形态、表型标记或功能活性的变化(与未处理的细胞或用惰性化合物处理的细胞相比),然后将该化合物的作用与观察到的变化相关联。

[0160] 在第一种情况中,通过对细胞活力、存活、形态和某些标记及受体的表达的影响测定细胞毒性,可检测DNA的合成或修复来测定药物对染色体DNA的作用。^{[3}H]-胸苷或BrdU的

掺入(量)与药物作用相一致,特别是在细胞周期中的不定期或高于细胞复制所需水平时。不良作用还包括通过中期扩增(metaphase spread)测定到比例不正常的姊妹染色体单体交换。其它细节读者可参见A.Vickers(第375-410页,药物研究的体外方法,学术出版社,1997)。

[0161] 如果观察到所述作用,可滴定化合物的浓度以确定有效剂量中值(ED₅₀)。

[0162] 调节免疫应答

[0163] 在某些实施方式中,本发明提供刺激对抗原免疫应答的方法,包括使本发明的细胞,例如sPS细胞分化产生的DC接触抗原。所述抗原包括蛋白质或肽,或者核酸,例如DNA、RNA。如果抗原是蛋白质或肽,所述树突细胞会摄取此种蛋白质或肽并加工以在MHC中呈递。加工通常包括蛋白水解切割抗原,使之适合于MHC沟槽。如果抗原是蛋白质,则DC细胞可以是imDC。如果抗原是全长蛋白质的肽片段,则DC可以是mDC。如果抗原是核酸,本发明考虑采用本领域已知的方法输送该核酸穿过细胞膜而递送入细胞质。在一个实施方式中,可电穿孔细胞使核酸穿过细胞膜。在一些实施方式中,采用电穿孔使细胞与抗原接触时,合适的细胞可以是imDC。在其它实施方式中,采用电穿孔使细胞与抗原接触时,合适的细胞可以是mDC。可用加利福尼亚州赫拉克勒斯BR实验室的(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA)基因脉冲Xcell仪,以300V、150uF和1000hms的参数电穿孔细胞。可用流式细胞术或蛋白质印迹测定蛋白质表达水平。当电穿孔的细胞是imDC时,可使该细胞与本文所述成熟混合液接触,从而使imDC成熟为mDC。

[0164] 在另一实施方式中,可利用病毒载体将编码抗原的核酸输送入细胞,例如mDC、imDC中。当利用病毒载体使细胞接触抗原时,合适的细胞可以是imDC。合适的病毒载体的例子包括腺病毒载体和痘病毒载体。在其它实施方式中,可用商品化购得的转染试剂将编码抗原的核酸输送入细胞中。合适的例子包括阳离子脂质制剂,例如脂转染胺Lipofectamine®。

[0165] 本发明考虑可采用任何来源的抗原。因此,抗原可以是肿瘤抗原,例如人端粒酶逆转录酶(hTERT);或传染因子,例如病毒、细菌或寄生虫表达的抗原。

[0166] 然后使mDC体内或体外接触免疫活性细胞,例如淋巴细胞。可通过检测免疫活性细胞的细胞增殖(例如,通过³H胸苷掺入)和/或mDC或免疫活性细胞产生的细胞因子(例如,IL-2、IFN、IL-6、IL-12)来监测淋巴细胞的免疫应答。这些研究可用于特定修改对抗原的免疫应答类型和程度使之适应。这些研究还可用于选择抗原的最佳表位来引发最合适的免疫应答。可采用合适的动物模型体外或体内刺激免疫应答。

[0167] 为测定细胞组合物是否适合治疗给予,可先用合适的动物模型检验所述细胞。合适的动物模型包括含人源化免疫系统的小鼠。参见,例如Goldstein(2008)AIDS Res Ther 5(1):3。可将用特异性抗原引发的mDC给予动物,测定该动物是否能产生对该抗原的特异性免疫应答。该动物与该DC的MHC I基因座可匹配或部分匹配。可研究抗原和细胞的给药剂量和剂型以特定修改对该抗原的免疫应答使之适应并监测所给予细胞在淋巴系统内的迁移。可依据对抗原应答产生的细胞因子以及淋巴细胞增殖来特征分析免疫应答的程度。可监测动物对抗原的抗体应答以及非典型免疫应答,例如超敏反应、自身免疫反应。可分离产生的抗体用作研究试剂或治疗剂。

[0168] 已知imDC能诱导抗原特异性耐受,参见,例如Cools等.,(2007)J Leukoc Biol 82

(6):1365。因此,可用本文所述的imDC诱导对象耐受。可使imDC细胞接触抗原,例如上述蛋白质或肽抗原或编码抗原的核酸。然后将(接触后的)细胞给予对象诱导对象耐受。或者,可使imDC成熟为mDC用于刺激免疫应答。

[0169] 造血细胞的重建

[0170] 按照本发明制备的造血谱系细胞可用于重建对象的一种或多种造血细胞群。例如,可利用骨髓祖细胞通过重建缺乏的细胞群而缓解与细胞减少症相关的一种或多种症状。例如,可利用骨髓祖细胞改善血小板计数低或红细胞计数低对象的病情。再例如,可利用造血谱系细胞,例如骨髓祖细胞改善遗传缺陷,例如凝固因子相关缺陷对象的一种或多种症状。因此,可采用本发明一些实施方式制备的细胞来提高凝血因子,例如第VIII因子或第IX因子的水平。在其它实施方式中,可利用造血谱系细胞重建淋巴细胞群,例如HIV患者中的CD4淋巴细胞群。

[0171] 给予人

[0172] 本发明产生的mDC在功能上与分离自PBMC的mDC相当。例如本发明的mDC能摄取、加工和呈递抗原;在对呈递的特定抗原应答中刺激T细胞增殖和诱导抗原特异性T细胞介导的靶细胞溶解。此外,即使在经射线照射后本发明的mDC仍维持了功能。因此,本发明的mDC可作为DC的来源提供给予人对象以刺激对特定抗原的免疫应答,同时尽可能降低接触未分化细胞和致病因子带来的风险。

[0173] 可将本发明mDC给予人对象以刺激对象的免疫应答。给药前,可使imDC接触感兴趣抗原然后成熟为mDC。抗原可经内化和加工,从而在该细胞表面的MHC I和/或MHC II中呈递,因此可刺激对抗原的特异性免疫应答。在一些实施方式中,所述特异性免疫应答有治疗作用。在其它实施方式中,所述免疫应答可提供预防作用。在还有其它实施方式中,所述特异性免疫应答可提供抗原特异性细胞,例如细胞毒性T细胞或B淋巴细胞,或特异性识别抗原的抗体的来源。可通过静脉内、真皮内或肌肉内注射给予本发明细胞。在其它实施方式中,可皮下给予所述细胞。可用合适缓冲液,例如PBS和/或合适赋形剂配制所述细胞。可用合适佐剂配制所述细胞。合适的药物载体的例子描述参见Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学)E.W.Martin第20版.巴尔的摩,马里兰州:LWW公司(Lippincott Williams&Wilkins),2000。

[0174] 对于医学制剂的通用原则,读者可参见Cell Therapy:Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy (细胞治疗:干细胞移植、基因治疗和细胞免疫治疗),G.Morstyn和W.Sheridan编,剑桥大学出版社,1996;和 Hematopoietic Stem Cell Therapy (造血干细胞),E.D.Ball,J.Lister和P.Law,丘吉尔利文斯敦,2000。所述组合中细胞赋形剂和相伴组分的选择应适合给药途径和所用装置。

[0175] 可任选将本发明的药物组合物包装在合适容器中,所述容器中包括所需目的,例如重建造血谱系细胞功能以改善疾病状况或刺激免疫应答的书写说明书。

[0176] 其它用途

[0177] 可用本发明细胞制备cDNA文库,该文库相对没有污染其它谱系细胞优先表达的cDNA。例如,1000rpm离心5分钟收集造血谱系细胞,然后制备mRNA和逆转录。用微阵列分析比较造血谱系细胞与其它类型细胞,例如pPS细胞的表达模式,综述参见Fritz等.,(2000) Science 288:316。由于这些细胞与分化它们的亲代pPS细胞系在遗传上实质性相同,它们

为研究参与造血谱系细胞分化和成熟的基因提供了特别合适的系统。例如,可制备亲代细胞系和造血后代细胞的核酸文库,采用减除杂交法分离后代细胞分化和成熟的重要基因。

[0178] 还可使用本发明的分化细胞制备造血谱系细胞标记的特异性抗体。可将免疫原性形式的本发明细胞注射给脊椎动物来制备多克隆抗体。单克隆抗体的制备描述可见标准参考文献,例如Harlow和Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (抗体:实验室手册);美国专利号4,491,632;4,472,500和4,444,887;和*Methods in Enzymology* (酶学方法) 73B:3 (1981)。

[0179] 灵长类多能干细胞

[0180] 本发明提供使pPS细胞分化成为造血谱系细胞的方法。pPS细胞包括任何灵长类多能细胞。在合适的培养条件下,多能细胞能形成三种原胚层(中胚层、内胚层和外胚层)各自的至少一种类型细胞。pPS细胞可来源于成熟分化的细胞。或者,建立的pPS细胞系可以是实施本发明的细胞的合适来源。pPS细胞通常不衍生自恶性来源。植入免疫缺陷小鼠,例如SCD小鼠时,pPS细胞会形成畸胎瘤。

[0181] 在显微镜下,灵长类多能干细胞显示核/质比例高、核仁显著和形成紧实的细胞集落,可辨别的细胞连接差。灵长类多能干细胞通常表达时期特异性胚胎抗原(SSEA) 3和4以及可用命名为Tra-1-60和Tra-1-81的抗体检测的标记。用RT-PCR检测,未分化的人胚胎干细胞通常也表达转录因子Oct-3/4、Cripto、胃泌素释放肽(GRP)受体、足萼蛋白样蛋白(PODXL)、nanog和端粒酶逆转录酶,例如hTERT (US 2003/0224411 A1)。

[0182] 可用于本发明任何实施方式的pPS细胞包括但不限于:胚胎干细胞,例如来自能购得的已建立细胞系的人胚胎干细胞(hES)。可分离灵长类动物的胚泡获得胚胎干细胞(美国专利5,843,780;Thomson等., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7844)。

[0183] 其它灵长类多能干细胞类型包括但不限于:WO 01/51610所述的原始外胚层样(EPL)细胞。

[0184] 适用于本发明任何实施方式的pPS细胞还包括诱生的灵长类多能干(iPS)细胞。iPS细胞指,例如用一种或多种合适载体转染经遗传学修饰的细胞,从而它们获得了pPS细胞的表型。这些重编程细胞获得的表型性状包括形态类似于胚泡分离的干细胞、表面抗原表达、基因表达和端粒酶活性均类似于胚泡衍生细胞。iPS细胞能分化成为原胚层(外胚层、内胚层和中胚层)各自的至少一种类型细胞。注射入免疫缺陷小鼠,例如SCID小鼠时,iPS细胞也能形成畸胎瘤(Takahashi等., (2007) *Cell* 131 (5):861;Yu等., (2007) *Science* 318:1917)。

[0185] 可从能购得的已建立的胚胎干细胞系选择本发明所用的胚胎干细胞。现已建立了大量的胚胎干细胞系,包括但不限于:H1、H7、H9、H13或H14(参见Thompson);佐治亚州雅典市BG公司(BresaGen, Inc., Athens, GA)的hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03;新加坡ES细胞国际公司(ES Cell International, Inc., Singapore)的HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5、HES-6;加利福尼亚大学旧金山分校(University of California at San Francisco)的HSF-1、HSF-6;以色列海法市以色列技术研究院(Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel)衍生的I3、I3.2、I3.3、I4、I6、I6.2、J3、J3.2;UCSF-1和UCSF-2(Genbacev等., (2005) *Fertil. Steril.* 83 (5):1517);细胞系HUES1-17(Cowan等., (2004) *NEJM* 350 (13):1353);和细胞系ACT-14(Klimanskaya等., (2005) *Lancet*, 365 (9471):

1636)。

[0186] 在某些实施方式中,可采用无饲养细胞方式衍生的本发明所用的pPS细胞(参见,例如Klimanskaya等.,(2005) Lancet,365(9471):1636)。在某些实施方式中,可先培养pPS再用于无血清环境中。

[0187] 灵长类多能干细胞的培养条件

[0188] 可用本领域已知的各种基质、培养液和其它添加剂及因子培养pPS细胞。在一些实施方式中,合适的基质可包含由以下一种或多种构成的基质:层粘连蛋白、胶原、纤连蛋白、玻连蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖。在一些实施方式中,所述基质可包含鼠EHS肉瘤基底膜的可溶性提取物,其可商品化购得,例如加利福尼亚州圣何塞BD生物科学公司(BD Biosciences, San Jose, CA)的Matrigel™。在其它实施方式中,所述基质可包含人、人源化或鼠源的一种或多种分离的基质蛋白,例如加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的CELLstart™。采用促进增殖同时抑制分化的培养条件,连续培养增殖灵长类多能干细胞。配制的示范性培养液含80%DMEM(例如吉比克公司的敲除DMEM(Knock-Out DMEM, Gibco))、20%成分明确的胎牛血清(FBS,海克隆公司(Hyclone))或血清替代品(US 2002/0076747 A1,生命技术公司(Life Technologies Inc.))、1%非必需氨基酸、1mM L-谷氨酰胺和0.1mMβ-巯基乙醇。其它合适的培养液包括成分明确的无血清培养液,例如马里兰州沃克斯维尔隆萨公司(Lonza, Walkersville, MD)的X-VIVO™ 10。

[0189] 在某些实施方式中,无需添加饲养细胞可将pPS细胞维持在未分化状态,(参见,例如(2004) Rosler等., Dev. Dynam. 229:259)。通常用含有促进细胞增殖而非分化的因子的营养培养液支持无饲养细胞的培养(参见,例如美国专利号6,800,480)。在某些实施方式中,可采用含有此类因子的条件化培养液。可通过用培养液培养分泌此类因子的细胞而获得条件化培养液。合适的细胞包括经射线照射(约4,000rad)的原代小鼠胚胎成纤维细胞、端粒化小鼠成纤维细胞(telomerized mouse fibroblast)或衍生自灵长类多能干细胞的成纤维细胞样细胞(美国专利6,642,048)。通过无血清培养液,例如补加20%血清替代品和4ng/mL bFGF的KO DMEM中接种饲养细胞使得培养液条件化。给条件化1-2天的培养液再补加bFGF,用于支持pPS细胞培养1-2天(参见,例如W001/51616; Xu等., (2001) Nat. Biotechnol. 19:971, 2001)。

