(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118846017 A
(43)申请公布日 2024.10.29

(21)申请号 202410633579.9

(22)申请日 2018.07.20

(30)优先权数据
62/535,742 2017.07.21 US
62/660,779 2018.04.20 US
62/664,279 2018.04.30 US

(62)分案原申请数据
201880058921.X 2018.07.20

(71)申请人 伯克利之光生命科技公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·J·比米勒
A·J·马斯特罗扬尼 S·N·裴
JR·R·D·洛 A·莫恰罗
K·D·卢瑟贝克
Y·布罗涅维特斯凯
G·K·斯塔德勒 A·W·麦克法兰
K·T·查普曼 D·史密斯
N·C·马克斯 A·L·古德塞尔

(74)专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 唐莉

(51)Int.Cl.
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07K 14/74(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C12N 5/0783(2010.01)
C12Q 1/02(2006.01)
C12M 1/34(2006.01)
C12M 1/00(2006.01)

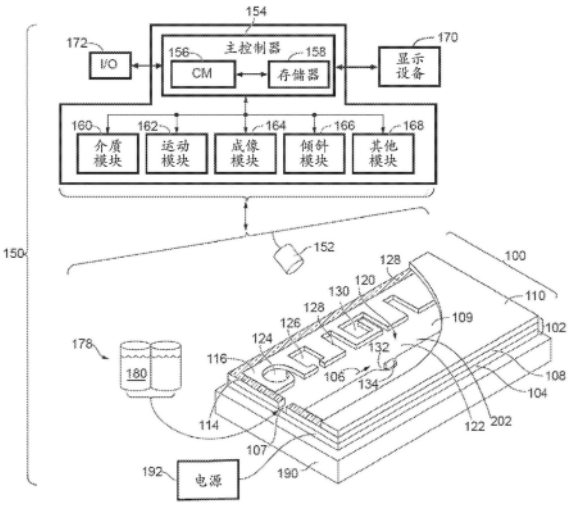
权利要求书5页 说明书109页 附图45页

(54)发明名称

抗原呈递合成表面、共价官能化表面、活化T细胞及其用途

(57)摘要

在生物科学和相关领域中,修饰与生物材料(例如生物分子和生物微物体)接触的装置、设备和材料的表面可能是有用的。本文描述了表面修饰和表面官能化试剂,其制备,以及修饰表面以活化T淋巴细胞的方法。



CN 118846017 A

1.用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面,其包括:

a.多个主活化分子配体,其中每个主活化分子配体包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体(TCR)的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子;和

b.多个共活化分子配体,每个包括TCR共活化分子或辅助TCR活化分子,

其中所述多个主活化分子配体和所述多个共活化分子配体中的每一个特异性结合至抗原呈递表面。

2.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化分子与所述辅助TCR活化分子的比例为约20:1至约1:20。

3.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分表面上。

4.权利要求1的抗原呈递表面,其还包括多个表面封闭分子配体。

5.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子的密度或以约5×10^3至约1.5×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分表面上。

6.权利要求1的抗原呈递表面,其中存在于所述抗原呈递表面上的主活化分子配体与共活化分子配体的比例为约1:10至约2:1、约1:5至约2:1、约1:2至约2:1、约1:10至约1:1、约1:5至约1:1、约1:1至约2:1,或约1:2约1:1。

7.权利要求1的抗原呈递表面,其中:

(i)所述抗原呈递表面包括玻璃、金属、陶瓷和/或金属氧化物;或者

(ii)所述抗原呈递表面包括聚合物表面。

8.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体中的每一个非共价结合至结合部分,并且进一步地,其中所述结合部分(i)共价结合至所述抗原呈递表面或(ii)非共价结合至与所述表面共价结合的第二结合部分。

9.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述MHC分子包括MHC蛋白序列和β微球蛋白。

10.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述MHC分子还包括肿瘤相关抗原。

11.权利要求10的抗原呈递表面,其中所述肿瘤相关抗原是SLC45A2、TCL1、VCX3A、MART1或NYESO1。

12.权利要求1的抗原呈递表面,其中:

(i)所述TCR共活化蛋白分子包括CD-28结合蛋白或其保留了与CD28的结合能力的片段;或者

(ii)第一TCR共活化分子包括抗CD28抗体或其保留了与CD28的结合活性的片段。

13.权利要求1的抗原呈递表面,其中:

(i)所述辅助刺激分子包括CD2结合蛋白或其保留了与CD2的结合活性的片段;或者

(ii)所述辅助刺激分子包括抗CD2抗体或其保留了与CD2的结合活性的片段。

14.权利要求4的抗原呈递表面,其中所述多个表面封闭分子配体中的每一个包括聚乙烯(PEG)部分、羧酸部分或其组合。

15.权利要求1的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约3:1至约1:3。

16.权利要求1至15中任一项的抗原呈递表面,其中所述抗原呈递表面是珠子的表面。

17.制备用于活化T细胞(T细胞)的抗原呈递表面的方法,包括:

使多个主活化分子与共价官能化表面的第一多个结合部分反应,所述多个主活化分子中的每一个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子,其中所述第一多个结合部分中的每一个被构造用于结合主活化分子;和

使多个共活化分子与被构造用于结合所述共活化分子的共价官能化表面的第二多个结合部分反应,每个共活化分子包括:

T细胞受体(TCR)共活化分子;或

辅助TCR活化分子;

从而在所述抗原呈递表面上提供了多个特异性结合的主活化分子配体和多个特异性结合的共活化分子配体。

18.权利要求17的方法,其中,所述TCR共活化分子与所述辅助TCR活化分子的比例为约20:1至约1:20。

19.权利要求17的方法,其还包括使多个表面封闭分子与所述共价官能化表面的第三多个结合部分反应,其中所述第三多个结合部分中的每一个被构造用于结合所述表面封闭分子。

20.权利要求17的方法,其中所述MHC分子包括蛋白质序列和β微球蛋白。

21.权利要求17的方法,其中包括MHC分子的多个主活化分子中的每一个还包括肿瘤相关抗原。

22.权利要求17的方法,其中所述肿瘤相关抗原是SLC45A2、TCL1、VCX3A、MART1或NYESO1。

23.权利要求17的方法,其中所述共价官能化表面的第一多个结合部分中的每一个包括链霉亲和素或生物素部分。

24.权利要求17的方法,其还包括通过使中间反应性表面的反应性部分的至少第一子集与各自包括结合部分的第一连接试剂反应来产生包括所述第一多个结合部分的共价官能化表面。

25.权利要求24的方法,其中所述结合部分是链霉亲和素或生物素,任选地,其中如果所述结合部分是生物素,则所述方法还包括将所述生物素与链霉亲和素非共价结合。

26.权利要求17的方法,其中所述第二多个结合部分是所述至少第一多个结合部分的第二子集。

27.权利要求19的方法,其中被构造为结合所述表面封闭分子的所述第三多个结合部分是所述中间反应性表面的反应性部分的另一子集。

28.权利要求17-27中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面是珠子的表面。

29.活化T淋巴细胞(T细胞)的方法,包括:

使多个T细胞与抗原呈递合成表面接触,所述表面包括:

多个主活化分子配体,每个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要的组织相容性(MHC)I类分子;和

多个共活化分子配体,每个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子;和

培养与抗原呈递合成表面接触的多个T细胞,从而将所述多个T细胞的至少一部分转化为活化T细胞。

30.活化T淋巴细胞(T细胞)的方法,包括:

使多个T细胞与权利要求1至15中任一项的抗原呈递合成表面接触;和

培养与所述抗原呈递合成表面接触的多个T细胞,从而将所述多个T细胞的至少一部分转化为活化T细胞。

31.权利要求30的方法,其中,所述T细胞包括CD8+T细胞。

32.权利要求30的方法,还包括使所述多个T细胞与多个生长刺激性分子配体接触。

33.权利要求32的方法,其中,每个所述生长刺激性分子配体包括生长因子受体配体。

34.权利要求33的方法,其中所述生长因子受体配体包括IL-21或其片段。

35.权利要求30的方法,其中与所述抗原呈递合成表面接触的培养进行约4天至约7天的时间。

36.根据权利要求30的方法,还包括:

完成与所述抗原呈递合成表面接触的第一活化期,其中所述抗原呈递合成表面是第一抗原呈递合成表面;

使多个活化T细胞与第二抗原呈递合成表面接触,所述表面包括各自包括MHC分子的多个主活化分子配体,以及各自包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子的多个共活化分子配体;和

将与第二抗原呈递合成表面接触的多个活化T细胞培养第二个培养期,从而提供扩增的多个活化T细胞。

37.权利要求36的方法,其中所述第二抗原呈递表面是多个珠子的表面,并且所述方法还包括以1:1的比例将所述第二多个抗原呈递珠子添加到所述多个活化T细胞中。

38.权利要求30的方法,其中所述活化T细胞是CD45RO+。

39.权利要求30的方法,其中所述活化T细胞是CD28阳性的。

40.权利要求30的方法,其中所述抗原呈递表面是珠子的表面。

41.权利要求40的方法,其中所述多个T细胞以抗原呈递珠子与细胞的比例为约1:1接触抗原呈递珠子。

42.活化T细胞群,包括通过权利要求30的方法产生的产物T细胞。

43.治疗需要治疗癌症的受试者的方法;包括:

从所述受试者获得多个T淋巴细胞(T细胞);

使所述多个T细胞与抗原呈递合成表面接触,所述抗原呈递合成表面包括多个被构造为结合至所述多个T细胞中的每一个的T细胞受体的主要组织相容性复合体(MHC)I分子,其中所述MHC分子包括对受试者的癌症具有特异性的抗原,并且其中所述抗原呈递合成表面是权利要求1-15中任一项的抗原呈递表面;

产生多个活化T细胞,其中所述活化被构造为对所述受试者的癌症具有特异性;

将所述多个特异性活化T细胞与未活化的细胞分离;和,

将所述多个抗原特异性活化T细胞引入受试者。

44.权利要求43的方法,其中分离所述多个抗原特异性活化T细胞还包括检测抗原特异性活化T细胞的表面生物标记物。

45.权利要求44的方法,其中所述表面生物标记物是CD45RO+或CD28+。

46.权利要求43的方法,其还包括快速扩增所述抗原特异性活化T细胞以提供扩增的抗

原特异性活化T细胞群。

47.权利要求46的方法,其中在将所述特异性活化T细胞与所述未活化T细胞分离之后进行所述快速扩增。

48.权利要求43的方法,其中所述治疗受试者的方法延迟或停止受试者中癌症的进展。

49.权利要求43的方法,其中所述抗原呈递表面是珠子的表面。

50.用于制备用于T淋巴细胞(T细胞)的抗原特异性活化的共价修饰的合成表面的试剂盒,包括:

a.共价官能化合成表面,其包括至少一种多个链霉亲和素官能团和至少一种多个表面封闭分子配体,其中所述多个表面封闭分子配体共价附接至所述共价官能化合成表面,并且所述链霉亲和素官能团是(i)共价附接至所述共价官能化合成表面,或(ii)通过共价附接至所述共价官能化合成表面的生物素部分非共价附接至所述共价官能化合成表面;和

b.第一修饰试剂,其包括多个被构造为与T细胞的T细胞受体结合的主要组织相容性复合体(MHC)I分子,并且进一步地,其中,所述MHC分子被构造为结合至共价官能化合成表面的多个链霉亲和素官能团的第一子集中的一个。

51.权利要求50的试剂盒,其中,所述多个MHC分子中的每一个还包括至少一个生物素官能团。

52.权利要求50的试剂盒,其还包括包含多个共活化分子的试剂,每个共活化分子被构造为结合至所述共价官能化合成表面的多个链霉亲和素官能团的第二子集中的一个,其中每个共活化分子包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子。

53.权利要求48的试剂盒,其中,所述多个共活化分子包括T细胞受体(TCR)共活化分子的第一子集和辅助TCR活化分子的第二子集。

54.权利要求49的试剂盒,其中容纳包括多个共活化分子的试剂的容器容纳的多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约20:1至约1:20。

55.权利要求50的试剂盒,其还包括包含生长刺激性分子的试剂,其中每个生长刺激性分子包括生长因子受体配体。

56.权利要求50的试剂盒,其中所述细胞因子包括IL-21或其片段。

57.权利要求50-56中任一项的试剂盒,其中所述共价官能化合成表面是珠子的表面。

58.制备包括多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体的共价官能化表面的方法,其中所述方法包括:

使中间反应性合成表面的反应性部分的至少第一子集与多个连接试剂反应,所述多个连接试剂中的每一个包括链霉亲和素或生物素;和

使所述中间反应性合成表面的反应性部分的至少第二子集与多个表面封闭分子反应,从而提供包括至少一种多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体的共价官能化合成表面;其中,如果所述连接试剂包括生物素,则该方法任选地还包括将链霉亲和素与生物素官能团非共价地联合。

59.在微流体设备内进行抗原特异性细胞毒性测定的方法,包括:

流动区域,其容纳第一液体介质;和

隔离围栏,其包括分离区域和连接区域,其中,所述连接区域具有通向所述流动区域的近端开口和通向所述分离区域的远端开口,并且所述分离区域通向所述连接区域,其中所

述第一隔离围栏的所述分离区域是所述流动区域的未被扫过区域,所述方法包括:

将一个或多个靶细胞加载至微流体设备的隔离围栏中;

在隔离围栏中加载一个或多个T细胞,以使所述一个或多个T细胞能接触所述一个或多个靶细胞;

使所述靶细胞与标记凋亡细胞的可检测标记物接触;和

检测所述靶细胞是否凋亡。

60.用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒,包括:

微流体设备;和

用于检测凋亡细胞的试剂。

抗原呈递合成表面、共价官能化表面、活化T细胞及其用途

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是申请日为2018年7月20日的中国专利申请CN201880058921.X的分案申请,本申请要求申请日为2017年7月21日的美国专利申请US62/535,742、申请日为2018年4月20日的美国专利申请US62/660,779和申请日为2018年4月30日的美国专利申请US62/664,279的优先权,在此通过引用将它们的全文并入本文。

技术领域

[0002] 本申请涉及抗原呈递合成表面、共价官能化表面、活化T细胞及其用途。

背景技术

[0003] 免疫疗法提供了潜在的强大方法以成功治疗癌症。通过抗原呈递树突状细胞活化T淋巴细胞是制备用于免疫疗法的靶向肿瘤的细胞毒性T淋巴细胞的一方面。通过树突状细胞的活化可以通过使用更可重现和更好表征的技术来改善。本发明的一些实施方案包括构造成活化T淋巴细胞的修饰表面,使用这种修饰表面活化T淋巴细胞的相关方法,以及含有此类活化T淋巴细胞的组合物。

发明内容

[0004] 在第一方面,提供了用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面,其包括:多个主活化分子配体,其中每个主活化分子配体包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体(TCR)的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)I类分子;和多个共活化分子配体,每个包括TCR共活化分子或辅助TCR活化分子,其中多个主活化分子配体和多个共活化分子配体中的每一个特异性结合至抗原呈递表面。在一些实施方案中,多个共活化分子配体包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。在一些实施方案中,TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例可以为约10:1至约1:20。在一些实施方案中,多个主活化分子配体可以以每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分上。在其他实施方案中,多个主活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分表面上。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是珠子的表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是晶片的表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是微流体设备的至少一个内表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是管的内表面。

[0005] 在另一方面,提供了制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面的方法,其包括:使多个主活化分子与共价官能化表面的第一多个结合部分反应,所述多个主活化分子中的每一个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子,其中,第一多个结合部分中的每一个被构造为结合主活化分子;以及使多个共活化分子与被构造为结合共活化分子的共价官能化表面的第二多个结合部分反应,所述多个共活化分子中的每一个包括:T细胞受体(TCR)共活化分子;或辅助TCR活化分子;从而在抗原呈

递表面上提供了多个特异性结合的主活化分子配体和多个特异性结合的共活化分子配体。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是珠子的表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是晶片的表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是微流体设备的至少一个内表面。在任何这些实施方案中,抗原呈递表面可以是管的内表面。

[0006] 在另一方面,提供了试剂盒用于制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递合成表面,包括:a.如本文所述的任何共价官能化合成表面,其包括多个非共价或共价联合的第一偶联剂;和第一修饰试剂,其包括多个构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要组织相容性复合体(MHC)I分子,以及进一步地,其中MHC分子被构造为结合至共价官能化合成表面的多个非共价或共价联合的第一偶联剂的第一子集中的一个。在一些实施方案中,第一偶联剂可以是生物素结合剂。生物素结合剂可以是链霉亲和素。在一些实施方案中,多个MHC分子中的每一个还可以包括至少一个生物素官能团。在一些实施方案中,试剂盒还包括包含多个共活化分子的试剂,每个共活化分子被构造为结合共价官能化合成表面的非共价或共价联合的第一偶联剂的第二子集中的一个。在一些实施方案中,共活化分子可以是T细胞受体(TCR)共活化分子、辅助TCR活化分子或其任何组合。共活化分子还可以包括至少一个生物素官能团。

[0007] 在另一方面,制备包括多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体的共价官能化表面的方法,其中该方法包括:使中间反应性合成表面的反应性部分的至少第一子集与多个连接试剂反应,所述多个连接试剂中的每一个包括链霉亲和素或生物素;并使中间反应性合成表面的反应性部分的至少第二子集与多个表面封闭分子反应,从而提供包括至少多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体的共价官能化合成表面。在一些实施方案中,如果连接试剂包括生物素,则该方法任选地还包括将链霉亲和素与生物素官能团非共价联合。

[0008] 在另一方面,提供了活化T淋巴细胞(T细胞)的方法,包括:将多个T细胞与抗原呈递合成表面接触,该抗原呈递合成表面包括:多个主活化分子配体,每个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要组织相容性(MHC)I类分子;和多个共活化分子配体,每个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子;并培养与抗原呈递合成表面接触的多个T细胞,从而将该多个T细胞的至少一部分转化为活化T细胞。抗原呈递合成表面可以是本文所述的任何抗原呈递合成表面,例如本文所述的抗原呈递珠子、抗原呈递晶片、抗原呈递管或抗原呈递微流体设备或本文所述的任何一种方法的产物。在一些实施方案中,T细胞包括CD8+T细胞。在一些实施方案中,该方法还包括使多个T细胞与多个生长刺激性分子配体接触。在一些实施方案中,每个生长刺激性分子配体包括生长因子受体配体。在一些实施方案中,生长因子受体配体包括IL-21或其片段。

[0009] 在另一方面,提供了进行抗原特异性细胞毒性测定的方法,其包括:将一个或多个靶细胞加载至微流体设备的隔离围栏中;在隔离围栏中加载一个或多个T细胞,以使一个或多个T细胞可以接触一个或多个靶细胞;将靶细胞与标记凋亡细胞的可检测标记物接触;检测靶细胞是否凋亡。在某些实施方案中,微流体设备还包括微流体通道,并且隔离围栏包括通向微流体通道的开口,使得隔离围栏流体连通至微流体通道。在某些实施方案中,多个靶细胞被加载至隔离围栏中。在其他实施方案中,将单个靶细胞加载至隔离围栏中。在某些实施方案中,将单个T细胞加载至隔离围栏中。在某些实施方案中,将单个T细胞加载至隔离围

栏中。在其他实施方案中,将多个T细胞加载至隔离围栏中。在某些实施方案中,通过使靶细胞和/或T细胞流入微流体通道,然后倾斜微流体芯片并允许重力将靶细胞和/或T细胞拉入隔离围栏中,将靶细胞和/或T细胞加载至隔离围栏中。在某些实施方案中,微流体设备包括DEP构造,并且DEP力用于将靶细胞和/或T细胞加载至隔离围栏中。在某些实施方案中,DEP力由结构化的光活化。在某些实施方案中,可检测标记物在流过微流体通道的溶液中提供,于是可检测标记物可从微流体通道扩散到隔离围栏中并与靶细胞接触。在某些实施方案中,可检测标记是酶促底物,例如胱天蛋白酶-3(Caspase-3)底物。在其他实施方案中,可检测标记物是与凋亡细胞和/或凋亡小体特异性结合的标记抗体。在某些实施方案中,在使靶细胞与可检测标记物接触后2小时或更长时间(例如3、4、5、6、7或更多小时)之后,确定检测靶细胞是否凋亡。在某些实施方案中,靶细胞是癌细胞,例如来自癌细胞系的细胞。在某些实施方案中,靶细胞是来自表达癌症相关或癌症特异性抗原的细胞系的细胞。在某些实施方案中,靶细胞表达与黑素瘤、乳腺癌或肺癌相关的抗原。在某些实施方案中,T细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。例如,T细胞可以是CAR T细胞。在其他实施方案中,T细胞不表达嵌合抗原受体。例如,T细胞可以是CAR T细胞。在其他实施方案中,T细胞不表达嵌合抗原受体。例如,T细胞可以是治疗性内源性T细胞(ETC)。

[0010] 在另一方面,提供了治疗需要治疗癌症的受试者的方法,包括:从受试者获得多个T淋巴细胞(T细胞);将多个T细胞与包括多个构造为结合至多个T细胞中每一个的T细胞受体的主要组织相容性复合体(MHC)I分子的抗原呈递合成表面接触,其中MHC分子包括对受试者的癌症具有特异性的抗原,并且其中抗原呈递合成表面是本文所述的抗原呈递表面或根据本文所述的方法产生;产生多个活化T细胞,其中所述活化被构造为对受试者的癌症具有特异性;将多个特异性活化T细胞与未活化细胞相分离;以及,将多个抗原特异性活化T细胞引入受试者。在一些实施方案中,抗原呈递表面是本文所述的抗原呈递珠子、抗原呈递晶片、抗原呈递管或抗原呈递微流体设备。

[0011] 在另一方面,提供了用于活化T淋巴细胞(T细胞)的试剂盒,其包括:本文所述的抗原呈递表面。在一些实施方案中,抗原呈递表面是本文所述的抗原呈递珠子、抗原呈递晶片、抗原呈递管或抗原呈递微流体设备。

[0012] 在另一方面,提供了用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒,其包括:微流体设备(例如,具有微流体通道和隔离围栏的微流体设备);和用于检测细胞凋亡的试剂。在某些实施方案中,微流体设备是抗原呈递微流体设备。微流体设备或抗原呈递微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备或抗原呈递微流体设备。在某些实施方案中,用于检测细胞凋亡的试剂是胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶-3)的底物。在某些实施方案中,用于检测凋亡的试剂与凋亡细胞特异性结合,例如凋亡特异性抗体。

[0013] 在另一方面,提供了一种共价官能化合成表面,其包括至少一种多个链霉亲和素官能团和至少一种多个表面封闭分子配体,其中多个表面封闭分子配体共价附接至共价官能化合成表面,并且链霉亲和素官能团(i)共价附接至共价官能化合成表面或(ii)通过共价附接至共价官能化合成表面的生物素部分而非共价附接至共价官能化合成表面。在一些实施方式中,共价官能化合成表面可以是共价官能化珠子、共价官能化晶片或共价官能化微流体设备,如本文所述。

附图说明

[0014] 图1A示出了根据本公开的一些实施方案的与微流体设备和相关联的控制设备一起使用的系统的示例。

[0015] 图1B和1C示出了根据本公开的一些实施方案的微流体设备。

[0016] 图2A和2B示出了根据本公开的一些实施方案的隔离围栏。

[0017] 图2C示出了根据本公开的一些实施方案的详细的隔离围栏。

[0018] 图2D-F示出了根据本公开的一些其他实施方案的隔离围栏。

[0019] 图2G示出了根据本公开的实施方案的微流体设备。

[0020] 图2H示出了根据本公开的实施方案的微流体设备的涂覆表面。

[0021] 图3A示出了根据本公开的一些实施方案的与微流体设备和相关联的控制设备一起使用的系统的特定示例。

[0022] 图3B示出了根据本公开的一些实施方案的成像设备。

[0023] 图4是根据本公开的实施方案的T细胞活化途径的图示。

[0024] 图5A和5B是根据本公开的各种实施方案的抗原呈递表面的制备的示意图。

[0025] 图6是根据本公开的实施方案的制备抗原呈递表面的方法的示意图。

[0026] 图7A和7B是根据本公开的一些实施方案的图案化抗原呈递表面的扫描电子显微照片表示。

[0027] 图8A-8D是根据本公开的一些实施方案,用于在培养7天时活化T淋巴细胞的各种表征参数的图示。

[0028] 图9是根据本公开的一些实施方案的活化T淋巴细胞的特征分布的图示。

[0029] 图10是根据本公开的一个实施方案,在第一期的刺激和培养之后,活化T淋巴细胞的分布的图示,其比较了抗原呈递珠子活化与树突状细胞活化的使用。

[0030] 图11是根据本公开内容的一个实施方案,在第二期的刺激和培养之后,活化T淋巴细胞的分布的图示,其比较了抗原呈递珠子活化与树突状细胞活化的使用。

[0031] 图12是与树突状细胞活化相比,在7天和14天时活化T淋巴细胞的各种表征参数的图示。

[0032] 图13是在选定的官能化步骤中共价官能化聚苯乙烯珠子的傅立叶变换红外光谱的图示。

[0033] 图14A-14D是根据本公开的实施方案的用于活化T细胞的各种表征参数的图示。

[0034] 图15A-15E是根据本公开的实施方案的细胞产物表征的图示。

[0035] 图16是根据本公开的实施方案的细胞产物表征的图示。

[0036] 图17是根据本公开的一个实施方案的细胞毒性实验的图示。

[0037] 图18A-18C是根据本公开的实施方案的细胞产物表征的图示。

[0038] 图19A-19F是根据本公开的一些实施方案的使用抗原呈递表面的活化的表征的图示。

[0039] 图20A-20I是根据本公开的一些实施方案的使用抗原呈递表面的活化的表征的图示。

[0040] 图21A-21F是根据本公开的一些实施方案的使用抗原呈递表面的活化的表征的图示。

[0041] 图22A-22B是根据本公开的一些实施方案在抗原特异性细胞毒性测定中与T淋巴细胞和胱天蛋白酶-3底物接触后在选定时间点拍摄的靶细胞的图像。

[0042] 图22C是根据本公开的一些实施方案的抗原特异性细胞毒性测定的过程的图示。

[0043] 图23A-23E是根据本公开的一些实施方案的使用抗原呈递表面获得的细胞产物的表征的图示。

具体实施方式

[0044] 本说明书描述了本公开的示例性实施方案和应用。然而,本公开不限于这些示例性实施方案和应用,也不限于本文中示例性实施方案和应用的操作或描述的方式。此外,附图可以示出简化视图或局部视图,并且附图中的元件的尺寸可以被放大或者不成比例。另外,当在本文中使用术语“在...上”、“附接至”、“连接至”、“偶联至”或类似词时,一个元件(例如,材料、层、底物等)可以“在”另一元件上,“附接至”、“连接至”或“偶联至”另一元件,不管该一个元件是直接在该另一元件上,附接至、连接至还是偶联至另一元件上,或者还是在该一个元件与该另一元件之间存在一个或多个中间元件。另外,除非上下文另外指出,否则在如果提供方向(例如,上方、下方、顶部、底部、侧面、向上、向下、以下、以上、上部、下部、水平、垂直、“x”、“y”、“z”等)时是相对的,并且仅以示例的方式提供,以便于说明和讨论,而不是限制。另外,在提及元件列表(例如,元件a、b、c)的情况下,这种引用意图包括单独列出的任何元件,少于所有列出元件的任何组合,和/或所有列出元素的组合。除非上下文另有指示,否则术语“或”以包括性含义使用,即等同于“和/或”。注意,如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“a(一个)”,“an(一种)”和“the(该)”以及任何词的任何单数使用包括复数个指代,除非明确地并且毫不含糊地限于一个指代。如本文中所使用的,术语“comprise(包括)”、“include(包括)”及其语法变体意图是非限制性的,使得列举列表中的项目并不排除可以替换或添加到所列项目的其他类似项目。说明书中的章节划分仅是为了便于阅读,并不限制所讨论元件的任何组合。在通过引用并入的材料与本文提供的明确描述的内容之间存在任何矛盾或冲突的情况下,以明确描述的内容为准。

[0045] 当微流体特征的尺寸被描述为具有宽度或面积时,该尺寸通常相对于x轴和/或y轴尺寸来描述,二者都位于平行于微流体设备的衬底和/或盖的平面内。可以相对于z轴方向描述微流体特征的高度,该z轴方向垂直于与微流体设备的衬底和/或盖平行的平面。在某些情况下,微流体特征(例如渠道(channel)或通道(passageway))的横截面面积可以是相关于x轴/z轴、y轴/z轴或x轴/y轴的面积。

[0046] 为了本说明书和所附权利要求的目的,除非另外指出,否则在所有情况下,在说明书和权利要求书中使用的所有表示数量、百分比或比例的数字以及其他数值应理解为均被术语“约”修饰,只要它们尚未被修饰即可。“约”表示基本上不影响所描述主题的性质的变化程度,例如在10%、5%、2%或1%之内。因此,除非有相反的指示,否则以下说明书和所附权利要求书中提出的数字参数是近似值,其可以根据试图获得的所需特性而变化。至少,并且不试图将等同原则的应用限制于权利要求的范围,每个数字参数至少应考虑所报告的有效数字的数目并通过应用普通的舍入技术来解释。

定义

[0047] 如本文所用,“基本上”是指足以用于预期目的。因此,术语“基本上”允许相对于绝

对或完美状态、尺寸、测量、结果等进行微小的、微不足道的变化，这是本领域普通技术人员所期望的，但是不会明显影响整体性能。当关于数值或可表示为数值的参数或特性使用时，“基本上”是指百分之十以内。

[0048] 术语“多数个(ones)”是指多于一个。如本文所用，术语“多个(plurality)”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。

[0049] 如本文所用，“烷基”是指仅由碳和氢原子组成且不包含不饱和度且具有1-6个碳原子的直链或支链烃基(例如，C_1-C_6烷基)。在本文中，无论何时出现，诸如“1至6”的数值范围是指给定范围内的每个整数。例如，“1至6个碳原子”是指烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等，直至并包括由6个碳原子组成，尽管本定义也涵盖了没有指定数字范围的术语“烷基”。在一些实施方案中，它是C_1-C_3烷基。典型的烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基异丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基等。烷基通过单键连接至分子的其余部分，例如，甲基(Me)、乙基(Et)、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、己基等。

[0050] 除非在说明书中另外具体说明，否则烷基可以任选地被一个或多个独立地为以下的取代基取代：芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、羟基、卤素、氰基、三氟甲基、三氟甲氧基、硝基、三甲基硅烷基、-OR’、-SR’、-OC(O)-R’、-N(R’)$_2$、-C(O)R’、-C(O)OR’、-OC(O)N(R’)$_2$、-C(O)N(R’)$_2$、-N(R’)C(O)OR’、-N(R’)C(O)R’、-N(R’)C(O)N(R’)$_2$、N(R’)C(NR’)N(R’)$_2$、-N(R’)S(O)$_t$R’(其中t为1或2)、-S(O)$_t$OR’(其中t为1或2)、-S(O)$_t$N(R’)$_2$(其中t为1或2)，或PO_3(R’)$_2$，其中每个R’独立地是氢、烷基、氟代烷基、芳基、芳烷基、杂环烷基或杂芳基。

[0051] 如本文所指，氟化烷基部分是这样的烷基部分，即该烷基部分的一个或多个氢被氟取代基取代。全氟烷基部分的所有氢原子均被氟取代基取代。

[0052] 如本文所指，“卤代”部分是溴、氯或氟部分。

[0053] 如本文所指，“烯烃”化合物是含有“烯烃”部分的有机分子。烯烃部分是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的基团。分子的非烯烃部分可以是任何种类的有机分子，并且在一些实施方案中，可以包括烷基或氟化的(包括但不限于全氟化的)烷基部分，其中任何一个可以被进一步取代。

[0054] 如本文所用，“空气”是指在地球大气中占优势的气体组成。四种最丰富的气体是氮气(通常以体积计约78％，例如约70至80％的浓度存在)、氧气(通常在海平面上以体积计约20.95％，例如在约10％至约25％的范围内存在)、氩气(通常以体积计约1.0％，例如在约0.1％至约3％的范围内存在)，和二氧化碳(通常以体积计约0.04％，例如在约0.01％至约0.07％的范围内存在)。空气可以具有其他微量气体，例如甲烷、一氧化二氮或臭氧，微量污染物和有机材料，例如花粉、柴油微粒等。空气可以包括水蒸气(通常以约0.25％的量存在，或者可以以体积计约10ppm至约5％的范围存在)。空气可以作为过滤的受控组合物提供用于培养实验，并且可以如本文所述进行调节。

[0055] 如本文所用，术语“多个”可以是2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多。

[0056] 如本文所用，术语“布置(disposed)”在其含义中包括“位于(located)”。

[0057] 如本文所用，“微流体设备(microfluidic device)”或“微流体装置(microfluidic apparatus)”是包括一个或更多个离散微流体管路的设备，所述离散微流体管路构造为容纳流体，每个微流体管路包括流体互连管路元件(包括但不限于区域、流动

路径、通道、腔室和/或围栏)以及被构造成允许流体(以及任选地,悬浮在流体中的微物体)流入和/或流出微流体设备的至少一个端口。典型地,微流体设备的微流体管路将包括可包括微流体通道的流动区域和至少一个腔室,并且将容纳小于约1mL体积的流体,例如小于约750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3或2μL。在某些实施例中,微流体管路容纳约1-2、1-3、1-4、1-5、2-5、2-8、2-10、2-12、2-15、2-20、5-20、5-30、5-40、5-50、10-50、10-75、10-100、20-100、20-150、20-200、50-200、50-250或50-300μL。微流体管路可被构造为具有与微流体设备中的第一端口(例如,入口)流体连接的第一端和与微流体设备中的第二端口(例如,出口)流体连接的第二端。

[0058] 如本文所用,“纳流体设备(nanofluidic device)”或“纳流体装置(nanofluidic apparatus)”是一类微流体设备,其具有包括至少一个管路元件的微流体管路,所述管路元件构造为容纳少于约1μL体积的流体,例如小于约750、500、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1nL或更少。纳流体设备可以包括多个管路元件(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10000或更多)。在某些实施方案中,至少一个管路元件中的一个或更多个(例如全部)构造为容纳约100pL至1nL、100pL至2nL、100pL至5nL、250pL至2nL、250pL至5nL、250pL至10nL、500pL至5nL、500pL至10nL、500pL至15nL、750pL至10nL、750pL至15nL、750pL至20nL、1至10nL、1至15nL、1至20nL、1至25nL或1至50nL体积的流体。在其他实施方案中,至少一个管路元件中的一个或更多个(例如全部)构造为容纳约20nL至200nL、100至200nL、100至300nL、100至400nL、100至500nL、200至300nL、200至400nL、200至500nL、200至600nL、200至700nL、250至400nL、250至500nL、250至600nL或250至750nL体积的流体。

[0059] 在本文中,微流体设备或纳流体设备可被称为“微流体芯片”或“芯片”;或“纳流体芯片”或“芯片”。

[0060] 如本文所用的“微流体通道”或“流动通道”是指具有的长度明显大于水平和垂直尺寸的的微流体设备的流动区域。例如,流动通道可以是水平或垂直尺寸的至少5倍长度,例如至少10倍长度、至少25倍长度、至少100倍长度、至少200倍长度、至少500倍长度、至少1000倍长度、至少5000倍长度或更长。在一些实施方案中,流动通道的长度为约100000微米至约500000微米,包括其间的任何数值。在一些实施方案中,水平尺寸为约100微米至约1000微米(例如约150至约500微米),并且垂直尺寸为约25微米至约200微米(例如约40至约150微米)。注意到流动通道在微流体设备中可以具有各种不同的空间构造(configuration),因此不限于完美的线性元件。例如,流动通道可以是或者包括具有以下构造的一个或更多个部分:曲线、弯曲、螺旋、倾斜、下降、叉支(例如,多个不同的流动路径)以及它们的任何组合。另外,流动通道沿其路径可具有不同的截面积,加宽和收缩以在其中提供期望的流体流动。流动通道可以包括阀,并且阀可以是微流体领域中已知的任何类型。在美国专利6408878和9227200中公开了包括阀的微流体通道的实例,在此通过引用将其全部内容并入本文。

[0061] 如本文所使用的,术语“障碍物”通常指的是足够大的隆起物或类似类型的结构,以部分(但不完全)阻止目标微物体在微流体设备中的两个不同区域或管路元件之间的移动。两个不同区域/管路元件可以是例如微流体隔离围栏(microfluidic sequestration

pen)和微流体通道,或者微流体隔离围栏的连接区域和分离区域。

[0062] 如本文所使用的,术语“收缩/收缩部(constriction)”通常是指微流体设备中的管路元件(或两个管路元件之间的接口)的宽度变窄。收缩部例如可位于微流体隔离围栏与微流体通道之间的交界处,或者位于微流体隔离围栏的分离区域与连接区域之间的交界处。

[0063] 如本文所使用的,术语“透明”是指材料允许可见光通过而基本上不会在光通过时改变光。

[0064] 如本文所使用的,术语“微物体”通常是指根据本公开可以分离和/或操作的任何微物体。微物体的非限制性实例包括:无生命的微物体,诸如微粒、微珠(例如,聚苯乙烯珠子,Luminex™珠子等)、磁珠、微棒、微丝、量子点等;生物微物体,诸如细胞;生物细胞器;囊泡或复合物;合成囊泡;脂质体(例如合成的或衍生自膜制备物);脂质纳米杆等;或无生命微物体和生物微物体的组合(例如,附着于细胞的微珠、脂质体包被的微珠、脂质体包被的磁珠等)。珠子可以包括共价或非共价附接的其他部分/分子,诸如能够在测定中使用的荧光标记、蛋白质、碳水化合物、抗原、小分子信号部分或其他化学/生物物质。脂质纳米杆已经例如在Ritchie等,(2009)“Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs,”Methods Enzymol.,464:211-231中得以描述。

[0065] 如本文所用,术语“细胞”与术语“生物细胞”可互换使用。生物细胞的非限制性实例包括真核细胞,植物细胞,动物细胞例如哺乳动物细胞、爬虫类细胞、禽类细胞、鱼细胞等,原核细胞,细菌细胞,真菌细胞,原生动物细胞等,从组织例如肌肉、软骨、脂肪、皮肤、肝、肺、神经组织等解离的细胞,免疫细胞例如T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞等,胚胎(例如受精卵),卵母细胞,卵子,精子细胞,杂交瘤,培养的细胞,来自细胞系的细胞,癌细胞,感染的细胞,转染和/或转化的细胞,报告细胞等。哺乳动物细胞可以例如来自人、小鼠、大鼠、马、山羊、绵羊,牛、灵长类动物等。

[0066] 如果群落中所有能够繁殖的活细胞都是衍生自单个亲本细胞的子细胞,则该生物群落是“克隆的”。在某些实施方案中,克隆群落中的所有子细胞均源自单个亲本细胞不超过10次分裂。在其他实施方案中,克隆群落中的所有子细胞均源自单个亲本细胞不超过14次分裂。在其他实施方案中,克隆群落中的所有子细胞均源自单个亲本细胞不超过17次分裂。在其他实施方案中,克隆群落中的所有子细胞均源自单个亲本细胞不超过20次分裂。术语“克隆细胞”是指相同克隆群落的细胞。

[0067] 如本文所用,生物细胞的“群落(colony)”是指2个或更多个细胞(例如约2至约20、约4至约40、约6至约60、约8至约80、约10至约100、约20至约200、约40至约400、约60至约600、约80至约800、约100至约1000或多于1000个细胞)。

[0068] 如本文所用,术语“维持(一个或更多个)细胞”是指提供包括流体和气体组分以及可选的表面的环境,其提供保持细胞存活和/或扩增所需的条件。

[0069] 如本文所用,术语“扩增(expanding)”在指细胞时是指细胞数目增加。

[0070] 如本文所指,“气体可渗透的”是指材料或结构可渗透氧气、二氧化碳或氮气中的至少一种。在一些实施例中,气体可渗透材料或结构可渗透氧气、二氧化碳和氮气中的一种以上,并且还可进一步渗透所有这三种气体。

[0071] 流体介质的“组分”是介质中存在的任何化学或生化分子,包括溶剂分子、离子、小

分子、抗生素、核苷酸和核苷、核酸、氨基酸、肽、蛋白质、糖、碳水化合物、脂质、脂肪酸、胆固醇、代谢物等。

[0072] 如本文中关于流体介质所使用的,“扩散(diffuse)”和“扩散(diffusion)”是指流体介质的组分沿着浓度梯度的热力学运动。

[0073] 短语“介质的流动(flow ofamedium)”是指主要由于扩散以外的任何机制导致的流体介质的大量移动。例如,由于点之间的压力差,介质的流动可能涉及流体介质从一点移动到另一点。这种流动可以包括液体的连续、脉冲、周期性、随机、间歇或往复流动,或其任何组合。当一种流体介质流入另一种流体介质时,可能导致介质的湍流和混合。

[0074] 短语“基本上不流动”是指随时间平均时,流体介质的流动速率小于材料(例如,感兴趣分析物)的组分扩散到流体介质中或流体介质内的速率。这种材料的组分的扩散速率可以取决于例如温度、组分的尺寸以及组分与流体介质之间相互作用的强度。

[0075] 如本文关于微流体设备内的不同区域所使用的,短语“流体连接”是指,当不同区域基本上充满流体(诸如流体介质)时,每个区域中的流体连接以形成单一体的流体。这并不意味着不同区域中的流体(或流体介质)在组成上必然相同。而是,微流体设备的不同流体连接区域中的流体可以具有不同的组成(例如不同浓度的溶质,诸如蛋白质、碳水化合物、离子或其他分子),其在流动中作为溶质沿着其各自的浓度梯度下移和/或流体流过该设备。

[0076] 如本文所用,“流动路径”是指一个或多个流体连接的管路元件(例如通道、区域、腔室等),其限定并且服从介质流动的轨迹。因此,流动路径是微流体设备的被扫过区域的实例。其他管路元件(例如,未被扫过区域)可以与包括流动路径的管路元件流体连接,而不受流动路径中的介质流动的影响。

[0077] 如本文所用,“分离微物体”将微物体限制在微流体设备内的限定区域。

[0078] 微流体(或纳流体)设备可以包括“被扫过”区域和“未被扫过”区域。如本文所使用的,“被扫过”区域包括微流体管路的一个或更多个流体互连的管路元件,当流体流过微流体管路时,每个管路元件经历介质流。被扫过区域的管路元件可以包括例如区域、通道以及全部或部分腔室。如本文所使用的,“未被扫过”区域包括微流体管路的一个或更多个流体互连的管路元件,当流体流过微流体管路时,每个管路元件基本上不经历流体通量。未被扫过区域可以流体连接到被扫过区域,只要流体连接被构造成能够扩散但基本上没有介质在被扫过区域和未被扫过区域之间流动。因此微流体设备可被构造成基本上将未扫过区域与被扫过区域中的介质流隔离开,同时在被扫过区域和未被扫过区域之间基本上仅允许扩散流体连通。例如,微流体设备的流动通道是被扫过区域的示例,而微流体设备的分离区域(下面进一步详细描述)是未被扫过区域的示例。

[0079] 如本文所用,流体介质流的“未扫过”速率是指在诸如微流体通道的流动区域中的流速,其足以允许隔离围栏的分离区域中的第二流体介质的成分扩散到在流动区域中的第一流体介质中和/或第一流体介质的成分扩散到在分离区域中的第二流体介质中;并且进一步地,其中第一介质基本上不流入分离区域。

[0080] 如本文所用,“合成表面”是指支撑结构与气/液介质之间的界面,其中合成表面是通过非生物方法制备的。合成表面可以具有与其连接的生物衍生材料,例如本文所述的主和共活化分子,以提供抗原呈递合成表面,前提是该合成表面不被生物有机体表达。通常,

支撑结构是固体,例如珠子、晶片或微流体设备的衬底,盖或管路材料的非表面暴露部分,并且不包封生物核或细胞器。

[0081] 如本文所用,“共活化”是指除了原代T细胞受体/抗原:MHC结合相互作用之外,生物大分子、其片段或其合成或修饰形式与T细胞之间的结合相互作用,其增强生产性免疫反应以活化T细胞。共活化相互作用是抗原非特异性相互作用,例如在能够参与细胞内信号传导的T细胞表面蛋白如CD28、CD2、ICOS等与其激动剂之间。如本文所用,“共活化(co-activation)”和“(进行)共活化(co-activating)”分别等同于术语共刺激和(进行)共刺激。

[0082] 如本文所用,“TCR共活化分子”是与T细胞上的一个或多个共受体结合的生物大分子、其片段或其合成或修饰形式,其活化远端信号分子,所述远端信号分子增强和/或完成由TCR的抗原特异性结合所激发的反应。在一个实例中,信号分子诸如转录因子核因子κB(NF kB)和活化T细胞核因子(NFAT)被TCR共活化分子活化。TCR共活化分子可以是,例如CD28受体的激动剂,其通过磷酸肌醇3激酶(PI3K)/Akt途径发出信号。参见图4。

[0083] 如本文所用,“CD28high”是指T细胞中高CD28表面表达的表型。本领域技术人员熟知CD28high表型和鉴定CD28high T细胞的合适方法。除非另有说明,否则CD28high T细胞包括满足以下任何标准的T细胞。在一些实施方案中,CD28high T细胞是表达比静止CD8+T细胞更高水平的CD28的T细胞。与无关的非抗原特异性T细胞相比,CD28high T细胞还可以表达更高水平的CD28。在一些实施方案中,CD28high T细胞是其中可通过FACS测量的表面CD28的水平等于或大于可通过FACS测量的存在于循环记忆T细胞上存在的表面CD28的水平的群体。在一些实施方案中,CD28high T细胞具有的表面CD28的水平等于或大于来自相同样品或个体的循环记忆T细胞上存在的表面CD28的水平。表面CD28的表达可以通过FACS确定,并且存在于循环记忆T细胞上的表面CD28的平均值(例如几何平均值)或中值水平可以用于确定给定的T细胞是否为CD28high。在一些实施方案中,CD28high T细胞是以显著高于来自相同样品或个体的初始CD8 T细胞的典型表达的水平表达CD28的T细胞,例如高于初始T细胞75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%或95%。初始CD8 T细胞可以通过已知方法进行鉴定和表征,例如流式细胞术,因为CD8+细胞表达可检测的CD28,而CD45RO很少或没有。

