



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 115137753 A

(43) 申请公布日 2022. 10. 04

(21) 申请号 202210767555.3

(22) 申请日 2014.02.04

(30) 优先权数据

61/761,176 2013.02.05 US

61/780,115 2013.03.13 US

(62) 分案原申请数据

201480020211.X 2014.02.04

(71) 申请人 细胞结构公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 张小葵 罗伯特·J·哈黎里

瓦内萨·沃斯基纳里安-贝尔斯

康琳 埃里克·劳

斯图尔特·阿博特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

专利代理师 刘晓杰 武晶晶

(51) Int.Cl.

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

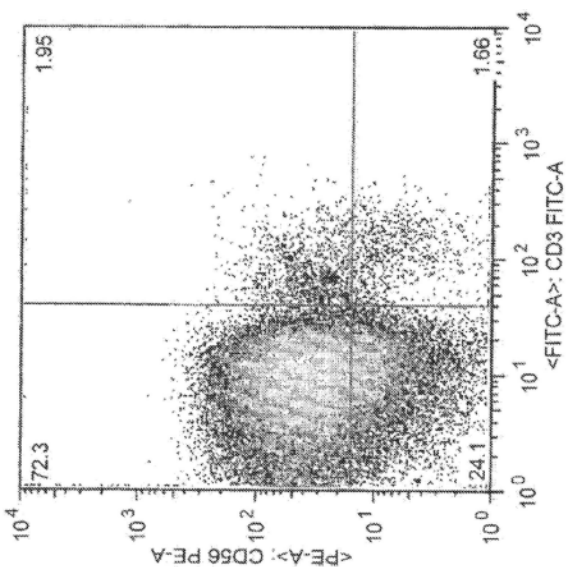
权利要求书2页 说明书82页  
序列表5页 附图17页

(54) 发明名称

来自胎盘的自然杀伤细胞

(57) 摘要

本发明提供的是胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘来源的中间体自然杀伤细胞、来自胎盘和脐带血的组合的自然杀伤细胞及其组合。本发明还提供的是包含胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘来源的中间体自然杀伤细胞和组合的自然杀伤细胞及其组合的组合物及使用它们来抑制肿瘤细胞、癌症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。本发明还提供的是用胎盘灌洗液、胎盘灌洗液来源的细胞、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)和脐带血的自然杀伤细胞的组合的自然杀伤细胞治疗患有肿瘤或移植物抗宿主病的个体的方法。



1. 抑制肿瘤细胞的增殖的方法, 包括使所述肿瘤细胞与分离自人胎盘灌洗液和脐带血的自然杀伤细胞接触。

2. 治疗移植物抗宿主病的方法, 包括将分离自人胎盘灌洗液和脐带血的自然杀伤细胞给予患有、怀疑患有移植物抗宿主病或处于发生移植物抗宿主病风险之中的患者。

3. 权利要求1的方法, 其中所述肿瘤细胞是血液癌症细胞。

4. 权利要求1的方法, 其中所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。

5. 权利要求1的方法, 其中, 所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性髓样淋巴瘤 (CML) 细胞、急性髓细胞白血病细胞、慢性髓细胞白血病 (CML) 细胞、肺癌细胞、结肠腺癌细胞、组织细胞性淋巴瘤细胞、结肠直肠癌细胞、结肠直肠腺癌细胞或视网膜母细胞瘤细胞。

6. 权利要求1的方法, 其中所述人胎盘灌洗液和脐带血已经过处理以除去大量的红细胞。

7. 权利要求1的方法, 其中所述接触是在体外接触。

8. 权利要求1的方法, 其中所述接触是在体内接触。

9. 权利要求8的方法, 其中所述接触是在人体内。

10. 权利要求1的方法, 其中所述胎盘灌洗液细胞是来自胎盘灌洗液的总有核细胞。

11. 权利要求1的方法, 其中所述自然杀伤细胞包含至少约50%CD56<sup>+</sup>细胞。

12. 权利要求1的方法, 其中所述自然杀伤细胞包含至少约50%CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>细胞。

13. 权利要求1的方法, 其中所述自然杀伤细胞与免疫调节化合物以足以使所述细胞比相等个数的未接触所述免疫调节化合物的细胞表达可检测更多的颗粒酶B的量和时间接触。

14. 权利要求13的方法, 其中所述免疫调节化合物是来那度胺或泊马度胺。

15. 权利要求1的方法, 其中所述自然杀伤细胞包含:

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞;

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞;

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>自然杀伤细胞;

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>自然杀伤细胞;

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>自然杀伤细胞;

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>自然杀伤细胞; 或

比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

16. 权利要求1的方法, 其中所述自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高的量表达hsa-miR-155、hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-

miR-618中的一种或多种。

17. 权利要求1的方法,其中所述自然杀伤细胞未经过培养。
18. 权利要求1的方法,其中所述自然杀伤细胞已经过培养。
19. 权利要求18的方法,其中所述自然杀伤细胞已培养约21天。
20. 权利要求18的方法,其中所述自然杀伤细胞已在饲养细胞存在下进行培养。
21. 权利要求20的方法,其中在约第7天向该培养物中另外添加饲养细胞。

## 来自胎盘的自然杀伤细胞

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为2014年2月4日提交的、发明名称为“来自胎盘的自然杀伤细胞”、申请号为201480020211X的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求2013年2月5日申请的美国临时专利申请第61/761,176号及2013年3月13日申请的美国临时专利申请第61/780,115号的权益,这两个临时专利申请的公开内容通过引用以其全部内容并入本文。

[0004] 1. 领域

[0005] 本文提供的是抑制肿瘤细胞生长或增殖的方法,即通过使肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液来源的细胞、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)和脐带血的自然杀伤细胞的组合的自然杀伤细胞接触。本文还提供的是产生来自胎盘(例如,来自胎盘灌洗液,例如人胎盘灌洗液)的独特的自然杀伤细胞群体的方法。本文进一步提供的是使用所述胎盘灌洗液和来自所述胎盘灌洗液的自然杀伤细胞来抑制肿瘤细胞增殖的方法。本文还提供的是用胎盘灌洗液、胎盘灌洗液来源的细胞、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)和脐带血的自然杀伤细胞的组合的自然杀伤细胞治疗患有肿瘤或移植物抗宿主病的个体的方法。

[0006] 2. 背景

[0007] 胎盘灌洗液包含通过使灌洗溶液通过胎盘脉管系统获得的胎盘细胞的收集物,和来自脉管系统、来自胎盘的母体表面或两者的灌洗液的收集物。灌洗哺乳动物胎盘的方法描述于例如美国专利第7,045,146号和美国专利第7,255,879号。通过灌洗获得的胎盘细胞群体是不均一的,包含造血(CD34<sup>+</sup>)细胞、有核细胞例如粒细胞、单核细胞和巨噬细胞、小百分比(小于1%)的组织培养基底--贴壁胎盘干细胞和自然杀伤细胞。迄今为止未曾有描述胎盘灌洗液或来自灌洗液的胎盘细胞群体在抑制肿瘤细胞增殖中的用途。

[0008] 自然杀伤(NK)细胞是构成先天性免疫系统的主要组分的细胞毒性淋巴细胞。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,但是通常在人类中表达表面标志物CD16(Fc $\gamma$ RIII)和CD56。NK细胞是细胞毒性的;它们的细胞质中的小颗粒含有特殊的蛋白质,例如穿孔素(perforin)和被称为颗粒酶的蛋白酶。一旦在要杀伤的靶细胞附近释放,则穿孔素在所述靶细胞的细胞膜中形成孔,颗粒酶及所缔合的分子通过该孔可以进入,从而诱导细胞凋亡。一种颗粒酶,颗粒酶B(也称为颗粒酶2和细胞毒性T-淋巴细胞相关丝氨酸酯酶1),是对于在细胞介导的免疫应答中快速诱导靶细胞凋亡来说至关重要的丝氨酸蛋白酶。

[0009] NK细胞对于干扰素或者巨噬细胞源性细胞因子响应而被激活。激活的NK细胞被称为淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞。NK细胞具备两种类型的表面受体,标记为“激活受体”和“抑制受体”,其控制细胞的细胞毒性活性。

[0010] 在其它活性中,NK细胞在宿主肿瘤排斥中起作用。因为癌细胞具有降低的或不具有I类MHC表达,所以它们可以变成NK细胞的靶标。积累的临床数据表明分离自外周血单核

细胞(PBMC)或骨髓的人NK细胞的单倍同一性移植介导了强效的抗白血病效应而不会引起可检测的移植物抗宿主病(GVHD)。参见Ruggeri等人,Science 295:2097-2100(2002))。自然杀伤细胞可以通过细胞缺少或显示出降低水平的主要组织相容性复合体(MHC)蛋白而被激活。激活并扩增的NK细胞和LAK细胞已在晚期癌症患者的离体疗法(ex vivo therapy)和体内治疗(in vivo treatment)中使用,其中对骨髓相关疾病,如白血病、乳癌和某些类型的淋巴瘤,取得了一定的成功。LAK细胞治疗需要患者首先接受IL-2,随后进行白细胞去除术且然后将所收获的自体血细胞在存在IL-2的情况下离体孵育和培养几天。必须将LAK细胞与相对高剂量的IL-2一起再输注以完成所述疗法。这种净化治疗(purging treatment)是昂贵的并且可引起严重的副作用。这些包括体液滞留、肺水肿、血压降低和高烧。

[0011] 虽然NK细胞在杀死肿瘤细胞和病毒感染的细胞中具有有利性能,但是它们仍难以与免疫疗法一起使用和在免疫疗法中应用,这主要是由于在培养和扩增期间难以维持它们的肿瘤靶向和杀肿瘤能力。因此,在本领域中存在即时供应自然杀伤细胞的需求。

[0012] 3. 概述

[0013] 在一个方面,本文提供的是胎盘灌洗液;来自胎盘灌洗液的细胞,例如来自胎盘灌洗液的总有核细胞;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抑制肿瘤细胞增殖的用途。

[0014] 在一个方面,本文提供的是抑制肿瘤细胞或肿瘤细胞群体的增殖的方法,包括使肿瘤细胞或肿瘤细胞群体与人胎盘灌洗液接触。在该方法的一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是血液癌症细胞。在另一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是血液癌症细胞。在另一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞群体是实体肿瘤细胞群体。在另一个实施方式中,所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性髓样淋巴瘤(CML)细胞、急性髓细胞白血病细胞、慢性髓细胞白血病(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、视网膜母细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体外。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体内。在一个更具体的实施方式中,所述体内接触发生在人体内。

[0015] 在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液是已经通过胎盘脉管系统(例如,仅通过胎盘脉管系统)的灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液已经通过胎盘脉管系统并且由胎盘的母体面收集。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液中所有或实质上所有(例如,大于90%、95%、98%或99%)的细胞是胎儿细胞。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含胎儿细胞和母体细胞。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液中的所述胎儿细胞占所述灌洗液中小于约90%、80%、70%、60%或50%的细胞。在另一个具体的实施方式中,通过将0.9%NaCl溶液通过胎盘脉管系统获得所述灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述灌洗液包含培养基。在另一个具体的实施方式中,所述灌洗液已经过处理以除去大量的红细胞。

[0016] 如本文所用的,短语“来自胎盘的自然杀伤细胞”不包括来自脐带血或胎盘血的自然杀伤细胞。

[0017] 在另一个方面,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,包括

使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。在另一个具体的实施方式中,所述众多胎盘灌洗液细胞是或包含来自胎盘灌洗液的总有核细胞。在另一个具体的实施方式中,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总有核细胞,已经过处理以除去至少一种细胞类型。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体外。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体内。在一个更具体的实施方式中,所述体内接触发生在哺乳动物(例如,人)体内。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞已经过处理以富集至少一种细胞类型,例如CD56<sup>+</sup>细胞。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞是CD56<sup>+</sup>胎盘细胞。在一个更具体的实施方式中,所述CD56<sup>+</sup>细胞是CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞,例如胎盘中体自然杀伤(PINK)细胞,例如获自胎盘灌洗液细胞或通过机械或酶促破坏胎盘组织获得的胎盘细胞。在另一个具体的实施方式中,所述CD56<sup>+</sup>细胞经由CD56-缀合的微珠选择。在另一个具体的实施方式中,所述CD56<sup>+</sup>细胞包含表现出比相等个数的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞可检测更低表达NKG2D、NKp46或CD94的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述PINK细胞是CD3<sup>-</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞中至少50%的细胞是所述CD56<sup>+</sup>细胞。在一个更具体的实施方式中,其中所述CD56<sup>+</sup>细胞是所述胎盘灌洗液细胞的至少50%,所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性髓样淋巴瘤(CML)细胞、急性髓细胞白血病细胞、慢性髓细胞白血病(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、视网膜母细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。在具体的实施方式中,所述接触是在体外接触。在另一个实施方式中,所述接触是在体内接触,例如在哺乳动物(例如,人)体内接触。

[0018] 在另一个方面,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,包括使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与来自胎盘的众多自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)接触。在一个具体的实施方式中,所述来自胎盘的天然杀伤细胞是从胎盘灌洗液获得的天然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述天然杀伤细胞是通过物理破坏和/或酶促消化胎盘组织获得的天然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述天然杀伤细胞是CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)。在另一个具体的实施方式中,所述天然杀伤细胞选自例如胎盘灌洗液细胞或通过物理破坏和/或酶促消化胎盘组织(通过CD56-缀合的微珠)获得的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述天然杀伤细胞是CD3<sup>-</sup>。在一个具体的实施方式中,所述众多天然杀伤细胞是包含天然杀伤细胞的细胞群体中的至少80%的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体外。在另一个具体的实施方式中,所述接触发生在体内。在一个更具体的实施方式中,所述体内接触发生在哺乳动物(例如,人)体内。

[0019] 在该方法的另一个具体的实施方式中,所述众多天然杀伤细胞包含表现出比相等个数的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞可检测更低表达NKG2D、NKp46或CD94的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述众多天然杀伤细胞(例如,PINK细胞)以比外周血天然杀伤细胞可检测更高的水平表达微小RNA(microRNA) 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中的一种或多种。

[0020] 在另一个具体的实施方式中,使所述众多天然杀伤细胞(例如,PINK细胞)与免疫

调节化合物以足以使所述众多自然杀伤细胞比相等个数的未接触所述免疫调节化合物的自然杀伤细胞表达可检测更多的颗粒酶B的量和时间接触。在一个更具体的实施方式中,所述免疫调节化合物是来那度胺(lenalidomide)或泊马度胺(pomalidomide)。在另一个具体的实施方式中,使所述众多自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)与免疫调节化合物以足以使所述自然杀伤细胞比相等个数的未接触所述免疫调节化合物(例如,来那度胺或泊马度胺)的自然杀伤细胞对所述肿瘤细胞表现出可检测更强的细胞毒性的量和时间接触。在另一个具体的实施方式中,所述众多自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)以比相等个数的未接触所述免疫调节化合物的自然杀伤细胞更高的水平表达BAX、CCL5、CCR5、CSF2、FAS、GUSB、IL2RA或TNFRSF18中的一种或多种。在另一个具体的实施方式中,所述众多自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)以比相等个数的未接触所述免疫调节化合物的自然杀伤细胞更高的水平表达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。

[0021] 在另一个实施方式中,将来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一种来源(例如,胎盘血和/或脐带血)的天然杀伤细胞进行组合,例如以形成组合的天然杀伤细胞(combined natural killer cells)。

[0022] 在另一个实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞是来自混合来源(例如,胎盘(例如,胎盘灌洗液)和脐带血)的天然杀伤细胞。例如,组合的天然杀伤细胞可获自匹配的脐带血和人胎盘灌洗液,例如供体匹配的来源,其中胎盘灌洗液获自与脐带血相同的胎盘。来自两者的天然杀伤细胞经单独或同时分离,并且进行组合。在一个实施方式中,天然杀伤细胞分离自组合的脐带血和人胎盘灌洗液。组合的天然杀伤细胞在本文中也可称为“pNK”细胞。在更具体的实施方式中,将来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一种来源的天然杀伤细胞以约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等的比率进行组合。在一个实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞获自来自胎盘(例如,来自胎盘灌洗液)的细胞和来自另一种来源(例如,脐带血)的细胞的组合。在一个实施方式中,来自胎盘和另一种来源的细胞在组合的天然杀伤细胞的分离之前进行组合。在又一个实施方式中,天然杀伤细胞分离自胎盘,并且独立地,天然杀伤细胞分离自另一种来源,然后将来自两种来源的天然杀伤细胞进行组合以形成组合的天然杀伤细胞。

[0023] 在具体的实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞未经过培养。在其它实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞经过培养。

[0024] 在某些实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的天然杀伤细胞可检测更高量的KIR2DL2/3<sup>+</sup>、NKp30<sup>+</sup>、2B4<sup>+</sup>和/或CD94<sup>+</sup>天然杀伤细胞。在某些实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的天然杀伤细胞可检测更低量的NKp46<sup>+</sup>天然杀伤细胞。

[0025] 在某些实施方式中,所述组合的天然杀伤细胞包含:比来自外周血的相等个数的天然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>天然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数

的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>自然杀伤细胞;或比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在其它具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞经过培养并且包含:比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>自然杀伤细胞;比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

[0026] 在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高的量表达miRNA hsa-miR-155、hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618中的一种或多种。在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低的量表达miRNA hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631中的一种或多种。

[0027] 在任何以上方法的一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是实体肿瘤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是液体肿瘤细胞,例如血液肿瘤细胞。在更具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性髓样淋巴瘤(CML)细胞、急性髓细胞白血病细胞、慢性髓细胞白血病(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、视网膜母细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。

[0028] 在另一个方面,本文提供的是组合物,其包含分离的胎盘CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞,例如PINK细胞。在一个具体的实施方式中,所述胎盘自然杀伤细胞分离自胎盘灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘自然杀伤细胞通过物理破坏和/或酶促消化胎盘组织而分离自胎盘。在另一个具体的实施方式中,所述自然杀伤细胞占所述组合物中至少50%的细胞。在一个具体的实施方式中,所述自然杀伤细胞占所述组合物中至少80%的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含分离的CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在一个更具体的实施方式中,所述CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞是来自与所述CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞不同的个体。在另一个具体的实施方式中,所述分离的CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞是来自单一个体。在一个更具体的实施方式中,所述分离的CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>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。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘自然杀伤细胞(例如,所述PINK细胞)经过扩增。

[0029] 在一个更具体的实施方式中,所述组合物包含胎盘的天然杀伤细胞和来自另一种来源的天然杀伤细胞。在一个具体的实施方式中,所述其它来源是脐血(cord blood)和/或脐带血(umbilical cord blood)。在另一个具体的实施方式中,所述其它来源是外周血。在更具体的实施方式中,将来自胎盘的天然杀伤细胞与来自另一种来源的天然杀伤细胞以约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等的比率进行组合。在具体的实施方式中,所述组合物包含获自胎盘细胞(例如,胎盘灌洗液)和来自另一种来源(例如,脐带血)的细胞的组合的自然杀伤细胞。

[0030] 在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含分离的胎盘灌洗液。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液是来自与所述自然杀伤细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含来自与所述自然杀伤细胞不同的个体的胎盘灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液中所有或实质上所有(例如,大于90%、95%、98%或99%)的细胞是胎儿细胞。在另一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含胎儿细胞和母体细胞。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液中的所述胎儿细胞占所述灌洗液中小于约90%、80%、70%、60%或50%的细胞。在另一个具体的实施方式中,通过将0.9%NaCl溶液通过胎盘脉管系统获得所述灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述灌洗液包含培养基。在另一个具体的实施方式中,所述灌洗液已经过处理以除去大量的红细胞。

[0031] 在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含胎盘灌洗液细胞。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞是来自与所述自然杀伤细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞是来自与所述自然杀伤细胞不同的个体。在另一个具体的实施方式中,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是来自不同的个体。在任何以上包含胎盘灌洗液的实施方式的另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含来自至少两个个体的胎盘灌洗液。在任何以上包含胎盘灌洗液细胞的实施方式的另一个更具体的实施方式中,所述分离的胎盘灌洗液细胞是来自至少两个个体。该组合物可另外包含分离的PINK细胞,其中所述PINK细胞是来自与所述胎盘灌洗液或所述灌洗液细胞不同的个体。

[0032] 在另一个方面,本文提供的是分离胎盘自然杀伤细胞的方法,包括获得众多胎盘细胞,和从所述众多胎盘细胞中分离出自然杀伤细胞。在一个实施方式中,本文提供的是从混合来源例如胎盘(例如,胎盘灌洗液)和脐带血中分离自然杀伤细胞的方法,包括获得众多胎盘细胞和脐带血细胞,和从所述众多胎盘细胞和脐带血细胞中分离出自然杀伤细胞。在一个具体的实施方式中,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总有核细胞。在另一个具体的实施方式中,所述众多胎盘细胞是或包含通过机械和/或酶促消化胎盘组织获得的胎盘细胞。在另一个实施方式中,使用一种或多种抗体进行所述分离。在一个更具体的实施方式中,所述一种或多种抗体包含抗CD3、CD16或CD56的抗体中的一种或多种。在一个更具体的实施方式中,所述分离包括将所述众多胎盘细胞中的CD56<sup>+</sup>细胞与CD56<sup>-</sup>细胞分离。在一个更具体的实施方式中,所述分离包括将CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>胎盘细胞与作为CD56<sup>-</sup>或CD16<sup>+</sup>的胎盘细胞分离。在一个更具体的实施方式中,所述分离包括将CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>胎盘细胞与作为CD56<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>或CD3<sup>+</sup>的胎盘细胞分离。在另一个实施方式中,所述的分离胎盘自然杀伤细胞的方法导致产生胎盘细胞群体,即至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞。

[0033] 在以上方法的某些实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞已在培养物中扩增。在某些实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞和来自另一种来源(例如,脐带血)的细胞已在培养物中

扩增。在某些实施方式中,获自胎盘(例如,胎盘灌洗液)或获自混合来源(例如,胎盘和脐带血)的自然杀伤细胞已在培养物中扩增。在各种不同的实施方式中,该细胞已扩增至少、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。在一个具体的实施方式中,所述细胞已经在饲养层存在下和/或在至少一种细胞因子存在下扩增。在一个更具体的实施方式中,所述饲养层包含K562细胞或外周血单核细胞(PBMC)或两者的组合。在另一个更具体的实施方式中,所述至少一种细胞因子是白介素-2。

[0034] 在另一个实施方式中,本文提供的是治疗患癌个体的方法,包括向所述个体给予治疗有效量的如本文描述的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞、组合的自然杀伤细胞(例如,获自胎盘和另一种来源(例如,脐带血)的自然杀伤细胞)或其组合。在某些实施方式中,所述个体患有实体肿瘤。在某些其它实施方式中,所述个体患有血液癌症。在具体的实施方式中,所述个体患有原发性导管癌、白血病、急性T细胞白血病、慢性髓样淋巴瘤(CML)、急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病(CML)、肺癌、结肠腺癌、组织细胞性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、视网膜母细胞瘤、结肠直肠癌或结肠直肠腺癌。

[0035] 在另一个实施方式中,本文提供的是治疗患有移植物抗宿主病的个体的方法。在一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病在同种异体骨髓移植之后发生。在另一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病在实体器官移植后发生。在另一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病在复合组织同种异体移植后发生。在另一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病通过所述给予经过至少一个步骤降低等级。在另一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病由于所述给予的结果在移植后100天以内不进展超出II级。在另一个更具体的实施方式中,所述移植物抗宿主病由于所述给予的结果在移植后100天以内不进展超出I级。

### [0036] 3.1. 定义

[0037] 如本文所用的,“组合的自然杀伤细胞(combined natural killer cells)”是例如来自匹配的脐带血和人胎盘灌洗液的自然杀伤细胞,其中胎盘灌洗液获自与脐带血相同的胎盘。来自两者的自然杀伤细胞经单独或同时分离,并且进行组合。

[0038] 如本文所用的,“PINK”和“PINK细胞”是指胎盘中间体自然杀伤细胞(placental intermediate natural killer cells),其获自人胎盘,例如人胎盘灌洗液或已经过机械和/或酶促破坏的胎盘组织。该细胞是CD56<sup>+</sup>和CD16<sup>-</sup>,例如,如通过流式细胞术所确定,例如使用抗CD56和CD16的抗体的荧光激活细胞分选术。PINK细胞不仅仅从脐血或外周血获得。

[0039] 如本文所用的,“胎盘灌洗液”意指已经通过至少部分胎盘,例如人胎盘,例如通过胎盘脉管系统的灌洗溶液,包括在通过胎盘期间通过灌洗溶液收集的众多细胞。

[0040] 如本文所用的,“胎盘灌洗液细胞”意指分离自或可分离自胎盘灌洗液的有核细胞,例如总有核细胞。

[0041] 如本文所用的,“肿瘤细胞抑制”、“肿瘤细胞增殖的抑制”等,包括使肿瘤细胞群体的生长减缓,例如通过杀死所述肿瘤细胞群体中的一个或多个肿瘤细胞,例如通过使所述肿瘤细胞群体与PINK细胞、包含PINK细胞的细胞群体、组合的自然杀伤细胞、包含组合的自然杀伤细胞的细胞群体、人胎盘灌洗液等接触。

### [0042] 4. 附图简述

[0043] 图1显示对于通过CD56微珠从人胎盘灌洗液(HPP)中选择的细胞,使用抗CD3抗体和抗CD56抗体的流式细胞术结果。所分离到的细胞多数是CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>。

[0044] 图2描绘在24小时培养后,细胞因子由PINK细胞和/或肿瘤细胞产生。图2A描绘干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )由胎盘灌洗液来源的中间体自然杀伤细胞(PINK)细胞单独或在KG-1a肿瘤细胞存在下的分泌。PINK细胞和KG-1a细胞单独培养或以1:1的比率组合培养。Y轴:由培养物产生的IFN $\gamma$ (单位:皮克)。图2B描绘粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)由PINK细胞单独或在KG-1a肿瘤细胞存在下的分泌。PINK细胞和KG-1a细胞单独培养或以1:1的比率组合培养。Y轴:由培养物产生的GM-CSF(单位:皮克)。

[0045] 图3描绘在24小时共培养中,以1:1、5:1、10:1或20:1PINK细胞:肿瘤细胞的比率,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率。Y轴:与无PINK细胞的肿瘤细胞相比,死肿瘤细胞的百分比。

[0046] 图4描绘培养21天的胎盘自然杀伤细胞和外周血(PB)NK细胞对K562细胞的细胞毒性。误差棒表示4单位的培养的胎盘NK细胞或3单位的培养的外周血NK细胞的标准偏差。

[0047] 图5描绘在24小时共培养中,以1:1、5:1、10:1或20:1或100:1HPP细胞:肿瘤细胞的比率,如获自胎盘的全人胎盘灌洗液对KG-1a肿瘤细胞的细胞毒性。X轴:HPP细胞与肿瘤细胞的比率。Y轴:与无HPP细胞的肿瘤细胞相比,死肿瘤细胞的百分比。

[0048] 图6描绘在48小时共培养中,以100:1、50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、3.12:1、1.56:1或0.78:1HPP细胞或UCB细胞:肿瘤细胞的系列稀释,如获自胎盘的全人胎盘灌洗液和脐带血对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率。Y轴:在48小时培养时间后,与无HPP细胞或脐带细胞的肿瘤细胞相比,死肿瘤细胞的百分比。

[0049] 图7描绘在48小时共培养中,以100:1、50:1、25:1、12.5:1、6.25:1、3.12:1、1.56:1或0.78:1HPP细胞:肿瘤细胞的系列稀释,如获自胎盘的全人胎盘灌洗液对KG-1a肿瘤细胞的细胞毒性。灌洗液可以如所收集的,或用100U/mL或1000U/mL白介素-2(IL-2)刺激24小时后使用。X轴:HPP细胞与肿瘤细胞的比率。Y轴:在48小时培养时间后,与无HPP细胞的肿瘤细胞相比,死肿瘤细胞的百分比。

[0050] 图8描绘在与HPP或UCB细胞与肿瘤细胞以50:1比率培养后,人胎盘灌洗液针对一组肿瘤细胞系的细胞毒性效应。图8A:共培养24小时。图8B:共培养48小时。X轴:被测的肿瘤细胞系。Y轴:在共培养后,与在不存在肿瘤细胞的情况下的肿瘤细胞数相比,死肿瘤细胞的百分比。

[0051] 图9描绘IFN $\gamma$ 由与KG-1a肿瘤细胞共培养的HPP细胞在HPP细胞与肿瘤细胞的不同比率下的产生。X轴:实验条件,包括HPP细胞与肿瘤细胞的比率。Y轴:在24小时共培养后每毫升的IFN $\gamma$ 水平。

[0052] 图10:在与一组肿瘤细胞共培养中,IFN $\gamma$ 由HPP或UCB细胞产生。HPP或UCB细胞以50:1的比率与肿瘤细胞系共培养24小时(图10A)或48小时(图10B)。通过Luminex试验(HCYT0-60K-03,Millipore)测定IFN $\gamma$ 水平。X轴:被测的肿瘤细胞系。Y轴:与在不存在肿瘤细胞的情况下产生的IFN $\gamma$ (单位:皮克)相比,由HPP或UCB细胞产生的IFN $\gamma$ (单位:皮克)。

[0053] 图11描绘在将 $2 \times 10^7$ 个人胎盘灌洗液(HPP)细胞给予具有KG-1细胞肿瘤(体积近似 $332\text{mm}^3$ )的小鼠后,肿瘤尺寸的减小。肿瘤内-将HPP细胞直接注射到皮下肿瘤部位里面。IV-HPP细胞经静脉内给予。对照-仅溶媒给药。肿瘤体积以 $\text{mm}^3$ 计。

[0054] 图12描绘来自供体匹配的人胎盘来源的干细胞和脐带血(CB)单位的NK细胞的比较。(A)来自供体匹配的人胎盘来源的干细胞和CB单位的NK细胞的免疫表型表征;使用双样品t-检验来确定群体平均值在人胎盘来源的干细胞和CB中是否相等。(B)来自供体匹配的人胎盘来源的干细胞和CB单位的扩增的NK细胞对K562细胞的细胞毒性。E=NK细胞;T=肿瘤细胞。

[0055] 图13描绘胎盘来源的NK细胞(pNK)细胞与外周血(PB)NK细胞相比的表型表征。(A)来自供体匹配的人胎盘来源的干细胞和UCB的NK细胞(在本文中称为“组合单位(Combo unit)”) (pNK)和来自PB的NK细胞(PB NK)的流式细胞术鉴定。CD56+CD3-门控的NK细胞表达对调节NK-细胞活性很重要的受体库(repertoire):包括CD16、KIR3DL1、NKG2D、KIR2DL2/L3、NKp46、CD94、CD226、NKp44、NKp30和2B4。(B)在NK细胞分离之前,来自组合单位的CD56+CD3-pNK细胞的百分比。(C)在NK细胞分离之后,达到了90%CD56+CD3-NK细胞来自组合单位。

[0056] 图14描绘扩增的pNK细胞的细胞周期分析。(A)在如指定的不同时间点,离体(ex vivo)扩增的pNK的代表性APC-BrdU/7-AAD细胞周期分析。(B)在如指定的不同时间点,来自离体扩增的pNK在不同期的细胞周期分析(n=5)。

[0057] 图15描绘离体扩增的pNK细胞的扩增倍数、表型和功能性表征。(A)第21天扩增的pNK细胞的扩增倍数和细胞活力。(B)第21天扩增的pNK细胞的表型表征。(C)与第21天扩增的PB NK细胞相比,在如指定的不同时间点,扩增的pNK细胞对K562的细胞毒性。

[0058] 图16描绘离体扩增的第21天pNK细胞对多种肿瘤细胞系的细胞毒性。离体扩增的pNK细胞以如指定的10:1、5:1、2:1和1:1的E:T比率对多种肿瘤细胞系的细胞毒性。

## [0059] 5. 详述

[0060] 本文提供的是胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或因此获得的自然杀伤细胞,例如胎盘灌洗液来源的中间体自然杀伤(“PINK”)细胞或组合的自然杀伤细胞抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的生长或增殖的用途。具体地说,本文提供的是自然杀伤(NK)细胞和NK细胞群体,其分离自胎盘灌洗液(例如,人胎盘灌洗液),或分离自与来自另一种来源(例如,脐带血(UCB))的细胞组合的胎盘灌洗液,或分离自己经过机械和/或酶促破坏的胎盘组织;获得该NK细胞的方法;及使用该细胞的方法。本文还提供的是包含自然杀伤细胞的细胞群体,例如包含自然杀伤细胞的胎盘细胞群体。在下文第5.1节中描述了获得胎盘灌洗液及从胎盘灌洗液中获得细胞的方法。在下文第5.2节中描述了从胎盘组织中获得细胞的方法。在下文第5.3节中描述了胎盘灌洗液来源的自然杀伤细胞(例如,胎盘中间体自然杀伤(PINK)细胞)及获得该细胞的方法。在下文第5.4节中描述了来自胎盘灌洗液细胞和来自另一种来源(例如,脐带血)的细胞的自然杀伤细胞,及获得该组合的自然杀伤细胞的方法。在下文第5.5节至第5.7节中描述了包含该胎盘灌洗液、胎盘灌洗液来源的细胞、胎盘灌洗液来源的自然杀伤细胞(例如,中间体自然杀伤细胞)和组合的自然杀伤细胞的组合物及保存和使用它们以抑制肿瘤细胞增殖的方法。

### [0061] 5.1. 胎盘灌洗液

#### [0062] 5.1.1. 细胞收集组合物

[0063] 可以通过使用胎盘细胞收集组合物灌洗哺乳动物(例如,人)分娩后的胎盘收集本文提供的胎盘灌洗液、灌洗液细胞和胎盘灌洗液来源的自然杀伤细胞。可以通过用任何生

理上可接受的溶液(例如,盐水溶液、培养基或更复杂的细胞收集组合物)灌洗胎盘而从胎盘收集灌洗液。适合于灌洗胎盘并且适合于收集和保存灌洗液细胞(例如,总有核胎盘灌洗液细胞或PINK细胞)的细胞收集组合物在相关的美国申请公布号2007/0190042中有详细描述,所述专利申请以其全部内容作为参考并入本文。

[0064] 所述细胞收集组合物可以包含适合于收集和/或培养干细胞的任何生理上可接受的溶液,例如盐水溶液(例如,磷酸缓冲盐溶液、克氏溶液(Kreb's solution)、改良的克氏溶液、伊格尔氏溶液(Eagle's solution)、0.9%NaCl等)、培养基(例如,DMEM、H.DMEM等)等。

[0065] 所述细胞收集组合物可以包含趋于保存胎盘细胞的一种或多种组分,即在从收集时间到培养时间防止胎盘细胞死亡或延缓胎盘细胞死亡、减少细胞群体中死亡的胎盘细胞数目等。这样的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(caspase)抑制剂或JNK抑制剂);血管扩张药(例如,硫酸镁、抗高血压药、心房钠尿肽(ANP)、促肾上腺皮质激素、促肾上腺皮质激素释放激素、硝普钠、肼屈嗪(hydralazine)、腺苷三磷酸、腺苷、吲哚美辛(indomethacin)或硫酸镁、磷酸二酯酶抑制剂等);坏死抑制剂(例如,2-(1H-吲哚-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泮(clonazepam));TNF- $\alpha$ 抑制剂;和/或携氧全氟化碳(例如,全氟辛基溴化物、全氟癸基溴化物等)。

[0066] 所述细胞收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、核糖核酸酶(RNase)或脱氧核糖核酸酶(DNase)等。这样的酶包括但不限于胶原酶(例如,胶原酶I、II、III或IV,来自溶组织梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)的胶原酶等);分散酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、释放酶(LIBERASE)、透明质酸酶等。

[0067] 所述细胞收集组合物可以包含杀细菌或抑细菌有效量的抗生素。在某些非限制性的实施方式中,所述抗生素是大环内酯(例如,妥布霉素(tobramycin))、头孢菌素(cephalosporin)(例如,头孢氨苄(cephalexin)、头孢拉定(cephradine)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢丙烯(cefprozil)、头孢克洛(cefaclor)、头孢克肟(cefixime)或头孢羟氨苄(cefadroxil))、克拉霉素(clarithromycin)、红霉素(erythromycin)、青霉素(penicillin)(例如,青霉素V)或喹诺酮(例如,氧氟沙星(ofloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)或诺氟沙星(norfloxacin))、四环素(tetracycline)、链霉素(streptomycin)等。在一个特定的实施方式中,所述抗生素对革兰氏(+)和/或革兰氏(-)细菌例如绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等是有活性的。

[0068] 所述细胞收集组合物也可以包含一种或多种下列化合物: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,在一个实施方式中,其以足以维持内皮完整性和细胞活力的量存在(例如,合成的或天然存在的胶体、多糖例如右旋糖酐或聚乙二醇,其以约25g/l至约100g/l或约40g/l至约60g/l存在);抗氧化剂(例如,丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、谷胱甘肽、维生素C或维生素E,其以约25 $\mu$ M至约100 $\mu$ M存在);还原剂(例如,N-乙酰基半胱氨酸,其以约0.1mM至约5mM存在);防止钙进入细胞的药剂(例如,维拉帕米(verapamil),其以约2 $\mu$ M至约25 $\mu$ M存

在);硝酸甘油(例如,约0.05g/L至约0.2g/L);抗凝血剂,在一个实施方式中,其以足以帮助防止残余血液凝结的量存在(例如,肝素或水蛭素(hirudin),其以约1000单位/升至约100,000单位/升的浓度存在);或含有阿米洛利(amiloride)的化合物(例如,阿米洛利、乙基异丙基阿米洛利、六亚甲基阿米洛利、二甲基阿米洛利或异丁基阿米洛利,其以约1.0 $\mu$ M至约5 $\mu$ M存在)。

#### [0069] 5.1.2. 胎盘的收集与处理

[0070] 一般而言,人胎盘在出生后在其娩出后不久进行回收。在一个优选的实施方式中,在知情同意后并且在取得患者的完整病历并且与胎盘有关后从患者回收胎盘。优选地,病历在分娩后继续。这样的医学病史可用于协调胎盘或由其收获的细胞的后续使用。例如,可以根据医学病史来使用人胎盘细胞,用于与胎盘有关的婴儿或用于婴儿的父母、兄弟姐妹或其它亲属的个性化医疗。

[0071] 在灌洗液回收之前,除去脐带血和胎盘血。在某些实施方式中,在分娩后,回收胎盘中的脐带血。胎盘可以经受常规脐带血回收过程。典型地,借助于重力,使用针或插管以将胎盘放血(参见,例如Anderson,美国专利第5,372,581号;Hessel等人,美国专利第5,415,665号)。通常将针或插管置于脐静脉中,并且可以轻柔地按摩胎盘以帮助从胎盘中排出脐带血。这样的脐带血回收可以商业性进行,例如LifeBank Inc.,Cedar Knolls,N.J.,ViaCord,Cord Blood Registry and CryoCell。优选地,胎盘经重力放血而无需其它操作从而使脐带血回收期间的组织破坏减到最小。

[0072] 典型地,把胎盘从分娩或生产房间送到另一个位置(例如,实验室)以用于脐带血回收和灌洗液收集。胎盘优选地放在无菌、隔热的运输装置(使胎盘的温度维持在20-28 $^{\circ}$ C之间)中转运,例如,通过将近端脐带夹紧的胎盘置于无菌自封(zip-lock)塑料袋中,然后置于保温容器中。在另一个实施方式中,在基本上如美国专利第7,147,626号中描述的脐带血收集试剂盒中运输胎盘。优选地,在分娩后4至24小时把胎盘送到实验室。在某些实施方式中,在脐带血回收之前,把近端脐带夹紧,优选地,在插入胎盘的4-5cm(厘米)以内。在其它实施方式中,在脐带血回收之后但在胎盘进一步处理之前把近端脐带夹紧。

[0073] 在灌洗液收集之前,可以将胎盘储存在无菌条件下及在室温下或在5至25 $^{\circ}$ C(摄氏)的温度下。在灌洗胎盘以除去任何残留脐带血之前,可以将胎盘储存超过48小时的一段时期,并且优选地储存4到24小时的一段时期。胎盘优选地储存在抗凝血剂溶液中的5 $^{\circ}$ C至25 $^{\circ}$ C(摄氏)的温度下。合适的抗凝血剂溶液是本领域众所周知的。例如,可以使用肝素或华法林钠溶液。在一个优选的实施方式中,所述抗凝血剂溶液包含肝素溶液(例如,1%w/w的1:1000溶液)。在收集胎盘灌洗液之前,经放血的胎盘优选储存不超过36小时。

#### [0074] 5.1.3. 胎盘灌洗

[0075] 灌洗哺乳动物胎盘的方法公开于例如Hariri的美国专利第7,045,148号和第7,255,879号及美国专利申请公布第2007/0190042号,名称为“改进的用于收集和保存器官的组合物(Improved Composition for Collecting and Preserving Organs)”,以上文献的公开内容以其全部内容作为参考并入本文。

