(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114269904 A
(43)申请公布日 2022.04.01

(21)申请号 202080059218.8
(22)申请日 2020.08.20
(30)优先权数据
1911953.6 2019.08.20 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.02.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/073400 2020.08.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/032852 EN 2021.02.25
(71)申请人 艾达普特免疫有限公司
地址 英国牛津郡
(72)发明人 L·J·巴克 L·卡朋特 A·西德韦
(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
代理人 徐迅 崔佳佳
(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2010.01)
C12N 5/0789(2010.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书28页 附图4页

(54)发明名称

由RAG失活的iPSC产生T细胞

(57)摘要

本发明涉及通过表达外源性T细胞受体(TCR)而将重组激活基因(RAG)失活的祖细胞分化为T细胞。T细胞群可通过以下方法产生:(i)将RAG失活的诱导多能干细胞(iPSC)群分化为中胚层细胞,(ii)将所述中胚层细胞(MC)分化以产生造血内皮细胞(HEC)群,(iii)将所述HEC分化为造血祖细胞(HPC)群,(iv)将所述HPC群分化为T细胞祖细胞;和(v)使所述T细胞祖细胞成熟以产生双阳性CD4+CD8+T细胞群。所述方法还可包括将编码抗原受体(例如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))的异源核酸引入下组之一:RAG失活的(a)iPSC,(b)MC,(c)HEC,(d)HPC或(e)祖细胞T细胞。这可能有助于例如生产用于免疫治疗的T细胞。

CN 114269904 A

1.一种产生T细胞群的方法,其特征在于,所述方法包括:

(i)将RAG失活的诱导多能干细胞(iPSC)群分化为中胚层细胞,

(ii)将所述中胚层细胞(MC)分化以产生造血内皮细胞(HEC)群,

(iii)将所述HEC分化为造血祖细胞(HPC)群,

(iv)将所述HPC群分化为T细胞祖细胞;和

(v)使所述T细胞祖细胞成熟以产生双阳性CD4+CD8+T细胞群,

其中所述方法包括将编码抗原受体的异源核酸引入下组之一:(a)iPSC,(b)所述HPC,或(c)所述T细胞祖细胞。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:

(vi)激活和扩增所述T细胞,以产生单阳性CD8+T细胞群或单阳性CD4+T细胞群。

3.如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述方法包括将所述异源核酸引入所述iPSC。

4.如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述方法包括将所述异源核酸引入所述HPC。

5.如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述方法包括将所述异源核酸引入所述T细胞祖细胞。

6.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述编码抗原受体的异源核酸包含在表达载体中。

7.如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述表达载体为慢病毒载体或腺相关病毒(AAV)载体。

8.如权利要求6所述的方法,其特征在于,所述慢病毒载体为VSVg假型病毒载体。

9.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述抗原受体为T细胞受体(TCR)。

10.如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述TCR是亲和力增强的TCR。

11.如权利要求9或10所述的方法,其特征在于,所述TCR是αβTCR或γδTCR。

12.如权利要求9至11中任一项所述的方法,其特征在于,所述TCR特异性结合MHC,所述MHC呈递细胞表达的靶抗原的肽片段,或所述TCR独立于MHC呈递而特异性结合细胞表达的靶抗原或其肽。

13.如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述TCR特异性结合MHC,所述MHC呈递癌细胞表达的肿瘤抗原的肽片段,或所述TCR独立于MHC呈递而特异性结合癌细胞表达的肿瘤抗原或其肽片段。

14.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其特征在于,所述抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

15.如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述CAR与细胞表达的靶抗原特异性地结合。

16.如权利要求15所述的方法,其特征在于,所述TCR与所述癌细胞表达的肿瘤抗原特异性地结合。

17.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其特征在于,所述抗原受体是NK细胞受体(NKCR)。

18.如权利要求17所述的方法,其特征在于,所述NKCR特异性结合MHC,所述MHC呈递由

细胞表达的靶抗原的肽片段。

19.如权利要求18所述的方法,其特征在于,所述NKCR受体特异性结合MHC,所述MHC呈递由所述癌细胞表达的肿瘤抗原的肽片段。

20.如权利要求13、16或19中任一项所述的方法,其特征在于,所述肿瘤抗原是甲胎蛋白(AFP)、NY-ESO1、MAGE-A10或MAGE-A4。

21.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述RAG失活的iPSC被分化为中胚层细胞,所述分化通过在适当条件下培养所述iPSC群以促进中胚层分化。

22.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述RAG失活的iPSC在第一、第二和第三中胚层诱导培养基中顺序培养,以诱导分化为中胚层细胞。

23.如权利要求22所述的方法,其特征在于,所述第一中胚层诱导培养基刺激SMAD2和SMAD3介导的信号通路。

24.如权利要求23所述的方法,其特征在于,所述第一中胚层诱导培养基包含激活素。

25.如权利要求23或24所述的方法,其特征在于,所述第一中胚层诱导培养基由补充一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,其中所述一种或多种分化因子由激活素组成。

26.如权利要求15至18中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二中胚层诱导培养基(i)刺激SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9介导的信号通路,和(ii)具有成纤维细胞生长因子(FGF)活性。

27.如权利要求26所述的方法,其特征在于,所述第二中胚层诱导培养基包含激活素、BMP和FGF。

28.如权利要求26或27所述的方法,其特征在于,所述第二中胚层诱导培养基由补充一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,其中所述一种或多种分化因子由激活素、BMP和FGF组成。

29.如权利要求22至28中任一项所述的方法,其特征在于,所述第三中胚层诱导培养基(i)刺激SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9介导的信号通路,(ii)具有成纤维细胞生长因子(FGF)活性,和(iii)抑制糖原合酶激酶3β。

30.如权利要求29所述的方法,其特征在于,所述第三中胚层诱导培养基包含激活素、BMP、FGF和GSK3抑制剂。

31.如权利要求30所述的方法,其特征在于,所述第三中胚层诱导培养基由补充一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,其中所述一种或多种分化因子由激活素、BMP、FGF和GSK3抑制剂组成。

32.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述中胚层细胞表现Brachyury+、Goosecoid+、Mixl1+、KDR+、FoxA2+、GATA6+和PDGFαR+中的一个或多个。

33.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述中胚层细胞被分化为HEC,所述分化通过在适当条件下培养所述中胚层细胞群以促进造血内皮(HE)分化。

34.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述中胚层细胞在HE诱导培养基中培养以诱导分化为HEC。

35.如权利要求34所述的方法,其特征在于,所述HE诱导培养基(i)刺激KIT(KIT原癌基因;KIT受体酪氨酸激酶)介导的信号通路,和(ii)刺激VEGFR介导的信号通路。

36.如权利要求35所述的方法,其特征在于,所述HE诱导培养基包含SCF和VEGF。

37.如权利要求36所述的方法,其特征在于,所述HE诱导培养基由补充一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,其中所述一种或多种分化因子由SCF和VEGF组成。

38.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述HPC在适当条件下被分化为T细胞祖细胞以促进淋巴分化。

39.如权利要求38所述的方法,其特征在于,所述HPC通过一种方法而被分化,所述方法包括在淋巴扩增培养基中培养所述HPC群以产生T细胞祖细胞。

40.如权利要求38或39所述的方法,其特征在于,所述T细胞祖细胞具有CD5+、CD7+表型。

41.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述T细胞祖细胞在促进T细胞成熟的适当条件下成熟为T细胞。

42.如权利要求41所述的方法,其特征在于,所述T细胞祖细胞通过一种方法成熟,所述方法包括在T细胞成熟培养基中培养所述T细胞祖细胞群以产生所述双阳性T细胞。

43.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括分离或纯化所述双阳性T细胞和/或单阳性T细胞。

44.如权利要求43所述的方法,其特征在于,双阳性T细胞和/或单阳性T细胞通过磁激活细胞分选而被分离。

45.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述方法包括浓缩所述双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群。

46.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述方法包括储存所述双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群。

47.如前述任一权利要求所述的方法,其特征在于,所述方法包括用药学上可接受的赋形剂配制所述双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群。

48.一种双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群,其特征在于,所述细胞群由如权利要求1至47中任一项所述的方法产生。

49.如权利要求48所述的细胞群,其特征在于,所述T细胞表达异源抗原受体。

50.如权利要求49所述的细胞群,其特征在于,所述异源抗原受体是TCR、CAR或NKCR。

51.如权利要求49或50所述的细胞群,其特征在于,所述T细胞RAG表达失活且不表达内源性TCR。

52.一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含由如权利要求1至47中任一项所述的方法产生的双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群以及药学上可接受的赋形剂。

53.一种双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群,用于治疗方法,其特征在于,所述细胞群由如权利要求1至47中任一项所述的方法产生。

54.一种双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群,用于癌症治疗方法,其特征在于,所述细胞群由如权利要求1至47中任一项所述的方法产生。

55.一种治疗癌症的方法,其特征在于,所述方法包括向有需要的个体施用由如权利要求1至47中任一项所述方法产生的双阳性T细胞群和/或单阳性T细胞群。

由RAG失活的iPSC产生T细胞

技术领域

[0001] 本发明涉及由RAG失活的祖细胞，例如诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iPSCs)产生T细胞的方法。

背景技术

[0002] 免疫疗法有望带来长期生存，从而有望改变癌症治疗领域(McDermott等人，《癌症治疗综述》“Cancer Treat Rev”.2014年10月;40(9):1056-64)。医疗需求显然尚未满足，需要新的免疫调节药物以扩大患者群体和肿瘤类型的范围。此外，需要新的试剂来提高抗肿瘤应答的幅度和持续时间。由于过去二十年来对控制T细胞免疫的基本原理的深入理解，这些试剂的开发成为可能(Sharma和Allison，《细胞》“Cell”.2015年4月9日;161(2):205-14)。这通常需要肿瘤特异性CD4+和CD8+T细胞识别MHC分子呈递的肿瘤相关肽抗原。不同的疫苗接种策略和体外扩增的肿瘤浸润淋巴细胞的过继转移在某些情况下证明了肿瘤特异性T细胞治疗晚期癌症的能力(Rosenberg等人，《自然医学》“Nat Med”.2004年9月;10(9):909-15)。

[0003] 然而，目前的过继性T细胞疗法由于缺乏合适的患者和肿瘤特异性T细胞而受到限制，并且为了有效地用于免疫治疗，需要有足够治疗的和功能性的抗原特异性T细胞。

[0004] 内源性T细胞受体(endogenous T cell receptors,TCRs)的表达可导致治疗性给药时T细胞产生非靶向毒性。虽然内源性TCR的表达原则上可通过重组激活基因1(recombination activating gene 1,RAG1)和/或重组激活基因2(RAG2)的失活来阻止，但这种失活也会阻止前体细胞分化为淋巴细胞谱系(Mombaerts等人，(1992)《细胞》“Cell”68(5)869-877)。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明人已经认识到，RAG失活的祖细胞分化为T细胞的能力可以通过外源性T细胞受体(TCR)的表达来恢复。这可能有助于例如生产用于免疫治疗的T细胞。

[0007] 本发明的第一方面提供一种产生T细胞群的方法，所述方法可包括：

[0008] (i)将诱导多能干细胞(iPSC)群分化为中胚层细胞(mesoderm cells,MCs)，

[0009] (ii)将所述MC分化以产生造血内皮细胞(haemogenic endothelial cells,HECs)群，

[0010] (iii)将所述HEC分化为造血祖细胞(haematopoietic progenitor cells,HPCs)群，

[0011] (iv)将所述HPC群分化为T细胞祖细胞(progenitor T cells)；和

[0012] (v)使所述T细胞祖细胞成熟以产生双阳性CD4+CD8+T细胞群，

[0013] 其中，所述方法包括

[0014] (a)失活下组之一的RAG：(a)iPSC，(b)MC和(c)HEC；和

[0015] (b)将编码抗原受体(例如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))的异源核酸引入下组之一：RAG失活的(a)iPSC，(b)MC，(c)HEC，(d)HPC或(e)祖细胞T细胞。

[0016] 例如,第一方面的方法可包括:

[0017] (i)将RAG失活(RAG-/-)的诱导多能干细胞(iPSC)群分化为中胚层细胞,

[0018] (ii)将所述中胚层细胞(MC)分化以产生造血内皮细胞(HEC)群,

[0019] (iii)将所述HEC分化为造血祖细胞(HPC)群,

[0020] (iv)将所述HPC群分化为T细胞祖细胞;和

[0021] (v)使所述T细胞祖细胞成熟以产生双阳性CD4+CD8+T细胞群,

[0022] 其中,所述方法包括将编码抗原受体(例如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR))的异源核酸引入选自下组之一的所述RAG失活的细胞:(a)iPSC,(b)MC,(c)HEC,(d)HPC或(e)祖细胞T细胞。

[0023] 第一方面的方法可进一步包括:

[0024] (vi)激活并扩增所述双阳性CD4+CD8+T细胞,以产生CD8+T细胞群或CD4+T细胞群。

[0025] 本发明的第二方面提供通过第一方面的方法产生的T细胞群。所述T细胞可以是RAG失活的(RAG-/-),且可以表现异源抗原受体的表达,而不表达内源性TCR。

[0026] 本发明的第三方面提供一种药物组合物,所述药物组合物包括第二方面的T细胞群和药学上可接受的赋形剂。

[0027] 本发明的第四方面提供一种治疗方法,所述治疗方法包括向需要的个体施用有效治疗剂量的第二方面的T细胞群。

[0028] 下面更详细地描述本发明的这些方面和其他方面以及实施例。

[0029] 附图简要说明

[0030] 图1显示了从iPSC产生T细胞的六阶段方法实例的示意图。

[0031] 图2显示了ADP-A2M4慢病毒对外周血淋巴细胞(peripheral blood lymphocytes,PBL)和第5阶段iPSC衍生T细胞的病毒滴定。流式细胞术图显示,在a)PBL和b)iPSC衍生T细胞(HCP547)中,随着ADP-A2M4慢病毒稀释度的增加,%Vα24+CD3+T细胞增加。细胞群是以全部活细胞设门的。c)在iPSC衍生T细胞中,CD3的表面表达与ADP-A2M4转导效率相关。细胞群是以全部活细胞设门的。d)慢病毒转导的iPSC衍生T细胞中CD3+T细胞群上Vα24的表达。细胞群是以CD3+T细胞设门的。数据代表重复试验。

[0032] 图3显示了CD3+细胞在CGT3 RAG-/-和CGT3野生型iPSC细胞系的转导和未转导细胞群中的百分比,无论是否转导ADP-A2M4 TCR。CD7+/CD5+祖细胞的转导可导致CD3表达细胞的比例增加。

[0033] 图4显示了CGT3 RAG-/-的细胞总数,无论是否转导ADP-A2M4 TCR。CD7+/CD5+阶段的T细胞祖细胞用ADP-A2M4 TCR进行转导,并定期进行细胞计数。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明涉及一种发现,即用编码外源性T细胞受体(TCR)的核酸转导RAG失活细胞以克服RAG失活引起的分化停滞,并允许在没有内源性TCR的情况下产生T细胞。这可能有助于例如产生用于免疫治疗的T细胞。

[0036] 诱导多能干细胞(iPSCs)是由非多能干细胞、完全分化的供体细胞或前体细胞衍生而来的多能干细胞。iPSC能够在体外自我更新,呈现出未分化的表型,并有可能分化为三个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)中任何一个的任何胎儿或成人细胞类型。iPSC群可以是克隆的,即从单个共同祖先细胞衍生而来的遗传上相同的细胞。

[0037] iPSC可表达以下一种或多种多能性相关标记物:POU5f1(Oct4)、Sox2、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase)、SSEA-3、Nanog、SSEA-4、Tra-1-60、KLF4和c-myc,优选地为POU5f1、Nanog和Sox2中的一种或多种。iPSC可以缺乏与特定分化命运相关的标记,如Bra、Sox17、FoxA2、αFP、Sox1、NCAM、GATA6、GATA4、Hand1和CDX2。特别地,iPSC可以缺乏与内胚层命运相关的标记。

