



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110914409 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880047659.9

(22)申请日 2018.06.13

(30)优先权数据

62/519,123 2017.06.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/037286 2018.06.13

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/231951 EN 2018.12.20

(71)申请人 菲特治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·A·帕龙 R·S·塔科

B·瓦拉梅尔 D·舒梅克

M·霍斯金 L·格雷塔兹

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 姚远

(51)Int.Cl.

C12N 5/078(2006.01)

A61K 35/15(2006.01)

权利要求书4页 说明书34页 附图11页

(54)发明名称

用于诱导骨髓抑制细胞的组合物和方法以及其用途

(57)摘要

提供了用于制造诱导性免疫调节细胞的组合物和方法,所述诱导性免疫调节细胞包括诱导性骨髓抑制细胞,所述诱导性骨髓抑制细胞包含MDSC(髓源性抑制细胞)、树突状细胞、巨噬细胞和其亚群。还提供了用于进一步修饰和调制所述诱导性免疫调节细胞以在治疗自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤、实体瘤、病毒感染、神经退行性疾病、炎性病状或GvHD时获得增强的治疗潜能的方法和组合物。

1. 一种生成诱导性免疫调节细胞群的体外方法,其包括:
 - (i) 获得诱导性定形造血内皮细胞 (iHE);
 - (ii) 用包括ROCK抑制剂和MCSF的培养基组合物引导iHE的分化;从而生成包括诱导性骨髓抑制细胞的诱导性免疫调节细胞群,并且其中所述细胞群具有增强的治疗潜能。
2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括以下特征中的一个或多个:
 - a) 其中所述培养基组合物进一步包括 (1) 选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGFβ、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF和FLT3L组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子;以及任选地, (2) AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种;
 - b) 其中所述培养基组合物无饲养层和/或无血清;
 - c) 其中诱导性骨髓抑制细胞群包括 (1) 诱导性髓源性抑制细胞 (iMDSC); (2) 诱导性树突状细胞;和/或 (3) 诱导性巨噬细胞;
 - d) 其中所述诱导性免疫调节细胞群包括以下的一个或多个亚群: (i) CD45⁺细胞; (ii) CD45⁺CD33⁺细胞; (iii) 单核细胞MDSC (M-MDSC); (iv) CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞; (v) CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞; (vi) 粒细胞MDSC (G-MDSC); (vii) CD45⁺CD14⁻CD15⁺CD11b⁺细胞; (viii) CD45⁺CD206⁺细胞;以及 (ix) CD45⁺CD11c⁺CD14⁻HLADR^{high}细胞;
 - e) 其中所述诱导性免疫调节细胞群包括以下中的至少一种:
 - (1) 超过90%的iMDSC,其中所述iMDSC包括单核细胞MDSC;和/或
 - (2) 超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的单核细胞MDSC和/或CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞;其中所述单核细胞MDSC包括CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞;和/或
 - (3) 超过20%、30%、40%或50%的粒细胞MDSC,其中所述粒细胞MDSC包括CD45⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁺细胞;和/或
 - (4) 超过20%、30%、40%或50%的巨噬细胞;其中所述巨噬细胞包括CD45⁺CD206⁺细胞;和/或
 - (5) 超过20%、30%、40%或50%的树突状细胞;其中所述树突状细胞包括CD45⁺CD11c⁺CD14⁻HLADR^{high}细胞;
 - f) 其中包括iMDSC的所述诱导性免疫调节细胞群基本上不含粒细胞、红细胞和/或淋巴样细胞;
 - g) 其中包括在所述诱导性免疫调节细胞群中的所述诱导性骨髓抑制细胞包括由对所述诱导性骨髓抑制细胞进行基因工程化获得的一个或多个遗传印记;
 - h) 其中包括在所述诱导性免疫调节细胞群中的所述诱导性骨髓抑制细胞包括从包括相同的一个或多个遗传印记的iHE中保留的一个或多个遗传印记;
 - i) 其中所述iHE细胞衍生自诱导性多能干细胞 (iPSC)、iPSC衍生的中胚层细胞或iPSC衍生的具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞;并且任选地,所述iPSC包括其衍生细胞能够保留的一个或多个遗传印记;
 - j) 其中所述ROCK抑制剂是噻唑维或Y27632;以及
 - k) 其中所述增强的治疗潜能包括以下中的一种或多种: (1) 所述诱导性免疫调节细胞群中诱导性MDSC的数量或比率增加; (2) 抑制T细胞增殖和效应子功能的效力提高;以及 (3) 与包括在PBMC (外周血单核细胞) 中的骨髓抑制细胞相比能够减弱GvHD。

3. 根据权利要求2所述的方法,所述方法进一步包括以下特征中的一个或多个:

a) 其中所述AhR拮抗剂包括StemRegenin1 (SR1);

b) 其中iPSC的所述一个或多个遗传印记通过包括以下的方法获得:(i) 获得具有供体特异性、疾病特异性或治疗反应特异性的源特异性免疫细胞,其中所述免疫细胞呈现出能保留的治疗属性;以及(ii) 将所述源特异性免疫细胞重编程为iPSC;或通过包括在将非多能细胞重编程为iPSC期间或之后进行基因组编辑的方法获得,其中所述遗传印记包括通过所述iPSC的基因组中的基因组插入、缺失或取代引入的一种或多种遗传修饰模式;

c) 其中所述方法进一步包括通过所述诱导性骨髓抑制细胞的基因组中的基因组插入、缺失或取代来对步骤(ii)的所述诱导性骨髓抑制细胞进行基因组编辑,以向所述细胞引入一种或多种遗传修饰模式;或

d) 其中所述方法进一步包括通过接触一种或多种调制剂来调制步骤(ii)的所述诱导性骨髓抑制细胞,以增强所述细胞的治疗潜能。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述遗传修饰模式包括:

a) 以下中的一种或多种:安全开关蛋白、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药理学活性蛋白和肽、药物靶标候选物;或促进所述诱导性骨髓抑制细胞或其所述亚群中的一个或多个亚群的植入、运输、归巢、生存力、自我更新、持久性、免疫应答调节和调制和/或存活的蛋白质;

b) 嵌合受体、归巢受体、抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体、生长因子、改变的促炎性细胞因子受体、CAR或用于与双特异性或多特异性或通用接合剂偶联的表面触发受体的引入的或增加的表达;并且任选地,其中所述引入的或增加的表达由通过炎症信号传导调节的启动子驱动;和/或

c) 共刺激基因的减少的或沉默的表达。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述方法具有以下特征中的一个或多个:

a) 所述遗传修饰模式包括以下中的一种或多种:(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、RFXANK、CITTA、RFX5、RFXAP或在染色体6p21区域中的任何HLA基因的缺失或表达降低;(ii) 引入或增加ID01、PDL1、CTLA4、Arg1、IL35、IL10、HO-1、CrmB、Y136、HGFL、GMCSF、TGF β 、HLA-E、HLA-G、CAR或双特异性或多特异性接合剂的表面触发受体的表达;

b) 所述嵌合受体包括(i) 细胞外域,所述细胞外域包括抗原特异性结合序列、免疫球蛋白或促炎性细胞因子受体;以及(ii) 用于抗炎信号传导的细胞内域,所述细胞内域包括IL10R、IL35R和AhR中的至少一个;

c) 所述归巢受体或粘附分子包括CXCR4、CCR2、CCR5、CCR6、CXCR3、CCR7、CD62L和VLA4中的至少一种;

d) 所述启动子(i) 由包括TLR或IFN γ R信号传导的所述炎症信号传导驱动;(ii) 是诱导型启动子;和/或(iii) 仅在所述iMDSC归巢之后被触发;

e) 所述改变的促炎性细胞因子受体(i) 隔离包括IL2R、IL6R和IFN γ R中的一种或多种的促炎性细胞因子;(ii) 是膜结合的;或(iii) 呈可溶形式;以及

f) 所述双特异性或多特异性接合剂对肿瘤细胞的表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中所述源特异性免疫细胞的所述治疗属性包括以下

中的一种或多种：(i) 抗原靶向受体表达；(ii) HLA呈递或其缺乏；(iii) 对肿瘤微环境具有抗性；(iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调制；(iv) 改善中靶特异性，降低肿瘤外效应；(v) 对如化学疗法的治疗具有抗性；以及(vi) 改善归巢、持久性和细胞毒性。

7. 根据权利要求2所述的方法，其中从诱导性多能干细胞(iPSC)衍生iHE细胞进一步包括将iPSC分化为中胚层细胞；将iPSC衍生的中胚层细胞分化为具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞；以及将iPSC衍生的具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞分化为iHE。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中将iPSC衍生的具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞分化为iHE包括：使所述具有定形HE潜能的中胚层细胞与包括bFGF和ROCK抑制剂的组合物接触以获得定形HE细胞；

其中将iPSC衍生的中胚层细胞分化为具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞包括：使所述iPSC衍生的中胚层细胞与包括BMP活化剂、GSK3抑制剂和bFGF的组合物接触以获得所述具有定形HE潜能的中胚层细胞；

其中将iPSC分化为中胚层细胞包括使所述iPSC与包括BMP活化剂和任选的bFGF的组合物接触以获得iPSC衍生的中胚层细胞；并且任选地，

其中所述iPSC在包括ROCK抑制剂、GSK3抑制剂和MEK抑制剂的组合物中被接种并且扩增，并且其中所述组合物不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

9. 根据权利要求8所述的方法，其中iPSC的分化(i) 缺乏生成胚状体的步骤；(ii) 在单层培养下；(iii) 在无饲养层条件下；和/或(iv) 在无基质条件下。

10. 根据权利要求2所述的方法，其进一步包括以下中的一种或多种：(1) 分离所述诱导性骨髓抑制细胞或其一种或多种亚型；(2) 分离所述iMDSC、单核细胞MDSC或其亚群；(3) 分离诱导性调节性树突状细胞；以及(4) 分离所述诱导性巨噬细胞。

11. 一种诱导性免疫调节细胞群，其包括使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得的诱导性骨髓抑制细胞。

12. 一种诱导性骨髓抑制细胞群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

13. 一种经过遗传修饰的诱导性骨髓抑制细胞群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

14. 一种经过调制的诱导性骨髓抑制细胞群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

15. 一种诱导性免疫调节细胞群，其包括使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得的iMDSC。

16. 一种iMDSC群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

17. 一种经过遗传修饰的iMDSC群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

18. 一种单核细胞MDSC群或其亚群，其使用根据权利要求1至10所述的方法中的任何一种方法获得。

19. 一种组合物，其包括根据权利要求11至18中任一项所述的细胞群或其亚群。

20. 一种治疗组合物，其包括根据权利要求11至18中任一项所述的细胞群或其亚群以

及药学上可接受的载剂。

21. 一种根据权利要求20所述的治疗组合物的治疗用途,其通过将所述组合物引入适于过继细胞疗法的受试者体内,其中所述受试者患有自身免疫性病症;血液恶性肿瘤;实体瘤;癌症;感染;神经退行性疾病;或炎性病状或者疾病。

22. 一种治疗需要细胞疗法的受试者的方法,其包括:

向所述有需要的受试者施用治疗上足够数量的根据权利要求11至18中任一项所述的细胞或其群或亚群。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述受试者:

(i) 是骨髓或干细胞移植候选人,或所述受试者已经接受化学疗法或照射疗法;

(ii) 已经接受骨髓消融性或非清髓性化学疗法或放射疗法;

(iii) 患有过度增殖性病症或造血系统癌症;

(iv) 患有实体瘤;

(v) 患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病;

(vi) 患有炎性病状;

(vii) 患有神经退行性疾病;或

(vii) 患有GvHD,

其中施用的包括诱导性骨髓抑制细胞或其亚群的细胞抑制体内的T细胞增殖和/或效应子功能。

24. 一种根据权利要求1至10中任一项所述制造用于治疗用途的细胞的方法。

用于诱导骨髓抑制细胞的组合物和方法以及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年6月13日提交的美国临时申请序列号62/519,123的优先权,所述美国临时申请的公开内容通过全文引用的方式结合在此。

技术领域

[0003] 本公开广泛地涉及过继免疫细胞疗法领域。更具体地,本发明涉及经过改善的培养平台,所述经过改善的培养平台用于由包含人诱导性多能干细胞的多能干细胞制造适于过继细胞疗法的骨髓谱系的衍生调节性免疫细胞。

背景技术

[0004] 过继免疫疗法涉及向患有肿瘤、癌症、免疫病症或感染的患者施用免疫细胞,由此所施用的免疫细胞为患者提供治疗益处。一般而言,适于免疫疗法的免疫细胞包括但不限于B细胞、T细胞、自然杀伤(NK)细胞、NKT(自然杀伤T)细胞和造血干细胞或祖细胞。另外,免疫调节细胞(如髓源性抑制细胞(MDSC)、巨噬细胞和树突状细胞)是NK细胞、B细胞和T细胞的强效免疫调节剂并且在细胞疗法中特别关注调节免疫应答。这些基于细胞的免疫疗法的中心目标是在患者中介导完全且持久的疾病反应。

[0005] MDSC是自然杀伤细胞、B细胞和T细胞的强效免疫调节剂。T细胞效应子功能的抑制通过多种机制发生,所述多种机制包括但不限于:PD-L1/PD1介导的无反应性、精氨酸酶1介导的L-精氨酸的耗竭、自由基物种的诱导型一氧化氮合酶和NADPH氧化酶的产生、半胱氨酸的吡啶胺2,3-双加氧酶螯合以及T调节细胞的扩增。通过MDSC在促进实体瘤的免疫抑制微环境中的关键作用强调了MDSC的免疫调节效力。这些特性表明,MDSC可以作为有效的细胞疗法来恢复免疫耐受,从而治疗包含移植物抗宿主病(GvHD)在内的免疫病症。在包含GvHD、炎症性肠病、1型糖尿病、系统性红斑狼疮和多发性硬化症在内的若干种鼠类疾病模型中,外源递送的MDSC被示出为减弱了免疫相关发病机制。然而,开发用于治疗免疫病症的患者来源的MDSC面临若干项挑战,包含MDSC的短缺和异质性、较差的可扩展性、高制造成本以及用于增强治疗属性的基因工程的有限选择。

[0006] 除其它免疫调节细胞外,利用hiPSC和衍生细胞(包含MDSC)用于治疗目的的主要障碍一直是需要在定义不确定的含血清培养基存在的情况下先将此类细胞与鼠源性或人源性基质细胞共培养以维持多能性并诱导分化。另外,现有方案还采用了由培养iPSC以形成胚状体(EB)组成的策略,所述胚状体是包括各种分化细胞(包含外胚层、中胚层和内胚层细胞)的异质细胞聚集体。这些程序需要例如通过旋转形成团块使多能细胞聚集、允许细胞在孔中沉淀和聚集、或者允许在悬浮培养时被动聚集并形成团块。在分化诱导培养系统中将形成的EB维持一定的持续时间(通常为七到十天),以允许适当的分化,然后将EB转移到粘附培养以进一步成熟或者解离成单细胞以进行细胞类型选择,以便继续进行随后的分化步骤。(Kennedy等人,《细胞报告(Cell Reports)》2012:1722-1735;Knorr等人,《干细胞转化医学(Stem Cells Translational Medicine)》2013(2):274-283)。例如,Kennedy等人教

导了生成用于iPSC分化的EB,其中用胶原酶和胰蛋白酶处理多能细胞以允许刮除细胞从而形成小的聚集体,然后对所述小的聚集体进行培养以形成EB。已经示出了EB形成促进了多能干细胞分化,然而形成聚集体和随后的EB的要求是劳动密集型的,在此过程中细胞数量的增加最少,三维EB聚集体中的细胞含量不一致且不均匀地暴露于培养基因素,这产生了处于可变化阶段的异质衍生细胞并且极大地阻碍了要求高效、一致且流线型的制造工艺的可扩展性和可重复性。

[0007] 另外,由于进入患者体内的细胞的最终状态,或者具体地说细胞亚型,在很大程度上可以通过制造工艺来定义,因此所述工艺的重要性无论怎样强调都不过分。优先地,维持或扩增具有期望的分化状态和/或适应性免疫细胞特征的细胞亚群会极为有益于增强基于细胞的疗法的功效。经过改善的细胞制造工艺具有多种潜在优势,包含缩短给药时间、提高细胞均匀性或增加达到期望剂量的患者百分比。另外,在制造工艺期间对细胞的功能改善,如归巢、增加的持久性和降低的毒性也可以使细胞疗法得到改善。因此,可以在数量和质量上均增强期望的免疫细胞亚群的制造方法可以显著地增强其治疗功效。

[0008] 本领域非常需要具有经过改善的治疗功效的免疫细胞亚群,并且需要分化干细胞以制造期望的免疫细胞而不依赖于共培养或含血清培养基并且无需形成胚状体聚集体作为中间体的方法和组合物。本发明的方法和组合物解决了这些需求并在免疫细胞治疗领域并且具体地说在免疫调节细胞方面提供了其它相关优势。

发明内容

[0009] 在健康患者的外周血中MDSC(髓源性抑制细胞)缺失或极为罕见。虽然在某些条件下,可以通过早期骨髓祖细胞的分化过程由PBMC(外周血单核细胞)或CD34细胞生成有限数量的MDSC,但是这些方法并未产生足够数量的MDSC用于过继细胞疗法。本申请提供了一种产生临床上相关数量的MDSC的方法。具体地,本申请提供了用于制造诱导性免疫调节细胞的组合物和方法,所述诱导性免疫调节细胞包括诱导性骨髓抑制细胞,所述诱导性骨髓抑制细胞包含但不限于诱导性MDSC(iMDSC)和其亚群、诱导性树突状细胞以及诱导性巨噬细胞。还提供了用于进一步修饰和调制所述诱导性免疫调节细胞以在治疗如自身免疫性疾病、血液恶性肿瘤、实体瘤、病毒感染、神经退行性疾病、炎性病状和疾病或GvHD等病状时获得增强的治疗潜能的方法和组合物。

[0010] 本发明的一方面提供了一种生成具有增强的治疗潜能的诱导性免疫调节细胞群的方法,并且所述方法通常包括:获得诱导性定形造血内皮细胞(iHE);以及用包括ROCK抑制剂和MCSF以及任选的GMCSF的培养基组合物引导iHE的分化,从而生成包括诱导性骨髓抑制细胞的免疫调节细胞群。在一些实施例中,所述诱导性骨髓抑制细胞包括诱导性髓源性抑制细胞(iMDSC)、诱导性巨噬细胞和/或诱导性树突状细胞。在一些实施例中,所述iMDSC进一步包括不同的亚型,所述不同的亚型包括单核细胞MDSC、粒细胞MDSC和/或早期MDSC。

[0011] 在所述方法的一个实施例中,所述培养基组合物进一步包括(1)选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGFβ、bFGF、VEGF、SCF和FLT3L组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子;以及任选地,AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种。在一个实施例中,如本文所公开的用于生成iMDSC群的培养基组合物包括ROCK抑制剂、MCSF、IL3、VEGF、bFGF、SCF和FLT3L。在一些实施例中,包括ROCK抑制剂、MCSF、IL3、VEGF、bFGF、SCF和FLT3L的所述

培养基进一步包括IL1b、IL6、IL10和TGFB中的一种或多种。在一些实施例中,所述培养基组合不具有IL6。在一些实施例中,所述培养基组合不需要TPO。在一些实施例中,所述培养基组合进一步包括饲养细胞或饲养细胞组分。在一些实施例中,所述饲养细胞是OP9。在一些实施例中,所述饲养细胞是K562。在一些实施例中,所述饲养细胞过表达一种或多种支持衍生细胞的分化、扩增和/或功能性的细胞因子、配体或受体。在所述方法的一个实施例中,所述培养基组合无饲养层和/或无血清。

[0012] 在所述方法的一个实施例中,所述诱导性免疫调节细胞群包括诱导性髓源性抑制细胞(iMDSC)、诱导性树突状细胞或诱导性巨噬细胞。在所述方法的另一个实施例中,所述诱导性免疫调节细胞群包括以下中的一种或多种:(i) CD45⁺细胞;(ii) CD45⁺CD33⁺细胞;(iii) 单核细胞MDSC(M-MDSC);(iv) CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞;(v) CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞;(vi) 粒细胞MDSC(G-MDSC);(vii) CD45⁺CD14⁻CD15⁺CD11b⁺细胞;(viii) CD45⁺CD206⁺细胞;以及(ix) CD45⁺CD11c⁺CD14⁻HLADR^{high}细胞。在所述方法的再一个实施例中,所述诱导性免疫调节细胞群包括以下中的一种或多种:(1) 超过90%的iMDSC;(2) 超过20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的单核细胞MDSC和/或CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞;其中所述单核细胞MDSC包括CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞;(3) 超过20%、30%、40%或50%的粒细胞MDSC,其中所述粒细胞MDSC包括CD45⁺CD11b⁺CD14⁻CD15⁺细胞;(4) 超过20%、30%、40%或50%的巨噬细胞;其中所述巨噬细胞包括CD45⁺CD206⁺细胞;以及(5) 超过20%、30%、40%或50%的树突状细胞;其中所述树突状细胞包括CD45⁺CD11c⁺CD14⁻HLADR^{high}细胞。在所述方法的一些实施例中,获得的包括iMDSC的诱导性免疫调节细胞群基本上不含粒细胞、红细胞和/或淋巴样细胞。在一些实施例中,包括在所述诱导性免疫调节细胞群中的所述iMDSC包括依据对所述iMDSC进行基因工程化获得的一个或多个遗传印记。在一个实施例中,包括在所述诱导性免疫调节细胞群中的所述iMDSC包括从包括相同的一个或多个遗传印记的iHE中保留的一个或多个遗传印记。

