



(10) 授权公告号 CN 111032850 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 13

(21) 申请号 201880042830.7

(22) 申请日 2018.04.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111032850 A

(43) 申请公布日 2020.04.17

(30) 优先权数据
62/491,245 2017.04.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2018/000507 2018.04.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/197949 EN 2018.11.01

(73) 专利权人 朱诺治疗学有限公司
地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 T·施密特 C·斯坦伯格
T·科夫斯基 K·普伦蒂斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2016166568 A1,2016.10.20
WO 2013124474 A2,2013.08.29
WO 2015158868 A2,2015.10.22
LOTHAR GERMEROTH,IBA T-CATCH cell
isolation in pipette tips.《[http://
businessdocbox.com/Biotech_and_
Biomedical/81283978-Corporate-tutorial-
iba-t-catch-cell-isolation-in-pipette-
tips-isct-paris-lothar-germeroth.html](http://businessdocbox.com/Biotech_and_Biomedical/81283978-Corporate-tutorial-iba-t-catch-cell-isolation-in-pipette-tips-isct-paris-lothar-germeroth.html)》
.2014,

审查员 陈云华

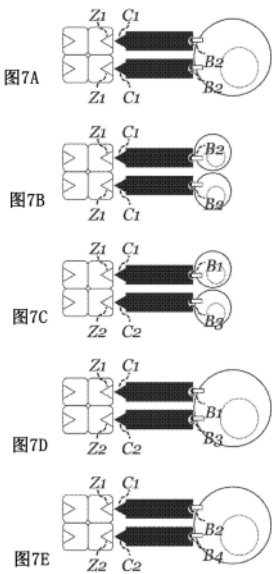
权利要求书6页 说明书153页
序列表53页 附图16页

(54) 发明名称

寡聚粒子试剂及其使用方法

(57) 摘要

本文提供寡聚试剂,包括链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚试剂、及其组合物、及制造寡聚试剂的方法,包括可靠地制造具有所需尺寸的寡聚粒子试剂的方法。在一些情况下,该试剂为含有多个针对剂的结合位点的寡聚粒子试剂,且因此该一种或多种剂是通过可逆地结合至该寡聚粒子试剂而多聚化,例如由此产生多聚化寡聚粒子试剂,其具有在其上多聚化的刺激剂。还提供使用该寡聚试剂进行孵育或培养的方法,例如以诱导刺激细胞(诸如淋巴细胞群体)的组合物扩增(增殖)、活化、共刺激和/或存活。在一些方面中,本发明提供刺激例如细胞群体的扩增(增殖)、存活或续存、活化、共刺激或其他效应的方法及试剂,其涉及将剂结合至细胞表面上的分子,由此向该细胞提供一种或多种信号。



1. 一种多聚化寡聚粒子试剂,其为可溶形式,且其包含(i)具有2000个与4000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子四聚体的寡聚体,其中所述寡聚体的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子被杂双官能团交联剂交联,和(ii)一个或多个结合剂,每个所述结合剂包含结合伴侣和受体结合剂,所述结合伴侣结合至所述寡聚体的所述链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的结合位点,所述受体结合剂结合至表达于分离的靶细胞的表面上的受体,其中所述链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素的位置的位置44至47的序列位置处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

2. 如权利要求1所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述链霉亲和素突变蛋白分子可逆地结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。

3. 如权利要求1所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述链霉亲和素突变蛋白分子包含:SEQ ID NO:3-6、27、28和60中的任一者中所示的氨基酸序列。

4. 如权利要求1所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述链霉亲和素突变蛋白分子包含SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂包含如下所述的半径:分别含上下限值的75nm与125nm之间、80nm与115nm之间、或90nm与110nm之间。

6. 如权利要求5所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该半径为流体动力半径。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述寡聚体包含如下分子量: 5×10^7 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、 1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、或 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间。

8. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述寡聚体具有2,000与3,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

9. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述寡聚体具有2,000与2,500个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

10. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述寡聚体的小于20%、10%、5%或1%的赖氨酸残基包含N-取代的亚氨基硫杂环戊烷。

11. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该杂双官能团交联剂为胺-至-巯基交联剂。

12. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中每个结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

13. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中每个结合伴侣可逆地结合至所述寡聚体的所述链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的结合位点。

14. 如权利要求12的多聚化寡聚粒子试剂,其中每个链霉亲和素结合肽选自如SED ID NO:7、8、15-19中所示的氨基酸序列。

15. 如权利要求12-14中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该一种或多种结合剂分别包含抗体或其抗原结合片段。

16. 如权利要求12-14中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该一种或多种结合剂各自包含单价抗体片段。

17. 如权利要求12-14中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该一种或多种结合剂各自包含Fab。

18. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂为刺激剂,其中该受体结合剂的结合诱导该分离的靶细胞中的信号。

19. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该分离的靶细胞为免疫细胞。

20. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该分离的靶细胞为T细胞。

21. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂的结合起始TCR/CD3复合物相关的信号。

22. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂结合至TCR/CD3复合物的成员。

23. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂特异性结合CD3。

24. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂为第一受体结合剂且所述一个或多个结合剂包含第二受体结合剂,其中该第二受体结合剂特异性结合至该分离的靶细胞表面上的第二分子。

25. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、或趋化因子受体,或者包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

26. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述第二受体结合剂特异性结合共刺激分子。

27. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述第二分子为CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo- /Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。

28. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该第二分子为CD28。

29. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该第一受体结合剂包含抗CD3抗体或抗体片段,且该第二受体结合剂包含抗CD28抗体或抗体片段。

30. 如权利要求24所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该第一受体结合剂包含抗CD3 Fab,且该第二受体结合剂包含抗CD28 Fab。

31. 如权利要求1-4中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、或趋化因子受体,或者包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

32. 如权利要求12-14中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该一种或多种结合剂包含选择剂,其中该选择剂结合至表达于分离的靶细胞表面上的选择标记物。

33. 如权利要求32所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该分离的靶细胞为免疫细胞。

34. 如权利要求32所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该分离的靶细胞为T细胞。

35. 如权利要求32所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中该选择标记物为CCR7、CD3、CD4、

CD8、CD25、CD28、CD27、CD45RA、CD45RO、CD62L或CD127。

36. 一种组合物,其包含多个如权利要求1-35中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂,其中所述多个多聚化寡聚粒子试剂包含多个所述链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚体。

37. 如权利要求36的组合物,其中该多个寡聚体包含i) 大于70nm的平均半径;

ii) 至少 1×10^8 g/mol的平均分子量;iii) 链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均数量为至少2,000个;和/或iv) 如下所述的半径尺寸分布:

其中该多个寡聚体中的至少95%包含10nm至150nm之间的半径。

38. 如权利要求36所述的组合物,其中所述多个寡聚体包含如下所述的平均半径:75nm与125nm之间、80nm与110nm之间、或90nm与110nm之间,分别包含上下限值。

39. 如权利要求36所述的组合物,其中所述多个寡聚体包含如下所述的平均半径:90nm $\pm$ 15nm, 95nm $\pm$ 20-25nm或97 $\pm$ 10nm。

40. 如权利要求36所述的组合物,其中该多个寡聚体的至少95%包含在70nm

与140nm之间、80nm与120nm之间、80nm与115nm之间、80nm与100

nm之间、90nm与110nm之间、或100nm与120nm之间的半径。

41. 如权利要求36所述的组合物,其中该多个寡聚体的至少95%包含该多个寡聚粒子试剂的平均半径的 $\pm 50\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 或 $\pm 5\%$ 之间的半径。

42. 如权利要求36所述的组合物,其中该多个寡聚体包含在80nm与115nm之间的平均半径,且其中所述寡聚体的至少95%包含该平均半径的 $\pm 25\%$ 之间的半径。

43. 如权利要求36所述的组合物,其中该多个寡聚体包含这样的平均分子量:

1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间,或 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间,分别含上下限值。

44. 如权利要求36所述的组合物,其中所述多个寡聚体包含如下所述的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量:2,000与3,500个之间、或2,000与3,000个之间,分别包含上下限值。

45. 如权利要求36所述的组合物,其中当在大约或低于 -80°C 、大约或低于 -20°C 或大约或低于 4°C 下储存至少1周时,该多个寡聚体的平均半径不增加超过25%或10%。

46. 一种将一种或多种结合剂多聚化至寡聚粒子试剂的方法,该方法包含在将一种或多种结合剂可逆地结合至该寡聚粒子试剂的条件下,将所述的寡聚粒子试剂与该一种或多种结合剂混合,从而产生如权利要求1-35中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂或如权利要求36-45中任一项所述的组合物。

47. 如权利要求46所述的方法,其中该一种或多种结合剂各自包含结合伴侣,其中每个结合伴侣结合至该寡聚体上的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子上的结合位点。

48. 如权利要求47所述的方法,其中每个结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

49. 如权利要求48所述的方法,其中每个结合伴侣包含选自SEQ ID NO:7、8、15-19的氨基酸序列。

50. 如权利要求46-49中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含抗体或其抗体片段。

51. 如权利要求46-49中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含单价抗体片段。

52. 如权利要求46-49中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含Fab。
53. 如权利要求46-49中任一项所述的方法,其中该一种或多种结合剂包含结合至表达于分离的靶细胞表面上的受体的受体结合剂。
54. 如权利要求53的方法,其中该受体结合剂为刺激剂,其中该受体结合剂的结合会诱导该分离的靶细胞中的信号。
55. 如权利要求53所述的方法,其中该分离的靶细胞为免疫细胞。
56. 如权利要求53所述的方法,其中该分离的靶细胞为T细胞。
57. 如权利要求53所述的方法,其中该受体结合剂的结合起始TCR/CD3复合物相关的信号。
58. 如权利要求53所述的方法,其中该受体结合剂结合至TCR/CD3复合物的成员。
59. 如权利要求53所述的方法,其中该受体结合剂特异性结合至CD3。
60. 如权利要求53所述的方法,其中该受体结合剂为第一受体结合剂,且该一个或多个结合剂包含第二受体结合剂,其中该第二受体结合剂特异性结合至该分离的靶细胞表面上的第二分子,其中该结合至该第二分子诱导该分离的靶细胞中的第二信号。
61. 如权利要求60所述的方法,其中该第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、或趋化因子受体,或者包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。
62. 如权利要求60所述的方法,其中所述第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子。
63. 如权利要求60所述的方法,其中所述第二分子为CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。
64. 如权利要求60所述的方法,其中该第二分子为CD28。
65. 如权利要求60所述的方法,其中该第一受体结合剂包含抗CD3抗体或抗体片段,且该第二受体结合剂包含抗CD28抗体或抗体片段。
66. 如权利要求60所述的方法,其中该第一受体结合剂包含抗CD3 Fab,且该第二受体结合剂包含抗CD28 Fab。
67. 如权利要求53所述的方法,其中该受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、或趋化因子受体,或者包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。
68. 如权利要求46-49中任一项所述的方法,其中该一种或多种结合剂包含选择剂,其中该选择剂结合至表达于分离的靶细胞表面上的选择标记物。
69. 如权利要求68所述的方法,其中该分离的靶细胞为免疫细胞。
70. 如权利要求68所述的方法,其中该分离的靶细胞为T细胞。
71. 如权利要求68所述的方法,其中该选择标记物为CCR7、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD27、CD45RA、CD45RO、CD62L或CD127。
72. 一种多聚化寡聚粒子试剂,其通过如权利要求46-71中任一项的方法产生。
73. 一种组合物,其包含多个通过如权利要求46-71中任一项所述的方法产生的多聚化寡聚粒子试剂。
74. 一种制品,其包含权利要求1-35和72中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂、或如权利要求36-45和73中任一项所述的包含多个多聚化寡聚粒子试剂的组合物。

75. 一种调节细胞的方法,该方法包含在权利要求1-35和72中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂或如权利要求36-45和73中任一项所述的包含多个多聚化寡聚粒子试剂的组合物的存在下,孵育包含分离的靶细胞的细胞组合物,由此调节该分离的靶细胞。

76. 如权利要求75所述的方法,其中调节该分离的靶细胞包括活化或扩增该分离的靶细胞。

77. 一种培养细胞的方法,该方法包含在权利要求1-35和72中任一项所述的多聚化寡聚粒子试剂或如权利要求36-45和73中任一项所述的包含多个多聚化寡聚粒子试剂的组合物的存在下,孵育包含分离的靶细胞的细胞组合物。

78. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该多聚化寡聚粒子试剂包含一个或多个结合剂,每个结合剂包含结合伴侣,其中每个结合伴侣可逆地结合于所述寡聚体的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的结合位点。

79. 如权利要求78所述的方法,其中每个结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

80. 如权利要求79所述的方法,其中每个链霉亲和素结合肽选自如SED ID NO:7、8和15-19所示的氨基酸序列。

81. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含抗体或其抗原结合片段。

82. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含单价抗体片段。

83. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该一个或多个结合剂各自包含Fab。

84. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该分离的靶细胞为免疫细胞。

85. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中该分离的靶细胞为T细胞。

86. 如权利要求75-77中任一项所述的方法,其中所述一个或多个结合剂包含结合至表达在分离的靶细胞表面上的受体的受体结合剂。

87. 如权利要求86所述的方法,其中该受体结合剂为刺激剂,其中该受体结合剂的结合诱导该分离的靶细胞中的信号。

88. 如权利要求86所述的方法,其中该受体结合剂的结合起始TCR/CD3复合物相关的信号。

89. 如权利要求86所述的方法,其中该受体结合剂结合至TCR/CD3复合物的成员。

90. 如权利要求88所述的方法,其中该受体结合剂特异性结合至CD3。

91. 如权利要求88所述的方法,其中该受体结合剂为第一受体结合剂,且一个或多个结合剂包含第二受体结合剂,其中该第二受体结合剂特异性结合至该分离的靶细胞表面上的第二分子,其中结合至该第二分子诱导该分离的靶细胞中的第二信号。

92. 如权利要求91所述的方法,其中该第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、或趋化因子受体,或者包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

93. 如权利要求91所述的方法,其中该第二分子为CD28。

94. 如权利要求91所述的方法,其中第一受体结合剂包含抗CD3抗体或抗体片段,且该第二受体结合剂包含抗CD28抗体或抗体片段。

95. 如权利要求91所述的方法,其中该第一受体结合剂包含抗CD3 Fab,且该第二受体

结合剂包含抗CD28 Fab。

96. 如权利要求75-77中任一项所述的方法, 其中该分离的靶细胞表达重组受体。

97. 如权利要求96所述的方法, 其中所述重组受体为重组T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。

98. 如权利要求78所述的方法, 其进一步包含破坏该一个或多个结合剂与该寡聚体之间的可逆结合, 所述破坏包括向该分离的靶细胞中引入逆转该一种或多种结合剂与该寡聚体之间的结合或与该一种或多种结合剂与该寡聚体之间的结合竞争的物质。

99. 如权利要求98所述的方法, 其中该物质包含生物素或生物素类似物。

100. 如权利要求98所述的方法, 其中该物质包括脱硫生物素或亚氨基生物素。

101. 如权利要求98所述的方法, 其中该物质包括D-生物素。

寡聚粒子试剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请案要求2017年4月27日提交的名称为“OLIGOMERIC PARTICLE REAGENTS AND METHODS OF USE THEREOF”的美国临时专利申请62/491,245的优先权,其内容以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 序列列表以引用的方式并入

[0004] 本申请与电子格式的序列列表一起提交。序列列表提供为2018年4月25日创建的名称为735042008542SeqList.TXT的文件,其大小为110,426位字节。电子格式的序列列表中的信息以全文引用的方式并入。

技术领域

[0005] 本公开内容提供寡聚试剂,包括链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚试剂,及其组合物以及用于制造寡聚试剂的方法,包括用于可靠地制造具有所需尺寸的寡聚粒子试剂的方法。在一些情况下,试剂为含有多个用于剂的结合位点的寡聚粒子试剂,且因此一种或多种剂(例如一种或多种选择剂或刺激剂)是通过可逆地结合至寡聚粒子试剂而多聚化,例如由此产生刺激剂或选择剂在其上多聚化的多聚化寡聚粒子试剂。本公开内容还提供使用寡聚试剂进行孵育或培养,以诱导刺激细胞(诸如淋巴细胞群体)的组合物扩增(增殖)、活化、共刺激和/或存活的方法。在一些方面中,本公开内容提供用于刺激例如细胞群体的扩增(增殖)、存活或维持、活化、共刺激或其他效应(例如亲和性选择)的方法及试剂,其包含将剂结合至细胞表面上的分子,由此向细胞提供一种或多种信号。

背景技术

[0006] 各种策略可用于体外刺激T细胞群体,包括用于体外扩增抗原特异性T细胞以用于过继性细胞免疫疗法或癌症疗法,其中已显示这类T细胞的输注在携有肿瘤的宿主中具有抗肿瘤反应性或用于治疗病毒感染。需要用于体外扩增细胞群体的改进的策略,包括用于研究、诊断及治疗目的。

发明内容

[0007] 本文提供包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚粒子试剂,其中寡聚粒子试剂的尺寸包含i) 大于25nm的半径,例如流体动力半径,ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii) 每一寡聚粒子试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0008] 在本文中提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子结合至或能够结合至生物素、生物素类似物(例如脱硫生物素、亚氨基生物素)或至链霉亲和素结合肽(例如Strep-tagII (WSHPQFEK, SEQ ID NO:8))。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子可逆地结合至或能够可逆地结合至生物素、生物素类似物或至链霉亲和素结合肽(例如

Strep-tagII (WSHPQFEK, SEQ ID NO:8))。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,其中链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置的位置44至47的序列位置处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

[0009] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子结合至或能够结合至生物素、亲和素、生物素类似物或突变蛋白、亲和素类似物或突变蛋白和/或其生物学活性片段。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子可逆地结合至或能够可逆地结合至生物素、亲和素、生物素类似物或突变蛋白、亲和素类似物或突变蛋白和/或其生物学活性片段。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,其中链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置的位置44至47的序列位置处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

[0010] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,所述链霉亲和素突变蛋白分子包含:a) SEQ ID NO:3-6、27、28、60或61中的任一者中所示的氨基酸序列;b) 与SEQ ID NO:3-6、27、28、60或61中的任一者展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷的氨基酸序列和/或可逆地结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽的氨基酸序列;或与SEQ ID NO:3-6、27、28、60或61中的任一者展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷的氨基酸序列和/或结合至生物素或其生物学活性形式、生物素类似物或突变蛋白或其生物学活性片段或链霉亲和素结合肽的氨基酸序列a) 或b) 的功能片段,该功能片段结合至生物素或其生物学活性形式、生物素类似物或突变蛋白或其生物学活性片段或链霉亲和素结合肽和/或可逆地结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽;或c) a) 或b) 的功能片段,该功能片段结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,其中寡聚粒子试剂包含多个包含SEQ ID NO:6或61中所示的氨基酸序列的链霉亲和素突变蛋白分子。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素中的位置的117、120和/或121位置处进一步包含一个或多个氨基酸置换。

[0011] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中:一个或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹或Phe¹²¹;或一个或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰或Tyr¹²¹中的一个或多个;或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰或Tyr¹²¹。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,该分子包含:a) SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;b) 与SEQ ID NO:28展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰和Tyr¹²¹的氨基酸序列和/或结合至生物素或生物学活性片

段、生物素类似物或突变蛋白或其生物学活性片段或链霉亲和素结合肽;或c) a) 或b) 的功能片段,该功能片段结合至生物素或生物学活性片段、生物素类似物或突变蛋白或其生物学活性片段或链霉亲和素结合肽。

[0012] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中:一个或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Asp¹¹⁷、Arg¹¹⁷、Ser¹²⁰、Ala¹²⁰、Gly¹²⁰、Trp¹²¹、Tyr¹²¹或Phe¹²¹;或一个或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰或Tyr¹²¹中的一个或多个;或多个氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰或Tyr¹²¹。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,该分子包含:a) SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;b) 与SEQ ID NO:28展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰及Tyr¹²¹的氨基酸序列和/或可逆地结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽;或c) a) 或b) 的功能片段,该功能片段可逆地结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。

[0013] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,寡聚粒子试剂经由结合伴侣结合至或能够结合至一种或多种剂,其中该一种或多种剂包含该结合伴侣诸如生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂包含结合伴侣,其中该结合伴侣能够结合至寡聚粒子试剂上的一个或多个结合位点。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,结合伴侣包含链霉亲和素结合肽或生物素或生物素类似物。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,结合伴侣包含选自由以下组成的组的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂结合或另外能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,一种或多种剂包含抗体,可选地为Fab或nanobody®,例如单域抗体(sdAb)。

[0014] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞的表面上的受体的受体结合剂。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂为或包含刺激剂,该刺激剂能够结合至靶细胞表面上的分子,由此诱导或调节靶细胞中的信号。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,刺激剂为第一受体结合剂且寡聚粒子试剂包含第二受体结合剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子任选地能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0015] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因

子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0016] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激或辅助分子,且共刺激或辅助分子选自CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体,且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体,且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4。

[0017] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子,且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。

[0018] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2;和/或配体是选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17及TNF,或为其生物学活性片段。

[0019] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体,其中配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4的趋化因子受体;或配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21及CCL25或为其生物学活性片段。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为黏附分子,且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)及CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。

[0020] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂包含选择剂,其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,靶细胞为免疫细胞。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,靶细胞为T细胞。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0021] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,寡聚粒子试剂包含大于25nm、大于50nm、大于60nm、大于70nm、大于80nm或大于90nm的半径。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂包含25nm与150nm之间、50nm与150nm

之间、75nm与125nm之间、80nm与115nm之间或90nm与110nm之间(含上下限值)或90nm±15nm或95nm±20-25nm的半径。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,寡聚粒子试剂具有小于150nm的半径。在特定实施方案中,半径为流体动力半径。

[0022] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,寡聚粒子试剂包含至少 1×10^7 g/mol、至少 5×10^7 g/mol或至少 1×10^8 g/mol的分子量。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂包含 1×10^6 g/mol与 1×10^{10} g/mol之间、 1×10^7 g/mol与 1×10^9 g/mol之间、 5×10^7 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、 1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间或 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间的分子量。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的一些实施方案中,寡聚粒子试剂包含至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少500个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少1,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少1,500个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、或至少2,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0023] 在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的特定实施方案中,寡聚粒子试剂包含100与50,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、1,000与20,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、1,000与10,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、或2,000与5,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在本文提供的寡聚粒子试剂中的任一者的某些实施方案中,多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包含赖氨酸残基,其中少于20%、10%、5%、1%的赖氨酸残基包含N经取代的亚氨基硫杂环戊烷。

[0024] 本文提供包含一种或多种寡聚粒子试剂的组合物。在本文提供的组合物中的任一者的一些实施方案中,一种或多种寡聚粒子试剂为多种寡聚粒子试剂。在本文提供的组合物中的任一者的特定实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含i) 大于70nm的平均半径;ii) 至少 1×10^8 g/mol的平均分子量;和/或iii) 每一寡聚粒子试剂至少2,000的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量;和/或iv) 其中至少95%的多种寡聚粒子试剂包含10nm至150nm之间的半径的半径尺寸分布。在某些实施方案中,半径尺寸分布为流体动力半径尺寸分布。

[0025] 在本文提供的组合物中的任一者的某些实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含大于25nm、大于50nm、大于60nm、大于70nm、大于80nm、大于90nm或大于100nm的平均半径。在本文提供的组合物中的任一者的一些实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含25nm与150nm之间、50nm与150nm之间、75nm与125nm之间、80nm与110nm之间、或90nm与110nm之间(含上下限值)或90nm±15nm或95nm±20-25nm的平均半径。在本文提供的组合物中的任一者的特定实施方案中,多种寡聚粒子试剂中的至少95%包含50nm与150nm之间、70nm与140nm之间、80nm与120nm之间、80nm与115nm之间、80nm与100nm之间、90nm与110nm之间和/或100nm与120nm之间的半径。

[0026] 在本文提供的组合物中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂中的至少95%包含多种寡聚粒子试剂的平均和/或中值半径的±50%、±25%、±20%、±15%、±10%和/或±5%之间的半径。在本文提供的组合物中的任一者的一些实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含80nm与115nm之间的平均半径且其中寡聚粒子试剂中的至少95%包含平均半径的±25%之间的半径。在本文提供的组合物中的任一者的特定实施方案中,多种粒子包含 1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间或 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间(含上下限值)的平均分

子量。

[0027] 在本文提供的组合物中的任一者的某些实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含每一寡聚粒子试剂至少100、至少500、至少1,000、至少1,500或至少2,000的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量。在本文提供的组合物中的任一者的一些实施方案中,多种寡聚粒子试剂包含每一寡聚粒子试剂在100与50,000之间、1,000与20,000之间、1,000与10,000之间、或2,000与5,000之间(各含上下限值)的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量。

[0028] 在本文提供的组合物中的任一者的特定实施方案中,当在大约或低于-80°C、大约或低于-20°C和/或大约或低于4°C下储存至少1周时,多种寡聚物粒子的平均半径不增加超过25%。在本文提供的组合物中的任一者的某些实施方案中,当储存于大约或低于4°C下至少1周时,多种寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。在本文提供的组合物中的任一者的一些实施方案中,当储存于大约或低于4°C下至少3周时,多种寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。在本文提供的组合物中的任一者的特定实施方案中,当储存于大约或低于4°C下至少9周、至少27周或至少46周时,多种寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。在特定实施方案中,当储存于或于大约或于低于-20°C、-30°C、-40°C、-50°C、-60°C、-70°C或-80°C下至少1周、3周、9周、27周或46周时,多种寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。

[0029] 本文提供用于产生包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚粒子试剂的方法,该方法包含:孵育多个包含能够与巯基官能团反应的巯基反应性官能团的活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个包含一个或多个巯基官能团的巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,由此产生寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白粒子;从单体和/或较小寡聚分子中分离寡聚粒子;和使寡聚粒子与稳定剂接触,由此产生寡聚粒子试剂。

[0030] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是通过将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与能够将一个或多个胺转化为巯基反应性官能团的活化剂一起孵育而产生。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是通过将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与添加或能够添加巯基官能团至一个或多个赖氨酸残基的巯基化剂一起孵育而产生。

[0031] 本文还提供一种用于产生寡聚粒子试剂的方法,该方法包含:(a) 在将一个或多个胺转化为能够与巯基官能团反应的巯基反应性基团的条件下将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育,由此产生多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;(b) 将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与添加或能够添加巯基官能团至一个或多个赖氨酸残基的巯基化剂一起孵育,由此产生多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;和(c) 将多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子一起孵育,由此产生包含寡聚粒子试剂的粒子组合物;其中该方法是在如下条件下进行:其中在起始(c)中的孵育时,多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子使得至少60%的赖氨酸平均包含一个巯基官能团,和/或每一巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体平均至少10个赖氨酸包含一个巯基官能团。

[0032] 某些实施方案进一步包括从单体和/或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子中分离寡聚粒子试剂。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,在1:1与1:10之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与活化剂的摩尔比下进行将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,在 $1:2 \pm 2\%$ 的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与活化剂的摩尔比下进行将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,活化剂包含杂双官能团交联剂。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,活化剂包含4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基SMCC)和/或6-[(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,巯基反应性官能团为卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮丙啶基、丙烯酰基、芳基、乙烯砜基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,巯基反应性官能团为马来酰亚胺基。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,在中性pH下孵育第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子和活化剂。

[0033] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在6.8与7.5之间的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在7.0与7.4之间,可选为或大约7.2的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在4°C与39°C之间的温度下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在室温下,可选在20°C与25°C之间,可选在约23°C或约24°C下孵育。

[0034] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂孵育15分钟至6小时或30分钟至2小时之间(各含上下限值)。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂孵育45分钟至1.5小时之间(含上下限值),可选孵育1小时或约1小时。

[0035] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,在巯基化剂与每一链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的各伯胺为10:1与1:1之间(含上下限值)的摩尔比下进行,将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,在1:50与1:500之间(含上下限值)的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与巯基化剂的摩尔比下进行将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,在1:100或大约1:100的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与活化剂的摩尔比下进行将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,巯基化剂为或包含2-亚氨基硫杂环戊烷。

[0036] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在7.0或大于7.0,可选7.0与8.0之间(含上下限值)的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在约7.7的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者

的一些实施方案中, 孵育第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在pH为8.0或大于8.0, 可选在8.0与9.0之间(含上下限值)的缓冲液存在下起始。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 孵育第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在pH为8.5或约8.5的缓冲液存在下起始。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 缓冲液包含硼酸盐。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 缓冲液包含10mM至200mM硼酸盐或50mM至100mM硼酸盐(各含上下限值), 可选约100mM硼酸盐。

[0037] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在4°C与39°C之间的温度下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂是在室温下, 可选在20°C与25°C之间, 可选在23°C或约23°C下或在24°C或约24°C下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂孵育15分钟至2小时或15分钟至1.5小时之间。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂孵育15分钟至2小时或25分钟至1小时之间(各含上下限值)。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 第二多个链霉亲和素分子与巯基化剂孵育1小时或约1小时。

[0038] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂孵育25分钟或约25分钟。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 孵育期间的多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的摩尔比为X:1, 其中X为每一链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子可用于巯基化的赖氨酸残基的数目。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 该摩尔比为1:1至8:1或2:1至6:1, 可选为4:1或约4:1。在某些实施方案中, 该摩尔比为1:1至1:8或1:2至1:6, 可选为1:4或约1:4。

[0039] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在6.8与7.5之间(含上下限值)的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在7.0与7.4之间(含上下限值)的pH下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在7.2或约7.2的pH下孵育。

[0040] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在4°C与39°C之间(含上下限值)的温度下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中, 多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在室温下, 可选在20°C与25°C之间(含上下限值), 可选在23°C或约23°C或在24°C或约24°C下孵育。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中, 多个活化链霉亲和素分子与多个巯基化链霉亲和素分子孵育15分钟至6小时或30分钟至2小时之间(各含上下限值)。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中, 多个活化链霉亲和素分子与多个巯基化链霉亲和素分子孵育45分钟至1.5小时之间(含上下限值), 可选孵育1小时或约1

小时。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的孵育通过使分子与N-乙基马来酰亚胺(NEM)接触而结束。

[0041] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育的至少一部分及将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育的至少一部分同时分开地进行。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育及将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育是持续基本上相同的时间量进行和/或在基本上相同的时间完成。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,其中在孵育巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子之前,该方法包括(i)自包含活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除活化剂;和/或(ii)自包含巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除巯基化剂。

[0042] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,其中孵育多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在将第二多个链霉亲和素分子与巯基化剂一起孵育结束之后和/或在自包含巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除巯基化剂之后15分钟内起始。

[0043] 本文提供产生寡聚粒子试剂的方法,其包含:将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与6-[(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)]在7.2或约7.2的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生多个包含马来酰亚胺巯基反应性官能团的活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与2-亚氨基硫杂环戊烷在7.5与8.5之间(含上下限值)的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生多个包含一个或多个巯基官能团的巯基化链霉亲和素分子;和将多个活化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化链霉亲和素分子在7.2或约7.2的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生包含寡聚粒子试剂的组合物;其中将多个活化链霉亲和素分子与多个巯基化链霉亲和素分子一起孵育是在将第二多个链霉亲和素分子与2-亚氨基硫杂环戊烷一起孵育后10分钟内起始。

[0044] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,该方法进一步包含使寡聚粒子试剂与稳定剂接触。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,稳定剂降低存在于寡聚粒子试剂的赖氨酸残基上的N经取代的亚氨基硫杂环戊烷的量。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,稳定剂降低存在于寡聚粒子试剂的赖氨酸残基上的N经取代的亚氨基硫杂环戊烷的量至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,稳定剂包含羟胺。

[0045] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,寡聚粒子试剂具有小于150nm的半径。本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案进一步包含对寡聚粒子试剂进行过滤灭菌。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,通过尺寸排阻层析法从单体或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子中分离寡聚粒子试剂。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,尺寸排阻极限大于或大于约100kDa、500kDa、750kDa、1000kDa或2000kDa。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,尺寸排阻

极限为500kDa至1000kDa或约500kDa至1000kDa。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,尺寸排阻极限为750kDa或约750kDa。

[0046] 本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案包含收集一个或多个包含空隙体积的级分,由此将寡聚粒子试剂与单体或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子分离。在某些实施方案中,该方法进一步包含将寡聚粒子试剂储存于大约4°C或低于4°C、大约-20°C或低于-20°C或大约-80°C或低于-80°C的温度下。在一些实施方案中,该方法进一步包含在将一种或多种剂可逆地结合至寡聚粒子试剂的条件下混合寡聚粒子试剂与该一种或多种剂。

[0047] 本文还提供将一种或多种剂多聚化为寡聚粒子试剂的方法,该方法包含将通过本文所提供的方法产生的寡聚粒子试剂与一种或多种剂在将该一种或多种剂可逆地结合至寡聚粒子试剂的条件下混合。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂包含结合伴侣,其中结合伴侣能够结合至寡聚粒子试剂上的一个或多个结合位点。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

[0048] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,结合伴侣包含选自以下组成的组的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0049] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,一种或多种剂包含抗体,可选为Fab。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的受体的受体结合剂。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上的分子由此诱导或调节靶细胞中的信号的刺激剂。

[0050] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,刺激剂为第一受体结合剂且该方法进一步包含将第二受体结合剂可逆地结合至寡聚粒子试剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子可选能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0051] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0052] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激或辅助分子且共刺激或辅助分子选自CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo- /

Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1和TNFR2。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3和CXCR4。

[0053] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1和TNFR2;和/或配体选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17和TNF,或为其生物学活性片段。

[0054] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体,其中配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3和CXCR4的趋化因子受体;或配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21和CCL25或为其生物学活性片段。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为黏附分子且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)和CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。

[0055] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂包含选择剂,其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,靶细胞为免疫细胞。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,靶细胞为T细胞。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0056] 特定实施方案涉及包含通过本文提供的实施方案中的任一者的方法产生的寡聚粒子试剂的组合物。特定实施方案涉及包含多种通过本文提供的实施方案中的任一者的方法产生的寡聚粒子试剂的组合物。某些实施方案涉及一种制品,其包含本文提供的实施方案中任一项的寡聚粒子试剂或本文提供的实施方案中任一项的组合物。

[0057] 本文提供用于调节细胞的方法,该方法包含在本文提供的实施方案中任一项的寡聚粒子试剂存在下或在本文提供的实施方案中任一者的组合物存在下孵育包含靶细胞的细胞组合物,由此调节靶细胞。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,调节靶细胞包括活化、富集和/或扩增靶细胞。

[0058] 本文提供用于培养细胞的方法,该方法包含在本文提供的实施方案中任一者的寡聚粒子试剂存在下或在本文提供的实施方案中任一项的组合物存在下孵育包含靶细胞的细胞组合物。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,寡聚粒子试剂可逆地结

合至一种或多种剂。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,一种或多种剂包含抗体,可选为Fab。

[0059] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的受体的受体结合剂。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上由此诱导或调节靶细胞中的信号的刺激剂的分子。

[0060] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,刺激剂为第一受体结合剂且该方法进一步包含将第二受体结合剂可逆地结合至寡聚粒子试剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子可选能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0061] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0062] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激或辅助分子且共刺激或辅助分子选自CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1和TNFR2。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3和CXCR4。

[0063] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1和TNFR2;和/或配体选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17和TNF,或为其生物学活性片段。

[0064] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体,其中配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3和CXCR4的趋化因子受体;或配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21和CCL25或为其生物学活性片段。

[0065] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,受体结合剂(第二受体结合

剂)为黏附分子且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-选择素)和CD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1),或为其生物学活性片段。

[0066] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,一种或多种剂包含选择剂,其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,靶细胞为免疫细胞。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,靶细胞为T细胞。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。在某些实施方案中,靶细胞包含血细胞、白细胞、淋巴细胞、B细胞、B细胞群体、T细胞、T细胞群体、NK细胞、树突细胞和/或巨噬细胞。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,靶细胞表达重组受体。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,靶细胞表达重组T细胞受体和/或嵌合抗原受体(CAR)。

[0067] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,靶细胞表达结合至与疾病和/或癌症相关的抗原的CAR。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,抗原为 α v β 6整合素(α v β 6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,还称为CAIX或G250)、一种癌症-睾丸抗原——癌症/睾丸抗原1B(CTAG,还称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、一种细胞周期蛋白——细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPha2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;还称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AchR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、胎儿乙酰胆碱受体、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人类高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、B型肝炎表面抗原、人类白细胞抗原A1(HLA-AI)、人类白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22Ra)、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、激酶插入域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞黏附分子(L1CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富含亮氨酸的重复序列的8个家族成员A(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、黏蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀手第2组成员D(NKG2D)配体、melan A(MART-1)、神经细胞黏附分子(NCAM)、癌胚抗原、黑色素瘤的优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、一种前列腺特异性抗原——前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活素、滋养层糖蛋白(TPBG,还称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、威尔姆氏肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原或与通用标签相关的抗原,和/或生物素化的分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0068] 本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案进一步包含破坏一种或多种剂与寡聚粒子试剂之间的可逆结合。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,该破

坏包含向靶细胞中引入包含能够逆转一种或多种剂与寡聚粒子试剂之间的结合的物质的组合物。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,该物质为自由结合伴侣和/或为竞争剂。

[0069] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,该破坏终止或减少靶细胞(可选T细胞)中的由一种或多种剂诱导的或调节的信号。在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,该物质包含链霉亲和素结合肽、生物素或生物学活性片段,可选为D-生物素或生物素类似物(或生物学活性片段)。

[0070] 在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,该物质为选自以下组成的组的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,该破坏是在起始该孵育之后5天内进行。

[0071] 附图简述

[0072] 图1描绘在例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 与2-亚氨基硫杂环戊烷在100mM硼酸盐存在下的时程孵育期间,附接至链霉亲和素突变蛋白四聚体的巯基官能团的水平。

[0073] 图2显示图,该图显示在pH 8.3或8.5下在25mM硼酸盐缓冲液中孵育例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 与2-亚氨基硫杂环戊烷期间,附接至链霉亲和素突变蛋白四聚体的巯基官能团的水平。

[0074] 图3显示与2-亚氨基硫杂环戊烷一起孵育的链霉亲和素突变蛋白的SEC洗脱概况。分子量标准品158,000Da、44,000Da、17,000Da或1350Da的洗脱峰显示为实线。非巯基化例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 的洗脱概况显示为虚线。其余的洗脱概况描绘在pH 8.3或pH 8.5下在25mM硼酸盐缓冲液存在下孵育10分钟、50分钟或390分钟的多种巯基化 **STREP-TACTIN® M2** 链霉亲和素突变蛋白的洗脱概况。具体显示了在pH 8.3在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续10分钟、在pH 8.3在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续50分钟、在pH 8.3在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续390分钟、或在pH 8.5在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续10分钟、在pH 8.5在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续50分钟、或在pH 8.5在25mM硼酸盐缓冲液存在下持续390分钟孵育例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 与2-亚氨基硫杂环戊烷之后的洗脱概况。

[0075] 图4描绘在pH 8.3、8.5及8.7在25mM硼酸盐缓冲液的情况下孵育例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 与2-亚氨基硫杂环戊烷1小时或3小时之后的巯基官能团的浓度(SH含量)。

[0076] 图5描绘例示性链霉亲和素突变蛋白 **STREP-TACTIN® M2** 在与2-亚氨基硫杂环戊烷一起孵育且通过PD10柱凝胶过滤之后的不同时间点处的巯基官能团损失(SH含量)。

[0077] 图6A及6B显示与多聚化在不同批次的由例示性链霉亲和素突变蛋白

STREP-TACTIN®M2组成的寡聚试剂的抗CD3/抗CD28一起孵育的来自三个不同供体的T细胞的WST代谢测定的结果。图6A概括相较于含有多聚化流体动力半径为36nm或101nm的寡聚主链上的抗CD3/抗CD28的参考批次,所有测试批次(汇合的)的WST代谢活性。对于各个测试批次及参考试剂,来自不同供体的T细胞的平均WST代谢活性显示于图6B中。

[0078] 图7,包括图7A-7E,提供例示性实施方案的示意性图示。

[0079] 图7A显示具有多个用于可逆地结合至剂的结合位点的试剂(或其代表性部分)诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂的示意性图示。在此状况下,试剂显示为能够可逆地结合至两种剂,这两种剂各自能够特异性结合至细胞上的分子。该试剂具有多个结合位点(包括多个结合位点Z1),每个结合位点能够可逆地结合至剂。所示的示意性图示中的第一及第二剂(其在一些情况下可相同)显示每个剂含有至少一种结合伴侣C1。结合伴侣C1可逆地结合至结合位点Z1。第一及第二剂还各含有结合位点B2,其可特异性结合至细胞表面上的分子,该分子在一些情况下可在相同细胞上。此处,第一及第二剂显示为特异性结合至相同细胞上的分子。

[0080] 图7B显示具有多个能够可逆地结合至第一及第二剂的结合位点的试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂的示意性图示,这些剂各自能够分别特异性结合至第一和第二细胞上的分子。该试剂具有多个结合位点Z1,每个结合位点能够可逆地结合至剂。第一及第二剂(其在一些情况下可相同)各含有结合伴侣C1,该结合伴侣C1可逆地结合至结合位点Z1。第一及第二剂各自含有结合位点B2,结合位点B2可特异性结合至细胞表面上的分子,该分子在一些情况下可在相同细胞或不同细胞上。此处,第一剂结合至第一细胞表面上的分子,且第二剂结合至第二细胞表面上的分子。

[0081] 图7C显示能够可逆地结合至第一及第二剂的试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂,这些剂各自能够分别特异性结合至第一及第二细胞上的分子。该试剂具有多个结合位点Z1及Z2,其可相同或不同,结合位点Z1及Z2各自能够可逆地结合至剂中的一者或两者。第一剂含有可逆地结合至Z1的结合伴侣C1;第二剂含有可逆地结合至Z2的结合伴侣C2。在一些情况下,C1与C2不同。在一些情况下,C1与C2相同或基本上相同。第一剂含有可特异性结合至细胞表面上的分子的结合位点B1,且第二剂含有至少一个可特异性结合至细胞表面上的分子的结合位点B3。结合位点B1及B3在一些情况下结合至两个不同细胞表面分子,或单一分子上的不同表位,或不同细胞表面上的相同或不同分子。此处,第一剂显示为经由B1结合至第一细胞表面上的分子,且第二剂结合至第二细胞表面上的分子。

[0082] 图7D显示能够可逆地结合至第一及第二剂诸如选择剂的试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂,这些剂各自能够特异性结合至细胞上的分子。该试剂具有多个结合位点,包括Z1及Z2,其可相同或不同,各自能够可逆地结合至剂。第一剂含有可特异性结合至结合位点Z1的结合伴侣C1且第二剂含有至少一个可特异性结合至结合位点Z2的结合伴侣C2。在一些情况下,C1与C2不同。在一些情况下,C1与C2相同或基本上相同。第一剂含有可特异性结合至细胞表面上的分子的结合位点B1,且第二剂含有可特异性结合至细胞表面上的分子的结合位点B3。在一些实施方案中,第一剂与第二剂可为选择剂。结合位点B1及B3可结合一个细胞表面上的相同或不同分子(例如受体)、一个分子上的相同或不同表位,或不同细胞表面上的相同或不同分子。此处,第一剂结合至一个细胞表面上的第一分子,且第二剂结合至同一细胞表面上的第二分子。

[0083] 图7E显示可逆地结合至第一及第二剂的试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂,这些剂各自能够特异性结合至细胞上的分子。该试剂具有多个结合位点,包括Z1及Z2,其可相同或不同,各自能够可逆地结合至剂。第一剂含有能够可逆地结合至该剂的Z1的结合伴侣C1,且第二剂含有能够可逆地结合至Z2的结合伴侣C2。在一些情况下,C1与C2不同。在一些情况下,C1与C2相同或基本上相同。第一剂含有至少一个可特异性结合至一个细胞表面上的分子的结合位点B2,且第二剂含有至少一个可特异性结合至一个细胞表面上的分子的结合位点B4。在一些实施方案中,第一剂及第二剂可为刺激剂。结合位点B2及B4可结合一个细胞表面上的相同或不同分子、一个分子上的相同或不同表位、或不同细胞表面上的相同或不同分子。此处,第一剂结合至一个细胞表面上的第一分子,且第二剂结合至同一细胞表面上的第二分子。

[0084] 图8,包括图8A-8E,其分别提供如图7A-7E中所示的例示性实施方案的示意性图示,除了描绘的试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂显示为固定于诸如固定相的支持物上。

[0085] 图9提供例示性实施方案的示意性图示,其中寡聚试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂用于使刺激剂多聚化,及与细胞一起孵育的所得复合物用于向细胞递送信号,接着逆转该结合。图A显示寡聚试剂1,其显示为不结合至任何支持物且显示为柔性的。在此处显示为Fab片段且能够特异性结合至细胞表面上的分子的刺激剂2与该试剂组合。该剂包含能够可逆地结合至该试剂上的结合位点(例如结合位点Z)使该剂多聚化的结合伴侣(例如结合伴侣C)。图B描绘可逆结合至该试剂上的结合位点的结合伴侣。将细胞3添加至系统。图C描绘特异性结合至细胞3表面上的分子4的多聚化剂(Fab片段)。在图C中,描绘的剂为刺激受体结合剂(例如第一受体结合剂和/或第二受体结合剂),其可在将剂结合至细胞上的分子后诱导或调节细胞中的信号。如图D中所示,将诸如竞争试剂(例如生物素)的物质5添加至组合物,该物质可为相较于针对剂上的结合伴侣,针对试剂上的结合位点展现较高结合亲和力,由此破坏试剂1与剂2之间的可逆结合的物质。在一些情况下,例如Fab片段的剂还可自其与细胞3上的分子4的相互作用解离。在一些情况下,这可破坏、减少和/或终止细胞中的信号传导。

[0086] 图10提供可逆系统的例示性实施方案的示意性图示,该可逆系统包含连接至支持物诸如固体支持物或表面(包括固定相)的寡聚试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂。图A显示含有试剂1的支持物6。将能够特异性结合至细胞表面上的分子的剂2诸如Fab片段添加至该系统。诸如Fab片段的剂2包含能够可逆地结合至该试剂上的结合位点(例如结合位点Z)的结合伴侣(例如结合伴侣C)。图B描绘可逆结合至该试剂上的结合位点的结合伴侣。将细胞3添加至系统。图C描绘结合至细胞3表面上的分子4的剂2,例如Fab片段。在一些实施方案中,scFv包含受体结合剂或选择剂。在一些实施方案中,剂例如Fab片段可为受体结合剂或选择剂。图C描绘例示性一种或多种受体结合剂(例如第一受体结合剂和/或第二受体结合剂),其可在将例如Fab片段的剂结合至细胞上的分子后诱导或调节细胞中的信号。添加物质5,诸如竞争试剂(例如生物素),其可为相较于针对例如Fab片段的剂上的结合伴侣,对该试剂上的结合位点展现较高结合亲和力,由此破坏试剂与剂之间的结合的物质。图D描绘剂2例如Fab片段与该试剂之间的结合的破坏,由此导致该试剂自该剂解离,且由此自细胞解离。在一些情况下,剂例如Fab片段还可自其与细胞3上的分子4的相互

作用解离。在一些情况下,这可破坏、减少和/或终止细胞中的信号传导。

[0087] 图11显示如在-80°C、4°C或37°C下储存之后的各个时间点处通过寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的动态光散射测量的尺寸变化的图。

[0088] 图12A及B显示在用于产生含有表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞的T细胞组合物的例示性工程改造过程期间,在与不同个别批次的抗CD3/抗CD28Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂一起孵育期间,随时间推移的活细胞的总量(图12A)及百分比(图12B)的图。

[0089] 图13显示图,该图显示在用于产生CAR T细胞组合物的例示性工程改造过程期间,与不同个别批次的抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂一起孵育的T细胞组合物的总CAR+、CD4+CAR+及CD8+CAR+细胞的百分比以及CD4+T细胞中的CAR+CD4+T细胞的百分比及CD8+T细胞中的CAR+CD8+T细胞的百分比。

[0090] 图14显示若干图,这些图显示在与不同个别批次的Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂一起孵育的细胞组合物中,针对残余Fab染色(上图)或残余链霉亲和素突变蛋白(下图)呈阳性的细胞的百分比。

[0091] 图15显示图,该图显示含有CAR T细胞的T细胞组合物的溶细胞活性,所述T细胞组合物是通过涉及与不同个别批次的抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂一起孵育的例示性工程改造过程产生的。

[0092] 发明详述

[0093] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术术语、标记法及其他技术及科学术语意欲具有与要求保护的主体所属的领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。在一些情况下,出于清楚起见和/或方便参考,在本文中定义具有通常所理解含义的术语,且本文中包括这类定义不应必然解释为表示与本领域中一般理解的含义存在实质性差异。

[0094] 本申请中所提及的所有公开,包括专利文件、科学论文及数据库,出于所有目的均以全文引用的方式并入本文中,其引用的程度如同各单个公开以引用的方式单独并入一般。若本文所示的定义与以引用方式并入本文中的专利、申请、公开的申请及其他公开中所述的定义相反或不一致,则以本文所示的定义为准,而非以以引用方式并入本文中的定义为准。

[0095] 本文中所用的部分标题仅出于组织目的而不应理解为限制所述主题。

[0096] I. 概述

[0097] 本文提供用于制造、生产和/或产生寡聚粒子试剂的方法。在一些实施方案中,本文所提供的方法适用于将分子寡聚为介于1百万Da至1亿Da、1百万Da至10亿Da、1百万Da至100亿Da和/或1百万Da至1000亿Da范围内的寡聚物粒子试剂。特定实施方案涵盖通过所提供方法生产的寡聚粒子试剂的尺寸分布受改变各个步骤中的一个或多个的有区别的反应条件影响。因此,在一些实施方案中,诸如试剂的时序、浓度及摩尔比以及溶液pH的条件经精确控制且保持恒定。在一些实施方案中,本文所提供的方法适用于得到在批次之间或批次之间具有一致尺寸的寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,可调节本文所提供的方法的一个或多个步骤或阶段的条件以制造、生产或产生具有一种或多种不同所需尺寸的寡聚粒子试剂。

[0098] 在一些实施方案中,用于制造、生产和/或产生寡聚粒子试剂的本文所提供的方法通过使多个具有附接巯基官能团的分子(还称为巯基化分子,例如巯基化链霉亲和素和素

或链霉亲和素突变蛋白分子)与多个具有附接巯基反应性官能团诸如马来酰亚胺官能团的分子(例如活化分子,例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子)反应而使分子(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)交联。

[0099] 特定实施方案涵盖具有一种或多种特定尺寸的多聚化试剂和/或寡聚离子试剂可尤其有效地用于调节细胞。举例而言,在一些实施方案中,具有某一尺寸的寡聚粒子试剂当可逆地结合至一种或多种刺激剂时,对扩增、活化和/或富集细胞群体尤其有效。如本文中所发现,可逆地结合至刺激剂的具有特定较大尺寸(例如具有大于32nm的平均半径(例如流体动力半径),且一般而言大于60nm的平均半径,诸如大于或大于大约90nm、95nm或100nm的平均半径)的寡聚粒子试剂在相较于具有较小尺寸的寡聚粒子(例如图6)较大程度上活化细胞。因此,在一些实施方案中,本文提供具有界定尺寸及尺寸分布的寡聚粒子试剂,及用于一致地制造具有所需尺寸及尺寸分布的寡聚粒子试剂的方法。

[0100] 在一些实施方案中,所提供的制造寡聚离子试剂的方法导致变化性减小且一般一致地产生具有较大尺寸的寡聚试剂同时使组合物中的寡聚物的尺寸分布最小化。在一些实施方案中,通过存在于赖氨酸残基上及分子N端处的胺的亚氨基硫杂环戊烷活化将用于寡聚反应的反应性巯基基添加至分子。在一些实施方案中,巯基化反应的时序,及巯基化反应结束与寡聚反应起始之间的时间在反应与反应间保持恒定,在一些情况下,因为游离巯基可由于异构化即形成N经取代的亚氨基硫杂环戊烷而损失。在一些方面中,时序应使巯基损失及N经取代的亚氨基硫杂环戊烷形式的产生最小化,该N经取代的亚氨基硫杂环戊烷形式在一些情况下为可导致寡聚物的合成后生长的再异构化之后的SH功能的隐藏来源。在一些实施方案中,控制用于与含马来酰亚胺的分子反应的巯基的可利用度,和使N经取代的亚氨基硫杂环戊烷的积聚最小化,为可影响寡聚物尺寸的一致性的参数。

[0101] 此外,在一些实施方案中,巯基活化以及其他化学反应的动力学可在一些情况下为pH依赖性的。在一些实施方案中,用于化学反应的一种或多种缓冲液(活化及偶合缓冲液)的pH,且特定而言用于巯基化剂的缓冲液的pH是在预定范围或水平内且一般精密测量并调节。此外,在一些实施方案中,巯基化及活化剂与分子之间的化学计量是通过在小公差($\pm 2\%$)内调节浓度而高精度地调节以获得多聚物的可再现平均尺寸。

[0102] 本文还提供如本文所述的这类寡聚试剂。在一些实施方案中,一种或多种剂能够可逆或不可逆地结合至寡聚试剂,其在一些情况下为多聚化剂,其中一种或多种剂在寡聚粒子试剂上多聚化。与一种或多种剂(诸如多聚化剂)结合的寡聚试剂可用于涉及与靶细胞(包括原代细胞,诸如T细胞)一起培养或孵育的方法中。

[0103] 在一些方面中,本文提供结合或可逆地结合(例如多聚化)至一种或多种剂(诸如受体结合剂和/或刺激剂)的寡聚离子试剂。在特定实施方案中,所提供的寡聚粒子包含寡聚分子(例如交联的链霉亲和素突变蛋白),并且结合至刺激剂和/或受体结合剂,该刺激剂和/或受体结合剂结合至和/或能够结合至细胞表面。在一些方面中,该剂为或包括具有结合伴侣(例如链霉亲和素结合肽,例如Strep-TagII)的抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂具有介于50nm与150nm之间、75nm与125nm之间、80nm与115nm之间的半径,或80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的半径,或大约80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm$

0.1%的半径。在一些方面中,提供了含有多寡聚粒子试剂(例如结合或可逆地结合(例如多聚化)至一种或多种剂的那些)的组合物,其中多种寡聚粒子试剂中的寡聚粒子试剂的平均半径为50nm与150nm之间、75nm与125nm之间、80nm与115nm之间,或80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm $\pm$ 25%、 $\pm$ 20%、 $\pm$ 15%、 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%或 $\pm$ 0.1%的半径,或大约80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm $\pm$ 25%、 $\pm$ 20%、 $\pm$ 15%、 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%或 $\pm$ 0.1%的半径。在一些方面中,寡聚粒子试剂特别适用于选择和/或刺激细胞,诸如经由分别将选择试剂或刺激剂结合至靶细胞上的细胞表面分子。在一些情况下,竞争试剂的存在或添加导致寡聚粒子试剂与这些剂(例如受体结合剂)之间的解离,这在一些情况下可以快速终止、结束或破坏由寡聚粒子试剂对细胞的刺激。

[0104] 本文提供一种使用提供的寡聚试剂扩增靶细胞(诸如T细胞)的组合物。在一些实施方案中,方法涉及能够结合至靶细胞表面上的分子(诸如受体结合分子)由此向细胞提供信号的可逆试剂系统,该信号在一些情况下可为初级活化信号。在一些实施方案中,方法中采用的寡聚粒子试剂为在其上结合有一种或多种剂(例如第一剂、第二剂等)的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,该一种或多种剂向细胞提供信号,诸如初级活化信号和/或辅助或共刺激信号。在一些实施方案中,初级活化信号可因此足以活化细胞以进行扩增/增殖。此第一剂能够可逆或不可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂可以还具有与其结合的第二剂,该第二剂刺激细胞表面上的辅助分子。第二剂当结合至细胞表面上的辅助分子时可由此刺激活化细胞进行扩增。另外,此第二剂能够可逆或不可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂可固定于固体支持物上或是可溶的。在一个方面中,本文所公开的方法为细胞群体的连续扩增,其中完整淋巴细胞群体被刺激/扩增,接着通过在适合的固定相上的层析移除扩增所需的试剂。在一些实施方案中,扩增/刺激的细胞(其为经培养细胞)可选用例如T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)转染,且在一些方面中可经受通过结合至引入的T细胞受体或嵌合抗原受体的不同刺激分子的第二刺激扩增。

[0105] 本文提供一种用于扩增靶细胞(诸如T细胞)的组合物。在一些实施方案中,该方法涉及能够结合至靶细胞表面上的分子(诸如受体结合分子)由此向细胞提供信号的可逆试剂系统,该信号在一些情况下可为初级活化信号。在一些实施方案中,该方法采用试剂(诸如寡聚粒子试剂),其可为在其上结合有一种或多种剂(例如第一剂、第二剂等)的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,该一种或多种剂向细胞提供信号,诸如初级活化信号和/或辅助或共刺激信号。在一些实施方案中,初级活化信号可因此足以活化细胞以进行扩增/增殖。此第一剂能够可逆或不可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂可以还具有与其结合的第二剂,该第二剂刺激细胞表面上的辅助分子。第二剂当结合至细胞表面上的辅助分子时可由此刺激活化细胞进行扩增。另外,此第二剂能够可逆或不可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。多聚化试剂可固定于固体支持物上或是可溶的。在一个方面中,本文所公开的方法为细胞群体的连续扩增,其中完整淋巴细胞群体被刺激/扩增,接着通过在适合的固定相上的层析移除扩增所需的试剂。在一些实施方案中,扩增/刺激的细胞(其为经培养细胞)可选用例如T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)转染,且在一些方面中可经受通过结合至引入的T细胞受体或嵌合抗原受体的不同刺

激分子的第二刺激扩增。

[0106] 在不存在外源生长因子或低量的外源生长因子的情况下体外扩增T细胞群体的方法为本领域已知的(参见例如美国专利6,352,694 B1及欧洲专利EP 0 700 430B1)。一般而言,这类方法采用直径大于1 μ m的固相表面,各种结合剂(例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)固定至该固相表面。举例而言,Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen) 为用于T细胞扩增的市售试剂,其为均一、4.5 μ m直径、超顺磁、无菌、非致热聚苯乙烯珠粒,涂布有针对人类T细胞上的CD3及CD28细胞表面分子的亲和性纯化的单克隆抗体的混合物。然而,在一些情况下,这类磁性珠粒(例如)难以整合至在临床试验或治疗目的所需的条件下扩增细胞的方法中,因为必须确保在向患者施用扩增的T细胞之前完全移除这些磁性珠粒。

[0107] 在一些实施方案中,本文所提供的方法解决这些问题。在一些方面中,提供的试剂为可逆的,使得刺激剂可自细胞组合物中移除。另外,在一些方面中,与刺激剂结合的试剂(例如多聚化试剂或寡聚粒子试剂)不固定于支持物上,诸如不固定于固体支持物或表面上。因此,在一些方面中,该试剂,(例如多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂)为可柔性的且非硬性的。在一些实施方案中,该试剂可适应或符合细胞表面。在一些实施方案中,有可能将试剂固定于支持物(诸如固体支持物,包括固定相)上。在一些实施方案中,这类方法可与使用类似选择剂的选择方法配合使用,在选择方法中可选择一种或多种靶细胞且同时或依序将一种或多种靶细胞暴露于刺激剂。因此,在一些方面中,刺激特定细胞或细胞亚群可由于连同刺激的选择及分离而有偏差。

[0108] 在一些实施方案中,提供的方法涉及用试剂培养细胞的组合物(例如使细胞的组合物与试剂接触),该试剂例如多聚化试剂或寡聚粒子试剂,该多聚化试剂或寡聚粒子试剂结合至一种或多种受体结合剂(例如刺激剂)(参见例如图10A及10B)。在一些实施方案中,在使细胞组合物与具有一个或多个结合的受体结合剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂接触以及通常用具有一个或多个结合的受体结合剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂孵育细胞群体之后,细胞群体形成复合物/经由第一剂与多聚化试剂结合至多聚化剂。初始样品中含有的缺乏特定细胞表面分子的其他细胞群体不结合至具有一个或多个结合的受体结合剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。就此而言,应注意,细胞群体通常在其表面上具有多个拷贝的细胞表面分子且这些多个拷贝的结合通常为刺激或活化所必需。

[0109] 因此,多聚化剂通常提供多于一个结合位点,例如Z1,其中在一些情况下,多种剂能够可逆地结合(诸如经由一种或多种剂的结合伴侣,例如C1的结合)至一个或多个结合位点,例如Z1。在一些这类方面中,这呈现足够密度的第一剂、第二剂和/或其他剂至细胞群体。就此而言,应注意,多聚化剂可因此具有多个结合位点(例如Z1),例如天然状态的链霉亲和素突变蛋白(为同源四聚体)具有四个这类结合位点(例如Z1),且可进一步被寡聚化。在一些情况下,试剂可仅具有一个用于可逆地结合结合伴侣(例如C1)的结合位点(例如Z1)。这类实例为多聚钙调蛋白。钙调蛋白因此仅具有一个用于钙调蛋白结合肽的结合位点。然而,钙调蛋白可经生物素标记且接着与链霉亲和素寡聚物反应(还参见下文),由此提供多聚化试剂,其中多个钙调蛋白分子以高密度呈现于“支架”上由此提供多聚钙调蛋白。

[0110] 在一些实施方案中,在孵育之后或期望破坏刺激的其他适合的时间,可逆结合剂的结合伴侣(在本文中还可称为结合伴侣C,例如C1)与多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z(例如Z1)之间的结合通过破坏各自可逆结合而破坏。在一些情况下,破坏可通过添加

竞争物至含有正在结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的细胞群体的孵育/反应混合物来达成。为了竞争性破坏(其可理解为是竞争性洗脱)可逆结合剂的结合伴侣C(例如C1)与多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z(例如Z1)之间的可逆结合,孵育混合物/细胞群体可与游离的第一结合伴侣C(例如C1)或能够破坏第一结合伴侣与结合位点Z(例如Z1)之间的结合的该第一结合伴侣C的类似物接触。在结合伴侣C(例如C1)为结合至链霉亲和素的生物素结合位点的链霉亲和素结合肽的实例中,第一游离伴侣可为竞争性地结合的对应游离链霉亲和素结合肽或类似物。这类类似物可例如为生物素或生物素衍生物或类似物,诸如脱硫生物素。

[0111] 在一些实施方案中,添加游离的伴侣或其类似物导致结合伴侣C(例如C1)从多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂上置换,且因此,由于结合伴侣包含于可逆结合剂中,实现了这类剂从多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂上置换。该剂的这种置换转而导致第一剂自细胞表面分子上解离,尤其在如果第一剂与细胞表面受体之间的结合的结合亲和力具有 10^{-2}M 至 10^{-13}M 范围内的解离常数(K_d),因此也为可逆的。由于此解离,在一些方面中,细胞群体的刺激也被终止。

[0112] 在一些实施方案中,抗体分子针对其抗原(包括例如细胞表面受体分子)的结合亲和力通常在 10^{-7}M 至 10^{-13}M 的 K_d 的亲和力范围内。因此,常规单克隆抗体可用作剂(第一或第二,受体结合的,例如刺激剂或选择剂)。在一些实施方案中,为了避免导致较强结合的任何非所需亲合力效应,单克隆抗体还可以其单价抗体片段诸如Fab片段或单链Fv片段的形式使用。

[0113] 在一些实施方案中,由于一种或多种可逆结合剂自细胞表面分子解离,提供的方法具有附加优势:刺激的细胞群体在刺激时段结束时不含刺激剂。并且,在一些实施方案中,用于该方法中的所有其他试剂,即剂(例如第一或第二,受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂)以及结合伴侣C(例如C1)或其类似物的竞争试剂可经由“移除筒(cartridge)”自刺激的细胞群体容易地移除(参见例如国际专利申请WO 2013/124474中所述)。在一些情况下,例如其中多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂固定于固体支持物诸如生物反应器表面或磁珠上,其被阻止。因此,使用移除筒来移除游离剂及竞争试剂可包括将洗脱样品(例如在破坏可逆结合(binding或bond)之后获得的样品)负载至第二层析柱上。

[0114] 在一些实施方案中,此层析柱具有适合的固定相,其为亲和性层析基质且同时可充当凝胶渗透基质。在一些方面中,此亲和性层析基质在其上固定有亲和性试剂。在一些实施方案中,亲和性试剂可例如为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素、亲和素突变蛋白或其混合物。在一些实施方案中,该剂(例如第一或第二,受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂)、结合伴侣C(C1)的竞争试剂结合至亲和性试剂,由此固定于层析基质上。因此,含有经分离及扩增的细胞群体的洗脱样品耗尽了该剂(例如第一或第二,受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂)及竞争试剂。在一些实施方案中,培养的组合物不含任何反应物,这在一些方面中有利于与诊断应用(例如另外的FACSTM分选)结合使用或用于任何基于细胞的治疗应用。

[0115] 在一些实施方案中,自组合物移除试剂及其他组分的能力具有能够避免任何固体支持物诸如磁性珠粒的另外优势。在一些实施方案中,这意味着不存在通过这类磁性珠粒污染活化T细胞的风险或风险极小。在一些实施方案中,此还意味着符合GMP标准的方法可

相较于其他方法更易于建立,其他方法诸如使用Dyna beads®,其中必须采取额外措施以确保最终扩增的T细胞群体不含磁性珠粒。此外,在一些实施方案中,使用可溶多聚化剂使得自活化细胞群体(T细胞、B细胞或连同自然杀伤细胞)移除磁性珠粒容易得多,因为细胞可通过离心简单地沉淀,且可丢弃包含可溶多聚化剂的上清液。或者,可溶多聚化剂可在诸如上文(例如国际专利申请案W0 2013/124474)所述的移除筒的凝胶渗透基质中自扩增的细胞群体移除。在一些实施方案中,由于不存在固相(例如磁性珠粒),本发明还提供用于扩增细胞的自动化封闭系统,其可整合至已知细胞扩增系统中,已知细胞扩增系统为诸如购自GE Healthcare(Little Chalfont,Buckinghamshire,United Kingdom)的Xuri细胞扩增系统W25及WAVE Bioreactor 2/10系统或购自TerumoBCT Inc. (Lakewood,CO,USA)的QUANTUM®细胞扩增系统。

[0116] 在一些方面中,本文所提供的方法可包括携有至少两种特定细胞表面分子的细胞群体。在一些实施方案中,第一细胞表面分子涉及向细胞群体的初级活化信号,而第二细胞表面分子为涉及向细胞提供刺激的细胞表面上的辅助分子。在特定实施方案中,细胞群体与多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂接触,其中可逆或非可逆地结合向细胞提供初级活化信号的第一剂与诱导或调节额外信号诸如刺激细胞表面上的辅助分子的第二剂。在一些实施方案中,细胞群体与多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂接触,其中可逆地结合向细胞提供初级活化信号的第一剂和诱导或调节额外信号诸如刺激细胞表面上的辅助分子的第二剂。细胞群体可例如为T细胞群体,其中细胞表面分子为TCR/CD3复合物且细胞表面分子为辅助分子CD28。在一些方面中,相较于经由CD28的常规刺激,经由这类其他辅助分子的刺激可导致分化较少且在一些情况下长寿的群体T细胞诸如长寿记忆T细胞的增加。在一些实施方案中,作为初级活化信号的TCR/CD3复合物及结合辅助分子(例如CD28或其他辅助分子)的结合可为T细胞扩增/增殖所必需的。

[0117] 在一些实施方案中,本文所提供的方法还可进一步组合以包括至少一种可逆地结合至相同试剂例如相同多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的选择剂作为第一或第二受体结合剂(例如刺激剂)中的任一者或两者。在一些情况下,有可能增强或增加产生于孵育或培养的一个或多个特征,诸如T细胞亚群中的扩增(增殖)、活化、共刺激和/或存活的刺激,这可在至少一种或多种选择剂存在下于还在一种或多种刺激剂存在下发生的孵育或培养中可逆地被选择。举例而言,如本文的实例中所示,当这类细胞与多聚化试剂一起孵育时,T细胞组合物中的扩增程度在CD8+细胞中选择性地增加,除抗CD3抗体及抗CD28抗体刺激剂以外,抗CD8抗体还可逆地结合至该多聚化试剂。在一些实施方案中,相较于仅存在一种或多种刺激剂但不存在选择剂的情况下的孵育,当在一种或多种刺激剂及特异性结合至选择标记物的选择剂存在下孵育时,产生于孵育或培养的一个或多个特征,诸如扩增(增殖)、活化、共刺激和/或存活的刺激可在对于选择标记物呈阳性的培养组合物中的T细胞亚群中增加至少1.5倍、至少2.0倍、至少3.0倍、至少4.0倍、至少5.0倍、至少6.0倍、至少7.0倍、至少8.0倍、至少9.0倍、至少10倍或更多。细胞(诸如T细胞)该此偏爱或选择性特征准许人们控制T细胞的特定亚群或群体的终点特征。在一些实施方案中,选择标记物可为如本文所述的任何选择标记物。在一些实施方案中,选择标记物选自:CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0118] 在一些实施方案中,多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂包含至少一个用于可逆地结合第一剂的结合位点Z例如Z1,且第一剂还包含至少一种结合伴侣C例如C1,其中结合伴侣C例如C1能够可逆或非可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z例如Z1。因此,第一剂当与多聚化剂接触或孵育时能够经由形成于结合伴侣C例如C1与结合位点Z例如Z1之间的可逆结合而可逆地结合至该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。另外,第二剂可包含结合伴侣C例如C2,其中该结合伴侣C2能够分别可逆地结合至该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z例如Z2。在一些实施方案中,第二剂当与多聚化剂接触或孵育时经由形成于结合伴侣C例如C1与结合位点Z例如Z2之间的可逆结合而可逆地结合至该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些情况下,C1与C2可相同或基本上相同和/或包含相同或基本上相同的部分。在一些情况下,Z1与Z2可相同或基本上相同和/或包含相同或基本上相同的部分。

[0119] 在一些实施方案中,使用结合至多聚化剂的相同结合位点的部分作为结合伴侣C1及C2具有如下优势:可使用(第一结合伴侣C1以及第二结合伴侣C2的)相同竞争试剂或其类似物来破坏,且在一些情况下终止靶细胞(例如T细胞)群体的扩增且将此靶细胞(例如T细胞)群体自多聚化剂释放。

[0120] 在一些情况下,为了产生包含结合伴侣C的结合剂(例如第一或第二,受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂),结合伴侣C(例如C1或C2)可通过用于重组产生该剂(例如抗体片段)的各自表达载体提供,以使得结合伴侣C(例如C1或C2)为融合肽的一部分,在该融合蛋白中该剂在N端或C端处。在一些实施方案中,在该剂为抗体或抗原结合片段的情况下,结合伴侣C(例如C1或C2)可存在于轻链或重链的C端处。另外,克隆重组蛋白诸如抗体分子的可变结构域以及以重组方式产生各个蛋白质例如抗体片段的该方法为本领域技术人员所熟知的,参见例如Skerra,A.(1994)。在一些实施方案中,抗体分子可针对给定靶靶诸如CD3或CD28或如所描述的其他辅助剂或刺激剂分子由具有抗体样特性的人工结合分子产生,诸如通过熟知进化方法,诸如噬菌体展示(综述于例如Kay,B.K等人(1996) *Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual*,第1版,Academic Press,New York NY; Lowman,H.B.(1997) *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 26,401-424,或Rodi,D.J.及Makowski,L.(1999) *Curr.Opin.Biotechnol.* 10,87-93中)、核糖体展示(综述于Amstutz,P.等人(2001) *Curr.Opin.Biotechnol.* 12,400-405)或报导于Wilson,D.S.等人(2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98,3750-3755中的mRNA展示。

[0121] II.可逆试剂系统及相关用途

[0122] 在一些实施方案中,该方法采用可逆系统,其中至少一种能够结合至细胞表面上的分子(细胞表面分子)的剂(例如受体结合剂或选择剂)与试剂缔合,例如可逆地缔合。在一些情况下,该试剂含有多个能够结合例如可逆地结合至该剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合位点。在一些情况下,该试剂为具有与其结合的该至少一种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,至少一种试剂(例如受体结合剂或选择剂)含有至少一个可特异性结合分子的表位或区域的结合位点B,且还含有特异性结合至该试剂的至少一个结合位点Z的结合伴侣(在本文中还称为结合伴侣C)。在一些情况下,结合伴侣C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用为非共价相互作用。在一些情况下,结合伴侣C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用为共价相互作用。在一些实施方案中,结合伴侣C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用诸如非共价相互作用为可逆的。

[0123] 在一些实施方案中,可逆缔合可在作为或含有结合位点的物质诸如竞争试剂(还称作洗脱试剂)的存在下介导,该结合位点还能够结合至至少一个结合位点Z。一般而言,物质(例如竞争试剂)可充当竞争者。举例而言,在一些实施方案中,结合伴侣C由于其解离速率而自至少一个结合位点Z解离。在某些方面中,在解离之后,结合伴侣C可(i)再次结合至至少一个结合位点Z,或在一些方面中,(ii)若物质例如竞争试剂首先结合至一个或多个结合位点Z,则结合伴侣C将被阻止再次结合至至少一个结合位点Z。在一些方面中,物质可具有更高结合亲和力和/或以对于存在于该试剂中的结合位点Z高和/或足够浓度存在,和/或由于以相较于结合伴侣C较高的浓度存在,由此减少来自一种或多种结合伴侣C的连接和/或缔合的结合伴侣C的量。在一些实施方案中,物质(例如竞争试剂)对于至少一个结合位点Z的亲合性大于该剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C对于至少一个结合位点Z的亲合性。在某些实施方案中,试剂的结合位点Z与剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C之间的结合可通过添加物质(例如竞争试剂)而减小或降低,由此在一些方面中使得剂(例如受体结合剂或选择剂)与试剂的缔合有效地可逆。

[0124] 可用于这类可逆系统中的试剂描述于现有技术中并且在现有技术中是已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604和国际公布PCT申请第W02013/124474和W02014/076277号。能够形成可逆相互作用的试剂和结合伴侣以及能够逆转这类结合的物质(例如竞争试剂)的非限制性实例描述于下文。

[0125] A. 试剂

[0126] 在一些实施方案中,试剂含有一个或多个能够可逆地结合至由剂(例如受体结合剂或选择剂)包含的结合伴侣C的结合位点Z。在一些实施方案中,试剂含有多个结合位点Z,其各自能够特异性结合至包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C,使得试剂能够可逆地结合至多个剂(例如受体结合剂或选择剂),例如为具有一个或多个结合的试剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,试剂为单个分子(例如单体)或组成单个分子的复合物(例如四聚体)的寡聚物或多聚物,单个分子(例如单体)或组成单个分子的复合物(例如四聚体)各自含有至少一个结合位点Z。在一些实施方案中,试剂含有至少两个结合位点Z、至少三个结合位点Z、至少四个结合位点Z,诸如至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72或更多个结合位点Z。结合位点可全部相同或多个结合位点可含有一种或多种不同结合位点(例如Z1、Z2、Z3等)。在一些实施方案中,试剂为寡聚粒子试剂,且含有至少72、120、140、200、240、280、320、360、400、440、480、520、560、600、640、680、720、760、800、900、1,000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000或至少100,000个结合位点Z。

[0127] 在一些实施方案中,一种或多种剂(例如受体结合剂或选择剂)与试剂缔合(诸如可逆地结合至试剂),诸如经由存在于试剂上的一个或多个结合位点Z。在一些情况下,这导致剂(例如受体结合剂或选择剂)彼此紧密地排布,使得若具有(至少两个拷贝的)细胞表面分子的靶细胞与具有一个或多个能够结合特定分子的结合位点B的剂(例如受体结合剂或选择剂)接触,则可发生亲合力效应。

[0128] 在一些实施方案中,相同(即含有相同结合位点B)的两种或更多种不同剂(例如受体结合剂或选择剂)能够可逆地结合至试剂。在一些实施方案中,含有相同结合位点B的两

种或更多种不同试剂可逆地结合至寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,有可能使用至少两种不同(类型的)剂(例如受体结合剂或选择剂),且在一些情况下,三种或四种不同(类型的)的剂,例如两种或更多种不同受体结合剂和/或选择剂。举例而言,在一些实施方案中,试剂能够可逆地结合至含有结合位点B1、B2、B3或B4等的第一剂(例如受体结合剂或选择剂)和含有另一结合位点(例如结合位点B1、B2、B3或B4中的另一者)的第二剂(例如受体结合剂或选择剂)。在一些情况下,第一剂和第二剂的结合位点可相同。举例而言,在一些方面中,至少两种剂(例如受体结合剂或选择剂)中的每一者可结合至相同分子。在一些情况下,第一剂和第二剂的结合位点可不同。在一些方面中,至少两种剂(例如受体结合剂或选择剂)中的每一者可结合至不同分子,诸如第一分子、第二分子等。在一些情况下,不同分子诸如细胞表面分子可存在于相同靶细胞上。在其他情况下,不同分子诸如细胞表面分子可存在于不同靶细胞上,这些不同靶细胞存在于相同细胞群体中。在一些情况下,第三、第四等剂(例如受体结合剂或选择剂)可与相同试剂缔合,各自含有另一不同结合位点。

[0129] 在一些实施方案中,两种或更多种不同剂(例如受体结合剂或选择剂)含有相同结合伴侣C。在一些实施方案中,两种或更多种不同试剂(例如受体结合剂或选择剂)含有不同结合伴侣。在一些方面中,第一剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有可特异性结合至存在于试剂上的结合位点Z1的结合伴侣C1,且第二剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有可特异性结合至存在于试剂上的结合位点Z1或结合位点Z2的结合伴侣C2。因此,在一些情况下,试剂包含的多个结合位点Z包括结合位点Z1及Z2,其能够分别可逆地结合至剂(例如受体结合剂或选择剂)包含的结合伴侣C1及C2。在一些实施方案中,C1及C2相同,和/或Z1及Z2相同。在其他方面中,多个结合位点Z中的一个或多个可不同。在其他情况下,多个结合伴侣C中的一个或多个可不同。选择与含有结合位点Z的试剂相容的不同结合伴侣C的任何组合在熟习本领域技术人员的能力内,只要结合伴侣C中的每一者能够与结合位点Z中的一者相互作用诸如特异性结合。

[0130] 在一些实施方案中,试剂为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(诸如中性亲和素)或其混合物,其中这类试剂含有一个或多个用于与结合伴侣C可逆缔合的结合位点Z。在一些实施方案中,结合伴侣C可为生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或其他能够特异性结合至链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素或亲和素突变蛋白或类似物的分子。在一些实施方案中,试剂为或含有链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素的类似物或突变蛋白,或亲和素的类似物或突变蛋白,其可逆地结合生物素、生物素类似物或其生物学活性片段。在一些实施方案中,试剂为或含有链霉亲和素的类似物或突变蛋白或亲和素的类似物或突变蛋白,其可逆地结合链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,物质(例如竞争试剂)可为能够与结合伴侣C竞争结合一个或多个结合位点Z的生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,结合伴侣C与物质(例如竞争试剂)不同,且相较于结合伴侣的亲合力,物质(例如竞争试剂)针对一个或多个结合位点Z展现较高结合亲合力。