[0038] 优选地,所述iPSC是人IPSC(human IPSCs,hiPSCs)。

[0039] 在一些实施例中,iPSC可被基因编辑,例如用于失活或删除:HLA基因,或与免疫原性或GVHD相关的其他基因,或任选地包括编码外源性抗原受体(例如外源性TCR、CAR或NKCR)的核酸。

[0040] iPSC可以从供体细胞中衍生或重编程,所述供体细胞可以是体细胞或从供体个体等来源获得的其他前体细胞。所述供体细胞可以是哺乳动物细胞,优选地为人类细胞。合适的供体细胞包括成人成纤维细胞和血细胞,例如外周血细胞,如HPC或单核细胞。

[0041] 如本文所述,可从一供体个体获得用于重编程为iPSC的合适供体细胞。在一些实施例中,所述供体个体可以是与受体个体相同的人,在如本文所述的T细胞的生产之后,所述受体个体将被施用所述T细胞(自体治疗)。在其他实施例中,所述供体个体可以是与受体个体不同的人,在如本文所述的T细胞的生产之后,所述受体个体将被施用所述T细胞(同种异体治疗)。例如,所述供体个体可以是一健康个体,其人白细胞抗原(human leukocyte antigen,HLA)与患有癌症的一受体个体相匹配(或者捐赠前,或者捐赠后)。在其他实施例中,所述供体个体可与所述受体个体HLA不匹配。优选地,所述供体个体可以是新生儿(刚出生),例如所述供体细胞可以从脐带血样本中获得。

[0042] 合适的供体个体优选地不含传染性病毒(如HIV、HPV、CMV)和外源因子(如细菌、支原体),且不存在已知的基因异常。

[0043] 在一些实施例中,用于重编程的一外周血细胞群,例如HPC,可从所述供体个体获得的血液样本(优选地脐带样本)中分离。用于分离HPC和其他外周血细胞的合适方法在本领域是众所周知的,包括:如磁激活细胞分选(例如,参见Gaudernack等人,1986《免疫学方法杂志》"J Immunol Methods"90 179)、荧光激活细胞分选(FACS:例如参见Rheinherz等人,(1979)《美国科学院院报》"PNAS"76 4061),和细胞淘选(例如参见Lum等人,(1982)《细胞免疫》"Cell Immunol"72 122)。HPC可通过CD34的表达在血细胞样本中被识别。在其他实施例中,用于重编程的一成纤维细胞群,在使用胶原酶或胰蛋白酶分散并在适当的细胞培养条件下生长后,可从皮肤活检中被分离。

[0044] 在一些实施例中,IPSC可衍生自抗原特异性T细胞。例如,所述T细胞可包含编码αβTCR的核酸,所述TCR结合于一抗原,例如与MHC I类分子复合呈递的一肿瘤抗原。用于产生iPSC的抗原特异性T细胞可通过对多种具有肽表位的T细胞群进行筛选获得,所述肽表位来自靶抗原,呈递于一抗原呈递细胞(例如树突状细胞)表面的MHC I类或II类分子上,所述抗原特异性T细胞或通过从一癌症患者的一肿瘤样本中分离获得。

[0045] 供体细胞通常通过向所述细胞中引入重编程因子(如Oct4、Sox2和Klf4)来重编程为iPSC。所述重编程因子可以是蛋白质或编码核酸,并且可以通过任何合适的技术引入所述分化细胞,所述技术包括:质粒、转座子,或更优选地病毒转染或蛋白质直接输送。其他重编程因子,例如:Klf基因,如Klf-1、-2、-4和-5;Myc基因,如C-myc、L-myc和N-myc;Nanog;

SV40大T抗原;Lin28;以及靶向p53等基因的短发夹RNA(short hairpins,shRNA)也可被引入所述细胞以提高诱导效率。在引入所述重编程因子后,所述供体细胞可被培养。表达多能性标记物的细胞可被分离和/或纯化以产生iPSC群。生产iPSC的技术在本领域是众所周知的(Yamanaka等人,《自然》"Nature"2007;448:313-7;Yamanaka 6,2007年6月7日;1(1):39-49;Kim等人,《自然》"Nature".2008年7月31日;454(7204):646-50;Takahashi,《细胞》"Cell"2007年11月30日;131(5):861-72;Park等人,《自然》"Nature".2008年1月10日;451(7175):141-6;Kimet等人,《细胞干细胞》"Cell Stem Cell".2009年6月5日;4(6):472-6;Vallier,L.等人,《干细胞》"Stem Cells"2009.9999(999A):p.N/A;Baghbaderani等人,2016;《干细胞报告》"Stem Cell Rev".2016年8月;12(4):394-420;Baghbaderani等人,(2015)《干细胞报告》"Stem Cell Reports",5(4),647-659)。

[0046] 常规技术可用于iPSC的培养和维持(Vallier,L.等人,《发育生物学》"Dev.Biol".275,403-421(2004);Cowan,CA等人,《新英格兰医学杂志》"N.Engl.J.Med".350,1353-1356(2004);Joannides,A.等人,《干细胞》"Stem Cells"24,230-235(2006);Klimanskaya,I.等人,《柳叶刀》"Lancet"365,1636-1641(2005);Ludwig,TE等人,《自然生物技术》"Nat.Biotechnol".24,185-187(2006))。用于本方法的iPSC可在给定的条件下或饲养细胞上生长。例如,iPSC能够常规地以适当的密度(例如10^5至10^6个细胞/60mm培养皿)被培养在一培养皿中或在一层饲养细胞上(例如经辐照的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEF)),或在一适当的基质上,培养于饲养层条件或iPSC成分确定的维持培养基中。用于本方法的iPSC可以通过酶或机械方式进行传代。在一些实施例中,iPSC可在iPSC维持培养基(例如mTeSR1(干细胞技术公司"StemCell Technologies")或E8 flex(赛默飞"Life Thermo")培养基)中,在matrigel™或ECM蛋白质(例如玻连蛋白(vitronectin))上传代。

[0047] 重组激活基因1(RAG1)和重组激活基因2(RAG2)介导免疫球蛋白和T细胞受体基因的V(D)J重组。在缺乏RAG1和/或RAG2的小鼠中,B细胞和T细胞分化在早期就被阻止,而缺乏RAG的小鼠缺乏成熟的B淋巴细胞和T淋巴细胞(Mombaerts等人,(1992)《细胞》"Cell"68(5)869-877;Shinkai Y等人,(1992)《细胞》"Cell"68(5):855-67)。

[0048] RAG1(基因号5896;也称为RAG-1)优选地为人RAG1,可具有数据库条目NP_00439.1的氨基酸序列,并可由数据库条目NM_000448.2的核酸序列编码。RAG2(基因号5897;也称为RAG-2)优选地为人RAG2,可具有数据库条目NP_000527.2、NM_001243785.2或NM_001243786.1的氨基酸序列,并可由数据库条目NM_000536.4、NP_001230714.1或NP_001230715.1的核酸序列编码。

[0049] RAG失活细胞(可被称为RAG-/-或完全敲除(null))是经过工程处理以使RAG1和/或RAG2失活的细胞,即所述RAG1和/或RAG2编码序列或调控区已被删除或以其他方式突变以阻止活性蛋白的表达。RAG失活的iPSC不能表达RAG1和RAG2中一个或两者的活性形式,因此不能支持免疫球蛋白和T细胞受体基因的V(D)J重组。由于它们缺乏通过重组产生活性免疫球蛋白和T细胞受体基因的能力,RAG失活细胞无法分化为淋巴细胞谱系。

[0050] 一种方法可包括使RAG1和RAG2中的一个或两者失活以产生RAG失活细胞。例如,可以通过重组技术删除所述基因或其调控区域。基因失活的合适方法在本领域是众所周知的,可包括AAV介导的基因编辑(Hirsch等人,2014《分子生物学方法》"Methods Mol Biol"

1114 291-307)和CRISPR/Cas9基因编辑。在其他实施例中,可以使用抑制核酸(例如siRNA或shRNA)抑制RAG基因的表达,或者可以使用抑制剂抑制RAG活性。RAG1和RAG2可通过任何方便的方法被失活。

[0051] 在一些实施例中,用于本文所述方法的iPSC可以是RAG失活的iPSC(RAG-/-iPSCs)。

[0052] 在其他实施例中,RAG高表达(RAG+/+)iPSC可用于本文所述的方法中,且RAG可在所述MC或HEC阶段被失活。例如,一种方法可包括(a)使所述中胚层细胞中的RAG失活以产生RAG失活的中胚层细胞群,或(b)使所述HEC中的RAG失活以产生RAG失活的HEC群。所述RAG失活细胞可被分化以产生如本文所述的T细胞。所述编码抗原受体的异源核酸可在所述RAG失活后被引入。

[0053] T细胞可通过一种方法从iPSC群产生,所述方法包括:

[0054] (i)将所述iPSC群分化为中胚层细胞(mesoderm cells,MCs),

[0055] (ii)将所述MC分化以产生造血内皮细胞(haemogenic endothelial cells,HECs)群,

[0056] (iii)将所述HEC分化为造血祖细胞(haematopoietic progenitor cells,HPCs)群,

[0057] (iv)将所述HPC群分化为T细胞祖细胞;和

[0058] (v)使所述T细胞祖细胞成熟以产生双阳性CD4+CD8+T细胞群。

[0059] 在引入所述异源核酸之前,所述细胞可被RAG失活。例如,所述iPSC可被RAG失活,或RAG可在所述MC或HEC中被失活。

[0060] 所述编码抗原受体的异源核酸可以在步骤(i)之前,或步骤(i)至(iv)中的任何一个之后被引入RAG失活的细胞中。例如,(a)iPSC,(b)MC,(c)HEC,(d)HPC或(e)祖细胞T细胞之一可以用编码抗原受体(例如T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体)的异源核酸进行转染或转导。

[0061] 如本文所述产生的T细胞可表达结合靶抗原的抗原受体。例如,所述抗原受体可与表达肿瘤抗原的癌细胞特异性结合。如下文所述,所述T细胞可用于例如免疫治疗。T细胞由RAG失活的前体细胞以本文所述的方法产生。因为所述RAG失活的细胞不支持V(D)J重组,所以本文产生的T细胞不含功能性内源性TCR基因并且不表达内源性TCR。

[0062] 所述T细胞表达外源性抗原受体,其由在重组技术(例如基因编辑或转导)生产期间引入细胞的异源核酸编码。所述抗原受体不是由细胞天然表达的(即所述抗原受体是外源的或异源的)。异源抗原受体可包括T细胞受体(TCR),例如αβTCR异二聚体,γδTCR异二聚体和NKT受体;或嵌合抗原受体(CAR)。

[0063] 所述抗原受体可以是T细胞受体(TCR)。TCR是二硫键连的膜锚定异二聚体蛋白,由高度可变的阿尔法(alpha,α)和贝塔(beta,β)链组成,表达为具有不变CD3链分子的复合体。表达这种TCR(αβTCR)的T细胞可称为αβ(或α:β)T细胞。少数T细胞表达由可变伽马(gamma,γ)链和德尔塔(delta,δ)链组成的替代性TCR,称为γδT细胞。

[0064] TCR与细胞表面的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complexes,MHC)特异性结合,所述复合体呈递靶抗原的肽片段。例如,TCR可与癌细胞表面的主要组织相容性复合体(MHC)特异性结合,所述复合体呈递肿瘤抗原的肽片段。MHC是一

组允许所述获得性免疫系统识别“外来”分子的细胞表面蛋白质。蛋白质在细胞内降解，并通过所述MHC呈递在细胞表面。呈递“外源”肽的MHC，如病毒或癌症相关肽，被具有适当TCR的T细胞识别，促使细胞破坏途径。癌细胞表面的MHC可呈递肿瘤抗原的肽片段，即所述抗原存在于癌细胞上但不存在于相应的非癌细胞上。识别这些肽片段的T细胞可对所述癌细胞产生细胞毒性作用。

[0065] 合适的异源TCR可特异性结合到呈递靶抗原肽片段的I类或II类MHC分子上。例如，所述T细胞可被修饰以表达异源TCR，所述异源TCR特异性地结合到I类或II类MHC分子上，所述I类或II类MHC分子呈递由癌症患者体内的癌细胞表达的肿瘤抗原的肽片段，或者所述T细胞可被修饰以表达异源TCR，所述异源TCR在癌症患者中不存在MHC呈递的情况下，特异性地结合所述癌细胞表达的肿瘤抗原或其肽片段。所述癌症患者体内癌细胞表达的肿瘤抗原可使用标准技术识别。优选的肿瘤抗原包括NY-ESO1、PRAME、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein,AFP)、MAGE A4、MAGE A1、MAGE A10和MAGE B2，最优选地NY-ESO-1、MAGE-A4和MAGE-A10。

[0066] 合适的TCR可包括非常规TCR，例如非MHC依赖的TCR，其结合识别由单形抗原呈递分子(例如CD1和MR1)呈递的非肽抗原；NKT细胞TCR和上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocyte,IEL)TCR。在一些实施例中，所述TCR可独立于MHC呈递而识别所述癌细胞上的靶抗原或靶抗原的肽片段。

[0067] 异源TCR可以是合成或人工TCR，即自然界中不存在的TCR。例如，异源TCR可被工程化以增加其对肿瘤抗原的亲和性或亲和力(即亲和力增强的TCR)。亲和力增强的TCR可包括相对于天然产生的TCR的一个或多个突变，例如所述TCR的α和β链或γ和δ链可变区的高变互补决定区(complementarity determining regions,CDRs)中的一个或多个突变。这些突变增加了所述TCR对MHC的亲和力，所述MHC呈递癌细胞表达的肿瘤抗原的肽片段。生成亲和力增强的TCR的合适方法包括使用噬菌体或酵母展示筛选TCR突变体库，这在本领域是众所周知的(例如参见Robbins等人，《免疫学杂志》“J Immunol”(2008)180(9):6116；San Miguel等人，《癌细胞》“Cancer Cell”(2015)28(3)281-283；Schmitt等人，《血液》“Blood”(2013)122 348-256；Jiang等人，《癌症发现》“Cancer Discovery”(2015)5 901)。优选的亲和力增强的TCR可与癌细胞结合，所述癌细胞表达一种或多种肿瘤抗原NY-ESO1、PRAME、甲胎蛋白(alpha-fetoprotein,AFP)、MAGE A4、MAGE A1、MAGE A10和MAGE B2。

[0068] 或者，所述抗原受体可以是嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)。CAR是一种人工受体，其被设计成包含免疫球蛋白抗原结合域，如单链可变片段(single-chain variable fragment,scFv)。例如，CAR可包含融合到TCR CD3跨膜区和胞内域的scFv。scFv是免疫球蛋白重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的融合蛋白，可与约10至25个氨基酸的短连接肽连接(Huston J.S.等人，《美国国家科学院院报》“Proc Natl Acad Sci USA”1988;85(16):5879-5883)。所述连接肽可富含甘氨酸以获得柔韧性，可富含丝氨酸或苏氨酸以获得溶解性，并且可以将所述V_H的N-末端连接到所述V_L的C-末端，反之亦然。所述scFv前端可能有一信号肽，其将蛋白质引导到内质网，随后到T细胞表面。在CAR中，所述scFv可与TCR跨膜区和胞内域融合。在所述scFv和所述TCR跨膜区之间可包括一柔性间隔区，其允许方向的可变和抗原的结合。所述胞内域是所述受体的功能性信号传导域。CAR的胞内域可包括例如来自CD3ζ链的或来自诸如CD28、41BB或ICOS等受体的细胞内信号传导域。CAR可包

括多个信号传导域,例如但不限于CD3z-CD28-41BB或CD3z-CD28-OX40。

[0069] CAR可与癌细胞表达的肿瘤特异性抗原特异性地结合。例如,所述T细胞可被修饰以表达CAR,所述CAR与特定癌症患者体内的癌细胞表达的肿瘤抗原特异性结合。所述癌症患者体内的癌细胞表达的肿瘤抗原可使用标准技术识别。