[0084] 如本文所用,“TCR辅助活化分子”刺激放大抗原特异性TCR相互作用的信号传导分子类别,并且不同于TCR共活化分子。例如,通过TCR近端信号复合物磷酸化的TCR近端信号是TCR辅助活化分子可以起作用的一种途径。TCR辅助活化分子可以是例如CD2受体的激动剂。参见图4。

[0085] 如本文所用,“活化T细胞”是经历抗原(或其后代)并能够对该抗原进行抗原特异性应答的T细胞。活化T细胞通常对于CD28、CD45RO、CD127和CD197中的至少一种是阳性的。

概述

[0086] 癌症的免疫疗法是有前途的发展方向,但是需要与治疗对象相容的特异性活化T淋巴细胞。然而,目前使用抗原呈递树突状细胞活化T淋巴细胞存在一些不利方面。树突状细胞必须从供体来源获得,从而限制了通量。树突状细胞必须针对每个T淋巴细胞活化序列而成熟,这需要大约7天的前置时间。还需要辐射树突状细胞,这限制了可以进行这种处理的地点。

[0087] 用抗原呈递合成表面代替使用自体抗原呈递树突状细胞来活化T淋巴细胞可提供

更大的再现性,以刺激和扩增治疗相关人群的T淋巴细胞。可以对抗原呈递合成表面进行工程改造以用于T淋巴细胞的抗原特异性活化,从而提供具有所需表型以治疗癌症的活化T淋巴细胞群的可控性、特征性、可再现性更高的和/或更快速的发展。抗原呈递合成表面还可允许对T细胞活化进行更多的控制和选择性,包括在活化后更精确地靶向所需的T细胞表型,例如特定形式的记忆T细胞的富集。此外,与使用自体抗原呈递树突状细胞相比,抗原呈递合成表面还可以利用规模经济和/或在更大程度上提供可再现性。这样,该技术可使细胞疗法可用于更大量的有需要的患者和/或以更短的时间用于有需要的患者。对于患有晚期疾病的患者,更快地提供可用于细胞疗法的T细胞可能尤其重要。本文描述了这种抗原呈递合成表面的结构及其制备和使用方法。在一些实施方案中,抗原呈递合成表面包括与TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子联合的主活化配体,它们一起用于活化T细胞。本文还公开了这些组分的表面密度范围以及可以进一步改善功效的彼此之间的比例。在一些实施方案中,抗原呈递合成表面及其制备和使用方法提供了一个或多个前述优点,或至少为公众提供了有用的选择。

用于T细胞活化的抗原呈递合成表面。

[0088] 本文提供了用于活化T淋巴细胞(T细胞)的呈递抗原合成表面,其包括:多个主活化分子配体;和多个共活化分子配体,其每个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子,其中多个主活化分子配体和多个共活化分子配体中的每一个都特异性地结合至呈递抗原合成表面上。每个主活化分子配体可以包括主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex,MHC)分子,其被构造为与T细胞的T细胞受体相结合。在一些实施方案中,MHC分子是1类MHC分子。在一些其他实施方案中,MHC分子是II类MHC分子。在一些实施方案中,主活化分子配体包括抗原肽(例如,共价或非共价结合至MHC分子)。在一些实施方案中,多个共活化分子配体包括多个T细胞受体(TCR)共活化分子和多个辅助TCR活化分子。在一些实施方案中,T细胞受体(TCR)共活化分子和辅助TCR活化分子以约1:100至约100:1的比例存在,例如约20:1至约1:20,或约10:1至约1:20。在一些实施方案中,多个共活化分子配体中的一个或多个是TCR共活化分子,其可以活化信号传导分子,例如转录因子核因子κB(NFκB)和活化T细胞的核因子(NFAT)。在一些实施方案中,TCR共活化分子是CD28受体的激动剂,其通过磷酸肌醇3激酶(PI3K)/Akt途径发出信号。在一些实施方案中,多个共活化分子配体中的一个或多个是TCR辅助活化分子,其例如通过TCR近端信号复合物的磷酸化来活化TCR近端信号传递。TCR辅助活化分子可以是例如CD2受体的激动剂。可以通过CD28和CD2受体活化的示例性途径(以及其他详细信息)如图4所示。被该抗原呈递合成表面活化的T细胞可以是初始T细胞(naïve T cell)。抗原呈递合成表面可以是抗原呈递珠子、抗原呈递晶片、管(例如玻璃或聚合物管)的抗原呈递内表面或微流体设备的抗原呈递内表面。抗原呈递微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备,并且可以具有本文所述的特征的任何组合。

[0089] 在各种实施方案中,抗原呈递合成表面被构造为在体外活化T淋巴细胞。主活化分子配体可以包括具有氨基酸序列的MHC分子,并且可以经由C末端连接共价连接至抗原呈递合成表面的表面。MHC分子可呈现出远离表面定向的MHC分子的N末端部分,从而促进MHC分子与置于表面上的T淋巴细胞的TCR的特异性结合。MHC分子可以包括MHC肽。可以将至少四个MHC分子的簇设置在抗原呈递合成表面上的位置,使得当该表面暴露于水性环境时,可以

形成MHC四聚体。

[0090] 在一些实施方案中,多个主活化分子配体中的每一个可以经由接头共价连接至抗原呈递合成表面。在一些实施方案中,主活化分子配体的MHC分子可以通过共价键连接至抗原呈递合成表面。共价键可以例如使用点击化学和适当的点击试剂对形成。同样,本文所述的其他配体,例如共活化分子配体(包括TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子)、生长刺激性分子配体和另外的刺激性分子配体可以通过接头共价连接至抗原呈递合成表面的表面,并且可以使用点击化学和适当的点击试剂对形成键。

[0091] 在其他实施方案中,MHC分子可以通过偶联基团(CG),例如生物素/链霉亲和素结合对相互作用,非共价地连接至抗原呈递合成表面。在一些实施方案中,偶联基团的一个成员与表面共价联合(例如,链霉亲和素)。偶联基团的其他实例包括但不限于生物素/亲和素、生物素/中性抗生物素蛋白(NeutrAvidin)和地高辛素(digoxygenin)/抗地高辛素(anti-digoxygenin)。链霉亲和素、抗生物素蛋白和中性抗生物素蛋白代表生物素结合剂的实例。同样,本文所述的其他配体,例如共活化分子配体(包括TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子)、生长刺激性分子配体和另外的刺激性分子配体可以非共价地偶联至抗原呈递合成表面,并且偶联基团可以包括生物素或地高辛素。

[0092] 在一些实施方案中,CG结合对的一个成员本身可以例如通过一个或多个接头共价结合至表面。连接至表面的共价连接可以是通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长。在一些实施方案中,共价结合至表面的CG结合对的成员通过点击试剂对结合。这对于涉及本文所述的其他配体(例如共活化分子配体、TCR共活化分子、辅助TCR活化分子、生长刺激性分子和另外的刺激性分子)与表面联合的CG结合对成员可能也是如此。此外,由于一些结合对成员如链霉亲和素具有多个结合位点(例如,链霉亲和素中有四个),因此主活化分子配体可以通过生物素/链霉亲和素/生物素键偶联至抗原呈递合成表面。再次,对于涉及本文所述的其他配体(例如共活化分子配体、TCR共活化分子、辅助TCR活化分子、生长刺激性分子和另外的刺激性分子)与表面联合的CG结合对成员可能也是如此。

[0093] 在一些实施方案中,CG结合对的第一个成员与主活化分子配体共价联合,并且CG结合对的第二个成员与表面非共价联合。例如,CG结合对的第一个成员可以是与主活化分子配体共价联合的生物素;而CG结合对的第二个成员可以是与表面非共价联合的链霉亲和素(例如,通过另外的生物素,其中另外的生物素与表面共价结合)。在一些实施方案中,与表面共价联合的生物素通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长与表面连接。例如,与表面共价联合的生物素可以通过一系列具有如上所述的总长度的一个或多个接头连接到该表面。再次,对于涉及本文所述的其他配体(例如共活化分子配体、TCR共活化分子、辅助TCR活化分子、生长刺激性分子和另外的刺激性分子)与表面联合的CG结合对成员可能也是如此。与如果CG结合对的第二成员与表面共价联合相比,CG结合对的第二个成员(例如链霉亲和素)与表面非共价联合可以促进以更高的密度加载配体(例如主活化分子配体、共活化分子配体、TCR共活化分子和辅助TCR活化分子)。

[0094] 主活化分子配体(例如,包括MHC分子)还可以包括包含肿瘤相关抗原的抗原肽。肿瘤相关抗原可以与主活化分子配体(例如,MHC分子)非共价联合。肿瘤相关抗原可以由主活

化分子配体(例如,MHC分子)以可以引发T淋巴细胞活化的方向进行呈递。肿瘤相关抗原可以是肽。肿瘤相关抗原的一些非限制性实例包括用于黑色素瘤的MART1(肽序列ELAGIGILTV)、涉及黑色素瘤和某些癌的NYESO1(肽序列SLLMWITQV)、SLC45A2、TCL1和VCX3A,但是本公开内容不限于此。肿瘤抗原的其他实例包括包含来自在肿瘤细胞表面上表达的蛋白质的氨基酸序列的片段的肽,所述蛋白质例如CD19、CD20、CLL-1、TRP-2、LAGE-1、HER2、EphA2、FOLR1、MAGE-A1、间皮素、SOX2、PSM、CA125、T抗原等。该肽可以来自肿瘤相关抗原的细胞外结构域。如果抗原在肿瘤细胞上的表达水平高于在其来源的健康细胞上表达的水平,则认为该抗原与肿瘤相关。识别该肿瘤相关抗原的T细胞是抗原特异性T细胞。任何与肿瘤相关的抗原均可用于本文所述的抗原呈递表面。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原是新抗原肽,例如,由肿瘤细胞中的突变基因编码。对于新抗原肽的详细讨论,参见,例如,US2011/0293637。

[0095] 抗原呈递合成表面包括多个共活化分子配体,其每一个包括TCR共活化分子或辅助TCR活化分子。在一些实施方案中,多个共活化分子配体包括多个TCR共活化分子。在一些实施方案中,多个共活化分子配体包括多个辅助TCE活化分子。在其他实施方案中,多个共活化分子配体可包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。TCR共活化分子和辅助TCR活化分子可以以例如100:1至1:100、10:1至1:20、5:1至1:5、3:1至1:3、2:1至1:2等的比例存在,其中每个上述值都可以用“约”修饰。在一些实施方案中,多个共活化分子配体可以包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子,其比例为约3∶1至约1∶3。

[0096] TCR共活化分子或辅助TCR活化分子可包括蛋白质,例如抗体或其片段。在一些实施方案中,TCR共活化分子可以是CD28结合分子(例如,包括CD80分子)或其保留了与CD28结合能力的片段。在一些实施方案中,TCR共活化分子可以是CD28结合分子(例如,包括CD80分子)或其与CD28特异性结合的片段。在一些实施方案中,TCR共活化分子可以是CD28结合分子(例如,包括CD80分子)或其CD28结合片段。在一些实施方案中,TCR共活化分子可以包括抗CD28抗体或其片段(例如,CD28结合片段)。

[0097] 在一些实施方案中,多个共活化分子配体中的每一个可以经由接头共价连接至抗原呈递合成表面。在其他实施方案中,多个共活化分子配体中的每一个可以非共价结合至与抗原呈递合成表面共价结合的接头。TCR共活化分子或辅助TCR活化分子可以通过CG例如生物素/链霉亲和素结合对相互作用非共价地连接至共价修饰表面。例如,TCR共活化分子或辅助TCR活化分子还可以包括与链霉亲和素相互作用的位点特异性C末端生物素部分,其可与本文所述的表面共价或非共价联合。可以使用已知方法,例如使用生物素连接酶如BirA酶将位点特异性C末端生物素部分添加至TCR共活化分子或辅助TCR活化分子。参见例如Fairhead等,Methods Mol Biol 1266:171-184,2015。偶联基团的其他实例包括生物素/抗生物素蛋白、生物素/中性抗生物素蛋白和地高辛素/抗地高辛素。在一些实施方案中,如上所述,CG结合对之一本身可以例如通过接头共价结合至表面。参见示例性TCR共活化分子或辅助TCR活化分子的实例。

[0098] 在一些其他实施方案中,例如,除了本文所述的TCR共活化分子之外或代替本文所述的TCR共活化分子,抗原呈递合成表面的共活化分子配体可包括多个辅助TCR活化分子。在一些其他实施方案中,可以存在另外的共活化分子配体。在一些实施方案中,辅助TCR活化分子或另外的共活化分子配体包括一个或多个CD2激动剂、CD27激动剂或CD137激动剂。

例如,辅助TCR活化分子可以是CD2结合蛋白或其片段,其中该片段保留了与CD2的结合能力。在一些实施方案中,辅助TCR活化分子可以是CD58或其保留了与CD2结合能力的片段。辅助TCR活化分子可以是CD2结合蛋白(例如,CD58)或其片段,其中该片段特异性结合CD2。辅助TCR活化分子可以是CD2结合蛋白(例如,CD58)或其CD2结合片段。辅助TCR活化分子或另外的共活化分子配体可以各自是针对CD2、CD27或CD137的抗体,或者可以存在此类抗体的任何组合。辅助TCR活化分子或另外的共活化分子配体可以或者各自是针对CD2、CD27或CD137的抗体的片段,或其任何组合。Varlilumab

(CDX-1127)是一种示例性的抗CD27抗体。Utomilumab(PF-05082566)是一种示例性的抗CD137抗体。CD70或其细胞外部分也可以用作CD27激动剂。TNFSF9,也称为CD137L,或其细胞外部分也可以用作CD137激动剂。在一些实施方案中,辅助TCR活化分子包括CD2激动剂,例如抗CD2抗体。在一些实施方案中,每个辅助TCR活化分子可以经由接头共价连接至表面。在其他实施方案中,每个辅助TCR活化分子可以非共价结合至与表面共价结合的接头,例如通过CG,例如生物素/链霉亲和素结合对相互作用。例如,辅助TCR活化分子可包括如上所述的与链霉亲和素相互作用的位点特异性C-末端生物素部分,其可与本文所述的表面共价或非共价联合。偶联基团的其他实例包括生物素/抗生物素蛋白、生物素/中性抗生物素蛋白和地高辛素/抗地高辛素。在一些实施方案中,CG结合对之一本身可以例如通过接头共价结合至表面。

[0099] 抗原呈递合成表面还可以包括至少一个生长刺激性分子配体。生长刺激性分子配体可以是蛋白质或肽。生长刺激蛋白或肽可以是细胞因子或其片段。生长刺激蛋白或肽可以是生长因子受体配体。生长刺激性分子配体可包括IL-21或其片段。在一些实施方案中,生长刺激性分子配体可通过共价接头连接至抗原呈递合成表面。在其他实施方案中,该生长刺激性分子配体可以通过CG(例如生物素/链霉亲和素结合对相互作用)连接至抗原呈递合成表面。偶联基团的其他实例包括生物素/抗生物素蛋白、生物素/中性抗生物素蛋白和地高辛素/抗地高辛素。在一些实施方案中,CG结合对之一本身可以例如通过接头共价结合至表面。在其他实施方案中,生长刺激性分子配体可以共价或通过生物素/链霉亲和素结合相互作用附接于表面,其中该表面是不同于具有连接有MHC分子的抗原呈递合成表面的表面。例如,生长刺激性分子配体所附接的表面可以是也包括第一抗原呈递合成表面的微流体设备的第二表面。

[0100] 在其他实施方案中,可能存在另外的生长刺激性分子配体,其可以是一个或多个细胞因子或其片段。在一些实施方案中,包括但不限于IL-2或IL-7的另外的刺激性分子配体可连接至抗原呈递合成表面或非抗原呈递合成表面的另一表面,如以上关于生长刺激性分子配体所讨论的。

[0101] 在一些实施方案中,抗原呈递合成表面包括粘附刺激性分子配体,其是包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体。

[0102] 另外的刺激性分子配体和/或粘附性刺激性分子配体可以通过CG(例如生物素/链霉亲和素结合对相互作用)共价连接至表面或可以非共价连接至表面。偶联基团的其他实例包括生物素/抗生物素蛋白、生物素/中性抗生物素蛋白和地高辛素/抗地高辛素。在一些实施方案中,CG结合对之一本身可以例如通过接头经由生物素/链霉亲和素结合相互作用共价结合至表面。

[0103] 在一些实施方案中,抗原呈递合成表面包括多个表面封闭分子配体,其可包括接头和末端表面封闭基团。接头可包括6个或更多个原子的线性链(例如7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100或更多个原子)共价连接在一起。任选地,接头具有线性结构。末端表面封闭基团可以是亲水部分、两亲部分、两性离子部分或带负电荷的部分。在一些实施方案中,末端封闭基团包括末端羟基。在一些实施方案中,末端封闭基团包括末端羧基。在一些实施方案中,末端封闭基团包括末端两性离子基团。多个表面封闭分子配体可以具有全部相同的末端表面封闭基团或可以具有末端表面封闭基团的混合物。不受理论的束缚,表面封闭分子配体的末端表面封闭基团以及亲水性接头可以与抗原呈递合成表面周围的水性介质中的水分子相互作用,从而整体上产生更亲水的表面。这种增强的亲水性质可以使抗原呈递合成表面与细胞之间的接触更相容并且更类似于体内的天然细胞间相互作用和/或细胞-细胞外流体环境。接头可包括例如聚合物。该聚合物可以包括包含亚烷基醚部分的聚合物。多种含亚烷基醚的聚合物可适用于本文所述的表面上。一类含亚烷基醚的聚合物是聚乙二醇(PEG M_w<100000Da),其在本领域中是已知生物相容性的。在一些实施方案中,PEG可以具有约88Da、100Da、132Da、176Da、200Da、220Da、264Da、308Da、352Da、396Da、440Da、500Da、600Da、700Da、800Da、900Da、1000Da、1500Da、2000Da、5000Da、10000Da或20000Da的M_w,或者可以具有落在上述任意两个值定义的范围内的M_w。在一些实施方案中,PEG聚合物具有约3、4、5、10、15、25个单元或它们之间的任何值的聚乙烯部分重复。在一些实施方案中,PEG是羧基取代的PEG部分。在一些实施方案中,PEG是羟基取代的PEG部分。在一些实施方案中,多个表面封闭分子配体中的每一个可以具有与所述多个中的其他配体的接头长度相同的接头。在其他实施方案中,多个表面封闭分子配体的接头可以具有变化的长度。在一些实施方案中,对于多个表面封闭分子配体中的每一个,表面封闭基团和接头的长度可以相同。可选地,在多个表面封闭分子配体内表面封闭基团和连接基团的长度可以变化,并且可以包括2、3或4个不同的表面封闭基团和/或2、3、4或更多个不同的长度,以任何组合选择。通常,表面封闭分子配体具有足够短的长度和/或结构,以免在空间上阻碍主活化分子配体和共活化分子配体的结合和/或功能。例如,在一些实施方案中,表面封闭分子配体的长度等于或小于结合至表面上的其他接头的长度(例如,连接偶联基团、主活化分子配体、共刺激分子配体或其他配体的接头)。在一些实施方案中,表面封闭分子配体的长度比结合至表面的其他接头(例如,连接偶联基团、主活化分子配体、共刺激分子配体或其他配体的接头)的长度小约1埃或更多埃(例如约2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100或更多埃)。在一些实施方案中,表面封闭分子配体的长度比结合至表面的其他接头的长度小约1至约100埃(例如,约2至约75埃、约3至约50埃、约4至约40埃或约5至约30埃)。当表面封闭分子配体的长度等于或略小于结合至该表面上的其他接头的长度时,所得的表面以易于用于与细胞偶联和/或相互作用的方式有效地呈现出与其他接头附接的配体。关于抗原呈递珠子,已经发现包括表面封闭分子配体例如亲水聚合物,例如PEG或PEO聚合物和/或包括末端羟基或羧基的配体,可以通过疏水相互作用有益地减少珠子的聚集。表面封闭分子配体可以在上面讨论的主要和其他(例如,共活化,辅助等)配体之后被连接至表面,或者可以在任何活化或共活化物质附接至表面之前引入,如本文公开的任何实施方案中所述。

[0104] 抗原呈递合成表面可以包括玻璃、金属、聚合物或金属氧化物。在一些实施方案

中,

抗原呈递合成表面是具有任何构造的晶片的表面、珠子的表面、构造为容纳多个细胞的包括流体管路的设备(例如,微流体设备)的至少一个内表面,或管(例如玻璃或聚合物管)的内表面。在一些实施方案中,可以将具有被构造为活化T淋巴细胞的抗原呈递合成表面的晶片的尺寸确定为适用于在标准的48、96或384孔板的孔内。在各种实施方案中,可以将具有被构造为活化T淋巴细胞的抗原呈递合成表面的珠子放置在孔板内或包括流体管路的设备内使用。在一些实施方案中,多个主活化分子配体在抗原呈递合成表面上(或在其附着的每个部分或子区域中)的密度可以为每平方微米约50至约500个分子;优选地,每平方微米约50至约500个分子;每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子;每平方微米约1×10^3至约2×10^4个分子;每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子;每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子;每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子;每平方微米约2×10^3至约5×10^3个分子;每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子;每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子;或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子。

[0105] 在一些实施方案中,多个共活化分子配体在抗原呈递合成表面上(或在其附着的每个部分或子区域中)的密度为每平方微米约20至约250个分子;每平方微米约2×10^2至约1×10^3个分子;每平方微米约500至约5×10^3个分子;每平方微米约1×10^3到约1×10^4个分子;

每平方微米约5×10^2至约2×10^4个分子;每平方微米约5×10^2到约1.5×10^4个分子;每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约1.5×10^4个分子,约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子,或约1.25×10^4至约1.5×10^4个分子。

[0106] 不希望受任何特定理论的束缚,某些实验表明,提供和使用具有相对限定的表面积/

体积比的用于T细胞活化的珠子可能是有利的。这样的珠子可以以更容易接近的方式呈现相关的配体,使得它们在活化过程中与T细胞更有效地相互作用。与具有较高表面积/体积比的珠子相比,此类珠子可提供所需的T细胞活化程度,而所需配体更少,和/或与具有较高表面积/体积比的珠子相比,此类珠子可以提供更高程度的T细胞活化或更多具有所需特征的T细胞(例如,本文所述的抗原特异性和/或标记表型)。理想的球形固体具有最低可能的表面积与体积之比。因此,在一些实施例中,珠子表面积在与相等尺寸(体积或直径)的球的表面积的相差10%以内,并且在本文中被称为“基本上球形”。例如,对于直径为2.8μm

(半径为1.4μm)的珠子,相应的理想球体的表面积为$4\pi r^2=24.63\mu m^2$。因此,具有与等体积或直径的理想球体的表面积相差10%以内的表面积的,基本为球形的2.8μm直径的珠子的表面积应小于或等于$27.093\mu m^2$。应当指出,据报道某些市售的珠子具有较高的表面积;例如,Dynabeads M-270环氧树脂在其产品文献中被描述为具有2-$5m^2/g$的比表面积和2.8μm的直径,并且文献还表明1mg的珠子是$6\text{-}7\times10^7$个珠子。将比表面积乘以1mg/$6\text{-}7\times10^7$珠子,每珠子的表面积为28-$83\mu m^2$/珠子,比直径为2.8μm的理想球体的表面积大10%以上。具有比理想球的表面积大10%以上的表面积的聚合物珠子在本文中被称为“褶皱珠子(convoluted bead)”。在一些实施方案中,聚合物珠可以是基本上球形的或褶皱的。在一些

实施方案中,聚合物珠子不是褶皱的,但是基本上是球形的。

[0107] 无图案的表面。在各种实施方案中,抗原呈递合成表面可以是具有在其上均匀分布的多个主活化分子配体的无图案的表面。主活化分子配体可包括MHC分子,每个分子可包括肿瘤相关抗原。无图案的表面还可以包括均匀分布在其上的多个共活化分子配体(例如,TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子)。共活化分子配体可以如上文针对抗原呈递表面所述的任意组合。主活化分子配体和共活化分子配体的密度可以具有与如上文针对抗原呈递表面所述的相同范围。如上文针对抗原呈递表面所述,无图案的抗原呈递合成表面还可以包括额外的生长刺激性、粘附性和/或表面封闭分子配体,每一种(如果存在的话)可均匀地分布在无图案的表面上。例如,无图案的表面可以包括连接至该表面的辅助刺激分子,例如IL-21。如上文针对抗原呈递表面所述,主活化分子配体、共活化分子配体和/或其他配体可连接至表面。如本文所用,其上具有"均匀分布"的配体的表面的特征在于,与表面的总表面积的平均配体浓度相比,占总表面积的10%或更大的表面部分没有统计上显著更高的配体浓度。

[0108] 图案化的表面。在各种实施方案中,抗原呈递合成表面可以被图案化并且可以具有多个区域,每个区域包括多个包括MHC分子的主活化分子配体,其中多个区域被构造为基本排除主活化分子配体的区域相分隔开。抗原呈递合成表面可以是平面。在一些实施方案中,包括至少多个主活化分子配体的多个区域中的每一个还可以包括多个共活化分子配体,例如TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子。共活化分子配体可以是如上所述的任何共活化分子配体,并且可以是任何组合。主活化分子配体和/或共活化分子配体可如上文针对抗原呈递表面所述连接至表面。在包括主活化分子配体和/或共活化分子配体的每个区域中的主活化分子配体和/或共活化分子配体的密度可以在与上文针对抗原呈递表面所述相同的范围内。

在一些实施方案中,包括至少多个主活化分子配体的多个区域中的每一个具有约0.10平方微米至约4.0平方微米的面积。在其他实施例中,多个区域中的每个区域的面积可以为大约0.20平方微米至大约0.8平方微米。多个区域可以彼此分开约2微米、约3微米、约4微米或约5微米。多个区域中的每个区域与其相邻区域之间的间距可以是约2微米、约3微米、约4微米、约5微米或约6微米。参见图7A和7B,其示出了图案化表面的两个实施方案。

[0109] 在各种实施方案中,被构造为基本上排除包括MHC分子的主活化分子配体的区域也可以被构造为基本上排除TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子。

[0110] 在一些实施方案中,被构造为基本上排除主活化分子配体和任选地TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子的区域也可以被构造为包括一个或多个表面封闭分子配体、生长刺激性分子、其他刺激分子和粘附刺激性分子配体。在一些实施方案中,生长刺激性分子和/

或其他刺激分子包括细胞因子或其片段,并且还可以包括IL-21或其片段。在一些实施方案中,被构造为基本上排除主活化分子配体和任选地TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子的区域可以进一步被构造为包括一个或多个支持部分。支持部分可以提供粘附基序(motif)以支持T淋巴细胞的生长,或者可以提供亲水性部分,从而为细胞生长提供一般的支持环境。提供粘合支持的部分可以包括包含RGD基序的肽序列。在其他实施方案中,提供粘附支持的部分可以是ICAM序列。提供亲水性的部分可以是诸如PEG部分或羧酸取代的

PEG部分的部分。

[0111] 微流体设备。在一些实施方案中,微流体设备包括根据前述实施方案中任一项的具有多个区域的图案化的抗原呈递合成表面。尽管微流体设备的抗原呈递表面可以是本文所述的任何微流体(或纳流体)设备,但是本公开内容不限于此。可以修改其他类型的微流体设备,包括但不限于包括微孔或微腔室的微流体设备,如WO2014/153651,WO2016/115337或WO2017/124101中所述,以包含本部分中所述的抗原呈递表面,或者在本公开所述的方法中可以与本文所述的抗原呈递珠子或抗原呈递晶片组合使用。

[0112] 在一些实施方案中,抗原呈递合成表面是包括一个或多个隔离围栏和通道的微流体设备的内表面。一个或多个这样的隔离围栏内的表面的至少一部分可以包括多个主活化分子配体和多个共活化分子配体,例如,包括TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子。主活化分子配体和共活化分子配体可以是上文针对抗原呈递表面所述的任何配体,并且可以以如上所述的任何浓度或组合存在。配体附着于微流体设备表面的性质可以是上文针对抗原呈递表面所描述的任何性质。在一些实施方案中,一个或多个这样的隔离围栏中的该表面还可以包括一个或多个表面封闭分子配体、生长刺激性分子配体、另外的刺激性分子配体和粘附刺激性分子配体。通道表面的至少一部分可以包括表面封闭分子配体,例如,被构造为基本上排除本文所述的主活化分子配体的任何区域。在一些实施方案中,通道的表面包括表面封闭分子配体和任选地其他非刺激性配体,但基本不含存在于隔离围栏表面上的其他配体,例如,主活化分子配体和共活化分子配体。

[0113] 细胞对表面粘附的调节。在一些实施方案中,调节细胞粘附到微流体设备内的表面的能力可能是有用的。具有基本上亲水性特性的表面可能无法为需要粘附机械应力以适当生长和扩增的细胞提供锚定点。呈现过量的此类锚定部分的表面可以防止成功生长的贴壁细胞从隔离围栏内输出并离开微流体设备。在一些实施方案中,共价结合的表面修饰包括表面接触部分以帮助锚定贴壁细胞。本文描述的表面的结构及其制备方法提供了选择特定用途可能期望的锚定部分的量的能力。可能需要非常小百分比的粘附型基序以提供足够的粘附增强环境。在一些实施方案中,在将细胞引入微流体设备之前制备粘附增强部分。或者,可以在引入细胞之前提供粘附增强的经修饰表面,并且可以进一步添加另外的粘附增强部分,其被设计成共价或非共价地连接于第一修饰表面(例如,如在生物素/链霉亲和素结合的情况下)。

[0114] 在一些实施方案中,粘附增强性表面修饰可以以表面修饰配体的个体分子的随机模式修饰表面。在一些其他实施方案中,可以通过使用含有多个粘附增强基序(例如带正电荷的赖氨酸侧链)的聚合物引入更集中的粘附增强性表面修饰的模式,其可以产生被表面的其余部分围绕的小的表面修饰区域,其可以具有亲水性表面修饰以调整粘附增强。这可以通过使用具有多个粘附增强配体的树枝状聚合物进一步精细化。相对于仅具有亲水性表面接触部分的第二表面修饰,树枝状聚合物型表面修饰化合物或试剂可以以非常小的比例存在,同时仍提供粘附增强。此外,树枝状聚合物型表面修饰化合物或试剂本身可以具有混合的一组末端官能团,其可以额外地调节整个表面的行为。

[0115] 在一些实施方案中,可能期望提供表面的区域选择性引入。例如,在包括微流体通道和隔离围栏的微流体设备中,可能期望在微流体通道内提供第一类型的表面,同时在隔离围栏内提供向通道开放的表面,其提供成功培养粘附型细胞的能力以及在需要时(例如

使用介电电泳力或其他力)容易地输出它们的能力。在一些实施方案中,粘附增强性修饰可以包括可切割部分。可切割部分可以在与其内培养的细胞相容的条件下可切割,使得在任何所需的时间点,可切割部分可以被切割,并且表面的性质可以改变为不那么增强粘附。下面的经切割的表面可以有用地防污,从而在那时增强输出。虽然本文讨论的实施例集中于调整粘附性和运动性,但这些区域选择性修饰表面的用途不限于此。用于为其中培养的细胞提供任何类型益处的不同表面修饰可以并入到根据本发明的具有第一和第二表面修饰的表面中。

[0116] 可以使用的示例性粘附基序包括聚-L-赖氨酸、胺等,以及三肽序列RGD,其可以作为生物素化试剂使用,并且容易适用于本文所述的方法。可以使用的其他较大的生物分子包括纤连蛋白、层粘连蛋白或胶原蛋白。具有如WO2017/205830中所定义的式XXVI的结构的表面修饰,包括聚谷氨酸表面接触部分,可以诱导贴壁细胞附着并存活。可以帮助提供粘附位点的另一基序是弹性蛋白样肽(ELP),其包括VPGXG的重复序列,其中X是可以调节基序作用的可变氨基酸。

[0117] 在一些实施方案中,在包括微流体通道和隔离围栏的微流体设备的背景下,流动区域(例如,微流体通道)的表面可以用第一共价结合的表面修饰进行修饰,并且至少一个隔离围栏的表面可以用第二共价结合的表面修饰进行修饰,其中第一和第二共价结合的表面修饰具有不同的表面接触部分、不同的反应性部分或其组合。第一和第二共价结合的表面修饰可以选自式XXX、式V、式VII、式XXXI、式VIII和/或式IX中的任何一种,所有这些均在WO2017/205830中定义。当第一和第二共价结合的表面修饰都包括如WO2017/205830中所定义的式XXX、式V或式VII的官能化表面时,则选择正交反应化学以用于选择第一反应性部分和第二反应性部分。在各种实施方案中,流动区域的所有表面都可以用第一共价表面修饰进行修饰,并且至少一个隔离围栏的所有表面都可以用第二共价修饰进行修饰。

制备抗原呈递合成表面的方法;共价官能化表面

[0118] 图5A和5B显示了抗原呈递合成表面的结构,它是由未修饰表面构成的,并通过一个或多个步骤添加活化、共活化和表面封闭分子配体。图5A示出了具有单个区域的抗原呈递合成表面的过程和结构,而图5B示出了具有两个区域的抗原呈递合成表面的每种中间产物和最终产物的过程和结构。

[0119] 转到图5A,该示意图表示示例性程序,其用于从包括多个表面暴露部分(SEM)的合成反应性表面开始制备抗原呈递表面。如果在制备中的这一点添加了反应性部分RM和表面封闭分子配体SB,则通过使SEM与合适的制备试剂反应而引入,从而提供中间反应性表面。

引入中间反应性表面的反应性部分RM可以是本文所述的任何反应性部分,并且可以通过本文所述的任何接头连接至中间反应性表面。中间反应性表面至少包括反应性部分RM,并且在一些实施方案中,可以包括表面封闭分子配体SB,其可以是本文所述的任何表面封闭分子配体。

[0120] 然后用包括结合部分BM的官能化试剂处理中间反应性表面,其中所述官能化试剂与反应性部分RM反应以引入结合部分BM配体。如此引入的结合部分可以是本文所述的任何结合部分BM。结合部分BM可以是链霉亲和素或生物素。在一些实施方案中,结合部分BM是链霉亲和素,其通过与反应性部分RM的反应经由接头共价附接至共价官能化表面。

在一些其他实施方案中,共价官能化表面可在两部分结构(a two part

structure)中非共价地引入链霉亲和素结合部分。通过使中间反应性表面与第一官能化试剂接触来引入该两部分结构,以通过与反应性部分RM反应引入经由接头共价连接的生物素部分。随后引入链霉亲和素作为第二种官能化试剂,提供了共价官能化表面,其中结合部分BM、链霉亲和素非共价地附接至生物素部分,该生物素部分本身共价附接至表面。可以在引入结合部分的同时引入表面封闭分子配体SB',或者可以在引入结合部分之后将其引入共价官能化表面。表面封闭分子配体SB'可以是本文所述的任何表面封闭分子配体,并且如果存在表面封闭分子配体SB,则可以与表面封闭分子配体SB相同或不同。在一些实施方案中,可以存在表面封闭分子配体SB,并且可以不存在表面封闭分子配体SB'。或者,可以存在表面封闭分子配体SB',但是没有表面封闭分子配体SB。在一些实施方案中,表面封闭分子配体SB和SB'都存在。不受理论的束缚,在共价官能化表面上可能存在一些未反应的反应性基团RM,但是存在的反应性基团RM的数量不足以防止产物抗原呈递合成表面起作用。通过使共价官能化表面的结合部分BM与合适的活化配体试剂反应,引入主活化配体MHC和共活化配体Co-A_1和Co-A_2,从而提供抗原呈递合成表面。Co-A_1和Co-A_2可以是相同或不同的共活化配体。例如,Co-A_1和Co-A_2可包括TCR共活化分子和TCR辅助活化分子中的一个、另一个或共同地包括二者。

Co-A_1和/或Co-A_2可以是本文所述的TCR共活化分子和TCR辅助活化分子的任何组合。在一些实施方案中,可以在将共价官能化表面与共活化配体Co-A_1和/或Co-A_2接触之前,将主活化配体MHC引入到共价官能化表面。在其他实施方案中,可以在引入共活化配体Co-A_1和Co-A_2的同时或之后,将主活化配体MHC引入共价官能化表面。在一些实施方案中,未在图5A中显示,在引入主活化配体MHC和共活化配体Co-A_1和/或Co-A_2之后,通过使表面封闭分子与仍存在于抗原呈递合成表面上的剩余反应性部分RM反应,可以将表面封闭分子配体SB引入抗原呈递合成表面。还包括但未在图5A中示出的是次要配体(Secondary Ligand)SL的引入,其可以是一个或多个生长刺激性分子配体和/或粘附刺激性分子配体。次要配体SL可以是这些配体中的任何一类。

[0121] 图5B提供了用于制备包括第一和第二区域的抗原呈递表面的示例性程序的示意图,

所述抗原呈递表面从包括多个表面暴露部分(SEM)的合成反应性表面开始。如图6所示,区域1中的表面暴露部分SEM可以不同于区域2中的表面暴露部分SEM_2,其中在合成反应性表面的表面上可以存在不同的材料。由于针对SEM和SEM_2中的每一个使用正交化学,将反应性部分RM引入区域1中并且基本上没有引入区域2中,而将反应性部分RM_2引入区域2中并且基本上没有引入区域1中。例如,如图6所示,区域1的SEM可以与包括叠氮化物的烷氧基硅氧烷试剂RM反应,而区域2的SEM_2可以与包括炔基的膦酸试剂RM反应。通过使SEM与合适的制备试剂(例如,对于类似图6的区域1的表面,试剂将是包括表面封闭基团SB的烷氧基硅氧烷试剂)反应,将表面保护性分子配体SB_1引入区域1中,并且基本上不引入区域2中。具有不同反应性部分的中间反应性表面由此过程产生。基于不同的反应性部分RM和RM_2,进一步的正交化学可以在区域1而基本上不在区域2中引入结合部分BM和表面封闭分子配体SB_1',而表面封闭分子配体SB_2被引入到区域2中,而基本上不在区域1中。因此,提供了具有两个不同区域的共价官能化表面。SB_1'可以与SB_1相同或不同;SB_1'可以与SB_2相同或不同;SB_2可以与SB_1相同或不同。通过使结合部分BM与合适的活化配体试剂反应,将主活化配体MHC和

共活化配体Co-A_1和Co-A_2引入区域1,并且通过使RM与合适的试剂反应,在区域2中形成次要配体SL,从而提供抗原呈递合成表面。次要配体SL可以是如图5A所述的任何类型的分子配体。类似于图5A中所述的方法,可以在引入共活化配体之前引入主活化配体MHC。Co-A_1和Co-A_2可以是相同或不同的共活化配体。例如,Co-A_1和Co-A_2可包括TCR共活化分子和TCR辅助活化分子中的一个、另一个或共同地包括二者。SEM、RM、SB、主活化配体MHC、共活化配体Co-A_1和Co-A_2以及次要配体SL中的每一个可以是本文所述的任何SEM、RM、SB、主活化配体MHC、共活化配体Co-A_1和Co-A_2以及次要配体SL。

制备抗原呈递合成表面的方法

[0122] 提供了一种制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递合成表面的方法,该方法包括:使多个主活化分子与包括结合部分(例如生物素结合剂诸如链霉亲和素,或与生物素结合剂诸如链霉亲和素非共价联合的生物素部分)的共价官能化合成表面的第一多个结合部分反应,其中第一多个结合部分中的每一个被构造用于结合主活化分子;和使多个共活化分子与共价官能化合成表面的第二多个结合部分反应,每个共活化分子包括:T细胞受体(TCR)共活化分子;或辅助TCR活化分子,其中第二多个结合部分中的每一个被构造用于结合共活化分子,从而在抗原呈递合成表面上提供多个特异性结合的主活化分子配体和多个特异性结合的共活化分子配体。

[0123] 还提供了共价官能化合成表面,其包括结合部分(例如生物素结合剂诸如链霉亲和素,

或与生物素结合剂诸如链霉亲和素非共价联合的生物素部分)和至少第一多个表面封闭分子配体。就以下讨论描述共价官能化合成表面的特征而言,它既适用于共价官能化合成表面的实施方案,也适用于制备使用了共价官能化合成表面的抗原呈递表面的方法的实施方案。

[0124] 共价官能化合成表面可以是本文所述的任何表面类型,例如珠子、晶片、微流体设备或管(例如,玻璃或聚合物管)的内表面。表面材料可以包括例如金属、玻璃、陶瓷、聚合物或金属氧化物。微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备,并且可以具有特征的任何组合。珠子可以是具有与等体积或直径的球的表面积相差10%以内的表面积的珠子,如本文在关于抗原呈递合成表面的部分中所讨论的。在一些实施方案中,珠子可以是表面积超过相等体积或直径的球的表面积的10%的珠子,如本文针对抗原呈递表面所讨论的。在一些实施方案中,珠子不是表面积超过相等体积或直径的球的表面积的10%的珠子,如本文针对抗原呈递表面所讨论的。

[0125] 主活化分子和共活化分子可以各自是本文所述的任何此类分子,并且可以使用其任何组合。因此,主活化分子可包括MHC分子和任选的抗原性肽;以及共活化分子可包括本文所述的任何TCR共活化分子或本文所述的任何辅助TCR活化分子。

[0126] 在一些实施方案中,使多个主活化分子与包括结合部分的共价官能化合成表面的第一多个结合部分反应包括在主活化分子和结合部分之间形成非共价联合。例如,主活化分子可包括生物素,而结合部分可包括生物素结合剂诸如链霉亲和素(例如,其可以与表面共价结合或可以与第二生物素非共价结合,而第二生物素本身与表面共价结合)。在一些实施方案中,生物素结合剂例如链霉亲和素通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长与表面连接。例如,生物素结合

剂可以通过一系列具有如上所述的选定长度的一个或多个接头连接到表面。在另一个实例中,结合部分和主活化分子都可以包括生物素,并且游离的多价生物素结合剂例如链霉亲和素可以用作非共价连接试剂。也可以使用任何其他合适的非共价结合对,例如本文其他地方所述的那些。

[0127] 或者,使多个主活化分子与包括结合部分的共价官能化合成表面的第一多个结合部分反应可以包括形成共价键。例如,叠氮-炔反应(例如本文其他地方描述的任何反应)可用于形成共价键,其中主活化分子和结合部分分别包括叠氮化物和炔烃,或炔烃和叠氮化物。如本领域中已知的,可以使用其他反应对,包括但不限于马来酰亚胺和硫化物。更一般地,可用于形成共价键的示例性官能团包括叠氮化物、羧酸及其活性酯、琥珀酰亚胺酯、马来酰亚胺、酮、磺酰卤、磺酸、二苯并环辛炔、烯烃、炔烃等。技术人员熟悉使用这些部分形成共价键的适当组合和反应条件。

[0128] 当共价官能化合成表面包括共价联合的生物素时,该表面还可以包括非共价联合的生物素结合剂(例如,链霉亲和素),使得该表面可以与包括生物素部分的主活化分子和共活化分子反应。在一些实施方案中,制备抗原呈递合成表面的方法包括使包括共价联合的生物素的共价官能化合成表面与生物素结合剂(例如,链霉亲和素)反应,然后与包括生物素部分的主活化分子和共活化分子反应。在一些实施方案中,共价官能化表面的生物素通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长与表面连接。

[0129] 在一些实施方案中,反应提供了本文所述的表面上的主活化分子配体的任何密度,例如每平方微米约4×10^2至约3×10^4、4×10^2至约2×10^3、约5×10^3至约3×10^4、约5×10^3至约2×10^4或约1×10^4至约2×10^4个分子。

[0130] 在一些实施方案中,使多个共活化分子(每个包括:T细胞受体(TCR)共活化分子;

或辅助TCR活化分子)与共价官能化合成表面的第二多个结合部分反应包括在共活化分子和结合部分之间形成非共价联合。关于涉及非共价结合对(例如生物素)和生物素结合剂(例如链霉亲和素)的主活化分子,可以使用上述或本文公开的任何实施方案中所述的任何实施方案。

[0131] 或者,使多个共活化分子与共价官能化合成表面的第二多个结合部分反应可以包括形成共价键。例如,叠氮-炔反应(例如本文其他地方描述的任何反应)可用于形成共价键,其中主活化分子和结合部分分别包括叠氮化物和炔烃,或炔烃和叠氮化物。

[0132] 在一些实施方案中,反应提供本文所述的表面上的共活化分子配体的任何密度,例如每平方微米约4×10^2至约3×10^4、4×10^2至约2×10^3、约5×10^3至约3×10^4、约5×10^3至约2×10^4或约1×10^4至约2×10^4个分子。

[0133] 在一些实施方案中,反应以本文所述的任何比例,例如100:1至1:100、10:1至1:20、

5:1至1:5或3:1至1:3提供表面上的TCR共活化分子和辅助TCR活化分子,其中每个前述值都可以用“约”修饰。

[0134] 在一些实施方案中,上文描述的或本文公开的任何实施方案中阐述的反应以本文所述的任何比例,例如约1:1至约2:1;约1:1;或约3:1至约1:3,在表面上提供主活化分子配体和共活化分子配体。

[0135] 在一些实施方案中,制备抗原呈递表面的方法还包括使多个表面封闭分子与共价官能化表面的第三多个结合部分反应,其中第三多个结合部分中的每个被构造用于结合表面封闭分子。可以使用本文其他地方描述的任何表面封闭分子。可以使用本文所述的用于形成非共价联合或共价键的任何反应方法。

[0136] 在一些实施方案中,制备抗原呈递表面的方法还包括使多个粘附刺激性分子配体(其中每个粘附刺激性分子配体包括针对包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体)与共价官能化珠子的第四多个结合部分反应,其中第四多个结合部分中的每个结合部分被构造用于与细胞粘附受体配体分子相结合。可以使用本文所述的用于形成非共价联合或共价键的任何反应方法。