[0190] 或者,可采用新鲜的,或非条件化但添加了能促进未分化形式细胞增殖的因子(例如成纤维细胞生长因子或毛喉素)的培养液。例子有基础培养液,例如马里兰州沃克斯维尔隆萨公司的X-VIVO™ 10或马里兰州盖瑟斯堡QB公司(Quality Biological Inc. Gaithersburg, MD)的QBSF™-60,其补加了40-80ng/mL的bFGF,任选含有SCF(15ng/mL)或Flt3配体(75ng/mL)(参见,例如Xu等., (2005) Stem Cells 23(3):315)。这些培养液制剂的优点是支持细胞生长的速度为其它系统的2-3倍(参见,例如W0 03/020920)。在一些实施方式中,可用含bFGF和TGFβ的培养液培养pPS细胞,例如hES细胞。bFGF的合适浓度包括约80ng/ml。TGFβ的合适浓度包括约0.5ng/ml。本发明的某些实施方式中可用其它可商品化购得的培养液制剂。合适的培养液制剂包括马里兰州沃克斯维尔隆萨公司的X-VIVO™ 15;加拿大温哥华干细胞技术公司(Srem Cell Technologies, Vancouver, CA)的mTeSR™;加拿大温哥华干细胞技术公司的hTeSR™;加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的StemPro™和弗吉尼亚州玛纳萨斯市米迪阿泰克公司(Mediatech, Inc., Manassas, VA)的Cellgro™ DC。

[0191] 在一些实施方式中,可用 $>15,000$ 个细胞/ cm^2 (优选 $90,000/\text{cm}^2$ - $170,000/\text{cm}^2$) 接种灵长类多能干细胞。通常在细胞完全分散之前停止酶消化(例如用胶原酶IV处理5分钟)。然后将约 10^2 - $2,000$ 个细胞的团块不作进一步分散直接接种在合适基质上。或者,可通过用 0.5mM EDTA的PBS溶液培育细胞约5分钟或通过机械方法,例如细移液管刮下或分离,使所需细胞从平板上简单脱离,而在平板细胞达到汇合前不用酶收集细胞。洗涤培养容器后,将细胞不作进一步分散接种新的培养液。再例如,可在 37°C ,用 0.05% (重量/体积) 胰蛋白酶(**Gibco®**,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)和 0.05mM EDTA溶液培育5-15分钟,从平板中取得无饲养细胞培养的汇合人胚胎干细胞,所述人胚胎干细胞源自能购得的已建立细胞系。可取出平板中的剩余细胞,将该细胞研磨成包含单个细胞和小集群的悬液,然后以 $50,000$ - $200,000$ 个细胞/ cm^2 的密度接种以促进存活并限制分化。

[0192] 在某些实施方式中,可在饲养细胞层上培养pPS细胞。在某些实施方式中,那些饲养细胞可衍生自人或鼠来源。可分离各种人组织的人饲养细胞或通过使人胚胎干细胞分化成为成纤维细胞而获得饲养细胞(参见,例如W001/51616),所述人胚胎干细胞源自能购得的已建立细胞系。在某些实施方式中,可采用的人饲养细胞包括但不限于:胎盘成纤维细胞(参见,例如Genbacev等., (2005) *Fertil. Steril.* 83 (5):1517)、输卵管上皮细胞(参见,例如Richards等., 92002) *Nat. Biotechnol.*, 20:933)、毛喉素成纤维细胞(参见,例如Amit等., (2003) *Biol. Reprod.* 68:2150)、子宫内膜细胞(参见,例如Lee等., (2005) *Biol. Reprod.* 72 (1):42),所述人饲养细胞源自能购得的已建立细胞系。

[0193] 在实施本发明时,可采用各种固体表面培养细胞。那些固体表面包括但不限于:可商品化购得的标准细胞培养平板,例如6-孔、24-孔、96-孔或144-孔板。其它固体表面包括但不限于微载体和园片。在某些实施方式中,所述微载体是珠。那些珠可有各种形式,例如含有正电基团可促进细胞粘附的Cytodex葡聚糖微载体珠、用于细胞粘附的明胶/胶原-包被珠和含有供细胞附着的多不同孔的大孔微载体珠。这种Cytodex葡聚糖、明胶包被和大孔微载体珠可商品化购得(密苏里州圣路易斯西格玛-阿尔德里奇公司(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)或密歇根州安阿伯索罗希尔过程公司(Solohill Engineering Inc., Ann Arbor, MI))。在某些实施方式中,所述珠的大小为 90 - $200\mu\text{m}$,面积为 350 - 500cm^2 。珠可由各种材料,例如但不限于玻璃或塑料制成。在某些实施方式中,园片可用于搅拌罐生物反应器中以供细胞附着。例如新泽西州埃迪逊NBS公司(New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, NJ)等公司出售的园片。在某些实施方式中,所述园片是Fibra-cel园片,如聚酯/聚丙烯园片。1克这些园片可提供 1200cm^2 的表面积。

[0194] 适合培养pPS细胞的固体表面可由各种物质制成,包括但不限于:玻璃或塑料,例如聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚碳酸酯、聚四氟乙烯、聚酯薄膜或塑料相比培养玻片(thermanox)。在本发明的某些实施方式中,固体表面可以是三维形状。示范性三维固体表面描述见,例如US20050031598。

[0195] 在某些实施方式中,在实施本发明方法期间所述细胞为单细胞悬液。可用各种方法制备单细胞悬液,包括但不限于:用旋转瓶、摇瓶或发酵罐培养。可用的发酵罐包括但不限于:Celligen Plus (NBS公司., 埃迪逊, 新泽西州) 和加利福尼亚州福斯特城安普利康公司(Applikon Inc., Foster City, CA)的STR或搅拌罐反应器。在某些实施方式中,可用培养液连续灌注生物反应器或以分批加料方式使用生物反应器。生物反应器的大小不同,包括

2. 2L、5L、7.5L、14L或20L生物反应器。

[0196] 通用技术

[0197] 为进一步阐述用于实施本发明的通用技术,实施者可参考细胞生物学、组织培养、胚胎学和免疫学的标准教科书和综述。

[0198] 关于组织和细胞培养及胚胎干细胞,读者可参考本领域已有的许多出版物,例如 Teratocarcinomas and Embryonic Stem cells:A Practical Approach(畸胎瘤和胚胎干细胞:实用方法)(E.J.Robertson编., IRL出版有限公司(IRL Press Ltd.)1987); Guide to Techniques in Mouse Development(小鼠发育技术指南)(P.M.Wasserman等编., 学术出版社1993); Embryonic Stem Cell Differentiation in Vitro(胚胎干细胞体外分化)(M.V.Wiles, Meth.Enzymol.225:900,1993); Properties and Uses of Embryonic Stem Cells:Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy(胚胎干细胞的特性和应用:应用于人生物学和基因治疗的各方面)(P.D.Rathjen等., Reprod.Fertil.Dev.10:31,1998;和R.I.Freshney, Culture of Animal Cells(动物细胞培养), Wiley-Liss, 纽约,2000)。关于造血谱系细胞的生物学,读者可参考任何免疫学教科书,例如 Immunobiology:The Immune System in Health and Disease(免疫生物学:健康和疾病中的免疫系统)(Janeway等., 2001加兰出版公司(Garland Publishing))。

[0199] 当采用衍生自灵长类多能干细胞的已建立细胞系时,本发明的细胞群和分离的细胞的特征是基因组与衍生它们的细胞系相同。这意味着用RFLP或SNP分析,灵长类多能干细胞与其分化后代细胞之间的染色体DNA基本上相同(假定细胞未经手工遗传操作)。应该知道虽然,例如在编码区中可能有微小改变,但pPS细胞与各自的后代细胞系之间的遗传学相同性与同卵双生子中所见相当。

[0200] 分化细胞的遗传改变

[0201] 在分化前后通过遗传工程改造细胞(US 2002/0168766 A1)制成的本发明细胞可包含一个或多个遗传学改变。例如,在一些实施方式中,可在细胞发展成为有限发育谱系细胞或终末分化细胞前后,可用遗传学方法改变所述细胞使之表达端粒酶逆转录酶来加工细胞,从而提高它们的复制能力(US 2003/0022367 A1)。

[0202] 也可用遗传学方法改造本发明的细胞以增强它们参与调节免疫应答,或将治疗性基因递送至给药部位的能力。利用所需基因已知编码序列设计的载体操作性连接于泛特异性启动子或分化类型细胞的特异性活性启动子。或者,这种启动子可以是允许定时表达所改变基因的诱导型启动子。例如,可工程改造所述细胞使之表达细胞因子而调节免疫应答,即增强应答或减弱应答。

[0203] 在以下实施例中,采用能购得的已建立的hES细胞系进行利用人胚胎细胞(hES)的所有实验。

实施例

[0204] 实施例1:借助各种分化混合液使hES细胞分化成为mDC

[0205] 在该实施例中,首先用分化混合液培养pPS细胞获得imDC,然后用成熟混合液培养imDC使pPS细胞进一步分化成为mDC。在实验期间随细胞分化成为imDC的阶段不同分化混合液所含的外源性细胞因子也不同(图1a)。用无动物来源产品无饲养细胞的成分明确无血清

培养液培养人ES细胞系H1 (Thomson等., (1998) Science 282:1145) (Xu等., (2001) Nat Biotechnol 19:971; Li等., (2005) Biotechnol Bioeng 91:688) (图1b)。在整个分化和成熟方案中,无基质细胞培养所述细胞。

[0206] 在允许形成胚状体(EB)的条件下培养hES细胞。简言之,用加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的胶原酶D处理H1细胞,用1X PBS洗涤一次,用纽约州康宁市康宁生命科学公司(Coming Life Sciences, Coming, NY)的细胞刮刀小心地从平板上刮下细胞。然后将细胞以3,000,000细胞/孔接种在含有1mM丙酮酸钠(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司)、1X非必需氨基酸(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司)、2mM L-谷氨酰胺(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司)、 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇(密苏里州圣路易斯西格玛公司)和10mM HEPES(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司)的马里兰州沃克斯维尔隆萨公司的X-VIVO 15培养液的纽约州康宁市康宁生命科学公司的6孔超低粘附平板中,使之形成胚状体。在培养液中加入以下生长因子:SCF (20ng/ml)、VEGF (50ng/ml)、BMP-4 (50ng/ml)和GM-CSF (50ng/ml)。所有生长因子购自明尼苏达州明尼阿波利斯的研发系统公司(R&D Systems, Minneapolis MN)。各孔含有4ml培养液。每2-3天给细胞加料,每次更换1/3培养液。

[0207] 第5天生长因子混合液中除去BMP-4,第10天生长因子混合液中除去VEGF,第15天生长因子混合液中除去SCF(图1A)。大约第17-25天,观察到圆形明亮的造血祖细胞(图2)。当观察到孔中有约100,000-约1百万漂浮发亮祖细胞时,离心收集它们、重新接种原来的6孔超低粘附平板用含GM-CSF (50ng/ml)和IL-4 (50ng/ml)(明尼苏达州明尼阿波利斯的研发系统公司)的X-VIVO 15(马里兰州沃克斯维尔隆萨公司)液培养,产生imDC。将原始EB移至新的6孔超低粘附平板培养约40-50天,每2-3天加入含GM-CSF (50ng/ml)的培养液(1:3的培养液改变),继续培养至产生发亮的造血细胞,收集之,进一步用GM-CSF和IL-4培养使之分化产生更多的imDC。

[0208] 如下对hES细胞进行流式细胞术分析:将细胞重悬于50 μ l流式缓冲液(PBS+0.1% BSA+2mM EDTA)中,用加利福尼亚州阿本市米尔泰尼公司(Miltenyi, Aurburn, CA)的抗-FC受体抗体4 $^{\circ}$ C封闭10分钟,然后加入靶标记的抗体(抗体见下表I)。4 $^{\circ}$ C培育20分钟后,用流式缓冲液洗涤细胞两次,分析样品前5分钟,每份样品中加入2 μ l 7AAD (0.25 μ g/1 $\times 10^6$ 个细胞)(加利福尼亚州圣何塞BD生物科学公司)评估细胞活力。用加利福尼亚州圣何塞BD公司(Becton Dickinson, San Jose, CA)的FACSCaliburTM收集样品数据,用俄亥俄州阿什兰的特雷斯达公司(Treestar, Ashland, OR)的FlowJo[®]软件分析。对于胞内Oct-4染色,按照生产商说明书用加利福尼亚州圣迭戈电子生物科学公司(eBioscience, San Diego, CA)的胞内固定缓冲液固定细胞,用加利福尼亚州圣迭戈电子生物科学公司的渗透缓冲液按厂产商说明书处理使细胞可渗透。如预计的那样,细胞表达了二种hES细胞的标记Oct-4和SSEA-4。此外,细胞也表达Flt-1和Flk-1(二者是VEGF的受体),以及CD117(SCF的受体)。未检测到GM-CSF的受体CD116(图1C)。

[0209] 用流式细胞术(如上所述)分析了imDC的以下标记:CD14、HLA-I、HLA-II、CD83、CD205和CD11b。发现细胞为HLA-I、HLA-II、CD83和CD11b阳性(图4A)。4-6天后,离心这些不成熟的DC,重悬于含以下细胞因子:IFN- γ (25ng/ml)、IL-1- β (10ng/ml)、TNF- α (10ng/ml)、PGE2 (1 μ g/ml)和GM-CSF (50ng/ml)的X-VIVO 15培养液(成熟混合液)中。将细胞再维持培养48小时产生成熟的DC。用FAC(如上所述)分析mDC,发现其表达以下标记:HLA-I、HLA-II、