[0076] 可以通过使灌洗溶液(例如,盐水溶液、培养基或以上描述的细胞收集组合物)通过胎盘脉管系统来获得灌洗液。在一个实施方式中,通过将灌洗溶液通过脐动脉和脐静脉之一或两者来灌洗哺乳动物胎盘。可以使用例如重力流动至胎盘来完成灌洗溶液通过胎盘

的流动。优选地,使用泵(例如,蠕动泵)迫使灌洗溶液通过胎盘。可以例如用连接到无菌连接装置(例如,无菌管)的插管(例如,TEFLON®或塑料插管)插入脐静脉。将无菌连接装置连接到灌洗歧管。

[0077] 在为灌洗做准备时,胎盘优选地以使脐动脉和脐静脉位于胎盘最高点的方式定向。可以通过使灌洗溶液通过胎盘脉管系统或通过胎盘脉管系统和周围组织来灌洗胎盘。在一个实施方式中,将脐动脉和脐静脉同时连接至通过柔性连接器连接至灌洗溶液储罐的移液管。使灌洗溶液通过脐静脉和动脉。灌洗溶液从血管壁流出和/或穿过血管壁流向胎盘的周围组织,并且从在妊娠期间与母体子宫相连的胎盘的表面收集到合适的开放容器中。也可以将灌洗溶液引入通过脐带开口并允许从与母体子宫壁分界的胎盘壁中的开口流出或渗出。在另一个实施方式中,使灌洗溶液通过脐静脉并从脐动脉收集,或者通过脐动脉并从脐静脉收集,也就是说,仅通过胎盘脉管系统(胎儿组织)。

[0078] 在一个实施方式中,例如,将脐动脉和脐静脉同时连接至例如通过柔性连接器连接至灌洗溶液储罐的移液管。使灌洗溶液通过脐静脉和动脉。灌洗溶液从血管壁流出和/或穿过血管壁流向胎盘的周围组织,并且从在妊娠期间与母体子宫相连的胎盘的表面收集到合适的开放容器中。也可以将灌洗溶液引入通过脐带开口并允许从与母体子宫壁分界的胎盘壁中的开口流出或渗出。通过这种方法(该方法可以称为“盘”法(“pan”method))收集的胎盘细胞通常是胎儿细胞和母体细胞的混合物。

[0079] 在另一个实施方式中,使灌洗溶液通过脐静脉并从脐动脉收集,或者通过脐动脉并从脐静脉收集。通过这种方法(该方法可以称为“封闭回路”法(“closed circuit” method))收集的胎盘细胞通常几乎只是胎儿细胞。

[0080] 在一个实施方式中,封闭回路灌洗方法可以如下进行。在分娩后约48小时以内获得分娩后的胎盘。夹紧脐带并在夹子上方切割。可以将脐带丢弃,或者可加工回收例如脐带干细胞和/或加工脐带膜用于生产生物材料。可以在灌洗期间保留羊膜,或者可以例如使用钝器剥离法用手指把羊膜与绒毛膜分离开。如果在灌洗之前把羊膜与绒毛膜分离开,则可以将羊膜丢弃,或者例如通过酶促消化加工获得干细胞或者生产例如羊膜生物材料,例如,在美国申请公布号2004/0048796中所描述的生物材料。在例如使用消毒纱布清洁胎盘的的所有可见血块和残留血液之后,通过例如部分切割脐带膜以暴露脐带的横截面来暴露脐带血管。鉴别血管并例如通过将闭合的鳄鱼夹向前通过每根血管的切割末端将血管打开。然后,将器械(例如,连接到灌洗装置或蠕动泵的塑料管)插入每根胎盘动脉。所述泵可以是适合于该目的任何泵,例如蠕动泵。然后,将连接到无菌收集储罐(例如,血袋,例如250mL收集袋)的塑料管插入胎盘静脉。作为另外一种选择,将连接到泵的管插入胎盘静脉,并将连接到收集储罐的管插入胎盘动脉之一或两者。然后,用大量的灌洗溶液(例如,约750ml的灌洗溶液)灌洗胎盘。然后,例如通过离心作用收集灌洗液中的细胞。

[0081] 在一个实施方式中,在灌洗期间把近端脐带夹紧,更优选地,在胎盘圆盘中脐带插入的4-5cm(厘米)以内夹紧近端脐带。

[0082] 一般而言,在放血过程中来自哺乳动物胎盘的第一次收集的灌洗液被脐带血和/或胎盘血的残留红色血液细胞染色。随着灌洗的进行,灌洗液变得更无色并且残留的脐带血细胞被清洗出胎盘。一般而言,30至100mL的灌洗液对开始冲洗来自胎盘的血液已足够,但是根据观察的结果可以使用更多或更少的灌洗液。



[0083] 灌洗胎盘所使用的灌洗液体积可以根据要收集的胎盘细胞数、胎盘大小、从单个胎盘进行收集的次数等而变化。在各种不同的实施方式中,灌洗液的体积可以为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,在放血后用700-800mL的灌洗液灌洗胎盘。

[0084] 可以在几小时或几天的过程中灌洗胎盘多次。当将胎盘灌洗多次时,可以将其在无菌条件下在容器或其它合适的器皿中维持或培养,并且用细胞收集组合物或标准灌洗溶液(例如,生理盐水溶液,例如磷酸缓冲盐溶液(“PBS”),加或不加抗凝血剂(例如,肝素、华法林钠、香豆素、双羟基香豆素)和/或加或不加抗微生物剂(例如, $\beta$ -巯基乙醇(0.1mM);抗生素,例如链霉素(例如,40-100 $\mu$ g/ml)、青霉素(例如,40U/ml)、两性霉素B(例如,0.5 $\mu$ g/ml)灌洗。在一个实施方式中,将分离的胎盘维持或培养一段时间而不收集灌洗液,从而在灌洗液的灌洗和收集之前,将胎盘维持或培养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天或3天或更多天。可以将灌洗的胎盘维持一个或多个另外的时间,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小时或24小时以上,并且用例如700-800mL灌洗液进行第二次灌洗。可以将胎盘灌洗1、2、3、4、5次或更多次,例如每1、2、3、4、5或6小时灌洗一次。在一个优选的实施方式中,重复胎盘的灌洗和灌洗溶液(例如,胎盘细胞收集组合物)的收集直至回收的有核细胞的数目降低至低于100个细胞/ml。可以在不同的时间点分别进一步加工处理灌洗液以回收时间依赖性的细胞(例如,总有核细胞)群体。也可以将来自不同时间点的灌洗液合并。

#### [0085] 5.1.4. 胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞

[0086] 胎盘灌洗液包含不均一的细胞收集物。典型地,胎盘灌洗液在使用之前将红细胞耗尽。这样的耗尽可以通过将红血细胞与有核血液细胞分离的已知方法来进行。在某一实施方式中,将所述灌洗液或灌洗液细胞冷冻保存。在某些实施方式中,来自胎盘灌洗液的细胞在冷冻保存之前既不扩增也不培养。在某些实施方式中,所述胎盘灌洗液包含或所述灌洗液细胞包含仅胎儿细胞,或者胎儿细胞和母体细胞的组合。

[0087] 典型地,来自单次胎盘灌洗的胎盘灌洗液包含约 $100 \times 10^6$ 至约 $500 \times 10^6$ 个有核细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌洗液或灌洗液细胞包含干细胞。在某些实施方式中,所述胎盘灌洗液或灌洗液细胞包含CD34<sup>+</sup>细胞,例如造血干细胞或祖细胞。在一个更具体的实施方式中,这样的细胞可以包含CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>干细胞或祖细胞、CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>干细胞或祖细胞、髓系祖细胞(myeloid progenitors)、淋巴系祖细胞(lymphoid progenitors)和/或红系祖细胞(erythroid progenitors)。在其它实施方式中,胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞包含贴壁胎盘干细胞,例如CD34<sup>-</sup>干细胞。在其它实施方式中,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。在某些实施方式中,如从胎盘收集并且耗尽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%自然杀伤细胞(CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>);约21-22%T细胞(CD3<sup>+</sup>);约6-7%B细胞(CD19<sup>+</sup>);约1-2%内皮祖细胞(CD34<sup>+</sup>、CD31<sup>+</sup>);约2-3%神经祖细胞(nestin<sup>+</sup>);约1-5%(例如,2-5%)造血祖细胞(CD34<sup>+</sup>);和约0.5-1.5%贴壁胎盘干细胞(例如,CD34<sup>-</sup>、CD117<sup>-</sup>、CD105<sup>+</sup>和CD44<sup>+</sup>),如例如通过流式细胞术、例如通过FACS分析所测定。

#### [0088] 5.2. 破坏和消化胎盘组织以获得PINK细胞

[0089] 胎盘自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)可以通过机械和/或酶促破坏的胎盘组织来



获得。

[0090] 胎盘组织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、核糖核酸酶(RNase)或脱氧核糖核酸酶(DNase)等)进行破坏。这样的酶包括但不限于胶原酶(例如,胶原酶I、II、III或IV,来自溶组织梭状芽孢杆菌(*Clostridium histolyticum*)的胶原酶等);分散酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、弹性蛋白酶、胰蛋白酶、释放酶(LIBERASE)、透明质酸酶等。典型地在消化之后,将经消化的组织通过粗滤器(strainer)或过滤器(filter)以去除部分消化的细胞团块(cell clumps),留下实质上单细胞的悬液。

[0091] 在获得胎盘细胞悬液之后,可以使用例如抗CD3和CD56的抗体分离出自然杀伤细胞。在一个具体的实施方式中,胎盘自然杀伤细胞通过以下方法进行分离:选择作为CD56<sup>+</sup>的细胞以产生第一细胞群体;使所述第一细胞群体与对CD3和/或CD16特异性的抗体接触;和去除来自作为CD3<sup>+</sup>或CD56<sup>+</sup>的所述第一细胞群体的细胞,从而产生实质上为CD56<sup>+</sup>和CD3<sup>-</sup>、CD56<sup>+</sup>和CD16<sup>-</sup>、或者CD56<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>和CD16<sup>-</sup>的第二细胞群体。

[0092] 在一个实施方式中,使用磁珠从胎盘细胞悬液中分离胎盘自然杀伤细胞。所述细胞可以例如使用磁激活细胞分选(MACS)技术(一种基于其结合包含一种或多种特异性抗体(例如,抗CD56抗体)的磁珠(例如,直径约0.5-100μm)的能力分离颗粒的方法)进行分离。可以在磁性微球上进行多种有用的修饰,包括共价添加特异性识别特定细胞表面分子或半抗原的抗体。然后,将珠与细胞混合以使其结合。然后,使细胞通过磁场以分离出具有特异性细胞表面标志物的细胞。在一个实施方式中,然后可将这些细胞分离并且和与抗另外的细胞表面标志物的抗体偶联的磁珠再混合。使这些细胞再次通过磁场,从而分离出结合两种抗体的细胞。然后,可以将这样的细胞稀释至单独的培养皿(例如,微量滴定培养皿)中供克隆分离用。

### [0093] 5.3. 胎盘自然杀伤细胞

[0094] 在一个方面,本文提供的是可获自胎盘,例如可获自胎盘灌洗液和/或可获自机械和/或酶促破坏的胎盘组织的自然杀伤细胞的分离、表征和用途,及包含这样的自然杀伤细胞的组合物的用途。在一个具体的实施方式中,所述胎盘自然杀伤细胞是“胎盘中间体自然杀伤细胞”或“PINK”细胞,其特征之处在于是CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>,即,展示CD56细胞标志物并且缺少CD16细胞标志物,例如,如通过流式细胞术所确定,例如使用抗CD16和CD56的抗体的荧光激活细胞分选术,如上所述。因此,本文提供的是分离的PINK细胞和分离的众多PINK细胞。本文还提供的是包含CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>PINK细胞与CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞组合的分离的众多细胞。在更具体的实施方式中,所述CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞可以从胎盘或从另一种来源(例如,外周血、脐带血、骨髓等)分离得到。因此,在各种其它实施方式中,PINK细胞可以与CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞组合,例如,以例如约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的比率。如上下文中所使用的,“分离的”意指细胞已从其正常环境(例如,胎盘)中除去。

[0095] 在某些实施方式中,所述PINK细胞是CD3<sup>-</sup>。

[0096] 在其它实施方式中,所述PINK细胞不表现出由完全成熟自然杀伤细胞(例如,CD16)所表现出的一种或多种细胞标志物,或以比完全成熟自然杀伤细胞可检测降低的水平表现出这样的一种或多种标志物,或表现出与自然杀伤细胞前体有关但与完全成熟自然

杀伤细胞无关的一种或多种细胞标志物。在一个具体的实施方式中,本文提供的PINK细胞以比完全成熟NK细胞可检测更低的水平表达NKG2D、CD94和/或NKp46。在另一个具体的实施方式中,本文提供的众多PINK细胞以比相等个数的完全成熟NK细胞可检测更低的水平表达NKG2D、CD94和/或NKp46全部。

[0097] 在某些实施方式中,PINK细胞以比外周血自然杀伤细胞可检测更高的水平表达微小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中的一种或多种。

[0098] 在某些实施方式中,所述胎盘自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)已在培养物中扩增。在某些其它实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞已在培养物中扩增。在一个具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞已在饲养层存在下和/或在至少一种细胞因子存在下扩增。在一个更具体的实施方式中,所述饲养层包含K562细胞或外周血单核细胞。在另一个更具体的实施方式中,所述至少一种细胞因子是白介素-2。

[0099] 在另一个实施方式中,本文提供的是分离的众多PINK细胞(例如,PINK细胞群体)。在另一个具体的实施方式中,所述分离的细胞群体通过CD56-微珠分离来自胎盘灌洗液的细胞而产生。在各种具体的实施方式中,所述群体包含至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少约99%PINK细胞。在另一个实施方式中,所述众多PINK细胞包含未经扩增的PINK细胞或由未经扩增的PINK细胞组成;例如,如从胎盘灌洗液所收集。在另一个实施方式中,所述众多PINK细胞包含已扩增的PINK细胞或由已扩增的PINK细胞组成。扩增自然杀伤细胞的方法已描述于例如Ohno等人,美国专利申请公布号2003/0157713;也参见Yssel等人,J.Immunol.Methods72(1):219-227(1984)和Litwin等人,J.Exp.Med.178(4):1321-1326(1993)和下文在实施例1中对自然杀伤细胞扩增的描述。

[0100] 在其它实施方式中,所述分离的众多PINK细胞不表现出由完全成熟自然杀伤细胞(例如,CD16)所表现出的一种或多种细胞标志物,或以比完全成熟自然杀伤细胞可检测降低的水平表现出这样的一种或多种标志物,或表现出与自然杀伤细胞前体有关但与完全成熟自然杀伤细胞无关的一种或多种细胞标志物。在一个具体的实施方式中,本文提供的PINK细胞以比完全成熟NK细胞可检测更低的水平表达NKG2D、CD94和/或NKp46。在另一个具体的实施方式中,本文提供的众多PINK细胞以比相等个数的完全成熟NK细胞可检测更低的水平表达NKG2D、CD94和/或NKp46全部。

[0101] 在某些具体的实施方式中,所述PINK细胞群体以比外周血自然杀伤细胞可检测更高的水平表达微小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中的一种或多种。在另一个具体的实施方式中,所述PINK细胞群体比相等个数的外周血自然杀伤细胞表达可检测更高的量的颗粒酶B。

[0102] 在其它实施方式中,本文提供的PINK细胞已在培养物中扩增。在具体的实施方式中,所述PINK细胞已经过培养,例如已在培养物中扩增至少、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。在一个具体的实施方式中,将所述PINK细胞培养约21天。

[0103] 在另一个实施方式中,本文提供的是分离的细胞群体,例如胎盘细胞群体,其包含PINK细胞。在一个具体的实施方式中,所述分离的细胞群体是来自胎盘灌洗液的总有核细胞,例如胎盘灌洗液细胞,其包含自体的分离的PINK细胞。在另一个具体的实施方式中,所述细胞群体是通过CD56<sup>+</sup>微珠分离来自胎盘灌洗液的细胞而产生的分离的细胞群体。在各种具体的实施方式中,所述群体包含至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少约99%PINK细胞。

[0104] 因为分娩后的胎盘包含来自胎儿和来自母体胎盘灌洗液的组织 and 细胞,所以胎盘灌洗液根据收集方法可以包含仅胎儿细胞或实质上大多数的胎儿细胞(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,胎儿细胞占灌洗液总有核细胞的小于约90%、80%、70%、60%或50%)。在一个实施方式中,所述PINK细胞仅来源于胎儿胎盘细胞,例如,从胎盘的封闭回路灌洗中获得的细胞(参见上文),其中所述灌洗产生包含实质上大多数的胎儿胎盘细胞或仅包含胎儿胎盘细胞的灌洗液。在另一个实施方式中,所述PINK细胞来源于胎儿细胞和母体细胞,例如,通过盘法(参见上文)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。因此,在一个实施方式中,本文提供的是胎盘来源的中间体自然杀伤细胞群体,其中实质上大多数具有胎儿基因型。在另一个实施方式中,本文提供的是胎盘来源的中间体自然杀伤细胞群体,其包含具有胎儿基因型的自然杀伤细胞和具有母体表型的自然杀伤细胞。

[0105] 本文还提供的是胎盘来源的中间体自然杀伤细胞群体,其包含来自非胎盘来源的自然杀伤细胞。例如,在一个实施方式中,本文提供的是PINK细胞群体,其也包含来自脐带血、外周血、骨髓的自然杀伤细胞或上述两种或两种以上的组合。在一个实施方式中,本文提供的是也包含来自脐带血的自然杀伤细胞的PINK细胞群体。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体可以包含呈例如约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等的比率的细胞。

[0106] 本文进一步提供的是脐带血和分离的PINK细胞的组合。在各种不同的实施方式中,脐带血与PINK细胞以每毫升脐带血约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 或 $5 \times 10^8$ 个或 $5 \times 10^8$ 个以上PINK细胞进行组合。

[0107] 本文还提供的是分离PINK细胞的方法。在一个实施方式中,PINK细胞通过如下方法收集:获得胎盘灌洗液,然后使胎盘灌洗液与特异性结合于CD56<sup>+</sup>细胞的组合物(例如,抗CD56的抗体)接触,随后基于所述结合分离CD56<sup>+</sup>细胞以形成CD56<sup>+</sup>细胞群体。所述CD56<sup>+</sup>细胞群体包含分离的自然杀伤细胞群体。在一个具体的实施方式中,CD56<sup>+</sup>细胞与特异性结合于CD16<sup>+</sup>细胞的组合物(例如,抗CD16的抗体)和来自CD56<sup>+</sup>细胞群体的CD16<sup>+</sup>细胞接触。在另一个具体的实施方式中,CD3<sup>+</sup>细胞也不包括在CD56<sup>+</sup>细胞群体中。

[0108] 在一个实施方式中, PINK细胞如下获自胎盘灌洗液。将分娩后的人胎盘放血并且例如用约200-800mL的灌洗溶液仅通过胎盘脉管系统灌洗。在一个具体的实施方式中, 将胎盘排干脐带血并且例如用灌洗溶液通过胎盘脉管系统冲洗以在所述灌洗之前去除残留的血液。收集灌洗液并且进行加工处理以去除任何残留的红细胞。在所述灌洗液中, 总有核细胞中的自然杀伤细胞可以基于CD56和CD16的表达进行分离。在某些实施方式中, PINK细胞的分离包括使用抗CD56抗体进行分离, 其中所分离的细胞是CD56<sup>+</sup>。在另一个实施方式中, PINK细胞的分离包括使用抗CD16抗体进行分离, 其中所分离的细胞是CD16<sup>-</sup>。在另一个实施方式中, PINK细胞的分离包括使用抗CD56抗体进行分离并且使用抗CD16抗体排除众多非PINK细胞, 其中所分离的细胞包含CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>细胞。

[0109] 可以通过本领域已知的任何方法, 例如荧光激活细胞分选术(FACS), 或优选地, 使用与特异性抗体缀合的微珠的磁性细胞分选术完成细胞分离。可以进行磁性细胞分离并且使用例如AUTOMACS™分离器(Miltenyi)将其自动化。

[0110] 在另一个方面, 本文提供的是分离胎盘自然杀伤细胞的方法, 包括获得众多胎盘细胞, 和从所述众多胎盘细胞中分离出自然杀伤细胞。在一个具体的实施方式中, 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总有核细胞。在另一个具体的实施方式中, 所述众多胎盘细胞是或包含通过机械和/或酶促消化胎盘组织获得的胎盘细胞。在另一个实施方式中, 所述分离使用一种或多种抗体来进行。在一个更具体的实施方式中, 所述一种或多种抗体包含抗CD3、CD16或CD56的抗体中的一种或多种。在一个更具体的实施方式中, 所述分离包括将所述众多胎盘细胞中的CD56<sup>+</sup>细胞与CD56<sup>-</sup>细胞分离开。在一个更具体的实施方式中, 所述分离包括将CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>胎盘细胞例如胎盘自然杀伤细胞(例如, PINK细胞)与作为CD56<sup>-</sup>或CD16<sup>+</sup>的胎盘细胞分离开。在一个更具体的实施方式中, 所述分离包括将CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>胎盘细胞与作为CD56<sup>-</sup>、CD16<sup>+</sup>或CD3<sup>+</sup>的胎盘细胞分离开。在另一个实施方式中, 所述的分离胎盘自然杀伤细胞的方法导致产生胎盘细胞群体, 即至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或至少99%CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞。

#### [0111] 5.4. 来自匹配的灌洗液和脐血的胎盘自然杀伤细胞

[0112] 本文进一步提供的是获自和可获自胎盘灌洗液和脐带血匹配的单位组合的自然杀伤细胞, 在本文中称之为组合的自然杀伤细胞。在某些实施方式中, 如本文所用的“匹配的单位”, 是指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获得胎盘灌洗液的胎盘的脐带血获得, 也就是说, 所述胎盘灌洗液细胞和脐带血细胞和因此来自各自的自然杀伤细胞是来自相同的个体。在某些实施方式中, 这样的匹配的单位被称为“供体匹配的”单位。在某些实施方式中, 如本文所用的“匹配的单位”, 是指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不是从获得胎盘灌洗液的胎盘的脐带血获得, 而是从免疫学上匹配的个体的脐带血获得, 也就是说, 所述胎盘灌洗液细胞和脐带血细胞和因此来自各自的自然杀伤细胞是来自不同的但免疫学上匹配的个体。在某些实施方式中, 这样的匹配的单位被称为“HLA匹配的”单位。

[0113] 在某些实施方式中, 所述组合的自然杀伤细胞包含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, 例如以约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等的比率。

[0114] 在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞仅包含或实质上仅包含作为CD56<sup>+</sup>和CD16<sup>-</sup>的自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞(例如,PINK细胞)。在某些其它实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含作为CD56<sup>+</sup>和CD16<sup>-</sup>的NK细胞和作为CD56<sup>+</sup>和CD16<sup>+</sup>的NK细胞。在特定的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

[0115] 在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含作为CD56<sup>+</sup>和CD3<sup>-</sup>的自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>自然杀伤细胞。

[0116] 在一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

[0117] 在一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/L3<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高个数的CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

[0118] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高含量的KIR2DL2/3<sup>+</sup>自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或55%以上KIR2DL2/3<sup>+</sup>自然杀伤细胞。

[0119] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自

然杀伤细胞可检测更高含量的NKp30+自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或55%以上NKp30+自然杀伤细胞。

[0120] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高含量的2B4+自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或55%以上2B4+自然杀伤细胞。

[0121] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高含量的CD94+自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99.5%或99.5%以上CD94+自然杀伤细胞。

[0122] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低含量的NKp46+自然杀伤细胞。在某些具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞包含小于5%、10%、15%、20%或25%NKp46+自然杀伤细胞。

[0123] 在一个实施方式中,组合的自然杀伤细胞具有与来自外周血的自然杀伤细胞相比不同的微小RNA(miRNA)表达谱(profile)。在一个具体的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞可检测地表达miRNA hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618中的一种或多种。在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞可检测地表达hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618。在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高的量表达hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618中的一种或多种。在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高的量表达hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618。在一个具体的实施方式中,与相等个数的外周血自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞具有增加的hsa-miR-155表达。

[0124] 在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞不可检测地表达miRNA hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631中的一种或多种。在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞不可检测地表达miRNA hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631。在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低的量表达miRNA hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631中的一种或多种。在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低的量表达hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631。

[0125] 在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更高的水平(例如,至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、75倍、90倍、100倍、250倍、500倍或1000倍或1000倍以上)表达以下miRNA中的一种或多种:hsa-miR-211、hsa-miR-520c、hsa-miR-125b、hsa-miR-100、hsa-miR-326、hsa-miR-519c、hsa-miR-515-5p、hsa-miR-450、hsa-miR-198、hsa-miR-522、hsa-miR-518e、hsa-miR-497、hsa-miR-

566、hsa-miR-519d、hsa-miR-627、hsa-miR-524、hsa-miR-520g、hsa-miR-302c、hsa-miR-512-3p和hsa-miR-520h。

[0126] 在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞以比来自外周血的相等个数的自然杀伤细胞可检测更低的水平(例如,至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、25倍、50倍、75倍、90倍、100倍、250倍、500倍或1000倍或1000倍以上)表达以下miRNA中的一种或多种:hsa-miR-331、hsa-miR-186、hsa-miR-17-5p、hsa-miR-26a、hsa-miR-133b、hsa-miR-181b、hsa-miR-222、hsa-miR-197、hsa-miR-146b、hsa-miR-342、hsa-miR-181d、hsa-miR-155、hsa-miR-484、hsa-let-7g、hsa-miR-200c、hsa-miR-181c、hsa-miR-191、hsa-miR-596、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-95、hsa-let-7a、hsa-miR-21、hsa-miR-152、hsa-miR-642、hsa-miR-24、hsa-miR-10a、hsa-miR-429、hsa-let-7b和hsa-miR-199b。

[0127] 在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞比相等个数的外周血自然杀伤细胞表达可检测更高的量的颗粒酶B。

[0128] 在某些实施方式中,与相等个数的外周血自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞以增加的水平诱导干扰素 (IFN) -  $\gamma$ 。

[0129] 在某些实施方式中,与相等个数的外周血自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞具有更高的细胞毒性,例如针对肿瘤细胞或肿瘤细胞系。细胞毒性可以使用本领域已知的任何方法来测量,例如乳酸脱氢酶试验或基于荧光激活细胞分选术 (FACS) 的PKH26/TP-PRO-3试验和例如肿瘤细胞系例如K562、U937、WERI-RB-1、RPMI8226、HCT-116或U266等。

[0130] 在一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞未经过培养或扩增。在另一个实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞已扩增,例如已扩增7天、10天、14天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天或28天以上。在一个特定的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞扩增超过14天。在某些实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞扩增少于28天。在一个特定的实施方式中,所述组合的自然杀伤细胞扩增21天。在某些实施方式中,扩增是离体的。在某些实施方式中,组合的自然杀伤细胞的扩增在不存在饲养细胞的情况下。在某些实施方式中,组合的自然杀伤细胞的扩增是在存在饲养细胞的情况下。在某些实施方式中,在扩增期间,例如,在启动培养(有或无饲养细胞)之后5天、6天、7天、8天、9天、10天或10天以上之后,将饲养细胞添加到组合的自然杀伤细胞中。本领域已知的在自然杀伤细胞的培养或扩增中使用的任何饲养细胞(例如,PBMCs或K562细胞)都可以用作饲养细胞。在一个实施方式中,使用PBMCs和K562细胞的组合作为饲养细胞,例如以1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2或1:1PBMC:K562的比率。在一个实施方式中,所述饲养细胞包含呈1:1比率的PBMCs和K562。

[0131] 在某些实施方式中,组合的自然杀伤细胞经扩增(例如离体扩增)约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28天或28天以上。在一个实施方式中,组合的自然杀伤细胞的离体扩增是持续约21天。在某些实施方式中,饲养细胞在扩增期间添加。在一个实施方式中,与在不存在另外的饲养细胞的情况下扩增相比,在扩增期间向培养物中添加饲养细胞增强了NK细胞扩增的程度。在一个实施方式中,当大多数培养的NK细胞是处于S-期时添加新鲜饲养细胞,如使用本领域已知的技术(例如,使用BrdU和7-氨基放线菌素-D(7-AAS)染色)所测定。在一个实施方式中,另外的饲养细胞在培养的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天或14天以上之后添加。在一个实施方式中,另外的饲养细胞

在培养的第7天添加。

[0132] 在某些实施方式中,与未扩增或已扩增少于21天的组合的自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞的扩增导致作为CD56+CD3-的细胞的比例增加。在某些实施方式中,与未扩增或已扩增少于21天的组合的自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞的扩增导致NKG2D、NKp46、NKp44和/或NKp30的表达增加。在某些实施方式中,与未扩增或已扩增少于21天的组合的自然杀伤细胞相比,组合的自然杀伤细胞的扩增导致双向受体2B4的表达减少。

[0133] 在某些实施方式中,扩增的组合的自然杀伤细胞具有某些miRNA的表达增加或减少-参见例如下表23-与未扩增或已扩增少于21天的相等个数的组合的自然杀伤细胞相比。在一个实施方式中,与未扩增、已扩增少于21天和/或已扩增超过21天(例如,22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天或28天以上)的组合的自然杀伤细胞相比,miRNA hsa-miR-155在21天扩增的组合的自然杀伤细胞中上调。

[0134] 在某些实施方式中,与未扩增、已扩增少于21天和/或已扩增超过21天(例如,22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天或28天以上)的相等个数的组合的自然杀伤细胞相比,扩增的(例如,21天扩增的)组合的自然杀伤细胞具有更高的细胞毒性,例如针对肿瘤细胞或肿瘤细胞系。

[0135] 在某些实施方式中,与未扩增、已扩增少于21天和/或已扩增超过21天(例如,22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天或28天以上)的相等个数的组合的自然杀伤细胞相比,扩增的组合的自然杀伤细胞以增加的水平诱导干扰素(IFN)- $\gamma$ 。

[0136] 本文进一步提供的是脐带血和组合的自然杀伤细胞的组合。在各种不同的实施方式中,脐带血与组合的自然杀伤细胞以每毫升脐带血约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个组合的自然杀伤细胞进行组合。

#### [0137] 5.5. 灌洗液/细胞组合物

[0138] 除了胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、组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)以外,本文还提供的是包含所述灌洗液或细胞的组合物,用于抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖。

##### [0139] 5.5.1. 胎盘灌洗液、灌洗液细胞和胎盘来源的中间体自然杀伤细胞的组合

[0140] 本文进一步提供的是组合物,其包含在上文第5.1节、第5.3节或第5.4节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/或组合的自然杀伤细胞的组合。在一个实施方式中,例如,本文提供的是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,胎盘中间体自然杀伤细胞,例如获自胎盘灌洗液细胞或机械或酶促破坏的胎盘组织)的胎盘灌洗液的体积。在具体的实施方式中,例如,每毫升的胎盘灌洗液补充约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或 $5 \times 10^8$ 个以上胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞和/或组合的自然杀伤细胞。在另一个实施方式中,众多胎盘灌洗液细胞补充胎盘灌洗液、胎盘中间体自然杀伤细胞和/或组合的自然杀伤细胞。在另一个实施方式中,众多胎盘中间体自然杀伤细胞补充胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞。在某些实施方式中,当用灌洗液补足时,灌洗液的体积是细胞(在溶液中)加上灌洗液的总体积的约、大于约或小于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%。在某些其它实施方式中,当胎盘灌洗液细胞与众多PINK细胞和/或组合的自然杀伤细胞组合时,所述胎盘灌洗液细胞一般占细胞总数的约、



大于约或少于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%。在某些其它实施方式中,当PINK细胞与众多胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞组合时,所述PINK细胞一般占细胞总数的约、大于约或少于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%。在某些其它实施方式中,当组合的自然杀伤细胞与PINK细胞和/或胎盘灌洗液细胞组合时,所述组合的自然杀伤细胞一般占细胞总数的约、大于约或少于约50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%。在某些其它实施方式中,当使用PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或胎盘灌洗液细胞来补充胎盘灌洗液时,其中使细胞悬浮的溶液(例如,盐水溶液、培养基等)的体积占灌洗液加上细胞的总体积的约、大于约或小于约、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、8%、6%、4%、2%或1%,其中在补充之前,将所述PINK细胞悬浮至每毫升约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或 $5 \times 10^8$ 个以上细胞。

[0141] 在其它实施方式中,以上组合中的任何一个进而与脐带血或来自脐带血的有核细胞进行组合。

[0142] 本文进一步提供的是获自两种或两种以上来源(例如,两个或两个以上胎盘)并且混合(例如,合并)的合并的胎盘灌洗液。这样的合并灌洗液可以包含来自每一种来源的近似相等体积的灌洗液,或者可以包含来自每一种来源的不同体积的灌洗液。可以随机选择来自每一种来源的相对体积,或者可以基于例如一种或多种细胞的因子(例如,细胞因子、生长因子、激素等)的浓度或量;来自每一种来源的灌洗液中胎盘细胞的数目;或来自每一种来源的灌洗液的其他特征进行选择。来自同一个胎盘的多次灌洗的灌洗液可以进行类似地合并。

[0143] 类似地,本文提供的是获自两种或两种以上来源(例如,两个或两个以上胎盘)并且合并的胎盘灌洗液细胞和胎盘来源的中间体自然杀伤细胞。这样的合并细胞可以包含来自两种或两种以上来源的近似相等数目的细胞,或者来自合并来源中的一种或多种的不同数目的细胞。来自每一种来源的细胞的相对数目可以基于例如要合并的细胞中的一种或多种特异性细胞类型的数目(例如, $CD34^+$ 细胞的数目、 $CD56^+$ 细胞的数目)等进行选择。

[0144] 合并物可以包含例如补充了胎盘灌洗液细胞的胎盘灌洗液;补充了胎盘来源的中间体自然杀伤(PINK)细胞的胎盘灌洗液;补充了胎盘灌洗液细胞和PINK细胞二者的胎盘灌洗液;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;补充了胎盘灌洗液和PINK细胞二者的胎盘灌洗液细胞;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;或补充了胎盘灌洗液细胞和胎盘灌洗液二者的PINK细胞。

[0145] 本文进一步提供的是胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和胎盘中间体自然杀伤细胞和它们的合并物或它们的组合,已对其进行了测定以确定根据例如给定数目的胎盘灌洗液或PINK细胞或给定体积的灌洗液所预期的肿瘤抑制程度或量(即效力)。例如,使等分试样或样品数目的细胞与已知数目的肿瘤细胞在所述肿瘤细胞将在别的情况下增殖的条件下接触,并且将在存在胎盘灌洗液、灌洗液细胞、胎盘自然杀伤细胞或其组合的情况下肿瘤细胞随时间(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的情况下相等数目的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细胞或它们的组合或合并物的效力可以表示为例如将肿瘤细胞生长抑制例如约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%等所需

要的细胞个数或溶液体积。

[0146] 在某些实施方式中,提供胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和PINK细胞作为药物级可给予的单位。这样的单位可以按以下离散的体积提供:例如100mL、150mL、200mL、250mL、300mL、350mL、400mL、450mL、500mL等。可以提供这样的单位以便含有例如胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞或它们两者的规定数目,例如 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个细胞/单位。可以提供这样的单位以含有胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞中的任何两种或所有三种的规定数目。

[0147] 在胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞的以上组合中,胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞中的任何一种、任何两种或所有三种对于接受者来说可以是自体的(即,获自该接受者),或者对接受者来说可以是同源的(即,获自所述接受者以外的至少一个其他个体)。

[0148] PINK细胞、胎盘灌洗液细胞和/或胎盘灌洗液的以上组合或合并物中的任何一种可以包含来自例如胎盘灌洗液、外周血、脐带血、骨髓等的 $CD56^+CD16^+$ 自然杀伤细胞。在具体的实施方式中,所述组合包含约、至少约或至多约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 个或更多个这样的自然杀伤细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个细胞/单位。所述 $CD56^+CD16^+$ 自然杀伤细胞可以像从天然来源分离的一样使用,或者可以在包含在以上组合或合并物中的一个之前扩增。所述 $CD56^+CD16^+$ NK细胞可以是自体的(即,获自与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞相同的个体;或获自接受者)或同源的(即,获自与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞不同的个体;或获自不是接受者的个体)。

[0149] 优选地,各单位做标记以指明体积、细胞个数、细胞类型,该单位是否已富集了特定类型的细胞和/或该单位中给定细胞数的效力或毫升单位的给定个数,引起一种或多种特定类型的肿瘤细胞增殖的可测量抑制。

[0150] 本文还提供的是组合物,其仅包含胎盘中间体自然杀伤细胞或者包含胎盘中间体自然杀伤细胞与胎盘灌洗液细胞和/或胎盘灌洗液的组合。因此,在另一个方面,本文提供的是组合物,其包含分离的 $CD56^+$ 、 $CD16^-$ 自然杀伤细胞,其中所述自然杀伤细胞分离自胎盘灌洗液,和其中所述自然杀伤细胞占所述组合物中至少50%的细胞。在一个具体的实施方式中,所述自然杀伤细胞占所述组合物中至少80%的细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含分离的 $CD56^+$ 、 $CD16^+$ 自然杀伤细胞。在一个更具体的实施方式中,所述 $CD56^+$ 、 $CD16^+$ 自然杀伤细胞是来自与所述 $CD56^+$ 、 $CD16^-$ 自然杀伤细胞不同的个体。在另一个具体的实施方式中,所述自然杀伤细胞是来自单一个体。在一个更具体的实施方式中,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。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含分离的胎盘灌洗液。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液是来自与所述自然杀伤细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含来自与所述自然杀伤细胞不同的个体的胎盘灌洗液。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含胎盘灌洗液细胞。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞是来自与所述自然杀伤细胞相同的个体。在另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液细胞是来自与

所述自然杀伤细胞不同的个体。在另一个具体的实施方式中,所述组合物另外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是来自不同的个体。在任何以上包含胎盘灌洗液的实施方式的另一个更具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液包含来自至少两个个体的胎盘灌洗液。在任何以上包含胎盘灌洗液细胞的实施方式的另一个更具体的实施方式中,所述分离的胎盘灌洗液细胞是来自至少两个个体。

#### [0151] 5.5.2. 包含贴壁胎盘干细胞的组合物

[0152] 在其它实施方式中,所述胎盘灌洗液、众多胎盘灌洗液细胞、众多组合的自然杀伤细胞和/或众多PINK细胞或任何上述的组合或合并物补充贴壁胎盘干细胞。这样的干细胞描述于例如Hariri的美国专利第7,045,148号和第7,255,879号。贴壁胎盘干细胞不是滋养层。

[0153] 所述胎盘灌洗液、众多胎盘灌洗液细胞、众多组合的自然杀伤细胞和/或众多PINK细胞或任何上述的组合或合并物,可以补充例如 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个贴壁胎盘细胞。该组合中的贴壁胎盘干细胞可以是例如已培养例如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次群体倍增或更多次群体倍增的贴壁胎盘干细胞。

[0154] 贴壁胎盘干细胞当在原代培养物中或在细胞培养物中培养时贴附至组织培养基底,例如组织培养容器表面(例如,组织培养塑料)。培养中的贴壁胎盘干细胞呈现出一般成纤维细胞样星形外观,其多个胞质突从中央细胞体中伸出。然而,由于胎盘干细胞显示出比成纤维细胞数目更多的此类胞质突,因此所述贴壁胎盘干细胞在形态上与在相同条件下培养的成纤维细胞是可区分的。在形态上,胎盘干细胞与造血干细胞也是可区分的,造血干细胞在培养时一般呈现出更圆的或鹅卵石形态。

[0155] 可用于本文提供的组合物和方法中的贴壁胎盘干细胞和胎盘干细胞群体表达可用于鉴别和/或分离干细胞或包含所述干细胞的细胞群体的多种标志物。可用于本文提供的组合物和方法中的贴壁胎盘干细胞和贴壁干细胞群体包括直接从胎盘或其任何部分(例如,羊膜、绒毛膜、羊膜-绒毛膜板、胎盘绒毛叶、脐带等)中获得的干细胞和含有干细胞的细胞群体。在一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞群体是培养中的贴壁胎盘干细胞群体(即,两种或两种以上),例如,在容器(例如,袋)中的群体。

[0156] 贴壁胎盘干细胞一般表达标志物CD73、CD105、CD200、HLA-G和/或OCT-4而不表达CD34、CD38或CD45。贴壁胎盘干细胞也可表达HLA-ABC(MHC-1)和HLA-DR。这些标志物可以用于鉴别贴壁胎盘干细胞并且将胎盘干细胞与其它类型的干细胞区别开。因为所述胎盘干细胞可表达CD73和CD105,所以它们可以具有间充质干细胞样特征。然而,因为所述贴壁胎盘干细胞可表达CD200和HLA-G(胎儿特异性标志物),所以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,骨髓衍生间充质干细胞)区别开。以同样的方式,CD34、CD38和/或CD45的表达缺乏将贴壁胎盘干细胞鉴别为非造血干细胞。