[0070] 或者,所述抗原受体可以是NK细胞受体(NK cell receptor,NKCR)。

[0071] 异源抗原受体(例如异源TCR、NKCR或CAR)的表达可改变如本文所述产生的T细胞的免疫原性特异性,以便它们识别一个或多个靶抗原或呈递对一个或多个靶抗原的改进识别,所述靶抗原例如存在于癌症患者癌细胞表面的肿瘤抗原。在一些实施例中,如本文所述产生的所述T细胞缺乏内源性TCR,可在缺乏所述异源抗原受体的情况下表现与癌细胞结合的减少或不结合。例如,所述异源TCR的表达可增加一T细胞相对于不表达所述抗原受体的T细胞的对癌细胞结合的亲和力和/或特异性。

[0072] 术语“异源”是指对特定生物系统(如宿主细胞)来说是外源的,并且不天然存在于该系统中的多肽或核酸。异源多肽或核酸可通过人工方法引入生物系统,例如使用重组技术。例如,编码多肽的异源核酸可被插入合适的表达构建体中,所述表达构建体反过来用于转化宿主细胞以产生多肽。异源多肽或核酸可以是人工合成的,也可以存在于不同的生物系统中,例如不同的物种或细胞类型。内源性多肽或核酸是特定生物系统(如宿主细胞)的天然产物,且天然存在于该系统中。重组多肽由异源核酸表达,所述异源核酸通过人工方式(例如使用重组技术)引入细胞。重组多肽可以与细胞中天然存在的多肽相同,也可以与细胞中天然存在的多肽不同。

[0073] 编码TCR的异源核酸可编码所述受体的所有亚单位。例如编码TCR的核酸可包括编码TCRα链的核苷酸序列和编码TCRβ链的核苷酸序列,或编码TCRδ链的核苷酸序列和编码TCRγ链的核苷酸序列。合适的核苷酸序列在本领域中是众所周知的。

[0074] 细胞可被修饰以表达所述异源抗原受体,如TCR或CAR,所述修饰通过在本文所述方法的任何阶段将异源编码核酸引入所述RAG失活细胞中实现。例如,异源编码核酸可被引入所述iPSC、中胚层细胞、造血内皮(HE;即HEC)细胞、HPC或T细胞祖细胞。在一些优选的实施例中,细胞可在如本文所述的淋巴扩增培养基(第4阶段)中培养2周后(即当所述细胞是T细胞祖细胞时),被编码所述抗原受体的异源核酸转导。编码抗原受体的异源核酸可编码所述受体的所有亚单位。例如,编码TCR的核酸可包含编码TCRα链的核苷酸序列和编码TCRβ链的核苷酸序列,或编码TCRδ链的核苷酸序列和编码TCRγ链的核苷酸序列。

[0075] 核酸可通过任何方便的技术被引入细胞。将所述表达载体转运到所述iPSC、中胚层细胞、HE(HEC)、HPC或T细胞祖细胞中的合适技术是本领域众所周知的,包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒(例如痘苗病毒或慢病毒)的转导,或通过基因编辑进入特定位点。当将异源核酸引入或并入iPSC、HPC或T细胞祖细胞时,必须考虑本领域技术人员熟知的应考虑因素。要插入的核酸应该被组装在一构建物或载体中,所述构建物或载体包含有效的调控元件,这些元件将驱动T细胞中的转录。许多已知的用于操纵和转化核酸的技术及操作,例如在核酸构建物的制备、将DNA引入细胞和基因表达中的技术及操作,在Ausubel等人主编的于1992年由约翰威立出版社“John Wiley&Sons”出版的第二版《分子生物学手册》“Protocols in Molecular Biology”中进行了详细描述。在一些实施例中,可通过基因编辑将核酸引入所述细胞。例如靶位点的DNA双

链断裂(double strand break,DSB)可被CRISPR/Cas9系统诱导,所述DSB的修复可将所述异源核酸于靶位点引入细胞基因组,或可使用rAAV载体引入所述核酸(AAV介导的基因编辑;Hirsch等人,2014《分子生物学方法》"Methods Mol Biol"1114 291-307)。

[0076] 用于将所述表达载体引入所述iPSC、中胚层细胞、HE(HEC)、HPC或T细胞祖细胞的合适技术在本领域是众所周知的,包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染、基因编辑(例如AAV介导的基因编辑),和使用逆转录病毒或其他病毒(例如痘苗或慢病毒)的转导。优选地,编码异源TCR的核酸可包含在病毒载体中,最优选地伽马逆转录病毒载体或慢病毒载体,例如VSVg假型慢病毒载体(VSVg-pseudotyped lentiviral vector)。本文所述的方法可包括用病毒载体转导细胞群(例如iPSC、中胚层细胞、HE(HEC)、HPC或T细胞祖细胞)以产生基因修饰细胞的转导细胞群。所述细胞可通过与包含所述核酸的病毒颗粒接触而被转导。用于转导的病毒颗粒可根据已知方法制备。例如,HEK293T细胞可被编码病毒包装和包膜元件的质粒转染,也可被包含所述编码核酸的慢病毒载体转染。VSVg假型病毒载体可与水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus,VSVg)的病毒包膜糖蛋白G组合产生,以产生假型病毒颗粒。例如,固相转导可通过在包被有重组人纤维蛋白片段的逆转录病毒载体预载组织培养板上的培养无选择进行。

[0077] 在本文所述方法的步骤中,细胞群的分化和成熟通过在补充一组分化因子的培养基中培养所述细胞来诱导形成。为每种培养基列出的一组分化因子优选地是全面的,并且培养基可以不包含其他分化因子。在优选的实施例中,所述培养基是纯化学培养基。例如,培养基可由补充有效量的一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,如下所述。纯化学营养培养基可包括补充一种或多种无血清培养基补充剂的基础培养基。

[0078] 分化因子是调节(例如促进或抑制)信号通路的因子,所述信号通路介导哺乳动物细胞的分化。分化因子可包括生长因子、细胞因子和小分子,其调节激活素/淋巴结(Activin/Nodal)、FGF、Wnt或BMP中的一个或多个信号通路。分化因子的实例包括:激活素/淋巴结(Activin/Nodal)、FGF、BMP、维甲酸(retinoic acid)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)、干细胞因子(stem cell factor,SCF)、TGFβ配体、GDF、LIF、白细胞介素(Interleukins)、GSK-3抑制剂和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)抑制剂。

[0079] 在本文所述的一种或多种培养基中使用的分化因子包括TGFβ配体,例如:激活素(activin)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)、干细胞因子(SCF)、血管内皮生长因子(VEGF)、GSK-3抑制剂(如CHIR-99021)、白细胞介素和激素(如IGF-1和血管紧张素II(angiotensin II))。分化因子能以一定数量存在于本文所述的培养基中,该数量的分化因子可有效调节所述培养基中培养细胞的信号通路。

[0080] 在一些实施例中,如上列出或如下列出的分化因子可在培养基中被对同一信号通路具有相同效果(即刺激或抑制)的因子替换。合适的因子在本领域是已知的,包括蛋白质、核酸、抗体和小分子。

[0081] 每个步骤中所述细胞群的分化程度可通过监测和/或检测分化细胞群中一个或多个细胞标记物的表达来确定。例如,可以测定具有更高分化细胞类型特征的标记物表达的增加或具有较低分化细胞类型特征的标记物表达的减少。细胞标记物的表达可以通过任何

合适的技术来确定，包括：免疫细胞化学、免疫荧光、RT-PCR、免疫印迹、荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting,FACS)和酶分析。在优选的实施例中，如果在细胞表面上可检测到标记物，则可以说该细胞表达标记物。例如，本文所述不表达标记物的细胞可表现标记基因的活跃转录和细胞内表达，但所述细胞的表面可不存在所述标记物的可检测水平。

[0082] 通过本文所述方法中的步骤产生的部分分化细胞群，可在下一个分化步骤之前进行培养、维持或扩增。部分分化的细胞可通过任何方便的技术进行扩增。

[0083] 在每个步骤之后，在所述培养基中培养后，由该步骤产生的所述部分分化细胞群可包含1％或更多、5％或更多、10％或更多、15％或更多的部分分化细胞。如果需要，部分分化细胞群可通过任何方便的技术(如MACs或FACS)进行纯化。

[0084] 在不存在饲养细胞的情况下，细胞可以单层培养在包被有细胞外基质蛋白(如纤维结合蛋白、层粘连蛋白或胶原)的表面或基质上。适用于细胞培养的技术在本领域是众所周知的(例如，参见《基本细胞培养手册》“Basic Cell Culture Protocols”,C.Helgason,胡马纳出版社“Humana Press Inc”.美国(2004年10月15日)ISBN:1588295451;《人类细胞培养手册》“Human Cell Culture Protocols”(分子医学方法“Methods in Molecular Medicine S.”)胡马纳出版社“Humana Press Inc”.美国(2004年12月9日)ISBN:158829223;《动物细胞培养：基本技术手册》“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique”,R.Freshney,约翰威立出版有限公司“John Wiley&Sons Inc”(2005年8月2日)ISBN:0471453293;Ho WY等人,《免疫学方法杂志》“J Immunol Methods”.(2006)310:40-52,《干细胞手册》“Handbook of Stem Cells”(R.Lanza主编)ISBN:0124366430)1997年J.Pollard和J.M.Walker所著的《基本细胞培养手册》“Basic Cell Culture Protocols”、1997年A.Doyle和J.B.Griffiths所著的《哺乳动物细胞培养：基本技术》“Mammalian Cell Culture:Essential Techniques”、2003年A.Chiu和M.Rao所著的《人类胚胎干细胞》“Human Embryonic Stem Cells”、2005年A.Bongso所著的《干细胞：从实验室走向临床》“Stem Cells:From Bench to Bedside”、2012年Peterson和Loring所著，由学术出版社“Academic Press”出版的《人类干细胞手册：实验室指南》“Human Stem Cell Manual:A Laboratory Guide”,以及2006年K.Turksen所著的《人类胚胎干细胞手册》“Human Embryonic Stem Cell Protocols”。培养基及其成分可从商业渠道获得(例如Gibco、罗氏“Roche”、西格玛“Sigma”、欧罗巴生物制品“Europa bioproducts”、安迪生物科技“R&D Systems”)。上述培养步骤可采用标准哺乳动物细胞培养条件，例如37℃、5％或21％氧气、5％二氧化碳。培养基优选地每两天更换一次，细胞通过重力沉降。

[0085] 细胞可在一培养容器中培养。合适的细胞培养容器在本领域是众所周知的，包括培养板、培养皿、培养瓶、生物反应器和多孔板，例如6孔、12孔或96孔板。

[0086] 所述培养容器优选地经处理用于组织培养，例如通过使用细胞外基质蛋白(例如纤维结合蛋白(fibronectin)、层粘连蛋白(laminin)或胶原(collagen))包被所述容器的一个或多个表面。培养容器可以使用标准技术进行处理以用于组织培养，例如通过使用本文所述的包被溶液进行孵育，或者可以从商业供应商处预处理获得。

[0087] 在第一阶段，iPSC可被分化为中胚层细胞，所述分化通过在适当条件下培养iPSC群以促进中胚层分化。例如，所述iPSC细胞可在第一、第二和第三中胚层诱导培养基中被顺

序培养,以诱导分化为中胚层细胞。

[0088] 合适的第一中胚层诱导培养基可刺激SMAD2和SMAD3介导的信号通路。例如,所述第一中胚层诱导培养基可包含激活素。

[0089] 合适的第二中胚层诱导培养基可以(i)刺激SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9和/或SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9介导的信号通路,以及(ii)具有成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)活性。例如,所述第二中胚层诱导培养基可包含激活素(优选地激活素A)、BMP(优选地BMP4)和FGF(优选地bFGF)。

[0090] 合适的第三中胚层诱导培养基可(i)刺激SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9和/或SMAD1、SMAD2、SMAD3、SMAD5和SMAD9介导的信号通路(ii)具有成纤维细胞生长因子(FGF)活性,以及(iii)抑制糖原合成酶激酶3β。例如,所述第三中胚层诱导培养基可包含激活素(优选地激活素A)、BMP(优选地BMP4)、FGF(优选地bFGF)和GSK3抑制剂(优选地CHIR99021)。

[0091] 除上述分化因子外,所述第一、第二和第三中胚层诱导培养基可不包含其他分化因子。

[0092] SMAD2和SMAD3介导的细胞内信号通路可通过所述第一、第二和第三中胚层诱导培养基中第一TGFβ配体的存在而被刺激。所述第一TGFβ配体可为激活素(Activin)。激活素(激活素A:NCBI基因号:3624,核酸参考序列NM_002192.2GI:62953137,氨基酸参考序列NP_002183.1GI:4504699)是一种二聚体多肽,通过刺激激活素/淋巴结(Activin/Nodal)通路发挥一系列细胞效应(Vallier等人,《细胞科学》"Cell Science"118:4495-4509(2005))。激活素可从商业渠道获得(例如施泰金公司"Stemgent Inc",美国马萨诸塞州;美天旎生物技术有限公司"Miltenyi Biotec Gmbh",德国)。本文所述培养基中激活素的浓度可以很方便地配制为1至100ng/ml,例如约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约12ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml,或约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml,或约95ng/ml中的任何一种,优选地约5至50ng/ml。

[0093] 第二和第三中胚层诱导培养基中成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)的活性可通过培养基中成纤维细胞生长因子的存在(FGF)来提供。成纤维细胞生长因子(FGF)是一种蛋白质因子,所述蛋白质因子通过与成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor,FGFR)的结合来刺激细胞生长、增殖和分化。合适的成纤维细胞生长因子包括FGF家族的任何成员,例如FGF1至FGF14和FGF15至FGF23中的任何一种。优选地,所述FGF为FGF2(也称为bFGF,NCBI基因号:2247,核酸序列NM_002006.3GI:41352694,氨基酸序列NP_001997.4GI:41352695);FGF7(也称为角质形成细胞生长因子(keratinocyte growth factor或KGF),NCBI基因号:2247,核酸序列NM_002006.3GI:41352694,氨基酸序列NP_001997.4GI:41352695);或FGF10(NCBI基因号:2247,核酸序列NM_002006.3GI:41352694,氨基酸序列NP_001997.4GI:41352695)。最优选地,所述成纤维细胞生长因子为FGF2。

[0094] 本文所述培养基中FGF(例如FGF2)的浓度可以很方便地配制为0.5至50ng/ml,例如约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/

ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml中的任何一种，优选地约5ng/ml。成纤维细胞生长因子，如FGF2、FGF7和FGF10，可使用常规重组技术生产，或从商业供应商处获得(如安迪生物科技“R&D Systems”，明尼阿波利斯，明尼苏达州；施泰金公司“Stemgent Inc”，美国；美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”，德国)。

[0095] SMAD1、SMAD5和SMAD9介导的细胞内信号通路可通过第二和第三中胚层诱导培养基中第二TGFβ配体的存在而被刺激。所述第二TGFβ配体可为骨形态发生蛋白(Bone Morphogenic Protein,BMP)。骨形态发生蛋白(BMP)与骨形态发生蛋白受体(Bone Morphogenic Protein Receptors,BMPRs)结合，并通过SMAD1、SMAD5和SMAD9介导的通路刺激细胞内信号传导。合适的骨形态发生蛋白包括BMP家族的任何成员，例如BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6或BMP7。优选地，所述第二TGFβ配体为BMP2(NCBI基因号:650，核酸序列NM_001200.2GI:80861484；氨基酸序列NP_001191.1GI:4557369)或BMP4(NCBI基因号:652，核酸序列NM_001202.3GI:157276592；氨基酸序列NP_001193.2GI:157276593)。合适的BMP包括BMP4。本文所述培养基中骨形态发生蛋白如BMP2或BMP4等的浓度可以很方便地配制为1至500ng/ml，例如约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约100ng/ml、约150ng/ml、约200ng/ml、约250ng/ml、约300ng/ml、约350ng/ml、约400ng/ml、约450ng/ml、约500ng/ml中的任何一种，优选地约10ng/ml。BMP可使用常规重组技术生产，或从商业供应商处获得(如安迪生物科技“R&D Systems”，明尼阿波利斯，美国；施泰金公司“Stemgent Inc”，美国；美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”，德国)。