[0013] 在所述方法的一个实施例中,所述培养基组合中的所述ROCK抑制剂是噻唑维(thiazovivin)或Y27632。在所述方法的一个实施例中,所述AhR拮抗剂包括StemRegenin1(SR1)。

[0014] 在一些实施例中,使用所述方法获得的细胞或细胞群具有增强的治疗潜能,所述增强的治疗潜能包括以下中的一种或多种:(1) 所述诱导性免疫调节细胞群中iMDSC或其亚群(M-MDSC和/或G-MDSC)的数量或比率增加;(2) 抑制T细胞增殖和效应子功能的效力提高;以及(3) 与包括在如PBMC(外周血单核细胞)等自然环境中的MDSC相比能够减弱GvHD。在一些实施例中,本申请的获得的iMDSC包括的单核细胞MDSC或表达PDL1的MDSC的数量或比率显著高于包括在如PBMC等自然环境中的MDSC或从PBMC分离的原代CD34细胞所分化的MDSC。

[0015] 在所述方法的一个实施例中,所述iHE细胞衍生自诱导性多能干细胞(iPSC)、iPSC衍生的中胚层细胞或iPSC衍生的具定形造血内皮潜能的中胚层细胞;并且任选地,所述iPSC包括其衍生细胞中可保留的一个或多个遗传印记。在一些实施例中,iPSC的所述一个或多个遗传印记通过包括以下的方法获得:(i) 获得具有供体特异性、疾病特异性或治疗反应特异性的源特异性免疫细胞,其中所述免疫细胞呈现出可保留的治疗属性;以及(ii) 将所述源特异性免疫细胞重编程为iPSC;或通过包括在将非多能细胞重编程为iPSC期间或之后进行基因组编辑的方法获得,其中所述遗传印记包括通过所述iPSC的基因组中的基因组插入、缺失或取代引入的一种或多种遗传修饰模式。

[0016] 在一些实施例中,所述源特异性免疫细胞的所述治疗属性包括以下中的一种或多种:(i) 抗原靶向受体表达;(ii) HLA呈递或其缺乏;(iii) 对肿瘤微环境具有抗性;(iv) 诱导旁观者免疫细胞和免疫调制;(iv) 改善中靶特异性,降低肿瘤外效应;(v) 对如化学疗法的治疗具有抗性;以及(vi) 改善归巢、持久性和细胞毒性。

[0017] 在一些实施例中,所述iPSC中的所述遗传修饰模式包括以下中的一种或多种:安全开关蛋白、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白和肽、药物靶标候选物;或促进所述诱导性骨髓抑制细胞的植入、运输、归巢、生存力、自我更新、持久性、免疫应答调节和调制和/或存活的蛋白质;嵌合受体、归巢受体、抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体、生长因子、改变的促炎性细胞因子受体、CAR或用于与双特异性或多特异性或通用接合剂偶联的表面触发受体的引入的或增加的表达;并且任选地,其中所述引入的或增加的表达由通过炎症信号传导调节的启动子驱动;和/或共刺激基因的减少的或沉默的表达。

[0018] 在一些实施例中,所述嵌合受体包括(i) 细胞外域,所述细胞外域包括抗原特异性结合序列、免疫球蛋白或促炎性细胞因子受体;以及(ii) 用于抗炎信号传导的细胞内域,所述细胞内域包括IL10R、IL35R和AhR中的至少一个。在一些实施例中,所述遗传修饰模式包括以下中的一种或多种:(i) B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、RFXANK、CITTA、RFX5、RFXAP或在染色体6p21区域中的任何HLA基因的缺失或表达降低;(ii) 引入或增加ID01、PDL1、CTLA4、Arg1、IL35、IL10、HO-1、CrmB、Y136、HGFL、GMCSF、TGF β 、HLA-E、HLA-G、CAR或双特异性或多特异性接合剂的表面触发受体的表达。在一些实施例中,所述归巢受体或粘附分子包括CXCR4、CCR2、CCR5、CCR6、CXCR3、CCR7、CD62L和VLA4中的至少一种。在又其它一些实施例中,所述启动子由包括TLR或IFN γ R信号传导的所述炎症信号传导驱动;是诱导型启动子;和/或仅在所述iMDSC归巢之后被触发。在一个实施例中,所述改变的促炎性细胞因子受体(i) 隔离包括IL2R、IL6R和IFN γ R中的一种或多种的促炎性细胞因子;并且(ii) 是膜结合的或呈可溶形式。在一些实施例中,所述双特异性或多特异性接合剂对肿瘤细胞的表面上的一种或多种肿瘤特异性抗原具有特异性。

[0019] 可替代地,在所述方法的一些实施例中,所述方法进一步包括通过所述细胞的基因组的基因组插入、缺失或取代来对获得的骨髓抑制细胞(包含iMDSC)进行基因组编辑,以向所述骨髓抑制细胞引入一种或多种上述遗传修饰模式。在一些实施例中,经过修饰的诱导性骨髓抑制细胞包括诱导性髓源性抑制细胞(iMDSC)、诱导性巨噬细胞和/或诱导性树突状细胞。在一些实施例中,经过修饰的iMDSC进一步包括不同的亚型,所述不同的亚型包括单核细胞MDSC、粒细胞MDSC和/或早期MDSC。

[0020] 在所述方法的一些实施例中,所述方法进一步包括通过使所述细胞与一种或多种调制剂接触来调制获得的具有或不具有遗传修饰的骨髓抑制细胞,以增强所述细胞的治疗潜能,所述治疗潜能包含细胞扩增、增殖、持续性、归巢;和/或T细胞扩增和功能抑制。在一些实施例中,经过调制的诱导性骨髓抑制细胞包括诱导性髓源性抑制细胞(iMDSC)、诱导性巨噬细胞和/或诱导性树突状细胞。在一些实施例中,经过调制的iMDSC进一步包括不同的亚型,所述不同的亚型包括单核细胞MDSC、粒细胞MDSC和/或早期MDSC。

[0021] 在所述方法的一些实施例中,所述方法进一步包括从诱导性多能干细胞(iPSC)衍生iHE细胞,所述步骤进一步包括将iPSC分化为中胚层细胞;将衍生的中胚层细胞分化为具

有定形造血内皮潜能的中胚层细胞,所述具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞然后被分化为造血内皮(iHE)。

[0022] 在一个实施例中,将iPSC衍生的具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞分化为iHE包括:使所述具有定形HE潜能的中胚层细胞与包括bFGF和ROCK抑制剂的组合物接触以获得定形HE细胞。

[0023] 在一个实施例中,将iPSC衍生的中胚层细胞分化为具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞包括:使所述iPSC衍生的中胚层细胞与包括BMP活化剂、GSK3抑制剂和bFGF的组合物接触以获得所述具有定形HE潜能的中胚层细胞。

[0024] 在另一个实施例中,将iPSC分化为中胚层细胞包括使所述iPSC与包括BMP活化剂和任选的bFGF的组合物接触以获得iPSC衍生的中胚层细胞。

[0025] 在所述方法的一些实施例中,所述方法进一步包括使所述iPSC在包括ROCK抑制剂、GSK3抑制剂和MEK抑制剂的组合物中接种并且扩增,并且所述组合物不含TGF β 受体/ALK抑制剂。

[0026] 在一些实施例中,iPSC的分化缺乏生成胚状体的步骤;在单层培养下;在无饲养层条件下;和/或在无基质条件下。

[0027] 所述方法的任何上述实施例可以进一步包括分离所述骨髓抑制细胞或其一种或多种细胞类型。在一些实施例中,分离的诱导性骨髓抑制细胞包括诱导性髓源性抑制细胞(iMDSC)、诱导性巨噬细胞和/或诱导性树突状细胞。在一些实施例中,所述iMDSC进一步包括不同的亚型,所述不同的亚型包括单核细胞MDSC、粒细胞MDSC和/或早期MDSC。在一个实施例中,所述分离的诱导性骨髓抑制细胞包括表达PDL1的MDSC。

[0028] 所述方法的任何上述实施例可以进一步包括分离所述iMDSC或其亚群,包含单核细胞MDSC。在一些实施例中,分离的iMDSC进一步包括不同的亚型,所述不同的亚型包括单核细胞MDSC、粒细胞MDSC和/或早期MDSC。在一些实施例中,分离的iMDSC亚群包括分离的单核细胞MDSC、分离的粒细胞MDSC和/或分离的早期MDSC。

[0029] 根据上文所展示的方法的各个实施例,本发明还提供了一种诱导性免疫调节细胞群,所述诱导性免疫调节细胞群包括使用所述方法获得的骨髓抑制细胞。还提供了iMDSC群。根据一些实施例,进一步提供了表达PDL1的iMDSC。

[0030] 本发明的另一方面提供了一种经过遗传修饰的骨髓抑制细胞群、经过遗传修饰的iMDSC群、经过遗传修饰的iMDSC亚群。在一些实施例中,上述群中的所述经过遗传修饰的iMDSC表达或过表达PDL1。

[0031] 本发明的另外方面提供了一种经过调制的骨髓抑制细胞群或经过调制的iMDSC群或包括M-MDSC、G-MDSC或E-MDSC的经过调制的iMDSC亚群。本文还提供了一种组合物,所述组合物包括此类细胞或其群或亚群。

[0032] 本发明的又一方面提供了一种治疗组合物,所述治疗组合物包括如本文所描述的细胞或其群或亚群以及药学上可接受的载剂。

[0033] 本发明的一方面提供了一种上述治疗组合物的治疗用途,所述治疗用途通过将所述组合物引入适于过继细胞疗法的受试者体内,其中所述受试者患有自身免疫性疾病;血液恶性肿瘤;实体瘤;癌症;感染;神经退行性疾病;或炎性病状或者疾病。因此,本发明提供了一种治疗需要细胞疗法的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用治疗

上足够数量的如本文所提供的细胞或其群或亚群。在一些实施例中,所述受试者可以是骨髓或干细胞移植候选人,或所述受试者已经接受化学疗法或照射疗法;或已经接受骨髓消融性或非清髓性化学疗法或放射疗法;或患有过度增殖性病症或造血系统癌症;或患有实体瘤;或患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病;或患有炎性病状;或患有GvHD。通过施用如本文所提供的包括诱导性骨髓抑制细胞、iMDSC或亚群的细胞,在体内抑制了T细胞增殖和/或效应子功能,并且因此减轻了疾病或病状。

[0034] 本发明的另一方面提供了一种制造用于治疗用途的细胞的方法,所述方法使用如所提供的组合物和方法用于生成如本文所公开的包括诱导性骨髓抑制细胞或iMDSC或M-MDSC或其任何亚群的iPSC衍生的细胞群。

[0035] 依据以下结合附图作出的描述,这种用途的各种目的和优势将变得显而易见,在附图中,通过图示和实例的方式阐述了本发明的某些实施例。

附图说明

[0036] 图1A-F示出了用于由诱导性多能干细胞(iPSC)和CD34⁺造血内皮(iHE, iCD34)生成衍生的MDSC的多阶段过程。图1A:亲本人诱导性多能干细胞通过约10天的多阶段单层培养过程分化为CD34⁺造血内皮。通过FACS分离第10天iCD34细胞并且在髓样促进条件下进行培养,从而在平板接种后第3天开始从内皮层出现CD45⁺细胞并且在第9天获取CD33。图1B:多阶段过程产生了带有骨髓标志物的细胞高度富集的群,所述群具有纯度超过95%的CD45⁺CD33⁺细胞,并且基本上不含粒细胞、红细胞和淋巴样细胞。图1C:LEGENDScreen™的免疫表型分型表明,第19天的CD45⁺CD33⁺细胞主要表达早期骨髓标志物。图1D:第19天的MDSC中细胞亚群的比例,所述细胞亚群包含表达免疫调节表面蛋白(包含PDL1)的细胞亚群。图1E:这个过程实现了1个iPSC产生1,000多个CD45⁺CD33⁺细胞。图1F:将骨髓分化延长到iCD34细胞接种后15天增加了CD45⁺CD33⁺CD14⁺iMDSC的百分比。

[0037] 图2A-C示出了iMDSC的体外T细胞抑制测定。对iMDSC共培养后独立供体的T细胞扩增进行量化并且揭示了T细胞扩增与HLA匹配无关的显著且可滴定的减少。图2A:与第10+9天的iMDSC共培养后来自5个独立供体的T细胞的归一化扩增;图2B:与第10+15天的iMDSC共培养后来自3个独立供体的T细胞的归一化扩增。图2C:观察到与D10+9iMDSC相比,D10+15iMDSC的T细胞数量更显著地减少。所有数据均呈现为平均值+/-SEM。****p<0.0001、***p<0.001、**p<0.01并且*p<0.05。

[0038] 图3A-B示出了iMDSC的体外细胞因子释放测定。图3A:iMDSC减弱了CD4⁺和CD8⁺T细胞产生IFN γ 、TNF、IL2和表达CD107a的能力。图3B:与iMDSC共培养的T细胞产生多种效应子功能(三种或四种功能)的能力较弱并且大多限于一种或两种功能。所有数据均呈现为平均值+/-SEM。***p<0.001、**p<0.01并且*p<0.05。

[0039] 图4A-C示出了使用异种急性GvHD模型的iMDSC体内功能测定。图4A:如通过GvHD得分测量的,iMDSC减弱了疾病的严重程度。图4B:iMDSC延长了存活期。使用疾病末期(体重损失>25%)作为终止标准生成卡普兰-迈耶(Kaplan-Meier)存活曲线。图4C:iMDSC导致人类CD45⁺扩增在第14天显著减少,其中外周血中Treg(CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo})增加。数据呈现为平均值+/-SEM。

具体实施方式

[0040] 本发明提供了从非多能细胞衍生免疫调节细胞以获得具有用于过继免疫疗法的期望治疗潜能的诱导性调节细胞群或亚群的组合物和方法。本发明进一步提供了包括具有期望治疗潜能的骨髓谱系的衍生的调节细胞的组合物。本发明还提供了使用衍生的免疫调节细胞的方法,所述免疫调节细胞包含具有用于治疗疾病和病状的期望治疗潜能的骨髓抑制细胞。通常,本文中具有期望治疗潜能的衍生的免疫调节细胞展现出以下中的至少一种:调节细胞亚型的数量或比率增加;和/或细胞扩增、生存力、持久性、归巢和/或炎性活化细胞抑制得到改善。本发明还提供了通过遗传修饰和小分子调制来优化衍生的免疫调节细胞治疗潜能的方法。

[0041] A. 定义

[0042] 除非本文另外定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的含义。进一步地,除非上下文另外要求,否则单数术语应当包含复数含义,并且复数术语应当包含单数含义。

[0043] 应当理解,本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等并且因此可以变化。本文所使用的术语仅出于描述特定实施例的目的并且不旨在限制本发明的范围,本发明的范围仅由权利要求书限定。

[0044] 如本文所用,冠词“一个/种(a/an)”和“所述(the)”是指冠词的一个/种或多于一个/种语法宾语。举例来说,T细胞意指一个/种T细胞或多于一个/种T细胞。

[0045] 如本文所用,术语“分离的”等是指已经与其原始环境分开的细胞或细胞群,即分离的细胞的环境基本上不含如在“未分离的”参考细胞所存在的环境中发现的至少一种组分。所述术语包含当在其自然环境(例如组织、活检)中发现时从一些或所有组分中移除的细胞。所述术语还包含当细胞在非天然存在的环境(例如培养物、细胞悬浮液)中发现时从至少一种、一些或所有组分中移除的细胞。因此,分离的细胞当在自然界中发现或在非天然存在的环境中生长、储存或生存时与至少一种组分(包含其它物质、细胞或细胞群)部分地或完全地分开。分离的细胞的具体实例包含部分纯的细胞、基本上纯的细胞和在非天然存在的培养基中培养的细胞。分离的细胞可以依据将期望细胞或其群与环境中的其它物质或细胞分离或者依据从环境中移除一个或多个其它细胞群或亚群而获得。

[0046] 如本文所用,术语“纯化”等是指提高纯度。例如,可以将纯度提高到至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%。

[0047] 如本文所用,术语“免疫调节细胞”是指与调节功能相关的各种白细胞集,所述调节功能包含但不限于自我和非自我判别、适应性免疫应答的启动和调制、自我耐受性的维持以及T细胞功能抑制。各种免疫调节细胞包含但不限于骨髓抑制细胞、间充质基质细胞(MSC)、T细胞(例如,Treg、T_{FH}、T_{FR}、 γ δ T细胞)和B细胞(例如,Breg)的不同子集以及调节性先天免疫细胞(例如,ILC2)。

[0048] 如本文所用,术语“骨髓抑制细胞”是指骨髓谱系的调节性免疫细胞,所述调节性免疫细胞包含但不限于髓源性抑制细胞(MDSC)、树突状细胞(DC)和巨噬细胞(Mreg)。它们不同于其它骨髓细胞类型,在所述其它骨髓细胞类型中,它们具有免疫抑制活性而不是免疫刺激特性。

[0049] 如本文所用,术语“髓源性抑制细胞”或“MDSC”是指具有免疫调节功能的未成熟骨

髓细胞的异质组,其通过常见骨髓标志物CD11b(或CD33)的表达和HLADR的缺失/低水平进行表征。作为免疫调节细胞,MDSC具有免疫抑制活性而不是免疫刺激特性。在稳态条件下,MDSC前体主要存在于骨髓中。在健康个体中,在骨髓中形成的MDSC前体分化为树突状细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞。然而,在不同病理条件下,如恶性肿瘤、感染、炎症、移植的器官和自身免疫性疾病,骨髓分化偏向于MDSC的扩增,并且可以在血液、外周淋巴组织、脾脏、癌组织和包含不同移植器官在内的炎症部位中检测到MDSC。这些MDSC渗透到炎症部位和肿瘤中,此时MDSC通过抑制T细胞和NK细胞来停止免疫应答。MDSC还与包含树突状细胞和巨噬细胞在内的其它免疫调节细胞类型相互作用,以调节其功能和免疫应答。如本文所公开的,衍生自iPSC或iCD34的诱导性MDSC包括以下亚型中的一种或多种:(i) CD45⁺细胞;(ii) CD45⁺CD33⁺细胞;(iii) 单核细胞MDSC(M-MDSC);(iv) CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞;(v) 粒细胞MDSC(G-MDSC);以及(vi) CD45⁺CD14⁻CD15⁺CD11b⁺。

[0050] 如本文所用,术语“单核细胞MDSC”或“M-MDSC”是指以例如CD45⁺、CD33⁺、CD14⁺为特征的细胞。单核细胞MDSC可以进一步包括CD11b⁺、CD66⁻(或CD15⁻)和HLADR^{low}中的一种或多种。

[0051] 如本文所用,术语“粒细胞MDSC”或“G-MDSC”是指以例如CD11b⁺、CD14⁻、CD15⁺、CD33^{dim}为特征的细胞。

[0052] 如本文所用,术语“树突状细胞”是指包括CD45⁺、CD11c⁺、CD14⁻和HLADR^{high}的细胞。

[0053] 如本文所用,术语“巨噬细胞”是指包括CD45⁺和CD206⁺的细胞。在一些亚群中,巨噬细胞还表达CD11b、CD86、CD163和CD68中的一种或多种。与产生促炎性细胞因子IL12的免疫刺激性巨噬细胞相比,调节性巨噬细胞产生高水平的抗炎细胞因子,如IL10。在重度促炎条件下,调节性巨噬细胞可以再极化成刺激性巨噬细胞。

[0054] 如本文所用,术语“群”在参考免疫细胞使用时是指一组一种或多种免疫细胞类型或其亚型,包含但不限于巨噬细胞、树突状细胞、髓源性抑制细胞(MDSC)、单核细胞、巨核细胞、嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞、T细胞、B细胞、NK细胞和NKT细胞。以MDSC为例,分离的或富集的MDSC群可以包含仅一种MDSC亚型或者可以包含两种或更多种MDSC亚型的混合物。分离的MDSC群可以是一种MDSC亚型的同质群或是两种或更多种MDSC亚型的异质群。分离的MDSC群还可以是具有MDSC和除MDSC以外的至少一种细胞类型的异质群,例如,B细胞、T细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等。异质群可以具有0.01%到约100%的MDSC。因此,分离的MDSC群可以具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%的MDSC。分离的MDSC群可以包含一种或多种或所有不同的MDSC亚型,包含但不限于单核细胞MDSC、粒细胞MDSC、早期MDSC(eMDSC;其通过例如CD33⁺、Lin⁻、HLADR⁻进行表征)。在包含多于一种MDSC亚型的分离的MDSC群中,每种MDSC亚型的相对比率的范围可以为0.01%到99.99%。分离的群还可以是MDSC的克隆群,其中所述群的所有MDSC均为单个MDSC的克隆。在一些实施例中,

[0055] 如本文所提供的,分离的免疫细胞群可以从自然来源(如人外周血或脐带血)获得或从体外环境(从iPSC分化的免疫调节细胞或诱导性定型造血内皮细胞)获得。本领域中已经开发了从组织或细胞混合物中解离细胞以将各种细胞类型分开的各种方式。在一些情况下,这些操作产生了相对同质的细胞群。例如,可以通过如本文所述的分选或选择过程或通过本领域中已知的其它方法来分离诱导性MDSC、诱导性巨噬细胞或诱导性树突状细胞或其