[0131] 在一些实施方案中,链霉亲和素可为野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物,诸如链霉亲和素样多肽。同样,在一些方面中,亲和素包括野生型亲和素或亲和素的突变蛋白或类似物,诸如中性亲和素,一种通常展现更中性pI且可用作天然亲和素的替代物的具有经修饰精氨酸的去糖基化亲和素。一般而言,去糖基化、中性形式的亲和素包括

那些市售形式,诸如可购自Sigma Aldrich的“Extravidin”,或例如购自Thermo Scientific或Invitrogen的“NeutrAvidin”。

[0132] 在一些实施方案中,试剂为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)具有由Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882(SEQ ID NO:1)所揭示的氨基酸序列。一般而言,链霉亲和素以四个相同亚基的四聚体形式天然地存在,即其为同源四聚体,其中每个亚基含有用于生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的单一结合位点。链霉亲和素亚基的例示性序列为SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,但这类序列还可包括存在于来自其他链霉菌物种的其同源物中的序列。特定言之,链霉亲和素的各亚基可展现针对生物素的强结合亲和力,其中解离常数(K_d)为近似 $10^{-14}M$ 。在一些情况下,链霉亲和素可以单价四聚体存在,其中四个结合位点中的仅一者是具有功能的(Howarth等人(2006)Nat.Methods,3:267-73;Zhang等人(2015)Biochem.Biophys.Res.Comm.,463:1059-63)、以二价四聚体存在,其中四个结合位点中的两者是具有功能的(Fairhead等人(2013)J.Mol.Biol.,426:199-214),或可以单体或二聚体形式存在(Wu等人(2005)J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等人(2010)Biochemistry,50:8682-91)。

[0133] 在一些实施方案中,链霉亲和素可呈任何形式,诸如野生型或未经修饰的链霉亲和素,诸如来自链霉菌物种的链霉亲和素或其功能活性片段,该功能活性片段包括至少一个含有用于生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的结合位点的功能亚基,诸如一般含有至少一个来自SEQ ID NO:1中所示的亲亲和素链霉菌(*Streptomyces avidinii*)的野生型链霉亲和素或其功能活性片段的功能亚基。举例而言,在一些实施方案中,链霉亲和素可包括野生型链霉亲和素的片段,其在N端和/或C端处缩短。这类最小链霉亲和素包括在N端开始于SEQ ID NO:1的氨基酸位置10至16的区域中且在C端终止于SEQ ID NO:1的氨基酸位置133至142的区域中的任何。在一些实施方案中,链霉亲和素的功能活性片段含有SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,链霉亲和素(诸如SEQ ID NO:2中所示的)可在对应于Ala13(根据SEQ ID NO:1中所示的编号)的位置处另外含有N端甲硫氨酸。链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中的残基位置的参考为参考SEQ ID NO:1中的残基的编号。

[0134] 在一些方面中,链霉亲和素突变蛋白包括多肽,其通过一个或多个氨基酸取代、缺失或添加区别于未经修饰或野生型链霉亲和素的序列,但包括至少一个含有用于生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的结合位点的功能亚基。在一些方面中,链霉亲和素样多肽及链霉亲和素突变蛋白可为基本在免疫学上等效于野生型链霉亲和素且尤其能够以与wt-链霉亲和素相同或不同的亲和性结合生物素、生物素衍生物或生物素类似物的多肽。在一些情况下,链霉亲和素样多肽或链霉亲和素突变蛋白可含有并非野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或其可包括野生型链霉亲和素的仅一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素样多肽为与野生型链霉亲和素不相同的多肽,因为宿主不具有将宿主产生的多肽转化为野生型链霉亲和素的结构所需的酶。在一些实施方案中,链霉亲和素还可以链霉亲和素四聚体及链霉亲和素二聚体,特定言的链霉亲和素同源四聚体、链霉亲和素同源二聚体、链霉亲和素异源四聚体及链霉亲和素异源二聚体的形式存在。一般而言,各亚基通常具有用于生物素或生物素类似物或用于链霉亲和素结合肽的结合位点。链霉亲和素或

链霉亲和素突变蛋白的实例提及于例如WO 86/02077、DE 19641876 A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中。

[0135] 在一些实施方案中,生物素一般以其天然d-立体异构形式,即D-生物素采用。在一些实施方案中,生物素为D-生物素。在特定实施方案中,生物素类似物和/或衍生物的实例包括(但不限于)D-生物素、N-酮生物素类似物、酮生物素类似物、N-叠氮化物生物素类似物、叠氮化物生物素类似物、N-酰基叠氮化物生物素类似物、NBD-GABA生物素类似物、1,2-二胺生物素类似物、N-炔烃生物素类似物、四巯基生物素类似物、N-羟基琥珀酰亚胺-亚氨基生物素、亚氨基生物素、酰氨基生物素N-羟基琥珀酰亚胺-亚氨基生物素、酰氨基生物素、脱巯生物素、生物素砜、己酰基酰氨基生物素及生胞素。在一些方面中,生物素类似物为或包括生物素砜、2'-硫代生物素、2'-亚氨基生物素、d-脱巯生物素、d1-脱巯生物素、d1-脱巯生物素甲酯及其他咪唑烷酮衍生物及Green, N.M., (1975) 于Advances in Protein Chemistry (Anson, M.L. 及Edsell, J.T. 编), 第29卷, 第85-133页, Academic Press, New York中所述的那些。在某些实施方案中,生物素类似物或衍生物为D-生物素、脱巯生物素和/或亚氨基生物素。

[0136] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可含有并非未经修饰或野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸或可包括野生型或未经修饰的链霉亲和素的仅一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有至少一个亚基,其相较于未经修饰或野生型链霉亲和素的亚基,诸如相较于SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素亚基或其功能活性片段(例如SEQ ID NO:2中所示),可具有一个或多个氨基酸取代(置换)。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白的至少一个亚基相较于野生型或未经修饰的链霉亲和素可具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸差异,和/或含有至少一个包含与SEQ ID NO:1、2或59中所示的氨基酸序列展现至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的亚基,其中这类链霉亲和素突变蛋白展现结合生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的功能活性。在一些实施方案中,氨基酸置换(取代)为保守或非保守突变。链霉亲和素突变蛋白的实例为本领域已知的,参见例如美国专利号5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;or 6,368,813;或国际公布PCT申请第W02014/076277号。

[0137] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包括含有一个或多个含有一个或多个用于生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的结合位点Z的功能亚基,诸如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个,且在一些情况下,5、6、7、8、9、10、11、12个或更多个功能亚基的蛋白质。在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白可包括单体;二聚体,包括异源二聚体或同源二聚体;四聚体,包括同源四聚体、异源四聚体、单价四聚体或二价四聚体;或可包括其更高阶的多聚物或寡聚物。

[0138] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对于肽配体结合伴侣的结合亲和力诸如解离常数(K_d)为小于 $1 \times 10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $1 \times 10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 或 $1 \times 10^{-7}M$,但一般大于 $1 \times 10^{-13}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或 $1 \times 10^{-11}M$ 。举例而言,诸如美国专利第5,506,121号中所揭示的肽序列(Strep-tag)可充当生物素模拟物且证实针对链霉亲和素的结合亲和力为例如约 10^{-4} 与 $10^{-5}M$ 之间的 K_d 。在一些情况下,可通过在链霉亲和素分子内制造突变而进一步提高结合亲和力,参见例如美国专利第6,103,493号或国际公布PCT申请第

W02014/076277号。在一些实施方案中,结合亲和力可通过本领域中已知的方法诸如本文所述的任何方法测定。

[0139] 在一些实施方案中,用于肽配体结合伴侣的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的结合亲和力为小于 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7}\text{M}$,但一般大于 $1 \times 10^{-13}\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 。举例而言,诸如美国专利第5,506,121号中所揭示的肽序列(Strep-tag)可充当生物素模拟物且展示针对链霉亲和素的结合亲和力,例如以大致 10^{-4} 与 10^{-5}M 之间的 K_d 。在一些情况下,可通过在链霉亲和素分子内制造突变而进一步提高结合亲和力,参见例如美国专利第6,103,493号或国际公布PCT申请案第W02014/076277号。在一些实施方案中,结合亲和力可通过此项技术中已知的方法,诸如本文所述的任何方法测定。

[0140] 在一些实施方案中,试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白展现针对肽配体结合伴侣的结合亲和力,该肽配体结合伴侣可为存在于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C。在一些实施方案中,肽序列含有具有SEQ ID NO:9中所示的通式的序列,诸如含有SEQ ID NO:10中所示的序列。在一些实施方案中,肽序列具有SEQ ID NO:11中所示,诸如SEQ ID NO:12中所示的通式。在一个实例中,肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(还称为**Strep-tag®**,示于SEQ ID NO:7中)。在一个实例中,肽序列为Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(还称为**Strep-tag® II**,示于SEQ ID NO:8中)。在一些实施方案中,肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的连续排布,其中两个模块之间的距离为至少0个且不超过50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸且至少含有序列His-Pro-Xaa(SEQ ID NO:9),其中Xaa为谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,且其中另一结合模块具有相同或不同链霉亲和素肽配体,诸如SEQ ID NO:11中所示(参见例如国际公布PCT申请第W002/077018号;美国专利第7,981,632号)。在一些实施方案中,肽配体含有具有SEQ ID NO:13或14中的任一者中所示的式的序列。在一些实施方案中,肽配体具有SEQ ID NO:15-19中的任一者中所示的氨基酸的序列。在大多数情况下,所有这些链霉亲和素结合肽结合至相同结合位点,即链霉亲和素的生物素结合位点。若这类链霉亲和素结合肽中的一个或多个用作结合伴侣C,例如C1及C2,则经由结合伴侣C结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂通常由一个或多个链霉亲和素突变蛋白组成。

[0141] 在一些实施方案中,试剂为或含有链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中,相较于SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物学活性部分,链霉亲和素突变蛋白含有一个或多个突变(例如氨基酸置换)。举例而言,链霉亲和素的生物学活性部分可包括在N端和/或C端处缩短的链霉亲和素变体,其在一些情况下称为最小链霉亲和素。在一些实施方案中,N端缩短的最小链霉亲和素(可对其进行所述突变中的任一者)相较于SEQ ID NO:1中所示的序列在N端开始于氨基酸位置10至16的区域中且在C端终止于氨基酸位置133至142的区域中。在一些实施方案中,N端缩短的链霉亲和素(可对其进行所述突变中的任一者)含有SEQ ID NO:2或59中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,最小链霉亲和素含有位置Ala13至Ser139的氨基酸序列且可选具有N端甲硫氨酸残基而非Ala13。出于本文的目的,氨基酸位置的编号通篇是指SEQ ID NO:1中所示的wt-链霉亲和素的编号(例如Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986),1871-1882,还参见图9)。

[0142] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白为如美国专利第6,103,493号中所述的突变体。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在基于(诸如SEQ ID NO:1中所示的)野生型链霉亲和素的氨基酸序列的氨基酸位置44至53的区域中含有至少一个突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在一个或多个残基44、45、46和/或47处含有突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在野生型链霉亲和素的位置44处含有用疏水性脂肪族氨基酸(例如Val、Ala、Ile或Leu)置换Glu、在位置45处的任何氨基酸、在位置46处的脂肪族氨基酸(诸如疏水性脂肪族氨基酸),和/或在位置47处的用碱性氨基酸(例如Arg或Lys,诸如一般而言Arg)置换Val。在一些实施方案中,Ala为位置46和/或Arg为位置47和/或Val或Ile为位置44。在一些实施方案中,链霉亲和素突变体含有残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,诸如含有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4或60中所示的氨基酸序列的例示性链霉亲和素突变蛋白中所示(还称为链霉亲和素突变体1,SAM1)。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,诸如含有SEQ ID NO:5、6或61中所示的氨基酸序列的例示性链霉亲和素突变蛋白中所示(还称为SAM2)。在一些情况下,这类链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中,且以商标**Strep-Tactin®**市售。

[0143] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白为如国际公布PCT申请第W0 2014/076277号中所述的突变体。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在参考SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置的氨基酸位置44至53的区域中含有至少两个半胱氨酸残基。在一些实施方案中,半胱氨酸残基存在于位置45及52处以产生连接这些氨基酸的二硫桥键。在此实施方案中,氨基酸44通常为甘氨酸或丙氨酸且氨基酸46通常为丙氨酸或甘氨酸且氨基酸47通常为精氨酸。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在参考SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置的氨基酸残基115至121的区域中含有至少一个突变或氨基酸差异。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置117、120及121处含有至少一个突变和/或含有氨基酸118及119的缺失及至少氨基酸位置121的取代。

[0144] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在对应于位置117的位置处含有突变,该突变可以是大的疏水性残基,如Trp、Tyr或Phe,或带电残基,如Glu、Asp或Arg,或亲水性残基,如Asn或Gln,或在一些情况下,疏水性残基Leu、Met或Ala,或极性残基Thr、Ser或His。在一些实施方案中,位置117处的突变与对应于位置120的位置处的突变(该突变可以是小的残基,如Ser或Ala或Gly)和对应于位置121的位置处的突变(该突变可以是疏水性残基,诸如大的疏水性残基,如Trp、Tyr或Phe)组合。在一些实施方案中,位置117处的突变与以下组合:对应于SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物学活性片段的位置120的位置处的突变,该突变可为疏水性残基,诸如Leu、Ile、Met或Val,或一般而言,Tyr或Phe,及对应于相较于SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物学活性片段的位置121的位置处的突变,该突变可针对小型残基,如Gly、Ala或Ser,或与Gln,或与疏水性残基,如Leu、Val、Ile、Trp、Tyr、Phe或Met。在一些实施方案中,这类突变蛋白还可含有残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰及Tyr¹²¹。在一些实施方案中,突变蛋白链霉亲和素含有SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列展现至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,含有

残基Val144、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120及Tyr121且展现结合至生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽的功能性活性。

[0145] 在一些实施方案中,分子,例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白具有约5至30个伯胺,其在一些情况下可包括N端胺和/或一个或多个赖氨酸残基。在特定实施方案中,分子为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白(包括所述链霉亲和素突变蛋白中的任一者)的四聚体,其作为四聚体,含有大于5个伯胺,诸如一般而言5至40个或15至35个,诸如一般而言约15、16、17、18、19、20、21、22、23、14、25、26、27、28、29、30、31、32或更多个伯胺。在一些实施方案中,分子为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或其截短片段,诸如这类所述分子中的任一者。在特定实施方案中,分子为包含SEQ ID NO:2、4、6、27、59、60或61中的任一者中所示的序列的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的四聚体,其作为四聚体,为含有20个伯胺的分子,包括每一单体1个N端胺和4个赖氨酸。

[0146] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可含有呈任何组合的以上突变中的任一者,且所得链霉亲和素突变蛋白可展现通过解离常数(K_d)表征的结合亲和力,该解离常数针对肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;还称为**Strep-tag®**,示于SEQ ID NO:7中)为或小于 $3.7 \times 10^{-5}M$,和/或针对肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;还称为**Strep-tag® II**,示于SEQ ID NO:8中)为或小于 $7.1 \times 10^{-5}M$,和/或针对SEQ ID NO:7-19中的任一者中所示的肽配体中的任一者为或小于 $7.0 \times 10^{-5}M$ 、 $6.0 \times 10^{-5}M$ 、 $5.0 \times 10^{-5}M$ 、 $4.0 \times 10^{-5}M$ 、 $3.0 \times 10^{-5}M$ 、 $2.0 \times 10^{-5}M$ 、 $1.0 \times 10^{-5}M$ 、 $9.0 \times 10^{-6}M$ 、 $8.0 \times 10^{-6}M$ 、 $7.0 \times 10^{-6}M$ 、 $6.0 \times 10^{-6}M$ 、 $5.0 \times 10^{-6}M$ 、 $4.0 \times 10^{-6}M$ 、 $3.0 \times 10^{-6}M$ 、 $2.0 \times 10^{-6}M$ 、 $1.0 \times 10^{-6}M$ 、 $9.0 \times 10^{-7}M$ 、 $8.0 \times 10^{-7}M$ 、 $7.0 \times 10^{-7}M$ 、 $6.0 \times 10^{-7}M$ 、 $5.0 \times 10^{-7}M$ 、 $4.0 \times 10^{-7}M$ 、 $3.0 \times 10^{-7}M$ 、 $2.0 \times 10^{-7}M$ 或 $1.0 \times 10^{-7}M$,但一般而言大于 $1 \times 10^{-13}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或 $1 \times 10^{-11}M$ 。

[0147] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可含有呈任何组合的以上突变中的任一者,且所得链霉亲和素突变蛋白可展现通过缔合常数表征的结合亲和力,该缔合常数针对肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly;还称为**Strep-tag®**,示于SEQ ID NO:7中)为或大于 $2.7 \times 10^4 M^{-1}$,和/或针对肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;还称为**Strep-tag® II**,示于SEQ ID NO:8中)为或大于 $1.4 \times 10^4 M^{-1}$,和/或针对SEQ ID NO:7-19中的任一者中所示的肽配体中的任一者为或大于 $1.43 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.11 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.25 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.43 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.11 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.25 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.43 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1.67 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $2 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $3.33 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $5 \times 10^6 M^{-1}$ 、 $1 \times 10^7 M^{-1}$,但一般小于 $1 \times 10^{13} M^{-1}$ 、 $1 \times 10^{12} M^{-1}$ 或 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 。

[0148] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白展现如SEQ ID NOs:3-6,27,28,60,or 61中任一项所示的氨基酸序列或与SEQ ID NOs:3-6,27,28,60,or 61中任一项所示的氨基酸序列展现至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高序列同一性的氨基酸序列,并且展现通过解离常数(K_d)表征的结合亲和力,该解离常数针对肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly;还称为**STREP-TAG®**,示于SEQ ID NO:7中)为或小于 $3.7 \times 10^{-5}M$,和/或针对肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;还称为

STREP-TAG® II, 示于SEQ ID NO:8中) 为或小于 $7.1 \times 10^{-5} \text{M}$, 和/或针对SEQ ID NO:7-19中的任一者中所示的肽配体中的任一者为或小于 $7.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $6.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $3.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $2.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $9.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $8.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $7.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $6.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $3.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $2.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $9.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $8.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $7.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $6.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $5.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $4.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $3.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $2.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 或 $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$, 但一般大于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 的结合亲和力。

[0149] 在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白还展现与其他链霉亲和素配体的结合, 其它链霉亲和素配体诸如(但不限于)生物素、亚氨基生物素、硫辛酸、脱硫生物素、二氨基生物素、HABA (羟基偶氮苯-苯甲酸) 和/或二甲基-HABA。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白展现针对另一链霉亲和素配体诸如生物素或脱硫生物素的结合亲和力, 该结合亲和力大于链霉亲和素突变蛋白针对生物素模拟肽配体(诸如SEQ ID NO:7-19中的任一者中所示)的结合亲和力。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白展现针对另一链霉亲和素配体诸如生物素或脱硫生物素的结合亲和力, 该结合亲和力与链霉亲和素突变蛋白针对生物素模拟肽配体(诸如SEQ ID NO:7-19中的任一者中所示)的结合亲和力相同、大约相同或比其更低。在一些实施方案中, 生物素或生物素类似物或衍生物(例如脱硫生物素)可用作所提供方法中的竞争试剂。举例而言, 作为实例, 称为**Strep-tactin®**的突变蛋白链霉亲和素(例如含有SEQ ID NO:4或60中所示的序列)与称为**STREP-TAG® II**的肽配体(例如示于SEQ ID NO:8中)的相互作用的特征在于相较于针对生物素-链霉亲和素相互作用的约 10^{-13}M , K_d 为约 10^{-6}M 的结合亲和力。在一些情况下, 可以高亲和力以 10^{-10} 与 10^{-13}M 之间或约 10^{-10} 与 10^{-13}M 之间的 K_d 与**Strep-Tactin®**结合的生物素可与**STREP-TAG® II**竞争结合位点。

[0150] 在一些情况下, 该试剂含有至少两个可能能够结合至过渡金属离子的螯合基团K。在一些实施方案中, 试剂可能能够结合至寡组氨酸亲和标签、谷胱甘肽-S-转移酶、钙调蛋白或其类似物、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG-肽、HA-标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)、HSV表位、myc表位和/或生物素化的载体蛋白。

[0151] 在一些实施方案中, 试剂为寡聚物或多聚物。在一些实施方案中, 寡聚物或多聚物可通过直接地或间接地连接天然存在形式的蛋白质的个别分子, 通过直接地或间接地连接单体的单个分子或构成单个分子的亚基的复合物(例如直接地或间接地连接天然存在形式的蛋白质的二聚体、三聚体、四聚体等)而产生。举例而言, 在一些实施方案中, 四聚链霉亲和素或亲和素可称为单分子或各个寡聚物或多聚物的最小建构块(building block)。在特定实施方案中, 链霉亲和素或亲和素的四聚同源二聚体或异源二聚体可称为单分子或各个寡聚物或多聚物的最小建构块。在一些实施方案中, 寡聚物或多聚物可含有至少2个蛋白质的单分子的连接(例如为2聚的), 或可为至少3聚的、4聚的、5聚的、6聚的、7聚的、8聚的、9聚的、10聚的、11聚的、12聚的、13聚的、14聚的、15聚的、16聚的、17聚的、18聚的、19聚的、20聚的、25聚的、30聚的、35聚的、40聚的、45聚的或50聚的蛋白质的单分子(例如单体、四聚体)。在某些实施方案中, 寡聚物可为至少100聚的、200聚的、300聚的、400聚的、500聚的、1,000聚的、1,500聚的、2,000聚的、2,500聚的、3,000聚的或至少3,500聚的蛋白质的单分子。在一些实施方案中, 试剂为第II(A)(1)或(2)部分中所述的寡聚粒子试剂, 或为通过第II(B)(3)部分中所述的方法制造的寡聚粒子试剂。

[0152] 寡聚物可使用本领域中已知的任何方法产生,诸如公布的美国专利申请第US2004/0082012号中所述的任何方法。在一些实施方案中,寡聚物或多聚物含有可通过诸如多糖或双官能连接剂交联的两个或更多个单分子。

[0153] 在一些实施方案中,寡聚物或多聚物是通过在多糖存在下交联单分子或构成单分子的亚基的复合物获得。在一些实施方案中,寡聚物或多聚物可通过将羧基残基引入至多糖例如葡萄聚糖中而制备。在一些方面中,试剂的单分子(例如单体、四聚体)可使用常规碳化二亚胺化学经由内部赖氨酸残基和/或游离N端的伯氨基偶合至葡萄聚糖主链中的羧基。在一些实施方案中,以每摩尔葡萄聚糖约60摩尔该试剂的单分子(例如单体、四聚体)的摩尔比进行偶合反应。

[0154] 在一些实施方案中,试剂为一个或多个链霉亲和素、或亲和素、或链霉亲和素的任何类似物或突变蛋白、或亲和素的类似物或突变蛋白(例如中性亲和素)的寡聚物或多聚物。在一些实施方案中,结合位点Z为亲和素或链霉亲和素的天然生物素结合位点,对于该亲和素或链霉亲和素可在单分子中存在至多四个结合位点(例如四聚体含有四个结合位点Z),由此同源四聚体可含有至多4个相同的结合位点即Z1,而异源四聚体可含有至多4个可不同的结合位点例如含有Z1和Z2。在一些实施方案中,寡聚物产生或生产自多个相同链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白的单分子(例如多个同源四聚体),在此情况下寡聚物的每个结合位点Z例如Z1是相同的。举例而言,在一些情况下,寡聚物可含有多个结合位点Z1,诸如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50或更多个结合位点Z1。在一些实施方案中,寡聚物产生或生产自多个可为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白的异源四聚体的单分子,和/或产生或生产自多个在结合位点Z例如Z1及Z2不同的链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白的两个或更多个不同的单分子(例如不同的同源四聚体),在此情况下,多个不同结合位点Z,例如Z1和Z2可存在于寡聚物中。举例而言,在一些情况下,寡聚物可含有多个结合位点Z1及多个结合位点Z,其组合地可包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50或更多个组合的结合位点Z1及Z2。

[0155] 在一些情况下,各个寡聚物或多聚物可通过多糖交联。在一个实施方案中,在第一步骤中链霉亲和素或亲和素或链霉亲和素或亲和素的类似物(例如中性亲和素)的寡聚物或多聚物可通过将羧基残基引入至多糖例如葡萄聚糖中而制备,基本上如Noguchi, A等人, *Bioconjugate Chemistry* (1992) 3, 132-137所述。在一些这类方面中,链霉亲和素或亲和素或其类似物可接着在第二步骤中使用常规碳化二亚胺化学经由内部赖氨酸残基和/或游离N端的伯氨基连接至葡萄聚糖主链中的羧基。在一些情况下,链霉亲和素或亲和素或链霉亲和素或亲和素的任何类似物的交联寡聚物或多聚物还可通过经由双官能分子(该双官能分子充当连接剂,诸如戊二醛)交联或通过本领域中描述的其他方法获得。

[0156] 在一些实施方案中,寡聚物或多聚物是通过使用双官能连接剂或其他化学连接剂(诸如戊二醛)交联单分子或构成单分子的亚基的复合物而获得,或通过本领域中已知的其他方法获得。在一些方面中,链霉亲和素或亲和素或链霉亲和素或亲和素的任何突变蛋白或类似物的交联寡聚物或多聚物可通过经由双官能分子(充当连接剂,例如戊二醛)交联单链霉亲和素或亲和素分子而获得、或通过本领域中描述的其他方法获得。举例而言,有可能

通过将巯基引入至链霉亲和素突变蛋白中(这可例如通过使链霉亲和素突变蛋白与2-亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂(Traut's reagent))反应而进行)及通过例如在独立反应中活化链霉亲和素突变蛋白中可用的氨基而产生链霉亲和素突变蛋白的寡聚物。在一些实施方案中,该氨基的活化可通过使链霉亲和素突变蛋白与市售杂双官能团交联剂,诸如4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基SMCC)或6-[β -马来酰亚胺基丙酰基]己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)反应来实现。在一些这类实施方案中,将由此获得的两种反应产物混合在一起,通常导致包含于一批改性链霉亲和素突变蛋白中的巯基与另一批改性链霉亲和素突变蛋白的活化(诸如通过马来酰亚胺官能团)的氨基酸反应。在一些情况下,通过此反应,形成链霉亲和素突变蛋白的多聚物/寡聚物。这些寡聚物可具有任何适合数目的单分子,诸如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50、100、200、300、400、500、1,000、1,500、2,000、2,500、3,000、3,500、4,000或更多,且寡聚程度可根据反应条件而变化。

[0157] 在一些实施方案中,寡聚或聚合试剂可经由尺寸排阻层析法分离,且任何所需级分可作为该试剂使用。举例而言,在一些实施方案中,在2-亚氨基硫杂环戊烷及杂双官能团交联剂(诸如磺基SMCC)存在下使改性链霉亲和素突变蛋白反应之后,可经由尺寸排阻层析法分离寡聚或多聚试剂,且任何所需级分可作为该试剂使用。在一些实施方案中,寡聚物不具有(且不需要具有)单一分子量,但其可观测到统计重量分布,诸如高斯分布。在一些情况下,任何具有超过三个链霉亲和素或突变蛋白四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体)的任何寡聚物(诸如一般3至50个四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体),10至40个四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体),或25至35个四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体))可作为试剂使用。寡聚物可具有例如3至25个链霉亲和素突变蛋白四聚体(例如同源四聚体或异源四聚体)。在一些方面中,在链霉亲和素突变蛋白的分子量为约50kDa的情况下,寡聚物的分子量可为约150kDa至约2000kDa、约150kDa至约1500kDa、约150kDa至约1250kDa、约150kDa至1000kDa、约150kDa至约500kDa、或约150kDa至约300kDa、约300kDa至约2000kDa、约300kDa至约1500kDa、约300kDa至约1250kDa、约300kDa至1000kDa、约300kDa至约500kDa、约500kDa至约2000kDa、约500kDa至约1500kDa、约500kDa至约1250kDa、约500kDa至1000kDa、约1000kDa至约2000kDa、约1000kDa至约1500kDa、约1000kDa至约1250kDa、约1250kDa至约2000kDa、或约1500kDa至约2000kDa。在一些实施方案中,寡聚物的分子量大于2,000kDa。一般而言,由于每个链霉亲和素分子/突变蛋白具有四个生物素结合位点,这类试剂可提供12至160个结合位点Z,诸如12至160个或更多个结合位点Z。在一些实施方案中,寡聚物为可溶试剂。

[0158] 1. 寡聚物粒子试剂

[0159] 本文提供由多个分子组成和/或含有多个分子的寡聚粒子试剂,该分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂为可溶试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有至少一个可逆地结合至或能够可逆地结合至一种或多种剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个能够(例如在连接至一种或多种剂的结合伴侣例如结合伴侣C上的位点处)可逆地结合至一种或多种剂的结合位点。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂可逆地结合至一种或多种剂。在特定实施方案中,寡聚物粒子试剂为通过第II(B)部分中所述的方法中的

任一者制造、生产或产生的寡聚粒子。

[0160] 在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂由寡聚分子组成和/或含有寡聚分子,所述寡聚分子为含有或包括一个或多个氨基酸的蛋白质、多肽、肽。在一些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有寡聚分子和/或由寡聚分子组成,所述寡聚分子含有多个能够结合至一种或多种剂例如受体结合剂的结合位点。在一些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个能够结合至第II(B)(4)部分和/或第II(B)(5)部分中所述的剂的结合位点。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个在连接至一种或多种剂的结合伴侣例如结合伴侣C内的位点处结合至或能够在连接至一种或多种剂的结合伴侣例如结合伴侣C内的位点处结合至一种或多种剂的结合位点。在特定实施方案中,经寡聚的分子含有多个能够结合至第II(A)部分中所述的结合伴侣C的结合位点。在一些实施方案中,经寡聚的分子为或包括链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(诸如中性亲和素)。在某些实施方案中,链霉亲和素为呈天然状态的四聚体。因此在某些实施方案中,分子为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(诸如中性亲和素)的四聚体。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂含有多种第II(A)部分中所述的试剂中的任一者或多者。

[0161] 在特定实施方案中,寡聚粒子试剂的尺寸是通过本领域中已知的任何适合的方法测定。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂的质量和/或分子量是通过本领域中的任何适合的方法测定,包括(但不限于)电泳(例如SDS-PAGE)、层析(例如凝胶过滤层析或SEC)或质谱。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂的尺寸例如半径通过动态光散射技术(DLS)测定。在一些实施方案中,尺寸例如半径是通过流场流分离(F4)技术测定。在某些实施方案中,F4可用于基于独立于粒子密度的尺寸来分离及测量粒子。在某些实施方案中,粒度是通过不对称流场流分离(AF4)来测量。在一些实施方案中,粒子的尺寸可通过测量粒子的直径或半径测定。在某些实施方案中,粒子的尺寸可通过测量粒子的流体动力学半径或回转半径测定。在某些实施方案中,半径由动态光散射技术测定。在某些实施方案中,半径例如流体动力学半径和/或斯托克斯半径(Stokes radius)可由层析技术例如尺寸排阻层析法SEC测定。

[0162] 在特定实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的半径例如平均半径为至少5nm、至少10nm、至少15nm、至少20nm、至少25nm、至少30nm、至少35nm、至少40nm、至少45nm、至少50nm、至少55nm、至少60nm、至少65nm、至少70nm、至少75nm、至少80nm、至少85nm、至少90nm、至少95nm、至少100nm、至少105nm、至少110nm、至少115nm、至少120nm、至少125nm、至少130nm、至少135nm、或至少140nm。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂的半径在5nm与150nm之间、在25nm与150nm之间、在50nm与150nm之间、在75nm与125nm之间、在80nm与140nm之间、在85nm与135nm之间、在80nm与120nm之间、在80nm与115nm之间或在90nm与110nm之间(含上下限值)。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的半径为约85nm、约86nm、约87nm、约88nm、约89nm、约90nm、约91nm、约92nm、约93nm、约94nm、约95nm、约96nm、约97nm、约98nm、约99nm、约100nm、约101nm、约102nm、约103nm、约104nm、约105nm、约106nm、约107nm、约108nm、约109nm、约110nm、约111nm、约112nm、约113nm、约114nm或约115nm。在某些实施方案中,粒子的半径在80nm与115nm之间(含上下限值)。

[0163] 在一些实施方案中,半径为流体动力学半径、回转半径、斯托克斯半径、斯托克斯-爱因斯坦半径(Stokes-Einstein radius)和/或溶液中的有效水合半径。在某些实施方案

中,半径为流体动力学半径。在一些实施方案中,半径为斯托克斯半径。在特定实施方案中,流体动力学半径为斯托克斯半径。在一些实施方案中,半径为多个粒子的平均值、中值和/或平均半径。

[0164] 在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的分子量为至少 2×10^6 g/mol、 3×10^6 g/mol、 5×10^6 g/mol、 1×10^7 g/mol、至少 5×10^7 g/mol、至少 1×10^8 g/mol、至少 1.25×10^8 g/mol、至少 1.5×10^8 g/mol、至少 2×10^8 g/mol或至少 5×10^8 g/mol。在一些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的分子量在 1×10^6 g/mol与 1×10^{10} g/mol之间、在 2×10^6 g/mol与 1×10^{10} g/mol之间、在 1×10^7 g/mol与 1×10^9 g/mol之间、在 5×10^7 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、在 7.5×10^7 g/mol与 2.5×10^8 g/mol之间、在 2.5×10^7 g/mol与 2.75×10^8 g/mol之间、在 1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、在 7.5×10^7 g/mol与 5×10^8 g/mol之间或在 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间(含上下限值)。在特定实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的分子量为约 7.5×10^7 g/mol、约 8.0×10^7 g/mol、约 9.0×10^7 g/mol、约 1.0×10^8 g/mol、约 1.1×10^8 g/mol、约 1.2×10^8 g/mol、约 1.3×10^8 g/mol、约 1.4×10^8 g/mol、约 1.5×10^8 g/mol、约 1.6×10^8 g/mol、约 1.7×10^8 g/mol、约 1.8×10^8 g/mol、约 1.9×10^8 g/mol、约 2.0×10^8 g/mol、约 2.1×10^8 g/mol、约 2.2×10^8 g/mol、约 2.3×10^8 g/mol、约 2.4×10^8 g/mol、或约 2.5×10^8 g/mol。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂的分子量在 5×10^7 g/mol与 2×10^8 g/mol之间(含上下限值)。

[0165] 在一些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂由至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,100、至少1,200、至少1,300、至少1,400、至少1,500、至少1,600、至少1,700、至少1,800、至少1,900、至少2,200、至少2,300、至少2,400、至少2,500、至少2,600、至少2,700、至少2,800、至少2,900、至少3,000、至少4,000、至少5,000、至少10,000、或至少20,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,100、至少1,200、至少1,300、至少1,400、至少1,500、至少1,600、至少1,700、至少1,800、至少1,900、至少2,200、至少2,300、至少2,400、至少2,500、至少2,600、至少2,700、至少2,800、至少2,900、至少3,000、至少4,000、至少5,000、至少10,000、或至少20,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在特定实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有100与50,000之间、500与10,000之间、1,000与20,000之间、500与5,000之间、300与7,500之间、1,500与7,500之间、500与3,500之间、1,000与5,000之间、1,500与2,500之间、1,500与2,500之间、2,000与3,000之间、2,500与3,500之间、2,000与4,000之间、或2,000与5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体和/或由100与50,000之间、500与10,000之间、1,000与20,000之间、500与5,000之间、300与7,500之间、1,500与7,500之间、500与3,500之间、1,000与5,000之间、1,500与2,500之间、1,500与2,500之间、2,000与3,000之间、2,500与3,500之间、2,000与4,000之间或2,000与5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成。在一些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂由约2,000与3,500个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有约2,000与3,500个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0166] 在一些实施方案中,本文提供由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个可逆地结合至或能够可逆地结合至一种或多种剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在一些实施方案中,寡聚粒子具有25nm与150nm之间(含上下限值)的半径; 2×10^6 g/mol与 1×10^{10} g/mol之间的分子量;和/或500个与10,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0167] 在特定实施方案中,本文提供由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个可逆地结合至或能够可逆地结合至一种或多种剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在一些实施方案中,寡聚粒子具有70nm与125nm之间(含上下限值)的半径例如平均半径; 1×10^7 g/mol与 1×10^9 g/mol之间(含上下限值)的分子量;和/或1,000个与5,000个之间(含上下限值)的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂结合(例如可逆地结合)至一种或多种剂(例如结合至细胞表面上的分子(例如受体)的剂)。在某些实施方案中,一种或多种剂是本文中(例如第II-C-3部分中)所述的剂。在一些实施方案中,剂是抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,例如含有结合伴侣例如链霉亲和素结合肽(例如**Strep-tag® II**)的抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中,一种或多种剂是含有结合伴侣例如链霉亲和素结合肽(例如**Strep-tag® II**)的抗CD3和/或抗CD28Fab。

[0168] 在一些实施方案中,本文提供由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚粒子试剂含有多个可逆地结合至或能够可逆地结合至一种或多种剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在一些实施方案中,寡聚粒子具有80nm与120nm之间(含上下限值)的半径例如平均半径; 7.5×10^6 g/mol与 2×10^8 g/mol之间(含上下限值)的分子量例如平均分子量;和/或500与10,000个之间(含上下限值)的量例如平均量的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂结合(例如可逆地结合)至一种或多种剂(例如结合至细胞表面上的分子(例如受体)的剂)。在某些实施方案中,一种或多种剂是本文中(例如第II-C-3部分中)所述的剂。在一些实施方案中,剂是抗CD3和/或抗CD28Fab,例如含有结合伴侣例如链霉亲和素结合肽(例如**Strep-tag® II**)的Fab。在特定实施方案中,一种或多种剂是含有结合伴侣例如链霉亲和素结合肽(例如**Strep-tag® II**)的抗CD3和/或抗CD28 Fab。

[0169] 2.寡聚粒子试剂的组合物

[0170] 本文提供含有寡聚粒子试剂例如多种寡聚粒子试剂的组合物,所述寡聚粒子试剂由多个分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,本文提供的组合物含有多种本文所述的寡聚粒子试剂中的任一者。在特定实施方案中,组合物含有多种第II(A)(1)部分中所述的寡聚粒子试剂中的任一者。在一些实施方案中,组合物含有多种通过第II(B)部分中所述的方法中的任一者制造、生产和/或产生的寡聚粒子试剂。

[0171] 在特定实施方案中,组合物含有具有平均、平均值和/或中值尺寸的寡聚粒子试

剂。在某些实施方案中,组合物含有平均、平均值或中值半径为至少25nm、至少30nm、至少35nm、至少40nm、至少45nm、至少50nm、至少55nm、至少60nm、至少65nm、至少70nm、至少75nm、至少80nm、至少85nm、至少90nm、至少95nm、至少100nm、至少105nm、至少110nm、至少115nm、至少120nm、至少125nm、至少130nm、至少135nm、或至少140nm的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,组合物含有平均、平均值或中值半径在5nm与150nm之间、在25nm与150nm之间、在50nm与150nm之间、在75nm与125nm之间、在80nm与140nm之间、在85nm与135nm之间、在80nm与120nm之间、在80nm与115nm之间、或在90nm与110nm之间(含上下限值)的寡聚粒子试剂。

[0172] 在一些实施方案中,组合物含有平均、平均值或中值半径为 $90\text{nm} \pm 25\text{nm}$ 、 $90\text{nm} \pm 20\text{nm}$ 、 $90\text{nm} \pm 15\text{nm}$ 、 $90\text{nm} \pm 10\text{nm}$ 、 $90\text{nm} \pm 5\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 25\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 20\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 15\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 10\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 5\text{nm}$ 、 $97\text{nm} \pm 20\text{nm}$ 、 $97\text{nm} \pm 15\text{nm}$ 、 $97\text{nm} \pm 10\text{nm}$ 、 $97\text{nm} \pm 5\text{nm}$ 的寡聚粒子试剂。

[0173] 在某些实施方案中,组合物含有平均、平均值或中值半径为约85nm、约86nm、约87nm、约88nm、约89nm、约90nm、约91nm、约92nm、约93nm、约94nm、约95nm、约96nm、约97nm、约98nm、约99nm、约100nm、约101nm、约102nm、约103nm、约104nm、约105nm、约106nm、约107nm、约108nm、约109nm、约110nm、约111nm、约112nm、约113nm、约114nm或约115nm的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,组合物含有平均、平均值或中值半径在80nm与115nm之间(含上下限值)的寡聚粒子试剂。

[0174] 在某些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值分子量为至少 $2 \times 10^6\text{g/mol}$ 、 $3 \times 10^6\text{g/mol}$ 、 $5 \times 10^6\text{g/mol}$ 、 $1 \times 10^7\text{g/mol}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{g/mol}$ 、至少 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 、至少 $1.25 \times 10^8\text{g/mol}$ 、至少 $1.5 \times 10^8\text{g/mol}$ 、至少 $2 \times 10^8\text{g/mol}$ 或至少 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 。在一些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值分子量在 $1 \times 10^6\text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10}\text{g/mol}$ 之间、在 $2 \times 10^6\text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10}\text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^9\text{g/mol}$ 之间、在 $5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间、在 $7.5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $2.5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间、在 $2.5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $2.75 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间、在 $7.5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间或在 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 与 $2 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间(含上下限值)。在特定实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值分子量为约 $7.5 \times 10^7\text{g/mol}$ 、约 $8.0 \times 10^7\text{g/mol}$ 、约 $9.0 \times 10^7\text{g/mol}$ 、约 $1.0 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.1 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.2 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.3 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.4 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.5 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.6 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.7 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.8 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $1.9 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $2.0 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $2.1 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $2.2 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $2.3 \times 10^8\text{g/mol}$ 、约 $2.4 \times 10^8\text{g/mol}$ 或约 $2.5 \times 10^8\text{g/mol}$ 。在某些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值分子量在 $5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $2 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间(含上下限值)。

[0175] 在一些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂各自由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂由平均、平均值或中值量为至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,100、至少1,200、至少1,300、至少1,400、至少1,500、至少1,600、至少1,700、至少1,800、至少1,900、至少2,200、至少2,300、至少2,400、至少2,500、至少2,600、至少2,700、至少2,800、至少2,900、至少3,000、至少4,000、至少5,000、至少10,000、或至少20,000的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有平均、平均值或中值量为至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,100、至少1,

200、至少1,300、至少1,400、至少1,500、至少1,600、至少1,700、至少1,800、至少1,900、至少2,200、至少2,300、至少2,400、至少2,500、至少2,600、至少2,700、至少2,800、至少2,900、至少3,000、至少4,000、至少5,000、至少10,000、或至少20,000的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在特定实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂含有平均、平均值或中值量在100与50,000之间、500与10,000之间、1,000与20,000之间、500与5,000之间、300与7,500之间、1,500与7,500之间、500与3,500之间、1,000与5,000之间、1,500与2,500之间、1,500与2,500之间、2,000与3,000之间、2,500与3,500之间、2,000与4,000之间或2,000与5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体和/或由平均、平均值或中值量在100与50,000之间、500与10,000之间、1,000与20,000之间、500与5,000之间、300与7,500之间、1,500与7,500之间、500与3,500之间、1,000与5,000之间、1,500与2,500之间、1,500与2,500之间、2,000与3,000之间、2,500与3,500之间、2,000与4,000之间或2,000与5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成。在一些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂由平均、平均值或中值量在约2,000与3,500之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有平均、平均值或中值量在约2,000与3,500之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0176] 在一些实施方案中,组合物含有具有一定尺寸分布的寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂具有尺寸分布,其中组合物的至少70%、80%、90%、或95%的寡聚粒子试剂的尺寸在组合物的寡聚粒子试剂的中值或平均值尺寸的 $\pm 100\%$ 、 $\pm 90\%$ 、 $\pm 80\%$ 、 $\pm 70\%$ 、 $\pm 60\%$ 、 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 、或 $\pm 0.001\%$ 内。在某些实施方案中,尺寸通过寡聚粒子试剂的分子(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)的半径、分子量或数目来测量。

[0177] 在一些实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的半径在组合物的寡聚粒子试剂的中值或平均值半径的 $\pm 100\%$ 、 $\pm 90\%$ 、 $\pm 80\%$ 、 $\pm 70\%$ 、 $\pm 60\%$ 、 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 、或 $\pm 0.001\%$ 内。在特定实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的半径在10nm与250nm之间、在25nm与200nm之间、在50与150nm之间、在70nm与140nm之间、在70与130nm之间、在70与100nm之间、在80nm与110nm之间、在80nm与120nm之间、在80nm与115nm之间、在80nm与100nm之间、在90与120nm之间、在90nm与110nm之间、在100nm与120nm之间或在85和/或115nm之间(含上下限值)。在特定实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的半径在组合物的寡聚粒子试剂的平均值半径的 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 内。

[0178] 在特定实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的分子量在组合物的寡聚粒子试剂的中值或平均值分子量的 $\pm 100\%$ 、 $\pm 90\%$ 、 $\pm 80\%$ 、 $\pm 70\%$ 、 $\pm 60\%$ 、 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 、或 $\pm 0.001\%$ 内。在一些实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的分子量在 $2 \times 10^6 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10} \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^6 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^9 \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10} \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^9 \text{g/mol}$ 之间、在 $5 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^9 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10} \text{g/mol}$ 之间、在 $1 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间、在 $7.5 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $2.5 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间、在 $5 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $2.5 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之

间、在 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 与 $3 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间、在 $7.0 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $3.0 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间或在 $1 \times 10^8 \text{g/mol}$ 与 $2 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间(含上下限值)。在一些实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的分子量在组合物的寡聚粒子试剂的平均值分子量的 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 内。

[0179] 在某些实施方案中,组合物的寡聚粒子由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成,且至少95%的寡聚粒子试剂由以下量的四聚体组成:该量在每一寡聚粒子试剂的四聚体的中值或平均值量的 $\pm 100\%$ 、 $\pm 90\%$ 、 $\pm 80\%$ 、 $\pm 70\%$ 、 $\pm 60\%$ 、 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 之内。在一些实施方案中,组合物的寡聚粒子,至少95%的寡聚粒子试剂由100与50,000之间、500与10,000之间、1,000与20,000之间、1,000与5,000之间、5,000与10,000之间、10,000与15,000之间、1,500与4,000之间、2,000与4,500之间、2,500与5,000之间、3,000与5,000之间、3,500与5,500之间、4,000与6,000之间或1,500与3,500之间个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成。在一些实施方案中,组合物的至少95%的寡聚粒子试剂由在组合物的寡聚粒子试剂的平均值分子量的 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 或 $\pm 1\%$ 内的量的四聚体组成。

[0180] 在一些实施方案中,将寡聚粒子试剂的组合物储存一段时间,例如在已制造、生产和/或产生寡聚粒子试剂之后及在添加剂例如受体结合剂之前。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂的组合物储存于具有中性pH的缓冲液中。在一些实施方案中,组合物储存于独立等分试样中。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂的组合物储存于处于或低于室温、处于或低于 4°C 、处于或低于 -20°C 或处于或低于 -80°C 。在某些实施方案中,将组合物储存恰好、大约或至少12小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、14天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、18周、20周、22周、24周、26周、27周、28周、30周、32周、34周、36周、38周、40周、42周、44周、46周、48周、50周、52周、60周、70周、80周、90周、12个月、16个月、18个月、24个月、30个月、36个月或超过36个月的时段。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂的组合物持续、持续大约或持续至少1周、9周、27周或46周储存于处于或低于 4°C 。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂的组合物持续、持续大约或持续至少1周、9周、27周或46周储存于处于或低于 -80°C 。在特定实施方案中,寡聚粒子的尺寸在储存期间稳定,例如尺寸不改变或不增加超过25%、20%、15%、10%或5%。

[0181] 在特定实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂在储存期间不经历平均粒子尺寸例如平均值粒子尺寸的增加。在某些实施方案中,将组合物储存一段时间且寡聚粒子试剂不经历超过1%、超过5%、超过10%、超过20%、超过25%、超过30%、超过40%或超过50%的平均尺寸增加。在特定实施方案中,组合物持续至少9周、27周或46周储存于大约或低于 4°C 、大约或低于 -20°C 、或大约或低于 -80°C 且不经历大于1%、5%或10%的平均尺寸增加。在某些实施方案中,组合物储存于大约 -80°C 。

[0182] 在一些实施方案中,本文提供寡聚粒子试剂的组合物,该寡聚粒子试剂由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,组合物的寡聚粒子试剂各自含有多个可逆地结合至或能够可逆地结合至一种或多种剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂具有25nm与150nm之间的平均、平均值或中值半径; $2 \times 10^6 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10} \text{g/mol}$

之间的平均、平均值或中值分子量；和/或500与10,000之间的平均、平均值或中值量的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中，组合物的至少70%、80%、90%、或95%的寡聚粒子试剂的半径、分子量或四聚体量在组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值半径、分子量或四聚体量的 $\pm 100\%$ 、 $\pm 90\%$ 、 $\pm 80\%$ 、 $\pm 70\%$ 、 $\pm 60\%$ 、 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 内。

[0183] 在特定实施方案中，本文提供寡聚粒子试剂的组合物，所述寡聚粒子试剂由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体且含有多个可逆地结合至一种或多种剂例如受体结合剂（例如具有streptag的抗CD3和/或抗CD28Fab）的结合位点。在一些实施方案中，寡聚粒子试剂具有50nm与150nm之间的平均、平均值或中值半径； $1 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^9 \text{g/mol}$ 之间的平均、平均值或中值分子量；和/或1,000与5,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均、平均值或中值量。在某些实施方案中，组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的半径、分子量或四聚体量在组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值半径、分子量或四聚体量的 $\pm 50\%$ 、 $\pm 40\%$ 、 $\pm 30\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 内。

[0184] 在一些实施方案中，本文提供寡聚粒子试剂的组合物，所述寡聚粒子试剂由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体组成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体且含有多个可逆地结合至一种或多种剂的结合位点。在一些实施方案中，寡聚粒子试剂具有50nm与150nm之间的平均、平均值或中值半径； $5 \times 10^7 \text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8 \text{g/mol}$ 之间的平均、平均值或中值分子量；和/或2,000与4,000之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均、平均值或中值量。在某些实施方案中，组合物的至少95%的寡聚粒子试剂的半径、分子量或四聚体量在组合物的寡聚粒子试剂的平均、平均值或中值半径、分子量或四聚体量的 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 内。在特定实施方案中，当储存于 -80°C 至少9周、27周或46周时，寡聚粒子试剂不经历大于10%的尺寸增加。

[0185] 在一些实施方案中，提供的寡聚试剂中的任一者是通过下文第II.B部分中所述的用于制造或产生寡聚试剂的方法产生。

[0186] B. 制造寡聚粒子试剂

[0187] 本文提供用于产生、生产和/或制造由寡聚试剂即寡聚粒子试剂组成的试剂的方法。在特定实施方案中，寡聚粒子试剂含有多个能够可逆地结合至剂例如刺激剂的结合位点。在一些实施方案中，寡聚粒子试剂含有多个能够可逆地结合至识别和/或结合至表达于细胞上的一个或多个分子的剂例如刺激剂和/或选择剂的结合位点。在某些实施方案中，本文所提供的方法适用于产生、生产和/或制造所需或目标尺寸的寡聚粒子试剂。

[0188] 本文提供用于制造、产生和/或生产为寡聚粒子试剂的试剂的方法。在一些实施方案中，本文所提供的方法适用于制造、产生和/或生产含有多个分子（例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体）和/或由多个分子（例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体）组成的寡聚粒子试剂。在一些实施方案中，本文所提供的方法是用于制造、产生和/或生产为可溶试剂的寡聚粒子试剂。在一些实施方案中，本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括或含有在适合于寡聚分子的条件下游育、处理和/或接触分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的步骤。在某些实施方案中，本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有将寡聚粒子试剂与未寡聚的分子分离

的步骤。在某些实施方案中,本文所提供的方法含有使寡聚粒子试剂的一种或多种特性例如粒子尺寸稳定化的步骤。

[0189] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有寡聚分子的步骤、将寡聚的分子自未寡聚的分子移除的步骤和/或使寡聚粒子试剂的特性稳定化的步骤。在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有和/或包括一个或多个向分子添加官能团例如适合于交联或寡聚反应的官能团的步骤。在某些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有和/或包括一个或多个向分子添加官能团的步骤及一个或多个寡聚分子的步骤。在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有和/或包括向分子添加一个或多个官能团的步骤、寡聚分子的步骤及将寡聚的分子(例如寡聚粒子)与未寡聚的分子分离的步骤。

[0190] 在某些实施方案中,经寡聚的分子为含有或包括一个或多个氨基酸的蛋白质、多肽、肽和/或分子。在一些实施方案中,经寡聚的分子含有多个能够结合至剂例如受体结合剂的结合位点。在一些实施方案中,经寡聚的分子含有多个能够结合至第II(C)(3)部分中所述的剂的结合位点。在某些实施方案中,经寡聚的分子含有多个能够结合至结合伴侣例如结合伴侣C的结合位点。在特定实施方案中,经寡聚的分子含有多个能够结合至第II(A)部分中所述的结合伴侣C的结合位点。在一些实施方案中,经寡聚的分子为或包括链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(诸如中性亲和素)。在某些实施方案中,链霉亲和素为呈天然状态的四聚体。因此在某些实施方案中,分子为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(诸如中性亲和素)的四聚体。在特定实施方案中,分子为第II(A)部分中所述的试剂中的任一者。在某些实施方案中,分子为第II(A)部分中所述的试剂的四聚体。

[0191] 特定实施方案涵盖通过本文所提供的方法制造、生产和/或产生的寡聚粒子试剂的特征例如尺寸取决于各种步骤、程序及孵育的时序,以及诸如程序的不同步骤或阶段处的试剂的pH及温度及浓度的条件。因此,在特定实施方案中,以精确时序及度量进行和/或记录本文所提供的方法的一个或多个步骤或阶段,例如以保证当重复本文所提供的方法时,所得经制造的寡聚粒子试剂将与通过本文所提供的方法生产的其他批次或批次具有相同或类似尺寸和特征。举例而言,在一些实施方案中,缓冲液及试剂测量为在目标或所需量或浓度的 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 内。在某些实施方案中,在所需或目标pH的 ± 1 、 ± 0.5 、 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.04 、 ± 0.03 、 ± 0.02 、 ± 0.01 、 ± 0.001 或 ± 0.0001 内进行反应,例如孵育、处理或接触。在特定实施方案中,在目标或所需时间量的30分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、90秒、60秒、45秒、30秒、15秒、10秒、5秒或1秒内进行孵育、处理或接触。在特定实施方案中,步骤、阶段和/或反应例如孵育或处理之间的时间在设定的目标或所需时间的30分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、90秒、60秒、45秒、30秒、15秒、10秒、5秒或1秒内。

[0192] 在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、生产或产生寡聚粒子试剂的方法的特定特征对于一致地生产寡聚粒子试剂而言至关重要。举例而言,在一些实施方案中,本文所提供的方法包括使分子巯基化的步骤,例如通过用巯基化剂孵育分子,且孵育的时序、pH和/或试剂浓度及量全部落入目标或所需值的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm$

0.001%内以实现寡聚粒子试剂的一致生产。在某些实施方案中,使分子巯基化的步骤的结束点与寡聚分子(例如通过孵育活化及巯基化分子)的步骤之间的时间量落入所需或目标时间量的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 内。在一些实施方案中,本文所提供的方法包括活化分子的步骤,例如通过用向分子添加官能团的活化剂孵育分子,且孵育的时序、pH和/或试剂浓度及量全部落入目标或所需值的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 内以实现寡聚粒子试剂的一致生产。在特定实施方案中,寡聚分子的步骤的时序、pH和/或试剂浓度及量全部落入目标或所需值的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 内以实现寡聚粒子试剂的一致生产。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂的一致生产导致或包括生产一致批次或批次。因此,在一些实施方案中,本文所提供的方法产生寡聚粒子试剂的一致批次或批次。举例而言,在一些实施方案中,本文所提供的方法产生寡聚粒子试剂的批次或批次,其平均(例如平均值)粒子尺寸落入通过本文中的方法制造、生产或产生的批次或批次的平均(例如平均值)粒子尺寸的 $\pm 50\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 或 $\pm 0.001\%$ 内。

[0193] 在某些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括通过用活化剂孵育、处理和/或接触分子而活化分子(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)的步骤。在某些实施方案中,活化剂添加或能够添加在交联反应中反应或能够在交联反应中反应的官能团至分子。在一些实施方案中,活化剂添加或能够添加官能团至分子的一个或多个胺。在一些实施方案中,活化剂添加或能够添加胺反应性基团、巯氢基(sulfhydryl)反应性或巯基反应性基团、醛反应性基团、光反应性基团和/或羟基反应性基团至分子。在一些实施方案中,活化剂添加或能够添加巯氢基反应性或巯基反应性基团至分子。在某些实施方案中,活化剂添加或能够添加卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮杂环丙烷基、丙烯酰基、芳化剂、乙烯基砜基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂至分子。在某些实施方案中,活化剂添加或能够添加马来酰亚胺基至分子。在某些实施方案中,活化剂为或含有4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基SMCC)和/或6-[(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)]。

[0194] 在特定实施方案中,在适合于活化分子即添加一个或多个官能团至分子的条件下列如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在特定实施方案中,在中性pH下进行孵育、处理或接触活化剂与分子。在一些实施方案中,在5.0与9.0之间、6.0与8.0之间、6.5与7.5之间或7.0与7.5之间的pH下进行孵育、处理或接触活化剂与分子。在某些实施方案中,在约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4或约7.5的pH下进行孵育、处理或接触活化剂与分子。在一些实施方案中,pH为约7.2。在特定实施方案中,pH为 7.2 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.02 、 ± 0.01 、 ± 0.005 或 ± 0.0001 。

[0195] 在一些实施方案中,在恒定温度下进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,在至少 4°C 、至少 8°C 、至少 12°C 、至少 16°C 、至少 20°C 、至少 24°C 、至少 28°C 、至少 32°C 、至少 37°C 、至少 39°C 、至少 50°C 、至少 60°C 、至少 70°C 、至少 80°C 、至少 90°C 、或至少 100°C 的温度下进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在特定实施方案中,在 4°C 与 39°C 之间、 10°C 与 37°C 之间、 10°C 与 25°C 之间、 20°C 与 30°C 之间、 24°C 与 39°C 之间、或 40°C 与 100°C 之间的温度下进行孵育、处理和/或接触活

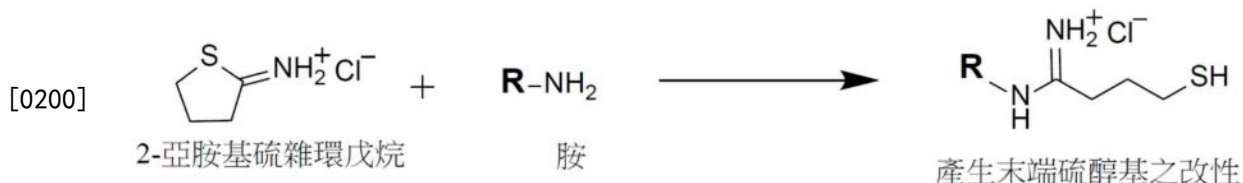
活化剂与分子。在特定实施方案中,在室温下进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在一些实施方案中,在24°C或约24°C进行孵育和/或处理以寡聚分子。在某些实施方案中,在24°C $\pm$ 2°C、 $\pm$ 1°C、 $\pm$ 0.5°C、 $\pm$ 0.2°C、 $\pm$ 0.1°C、 $\pm$ 0.05°C或 $\pm$ 0.01°C进行孵育和/或处理以活化分子。

[0196] 在某些实施方案中,持续一定时间进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,持续5分钟至1小时之间、15分钟至2小时之间、30分钟至90分钟之间、1小时至6小时之间、6小时至24小时之间或超过24小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在一些实施方案中,持续约5分钟、15分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时、约1.5小时、约2小时、约3小时、约6小时、约8小时、约12小时、约16小时、约18小时、约20小时、或约24小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在某些实施方案中,持续1小时或约1小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在特定实施方案中,持续1小时 $\pm$ 5分钟、 $\pm$ 2分钟、 $\pm$ 1分钟、 $\pm$ 30秒、 $\pm$ 15秒、 $\pm$ 10秒、 $\pm$ 5秒、或 $\pm$ 1秒进行孵育、处理或接触活化剂与分子。

[0197] 在特定实施方案中,在活化剂与分子的一定摩尔比下孵育、处理和/或接触活化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,分子与活化剂的摩尔比为或为约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10。在特定实施方案中,分子与活化剂的摩尔比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10的 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%、 $\pm$ 0.5%、 $\pm$ 0.1%、 $\pm$ 0.05%或 $\pm$ 0.001%。在某些实施方案中,摩尔比为1:2 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%、 $\pm$ 0.5%、 $\pm$ 0.1%、 $\pm$ 0.05%或 $\pm$ 0.001%。在一些实施方案中,摩尔比为1:2 $\pm$ 5%。在特定实施方案中,摩尔比为1:2 $\pm$ 2%。

[0198] 在某些实施方案中,通过自分子移除活化剂而结束活化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,通过层析自分子移除活化剂。在某些实施方案中,通过凝胶过滤层析例如通过去盐柱自分子移除活化剂。

[0199] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括通过孵育、处理和/或接触分子与巯基化剂而使分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体巯基化的步骤。在某些实施方案中,巯基化剂为添加或能够添加巯基官能团至分子的试剂。在一些实施方案中,巯基化剂为添加或能够添加巯基官能团至一个或多个游离胺的剂。在一些实施方案中,巯基官能团被添加至N端胺基和/或存在于分子的赖氨酸残基处的游离胺。在某些实施方案中,巯基化剂为或含有环状硫酰亚胺(thioimide)化合物。在特定实施方案中,巯基化剂为或含有2-亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂)。在一些实施方案中,巯基化剂为或含有2-亚氨基硫杂环戊烷且在如下所说明的反应中添加巯基官能团至游离胺:



[0201] 在特定实施方案中,以盐酸盐,例如2-亚氨基硫杂环戊烷-HCl盐形式购买、储存和/或获得巯基化剂例如2-亚氨基硫杂环戊烷。因此,在一些实施方案中,添加2-亚氨基硫杂环戊烷至溶液诱发溶液pH的显著降低。在某些实施方案中,溶液可经缓冲以阻止或减少

pH降低。特定实施方案涵盖在酸性pH和/或低于7.0的pH下进行的巯基化反应限制赖氨酸残基可供使用性,例如限制赖氨酸残基上的游离胺的可供使用性,且因此限制通过巯基化剂添加至分子的巯基官能团的量。在某些实施方案中,赖氨酸残基上的胺基可在减弱或阻止在酸性pH值和/或低于7.0的pH值下巯基化和/或添加巯基官能团至胺基的能力的程度上变得质子化。因此,在某些实施方案中,含有巯基化剂的溶液的酸度经调节和/或中和以提高巯基化反应的效率。

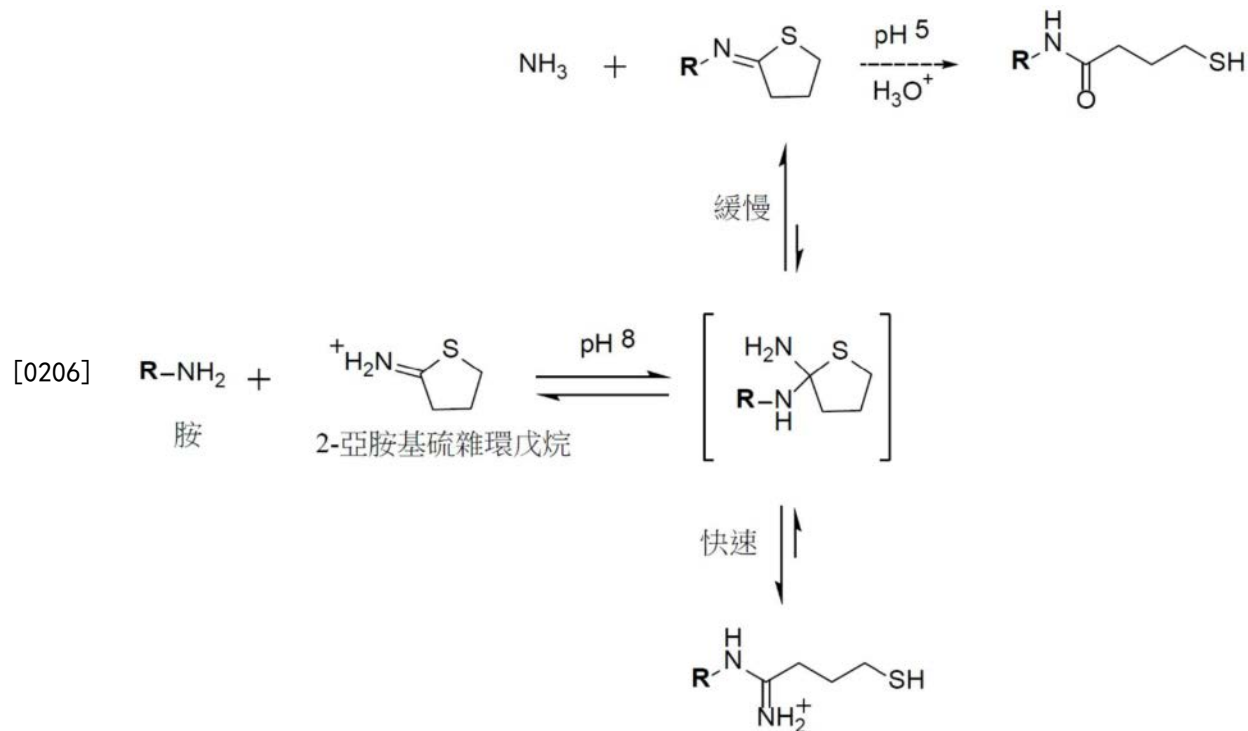
[0202] 在一些实施方案中,孵育、处理和/或接触巯基化剂与分子包括在孵育、处理、接触巯基化剂与分子之前或开始时添加巯基化剂至具有碱性pH或高于7.0的pH的缓冲液。在特定实施方案中,在孵育、处理、接触巯基化剂与分子之前或开始时将巯基化剂添加至pH为至少7.0、至少7.2、至少7.4、至少7.6、至少7.8、至少8.0、至少8.1、至少8.2、至少8.3、至少8.4、至少8.5、至少8.6、至少8.7、至少8.8、至少8.9、至少9.0、至少9.5、或至少10.0的缓冲液。在某些实施方案中,在孵育、处理、接触巯基化剂与分子之前或开始时将巯基化剂添加至pH为约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8.0、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4、约8.5、约8.6、约8.7、约8.8、约8.9、约9.0、约9.1、约9.2、约9.3、约9.4、或约9.5的缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液的pH为约8.5。在特定实施方案中,缓冲液的pH为 8.5 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.02 、 ± 0.01 、 ± 0.005 或 ± 0.0001 。在某些实施方案中,缓冲液含有缓冲剂,该缓冲剂在室温下的 pK_a 大于7.0、大于7.5、大于8.0、大于8.5或大于9.0。在特定实施方案中,缓冲剂为或包括TES、HEPES、DIPSO、MOBS、TAPSO、Trizma、HEPPSO、POPSO、TEA、EPPS、tricine、Gly-gly、bicine、HEPBS、TAPS、AMPD、TABS、AMPSO、CHES、CAPSO、AMP、CAPS、CABS和/或硼酸盐。在某些实施方案中,缓冲液为或含有硼酸盐缓冲液。在特定实施方案中,硼酸盐缓冲液含有至少25mM硼酸盐、至少50mM硼酸盐、至少75mM硼酸盐或约或至少100mM硼酸盐。在特定实施方案中,缓冲液为或包括 $100\text{mM} \pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.05\%$ 、或 $\pm 0.001\%$ 硼酸盐。

[0203] 在某些实施方案中,在碱性pH或高于7.0的pH下进行孵育、处理和/或接触巯基化剂与分子。举例而言,在一些实施方案中,当添加巯基化剂及分子时,溶液的pH为碱性pH或高于7.0的pH。在某些实施方案中,在孵育、处理或接触巯基化剂与分子期间的pH在7.0与11.0之间、在7.0与9.0之间、在7.5与8.5之间或在7.5与8.0之间。在某些实施方案中,在约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、或约8.0的pH下进行孵育、处理或接触巯基化剂与分子。在某些实施方案中,在孵育、处理或接触巯基化剂与分子期间的pH为或为约7.7。在特定实施方案中,在孵育、处理或接触巯基化剂与分子期间的pH为 7.7 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.02 、 ± 0.01 、 ± 0.005 、或 ± 0.0001 。

[0204] 在某些实施方案中,持续一定时间进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在某些实施方案中,持续5分钟至1小时之间、15分钟至2小时之间、30分钟至90分钟之间、1小时至6小时之间、6小时至24小时之间或超过24小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在某些实施方案中,持续约5分钟、15分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时、约1.5小时、约2小时、约3小时、约6小时、约8小时、约12小时、约16小时、约18小时、约20小时、或约24小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在某些实施方案中,持续1小时或约1小时进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在特定实施方案中,持续1小时 ± 5 分钟、 ± 2 分钟、 ± 1 分钟、 ± 30 秒、 ± 15 秒、 ± 10 秒、 ± 5 秒、或 ± 1 秒进行孵

育、处理或接触活化剂与分子。在一些实施方案中,持续25分钟或约25分钟进行孵育、处理和/或接触活化剂与分子。在特定实施方案中,持续25分钟 $\pm$ 5分钟、 $\pm$ 2分钟、 $\pm$ 1分钟、 $\pm$ 30秒、 $\pm$ 15秒、 $\pm$ 10秒、 $\pm$ 5秒、或 $\pm$ 1秒进行孵育、处理或接触活化剂与分子。

[0205] 特定实施方案涵盖孵育、处理和/或接触分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子导致添加所需巯基官能团的第一反应。然而,在一些实施方案中,所需巯基官能团可再异构化为更稳定但无活性的N取代形式。因此,在一些实施方案中,分子通过2-亚氨基硫杂环戊烷的巯基化添加巯基官能团至分子,该分子可再异构化为更稳定的N取代形式而不具有与巯基官能团相同的反应性(Singh等人Anal Biochem 236(1):114-1125(1996))。此反应的描绘显示如下:



[0207] 因此,在一些实施方案中,用2-亚氨基硫杂环戊烷的巯基化分子不应产生标准饱和曲线且将替代地产生其中存在于分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体上的巯基官能团的水平或量将达到峰值或最大水平且接着应在达到最大值之后再次降低的曲线。在某些实施方案中,巯基官能团的半衰期为139分钟。

[0208] 在一些实施方案中,在巯基化反应期间实现的连接至分子的巯基官能团的最大或峰值水平受发生反应的溶液的pH影响。在某些实施方案中,相较于巯基化剂添加至碱性较小的缓冲液时,在巯基化剂添加至具有更碱性pH的缓冲液时巯基官能团的最大或峰值水平更大。在一些实施方案中,相较于巯基化剂添加至碱性较小的缓冲液时,在巯基化剂添加至具有更碱性pH的缓冲液时巯基官能团的最大或峰值水平在较短时间量内实现。在某些实施方案中,相较于巯基化剂添加至碱性较小的缓冲液例如pH为8.3的缓冲液时,在巯基化剂添加至pH为或为大约8.5的缓冲液时巯基官能团的最大或峰值水平更大。在某些实施方案中,相较于巯基化剂添加至碱性较小的缓冲液例如pH为8.3的缓冲液时,在巯基化剂添加至pH为或为大约8.5的缓冲液时巯基官能团的最大或峰值水平在较短时间量内实现。在某些实施方案中,相较于孵育、处理和/或接触发生于在反应期间pH小于7.7,例如pH为约6.9的溶

液中时,在孵育、处理和/或接触巯基化剂和分子的溶液的pH在反应期间在pH 7.7或在约pH 7.7处时巯基官能团的最大或峰值水平更大。在一些实施方案中,相较于孵育、处理和/或接触发生于在反应期间pH小于7.7,例如pH为约6.9的溶液中时,在孵育、处理和/或接触巯基化剂和分子的溶液的pH在反应期间在pH 7.7或在约pH 7.7处时巯基官能团的最大或峰值书评在较短时间量内达到。

[0209] 在一些实施方案中,添加至分子的巯基官能团的最大或峰值水平为表示为添加至分子的巯基官能团的量的平均数(例如平均值)。在一些实施方案中,巯基官能团的最大或峰值水平为至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个或至少50个巯基官能团。在一些实施方案中,添加至每个分子的巯基官能团的最大或峰值水平为具有连接或添加的巯基官能团的每分子的赖氨酸残基的平均(例如平均值)百分比。在某些实施方案中,最大或峰值水平为至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%赖氨酸残基具有连接或添加的巯基官能团。在特定实施方案中,分子为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,且巯基官能团的最大或峰值水平为每个四聚体至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个巯基官能团。

[0210] 在一些实施方案中,持续足以实现添加至分子的巯基官能团的最大或峰值水平的时间量孵育、处理和/或接触分子与巯基化剂。在特定实施方案中,最大或峰值水平是在孵育、处理或接触巯基化剂与分子的1分钟内、2分钟内、5分钟内、10分钟内、15分钟内、20分钟内、25分钟内、30分钟内、45分钟内、60分钟内、90分钟内或120分钟内达成。

[0211] 在特定实施方案中,巯基化剂与分子孵育、处理和/或接触,且添加或连接至分子的巯基官能团的量达到峰值或最大水平且,接着在已达到最大值或峰值后开始下降。在一些实施方案中,孵育、接触和/或处理在已达成峰值或最大水平之后结束。在一些实施方案中,在连接至分子的巯基官能团的量相较于最大或峰值水平小50%、小40%、小30%、小25%、小20%、小15%、小10%、小5%、或小1%时或之前结束孵育、处理或接触。在某些实施方案中,在巯基官能团的平均(例如平均值)量为至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个或至少50个巯基官能团的时间点结束孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,在至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的赖氨酸残基具有连接或添加的巯基官能团的时间点结束孵育、接触和/或处理。在特定实施方案中,分子为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,且在巯基官能团的量为每一四聚体至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个或至少16个巯基官能团的时间点结束孵育、接触和/或处理。在特定实施方案中,在1小时之后结束巯基化剂与分子的孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,在25分钟之后结束巯基化剂与分子的孵育、处理和/或接触。

[0212] 在一些实施方案中,在恒定温度下进行巯基化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,巯基化剂与分子的孵育、处理和/或接触是在至少4℃、至少8℃、至少12℃、至少16℃、至少20℃、至少24℃、至少28

°C、至少32°C、至少37°C、至少39°C、至少50°C、至少60°C、至少70°C、至少80°C、至少90°C、或至少100°C的温度进行。在特定实施方案中,在4°C与39°C之间、10°C与37°C之间、10°C与25°C之间、20°C与30°C之间、24°C与39°C之间、或40°C与100°C之间的温度进行巯基化剂的孵育、处理和/或与分子接触。在特定实施方案中,在室温进行巯基化剂与分子的孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,在24°C或约24°C进行孵育和/或处理以寡聚分子。在某些实施方案中,在24°C±2°C、±1°C、±0.5°C、±0.2°C、±0.1°C、±0.05°C或±0.01°C进行孵育和/或处理以进行分子巯基化。

[0213] 在特定实施方案中,在巯基化剂与分子的一定摩尔比下使巯基化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,在巯基化剂与每分子的各伯胺的1:1至10:1之间的摩尔比下,进行巯基化剂与分子的孵育、处理和/或接触。在特定实施方案中,在巯基化剂与每分子的各伯胺的5:1的摩尔比下进行巯基化剂及分子的孵育、处理和/或接触。在某些实施方案中,巯基化剂与每分子的各伯胺的摩尔比为或为约10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1。在特定实施方案中,巯基化剂与每分子的各伯胺的摩尔比为10:1、9:1、8:1、7:1、6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1±10%、±5%、±2%、±1%、±0.5%、±0.1%、±0.05%或±0.001%。在某些实施方案中,摩尔比为1:5±10%、±5%、±2%、±1%、±0.5%、±0.1%、±0.05%或±0.001%。在某些实施方案中,巯基化剂与分子的摩尔比为1:1与1,000:1之间、在1:1与500:1之间、在10:1与200:1之间、或在100:1与1,000:1之间。在特定实施方案中,活化剂与分子的摩尔比为约100:1。在某些实施方案中,摩尔比为100:1±10%、±5%、±2%、±1%、±0.5%、±0.1%、±0.05%或±0.001%。

[0214] 在某些实施方案中,通过自分子移除或分离巯基化剂而结束巯基化剂与分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的孵育、处理和/或接触。用于移除或分离分子例如蛋白质或多肽分子诸如链霉亲和素的方法在本领域中是常规的,且包括诸如层析和/或凝胶过滤的方法。在一些实施方案中,通过层析自分子移除巯基化剂。在某些实施方案中,通过凝胶过滤层析例如通过去盐柱自分子移除活化剂。

[0215] 在某些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有和/或包括寡聚分子的步骤。在某些实施方案中,分子通过交联单分子或构成单分子的亚基的复合物而寡聚。在一些实施方案中,本文所提供的方法包括一个或多个处理、孵育和/或接触分子与促进寡聚的剂的步骤。举例而言,在一些实施方案中,分子是通过孵育、处理和/或接触分子与剂例如活化剂而寡聚,该剂为连接剂或交联剂,例如双官能连接剂或交联剂或其他化学连接剂。在一些实施方案中,连接剂或交联剂为或包括双官能连接剂。在一些实施方案中,连接剂为同型双官能连接剂,例如具有至少两个相同的官能团和/或反应基团的连接剂。在特定实施方案中,连接剂为杂双官能连接剂,例如具有至少两个不同的官能团和/或反应基团的连接剂。在某些实施方案中,分子与连接剂一起孵育以寡聚或变得能够寡聚。寡聚分子的适合的连接剂为本领域中已知的,且包括(但不限于)戊二醛、己二亚氨二甲酯(DMA)、辛二亚氨二甲酯(DMS)、庚二亚氨二甲酯(DMP)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯)(DSP)、二硫代双(磺酸基琥珀酰亚氨基丙酸酯)(DTSSP)、乙二醇双[琥珀酰亚氨基琥珀酸酯]、NHS酯、N-ε-马来酰亚胺基己酸、N-[ε-马来酰亚胺基己酸]酰肼、N-琥珀酰亚氨基S-乙酰基硫代乙酸酯、N-琥珀酰亚氨基S-乙酰基硫代丙酸酯、2-

亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂)、4-琥珀酰亚氨基氧基羰基-甲基-(2-吡啶基二硫代)-甲苄磺基琥珀酰亚氨基、4-[N-马来酰亚胺基甲基]-环己烷-1-甲酸酯、N-[γ -马来酰亚胺基丁酰氧基]磺基-琥珀酰亚胺酯、N-(K-马来酰亚胺基十一酰氧基)磺基琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺基乙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯、N-(ϵ -马来酰亚胺基己酸)酰肼、N-(K-马来酰亚胺基十一酸)酰肼、N-(β -马来酰亚胺基丙酸)酰肼及3-(2-吡啶基二硫代)丙酰基酰肼。

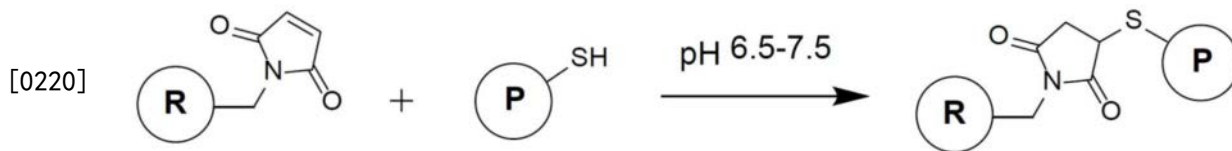
[0216] 在一些实施方案中,本文所提供的方法含有和/或包括寡聚已经修饰例如化学修饰的分子。在特定实施方案中,一个或多个经修饰分子被寡聚化。在特定实施方案中,一个或多个分子被活化。在某些实施方案中,经修饰分子为已通过添加和/或连接可在交联和/或寡聚反应中反应的官能团而被活化的活化分子。在一些实施方案中,官能团被添加或连接至分子的胺,例如伯胺,例如可利用的胺和/或游离胺。在一些实施方案中,该胺例如伯胺为N端胺。在特定实施方案中,该胺例如伯胺在赖氨酸残基上。在一些实施方案中,活化分子已通过添加和/或连接官能团而被修饰,该官能团为或包括胺反应性基团(例如N-羟基琥珀酰亚胺酯、亚胺酯、五氟苯酯(pentafluorophyl ester)、或羟甲基膦)、硫氢基反应性或巯基反应性基团(例如马来酰亚胺、卤乙酰基、吡啶基二硫化物、硫代磺酸盐或乙烯基砜)、醛反应性基团(例如酰肼或烷氧基胺)、光反应性基团(例如双吡丙啶或芳基叠氮化物)和/或羟基反应性基团(例如异氰酸酯)。在一些实施方案中,活化分子已通过添加和/或连接硫氢基反应性或巯基反应性基团而被活化。在某些实施方案中,活化分子已通过添加和/或连接卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮杂环丙烷基、丙烯酰基、芳化剂、乙烯基砜基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂而被活化。在某些实施方案中,活化分子已通过添加和/或连接马来酰亚胺基而被活化。

[0217] 在某些实施方案中,已经被修饰的分子为巯基化分子。在特定实施方案中,经修饰分子已通过巯基化例如添加巯基(即巯基、巯基官能团或巯基官能团)而被修饰。在特定实施方案中,巯基化分子已通过连接和/或添加巯基官能团至一个或多个赖氨酸残基而被巯基化。

[0218] 在某些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法含有和/或包括孵育、处理或接触活化分子与巯基化分子的步骤。在一些实施方案中,该孵育、处理和/或接触寡聚化和/或导致巯基化分子与活化分子之间的寡聚反应。在特定实施方案中,分子的寡聚物是通过孵育、处理和/或接触巯基化分子与活化分子而形成。在某些实施方案中,活化分子具有一个或多个连接的马来酰亚胺基团。在特定实施方案中,活化分子为或包括活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子。在某些实施方案中,活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子为或包括具有一个或多个连接的马来酰亚胺基团的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子。在特定实施方案中,巯基化分子为巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子。在一些实施方案中,巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子为具有一个或多个巯基官能团的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子。在特定实施方案中,本文所提供的方法包括孵育、接触和/或处理巯基化链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的步骤,例如用以寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0219] 在特定实施方案中,分子是通过交联反应寡聚。在一些实施方案中,一部分分子已通过添加一个或多个巯基官能团至分子而被巯基化。在某些实施方案中,巯基被添加至分

子的游离胺基,例如在赖氨酸残基的胺基例如伯胺上和/或N端胺例如N端伯胺。在一些实施方案中,与巯基化分子分离的一部分分子通过添加或连接马来酰亚胺基团而被活化。在一些实施方案中,活化分子不含半胱氨酸残基和/或巯基官能团。因此,在一些实施方案中,这些活化分子不与其他活化分子反应。在一些实施方案中,活化分子和巯基化分子经孵育,且发生活化分子的马来酰亚胺官能团与巯基化分子的巯基官能团之间的交联反应。举例而言,分子R上的马来酰亚胺官能团与分子P上的巯基(SH)官能团之间的交联反应说明于下:



[0221] 在一些实施方案中,巯基官能团与马来酰亚胺官能团之间的反应适合于交联分子以形成寡聚物。在某些实施方案中,分子为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0222] 在特定实施方案中,分子例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体和巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体是在适合于寡聚分子的条件下孵育和/或处理。在特定实施方案中,在中性pH下进行孵育和/或处理以寡聚分子。在一些实施方案中,在5.0与9.0之间、6.0与8.0之间、6.5与7.5之间、或7.0与7.5之间的pH下进行孵育和/或处理以寡聚分子。在某些实施方案中,在约6.5、约6.6、约6.7、约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、约7.3、约7.4、或约7.5的pH下进行孵育和/或处理以寡聚分子。在一些实施方案中,pH为约7.2。在特定实施方案中,pH为 7.2 ± 0.1 、 ± 0.05 、 ± 0.02 、 ± 0.01 、 ± 0.005 或 ± 0.0001 。

[0223] 在一些实施方案中,分子例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在适合于寡聚分子的条件下孵育和/或处理,且适合的条件包括温度。在一些实施方案中,在至少4°C、至少8°C、至少12°C、至少16°C、至少20°C、至少24°C、至少28°C、至少32°C、至少37°C、至少39°C、至少50°C、至少60°C、至少70°C、至少80°C、至少90°C、或至少100°C的温度进行孵育和/或处理以寡聚分子。在特定实施方案中,在4°C与39°C之间、10°C与37°C之间、10°C与25°C之间、20°C与30°C之间、24°C与39°C之间、或40°C与100°C之间的温度进行孵育和/或处理以寡聚分子。在特定实施方案中,在室温进行孵育和/或处理以寡聚分子。在一些实施方案中,在24°C或约24°C进行孵育和/或处理以寡聚分子。在某些实施方案中,在 $24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $\pm 1^\circ\text{C}$ 、 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 $\pm 0.2^\circ\text{C}$ 、 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 、 $\pm 0.05^\circ\text{C}$ 或 $\pm 0.01^\circ\text{C}$ 进行孵育和/或处理以寡聚分子。

[0224] 在某些实施方案中,分子例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体和巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体在适合于寡聚分子的条件下孵育和/或处理一定时间量。在一些实施方案中,分子在适合于寡聚分子的条件下孵育和/或处理5分钟至1小时之间、15分钟至2小时之间、30分钟至90分钟之间、1小时至6小时之间、6小时至24小时之间或超过24小时。在一些实施方案中,持续约5分钟、15分钟、约30分钟、约45分钟、约1小时、约1.5小时、约2小时、约3小时、约6小时、约8小时、约12小时、约16小时、约18小时、约20小时、或约24小时进行孵育和/或处理以寡聚分子。在某些实施方案中,持续1小时或约1小时进行孵育和/或处理以寡聚分子。在特定实施方案中,持续1小时 ± 5 分钟、 ± 2 分钟、 ± 1 分钟、 ± 30 秒、 ± 15 秒、 ± 10 秒、 ± 5 秒、或 ± 1 秒进行孵育和/或处理以寡聚分子。

[0225] 在特定实施方案中,活化分子及巯基化分子,例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,以活化分子与巯基化分子的一定摩尔比孵育和/或处理以寡聚分子。在特定实施方案中,活化分子与巯基化分子的摩尔比为1:X。在一些实施方案中,X为巯基化分子上的赖氨酸及N端胺的数目,即总和。在一些实施方案中,X为分子上的游离或可用胺基的数目。在一些实施方案中,X为在添加巯基官能团之前的巯基化分子上的赖氨酸的数目。在特定实施方案中,活化分子与巯基化分子的摩尔比为或为约1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、或1:10。在特定实施方案中,活化分子与巯基化分子的摩尔比为1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、或1:10 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%、 $\pm$ 0.5%、 $\pm$ 0.1%、 $\pm$ 0.05%、或 $\pm$ 0.001%。在某些实施方案中,摩尔比为1:4 $\pm$ 10%、 $\pm$ 5%、 $\pm$ 2%、 $\pm$ 1%、 $\pm$ 0.5%、 $\pm$ 0.1%、 $\pm$ 0.05%、或 $\pm$ 0.001%。

[0226] 在某些实施方案中,在寡聚分子例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的条件下的孵育、处理和/或接触通过添加一种或多种结束和/或能够结束寡聚反应的剂例如化学剂而被结束。在一些实施方案中,该剂为修饰或以其他方式阻止一种或多种官能团例如马来酰亚胺或巯基官能团在交联或寡聚反应中反应的剂。在一些实施方案中,分子为活化分子和巯基化分子且一种或多种剂为或包括(诸如通过添加和/或附接巯基基)使可用马来酰亚胺基团饱和,或将马来酰亚胺基团与分子裂解和/或分离的剂。在一些实施方案中,可通过提升pH的剂移除未反应的马来酰亚胺基团。在某些实施方案中,升高的pH将导致移除和/或分离未反应的马来酰亚胺基团,而交联的马来酰亚胺基团将保持稳定。在某些实施方案中,一种或多种剂包括(例如通过开环反应)催化马来酰亚胺环系统的水解的剂。在一些实施方案中,分子为活化分子及巯基化分子,且一种或多种剂为或包括修饰和/或饱和巯基官能团的剂。在一些实施方案中,巯基官能团的饱和和/或修饰阻止与马来酰亚胺基团的寡聚和/或交联反应。在一些实施方案中,活化分子及巯基化分子,例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体,与N-乙基马来酰亚胺(NEM)孵育、处理和/或接触以结束寡聚和/或交联反应。

[0227] 在一些实施方案中,分子例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与结束和/或能够结束寡聚和/或交联反应的剂孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,结束和/或能够结束寡聚和/或交联反应的剂在4°C与39°C之间、4°C与25°C之间、4°C与10°C之间、或20°C与30°C之间的温度与分子孵育、处理和/或接触。在特定实施方案中,孵育、处理和/或接触起初在室温进行,且接着在约4°C进行。在一些实施方案中,孵育、处理和/或接触起初在24°C或约24°C进行,且接着在约4°C进行。在某些实施方案中,孵育、处理或接触起初在室温和/或在约24°C进行约5分钟、约10分钟、约15分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟、或约120分钟,且接着孵育、接触和/或处理在约4°C进行约1小时、约2小时、约4小时、约6小时、约8小时、约12小时、约16小时、约24小时、或超过24小时。在一些实施方案中,孵育、处理或接触起初在室温和/或在约24°C进行约15分钟,且接着在约4°C进行约16小时。在某些实施方案中,与NEM孵育、处理或接触起初在室温和/或在约24°C进行约15分钟,且接着在约4°C孵育、接触和/或处理约16小时。

[0228] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括使分子巯基化和使分子活化的步骤。在某些实施方案中,与被活化的分子群体或多个

分子不同的分子群体或多个分子被巯基化。在一些实施方案中,活化和巯基化步骤以大约相同时间进行,例如以使得巯基化分子及活化分子二者对于孵育反应都是可得的,而不需要在另一过程发生时储存巯基化分子或活化分子。在一些实施方案中,至少一部分的孵育、处理及或接触巯基化剂与分子及孵育、处理及或接触活化剂与分子同时进行。

[0229] 在某些实施方案中,至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%的孵育、处理及或接触巯基化剂与分子是在进行孵育、处理及或接触活化剂与分子的同时进行的。在某些实施方案中,至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少95%的孵育、处理及或接触活化剂与分子是在进行孵育、处理及或接触巯基化剂与分子的同时进行的。

[0230] 在一些实施方案中,至少1分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少60分钟、至少90分钟、至少120分钟、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少12小时、至少16小时、或至少24小时的孵育、处理及或接触活化剂与分子是在进行孵育、处理及或接触巯基化剂与分子的同时进行的。在特定实施方案中,至少1分钟、至少5分钟、至少10分钟、至少15分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少60分钟、至少90分钟、至少120分钟、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少12小时、至少16小时、或至少24小时的孵育、处理及或接触巯基化剂与分子是在进行孵育、处理及或接触活化剂与分子的同时进行的。

[0231] 在一些实施方案中,孵育、处理和/或接触巯基化剂以及孵育、处理和/或接触活化剂与分子是在大约相同时间开始的。在某些实施方案中,孵育、处理和/或接触巯基化剂以及孵育、处理和/或接触活化剂与分子是在彼此的30分钟内、15分钟内、10分钟内、5分钟内、1分钟内、30秒内、15秒内、10秒内、5秒内、1秒内开始的。在一些实施方案中,孵育、处理和/或接触巯基化剂以及孵育、处理和/或接触活化剂与分子是在大约相同时间结束的。在特定实施方案中,孵育、处理和/或接触巯基化剂以及孵育、处理和/或接触活化剂与分子是在彼此的30分钟内、15分钟内、10分钟内、5分钟内、1分钟内、30秒内、15秒内、10秒内、5秒内、1秒内结束的。

[0232] 特定实施方案涵盖当巯基官能团连接或添加至分子时,巯基官能团可异构化为更稳定但非活性的N取代形式。在一些方面中,巯基官能团是在2-亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂)存在下被添加或连接的。某些实施方案涵盖当巯基官能团在2-亚氨基硫杂环戊烷(妥特氏试剂)存在下被连接或添加至分子时,巯基官能团可异构化为更稳定但非活性的N取代形式。在某些实施方案中,巯基官能团在移除巯基化剂之后以139分钟或约139分钟的半衰期异构化。因此,在一些实施方案中,在与巯基化剂孵育、处理和/或接触后,分子上的巯基官能团的量随时间推移而减少。

[0233] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括使分子巯基化、使分子活化及使分子寡聚的步骤,例如在适合于寡聚的条件下孵育活化分子和巯基化分子。在特定实施方案中,寡聚分子的步骤定时为在巯基化步骤已结束或完成之后的精确时间量内或精确时间量处开始。在一些实施方案中,寡聚分子的步骤定时为在巯基化步骤及活化步骤已结束或完成之后的精确时间量内或精确时间量处开始。

[0234] 在特定实施方案中,寡聚分子(例如在适合于寡聚的条件下孵育活化分子及巯基

化分子)的步骤是在巯基化步骤结束(例如孵育分子与巯基化剂已结束之后)的一定时间内开始。在某些实施方案中,在巯基化步骤结束时连接至分子的巯基官能团的50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.01%、0.001%、或0.0001%损失、减少或衰减之前开始或起始寡聚分子的步骤。在特定实施方案中,在巯基化步骤结束时连接至分子的巯基官能团的10%损失、减少或衰减之前开始或起始寡聚分子的步骤。在一些实施方案中,在巯基化步骤结束之后的24小时内、16小时内、12小时内、8小时内、6小时内、4小时内、2小时内、90分钟内、60分钟内、45分钟内、30分钟内、15分钟内、10分钟内、5分钟内、或1分钟内开始或起始寡聚分子的步骤。在某些实施方案中,寡聚分子的步骤开始或起始6小时、5小时、4小时、3小时、2小时、90分钟、60分钟、45分钟、30分钟、15分钟、10分钟、5分钟、或1分钟±5分钟、±2分钟、±1分钟、±30秒、±15秒、±10秒、±5秒、或±1秒。在某些实施方案中,在巯基化步骤结束之后的15分钟内开始或起始寡聚分子的步骤。在特定实施方案中,在巯基化步骤结束之后10分钟±1分钟、±30秒、±15秒、±10秒、±5秒、或±1秒开始或起始寡聚分子的步骤。

[0235] 在特定实施方案中,巯基化步骤例如孵育分子与巯基化剂的终点为或发生于巯基化剂自分子移除时或移除巯基化剂的过程开始或起始时。在一些实施方案中,巯基化步骤的终点为或发生于移除巯基化剂的过程开始或起始时。在特定实施方案中,移除巯基化剂的方法为或包括层析,例如凝胶过滤层析。在一些实施方案中,巯基化步骤的终点为或发生于含有巯基化剂及分子的样品或溶液倒入至层析柱例如凝胶过滤层析柱中以及将巯基化剂自分子移除或分离时或那一刻。在特定实施方案中,寡聚分子的步骤的起点开始和/或起始于活化分子与巯基化分子接触、添加和/或混合时。

[0236] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括将寡聚物粒子试剂和/或寡聚分子自未经寡聚的分子移除和/或分离的步骤。在某些实施方案中,将寡聚物粒子试剂和/或寡聚分子自未经寡聚的分子移除和/或分离的步骤发生于寡聚分子的步骤已完成或结束之后。

[0237] 在一些实施方案中,寡聚粒子试剂和/或分子的寡聚物自未经寡聚的分子及小于或低于临限值尺寸的寡聚物粒子移除和/或分离。在一些实施方案中,尺寸的临限值为或包括至少5nm、至少10nm、至少15nm、至少20nm、至少25nm、至少30nm、至少40nm、至少50nm、至少60nm、至少70nm、至少75nm、至少80nm、至少85nm、或至少90nm的半径。在某些实施方案中,尺寸的临限值为或包括至少100kDa、至少500kDa、至少1,000kDa、至少2,000kDa、至少5,000kDa、至少10,000kDa、至少50,000kDa、或至少100,000kDa的分子量。在某些实施方案中,临限值尺寸不影响通过本文所提供的方法生产的寡聚物粒子试剂的平均(例如平均值)尺寸和/或尺寸分布。

[0238] 在一些实施方案中,寡聚物粒子试剂例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚物通过尺寸排阻层析(SEC)自未经寡聚的粒子移除和/或分离。在一些实施方案中,SEC为允许在不损坏或破坏分子的情况下通过尺寸分离分子的技术,由此小于排阻极限的分子截留于柱中,且大于排阻极限的分子穿过柱,例如在无延迟的情况下。在某些实施方案中,排阻极限为落在1kDa与100,000kDa之间、100kDa与10,000kDa之间、500kDa与1,000kDa之间、500kDa与5,000kDa之间、5,000kDa与20,000kDa之间、10,000kDa与50,000kDa之间、或50,000与100,000kDa之间的尺寸。在某些实施方案中,排阻极限大于分子的单体

和/或四聚体的分子量。在一些实施方案中,排阻极限大于链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的分子量。在特定实施方案中,收集所有粒子,例如穿过SEC柱诸如在空隙体积中的寡聚粒子,例如在无延迟的情况下。

[0239] 在特定实施方案中,当进行SEC时,分子离开柱的次序与分子的大小有关,因此,在一些实施方案中,可将柱的洗脱液收集在不同级分中。在一些实施方案中,可组合级分或丢弃级分以去除某些尺寸的粒子。举例而言,在一些实施方案中,可丢弃级分以去除尺寸小于100kDa、小于500kDa、小于1,000kDa、小于2,000kDa、小于5,000kDa、小于10,000kDa、小于50,000kDa、或小于100,000kDa的粒子例如寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,SEC自未经寡聚的分子移出寡聚粒子试剂,但不影响通过本文所提供的方法生产的寡聚物粒子试剂的平均(例如平均值或中值)尺寸和/或尺寸分布。

[0240] 在某些实施方案中,寡聚粒子试剂例如寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体可在孵育、处理和/或接触分子以进行寡聚已完成或结束之后继续交联和/或寡聚。因此,在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括使寡聚物稳定化例如使其尺寸稳定化的步骤。在一些实施方案中,用于稳定化寡聚物的步骤为或包括孵育、接触和/或处理寡聚分子(例如寡聚粒子试剂)与稳定剂。

[0241] 在一些实施方案中,稳定剂为防止或能够防止粒子(例如寡聚粒子试剂)尺寸变化的任何剂。在一些实施方案中,稳定剂为修饰分子或寡聚粒子上的官能团的任何剂,该官能团在寡聚和/或交联反应中反应或能够在寡聚和/或交联反应中反应。在某些实施方案中,稳定剂为防止形成、异构化和/或转化以在分子或寡聚粒子上产生官能团的任何剂,该官能团在寡聚和/或交联反应中反应或能够在寡聚和/或交联反应中反应。在一些实施方案中,稳定试剂为修饰或能够修饰连接至分子或寡聚粒子的卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮杂环丙烷基、丙烯酰基、芳化剂、乙烯基砷基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂的任何剂。在特定实施方案中,稳定试剂为防止形成、异构化和/或转化以产生连接至分子或寡聚粒子的卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮杂环丙烷基、丙烯酰基、芳化剂、乙烯基砷基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂的任何剂。

[0242] 在一些实施方案中,稳定剂与寡聚粒子孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,寡聚粒子为含有多个巯基化分子及活化分子(例如活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)的寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,寡聚粒子含有更多含有连接的N取代亚氨基硫杂环戊烷的巯基化分子。在一些实施方案中,与NEM孵育和/或处理使所有可用的巯基官能团饱和和/或经修饰,由此停止交联和/或寡聚反应。然而,在一些实施方案中,N取代亚氨基硫杂环戊烷不与NEM反应且这些异构体在与NEM孵育之后保留在分子和寡聚粒子上。在一些实施方案中,N取代亚氨基硫杂环戊烷再异构化为巯基异构体可因此导致寡聚粒子试剂的合成后生长,例如通过额外交联和/或寡聚反应,诸如与其他寡聚粒子上的剩余的可用的马来酰亚胺基团额外交联和/或寡聚反应。

[0243] 在一些实施方案中,稳定剂为修饰、移除和/或防止N取代亚氨基硫杂环戊烷再异构化为巯基官能团或能够如此的剂。在一些实施方案中,稳定剂为或包括羟胺。在某些实施方案中,含有连接的N取代亚氨基硫杂环戊烷的寡聚粒子和/或分子与稳定剂孵育、处理和/或接触,该稳定剂修饰、移除和/或防止N取代亚氨基硫杂环戊烷再异构化为巯基官能团或

能够如此。在特定实施方案中,含有连接的N取代亚氨基硫杂环戊烷的寡聚粒子和/或分子与羟胺孵育、处理和/或接触。

[0244] 在一些实施方案中,稳定试剂(例如羟胺)与寡聚分子(例如寡聚粒子试剂)接触、处理和/或孵育,例如以进行稳定化反应。在一些实施方案中,在进行和/或完成巯基官能团与马来酰亚胺官能团之间的交联反应之后将稳定试剂(例如羟胺)添加至寡聚分子。在特定实施方案中,在通过添加NEM至寡聚分子而结束、完成和/或终止交联反应之后,将稳定试剂(例如羟胺)与寡聚分子(例如寡聚粒子试剂)接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,在通过添加NEM至寡聚分子结束、完成和/或终止交联反应之后将稳定试剂(例如羟胺)与寡聚分子(例如寡聚粒子试剂)接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,稳定试剂与寡聚分子接触、处理和/或孵育,随后长期储存,例如在、在大约或低于室温、4°C、-20°C、或-80°C储存至少1天、1周、3周、9周、27周、46周或1或超过1年。在一些实施方案中,在寡聚分子负载至诸如层析柱和/或SEC柱的柱上、穿过该柱和/或自该柱洗脱之后,将稳定试剂(例如羟胺)与寡聚分子(例如寡聚粒子试剂)接触、处理和/或孵育。在特定实施方案中,在寡聚分子负载至SEC柱上、穿过SEC柱和/或自SEC柱洗脱之后将稳定试剂与寡聚分子接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,在寡聚分子负载至SEC柱上、穿过SEC柱和/或自SEC柱洗脱的任何步骤之前将稳定试剂与寡聚分子接触、处理和/或孵育。

[0245] 在一些实施方案中,稳定试剂例如羟胺持续、持续大约或持续至少1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、90分钟、120分钟、4小时、6小时、8小时、12小时、16小时或24小时与寡聚分子例如寡聚粒子试剂接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,稳定试剂持续1分钟至12小时之间、1分钟至1小时之间、1分钟至30分钟之间、5分钟至30分钟之间、10分钟至60分钟之间、10分钟至20分钟之间、1小时至3小时之间、1小时至2小时之间、或6小时至12小时之间与寡聚分子接触、处理和/或孵育。在特定实施方案中,稳定试剂持续5分钟至30分钟之间、或持续15分钟或大约15分钟与寡聚分子接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,通过混合和/或摇动(例如温和摇动和/或混合)进行处理、接触和/或孵育。

[0246] 在一些实施方案中,稳定试剂例如羟胺在、在大约或4°C、8°C、12°C、16°C、20°C、24°C、28°C、32°C、37°C、39°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C或100°C的温度与寡聚分子例如寡聚粒子试剂接触、处理和/或孵育。在一些实施方案中,稳定试剂在4°C与39°C之间、10°C与37°C之间、10°C与25°C之间、20°C与30°C之间、24°C与39°C之间、或40°C与100°C之间的温度与寡聚分子接触、处理和/或孵育。在特定实施方案中,稳定试剂在室温与寡聚分子接触、处理和/或孵育。在某些实施方案中,稳定试剂在或在大约23°C、24°C、25°C、或26°C±2°C、±1°C、±0.5°C、±0.2°C、±0.1°C、±0.05°C、或±0.01°C与寡聚分子接触、处理和/或孵育。

[0247] 在一些实施方案中,稳定试剂例如羟胺自寡聚分子例如寡聚粒子试剂移除和/或分离。在特定实施方案中,稳定化反应通过自寡聚粒子分离和/或移除稳定试剂而结束和/或终止。在一些实施方案中,稳定试剂是通过层析步骤自寡聚粒子移除和/或分离。在特定实施方案中,层析步骤为或包括SEC。在一些实施方案中,稳定试剂是通过柱和/或过滤器自寡聚分子移除和/或分离。在一些实施方案中,柱或过滤器为去盐柱。在某些实施方案中,去盐柱含有树脂,例如为或含有葡聚糖凝胶、葡萄糖和/或表氯醇的树脂。

[0248] 在特定实施方案中,稳定试剂例如羟胺持续1分钟至1小时之间在4°C与39°C之间、10°C与25°C之间或20°C与30°C之间的温度与寡聚分子例如寡聚粒子试剂接触、处理和/或

孵育。在一些实施方案中,稳定试剂例如羟胺持续5分钟至30分钟之间在10°C与25°C之间的温度与寡聚分子例如寡聚粒子试剂接触、处理和/或孵育。

[0249] 在特定实施方案中,与稳定剂孵育、处理或接触的寡聚粒子试剂(例如含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚粒子试剂)就尺寸而言稳定。在一些实施方案中,当粒子储存于室温、储存于或储存于大约4°C或低于4°C、储存于或储存于大约-20°C或低于-20°C、或储存于或储存于大约-80°C时,与稳定剂孵育、处理或接触的寡聚粒子试剂经一定时间量,例如12小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、14天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、或超过16周不经历大于1%、大于5%、大于10%、大于20%、大于25%、大于30%、大于40%、或大于50%的随时间推移的尺寸变化,例如半径或分子量变化。在一些实施方案中,与稳定剂孵育、处理或接触的寡聚粒子试剂经12小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、14天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、或超过16周不经历大于1%、大于5%、大于10%、大于20%、大于25%、大于30%、大于40%、或大于50%尺寸增加的随时间推移的尺寸增加。

[0250] 在一些实施方案中,本文所提供的方法包括一个或多个对分子(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)和/或寡聚粒子试剂进行过滤灭菌的步骤。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂经过滤灭菌。在一些实施方案中,分子或寡聚粒子试剂在与活化剂或巯基化剂孵育之前或之后、在活化分子与巯基化分子经交联和/或寡聚之前或之后、在进行SEC以自未寡聚的分子(例如四聚体)移除寡聚粒子试剂之前或之后、和/或在寡聚粒子试剂与稳定剂孵育之前或之后进行过滤灭菌。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂经过滤灭菌或能够经过滤灭菌。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂不聚集、阻塞或以其他方式阻碍或阻止过滤灭菌过程。在一些实施方案中,过滤灭菌包括使含有分子或寡聚粒子试剂的溶液穿过多孔过滤器或膜。在一些实施方案中,多孔过滤器或膜含有孔隙,该孔隙的直径为或为至少约0.02 μm 、约0.05 μm 、约0.1 μm 、约0.15 μm 、约0.2 μm 、约0.22 μm 、约0.3 μm 、约0.4 μm 、约0.45 μm 、或约0.5 μm 。在一些实施方案中,孔隙的尺寸在0.01 μm 与1.0 μm 之间、在0.1 μm 与.05 μm 之间、在0.2 μm 与0.25 μm 之间、在0.4与0.45 μm 之间、或在0.2 μm 与0.45 μm 之间。在一些实施方案中,寡聚粒子的半径和/或平均半径为或低于150nm。在特定实施方案中,寡聚粒子的半径和/或平均半径为大约、恰好或低于125nm、110nm、或100nm。

[0251] 在一些实施方案中,寡聚粒子试剂是通过本文所提供的方法制造、产生和/或生产且接着储存。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂在任何处理或孵育以将剂(例如受体结合剂)结合至寡聚粒子试剂之前储存一定时间量。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂在一个或多个处理或孵育以将剂(例如受体结合剂)可逆地结合至寡聚粒子试剂之后储存一定时间量。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂储存于两个或更多个等分试样中。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂储存于缓冲液中。在一些实施方案中,缓冲液具有中性pH和/或6.5与7.5之间、6.8与7.4之间、或约6.8、约6.9、约7.0、约7.1、约7.2、或约7.3的pH。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂储存于pH为约7.2的缓冲液中。在某些实施方案中,缓冲液为磷酸盐缓冲液,例如磷酸钠缓冲液。在某些实施方案中,寡聚粒子试剂储存于室温、储存于或储存于大约4°C或低于4°C、储存于或储存于大约-20°C或低于-20°C、或储存于或储存于大约-80°C。在特定实施方案中,寡聚粒子试剂储存12小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、

14天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、或超过16周。在一些实施方案中,寡聚粒子试剂置于具有中性pH的缓冲液中且储存于-80°C或约-80°C的温度。

[0252] 在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括或含有在适合于寡聚分子的条件下游育、处理和/或接触分子(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体)的步骤;自通过SEC未寡聚的分子分离寡聚粒子试剂的步骤;及下游育粒子与稳定剂的步骤。在一些实施方案中,在适合于寡聚分子的条件下游育、处理和/或接触分子的步骤为或包括下游育具有一个或多个连接的巯基官能团的巯基化分子与具有一个或多个连接的马来酰亚胺官能团的活化分子。

[0253] 在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括:持续15至90分钟之间的时间量在具有碱性pH的缓冲液中下游育多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与巯基化剂以使四聚体巯基化的步骤、持续30分钟至90分钟之间的时间量下游育独立的多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与活化剂以将一个或多个马来酰亚胺官能团添加至四聚体的步骤,在相同时间或大约相同时间结束2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH下游育,在活化及巯基化下游育结束之后的五分钟至十五分钟之间的时间量内下游育巯基化的四聚体与活化的四聚体的步骤、自通过SEC未寡聚的分子分离寡聚粒子试剂的步骤、及下游育粒子与稳定剂以使寡聚物粒子试剂的尺寸稳定的步骤。在一些实施方案中,方法包括在大约或低于-80°C、-20°C或4°C在具有中性pH的缓冲溶液中储存寡聚粒子试剂的步骤。

[0254] 在一些实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括:持续60分钟在约24°C的温度在具有7.7与8.5之间的碱性pH的缓冲液中下游育多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与2-亚氨基硫杂环戊烷以使四聚体巯基化的步骤、持续1小时在约24°C的温度在7.2的中性pH下下游育独立的多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与SMPH以将一个或多个马来酰亚胺官能团添加至四聚体的步骤、通过用例如SEC的层析自四聚体分离2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH下游育物而同时结束2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH下游育的步骤、在结束2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH下游育之后下游育巯基化四聚体与活化四聚体十分钟的步骤、通过下游育四聚体与NEM而在60分钟之后结束巯基化四聚体与活化四聚体之间的寡聚反应的步骤、自通过SEC未寡聚的分子分离寡聚粒子试剂的步骤、以及下游育粒子与羟胺以使寡聚物粒子试剂的尺寸稳定的步骤。在一些实施方案中,方法包括将寡聚粒子试剂在-80°C储存于具有中性pH的缓冲溶液中的步骤。在一些实施方案中,将2-亚氨基硫杂环戊烷添加至具有8.5的碱性pH的缓冲液。在某些实施方案中,缓冲液为或含有100mM硼酸盐缓冲液。在一些实施方案中,粒子为稳定的,例如持续至少46周不经历大于10%的尺寸变化。

[0255] 在特定实施方案中,本文所提供的用于制造、产生和/或生产寡聚粒子试剂的方法包括:持续60分钟在约24°C的温度在具有7.7与8.5之间的碱性pH的缓冲液中下游育多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与2-亚氨基硫杂环戊烷以使四聚体巯基化的步骤;持续1小时在约24°C的温度在7.2的中性pH下下游育独立的多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与SMPH以将一个或多个马来酰亚胺官能团添加至四聚体的步骤;通过用例如SEC的层析自四聚体分离2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH下游育物而同时结束2-亚氨基硫杂环戊

烷及SMPH孵育的步骤;在结束2-亚氨基硫杂环戊烷及SMPH孵育之后(可选地10分钟内)孵育巯基化四聚体与活化四聚体的步骤;通过孵育四聚体与NEM而在60分钟之后或在大约60分钟之后结束巯基化四聚体与活化四聚体之间的寡聚反应的步骤;孵育粒子与羟胺的步骤;SEC步骤;及可选的过滤粒子的步骤,例如通过具有或具有约0.45 μm 和/或0.2 μm 直径孔径的膜和/或过滤器。在一些实施方案中,方法包括将寡聚粒子试剂在-80 $^{\circ}\text{C}$ 储存于具有中性pH的缓冲溶液中的步骤。在一些实施方案中,粒子为稳定的,例如持续至少46周未经历大于10%的尺寸变化。

[0256] C. 试剂形式

[0257] 1. 支持物

[0258] 在一些实施方案中,试剂包含于支持物,诸如固体支持物或表面(例如珠粒),或固相或固定相(层析基质)上。在一些这类实施方案中,试剂可逆地固定在支持物上。在一些情况下,试剂经由共价键固定至支持物。在一些方面中,试剂以非共价方式可逆地固定至支持物。

[0259] 在一些实施方案中,支持物为固体支持物。任何固体支持物(表面)可用于试剂的可逆固定。试剂可在上面固定的固体支持物的示例性实例包括磁珠、聚合珠粒、细胞培养板、微量滴定板、膜、琼脂糖珠粒、聚苯乙烯珠粒或中空纤维。在一些方面中,中空纤维可用作购自TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA)的Quantum[®]细胞扩增系统(Cell Expansion System)中的生物反应器。在一些实施方案中,试剂共价连接至固体支持物。在其他实施方案中,非共价相互作用还可用于固定例如在塑胶基底上。在一些实施方案中,试剂可例如为可逆地结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素或亲和素突变蛋白。这类链霉亲和素突变蛋白可共价连接至任何表面,例如用于层析纯化的树脂(珠粒)且可以这类形式商购自IBA GmbH, Göttingen, 例如作为Strep-Tactin[®]琼脂糖、

Strep-Tactin[®] Superflow[®]、Strep-Tactin[®] Superflow[®] 高容量或 Strep-Tactin[®] MacroPrep[®]。可易于商购的其他示例性实例为固定化金属亲和性层析(IMAC)树脂,诸如TALON[®]树脂(Westburg, Leusden, The Netherlands),其可用于可逆地固定寡聚组氨酸标记的(his-标记的)蛋白质,诸如用于可逆地结合剂(例如受体结合剂或选择剂),该剂含有作为结合伴侣C的寡聚组氨酸标签(诸如五-或六-组氨酸标签)。其他实例包括购自GE Life Sciences的钙调蛋白琼脂糖(其可与含有作为结合伴侣C的钙调蛋白结合肽的剂(例如受体结合剂或选择剂)一起使用)、或连接有谷胱甘肽的琼脂糖。在一些这类情况下,结合伴侣C为谷胱甘肽-S-转移酶。

[0260] 在一些实施方案中,支持物含有固相或固定相。因此,在一些实施方案中,试剂包含于固相或固定相(还称作层析基质)上。在一些这类实施方案中,试剂可逆地固定于固相或固定相上。在一些情况下,试剂经由共价键可逆地固定至固定相。在一些方面中,试剂以非共价方式可逆地固定至固定相。

[0261] 任何材料可用作层析基质。一般而言,适合的层析材料基本上无害,即不会对细胞活力不利,诸如当在所需条件下用于填充层析柱中时。在一些实施方案中,固定相保持于预定地点,诸如预定位置,而样品的地点正在被改变。因此,在一些实施方案中,固定相为移动相流经(通过流经或以分批模式)的层析系统的一部分,且其中出现包含于液相中的组分

(溶解或分散的)在各相之间分布。

[0262] 在一些实施方案中,层析基质具有固相或半固相形式,而含有待隔离/分离的靶细胞的样品为流体相。层析基质可为微粒材料(具有任何适合的尺寸及形状)或单层层析材料,包括纸基板或膜。因此,在一些方面中,层析可为柱层析以及平面层析二者。在一些实施方案中,除标准层析柱以外,允许双向流动的柱,诸如购自PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A.的**PhyTip®**柱或吸管端可用于基于柱/基于流经模式的方法。因此,在一些情况下,适用于本发明方法的层析柱还包含允许双向流动的吸管端或柱。在一些情况下,诸如使用微粒基质材料的情况下,微粒基质材料的平均颗粒尺寸可例如为约5 μm 至约200 μm 、或约5 μm 至约400 μm 、或约5 μm 至约600 μm 。在一些方面中,层析基质可例如为或包括聚合树脂或金属氧化物或类金属氧化物。在一些方面中,诸如使用平面层析的情况下,基质材料可为任何适合于平面层析的材料,诸如常规的基于纤维素或基于有机聚合物的膜(例如纸膜、硝化纤维素膜或聚偏二氟乙烯(PVDF)膜)或二氧化硅包覆的玻璃板。在一个实施方案中,层析基质/固定相为非磁性材料或非可磁化材料。

[0263] 在一些实施方案中,适合于本发明方法的非磁性或非可磁化层析固定相或固相包括衍生二氧化硅或交联凝胶。在一些方面中,交联凝胶可基于天然聚合物,诸如基于在自然界中存在的聚合物类别。举例而言,层析固定相可基于的天然聚合物为多糖。在一些实施方案中,固相或固定相为聚苯乙烯珠粒。在一些情况下,各别多糖总体上交联。多糖基质的实例包括(但不限于)琼脂糖凝胶(例如Superflow™琼脂糖或**Sephacryl®**材料,诸如以不同珠粒尺寸及孔径市售的Superflow™**Sephacryl®**)或交联葡萄糖聚糖的凝胶。另一示例性实例为与葡萄糖聚糖共价键合的微粒交联琼脂糖基质,其以均购自GE Healthcare的**Sephadex®**或**Superdex®**形式市售(以各种珠粒尺寸及各种孔径)。这类层析材料的另一示例性实例为**Sephacryl®**,其也可以不同珠粒尺寸及孔径商购自GE Healthcare。这类层析材料的另一示例性实例为CytoSorb聚苯乙烯珠粒。

[0264] 在一些实施方案中,交联凝胶还可基于合成聚合物,诸如基于自然界中不存在的聚合物类别。在一些方面中,层析固定相或固相基于的这类合成聚合物为具有极性单体单元且因此本身具极性的聚合物。因此,在一些情况下,这类极性聚合物为亲水性的。在一些方面中,亲水性分子(还称为疏油性)含有可与水分子形成偶极-偶极相互作用的部分。一般而言,疏水性分子(还称为亲脂性)具有与水分离的倾向。

[0265] 适合的合成聚合物的示例性实例为聚丙烯酰胺、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶以及丙烯酸酯与二醇的共聚物或丙烯酸酯与二醇的共聚物。示例性实例为以**Fractogel®**市售的聚甲基丙烯酸酯凝胶。另一实例为以**Toyopearl®**市售的乙二醇与甲基丙烯酸酯的共聚物。在一些实施方案中,层析固定相还可包括天然及合成聚合物组分,诸如复合基质、或多糖与琼脂糖的复合物或共聚物(例如聚丙烯酰胺/琼脂糖复合物)、或多糖与N,N'-亚甲基双丙烯酸酯的复合物或共聚物。葡萄糖聚糖及N,N'-亚甲基双丙烯酸酯的共聚物的示例性实例为上文所提及的**Sephacryl®**系列材料。在一些实施方案中,衍生二氧化硅可包括偶合至合成或天然聚合物的二氧化硅粒子。这类实施方案的实例包括(但不限于)多糖接枝的二氧

化硅、聚乙烯吡咯啉酮接枝的二氧化硅、聚氧化乙烯接枝的二氧化硅、聚(2-羟乙基天冬酰胺)二氧化硅及聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝的二氧化硅。

[0266] 在一些实施方案中,层析基质为凝胶过滤基质,例如当在如本文所述的移除筒中使用时。一般而言,凝胶过滤可通过其经设计以经历的特性表征。因此,凝胶过滤基质在一些方面中允许在很大程度上基于尺寸分离细胞或其他生物实体。在一些这类方面中,各别层析基质通常为如上所述的微粒多孔材料。层析基质可具有某一排阻极限,其通常在分子量方面界定,高于该分子量的分子完全不会进入孔中。在一些实施方案中,界定尺寸排阻极限的各分子量可被选择为低于对应于靶细胞重量的重量。在此实施方案中,阻止靶细胞进入尺寸排阻层析基质的孔中。同样,固定相可具有尺寸小于所选靶细胞的尺寸的孔。在示例性实施方案中,层析基质的平均孔径为0至约500nm。

[0267] 在一些实施方案中,存在于样品中的组分(诸如剂(例如受体结合剂或选择剂)或竞争试剂)可具有低于孔的排阻极限的尺寸,并因此可进入层析基质的孔中。在一些方面中,在能够部分或完全进入孔体积的这类组分中,较不接近孔体积的较大分子可以被首先洗脱,而最小分子通常最后洗脱。在一些实施方案中,层析基质的排阻极限被选择为低于靶细胞的最大宽度。因此,在一些方面中,相较于靶细胞,可接近孔体积的组分可保持于层析基质中/上更久。因此,在一些情况下,靶细胞可以收集于与样品的其它物质/组分分离的层析柱洗脱液中。因此,在一些方面中,组分(诸如剂(例如受体结合剂或选择剂)、或适用时竞争试剂)可在相较于靶细胞更晚的时间点从凝胶过滤基质洗脱。在一些实施方案中,此效应可进一步增加,诸如如果凝胶渗透基质含有试剂(诸如共价键结于其上),该试剂含有能够结合存在于样品中的剂(例如受体结合剂或选择剂)和/或竞争试剂的结合位点Z的情况下。在一些情况下,剂(例如受体结合剂或选择剂)和/或竞争试剂可被试剂的结合位点Z结合,并由此被固定于基质上。在一些方面中,此方法在移除筒中进行。

[0268] 在一些实施方案中,本发明方法中采用的层析基质还可包括磁性可吸引的物质,诸如一种或多种磁性可吸引的粒子或铁磁流体。各磁性可吸引的粒子可包含具有能够结合靶细胞的结合位点的试剂。在一些情况下,磁性可吸引的粒子可含有反磁、铁磁、顺磁或超顺磁材料。一般而言,超顺磁材料响应于具有感应磁场的磁场而不会导致永久磁化。基于氧化铁磁性粒子例如可以 **Dynabeads®** 形式商购自DynaL Biotech,以磁性微珠形式商购自Miltenyi Biotec,以磁性多孔玻璃珠形式商购自CPG Inc.,以及各种其他来源,诸如Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences或Novagen Inc. (仅列举几例)。已例如由Hutten, A. 等人(J. Biotech. (2004), 112, 47-63) 描述了基于超顺磁Co及FeCo以及铁磁性Co纳米结晶的磁性纳米粒子。在其他实施方案中,本发明方法中采用的层析基质为任何磁性可吸引的物质的空隙。

[0269] 在一些实施方案中,提供含有第一及第二固定相(诸如用于细胞选择的层析柱(选择筒)及用于试剂移除的第二层析柱(移除筒))的至少一种配置的装置。装置可包含流体串联连接的第一及第二固定相(层析柱)的多个配置。装置可包含流体连接至第一及第二固定相的第一配置的第一固定相的样品入口。在一些实施方案中,装置还可包含用于细胞的样品出口,该样品出口流体连接至用于层析的第一及第二固定相的至少一个配置的最后者的第二固定相。在一些方面中,装置还可包含流体连接第一及第二固定相的配置的第一固

定相中的至少一者的竞争试剂容器。

[0270] 2.可溶试剂

[0271] 在一些实施方案中,试剂不结合至固体支持物,即其以可溶形式存在或为可溶的。原则上,可使用与固定于支持物(诸如固体支持物或固定相)上的试剂的情况相同的试剂。举例而言,可在不将这类试剂固定或连接至支持物(例如不连接固体支持物或固定相)的情况下使用上文所述的例示性试剂中的任一者。在一些实施方案中,试剂含有多个用于经由与结合伴侣C的相互作用而可逆地结合至结合剂的结合位点Z。在一些情况下,试剂为单分子的寡聚物或多聚物或构成单分子的亚基的复合物的寡聚物或多聚物(例如二聚、三聚或四聚蛋白质的寡聚物或多聚物)。在一些实施方案中,试剂可例如为链霉亲和素突变蛋白寡聚物、钙调蛋白寡聚物、提供至少两个螯合基团K的化合物(寡聚物),其中至少两个螯合基团能够结合至过渡金属离子,由此使得试剂能够结合至寡组氨酸亲和标签、多聚谷胱甘肽-S-转移酶或生物素化的载体蛋白。

[0272] 在一些实施方案中,试剂是通过不存在连接至试剂的固体支持物(表面)来表征的。举例而言,在一些实施方案中,试剂不包括或不连接(直接地或间接地)至粒子、珠粒、纳米粒子、微球或其他固体支持物。在一些实施方案中,试剂不是刚性的、非柔性的或硬性的,或不包括或不连接至刚性、非柔性或硬性表面。在一些实施方案中,试剂为柔性的或基本上柔性的。在一些情况下,试剂能够调节或适应于细胞表面的形式。在一些实施方案中,试剂并非或不包含球形或大体上球体的形状。

[0273] 在一些实施方案中,基本上所有,即大于80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%,的试剂为有机材料、由有机材料组成或含有有机材料。举例而言,在一些实施方案中,大于80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或大于99%的试剂为脂质、碳水化合物、蛋白质、肽或其混合物,由该等物质组成或含有该等物质。在一些实施方案中,试剂为基本上不含无机材料、无机核心(例如金属,例如铁)、合成或无机聚合物(诸如苯乙烯聚合物、例如聚苯乙烯)、乳胶、二氧化硅或磁心的物质,由该等物质组成或含有该等物质。举例而言,在一些实施方案中,试剂的或作为试剂的一部分被包含的无机材料的相对百分比为小于20%、15%、10%、5%或更小。

[0274] 在一些实施方案中,水溶液中的试剂的总体积的大多数(即大于50%) (诸如大于60%、70%、80%、90%、95%、99%或大于99%) 由包含试剂的个别蛋白分子(诸如单分子的寡聚物或多聚物或构成单分子(例如四聚分子)的亚基的复合物的寡聚物或多聚物)组成。在一些实施方案中,可溶试剂的总密度小于 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.1\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 或更小。

[0275] 在一些实施方案中,可溶试剂(例如不连接至支持物或固体支持物(例如不连接至珠粒)的可溶试剂)的具有相对小的尺寸,诸如尺寸一般小于或大约小于20nm,诸如小于或大约小于15nm、小于或大约小于10nm、小于或大约小于5nm或更小。

[0276] 在一些实施方案中,可溶试剂(例如不连接至支持物或固体支持物(例如不连接至珠粒)的可溶试剂)为生物惰性的,即其对活细胞无毒。在一些实施方案中,试剂可为可生物降解的,例如其可被酶活性降解或被吞噬细胞清除。

[0277] 在一些实施方案中,有可能使试剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,诸如四聚链霉亲和素突变蛋白)与载剂(诸如有机载剂)反应。在一些方面中,除与多糖反应以外,还有可能使用生理学上或医药学上可接受的蛋白质,诸如血清白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA)或牛

血清白蛋白 (BSA)) 作为载剂蛋白。在此情况下, 试剂诸如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白 (以单独的四聚体或还呈寡聚物形式) 可经由非共价相互作用偶合至载剂蛋白。在一些这类实施方案中, 生物素化的BSA (其可商购自各种供应商, 诸如ThermoFisher Scientific、Sigma Aldrich或Vectorlabs, 仅列举几例) 可与试剂 (例如链霉亲和素突变蛋白) 反应。在一些方面中, 试剂寡聚物 (例如链霉亲和素寡聚物) 中的一些可经由一个或多个结合位点Z非共价结合至生物素化的载剂蛋白, 留下可用于结合剂 (例如受体结合剂或选择剂) 及如本文所述的任何其他剂的寡聚物的大多数结合位点Z。因此, 通过这类方法, 可制备具有多个结合位点Z的可溶试剂。

[0278] 在一些实施方案中, 试剂诸如链霉亲和素突变蛋白 (以单独的四聚体或还呈寡聚物形式) 可共价偶合至合成载剂, 诸如聚乙二醇 (PEG) 分子。举例而言, 任何适合的PEG分子可用于此目的, 且PEG分子及各试剂可为可溶的。通常, 至多1000Da分子量的PEG分子可溶于可用于本发明方法的水或培养基中。在一些情况下, 这类基于PEG的试剂可使用市售的活化PEG分子 (例如购自NOF North America Corporation, Irvine, California, USA的PEG-NHS衍生物, 或购自Creative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USA的活化PEG衍生物) 与链霉亲和素突变蛋白的氨基制备。

[0279] 3. 剂

[0280] 在一些实施方案中, 剂 (例如受体结合剂或选择剂) 具有一或个用于结合至细胞表面上的分子 (例如细胞表面分子) 的结合位点B。因此, 在一些情况下, 剂 (例如受体结合剂或选择剂) 含有一个结合位点B或多个结合位点B, 其中剂 (受体结合剂或选择剂) 与靶细胞表面上的分子之间的特异性结合含有B与该分子之间的相互作用。在一些实施方案中, 剂仅含有单一结合位点, 即为单价。在一些实施方案中, 剂 (例如受体结合剂或选择剂) 具有至少两个, 诸如多个结合位点B, 包括三个、四个或五个能够结合至细胞表面分子的结合位点B。在一些这类方面中, 至少两个或多个结合位点B可以是相同的。在一些实施方案中, 至少两个或多个结合位点B中的一个或多个可以是不同的 (例如B1和B2)。

[0281] 在一些实施方案中, 一种或多种不同的剂 (例如一种或多种不同的受体结合剂、选择剂或其他结合至细胞上的分子的剂) 可逆地结合至试剂。在一些实施方案中, 试剂为寡聚粒子试剂。在一些实施方案中, 至少2、3、4或更多种不同剂可逆地结合至相同试剂。在一些实施方案中, 至少两种不同的剂可逆地结合至相同试剂, 由此每个试剂包含一个结合位点B或多个结合位点B用于试剂与分子之间的特异性结合。在一些实施方案中, 至少两种或更多种剂含有相同结合位点B, 例如用以结合相同或基本上相同的分子。在一些实施方案中, 至少两种或更多种剂含有不同结合位点B, 例如用以结合至不同分子。在一些实施方案中, 第一剂 (例如第一受体结合剂或第一选择剂) 含有结合位点B1、B2、B3、B4等且第二剂 (例如第二受体结合剂或第二选择剂) 含有结合位点B1、B2、B3、B4等中的另一个。在一些实施方案中, 第一剂 (例如第一选择剂) 含有结合位点B1且第二剂 (例如第二选择剂) 含有结合位点B3。在一些实施方案中, 第一剂 (例如第一受体结合剂) 含有结合位点B2且第二剂 (例如第二受体结合剂) 含有结合位点B4。在这类实施方案中的任一者中, 第一剂及第二剂可含有结合伴侣C1或C2。在一些实施方案中, C1和C2可以是相同的。在一些实施方案中, C1和C2不同。在一些实施方案中, 第一剂和第二剂含有相同结合伴侣C1。

[0282] 在一些情况下, 剂与试剂的结合位点Z之间的结合 (例如经由结合位点B) 的解离常

数(K_d)可具有介于约 10^{-2} M至约 10^{-13} M,或约 10^{-3} M至约 10^{-12} M、或约 10^{-4} M至约 10^{-11} M、或约 10^{-5} M至约 10^{-10} M范围内的值。在一些实施方案中,结合剂与分子之间的结合的解离常数(K_d)具有低亲和力,例如在约 10^{-3} 至约 10^{-7} M的 K_d 范围内。在一些实施方案中,结合剂与分子之间的结合的解离常数(K_d)具有高亲和力,例如在约 10^{-7} 至约 1×10^{-10} M的 K_d 范围内。

[0283] 在一些实施方案中,剂经由结合位点B与分子的结合的解离充分快速地出现,例如以允许在破坏试剂与剂之间的可逆结合之后靶细胞仅短暂染色或与剂缔合。在一些情况下,当以 k_{off} 速率(还称作解离速率常数)表示剂与分子之间的结合(经由结合位点B)时, k_{off} 速率为约 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、约 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-2} \text{sec}$ 或更大、或约 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大。凭经验确定适合于特定剂与细胞分子相互作用的 k_{off} 速率范围在本领域技术人员的水平内(参见例如美国公布申请第US2014/0295458号)。举例而言,可使用具有例如大于 $4.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 的相当高 k_{off} 速率的剂,以使得在破坏结合复合体之后,可在一小时内移除或解离大部分剂。在其他情况下,可使用具有例如 $1.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 的较低 k_{off} 速率的剂,以使得在破坏结合复合体之后,可在约3个半小时内自细胞移除或解离大部分剂。

[0284] 在一些实施方案中,此结合的 K_d 以及形成于剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合位点B与细胞表面分子之间的结合的 k_{off} 及 k_{on} 速率可通过任何适合的方法测定,例如通过荧光滴定、平衡渗析或表面等离子共振。

[0285] 在一些方面中,细胞表面分子为剂(例如受体结合剂或选择剂)可针对的分子。在一些实施方案中,细胞表面分子为肽或蛋白质,诸如受体,例如膜受体蛋白。在一些实施方案中,受体为脂质、多糖或核酸。在一些实施方案中,为蛋白质的细胞表面分子可为外周膜蛋白或整合膜蛋白。细胞表面分子可在一些实施方案中具有一个或多个跨膜的结构域。作为一些示例性实例,具有跨膜域的膜蛋白可为G蛋白偶联受体,诸如气味受体、视紫质受体、视紫质信息素受体、肽激素受体、味觉受体、GABA受体、阿片剂受体、血清素受体、 Ca^{2+} 受体、黑素蛋白、神经递质受体(诸如配体门控、电压门控或机械门控受体,包括乙酰胆碱、烟碱、肾上腺素、去甲肾上腺素、儿茶酚胺、L-DOPA-、多巴胺及血清素(生物胺、内啡肽/脑啡肽)神经肽受体)、受体激酶(诸如丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶)、孔蛋白/通道(诸如氯通道、钾通道、钠通道)、OMP蛋白质、ABC转运蛋白(ATP结合性盒型转运蛋白,诸如氨基酸转运蛋白、Na-葡萄糖转运蛋白、Na/碘化物转运蛋白)、离子转运蛋白(诸如集光复合体)、细胞色素c氧化酶、ATP酶Na/K、H/K、Ca、细胞黏附受体(诸如金属蛋白酶、整合素或钙黏素)。

[0286] 在一些实施方案中,细胞表面分子可为界定所需细胞群体或亚群的抗原,该细胞群体或亚群例如血细胞群体或亚群,例如淋巴细胞(例如T细胞、T辅助细胞(例如CD4+T辅助细胞)、B细胞或自然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,例如CD34阳性外周干细胞或Nanog或Oct-4表达干细胞。T细胞的实例包括诸如CMV特异性CD8+T-淋巴细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞及调节T细胞(Treg)的细胞。Treg的示例性实例为CD4 CD25 CD45RA Treg细胞,且记忆T细胞的示例性实例为CD62L CD8+特异性中枢记忆T细胞。细胞表面分子还可为肿瘤细胞的标记物。

[0287] 如上文所述,在一些实施方案中,除能够结合细胞表面分子的结合位点B以外,剂

(例如受体结合剂或选择剂)具有结合伴侣C。在一些方面中,此结合伴侣C能够结合至试剂的结合位点Z,其中试剂具有一个或多个用于结合伴侣C的结合位点。在一些实施方案中,可在包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C与试剂的结合位点Z之间形成的非共价结合可具有任何所需强度及亲和力,且可在进行该方法的条件下是可破坏或可逆的。剂(例如受体结合剂或选择剂)可包括至少一种(包括两种、三种或更多种)额外的结合伴侣C,且试剂可包括至少两个(诸如三个、四个、五个、六个、七个、八个或更多个)用于包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C的结合位点Z。如美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请W0 2002/054065中所述,可选择结合伴侣C与具有一个或多个对应结合位点Z的试剂的任何组合,例如以使得结合伴侣C及结合位点Z能够在复合物中可逆地结合,以便引起亲合力效应。

[0288] 包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C可例如为基于烃的(包括聚合的)且包括氮、磷、硫、碳、卤素或假卤素基团。在一些方面中,其可为醇、有机酸、无机酸、胺、膦、巯基、二硫化物、烷烃、氨基酸、肽、寡肽、多肽、蛋白质、核酸、脂质、糖、寡糖、或多糖。作为其他实例,其还可为阳离子、阴离子、聚阳离子、聚阴离子、聚阳离子、电解质、聚电解质、碳纳米管或碳纳米泡沫。一般而言,这类结合伴侣C针对试剂的结合位点的亲和力高于针对其他物质的亲和力。各结合伴侣C的实例包括(但不限于)冠醚、免疫球蛋白、其片段及具有抗体样功能的蛋白质(proteinaceous)结合分子。

[0289] 在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括生物素,且试剂包括可逆地结合至生物素的链霉亲和素类似物或亲和素类似物。在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括可逆地结合至链霉亲和素或亲和素的生物素类似物,且试剂包括可逆地结合至分别的生物素类似物的链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物。在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括链霉亲和素结合肽或亲和素结合肽,且试剂包括可逆地结合至分别的链霉亲和素结合肽或亲和素结合肽的链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物。

[0290] 在一些实施方案中,试剂为链霉亲和素,诸如链霉亲和素突变蛋白,包括上文所述的任何链霉亲和素突变蛋白(例如SEQ ID NO:3-6或60-61中所示),且包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C可包括链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽可包括具有SEQ ID NO:9中所示的通式的序列,诸如含有SEQ ID NO:10中所示的序列。在一些实施方案中,肽序列具有SEQ ID NO:11中所示,诸如SEQ ID NO:12中所示的通式。在一个实例中,肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(还称作**Strep-tag®**,示于SEQ ID NO:7中)。在一个实例中,肽序列为Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(还称作**Strep-tag® II**,示于SEQ ID NO:8中)。在一些实施方案中,肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的连续配置,其中两个模块之间的距离为至少0个且不超过50个氨基酸,其中一个结合模块具有3至8个氨基酸且含有至少序列His-Pro-Xaa(SEQ ID NO:9),其中Xaa为谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,且其中另一结合模块具有相同或不同链霉亲和素肽配体,诸如SEQ ID NO:11中所示(参见例如国际公布PCT申请第W002/077018号;美国专利第7,981,632号)。在一些实施方案中,肽配体含有具有SEQ ID NO:13或14中的任一者中所示的式的

序列。在一些实施方案中,肽配体具有SEQ ID NO:15-19中的任一者中所示的氨基酸的序列。

[0291] 在一些实施方案中,剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C包括本领域技术人员已知的部分作为亲和标签。在这类实施方案中,试剂可包括已知结合至亲和标签的对应结合伴侣,例如抗体或抗体片段。作为已知亲和标签的一些示例性实例,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C可包括二硝基苯酚或地高辛、寡组氨酸、聚组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、几丁质结合蛋白(CBP)或硫氧还蛋白、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG'-肽、HA-标签(序列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)(SEQ ID NO:20)、VSV-G-标签(序列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys)(SEQ ID NO:21)、HSV-标签(序列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp)(SEQ ID NO:22)、T7表位(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)(SEQ ID NO:22)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、单纯疱疹病毒糖蛋白D的序列的HSV表位Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp(SEQ ID NO:24)、序列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu(SEQ ID NO:25)的转录因子c-myc的“myc”表位、V5-标签(序列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr)(SEQ ID NO:26)或谷胱甘肽-S-转移酶(GST)。在这类实施方案中,在可为抗体或抗体片段的试剂的一个或多个结合位点Z与抗原之间形成的复合物可通过添加游离抗原即游离肽(表位标签)或游离蛋白质(诸如MBP或CBP)而竞争性地被破坏。在一些实施方案中,亲和标签还可为寡核苷酸标签。在一些情况下,这类寡核苷酸标签可例如用于杂交至具有连接至试剂或包含于试剂中的互补序列的寡核苷酸。

[0292] 适合的结合伴侣C的其他实例包括(但不限于)凝集素、蛋白A、蛋白G、金属、金属离子、氨基三乙酸衍生物(NTA)、RGD-基序、葡萄聚糖、聚乙烯亚胺(PEI)、氧化还原聚合物、糖蛋白、适配体、染料、直链淀粉、麦芽糖、纤维素、几丁质、谷胱甘肽、钙调蛋白、明胶、多粘菌素、肝素、NAD、NADP、赖氨酸、精氨酸、苯甲脒、聚尿苷酸(poly U)、或寡聚脱氧胸苷酸(oligo-dT)。已知诸如伴刀豆球蛋白A的凝血素结合至多糖及糖基化蛋白质。染料的示例性实例为三嗪染料,诸如Cibacron blue F3G-A(CB)或Red HE-3B,其特异性结合NADH依赖性酶。通常,Green A结合至Co A蛋白质、人血清白蛋白及脱氢酶。在一些情况下,染料7-氨基放线菌素D及4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶结合至DNA。一般而言,诸如Ni、Cd、Zn、Co、或Cu的金属的阳离子通常用于结合亲和标签,诸如含有寡组氨酸的序列,包括六组氨酸或His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys标签(MAT标签)(SEQ ID NO:35),及N-甲基丙烯酰基-(L)-半胱氨酸甲酯。

[0293] 在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C与试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合在二价、三价或四价阳离子存在下出现。就此而言,在一些实施方案中,试剂包括二价、三价或四价阳离子,通常借助于适合的螯合剂保持,例如络合。在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C可包括一个部分,该部分包含(例如络合)二价、三价或四价阳离子。各个金属螯合剂的实例包括(但不限于)乙二胺、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、二乙烯三胺五乙酸(DTPA)、N,N-双(羧甲基)甘氨酸(还称作氨基三乙酸,NTA)、1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、2,3-二巯基-1-丙醇(二巯基丙醇)、卟吩及血红素。举例而言,EDTA与大部分

单价、二价、三价及四价金属离子,诸如银(Ag^+)、钙(Ca^{2+})、锰(Mn^{2+})、铜(Cu^{2+})、铁(Fe^{2+})、钴(Co^+)及锆(Zr^{4+})形成络合物,而BAPTA对 Ca^{2+} 具有特异性。作为示例性实例,用于本领域中的标准方法为在寡组氨酸标签与铜(Cu^{2+})、镍(Ni^{2+})、钴(Co^{2+})或锌(Zn^{2+})离子之间形成络合物,所述离子是借助于螯合剂氨基三乙酸(NTA)呈现。

[0294] 在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括钙调蛋白结合肽,且试剂包括多聚钙调蛋白,如例如美国专利5,985,658中所述的。在一些实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括FLAG肽,且试剂包括结合至FLAG肽的抗体,例如结合至单克隆抗体4E11的FLAG肽,如美国专利4,851,341中所述。在一个实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C包括寡组氨酸标签,且试剂包括结合寡组氨酸标签的抗体或过渡金属离子。在一些情况下,可通过金属离子螯合,例如钙螯合,例如通过添加EDTA或EGTA而实现所有这类结合络合物的破坏。在一些实施方案中,钙调蛋白、诸如4E11的抗体或螯合的金属离子或游离螯合剂可通过常规方法多聚化,例如通过生物素化及与链霉亲和素或其寡聚物复合,或通过在第一步骤中将羧基残基引入至多糖,例如葡萄聚糖中,基本上如Noguchi, A等人*Bioconjugate Chemistry* (1992) 3, 132-137中所述,且在第二步骤中使用常规碳化二亚胺化学方法,经由伯氨基将钙调蛋白或抗体或螯合的金属离子或游离螯合剂连接至多糖(例如葡萄聚糖)主链中的羧基。在一些这类实施方案中,包含于剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C与试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合可通过金属离子螯合破坏。金属螯合可例如通过添加EGTA或EDTA实现。

[0295] 在一些实施方案中,特异性结合至细胞表面分子的剂(例如受体结合剂或选择剂)可例如被抗体、其片段或具有抗体样功能的蛋白质结合分子所包含。在一些实施方案中,剂的结合位点B为抗体组合位点,诸如为或含有抗体的一个或多个互补决定区(CDR)。(重组)抗体片段的实例包括(但不限于)Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、诸如(Fab) $2'$ 片段的二价抗体片段、双抗体、三抗体(Iliades, P.等人, *FEB S Lett* (1997) 409, 437-441)、十功能抗体(Stone, E.等人, *Journal of Immunological Methods* (2007) 318, 88-94)及其他域抗体(Holt, L. J.等人, *Trends Biotechnol.* (2003), 21, 11, 484-490)、单域抗体(**nanobodies®**)。在一些实施方案中,剂(例如受体结合剂或选择剂)可包含二价蛋白质人工结合分子,诸如还称为“duocalin”的二聚脂质运载蛋白突变蛋白。

[0296] 在一些实施方案中,剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有单一结合位点B,还即其可为单价的。单价剂(例如受体结合剂或选择剂)的实例包括(但不限于)单价抗体片段、具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子或MHC分子。单价抗体片段的实例包括(但不限于)Fab片段、Fv片段、单域抗体(例如骆驼源性 **nanobodies®**及单链Fv片段(scFv)(包括二价单链Fv片段))。

[0297] 在一些实施方案中,剂为抗体或其抗原结合片段,诸如Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、单域抗体(例如骆驼源性 **nanobodies®**)、二价抗体片段(诸如(Fab) $2'$ 片段)。在一些实施方案中,剂为或衍生自已知结合至所关注的细胞分子的亲本抗体。针对细胞表面分子的各种抗体分子或其片段为本领域熟知的,且多种这类者中的任一者可用作本文方法中的剂。在一些实施方案中,剂为在亲本或参考抗体的可变重链中含有一个或多个氨基酸

置换的抗体或其片段,例如以产生具有改变的亲和力或展现如上文所述的充分快速解离速率的抗体。举例而言,在抗CD4抗体13B8.2的突变体的背景下已知例示性这类突变(参见例如美国专利号7,482,000、美国专利申请号US2014/0295458或国际专利申请号W02013/124474),且这类突变中的任一者可在另一亲本或参考抗体中产生。

[0298] 在一些方面中,剂(例如受体结合剂或选择剂)可为单价的,例如包含单价抗体片段或单价人工结合分子(蛋白质或其他),诸如基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白(还称为“**Anticalin®**”),或二价分子,诸如保留两个结合位点的抗体或片段,诸如F(ab')₂片段。

[0299] 具有抗体样功能的蛋白质结合分子的实例包括基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白(参见例如W0 03/029462, Beste等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903)。一般而言,脂质运载蛋白,诸如后胆色素结合蛋白、人类嗜中性白细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、人类Apo脂蛋白D或人泪液脂质运载蛋白具有可经修饰以使其结合给定标靶的天然配体结合位点。可用作特异性结合至细胞表面分子的剂(例如受体结合剂或选择剂)的具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子的其他实例包括(但不限于)所谓glubody(参见例如国际专利申请W0 96/23879)、基于锚蛋白支架的蛋白质(Mosavi, L.K.等人, Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448)或结晶支架(例如国际专利申请W0 01/04144)、Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187中所述的蛋白质、AdNectin、四连接素(tetranectin)及avimer。一般而言, avimer, 包括通过人类受体域家族的外显子改组进化的多价avimer蛋白质, 含有所谓的A-域, 其以若干细胞表面受体中的多个域的串形式出现(Silverman, J.等人, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561)。一般衍生自人类纤连蛋白的AdNectin通常含有三个可经工程改造以用于免疫球蛋白样结合至标靶的环(Gill, D.S.及Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658)。一般衍生自各人类同源三聚蛋白质的四连接素同样通常含有可经工程改造以用于所需结合的C型凝集素域中的环区。可在一些情况下充当蛋白质配体的类肽通常为寡聚(N-烷基)甘氨酸, 其与肽的不同之处在于侧链连接至酰胺氮而非碳原子。类肽通常对蛋白酶及其他修饰酶具抗性, 且可具有相较于肽高得多的细胞渗透性(参见例如Kwon, Y.-U.及Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509)。

[0300] 适合的蛋白质结合分子的其他实例包括(但不限于)EGF样域、三环域、I型纤连蛋白域、II型纤连蛋白域、III型纤连蛋白域、PAN域、Gla域、SRCR域、Kunitz/牛胰脏胰蛋白酶抑制剂域、淀粉酶抑肽、Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂域、三叶草(P型)域、C型血管性血友病因子域、过敏毒素样域、CUB域、I型甲状腺球蛋白重复序列、A类LDL受体域、寿司域(Sushi domain)、连接域、I型血小板反应蛋白域、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白样结构域(例如域抗体或骆驼重链抗体)、C型凝集素域、MAM域、A型血管性血友病因子域、生长调节素B域、WAP型四二硫化物核心域、F5/8C型域、血液结合素域、SH2域、SH3域、层黏连蛋白型EGF样域、C2域、“κ抗体(Kappabodies)”(Ill等人Protein Eng (1997) 10, 949-57、所谓的“微型抗体”(Martin等人, EMBO J (1994) 13, 5303-5309)、双功能抗体(Holliger等人, PNAS USA (1993) 90, 6444-6448)、所谓的“Janusis”(Traunecker等人, EMBO J (1991) 10, 3655-3659, 或Traunecker等人, Int J Cancer (1992) 增刊7, 51-52)、纳米抗体、微体、affilin、affibody、knottin、泛素、锌指蛋白、自发荧光蛋白、DARPin或富亮氨酸重复蛋白。在一些实施方案中,

具有抗体样功能的核酸分子可为适体。一般而言,适体折迭为界定三维基序且显示针对给定目标结构的高亲和力。

[0301] 在某些实施方案中,一种或多种剂,例如含有诸如结合伴侣C的结合伴侣的剂,附接、连接和/或结合至寡聚粒子试剂。在特定实施方案中,一种或多种剂可逆地附接、连接和/或结合至寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,一种或多种剂通过接触、处理和/或孵育一种或多种剂与寡聚粒子试剂而附接、连接和/或结合(例如可逆地结合)至寡聚粒子试剂。在某些实施方案中,通过混合和/或摇动(例如温和摇动和/或混合)进行处理、接触和/或孵育。

[0302] 在某些实施方案中,一种或多种剂持续、持续大约或持续至少1分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、90分钟、120分钟、4小时、6小时、8小时、12小时、16小时或24小时与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,一种或多种剂持续1分钟至12小时之间、1分钟至1小时之间、1分钟至30分钟之间、10分钟至60分钟之间、10分钟至20分钟之间、1小时至3小时之间、1小时至2小时之间、或6小时至12小时之间与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在某些实施方案中,一种或多种剂持续5分钟至30分钟之间,或持续15分钟或约15分钟与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。

[0303] 在特定实施方案中,一种或多种剂在、在大约或在至少4°C、8°C、12°C、16°C、20°C、24°C、28°C、32°C、37°C、39°C、50°C、60°C、70°C、80°C、90°C或100°C的温度下与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在一些实施方案中,一种或多种剂在4°C与39°C之间、10°C与37°C之间、10°C与25°C之间、20°C与30°C之间、24°C与39°C之间、或40°C与100°C之间的温度下与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在特定实施方案中,一种或多种剂在室温下与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在某些实施方案中,一种或多种剂在或在大约23°C、24°C、25°C、或26°C±2°C、±1°C、±0.5°C、±0.2°C、±0.1°C、±0.05°C、或±0.01°C下与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。

[0304] 在某些实施方案中,一种或多种剂以每0.5μg、1.0μg、1.5μg、2.0μg、2.5μg、3.0μg、4.0μg、5.0μg、6μg、7μg、8μg、9μg或10μg寡聚粒子试剂恰好、大约或至少0.1μg、0.2μg、0.3μg、0.4μg、0.5μg、0.6μg、0.7μg、0.8μg、0.9μg、1.0μg、1.2μg、1.4μg、1.6μg、1.8μg、2.0μg、2.2μg、2.4μg、2.6μg、2.8μg或3.0μg剂的量与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在特定实施方案中,一种或多种剂以每2μg、3μg、4μg、或5μg寡聚粒子试剂恰好或大约1.0μg剂的量与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。

[0305] 在一些实施方案中,一种或多种剂,例如含有诸如结合伴侣C的结合伴侣的剂,通过孵育、处理及或接触寡聚粒子试剂与一种或多种剂而附接、连接和/或结合至寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,一种或多种剂在4°C与39°C之间、10°C与25°C之间、或20°C与30°C之间的温度下持续1分钟至1小时之间以每2μg、3μg、4μg、或5μg寡聚粒子试剂恰好或大约1.0μg剂的量与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在特定实施方案中,一种或多种剂在10°C与25°C之间的温度下持续5分钟至30分钟之间以每3μg寡聚粒子试剂恰好或大约1.0μg剂的量与寡聚粒子试剂孵育、处理和/或接触。在某些实施方案中,一种或多种剂是本文所述的剂,例如部分II-C-3中所述的剂。在一些实施方案中,剂是抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,例如含有结合伴侣例如streptag的抗体或其抗原结合片段。在特定实施方案中,一种或多种剂是含有结合伴侣例如链霉亲和素结合肽诸如Strep-tagII的抗CD3和/或抗

CD28Fab。

[0306] a. 受体结合剂

[0307] 在一些实施方案中,剂为受体结合剂。在一些实施方案中,受体结合剂结合至细胞表面上的分子(例如受体),剂与分子之间的该结合能够诱导或调节细胞中的信号。在一些情况下,细胞表面分子(例如受体)为信号传导分子。在一些这类情况下,受体结合剂能够特异性结合至由细胞中的一个或多个表达的信号传导分子。在一些情况下,受体结合剂为刺激剂,其可为能够在结合至诸如受体的细胞表面分子后在细胞(例如T细胞)中诱导信号的任何剂。在一些实施方案中,信号可为免疫刺激性的,在此情况下,受体结合剂或刺激剂能够诱导或调节参与免疫反应或通过细胞(例如T细胞)刺激免疫反应的信号,例如增加免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞活化、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒性活性或免疫细胞的一种或多种其他功能活性。在一些实施方案中,信号可为抑制性的,在此情况下,受体结合剂或刺激剂能够在细胞(例如T细胞)中诱导或调节参与或抑制免疫反应的信号,例如抑制或减少免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞活化、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒性活性或免疫细胞的一种或多种其他功能活性。

[0308] 在一些实施方案中,受体结合剂,例如刺激剂,为第一受体结合剂,例如第一刺激剂。在一些方面中,第一受体结合剂,例如第一刺激剂,结合至细胞表面上的受体分子。因此,在一些情况下,第一受体结合剂,例如第一刺激剂,诱导或调节信号。在一些方面中,通过第一受体结合剂例如第一刺激剂诱导或调节信号实现细胞的活化、刺激和/或扩增(增殖)。因此,在一些情况下,第一受体结合剂例如第一刺激剂向细胞提供初级活化信号,由此活化细胞。

[0309] 在一些实施方案中,细胞群体可为淋巴细胞群体,包括(但不限于)B细胞群体、T细胞群体或自然杀伤细胞群体。细胞群体的说明性实例为携有CD40或CD137的B细胞(两种细胞群体均可在仅结合第一剂后增殖,该第一剂提供活化信号,例如4-1BB配体;或 α CD40抗体分子或 α CD137抗体分子(参见例如Zhang等人,2010,J Immunol,184:787-795))。可用于扩增B细胞的剂(第一或第二剂)的其他说明性实例为结合至IgG、CD19、CD28或CD14的剂,例如 α CD19、 α IgG、 α CD28、或 α CD14抗体分子。还预想用于扩增B细胞的第一或第二剂可包含用于toll样受体或白细胞介素的配体,诸如IL-21(参见例如Dienz 0等人2009.J.Exp.Med.206:69)。应注意,B细胞的脂多糖依赖性活化也包涵于本发明中,因为脂多糖也可用作第一剂且可装备有如本文所用的结合伴侣C1。

[0310] 适合的细胞群体的其他说明性实例包括在通过将第一剂结合至TCR/CD3及将第二剂结合至T细胞上的辅助分子诸如CD28而活化之后扩增的T细胞群体。在此状况下,第一剂刺激T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号且第二剂通过结合作为辅助分子的CD28而提供二次刺激。可用于扩增T细胞的剂还可包括白细胞介素,诸如IL-2、IL-7、IL-15或IL-21(参见例如Cornish等人2006,Blood.108(2):600-8,Bazdar及Sieg,2007,Journal of Virology,2007,81(22):12670-12674,Battalia等人,2013,Immunology,139(1):109-120)。可用于扩增T细胞的剂的其他说明性实例为结合至CD8、CD45或CD90的剂,诸如 α CD8、 α CD45或 α CD90抗体。T细胞群体的说明性实例包括抗原特异性T细胞、辅助性T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(记忆T细胞的说明性实例为CD62L⁺CD8⁺特异性中枢记忆T细胞)或调节性T细胞(Treg的说明性实例为CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺Treg细胞)。

[0311] 适合的细胞群体的另一说明性实例包括自然杀伤细胞(NK细胞),其可例如通过结合至CD16或CD56的剂诸如 α CD16或 α CD56抗体扩增。在说明性实例中,这类 α CD16抗体为具有SEQ ID NO:52中所示的VH序列及SEQ ID NO:53中所示的VL序列的抗体3G8(参见例如Hoshino等人,Blood.1991年12月15日;78(12):3232-40)。可用于扩增NK细胞的另一剂可为IL-15(参见例如Vitale等人2002.The Anatomical Record.266:87-92)。适合的细胞群体的另一说明性实例包括单核细胞,其可例如使用结合至CD14的剂诸如 α CD14抗体分子扩增。

[0312] 在一些方面中,受体结合剂例如刺激剂特异性靶向表达于靶细胞表面上的分子,其中该分子为TCR或嵌合抗原受体。举例而言,表达于靶细胞表面上的分子选自T细胞或B细胞抗原受体复合物、CD3链、CD3 ξ 、T细胞受体或B细胞受体的抗原结合部分、或嵌合抗原受体。在一些情况下,受体结合剂靶向肽:MHC I类复合物。在一些方面中,受体结合剂例如刺激剂特异性结合至重组受体的抗体部分,例如CAR。在一些情况下,重组受体的抗体部分包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分,诸如铰链区,例如IgG4铰链区,和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分是人类IgG诸如IgG4或IgG1的。在一些情况下,试剂负载有识别IgG4间隔区的 α IgG。

[0313] 在一些实施方案中,第一受体结合剂例如第一刺激剂可刺激细胞例如T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号。在一些方面中,第一受体结合剂例如第一刺激剂可为特异性结合CD3的结合剂。在一些情况下,特异性结合CD3的第一受体结合剂例如第一刺激剂可选自由以下各者组成的组:抗CD3抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD3结合分子。二价抗体片段可为(Fab)2'片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、纳米抗体(sdAntibody)及单链Fv片段(scFv)。在一些情况下,具有抗体样结合特性的蛋白质CD3结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin、DARPin或avimer。

[0314] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段可衍生自融合瘤细胞系OKT3(ATCC® CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549)产生的CD3结合单克隆抗体。抗CD3抗体OKT3的重链的可变域及轻链的可变域描述于Arakawa等人J. Biochem. 120, 657-662 (1996)中且分别包含SEQ ID NO: 31及32中所示的氨基酸序列。

[0315] 在一些方面中,受体结合剂例如刺激剂为第二受体结合剂例如第二刺激剂。在一些情况下,第二受体结合剂例如第二刺激剂结合至细胞表面上的分子诸如细胞表面分子,例如受体分子。在一些实施方案中,第二受体结合剂例如第二刺激剂能够增强、抑制或修改通过第一分子递送的信号。在一些实施方案中,第二受体结合剂例如第二刺激剂诱导或调节信号,例如第二或额外信号。在一些方面中,第二受体结合剂例如第二刺激剂可增强或强化由第一受体结合剂例如第一刺激剂诱导的信号。在一些实施方案中,第二受体结合剂例如第二刺激剂结合至辅助分子和/或可刺激或诱导细胞中的辅助或二次信号。在一些方面中,第二受体结合剂例如第二刺激剂结合至共刺激分子和/或提供共刺激信号。

[0316] 在一些实施方案中,可为第二受体结合剂例如第二刺激剂的受体结合剂例如刺激剂结合例如特异性结合至第二分子,该第二分子可为共刺激分子、辅助分子、细胞因子受体、趋化因子受体、免疫检查点分子、或TNF家族或TNF受体家族的成员。

[0317] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CD28,且受体结合剂例如刺激剂

(例如其可为第二受体结合剂例如第二刺激剂) 特异性结合CD28。在一些方面中, 特异性结合CD28的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂例如第二刺激剂) 可选自由以下各者组成的组: 抗CD28抗体、抗CD28抗体的二价抗体片段、抗CD28抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD28结合分子。二价抗体片段可为(Fab)₂'片段或二价单链Fv片段, 而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组: Fab片段、Fv片段、及单链Fv片段(scFv)。具有抗体样结合特性的蛋白质CD28结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin及avimer。在一些情况下, 特异性结合受体的受体结合剂, 例如第一、第二和/或额外受体结合剂, 例如刺激剂, 为抗体或其抗原结合片段, 例如Fab片段。

[0318] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为结合例如特异性结合至受体的配体, 该受体例如在结合剂后刺激或活化T细胞活化信号2例如共刺激信号的细胞表面分子。在一些实施方案中, 受体结合剂, 例如第一、第二和/或额外受体结合剂, 为内源性配体、同源配体、合成配体和/或其部分、变体或修改形式。在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为内源性配体和/或同源配体的细胞外域或其部分。

[0319] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂能够结合至以下中的任何一个或多个: CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30L及LIGHT。在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为抗体、二价抗体(例如F(ab')₂片段或二价单链Fv片段)、单价抗体(例如Fab片段、Fv片段、或单链Fv片段(scFv))或CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30L及LIGHT中的任何一个或多个的配体, 其中这类剂能够在将受体结合剂例如刺激剂结合至该分子后诱导或建模细胞中的信号。

[0320] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30L及LIGHT中的任何一个或多个的配体, 其中这类剂能够在将受体结合剂例如刺激剂结合至该分子后诱导或建模细胞中的信号。在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为内源性配体和/或同源配体的细胞外域或其部分。举例而言, 在一些实施方案中, 受体结合剂为或含有B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、ICOS-L、PD-L1、OX40L、CD27、4-1BB (CD137) 和/或CD30的细胞外域或其部分。

[0321] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂能够特异性结合至除CD28、CD3、CD137或CD40以外的靶细胞表面上的分子。在一些情况下, 受体结合剂例如刺激剂结合至除CD28、CD3、CD137或CD40以外的靶细胞表面上的分子诱导或调节靶细胞中的信号和/或改变靶细胞的功能, 由此产生经培养的靶细胞。

[0322] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂能够结合至TNF家族或TNF受体家族的任何个或多个成员, 例如TNF受体超家族的成员, 和/或Wnt受体或共同受体, 例如受体的卷曲蛋白(Frizzled; Fz) 家族。

[0323] 在一些实施方案中, 细胞上的分子为TNF受体超家族的成员, 诸如肿瘤坏死因子受体1 (CD120a)、肿瘤坏死因子受体2 (CD120b)、淋巴毒素 β 受体 (CD18)、OX40 (CD134)、CD40 (Bp50)、Fas受体 (Apo-1, CD95)、诱饵受体3 (TR6, M68)、CD27 (S152, Tp55)、CD30 (Ki-1)、4-1BB (CD137)、死亡受体4 (TRAILR1, Apo-2, CD261)、死亡受体5 (TRAILR2, CD262)、诱饵受体1 (TRAILR3, LIT, TRID, CD263)、诱饵受体2 (TRAILR4, TRUNDD, CD264)、RANK (CD265)、骨保护素

(OCIF, TR1)、TWEAK受体 (Fn14, CD266)、TACI (IGAD2, CD267)、BAFF受体 (CD268)、疱疹病毒进入介体 (ATAR, TR2, CD270)、神经生长因子受体 (p75NTR, CD271)、B细胞成熟抗原 (TNFRSF13A, CD269)、糖皮质激素诱导的TNFR相关 (AITR, CD357)、TROY (TAJ, TRADE)、死亡受体6 (CD358)、死亡受体3 (Apo-3, TRAMP, LARD, WS-1) 或外异蛋白A2受体 (XEDAR)。

[0324] 在一些情况下, 特异性结合TNF受体超家族蛋白质的受体结合剂为抗体或其抗原结合片段, 例如Fab片段。在一些实施方案中, 特异性结合TNF受体超家族蛋白质的受体结合剂可为结合例如特异性结合至受体的配体, 和/或其细胞外域或其部分。在一些实施方案中, 配体为或包括TNF α 、淋巴毒素 β (TNF-C)、OX40L、CD154、FasL、FasL、LIGHT、TL1A、CD70、Siva、CD153、4-1BB配体、TRAIL、RANKL、TWEAK、APRIL、BAFF、CAMLG、BAFF、LIGHT、NGF、BDNF、NT-3、NT-4、BAFF、GITR配体、TL1A或EDA-A2, 或跨膜蛋白中的任一者的细胞外域或其部分。

[0325] 在一些实施方案中, 细胞上的分子为Wnt受体或共同受体、受体 (诸如卷曲蛋白 (Fz) 家族受体)、脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) -5/6、受体酪氨酸激酶 (RTK) 及受体相关孤儿受体2 (ROR2)。在一些实施方案中, 细胞上的分子为例如卷曲蛋白-1 (FZD1)、卷曲蛋白-2 (FZD2)、卷曲蛋白-3 (FZD3)、卷曲蛋白-4 (FZD4)、卷曲蛋白-5 (FZD5)、卷曲蛋白-6 (FZD6)、卷曲蛋白-7 (FZD7)、卷曲蛋白-8 (FZD8)、卷曲蛋白-9 (FZD9) 或卷曲蛋白-10 (FZD10)。

[0326] 在一些情况下, 特异性结合Wnt受体或共同受体的受体结合剂为抗体或其抗原结合片段, 例如Fab片段。在一些实施方案中, 特异性结合Wnt受体或共同受体的受体结合剂可为结合例如特异性结合至受体的配体。在一些实施方案中, 配体为或包括例如WNT1、WNT2、WNT2B、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、或WNT16。

[0327] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂能够结合至以下中的任何一个或多个: CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40及HVEM。在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为抗体、二价抗体 (例如F(ab')₂ 片段或二价单链Fv片段)、单价抗体 (例如Fab片段、Fv片段、或单链Fv片段 (scFv)) 或CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40及HVEM中的任何一个或多个的配体, 其中这类剂能够在将受体结合剂例如刺激剂结合至分子后诱导或建模细胞中的信号。

[0328] 在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为CD28、4-1BB (CD137)、CD40、CD40L、T细胞活化连接子 (LAT)、CD27、OX40 (CD134) 及疱疹病毒进入介体 (HVEM) 中的任何一个或多个的配体, 其中这类剂能够在将受体结合剂例如刺激剂结合至分子后诱导或建模细胞中的信号。在一些实施方案中, 受体结合剂例如刺激剂可为内源性配体和/或同源配体的细胞外域或其部分。举例而言, 在一些实施方案中, 受体结合剂为或含有B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、4-1BBL、CD40、CD40L、CD27L (CD70) 和/或OX40L的细胞外域或其部分。

[0329] 在一些实施方案中, 细胞例如T细胞上的分子可为CD28, 且受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 特异性结合CD28。

[0330] 在一些实施方案中, 细胞例如T细胞上的分子可为CD28, 且受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 特异性结合CD28。在一些方面中, 特异性结合CD28的受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 可选自由以下各者组成的组: 抗CD28抗体、抗CD28抗体的二价抗体片段、抗CD28抗体的单价抗体片

段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD28结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、纳米抗体及单链Fv片段(scFv)。

[0331] 在一些实施方案中,抗CD28 Fab片段可衍生自抗体CD28.3(以GenBank登记号AF451974.1的合成单链Fv构建体;还参见Vanhove等人,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页),其重链及轻链分别包含SEQ ID NO:33及34。

[0332] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CD90,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD90。在一些方面中,特异性结合CD90的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗CD90抗体、抗CD90抗体的二价抗体片段、抗CD90抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD90结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。参见例如抗CD90抗体G7(Biolegend,目录号105201)。

[0333] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CD95,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD95。在一些方面中,特异性结合CD95的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗CD95抗体、抗CD95抗体的二价抗体片段、抗CD95抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD95结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。举例而言,在一些方面中,抗CD95抗体可为单克隆小鼠抗人类CD95 CH11(Upstate Biotechnology,Lake Placid,NY)或可为抗CD95 mAb 7C11或抗APO-1,诸如Paulsen等人Cell Death&Differentiation 18.4(2011):619-631中所述的。

[0334] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞或B细胞上的分子可为CD137,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD137。在一些方面中,特异性结合CD137的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗CD137抗体、抗CD137抗体的二价抗体片段、抗CD137抗体的单价抗体片段及具有抗体样结合特性的蛋白质CD137结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。举例而言,抗CD137抗体可为如Taraban等人Eur J Immunol.2002年12月;32(12):3617-27中所述的LOB12、IgG2a或LOB12.3、IgG1。还参见例如US6569997、US6303121、Mittler等人Immunol Res.2004;29(1-3):197-208。

[0335] 在一些实施方案中,细胞例如B细胞上的分子可为CD40,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD40。在一些方面中,特异性结合CD40的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗CD40抗体、抗CD40抗体的二价抗体片段、抗CD40抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD40结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。举例而言,抗CD40抗体可为嵌合单克隆抗人类CD40抗体替奈昔单抗(Teneliximab)及抗人类CD40(Affymetrix目录号14-0409-80),或例如US 2002/0142358、US 2007/0077242、WO 2001/083755、Zhang等人,2010,J Immunol,184:787-795中所述的任何。

[0336] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CD40L(CD154),且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD40L。在一些方面

中,特异性结合CD40L的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗CD40L抗体、抗CD40L抗体的二价抗体片段、抗CD40L抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD40L结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。举例而言,抗CD40L抗体可在一些方面中为Hu5C8,如Blair et al. JEM第191卷第4期651-660中所述。还参见例如W01999061065、US20010026932、US7547438、W02001056603。在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为诱导性T细胞共刺激因子(ICOS)、T细胞活化连接子(LAT)、CD27、OX40(CD134)、疱疹病毒进入介体(HVEM)、CD90和/或CD95,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)分别特异性结合ICOS、LAT、CD27、CD134、HVEM、CD90和/或CD95。在一些方面中,特异性结合ICOS、LAT、CD27、CD134、HVEM、CD90和/或CD95的受体结合剂例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自由以下各者组成的组:抗体、其二价抗体片段、其单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何。

[0337] 在一些实施方案中,可为第二或额外受体结合剂的受体结合剂结合至的细胞例如T细胞上的分子细胞表面分子,该细胞表面分子在剂结合后刺激或活化细胞因子信号、趋化因子信号、细胞黏附信号、T细胞活化信号或额外信号例如环境信号。在一些实施方案中,可为第二或额外受体结合剂的受体结合剂特异性结合至的细胞例如T细胞上的分子为细胞因子受体或趋化因子受体。在一些情况下,受体结合剂例如额外受体结合剂为或含有黏附分子,为诱导细胞因子产生、趋化因子产生、黏附分子表达的因子,和/或参与刺激和/或调节辅助信号和/或额外信号例如环境信号。

[0338] 在本文提供的实施方案中的任一者中,受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂可为特异性结合受体例如表达于细胞表面上的受体的结合剂。

[0339] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂为抗体或其抗原结合片段,例如结合至细胞表面分子的抗体或其抗原结合片段,该细胞表面分子在剂结合后刺激或活化细胞因子信号、趋化因子信号、细胞黏附信号、T细胞活化信号或额外信号例如环境信号。在一些情况下,特异性结合受体的受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂,可选自由以下各者组成的组:抗受体抗体、抗受体抗体的二价抗体片段、抗受体抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质受体结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、及单链Fv片段(scFv)。在一些情况下,具有抗体样结合特性的蛋白质受体结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin、DARPin或avimer。在一些情况下,特异性结合受体的受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂,为抗体或其抗原结合片段,例如Fab片段。

[0340] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂可为结合例如特异性结合受体例如细胞表面分子的配体,该细胞表面分子在剂结合后刺激或活化细胞因子信号、趋化因子信号、细胞黏附信号、T细胞活化信号或额外信号例如环境信号。在一些实施方案中,受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,为内源性配体、同源配体、合成配体和/或其部分、变异体或修改形式。在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂可为内源性配体和/或同源配体的细胞外域或其部分。

[0341] 在一些实施方案中,受体结合剂例如第二或额外受体结合剂为或含有特异性结合至细胞因子受体的配体。在一些实施方案中,受体结合剂例如第二或额外受体结合剂为或包含细胞因子受体的配体,例如细胞因子或其部分。例示性细胞因子受体包括(但不限于)IL-2R、IL-7R、IL-21R、CD132(IL受体共用 γ 链)、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-17R、TNFR1及TNFR2。例示性配体,例如细胞因子,包括(但不限于)IL-2、IL-7、IL-21、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、I型干扰素(例如IFN α 和/或IFN β)、IL-12、IL-17、IL-9及TNF,及其生物学活性片段。

[0342] 在一些实施方案中,受体结合剂,例如第二或额外受体结合剂,为特异性结合至细胞因子受体的抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,特异性结合细胞因子受体的受体结合剂例如第二或额外受体结合剂可选自由以下各者组成的组:抗(细胞因子受体)抗体、抗(细胞因子受体)抗体的二价抗体片段、抗(细胞因子受体)抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质细胞因子受体结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、及单链Fv片段(scFv)。

[0343] 在一些实施方案中,受体结合剂例如额外受体结合剂为或含有特异性结合至趋化因子受体的配体。在一些实施方案中,受体结合剂例如第二或额外受体结合剂为或包含趋化因子受体的配体,例如趋化因子或其部分。例示性趋化因子受体包括(但不限于)CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4。例示性配体例如趋化因子包括(但不限于)CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21及CCL25、或其生物学活性片段。

[0344] 在一些实施方案中,受体结合剂例如第二或额外受体结合剂为特异性结合至趋化因子受体的抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,特异性结合趋化因子受体的受体结合剂例如第二或额外受体结合剂可选自由以下各者组成的组:抗(趋化因子受体)抗体、抗(趋化因子受体)抗体的二价抗体片段、抗(趋化因子受体)抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质趋化因子受体结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、及单链Fv片段(scFv)。

[0345] 在一些情况下,特异性结合诱导细胞因子的黏附分子或因子的受体结合剂为抗体或其抗原结合片段,例如Fab片段。在一些实施方案中,特异性结合诱导细胞因子的黏附分子或因子的受体结合剂可为结合例如特异性结合至该受体的配体。在一些实施方案中,受体结合剂为黏附分子和/或受体的内源性配体、同源配体、合成配体和/或其部分、变异体或修改形式。在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂可为自身为细胞表面或跨膜蛋白的内源性配体和/或同源配体的细胞外域或其部分。

[0346] 在一些情况下,细胞上的分子例如黏附分子为CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1;分别示于SEQ ID NO:36及37中的全长 α 及 β 链序列)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素;示于SEQ ID NO:38中的全长序列)、CD29/CD49d(VLA-4;示于SEQ ID NO:40中的全长序列)、CD106(VCAM-1;示于SEQ ID NO:39中的全长序列)或为其生物学活性片段。在一些实施方案中,受体结合剂为结合例如特异性结合至黏附分子的抗体或其抗原结合片段,该黏附分子为例如CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)、CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。在一些实施方案中,受体结合剂为

结合例如特异性结合至黏附分子的配体或其部分,该黏附分子为例如CD44、CD31、CD18/CD11a (LFA-1)、CD29、CD54 (ICAM-1)、CD62L (L-选择素)、CD29/CD49d (VLA-4)、CD106 (VCAM-1)。这类受体结合剂包括一种试剂,其为或包含黏附分子的内源性配体和/或同源配体的细胞外域 (ECD) 或其部分。在一些实施方案中,受体结合剂为黏附分子的细胞外域或其部分,且可结合细胞表面上的一个或多个黏附分子。这类受体结合剂的实例包括LFA-1 α 的细胞外域 (示于SEQ ID NO:54中的ECD); LFA-1 β 的细胞外域 (示于SEQ ID NO:55中的ECD); L-选择素的细胞外域 (示于SEQ ID NO:57中的ECD); VCAM-1的细胞外域 (示于SEQ ID NO:56中的ECD); 及VLA-4的细胞外域 (示于SEQ ID NO:58中的ECD),或其任何部分。

[0347] 在一些实施方案中,诱导细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子为或含有核因子,诸如视黄酸受体相关孤儿受体 γ (ROR γ) 或ROR α 。在一些实施方案中,受体结合剂例如第二或额外受体结合剂为或含有特异性结合至细胞因子受体的配体。

[0348] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为IL-2R、IL-7R (CD127)、IL-21R (CD360)、IL受体共用 γ 链 (γc ; 或CD132)、IL-1R (CD121) (诸如IL-1R1或IL-1R2)、IL-15R (CD215)、干扰素 γ 受体 (IFN γ R; CD119)、包括TNFR1 (CD120a) 及TNFR2 (CD120b) 在内的肿瘤坏死因子 α 受体 (TNF α R)、IL-4R、IL-10R、干扰素I型受体 (例如IFN α 受体 (IFNAR), 包括IFNAR1及IFNAR2)、IL-17R (CD217) 和/或IL-12R,及受体结合剂,例如特异性结合至该分子的刺激剂。在一些方面中,特异性结合细胞上的该分子的受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 可选自由以下各者组成的组: 抗体、二价抗体片段、单价抗体片段及具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子。

[0349] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 可包括刺激受体或能够在细胞中诱导信号的其他受体的配体,诸如IL-2配体、IL-7配体、IL-21配体、IL-1配体、IL-15配体、IL-9配体、IFN γ 配体、TNF α 配体、IL-4配体、IL-10配体、IL-12配体、IL-17配体,或其生物学活性部分或变体。在一些实施方案中,生物学活性部分或变体保留结合至受体的活性和/或调节一个或多个至受体的信号的功能活性。

[0350] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 可包括刺激受体或能够在细胞中诱导信号的其他受体的配体,诸如I型干扰素,例如IFN α 、IFN β 、IFN κ 、IFN δ 、IFN ϵ 、IFN τ 、IFN ω 及IFN ζ (还称为限制素) 或其生物学活性部分。

[0351] 在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CXCR3、CCR7、CXCR1或CXCR4,且受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 特异性结合CXCR3、CCR7、CXCR1或CXCR4。在一些方面中,特异性结合CXCR3、CCR7、CXCR1或CXCR4的受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 可选自由以下各者组成的组: 抗体、二价抗体片段、单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子。

[0352] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂 (例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂) 可包括刺激受体或能够在细胞中诱导信号的其他受体的配体,诸如CXCL9配体、CXCL10配体、CCL19配体、CCL21配体、CCL25配体或保留结合至受体的活性和/或调节一个或多个至受体的信号的功能活性的其生物学活性部分。

[0353] 在一些情况下,受体结合剂例如额外受体结合剂为或含有黏附分子,或为诱导细

胞因子产生、趋化因子产生、黏附分子表达的因子,和/或参与刺激和/或调节辅助信号和/或额外信号。在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为CD62L,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂)特异性结合CD62L。在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为ROR γ t,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂)特异性结合ROR γ t。在一些实施方案中,细胞例如T细胞上的分子可为ROR α ,且受体结合剂例如刺激剂(例如其可为额外受体结合剂,例如额外刺激剂)特异性结合ROR α 。

[0354] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂能够结合至CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30L及LIGHT中的任何一个或多个,且受体结合剂例如刺激剂可为抗体、二价抗体(例如(Fab)₂'片段或二价单链Fv片段)、单价抗体(例如Fab片段、Fv片段、或单链Fv片段(scFv))或CD28、CD5、CD4、CD8、MHC I、MHC II、CTLA-4、ICOS、PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BBL、CD30L及LIGHT中的任何一个或多个的配体,其中这类剂能够在将受体结合剂例如刺激剂结合至分子后诱导或建模细胞中的信号。

[0355] 在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂能够特异性结合至除CD28、CD3、CD137或CD40以外的靶细胞表面上的分子。在一些情况下,受体结合剂例如刺激剂结合至除CD28、CD3、CD137或CD40以外的靶细胞表面上的分子诱导或调节靶细胞中的信号和/或改变靶细胞的功能,由此产生经培养靶细胞。

[0356] 在以上实例中的任一者中,二价抗体片段可为(Fab)₂'片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由Fab片段、Fv片段及单链Fv片段(scFv)组成的组。在以上实例中的任一者中,具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin、纳米抗体、DARPin及avimer。

[0357] b. 选择剂

[0358] 在一些实施方案中,剂为选择剂。在一些实施方案中,选择剂结合至细胞表面上的分子,诸如细胞表面分子。在一些情况下,细胞表面分子为选择标记物。在一些这类情况下,选择剂能够特异性结合至由细胞中的一个或多个表达的选择标记物。在一些实施方案中,可逆地结合至试剂的一种或多种选择剂可用于促进细胞的选择或分离。

[0359] 在本文提供的实施方案中的任一者中,受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂,可为特异性结合受体例如表达于细胞表面上的受体的结合剂。在一些情况下,特异性结合受体的受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂,可选自由以下各者组成的组:抗受体抗体、抗受体抗体的二价抗体片段、抗受体抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质受体结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由以下各者组成的组:Fab片段、Fv片段、及单链Fv片段(scFv)。在一些情况下,具有抗体样结合特性的蛋白质受体结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin、纳米抗体、DARPin或avimer。在一些情况下,特异性结合受体的受体结合剂,例如第一、第二和/或额外受体结合剂,例如刺激剂,为抗体或其抗原结合片段,例如Fab片段。

[0360] 在一些方面中,细胞表面分子,例如选择标记物,可为界定所需细胞群体或亚群的

抗原,所述所需细胞群体或亚群为例如血细胞群体或亚群,例如淋巴细胞(例如T细胞、T辅助细胞(例如CD4+T辅助细胞)、B细胞或自然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,例如CD34阳性周围干细胞或Nanog或Oct-4表达干细胞。在一些实施方案中,选择标记物可为表达于T细胞或T细胞亚群的表面上的标记物,诸如CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。T细胞的实例包括诸如CMV特异性CD8+T淋巴细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞及调节T细胞(Treg)的细胞。Treg的说明性实例包括CD4 CD25 CD45RA Treg细胞,且记忆T细胞的说明性实例包括CD62L CD8+特异性中枢记忆T细胞。细胞表面分子,例如选择标记物,还可为肿瘤细胞标记物。

[0361] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD4,且选择剂特异性结合CD4。在一些方面中,特异性结合CD4的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD4抗体、抗CD4抗体的二价抗体片段、抗CD4抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD4结合分子(例如anticalin或纳米抗体)。在一些实施方案中,抗CD4抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD4 Fab片段),可衍生自抗体13B8.2或保持针对CD4的特异性结合的13B8.2的功能活性突变体。举例而言,例示性的抗体13B8.2的突变体或m13B8.2描述于美国专利号7,482,000、美国专利申请号US2014/0295458或国际专利申请号W02013/124474;以及Bes,C等人J Biol Chem 278,14265-14273(2003)中。称为“m13B8.2”的突变体Fab片段携有CD4结合鼠类抗体13B8.2的可变域及含有就重链而言 γ 型恒定人类CH1域及 κ 型恒定人类轻链域的恒定域,如美国专利7,482,000中所述。在一些实施方案中,抗CD4抗体,例如抗体13B8.2的突变体,含有可变轻链中的氨基酸置换H91A、可变轻链中的氨基酸置换Y92A、可变重链中的氨基酸置换H35A和/或可变重链中的氨基酸置换R53A,其各自通过Kabat编号。在一些方面中,相较于m13B8.2中的13B8.2 Fab片段的可变域,轻链的位置91(SEQ ID NO:30中的位置93)处的His残基突变为Ala,且重链的位置53(SEQ ID NO:29中的位置55)的Arg残基突变为Ala。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD4或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-206或6-8000-205或6-8002-100;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0362] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD8,且选择剂特异性结合CD8。在一些方面中,特异性结合CD8的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD8抗体、抗CD8抗体的二价抗体片段、抗CD8抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD8结合分子。在一些实施方案中,抗CD8抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD8 Fab片段),可衍生自抗体OKT8(例如ATCC CRL-8014)或保留针对CD8的特异性结合的其功能活性突变体。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD8或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8003或6-8000-201;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0363] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD3,且选择剂特异性结合CD3。在一些方面中,特异性结合CD3的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD3抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD3结合分子。在一些实施方案中,抗CD3抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD3 Fab片段),可衍生自抗体OKT3(例如ATCC CRL-8001;参见例如Stemberger等人PLoS One.2012;7(4):e35798)或保留针对CD3的特异性结合的其功能活性突变体。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD3或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-201、6-8001-100;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0364] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD25,且选择剂特异性结合CD25。在一些方面中,特异性结合CD25的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD25抗体、抗CD25抗体的二价抗体片段、抗CD25抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD25结合分子。在一些实施方案中,抗CD25抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD25 Fab片段)可衍生自抗体FRT5(参见例如Stemberger等人2012)或保留针对CD25的特异性结合的其功能活性突变体。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD4或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-205或6-8000-207或6-8004-050;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0365] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD62L,且选择剂特异性结合CD62L。在一些方面中,特异性结合CD62L的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD62L抗体、抗CD62L抗体的二价抗体片段、抗CD62L抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD62L结合分子。在一些实施方案中,抗CD62L抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD62L Fab片段),可衍生自抗体DREG56(例如ATCC HB300;参见例如Stemberger等人2012)或保留针对CD62L的特异性结合的其功能活性突变体。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD62L或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-204或6-8005-050;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0366] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD45RA,且选择剂特异性结合CD45RA。在一些方面中,特异性结合CD45RA的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD45RA抗体、抗CD45RA抗体的二价抗体片段、抗CD45RA抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD45RA结合分子。在一些实施方案中,抗CD45RA抗体,诸如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD45RA Fab片段),可衍生自抗体MEM56(例如Millipore 05-1413;参见例如Stemberger等人2012)或保留针对CD45RA的特异性结合的其功能活性突变体。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD45RA或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-208或6-8007-050;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0367] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD45RO,且选择剂特异性结合CD45RO。在一些方面中,特异性结合CD45RO的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD45RO抗体、抗CD45RO抗体的二价抗体片段、抗CD45RO抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD45RO结合分子。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD45RO或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-209或6-8012-020;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0368] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD154,且选择剂特异性结合CD154。在一些方面中,特异性结合CD154的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD154抗体、抗CD154抗体的二价抗体片段、抗CD154抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD154结合分子。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD154或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂(例如目录号6-8000-202或6-5510-050;IBA GmbH,Gottingen,Germany)。

[0369] 在一些实施方案中,选择标记物可为CD16,且选择剂特异性结合CD16。在一些方面中,特异性结合CD16的选择剂可选自由以下各者组成的组:抗CD16抗体、抗CD16抗体的二价抗体片段、抗CD16抗体的单价抗体片段、及具有抗体样结合特性的蛋白质CD16结合分子。在一些实施方案中,可逆地结合至抗CD16或其片段的试剂为市售的或衍生自市售试剂。在一些方面中,CD16结合分子包含分别在SEQ ID NO:52及53中所示的重链和/或轻链序列。

[0370] 在以上实例中的任一者中,二价抗体片段可为 $(\text{Fab})_2$ ’片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自由Fab片段、Fv片段及单链Fv片段(scFv)组成的组。在以上实例中的任一者中,具有抗体样结合特性的蛋白质结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、glubody、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、adnectin、纳米抗体、DARPin及avimer。

[0371] III. 培养细胞的方法

[0372] 本文提供培养细胞的方法,其包括在剂(例如第一或第二受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂)存在下孵育含有靶细胞(例如T细胞)的组合物,该剂能够结合至组合物中的靶细胞(例如T细胞)表面上的分子且可逆地结合至含有多个能够可逆地结合至该剂的结合位点的试剂。在某些实施方案中,该试剂为寡聚粒子试剂,诸如如所描述的任何试剂。在一些实施方案中,孵育是在剂结合诸如特异性结合至细胞上的分子的条件下进行。在一些情况下,对于某些受体结合剂(例如刺激剂),这类结合可在组合物中的靶细胞(例如T细胞)中诱导或调节信号,诸如如所描述的初级信号或辅助信号。在一些实施方案中,剂结合至分子导致组合物中的靶细胞的刺激、活化、扩增(增殖)和/或分化中的一种或多种。

[0373] 在一些实施方案中,提供的方法可用于选择性地诱导细胞群体,诸如B细胞、T细胞或自然杀伤细胞,的离体扩增。在一些情况下,刺激可在不存在外源生长因子(诸如淋巴因子)及辅助细胞的情况下。在一些实施方案中,诸如B细胞或T细胞的这类细胞的增殖可在不需要抗原的情况下诱导,因此提供扩增的细胞群体(诸如T细胞群体),其就抗原反应性而言为多克隆的。本文所揭示的方法可提供所选择的T细胞群体(诸如CD4+或CD8+T细胞)经延长时段的持续增殖,以产生这些细胞的数目相对于原始T细胞群体的多倍增加。一般而言,在如本文所述的淋巴细胞群体的(克隆)扩增的情况下,所有后代可与被选择用于扩增的细胞群体共有相同抗原特异性。

[0374] 在一些实施方案中,方法涉及扩增抗原特异性T细胞群体。在一些实施方案中,为了产生抗原特异性T细胞群体,使T细胞与呈适合于在T细胞中触发初级活化信号的形式抗原接触,即将抗原呈递至T细胞,使得经由TCR/CD3复合物在T细胞中触发信号。举例而言,可通过与MHC分子结合的抗原呈递细胞将抗原呈递至T细胞。抗原呈递细胞,诸如B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞或可将抗原呈递至T细胞的其他细胞,可在抗原(例如可溶抗原)存在下与T细胞一起孵育,以使得抗原呈递细胞向T细胞呈递抗原。或者,表达感兴趣的抗原的细胞可与T细胞一起孵育。举例而言,表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞可与T细胞一起孵育以诱发肿瘤特异性反应。类似地,经病原体例如病毒感染的细胞(其呈递病原体的抗原)可与T细胞一起孵育。在T细胞群体的抗原特异性活化之后,细胞可根据所提供方法扩增。举例而言,在已建立抗原特异性之后,T细胞可通过根据本文所描述的方法与抗CD3抗体(用作第一剂)及抗CD28抗体(用作第二剂)培养而扩增。在另一实施方案中,第一剂可为MHC I:肽复合物,其结合至抗原特异性T细胞群体。在这类实施方案中,可使用任何已知且可与各个MHC I分子复合的抗原特异性肽。或者,还有可能将触发细胞扩增的受体的天然配体用作第一剂。举例而言,CD19的细胞外域可用于引起经转导以表达嵌合CD19结合抗原受体(CAR)的细胞的细胞内信号传导级联的激活。以上的例示性方面显示于实施例。

[0375] 在一些实施方案中,提供培养细胞群体的体外方法,其包括使样品与结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂接触,该样品包含有包含多个细胞的组合物。在

一些实施方案中,多聚化试剂为寡聚粒子试剂。结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂在其上可逆地固定有(结合于其中)剂(第一或第二受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂),该剂可用于细胞的选择、刺激、扩增和/或分化。在一些实施方案中,第一剂向细胞提供初级活化信号,其中结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂包含至少一个结合位点Z1用于可逆地结合该第一剂。第一剂包含至少一种结合伴侣C1,其中结合伴侣C1能够可逆地结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z1,其中第一剂经由形成于结合伴侣C1与结合位点Z1之间的可逆结合而结合至多聚化试剂。第一剂结合至细胞表面上的受体分子,由此向细胞提供初级活化信号且由此活化细胞。

[0376] 在一些实施方案中,结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂固定于支持物诸如固体表面上。在一些实施方案中,结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂不结合至支持物,诸如不结合至固体表面或固定相。

[0377] 举例而言,在一些实施方案中,提供扩增细胞群体的体外方法,其包括使包含细胞群体的样品与结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂接触,其中结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂不固定于固体支持物上,即呈可溶形式,且具有与其结合的剂(第一或第二受体结合剂,例如刺激剂,或选择剂),该剂可用于细胞的选择、刺激、扩增和/或分化。在一些实施方案中,向细胞提供初级活化信号的第一剂可逆地结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂包含至少一个结合位点例如Z1用于结合第一剂,其中第一剂包含至少一种结合伴侣,例如C1,其中结合伴侣C1能够结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z1。在一些实施方案中,第一剂经由形成于结合伴侣C1与结合位点Z1之间的结合而结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,且第一剂结合至细胞表面上的受体分子,由此向细胞提供初级活化信号且由此活化细胞。在一些实施方案中,当使用可溶多聚化剂时,结合部分C例如C1与结合位点Z例如Z1之间的结合不需要可逆。

[0378] 举例而言,在一些实施方案中,提供的方法还包括使用结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,其具有与其结合的第二剂,该第二剂诸如刺激细胞表面上的辅助分子的辅助或共刺激分子。在一些情况下,多聚化剂固定于支持物,例如固体支持物、固相或固定相上。在一些实施方案中,多聚化剂不固定于支持物上,即呈可溶形式。在一些实施方案中,第二剂包含结合伴侣例如C2,其中该结合伴侣例如C2能够可逆地结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点例如Z2,其中第二剂经由形成于结合伴侣C2与结合位点Z2之间的可逆结合而结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,形成于结合伴侣C1与结合位点Z1之间的结合可为可逆的,且形成于结合伴侣C2与结合位点Z2之间的结合可为可逆的。在该情况下,该结合位点Z1与该结合伴侣C1之间的可逆结合和/或该结合位点Z2与该结合伴侣C2之间的可逆结合的解离常数(K_d)可在 10^{-2}M 至 10^{-13}M 的范围内。在一些方面中,诸如当结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂不结合至支持物(例如不结合至固体支持物或固定相)时,形成于结合伴侣C1与结合位点Z1之间的结合可为不可逆的,和/或形成于结合伴侣C2与结合位点Z2之间的结合也可为不可逆的。

[0379] 在一些情况下,第二剂结合至细胞表面上的辅助分子,由此刺激活化的细胞。在此实施方案中,第一剂可刺激T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号,且可为特异性结合CD3的结

合剂。在此实施方案中,T细胞上的辅助分子可为CD28,且结合该辅助分子的第二剂为特异性结合CD28的结合试剂。或者,在一些实施方案中,发现还可采用靶向其他辅助分子,其可在一些情况下改变诸如改良经培养的细胞的一个或多个特点、特性或特征。在一些实施方案中,辅助分子可为以下中的一个或多个:IL-12R、IFN γ R、IL-4R、IL-17R、ROR γ t、ROR α 、CXCR3、CCR7、CD62L、CXCR1或CXCR4(例如分别为抗IL-12R抗体、抗IFN γ R抗体、抗IL-4R抗体、及抗IL-17R抗体、抗ROR γ t抗体、抗ROR α 抗体、抗CXCR3抗体、抗CCR7抗体、抗CD62L抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR4抗体)。例示性的剂,诸如受体结合剂(例如刺激剂),描述于下文。

[0380] 在一些实施方案中,提供的方法可在细胞群体的活力至少基本上不受损的任何温度下进行。在一些实施方案中,进行孵育或培养的条件包括至少基本上不会有害、不会不利或至少基本上不损害活力的任何条件,例如在该等条件下,以完整活力扩增的细胞群体的百分比为至少70%,包括至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%。在一些实施方案中,提供的方法是在约20°C或更高温度下进行。取决于待扩增的细胞群体,适合的温度范围可例如为约20°C至约45°C,包括约25°C至约40°C,或约32°C至37°C。在一些实施方案中,根据本发明的方法是在恒定温度值下,或在所选温度值 $\pm$ 约5°C、 $\pm$ 约4°C、 $\pm$ 约3°C、 $\pm$ 约2°C、 $\pm$ 约1°C或 $\pm$ 约0.5°C下进行。本领域技术人员能够考虑细胞性质及扩增条件而凭经验确定适合的温度。通常,人类细胞是在诸如37°C的温度下扩增。

[0381] 根据本文中的公开内容,还提供多聚化试剂,或包含能够扩增细胞群体的结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的组合物。能够扩增细胞群体的结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂为结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,其不结合至支持物(例如呈可溶形式)且包含至少一个用于可逆地结合向细胞提供初级活化信号的第一剂的结合位点Z例如Z1,其中结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂具有与其可逆结合的向细胞提供初级活化信号的该第一剂;其中第一剂包含至少一种结合伴侣C,例如C1,其中结合伴侣C1能够可逆地结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的至少一个结合位点Z1,其中第一剂经由形成于结合伴侣C1与结合位点Z1之间的可逆结合而结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在此处应注意,这类多聚化试剂可在其上固定有本文所述的第一剂中的任一者。

[0382] 在一些实施方案中,本文提供的多聚化试剂可进一步包含至少一个用于可逆地结合刺激细胞表面上的辅助分子的第二剂的结合位点,例如Z2,其中结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂具有与其可逆地结合的刺激细胞表面上的辅助分子的第二剂,其中第二剂包含结合伴侣,例如C2,其中结合伴侣C2能够结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的至少一个结合位点Z2。在此实施方案中,第二剂经由形成于结合伴侣C2与结合位点Z2之间的结合而结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,第二剂为可结合至IL-12R、IFN γ R、IL-4R、IL-17R、ROR γ t、ROR α 、CXCR3、CCR7、CD62L、CXCR1或CXCR4的任何剂,(例如分别为抗IL-12R抗体、抗IFN γ R抗体、抗IL-4R抗体、及抗IL-17R抗体、抗ROR γ t抗体、抗ROR α 抗体、抗CXCR3抗体、抗CCR7抗体、抗CD62L抗体、抗CXCR1抗体或抗CXCR4抗体)。

[0383] 在一些实施方案中,通过多聚化试剂(例如抗CD3/抗CD28突变蛋白链霉亲和素或

其寡聚物)培养含有靶细胞(例如T细胞)的组合物可在生物反应器,诸如中空纤维生物反应器(例如Quantum®细胞扩增系统的中空纤维生物反应器)或塑胶袋生物反应器(例如用于获自GE Healthcare的Xuri细胞扩增系统W25的Cellbag®)中进行。

[0384] 在一些实施方案中,方法进一步包括使反应混合物(例如含有经由例如第一剂和第二剂结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的靶细胞例如T细胞)中的培养的靶细胞(例如T细胞)与以下各者接触:(i)竞争试剂(例如游离第一结合伴侣C,例如C1)或其类似物,其能够破坏第一结合伴侣例如C1与结合位点例如Z1之间的结合,和/或(诸如必要时)(ii)第二竞争试剂,例如游离第二结合伴侣例如C2,或其类似物,其能够破坏第二结合伴侣C2与结合位点Z2之间的结合。由此破坏第一剂的该结合伴侣C1与该结合位点Z1之间的可逆结合以及第二剂的该结合伴侣C2与该多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的该结合位点Z2之间的可逆结合,由此在洗脱液中释放经由第一剂及第二剂结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的T细胞并且破坏T细胞的刺激和/或扩增。

[0385] 在一些实施方案中,竞争试剂(例如第一和/或第二竞争试剂)在孵育起始之后14天、10天、7天或5天内,诸如在孵育起始之后10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天或1天内被添加。在特定实施方案中,竞争试剂在孵育起始之后5天内,诸如在孵育起始之后4天、3天、2天或1天内被添加。在某些实施方案中,竞争试剂在孵育起始之后1天内,诸如在孵育起始之后18小时、16小时、12小时、8小时、6小时、4小时、3小时、2小时、90分钟、60分钟或30分钟内被添加。因此,通过控制破坏刺激的时间,自多聚化试剂洗脱的培养的T细胞的一个或多个特定特征可如本文所述地改变。举例而言,在一些实施方案中,在孵育起始之后5天、4天、3天、2天或1天内添加竞争试剂将增加一个或多个经培养的细胞的刺激、活化、富集、扩增、选择和/或增殖。

[0386] 在一些实施方案中,方法进一步包括在组分的可逆解离之后分离或移除残余的组分中的一个或多个。在一些实施方案中,可分离或移除经培养的靶细胞(例如T细胞)中的任何非结合或残余生物素。在一些实施方案中,多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂自经培养的靶细胞组合物中的细胞移除或分离。举例而言,在一些实施方案中,分离/移除可使用第二固定相进行。出于此目的,包含靶细胞(例如T细胞)及可溶多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的混合物在涂覆至上文所述的第一固定相上之前或之后暴露于适合的第二固定相上的层析。此第二固定相可为凝胶过滤基质和/或亲和性层析基质,其中凝胶过滤和/或亲和性层析基质包含亲和性试剂。层析树脂上包含的亲和性试剂包括(特异性)结合至结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z1和/或结合位点Z2(若存在),由此将结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂固定于固定相上。若使用基于链霉亲和素的结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂且第一及第二剂均具有链霉亲和素结合肽作为结合伴侣C1或C2,则包含于此第二固定相的亲和性试剂中的结合伴侣D可为生物素。用作多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的可溶寡聚物接着结合至生物素,该生物素通常共价偶合至层析基质,诸如市售的生物素-琼脂糖™。在一些这类实施方案中,可以从多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂中回收培养的细胞(例如培养的T细胞)。

[0387] A.细胞

[0388] 包含于含有靶细胞的组合物中的细胞一般为真核细胞,诸如哺乳动物细胞,且通常为人类细胞。在一些实施方案中,细胞来源于血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,或为免疫系统的细胞,诸如先天性或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,通常为T细胞和/或NK细胞。其他例示性细胞包括干细胞,诸如多潜能(multipotent)及多能(pluripotent)干细胞,包括经诱导的多能干细胞(iPSC)。细胞通常为原代细胞,诸如直接自个体分离和/或自个体分离并冷冻的那些。

[0389] 在一些实施方案中,本文提供的可逆结合剂,诸如多聚化试剂,能够扩增淋巴细胞群体或淋巴细胞群体中包含的亚群。待扩增的淋巴细胞群体可为任何适合的群体,例如B细胞群体、T细胞群体或自然杀伤细胞群体。T细胞群体可为抗原特异性T细胞群体、T辅助细胞群体、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞、或自然杀伤T细胞群体。因此,在多聚化试剂的这类实施方案中,第一剂能够刺激T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号。存在于多聚化试剂中的第一剂可因此为特异性结合CD3的结合试剂,而结合辅助分子的第二剂例如可为特异性结合CD28、CD137、IL-12R、IFN γ R、IL-4R、IL-17R、ROR γ t、ROR α 、CXCR3、CCR7、CD62L、CXCR1或CXCR4的结合剂。

[0390] 在一些实施方案中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一种或多种亚组,诸如完整T细胞群体、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,诸如根据功能、活化状态、成熟度、分化潜能、扩增、再循环、位置和/或持久能力、抗原特异性、抗原受体的类型、存在于特定器官或区室中、标记物或细胞因子分泌概况和/或分化程度定义的那些。提及待治疗的个体时,细胞可为同种异体细胞和/或自体细胞。在该等方法当中包括现成方法。在一些方面中,诸如在现成技术中,细胞为多能和/或多潜能细胞,诸如干细胞,诸如经诱导的多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,方法包括如本文所述的自个体分离出细胞、对其进行制备、处理、培养和/或工程改造,及低温保存之前或之后将其再引入同一患者中。

[0391] 在这些中,T细胞和/或CD4⁺T细胞和/或CD8⁺T细胞的亚型及亚群为未处理T(T_N)细胞、效应子T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型,诸如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM})、效应子记忆T(T_{EM})或末期分化效应子记忆T细胞、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、黏膜相关不变T(MAIT)细胞、天然存在及适应性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,诸如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡性辅助T细胞; α/β T细胞及 δ/γ T细胞。

[0392] 在一些实施方案中,细胞为自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方案中,细胞为单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。

[0393] 1. 制备细胞

[0394] 在一些实施方案中,细胞制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。细胞可自样品,诸如生物样品,例如获自或衍生自个体的样品,分离。在一些实施方案中,细胞自其分离的个体为患有疾病或病况或需要细胞疗法或将向其施用细胞疗法的个体。在一些实施方案中,个体为需要特定治疗性干预(诸如对细胞进行分离、处理和/或工程改造的过继性细胞疗法)的人类。

[0395] 因此,在一些实施方案中,细胞为原代细胞,例如原代人类细胞。样品包括直接获自个体的组织、流体及其他样品,以及产生于一个或多个处理步骤,诸如分离、离心、基因工

程改造(例如通过病毒载体转导)、洗涤和/或孵育的样品。生物样品可为直接获自生物学来源的样品或经处理的样品。生物样品包括(但不限于)体液,诸如血液、血浆、血清、脑脊髓液、滑液、尿液及汗液、组织及器官样品,包括来源于其的经处理的样品。

[0396] 在一些方面中,细胞由其衍生或分离的样品为血液或血液源性样品,或为或来源于单采血液成分法或白细胞除去法的产物。例示性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠道相关淋巴组织、黏膜相关淋巴组织、脾脏、其他淋巴组织、肝脏、肺、胃、肠、结肠、肾脏、胰脏、乳房、骨骼、前列腺、子宫颈、睪丸、卵巢、扁桃体或其他器官,和/或来源于其的细胞。在细胞疗法(例如过继性细胞疗法)的情形中,样品包括自体及同种异体来源的样品。

[0397] 在一些实施方案中,细胞来源于细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,细胞自异种来源获得,例如自小鼠、大鼠、非人类灵长类动物或猪获得。

[0398] 在一些实施方案中,细胞的分离包括一个或多个制备步骤和/或不基于亲和力的细胞分离步骤。在一些实例中,对细胞进行洗涤、离心且/或在一种或多种剂存在下孵育,以例如移除不合需要的组分、富集所需组分、裂解或移除对特定试剂敏感的细胞。在一些实例中,基于一种或多种特性(诸如密度、黏附特性、大小、敏感性和/或对特定组分的耐受性)分离细胞。

[0399] 在一些实例中,获得来自个体的循环血液的细胞,例如通过单采血液成分法或白细胞除去法获得。在一些方面中,样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红血球和/或血小板,且在一些方面中含有除红血球及血小板之外的细胞。

[0400] 在一些实施方案中,自个体收集的血细胞经洗涤,例如以移除血浆级分及将细胞置于适当缓冲液或培养基中用于后续处理步骤。在一些实施方案中,细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或多种或全部二价阳离子。在一些方面中,利用半自动化“流过”式离心机(例如Cobe 2991细胞处理器, Baxter),根据制造商说明书完成洗涤步骤。在一些方面中,根据制造商说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,将细胞在洗涤之后重新悬浮于多种生物相容性缓冲液(诸如无 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的PBS)中。在某些实施方案中,移除血细胞样品中的组分且将细胞直接重新悬浮于培养基中。

[0401] 在一些实施方案中,方法包括基于密度的细胞分离方法,诸如通过裂解红血球及经由Percoll或Ficoll梯度离心而自外周血制备白细胞。

[0402] 在一些实施方案中,分离方法包括基于一种或多种特定分子,诸如表面标记物,例如表面蛋白质、细胞内标记物或核酸于细胞中的表达或存在而分离不同细胞类型。在一些实施方案中,可使用用于基于这类标记物分离的任何已知方法。分离方法可包括本文公开的那些方法中的任一者,包括使用可逆试剂系统,例如如本文所述的剂(诸如受体结合剂或选择剂)及试剂的方法。

[0403] 在一些实施方案中,分离为基于亲和力或免疫亲和力的分离。举例而言,在一些方面中,分离包括基于细胞的一种或多种标记物(典型地为细胞表面标记物)的表达或表达水平而分离细胞及细胞群体,例如通过与特异性结合至这类标记物的抗体或结合伴侣一起孵育,随后通常通过洗涤步骤且将已结合抗体或结合伴侣的细胞与尚未结合至该抗体或结合

伴侣的那些细胞分离。

[0404] 这类分离步骤可基于阳性选择,其中保留已结合试剂的细胞供进一步使用;和/或阴性选择,其中保留尚未结合至抗体或结合伴侣的细胞。在一些实例中,两个级分皆保留以供进一步使用。在一些方面中,当特异性鉴别非均质群体中的细胞类型的抗体无法获得时,阴性选择可为特别有用的,使得基于除所需要的群体之外的细胞所表达的标记物进行分离最佳。

[0405] 分离无需导致表达特定标记物的特定细胞群体或细胞的100%富集或移除。举例而言,特定类型的细胞(诸如表达标记物的那些细胞)的阳性选择或富集是指增加这类细胞的数目或百分比,但无需导致不表达该标记物的细胞完全不存在。同样,特定类型的细胞(诸如表达标记物的细胞)的阴性选择、移除或消耗是指这类细胞的数目或百分比的降低,但无需导致所有这类细胞完全移除。

[0406] 在一些实例中,进行多轮分离步骤,其中对来自一个步骤的经阳性或阴性选择的部分进行另一个分离步骤,诸如后续阳性或阴性选择。在一些实例中,单一分离步骤能同时消耗表达多种标记物的细胞,诸如通过将细胞与各自对阴性选择所靶向的标记物具特异性的多种抗体或结合伴侣一起孵育。同样,可通过使细胞与各种细胞类型上所表达的多种抗体或结合伴侣一起孵育而同时对多种细胞类型进行阳性选择。

[0407] 举例而言,在一些方面中,通过阳性或阴性选择技术分离T细胞的特定亚群,诸如阳性或表达高水平的一种或多种表面标记物的细胞,例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。

[0408] 举例而言,CD3⁺、CD28⁺T细胞可使用CD3/CD28缀合的磁性珠粒(例如DYNABEADS®M-450CD3/CD28T细胞扩增器)进行阳性选择。

[0409] 在一些实施方案中,分离如下进行:通过阳性选择富集特定细胞群体,或通过阴性选择消耗特定细胞群体。在一些实施方案中,阳性或阴性选择如下完成:将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育,该一种或多种抗体或其他结合剂分别特异性结合至一种或多种表达(标记物⁺)于或以相对较高水平(标记物^高)表达于阳性或阴性选择的细胞上的表面标记物。

[0410] 在一些实施方案中,T细胞通过阴性选择非T细胞(诸如B细胞、单核细胞或其他白细胞)上所表达的标记物(诸如CD14)而从PBMC样品中分离。在一些方面中,使用CD4⁺或CD8⁺选择步骤来分离CD4⁺辅助细胞与CD8⁺细胞毒性T细胞。这类CD4⁺及CD8⁺群体可通过对在一种或多种初始、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或相对较高程度表达的标记物的阳性或阴性选择而进一步分类成亚群。

[0411] 在一些实施方案中诸如通过基于与各个亚群相关联的表面抗原的阳性或阴性选择而对CD8⁺细胞进行进一步富集或消耗初始、中枢记忆、效应记忆和/或中枢记忆干细胞。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以提高功效,诸如在施用之后改良长期存活率、扩增和/或移植,在一些方面中,功效在这类亚群中特别强健。参见Terakura等人(2012)Blood.1:72-82;Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,将T_{CM}富集的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞组合进一步增强功效。

[0412] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺与CD62L⁻亚组两者中。可诸如使用抗CD8及抗CD62L抗体对PBMC进行富集或消耗CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级

分。

[0413] 在一些实施方案中,中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD 127的阳性或高表面表达;在一些方面中,其是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞进行的阴性选择。在一些方面中,通过消耗表达CD4、CD14、CD45RA的细胞及对表达CD62L的细胞进行阳性选择或富集来进行 T_{CM} 细胞富集的CD8⁺群体的分离。在一个方面中,如下进行中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集:以基于CD4表达所选择的阴性细胞级分起始,基于CD14及CD45RA的表达进行阴性选择,且基于CD62L进行阳性选择。这类选择在一些方面中同时进行,且在其他方面中以任一顺序依次进行。在一些方面中,制备CD8⁺细胞群体或亚群所用的相同的基于CD4表达的选择步骤还用于产生CD4⁺细胞群体或亚群,从而保留基于CD4的分离所得的阳性与阴性级分,且用于方法之后续步骤,可选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。

[0414] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群体,将CD4⁺T辅助细胞分类为初始、中枢记忆及效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,初始CD4⁺T淋巴细胞为CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞为CD62L⁺及CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应CD4⁺细胞为CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0415] 在一个实例中,为了通过阴性选择来富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物典型地包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及CD8的抗体。在一些实施方案中,抗体或结合伴侣结合至固体支持物或基质,诸如磁性珠粒或顺磁珠粒,以便根据阳性和/或阴性选择来分离细胞。举例而言,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分离技术分离(separate)或分离(isolate)细胞及细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页,编辑为S.A.Brooks及U. Schumacher ©Humana Press Inc.,Totowa,NJ)。

[0416] 在一些方面中,待分离的细胞的样品或组合物是与可磁化或磁性反应的小物质(诸如磁性反应粒子或微粒,诸如顺磁珠粒(例如DynaBeads或MACS珠粒))一起孵育。磁性反应物质,例如粒子,一般直接或间接地连接至特异性结合至分子例如表面标记物的结合伴侣例如抗体,该分子存在于需要分离(例如需要阴性或阳性选择)的一个或多个细胞或细胞群体上。

[0417] 在一些实施方案中,磁性粒子或珠粒含有结合至特异性结合成员(诸如抗体或其他结合伴侣)的磁性反应物质。存在磁性分离方法中所用的许多熟知磁性反应材料。适合的磁性粒子包括Molday的美国专利号4,452,773及欧洲专利说明书EP 452342B中所述的那些,这些专利以引用的方式并入本文中。胶态尺寸化粒子(诸如Owen的美国专利号4,795,698及Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)为其他实例。

[0418] 孵育一般在一定条件下进行,由此附接至磁性粒子或珠粒的抗体或结合伴侣或特异性结合至这类抗体或结合伴侣的分子(诸如二级抗体或其他试剂)特异性结合至样品内的细胞上的细胞表面分子(若存在)。

[0419] 在一些方面中,将样品置放于磁场中,且连接至磁性反应或可磁化粒子的那些细胞将被吸引至磁体且与未标记的细胞分离。对于阳性选择,被吸引至磁体的细胞得以保留;对于阴性选择,未被吸引的细胞(未标记的细胞)得以保留。在一些方面中,在相同选择步骤期间进行阳性选择与阴性选择的组合,其中保留阳性及阴性级分且进一步处理或进行进一

步分离步骤。

[0420] 在某些实施方案中,磁性反应粒子被包被在初级抗体或其他结合伴侣、二级抗体、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,磁性粒子经由对一种或多种标记物具有特异性的一级抗体的包被而被连接至细胞。在某些实施方案中,细胞(而非珠粒)经初级抗体或结合伴侣标记,且接着添加细胞类型特异性二级抗体或其他结合伴侣(例如链霉亲和素)包被的磁性粒子。在某些实施方案中,经链霉亲和素包被的磁性粒子与经生物素化的初级或二级抗体结合使用。

[0421] 在一些实施方案中,磁性反应粒子保持附接至待随后孵育、培养和/或工程改造的细胞;在一些方面中,这样的粒子保持附接至向患者施用的细胞。在一些实施方案中,自细胞移除可磁化或磁性反应粒子。自细胞移除可磁化粒子的方法是已知的,且包括例如使用未经标记的竞争性抗体、可磁化粒子、或与可切割的接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,可磁化粒子可生物降解的。

[0422] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁性活化细胞分选术(MACS)(Miltenyi Biotech, Auburn, CA)。磁性活化细胞分选术(MACS)系统能够高纯度选择连接至磁化粒子的细胞。在某些实施方案中,MACS是以其中施加外部磁场之后依序洗脱非目标及目标种类的模式操作。即,附接至磁化粒子的细胞保持在适当位置,而未附接的种类被洗脱。接着,在此第一洗脱步骤完成之后,在磁场中捕获且未被洗脱的种类以某一方式被释放,使其可被洗脱及回收。在某些实施方案中,非目标细胞经标记且自非均质细胞群体中消耗。

[0423] 在某些实施方案中,使用进行该方法的分离(isolation)、细胞制备、分离(separation)、处理、孵育、培养且/或调配步骤中的一个或多个的系统、装置或设备来进行分离(isolation)或分离(separation)。在一些方面中,系统用于在封闭或无菌环境中进行这类步骤中的每一者,例如以使误差、使用者操作和/或污染最小化。在一个实例中,系统为如国际专利申请公开号W02009/072003或US 20110003380A1中所述的系统。

[0424] 在一些实施方案中,该系统或设备在整合式或自含式系统中和/或以自动化或可程序化方式进行分离、处理、工程改造及调配步骤中的一个或多个(例如全部)。在一些方面中,该系统或设备包括与该系统或设备通信的电脑和/或电脑程序,其允许使用者对处理、分离、工程改造及调配步骤进行程序化、控制、评估其结果和/或调整其各个方面。

[0425] 在一些方面中,例如为了在封闭的无菌系统中、在临床规模水平自动化分离细胞,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行该分离和/或其他步骤。组件可包括整合式微电脑、磁性分离单元、蠕动泵及各种夹阀。在一些方面中,整合式电脑控制仪器的所有组件且导引系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面中,磁性分离单元包括可移动永久磁体及用于选择柱的固持器。蠕动泵控制通过整个管组的流速,且连同夹阀一起确保控制缓冲液通过系统的流动及细胞的持续悬浮。

[0426] 在一些方面中,CliniMACS系统使用以无菌非热解溶液供应的抗体偶联可磁化粒子。在一些实施方案中,在细胞经磁性粒子标记之后,洗涤细胞以移除过量粒子。接着使细胞制剂袋连接至管组,管组又连接至含有缓冲液的袋及细胞收集袋。管组由预组装的无菌管组成,包括前管柱及分离管柱,且仅用于单次使用。起始分离程序之后,系统自动地将细胞样品施加至分离管柱上。经标记的细胞保留于管柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤

步骤移除。在一些实施方案中,适用于本文所述方法的细胞群体未标记且未保留于管柱中。在一些实施方案中,适用于本文所述方法的细胞群体经标记且保留于管柱中。在一些实施方案中,移除磁场之后,自管柱洗脱适用于本文所述方法的细胞群体,且收集于细胞收集袋内。

[0427] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)执行分离和/或其他步骤。在一些方面中,CliniMACS Prodigy系统装备有允许自动化洗涤及通过离心对细胞进行分级分离的细胞处理单元。CliniMACS Prodigy系统还可包括机载照相机及影像识别软体,该软体通过辨别源细胞产物的宏观层来确定最佳的细胞分级分离终点。举例而言,外周血可自动分离成红细胞、白细胞及血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可包括整合式细胞培养室,从而完成细胞培养方案,诸如细胞分化及扩增、抗原负载及长期细胞培养。输入端口可允许对培养基进行无菌移除及补充,且可使用整合式显微镜监测细胞。参见例如Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35(9):651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 117:72-82, 及Wang等人(2012) *J Immunother.* 35(9):689-701。

[0428] 在一些实施方案中,本文所描述的细胞群体经由流式细胞术收集及富集(或耗乏),其中经多种细胞表面标记物染色的细胞载于流体流中。在一些实施方案中,本文所描述的细胞群体经由制备级(FACS)分选术收集及富集(或耗乏)。在某些实施方案中,本文所描述的细胞群体通过使用微机电系统(MEMS)芯片与基于FACS的检测系统的组合来收集及富集(或耗乏)(参见例如WO 2010/033140; Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 及Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376。在两种情况下,细胞均可经多种标记物标记,从而允许以高纯度对明确限定的T细胞亚群进行分离。

[0429] 在一些实施方案中,抗体或结合伴侣经一种或多种可检测标记物标记,以促进根据正向和/或负向选择进行的分离。举例而言,分离可基于与经荧光标记的抗体的结合。在一些实例中,基于对一种或多种细胞表面标记物具有特异性的抗体或其他结合伴侣的细胞分离是在射流流体中进行,诸如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备级(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。这类方法允许基于多种标记物同时进行阳性及阴性选择。

[0430] 在一些实施方案中,制备方法包括在分离、孵育和/或工程改造之前或之后,冷冻(例如低温保藏)细胞的步骤。在一些实施方案中,冷冻及后续解冻步骤移除细胞群体中的粒细胞及在一定程度上移除单核细胞。在一些实施方案中,将细胞悬浮于冷冻溶液中,例如在洗涤步骤之后将细胞悬浮于冷冻溶液中,以移除血浆及血小板。在一些方面中,可使用多种已知冷冻溶液及参数中的任一者。一个实例涉及使用含有20% DMSO及8% 人类血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他适合的细胞冷冻培养基。接着用培养基1:1稀释,使得DMSO及HSA的最终浓度分别为10%及4%。细胞随后以每分钟1°的速率冷冻至-80°C且储存于液氮储罐的蒸汽相中。

[0431] 在一些实施方案中,在基因工程改造之前或与基因工程改造结合进行孵育和/或培养细胞。孵育(incubation)步骤可包括培养、培育(cultivation)、刺激、活化和/或增殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂存在下孵育组合物或细胞。这类条件包括经设计以诱导群体中的细胞增殖、扩增、活化和/或存活、模拟抗原暴露和/或准备好用于基因工程改造(诸如用于引入重组抗原受体)的细胞的那些条件。

[0432] 该条件可包括以下中的一个或多个:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂,例如营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子,诸如细胞因子、趋化因子、抗原、结合伴侣、融合蛋白、重组可溶受体及任何其他经设计以活化细胞的剂。

[0433] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激剂包括一种或多种剂,例如配体,其能够活化TCR复合物的细胞内信号传导域。在一些方面中,该剂开启或起始T细胞中的TCR/CD3细胞内信号传导级联。这类剂可包括抗体,诸如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些,例如抗CD3、抗CD28,例如结合至诸如珠粒的固体支持物,和/或一种或多种细胞因子。可选地,扩增方法可进一步包含将抗CD3和/或抗CD28抗体添加至培养基(例如以至少约0.5ng/ml的浓度)的步骤。在一些实施方案中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如至少约10个单位/毫升浓度的IL-2。

[0434] 在一些方面中,根据以下技术进行孵育,诸如Riddell等人的美国专利第6,040,177号、Klebanoff等人(2012) J Immunother. 35 (9):651-660、Terakura等人(2012) Blood. 117:72-82和/或Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9):689-701中所描述的那些技术。

[0435] 在一些实施方案中,T细胞是通过向组合物添加饲养层细胞,诸如非分裂外周血单核细胞(PBMC)(例如使得所得细胞群体含有就待扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞而言至少约5、10、20、或40个或更多个PBMC饲养层细胞);及孵育培养物(例如持续足以扩大T细胞数目的时间)而扩增。在一些方面中,非分裂饲养层细胞可包含 γ 辐射后的PBMC饲养层细胞。在一些实施方案中,PBMC经约3000rads至3600拉德范围内的 γ 射线辐射以防止细胞分裂。在一些方面中,添加T细胞群体之前,向培养基中添加饲养层细胞。

[0436] 在一些实施方案中,刺激条件包括适用于人类T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25°C,通常至少约30°C,且通常为37°C或约37°C。可选地,孵育可进一步包含添加非分裂EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养层细胞。LCL可经约6000至10,000拉德范围内的 γ 射线辐射。在一些方面中,LCL饲养层细胞以任何适合量提供,诸如LCL饲养层细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1。

[0437] 在实施方案中,抗原特异性T细胞(诸如抗原特异性CD4+和/或CD8+T细胞)通过用抗原刺激初始T淋巴细胞或抗原特异性T淋巴细胞来获得。举例而言,针对巨细胞病毒抗原的抗原特异性T细胞系或克隆可通过从经感染的个体分离T细胞且用相同抗原体外刺激该细胞来产生。

[0438] B. 装置及制品

[0439] 在一些实施方案中,还提供装置或制品。在一些实施方案中,提供生物反应器及用于层析的第一固定相的配置。生物反应器适合于扩增细胞,且固定相适合于细胞分离及试剂移除。第一固定相为凝胶过滤基质和/或亲和性层析基质,其中凝胶过滤和/或亲和性层析基质包含亲和性试剂,其中亲和性试剂包含特异性结合至第一剂中包含的结合伴侣C1的结合位点Z1和/或亲和性试剂包含特异性结合至第二剂中包含的结合伴侣C2的结合位点Z2。第一固定相由此适合于在其上固定第一剂和/或第二剂,第一结合伴侣C1和/或游离第二结合伴侣C2。另外,生物反应器及固定相经流体地连接。此配置可用于如上所解释的连续扩增且可整合于已知的细胞扩增系统,诸如Quantum®细胞扩增系统)或Xuri细胞扩增系统W25中。

[0440] 在此配置中,第一固定相包含于层析柱中或为平面固定相。该配置可进一步包含

第二固定相,其流体地连接至第一固定相。第二固定相可为凝胶过滤基质和/或亲和性层析基质,其中凝胶过滤和/或亲和性层析基质包含亲和性试剂。此亲和性试剂可包含结合伴侣D,其(特异性)结合至多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂的结合位点Z1,由此适合于将多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂固定于固定相上。

[0441] 本发明另外涉及用于纯化(例如选择)及培养(诸如刺激或扩增)细胞组合物的装置,该装置包含至少一种生物反应器及如上文所定义的用于层析的第一固定相和/或第二固定相中的配置。

[0442] 装置可进一步包含串联流体连接的生物反应器及固定相的多个配置。

[0443] 装置可包含样品入口,该样品入口流体连接至生物反应器和用于层析的固定相的配置的生物反应器。装置还可包含用于经纯化及扩增的靶细胞的样品的出口,该样品出口流体地连接至至少一种生物反应器及用于层析的固定相的配置中的最后一者的固定相。

[0444] 在某些实施方案中,装置可设计为功能封闭系统。

[0445] C. 经培养细胞的例示性特征

[0446] 在一些实施方案中,经培养的靶细胞(例如经培养的T细胞),其可包括根据本文所提供的方法产生或生产的经培养的细胞,其基于或相关于其增殖能力、表面标记物表达、分化状态、活化状态和/或代谢状况而展现一种或多种指定的表型特征和/或功能特征。在一些实施方案中,根据所提供方法中的任一者培养靶细胞(例如培养T细胞)导致相较于根据本文提供的方法进行孵育之前的组合物中的细胞的对应或各个功能或表型,与细胞的功能(例如功能活性的增加或减少)或表型(例如一种或多种标记物的更高或更低表达)相关的参数的变化。在一些实施方案中,培养的T细胞展现就选自扩增和/或增殖能力、CD4+/CD8+T细胞分布或比率、表面标记物表达、功能活性或代谢状况的参数而言的变化。

[0447] 在一些实施方案中,将如在经培养的T细胞中测量的参数的变化与参考T细胞组合物或制备物中测量的相同或类似参数进行比较或参照参考T细胞组合物或制备物中测量的相同或类似参数。通常,参考T细胞组合物或制备物中的T细胞包括或衍生自在与可逆结合剂(例如多聚化剂,诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)一起孵育之前的相同或基本上相同的T细胞组合物,除了这类细胞不经受孵育或经受不同孵育。在一些实施方案中,参考T细胞制备物使用基本上相同的方案或条件(例如一种或多种刺激剂的类型、一种或多种刺激剂的形式、基本上相同的起始细胞数目、洗涤、存在或不存在额外试剂、孵育时序、孵育温度)经受孵育,除了参考T细胞制备物的这类孵育的至少一个方面,且在一些情况下仅一个方面,不同于产生培养的T细胞的孵育。

[0448] 在一些实施方案中,参考T细胞组合物或制备物是在与可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之前的含有T细胞的组合物。

[0449] 在一些实施方案中,通过以下方式产生经培养的T细胞:与可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)小于28天、21天、14天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、或1天和/或其中这类剂与细胞上的一种或多种分子的缔合被破坏(例如在竞争试剂,例如生物素或生物素类似物的存在下),诸如在起始与这类剂一起孵育的28天、21天、14天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、或1天内被破坏。举例而言,在一些方面中,经培养的T细胞是在与如本文所述

的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中孵育在起始这类孵育之后28天、21天、14天、10天、9天、8天、7天、6天、5天内(诸如在4、3、2或1天或更小内或在大约4、3、2或1天或更小内,)被终止和/或破坏,和/或其中将可逆结合剂自细胞解离的竞争剂(例如生物素)在起始这类孵育之后28天、21天、14天、10天、9天、8天、7天、6天、5天内(诸如在4、3、2或1天或更小内或在大约4、3、2或1天或更小内)被添加至经孵育的细胞。在一些实施方案中,参考T细胞制备物是通过以下方式产生或生产的:在与相同或基本上相同的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后,但其中进行孵育超过5天并且不终止和/或破坏以减少或终止细胞中诱导或调节的信号,和/或其中T细胞制备物是在不添加将该试剂自细胞解离的竞争剂(例如生物素或生物素类似物)的情况下生产的。

[0450] 在一些实施方案中,经培养的T细胞是通过与可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)而产生的,其中受体结合剂(例如刺激剂)为不结合至CD28和/或诱导信号传导的剂,即不是抗CD28抗体或其片段。举例而言,在一些实施方案中,经培养的T细胞是在与可逆结合试剂一起孵育之后产生或生产的,其中一种或多种刺激剂可逆地结合至突变蛋白链霉亲和素,其中至少一种刺激剂对CD3(例如抗CD3抗体或其片段)具有特异性,且第二刺激剂可对CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM中的一个或多个具有特异性(例如分别为抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、及抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体、或抗HVEM抗体,或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,参考T细胞制备物为在与可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的T细胞培养物,但其中试剂包含特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号传导的剂。举例而言,在一些实施方案中,参考T细胞制备物是在T细胞组合物与抗CD3/抗CD28 **Dynabeads®**、抗CD3/抗CD28 **ExPact®** 珠粒或其他抗CD3/抗CD28刺激剂孵育之后产生或生产的。在一些实施方案中,这类其他抗CD3/抗CD28刺激剂为其中抗体试剂结合至支持物(例如固体支持物)(例如珠粒、粒子、磁性粒子或珠粒、纳米粒子或微球)的试剂。在一些实施方案中,经培养的T细胞是通过与可溶即不结合至支持物(例如固体支持物)的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)而制备的。

[0451] 举例而言,在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中经培养的T细胞的特征在于相较于参考T细胞组合物或制备物增强的扩增和/或增殖能力。在一些实施方案中,增强的扩增和/或增殖能力包含分别相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD3+T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的数目或百分比,经培养的T细胞中的CD3+T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的数目或百分比增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0452] 在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育

(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中经培养的T细胞的特征在于CD3+T细胞相较于参考T细胞培养物增强的扩增和/或增殖能力。在一些实施方案中,增强的扩增和/或增殖能力包含相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD3+T细胞的数目或百分比,培养的T细胞中的CD3+T细胞的数目或百分比增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0453] 在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中经培养的T细胞的特征在于CD4+T细胞相较于参考T细胞组合物或制备物增强的扩增和/或增殖能力。在一些实施方案中,增强的扩增和/或增殖能力包含相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD4+T细胞的数目或百分比,经培养的T细胞中的CD4+T细胞的数目或百分比增加了至少约2倍(诸如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0454] 在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中经培养的T细胞的特征在于CD8+T细胞相较于参考T细胞组合物或制备物增强的扩增和/或增殖能力。在一些实施方案中,增强的扩增和/或增殖能力包含相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD8+T细胞的数目或百分比,培养的T细胞中的CD8+T细胞的数目或百分比增加了至少约2倍(诸如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0455] 在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,其中经培养的T细胞的特征在于相较于参考T细胞组合物或制备物改变的CD8+/CD4+T细胞分布或标准化T细胞分布,诸如改变的CD8+/CD4+比率或标准化CD8+/CD4+T细胞比率。CD8+/CD4+比率或标准化比率可增加或减少。在一些实施方案中,改变的CD8+/CD4+T细胞比率由相对于或相较于参考组合物或制备物中的数目或百分比或标准化数目或百分比,经培养的T细胞中的CD8+T细胞的数目或百分比或标准化数目或百分比的增加而产生。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD8+T细胞的数目或百分比或CD8+T细胞的标准化数目或百分比,培养的T细胞中的CD8+T细胞的数目增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或制备物中的CD8+/CD4+T细胞的比率或CD8+/CD4+的标准化比率,CD8+/CD4+T细胞的比率或CD8+/CD4+的标准化比率增加了至少约2倍(诸如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。在一些实施方案中,经培养的T细胞或组合物或制备物中的数目、百分比或比率标准化至孵育之前的含有T细胞的起始组合物中的数目、百分比或比率。

[0456] 在一些实施方案中,提供根据本文所提供的方法中的任一者制备的经培养的T细胞,其中经培养的T细胞是在与如本文所述的可逆结合剂(例如与多聚化剂)一起孵育(诸如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉亲和素的刺激剂一起孵育)之后产生或生产的,且其中

经培养的T细胞的特征在于相较于参考T细胞组合物或制备物改变的表面标记物表达谱。在一些实施方案中,改变的表面标记物表达谱归因于T细胞的一个或多个亚群的数目或百分比的变化,该T细胞的一个或多个亚群对于选自以下的一个或多个表面标记物而言为正性、负性或较低:CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69、CCR7、CD27、CD28、CD122、t-bet、IL-7R α 、CD95、IL-2R β 、CXCR3、LFA-1、KLRG1。在一些实施方案中,相较于参考组合物或制备物中的所述T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的所述T细胞亚群的数目或百分比增加至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0457] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群(例如相较于参考组合物或制备物,在经培养的T细胞中增加的T细胞亚群)展现相较于参考T细胞组合物或制备物降低或减少的分化或活化状态。在一些实施方案中,该T细胞亚群不为或不包括效应T细胞(T_E)或效应记忆T细胞(T_{EM})表型。在一些实施方案中,该T细胞亚群含有为CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD28⁺或KLRG1^{低/}中的一个或多个的表面表型。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的该T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0458] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群(例如相较于参考组合物或制备物,在经培养的T细胞中增加的T细胞亚群)针对CD62L和/或IL-7R α (CD127) 为阳性和/或针对t-bet为阴性或较低。在一些实施方案中,该T细胞亚群针对CD45RA为阳性和/或针对CD45RO为阴性或较低。在一些实施方案中,T细胞亚群针对CCR7、CD45RA、CD62L、CD27、CD28、IL-7R α (CD127)、CD95、IL-2R β 、CXCR3及LFA-1中的一个或多个为阳性,和/或针对CD45RO为阴性。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0459] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群(例如相较于参考组合物或制备物,在经培养的T细胞中增加的T细胞亚群)为或包括针对CD62L为阳性的细胞(CD62L⁺)。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0460] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群(例如相较于参考组合物或制备物,在经培养的T细胞中增加的T细胞亚群)为或包括细胞,该细胞为CD62L⁺并且a) CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一个或多个,及b) t-bet^低、IL-7R α (CD127⁺)、CD95⁺、IL-2R β 、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一个或多个。在一些实施方案中,该T细胞亚群还可为CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的该T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0461] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群,诸如CD62L⁺T细胞亚群,为或包括记忆T细胞或其特定亚群诸如长期存活的记忆T细胞,或与其共用表型特征。在一些实施方案中,这类记忆T细胞为中枢记忆T细胞(T_{cm})或T记忆干细胞(T_{scm})细胞。在一些实施方案中,记忆T细胞为T_{scm}细胞。T_{scm}细胞可描述为相较于其他记忆T细胞亚群或相较于初始T细胞具有一个或多个表型差异或功能特征,诸如分化较少或更初始的(参见例如Ahlers

及Belyakov(2010)Blood,115:1678);Cieri等人(2015)Blood,125:2865;Flynn等人(2014)Clinical&Translational Immunology,3,e20;Gattinoni等人(2012)Nat.Med.,17:1290-1297;Gattinoni等人(2012)Nat.Reviews,12:671;Li等人(2013)PLOS ONE,8:e67401;及公布的PCT申请第W02014/039044号)。在一些情况下,认为Tscm细胞为能够产生效应T细胞及记忆T细胞的全部三个亚群(Tscm、Tcm及Tem)的唯一记忆T细胞。在一些方面中,Tscm细胞具有所有记忆T细胞亚群的最高存活率及针对抗原或恒稳刺激响应的增殖,及不存在同源抗原的最小消耗。在一些实施方案中,分化较少的Tscm细胞相较于其他记忆T细胞可在过继性转移之后展现较大的扩增、长期活力及靶细胞破坏,因此可能能够相较于Tcm或Tem细胞可能的情况用较少的转移细胞介导更有效治疗。