[0137] 在一些实施方案中,制备抗原呈递表面的方法还包括产生中间反应性表面。这可以包括例如使布置在合成反应性表面的表面上的表面暴露部分的至少第一部分与包括反应性部分的多个中间制备分子反应,从而产生中间反应性表面。本文中其他地方详细描述了制备可用作中间反应性表面的共价官能化表面的方法。产生中间反应性表面可以包括本文关于制备共价官能化表面的方法所述的任何特征。

[0138] 在一些实施方案中,所述方法还包括例如通过为需要机械粘附力以适当生长和扩展的细胞提供锚定点,来调节细胞粘附于微流体设备内的表面的能力。这可以通过引入包括表面接触部分的共价结合的表面修饰来帮助锚定粘附细胞来实现。可以使用本文其他地方描述的任何表面接触部分。

[0139] 共价官能化合成表面可包括适用于本文所述任何反应的部分。

制备共价官能化表面的方法

[0140] 还提供了一种制备共价官能化表面的方法,该表面包括多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体,其中所述方法包括:将中间反应性合成表面的反应性部分的至少第一子集与多个连接试剂反应,每个连接试剂包括链霉亲和素或生物素;和将中间反应性合成表面的反应性部分的至少第二子集与多个表面封闭分子反应,从而提供共价官能化合成表面,其包括至少一种多个链霉亲和素或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体。通常,仅使用包括链霉亲和素的连接试剂或包括生物素的连接试剂中的一种或另一种。中间反应性合成表面可以是本文所述的任何表面类型,例如,珠子、晶片、微流体设置或管(例如,玻璃或聚合物管)的内表面。表面材料可以包括例如金属、玻璃、陶瓷、聚合物或金属氧化物。抗原呈递微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备,并且可以具有特征的任何组合。珠子可以是表面积与相同体积或直径的球体表面积相差10%以内的珠子,如本文中有关抗原呈递合成表面的部分所述。

[0141] 在连接试剂包括生物素的实施方案中,该方法还可以包括将链霉亲和素与生物素非共价联合。在这样的实施方案中,参考图5A,反应性部分RM向结合部分BM的转化可包括通过与RM反应共价附接生物素(对应于上述描述中的另外的生物素),然后将链霉亲和素非共价地与共价附接的生物素相联合。

[0142] 在一些实施方案中,中间反应性合成表面的反应性部分通过一系列的5、10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20的键,或在一些实施方案中,更多数量的键连接至表面。例如,反应性部分可以经一系列15个键例如使用(11-(X)十一烷基)三甲氧基硅烷被连

接,其中X是反应性部分(例如,X可以是叠氮基)。关于包括生物素的连接试剂,然后可以使用连接试剂例如具有一般结构DBCO-PEG_4-生物素(可从BroadPharm商购)的连接试剂共价联合生物素。在一些实施方案中,生物素通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长与表面连接。关于包括链霉亲和素的连接试剂,然后可以使用连接试剂例如具有一般结构DBCO-PEG_{13}-琥珀酰亚胺的连接试剂将链霉亲和素共价联合,然后使链霉亲和素与琥珀酰亚胺反应。在一些实施方案中,链霉亲和素通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长与表面连接。例如,通过使用与上述类似但具有不同长度的亚烷基和/或PEG链的试剂,可以改变将部分连接至表面的键的数目。

[0143] 在一些实施方案中,中间反应性合成表面的至少第一区域的反应性部分包括叠氮化物部分。在一些实施方案中,共价键通过叠氮-炔反应形成,例如本文其他地方描述的任何叠氮-炔反应。

[0144] 在一些实施方案中,共价官能化合成表面包括第二区域,其中多个链霉亲和素官能团被排除。在一些实施方案中,至少第一多个表面封闭分子配体被布置在共价官能化合成表面的第二区域中。

[0145] 在一些实施方案中,方法还包括使第二多个表面封闭分子与中间反应性合成表面的至少第一区域中的反应性部分的第二子集反应。

[0146] 在一些实施方案中,在包括反应性部分的共价制备的合成表面的至少第一区域的多个子区域进行多个链霉亲和素官能团的反应和至少第一多个表面封闭分子的反应。

[0147] 在一些实施方案中,反应性合成表面的第二部分包括表面暴露部分,其被构造为基本上不与多个主活化和共活化分子反应。

[0148] 在一些实施方案中,一种方法还包括制备中间反应性合成表面,包括:将包括叠氮化物反应性部分的至少第一表面制备试剂与设置在反应性合成表面的至少第一区域上的表面暴露部分反应。

[0149] 在一些实施方案中,表面暴露部分是亲核部分。在一些实施方案中,表面的亲核部分是氢氧化物、氨基或硫醇。在一些其他实施方案中,表面的亲核部分可以是氢氧化物。

[0150] 在一些实施方案中,表面暴露部分是可置换的部分。

[0151] 在一些实施方案中,在使用两种修饰剂的情况下,第一修饰剂和第二修饰剂与表面的反应可以在表面上的随机位置处发生。在其他实施方案中,第一修饰剂的反应可以在表面的第一区域内发生,而第二修饰剂的反应可以在与第一区域邻接的表面的第二区域内发生。例如,微流体设备的通道内的表面可以用第一表面修饰来选择性地修饰,而隔离围栏内与通道内表面邻接的表面可以用第二种不同的表面修饰选择性地修饰。

[0152] 在其他实施方案中,第一修饰剂的反应可以在至少一个表面上彼此分离的多个第一区域内发生,以及第二修饰反应的反应可以发生在围绕彼此分离的多个第一区域的第二区域。

[0153] 在各种实施方案中,可以在微流体设备已经被组装之后执行微流体设备的一个或多个表面的修饰以引入第一表面修饰和第二表面修饰的组合。对于一个非限制性实例,可以在组装微流体设备之后通过化学气相沉积来引入第一和第二表面修饰。在另一个非限制性实例中,可以引入具有含第一反应性部分的第一表面修饰和含第二正交反应性部分的第

二表面修饰的官能化表面。可以随后进行向具有两个不同表面接触部分的两个不同表面修饰配体的差异转化。

[0154] 在一些实施方案中,可以在组装微流体设备之前执行第一和第二表面修饰的组合中的至少一个。在一些实施方案中,可以在组装微流体设备之后执行对至少一个表面的修饰。

[0155] 在一些实施方案中,制备包括结合剂的共价官能化表面。在一些实施方案中,在其连接的每个区域中,多种结合剂(例如,多个多价结合剂,诸如四价结合剂,例如链霉亲和素官能团,其可以共价联合或非共价联合至共价结合的生物素)在共价官能化合成表面上的分布为每平方微米约6×10^2至约5×10^3个分子。在一些实施方案中,在其连接的每个区域中,多种结合剂(例如,多个多价结合剂,例如三价结合剂)的分布为每平方微米约1.5×10^3至约1×10^4,约1.5×10^3至约7.5×10^3,或约3×10^3至约7.5×10^3个分子。在一些实施方案中,在其连接的每个区域中,多种结合剂(例如,多个多价结合剂,例如二价结合剂)的分布为每平方微米约2.5×10^3至约1.5×10^4,约2.5×10^3至约1×10^4,或约2.5×10^3至约1.5×10^4个分子。在一些实施方案中,在其连接的每个区域中,多个结合剂(例如多个单价结合剂)的分布为每平方微米约5×10^3至约3×10^4,约5×10^3至约2×10^4,或约1×10^4至约2×10^4个分子。

[0156] 在一些实施方案中,制备包括结合剂的共价官能化表面,其中在其连接的每个区域中,

多个结合剂(例如链霉亲和素官能团,其可以共价联合或非共价联合至共价结合的生物素)在共价官能化合成表面上的分布为每平方微米约1×10^4至约1×10^6个分子。

[0157] 在一些实施方案中,提供了包括制备共价官能化表面然后制备抗原呈递合成表面的组合方法。这样,可以使用制备共价官能化表面的步骤和制备抗原呈递合成表面的步骤的任何合适的组合。

表面制备和共价官能化表面的其他方面。

[0158] 本文所述的制备表面的任何方法,包括制备抗原呈递合成表面的方法和制备共价官能化表面的方法,都还可以包括以下方面中的一个或多个。共价官能化表面还可以包括适用于此类表面的一个或多个以下方面,例如反应性基团。

[0159] 叠氮-炔反应。在一些实施方案中,共价键通过使炔烃(例如无环炔烃)与叠氮化物反应而形成。例如,可以进行“点击”环化反应,其由铜(I)盐催化。当使用铜(I)盐催化反应时,反应混合物可任选地包括可提高反应速率或程度的其他试剂。当例如表面修饰剂或官能化表面的炔烃是环辛炔时,与相应官能化表面或表面修饰剂的叠氮化物进行的“点击”环化反应可以是无铜的。由此可以使用“点击”环化反应将表面修饰的配体偶联至官能化表面以形成共价修饰表面。

[0160] 铜催化剂。可以使用任何合适的铜(I)催化剂。在一些实施方案中,碘化铜(I)、氯化铜(I)、溴化铜(I)或另一种铜(I)盐。在其他实施方案中,铜(II)盐可以与还原剂例如抗坏血酸盐组合使用以原位产生铜(I)物质。硫酸铜或乙酸铜是合适的铜(II)盐的非限制性实例。在其他实施方案中,还原剂例如抗坏血酸盐可以与铜(I)盐组合存在,以确保在反应过程中足够的铜(I)物质。铜金属可以用于在氧化还原反应中提供Cu(I)物质,也产生Cu(II)物质。可以使用铜的配位络合物,例如$[CuBr(PPh_3)_3]$、铜的硅钨酸盐络合物、[Cu

$(CH_3CN)_4]PF_6$或$(Eto)_3P$ CuI。在其他实施方案中,二氧化硅负载的铜催化剂、铜纳米簇或铜/氧化亚铜纳米颗粒可以用作催化剂。

[0161] 其他反应促进剂。如上所述,即使没有严格地从反应中排除氧,也可以使用还原剂例如抗坏血酸钠来使铜(I)物质保持在整个反应过程中。反应混合物中可包括其他辅助配体,以稳定铜(I)物质。可以使用含有三唑基的配体,包括但不限于三(苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲胺(TBTA)或3-[三(3-羟丙基三唑基甲基)胺(THPTA)。可以用来促进反应的另一类辅助配体是磺化的邻菲咯啉,它也是水溶性的,可以在排除氧气的情况下使用。如本领域已知的其他化学偶联可以用于将表面修饰试剂偶联至官能化表面。

[0162] 清洁表面。可以在修饰之前清洁要修饰的表面,以确保表面上的亲核部分可自由地用于反应,例如不被油或粘合剂覆盖。清洁可以通过任何合适的方法来完成,包括用包括醇或丙酮的溶剂处理、超声处理、蒸汽清洁等。替代地或另外地,这种预清洁可以包括在氧等离子体清洁器中清洁(例如,在微流体设备的组件的上下文中,对盖、微流体电路材料和/或衬底的清洁),其可以除去各种杂质,同时引入氧化的表面(例如表面上的氧化物,其可以如本文所述进行共价修饰)。或者,可以进行液相处理,例如盐酸和过氧化氢的混合物或硫酸和过氧化氢的混合物(例如食人鱼溶液(piranha solution),其硫酸与过氧化氢之比约为3:1至7:1)可以代替氧气等离子清洁器使用。这可以有利地在表面上提供更多的修饰位置,从而提供更紧密堆积的修饰表面层。

[0163] 微流体设备的组件。可用作微流体设备的组件的材料的表面可以在其组装之前被修饰。

或者,可以修饰部分或完全构造的微流体设备,使得同时修饰所有将与生物材料(包括生物分子和/或微物体(其可能包括生物微物体))接触的表面。在一些实施方案中,即使在设备和/

或装置内的不同表面处存在不同的材料,也可以修饰设备和/或装置的整个内部。该讨论也适用于制备本文所述的抗原呈递合成表面的方法。

[0164] 当微流体设备的内表面与表面修饰剂反应时,可以通过使表面修饰剂的溶液流入微流体设备中并通过微流体设备来进行反应。

[0165] 表面修饰试剂溶液和反应条件。在各种实施方案中,表面修饰剂可以用于液相表面修饰反应,例如其中表面修饰剂以溶液例如水溶液的形式提供。可以使用其他有用的溶剂包括二甲基亚砜水溶液(DMSO)、DMF、乙腈或醇。例如,可以在液相反应中修饰被甲苯磺酰基活化或被环氧基标记的表面。将生物素或蛋白质,例如抗体、MHC或链霉亲和素,偶联至结合部分的反应也可以作为液相反应进行。

[0166] 反应可以在室温或升高的温度下进行。在一些实施方案中,反应在以下范围内的温度下进行:约15℃至约60℃;约15℃至约55℃;约15℃至约50℃;约20℃至约45℃。

在一些实施方案中,将微流体设备的官能化表面转化为共价修饰表面的反应在约15℃、

20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃或约60℃的温度下进行。

[0167] 或者,可以在气相表面修饰反应中使用表面修饰剂。例如,可以在气相反应中修饰二氧化硅表面和其他包括羟基的表面。在一些实施方案中,用等离子体(例如使用氧等离子体清洁器;关于示例性处理条件,参见实施例)处理表面(例如硅表面)。在一些实施方案中,

使表面例如经等离子体处理的表面和/或硅表面在真空下与制备试剂反应,例如包括甲氧基硅烷和叠氮化物,例如(11-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷。制备试剂最初可以以液体形式提供在与表面分开的容器中,并且可以被汽化以使其可用于与表面反应。还可以例如在另外的单独容器中提供水源,诸如水合盐,例如七水合硫酸镁。例如,可以将真空反应器底部的箔舟用作单独的容器。示例性的反应条件和步骤包括使用真空泵抽吸腔室至约750mTorr,然后密封腔室。然后可以将真空反应器在高于环境温度的温度下保温一段适当的时间,例如,将其放入烘箱中在110℃下加热24至48小时。在反应时间之后,可以使腔室冷却,并且可以将惰性气体例如氩气引入到抽空的腔室中。可以用一个或多个合适的液体(例如丙酮和/或异丙醇)冲洗表面,然后在惰性气体(例如氮气)流中干燥。可以使用椭圆偏振法和接触角测角法等技术来确定是否引入了修饰表面。

[0168] 在2017年11月30日公开的WO2017/205830中描述了可根据本公开使用的其他修饰表面、表面修饰剂和相关方法,出于所有目的将其通过引用并入本文。

活化T淋巴细胞的方法。

[0169] 提供了一种活化T淋巴细胞的方法,该方法包括:使多个T淋巴细胞与抗原呈递合成表面接触,所述抗原呈递合成表面包括:多个主活化分子配体,每个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要组织相容性(MHC)分子;和多个共活化分子配体,每个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子;并培养与抗原呈递合成表面接触的多个T淋巴细胞,从而将多个T淋巴细胞的至少一部分转化为活化T淋巴细胞。抗原呈递表面可以是本文所述的任何抗原呈递表面。在一些实施方案中,MHC分子是MHC 1类分子。可以使用本文所述的任何抗原呈递合成表面。在各种实施方案中,多个MHC分子可以各自包括氨基酸序列,并且还可以经由氨基酸序列的C端连接而与抗原呈递合成表面相连接。或者,MHC分子可以通过非共价联合连接至抗原呈递合成表面。可以使用任何非共价联合,例如,MHC的生物素化以及其与表面上的链霉亲和素的结合。在各种实施方案中,MHC分子还可以包括抗原分子,例如肿瘤相关抗原,例如本文所述的任何肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,抗原分子可以是MART1、NYESO1、SLC45A2、TCL1或VCX3A。

[0170] 在一些实施方案中,共活化分子可以连接至抗原呈递合成表面,如本文所述。T细胞受体(TCR)共活化分子或多个共活化分子中的辅助TCR活化分子可以是本文所述的任何TCR共活化分子或任何辅助TCR活化分子,并且可以以本文所述的任何比例提供。

[0171] 在各种实施方案中,该方法还可以包括使多个T淋巴细胞与多个生长刺激性分子配体接触。在一些实施方案中,每个生长刺激性分子配体可包括生长因子受体配体。在一些实施方案中,可以在至少一天的第一培养期之后,使多个T淋巴细胞与多个生长刺激性分子配体接触。在一些实施方案中,多个生长刺激性分子配体可包括IL-21或其片段。在各种实施方案中,多个生长刺激性分子配体可以连接至抗原呈递合成表面。在一些实施方案中,多个生长刺激性分子配体可以连接至与包括包含MHC分子在内的生物分子的抗原呈递合成表面不同的表面(例如,珠子的表面)。在一些实施方案中,多个生长刺激性分子配体可以连接至包括MHC分子的抗原呈递合成表面。

[0172] 在各种实施方案中,该方法可以包括使用珠子上的抗原呈递表面。当使用具有抗原呈递表面的珠子时,珠子与T淋巴细胞的比例可以为约1:1;约3:1;约5:1;约7:1或约10:1。在本文所述的任何方法中,珠子可以附着有抗原呈递MHC分子和抗CD28抗体。在一些实施

方案中,IL-21也可以附着于珠子的抗原呈递表面。在其他实施方案中,IL-21可以连接至第二珠子,该第二珠子具有IL-21作为唯一有助于活化的生物分子。

[0173] 在其他实施方案中,可以使用可以被图案化或无图案的平面来执行该方法。

[0174] 在各种实施方案中,可以进行4、5、6、7或8天的第一培养期。在第一培养期中,生长刺激性分子,例如IL-21、IL-2和/或IL-7可以添加在溶液中,或者可以添加至珠子上以喂养T淋巴细胞。

[0175] 在第一培养期结束时,细胞群可包括未活化和活化T淋巴细胞的混合物。可以进行使用多种细胞表面标记物的流式细胞术来确定分析的细胞的活化程度和表型。

[0176] 可以进行第二培养期。如果抗原呈递表面是珠子,则可以向T淋巴细胞提供第二等份的珠子,其含有包括MHC分子的主活化分子配体,其包括肿瘤相关抗原和共活化分子(例如,TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子,例如分别为抗CD28抗体和/或其他抗CD2抗体),例如,通过添加至孔板、包括流体管路的设备的腔室,或本文所述的具有隔离围栏的微流体设备。抗原呈递珠子还可以包括与其连接的其他生长刺激性分子,例如IL-21。可以将抗原呈递珠子相比细胞以约1∶1;约3:1;约5:1;或约10:1的比例加入到正在培养的细胞中。在一些实施方案中,可以添加第二等份的IL-21作为其上连接有IL-21的第二组珠子,或者进一步可以将其作为溶液添加。IL-2和IL-7也可以在第二个培养期添加,以活化更多数量的T淋巴细胞。

[0177] 当使用图案化或无图案的晶片、包括流体管路的设备的内表面、管的内表面或具有隔离围栏的微流体设备的内表面时,第二培养期可以通过与相同的抗原呈递表面接触继续培养来完成。或者,可以使新的抗原呈递表面与由第一培养期产生的T淋巴细胞接触。在其他实施方案中,可以将如上所述或在本文公开的任何实施方案中阐述的抗原呈递珠子添加到包括流体管路的设备的孔或内腔或微流体设备的隔离围栏中。可以将诸如IL-21、IL-2、IL-7或其组合的生长刺激性分子添加到溶液中或珠子上。在一些实施方案中,添加IL-2和IL-7。

[0178] 在第二个培养期结束时,可以进行流式细胞仪分析以确定活化程度并确定当时存在的其他活化T淋巴细胞的表型。

[0179] 在一些实施方案中,可以包括第三培养期。第三期可以具有本文关于第二期描述的任何特征。在一些实施例中,以与第二期相同的方式执行第三期。例如,可以重复在第二培养期中采用的所有动作,以进一步活化孔板的孔中、管中或在包括流体管路的设备的腔室或具有隔离围栏的微流体设备中的T淋巴细胞。

[0180] 在一些实施方案中,被活化的T淋巴细胞包括CD8+T淋巴细胞,例如初始CD8+T淋巴细胞。在一些实施方案中,被活化的T淋巴细胞富含CD8+T淋巴细胞,例如初始CD8+T淋巴细胞。或者,在一些实施方案中,被活化的T淋巴细胞包括CD4+T淋巴细胞,例如初始CD4+T淋巴细胞。在一些实施方案中,被活化的T淋巴细胞富含CD4+T淋巴细胞,例如初始CD4+T淋巴细胞。可以使用CD4+T淋巴细胞,例如,如果需要对II类限制性抗原具有特异性的T细胞。

[0181] 在一些实施方案中,该方法产生为CD45RO+的活化T淋巴细胞。在一些实施方案中,该方法产生为CD28+的活化T淋巴细胞。在一些实施方案中,该方法产生为CD28+CD45RO+的活化T淋巴细胞。在一些实施方案中,该方法产生为CD197+的活化T淋巴细胞。在一些实施方案中,该方法产生为CD127+的活化T淋巴细胞。在一些实施方案中,该方法产生对CD28、

CD45RO、CD127和CD197,或前述标记物中的三种的至少任何组合,或前述标记物中的两种的至少任何组合呈阳性的活化T淋巴细胞。具有任何上述表型的活化T淋巴细胞可以进一步是CD8+。在一些实施方案中,CD28+的任何前述表型包括CD28high表型。

[0182] 在一些实施方案中,该方法产生包括抗原特异性T细胞的T细胞群,其中至少65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%的抗原特异性T细胞是CD45RO+/CD28High细胞,其中每个上述值都可以用"约"修饰。替代地或另外,在一些实施方案中,该方法产生T细胞群,其中至少1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的T细胞是抗原特异性T细胞;或其中1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-6%、6%-7%、7%-8%、8%-9%、9%-10%、10%-11%或11%-12%的T细胞是抗原特异性T细胞,其中每个上述值都可以用"约"修饰。可以在与抗原呈递表面接触并任选进一步的扩增步骤之后,即富集或分离具有特定表型的产物T细胞之前/未进行富集或分离具有特定表型的产物T细胞,在该方法的"粗"产物上确定T细胞群的含量。对抗原特异性和/或T细胞标记物表型进行确定可以排除死细胞。

[0183] 在一些实施方案中,该方法提供了T细胞群,其中相对于起始群而言,具有抗原特异性的T细胞的比例增加了。

细胞和组合物。

[0184] 提供了通过本文所述的任何方法产生的活化T淋巴细胞。

[0185] 在一些实施方案中,活化T淋巴细胞是CD45RO+。在一些实施方案中,活化T淋巴细胞是CD28+。在一些实施方案中,活化T淋巴细胞是CD28+CD45RO+。在一些实施方案中,活化T淋巴细胞是CD197+。在一些实施方案中,活化T淋巴细胞是CD127+。在一些实施方案中,活化T淋巴细胞对CD28、CD45RO、CD127和CD197,前述标记物中的三种的至少任何组合或前述标志中的两种的至少任何组合呈阳性。具有任何上述表型的活化T淋巴细胞可以进一步是CD8+。在一些实施方案中,为CD28+的任何前述表型包括CD28high表型。

[0186] 在一些实施方案中,提供了包括通过本文所述的任何方法产生的活化T细胞的T细胞群。该群可以具有上述针对T细胞群的任何特征。

[0187] 在一些实施方案中,提供了一种微流体设备,其包括本文提供的T细胞群。微流体设备可以是本文所述的任何抗原呈递微流体设备或其他微流体设备(例如,用于执行抗原特异性细胞毒性测定)。

[0188] 在一些实施方案中,提供了包括本文提供的T细胞群的药物组合物。药物组合物还可以包括例如盐水、葡萄糖和/或人血清白蛋白。该组合物可以是水性组合物并且可以以冷冻或液体形式提供。药物组合物可以例如在注射器内以单剂量提供,并且可以包括1000万、1亿、10亿或100亿个细胞。所施用的细胞数量是适应症特异性的、患者特异性的(例如患者的大小),并且还将随所施用细胞的纯度和表型而变化。

进行抗原特异性细胞毒性测定的方法。

[0189] 本文提供了一种进行抗原特异性细胞毒性测定的方法,包括:

将一个或多个靶细胞加载至微流控设备的隔离围栏中;

将一个或多个T细胞加载至该隔离围栏中,以使一个或多个T细胞可以接触一个或多个靶细胞;

将靶细胞与标记凋亡细胞的可检测标记物接触;和

检测靶细胞是否凋亡。

[0190] 微流体设备可以是本文描述的任何设备。用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒中包括的微流体设备无需包括抗原呈递合成表面。可以根据本文描述的用于产生或活化这种细胞的任何方法来产生或活化一个或多个T细胞。可以使用本文所述的任何类型的CD8+T细胞。在一些实施方案中,一个或多个T细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,一个或多个T细胞不表达CAR。

[0191] 靶细胞可表达肿瘤抗原,例如本文所述的任何肿瘤抗原。在一些实施方案中,T细胞对靶细胞表达的抗原具有特异性。在一些实施方案中,靶细胞来自永生细胞系和/或源自癌症,例如黑素瘤、乳腺癌或肺癌。

[0192] 在一些实施方案中,将单个靶细胞和/或单个T细胞加载至隔离围栏中。在一些实施方案中,多个靶细胞和/或多个T细胞被加载至隔离围栏中。在一些实施方案中,多个T细胞是克隆群。在一些实施方案中,单个T细胞和多个靶细胞被加载至隔离围栏中。

[0193] 可以使用重力将细胞加载至隔离围栏中,例如,通过倾斜微流体设备,从而将细胞经重力拉入围栏中。或者,对于具有介电电泳(DEP)构造的微流体设备,可以使用DEP力来加载细胞。在一些实施方案中,DEP力由结构化的光活化。

[0194] 可以使用任何合适的标记凋亡细胞的标记物。标记凋亡细胞的标记物包括与活细胞相区分地标记死亡细胞的标记物,例如,不穿过活细胞膜但穿过受损的死细胞膜的染料,以及依赖于凋亡相关蛋白或酶活性(例如,凋亡相关蛋白酶)的标记。在一些实施方案中,标记物包括核酸结合部分。在一些实施方案中,标记物是荧光或可切割的标记物,其通过被蛋白酶例如与凋亡相关的蛋白酶诸如胱天蛋白酶(例如胱天蛋白酶-3)切割而被活化。在一些实施方案中,标记物包括与凋亡细胞和/或凋亡小体特异性结合的结合剂(例如抗体);结合剂还可以包括可检测部分,例如荧光团。

[0195] 该方法可以包括检测靶细胞是一次还是周期性地(例如两次、三次或多次)凋亡。该方法可以包括在靶细胞与标记物和/或T细胞接触后2小时或更长时间时检测靶细胞是否已经凋亡。

用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒。

[0196] 本文还提供了用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包括微流体设备。该微流体设备可以是本文所述的任何微流体设备。在一些实施方案中,微流体设备如上文关于进行抗原特异性细胞毒性测定的方法的部分中所述,或如本文公开的任何实施方案中所述。用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒中包括的微流体设备无需包括抗原呈递合成表面。在一些实施方案中,试剂盒包括用于检测凋亡细胞的试剂。在一些实施方案中,用于检测凋亡细胞的试剂是如上文在关于进行抗原特异性细胞毒性测定的方法的部分中所述或在本文公开的任何实施方案中阐述的标记凋亡细胞的可检测标记物。

治疗方法

[0197] 本文提供了治疗需要治疗癌症的受试者的方法,包括:从受试者获得包括T淋巴细胞的样品;将T淋巴细胞与样品中的其他细胞分离;根据本文所述的任何方法,将T淋巴细胞与包括MHC分子的抗原呈递合成表面接触,其中MHC分子包括对受试者的癌症具有特异性的抗原;产生多个T淋巴细胞,所述T淋巴细胞被活化以特异性针对受试者癌症;从未活化T淋

巴细胞中分离出多个特异性活化T淋巴细胞;以及,将多个特异性活化T淋巴细胞引入受试者。本文还提供了用于治疗癌症的多个特异性活化T淋巴细胞,其中这多个是通过以下方法制备的,该方法包括:从受试者获得包括T淋巴细胞的样品;将T淋巴细胞与样品中的其他细胞分离;根据本文所述的任何方法,将T淋巴细胞与包括MHC分子的抗原呈递合成表面接触,其中MHC分子包括对受试者的癌症具有特异性的抗原;产生多个T淋巴细胞,所述T淋巴细胞被活化以特异性针对受试者癌症;以及从未活化T淋巴细胞中分离出多个特异性活化T淋巴细胞。本文还提供了多个特异性活化T淋巴细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中这多个是通过以下方法制备的,该方法包括:从受试者获得包括T淋巴细胞的样品;将T淋巴细胞与样品中的其他细胞分离;根据本文所述的任何方法,将T淋巴细胞与包括MHC分子的抗原呈递合成表面接触,其中MHC分子包括对受试者的癌症具有特异性的抗原;产生多个T淋巴细胞,所述T淋巴细胞被活化以特异性针对受试者癌症;以及从未活化T淋巴细胞中分离出多个特异性活化T淋巴细胞。

[0198] 还提供了治疗需要治疗癌症的受试者的方法;包括将多个特异性活化T淋巴细胞引入受试者,其中多个特异性活化T淋巴细胞是通过本文所述的方法产生的。还提供了治疗需要治疗癌症的受试者的方法,包括将本文所述的特异性活化T淋巴细胞群引入受试者。这样的方法还可以包括将活化T淋巴细胞与未活化T淋巴细胞分离。还提供了用于治疗需要治疗癌症的受试者的多个特异性活化T淋巴细胞,其中所述多个特异性活化T淋巴细胞是通过本文所述的方法产生的。还提供了本文所述的特异性活化T淋巴细胞群,其用于治疗需要治疗癌症的受试者。还提供了多个特异性活化T淋巴细胞在制备用于治疗需要治疗癌症的受试者的药物中的用途,其中多个特异性活化T淋巴细胞是通过本文所述的方法产生的。还提供了本文所述的特异性活化T淋巴细胞群在制备用于治疗需要治疗癌症的受试者的药物中的用途。可以通过将活化T淋巴细胞与未活化T淋巴细胞分离来进一步制备这样的多个特异性活化T淋巴细胞或这样的特异性活化T淋巴细胞群。

[0199] 在一些实施方案中,分离多个特异性活化T淋巴细胞还可以包括检测特异性活化T淋巴细胞的表面生物标记物。

[0200] 在一些实施方案中,特异性活化T淋巴细胞是自体的(即,源自要对其施用的受试者)。

[0201] 在各种实施方案中,多个特异性活化T淋巴细胞或特异性活化T淋巴细胞群的方法或制备还可以包括快速扩增活化T淋巴细胞以提供扩增的活化T淋巴细胞群。在一些实施方案中,可以在将特异性活化T淋巴细胞与未活化T淋巴细胞分开之后进行快速扩增。可以使用本文所述或本领域已知的快速扩增方法来实现足够水平的T淋巴细胞的产生。参见例如以下的实施例;Riddell,美国5,827,642;和Riddell等,美国专利号6,040,177,以及Yee和Li,PCT专利申请公开号WO2009/045308A2。

[0202] T细胞在治疗人类受试者中的用途(例如用于过继细胞疗法)是本领域已知的。根据本文所述方法制备的T细胞可用于此类方法。例如,已经在临床上测试了使用包括MART-1抗原特异性T细胞的肿瘤浸润淋巴细胞的过继细胞疗法(Powell等,Blood 105:241-250,2005)。而且,在Chang等,J.Clinical Oncology 21:884-890,2003中描述了用抗CD3单克隆抗体和IL-2共活化的T细胞的施用。在Dudley等,Science 298:850-854,2002;Roszkowski等,CancerRes 65(4):1570-76,2005;Cooper等,Blood 101:1637-44,2003;Yee,美国专利

申请公开号2006/0269973;Yee和Li,PCT专利申请公开号WO2009/045308A2;Gruenberg等,美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg,美国专利号4,690,915;和Alajez等,Blood 105:4583-89,2005中提供了用于治疗癌症的T细胞施用的其他实例和/或讨论。

[0203] 在一些实施方案中,细胞通过如下方式进行配制:通过首先从它们的培养基中收获它们,然后在适合于施用的介质和容器系统("药学上可接受的"载体)中洗涤并浓缩治疗有效量的细胞。合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,通常是生理盐水、Normosol R(Abbott)或Plasma-Lyte A(Baxter),但也可以使用含5%葡萄糖的水或林格氏乳酸。输注介质可以补充有人血清白蛋白。

[0204] 在一些实施方案中,组合物中的细胞数量为至少10^9个或至少10^{10}个细胞。在一些实施方案中,单剂可以包括至少1000万、1亿、10亿或100亿个细胞。所施用的细胞数量是适应症特异性的、患者特异性的(例如患者的大小(size ofpatient)),并且还将随所施用细胞的纯度和表型而变化。细胞的数量将取决于组合物所预期的最终用途,包括在其中的细胞类型也将取决于最终用途。例如,如果需要对特定抗原具有特异性的细胞,则该群将包括大于70%,通常大于80%、85%和90-95%的此类细胞。对于本文提供的用途,细胞通常为一升或更少的体积,可以为500毫升或更少,甚至250毫升或100毫升或更少。因此,所需细胞的密度可以大于10^6个细胞/mL,大于10^7个细胞/mL,或10^8个细胞/mL或更高。临床上相关的免疫细胞数量可以分配为多次输注,这些输注累计等于或超过10^9、10^{10}或10^{11}个细胞。

[0205] 在一些实施方案中,本文所述或根据本文所述的本发明方法制备的T淋巴细胞可用于赋予个体抵抗肿瘤或癌细胞的免疫力。"免疫力(immunity)"是指针对抗原(其淋巴细胞已被活化)的与癌细胞或肿瘤有关的一种或多种身体症状的减轻。可以通过输注来施用细胞,每次输注的范围为至少10^6至10^{10}个细胞/m^2,例如,至少为10^7至10^9个细胞/m^2的范围。可以通过单次输注或在一段时间内多次输注来施用克隆。但是,由于预期不同个体的反应能力会有所不同,因此输注细胞的类型和数量以及输注次数和多次输注的时间范围由主治医生确定,并且可以通过检查确定。

[0206] 在将细胞转移回患者体内之后,可以采用通过用可能包括IL-21和IL-2的细胞因子治疗患者来维持其活力的方法(Bear等,Cancer Immunol.Immunother.50:269-74,2001;和

Schultze等,Br.J.Haematol.113:455-60,2001)。在另一个实施方案中,在施用给患者之前在IL-21存在下培养细胞。参见,例如,Yee,美国专利申请公开号2006/0269973。IL-21可以将包括活化T细胞的群中的T细胞频率增加到足以进行扩增和过继转移的水平,而无需进一步的抗原特异性T细胞富集。因此,这样的步骤可以进一步减少治疗时间和/或消除对进一步选择和/或克隆的需要。

用于制备抗原呈递合成表面的试剂盒。

[0207] 还提供了试剂盒,用于制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递合成表面,包括:

a.如本文所述的任何共价官能化合成表面,其包括多种非共价或共价联合的第一偶联剂;和

第一修饰剂,其包括多个构造为与T细胞的T细胞受体结合的主要组织相容性复合体(MHC)

I分子,进一步地,其中所述MHC分子被构造为结合至共价官能化合成表面的多个非共价或共价联合的第一偶联剂的第一子集中的一个。在一些实施方案中,第一偶联剂可以是生物素结合剂。生物素结合剂可以是链霉亲和素。在一些实施方案中,多个MHC分子中的每一个还可以包括至少一个生物素官能团。如本领域已知的,可以使用其他偶联化学,其中其他位点特异性蛋白质标签可以附着于MHC蛋白质,其被构造为共价附着于基于识别蛋白质的物质,所述物质附着于珠子。这些偶联策略可以提供如MHC分子的C端生物素化反应所提供的MHC分子的等效的位点特异性和特异性定向连接。共价官能化合成表面可以是晶片、珠子、微流体设备或管的至少一个内表面。

[0208] 试剂盒还可以包括试剂,该试剂包括多个共活化分子,每一个被构造为结合共价官能化合成表面的多个非共价或共价联合的生物素结合剂的第二子集中的一个。在一些实施方案中,多个共活化分子中的每一个可以包括生物素官能团。每个共活化分子可包括T细胞受体(TCR)共活化分子、辅助TCR活化分子或其任何组合。在一些实施方案中,试剂在包括T细胞受体(TCR)共活化分子和/或辅助TCR活化分子的单独容器中提供。或者,可以在一个容器中提供包括多个共活化分子的试剂,该容器以约100:1至1:100的比例容纳多个共活化分子配体的TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子。在一些实施方案中,包括多个共活化分子的试剂包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子的混合物,其中,多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子之比为100:1至90:1、90:1至80:1、80:1至70:1、70:1至60:1、60:1至50:1、50:1至40:1、40:1至30:1、30:1至20:1、20:1至10:1、10:1至1:1、1:1至1:10、1:10至1:20、1:20至1:30、1:30至1:40、1:40至1:50、1:50至1:60、1:60至1:70、1:70至1:80、1:80至1:90或1:90至1:100,其中每个前述值都用“约”修饰。在一些实施方案中,包括多个共活化分子的试剂以约20:1至约1:20的比例包括多个共活化分子配体的TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

[0209] 在一些实施方案中,用于制备抗原呈递合成表面的试剂盒还可以包括包含粘附刺激性分子的试剂,其中每个粘附刺激性分子包括包含ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体,其被构造为与共价官能化合成表面的多个非共价或共价联合的生物素结合剂官能团的第三子集反应。在一些实施方案中,粘附刺激性分子可以包括生物素官能团。

[0210] 在一些实施方案中,用于制备抗原呈递合成表面的试剂盒还可以包括包含生长刺激性分子的试剂,其中每个生长刺激性分子可包括生长因子受体配体。在一些实施方案中,生长因子受体配体可包括细胞因子或其片段。在一些实施方案中,细胞因子可包括IL-21或其片段。在一些实施方案中,该生长刺激性分子可以连接至共价修饰珠子。

[0211] 在一些实施方案中,用于制备抗原呈递合成表面的试剂盒还可以包括包含一个或多个另外的生长刺激性分子的试剂。在一些实施方案中,一个或多个另外的生长刺激性分子包括IL2和/或IL7或其片段。在一些实施方案中,该生长刺激性分子可以连接至共价修饰珠子。

活化T淋巴细胞的试剂盒。

[0212] 还提供了用于活化T淋巴细胞的试剂盒,其包括本文所述的抗原呈递合成表面。该试剂盒还可以包括生长刺激性分子,其中每个生长刺激性分子可以包括生长因子受体配体。生长刺激性分子可以以游离分子,附着于抗原呈递合成表面(在与主活化分子配体相同或不同的区域中),或附着于不同的共价修饰的合成表面而提供。例如,试剂盒还可以包括

多个包括辅助刺激分子的共价修饰珠子。在一些实施方案中,生长因子受体配体分子可包括细胞因子或其片段。在一些实施方案中,生长因子受体配体可包括IL-21。在其他实施方案中,试剂盒可包括一个或多个其他(例如,第二或第二和第三)生长刺激性分子。在一些实施方案中,一个或多个其他生长刺激性分子可以包括IL-2和/或IL-7或其片段。其他生长刺激性分子可以以游离分子,附着于抗原呈递合成表面(在与主活化分子配体相同或不同的区域中),或附着于不同的共价修饰的合成表面例如珠子而提供。

微流体设备结构、加载和操作的其他方面;相关系统

[0213] 本文所述的微流体设备及其用途可以具有以下任何特征,并且可以与以下所述的系统结合使用。

[0214] 加载方法。生物微物体或微物体(例如但不限于珠子)的加载可以涉及使用如本文所述的流体流动、重力、介电电泳(DEP)力、电润湿、磁力或其任何组合。可以采用光学方法例如通过光电镊子(OET)构造和/或采用电学方法例如通过以时间/空间模式活化电极/电极区域来生成DEP力。类似地,可以采用光学方法例如通过光电润湿(OEW)构造和/或采用电学方法例如通过以时间空间模式活化电极/电极区域来提供电润湿力。

[0215] 微流体设备和用于操作和观察这种设备的系统。图1A示出了可以用于保持、分离、测定或培养生物微物体的微流体设备100和系统150的实例。示出了微流体设备100的透视图,其盖110被部分切除以提供微流体设备100中的局部视图。微流体设备100通常包括具有流动路径106的微流体管路120,流体介质180可以任选地携带一个或多个微物体(未示出)经过流动路径106流入到和/或流过微流体管路120。虽然在图1A中示出了单个微流体管路120,但合适的微流体设备可以包括多个(例如,2或3个)这样的微流体管路。无论如何,微流体设备100可以被构造为纳流体设备。如图1A所示,微流体管路120可以包括多个微流体隔离围栏124、126、128和130,其中每个隔离围栏可以具有与流动路径106为流体连通的一个或多个开口。在图1A的设备的一些实施方案中,隔离围栏可以仅具有单个与流动路径106为流体连通的开口。如下文进一步讨论的,微流体隔离围栏包括已被优化用于即使当介质180流过流动路径106时,仍然将微物体保留在微流体设备(例如微流体设备100)中的各种特征和结构。

然而,在描述上述之前,提供了对微流体设备100和系统150的简要说明。

[0216] 如图1A中大体示出的,微流体管路120由外壳102来限定。尽管外壳102可以被物理地构建成不同的构造,但是在图1A所示的实例中,外壳102被描绘为包括支撑结构104(例如,基部)、微流体管路结构108和盖110。支撑结构104、微流体管路结构108和盖110可以彼此附接。例如,微流体管路结构108可以被设置在支撑结构104的内表面109上,并且盖110可以被设置在微流体管路结构108上方。微流体管路结构108与支撑结构104和盖110一起可以限定微流体管路120的元件。

[0217] 如图1A所示,支撑结构104可以位于微流体管路120的底部,盖110可以位于微流体管路120的顶部。或者,支撑结构104和盖110可以以其他取向来构造。例如,支撑结构104可以位于微流体管路120的顶部,盖110可以位于微流体管路120的底部。无论如何,可以存在一个或多个端口107,每个端口107均包括进入或离开外壳102的通路。通路的实例包括阀、门、通孔等。如图所示,端口107是由微流体管路结构108中的间隙产生的通孔。然而,端口107可以位于外壳102的其他组件(例如盖110)中。图1A中仅示出了一个端口107,但微流体

管路120可以具有两个或更多个端口107。例如,可以存在第一端口107,其用作流体进入微流体管路120的入口,并且可以存在第二端口107,其用作流体离开微流体管路120的出口。端口107是用作入口还是出口可以取决于流体流过流动路径106的方向。

[0218] 支撑结构104可以包括一个或多个电极(未示出)和衬底或多个互连的衬底。例如,支撑结构104可以包括一个或多个半导体衬底,每个半导体衬底电连接到电极(例如,半导体衬底的全部或子集可以电连接到单个电极)。支撑结构104还可以包括印刷电路板组件(“PCBA”)。例如,半导体衬底可以安装在PCBA上。

[0219] 微流体管路结构108可以限定微流体管路120的管路元件。当微流体管路120填充有流体时,这样的管路元件可以包括可以流体互连的空间或区域,例如流动区域(其可以包括或者是一个或多个流动通道)、室、围栏、阱(trap)等。在图1A所示的微流体管路120中,微流体管路结构108包括框架114和微流体管路材料116。框架114可以部分地或完全地包围微流体管路材料116。框架114可以是例如基本上包围微流体管路材料116的相对刚性的结构。例如,框架114可以包括金属材料。

[0220] 微流体管路材料116可以用空腔等进行图案化,以限定微流体管路120的管路元件和互连。微流体管路材料116可以包括柔性材料,例如柔性聚合物(例如橡胶、塑料、弹性体、硅氧烷、聚二甲基硅氧烷(“PDMS”)等),其可以是可透气的。可以构成微流体管路材料116的材料的其他实例包括模制玻璃;可蚀刻材料,例如硅氧烷(例如,可光图案化的硅氧烷或“PPS”)、光致抗蚀剂(例如,SU8)等。在一些实施方案中,此类材料以及因此微流体管路材料116可以是刚性的和/或基本上不可透气的。无论如何,微流体管路材料116可以被设置在支撑结构104上和框架114内。

[0221] 盖110可以是框架114和/或微流体管路材料116的集成部件。或者,盖110可以是结构上不同的元件,如图1A所示。盖110可以包括与框架114和/或微流体管路材料116相同或不同的材料。类似地,支撑结构104可以是与框架114或微流体管路材料116分开的结构(如图所示),或者是框架114或微流体管路材料116的集成部件。同样地,框架114和微流体管路材料116可以是如图1A所示的单独的结构或同一结构的集成部分。

[0222] 在一些实施方案中,盖110可以包括刚性材料。刚性材料可以是玻璃或具有类似性质的材料。在一些实施方案中,盖110可以包括可变形材料。可变形材料可以是聚合物,例如PDMS。在一些实施方案中,盖110可以包括刚性材料和可变形材料两者。例如,盖110的一个或多个部分(例如,位于隔离围栏124、126、128、130上方的一个或多个部分)可以包括与盖110的刚性材料交界的可变形材料。在一些实施方案中,盖110还可以包括一个或多个电极。该一个或多个电极可以包括导电氧化物,例如氧化铟锡(ITO),其可以涂覆在玻璃或类似的绝缘材料上。或者,该一个或多个电极可以是柔性电极,例如嵌入在可变形材料例如聚合物(例如PDMS)中的单壁纳米管、多壁纳米管、纳米线、导电纳米颗粒簇或其组合。已经在例如U.S.2012/0325665(Chiou等)中描述了可以用于微流体设备中的柔性电极,其内容通过引用并入本文。在一些实施方案中,可以修饰盖110(例如,通过调节向内朝向微流体管路120的表面的全部或一部分)以支持细胞粘附、活力和/或生长。该修饰可以包括合成或天然聚合物的涂层。在一些实施方案中,盖110和/或支撑结构104可以是透光的。盖110还可包括至少一种可透气的材料(例如,PDMS或PPS)。