[0157] 在一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD200<sup>+</sup>、HLA-G<sup>+</sup>,其中所述干细胞可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。在一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD73<sup>+</sup>

和CD105<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>或CD45<sup>-</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>和CD105<sup>+</sup>。在另一个实施方式中,当在允许胚胎样小体形成的条件下培养时,所述贴壁干细胞产生一个或多个胚胎样小体。

[0158] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>,其中所述干细胞可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。在所述群体的一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是HLA-G<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>或CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>和HLA-G<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,当在允许胚胎样小体形成的条件下培养时,所述贴壁胎盘干细胞产生一个或多个胚胎样小体。

[0159] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD200<sup>+</sup>、OCT-4<sup>+</sup>,其中所述干细胞可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。在一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD73<sup>+</sup>和CD105<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是HLA-G<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述贴壁干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和HLA-G<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,当在允许胚胎样小体形成的条件下培养时,所述贴壁胎盘干细胞产生一个或多个胚胎样小体。

[0160] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>和HLA-G<sup>+</sup>,其中所述贴壁干细胞可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。在以上多数(the above plurality)的一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>或CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是OCT-4<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD200<sup>+</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、OCT-4<sup>+</sup>和CD200<sup>+</sup>。

[0161] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>干细胞,其中所述干细胞在允许胚胎样小体形成的条件下产生一个或多个胚胎样小体,和其中所述贴壁干细胞可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。在一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>或CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是OCT-4<sup>+</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述贴壁干细胞也是OCT-4<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。

[0162] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是OCT-4<sup>+</sup>干细胞,其中所述贴壁胎盘干细胞当在允许胚胎样小体形成的条件下培养时产生一个或多个胚胎样小体,和其中所述干细胞已鉴定为可检测地抑制癌症细胞增殖或肿瘤生长。

[0163] 在各种不同的实施方式中,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<sup>+</sup>干细胞。在以上群体的一个具体的实施方式中,所述干细胞是CD73<sup>+</sup>和CD105<sup>+</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述干细胞是CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>或CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述干细胞是CD200<sup>+</sup>。在一个更具体的实施方式中,所述干细胞是CD73<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>-</sup>、CD38<sup>-</sup>和CD45<sup>-</sup>。在另一个具体的实施方式中,所述群体已扩增,例如,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。

[0164] 在任何以上实施方式的一个更具体的实施方式中,所述贴壁胎盘细胞表达ABC-p(胎盘-特异性ABC转运蛋白;参见,例如Allikmets等人,CancerRes.58(23):5337-9(1998))。

[0165] 在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞是CD29<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>、CD73<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、CD200<sup>+</sup>、CD34<sup>+</sup>和CD133<sup>+</sup>。在另一个实施方式中,所述贴壁胎盘干细胞、所述胎盘干细胞组成性地分泌IL-6、IL-8和单核细胞化学引诱蛋白(MCP-1)。

[0166] 每一种以上提及的胎盘干细胞可以包含直接从哺乳动物胎盘获得和分离的胎盘干细胞,或者已培养和传代至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25、30次或30次以上的胎盘干细胞,或者它们的组合。以上描述的多种肿瘤细胞抑制性贴壁胎盘干细胞可以包含约、至少或不超过 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个贴壁胎盘干细胞。

#### [0167] 5.5.3. 包含胎盘干细胞条件化培养基的组合物

[0168] 本文还提供的是包含PINK细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘灌洗液且另外包含条件化培养基的肿瘤抑制性组合物的用途。贴壁胎盘干细胞、胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘中间体自然杀伤细胞可以用于产生肿瘤细胞抑制性的条件化培养基,即包含对一种或多种免疫细胞类型的多数具有可检测的肿瘤细胞抑制效果且由所述干细胞所分泌或排泄的一种或多种生物分子的培养基。在各种不同的实施方式中,所述条件化培养基包含其中胎盘细胞(例如,干细胞、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞)或组合的自然杀伤细胞已生长至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24天或24天以上的培养基。在其它实施方式中,所述条件化培养基包含其中所述细胞已生长至至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%汇合,或至多100%汇合的培养基。这样的条件化培养基可以用于支持单独的胎盘细胞群体或另一类细胞群体的培养。在另一个实施方式中,本文提供的条件化培养基包含其中已培养了贴壁胎盘干细胞和非胎盘干细胞的培养基。

[0169] 这样的条件化培养基可以与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘中间体自然杀伤细胞的任何或任何组合进行组合以形成肿瘤细胞抑制性组合物。在某些实施方式中,所述组合物包含按体积小于一半的条件化培养基,例如按体积计约或小于约、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0170] 因此,在一个实施方式中,本文提供的是组合物,其包含来自胎盘干细胞的培养物的培养基,其中所述胎盘干细胞(a)贴附至基底;(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并且当所述群体在允许胚胎样小体形成的条件下培养时有利于在包含胎盘干细胞的胎盘细胞群体中形成一个或多个胚胎样小体,或表达OCT-4并且当所述群体在允许胚胎样小体形成的条件下培养时有利于在包含胎盘干细胞的胎盘细胞群体中形成一个或多个胚胎样小体;和(c)可检测地抑制肿瘤细胞或肿瘤细胞群体的生长或增殖。在一个具体的实施方式中,所述组合物还包含众多的所述胎盘干细胞。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含众多的非胎盘细胞。在一个更具体的实施方式中,所述非胎盘细胞包含CD34<sup>+</sup>细胞,例如造血祖细胞,例如外周血造血祖细胞、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包含其它干细胞,例如间充质干细胞,例如骨髓衍生间充质干细胞。所述非胎盘细胞也可

以是一种或多种类型的成体细胞或细胞系。在另一个具体的实施方式中,所述组合物包含抗增殖剂,例如抗MIP-1 $\alpha$ 或抗MIP-1 $\beta$ 抗体。

[0171] 在一个具体的实施方式中,胎盘细胞-条件化培养基或上清液获自以约1:1、约2:1、约3:1、约4:1或约5:1胎盘干细胞:肿瘤细胞的比率与众多肿瘤细胞共培养的众多胎盘干细胞。例如,所述条件化培养基或上清液可获自包含约 $1 \times 10^5$ 个胎盘干细胞、约 $1 \times 10^6$ 个胎盘干细胞、约 $1 \times 10^7$ 个胎盘干细胞或约 $1 \times 10^8$ 个胎盘干细胞或更多的培养物。在另一个具体的实施方式中,所述条件化培养基或上清液获自包含约 $1 \times 10^5$ 个至约 $5 \times 10^5$ 个胎盘干细胞和约 $1 \times 10^5$ 个肿瘤细胞;约 $1 \times 10^6$ 个至约 $5 \times 10^6$ 个胎盘干细胞和约 $1 \times 10^6$ 个肿瘤细胞;约 $1 \times 10^7$ 个至约 $5 \times 10^7$ 个胎盘干细胞和约 $1 \times 10^7$ 个肿瘤细胞;或约 $1 \times 10^8$ 个至约 $5 \times 10^8$ 个胎盘干细胞和约 $1 \times 10^8$ 个肿瘤细胞的共培养物。

[0172] 在一个具体的实施方式中,适合于向70kg个体给药的条件下培养基包含在约200mL培养基中由约 $70 \times 10^6$ 个胎盘干细胞条件化的上清液。

[0173] 条件化培养基可经浓缩以制备可给予的药物级产品。例如,条件化培养基可以通过除去水(例如,通过蒸发、冻干法等)而浓缩至约90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%或10%以上。在一个具体的实施方式中,例如,200mL来自约 $70 \times 10^6$ 个胎盘干细胞的条件下培养基可浓缩至约180mL、160mL、140mL、120mL、100mL、80mL、60mL、40mL、20mL或更少的体积。所述条件化培养基也可以基本上干燥成例如粉末,例如通过蒸发、冻干法等。

#### [0174] 5.6. 灌洗液和胎盘细胞的保存

[0175] 胎盘灌洗液、胎盘细胞,例如灌洗液细胞或PINK细胞和组合的自然杀伤细胞可以进行保存,即放置在允许长期储存的条件下或在抑制细胞死亡(例如,通过抑制细胞凋亡或坏死)的条件下。

[0176] 可以通过将胎盘细胞组合物通过至少一部分胎盘(例如,通过胎盘脉管系统)来产生胎盘灌洗液。所述胎盘细胞收集组合物包含对保存灌洗液中所含细胞起作用的一种或多种化合物。在上文第5.1节中描述了这样的胎盘细胞收集组合物,例如包含细胞凋亡抑制剂、坏死抑制剂和/或携氧全氟化碳的组合物,如2007年8月16日公布的相关美国申请公布号2007-0190042中所描述。在一个实施方式中,通过胎盘或胎盘组织的胎盘细胞收集组合物是可用于下文第5.4节中描述的方法中的胎盘灌洗液。

[0177] 在一个实施方式中,胎盘灌洗液和/或胎盘细胞从哺乳动物(例如,人)分娩后的胎盘收集,即使所述细胞与包含细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳的胎盘细胞收集组合物接触,其中所述细胞凋亡抑制剂以与未接触细胞凋亡抑制剂的干细胞群体相比足以降低或防止干细胞群体中的细胞凋亡的量和时间存在。例如,可以用胎盘细胞收集组合物灌洗胎盘,并从中分离胎盘细胞,例如总有核胎盘细胞。在一个具体的实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂。在另一个具体的实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂是JNK抑制剂。在一个更具体的实施方式中,所述JNK抑制剂不调节所述干细胞的分化或增殖。在另一个实施方式中,所述胎盘细胞收集组合物包含处于分离的相中的所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳。在另一个实施方式中,所述胎盘细胞收集组合物包含处于乳浊液中的所述细胞凋亡抑制剂和所述携氧全氟化碳。在另一个实施方式中,所述胎盘细胞收集组合物另外包含乳化剂,例如卵磷脂。在另一个实施方式中,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在接触胎盘细胞的时间时是处于约0℃和约25℃之间。在另一个更具体的实施

方式中,所述细胞凋亡抑制剂和所述全氟化碳在接触胎盘细胞的时间时是处于约2℃和10℃之间,或者处于约2℃和约5℃之间。在另一个更具体的实施方式中,所述接触在所述干细胞群体的运输期间进行。在另一个更具体的实施方式中,所述接触在所述干细胞群体的冷冻和融化期间进行。

[0178] 在另一个实施方式中,可以收集胎盘灌洗液和/或胎盘细胞并且通过使所述灌洗液和/或细胞与细胞凋亡抑制剂和保存器官的化合物接触进行保存,其中所述细胞凋亡抑制剂以与未接触所述细胞凋亡抑制剂的灌洗液或胎盘细胞相比足以降低或防止细胞凋亡的量和时间存在。

[0179] 在一个具体的实施方式中,所述保存器官的化合物是UW溶液(美国专利第4,798,824号中有描述;也称为VIASPAN™;也参见Southard等人,Transplantation 49(2):251-257(1990)或Stern等人的美国专利第5,552,267号中描述的溶液。在另一个实施方式中,所述保存器官的组合物是羟乙基淀粉、乳糖酸、棉子糖或其组合。在另一个实施方式中,所述胎盘细胞收集组合物另外包含处于两相或作为乳浊液的携氧全氟化碳。

[0180] 在该方法的另一个实施方式中,在灌洗期间,使胎盘灌洗液和/或胎盘细胞与包含细胞凋亡抑制剂和携氧全氟化碳、保存器官的化合物或其组合的胎盘细胞收集组合物接触。在另一个实施方式中,在通过灌洗收集之后,使胎盘细胞与所述干细胞收集化合物接触。

[0181] 典型地,在胎盘细胞收集、富集和分离期间,优选地最小化或消除由于低氧和机械应力所造成的细胞胁迫。因此,在该方法的另一个实施方式中,在收集、富集或分离期间,使胎盘灌洗液、胎盘细胞或胎盘细胞群体在所述保存期间暴露于低氧条件少于六小时,其中低氧条件是低于正常血氧浓度的氧浓度。在一个更具体的实施方式中,所述胎盘细胞群体在所述保存期间暴露于所述低氧条件少于两小时。在另一个更具体的实施方式中,在收集、富集或分离期间,所述胎盘细胞群体暴露于所述低氧条件少于一小时或少于三十分钟,或者不暴露于低氧条件。在另一个具体的实施方式中,在收集、富集或分离期间,所述胎盘细胞群体不暴露于切变应力。

[0182] 本文提供的胎盘细胞、来自胎盘的自然杀伤细胞或组合的自然杀伤细胞可以例如在冷冻保存培养基中在小容器(例如,安瓿)中进行冷冻保存。合适的冷冻保存培养基包括但不限于以下培养基:包括例如生长培养基或细胞冷冻培养基,例如商购的细胞冷冻培养基,例如C2695、C2639或C6039(Sigma)。冷冻保存培养基优选包含DMSO(二甲亚砜),浓度为例如约10%(v/v)。冷冻保存培养基可包含另外的试剂,例如甲基纤维素和/或甘油。细胞优选在冷冻保存期间以约1℃/min冷却。优选的冷冻保存温度为约-80℃至约-180℃,优选约-125℃至约-140℃。冷冻保存的细胞可以在融化之前转移到液氮中备用。在有些实施方式中,例如,一旦安瓿已经达到约-90℃,就将它们转移到液氮贮藏区域。冷冻保存的细胞优选在约25℃至约40℃的温度下、优选至约37℃的温度下融化。

[0183] 5.7. 应用胎盘灌洗液、PINK细胞和组合的自然杀伤细胞抑制肿瘤细胞生长

[0184] 本文还提供的是使用胎盘灌洗液、分离自胎盘灌洗液的细胞、分离的组合的自然杀伤细胞或分离的胎盘自然杀伤细胞(例如,胎盘来源的中间体自然杀伤细胞)抑制肿瘤细胞的生长(例如,增殖)的方法。

[0185] 在一个实施方式中,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,



包括使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或PINK细胞接触,使得与未接触所述胎盘灌洗液、灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或PINK细胞的相同类型的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降低。

[0186] 如本文所用的,“接触”在一个实施方式中涵盖了胎盘灌洗液、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/或组合的自然杀伤细胞;和肿瘤细胞或众多肿瘤细胞之间的直接物理(例如,细胞—细胞)接触。在另一个实施方式中,“接触”涵盖了在相同物理空间中的存在,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/或组合的自然杀伤细胞置于与肿瘤细胞或众多肿瘤细胞相同的容器(例如,培养皿、多孔板)中。在另一个实施方式中,通过(例如)将所述胎盘灌洗液或细胞(例如,胎盘灌洗液细胞、组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(例如,包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的人,例如癌症患者)来完成胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、组合的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的“接触”。

[0187] 在某些实施方式中,将胎盘灌洗液以导致可检测的治疗益处的任何量应用于包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体,例如癌症患者。在某些其它实施方式中,将胎盘灌洗液细胞、胎盘中间体自然杀伤细胞和/或组合的自然杀伤细胞以导致可检测的治疗益处的任何量应用于包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体。因此,在另一个实施方式中,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,包括使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、胎盘来源的中间体自然杀伤细胞或众多PINK细胞和/或组合的自然杀伤细胞在个体的体内接触,使得所述接触对于所述个体来说有可检测或可证明的治疗益处。

[0188] 如本文所用的,“治疗益处”包括但不限于,例如肿瘤尺寸的减小;肿瘤扩大的减轻或停止;组织样品(例如,血液样品)中每单位体积癌细胞数减少;所述个体所患的特定癌症的任何症状的临床改善、所述个体所患的特定癌症的任何症状的减轻或恶化停止,等等。达到了这样的治疗益处中的任何一种或多种的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或PINK细胞的接触被认为是治疗上有益的。

[0189] 在某些实施方式中,将胎盘灌洗液细胞,例如来自胎盘灌洗液的有核细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘中间体自然杀伤细胞以导致可检测的治疗益处的任何量或数目应用于包含肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的个体,例如癌症患者。将胎盘灌洗液细胞、组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按细胞个数给予这样的个体,例如,所述个体可给予约、至少约或至多约 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 或 $5 \times 10^{10}$ 个胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘来源的中间体自然杀伤细胞。在其它实施方式中,可将胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘来源的中间体自然杀伤细胞按细胞个数给予这样的个体,例如,所述个体可给予约、至少约或至多约 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 或 $5 \times 10^{10}$ 个胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘来源的中间体自然杀伤细胞/千克个体。可将胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘来源的中间体自然杀伤细胞按所述个体中胎盘灌洗液细胞、组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和肿瘤细胞之间的近似比率给予这样的个体。例如,可将胎盘灌洗液细胞、组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,在个体中与肿瘤细胞数的约、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的比率给予所述个体。可以估计这样的个体的肿瘤细胞数,例如通过对来自个体的组织样品(例如,血液样品、生物活检样品(biopsy)等)中的肿瘤细胞数进行计数。在具体的实施方式中,例如对于实体肿瘤,所述计数结合一个或多个肿瘤的造影来进行以获得近似肿瘤体积。

[0190] 本文进一步提供的是使用胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘来源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的增殖的方法。在各种不同的实施方式中,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,包括使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与补充众多胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞或PINK细胞的胎盘灌洗液;补充胎盘灌洗液或众多组合的自然杀伤细胞或PINK细胞的胎盘灌洗液细胞;补充胎盘灌洗液和胎盘灌洗液细胞、众多PINK细胞和/或众多组合的自然杀伤细胞的PINK细胞或组合的自然杀伤细胞;众多组合的自然杀伤细胞和众多胎盘灌洗液细胞;补充组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、组合的自然杀伤细胞和PINK细胞全部的组合接触。

[0191] 在一个具体的实施方式中,例如,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被补充众多胎盘灌洗液细胞、组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抑制。在具体的实施方式中,例如,每毫升的胎盘灌洗液补充约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞或胎盘中间体自然杀伤细胞。在其它具体的实施方式中,胎盘灌洗液,例如一个单位(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,补充约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个PINK细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘灌洗液细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个PINK细胞、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘灌洗液细胞。

[0192] 在另一个具体的实施方式中,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被补充胎盘灌洗液、组合的自然杀伤细胞和/或胎盘中间体自然杀伤细胞的众多胎盘灌洗液细胞抑制。在更具体的实施方式中,约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞,补充约或至少约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个PINK细胞和/或组合的自然杀伤细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个PINK细胞或组合的自然杀伤细胞。在其它更具体的实施方式中,约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞、PINK细胞和/或组合的自然杀伤细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞,补充约或至少约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单位的灌洗液。

[0193] 在另一个具体的实施方式中,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖被由胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞补充的众多胎盘中间体自然杀伤细胞或组合的自然杀伤细胞抑制。在更具体的实施方式中,约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个胎盘中间体自然杀伤细胞,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个PINK细胞,补充约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞。在其它更具体的实施方式中,约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个胎盘灌洗液细胞和/或组合的自然杀伤细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个胎盘中间体自然杀伤细胞和/或组合的自然杀伤细胞,补充约或至少约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单位的灌洗液。

[0194] 在另一个实施方式中,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖通过使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与补充贴壁胎盘干细胞的胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞和/或组合的自然杀伤细胞接触来抑制。在具体的实施方式中,所述胎盘灌洗液、灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞或PINK细胞补充约 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 个或更多个贴壁胎盘干细胞/毫升,或 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 个或更多个贴壁胎盘干细胞。

[0195] 在另一个实施方式中,肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖通过使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与补充贴壁胎盘干细胞-条件化培养基的胎盘灌洗液、灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞和/或PINK细胞接触来抑制,例如,每单位灌洗液、灌洗液细胞、组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。

[0196] 在其它实施方式中,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)、组合的自然杀伤细胞和包含它们的组合和合并物按最初获得的使用,即,如在灌洗期间获得的灌洗液、如从这样的灌洗液中分离的胎盘灌洗液细胞、来自这样的灌洗液和匹配的脐带血的组合的自然杀伤细胞或从这样的灌洗液或这样的胎盘灌洗液细胞中分离的PINK细胞。在其它实施方式中,所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞和它们的组合和合并物在使用之前进行加工。例如,胎盘灌洗液可以其原样(如从胎盘收集的未加工形式)使用。胎盘灌洗液也可以在使用之前进行加工,例如通过负选择一种或多种细胞类型、通过脱水使体积减小;冻干法和再水化等。类似地,灌洗液细胞群体按最初从胎盘灌洗液分离的使用,例如,如来自胎盘灌洗液的总有核细胞,或者可以进行加工,例如以去除一种或多种细胞类型(例如,红细胞)。PINK细胞按最初从胎盘灌洗液分离的

使用(例如,使用CD56微珠)或可以进行加工,例如以去除一种或多种非杀伤细胞类型。

[0197] 在另一个实施方式中,本文提供的是抑制肿瘤细胞或众多肿瘤细胞的增殖的方法,包括使所述肿瘤细胞或众多肿瘤细胞与胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或包含它们的合并物或组合接触,其中所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或包含它们的合并物或组合在所述接触之前已与白介素-2(IL-2)接触一段时间周期。在某些实施方式中,在所述接触之前,所述时间周期为约、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。

[0198] 所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或包含它们的合并物和/或组合物可以在抗癌疗法的疗程中向患癌个体或具有肿瘤细胞的个体给予一次或可以给予多次,例如,在疗法期间每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时一次,或每1、2、3、4、5、6或7天一次,或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10周或更长时间一次。可以给予所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞和包含它们的合并物和/或组合物,而不管过去是否已向患有癌症或具有肿瘤细胞的病人给予所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞、包含它们的合并物和/或组合物。因此,本文提供的方法涵盖向患有癌症或具有肿瘤细胞的病人给予胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞、包含它们的合并物和/或组合的任何组合。

[0199] 在一个具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是血液癌症细胞。在各种具体的实施方式中,所述肿瘤细胞是原发性导管癌细胞、白血病细胞、急性T细胞白血病细胞、慢性髓样淋巴瘤(CML)细胞、急性髓细胞白血病细胞、慢性髓细胞白血病(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、视网膜母细胞瘤细胞、结肠直肠癌细胞或结肠直肠腺癌细胞。

[0200] 所述胎盘灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞、包含它们的合并物和/或组合物可以是包括一种或多种其它抗癌剂的抗癌疗法方案的一部分。这样的抗癌剂在本领域中是熟知的。除了所述灌洗液、灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞、它们的合并物和/或组合物以外,还可给予至患癌个体的具体抗癌剂包括但不限于:阿西维辛(acivicin);阿柔比星(aclarubicin);盐酸阿考达唑(acodazole hydrochloride);阿克罗宁(acronine);阿多来新(adozelesin);阿地白介素(aldesleukin);六甲蜜胺(altretamine);安波霉素(ambomycin);醋酸阿美蒽醌(ametantrene acetate);安吡啶(amsacrine);阿那曲唑(anastrozole);安曲霉素(anthracycline);天冬酰胺酶(asparaginase);曲林菌素(asperlin);阿扎胞苷(azacitidine);阿扎替派(azetepa);阿佐霉素(azotomycin);巴马司他(batimastat);苯佐替派(benzodepa);比卡鲁胺(bicalutamide);盐酸比生群(bisantrene hydrochloride);二甲磺酸双奈法德(bisnafide dimesylate);比折来新(bizelesin);硫酸博来霉素(bleomycin sulfate);布喹那钠(brequinar sodium);溴匹立明(bropiramine);白消安(busulfan);放线菌素C(cactinomycin);卡普睾酮(calusterone);卡醋胺(caracemide);卡贝替姆(carbetimer);卡铂(carboplatin);卡莫司汀(carmustine);盐酸卡柔比星(carubicin hydrochloride);卡折来新(carzelesin);西地芬戈(cedefingol);塞来考昔(celecoxib)(COX-2抑制剂);苯丁酸氮芥(chlorambucil);西罗霉素(cirolemycin);顺铂(cisplatin);克拉屈滨

(cladribine);甲磺酸克立那托(crisnatol mesylate);环磷酰胺(cyclophosphamide);阿糖胞苷(cytarabine);达卡巴嗪(dacarbazine);放线菌素D(dactinomycin);盐酸柔红霉素(daunorubicin hydrochloride);地西他滨(decitabine);右奥马铂(dexormaplatin);地扎呱宁(dezaguanine);甲磺酸地扎呱宁(dezaguanine mesylate);地吡醌(diaziquone);多西他赛(docetaxel);多柔比星(doxorubicin);盐酸多柔比星(doxorubicin hydrochloride);屈洛昔芬(droloxifene);柠檬酸屈洛昔芬(droloxifene citrate);丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate);达佐霉素(duazomycin);依达曲沙(edatrexate);盐酸依氟鸟氨酸(eflomithine hydrochloride);依沙芦星(elsamitrucin);恩洛铂(enloplatin);恩普氨酯(enpromate);依匹哌啉(epipropidine);盐酸表柔比星(epirubicin hydrochloride);厄布洛唑(erbulozole);盐酸依索比星(esorubicin hydrochloride);雌莫司汀(estramustine);雌莫司汀磷酸钠(estramustine phosphate sodium);依他硝唑(etanidazole);依托泊苷(etoposide);磷酸依托泊苷(etoposide phosphate);氯苯乙嘧啶(etoprine);盐酸法倔唑(fadrozole hydrochloride);法扎拉滨(fazarabine);芬维A胺(fenretinide);氮尿苷(floxuridine);磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate);氟尿嘧啶(flurouracil);氟西他滨(flurocitabine);磷喹酮(fosquidone);福司曲星钠(fostriecin sodium);吉西他滨(gemcitabine);盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride);羟基脲(hydroxyurea);盐酸伊达比星(idarubicin hydrochloride);异环磷酰胺(ifosfamide);伊莫福新(ilmofosine);异丙铂(iproplatin);伊立替康(irinotecan);盐酸伊立替康(irinotecan hydrochloride);醋酸兰瑞肽(lanreotide acetate);来曲唑(letrozole);醋酸亮丙立德(leuprolide acetate);盐酸利阿唑(liarozole hydrochloride);洛美曲索钠(lometrexol sodium);洛莫司汀(lomustine);盐酸洛索蒽醌(losoxantrone hydrochloride);马索罗酚(masoprocol);美登素(maytansine);盐酸氮芥(mechlorethamine hydrochloride);醋酸甲地孕酮(megestrol acetate);醋酸美仑孕酮(melengestrol acetate);美法仑(melphalan);美诺立尔(menogaril);巯基嘌呤(mercaptapurine);甲氨蝶呤(methotrexate);甲氨蝶呤钠(methotrexate sodium);氯苯氨啉(metoprine);美妥替哌(meturedopa);米丁度胺(mitindomide);米托卡星(mitocarcin);丝裂红素(mitocromin);米托洁林(mitogillin);米托马星(mitomalcin);丝裂霉素(mitomycin);米托司培(mitosper);米托坦(mitotane);盐酸米托蒽醌(mitoxantrone hydrochloride);麦考酚酸(mycophenolic acid);诺考达唑(nocodazole);诺拉霉素(nogalamycin);奥马铂(ormaplatin);奥昔舒仑(oxisuran);紫杉醇(paclitaxel);培门冬酶(pegaspargase);培利霉素(peliomycin);奈莫司汀(pentamustine);硫酸培洛霉素(peplomycin sulfate);培磷酰胺(perfosfamide);哌泊溴烷(pipobroman);哌泊舒凡(piposulfan);盐酸吡罗蒽醌(piroxantrone hydrochloride);普卡霉素(plicamycin);普洛美坦(plomestane);吡吩姆钠(porfimer sodium);泊非霉素(porfiromycin);泼尼莫司汀(prednimustine);盐酸丙卡巴肼(procarbazine hydrochloride);嘌呤霉素(puromycin);盐酸嘌呤霉素(puromycin hydrochloride);吡唑呋林(pyrazofurin);利波腺苷(riboptine);沙芬戈(safingol);盐酸沙芬戈(safingol hydrochloride);司莫司汀(semustine);辛曲秦(simtrazene);磷乙酰天冬氨酸钠

(sparfosate sodium); 司帕霉素 (sparsomycin); 盐酸锗螺胺 (spirogermanium hydrochloride); 螺莫司汀 (spiromustine); 螺铂 (spiroplatin); 链黑霉素 (streptonigrin); 链佐星 (streptozocin); 磺氯苯脲 (sulofenur); 他利霉素 (talismycin); 替可加兰钠 (tecogalan sodium); 泰索帝 (taxotere); 替加氟 (tegafur); 盐酸替洛萸醌 (teloxantrone hydrochloride); 替莫泊芬 (temoporfin); 替尼泊苷 (teniposide); 替罗昔隆 (teroxirone); 睾内酯 (testolactone); 硫唑嘌呤胺 (thiamiprine); 硫鸟嘌呤 (thioguanine); 塞替派 (thiotepa); 噻唑呋林 (tiazofurin); 替拉扎明 (tirapazamine); 柠檬酸托瑞米芬 (toremifene citrate); 醋酸曲托龙 (trestolone acetate); 磷酸曲西立滨 (triciribine phosphate); 三甲曲沙 (trimetrexate); 葡萄糖醛酸三甲曲沙 (trimetrexate glucuronate); 曲普瑞林 (triptorelin); 盐酸妥布氯唑 (tubulazole hydrochloride); 乌拉莫司汀 (uracil mustard); 乌瑞替派 (uredepa); 伐普肽 (vapreotide); 维替泊芬 (verteporfin); 硫酸长春碱 (vinblastine sulfate); 硫酸长春新碱 (vincristine sulfate); 长春地辛 (vindesine); 硫酸长春地辛 (vindesine sulfate); 硫酸长春匹定 (vinepidine sulfate); 硫酸长春甘酯 (vinglycinate sulfate); 硫酸长春罗辛 (vinleurosine sulfate); 酒石酸长春瑞滨 (vinorelbine tartrate); 硫酸长春罗定 (vinrosidine sulfate); 硫酸长春利定 (vinzolidine sulfate); 伏氯唑 (vorozole); 折尼铂 (zeniplatine); 净司他丁 (zinostatin); 和盐酸佐柔比星 (zorubicin hydrochloride)。

[0201] 其它抗癌症药物包括但不限于: 20-表-1, 25-二羟基维生素D3; 5-乙炔基尿嘧啶 (5-ethynyluracil); 阿比特龙 (abiraterone); 阿柔比星 (acliarubicin); 酰夫文 (acylfulvene); 腺环戊醇 (adecypenol); 阿多来新 (adozelesin); 阿地白介素 (aldesleukin); ALL-TK拮抗剂; 六甲蜜胺 (altretamine); 氨莫司汀 (ambamustine); 3,4-二羟基苜蓿胺 (amidox); 氨磷汀 (amifostine); 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid); 氨柔比星 (amrubicin); 安吡啶 (amsacrine); 阿那格雷 (anagrelide); 阿那曲唑 (anastrozole); 穿心莲内酯 (andrographolide); 血管生成抑制剂; 拮抗剂D; 拮抗剂G; 安雷利克斯 (antarelix); 抗背侧形态发生蛋白-1 (anti-dorsalizing morphogenetic protein-1); 抗雄激素 (antiandrogen); 前列腺癌; 抗雌激素 (antiestrogen); 抗瘤酮 (antineoplaston); 反义寡核苷酸; 甘氨酸阿非迪霉素 (aphidicolin glycinate); 细胞凋亡基因调制剂 (apoptosis gene modulators); 细胞凋亡调节剂 (apoptosis regulators); 脱嘌呤核酸 (apurinic acid); ara-CDP-DL-PTBA; 精氨酸脱氨酶 (arginine deaminase); asulacrine; 阿他美坦 (atamestane); 阿莫司汀 (atrimustine); axinastatin 1; axinastatin 2; axinastatin 3; 阿扎司琼 (azasetron); 阿扎毒素 (azatoxin); 氮杂酪氨酸 (azatyrosine); 浆果赤霉素III衍生物 (baccatin III derivatives); balanol; 巴马司他 (batimastat); BCR/ABL拮抗剂; 苯并二氢卟吩 (benzochlorins); 苯甲酰星孢菌素 (benzoylstauroporine);  $\beta$ 内酰胺衍生物 (beta lactam derivatives);  $\beta$ -alethine; betaclamycin B; 桦木酸 (betulinic acid); bFGF抑制剂; 比卡鲁胺 (bicalutamide); 比生群 (bisantrene); 双氮丙啶基精胺 (bisaziridinylspermine); 双奈法德 (bisnafide); bistratene A; 比折来新 (bizelesin); breflate; 溴匹立明 (bropirimine); 布度钛 (budotitane); 丁硫堇 (buthionine sulfoximine); 卡泊三醇 (calcipotriol); 卡弗他丁C

(calphostin C);喜树碱衍生物(camptothecin derivatives);卡培他滨(capecitabine);  
羧基氨基三唑(carboxamide-amino-triazole);羧基酰氨基三唑;CaRest M3;CARN  
700;软骨源性抑制剂;卡折来新(carzelesin);酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺  
(castanospermine);杀菌肽B(cecropin B);西曲瑞克(cetrorelix);绿素类(chlorins);  
氯喹啉磺酰胺(chloroquinoline sulfonamide);西卡前列素(cicaprost);顺-卟啉  
(cis-porphyrin);克拉屈滨(cladribine);氯米芬类似物(clomifene analogues);克霉唑  
(clotrimazole);collismycin A;collismycin B;考布他汀A4(combretastatin A4);考布  
他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托(crisnatol);cryptophycin 8;  
cryptophycin A衍生物;curacin A;环戊烯蒽醌类(cyclopentantraquinones);  
cycloplatam;cypemycin;十八烷基磷酸阿糖胞苷(cytarabine ocfosfate);溶细胞因子  
(cytolytic factor);细胞生长抑素(cytostatin);达昔单抗(dacliximab);地西他滨  
(decitabine);脱水代代宁B(dehydrodidenmin B);地洛瑞林(deslorelin);地塞米松  
(dexamethasone);右异环磷酰胺(dexifosfamide);右雷佐生(dexrazoxane);右维拉帕米  
(dexverapamil);地吡酮(diaziquone);代代宁B(didemnin B);3,4-二羟茺苯并氧肟酸  
(didox);二乙基去甲精胺(diethylnorspermine);二氢-5-氮杂胞苷(dihydro-5-  
azacytidine);9-二氢紫杉醇(dihydrotaxol,9-);dioxamycin;二苯基螺莫司汀(diphenyl  
spiromustine);多西他赛(docetaxel);二十二醇(docosanol);多拉司琼(dolasetron);去  
氧氟尿苷(doxifluridine);多柔比星(doxorubicin);屈洛昔芬(droloxifene);屈大麻酚  
(dronabinol);倍癌霉素SA(duocarmycin SA);依布硒(ebselen);依考莫司汀  
(ecomustine);依地福新(edelfosine);依决洛单抗(edrecolomab);依氟鸟氨酸  
(eflornithine);榄香烯(elemene);乙嘧替氟(emitofur);表柔比星(epirubicin);依立雄  
胺(epristeride);雌莫司汀类似物(estramustine analogue);雌激素激动剂;雌激素拮抗  
剂;依他硝唑(etanidazole);磷酸依托泊苷(etoposide phosphate);依西美坦  
(exemestane);法倔唑(fadrozole);法扎拉滨(fazarabine);芬维A胺(fenretinide);非格  
司亭(filgrastim);非那雄胺(finasteride);黄酮吡多(flavopiridol);氟卓斯汀  
(flezelastrine);fluasterone;氟达拉滨(fludarabine);fluorodaunorubicin  
hydrochloride;福酚美克(forfenimex);福美坦(formestane);福司曲星(fostriecin);福  
莫司汀(fotemustine);钆替沙林(gadolinium texaphyrin);硝酸镓(gallium nitrate);  
加洛他滨(galocitabine);加尼瑞克(ganirelix);明胶酶抑制剂;吉西他滨  
(gemcitabine);谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;heregulin;六亚甲基双乙酰胺  
(hexamethylene bisacetamide);金丝桃素(hypericin);伊班膦酸(ibandronic acid);伊  
达比星(idarubicin);艾多昔芬(idoxifene);伊决孟酮(idramantone);伊莫福新  
(ilmofosine);伊洛马司他(ilomastat);伊马替尼(imatinib)(例如,GLEEVEC®),咪喹  
莫德(imiquimod);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;  
白介素(interleukins);碘苄胍(iobenguane);碘阿霉素(iododoxorubicin);4-依波米醇  
(ipomeanol,4-);伊罗普拉(iroplact);伊索拉定(irsogladine);isobengazole;  
isohomohalicondrin B;伊他司琼(itasetron);jasplakinolide;kahalalide F;三醋酸层  
状素N(lamellarin-N triacetate);兰瑞肽(lanreotide);leinamycin;来格司亭  
(lenograstim);硫酸香菇多糖(lentinan sulfate);leptolstatin;来曲唑(letrozole);

白血病抑制因子;白细胞 $\alpha$ 干扰素;亮丙立德+雌激素+黄体酮(leuprolide+estrogen+progesterone);亮丙瑞林(leuprorelin);左旋咪唑(levamisole);利阿唑(liarozole);直链聚胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂(lobaplatin);蚯蚓磷脂(lombricine);洛美曲索(lometrexol);氯尼达明(lonidamine);洛索萘醌(losoxantrone);洛索立宾(loxoribine);勒托替康(lurtotecan);德克萨卜啉锗(lutetium texaphyrin);利索茶碱(lysofylline);裂解肽;美坦新(maitansine);制甘糖酶素A(mannostatin A);马立马司他(marimastat);马索罗酚(masoprocol);maspin;基质溶素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔(menogaril);merbarone;美替瑞林(meterelin);甲硫氨酸酶(methioninase);甲氧氯普胺(metoclopramide);MIF抑制剂;米非司酮(mifepristone);米替福新(miltefosine);米立司亭(mirimostim);米托胍脲(mitoguazone);二溴卫矛醇(mitolactol);丝裂霉素类似物(mitomycin analogues);米托蒽胺(mitonaftide);有丝分裂毒素成纤维细胞生长因子-肥皂草蛋白(saporin);米托蒽醌(mitoxantrone);莫法罗汀(mofarotene);莫拉司亭(molgramostim);爱必妥(Erbix),人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质A+分枝杆菌细胞壁sk(monophosphoryl lipid A+mycobacterium cell wall sk);莫哌达醇(mopidamol);芥末抗癌剂(mustard anticancer agent);印度洋海绵B(mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物(mycobacterial cell wall extract);myriaporone;N-乙酰基地那林(N-acetyldinaline);N-取代的苯甲酰胺(N-substituted benzamides);那法瑞林(nafarelin);nagrestip;纳洛酮+喷他佐辛(naloxone+pentazocine);napavin;naphterpin;那托司亭(nartograstim);奈达铂(nedaplatin);奈莫柔比星(nemorubicin);奈立膦酸(neridronic acid);尼鲁米特(nilutamide);nisamycin;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;奥利美生(oblimersen) (**GENA SENSE®**);0<sup>6</sup>-苄基鸟嘌呤(0<sup>6</sup>-benzylguanine);奥曲肽(octreotide);okicenone;寡核苷酸;奥那司酮(onapristone);昂丹司琼(ondansetron);昂丹司琼(ondansetron);oracin;口服细胞因子诱导剂(oral cytokine inducer);奥马铂(ormaplatin);奥沙特隆(osaterone);奥沙利铂(oxaliplatin);oxaunomycin;紫杉醇(paclitaxel);紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;棕榈酰根霉素(palmitoylrhizoxin);帕米膦酸(pamidronic acid);人参三醇(panaxytriol);帕诺米芬(panomifene);副球菌素(parabactin);帕折普汀(pazelliptine);培门冬酶(pegaspargase);培得星(peldesine);木聚硫酸钠(pentosan polysulfate sodium);喷司他丁(pentostatin);pentrozole;全氟溴烷(perflubron);培磷酰胺(perfosfamide);紫苏子醇(perillyl alcohol);吩嗪霉素(phenazinomycin);苯乙酸盐(phenylacetate);磷酸酶抑制剂;溶血性链球菌制剂(picibanil);盐酸毛果芸香碱(pilocarpine hydrochloride);吡柔比星(pirarubicin);吡曲克辛(piritrexim);帕斯婷A(placetin A);帕斯婷B(placetin B);纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物(platinum-triamine complex);卟吩姆钠(porfimer sodium);泊非霉素(porfiromycin);泼尼松(prednisone);丙基双吡啶酮(propyl bis-acridone);前列腺素J2(prostaglandin J2);蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂(protein A-based immune modulator);蛋白激酶C抑制剂;微藻(microalgal);蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;紫红素(purpurins);吡唑啉吡啶(pyrazoloacridine);吡多醇羟乙酯化(pyridoxylated)血红

蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞(raltitrexed);雷莫司琼(ramosetron);ras法呢基蛋白质转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;脱甲基化的瑞替普汀(retelliptine demethylated);羟乙膦酸铼Re186(rhenium Re 186etidronate);根霉素(rhizoxin);核糖酶(ribozymes);RII视黄酰胺(RII retinamide);罗希吐碱(rohitukine);罗莫肽(romurtide);罗喹美克(roquinimex);rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈(safingol);saintopin;SarCNU;sarcophytol A;沙格司亭(sargramostim);Sdi 1模拟物;司莫司汀(semustine);衰老衍生抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;西佐喃(sizofiran);索布佐生(sobuzoxane);硼卡钠(sodium borocaptate);苯乙酸钠(sodium phenylacetate);solverol;促生长因子(somatomedin)结合蛋白;索纳明(sonermin);膦门冬酸(sparfosic acid);穗霉素D(spicamycin D);螺莫司汀(spiromustine);脾脏五肽(splenopentin);海绵抑制素1(spongistatin 1);角鲨胺(squalamine);stipiamide;基质溶素(stromelysin)抑制剂;sulfinosine;超活性血管活性肠肽拮抗剂;suradista;苏拉明(suramin);苦马豆碱(swainsonine);他莫司汀(tallimustine);他莫昔芬甲碘化物(tamoxifen methiodide);牛磺莫司汀(tauromustine);他扎罗汀(tazarotene);替可加兰钠(tecogalan sodium);替加氟(tegafur);tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬(temoporfin);替尼泊苷(teniposide);tetrachlorodecaoxide;tetrazomine;菌体胚素(thaliblastine);噻可拉林(thiocoraline);促血小板生成素(thrombopoietin);促血小板生成素模拟物(thrombopoietin mimetic);胸腺法新(thymalfasin);促胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南(thymotrinan);促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone);乙基锡初红紫素(tin ethyl etiopurpurin);替拉扎明(tirapazamine);二氯环戊二烯钛(titanocene bichloride);topsentin;托瑞米芬(toremifene);翻译抑制剂;维A酸(tretinoin);三乙酰尿苷(triacetyluridine);曲西立滨(triciribine);三甲曲沙(trimetrexate);曲普瑞林(triptorelin);托烷司琼(tropisetron);妥罗雄脲(turosteride);酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostins);UBC抑制剂;乌苯美司(ubenimex);泌尿生殖窦源性生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽(vapreotide);variolin B;维拉雷琐(velaresol);藜芦明(veramine);verdins;维替泊芬(verteporfin);长春瑞滨(vinorelbine);vinxaltine; $\alpha$ V $\beta$ 3人源化抗单抗(vitaxin);伏氯唑(vorozole);扎诺特隆(zanoterone);折尼铂(zeniplatin);亚苾维(zilascorb);和净司他丁斯酯(zinostatin stimalamer)。

[0202] 在另一个实施方式中,本文提供的是治疗具有或正在经历移植物抗宿主病(GVHD)的症状或处于发生移植物抗宿主病(GVHD)风险之中的个体(例如,移植接受者或将接受移植的个体)的方法,包括向该个体给予治疗有效量的胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或包含它们的合并物或组合,其中所述胎盘灌洗液、胎盘灌洗液细胞、PINK细胞、组合的自然杀伤细胞或包含它们的合并物或组合在所述接触之前已与白介素-2(IL-2)接触一段时间周期,其中所述治疗有效量是足以引起GVHD的一种或多种症状可检测的改善或足以可检测地减少GVHD一种或多种症状发作的量。在某些实施方式中,所述时间周期为在所述接触之前约、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。

[0203] 5.8. 用免疫调节化合物治疗自然杀伤细胞



[0204] 如本文别处描述的分离的自然杀伤细胞(例如,PINK细胞或组合的自然杀伤细胞)可以用免疫调节化合物治疗(例如,与免疫调节化合物接触),以增强细胞的抗肿瘤活性。因此,本文提供的是增加自然杀伤细胞对肿瘤细胞的细胞毒性的方法,包括使所述自然杀伤细胞与免疫调节化合物以足以使所述自然杀伤细胞与未接触所述免疫调节化合物的自然杀伤细胞相比证明针对肿瘤细胞的细胞毒性增加的时间和浓度接触。在另一个实施方式中,本文提供的是增加自然杀伤细胞中颗粒酶B的表达的方法,包括使自然杀伤细胞与免疫调节化合物以足以使所述自然杀伤细胞与未接触所述免疫调节化合物的自然杀伤细胞相比证明颗粒酶B的表达增加的时间和浓度接触。所述免疫调节化合物可以是以下描述的任何化合物,例如来那度胺或泊马度胺。

[0205] 本文还提供的是增加自然杀伤细胞(例如,PINK细胞或组合的自然杀伤细胞)群体对众多肿瘤细胞的细胞毒性的方法,包括使自然杀伤细胞群体与免疫调节化合物以足以使所述自然杀伤细胞群体与未接触所述免疫调节化合物的相等个数的自然杀伤细胞相比证明针对所述众多肿瘤细胞的细胞毒性可检测增加的时间和浓度接触。在另一个实施方式中,本文提供的是增加自然杀伤细胞群体中颗粒酶B的表达的方法,包括使自然杀伤细胞群体与免疫调节化合物以足以使所述自然杀伤细胞群体与未接触所述免疫调节化合物的相等个数的自然杀伤细胞相比表达可检测增加量的颗粒酶B的时间和浓度接触。在一个具体的实施方式中,所述自然杀伤细胞群体包含在胎盘灌洗液细胞(例如,来自胎盘灌洗液的总有核细胞)中。

[0206] 在以上实施方式的具体实施方式中,所述自然杀伤细胞是CD56<sup>+</sup>、CD16<sup>-</sup>胎盘中间体自然杀伤细胞(PINK细胞)。在以上实施方式的另一个具体实施方式中,所述自然杀伤细胞是组合的自然杀伤细胞,即来自匹配的胎盘灌洗液和脐带血的自然杀伤细胞。

[0207] 在另一个具体的实施方式中,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细胞或组合的自然杀伤细胞)以比未接触所述免疫调节化合物的相等个数的自然杀伤细胞更高的水平表达BAX、CCL5、CCR5、CSF2、FAS、GUSB、IL2RA或TNFRSF18中的一种或多种。在另一个具体的实施方式中,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)以比未接触所述免疫调节化合物的相等个数的自然杀伤细胞更高的水平表达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。

[0208] 本文还提供的是增加人胎盘灌洗液细胞(例如,来自胎盘灌洗液的总有核细胞)群体针对众多肿瘤细胞的细胞毒性的方法,包括使所述胎盘灌洗液细胞与免疫调节化合物以足以使所述胎盘灌洗液细胞与未接触所述免疫调节化合物的相等个数的胎盘灌洗液细胞相比证明针对所述众多肿瘤细胞的细胞毒性可检测增加的时间和浓度接触。在另一个实施方式中,本文提供的是增加胎盘灌洗液细胞群体中颗粒酶B的表达的方法,包括使胎盘灌洗液细胞群体与免疫调节化合物以足以使所述胎盘灌洗液细胞群体与未接触所述免疫调节化合物的相等个数的胎盘灌洗液细胞相比表达可检测增加量的颗粒酶B的时间和浓度接触。

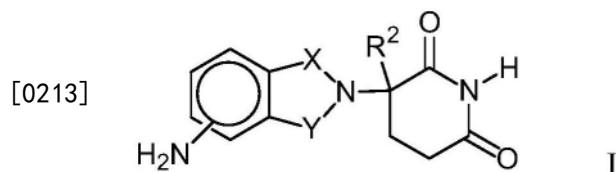
[0209] 免疫调节化合物可以商购或按照本文提及的专利或专利申请中所描述的方法制备,这些专利或专利申请全部通过引用并入本文。进一步,光学纯的组合物可以进行不对称合成或使用已知的拆分剂或手性柱以及其它标准合成有机化学技术来解析。免疫调节化合

物可以是外消旋的、立体异构体富集的或立体异构体纯的,并且可以涵盖其药学上可接受的盐、溶剂化物和前药。

[0210] 如本文所用的和除非另有说明的,术语“免疫调节化合物”包括明显地抑制TNF- $\alpha$ 、LPS诱导的单核细胞IL-1 $\beta$ 和IL-12并且部分地抑制IL-6产生的有机小分子。在具体的实例中,所述免疫调节化合物是来那度胺、泊马度胺或沙利度胺。

[0211] 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,例如在美国专利第5,929,117号中所公开的那些;1-氧代-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉,例如在美国专利第5,874,448号和第5,955,476号中所描述的那些;四取代的2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉,其描述于美国专利第5,798,368号;1-氧代和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吲哚啉(例如,沙利度胺的4-甲基衍生物),包括但不限于在美国专利第5,635,517、6,476,052、6,555,554和6,403,613号中所公开的那些;在吲哚啉环的4-或5-位上取代的1-氧代和1,3-二氧化异吲哚啉(例如,4-(4-氨基-1,3-二氧化异吲哚啉-2-基)-4-氨基甲酰基丁酸),其描述于美国专利第6,380,239号;在2-位被2,6-二氧化-3-羟基哌啶-5-基取代的异吲哚啉-1-酮和异吲哚啉-1,3-二酮(例如,2-(2,6-二氧化-3-羟基-5-氟哌啶-5-基)-4-氨基异吲哚啉-1-酮),其描述于美国专利第6,458,810号;一类非多肽环状酰胺,其公开于美国专利第5,698,579和5,877,200号;氨基沙利度胺以及氨基沙利度胺的类似物、水解产物、代谢物、衍生物和前体,和取代的2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)邻苯二甲酰亚胺取代的2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉,例如在美国专利第6,281,230号和第6,316,471号中所描述的那些;和异吲哚啉-酰亚胺化合物,例如在美国专利申请号2003/0045552A1、美国专利第7,091,353号和WO 02/059106中所描述的那些。本文中标识的专利和专利申请中的每一个的全部内容通过引用并入本文。免疫调节化合物不包括沙利度胺。

[0212] 在某些实施方式中,所述免疫调节化合物是苯并环中被氨基取代的1-氧代-和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吲哚啉,如美国专利第5,635,517号中所描述,该专利通过引用以其全部内容并入本文。这些化合物具有结构I:



[0214] 其中X和Y中的一个为C=O,X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>,并且R<sup>2</sup>为氢或低级烷基,特别是甲基。具体的免疫调节化合物包括但不限于:

[0215] 1-氧代-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-4-氨基异吲哚啉;

[0216] 1-氧代-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-5-氨基异吲哚啉;

[0217] 1-氧代-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-6-氨基异吲哚啉;

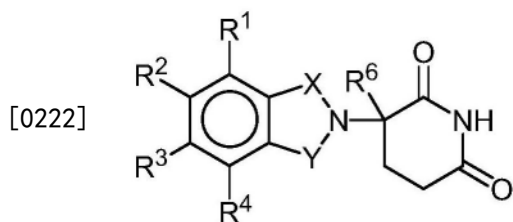
[0218] 1-氧代-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-7-氨基异吲哚啉;

[0219] 1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-4-氨基异吲哚啉;和

[0220] 1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-5-氨基异吲哚啉。

[0221] 其它具体的免疫调节化合物属于一类取代的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-氧代异吲哚啉,例如在美国专利第6,281,230、

6,316,471、6,335,349和6,476,052号和WO 98/03502中所描述的那些,所述专利中的每一个通过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物:



[0223] 其中:

[0224] X和Y中的一个为C=O,而X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>;

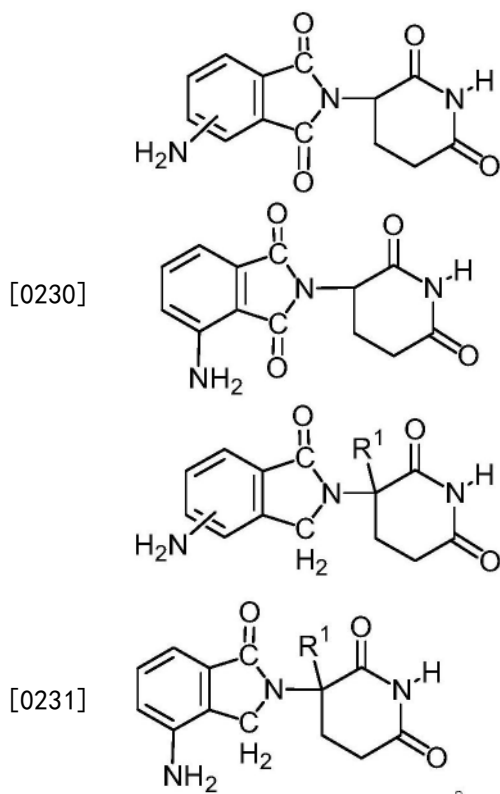
[0225] (i) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基,或(ii) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的一个为-NHR<sup>5</sup>并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中其余的为氢;

[0226] R<sup>5</sup>为氢或1至8个碳原子的烷基;

[0227] R<sup>6</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基、苄基或卤代;

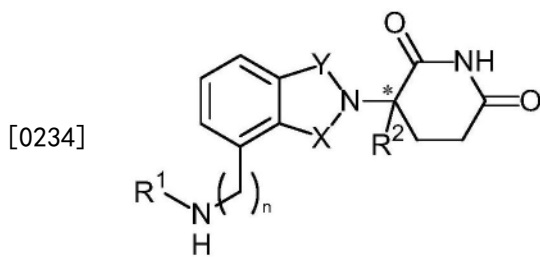
[0228] 前提条件是R<sup>6</sup>不为氢,如果X和Y为C=O的话,并且(i) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个为氟,或者(ii) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中的一个为氨基。

[0229] 这一类中代表性的化合物为下式的化合物:



[0232] 其中R<sup>1</sup>为氢或甲基。在一个单独的实施方式中,所涵盖的是这些化合物的对映异构体纯形式(例如,光学纯的(R)或(S)对映异构体)的用途。

[0233] 再一些具体的免疫调节化合物属于在美国专利申请公布号US 2003/0096841和US 2003/0045552,和WO 02/059106中所公开的一类异唑啉-酰亚胺类,所述专利申请中的每一个通过引用并入本文。代表性的化合物是式II的化合物:



[0235] 及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、笼形包合物(cathrate)、对映异构体、非对映异构体、外消旋体和立体异构体混合物,其中:

[0236] X和Y中的一个为C=O,而另一个为CH<sub>2</sub>或C=O;

[0237] R<sup>1</sup>为H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 杂环烷基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基、C(O)R<sup>3</sup>、C(S)R<sup>3</sup>、C(O)OR<sup>4</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-C(O)OR<sup>5</sup>、C(O)NHR<sup>3</sup>、C(S)NHR<sup>3</sup>、C(O)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup>、C(S)NR<sup>3</sup>R<sup>3'</sup>或(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-O(CO)R<sup>5</sup>;

[0238] R<sup>2</sup>为H、F、苄基、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基或(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基;

[0239] R<sup>3</sup>和R<sup>3'</sup>独立地为(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 杂环烷基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-C(O)OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-O(CO)R<sup>5</sup>或C(O)OR<sup>5</sup>;

[0240] R<sup>4</sup>为(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-OR<sup>5</sup>、苄基、芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 杂环烷基或(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基;

[0241] R<sup>5</sup>为(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基或(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基;

[0242] R<sup>6</sup>的每次出现独立地为H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基、(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基或(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-C(O)O-R<sup>5</sup>,或者这些R<sup>6</sup>基团可以连接在一起形成杂环烷基基团;

[0243] n为0或1;和

[0244] \*代表手性碳中心。

[0245] 在具体的式II的化合物中,当n为0时,那么R<sup>1</sup>为(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 杂环烷基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基、C(O)R<sup>3</sup>、C(O)OR<sup>4</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-C(O)OR<sup>5</sup>、C(S)NHR<sup>3</sup>或(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-O(CO)R<sup>5</sup>;

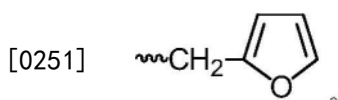
[0246] R<sup>2</sup>为H或(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基;和

[0247] R<sup>3</sup>为(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>) 环烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) 炔基、苄基、芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 杂环烷基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>) 杂芳基、(C<sub>5</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>; (C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-NH-C(O)O-R<sup>5</sup>; (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-C(O)OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基-O(CO)R<sup>5</sup>或C(O)OR<sup>5</sup>;而其它的变量具有相同的定义。

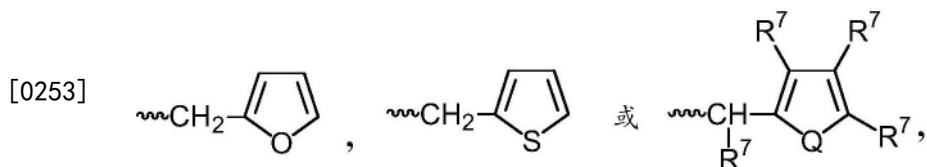
[0248] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>2</sup>为H或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 烷基。

[0249] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>1</sup>为(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基或苄基。

[0250] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>1</sup>为H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基、苄基、CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>或



[0252] 在式II的化合物的另一个实施方式中,R<sup>1</sup>为



[0254] 其中Q为O或S,并且R<sup>7</sup>的每次出现独立地为H、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基、(C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)环烷基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)烯基、(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>)炔基、苄基、芳基、卤素、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)杂环烷基、(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)杂芳基、(C<sub>0</sub>-C<sub>8</sub>)烷基-N(R<sup>6</sup>)<sub>2</sub>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基-OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基-C(O)OR<sup>5</sup>、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基-O(CO)R<sup>5</sup>或C(O)OR<sup>5</sup>,或者相邻出现的R<sup>7</sup>可以结合在一起形成二环烷基或芳基环。

[0255] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>1</sup>为C(O)R<sup>3</sup>。

[0256] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>3</sup>为(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)烷基-(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)杂芳基、(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)烷基、芳基或(C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)烷基-OR<sup>5</sup>。

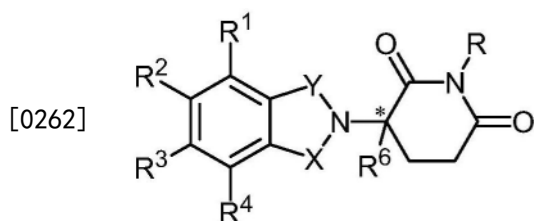
[0257] 在其它具体的式II的化合物中,杂芳基为吡啶基、呋喃基或噻吩基。

[0258] 在其它具体的式II的化合物中,R<sup>1</sup>为C(O)OR<sup>4</sup>。

[0259] 在其它具体的式II的化合物中,C(O)NHC(O)中的H可以被(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基、芳基或苄基置换。

[0260] 在这一类中该化合物的更多实例包括但不限于:[2-(2,6-二氧代-哌啶-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吡啶-4-基甲基]-酰胺;2-(2,6-二氧代-哌啶-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吡啶-4-基甲基)-氨基甲酸叔丁酯;4-(氨基甲基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-异吡啶啉-1,3-二酮;N-(2-(2,6-二氧代-哌啶-3-基)-1,3-二氧代-2,3-二氢-1H-异吡啶-4-基甲基)-乙酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}环丙基-甲酰胺;2-氯-N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}乙酰胺;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)-3-吡啶基甲酰胺;3-{1-氧代-4-(苄基氨基)异吡啶啉-2-基}哌啶-2,6-二酮;2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-4-(苄基氨基)异吡啶啉-1,3-二酮;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}丙酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}-3-吡啶基甲酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}庚酰胺;N-{(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)甲基}-2-呋喃基甲酰胺;乙酸{N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)氨基甲酰基}甲基酯;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)戊酰胺;N-(2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基)-2-噻吩基甲酰胺;N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基]甲基}(丁基氨基)甲酰胺;N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基]甲基}(辛基氨基)甲酰胺;和N-{[2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-1,3-二氧代异吡啶啉-4-基]甲基}(苄基氨基)甲酰胺。

[0261] 再一些具体的免疫调节化合物属于在美国专利申请公布号2002/0045643、国际公布号W0 98/54170和美国专利号6,395,754中所公开的一类异吡啶-酰亚胺类,所述文献的每一个通过引用并入本文。代表性的化合物是式III的化合物:



III

[0263] 及其药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、笼形包合物、对映异构体、非对映异构体、外消旋体和立体异构体混合物,其中:

[0264] X和Y中的一个为C=O,而另一个为CH<sub>2</sub>或C=O;

[0265] R为H或CH<sub>2</sub>OCOR';

[0266] (i) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基,或者(ii) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中的一个为硝基或-NHR<sup>5</sup>并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中其余的为氢;

[0267] R<sup>5</sup>为氢或1至8个碳的烷基;

[0268] R<sup>6</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基、苯并、氯代或氟代;

[0269] R' 为R<sup>7</sup>-CHR<sup>10</sup>-N(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);

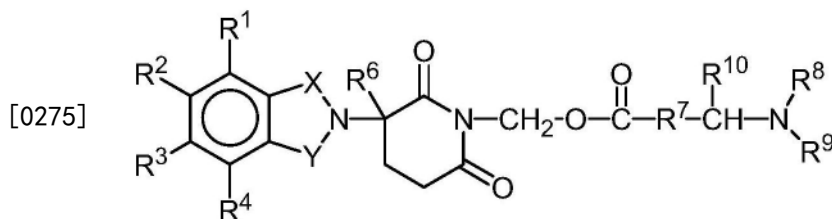
[0270] R<sup>7</sup>为m-亚苯基或p-亚苯基或-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-,其中n的值为0至4;

[0271] R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>中的每一个彼此独立地为氢或1至8个碳原子的烷基,或者R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>结合在一起为四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基或-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sub>1</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,其中X<sub>1</sub>为-O-、-S-或-NH-;

[0272] R<sup>10</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基或苯基;和

[0273] \*代表手性碳中心。

[0274] 其它代表性的化合物为下式的化合物:



[0276] 其中:

[0277] X和Y中的一个为C=O,而X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>;

[0278] (i) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>或R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基,或者(ii) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的一个为-NHR<sup>5</sup>并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中其余的为氢;

[0279] R<sup>5</sup>为氢或1至8个碳原子的烷基;

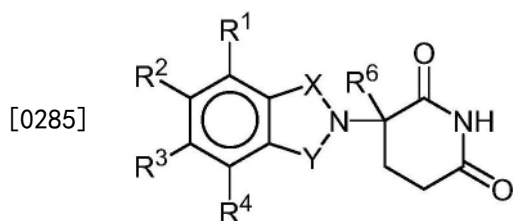
[0280] R<sup>6</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基、苯并、氯代或氟代;

[0281] R<sup>7</sup>为m-亚苯基或p-亚苯基或-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-,其中n的值为0至4;

[0282] R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>中的每一个彼此独立地为氢或1至8个碳原子的烷基,或者R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>结合在一起为四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基或-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,其中X<sup>1</sup>为-O-、-S-或-NH-;

[0283] R<sup>10</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基或苯基。

[0284] 其它代表性的化合物为下式的化合物:



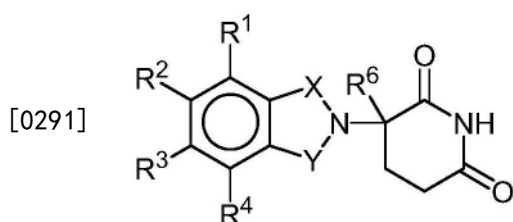
[0286] 其中

[0287] X和Y中的一个为C=O,而X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>;

[0288] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基,或者(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的一个为硝基或被保护的氨基并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中其余的为氢;和

[0289] R<sup>6</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基、苄基、氯代或氟代。

[0290] 其它代表性的化合物为下式的化合物:



[0292] 其中:

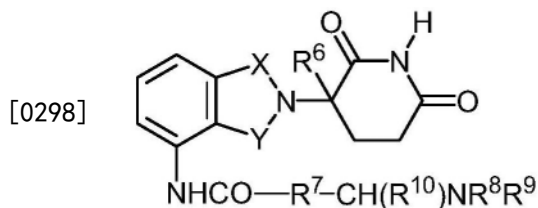
[0293] X和Y中的一个为C=O,而X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>;

[0294] (i) R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基,或者(ii)R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的一个为-NHR<sup>5</sup>并且R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中其余的为氢;

[0295] R<sup>5</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基或CO-R<sup>7</sup>-CH(R<sup>10</sup>)NR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>,其中R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>和R<sup>10</sup>中的每一个如本文中所定义;和

[0296] R<sup>6</sup>为1至8个碳原子的烷基、苄基、氯代或氟代。

[0297] 该化合物的具体实例为下式的化合物:



[0299] 其中:

[0300] X和Y中的一个为C=O,而X和Y中的另一个为C=O或CH<sub>2</sub>;

[0301] R<sup>6</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基、苄基、氯代或氟代;

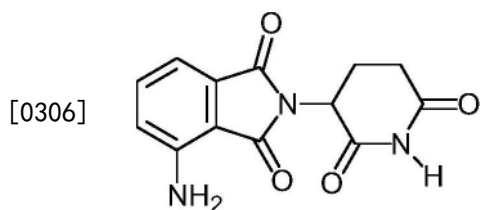
[0302] R<sup>7</sup>为m-亚苯基、p-亚苯基或-(C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>)-,其中n的值为0至4;

[0303] R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>中的每一个彼此独立地为氢或1至8个碳原子的烷基,或者R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>结合在一起为四亚甲基、五亚甲基、六亚甲基或-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>1</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-,其中X<sup>1</sup>为-O-、-S-或-NH-;和

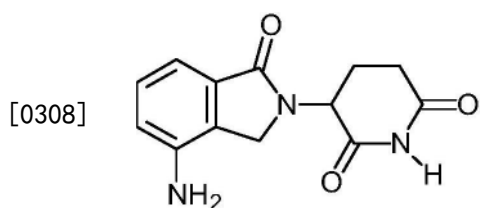
[0304] R<sup>10</sup>为氢、1至8个碳原子的烷基或苯基。

[0305] 最优的免疫调节化合物是4-(氨基)-2-(2,6-二氧代(3-哌啶基))-异吡啶-1,3-二酮和3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吡啶-2-基)-哌啶-2,6-二酮。该化合物可以通过

标准合成方法获得(参见,例如美国专利第5,635,517号,其通过引用并入本文)。该化合物可购自Celgene Corporation,Warren,NJ。4-(氨基)-2-(2,6-二氧化(3-哌啶基))-异吲哚啉-1,3-二酮具有以下化学结构:



[0307] 化合物3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮具有以下化学结构:



[0309] 在另一个实施方式中,具体的免疫调节化合物涵盖3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的多晶型形式,例如形式A、B、C、D、E、F、G和H,其公开于美国公布号US 2005/0096351 A1,通过引用并入本文。例如,3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式A是未溶剂化的结晶材料,可获自非水性溶剂体系。形式A的X-射线粉末衍射图案在近似8、14.5、16、17.5、20.5、24和26度 $2\theta$ 处包含有显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约270℃。形式A为弱吸湿或不吸湿的并且似乎是迄今被发现的3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的热力学上最稳定的无水多晶型物。

[0310] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式B是半水合的结晶材料,可获自各种溶剂体系,包括但不限于己烷、甲苯和水。形式B的X-射线粉末衍射图案在近似16、18、22和27度 $2\theta$ 处包含显著峰,并且其来自DSC曲线的吸热为约146℃和268℃,其通过高温显微镜术实验被鉴定为脱水和熔化。相互转化研究显示形式B在水性溶剂体系中转化成形式E并且在丙酮和其它无水体系中转化成其它形式。

[0311] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式C是半溶剂化的结晶材料,可获自例如但不限于丙酮的溶剂。形式C的X-射线粉末衍射图案在近似15.5和25度 $2\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约269℃。形式C在约85% RH以下是不吸湿的,但是可在较高相对湿度下转化成形式B。

[0312] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式D是由乙腈和水的混合物制备的结晶、溶剂化多晶型物。形式D的X-射线粉末衍射图案在近似27和28度 $2\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约270℃。形式D是弱吸湿或不吸湿的,但是当在较高相对湿度下受压时将典型地转化成形式B。

[0313] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式E是二水合的结晶材料,可通过将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且通过将3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮在丙酮:水的比率约9:1的溶剂体系中慢慢蒸发来获得。形式E的X-射线粉末衍射图案在近似20、24.5和29



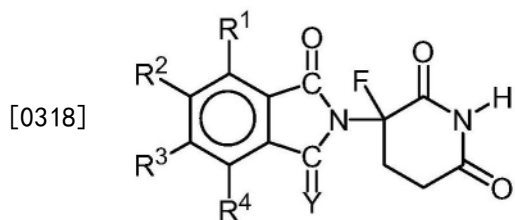
度2 $\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约269℃。形式E可在丙酮溶剂体系中转化成形式C并且在THF溶剂体系中转化成形式G。在水性溶剂体系中,形式E似乎是最稳定的形式。在形式E上进行的解溶剂化实验显示当在约125℃下加热约五分钟时,形式E可转化成形式B。当在175℃下加热约五分钟时,形式B可转化成形式F。

[0314] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式F是未溶剂化的结晶材料,可获自形式E的脱水。形式F的X-射线粉末衍射图案在近似19、19.5和25度2 $\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约269℃。

[0315] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式G是未溶剂化的结晶材料,可通过将形式B和E在例如但不限于四氢呋喃(THF)的溶剂中制浆来获得。形式G的X-射线粉末衍射图案在近似21、23和24.5度2 $\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约267℃。

[0316] 3-(4-氨基-1-氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基)-哌啶-2,6-二酮的形式H是部分水合的(约0.25mol)结晶材料,其可通过将形式E暴露于0%相对湿度来获得。形式H的X-射线粉末衍射图案在近似15、26和31度2 $\theta$ 处包含显著峰,并且其差示扫描量热法熔化温度最大值为约269℃。

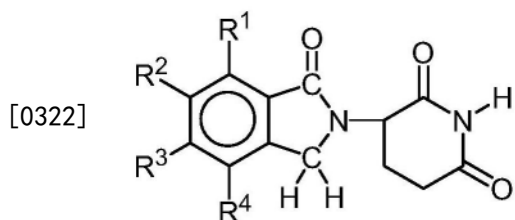
[0317] 在本文提供的方法中可使用的其它具体的免疫调节化合物包括但不限于1-氧代-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化-3-氟哌啶-3-基)异吲哚啉,例如在美国专利第5,874,448和5,955,476号中所描述的那些,所述专利中的每一个通过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物:



[0319] 其中Y为氧或H<sup>2</sup>,和

[0320] R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为氢、卤代、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基或氨基。

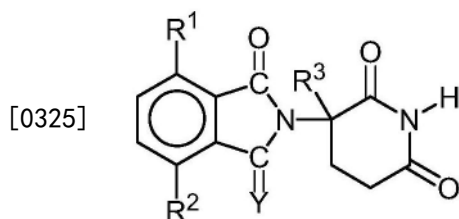
[0321] 在本文提供的方法中可使用的其它具体的免疫调节化合物包括但不限于四取代的2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)-1-氧代异吲哚啉,其描述于美国专利第5,798,368号,通过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物:



[0323] 其中R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>中的每一个彼此独立地为卤代、1至4个碳原子的烷基或1至4个碳原子的烷氧基。

[0324] 在本文提供的方法中可使用的其它具体的免疫调节化合物包括但不限于1-氧代和1,3-二氧化-2-(2,6-二氧化哌啶-3-基)异吲哚啉,其公开于美国专利第6,403,613号,通

过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物：



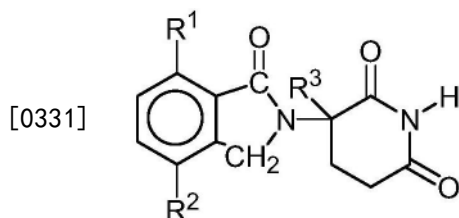
[0326] 其中

[0327] Y为氧或H<sub>2</sub>，

[0328] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第一个为卤代、烷基、烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第二个，独立于第一个，为氢、卤代、烷基、烷氧基、烷基氨基、二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，和

[0329] R<sup>3</sup>为氢、烷基或苄基。

[0330] 该化合物的具体实例为下式的化合物：

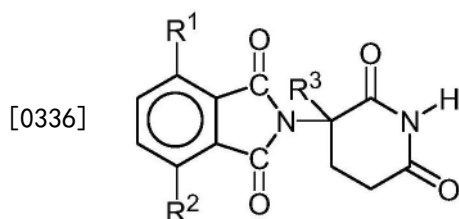


[0332] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第一个为卤代、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基、其中每一个烷基都为1至4个碳原子的二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，

[0333] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第二个，独立于第一个，为氢、卤代、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基、其中烷基为1至4个碳原子的烷基氨基、其中每一个烷基都为1至4个碳原子的二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，和

[0334] R<sup>3</sup>为氢、1至4个碳原子的烷基或苄基。具体的实例包括但不限于1-氧代-2-(2,6-二氧代哌啶-3-基)-4-甲基异吲哚啉。

[0335] 在本文提供的方法中可使用的其它化合物为下式的化合物：



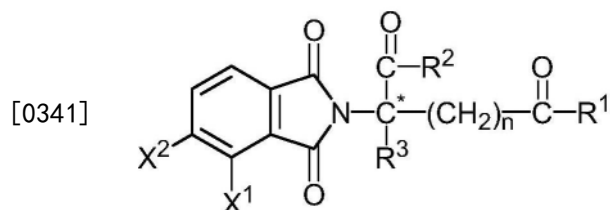
[0337] 其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第一个为卤代、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基、其中每一个烷基都为1至4个碳原子的二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，

[0338] R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的第二个，独立于第一个，为氢、卤代、1至4个碳原子的烷基、1至4个碳原子的烷氧基、其中烷基为1至4个碳原子的烷基氨基、其中每一个烷基都为1至4个碳原子的二烷基氨基、氰基或氨基甲酰基，和

[0339] R<sup>3</sup>为氢、1至4个碳原子的烷基或苄基。

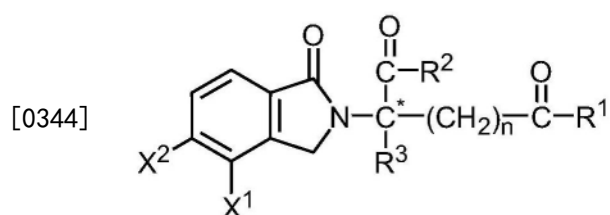
[0340] 在本文提供的方法中可使用的其它具体的免疫调节化合物包括但不限于在吲哚啉环的4-或5-位上取代的1-氧代和1,3-二氧代异吲哚啉，其描述于美国专利第6,380,239

号和美国申请公布号2006/0084815,通过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物:



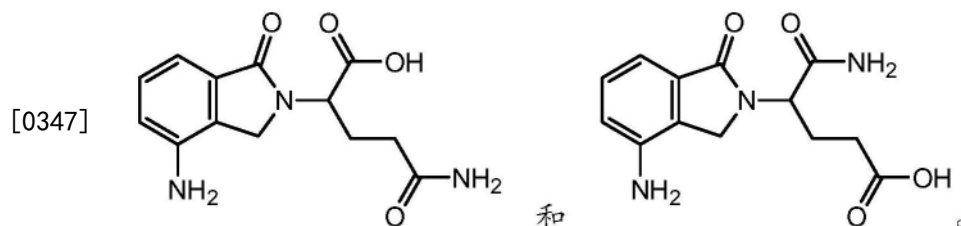
[0342] 其中标注为C\*的碳原子构成手性的中心(当n不为零并且R<sup>1</sup>与R<sup>2</sup>不相同);X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>中的一个为氨基、硝基、1至6个碳的烷基或NH-Z,而X<sup>1</sup>或X<sup>2</sup>中的另一个为氢;R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的每一个彼此独立地为羟基或NH-Z;R<sup>3</sup>为氢、1至6个碳的烷基、卤代或卤代烷基;Z为氢、芳基、1至6个碳的烷基、甲酰基或1至6个碳的酰基;且n的值为0、1或2;前提条件是如果X<sup>1</sup>为氨基,且n为1或2,那么R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>不同时为羟基;和其盐。

[0343] 在本文提供的方法中可使用的更多化合物为下式的化合物:

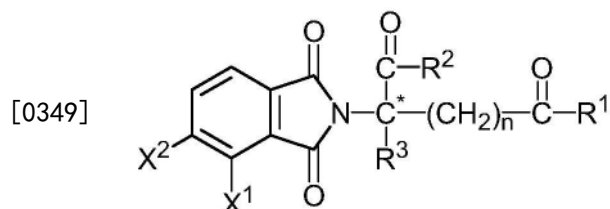


[0345] 其中标注为C\*的碳原子构成手性的中心,当n不为零并且R<sup>1</sup>不为R<sup>2</sup>时;X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>中的一个为氨基、硝基、1至6个碳的烷基或NH-Z,而X<sup>1</sup>或X<sup>2</sup>中的另一个为氢;R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的每一个彼此独立地为羟基或NH-Z;R<sup>3</sup>为1至6个碳的烷基、卤代或氢;Z为氢、芳基或1至6个碳的烷基或酰基;且n的值为0、1或2。

[0346] 在本文提供的方法中可使用的化合物的具体实例包括但不限于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(cabamoyl)-丁酸,其分别具有以下结构;及其药学上可接受的盐、溶剂化物、前药和立体异构体:

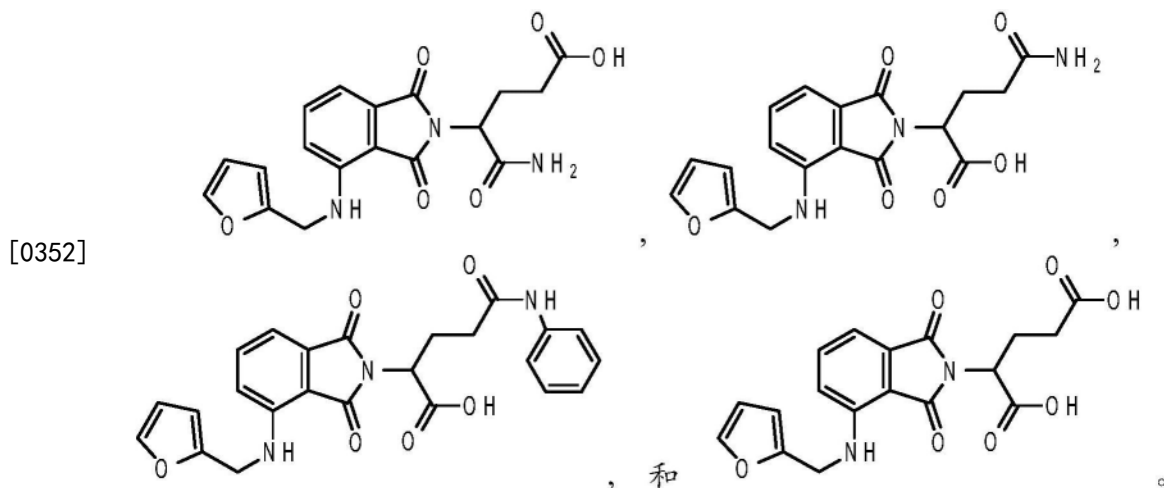


[0348] 其它代表性的化合物为下式的化合物:

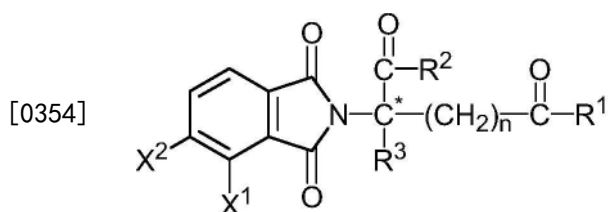


[0350] 其中标注为C\*的碳原子构成手性的中心,当n不为零并且R<sup>1</sup>不为R<sup>2</sup>时;X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>中的一个为氨基、硝基、1至6个碳的烷基或NH-Z,而X<sup>1</sup>或X<sup>2</sup>中的另一个为氢;R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>中的每一个彼此独立地为羟基或NH-Z;R<sup>3</sup>为1至6个碳的烷基、卤代或氢;Z为氢、芳基或1至6个碳的烷基或酰基;且n的值为0、1或2;和其盐。

[0351] 具体的实例包括但不限于4-氨基甲酰基-4-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧代-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]-1,3-二氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-丁酸、2-{4-[(呋喃-2-基-甲基)-氨基]-1,3-二氧代-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]-1,3-二氧代-1,3-二氢-异吲哚-2-基}-戊二酸,其分别具有以下结构;及其药学上可接受的盐、溶剂化物、前药和立体异构体:



[0353] 该化合物的其它具体实例为下式的化合物:



[0355] 其中 $X^1$ 和 $X^2$ 中的一个为硝基或NH-Z,而 $X^1$ 或 $X^2$ 中的另一个为氢;

[0356]  $R^1$ 和 $R^2$ 中的每一个彼此独立地为羟基或NH-Z;

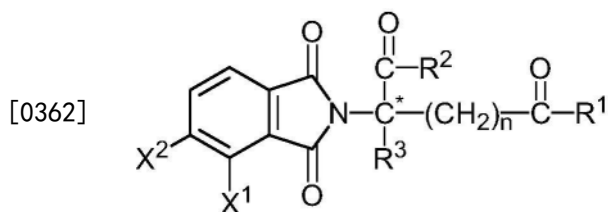
[0357]  $R^3$ 为1至6个碳的烷基、卤代或氢;

[0358] Z为氢、苯基、1至6个碳的酰基或1至6个碳的烷基;和

[0359] n的值为0、1或2;