任何亚群。分离的群中iMDSC的比例可以比自然来源中MDSC的比例高至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约85%、约90%或约95%。分离的iMDSC群通常可以是用于iMDSC,或iMDSC的一种或多种特定亚型,如M-MDSC、G-MDSC。

[0056] 如本文所用,术语“亚群”在参考MDSC使用时是指包含MDSC的一种或多种亚型但少于在自然界中发现的所有亚型的MDSC群。例如,MDSC至少包括单核细胞亚型、粒细胞亚型、早期MDSC亚型,所述亚型中的每种亚型基于表面标志物和/或功能可以进一步划分为更多亚型。

[0057] 如本文所用,术语“多能”是指细胞能够形成身体或细胞体(即胚体)的所有谱系。例如,胚胎干细胞是能够由三个胚层即外胚层、中胚层和内胚层中的每一个形成细胞的多能干细胞类型。多能性是连续的发育效力,其范围为不能产生完整生物体的不完全或部分多能细胞(例如上胚层干细胞或EpiSC)到能够产生完整生物体的更原始、更多能细胞(例如胚胎干细胞)。

[0058] 如本文所用,术语“诱导性多能干细胞”或“iPSC”是指由分化的成体细胞产生的干细胞,所述分化的成体细胞已经被诱导或改变(即重编程)成能够分化成以下所有三个胚层或真皮层的组织的细胞:中胚层、内胚层和外胚层。

[0059] 如本文所用,术语“胚胎干细胞”是指胚胎囊胚的内部细胞团块的天然存在的多能干细胞。胚胎干细胞是多能的并且在发育期间产生以下三个主要胚层的所有衍生物:外胚层、内胚层和中胚层。它们不促成胚外膜或胎盘并且不是全能的。

[0060] 如本文所用,术语“祖细胞”是指具有更大发育潜能的细胞,即相对于其可以通过分化产生的细胞更原始的细胞表型(例如,处于发育途径或进程的早期步骤)。祖细胞常常具有显著的或非常高的增殖潜能。祖细胞可以产生具有较低发育潜能的多种不同的细胞即分化细胞类型或者单一分化细胞类型,这取决于发育途径以及细胞发育和分化的环境。

[0061] 如本文所用,术语“重编程”或“去分化”或“增加细胞效力”或“增强发育效力”是指增加细胞的效力或使细胞去分化至较低分化状态的方法。例如,与处于非重编程状态的同一细胞相比,具有增加的细胞效力的细胞具有更多的发育可塑性(即,可以分化成更多细胞类型)。换句话说,经过重编程的细胞是处于比非重编程状态的同一细胞更低的分化状态的细胞。

[0062] 如本文所用,术语“分化”是非特化的(“不受约束的”)或较少特化的细胞获取特化的细胞(如例如血细胞或肌肉细胞)的特征的过程。分化的或分化诱导的细胞是在细胞谱系中占据了更特化的(“受约束的”)位置的细胞。当应用于分化过程时,术语“受约束的”是指细胞在分化途径中进行到某个点,此时在正常情形下细胞将继续分化成特异性细胞类型或细胞类型子集但无法在正常情形下分化成不同的细胞类型或还原到低分化细胞类型。

[0063] 如本文所用,术语“多能干细胞”是指具有发育潜能以分化成一个或多个胚层(外胚层、中胚层和内胚层)但不是所有三个胚层的细胞的细胞。因此,多能细胞也可以被称为“部分分化细胞”。多能细胞在本领域中是众所周知的,并且多能细胞的实例包含成体干细胞,如例如造血干细胞和神经干细胞。“多能”指示细胞可以形成给定谱系中的许多类型的细胞,但无法形成其它谱系的细胞。例如,多能造血细胞可以形成许多不同类型的血细胞(红血细胞、白血细胞、血小板等),但无法形成神经元。因此,术语“多能性”是指具有低于全能和多能的发育潜能程度的细胞状态。

[0064] 多能干细胞的分化需要改变培养系统,如改变培养基中的刺激剂或细胞的物理状态。最常规的策略利用了胚状体(EB)的形成作为常见且关键的中间体来启动谱系特异性分化。EB是已经被示出为模仿胚胎发育的三维簇,因为EB在其三维区域内产生了许多谱系。通过分化过程(通常数小时到数天),简单的EB(例如,聚集的多能干细胞引发分化)继续成熟并发育成囊性EB,此时(通常数天到数周),EB将被进一步加工以继续分化。EB形成是通过使多能干细胞在三维多层细胞簇中彼此紧密靠近而启动的,这通常是通过包含以下的若干种方法中的一种实现的:允许多能细胞以液滴沉积、将细胞沉积到“U”形底孔板中或通过机械搅拌。为了促进EB发育,多能干细胞聚集体需要另外的分化诱因,因为维持在多能培养维持培养基中的聚集体并未形成适合的EB。因此,多能干细胞聚集体需要转移到为选择的谱系提供引发诱因的分化培养基中。基于EB的多能干细胞的培养通常导致分化的细胞群(外胚层、中胚层和内胚层胚层)生成,其中EB细胞簇内有适度增殖。尽管已被证明促进了细胞分化,但是由于三维结构中的细胞不一致地暴露于来自环境的分化诱因,因此EB产生了处于可变化状态的异质细胞。另外,产生和维护EB非常费力。而且,通过EB进行的细胞分化伴随着适度的细胞扩增,这也导致了低分化效率。

[0065] 相比之下,不同于“EB形成”的“聚集体形成”可以用于诱导多能干细胞的分化和/或扩增多能干细胞衍生的细胞群。例如,在基于聚集体的多能干细胞扩增期间,选择培养基以维持增殖和多能性。细胞增殖通常会增加聚集体的大小从而形成较大的聚集体,这些聚集体可以常规地机械地或酶促地解离成较小的聚集体,以维持培养物中的细胞增殖并且增加细胞数量。与EB培养不同,在维持培养的聚集体中培养的细胞维持了多能性标志物。

[0066] 如本文所用,“单层分化”是指代不同于通过三维多层细胞簇即“EB形成”的分化方法的术语。除了本文所公开的其它优点外,单层分化还避免了分化启动需要EB形成。因为单层培养不模仿胚胎发育(如EB形成),所以与EB中的所有三个胚层分化相比,最低限度地向特定谱系分化。

[0067] 如本文所用,“解离”细胞是指已经从其它细胞或与表面(例如,培养板表面)基本上分开或纯化出来的细胞。例如,可以通过机械或酶促方法将细胞从动物或组织中解离。可替代地,在体外聚集的细胞可以彼此解离,如酶促地或机械地解离成簇、单细胞或单细胞和簇的混合物的悬浮液。在又一个替代性实施例中,粘附细胞从培养板或其它表面解离。因此,解离可以涉及破坏细胞与细胞外基质(ECM)和衬底(例如,培养表面)的相互作用或破坏细胞之间的ECM。

[0068] 如本文所用,术语“编码”是指如基因、cDNA或mRNA等多核苷酸中的特定核苷酸序列的固有特性,所述序列用于在生物过程中充当用于合成其它聚合物和大分子的模板,所述聚合物和大分子具有确定的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或确定的氨基酸序列和由此产生的生物学特性。因此,如果与基因相对应的mRNA的转录和翻译在细胞或其它生物系统中产生蛋白质,则所述基因对蛋白质进行编码。其核苷酸序列与mRNA序列完全相同并且通常设置在序列列表中的编码链和用作基因或cDNA的转录模板的非编码链均可以称为对所述基因或cDNA的蛋白质或其它产物进行编码。

[0069] 如本文所用,术语“外源”旨在意指将参考的分子或参考的活性引入宿主细胞中。分子可以通过例如将编码核酸引入宿主基因材料中来引入,如通过整合到宿主染色体中或作为如质粒等非染色体基因材料。因此,所述术语如其参考编码核酸的表达使用的那样是

指以可表达的形式将编码核酸引入细胞中。术语“内源”是指存在于宿主细胞中的参考的分子或参考的活性。类似地,当参考编码核酸的表达使用时,所述术语是指包含在细胞内并且未外源引入的编码核酸的表达。

[0070] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸序列由四个核苷酸碱基构成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);胸腺嘧啶(T);以及当多核苷酸为RNA时,胸腺嘧啶换为尿嘧啶(U)。多核苷酸可以包含基因或基因片段(例如,探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸还指代双链和单链分子。

[0071] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换地使用并且是指具有通过肽键共价连接的氨基酸残基的分子。多肽必须包含至少两个氨基酸,并且多肽的最大氨基酸数没有限制。如本文所用,所述术语指代短链和较长链两者,所述短链在本领域中一般也称为例如肽、寡肽和寡聚物,所述较长链在本领域中通常称为多肽或蛋白质。“多肽”包含例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽的变体、经过修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包含天然多肽、重组多肽、合成多肽或其组合。

[0072] 如本文所用,术语“离体”是指在生物体外发生的活动,如在生物体外的人工环境中在活组织中或上进行的实验或测量,优选具有最小的自然条件改变。“离体”程序可以涉及从生物体取得并且在实验室设备中通常在无菌条件下并且通常在几小时或长达约24小时但包含长达2到28天(视情况而定)内培养的活细胞或活组织。也可以收集和冷冻此类组织或细胞,并且随后将其解冻用于离体治疗。使用活细胞或活组织进行持续超过几天的组织培养实验或程序通常被认为是“在体外”,但在某些实施例中,此术语可以与离体可互换地使用。同时,“体内”活动发生在生物体例如小鼠中,其中此类活动可以包含细胞植入、细胞归巢、细胞自我更新和细胞扩增。

[0073] 如本文所用,术语“体外”是指在试管、培养皿或活生物体外部的其它地方进行或发生的活动。

[0074] 如本文所用,术语“接触”、“治疗”或“调制”当参考免疫细胞使用时在本文中可互换地使用以指代用本文所公开的药剂中的一种或多种药剂培养、培育或暴露免疫细胞。

[0075] 如本文所用,“非接触”或“未处理”细胞是指未经过处理,例如未经过与除控制剂或媒介以外的药剂培养、接触或培育的细胞。与控制剂(如DMSO)接触或与另一种媒介接触的细胞是非接触细胞的实例。

[0076] 如本文所用,“饲养细胞”或“饲养层”是描述与第二类型的细胞共培养以提供第二类型的细胞可以生长、扩增或分化的环境的一种类型的细胞的术语,如同饲养细胞提供了刺激、生长因子和营养物以用于支持第二细胞类型。饲养细胞任选地来自与其支持的细胞不同的物种。例如,某些类型的人类细胞(包含干细胞)可以通过小鼠胚胎成纤维细胞或永生小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养得到支持。在另一个实例中,外周血衍生的细胞或转化的白血病细胞支持自然杀伤细胞的扩增和成熟。当与其它细胞共培养时,饲养细胞通常可以通过照射或用抗有丝分裂剂(如丝裂霉素)进行处理来失活以防止其生长超过其所支持的细胞。饲养细胞可以包含内皮细胞、基质细胞(例如,上皮细胞或成纤维细胞)和白血病

细胞。在不限制前述内容的情况下,一种特定的饲养细胞类型可以是人类饲养细胞,如人类皮肤成纤维细胞。另一种饲养细胞类型可以是小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)。通常,各种饲养细胞可以部分地用于维持多能性、引导向某种谱系分化、增强增殖能力并促进成熟为特化的细胞类型,如效应细胞。

[0077] 如本文所用,“无饲养层”(FF)环境是指基本上不含饲养细胞或基质细胞和/或尚未通过培养饲养细胞进行预处理的环境,如培养条件、细胞培养或培养基。“经过预处理的”培养基是指在饲养细胞已经在培养基中培养一段时间(如至少一天)后收获的培养基。经过预处理的培养基含有许多介体物质,所述介体物质包含由在培养基中培养的饲养细胞分泌的生长因子和细胞因子。在一些实施例中,无饲养层环境既不含饲养细胞或基质细胞,也没有通过培养饲养细胞来进行预处理。

[0078] 如本文所用,术语“类似物”是指在结构和功能上类似于另一种化学物质的化学分子,在所述化学分子保留与亲本化学品相同的化学支架和功能的情况下,在结构上的不同之处在于一个单个元素或基团或多于一个基团(例如,2个、3个或4个基团)。此类修饰对于本领域技术人员而言是常规的并且包含例如另外的或取代的化学部分(如酸的酯或酰胺)、保护基团(如醇或硫醇的苄基和胺的叔丁氧基羰基)。还包含对烷基侧链的修饰(如烷基取代(例如,甲基、二甲基、乙基等)、卤素加成、对侧链的饱和或不饱和水平的修饰以及经过修饰的基团(如取代的苯基和苯氧基)的加成。类似物还可以包含缀合物(如生物素或亲和素部分)、酶(如辣根过氧化物酶等),并且包含放射性标记的、生物发光的、化学发光的或荧光的部分。而且,可以将这些部分添加到本文所述的药剂中以改变其药代动力学特性,如除了其它期望的特性之外,还增加体内或离体的半衰期或增加其细胞穿透特性。还包含前药,所述前药已知增强了药品的许多期望品质(例如,溶解度、生物利用度、制造等)。

[0079] 如本文所用,术语“增加”是指与由媒剂或对照分子/组合物引起的应答相比,药剂能够在细胞中产生或引起更大的生理应答(即下游效应),例如通过分离的T细胞群增加白介素2或TNF的产生。增加可以是由于通过某些细胞信号传导途径增加信号传导而产生的基因表达的增加。“增加的”量通常是统计上显著的量并且可以包含与媒剂(药剂不存在)或对照组合物所产生的应答相比增加1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含介于之间并且超过1的所有整数和小数点,如1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0080] 如本文所用,术语“减少”是指与由媒剂或对照分子/组合物引起的应答相比,药剂能够在细胞中产生或引起更小的生理应答(即下游效应)。减少可以是基因表达的减少、细胞信号传导的减少或细胞增殖的减少。“减少的”量通常是统计上显著的量并且可以包含与媒剂(药剂不存在)或对照组合物所产生的应答相比减少1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍或更多倍(例如,500倍、1000倍)(包含介于之间并且超过1的所有整数和小数点,如1.5、1.6、1.7、1.8等)。

[0081] 如本文所用,术语“协同”或“协同的”是指用于增强效果的两个或更多个实体的组合,使得所述两个或更多个实体的共同工作产生的效果大于其单独的效果之和,相比之下,“拮抗”在组合中的两个或更多个实体抵消或中和彼此的效果时使用;并且相比之下,“加性”在组合中的两个或更多个实体产生的效果几乎等于其单独的效果之和时使用。

[0082] 如本文所用,术语“基本上不含”在用于描述组合物(如细胞群或培养基)时是指组

合物不含任何来源的指定物质,如95%、96%、97%、98%、99%不含指定物质,或通过常规手段无法检测到。类似的含义可以应用于术语“不存在”,其中是指组合物中不存在特定物质或组分。

[0083] 如本文所用,术语“约 (about/approximately)”是指与参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相比,变化幅度高达15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的范围可以是参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度的约±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%或±1%。

[0084] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物。受试者可以是人类或非人类哺乳动物,如狗、猫、牛、马、小鼠、大鼠、兔或其转基因物种。

[0085] 如本文所用,术语“治疗 (treat/treatment等)”在参考需要治疗处理的受试者使用时是指获得期望的药理学和/或生理学效果,包含但不限于实现疾病症状的改善或消除。就完全或部分地预防疾病或其症状而言,所述效果可以是预防性的;和/或就实现症状的改善或消除而言或就针对疾病和/或由所述疾病引起的副作用提供部分或完全治愈而言,所述效果可以是治疗性。术语“治疗”包含对哺乳动物,特别是人类的疾病的任何治疗并且包含:(a)防止疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;(b)抑制疾病或阻止其发展;(c)减轻疾病或使疾病消退或完全或者部分地消除疾病的症状;以及(d)使个体恢复到疾病前状态,如重建造血系统。

[0086] 如本文所用,“遗传修饰”是指包含以下的遗传改变:(1)从重排、突变、遗传印记和/或表观遗传修饰自然地衍生的那些;或(2)通过细胞的基因组中的插入、缺失或取代经由基因组工程获得的那些,无论其具有基因座特异性还是基因座非特异性。如本文所用,遗传修饰还包含具有供体特异性、疾病特异性或治疗反应特异性的源特异性免疫细胞的一种或多种可保留的治疗属性。

[0087] 如本文所用,术语“遗传印记”是指有助于源细胞中的优先治疗属性的遗传或表观遗传信息。在从特别地选择的供体、疾病或治疗环境中获得的源细胞方面,有助于优先治疗属性的遗传印记可以包含表现出可保留的表型即优先治疗属性的任何环境特异性遗传或表观遗传修饰,而不管潜在的分子事件是否被鉴别出来。供体特异性、疾病特异性或治疗反应特异性源细胞可以包括可保留在iPSC和衍生的造血谱系细胞中的遗传印记。这些遗传印记包含但不限于:单特异性TCR,例如来自病毒特异性T细胞或非变异自然杀伤T (iNKT) 细胞;可跟踪且期望的遗传多态性,例如针对对选定供体中的高亲和力CD16受体进行编码的点突变纯合的;以及预定HLA要求,即选择的表现出共同的单倍型的HLA匹配的供体细胞。如本文所用,优先治疗属性包含衍生的细胞的经过改善的植入、运输、归巢、生存力、自我更新、持久性、免疫应答调节和调制、存活以及细胞毒性。优先治疗属性还可以与以下有关:抗原靶向受体表达;HLA呈递或其缺乏;对肿瘤微环境的免疫抑制效果具有抗性;诱导旁观者免疫细胞和期望的免疫调制;改善中靶特异性,降低肿瘤外效应;以及对如化学疗法的治疗具有抗性。

[0088] 如本文所用,术语“安全开关蛋白”是指被设计成防止细胞疗法的潜在毒性或其它方面的不利影响的工程蛋白。在一些情况下,有条件地控制安全开关蛋白表达,以解决已经

将对安全开关蛋白进行编码的基因永久地并入其基因组中的移植的工程细胞的安全问题。这种有条件的调节可以是可变的并且可能包含通过小分子介导的翻译后活化和组织特异性和/或时间转录调节进行的控制。安全开关可以介导对凋亡的诱导、对蛋白合成或DNA复制的抑制、生长阻滞、转录和转录后遗传调节和/或抗体介导的耗竭。在一些情况下,安全开关蛋白由外源分子例如前药活化,所述外源分子在被活化时触发了治疗细胞的凋亡和/或细胞死亡。安全开关蛋白的实例包含但不限于自杀基因,如半胱天冬酶9(或半胱天冬酶3或7)、胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、B细胞CD20、经过修饰的EGFR和其任何组合。在这种策略中,在发生不良事件时施用的前药由自杀基因产物活化并且杀死转导的细胞。

[0089] 如本文所用,“治疗上足够的量”在其含义内包含无毒但足够和/或有效量的其所指代的用于提供期望的治疗效果的特定治疗和/或药物组合物。取决于如患者的总体健康状况、患者的年龄以及病状的阶段和严重程度等因素,精确的量将因受试者而有所不同。在特定实施例中,治疗上足够的量足以和/或有效地减轻、减少和/或改善与正在治疗的受试者的疾病或病状相关的至少一种症状。

[0090] B. 综述

[0091] 本发明总体上涉及将多能细胞分化为非多能细胞或部分分化细胞的多阶段过程,所述非多能细胞或部分分化细胞包含中胚层细胞、造血内皮细胞、造血干细胞或祖细胞、CD34⁺细胞、多能祖细胞(MPP)(能够分化为包含嗜中性粒细胞祖细胞在内的骨髓细胞)和髓源性抑制细胞(MDSC)。本发明还涉及在公开的方法中使用的组合物;和使用公开的方法生成的细胞群、细胞系或克隆细胞。

[0092] 本发明还提供了用于生成由人诱导性多能干细胞(iPSC)诱导或衍生的MDSC(iMDSC)的制造工艺。所述工艺与GMP兼容、无血清/饲养层并且高度地可扩展且高效。生成的iMDSC群是高度同质的,即基本上不含红细胞和淋巴样细胞;并且在包含与HLA匹配无关的抑制T细胞效应子功能以及减弱移植物抗宿主病(GvHD)方面具有高功能性。因此,本发明的iMDSC和细胞群可以充当可扩展的“现成的”免疫调节细胞源以用于治疗自身免疫性疾病和炎性疾病。

[0093] I. 用于生成多能干细胞衍生的免疫调节细胞的组合物和方法

[0094] 本发明的一方面提供了用于通过分化多能细胞或多能祖细胞来获得诱导性免疫调节细胞的培养平台,所述诱导性免疫调节细胞包含但不限于髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞、调节性B细胞、巨噬细胞、树突状细胞和间充质基质细胞。本发明的另一方面提供了用于产生多能细胞或多能祖细胞衍生的免疫调节细胞的方法,所述免疫调节细胞至少包括MDSC。在一个特定实施例中,本发明提供了用于通过分化多能细胞或多能祖细胞来获得诱导性MDSC的组合物和方法。如本文所用,多能细胞或多能祖细胞衍生的MDSC统称为iMDSC或诱导性MDSC。如本文所用,多能细胞包含但不限于多能干细胞、诱导性多能干细胞(iPSC)和多能祖细胞。在一些实施例中,多能干细胞是胚胎干细胞。在一些实施例中,多能祖细胞是造血内皮细胞。在一些实施例中,造血内皮细胞表达CD34(iCD34,也称为定形HE或iHE)。

[0095] 本发明的一方面提供了使用经过优化的多阶段过程来生成定形造血内皮(iHE)的方法,所述iHE然后可以用于分化和获得iMDSC。所述方法通常从第一阶段开始,在所述第一阶段中,对多能干细胞进行接种并且扩增。然后,将多能干细胞分化为中胚层细胞,所述中