[0096] 所述第三中胚层诱导培养基中GSK3β的抑制活性可通过所述培养基中GSK3β抑制剂的存在来提供。GSK3β抑制剂抑制糖原合成酶激酶3β的活性(基因号2932:EC2.7.11.26)。优选的抑制剂特异性抑制糖原合成酶激酶3β的活性。合适的抑制剂包括CHIR99021(6-((2-((4-(2,4-二氯苯基)-5-(4-甲基-1H-咪唑-2-基)嘧啶-2-基)氨基)乙基)氨基)烟腈；Ring D.B.等人，《糖尿病》“Diabetes”，52:588-595(2003))、阿尔斯特保隆“alsterpaullone”、肯保隆“kenpaullone”、BIO(6-溴靛玉红-3’-肟(Sato等人，《自然医学》“Nat Med”.2004年1月;10(1):55-63)、SB216763(3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮)、锂(Lithium)和SB415286(3-[(3-氯-4-羟基苯基)氨基]-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮；Coghlan等人，《化学与生物》“Chem Biol”.2000年10月;7(10):793-803)。在一些优选的实施例中，所述GSK3β抑制剂为CHIR99021。合适的糖原合成酶激酶3β抑制剂可从商业供应商处获得(例如施泰金公司“Stemgent Inc”，美国马萨诸塞州；开曼化工有限公司“Cayman Chemical Co”，美国密歇根州；赛力克化学“Selleckchem”，美国马萨诸塞州)。例如，所述第三中胚层诱导培养基可含有0.1至100μM的GSK3β抑制剂(如CHIR99021)，例如约0.1μM、约0.25μM、约0.5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约7μM、约8μM、约9μM、约10μM、约11μM、约12μM、约13μM、约14μM、约15μM、约20μM、约25μM、约30μM、约35μM、约40μM、约45μM、约50μM、约60μM、约70μM、约80μM、约90μM或约95μM中的任何一种，优选地约10μM。

[0097] 在优选的实施例中，所述第一、第二和第三中胚层诱导培养基是纯化学培养基。例如，所述第一中胚层诱导培养基可由补充有效量激活素的纯化学营养培养基组成，所述激

活素优选地为激活素A,例如50ng/ml激活素A;所述第二中胚层诱导培养基可由纯化学营养培养基组成,所述纯化学营养培养基补充有效量的:激活素,优选地激活素A,如5ng/ml激活素A;BMP,优选地BMP4,如10ng/ml BMP4;和FGF,优选地bFGF(FGF2),如5ng/ml bFGF;所述第三中胚层诱导培养基可由纯化学营养培养基组成,所述纯化学营养培养基补充有效量的:激活素,优选地激活素A,如5ng/ml激活素A;BMP,优选地BMP4,如10ng/ml BMP4;FGF,优选地bFGF(FGF2),如5ng/ml bFGF;和GSK3抑制剂,优选地CHIR-99021,如10μM CHIR-99021。

[0098] 纯化学培养基(chemically defined medium,CDM)是一种用于培养细胞的营养溶液,只包含特定成分,优选地为已知化学结构的成分。CDM不包括未定义的成分或要素,所述未定义的成分包括例如饲养细胞、基质细胞、血清和复杂的细胞外基质(如matrigel™)。例如,CDM不包含表达Notch配体(如DLL1或DLL4)的基质细胞(如OP9细胞)。

[0099] 纯化学营养培养基可包括纯化学基础培养基。合适的纯化学基础培养基包括:Iscove改良Dulbecco培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium,IMDM)、Ham氏F12(Ham's F12)、高级Dulbecco改良eagle培养基(Dulbecco's modified eagle medium,DMEM)(Price等人,《焦点》"Focus"(2003),25 3-6)、Williams E(Williams,G.M.等人,《实验细胞研究》"Exp.Cell Research",89,139-142(1974))、RPMI-1640(Moore,G.E.和Woods L.K.,(1976)《组织培养协会手册》"Tissue Culture Association Manual".3,503-508)和StemPro™-34PLUS(赛默飞世尔科技"ThermoFisher Scientific")。

[0100] 基础培养基可由无血清培养基补充剂和/或培养基中的附加成分进行补充。合适的补充剂和附加成分如上所述,可包括L-谷氨酰胺或其替代物(如GlutaMAX-1™)、抗坏血酸(ascorbic acid)、单硫醇甘油(monothiolglycerol,MTG)、抗生素(antibiotics)(例如青霉素(penicillin)和链霉素(streptomycin))、人血清白蛋白(human serum albumin)(例如重组人血清白蛋白,如Cellastim™(默克/西格玛"Merck/Sigma")和Recombumin™(albumedix.com))、胰岛素(insulin)、转铁蛋白(transferrin)和2-巯基乙醇(2-mercaptoethanol)。基础培养基中可补充血清替代物,如敲除血清替代物(Knockout Serum Replacement,KOSR;英杰"Invitrogen")。

[0101] 所述iPSC可在第一中胚层诱导培养基中培养1至12小时,例如1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时或12小时中的任何一个,优选地约4小时;随后在第二中胚层诱导培养基中培养30至54小时,例如35小时、36小时、37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、49小时或50小时中的任何一个,优选地约44小时;之后在第三中胚层诱导培养基中培养36至60小时,例如37小时、38小时、39小时、40小时、41小时、42小时、43小时、44小时、45小时、46小时、47小时、48小时、49小时、50小时、51小时、52小时或53小时中的任何一个,优选地约48小时,以产生中胚层细胞群。

[0102] 中胚层细胞是部分分化的祖细胞,其致力于中胚层谱系,能够在适当条件下分化为间充质(成纤维细胞)、肌肉、骨骼、脂肪、血管和造血系统中的所有细胞类型。中胚层细胞可表达一种或多种中胚层标记物。例如,所述中胚层细胞可表达Brachyury、Goosecoid、Mixl1、KDR、FoxA2、GATA6和PDGFαR中的任何一个、两个、三个、四个、五个、六个或全部七个。

[0103] 在第二阶段,中胚层细胞可分化为造血内皮细胞(haemogenic endothelial cells,HECs),通过在适当条件下培养中胚层细胞群,促进造血内皮(haemogenic

endothelial,HE)分化。例如,所述iPSC细胞可在HE诱导培养基中培养。

[0104] 合适的HE诱导培养基可以(i)刺激cKIT受体(CD117)和/或cKIT受体(CD117)介导的信号通路,以及(ii)刺激VEGFR和/或VEGFR介导的信号通路。例如,所述HE诱导培养基可包含SCF和VEGF。

[0105] 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是PDGF家族的一种蛋白因子,它与VEGFR酪氨酸激酶受体结合,刺激血管生成(vasculogenesis)和血管新生(angiogenesis)。合适的VEGF包括VEGF家族的任何成员,例如VEGF-A至VEGF-D和PIGF中的任何一种。优选地,所述VEGF为VEGF-A(也称为VEGF,NCBI基因号:7422,核酸序列NM_001025366.2,氨基酸序列NP_001020537.2)。优选地,所述VEGFR介导的信号通路是VEGFR2(KDR/Flk-1)介导的信号通路。VEGF可从商业渠道(如安迪生物科技"R&D Systems",美国)获得。本文所述HE诱导培养基中VEGF的浓度可以很方便地配制为1至100ng/ml,例如约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约12ng/ml、约15ng/ml、约16ng/ml、约17ng/ml、约18ng/ml、约19ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml,或约50ng/ml、约55ng/ml、约60ng/ml、约65ng/ml、约70ng/ml、约75ng/ml、约80ng/ml、约85ng/ml、约90ng/ml,或约95ng/ml中的任何一种,优选地约15ng/ml。

[0106] 在一些HE诱导培养基的实例中,VEGF可被刺激VEGFR介导的信号通路的VEGF激活剂或激动剂替代。合适的VEGF激活剂在本领域为已知的,包括:蛋白质,例如格里莫林"gremlin"(Mitola等人,(2010)《血液》"Blood"116(18)3677-3680);核酸,例如shRNA(例如Turunen等人,《循环研究》"Circ Res".2009年9月11日;105(6):604-9);基于CRISPR的质粒(例如VEGF CRISPR激活质粒;圣克鲁斯生物技术"Santa Cruz Biotech",美国);抗体;以及小分子。

[0107] 干细胞因子(Stem cell factor,SCF)是一种与所述KIT受体(KIT原癌基因,受体酪氨酸激酶)(CD117;SCFR)结合并参与造血的细胞因子。SCF(也称为KITLG,NCBI基因号:4254)可具有参考核酸序列NM_000899.5或NM_03994.5和参考氨基酸序列NP_000890.1或NP_003985.5。SCF易从商业渠道获得(如安迪生物科技"R&D Systems",美国)。本文所述HE诱导培养基中SCF的浓度可以很方便地配制为1至1000ng/ml,例如约10ng/ml、约20ng/ml、约30ng/ml、约40ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约110ng/ml、约120ng/ml、约130ng/ml、约140ng/ml、约150ng/ml、约200ng/ml、约250ng/ml、约300ng/ml、约350ng/ml、约400ng/ml、约450ng/ml、约500ng/ml、约600ng/ml、约700ng/ml、约800ng/ml、约900ng/ml中的任何一种,优选地约100ng/ml。

[0108] 在优选的实施例中,所述HE诱导培养基是纯化学培养基。例如,所述HE诱导培养基可由纯化学营养培养基组成,所述纯化学营养培养基补充有效量的:VEGF,如15ng/ml VEGF;和SCF,例如100ng/ml SCF。

[0109] 上文描述了合适的纯化学营养培养基,包括StemPro™-34PLUS(赛默飞世尔科技"ThermoFisher Scientific")。

[0110] 所述中胚层细胞可在所述HE诱导培养基中培养2至6天或3至5天,优选地约4天,以产生HE群。

[0111] 造血内皮细胞(HECs)是部分分化的内皮祖细胞,具有造血潜能,能够在适当条件

下分化为造血谱系(haematopoietic lineages)。HE细胞可表达CD34。在一些实施例中,HEC可不表达CD73或CXCR4(CD184)。例如,所述HE细胞可具有CD34+CD73-表型或CD34+CD73-CXCR4-表型。

[0112] 在第三阶段,造血内皮(HE)细胞可被分化为造血祖细胞(HPCs),所述分化通过在适当条件下培养所述HE细胞群来促进造血分化。例如,所述HE细胞可在一造血诱导培养基中培养。

[0113] 合适的造血诱导培养基可刺激以下:(i)cKIT受体(CD117)和/或cKIT受体(CD117)介导的信号通路,(ii)VEGFR和/或VEGFR介导的信号通路,优选地VEGFR2或VEGFR2介导的信号通路,(iii)MPL(CD110)和/或MPL(CD110)介导的信号通路,(iv)FLT3和/或FLT3介导的信号通路,(v)IGF1R和/或IGF1R介导的信号通路,(vi)SMAD1、SMAD5和SMAD9和/或SMAD1、SMAD5和SMAD9介导的信号通路,(vii)刺猬(Hedgehog)和/或刺猬信号通路,(viii)EpoR和/或EpoR介导的信号通路,和(ix)AGTR2和/或AGTR2介导的信号通路。合适的造血诱导培养基也可抑制所述AGTR1(血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT_1))和/或AGTR1(血管紧张素II 1型受体(AT_1))介导的信号通路。合适的造血诱导培养基也可具有白细胞介素(IL)活性和FGF活性。

[0114] 例如,造血诱导培养基可包含所述分化因子:VEGF、SCF、血小板生成素(TPO)、Flt3配体(Flt3L)、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IGF-1、BMP、FGF、音猬因子(Sonic hedgehog,SHH)、促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)、血管紧张素II(angiotensin II)和血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT_1)拮抗剂。合适的造血诱导培养基的一个实例是如下表1所示的第3阶段培养基。

[0115] 血小板生成素(Thrombopoietin,TPO)是调节血小板生成的糖蛋白激素。TPO(也称为THPO,NCBI基因号:7066)可具有参考核酸序列NM_000460.4和参考氨基酸序列NP_000451.1。TPO易从商业渠道获得(如安迪生物科技"R&D Systems",美国;美天旎生物技术公司"Miltenyi Biotec Gmbh",德国)。本文所述造血诱导培养基中TPO的浓度可以很方便地配制为3至300ng/ml,例如约3ng/ml、约5ng/ml、约7ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约13ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约19ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约30ng/ml、约32ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约110ng/ml、约120ng/ml、约130ng/ml、约140ng/ml、约150ng/ml、约200ng/ml、约250ng/ml、约300ng/ml、约350ng/ml、约400ng/ml、约450ng/ml、约500ng/ml、约600ng/ml、约700ng/ml、约800ng/ml、约900ng/ml中的任何一种,优选地约30ng/ml。

[0116] Flt3配体(Fms相关酪氨酸激酶3配体或FLT3L)是具有造血活性的细胞因子,其与Flt3受体结合并刺激祖细胞的增殖和分化。Flt3配体(也称为FLT3LG,NCBI基因号:2323)可具有参考核酸序列NM_001204502.2和参考氨基酸序列NP_001191431.1。Flt3易从商业渠道获得(如安迪生物科技"R&D Systems",美国;美天旎生物技术公司"Miltenyi Biotec Gmbh",德国)。本文所述造血诱导培养基中Flt3配体的浓度可以很方便地配制为0.25至250ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约

100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、或约250ng/ml中的任何一种，优选地约25ng/ml。

[0117] 白细胞介素(Interleukins,ILs)是在免疫的发育及功能中起主要作用的细胞因子。造血诱导培养基中的IL可包括IL-3、IL-6、IL-7和IL-11。

[0118] IL-3(也称为IL3或MCGF,NCBI基因号:3562)可具有参考核酸序列NM_000588.4和参考氨基酸序列NP_000579.2。IL-3易从商业渠道获得(如安迪生物科技“R&D Systems”,美国;美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”,德国)。本文所述造血诱导培养基中IL-3的浓度可以很方便地配制为0.25至250ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、或约250ng/ml中的任何一种,优选地约25ng/ml。

[0119] IL-6(也称为IL6或HGF,NCBI基因号:3569)可具有参考核酸序列NM_000600.5和参考氨基酸序列NP_000591.5。IL-6易从商业渠道获得(如安迪生物科技“R&D Systems”,美国;美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”,德国)。本文所述造血诱导培养基中IL-6的浓度可以很方便地配制为0.1至100ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml或约95ng/ml中的任何一种,优选地约10ng/ml。

[0120] IL-7(也称为IL7,NCBI基因号:3574)可具有参考核酸序列NM_000880.4和参考氨基酸序列NP_000871.1。IL-7易从商业渠道获得(如安迪生物科技“R&D Systems”,美国;美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”,德国)。本文所述造血诱导培养基中IL-7的浓度可以很方便地配制为0.1至100ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml或约95ng/ml中的任何一种,优选地约10ng/ml。

[0121] IL-11(也称为AGIF,NCBI基因号:3589)可具有参考核酸序列NM_000641.4和参考氨基酸序列NP_000632.1。IL-11易从商业渠道(如安迪生物科技“R&D Systems”,美国;美天旎生物技术公司“Miltenyi Biotec Gmbh”,德国)获得。本文所述造血诱导培养基中IL-11配体的浓度可以很方便地配制为0.5至100ng/ml,例如约0.5ng/ml、约0.75ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约25ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml或约95ng/ml中的任何一种,优选地约5ng/ml。

[0122] 胰岛素样生长因子1(Insulin-like growth factor 1,IGF-1)是一种与酪氨酸激酶IGF-1受体(IGF1R)和胰岛素受体结合并激活多种信号通路的激素。IGF-1(也称为IGF或

MGF,NCBI基因号:3479)可以具有参考核酸序列NM_000618.5和参考氨基酸序列NP_000609.1。IGF-1易从商业渠道获得(如安迪生物科技"R&D Systems",美国)。本文所述造血诱导培养基中IGF-1的浓度可以很方便地配制为0.25至250ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约20ng/ml、约22ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、或约250ng/ml中的任何一种,优选地约25ng/ml。