[0360] 前提条件是如果 $X^1$ 和 $X^2$ 中的一个为硝基,且n为1或2,那么 $R^1$ 和 $R^2$ 不为羟基;和

[0361] 如果 $-COR^2$ 和 $-(CH_2)_nCOR^1$ 不同,那么标注为 $C^*$ 的碳原子构成手性的中心。其它代表性的化合物为下式的化合物:



[0363] 其中 $X^1$ 和 $X^2$ 中的一个为1至6个碳的烷基;

[0364]  $R^1$ 和 $R^2$ 中的每一个彼此独立地为羟基或NH-Z;

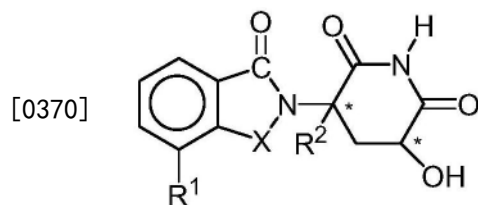
[0365]  $R^3$ 为1至6个碳的烷基、卤代或氢;

[0366] Z为氢、苯基、1至6个碳的酰基或1至6个碳的烷基;和

[0367] n的值为0、1或2;和

[0368] 如果 $-\text{COR}^2$ 和 $-(\text{CH}_2)_n\text{COR}^1$ 不同,那么标注为 $\text{C}^*$ 的碳原子构成手性的中心。

[0369] 再一些具体的免疫调节化合物包括但不限于在2-位上被2,6-二氧化-3-羟基哌啶-5-基取代的异吲哚啉-1-酮和异吲哚啉-1,3-二酮,其描述于美国专利第6,458,810号,通过引用并入本文。代表性的化合物为下式的化合物:



[0371] 其中:

[0372] 标有\*的碳原子构成手性的中心;

[0373] X为 $-\text{C}(\text{O})-$ 或 $-\text{CH}_2-$ ;

[0374]  $\text{R}^1$ 为1至8个碳原子的烷基或 $-\text{NHR}^3$ ;

[0375]  $\text{R}^2$ 为氢、1至8个碳原子的烷基或卤素;和

[0376]  $\text{R}^3$ 为氢,

[0377] 1至8个碳原子的烷基,未取代的或被1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代,

[0378] 3至18个碳原子的环烷基,

[0379] 苯基,未取代的或被1至8个碳原子的烷基、1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代,

[0380] 苄基,未取代的或被1至8个碳原子的烷基、1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代,或 $-\text{COR}^4$ ,其中

[0381]  $\text{R}^4$ 为氢,

[0382] 1至8个碳原子的烷基,未取代的或被1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代,

[0383] 3至18个碳原子的环烷基,

[0384] 苯基,未取代的或被1至8个碳原子的烷基、1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代,或

[0385] 苄基,未取代的或被1至8个碳原子的烷基、1至8个碳原子的烷氧基、卤代、氨基或1至4个碳原子的烷基氨基取代。

[0386] 本文提供的化合物可以商购或按照本文公开的专利或专利公开中所描述的方法制备。进一步,光学纯的化合物可以进行不对称合成或使用已知的拆分剂或手性柱以及其它标准合成有机化学技术来解析。

[0387] 各种免疫调节化合物含有一个或多个手性中心,并且可以作为外消旋的对映异构体混合物或非对映异构体混合物存在。所涵盖的是这样的化合物的立体异构体纯的形式的使用以及那些形式的混合物的用途。例如,在本文提供的方法和组合物中可使用包含特定免疫调节化合物的相等或不相等量的对映异构体的混合物。这些异构体可以进行不对称合成或使用标准技术(例如,手性柱或手性拆分剂)来解析。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)。

[0388] 应该注意的是, 如果在所描绘的结构和给定该结构的名称之间存在不一致, 那么所描绘的结构占更多的权重。另外, 如果结构或结构部分的立体化学没有用例如粗体或短划线标出, 那么该结构或结构部分被理解为涵盖了它的所有立体异构体。

#### [0389] 5.9. PINK细胞、人胎盘灌洗液或组合的自然杀伤细胞的给药

[0390] 可以通过本领域已知的适合于活细胞给药的任何医学上可接受的途径将所述PINK细胞、人胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞、包含这样的细胞的细胞群体或其组合给予个体, 例如具有肿瘤细胞的个体, 例如癌症患者。在各种不同的实施方式中, 本文提供的细胞可实施手术植入、注射、输注, 例如通过导管或注射器或其它方式直接或间接给予需要修复或强化的部位。在一个实施方式中, 所述细胞经静脉内给予个体。在另一个实施方式中, 所述细胞给予至个体的肿瘤(例如, 实体肿瘤)部位。在其中所述个体在超过一个部位患有肿瘤的一个具体的实施方式中, 将所述细胞给予至至少两个或所有肿瘤部位。在某些其它实施方式中, 本文提供的细胞或包含所述细胞的组合物经口服、经鼻、动脉内、胃肠外、经眼、肌内、皮下、腹膜内、大脑内、心室内、脑室内、鞘内、脑池内、脊柱内和/或脊柱周给予。在某些具体的实施方式中, 所述细胞通过颅内或椎管内针和/或导管(有或无泵装置)递送。

[0391] 所述PINK细胞、人胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞或其组合或包含这样的细胞的细胞群体可以在包含所述细胞的组合物(例如, 基质、水凝胶、支架等)中给予至个体。

[0392] 在一个实施方式中, 将本文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的羊膜; 固定或热处理的羊膜、基本上干燥的(即,  $<20\% \text{H}_2\text{O}$ )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, 等等。可在其上接种胎盘干细胞的优选的胎盘生物材料描述于Hariri的美国专利申请公布号2004/0048796, 其公开内容通过引用以其全部内容并入本文。

[0393] 在另一个实施方式中, 将所述PINK细胞、人胎盘灌洗液细胞、组合的自然杀伤细胞或其组合或包含这样的细胞的细胞群体悬浮于适合于例如注射的水凝胶溶液中。用于此类组合物的合适的水凝胶包括自组装的肽, 例如RAD16。在一个实施方式中, 可允许包含所述细胞的水凝胶溶液硬化, 例如在模子中, 以形成细胞分散在其中的基质供植入用。这样的基质中的细胞也可进行培养使得细胞在植入之前经过有丝分裂扩增。所述水凝胶可以是例如有机聚合物(天然或合成), 其通过共价键、离子键或氢键交联以产生三维开放晶格(open-lattice)结构, 该结构捕获水分子以形成凝胶。形成水凝胶的材料包括多糖例如海藻酸及其盐、肽、聚膦腈和聚丙烯酸酯(其是离子交联的), 或嵌段聚合物例如聚环氧乙烷-聚丙二醇嵌段共聚物(其分别是通过温度或pH交联的)。在有些实施方式中, 本发明的水凝胶或基质为生物可降解的。

[0394] 在本发明的有些实施方式中, 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)。

[0395] 在有些实施方式中,所述聚合物在水溶液(例如,水)、缓冲盐溶液或水醇溶液中至少部分溶解,其具有带电荷的侧基,或其一价离子盐。具有可与阳离子反应的酸性侧基的聚合物的实例是聚(磷腈)、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)和磺酸化聚合物,例如磺酸化聚苯乙烯。也可以使用由丙烯酸或甲基丙烯酸和乙烯基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团、磺酸基团、卤化(优选氟化)醇基团、酚OH基团和酸性OH基团。

[0396] 可以将本发明的胎盘干细胞或其共培养物接种在三维构架(framework)或支架(scaffold)上并且植入体内。这样的构架可以结合刺激组织形成或另外增强或改进本发明实践的任何一种或多种生长因子、细胞、药物或其它组分进行植入。

[0397] 在本发明中可使用的支架的实例包括非织毡、多孔泡沫或自组装肽。非织毡可使用由合成的可吸收的乙醇酸和乳酸共聚物(例如,PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Somerville, N.J.) 组成的纤维来形成。也可以使用通过例如冷冻-干燥或冻干法等工艺形成的由例如聚( $\epsilon$ -己内酯)/聚(乙醇酸) (PCL/PGA) 共聚物组成的泡沫作为支架(参见,例如美国专利第6,355,699号)。

[0398] 本发明的胎盘干细胞也可以接种在生理学上可接受的陶瓷材料包括但不限于磷酸一、二、三、 $\alpha$ -三、 $\beta$ -三和四-钙、羟基磷灰石、氟磷灰石、硫酸钙、氟化钙、氧化钙、碳酸钙、磷酸镁钙、生物活性玻璃(例如, BIOGLASS<sup>®</sup>) 及其混合物上,或者与它们接触。目前商购的多孔生物相容性陶瓷材料包括 SURGIBONE<sup>®</sup> (CanMedica Corp., Canada)、ENDO BON<sup>®</sup> (Merck Biomaterial France, France)、CEROS<sup>®</sup> (Mathys, AG, Bettlach, Switzerland) 和矿物化胶原骨移植产品例如 HEALOS<sup>™</sup> (DePuy, Inc., Raynham, MA) 和 VITOSS<sup>®</sup>、RHAKOSS<sup>™</sup> 和 CORTOSS<sup>®</sup> (Orthovita, Malvern, Pa.)。所述构架可以是天然和/或合成材料的混合物、掺混物或复合材料。

[0399] 在另一个实施方式中,可以将胎盘干细胞接种在例如可由复丝纱组成的毛毡或透明质酸上或与其接触,所述复丝纱由生物可吸收材料(例如,PGA、PLA、PCL共聚物或掺混物)制成。

[0400] 在另一个实施方式中,可以将本发明的胎盘干细胞接种在可为复合结构的泡沫支架上。这样的泡沫支架可以模制成有用的形状,例如待修复、置换或强化的身体内特异结构的一部分的形状。在有些实施方式中,所述构架在接种本发明的细胞之前例如用0.1M乙酸处理,然后在聚赖氨酸、PBS和/或胶原中孵育,以便增强细胞附着。基质的外表面可以改性以改善细胞附着或生长及组织分化,例如通过血浆包被的基质或者添加一种或多种蛋白质(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、4-硫酸软骨素、6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素等)、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)。

[0401] 在有些实施方式中,所述支架包含使其为非血栓生成的材料或者用使其为非血栓生成的材料处理。这些处理和材料也可以促进和支撑内皮生长、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(如EPTFE)和链段聚氨酯脲硅酮(如PURSPAN<sup>™</sup>) (The Polymer Technology

Group, Inc., Berkeley, Calif.)。所述支架也可包含抗血栓剂(如肝素);所述支架也可以进行处理以在用胎盘干细胞接种之前改变表面电荷(例如,用血浆包被)。

## 6. 实施例

### [0402] 6.1. 实施例1

[0403] 本实施例证明来自人胎盘灌洗液和脐带血的自然杀伤细胞的分离、培养和表征。

[0404] 自然杀伤细胞的分离。使用CD56-缀合的微珠从8单位的人胎盘灌洗液(HPP)和从4单位的脐带血(UCB,在本文中也称为“CB”)中分离出自然杀伤细胞。通过磁珠选择(Miltenyi Biotec)进行分离。将分娩后的胎盘放血并且用约200mL至约750mL的灌洗溶液(0.9%NaCl注射溶液USP Grade(目录号68200-804,VWR)灌洗。收集未加工的灌洗液并且进行加工以去除红细胞。来自HPP或UCB的单核细胞用荧光激活细胞分选(FACS)缓冲液(RPMI 1640,无酚红,加5%FBS)洗涤一次,然后在1500rpm下离心6分钟。对细胞数进行计数,将细胞沉淀重悬浮于含有20μL的CD3微珠(目录号130-050-101,Miltenyi)的80μL缓冲液(每 $10^7$ 个总细胞)中。将该系统充分混合并在4-8℃下孵育15分钟。每 $10^7$ 个总细胞加入1-2mL缓冲液,然后将混合物在300g下离心10分钟。用移液管完全吸出上清液。将细胞沉淀在500μL缓冲液中重悬浮至至多 $10^8$ 个细胞并且准备用于磁性分离。将LS柱(Miltenyi Biotec)置于MIDIMACS™细胞分离器(Miltenyi Biotec)的磁场中,使用3mL缓冲液漂洗该柱,再将细胞/微珠悬浮液应用于该柱。将通过该柱并且将包括自然杀伤细胞的未标记的CD3<sup>-</sup>细胞收集起来,共用2x3mL洗涤缓冲液。对CD3<sup>-</sup>细胞进行计数,洗涤一次,然后用CD56微珠(目录号#:130-050-401,Miltenyi)染色,并使用与以上描述的用于CD3微珠分离相同的方案进行分开/分离。如此收集CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>群体并准备好做进一步分析。自然杀伤细胞的百分比范围在HPP中为3.52至11.6(中位值6.04,平均值5.22)并且在UCB中为1.06至8.44(中位值:3.42,平均值:4.2)。来自HPP的自然杀伤细胞的CD56微珠选择产生近似80%纯的群体。参见图1。在全CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>自然杀伤细胞群体中,来自HPP的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞(即,PINK细胞)的百分比范围为56.6至87.2(中位值74.2,平均值65.5),并且来自UCB的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>自然杀伤细胞的百分比范围为53.7至96.6(中位值72.8)。来自HPP的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞的百分比范围为12.8至43.3(中位值25.8,平均值34.5),并且来自UCB的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>自然杀伤细胞的百分比范围为3.4至46.3(中位值27.3,平均值33.4)。

[0405] 在其它实验中,使用靶向人血液细胞上的细胞表面抗原(CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD123、HLA-DR、血型糖蛋白A)的磁性负选择试剂盒分离自然杀伤细胞。将HPP和UCB冷冻保存的单位融化并且用融化培养基(RPMI培养基1640(目录号#22400,Gibco)加上20%胎牛血清-热灭活(目录号#SH30070.03,Hyclone))以1:1进行稀释并且在1500rpm下离心8分钟。取出上清液,施加氯化铵处理以进一步耗尽红细胞;将各单位重悬浮于近似30mL的冰冷FACS缓冲液(RPMI 1640,无酚红,加5%FBS)中,然后加入60mL冰冷氯化铵(目录号#07850,Stem Cell),将溶液涡旋离心,然后在冰上孵育5分钟。然后单核细胞用FACS缓冲液洗涤3次,然后在1500rpm下离心8分钟。对细胞数进行计数,将细胞沉淀在RoboSep缓冲液(目录号#20104,Stem Cell)中以 $5 \times 10^7$ 个活细胞/ml重悬浮,向该细胞悬液加入0.1mg/mL DNAase I溶液(目录号#07900,Stem Cell),用吸液管轻柔混合并且在分离之前在室温下孵育15分钟。在进行到分离之前,通过用40μm目尼龙粗滤器(目录号#352340,



BD Falcon) 过滤去除细胞悬液中的团块。用人NK细胞富集试剂盒 (Human NK Cell Enrichment Kit) (目录号#19055, Stem Cell) (包括EasySep负选择人NK细胞富集混合物 (EasySep Negative Selection Human NK Cell Enrichment Cocktail) 和EasySep磁性微颗粒 (EasySep Magnetic Microparticles)), 通过装置RoboSep (目录号#20000, Stem Cell) 和程序“人NK负选择19055和高回收 (Human NK Negative Selection 19055 and high recovery)” (50 $\mu$ L/mL混合物 (cocktail) 添加, 100 $\mu$ L/mL微颗粒 (Microparticle) 添加, 10分钟和5分钟孵育, 1x 2.5分钟分离) 将分离自动化。如此收集CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>群体并且准备好做进一步分析。

[0406] 自然杀伤细胞的扩增。一般而言, 自然杀伤细胞扩增如下。基于在Yssel等人, J. Immunol. Methods 72 (1): 219-227 (1984) 和Litwin等人, J. Exp. Med. 178 (4): 1321-1326 (1993) 中所描述的方案的改进, 制备用于自然杀伤细胞培养的起始培养基。简而言之, 起始培养基包括IMDM (Invitrogen) 加上10% FCS (Hyclone), 还含有以下试剂及最终浓度: 35 $\mu$ g/mL转铁蛋白 (Sigma-Aldrich), 5 $\mu$ g/mL胰岛素 (Sigma-Aldrich), 2x 10<sup>-5</sup>M乙醇胺 (Sigma-Aldrich), 1 $\mu$ g/mL油酸 (Sigma-Aldrich), 1 $\mu$ g/mL亚油酸 (Sigma-Aldrich), 0.2 $\mu$ g/mL棕榈酸 (Sigma-Aldrich), 2.5 $\mu$ g/mL BSA (Sigma-Aldrich) 和0.1 $\mu$ g/mL植物凝集素 (PHA-P, Sigma-Aldrich)。将CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>NK细胞以2.5x10<sup>5</sup>个活细胞/mL起始培养基加上200U/mL IL-2 (R&D Systems) 在细胞培养物处理的24孔板或T烧瓶中重悬浮。同时向起始培养基中添加丝裂霉素C处理过的同种异体的PBMC和K562细胞 (慢性髓细胞白血病细胞系) 作为饲养细胞, 至最终浓度为1x10<sup>6</sup>/mL。将NK细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下培养5-6天。5-6天后并且然后每3-4天向培养物中加入等体积的维持培养基 (IMDM+10% FCS、2%人AB血清、抗生素、L-谷氨酰胺和400单位的IL-2/mL)。在第21天收获NK细胞。

[0407] 来自胎盘和脐带血的自然杀伤细胞的表征。将供体匹配的HPP和CB融化, 用FACS缓冲液 (RPMI-1640+5% FBS) 洗涤细胞。然后, 使用ROBOSEP<sup>®</sup> 磁性分离系统 (StemCell Technologies), 按照生产商的说明, 用CD56微珠富集自然杀伤细胞。经CD56富集的自然杀伤细胞群体用以下抗体 (BD Bioscience, 如果不另外指出的话) 染色用于免疫表型表征: 与PE-Cy-7缀合的抗CD56、抗CD3 APC Cy7、抗CD16 FITC、抗NKG2D APC、抗NKp46 APC、抗CD94 PE (R&D)、抗NKB1 PE和抗KIR-NKAT2 PE。CD94、NKG2D和NKp46是这样的标志物: 其在NK祖细胞中不存在或显示表达降低, 但在完全分化的NK细胞上存在。参见Freud等人, “Evidence for Discrete States of Human Natural Killer Cell Differentiation In Vivo (人自然杀伤细胞体内分化的分离状态的证据),” J. Exp. Med. 203 (4): 1033-1043 (2006); Eagle & Trowsdale, “Promiscuity and the Single Receptor: NKG2D (混杂及单一受体: NKG2D),” Nature Reviews Immunology 7, 737-744 (2007); Walzer等人, “Natural Killer Cells: From CD3<sup>-</sup>NKp46<sup>+</sup> to Post-Genomics Meta-Analyses,” Curr. Opin. Immunol. 19: 365-372 (2007)。如表1所示, KIR3DL1、KIR2DL2/L3、NKG2D和CD94 (和NKp46; 数据未显示) 的表达在来自HPP的富集的CD56<sup>+</sup>细胞群体和来自脐带血 (CB) 的HLA-匹配的CD56<sup>+</sup>细胞群体之间没有显著性差异。

[0408] 表1. 带有某些标志物组合的NK细胞的百分比。3个样品的平均值。

[0409]

	平均(%)		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

[0410] 6.2. 实施例2

[0411] 将脐带血和胎盘灌洗液(组合)的供体匹配的单有核细胞混合并且用FACS缓冲液(RPMI-1640+5%FBS)洗涤一次并且使用表2中所列举的抗体在BD FACSCanto (BD Biosciences)上进行免疫表型表征。通过FlowJo软件(Tree Star)对数据进行分析。

[0412] 表2:免疫表型表征中使用的抗体一览表。

[0413]

品名	供应商	编号
FITC 抗-hu CD3	BD Bioscience	555332
FITC 抗-hu CD3	Miltenyi	130-080-401
APC-Cy7 抗-hu CD3	BD Bioscience	557832
FITC 抗-hu CD 16	BD Bioscience	555406
PE-Cy5 anti-hu CD16	BD Bioscience	555408
PE 抗-hu CD56	BD Bioscience	555516
PE 抗-hu CD56	Miltenyi	130-090-755
PE-CY5 抗-hu CD56	BD Bioscience	555517
PE-Cy7 抗-hu CD56	BD Bioscience	557747
PE 抗-hu CD94	R&D	FAB-1058P
PE 抗-hu KIR-NKAT2 (2DL2/L3)	BD Bioscience	556071
PE 抗-hu NKB1(3DL1)	BD Bioscience	555967
APC 抗-hu NKG2D	BD Bioscience	558071
APC 抗-hu NKp46	BD Bioscience	558051
PE 抗-hu CD226	BD Bioscience	559789
PE 抗-hu NKp44	BD Bioscience	558563
PE 抗-hu NKp30	BD Bioscience	558407
PE 抗-hu 2B4	BD Bioscience	550816
同种型 FITC 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340755
同种型 FITC 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	556577
同种型 PE 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340761
同种型 PE 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	555743
同种型 PerCP 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340762

[0414]

同种型 PE-Cy5 小鼠 IgG2b	BD Bioscience	555744
同种型 APC 小鼠 IgG1	BD Bioscience	340754
同种型 APC 小鼠 IgG2a	BD Bioscience	555576
同种型 APC-Cy7 小鼠 IgG1	BD Bioscience	348802
同种型 PE-Cy7 小鼠 IgG1	BD Bioscience	348798

[0415] 胎盘NK细胞和外周血 (PB) NK细胞的免疫表型表征。可将NK细胞分成两个大组：CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞和CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>细胞。CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞具有大量的细胞溶解颗粒和CD16高表达，并因此能够引发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。相反地，CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>NK细胞具有极少的细胞溶解颗粒，CD16低表达或无表达，但是能够在活化时产生细胞因子和趋化因子。个别的NK细胞展示活化受体和抑制受体的多样性库 (diverse repertoire)，包括杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIRs，例如KIR3DL1和KIR2DL2/3)、天然细胞毒性受体NCRs (例如，NKp30、NKp44和NKp46)、杀伤细胞凝集素样受体 (KLRs；例如，CD94、NKG2D)、2B4和CD226。

[0416] 使用荧光缀合的抗特异性NK受体的单克隆抗体 (mAbs) 在胎盘 (组合) NK和外周血NK细胞上进行FACS分析。在表征的11个NK亚组 (subsets) 中，11个NK亚组中有七个 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/3<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>2B4<sup>+</sup>和CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD94<sup>+</sup>) 的细胞个数显示在胎盘NK和外周血NK细胞之间有显著性差异 (计算出64%差异) ( $p < 0.05$ ) (表3A；也参见表3B和表3C)。

[0417] 表3A. CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK细胞在16单位的组合的供体匹配的脐带血和人胎盘灌洗液 (组合) 和13单位的外周血 (PB) 中的表型表征。使用双样品 t-检验来确定群体平均值在胎盘和外周血单位中是否相等。

[0418]

表面标记物	组合(16 单位)	PB(13 单位)	
	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

[0419] 表3B和3C显示在独立的实验中，CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>和CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>NK细胞在16单位的组合的供体匹配的脐带血和人胎盘灌洗液 (组合) 和13单位的外周血 (PB) 中的表型表征。

[0420] 表3B.

[0421]

	组合	PB	
表面标志物	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

[0422] 表3C.

[0423]

	组合	PB	
表面标志物	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
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

[0424] 60.9%的胎盘NK细胞是CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (胎盘来源的中间体自然杀伤 (PINK) 细胞), 而仅仅21.4%的外周血NK细胞是CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>。在培育21天之后, 11个NK亚组中有四个 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>KIR2DL2/3<sup>+</sup>、CD3-CD56<sup>+</sup>NKp46<sup>+</sup>、CD3-CD56<sup>+</sup>NKp44<sup>+</sup>和CD3-CD56<sup>+</sup>NKp30<sup>+</sup>) 的百分比显示在胎盘NK细胞和外周血NK细胞之间有显著性差异 (p<0.05)。

[0425] 另外, 在独立的实验中, 经测定在培育21天之后, 胎盘NK细胞和外周血NK细胞证明独特的细胞因子分布型 (profiles), 特别是对于IL-8, 如通过Luminex试验所测定 (表4)。

[0426] 表4

[0427]

细胞因子	PB (pg/mL)	组合 (pg/mL)
IL-13	1.26	1.89
IL-8	6.61	15.77
IL-10	1.26	2.23

[0428]

TNFα	0.28	0.34
MCP-1	10.49	11.32

[0429] 胎盘NK细胞和外周血NK细胞的微小RNA概况分析 (Profiling)。使用MIRVANA™miRNA分离试剂盒 (Ambion, 目录号#1560) 对分离的或扩增的NK细胞实施微小RNA (miRNA) 制备。将NK细胞 ( $0.5$ 至 $1.5 \times 10^6$ 个细胞) 在变性溶胞缓冲液中破坏。接下来, 对样品实施酸-苯酚+氯仿抽提以分离高度富集小RNA种类的RNA。加入100%乙醇以使样品至25%乙醇。当该溶胞物/乙醇混合物通过玻璃纤维过滤器时, 大RNA种类被固定化, 而小RNA种类被收集在滤液中。然后使滤液的乙醇浓度增加至55%, 使混合物通过第二个玻璃纤维过滤器, 在这里小RNA种类变成固定化的。将这种RNA洗涤几次, 并且在低离子强度溶液中洗脱。所回收的小RNA的浓度和纯度通过测量其在260nm和280nm下的吸光度来确定。

[0430] 发现对于PINK细胞是独特的miRNA显示于表5。发现命名为hsa-miR-199b的一种miRNA对于外周血NK细胞是独特的。

[0431] 表5. 通过qRT-PCR对piNK细胞和PB NK细胞的miRNA概况分析

miRNA ID	Sanger 登记号	序列
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aacccguagaucggaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggaucgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uucccuuugucauccuucgcu
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucuggggccuuccuccag
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	aaagcgcucccuuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcucccuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccucccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaagugcuucccuuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaagugcuucccuuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc
hsa-miR-566	MIMAT0003230	ggcgccugugaucaccaac
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aacccguagaucggaacuugug

[0433] 培养的胎盘NK细胞和未培养的NK细胞的免疫表型表征。通过广泛深入的免疫表型研究和细胞毒性测定评估了培养的PINK细胞的总体特性。为了确定扩增的NK细胞的表型, 对NK受体 (NKRs) (如KIRs, NKG2D、NKp46、NKp44和2B4) 的表达进行了分析。通过用PKH26标记肿瘤细胞 (K562细胞), 然后与PINK细胞共培养4小时, 进行了细胞毒性测定。从第0天到第21天, NKG2D的表达从 $60.9\% \pm 4.8\%$ 增加到 $86\% \pm 17.4\%$  (p值为0.024); NKp46的表达从 $10.5\% \pm 5.4\%$ 增加到 $82.8\% \pm 9.0\%$  (p值为0.00002); NKp44的表达从 $9.6\% \pm 6.5\%$ 增加到 $51.6\% \pm 27.5\%$  (p值为0.022); 并且2B4的表达从 $13.0\% \pm 7.1\%$ 减少到 $0.65\% \pm 0.5\%$  (p值为0.009%) (表6)。在这些培养条件下, 抑制性KIRs包括KIR3DL1 (杀伤细胞免疫球蛋白样受体, 三个结构域, 长的细胞质尾1, 抑制受体) 和KIR2DL2/L3 (杀伤细胞免疫球蛋白样受体, 两个结构域, 长的细胞质尾2和长的细胞质尾3; 抑制受体) 在21天扩增期间仍然不受影

响。NKRs表达的变化还与在第21天vs第14天对K562细胞的细胞溶解活性明显增加相关(63%±15%vs 45%±4%,p值为0.0004)。这些发现导致鉴定出与NK细胞细胞毒性活性良好相关的NK细胞的推定标志物。

[0434] 表6. 在21天培养之前和之后,piNK细胞的表型表征。对于5个供体,计算群体平均值的标准偏差(Stdev)。

	第0天		第21天	
	平均值%	Stdev	平均值%	Stdev
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

[0436] 培养的胎盘NK细胞和培养的外周血NK细胞通过基于脂质的蛋白质固定化技术(Lipid-Based Protein Immobilization Technology)和线性离子阱LC/MS(Linear Ion Trap LC/MS)的膜蛋白质组学概况分析。膜蛋白质纯化:在细胞溶解之前,将培养21天的来自组合的胎盘灌洗液和脐带血细胞的胎盘自然杀伤细胞和PB NK细胞与蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)溶液(P8340,Sigma Aldrich,St.Louis,MO;含有4-(2-氨基乙基)苯磺酰基氟化物(AEBSF)、抑胃酶肽A、E-64、苯丁抑制素(bestatin)、亮抑酶肽(leupeptin)和抑蛋白酶肽(aprotinin),无金属螯合剂)一起孵育15分钟。然后,通过加入10mM HCl溶液(无去污剂)使细胞溶解,并且在400g下离心10分钟以使细胞核沉淀并将其去除。将核后上清液转移到超离心管中并在装有T-1270转子的WX80超离心机(Thermo Fisher Scientific,Asheville,NC)中以100,000g离心150分钟,产生膜蛋白质沉淀。

[0437] 脂蛋白体的产生、固定化和消化:膜蛋白质沉淀用NANOXIS®缓冲液(10mM Tris,300mM NaCl,pH 8)洗涤几次。将膜蛋白质沉淀悬浮于1.5mL的NANOXIS®缓冲液中,然后使用VIBRA-CELL™VC505超声波处理器(Sonics&Materials,Inc.,Newtown,CT)在冰上进行尖部超声处理20分钟。通过用FM1-43染料(Invitrogen,Carlsbad,CA)染色并用荧光显微镜术显现来确定脂蛋白体的大小。通过BCA试验(Thermo Scientific)确定脂蛋白体悬浮液的蛋白质浓度。然后,使用标准移液管尖将脂蛋白体注入在LPI™Flow Cell(Nanoxis AB,Gothenburg,Sweden)上并允许其固定化1小时。在固定化之后,进行一系列洗涤步骤并且将5μg/mL的胰蛋白酶(Princeton Separations,Adelphi,NJ)直接注入在LPI™Flow Cell上。将芯片于37℃孵育过夜。然后从芯片中洗脱胰蛋白酶肽,然后使用Sep-Pak柱体(Waters Corporation,Milford,MA)脱盐。

[0438] 强阳离子交换(SCX)分级分离:将胰蛋白酶肽在0.1%甲酸/水溶液中复原并且上样到强阳离子交换(SCX)TOP-TIP™柱(PolyLC,Columbia,MD)(一种用30μm聚磺基乙基天冬酰胺SCX包装材料包裹的移液管尖)上。使用甲酸铵缓冲液(pH 2.8)的分步-梯度(10mM-500mM),从SCX TOP-TIP™中洗脱肽。使用真空离心蒸发浓缩器(speed-vac)系统将各SCX馏

分干燥并在制备中用5%乙腈、0.1%甲酸复原用于下游LC/MS分析。

[0439] LTQ线性离子阱LC/MS/MS分析:将各SCX馏分在0.2mm x 150mm 3 $\mu$ m200 ÅMAGIC C18柱((Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA)上进行分离,该C18柱使用180min梯度(缓冲液A:水、0.1%甲酸;缓冲液B:乙腈、0.1%甲酸)直接与轴向去溶剂化真空辅助纳毛细管电喷雾电离(axial desolvation vacuum-assisted nanocapillary electrospray ionization, ADVANCE)源((Michrom Bioresources, Inc.)交界。ADVANCE源达到了与传统nanoESI相当的灵敏度,同时可以在3 $\mu$ L/min的相当高的流速下进行操作。洗脱的肽在LTQ线性离子阱质谱仪(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)上进行分析,该质谱仪在各完全扫描质谱后使用10个数据依赖性MS/MS扫描。

[0440] 生物信息学:使用SEQUEST算法在SORCERER<sup>TM</sup>SOLO<sup>TM</sup>工作站(Sage-N Research, San Jose, CA)上实现,在IPI人类数据库中检索对应于针对各种肿瘤细胞系(AML, CML)收集的6个盐馏分的六个原始文件(Six RAW files)作为单一检索(single search)。将1.2amu的肽质量耐受性特化,将甲硫氨酸的氧化特化为差异修饰,并将氨基甲酰胺基甲基化特化为静态修饰。应用Trans-Proteomic Pipeline (TPP)的支架软件实现来分选和解析膜蛋白质组学数据。如果蛋白质用95%的肽概率、95%的蛋白质概率和1个独特的肽进行标识,那么该蛋白质被认为可用于分析。使用为企业内部(in-house)开发的自定义的Perl脚本(custom Perl scripts)作出膜蛋白质组学数据集之间的比较。

[0441] 该分析揭示出相对于由外周血NK细胞鉴定的膜蛋白质是独特的来自培养的胎盘NK细胞的8个膜蛋白质的鉴定。参见表7。进一步,从外周血NK细胞鉴定得到了8个相对于培养的胎盘NK细胞是独特的膜蛋白质。参见表7。发现所鉴定的仅10个膜蛋白质在培养的胎盘NK细胞和外周血NK细胞两者中是共享的。

[0442] 表7.

对胎盘NK细胞有特异性的蛋白质	对PB NK细胞有特异性的蛋白质
氨基肽酶N	成纤维细胞生长因子受体4前体
脱脂载脂蛋白E	免疫力相关的核苷酸4样1蛋白质
萎缩蛋白-1相互作用蛋白1	整联蛋白 $\alpha$ -L前体
Innexin inx-3	整联蛋白 $\beta$ -2前体
整联蛋白 $\alpha$ -2前体	整联蛋白 $\beta$ -4前体
整联蛋白 $\beta$ -5前体	膜结合的裂解的胞壁质转糖基酶D前体
肥大细胞表面糖蛋白GP49B前体	氧甾醇结合蛋白相关蛋白8
兰尼定(Ryanodine)受体1	穿孔素1前体

[0444] 6.3. 实施例3

[0445] 本实施例证明胎盘中间体自然杀伤细胞对肿瘤细胞是细胞毒性的。来自HPP的PINK细胞对急性髓细胞白血病细胞是细胞毒性的,如在细胞毒性测定中并通过NK细胞细胞因子分泌的Luminex分析所证明。

[0446] 在细胞因子分泌试验中,将经CD56微珠富集的来自HPP的NK细胞与KG-1a急性髓细胞白血病细胞以1:1比率混合。在孵育24小时之后,收集上清液并且对IFN- $\gamma$ 和GM-CSF分泌进行Luminex分析。在CD56-富集的HPP细胞与KG-1a细胞一起孵育24小时之后观察到IFN- $\gamma$ 和GM-CSF的水平增加,如图2所示。



[0447] PINK细胞的细胞毒性

[0448] 在使用PINK细胞的细胞毒性测定中,将靶标肿瘤细胞用羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记。CFSE是一种对细胞无毒性的活体染料,并且在细胞分裂期间在子细胞之间分配。然后,将细胞置于96孔U型底组织培养板中并且与新鲜分离的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>PINK细胞以20:1、10:1、5:1和1:1的效应子-靶标(E:T)比率在补充10%FBS的RPMI 1640中进行孵育。在4小时孵育时间之后,收获细胞,通过流式细胞术检查CFSE的存在。从无NK细胞的培养物中回收的靶细胞数用作参考。细胞毒性定义为:(1-CFSE<sub>样品</sub>/CFSE<sub>对照</sub>)\*100%。观察到在20:1比率时有显著的肿瘤细胞细胞毒性。参见图3。

[0449] 肿瘤细胞对培养的PINK细胞的敏感性

[0450] 乳酸脱氢酶(LDH)-释放测定。使用CYTOTOX 96® 比色细胞毒性测定试剂盒(Promega,目录号#G1780)进行LDH-释放测定。在该测定中,包含来源于匹配的HPP/UCB的CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>细胞和CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>细胞的组合的培养的NK细胞是效应子细胞,而肿瘤细胞是靶细胞。将效应子细胞和靶细胞置于96孔U型底组织培养板并且以各种效应子-靶标(E:T)比率在100μl补充2%人AB血清(Gemini,目录号#100-512)的RPMI 1640(无酚红)(Invitrogen,目录号#11835-030)中进行孵育。将培养物在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育4小时。在孵育之后,将50μl上清液转移至酶促测定板中并且检测LDH活性,如由生产商所提供的;并且在ELISA阅读器(Synergy HT,Biotek)中测量490nm下的吸收。根据如下公式计算细胞毒性的程度:%细胞毒性=(样品-效应子自发-靶标自发)/(靶标最大-靶标自发)\*100。

[0451] 某些肿瘤类型可能对NK细胞比其它细胞反应性更大。为了分析肿瘤细胞对培养的PINK细胞的敏感性,在LDH释放测定中分析了与PINK细胞共培养的12种不同的肿瘤细胞系。这12种肿瘤细胞系包括人慢性髓细胞白血病(CML)、淋巴瘤、视网膜母细胞瘤(RB)和多发性骨髓瘤(MM)(表8)。在4小时共培养后,通过LDH释放测定测量了NK细胞的细胞毒性。

[0452] 表8.ATCC肿瘤细胞系

[0453]	名称	描述
	CCRF-CEM	人白血病
	KG-1	人急性髓样白血病
	KG-1A	人急性髓样白血病
	K562	人慢性髓样白血病
	KU812	人慢性髓样白血病
	U-937	人组织细胞性淋巴瘤
	WERI-RB-1	人视网膜母细胞瘤
	HCC2218	人乳腺癌
	RPMI8226	人多发性骨髓瘤
[0454]	HCT116	人结肠直肠癌
	HT29	人结肠直肠腺癌
	U266	人多发性骨髓瘤

[0455] 可以见到以10:1的效应子与靶标(E:T)比率,培养的PINK细胞的显著细胞毒性如下:对于K562细胞(CML),88.6%±5.6%;对于U937细胞(淋巴瘤),89.2%±9.8%;对于

WERI-RB-1细胞(RB),  $73.3\% \pm 11.8\%$ ; 对于RPMI8226细胞(MM),  $61.3\% \pm 1.3\%$ ; 和对于U266细胞(MM),  $57.4\% \pm 4.7\%$  (表9)。

[0456] 表9. 肿瘤细胞对培养的pINK细胞的差异敏感性。对于来自3个供体的平均细胞毒性计算平均值的标准误差(S.E.M.)