胚层细胞在此阶段扩增。然后,将扩增的中胚层群分化为具有定形造血内皮潜能的中胚层群,然后从具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞中分化和扩增定形造血内皮。可替代地,本发明提供了生成定形造血内皮(iHE)的方法,所述方法包括从多能干细胞中分化和扩增中胚层细胞;然后从中胚层细胞中分化和扩增定形造血内皮(iHE)。在一些实施例中,多能干细胞是iPSC。在一些实施例中,iPSC是未处理的iPSC。本发明进一步提供了生成和扩增定形造血内皮(iHE)的方法,所述方法包括分化和扩增多能干细胞衍生的中胚层细胞以及获得具有定形iHE潜能的中胚层细胞,然后将所述中胚层细胞中胚层细胞分化为iHE。可替代地,本发明提供了生成和扩增定形造血内皮的方法,所述方法包括将多能干细胞衍生的中胚层细胞分化为iHE。本文公开的方法利用了在没有EB形成的情况下的经过优化的单层iCD34培养平台并且任选地不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。

[0096] 在一个实施例中,用于使用包含iPSC的多能干细胞获得iHE的培养平台包括接种培养基,所述接种培养基包括MEKi、GSKi和ROCKi。在一些实施例中,接种培养基不含或基本上不含TGFβ受体/ALK抑制剂。在一个实施例中,本发明的接种培养基中的小分子的组合在表1中示出为命运维持培养基(FMM)。培养基中存在的培养基的组分的量可以在表1所示的浓度范围内。在一个实施例中,用于获得定形造血内皮的iPSC是使用命运重编程培养基(FRM)生成的细胞系并且在FMM中进一步维持以建立和保持iPSC细胞系的基础或未处理状态,所述iPSC细胞系适于如本文所公开的阶段特异性分化。如此获得的基础或未处理iPSC适于冷冻保存。在本发明中,可以将保存的iPSC细胞系或克隆iPSC接种到FMM中以用于随后分化为定形造血内皮。

[0097] 表1:接种培养未处理的iPSC以获得CD34⁺造血内皮:

常规 hESC 培养基 (Conv.)	命运重编程培养基 (FRM)	命运维持培养基 (FMM)
DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM/F12
Knockout 血清替代品 (20%)	Knockout 血清替代品 (20%)	Knockout 血清替代品 (20%)
	N2	
	B27	
谷氨酰胺	谷氨酰胺	谷氨酰胺 (1x)
非必需氨基酸 (1x)	非必需氨基酸 (1x)	非必需氨基酸 (1x)
β-巯基乙醇 (100 μM)	β-巯基乙醇 (100 μM)	β-巯基乙醇 (100 μM)
bFGF (0.2-50 ng/mL)	bFGF (2-500 ng/mL)	bFGF (2-500 ng/mL)
	LIF (0.2-50 ng/mL)	LIF (0.2-50 ng/mL)
	噻唑维 (0.1-25 μM)	噻唑维 (0.1-25 μM)
	PD0325901 (0.005-2 μM)	PD0325901 (0.005-2 μM)
	CHIR99021 (0.02-5 μM)	CHIR99021 (0.02-5 μM)
	SB431542 (0.04-10 μM)	
与 MEF 饲养细胞组合	无饲养层, 与 Matrigel™或玻连蛋白组合	

[0098]

[0099] 本发明的一方面提供了用于从包含iPSC的多能干细胞中分化和扩增中胚层的培养基。在一些实施例中,iPSC是未处理的iPSC。在一个实施例中,培养基包括BMP活化剂和任选的bFGF以及CD34基础培养基,所述CD34基础培养基包括如表2所示的组合的小分子。在一些实施例中,培养基包括细胞外基质蛋白。在其它实施例中,本文的培养基包括浓度范围如表2所示的小分子、生长因子和/或细胞因子中的一种或多种。在一些实施例中,用Matrigel™取代玻连蛋白来完全定义培养基。

表 2: 用于从 iPSC 中获得中胚层的 iCD34-A 培养基	
[0100] 基础培养基	StemPro 34
	谷氨酰胺
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
BMP4 (0.05-15 ng/ml)	
无饲养层, 与 Matrigel™或玻连蛋白组合	

[0101] 在一个实施例中,用于从多能干细胞中分化和扩增中胚层的上述培养基进一步包括在0.2-50ng之间的bFGF。

[0102] 本发明的一方面提供了用于从包含iPSC的多能干细胞中获得具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞的培养基。在一些实施例中,iPSC是未处理的iPSC。在一个实施例中,培养基包括BMP活化剂、GSK3抑制剂和bFGF。在一个实施例中,包括GSK3抑制剂的培养基仅在中胚层细胞特化之后施用,以实现定形HE潜能。在一个实施例中,包括BMP活化剂、GSK3抑制剂和bFGF的培养基进一步包括CD34基础培养基,所述CD34基础培养基包括如表3所示的组合的小分子。在一个实施例中,上述培养基不含TGF β 受体/ALK抑制剂。在一些实施例中,培养基包括细胞外基质蛋白。在其它实施例中,本文的培养基包括浓度范围如表3所示的小分子、生长因子和/或细胞因子。在一些实施例中,用Matrigel™取代玻连蛋白来完全定义培养基。

表 3: 用于获得具有定形造血内皮潜能的中胚层细胞的 iCD34-B 培养基	
[0103] 基础培养基	StemPro 34
	谷氨酰胺
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
BMP4 (0.05-15 ng/ml)	
bFGF (0.2-50 ng/ml)	
CHIR99012 (0.04-10 μ M)	
无饲养层, 与 Matrigel™或玻连蛋白组合	

[0104] 本发明的一方面提供了用于从中胚层细胞中获得定形造血内皮 (iHE或iCD34⁺) 的培养基。在一个实施例中,培养基包括ROCK抑制剂以及选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的一种或多种生长因子和细胞因子。在一个实施例中,培养基包括VEGF、bFGF、SCF、IL6、IL11和ROCK抑制剂以及CD34基础培养基,所述CD34基础培养基包括如表4所示的组合的小分子。在一个实施例中,包括VEGF、bFGF、SCF、IL6、IL11和ROCK抑制剂的培养基不含IGF1和/或EPO。在其它实施例中,本文的培养基包括浓度范围如表4所示的小分子、生长因子和/或细胞因子。

表 4: 用于从具有造血内皮潜能的中胚层中获得定形造血内皮的 iCD34-C 培养基	
基础培养基	StemPro 34
	谷氨酰胺
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
[0105]	VEGF (0.2-50 ng/ml)
	bFGF (0.1-25 ng/ml)
	SCF (1-250 ng/ml)
	IL6 (0.2-50 ng/ml)
	IL11 (0.2-50 ng/ml)
	Y27632 (0.2-50 μ M)
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻连蛋白组合

[0106] 本发明的一方面提供了用于从 iHE (iCD34) 中获得包含髓源性抑制细胞 (MDSC) 的骨髓抑制细胞的培养平台。在一个实施例中, 培养平台包括 (i) 培养基, 所述培养基包括 ROCK 抑制剂和 MCSF 以及一种或多种生长因子和细胞因子, 所述一种或多种生长因子和细胞因子选自由 IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGF β 、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF 和 FLT3L 组成的组; 以及任选的 AhR (芳烃受体) 拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种, 其中所述培养基适于将定形造血内皮分化为 MDSC (iMDSC) (表5)。在一些实施例中, IL3 包含在用于 iMDSC 分化的培养基中。在一些实施例中, IL4 和 GMCSF 包含在培养基中以诱导树突状细胞。在其它一些实施例中, IL3、IL4 和 IL10 包含在培养基中以诱导巨噬细胞。在一些实施例中, ROCK 抑制剂是 噻唑维或 Y27632。在一些实施例中, ROCK 抑制剂是 Y27632。在一些实施例中, AhR 拮抗剂是 StemRegenin1 (SR1)。在其它一些实施例中, 前列腺素途径激动剂是 PGE2 或其衍生物和类似物。如本文所用, “类似物或衍生物” 包含但不限于化合物的盐、酯、醚、溶剂化物、水合物、立体异构体或前药。在其它实施例中, 本文的培养基包括浓度范围如表5所例证的小分子、生长因子和/或细胞因子。

表 5: 用于从 iCD34 中获得骨髓抑制细胞的 MDSC 培养基	
基础培养基	StemPro 34
	谷氨酰胺
	非必需氨基酸
	抗坏血酸 (1-250 ng/ml)
	MTG (10-2500 μ M)
[0107]	VEGF (0.2-50 ng/ml)
	bFGF (0.2-25 ng/ml)
	SCF (1-250 ng/ml)
	MCSF (1-250 ng/ml)
	GMCSF (2-500 ng/ml)
	IL3 (0.5-150 ng/ml)
	FLT3L (0.5-150 ng/ml)
	Y27632 (0.2-50 μ M) *, 当将前 HSC 分化为多能祖细胞时不包含在内
	StemRegenin1 (500-1000 nM)
	无饲养层, 与 Matrigel™或玻连蛋白组合

[0108] 在由定形HE产生包含iMDSC的骨髓抑制细胞的方法的一个实施例中,并且所述方法包括使定形HE与培养基接触,所述培养基包括:ROCK抑制剂和MCSF以及选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGF β 、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF和FLT3L组成的组的一种或多种生长因子和细胞因子;以及任选地,AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种。在一个实施例中,用于生成iMDSC群的培养基组合物包括ROCK抑制剂、MCSF、IL3、VEGF、bFGF、SCF和FLT3L。在一些实施例中,包括ROCK抑制剂、MCSF、IL3、VEGF、bFGF、SCF和FLT3L的所述培养基进一步包括IL1b、IL6、IL10和TGF β 中的一种或多种。在一些实施例中,所述培养基组合物不包含IL6。在一些实施例中,所述培养基组合物不需要TPO。在一些实施例中,所述培养基组合物进一步包括饲养细胞或饲养细胞组分。在一些实施例中,所述饲养细胞是OP9。在一些实施例中,所述饲养细胞是K562。在一些实施例中,所述饲养细胞过表达一种或多种支持衍生细胞的分化、扩增和/或功能性的细胞因子、配体或受体。在一个实施例中,所述定形HE是CD34阳性。在一个实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺细胞。在一个实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺细胞。在一些实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞。在又其它一些实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞。

[0109] 在由多能干细胞产生包含iMDSC的骨髓抑制细胞的方法的一个实施例中,并且所述方法包括(1)通过使多能干细胞与包括BMP活化剂和任选的bFGF的培养基接触来分化和扩增多能干细胞以获得中胚层群;(2)通过使中胚层群与包括BMP活化剂、Wnt途径活化剂和bFGF的培养基接触来分化和扩增中胚层群以获得具有定形HE潜能的中胚层细胞;(3)通过使具有定形HE潜能的中胚层细胞与培养基接触来分化和扩增具有定形HE潜能的中胚层细胞以获得定形HE细胞,所述培养基包括ROCK抑制剂以及选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组的生长因子和细胞因子中的一种或多种;以及(4)通过使定形HE与培养基接触来分化和扩增定形HE细胞以获得iMDSC,所述培养基包括:ROCK抑制剂和MCSF以及选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGF β 、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF和FLT3L组成的组的一种或多种细胞因子和细胞;以及任选地,AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种。在一

些实施例中,上述方法进一步包括在包括ROCK抑制剂、GSK3抑制剂和MEK抑制剂的培养基中接种和扩增多能干细胞。在一些实施例中,多能干细胞是iPSC。在一些实施例中,iPSC是未处理的iPSC。在一些实施例中,依据以上方法获得的iHE细胞表达CD34。在一些实施例中,上述方法进一步包括使用CD34、CD43、CD73和/或CXCR4对获得的iHE细胞进行分选。在一些实施例中,分选使用了CD34阳性和CD43阴性。在一些实施例中,分选使用了CD34阳性、CD43阴性和CD73阴性。在其它一些实施例中,分选使用了CD34阳性、CD43阴性、CD73阴性和CXCR4阴性。在一些实施例中,以上方法中的培养基不含或基本上不含TGF β 受体抑制剂。在一些实施例中,所述方法的BMP活化剂是BMP4。在一些实施例中,Wnt途径活化剂是GSK3抑制剂。在一些实施例中,仅在中胚层细胞特化之后使细胞与包含GSK3抑制剂的培养基接触,以实现定形HE潜能。在一些实施例中,AhR拮抗剂是StemRegenin1 (SR1)。在一些实施例中,前列腺素途径激动剂是PGE2或其衍生物和类似物。在一些实施例中,上述方法进一步包括使接种的iPSC和/或中胚层细胞经受在约2%与约10%之间的低氧张力。在一个实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺细胞。在一个实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺细胞。在一些实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞。在又其它一些实施例中,获得的iMDSC包括CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞。

[0110] 在所述方法的一个实施例中,所述方法实现了由从多能干细胞衍生的中胚层群产生包含iMDSC的骨髓抑制细胞,并且所述方法包括(1)通过使中胚层群与包括BMP活化剂、Wnt途径活化剂和bFGF的培养基接触来分化和扩增中胚层群以获得具有定形HE潜能的中胚层细胞;(2)通过使具有定形HE潜能的中胚层细胞与培养基接触来分化和扩增具有定形HE潜能的中胚层细胞以获得定形HE细胞,所述培养基包括ROCK抑制剂以及选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组的生长因子和细胞因子中的一种或多种;以及(3)通过使定形HE与培养基接触来分化和扩增定形HE细胞以获得iMDSC,所述培养基包括:ROCK抑制剂和MCSF以及选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGF β 、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF和FLT3L组成的一种或多种细胞因子和细胞;以及任选地,AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种。在一个实施例中,用于生成iMDSC群的培养基组合包括ROCK抑制剂、MCSF、IL3、VEGF、bFGF、SCF和FLT3L。在一些实施例中,所述培养基进一步包括IL1b、IL6、IL10和TGF β 中的一种或多种。在一些实施例中,所述培养基组合不具有IL6。在一些实施例中,所述培养基组合不需要TPO。在一些实施例中,所述培养基组合进一步包括饲养细胞或饲养细胞组分。在一些实施例中,所述饲养细胞是OP9。在一些实施例中,所述饲养细胞是K562。在一些实施例中,所述饲养细胞过表达一种或多种支持衍生细胞的分化、扩增和/或功能性的细胞因子、配体或受体。

[0111] 在所述方法的另一个实施例中,所述方法实现了由具有定形HE潜能的中胚层细胞产生包含iMDSC的骨髓抑制细胞,并且所述方法包括(1)通过使中胚层群与包括BMP活化剂、Wnt途径活化剂和bFGF的培养基接触来分化和扩增中胚层群以获得具有定形HE潜能的中胚层细胞;(2)通过使具有定形HE潜能的中胚层细胞与培养基接触来分化和扩增具有定形HE潜能的中胚层细胞以获得定形HE细胞,所述培养基包括ROCK抑制剂以及选自由VEGF、bFGF、SCF、IL6和IL11组成的组的生长因子和细胞因子中的一种或多种;以及(3)通过使定形HE与培养基接触来分化和扩增定形HE细胞以获得iMDSC,所述培养基包括:ROCK抑制剂和MCSF以及选自由IL1b、IL3、IL6、IL4、IL10、IL13、TGF β 、bFGF、VEGF、SCF、GMCSF和FLT3L组成的组的

一种或多种细胞因子和细胞;以及任选地,AhR拮抗剂和前列腺素途径激动剂中的一种或两种。在一些实施例中,获得的iMDSC进一步扩增以生成富含或包括增加数量和比例的单核细胞MDSC的细胞群。在一些实施例中,获得的iMDSC中单核细胞MDSC的百分比超过约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%或约90%或介于之间的任何范围。在一些实施例中,定形HE细胞的分化和iMDSC的扩增持续不少于约5天、约7天、约9天、约12天、约15天、约18天、约22天或约25天或介于之间的任何时间长度。在一些实施例中,定形HE细胞的分化和iMDSC的扩增持续约5到25天、约6到22天、约6到20天、约6到18天、约7到18天、约7到17天、约8到17天、约9到17天、约10到17天、约9到16天、约8到16天、约9到15天、约12到15天、约10到14天或介于之间的任何时间长度。

[0112] 本文公开的方法的其它方面进一步包含经过优化的细胞冷冻培养基和程序,以使诱导性骨髓抑制细胞最大化,包含解冻后的iMDSC生存力、恢复和功能;细胞制造扩展和增加工艺产量,其中优化了分化时间延长;以及临床兼容性。

[0113] II. 多能干细胞或祖细胞衍生的免疫调节细胞或其群

[0114] 本发明提供了从多能干细胞或造血内皮衍生的免疫调节细胞或其亚群。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞包括髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞、调节性B细胞、巨噬细胞、树突状细胞或间充质基质细胞。

[0115] 在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞包括髓源性抑制细胞(MDSC)。在一个实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括CD45⁺CD33⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多或介于之间的任何百分比的CD45⁺CD33⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括不少于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或介于之间的任何百分比的CD45⁺CD33⁺细胞。

[0116] 在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括单核细胞或单核细胞MDSC。在一些实施例中,单核细胞包括CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括至少20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或介于之间的任何百分比的单核细胞或CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节性细胞群包括不少于20%、30%、40%、50%或介于之间的任何百分比的单核细胞或CD45⁺CD33⁺CD14⁺细胞。

[0117] 在又其它一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括至少20%、25%、30%、40%、50%或介于之间的任何百分比的CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括不少于20%、30%、40%、50%或介于之间的任何百分比的CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞。

[0118] 在其它一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括CD33⁺CD15⁺CD14⁻CD11b⁻细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或介于之间的任何百分比的CD33⁺CD15⁺CD14⁻CD11b⁻细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群包括不少于5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%或介于之间的任何百分比的CD33⁺CD15⁺CD14⁻CD11b⁻细胞。

[0119] 在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.1%的红细胞。在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.1%的CD45⁻CD235⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群基本上不含红细胞或CD45⁻CD235⁺细胞。

[0120] 在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的淋巴样。在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的CD45⁺CD7⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群基本上不含淋巴样细胞或CD45⁺CD7⁺细胞。

[0121] 在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的淋巴样。在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的CD45⁺CD7⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群基本上不含淋巴样细胞或CD45⁺CD7⁺细胞。

[0122] 在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的粒细胞。在一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群包括少于50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1%或0.1%的CD45⁺CD33⁺CD66b⁺细胞。在一些实施例中,衍生的免疫调节细胞群基本上不含淋巴样细胞或CD45⁺CD33⁺CD66b⁺细胞。

[0123] 在其它一些实施例中,包括iMDSC的衍生的免疫调节细胞群基本上不含选自由红细胞、淋巴样和粒细胞组成的组的一种或多种细胞亚群。

[0124] 本发明的另一方面提供了包括CD45⁺CD33⁺、CD45⁺CD33⁺CD14⁺或CD45⁺CD33⁺PDL1⁺细胞的免疫调节细胞的富集细胞群或亚群。如本文所用,术语“富集的”或“分离的”或“纯化的”或“分选的”是指包括超过50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多或介于之间的任何百分比的感兴趣细胞群或亚群的细胞群。

[0125] 本发明的又一个方面提供了衍生的免疫调节细胞,所述衍生的免疫调节细胞包括基因组工程化的iMDSC和/或其亚群,所述基因组工程包含插入、缺失或核酸置换。在一个实施例中,基因组工程化免疫调节细胞包括遗传修饰模式,所述遗传修饰模式包含以下中的一种或多种:安全开关蛋白、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白和肽、药物靶标候选物;或促进免疫调节细胞的植入、运输、归巢、生存力、自我更新、持久性、免疫应答调节和调制和/或存活的蛋白质。在一些实施例中,包含iMDSC的免疫调节细胞具有至少一种基因组修饰,所述至少一种基因组修饰包括嵌合受体、归巢受体或粘附分子、抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体、生长因子、改变的促炎性细胞因子受体、CAR或用于与双特异性或多特异性或通用接合剂偶联的表面触发受体的引入的或增加的表达;或共刺激基因的减少的或沉默的表达。

[0126] 在一些实施例中,包括iMDSC和/或其亚群的衍生的免疫调节细胞包括外源核酸。在一些实施例中,通过细胞的直接基因组编辑将外源核酸引入免疫调节细胞。在其它一些实施例中,通过从经过基因组工程造的造血干细胞或祖细胞iCD34或iPSC中保留外源核酸,将外源核酸引入免疫调节细胞,所述iCD34或iPSC通过分化产生了免疫调节细胞。在一些实施例中,包含iMDSC的基因工程化免疫调节细胞具有一种或多种增强的免疫调节功能,如:增强的抗炎信号传导;增强的对炎症部位的归巢;降低的免疫原性和免疫清除;以及增强的诱导T细胞无反应的能力。

[0127] 在包含iMDSC的经过修饰的免疫调节细胞的一些实施例中,包括用于活化iMDSC的嵌合受体。在一个实施例中,嵌合受体包括融合到细胞内域以用于抗炎信号传导的细胞外域。在嵌合受体的一些实施例中,受体的细胞外域衍生自抗原特异性结合序列;免疫球蛋

白;或促炎性细胞因子受体。在嵌合受体的一些实施例中,用于抗炎信号传导的胞内域包括IL10R、IL35R和AhR中的至少一个。

[0128] 在包含iMDSC的经过修饰的免疫调节细胞的一些实施例中,其中所述归巢受体或粘附分子包括CXCR4、CCR2、CCR5、CCR6、CXCR3、CCR7、CD62L和VLA4中的至少一种。