CD40、CD86、CD83、CD205、CD11c^高和CCR7。这些细胞的CD14为阴性(图4B)。CD83是树突细胞成熟的标志。CCR7是参与DC迁移的趋化因子受体。这种表达概况与衍生自外周血单个核细胞(PBMC)的DC相当。还用实时定量PCR分析了此种细胞的以下转录因子表达: NF- κ B、CIITA和Spi-B(图4C)。显示衍生自PBMC的DC表达了Spi-B(Schotte等., (2003) Blood 101 (3):1015; Risoan等., (2002) Blood 100 (9):3295; Schotte等., (2004) J. Exp. Med. 200 (11):1503; Chicha等., (2004) J. Exp. Med. 200 (11):1519)。表达NF- κ B与相关共刺激分子是DC活化过程所需。CIITA是HLA-II表达的主调节物。

[0210] 分析细胞的形态发现为DC的典型形态(图4D)。为进一步研究mDC的形态,用梅-格氏染料染色细胞。用1X PBS洗涤细胞后重悬于50u11X PBS中加到细胞离心涂片机配备的玻璃载玻片上。取10u1细胞悬液加到该载玻片上。用马萨诸塞州沃尔瑟姆热科学公司(Thermo Scientific, Waltham, MA)的ShandonCytospin3细胞离心机,以1200rpm离心载玻片5分钟。然后用梅-格氏染色液(密苏里州圣路易斯的西格玛公司)25°C染色细胞5分钟,用dH₂O洗涤3次,空气干燥过夜。用密苏里州圣路易斯西格玛公司的**Permount®**包被样品区,加盖玻璃盖玻片,将载玻片干燥过夜。用装有100x平面物镜和40xPlan-Neofluar物镜的马萨诸塞州皮博迪蔡氏公司(Zeiss, Peabody, MA)的立式显微镜获取图像。图4E所示结果显示,mDC具有分离自PBMC的树突细胞的典型形态,包括从细胞发散的分支突起或树状突起。还用流式细胞术(如上所述)分析了细胞的CD19、CD3、CD235a和CD41(分别表示B细胞、T细胞、红细胞和血小板、巨核细胞),但没检测到所有这些标记。发现此制品含有5-20%粒细胞和5-20%祖细胞。细胞群约50%-约90%是DC。

[0211] 实施例2:分化细胞培养物的时程分析

[0212] 为特征分析pPS分化成为imDC过程中产生的前体细胞群,用RT-PCR和实时定量PCR(如下所述)评估了实施例1所述细胞培养物随时间推移的转录因子表达,并用流式细胞术(如上所述)分析细胞了随时间推移的表面标记表达。

[0213] 对于实时定量PCR,收集靶细胞,按照加利福尼亚州瓦伦西亚市恰根公司(Qiagen, Valencia, CA)的标准恰根**RNeasy®**迷你制备方案分离总RNA。用加利福尼亚州瓦伦西亚市恰根公司的Qiagen QiaShredder仪匀浆裂解物。-80°C保存分离的RNA。对于cDNA合成,用德克萨斯州奥斯汀安变公司(Ambion, Austin, TX)的DNA酶处理1 μ g RNA样品除去RNA制品中的任何基因组DNA杂质。用加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的Superscript IITM第一链合成系统进行逆转录酶PCR(RT-PCR)制备cDNA。用水1:5稀释cDNA产物,将其用作加利福尼亚州福斯特城应用生物系统公司(Applied Biosystems, Foster City, CA)的**Taqman®**PCR循环阈值(CT)实时定量测定的模板。用加利福尼亚州福斯特城应用生物系统公司的应用生物系统7900HT序列检测系统检测样品。根据第0天的靶信号标准化靶信号,分析数据的相对表达水平。结果见图3a和3b。第5天Oct-4表达降低20倍。第5天brachyury增加5倍表明细胞已分化成为中胚层。造血干细胞发现有Flk-1。Flk-1的表达增加提示已分化为造血细胞群。Tie-2表达提示已分化为成血管细胞。成血管细胞包括造血潜能和内皮潜能细胞。

[0214] 图3b显示随时间推移的其它转录因子表达水平。HoxB4和Gata2表达水平增加提示细胞已分化成为造血细胞群。HoxB4在造血干细胞更新和存活中起着作用(Antonchuk等., (2002) Cell 109 (1):39)。Gata2是早期造血转录因子在GMP中也有表达。

[0215] 如实施例1所述进行流式细胞术。流式细胞术实验中所用的所有抗体列于下表I。

[0216] 表I.

SSEA-4	研发(R&D)系统公司
4-Oct	SC 生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology)
CD117	BD 生物科学公司
Flt-1	研发系统公司
RD-KD	研发系统公司
R	
CD116	BD 生物科学公司
CD19	BD 生物科学公司
CD3	电子生物科学公司
CD11b	BD 生物科学公司
CD11c	BD 生物科学公司
CD13	BD 生物科学公司
CD15	BD 生物科学公司
[0217] CD34	BD 生物科学公司
CD38	BD 生物科学公司
CD40	BD 生物科学公司
CD44	BD 生物科学公司
CD45	BD 生物科学公司
CD80	BD 生物科学公司
CD86	BD 生物科学公司
CD83	BD 生物科学公司
HLA-I	BD 生物科学公司
HLA-II	BD 生物科学公司
CD205	BD 生物科学公司
CD303	米尔泰尼公司
CD123	BD 生物科学公司
CCR7	BD 生物科学公司

[0218] 图3c和3d显示CD45和CD34随时间表达的流式细胞术研究结果。第5天CD34的表达表明早期血细胞生成。第5天培养物的形态呈现为囊性胚状体外观(图3e)。第15天CD45(泛造血细胞标记)的表达明显。同时实时定量PCR检测到转录因子PU.1(图3b)。在早期造血细胞中发现有PU.1表达,其表达水平随细胞分化成为树突细胞而增加(Guerriero等.,(2000) Blood 95(3):879;Nutt等.,(2005)JExp.Med.201(2):221)。第15天骨髓谱系标记CD13表达变得明显(图3F)。这提示从分化混合液中除去SCF时,细胞已进入造血和骨髓谱系。单核细胞标记CD14在第20天表达(图3F)。CD13和CD14的表达随时间增加(图3F)。

[0219] 第20天时培养物中显示有两种CD45⁺细胞群:CD45^高和CD45^低(图3G)。CD45^高群中CD14的表达随时间增加。第32天时65%细胞表达CD14和CD45。CD45^低细胞群未见到CD14表达(图3G)。在前向散射与侧向散射门控选择的细胞图中,CD45^高细胞群与称为(R1)的单核细胞/树突细胞相关,而CD45^低细胞群与称为(R2)的粒细胞祖细胞相关(图3G)。在该分化方案第32天进一步特征分析CD45^高细胞群,发现为CD11c、CD11b、HLA-I、HLA-II^{低/负}和CD86阳性

(图3H),所有均提示细胞是imDC。CD86是参与T细胞活化的共刺激分子,而CD83是mDC的标记。缺乏CD83表达表明该细胞不是mDC。

[0220] 实施例3:抗原加工和呈递

[0221] 为检验hES衍生的imDC加工抗原的能力,将荧光染料DQ-OVA蛋白(加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司)以1mg/ml溶于PBS,以100 μ g/ml加入实施例1所述衍生自hES的imDC中。用pH不敏感的BODIPY-F1染料标记该蛋白。当该蛋白质完整时染料可自身猝灭,当该蛋白质变性或经历蛋白水解作用时可产生亮绿色荧光。37 $^{\circ}$ C或4 $^{\circ}$ C(作为背景荧光的对照)培育细胞,用流式缓冲液洗涤2次。用加利福尼亚州圣何塞BD公司的FACSCaliburTM仪收集FL1中的数据。发现经处理的细胞产生了荧光,表明imDC已使该蛋白质水解,而对照细胞则不(图5a)。

[0222] 然后进行功能试验以确定实施例1方法制备的DC是否能刺激抗原特异性淋巴细胞分泌IFN γ (适应性免疫应答的一种标志)。采用腮腺炎蛋白作为刺激性抗原(缅因州萨克市生物设计公司(Biodesign,Saco,ME))。将该蛋白质以100 μ g/ml加入实施例1所述hES衍生的imDC中培育1小时。然后加入包含IFN- γ (25ng/ml)、IL-1- β (10ng/ml)、TNF- α (10ng/ml)、PGE2(1 μ g/ml)和GM-CSF(50ng/ml)的上述成熟混合液。24小时后,收集用或未用腮腺炎蛋白处理的成熟DC,用加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的AIM-V培养液洗涤2次。将1 \times 10⁴个DC细胞/孔与1 \times 10⁵个PBMC/孔(俄亥俄州谢克-海茨的细胞技术有限公司(Cellular Technologies LTD,Shaker Heights,OH))一起接种IFN γ ELISPOT平板(马萨诸塞州贝德福德市米利波尔公司(Millipore Corp.Bedford,MA))进行读数。此ELISPOT平板曾用10 μ g/ml抗-IFN γ 抗体(俄亥俄州马里蒙特马伯技术公司(Mabtech,Mariemont,OH))包被过夜(16-24小时)。将该试验平板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下静置16-24小时,按照马伯技术公司提供的说明书显色。用伊利诺斯州迪卡特细胞技术有限公司(Cellular Technology Limited,Decatur,IL)的CTL分析仪计数斑点。图5B所示结果证明本发明mDC的IFN γ 产量高于未处理对照差异达3倍。

[0223] 实施例4:细胞因子产生

[0224] 用佐治亚州诺克斯雷比奥泰克公司(Raybiotech,Norcross,GA)的人细胞因子阵列III和V试剂盒,对按照实施例1所述方法获得的imDC和mDC进行定量细胞因子阵列分析。按照生产商说明书进行试验。发现mDC产生以下促炎细胞因子:IL-6、IL-7、IL-8和IL-10。据认为IL-7是T细胞存活的至关重要因子。IL-8据认为是趋化性刺激因子。按照生产商说明书,用加利福尼亚州圣何塞BD生物科学公司的BD细胞计数珠阵列,定量测定了细胞因子IL-6、IL-10和IL-12。用马萨诸塞州贝德福德市米利波尔公司的Amicon Ultra-1510,000NMWL离心管离心,收集hES衍生的不成熟和成熟细胞的培养上清液。将上清液加入人IL-6、IL-10和IL-12珠装置(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州)中25 $^{\circ}$ C培育1小时。加入偶联有PE的检测抗体试剂(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州)室温再培育2小时。洗涤样品1次,重悬于洗涤缓冲液中(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州),用FACSCaliberTM(BD公司,圣何塞,加利福尼亚州)通过流式细胞术收集。用FCAP阵列软件(BD生物科学公司,圣何塞,加利福尼亚州)测定细胞因子浓度。图6A所示结果证明mDC产生了显著水平的所有这3种细胞因子。

[0225] 实施例5:mDC的趋化行为分析

[0226] 将加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的AIM-V培养液加入含有8.0uM孔径插片的Transwell 24孔板的上室和下室(康宁公司,康宁市,纽约州)中37℃、5%CO₂培育过夜。除去各孔的培养液后,将含或不含趋化因子MIP3β(100ng/ml)的0.6ml AIM-V液加入下室。收集hES衍生的成熟DC(如实施例1所述),用AIM-V培养液洗涤2次。将细胞以2.0x 10⁶个细胞/毫升重悬于AIM-V培养液中,取0.1ml加入上室。37℃、5%CO₂培育Transwell板2小时。用血球计数器测定迁移至下室的细胞数量。图6D所示结果证明在对MIP3β的应答中本发明mDC可迁移。

[0227] 实施例6:树突细胞的免疫刺激能力

[0228] 进行几项试验以特征分析按照实施例1所示方法产生的mDC能否刺激免疫应答。首先进行混合淋巴细胞反应(MLR)试验证明mDC能够激发强烈的原初同种异体(allo)-应答。

[0229] 通过从健康献血者新鲜的血沉棕黄层制品分离得到的外周血单个核细胞(PBMC),制备PBMC衍生的DC。使PBMC粘附于含AIM-V培养液的组织培养瓶壁2小时,然后用温热PBS洗涤除去不粘附细胞。将主要含单核细胞的剩余粘附细胞与1000U/ml的重组人白介素4(rhIL-4)(明尼苏达州明尼阿波利斯的研发系统公司)和重组人GM-CSF(rhGM-CSF)(明尼苏达州明尼阿波利斯的研发系统公司)于37℃、5%CO₂下培育6天,产生imDC。然后用含800U/mlrhGM-CSF、10ng/ml TNFα、10ng/ml IL1-β和10ng/ml IL-6及1.0ug/ml PGE2(明尼苏达州明尼阿波利斯的研发系统公司)的AIM-V培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)培养24小时使imDC成熟。

[0230] 对于MLR试验,用Ficoll-Paque梯度(英国白金汉郡APB公司(Amersham Pharmacia Biotech AB,Buckinghamshire,UK))离心细胞,分离获自健康献血者(斯坦福血库(Stanford Blood Bank))的血沉棕黄层得到PBMC。洗涤分离的细胞后重悬于含10%FBS(加利福尼亚州山景市克隆技术公司(Clonetech,Mountain View,CA))和1%青霉素/链霉素(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)的完全RPMI 1640培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)中。在96-孔U-底平板(加利福尼亚州圣何塞BD公司)中混合5x 10⁴个PBMC和不同数量经射线照射的刺激细胞(对于hESC、单核细胞衍生的DC和hES衍生的DC照射剂量为2000rad),37℃、5%CO₂培育5天。然后37℃、5%CO₂用每孔1uCi³H胸苷脉冲细胞18小时。用Filtermate收集仪(帕金埃尔默公司(Perkin Elmer),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)将细胞收集在UniFilter-96GF/C(帕金埃尔默公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)上,用TopCount闪烁计数器(帕金埃尔默公司,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)计数³H胸苷的掺入。结果证明按照实施例1产生的mDC具有良好的同种异体刺激活性(图7A)。