[0457]

细胞系	细胞毒性%	S.E.M
CCRF-CEM	7.6	1.2
KG-1	20.5	1.5
KG-1a	6.0	3.2
K562	88.6	5.6
KU812	40.3	8.2
U937	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
HT-29	45.6	6.0

[0458] 通过用来那度胺和泊马度胺治疗, PINK细胞细胞毒性的增强

[0459] RNA分离和纯化。使用RNAQUEOUS®-4PCR 试剂盒(Ambion, 目录号#AM1914)对分离的或扩增的NK细胞进行RNA制备。简而言之, 将NK细胞( $0.5$ 至 $1.5 \times 10^6$ 个细胞)在胍鎗溶解溶液中溶解。然后将样品溶胞物与乙醇溶液混合, 并且加样到选择性和定量结合mRNA和较大核糖体RNA的基于二氧化硅的过滤器中; 非常小的RNA(例如, tRNA和5S核糖体RNA)不被定量结合。然后洗涤该过滤器以去除残留的DNA、蛋白质和其它污染物, 将RNA在含有痕量的EDTA(以螯合重金属)的无核酸酶的水中洗脱。将二氧化硅过滤器置于拟合到无RNase的微量离心管(与试剂盒一起供应)的小柱体中。通过离心或真空压力使样品溶胞物、洗涤溶液和洗脱溶液移动通过过滤器。在从过滤器洗脱之后, RNA用与试剂盒一起提供的超纯DNase 1处理以去除痕量的DNA。最后, 也通过与试剂盒一起提供的试剂去除DNase和二价阳离子。所回收的RNA的浓度和纯度通过测量其在260nm和280nm下的吸光度来确定。

[0460] 定量实时(qRT-PCR)分析。然后, 使用TAQMAN® 反转录试剂(Applied Biosystems, 目录号#N8080234), 随后使用实时PCR分析, 通过7900HT快速实时PCR系统, 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), 使用分离的RNA进行cDNA合成。

[0461] 来那度胺和泊马度胺是具有增强的抗癌和抗炎活性的沙利度胺的化学类似物。为了研究来那度胺和泊马度胺是否能够增强PINK细胞细胞毒性, 将离体培养的(第19天)PINK细胞用来那度胺或泊马度胺预处理24小时, 然后与靶标结肠直肠癌细胞系HCT-116共培养。经来那度胺处理的NK细胞证明42.1%细胞毒性, 并且经泊马度胺处理的NK细胞显示47.4%细胞毒性, 而对照未处理的PINK细胞显示仅24.3%细胞毒性。

[0462] 定量实时PCR(qRT-PCR)和流式细胞术分析显示泊马度胺引发的NK细胞细胞毒性的增强与增加的颗粒酶B(GZMB)基因表达( $60\% \pm 1.7\%$ 增加)(表10)和增加的GZMB-阳性NK细胞的百分比(25%增加)相关。另外, GM-CSF的表达在来那度胺( $232\% \pm 1.6\%$ 增加)和泊马度胺( $396\% \pm 0.3\%$ 增加)处理的PINK细胞中增加(表10A, 表10B)。

[0463] 表10A、表10B: 经来那度胺和泊马度胺处理的培养的PINK细胞与未处理细胞相比

的qRT-PCT分析。10A:所列举基因的基因表达在经来那度胺处理的样品和未经来那度胺处理的样品之间的倍数变化。运用配对t-检验来确定倍数变化在经来那度胺处理的样品和未处理样品中是否相等。10B:对于所列举的25个基因的基因表达在经泊马度胺处理的样品和未经泊马度胺处理的样品之间的倍数变化。运用配对t-检验来确定倍数变化在处理样品和未处理样品中是否相等。

[0464] 表10A

[0465]

	Veh	Len.	Veh-stdev	Len.-stdev	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

[0466] BAX-BCL2-相关的X蛋白质

[0467] CCL5-趋化因子(C-C基序)配体5

[0468] CCR5-趋化因子(C-C基序)受体5

[0469] CSF2-集落刺激因子2(粒细胞-巨噬细胞)

[0470] FAS-TNF受体超家族,成员6

[0471] GUSB-β葡萄糖醛酸糖苷酶β

[0472] IL2RA-α白介素2受体

[0473] TNFRSF18-肿瘤坏死因子受体超家族,成员18

[0474] 表10B

[0475]

	Veh	Pom.	Veh-stdev	Pom.-stdev	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

- [0476] ACTB- $\beta$ -肌动蛋白
- [0477] BAX-BCL2-相关的X蛋白质
- [0478] CCL2-趋化因子(C-C基序)配体2
- [0479] CCL3-趋化因子(C-C基序)配体3
- [0480] CCL5-趋化因子(C-C基序)配体5
- [0481] CCR5-趋化因子(C-C基序)受体5
- [0482] CSF1-集落刺激因子1(巨噬细胞)
- [0483] CSF2-集落刺激因子2(粒细胞-巨噬细胞)
- [0484] ECE1-内皮素转化酶1
- [0485] FAS-TNF受体超家族,成员6
- [0486] GNLY-粒溶蛋白
- [0487] GUSB-葡糖醛酸糖苷酶- $\beta$
- [0488] GZMB-颗粒酶B(颗粒酶2,细胞毒性T-淋巴细胞相关丝氨酸酯酶1)
- [0489] IL1A- $\alpha$ 白介素1
- [0490] IL2RA-白介素2受体- $\alpha$
- [0491] IL8-白介素8
- [0492] IL10-白介素10
- [0493] LTA-淋巴毒素 $\alpha$ (TNF超家族,成员1)
- [0494] PRF1-穿孔素1(孔形成蛋白)
- [0495] PTGS2-前列腺素-内过氧化物合酶2(前列腺素G/H合酶和环加氧酶)
- [0496] SKI-v-ski肉瘤病毒癌基因同源物(禽类)
- [0497] TBX21-T-框21
- [0498] 组合的自然杀伤细胞的细胞毒性
- [0499] 在单独的细胞毒性测定中,从供体匹配的脐带血和胎盘灌洗液获得的培养的NK细胞是效应子细胞,而肿瘤细胞是靶细胞。肿瘤细胞用由于其亲脂性脂族残基而插入到细胞浆膜中的KH26(Sigma-Aldrich,目录号#PKH26-GL)标记(参见,例如Lee-MacAry等人,

J. Immunol. Meth. 252 (1-2) : 83-92 (2001)), 然后置于96孔U型底组织培养板并且与培养的NK细胞以各种效应子-靶标 (E:T) 比率在补充10%FBS的200 $\mu$ l RPMI 1640中进行孵育。将培养物在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育4小时。在孵育之后, 收获细胞, 向培养物中加入T0-PRO-3 (Invitrogen目录号#T3605) (一种膜不可渗透的DNA染料) 至1 $\mu$ M最终浓度, 然后使用BD FACSCanto进行FACS分析。细胞毒性表示为总PKH26<sup>+</sup>靶标肿瘤细胞内死细胞 (PKH26<sup>+</sup>T0-PRO-3<sup>+</sup>) 的百分比。

[0500] 在该细胞毒性测定中, 人慢性髓样淋巴瘤 (CML) K562细胞用插入到细胞浆膜中的PKH26标记, 并且置于96孔U型底组织培养板中。将培养21天的胎盘 (组合) 或外周血NK细胞与K562细胞以10:1、5:1、2.5:1和1.25:1的效应子与靶标 (E:T) 比率在补充10%v/v FBS的RPMI 1640中混合。在4小时孵育时间之后, 收获细胞, 将T0-PRO-3加到细胞培养物中, 然后通过流式细胞术分析PKH26和T0-PRO-3的存在。细胞毒性表示为总PKH26<sup>+</sup>靶标肿瘤细胞内PKH26<sup>+</sup>T0-PRO-3<sup>+</sup>死细胞的百分比。胎盘NK细胞和外周血NK细胞两者均显示在所测试的所有E:T比率下对K562细胞都有相当大的毒性 (图4)。观察到在10:1和5:1二个E:T比率下胎盘NK细胞比外周血NK细胞对K562细胞的毒性明显更高 (图4)。

#### [0501] 6.4. 实施例4

[0502] 本实施例证明人胎盘灌洗液细胞对肿瘤细胞是细胞毒性的, 并且来自HPP的总有核细胞 (TNC-HPP) 对KG-1a的细胞毒性高于来自匹配的UCB的TNC对KG-1a的细胞毒性。将来自HPP或脐带血 (UCB) 的总有核细胞与KG-1a细胞以1:1、5:1、10:1、20:1或100:1的比率混合。在24小时或48小时孵育之后, 收获细胞并且通过FACS分析 (BD FACSCanto, BD Bioscience) 检查CFSE的存在。将单独培养的肿瘤细胞用作对照。细胞毒性定义为:  $(1 - \text{CFSE}_{\text{样品}} / \text{CFSE}_{\text{对照}}) * 100\%$ 。显示在100:1比率时有显著细胞毒性。参见图5。

[0503] 在独立的实验中, 将来自HPP的总有核细胞的细胞毒性与来自脐带血的总有核细胞的细胞毒性进行比较。将匹配的TNC-HPP或UCB与KG-1a细胞以0.78:1、1.56:1、3.12:1、6.25:1、12.5:1、25:1、50:1或100:1的比率混合。TNC-HPP显示与UCB的细胞毒性相比, 在所有比率下有一致较高的细胞毒性。参见图6。

[0504] 在另一个实验中, 在与KG-1a细胞孵育之前24小时, TNC-HPP用100U/mL或1000U/mL的IL-2刺激, 而将用RPMI培养基培养的HPP用作对照。在6.25NK细胞/KG-1a细胞及以上的比率下, IL-2似乎增加TNC-HPP的细胞毒性。参见图7。

[0505] 使用肿瘤细胞类型的更宽阵列重复这些实验, 如表11所示, 使用 $5 \times 10^5$ 个HPP细胞和 $1 \times 10^4$ 个肿瘤细胞。

[0506] 表11: 对胎盘灌洗液的细胞毒性效应所测试的肿瘤细胞类型

[0507]

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
K562	人慢性髓样淋巴瘤 (CML)
KG-1	人急性髓细胞白血病
KG-1a	人急性髓细胞白血病 (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	人视网膜母细胞瘤
HCT-116	人结肠直肠癌
HT-29	人结肠直肠腺癌
U266	人骨髓瘤

[0508] 当HPP细胞和肿瘤细胞以50:1比率共培养24小时或48小时时, HPP细胞显示对所述肿瘤细胞有相当大的毒性。对于这两个时间, 共培养导致超过50%的肿瘤细胞死亡。参见图8A和图8B。

#### [0509] 6.5. 实施例5

[0510] 虽然不希望受到负责介导HPP细胞强效抗肿瘤效应的任何具体作用机制的束缚, 但是通过多重Luminex试验, 在不同时间点分析了与肿瘤细胞系共培养的HPP细胞的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF细胞因子释放分布型, 并且将其同与所述肿瘤细胞系共培养的UCB细胞的进行了比较。为了得出上清液中IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF的来源, 对共培养细胞进行了基于流式细胞术的细胞内表征, 结果证明在肿瘤细胞中不产生这些细胞因子。

[0511] 对孵育后收集的上清液进行Luminex试验以测定IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF(目录号#HCYT0-60K-03, Millipore)的浓度。这三种细胞因子都与NK细胞毒性有关。(参见, 例如Imai等人, Blood 2005.106(1):376-83)。也使用Applied Biosystems FAST 7900HT仪器和引物进行了定量RT-PCR以检查IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF的表达。培养条件与以上描述的共培养细胞毒性测定相同。使用Luminex试验测定了细胞因子的浓度。

[0512] 与UCB细胞相比, 来自与肿瘤细胞共培养的HPP细胞的IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和GM-CSF的分泌明显更高。在一个实验中, 将HPP细胞与KG-1a细胞以0.78:1、1.56:1、3.12:1、6.25:1、12.5:1、25:1、50:1或100:1的比率在存在或不存在100U/ml IL-2的情况下混合。TNC-HPP显示, 与不存在IL-2的情况下相比, IFN- $\gamma$ 的产生在存在IL-2的情况下一致地增加。经测定IFN- $\gamma$ 水平在24小时时增加约5-26倍(中位值:16倍); 在48小时时增加约3~65倍(中位值:27倍), 这与得自细胞毒性研究的结果一致。参见图9。

[0513] 在另一个实验中, 在与KG-1a细胞孵育之前24小时, TNC-HPP用100U/mL或1000U/mL的IL-2刺激, 而将用RPMI培养基培养的HPP用作对照。在与KG-1a细胞共培养之前, 将HPP或匹配的UCB细胞在有或无IL-2的情况下孵育24小时。IFN- $\gamma$ 的分泌在与K562和KG-1a共培养的HPP细胞中在48小时时增加最多。当HPP细胞用100U/mL IL-2处理时, HPP细胞对KG-1a的细胞毒性在24小时和48小时时增加。在IL-2处理后, HPP细胞中IFN- $\gamma$ 的分泌水平高于匹配的UCB细胞。IFN- $\gamma$ 的较高表达通过对来自匹配的HPP和UCB的细胞的RT-PCR分析得到证实。这些结果显示HPP细胞表现出比UCB细胞更高的抗白血病活性, 并且这种更高活性与IFN- $\gamma$ 产生显著增加有关。

[0514] 使用以上表1列举的肿瘤细胞系分析了在与一组肿瘤细胞系共培养期间, 在HPP细胞中和在脐带血细胞中的IFN- $\gamma$ 产生。将HPP细胞和肿瘤细胞以50:1的比率(使用 $10^4$ 个肿瘤细胞和 $5 \times 10^5$ 个HPP细胞)共培养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HPP细胞中IFN- $\gamma$ 产生增加在24小时共培养时超过了与这些细胞系共培养相同时间的脐带血细胞。参见图10A。在48小时共培

养时,对于所有肿瘤细胞系,在HPP细胞中IFN- $\gamma$ 产生增加超过了脐带血。参见图10B。在所述肿瘤细胞系中,在HPP细胞中,在24小时和48小时, K562细胞诱导了IFN- $\gamma$ 产生的最高增加。对于TNF- $\alpha$ 和GM-CSF观察到类似结果。

[0515] 细胞周期分析证明与单独培养的KG-1a细胞相比,当与HPP共培养时,KG-1a的百分比在S期减少30%。使用HPP的不同富集馏分进行的进一步共培养实验证明HPP的抗白血病活性很大程度上归因于以CD56<sup>+</sup>高表达、缺乏CD16表达为特征的独特的未成熟自然杀伤细胞的高浓度。

#### [0516] 6.6. 实施例6:通过人胎盘灌洗液细胞抑制体内肿瘤细胞增殖

##### [0517] 6.6.1. 材料与方法

[0518] 本文给出的实施例证明通过人胎盘灌洗液细胞抑制体内肿瘤细胞增殖。具体地说,本实施例证明使用NOD/SCID小鼠异种移植物肿瘤模型,人胎盘灌洗液在体内抵抗肿瘤细胞的有效性。

[0519] KG-1细胞的培养。将KG-1细胞维持在补充20%的胎牛血清的伊思考夫改良杜尔贝可培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM) (生长培养基)中,于37°C,在95%空气/5%CO<sub>2</sub>和100%湿度下。每隔一天更换培养物中的培养基,每周将细胞传代。KG-1细胞生长为悬浮液。因此,为了更换培养基或将细胞传代,将细胞悬液收集在离心管中并以2,000rpm在SORVALL® HERAEUS®转予(零件号:75006434)中离心10分钟。弃去上清液,将适量的细胞沉淀重悬浮于生长培养基中用于继续培养。

[0520] 植入用的KG-1细胞制备。为了将细胞植入到小鼠体内,如上所述通过离心收获细胞。收集细胞沉淀并将其重悬浮于磷酸缓冲盐溶液中。为了测定植入到小鼠体内的细胞数,使用血细胞计数器对细胞悬液的等分试样计数。使用锥虫蓝染料(Trypan Blue dye)排除悬浮液中的非活细胞。

[0521] 植入用的HPP细胞制备。为了HPP贮藏和融化,将样品在干燥运输容器中在良好条件下冷冻存取。在融化当天,从冷冻器(cryofreezer)中取出HPP单位(一次一个)并将其置于顶部拉链(ziptop)塑料袋中。然后将该袋置于37°C水浴中,伴有轻柔搅拌,直到大部分融化(在袋中仍保留小的冷冻碎块)。然后,从水浴中取出袋子,从顶部拉链(zip-top)袋子中取出样品单位,将该单位轻轻倒置直到完全融化。然后将该单位置于层流罩超净台(laminar flow hood)中,血袋的外表面通过用70%乙醇喷雾进行消毒。用无菌剪刀剪开血袋,通过无菌移液管将细胞转移至无菌的50ml圆锥管(对每个HPP单位,1支管;对每个UCB单位,2支管)。接下来,向各管中慢慢加入10mL融化缓冲液(2.5%人白蛋白,5%右旋糖苷40),伴有轻柔混合(在2.2-2.9分钟的周期内)。然后各血袋用10mL融化缓冲液漂洗,再将其慢慢加入到50ml圆锥管中(在0.7-1.3分钟的周期内)。

[0522] 融化后,将各单位在离心前贮存在湿冰上。所有管都离心10分钟(440x g,在10°C),使用无菌移液管吸出上清液,并通过震荡管使沉淀轻柔破碎。向其中一支管中加入1ml等分溶媒试样(PBS+1%胎牛血清),通过轻柔涡旋将管混合。使用2ml移液管,将内容物转移至第二支管中,然后转移至第三支管中,然后转移至第四支管中。已清空的管用0.2ml稀释缓冲液洗涤。

[0523] 对于细胞计数,将25 $\mu$ l等分试样转移至装有975 $\mu$ l溶媒的15ml圆锥管(在冰上)中。然后通过加入4ml冷的氯化铵溶胞试剂并且在冰上孵育10分钟使红细胞发生溶解。在孵育

之后,向各管中加入5ml冷PBS并将管离心(10min, 400x g, 10℃)。在RBC溶解后,使用锥虫蓝,通过血细胞计数器对细胞计数以评价活力(viability)。根据稀释校正计数结果,然后将计数结果除以溶胞系数(0.46)以估计在RBC溶胞之前存在的细胞数目。

[0524] 对于HPP剂量制备,在计数之后,通过加入溶媒将HPP细胞稀释至 $1 \times 10^8$ 个细胞/ml。然后将HPP细胞置于冰上保存直到加载注射器。在融化第一单位和完成剂量制备之间的实耗时间是少于3小时。

[0525] 在充满注射器之前,将50 $\mu$ l等分的施用材料放在一边用于通过如上所述的计数进行剂量后验证。施用后,评价剩余的剂量材料用于剂量验证。

[0526] 研究设计。在第1天,给24只NOD/SCID雄性小鼠(Jackson Laboratories)在肋腹区域植入 $5 \times 10^6$ 个活的KG-1细胞(S/C)。将小鼠分开使得在铺有木屑垫料的微隔离笼系统中关养四到五只小鼠。随意提供无菌的啮齿动物饲料和水。一周两次密切监视小鼠的肿瘤生长。第一次可测量的肿瘤在第25天观察到。然后记录小鼠体重一周一次并且记录用测径器一周两次的肿瘤测量值。在植入后的第52天,把动物随机分成三个独立的组,肿瘤体积平均为约300-350mm<sup>3</sup>。参见下表12。第一组由平均肿瘤体积为312mm<sup>3</sup>的四个对照小鼠组成。这些小鼠中两只经静脉内(IV)植入,两只经肿瘤内(IT)植入,分别使用200 $\mu$ l和50 $\mu$ l的溶媒溶液。具有平均肿瘤体积为345mm<sup>3</sup>的第二组由每只小鼠经静脉内植入200 $\mu$ l的HPP细胞( $2 \times 10^7$ 个细胞)的四只小鼠组成。最后一组(每只小鼠经肿瘤内(IT)植入50 $\mu$ l的HPP细胞)也由平均肿瘤体积为332mm<sup>3</sup>的四只小鼠组成。

[0527] 表12:用于体内肿瘤抑制实验的实验组。

动物#	HPP 治疗组	HPP 植入当天的肿瘤体积
<b>第 1 组(对照)</b>		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	平均值:	312
<b>第 2 组(IV 细胞植入)</b>		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	平均值:	345
<b>第 3 组(IT 细胞植入)</b>		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	平均值:	332
IV - 200 $\mu$ L 植入; IT - 50 $\mu$ L 植入。		

[0530] 在第66天,在HPP细胞植入后14天,由于高肿瘤体积而终止研究。

[0531] 6.6.2. 结果

[0532] 当对照组的肿瘤体积(TV)达到了平均为2921mm<sup>3</sup>时,测量肿瘤体积(TV)直到第66



天(HPP-细胞植入后的第14天)。研究结束时,IV治疗组的平均TV为2076mm<sup>3</sup>,而IT组的TV为2705mm<sup>3</sup>。至于治疗后TV的%增加,与对照组相比,IT组显示肿瘤生长中度20%抑制,而IV组显示肿瘤生长超过35%抑制。IT组中的抑制是可证明的。参见图11。

#### [0533] 6.7. 实施例7

[0534] 本实施例描述来自供体匹配的足月人胎盘灌洗液细胞和脐带血(UCB)细胞的组合的自然杀伤细胞的产生和表征。

##### [0535] 6.7.1. 材料与方法

[0536] 人胎盘来源的干细胞和UCB的加工处理。捐赠的足月胎盘用生理盐水灌洗以回收人胎盘来源的干细胞。人胎盘来源的干细胞经后续加工以去除红血细胞、非活细胞和组织碎片,然后冷冻保存。人胎盘来源的干细胞在加工处理期间既不扩增也不培养。

[0537] 来自人胎盘来源的干细胞和UCB的天然杀伤细胞的分离。最初将供体匹配的冷冻保存的人胎盘来源的干细胞和UCB融化、混合并用含有5%v/v胎牛血清(FBS;Hyclone laboratories)的RPMI 1640(无酚红)(Gibco)洗涤。在有些NK细胞扩增实验中,将从血沉棕黄层(血液中心,NJ)获得的外周血单核细胞(PBMCs)制备为NK细胞的另一种来源。在洗涤之后,将细胞沉淀以 $5 \times 10^7$ 个细胞/ml重悬浮于RoboSep缓冲液(StemCell Technologies)中。向细胞悬液中加入0.1mg/ml DNase I(StemCell Technologies)溶液至最终浓度为100μl/ml,通过移液管将其轻轻混合并且在通过EasySep® NK细胞富集试剂盒(StemCell Technologies)分离之前在室温下孵育15分钟。向细胞悬液中以50μl/ml的最终浓度加入含有抗以下人细胞表面抗原的单克隆抗体的人NK细胞富集混合物(Cocktail):CD3、CD4、CD14、CD19、CD20、CD36、CD66b、CD123、HLA-DR和血型糖蛋白A并且孵育10分钟。然后,加入EasySep®磁性微颗粒至最终浓度为100μl/ml并且孵育5分钟。然后,使用完全自动化细胞分离器RoboSep,按照生产商提供的方案(StemCell Technologies),对NK细胞进行富集。如此收集CD56+CD3-群体并且准备好做进一步分析或培养。

[0538] pNK细胞的离体扩增。根据先前描述的方案(Yssel等人,1984,J.Immunol.Methods.72,219-227)的改进,将经富集的胎盘CD56+CD3-NK细胞在起始培养基中进行培养。简而言之,起始培养基由补充以下成分的IMDM(ATCC)组成:10%胎牛血清(FBS)(Hyclone),35mg/ml转铁蛋白(Sigma-Aldrich),5μg/ml胰岛素(Sigma-Aldrich),20μM乙醇胺(Sigma-Aldrich),1μg/ml油酸(Sigma-Aldrich),1μg/ml亚油酸(Sigma-Aldrich),0.2μg/ml棕榈酸(Sigma-Aldrich),2.5μg/ml BSA(Sigma-Aldrich)和0.1μg/ml植物凝集素(PHA-P,Sigma-Aldrich)。将NK细胞以近似 $2.5 \times 10^5$ /ml重悬浮于加有青霉素-链霉素(Invitrogen)和200IU/ml IL-2(R&D Systems)的起始培养基中。将丝裂霉素C(Sigma-Aldrich)处理的PBMC和K562(ATCC)细胞作为饲养细胞以 $1 \times 10^6$ /ml(对于PBMC细胞)和 $1 \times 10^6$ /ml(对于K562细胞)的最终浓度加入到起始培养基中。为了启动NK细胞扩增,将饲养细胞-NK细胞悬液转移到透气培养袋(American Fluoroseal)中并且在培养箱中在37℃、5%CO<sub>2</sub>下进行培养。在培养5至7天之后,给扩增的细胞群体补加维持培养基达至多21天。维持培养基由补充以下成分的IMDM组成:10%FBS,2%人AB血清(Gemini),青霉素-链霉素和200IU/ml IL-2。使用Easycount(Immunicon)和Easycount Viasure试剂盒(Immunicon)检查总细胞数和细胞活力。运用如下公式计算扩增倍数:倍数=第21天的CD56+CD3-NK细胞绝对数/第0天的NK细胞绝对数。

[0539] BrdU/7-AAD细胞周期分析。扩增的细胞用BrdU (BD Bioscience) 标记并且在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养24小时。根据生产商提供的方案,将细胞收获、固定并用抗BrdU和7-AAD染色。通过FACSCalibur (BD Biosciences) 收集细胞周期数据并且用FlowJo (Tree Star, Inc.) 完成分析。

[0540] 免疫表型表征。单核细胞 (MNCs) 或来自供体匹配的人胎盘来源的干细胞和UCB的富集的NK细胞或来自第7、14、21天培养物的扩增的细胞的表型通过多色流式细胞术进行分析。细胞用荧光染料-缀合的抗人血表面抗原的单克隆抗体染色:CD56-PerCP/-PE/-PE-Cy7、CD3-FITC/-APC-Cy7、CD16-FITC/-PerCP、CD158b-PE (杀伤细胞-免疫球蛋白样受体 [KIR] 2DL2/2DL3)、CD158e1-PE (KIR3DL1)、NKG2D-APC、NKp46-APC、NKp44-PE、NKp30-PE、CD226-PE、2B4-PE (全都购自BD Biosciences Pharmingen) 和CD94-PE (R&D Systems)。使用FACSCanto I (BD Biosciences) 和FlowJo分析软件进行所有分析。

[0541] PKH26/T0-PRO-3细胞毒性测定。使用NK细胞作为效应子细胞且各种肿瘤细胞系作为靶细胞检查NK细胞体外细胞毒性。靶细胞用PKH26 (Sigma-Aldrich) 标记 (Ferlazzo等人, 2004; Lee-MacAry et al., 2001), 置于96孔U型底组织培养板并且与效应子细胞一起以各种效应子与靶标 (E:T) 比率在补充10%FBS的200μl RPMI 1640中进行孵育。在37℃、5%CO<sub>2</sub>下4小时孵育之后,收获细胞,将T0-PRO-3 (Invitrogen) 以1μM最终浓度加入到培养物中,然后使用BD FACSCanto I进行FACS分析。细胞毒性表示为总PKH26+靶标肿瘤细胞内死细胞 (PKH26+T0-PRO-3+) 的百分比。

[0542] 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定。作为另一种选择,使用CYTOTOX 96®比色细胞毒性测定试剂盒 (Promega), 通过LDH释放测定检查NK细胞体外细胞毒性。在本试验中,将效应子细胞和靶细胞置于96孔U型底组织培养板并且以各种E:T比率在补充2%人AB血清的100μl RPMI 1640 (无酚红) (Invitrogen) 中孵育,然后在37℃、5%CO<sub>2</sub>下孵育4小时。在孵育之后,将50μl上清液转移至酶促测定板中用于检测LDH活性,如生产商所指示。运用以下公式计算细胞毒性: %细胞毒性 = (实验释放 - 效应子自发释放 - 靶标自发释放) / (靶标最大释放 - 靶标自发释放) \* 100。

[0543] miRNA制备和定量PCR (QPCR)。使用MIRVANA™miRNA分离试剂盒 (Ambion), 根据生产商所提供的方案,从0.5至1.5x10<sup>6</sup>个细胞分离miRNA。所回收的小RNA的浓度和纯度通过测量其在260nm和280nm下的吸光度来确定。将纯化的RNA样品如下进行cDNA合成: 使用TAQMAN®反转录试剂 (Applied Biosystems), 通过实时PCR分析,然后通过7900HT快速实时PCR系统。使用人微小RNA阵列 (Applied Biosystems) 进行基因表达概况分析和miRNA概况分析。对于各miRNA,来自实时PCR的平均ΔCt计算为 $\Delta C_{t_{平均}} = \text{平均值}(C_{t_{样品}}) - \text{平均值}(C_{t_{内源}})$ , 其中C<sub>t<sub>样品</sub></sub>是miRNA的Ct值, C<sub>t<sub>内源</sub></sub>是内源对照的Ct值。miRNA对于pNK或PB NK是独特的,如果它们满足以下标准: 1)  $\Delta C_{t_{平均}} < 0$ ; 2)  $|\Delta C_{t_{平均}}| \geq 2 * C_{t_{内源\_SD}}$ ,  $|\Delta C_{t_{平均}}|$ 是 $\Delta C_{t_{平均}}$ 的绝对值, C<sub>t<sub>内源\\_SD</sub></sub>是C<sub>t<sub>内源</sub></sub>的标准偏差; 和3) 满足前两个标准的miRNA对于细胞类型来说是独有的。使用上述标准的基本原理是证实miRNA在至少一个供体样品中与内源对照相比是丰富的。当将Ct值平均时,无可检测水平的miRNA的供体样品在数字上可忽略。来自对照基因的负 $\Delta C_{t_{平均}}$ 以及两个标准偏差确保特定基因有相对丰度。另外,参考基因的所有标准偏差都小于0.25,从而证实了对照的品质。通过对ΔCt值的双样品t-检验 (p值为0.01显著性水平), 求出在pNK和PB NK之间的显著性表达的miRNA,也求出在第0天pNK和第21天pNK之间的

那些。表达倍数变化根据 $R=2^{(\Delta Ct1_{\text{平均}}-\Delta Ct2_{\text{平均}})}$ 来计算,其中R为倍数变化(Livak,K.J.和Schmittgen,T.D,2001,Methods.4,402-408); $\Delta Ct1_{\text{平均}}$ 是pNK在第0天的平均 $\Delta Ct$ , $\Delta Ct2_{\text{平均}}$ 是PB NK或扩增的pNK的平均 $\Delta Ct$ 。将RNU44(最高丰度的miRNA之一)用作内源对照。每个样品有8个对照孔。用对照的平均Ct来计算 $\Delta Ct$ 。本文中使用的统计学方法消除了与对照相比不丰富的miRNA。

[0544] miRNA靶预测和途径分析。将对PB NK和pNK独特的miRNA以及在扩增的pNK中高度表达的miRNA通过使用中等到高严格性检索标准,在七个miRNA靶基因预测数据库(Diana-microT,miRDB,miRTar,microRNA.org,MicroCosmTargets,picTar和TargetScan)和三个实验验证的靶基因数据库(TarBase,miRecords和miRTarBase)进行了检索。由五个或五个以上数据库预测的基因被认为是高置信靶标。然后,将这样的中靶基因在途径分析(Ingenuity Systems)中进行检查以便确定相关的信号传导途径和细胞功能。对途径评分并且基于它们的p-值排序。

[0545] 6.7.2.结果和讨论

[0546] 6.7.2.1.来自人胎盘来源的干细胞的NK细胞的表型分布型

[0547] 从三个胎盘收获人胎盘来源的干细胞,并且与供体匹配的UCB相比较,通过流式细胞术分析细胞表面标志物。通过细胞表面标志物表达(CD56+CD3-)所分析的NK细胞组成揭示出在人胎盘来源的干细胞( $0.70\% \pm 0.24\%$ )和供体匹配的UCB( $0.63\% \pm 0.36\%$ )之间没有明显差异( $n=3$ )。然后,使用荧光-缀合的抗特异性杀伤细胞免疫球蛋白(Ig)样受体(KIRs)和C-型凝集素受体(KLRs)(CD94、NKG2D)的单克隆抗体检查CD56+CD3-NK细胞。用双样品t-检验确定群体平均值在人胎盘来源的干细胞和UCB中是否相等。如图12A所示,来自3对供体匹配的人胎盘来源的干细胞和UCB单位的NK细胞表现出表型相似性,在例如CD56+CD16-、CD56+CD16+、NKG2D、CD94、KIR3DL1和KIR2DL2/L3等亚群体的表达中无显著性差异。在NK单独扩增21天之后,来自人胎盘来源的干细胞的NK细胞和UCB NK细胞显示以各种E:T比率对K562细胞都有可比较的细胞毒性,表明在扩增之后在人胎盘来源的干细胞衍生和UCB NK细胞之间有功能性相似性(图12B)。

[0548] 6.7.2.2.来自冷冻保存的组合单位的pNK的分离和表征

[0549] 将人胎盘来源的干细胞和供体匹配的UCB单位组合成一个“组合单位(Combo unit)”用作用于细胞扩增的起始材料。

[0550] 分析证明从冷冻保存的组合单位常规地回收接近90%的pNK细胞,CD56+CD3-细胞纯度大于70%。

[0551] 将来自16个组合单位的pNK细胞和来自13个单位的血沉棕黄层外周血(PB)的NK细胞进行免疫表型表征。评估了包括KIR(KIR3DL1,KIR2DL2/3)、KLR(CD94)、NKG2D、天然细胞毒性受体NCR(NKp46、NKp44和NKp30)、2B4和CD226在内的细胞表面标志物的表达。观察到在pNK细胞和PB NK细胞之间的显著性差异,包括CD56+CD16-、CD56+CD16+、KIR2DL2/3+、NKp46+、NKp30+、2B4+和CD94+(图13A和表13)。非常多(79%)的PB NK细胞展示成熟CD56+CD16+表型,而pNK群体多数(超过60%)是未成熟CD56+CD16-细胞。与PB NK细胞相比,在pNK细胞中观察到的CD16-细胞的更高比例表明,pNK细胞比PB NK细胞包含更多的未成熟NK细胞群体。

[0552] 表13.在pNK和PB NK细胞表型内亚群体的比较

	NK 表征	组合(16 单位)		PB (13 单位)		P 值
	NK 亚群体	平均值%	STDEV	平均值%	STDEV	
[0553]	CD16-	60.94	16.58	21.38	14.00	***
	CD16+	39.05	16.58	78.63	14.01	***
	KIR3DL1+	12.31	8.11	7.07	8.28	NS
	KIR2DL2/L3+	21.89	8.65	9.46	11.31	**
	NKG2D+	42.11	17.79	29.88	22.64	NS
	NKp46+	6.98	4.33	18.86	13.97	*
	CD226+	15.97	6.66	26.75	23.31	NS
	NKp44+	9.48	5.27	4.89	6.40	NS
	NKp30+	39.08	19.06	18.99	20.86	**
	2B4+	11.07	5.90	4.46	6.45	*
	CD94+	71.31	13.94	26.17	30.49	***

[0554] \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; NS=非显著性

[0555] 使用TaqMan阵列人微小RNA卡片,通过miRNA分析进一步探索pNK细胞和PB NK细胞的表型以比较pNK和PB NK细胞中的365个miRNA的表达。这些分析鉴定出4个对pNK细胞独特的miRNA (hsa-miR-337、hsa-miR-422a、hsa-miR-549和hsa-miR-618) 和8个由PB NK细胞独特表达的miRNA (hsa-let-7b、hsa-miR-146b、hsa-miR-19b、hsa-miR-24、hsa-miR-347、hsa-miR-381、hsa-miR-517c和hsa-miR-631)。另外,与PB NK细胞相比,在pNK细胞中,20个miRNA以显著更高水平表达,29个miRNA以显著较低水平表达(表14和表15)。这些结果证明与PB NK细胞相比,pNK细胞具有独特的miRNA表达模式。

[0556] 表14. 在pNK细胞中高度表达的miRNA。

	miRNA	pNK 中的增加倍数	P 值
[0557]	hsa-miR-211	5.26	6.73E-03
	hsa-miR-520c	5.58	7.70E-03
	hsa-miR-125b	7.46	9.26E-04
	hsa-miR-100	11.19	4.29E-04
	hsa-miR-326	14.50	5.05E-05
	hsa-miR-519c	18.74	6.32E-03
	hsa-miR-515-5p	20.99	6.88E-03
	hsa-miR-450	21.31	3.00E-03
	hsa-miR-198	27.97	3.41E-04
	hsa-miR-522	33.63	2.56E-03
	hsa-miR-518e	39.78	7.17E-03
	hsa-miR-497	54.47	8.88E-03
	hsa-miR-566	75.98	1.32E-04
	hsa-miR-519d	96.65	3.47E-04
	hsa-miR-627	98.54	3.42E-04
	hsa-miR-524	106.36	7.97E-04
	hsa-miR-520g	291.10	3.24E-04
	hsa-miR-302c	396.53	3.55E-04
	hsa-miR-512-3p	640.56	3.16E-05
[0558]	hsa-miR-520h	1793.82	9.60E-05

[0559] 表15. 在PB NK细胞中高度表达的miRNA。

	miRNA	PB NK 中的增加倍数	P 值
	hsa-miR-331	1.43	5.33E-03
	hsa-miR-186	1.90	4.54E-03
	hsa-miR-17-5p	2.38	2.34E-03
	hsa-miR-26a	2.66	2.36E-03
	hsa-miR-133b	2.69	8.19E-04
	hsa-miR-181b	2.77	4.42E-03
	hsa-miR-222	2.83	5.76E-03
	hsa-miR-197	3.00	5.48E-05
	hsa-miR-146b	3.05	2.92E-03
	hsa-miR-342	3.06	3.23E-04
	hsa-miR-181d	3.08	3.41E-03
	hsa-miR-155	3.12	8.24E-04
	hsa-miR-484	3.18	1.23E-03
[0560]	hsa-let-7g	3.18	2.08E-03
	hsa-miR-200c	3.66	1.91E-03
	hsa-miR-181c	3.83	2.72E-04
	hsa-miR-191	4.06	3.16E-04
	hsa-miR-596	4.14	7.06E-03
	hsa-miR-142-5p	4.63	4.84E-04
	hsa-miR-95	4.86	2.99E-03
	hsa-let-7a	5.04	3.91E-04
	hsa-miR-21	5.10	2.87E-04
	hsa-miR-152	5.46	1.76E-03
	hsa-miR-642	5.56	4.70E-04
	hsa-miR-24	5.91	2.54E-05
	hsa-miR-10a	14.56	5.71E-03
	hsa-miR-429	31.74	5.70E-03
	hsa-let-7b	108.34	4.66E-05
	hsa-miR-199b	2819.55	3.05E-03

#### [0561] 6.7.2.3.miRNA靶基因预测

[0562] miRNA靶基因预测分析根据材料与方法中所描述的进行。14个在pNK中高度表达的miRNA和24个在PB NK中高度表达的miRNA用超过一个靶基因恢复(表16)。详细地讲,在PB NK中鉴定出一些靶向抗凋亡基因Bcl-2和Bcl-2L的高度表达的miRNA,包括hsa-let-7a、hsa-let-7g、hsa-mir-133b、hsa-mir-181b和hsa-mir-181d。另外,miRNA hsa-mir-146b在PB NK细胞中高度表达并且其靶标TRAF6据报道下调NF- $\kappa$ B活性、抑制细胞增殖并且增强化学敏感性(Paik等人,2011,Clin.Cancer Res.17,4761-4771)。TRAF6连同例如MAPK14、IL6和FOS(其分别由hsa-mir-24、hsa-mir-7a和hsa-mir-222所靶向)等基因一起在先天性和适应性免疫力中起到关键性作用(Chiffolleau等人,2003,J.Immunol.171,5751-5759),在该研究中全都发现在PB NK中高度表达。此外,在PB NK中鉴定出高出3倍的hsa-mir-181组(hsa-mir-181b、hsa-mir-181c、hsa-mir-181d)。这些miRNA靶向nemo样激酶(一种Notch信号传导调节子),其在原代CD56+NK细胞中在自CD34+HSCs发育NK细胞和IFN- $\gamma$ 产生中起重要的作用(Cichocki等人,2011,J.Immunol.187,6171-6175)。最后,在pNK中高度表达的

miRNA组中,鉴定出由干细胞中的多潜能标志物和细胞周期调节子(如SOX2、BMPI1、SMO、AKT1、ATM、RAF1和MTOR)组成的miRNA:mRNA靶标对,其中大多数在PB NK中的miRNA的靶向基因列表(实验和已证实二者)中不存在。

[0563] 表16.与PB NK相比,在pNK中差异调节的miR及其已证实的靶基因

[0564] 在PB NK中的高度表达的miRNA

miR	基因					
hsa-let-7a	TRIM71 (7)	HMGA1 (4)	LIN28A (3)	ACP1 (2)	E2F2 (2)	SMOX (1)
	HMGA2 (6)	THBS1 (4)	CASP3 (3)	RTCD1 (2)	ITGB3 (2)	MYC (1)
			PRDM1 (2)	CCND2 (2)	LIN28 (1)	TUSC2 (1)
	UHRF2 (5)	NRAS (3)	DICER1 (2)	SLC20A1 (2)	NF2 (1)	BCL2 (1)
	MED28 (4)	EIF2C4 (3)			NEFM	
	ZFP36L1 (1)	NKIRAS2 (1)	EGR3 (1)	IL6 (1)	(1)	
hsa-let-7b*	HMGA2 (6)	CDC25A (3)	GRPEL2 (2)	NXT2 (2)	CDIPT (1)	SLC25A13 (1)
	IGF2BP1 (5)	AURKB (3)	MARS2 (2)	EIF2C3 (2)	CDKAL1 (1)	SLC25A1 (1)
	TMEM2 (5)	DHX57 (3)	MRM1 (2)	CCNA2 (2)	CSNK1D (1)	UHRF1 (1)
	LIN28B (5)	FNDC3A (3)	POM121 (2)		DOCK5 (1)	C20ORF72 (1)
		RDH10		CCNF (2)		
				EDEM3		SCAMP3
	CCNJ (5)	(3)	PXDN (2)	(2)	FADS2 (1)	(1)
	CDC34 (5)	SLC25A2 4 (3)	SCYL1 (2)	TRABD (2)	FAM96A (1)	C2ORF18 (1)
	IGF2BP2 (5)	SNAP23 (3)	SLC25A3 2 (2)	PLAGL2 (2)		
		LIN28A	SPRYD4	FARP1	GPR56 (1)	CIAO1 (1)
	DMD (5)	(3)	(2)	(2)	IPO4 (1)	BIRC6 (1)
		PRDM1		C7ORF58	KIAA040	AURKA
	E2F6 (5)	(3)	TAF9B (2)	(2)	9 (1)	(1)
	HMGA1 (4)	NRAS (3)	TTC9C (2)	LIN28 (1)	NEDD4 (1)	ALG3 (1)
	PGRMC1 (4)	RRM2 (3)	DLC1 (2)	BCL7A (1)	OPRS1 (1)	ARID3A (1)
	THBS1 (4)	CCND1 (2)	CCND2 (2)	ACTG1 (1)	RHOB (1)	CCBL2 (1)
	PDE12 (4)	ATP6V1F (2)	DICER1 (2)	AARSD1 (1)	RHOG (1)	RRP1B (1)
	E2F5 (4)	GEMIN7	GTF2I (2)	ANAPC1	SLC1A4	TAB2 (1)

[0565]

[0566]