[0129] 在包含iMDSC的经过修饰的免疫调节细胞的一些实施例中,其中抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体和/或生长因子的引入的或增加的表达由通过炎症信号传导调节的启动子驱动。在一些实施例中,炎症信号传导包括TLR或IFN γ R信号传导。在一些实施例中,启动子是诱导型启动子。在一些实施例中,启动子仅在iMDSC归巢之后被触发。在一些实施例中,工程化表达包括ID01、PDL1、CTLA4、Arg1、IL35、IL10、HO-1、CrmB、Y136、HGFL、GMCSF和TGF β 中的一种或多种。

[0130] 在包含iMDSC的经过修饰的免疫调节细胞的一些实施例中,包括工程化HLA。在一个实施例中,HLA1或2被敲除。在一个实施例中,经过修饰的免疫调节细胞包括B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP和在染色体6p21区域中的任何HLA基因中的至少一种的缺失或降低的表达。在另一个实施例中,经过修饰的免疫调节细胞包括HLA-E或HLA-G的引入的或增加的表达。具有经过修饰的I类和/或II类HLA的iMDSC能够免疫逃避,对免疫检测具有增加的抗性和/或呈现出经过改善的体内持久性。此外,此类细胞可以避免在过继细胞疗法中需要HLA匹配并由此提供通用的现成的治疗方案源。本申请的一方面提供了从工程化克隆iPSC中获得此类经过修饰的iMDSC的方法。这种方法在衍生的MDSC群中提供了同质工程化模式,从而使以其它方式由在对本质上异质的原代MDSC群进行工程化时会存在的未经修饰细胞引起的排斥病症的风险显著较低。另外,通过iPSC分化获得MDSC使衍生的MDSC群的表型偏向于含有显著增加的数量和比例的治疗上相关的亚群,如M-MDSC,所述亚群通过CD45⁺、CD33⁺和CD14⁺进行表征。如本文所提供的,在延长的培养中,此类衍生的MDSC群可以进一步选择性地扩增以包括超过90%的M-MDSC。

[0131] 在包含iMDSC的经过修饰的免疫调节细胞的一些实施例中,包括一种或多种改变的促炎性细胞因子受体。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体隔离炎症环境中存在的促炎性细胞因子。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体是膜结合的。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体呈可溶形式。在一些实施例中,隔离的细胞因子包含但不限于IL2R、IL6R和IFN γ R。

[0132] 在一些实施例中,免疫调节细胞群或亚群在体外从干细胞或祖细胞分化。在一些实施例中,分离的免疫调节细胞群或亚群可以从干细胞、造血干细胞或祖细胞(HSC)或者祖细胞分化。祖细胞可以是CD34⁺造血内皮细胞。干细胞可以是多能干细胞,如诱导性多能干细胞(iPSC)和胚胎干细胞(ESC)。iPSC是非天然存在的重编程多能细胞。一旦将受试者的细胞重编程为多能状态,就可以将所述细胞编程或分化为期望的细胞类型或亚型,如MDSC。

[0133] 在一些实施例中,通过多阶段分化平台将iPSC分化为MDSC,其中可以将来自不同发育阶段的细胞诱导为表达CD34的造血内皮细胞(参见例如美国申请62/107,517和62/251,016,其全部公开内容并入本文中),所述造血内皮细胞根据本申请的方法进一步分化以呈现免疫调节细胞表型。在一些实施例中,对用于调节性细胞分化的iPSC或iCD34进行基因组工程化,所述基因组工程化包含插入、缺失或核酸置换。

[0134] 在一些实施例中,基因组工程化iPS或iCD34细胞包括遗传修饰模式,所述遗传修

饰模式包含以下中的一种或多种：安全开关蛋白、靶向模式、受体、信号传导分子、转录因子、药学活性蛋白和肽、药物靶标候选物；或促进免疫调节细胞的植入、运输、归巢、生存力、自我更新、持久性、免疫应答调节和调制和/或存活的蛋白质。在一些实施例中，基因组工程化iPS或iCD34细胞具有至少一种基因组修饰，所述至少一种基因组修饰包括嵌合受体、归巢受体、抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体、生长因子、改变的促炎性细胞因子受体、CAR或用于与双特异性或多特异性或通用接合剂偶联的表面触发受体的引入的或增加的表达；或共刺激基因的减少的或沉默的表达。在一些实施例中，基因组工程化iPS或iCD34细胞包括外源核酸。在一些实施例中，通过iPS或iCD34细胞的直接基因组编辑将外源核酸引入iPS或iCD34细胞。在其它一些实施例中，通过从用于分化的基因组工程化iPS细胞中保留包括在iCD34细胞中的外源核酸，将外源核酸引入iCD34细胞。在其它一些实施例中，通过从用于重编程以获得iPS细胞的基因组工程化体细胞或非多能细胞中保留包括在iPS细胞中的外源核酸，将外源核酸引入iPS。在一些实施例中，用于重编程以获得iPS细胞的体细胞或非多能细胞是从先前施用了经过遗传修饰的免疫细胞的受试者获得的。在一些实施例中，先前施用的经过遗传修饰的免疫细胞包括对T细胞受体 (TCR) 和/或嵌合抗原受体 (CAR) 进行编码的外源核酸。

[0135] 正在寻求各种策略以诱导细胞的多能性或增加细胞的效力 (Takahashi, K. 和 Yamanaka, S., 《细胞 (Cell)》, 126, 663-676 (2006); Takahashi 等人, 《细胞》131, 861-872 (2007); Yu 等人, 《科学 (Science)》318, 1917-1920 (2007); Zhou 等人, 《细胞干细胞 (Cell Stem Cell)》4, 381-384 (2009); Kim 等人, 《细胞干细胞》4, 472-476 (2009); Yamanaka 等人, 2009; Saha, K., Jaenisch, R., 《细胞干细胞》5, 584-595 (2009) 并且提高重编程效率 (Shi 等人, 《细胞干细胞》2, 525-528 (2008a); Shi 等人, 《细胞干细胞》3, 568-574 (2008b); Huangfu 等人, 《自然生物技术 (Nat Biotechnol)》26, 795-797 (2008a); Huangfu 等人, 《自然生物技术》26, 1269-1275 (2008b); Silva 等人, 《美国科学公共图书馆生物学 (Plos Bio)》6, e253. Doi:10.1371/journal.Pbio.0060253 (2008); Lyssiotis 等人, 《美国国家科学院院刊 (PNAS)》106, 8912-8917 (2009); Ichida 等人, 《细胞干细胞》5, 491-503 (2009); Maherali, N., Hochedlinger, K., 《当代生物学 (Curr Biol)》19, 1718-1723 (2009b); Esteban 等人, 《细胞干细胞》6, 71-79 (2010); 以及 Feng 等人, 《细胞干细胞》4, 301-312 (2009), 上述文献的公开内容通过全文引用的方式结合在此。

[0136] 在一些实施例中，用于衍生包含iMDSC的免疫调节细胞的经过修饰的iPS或iCD34细胞包括MDSC活化嵌合受体。在一个实施例中，嵌合受体包括融合到细胞内域以用于抗炎信号传导的细胞外域。在嵌合受体的一些实施例中，受体的细胞外域衍生自抗原特异性结合序列；免疫球蛋白；或促炎性细胞因子受体。在嵌合受体的一些实施例中，用于抗炎信号传导的胞内域包括IL10R、IL35R和AhR中的至少一个。

[0137] 在一些实施例中，用于衍生包含iMDSC的免疫调节细胞的经过修饰的iPS或iCD34细胞包括一种或多种归巢受体或粘附分子，所述一种或多种归巢受体或粘附分子包括CXCR4、CCR2、CCR5、CCR6、CXCR3、CCR7、CD62L或VLA4。

[0138] 在一些实施例中，用于衍生包含iMDSC的免疫调节细胞的经过修饰的iPS或iCD34细胞包括抗炎分子、免疫检查点蛋白、细胞因子/趋化因子诱饵受体和/或生长因子的引入的或增加的表达，所述引入的或增加的表达由通过炎症信号传导调节的启动子驱动。在一

些实施例中,炎症信号传导包括TLR或IFN γ R信号传导。在一些实施例中,启动子是诱导型启动子。在一些实施例中,启动子仅在iMDSC归巢之后被触发。在一些实施例中,工程化表达包括IDO1、PDL1、CTLA4、Arg1、IL35、IL10、HO-1、CrmB、Y136、HGFL、GMCSF和TGF β 中的一种或多种。

[0139] 在一些实施例中,用于衍生包含iMDSC的免疫调节细胞的经过修饰的iPS或iCD34细胞包括工程化HLA。在一个实施例中,敲除经过修饰的iPS或iCD34中的HLA1或2。在一个实施例中,经过修饰的iPS或iCD34细胞包括B2M、TAP1、TAP2、TAP相关糖蛋白、NLRC5、RFXANK、CIITA、RFX5、RFXAP和在染色体6p21区域中的任何HLA基因中的至少一种的缺失或降低的表达。在另一个实施例中,经过修饰的iPS或iCD34细胞包括HLA-E或HLA-G的引入的或增加的表达。

[0140] 在用于衍生包含iMDSC的免疫调节细胞的经过修饰的iPS或iCD34细胞的一些实施例中,包括一种或多种改变的促炎性细胞因子受体。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体隔离炎症环境中存在的促炎性细胞因子。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体是膜结合的。在一些实施例中,改变的促炎性细胞因子受体呈可溶形式。在一些实施例中,隔离的细胞因子包含但不限于IL2R、IL6R和IFN γ R。

[0141] 本发明的另一方面提供了经过调制的免疫调节细胞或其亚群,其中所述免疫调节细胞衍生自多能干细胞或造血内皮,其中免疫调节细胞群或亚群已经与一种或多种调制剂接触,并且其中与在没有调制剂的情况下的细胞相比,经过调制的免疫调节细胞具有经过改善的治疗潜能。在一些实施例中,经过调制的免疫调节细胞包括经过调制的髓源性抑制细胞(MDSC)。用所述药剂中的一种或多种药剂进行调制可以修饰免疫调节细胞的生物学特性,以改善细胞增殖、存活、持久性、归巢和/或免疫调节功能。

[0142] 如本文可互换地使用的,“调制剂(modulator/modulating agent)”用于指代使用体外和体内测定鉴别其调节特定靶标(蛋白质或编码多核苷酸)的表达或活性的能力的抑制剂或活化剂。“调制剂”包含抑制剂和活化剂,例如配体、激动剂、拮抗剂。如本文所用,调制剂可以是有机化合物(例如,小化学分子)、多肽(例如,肽或抗体)、核酸(例如,DNA、RNA、双链、单链、寡核苷酸、反义RNA、小抑制RNA、微RNA、核酶等)、寡糖或脂质;或其类似地起作用(例如,针对同一靶标进行抑制或活化)的同系物、模拟物、衍生物、类似物或盐,无论合成的还是天然存在的。

[0143] 抑制剂是可以例如降低或消除描述的靶蛋白的表达、或部分地或全部阻断靶蛋白的刺激或蛋白酶抑制剂活性、或降低、防止、延迟活化、失活、脱敏或下调靶蛋白的活性的药剂,例如拮抗剂。活化剂是可以例如诱导或活化描述的靶蛋白的表达、或刺激、增加、活化、促进、增强活化或蛋白酶抑制剂活性、敏化或上调描述的靶蛋白的活性的药剂,例如激动剂。对抑制剂和活化剂的测定包含例如将推定的调制剂应用于表达描述的靶蛋白的细胞以及然后确定对描述的靶蛋白表达和/或活性的功能效应和效应程度。对样品(未经过调制剂处理或仅用媒介剂处理)通常被赋予100%的比活性值。当相对于对照物的活性值为约90%,任选地80%、70%、60%、50%、25%、10%、5%或1%或更低时,实现了对描述的靶蛋白的抑制。当相对于对照物的活性值为110%,任选地150%、200%、300%、400%、500%或1000-3000%或更高时,实现了对描述的靶蛋白的活化。

[0144] 改善免疫调节细胞治疗潜能通常需要对细胞的质量进行一定的改善。用选定的一

种或多种调制剂进行处理可以通过调制以下中的至少一种来增强处理后免疫调节细胞的生物学特性:细胞表型偏向、扩增、维持、存活、增殖、持久性和/或T细胞抑制,从而改善了免疫调节细胞的治疗潜能。例如,在MDSC群中,表型偏向增加的数量或相对比率的在抑制T细胞增殖和/或T细胞效应子功能方面功能更多并且更有效的一个细胞亚群使MDSC群的治疗潜能得到改善。在一个实施例中,包括在MDSC群中的单核细胞的数量或相对比率在调制后增加。在另一个实施例中,包括在MDSC群中的CD45⁺CD33⁺PDL1⁺亚群的数量或相对比率在调制后增加。

[0145] 在一些实施例中,选定的调制剂包括一种或多种小分子化合物。在一些实施例中,调制适于基于过继细胞的疗法的免疫调节细胞群或亚群的方法包括使细胞与包括足量的至少一种所述药剂组合物接触以与不接触同一组合物的免疫调节细胞相比改善至少一种期望的治疗属性。在一个实施例中,用于免疫调节细胞治疗的调制剂在约0.1nM到约50μM之间。在一个实施例中,用于免疫细胞治疗的药剂为约0.1nM、0.5nM、1nM、5nM、10nM、50nM、100nM、500nM、1μM、5μM、10μM、20μM或25μM或介于之间的任何浓度。在一个实施例中,用于免疫调节细胞治疗的调制剂在约0.1nM到约5nM之间、约1nM到约100nM之间、约50nM到约250nM之间、约100nM到约500nM之间、约250nM到约1μM之间、约500nM到约5μM之间、约3μM到约10μM之间、约5μM到约15μM之间、约12μM到约20μM之间或约18μM到约25μM之间或介于其间的任何范围。

[0146] 在一些实施例中,调制适于基于过继细胞的疗法的免疫调节细胞群或亚群的方法包括使免疫调节细胞与包括至少一种调制剂的组合物接触足够长的时间以与不接触同一组合物的免疫调节细胞相比改善至少一种期望的治疗属性。在一个实施例中,使免疫调节细胞与所述药剂中的一种或多种药剂接触至少10分钟、30分钟、1小时、2小时、5小时、12小时、16小时、18小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、15天、20天、25天、30天或介于之间的任何时间长度。在一个实施例中,使免疫细胞与所述药剂中的一种或多种药剂接触介于约0.5小时到约2小时之间、约1小时到约12小时之间、约10小时到约2天之间、约1天到约3天之间、约2天到约5天之间、约3天到约6天之间、约5天到约8天之间、约7天到约14天之间、约12天到约22天之间、约14天到约25天之间、约20天到约30天之间。在一些实施例中,使免疫细胞与所述药剂中的一种或多种药剂接触不少于16小时、14小时、12小时、10小时、8小时、6小时、4小时、2小时或介于之间的任何时间长度。因此,所述足够的时间长度例如不少于15小时、13小时、11小时、9小时、7小时、5小时、3小时或1小时。在所述方法的其它一些实施例中,所述足够的时间长度不少于24小时、36小时、48小时、60小时、72小时或介于之间的任何时间长度。因此,所述足够的时间长度是例如不少于30小时、42小时、54小时、66小时、78小时、90小时。

[0147] 包括使免疫调节细胞与包括至少一种所述药剂的组合物接触的调制适于基于过继细胞的疗法的免疫调节细胞群或亚群的方法可以进一步包括在接触之后从免疫调节细胞中富集或分离一个或多个期望的亚群,其中所述一个或多个期望的亚群包括CD45⁺CD33⁺、CD45⁺CD33⁺CD14⁺和/或CD45⁺CD33⁺PDL1⁺。

[0148] 本发明的再一方面提供了治疗组合物。在一些实施例中,任选地具有遗传修饰和/或药剂调制的衍生的免疫调节细胞可以自体地或同种异体地施用。

[0149] 本文还提供了包括如所公开的免疫调节细胞以及一种或多种治疗添加剂/治疗剂

的组合型治疗组合物。在组合型治疗组合物的一些实施例中,所述一种或多种治疗添加剂包括肽、细胞因子、丝裂原、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包括一种或多种感兴趣多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分、或免疫调节药物(IMiD)。

[0150] 在一些实施例中,另外的治疗剂包括抗体或抗体片段。在一些实施例中,抗体可以是人源化抗体、人源化单克隆抗体、嵌合抗体。在一些实施例中,抗体或抗体片段与病毒抗原特异性地结合。在其它实施例中,抗体或抗体片段与肿瘤抗原特异性地结合。在一些实施例中,肿瘤或病毒特异性抗原使经过调制的细胞活化以更好地与其靶细胞相互作用。

[0151] 如本文所用,化学治疗剂是指细胞毒性抗肿瘤剂,即优先杀死肿瘤细胞或破坏迅速增殖细胞的细胞周期、或被发现根除干癌细胞的化学试剂并且在治疗上用于预防或减少肿瘤细胞的生长的化学药剂。化学治疗剂有时也被称为抗肿瘤或细胞毒性药物或药剂并且在本领域中是众所周知的。在一些实施例中,化学治疗剂包括蒽环霉素、烷化剂、烷基磺酸盐、氮丙啶、乙烯亚胺、甲基三聚氰胺、氮芥(nitrogen mustard)、亚硝基脲、抗生素、抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、酶、鬼臼毒素、含铂药剂、干扰素、长春花生物碱、表鬼臼毒素或白介素。示例性化学治疗剂包含但不限于环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、美法仑(mephalan)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、六甲噻胺(hexamethylmelamine)、噻替派(thiotepa)、白消安(busulfan)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)、甲氨蝶呤、氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、长春地辛(vindesine)、依托泊苷(etoposide)、依托泊苷邻醌(etoposide orthoquinone)、替尼泊苷(teniposide)、柔红霉素(daunorubicin)、阿霉素(doxorubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、比生群(bisantrene)、放线菌素D(actinomycin D)、普卡霉素(plicamycin)、嘌呤霉素(puromycin)、短杆菌肽D(gramicidine D)、紫杉醇(paclitaxel)、秋水仙碱(colchicine)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、吐根碱(emetine)、美登木素(maytansine)以及安吡啶(amsacrine)。另外的药剂包含氨鲁米特(aminoglutethimide)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、丝裂霉素、六甲蜜胺(altretamine)、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、卡莫司汀(BCNU)、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)、阿仑单抗(alemtuzumab)、六甲蜜胺、阿那曲唑(anastrozole)、L-天冬酰胺酶(L-asparaginase)、阿扎胞苷(azacitidine)、贝伐单抗(bevacizumab)、蓓萨罗丁(bexarotene)、争光霉素(bleomycin)、硼替佐米(bortezomib)、白消安、卡普睾酮(calusterone)、卡培他滨(capecitabine)、塞来昔布(celecoxib)、西妥昔单抗(cetuximab)、克拉屈滨(cladribine)、氟达拉滨(clofarabine)、阿糖胞苷、达卡巴嗪(dacarbazine)、地尼白介素(denileukindiftitox)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、多西他赛(docetaxel)、屈他雄酮(dromostanolone)、表柔比星(epirubicin)、厄洛替尼(erlotinib)、雌莫司汀(estramustine)、依托泊苷(etoposide)、乙炔雌二醇(ethinyl estradiol)、依西美坦(exemestane)、氟尿苷、5-氟尿嘧啶、氟达拉滨(fludarabine)、氟他胺(flutamide)、氟维司群(fulvestrant)、吉非替尼(gefitinib)、吉西他滨(gemcitabine)、戈舍瑞林(goserelin)、羟基脲(hydroxyurea)、替伊莫单抗(ibritumomab)、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊马替尼(imatinib)、

干扰素 α (2a, 2b)、伊立替康、来曲唑 (letrozole)、甲酰四氢叶酸 (leucovorin)、亮丙瑞林 (leuprolide)、左旋咪唑 (levamisole)、氮芥、甲地孕酮 (megestrol)、美法仑、巯嘌呤 (mercaptopurine)、氨甲蝶呤、甲氧沙林 (methoxsalen)、丝裂霉素C、米托坦 (mitotane)、米托蒽醌、苯丙酸诺龙 (nandrolone)、nofetumomab、奥沙利铂 (oxaliplatin)、紫杉醇、帕米磷酸二钠 (pamidronate)、培美曲塞 (pemetrexed)、培加酶 (pegademase)、培门冬酶 (pegaspargase)、喷司他丁、哌泊溴烷 (pipobroman)、普卡霉素、聚苯丙生 (polifeprosan)、卟菲尔钠 (porfimer)、甲基苄肼 (procarbazine)、奎纳克林 (quinacrine)、利妥昔单抗 (rituximab)、沙格司亭 (sargramostim)、链脲霉素 (streptozocin)、它莫西芬 (tamoxifen)、替莫唑胺 (temozolomide)、替尼泊苷、睾内酯 (testolactone)、硫鸟嘌呤、噻替哌、拓扑替康 (topotecan)、托瑞米芬 (toremifene)、托西莫单抗 (tositumomab)、曲妥单抗 (trastuzumab)、维甲酸 (tretinoin)、乌拉莫司汀 (uracil mustard)、戊柔比星 (valrubicin)、长春瑞滨 (vinorelbine) 以及唑来磷酸 (zoledronate)。