[0123] 音猬因子(Sonic hedgehog,SHH)是调节脊椎动物器官发生的刺猬信号通路的配体。SHH(也称为TPT或HHG1,NCBI基因号:6469)可具有参考核酸序列NM_000193.4和参考氨基酸序列NP_000184.1。SHH易从商业渠道(如安迪生物科技"R&D Systems",美国;美天旎生物技术公司"Miltenyi Biotec Gmbh",德国)获得。本文所述的造血诱导培养基中的SHH浓度可以很方便地配制为0.25至250ng/ml,例如约0.1ng/ml、约0.25ng/ml、约0.5ng/ml、约1ng/ml、约2ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约11ng/ml、约12ng/ml、约13ng/ml、约14ng/ml、约15ng/ml、约17ng/ml、约20ng/ml、约22ng/ml、约25ng/ml、约27ng/ml、约30ng/ml、约35ng/ml、约40ng/ml、约45ng/ml、约50ng/ml、约60ng/ml、约70ng/ml、约80ng/ml、约90ng/ml、约100ng/ml、约125ng/ml、约150ng/ml、约175ng/ml、约200ng/ml、约225ng/ml、或约250ng/ml中的任何一种,优选地约25ng/ml。

[0124] 促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是一种与促红细胞生成素受体(erythropoietin receptor,EpoR)结合并刺激红细胞生成的糖蛋白细胞因子。EPO(也称为DBAL,NCBI基因号:2056)可具有参考核酸序列NM_000799.4和参考氨基酸序列NP_000790.2。EPO易从商业渠道(如安迪生物科技"R&D Systems",美国;派普泰克"PreproTech",美国)获得。本文所述的造血诱导培养基中的EPO浓度可以很方便地配制为0.02至20U/ml,例如约0.01U/ml、约0.025U/ml、约0.05U/ml、约0.075U/ml、约0.1U/ml、约0.5U/ml、约0.75U/ml、约1.0U/ml、约1.5U/ml、约2.0U/ml、约2.5U/ml、约3U/ml、约4U/ml、约5U/ml、约6U/ml、约7U/ml、约8U/ml、约9U/ml、约10U/ml、约13U/ml、约15U/ml、约17U/ml或约19U/ml中的任何一种,优选地约2U/ml。

[0125] 血管紧张素II是一种七肽激素,由血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme,ACE)作用于血管紧张素I形成。血管紧张素II刺激血管收缩。血管紧张素I和II由血管紧张素原(angiotensinogen)(也称为AGT,NCBI基因号:183)的裂解形成,其可具有参考核酸序列NM_000029.4和参考氨基酸序列NP_000020.1。血管紧张素II易从商业渠道(如安迪生物科技"R&D Systems",美国;托克里斯公司"Tocris",美国)获得。本文所述造血诱导培养基中血管紧张素II的浓度可以很方便地配制为0.05至50ng/ml,例如约0.01ng/ml、约0.025ng/ml、约0.05ng/ml、约0.075ng/ml、约0.1ng/ml、约0.5ng/ml、约0.75ng/ml、约1.0ng/ml、约1.5ng/ml、约2.0ng/ml、约2.5ng/ml、约3ng/ml、约4ng/ml、约5ng/ml、约6ng/ml、约7ng/ml、约8ng/ml、约9ng/ml、约10ng/ml、约15ng/ml、约20ng/ml、约30ng/ml、约40ng/ml或约50ng/ml中的任何一种,优选地约5ng/ml。

[0126] 血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT_1)拮抗剂(Angiotensin II type 1receptor antagonists,ARBs)是选择性阻断AT_1受体(AGTR1;基因号185)激活的化合物。合适的AT_1拮抗剂包括氯沙坦(losartan)(2-丁基-4-氯-1-{[2'-(1H-四唑-5-基)-4-联苯基]甲基}-1H-咪唑-5-基)甲醇)、缬沙坦(valsartan)((2S)-3-甲基-2-(戊酰基{[2'-(1H-四唑-5-基)联苯基-4-基]甲基}氨基)丁酸),和替米沙坦(telmisartan)(4'[(1,4'-二甲基-2'-丙基[2,6'-双-1H-苯并咪唑]-1'-基)甲基][1,1'-联苯]-2-羧酸)。在一些优选的实施例中,所述AT_1拮抗剂为氯沙坦。合适的AT_1拮抗剂可从商业供应商处获得(如托克里斯公司"Tocris",美国;开曼化工有限公司"Cayman Chemical Co",美国密歇根州)。本文所述造血诱导培养基中血管紧张素II 1型受体(AT_1)拮抗剂的浓度可以很方便地配制为1至1000μM,例如约10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、110ng/ml、120ng/ml、130ng/ml、140ng/ml、150ng/ml、160ng/ml、170ng/ml、180ng/ml、190ng/ml、200ng/ml、250ng/ml、300ng/ml、350ng/ml、400ng/ml、450ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml中的任何一种,优选地约100μM。

[0127] 在优选的实施例中,所述造血诱导培养基是纯化学培养基。例如,所述造血诱导培养基可由纯化学营养培养基组成,所述纯化学营养培养基补充有效量的:VEGF,如15ng/ml;SCF,如100ng/ml;血小板生成素(TPO),如30ng/ml;Flt3配体(Flt3L),如25ng/mL;IL-3,如25ng/ml;IL-6,如10ng/ml;IL-7,如10ng/ml;IL-11,如5ng/ml;IGF-1,如25ng/ml;BMP,如10ng/ml的BMP4;FGF,如5ng/ml的bFGF;音猬因子(Sonic hedgehog,SHH),如25ng/ml;促红细胞生成素(erythropoietin,EPO),如2u/ml;血管紧张素II(angiotensin II),如10μg/ml;和血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT_1)拮抗剂,如100μM氯沙坦。合适的造血诱导培养基不含其他分化因子。例如,造血诱导培养基可由补充一种或多种分化因子的纯化学营养培养基组成,其中所述一种或多种分化因子由VEGF、SCF、血小板生成素(TPO)、Flt3配体(Flt3L)、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IGF-1、BMP、FGF、音猬因子(Sonic hedgehog,SHH)、促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)、血管紧张素II(angiotensin II)和血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1receptor,AT_1)拮抗剂组成(即所述培养基不含除VEGF、SCF、血小板生成素(TPO)、Flt3配体(Flt3L)、IL-3、IL-6、IL-7、IL-11、IGF-1、BMP、FGF、音猬因子(SHH)、促红细胞生成素(EPO)、血管紧张素II和血管紧张素II 1型受体(AT_1)拮抗剂以外的任何分化因子)。

[0128] 上文描述了合适的纯化学营养培养基,包括StemPro™-34PLUS(赛默飞世尔科技"ThermoFisher Scientific")或基础培养基,例如补充白蛋白(albumin)、胰岛素(insulin)、转铁蛋白硒(selenium transferrin)和脂质(lipids)的如下所述的IMDM。

[0129] 所述HE细胞可在所述造血诱导培养基中培养8至21天以产生HPC群,例如约9天、约10天、约11天、约12天、约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、或约20天中的任何一天,优选地约16天。

[0130] HPC(也称为造血干细胞)是多能干细胞,其致力于造血谱系,能够进一步造血分化成所有血细胞类型,包含骨髓和淋巴谱系,包括:单核细胞、B细胞和T细胞。HPC可表达CD34。HPC可共表达CD133、CD45和FLK1(也称为KDR或VEGFR2),可对CD38和其他谱系特异性标记的表达呈阴性。例如,HPC可表现CD34+CD133+CD45+FLK1+CD38-表型。

[0131] 在从HE细胞生成HPC之后，表达一个或多个细胞表面标记物(例如CD34)的HPC群可在进一步分化之前，通过例如磁激活细胞分选(magnetic activated cell sorting,MACS)被纯化。例如，CD34+HPC群可被纯化。所述CD34+HPC可在所述HE诱导培养基中培养8天后(例如8天、9天或10天)被纯化。所述CD34+HPC可在分化16天后被纯化，例如在所述分化方法的第16天、第17天或第18天。

[0132] 在第四阶段，造血祖细胞(HPC)可通过在适当条件下培养所述HPC群以促进淋巴分化而分化为T细胞祖细胞。例如所述造血祖细胞可培养在一淋巴扩增培养基中。

[0133] 淋巴扩增培养基是一种细胞培养基，所述细胞培养基促进HPC向T细胞祖细胞的淋巴分化。

[0134] 合适的淋巴扩增培养基可以(i)刺激cKIT受体(CD117;KIT受体酪氨酸激酶(KIT receptor tyrosine kinase))和/或cKIT受体(CD117;KIT受体酪氨酸激酶)介导的信号通路，(ii)刺激MPL(CD110)和/或MPL(CD110)介导的信号通路，(iii)FLT3和/或FLT3介导的信号通路，以及(iv)具有白细胞介素(IL)活性。例如，淋巴扩增培养基可包含所述分化因子SCF、FLT3L、TPO和IL7。

[0135] 在优选的实施例中，所述淋巴扩增培养基是纯化学培养基。例如，所述淋巴扩增培养基可由补充有效量的上述分化因子的纯化学营养培养基组成。合适的淋巴扩增培养基在本领域是众所周知的，包括具有Stemspan™淋巴扩增补充剂(目录#9915;干细胞技术公司“StemCell Technologies Inc”，加拿大)的Stemspan™ SFEM II(目录#9605;干细胞技术公司“StemCell Technologies Inc”，加拿大)。

[0136] 所述HPC在分化为T细胞祖细胞期间可在一表面上培养。例如，所述HPC可在培养容器、磁珠或其他生物材料或聚合物的表面上培养。

[0137] 优选地，所述表面可包被有刺激Notch信号传导的因子，例如Notch配体，如δ1样(Delta-like 1,DLL1)或δ4样(Delta-like 4,DLL4)配体。合适的Notch配体在本领域是众所周知的，可从商业供应商处获得。

[0138] 所述表面还可被细胞外基质蛋白(例如纤维结合蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白或胶原)和/或一种或多种细胞表面粘附蛋白(例如VCAM1)包被。在一些实施例中，所述用于HPC培养的表面可具有一包被层，所述包被层包含刺激Notch信号传导的因子，例如Notch配体，如DLL4，而不含细胞外基质蛋白或细胞表面粘附蛋白。

[0139] 在一些实施例中，所述用于HPC培养的表面可具有一包被层，所述包被层包含刺激Notch信号传导的因子，例如Notch配体(如DLL4)、细胞外基质蛋白(如玻连蛋白)以及细胞表面粘附蛋白(如VCAM1)。所述表面可包被有细胞外基质蛋白，该因子刺激Notch信号传导和一细胞表面粘附蛋白，所述刺激通过与具有包被溶液的所述表面进行接触来实现。例如，所述包被溶液可在适当条件下在所述表面上被孵育以包被所述表面。例如，所述条件可包括室温下孵育约2小时。包被溶液可从商业供应商(StemSpan™淋巴分化包被材料(StemSpan™ Lymphoid Differentiation Coating Material);目录#9925;干细胞技术公司“StemCell Technologies Inc”，加拿大)处获得，所述包被溶液由细胞外基质蛋白和刺激Notch信号传导的因子组成。

[0140] 所述HPC可在所述基质或表面上的所述淋巴扩增培养基中培养足够长的时间，以使所述HPC分化为T细胞祖细胞。例如，所述HPC可培养2-6周、2-5周或2-4周，优选地3周。

[0141] T细胞祖细胞是多功能的淋巴细胞生成祖细胞，能够产生αβT细胞、γδT细胞、组织驻留T细胞和NKT细胞。在胸腺中进行前TCR选择后，T细胞祖细胞可向αβT细胞谱系分化。T细胞祖细胞能在体内胸腺定植，并且能在胸腺中进行前TCR选择后，向T细胞谱系分化。T细胞祖细胞也能成熟为产生细胞因子的CD3+T细胞。

[0142] T细胞祖细胞可表达CD5和CD7，即所述T细胞祖细胞可具有CD5+CD7+表型。T细胞祖细胞也可共同表达CD44、CD25和CD2。例如，T细胞祖细胞可具有CD5+、CD7+CD44+、CD25+CD2+表型。在一些实施例中，T细胞祖细胞也可共同表达CD45。T细胞祖细胞可缺乏CD3、CD4和CD8的表达，例如其在所述细胞表面的表达。

[0143] 在第五阶段，T细胞祖细胞可成熟为T细胞，所述成熟通过在适当条件下培养T细胞祖细胞群以促进T细胞成熟。例如，所述T细胞祖细胞可被培养于一T细胞成熟培养基中。

[0144] T细胞成熟培养基是一种细胞培养基，所述细胞培养基促进T细胞祖细胞成熟为成熟T细胞。合适的T细胞成熟培养基可以(i)刺激cKIT受体(CD117;KIT受体酪氨酸激酶(KIT receptor tyrosine kinase))和/或cKIT受体(CD117;KIT受体酪氨酸激酶)介导的信号通路，(ii)FLT3和/或FLT3介导的信号通路，以及(iii)具有白细胞介素(IL)活性。例如，T细胞成熟培养基可包含分化因子SCF、FLT3L和IL7。

[0145] 在优选的实施例中，所述T细胞成熟培养基是纯化学培养基。例如，所述T细胞成熟培养基可以由补充有效量的上述分化因子的纯化学营养培养基组成。合适的T细胞成熟培养基在本领域是众所周知的，包括具有Stemspan™ T细胞成熟补充剂(目录#9930;干细胞技术公司“StemCell Technologies Inc”，加拿大)的Stemspan™ SFEM II(目录#9605;干细胞技术公司“StemCell Technologies Inc”，加拿大)，以及其他适合PBMC和CD3+细胞扩增的培养基，如ExCellerate人T细胞扩增培养基(安迪生物科技“R&D Systems”，美国)。如本文其他地方所述，其他合适的T细胞成熟培养基可包括补充有ITS、白蛋白和脂质的基础培养基如IMDM，所述基础培养基中进一步补充有效量的上述分化因子。

[0146] 所述T细胞祖细胞可在一表面上培养。例如，所述T细胞祖细胞可在培养容器、磁珠或其他生物材料或聚合物的表面上培养。

[0147] 优选地，所述表面可包被有刺激Notch信号传导的因子，例如Notch配体，如δ1样(Delta-like 1,DLL1)或δ4样(Delta-like 4,DLL4)配体。合适的Notch配体在本领域是众所周知的，可从商业供应商处获得。所述表面还可被细胞外基质蛋白(例如纤维结合蛋白、玻连蛋白、层粘连蛋白或胶原)和/或一种或多种细胞表面粘附蛋白(例如VCAM1)包被。合适的包被层在本领域中是众所周知的，并在本文其他地方进行了描述。

[0148] 所述T细胞祖细胞可在所述基质或表面上的所述T细胞成熟培养基中培养足够长的时间，以使所述T细胞祖细胞成熟为T细胞。例如，所述T细胞祖细胞可培养1-4周，优选地2或3周。

[0149] 在一些实施例中，由T细胞祖细胞成熟产生的所述T细胞可以是双阳性CD4+CD8+T细胞。

[0150] T细胞祖细胞可通过上述方法成熟为T细胞。T细胞(也称为T淋巴细胞)是在细胞介导的免疫中起核心作用的白细胞。T细胞与其他淋巴细胞的区别在于其细胞表面存在T细胞受体(T cell receptor,TCR)。

[0151] T细胞有几种类型，每种类型都有不同的功能。

[0152] 辅助性T细胞(T_H细胞)(T helper cells,T_H cells)被称为$CD4^+$T细胞,因为它们表达CD4表面糖蛋白。$CD4^+$T细胞在适应性免疫系统中发挥重要作用,并通过释放T细胞因子和协助抑制或调节免疫应答来辅助其他免疫细胞的活性。它们对CD4+CD8+T细胞的激活和生长至关重要。

[0153] 细胞毒性T细胞(T_C细胞、CTL、杀伤性T细胞(killer T cells)、CD4+CD8+T细胞)被称为CD8+T细胞,因为它们表达CD8表面糖蛋白。CD8+T细胞可以破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞。大多数CD8+T细胞表达TCR,所述TCR可识别由I类MHC分子呈递在感染或受损细胞表面的特定抗原。所述TCR和CD8糖蛋白其与所述抗原和MHC分子的特异性结合导致T细胞介导的对感染或受损细胞的破坏。