	(2)		(1)		(1)	
<b>hsa-let-7g</b>	HMGA2 (6)	EIF4G2 (5)	IGF2BP1 (5)	COL1A2 (3)	BCL2L1 (1)	
<b>hsa-miR-10a</b>	NCOR2 (5)	MAP3K7 (4)	HOXA1 (1)	USF2 (1)	BTRC (1)	
<b>hsa-miR-133b</b>	BCL2L1 (2)	MCL1 (2)				
<b>hsa-miR-146b*</b>	TRAF6 (7)	IRAK1 (5)	MMP16 (2)	CARD10 (1)		
<b>hsa-miR-152</b>	DNMT1 (5)		HLA-G (2)			
<b>hsa-miR-155</b>	SOCS1 (5)	DET1 (4)	SPI1 (3)	SMAD1 (2)	TM6SF1 (1)	RAB34 (1)
	TSHZ3 (5)	IKBKE (3)	MEIS1 (2)	TRAM1 (2)	FOXO3 (1)	RAB6A (1)
	HIVEP2 (5)	PHF17 (3)	SMAD2 (2)	TRIP13 (2)	ARL5B (1)	SYPL1 (1)
	TAB2 (4)	BACH1 (3)	CYR61 (2)	FGF7 (2)	ATG3 (1)	VAMP3 (1)
	JARID2 (4)	RCN2 (3)	TP53INP1 (2)	KRAS (2)	ATP6V1C1 (1)	WDFY1 (1)
	CEBPB (4)	RCOR1 (3)	ANKFY1 (2)	HIF1A (2)	BET1 (1)	ETS1 (1)
	ARID2 (4)	ZNF652 (3)	CHAF1A (2)	C5ORF41 (2)	CBFB (1)	INPP5D (1)
	DHX40 (4)	MYB (3)	CLDN1 (2)	IKBIP (2)	DNAJB1 (1)	PAPOLA (1)
	PICALM (4)	TLE4 (3)	MYO10 (2)	TWF1 (2)	DSG2 (1)	SERTAD2 (1)
	TRIM32 (4)	CSF1R (3)	NARS (2)	CUX1 (2)	FMNL2 (1)	ERMP1 (1)
	ZIC3 (4)	FAR1 (3)	PHC2 (2)	SLA (2)	PKN2 (1)	C3ORF58 (1)
	KBTBD2 (4)	ZNF236 (3)	SDCBP (2)	AGTR1 (1)	PRAF2 (1)	HNRNPA3P1 (1)
	MSH2 (1)	PELI1 (1)				
<b>hsa-miR-17-5p</b>	E2F1 (1)					
<b>hsa-miR-181b</b>	GRIA2 (4)	GATA6 (4)	TIMP3 (4)	MAP3K1 (0)	NLK (2)	PLAG1 (2)
	CYLD (2)	VSNL1 (1)	KAT2B (1)	BCL2 (1)		
<b>hsa-miR-181c</b>	GATA6 (4)	KRAS (3)	NLK (2)	NOTCH4 (2)	NOTCH2 (1)	
<b>hsa-miR-181d</b>	GATA6 (3)	NLK (2)	BCL2 (1)			
<b>hsa-miR-186</b>	AKAP12 (1)					
<b>hsa-miR-191</b>	TMC7 (2)	SOX4 (1)				
<b>hsa-miR-197</b>	FBXW7 (4)	DPH1 (2)	UMPS (2)	CLIC1 (1)	HNF4A (1)	FOXO3 (1)
	CHIC2 (4)	ALMS1 (2)	CPNE6 (2)	WDR6 (1)	PEX13 (1)	IL1R1 (1)
	ACVR1 (4)	CES1 (2)	RBM4 (2)	NEK4 (1)	C10RF3 (8)	CPSF1 (1)

	RAB28 (3)	ZNF302 (2)	CYLD (2)	PIPOX (1)	MED16 (1)	SNX1 (1)
	HNRNP D (2)	RAD51 (2)	RFX1 (2)	IGF2AS (1)	LRP4 (1)	KLF10 (1)
	GOLGB1 (2)	RXR (2)	IER3 (1)	DCBLD2 (1)	TSPYL1 (1)	AGR2 (1)
	TUSC2 (1)	EHD2 (1)				
<b>hsa-miR-19 9b</b>	LAMC 2 (1)	HES1 (1)				
<b>hsa-miR-20 0c</b>	ZFPM2 (6)	ZEB1 (5) PTPN13	ERRFI1 (5)	ZEB2 (5)	FN1 (5) TUBB3 (1)	UBE2I (3)
<b>hsa-miR-21</b>	BAP1 (2)	(1)	BMI1 (1)	JAG1 (1)	(1)	
	TGFB1 (5)	GLCC1 (3)	RASGRP1 (3)	SGK3 (2)	ANKRD 46 (2) ACTA2 (1)	SLC16A1 0 (1)
	NFIB (4) RECK (4)	SOX5 (3) JAG1 (3)	MSH2 (3) PCBP1 (3)	RP2 (2) SERPINB5 (2)	BTG2 (1) SESNI (1)	TIMP3 (1) TGFB2 (1)
	PDCD4 (3)	BMPT2 (3)	TOPORS (3)	SPRY2 (2)	SOCS5 (1)	NCAPG (1)
	FAM3C (3)	TIAM1 (3)	APAF1 (2)	RHOB (2)	(1)	IL1B (1)
	RTN4 (1)	PTX3 (1)	CDK2AP1 (1)			
<b>hsa-miR-22 2</b>	CDKN1B (5)	FOS (5)	KIT (4)	CDKN1C (3) ICAM1 (1)	PPP2R2A (2)	MMP1 (1)
	SOD2 (1)	BBC3 (1)	PTEN (1)	(1)	ESR1 (1)	
<b>hsa-miR-24 *</b>	CDKN1B (4)	TRIB3 (4)	MAPK14 (2)	FURIN (2)	BRCA1 (1) KIAA0152 (1)	NOTCH1 (1) CDKN2A (1)
	ACVR1B (4)	DND1 (3)	NFAT5 (2)	MLEC (2)		
	KHSRP (1)	HNF4A (1)	TGFB1 (1)			
<b>hsa-miR-26 a</b>	SMAD1 (5)	HMGA1 (5)	CDK8 (4)	HMGA2 (3)	CCND2 (2)	CCNE2 (2)
	STRADB (5)	GSK3B (5)	MTDH (4) MAP3K2 (4)	CPEB4 (3) SERBP1 (2)	CTGF (2) CDC6 (2)	LIF (2) CPEB2 (1)
<b>hsa-miR-33 1</b>	PTEN (5) CPEB3 (1)	EZH2 (4) SMAD4 (1)				
	ERBB2 (2)	CDCA 5 (2)	KIF23 (1)			
<b>hsa-miR-34 2</b>	BMP7 (1)			GEMIN4 (1)		
<b>hsa-miR-42 9</b>	ZFPM2 (6)	ZEB1 (6)	ERRFI1 (4)	ZEB2 (4)	WASF3 (3)	BAP1 (1)

[0567] 在pNK中的高度表达的miRNA

[0568]

[0569]



	<b>hsa-miR-100</b>	MTOR (3)	PLK1 (1)	FGFR3 (1)	IGF1R (1)	ATM (1)
	<b>hsa-miR-125b</b>	LACTB (6)	BMF (3) BMPR1B (3)	SAMD10 (3) EIF4EBP1 (3)	MKKNK2 (2) BBC3 (2) QSOX2 (2)	DICER1 (1) JUB (1) DDX19B (1) PABPC1 (1) AKT1 (1) TP53 (1) CASC3 (1)
		BAK1 (5) ARID3B (5)	ENTPD4 (3)	KLF13 (3)	LIN28A (2) LIN28 (1) C10ORF1 (1) 04 (1)	
		IRF4 (5) PRDM1 (4) SLC35A4 (4)	TOR2A (3) KCNS3 (3) LIN28B (3) GRIN2A (3)	ULK3 (3) SLC7A6 (3) SLC7A1 (3)	IGF2 (2) NKIRAS2 (2) SEL1L (2) ATXN1 (2)	B3GALT4 (1) UBE2I (1) RBM8A (1) IGFBP3 (1)
		CGN (4)	STAT3 (3)	ERBB3 (2) CDKN2A (2)	RAF1 (2) CYP24A1 (2)	E2F3 (1) RNF144A (1)
		CBX7 (3)	LIF (3) SMARCD2 (3)	ABTB1 (2) ARID3A (2)	ABCC4 (2)	LYPLA2 (1)
		SGPL1 (3) PLEKHA8 (1)	TP53INP1 (1)	VDR (1)	SMO (1)	
[0570]	<b>hsa-miR-211</b>	KCNMA1 (3)				
	<b>hsa-miR-302c</b>	ESR1 (2)				
	<b>hsa-miR-326</b>	PKM2 (2)	SMO (1)	GLI1 (1)	NOTCH2 (1)	
	<b>hsa-miR-422a**</b>	CYP8B1 (2)				
	<b>hsa-miR-519c</b>	HIF1A (4)				
	<b>hsa-miR-519d</b>	CDKN1A (4)	PPARA (3)			
	<b>hsa-miR-520c</b>	APP (3)	CD44 (3)			
	<b>hsa-miR-520g</b>	VEGFA (2)				
	<b>hsa-miR-520h</b>	SMAD6 (3)	ABCG2 (2)	CDKN1A (2)	VEGFA (2)	ID1 (1) ID3 (1)
	<b>hsa-miR-522</b>	SOX2 (1)				
	<b>hsa-miR-342</b>	BMP7 (1)		GEMIN4 (1)		
	<b>hsa-miR-429</b>	ZFPM2 (6)	ZEB1 (6)	ERRFI1 (4)	WASF3 (3)	BAP1 (1)

[0571] \*和\*\*分别表示在仅PB或pNK中,至少一个供体中的表达水平显著高于内源对照(高出2个标准偏差)。括号内的数字表示数据库的个数,说明该基因由该miR所靶向,除了先前已证实的以外(例如,通过统计学分析和通过实验)。

[0572] 6.7.2.4. pNK细胞的离体扩增

[0573] 在以上描述的分选程序之后从平均为 $10 \times 10^6$ 个pNK细胞开始,使用一种扩增细胞

毒性和辅助T细胞的方案 (Yssel等人, 1984) 将pNK细胞的扩增最优化。首先, 为了将饲养细胞浓度最优化, 将同种异体PBMC和K562细胞以1:10、1:5和1:1的比率进行测试, 同时将PBMC的浓度固定在 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。如表17所示, 1:1 ( $1 \times 10^6/\text{ml}$  K562: $1 \times 10^6/\text{ml}$  PBMC) 的比率导致98.4倍 ( $N=14$ ) 的最大NK细胞扩增, 相比之下, 对于1:5比率为31.8倍 ( $N=3$ ) 和对于1:10比率为53.1倍 ( $N=9$ )。因此, 使用1:1比率进行进一步pNK培养。接下来, 评估了在培养过程中补加新鲜饲养细胞增强NK扩增的能力。为了确定补加新鲜饲养细胞的最佳时间窗, 用BrdU和7-氨基放线菌素-D (7-AAD) 双染色, 然后用流式细胞术评估了在第7、14、21和28天时pNK细胞的细胞生长动力学。如图14所见到的, 在第7天, 培养的NK细胞的多数处于S-期, 表明细胞正在增殖。活跃增殖/分裂细胞的百分比在后续培养期间明显减少, 提示第7天是进行再刺激的最佳窗口。如表18所示, 在第7天添加新鲜K562和PBMC饲养细胞导致NK细胞扩增增加3倍。在20个扩增实验中重复了这种最优化的21天NK培养方法, 得出每个供体平均 $1.2 \times 10^9$  CD56+ CD3-NK细胞具有近似80%活力 (图15A)。

[0574] 表17. 作为饲养细胞的K562与PBMC的比率的最优化

	饲养细胞比			平均扩增倍
	饲养细胞类型	率	#供体	扩增倍数*范围
[0575]	K562:PBMC	1:10	9	6.2~130.6
	K562:PBMC	1:5	3	10.64~53.76
	K562:PBMC	1:1	14	14.8~358.4

[0576] \*扩增倍数=在第21天的CD56+CD3-NK细胞绝对数/在第0天的NK细胞绝对数。

[0577] 表18. 饲养细胞在不同时间点补加的效果

	刺激天数	#供体	扩增倍数范围	平均扩增倍数
[0578]	第0天	10	17.4~83.0	40.9
	第0天+第7天	10	47.6~394.8	147.5

[0579] 6.7.2.5. 离体-扩增的pNK细胞的表征

[0580] 免疫表型变化和miRNA变化在来自12个组合单位的扩增的pNK细胞中与未扩增的细胞相比进行了表征。例如, 第21天pNK细胞显示与未扩增的细胞相比, 在激活受体 (如NKG2D、NKp46、NKp44和NKp30) 的表达中显著增加, 而在双向受体2B4的表达中显著减少。抑制性KIR (包括KIR3DL1和KIR2DL2/L3) 的表达对于扩增的和未扩增的细胞是相似的 (图15B和表19)。

[0581] 表19. 第21天-扩增的pNK vs未扩增的pNK细胞的亚群体比较

[0582]	NK 表征	第21天 pNK (12个单位)		第0天 pNK (16个单位)		P 值
	NK 亚群体	平均值%	STDEV	平均	STDEV	

			值%			
[0583]	CD56+CD16-	35.98	18.18	60.94	16.58	**
	CD56+CD16+	63.80	18.32	39.05	16.58	**
	KIR3DL1+	17.92	13.44	12.31	8.11	NS
	KIR2DL2/L3+	21.10	10.48	21.89	8.65	NS
	NKG2D+	89.28	12.88	42.11	17.79	***
	NKp46+	88.74	5.34	6.98	4.33	***
	CD226+	18.79	12.14	15.97	6.66	NS
	NKp44+	64.13	16.65	9.48	5.27	**
	NKp30+	84.53	12.40	39.08	19.06	***
	2B4+	0.89	0.99	11.07	5.90	***
	CD94+	74.82	12.45	71.31	13.94	NS

[0584] \*p<0.05;\*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001

[0585] 也使用针对pNK建立的最优化的分离和扩增程序(如上所述)在9个供体中对PB NK的扩增和免疫表型进行了表征,并且将第21天-扩增的pNK vs第21天-扩增的PB NK的比较显示在表20中。

[0586] 表20.第21天-扩增的pNK vs第21天-扩增的PB NK中的亚群体比较

NK 亚群体	组合(12 个单位)		PB (9 个单位)		P 值
	平均值%	STDEV	平均值%	STDEV	
CD16-	35.98	18.18	28.39	7.78	NS
CD16+	63.80	18.32	71.50	7.78	NS
KIR3DL1+	17.92	13.44	8.83	6.44	NS
KIR2DL2/L3+	21.10	10.48	37.40	17.82	*
NKG2D+	89.28	12.88	73.27	20.06	NS
NKp46+	88.74	5.34	64.97	17.26	**
CD226+	18.79	12.14	4.80	1.72	NS
NKp44+	64.13	16.65	16.00	3.82	**
NKp30+	84.53	12.40	55.77	1.96	*
2B4+	0.89	0.99	2.16	1.76	NS
CD94+	74.82	12.45	71.76	20.35	NS

[0588] \*p<0.05;\*\*p<0.01;\*\*\*p<0.001

[0589] 此外,在离体扩增之后,23个miRNA的表达增加,而31个其它miRNA被下调(表21)。发现其中有一个被上调的miRNA是hsa-miR-155,已显示当其过度表达时通过IFN- $\gamma$ 诱导增强而增加NK细胞功能(Trotta等人,2012,Blood 119,3478-3485)。

[0590] 表21.在pNK离体扩增期间差异调节的miRNA

第 21 天 vs 第 0 天			
miRNA		的倍数变化	P 值
[0591]	hsa-miR-520g	-2820.57	6.33E-05
	hsa-miR-520h	-2803.02	4.35E-04
	hsa-miR-518a	-2300.60	5.72E-05
	hsa-miR-517b	-1669.82	8.11E-05
	hsa-miR-451	-1626.65	2.40E-03
	hsa-miR-518c	-609.88	2.93E-04
	hsa-miR-127	-557.55	3.40E-04

	hsa-miR-517a	-288.89	8.27E-05
	hsa-miR-382	-273.34	1.77E-04
	hsa-miR-519d	-245.09	7.13E-04
	hsa-miR-486	-149.95	6.29E-03
	hsa-miR-518b	-112.10	9.70E-05
	hsa-miR-522	-85.30	2.58E-03
	hsa-miR-376a	-72.14	2.95E-03
	hsa-miR-198	-70.93	1.13E-03
	hsa-miR-126	-51.46	1.97E-04
	hsa-miR-487b	-47.68	3.32E-03
	hsa-miR-519c	-47.52	4.88E-03
	hsa-miR-518e	-34.89	5.06E-03
	hsa-miR-433	-18.07	5.68E-04
	hsa-miR-125b	-16.66	4.66E-04
	hsa-miR-214	-16.38	5.74E-03
	hsa-miR-130a	-12.98	4.13E-03
	hsa-miR-518d	-10.75	8.73E-03
	hsa-miR-99a	-7.91	2.03E-03
	hsa-miR-515-3p	-4.93	2.50E-03
	hsa-miR-95	-4.73	9.30E-04
	hsa-miR-30a-3p	-3.06	1.20E-03
	hsa-miR-30d	-2.59	4.32E-03
	hsa-miR-26a	-1.75	7.81E-03
[0592]	hsa-miR-191	-1.32	2.12E-03
	hsa-miR-331	1.53	6.74E-03
	hsa-miR-181c	1.71	1.24E-03
	hsa-miR-142-3p	2.24	5.55E-03
	hsa-miR-155	2.48	3.47E-03
	hsa-miR-24	2.66	1.03E-03
	hsa-miR-23a	3.07	8.50E-03
	hsa-miR-142-5p	3.21	3.34E-04
	hsa-let-7d	3.22	3.29E-03
	hsa-miR-195	3.77	2.92E-04
	hsa-miR-141	3.80	5.20E-03
	hsa-miR-98	3.83	2.96E-03
	hsa-miR-222	3.86	7.71E-03
	hsa-miR-545	5.28	5.60E-03
	hsa-miR-642	7.17	2.82E-04
	hsa-miR-21	13.46	1.94E-04
	hsa-miR-210	13.87	6.66E-03
	hsa-miR-221	21.73	3.04E-03
	hsa-miR-34c	45.37	5.26E-04
	hsa-miR-135b	49.26	1.17E-03
	hsa-miR-34a	66.38	8.08E-03
	hsa-miR-10a	72.27	1.27E-03
	hsa-miR-380-3p	921.50	1.18E-03
	hsa-miR-520a	10892.33	2.38E-05

[0593] 6.7.2.6. 扩增的pNK细胞的抗肿瘤细胞溶解活性

[0594] 评估了扩增的pNK细胞对多种肿瘤类型的细胞溶解活性。在基于FACS的PKH26/T0-

PRO-3细胞毒性测定中,评估了扩增的pNK对K562细胞的细胞溶解活性。如图15C所示,在第21天vs第14天,以10:1的E:T比率,pNK细胞对K562显著增强( $63\% \pm 15\%$  vs  $45\% \pm 4\%$ ,  $p < 0.001$ )。通过比较,在第21天,观察到来自PB NK细胞(vs.pNK细胞)的细胞毒性/细胞溶解活性较少( $42\% \pm 7\%$ ) (图15C)。

[0595] 在pNK细胞21天扩增之后在细胞溶解活性方面的这种增加与激活受体和miRNA中的表达增加相关。延长培养至28天不导致针对K562细胞的细胞溶解活性进一步增加。

[0596] 将11个另外的肿瘤细胞系与第21天扩增的pNK细胞共培养,并且在4小时LDH释放测定中测量以10:1、5:1、2:1和1:1的E:T比率的NK细胞细胞溶解活性。在10:1的E:T比率下,扩增的pNK细胞表现出针对多种肿瘤细胞系大于50%细胞毒性,包括U937细胞, $89.2\% \pm 9.8\%$ ; WERI-RB-1细胞, $73.3\% \pm 11.8\%$ ; RPMI8226细胞, $61.3\% \pm 1.3\%$ ; HCT-116细胞, $61\% \pm 5.1\%$ ; 和U266细胞, $57.4\% \pm 4.7\%$ ,以及K562细胞, $88.6\% \pm 5.6\%$  (图16)。扩增的pNK细胞对肿瘤系的细胞溶解活性是以剂量依赖性的方式,如通过E:T比率的系统滴定所显示。

[0597] 这些结果证明,扩增的pNK具有杀死多种肿瘤细胞(包括血液肿瘤(例如,白血病)和实体肿瘤)的能力。

[0598] 6.7.3. 结论

[0599] 本实施例证明pNK细胞(例如,来自人胎盘来源的干细胞和UCB细胞的细胞,与PB NK细胞相比,其在表型和miRNA分布型中是截然不同的)能够经过扩增以产生临床上相关数量的可用于抵抗多种肿瘤细胞类型的高度细胞毒性的细胞。

[0600] 6.8. 实施例8

[0601] 本实施例描述pNK细胞用于治疗接受HLA-不完全相同的(同种异体的)干细胞移植的患者的GVHD的用途。

[0602] 在患有血液恶性肿瘤的患者中HLA-不完全相同的供体造血干细胞(HSC)加上pNK细胞移植。对患有血液恶性肿瘤的个体实施化疗和全身放疗以使癌细胞的生长停止并且防止个体的免疫系统排斥健康供体的干细胞。给该个体输注的来自供体的健康HSC帮助该个体的造血系统重建。然后,个体经历pNK细胞移植以防止GVHD或降低GVHD的严重性,除了防止复发并且改善生存期以外。

[0603] 等同实施方式:

[0604] 本发明并不局限于由本文描述的具体实施方式所涵盖的范围。实际上,根据以上描述和附图,对本发明的各种修改,除了所述的那些以外,对于本领域技术人员来说将变得显而易见。这样的修改计划落入附上的权利要求书的范围内。

[0605] 在本说明书中引用的所有参考文献通过引用以其全部内容并入本文并且用于所有目的,其程度就像每个单独的出版物、专利或专利申请具体地和单独地指明通过引用以其全部内容并入本文用于所有目的一样。任何出版物的引用是针对其在申请日之前的公开内容并且不应当被解释为承认本发明无权凭借着在先发明早于这样的公开。

## 序列表

<110> 人类起源公司

<120> 来自胎盘的自然杀伤细胞

<130> 14247-221-146

<140> PCT/US2014/014632

<141> 2014-02-04

<150> US 61/761,176

<151> 2013-02-05

<150> US 61/780,115

<151> 2013-03-13

<160> 20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<220>

<223> hsa-miR-100 (Sanger登记号: MIMAT0000098)

<400> 1

aacccguaga uccgaacuug ug 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<220>

<223> hsa-miR-127 (Sanger登记号: MIMAT0000446)

<400> 2

ucggauccgu cugagcuugg cu 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<220>

<223> hsa-miR-211 (Sanger登记号: MIMAT0000268)

<400> 3

uuuccuuugu cauccuucgc cu 22

<210> 4

<211> 23

<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-302c (Sanger登记号: MIMAT0000717)  
<400> 4  
uaagugcuuc cauguuucag ugg 23  
<210> 5  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-326 (Sanger登记号: MIMAT0000756)  
<400> 5  
ccucugggcc cuuccuccag 20  
<210> 6  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-337 (Sanger登记号: MIMAT0000754)  
<400> 6  
uccagcuccu auaugaugcc uuu 23  
<210> 7  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-497 (Sanger登记号: MIMAT0002820)  
<400> 7  
cagcagcaca cugugguuug u 21  
<210> 8  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-512-3p (Sanger登记号: MIMAT0002823)  
<400> 8  
aagugcuguc auagcugagg uc 22  
<210> 9

<211> 24  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-515-5p (Sanger登记号: MIMAT0002826)  
<400> 9  
uucuccaaaa gaaagcacuu ucug 24  
<210> 10  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-517b (Sanger登记号: MIMAT0002857)  
<400> 10  
ucgugcaucc cuuuagagug uu 22  
<210> 11  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-517c (Sanger登记号: MIMAT0002866)  
<400> 11  
aucgugcauc cuuuuagagu gu 22  
<210> 12  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-518a (Sanger登记号: MIMAT0002863)  
<400> 12  
aaagcgcuuc ccuuugcugg a 21  
<210> 13  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-518e (Sanger登记号: MIMAT0002861)  
<400> 13  
aaagcgcuuc ccuucagagu g 21



<210> 14  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-519d (Sanger登记号: MIMAT0002853)  
<400> 14  
caaagugccu cccuuuagag ug 22  
<210> 15  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-520g (Sanger登记号: MIMAT0002858)  
<400> 15  
acaaagugcu uccuuuaga gugu 24  
<210> 16  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-520h (Sanger登记号: MIMAT0002867)  
<400> 16  
acaaagugcu uccuuuaga gu 22  
<210> 17  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-564 (Sanger登记号: MIMAT0003228)  
<400> 17  
aggcacggug ucagcaggc 19  
<210> 18  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 智人  
<220>  
<223> hsa-miR-566 (Sanger登记号: MIMAT0003230)  
<400> 18

gggcgccugu gaucccaac 19

<210> 19

<211> 23

<212> RNA

<213> 智人

<220>

<223> hsa-miR-618 (Sanger登记号: MIMAT0003287

<400> 19

aaacucuacu uguccuucug agu 23

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<220>

<223> hsa-miR-99a (Sanger登记号: MIMAT0000097)