[0152] 其它适合的药剂是被批准用于人类用途 (包含将被批准的那些) 用作化学治疗药物或放射治疗药物并且是本领域已知的那些药剂。可以通过许多标准医师和肿瘤学家的参考文献 (例如, Goodman和Gilman的《治疗学的药理学基础 (The Pharmacological Basis of Therapeutics)》, 第九版, 麦格劳希尔集团 (McGraw-Hill), 纽约州, 1995) 或通过美国国家癌症研究所网站 (fda.gov/cder/cancer/druglistframe.htm) 参考此类药剂, 这两种来源均不时地更新。如沙利度胺 (thalidomide)、来那度胺 (lenalidomide) 和泊马度胺 (pomalidomide) 等免疫调节药物 (IMiD) 刺激NK细胞和T细胞两者。如本文所提供的, IMiD可以与经过调制的治疗性免疫调节细胞一起用于癌症治疗。

[0153] III. 免疫调节细胞、细胞群或亚群的治疗用途

[0154] 本发明还提供了治疗受试者的方法, 即通过使用在体外衍生自多能干细胞或祖细胞的免疫调节细胞以及任选地通过如所描述的一种或多种另外的治疗剂来抑制、预防、减轻病状。在一些实施例中, 衍生的免疫调节细胞包括至少一种遗传修饰。在其它一些实施例中, 衍生的免疫调节细胞已经与一种或多种调制剂接触。

[0155] 一方面, 衍生的免疫调节细胞可以用于治疗、预防或减轻与炎性细胞活化相关的病状和疾病。“炎性细胞活化”是指通过刺激物 (包含但不限于细胞因子、抗原或自身抗体) 诱导增殖性细胞应答、产生可溶性介体 (包含但不限于细胞因子、氧自由基、酶、前列腺素或血管活性胺) 或对炎性细胞 (包含但不限于单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、粒细胞 (包含嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞在内的多形核白血球)、肥大细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞和内皮细胞) 中新的或增加数量的介体 (包含但不限于主要组织相容性抗原或细胞粘附分子) 的细胞表面表达。本领域技术人员应当了解, 这些细胞中的这些表型中的一种或其组合的活化可以促使炎性病状引发、永存或恶化。

[0156] 炎性病状或疾病包含但不限于关节炎疾病, 如类风湿性关节炎 (RA)、骨关节炎、痛风性关节炎、脊椎炎和反应性关节炎; 白塞综合征; 脓毒症; 脓毒症休克; 内毒素休克; 革兰氏阴性脓毒症; 革兰氏阳性脓毒症; 中毒性休克综合征; 继发于败血症、创伤或出血的多器官损伤综合征; 眼科病症, 包含但不限于过敏性结膜炎、春季结膜炎、葡萄膜炎和甲状腺相关眼病; 嗜酸性肉芽肿; 肺部或呼吸系统病状, 包含但不限于哮喘、慢性支气管炎、过敏性鼻炎、成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、严重急性呼吸综合征 (SARS)、慢性肺部炎性疾病 (例如, 慢

性阻塞性肺病)、硅肺病、肺结节病、胸膜炎、肺泡炎、血管炎、肺炎、支气管扩张、遗传性肺气肿和肺氧中毒;缺血性再灌注损伤,例如心肌、脑或四肢的缺血再灌注损伤;纤维化,包括但不限于囊胞性纤维化;瘢痕瘤形成或瘢痕组织形成;动脉粥样硬化;自身免疫性疾病,包括但不限于系统性红斑狼疮(SLE)、狼疮性肾炎、自身免疫性甲状腺炎、多发性硬化症、一些形式的糖尿病以及雷诺综合征;组织或器官移植排斥病症,包括但不限于移植物抗宿主病(GvHD)和同种异体移植物排斥;慢性或急性肾小球性肾炎;炎性肠病,包括但不限于克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和坏死性小肠结肠炎;炎性皮炎,包括但不限于接触性皮炎、特应性皮炎、牛皮癣和荨麻疹;由于感染引起的发烧和肌痛;中枢或周围神经系统的炎性病状,包括但不限于脑膜炎(例如,急性化脓性脑膜炎)、脑炎以及由于轻度创伤引起的脑损伤或脊髓损伤;干燥综合征;涉及白细胞渗出的疾病;酒精性肝炎;细菌性肺炎;社区获得性肺炎(CAP);卡氏肺孢子虫肺炎(PCP);抗原-抗体复合物介导的疾病;低血容量性休克;I型糖尿病;急性和延迟超敏反应;由于白细胞恶液质和转移引起的疾病状态;热损伤;粒细胞输血相关综合征;细胞因子诱导的毒性;中风;胰腺炎;心肌梗塞、呼吸道合胞病毒(RSV)感染;以及脊髓损伤。

[0157] 使用本发明的免疫调节细胞的治疗可以在出现症状时进行或用于预防复发。术语“治疗(treating/treatment等)”在本文中通常用于意指获得期望的药理学和/或生理学效果。就完全或部分地预防疾病而言,所述效果可以是预防性的;和/或就部分或完全治愈疾病和/或由所述疾病引起的副作用而言,所述效果可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”覆盖对哺乳动物的疾病的任何治疗并且包含:防止疾病在可能倾向于患有疾病但尚未被诊断为患有疾病的受试者身上发生;抑制疾病,即阻止其发展;或者缓解疾病,即使疾病消退。可以在疾病或损伤发作之前、期间或之后施用治疗剂或组合物。还特别关注了对发展中的疾病的治疗,其中所述治疗稳定或减少了患者的不期望的临床症状。在特定实施例中,需要治疗的受试者患有可以通过细胞疗法在至少一种相关症状方面得到治疗、减轻和/或改善的疾病、病状和/或损伤。某些实施例设想了,需要细胞疗法的受试者包括但不限于骨髓或干细胞移植候选人、已经接受化学疗法或照射疗法的受试者、患有过度增殖性病征或癌症(例如,过度增殖性病征或造血系统癌症)或者处于患有其的风险中的受试者、患有肿瘤(例如,实体瘤)或处于患上其的风险中的受试者、患有病毒感染或与病毒感染相关的疾病或者处于患有其的风险中的受试者。

[0158] 如所公开的包含衍生的免疫调节细胞的治疗组合物可以在其它治疗之前、期间和/或之后施用于受试者体内。因此,组合疗法的方法可以涉及在使用另外的治疗剂之前、期间和/或之后施用或制备经过调制的细胞。如上文所提供的,所述一种或多种另外的治疗剂包括肽、细胞因子、丝裂原、生长因子、小RNA、dsRNA(双链RNA)、单核血细胞、饲养细胞、饲养细胞组分或其置换因子、包括一种或多种感兴趣多核酸的载体、抗体、化学治疗剂或放射性部分、或免疫调节药物(IMiD)。经过调制的免疫细胞的施用可以在时间上与另外的治疗剂的施用分开数小时、数天或甚至数周。另外或可替代地,所述施用可以与其它生物活性剂或模式组合,如但不限于抗肿瘤剂、非药物疗法,如手术。

[0159] 如本领域普通技术人员将会理解的,如上所述,自体免疫调节细胞和同种异体免疫调节细胞均可以调制并且用于细胞疗法中。

[0160] 在一些实施例中,治疗组合物中的衍生的免疫调节细胞的数量为至少 0.1×10^5 个

细胞、至少 1×10^5 个细胞、至少 5×10^5 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 5×10^6 个细胞、至少 1×10^7 个细胞、至少 5×10^7 个细胞、至少 1×10^8 个细胞、至少 5×10^8 个细胞、至少 1×10^9 个细胞或至少 5×10^9 个细胞。

[0161] 在一些实施例中,治疗组合物中的衍生的免疫调节细胞的数量为约 0.1×10^5 个细胞到约 1×10^6 个细胞;约 0.5×10^6 个细胞到约 1×10^7 个细胞;约 0.5×10^7 个细胞到约 1×10^8 个细胞;约 0.5×10^8 个细胞到约 1×10^9 个细胞;约 1×10^9 个细胞到约 5×10^9 个细胞;约 0.5×10^9 个细胞到约 8×10^9 个细胞或介于之间的任何范围。

[0162] 在一些实施例中,治疗组合物中的衍生的免疫调节细胞的数量为约 0.5×10^6 个细胞到约 1×10^6 个细胞;约 0.5×10^7 个细胞到约 1×10^7 个细胞;约 0.5×10^8 个细胞到约 1×10^8 个细胞;约 0.5×10^9 个细胞到约 5×10^9 个细胞;约 1×10^9 个细胞到约 8×10^9 个细胞或介于之间的任何范围。

[0163] 在其它一些实施例中,治疗组合物中的衍生的免疫调节细胞的数量为约 0.1×10^5 个细胞到约 0.5×10^6 个细胞;约 0.5×10^6 个细胞到约 0.5×10^7 个细胞;约 0.5×10^7 个细胞到约 0.5×10^8 个细胞;约 0.5×10^8 个细胞到约 0.5×10^9 个细胞;约 0.5×10^9 个细胞到约 8×10^9 个细胞或介于之间的任何范围。

[0164] 在一个实施例中,治疗组合物中的衍生的免疫调节细胞的数量是部分或单个血脐带中的免疫细胞数或为至少 0.1×10^5 个细胞/千克体重、至少 0.5×10^5 个细胞/千克体重、至少 1×10^5 个细胞/千克体重、至少 5×10^5 个细胞/千克体重、至少 10×10^5 个细胞/千克体重、至少 0.75×10^6 个细胞/千克体重、至少 1.25×10^6 个细胞/千克体重、至少 1.5×10^6 个细胞/千克体重、至少 1.75×10^6 个细胞/千克体重、至少 2×10^6 个细胞/千克体重、至少 2.5×10^6 个细胞/千克体重、至少 3×10^6 个细胞/千克体重、至少 4×10^6 个细胞/千克体重、至少 5×10^6 个细胞/千克体重、至少 10×10^6 个细胞/千克体重、至少 15×10^6 个细胞/千克体重、至少 20×10^6 个细胞/千克体重、至少 25×10^6 个细胞/千克体重、至少 30×10^6 个细胞/千克体重、 1×10^8 个细胞/千克体重、 5×10^8 个细胞/千克体重或 1×10^9 个细胞/千克体重或 8×10^9 个细胞/千克体重。

[0165] 本发明所提供的衍生的免疫调节细胞可以施用于受试者,而无需在施用前离体或体外扩增。在特定实施例中,可以洗涤衍生的免疫调节细胞的经过调制的群以移除一种或多种调制剂。

[0166] 适于施用于患者的治疗组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载剂(添加剂)和/或稀释剂(例如,药学上可接受的培养基,例如细胞培养基)或其它药学上可接受的组分。药学上可接受的载剂和/或稀释剂部分地由所施用的特定组合物以及通过用于施用治疗组合物的特定方法来确定。因此,本发明的治疗组合物存在多种适合的调配物(参见例如《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版,1985,其公开内容通过全文引用的方式结合在此)。

[0167] 在特定实施例中,具有分离的免疫调节细胞群的治疗性细胞组合物还具有药学上可接受的细胞培养基或药学上可接受的载剂和/或稀释剂。如本文公开的包括免疫调节细胞群的治疗组合物可以通过静脉内、腹膜内、肠内或气管施用法分开施用或者与其它适合的化合物组合地施用,以实现期望的治疗目标。

[0168] 这些药学上可接受的载剂和/或稀释剂存在的量可以足以维持治疗组合物的PH在

约3到约10之间。因此,缓冲剂按重量计可以占总组合物重量的多约5%。治疗组合物中还可以包含电解质,如但不限于氯化钠和氯化钾。一方面,治疗组合物的PH在约4到约10的范围内。可替代地,治疗组合物的PH在约5到约9、约6到约9或约6.5到约8的范围内。在另一个实施例中,治疗组合物包含缓冲剂,从而具有在所述PH范围中的一个中的PH。在另一个实施例中,治疗组合物的PH为约7。可替代地,治疗组合物的PH在约6.8到约7.4的范围内。在再一个实施例中,治疗组合物的PH为约7.4。

[0169] 本发明还部分地提供了药学上可接受的细胞培养基在本发明的特定组合物和/或培养中的用途。此类组合物适于施用于人类受试者。一般而言,支持本发明的经过调制的免疫细胞的维持、生长和/或健康的任何培养基均适于用作药物细胞培养基。在特定实施例中,药学上可接受的细胞培养基是无血清和/或无饲养层培养基。

[0170] 在各个实施例中,无血清培养基是无动物的并且可以任选地是无蛋白质的。任选地,培养基可以含有生物药学上可接受的重组蛋白。无动物培养基是指组分源自非动物源的培养基。重组蛋白置换无动物培养基中的天然动物蛋白,并且营养物从合成的植物或微生物来源获得。相比之下,无蛋白质培养基被定义为基本上不含蛋白质。本领域普通技术人员将会了解,上述培养基实例是说明性的并且绝不限定于用于本发明中的培养基的调配,并且存在许多本领域技术人员已知并且可获得的适合的培养基。

[0171] 实例

[0172] 以下实例以说明性方式而不是以限制性方式提供。

[0173] 实例1—从诱导性多能干细胞制造髓源性抑制细胞

[0174] 为了开始向造血谱系分化,在第0天(D0)将hiPSC作为单层接种在含有小分子的维持培养基中,所述小分子包括ROCK抑制剂、MEK抑制剂和GSK3抑制剂,并且使所述hiPSC粘附并且扩增约24小时。在此过程中并未形成EB。在D1,在未与小分子组合的情况下,将维持培养基移除并且用基础培养基(例如,含有StemPro 34、谷氨酰胺、非必需氨基酸(NEAA)、抗坏血酸和单硫代甘油(MTG))置换。在D2左右,通过将培养基切换到iCD34-A(例如,包括基础培养基和BMP4)来开始造血分化。在D3,向培养基补充生长因子bFGF并且随后切换至iCD34-B培养基(例如,包括基础培养基、BMP4、bFGF和GSK3抑制剂)以进行分化。维持单层直至D5-D6左右,此时将单层解离为单细胞并且作为低密度单层接种在iCD34-C培养基(例如,包括基础培养基、ROCK抑制剂、bFGF、VEGF、SCF、IL6和IL11)中,直到在D10左右分化为止。从D2左右的造血分化开始维持低氧张力(2-10%O₂),直到分化的D10左右。

[0175] 在培养过程中,通过将单层解离成单细胞并且分析CD34以及任选地CD43、CD45、CXCR4和CD73的表面标志物表达来监测向造血谱系的定向分化。在分化的D8左右,通过细胞表面表达标签CD34⁺观察到表示HE(造血内皮)的细胞群出现。在CD34⁺细胞中还观察到了CD43⁻CXCR4⁻CD73⁻。维持iCD34(即,iPSC衍生的CD34细胞)群直到D10左右。在D10(此时间点可以缩短至约D9或延长至约D12),将细胞解离为单细胞,并且通过FACS对iCD34细胞群进行分选并且然后冷冻保存。

[0176] 为了进行骨髓谱系细胞分化,在骨髓分化培养基(例如,包括基础培养基、VEGF、bFGF、SCF、IL3、FLT3L、MCSF、GMCSF、StemRegenin1(SR1)和ROCK抑制剂)中,将刚解冻的iCD34细胞以12孔平板每孔 7.5×10^4 个细胞平板接种在Matrigel涂覆的平板上(第1天)。在培养的第2天、第4天、第6天、第8天,向每个孔中加入1ml不补充Rock抑制剂的骨髓分化培养

基。在第9天,通过连续冲洗每个孔来收集非粘附细胞,所述非粘附细胞可以进一步进行培养、扩增和富集。如图1A所示,亲本人诱导性多能干细胞(hiPSC)通过约10天的多阶段单层培养过程分化为CD34⁺造血内皮(HE或iCD34)。在平板接种后第3天开始,在髓样促进条件下培养的D10 iCD34⁺HE细胞使CD45⁺细胞从内皮层出现,并且在第9天获取CD33。

[0177] 为了表征收集的使用这种约19天过程制造的CD45⁺CD33⁺细胞,将细胞以每孔10×10⁴个细胞接种在圆底96孔平板中。在4℃下以1:200的浓度将细胞用人Fc阻断剂(BD公司,564219)处理30分钟。然后将细胞在BD染色缓冲液(BD公司,554657)中洗涤并且与骨髓或红系抗体组在4℃下培育30分钟。骨髓抗体组包含CD45-BV786、CD16-BUV395、CD33-APC、CD1c-BV421、CD14-PerCP-Cy5.5、CD66b-FITC、PDL1-PECy7、CD141-BB515和Live Dead-APCcy7抗体。红系抗体组包含CD45-BV786、CD71-PE、CD235a-PECy7、CD144-APC、CD7-BV421、CD43-BV510、CD123-PCP5.5和Live Dead-APCcy7抗体。培育后,则对细胞进行洗涤并且在LSRII(BD公司)流式细胞仪上通过流式细胞术进行评估。还使用BioLegendLEGENDScreen™抗体组对收集的CD45⁺CD33⁺细胞进行表征。

[0178] 这种无偏见的免疫表型分型方法表明,第9天CD45⁺细胞主要表达与单核细胞群(例如,CD14)相关的早期骨髓标志物(例如,CD33)并且大部分不含淋巴样谱系细胞(例如,CD3和CD20)(图1B)。另外,第9天的CD45⁺细胞表达若干种免疫调节表面蛋白(例如,PD-L1、CD112、Siglec9)并且具有降低水平的II类MHC细胞表面受体HLADR和共刺激分子CD80(图1C)。第9天CD45⁺CD33⁺细胞的表面标志物曲线与健康个体中天然存在但很少发现的免疫调节单核细胞髓源性抑制细胞(M-MDSC)有显著的相似性,两者的特征均在于CD33⁺CD14⁺,并且另外与CD11b⁺、CD66⁻和/或HLADR^{low}具有显著的相似性。鉴于这些相似性,使用本文概述的多天过程制造的CD45⁺细胞被称为iMDSC。

[0179] 如图1D进一步所示,通过多天过程从iCD34细胞衍生的CD45⁺CD33⁺细胞高度富集骨髓标志物(纯度>90%)并且基本上不含粒细胞(CD45⁺CD33⁺CD66b⁺)、红细胞(CD45⁺CD235⁺)和淋巴样细胞(CD45⁺CD7⁺)。还应注意,这种iMDSC群明显偏向特定的细胞亚型,即单核细胞MDSC(M-iMDSC;CD45⁺CD33⁺CD14⁺),其中所述群的一半以上是M-iMDSC。这与从原代CD34⁺细胞(分离自PBMC)中分化的MDSC形成对比,其中获得的MDSC群包括最多20%富集的CD33/CD14细胞(Casacuberta-Serra等人,2017年),从而表明单核细胞MDSC的百分比甚至更低。

[0180] 另外,在同一参考研究中,与从原代CD34⁺细胞衍生的MDSC群中的仅20% iMDSC相比,本文所获得的超过50%的iMDSC表达了升高水平的PD-L1。PD-L1,也称为B7-H1,是属于T细胞共抑制分子B7家族的强效跨膜免疫检查点蛋白。在癌症免疫疗法中已经描述了PD-L1在阻断T细胞活化和增殖方面的作用。更具体地,PD-L1能够通过T细胞上的共刺激分子(例如,B7-1和/或B7-2)竞争并且通过PD1在T细胞上的直接接合来预防T细胞活化。因此,PD-L1能够以细胞接触依赖性方式对T细胞活化进行调节。PD-L1与其受体PD-1的结合抑制了T细胞活化、减少了增殖和细胞毒性并且诱导了细胞凋亡。因此,包括增加的数量和比率的表达PD-L1的细胞亚群的iMDSC群因其在以下实例中进一步描述的增强的免疫调节特性而令人期待。

[0181] 本文提供的用于制备具有增强的免疫调节特性的iPSC衍生的MDSC的方法也被证明是稳健且可扩展的,从而实现了针对1个iPSC产生1,000多个iMDSC(图1E)。为了优化iMDSC的选择性分化和扩增,在接种iCD34后第12天,收集细胞并且重新平板接种并且在骨

髓分化培养基中再生长3天。如图1F所示,分化过程中的这种延长导致单核细胞MDSC(具有表型CD45⁺、CD33⁺和CD14⁺)亚群从约9天过程中的50%以上显著增加到约15天经延长过程中的90%以上,其中最大的扩增出现在接种iCD34细胞后12天左右。利用这种延长的分化过程,在第10+15天,一些单核细胞MDSC也表达巨噬细胞的早期标志物(如CD206)和树突状细胞的早期标志物(如CD11c)。因此,预计在不改变培养基的细胞因子组成的情况下,将单核细胞MDSC的培养延长到在iCD34接种后第15天之后可能产生更成熟的巨噬细胞,所述更成熟的巨噬细胞进一步通过例如CD163、CD86和/或CD68表达来表征。类似地,在第10+15天的分化培养基中加入增加浓度的IL4预计将会促进单核细胞MDSC向树突状细胞分化。

[0182] 结果还表明,不含IL6的细胞因子混合物有利于iMDSC在培养条件下(如StemPro-34)的扩增。使用本申请的组合物和方法从iPSC中分化和扩增iMDSC不需要饲养细胞。当使用了饲养细胞时,饲养细胞可以包含内皮细胞、基质细胞(例如,上皮细胞或成纤维细胞)或白血病细胞。饲养细胞的具体实例包含但不限于OP9或K562或其工程化变体。