[0223] 图1A还示出了用于操作和控制微流体设备(例如微流体设备100)的系统150。系统

150包括电源192、成像设备(结合在成像模块164内,并且未在图1A中明确示出)以及倾斜设备(倾斜模块166的一部分,并且未在图1A中明确示出)。

[0224] 电源192可以向微流体设备100和/或倾斜设备190提供电力,根据需要提供偏置电压或电流。电源192可以例如包括一个或多个交流(AC)和/或直流(DC)电压或电流源。成像设备194(成像模块164的一部分,如下文所讨论的)可以包括用于捕捉微流体管路120内的图像的设备,例如数码相机。在一些情况下,成像设备194还包括具有快速帧速率和/或高灵敏度(例如,用于低光应用)的检测器。成像设备194还可以包括用于将刺激性辐射和/或光束引导到微流体管路120中并收集从微流体管路120(或其中包括的微物体)反射或发射的辐射和/或光束的机构。所发射的光束可以在可见光谱中,并且可以例如包括荧光发射。所反射的光束可以包括源自LED或诸如汞灯(例如高压汞灯)或氙弧灯的宽光谱灯的反射的发射。如针对图3B所讨论的,成像设备194还可以包括显微镜(或光具组(optical train)),其可以包括或不包括目镜。

[0225] 系统150还包括倾斜设备190(倾斜模块166的一部分,如下文所讨论的),其被构造为使微流体设备100围绕一个或多个旋转轴旋转。在一些实施方案中,倾斜设备190被构造为围绕至少一个轴来支撑和/或保持包括微流体管路120的外壳102,使得微流体设备100(以及因此微流体管路120)可以保持在水平取向(即,相对于x轴和y轴为0°)、垂直取向(即,相对于x轴和/或y轴为90°)或其间的任何取向。微流体设备100(和微流体管路120)相对于轴的取向在本文中被称为微流体设备100(和微流体管路120)的“倾斜”。例如,倾斜设备190可以使微流体设备100相对于x轴倾斜0.1°、0.2°、0.3°、0.4°、0.5°、0.6°、0.7°、0.8°、0.9°、1°、2°、3°、4°、5°、10°、15°、20°、25°、30°、35°、40°、45°、50°、55°、60°、65°、70°、75°、80°、90°或其间的任何角度。水平取向(以及因此x轴和y轴)被定义为垂直于由重力限定的垂直轴。倾斜设备还可以使微流体设备100(和微流体管路120)相对于x轴和/或y轴倾斜任何大于90°的度数,或者使微流体设备100(和微流体管路120)相对于x轴或y轴倾斜180°,以完全反转微流体设备100(和微流体管路120)。类似地,在一些实施方案中,倾斜设备190使微流体设备100(和微流体管路120)围绕由流动路径106或微流体管路120的一些其他部分限定的旋转轴倾斜。

[0226] 在一些情况下,将微流体设备100倾斜成垂直取向,使得流动路径106位于一个或多个隔离围栏的上方或下方。如本文在微流体设备的上下文中所用的术语“上方”表示流动路径106被定位为在由重力限定的垂直轴上高于一个或多个隔离围栏(即,在流动路径106上方的隔离围栏中的物体会具有比流动路径中的物体更高的重力势能)。如本文在微流体设备的上下文中所用的术语“下方”表示流动路径106被定位为在由重力限定的垂直轴上低于一个或多个隔离围栏(即,在流动路径106下方的隔离围栏中的物体会具有比流动路径中的物体更低的重力势能)。

[0227] 在一些情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕平行于流动路径106的轴倾斜。此外,微流体设备100可以被倾斜至小于90°的角度,使得流动路径106位于一个或多个隔离围栏的上方或下方,而不是位于隔离围栏的正上方或正下方。在其他情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕垂直于流动路径106的轴倾斜。在另外其他情况下,倾斜设备190使微流体设备100围绕既不平行也不垂直于流动路径106的轴倾斜。

[0228] 系统150还可以包括介质源178。介质源178(例如,容器、贮液器等)可以包括多个

部分或容器,每个部分或容器用于容纳不同的流体介质180。因此,介质源178可以是在微流体设备100外部并与之分开的设备,如图1A所示。或者,介质源178可以整体或部分地位于微流体设备100的外壳102内部。例如,介质源178可以包括作为微流体设备100的一部分的贮液器。

[0229] 图1A还示出了描绘构成系统150的一部分并且可以与微流体设备100结合使用的控制和检测设备152的实例的简化框图。如图所示,这种控制和监测设备152的实例包括主控制器154,其包括介质模块160,其用于控制介质源178;运动模块162,其用于控制微流体管路120中的微物体(未示出)和/或介质(例如,介质液滴)的移动和/或选择;成像模块164,其用于控制成像设备194(例如,相机、显微镜、光源或其任何组合)以捕捉图像(例如,数字图像);以及倾斜模块166,其用于控制倾斜设备190。控制设备152还可以包括其他模块168,其用于控制、监测或执行关于微流体设备100的其他功能。如图所示,设备152还可以包括显示设备170和输入/输出设备172。

[0230] 主控制器154可以包括控制模块156和数字存储器158。控制模块156可以包括例如数字处理器,该数字处理器被构造为根据被存储为存储器158中的非暂态数据或信号的机器可执行指令(例如,软件、固件、源代码等)进行操作。替代地或另外地,控制模块156可以包括硬连线数字电路和/或模拟电路。可以类似地构造介质模块160、运动模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168。因此,可以由如上文所讨论地构造的主控制器154、介质模块160、运动模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168中的任意一个或多个来实施本文所讨论的针对微流体设备100或任何其他微流体设备所执行的功能、过程、动作、行动或过程的步骤。类似地,主控制器154、介质模块160、运动模块162、成像模块164、倾斜模块166和/或其他模块168可以通信地耦接,以发送和接收本文所讨论的任何功能、过程、动作、行动或步骤中使用的数据。

[0231] 介质模块160控制介质源178。例如,介质模块160可以控制介质源178以将选定的流体介质180输入到外壳102中(例如,通过入口端口107)。介质模块160还可以控制从外壳102中移除介质(例如,通过出口端口(未示出))。因此,可以将一种或多种介质选择性地输入到微流体管路120中以及从其中移除。介质模块160还可以控制微流体管路120内部的流动路径106中的流体介质180的流动。例如,在一些实施方案中,在倾斜模块166使倾斜设备190将微流体设备100倾斜到期望的倾斜角度之前,介质模块160停止介质180在流动路径106中和通过外壳102的流动。

[0232] 运动模块162可以被构造为控制微流体管路120中的微物体(未示出)的选择、捕集和移动。如下文参考图1B和1C所讨论的,外壳102可以包括介电电泳(DEP)、光电镊子(OET)和/或光电润湿(OEW)构造(图1A中未示出),并且运动模块162可以控制电极和/或晶体管(例如,光电晶体管)的活化,以选择和移动流动路径106和/或隔离围栏124、126、128、130中的微物体(未示出)和/或介质液滴(未示出)。

[0233] 成像模块164可以控制成像设备194。例如,成像模块164可以接收和处理来自成像设备194的图像数据。来自成像设备194的图像数据可以包括由成像设备194捕捉的任何类型的信息(例如,存在或不存在微物体、介质液滴、标记物(例如荧光标记物)的累积等)。使用由成像设备194捕捉的信息,成像模块164还可以计算微流体设备100内物体(例如,微物体、介质液滴)的位置和/或这些物体的运动速率。

[0234] 倾斜模块166可以控制倾斜设备190的倾斜运动。替代地或另外地,倾斜模块166可以控制倾斜速率和时机,以优化微物体经由重力向一个或多个隔离围栏的转移。倾斜模块166与成像模块164通信地耦接,以接收描述微流体管路120中的微物体和/或介质液滴的运动的数据。使用该数据,倾斜模块166可以调节微流体管路120的倾斜,以便调节微物体和/或介质液滴在微流体管路120中移动的速率。倾斜模块166还可以使用该数据来迭代地调节微流体管路120中的微物体和/或介质液滴的位置。

[0235] 在图1A所示的实例中,微流体管路120被示为包括微流体通道122和隔离围栏124、126、128、130。每个围栏均包括通向通道122的开口,但是其他部分被包围,使得围栏可以将围栏内部的微物体与通道122的流动路径106中或其他围栏中的流体介质180和/或微物体基本上分离。隔离围栏的壁从基部的内表面109延伸到盖110的内表面,以提供外壳。围栏到微流体通道122的开口被取向为与流体介质180的流动106成一角度,使得流动106不被引导到围栏中。流动可以与围栏的开口的平面相切或垂直。在一些情况下,围栏124、126、128、130被构造为物理地围住微流体管路120内的一个或多个微物体。根据本公开的隔离围栏可以包括各种形状、表面和特征,其被优化为与DEP、OET、OEW、流体流动和/或重力一起使用,如下文将详细讨论和示出的。

[0236] 微流体管路120可以包括任何数目的微流体隔离围栏。尽管示出了五个隔离围栏,但微流体管路120可以具有更少或更多的隔离围栏。如图所示,微流体管路120的微流体隔离围栏124、126、128和130各自包括不同的特征和形状,这些特征和形状可以提供用于保持、分离、测定或培养生物微物体的一个或多个益处。在一些实施方案中,微流体管路120包括多个相同的微流体隔离围栏。

[0237] 在图1A所示的实施方案中,示出了单个通道122和流动路径106。然而,其他实施方案可以含有多个通道122,每个通道均被构造为包括流动路径106。微流体管路120还包括与流动路径106和流体介质180为流体连通的入口阀或端口107,由此流体介质180可以经由入口端口107进入通道122。在一些情况下,流动路径106包括单个路径。在一些情况下,单个路径被设置为Z字形图案,由此流动路径106以交替的方向穿过微流体设备100两次或更多次。

[0238] 在一些情况下,微流体管路120包括多个平行的通道122和流动路径106,其中每个流动路径106内的流体介质180沿相同的方向流动。在一些情况下,每个流动路径106内的流体介质沿正向或反向中的至少一个方向流动。在一些情况下,构造多个隔离围栏(例如,相对于通道122),使得隔离围栏可以平行地加载目标微物体。

[0239] 在一些实施方案中,微流体管路120还包括一个或多个微物体阱132。阱132通常形成在形成通道122的边界的壁中,并且可以与微流体隔离围栏124、126、128、130中的一个或多个的开口相对地设置。在一些实施方案中,阱132被构造为成从流动路径106接收或捕获单个微物体。在一些实施方案中,阱132被构造为从流动路径106接收或捕获多个微物体。在一些情况下,阱132包括大约等于单个目标微物体的体积的体积。

[0240] 阱132还可以包括开口,其被构造为帮助目标微物体流入阱132。在一些情况下,阱132包括开口,该开口的高度和宽度近似地等于单个目标微物体的尺寸,由此防止更大的微物体进入微物体阱。阱132还可以包括被构造为帮助将目标微物体保留在阱132内的其他特征。在一些情况下,阱132相对于微流体隔离围栏的开口对齐并且位于通道122的相对侧上,使得当微流体设备100围绕平行于微流体通道122的轴倾斜时,被捕集的微物体按照使得微

物体落入隔离围栏的开口中的轨迹离开阱132。在一些情况下,阱132包括小于目标微物体的侧通道134,以便有助于穿过阱132的流动,从而增加在阱132中捕获微物体的可能性。

[0241] 在一些实施方案中,经由一个或多个电极(未示出)将介电电泳(DEP)力施加在流体介质180(例如,在流动路径中和/或在隔离围栏中)上,以操纵、运输、分离和分类位于其中的微物体。例如,在一些实施方案中,将DEP力施加到微流体管路120的一个或多个部分,以便将单个微物体从流动路径106转移到期望的微流体隔离围栏中。在一些实施方案中,使用DEP力来防止隔离围栏(例如,隔离围栏124、126、128或130)内的微物体从其中被替换。

进一步地,在一些实施方案中,使用DEP力来从隔离围栏中选择性地移除先前根据本公开的实施方案收集的微物体。在一些实施方案中,DEP力包括光电镊子(OET)力。

[0242] 在其他实施方案中,经由一个或多个电极(未示出)将光电润湿(OEW)力施加到微流体设备100的支撑结构104(和/或盖110)中的一个或多个位置(例如,有助于限定流动路径和/

或多个隔离围栏的位置),以操纵、运输、分离和分类位于微流体管路120中的液滴。例如,在一些实施方案中,将OEW力施加到支撑结构104(和/或盖110)中的一个或多个位置,以将单个液滴从流动路径106转移到期望的微流体隔离围栏中。在一些实施方案中,使用OEW力来防止隔离围栏(例如,隔离围栏124、126、128或130)内的液滴从其中被替换。进一步地,在一些实施方案中,使用OEW力来从隔离围栏中选择性地去除先前根据本公开的实施方案收集的液滴。

[0243] 在一些实施方案中,将DEP和/或OEW力与其他力(例如流动和/或重力)组合,以便操纵、运输、分离和分类微流体管路120内的微物体和/或液滴。例如,可以将外壳102倾斜(例如,通过倾斜设备190),以将流动路径106和位于其中的微物体定位在微流体隔离围栏的上方,并且重力可以将微物体和/或液滴运输到围栏中。在一些实施方案中,可以在施加其他力之前施加DEP和/或OEW力。在其他实施方案中,可以在其他力之后施加DEP和/或OEW力。

在另外其他情况下,可以与其他力同时或者以与其他力交替地的方式施加DEP和/或OEW力。

[0244] 图1B、1C和2A-2H示出了可以用于实施本公开的实施方案的微流体设备的各种实施方案。图1B描述了其中微流体设备200被构造为光致动的电动力学设备的实施方案。本领域已知多种光致动的电动力学设备,包括具有光电镊子(OET)构造的设备和具有光电润湿(OEW)构造的设备。在以下美国专利文献中示出了合适的OET构造的实例,其每一篇均通过引用整体并入本文:美国专利号RE 44,711(Wu等)(最初以美国专利号7,612,355发布);和美国专利号7,956,339(Ohta等)。美国专利号6,958,132(Chiou等)和美国专利申请公开号2012/0024708(Chiou等)中示出了OEW构造的实例,上述两篇文献都通过引用整体并入本文。

光致动的电动力学设备的又一个实例包括组合的OET/OEW构造,在美国专利公开号20150306598(Khandros等)和20150306599(Khandros等)以及其对应的PCT公开WO2015/164846和WO2015/164847中示出了其实例,其全都通过引用整体并入本文。

[0245] 已经在例如US2014/0116881(申请号14/060,117,2013年10月22日提交)、US2015/0151298(申请号14/520,568,2014年10月22日提交)和US2015/0165436(申请号14/521,

447,2014年10月22日提交)中描述了具有围栏的微流体设备的实例,其中可以放置、培养和/或监测生物微物体,这些申请中的每一篇都通过引用整体并入本文。美国申请号14/520,568和14/521,447也描述了分析在微流体设备中培养的细胞的分泌的示例性方法。前述申请中的每一篇还描述了微流体设备,其被构造为产生介电电泳(DEP)力,例如光电镊子(OET),或被构造为提供光电润湿(OEW)。例如,US2014/0116881的图2中所示的光电镊子设备是可以在本公开的实施方案中用于选择和移动单个生物微物体或一组生物微物体的设备的实例。

[0246] 微流体设备运动构造。如上文所述,系统的控制和监测设备可以包括运动模块,其用于选择和移动微流体设备的微流体管路中的物体,例如微物体或液滴。微流体设备可以具有各种运动构造,这取决于被移动物体的类型和其他考虑因素。例如,可以使用介电电泳(DEP)构造来选择和移动微流体管路中的微物体。因此,微流体设备100的支撑结构104和/或盖110可以包括DEP构造,其用于在微流体管路120中的流体介质180中的微物体上选择性地诱导DEP力,从而选择、捕捉和/或移动单个微物体或微物体组。或者,微流体设备100的支撑结构104和/或盖110可以包括电润湿(EW)构造,其用于在微流体管路120中的流体介质180中的液滴上选择性地诱导EW力,从而选择、捕捉和/或移动单个液滴或液滴组。

[0247] 图1B和1C中示出了包括DEP构造的微流体设备200的一个实例。虽然为了简化的目的,

图1B和1C分别示出了具有区域/室202的微流体设备200的外壳102的一部分的侧截面图和顶截面图,但应当理解,区域/室202可以是具有更详细结构的流体管路元件的一部分,例如生长室、隔离围栏、流动区域或流动通道。此外,微流体设备200可以包括其他流体管路元件。

例如,微流体设备200可以包括多个生长室或隔离围栏和/或一个或多个流动区域或流动通道,例如本文关于微流体设备100所描述的那些。DEP构造可以被包含在微流体设备200的任何这种流体管路元件中,或者其选择的部分中。还应当理解,上文或下文描述的微流体设备组件和系统组件中的任一个可以被包含在微流体设备200中和/或与微流体设备200组合使用。例如,上述包括控制和监测装置152的系统150可以与微流体设备200一起使用,该微流体设备200包括介质模块160、运动模块162、成像模块164、倾斜模块166和其他模块168中的一个或多个。

[0248] 如图1B所示,微流体设备200包括具有底部电极204和覆盖底部电极204的电极活化衬底206的支撑结构104,以及具有顶部电极210的盖110,顶部电极210与底部电极204间隔开。

顶部电极210和电极活化衬底206限定区域/室202的相对表面。因此,包括在区域/室202中的介质180在顶部电极210和电极活化衬底206之间提供电阻连接(resistive connection)。还示出了电源212,其被构造为连接到底部电极204和顶部电极210并且在这些电极之间产生偏置电压,如在区域/室202中产生DEP力所需要的。电源212可以是例如交流(AC)电源。

[0249] 在某些实施方案中,图1B和1C中所示的微流体设备200可以具有光致动的DEP构造。

因此,改变来自光源216的光218的图案(其可以由运动模块162控制)可以选择性

地活化和去活化电极活化衬底206的内表面208的区域214处的DEP电极的变化图案。(下文中,具有DEP构造的微流体设备的区域214被称为“DEP电极区域”。)如图1C所示,指向电极活化衬底206的内表面208的光图案218可以以诸如正方形的图案照射选择的DEP电极区域214a(以白色示出)。在下文中将未被照射的DEP电极区域214(交叉阴影线)称为“暗”DEP电极区域214。通过DEP电极活化衬底206(即,从底部电极204直到与流动区域106中的介质180相交界的电极活化衬底206的内表面208)的相对电阻抗大于在每个暗DEP电极区域214处通过区域/室202中的介质180(即,从电极活化衬底206的内表面208到盖110的顶部电极210)的相对电阻抗。然而,被照射的DEP电极区域214a表现出通过电极活化衬底206的减小的相对阻抗,其小于在每个被照射的DEP电极区域214a处通过区域/室202中的介质180的相对阻抗。

[0250] 在电源212被活化的情况下,前述DEP构造在被照射的DEP电极区域214a和相邻的暗DEP电极区域214之间的流体介质180中产生电场梯度,这又产生了吸引或排斥流体介质180中附近微物体(未示出)的局部DEP力。因此,通过改变从光源216投射到微流体设备200中的光图案218,可以在区域/室202的内表面208处的许多不同的此类DEP电极区域214处选择性地活化和去活化吸引或排斥流体介质180中微物体的DEP电极。DEP力是吸引还是排斥附近的微物体可以取决于诸如电源212的频率和介质180和/或微物体(未示出)的介电性质之类的参数。

[0251] 图1C中所示的被照射的DEP电极区域214a的正方形图案220仅是一个实例。可以通过投射到微流体设备200中的光图案218照射(并由此活化)DEP电极区域214的任何图案,并且可以通过改变或移动光图案218来重复地改变被照射/活化的DEP电极区域214的图案。

[0252] 在一些实施方案中,电极活化衬底206可以包括光电导材料或由其组成。在这样的实施方案中,电极活化衬底206的内表面208可以是无特征的。例如,电极活化衬底206可以包括氢化非晶硅(a-Si:H)层或由其组成。a-Si:H可以包括例如约8%至40%的氢(以100×氢原子数/氢和硅原子的总数来计算)。a-Si:H层可以具有约500nm至约2.0μm的厚度。在这样的实施方案中,根据光图案218,可以在电极活化衬底206的内表面208上的任何地方以任何图案形成DEP电极区域214。因此,无需固定DEP电极区域214的数目和图案,但是可以将其对应于光图案218。已经在例如美国专利号RE 44,711(Wu等)(最初发布为美国专利号7,612,355)中描述了具有包括光电导层(例如上文所述的光电导层)的DEP构造的微流体设备的实例,其全部内容通过引用并入本文。

[0253] 在其他实施方案中,电极活化衬底206可以包括衬底,该衬底包括多个掺杂层、电绝缘层(或区域)和形成半导体集成电路的导电层,例如在半导体领域中已知的。例如,电极活化衬底206可以包括多个光电晶体管,包括例如横向双极光电晶体管,每个光电晶体管均对应于DEP电极区域214。或者,电极活化衬底206可以包括由光电晶体管开关控制的电极(例如,导电金属电极),其中每个这样的电极均对应于DEP电极区域214。电极活化衬底206可以包括此类光电晶体管或光电晶体管控制的电极的图案。例如,该图案可以是排列成行和列的基本上为正方形的光电晶体管或光电晶体管控制的电极的阵列,如图2B所示。或者,图案可以是形成六边点格(hexagonal lattice)的基本上六边形的光电晶体管或光电晶体管控制的电极的阵列。无论图案如何,电路元件都可以在电极活化衬底206的内表面208处的DEP电极区域214与底部电极210之间形成电连接,并且可以由光图案218选择性地活化和

去活化那些电连接(即,光电晶体管或电极)。当未被活化时,每个电连接都可以具有高阻抗,使得通过电极活化衬底206(即,从底部电极204到与区域/室202中的介质180相交界的电极活化衬底206的内表面208)的相对阻抗大于在相应的DEP电极区214处通过介质180(即,从电极活化衬底206的内表面208到盖110的顶部电极210)的相对阻抗。然而,当被光图案218中的光活化时,通过电极活化衬底206的相对阻抗小于在每个被照射的DEP电极区域214处通过介质180的相对阻抗,从而在相应DEP电极区域214处活化DEP电极,如上文所述。因此,以光图案218所确定的方式,可以在区域/室202中的电极活化衬底206的内表面208处的许多不同的DEP电极区域214处选择性地活化和去活化吸引或排斥介质180中的微物体(未示出)的DEP电极。

[0254] 已经在例如美国专利号7,956,339(Ohta等)(参见例如图21和22中所示的设备300及其描述)中描述了具有包括光电晶体管的电极活化衬底的微流体设备的实例,其全部内容通过引用并入本文。已经在例如美国专利公开号2014/0124370(Short等)(参见例如整个附图中所示的设备200、400、500、600和900及其描述)中描述了具有包括由光电晶体管开关控制的电极的电极活化衬底的微流体设备的实例,其全部内容通过引用并入本文。

[0255] 在DEP构造的微流体设备的一些实施方案中,顶部电极210是外壳102的第一壁(或盖110)的一部分,并且电极活化衬底206和底部电极204是外壳102的第二壁(或支撑结构104)的一部分。区域/室202可以位于第一壁和第二壁之间。在其他实施方案中,电极210是第二壁(或支撑结构104)的一部分,并且电极活化衬底206和/或电极210中的一个或两个是第一壁(或盖110)的一部分。此外,光源216可以替代地用于从下方照射外壳102。

[0256] 利用具有DEP构造的图1B-1C的微流体设备200,通过将光图案218投射到微流体设备200中,以便以围绕并捕捉微物体的图案(例如,正方形图案220)来活化电极活化衬底206的内表面208的DEP电极区域214a处的第一组的一个或多个DEP电极,运动模块162可以选择区域/室202中的介质180中的微物体(未示出)。然后,通过相对于微流体设备200移动光图案218以活化DEP电极区域214处的第二组的一个或多个DEP电极,运动模块162可以移动原位产生的捕捉的微物体。或者,可以相对于光图案218来移动微流体设备200。

[0257] 在其他实施方案中,微流体设备200可以具有不依赖于电极活化衬底206的内表面208处的DEP电极的光活化的DEP构造。例如,电极活化衬底206可以包括位于与包括至少一个电极的表面(例如,盖110)相对的位置的选择性可寻址且可激发的电极。可以选择性地打开和闭合开关(例如,半导体衬底中的晶体管开关)以活化或去活化DEP电极区域214处的DEP电极,从而在活化的DEP电极附近的区域/室202中的微物体(未示出)上产生净DEP力。取决于诸如电源212的频率和区域/室202中的介质(未示出)和/或微物体的介电性质的特征,DEP力可以吸引或排斥附近的微物体。通过选择性地活化和去活化一组DEP电极(例如,在形成正方形图案220的一组DEP电极区域214处),可以在区域/室202中捕集和移动区域/室202中的一个或多个微物体。图1A中的运动模块162可以控制这类开关,从而活化和去活化各个DEP电极,以选择、捕集和移动区域/室202周围的特定微物体(未示出)。具有包括选择性可寻址且可激发的电极的DE构造的微流体设备在本领域中是已知的,并且已经被描述在例如美国专利号6,294,063(Becker等)和6,942,776(Medoro)中,其全部内容通过引用并入本文。

[0258] 作为又一个实例,微流体设备200可以具有电润湿(EW)构造,其可以代替DEP构造,

或者可以位于微流体设备200与具有DEP构造的部分分离的部分中。EW构造可以是光电润湿构造或电介质上的电润湿(EWOD)构造,两者都是本领域已知的。在一些EW构造中,支撑结构104具有夹在介电层(未示出)和底部电极204之间的电极活化衬底206。介电层可以包括疏水材料和/或可涂覆有疏水材料,如下文所述。对于具有EW构造的微流体设备200,支撑结构104的内表面208是介电层或其疏水涂层的内表面。

[0259] 介电层(未示出)可以包括一个或多个氧化物层,并且可以具有约50nm至约250nm(例如,约125nm至约175nm)的厚度。在某些实施方案中,介电层可以包括氧化物层,例如金属氧化物(例如,氧化铝或氧化铪)层。在某些实施方案中,介电层可以包括除金属氧化物之外的介电材料,例如硅氧化物或氮化物。无论确切的组成和厚度如何,介电层可以具有约10kOhm至约50kOhm的阻抗。

[0260] 在一些实施方案中,介电层的向内朝向区域/室202的表面涂覆有疏水材料。疏水材料可以包括例如氟化碳分子。氟化碳分子的实例包括全氟聚合物,例如聚四氟乙烯(例如,

TEFLON®)或聚(2,3-二氟亚甲基-全氟四氢呋喃)(例如,CYTOP™)。构成疏水材料的分子可以共价键合到介电层的表面。例如,疏水材料的分子可以借助于诸如硅氧烷基团、膦酸基团或硫醇基团的连接基团共价结合至介电层的表面。因此,在一些实施方案中,疏水材料可以包括烷基封端的硅氧烷、烷基封端的膦酸或烷基封端的硫醇。烷基可以是长链烃(例如,具有至少10个碳或至少16、18、20、22或更多个碳的链)。或者,可以使用氟化(或全氟化)碳链代替烷基。因此,例如,疏水材料可以包括氟代烷基封端的硅氧烷、氟代烷基封端的膦酸或氟代烷基封端的硫醇。在一些实施方案中,疏水涂层的厚度为约10nm至约50nm。在其他实施方案中,疏水涂层的厚度小于10nm(例如,小于5nm,或约1.5至3.0nm)。

[0261] 在一些实施方案中,具有电润湿构造的微流体设备200的盖110也涂覆有疏水材料(未示出)。疏水材料可以是用于涂覆支撑结构104的介电层的相同疏水材料,并且疏水涂层可以具有与支撑结构104的介电层上的疏水涂层的厚度基本相同的厚度。此外,盖110可以包括以支撑结构104的方式夹在介电层和顶部电极210之间的电极活化衬底206。盖110的电极活化衬底206和介电层可以具有与支撑结构104的电极活化衬底206和介电层相同的组成和/或尺寸。

因此,微流体设备200可以具有两个电润湿表面。

[0262] 在一些实施方案中,电极活化衬底206可以包括光电导材料,例如上文所述的那些。

因此,在某些实施方案中,电极活化衬底206可以包括氢化非晶硅层(a-Si:H)或由其组成。a-

Si:H可以包括例如约8%至40%的氢(以100×氢原子数/氢和硅原子的总数来计算)。a-Si:H层可以具有约500nm至约2.0μm的厚度。或者,如上文所述,电极活化衬底206可以包括由光电晶体管开关控制的电极(例如,导电金属电极)。具有光电润湿构造的微流体设备在本领域中是已知的和/或可以用本领域已知的电极活化衬底来构建。例如,美国专利号6,958,132(Chiou等)(其全部内容通过引用并入本文)公开了具有诸如a-Si:H的光电导材料的光电润湿构造,而上文引用的美国专利公开号2014/0124370(Short等)公开了具有由光电晶体管开关控制的电极的电极活化衬底。

[0263] 因此,微流体设备200可以具有光电润湿构造,并且光图案218可以用于活化电极活化衬底206中的光电导EW区域或光响应EW电极。电极活化衬底206的这类活化的EW区域或EW电极可以在支撑结构104的内表面208(即,覆盖介电层或其疏水涂层的内表面)处产生电润湿力。通过改变入射在电极活化衬底206上的光图案218(或相对于光源216移动微流体设备200),可以移动与支撑结构104的内表面208接触的液滴(例如,包括水性介质、溶液或溶剂)穿过区域/室202中存在的不混溶流体(例如,油介质)。

[0264] 在其他实施方案中,微流体设备200可以具有EWOD构造,并且电极活化衬底206可以包括不依赖于光来活化的选择性可寻址且可激发的电极。因此,电极活化衬底206可以包括这类电润湿(EW)电极的图案。例如,图案可以是排列成行和列的基本上正方形的EW电极的阵列,如图2B所示。或者,图案可以是形成六边点格的基本上六边形EW电极的阵列。无论图案如何,都可以通过电开关(例如,半导体衬底中的晶体管开关)选择性地活化(或去活化)EW电极。通过选择性地活化和去活化电极活化衬底206中的EW电极,可以在区域/室202内移动与覆盖介电层或其疏水涂层的内表面208接触的液滴(未示出)。图1A中的运动模块162可以控制此类开关,从而活化和去活化各个EW电极,以选择和移动区域/室202周围的特定液滴。具有有选择性可寻址且可激发的电极的EWOD构造的微流体设备在本领域中是已知的,

并且已经描述在例如美国专利号8,685,344(Sundarsan等)中,其全部内容通过引用并入本文。

[0265] 无论微流体设备200的构造如何,电源212可以用于提供为微流体设备200的电路供电的电势(例如,AC电压电势)。电源212可以与图1中参引的电源192相同或者是其组件。电源212可以被构造为向顶部电极210和底部电极204提供AC电压和/或电流。对于AC电压,电源212可以提供这样的频率范围和平均或峰值功率(例如,电压或电流)范围,其如上文所述,足以产生足够强的净DEP力(或电润湿力)以在区域/室202中捕集和移动各个微物体(未示出),和/或还如上文所述,足以改变区域/室202中支撑结构104的内表面208(即,介电层和/或介电层上的疏水涂层)的润湿性质。这样的频率范围和平均或峰值功率范围在本领域中是已知的。参见,例如,美国专利号6,958,132(Chiou等)、美国专利号RE44,711(Wu等)(最初作为美国专利号7,612,355发布)和美国专利申请公开号US2014/0124370(Short等)、US2015/0306598(Khandros等)和US2015/0306599(Khandros等)。

[0266] 隔离围栏。在图2A-2C中描绘的微流体设备230内示出了一般隔离围栏224、226和228的非限制性实例。每个隔离围栏224、226和228可以包括分离结构232,其限定了分离区域240和将分离区域240流体连接到通道122的连接区域236。连接区域236可以包括通向微流体通道122的近端开口234和通向分离区域240的远端开口238。连接区域236可以被构造为使得从微流体通道122流入隔离围栏224、226、228的流体介质(未示出)的流动的最大穿透深度不延伸到分离区域240中。因此,由于连接区域236,设置在隔离围栏224、226、228的分离区域240中的微物体(未示出)或其他材料(未示出)可以与微流体通道122中的介质流180分离且基本上不受其影响。

[0267] 图2A-2C的隔离围栏224、226和228各自具有单个开口,该开口直接通向微流体通道122。隔离围栏的开口从微流体通道122侧向开放。电极活化衬底206在微流体通道122和隔离围栏224、226和228二者的下方。隔离围栏的外壳内的电极活化衬底206的上表面(形成

隔离围栏的底板)被设置在与微流体通道122(或者,如果不存在通道,则为流动区域)内的电极活化衬底206的上表面(形成微流体设备的流动通道(或流动区域)的底板)相同水平面上或基本相同的水平面上。电极活化衬底206可以是无特征的,或者可以具有不规则或图案化的表面,其从其最高凸起到其最低凹陷变化小于约3微米、2.5微米、2微米、1.5微米、1微米、0.9微米、0.5微米、0.4微米、0.2微米、0.1微米或更小。跨越微流体通道122(或流动区域)和隔离围栏的衬底的上表面中的高度变化可以小于隔离围栏的壁或微流体设备的壁的高度的约3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.5%、0.3%或0.1%。虽然详细描述了微流体设备200,但这也适用于本文所述的微流体设备100、230、250、280、290中的任一个。

[0268] 因此,微流体通道122可以是被扫过区域的实例,并且隔离围栏224、226、228的分离区域240可以是未被扫过区域的实例。应当注意,微流体通道122和隔离围栏224、226、228可以被构造为包括一种或多种流体介质180。在图2A-2B所示的实例中,开口222被连接到微流体通道122,并允许将流体介质180引入到微流体设备230中或从其中移除。在引入流体介质180之前,微流体设备可以装填有气体,如二氧化碳气体。一旦微流体设备230包括流体介质180,就可以选择性地产生和停止微流体通道122中的流体介质180的流动242。例如,如图所示,开口222可以被设置在微流体通道122的不同位置处(例如,相对端),并且可以从用作入口的一个开口222到用作出口的另一个开口222形成介质的流动242。

[0269] 图2C示出了根据本公开的隔离围栏224的实例的详细视图。还示出了微物体246的实例。

[0270] 已知的是,微流体通道122中的流体介质180经过隔离围栏224的近端开口234的流动242可以产生介质180进入和/或离开隔离围栏224的二次流动244。为了将隔离围栏224的分离区域240中的微物体246与二次流动244分离,隔离围栏224的连接区域236的长度L_{con}(即,从近端开口234到远端开口238)应当大于二次流动244进入连接区域236的穿透深度D_p。二次流动244的穿透深度D_p取决于在微流体通道122中流动的流体介质180的速度以及与微流体通道122以及到微流体通道122的连接区域236的近端开口234的构造有关的各种参数。对于给定的微流体设备,微流体通道122和开口234的构造将是固定的,而微流体通道122中的流体介质180的流动242的速率将是可变的。因此,对于每个隔离围栏224,可以识别通道122中的流体介质180的流动242的最大速度V_{max},确保二次流动244的穿透深度D_p不超过连接区域236的长度L_{con}。只要微流体通道122中的流体介质180的流动242的速率不超过最大速度V_{max},所得到的二次流动244就可以被限制到微流体通道122和连接区域236并且保持在分离区域240之外。

因此,微流体通道122中的介质180的流动242将不会将微物体246拖曳出分离区域240。相反,无论微流体通道122中的流体介质180的流动242如何,位于分离区域240中的微物体246将停留在分离区域240中。

[0271] 而且,只要微流体通道122中的介质180的流动242的速率不超过V_{max},微流体通道122中的流体介质180的流动242就不会使混杂的颗粒(例如,微粒和/或纳米颗粒)从微流体通道122移动到隔离围栏224的分离区域240中。因此,使连接区域236的长度L_{con}大于二次流动244的最大穿透深度D_p可以防止一个隔离围栏224被来自微流体通道122或另一个隔离围栏(例如,图2D中的隔离围栏226、228)的混杂的颗粒污染。

[0272] 因为微流体通道122和隔离围栏224、226、228的连接区域236可能受到微流体通道

122中的介质180的流动242的影响,所以微流体通道122和连接区域236可以被认为是微流体设备230的被扫过(或流动)区域。另一方面,隔离围栏224、226、228的分离区域240可以被认为是未被扫过(或非流动)区域。例如,微流体通道122中的第一流体介质180中的组分(未示出)可以基本上仅通过第一介质180的组分从微流体通道122扩散通过连接区域236并进入分离区域240中的第二流体介质248中而与分离区域240中的第二流体介质248混合。类似地,分离区域240中的第二介质248的组分(未示出)可以基本上仅通过第二介质248的组分从分离区域240扩散通过连接区域236并进入微流体通道122中的第一介质180中而与微流体通道122中的第一介质180混合。在一些实施方案中,隔离围栏的分离区域与流动区域之间通过扩散进行的流体介质交换的程度大于约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或大于约99%的流体交换。第一介质180可以是与第二介质248相同的介质或不同的介质。此外,第一介质180和第二介质248可以开始相同,然后变得不同(例如,通过分离区域240中的一个或多个细胞来调节第二介质248,或者通过改变流过微流体通道122的介质180)。

[0273] 如上所述,由微流体通道122中的流体介质180的流动242引起的二次流动244的最大穿透深度D_p可以取决于多个参数。这些参数的实例包括:微流体通道122的形状(例如,微流体通道可以将介质引导到连接区域236中,将介质从连接区域236转移,或者沿着基本上垂直于通向微流体通道122的连接区域236的近端开口234的方向引导介质);微流体通道122在近端开口234处的宽度W_{ch}(或横截面积);和连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}(或横截面积);微流体通道122中的流体介质180的流动242的速度V;第一介质180和/或第二介质248的粘度,等等。

[0274] 在一些实施方案中,微流体通道122和隔离围栏224、226、228的尺寸可以相对于微流体通道122中的流体介质180的流动242的向量如下定向:微流体通道宽度W_{ch}(或微流体通道122的横截面积)可以基本上垂直于介质180的流动242;连接区域236在开口234处的宽度W_{con}

(或横截面积)可以基本上平行于微流体通道122中的介质180的流动242;和/或连接区域的长度L_{con}可以基本上垂直于微流体通道122中的介质180的流动242。前述仅是示例,并且微流体通道122和隔离围栏224、226、228的相对位置可以相对于彼此为其他取向。

[0275] 如图2C所示,连接区域236的宽度W_{con}从近端开口234到远端开口238可以是均匀的。

因此,连接区域236在远端开口238处的宽度W_{con}可以是本文中为连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}所确定的任何值。或者,连接区域236在远端开口238处的宽度W_{con}可以大于连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}。

[0276] 如图2C所示,分离区域240在远端开口238处的宽度可以与连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}基本上相同。因此,分离区域240在远端开口238处的宽度可以是本文中为连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}所确定的任何值。或者,分离区域240在远端开口238处的宽度可以大于或小于连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}。此外,远端开口238可以小于近端开口234,并且连接区域236的宽度W_{con}可以在近端开口234和远端开口238之间变窄。例如,使用各种不同的几何形状(例如,斜切连接区域、使连接区域成斜面),连接区域236可以在近端开口和远端开口之间变窄。此外,连接区域236的任何部分或子部分可

以变窄(例如,连接区域与近端开口234相邻的一部分)。

[0277] 图2D-2F描绘了包括微流体管路262和流动通道264的微流体设备250的另一示例性实施方案,其是图1A的相应微流体设备100、管路132和通道134的变体。微流体设备250还具有多个隔离围栏266,其是上述隔离围栏124、126、128、130、224、226或228的另外的变体。

特别地,应当理解,图2D-2F中所示的设备250的隔离围栏266可以代替设备100、200、230、280、290中的上述隔离围栏124、126、128、130、224、226或228中任一个。类似地,微流体设备250是微流体设备100的另一变体,并且还可以具有与上述微流体设备100、200、230、

280、290相同或不同的DEP构造,以及本文所述的其他微流体系统组件中的任一个。

[0278] 图2D-2F的微流体设备250包括支撑结构(在图2D-2F中不可见,但可以与图1A中所描绘的设备100的支撑结构104相同或基本上类似)、微流体管路结构256和盖(在图2D-2F中不可见,但可以与图1A中所描绘的设备100的盖122相同或基本上类似)。微流体管路结构256包括框架252和微流体管路材料260,其可以与图1A中所描绘的设备100的框架114和微流体管路材料116相同或基本上类似。如图2D所示,由微流体管路材料260所定义的微流体管路262可以包括多个通道264(示出了两个,但可以有更多个),多个隔离围栏266与其流体连接。

[0279] 每个隔离围栏266可以包括分离结构272、分离结构272内的分离区域270、以及连接区域268。从微流体通道264处的近端开口274到分离结构272处的远端开口276,连接区域268将微流体通道264流体连接至分离区域270。通常,根据上文对图2B和2C的讨论,通道264中的第一流体介质254的流动278可以产生第一介质254从微流体通道264进入和/或离开隔离围栏266的相应连接区域268的二次流动282。

[0280] 如图2E所示,每个隔离围栏266的连接区域268通常包括在至通道264的近端开口274与至分离结构272的远端开口276之间延伸的区域。连接区域268的长度L_{con}可以大于二次流动282的最大穿透深度D_p,在这种情况下,二次流动282将延伸到连接区域268中而不被再引导向分离区域270(如图2D所示)。或者,如图2F所示,连接区域268可以具有小于最大穿透深度D_p的长度L_{con},在这种情况下,二次流动282将延伸通过连接区域268并且被再引导向分离区域270。在后一种情况下,连接区域268的长度L_{c1}和L_{c2}的和大于最大穿透深度D_p,使得二次流动282不延伸到分离区域270中。无论连接区域268的长度L_{con}是否大于穿透深度D_p,或者连接区域268的长度L_{c1}和L_{c2}的和是否大于穿透深度D_p,通道264中的第一介质254的不超过最大速度V_{max}的流动278会产生具有穿透深度D_p的二次流动,并且隔离围栏266的分离区域270中的微物体(未示出,但可以与图2C中所示的微物体246相同或基本上类似)不会被通道264中的第一介质254的流动278拖曳离开分离区域270。通道264中的流动278也不会将混杂的物质(未示出)从通道264拖曳到隔离围栏266的分离区域270中。这样,扩散是微流体通道264中的第一介质254中的组分可以从微流体通道264移动到隔离围栏266的分离区域270中的第二介质258中的唯一机制。类似地,扩散是隔离围栏266的分离区域270中的第二介质258中的组分可以从分离区域270移动到微流体通道264中的第一介质254中的唯一机制。第一介质254可以是与第二介质258相同的介质,或者第一介质254可以是与第二介质258不同的介质。或者,第一介质254和第二介质258可以在开始时相同,然后变得不同,例

如,通过分离区域270中的一个或多个细胞调节第二介质,或者通过改变流过微流体通道264的介质。

[0281] 如图2E所示,微流体通道264中的微流体通道264的宽度W_{ch}(即,横切流体介质流过微流体通道的方向,如图2D中的箭头278所示)可以基本上垂直于近端开口274的宽度W_{con1},并且因此基本上平行于远端开口276的宽度W_{con2}。然而,近端开口274的宽度W_{con1}和远端开口276的宽度W_{con2}不需要基本上彼此垂直。例如,近端开口274的宽度W_{con1}定向于其上的轴(未示出)与远端开口276的宽度W_{con2}定向于其上的另一轴之间的角度可以不是垂直的,并因此不是90°。可选择的取向角度的实例包括以下角度:约30°至约90°、约45°至约90°、约60°至约90°等。

[0282] 在隔离围栏(例如,124、126、128、130、224、226、228或266)的各种实施方案中,分离区域(例如240或270)被构造为包括多个微物体。在其他实施方案中,分离区域可以被构造为包括仅一个、两个、三个、四个、五个或类似的相对较少数目的微物体。因此,分离区域的体积可以是例如至少1×10^6、2×10^6、4×10^6、6×10^6立方微米或更大。

[0283] 在隔离围栏的各种实施方案中,微流体通道(例如,122)在近端开口(例如234)处的宽度W_{ch}可以是约50-1000微米、50-500微米、50-400微米、50-300微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、70-500微米、70-400微米、70-300微米、70-250微米、70-200微米、70-150微米、90-400微米、90-300微米、90-250微米、90-200微米、90-150微米、100-300微米、100-250微米、100-200微米、100-150微米或100-120微米。在一些其他实施方案中,微流体通道(例如,122)在近端开口(例如234)处的宽度W_{ch}可以是约200-800微米、200-700微米或200-600微米。以上仅是示例,并且微流体通道122的宽度W_{ch}可以是上文列出的任何端点内的任何宽度。此外,在微流体通道的除了隔离围栏的近端开口之外的区域中,微流体通道122的W_{ch}可以被选择为任何这些宽度。

[0284] 在一些实施方案中,隔离围栏的高度为约30至约200微米或约50至约150微米。在一些实施方案中,隔离围栏的横截面积为约1×10^4至3×10^6平方微米、2×10^4至2×10^6平方微米、4×10^4至1×10^6平方微米、2×10^4至5×10^5平方微米、2×10^4至1×10^5平方微米或约2×10^5至2×10^6平方微米。

[0285] 在隔离围栏的各种实施方案中,微流体通道(例如,122)在近端开口(例如,234)处的高度H_{ch}可以是任何以下高度内的高度:20-100微米、20-90微米、20-80微米、20-70微米、20-60微米、20-50微米、30-100微米、30-90微米、30-80微米、30-70微米、30-60微米、30-50微米、40-100微米、40-90微米、40-80微米、40-70微米、40-60微米或40-50微米。前述仅仅是示例,并且微流体通道(例如,122)的高度H_{ch}可以是上文列出的任何端点内的高度。在微流体通道的除了隔离围栏的近端开口之外的区域中,微流体通道122的高度H_{ch}可以被选择为在任何这些高度内。

[0286] 在隔离围栏的各种实施方案中,微流体通道(例如,122)在近端开口(例如234)处的横截面积可以是约500-50000平方微米、500-40000平方微米、500-30000平方微米、500-25000平方微米、500-20000平方微米、500-15000平方微米、500-10000平方微米、500-7500平方微米、500-5000平方微米、1000-25000平方微米、1000-20000平方微米、1000-15000平方微米、1000-10000平方微米、1000-7500平方微米、1000-5000平方微米、2000-20000平方微米、2000-15000平方微米、2000-10000平方微米、2000-7500平方微米、2000-6000平方微