[0462] 在一些方面中,已关于Tscm细胞报导或已知的表型或功能特征的实例包括例如这类细胞a)为CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、IL-7Rα⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺及LFA-1⁺;b)为CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺及CD95⁺;c)为CD45RA⁺、CD45RO⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺及IL-2Rβ⁺;d)为CD45RO⁻、CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺及CD95⁺;e)为CD45RA⁺、CD44^{+/+}、CD62L⁺、CD127⁺、IL-2Rβ⁺、CD28⁺、CD43⁻、KLRG1⁻、Peforin⁻及GranzymeB⁻;f)表达高水平的CCR7、CD62L、CD27及CD28、中等水平的CD95及IL-2Rβ、低水平的CD45RA,且不表达CD45RO或KLRG-1;或g)表达高水平的CD62L、低水平的CD44及t-bet,及为Sca-1⁺;和/或具有中等IL-2生产能力、低IFN γ 生产能力、低细胞毒性及高自我更新能力。

[0463] 在一些实施方案中,经培养的T细胞中的T细胞亚群(例如相较于参考组合物或制备物,在经培养的T细胞中增加的T细胞亚群)为或包括记忆T细胞,诸如长期存活的记忆T细胞。在一些实施方案中,记忆T细胞为中枢记忆(Tcm)T细胞。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺CD122⁺和/或KLRG1^低。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的T细胞亚群的数目或百分比,经培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0464] 在一些实施方案中,记忆T细胞为主干中枢记忆(stem central memory)T细胞(Tscm)。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD122⁺和/或KLRG1⁻。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA^{低/+}、CD45RO⁻、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD122⁺和/或KLRG1⁻。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、IL-7Rα⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和/或LFA-1⁺。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺和/或CD95⁺。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA⁺、CD45RO⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺和/或IL-2Rβ⁺。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RO⁻、CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺和/或CD95⁺。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征CD45RA⁺、CD44^{+/+}、CD62L⁺、CD127⁺、IL-2Rβ⁺、CD28⁺、CD43⁻、KLRG1⁻、Peforin⁻和/或GranzymeB⁻。在一些实施方案中,T细胞亚群表达高水平的CCR7、CD62L、CD27和/或CD28、中等水平的CD95和/或IL-2Rβ、低水平的CD45RA,和/或不表达CD45RO和/或KLRG-1。在一些实施方案中,T细胞亚群表达高水平的CD62L、低水平的CD44及t-bet,和/或为Sca-1⁺。在一些实施方案中,T细胞亚群具有表型特征中等IL-2生产能力、低IFN γ 生产能

力、低细胞毒性和/或高自我更新能力。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或培养物中的T细胞亚群的数目或百分比,并培养的T细胞中的这类T细胞亚群增加了至少约2倍(诸如增加了至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0465] 在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或制备物,T细胞亚群,诸如上文所述的任何T细胞亚群,以经培养的T细胞中的总T细胞的较大百分比或经培养的T细胞中的总T细胞的较大数目存在。在一些实施方案中,呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的T细胞亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更大。在一些实施方案中,相较于基于包含表型的一种或多种标记物的表面表达而直接自人类受试者分离或富集的但未经孵育或培养的T细胞组合物中的细胞亚群在T细胞中的相应的百分比,经培养的细胞中的T细胞亚群,诸如上文所述的任何T细胞亚群,的百分比更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或更多倍。在一些实施方案中,相较于参考T细胞组合物或制备物中的T细胞亚群的数目、相对数目或标准化数目,诸如上文所述的任何参考T细胞组合物或制备物,诸如根据本文所提供的方法中的任一者与可逆结合剂(例如多聚化剂)一起孵育(例如与可逆地结合至寡聚突变蛋白链霉素亲和素的刺激剂一起孵育)之前的T细胞组合物,经培养细胞中的T细胞亚群,诸如上文所述的任何T细胞亚群,的总数、相对数目或标准化数目更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或更多倍。在一些实施方案中,对应于存在于T细胞培养物中的T细胞亚群的T细胞的数目为至少或至少约 1×10^6 个细胞、 2×10^6 个细胞、 3×10^6 个细胞、 4×10^6 个细胞、 5×10^6 个细胞或更多。

[0466] 在一些实施方案中,T细胞亚群为CD62L⁺和/或IL-7R α ⁺(CD127⁺)且呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的CD62L⁺和/或IL-7R α ⁺(CD127⁺)亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,T细胞亚群为CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1^低且呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1^低亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方案中,T细胞亚群为CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1⁻且呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1⁻亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0467] 在一些实施方案中,T细胞亚群为或包括Tcm细胞。在一些实施方案中,呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的Tcm亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0468] 在一些实施方案中,T细胞亚群为或包括Tscm细胞。在一些实施方案中,呈培养物中的总T细胞或总细胞的百分比形式的经培养的T细胞中的Tscm亚群的百分比为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0469] 在一些实施方案中,T细胞亚群,诸如CD62L⁺T细胞,具有或展现a)低水平的TCR重排切除环(TREC);和/或b)表达增殖标记物(例如Ki-67);和/或c)展现在刺激剂存在下增殖的能力;和/或d)展现在刺激剂存在下产生选自IFN- γ 、TNF及IL-2的细胞因子的能力;和/或e)在不存在刺激剂的情况下难以消耗;和/或f)能够产生Tscm、Tcm、Tem及Teff细胞;和/

或g) 具有低细胞毒性;和/或h) 相较于Tcm或Tem细胞,可在较少细胞的过继性转移之后产生相同或更大反应。在一些实施方案中,刺激剂为抗原、恒稳细胞因子(例如IL-15或IL-17),或为能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号的剂。在一些实施方案中,产生细胞因子的能力包含较低的产生IFN γ 的能力和/或中等的产生IL-2的能力。

[0470] 在一些实施方案中,提供经培养的T细胞,诸如根据本文所提供的方法中的任一者制备的,其中经培养的T细胞是在如本文所述的孵育之后产生或生产的,且其中经培养的T细胞的特征在于相较于参考T细胞组合物或制备物改良的功能活性概况。在一些实施方案中,存在于培养物中的经培养的T细胞或特定T细胞亚群展现相较于参考组合物或制备物或相较于参考组合物或制备物中的该T细胞亚群改变的功能活性概况,诸如改变(例如增加或减少)至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍的功能活性。在一些实施方案中,功能活性选自以下中的一个或多个:a) 低水平的TCR重排切除环(TREC);和/或b) 表达增殖标记物(例如Ki-67);和/或c) 展现在刺激剂存在下增殖的能力;和/或d) 展现在刺激剂存在下产生选自IFN- γ 、TNF及IL-2的细胞因子的能力;和/或e) 在不存在刺激剂的情况下难以消耗;和/或f) 能够产生Tscm、Tcm、Tem及Teff细胞;和/或g) 具有低细胞毒性。在一些实施方案中,刺激剂为抗原、恒稳细胞因子(例如IL-15或IL-17),或为能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号的剂。在一些实施方案中,产生细胞因子的能力包含较低的产生IFN γ 的能力和/或中等的产生IL-2的能力。在一些实施方案中,T细胞亚群包含经培养的T细胞中的记忆T细胞,诸如长期存活的记忆T细胞。在一些实施方案中,记忆T细胞为Tscm细胞。

[0471] 在一些实施方案中,相较于可通过参考组合物或制备物或通过参考组合物或制备物中的T细胞亚群实现的反应,存在于培养物中的经培养的T细胞或特定T细胞亚群可在较少细胞的过继性转移之后产生相同或更大反应。在一些实施方案中,通过至少少约2倍(诸如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或超过10倍中的任一者)的细胞实现这类反应。在一些实施方案中,反应增加或大了至少约2倍(诸如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或超过10倍中的任一者)。

[0472] 在一些实施方案中,相较于在GSK-P抑制剂存在下孵育的T细胞制备物中的对应细胞亚群,经培养的细胞中的T细胞亚群,诸如上文所述的任何T细胞亚群,的百分比更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或更多倍。在一些实施方案中,经培养的T细胞的组合物不含GSK-P抑制剂。

[0473] 在一些实施方案中,相较于在重组恒稳细胞因子(可选地IL-7或IL-15)存在下孵育的对应细胞亚群,经培养的细胞中的T细胞亚群,诸如上文所述的任何T细胞亚群,的百分比更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或更多倍。在一些实施方案中,经培养的T细胞的组合物不含重组(例如外源)IL-7细胞因子或重组(例如外源)IL-15细胞因子。

[0474] 在一些实施方案中,经培养的T细胞的组合物是根据本文所提供的方法中的任一者生产或产生的,其中诸如竞争剂的物质被添加至T细胞以破坏,(例如以减少和/或终止)一种或多种刺激剂的信号传导。在一些实施方案中,经培养的T细胞的组合物含有物质的存在,该物质诸如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素。在一些实施方案中,相较于在孵育期间并未外源地添加该物质的经培养的T细胞的参考组合物或制备物中的物质的量,物质(诸如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)以大至少1.5倍、至少

2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍的量存在。在一些实施方案中,经培养的T细胞的组合物中的物质(诸如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)的量或为约10 μ M至100 μ M、100 μ M至1mM、100 μ M至500 μ M、或10 μ M至100 μ M。

[0475] IV.对经培养的细胞进行基因工程改造的方法、抗原受体及基因工程改造的细胞

[0476] 在一些实施方案中,经培养的细胞含有或经工程改造以含有工程改造的受体,例如工程改造的抗原受体,诸如嵌合抗原受体(CAR),或T细胞受体(TCR)。还提供这类细胞的群体、含有这类细胞和/或富集这类细胞的组合物,诸如在其中富集或选择某一类型的细胞,诸如T细胞或CD8⁺或CD4⁺细胞。在组合物当中为用于施用(诸如用于过继性细胞疗法)的医药组合物及制剂。还提供向受试者(例如患者)施用细胞及组合物的治疗方法。

[0477] 因此,在一些实施方案中,经培养的细胞包括经由基因工程改造所引入的一种或多种核酸且由此表达这类核酸的重组或基因工程改造产物。在一些实施方案中,如下实现基因转移:首先刺激经培养的细胞,诸如通过将其与诱导诸如增殖、存活和/或活化的反应(例如如通过细胞因子或活化标记物的表达所测量的)的刺激物组合,接着转导活化的细胞,且在培养物中扩增至对于临床应用而言足够的数目。

[0478] 在一些情形中,刺激因子(例如淋巴因子或细胞因子)的过表达可对受试者具有毒性。因此,在一些情形中,经工程改造的细胞包括使得细胞容易受体内负选择影响(诸如以过继性免疫疗法施用时的)的基因区段。举例而言,在一些方面中,经培养的细胞经工程改造以使其可由于其所施用的患者的体内条件的变化而被消除。阴性可选表型可由赋予所施用的剂(例如化合物)以敏感性的基因的插入而产生。阴性可选基因包括赋予更昔洛韦(ganciclovir)敏感性的单纯性疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人,Cell II:223,1977);细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因、细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因、细菌胞嘧啶脱氨酶(MuIlen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。在一些方面中,经培养的细胞进一步被经工程改造以促进细胞因子或其他因子的表达。

[0479] A.编码抗原受体例如嵌合抗原受体的核酸

[0480] 提供用于生产基因工程改造的细胞的方法、核酸、组合物及试剂盒。基因工程改造一般涉及将编码重组或工程改造组分的核酸引入至含有经培养的细胞的组合物中,诸如通过逆转录病毒转导、转染或转化。

[0481] 在一些实施方案中,核酸为异源核酸,即通常不存在于细胞或自该细胞获得的样品中的核酸,诸如自另一生物体或细胞获得的核酸,这类核酸例如在经工程改造的细胞和/或这类细胞所来源的生物体中通常未发现的。在一些实施方案中,核酸为非天然存在的核酸,诸如自然界中未发现的核酸,包括包含编码来自多种不同细胞类型的不同域的核酸的嵌合组合的核酸。

[0482] 1.嵌合抗原受体(CAR)

[0483] 细胞一般表达重组受体,诸如抗原受体,包括功能性非TCR抗原受体例如嵌合抗原受体(CAR),及其他抗原结合受体诸如转基因T细胞受体(TCR)。其他嵌合受体也包括在这些受体中。

[0484] 例示性抗原受体(包括CAR)及对这类受体进行工程改造且将其引入至细胞中的方法包括例如国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、

W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061、美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337、美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353及8,479,118以及欧洲专利申请号EP2537416中所描述的那些内容和/或由Sadelain等人,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75所描述的那些内容。在一些方面中,抗原受体包括如美国专利第7,446,190号中所述的CAR,及国际专利申请公开案第W0/2014055668A1号中所述的那些。CAR的实例包括如上述公开案中的任一者,诸如W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利第7,446,190号、美国专利第8,389,282号;Kochenderfer等人,2013,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;及Brentjens等人,Sci Transl Med.2013 5(177)中所揭示的CAR。还参见W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利第7,446,190号及美国专利第8,389,282号。嵌合受体,诸如CAR,一般包括胞外抗原结合域,诸如抗体分子的一部分,一般为抗体的可变重链(V_H)区和/或可变轻链(V_L)区,例如scFv抗体片段。

[0485] 在一些实施方案中,通过受体靶向的抗原为多肽。在一些实施方案中,其为碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中,相较于正常或未被靶向的细胞或组织,抗原选择性地表达或过度表达于疾病或病况细胞,例如肿瘤或发病细胞上。在其他实施方案中,抗原表达于正常细胞上和/或表达于工程改造的细胞上。

[0486] 在一些实施方案中,通过受体靶向的抗原包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA及B型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3或4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、路易斯Y、L1-细胞黏附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、ephrinB2、CD123、c-Met、GD-2、及MAGE A3、CE7、威尔姆斯肿瘤1(WT-1)、诸如细胞周期蛋白A1(CCNA1)的细胞周期蛋白和/或生物素标记分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0487] 在本文所提供的方法中的任一者的某些实施方案中,靶细胞表达结合至与疾病和/或癌症相关的抗原的CAR。在本文所提供的方法中的任一者的特定实施方案中,抗原为 α v β 6整合素(α v β 6整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,还称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B(CTAG,还称为NY-ESO-1及LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSPG4)、表皮生长因子蛋白质(EGFR)、截短表皮生长因子蛋白质(tEGFR)、III型表皮生长因子受体突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、ephrinB2、肾上腺素受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;还称为Fc受体同是物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、胎儿乙酰胆碱

受体、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、G蛋白偶合受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人类高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、B型肝炎表面抗原、人类白细胞抗原A1(HLA-AI)、人类白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (伊利诺伊州-22Ra)、IL-13受体 α 2(IL-13Ra2)、激酶插入域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞黏附分子(L1CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有8个家族成员A的富含亮氨酸的重复序列(LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、黏蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀手第2组成员D(NKG2D)配体、melan A(MART-1)、神经细胞黏附分子(NCAM)、癌胚抗原、黑色素瘤的优先表达抗原(PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原(PSCA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR1)、存活素、滋养层糖蛋白(TPBG,还称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72(TAG72)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)、威尔姆斯肿瘤1(WT-1)、病原体特异性抗原或与通用标签相关的抗原,和/或生物素标记分子,和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。

[0488] 在一些实施方案中,CAR结合病原体特异性抗原。在一些实施方案中,CAR对病毒抗原(诸如HIV、HCV、HBV等)、细菌抗原和/或寄生虫抗原具有特异性。

[0489] 在一些实施方案中,重组受体例如CAR的抗体部分进一步包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分,诸如铰链区,例如IgG4铰链区,和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,恒定区或部分属于人类IgG,诸如IgG4或IgG1。在一些方面中,恒定区的部分充当抗原识别组分例如scFv与跨膜域之间的间隔区。间隔区的长度可使得细胞在抗原结合后的反应性与间隔区不存在的情况相比增加。例示性间隔区(例如铰链区)包括国际专利申请公开案第W02014031687号中所述的间隔区。在一些实例中,间隔区的长度为或为约为12个氨基酸或长度不超过12个氨基酸。例示性间隔区包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(且包括任一所列范围的端点之间的任何整数)的那些间隔区。在一些实施方案中,间隔区具有约12或少于12个氨基酸、约119个或少于119个氨基酸、或约229个或少于229个氨基酸。例示性间隔区包括单独IgG4铰链、连接至CH2及CH3域的IgG4铰链,或连接至CH3域的IgG4铰链。

[0490] 此抗原识别域一般连接至一种或多种细胞内信号传导组分,诸如在CAR的情况下经由抗原受体复合物(诸如TCR复合物)模拟活化和/或经由另一细胞表面受体传导信号的信号传导组分。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如抗体)连接至一个或多个跨膜及细胞内信号传导域。在一些实施方案中,跨膜域与细胞外域融合。在一个实施方案中,使用与受体(例如CAR)中的一个域天然关联的跨膜域。在一些情况下,跨膜域可经选择或通过氨基酸取代修饰,以避免这类域结合至相同或不同表面膜蛋白质的跨膜域,以使与受体复合物的其他成员的相互作用降至最低。

[0491] 在一些实施方案中,跨膜域来源于天然或合成来源。在天然来源的情况下,在一些方面中,域来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括来源于以下各者的跨膜区(即至少包含以下各者的一个或多个跨膜区):T细胞受体的 α 、 β 或 ξ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD 16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD 134、CD137、CD 154。或者,在一些实

施方案中,跨膜域为合成的。在一些方面中,合成性跨膜域主要包含疏水性残基,诸如亮氨酸及缬氨酸。在一些方面中,将在合成性跨膜域的各端处发现苯丙氨酸、色氨酸及缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,通过连接子、间隔区和/或一个或多个跨膜域进行连接。

[0492] 细胞内信号传导域为经由天然抗原受体模拟或接近信号、经由此受体与共刺激受体的组合模拟或接近信号和/或经由单独协同刺激受体模拟或接近信号的那些域。在一些实施方案中,存在短寡肽或多肽连接子(例如长度在2个与10个氨基酸之间的连接子,诸如含有甘氨酸及丝氨酸的连接子,例如甘氨酸-丝氨酸二联体)且形成CAR的跨膜域与细胞质信号传导域之间的连接。

[0493] 受体(例如CAR)一般包括至少一种细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,诸如介导T细胞活化及细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ξ 链。因此,在一些方面中,抗原结合部分连接至一个或多个细胞信号传导模块。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜域、CD3细胞内信号传导域和/或其他CD跨膜域。在一些实施方案中,受体(例如CAR)进一步包括一个或多个额外分子的一部分,诸如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16。举例而言,在一些方面中,CAR或其他嵌合受体包括CD3- ζ 或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0494] 在一些实施方案中,在连接CAR或其他嵌合受体后,受体的细胞质域或细胞内信号传导域活化免疫细胞(例如经工程改造以表达CAR的T细胞)的正常效应功能或反应中的至少一者。举例而言,在一些情形下,CAR诱导T细胞功能,诸如细胞溶解活性;或T辅助细胞活性,诸如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导域的截短部分置换完整免疫刺激链,例如在该部分转导效应功能信号的情况下使用。在一些实施方案中,一个或多个细胞内信号传导域包括T细胞受体(TCR)的细胞质序列,且在一些方面中,还包括在天然情形中与这类受体协同作用以在抗原受体参与后引发信号转导的共同受体的细胞质序列。

[0495] 在天然TCR的情形下,完全活化一般不仅需要经由TCR的传导信号,而且需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全活化,CAR中还包括用于产生二级或共刺激信号的组分。在其他实施方案中,CAR不包括产生共刺激信号的组分。在一些方面中,额外的CAR表达于相同细胞中且提供用于产生二级或共刺激信号的组分。

[0496] T细胞活化在一些方面中描述为由两类细胞质信号传导序列介导:经由TCR起始抗原依赖性初级活化的细胞质信号传导序列(初级细胞质信号传导序列),及以抗原非依赖性方式起作用以提供二级或协同刺激信号的细胞质信号传导序列(二级细胞质信号传导序列)。在一些方面中,CAR包括这类信号传导组分中的一者或两者。

[0497] 在一些方面中,CAR包括调节TCR复合物初级活化的初级细胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级细胞质信号传导序列可含有信号传导基序,其称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。含有ITAM的初级细胞质信号传导序列的实例包括来源于TCR ξ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b及CD66d的初级细胞质信号传导序列。在一些实施方案中,CAR中的一个或多个细胞质信号传导分子含有细胞质信号传导域、其部分或来源于CD3 ξ 的序列。

[0498] 在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体(诸如CD28、4-1BB、OX40、DAP10及ICOS)的信号传导域和/或跨膜部分。在一些方面中,同一CAR包括活化组分及共刺激组分。

[0499] 在一些实施方案中,活化域包括在一个CAR内,而共刺激组分由识别另一抗原的另一CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括活化或刺激CAR、共刺激CAR,其均表达于同一细胞上(参见W02014/055668)。在一些方面中,细胞包括一个或多个刺激或活化CAR和/或共刺激CAR。在一些实施方案中,细胞另外包括抑制CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月),诸如识别除与疾病或病况相关联和/或对疾病或病况具有特异性的抗原以外的抗原的CAR,由此经由靶向疾病的CAR传递的活化信号通过抑制性CAR结合至其配体而减弱或抑制,例如以减小脱靶效应。

[0500] 在某些实施方案中,细胞内信号传导域包含连接至CD3(例如CD3- ξ)细胞内域的CD28跨膜及信号传导域。在一些实施方案中,细胞内信号传导域包含连接至CD3 ξ 细胞内域的嵌合CD28及CD137(4-1BB、TNFRSF9)共刺激域。

[0501] 在一些实施方案中,CAR在细胞质部分中涵盖一个或多个,例如两个或更多个,共刺激域及活化域,例如初级活化域。例示性CAR包括CD3- ζ 、CD28及4-1BB的细胞内组分。

[0502] 在一些实施方案中,CAR或其他抗原受体进一步包括标记物,诸如细胞表面标记物,其可用于确认表达受体(诸如细胞表面受体的截短形式,诸如截短的EGFR(tEGFR))的细胞得到转导或工程改造。在一些方面中,标记物包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如tEGFR)的全部或一部分(例如截短形式)。在一些实施方案中,编码标记物的核酸可操作地连接于编码连接子序列(诸如可切割的连接子序列,例如T2A)的多核苷酸。参见W02014031687。

[0503] 在一些实施方案中,标记物为非天然地发现于T细胞上或非天然地发现于T细胞表面上的分子,例如细胞表面蛋白,或其部分。

[0504] 在一些实施方案中,分子为非自身分子,例如非自身蛋白质,即不能被细胞待过继性转移至其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0505] 在一些实施方案中,标记物不具有治疗功能且/或不产生除用作基因工程改造的标记物(例如用于选择成功地经工程改造的细胞)之外的作用。在其他实施方案中,标记物可为以其他方式发挥一些所需作用的治疗分子或分子,诸如细胞在体内所遇到的配体,诸如共刺激或免疫检查点分子,以在过继性转移且与配体相遇时增强且/或减弱细胞反应。

[0506] 在一些情况下,CAR称为第一、第二和/或第三代CAR。在一些方面中,第一代CAR为在抗原结合时仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面中,第二代CAR为提供此信号及共刺激信号的CAR,诸如包括来自共刺激受体(诸如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面中,第三代CAR为包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0507] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些方面中,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分及细胞内信号传导域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv,且细胞内域含有ITAM。在一些方面中,细胞内信号传导域包括CD3- ξ (CD3 ζ)链的 ξ 链的信号传导域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接胞外域及细胞内信号传导域的跨膜域。在一些方面中,跨膜域含有CD28的跨膜部分。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内域。在一些方面中,T细胞共刺激分子为CD28或41BB。

[0508] 术语“多肽”及“蛋白质”可互换使用且是指氨基酸残基的聚合物,且不限于最小长度。多肽(包括所提供的受体及其他多肽,例如连接子或肽)可包括具有天然和/或非天然氨

氨基酸残基的氨基酸残基。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化。在一些方面中,多肽可含有相对于原生或天然序列的修饰,只要蛋白质维持所需活性。这些修饰可为有意的,如经由定点诱变;或可为偶然的,诸如经由产生蛋白质的宿主的突变或因PCR扩增所致的错误。

[0509] 在一些实施方案中,由呈连续剂量的细胞表达的受体(例如CAR)含有至少一种免疫反应性表位作为由第一剂量的细胞表达的受体,例如CAR。在一些方面中,由以连续剂量施用的细胞表达的受体(例如CAR)与由第一剂量表达的受体(例如CAR)相同,或与由以第一剂量施用的细胞表达的受体(例如CAR)大体上相同。

[0510] 由以各种剂量向受试者施用的细胞表达的重组受体(诸如CAR)一般识别或特异性结合至分子,该分子表达于正在治疗的疾病或病况或其细胞中,与正在治疗的疾病或病况或其细胞相关,和/或对正在治疗的疾病或病况或其细胞具有特异性。在特异性结合至该分子(例如抗原)后,受体一般将免疫刺激信号(诸如ITAM转导的信号)传递至细胞中,由此促进靶向该疾病或病况的免疫应答。举例而言,在一些实施方案中,第一剂量的细胞表达特异性结合至抗原的CAR,该抗原由该疾病或病况细胞或组织表达或与该疾病或病况相关。

[0511] 2. TCR

[0512] 在一些实施方案中,基因工程改造的抗原受体包括重组T细胞受体(TCR)和/或自天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方案中,靶抗原(例如癌症抗原)的高亲和力T细胞克隆被识别,自患者分离,且引入至该细胞中。在一些实施方案中,已在经人类免疫系统基因(例如人类白细胞抗原系统,或HLA)工程改造的转基因小鼠中产生靶抗原的TCR克隆。参见例如肿瘤抗原(参见例如Parkhurst等人(2009)Clin Cancer Res.15:169-180及Cohen等人(2005)J Immunol.175:5799-5808。在一些实施方案中,噬菌体展示用于分离针对靶抗原的TCR(参见例如Varela-Rohena等人(2008)Nat Med.14:1390-1395及Li(2005)Nat Biotechnol.23:349-354)。

[0513] 在一些实施方案中,在获得T细胞克隆之后,TCR α 及 β 链被分离且克隆至基因表达载体中。在一些实施方案中,TCR α 及 β 基因经由小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽连接以使得两条链共表达。在一些实施方案中,TCR的基因转移经由逆转录病毒或慢病毒载体或经由转座子实现(参见例如Baum等人(2006)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.13:1050-1063;Frecha等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;Hackett等人(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-683)。

[0514] 3. 多靶向

[0515] 在一些实施方案中,所述细胞及方法包括多靶向策略,诸如在细胞上表达两种或更多种基因工程改造的受体,每种受体识别不同抗原的相同组分且通常各自包括不同的细胞内信号传导组分。这类多靶向策略描述于例如国际专利申请公开案第WO 2014055668A1号(描述了活化CAR及共刺激CAR的组合,例如靶向两种不同的抗原,这两种不同的抗原在脱靶例如正常细胞上单独存在,但仅在待治疗的疾病或病况的细胞上在一起存在)及Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述了表达活化CAR及抑制CAR的细胞,诸如其中活化CAR结合至在正常或非病变细胞及待治疗的疾病或病况的细胞两者上表达的

一种抗原,且抑制CAR结合至仅在正常细胞或不需要治疗的细胞上表达的另一抗原)中。

[0516] 举例而言,在一些实施方案中,细胞包括表达第一基因工程改造的抗原受体(例如CAR或TCR)的受体,该第一基因工程改造的抗原受体能够将活化信号诱导至细胞,一般在特异性结合至通过第一受体识别的抗原(例如第一抗原)之后。在一些实施方案中,细胞进一步包括第二基因工程改造的抗原受体(例如CAR或TCR)(例如嵌合共刺激受体),其能够将共刺激信号诱导至免疫细胞,一般在特异性结合至由该第二受体识别的第二抗原之后。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原相同。在一些实施方案中,第一抗原与第二抗原不同。

[0517] 在一些实施方案中,第一和/或第二基因工程改造的抗原受体(例如CAR或TCR)能够将活化信号诱导至细胞。在一些实施方案中,该受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导组分。在一些实施方案中,通过第一受体诱导的活化涉及细胞中的信号转导或蛋白质表达的变化,其导致起始免疫反应,诸如ITAM磷酸化和/或起始ITAM介导的信号转导级联、形成免疫突触和/或在结合受体(例如CD4或CD8等)附近聚集分子、活化一种或多种转录因子诸如NF- κ B和/或AP-1、和/或诱导因子诸如细胞因子的基因表达、增殖和/或存活。

[0518] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括共刺激受体(诸如CD28、CD137(4-1BB)、OX40和/或ICOS)的细胞内信号传导域。在一些实施方案中,第一及第二受体包括不同共刺激受体的细胞内信号传导域。在一个实施方案中,第一受体含有CD28共刺激信号传导区且第二受体含有4-1BB共刺激信号传导区,或反之亦然。

[0519] 在一些实施方案中,第一和/或第二受体包括含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导域以及共刺激受体的细胞内信号传导域。

[0520] 在一些实施方案中,第一受体含有含有ITAM或ITAM样基序的细胞内信号传导域,且第二受体含有共刺激受体的细胞内信号传导域。与在相同细胞中诱导的活化信号组合的共刺激信号为导致免疫应答的信号,该免疫应答诸如有力且持续的免疫应答,诸如增加的基因表达、分泌细胞因子及其他因子、及T细胞介导的效应功能(诸如细胞杀伤)。

[0521] 在一些实施方案中,单独结合第一受体或单独结合第二受体均不诱导有力的免疫应答。在一些方面中,若仅结合一种受体,则细胞变得对抗原耐受或无反应,或被抑制,和/或不被诱导以增殖或分泌因子或执行效应功能。然而,在一些这类实施方案中,当结合多种受体时,诸如在遇到表达第一及第二抗原的细胞时,实现所需应答,诸如完全免疫活化或刺激,例如如由分泌一种或多种细胞因子、增殖、持久性和/或执行免疫效应功能(诸如靶细胞的细胞毒性杀伤)所指示的。

[0522] 在一些实施方案中,这两种受体分别将活化信号及抑制信号诱导至细胞,使得该受体中的一者与其抗原的结合活化细胞或诱导应答,但第二抑制受体与其抗原的结合诱导抑制或减弱该应答的信号。实例为活化CAR和抑制CAR或iCAR的组合。这类策略可用于例如活化CAR结合表达于疾病或病况中但也表达于正常细胞上的抗原,且抑制受体结合至表达于正常细胞上但不表达于疾病或病况细胞上的单独抗原的情况下。

[0523] 在一些实施方案中,多靶向策略用于与特定疾病或病况相关的抗原表达于非疾病细胞上和/或表达于工程改造的细胞本身上(短暂地(例如与基因工程改造相关的刺激后)或永久地)的情况下。在这类情况下,通过要求两种独立且单独地特异性抗原受体的结合,可改良特异性、选择性和/或功效。

[0524] 在一些实施方案中,多种抗原,例如第一及第二抗原,表达于被靶向的细胞、组织

或疾病或病况上,诸如癌细胞上。在一些方面中,细胞、组织、疾病或病况为多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方案中,多种抗原中的一种或多种一般还表达于不需要通过细胞疗法靶向的细胞(诸如正常或非病变细胞或组织)上,和/或工程改造细胞本身上。在这类实施方案中,通过要求多种受体的结合实现细胞应答而实现特异性和/或功效。

[0525] B. 用于基因工程改造的载体及方法

[0526] 用于引入基因工程改造的组分(例如抗原受体,例如CAR或TCR)的各种方法是公知的,且可与提供的方法及组合物一起使用。例示性方法包括转移编码受体的核酸的方法,包括经由病毒,例如逆转录病毒或慢病毒;转导、转座子及电穿孔。

[0527] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒粒子(诸如例如来源于猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移至经培养的细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(诸如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移至T细胞中(参见例如Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25; Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29(11):550-557)。

[0528] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如衍生自莫洛尼鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus,MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)、或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒。大部分逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括衍生自任何鸟类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常为双嗜性的,意味着其能够感染数个物种(包括人类)的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替换逆转录病毒的gag、pol和/或env序列。已描述多种说明性逆转录病毒系统(例如美国专利第5,219,740号;第6,207,453号;第5,219,740号;Miller及Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller,A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology 180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;及Boris-Lawrie及Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109)。

[0529] 慢病毒转导方法为已知的。例示性方法描述于例如Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeven等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;及Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505中。

[0530] 在一些实施方案中,重组核酸经由电穿孔转移至T细胞中(参见例如Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298及Van Tedeloo等人,(2000)Gene Therapy 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,重组核酸经由转位转移(transposition)至T细胞中(参见例如Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;及Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。将遗传物质引入且表达于免疫细胞中的其他方法包括磷酸钙转染(例如如Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,N.Y.中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨粒子促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));及磷酸铯DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0531] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法及载体为例如国际专利申请公开案第

W02014055668号及美国专利第7,446,190号中所述的那些。

[0532] 在一些实施方案中,细胞(例如T细胞)可在例如使用T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)扩增期间或之后被转染。用于引入所需受体的基因的该转染可例如通过任何适合的逆转录病毒载体进行。遗传修饰的细胞群体可随后自初始刺激物(例如CD3/CD28刺激物)释放,且随后通过第二类型的刺激物刺激(例如经由重新引入的受体)。该第二类型的刺激物可包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、以遗传方式引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(诸如抗体)。参见例如Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”*Methods Mol Biol.*2012;907:645-66或Barrett等人,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer *Annual Review of Medicine*第65卷:333-347(2014)。

[0533] 用于引入的其他核酸(例如基因)包括改良治疗功效(诸如促进所转移细胞的存活力和/或功能)的核酸;为选择和/或评价细胞(诸如评估体内存活或定位)提供遗传标记物的基因;改善安全的基因,例如通过使得细胞对体内负向选择易感,如Lupton S.D.等人,*Mol. and Cell Biol.*,11:6(1991);及Riddell等人,*Human Gene Therapy* 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的公开案PCT/US91/08442及PCT/US94/05601,其描述经由显性正向选择性标记物与负向选择性标记物融合所得的双功能选择性融合基因的用途。参见例如Riddell等人的美国专利第6,040,177号的第14-17栏。

[0534] 在一些情况下,可使用不需要活化细胞例如T细胞的载体。在一些这类情况下,细胞可在活化之前经选择和/或经转导。因此,细胞基因工程改造可在如本文所述的培养细胞之前或之后,且在一些情况下与培养的至少一部分同时或在其期间。在一些实施方案中,待工程改造的细胞为经培养的培养细胞,或在一些情况下,细胞可在进行如本文所述的培养之前经转导。

[0535] C. 转导细胞的方法

[0536] 在一些实施方案中,将病毒载体转移至细胞中的方法是使用所提供的寡聚蛋白质(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白)试剂中的任一者进行。在一些实施方案中,根据所提供的转导方法所使用的寡聚蛋白质试剂为结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,细胞用于细胞疗法,诸如制备用于自体或同种异体移植例如用于过继性细胞疗法的原代细胞。在一些实施方案中,该试剂还可用于该方法中以促进与制备工程改造的细胞组合物相关的一个或多个其他处理步骤,诸如选择或调节、活化和/或刺激细胞中的一个或多个。该方法可包括额外的细胞处理步骤,诸如细胞洗涤、分离(isolation)、分离(separation)、配制或与产生细胞组合物相关的其他步骤。

[0537] 在一些实施方案中,所提供的方法用于将病毒载体粒子诸如逆转录病毒载体粒子引入至细胞(诸如免疫细胞,包括T细胞)中。在一些实施方案中,病毒载体粒子具有基因组,该基因组含有编码抗原受体诸如嵌合抗原受体(CAR)或转基因T细胞受体(TCR)的核酸。因此,在一些实施方案中,所提供的方法可用于在诸如T细胞的免疫细胞中表达基因工程改造的抗原受体,诸如转基因TCR或CAR。还提供通过这类粒子及方法转导的细胞及含有这类细胞的组合物,及其使用方法。

[0538] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体粒子及方法包括导致用于过继性免疫疗法所需要的增加的免疫细胞和/或某些群体和/或其亚群的转导的特征。在所提供的转导方法及

病毒载体粒子的一些实施方案中,经转导的群体中的细胞(例如T细胞)在使细胞与提供的逆转录病毒载体粒子接触或孵育之前不或不必进行刺激和/或活化,和/或不或不必与使细胞与提供的逆转录病毒载体粒子接触或孵育相结合而进行刺激和/或活化。

[0539] a. 孵育细胞与病毒载体粒子

[0540] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及通过使包含多个细胞的细胞组合物(在下文中还称作“输入组合物”)与(1)寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)试剂(诸如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂)及(2)病毒粒子接触例如孵育而转导细胞的方法。在一些实施方案中,该方法涉及同时或依序掺合细胞与试剂及病毒粒子。在一些实施方案中,该方法涉及将病毒粒子与试剂预混合在一起且接着使细胞组合物与病毒粒子与试剂缔合的混合物接触。在一些实施方案中,接触持续30分钟至72小时,诸如30分钟至48小时、30分钟至24小时、或1小时至24小时,诸如至少或大约至少30分钟、1小时、2小时、6小时、12小时、24小时、36小时或更多。

[0541] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,(i)孵育包括以任一顺序依序掺合靶细胞与试剂,和/或掺合靶细胞与病毒粒子,可选地其中(a)中的掺合及(b)中的掺合在不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、或72小时的时段内进行和/或(a)中的掺合与(b)中的掺合间隔不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、或48小时进行;(ii)孵育包括掺合靶细胞、试剂及病毒粒子,该掺合同时或基本上同时进行;(iii)孵育包括掺合含有靶细胞及病毒粒子且不包括试剂的组合物,可选地其中:包括靶细胞及试剂的组合物中不超过5%、10%、20%、30%、或40%的靶细胞为活化细胞,表达选自由HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L及4-1BB组成的组的表面标记物;包括选自由IL-2、IFN γ 、TNF- α 组成的组的细胞因子的细胞内表达,和/或能够增殖;和/或该掺合是在于组合物中掺合靶细胞及病毒粒子之后不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、或48小时进行;(iv)孵育包括掺合含有靶细胞及试剂且不包括病毒粒子的组合物与病毒粒子,可选地其中:包括靶细胞及试剂的组合物中不超过5%、10%、20%、30%、或40%的靶细胞为活化细胞,表达选自由HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L及4-1BB组成的组的表面标记物;包括选自由IL-2、IFN γ 、TNF- α 组成的组的细胞因子的细胞内表达,和/或能够增殖;和/或该掺合是在于组合物中掺合靶细胞及病毒粒子之后不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、或48小时进行;和/或(v)孵育包括掺合包括病毒粒子及试剂的组合物与含有靶细胞且不含病毒粒子和/或不含试剂的组合物,可选地其中:包括靶细胞及试剂的组合物中不超过5%、10%、20%、30%、或40%的靶细胞为活化细胞,表达选自由HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L及4-1BB组成的组的表面标记物;包括选自由IL-2、IFN γ 、TNF- α 组成的组的细胞因子的细胞内表达,和/或能够增殖。

[0542] 在一些实施方案中,孵育包括同时或以任一顺序依序掺合细胞与试剂及病毒粒子。在一些实施方案中,在孵育的至少一部分期间,试剂及病毒粒子是在细胞存在下或同时与细胞接触。

[0543] 在一些实施方案中,提供的方法涉及(a)使病毒粒子与寡聚蛋白质试剂接触,由此

产生包括病毒粒子及试剂的组合物,其中病毒粒子可选地与试剂缔合;及(b)孵育(a)中的组合物与包括靶细胞的多个细胞,其中该方法产生包括一个或多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。

[0544] 在一些实施方案中,提供的方法涉及掺合含有病毒粒子及寡聚蛋白质试剂的组合物与包括靶细胞的多个细胞,其中该方法产生包括一个或多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。

[0545] 在一些实施方案中,提供的方法涉及(a)使病毒粒子与包括链霉亲和素或突变蛋白或前述任一者的生物学活性片段,和/或前述任一者的多个亚基的寡聚蛋白质试剂接触,由此产生包括病毒粒子及试剂的组合物,其中病毒粒子可选地与试剂缔合;及(b)孵育(a)中的组合物与多个细胞,其中该方法产生包括一个或多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。

[0546] 在一些实施方案中,提供的方法涉及掺合含有病毒粒子及蛋白质试剂的组合物与包括靶细胞的多个细胞,其中:蛋白质试剂包括链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、亲和素类似物、突变蛋白、或前述任一者的生物学活性片段和/或前述任一者的多个亚基;且该方法产生包括一个或多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,试剂和/或单体单元中的每一者和/或多聚单元中的每一者具有净正电荷或总正电荷。

[0547] 在一些实施方案中,提供的方法涉及孵育包括靶细胞的多个细胞与:1)包括多个能够可逆地结合至结合剂的结合位点的寡聚蛋白质试剂,其中一个或多个结合位点可逆地结合至结合剂;及2)病毒粒子,其中(1)中的孵育的至少一部分与(2)同时进行,且其中该方法产生包括一个或多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。

[0548] 在一些实施方案中,提供的方法涉及(1)使(a)包括一个或多个病毒粒子的组合物与(b)为病毒结合剂的结合剂接触,该病毒结合剂(i)能够特异性结合至病毒粒子表面上的分子,及ii)可逆地结合至包括多个能够可逆地结合至病毒结合剂的结合位点的试剂;及(2)在一个或多个病毒粒子存在下孵育至少多个包括靶细胞的细胞,其中(1)中的接触及(2)中的孵育是同时或以任一顺序依序进行,其中该方法产生包括多个经病毒粒子转导的细胞的输出组合物。

[0549] 在本文所提供的方法中的任一者的一些实施方案中,(1)中的接触及(2)中的孵育是在不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、或72小时的时段内进行,和/或(a)中的掺合是在与(b)中的孵育间隔不超过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、12小时、18小时、24小时、36小时、或48小时进行。在一些实施方案中,病毒载体粒子包含编码重组抗原受体(可选地地嵌合抗原受体)的基因组。

[0550] 在转导步骤期间含有病毒载体粒子及细胞的组合物可另外包括一种或多种额外试剂,诸如提高转导效率的试剂,诸如聚阳离子,包括鱼精蛋白(例如硫酸鱼精蛋白)、海地美溴铵(hexadimethrine bromide) (POLYBRENE®, Abbott Laboratories Corp) 及 CH-296 (RETRONECTIN®, Clontech)。在一些实施方案中,聚阳离子可以1 μ g/mL至100 μ g/mL诸如5 μ g/mL至50 μ g/mL的最终浓度存在于输入组合物中。该组合物还可包括培养基,包括细胞培养基,包括经设计用于培养待处理细胞类型的培养基,诸如造血干细胞培养基,例

如无血清培养基。

[0551] 在一些实施方案中,输入组合物的细胞浓度为或为约 1.0×10^5 个细胞/毫升至 1.0×10^8 个细胞/毫升,诸如至少或大约至少或大约 1.0×10^5 个细胞/毫升、 5×10^5 个细胞/毫升、 1×10^6 个细胞/毫升、 5×10^6 个细胞/毫升、 1×10^7 个细胞/毫升、 5×10^7 个细胞/毫升或 1×10^8 个细胞/毫升。

[0552] 在一些实施方案中,病毒粒子是以以下方式提供的:输入组合物中或待转导的总数量的细胞中,病毒载体粒子或其感染单位(IU)的拷贝数/总数量的细胞(IU/个细胞)。举例而言,在一些实施方案中,病毒粒子在接触期间以在或约或至少在或至少约0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、或60IU的病毒载体粒子/细胞中的一者存在。

[0553] 在一些实施方案中,病毒载体粒子的效价为或约为 1×10^6 IU/mL至 1×10^8 IU/mL之间,诸如为或约为 5×10^6 IU/mL至 5×10^7 IU/mL之间,诸如至少 6×10^6 IU/mL、 7×10^6 IU/mL、 8×10^6 IU/mL、 9×10^6 IU/mL、 1×10^7 IU/mL、 2×10^7 IU/mL、 3×10^7 IU/mL、 4×10^7 IU/mL或 5×10^7 IU/mL。

[0554] 在一些实施方案中,转导可以小于100,诸如一般小于60、50、40、30、20、10、5或更小的感染复数(MOI)实现。

[0555] 在一些实施方案中,接触是在溶液中进行,诸如使用可溶性寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)试剂或结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂。在一些实施方案中,细胞、寡聚试剂及病毒粒子以或以大约0.5mL至500mL,诸如以或以大约0.5mL至200mL、0.5mL至100mL、0.5mL至50mL、0.5mL至10mL、0.5mL至5mL、5mL至500mL、5mL至200mL、5mL至100mL、5mL至50mL、5mL至10mL、10mL至500mL、10mL至200mL、10mL至100mL、10mL至50mL、50mL至500mL、50mL至200mL、50mL至100mL、100mL至500mL、100mL至200mL、或200mL至500mL的体积接触。

[0556] 在一些实施方案中,当在溶液中,例如使用可溶性寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)试剂进行接触时,接触可在接触的至少一部分是通过离心,诸如旋转接种(spinoculation)(例如离心接种)的情况下进行。在一些实施方案中,含有细胞、病毒粒子及试剂的组合物可经旋转,一般在相对较低力或速度,诸如低于用于将细胞制成片状沉淀的速度,诸如自或自大约600rpm至1700rpm(例如在或在大约或至少600rpm、1000rpm、或1500rpm或1700rpm)。在一些实施方案中,旋转是在自或自大约100g至3200g的力(例如相对离心力)(例如在或在大约或至少在或至少大约100g、200g、300g、400g、500g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g或3200g)进行,如例如在室或腔的内壁或外壁处所测量的。术语“相对离心力”或RCF一般理解为在空间中相较于旋转轴的具体点,相对于地球重力赋予物体或物质(诸如细胞、样品或集结粒和/或旋转的腔室或其他容器中的点)的有效力。该值可使用熟知公式,考虑重力、旋转速度及旋转半径(旋转轴与量测RCF的物体、物质或粒子的距离)来确定。

[0557] 在一些实施方案中,寡聚试剂,诸如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,不结合至支持物,诸如不结合至固体表面或固定相。

[0558] 在一些实施方案中,寡聚试剂,结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,固定于支持物,诸如固体表面或固定相上。在一些实施方案中,接触是在固定相中进行,诸如使用层析基质,在其上固定有蛋白质(链霉亲和素突变蛋白),诸如寡聚蛋白质(例

如链霉亲和素突变蛋白)试剂。与提供的方法结合使用的这种形式的实例描述于本文中。因此,在一些实施方案中,可根据提供的方法进行柱上转导。

[0559] 在一些实施方案中,与细胞接触的输入组合物包含活化细胞。在一些实施方案中,输入组合物中的至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的细胞例如T细胞被活化,诸如在一些情况下针对HLA-DR、CD25、CD69、CD71、CD40L和/或4-1BB中的一个或多个为表面阳性的。在一些实施方案中,细胞通过活化剂活化,诸如在抗CD3/抗CD28存在下,在接触起始之前,例如在转导起始之前。在不存在外源生长因子或低量的外源生长因子的情况下体外扩增T细胞群体的方法为本领域已知的(参见例如美国专利6,352,694B1及欧洲专利EP 0 700 430 B1)。一般而言,这类方法采用大于1 μ M的固相表面,各种结合剂(例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)固定至该固相表面。举例而言,Dynabeads® CD3/CD28(Invitrogen)为用于T细胞扩增的市售试剂,其为均一、4.5 μ m超顺磁、无菌、非致热聚苯乙烯珠粒,其涂布有针对人类T细胞上的CD3及CD28细胞表面分子的亲和纯化的单克隆抗体的混合物。在一些实施方案中,活化剂,例如抗CD3和/或抗CD28,可固定于珠粒,诸如磁性珠粒上。

[0560] 在一些实施方案中,细胞活化还在IL-2(例如自或自大约50IU/mL至200IU/mL,诸如或大约100IU/mL)存在下进行。在一些实施方案中,持续或持续大约1小时至96小时、1小时至72小时、1小时至48小时、4小时至36小时、8小时至30小时或12小时至24小时之间,诸如至少或大约至少6小时、12小时、18小时、24小时、36小时或72小时进行活化。在一些实施方案中,在大于或大于约25°C,诸如一般大于或大于约32°C、35°C或37°C,例如在或在约37°C $\pm$ 2°C的温度下,诸如在或在约37°C的温度下进行活化。

[0561] 在一些实施方案中,细胞不通过活化剂活化,诸如在抗CD3/抗CD28存在下,在接触起始之前,例如在转导起始之前。在一些实施方案中,与细胞接触的输入组合物包含多个静息细胞。在一些实施方案中,群体中至少40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多的T细胞为静息T细胞,诸如不具有T细胞活化标记物诸如表面标记物或细胞内细胞因子或其他标记物的T细胞,和/或处于细胞周期的G₀或G₀G_{1a}阶段的T细胞。

[0562] 在特定方面中,提供的方法允许在不需要在与寡聚蛋白质试剂(诸如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂)接触和/或孵育之前进行活化的情况下在T细胞中发生转导。在一些实施方案中,方法包括在不首先(即在转导之前)活化和/或刺激T细胞的情况下,根据提供的方法在寡聚蛋白质(例如链霉亲和素)试剂存在下,通过病毒载体转导含有静息或初始T细胞的T细胞群体。在一些这类实施方案中,提供的方法可用于制备免疫细胞,诸如T细胞用于过继性疗法,该方法不包括活化和/或刺激T细胞的步骤。

[0563] 在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)为裸蛋白。

[0564] 在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)为结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,其具有与其结合的一种或多种结合剂,该一种或多种结合剂能够结合至靶细胞(例如T细胞)的表面上的分子,或在一些情况下,组合物中的病毒粒子的表面上的分子。在一些实施方案中,结合剂可逆地结合至含有多个能够可逆地结合至该剂的结合位点的试剂。在一些实施方案中,孵育是在试剂结合诸如特异性结合至细胞或病毒粒子上的分子的条件下进行。在如所描述的一些实施方案中,寡聚试剂具有可逆地结合于其上(与其结合)的一种或多种剂(例如第一或第二或第三等),该一种或多种剂可包括受体结合剂(例如刺激剂或辅助剂)、选择剂或病毒结合剂,其可用于细胞的选择、刺激、

扩增和/或分化或细胞的转导调节。

[0565] 在一些情况下,对于某些受体结合剂(例如刺激剂或辅助剂),这类结合可诱导或调节组合物中的靶细胞(例如T细胞)中的信号,诸如如所描述的初级信号或辅助信号。在一些实施方案中,剂结合至分子导致组合物中的靶细胞的刺激、活化、扩增(增殖)和/或分化中的一个或多个。在一些实施方案中,试剂包含向细胞提供初级活化信号的刺激剂,其中刺激剂包含至少一种结合伴侣C(例如C1、C2或C3等),其中结合伴侣C能够可逆地结合至寡聚试剂的结合位点Z1用于可逆地结合该剂。在一些实施方案中,试剂包含向细胞提供辅助信号的辅助剂,其中辅助剂包含至少一种结合伴侣C(例如C1、C2或C3等),其中结合伴侣C能够可逆地结合至寡聚试剂的结合位点Z1用于可逆地结合该剂。在一些实施方案中,试剂包含特异性靶向结合至特定细胞表面分子或标记物的选择剂,其中选择剂包含至少一种结合伴侣C(例如C1、C2或C3等),其中结合伴侣C能够可逆地结合至寡聚试剂的结合位点Z1用于可逆地结合该剂。

[0566] 在一些实施方案中,输入组合物中的细胞的活化是在输入组合物的细胞与寡聚蛋白质试剂和/或病毒粒子接触期间起始的。在这类情况下,寡聚蛋白质试剂可具有在其上固定的能够诱导或调节细胞诸如T细胞中的信号的受体结合剂,例如刺激剂和/或辅助剂。在一些实施方案中,刺激剂包含MHC I:肽复合物或其功能部分、MHC II:肽复合物或其功能部分,和/或能够经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3的复合物和/或T细胞中的含ITAM的分子递送刺激信号。在一些实施方案中,寡聚试剂可具有在其上固定的能够向细胞诸如T细胞提供辅助信号的辅助剂。在一些实施方案中,受体结合剂例如刺激剂和/或辅助剂为如本文所述的任何剂,诸如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体(例如Fab)。或者,还有可能将触发细胞扩增的受体的配体诸如天然配体用作刺激剂。举例而言,CD19的细胞外域可用于引起经转导以表达嵌合CD19结合抗原受体(CAR)的细胞的细胞内信号传导级联的激活。在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素)试剂能够在接触及可选的另外的孵育期间调节细胞转导以及活化,诸如刺激细胞。在一些实施方案中,包含刺激剂的寡聚试剂的结合为可逆的,诸如在竞争剂例如生物素的存在下。

[0567] 在一些实施方案中,提供的方法可用于选择性地诱导特定细胞群体(诸如B细胞、T细胞或自然杀伤细胞)的转导和/或离体扩增。在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素突变蛋白)试剂为结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,其可包括至少一种可逆地结合至用于调节转导的相同试剂的选择剂。在一些实施方案中,寡聚(例如链霉亲和素突变蛋白)试剂为结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,其可在相同试剂上含有选择剂及第一或第二受体结合剂(例如刺激剂或辅助剂)中的一者或两者。在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素)试剂,诸如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,能够调节细胞转导且将转导优先靶向至所选或靶向的细胞的特定亚群。在一些实施方案中,寡聚蛋白质(例如链霉亲和素)试剂,诸如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子试剂,能够在接触及可选的另外的孵育期间调节细胞转导,诸如将转导优先靶向至所选或靶向的细胞的特定亚群,及活化诸如刺激细胞。

[0568] 在一些实施方案中,包含结合剂(例如选择剂和/或刺激剂)的寡聚试剂的结合为可逆的,诸如在竞争剂(例如生物素)存在下。如下所述,在一些方面中,方法包括添加或孵育含有细胞、病毒粒子及寡聚试剂(例如结合至一种或多种剂的多聚化试剂和/或寡聚粒子

试剂)的组合物与竞争物质,以逆转、解离或破坏一种或多种结合剂与细胞或病毒粒子的结合。在一些实施方案中,在逆转、解离或破坏之后,可移除组合物的一种或多种组分,诸如解离的寡聚试剂、一种或多种结合剂和/或竞争物质。

[0569] 在一些实施方案中,产生自所提供方法的细胞(在下文中还称作“输出组合物”或“孵育组合物”)包括经病毒载体(诸如含有编码异源蛋白质(诸如重组受体,例如CAR)的核苷酸的病毒载体)转导的那些。在此背景下,异源是指通常不表达自病毒和/或不由病毒基因组编码的蛋白质。在一些实施方案中,病毒载体整合至宿主基因组中可通过测量在孵育后由病毒载体粒子的基因组中所含的核酸编码的重组蛋白质(诸如异源蛋白质)的表达水平来评定。可使用用于评估重组分子的表达水平的多种熟知方法,诸如通过基于亲和性的方法,例如基于免疫亲和性的方法,例如在细胞表面蛋白质的情况下,诸如通过流式细胞术进行检测。在一些实例中,通过检测转导标记物和/或报告构建体来测量表达。在一些实施方案中,编码截短表面蛋白质的核酸包括在载体内且用作其表达和/或增强的标志物。

[0570] V. 组合物、制剂及施用方法

[0571] 还提供含有工程改造的受体(例如工程改造的抗原受体)(诸如CAR或TCR)的组合物,及含有工程改造的细胞的组合物,包括医药组合物及制剂。还提供使用方法及组合物的用途,诸如用于治疗其中表达该抗原的疾病、病况及病症,或用于检测、诊断及预后方法。

[0572] A. 组合物/制剂

[0573] 术语“医药制剂”是指呈准许其中所含活性成分的生物活性有效的形式的制剂,且其不含对制剂将施用的受试者具有不可接受的毒性的其他组分。

[0574] “医药学上可接受的载剂”是指药物制剂中除活性成分之外对个体无毒的成分。医药学上可接受的载剂包括(但不限于)缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0575] 在一些方面中,载剂的选择在某种程度上由具体细胞和/或施用方法决定。因此,存在多种合适的制剂。举例而言,医药组合物可含有防腐剂。适合的防腐剂可包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠及苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。载剂例如由Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编(1980)描述。医药学上可接受的载剂一般在采用的剂量及浓度下对接受者无毒,且包括(但不限于):缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐及其他有机酸;包括抗坏血酸及甲硫氨酸在内的抗氧化剂;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚醇、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐相对离子,诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子界面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。

[0576] 在一些方面中,组合物中包括缓冲剂。适合的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及各种其他酸及盐。在一些方面中,使用两种或两种以上缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物典型地以总组合物重量的约0.001%至约4%的量存在。制备可施用的医药组合物的方法为已知的。例示性方法更详细地描述于例如Remington: The Science and

Practice of Pharmacy, Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中。

[0577] 制剂或组合物还可含有超过一种适用于用细胞治疗的具体适应症、疾病或病况的活性成分,优选为具有与细胞互补的活性的活性成分,其中各自活性并未彼此不利地影响。这类活性成分宜以有效达成预期目的的量的组合存在。因此,在一些实施方案中,医药组合物进一步包括其他医药活性剂或药物,诸如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、小红莓、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲胺喋呤、太平洋紫杉醇、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中,细胞或抗体是以盐,例如医药学上可接受的盐形式施用。适合的医药学上可接受的酸加成盐包括衍生自无机酸及有机酸的盐,无机酸,诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸及硫酸,有机酸,诸如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、反丁烯二酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、丁二酸及芳基磺酸,例如对甲苯磺酸。

[0578] 活性成分可截留于微胶囊、胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米胶囊)或巨乳液中。在某些实施方案中,医药组合物调配为包合错合物,诸如环糊精包合错合物;或调配为脂质体。脂质体可用于使宿主细胞(例如T细胞或NK细胞)靶向特定组织。多种方法可供用于制备脂质体,诸如以下文献中所描述的彼等方法:例如Szoka等人,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980),及美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028及5,019,369。

[0579] 在一些方面中,医药组合物可采用定时释放型、延迟释放型及持续释放型递送系统,使得组合物的递送在所治疗的位点敏感化之前发生且其时间足以引起所治疗的部位的敏感化。多种类型的释放递送系统为可供使用且已知的。这类系统可避免重复施用组合物,从而提高个体及医师的便利性。

[0580] 在一些实施方案中,医药组合物含有有效治疗或预防疾病或病况的量,诸如治疗有效或预防有效量的细胞。在一些实施方案中,治疗或预防功效通过定期评定所治疗的个体来监测。对于经数天或更长时间的重复施用,视病况而定,重复治疗直至出现疾病症状的所需抑止为止。然而,其他给药方案可为适用的且可加以确定。所期望的剂量可通过单次快速施用组成物、通过多次快速施用组成物或通过连续输注施用组成物来递送。

[0581] 可使用标准施用技术、制剂和/或装置施用细胞。提供制剂及用于储存及施用组合物的装置,诸如注射器及小瓶。细胞的施用可为自体或异源的。举例而言,免疫反应性细胞或祖细胞可自一位个体获得且向同一个体或不同的相容个体施用。来源于周边血液的免疫反应性细胞或其后代(例如体内、离体或体外来源)可经由局域化注射施用,包括导管施用、全身性注射、局域化注射、静脉内注射或非经肠施用。当施用治疗组合物(例如含有经基因修饰的免疫反应性细胞的医药组合物)时,其通常调配成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0582] 制剂包括用于经口、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、经皮、肌肉内、鼻内、经颊、舌下或栓剂施用的彼等制剂。在一些实施方案中,细胞群体是非经肠施用。如本文所用,术语“非经肠”包括静脉内、肌肉内、皮下、经直肠、经阴道及腹膜内施用。在一些实施方案中,细胞群体是利用周边全身性递送、通过静脉内、腹膜内或皮下注射来向个体施用。

[0583] 在一些实施方案中,组合物提供为无菌液体制剂,例如等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散液或黏滞组合物,其可在一些方面中缓冲至所选pH。液体制剂的制备通常比凝胶、其他

黏稠组合物及固体组合物更容易。另外,施用液体组合物在某种程度上更方便,尤其通过注射施用。另一方面,黏稠组合物可在适当黏度范围内调配以使得与特定组织接触的时段更长。液体或黏稠组合物可包含载剂,载剂可为含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其适合混合物的溶剂或分散介质。

[0584] 无菌可注射溶液可通过将细胞并入溶剂中,诸如使细胞与适合的载剂、稀释剂或赋形剂(诸如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖或其类似物)混合来制备。组合物还可经冻干。视施用途及所需制剂而定,组合物可含有辅助物质,诸如湿润剂、分散剂或乳化剂(例如甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或黏度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料及其类似物。在一些方面中,可查询标准文本以制备适合制剂。

[0585] 可添加增强组合物的稳定性及无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂及缓冲剂。可通过各种抗细菌剂及抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸及其类似物)来确保防止微生物的作用。可注射医药形式的延长吸收可通过使用延迟吸收剂(诸如单硬脂酸铝及明胶)来实现。

[0586] 可制备延释制剂。持续释放型制剂的适合实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该等基质呈成形制品形式,例如膜或微胶囊。

[0587] 用于体内施用的制剂通常为无菌的。无菌性可容易通过例如无菌过滤膜过滤来实现。

[0588] B.施用的方法

[0589] 提供施用细胞、群体及组合物的方法,及这类细胞、群体及组合物用于治疗或预防疾病、病况及病症,包括癌症的用途。在一些实施方案中,向患有待治疗的特定疾病或病况的患者施用细胞、群体及组合物,例如经由过继性细胞疗法(诸如过继性T细胞疗法)施用。在一些实施方案中,通过提供的方法制备的细胞及组合物,诸如孵育和/或其他处理步骤之后的工程改造组合物及生产结束组合物是向个体,诸如患有疾病或病况或处于患有疾病或病况的风险下的个体施用。在一些方面中,方法藉以治疗,例如改善疾病或病况的一种或多种症状,诸如通过减轻癌症中的肿瘤负荷,该癌症表达通过工程改造T细胞识别的抗原。

[0590] 施用用于过继性细胞疗法的细胞的方法已知且可联合所提供的方法及组合物使用。举例而言,过继性T细胞疗法方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开案第2003/0170238号;Rosenberg的美国专利第4,690,915号;Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)中。参见例如Themeli等人(2013) Nat Biotechnol.31(10):928-933; Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9; Davila等人(2013) PLoS ONE 8(4):e61338中。

[0591] 如本文所用,“个体”为哺乳动物,诸如人类或其他动物,且通常为人类。在一些实施方案中,施用细胞、细胞群体、或组合物的个体,例如患者为哺乳动物,通常为灵长类动物,诸如人类。在一些实施方案中,灵长类动物为猴或猿。个体可为雄性或雌性且可为任何适龄(包括婴儿、幼年、青年、成年及老年)个体。在一些实施方案中,个体为非灵长类哺乳动物,诸如啮齿动物。

[0592] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其文法变化形式,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指疾病或病况或病症、或症状、不良作用或后果、或与其相关联的表型完全或部分改善或减轻。所需治疗作用包括(但不限于)预防疾病发生或复发,缓解症状,减轻

疾病的任何直接或间接病理学结果,预防癌转移,减缓疾病进展速率,改善或缓和疾病病况及缓解或改良预后。该术语不表示疾病的完全治愈或任何症状的完全排除或对所有症状或结果均有作用。

[0593] 如本文所用,“延迟疾病发展”意谓延缓、阻碍、减缓、阻滞、稳定和/或延迟疾病(诸如癌症)的发展。此延迟可具有不同时间长度,视所治疗的疾病和/或个体的病史而定。如熟习此项技术者显而易见,足够或显著延迟可实际上涵盖预防,从而使个体不出现疾病。举例而言,可延迟晚期癌症,诸如癌转移发展。

[0594] 如本文所用,“预防”包括在个体疾病出现或复发方面提供预防作用,该个体可能易患该疾病但尚未诊断患有该疾病。在一些实施方案中,所提供的细胞及组合物用于延缓疾病发展或减缓疾病进展。

[0595] 如本文所用,“抑止”功能或活性为当与除相关条件或参数以外在其他方面相同的条件相比或者与另一条件相比时,减小功能或活性。举例而言,抑制肿瘤生长的细胞与不存在该等细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,减小肿瘤生长速率。

[0596] 在施用的情况下,试剂,例如医药制剂、细胞或组合物的“有效量”是指在剂量/量下且持续获得期望结果,诸如治疗或预防结果所需的时段有效的量。

[0597] 试剂,例如医药制剂或细胞的“治疗有效量”是指在剂量下且持续获得所需治疗结果,诸如治疗疾病、病况或病症,和/或治疗的药物动力学或药效动力学效应所需的时段有效的量。治疗有效量可根据诸如以下因素来变化:疾病病况、个体的年龄、性别及体重,及所施用的细胞群体。在一些实施方案中,提供的方法包含施用有效量(例如治疗有效量)的细胞和/或组合物。

[0598] “预防有效量”是指以必要的剂量及时间段有效达成所需预防结果的量。由于个体在患病之前或在疾病早期使用预防剂量,因此预防有效量将通常(但不一定)小于治疗有效量。

[0599] 治疗的疾病或病况可为其中抗原的表达与疾病、病况或病症的病源学,例如病因相关和/或涉及于其中,加重或以其他方式涉及这类疾病、病况或病症的任何疾病或病况。例示性疾病和病况可包括与细胞的恶性肿瘤或转化(例如癌症)、自体免疫或发炎疾病或感染性疾病相关,例如由细菌、病毒或其他病原体引起的疾病或病况。上文描述例示性抗原,其包括与可治疗的各种疾病及病况相关的抗原。在特定实施方案中,嵌合抗原受体或转殖基因TCR特异性结合至与疾病或病况相关的抗原。

[0600] 因此,所提供的方法及用途包括用于过继性细胞疗法的方法及用途。在一些实施方案中,方法包括向个体、组织或细胞(诸如处于疾病、病况或病症的风险中或怀疑患有疾病、病况或病症)施用细胞或含有细胞的组合物。在一些实施方案中,向患有待治疗的特定疾病或病况的个体施用细胞、群体及组合物,例如经由过继性细胞疗法,诸如过继性T细胞疗法。在一些实施方案中,向个体,诸如患有或处于患有疾病或病况的风险下的个体施用细胞或组合物,改善疾病或病况的一种或多种症状。

[0601] 在一些实施方案中,通过自体移植进行细胞疗法,例如过继性T细胞疗法,其中细胞分离和/或另外制备自待接受细胞疗法的个体,或来源于这类个体的样品。因此,在一些方面中,细胞来源于需要治疗的个体,例如患者,且该等细胞在分离及处理后施用至相同个体。

[0602] 在一些实施方案中,细胞疗法,例如过继性T细胞疗法是通过同种异体移植进行,其中细胞分离和/或另外制备自除待接受或最终接受细胞疗法的个体,例如第一个体以外的个体。在这类实施方案中,随后向相同物种的不同个体(例如第二个体)施用该等细胞。在一些实施方案中,第一及第二个体在基因上相同。在一些实施方案中,第一及第二个体在基因上类似。在一些实施方案中,第二个体表达的HLA种类或超类型与第一个体相同。细胞可通过任何适合方法施用。给药及施用可部分地视施用是否为短暂或长期而定。各种给药时程包括(但不限于)单次施用或在各时间点多次施用、推注施用及脉动输注。

[0603] 在某些实施方案中,细胞或细胞亚型的个别群体是以约一百万至约1000亿细胞的范围和/或每公斤体重的细胞量向个体施用,诸如1百万至约500亿细胞(例如约5百万细胞、约2.5千万细胞、约5亿细胞、约10亿细胞、约50亿细胞、约200亿细胞、约300亿细胞、约400亿细胞,或通过任何两个前述值限定的范围),诸如约1千万至约1000亿细胞(例如约2千万细胞、约3千万细胞、约4千万细胞、约6千万细胞、约7千万细胞、约8千万细胞、约9千万细胞、约100亿细胞、约250亿细胞、约500亿细胞、约750亿细胞、约900亿细胞,或通过任何两个前述值限定的范围),且在一些情况下,为约1亿细胞至约500亿细胞(例如约1.2亿细胞、约2.5亿细胞、约3.5亿细胞、约4.5亿细胞、约6.5亿细胞、约8亿细胞、约9亿细胞、约30亿细胞、约300亿细胞、约450亿细胞)或这类范围之间和/或以每公斤体重计的任何值。此外,剂量可视疾病或病症特有的性质和/或患者和/或其他疗法而变化。在一些实施方案中,细胞作为组合治疗的一部分施用,诸如与另一治疗性干预(诸如抗体或经工程改造的细胞或受体或试剂,诸如细胞毒性剂或治疗剂)同时或按任何次序依次施用。在一些实施方案中,细胞与一种或多种额外治疗剂一起共施用或与另一治疗性干预结合同时或按任何次序依次施用。在一些情形中,细胞与另一疗法在足够接近的时间上共施用,使得细胞群体增强一种或多种其他治疗剂的作用,或反的还然。在一些实施方案中,细胞在一种或多种额外治疗剂之前施用。在一些实施方案中,细胞在一种或多种额外治疗剂之后施用。在一些实施方案中,一种或多种额外试剂包括细胞因子(诸如IL-2)以例如增强持久性。在一些实施方案中,方法包含施用化学治疗剂。

[0604] 在施用细胞后,在一些实施方案中量测工程改造细胞群体的生物活性,例如通过多种已知方法中的任一者。评估的参数包括工程改造或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原在体内的特异性结合,例如通过成像,或离体,例如通过ELISA或流动式细胞测量术。在某些实施方案中,工程改造细胞破坏靶细胞的能力可使用此项技术中已知的任何适合方法量测,诸如以下文献中所述的细胞毒性分析:例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),及Herman等人,J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方案中,细胞的生物活性是通过分析一种或多种细胞因子,诸如CD107a、IFN γ 、IL-2及TNF的表达和/或分泌来量测。在一些方面中,通过评定临床结果(诸如肿瘤负荷的减小)来量测生物活性。

[0605] 在某些实施方案中,经工程改造的细胞是以多种方式进一步修饰,从而增加其治疗或预防功效。举例而言,群体所表达的经工程改造的CAR或TCR可与靶向部分直接结合或经由连接子间接结合。使化合物(例如CAR或TCR)结合至靶向部分的实践为此项技术中已知的。参见例如Wadwa等人,J.Drug Targeting 3:1 1 1(1995)及美国专利5,087,616。

[0606] VI.定义

[0607] 如本文所用,除非上下文以另外方式除非本文另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一(a/an)”及“该”包括多个指示物。举例而言,“一(a/an)”意谓“至少一个/种”或“一个或多个/种”。应了解,本文所述的方面及变化形式包括“组成”和/或“主要组成”方面及变化形式。

[0608] 在通篇本发明中,所主张的标的物的各种方面均以范围形式呈现。应了解,范围形式的描述仅为了方便及简洁起见,且不应解释为对所主张的主题的不灵活限制。因此,范围的描述应视为已特定揭示所有可能的子范围以及该范围内的个别数值。举例而言,在提供值范围的情况下,应理解,该范围的上限与下限之间的各中间值及该陈述范围内的任何其他陈述值或中间值均涵盖于所主张的标的物内。这类较小范围的上限及下限可独立地包括于较小范围内且还涵盖于所主张的主题内,在所陈述范围内受到任何特定排他性限制。在所述范围包括一个或两个限值的情况下,排除彼等包括性限值中的任一者或两者的范围还包括于所主张的标的物中。不管范围的宽度如何,此均适用。

[0609] 如本文所用,术语“约”是指此技术领域的技术人员易于知晓的相应值的常见误差范围。本文中提及“约”某一值或参数包括(且描述)针对该值或参数本身的实施方案。举例而言,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。在特定实施方案中,“约”为 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 、 $\pm 0.01\%$ 、或 $\pm 0.001\%$ 。

[0610] 如本文所用,组合物是指两种或两种以上产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可为溶液、悬浮液、液体、粉末、膏剂、水溶液、非水溶液或其任何组合。

[0611] 如本文所用,当参考一种或多种特定细胞类型或细胞群体时,「富集」是指增加细胞类型或群体的数目或百分比,例如相较于组合物中的细胞的总数目或组合物体积,或相对于其他细胞类型,诸如通过基于经群体或细胞表达的标记物的阳性选择,或通过基于不存在于待耗尽的细胞群体或细胞上的标记物的阴性选择。该术语不需要自组合物完全移除其他细胞、细胞类型或群体且不需要细胞富集至以或甚至接近100%存在于富集组合物中。

[0612] 如本文所用,细胞或细胞群体对具体标记呈“阳性”的表述是指细胞表面或细胞内可检测的存在具体标记(通常表面标记)。当提及表面标记时,该术语是指如通过流动式细胞测量术所检测存在表面表达,例如通过用特异性结合至标记的抗体染色且检测该抗体,其中该染色可通过流动式细胞测量术检测,其水准实质上高于使用同型匹配对照物在其他方面相同的条件下执行相同程序所检测的染色,和/或水准实质上类似于已知对标记呈阳性的细胞,和/或水准实质上高于已知对标记呈阴性的细胞。

[0613] 如本文所用,细胞或细胞群体对特定标记物呈“阴性”的表述是指特定标记物(典型地为表面标记物)没有实质性可检测地存在于细胞表面或细胞内。提及表面标记物时,术语是指缺乏表面表达,如通过流式细胞术所检测,例如用专一性结合至标记物的抗体染色且检测该抗体,其中该染色在实质上高于使用同型匹配对照物、在原本相同条件下执行相同程序所检测的染色的水准下,和/或在实质上低于已知对标记物呈阳性的细胞的水准下,和/或在实质上类似于已知对标记物呈阴性的细胞的水准下不可通过流式细胞术检测到。

[0614] 如本文所用的术语“表达”是指基于核酸分子,诸如基因的编码序列产生多肽的方法。方法可包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰,或其任何组合。

[0615] 如本文所用,个体包括任何活有机体,诸如人类及其他哺乳动物。哺乳动物包括

(但不限于)人类及非人类动物,包括农畜、竞赛动物、啮齿动物及宠物。

[0616] 如本文所用,对照是指与测试样品大体上相同的样品,除了其不通过测试参数处理,或若其为血浆样品,则其可获自不受所关注的病况影响的正常志愿者。对照还可为内部对照。

[0617] VII. 例示性实施方案

[0618] 在所提供的实施方案中包括:

[0619] 1. 一种寡聚粒子试剂,其包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,其中该寡聚粒子试剂的尺寸包含i) 大于25nm的半径,ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii) 每一寡聚粒子试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0620] 2. 如实施方案1的寡聚粒子试剂,其中链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子结合至或能够结合至生物素、亲和素、生物素类似物或突变蛋白、亲和素类似物或突变蛋白、和/或其生物学活性片段,或链霉亲和素结合肽。

[0621] 3. 如实施方案2的寡聚粒子试剂,其中链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子可逆地结合至或能够可逆地结合至生物素、亲和素、生物素类似物或突变蛋白、亲和素类似物或突变蛋白、和/或其生物学活性片段,或链霉亲和素结合肽。

[0622] 4. 如实施方案1至3中任一项的寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,其中该链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素的位置的位置44至47的序列位置处包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

[0623] 5. 如实施方案1至4中任一项的寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂包含多个包含以下各者的链霉亲和素突变蛋白分子:

[0624] a) SEQ ID NO:3-6、27、28、60或61中的任一者中所示的氨基酸序列;

[0625] b) 与SEQ ID NO:3-6、27、28、60或61中的任一者展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷的氨基酸序列和/或可逆地结合至生物素或其生物学活性形式、生物素类似物或突变蛋白、或其生物学活性片段、或链霉亲和素结合肽的氨基酸序列;或

[0626] c) 可逆地结合至生物素或其生物学活性形式、生物素类似物或突变蛋白、或其生物学活性片段、或链霉亲和素结合肽的a) 或b) 的功能片段。

[0627] 6. 如实施方案1至5中任一项的寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂包含多个链霉亲和素突变蛋白分子,该多个链霉亲和素突变蛋白分子包含SEQ ID NO:6或61中所示的氨基酸序列。

[0628] 7. 如实施方案4至6中任一项的寡聚粒子试剂,其中该链霉亲和素突变蛋白分子在对应于参照SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的链霉亲和素的位置的117、120和/或121的位置处进一步包含一个或多个氨基酸置换。

[0629] 8. 如实施方案7的寡聚粒子试剂,其中:

[0630] 该一个或多个氨基酸置换选自Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121或Phe121;或

[0631] 该一个或多个氨基酸置换选自Glu117、Gly120或Tyr121中的一个或多个;或

[0632] 该氨基酸置换选自Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰或Tyr¹²¹。

[0633] 9.如实施方案1至8中任一项的寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂包含多个包含以下各者的链霉亲和素突变蛋白分子:

[0634] a) SEQ ID NO:27或28中所示的氨基酸序列;

[0635] b) 与SEQ ID NO:28展现至少85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性且含有对应于Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰及Tyr¹²¹的氨基酸序列和/或可逆地结合至生物素或生物学活性片段、生物素类似物或突变蛋白、或其生物学活性片段、或链霉亲和素结合肽;或

[0636] c) 可逆地结合至生物素或生物学活性片段、生物素类似物或突变蛋白、或其生物学活性片段、或链霉亲和素结合肽的a)或b)的功能片段。

[0637] 10.如实施方案1至9中任一项的寡聚粒子试剂,其中该寡聚粒子试剂结合至或能够结合至一种或多种剂。

[0638] 11.如实施方案10的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂包含结合伴侣,其中结合伴侣能够结合,可选地可逆地结合,至寡聚粒子试剂上的一个或多个结合位点。

[0639] 12.如实施方案11的寡聚粒子试剂,其中结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

[0640] 13.如实施方案11或12的寡聚粒子试剂,其中该结合伴侣包含选自以下组成的组的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0641] 14.如实施方案10至13中任一项的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂结合或能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。

[0642] 15.如实施方案10至14中任一项的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂为或包含抗体或其抗原结合片段。

[0643] 16.如实施方案15的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂为或包含单价抗体片段。

[0644] 17.如实施方案15或实施方案16的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂为或包含Fab。

[0645] 18.如实施方案10至17中任一项的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的受体的受体结合剂。

[0646] 19.如实施方案10至18中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上的分子的刺激剂,其中结合诱导或调节靶细胞中的信号。

[0647] 20.如实施方案18或实施方案19的寡聚粒子试剂,其中靶细胞为免疫细胞。

[0648] 21.如实施方案18至20中任一项的寡聚粒子试剂,其中靶细胞为T细胞。

[0649] 22.如实施方案18至21中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂能够在T细胞中起始TCR/CD3复合物相关的信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。