[0231] 然后研究mDC能否刺激抗原特异性效应T细胞。用CMV肽pp65(氨基酸序列495-503)证明DC能将抗原呈递给CD8+淋巴细胞。经特征鉴定的反应性PBMC含有能特异性识别pp65肽的CD8淋巴细胞。此CD8T淋巴细胞和DC具有共同的HLA-A2等位基因。对于CMV特异性抗原呈递,将成熟的PBMC-DC和hES衍生的DC重悬于含或不含10μg/ml CMV pp65肽的无血清150u1AIM-V培养液中(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)。37℃、5%CO₂培育细胞2小时,然后用AIM-V培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)洗涤2次。取DC以1x10⁴个细胞/100微升/孔接种ELISPOT平板,反应细胞与刺激细胞之比为10:1。在37℃水浴中融化CMV的经特征鉴定的特异性反应性PBMC细胞(伊利诺斯州迪卡特细胞技术有限公司),洗涤两次,重悬于AIM-V培养液中(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司),以1x 10⁵个细胞/100微

升/孔接种ELISPOT平板(马萨诸塞州贝德福德市米利波尔公司)。此ELISPOT平板曾用10ug/ml抗-IFN γ 抗体(俄亥俄州马里蒙特马伯技术公司)包被过夜(16-24小时)。该试验平板在37°C和5%CO₂下静置16-24小时,按照马伯技术公司提供的说明书显色。用伊利诺斯州迪卡特细胞技术有限公司的CTL分析仪计数斑点。图7B所示结果证明mDC(图中标记的ES-DC)能刺激产生IFN γ ,其量与PBMC-DC相当。

[0232] 然后,检测mDC体外能否刺激T细胞扩增。37°C融化CMV T细胞系(67%特异性)(佛罗里达州布拉登顿PI公司(ProImmune, Bradenton, FL)),用含+5%FBS(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)、1mM丙酮酸钠、非必需氨基酸、2mM L-谷氨酰胺、 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇和HEPES的1640RPMI培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)洗涤两次。然后37°C和5%CO₂培育该T细胞2小时。溶解5mM CellTrace CFSE储备液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)后立即用于DMSO(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)中。将T细胞以 1×10^6 /ml重悬于预热的PBS/0.1%BSA中。细胞中加入终浓度2uM的Celltrace染料37°C培育10分钟。加入5X冰冷冷却的培养液猝灭染料。洗涤细胞两次后开始试验。

[0233] 用10 μ g/ml CMV495-503pp65肽(安斯派克公司(Anaspec), 圣何塞, 加利福尼亚州)($>95\%$ 纯, HPLC) 37°C预脉冲hES衍生的DC 2小时, 洗涤两次, 然后以 2×10^4 /孔接种96孔U底Falcon™平板(加利福尼亚州圣何塞BD公司)。以 2×10^5 个细胞/孔接种CFSE标记的T细胞。第5天收集细胞, 每百万个细胞用5 μ l APC标记的CMV495-503特异性五聚体(佛罗里达州布拉登顿PI公司) 25°C染色10分钟。该试验识别CMV肽495-503的特异性T细胞。该试验能对这种特异性细胞群进行FACS门控选择作CFSE分析。用流式缓冲液洗涤细胞两次, 用7AAD染色5分钟, 然后在FACSCalibur™(加利福尼亚州圣何塞BD公司)上运行样品。根据7AAD分析排除死细胞。染料标记物的稀释度(多个峰)表示T细胞增殖。如图7C所示, 按照实施例1制备的DC(图中的ES-DC)导致的T细胞增殖与PBMC-DC相当。CD8T淋巴细胞和树突细胞具有共同的HLA-A2等位基因。

[0234] 实施例7:分化混合液比较

[0235] 按实施例1所述培养条件, 进行hES细胞培育和分化成为imDC和mDC, 除了更换所用的分化混合液以比较含各种外源性细胞因子的不同分化混合液的效果外。检验了7、5、4和3种细胞因子(生长因子)的各种组合使hES细胞分化成为imDC的能力。表II提供了关于包含7、5和4种外源性细胞因子(“+”表明存在该因子/“-”表明未用该因子)分化混合液的实验细节。该表格下半部分的数值表明用相应的混合液获得的各标记细胞的百分比, 直接标在百分比上。表III提供包含4和3种外源性细胞因子分化混合液的细节(“+”表明存在该因子/“-”表明未用该因子)。该表的下半部分标出相对于相应混合液获得的标记的百分比, 此百分比对应于在数值数据上标出的混合液。表IV-VI提供整个实验期间分化混合液的组成(如表II和III所述)(“X”表示特定时间存在该因子)(在这些表中“d”为“天”的缩写)。

[0236] 采用了两种不同的成熟混合液使imDC成熟为mDC。表II所述实验采用包含GM-CSF、IL-1 β 、IFN- γ 、CD40L和IFN α 的成熟混合液。表III所述实验采用包含TNF α 、IL1 β 、IFN γ 和PGE2的成熟混合液。表VII提供了所测试的各细胞因子(生长因子)的浓度和来源。

[0237] 表II:生长因子减少实验

BMP-4	+	+	+
GM-CSF	+	+	+
VEGF	+	+	+
SCF	+	+	+
Flt3-L	+	+	-
TPO	+	-	-
IL-3	+	-	-

时间	标记	%阳性		
d20	CD45	67.2 ± 6.71	72.1 ± 5.2	71.2 ± 7.46
	CD11c	39.2 ± 6.49	42.9 ± 6.33	36.7 ± 7.23
	CD14	23.1 ± 8.15	23.7 ± 8.4	25.3 ± 8.7
[0238] d30	CD45	89.6 ± 1.29	91.7 ± 0.73	86.5 ± 2.94
	CD11c	82.7 ± 1.67	83.1 ± 1.39	72.5 ± 4.61
	CD14	22.2 ± 3.74	25.4 ± 4.56	26.8 ± 4.15
iDC	CD86	65.5 ± 3.9	67.4 ± 4.29	71.7 ± 3.02
	CD83	37.8 ± 1.74	47.6 ± 2.55	45.3 ± 3.51
	MHC II	34.2 ± 7.5	31 ± 4.78	25.6 ± 6.03
mDC	CD86	63.9 ± 4.51	73.4 ± 4.48	74.9 ± 2.58
	CD83	63.3 ± 3.8	69.8 ± 5.09	71 ± 3.83
	MHC II	43.3 ± 5.23	46.6 ± 6.08	34.5 ± 7.26
	CCR7	44.7 ± 5.32	56.7 ± 6.41	57 ± 4.79
得率[#]				
10³个细胞/孔*		335 ± 92	385 ± 7.1	666 ± 182

[0239] 总细胞群中的阳性细胞%

[0240] 平均值是n=4平均值的标准误差

[0241] *在超低粘附6孔板中进行分化

[0242] #平均的n=2.

[0243] 表III. 生长因子减少实验

BMP-4	+		+	+	+
GM-CSF	+	+	-	+	+
VEGF	+	+	+	-	+
SCF	+	+	+	+	-

[0244]

时间	标记	%阳性									
d20	CD34	26.5	11.3	1.3 ± 0.17	14 ± 9.5	20.8 ± 16.5	18.4 ± 11.4				
	CD45	76.4	10.9	1.2 ± 0.54	7.6 ± 6.4	30.1 ± 27.2	54.2 ± 25.7				
	CD11c	42.1	20.8	1.5 ± 0.74	1.9 ± 0.4	4.2 ± 2.7	27.8 ± 23.4				
d30	CD45	70.7	10.8	0.7 ± 0.4	12 ± 7.1	51 ± 23	77.3 ± 6				
	CD11c	69.6	5.9	0.7 ± 0.4	9 ± 4.5	46.7 ± 21.4	65.4 ± 5.9				
	CD14	23	5.8	0.8 ± 0.6	8.3 ± 5	20.8 ± 11	27.6 ± 7.9				

[0245] 总细胞群中的阳性细胞%

[0246] *在超低粘附6孔板中进行分化

[0247] 平均值是n=3平均值的标准误差

[0248] 表IV

[0249]

	7种生长因子						
	BMP-4	IL-3	VEGF	TPO	SCF	flt3L	GM-CSF
d0-5	x	x	x	x	x	x	x
d6-10			x	x	x	x	x
d11-15					x	x	x
d16 on						x	x

[0250] 表V.

[0251]

	5种生长因子					4种生长因子			
	BMP-4	VEGF	SCF	flt3L	GM-CSF	BMP-4	VEGF	SCF	GM-CSF
d0-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
d6-10		x	x	x	x		x	x	x
d11-15			x	x	x			x	x
d16 on					x				x

[0252] 表VI.

[0253]

	3种生长因子			3种生长因子			3种生长因子			3种生长因子		
	BMP-4	VEGF	GM-CSF	BMP-4	SCF	GM-CSF	BMP-4	VEGF	SCF	VEGF	SCF	GM-CSF
D0-5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
D6-10		x	x		x	x		x	x	x	x	x
D11-15			x		x	x			x		x	x
D16 on			x			x						x

[0254] 表VII: 试剂

[0255]

生长因子	生产商	目录	所用浓度
rhBMP-4	研发系统公司	314-BP	50 ng / ml
rhSCF	研发系统公司	255-SC-050	20 ng / ml
rhGM-CSF	研发系统公司	215-GM-050	50 ng / ml

[0256]	rhFLT3L	研发系统公司	308-FKN-025	20 ng / ml
	rhVEGF	研发系统公司	293-VE-050	50 ng / ml
	rhIL-4	研发系统公司	204-IL-010	50 ng / ml
	rhTNF- α	研发系统公司	210-TA-010	10 ng / ml
	rhIFN- γ	研发系统公司	285-IF-100	20 ng / ml
	rhIL-3	研发系统公司	203-IL-050	25 ng / ml
	MIP-3B	派普罗技术公司 (Pepro Tech)	300-29B	100 ng / ml
	rhCD40L	研发系统公司	617-CL-050/CF	100 ng / ml
	rhIFN- α	研发系统公司	11101-2	10 ng / ml
	IL-1 β	研发系统公司	201-LB-005	10 ng / ml

[0257] 实施例8:成熟混合液的比较

[0258] 采用细胞因子/生长因子的不同组合使本发明各种实施方式的pPS细胞分化产生的imDC成熟为mDC。将细胞接种96孔板,浓度为 0.05×10^6 个细胞/孔,用含表VIII所列细胞因子/生长因子各种组合的X VIVO-15培养液培养24小时。所用各因子的浓度见表VII。Poly I:C采用10ug/ml;PGE2采用1ug/ml;IL-6采用10ng/ml。所有测试的成熟混合液均含有50ng/ml GM-CSF。用新泽西州富兰克林湖BD生物科学公司(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)的BDTM细胞计数珠阵列,检测24小时上清液作为imDC成熟为mDC的标志的IL-12和IL-10水平。结果提示最少4种细胞因子能刺激imDC成熟为mDC。

[0259] 表VIII.

成熟混合物							pg/ml		
	TNF α	IL1 β	IFN γ	PGE2	POLY I:C	IFN α	CD40L	IL-12	IL-10
[0260]	1	-	-	-	-	-	-	0.0	35.8
	2	+	+	+	-	-	-	1.9	118.4
	3	+	+	+	-	-	+	2.6	104.8
	4	+	+	+	+	+	-	1.4	219.8
	5	+	+	+	+	+	+	1.9	206.3
	6	+	+	+	-	+	-	0.0	155.6
	7	+	+	+	-	+	+	1.9	202.8

[0261] 用 0.2×10^6 个细胞/孔的细胞浓度在6孔板中重复该实验,但此时检验不同的细胞因子组合。细胞因子浓度如下:TNF α 10ng/ml;IL-1 β 10ng/ml;IFN γ 20ng/ml;PGE2 1ug/ml;IL-6 10ng/ml。用马萨诸塞州贝德福德市米利波尔公司的Amicon Ultra-1510,000NMWL离心管浓缩上清液,分析接触各种成熟混合液后48小时作为DC成熟标志的IL-12和IL-6产量。在先前的实验中,所有成熟混合液还包含50ng/ml GM-CSF。也包括人PBMC产生的单核细胞衍生的DC作为阳性对照。结果示于下表IX。

[0262] 表IX.

[0263]

IFN- γ	成熟混合物				细胞因子 (pg/ml)		细胞类型
	TNF- α	IL-1 β	PGE2	IL-6	IL-12	IL-6	
-	-	-	-	-	2.0	96.3	es-iDCs
+	+	+	+	-	11.6	38,729.2	es-mDCs
-	+	+	+	+	2.2	53,438.0	es-mDCs
+	-	+	+	-	3.4	9,796.6	es-mDCs
+	+	-	+	-	1.7	195.3	es-mDCs
-	+	+	+	+	16.5	64,856.8	Mo-mDCs

[0264] 实施例9:产生hTERT T细胞系

[0265] 采用Ficoll Plaque-Plus (新泽西州皮斯卡塔韦GE保健生物科学公司 (GE Healthcare Bioscience AB, Piscataway, NJ)) 分离方法从健康献血者的HLA-A2+血沉棕黄层分离得到PBMC。为产生imDC,用CD14+微珠 (加利福尼亚州阿本市米尔泰尼公司) 分离HLA-A2+PBMC中的单核细胞,转移入含rhGM-CSF (1000U/ml) (加利福尼亚州里士满贝莱克斯公司 (Berlex, Richmond, CA)) 和rhIL-4 (1000U/ml) (明尼苏达州明尼阿波利斯研发系统公司) 的无血清AIM-V培养液 (加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司) 中,37°C、5%CO₂培育5天。加入含TNF α (10ng/ml) (研发系统公司)、IL1 β (10ng/ml) (研发系统公司)、IL-6 (10ng/ml) (研发系统公司) 和PGE2 (1ug/ml) (研发系统公司) 的细胞因子混合液培养24小时使DC成熟。收集mDC,用AIM-V培养液洗涤两次,重悬于200ul AIM-V培养液中,37°C、5%CO₂用540hTERT肽脉冲2小时,该肽是始于hTERT蛋白540氨基酸的9聚体 (100ug/ml) (加利福尼亚州圣何塞安斯派克公司)。