米、3000-20000平方微米、3000-15000平方微米、3000-10000平方微米、3000-7500平方微米或3000至6000平方微米。前述仅仅是示例,并且微流体通道(例如,122)在近端开口(例如,234)处的横截面积可以是上文列出的任何端点内的任何面积。

[0287] 在隔离围栏的各种实施方案中,连接区域(例如,236)的长度L_{con}可以是约1-600微米、5-550微米、10-500微米、15-400微米、20-300微米、20-500微米、40-400微米、60-300微米、80-200微米或约100-150微米。前述仅仅是示例,并且连接区域(例如,236)的长度L_{con}可以是上文列出的任何端点内任何长度。

[0288] 在隔离围栏的各种实施方案中,连接区域(例如,236)在近端开口(例如,234)处的宽度W_{con}可以是约20-500微米、20-400微米、20-300微米、20-200微米、20-150微米、20-100微米、20-80微米、20-60微米、30-400微米、30-300微米、30-200微米、30-150微米、30-100微米、30-80微米、30-60微米、40-300微米、40-200微米、40-150微米、40-100微米、40-80微米、40-60微米、50-250微米、50-200微米、50-150微米、50-100微米、50-80微米、60-200微米、60-150微米、60-100微米、60-80微米、70-150微米、70-100微米或和80-100微米。前述仅仅是示例,并且连接区域(例如,236)在近端开口(例如,234)处的宽度W_{con}可以与前述示例不同(例如,上文列出的任何端点内任何值)。

[0289] 在隔离围栏的各种实施方案中,连接区域(例如,236)在近端开口(例如,234)处的宽度W_{con}可以至少与隔离围栏预期用于的微物体(例如,生物细胞,其可以是T细胞或B细胞)的最大尺寸一样大。前述仅仅是示例,并且连接区域(例如,236)在近端开口(例如,234)处的宽度W_{con}可以与前述示例(例如,上文列出的任何端点内宽度)不同。

[0290] 在隔离围栏的各种实施方案中,连接区域的近端开口的宽度W_{pr}可以至少与隔离围栏预期用于的微物体(例如,生物微物体,例如细胞)的最大尺寸一样大。例如,宽度W_{pr}可以是约50微米、约60微米、约100微米、约200微米、约300微米,或者可以是约50-300微米、约50-200微米、约50-100微米、约75-150微米、约75-100微米或约200-300微米。

[0291] 在隔离围栏的各种实施方案中,连接区域(例如,236)的长度L_{con}与连接区域(例如,236)在近端开口234处的宽度W_{con}的比例可以大于或等于任何以下比例:0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0或更大。以上仅仅是示例,并且连接区域236的长度L_{con}与连接区域236在近端开口234处的宽度W_{con}的比例可以与前述示例不同。

[0292] 在微流体设备100、200、23、250、280、290的各种实施方案中,V_{max}可以被设定为约0.2、0.5、0.7、1.0、1.3、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.7、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10、11、12、13、14或15微升/秒。

[0293] 在具有隔离围栏的微流体设备的各种实施方案中,隔离围栏的分离区域(例如,240)的体积可以是例如至少5×10^5、8×10^5、1×10^6、2×10^6、4×10^6、6×10^6、8×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8、5×10^8或8×10^8立方微米或更大。在具有隔离围栏的微流体设备的各种实施方案中,隔离围栏的体积可以是约5×10^5、6×10^5、8×10^5、1×10^6、2×10^6、4×10^6、8×10^6、1×10^7、3×10^7、5×10^7或约8×10^7立方微米或更大。在一些其他实施方案中,隔离围栏的

体积可以是约1纳升至约50纳升、2纳升至约25纳升、2纳升至约20纳升、约2纳升至约15纳升、或约2纳升至约10纳升。

[0294] 在各种实施方案中,微流体设备具有如本文所讨论的任何实施方案中所构造的隔离围栏,其中微流体设备具有约5至约10个隔离围栏、约10至约50个隔离围栏、约100至约500个隔离围栏;约200至约1000个隔离围栏、约500至约1500个隔离围栏、约1000至约2000个隔离围栏、约1000至约3500个隔离围栏、约3000至约7000个隔离围栏、约5000至约10000个隔离围栏、约9000至约15000个隔离围栏或约12000至约20000个隔离围栏。隔离围栏不需要全部是相同的尺寸,并且可以包括多种构造(例如,隔离围栏内不同的宽度、不同的特征)。

[0295] 图2G示出了根据一个实施方案的微流体设备280。图2G中所示的微流体设备280是微流体设备100的程式化示意图。在实施中,微流体设备280及其组成管路元件(例如,通道122和隔离围栏128)会具有本文所讨论的尺寸。图2G中所示的微流体管路120具有两个端口107、四个不同的通道122和四个不同的流动路径106。微流体设备280还包括向每个通道122开放的多个隔离围栏。在图2G所示的微流体设备中,隔离围栏具有与图2C中所示的围栏类似的几何形状,因此具有连接区域和分离区域这两者。因此,微流体管路120包括被扫过区域(例如,通道122和连接区域236的在二次流动244的最大穿透深度D_p内的部分)和未被扫过区域(例如,分离区域240和连接区域236的不在二次流动244的最大穿透深度D_p内的部分)这两者。

[0296] 图3A至3B示出了可用于操作和观察根据本公开的微流体设备(例如,100、200、230、

250、280、290)的系统150的各种实施方案。如图3A所示,系统150可以包括结构(“巢”)300,其被构造为保持微流体设备100(未示出)或本文所述的任何其他微流体设备。巢300可以包括插座(socket)302,其能够与微流体设备320(例如,光致动的电动力学设备100)交界并提供从电源192到微流体设备320的电连接。巢300还可以包括集成的电信号生成子系统304。电信号生成子系统304可以被构造为向插座302提供偏置电压,使得当插座302承载微流体设备320时,在微流体设备320中的一对电极之间施加偏置电压。因此,电信号生成子系统304可以是电源192的一部分。向微流体设备320施加偏置电压的能力并不意味着当插座302承载微流体设备320时会一直施加偏置电压。相反,在大多数情况下,将间歇地施加偏压电压,例如,仅在需要时施加,以促进在微流体设备320中生成电动力,例如介电电泳或电润湿。

[0297] 如图3A所示,巢300可以包括印刷电路板组件(PCBA)322。电信号生成子系统304可以被安装在PCBA 322上并被电集成到其中。示例性支撑件包括也安装在PCBA 322上的插座302。

[0298] 通常,电信号生成子系统304将包括波形发生器(未示出)。电信号生成子系统304还可以包括示波器(未示出)和/或被构造为放大从波形发生器接收到的波形的波形放大电路(未示出)。示波器(如果存在的话)可以被构造为测量供给至由插座302承载的微流体设备320的波形。在某些实施方案中,示波器在微流体设备320附近(并且远离波形发生器)的位置处测量波形,从而确保更精确地测量实际施加到设备的波形。从示波器测量所获得的数据可以被例如作为反馈提供给波形发生器,并且波形发生器可以被构造为基于这样的反

馈而调整其输出。

合适的组合式波形发生器和示波器的示例是RedPitaya™。

[0299] 在某些实施方案中,巢300还包括控制器308,例如用于感测和/或控制电信号生成子系统304的微处理器。合适的微处理器的实例包括Arduino™微处理器,例如ArduinoNano™。

控制器308可以用于执行功能和分析,或者可以与外部主控制器154(在图1A中示出)进行通信以执行功能和分析。在图3A所示的实施方案中,控制器308通过界面310(例如,插头或连接器)与主控制器154通信。

[0300] 在一些实施方案中,巢300可以包括电信号生成子系统304,其包括Red Pitaya™波形发生器/示波器单元(“RedPitaya单元”)和波形放大电路,该波形放大电路将RedPitaya单元所产生的波形放大并且将放大的电压传送给微流体设备100。在一些实施方案中,RedPitaya单元被构造为测量微流体设备320处的放大的电压,然后根据需要调节其自身的输出电压,使得在微流体设备320处测量到的电压是期望值。在一些实施方案中,波形放大电路可以具有由安装在PCBA 322上的一对DC-DC转换器产生的+6.5V至-6.5V的电源,从而在微流体设备100处产生高达13Vpp的信号。

[0301] 如图3A所示,支撑结构300(例如,巢)还可以包括热控制子系统306。热控制子系统306可以被构造为调节由支撑结构300保持的微流体设备320的温度。例如,热控制子系统306可以包括Peltier热电设备(未示出)和冷却单元(未示出)。Peltier热电设备可以具有被构造为与微流体设备320的至少一个表面相交界的第一表面。冷却单元可以是例如冷却块(未示出),例如液体冷却铝块。Peltier热电设备的第二表面(例如,与第一表面相对的表面)可以被构造为与这种冷却块的表面交界。冷却块可以被连接到流体路径314,流体路径314被构造为使冷却的流体循环通过冷却块。在图3A所示的实施方案中,支撑结构300包括入口316和出口318,以从外部贮液器(未示出)接收冷却的流体,将冷却的流体引入到流体路径314中并通过冷却块,然后将冷却的流体返回到外部贮液器。在一些实施方案中,Peltier热电设备、冷却单元和/或流体路径314可以被安装在支撑结构300的壳体312上。在一些实施方案中,热控制子系统306被构造为调节Peltier热电设备的温度,以实现微流体设备320的目标温度。Peltier热电设备的温度调节可以例如通过热电电源实现,例如通过Pololu™热电电源(Pololu Robotics and Electronics Corp.)实现。热控制子系统306可以包括反馈电路,例如由模拟电路提供的温度值。或者,反馈电路可以由数字电路提供。

[0302] 在一些实施方案中,巢300可以包括具有反馈电路的热控制子系统306,该反馈电路是包括电阻器(例如,具有1kOhm+/-0.1%的电阻,+/-0.02ppm/C0的温度系数)和NTC热敏电阻(例如,具有1kOhm+/-0.01%的标称电阻)的模拟分压器电路(未示出)。在一些情况下,热控制子系统306测量来自反馈电路的电压,然后使用计算出的温度值作为机载PID控制环路算法的输入。来自PID控制环路算法的输出可以驱动例如Pololu™马达驱动器(未示出)上的定向和脉冲宽度调制的信号引脚,以致动热电电源,从而控制Peltier热电设备。

[0303] 巢300可以包括串行端口324,其允许控制器308的微处理器经由界面310(未示出)与外部主控制器154进行通信。另外,控制器308的微处理器可以与电信号生成子系统304和热控制子系统306进行通信(例如,经由Plink工具(未示出))。因此,经由控制器308、界面310和串行端口324的组合,电信号生成子系统304和热控制子系统306可以与外部主控制器

154进行通信。以这种方式,除了其他方面之外,主控制器154还可以通过执行用于输出电压调节的定标(scaling)计算来辅助电信号生成子系统304。经由耦接到外部主控制器154的显示设备170提供的图形用户界面(GUI)(未示出)可以被构造为绘制分别从热控制子系统306和电信号生成子系统304获得的温度和波形数据。替代地或另外地,GUI可以允许更新控制器308、热控制子系统306和电信号生成子系统304。

[0304] 如上文所讨论的,系统150可以包括成像设备194。在一些实施方案中,成像设备194包括光调制子系统330(参见图3B)。光调制子系统330可以包括数字镜像设备(DMD)或微快门阵列系统(MSA),其中任一个都可以被构造为接收来自光源332的光并将接收到的光的一部分发送到显微镜350的光具组中。或者,光调制子系统330可以包括产生其自身光的设备(因此无需光源332),例如有机发光二极管显示器(OLED)、硅基液晶(LCOS)设备、铁电硅基液晶设备(FLCOS)或透射式液晶显示器(LCD)。光调制子系统330可以是例如投影仪。因此,光调制子系统330能够发射结构光和非结构光。在某些实施方案中,系统150的成像模块164和/或运动模块162可以控制光调制子系统330。

[0305] 在某些实施方案中,成像设备194还包括显微镜350。在这样的实施方案中,巢300和光调制子系统330可以被单独地构造为安装在显微镜350上。显微镜350可以是例如标准研究级别的光学显微镜或荧光显微镜。因此,巢300可以被构造为安装在显微镜350的载物台344上和/或光调制子系统330可以被构造为安装在显微镜350的端口上。在其他实施方案中,本文所述的巢300和光调制子系统330可以是显微镜350的集成部件。

[0306] 在某些实施方案中,显微镜350还可以包括一个或多个检测器348。在一些实施方案中,

检测器348由成像模块164控制。检测器348可以包括目镜、电荷耦合设备(CCD)、相机(例如,数码相机)或其任何组合。如果存在至少两个检测器348,则一个检测器可以是例如快速帧速率相机,而另一个检测器可以是高灵敏度相机。此外,显微镜350可以包括光具组,其被构造为接收从微流体设备320反射和/或发射的光,并将反射和/或发射的光的至少一部分聚焦到一个或多个检测器348上。显微镜的光具组还可以包括用于不同检测器的不同镜筒透镜(未示出),使得每个检测器上的最终放大率可以是不同的。

[0307] 在某些实施方案中,成像设备194被构造为使用至少两个光源。例如,可以使用第一光源332来产生结构光(例如,经由光调制子系统330),并且可以使用第二光源334来提供非结构光。第一光源332可以产生用于光驱动的电运动和/或荧光激发的结构光,且第二光源334可以用于提供亮视场照明。在这些实施方案中,运动模块164可以用于控制第一光源332,并且成像模块164可以用于控制第二光源334。显微镜350的光具组可以被构造为(1)接收来自光调制子系统330的结构光,并且当该设备被巢300承载时,将结构光聚焦在微流体设备(例如,光致动的电动力学设备)中的至少第一区域上,以及(2)接收从微流体设备反射和/或发射的光,并将这种反射和/或发射的光的至少一部分聚焦到检测器348上。光具组还可以被构造为接收来自第二光源的非结构光,并且当该设备被巢300承载时,将非结构光聚焦在微流体设备的至少第二区域上。在某些实施方案中,微流体设备的第一和第二区域可以是重叠的区域。例如,第一区域可以是第二区域的子集。在其他实施方案中,第二光源334可以另外地或替代地包括激光,其可以具有任何合适的光波长。图3B中所示的光学系统的表示仅是示意性表示,并且光学系统可以包括另外的滤光器、陷波滤波器、透镜等。当第二

光源334包括用于亮视场和/或荧光激发的一个或多个光源以及激光照明时,光源的物理布置可以与图3B中所示的不同,并且可以在光学系统内的任何合适的物理位置引入激光照明。光源334和光源332/光调制子系统330的示意性位置也可以互换。

[0308] 在图3B中,第一光源332被显示为将光提供给光调制子系统330,其将结构光提供给系统355的显微镜350的光具组(未示出)。第二光源334被显示为经由分束器336将非结构光提供给光具组。来自光调制子系统330的结构光和来自第二光源334的非结构光一起从分束器336通过光具组行进到达第二分束器(或二向色滤光器338,取决于光调制子系统330提供的光),光在此通过物镜336向下反射到样品平面342。然后,从样品平面342反射和/或发射的光向上返回通过物镜340、通过分束器和/或二向色滤光器338,并返回到二向色滤光器346。仅一部分到达二向色滤光器346的光穿过并到达检测器348。

[0309] 在一些实施方案中,第二光源334发射蓝光。利用适当的二向色滤光器346,从样品平面342反射的蓝光能够穿过二向色滤光器346并到达检测器348。相反,来自光调制子系统330的结构光从样品平面342反射,但不穿过二向色滤光器346。在该实例中,二向色滤光器346滤除波长长于495nm的可见光。只有从光调制子系统发射的光不包括短于495nm的任何波长时,对来自光调制子系统330的光的这种滤除才算完成(如图所示)。在实施中,如果来自光调制子系统330的光包括短于495nm的波长(例如,蓝色波长),则来自光调制子系统的一些光会穿过滤光器346到达检测器348。在这样的实施方案中,滤光器346用于改变从第一光源332和第二光源334到达检测器348的光量之间的平衡。如果第一光源332显著强于第二光源334,则这可能是有益的。在其他实施方案中,第二光源334可以发射红光,并且二向色滤光器346可以滤除除了红光之外的可见光(例如,波长短于650nm的可见光)。

[0310] 涂覆溶液和涂覆剂。不希望受理论的限制,当微流体设备的至少一个或多个内表面已经被调节或涂覆以便呈现有机和/或亲水分子层(其提供微流体设备和保持在其中的生物微物体之间的主要界面)时,可以促进微流体设备(例如,DEP构造的和/或EW构造的微流体设备)内的生物微物体(例如,生物细胞)的维持(即,生物微物体在微流体设备内表现出增加的活力、更大的扩增和/或更大的可移植性)。在一些实施方案中,微流体设备的一个或多个内表面(例如,DEP构造的微流体设备的电极活化衬底的内表面、微流体设备的盖和/或管路材料的表面)可以用涂覆溶液和/或涂覆剂处理或修饰,以产生所需的有机和/或亲水分子层。

[0311] 涂层可以在引入生物微物体之前或之后施加,或者可以与生物微物体同时引入。在一些实施方案中,生物微物体可以在包括一种或多种涂覆剂的流体介质中输入到微流体设备中。

在其他实施方案中,在将生物微物体引入到微流体设备中之前,将微流体设备(例如,DEP构造的微流体设备)的内表面用包括涂覆剂的涂覆溶液处理或“装填(primed)”。

[0312] 在一些实施方案中,微流体设备的至少一个表面包括涂覆材料,其提供适合于维持和

/或扩增生物微物体的有机和/或亲水分子层(例如提供如下文所述的经调节的表面)。在一些实施方案中,微流体设备的基本上所有内表面都包括涂覆材料。经涂覆的内表面可以包括流动区域(例如,通道)、室或隔离围栏或其组合的表面。在一些实施方案中,多个隔离围栏中的每一个都具有至少一个涂覆有涂覆材料的内表面。在其他实施方案中,多

个流动区域或通道中的每一个都具有至少一个涂覆有涂覆材料的内表面。在一些实施方案中,多个隔离围栏中的每一个和多个通道中的每一个的至少一个内表面都涂覆有涂覆材料。

[0313] 涂覆剂/溶液。可以使用任何方便的涂覆剂/涂覆溶液,包括但不限于:血清或血清因子、牛血清白蛋白(BSA)、聚合物、洗涤剂、酶及其任何组合。

[0314] 基于聚合物的涂覆材料。至少一个内表面可以包括包含聚合物的涂覆材料。聚合物可以与至少一个表面共价或非共价地结合(或可以非特异性地粘附)。聚合物可以具有多种结构基序,例如嵌段聚合物(和共聚物)、星形聚合物(星形共聚物)和接枝或梳形聚合物(接枝共聚物)中所发现的,所有这些都可以适用于本文公开的方法。

[0315] 聚合物可以包括含有亚烷基醚部分的聚合物。各种各样的含亚烷基醚的聚合物可以适用于本文所述的微流体设备。一类非限制性示例性的含亚烷基醚的聚合物是两性非离子嵌段共聚物,其包括在聚合物链内具有不同比例和位置的聚氧乙烯(PEO)和聚氧丙烯(PPO)子单元的嵌段。Pluronic®聚合物(BASF)是这类嵌段共聚物,并且在本领域中已知适合于在与活细胞接触时使用。聚合物的平均分子量M_w可以为约2000Da至约20KDa。在一些实施方案中,PEO-PPO嵌段共聚物可以具有大于约10(例如,12-18)的亲水-亲油平衡(HLB)。可用于产生经涂覆的表面的Pluronic®聚合物包括Pluronic®L44、L64、P85和F127(包括F127NF)。另一类含亚烷基醚的聚合物是聚乙二醇(PEG M_w<100000Da)或可替代地,聚氧乙烯(PEO,M_w>100000)。在一些实施方案中,PEG可以具有约88Da、100Da、132Da、176Da、200Da、220Da、264Da、308Da、352Da、396Da、440Da、500Da、600Da、700Da、800Da、900Da、1000Da、1500Da、2000Da、5000Da、10000Da或20000Da的M_w,或可以具有落在上述任意两个值所定义的范围内的M_w。

[0316] 在其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有羧酸部分的聚合物。羧酸子单元可以是含有烷基、烯基或芳香性部分的子单元。一个非限制性实例是聚乳酸(PLA)。在其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有磷酸酯部分的聚合物,该磷酸酯部分在聚合物主链的末端处或者从聚合物的主链悬垂。在其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有磺酸部分的聚合物。磺酸子单元可以是含有烷基、烯基或芳香性部分的子单元。一个非限制性实例是聚苯乙烯磺酸(PSSA)或聚茴香脑磺酸。在进一步的实施方案中,涂覆材料可以包括含有胺部分的聚合物。

聚氨基聚合物可以包括天然多胺聚合物或合成的多胺聚合物。天然多胺的实例包括精胺、亚精胺和腐胺。

[0317] 在其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有糖部分的聚合物。在一个非限制性实例中,

诸如黄原胶或葡聚糖的多糖可以适合于形成可以在微流体设备中减少或防止细胞粘附的材料。

例如,大小为约3kDa的葡聚糖聚合物可以用于为微流体设备内的表面提供涂覆材料。

[0318] 在其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有核苷酸部分的聚合物,即核酸,其可以具有核糖核苷酸部分或脱氧核糖核苷酸部分,从而提供聚电解质表面。核酸可以仅含有天然核苷酸部分或者可以含有非天然核苷酸部分,其包括核碱基、核糖或磷酸酯部分类似物,

例如7-脱氮腺嘌呤、戊糖、甲基膦酸酯或硫代磷酸酯部分,但不限于此。

[0319] 在又一些其他实施方案中,涂覆材料可以包括含有氨基酸部分的聚合物。含有氨基酸部分的聚合物可以包括含有天然氨基酸的聚合物或含有非天然氨基酸的聚合物,其均可以包括肽、多肽或蛋白质。在一个非限制性实例中,蛋白质可以是牛血清白蛋白(BSA)和/或包括白蛋白的血清(或多种不同血清的组合)和/或一种或多种作为涂覆剂的其他类似蛋白质。

血清可以来自任何方便的来源,包括但不限于胎牛血清、绵羊血清、山羊血清、马血清等。

在某些实施方案中,BSA在涂覆溶液中存在的浓度为约1mg/mL至约100mg/mL,包括5mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、

80mg/mL、90mg/mL,或更高或介于其间的任何值。在某些实施方案中,血清在涂覆溶液中存在的浓度可以为约20%(v/v)至约50%v/v,包括25%、30%、35%、40%、45%,或更高或介于其间的任何值。在一些实施方案中,BSA可以作为涂覆剂以5mg/mL存在于涂覆溶液中,而在其他实施方案中,BSA可以作为涂覆剂以70mg/mL存在于涂覆溶液中。在某些实施方案中,血清作为涂覆剂以30%存在于涂覆溶液中。在一些实施方案中,可以在涂覆材料内提供细胞外基质(ECM)蛋白质,用于获得优化的细胞粘附以促进细胞生长。可以包括在涂覆材料中的细胞基质蛋白质可以包括但不限于胶原蛋白、弹性蛋白、含RGD的肽(例如纤连蛋白)或层粘连蛋白。在其他实施方案中,可以在微流体设备的涂覆材料内提供生长因子、细胞因子、激素或其他细胞信号传导物质。

[0320] 在一些实施方案中,涂覆材料可以包括含有环氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、糖部分、核苷酸部分或氨基酸部分中超过一种的聚合物。在其他实施方案中,经聚合物调节的表面可以包括超过一种聚合物的混合物,每种聚合物具有环氧烷部分、羧酸部分、磺酸部分、磷酸酯部分、糖部分、核苷酸部分和/或氨基酸部分,其可以独立地或同时地并入到涂覆材料中。

[0321] 此外,在其中共价修饰表面与涂覆剂联合使用的实施方案中,共价修饰表面的阴离子、阳离子和/或两性离子可以与外壳中流体介质(例如涂覆溶液)中存在的非共价涂覆剂(例如溶液中的蛋白质)的带电荷部分形成离子键。

[0322] 适当的涂层处理和修饰的进一步细节可以在2016年4月22日提交的美国专利申请系列号15/135707中找到,其通过引用整体并入。

[0323] 用于在微流体设备的隔离围栏内维持细胞活力的其他系统组件。为了促进细胞群的生长和/或扩增,可以通过系统的另外的组件提供有利于维持功能细胞的环境条件。例如,此类另外的组件可以提供营养物、细胞生长信号传导物质、pH调节、气体交换、温度控制和从细胞中除去废产物。

实施例

一般材料和方法。

[0324] 系统和微流体设备:OptoSelect芯片,一种微流体(或纳流体)设备,其由Berkeley Lights,Inc.制造并被也由Berkeley Lights,Inc.制造的光学仪器控制。该仪器包括:用于芯片的安装台,其耦接到温度控制器;泵和流体介质调节组件;以及包括相机和适合于活化芯片内的光电晶体管的结构光源的光具组。OptoSelect™芯片包括采用提供光电晶体管活

化的OET力的OptoElectroPositioning(OEP™)技术构造的衬底。芯片还包括多个微流体通道,每个微流体通道具有与其流体连接的多个NanoPen™室(或隔离围栏)。每个隔离围栏的体积约为1×10^6立方微米。

[0325] 装填(priming)溶液:含有0.1%Pluronic® F127((Life Technologies® 目录号P6866)的完全生长培养基。

[0326] 准备培养:将具有修饰表面的微流体设备加载至系统上,并用100%二氧化碳在15psi下吹扫5分钟。在二氧化碳吹扫之后,立即将装填溶液以5微升/秒的速度灌注通过微流体设备8分钟。然后使培养基以5微升/秒流过微流体设备5分钟。

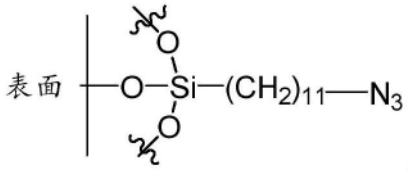
[0327] 装填方案。使250微升100%二氧化碳以12微升/秒的速率流入。接着是250微升含有0.1% Pluronic® F27(LifeTechnologies®目录号P6866)的PBS,以12微升/秒流入。装填的最后步骤包括250微升PBS,以12微升/秒流入。随后引入培养基。

[0328] 灌注方案。灌注方法是以下两种方法之一:

[0329] 1.以0.01微升/秒灌注2小时;以2微升/秒灌注64秒;并重复。

[0330] 2.以0.02微升/秒灌注100秒;停止流动500秒;以2微升/秒的速度灌注64秒;并重复。

[0331] 实施例1.无图案硅晶片的官能化表面的制备。在氧等离子体清洁器(NordsonAsymtek)中使用100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速处理硅晶片(780微米厚,1cm×1cm)5分钟。将在真空反应器中,在硫酸镁七水合物(0.5g,Acros目录号10034-99-8)(作为真空反应器底部的单独箔舟中的水反应物源)的存在下,用在真空反应器底部的箔舟中的(11-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷(300微升)对等离子体处理的硅晶片进行处理。然后使用真空泵将腔室抽至750mTorr,然后密封。将真空反应器置于烘箱中在110℃下加热24-48小时。这为晶片引入了修饰表面,其中修饰表面具有式I的结构:

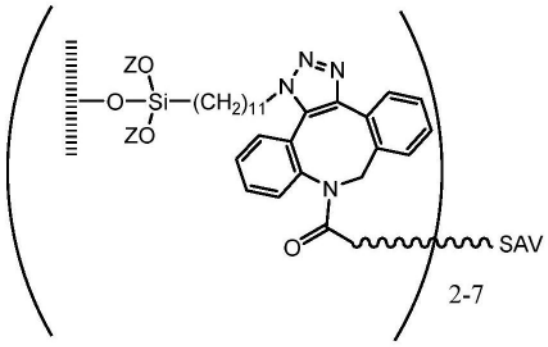


式I。

[0332] 冷却至室温并将氩气引入真空室后,从反应器中取出晶片。晶片用丙酮、异丙醇冲洗,并在氮气流下干燥。通过椭圆偏光法和接触角测角法确定是否引入了修饰表面。

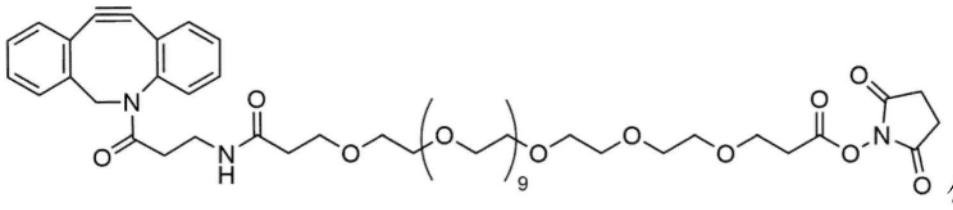
[0333] 或者,在将式I的官能化表面引入其上之前,将硅晶片切成一定尺寸以适合平底孔板的底部,并且同时将多个格式化的硅晶片官能化。

[0334] 实施例2.制备具有链霉亲和素官能化表面的平面无图案的硅晶片。用二苄基环辛炔基(DBCO)链霉亲和素(SAV)(Nanocs,Cat.#SV1-DB-1,其中SAV的每个分子具有2-7DBCO)通过使硅晶片与含有2微摩尔市售DBCO-SAV溶液的水溶液接触来处理来自实施例1的具有如上所述的式I表面的产品硅晶片。使反应在室温下进行至少1小时。然后用1×PBS冲洗具有式II的修饰表面的未图案化的硅晶片。



式 II

[0335] 实施例3.DBCO标记的链霉亲和素(SAV)化合物1的合成:将5mg冻干的SAV(ThermoFisher PN#S888)溶于1mL的1×PBS(Gibco)和1mL的2mM Na_2CO_3(Acros)的1×PBS中。将10mg的纯净DBCO-PEG13-NHS(化合物2,点击化学工具PN#1015-10)溶于0.4mL干燥DMSO中。将16μL的DBCO-PEG13-NHS溶液添加到SAV溶液中,并在EppendorfThermoMixer上于25℃在400RPM下混合4小时。通过使反应混合物通过Zeba尺寸排阻色谱旋转柱(ThermoFisher PN#89882),从DBCO-PEG13-NHS中纯化标记的SAV(化合物1),并且无需进一步纯化即可使用。



化合物 2

[0336] 实施例4.制备具有链霉亲和素官能化表面的平面无图案的硅晶片。用化合物1(DBCO连接的链霉亲和素(SAV)、具有PEG13接头的实施例3的产物,其中对于SAV的每个分子具有2-7DBCO)通过使硅片与含有2微摩尔化合物1的水溶液接触来处理来自实施例1的具有如上所述的式I的表面的产物硅晶片。使反应在室温下进行至少1小时。然后用1×PBS冲洗具有包括PEG 13接头的链霉亲和素共价官能化表面的无图案硅晶片。

[0337] 实施例5.使用市售DBCO连接SAV对硅晶片进行官能化与使用化合物1进行官能化的比较。在引入反应性叠氮化物部分(实施例1);引入各自的SAV层;然后引入生物素化的抗CD28的每个步骤之后,通过椭圆偏光法和接触角测角法比较SAV修饰表面,其中试剂浓度和反应条件相同。显然,使用具有包括PEG13部分的接头的DBCO SAV试剂的样品2提供了比样品1更稳健的SAV官能化,随后,通过生物素化的抗CD2结合至SAV结合位点,获得更稳健的官能化。

样品	叠氮化物层的厚度(埃)	DBCO SAV偶联后的总厚度(埃)	抗CD28结合后的总厚度(埃)	引入的SAV层的厚度(埃)	引入的抗CD28层的厚度(埃)
来自实施例2的晶片1	13.31	25.22	28.54	11.91	3.32
来自实施例4的晶片2	13.43	45.08	62.37	31.65	17.29

[0338] 不受理论的束缚,已显示具有至少5个PEG重复单元,至多约20个PEG重复单元的长度的接头(或者,长度为约20埃至约100埃的接头)可提供与硅晶片的该反应性表面上的反应性部分的优异偶联水平。样品晶片2中引入的抗CD28层的额外厚度进一步证明了这一点,

因为可以获得更多的SAV结合位点。

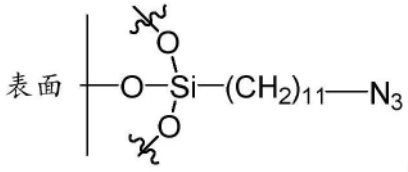
[0339] 实施例6.制备平面图案化的表面,并进一步精加工以在由没有活化官能化的区分区域相分隔开的多个区域内提供抗原呈递表面。氧化铟锡(ITO)晶片被制造为在ITO上具有多个非晶硅的图案化区域。这些区域是a.)直径1微米的圆形非晶硅区域,彼此间隔3微米,或b.)2微米正方形的非晶硅区域,彼此间隔2微米。图6示出了每种类型的图案化表面的部分的SEM图像。

[0340] 在官能化之前,通过在丙酮中超声处理10分钟来清洗图案化的晶片,用去离子水冲洗并干燥(图6的步骤1)。然后,使用100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速,在氧气等离子体清洁器(Nordson Asymtek)中将图案化的晶片处理5分钟。

[0341] 官能化过程的示意图如图6所示。ITO表面的初始共价修饰。通过与在50%N-甲基吡咯烷(NMP)/水溶液中的40mM十一炔基膦酸(Sikemia目录号SIK7110-10)反应来使晶片的氧化铟锡基底层官能化(图6的步骤2)。将晶片的清洁表面浸入小瓶中的溶液并密封。将小瓶在50℃水浴中保持过夜。次日,取出晶片并用50%异丙醇/水洗涤,然后用异丙醇洗涤。

[0342] A.图案化表面的ITO区域的生物素化。通过与1.5mM的连接到叠氮基反应性部分的生物素(叠氮化物S-S-生物素,Broadpharm目录编号BP-2877)、0.5mM的抗坏血酸钠;和水中的1mM Cu(II)SO_4/THPTA反应进一步对炔烃官能化的ITO区进行共价修饰(图6的步骤3)。在与含二硫键的生物素试剂接触之前,要小心地将铜配体和抗坏血酸钠预混合。使表面与生物素试剂溶液保持接触一小时。然后用水洗涤晶片的表面,并干燥,为下一步做准备。

[0343] B.图案化晶片的多个非晶硅区域的表面的共价修饰。在真空反应器中,在硫酸镁七水合物(0.5g,Acros Cat.#10034-99-8)(作为真空反应器底部的单独箔舟中的水反应物源)存在下,用位于真空反应器底部的箔舟中的(11-叠氮基)三甲氧基硅烷(化合物3,300微升)处理在晶片的ITO区域内具有生物素化表面的图案化晶片(图6的步骤4)。然后使用真空泵将腔室抽至750mTorr,然后密封。将真空反应器放置在加热至110℃的烘箱中过夜。这将修饰表面引入了晶片上的多个非晶硅区域,其中该修饰表面具有式I的结构:



式I。

[0344] 冷却至室温并将氩气引入真空室后,从反应器中取出晶片。晶片用丙酮、异丙醇冲洗,

并在氮气流下干燥。计量学表明,图案化晶片的生物素化ITO区域对式I的官能化配体没有实质性的污染;发现10%或更少的污染物。

[0345] C.对图案化晶片的生物素修饰ITO区域进行共价修饰以提供支持部分。使具有多个被生物素修饰ITO区域相分隔开的十一烷基叠氮基修饰的非晶硅区域的图案化晶片与链霉亲和素(SAV,3.84微摩尔)在含有0.02%叠氮化钠的PBS中的溶液反应,并温育30分钟(图6的步骤5)。然后将晶片用PBS洗涤并干燥。

[0346] 然后通过与200微摩尔生物素-RGD(Anaspec Catalog#AS-62347)在含0.02%叠氮化钠的PBS中的溶液反应来修饰图案化晶片的ITO区域的链霉亲和素修饰表面,从而提供了用于在这些表面上培养时总体上提高T淋巴细胞活力的粘合部分(图6的步骤6)。温育45分

钟后,将晶片用PBS冲洗,然后干燥。

[0347] 进一步一般化。或者,可以通过与200微摩尔生物素-PEG-5K溶液(Jenkem目录号M-BIOTIN-5000)反应来修饰图案化晶片的ITO区域的链霉亲和素修饰表面,以在图案化表面的该非活化区域内提供亲水部分。此外,通过使链霉亲和素表面与200微摩尔生物素化部分的储备溶液的混合物以任何比例,例如1:1;1:10;10:1或上述之间的任何比例进行反应,可以用粘合剂和亲水性部分的混合物来修饰链霉亲和素表面。

[0348] D.向图案化晶片的多个叠氮基官能化非晶硅区域提供第二官能化表面。使DBCO-SAV(Nanocs目录号SV1-DB-1,2微摩尔)在含有0.02%叠氮化钠的PBS中的溶液与具有被其上共价连接有支撑部分(例如,粘性基序诸如RGD或亲水部分诸如PEG-5K)的ITO区域相分隔开的多个叠氮基官能化非晶硅区域的图案化晶片接触,温育30分钟,提供被支持性修饰ITO表面区域相分隔开多个具有链霉亲和素官能化表面的非晶区域(图6的步骤7)。将图案化晶片保持在PBS/0.02%叠氮化钠中,直到最终引入抗原活化配体。

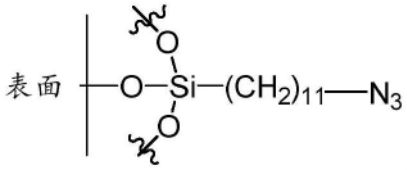
[0349] E.图案化晶片的非晶硅区域的链霉亲和素修饰表面的官能化(图6的步骤8)。与实施例12类似地进行逐步官能化,首先将图案化表面暴露于溶液中的生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01MART-1(MBL International Corp.,目录号MR01008,ELAGIGILTV))中,并温育45分钟。在用洗涤缓冲液冲洗具有多个MHC修饰非晶硅区域的图案化晶片后,然后将图案化晶片与生物素化抗CD28(Miltenyi Biotec,目录号130-100-144)溶液接触并温育30-45分钟,以提供多个被图案化晶片的支持性修饰ITO区域分隔开的pMHC/抗CD28区域。

[0350] 实施例7.使用含有多个连接有pMHC和抗CD28的区域的图案化表面活化CD8+T淋巴细胞,所述图案化表面与无图案的表面相比被连接有支持性部分的区域分隔开。将实施例6的产品图案化晶片的尺寸适宜于放置在48孔板的孔的底部内。使用了两个不同的图案化表面,第一个具有直径为1微米的圆形区域,如图7A所示,第二个具有每边2微米的正方形区域,如图7B所示。在第三48孔板的第三孔中使用无图案的平面第三表面,其具有相同水平的MHC肽修饰和抗CD28的随机分布。仅将一种水平的抗CD28抗体加载至平坦表面上。将如实施例12(下文)所述获得的初始T淋巴细胞置于孔板的孔内,并与图案化或无图案的晶片接触。刺激方案和培养方案分别按照实施例12进行1-7天。流式细胞仪分析表明初始T淋巴细胞的活化。如图8A-8D所示的流式细胞术结果表明,三种表面中的每一种都可以活化T淋巴细胞。对于这三种活化条件,图8A-D中所示的图形表征表明获得了表型特异性。图8A示出了针对1微米活化岛图案、2微米活化岛图案和无图案的晶片表面中的每一个在产物细胞群中发现的抗原特异性(MART1)T细胞的百分比。图8B显示了在每种表面类型的每个所得细胞群中发现的MART 1抗原特异性T细胞的总数。图8C显示了每种表面类型的MART 1抗原特异性T细胞的倍数扩增。图8D显示了每种表面类型在抗原特异性T细胞群中表达$CD28^{hig}$的抗原特异性T细胞的百分比。图案化的表面显示出可再现性和可控制性更高的扩展量、表型和实际细胞数量。较小的1微米区域可以更有效地模仿所呈递的抗原、MHC分子和抗CD 28的天然优选排列方式。参见图9。

[0351] 在第一刺激期完成后,在孔板的同一孔内对所得的T细胞在第7-14日进行再刺激,并可选地在第14-21日进行再刺激,添加上述细胞因子。或者,可在第7天和/或第14天,将所得的T淋巴细胞移至具有新鲜的图案化晶片的新孔中,并继续实施例12的方案。在所需的刺激重复结束时,可以对一部分细胞进行染色并通过流式细胞术进行检查,以确定活化的程

度。期望图案化的表面晶片刺激T细胞活化,就像基于珠子的活化或抗原呈递树突状细胞的活化一样容易。

[0352] 实施例8.具有式I的修饰内表面的微流体设备的制备。将如上文一般实验部分所述的在相对壁上具有第一硅电极活化衬底和第二ITO衬底以及分隔所述两个衬底的光图案化的硅氧烷微流体管路材料的微流体设备(Berkeley Lights,Inc.)在氧等离子体清洁器(Nordson Asymtek)中使用100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速处理1分钟。在真空反应器中,在硫酸镁七水合物(0.5g,Acros)(作为在真空反应器底部的单独箔舟中的水反应物源)的存在下,用在真空反应器底部的箔舟中的3-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷(300微升)对等离子体处理的微流体设备进行处理。然后使用真空泵将腔室抽至750mTorr,然后密封。将真空反应器置于烘箱中在110℃下加热24-48小时。这向微流体设备引入了修饰表面,其中修饰表面具有式I的结构:



式I。

[0353] 冷却至室温并将氩气引入真空室后,将微流体设备从反应器中移出。用至少250微升的去离子水冲洗具有官能化表面的微流体设备,并以备进一步使用。

[0354] 实施例9.在微流体设备内引入T细胞活化表面。

[0355] A.将OptoSelect微流体设备的内表面共价修饰以包括如实施例8所述的叠氮基部分(式I)。为了用链霉亲和素使表面官能化,首先用100%的二氧化碳反复冲洗OptoSelect微流体设备,然后加载浓度为约0.5至约2微摩尔的DBCO-链霉亲和素溶液,如实施例4所述。温育15-30分钟,在此期间DBCO和叠氮化物基团偶联,之后用1×PBS反复洗涤OptoSelect微流体设备以冲洗未结合的DBCO修饰的链霉亲和素。

[0356] 然后用生物素化的pMHC和生物素化的抗CD28、生物素化的抗CD2或其任意组合进一步修饰该链霉亲和素表面。这些分子以约1至10微克/mL的浓度悬浮在含2%牛血清白蛋白的PBS中,pMHC分子与抗CD28/抗CD2的比例为约2:1至约1:2。灌注该溶液通过具有链霉亲和素官能化表面的OptoSelect微流体设备,以促进与表面的缀合。温育一小时后,在加载细胞之前,先用PBS或培养基冲洗OptoSelect微流体设备。

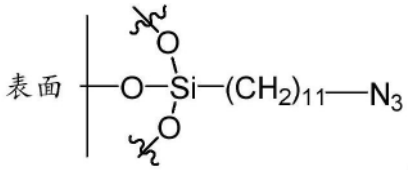
[0357] B.或者,在与OptoSelect微流体设备的叠氮基修饰表面反应之前,感兴趣的生物分子通过生物分子的生物素修饰缀合到链霉亲和素上。DBCO-链霉亲和素和生物素化的生物分子分别在PBS溶液中以0.5至2微摩尔的浓度制备,然后按任何所需的比例混合,如下所述。在使生物素化的生物分子与链霉亲和素缀合至少15分钟后,该复合物用于修饰如上所述的叠氮基修饰的OptoSelect微流体设备的表面。

[0358] 可以将细胞导入具有至少一个抗原呈递内表面的微流体设备中,并在培养期间被活化,类似于用实施例19的抗原呈递珠子活化T细胞所描述的。

[0359] 实施例10.二氧化硅珠子的共价修饰和官能化。

[0360] 10A.具有与链霉亲和素连接的共价PEG 3二硫键生物素的二氧化硅珠子。将球形二氧化硅珠子(2.5微米,G Biosciences目录号786-915,具有基本简单的球形体积,例如,珠子的表面积在与通过关系式$4\pi r^2$所估算的相差不超过+/-10%的范围内)分散在异丙醇

中,然后干燥。将干燥的珠子在氧气等离子清洁器(Nordson Asymtek)中以100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速处理5分钟。在真空反应器中,在硫酸镁七水合物(0.5g,Acros目录号#10034-99)(在真空反应器底部的单独箔舟中用作水反应物源)的存在下,在真空反应器底部的箔舟中用(11-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷(300微升)处理经清洁的珠子。然后使用真空泵将腔室抽至750mTorr,然后密封。将真空反应器置于烘箱中在110℃下加热24-48小时。这将共价修饰表面引入到珠子中,其中该修饰表面具有式I的叠氮化物官能化结构:



式I。

[0361] 冷却至室温并将氩气引入真空室后,将共价修饰珠子从反应器中移出。用丙酮、异丙醇冲洗具有被叠氮化物反应性部分官能化的共价修饰表面的珠子,并在氮气流下干燥。将共价修饰的叠氮化物官能化珠子以1mg/20微升的浓度分散在5.7mM的二苄基环辛炔基(DBCO)S-S生物素修饰的PEG3的DMSO溶液中(Broadpharm,Cat.#BP-22453),然后在热混合器中以90℃/2000RPM温育18小时。将生物素修饰的珠子分别在过量的DMSO中洗涤3次,然后用PBS冲洗。将PBS中的生物素修饰的珠子分散在含有约30微摩尔/700微升浓度的链霉亲和素的PBS溶液中。将反应混合物在热混合器中以30℃/2000RPM振摇30分钟。在反应阶段完成时,将呈递链霉亲和素的共价修饰珠子用过量的PBS洗涤3次。FTIR分析确定SAV已添加到表面(数据未显示)。如果可能需要从表面切割,则含二硫化物的接头可能特别有用。二硫键接头易于被二硫苏糖醇以与T淋巴细胞活力相容的浓度切割(数据未显示)。