[0650] 23.如实施方案22的寡聚粒子试剂,其中刺激剂为第一受体结合剂且寡聚粒子试剂包含第二受体结合剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子可选地能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0651] 24.如实施方案23的寡聚粒子试剂,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0652] 25.如实施方案22或实施方案23的寡聚粒子试剂,其中该第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子,且该共刺激分子为CD28。

[0653] 26.如实施方案10至25中任一项的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂为抗CD3抗体及抗CD28抗体,可选地为抗CD3 Fab及抗CD28 Fab。

[0654] 27.如实施方案18至21中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0655] 28.如实施方案18至21、23或24中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激或辅助分子,且共刺激分子或辅助分子选自CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。

[0656] 29.如实施方案18至21、23或24中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体,且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2。

[0657] 30.如实施方案18至21、23或24中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体,且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4。

[0658] 31.如实施方案18至21、23、或24中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子,且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。

[0659] 32.如实施方案31的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中

[0660] 配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2;和/或

[0661] 配体选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17及TNF,或为其生物学活性片段。

[0662] 33.如实施方案30的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体,其中

[0663] 配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4的趋化因子受体;或

[0664] 配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21及CCL25或为其生物学活性片段。

[0665] 34.如实施方案18至21、23或24中任一项的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为黏附分子,且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)及CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。

[0666] 35.如实施方案10至34中任一项的寡聚粒子试剂,其中一种或多种剂包含选择剂,

其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。

[0667] 36. 如实施方案35的寡聚粒子试剂, 其中靶细胞为免疫细胞。

[0668] 37. 如实施方案35或实施方案36的寡聚粒子试剂, 其中靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。

[0669] 38. 如实施方案35至37中任一项的寡聚粒子试剂, 其中靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。

[0670] 39. 如实施方案35至38中任一项的寡聚粒子试剂, 其中靶细胞为T细胞。

[0671] 40. 如实施方案35至39中任一项的寡聚粒子试剂, 其中选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0672] 41. 如实施方案1至40中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含大于25nm、大于50nm、大于60nm、大于70nm、大于80nm或大于90nm的半径。

[0673] 42. 如实施方案1至41中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含25nm与150nm之间、50nm与150nm之间、75nm与125nm之间、80nm与115nm之间、或90nm与110nm之间(含上下限值)或 $90\text{nm} \pm 15\text{nm}$ 或 $95\text{nm} \pm 20-25\text{nm}$ 的半径。

[0674] 43. 如实施方案1至42中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂具有小于150nm的半径。

[0675] 44. 如实施方案41至43中任一项的寡聚粒子试剂, 其中半径为流体动力半径。

[0676] 45. 如实施方案1至44中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含至少 $1 \times 10^7\text{g/mol}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{g/mol}$ 或至少 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 的分子量。

[0677] 46. 如实施方案1至45中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含 $1 \times 10^6\text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^{10}\text{g/mol}$ 之间、 $1 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $1 \times 10^9\text{g/mol}$ 之间、 $5 \times 10^7\text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间、 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 与 $5 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间或 $1 \times 10^8\text{g/mol}$ 与 $2 \times 10^8\text{g/mol}$ 之间的分子量。

[0678] 47. 如实施方案1至46中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少500个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少1,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、至少1,500个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体或至少2,000个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0679] 48. 如实施方案1至47中任一项的寡聚粒子试剂, 其中寡聚粒子试剂包含100与50,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、1,000与20,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、1,000与10,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体、或2,000与5,000个之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0680] 49. 如实施方案1至48中任一项的寡聚粒子试剂, 其中多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包含赖氨酸残基, 其中小于20%、10%、5%、1%的赖氨酸残基包含N-取代的亚氨基硫杂环戊烷。

[0681] 50. 一种组合物, 其包含一种或多种实施方案1至49中任一项所述的寡聚粒子试剂。

[0682] 51. 如实施方案50的组合物, 其中该一种或多种寡聚粒子试剂为多种寡聚粒子试剂。

[0683] 52. 如实施方案51的组合物, 其中多种寡聚粒子试剂包含i) 大于70nm的平均半径;

ii) 至少 1×10^8 g/mol的平均分子量;和/或iii) 每一寡聚粒子试剂至少2,000个链霉亲和素或链霉亲和素四聚物的平均数量;和/或iv) 其中至少95%的多种寡聚粒子试剂包含10nm至150nm之间的半径的半径尺寸分布。

[0684] 53. 如实施方案51或52的组合物, 其中多种寡聚粒子试剂包含大于25nm、大于50nm、大于60nm、大于70nm、大于80nm、大于90nm或大于100nm的平均半径。

[0685] 54. 如实施方案51至53中任一项的组合物, 其中:

[0686] 多种寡聚粒子试剂包含25nm与150nm之间、50nm与150nm之间、75nm与125nm之间、80nm与110nm之间或90nm与110nm之间(含上下限值)的平均半径;或

[0687] 多种寡聚粒子试剂包含 $90\text{nm} \pm 15\text{nm}$ 、 $95\text{nm} \pm 20$ -25nm或 $97 \pm 10\text{nm}$ 的平均半径。

[0688] 55. 如实施方案51至54中任一项的组合物, 其中至少95%的多种寡聚粒子试剂包含50nm与150nm之间、70nm与140nm之间、80nm与120nm之间、80nm与115nm之间、80nm与100nm之间、90nm与110nm之间和/或100nm与120nm之间的半径。

[0689] 56. 如实施方案51至55中任一项的组合物, 其中至少95%的寡聚粒子试剂包含多种寡聚粒子试剂的平均和/或中值半径的 $\pm 50\%$ 、 $\pm 25\%$ 、 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$ 和/或 $\pm 5\%$ 之间的半径。

[0690] 57. 如实施方案51至56中任一项的组合物, 其中多种寡聚粒子试剂包含80nm与115nm之间的平均半径且其中至少95%的寡聚粒子试剂包含平均半径的 $\pm 25\%$ 之间的半径。

[0691] 58. 如实施方案51至57中任一项的组合物, 其中多个粒子包含 1×10^8 g/mol与 5×10^8 g/mol之间、或 1×10^8 g/mol与 2×10^8 g/mol之间(含上下限值)的平均分子量。

[0692] 59. 如实施方案51至58中任一项的组合物, 其中多种寡聚粒子试剂包含每一寡聚粒子试剂至少100、至少500、至少1,000、至少1,500或至少2,000的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量。

[0693] 60. 如实施方案51至59中任一项的组合物, 其中多种寡聚粒子试剂包含每一寡聚粒子试剂在100与50,000之间、1,000与20,000之间、1,000与10,000之间或2,000与5,000之间(各含上下限值)的链霉亲和素或链霉亲和素四聚体的平均数量。

[0694] 61. 如实施方案51的60中任一项的组合物, 其中当在大约或低于 -80°C 、大约或低于 -20°C 、和/或大约或低于 4°C 下储存至少1、3、9、27或46周时, 多个寡聚物粒子的平均半径不增加超过25%或10%。

[0695] 62. 如实施方案51至61中任一项的组合物, 其中当在大约或低于 4°C 下储存至少一周时, 多个寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。

[0696] 63. 如实施方案61至62中任一项的组合物, 其中当在大约或低于 4°C 下储存至少3周时, 多个寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。

[0697] 64. 如权利要求51至63中任一项的组合物, 其中当在大约或低于 4°C 下储存至少9周时, 多个寡聚物粒子的平均半径不增加超过10%。

[0698] 65. 一种用于产生包含链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的寡聚粒子试剂的方法, 该方法包含:

[0699] 孵育多个包含能够与巯基官能团反应的巯基反应性官能团的活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个包含一个或多个巯基官能团的巯基化的链霉亲和素或

链霉亲和素突变蛋白分子,由此产生包含寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白粒子的粒子组合物;

[0700] 从单体和/或较小寡聚分子中分离寡聚粒子;以及

[0701] 使寡聚粒子与稳定剂接触,由此产生寡聚粒子试剂。

[0702] 66.如实施方案65的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是通过将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与能够将一个或多个胺转化为巯基反应性官能团的活化剂一起孵育而产生。

[0703] 67.如实施方案65或实施方案66的方法,其中多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是通过将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与添加或能够添加巯基官能团至一个或多个赖氨酸残基的巯基化剂一起孵育而产生。

[0704] 68.一种用于产生寡聚粒子试剂的方法,该方法包含:

[0705] (a)在将一个或多个胺转化为能够与巯基官能团反应的巯基反应性基团的条件下将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育,由此产生多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;

[0706] (b)将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与添加或能够添加巯基官能团至一个或多个赖氨酸残基的巯基化剂一起孵育,由此产生多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;以及

[0707] (c)将多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子一起孵育,由此产生包含寡聚粒子试剂的粒子组合物;

[0708] 其中该方法是在如下条件下进行:其中在起始(c)中的孵育时,多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子使得至少60%的赖氨酸平均包含一个巯基官能团,和/或每一巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体平均至少10个赖氨酸包含一个巯基官能团。

[0709] 69.如实施方案68的方法,其进一步包含从单体和/或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子中分离寡聚粒子试剂。

[0710] 70.如实施方案65至69中任一项的方法,其中孵育第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在1:1与1:10之间的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与活化剂的摩尔比下进行。

[0711] 71.如实施方案66至70中任一项的方法,其中孵育第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂是在 $1:2 \pm 2\%$ 的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白与活化剂的摩尔比下进行。

[0712] 72.如实施方案66至71中任一项的方法,其中活化剂包含杂双官能团交联剂。

[0713] 73.如实施方案66至72中任一项的方法,其中该活化剂包含4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸磺基琥珀酰亚胺酯(磺基SMCC)和/或6-[β -(马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)]。

[0714] 74.如实施方案65至73中任一项的方法,其中巯基反应性官能团为卤乙酰基、马来酰亚胺基、氮丙啶基、丙烯酰基、芳化剂、乙烯基砷基、吡啶基二硫化物、TNB-巯基或二硫化物还原剂。

[0715] 75.如实施方案65至74中任一项的方法,其中巯基反应性官能团为马来酰亚胺基。

[0716] 76.如实施方案65至75中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂是在中性pH下孵育。

[0717] 77.如实施方案65至76中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂是在6.8与7.5之间的pH下孵育。

[0718] 78.如实施方案65至77中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂是在7.0与7.4之间,可选为7.2或大约7.2的pH下孵育。

[0719] 79.如实施方案65至78中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂是在4°C与39°C之间的温度下孵育。

[0720] 80.如实施方案65至79中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂是在室温下,可选在20°C与25°C之间,可选在约23°C或约24°C下孵育。

[0721] 81.如实施方案65至80中任一项的方法,其中该第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂孵育15分钟至6小时、或30分钟至2小时之间(各含上下限值)。

[0722] 82.如实施方案65至81中任一项的方法,其中第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化剂孵育45分钟至1.5小时之间(含上下限值),可选孵育1小时或约1小时。

[0723] 83.如实施方案66至82中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂的孵育是在巯基化剂与每一链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的各伯胺为10:1与1:1之间(含上下限值)的摩尔比下进行。

[0724] 84.如实施方案66至83中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂的孵育是在1:50与1:500之间(含上下限值)的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与巯基化剂的摩尔比下进行。

[0725] 85.如实施方案66至84中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂的孵育是在1:100或大约1:100的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体与活化剂的摩尔比下进行。

[0726] 86.如实施方案66至85中任一项的方法,其中巯基化剂为或包含2-亚氨基硫杂环戊烷。

[0727] 87.如实施方案66至86中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂是在7.0或更大,可选7.0与8.0之间(含上下限值)的pH下孵育。

[0728] 88.如实施方案66至87中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂是在约7.7的pH下孵育。

[0729] 89.如实施方案66至88中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂的孵育是在pH为8.0或更大,可选在8.0与9.0之间(含上下限值)的缓冲液存在下起始。

[0730] 90.如实施方案66至89中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂的孵育是在pH为8.5或约8.5的缓冲液存在下起始。

[0731] 91.如实施方案89或90的方法,其中缓冲液包含硼酸盐。

[0732] 92.如实施方案89至91中任一项的方法,其中缓冲液包含10mM至200mM硼酸盐或50mM至100mM硼酸盐(各含上下限值),可选约100mM硼酸盐。

[0733] 93.如实施方案65至92中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂是在4℃与39℃之间的温度下孵育。

[0734] 94.如实施方案65至93中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂是在室温下,可选在20℃与25℃之间,可选在23℃或约23℃下或在24℃或约24℃下孵育。

[0735] 95.如实施方案66至94中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂孵育15分钟至2小时、或15分钟至1.5小时之间。

[0736] 96.如实施方案66至95中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂孵育15分钟至2小时、或25分钟至1小时之间(各含上下限值)。

[0737] 97.如实施方案66至96中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素分子及巯基化剂孵育1小时或约1小时。

[0738] 98.如实施方案66至97中任一项的方法,其中第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化剂孵育25分钟或约25分钟。

[0739] 99.如实施方案65至98中任一项的方法,其中孵育期间的多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在1:X的摩尔比下,其中X为每一链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的分子可用于巯基化的赖氨酸残基的数目。

[0740] 100.如实施方案65至99中任一项的方法,其中该摩尔比为1:1至1:8、或1:2至1:6,可选为1:4或为大约1:4。

[0741] 101.如实施方案65至100中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在6.8与7.5之间(含上下限值)的pH下孵育。

[0742] 102.如实施方案65至101中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在7.0与7.4之间(含上下限值)的pH下孵育。

[0743] 103.如实施方案65至102中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在7.2或约7.2的pH下孵育。

[0744] 104.如实施方案65至103中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子在4℃与39℃之间(含上下限值)的温度下孵育。

[0745] 105.如实施方案65至104中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在室温下,可选在20℃与25℃之间(含上下限值),可选在23℃或约23℃下或在24℃或约24℃下孵育。

[0746] 106.如实施方案65至105中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素分子及多个巯基化的链霉亲和素分子孵育15分钟至6小时、或30分钟至2小时之间(各含上下限值)。

[0747] 107.如实施方案65至106中任一项的方法,其中多个活化的链霉亲和素分子及多个巯基化的链霉亲和素分子孵育45分钟至1.5小时之间(含上下限值),可选孵育1小时或约1小时。

[0748] 108.如实施方案65至107中任一项的方法,其中孵育活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是通过使这些分子与N-乙基马来酰亚胺(NEM)接触而结束。

[0749] 109.如实施方案68至108中任一项的方法,其中将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育的至少一部分与将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育的至少一部分同时分开地进行。

[0750] 110.如实施方案109的方法,其中将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与活化剂一起孵育及将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与巯基化剂一起孵育持续基本上相同的时间量进行和/或在基本上相同的时间完成。

[0751] 111.如实施方案68至110中任一项的方法,其中在孵育巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子之前,该方法包含:

[0752] (i) 自包含活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除活化剂;和/或

[0753] (ii) 自包含巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除巯基化剂。

[0754] 112.如实施方案68至111中任一项的方法,其中孵育多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子及多个巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子是在将第二多个链霉亲和素分子与巯基化剂一起孵育结束之后和/或在自包含巯基化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的组合物移除巯基化剂之后15分钟内起始。

[0755] 113.一种用于产生寡聚粒子试剂的方法,其包含:

[0756] 将第一多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与6-[(β -马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)在7.2或约7.2的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生多个包含马来酰亚胺巯基反应性官能团的活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子;

[0757] 将第二多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与2-亚氨基硫杂环戊烷在7.5与8.5之间(含上下限值)的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生多个包含一个或多个巯基官能团的巯基化的链霉亲和素分子;及

[0758] 将多个活化的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与多个巯基化的链霉亲和素分子在7.2或约7.2的pH下一起孵育1小时或约1小时,由此产生包含寡聚粒子试剂的粒子组合物;

[0759] 其中将多个活化的链霉亲和素分子与多个巯基化的链霉亲和素分子一起孵育在将第二多个链霉亲和素分子与2-亚氨基硫杂环戊烷一起孵育结束之后10分钟内起始。

[0760] 114.如实施方案68至113中任一项的方法,其中该方法进一步包含使寡聚粒子试剂与稳定剂接触。

[0761] 115.如实施方案65至67或114中任一项的方法,其中稳定剂减少存在于寡聚粒子试剂的赖氨酸残基上的N-取代的亚氨基硫杂环戊烷的量。

[0762] 116.如实施方案65至67或114至115中任一项的方法,其中稳定剂将存在于寡聚粒子试剂的赖氨酸残基上的N-取代的亚氨基硫杂环戊烷的量减少了至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%。

- [0763] 117. 如实施方案65至67及114至116中任一项的方法,其中稳定剂包含羟胺。
- [0764] 118. 如实施方案65至67及114至117中任一项的方法,其中稳定剂是通过层析可选通过尺寸排阻层析(SEC)自寡聚粒子试剂移除的。
- [0765] 119. 如实施方案65至118中任一项的方法,其中寡聚粒子试剂的半径小于150nm。
- [0766] 120. 如实施方案65至119中任一项的方法,其进一步包含对寡聚粒子试剂进行过滤灭菌。
- [0767] 121. 如实施方案65至67及69至120中任一项的方法,其中寡聚粒子试剂是通过尺寸排阻层析与单体或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子分离的。
- [0768] 122. 如实施方案113的方法,其中尺寸排阻极限大于或大于约100kDa、500kDa、750kDa、1000kDa或2000kDa。
- [0769] 123. 如实施方案121或实施方案122的方法,其中尺寸排阻极限为或为约500kDa至1000kDa。
- [0770] 124. 如实施方案121至123中任一项的方法,其中尺寸排阻极限为或为约75kDa。
- [0771] 125. 如实施方案65至67及69至124中任一项的方法,其包含收集一个或多个包含空隙体积的级分,由此将寡聚粒子试剂与单体或较小寡聚链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子分离。
- [0772] 126. 如实施方案65至125中任一项的方法,其进一步包含将寡聚粒子试剂储存于大约或低于4°C、大约或低于-20°C或大约或低于-80°C的温度下。
- [0773] 127. 如实施方案65至126中任一项的方法,其进一步包含在将一种或多种剂可逆地结合至寡聚粒子试剂的条件下混合寡聚粒子试剂与一种或多种剂。
- [0774] 128. 一种寡聚粒子试剂,其由实施方案65至127中任一项所述的方法产生。
- [0775] 129. 一种将一种或多种剂多聚化至寡聚粒子试剂的方法,该方法包含在将一种或多种剂可逆地结合至寡聚粒子试剂的条件下将权利要求1至49中任一项的寡聚粒子试剂、权利要求50至64中任一项的包含寡聚粒子试剂的组合物,或通过实施方案65至128中任一项的方法产生的寡聚粒子试剂与一种或多种剂混合。
- [0776] 130. 如实施方案127或实施方案129的方法,其中一种或多种剂包含结合伴侣,其中结合伴侣能够结合至寡聚粒子试剂上的一个或多个结合位点。
- [0777] 131. 如实施方案130的方法,其中结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。
- [0778] 132. 如实施方案130或实施方案131的方法,其中该结合伴侣包含选自以下组成的组的链霉亲和素结合肽: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。
- [0779] 133. 如实施方案130至132中任一项的方法,其中一种或多种剂结合或能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。
- [0780] 134. 如实施方案130至133中任一项的方法,其中一种或多种剂包含抗体或其抗原结合片段。
- [0781] 135. 如实施方案134的方法,其中一种或多种剂为或包含单价抗体片段。

- [0782] 136. 如实施方案134或实施方案135的方法,其中一种或多种剂为或包含Fab。
- [0783] 137. 如实施方案130至136中任一项的方法,其中一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的受体的受体结合剂。
- [0784] 138. 如实施方案137的方法,其中受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上的分子的刺激剂,其中结合诱导或调节靶细胞中的信号。
- [0785] 139. 如实施方案137或实施方案138的方法,其中靶细胞为免疫细胞。
- [0786] 140. 如实施方案137至139中任一项的方法,其中靶细胞为T细胞。
- [0787] 141. 如实施方案137至140中任一项的方法,其中受体结合剂能够在T细胞中起始TCR/CD3复合物相关的信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。
- [0788] 142. 如实施方案141的方法,其中刺激剂为第一受体结合剂,且该方法进一步包含将第二受体结合剂可逆地结合至寡聚粒子试剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子可选地能够诱导或调节靶细胞中的信号。
- [0789] 143. 如实施方案142的方法,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。
- [0790] 144. 如实施方案142或实施方案143的方法,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子,且共刺激分子为CD28。
- [0791] 145. 如实施方案127及129至144中任一项的方法,其中一种或多种剂为抗CD3抗体及抗CD28抗体,可选地为抗CD3 Fab及抗CD28 Fab。
- [0792] 146. 如实施方案137或实施方案138的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。
- [0793] 147. 如实施方案137、138、143或144中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激分子或辅助分子,且共刺激分子或辅助分子选自CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。
- [0794] 148. 如实施方案137、138、143或144中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2。
- [0795] 149. 如实施方案137、138、143或144中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体,且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4。
- [0796] 150. 如实施方案137、138、143或144中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子,且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。
- [0797] 151. 如实施方案150的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中
- [0798] 配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2;和/或

[0799] 配体选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17及TNF,或为其生物学活性片段。

[0800] 152.如实施方案151的寡聚粒子试剂,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体,其中配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1 CXCR3及CXCR4的趋化因子受体;或

[0801] 配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21及CCL25或为其生物学活性片段。

[0802] 153.如实施方案137、138、143或144中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为黏附分子且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)及CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。

[0803] 154.如实施方案127至153中任一项的方法,其中一种或多种剂包含选择剂,其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。

[0804] 155.如实施方案154的方法,其中靶细胞为免疫细胞。

[0805] 157.如实施方案154或实施方案155的方法,其中靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。

[0806] 158.如实施方案154至156中任一项的方法,其中靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。

[0807] 159.如实施方案154至158中任一项的方法,其中靶细胞为T细胞。

[0808] 160.如实施方案154至159中任一项的方法,其中选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0809] 161.一种组合物,其包含通过实施方案65至160中任一项所述的方法产生的寡聚粒子试剂。

[0810] 162.一种组合物,其包含多种通过实施方案65至161中任一项的方法产生的寡聚粒子试剂。

[0811] 163.一种制品,其包含实施方案1至49中任一项所述的寡聚粒子试剂或实施方案50至64或161至162中任一项所述的组合物。

[0812] 164.一种用于调节细胞的方法,该方法包含在实施方案1至49中任一项的寡聚粒子试剂存在下或在如实施方案50至64或161至163中任一项的组合物存在下孵育包含靶细胞的细胞组合物,由此调节靶细胞。

[0813] 165.如实施方案164的方法,其中调节靶细胞包含活化、富集和/或扩增靶细胞。

[0814] 166.一种用于培养细胞的方法,该方法包含在实施方案1至49中任一项的寡聚粒子试剂存在下或在实施方案50至64或161至163中任一项的组合物存在下孵育包含靶细胞的细胞组合物。

[0815] 167.如实施方案164至166中任一项的方法,其中寡聚粒子试剂可逆地结合至一种或多种剂。

[0816] 168.如实施方案167的方法,其中一种或多种剂包含结合伴侣,其中结合伴侣能够结合至寡聚粒子试剂上的一个或多个结合位点,由此将一种或多种剂可逆地结合至寡聚粒子试剂。

[0817] 169.如实施方案168的方法,其中结合伴侣包含链霉亲和素结合肽。

[0818] 170.如实施方案168或169的方法,其中结合伴侣包含选自以下组成的组的链霉

亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0819] 171. 如实施方案167至170中任一项的方法,其中一种或多种剂结合或能够结合至表达于靶细胞表面上的分子。

[0820] 172. 如实施方案167至171中任一项的方法,其中一种或多种剂包含抗体,可选为Fab。

[0821] 173. 如实施方案167至172中任一项的方法,其中一种或多种剂为结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的受体的受体结合剂。

[0822] 174. 如实施方案173的方法,其中受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上的分子由此诱导或调节靶细胞中的信号的刺激剂。

[0823] 175. 如实施方案173或实施方案174的方法,其中受体结合剂能够在T细胞中起始TCR/CD3复合物相关的信号,结合至TCR/CD3复合物的成员;和/或特异性结合至CD3。

[0824] 176. 如实施方案175的方法,其中刺激剂为第一受体结合剂,且该方法进一步包含将第二受体结合剂可逆地结合至寡聚粒子试剂,其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子,该结合至第二分子可选能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0825] 177. 如实施方案176的方法,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0826] 178. 如实施方案176或177的方法,其中受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0827] 179. 如实施方案174、175、177或178中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)结合至共刺激分子或辅助分子且共刺激分子或辅助分子选自CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。

[0828] 180. 如实施方案174、175、177或178中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至细胞因子受体,且细胞因子受体选自IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2。

[0829] 181. 如实施方案174、175、177或178中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)特异性结合至趋化因子受体,且趋化因子受体选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4。

[0830] 182. 如实施方案174、175、177或178中任一项的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为诱导细胞因子或趋化因子产生的因子,且该因子为特异性结合至细胞因子或趋化因子受体的配体。

[0831] 183. 如实施方案182的方法,其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至细胞因子受体的配体,其中

[0832] 配体特异性结合IL-2R、IL-1R、IL-15R、IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、I型IFNR、

IL-12R、IL-15R、IL-17R、TNFR1及TNFR2；和/或

[0833] 配体选自IL-2、IL-1、IL-15、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17及TNF，或为其生物学活性片段。

[0834] 184.如实施方案183的方法，其中受体结合剂(第二受体结合剂)为特异性结合至趋化因子受体的配体，其中

[0835] 配体特异性结合至选自CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7、CCR9、CXCR1、CXCR3及CXCR4的趋化因子受体；或

[0836] 配体选自CXCL9、CXCL10、CCL19、CCL21及CCL25或为其生物学活性片段。

[0837] 185.如实施方案174、175、177或178中任一项的方法，其中受体结合剂(第二受体结合剂)为黏附分子且黏附分子选自CD44、CD31、CD18/CD11a(LFA-1)、CD29、CD54(ICAM-1)、CD62L(L-选择素)及CD29/CD49d(VLA-4)、CD106(VCAM-1)或为其生物学活性片段。

[0838] 186.如实施方案164至185中任一项的方法，其中一种或多种剂包含选择剂，其中选择剂结合至或能够结合至表达于靶细胞表面上的选择标记物。

[0839] 187.如实施方案186的方法，其中靶细胞为免疫细胞。

[0840] 188.如实施方案186或实施方案187的方法，其中靶细胞为淋巴细胞或抗原呈递细胞。

[0841] 189.如实施方案186至188中任一项的方法，其中靶细胞为T细胞、B细胞、NK细胞、巨噬细胞或树突细胞。

[0842] 190.如实施方案186至189中任一项的方法，其中靶细胞为T细胞。

[0843] 191.如实施方案186至190中任一项的方法，其中选择标记物为CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0844] 192.如实施方案186至191中任一项的方法，其中靶细胞包含血细胞、白细胞、淋巴细胞、B细胞、B细胞群体、T细胞、T细胞群体、NK细胞、树突细胞和/或巨噬细胞。

[0845] 193.如实施方案186至192中任一项的方法，其中靶细胞表达重组受体。

[0846] 194.如实施方案186至193中任一项的方法，其中靶细胞表达重组T细胞受体和/或嵌合抗原受体(CAR)。

[0847] 195.如实施方案186至194中任一项的方法，其中靶细胞表达结合至与疾病和/或癌症相关的抗原的CAR。

[0848] 196.如实施方案195的方法，其中抗原为 $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 整合素($\alpha\text{v}\beta\text{6}$ 整合素)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,还称为asCAIX或G250)、一种癌症-睾丸抗原-癌症/睾丸抗原1B(CTAG,还称为NY-ESO-1及LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、一种细胞周期蛋白-细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短表皮生长因子蛋白(tEGFR)、III型表皮成长因子受体突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、ephrinB2、肾上腺素受体A2(EPha2)、雌激素受体、Fc受体样5(FCRL5;还称为Fc受体同系物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、胎儿乙酰胆碱受体、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erbB2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人类高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、B型肝炎表面抗原、人类白细胞抗原A1(HLA-AI)、

人类白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22Ra)、IL-13受体 α 2 (IL-13Ra2)、激酶插入域受体 (kdr)、 κ 轻链、L1细胞黏附分子 (L1CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有8个家族成员A的富含亮氨酸的重复序列 (LRRC8A)、路易斯Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、间皮素、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、黏蛋白1 (MUC1)、MUC16、自然杀手第2组成员D (NKG2D) 配体、melan A (MART-1)、神经细胞黏附分子 (NCAM)、癌胚抗原、黑色素瘤的优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原-前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活素、滋养层糖蛋白 (TPBG, 还称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、威尔姆氏肿瘤1 (WT-1) 或病原体特异性抗原。

[0849] 197. 如实施方案186至196中任一项的方法, 其进一步包含破坏一种或多种剂与寡聚粒子试剂之间的可逆结合。

[0850] 198. 如实施方案197的方法, 其中该破坏包含向靶细胞中引入包含能够逆转一种或多种剂与寡聚粒子试剂之间的结合的物质组合物。

[0851] 199. 如实施方案198的方法, 其中该物质为游离的结合伴侣和/或为竞争剂。

[0852] 200. 如实施方案197至199中任一项的方法, 其中该破坏终止或减少靶细胞中可选T细胞中由一种或多种剂诱导或调节的信号。

[0853] 201. 如实施方案197至200中任一项的方法, 其中该物质包含链霉亲和素结合肽、生物素或生物学活性片段, 可选为D-生物素或生物素类似物或生物学活性片段。

[0854] 202. 如实施方案201的方法, 其中该物质为选自以下组成的组的链霉亲和素结合肽: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 及 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0855] 203. 如实施方案197至202中任一项的方法, 其中该破坏是在该孵育起始之后5天内进行。

[0856] 204. 如实施方案164至203中任一项的方法, 其中一种或多种受体结合剂为或包含抗体或其抗原结合片段。

[0857] 205. 如实施方案204的方法, 其中一种或多种受体结合剂为或包含单价抗体片段。

[0858] 206. 如实施方案204或实施方案205的方法, 其中一种或多种剂为或包含Fab。

[0859] 207. 如实施方案164至206中任一项的方法, 其中靶细胞为免疫细胞。

[0860] 208. 如实施方案164至207中任一项的方法, 其中靶细胞为T细胞。

[0861] 209. 如实施方案176至208中任一项的方法, 其中受体结合剂为或包含能够结合至靶细胞表面上的分子的刺激剂, 其中结合诱导或调节靶细胞中的信号。

[0862] 210. 如权利要求176至209中任一项的方法, 其中受体结合剂能够在T细胞中起始TCR/CD3复合物相关的信号, 结合至TCR/CD3复合物的成员; 和/或特异性结合至CD3。

[0863] 211. 如权利要求209或权利要求210的方法, 其中刺激剂为第一受体结合剂, 且寡聚粒子试剂包含第二受体结合剂, 其中第二受体结合剂能够特异性结合至靶细胞表面上的第二分子, 其中结合至第二分子可选地能够诱导或调节靶细胞中的信号。

[0864] 212. 如权利要求211的方法,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子、辅助分子、免疫检查点分子,为TNF家族成员或TNF家族受体、细胞因子受体、趋化因子受体,或为或包含黏附分子或诱发细胞因子产生、趋化因子产生和/或黏附分子表达的因子。

[0865] 213. 如权利要求211或权利要求212的方法,其中第二受体结合剂特异性结合至共刺激分子且共刺激分子为CD28。

[0866] 214. 如权利要求176至213中任一项的方法,其中一种或多种剂为抗CD3抗体及抗CD28抗体,可选为抗CD3 Fab及抗CD28 Fab。

[0867] VIII. 实例

[0868] 包括以下实例仅为达成说明的目的,且不意欲限制本发明的范畴。

[0869] 实施例1:用于制备包含链霉亲和素突变蛋白的寡聚试剂的方法

[0870] 寡聚试剂是通过聚合称为**STREP-TACTIN® M2**的例示性链霉亲和素突变蛋白(含有SEQ ID NO:61中所示的突变蛋白氨基酸序列的链霉亲和素同源四聚体,参见例如美国专利第6,103,493号以及Voss及Skerra (1997) *Protein Eng.*, 1:975-982) 制备。为了制备用于寡聚化的链霉亲和素突变蛋白,含有一个或多个反应性巯基的链霉亲和素突变蛋白与马来酰亚胺活化的链霉亲和素突变蛋白一起孵育。为了制备巯基化的链霉亲和素突变蛋白,约100mg的链霉亲和素突变蛋白四聚体通过与2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐在1:100的摩尔比下在约8.5的pH下在24℃下持续1小时以2.6mL总体积在100mM硼酸盐缓冲液中一起孵育而巯基化。关于引入马来酰亚胺的活化反应,约400mg的链霉亲和素突变蛋白四聚体与6-[(β-马来酰亚胺基丙酰胺基)己酸琥珀酰亚胺酯(SMPH)在1:2的摩尔比下在约7.2的pH值下在24℃下持续1小时以约10.4mL的总体积在磷酸钠缓冲液中一起孵育。巯基化及马来酰亚胺活化反应经协调以在大约相同时间开始,且反应的持续时间经控制。

[0871] 在反应之后,未与**STREP-TACTIN® M2**反应的2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐及SMPH连同低分子量反应副产物(主要为NHS)是通过用PD-10去盐柱(GE Healthcare)个别地进行样品的凝胶过滤而自样品移除。对于各2.5mL体积的样品,PD-10柱(8.3ml床体积)经平衡且负载有巯基化突变蛋白链霉亲和素或马来酰亚胺突变蛋白链霉亲和素且通过添加3.5mL偶合缓冲液(100mM NaH₂P₄, 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.2)进行洗脱。在4个柱上进行马来酰亚胺突变蛋白链霉亲和素的凝胶过滤以占>10mL体积且汇合洗脱液。小心地控制活化及巯基化反应的时序以及活化及巯基化反应结束与寡聚反应开始之间的时序。一般而言,使得自凝胶过滤开始即活化及巯基化反应结束至寡聚反应起始经过十分钟或大致十分钟。

[0872] 关于寡聚,马来酰亚胺链霉亲和素突变蛋白及巯基化的链霉亲和素突变蛋白样品接着组合为约17.5mL的总体积且在pH 7.2下在24℃下在约600rpm的搅拌条件下孵育1小时。由于相较于与2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐孵育,四倍的链霉亲和素突变蛋白与SMPH一起孵育,因此在寡聚反应期间的巯基化的链霉亲和素突变蛋白与马来酰亚胺链霉亲和素突变蛋白的摩尔比为1:4。在反应之后,寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的剩余的SH基团通过在24℃下在搅拌(约600rpm)下与N-乙基马来酰亚胺(NEM)一起孵育15min,接着在4℃下再孵育16-20小时而被饱和。

[0873] 在与NEM一起孵育之后,含有寡聚的Strep-Tactin突变蛋白的样品经离心且经由0.45μm膜(获自Merck Millipore的Millex-HP 0.45μm)过滤上清液。过滤的溶液接着负载

至柱 (Sephacryl S-300HR HiPrep 26/60, GE Healthcare) 上以通过 AKTA Explorer 层析系统 (GE Healthcare) 进行尺寸排阻层析 (SEC)。汇合在收集结束时毫吸收单位 (mAU) 大于或等于 1500mAU 的级分。

[0874] 含有寡聚链霉亲和素突变蛋白的汇合的样品通过在室温下添加 890mM pH 6.35 持续 15 分钟而用 100mM 羟胺处理。为了在处理后将羟胺去除, 将样品负载至经 100mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、1mM EDTA, pH 7.2 平衡的 PD10 柱 (2.5mL/柱) 上且用 3.5mL 的相同缓冲液 (100mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.2) 洗脱。PD10 洗脱液经汇合且用 0.45 μ m 过滤器, 接着用 0.22 μ m 过滤器无菌过滤, 且接着将样品冷冻及储存于 -80°C 下。在冷冻之前, 测量寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的最终浓度, 且通过动态光散射 (DLS) 测定寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的尺寸。

[0875] 为了评估寡聚方法的同一性, 使用上文所述的方法自五个不同批次的链霉亲和素突变蛋白 (SAM) 制备 10 份寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂。评估寡聚物的平均尺寸、产率 % (通过在不基线校正的情况下于 280nm 处测量吸光度而测定) 及活性 (生物素结合) 且结果显示于表 E1 中。结果指示所得寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的这些参数是一致的, 其中平均半径为 97nm $\pm$ 10nm 且生物素结合为 40nmol/mg $\pm$ 3nmol/mg。

[0876] 表 E1: 比较来自不同批次的寡聚 STREP-TACTIN。

	SAM 批次	半径(nm)	产率(%)	生物素结合 (nmol/mg)
[0877]	批次 1	92	74	41
	批次 2	100	68	40
	批次 3	106	82	37
	批次 4	94	73	39
	批次 5	87	79	41
	批次 6	90	81	39
	批次 7	97	84	43
	批次 8	97	76	43
	批次 9	102	85	42
	批次 10	87	63	42

[0878] 如上文所述产生的三种寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的平均分子量 (MW) 是通过以 HPLC 系统 (AGILENT 1100 及 Wyatt ECLIPSE DUALTEC) 进行的非对称流场流分离 (AF4) 与 UV 检测 (与 MALLS DAWN HELEOS (Wyatt) 耦接的 Agilent UV 检测器) 来测量。通过 AF4 的测量允许假设链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均分子量为 52,500g/mol (52.5kDa) 而计算每个寡聚试剂中的链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均数目 (表 E2)。

[0879] 表 E2: 寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的尺寸及分子量

[0880]	半径(nm)	MW (g/mol)	四聚体的数目
	102	1.65×10^8	3150
[0881]	82	1.08×10^8	2050
	92	1.26×10^8	2280

[0882] 实施例2:评估影响链霉亲和素突变蛋白试剂的寡聚化的参数

[0883] 评估描述于实施例1中的方法中的各种参数,以评估该程序的不同方面对产生寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的影响。

[0884] A.pH水平

[0885] 评估在不同pH下进行巯基化反应对寡聚物尺寸及产物产率的影响。亚氨基硫杂环戊烷以盐酸盐形式购买,且将其于pH 8.5的100mM硼酸盐缓冲液中溶解至100mg/mL的浓度,诱发pH下降 ± 0.7 单位至pH 7.8。当使用较低强度,即25mM的硼酸盐缓冲液时,添加亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐至100mg/mL的浓度,诱发1.6单位的较大pH下降至pH 6.9。通过在pH 7.5、pH 8.5及pH 9.5的25mM硼酸盐缓冲液中以1:100的摩尔比孵育100mg链霉亲和素突变蛋白与2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐而在不同pH下进行巯基化反应。巯基化的链霉亲和素突变蛋白与马来酰亚胺活化的链霉亲和素突变蛋白组合,且寡聚方法是基本上如实施例1中所述地进行。如表E3中所示,降低用于巯基化反应的硼酸盐缓冲液的pH导致寡聚物尺寸及产率减小,而增加pH导致尺寸及产率增加。在pH 9.5条件下的实验期间出现材料的无意损失,其导致产率降低。表E3中圆括号中的值反映未出现损失的计算产率。

[0886] 表E3:在不同pH下进行巯基化之后的STREP-TACTIN寡聚物尺寸及产率

[0887]	巯基化反应pH	半径 (nm)	产率 (%)
	pH 7.5	14	6
	pH 8.5	40	48
	pH 9.5	52	14 (62)

[0888] 为了评估较强缓冲液(即100mM硼酸盐缓冲液相较于25mM)最终以最终反应混合物中的pH增加)是否改变反应动力学,如实施例1中所述地进行亚氨基硫杂环戊烷活化反应。通过Ellman试剂在反应期间的多个时间点处测定净巯基官能团含量。100mM硼酸盐缓冲液中的反应速度描绘于图1中,且观测为相较于当在25mM硼酸盐缓冲液中进行反应时更快且引入更多SH基团。相较于在25mM硼酸盐缓冲液中进行反应时的50与150分钟之间,亚氨基硫杂环戊烷活化反应在100mM硼酸盐缓冲液中早在反应起始之后25分钟开始达到巯基官能团的峰值浓度,这是当使用100mM缓冲液而非25mM缓冲液时发生反应的较高最终pH的结果。

[0889] 还评估了pH对寡聚方法的其他步骤的影响。使用不同pH(pH 8.3及8.5)的反应缓冲液(25mM硼酸盐)和使用不同pH(pH 7.0及7.2)的偶联缓冲液(100mM磷酸盐)进行寡聚反应。相较于在较低pH(7.0而非7.3)下进行活化或偶联反应,在较低pH(8.3而非8.5)下进行巯基化反应对寡聚物尺寸具有更大影响。然而,相较于在pH 7.2下进行反应,在pH 7.0下进行活化反应或偶联反应确实减小寡聚物尺寸。

[0890] B.时序及pH对巯基化反应的影响

[0891] 对亚氨基硫杂环戊烷活化(巯基化)的链霉亲和素突变蛋白进行分析以确定巯基官能团的衰减是否归因于二硫化物形成(其不能与马来酰亚胺反应)或向N-取代的亚氨基硫杂环戊烷的异构化。

[0892] 在一个实验中,通过在与亚氨基硫杂环戊烷的巯基化反应之后在412nm处测量吸光度而用Ellman试剂在不同时间点处检测净巯基官能团含量。反应是使用起始pH为8.3或8.5的25mM硼酸盐缓冲液进行,尽管反应期间的实际pH略微低于7。如图2中所示,巯基官能团含量在50与150分钟之间达到最大值(使用pH 8.5较早且pH 8.3较晚)且高度为pH依赖性的(相较于使用pH 8.3,使用pH 8.5更高)。在两种pH下的反应期间的链霉亲和素突变蛋白的巯基官能团含量均在3小时之后收敛,表明在3小时之后,使用较高pH 8.5产生的链霉亲和素突变蛋白包括更多的N-取代的亚氨基硫杂环戊烷。额外实验指示SH官能团的减少不受添加还原剂tris(2-羧乙基)膦(TCEP)的影响,若二硫化物形成为SH官能团减少的原因,则其已逆转。

[0893] 另外,链霉亲和素突变蛋白是通过使用25mM硼酸盐缓冲液在pH 8.3及8.5下与亚氨基硫杂环戊烷一起孵育10分钟、50分钟或390分钟而巯基化,且经由尺寸排阻层析(SEC),使用0.4mL/min流动速率,使用100mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、1mM EDTA, pH 7.0及使用Agilent Bio SEC-3 3 μ m300Å柱分析反应产物。为测定尺寸,采用分子量标准(在图3中通过158,000Da、44,000Da、17,000Da或1,350Da处的峰指示)。对SEC的分析显示于图3中,其中非活化的链霉亲和素突变蛋白四聚体由虚线显示。观测到非活化的突变蛋白四聚体具有最低滞留时间,而巯基化的样品迁移越小(与较小分子量一致),其与亚氨基硫杂环戊烷反应越久。与亚氨基硫杂环戊烷反应的样品的观测峰基本上尺寸一致且未观测到具有较低滞留时间的峰。因此,根据分析,可推断在与亚氨基硫杂环戊烷的延长反应期间未产生二聚体或更高阶的寡聚物,这在二硫化物形成的情况下应如此。

[0894] 为了评估时序对SH含量衰减的影响,评估在25mM硼酸盐缓冲液中的不同pH(pH 8.3、8.5或8.7)下,在链霉亲和素突变蛋白的1h或3h亚氨基硫杂环戊烷活化结束时的净巯基官能团含量。在反应及PD10凝胶过滤之后,通过在添加Ellman试剂5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸酯)(DTNB)之后测量412nm处的吸光度而测定SH含量。反应释放5-硫代-2-硝基苯甲酸酯离子TNB²⁻,其在412nm处具有吸收最大值。通过测量412nm处的吸光度增加且除以412nm处的TNB²⁻离子的摩尔消光系数,可计算分子的游离巯基含量。如图4中所示,尽管1小时反应之后的巯基官能团含量为pH依赖性的,在3h反应之后,pH对巯基官能团含量的极小影响为显而易见的。假设较长时间的活化反应可减小pH对巯基官能团含量的影响,且由此使得反应就pH依赖性尺寸变化而言更稳定,但还可增加N-取代的亚氨基硫杂环戊烷,其可为由再异构化所致的长期尺寸不稳定性的来源。

[0895] 为测量在不存在巯基形成的情况下的巯基官能团衰减,在巯基化反应结束之后即在移除亚氨基硫杂环戊烷试剂之后的若干时间点测量巯基官能团含量。在通过PD10凝胶过滤移除2-亚氨基硫杂环戊烷之后的各个时间处用Ellman试剂测量巯基化链霉亲和素的SH含量。如图5中所示,在反应结束之后10分钟检测到巯基官能团的5%衰减,在反应之后60分钟检测到26%衰减,且在反应之后120分钟处检测到巯基官能团的45%衰减。SH损失的半衰期计算为139min。这指示在亚氨基硫杂环戊烷及SMPH活化结束与多聚化反应起始之间使用

不同时间表的影响。

[0896] C. 链霉亲和素突变蛋白及SMPH的摩尔比

[0897] 为了评估SMPH活化反应中的SMPH及链霉亲和素突变蛋白浓度对链霉亲和素突变蛋白寡聚化的影响,以不同浓度(范围 $\pm 10\%$)的SMPH及链霉亲和素突变蛋白进行寡聚化程序。SMPH或链霉亲和素的浓度增加或减少百分之十导致链霉亲和素突变蛋白寡聚物尺寸的可检测差异。在一些方面中,推荐这些参数(Strep-Tactin及SMPH的浓度)的精确性应该比 $\pm 2\%$ 更好。

[0898] D. 寡聚物的稳定化

[0899] 来自巯基化的未反应的N-取代的亚氨基硫杂环戊烷可保留于赖氨酸残基上及链霉亲和素突变蛋白的游离N端处,且有助于寡聚物尺寸的合成后增加。为评估羟胺处理对合成后寡聚物生长的影响,如实施例1中所述地进行寡聚化程序,除了程序涉及与亚氨基硫杂环戊烷的1小时活化反应(样品1及2)或与亚氨基硫杂环戊烷的3.5小时活化反应(样品3及4)之外。另外,在这些研究中,在进行SEC之后,含有寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的样品接受在室温下在pH 6.35下用100mM羟胺(HA)处理15分钟(样品1及3)或不接受羟胺处理(样品2及4)。将样品分成储存于 -80°C 、 4°C 或 37°C 下的小份。在合成之后立即(第0天)及合成后1周、3周、及9周通过DLS来测量寡聚物尺寸。结果显示于表E4中。

[0900] 表E4: 储存温度及羟胺处理对合成后生长的影响

[0901]	样品	储存条件	在第0天的半径	1周后的半径	3周后的半径	9周后的半径	27周后的半径
	样品 1 +HA 1 hr Act	-80°C	89 nm	94 nm	93 nm	91 nm	91 nm
		4°C	89 nm	95 nm	95 nm	96 nm	100 nm
		37°C	89 nm	99 nm	108 nm	107 nm	114 nm
	样品 2 -HA 1 hr Act	-80°C	88 nm	93 nm	96 nm	94 nm	94 nm
		4°C	88 nm	97 nm	106 nm	106 nm	112 nm
		37°C	88 nm	115 nm	137 nm	178 nm	329 nm
	样品 3 +HA 3.5 hr Act	-80°C	94 nm	100 nm	98 nm	94 nm	92 nm
		4°C	94 nm	96 nm	98 nm	100 nm	102 nm
		37°C	94 nm	108 nm	121 nm	142 nm	249 nm
	样品 4 -HA 3.5 hr Act	-80°C	91 nm	98 nm	98 nm	96 nm	100 nm
		4°C	91 nm	111 nm	138 nm	157 nm	99 nm
		37°C	91 nm	148 nm	177 nm	265 nm	409 nm

[0902] 如表E4中所示,羟胺处理在储存于 4°C 及 37°C 的温度下期间减少寡聚物生长。观测到不管羟胺处理,尺寸在储存于 -80°C 下期间稳定。样品3及4经活化3.5小时且显示寡聚物的更显著合成后生长。不希望受理论所束缚,在一些方面中,3.5小时活化时间不如1小时活化时间对pH变化敏感(参见实例2B),但可产生较高含量的N-取代的亚氨基硫杂环戊烷。总

之,结果显示羟胺处理降低链霉亲和素突变蛋白寡聚物的合成后生长。数据还证实储存于-80°C增强寡聚物的稳定性。因此,在一些方面中,组合羟胺处理随后储存于-80°C的温度可提供增强的稳定性以维持一致尺寸,包括在延长储存期间。

[0903] 实施例3:产生含有可逆地结合至链霉亲和素突变蛋白寡聚物的寡聚化的抗CD3及抗CD28 Fab片段的可溶刺激剂。

[0904] 通过可逆地结合至如实施例1中所述产生的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂而多聚化刺激剂(抗CD3及抗CD28 Fab片段)。抗CD3及抗CD28 Fab片段经由融合至每个Fab片段的链霉亲和素肽结合伴侣而可逆地结合至链霉亲和素突变蛋白寡聚物。抗CD3 Fab片段衍生自通过杂交瘤细胞系OKT3(ATCC® CRL-8001™;还参见美国专利第4,361,549号)产生的CD3结合单克隆抗体,且含有Arakawa等人J.Biochem.120,657-662(1996)中所述的抗CD3抗体OKT3的重链可变域及轻链可变域。这些序列分别示于SEQ ID NO:31及32中。抗CD28 Fab片段衍生自抗体CD28.3(以GenBank登记号AF451974.1保藏为合成单链Fv构建体;还参见Vanhove等人,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页)且含有分别示于SEQ ID NO:33及34中的抗CD28抗体CD28.3的重链及轻链可变域。这两种Fab片段在它们的重链的羧基末端处单独地融合至链霉亲和素肽结合序列,该序列含有两个具有氨基酸序列SAWSHPQFEK(GGGS)2GGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16)的链霉亲和素结合模块的顺序排布。以重组方式产生肽标记的Fab片段(参见国际专利申请公开案第W0 2013/011011及W0 2013/124474号)。

[0905] 为进行可逆结合,将肽标记的抗CD3及抗CD28 Fab片段与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂在大约室温下混合,由此经由Fab片段上的双-strep标签之间的相互作用将它们可逆地结合至试剂,这些Fab片段上的双-strep标签为能够可逆地结合至试剂上的结合位点的结合伴侣。在一些情况下,肽标记的Fab片段在固定至寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂上之前预混,这在一些情况下可导致不同Fab分子的更均匀分布。

[0906] 实例4:可逆地结合至链霉亲和素突变蛋白寡聚物的寡聚化的抗CD3及抗CD28 Fab片段的活性评估

[0907] 对通过实施例1中描述的方法可逆地结合至来自表E1中所述的批次中的每一者的各种寡聚链霉亲和素试剂的抗CD3及抗CD28 Fab片段评估刺激T细胞的能力。这些寡聚链霉亲和素试剂的平均半径为约95nm。通过比色监测稳定四唑鎓盐WST-1裂解为可溶甲臞染料复合物来评估作为细胞增殖的指标的细胞代谢活性。

[0908] 来自三个不同供体的T细胞与可逆地结合于寡聚链霉亲和素试剂上的抗CD3/抗CD28多聚化Fab片段一起孵育。细胞还与平均半径为101(内部参考)或36nm的对照寡聚试剂一起孵育,这些对照寡聚试剂也可逆地结合至抗CD3/抗CD28 Fab片段。在孵育之后,将WST-1试剂施加至细胞且通过测量450nm处的吸光度作为读数来评估代谢活性水平。将结果标准化至被测定的培养物中的细胞的数目,且描绘为WST-1/细胞数目的比率。

[0909] 如图6B中所示,用测试试剂中的每一者刺激的T细胞的平均WST-1活性是相当的。此外,刺激程度对于所有测试试剂而言类似且与类似尺寸的内部参考试剂相当(一般在±2标准偏差内改变)。图6A显示对于各试剂描绘为独立数据点的WST-1活性。图6A及图6B指示使用多聚化于较小36nm寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂主链上的抗CD3/抗CD28 Fab,如通过WST-1活性观测的T细胞刺激较低。

[0910] 实例5:制备寡聚链霉亲和素突变蛋白的例示性方法。

[0911] 寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂是通过与描述于实施例1中的方法类似的具有一些修改的例示性方法产生的。具体地,在与NEM一起孵育之后,含有寡聚链霉亲和素突变蛋白的样品经离心且经由0.45 μ m膜过滤上清液。过滤的溶液接着在室温下用pH 6.35的100mM羟胺处理15分钟。样品接着负载至柱上以通过AKTA Explorer层析系统(GE Healthcare)进行尺寸排阻层析(SEC)。具有大于或等于1500mAU的毫吸光度单位(mAU)的级分经汇合且接着用0.45 μ m过滤器然后用0.22 μ m过滤器无菌过滤。寡聚链霉亲和素储存于-80 $^{\circ}$ C下。因此,不同于描述于实施例1中的方法,不另外进行基于PD-10的凝胶过滤。

[0912] 将通过该例示性方法产生的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的尺寸及稳定性与通过描述于实施例1中的方法产生的寡聚物进行比较。将寡聚物分成储存于-80 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下的小份。在合成之后立即(第0天)及合成后的各种时间点通过DLS来测量寡聚物尺寸。无论在SEC之后或在SEC之前移除羟胺,两种方法均产生尺寸及稳定性相当的寡聚物。如图11中所示,持续长至合成后46周储存于-80 $^{\circ}$ C或4 $^{\circ}$ C下的寡聚物显示小于10%的平均尺寸变化。储存于37 $^{\circ}$ C下的寡聚物在合成后9周内显示大致50%的尺寸增加。

[0913] 实例6:评估不同制造批次的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂

[0914] 评估由不同原料批次组成的不同批次的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂作为用嵌合抗原受体(CAR)对T细胞进行工程改造的方法的一部分。自个别批次的基本上如上文所述的STREP-TACTIN[®]M2产生三个离散寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂批次。将来自同一制造批次的含有融合的链霉亲和素肽结合伴侣的抗CD3及抗CD28 Fab可逆地结合至来自基本上如上文所述的各批次的个别链霉亲和素突变蛋白寡聚物。三个离散寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂批次的平均直径在100nm与109nm之间。

[0915] 三个个别批次的抗CD3/抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂用于刺激原代CD4⁺细胞及CD8⁺T细胞。CD4⁺细胞及CD8⁺T细胞个别地选自来自三个单独供体的单采血液成分法样品,随后以CD4⁺细胞与CD8⁺T细胞的指定比率组合所选细胞。组合的CD4⁺细胞及CD8⁺T细胞接着通过例示性工程改造方法用嵌合抗原受体(CAR)工程改造,该方法包括用大量抗CD3/抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂孵育细胞,用慢病毒转导,且接着培养以进行扩增。在扩增完成之前,将细胞用生物素处理以将抗CD3/抗CD28 Fab自链霉亲和素寡聚试剂解离。孵育、转导及培养条件对于所有测试批次的抗CD3/抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白试剂来说是相同的,且各批次针对三个供体样品中的每一者测试多达四次重复。为了监测工程改造的T细胞的转导效率,慢病毒通过过核糖体跳跃序列递送编码分离自截短受体的CAR的多核苷酸,用作检测CAR表达的替代标记物。

[0916] 定量例示性工程改造过程的各个阶段处的活细胞的总数目。在添加Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂之前(第0天)及该过程的不同天,用活力染色对细胞进行标记。如图12A及12B中所示,在工程改造过程的不同阶段处测量的活细胞的总数及活细胞的百分比在获自不同供体及使用不同批次的Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚试剂的细胞之间是一致的。

[0917] 在收集自例示性工程改造过程的细胞中测量转导效率。用对CD4、CD8及替代标记物具有特异性的抗体标记细胞,且通过流式细胞术进行分析。总活T细胞中的CAR⁺、CAR⁺CD4⁺、CAR⁺CD8⁺细胞百分比显示于图13中。转导效率在不同Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋

白试剂批次之间是一致的,且观测到的变化性主要取决于供体来源。

[0918] 还关于与记忆或耗尽表型相关的不同标记物检查工程改造CAR+T细胞。T细胞用对CD3、CD4、CD8及替代标记物具有特异性的抗体以及记忆相关标记物CCR7、CD27 CD28、CD45RA、CD45RO及CD62L或耗尽相关标记物CCR7、LAG3、PD-1及TIM3标记,且接着通过流式细胞术分析。针对记忆相关或耗尽相关标记物,未观测到染色的显著变化。进行根据记忆相关及耗尽相关表型标记物的主组分分析。衍生自累积数据比较、根据供体而非个别批次的Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂分离的集群与可在工程改造过程期间出现的试剂针对T细胞的记忆及耗尽相关表型的一致性是一致的。

[0919] 通过以StrepTactin-PE染色检测残余抗CD3及抗CD28 Fab或通过以特异于StrepTactin的抗体检测残余突变蛋白链霉亲和素而对于工程改造CAR+T细胞分析细胞表面上的残余Fab或突变蛋白链霉亲和素的存在。如图14中所示,小于1%的活T细胞对于Fab或突变蛋白链霉亲和素呈阳性。

[0920] 通过共培养工程改造的CAR+T细胞与表达CAR的靶抗原的经辐射的细胞来评估CAR依赖性抗原活性。在不存在经辐射的抗原表达细胞的情况下培养的T细胞充当阴性对照。在四小时的共培养之后,通过细胞内细胞因子染色(ICS)评估T细胞的细胞内IL-2、IFN- γ 及TNF- α ,对于指示CAR表达及CD3的替代标记物进行染色,且通过流式细胞术评估。在源自不同供体的CAR+CD3+T细胞中且在不同批次的Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂存在下产生的细胞中观测到类似百分比的对于IL-2、IFN- γ 及TNF- α 呈阳性的细胞,以及类似百分比的表达这些细胞因子中的两种或三种的细胞。

[0921] 在以5:1的效应细胞与靶细胞的比率共培养工程改造CAR+T细胞与表达CAR的靶抗原的靶细胞之后评估工程改造CAR+T细胞的溶细胞活性。将黏附靶细胞接种于电子微量滴定盘的孔中,且通过测量附接电极之间的电流阻抗来定量靶细胞数目。关于对照,单独或与T细胞一起培养靶细胞,该T细胞已在例示性工程改造过程期间用参考抗CD3/抗CD28抗体缀合的顺磁珠粒试剂孵育。如图15中所示,在测定中,CAR+T细胞证实有效的杀伤性。观测的溶细胞活性在获自不同个别供体的T细胞中及不同制造批次的Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂中是相当的。

[0922] 结合在一起,这些数据与通过所提供方法产生的Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的高度一致性是一致的。

[0923] 本发明不意欲限制在特定公开的实施方案的范围中,该实施方案被提供用于例如示例性说明本发明的各种方面。对所述组合物及方法的各种修改将由本文中的描述及教导而变得显而易见。这类变化形式可在不背离本发明的真正范围及精神的情况下加以实施且意图落入本发明的范围内。

[0924] 序列

[0925]

编号	序列	描述
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIV TAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYD SAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATT WSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW KSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素 物种：亲和素链霉菌 UniProt编号P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYE SAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALG WTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEA RINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTK VKPSAAS	最小链霉亲和素 物种：亲和素链霉菌
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGAD GALTGTYV TARG NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTA LGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种：亲和素链霉菌
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYV TARG NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNY RNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEAN AWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 物种：亲和素链霉菌
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGAD GALTGTY IGARG NAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTA LGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种：亲和素链霉菌
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGARGN AESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYR NAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANA WKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种：亲和素链霉菌
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	链霉亲和素结合肽

[0926]

		Strep-tag®
8	WSHPQFEK	Strep-tag® II
9	His-Pro-Baa	链霉亲和素结合肽 Baa是选自谷氨酰胺、天冬酰胺及甲硫氨酸
10	His-Pro-Gln-Phe	链霉亲和素结合肽
11	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	链霉亲和素结合肽 Oaa为Trp、Lys或Arg； Xaa为任何氨基酸； Yaa为Gly或Glu Zaa为Gly、Lys或Arg
12	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	链霉亲和素结合肽 Xaa为任何氨基酸； Yaa为Gly或Glu Zaa为Gly、Lys或Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉亲和素结合肽的序列模块 Xaa为任何氨基酸； n为8或12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉亲和素结合肽的序列模块 n为2或3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	双-Strep-标签
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK	双-Strep-标签
18	WSHPQFEKGGGSGGGSWHPQFEK	双-Strep-标签
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	双-Strep-标签
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-标签
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-标签

[0927]

22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-标签
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7表位
24	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	HSV表位
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc表位
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-标签
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGN AESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYR NAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENA GYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 及 Glu117、Gly120、Try121 (突变蛋白m1-9) 物种：亲和素链霉菌
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGAD GALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTA LGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 及 Glu117、Gly120、Try121 (突变蛋白m1-9) 物种：亲和素链霉菌
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYCAKN DPGTGFAYWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSSVVTY PSSSLGTQTY ICNVNHNKPSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQ FEK	Fab片段m13B8.2的可变重链
30	AMDIQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLLV HDAKTLAEGV PSRFSGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYTC QAHYGNPPTF	Fab片段m13B8.2的可变轻链

[0928]

	GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	抗CD3 抗体OKT3 的可 变重链
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3 抗体OKT3 的可 变轻链
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗CD28 抗体CD28.3 的 可变重链
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu	抗CD28 抗体CD28.3 的 可变轻链

[0929]

	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT标签
36	YNLDVVRGARSFSPPRAGRHFGRVQLQVGNG VIVGAPGEGNSTGSLYQCQSGTGHCLPVTLR GSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSR TCDQNTYLSGLCYLFRQNLQGPMQLQGRPGF QECIKGNVDLVFLFDGSMQLQDEFQKILDF MKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDF SDYVKRKDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAIN YVATEVFREELGARPDAKVLIIITDGEATDS GNIDAAKDIIRYIIIGIGKHFQTKESQETLHKFA SKPASEFVKILDTFEKLKDLFTLQKKIYVIE GTSKQDLTSFNMELSSSGISADLSRGHAVVG AVGAKDWAGGFLDLKADLQDDTFIGNEPLT PEVRAGYLGYYTVTWLPSRQKTSLLASGAPR YQHMGRVLLFQEPQGGGHWSQVQTIHGTQI GSYFGGELCGVDVDQDGETELLIGAPLFYQ EQRGGRVFIYQRRQLGFEEVSELQGDPGYPL GRFGAITALTDINGDGLVDVAVGAPLEEQ AVYIFNGRHGGLSPQPSQRIEGTQVLSGIQWF GRSIHGVKDLEGDGLADVAVGAESQMIVLSS RPVVDMMVTLMSFSPAEIPVHEVECSYSTSNK MKEGVNITICFQIKSLIPQFQGRLVANLTYTL QLDGHRTRRRGLFPGGRHELRRNIAVTTSMS CTDFSFHFPVCVQDLISPINVSLSNFWEEEG TPRDQRAQGKDIPPILRPSLHSETWEIPFEKN CGEDKKCEANLRVSFSPARSRALRLTAFASLS VELSLSNLEEDAYWVQLDLHFPPGLSFRKVE MLKPHSQIPVSCEELPEESRLLSRALSCNVSS PIFKAGHSVALQMMFNTLVNSSWGDSVELH ANVTCNNEDSDILEDNSATTIIPILYPINILIQD QEDSTLYVSFTPKGPKIHQVKHMYQVRIQPSI	LFA-1 α (智人)

[0930]

	HDHNIPTLEAVVGVPQPPSEGPITHQWSVQM EPPVPCHYEDLERLPDAAEPCLPGALFRCPV VFRQEILVQVIGTLELVGEIEASSMFSLCSSLS ISFNSSKHFFHLYGSNASLAQVVMKVDVVE KQMLYLYVLSGIGGLLLLLLIFIVLYKVGFFK RNLKEKMEAGRGPNGIPAEDSEQLASGQE AGDPGCLKPLHEKDSESGGGKD	
37	QECTKFKVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTG PGDPDSIRCDTRPQLLMRGCAADDIMDPTSL AETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAA FNVTFERRAKGYPIDLYYLMDSLYSMLDDL NVKKLGGDLLRALNEITESGRIGFGSFVDKT VLPFVNTHPKLRNPCPNKEKECQPPFAFRH VLKLTNNSNQFQTEVGKQLISGNLDAPEGGL DAMMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGF HFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNE FDYPSVGQLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKT YEKLTEIIPKSAVGELSEDSSNVVQLIKNAYN KLSSRVFLDHNALPDTLKVTYDSFCSNGVTH RNQPRGDCDGVQINVPITFQVKVTATECIQE QSFVIRALGFTDIVTVQVLPQCECRCRDQSR DRSLCHGKGFLECGICRCDTGYIGKNCECQT QGRSSQELEGSCRKDNNIICSGLGDCVCGQ CLCHTSDVPGKLIYGQYCECDTINCERYNGQ VCGGPGRGLCF CGKCRCHPGFEGSACQCER TTEGCLNPRRVECSGRGRCRCNVCECHSGY QLPLCQECPCSPCGKYISCAECLKFEKGPF GKNCSAACPGQLSNNPVKGRTCKERDSEG CWVAYTLEQQDGMDRYLIYVDESRECVAGP NIAAIVGGTVAGIVLIGILLVIWKALIHLSL REYRRFEKEKLKSQWNNDNPLFKSATTVM NPKFAES	LFA-1 β (智人)
38	DFLAHHGTDCWTYHYSEKPMNWQRARRFC RDNYTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPFSSYYWI GIRKIGGIWTWVGTKSLTEEAENWGDGEP	L-选择素 (智人)

[0931]

	NNKKNKEDCVEIYIKRNKDAGKWND DACH KLKAALCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYT CNC DVGYYGPQCQFVIQCEPLEAPELGTMD CTHPLGNFSFSSQCAFSCSEGTNLTGIEETTC GPFGNWSSPEPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCS HPLASFSFTSACTFICSEGTELIGKKKTICSS GIWSNPSPICQKLDKSFSMIKEGDYNPLFIPV AVMVTAFSGLAFIWLARRLKKGKSKRSM NDPY	
39	FKIETTPESRYLAQIGDSVSLTCSTTGCESPFF SWRTQIDSPLNGKVTNEGTTSTLTMPVVSFG NEHSYLCTATCESRKLEKGIQVEIYSF PKDPEI HLSGPLEAGKPITVKCSVADVYPFDRLEIDLL KGDHLMKSQEFLEDADRKSLET KSLEVTFTP VIEDIGKVLVCRAKLHIDEMDSVPTVRQAVK ELQVYISPKNTVISVNPSTKLQEGGSVTMTC SSEGLPAPEIFWSKKLDNGNLQHLSGNATLT LIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVELIV QEKPFTEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSVMGC ESPSFSWRTQIDSPLSGKVRSEG TNSTLTLS VSFENEHSYLCTVTCGHKKLEKGIQVELYSF PRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCKVPSVYPLD RLEIELLKGETILENIEFLED TDMKSLENKSL EMTFIPTIEDTGKALVCQAKLHIDDMEFEPK QRQSTQTLYVNVAPRDTTVLVSPSSILEEGSS VNMTCLSQGFPAPKILWSRQLPNGELQPLSE NATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKE VELIIQVTPKDIKLTAFPSESVKEGDTVIIISCTC GNVPETWIILKKKAETGDTVLSIDGAYTIR KAQLKDAGVYECESKNKVGSQ LRS LTLDVQ GRENNKDYFSPPELLVLYFASSLIIPAIGMIIYFA RKANMKGSYSLVEAQKSKV	VCAM-1 (智人)
40	YNVDTESALLYQGPHNTLFGYSVVLHSHGA NRWLLVGAPTANWLANASVINPGA IYRCRIG KNPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDN	VLA-4 (智人)

[0932]

	QWLGVTLSRQPGENGSIIVTCGHRWKNIFYIK NENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKRIAPCYQD YVKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPG SSYWTGSLFVYNITTNKYKAFLDKQNQVKF GSYLGYSVGAGHFRSQHTTEVVGGAPQHEQ IGKAYIFSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGAS VCAVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVF VYINSGSGAVMNAMETNLVGSDKYAARFGE SIVNLGDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIYI YNGRADGISSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSIG GQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRP VVIVDASLSHPESVNRKFDCEVNGWPSVCI DLTLCFSYKGKEVPGYIVLFYNMSLDVNRK AESPPRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCR THQAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPHVISK RSTEEFPPLQPILQQKKEKDIMKKTINFARFC AHENCSADLQVSAKIGFLKPHENKTYLAVGS MKTLMNLNVSLFNAGDDAYETTLHVKLVPVGL YFIKILEEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGY IYVDHLSRIDISFLLDVSSLSRAEEDLSITVHA TCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLKYEVKLTVH GFVNPTSFVYGSNDENEPETCMVEKMNLTF HVINTGNSMAPNVSVEIMVPNSFSPQTDKLF NILDVQTTTGECHFENYQRVCALEQQKSAM QTLKGIVRFLSKTDKRLLYCIKADPHCLNFL CNFGKMESGKEASVHIQLEGRPSILEMDETS ALKFEIRATGFPEPNPRVIELNKDENVAHVIL EGLHHQRPKRYFTIVISSLLLGLIVLLLISYV MWKAGFFKRQYKSILQEENRRDSWSYINSK SNDD	
41	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELK GSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT	IL-2

[0933]

42	HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKN TTEKETFCRAATVLRQFYSHHE KDTRCLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAG LNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIM REKYSKCSS	IL-4
43	DCDIEGKDGGKQYESVLMVSIQLLDSMKEIGSNCLN NEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAA RKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNCTGQV KGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLK EQKKLNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKHEH	IL-7
44	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTF FQMKDQLDNLLLKESILEDKGYL GCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLG ENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKA VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM KIRN	IL-10
45	GIHVFI LGCFSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQS MHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFILELQVISLESG DASIH DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIK EFLQSFVHIVQMFINTS	IL-15
46	GITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNP KRSSDY YNRSTSPWNLHRNEDPE RYP SVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEI LVLRRPPHCPNSFRLEKILVSVG CTCVTPIVHHVA	IL-17
47	TPVVRKGRCSCISTNQGTIHLQSLKDLKQFAPSPSCE KIEIATLKNQVQTCLNPDSADV KELIKKWEKQVSQKKKQKNGKKHQKKKVLKVRKS QRSRQKKT	CXCL9
48	VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRV EIIATMKKKGEKRCLNPESKA IKNLLKAVSKERSKRSP	CXCL10
49	GTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNHFYLLIKDGCRVP AVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVER	CCL19

[0934]

	IIQRLQRTSAKMKRRSS	
50	SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSI PAILFLPRKRSQAELCADPKELWV QQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGK GSKGCKRTERSQTPKGP	CCL21
51	QGVFEDCCLAYHYPIGWAVLRRRAWTYRIQEVSGSCN LPAAIFYLPKRHRKVCGNPKSREV QRAMKLLDARNKVFAKLHHNTQTFQAGPHAVKKL SSGNSKLSSSKFSNPISSSKRNVSL ISANSGL	CCL25
52	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	α CD16抗体3G8 VH
53	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	α CD16抗体3G8 VL
54	YNLDVRGARSFSPPRAGRHFYRVLQVGNG VIVGAPGEGNSTGSLYQCQSGTGHCLPVTLR GSNYTSKYLGMTLATDPTDGSILACDPGLSR TCDQNTYLSGLCYLFRQNLQGPMQLQGRPGF QECIKGNVDLVFLFDGSMQLQDEFQKILDF MKDVMKKLSNTSYQFAAVQFSTSYKTEFDF SDYVKKRDPDALLKHVKHMLLLTNTFGAIN YVATEVFREELGARPDATKVLIIITDGEATDS	LFA-1 α 细胞外域(ECD)

[0935]

	GNIDAAKDIIRYIIGIGKHFQTKESQETLHKFA SKPASEFVKILDTFEKLKDLFTTELQKKIYVIE GTSKQDLTSFNMELSSSGISADLSRGHAVVG AVGAKDWAGGFLDLKADLQDDTFIGNEPLT PEVRAGYLGYYTVTWLPSRQKTSLLASGAPR YQHMGRVLLFQEPQGGGHWSQVQTIHGTQI GSYFGGELCGVDVDQDGETELLLIGAPLFYG EQRGGRVFIYQRRQLGFEEVSELQGDPGYPL GRFGEAITALTDINGDGLVDVAVGAPLEEQG AVYIFNGRHGGLSPQPSQRIEGTQVLSGIQWF GRSIHGVKDLEGDGLADVAVGAESQMIVLSS RPVVDMMVTLMSPAEIPVHEVECSYSTSNK MKEGVNITICFQIKSLIPQFQGRLVANLTYTL QLDGHRTRRRGLFPGGRHELRRNIAVTTSMS CTDFSFHFPVCVQDLISPINVSLNFSWEEEG TPRDQRAQGKDIPPILRPSLHSETWEIPFEKN CGEDKKCEANLRVSFSPARSRALRLTAFASLS VELSLSNLEEDAYWVQLDLHFPPGLSFRKVE MLKPHSQIPVSCEELPEESRLLSRALSCNVSS PIFKAGHSVALQMMFNTLVNSSWGDSVELH ANVTCNNEDSDILEDNSATTIIPILYPINILIQD QEDSTLYVSFTPKGPKIHQVKHMYQVRIQPSI HDHNIPTLEAVVGVPQPPSEGPIHQWSVQM EPPVPCHYEDLERLPDAAEPCLPGALFRCPV VFRQEILVQVIGTLELVGEIEASSMFSLCSSLS ISFNSSKHFHLYGSNASLAQVVMKVDVVEE KQML	
55	QECTKFKVSSCRECIESGPGCTWCQKLNFTG PGDPDSIRCDTRPQLLMRGCAADDIMDPTSL AETQEDHNGGQKQLSPQKVTLYLRPGQAAA FNVTFERRAKGYPIDLYYLMDSLYSMLDDLRL NVKKLGGDLLRALNEITESGRIGFGSFVDKT VLPFVNTHPDKLRNPCPNKEKECQPPFAFRH VLKLTNNSNQFQTEVGKQLISGNLDAPEGGL DAMMQVAACPEEIGWRNVTRLLVFATDDGF	LFA-1 β 细胞外域(ECD)

[0936]

	HFAGDGKLGAILTPNDGRCHLEDNLYKRSNE FDYPSVGQLAHKLAENNIQPIFAVTSRMVKT YEKLTEIIPKSAVGELSESSNVVQLIKNAYN KLSSRVFLDHNALPDTLKVTYDSFCSNGVTH RNQPRGDCDGVQINVPITFQVKVTATECIQE QSFVIRALGFTDIVTVQVLPQCECRCDQSR DRSLCHGKGFLECGICRCDTGYIGKNCECQT QGRSSQELEGSCRKDNNSIICSGLGDCVCGQ CLCHTSDVPGKLIYGQYCECDTINCERYNGQ VCGGPGRGLCF CGKCRCHPGFEGSACQCER TTEGCLNPRRVECSGRGRCRCNVCECHSGY QLPLCQECPGCPSPCGKYISCAECLKFEKGPF GKNCSAACPGQLSNNPVKGRTCKERDSEG CWVAYTLEQQDGM DRYLIYVDESRECVAGP N	
56	FKIETTPESRYLAQIGDSVSLTCSTTGCESPFF SWRTQIDSPLNGKVTNEGTTSTLTMPVVSFG NEHSYLCTATCESRKLEKGIQVEIYSFPKDPEI HLSGPLEAGKPITVKCSVADVYPFDRLEIDLL KGDHLMKSQEFLADADRKSLETKSLEVTFTP VIEDIGKVLVCRAKLHIDEMDSVPTVRQAVK ELQVYISPKNTVISVNPSTKLQEGGSVTMTC SSEGLPAPEIFWSKKLDNGNLQHLSGNATLT LIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVELIV QEKPFTEISPGPRIAAQIGDSVMLTCSVMGC ESPSFSWRTQIDSPLSGKVRSEG TNSTLTLS VSFENEHSYLCTVTCGHKKLEKGIQVELYSF PRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSCKVPSVYPLD RLEIELLKGETILENIEFLED TDMKSLENKSL EMTFIPTIEDTGKALVCQAKLHIDDMEFEPK QRQSTQTLYVNVAPRDTTVLVSPSSILEEGSS VNMTCLSQGFPAPKILWSRQLPNGELQPLSE NATLTLISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKE VELIIQVTPKDIKLTAFPSESVKEGDTVIIISCTC GNVPETWILKKKAETGDTVLSIDGAYTIR	VCAM-1 细胞外域 (ECD)

[0937]

	KAQLKDAGVYECESKNKVGSQRLSLTLDVQ GRENNKDYFSPE	
57	WTYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAI QNKAIEIEYLEKTLPSRSYYWIGIRKIGGIWT WVGTKSLTEEAENWGDGEPNNKKNKEDC VEIYIKRNDAGKWND DACHKLKAALCYT ASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGY GPQCQFVIQCEPLEAPELGTMDCTHPLGNFS FSSQCAFSCSEGTLNLTGIEETTCGPFGNWSSP EPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCSHPLASFSFT SACTFICSEGTELIGKKKTICESSGIWSNPSPIC QKLDKSFSMIKEGDYN	L- 选择素细胞外域 (ECD)
58	NVDTESALLYQGPHNTLFGYSVVLHSHGAN RWLLVGAPTANWLANASVINPGAIYRCRIGK NPGQTCEQLQLGSPNGEPCGKTCLEERDNQ WLGVTLSRQPGENGSIIVTCGHRWKNIFYIKN ENKLPTGGCYGVPPDLRTELSKRIAPCYQDY VKKFGENFASCQAGISSFYTKDLIVMGAPGS SYWTGSLFVYNITTNKYKAFLDKQNQVKFG SYLGYSVGAGHFERSQHTTEVVGGAPQHEQI GKAYIFSIDEKELNILHEMKGKKLGSYFGAS VCAVDLNADGFSDLLVGAPMQSTIREEGRVF VYINSGSGAVMNAME TNLVGSDKYAARFGE SIVNLGDIDNDGFEDVAIGAPQEDDLQGAIYI YNGRADGISSTFSQRIEGLQISKSLSMFGQSI GQIDADNNGYVDVAVGAFRSDSAVLLRTRP VVIVDASLSHPESVNRTKFDCVENGWPSVCI DLTLCFSYKGKEVPGYIVLFYNMSLDVNRK AESPPRFYFSSNGTSDVITGSIQVSSREANCR THQAFMRKDVRDILTPIQIEAAYHLGPHVISK RSTEEFPPLQPILQQKKEKDIMKKTINFARFC AHENC SADLQVSAKIGFLKPHENKTYLAVGS MKTMLNVS LFNAGDDAYETTLHVKL PVGL YFIKILELEEKQINCEVTDNSGVVQLDCSIGY IYVDHLSRIDISFLLDVSSLSRAEEDLSITVHA	VLA-4细胞外域(ECD)