[0266] 用CD8+T细胞磁力分离试剂盒 (加利福尼亚州阿本市米尔泰尼公司) 去除非-CD8+细胞,分离PBMC中的自身CD8+T细胞。将CD8+细胞重悬于含10%人AB血清 (弗吉尼亚州温切斯特市VB公司 (Valley Biomedical, Winchester, VA)) 的AIM-V培养液中,以1.0-2.0x 10⁶个细胞/毫升的浓度转移至24孔板。各孔加入540hTERT脉冲的DC,刺激细胞与反应细胞比例1:10,37°C、5%CO₂培育。随后一天,培养物中加入重组人IL-7 (10ng/ml) (研发系统公司) 和IL-2 (10U/ml) (研发系统公司)。

[0267] 每7-10天进行肽hTERT 540的重刺激。对于重刺激,用自身PBMC呈递抗原。将自身PBMC以2.0-3.0x 10⁶个细胞/孔的浓度转移至含无血清AIM-V培养液和hTERT 540肽 (10ug/ml) 的24孔板。于37°C、5%CO₂维持PBMC2小时以促进细胞粘附于平板。用AIM-V培养液洗涤两次除去不粘附细胞。用540hTERT肽 (10ug/ml) 脉冲粘附的PBMC 2小时,然后以2000rad射线照射。

[0268] 收集用540hTERT脉冲DC初始引发的CD8+T细胞,洗涤1次,转移到含有540hTERT脉冲过的粘附PBMC的孔中。培养物中加入IL-12 (10ng/ml) (研发系统公司)。随后一天,培养物中加入重组人IL-7 (10ng/ml) 和/或IL-2 (10U/ml)。每3-4天,除去一半培养液,加入合适量含IL-7和/或IL-2的新鲜培养液。用540hTERT脉冲过的自身粘附性PBMC重复刺激至少3次。

[0269] 采用俄亥俄州阿什兰树星公司 (Tree Star, Ashland, OR) 的FlowJo软件,用APC (佛罗里达州布拉登顿PI公司) 和抗-人CD8 FITC偶联抗体 (佛罗里达州布拉登顿PI公司) 标记的540五聚体染色细胞,测定540hTERT阳性特异性CD8+T细胞的百分比。采用加利福尼亚州圣何塞BD公司的FACSCaliber™,通过流式细胞术收集TERT特异性CD8+细胞,将之用于随后

实验中。

[0270] 实施例10:540hTERT T细胞系的ELISpot IFN γ 试验

[0271] 将hES衍生的mDC(实施例1)重悬于200 μ l无血清AIM-V培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)中,用540hTERT肽(100 μ g/ml)37 $^{\circ}$ C、5%CO₂脉冲2小时。未脉冲的mDC用作对照。未脉冲hES衍生的mDC也用作对照。mDC用AIM-V培养液洗涤两次后重悬于AIM-V培养液中,与540hTERT T细胞系一起接种抗-IFN- γ Ab(10 μ g/ml)(俄亥俄州马里蒙特马伯技术公司)包被的ELISpot平板,刺激细胞与反应细胞比例为1:10。将试验平板在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下静置16-24小时,按照生产商提供的说明书显色。用伊利诺斯州迪卡特细胞技术有限公司的CTL分析仪计数斑点。结果示于图8,证明衍生自hES的mDC能刺激对hTERT抗原的特异性T细胞应答。

[0272] 实施例11:540hTERT T细胞系的增殖

[0273] 将540hTERT T细胞系以 1.0×10^6 /ml重悬于预热的PBS/0.1%BSA中。细胞中加入2 μ M终浓度的CFSE(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司),37 $^{\circ}$ C培育10分钟。加入含10%FBS(加利福尼亚州山景市克隆技术公司)的预冷AIM-V培养液猝灭染色。洗涤细胞两次后开始试验。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下,用10 μ g/ml 540hTERT肽(加利福尼亚州圣何塞安斯派克公司)脉冲hES衍生的成熟DC(实施例1)2小时,用AIM-V培养液洗涤两次后以 2×10^4 /孔接种96孔U底FalconTM平板(加利福尼亚州圣何塞BD公司)。以 2×10^5 个细胞/孔接种CFSE标记的540hTERT T细胞系。未-脉冲hES衍生的mDC用作对照。第4天收集细胞,用偶联于APC的540五聚体试剂(佛罗里达州布拉登顿PI公司)染色。用FACS缓冲液洗涤细胞两次,用7AAD染色,然后用FACSCaliberTM(加利福尼亚州圣何塞BD公司)收集。用俄亥俄州阿什兰树星公司的FlowJo软件进行分析。结果示于图9,证明hES细胞分化产生的mDC可在HLA-A2中呈递hTERT抗原,刺激抗原特异性T细胞增殖。

[0274] 实施例12:经射线照射mDC的免疫刺激能力

[0275] 按照实施例1所述方法使pPS细胞体外分化为成熟的树突细胞。为阐述射线照射对hES细胞体外分化的树突细胞(hESC-DC)的作用,比较了经照射和未经照射hESC-DC刺激T细胞产生抗原特异性效应细胞应答的能力。用CMV肽pp65(氨基酸序列495-503)证明了hESC-DC可将抗原呈递给CD8+淋巴细胞。采用经特征鉴定的含CD8+T细胞的PBMC反应细胞(伊利诺斯州迪卡特细胞技术有限公司)作为反应细胞,该T细胞能识别与HLA-A2形成复合物的pp65。对于pp65特异性抗原呈递,将成熟的hESC-DC重悬于含或不含10 μ g/ml pp65肽的无血清AIM-V培养液中(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培育细胞2小时,然后用AIM-V培养液(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司)洗涤两次。用加利福尼亚州长滩EG&C天体物理研究公司(EG&G Astrophysics Research Corporation, Long Beach, CA)的Torrex 150D X-射线检查系统对部分pp65脉冲和未脉冲的hESC-DC进行2,000rad的X-射线照射4分钟14秒。取经照射和未-照射的hESC-DC以 1×10^4 个细胞/100 μ l/孔接种ELISPOT平板,反应细胞与刺激细胞比例为10:1。37 $^{\circ}$ C水浴融化经特征鉴定的PBMC反应细胞,洗涤两次,重悬于AIM-V培养液中(加利福尼亚州卡尔斯巴德市英杰公司),以 1×10^5 个细胞/100 μ l/孔接种ELISPOT平板(马萨诸塞州贝德福德市米利波尔公司)。此ELISPOT平板曾用10 μ g/ml抗-IFN γ 抗体(俄亥俄州马里蒙特马伯技术公司)包被过夜(16-24小时)。将该试验平板在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下静置16-24小时,按照马伯技术公司提供的说明书显色。用伊利诺斯州迪

卡特细胞技术有限公司的CTL分析仪计数斑点。图10所示结果证明经照射的hESC-DC保留了以抗原特异性方式刺激IFN γ 产生的能力。

[0276] 实施例13:经射线照射的mDC的趋化迁移

[0277] 按照与实施例12所用相同的方案分化得到成熟的树突细胞。采用体外transwell试验检测存在趋化配体MIP3 β (图11中的MIP3b) 时经照射和未经照射mDC (hESC-DC) 的迁移能力。将加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司的AIM-V培养液加入含有8.0 μ M孔径插片的Transwell 24孔板的上室和下室(康宁公司,康宁市,纽约州),37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培育过夜以平衡膜。收集mDC用AIM-V培养液洗涤两次。将细胞以1.5 \times 10⁶个细胞/毫升重悬于AIM-V培养液中,用加利福尼亚州长滩EG&C天体物理研究公司的Torrex 150D X-射线检查系统对这些细胞的一部分进行2,000rad的X-射线照射。除去transwell孔中的培养液后,下室加入0.6ml含或不含趋化因子MIP3 β (100ng/ml) 的AIM-V液。取0.1ml体积经照射或未经照射的mDC (0.15 \times 10⁶个细胞) 加入上室。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培育transwell板2小时。用血球计数器测定迁移至下室的细胞数量。图11所示结果证明在对MIP3 β 应答中射线照射不影响mDC的迁移能力。

[0278] 实施例14:比较可商品化购得培养液的细胞产率

[0279] 研究了两种可商品化购得的培养液:mTeSRTM无血清培养液(干细胞技术公司,温哥华,不列颠哥伦比亚,加拿大)和XVIVO-10培养液(马里兰州沃克斯维尔隆萨公司)对mDC细胞产率的影响。如实施例1所述进行H1hESC培养和分化方法。比较每次收集时得自用XVIVO-10或mTeSR培养的成熟DC的数量,见图12。从最初分化总共收集三次。虽然两种培养液均成功产生了hES体外分化的mDC,但结果提示用mTeSR培养的hESC提供的细胞产率优于XVIVO-10。

[0280] 实施例15.用商品化购得的培养液培养使hESC-产生成熟的DC

[0281] 成熟DC能刺激T细胞应答;因此,需要优化hESC-产生成熟的DC过程。(参见,例如Chiara等,2007)我们在实施例1中描述了分化的H1hESC,但在产生不成熟和成熟的hESC-衍生DC的步骤中采用的是Cellgro DC培养液。成熟24小时后,收集细胞,根据:1)细胞表面表达的标记,2)迁移和3) IL-2表达,评估是否存在成熟DC表型。

[0282] 采用实施例2所述的流式细胞术分析DC细胞表面表达的相关标记:II类MHC、CD83、CD86和CCR7。与用XVIVO-15培养的DC相比,用CellgroTM DC培养液培养的hESC-衍生成熟DC的II类MHC、CD83和CCR7阳性细胞百分比(%)和表达水平(MFI)均升高,见图13。表达CD86的细胞%保持不变,但用CellgroTM DC培养液的平均荧光强度(MFI)较高。该数据提示CellgroTM DC培养液能促进产生更稳定的成熟DC表面表型。

[0283] 随后采用实施例5所述的Transwell试验研究了用CellgroTM DC和XVIVO-15培养液培养hESC-衍生的成熟DC的迁移效率。对于有效迁移,用XVIVO-15培养的hESC-衍生DC需要成熟至少48小时。用CellgroTM DC培养液培养24小时成熟后的hESC-衍生成熟DC在对MIP3 β 应答中迁移能力比用XVIVO-15培养的DC增加(图14)。这些数据提示用CellgroTM DC培养液培养24小时的hESC-衍生DC在成熟后迁移力改善。

[0284] IL-12有助于促进Th1型免疫应答;因此,优化hESC-衍生成熟DC的IL-12表达可能有用。如实施例4所述检测IL-12表达水平。用CellgroTM DC培养的hESC-衍生成熟DC的IL-12表达水平高于用XVIVO-15培养的DC (3.4倍) (图15)。成熟混合液加入IL-4能提高DC表达IL-

12(参见,例如Ebner等,(2001) J.Immunology 166:633)。在两种培养液条件下IL-4均提高了IL-12的表达,但用Cellgro™ DC培养液培养的hESC-衍生成熟DC产生的IL-12水平高得多(5.6倍)(图15)。综合而言,这些数据提示用Cellgro™ DC培养液培养的hESC-衍生成熟DC表达了比用XVIVO-15培养的DC更高水平的IL-12。

[0285] 实施例16:用编码hTERT-LAMP的RNA转染的hESC-衍生DC刺激540hTERT T细胞系

[0286] 按照实施例1所述方法分化H1hESC,除了用mTeSR™培养hESC和用Cellgro™ DC培养产生hESC-衍生的不成熟和成熟DC外。用Biorad基因脉冲仪(Gene Pulser) Xee11(加利福尼亚州赫拉克勒斯BR实验室),在0.4cm小杯中(加利福尼亚州赫拉克勒斯BR实验室)电穿孔2.0-4.0e6hESC-衍生的成熟DC细胞,使编码hTERT-LAMP或GFP的RNA进入细胞,所用参数如下:300V、150uF和100Ω。用Cellgro™ DC培养液洗涤电穿孔细胞一次后将细胞转移入成熟培养液中再培育6小时。收集电穿孔摄入GFP-和hTERT-LAMP RNA的hESC-衍生的成熟DC,与540hTERT T细胞系共同培育,如实施例9和10所述检测IFN γ 表达,。结果证明,用经电穿孔摄入hTERT-LAMP RNA的hESC-衍生成熟DC刺激540hTERT特异性T细胞系产生的IFN γ 水平高于用GFP-RNA转染的hESC-衍生DC刺激的(图16)。该数据提示hESC-衍生的DC能加工和呈递hTERT抗原。

[0287] 本领域技术人员明白可对本发明作出许多改进和改变但不脱离其范围。提供本文所述的具体实施方式只是为了举例,并非以任何方式限制本发明的范围。说明书和实施例应只视为示范性,本发明的真实范围和构思由以下权利要求所定。