[0362] 10B.具有与链霉亲和素连接的共价PEG4生物素的二氧化硅珠子,用PEG5-羧酸表面封闭分子配体稀释。如上文实施例10A中所制备,将具有被式1的叠氮化物反应性部分官能化的共价修饰表面的珠子用丙酮、异丙醇冲洗,并在氮气流下干燥。将共价修饰的叠氮化物官能化珠子以1mg/10微升的浓度分散在0.6mM二苄基环辛炔(DBCO)修饰的PEG4-生物素(Broadpharm,Cat.#BP-22295)、5.4mM二苄基环辛炔(DBCO)修饰的PEG5-羧酸(Broadpharm,Cat.#BP-22449)和100mM碘化钠的DMSO溶液中,然后在热混合器中以30℃/1000RPM温育18小时。将生物素修饰的珠子分别在过量的DMSO中洗涤3次,然后用PBS冲洗。将PBS中的生物素修饰的珠子分散在含有约10纳摩尔/1毫升浓度的链霉亲和素的PBS溶液中。将反应混合物在热混合器中以30℃/1000RPM振摇30分钟。在反应阶段完成时,将呈递链霉亲和素的共价修饰珠子用过量的PBS洗涤3次。FTIR分析确定SAV已添加到表面(数据未显示)。

[0363] 实施例11.制备聚合物珠子的抗原呈递表面。将链霉亲和素官能化(共价偶联的)的褶皱球形聚合物珠子(例如,珠子的实际表面积与关系表面积=$4\pi r^2$+/-相差不大于10%,DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D,6.67e8个/mL的珠子储备液))输送(15微升;1e7个珠子)至带有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244毫升);EDTA(1mL,最终浓度2mM);和BSA(5mL的5%,最终浓度为0.1%))的1.5mL微量离心管中,并使用磁力DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0364] 将含有1.5微克生物素化单体MHC(HLA-A*02:01MART-1(MBL International

Corp.,目录号MR01008,ELAGIGILTV)的洗涤缓冲液(600微升)分配到微量离心管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将该管脉冲离心并除去上清液,并将该管置于磁力架内以除去更多的上清液而不除去珠子。

[0365] 将生物素化的抗CD28(Miltenyi Biotec,目录号130-100-144,22.5微升)在600微升洗涤缓冲液中的溶液添加到微量离心管中。通过上下吸移将珠子重悬。将珠子在4℃下温育30分钟,再次上下吸移以重悬15分钟。在温育期结束时,将管短暂脉冲离心。将其放回磁力架中并使其分离1分钟后,将缓冲液从官能化的珠子中吸出。将呈递MHC单体/抗CD28抗原的珠子重悬于100微升缓冲液中,保存在4℃,无需进一步操作即可使用。1e7个的直径为2.80微米的官能化DynaBeads具有约为24e6平方微米的标称(理想的球形预测表面积)表面积可用于与T淋巴细胞接触。但是,这类聚合珠子的皱褶(其并不一定能够被T淋巴细胞接触到)也可以在此方法中进行官能化。总配体数可能无法反映可用于接触和活化T淋巴细胞的物质。

[0366] 通过用AlexaFluor488缀合的兔抗小鼠IgG(H+L)交叉吸附的二抗(Invitrogen目录号A-11059)和APC缀合的抗HLA-A2抗体(Biolegend目录号343307)染色来对MHC单体/抗CD28抗原呈递珠子进行表征,并通过流式细胞术进行表征。

[0367] 实施例12.与通过树突状细胞活化CD8+T淋巴细胞相比,通过抗原呈递珠子活化CD8+T淋巴细胞。

[0368] 细胞:按照EasySep ™人CD8阳性选择试剂盒II(EasySep ™Human CD8 Positive Selection Kit II,来自StemCell Technologies Canada Inc.的商购获得的试剂盒,目录号17953)的生产商说明,通过阴性选择,从商购获得的PBMC中将CD8+T淋巴细胞在包括RPMI加10%胎牛血清(FBS)的培养基中进行富集。

[0369] 树突状细胞:由自体PBMC产生。将自体PBMC(10-50e6)解冻到10mL的包括10%FBS的预热RPMI培养基中。通过以400×g离心5分钟沉淀细胞。将细胞重悬于RPMI中并计数。

[0370] 根据制造商的说明书,使用阴性珠子分离(EasySep™人单核细胞分离试剂盒(EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit),StemCell Technologies,目录号19359)就单核细胞对细胞进行富集。计数得到的单核细胞,提供约5%的产率,然后以每孔每3mL每1.5-3e6个细胞铺板在包含17ng/mL IL-4和53ng/mL人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF,ThermoFisher Catalog#PHC2013))的AIM-V®培养基(ThermoFisher Catalog#12055091)中。将细胞在37℃下温育总共6天。在第2天和第4天,将100微升补料培养基(AIM-V®培养基加IL-4(167U/mL)和GM-CSF(540ng/mL))添加到每个孔中,并继续温育。

[0371] 在第6天,将0.5mL成熟混合物(maturation cocktail)加到每个孔中。成熟混合物包括在AIM-V®培养基中的10ng/mL TNF-α;2ng/mL IL-1B;1000U/mL IL-6、1000ng/mL PGE2;167U/mL IL-4和267U/mL GM-CSF。将细胞在37℃下再温育24小时。然后从成熟培养基中收集成熟的DC,进行计数,并以备进一步使用。通过针对CD3(BD目录号344828)、DC-SIGN(CD209,Biolegend目录号330104)、CD14(Biolegend目录号325608)、CD86(BD目录号560359)、Fc块(BioLegend目录号422302)和活力(BD目录号565388)进行染色;悬浮在FACS缓冲液中;并通过FACS流式细胞仪检查来表征DC。

[0372] 如下制备抗原呈递树突状细胞:在1%的HSA中以2e6个/mL的浓度进行铺板,并用抗原(MART1肽,Anaspec,定制合成,40微克/毫升)和β2-微球蛋白(Sigma Aldrich产品目录

号M4890,3微克/毫升)进行脉冲,然后搅拌培养4小时。在使用前,将脉冲的DC在Faxitron CellRad®X射线细胞辐照器中辐照30分钟,目标剂量为50grey。

[0373] 用于添加试剂的培养基和稀释剂:高级RPMI(ThermoFisher目录号12633020,500mL);1×GlutaMAX(ThermoFisher目录号35050079,5mL);10%人AB血清(zen-bio,目录号HSER-ABP 100mL,50mL);和50nMβ-巯基乙醇(ThermoFisher目录编号31350010,50nm储备液,0.5mL,最终浓度50微摩尔)。

[0374] 实验设置:对于每种活化物质,使用单个96孔组织培养处理的板(VWR目录号10062-902)(孔板1(DC);孔板2(抗原呈递珠子))。将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到每个孔中。

[0375] 在孔板1的每个孔中,以5e3个添加脉冲DC,产生比例为1:40的DC:CD8+T淋巴细胞。

[0376] 将如实施例11中制备的抗原呈递表面聚合物珠子(2e5个),其呈递包括MART1的pMHC和抗CD28抗体,添加到孔板2中的每个孔中。将pMHC以1.5微克/1e7个珠子进行加载。将抗CD 28抗体以三种不同的水平上样至珠子上:0.25微克/1e7个珠子;0.75微克/1e7个珠子;和2.25微克/1e7个珠子。

[0377] 每个孔板在37℃下培养。在第0天,将CTL培养基中的IL-21(150ng/毫升)加入孔板1和2的每个孔中,使每个孔中的终浓度为30ng/mL。在第2天,将IL21添加至孔板的每个孔中,至终浓度为30ng/mL。培养持续到第7天。

[0378] 第七日。将每个孔板的孔的子集分别针对MHC四聚体(Tetramer PE,MBL目录号T02000,1微升/孔)、CD4(Biolegend目录号300530,0.5微升/孔);CD8(Biolegend目录号301048,0.5微升/孔);CD28(Biolegend目录号302906,0.31微升/孔);CD45RO(Biolegend目录号304210,0.63微升/孔);CCR7(CD197,Biolegend目录号353208,0.5微升/孔);和活力(BD目录号565388,0.125微升/孔)进行染色。将每个孔用150微升FACS缓冲液和10微升Countbright™珠子(ThermoFisher目录号C36950)重悬。在FACSCelesta™流式细胞仪(BD Biosciences)上进行FACS分析。图10显示了用于CD8/MART1表型的流式细胞术分析的zebra图。对于zebra图的每行(1010、1020、1030和1040),左侧图是代表性的阴性孔,右侧图是代表性的阳性孔。第1010行是来自DC刺激孔板的孔。第1020、1030和1040行显示了抗原呈递珠子刺激孔板的结果。第1020行显示了抗CD28抗体加载量为0.25微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7个珠子的结果。第1030行显示了抗CD28抗体加载量为0.75微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7个珠子的结果。第1040行显示了抗CD28抗体加载量为2.25微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7个珠子的结果。可以看出,当改变抗CD28抗体的水平时,抗原呈递珠子以剂量/应答方式启动活化,并且加载有MART1的MHC肽足以与抗CD28加载相结合以活化T淋巴细胞,类似于DC。

[0379] 第七日。重新刺激。将脉冲DC或抗原呈递珠子的第二等分试样分别递送至孔板1和孔板2中的每个占用孔中。将IL21添加至孔板的每个孔中至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0380] 第八日。在孔板1和孔板2的每个孔中分别添加50微升的IL-2(50IU/mL)和IL-7(25ng/mL),以分别提供10IU/mL和5ng/mL的终浓度。继续培养。

[0381] 第九日。向孔板1和孔板2的每个占用的孔中加入50微升的IL-21(150ng/mL),至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0382] 第14日。按照所描述的第7天的分析,对每个孔板的孔的第二子集分别进行染色,

并进行FACS分选。流式细胞术结果显示在图11中。对于第1110、1120、1130、1140行中每一行具有代表性的较低阳性孔(每行的左侧图)和高度阳性孔(每行的右侧图)。第1110行示出了由DC活化产生的活化量。如针对第7日的结果所述,第1120、1130和1140行代表抗CD 28数量增加的结果。第1120行显示了抗CD28抗体加载量为0.25微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7个珠子的结果。第1130行显示了抗CD28抗体加载量为0.75微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7个珠子的结果。第1140行显示了抗CD28抗体加载量为2.25微克/1e7个珠子和pMHC为1.5微克/1e7子珠的结果。值得注意的是,对于具有增加数量的共刺激配体的抗原呈递珠子,没有不含有抗原特异性T细胞的孔。特别是在0.75微克和2.25微克的CD28抗体加载水平(第1130和1140行)下,抗原特异性T细胞的数量比DC脉冲孔(第1110行)多得多。

[0383] 图12显示了来自这些实验的表格结果。第1210行示出了在第7日的T细胞活化特性的图形表示。第1220行示出了在第14日的T细胞活化特性的图形表示。在每行中从左到右,y轴代表抗原特异性T细胞的百分比;抗原特异性T细胞总数;抗原特异性T细胞倍数扩增;

抗原特异性T细胞群中CD28高表达细胞的百分率。每个图的x轴显示DC、0.25微克CD28加载的珠子、0.75微克CD28加载的珠子和2.25微克CD28加载的珠子中的每一个的数据集。抗原呈递珠子刺激活化最初看起来要比DC刺激更慢,但到第二个培养期结束时产量达到相同水平。表型结果显示使用抗原呈递珠子的活化具有良好的特异性。图12显示了与DC刺激的实施例相比,在所述抗原呈递珠子引发的实施例中等效水平的MART 1活化T淋巴细胞。但是,使用树突状细胞作为活化物质,在14天后,有些孔没有活化T淋巴细胞。因此,与树突状细胞相比,抗原呈递珠子的活化提供了可控性和可再现性更高的活化。

[0384] 第三培养期。在另一个实验中,如前几段所述,使用了珠子上的抗原呈递表面,但未与DC进行比较,进行了第三期的刺激和培养。从第14天到第21天,在继续进行培养条件直至第21天的过程中,如同以上针对第7天至第14天所述进行了重新刺激和加料。在第21天,按照针对第7天的分析所描述的,对每个孔板的孔的最后一个子集分别进行染色,并进行FACS分选。对于延长的第三刺激顺序(sequence),观察到另外的活化(数据未显示)。

[0385] 实施例13.制备共价官能化的玻璃珠子。将二氧化硅珠子(2.5微米,Gbiosciences目录号786-915,具有基本简单的球形表面,例如,珠子的表面积在与由关系式$4\pi r^2$/-预测的相差不超过+/-10%范围内)分散在异丙醇中,然后干燥。将干燥的珠子在氧气等离子清洁器(Nordson Asymtek)中以100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速处理5分钟。在真空反应器中,在硫酸镁七水合物(0.5g,Acros目录号10034-99-8)(作为真空反应器底部的单独箔舟中的水反应物源)的存在下,用在真空反应器底部的箔舟中的(11-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷(300微升)处理经清洁的珠子。然后使用真空泵将腔室抽至750mTorr,然后密封。将真空反应器置于烘箱中在110℃下加热24-48小时。这将呈递反应性叠氮化物部分的共价连接表面引入到珠子上,其中修饰表面具有式I的结构。

[0386] 冷却至室温并将氩气引入真空室后,从反应器中移出呈递中间体反应性叠氮化物的珠子,并用丙酮、异丙醇冲洗,并在氮气流下干燥。将呈递叠氮化物的反应性珠子(50mg)分散在500微升DMSO中,并进行剧烈涡旋/简短超声处理。将珠子沉淀,并从珠子中吸出450微升DMSO。将剩余的50微升DMSO中的小团块剧烈涡旋以分散。加入如实施例3中合成的具有PEG13接头的DBCO-SAV(52微升,浓度为10微摩尔,化合物1)。通过尖端混合将珠子分散,然

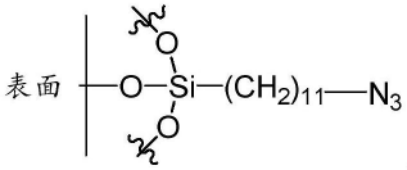
后涡旋。加入398微升含0.02％叠氮化钠溶液的PBS,然后进一步涡旋。

将反应混合物在热混合器上在30℃,1000RPM下温育过夜。

[0387] 16小时后,将10微升83.7mM DBCO-PEG5-酸添加到每个样品中,并在30℃/1000RPM下再温育30分钟。将小珠在PBS/叠氮化物中洗涤3次,然后悬浮于500微升的PBS/叠氮化物中。

[0388] 如下文实施例18所述,修饰这些共价官能化珠子以引入主活化分子和共活化分子。

[0389] 实施例14.共价官能化的聚苯乙烯珠子的制备。将二乙烯基苯交联的聚苯乙烯珠子(14-20微米,Cosphere目录号786-915)分散在异丙醇中,然后在玻璃培养皿中干燥。将干燥的珠子在氧气等离子清洁器(Nordson Asymtek)中使用100W功率、240mTorr压力和440sccm氧气流速处理40秒。在真空烘箱中,在硫酸镁七水合物(1g,Acros目录号10034-99-8)(作为烘箱中相同架子上的单独箔舟中的水反应物源)的存在下,用在烘箱中架子上的箔舟中的(11-叠氮基十一烷基)三甲氧基硅烷(化合物5,900微升)处理经清洁的珠子。然后使用真空泵将烘箱抽至250mTorr,然后密封。将烘箱在110℃下加热18-24小时。这将共价修饰表面引入到珠子中,其中该修饰表面具有式I的结构:



式I。

[0390] 在烘箱中抽气3次后,将共价修饰珠子从烘箱中取出并冷却。将共价修饰的叠氮化物官能化的珠子以15mg/50微升的浓度分散在DMSO中。向其中加入浓度为9.9微摩尔的450微升DBCO标记的链霉亲和素(SAV)(化合物1)溶液。然后将该溶液在热混合器中在30℃/1000RPM下温育18小时。将SAV修饰的珠子在PBS中洗涤3次。FTIR分析确定SAV已添加至表面,如图13所示。

[0391] 图13显示了在共价官能化表面形成时官能化珠子的叠加FTIR迹线。迹线1310显示了聚苯乙烯珠子的原始未官能化表面。迹线1320显示了在引入叠氮化物官能化表面(具有式I的结构)之后的表面的FTIR。迹线1330显示了在将共价连接的PEG13-链霉亲和素表面引入聚苯乙烯珠子后,表面的FTIR。迹线1320和1330显示了与逐步合成中每组化学物质的引入相一致的FTIR吸收带的引入。

[0392] 实施例15.用抗CD28和抗CD2制备珠子的抗原呈递表面。将链霉亲和素官能化的(共价偶联的)DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D),6.67e8个/mL的珠子储备液,(如前所述)褶皱的聚合物珠子输送(15微升;1e7个珠子)到盛有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244mL);EDTA(1mL,终浓度2mM);和BSA(5mL的5％,终浓度为0.1％)的1.5mL微量离心管中,并使用磁性DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0393] 将含有0.5微克生物素化单体MHC(HLA-A*02:01MART-1(MBL International Corp.,目录号MR01008,ELAGIGILTV)的洗涤缓冲液(600微升)分配到微量离心管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将该管脉冲离心并除去上清液,并将该管置于磁力架内以除去更多的上清液而不除去珠子。

[0394] 将生物素化的抗CD28(Biolegend,目录号302904)和生物素化的抗CD2(Biolegend,目录号300204)在600微升洗涤缓冲液中的溶液添加到微量离心管中。溶液中总共含有3微克的抗体。该溶液包括:3微克抗CD28和0微克抗CD2、2.25微克抗CD28和0.75微克抗CD2、1.5微克抗CD28和1.5微克抗CD2、0.75微克抗CD28和2.25微克抗CD2,或0微克抗CD28和3微克抗CD2。通过上下吸移将珠子重悬。将珠子在4℃下温育30分钟,再次上下吸移以重悬15分钟。在温育期结束时,将管短暂脉冲离心。将其放回磁力架中并使其分离1分钟后,将缓冲液从官能化的珠子中吸出。将呈递MHC单体/抗CD28抗原的珠子重悬于100微升缓冲洗涤液中,保存在4℃,无需进一步操作即可使用。1e7个的直径为2.80微米的官能化DynaBeads具有约为24e6平方微米的标称表面积可用于与T淋巴细胞接触,但是如上所述,这些褶皱的球形珠子的实际表面积比标称表面积大10%以上。

[0395] 实施例16.共价官能化的聚合物珠子的制备。制备中间反应性合成表面。在制造过程的第一步中,将M-450环氧官能化顺磁褶皱聚合物珠子(DynaBeads™,ThermoFisher目录号14011(褶皱具有与上述相同的含义))与叠氮化四丁基铵反应,以制备呈递叠氮化物反应性部分的聚合物珠子,该叠氮化物反应性部分能够与具有点击化学相容反应性基团的官能化试剂反应。

[0396] 实施例17.制备珠子的共价官能化合成表面。然后将实施例16的叠氮化物制备的褶皱珠子与二苯并环辛炔基(DBCO)偶联的链霉亲和素反应,以将链霉亲和素共价附接至聚合物珠子上。通过使链霉亲和素与胺反应性DBCO-聚乙二醇(PEG)13-NHS酯反应生成DBCO-链霉亲和素试剂,提供每个链霉亲和素单元一个以上的连接位点。

[0397] 与表面封闭分子的进一步反应。随后可以用DBCO官能化的表面封闭分子处理来自实施例17的所得呈递链霉亲和素官能团的共价官能化聚合物珠子,以使其与聚合物珠子上的任何剩余的叠氮化物反应性部分反应。在一些情况下,DBCO官能化的表面封闭分子可以包括PEG分子。在一些情况下,DBCO PEG分子可以是DBCO PEG5-羧酸。包括其他PEG或PEG-羧酸表面封闭分子的链霉亲和素官能化聚合物珠子具有出色的物理性能,表明在水性环境中的分散性得到改善。另外,剩余叠氮化物部分的表面封闭防止了在此或随后的制备步骤或活化步骤中存在的其他不相关/不想要的组分也共价结合至聚合物珠子。最后,引入表面封闭分子配体可以防止存在于T淋巴细胞上的表面分子与反应性叠氮化物官能团接触。

[0398] 进一步一般化。可能希望用含DBCO的配体分子的混合物修饰实施例16的叠氮化物官能化表面。例如,可以将DBCO-聚乙二醇(PEG)13-链霉亲和素(如实施例3中制备的化合物1)以各种比例与DBCO-PEG5-COOH(表面封闭分子)混合,然后与叠氮化物官能化的珠子接触。在某些情况下,DBCO-链霉亲和素分子与DBCO-PEG5-COOH的比例可能约为1:9;约1:6,约1:4或约1:3。不希望被理论所束缚,表面封闭分子配体防止了链霉亲和素分子过度加载到珠子的表面,并通过提供额外的亲水性进一步提供了增强的物理化学行为。表面封闭分子不限于PEG5-COOH,而可以是本文所述的任何合适的表面封闭分子。

[0399] 实施例18.制备共价修饰的抗原呈递珠子。肽-HLA和单克隆抗体共活化分子的缀合。

[0400] 材料:A.带有抗原的主要组织相容性复合体(MHC)I分子。生物素化的肽-人类白细胞抗原复合物(pMHC)可从MBL,Immunitrack或Biolegend商购获得。生物素化的肽-HLA复合物包括非共价结合至I类HLA分子的肽结合槽的抗原性肽,该抗原性肽在制造商处生产并折

叠成HLA复合物。生物素化的肽-HLA复合物也非共价结合至Beta2-微球蛋白。该复合物在通过BirA酶在HLA的C端肽序列上的识别位置处引入的赖氨酸残基的侧链胺上被共价生物素化,这也由制造商进行。

[0401] B.共活化分子。生物素化抗体用于共刺激,并是由鼠杂交瘤培养物的上清液所产生。通过赖氨酸侧链的多种胺官能团将抗体与生物素缀合,赖氨酸侧链随机提供在抗体表面上。生物素化抗体是可商购的(Biolegend、Miltenyi或Thermo Fisher)。

[0402] 从克隆CD28.2,15e8或9.3产生可用于这些实验的生物素化抗CD28。

[0403] 这些实验中有用的生物素化抗CD2是从克隆LT2或RPA-2.10中产生的。其他克隆也可用于构建共价修饰的抗原呈递合成表面,例如这些聚合物珠子。

[0404] 主活化和共活化分子与珠子的共价官能化表面的缀合。MHC分子(包括抗原性分子)和共活化分子与珠子经两步过程进行缀合。在各种实验中,共活化分子的比例(在这种情况下,为生物素化的抗CD28和生物素化的抗CD2的比例)可以在约100:1至约1:100的范围内变化;或从约20:1至约1:20的范围内变化。在其他实验中,共活化分子的比例为约3:1至约1:3或约1:1。参见图14A-D。

[0405] pMHC加载。用洗涤缓冲液(不含钙或镁的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水;0.1%牛血清白蛋白;2mM乙二胺四乙酸)洗涤链霉亲和素官能化的(共价偶联的)DynaBeads™((ThermoFisher目录号11205D),6.67e8个/mL的珠子储备液,褶皱的(如上所述)聚合物珠子)。将洗涤缓冲液吸移到管中,向其中加入链霉亲和素珠子。通常,将约1e7个珠子移入1mL的洗涤缓冲液中。使用磁体(例如,DYNAL DynaMag-2,ThermoFisher目录号12-321-D)将珠子收集在管壁上。珠子迁移到管壁后,通过抽吸除去洗涤缓冲液,避开珠子所在的壁。将该洗涤过程再重复两次。第三次洗涤后,将珠子以1.67e7珠子/mL重悬于洗涤缓冲液中。

[0406] 然后将珠子与pMHC混合。将pMHC以0.83微克pMHC/mL的终浓度添加到洗涤缓冲液中的珠子中。通过涡旋将珠子和pMHC充分混合,然后在4℃下温育15分钟。将珠子再次涡旋,然后在4℃下再温育15分钟。

[0407] 共活化分子加载。再次通过磁体捕获pMHC-官能化珠子,并通过抽吸除去pMHC试剂混合物。然后在洗涤缓冲液中将珠子量升至1.67e7个/mL。然后将生物素化的抗CD28和生物素化的抗CD2(如果使用)以最终浓度为5微克/mL的总抗体添加到珠子中。如果同时使用抗CD28和抗CD2,则每种抗体的添加量为2.5微克/毫升。

[0408] 通过涡旋将珠子和pMHC充分混合,然后在4℃下温育15分钟。将珠子再次涡旋,然后在4℃下再温育15分钟。

[0409] 用生物素化抗体修饰后,珠子通过磁体被捕获,并通过抽吸去除抗体混合物。将珠子以1e8个珠子/mL的最终密度重悬于洗涤缓冲液中。珠子直接使用,而无需进一步洗涤。

[0410] 表征。为了评估所得抗原呈递珠子的加载程度和均匀性,将珠子用结合珠子上的pMHC和共活化CD28/CD2(如果存在)抗体的抗体进行染色。然后通过流式细胞术对所得的染色抗体量进行定量。然后根据制造商的说明,使用分子定量试剂盒(Quantum Simply Cellular,Bangs Labs)确定珠子上的pMHC和共刺激抗体的数量。

[0411] 为了分析珠子,将2e5个珠子添加到两个装有1mL洗涤缓冲液的微量离心管中。在单独的试管中进行pMHC定量和共刺激抗体定量。在每个单独的实验中,使用磁体将珠子收集在试管壁上,然后除去洗涤缓冲液。将珠子重悬在各个管中的0.1mL洗涤缓冲液中,然后

将每个管短暂涡旋以将珠子与管壁分开。为了检测pMHC,将0.5微升与APC(克隆BB7.2,Biolegend)缀合的抗HLA-A添加到第一管中。将第一管再次短暂涡旋以混合珠子和检测抗体。为了检测共刺激抗体,将0.5微升与APC缀合的抗小鼠IgG添加到第二管中。取决于所使用的共刺激抗体克隆,使用了不同的抗小鼠抗体,例如,使用RMG1-1(Biolegend)检测CD28.2(抗CD28)和RPA-2.10(抗CD2)。对于每个管,将检测抗体与珠子在黑暗中于室温下温育30分钟。

[0412] 对于每个试管,然后通过磁体将珠子捕获在试管壁上,并通过抽吸除去染色液。将1mL洗涤缓冲液添加到每个试管中,然后抽吸以去除任何残留的染色抗体。将每个试管中的珠子重悬在0.2mL的洗涤缓冲液中,然后将每个管中的珠子转移到5mL聚苯乙烯管中,保持两组珠子分开。

[0413] 为了量化不同物质的加载,在流式细胞仪(FACS Aria或FACS Celesta,BD Biosciences)上对珠子进行了分析。首先,收集未染色产物带有抗原的珠子的样品。在单峰和双峰珠子周围绘制一个门。根据其前向和侧向散射幅度较高,可将双峰珠子与单峰珠子区分开。通常,记录大约10000个小珠事件。然后在单独的实验中分析了针对pMHC和共刺激抗体染色的珠子。再次,每个样本收集了大约10000个珠子事件,记录单峰事件的APC中值荧光强度(MFI)和APC MFI的变异系数(100*[MFI标准偏差]/[MFI])。

[0414] 为了确定每个珠子的pMHC和共刺激抗体的数量,使用了分子定量试剂盒。试剂盒(Quantum Simply Cellular,Bangs实验室)包括一组具有特定抗体结合能力(由制造商确定)的珠子。这些珠子用于捕获检测抗体。简而言之,将定量珠子与饱和量的检测结合物一起温育,然后彻底洗涤以除去过量的抗体。将具有不同结合能力的珠子与阴性对照珠子混合在一起,并重悬于洗涤缓冲液中。然后通过流式细胞术分析混合的珠子。记录具有指定结合能力的每个珠子的APC MFI,并生成MFI相比结合能力的线性拟合。然后使用aAPC的MFI确定每个aAPC结合的检测抗体的数量。该数目等于珠子上的(pMHC或共刺激)抗体的数目。下表显示了以下结果:

[0415] A.在实施例16-17中产生并如上在本实验中官能化的抗原呈递的褶皱聚合物珠子。

[0416] B.如实施例10B中产生的抗原呈递的基本上球形的二氧化硅珠子

条件	标记	配体/珠子	配体/sq μm	靶抗体(μg)/mg 珠子
A.聚合物珠子	HLA	487209	19781	8.1
A.聚合物珠子	Costim	426992	17336	7.1
B.4微米单分散二氧化硅(10B)	HLA	604471	12026	2.35
B.4微米单分散二氧化硅(10B)	Costim	760489	15129	2.96

[0417] 实施例19.通过抗原呈递珠子的刺激。

[0418] 输入细胞群。为了增加每孔铺板的抗原特异性$CD8^+$T细胞的数量,首先使用市售试剂从外周血单核细胞中分离CD8+T细胞。可以使用阴性选择,例如EasySep™人CD8+T细胞分离试剂盒(EasySep™Human CD8+T Cell Isolation Kit,StemCell Technologies)或通过阳性选择,例如CliniMACS CD8试剂(Miltenyi Biotec)分离细胞。根据制造商推荐的方案分离$CD8^+$T细胞。或者,可以分离T细胞的不同子集,例如仅初始$CD8^+$T细胞,或者可以进行不

太严格的纯化,例如通过CliniMACS CD14试剂(Miltenyi Biotec)耗尽单核细胞。或者,如果需要对II类限制性抗原具有特异性的T细胞,则可以通过相应的方法分离$CD4^+$T细胞。

[0419] 第一T细胞刺激期。将富集的CD8+T细胞以1e6个/mL重新悬浮在含有30纳克/mL的IL-21培养基(R&D Systems)中。用于T细胞的培养基是高级RPMI 1640培养基(Thermo Fisher),其补充有10%人AB血清(Corning CellGro)和GlutaMax(Thermo Fisher)和50微摩尔β-巯基乙醇(Thermo Fisher)或ImmunoCult™-XF T细胞扩增培养基(StemCell Technologies)。

[0420] 如实施例18中所述制备抗原呈递珠子,其中以0.83微克pMHC/mL的终浓度加载褶皱的聚合物珠子。将得到的大量珠子分成五个部分,按以下比例加载共刺激配体:

[0421] 第1组:CD28为3.00微克/mL,CD2浓度为零。

[0422] 第2组:CD28为2.25微克/mL,CD2为0.75微克/mL。

[0423] 第3组:CD28为1.50微克/mL,CD2为2.25微克/mL。

[0424] 第4组:CD28为0.75微克/mL,CD2为2.25微克/mL。

[0425] 第5组:CD28为0.00微克/mL,CD2为3.00微克/mL。

[0426] 向培养基中的T细胞,将每组抗原呈递珠子的等分试样添加至单独的孔中,以使终浓度为每个细胞1个抗原呈递珠子。将细胞和抗原呈递珠子混合,并接种到经组织培养处理的圆底96孔微孔板中。将0.2mL(2e5个细胞)添加到平板的每个孔中,然后将其置于标准的5%CO_2,37℃恒温箱中。通常,每个板使用48-96孔。两天后,在培养基中将IL-21稀释至150纳克/mL。将在培养基中稀释的50微升IL-21加入到每个孔中,并将板放回培养箱中。

[0427] 再培养细胞5天(总共7天)后,分析细胞的抗原特异性T细胞扩增。或者,如以下段落所述,在第二刺激期中刺激细胞以继续扩增抗原特异性T细胞。

[0428] 第二T细胞刺激期。在第一刺激期结束时,从上述孔板的每个孔中移出50微升培养基,注意不要扰动孔底部的细胞沉淀。在新鲜培养基中将IL-21稀释至150ng/mL,并将上述产生的抗原呈递珠子以4e6个抗原呈递珠子/mL的最终密度添加到IL-21/培养基混合物中。将50微升这种IL-21/抗原呈递珠子/培养基混合物添加到每个孔中,从而将另外的2e5个抗原呈递珠子添加到每个孔中。任选地,可以将孔板以400×g离心5分钟以将抗原呈递珠子在细胞上成粒。将孔板返回到培养箱。

[0429] 次日(从刺激实验开始的8天),从培养箱中移出孔板,并从每个孔中移出50微升培养基。将IL-2(R&D Systems)稀释到新鲜培养基中至50单位/mL。向其中添加含有IL-2、IL-7(R&D Systems)的培养基至终浓度为25ng/mL。将50微升的该IL-2/IL-7/培养基混合物添加至每个孔,并将孔板返回至培养箱。

[0430] 接下来的一天(从刺激实验开始的9天),从培养箱中移出孔板,并再次从每个孔中移出50微升培养基。将IL-21稀释到新鲜培养基中至150纳克/mL。将50微升的该IL-21/培养基混合物添加至每个孔,并将孔板返回至培养箱。

[0431] 细胞再培养5天后(从刺激实验开始14天),典型地分析细胞的抗原特异性T细胞扩增。然而,可以用更多的抗原呈递珠子再刺激细胞,以再进行一期如上所述的培养,以继续扩增抗原特异性T细胞。

[0432] 抗原特异性T细胞刺激和扩增的分析。一旦执行了所需的T细胞刺激次数,就对细胞进行了分析,以了解对用于制备抗原呈递珠子的pMHC复合物特异的T细胞扩增。使用藻红

蛋白(PE)缀合的链霉亲和素检测抗原特异性T细胞,其与4个pMHC复合物结合。这些复合物称为四聚体。通常,使用与抗原呈递珠子的pMHC中使用的相同肽生产的四聚体来检测抗原特异性T细胞。

[0433] 为了检测和表征抗原特异性T细胞,在FACS缓冲液(不含钙或镁的Dulbecco磷酸盐缓冲盐水;2%胎牛血清;5mM乙二胺四乙酸,10mM HEPES)中制备了PE-四聚体(MBL,Intl)和对具有各种荧光团的各种细胞表面标记物具有特异性的抗体(例如FITC缀合的抗CD28,PerCP-Cy5.5缀合的抗CD8)的混合物。通过针对标准细胞样品的滴定来确定所使用的抗体的量。通常用于表征的表面标记是:CD4、CD8、CD28、CD45RO、CD127和CD197。此外,添加了活/死细胞区分染料,例如Zombie Near-IR(Biolegend)和Fc受体封闭剂,例如Human TruStain FcX™(Biolegend),以区分活细胞并分别防止培养物中任何Fc受体表达细胞的非特异性抗体染色。

[0434] 通常,使用多通道微量移液器将孔混合,并将每个孔中的50微升细胞转移到新鲜的,未经处理的圆底96孔微孔板中。通过向每个孔中添加0.2mL的FACS缓冲液来洗涤细胞。将细胞在室温下以400×g离心5分钟,并除去洗液。向每个孔中加入25微升的四聚体、抗体、活/死、Fc封闭剂混合物。室温下在箔下将细胞染色30分钟。然后再次洗涤细胞,并最终用CountBright绝对计数珠子(Thermo Fisher)重悬在FACS缓冲液中。然后通过流式细胞术(FACS Aria或FACS Celesta,BD Biosciences)分析细胞。通过首先在Single/Live细胞上门控(gating),然后在$CD8^+$/$Tetramer^+$细胞上门控来确定抗原特异性T细胞的频率。从对照染色剂,例如没有已知特异性的阴性对照四聚体(MBL,Intl)或抗体同种型对照来确定合适的门控条件(gating condition)。在抗原特异性T细胞群中,确定了CD45RO+/$CD28^{High}$细胞的频率以及表达CD127的细胞数量。已显示持续表达高水平CD28和CD127的表达CD45RO的活化T细胞包括记忆前体效应细胞。与不表达这些标记物的活化T细胞相比,记忆前体细胞已被证明分化程度较低,复制潜力更高。

[0435] 图14A:使用指示量(以微克为单位)的抗CD28和/或抗CD2制备的抗原呈递珠子刺激后7天的MART1特异性T细胞(活细胞百分比)的频率。每个点代表96孔微孔板的一个孔。数据收集自两个独立的实验。

[0436] 图14B:使用指示量(以微克为单位)的抗CD28和/或抗CD2制备的抗原呈递珠子刺激后7天的MART1特异性T细胞总数。每个点代表96孔微孔板的一个孔。数据收集自两个独立的实验。

[0437] 图14C:使用指示量(以微克为单位)的抗CD28和/或抗CD2制备的aAPC刺激后7天的MART1特异性T细胞的倍数扩增。每个点代表96孔微孔板的一个孔。数据收集自两个独立的实验。通过将第7日每个孔中MART1 T细胞的频率除以第0日样品中MART1 T细胞的频率来计算倍数扩增。

[0438] 图14D:使用指示量(以微克为单位)的抗CD28和/或抗CD2制备的aAPC刺激后7天对CD45RO呈阳性并表达高水平CD28的MART1特异性T细胞的比例。每个点代表96孔微孔板的一个孔。数据收集自两个独立的实验。通过将第7日每个孔中MART1 T细胞的频率除以第0日样品中MART1 T细胞的频率来计算倍数扩增。

[0439] 观察到,可以使用宽范围比例的共刺激配体抗CD28和抗CD2来产生抗原特异性T细胞。仅使用两种共刺激配体之一就可以生产。然而,抗CD28和抗CD2的组合,包括以约3:1至

约1:3的抗CD28L:抗CD2的比例,提供了上述每个特征的增加的测量值。

[0440] 图15A-15E:对于如上所述刺激的T细胞,使用如上所述产生的抗原呈递珠中的SLC45A2抗原,显示了示例性流式细胞术图。图15A显示了刺激之前T细胞的结果(“输入”)。位于下侧的图显示了代表性的受激孔:阴性生长孔(图15B);中等生长井(图15C);高生长井(图15D);和无关的四聚体染色(图15E)。

[0441] 图16:对于如上所述刺激的T细胞,使用NYESO1抗原,分别显示了在单个刺激周期(7天,左栏)和如上所述两个刺激周期(14天,右栏)后,对CD45RO呈阳性并表达高水平CD28的T细胞的频率。观察到抗原特异性活化T细胞的频率增加。

[0442] 细胞毒性:通过SLC45A2特异性T细胞杀死靶肿瘤细胞和非靶肿瘤细胞,所述SLC45A2特异性T细胞使用用SLC45A2抗原脉冲的树突状细胞进行扩增(DC,黑条)或使用如上所述产生的抗原呈递珠子(呈递SLC45A2抗原)进行扩增(灰色阴影条)。参见图17。通过在靶细胞中活化胱天蛋白酶-3来测量杀伤。MEL526肿瘤细胞表达SLC45A2,并被使用DC和抗原呈递珠扩增的T细胞杀死。A375细胞不表达SLC45A2,也不会被使用DC或抗原呈递珠扩增的T细胞杀死。抗原呈递珠子的表现与树突状细胞一样好。

[0443] 图18A-18C显示了树突状细胞刺激的细胞产物与抗原呈递珠子刺激的细胞产物之间的比较。图18A显示在抗原呈递珠子刺激实验中抗原特异性(AS)活化的T细胞的百分比更高。图18B显示,与树突状细胞刺激的细胞产物相比,抗原呈递珠子刺激实验的细胞产物具有更高百分比的所需CD45RO阳性/高CD28阳性表型。图18C显示,在抗原呈递珠子刺激实验产生的细胞产物中,抗原特异性T细胞的实际数目更高。总体而言,抗原呈递珠子刺激提供了更理想的细胞产物,并且是与使用树突状细胞活化相比更可控且更具成本效益的活化T细胞的方法。

[0444] 实施例20.制备具有蛋白片段共活化配体的抗原呈递珠子。

[0445] 20A.制备具有赖氨酸生物素化CD80和CD58的珠子的抗原呈递表面。将链霉亲和素官能化(共价偶联,褶皱的(如上所述)聚合物)DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D,6.67e8个/mL的珠子储备液)递送(15微升;1e7个珠子)至盛有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244mL);EDTA(1mL,终浓度2mM);和BSA(5mL的5%,终浓度0.1%)的1.5mL微量离心管中,并使用磁力DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0446] 将含有0.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01SLC45A2(Biolegend,定制产品,SLYSYFQKV))的洗涤缓冲液(600微升)分配到微量离心管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管脉冲离心并除去上清液,并将试管置于磁力架内以除去更多的上清液而不除去珠子。

[0447] 将生物素化的重组CD80蛋白(R&D Systems,定制产品)和生物素化重组CD58(R&D Systems,定制产品)在600微升洗涤缓冲液中的溶液添加到微量离心管中。CD80被制备为与人IgG1 Fc结构域的N端融合体,并由制造商在随机的赖氨酸残基上进行生物素化。CD58以相同方式被生物素化。该溶液总共包括4.5微克的CD80和1.5微克的CD58。通过上下吸移将珠子重悬。将珠子在4℃下温育30分钟,再上下吸移15分钟来再悬。在温育期结束时,将试管短暂脉冲离心。将其放回磁力架中并使其分离1分钟后,将缓冲液从官能化珠子吸出。将MHC单体/CD80/CD58抗原呈递珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中,保存在4℃下,无需进一步操

作即可使用。将1e7个直径为2.80微米的官能化DynaBeads具有可与T淋巴细胞接触的约为24e6平方微米的标称表面积,如本文所述,该表面积不反映pMHC和共刺激分子配体所占据的总表面。

[0448] 20B.制备具有BirA生物素化CD80和CD58的珠子的抗原呈递表面。将链霉亲和素官能化(共价偶联,褶皱的(如上所述)聚合物)DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D,6.67e8个/mL的珠子储备液)递送(15微升;1e7个珠子)至盛有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244mL);EDTA(1mL,终浓度2mM);和BSA(5mL的5%,终浓度0.1%)的1.5mL微量离心管中,并使用磁力DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0449] 将含有0.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01MART1(Biolegend,定制产品,ELAGIGILTV))的洗涤缓冲液(600微升)分配到微量离心管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管脉冲离心并除去上清液,并将试管置于磁力架内以除去更多的上清液而不除去珠子。

[0450] 将生物素化的重组CD80蛋白(R&D Systems,目录号71114)和生物素化重组CD58(R&D Systems,目录号71269)在600微升洗涤缓冲液中的溶液添加到微量离心管中。重组蛋白被制备为与人IgG1 Fc结构域的N端融合体,具有最终的C端BirA生物素化位点,并由制造商进行生物素化。该溶液总共包括1.5微克的重组CD80和1.5微克的重组CD58蛋白。通过上下吸移将珠子重悬。将珠子在4℃下温育30分钟,15分钟后再上下吸移来重悬珠子。在温育期结束时,将试管短暂脉冲离心。将其放回磁力架中并使其分离1分钟后,将缓冲液从官能化珠子中吸出。将MHC单体/CD80/CD58抗原呈递珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中,保存在4℃下,无需进一步操作即可使用。将1e7个直径为2.80微米的官能化DynaBeads具有可与T淋巴细胞接触的约为24e6平方微米的标称表面积,如本文所述,该表面积不反映pMHC和共刺激分子配体所占据的总表面。

[0451] 实施例21.与重组蛋白共刺激相比,用具有抗体共刺激的抗原呈递珠子活化CD8+T淋巴细胞。

[0452] 细胞:按照制造商对EasySep ™人类CD8+T细胞分离试剂盒(EasySep™ Human CD8+T Cell Isolation Kit,可由StemCell Technologies Canada Inc.购得的试剂盒(目录号17953))的说明,通过阴性选择,从商售PBMC中将CD8+T淋巴细胞富集在包括RPMI和10%胎牛血清(FBS)的培养基中。

[0453] 用于添加试剂的培养基和稀释剂:高级RPMI(ThermoFisher目录号12633020,500mL);1×GlutaMAX(ThermoFisher目录号35050079,5mL);10%人AB血清(zen-bio,目录号HSER-ABP 100mL,50mL);和50nMβ-巯基乙醇(ThermoFisher目录号31350010,50nm储备液,0.5mL,最终浓度50微摩尔)。

[0454] 实验设置:对于每种活化物质,使用单个96孔组织培养基处理板(VWR目录号10062-902):

[0455] 孔板1.具有抗原共刺激的抗原呈递珠子。

[0456] 孔板2.具有随机生物素化的重组蛋白共活化的抗原呈递珠子。

[0457] 孔板3.具有BirA生物素化重组蛋白共活化的抗原呈递珠子。

[0458] 将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到每个孔中。

[0459] 将通过与实施例15中所述类似的方法制备的抗原呈递表面珠子(2e5个)加入到孔板1的每个孔中,所述珠子呈递包括MART1的pMHC、抗CD28抗体和抗CD2抗体。pMHC以0.5微克/1e7个珠子加载。抗CD28抗体以1.5微克/1e7个珠子加载。抗CD2抗体以1.5微克/1e7个珠子加载。

[0460] 将如实施例20A中制备的抗原呈递表面珠子(2e5个)加入到孔板2的每个孔中,所述珠子呈递包括MART1的pMHC、重组CD80和重组CD58。pMHC以0.5微克/1e7个珠子加载。重组CD80以4.5微克/1e7个珠子加载。重组CD58以1.5微克/1e7个珠子加载。

[0461] 将如实施例20B中制备的抗原呈递表面珠子(2e5个)加入到孔板3的每个孔中,所述珠子呈递包括MART1的pMHC、BirA生物素化的重组CD80和重组CD58。pMHC以0.5微克/1e7个珠子加载。重组CD80以1.5微克/1e7个珠子加载。重组CD58以1.5微克/1e7个珠子加载。

[0462] 每个孔板在37℃下培养。在第0日,将CTL培养基中的IL-21(150ng/毫升)加入孔板1和2的每个孔中,使每个孔中的终浓度为30ng/mL。在第2日,将IL21添加至孔板的每个孔中,至终浓度为30ng/mL。培养持续到第7日。

[0463] 第7日。重刺激。将具有抗体共刺激或重组蛋白共刺激的第二等份抗原呈递珠子分别递送至孔板1、孔板2和孔板3中的每个占用的孔中。将IL21添加至孔板的每个孔中至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0464] 第8日。向每个孔板的每个孔中添加50微升IL-2(50IU/mL)和IL-7(25ng/mL),以分别提供10IU/mL和5ng/mL的终浓度。继续培养。