[0938]

	TCENEEEMDNLKHSRVTVAIPLKYEVKLT VH GFVNPTSFVYGSNDENEPETCMVEKMNLTF HVINTGNSMAPNVSV EIMVPNSFSPQTDKLF NILDVQTTTGECHFENYQ RVCAL EQQKSAM QTLKGIVRFLSKTDKRLLYCIKADPHCLNFL CNFGKMESGKEASVHIQLEGRPSILEMDETS ALKFEIRATGFPEPNPRVIELNKDENV AHVIL EGLHHQRPKRYFT	
59	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTAL GWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGA E ARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFT KVKPSAAS	最小链霉亲和素 物种：亲和素链霉菌
60	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YVTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNN YRNAHSATTWSGQYVGGA E ARINTQWLLTSGTTEA NAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val44-Thr45-Ala46- Arg47 物种：亲和素链霉菌
61	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIGARGN AESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYR NAHSATTWSGQYVGGA E ARINTQWLLTSGTTEANA WKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46- Arg47 物种：亲和素链霉菌

[0001] 序列表
 [0002] <110> JUNO THERAPEUTICS GMBH
 [0003] SCHMIDT, Thomas
 [0004] STEMBERGER, Christian
 [0005] KOWSKI, Tom
 [0006] PRENTICE, Ken
 [0007] <120> 寡聚粒子试剂及其使用方法
 [0008] <130> 735042008540
 [0009] <140> 尚未分配
 [0010] <141> 同时并入
 [0011] <150> US 62/491,245
 [0012] <151> 2017-04-27
 [0013] <160> 61
 [0014] <170> PatentIn version 3.5
 [0015] <210> 1
 [0016] <211> 159
 [0017] <212> PRT
 [0018] <213> 阿维丁链霉菌(阿维丁链霉菌)
 [0019] <220>
 [0020] <221> misc_feature
 [0021] <223> 链霉亲和素
 [0022] <400> 1
 [0023] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 [0024] 1 5 10 15
 [0025] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 [0026] 20 25 30
 [0027] Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
 [0028] 35 40 45
 [0029] Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 [0030] 50 55 60
 [0031] Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 [0032] 65 70 75 80
 [0033] Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 [0034] 85 90 95
 [0035] Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 [0036] 100 105 110
 [0037] Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 [0038] 115 120 125

[0039] Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 [0040] 130 135 140
 [0041] Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 [0042] 145 150 155
 [0043] <210> 2
 [0044] <211> 126
 [0045] <212> PRT
 [0046] <213> 阿维丁链霉菌
 [0047] <220>
 [0048] <221> misc_feature
 [0049] <223> 最小链霉亲和素
 [0050] <400> 2
 [0051] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 [0052] 1 5 10 15
 [0053] Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser
 [0054] 20 25 30
 [0055] Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 [0056] 35 40 45
 [0057] Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 [0058] 50 55 60
 [0059] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 [0060] 65 70 75 80
 [0061] Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 [0062] 85 90 95
 [0063] Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 [0064] 100 105 110
 [0065] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [0066] 115 120 125
 [0067] <210> 3
 [0068] <211> 159
 [0069] <212> PRT
 [0070] <213> 阿维丁链霉菌
 [0071] <220>
 [0072] <221> misc_feature
 [0073] <223> 突变蛋白链霉亲和素Val44-Thr45-Ala46-Arg47
 [0074] <400> 3
 [0075] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 [0076] 1 5 10 15
 [0077] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

[0078]	20	25	30
[0079]	Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly		
[0080]	35	40	45
[0081]	Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro		
[0082]	50	55	60
[0083]	Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys		
[0084]	65	70	75
[0085]	Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr		
[0086]	85	90	95
[0087]	Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser		
[0088]	100	105	110
[0089]	Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp		
[0090]	115	120	125
[0091]	Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys		
[0092]	130	135	140
[0093]	Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln		
[0094]	145	150	155
[0095]	<210> 4		
[0096]	<211> 126		
[0097]	<212> PRT		
[0098]	<213> 阿维丁链霉菌		
[0099]	<220>		
[0100]	<221> misc_feature		
[0101]	<223> 突变蛋白链霉亲和素Val44-Thr45-Ala46-Arg47		
[0102]	<400> 4		
[0103]	Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe		
[0104]	1	5	10
[0105]	Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr		
[0106]	20	25	30
[0107]	Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp		
[0108]	35	40	45
[0109]	Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val		
[0110]	50	55	60
[0111]	Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
[0112]	65	70	75
[0113]	Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		
[0114]	85	90	95
[0115]	Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
[0116]	100	105	110

[0117] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [0118] 115 120 125
 [0119] <210> 5
 [0120] <211> 159
 [0121] <212> PRT
 [0122] <213> 阿维丁链霉菌
 [0123] <220>
 [0124] <221> misc_feature
 [0125] <223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 [0126] <400> 5
 [0127] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 [0128] 1 5 10 15
 [0129] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 [0130] 20 25 30
 [0131] Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 [0132] 35 40 45
 [0133] Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 [0134] 50 55 60
 [0135] Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 [0136] 65 70 75 80
 [0137] Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 [0138] 85 90 95
 [0139] Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 [0140] 100 105 110
 [0141] Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 [0142] 115 120 125
 [0143] Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 [0144] 130 135 140
 [0145] Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 [0146] 145 150 155
 [0147] <210> 6
 [0148] <211> 126
 [0149] <212> PRT
 [0150] <213> 阿维丁链霉菌
 [0151] <220>
 [0152] <221> misc_feature
 [0153] <223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 [0154] <400> 6
 [0155] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

[0156]	1	5	10	15
[0157]	Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly			
[0158]	20	25	30	
[0159]	Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp			
[0160]	35	40	45	
[0161]	Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val			
[0162]	50	55	60	
[0163]	Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser			
[0164]	65	70	75	80
[0165]	Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu			
[0166]	85	90	95	
[0167]	Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val			
[0168]	100	105	110	
[0169]	Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser			
[0170]	115	120	125	
[0171]	<210> 7			
[0172]	<211> 8			
[0173]	<212> PRT			
[0174]	<213> 人工序列			
[0175]	<220>			
[0176]	<223> 链霉亲和素结合肽, Strep-tag			
[0177]	<400> 7			
[0178]	Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly			
[0179]	1	5		
[0180]	<210> 8			
[0181]	<211> 8			
[0182]	<212> PRT			
[0183]	<213> 人工序列			
[0184]	<220>			
[0185]	<223> Strep-tag			
[0186]	<400> 8			
[0187]	Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly			
[0188]	1	5		
[0189]	<210> 9			
[0190]	<211> 3			
[0191]	<212> PRT			
[0192]	<213> 人工序列			
[0193]	<220>			
[0194]	<223> 链霉亲和素结合肽			

- [0195] <220>
[0196] <221> 变体
[0197] <222> (3) .. (3)
[0198] <223> Xaa选自谷氨酰胺、天冬酰胺和甲硫氨酸
[0199] <400> 9
[0200] His Pro Xaa
[0201] 1
[0202] <210> 10
[0203] <211> 4
[0204] <212> PRT
[0205] <213> 人工序列
[0206] <220>
[0207] <223> 链霉亲和素结合肽
[0208] <400> 10
[0209] His Pro Gln Phe
[0210] 1
[0211] <210> 11
[0212] <211> 8
[0213] <212> PRT
[0214] <213> 人工序列
[0215] <220>
[0216] <223> 链霉亲和素结合肽
[0217] <220>
[0218] <221> 变体
[0219] <222> (1) .. (1)
[0220] <223> Xaa是Trp、Lys或Arg;
[0221] <220>
[0222] <221> 变体
[0223] <222> (2) .. (2)
[0224] <223> Xaa是任何氨基酸
[0225] <220>
[0226] <221> 变体
[0227] <222> (7) .. (7)
[0228] <223> Xaa是Gly或Glu
[0229] <220>
[0230] <221> 变体
[0231] <222> (8) .. (8)
[0232] <223> Xaa是Gly、Lys或Arg
[0233] <400> 11

[0234]	Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0235]	1 5
[0236]	<210> 12
[0237]	<211> 8
[0238]	<212> PRT
[0239]	<213> 人工序列
[0240]	<220>
[0241]	<223> 链霉亲和素结合肽
[0242]	<220>
[0243]	<221> 变体
[0244]	<222> (2) .. (2)
[0245]	<223> Xaa是任何氨基酸
[0246]	<220>
[0247]	<221> 变体
[0248]	<222> (7) .. (7)
[0249]	<223> Xaa是Gly或Glu
[0250]	<220>
[0251]	<221> 变体
[0252]	<222> (8) .. (8)
[0253]	<223> Xaa是Gly、Lys 或Arg
[0254]	<400> 12
[0255]	Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0256]	1 5
[0257]	<210> 13
[0258]	<211> 17
[0259]	<212> PRT
[0260]	<213> 人工序列
[0261]	<220>
[0262]	<223> 链霉亲和素结合肽的连续模块
[0263]	<220>
[0264]	<221> 变体
[0265]	<222> (9) .. (9)
[0266]	<223> Xaa是任何氨基酸
[0267]	<220>
[0268]	<221> REPEAT
[0269]	<222> (9) .. (9)
[0270]	<223> Xaa重复8或12次
[0271]	<400> 13
[0272]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

[0273]	1	5	10	15
[0274]	Lys			
[0275]	<210> 14			
[0276]	<211> 20			
[0277]	<212> PRT			
[0278]	<213> 人工序列			
[0279]	<220>			
[0280]	<223> 链霉亲和素结合肽的连续模块			
[0281]	<220>			
[0282]	<221> 重复			
[0283]	<222> (9) .. (12)			
[0284]	<223> 重复2或3次			
[0285]	<400> 14			
[0286]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro			
[0287]	1	5	10	15
[0288]	Gln Phe Glu Lys			
[0289]	20			
[0290]	<210> 15			
[0291]	<211> 30			
[0292]	<212> PRT			
[0293]	<213> 人工序列			
[0294]	<220>			
[0295]	<223> Twin-Strep-标签			
[0296]	<400> 15			
[0297]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
[0298]	1	5	10	15
[0299]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys			
[0300]	20	25	30	
[0301]	<210> 16			
[0302]	<211> 30			
[0303]	<212> PRT			
[0304]	<213> 人工序列			
[0305]	<220>			
[0306]	<223> Twin-Strep-标签			
[0307]	<400> 16			
[0308]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
[0309]	1	5	10	15
[0310]	Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys			
[0311]	20	25	30	

[0312]	<210> 17
[0313]	<211> 28
[0314]	<212> PRT
[0315]	<213> 人工序列
[0316]	<220>
[0317]	<223> Twin-Strep-标签
[0318]	<400> 17
[0319]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0320]	1 5 10 15
[0321]	Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0322]	20 25
[0323]	<210> 18
[0324]	<211> 24
[0325]	<212> PRT
[0326]	<213> 人工序列
[0327]	<220>
[0328]	<223> Twin-Strep-标签
[0329]	<400> 18
[0330]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0331]	1 5 10 15
[0332]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0333]	20
[0334]	<210> 19
[0335]	<211> 28
[0336]	<212> PRT
[0337]	<213> 人工序列
[0338]	<220>
[0339]	<223> Twin-Strep-标签
[0340]	<400> 19
[0341]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
[0342]	1 5 10 15
[0343]	Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
[0344]	20 25
[0345]	<210> 20
[0346]	<211> 9
[0347]	<212> PRT
[0348]	<213> 人工序列
[0349]	<220>
[0350]	<223> HA-标签

[0351]	<400> 20
[0352]	Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
[0353]	1 5
[0354]	<210> 21
[0355]	<211> 11
[0356]	<212> PRT
[0357]	<213> 人工序列
[0358]	<220>
[0359]	<223> VSV-G-标签
[0360]	<400> 21
[0361]	Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
[0362]	1 5 10
[0363]	<210> 22
[0364]	<211> 11
[0365]	<212> PRT
[0366]	<213> 人工序列
[0367]	<220>
[0368]	<223> HSV-标签
[0369]	<400> 22
[0370]	Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
[0371]	1 5 10
[0372]	<210> 23
[0373]	<211> 10
[0374]	<212> PRT
[0375]	<213> 人工序列
[0376]	<220>
[0377]	<223> T7表位
[0378]	<400> 23
[0379]	Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
[0380]	1 5 10
[0381]	<210> 24
[0382]	<211> 10
[0383]	<212> PRT
[0384]	<213> 人工序列
[0385]	<220>
[0386]	<223> HSV表位
[0387]	<400> 24
[0388]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
[0389]	1 5 10

[0390]	<210>	25	
[0391]	<211>	10	
[0392]	<212>	PRT	
[0393]	<213>	人工序列	
[0394]	<220>		
[0395]	<223>	Myc表位	
[0396]	<400>	25	
[0397]	Glu	Gln	Lys
[0398]	1	5	10
[0399]	<210>	26	
[0400]	<211>	14	
[0401]	<212>	PRT	
[0402]	<213>	人工序列	
[0403]	<220>		
[0404]	<223>	V5-标签	
[0405]	<400>	26	
[0406]	Gly	Lys	Pro
[0407]	1	5	10
[0408]	<210>	27	
[0409]	<211>	126	
[0410]	<212>	PRT	
[0411]	<213>	阿维丁链霉菌	
[0412]	<220>		
[0413]	<221>	misc_feature	
[0414]	<223>	突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47和Glu117, Gly120,	
[0415]	Try121	(突变蛋白 m1-9)	
[0416]	<400>	27	
[0417]	Glu	Ala	Gly
[0418]	1	5	10
[0419]	Ile	Val	Thr
[0420]		20	30
[0421]	Ala	Arg	Gly
[0422]		35	45
[0423]	Ser	Ala	Pro
[0424]		50	60
[0425]	Ala	Trp	Lys
[0426]	65	70	80
[0427]	Gly	Gln	Tyr
[0428]		85	95

[0429] Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val
 [0430] 100 105 110
 [0431] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [0432] 115 120 125
 [0433] <210> 28
 [0434] <211> 139
 [0435] <212> PRT
 [0436] <213> 阿维丁链霉菌
 [0437] <220>
 [0438] <221> misc_feature
 [0439] <223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47和Glu117, Gly120,
 [0440] Try121 (突变蛋白m1-9)
 [0441] <400> 28
 [0442] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 [0443] 1 5 10 15
 [0444] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 [0445] 20 25 30
 [0446] Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 [0447] 35 40 45
 [0448] Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 [0449] 50 55 60
 [0450] Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 [0451] 65 70 75 80
 [0452] Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 [0453] 85 90 95
 [0454] Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 [0455] 100 105 110
 [0456] Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 [0457] 115 120 125
 [0458] Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [0459] 130 135
 [0460] <210> 29
 [0461] <211> 253
 [0462] <212> PRT
 [0463] <213> 人工序列
 [0464] <220>
 [0465] <223> Fab片段m13B8.2的可变重链
 [0466] <400> 29
 [0467] Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro

[0468]	1	5	10	15
[0469]	Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr			
[0470]	20	25	30	
[0471]	Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
[0472]	35	40	45	
[0473]	Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro			
[0474]	50	55	60	
[0475]	Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val			
[0476]	65	70	75	80
[0477]	Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr			
[0478]	85	90	95	
[0479]	Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0480]	100	105	110	
[0481]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
[0482]	115	120	125	
[0483]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
[0484]	130	135	140	
[0485]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
[0486]	145	150	155	160
[0487]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
[0488]	165	170	175	
[0489]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
[0490]	180	185	190	
[0491]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
[0492]	195	200	205	
[0493]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser			
[0494]	210	215	220	
[0495]	Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly			
[0496]	225	230	235	240
[0497]	Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys			
[0498]	245	250		
[0499]	<210> 30			
[0500]	<211> 218			
[0501]	<212> PRT			
[0502]	<213> 人工序列			
[0503]	<220>			
[0504]	<223> Fab片段m13B8.2的可变轻链			
[0505]	<400> 30			
[0506]	Ala Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser			

[0507]	1	5	10	15
[0508]	Val Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Glu Met Ile Tyr			
[0509]	20	25	30	
[0510]	Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu			
[0511]	35	40	45	
[0512]	Leu Val His Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe			
[0513]	50	55	60	
[0514]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu			
[0515]	65	70	75	80
[0516]	Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn			
[0517]	85	90	95	
[0518]	Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile			
[0519]	100	105	110	
[0520]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys			
[0521]	115	120	125	
[0522]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg			
[0523]	130	135	140	
[0524]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
[0525]	145	150	155	160
[0526]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
[0527]	165	170	175	
[0528]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
[0529]	180	185	190	
[0530]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
[0531]	195	200	205	
[0532]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser			
[0533]	210	215		
[0534]	<210> 31			
[0535]	<211> 119			
[0536]	<212> PRT			
[0537]	<213> 人工序列			
[0538]	<220>			
[0539]	<223> 抗CD3抗体OKT3的可变轻链			
[0540]	<400> 31			
[0541]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
[0542]	1	5	10	15
[0543]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr			
[0544]	20	25	30	
[0545]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			

[0546]	35	40	45
[0547]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0548]	50	55	60
[0549]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0550]	65	70	75
[0551]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0552]	85	90	95
[0553]	Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0554]	100	105	110
[0555]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
[0556]	115		
[0557]	<210> 32		
[0558]	<211> 106		
[0559]	<212> PRT		
[0560]	<213> 人工序列		
[0561]	<220>		
[0562]	<223> 抗CD3抗体OKT3的可变轻链		
[0563]	<400> 32		
[0564]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly		
[0565]	1	5	10
[0566]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met		15
[0567]	20	25	30
[0568]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr		
[0569]	35	40	45
[0570]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser		
[0571]	50	55	60
[0572]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu		
[0573]	65	70	75
[0574]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr		80
[0575]	85	90	95
[0576]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn		
[0577]	100	105	
[0578]	<210> 33		
[0579]	<211> 116		
[0580]	<212> PRT		
[0581]	<213> 人工序列		
[0582]	<220>		
[0583]	<223> 抗CD28抗体CD28.3的可变重链		
[0584]	<400> 33		

[0585]	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Arg
[0586]	1				5					10					15	
[0587]	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Ile	His
[0588]					20					25					30	
[0589]	Trp	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Phe
[0590]					35					40					45	
[0591]	Tyr	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr	Asn	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys
[0592]					50					55					60	
[0593]	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Leu
[0594]	65									70					75	
[0595]	Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg
[0596]										85					90	
[0597]	Asp	Asp	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Pro	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[0598]										100					105	
[0599]	Met	Val	Thr	Val												
[0600]																
[0601]	<210>	34														
[0602]	<211>	108														
[0603]	<212>	PRT														
[0604]	<213>	人工序列														
[0605]	<220>															
[0606]	<223>	抗CD28抗体CD28.3的可变轻链														
[0607]	<400>	34														
[0608]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly
[0609]	1					5					10				15	
[0610]	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Asn	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn
[0611]											20				25	
[0612]	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile
[0613]											35				40	
[0614]	Tyr	Ala	Ala	Thr	His	Leu	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0615]											50				55	
[0616]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	Ser
[0617]	65										70				75	
[0618]	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Cys
[0619]											85				90	
[0620]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
[0621]											100				105	
[0622]	<210>	35														
[0623]	<211>	11														

[0624]	<212>	PRT
[0625]	<213>	人工序列
[0626]	<220>	
[0627]	<223>	MAT 标签
[0628]	<400>	35
[0629]	His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys	
[0630]	1	5 10
[0631]	<210>	36
[0632]	<211>	1145
[0633]	<212>	PRT
[0634]	<213>	智人
[0635]	<220>	
[0636]	<221>	MISC_FEATURE
[0637]	<223>	LFA-1 α
[0638]	<400>	36
[0639]	Tyr Asn Leu Asp Val Arg Gly Ala Arg Ser Phe Ser Pro Pro Arg Ala	
[0640]	1	5 10 15
[0641]	Gly Arg His Phe Gly Tyr Arg Val Leu Gln Val Gly Asn Gly Val Ile	
[0642]	20	25 30
[0643]	Val Gly Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Thr Gly Ser Leu Tyr Gln Cys	
[0644]	35	40 45
[0645]	Gln Ser Gly Thr Gly His Cys Leu Pro Val Thr Leu Arg Gly Ser Asn	
[0646]	50	55 60
[0647]	Tyr Thr Ser Lys Tyr Leu Gly Met Thr Leu Ala Thr Asp Pro Thr Asp	
[0648]	65	70 75 80
[0649]	Gly Ser Ile Leu Ala Cys Asp Pro Gly Leu Ser Arg Thr Cys Asp Gln	
[0650]	85	90 95
[0651]	Asn Thr Tyr Leu Ser Gly Leu Cys Tyr Leu Phe Arg Gln Asn Leu Gln	
[0652]	100	105 110
[0653]	Gly Pro Met Leu Gln Gly Arg Pro Gly Phe Gln Glu Cys Ile Lys Gly	
[0654]	115	120 125
[0655]	Asn Val Asp Leu Val Phe Leu Phe Asp Gly Ser Met Ser Leu Gln Pro	
[0656]	130	135 140
[0657]	Asp Glu Phe Gln Lys Ile Leu Asp Phe Met Lys Asp Val Met Lys Lys	
[0658]	145	150 155 160
[0659]	Leu Ser Asn Thr Ser Tyr Gln Phe Ala Ala Val Gln Phe Ser Thr Ser	
[0660]	165	170 175
[0661]	Tyr Lys Thr Glu Phe Asp Phe Ser Asp Tyr Val Lys Arg Lys Asp Pro	
[0662]	180	185 190

[0663]	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	His	Val	Lys	His	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	Thr
[0664]			195					200					205			
[0665]	Phe	Gly	Ala	Ile	Asn	Tyr	Val	Ala	Thr	Glu	Val	Phe	Arg	Glu	Glu	Leu
[0666]			210					215					220			
[0667]	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Ile	Ile	Thr	Asp	Gly
[0668]	225						230				235					240
[0669]	Glu	Ala	Thr	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Asp	Ile	Ile	Arg
[0670]					245					250					255	
[0671]	Tyr	Ile	Ile	Gly	Ile	Gly	Lys	His	Phe	Gln	Thr	Lys	Glu	Ser	Gln	Glu
[0672]				260					265						270	
[0673]	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ala	Ser	Lys	Pro	Ala	Ser	Glu	Phe	Val	Lys	Ile
[0674]				275					280						285	
[0675]	Leu	Asp	Thr	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	Leu	Phe	Thr	Glu	Leu	Gln	Lys
[0676]		290					295					300				
[0677]	Lys	Ile	Tyr	Val	Ile	Glu	Gly	Thr	Ser	Lys	Gln	Asp	Leu	Thr	Ser	Phe
[0678]	305					310					315					320
[0679]	Asn	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly
[0680]					325					330					335	
[0681]	His	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Asp	Trp	Ala	Gly	Gly	Phe
[0682]				340						345					350	
[0683]	Leu	Asp	Leu	Lys	Ala	Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Thr	Phe	Ile	Gly	Asn	Glu
[0684]			355					360					365			
[0685]	Pro	Leu	Thr	Pro	Glu	Val	Arg	Ala	Gly	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Thr	Val	Thr
[0686]		370					375					380				
[0687]	Trp	Leu	Pro	Ser	Arg	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Pro
[0688]	385					390					395					400
[0689]	Arg	Tyr	Gln	His	Met	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Phe	Gln	Glu	Pro	Gln	Gly
[0690]				405						410					415	
[0691]	Gly	Gly	His	Trp	Ser	Gln	Val	Gln	Thr	Ile	His	Gly	Thr	Gln	Ile	Gly
[0692]				420						425				430		
[0693]	Ser	Tyr	Phe	Gly	Gly	Glu	Leu	Cys	Gly	Val	Asp	Val	Asp	Gln	Asp	Gly
[0694]			435						440				445			
[0695]	Glu	Thr	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Ala	Pro	Leu	Phe	Tyr	Gly	Glu	Gln
[0696]		450						455					460			
[0697]	Arg	Gly	Gly	Arg	Val	Phe	Ile	Tyr	Gln	Arg	Arg	Gln	Leu	Gly	Phe	Glu
[0698]	465					470					475					480
[0699]	Glu	Val	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Pro	Gly	Tyr	Pro	Leu	Gly	Arg	Phe
[0700]					485					490					495	
[0701]	Gly	Glu	Ala	Ile	Thr	Ala	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Leu	Val

[0702]		500		505		510											
[0703]	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Gln	Gly	Ala	Val	Tyr	Ile	
[0704]		515		520		525											
[0705]	Phe	Asn	Gly	Arg	His	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Gln	Pro	Ser	Gln	Arg	Ile	
[0706]		530		535		540											
[0707]	Glu	Gly	Thr	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gln	Trp	Phe	Gly	Arg	Ser	Ile	
[0708]	545			550		555										560	
[0709]	His	Gly	Val	Lys	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Val	Ala	Val	
[0710]				565		570										575	
[0711]	Gly	Ala	Glu	Ser	Gln	Met	Ile	Val	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro	Val	Val	Asp	
[0712]				580		585										590	
[0713]	Met	Val	Thr	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Pro	Ala	Glu	Ile	Pro	Val	His	Glu	
[0714]				595		600										605	
[0715]	Val	Glu	Cys	Ser	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Met	Lys	Glu	Gly	Val	Asn	
[0716]				610		615										620	
[0717]	Ile	Thr	Ile	Cys	Phe	Gln	Ile	Lys	Ser	Leu	Ile	Pro	Gln	Phe	Gln	Gly	
[0718]	625					630										640	
[0719]	Arg	Leu	Val	Ala	Asn	Leu	Thr	Tyr	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Gly	His	Arg	
[0720]				645		650										655	
[0721]	Thr	Arg	Arg	Arg	Gly	Leu	Phe	Pro	Gly	Gly	Arg	His	Glu	Leu	Arg	Arg	
[0722]				660		665										670	
[0723]	Asn	Ile	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Met	Ser	Cys	Thr	Asp	Phe	Ser	Phe	His	
[0724]				675		680										685	
[0725]	Phe	Pro	Val	Cys	Val	Gln	Asp	Leu	Ile	Ser	Pro	Ile	Asn	Val	Ser	Leu	
[0726]				690		695										700	
[0727]	Asn	Phe	Ser	Leu	Trp	Glu	Glu	Glu	Gly	Thr	Pro	Arg	Asp	Gln	Arg	Ala	
[0728]	705					710										720	
[0729]	Gln	Gly	Lys	Asp	Ile	Pro	Pro	Ile	Leu	Arg	Pro	Ser	Leu	His	Ser	Glu	
[0730]				725		730										735	
[0731]	Thr	Trp	Glu	Ile	Pro	Phe	Glu	Lys	Asn	Cys	Gly	Glu	Asp	Lys	Lys	Cys	
[0732]				740		745										750	
[0733]	Glu	Ala	Asn	Leu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Pro	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Leu	
[0734]				755		760										765	
[0735]	Arg	Leu	Thr	Ala	Phe	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Glu	Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	
[0736]				770		775										780	
[0737]	Leu	Glu	Glu	Asp	Ala	Tyr	Trp	Val	Gln	Leu	Asp	Leu	His	Phe	Pro	Pro	
[0738]	785					790										800	
[0739]	Gly	Leu	Ser	Phe	Arg	Lys	Val	Glu	Met	Leu	Lys	Pro	His	Ser	Gln	Ile	
[0740]				805		810										815	

[0741]	Pro	Val	Ser	Cys	Glu	Glu	Leu	Pro	Glu	Glu	Ser	Arg	Leu	Leu	Ser	Arg
[0742]					820				825					830		
[0743]	Ala	Leu	Ser	Cys	Asn	Val	Ser	Ser	Pro	Ile	Phe	Lys	Ala	Gly	His	Ser
[0744]					835				840					845		
[0745]	Val	Ala	Leu	Gln	Met	Met	Phe	Asn	Thr	Leu	Val	Asn	Ser	Ser	Trp	Gly
[0746]					850				855					860		
[0747]	Asp	Ser	Val	Glu	Leu	His	Ala	Asn	Val	Thr	Cys	Asn	Asn	Glu	Asp	Ser
[0748]					865				870					875		880
[0749]	Asp	Leu	Leu	Glu	Asp	Asn	Ser	Ala	Thr	Thr	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Tyr
[0750]					885				890					895		
[0751]	Pro	Ile	Asn	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp	Gln	Glu	Asp	Ser	Thr	Leu	Tyr	Val
[0752]					900				905					910		
[0753]	Ser	Phe	Thr	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ile	His	Gln	Val	Lys	His	Met	Tyr
[0754]					915				920					925		
[0755]	Gln	Val	Arg	Ile	Gln	Pro	Ser	Ile	His	Asp	His	Asn	Ile	Pro	Thr	Leu
[0756]					930				935					940		
[0757]	Glu	Ala	Val	Val	Gly	Val	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	Pro	Ile	Thr
[0758]					945				950					955		960
[0759]	His	Gln	Trp	Ser	Val	Gln	Met	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Cys	His	Tyr	Glu
[0760]					965				970					975		
[0761]	Asp	Leu	Glu	Arg	Leu	Pro	Asp	Ala	Ala	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Gly	Ala
[0762]					980				985					990		
[0763]	Leu	Phe	Arg	Cys	Pro	Val	Val	Phe	Arg	Gln	Glu	Ile	Leu	Val	Gln	Val
[0764]					995				1000					1005		
[0765]	Ile	Gly	Thr	Leu	Glu	Leu	Val	Gly	Glu	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser	Met	
[0766]					1010				1015					1020		
[0767]	Phe	Ser	Leu	Cys	Ser	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Phe	Asn	Ser	Ser	Lys	
[0768]					1025				1030					1035		
[0769]	His	Phe	His	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	Val	Val	
[0770]					1040				1045					1050		
[0771]	Met	Lys	Val	Asp	Val	Val	Tyr	Glu	Lys	Gln	Met	Leu	Tyr	Leu	Tyr	
[0772]					1055				1060					1065		
[0773]	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Phe	
[0774]					1070				1075					1080		
[0775]	Ile	Val	Leu	Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Asn	Leu	Lys	Glu	
[0776]					1085				1090					1095		
[0777]	Lys	Met	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Pro	Asn	Gly	Ile	Pro	Ala	Glu	
[0778]					1100				1105					1110		
[0779]	Asp	Ser	Glu	Gln	Leu	Ala	Ser	Gly	Gln	Glu	Ala	Gly	Asp	Pro	Gly	

[0780]	1115	1120	1125
[0781]	Cys Leu Lys Pro Leu His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Gly Gly Gly		
[0782]	1130	1135	1140
[0783]	Lys Asp		
[0784]	1145		
[0785]	<210> 37		
[0786]	<211> 747		
[0787]	<212> PRT		
[0788]	<213> 智人		
[0789]	<220>		
[0790]	<221> MISC_FEATURE		
[0791]	<223> LFA-1 β		
[0792]	<400> 37		
[0793]	Gln Glu Cys Thr Lys Phe Lys Val Ser Ser Cys Arg Glu Cys Ile Glu		
[0794]	1 5 10 15		
[0795]	Ser Gly Pro Gly Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro		
[0796]	20 25 30		
[0797]	Gly Asp Pro Asp Ser Ile Arg Cys Asp Thr Arg Pro Gln Leu Leu Met		
[0798]	35 40 45		
[0799]	Arg Gly Cys Ala Ala Asp Asp Ile Met Asp Pro Thr Ser Leu Ala Glu		
[0800]	50 55 60		
[0801]	Thr Gln Glu Asp His Asn Gly Gly Gln Lys Gln Leu Ser Pro Gln Lys		
[0802]	65 70 75 80		
[0803]	Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ala Ala Phe Asn Val Thr		
[0804]	85 90 95		
[0805]	Phe Arg Arg Ala Lys Gly Tyr Pro Ile Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp		
[0806]	100 105 110		
[0807]	Leu Ser Tyr Ser Met Leu Asp Asp Leu Arg Asn Val Lys Lys Leu Gly		
[0808]	115 120 125		
[0809]	Gly Asp Leu Leu Arg Ala Leu Asn Glu Ile Thr Glu Ser Gly Arg Ile		
[0810]	130 135 140		
[0811]	Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Asn Thr		
[0812]	145 150 155 160		
[0813]	His Pro Asp Lys Leu Arg Asn Pro Cys Pro Asn Lys Glu Lys Glu Cys		
[0814]	165 170 175		
[0815]	Gln Pro Pro Phe Ala Phe Arg His Val Leu Lys Leu Thr Asn Asn Ser		
[0816]	180 185 190		
[0817]	Asn Gln Phe Gln Thr Glu Val Gly Lys Gln Leu Ile Ser Gly Asn Leu		
[0818]	195 200 205		

[0819]	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Met	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Cys
[0820]	210						215					220				
[0821]	Pro	Glu	Glu	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	Ala
[0822]	225						230					235				240
[0823]	Thr	Asp	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile
[0824]						245					250				255	
[0825]	Leu	Thr	Pro	Asn	Asp	Gly	Arg	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Tyr	Lys
[0826]						260						265			270	
[0827]	Arg	Ser	Asn	Glu	Phe	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	His	Lys
[0828]						275							280		285	
[0829]	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Arg	Met
[0830]	290						295					300				
[0831]	Val	Lys	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Val
[0832]	305						310					315				320
[0833]	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Ile	Lys	Asn
[0834]						325						330			335	
[0835]	Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu
[0836]						340						345			350	
[0837]	Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Tyr	Asp	Ser	Phe	Cys	Ser	Asn	Gly	Val
[0838]						355						360			365	
[0839]	Thr	His	Arg	Asn	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	Cys	Asp	Gly	Val	Gln	Ile	Asn
[0840]	370						375					380				
[0841]	Val	Pro	Ile	Thr	Phe	Gln	Val	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln
[0842]	385						390					395				400
[0843]	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Ile	Arg	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Asp	Ile	Val	Thr
[0844]						405						410			415	
[0845]	Val	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Cys	Glu	Cys	Arg	Cys	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg
[0846]						420						425			430	
[0847]	Asp	Arg	Ser	Leu	Cys	His	Gly	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Cys
[0848]						435						440			445	
[0849]	Arg	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ile	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Cys	Gln	Thr	Gln
[0850]	450						455					460				
[0851]	Gly	Arg	Ser	Ser	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Asp	Asn	Asn
[0852]	465						470					475				480
[0853]	Ser	Ile	Ile	Cys	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Gln	Cys	Leu
[0854]						485						490			495	
[0855]	Cys	His	Thr	Ser	Asp	Val	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Cys
[0856]						500						505			510	
[0857]	Glu	Cys	Asp	Thr	Ile	Asn	Cys	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Gln	Val	Cys	Gly

[0858]	515	520	525
[0859]	Gly Pro Gly Arg Gly Leu Cys Phe Cys Gly Lys Cys Arg Cys His Pro		
[0860]	530	535	540
[0861]	Gly Phe Glu Gly Ser Ala Cys Gln Cys Glu Arg Thr Thr Glu Gly Cys		
[0862]	545	550	555
[0863]	Leu Asn Pro Arg Arg Val Glu Cys Ser Gly Arg Gly Arg Cys Arg Cys		
[0864]	565	570	575
[0865]	Asn Val Cys Glu Cys His Ser Gly Tyr Gln Leu Pro Leu Cys Gln Glu		
[0866]	580	585	590
[0867]	Cys Pro Gly Cys Pro Ser Pro Cys Gly Lys Tyr Ile Ser Cys Ala Glu		
[0868]	595	600	605
[0869]	Cys Leu Lys Phe Glu Lys Gly Pro Phe Gly Lys Asn Cys Ser Ala Ala		
[0870]	610	615	620
[0871]	Cys Pro Gly Leu Gln Leu Ser Asn Asn Pro Val Lys Gly Arg Thr Cys		
[0872]	625	630	635
[0873]	Lys Glu Arg Asp Ser Glu Gly Cys Trp Val Ala Tyr Thr Leu Glu Gln		
[0874]	645	650	655
[0875]	Gln Asp Gly Met Asp Arg Tyr Leu Ile Tyr Val Asp Glu Ser Arg Glu		
[0876]	660	665	670
[0877]	Cys Val Ala Gly Pro Asn Ile Ala Ala Ile Val Gly Gly Thr Val Ala		
[0878]	675	680	685
[0879]	Gly Ile Val Leu Ile Gly Ile Leu Leu Leu Val Ile Trp Lys Ala Leu		
[0880]	690	695	700
[0881]	Ile His Leu Ser Asp Leu Arg Glu Tyr Arg Arg Phe Glu Lys Glu Lys		
[0882]	705	710	715
[0883]	Leu Lys Ser Gln Trp Asn Asn Asp Asn Pro Leu Phe Lys Ser Ala Thr		
[0884]	725	730	735
[0885]	Thr Thr Val Met Asn Pro Lys Phe Ala Glu Ser		
[0886]	740	745	
[0887]	<210> 38		
[0888]	<211> 344		
[0889]	<212> PRT		
[0890]	<213> 智人		
[0891]	<220>		
[0892]	<221> MISC_FEATURE		
[0893]	<223> L-选择素		
[0894]	<400> 38		
[0895]	Asp Phe Leu Ala His His Gly Thr Asp Cys Trp Thr Tyr His Tyr Ser		
[0896]	1	5	10
			15

[0897]	Glu	Lys	Pro	Met	Asn	Trp	Gln	Arg	Ala	Arg	Arg	Phe	Cys	Arg	Asp	Asn
[0898]				20				25					30			
[0899]	Tyr	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	Ile	Gln	Asn	Lys	Ala	Glu	Ile	Glu	Tyr	Leu
[0900]			35				40					45				
[0901]	Glu	Lys	Thr	Leu	Pro	Phe	Ser	Arg	Ser	Tyr	Tyr	Trp	Ile	Gly	Ile	Arg
[0902]		50					55					60				
[0903]	Lys	Ile	Gly	Gly	Ile	Trp	Thr	Trp	Val	Gly	Thr	Asn	Lys	Ser	Leu	Thr
[0904]	65					70				75					80	
[0905]	Glu	Glu	Ala	Glu	Asn	Trp	Gly	Asp	Gly	Glu	Pro	Asn	Asn	Lys	Lys	Asn
[0906]				85				90						95		
[0907]	Lys	Glu	Asp	Cys	Val	Glu	Ile	Tyr	Ile	Lys	Arg	Asn	Lys	Asp	Ala	Gly
[0908]			100					105						110		
[0909]	Lys	Trp	Asn	Asp	Asp	Ala	Cys	His	Lys	Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	Cys	Tyr
[0910]			115					120						125		
[0911]	Thr	Ala	Ser	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Cys	Ser	Gly	His	Gly	Glu	Cys	Val
[0912]		130					135					140				
[0913]	Glu	Ile	Ile	Asn	Asn	Tyr	Thr	Cys	Asn	Cys	Asp	Val	Gly	Tyr	Tyr	Gly
[0914]	145					150					155					160
[0915]	Pro	Gln	Cys	Gln	Phe	Val	Ile	Gln	Cys	Glu	Pro	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu
[0916]				165						170					175	
[0917]	Leu	Gly	Thr	Met	Asp	Cys	Thr	His	Pro	Leu	Gly	Asn	Phe	Ser	Phe	Ser
[0918]			180					185						190		
[0919]	Ser	Gln	Cys	Ala	Phe	Ser	Cys	Ser	Glu	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Ile
[0920]			195					200						205		
[0921]	Glu	Glu	Thr	Thr	Cys	Gly	Pro	Phe	Gly	Asn	Trp	Ser	Ser	Pro	Glu	Pro
[0922]		210					215					220				
[0923]	Thr	Cys	Gln	Val	Ile	Gln	Cys	Glu	Pro	Leu	Ser	Ala	Pro	Asp	Leu	Gly
[0924]	225					230					235					240
[0925]	Ile	Met	Asn	Cys	Ser	His	Pro	Leu	Ala	Ser	Phe	Ser	Phe	Thr	Ser	Ala
[0926]				245						250				255		
[0927]	Cys	Thr	Phe	Ile	Cys	Ser	Glu	Gly	Thr	Glu	Leu	Ile	Gly	Lys	Lys	Lys
[0928]			260					265						270		
[0929]	Thr	Ile	Cys	Glu	Ser	Ser	Gly	Ile	Trp	Ser	Asn	Pro	Ser	Pro	Ile	Cys
[0930]			275					280						285		
[0931]	Gln	Lys	Leu	Asp	Lys	Ser	Phe	Ser	Met	Ile	Lys	Glu	Gly	Asp	Tyr	Asn
[0932]		290						295					300			
[0933]	Pro	Leu	Phe	Ile	Pro	Val	Ala	Val	Met	Val	Thr	Ala	Phe	Ser	Gly	Leu
[0934]	305					310					315					320
[0935]	Ala	Phe	Ile	Ile	Trp	Leu	Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Ser

[0936]		325		330		335
[0937]	Lys Arg Ser Met Asn Asp Pro Tyr					
[0938]		340				
[0939]	<210> 39					
[0940]	<211> 715					
[0941]	<212> PRT					
[0942]	<213> 智人					
[0943]	<220>					
[0944]	<221> MISC_FEATURE					
[0945]	<223> VCAM-1					
[0946]	<400> 39					
[0947]	Phe Lys Ile Glu Thr Thr Pro Glu Ser Arg Tyr Leu Ala Gln Ile Gly					
[0948]	1	5		10		15
[0949]	Asp Ser Val Ser Leu Thr Cys Ser Thr Thr Gly Cys Glu Ser Pro Phe					
[0950]		20		25		30
[0951]	Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Asn Gly Lys Val Thr					
[0952]		35		40		45
[0953]	Asn Glu Gly Thr Thr Ser Thr Leu Thr Met Asn Pro Val Ser Phe Gly					
[0954]		50		55		60
[0955]	Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr Ala Thr Cys Glu Ser Arg Lys Leu					
[0956]	65	70		75		80
[0957]	Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Ile Tyr Ser Phe Pro Lys Asp Pro Glu					
[0958]		85		90		95
[0959]	Ile His Leu Ser Gly Pro Leu Glu Ala Gly Lys Pro Ile Thr Val Lys					
[0960]		100		105		110
[0961]	Cys Ser Val Ala Asp Val Tyr Pro Phe Asp Arg Leu Glu Ile Asp Leu					
[0962]		115		120		125
[0963]	Leu Lys Gly Asp His Leu Met Lys Ser Gln Glu Phe Leu Glu Asp Ala					
[0964]		130		135		140
[0965]	Asp Arg Lys Ser Leu Glu Thr Lys Ser Leu Glu Val Thr Phe Thr Pro					
[0966]	145	150		155		160
[0967]	Val Ile Glu Asp Ile Gly Lys Val Leu Val Cys Arg Ala Lys Leu His					
[0968]		165		170		175
[0969]	Ile Asp Glu Met Asp Ser Val Pro Thr Val Arg Gln Ala Val Lys Glu					
[0970]		180		185		190
[0971]	Leu Gln Val Tyr Ile Ser Pro Lys Asn Thr Val Ile Ser Val Asn Pro					
[0972]		195		200		205
[0973]	Ser Thr Lys Leu Gln Glu Gly Gly Ser Val Thr Met Thr Cys Ser Ser					
[0974]		210		215		220

[0975]	Glu Gly Leu Pro Ala Pro Glu Ile Phe Trp Ser Lys Lys Leu Asp Asn
[0976]	225 230 235 240
[0977]	Gly Asn Leu Gln His Leu Ser Gly Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ala
[0978]	245 250 255
[0979]	Met Arg Met Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Val Cys Glu Gly Val Asn Leu
[0980]	260 265 270
[0981]	Ile Gly Lys Asn Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Val Gln Glu Lys Pro
[0982]	275 280 285
[0983]	Phe Thr Val Glu Ile Ser Pro Gly Pro Arg Ile Ala Ala Gln Ile Gly
[0984]	290 295 300
[0985]	Asp Ser Val Met Leu Thr Cys Ser Val Met Gly Cys Glu Ser Pro Ser
[0986]	305 310 315 320
[0987]	Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Ser Gly Lys Val Arg
[0988]	325 330 335
[0989]	Ser Glu Gly Thr Asn Ser Thr Leu Thr Leu Ser Pro Val Ser Phe Glu
[0990]	340 345 350
[0991]	Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr Val Thr Cys Gly His Lys Lys Leu
[0992]	355 360 365
[0993]	Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Leu Tyr Ser Phe Pro Arg Asp Pro Glu
[0994]	370 375 380
[0995]	Ile Glu Met Ser Gly Gly Leu Val Asn Gly Ser Ser Val Thr Val Ser
[0996]	385 390 395 400
[0997]	Cys Lys Val Pro Ser Val Tyr Pro Leu Asp Arg Leu Glu Ile Glu Leu
[0998]	405 410 415
[0999]	Leu Lys Gly Glu Thr Ile Leu Glu Asn Ile Glu Phe Leu Glu Asp Thr
[1000]	420 425 430
[1001]	Asp Met Lys Ser Leu Glu Asn Lys Ser Leu Glu Met Thr Phe Ile Pro
[1002]	435 440 445
[1003]	Thr Ile Glu Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Cys Gln Ala Lys Leu His
[1004]	450 455 460
[1005]	Ile Asp Asp Met Glu Phe Glu Pro Lys Gln Arg Gln Ser Thr Gln Thr
[1006]	465 470 475 480
[1007]	Leu Tyr Val Asn Val Ala Pro Arg Asp Thr Thr Val Leu Val Ser Pro
[1008]	485 490 495
[1009]	Ser Ser Ile Leu Glu Glu Gly Ser Ser Val Asn Met Thr Cys Leu Ser
[1010]	500 505 510
[1011]	Gln Gly Phe Pro Ala Pro Lys Ile Leu Trp Ser Arg Gln Leu Pro Asn
[1012]	515 520 525
[1013]	Gly Glu Leu Gln Pro Leu Ser Glu Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ser

[1014]	530	535	540
[1015]	Thr Lys Met Glu Asp Ser Gly Val Tyr Leu Cys Glu Gly Ile Asn Gln		
[1016]	545	550	555 560
[1017]	Ala Gly Arg Ser Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Ile Gln Val Thr Pro		
[1018]	565	570	575
[1019]	Lys Asp Ile Lys Leu Thr Ala Phe Pro Ser Glu Ser Val Lys Glu Gly		
[1020]	580	585	590
[1021]	Asp Thr Val Ile Ile Ser Cys Thr Cys Gly Asn Val Pro Glu Thr Trp		
[1022]	595	600	605
[1023]	Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser		
[1024]	610	615	620
[1025]	Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly		
[1026]	625	630	635 640
[1027]	Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser		
[1028]	645	650	655
[1029]	Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser		
[1030]	660	665	670
[1031]	Pro Glu Leu Leu Val Leu Tyr Phe Ala Ser Ser Leu Ile Ile Pro Ala		
[1032]	675	680	685
[1033]	Ile Gly Met Ile Ile Tyr Phe Ala Arg Lys Ala Asn Met Lys Gly Ser		
[1034]	690	695	700
[1035]	Tyr Ser Leu Val Glu Ala Gln Lys Ser Lys Val		
[1036]	705	710	715
[1037]	<210> 40		
[1038]	<211> 999		
[1039]	<212> PRT		
[1040]	<213> 智人		
[1041]	<220>		
[1042]	<221> MISC_FEATURE		
[1043]	<223> VLA-4		
[1044]	<400> 40		
[1045]	Tyr Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn		
[1046]	1 5 10 15		
[1047]	Thr Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg		
[1048]	20 25 30		
[1049]	Trp Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser		
[1050]	35 40 45		
[1051]	Val Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro		
[1052]	50 55 60		

[1053]	Gly	Gln	Thr	Cys	Glu	Gln	Leu	Gln	Leu	Gly	Ser	Pro	Asn	Gly	Glu	Pro
[1054]	65					70					75					80
[1055]	Cys	Gly	Lys	Thr	Cys	Leu	Glu	Glu	Arg	Asp	Asn	Gln	Trp	Leu	Gly	Val
[1056]					85					90					95	
[1057]	Thr	Leu	Ser	Arg	Gln	Pro	Gly	Glu	Asn	Gly	Ser	Ile	Val	Thr	Cys	Gly
[1058]				100					105					110		
[1059]	His	Arg	Trp	Lys	Asn	Ile	Phe	Tyr	Ile	Lys	Asn	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro
[1060]			115					120					125			
[1061]	Thr	Gly	Gly	Cys	Tyr	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Leu	Arg	Thr	Glu	Leu	Ser
[1062]		130					135					140				
[1063]	Lys	Arg	Ile	Ala	Pro	Cys	Tyr	Gln	Asp	Tyr	Val	Lys	Lys	Phe	Gly	Glu
[1064]	145					150				155						160
[1065]	Asn	Phe	Ala	Ser	Cys	Gln	Ala	Gly	Ile	Ser	Ser	Phe	Tyr	Thr	Lys	Asp
[1066]				165					170						175	
[1067]	Leu	Ile	Val	Met	Gly	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Trp	Thr	Gly	Ser	Leu
[1068]			180						185					190		
[1069]	Phe	Val	Tyr	Asn	Ile	Thr	Thr	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys
[1070]		195						200					205			
[1071]	Gln	Asn	Gln	Val	Lys	Phe	Gly	Ser	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ser	Val	Gly	Ala
[1072]		210					215					220				
[1073]	Gly	His	Phe	Arg	Ser	Gln	His	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Pro
[1074]	225					230				235						240
[1075]	Gln	His	Glu	Gln	Ile	Gly	Lys	Ala	Tyr	Ile	Phe	Ser	Ile	Asp	Glu	Lys
[1076]				245					250					255		
[1077]	Glu	Leu	Asn	Ile	Leu	His	Glu	Met	Lys	Gly	Lys	Lys	Leu	Gly	Ser	Tyr
[1078]			260					265					270			
[1079]	Phe	Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Ala	Val	Asp	Leu	Asn	Ala	Asp	Gly	Phe	Ser
[1080]		275					280					285				
[1081]	Asp	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Met	Gln	Ser	Thr	Ile	Arg	Glu	Glu	Gly
[1082]		290					295					300				
[1083]	Arg	Val	Phe	Val	Tyr	Ile	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Val	Met	Asn	Ala
[1084]	305					310				315						320
[1085]	Met	Glu	Thr	Asn	Leu	Val	Gly	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly
[1086]				325					330					335		
[1087]	Glu	Ser	Ile	Val	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile	Asp	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Asp
[1088]			340					345					350			
[1089]	Val	Ala	Ile	Gly	Ala	Pro	Gln	Glu	Asp	Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Tyr
[1090]		355					360					365				
[1091]	Ile	Tyr	Asn	Gly	Arg	Ala	Asp	Gly	Ile	Ser	Ser	Thr	Phe	Ser	Gln	Arg

[1092]	370	375	380
[1093]	Ile Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln Ser		
[1094]	385	390	395 400
[1095]	Ile Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val Ala		
[1096]	405	410	415
[1097]	Val Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr Arg Pro		
[1098]	420	425	430
[1099]	Val Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro Glu Ser Val Asn Arg		
[1100]	435	440	445
[1101]	Thr Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro Ser Val Cys Ile Asp		
[1102]	450	455	460
[1103]	Leu Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu Val Pro Gly Tyr Ile		
[1104]	465	470	475 480
[1105]	Val Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ala Glu Ser		
[1106]	485	490	495
[1107]	Pro Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr Ser Asp Val Ile Thr		
[1108]	500	505	510
[1109]	Gly Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn Cys Arg Thr His Gln		
[1110]	515	520	525
[1111]	Ala Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu Thr Pro Ile Gln Ile		
[1112]	530	535	540
[1113]	Glu Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile Ser Lys Arg Ser Thr		
[1114]	545	550	555 560
[1115]	Glu Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln Gln Lys Lys Glu Lys		
[1116]	565	570	575
[1117]	Asp Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg Phe Cys Ala His Glu		
[1118]	580	585	590
[1119]	Asn Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys Ile Gly Phe Leu Lys		
[1120]	595	600	605
[1121]	Pro His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly Ser Met Lys Thr Leu		
[1122]	610	615	620
[1123]	Met Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp Asp Ala Tyr Glu Thr		
[1124]	625	630	635 640
[1125]	Thr Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Ile Leu		
[1126]	645	650	655
[1127]	Glu Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val Thr Asp Asn Ser Gly		
[1128]	660	665	670
[1129]	Val Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile Tyr Val Asp His Leu		
[1130]	675	680	685

[1131]	Ser Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val Ser Ser Leu Ser Arg
[1132]	690 695 700
[1133]	Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala Thr Cys Glu Asn Glu
[1134]	705 710 715 720
[1135]	Glu Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val Thr Val Ala Ile Pro
[1136]	725 730 735
[1137]	Leu Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly Phe Val Asn Pro Thr
[1138]	740 745 750
[1139]	Ser Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu Pro Glu Thr Cys Met
[1140]	755 760 765
[1141]	Val Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile Asn Thr Gly Asn Ser
[1142]	770 775 780
[1143]	Met Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val Pro Asn Ser Phe Ser
[1144]	785 790 795 800
[1145]	Pro Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp Val Gln Thr Thr Thr
[1146]	805 810 815
[1147]	Gly Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val Cys Ala Leu Glu Gln
[1148]	820 825 830
[1149]	Gln Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile Val Arg Phe Leu Ser
[1150]	835 840 845
[1151]	Lys Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys Ala Asp Pro His Cys
[1152]	850 855 860
[1153]	Leu Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu Ala
[1154]	865 870 875 880
[1155]	Ser Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp
[1156]	885 890 895
[1157]	Glu Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu
[1158]	900 905 910
[1159]	Pro Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala His
[1160]	915 920 925
[1161]	Val Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr
[1162]	930 935 940
[1163]	Ile Val Ile Ile Ser Ser Ser Leu Leu Leu Gly Leu Ile Val Leu Leu
[1164]	945 950 955 960
[1165]	Leu Ile Ser Tyr Val Met Trp Lys Ala Gly Phe Phe Lys Arg Gln Tyr
[1166]	965 970 975
[1167]	Lys Ser Ile Leu Gln Glu Glu Asn Arg Arg Asp Ser Trp Ser Tyr Ile
[1168]	980 985 990
[1169]	Asn Ser Lys Ser Asn Asp Asp

[1170] 995
 [1171] <210> 41
 [1172] <211> 133
 [1173] <212> PRT
 [1174] <213> 智人
 [1175] <220>
 [1176] <221> MISC_FEATURE
 [1177] <223> IL-2
 [1178] <400> 41
 [1179] Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 [1180] 1 5 10 15
 [1181] Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 [1182] 20 25 30
 [1183] Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
 [1184] 35 40 45
 [1185] Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 [1186] 50 55 60
 [1187] Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 [1188] 65 70 75 80
 [1189] Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 [1190] 85 90 95
 [1191] Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 [1192] 100 105 110
 [1193] Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 [1194] 115 120 125
 [1195] Ile Ser Thr Leu Thr
 [1196] 130
 [1197] <210> 42
 [1198] <211> 129
 [1199] <212> PRT
 [1200] <213> 智人
 [1201] <220>
 [1202] <221> MISC_FEATURE
 [1203] <223> IL-4
 [1204] <400> 42
 [1205] His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
 [1206] 1 5 10 15
 [1207] Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
 [1208] 20 25 30

[1209]	Phe	Ala	Ala	Ser	Lys	Asn	Thr	Thr	Glu	Lys	Glu	Thr	Phe	Cys	Arg	Ala
[1210]			35					40					45			
[1211]	Ala	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Phe	Tyr	Ser	His	His	Glu	Lys	Asp	Thr	Arg
[1212]			50				55					60				
[1213]	Cys	Leu	Gly	Ala	Thr	Ala	Gln	Gln	Phe	His	Arg	His	Lys	Gln	Leu	Ile
[1214]	65					70					75				80	
[1215]	Arg	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Asp	Arg	Asn	Leu	Trp	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu
[1216]					85					90					95	
[1217]	Asn	Ser	Cys	Pro	Val	Lys	Glu	Ala	Asn	Gln	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Phe
[1218]				100					105					110		
[1219]	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Ile	Met	Arg	Glu	Lys	Tyr	Ser	Lys	Cys	Ser
[1220]			115					120					125			
[1221]	Ser															
[1222]	<210>	43														
[1223]	<211>	152														
[1224]	<212>	PRT														
[1225]	<213>	智人														
[1226]	<220>															
[1227]	<221>	MISC_FEATURE														
[1228]	<223>	IL-7														
[1229]	<400>	43														
[1230]	Asp	Cys	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu
[1231]	1			5						10				15		
[1232]	Met	Val	Ser	Ile	Asp	Gln	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Ile	Gly	Ser
[1233]				20					25				30			
[1234]	Asn	Cys	Leu	Asn	Asn	Glu	Phe	Asn	Phe	Phe	Lys	Arg	His	Ile	Cys	Asp
[1235]			35					40					45			
[1236]	Ala	Asn	Lys	Glu	Gly	Met	Phe	Leu	Phe	Arg	Ala	Ala	Arg	Lys	Leu	Arg
[1237]			50				55					60				
[1238]	Gln	Phe	Leu	Lys	Met	Asn	Ser	Thr	Gly	Asp	Phe	Asp	Leu	His	Leu	Leu
[1239]	65					70					75				80	
[1240]	Lys	Val	Ser	Glu	Gly	Thr	Thr	Ile	Leu	Leu	Asn	Cys	Thr	Gly	Gln	Val
[1241]					85					90					95	
[1242]	Lys	Gly	Arg	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Ser
[1243]				100					105					110		
[1244]	Leu	Glu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Glu	Gln	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu
[1245]				115					120					125		
[1246]	Cys	Phe	Leu	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Ile	Lys	Thr	Cys	Trp	Asn	Lys
[1247]			130					135					140			

[1248]	Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
[1249]	145 150
[1250]	<210> 44
[1251]	<211> 160
[1252]	<212> PRT
[1253]	<213> 智人
[1254]	<220>
[1255]	<221> MISC_FEATURE
[1256]	<223> IL-10
[1257]	<400> 44
[1258]	Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
[1259]	1 5 10 15
[1260]	Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
[1261]	20 25 30
[1262]	Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
[1263]	35 40 45
[1264]	Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
[1265]	50 55 60
[1266]	Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
[1267]	65 70 75 80
[1268]	Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
[1269]	85 90 95
[1270]	Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
[1271]	100 105 110
[1272]	Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
[1273]	115 120 125
[1274]	Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
[1275]	130 135 140
[1276]	Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
[1277]	145 150 155 160
[1278]	<210> 45
[1279]	<211> 133
[1280]	<212> PRT
[1281]	<213> 智人
[1282]	<220>
[1283]	<221> MISC_FEATURE
[1284]	<223> IL-15
[1285]	<400> 45
[1286]	Gly Ile His Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys

[1287]	1	5	10	15
[1288]	Thr Glu Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu			
[1289]	20	25	30	
[1290]	Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser			
[1291]	35	40	45	
[1292]	Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu			
[1293]	50	55	60	
[1294]	Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp			
[1295]	65	70	75	80
[1296]	Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn			
[1297]	85	90	95	
[1298]	Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu			
[1299]	100	105	110	
[1300]	Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met			
[1301]	115	120	125	
[1302]	Phe Ile Asn Thr Ser			
[1303]	130			
[1304]	<210> 46			
[1305]	<211> 132			
[1306]	<212> PRT			
[1307]	<213> 智人			
[1308]	<220>			
[1309]	<221> MISC_FEATURE			
[1310]	<223> IL-17			
[1311]	<400> 46			
[1312]	Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys			
[1313]	1	5	10	15
[1314]	Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn			
[1315]	20	25	30	
[1316]	Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr			
[1317]	35	40	45	
[1318]	Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser			
[1319]	50	55	60	
[1320]	Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp			
[1321]	65	70	75	80
[1322]	Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile			
[1323]	85	90	95	
[1324]	Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu			
[1325]	100	105	110	

[1326]	Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
[1327]	115 120 125
[1328]	His His Val Ala
[1329]	130
[1330]	<210> 47
[1331]	<211> 103
[1332]	<212> PRT
[1333]	<213> 智人
[1334]	<220>
[1335]	<221> MISC_FEATURE
[1336]	<223> CXCL9
[1337]	<400> 47
[1338]	Thr Pro Val Val Arg Lys Gly Arg Cys Ser Cys Ile Ser Thr Asn Gln
[1339]	1 5 10 15
[1340]	Gly Thr Ile His Leu Gln Ser Leu Lys Asp Leu Lys Gln Phe Ala Pro
[1341]	20 25 30
[1342]	Ser Pro Ser Cys Glu Lys Ile Glu Ile Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
[1343]	35 40 45
[1344]	Val Gln Thr Cys Leu Asn Pro Asp Ser Ala Asp Val Lys Glu Leu Ile
[1345]	50 55 60
[1346]	Lys Lys Trp Glu Lys Gln Val Ser Gln Lys Lys Lys Gln Lys Asn Gly
[1347]	65 70 75 80
[1348]	Lys Lys His Gln Lys Lys Lys Val Leu Lys Val Arg Lys Ser Gln Arg
[1349]	85 90 95
[1350]	Ser Arg Gln Lys Lys Thr Thr
[1351]	100
[1352]	<210> 48
[1353]	<211> 77
[1354]	<212> PRT
[1355]	<213> 智人
[1356]	<220>
[1357]	<221> MISC_FEATURE
[1358]	<223> CXCL10
[1359]	<400> 48
[1360]	Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
[1361]	1 5 10 15
[1362]	Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
[1363]	20 25 30
[1364]	Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys

[1365]	35	40	45
[1366]	Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu		
[1367]	50	55	60
[1368]	Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro		
[1369]	65	70	75
[1370]	<210> 49		
[1371]	<211> 77		
[1372]	<212> PRT		
[1373]	<213> 智人		
[1374]	<220>		
[1375]	<221> MISC_FEATURE		
[1376]	<223> CCL19		
[1377]	<400> 49		
[1378]	Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser Val Thr Gln Lys Pro		
[1379]	1	5	10
[1380]	Ile Pro Gly Tyr Ile Val Arg Asn Phe His Tyr Leu Leu Ile Lys Asp		
[1381]	20	25	30
[1382]	Gly Cys Arg Val Pro Ala Val Val Phe Thr Thr Leu Arg Gly Arg Gln		
[1383]	35	40	45
[1384]	Leu Cys Ala Pro Pro Asp Gln Pro Trp Val Glu Arg Ile Ile Gln Arg		
[1385]	50	55	60
[1386]	Leu Gln Arg Thr Ser Ala Lys Met Lys Arg Arg Ser Ser		
[1387]	65	70	75
[1388]	<210> 50		
[1389]	<211> 111		
[1390]	<212> PRT		
[1391]	<213> 智人		
[1392]	<220>		
[1393]	<221> MISC_FEATURE		
[1394]	<223> CCL21		
[1395]	<400> 50		
[1396]	Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys		
[1397]	1	5	10
[1398]	Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu		
[1399]	20	25	30
[1400]	Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln		
[1401]	35	40	45
[1402]	Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met		
[1403]	50	55	60

[1404]	Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys
[1405]	65 70 75 80
[1406]	Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser
[1407]	85 90 95
[1408]	Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser Gln Thr Pro Lys Gly Pro
[1409]	100 105 110
[1410]	<210> 51
[1411]	<211> 127
[1412]	<212> PRT
[1413]	<213> 智人
[1414]	<220>
[1415]	<221> MISC_FEATURE
[1416]	<223> CCL25
[1417]	<400> 51
[1418]	Gln Gly Val Phe Glu Asp Cys Cys Leu Ala Tyr His Tyr Pro Ile Gly
[1419]	1 5 10 15
[1420]	Trp Ala Val Leu Arg Arg Ala Trp Thr Tyr Arg Ile Gln Glu Val Ser
[1421]	20 25 30
[1422]	Gly Ser Cys Asn Leu Pro Ala Ala Ile Phe Tyr Leu Pro Lys Arg His
[1423]	35 40 45
[1424]	Arg Lys Val Cys Gly Asn Pro Lys Ser Arg Glu Val Gln Arg Ala Met
[1425]	50 55 60
[1426]	Lys Leu Leu Asp Ala Arg Asn Lys Val Phe Ala Lys Leu His His Asn
[1427]	65 70 75 80
[1428]	Thr Gln Thr Phe Gln Ala Gly Pro His Ala Val Lys Lys Leu Ser Ser
[1429]	85 90 95
[1430]	Gly Asn Ser Lys Leu Ser Ser Ser Lys Phe Ser Asn Pro Ile Ser Ser
[1431]	100 105 110
[1432]	Ser Lys Arg Asn Val Ser Leu Leu Ile Ser Ala Asn Ser Gly Leu
[1433]	115 120 125
[1434]	<210> 52
[1435]	<211> 118
[1436]	<212> PRT
[1437]	<213> 人工序列
[1438]	<220>
[1439]	<223> 抗CD16抗体3G8 VH
[1440]	<400> 52
[1441]	Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
[1442]	1 5 10 15

[1443]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser
[1444]				20					25					30		
[1445]	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
[1446]			35					40					45			
[1447]	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala
[1448]		50					55					60				
[1449]	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val
[1450]	65					70					75				80	
[1451]	Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr
[1452]				85						90					95	
[1453]	Cys	Ala	Gln	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
[1454]			100						105						110	
[1455]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
[1456]			115													
[1457]	<210>	53														
[1458]	<211>	111														
[1459]	<212>	PRT														
[1460]	<213>	人工序列														
[1461]	<220>															
[1462]	<223>	抗CD16抗体3G8 VL														
[1463]	<400>	53														
[1464]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[1465]	1			5						10				15		
[1466]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp
[1467]			20						25					30		
[1468]	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[1469]			35					40					45			
[1470]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Thr	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala
[1471]		50					55					60				
[1472]	Arg	Phe	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
[1473]	65					70					75				80	
[1474]	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn
[1475]				85						90					95	
[1476]	Glu	Asp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
[1477]			100						105						110	
[1478]	<210>	54														
[1479]	<211>	1065														
[1480]	<212>	PRT														
[1481]	<213>	人工序列														

[1482]	<220>															
[1483]	<223> LFA-1 α 细胞外结构域 (ECD)															
[1484]	<400> 54															
[1485]	Tyr	Asn	Leu	Asp	Val	Arg	Gly	Ala	Arg	Ser	Phe	Ser	Pro	Pro	Arg	Ala
[1486]	1				5					10					15	
[1487]	Gly	Arg	His	Phe	Gly	Tyr	Arg	Val	Leu	Gln	Val	Gly	Asn	Gly	Val	Ile
[1488]				20					25					30		
[1489]	Val	Gly	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Tyr	Gln	Cys
[1490]			35					40					45			
[1491]	Gln	Ser	Gly	Thr	Gly	His	Cys	Leu	Pro	Val	Thr	Leu	Arg	Gly	Ser	Asn
[1492]		50					55					60				
[1493]	Tyr	Thr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Gly	Met	Thr	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Thr	Asp
[1494]	65					70					75					80
[1495]	Gly	Ser	Ile	Leu	Ala	Cys	Asp	Pro	Gly	Leu	Ser	Arg	Thr	Cys	Asp	Gln
[1496]					85					90					95	
[1497]	Asn	Thr	Tyr	Leu	Ser	Gly	Leu	Cys	Tyr	Leu	Phe	Arg	Gln	Asn	Leu	Gln
[1498]				100					105					110		
[1499]	Gly	Pro	Met	Leu	Gln	Gly	Arg	Pro	Gly	Phe	Gln	Glu	Cys	Ile	Lys	Gly
[1500]			115					120					125			
[1501]	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Phe	Asp	Gly	Ser	Met	Ser	Leu	Gln	Pro
[1502]		130					135					140				
[1503]	Asp	Glu	Phe	Gln	Lys	Ile	Leu	Asp	Phe	Met	Lys	Asp	Val	Met	Lys	Lys
[1504]	145					150					155					160
[1505]	Leu	Ser	Asn	Thr	Ser	Tyr	Gln	Phe	Ala	Ala	Val	Gln	Phe	Ser	Thr	Ser
[1506]					165					170					175	
[1507]	Tyr	Lys	Thr	Glu	Phe	Asp	Phe	Ser	Asp	Tyr	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Pro
[1508]				180					185					190		
[1509]	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	His	Val	Lys	His	Met	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn	Thr
[1510]			195					200					205			
[1511]	Phe	Gly	Ala	Ile	Asn	Tyr	Val	Ala	Thr	Glu	Val	Phe	Arg	Glu	Glu	Leu
[1512]		210					215					220				
[1513]	Gly	Ala	Arg	Pro	Asp	Ala	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Ile	Ile	Thr	Asp	Gly
[1514]	225					230					235					240
[1515]	Glu	Ala	Thr	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	Asp	Ile	Ile	Arg
[1516]					245					250					255	
[1517]	Tyr	Ile	Ile	Gly	Ile	Gly	Lys	His	Phe	Gln	Thr	Lys	Glu	Ser	Gln	Glu
[1518]				260					265					270		
[1519]	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ala	Ser	Lys	Pro	Ala	Ser	Glu	Phe	Val	Lys	Ile
[1520]			275					280					285			

[1521]	Leu	Asp	Thr	Phe	Glu	Lys	Leu	Lys	Asp	Leu	Phe	Thr	Glu	Leu	Gln	Lys
[1522]	290						295					300				
[1523]	Lys	Ile	Tyr	Val	Ile	Glu	Gly	Thr	Ser	Lys	Gln	Asp	Leu	Thr	Ser	Phe
[1524]	305					310					315					320
[1525]	Asn	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Arg	Gly
[1526]					325					330					335	
[1527]	His	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Ala	Lys	Asp	Trp	Ala	Gly	Gly	Phe
[1528]				340					345					350		
[1529]	Leu	Asp	Leu	Lys	Ala	Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Thr	Phe	Ile	Gly	Asn	Glu
[1530]			355					360					365			
[1531]	Pro	Leu	Thr	Pro	Glu	Val	Arg	Ala	Gly	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Thr	Val	Thr
[1532]		370					375					380				
[1533]	Trp	Leu	Pro	Ser	Arg	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Pro
[1534]	385					390					395					400
[1535]	Arg	Tyr	Gln	His	Met	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Phe	Gln	Glu	Pro	Gln	Gly
[1536]					405					410					415	
[1537]	Gly	Gly	His	Trp	Ser	Gln	Val	Gln	Thr	Ile	His	Gly	Thr	Gln	Ile	Gly
[1538]				420					425					430		
[1539]	Ser	Tyr	Phe	Gly	Gly	Glu	Leu	Cys	Gly	Val	Asp	Val	Asp	Gln	Asp	Gly
[1540]			435					440					445			
[1541]	Glu	Thr	Glu	Leu	Leu	Leu	Ile	Gly	Ala	Pro	Leu	Phe	Tyr	Gly	Glu	Gln
[1542]		450					455					460				
[1543]	Arg	Gly	Gly	Arg	Val	Phe	Ile	Tyr	Gln	Arg	Arg	Gln	Leu	Gly	Phe	Glu
[1544]	465					470					475					480
[1545]	Glu	Val	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Asp	Pro	Gly	Tyr	Pro	Leu	Gly	Arg	Phe
[1546]					485					490					495	
[1547]	Gly	Glu	Ala	Ile	Thr	Ala	Leu	Thr	Asp	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Leu	Val
[1548]				500					505					510		
[1549]	Asp	Val	Ala	Val	Gly	Ala	Pro	Leu	Glu	Glu	Gln	Gly	Ala	Val	Tyr	Ile
[1550]			515					520					525			
[1551]	Phe	Asn	Gly	Arg	His	Gly	Gly	Leu	Ser	Pro	Gln	Pro	Ser	Gln	Arg	Ile
[1552]		530					535						540			
[1553]	Glu	Gly	Thr	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Ile	Gln	Trp	Phe	Gly	Arg	Ser	Ile
[1554]	545					550					555					560
[1555]	His	Gly	Val	Lys	Asp	Leu	Glu	Gly	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Val	Ala	Val
[1556]					565					570					575	
[1557]	Gly	Ala	Glu	Ser	Gln	Met	Ile	Val	Leu	Ser	Ser	Arg	Pro	Val	Val	Asp
[1558]				580					585					590		
[1559]	Met	Val	Thr	Leu	Met	Ser	Phe	Ser	Pro	Ala	Glu	Ile	Pro	Val	His	Glu

[1560]	595	600	605
[1561]	Val Glu Cys Ser Tyr Ser Thr Ser Asn Lys Met Lys Glu Gly Val Asn		
[1562]	610	615	620
[1563]	Ile Thr Ile Cys Phe Gln Ile Lys Ser Leu Ile Pro Gln Phe Gln Gly		
[1564]	625	630	635
[1565]	Arg Leu Val Ala Asn Leu Thr Tyr Thr Leu Gln Leu Asp Gly His Arg		
[1566]	645	650	655
[1567]	Thr Arg Arg Arg Gly Leu Phe Pro Gly Gly Arg His Glu Leu Arg Arg		
[1568]	660	665	670
[1569]	Asn Ile Ala Val Thr Thr Ser Met Ser Cys Thr Asp Phe Ser Phe His		
[1570]	675	680	685
[1571]	Phe Pro Val Cys Val Gln Asp Leu Ile Ser Pro Ile Asn Val Ser Leu		
[1572]	690	695	700
[1573]	Asn Phe Ser Leu Trp Glu Glu Glu Gly Thr Pro Arg Asp Gln Arg Ala		
[1574]	705	710	715
[1575]	Gln Gly Lys Asp Ile Pro Pro Ile Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Glu		
[1576]	725	730	735
[1577]	Thr Trp Glu Ile Pro Phe Glu Lys Asn Cys Gly Glu Asp Lys Lys Cys		
[1578]	740	745	750
[1579]	Glu Ala Asn Leu Arg Val Ser Phe Ser Pro Ala Arg Ser Arg Ala Leu		
[1580]	755	760	765
[1581]	Arg Leu Thr Ala Phe Ala Ser Leu Ser Val Glu Leu Ser Leu Ser Asn		
[1582]	770	775	780
[1583]	Leu Glu Glu Asp Ala Tyr Trp Val Gln Leu Asp Leu His Phe Pro Pro		
[1584]	785	790	795
[1585]	Gly Leu Ser Phe Arg Lys Val Glu Met Leu Lys Pro His Ser Gln Ile		
[1586]	805	810	815
[1587]	Pro Val Ser Cys Glu Glu Leu Pro Glu Glu Ser Arg Leu Leu Ser Arg		
[1588]	820	825	830
[1589]	Ala Leu Ser Cys Asn Val Ser Ser Pro Ile Phe Lys Ala Gly His Ser		
[1590]	835	840	845
[1591]	Val Ala Leu Gln Met Met Phe Asn Thr Leu Val Asn Ser Ser Trp Gly		
[1592]	850	855	860
[1593]	Asp Ser Val Glu Leu His Ala Asn Val Thr Cys Asn Asn Glu Asp Ser		
[1594]	865	870	875
[1595]	Asp Leu Leu Glu Asp Asn Ser Ala Thr Thr Ile Ile Pro Ile Leu Tyr		
[1596]	885	890	895
[1597]	Pro Ile Asn Ile Leu Ile Gln Asp Gln Glu Asp Ser Thr Leu Tyr Val		
[1598]	900	905	910

[1599]	Ser Phe Thr Pro Lys Gly Pro Lys Ile His Gln Val Lys His Met Tyr
[1600]	915 920 925
[1601]	Gln Val Arg Ile Gln Pro Ser Ile His Asp His Asn Ile Pro Thr Leu
[1602]	930 935 940
[1603]	Glu Ala Val Val Gly Val Pro Gln Pro Pro Ser Glu Gly Pro Ile Thr
[1604]	945 950 955 960
[1605]	His Gln Trp Ser Val Gln Met Glu Pro Pro Val Pro Cys His Tyr Glu
[1606]	965 970 975
[1607]	Asp Leu Glu Arg Leu Pro Asp Ala Ala Glu Pro Cys Leu Pro Gly Ala
[1608]	980 985 990
[1609]	Leu Phe Arg Cys Pro Val Val Phe Arg Gln Glu Ile Leu Val Gln Val
[1610]	995 1000 1005
[1611]	Ile Gly Thr Leu Glu Leu Val Gly Glu Ile Glu Ala Ser Ser Met
[1612]	1010 1015 1020
[1613]	Phe Ser Leu Cys Ser Ser Leu Ser Ile Ser Phe Asn Ser Ser Lys
[1614]	1025 1030 1035
[1615]	His Phe His Leu Tyr Gly Ser Asn Ala Ser Leu Ala Gln Val Val
[1616]	1040 1045 1050
[1617]	Met Lys Val Asp Val Val Tyr Glu Lys Gln Met Leu
[1618]	1055 1060 1065
[1619]	<210> 55
[1620]	<211> 678
[1621]	<212> PRT
[1622]	<213> 人工序列
[1623]	<220>
[1624]	<223> LFA-1 β 细胞外结构域 (ECD)
[1625]	<400> 55
[1626]	Gln Glu Cys Thr Lys Phe Lys Val Ser Ser Cys Arg Glu Cys Ile Glu
[1627]	1 5 10 15
[1628]	Ser Gly Pro Gly Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro
[1629]	20 25 30
[1630]	Gly Asp Pro Asp Ser Ile Arg Cys Asp Thr Arg Pro Gln Leu Leu Met
[1631]	35 40 45
[1632]	Arg Gly Cys Ala Ala Asp Asp Ile Met Asp Pro Thr Ser Leu Ala Glu
[1633]	50 55 60
[1634]	Thr Gln Glu Asp His Asn Gly Gly Gln Lys Gln Leu Ser Pro Gln Lys
[1635]	65 70 75 80
[1636]	Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ala Ala Phe Asn Val Thr
[1637]	85 90 95

[1638]	Phe	Arg	Arg	Ala	Lys	Gly	Tyr	Pro	Ile	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	Asp
[1639]				100					105					110		
[1640]	Leu	Ser	Tyr	Ser	Met	Leu	Asp	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Lys	Lys	Leu	Gly
[1641]				115					120					125		
[1642]	Gly	Asp	Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Asn	Glu	Ile	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Ile
[1643]				130					135					140		
[1644]	Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Leu	Pro	Phe	Val	Asn	Thr
[1645]	145								150					155		160
[1646]	His	Pro	Asp	Lys	Leu	Arg	Asn	Pro	Cys	Pro	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Cys
[1647]					165						170				175	
[1648]	Gln	Pro	Pro	Phe	Ala	Phe	Arg	His	Val	Leu	Lys	Leu	Thr	Asn	Asn	Ser
[1649]				180							185				190	
[1650]	Asn	Gln	Phe	Gln	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Gly	Asn	Leu
[1651]				195							200				205	
[1652]	Asp	Ala	Pro	Glu	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala	Met	Met	Gln	Val	Ala	Ala	Cys
[1653]				210										220		
[1654]	Pro	Glu	Glu	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Thr	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	Ala
[1655]	225						230					235				240
[1656]	Thr	Asp	Asp	Gly	Phe	His	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile
[1657]					245						250					255
[1658]	Leu	Thr	Pro	Asn	Asp	Gly	Arg	Cys	His	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Tyr	Lys
[1659]				260							265				270	
[1660]	Arg	Ser	Asn	Glu	Phe	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Leu	Ala	His	Lys
[1661]				275							280				285	
[1662]	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Arg	Met
[1663]				290							295				300	
[1664]	Val	Lys	Thr	Tyr	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Val
[1665]	305						310					315				320
[1666]	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Ile	Lys	Asn
[1667]					325						330				335	
[1668]	Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Val	Phe	Leu	Asp	His	Asn	Ala	Leu
[1669]				340							345				350	
[1670]	Pro	Asp	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Tyr	Asp	Ser	Phe	Cys	Ser	Asn	Gly	Val
[1671]				355							360				365	
[1672]	Thr	His	Arg	Asn	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	Cys	Asp	Gly	Val	Gln	Ile	Asn
[1673]				370								375			380	
[1674]	Val	Pro	Ile	Thr	Phe	Gln	Val	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Glu	Cys	Ile	Gln
[1675]	385						390					395				400
[1676]	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Ile	Arg	Ala	Leu	Gly	Phe	Thr	Asp	Ile	Val	Thr