[0154] 如本文所述产生的T细胞可以是双阳性CD4+CD8+T细胞或单阳性CD4+或CD8+T细胞。

[0155] 如本文所述产生的T细胞可以是成熟的CD3+T细胞。例如,所述细胞可具有TCR+CD3+CD8+CD4+表型。在一些实施例中,T细胞还可表达CD45和CD28。

[0156] 如本文所述产生的T细胞可以是γδT细胞、αβT细胞或NKT细胞。

[0157] 在一些优选的实施例中,如本文所述产生的T细胞为αβT细胞。在T细胞祖细胞成熟(第5阶段)后,所述T细胞群可能主要是CD4+CD8+T细胞。

[0158] 在第六阶段,所述TCR T细胞群可被激活和/或扩增以产生单阳性CD4+T细胞或增加单阳性CD4+T细胞的比例,或更优选地单阳性CD8+T细胞。用于激活和扩增T细胞的合适方法是本领域众所周知的。例如,可以在适当的培养条件下将T细胞与T细胞受体(TCR)激动剂接触。合适的TCR激动剂包括配体例如肽,所述肽呈递在磁珠或抗原呈递细胞(例如树突状细胞)表面上的I类或II类MHC分子(MHC-肽复合体)上;还包括可溶性因子例如抗TCR抗体,如抗CD28抗体和多聚体MHC-肽复合体(如MHC-肽四聚体、五聚体或右旋体)。

[0159] 活化是指T细胞受到充分刺激从而诱导可检测的细胞增殖的状态。激活也可能与细胞因子的诱导产生和可检测的效应因子的功能有关。术语“活化T细胞”指在一众T细胞中,正在进行细胞分裂的T细胞。

[0160] 抗TCR抗体可特异性结合到所述TCR的一个组分,例如εCD3、αCD3或αCD28。适用于TCR刺激的抗TCR抗体在本领域是众所周知的(例如OKT3),并可从商业供应商(例如益佰欧生物科学公司“eBioscience CO”,美国)处获得。在一些实施例中,T细胞可通过与抗αCD3抗体和IL2、IL7或IL15接触而被激活。更优选地,T细胞通过与抗αCD3抗体和抗αCD28抗体接触而被激活。所述激活可发生在CD14+单核细胞存在或不存在的情况下。所述T细胞可被抗CD3和抗CD28抗体包被的磁珠激活。例如,包括CD4+和/或CD8+细胞的PBMC或T细胞亚群可在无饲养细胞(抗原呈递细胞)或抗原的情况下,使用抗体包被的磁珠例如包被有抗CD3和抗CD28抗体的磁珠(如Dynabeads®人T激活剂CD3/CD28(Dynabeads®Human T-Activator CD3/CD28)(赛默飞世尔科技“ThermoFisher Scientific”))从而被激活。在其他实施例中,结合CD3、CD28和CD2细胞表面配体的可溶性四聚体抗体复合物(例如免疫培养公司“ImmunoCult™”的人CD3/CD28/CD2 T细胞激活剂或人CD3/CD28 T细胞激活剂)可用于激活T细胞。在其他实施例中,T细胞可被MHC肽复合体激活,优选地多聚体MHC肽复合体,任选地与抗CD28抗体结合使用。

[0161] 表达嵌合抗原受体的T细胞可使用所述受体的可溶性抗原激活。所述抗原可以是

多聚体形式或位于磁珠的表面上，并且可以任选地与抗TCR抗体(例如抗CD28抗体)结合使用。

[0162] 在一些实施例中，双阳性CD4+CD8+T细胞可在补充有IL-15的如本文所述的T细胞成熟培养基中培养。如上文所述，所述培养基可进一步补充T细胞受体(TCR)激动剂，例如一种或多种抗TCR抗体(如抗αCD3抗体和抗αCD28抗体)，以激活和扩大所述细胞群，并产生单阳性T细胞。

[0163] 所述T细胞可使用任何方便的技术培养，以产生扩大的细胞群。合适的培养系统包括搅拌发酵罐、气升式发酵罐、转瓶、培养袋或培养皿，以及其他生物反应器，尤其是中空纤维生物反应器。这种系统的使用在本领域是众所周知的。

[0164] 如本文所述产生的T细胞可表达异源抗原受体，例如结合靶抗原的T细胞受体(TCR)、NK细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。例如，所述异源抗原受体可与表达肿瘤抗原或其肽片段的癌细胞特异性地结合。因为它们是RAG失活的(即所述细胞中的所述RAG1和/或RAG2基因被缺失突变或其他突变敲除)，所述T细胞不表达内源性TCR。如下文所述，所述T细胞可用于例如免疫治疗。

[0165] 产生后，可分离和/或纯化所述T细胞群，例如双阳性(double positive,DP)CD4+CD8+细胞、单阳性(single positive,SP)CD4+细胞或SP CD8+细胞。可以使用任何方便的技术，包括荧光激活细胞分选(fluorescence-activated cell sorting,FACS)或使用抗体包被磁性颗粒的磁激活细胞分选(magnetic-activated cell sorting,MACS)。

[0166] 所述T细胞群，例如DP CD4+CD8+细胞、SP CD4+细胞或SP CD8+细胞可被扩增和/或浓缩。任选地，如本文所述产生的T细胞群可在使用前例如被储存或冷冻保存。

[0167] T细胞群可与其他试剂混合，例如缓冲剂、载体、稀释剂、防腐剂和/或药学上可接受的赋形剂。下文将更详细地描述合适的试剂。本文所述的方法可包括将所述T细胞群与药学上可接受的赋形剂混合。

[0168] 适用于给药(例如通过输液)的药物组合物包括水性和非水性等渗、无热原、无菌注射溶液，所述注射溶液可含有抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质；以及可包括悬浮剂和增稠剂的水性和非水性无菌悬浮液。用于此类制剂的合适等渗载体的实例包括氯化钠注射液(Sodium Chloride Injection)、林格氏液(Ringer's Solution)或乳酸钠林格注射液(Lactated Ringer's Injection)。合适的载体可在标准制药文本中找到，例如1990年麦克出版公司“Mack Publishing Company”于宾夕法尼亚州伊斯顿出版的第18版《雷明顿药物科学》“Remington's Pharmaceutical Sciences”。

[0169] 在一些优选的实施例中，所述T细胞(可以是DP CD4+CD8+T细胞、SP CD4+T细胞或优选地SP CD8+T细胞)可被配制成适于静脉输注到个体体内的药物组合物。

[0170] 本文使用的术语“药学上可接受的”涉及化合物、材料、组合物和/或剂型，这些化合物、材料、组合物和/或剂型在合理的医学判断范围内，适合与受试者(例如人类)的组织接触使用，且没有过度毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症，与合理的收益/风险比相称。每种载体、赋形剂等在与所述制剂的其他成分相容的意义上也必须是“可接受的”。

[0171] 本发明的一个方面提供通过上述方法产生的T细胞群，所述T细胞群可以是例如DP CD4+CD8+T细胞、SP CD4+T细胞或SP CD8+T细胞。所述T细胞可以是RAG失活的，可缺乏功能

性内源性TCR基因，因此所述T细胞不表达内源性TCR。所述T细胞可表达来自异源编码核酸的外源性TCR。

[0172] 所述T细胞群可以用作药物。例如本文所述的成熟T细胞群可用于癌症免疫治疗，如过继性T细胞治疗。

[0173] 过继性细胞治疗或过继性免疫治疗是指过继性转移人T淋巴细胞，所述T淋巴细胞表达对靶细胞具有特异性的抗原受体。例如人T淋巴细胞可表达对靶细胞上表达的抗原具有特异性的TCR，和/或对靶细胞上表达的MHC肽复合体具有特异性的TCR，或对靶细胞上表达的抗原具有特异性的嵌合抗原受体(CAR)或NKCR。

[0174] 这可以用于治疗一系列疾病，取决于选择的靶点，例如选择肿瘤特异性抗原治疗癌症。过继性细胞疗法涉及移除供者或所述患者的部分细胞，例如白细胞。随后，这些细胞被用于体外生成iPSC，这些iPSC被用于高效地生成T细胞，所述T细胞对靶细胞上表达的抗原具有特异性和/或对靶细胞上的MHC肽复合体具有特异性，如本文所述。所述T细胞可被扩增、洗涤、浓缩，和/或随后冷冻，以便留出时间进行检测、运输和储存，直到患者准备好接受细胞输注。

[0175] 本发明的其他方面提供了如本文所述的或如本文所述方法生产的T细胞群在制造用于治疗癌症的药物中的用途，提供了如本文所述的或如本文所述方法生产的用于治疗癌症的T细胞群，以及提供了一种癌症治疗方法，所述方法包括向有需要的个体施用如本文所述的或如本文所述方法生产的T细胞群。

[0176] 所述T细胞群可以是自体的，即所述T细胞可从细胞衍生的iPSC中产生，所述细胞最初从随后被施用所述T细胞的同一个体获得(即所述供体和受体个体是相同的)。

[0177] 所述T细胞群可以是同种异体的，即所述T细胞可从细胞衍生的iPSC中产生，所述细胞最初从与随后被施用所述T细胞的个体不相同的个体获得(即所述供体和受体个体是不同的)。同种异体指的是来源于同一物种的不同动物的移植物。

[0178] 所述供者和受体个体可以是HLA匹配的，以避免GVHD和其他不良免疫效应，如排斥反应。或者，所述供体和受体个体可以是HLA不匹配的，或者来自所述供体个体的细胞中的HLA基因可被修饰，例如通过基因编辑，以去除与所述受体任何HLA的不匹配。

[0179] 用于给受体个体施用的适当T细胞群可通过一方法来产生，所述方法包括：提供从供体个体获得的初始细胞群；将所述细胞重编程为iPSC，使所述iPSC中的RAG失活，并如本文所述将所述RAG失活的iPSC分化为表达抗原受体(例如αβTCR)的T细胞，所述抗原受体在受体个体中特异性地结合癌细胞或癌细胞上任选地与MHC复合呈递的抗原或抗原肽。

[0180] 在施用所述T细胞后，所述受体个体可表现出T细胞介导的对所述受体个体体内癌细胞的免疫应答。这可对所述个体的癌症状况产生有益的影响。

[0181] 如本文所用，术语“癌症”、“赘生物”和“肿瘤”可以互换使用，单数或复数形式均表示已经经历恶性转化的细胞，这使得它们对宿主机体具有病理性。

[0182] 通过成熟的技术，尤其是组织学检查，原代癌细胞易与非癌细胞区分开来。如本文所用，癌细胞的定义不仅包括原代癌细胞，还包括来源于癌细胞祖先的任何细胞。这包括转移的癌细胞、体外培养的和来源于癌细胞的细胞系。当提到一种通常表现为实体瘤的癌症时，“临床可检测”肿瘤是指依据肿瘤质量可检测出的肿瘤，例如通过计算机断层(computed tomography，CT)扫描、磁共振成像(magnetic resonance imaging，MRI)、X射线、超声波或

体检触诊等程序,和/或由于从患者获得的样本中一种或多种癌症特异性抗原的表达而可被检测出。

[0183] 癌症病状的特征可以是恶性癌细胞的异常增殖,可包括白血病,如AML、CML、ALL和CLL、淋巴瘤(lymphomas)(如霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)和多发性骨髓瘤(multiple myeloma)),和实体癌(solid cancers)(如肉瘤(sarcomas)、皮肤癌(skin cancer)、黑色素瘤(melanoma)、膀胱癌(bladder cancer)、脑癌(brain cancer)、乳腺癌(breast cancer)、子宫癌(uterus cancer)、卵巢癌(ovary cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、肺癌(lung cancer)、结直肠癌(colorectal cancer)、宫颈癌(cervical cancer)、肝癌(liver cancer)、头颈癌(head and neck cancer)、食管癌(oesophageal cancer)、胰腺癌(pancreas cancer)、肾癌(renal cancer)、肾上腺癌(adrenal cancer)、胃癌(stomach cancer)、睾丸癌(testicular cancer)、胆囊癌(cancer of the gall bladder)和胆管癌(cancer of biliary tracts)、甲状腺癌(thyroid cancer)、胸腺癌(thymus cancer)、骨癌(cancer of bone)和脑癌(cerebral cancer)),以及原发灶不明癌症(cancer of unknown primary,CUP)。

[0184] 个体体内的癌细胞可在免疫学上不同于个体体内的正常体细胞(即所述癌性肿瘤可具有免疫原性)。例如所述癌细胞能够在所述个体中引发针对癌细胞表达的一种或多种抗原的全身性免疫应答。引发免疫应答的所述肿瘤抗原可对癌细胞具有特异性,也可以是个体体内的一种或多种正常细胞所共用。

[0185] 适合如本文所述治疗的个体的所述癌细胞可表达所述抗原和/或可具有正确的HLA类型以结合T细胞表达的异源TCR。

[0186] 适合如上所述治疗的个体可以是哺乳动物。在优选的实施例中,所述个体是人。在其他优选的实施例中,可使用非人哺乳动物,尤其是传统上用作证明对人治疗效果的模型的哺乳动物(例如小鼠、灵长类动物、猪、犬或兔类动物)可被使用。

[0187] 在一些实施例中,所述个体在初始癌症治疗后可具有微小残留病(minimal residual disease,MRD)。

[0188] 患有癌症的个体可表现至少一种可识别的迹象、症状或足以根据本领域已知的临床标准进行癌症诊断的实验室发现。这些临床标准的实例可在医学教科书中找到,比如2001年Fauci AS等人主编的由麦格劳-希尔出版社“McGraw-Hill”于纽约出版的第15版《哈里森内科学》“Harrison's Principles of Internal Medicine”。在某些情况下,个体癌症的诊断可包括从所述个体获得的体液或组织样本中识别特定细胞类型(例如癌细胞)。

[0189] 抗肿瘤效应是一种生物学效应,其表现为肿瘤生长速度减缓、肿瘤体积减小、肿瘤细胞数量减少、转移数量减少、预期寿命延长或与癌症状况相关的各种生理症状改善。“抗肿瘤效应”还可以通过肽、多核苷酸、细胞和抗体以及T细胞的能力来表现,其中所述T细胞可根据本发明的方法获得,如本文所述用于首先预防肿瘤的发生。

[0190] 治疗可以是任何治疗或疗法,无论是针对人还是动物(例如在兽医应用中),其中实现了一些期望的治疗效果,例如抑制或延迟病情进展,包括:减缓进展速度、停止进展速度;改善病情、治愈或缓解(部分或全部)病情;预防、延迟、减轻或阻止一种或多种病情的症状和/或迹象;或延长受试者或患者的生存期,所述生存期超过未经治疗的生存期。

[0191] 治疗也可以是预防性的(即预防)。例如易于发生或再发生癌症的个体或具有发生

或再发生癌症风险的个体可如本文所述进行治疗。这种治疗可以预防或延迟个体癌症的发生或再发生。

[0192] 特别地，治疗可包括抑制癌症生长，包括癌症完全缓解，和/或抑制癌症转移。癌症生长通常指的是一系列指标中的任何一项，其中所述指标表明所述癌症内部发生了更为严重的变化。因此，用于测量癌症生长抑制的指标包括：癌细胞存活率的降低、肿瘤体积或形态的减少(例如使用计算机断层扫描(CT)、超声或其他成像方法确定)、肿瘤生长延迟、肿瘤血管系统破坏、改善迟发型超敏皮肤试验(delayed hypersensitivity skin test)的表现、增加T细胞的活性，降低肿瘤特异性抗原的水平。如本文所述经修饰的T细胞的施用可提高所述个体抵抗癌症生长的能力，尤其是抵抗受试者已呈现癌症的生长和/或降低个体体内癌症生长的倾向。

[0193] 所述T细胞或包含所述T细胞的所述药物组合物可通过任何方便的给药途径给施用于受试者，无论是全身/外周给药还是在所需作用部位给药，包括但不限于：非经胃肠道途径，例如通过输液。输注包括通过针头或导管以适当的成分给药所述T细胞。通常，T细胞通过静脉或皮下输注，尽管所述T细胞可通过其他非口服途径输注，例如肌肉注射和硬膜外途径。合适的输注技术在本领域是已知的，且通常用于治疗(例如参见Rosenberg等人，《新英格兰医学杂志》“New Eng.J.of Med”,319:1676,1988)。