[0183] 实例2—iMDSC与HLA匹配无关地强效抑制了T细胞增殖和效应子功能

[0184] 为了评估iMDSC的功能,将来自5个独立供体中的每一个的 5×10^4 个先前冷冻且储存的聚蔗糖分离的PBMC静置整夜、用Cell Trace Violet(加利福尼亚州卡尔斯巴德的英杰公司(Invitrogen, Carlsbad, CA))标记并且以1:2的比率用抗CD3/28珠粒(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))活化。在96孔U形底平板中在完全RPMI培养基中以1:1、1:2或1:4的比率将iMDSC与活化的PBMC共培养。五天后,收获共培养物,并且通过流式细胞术对T细胞扩增进行量化。洗涤PBMC/iMDSC共培养物、用Live/Dead固定式近红外活力染料(亿生物科技公司(eBioscience))染色以排除死细胞、在冰上FC阻断(加利福尼亚州圣地亚哥的BD生物科学公司(BD Biosciences, San Diego, Ca))约30分钟并且在冰上用荧光共轭抗体(加利福尼亚州圣地亚哥的BD生物科学格式和百进生技公司(Biolegend))表面染色约30分钟至CD3(UCHT1)、CD14(M5E2)、CD8 α (RPA-T8)和CD4(RPA-T4)。T细胞被鉴定为活力染料CD3⁺CD14⁻和CD8 α ⁺或CD4⁺。染色后,将细胞洗涤三次并且在LSR-Fortessa(BD生物科学公司)上获取并且用FlowJo v10(俄勒冈州阿什兰的Treestar公司(Treestar, Ashland, OR))进行分析。使用AccuCount荧光珠粒(伊利诺伊州森林湖的Spherotech公司(Spherotech, Lake Forest, IL))确定相对T细胞数量。然后,对五个独立供体在iMDSC共培养后的T细胞扩增进行量化,并且这揭示了T细胞扩增与HLA匹配无关地显著且可滴定地减少(图2)。如图2A所示,与iMDSC共培养将T细胞扩增减少高达约75-85%。图2B中示出了使用延长方案(例如, D10+15)分化的iMDSC的T细胞抑制活性。将D10+15iMDSC与用CD3/CD28活化的T细胞共培养。通过流式细胞术对三个独立的T细胞供体在iMDSC共培养后的T细胞扩增进行量化,并且这揭示了T细胞扩增与HLA匹配无关的地显著且可滴定地减少(所有数据均呈现为平均值 \pm SEM;**** $p < 0.0001$ 、*** $p < 0.001$ 并且** $p < 0.01$)。这些结果表明,iMDSC群中单核细胞MDSC的数量和比例的增加与MDSC抑制T细胞的能力的增强有关。

[0185] 进一步地,为了评估iMDSC的T细胞抑制活性,将D10 iHE后9天或15天获得的iMDSC与用CD3/CD28活化的T细胞共培养。如上所示,与使用D10+9方案分化的iMDSC相比,使用D10+5方案延长iMDSC的分化显著增强了iMDSC的T细胞抑制活性(参见图2C;所有数据均呈现为平均值 \pm SEM;**** $p < 0.0001$ 并且** $p < 0.01$)。

[0186] 为了评估iMDSC影响T细胞效应子功能的能力,研究了iMDSC共培养的T细胞中的细

胞因子产生简况。为了进行细胞内细胞因子染色,在与iMDSC共培养5天后,在布雷菲德菌素A(GolgiPlug,BD生物科学公司)和PE缀合的抗CD107a(H4A3,BD生物科学公司)抗体的存在下,用PMA/离子霉素(亿生物科技公司)将活化的PBMC再活化4小时。刺激后,洗涤PBMC共培养物、用活力染料染色、进行Fc阻断并且在冰上进行CD3、CD4和CD8a表面染色30分钟。表面染色后,洗涤PBMC、用Cytotfix/Cytoperm(BD生物科学公司)固定/透化并且重悬于1x PermWash(BD生物科学公司)中。用针对IFN γ (4S.B3)、TNF(Mab11)和IL2(MQ1-17H12)的抗体(百进生技公司)在冰上鉴定细胞因子产生30分钟。然后用1x PermWash洗涤PBMC共培养物、在LSR-Fortessa上获取并且用FlowJo v10进行分析。将未刺激的PBMC用作对照物,以鉴定通过共培养的T细胞产生的特定细胞因子。

[0187] 为了确定iMDSC是否抑制T细胞效应子功能,如通过细胞因子分泌和脱粒证实的,用佛波醇乙酯和离子霉素再刺激五天珠粒活化的PBMC和iMDSC共培养物;并且通过流式细胞术评估细胞内细胞因子的产生和脱粒。当与iMDSC共培养时,CD4⁺和CD8⁺T细胞在其迅速产生IFN γ 、TNF、IL2并表达CD107a的能力上均出现缺陷,从而表明iMDSC除了抑制T细胞增殖外还抑制了T细胞效应子功能(图3A)。此外,与iMDSC共培养的T细胞产生多种效应子功能(3或4种功能)的能力较弱并且大多限于一种或两种功能(图3B),从而表明尽管进行了T细胞刺激和再刺激,但与iMDSC的共培养抑制了T细胞效应子功能。

[0188] 实例3—iMDSC减弱了移植物抗宿主病(GvHD)

[0189] 为了评估iMDSC在体内减弱GvHD、自身免疫性疾病或炎性适应症的能力,使用了异种急性GvHD小鼠模型。所有动物实验根据内部机构动物保护和使用委员会(internal Institutional Animal Care and Use Committee)批准和进行。用2Gy对NSG小鼠(JAX#005557)进行亚致死地照射,并且一天后静脉注射 7.5×10^6 个经过整夜静置的PBMC。连同注射的PBMC,一半的小鼠还接受了 2.5×10^6 个iMDSC。对动物的临床GvHD的症状进行了长达50天的评分,并且在同一阶段期间还监测了动物的体重和存活率。在治疗后第14天,收集外周血,裂解红细胞并且用针对mCD45(30-F11)、hCD45(2D1)、hCD3、hCD4、hCD25(M-A251)和hCD127(A019D5)的荧光共轭抗体(BD生物科学公司和百进生技公司)染色以对嵌合体(hCD45⁺mCD45⁻)和调节性T细胞(hCD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{lo})的水平进行量化。

[0190] 临床GvHD体征和症状包含:腹泻、不活动、驼背、皮毛皱褶、眼部病变、鼻部肿胀/皮肤完整。监测体重作为与疾病进程相关的独立参数。如通过GvHD得分测量的,图4A示出了单次iMDSC输注显著减弱了疾病的严重程度。进一步地,使用疾病末期(体重损失>25%)作为终止标准生成卡普兰-迈耶存活曲线。通过iMDSC输注减弱疾病还使存活期延长,因此这表明在疾病的体内环境中,iMDSC是T细胞的强效抑制剂(图4B)。另外,观察到,iMDSC导致人CD45⁺扩增在第14天显著减少,其中外周血中Treg(CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo})增加(图4C)。

[0191] 实例4—iMDSC衍生自基因工程化iPSC

[0192] 使用本申请中提供的方法和组合物,将克隆的iPSC工程化以过表达PDL1,并且分化为过表达引入的PDL1的iCD34细胞。使用本文提供的方案将经过修饰的iCD34细胞分化为iMDSC,而没有破坏细胞发育生物学的证据,并且所得iMDSC也过表达PDL1(iMDSC-PDL1)。将iMDSC(无PDL1修饰)和iMDSC-PDL1与用CD3/CD28活化的T细胞共培养,并且通过流式细胞术评估T细胞扩增。结果表明,PDL1的过表达未对iMDSC的体外T细胞抑制活性产生负面影响。与iMDSC相比,在如上所述的GvHD异种模型中的iMDSC-PDL1试验在体内证实了iMDSC-PDL1

的疗效。基于对关于过表达PDL1的MDSC的早期发现(参见例如,Clements等人,2018《白细胞生物学杂志(J Leukoc Biol)》),预计iMDSC的体内抑制活性由于经过修饰的细胞的PDL1表达的增加而增加。

[0193] 并入本申请的衍生iMDSC中的另外的遗传修饰与细胞的免疫逃避有关。在一些实施例中,iPSC先被工程化为包括B2M null、HLA-E、HLA-G、PDL1、A_{2A}R、CD47、LAG3 null、TIM3 null、TAP1 null、TAP2 null、TAP相关糖蛋白null、NLRC5 null、PD1 null、RFKANK null、CITTA null、RFX5 null和RFXAP null中的一个或多个。从所述工程化iPSC分化的包含iMDSC在内的衍生造血细胞包括与iPSC相同的涉及I类和/或II类HLA的工程化模式。具有经过修饰的I类和/或II类HLA的这些细胞对免疫检测具有增加的抗性并且因此呈现出经过改善的体内持久性。此外,此类细胞可以避免在过继细胞疗法中需要HLA匹配并由此提供通用的现成的治疗方案源。作为实例,使用延长的分化和扩增方案,将在具有/不具有过表达HLA-G的B2M表达方面有缺陷的iCD34⁺细胞和iCD34⁺细胞分化为iMDSC。将iMDSC(对照物)、在B2M表达方面有缺陷的iMDSC(B2M KO)和在B2M表达和过表达HLA-G方面有缺陷的iMDSC(HLA-G B2M KO)与用CD3/CD28活化的T细胞共培养,并且通过流式细胞术评估T细胞扩增。结果表明,仅B2M缺陷或B2M缺陷与HLA-G过表达一起并未降低iMDSC的T细胞抑制活性。这表明通过消除I类HLA表达并且表达免疫调节蛋白HLA-G来减弱iMDSC的免疫原性是增强iMDSC的持久性而不损害细胞的免疫调节活性的可行策略。与iMDSC相比,在GvHD异种模型中进一步证实了为免疫逃避而工程化的iMDSC的持久性。

[0194] 本领域的技术人员将会容易了解到,本文描述的方法、组合物和产品代表例性实施例,而不旨在作为对本发明的范围的限制。对于本领域技术人员而言将显而易见的是,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下对本文公开的本发明公开内容作出不同的取代和修改。

[0195] 本说明书中所提及的所有专利和出版物指示本公开所属领域的技术人员的水平。所有专利和出版物以相同的程度通过引用的方式并入本文,其程度如同明确且单独地指出各个单独的出版物通过引用的方式并入。

[0196] 可以在本文未明确公开的任一个或多个要素、一个或多个限制不存在的情况下实践本文中适当地说明性地描述的本公开。因此,例如,在本文的每种情况下,术语“包括”,“基本上由……组成”和“由……组成”中的任何一个可以用另外两个术语中的任一个替换。已经采用的术语和表达被用作说明的术语而不是限制性术语,并且不旨在使用此类术语和表达而将其示出或描述的特征的任何等同物或其一部分排除在外,但是将认识到,在要求保护的本公开的范围之内的各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管已经通过优选实施例和任选的特征明确地公开了本公开,但是本文公开的概念的修改和改变可以由本领域技术人员采取,并且此类修改或改变被视为在由所附权利要求书限定的本发明的范围之内。

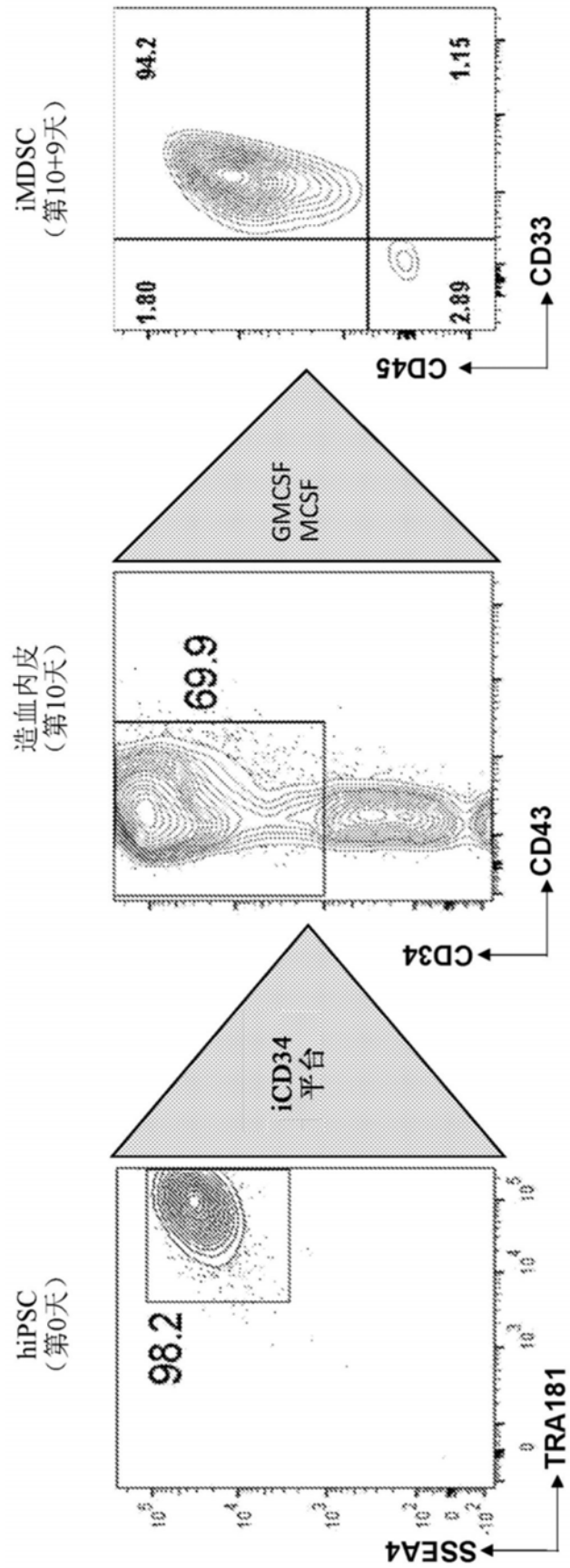


图1A

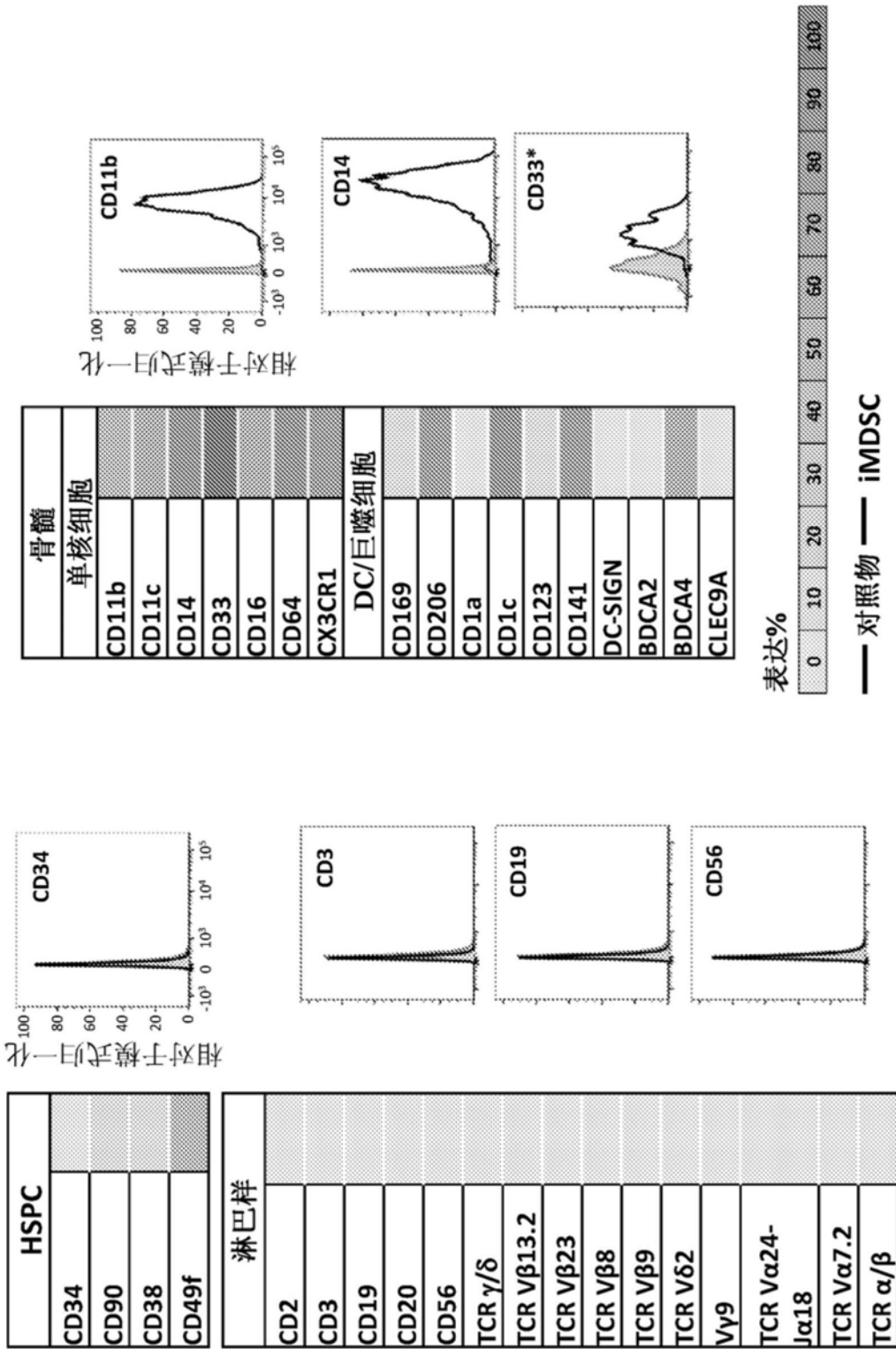


图1B

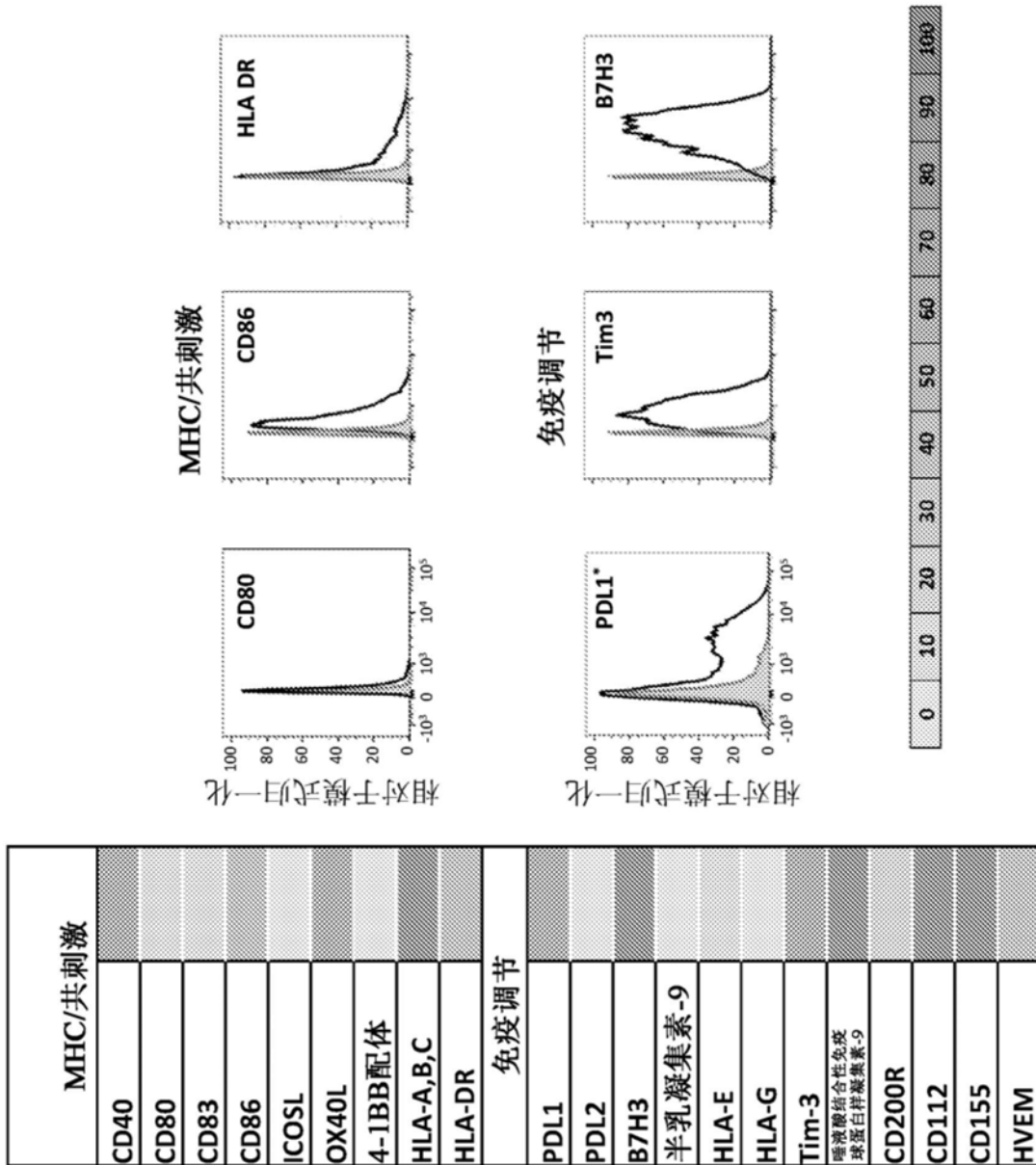


图1C

	MDSC (非粘附细胞% ± SEM)
CD45 ⁺	95.15 ± 1.57
CD45 ⁺ CD33 ⁺	93.75 ± 1.77
单核细胞MDSC (CD45 ⁺ CD33 ⁺ CD14 ⁺)	52.8 ± 8.93
PDL1表达 (CD45 ⁺ PDL1 ⁺)	56.66 ± 9.297
粒细胞 (CD45 ⁺ CD33 ⁺ CD66b ⁺)	3.833 ± 2.19
红细胞 (CD45 ⁻ CD235 ⁺)	0.084 ± 0.05
淋巴细胞 (CD45 ⁺ CD7 ⁺)	0.015 ± 0.01