[0465] 第9日。向每个孔板的每个占用的孔中添加50微升IL-21(150ng/mL),至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0466] 第14日。将来自每个孔板的孔分别针对MHC四聚体(Tetramer PE,MBL目录号T02000,1微升/孔)、CD4(Biolegend目录号300530,0.5微升/孔)、CD8(Biolegend目录号301048,0.5微升/孔);CD28(Biolegend目录号302906,0.31微升/孔);CD45RO(Biolegend目录号304210,0.63微升/孔);CCR7(CD197,Biolegend目录号353208,0.5微升/孔);和活力(BD目录号565388,0.125微升/孔)进行染色。将每个孔用150微升FACS缓冲液和10微升Countbright™珠子(ThermoFisher目录号C36950)重悬。在FACSCelesta™流式细胞仪(BD Biosciences)上进行FACS分析。

[0467] 图19A显示了使用带有抗体或随机生物素化重组蛋白配体的抗原呈递珠子进行扩增的每个孔中MART1特异性T细胞的频率(占所有活细胞的百分比)。图19B显示了使用带有抗体或随机生物素化的重组蛋白配体的抗原呈递珠子进行扩增的每个孔中MART1特异性T细胞的数量。图19C显示了表达高水平CD28的MART1 T细胞的频率,其是比较抗体刺激或随机生物素化的重组蛋白配体的记忆前体表型的指标。

[0468] 图19D显示了使用带有抗体或重组蛋白BirA配体的抗原呈递珠子进行扩增的每个孔中MART1特异性T细胞的频率(占所有活细胞的百分比)。图19E显示了使用带有抗体或重组蛋白BirA配体的抗原呈递珠子进行扩增的每个孔中MART1特异性T细胞的数量。图19F显示了表达高水平CD28的MART1 T细胞的频率,其是记忆前体表型的指标。可以看出具有被BirA生物素化的重组蛋白配体的抗原呈递珠子有效地扩增了抗原特异性CD8+T细胞,并且许多扩增的细胞都具有记忆前体表型。相反,使用随机生物素化的蛋白质配体不会导致显著的抗原特异性T细胞群,也不会为提供具有记忆前体表型的细胞。

[0469] 实施例22.褶皱的聚合物珠子和基本上球形的二氧化硅珠子之间的加载和活化的比较。

[0470] 实施例22A.加载到聚合物和二氧化硅抗原呈递珠子上的活化物质的比较。测量了可以沉积到聚合物和二氧化硅珠子上的pMHC和共刺激抗体的量。

[0471] 将链霉亲和素官能化(共价偶联)DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D,6.67e8个/mL的珠子储备液)递送(15微升;1e7个珠子)至盛有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244mL);EDTA(1mL,终浓度2mM);和BSA(5mL的5%,终浓度0.1%)的1.5mL微量离心管中,并使用磁力DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0472] 首先通过用储存在100微摩尔链霉亲和素中的链霉亲和素将生物素官能化(共价偶联)的光滑二氧化硅珠子进行涂覆。通过在微量离心管中稀释到1毫升洗涤缓冲液中,洗涤大约5e6个珠子,然后以1000×g离心1分钟。通过抽吸小心地除去上清液,并且洗涤过程再重复两次。去除上清液洗涤缓冲液。

[0473] 为了制备抗原呈递珠子,将含有0.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01SLC45A2(Biolegend,定制产品,SLYSYFQKV))的洗涤缓冲液(600微升)分配到带有DynaBeads和二氧化硅珠子的管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。

[0474] 使用含有1.5微克生物素化抗CD28和1.5微克生物素化抗CD2的洗涤缓冲液(600微升)重悬每个珠子样品,并通过上下吸移将珠子重悬。使抗体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。最后,将珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中。

[0475] 用洗涤缓冲液(1毫升)洗涤约2e5个聚合物抗原呈递珠子或1e5个二氧化硅抗原呈递珠子的两个样品。将珠子样品重悬于100微升的洗涤缓冲液中,并通过添加1微升的APC缀合的抗HLA-A(Biolegend,货号343308)或1微升的APC缀合的单克隆抗小鼠IgG1(Biolegend,目录号406610)进行染色。将珠子与抗体混合,并在黑暗中染色30分钟。染色后,将珠子洗涤,重悬于洗涤缓冲液(200微升)中,并转移到试管中,以进行流式细胞术分析。

[0476] 然后制备一组Quantum Simply Cellular荧光定量珠子(Bangs Labs,目录号815),以确定与每种抗原呈递珠子样品结合的抗HLA-A抗体和抗小鼠IgG1抗体的数量。定量珠子具有由制造商确定的抗体结合能力。将一滴具有预定结合能力的珠子放入装有50微升洗涤缓冲液的微量离心管中。向管中加入5微升APC缀合的抗HLA-A或APC缀合的抗小鼠IgG1,并通过涡旋混合。将珠子在黑暗中染色30分钟,使用与上述相同的方法洗涤。然后将具有不同结合能力的珠子合并到一个样品中,并转移到单个试管中。加入一滴空白珠子(没有抗体结合能力),并通过流式细胞术分析珠子。

[0477] 通过流式细胞术(BD FACSCelesta,Becton Dickinson and Company)通过记录5000个事件来分析定量珠子。通过正向散射和侧向散射对定量珠进行识别,并记录每个珠子的APC通道中的中值强度。该数据记录在制造商(Bangs)提供的专有Excel电子表格中,该电子表格计算APC强度与抗体结合能力的标准曲线。在确认校准是线性的之后,分析了抗原呈递珠子样品。通过正向散射和侧向散射识别珠子,并在电子表格中记录APC通道中的中值

强度。电子表格计算每个抗原呈递珠子上的APC抗HLA-A抗体或APC抗小鼠IgG1的数量。假设1个抗HLA-A抗体与抗原呈递珠子上的一个pMHC结合,则该值代表每个珠子上的pMHC分子的数量。类似地,可以确定共刺激抗体的数量。

[0478] 从每个抗原呈递珠子的标称表面积,可以确定每种物质的密度(分子数/平方微米的珠子表面)。确定二氧化硅微球上的pMHC总数约为800000pMHC/抗原呈递珠子。共刺激抗体的总数确定为约850000抗体/珠子。由于无法区分用于制备抗原呈递珠子的抗CD28和抗CD2克隆(它们是相同的同种型),因此假定两种抗体的比例为1:1。由于二氧化硅珠子表面的规则性,可以从球体合理地模拟表面积。对于直径为4.08微米的微球,这对应于约52.3平方微米的表面积。据此,可以估计每平方微米珠子表面约有15000pMHC和15000共刺激抗体由二氧化硅抗原呈递珠子进行呈递,如表1所示。图20A中显示了每种配体类别在每个珠子群上的分布,其中,每行2010、2020和2030对于每种类型的珠子在左侧图中显示了pMHC的分布,在右侧图中显示了共刺激抗体的分布。第2010行显示了2.8微米直径的褶皱聚合物珠子(Dynal)的配体分布。第2020行显示4.5微米直径的褶皱聚合物珠子(Dynal)的配体分布。第2030行示出了如实施例10B中产生的2.5微米直径的基本上球形的二氧化硅珠子的配体分布。产生了严格控制的珠子群,其中基本上球形的二氧化硅珠子在整个群中具有甚至更严格控制的配体分布,并且中值分布稍高。因此,使用基本上球形的二氧化硅珠子可以实现这些活化物质的再现性和可控性更高的产生。另外,由于所有配体都可被T淋巴细胞接近,这与褶皱聚合物珠子配体分布不同,因此可以更有效地利用宝贵的生物配体,例如抗体。

[0479] 表1.褶皱的聚合物珠子和基本上球形的二氧化硅珠子的配体定量和密度。

珠子	pMHC/珠子	pMHC 密度(分子/平方微米)	共刺激抗体/珠子	共刺激抗体密度(平方微米)
M-280 聚合物	487209	19781	426992	17336
二氧化硅	807180	14847	845388	15550

[0480] 对于聚合物珠子,褶皱表面使得珠直径与表面积之间的关系不太直接。通过定量,确定基于M-280DynaBeads的聚合物抗原呈递珠子在其表面上具有约480000pMHC分子和425000共刺激抗体。对于半径为1.4微米的球体(等于M-280DynaBeads的标称半径),这相当于每平方微米约20000pMHC和17000共刺激抗体,如表1所示。然而,由于聚合物珠子的褶皱表面,实际表面积可能较大,因此实际密度较低。然而,从图20E、20F和20G可以看出,这些珠子可以用作抗原呈递珠子衬底以扩增大量抗原特异性T细胞,其中以与实施例22B类似的方式进行扩增。另外,从图20H,这些抗原呈递珠子产生大量具有CD28高表达的抗原特异性T细胞,表明记忆前体表型。

[0481] 用链霉亲和素修饰的M-450环氧DynaBeads以相同的方式制备抗原呈递珠子。根据流式细胞仪,由M-450珠子制备的抗原呈递珠子与使用M-280DynaBeads制备的抗原呈递珠子具有大约相同数量的pMHC和共刺激抗体分子。由于M-450DynaBeads比M-280珠子大,因此这意味着M-450抗原呈递珠子上的活化物质密度比M-280抗原呈递珠子上的低约2-3倍。然而,从图20F可以看出,当用于扩增SLC45A2 T细胞时,M-450抗原呈递珠子产生阳性孔(其中SLC45A2特异性T细胞扩增以代表孔中0.5%或更多的活细胞)。从图20G和20H可以看出,这些孔以高频地产生了SLC45A2 T细胞,并且SLC45A2 T细胞的数量与从M-280抗原呈递珠子获得的数量相当。另外,从图20I可以看出,当使用M-280或M-450抗原呈递珠子来扩增

SLC45A2 T细胞时,表达高水平CD28的SLC45A2 T细胞的级分是具有可比性的。

[0482] 实施例22B.聚合物与二氧化硅珠子相比的抗原特异性T细胞的扩增。测试了使用二氧化硅抗原呈递珠子的抗原特异性T细胞的扩增,并将其与褶皱聚合物珠子(聚苯乙烯)进行比较。

[0483] 将链霉亲和素官能化的(共价偶联的,皱褶的)DynaBeads™(ThermoFisher目录号11205D,6.67e8个/mL的珠子储备液输送)(15微升;1e7个珠子)到盛有1mL洗涤缓冲液(DPBS(无镁$^{+2}$,无钙$^{+2}$,244mL);EDTA(1mL,终浓度2mM);和BSA(5mL的5%,终浓度为0.1%)的1.5mL微量离心管中,并使用磁性DynaBead架进行分离。反复用1mL洗涤缓冲液进行洗涤/分离,并且加入另外的200微升洗涤缓冲液,随后进行脉冲离心。去除上清液洗涤缓冲液。

[0484] 首先通过储存在100微摩尔链霉亲和素中的链霉亲和素将按照实施例10B制备的生物素官能化(共价偶联)的光滑二氧化硅珠子进行涂覆。通过在微量离心管中稀释到1毫升洗涤缓冲液中,洗涤大约5e6个珠子,然后以1000×g离心1分钟。通过抽吸小心地除去上清液,并且洗涤过程再重复两次。去除上清液洗涤缓冲液。

[0485] 为了制备抗原呈递珠子,将含有0.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01SLC45A2(Biolegend,定制产品,SLYSYFQKV))的洗涤缓冲液(600微升)分配到带有DynaBeads和二氧化硅珠子的管中,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。

[0486] 使用含有1.5微克生物素化抗CD28和1.5微克生物素化抗CD2的洗涤缓冲液(600微升)重悬每个珠子样品,并通过上下吸移将珠子重悬。使抗体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。最后,将珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中。

[0487] 细胞:按照制造商对EasySep TM人类CD8+T细胞分离试剂盒(EasySep ™Human CD8+T Cell Isolation Kit,可由StemCell Technologies Canada Inc.购得的试剂盒(目录号17953))的说明,通过阴性选择,从商售PBMC中将CD8+T淋巴细胞富集在包括RPMI和10%胎牛血清(FBS)的培养基中。

[0488] 用于添加试剂的培养基和稀释剂:高级RPMI(ThermoFisher目录号12633020,500mL);1×GlutaMAX(ThermoFisher目录号35050079,5mL);10%人AB血清(zen-bio,目录号HSER-ABP 100mL,50mL);和50nMβ-巯基乙醇(ThermoFisher目录号31350010,50nm储备液,0.5mL,最终浓度50微摩尔)。

[0489] 实验设置:对于每种类型的抗原呈递珠子(二氧化硅或聚合物,本实施例中如上文所述制备),使用单个96组织培养处理的孔板(VWR目录号10062-902)。将二氧化硅抗原呈递珠子与CD8+T淋巴细胞以~1:2的珠子:细胞比例混合。将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到每个孔中,每个孔带有大约1e5个抗原呈递珠子(孔板1)。将聚合物抗原呈递珠子与CD8+T淋巴细胞以~1:1的珠子:细胞比例混合。将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到每个孔中,每个孔带有大约2e5个抗原呈递珠子(孔板2)。

[0490] 每个孔板在37℃下培养。在第0日,将CTL培养基中的IL-21(150ng/毫升)加入孔板1和2的每个孔中,使每个孔中的终浓度为30ng/mL。在第2日,将IL21添加至孔板的每个孔中,至终浓度为30ng/mL。培养持续到第7日。

[0491] 第7日。重刺激。将第二等份抗原呈递珠子添加到孔板1和孔板2中的相应孔中。对

于二氧化硅珠子,添加约1e5个珠子(本实施例中如上所述制备的二氧化硅珠子)。对于聚合物珠子,加入大约2e5个珠子(本实施例中如上所述制备的褶皱聚合物珠子)。将IL21添加至孔板的每个孔中至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0492] 第8日。向孔板1和孔板2的每个孔中分别添加50微升IL-2(50IU/mL)和IL-7(25ng/mL),以分别提供10IU/mL和5ng/mL的终浓度。继续培养。

[0493] 第9日。向孔板1和孔板2的每个占用的孔中添加50微升IL-21(150ng/mL),至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0494] 第14日。将来自每个孔板的孔分别针对MHC四聚体(Tetramer PE,MBL目录号TO2000,1微升/孔)、CD4(Biolegend目录号300530,0.5微升/孔)、CD8(Biolegend目录号301048,0.5微升/孔);CD28(Biolegend目录号302906,0.31微升/孔);CD45RO(Biolegend目录号304210,0.63微升/孔);CCR7(CD197,Biolegend目录号353208,0.5微升/孔);和活力(BD目录号565388,0.125微升/孔)进行染色。将每个孔用150微升FACS缓冲液和10微升Countbright™珠子(ThermoFisher目录号C36950)重悬。在FACSCelesta™流式细胞仪(BD Biosciences)上进行FACS分析。

[0495] 图20B显示了使用聚合物或二氧化硅抗原呈递珠子扩增后的阳性孔百分比(其中SLC45A2特异性T细胞扩增以表示孔中0.5%或更多的活细胞)。图20C显示了用聚合物或二氧化硅抗原呈递珠子扩增后的SLC45A2 T细胞频率(每个孔中活细胞的百分比)。图20D显示了每个孔中SLC454A2 T细胞的总数。图20E显示了表达高水平CD28的孔中SLC45A2 T细胞的百分比,表明了分化为记忆T细胞的潜力。从这些图中可以看出,二氧化硅抗原呈递珠子产生阳性孔,并且二氧化硅抗原呈递珠子使SLC45A2 T细胞扩增得与聚合物抗原呈递珠子一样好或者更好。另外,二氧化硅抗原呈递珠子产生具有高表达CD28的细胞,表明它们支持记忆前体T细胞的形成,这是细胞产物所需的表型。

[0496] 对于聚合物珠,褶皱表面使得珠直径与表面积之间的关系不太直接。通过定量,确定基于M-280DynaBeads的聚合物抗原呈递珠子在其表面上具有约480000pMHC分子和425000共刺激抗体。对于半径为1.4微米(等于M-280DynaBeads的标称半径)的球体,这相当于每平方微米约20000pMHC和17000共刺激抗体。然而,由于聚合物珠子的褶皱表面,实际表面积可能较大,因此实际密度较低。但是,从图20F、20G和20H可以看出,这些珠子可以用作抗原呈递珠子衬底以扩增大量的抗原特异性T细胞。另外,从图20I,这些抗原呈递珠子产生大量具有高表达CD28的抗原特异性T细胞,表明记忆前体表型。

[0497] 实施例23A.制备具有限定的配体密度的抗原呈递珠子。

[0498] 实施例23A.1.制备链霉亲和素呈递珠子。制备了洗涤缓冲液中pMHC(HLA-A*02:01SLC45A2(Biolegend,定制产品,SLYSYFQKV))的三倍系列稀释液。将20微升洗涤缓冲液添加至微量离心管中,以进行每次系列稀释。向第一系列稀释管中加入10微升的pMHC。

稀释的pMHC通过涡旋混合。然后将10μL稀释的pMHC混合物用于制备后续的系列稀释液,总共进行7次稀释。

为了确定溶液中pMHC的浓度与沉积在珠子上的密度(分子/单位面积)之间的关系,将如实施例10B制备的生物素官能化(共价偶联)光滑(例如,如上所述的基本球形)的4微米单分散二氧化硅珠子(目录号SiO2MS-1.84.08um-1g,Cospheric),首先通过储存在100微摩尔链霉亲和素中的链霉亲和素进行涂覆。通过在微量离心管中稀释到1毫升洗涤缓冲

液中,洗涤大约1e7个珠子,然后以1000×g离心1分钟。通过抽吸小心地除去上清液,并且洗涤过程再重复两次。洗涤后,将约1e6个珠子递送到8个微量离心管中,再次离心,并小心除去上清液。

[0499] 实施例23A.2.制备具有一系列MHC浓度的珠子。将含有4.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01SLC45A2(Biolegend,定制产品,SLYSYFQKV))的洗涤缓冲液(120微升)分配到一个微量离心管中,并通过上下吸液将其重悬。将未稀释的pMHC和pMHC的系列稀释液进一步稀释到洗涤缓冲液(120微升)中,并用于重悬珠子,使珠子悬浮在溶液中,溶液中含有每5e6个珠子4.5、1.5、0.5、0.167、0.056、0.019、0.006或0.002微克pMHC单体。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管离心,除去上清液,并将珠以约5e7/毫升进行重悬。

[0500] 用洗涤缓冲液(1毫升)洗涤用每种浓度的pMHC制备的约1e5个珠子。将珠子样品重悬于100微升洗涤缓冲液中,并通过添加1微升APC缀合的抗HLA-A(Biolegend,目录号343308)进行染色。将珠子与抗体混合,并在黑暗中染色30分钟。染色后,将珠子洗涤,重悬于洗涤缓冲液(200微升)中,并转移到试管中,以进行流式细胞术分析。

[0501] 然后制备一组Quantum Simply Cellular荧光定量珠(Bangs Labs,目录号815),以确定与每种抗原呈递珠子样品结合的抗HLA-A抗体的数量。定量珠具有由制造商确定的抗体结合能力。将一滴具有预定结合能力的珠子放入装有50微升洗涤缓冲液的微量离心管中。向该试管中加入5微升APC缀合的抗HLA-A,并通过涡旋混合。将珠子在黑暗中染色30分钟,使用与上述相同的方法洗涤。然后将具有不同结合能力的珠子合并到一个样品中,并转移到单个试管中。加入一滴空白珠子(没有抗体结合能力),并通过流式细胞术分析珠子。

[0502] 通过流式细胞术(BD FACSCelesta,Becton Dickinson and Company)通过记录5000个事件来分析定量珠子。通过正向散射和侧向散射对定量珠子进行识别,并记录每个珠子的APC通道中的中值强度。如实施例22A所述,使用定量珠子制造商提供的专有方法计算定量。然后,从抗原呈递珠子标准品可以确定含珠子的溶液中pMHC的浓度,其产生具有目标密度pMHC的抗原呈递珠子,例如,每平方微米具有约10000、1000或100个pMHC分子的珠子,如图21A所示。

[0503] 实施例23A.3.共刺激分子浓度变化。制备洗涤缓冲液中生物素化抗CD28和抗CD2的三倍系列稀释液。在微量离心管中将20微升抗CD28与20微升抗CD2混合。然后将洗涤缓冲液(20微升)添加到微量离心管中进行每次系列稀释。然后将抗CD28/抗CD2混合物(10微升)添加到第一个系列稀释管中。使用涡旋仪将该溶液混合,然后将10μL稀释的抗CD28/抗CD2混合物用于制备后续的系列稀释液,总共进行7次稀释。

[0504] 为了量化溶液中的共刺激抗体与沉积在珠子上的密度(分子/单位面积)之间的关系,

如实施例23A.1中制备的具有链霉亲和素结合部分的约1e7个基本上球形的4微米二氧化硅珠子,首先通过在微量离心管中稀释到1毫升洗涤缓冲液中进行洗涤,然后以1000×g离心1分钟。通过抽吸小心地除去上清液,并且洗涤过程再重复两次。洗涤后,将约1e6个珠子递送入8个微量离心管中,再次离心,并小心除去上清液。

[0505] 首先在洗涤缓冲液(1200微升)中用1.0微克pMHC将珠子官能化。洗涤后,将珠子重悬于洗涤缓冲液(1000微升)中。将100微升的pMHC官能化的珠子分散到八个微量离心管中。

将珠子离心,并小心地除去上清液。

[0506] 将未稀释的混合抗CD28和抗CD2以及抗CD28/抗CD2的系列稀释液进一步稀释到洗涤缓冲液(120微升)中,并用于重悬珠子,使珠子悬浮在溶液中,溶液中含有每5e6个珠子4.5、1.5、0.5、0.167、0.056、0.019、0.006或0.002微克混合的共刺激抗体单体。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管离心,除去上清液,并将珠子以约5e7/毫升进行重悬。

[0507] 用洗涤缓冲液(1毫升)洗涤用每种浓度的共刺激抗体制备的大约1e5个珠子。将珠子样品重悬于100微升的洗涤缓冲液中,并通过添加1微升的APC缀合的单克隆抗小鼠IgG1抗体(Biolegend,目录号406610)进行染色。将珠子与抗体混合,并在黑暗中染色30分钟。

染色后,将珠子洗涤,重悬于洗涤缓冲液(200微升)中,并转移到试管中,以进行流式细胞术分析。

[0508] 然后制备一组Quantum Simply Cellular荧光定量珠子(Bangs Labs,目录号815),以确定与每种抗原呈递珠子样品结合的APC抗小鼠IgG1抗体的数量。将一滴具有预定结合能力的珠子放入装有50微升洗涤缓冲液的微量离心管中。向管中加入5微升APC缀合的抗小鼠IgG1,并通过涡旋混合。将珠子在黑暗中染色30分钟,使用与上述相同的方法洗涤。然后将具有不同结合能力的珠子合并到一个样品中,并转移到单个试管中。加入一滴空白珠子(没有抗体结合能力),并通过流式细胞术分析珠子。

[0509] 通过流式细胞术(BD FACSCelesta,Becton Dickinson and Company)通过记录5000个事件来分析定量珠子。通过正向散射和侧向散射对定量珠子进行识别,并记录每个珠子的APC通道中的中值强度。如实施例22A中所述使用定量珠子制造商提供的专有方法进行定量。此定量方法计算每个抗原呈递珠上的APC抗小鼠IgG1抗体的数量。假设1个抗小鼠IgG1抗体与抗原呈递珠上的一个共刺激抗体结合,则该值代表每个珠子上的共刺激抗体的数量。然后从抗原呈递珠标准物中可以确定含珠子的溶液中共刺激抗体的浓度,其产生具有目标密度共刺激抗体的抗原呈递珠子,例如,每平方微米具有约10000、1000或100个共刺激分子的珠子,如图21B所示。

[0510] 实施例23B.用具有不同配体密度的抗原呈递珠子扩增抗原特异性T细胞。使用得到的抗原呈递珠子上的pMHC和共刺激抗体浓度与密度的关系图(图21A),确定应使用什么浓度的每种pMHC来制备每平方微米珠子表面具有~10000、~1000或~100个pMHC的抗原呈递珠子。重复该过程以确定用于制备每平方微米珠表面具有~10000、~1000或~100个共刺激抗体的抗原呈递珠子的抗CD28和抗CD2的浓度。

[0511] 实施例23B.1.首先通过储存在100微摩尔链霉亲和素中的链霉亲和素将按照实施例23.A.1制备的生物素官能化(共价偶联的)光滑二氧化硅珠子进行涂覆。通过在微量离心管中稀释到1毫升洗涤缓冲液中,洗涤约5e7个珠子,然后以1000×g离心1分钟。通过抽吸小心地除去上清液,并且洗涤过程再重复两次。洗涤后,将约5e6个珠子递送入三个微量离心管中,再次离心,并小心地除去上清液。

[0512] 实施例23B.2.为制备具有滴定的pMHC的抗原呈递珠子,将含有0.5、0.056或0.006微克生物素化单体MHC(HLA-A*02:01MART-1(MBL International Corp.,目录号MR01008,ELAGIGILTV)的洗涤缓冲液(600微升)分配到三个微量离心管中,通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1

分钟,然后除去上清液。

[0513] 将洗涤缓冲液(600微升)与1.0微克混合生物素化抗CD28和生物素化抗CD2用于重悬每个珠子样品,并通过上下吸移将珠子重悬。使抗体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。最后,将珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中。通过流式细胞术分析和与定量珠子的比较来验证期望量级的pMHC和抗体加载到珠子上。

[0514] 使用含有1.0微克抗CD28和抗CD2的洗涤缓冲液(600微升)重悬每个珠子样品,并通过上下吸移将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。最后,将珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中。通过流式细胞术分析和与定量珠子比较来验证期望数量级的pMHC加载到珠子上。

[0515] 实施例23B.3.为了制备具有滴定的共刺激抗体的抗原呈递珠子,将含有1.5微克生物素化的单体MHC(HLA-A*02:01MART-1(MBL International Corp.,目录号MR01008,ELAGIGILTV)的洗涤缓冲液(1200微升)分配到含有来自实施例23.B.1的1.5e7个经洗涤的珠子的微量离心管中,通过上下吸液将珠子重悬。使单体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。

[0516] 然后将珠子重悬于洗涤缓冲液(900微升)中,并将300微升的珠子转移到3个微量离心管中。

[0517] 将含有1.0微克混合的抗CD28和抗CD2、0.111微克混合的抗CD28和抗CD2或0.012微克混合的抗CD28和抗CD2的洗涤缓冲液(300微升)混合到三个珠子样品中,通过上下吸移将珠子充分混合。使抗体在4℃下结合30分钟。15分钟后,将混合物再次上下吸移。将试管以1000×g离心1分钟,然后除去上清液。最后,将珠子重悬于100微升洗涤缓冲液中。通过流式细胞术分析和与定量珠子的比较来验证期望数量级的共刺激抗体加载到珠子上。

[0518] 实施例23B.4.刺激。细胞:按照制造商对EasySep™人类CD8+T细胞分离试剂盒(EasySep™Human CD8+T Cell Isolation Kit,可由StemCell Technologies Canada Inc.购得的试剂盒(目录号17953))的说明,通过阴性选择,从商售PBMC中将CD8+T淋巴细胞富集在包括RPMI和10%胎牛血清(FBS)的培养基中。

[0519] 用于添加试剂的培养基和稀释剂:高级RPMI(ThermoFisher目录号12633020,500mL);1×GlutaMAX(ThermoFisher目录号35050079,5mL);10%人AB血清(zen-bio,目录号HSER-ABP 100mL,50mL);和50nMβ-巯基乙醇(ThermoFisher目录号31350010,50nm储备液,0.5mL,最终浓度50微摩尔)。

[0520] 实验设置:对于每种活化物质滴定(pMHC或共刺激抗体),使用单个96孔组织培养处理的孔板(VWR目录号10062-902):每平方微米珠子表面具有~10000、~1000或~100个pMHC和每平方微米珠子表面具有~10000个共刺激抗体的抗原呈递珠子(来自实施例23.B.2)与CD8+T淋巴细胞以~1:2的珠子:细胞比例进行混合。将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到具有约1e5个抗原呈递珠子的每个孔中(孔板1)。每平方微米珠子表面具有~10000个pMHC和每平方微米珠子表面具有~10000、~1000或~100个共刺激抗体的抗原呈递珠子与CD8+T淋巴细胞以~1:2的珠子:细胞比例进行混合。将CD8+T淋巴细胞(2e5个)(纯度为80-90%)添加到具有约1e5个抗原呈递珠子的每个孔中(孔板2)。

[0521] 每个孔板在37℃下培养。在第0日,将CTL培养基中的IL-21(150ng/毫升)加入孔板

1和2的每个孔中,使每个孔中的终浓度为30ng/mL。在第2日,将IL21添加至孔板的每个孔中,至终浓度为30ng/mL。培养持续到第7日。

[0522] 第7日。重刺激。将具有目标密度的pMHC或共刺激抗体的第二等份抗原呈递珠子加入孔板1和孔板2中的相应孔中。将IL21添加至孔板的每个孔中至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0523] 第8日。向孔板1和孔板2的每个孔中分别添加50微升IL-2(50IU/mL)和IL-7(25ng/mL),以分别提供10IU/mL和5ng/mL的终浓度。继续培养。

[0524] 第9日。向孔板1和孔板2的每个占用的孔中添加50微升IL-21(150ng/mL),至终浓度为30ng/mL。继续培养。

[0525] 第14日。将来自每个孔板的孔分别针对MHC四聚体(Tetramer PE,MBL目录号TO2000,1微升/孔)、CD4(Biolegend目录号300530,0.5微升/孔)、CD8(Biolegend目录号301048,0.5微升/孔);CD28(Biolegend目录号302906,0.31微升/孔);CD45RO(Biolegend目录号304210,0.63微升/孔);CCR7(CD197,Biolegend目录号353208,0.5微升/孔);和活力(BD目录号565388,0.125微升/孔)进行染色。将每个孔用150微升FACS缓冲液和10微升Countbright™珠子(ThermoFisher目录号C36950)重悬。在FACSCelesta™流式细胞仪(BD Biosciences)上进行FACS分析。图21C显示了使用具有各种密度的pMHC/平方微米的抗原呈递珠子扩增的每个孔中的MART1特异性T细胞的数目。图21D显示了来自图21C的MART1特异性T细胞上的CD127(记忆前体T细胞的标记物)的表达水平。从这些图中可以看出,当密度为~100个pMHC/平方微米或更高时,MART1特异性T细胞的数量和CD127在这些细胞上的表达对pMHC密度不敏感。

[0526] 图21E显示了使用具有各种密度的共刺激抗体/平方微米的抗原呈递珠子扩增的每个孔中的MART1特异性T细胞的数目。图21F显示了来自图21E的MART1特异性T细胞上的CD127(记忆前体T细胞的标记物)的表达水平。从这些图中可以看出,MART1特异性T细胞的数量和CD127在这些细胞上的表达对共刺激抗体密度敏感。用每平方微米约10000个共刺激抗体制备的珠子(其几乎饱和了珠子的生物素结合位点(见图21B)),产生了最高数量的抗原特异性T细胞,并且这些细胞表达了最高水平的CD127。随着共刺激配体的数量减少至加载方案的下限,由pMHC进行的主刺激并未得到有效的共刺激,并且细胞产物的表型受到影响。

[0527] 实施例24.在微流体设备内进行抗原特异性细胞毒性测定

[0528] 实验设计:从黑素瘤细胞(包括Mel 526细胞和A375细胞)获得的肿瘤细胞系在芯片上T细胞杀伤试验中进行了测试。每个细胞系均按照标准程序在体外生长,然后用CellTrace™远红染料(目录号C34572,ThermoFisher Scientific)标记,该标记可提供稳定的细胞内标记。将每个标记的肿瘤细胞群流入补充了10μM荧光胱天蛋白酶-3底物(DEVD,绿色)(488,目录号10403,Biotium)的T细胞培养基(Adv.RPMI+10%人AB血清(目录号35-060-CI,Corning)+Gln+50μM 2-巯基乙醇(BME,目录号31350-010,Gibco,ThermoFisher Scientific))中的单个微流体芯片(Berkeley Lights,Inc.)中。通过倾斜微流体芯片并依重力将肿瘤细胞拉入隔离围栏,从而将成组的标记肿瘤细胞(约2-10个)装入两个微流体芯片(一个用于Mel 526细胞,一个用于A375细胞)的每一个上的多个隔离围栏的每一个中,为每个微流体芯片的测定提供了时间=0时5μM胱天蛋白酶-3底物的终浓度。胱天蛋白酶-3底

物在被切割之前不会提供任何荧光信号,因此在时间＝0时,由于该试剂而没有荧光信号。根据如上所述的内源性T细胞(ETC)方案,针对SLC45A2抗原扩增的T细胞流入两个微流体芯片的每一个中,并依重力加载至每个相应芯片的肿瘤细胞的顶部。通常,在加载肿瘤细胞和T细胞后,每个隔离围栏含有每个T细胞0-5个肿瘤细胞。如每个时间点和每个包括SLC45A2特异性T细胞和Mel526肿瘤细胞(图22A)以及SLC45A2特异性T细胞和A375细胞(图22B)的微流体芯片的明场图像(BF)分别所示,存在细胞群。通过每个微流体芯片上的微流体通道灌注补充了5μM胱天蛋白酶-3底物(绿色)(Nucview 488,来自Biotium)的T细胞培养基(Adv.RPMI+10％人AB血清+Gln+50μM BME),(从T细胞加载结束时开始)每30分钟拍摄隔离围栏的图像,持续7小时。使用不同的荧光立方体(分别为Cy5,FITC)将CellTrace远红色标记和已裂解的目前为荧光的胱天蛋白酶-3标记可视化。

[0529] Mel526黑色素瘤细胞系表达SLC45A2肿瘤相关的抗原,并有望被SLC45A2特异性T细胞靶向并杀死。A375黑色素瘤细胞系不表达SLC45A2肿瘤相关抗原,并且预期不会被SLC45A2特异性T细胞靶向或杀死,因此被用作T细胞细胞毒性的阴性对照。

[0530] 结果:Mel526肿瘤细胞(图22A)和A375肿瘤细胞(图22B)在1小时的时间点上显示CellTrace远红信号(Cy5荧光立方体),但没有与胱天蛋白酶-3底物切割相关的信号(绿色荧光信号,FITC荧光立方体)。随着时间的流逝,与胱天蛋白酶-3底物的切割有关的绿色荧光信号在Mel526肿瘤细胞中增加(图22A,显示长达7小时的时间点),但在A375肿瘤细胞中却没有增加(图22B,显示长达7小时的时间点)。结果表明,Mel526肿瘤细胞被SLC45A2特异性T细胞有效杀伤,图22A中包括Mel526肿瘤细胞的8个隔离围栏中有6个显示了高水平的胱天蛋白酶-3底物切割。图22C显示了在实验过程中抗原特异性Mel526肿瘤细胞杀死程度与A375非靶向细胞的细胞杀死程度的定量。对于A375非靶向细胞,观察到非常少量的SLC45A2特异性T细胞(部分)杀伤,而SLC45A2特异性T细胞对Mel 526肿瘤细胞的靶向抗原特异性细胞杀伤在相同的7小时时间内达到了0.25的部分杀伤。对于每个微流体芯片和每个时间点,每个荧光图像的曝光时间是相同的。对于任何一组细胞,通常都观察到来自Cell Trace Far Red染色的Cy5信号随时间的减少;观察到每种细胞类型的这种减少并不意外。

[0531] 实施例25.珠子刺激后抗原特异性T淋巴细胞的快速扩增和细胞产物表征。通常,在完成前述实验中所述的抗原特异性T淋巴细胞活化后,在FACS缓冲液(1×DPBS w/o Ca^{2+} Mg^{2+}(目录号4190250,ThermoFisher),5mM EDTA(目录号AM9260G,ThermoFisher),10mM HEPES(目录号15630080,ThermoFisher),2％FBS)和抗CD8-PerCPCy5.5(克隆RPA-T8,301032,Biolegend,San Diego,CA)、对抗原具有特异性的Tetramer-PE(MBL International,Woburn,MA)和排除死细胞的Zombie NIR(目录号423106,Biolegend,San Diego,CA)中室温染色30min后,在FACSAria融合系统(Becton Dickinson,San Jose,CA)上通过FACS分选富集抗原特异性T细胞。通过门控对所需细胞进行纯度分类:大小,单株,活的,CD8阳性和四聚体阳性进入具有2mM HEPES的CTL培养基(高级RPMI(目录号12633020,ThermoFisher),1×Glutamax(目录号35050079,ThermoFisher),10％人血清(目录号MT35060CI,ThermoFisher),50μMβ-巯基乙醇(目录号31350010,ThermoFisher)。

[0532] 然后如Riddell,US 5827642中所述,在至少一轮快速扩增方案(REP)中扩增分选的抗原特异性T细胞。使用X射线辐射器,淋巴母细胞系细胞(LCL,LCL细胞系是Anderson Cancer Center的Cassian Yee,M.D.提供的礼物)用100Gy照射,来自3个供体的PBMC用50Gy

照射。经照射的细胞在含有10％FBS的RPMI中洗涤,并以1:5(LCL:PBMC)的比例混合。将这些经照射的细胞添加到FACS分选的T细胞中(用于REP的第一个循环),或添加到第一循环REP的产物中(过量200至500倍)。在补充有50U/mL IL-2(目录号202-IL,R&D Systems)和30ng/mL抗CD3抗体(目录号16-0037-85,ThermoFisher)的T细胞培养基(高级RPMI,10％人AB血清,GlutaMax,50μM巯基乙醇)中建立培养物。在第2、5和10天用新鲜的IL-2喂养细胞,并根据其生长速率进行扩增。

[0533] 在第一个REP周期内,扩增通常是1000倍。REP1期间的扩增变化很大(316-7,800倍,数据未显示)。低输入细胞数量的不准确定量可能导致了这种可变性。在图23A中示出了在第一周期之后从第二REP方案获得的倍数扩增(n＝20个实验,11个供体,12个STIM)。扩增范围为约200至约2000倍。但是,在这些实验中,对于特定细胞群,REP1和REP2之间的扩增程度没有明显的相关性。

[0534] 在图23B中,显示了REP方案的20次实验中REP群中抗原特异性T细胞的百分比。

观察到的是,在至少两个REP循环期间,维持了高百分比的抗原特异性T细胞(％Ag+),通常为～90％。相反,REP1后的低％Ag+导致REP2后的低％Ag+。

[0535] 在图23C中,显示了在REP2完成之后还表达共刺激受体CD27和CD28的抗原特异性T细胞的百分比。在图23D中,显示了在REP2完成之后还表达CD127的抗原特异性T细胞的百分比,CD127是中央记忆表型的标志物,其可以预示体内的持久性。尽管任何标记物的表达分布都不紧密聚集,并且一些个别实验显示表达所需标记物的细胞较少(例如百分之几),但在每个实验中获得的细胞产物在所有类别中均表现出足够的阳性表型,使其成为体内导入的候选者。看到的一些低的值,例如CD28的表达,可能是由于在活化周期中使用CD28配体的广泛刺激,导致这些表面标记物的低表达。

[0536] 在图23E中,显示了在两轮REP之后,针对三个独立细胞群中的每一个的抗原特异性细胞毒性测定的结果。如实施例24中所述进行测定,使用Me1526细胞作为靶癌细胞系和A375细胞作为非靶细胞系,其中抗原特异性T细胞是SLC45A2特异性T细胞。在每个实验中,超过50％的靶Me1526细胞表现出胱天蛋白酶-3触发的荧光信号,而A375非靶细胞没有表现出凋亡行为或仅很少的A375非靶细胞表现出凋亡行为,如胱天蛋白酶-3底物的荧光裂解产物所表明的那样。因此,在经历了所有回合的活化和扩增后,活化T细胞仍然表现出抗原特异性细胞杀伤行为。

[0537] 因此,如本文所述,通过在合成表面上呈递抗原的活化过程可提供适用于免疫疗法的良好控制的、可再现的和可表征的细胞产物。与目前可用的实验方法相比,本文所述的抗原呈递表面为这些个体化疗法提供了较低的制造成本。

本公开的一些实施方案的详述。

1.用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面,其包括:

多个主活化分子配体,其中每个主活化分子配体包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体(TCR)的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子;和多个共活化分子配体,每个包括TCR共活化分子或辅助TCR活化分子,其中所述多个主活化分子配体和所述多个共活化分子配体中的每一个特异性结合至抗原呈递表面。

2.实施方案1的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

3.实施方案1或2的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约100:1至约1:100。

4.实施方案1或2的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为100:1至90:1、90:1至80:1、80:1至70:1、70:1至60:1、60:1至50:1、50:1至40:1、40:1至30:1、30:1至20:1、20:1至10:1、10:1至1:1、1:1至1:10、1:10至1:20、1:20至1:30、1:30至1:40、1:40至1:50、1:50至1:60、1:60至1:70、1:70至1:80、1:80至1:90或1:90至1:100,其中每个前述值都用“约”修饰。

5.实施方案1或2的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化分子与所述辅助TCR活化分子的比例为约10:1至约1:20。

6.实施方案1或2的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约10:1至约1:10。

7.前述实施方案中任一项的抗原呈递表面,其中在其连接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体以每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分上。

8.实施方案7的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分上。

9.实施方案7的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约2×10^3至约5×10^3个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分上。

10.实施方案7的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米1×10^4至约2×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子的密度设置在抗原呈递表面的至少一部分表面上。

11.实施方案7-10中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体以所述密度布置在基本上所有的抗原呈递表面上。

12.实施方案1-11中任一项的抗原呈递表面,其还包括多个表面封闭分子配体。

13.实施方案1-12中任一项的抗原呈递表面,其中所述辅助TCR活化分子被构造为提供粘附刺激。

14.实施方案1-13中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^2至约2×10^4个分子或每平方微米约5×10^2至约1.5×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分上。

15.实施方案1-14中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.5×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分上。

16.实施方案1-14中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以每平方微米约2×10^3至约5×10^3个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分上。

17.实施方案1-14中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^2至约2×10^3个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分表面上。

18.实施方案14-17中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体以所述密度设置在基本上所有的抗原呈递表面上。

19.实施方案1-18中任一项的抗原呈递表面,其中存在于抗原呈递表面上的所述主活化分子配体与所述共活化分子配体的比例为约1:10至约2:1、约1:5至约2:1、约1:2至约2:1、约1:10至约1:1、约1:5至约1:1、约1:1至约2:1或约1:2至约1:1。

20.实施方案1-19中任一项的抗原呈递表面,其中所述抗原呈递表面包括玻璃、金属、陶瓷和/或金属氧化物或其任何组合。

21.实施方案1-20中任一项的抗原呈递表面,其中所述抗原呈递表面包括聚合物表面。

22.实施方案20或21的抗原呈递表面,其中所述表面包括磁性材料。

23.实施方案1-22中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体中的每一个非共价地结合至结合部分,并且进一步地其中所述结合部分共价结合至抗原呈递表面。

24.实施方案23的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体中的每一个包括生物素并且非共价结合至生物素结合剂,并且进一步地其中所述生物素结合剂与抗原呈递表面共价结合。

25.实施方案1-22中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体中的每一个非共价结合至结合部分,并且进一步地其中所述结合部分非共价结合至抗原呈递表面。

26.实施方案25的抗原呈递表面,其中所述多个主活化分子配体中的每一个包括生物素部分,所述结合部分包括生物素结合剂,并且所述生物素结合剂非共价结合至第二生物素部分,所述第二生物素部分共价附接至抗原呈递表面。

27.24或26的抗原呈递表面,其中所述生物素结合剂是链霉亲和素。

28.实施方案1-27中任一项的抗原呈递表面,其中所述MHC分子包括MHC蛋白序列和β微球蛋白。

29.实施方案1-28中任一项的抗原呈递表面,其中所述MHC分子还包括肿瘤特异性抗原。

30.实施方案29的抗原呈递表面,其中所述肿瘤特异性抗原与所述MHC分子非共价联合。

31.实施方案29或30的抗原呈递表面,其中所述抗原是SLC45A2、TCL1、VCX3A、MART1或NYESO1。

32.实施方案1-31中任一项的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化分子包括蛋白质。

33.实施方案32的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化蛋白分子包括CD-28结合蛋白或其保留了与CD28的结合能力的片段。

34.实施方案32或33的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化分子还包括位点特异性C末端生物素部分。

35.实施方案33或34的抗原呈递表面,其中所述CD28结合蛋白包括CD80分子或其片段,其中所述片段保留了与CD28的结合能力。

36.实施方案32-35中任一项的抗原呈递表面,其中所述TCR共活化分子包括抗CD28抗体或其片段,其中所述片段保留了与CD28的结合活性。

37.实施方案1-36中任一项的抗原呈递表面,其中所述辅助TCR活化分子配体包括CD2结合蛋白或其片段,其中所述片段保留了与CD2的结合能力。

38.实施方案37的抗原呈递表面,其中所述CD2结合蛋白还包括位点特异性C末端生物素部分。

39.实施方案37或38的抗原呈递表面,其中所述辅助TCR活化分子配体包括CD58分子或其片段,其中所述片段保留了与CD2的结合活性。

40.实施方案1-39中任一项的抗原呈递表面,其中所述辅助TCR活化分子包括抗CD2抗体或其片段,其中所述片段保留了与CD2的结合活性。

41.实施方案1-40中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的每一个非共价地连接至链霉亲和素,其中所述链霉亲和素非共价地连接至链霉亲和素结合分子,进一步地,其中所述链霉亲和素结合分子经由接头共价连接于抗原呈递表面,任选地其中所述链霉亲和素结合分子包括生物素。

42.实施方案1-40中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的每一个经由接头共价连接至表面。

43.实施方案41或42的抗原呈递表面,其中所述接头通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长将所述链霉亲和素结合分子和/或共活化分子配体连接至表面。

44.实施方案1-40中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体中的每一个非共价连接至链霉亲和素部分;所述链霉亲和素部分共价连接至抗原呈递表面。

45.实施方案42的抗原呈递表面,其中所述链霉亲和素部分通过接头经由一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长连接至表面。

46.实施方案5-45中任一项的抗原呈递表面,其中:

(i)所述多个表面封闭分子配体中的每一个包括亲水部分、两亲部分、两性离子部分和/或带负

电荷的部分;