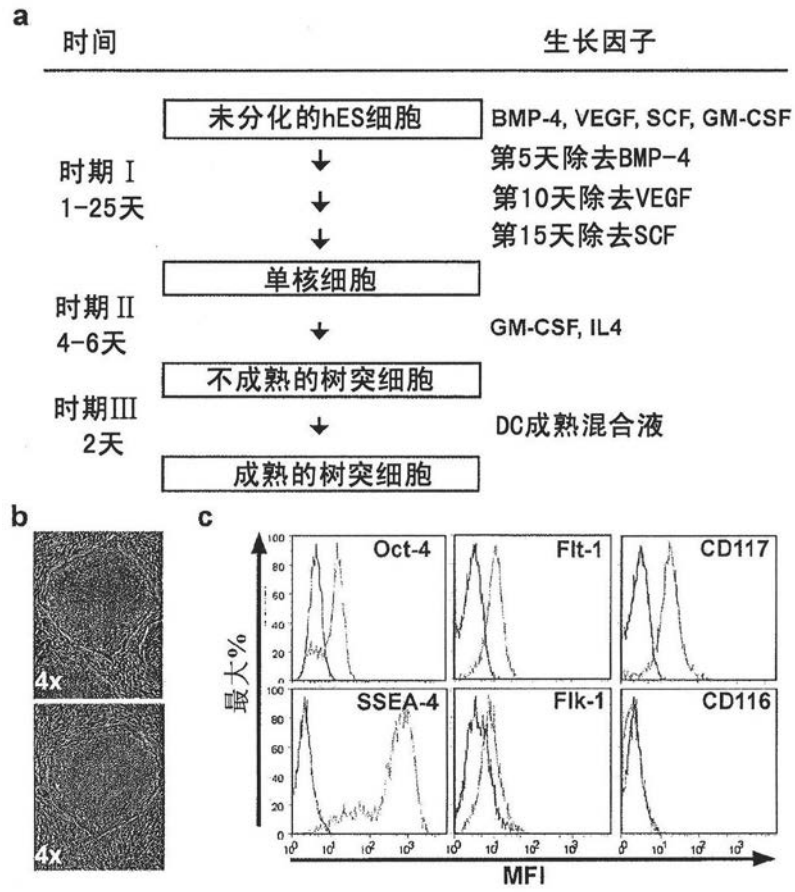


图1

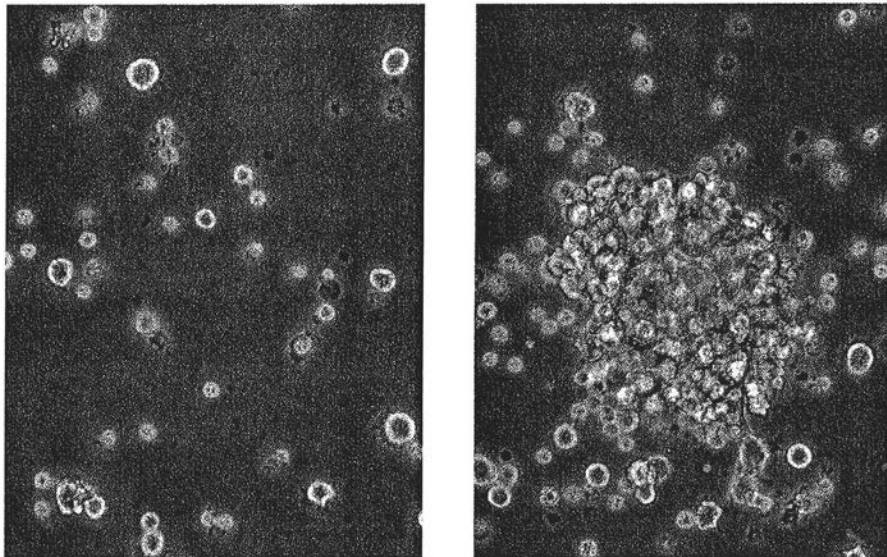


图2

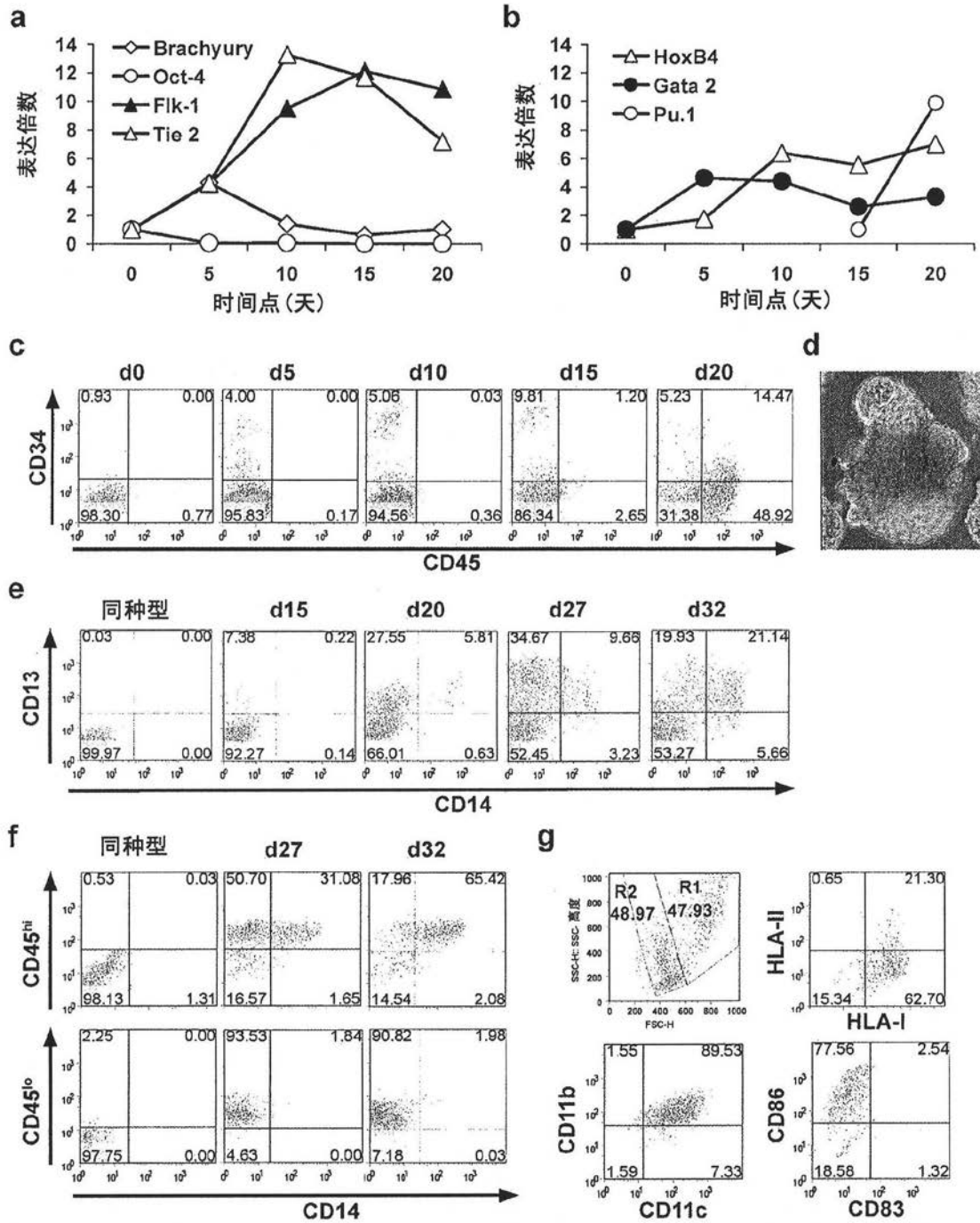


图3

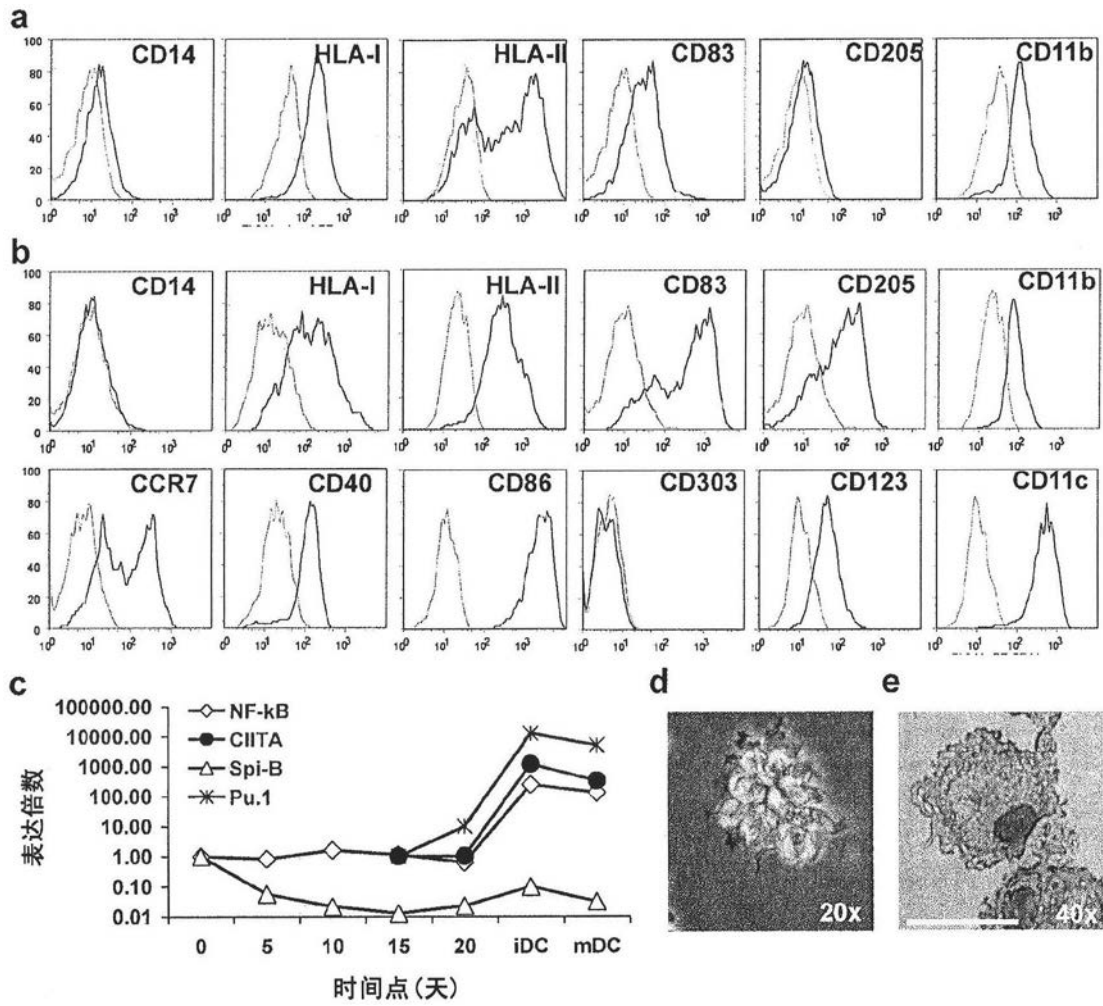