图1D

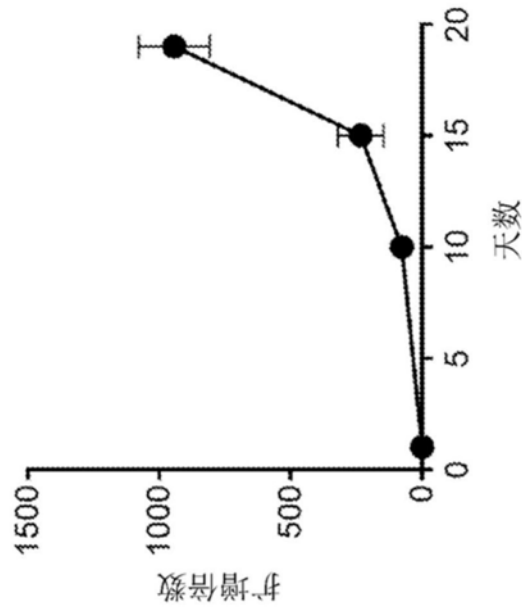


图1E

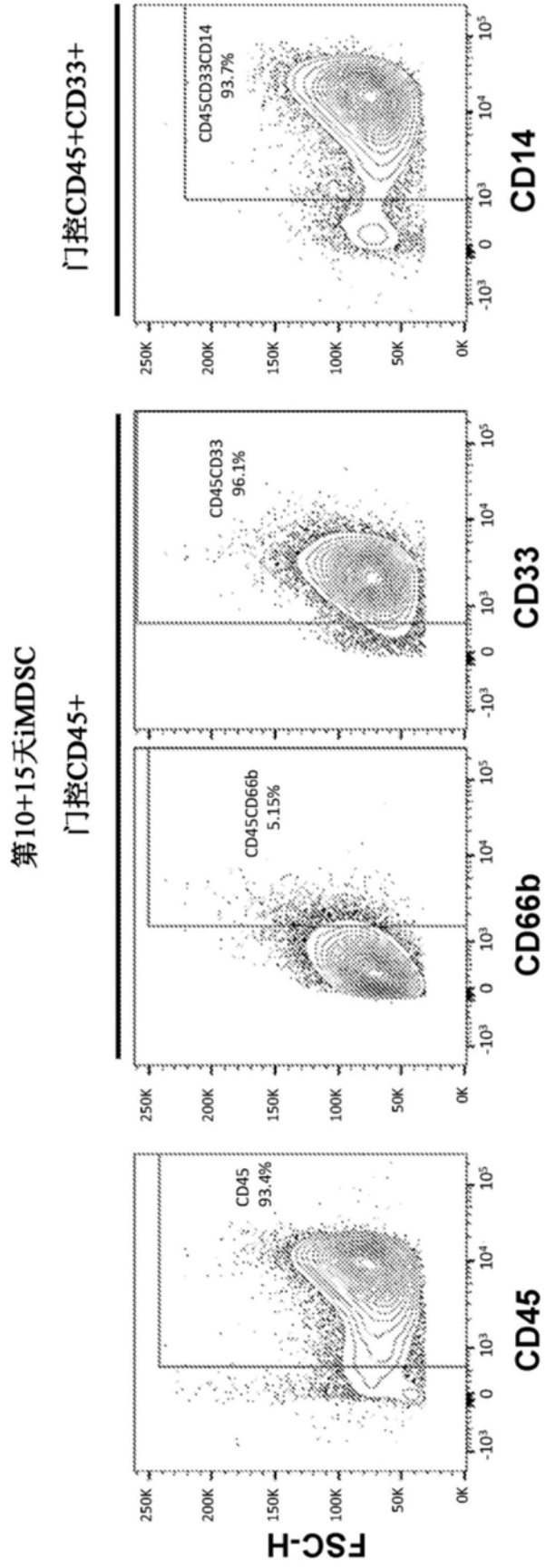


图1F

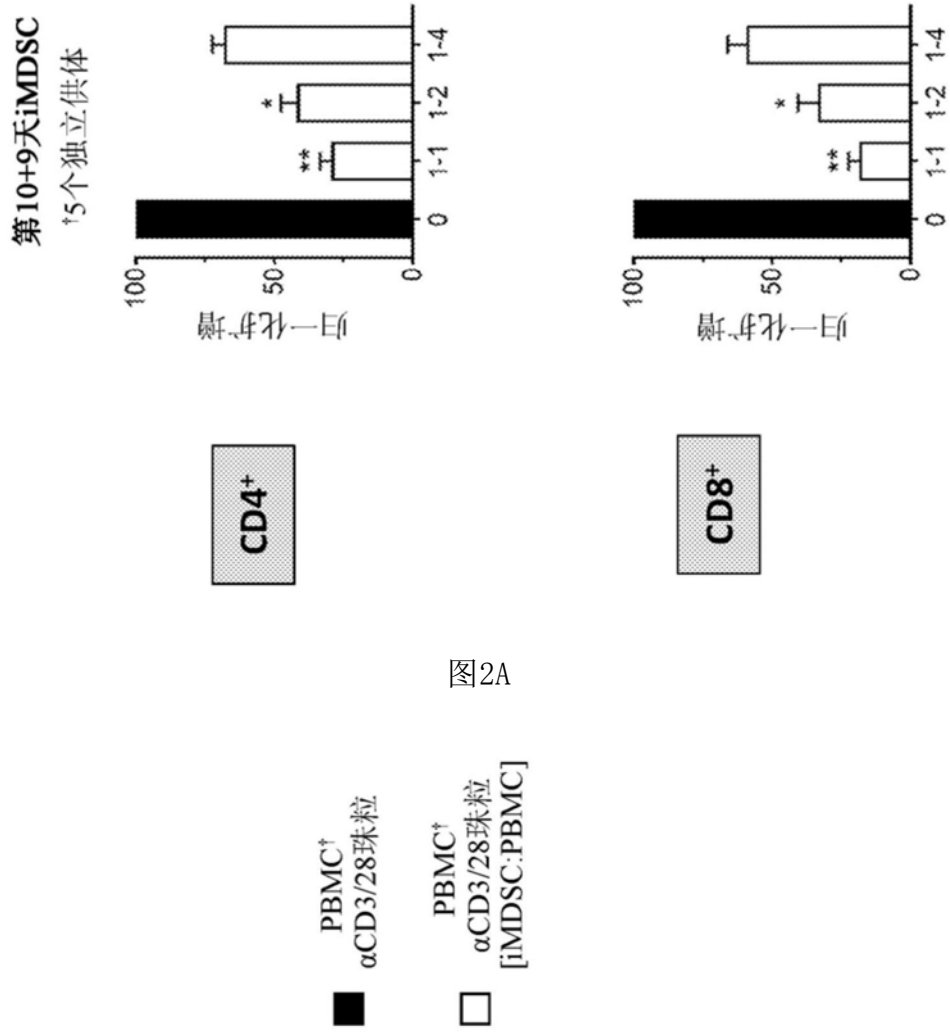


图2A

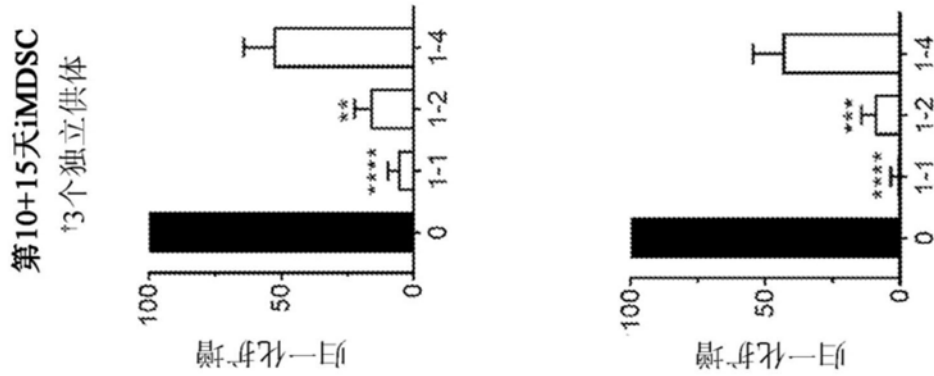


图2B

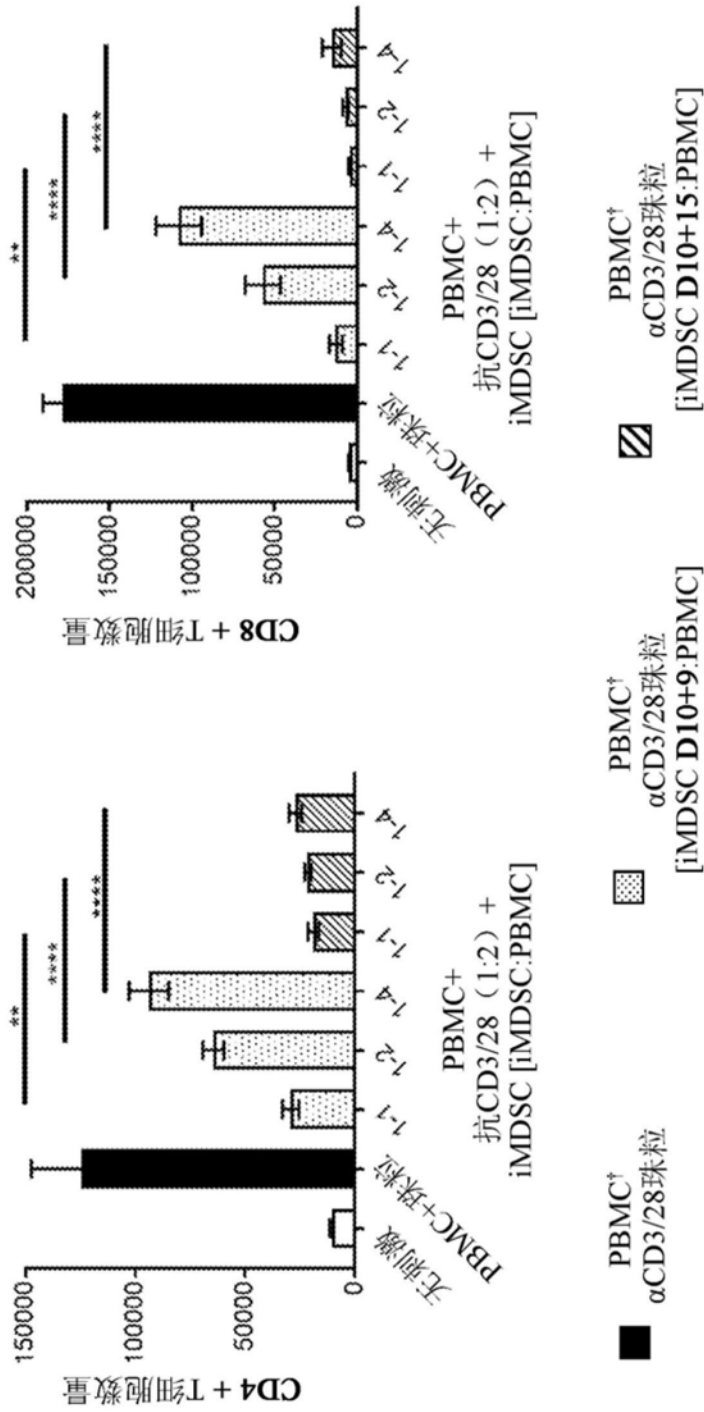


图2C

+/- SEM; **** p < 0.0001; ** p < 0.01

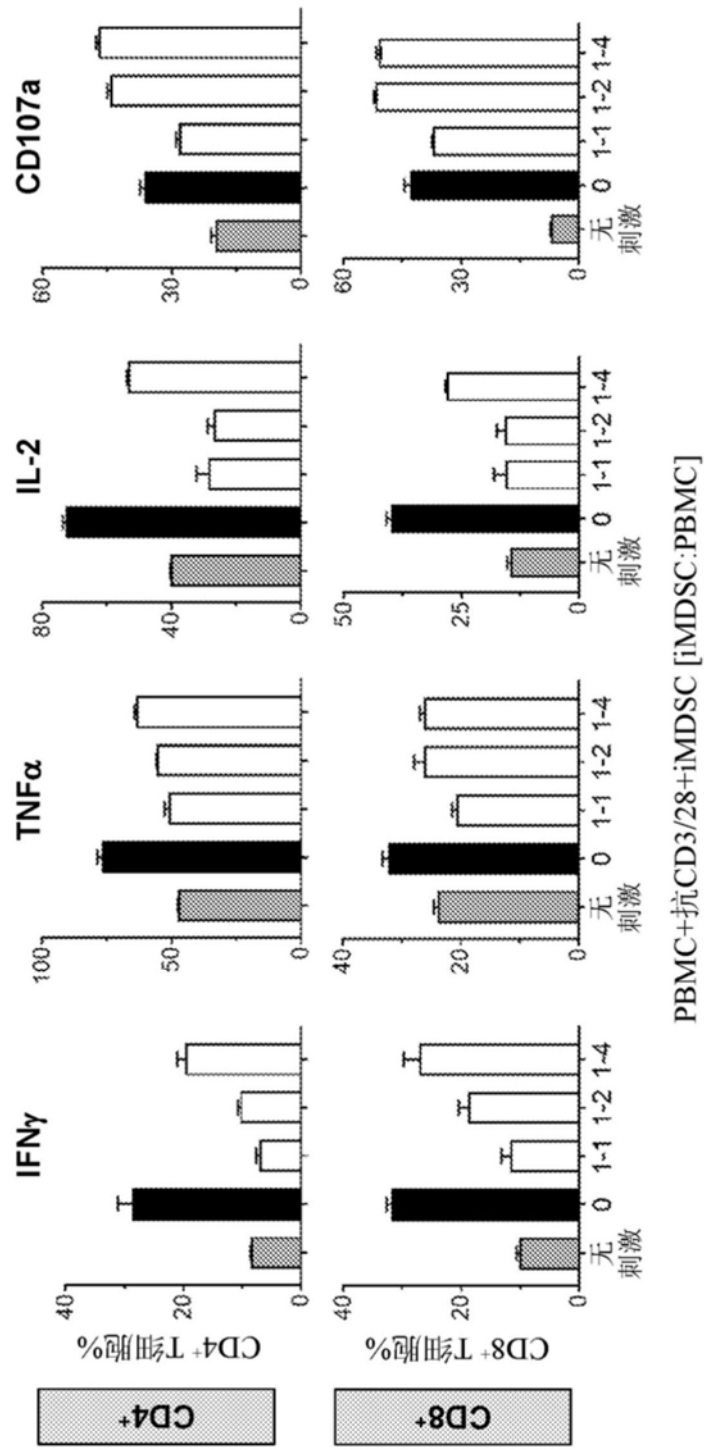


图3A

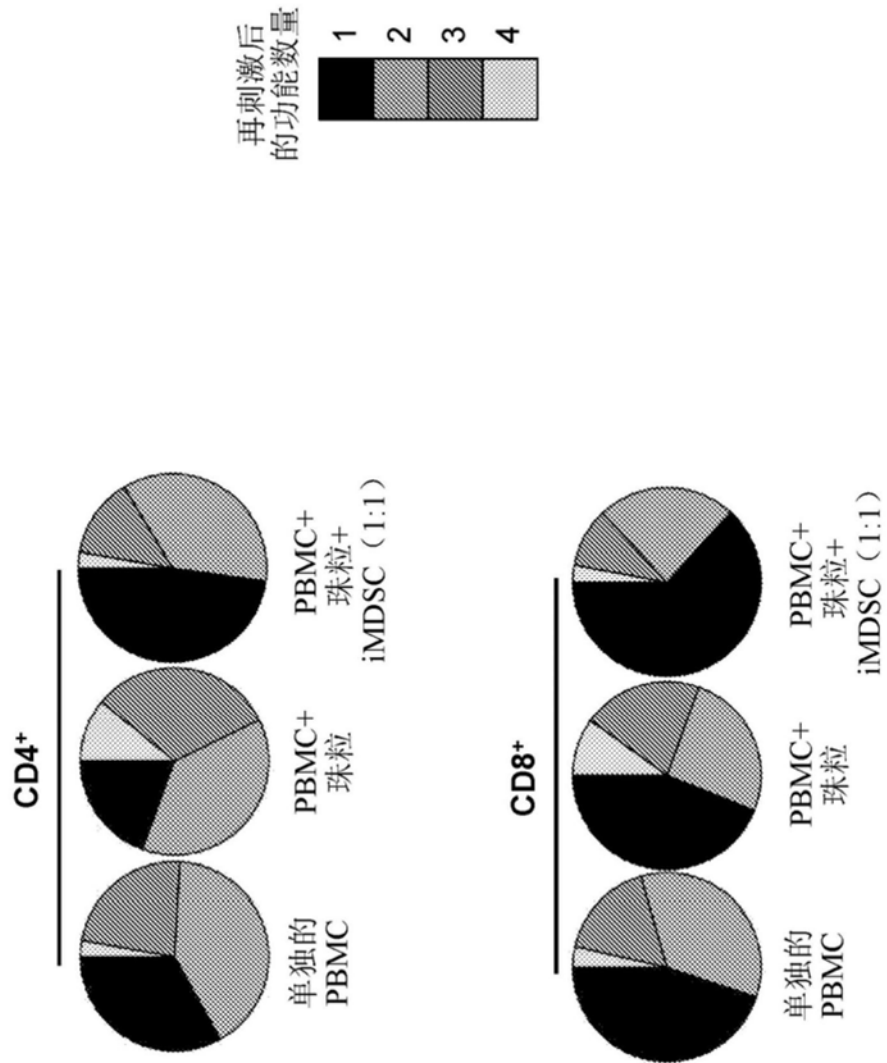


图3B

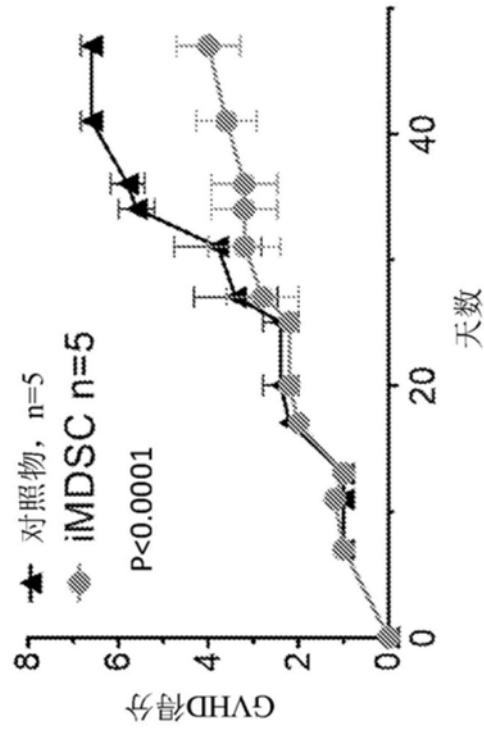


图4A

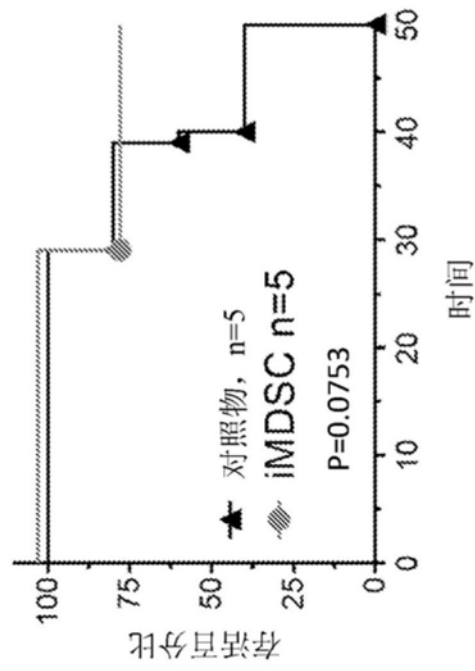


图4B

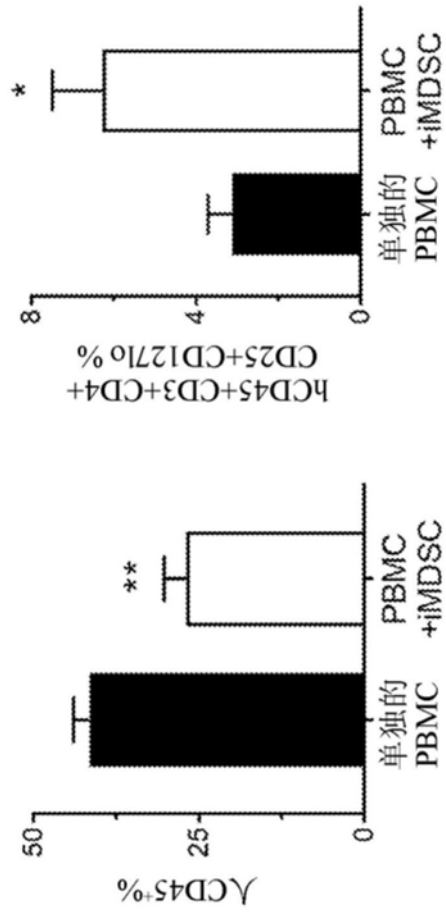


图4C