<400> 20

aacccguaga uccgaucuug ug 22

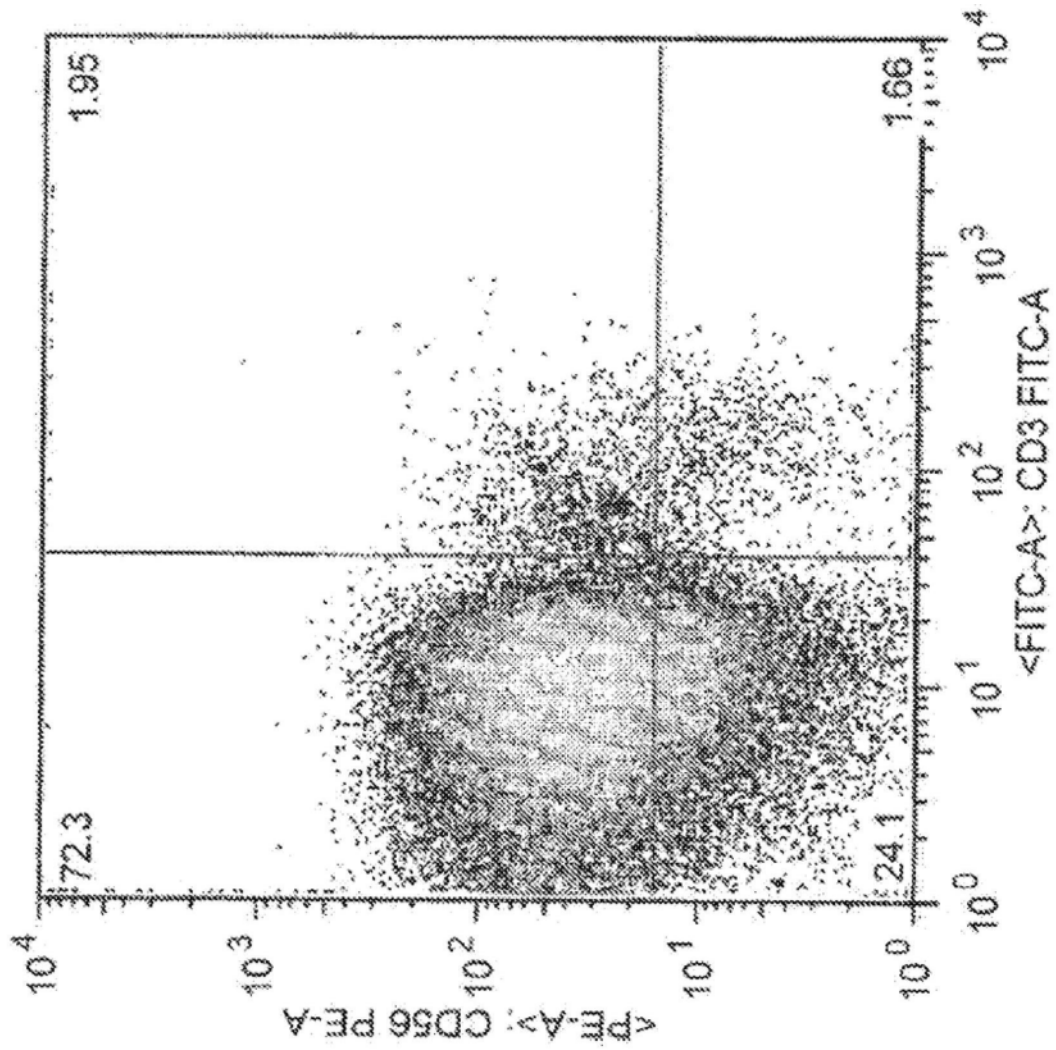


图1

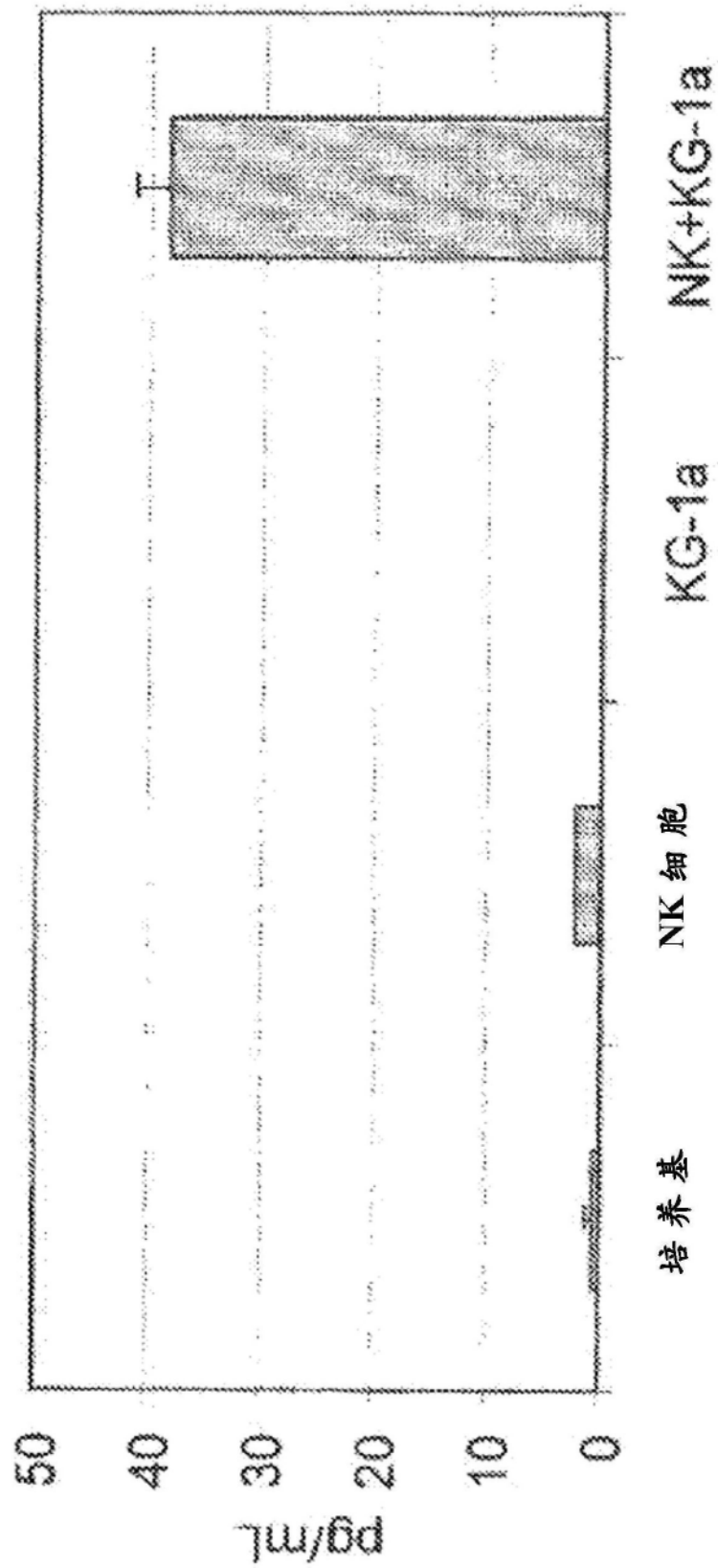


图2A

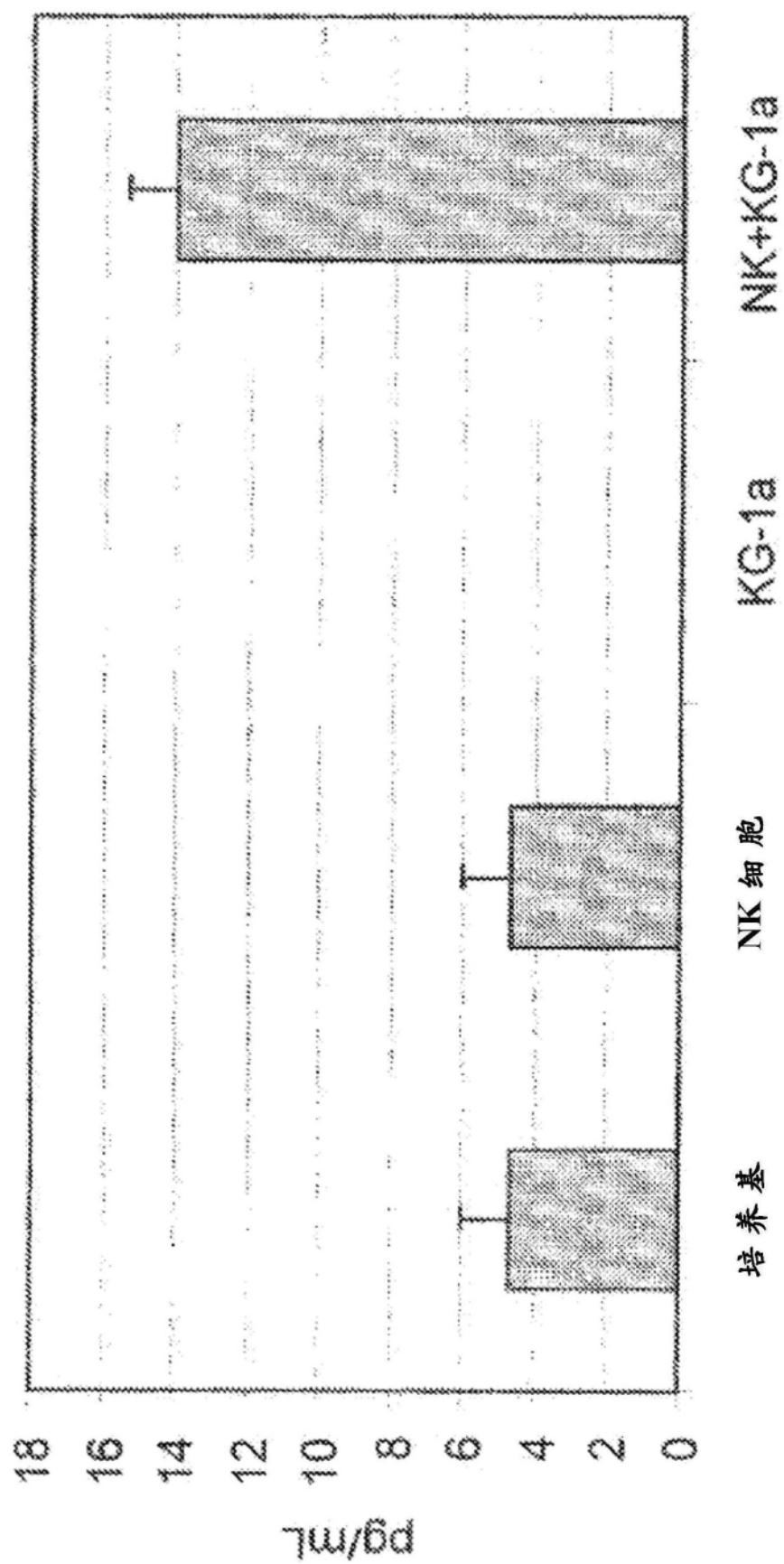


图2B

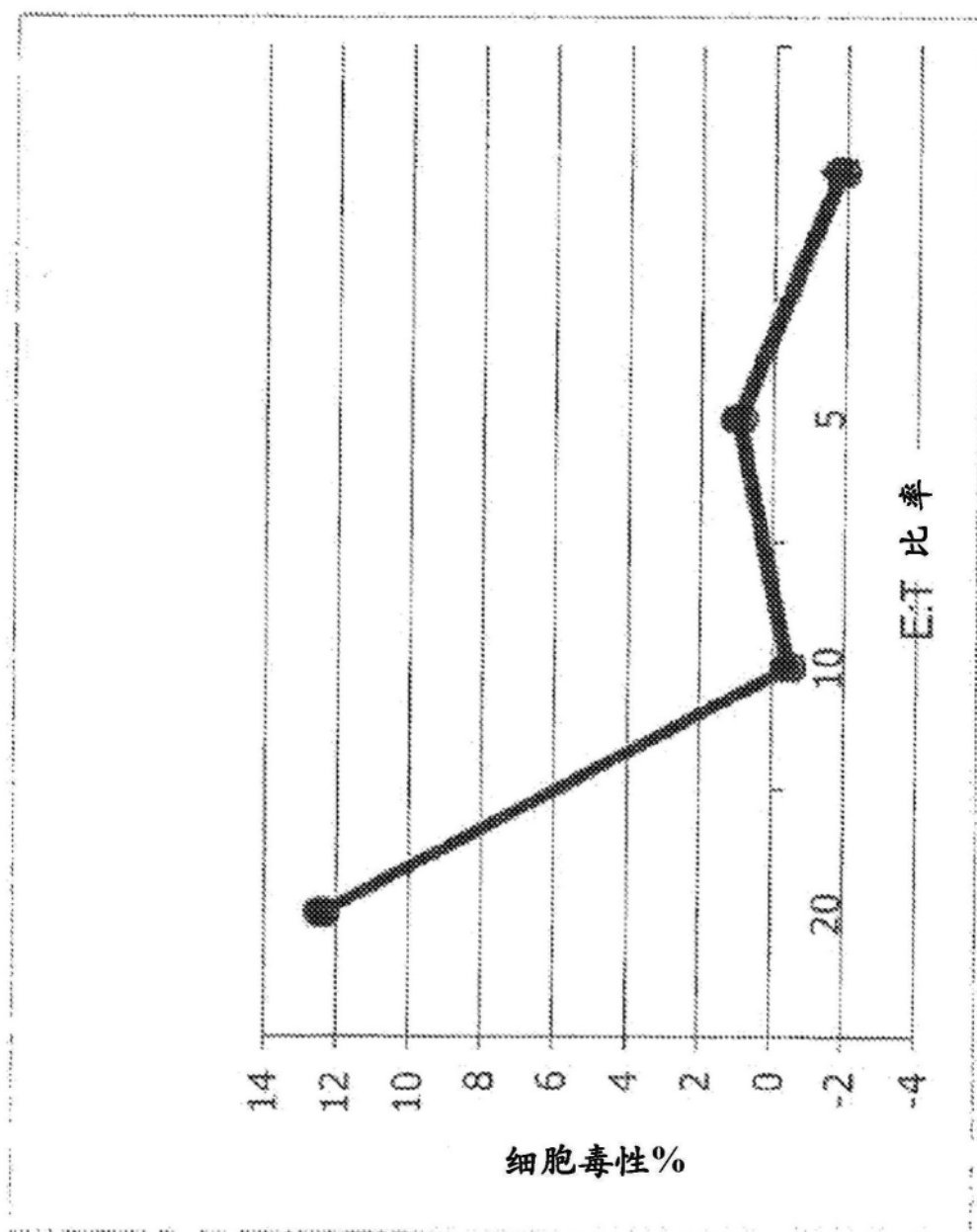


图3

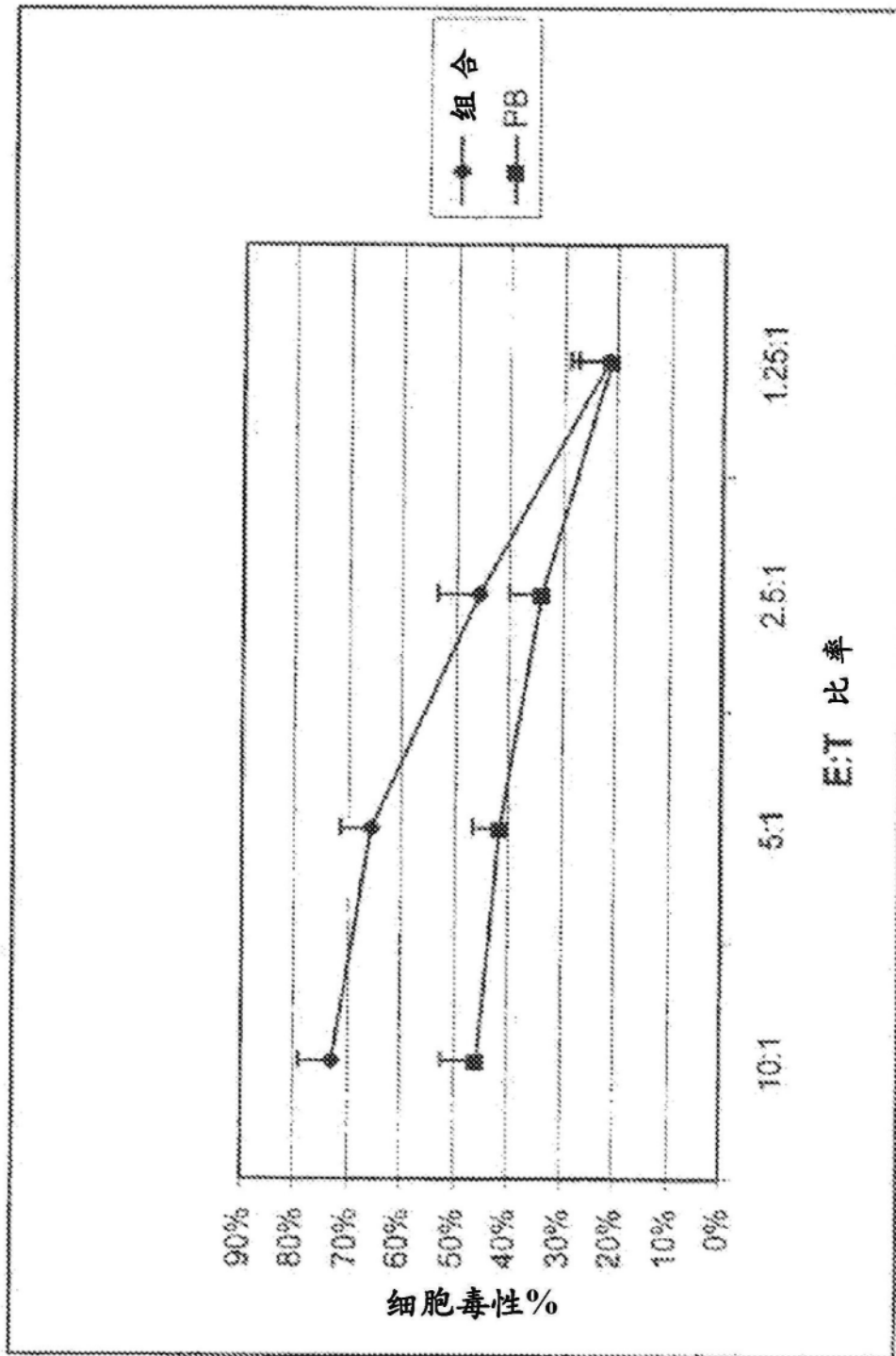


图4

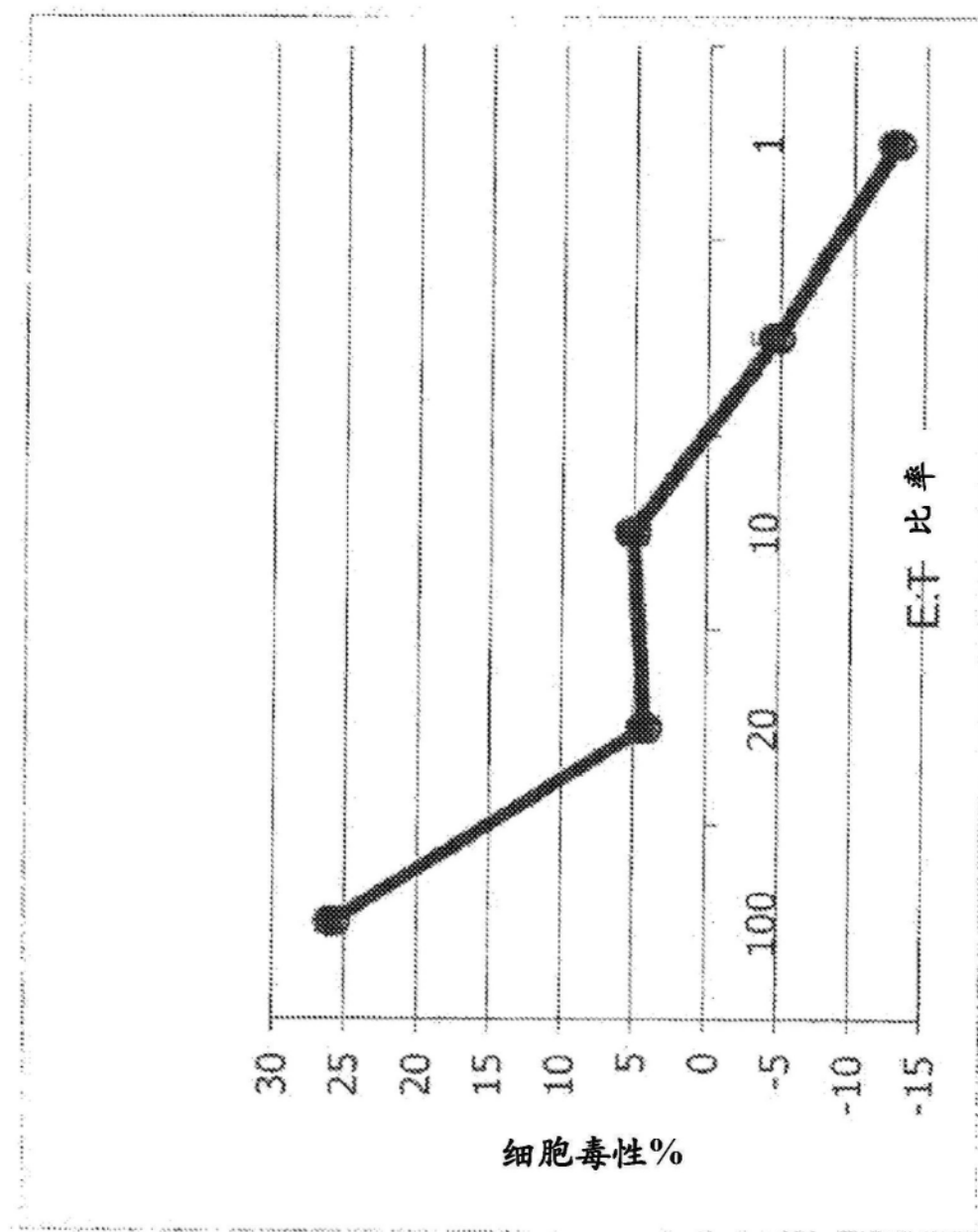


图5



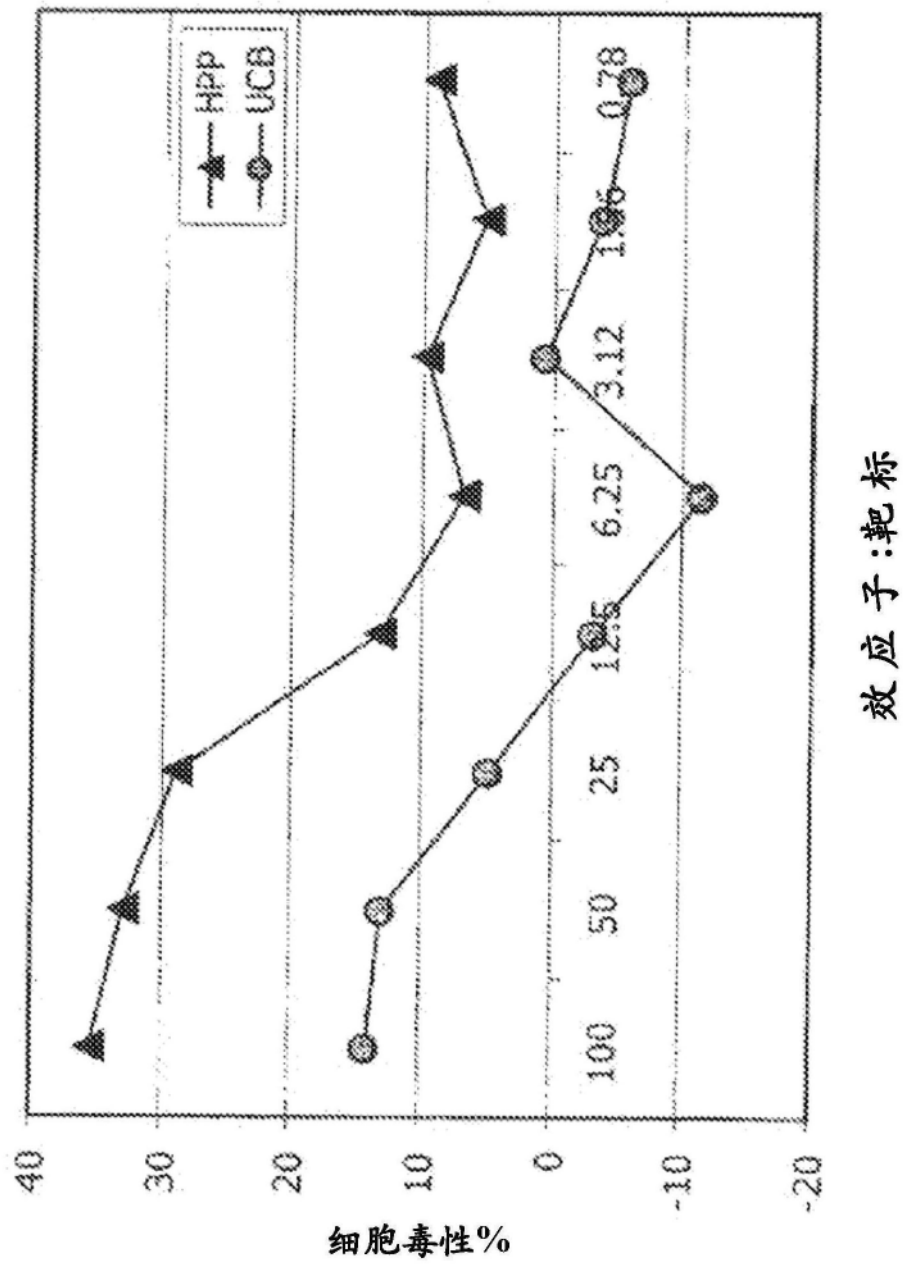


图6

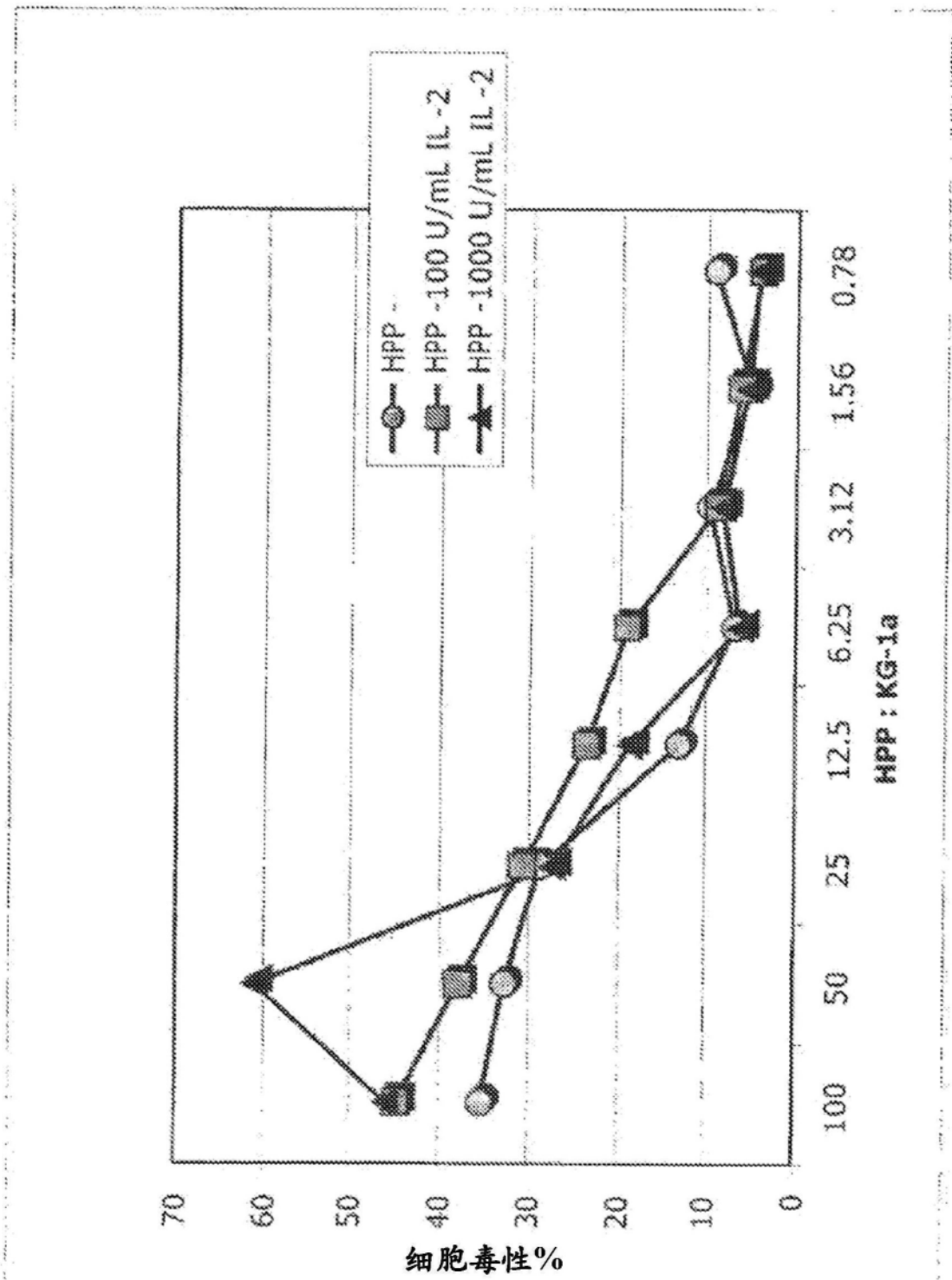
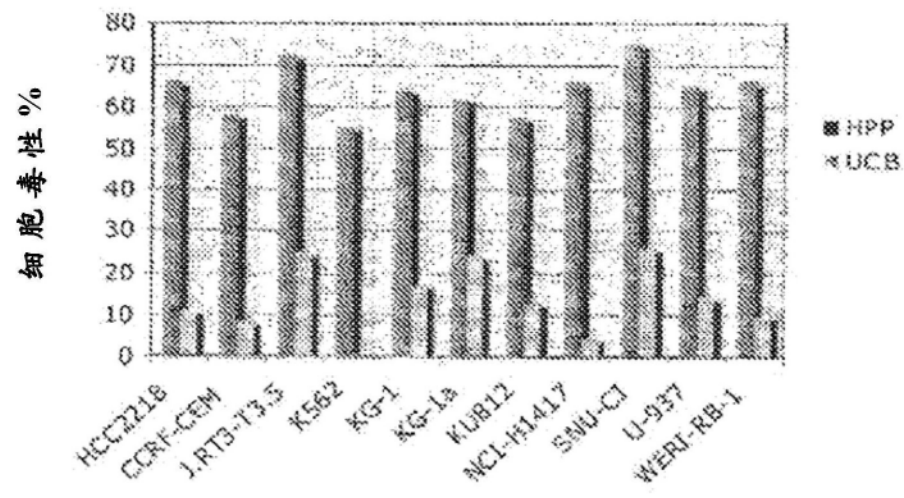


图7

A



B

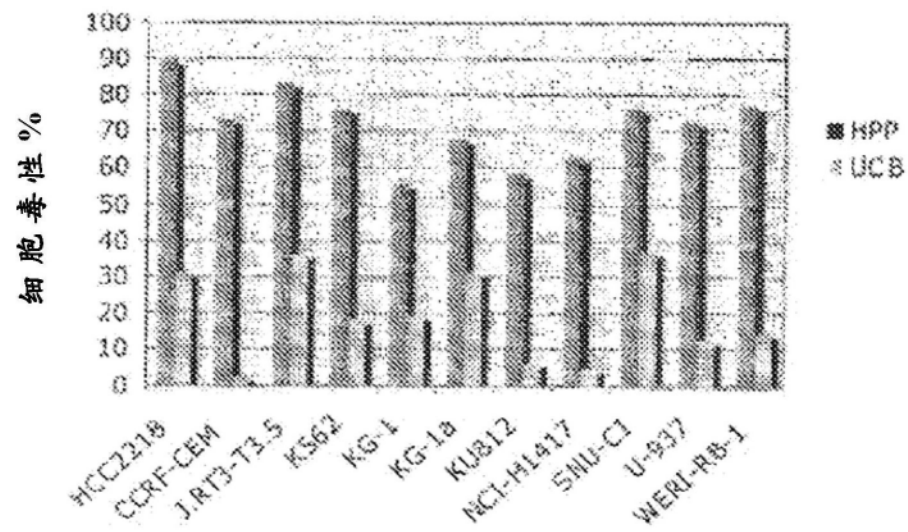


图8A,8B

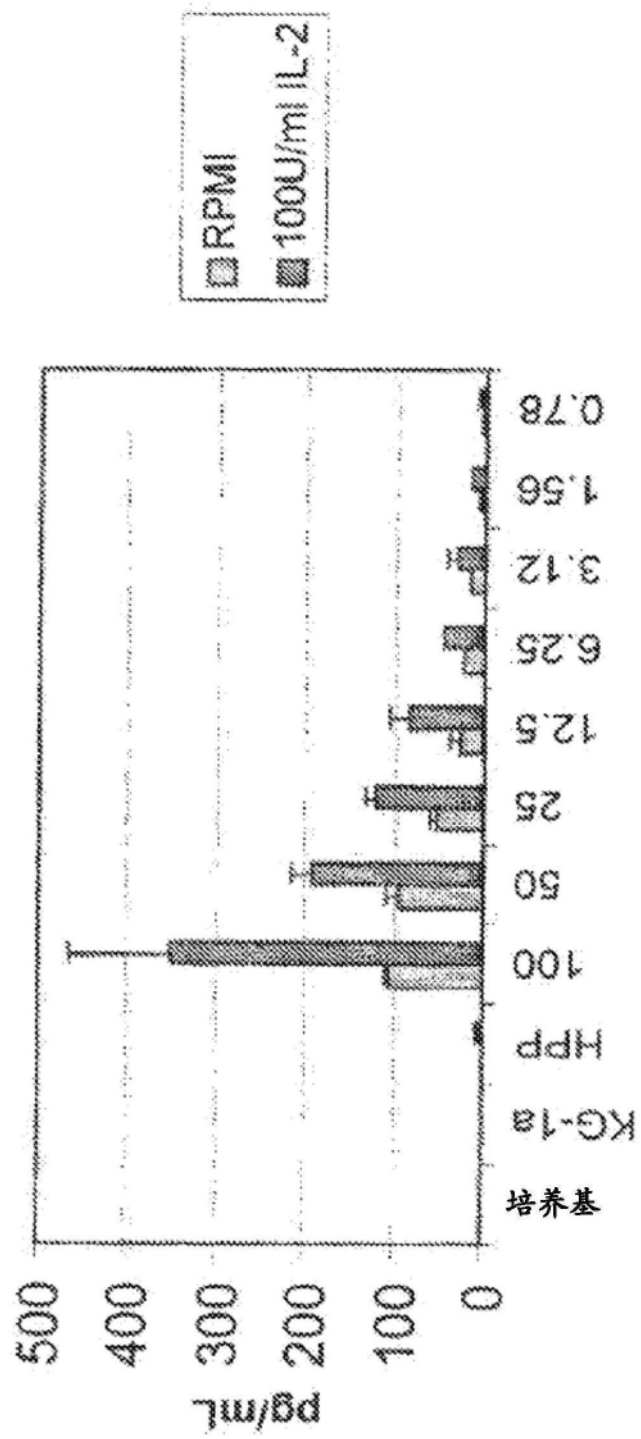


图9

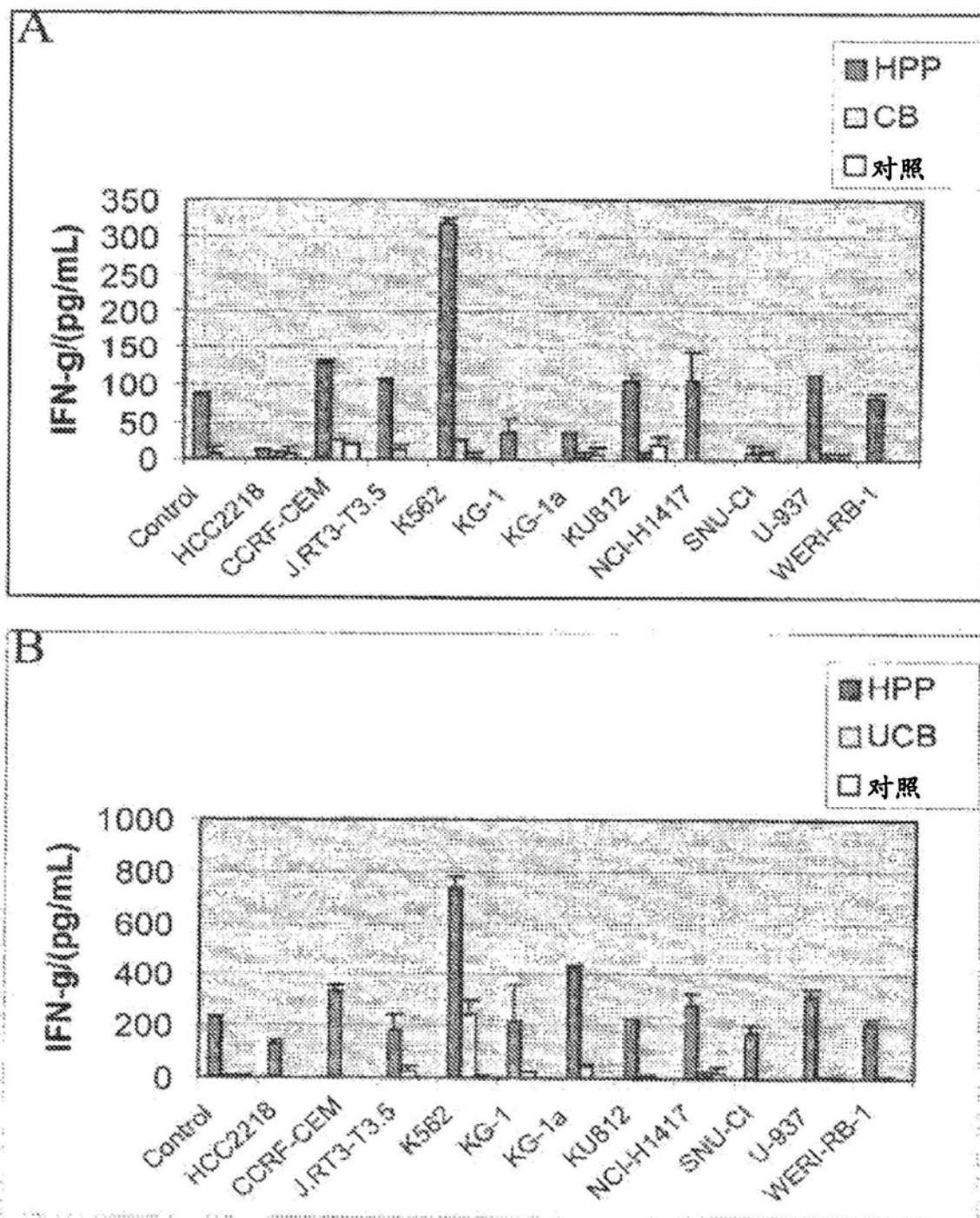


图10A,10B

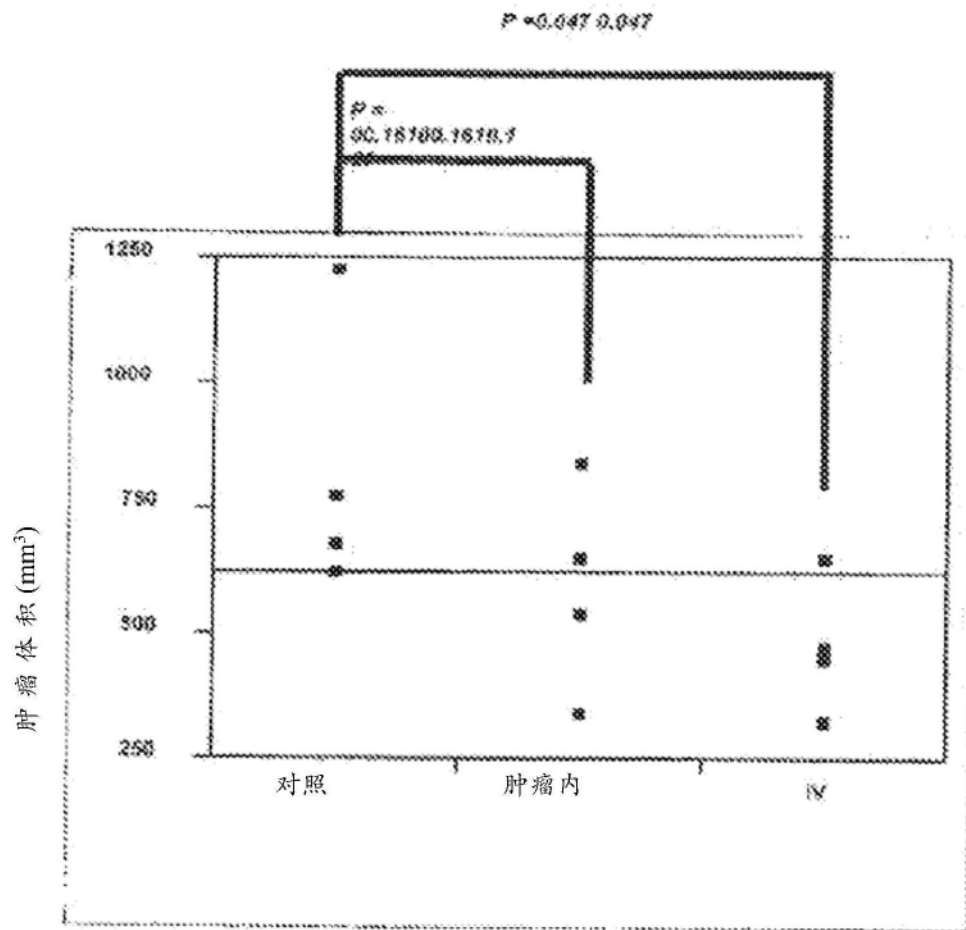


图11

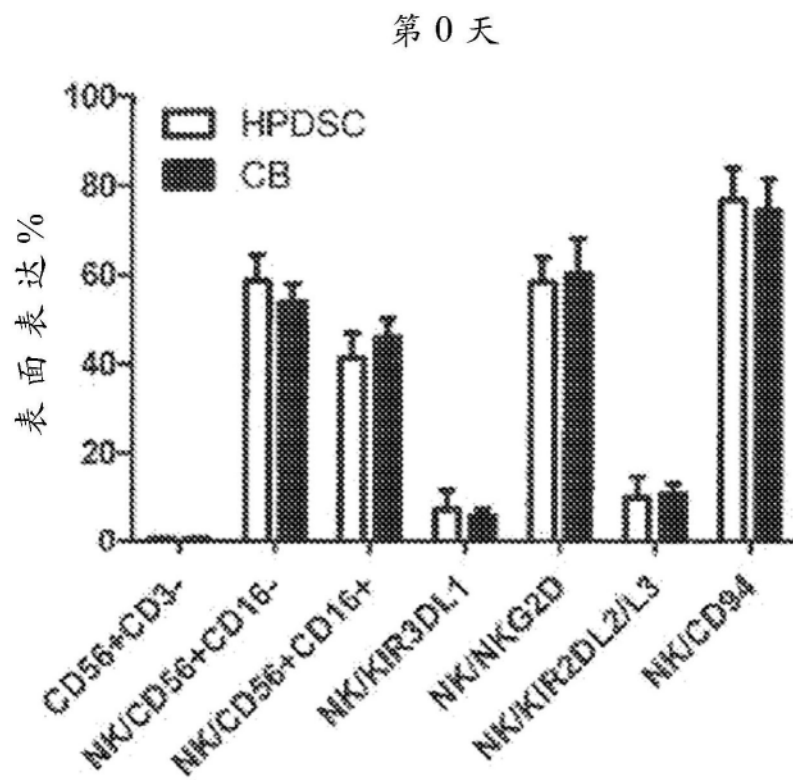


图12A

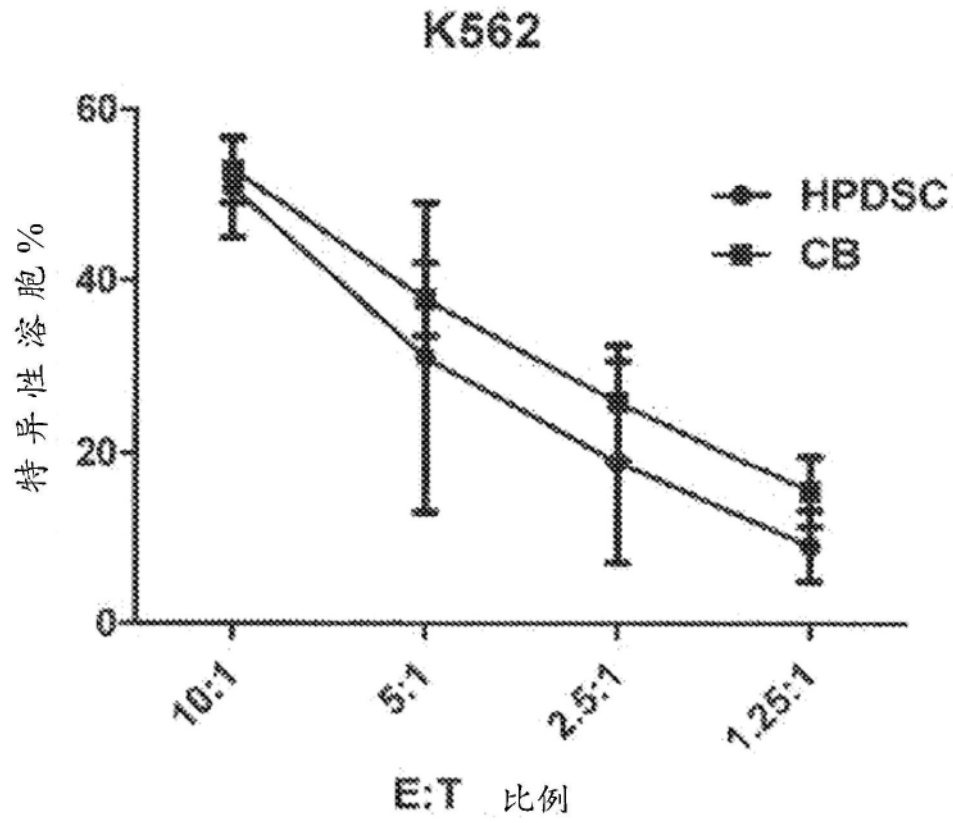


图12B

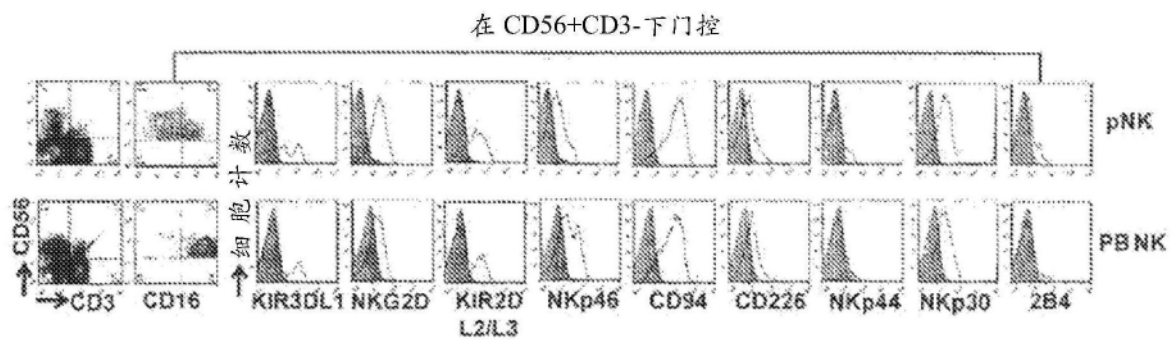


图13A



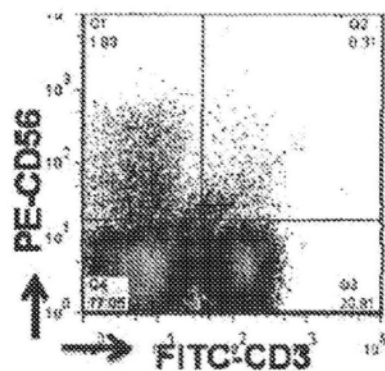


图13B

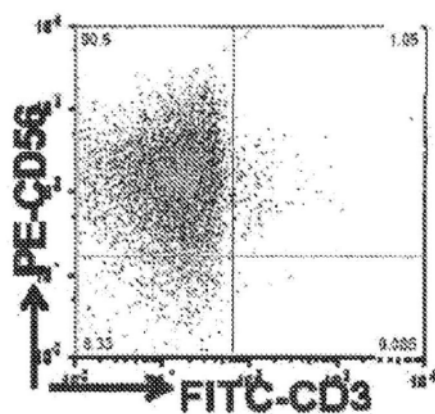


图13C

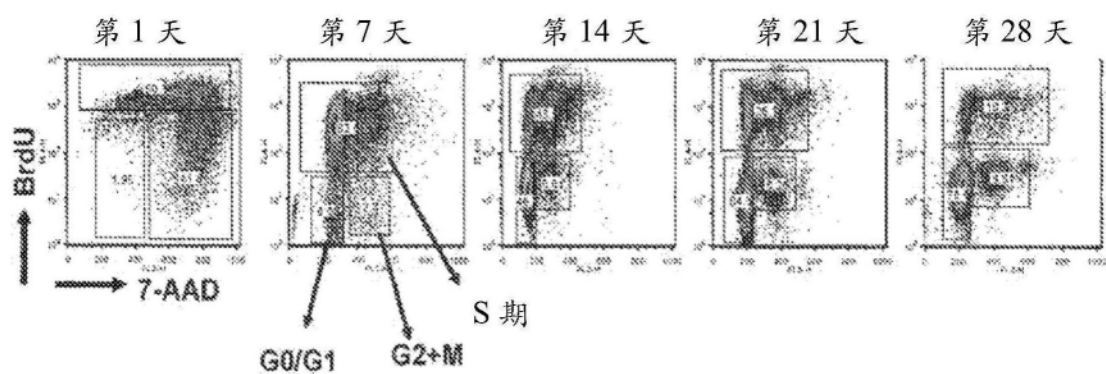


图14A

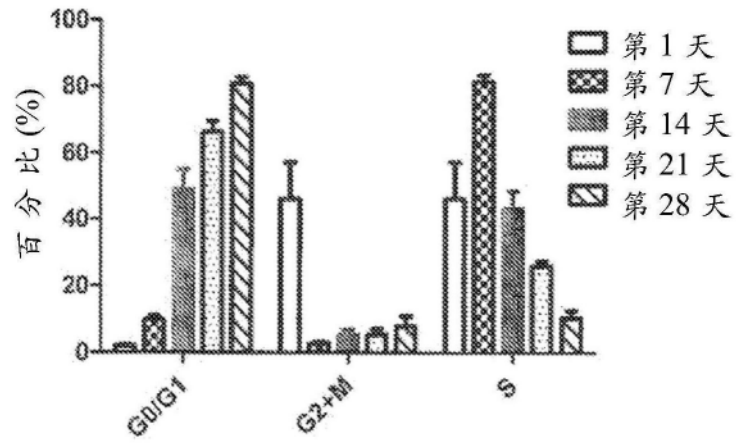


图14B

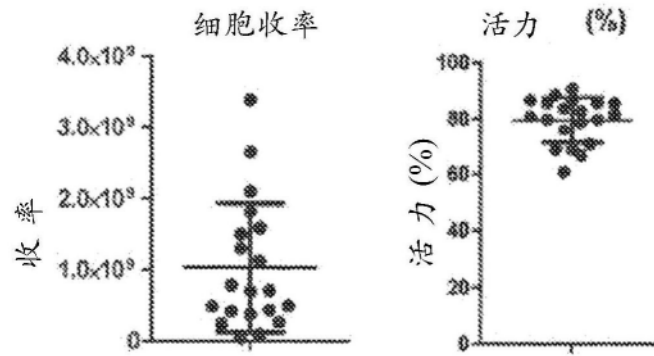


图15A

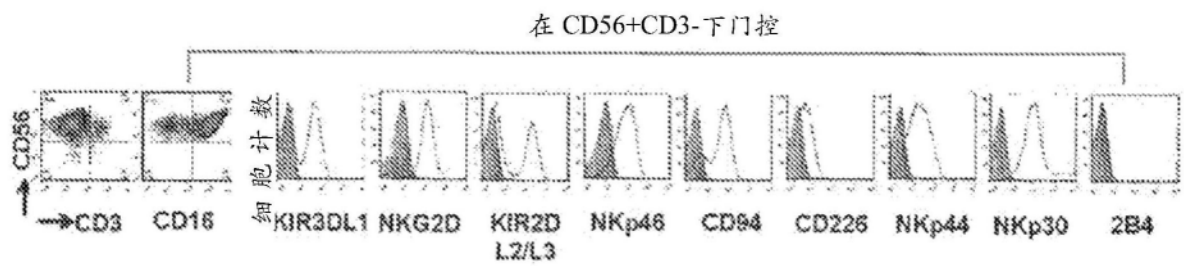


图15B

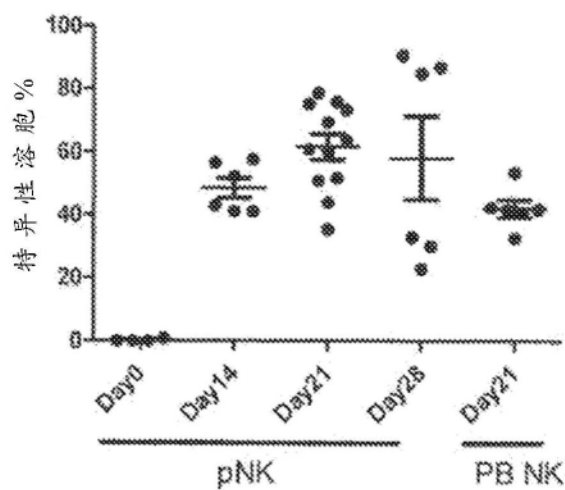


图15C

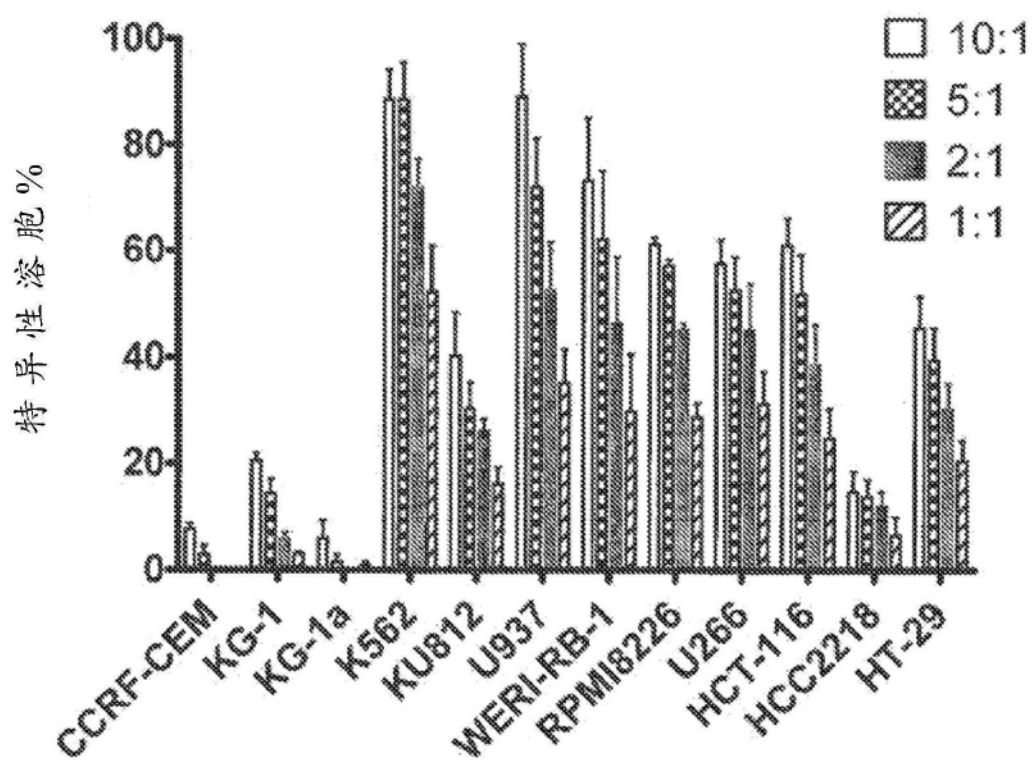


图16