图4

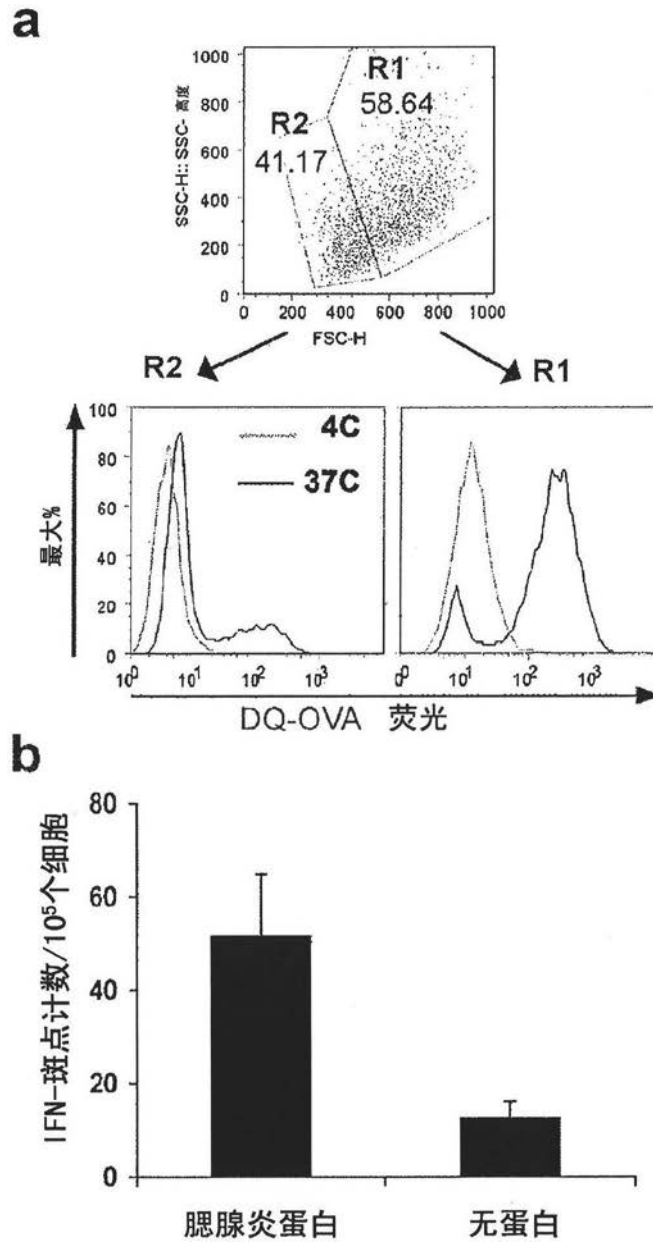


图5

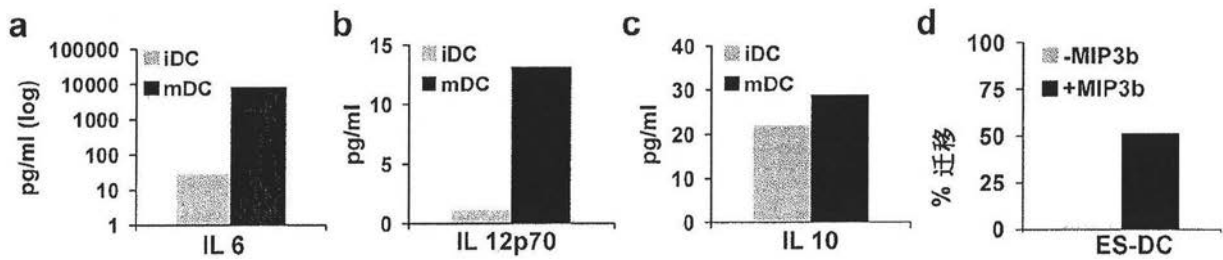


图6

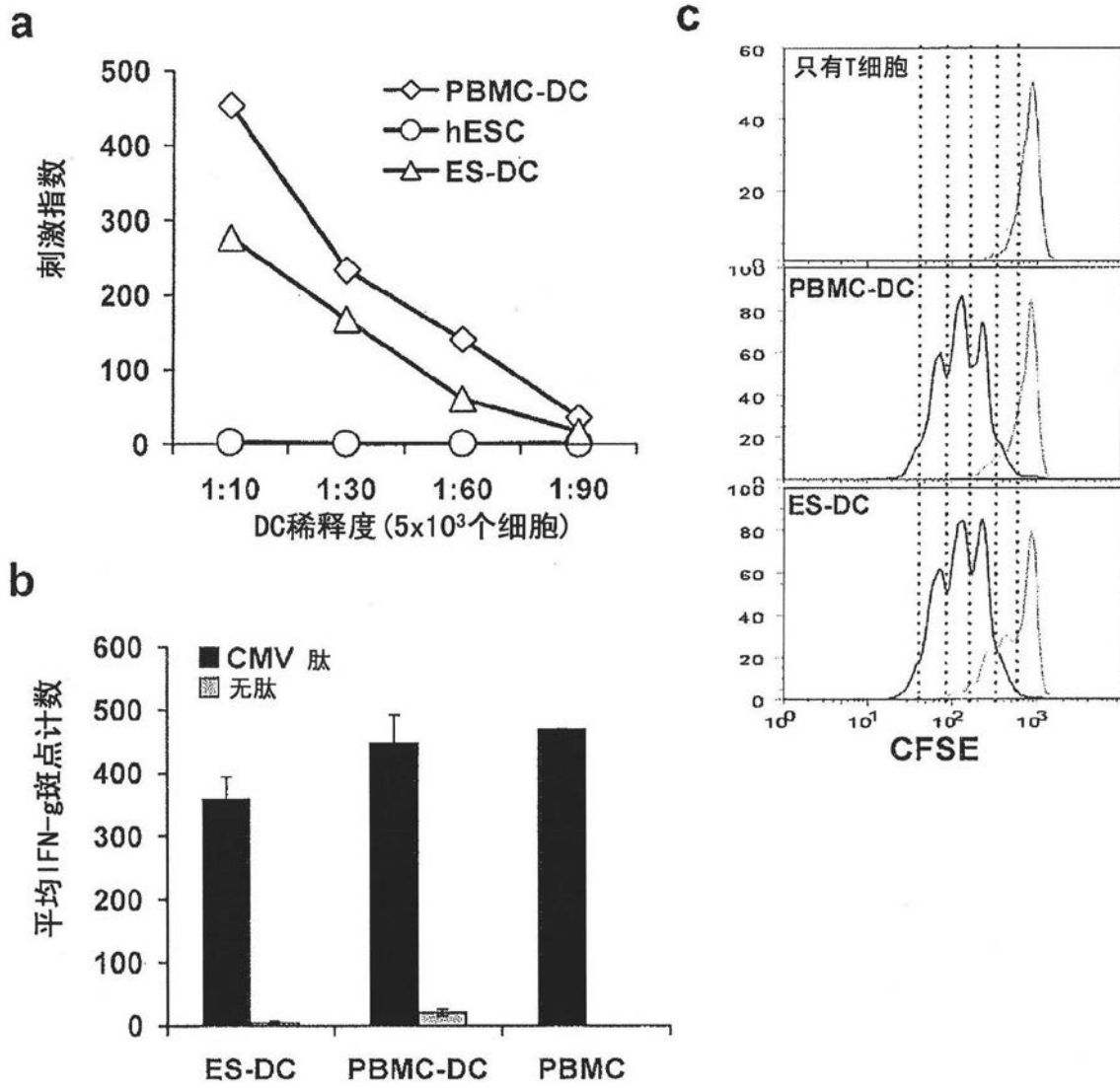
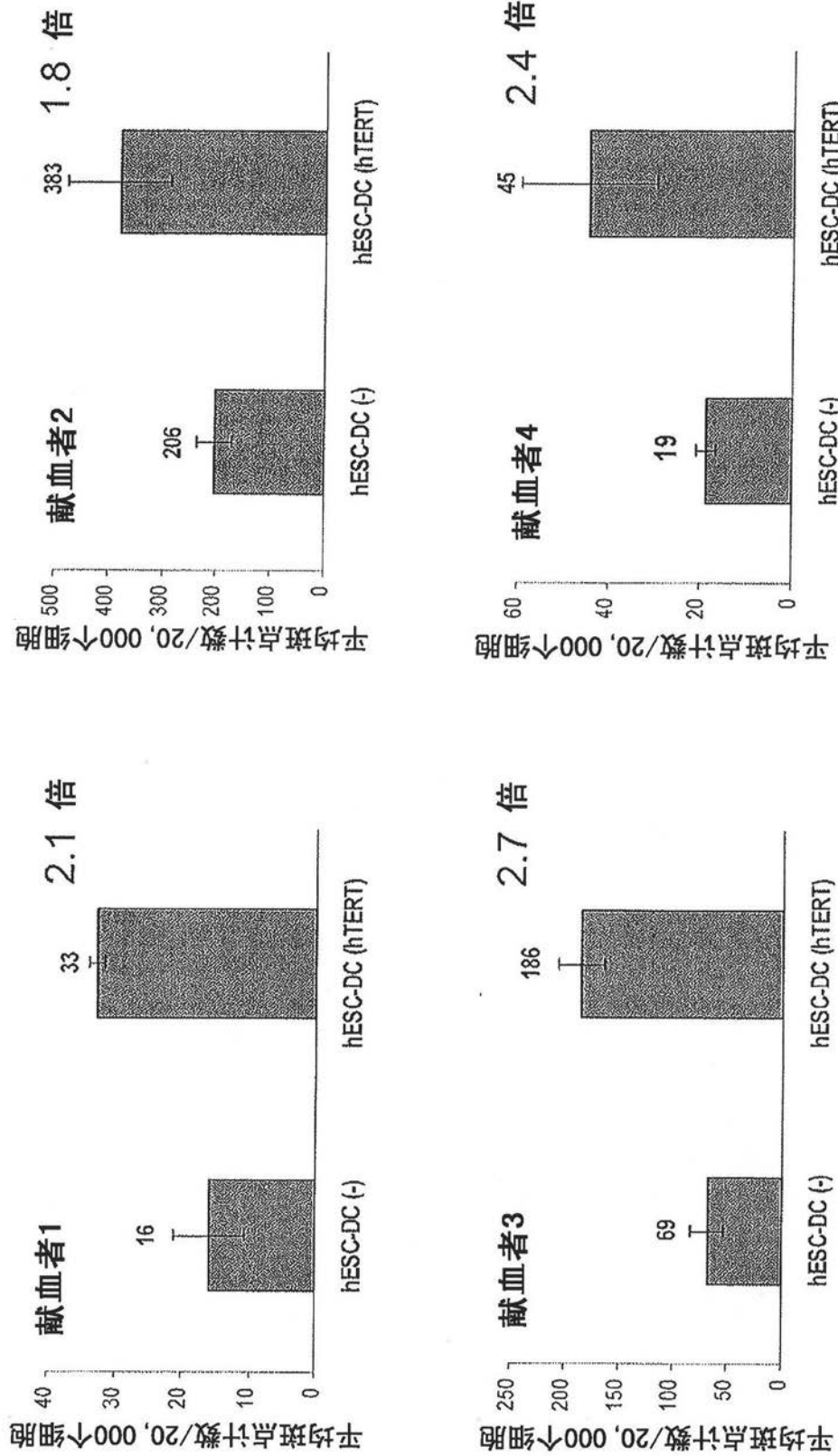