[1677]	405																410				415				
[1678]	Val	Gln	Val	Leu	Pro	Gln	Cys	Glu	Cys	Arg	Cys	Arg	Asp	Gln	Ser	Arg									
[1679]	420																425				430				
[1680]	Asp	Arg	Ser	Leu	Cys	His	Gly	Lys	Gly	Phe	Leu	Glu	Cys	Gly	Ile	Cys									
[1681]	435																440				445				
[1682]	Arg	Cys	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ile	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Cys	Gln	Thr	Gln									
[1683]	450																455				460				
[1684]	Gly	Arg	Ser	Ser	Gln	Glu	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Arg	Lys	Asp	Asn	Asn									
[1685]	465	470																475				480			
[1686]	Ser	Ile	Ile	Cys	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Cys	Val	Cys	Gly	Gln	Cys	Leu									
[1687]	485																490				495				
[1688]	Cys	His	Thr	Ser	Asp	Val	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Tyr	Gly	Gln	Tyr	Cys									
[1689]	500																505				510				
[1690]	Glu	Cys	Asp	Thr	Ile	Asn	Cys	Glu	Arg	Tyr	Asn	Gly	Gln	Val	Cys	Gly									
[1691]	515																520				525				
[1692]	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Cys	Phe	Cys	Gly	Lys	Cys	Arg	Cys	His	Pro									
[1693]	530																535				540				
[1694]	Gly	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Cys	Gln	Cys	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Gly	Cys									
[1695]	545	550																555				560			
[1696]	Leu	Asn	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Arg	Cys	Arg	Cys									
[1697]	565																570				575				
[1698]	Asn	Val	Cys	Glu	Cys	His	Ser	Gly	Tyr	Gln	Leu	Pro	Leu	Cys	Gln	Glu									
[1699]	580																585				590				
[1700]	Cys	Pro	Gly	Cys	Pro	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Tyr	Ile	Ser	Cys	Ala	Glu									
[1701]	595																600				605				
[1702]	Cys	Leu	Lys	Phe	Glu	Lys	Gly	Pro	Phe	Gly	Lys	Asn	Cys	Ser	Ala	Ala									
[1703]	610																615				620				
[1704]	Cys	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Asn	Asn	Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Thr	Cys									
[1705]	625	630																635				640			
[1706]	Lys	Glu	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Trp	Val	Ala	Tyr	Thr	Leu	Glu	Gln									
[1707]	645																650				655				
[1708]	Gln	Asp	Gly	Met	Asp	Arg	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Val	Asp	Glu	Ser	Arg	Glu									
[1709]	660																665				670				
[1710]	Cys	Val	Ala	Gly	Pro	Asn																			
[1711]	675																								
[1712]	<210>	56																							
[1713]	<211>	674																							
[1714]	<212>	PRT																							
[1715]	<213>	人工序列																							

[1716]	<220>	
[1717]	<223>	VCAM-1细胞外结构域 (ECD)
[1718]	<400>	56
[1719]	Phe Lys Ile Glu Thr Thr Pro Glu Ser Arg Tyr Leu Ala Gln Ile Gly	
[1720]	1	5 10 15
[1721]	Asp Ser Val Ser Leu Thr Cys Ser Thr Thr Gly Cys Glu Ser Pro Phe	
[1722]	20	25 30
[1723]	Phe Ser Trp Arg Thr Gln Ile Asp Ser Pro Leu Asn Gly Lys Val Thr	
[1724]	35	40 45
[1725]	Asn Glu Gly Thr Thr Ser Thr Leu Thr Met Asn Pro Val Ser Phe Gly	
[1726]	50	55 60
[1727]	Asn Glu His Ser Tyr Leu Cys Thr Ala Thr Cys Glu Ser Arg Lys Leu	
[1728]	65	70 75 80
[1729]	Glu Lys Gly Ile Gln Val Glu Ile Tyr Ser Phe Pro Lys Asp Pro Glu	
[1730]	85	90 95
[1731]	Ile His Leu Ser Gly Pro Leu Glu Ala Gly Lys Pro Ile Thr Val Lys	
[1732]	100	105 110
[1733]	Cys Ser Val Ala Asp Val Tyr Pro Phe Asp Arg Leu Glu Ile Asp Leu	
[1734]	115	120 125
[1735]	Leu Lys Gly Asp His Leu Met Lys Ser Gln Glu Phe Leu Glu Asp Ala	
[1736]	130	135 140
[1737]	Asp Arg Lys Ser Leu Glu Thr Lys Ser Leu Glu Val Thr Phe Thr Pro	
[1738]	145	150 155 160
[1739]	Val Ile Glu Asp Ile Gly Lys Val Leu Val Cys Arg Ala Lys Leu His	
[1740]	165	170 175
[1741]	Ile Asp Glu Met Asp Ser Val Pro Thr Val Arg Gln Ala Val Lys Glu	
[1742]	180	185 190
[1743]	Leu Gln Val Tyr Ile Ser Pro Lys Asn Thr Val Ile Ser Val Asn Pro	
[1744]	195	200 205
[1745]	Ser Thr Lys Leu Gln Glu Gly Gly Ser Val Thr Met Thr Cys Ser Ser	
[1746]	210	215 220
[1747]	Glu Gly Leu Pro Ala Pro Glu Ile Phe Trp Ser Lys Lys Leu Asp Asn	
[1748]	225	230 235 240
[1749]	Gly Asn Leu Gln His Leu Ser Gly Asn Ala Thr Leu Thr Leu Ile Ala	
[1750]	245	250 255
[1751]	Met Arg Met Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Val Cys Glu Gly Val Asn Leu	
[1752]	260	265 270
[1753]	Ile Gly Lys Asn Arg Lys Glu Val Glu Leu Ile Val Gln Glu Lys Pro	
[1754]	275	280 285

[1755]	Phe	Thr	Val	Glu	Ile	Ser	Pro	Gly	Pro	Arg	Ile	Ala	Ala	Gln	Ile	Gly	
[1756]	290					295					300						
[1757]	Asp	Ser	Val	Met	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Met	Gly	Cys	Glu	Ser	Pro	Ser	
[1758]	305					310					315					320	
[1759]	Phe	Ser	Trp	Arg	Thr	Gln	Ile	Asp	Ser	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	Arg	
[1760]	325					330					335						
[1761]	Ser	Glu	Gly	Thr	Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Phe	Glu	
[1762]	340					345					350						
[1763]	Asn	Glu	His	Ser	Tyr	Leu	Cys	Thr	Val	Thr	Cys	Gly	His	Lys	Lys	Leu	
[1764]	355					360					365						
[1765]	Glu	Lys	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Leu	Tyr	Ser	Phe	Pro	Arg	Asp	Pro	Glu	
[1766]	370					375					380						
[1767]	Ile	Glu	Met	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Ser	
[1768]	385					390					395					400	
[1769]	Cys	Lys	Val	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Asp	Arg	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu	
[1770]	405					410					415						
[1771]	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Ile	Leu	Glu	Asn	Ile	Glu	Phe	Leu	Glu	Asp	Thr	
[1772]	420					425					430						
[1773]	Asp	Met	Lys	Ser	Leu	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Phe	Ile	Pro	
[1774]	435					440					445						
[1775]	Thr	Ile	Glu	Asp	Thr	Gly	Lys	Ala	Leu	Val	Cys	Gln	Ala	Lys	Leu	His	
[1776]	450					455					460						
[1777]	Ile	Asp	Asp	Met	Glu	Phe	Glu	Pro	Lys	Gln	Arg	Gln	Ser	Thr	Gln	Thr	
[1778]	465					470					475					480	
[1779]	Leu	Tyr	Val	Asn	Val	Ala	Pro	Arg	Asp	Thr	Thr	Val	Leu	Val	Ser	Pro	
[1780]	485					490					495						
[1781]	Ser	Ser	Ile	Leu	Glu	Glu	Gly	Ser	Ser	Val	Asn	Met	Thr	Cys	Leu	Ser	
[1782]	500					505					510						
[1783]	Gln	Gly	Phe	Pro	Ala	Pro	Lys	Ile	Leu	Trp	Ser	Arg	Gln	Leu	Pro	Asn	
[1784]	515					520					525						
[1785]	Gly	Glu	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Glu	Asn	Ala	Thr	Leu	Thr	Leu	Ile	Ser	
[1786]	530					535					540						
[1787]	Thr	Lys	Met	Glu	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Leu	Cys	Glu	Gly	Ile	Asn	Gln	
[1788]	545					550					555					560	
[1789]	Ala	Gly	Arg	Ser	Arg	Lys	Glu	Val	Glu	Leu	Ile	Ile	Gln	Val	Thr	Pro	
[1790]	565					570					575						
[1791]	Lys	Asp	Ile	Lys	Leu	Thr	Ala	Phe	Pro	Ser	Glu	Ser	Val	Lys	Glu	Gly	
[1792]	580					585					590						
[1793]	Asp	Thr	Val	Ile	Ile	Ser	Cys	Thr	Cys	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Thr	Trp	

[1794]	595	600	605
[1795]	Ile Ile Leu Lys Lys Lys Ala Glu Thr Gly Asp Thr Val Leu Lys Ser		
[1796]	610	615	620
[1797]	Ile Asp Gly Ala Tyr Thr Ile Arg Lys Ala Gln Leu Lys Asp Ala Gly		
[1798]	625	630	635
[1799]	Val Tyr Glu Cys Glu Ser Lys Asn Lys Val Gly Ser Gln Leu Arg Ser		
[1800]	645	650	655
[1801]	Leu Thr Leu Asp Val Gln Gly Arg Glu Asn Asn Lys Asp Tyr Phe Ser		
[1802]	660	665	670
[1803]	Pro Glu		
[1804]	<210> 57		
[1805]	<211> 294		
[1806]	<212> PRT		
[1807]	<213> 人工序列		
[1808]	<220>		
[1809]	<223> L-选择素细胞外结构域 (ECD)		
[1810]	<400> 57		
[1811]	Trp Thr Tyr His Tyr Ser Glu Lys Pro Met Asn Trp Gln Arg Ala Arg		
[1812]	1	5	10
[1813]	Arg Phe Cys Arg Asp Asn Tyr Thr Asp Leu Val Ala Ile Gln Asn Lys		
[1814]	20	25	30
[1815]	Ala Glu Ile Glu Tyr Leu Glu Lys Thr Leu Pro Phe Ser Arg Ser Tyr		
[1816]	35	40	45
[1817]	Tyr Trp Ile Gly Ile Arg Lys Ile Gly Gly Ile Trp Thr Trp Val Gly		
[1818]	50	55	60
[1819]	Thr Asn Lys Ser Leu Thr Glu Glu Ala Glu Asn Trp Gly Asp Gly Glu		
[1820]	65	70	75
[1821]	Pro Asn Asn Lys Lys Asn Lys Glu Asp Cys Val Glu Ile Tyr Ile Lys		
[1822]	85	90	95
[1823]	Arg Asn Lys Asp Ala Gly Lys Trp Asn Asp Asp Ala Cys His Lys Leu		
[1824]	100	105	110
[1825]	Lys Ala Ala Leu Cys Tyr Thr Ala Ser Cys Gln Pro Trp Ser Cys Ser		
[1826]	115	120	125
[1827]	Gly His Gly Glu Cys Val Glu Ile Ile Asn Asn Tyr Thr Cys Asn Cys		
[1828]	130	135	140
[1829]	Asp Val Gly Tyr Tyr Gly Pro Gln Cys Gln Phe Val Ile Gln Cys Glu		
[1830]	145	150	155
[1831]	Pro Leu Glu Ala Pro Glu Leu Gly Thr Met Asp Cys Thr His Pro Leu		
[1832]	165	170	175

[1833]	Gly Asn Phe Ser Phe Ser Ser Gln Cys Ala Phe Ser Cys Ser Glu Gly
[1834]	180 185 190
[1835]	Thr Asn Leu Thr Gly Ile Glu Glu Thr Thr Cys Gly Pro Phe Gly Asn
[1836]	195 200 205
[1837]	Trp Ser Ser Pro Glu Pro Thr Cys Gln Val Ile Gln Cys Glu Pro Leu
[1838]	210 215 220
[1839]	Ser Ala Pro Asp Leu Gly Ile Met Asn Cys Ser His Pro Leu Ala Ser
[1840]	225 230 235 240
[1841]	Phe Ser Phe Thr Ser Ala Cys Thr Phe Ile Cys Ser Glu Gly Thr Glu
[1842]	245 250 255
[1843]	Leu Ile Gly Lys Lys Lys Thr Ile Cys Glu Ser Ser Gly Ile Trp Ser
[1844]	260 265 270
[1845]	Asn Pro Ser Pro Ile Cys Gln Lys Leu Asp Lys Ser Phe Ser Met Ile
[1846]	275 280 285
[1847]	Lys Glu Gly Asp Tyr Asn
[1848]	290
[1849]	<210> 58
[1850]	<211> 943
[1851]	<212> PRT
[1852]	<213> 人工序列
[1853]	<220>
[1854]	<223> VLA-4 细胞外结构域 (ECD)
[1855]	<400> 58
[1856]	Asn Val Asp Thr Glu Ser Ala Leu Leu Tyr Gln Gly Pro His Asn Thr
[1857]	1 5 10 15
[1858]	Leu Phe Gly Tyr Ser Val Val Leu His Ser His Gly Ala Asn Arg Trp
[1859]	20 25 30
[1860]	Leu Leu Val Gly Ala Pro Thr Ala Asn Trp Leu Ala Asn Ala Ser Val
[1861]	35 40 45
[1862]	Ile Asn Pro Gly Ala Ile Tyr Arg Cys Arg Ile Gly Lys Asn Pro Gly
[1863]	50 55 60
[1864]	Gln Thr Cys Glu Gln Leu Gln Leu Gly Ser Pro Asn Gly Glu Pro Cys
[1865]	65 70 75 80
[1866]	Gly Lys Thr Cys Leu Glu Glu Arg Asp Asn Gln Trp Leu Gly Val Thr
[1867]	85 90 95
[1868]	Leu Ser Arg Gln Pro Gly Glu Asn Gly Ser Ile Val Thr Cys Gly His
[1869]	100 105 110
[1870]	Arg Trp Lys Asn Ile Phe Tyr Ile Lys Asn Glu Asn Lys Leu Pro Thr
[1871]	115 120 125

[1872]	Gly Gly Cys Tyr Gly Val Pro Pro Asp Leu Arg Thr Glu Leu Ser Lys
[1873]	130 135 140
[1874]	Arg Ile Ala Pro Cys Tyr Gln Asp Tyr Val Lys Lys Phe Gly Glu Asn
[1875]	145 150 155 160
[1876]	Phe Ala Ser Cys Gln Ala Gly Ile Ser Ser Phe Tyr Thr Lys Asp Leu
[1877]	165 170 175
[1878]	Ile Val Met Gly Ala Pro Gly Ser Ser Tyr Trp Thr Gly Ser Leu Phe
[1879]	180 185 190
[1880]	Val Tyr Asn Ile Thr Thr Asn Lys Tyr Lys Ala Phe Leu Asp Lys Gln
[1881]	195 200 205
[1882]	Asn Gln Val Lys Phe Gly Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val Gly Ala Gly
[1883]	210 215 220
[1884]	His Phe Arg Ser Gln His Thr Thr Glu Val Val Gly Gly Ala Pro Gln
[1885]	225 230 235 240
[1886]	His Glu Gln Ile Gly Lys Ala Tyr Ile Phe Ser Ile Asp Glu Lys Glu
[1887]	245 250 255
[1888]	Leu Asn Ile Leu His Glu Met Lys Gly Lys Lys Leu Gly Ser Tyr Phe
[1889]	260 265 270
[1890]	Gly Ala Ser Val Cys Ala Val Asp Leu Asn Ala Asp Gly Phe Ser Asp
[1891]	275 280 285
[1892]	Leu Leu Val Gly Ala Pro Met Gln Ser Thr Ile Arg Glu Glu Gly Arg
[1893]	290 295 300
[1894]	Val Phe Val Tyr Ile Asn Ser Gly Ser Gly Ala Val Met Asn Ala Met
[1895]	305 310 315 320
[1896]	Glu Thr Asn Leu Val Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly Glu
[1897]	325 330 335
[1898]	Ser Ile Val Asn Leu Gly Asp Ile Asp Asn Asp Gly Phe Glu Asp Val
[1899]	340 345 350
[1900]	Ala Ile Gly Ala Pro Gln Glu Asp Asp Leu Gln Gly Ala Ile Tyr Ile
[1901]	355 360 365
[1902]	Tyr Asn Gly Arg Ala Asp Gly Ile Ser Ser Thr Phe Ser Gln Arg Ile
[1903]	370 375 380
[1904]	Glu Gly Leu Gln Ile Ser Lys Ser Leu Ser Met Phe Gly Gln Ser Ile
[1905]	385 390 395 400
[1906]	Ser Gly Gln Ile Asp Ala Asp Asn Asn Gly Tyr Val Asp Val Ala Val
[1907]	405 410 415
[1908]	Gly Ala Phe Arg Ser Asp Ser Ala Val Leu Leu Arg Thr Arg Pro Val
[1909]	420 425 430
[1910]	Val Ile Val Asp Ala Ser Leu Ser His Pro Glu Ser Val Asn Arg Thr

[1911]	435	440	445
[1912]	Lys Phe Asp Cys Val Glu Asn Gly Trp Pro Ser Val Cys Ile Asp Leu		
[1913]	450	455	460
[1914]	Thr Leu Cys Phe Ser Tyr Lys Gly Lys Glu Val Pro Gly Tyr Ile Val		
[1915]	465	470	475
[1916]	Leu Phe Tyr Asn Met Ser Leu Asp Val Asn Arg Lys Ala Glu Ser Pro		
[1917]	485	490	495
[1918]	Pro Arg Phe Tyr Phe Ser Ser Asn Gly Thr Ser Asp Val Ile Thr Gly		
[1919]	500	505	510
[1920]	Ser Ile Gln Val Ser Ser Arg Glu Ala Asn Cys Arg Thr His Gln Ala		
[1921]	515	520	525
[1922]	Phe Met Arg Lys Asp Val Arg Asp Ile Leu Thr Pro Ile Gln Ile Glu		
[1923]	530	535	540
[1924]	Ala Ala Tyr His Leu Gly Pro His Val Ile Ser Lys Arg Ser Thr Glu		
[1925]	545	550	555
[1926]	Glu Phe Pro Pro Leu Gln Pro Ile Leu Gln Gln Lys Lys Glu Lys Asp		
[1927]	565	570	575
[1928]	Ile Met Lys Lys Thr Ile Asn Phe Ala Arg Phe Cys Ala His Glu Asn		
[1929]	580	585	590
[1930]	Cys Ser Ala Asp Leu Gln Val Ser Ala Lys Ile Gly Phe Leu Lys Pro		
[1931]	595	600	605
[1932]	His Glu Asn Lys Thr Tyr Leu Ala Val Gly Ser Met Lys Thr Leu Met		
[1933]	610	615	620
[1934]	Leu Asn Val Ser Leu Phe Asn Ala Gly Asp Asp Ala Tyr Glu Thr Thr		
[1935]	625	630	635
[1936]	Leu His Val Lys Leu Pro Val Gly Leu Tyr Phe Ile Lys Ile Leu Glu		
[1937]	645	650	655
[1938]	Leu Glu Glu Lys Gln Ile Asn Cys Glu Val Thr Asp Asn Ser Gly Val		
[1939]	660	665	670
[1940]	Val Gln Leu Asp Cys Ser Ile Gly Tyr Ile Tyr Val Asp His Leu Ser		
[1941]	675	680	685
[1942]	Arg Ile Asp Ile Ser Phe Leu Leu Asp Val Ser Ser Leu Ser Arg Ala		
[1943]	690	695	700
[1944]	Glu Glu Asp Leu Ser Ile Thr Val His Ala Thr Cys Glu Asn Glu Glu		
[1945]	705	710	715
[1946]	Glu Met Asp Asn Leu Lys His Ser Arg Val Thr Val Ala Ile Pro Leu		
[1947]	725	730	735
[1948]	Lys Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val His Gly Phe Val Asn Pro Thr Ser		
[1949]	740	745	750

[1950]	Phe Val Tyr Gly Ser Asn Asp Glu Asn Glu Pro Glu Thr Cys Met Val
[1951]	755 760 765
[1952]	Glu Lys Met Asn Leu Thr Phe His Val Ile Asn Thr Gly Asn Ser Met
[1953]	770 775 780
[1954]	Ala Pro Asn Val Ser Val Glu Ile Met Val Pro Asn Ser Phe Ser Pro
[1955]	785 790 795 800
[1956]	Gln Thr Asp Lys Leu Phe Asn Ile Leu Asp Val Gln Thr Thr Thr Gly
[1957]	805 810 815
[1958]	Glu Cys His Phe Glu Asn Tyr Gln Arg Val Cys Ala Leu Glu Gln Gln
[1959]	820 825 830
[1960]	Lys Ser Ala Met Gln Thr Leu Lys Gly Ile Val Arg Phe Leu Ser Lys
[1961]	835 840 845
[1962]	Thr Asp Lys Arg Leu Leu Tyr Cys Ile Lys Ala Asp Pro His Cys Leu
[1963]	850 855 860
[1964]	Asn Phe Leu Cys Asn Phe Gly Lys Met Glu Ser Gly Lys Glu Ala Ser
[1965]	865 870 875 880
[1966]	Val His Ile Gln Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ile Leu Glu Met Asp Glu
[1967]	885 890 895
[1968]	Thr Ser Ala Leu Lys Phe Glu Ile Arg Ala Thr Gly Phe Pro Glu Pro
[1969]	900 905 910
[1970]	Asn Pro Arg Val Ile Glu Leu Asn Lys Asp Glu Asn Val Ala His Val
[1971]	915 920 925
[1972]	Leu Leu Glu Gly Leu His His Gln Arg Pro Lys Arg Tyr Phe Thr
[1973]	930 935 940
[1974]	<210> 59
[1975]	<211> 127
[1976]	<212> PRT
[1977]	<213> 阿维丁链霉菌
[1978]	<220>
[1979]	<221> MISC_FEATURE
[1980]	<223> 最小链霉亲和素
[1981]	<400> 59
[1982]	Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
[1983]	1 5 10 15
[1984]	Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
[1985]	20 25 30
[1986]	Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
[1987]	35 40 45
[1988]	Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

[1989]	50	55	60
[1990]	Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp		
[1991]	65	70	75 80
[1992]	Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp		
[1993]	85	90	95
[1994]	Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu		
[1995]	100	105	110
[1996]	Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
[1997]	115	120	125
[1998]	<210> 60		
[1999]	<211> 127		
[2000]	<212> PRT		
[2001]	<213> 阿维丁链霉菌		
[2002]	<220>		
[2003]	<221> MISC_FEATURE		
[2004]	<223> 突变蛋白链霉亲和素Val44-Thr45-Ala46-Arg47		
[2005]	<400> 60		
[2006]	Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr		
[2007]	1	5	10 15
[2008]	Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val		
[2009]	20	25	30
[2010]	Thr Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr		
[2011]	35	40	45
[2012]	Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr		
[2013]	50	55	60
[2014]	Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp		
[2015]	65	70	75 80
[2016]	Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp		
[2017]	85	90	95
[2018]	Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu		
[2019]	100	105	110
[2020]	Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
[2021]	115	120	125
[2022]	<210> 61		
[2023]	<211> 126		
[2024]	<212> PRT		
[2025]	<213> 阿维丁链霉菌		
[2026]	<220>		
[2027]	<221> MISC_FEATURE		

[2028] <223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 [2029] <400> 61
 [2030] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 [2031] 1 5 10 15
 [2032] Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
 [2033] 20 25 30
 [2034] Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 [2035] 35 40 45
 [2036] Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 [2037] 50 55 60
 [2038] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 [2039] 65 70 75 80
 [2040] Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 [2041] 85 90 95
 [2042] Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 [2043] 100 105 110
 [2044] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [2045] 115 120 125

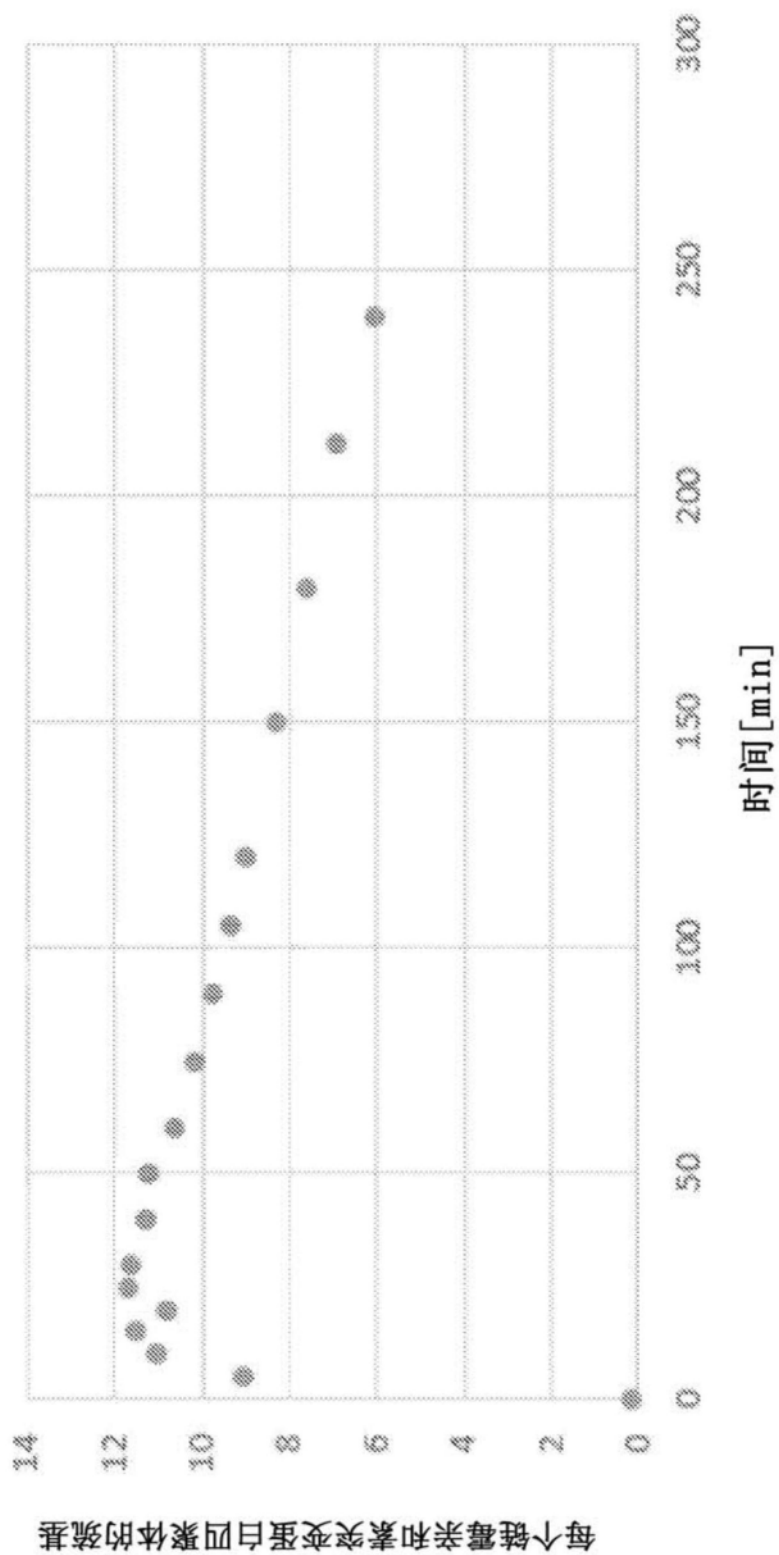


图1

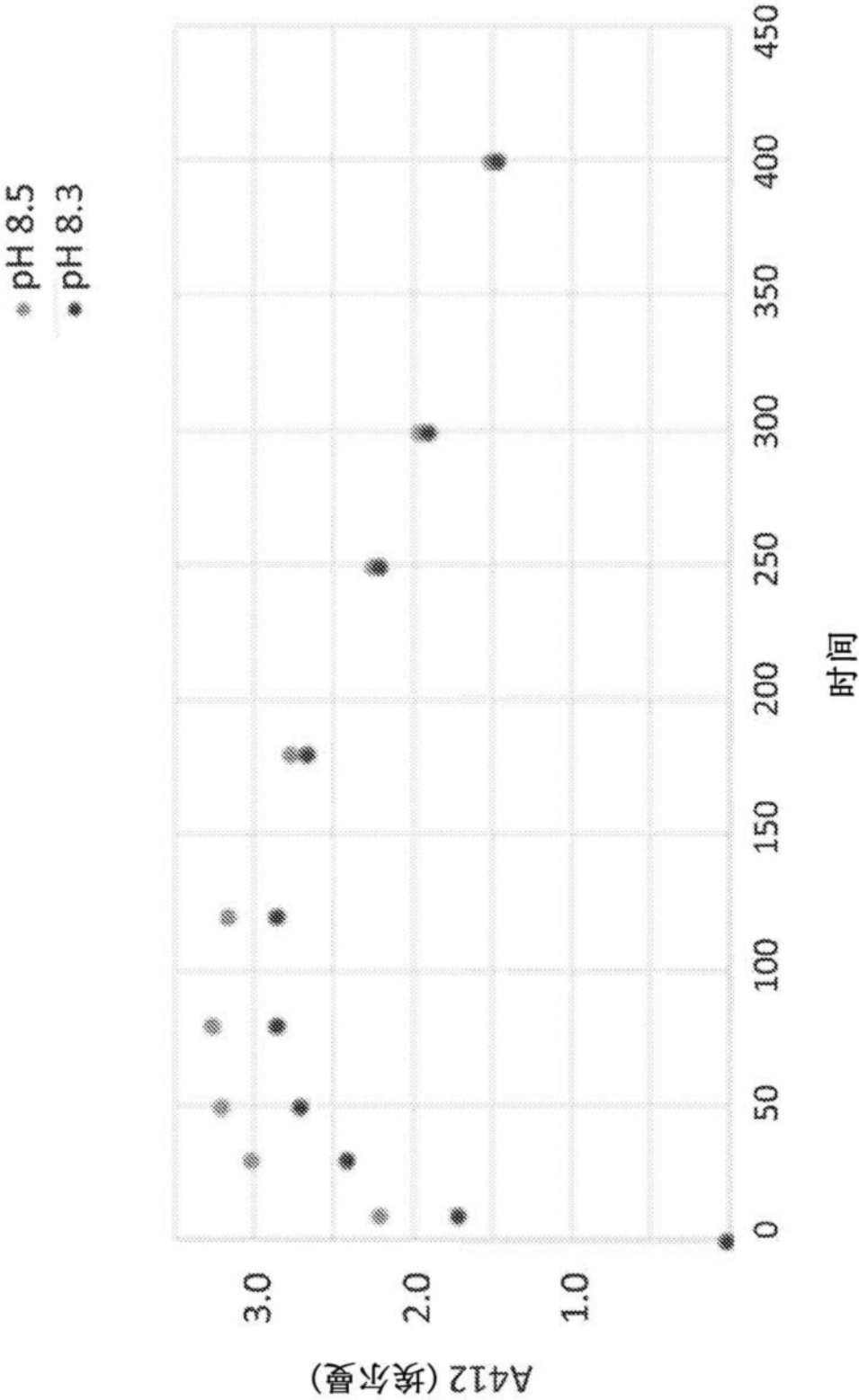


图2

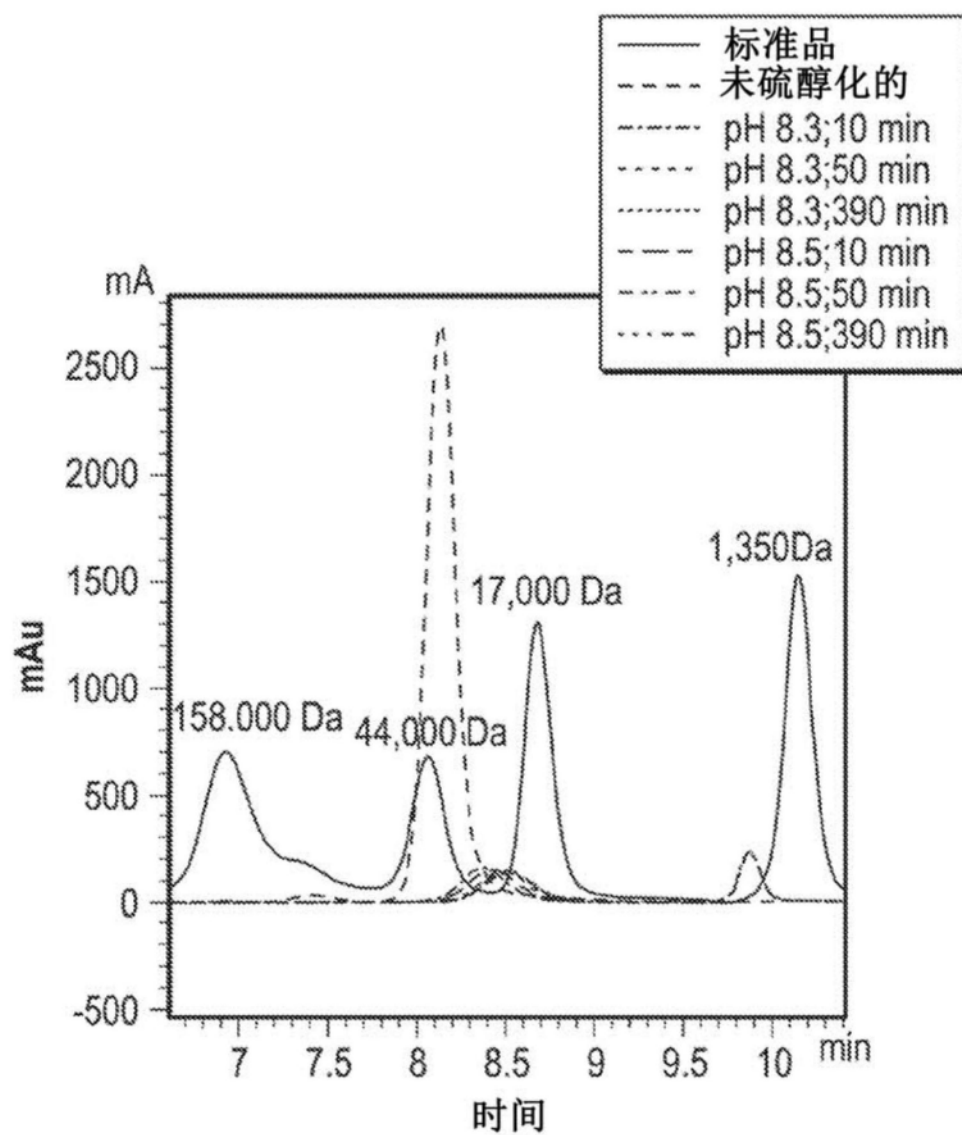


图3

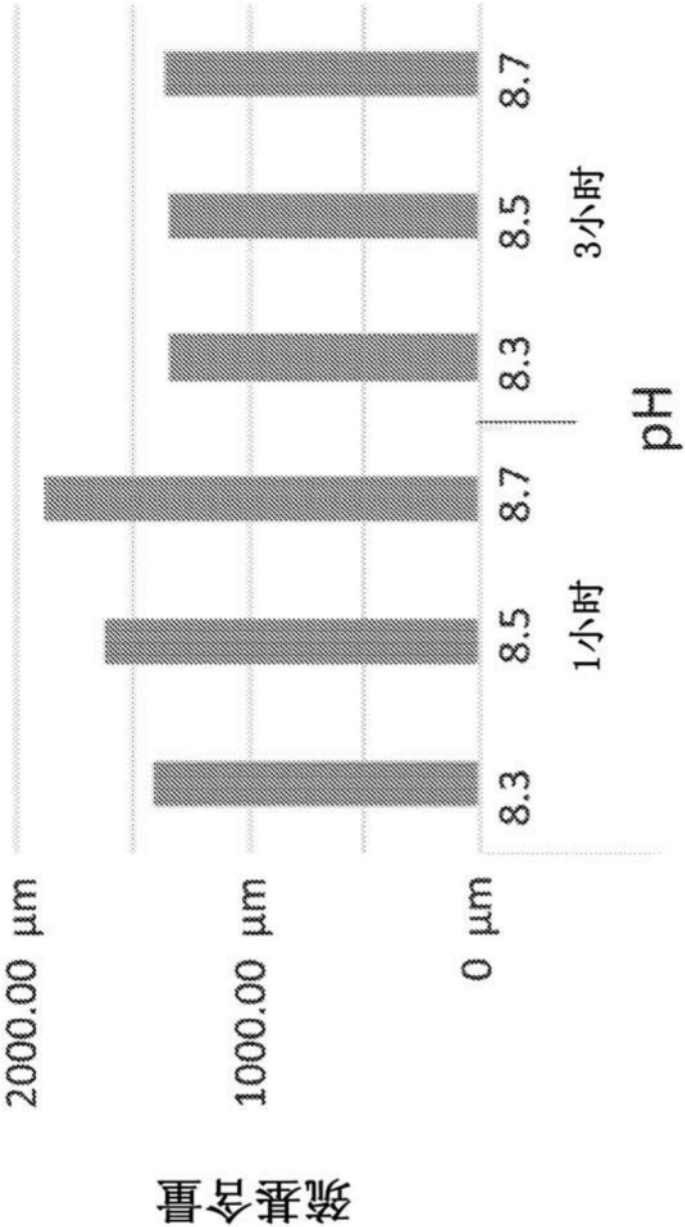


图4

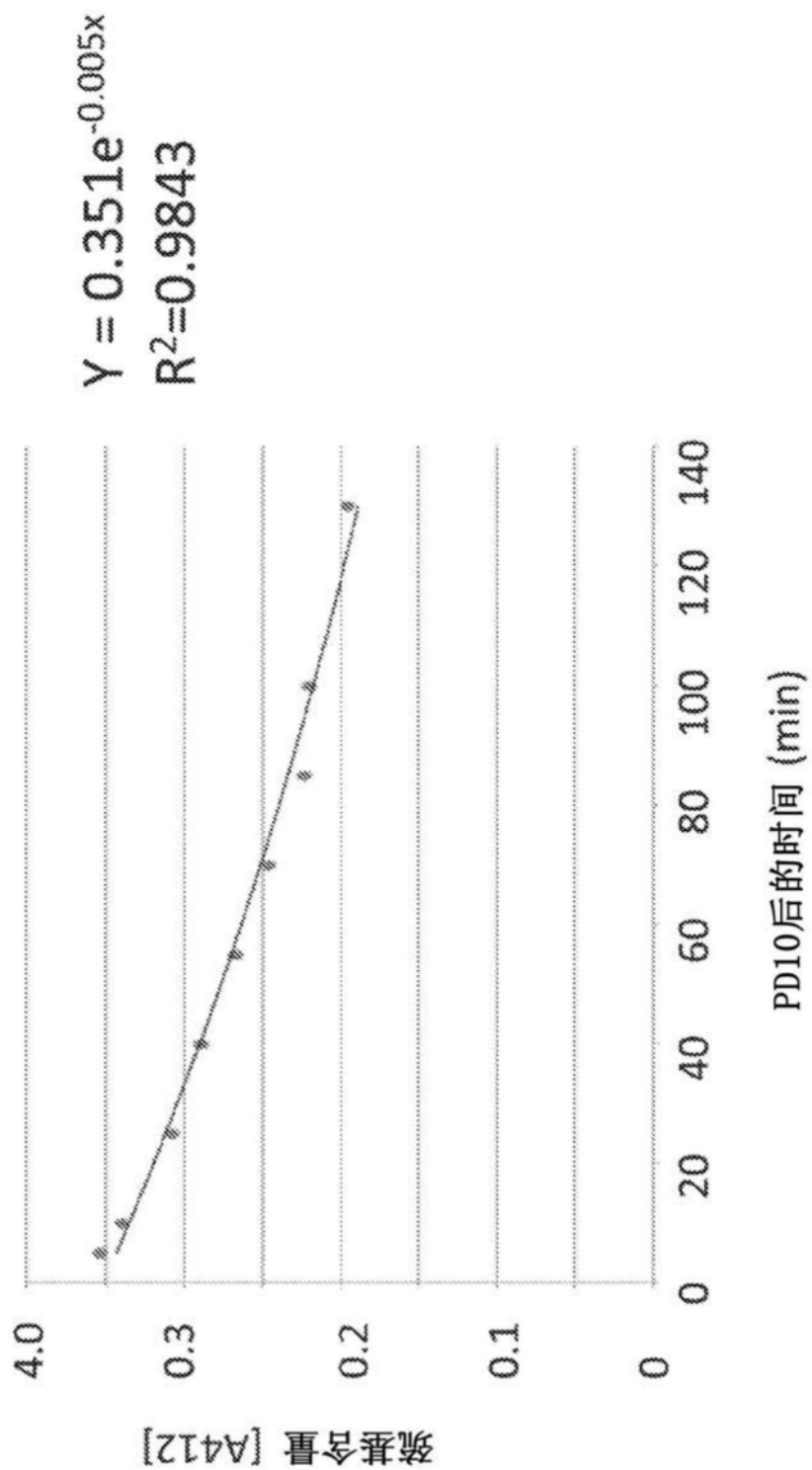


图5

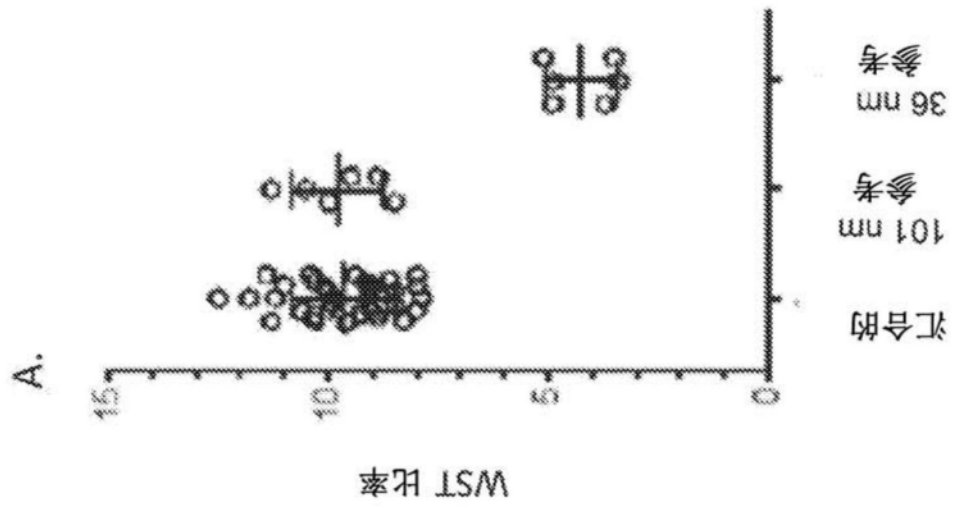


图6A

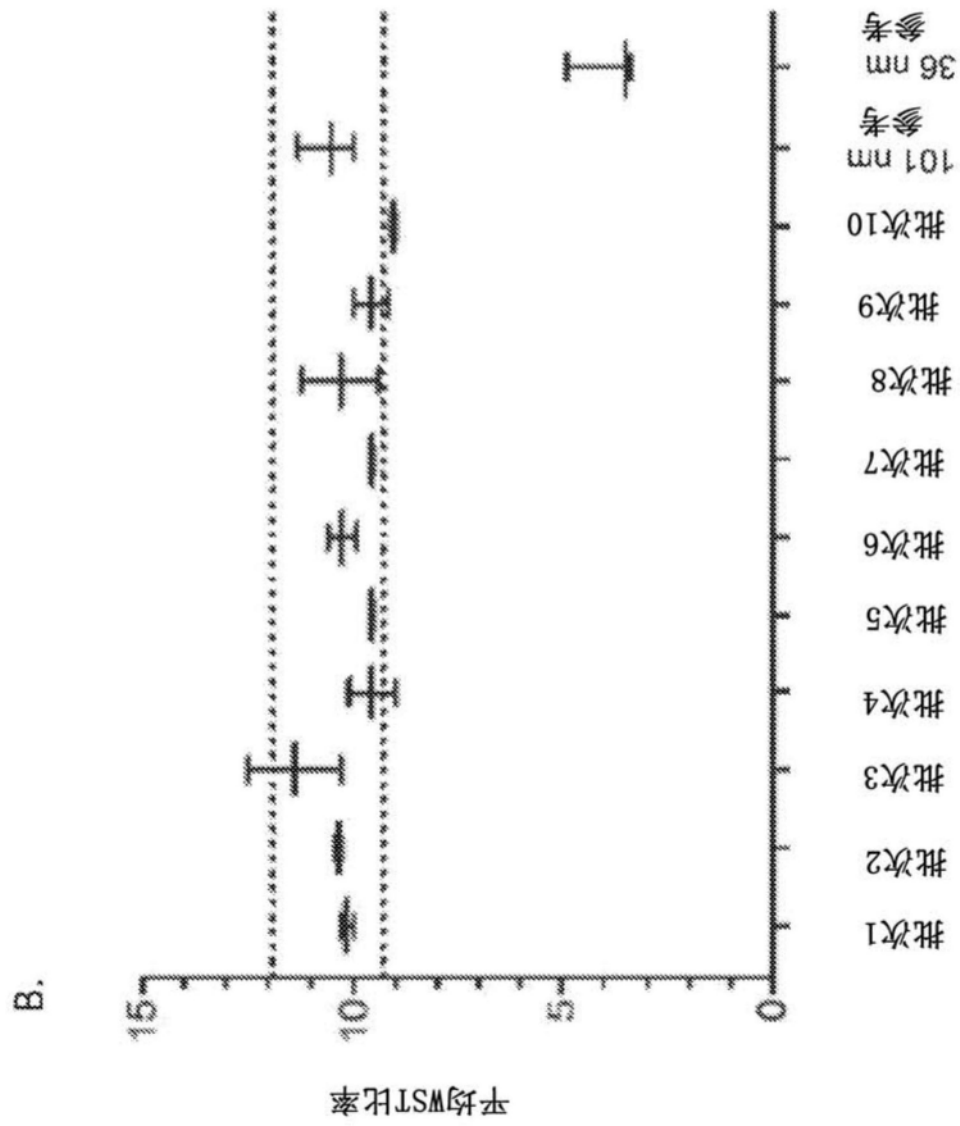


图6B

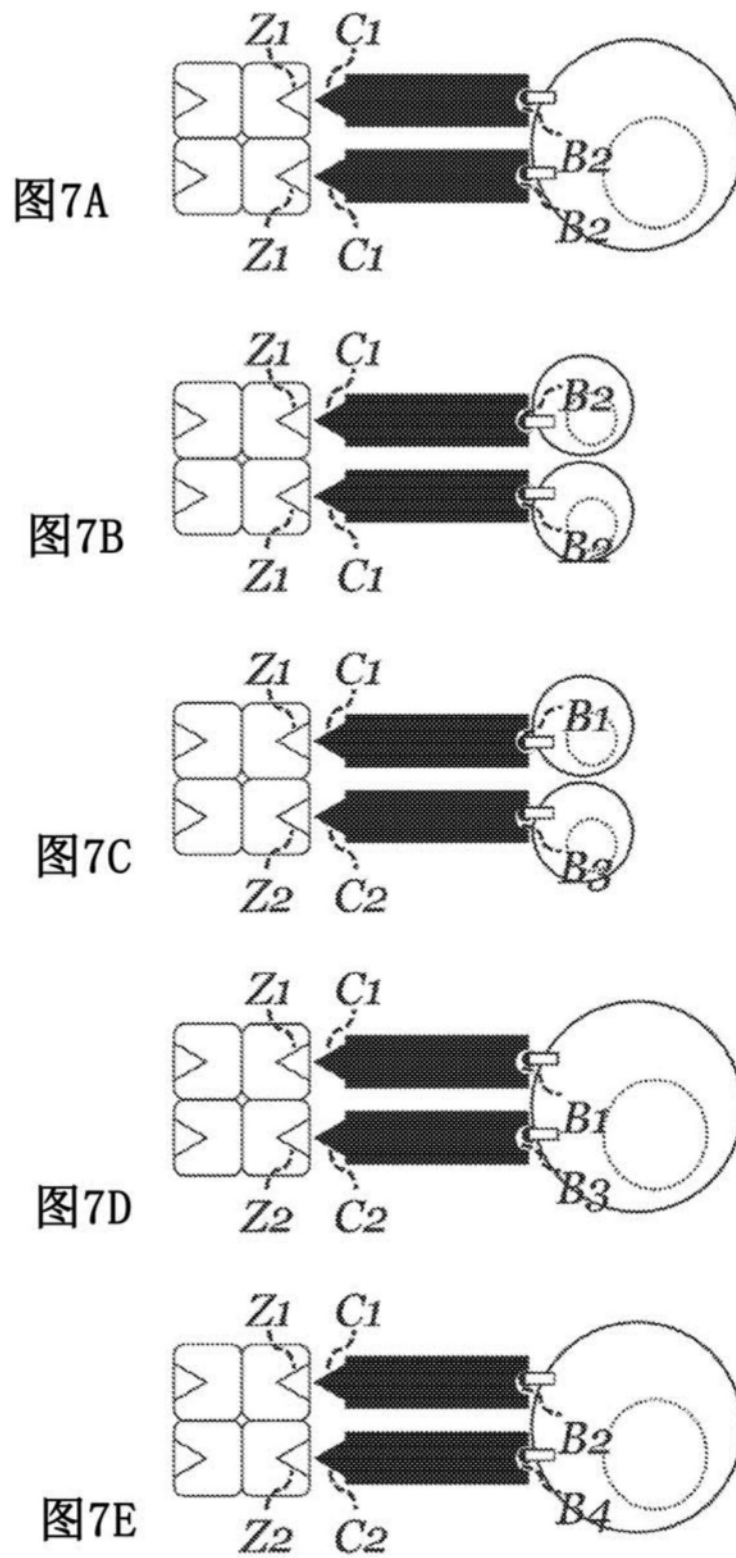


图7

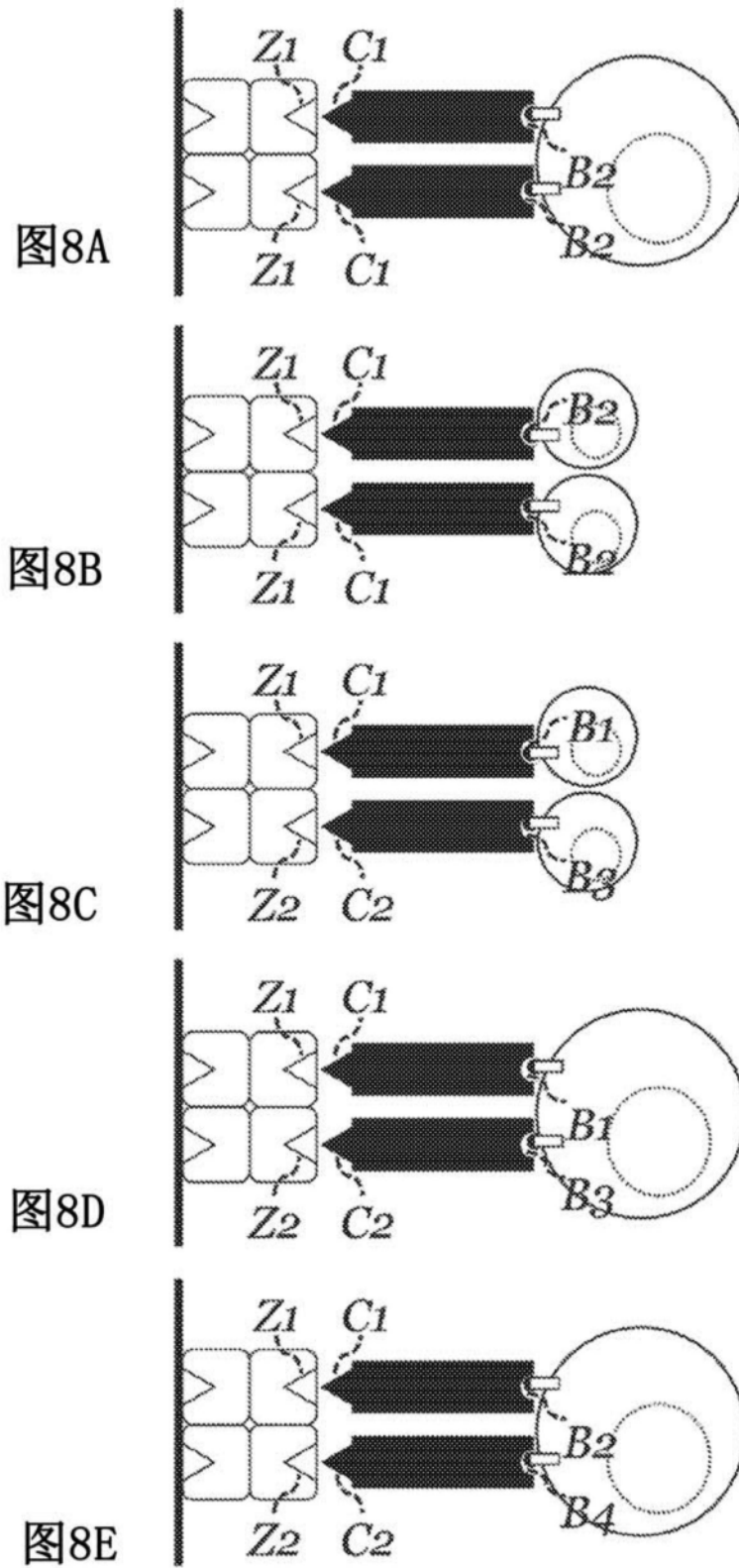


图8

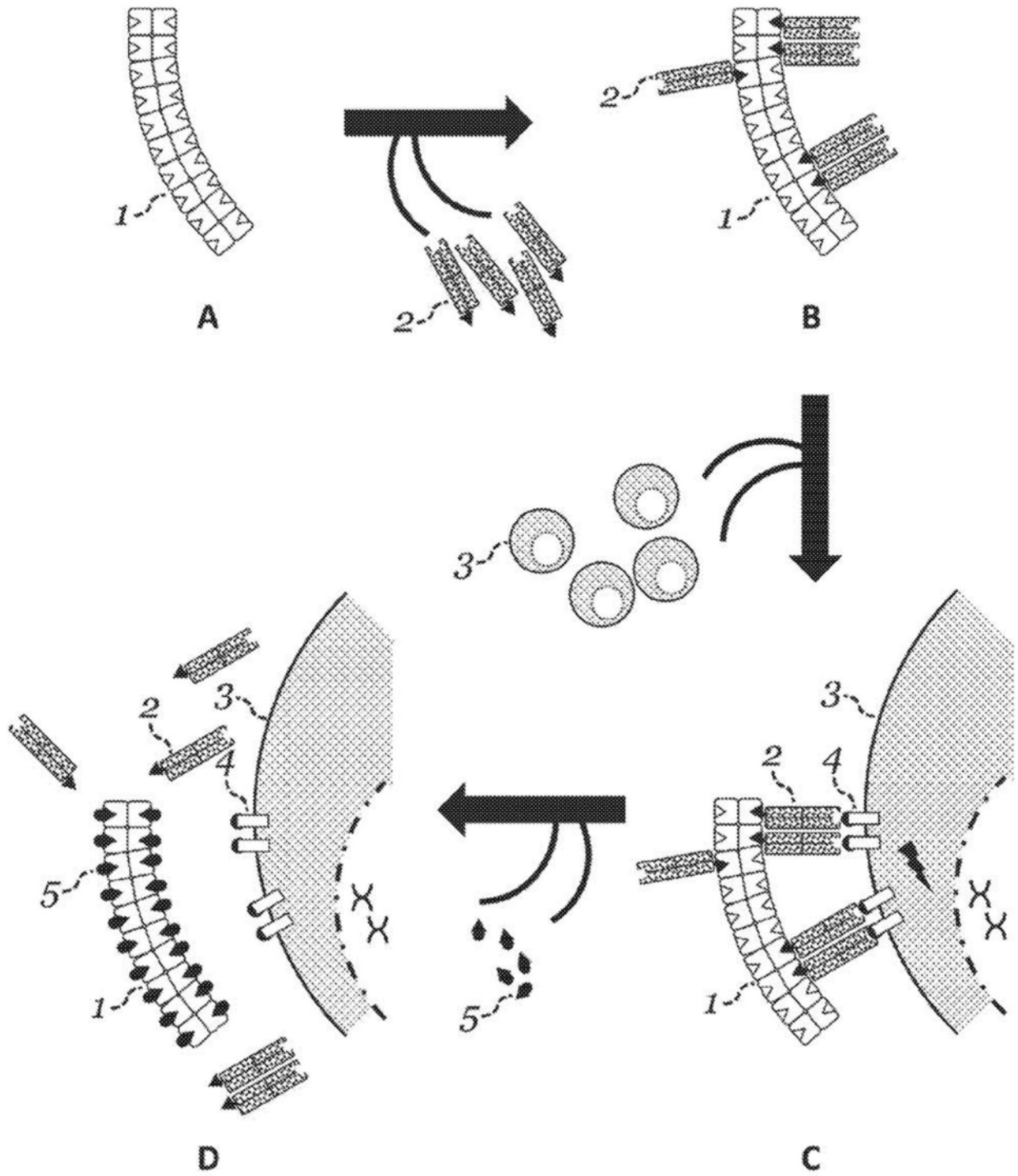


图9

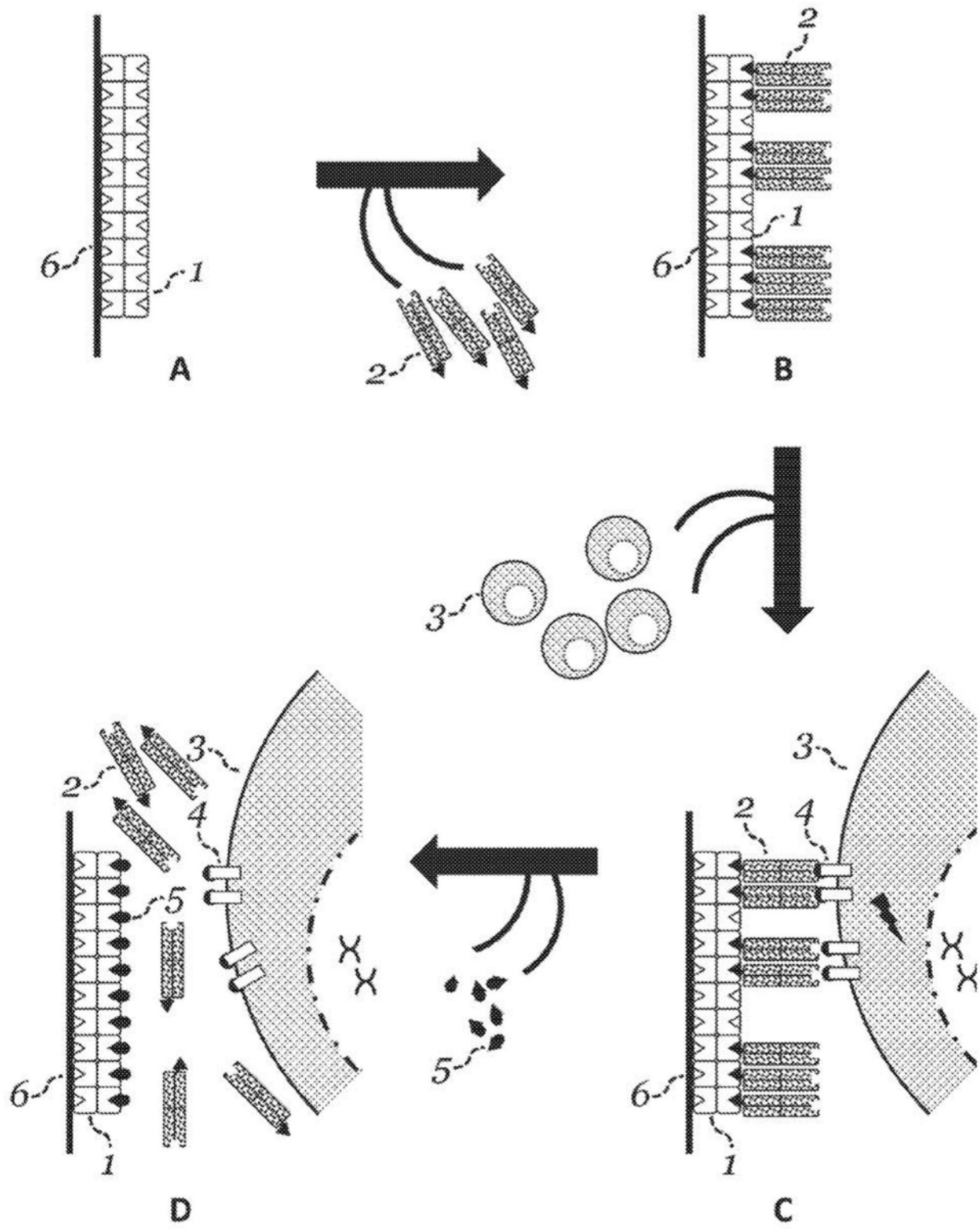


图10

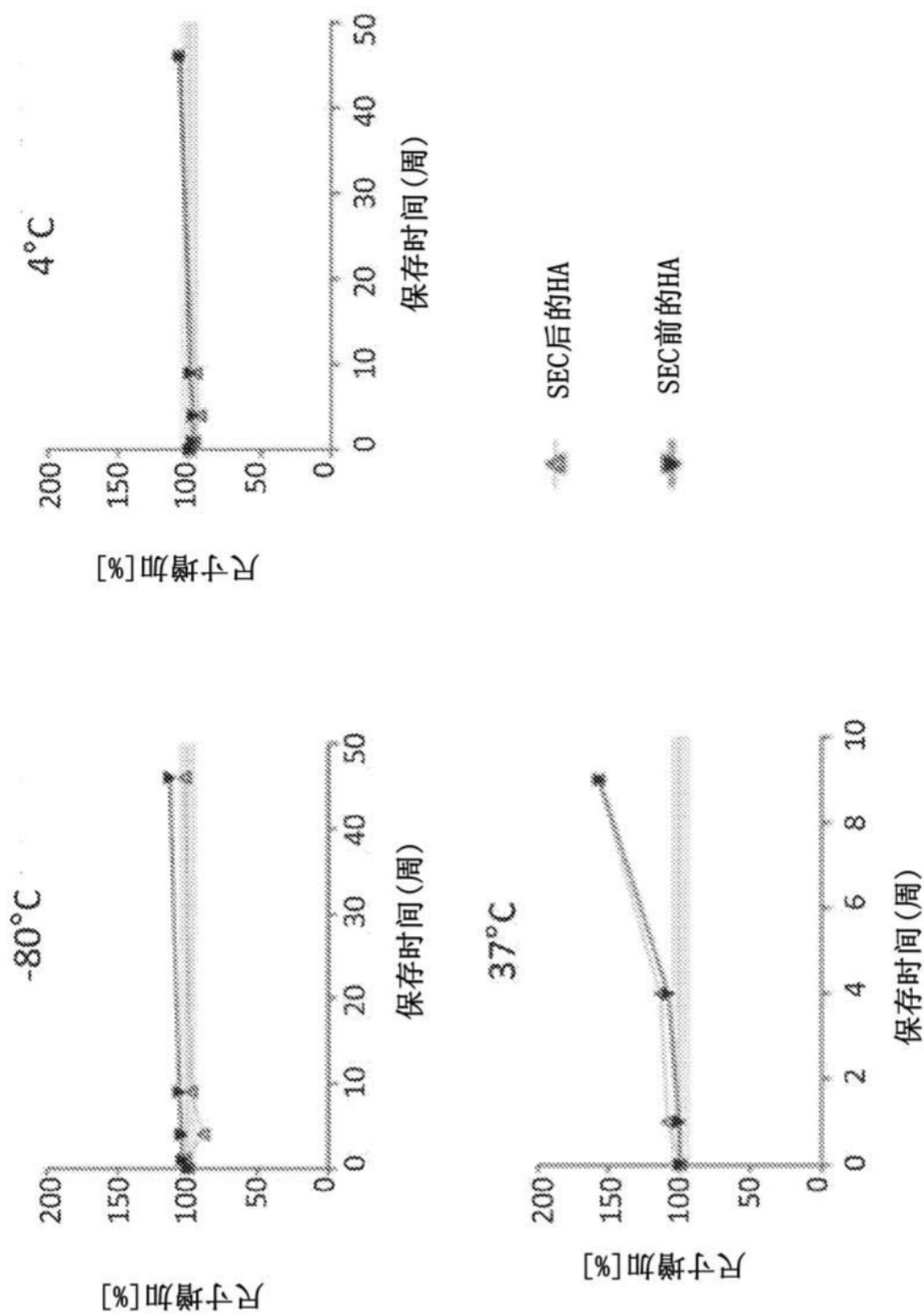


图11

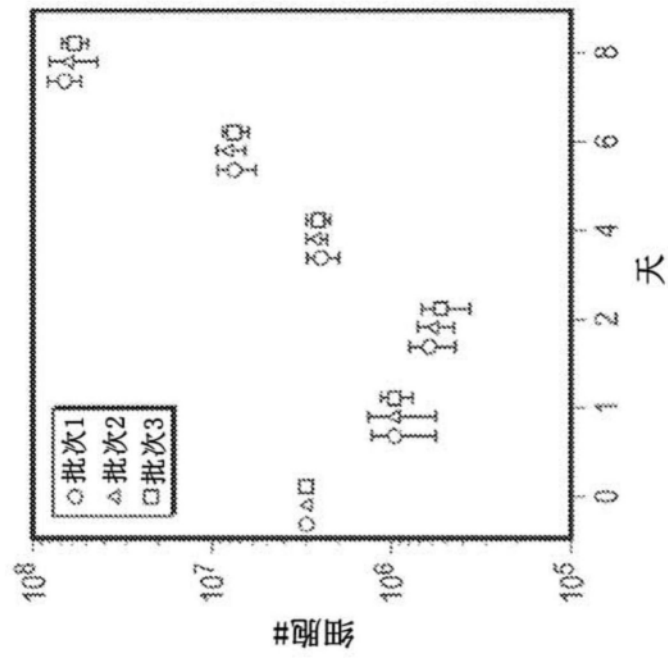


图12A

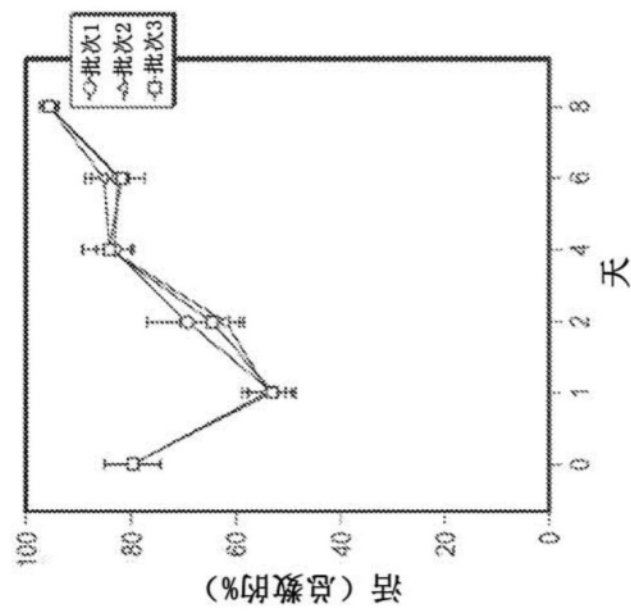


图12B

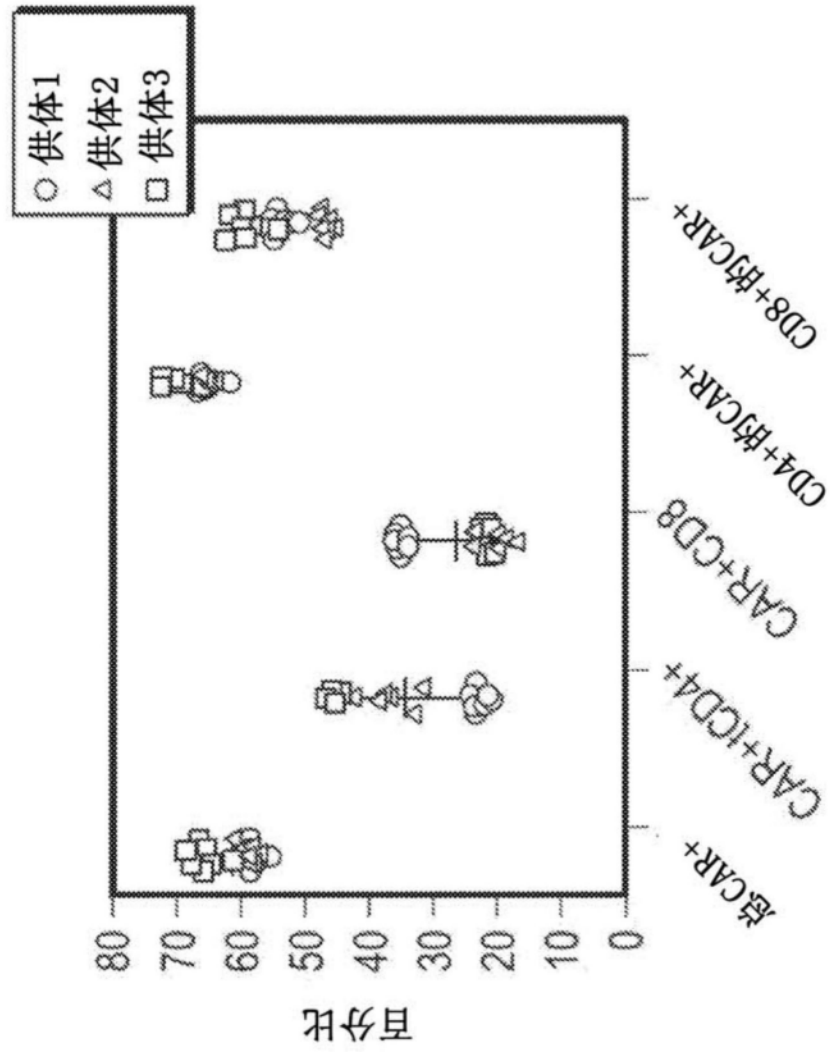


图13

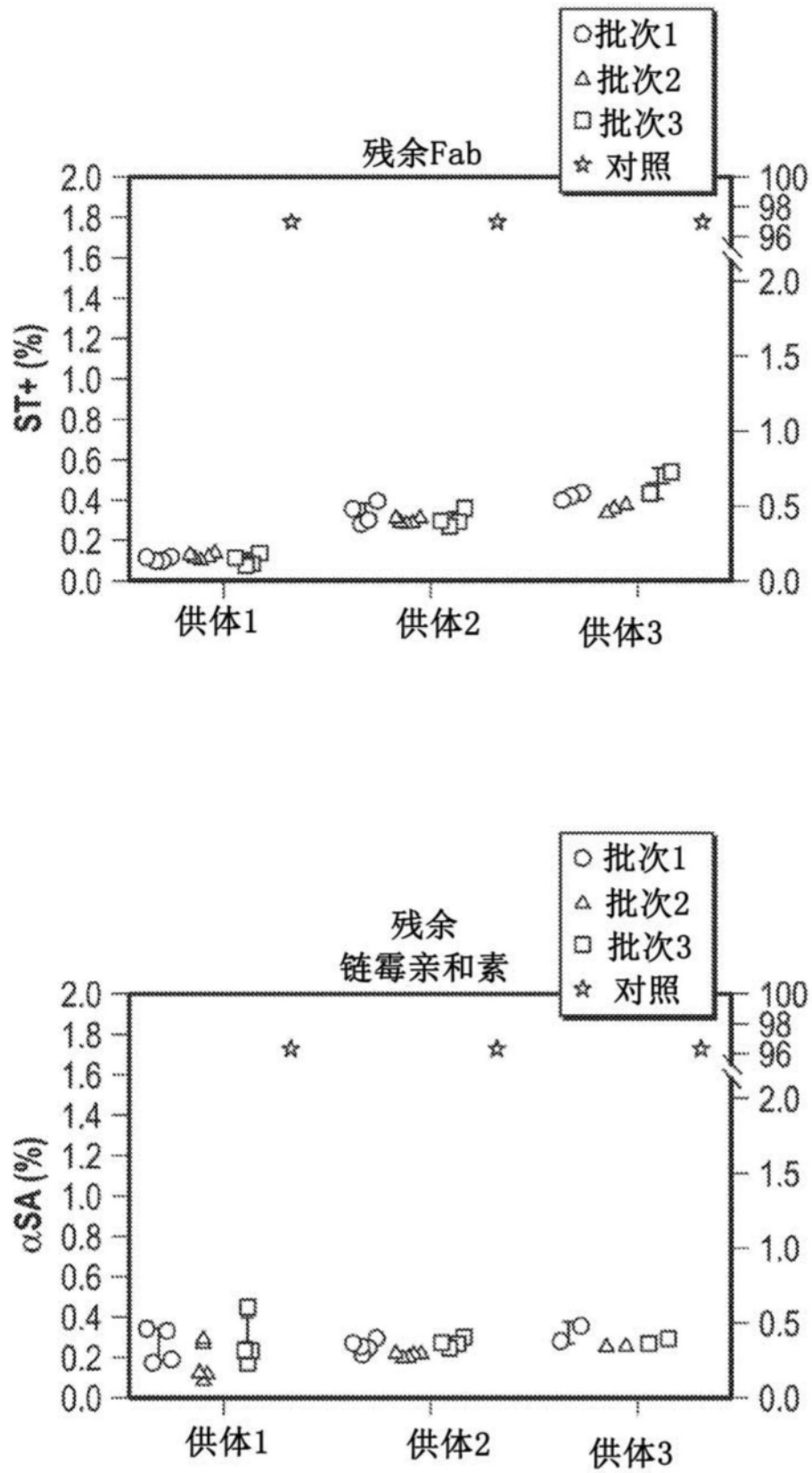


图14

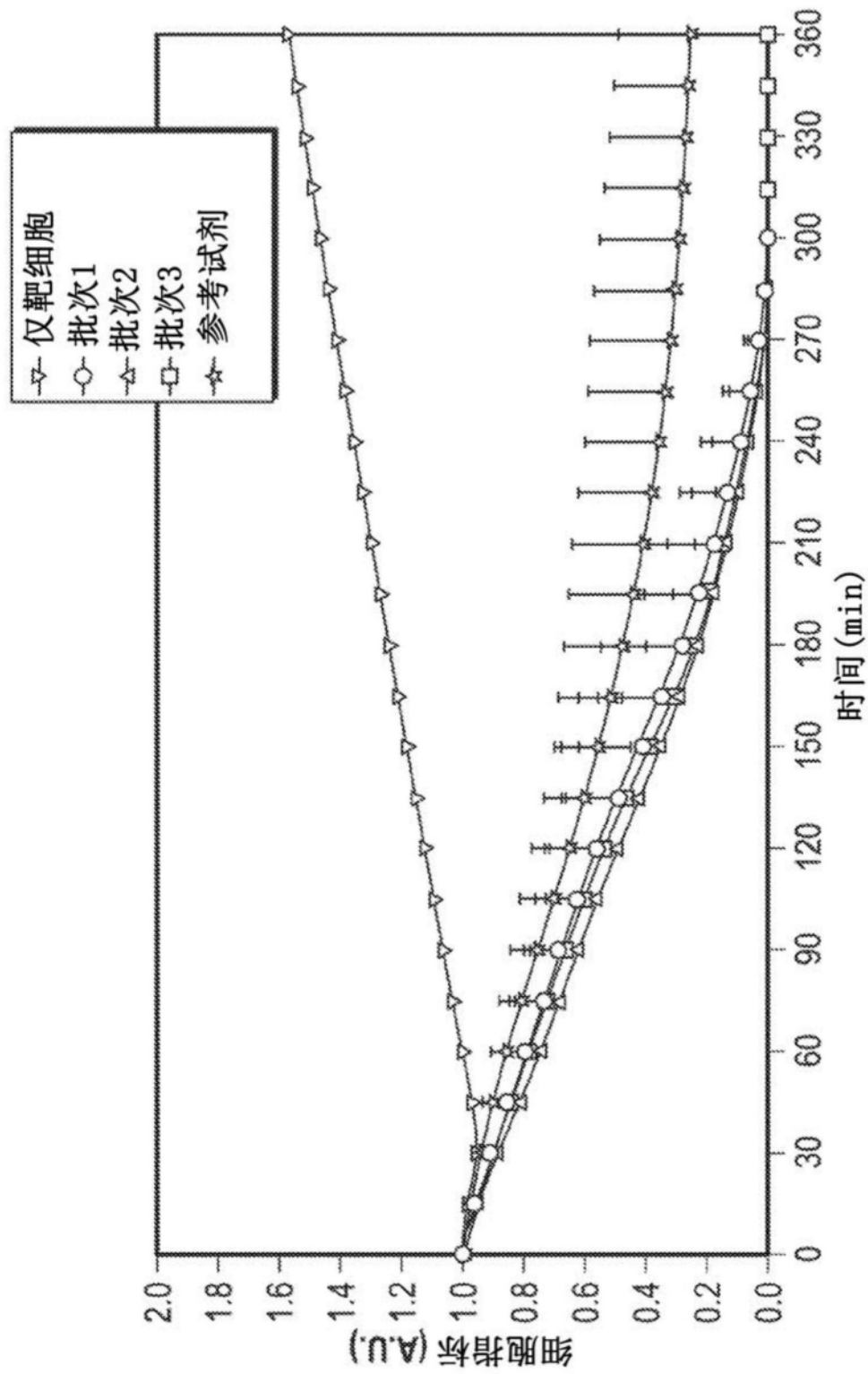


图15