[0194] 通常，施用的细胞数量为每千克体重约10^5至约10^{10}个，例如约1、约2、约3、约4、约5、约6、约7、约8或约9，$\times10^5$、$\times10^6$、$\times10^7$、$\times10^8$、$\times10^9$或$\times10^{10}$个细胞，通常为每个个体2×10^8至2×10^{10}个细胞，通常持续30分钟，必要时重复治疗，例如每隔几天到几周。应了解，所述TCRαβ+T细胞的适当剂量以及包含所述TCRαβ+T细胞的组合物可因患者而异。确定最佳剂量通常涉及平衡治疗效益与本发明治疗的任何风险或有害副作用之间的水平。选择的剂量水平取决于多种因素，包括但不限于：特定细胞的活性、细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome,CRS)、给药途径、给药时间、细胞丢失率或失活率、治疗持续时间、其他药物、化合物，和/或组合使用的材料，以及患者的年龄、性别、体重、病情、整体健康状况和既往病史。细胞的数量和给药途径最终将由医生决定，尽管一般情况下，所述剂量将在所述作用部位达到局部浓度，从而达到预期效果而不会造成严重的有害或损害副作用。

[0195] 虽然所述T细胞可单独施用，但在某些情况下，所述T细胞可与所述靶抗原、呈递所述靶抗原的APC、CD3/CD28磁珠、IL-2、IL-7和/或IL-15组合施用，以促进所述T细胞群在体内的扩增。组合给药可通过单独、同时或顺序给药所述组合成分。

[0196] 所述T细胞群可与一种或多种其他疗法结合施用，例如细胞因子(例如IL-2)、CD4+CD8+化疗、辐射和免疫肿瘤制剂，所述免疫肿瘤制剂包括：检查点抑制剂(例如抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、抗TIM3抗体、抗KIR抗体、抗LAG3抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和抗CTLA4抗体)。组合给药可通过单独、同时或顺序给药所述组合成分。

[0197] 一种或多种其他疗法可通过任何方便的方式进行施用，优选地施用于与T细胞施用部位分离的部位。

[0198] 在整个治疗过程中，T细胞的施用可以是一剂，连续给药或间歇给药(例如以适当的间隔分次给药)。本领域技术人员熟知确定最有效的给药方式和剂量的方法，并将根据用于治疗的制剂、治疗目的、被治疗的靶细胞和接受治疗的受试者而变化。单次或多次给药可由治疗医生选择剂量水平和模式。优选地，所述T细胞以单次输注5亿、10亿、20亿、30亿、40

亿、50亿、60亿、70亿、80亿、90亿、100亿、110亿、120亿、130亿、140亿、150亿个T细胞(例如至少1×10^9个T细胞)中任何一种的方式施用。

[0199] 本发明的其他方面和实施例提供了其中术语“包括”替换为术语“由……组成”的上述方面和实施例,以及其中术语“包括”替换为术语“基本上由……组成”的上述方面和实施例。

[0200] 应当理解,除非上下文另有要求,否则本申请公开了上述任何方面和实施例的所有组合。类似地,除非上下文另有要求,否则本申请公开了无论是单独的还是与任何其他方面组合的优选和/或任选特征的所有组合。

[0201] 阅读本发明后,本领域技术人员将清楚理解上述实施例的变形、其他实施例及其变形,因此这些形式都落在本发明的范围之内。

[0202] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管在本发明方法的实践或检测中可以使用与本文所述类似或等效的任何组合物和方法,但本文描述了示例性组合物和方法。本文描述的本发明的任何方面和实施例也可以组合。例如,本文公开的任何从属权利要求或独立权利要求的主要内容可以多样组合(例如每个从属权利要求的一个或多个陈述可以基于它们所从属的独立权利要求组合成单个权利要求)。

[0203] 本文提供的范围包括所述特定范围内的所有值以及特定范围内端点附近的值。本发明的附图和表格还描述了范围和离散值,它们可构成本文所公开的任何方法的元素。本文所述浓度在环境温度和压力下测定。例如,这可能是室温下或工艺流特定部分内的温度和压力。优选地,在21℃和1bar压力的标准状态下测定浓度。术语“约”是指在任何特定测量值的平均值的两个标准偏差范围内的值。

[0204] 如本文和权利要求书中所用,除非上下文另有明确规定,单数形式“一个”、“一种”以及“该”包括复数引用。因此,例如对“一个肽链”的引用是对一个或多个肽链的引用,且包括本领域技术人员已知的其等价物。

[0205] 本说明书中提及的所有文件和序列数据库条目均以引用的方式用于所有目的全部并入本文。

[0206] 本文使用的“和/或”将被视为对两个指定特征或组分中的每一个,包括或不包括另一个的具体披露。例如,“A和/或B”将被视为(i)A,(ii)B和(iii)A和B中每一项的具体披露,正如本文中单独列出的每一项一样。

实施例

[0207] 方法

[0208] hiPSC培养

[0209] iPSC常规在mTeSR1(SCT)中在基质胶(Matrigel)(BD品牌,康宁公司“Corning”)上使用组织培养塑料器皿培养,培养条件为5%CO_2、5%O_2和37℃。使用EasyPassage工具(英杰“Invitrogen”)根据说明书获取hiPSC,在培养的前48小时以1:6或1:12的比例接种于具有10μm Y27632(安迪生物科技“R&D Systems”)的培养基中。为了分化,hiPSC使用1:48或1:98的分流比以低密度培养物传代到基质胶(matrigel)或玻连蛋白(vitronectin)上。接种后24小时,在显微镜下放大×4倍观察时,接种密度约为每视野1个菌落。hiPSC在mTeSR2或E8

flex(SCT)中培养,培养时间具体取决于所使用的细胞培养基质,培养约4-5天直到菌落致密,不再可见不同的细胞。

[0210] 从多能干细胞分化T细胞

[0211] 去除hiPSC维持培养基(mTeSR2或E8 flex),用DMEM/F12洗涤所述细胞两次。

[0212] 添加2mL StemPro34 PLUS(来自英杰"Invitrogen"的StemPro34;StemPro34基础培养基,添加补充剂和青霉素链霉素(1%v/v:英杰"Invitrogen")和谷氨酰胺(2mM:英杰"Invitrogen")、抗坏血酸(50μg/ml:西格玛奥德里奇"Sigma Aldrich")和单硫醇甘油(100μM:西格玛奥德里奇"Sigma Aldrich")),进一步补充50ng/mL的激活素并孵育4小时。体积取决于培养瓶的大小,通常至少为2mls/9cm^{2}和20mls/150cm^2。

[0213] 4小时后,去除所述培养基,用DMEM/F12洗涤细胞两次以去除残留的高浓度激活素A。用2mL的StemPro34 PLUS替换所述培养基,补充5ng/mL的激活素A、10ng/mL的BMP4和5ng/mL的bFGF,并孵育44小时(第1阶段培养基)。然后用新鲜的第1阶段培养基替换所述培养基,并补充10μM CHIR-99021,进一步培养48小时。

[0214] 第4天,去除所述培养基,用DMEM/F12洗涤细胞两次以去除残留的第1阶段细胞因子。然后用补充100ng/mL SCF和15ng/mL VEGF的StemPro34 PLUS替换所述培养基,并孵育48小时(第2阶段培养基)。随后用新鲜的第2阶段培养基补充所述培养基,所述细胞进一步培养48小时。

[0215] 之后用表1所示的第3阶段培养基替换所述培养基,所述细胞培养16-18天,每48小时1:1(v/v)换液一次。这通常涉及通过离心(在300g,10min的条件)收集培养基和悬浮细胞,并将悬浮细胞返回到新鲜培养基(即一个T150培养瓶使用20ml)中培养。

[0216] 根据所使用的hiPSC细胞系(收获前通过流式细胞术分别确认),在约第16-18天从所得的单层细胞中分离CD34+细胞,用于继续培养。在这里,在实验中通常包括指定为ChiPSC31(宝日医"Takara")、NIH2(野生型"WT":来自龙沙"Lonza"的MR1.1的亚克隆)和NIH2:c3F3和c1A12的亚克隆的hiPSC细胞系。CD34+细胞通过使用Accutase细胞消化液(SCT:在37℃下培养30分钟)和胶原酶II(Collagenase II)(英杰"Invitrogen":2mg/ml)在37℃下连续孵育30分钟获得。在通过磁激活磁珠(MACS)分离CD34+细胞之前,收集并洗涤细胞悬浮液(×2次离心,在DMEM/F12中以300g离心12分钟)(美天旎"Miltenyi":根据生产商的说明书)。

[0217] 在MACS分离CD34+细胞后,这些细胞随后在CS10(SCT)中以2×10^{5}个细胞/瓶冷冻保存,首先在-80℃慢速冷冻,之后在液氮中长期保存。

[0218] 为了持续的淋巴细胞增殖和分化,使用了干细胞技术专有2阶段(Stem Cell Technologies proprietary 2stage)(淋巴细胞增殖/T细胞成熟(Lymphoid Proliferation/T cell Maturation))培养基(根据制造商的说明书)。

[0219] ADP-A2M4慢病毒的产生

[0220] 在转染前一天,HEK293T(ATCC)细胞以每台Stacker堆板器40000个细胞的速度接种。第二天,按照要求将试剂和293T培养基预热(无血清和无抗生素RPMI(生命技术公司"Life Technologies")至37℃,Turbofect转染试剂(英赛特生物技术"Insight Biotechnology")和质粒(来自金斯瑞"GenScript"的gag/pol、REV、VSV-G)至室温,移除所述Stacker堆板器的培养基,并用新鲜RPMI替换。在新鲜的猎鹰(falcon)管中,按照以下顺

序制备转染混合物:无血清和无抗生素RPMI培养基;包装质粒;根据生产规模确定所需浓度的慢病毒载体质粒。最后,将Turbofect转染试剂小心地添加到所述培养基表面,在添加到培养瓶中之前,通过轻轻反转5次混合所述猎鹰管。培养瓶在37℃下孵育48小时。

[0221] 孵育48小时后,移除HEK293T培养上清液,以1400rpm离心6分钟,使细胞碎片成团,并通过0.45uM孔径过滤器(pore size filters,PES)过滤所述上清液一次。通过在4℃以10000g离心16小时进行病毒浓缩,无需紧急刹车(no brakes)。浓缩病毒后,小心地从所述病毒颗粒中去除上清液,并将所述病毒颗粒重新悬浮在所需量的SFEM-II培养基中。单用SFEM-II是贯穿第4-6阶段分化进程的最佳培养基,可减少细胞污染物的生长。将ADP-A2M4病毒快速冷冻并储存在-80℃冰箱中。

[0222] 用ADP-A2M4 TCR转导T细胞祖细胞

[0223] 经修饰以防止RAG表达(称为RAG-/-或完全敲除(null))的iPSC(CGT3细胞系)如所述被培养以产生CD34+细胞。

[0224] 在MACS分离后,CD34+细胞在干细胞技术淋巴增殖培养基(Stem Cell Technologies Lymphoid Proliferation media)中被培养2周以产生表达CD7和CD5(而不是CD3、CD4或CD8)的T细胞祖细胞,表明了在TCR重排通常于未经编辑的细胞系中发生之前的未成熟细胞类型。注意慢病毒转导可以在CD34+分离阶段或iPS未分化细胞阶段(例如中胚层细胞、HE(HEC)、HPC、祖细胞)进行,且已显示每种阶段都能成功进行。

[0225] 将淋巴祖细胞培养基中1/32稀释的病毒颗粒(通过上述生物滴度实验测定)以终体积500μl加入到在24孔板(表面积1.9cm^2)中培养的所述细胞中。

[0226] 还以1mg/ml的浓度添加泊洛沙姆(Poloxamer)(F108)(西格玛"Sigma")以提高转导效率。48小时后,进行完全培养基更换,并酌情将祖细胞扩增到更多/更大的孔中。转导后1周,使用表2中的抗体通过流式细胞术(BD公司福特萨品牌"BD Fortessa")对所述细胞进行表型分析,以检查成熟T细胞标志物的表达。

[0227] 结果

[0228] ADP-A2M4慢病毒在原代外周血白细胞(primary peripheral blood leukocytes,PBL)和第5阶段iPSC衍生T细胞(NIH2)上进行滴定。数据显示了随着ADP-A2M4慢病毒稀释度的增加,PBL中TCR表达的预期滴定(图2A和2B)。重要的是,数据表明,随着iPSC衍生T细胞的转导,Vα24+表达的增加与CD3+表达的增加相关,表明LV转导促进CD3的表面表达(图2C和1D)。

[0229] iPS细胞系CGT3使用本文所述的T细胞分化方案进行分化,在淋巴祖细胞培养基中培养2周后,用ADP-A2M4 TCR转导细胞。在未转导的野生型细胞系中,少数细胞成功地通过选择阶段转化为CD3+,而这一细胞数量被发现可通过所述ADP-A2M4 TCR的表达被显著改善(图3A)。在RAG完全缺失的遗传背景下,不可发生内源性TCR基因重排,所述CD3+的表达可以忽略不计,因为需要与TCR形成复合物才能运输到所述细胞表面(图3B)。这种CD3阴性表型显示通过慢病毒转导所述ADP-A2M4 TCR可得以挽救(图3B)。

[0230] CD7/5+阶段的T细胞祖细胞使用ADP-A2M4 TCR进行转导,并定期进行细胞计数。细胞数量表明,在外源性表达TCR以拯救所述RAG完全缺失表型后,T细胞祖细胞的增殖和存活率更高(图4)。

[0231]

试剂	终浓度
StemPro34 PLUS	1 L（需要 2 瓶）
VEGF	15 ng/mL
SCF	100 ng/mL
TPO	30 ng/mL
Flt3L	25 ng/mL
IL-3	25 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
IL-7	10 ng/mL
IL-11	5 ng/mL
IGF-1	25 ng/mL
BMP-4	10 ng/mL
bFGF	5 ng/mL
SHH	25 ng/mL
EPO	2 U/mL
血管紧张素 II	10 μg/mL
氯沙坦	100 μM

[0232] 表1

[0233]

抗体	体积/检测(μl)
TCRαβ (IP26) PE（百进“BioLegend”: 306708）	2.5 μl

[0234]

TCRγδ (B1) APC（百进“BioLegend”: 331212）	5 μl
CD5 (UCHT2) BV421 (BD: 562646)	5 μl
CD7 (CD7-6B7) PerCP Cy5.5（百进“BioLegend”: 343116）	5 μl
CD45 (HI30) BUV395 (BD: 563792)	5 μl
CD4 (OKT4) BV786（百进“BioLegend”: 317442）	5 μl
CD3 (SK7) AF488（百进“BioLegend”: 344810）	5 μl
CD8α (RPA-T8) PE-Cy7 (BD: 557746)	5 μl
CD56 (NCAM16.2) BV605 (BD: 562780)	5 μl
Ef506 BV510（英杰“Invitrogen”: 65-0866-14）	1/100 稀释