图7

成熟hESC-DC在HLA-A2上呈递hTERT抗原并刺激T细胞分泌IFN-g



2

图8

成熟hESC-DC在HLA-A2上呈递hTERT抗原并刺激T细胞增殖
利用鉴定抗原特异性细胞的CFSE染料稀液和hTERT五聚体检测增殖

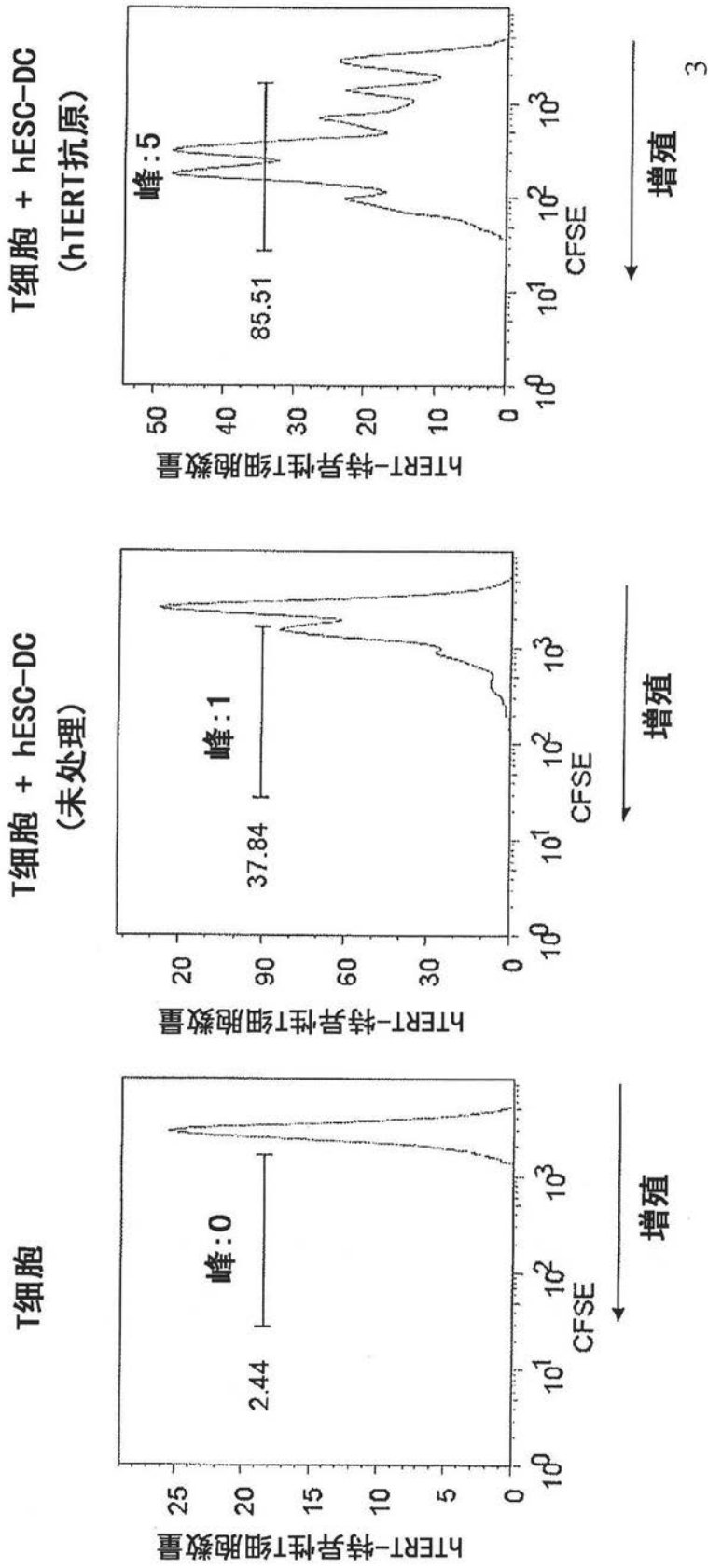


图9

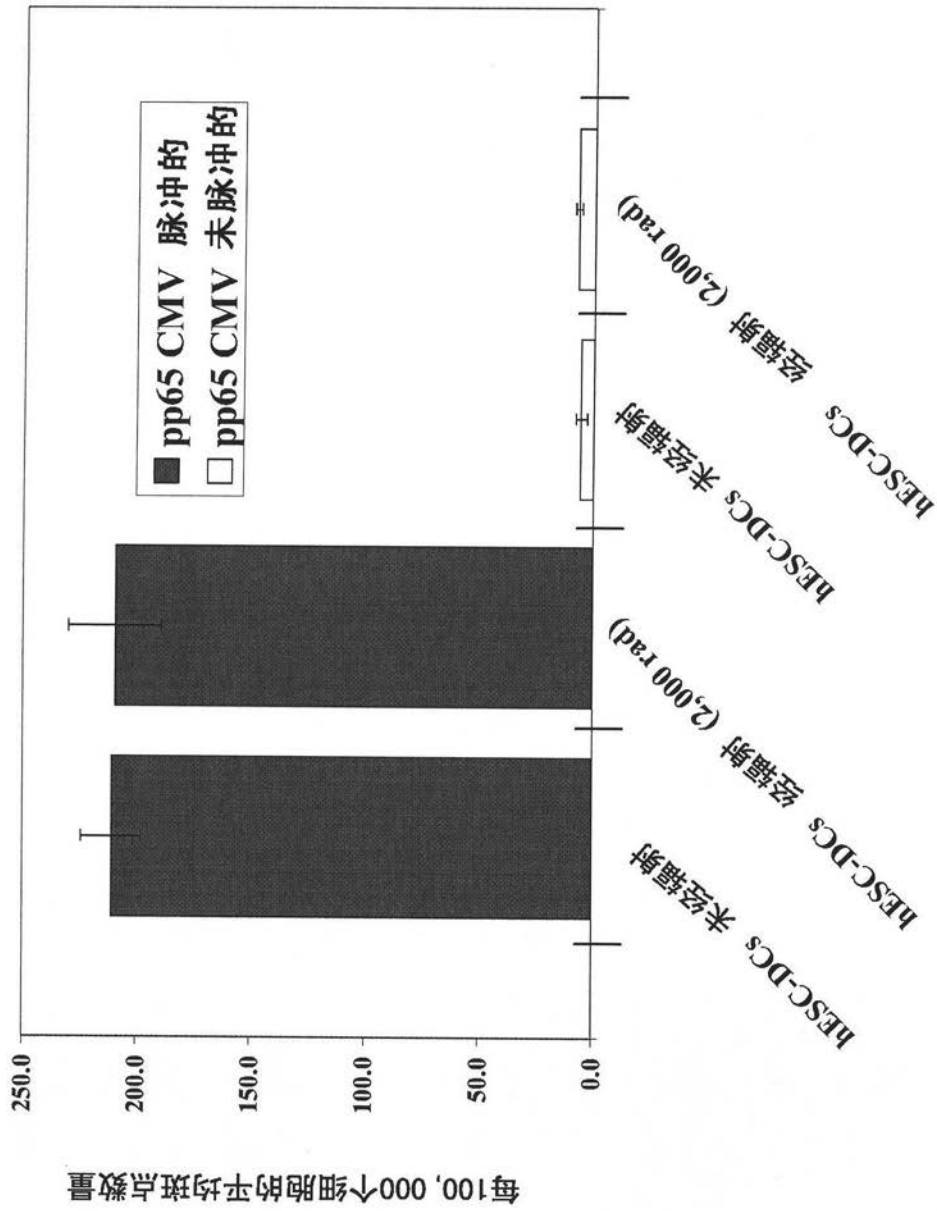


图10

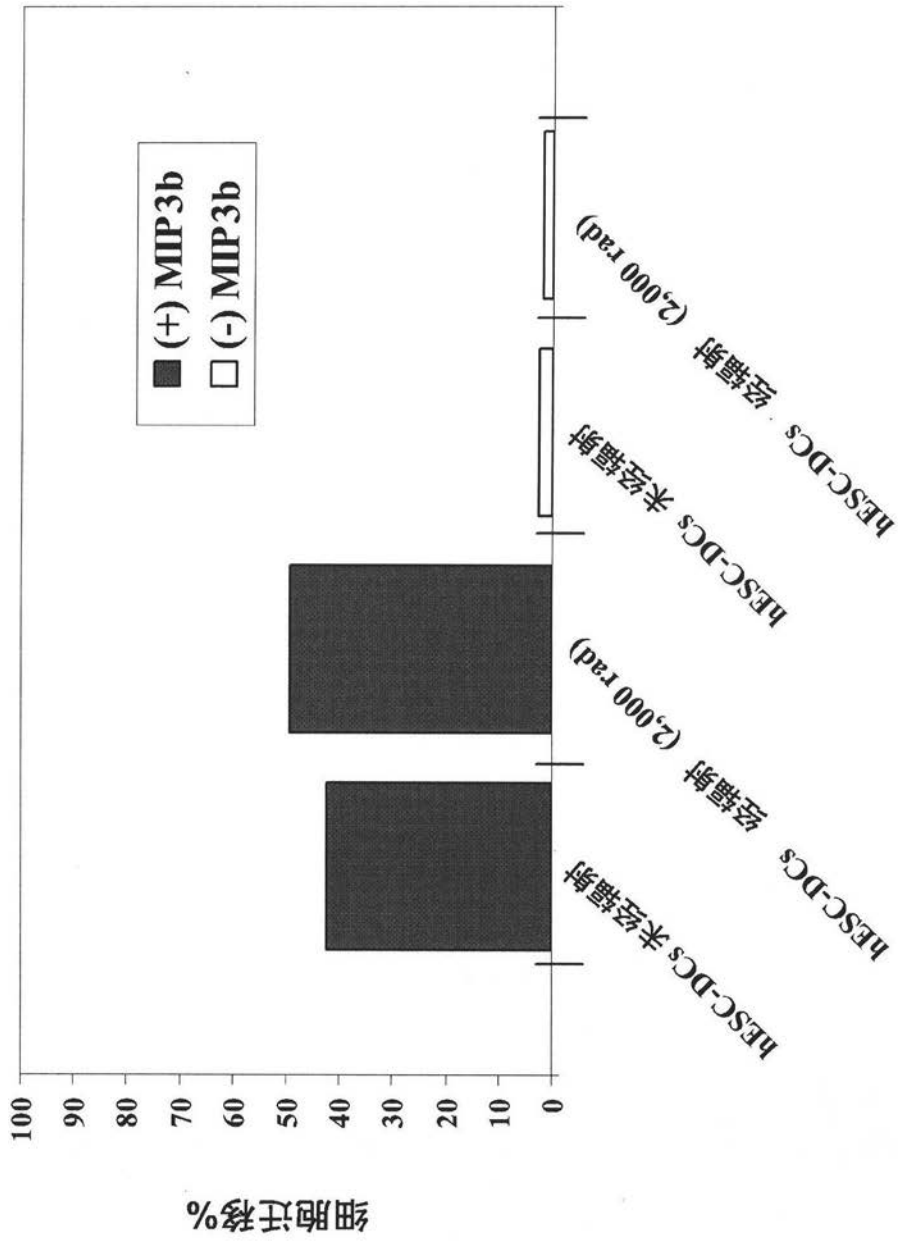


图11

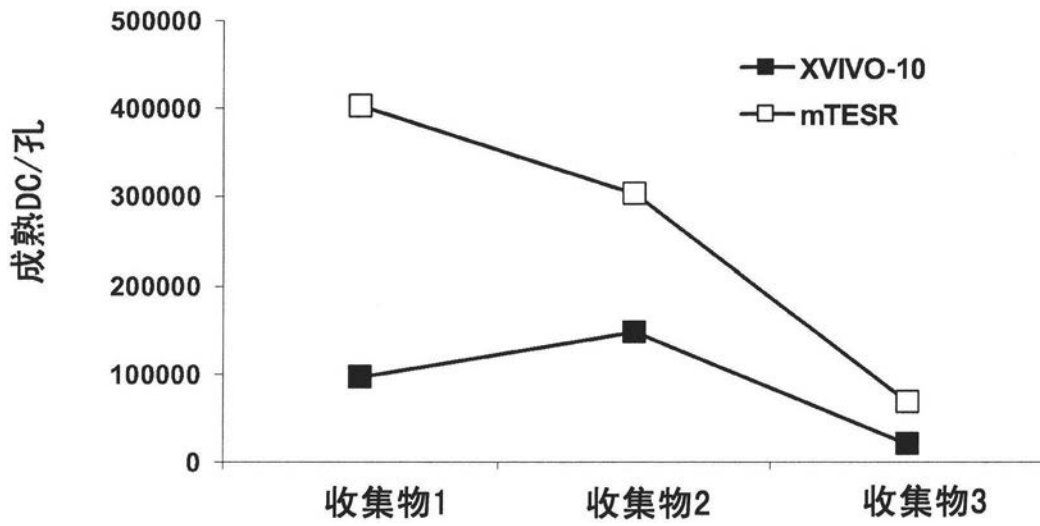


图12

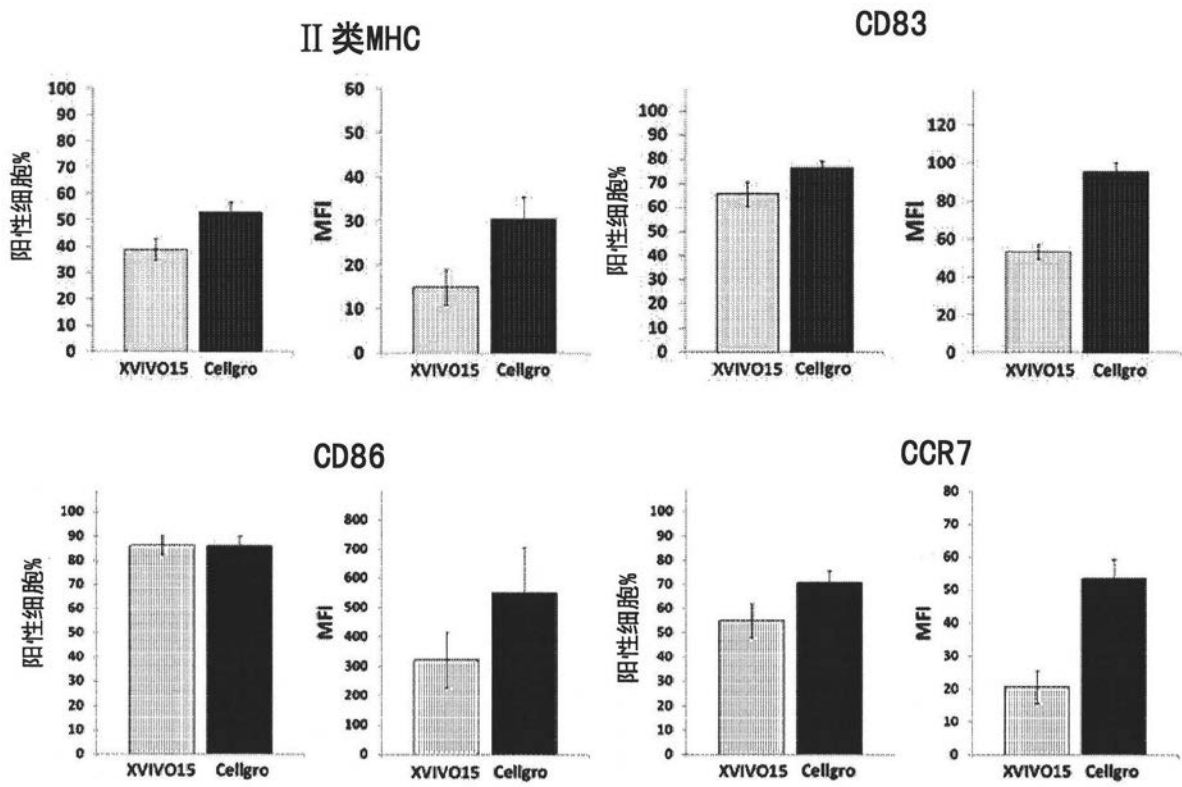


图13

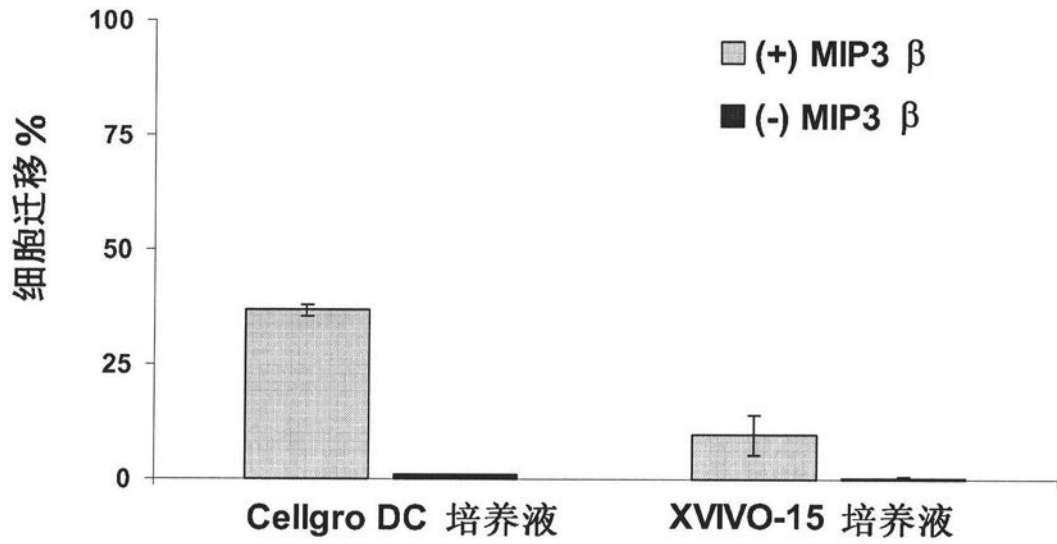


图14

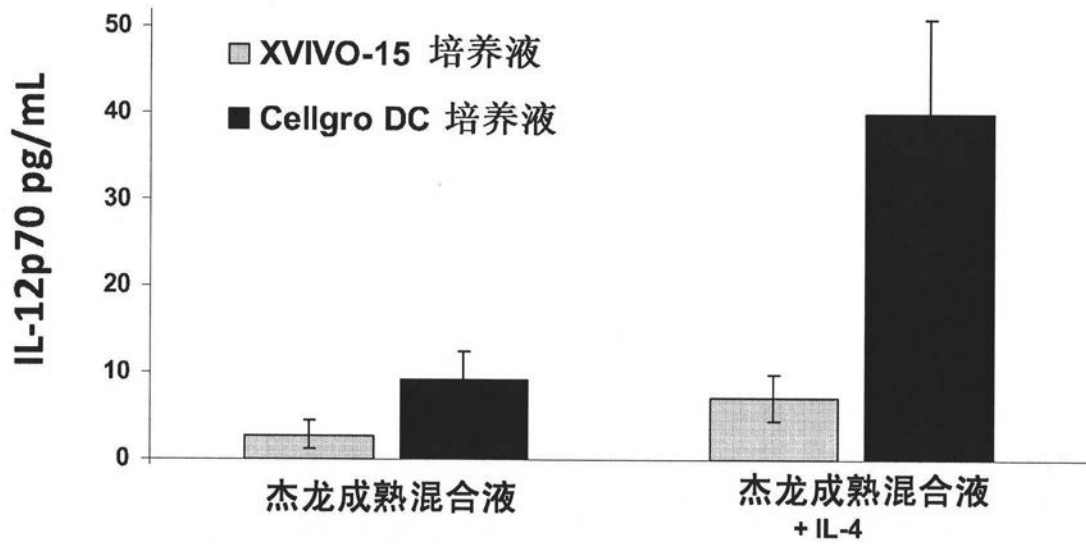


图15

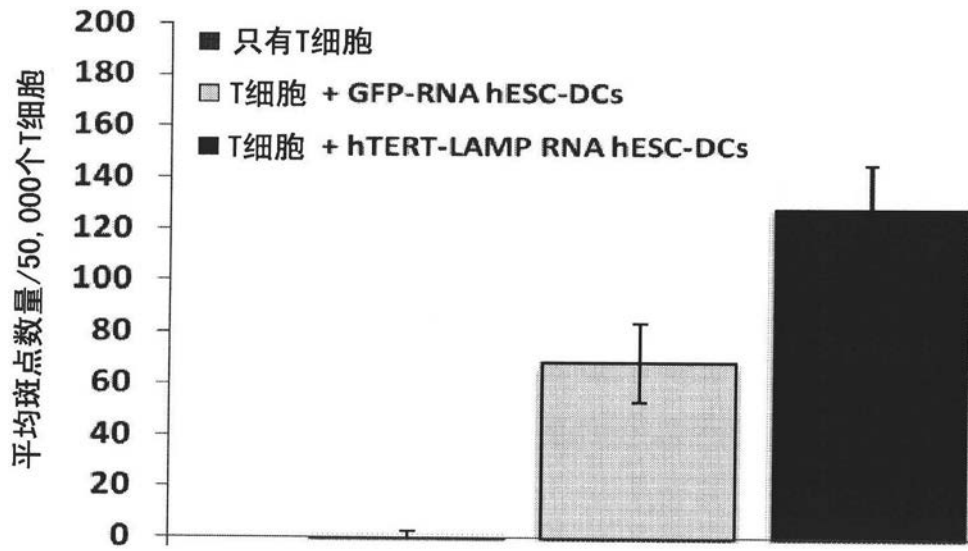


图16