[0235] 表2:用于确定T细胞表型的抗体。

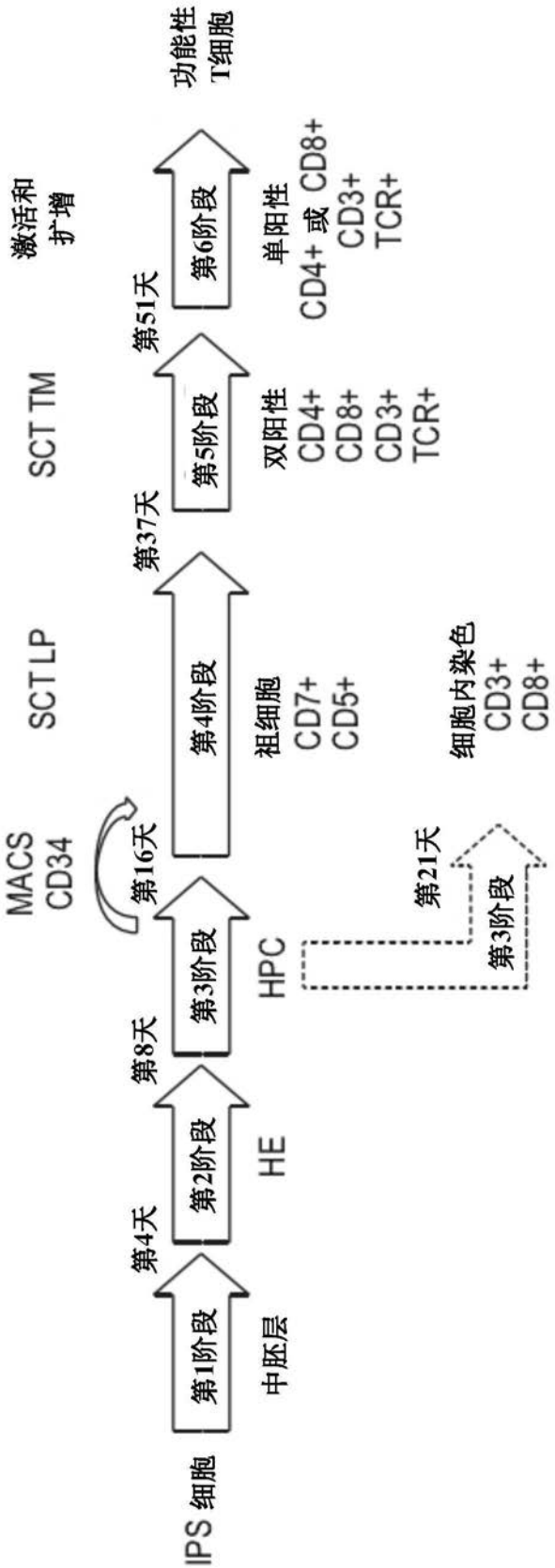

IPS 细胞
中胚层
第1阶段
第4天
HE
第2阶段
第8天
HPC
第3阶段
MACS
CD34
第16天
SCT LP
祖细胞
CD7+
CD5+
第4阶段
第37天
SCT TM
双阳性
CD4+
CD8+
CD3+
TCR+
第5阶段
第51天
激活和
扩增
单阳性
CD4+ 或 CD8+
CD3+
TCR+
第6阶段
功能性
T细胞
第21天
细胞内染色
CD3+
CD8+
第3阶段

图1

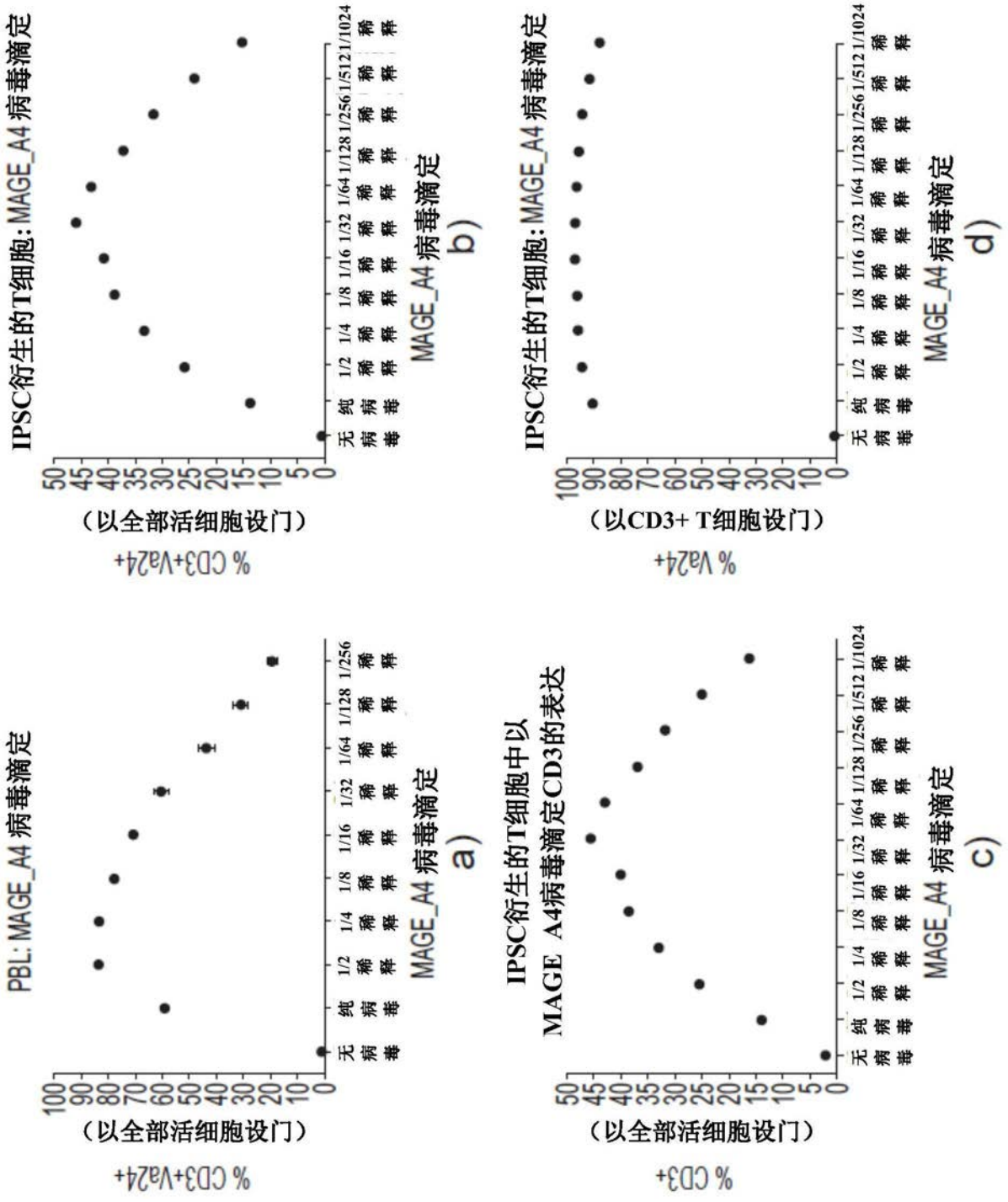

IPSC衍生的T细胞:MAGE_A4 病毒滴定
（以全部活细胞设门）
% CD3+Va24+
无病毒 纯病毒 1/2 稀释 1/4 稀释 1/8 稀释 1/16 稀释 1/32 稀释 1/64 稀释 1/128 稀释 1/256 稀释 1/512 稀释 1/1024 稀释
MAGE_A4 病毒滴定
b)
IPSC衍生的T细胞:MAGE_A4 病毒滴定
（以CD3+ T细胞设门）
% Va24+
无病毒 纯病毒 1/2 稀释 1/4 稀释 1/8 稀释 1/16 稀释 1/32 稀释 1/64 稀释 1/128 稀释 1/256 稀释 1/512 稀释 1/1024 稀释
MAGE_A4 病毒滴定
d)
PBL: MAGE_A4 病毒滴定
（以全部活细胞设门）
% CD3+Va24+
无病毒 纯病毒 1/2 稀释 1/4 稀释 1/8 稀释 1/16 稀释 1/32 稀释 1/64 稀释 1/128 稀释 1/256 稀释
MAGE_A4 病毒滴定
a)
IPSC衍生的T细胞中以
MAGE A4病毒滴定CD3的表达
（以全部活细胞设门）
% CD3+
无病毒 纯病毒 1/2 稀释 1/4 稀释 1/8 稀释 1/16 稀释 1/32 稀释 1/64 稀释 1/128 稀释 1/256 稀释 1/512 稀释 1/1024 稀释
MAGE_A4 病毒滴定
c)

图2

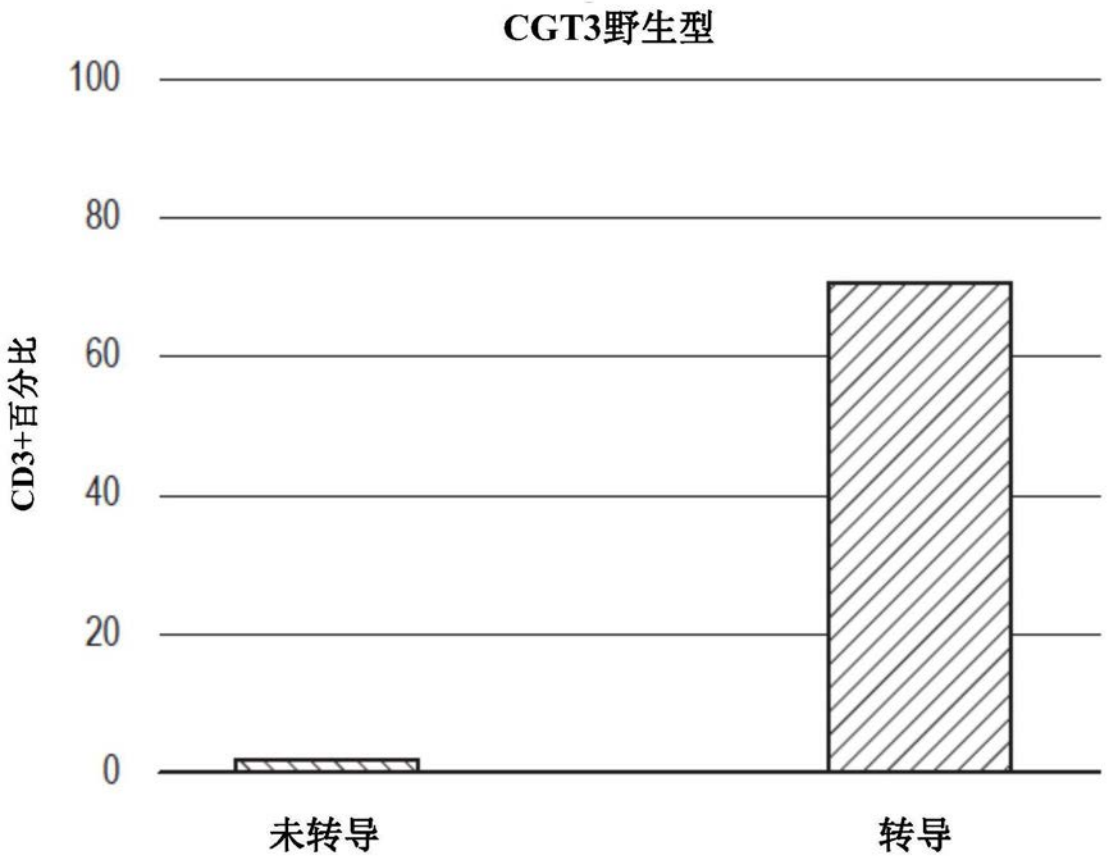


图3A

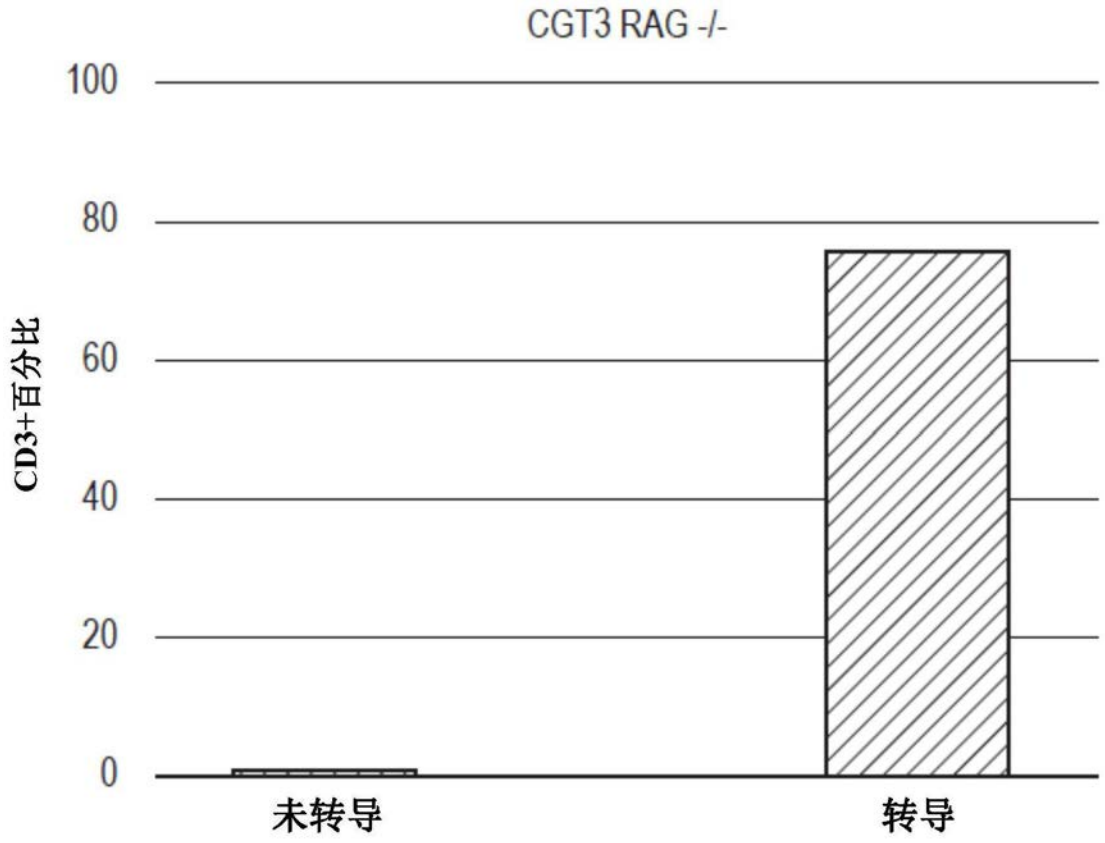

CGT3 RAG -/-
100
80
60
40
20
0
CD3+百分比
未转导
转导

图3B

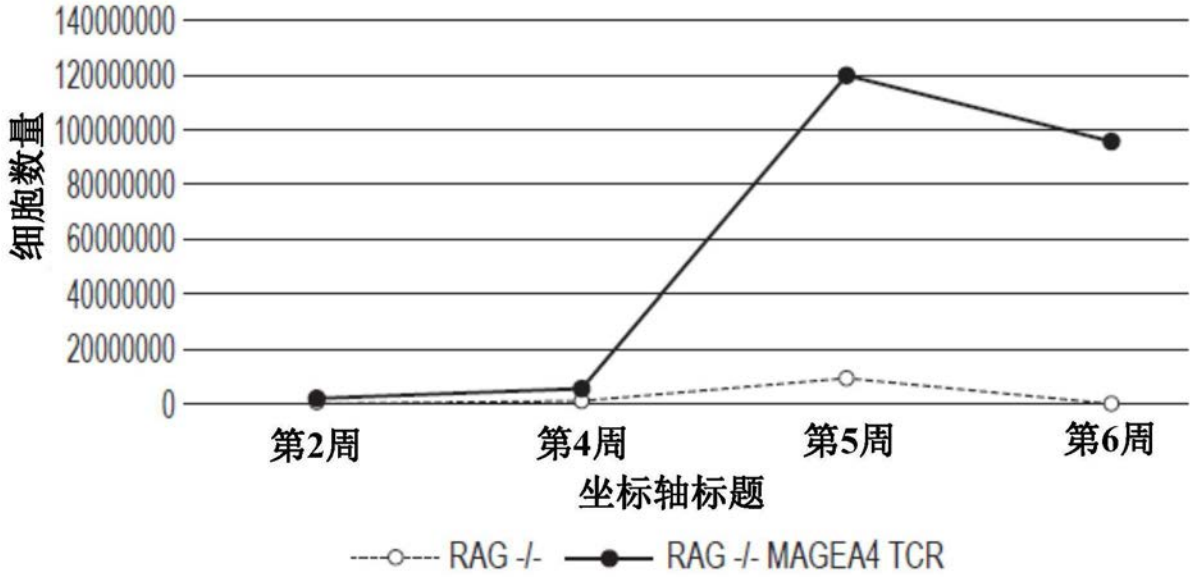

14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
细胞数量
第2周
第4周
第5周
第6周
坐标轴标题
RAG -/-
RAG -/- MAGEA4 TCR

图4