(ii)所述多个表面封闭分子配体的每一个包括接头和末端表面封闭基团,任选地,其中所述多个

表面封闭分子配体的接头具有相同的长度或不同的长度;或者

(iii)所述多个表面封闭分子配体中的每一个包括接头和末端表面封闭基团,其中所述末端表面封

闭基团包括亲水性部分、两亲性部分、两性离子部分和/或带负电荷的部分,任选地其中所述多个表面封闭分子配体的接头具有相同的长度或具有不同的长度。

47.实施方案46的抗原呈递表面,其中:

(i)所述多个表面封闭分子配体具有相同的末端表面封闭基团;或者

(ii)所述多个表面封闭分子配体具有末端表面封闭基团的混合物;任选地,其中所述多个表面封

闭分子配体的每一个包括聚乙二醇(PEG)部分、羧酸部分或其组合,进一步任选地,其中所述每个表面封闭分子配体的PEG部分具有约10个原子至约100个原子的主链直链长度。

48.实施方案5-47中任一项的抗原呈递表面,其中:

(i)所述多个表面封闭分子配体中的每一个均共价连接至抗原呈递表面;和/或

(ii)所述多个表面封闭分子配体,并且可以包括2、3或4个不同的表面封闭基团和/或2、3、4

或更多个不同长度的接头,以任何组合选择。

49.实施方案1-48中任一项的抗原呈递表面,其还包括多个粘附刺激性分子配体,任选地其中每个粘附分子配体包括用于包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体。

50.实施方案49的抗原呈递表面,其中所述粘附刺激性分子配体通过接头共价连接至所述抗原呈递表面。

51.实施方案50的抗原呈递表面,其中所述粘附刺激性分子配体非共价附接至链霉亲和素部分,其中所述链霉亲和素部分经由接头共价附接至所述抗原呈递表面。

52.实施方案50的抗原呈递表面,其中所述粘附刺激性分子配体非共价附接至链霉亲和素,其中所述链霉亲和素非共价附接至生物素,并且所述生物素经由接头共价附接至所述抗原呈递表面。

53.实施方案1-52中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约3:1至约1:3。

54.实施方案1-53中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约1:2至约2:1。

55.实施方案1-54中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约1:1。

56.实施方案1-55中任一项的抗原呈递表面,其还包括多个生长刺激性分子配体,其中

所述生长刺激性分子配体中的每一个包括生长因子受体配体。

57.实施方案56的抗原呈递表面,其中所述生长因子受体配体包括细胞因子或其片段,其中所述片段保留了受体结合能力,任选地其中所述细胞因子包括IL-21。

58.实施方案1-57中任一项的抗原呈递表面,其是珠子的抗原呈递表面。

59.实施方案58的抗原呈递表面,其中所述珠子的表面积与具有相等体积或直径的球的表面积相差10%以内。

60.实施方案58的抗原呈递表面,其中所述珠子的表面积超过具有相等体积或直径的球的表面积的10%以上。

61.实施方案1-57中任一项的抗原呈递表面,其是微流体设备、晶片或管的抗原呈递表面。

62.实施方案61的抗原呈递表面,其还包括第一部分和第二部分,其中所述多个主活化分子配体的分布和所述多个共活化分子配体的分布位于所述抗原呈递表面的第一部分,并且所述第二部分被构造为基本上排除所述主活化分子配体。

63.实施方案62的抗原呈递表面,其中所述多个表面封闭分子配体中的至少一个

位于抗原呈递表面的至少一个内表面的第二部分中。

64.62或63的抗原呈递表面,其中所述抗原呈递表面的第一部分还包括多个第一区域,每个第一区域包括所述多个主活化分子配体的至少一个子集,其中所述多个第一区域中的每一个通过构造为基本上排除主活化分子配体的第二部分与所述多个第一区域中的另一个相分隔开。

65.实施方案64的抗原呈递表面,其中所述包括多个主活化分子配体的至少一个子集的多个第一区域中的每一个还包括所述多个共活化分子配体的子集。

66.实施方案64或65的抗原呈递表面,其中所述包括至少多个主活化分子配体的子集的多个第一区域中的每一个具有约0.10平方微米至约4.0平方微米的面积。

67.实施方案64-66中任一项的抗原呈递表面,其中所述包括至少多个主活化分子配体的子集的多个第一区域中的每一个的面积为约4.0平方微米至约0.8平方微米。

68.实施方案64-67中任一项的抗原呈递表面,其中所述多个第一区域中的每一个还包括至少多个粘附刺激性分子配体的子集,并且任选地其中每个粘附刺激性分子配体包括用于包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体。

69.实施方案63-68中任一项的抗原呈递表面,其中被构造为基本上排除主活化分子配体的第二部分也被构造为基本上排除共活化分子配体。

70.实施方案62-69中任一项的抗原呈递表面,其中被构造为基本排除主活化分子配体的第二部分还构造为包括多个生长刺激性分子配体,其中每个生长刺激性分子配体包括生长因子受体配体。

71.实施方案62-70中任一项的抗原呈递表面,其中被构造为基本上排除主活化分子配体的第二部分包括多个粘附刺激性分子配体,其中每个粘附刺激性分子配体包括用于包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体。

72.实施方案61-71中任一项的抗原呈递表面,其是晶片的抗原呈递表面。

73.实施方案61-71中任一项的抗原呈递表面,其是管的抗原呈递表面。

74.实施方案61-71中任一项的抗原呈递表面,其是微流体设备的抗原呈递表面。

75.实施方案74的抗原呈递微流体设备,其中包括至少多个主活化分子配体的子集的多个第一区域中的每一个被布置在抗原呈递微流体设备的腔室内的至少一个表面。

76.实施方案75的抗原呈递微流体设备,其中所述腔室是隔离围栏。

77.实施方案74-76所述的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体设备还包括用于容纳第一流体介质流动的流动区域;以及所述隔离围栏包括用于容纳第二流体介质的分离区域,所述分离区域具有单个开口,其中所述隔离围栏的分离区域是微流体设备的未被扫过区域;以及连接区域,其将分离区域流体地连接至流动区域;任选地,其中所述微流体设备包括微流体通道,所述微流体通道包括至少一部分流动区域。

78.实施方案77的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体设备包括包含至少一部分流动区域的微流体通道,并且所述连接区域包括通向所述微流体通道的近端开口和通向分离区域的远端开口,所述近端开口的宽度W_{con}为约20微米至约100微米,其中从所述近端开口到所述远端开口的连接区域的长度L_{con}至少是连接区域的近端开口的宽度W_{con}的1.0倍。

79.实施方案78的抗原呈递微流体设备,其中从所述近端开口到所述远端开口的

连接区域的长度L_{con}至少是连接区域的近端开口的宽度W_{con}的1.5倍。

80.实施方案78的抗原呈递微流体设备,其中从所述近端开口到所述远端开口的连接区域的长度L_{con}至少是连接区域的近端开口的宽度W_{con}的2.0倍。

81.实施方案78-80中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述连接区域的近端开口的宽度W_{con}在约20微米至约60微米的范围内。

82.实施方案78-81中任一项的抗原呈递微流体设备,其中从所述近端开口到所述远端开口的连接区域的长度L_{con}在约20微米至约500微米之间。

83.实施方案78-82中任一项的抗原呈递微流体设备,其中在所述连接区域的近端开口处的微流体通道的宽度在约50微米至约500微米之间。

84.实施方案78-83中任一项的抗原呈递微流体设备,其中在所述连接区域的近端开口处的微流体通道的高度为20微米至100微米。

85.实施方案77-84中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述分离区域的体积为约2×10^4至约2×10^6立方微米。

86.实施方案77-85中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述连接区域的近端开口平行于第一介质在所述流动区域中的流动方向。

87.实施方案77-86中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体设备包括包含基部的外壳,布置在所述基部上的微流体管路结构和共同限定微流体管路的盖,并且所述微流体管路包括流动区域、微流体通道和隔离围栏。

88.实施方案77-87中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体管路还包括一个或多个入口,通过所述入口可将第一介质输入到流动区域中,以及一个或多个出口,通过所述出口可将第一介质从流动区域中去除。

89.实施方案87的抗原呈递微流体设备,其中所述盖是所述微流体管路结构的集成部分。

90.实施方案87或88的抗原呈递微流体设备,其中界定所述微流体隔离围栏的屏障从所述微流体设备的基部的表面延伸至所述微流体设备的盖的表面。

91.实施方案87-90中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述盖和所述基部是介电电泳(DEP)机制的一部分,其用于选择性地在微物体上诱导DEP力。

92.实施方案87-91中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体设备还包括第一电极、电极活化衬底和第二电极,其中所述第一电极是所述外壳的第一壁的一部分和所述电极活化衬底,所述第二电极是所述外壳的第二壁的一部分,其中所述电极活化衬底包括光电导材料、半导体集成电路或光电晶体管。

93.实施方案92的抗原呈递微流体设备,其中所述微流体设备的第一壁是盖,并且其中所述微流体设备的第二壁是基部。

94.实施方案92或93的抗原呈递微流体设备,其中所述电极活化衬底包括光电晶体管。

95.实施方案87-94中任一项的抗原呈递微流体设备,其中所述盖和/或所述基部对光是透明的。

96.实施方案61-95中任一项的抗原呈递微流体设备,其中第二部分设置在所述抗原呈递微流体设备的微流体通道的至少一个表面。

97.共价官能化合成表面,其包括至少一种多个生物素结合剂或生物素官能团和至少一种多个表面封闭分子配体,其中生物素结合剂或生物素官能团中的每一个和多个表面封闭分子配体中的每一个共价连接至所述共价官能化合成表面。

98.实施方案97的共价官能化合成表面,其中所述表面包括多个生物素官能团。

99.实施方案98的共价官能化合成表面,其中所述表面还包括通过生物素官能团非共价附接至所述表面的多个生物素结合剂官能图。

100.实施方案97-99中任一项的共价官能化合成表面,其中所述多个生物素官能团中的每一个经由接头连接至所述共价官能化表面。

101.实施方案97-100中任一项的共价官能化合成表面,其中所述生物素结合剂是链霉亲和素。

102.实施方案97或101的共价官能化合成表面,其中所述多个生物素或生物素结合剂官能团中的每一个经由接头连接至所述共价官能化表面。

103.实施方案102的共价官能化合成表面,其中连接生物素或生物素结合剂官能团的接头的长度为约20埃至约100埃。

104.实施方案102或103的共价官能化合成表面,其中所述接头通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长将生物素结合剂功能团连接至所述表面。

105.实施方案102或103的共价官能化合成表面,其中所述接头通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长将生物素连接至所述表面。

106.实施方案102-105中任一项的共价官能化合成表面,其中生物素或生物素结合剂官能团中每一个的接头包括聚乙二醇(PEG)部分。

107.实施方案106的共价官能化合成表面,其中所述PEG接头包括$(PEG)_{13}$重复序列,可选地其中所述表面包括多个生物素结合剂官能团。

108.实施方案106的共价官能化合成表面,其中所述PEG接头包括$(PEG)_{4}$重复序列,可选地其中所述表面包括多个生物素官能团。

109.实施方案97-108中任一项的共价官能化合成表面,其中:

(i)所述多个表面封闭分子配体中的每一个包括亲水部分、两亲部分、两性离子部分和/或带负

电荷的部分;

(ii)所述多个表面封闭分子配体的每一个包括接头和末端表面封闭基团,任选地,其中所述多个表面封闭分子配体的接头具有相同的长度或不同的长度;或者

(iii)所述多个表面封闭分子配体中的每一个包括连接基和末端表面封闭基团,其中所述末端表面封闭基团包括亲水性部分、两亲性部分、两性离子部分和/或带负电荷的部分,任选地其中所述多个表面封闭分子配体的接头具有相同的长度或具有不同的长度。

(iv)所述多个表面封闭分子配体中的每一个共价连接至抗原呈递表面;和/或

(v)所述多个表面封闭分子配体,并且可以包括2、3或4个不同的表面封闭基团和/或2、3、4

或更多个不同长度的接头,以任何组合选择。

110.实施方案109的共价官能化合成表面,其中:

(i)所述多个表面封闭分子配体具有相同的末端表面封闭基团;或者

(ii)所述多个表面封闭分子配体具有末端表面封闭基团的混合物;任选地,其中所述多个表面封

闭分子配体中的每一个包括聚乙二醇(PEG)部分、羧酸部分或其组合。

111.实施方案108的共价官能化合成表面,其中每个表面封闭分子配体的PEG部分具有约10个原子至约100个原子的主链直链长度。

112.实施方案97-111中任一项的共价官能化合成表面,其中在其附接的每个部分或子区域中,至少一种多个链霉亲和素部分以每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子的密度设置在所述共价官能化合成表面上。

113.实施方案97-111中任一项的共价官能化合成表面,其中在其附接的每个部分或子区域中,至少一种多个链霉亲和素部分以每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子的密度设置在所述共价官能化合成表面上。

114.实施方案97-111中任一项的共价官能化合成表面,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述至少一种多个链霉亲和素部分以每平方微米约6×10^2至约5×10^3个分子,每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子设置在共价官能化合成表面上。

115.实施方案97-114中任一项的共价官能化合成表面,其中所述表面包括玻璃、聚合物、金属、陶瓷和/或金属氧化物。

116.实施方案97-115中任一项的共价官能化合成表面,其中所述共价官能化合成表面是共价官能化的晶片、管的共价官能化的内表面或微流体设备的共价官能化的内表面。

117.实施方案116的共价官能化合成表面,其中所述管是玻璃或聚合物管。

118.实施方案97-115中任一项的共价官能化合成表面,其中所述共价官能化合成表面是共价官能化珠子。

119.实施方案118的共价官能化合成表面,其中所述共价官能化珠子包括磁性材料。

120.实施方案118或119的共价官能化合成表面,其中所述珠子的表面积与相等体积或直径的球的表面积相差在10%以内。

121.实施方案118-120中任一项的共价官能化合成表面,其中至少一种多个链霉亲和素或生物素部分设置在基本上所有的共价官能化合成表面上。

122.实施方案97-117中任一项的共价官能化合成表面,其还包括第一部分和第二部分,其中至少一种多个链霉亲和素或生物素官能团的分布位于所述共价修饰的合成表面的第一部分中,并且至少一种多个表面封闭分子配体的分布位于第二部分中。

123.实施方案122的共价官能化合成表面,其中第二多个表面封闭分子配体设置在该共价官能化合成表面的第一部分中。

124.实施方案123的共价官能化合成表面,其中第二多个表面封闭分子配体限制了由所述共价官能化合成表面形成的抗原呈递合成表面的官能化部分的密度。

125.实施方案123或125的共价官能化合成表面,其中所述共价官能化合成表面的

第一部分还包括多个第一区域,每个第一区域包括至少所述多个链霉亲和素或生物素功能团的子集,其中所述多个第一区域中的每一个与所述多个第一区域中的另一个通过构造为基本排除链霉亲和素或生物素功能团的第二区域相分隔开。

126.实施方案125的共价官能化合成表面,其中所述包括至少多个链霉亲和素或生物素官能团的子集的多个第一区域中的每一个具有约0.10平方微米至约4.0平方微米的面积。

127.实施方案125或126的共价官能化合成表面,其中所述包括至少多个主活化分子配体的子集的多个第一区域中的每一个的面积为约4.0平方微米至约0.8平方微米。

128.实施方案97-116或122-127中任一项的共价官能化合成表面,其中所述共价官能化合成表面是微流体设备的至少一个内表面。

129.实施方案128的共价官能化合成表面,其中所述包括至少多个链霉亲和素或生物素官能团的子集的多个第一区域中的每一个包括在微流体设备的腔室内的至少一个表面。

130.实施方案129的共价官能化合成表面,其中所述腔室是隔离围栏。

131.用于制备活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递合成表面的试剂盒,包括:

a.实施方案95-128中任一项的共价官能化合成表面,其包括多个非共价或共价结合的第一偶联剂;和

b.第一修饰试剂,其包括多个被构造为与T细胞的T细胞受体结合的主要组织相容性复合体(MHC)I分子,并且进一步地,其中,MHC分子被构造为结合至共价官能化合成表面的多个非共价或共价结合的第一偶联剂的第一子集中的一个;任选地,其中所述第一偶联剂是生物素结合剂。

132.实施方案131的试剂盒,其中所述多个MHC分子中的每一个还包括至少一个生物素官能团。

133.实施方案131或132的试剂盒,其还包括包含多个共活化分子的试剂,每个共活化分子被构造为结合共价官能化合成表面的多个非共价或共价结合的第一偶联剂的第二子集中的一个。

134.实施方案133的试剂盒,其中所述多个共活化分子中的每一个包括生物素官能团。

135.实施方案134的试剂盒,其中所述多个共活化分子中的每一个还包括位点特异性C末端生物素部分。

136.实施方案133-135中任一项的试剂盒,其中每个共活化分子包括T细胞受体(TCR)共活化分子、辅助TCR活化分子或其任何组合。

137.实施方案136的试剂盒,其中所述多个共活化分子配体包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

138.实施方案136或137的试剂盒,其中容纳包括多个共活化分子的试剂的容器以约100:1至约1:100或以约3:1至约1:3的比例包括所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子和/或辅助TCR活化分子。

139.实施方案136-138中任一项的试剂盒,其中容纳包括多个共活化分子的试剂的容器以约10:1至约1:10或约10:1至约1:20的比例包括所述多个共活化分子配体的TCR共

活化分子和辅助TCR活化分子。

140.实施方案136-139中任一项的试剂盒,其中所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子和辅助TCR活化分子的比例为100:1至90:1、90:1至80:1、80:1至70:1、70:1至60:1、60:1至50:1、50:1至40:1、40:1至30:1、30:1至20:1、20:1至10:1、10:1至1:1、3:1至1:3;1:1至1:10、1:10至1:20、1:20至1:30、1:30至1:40、1:40至1:50、1:50至1:60、1:60至1:70、1:70至1:80、1:80至1:90或1:90至1:100,其中每个前述值均用“约”修饰。

141.实施方案136-140中任一项的试剂盒,其中容纳包括多个共活化分子的试剂的容器以约20:1至约1:20的比例包括所述多个共活化分子配体的TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

142.实施方案136的试剂盒,其中包括多个共活化分子的试剂被容纳在两个容器中,其中第一容器容纳T细胞受体(TCR)共活化分子,而第二容器容纳辅助TCR活化分子。

143.实施方案136-142中任一项的试剂盒,其中所述TCR共活化分子是CD28结合蛋白或其保留了与CD28结合能力的片段。

144.实施方案136-143中任一项的试剂盒,其中所述辅助TCR共活化分子是CD2结合蛋白或其片段。

145.实施方案131-144中任一项的试剂盒,所述试剂盒还包括包含粘附刺激性分子的试剂,其中每个粘附刺激性分子包括针对包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体,其被构造为与共价官能化合成表面的多个非共价或共价结合的第一偶联剂官能团的第三子集反应。

146.实施方案145的试剂盒,其中所述粘附刺激性分子包括生物素官能团。

147.实施方案131-146中任一项的试剂盒,其还包括包含生长刺激性分子的试剂,其中每个生长刺激性分子包括生长因子受体配体。

148.实施方案147的试剂盒,其中所述生长因子受体配体包括细胞因子或其片段。

149.实施方案148的试剂盒,其中所述细胞因子包括IL-21或其片段。

150.实施方案147-149中任一项的试剂盒,其还包括一个或多个另外的生长刺激性分子。

151.实施方案150的试剂盒,其中所述一个或多个另外的的生长刺激性分子包括IL2和/或IL7或其片段。

152.实施方案148-151中任一项的试剂盒,其中所述生长刺激性分子附接至共价修饰珠子。

153.实施方案131-152中任一项的试剂盒,其中所述第一偶联剂是链霉亲和素。

154.制备共价官能化表面的方法,所述表面包括多个生物素结合剂或生物素官能团以及至少第一多个表面封闭分子配体,其中所述方法包括:使中间反应性合成表面的反应性部分的至少第一子集与多个连接试剂反应,每个连接试剂包括生物素结合剂或生物素;使中间反应性合成表面的反应性部分的至少第二子集与多个表面封闭分子反应,从而提供包括至少一个生物素结合剂或生物素官能团和至少第一多个表面封闭分子配体的共价官能化合成表面。

155.实施方案154的方法,其中所述连接试剂包括生物素,并且所述方法还包括将生物素结合剂与所述生物素官能团非共价结合。

156.实施方案154或155的方法,其中所述中间反应性合成表面的至少第一区域的反应性部分包括叠氮化物部分。

157.实施方案154-156中任一项的方法,其中所述表面封闭分子的反应在包括生物素结合剂或生物素官能团的连接试剂反应之后进行。

158.实施方案154-156中任一项的方法,其中所述表面封闭分子的反应与所述多个连接试剂的反应同时进行。

159.实施方案154-158中任一项的方法,其中所述多个生物素结合剂或生物素官能团以及所述至少第一多个表面封闭分子配体被布置在所述共价官能化合成表面的至少第一区域中。

160.实施方案159的方法,其中所述共价官能化合成表面包括第二区域,其中所述多个生物素结合剂或生物素官能团被排除。

161.实施方案160的方法,其中所述至少第一多个表面封闭分子配体布置在所述共价官能化合成表面的第二区域中。

162.实施方案161的方法,其中在所述中间反应性合成表面的至少第一区域中的包括生物素结合剂或生物素官能团的连接试剂的反应之前,进行所述中间反应性合成表面的第二区域中的包括表面封闭分子的试剂的反应。

163.实施方案162的方法,其还包括使第二多个表面封闭分子与所述中间反应性合成表面的至少第一区域中的反应性部分的第二子集反应。

164.实施方案159-163中任一项的方法,其中在共价制备的包括反应性部分的合成表面的至少第一区域的多个子区域中进行多个生物素结合剂或生物素官能团的反应以及至少第一多个表面封闭分子的反应。

165.实施方案154-164中任一项的方法,所述方法还包括制备所述中间反应性合成表面,包括:使包括叠氮化物反应性部分的至少第一表面制备试剂与设置在反应性合成表面的至少第一区域上的表面暴露部分反应。

166.实施方案165的方法,其还包括使设置在反应性合成表面的第二区域中的表面暴露部分的第二部分与多个表面封闭分子反应。

167.实施方案165或166的方法,其中所述反应性合成表面的至少第一区域的表面暴露部分和所述反应性合成表面的第二区域的表面暴露部分不是相同的表面暴露部分。

168.实施方案166或167的方法,其中所述反应性合成表面的第二部分包括表面暴露部分,其被构造为基本上不与所述多个主活化和共活化分子反应。

169.实施方案166-168中任一项的方法,其中在使合成表面的第一部分的表面暴露部分与至少第一表面制备试剂反应以在所述表面的第一部分上提供共价制备表面之前,进行反应性合成表面的第二部分的表面暴露部分与多个表面封闭分子的反应。

170.实施方案165-169中任一项的方法,其中所述表面暴露部分是亲核部分。

171.实施方案165-170中任一项的方法,其中所述表面暴露部分是可移位部分。

172.实施方案154-171中任一项的方法,其中在其附接的每个区域中,所述多个生物素结合剂或生物素官能团在共价官能化合成表面上的分布为每平方微米约6×10^{2}至约5×10^{3}个分子

173.实施方案154-171中任一项的方法,其中在其附接的每个区域中,所述多个生

物素结合剂或生物素官能团在共价官能化合成表面上的分布为每平方微米约5×10^3分子至约1×10^4个分子。

174.实施方案154-171中任一项的方法,其中在其附接的每个区域中,所述多个生物素结合剂或生物素官能团在共价官能化合成表面上的分布为每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4到约3×10^4个分子,每平方微米约1×10^4到约2×10^4个分子或每平方微米约1.25×10^4到约1.75×10^4个分子。

175.实施方案154-174中任一项的方法,其中所述表面是金属、玻璃、陶瓷、聚合物或金属氧化物。

176.实施方案154-175中任一项的方法,其中所述表面是珠子表面、任何构造的晶片表面、管的内表面或微流体设备的至少一个内表面。

177.实施方案176的方法,其中所述珠子的表面积与相等体积或直径的球的表面积相差在10%以内。

178.实施方案176的方法,其中所述管是玻璃或聚合物管。

179.实施方案154或156-178中任一项的方法,其中所述连接试剂包括生物素结合剂。

180.实施方案154-179中任一项的方法,其还包括制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面,包括:

使多个主活化分子与设置在共价官能化表面上的第一多个结合部分反应,每个主活化分子包括被构造为与T细胞的T细胞受体(TCR)结合的主要组织相容性复合体(MHC)I类分子,其中所述第一多个结合部分中的每一个被构造用于结合主活化分子;和使多个共活化分子与被构造用于结合所述共活化分子的共价官能化表面的第二多个结合部分反应,每个共活化分子包括:TCR共活化分子;或辅助的TCR活化分子,从而在抗原呈递表面上提供了多个特异性结合的主活化分子配体和多个特异性结合的共活化分子配体。

181.制备用于活化T淋巴细胞(T细胞)的抗原呈递表面的方法,包括:

使多个主活化分子与设置在共价官能化表面上的第一多个结合部分反应,每个主活化分子包括被构造为结合T细胞的T细胞受体(TCR)的主要的组织相容性复合体(MHC)I类分子,其中第一多个结合部分中的每一个被构造为用于结合主活化分子;和使多个共活化分子与被构造用于结合所述共活化分子的共价官能化表面的第二多个结合部分反应,每个共活化分子包括:TCR共活化分子或辅助的TCR活化分子;从而在抗原呈递表面上提供了多个特异性结合的主活化分子配体和多个特异性结合的共活化分子配体。

182.实施方案181的方法,其中所述多个共活化分子配体包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

183.实施方案181或182的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约100:1至约1:100。

184.实施方案181-183中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约10:1至约1:10。

185.实施方案181-184中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为100:1至90:1、90:1至80:1、80:1至70:1、70:1至60:

1、60:1至50:1、50:1至40:1、40:1至30:1、30:1至20:1、20:1至10:1、10:1至1:1、3:1至1:3;1:1至1:10、1:10至1:20、1:20至1:30、1:30至1:40、1:40至1:50、1:50至1:60、1:60至1:70、1:70至1:80、1:80至1:90或1:90至1:100,其中每个前述值都用“约”修饰。

186.实施方案181-185中任一项的方法,其中所述TCR共活化分子与所述辅助TCR活化分子的比例为约20:1至约1:20或约3:1至约1:3。

187.实施方案181-186中任一项的方法,其还包括使多个表面封闭分子与所述共价官能化表面的第三多个结合部分反应,其中第三多个结合部分中的每一个被构造用于结合表面封闭分子。

188.实施方案181-187中任一项的方法,其中所述MHC分子包括蛋白质序列和β微球蛋白。

189.实施方案181-188中任一项的方法,其中所述包括MHC分子的多个主活化分子中的每一个还包括肿瘤特异性抗原。

190.实施方案189的方法,其中所述肿瘤特异性抗原是SLC45A2、TCL1、VCX3A、MART1或NYESO1。

191.实施方案181-190中任一项的方法,其还包括使多个粘附刺激性分子配体与所述共价官能化表面的第四多个结合部分反应,其中每个粘附刺激性分子配体包括针对包括ICAM蛋白序列的细胞粘附受体的配体,其中第四多个结合部分中的每一个被构造为用于结合细胞粘附受体配体分子。

192.实施方案181-191中任一项的方法,其中所述共价官能化表面的第一多个结合部分中的每一个包括生物素结合剂或生物素部分。

193.实施方案181-192中任一项的方法,其中所述第一多个结合部分和所述第二多个结合部分包括相同的结合部分。

194.实施方案181-193中任一项的方法,其中被构造为结合表面封闭分子的第二多个结合部分和第三多个结合部分包括相同的结合部分。

195.实施方案181-194中任一项的方法,其还包括通过使中间反应性表面的反应性部分的至少第一子集与各自包括结合部分的第一连接试剂反应来产生包括第一多个结合部分的共价官能化表面。

196.实施方案195的方法,其中所述结合部分是生物素结合剂。

197.实施方案193-196中任一项的方法,其中所述第二多个结合部分是至少第一多个结合部分的第二子集。

198.实施方案195-197中任一项的方法,其中所述共价官能化合成表面的第二多个结合部分是所述中间反应性表面的反应性部分的第二子集。

199.实施方案187-198中任一项的方法,其中被构造为结合表面封闭分子的第三多个结合部分是至少第一多个结合部分的第三子集。

200.实施方案195-198中任一项的方法,其中被构造为结合表面封闭分子的第三多个结合部分是中间反应性珠子的反应性部分的另一子集。

201.实施方案181-200中任一项的方法,其中所述共价官能化表面包括金属、玻璃、陶瓷、聚合物、金属氧化物或其任何组合。

202.实施方案181-201中任一项的方法,其中所述MHC分子包括MHC蛋白序列和β微

球蛋白。

203.实施方案202的方法,其中所述MHC分子通过MHC蛋白序列的C端连接而连接至共价修饰表面。

204.实施方案181-203中任一项的方法,其中所述MHC分子还包括抗原特异性肽序列。

205.实施方案181-204中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在抗原呈递表面上的密度为每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子。

206.实施方案181-204中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在抗原呈递表面上的密度为每平方微米约2×10^3至约5×10^3个分子。

207.实施方案181-204中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在抗原呈递表面上的密度为每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子。

208.实施方案181-207中任一项的方法,其中所述TCR共活化分子包括CD28结合蛋白或其片段。

209.实施方案209的方法,其中所述CD28结合蛋白或其片段还包括位点特异性C末端生物素部分。

210.实施方案181-209中任一项的方法,其中所述TCR共活化分子包括CD80分子或其片段,其中所述片段保留了与CD28的结合活性。

211.实施方案181-209中任一项的方法,其中所述TCR共活化分子包括抗CD28抗体或其片段。

212.实施方案181-211中任一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括CD2结合蛋白。

213.实施方案212的方法,其中所述CD2结合蛋白或其片段还包括位点特异性C末端生物素部分。

214.实施方案181-213中任一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括CD58分子或其片段,其中所述片段保留了与CD2的结合活性。

215.实施方案181-214中一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括抗CD2抗体或其片段。

216.实施方案181-215中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面上的所述主活化分子配体与所述共活化分子配体的比例为约1:10至约2:1、约1:5至约2:1、约1:2至约2:1、约1:10至约1:1、约1:5至约1:1、约1:1至约2:1或约1:2至约1:1。

217.实施方案181-216中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面上的所述主活化分子配体与所述共活化分子配体的比例为约1:1。

218.实施方案181-217中任一项的方法,其中所述方法产生根据实施方案1-96中任一项的抗原呈递表面。

219.实施方案181-218中任一项的方法,其中所述共价官能化表面是珠子的表面。

220.实施方案181-218中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面是抗原呈递珠子。

221.实施方案219-220中任一项的方法,其中所述珠子的表面积与相等体积或直径的球的表面积相差在10%以内。

222.实施方案219-221中任一项的方法,其中所述珠子包括玻璃。

223.实施方案219-222中任一项的方法,其中所述珠子包括聚合物。

224.实施方案219-223中任一项的方法,其中所述珠子包括磁性材料。

225.实施方案181-224中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约3:1至约1:3。

226.实施方案181-225中任一项的方法,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约4×10^2至约3×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递珠子的表面上。

227.实施方案181-226中任一项的方法,其中所述多个主活化分子配体在所述抗原呈递珠子上的分布为每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子。

228.实施方案181-226中任一项的方法,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约2×10^3至约3×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递珠子的表面的至少一部分上。

229.实施方案181-226中任一项的方法,其中所述多个主活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递珠的表面的至少一部分上。

230.实施方案219-229中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体在抗原呈递珠上的分布为每平方微米约2×10^2至约1×10^3个分子。

231.实施方案219-230中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体在抗原呈递珠上的分布为每平方微米约1×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.5×10^4个分子。

232.实施方案181-218或225-231中任一项的方法,其中所述共价官能化表面是微流体设备的内表面。

233.实施方案181-218或225-229或232中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面是微流体设备的抗原呈递内表面。

234.实施方案233的方法,其中包括抗原呈递内表面的微流体设备是实施方案61-96中任一项的微流体设备。

235.实施方案181-218或224-229中任一项的方法,其中所述共价官能化表面是晶片的表面。

236.实施方案181-218或224-229或235中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面是抗原呈递晶片。

237.实施方案181-218或224-2231中任一项的方法,其中所述共价官能化表面是管的内表面。

238.实施方案181-218或224-229或237中任一项的方法,其中所述抗原呈递表面是管的抗原呈递内表面。

239.实施方案237或238中任一项的方法,其中所述管是(i)玻璃管或(ii)聚合物

管。

240.实施方案181-239中任一项的方法,其中在所述多个共活化分子与所述第二多个结合部分反应之前,使所述多个主活化分子与所述第一多个结合部分反应。

241.实施方案154-240中任一项的方法,其还包括产生中间反应性表面,包括:使布置在合成反应性表面的至少第一部分上的至少第一多个表面暴露部分与多个包括反应性部分的中间制备分子反应,从而产生包括多个包括反应性部分的中间反应性表面。

242.实施方案241的方法,其中产生中间反应性表面还包括使布置在合成反应性表面的至少第一部分上的至少第二多个表面暴露部分与多个表面封闭分子反应。

243.实施方案241或242的方法,其还包括使布置在所述合成反应性表面的第二部分中的第二多个表面暴露部分与多个表面封闭分子反应,从而在中间反应性表面的第二部分提供多个表面封闭分子配体。

244.实施方案243的方法,其中每个表面封闭分子配体被构造为排除包括MHC分子的主活化分子配体。

245.实施方案241-244中任一项的方法,其中所述表面暴露部分是亲核部分。

246.实施方案241-244中任一项的方法,其中所述表面暴露部分是可移位部分。

247.实施方案241-246中任一项的方法,其中所述合成反应性表面的至少第一部分的表面暴露部分和所述合成反应性表面的第二部分的表面暴露部分不是相同的表面暴露部分。

248.实施方案241-247中任一项的方法,其中在共价官能化表面的至少第一部分的多个子区域中进行所述多个主活化分子的反应和所述多个共活化分子的反应,其中每个子区域包括各自的第一结合部分和第二结合部分。

249.实施方案248的方法,其还包括使所述多个表面封闭分子在包括结合部分的共价官能化表面的至少第一部分的多个子区域中反应。

250.实施方案249的方法,其中在多个子区域进行所述多个主活化分子的反应和所述多个共活化分子的反应之前,在共价官能化表面的至少第一部分的多个子区域进行多个表面封闭分子的反应。

251.实施方案248的方法,其中在所述多个子区域进行多个主活化分子的反应和多个共活化分子的反应之后,在所述共价官能化表面的至少第一部分的多个子区域进行所述多个表面封闭分子的反应。

252.实施方案241-250中任一项的方法,其中所述共价官能化表面的多个第一子区域中的每一个与所述多个第一子区域中的另一个通过所述共价官能化表面的第二部分相分隔开。

253.实施方案252的方法,其还包括使多个表面封闭分子与位于所述共价官能化表面的第二部分处的相应多个结合部分反应。

254.实施方案252的方法,其中所述中间反应性表面的第二部分包括被构造为基本上不与所述多个主活化和共活化分子反应的表面暴露部分。

255.实施方案253或254的方法,其中使所述合成反应性表面的第一部分的表面暴露部分与一个或多个表面制备试剂反应之前,使所述合成反应性表面的第二部分的表面暴露部分与多个表面封闭分子进行反应,从而提供中间反应性表面。

256.实施方案181-255中任一项的方法,其中在进行包括MHC分子的第一多个分子的反应之后进行所述多个共活化分子的反应。

257.实施方案227-256中任一项的方法,其中所述MHC分子经由所述MHC蛋白序列的C-末端连接而连接至所述抗原呈递表面。

258.实施方案181-257中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在所述抗原呈递表面上的分布为每平方微米约有4×10^2至约2×10^3个分子。

259.实施方案181-258中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在所述抗原呈递表面上的分布为每平方微米约2×10^3至约5×10^3个分子。

260.实施方案181-258中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体在所述抗原呈递晶片上的分布为每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,或每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4分子个分子。

261.实施方案181-260中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体在抗原呈递表面上的分布为每平方微米约2×10^2至约1×10^3个分子。

262.实施方案181-260中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体在抗原呈递表面上的分布为每平方微米约1×10^3至约5×10^3个分子。

263.实施方案181-260中任一项的方法,其中在存在共活化分子配体的抗原呈递表面的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体在所述抗原呈递表面上的分布为每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4个分子,每平方微米约1×10^4至约1.5×10^4个分子,每平方微米约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子或每平方微米约1.25×10^4至约1.5×10^4个分子。

264.实施方案154-263中任一项的方法,其中所述生物素结合剂是链霉亲和素。

265.活化T淋巴细胞(T细胞)的方法,包括:使多个T细胞与抗原呈递合成表面接触,所述表面包括:多个主活化分子配体,每个包括被构造为结合至T细胞的T细胞受体的主要的组织相容性(MHC)I类分子;和多个共活化分子配体,每个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子;以及培养与抗原呈递合成表面接触的所述多个T细胞,从而将所述多个T细胞中的至少一部分转化为活化T细胞。

266.活化T淋巴细胞(T细胞)的方法,所述方法包括:使多个T细胞与实施方案1-96中任一项的抗原呈递合成表面接触;以及培养与抗原呈递合成表面接触的所述多个T细胞,从而将所述多个T细胞中的至少一部分转化为活化T细胞。

267.实施方案265或266的方法,其中所述T细胞包括CD8+T细胞。

268.实施方案265-267中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体包括TCR共活化分子和辅助TCR活化分子。

269.实施方案265-268中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约100:1至约1:100。

270.实施方案265-269中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为100:1至90:1、90:1至80:1、80:1至70:1、70:1至60:1、60:1至50:1、50:1至40:1、40:1至30:1、30:1至20:1、20:1至10:1、10:1至1:1、3:1至1:3;1:1至1:10、1:10至1:20、1:20至1:30、1:30至1:40、1:40至1:50、1:50至1:60、1:60至1:70、1:70至1:80、1:80至1:90或1:90至1:100,其中每个前述值都用“约”修饰。

271.实施方案265-270中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约20:1至约1:20或约3:1至约1:3。

272.实施方案265-271中任一项的方法,其中所述多个MHC分子各自包括MHC蛋白序列和β微球蛋白。

273.实施方案272的方法,其中所述MHC分子的蛋白质序列经由所述蛋白质序列的C-末端连接而连接至所述抗原呈递合成表面。

274.实施方案265-273中任一项的方法,其中所述MHC分子包括生物素部分,并经由与生物素结合剂的非共价相互作用而附接至所述抗原呈递合成表面。

275.实施方案274的方法,其中所述生物素结合剂自身共价键合至所述抗原呈递合成表面。

276.实施方案275的方法,其中所述生物素结合剂通过一系列约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长键合至所述表面。

277.实施方案274的方法,其中所述生物素结合剂与所述抗原呈递合成表面非共价联合。

278.实施方案274的方法,其中所述生物素结合剂与生物素非共价联合,并且所述生物素共价键合至所述抗原呈递合成表面。

279.实施方案278的方法,其中所述生物素通过接头经由一系列约2至约15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、95、100、200键长,或其间任意数量的键长连接至所述表面。

280.实施方案274-279中任一项的方法,其中所述生物素结合剂是链霉亲和素。

281.实施方案265-280中任一项的方法,其中所述MHC分子还包括抗原分子。

282.实施方案281的方法,其中所述抗原分子是SLC45A2、TCL1、VCX3A、MART1或NYESO1。

283.实施方案265-282中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的每一个连接至所述抗原呈递合成表面。

284.实施方案265-283中任一项的方法,其中所述T细胞受体(TCR)共活化分子包括CD28结合蛋白或其保留了与CD28结合能力的片段。

285.实施方案284的方法,其中所述CD28结合蛋白或其片段还包括位点特异性C末端生物素部分。

286.实施方案265-285中任一项的方法,其中所述T细胞受体(TCR)共活化分子包括CD80分子或其片段,其中所述片段保留了与CD28的结合活性。

287.实施方案265-286中任一项的方法,其中所述T细胞受体(TCR)共活化分子包括抗CD28抗体或其片段。

288.实施方案265-287中任一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括CD2结合蛋白。

289.实施方案288的方法,其中所述CD2结合蛋白或其片段还包括位点特异性C末端生物素部分。

290.实施方案265-289中任一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括CD58分子或其片段,其中所述片段保留了与CD2的结合活性。

291.实施方案265-290中任一项的方法,其中所述辅助TCR活化分子包括抗CD2抗体或其片段。

292.实施方案265-291中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体以每平方微米约4×10^2至约2×10^3个分子的密度存在于所述抗原呈递表面的至少一个区域上。

293.实施方案265-292中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体以每平方微米约2×10^2至约1×10^3个分子的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分上。

294.实施方案265-292中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个主活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约3×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递合成表面的至少一部分上。

295.实施方案265-292或294中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^2至约1.5×10^4个分子的密度设置在所述抗原呈递合成表面的至少一部分上。

296.实施方案265-295中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多种主活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4,约2×10^3至约5×10^3,约1×10^4至约2×10^4或约1.25×10^4至约1.75×10^4个分子密度存在于所述抗原呈递表面的至少一个区域中。

297.实施方案265-296中任一项的方法,其中在其附接的每个部分或子区域中,所述多个共活化分子配体以每平方微米约5×10^3至约2×10^4个分子,每平方微米约5×10^3至约1.5×10^4分子,每平方微米约1×10^4至约2×10^4,每平方微米约1×10^4至约1.5×10^4,约1.25×10^4至约1.75×10^4或约1.25×10^4至约1.5×10^4的密度设置在所述抗原呈递表面的至少一部分上。

298.实施方案265-297中任一项的方法,其中所述共价修饰表面上的主活化分子配体与所述共活化分子配体的比例为约1:10至约2:1、约1:5至约2:1、约1:2至约2:1、约1:10至约1:1、约1:5至约1:1、约1:1至约2:1或约1:2至约1:1。

299.实施方案265-298中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约3:1至约1:3。

300.实施方案265-299中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约2:1至约1:2。

301.实施方案265-300中任一项的方法,其中所述多个共活化分子配体中的TCR共活化分子与辅助TCR活化分子的比例为约1:1。

302.实施方案265-301中任一项的方法,其还包括使所述多个T细胞与包括ICAM分

子的多个粘附刺激分子配体接触,其中所述多个粘附刺激分子配体中的每一个附接至所述抗原呈递合成表面。

303.实施方案302的方法,其中所述多个粘附刺激分子配体共价附接至所述抗原呈递合成表面。

304.实施方案265-303中任一项的方法,其中所述抗原呈递合成表面还包括多个表面封闭分子配体。

305.实施方案304的方法,其中所述多个表面封闭分子配体限制了主活化分子配体的密度和/或共活化分子配体的密度。

306.实施方案304或305的方法,其中所述多个表面封闭分子配体基本上从所述共价修饰的合成表面的选定区域中排除了所述多个主活化分子配体。

307.实施方案306的方法,其中所述被构造为基本排除所述多个主活化分子配体的抗原呈递合成表面的选定区域包括微流体设备的微流体通道。

308.实施方案306的方法,其中所述多个主活化分子配体设置在所述抗原呈递合成表面的第一部分的多个子区域中,所述多个表面封闭分子配体设置在第二区域中,并且进一步地,其中通过所述抗原呈递表面的第二区域将所述抗原呈递合成表面的第一部分的多个子区域中的每一个与所述第一部分的多个子区域中的其他子区域相分隔开。

309.实施方案308的方法,其中所述抗原呈递合成表面的第一部分的多个子区域还包括第二多个表面封闭分子配体。

310.实施方案308或309的方法,其中所述多个共活化分子配体设置在所述抗原呈递合成表面的第一部分的多个子区域中。

311.实施方案265-310中任一项的方法,其还包括使所述多个T细胞与多个生长刺激性分子配体接触。

312.实施方案311的方法,其中每个所述生长刺激性分子配体包括生长因子受体配体。

313.实施方案312的方法,其中所述生长因子受体配体包括IL-21或其片段。

314.实施方案265-313中任一项的方法,其中与所述多种生长刺激性分子配体的接触是在至少一天的第一培养期之后进行的。

315.实施方案311-314中任一项的方法,其中所述生长因子受体配体连接至所述抗原呈递合成表面。

316.实施方案311-315中任一项的方法,其中所述多个生长因子受体配体连接至与包括多个主活化分子配体的抗原呈递合成表面不相同的抗原呈递合成表面。

317.实施方案265-316中任一项的方法,其中所述抗原呈递合成表面是实施方案181-264中任一项的产物。

318.实施方案265-317中任一项的方法,其中与所述抗原呈递合成表面接触的培养进行约4天至约7天的时间。

319.实施方案265-318中任一项的方法,其中当所述抗原呈递合成表面是珠子时,所述抗原呈递珠子与细胞的比例为约1:1。

320.实施方案265-319中任一项的方法,其中当所述抗原呈递合成表面是珠子时,在培养开始时所述抗原呈递珠子与细胞的比例为约1:1。

321.实施方案265-320中任一项的方法,其还包括:完成与所述抗原呈递合成表面接触的第一活化期,其中所述抗原呈递合成表面是第一抗原呈递合成表面;使多个活化T细胞与第二抗原呈递合成表面接触,该表面包括其每一个包括MHC分子的多个主活化分子配体和其每一个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助TCR活化分子的多个共活化分子配体;以及使与所述第二抗原呈递合成表面接触的多个活化T细胞进行第二期培养,从而提供扩增的多个活化T细胞。

322.实施方案321的方法,其中所述第二抗原呈递合成表面是实施方案1-96中任一项的抗原呈递珠子、抗原呈递晶片或抗原呈递微流体设备,或者是实施方案181-264任一项的产物。

323.实施方案321或322的方法,其中当所述第一抗原呈递合成表面包括第一多个抗原呈递珠子时,则使所述多个活化T细胞与第二抗原呈递合成表面接触包括将第二多个抗原呈递珠子引入所述多个活化T细胞中。

324.实施方案323的方法,其还包括以1:1的比例将所述第二多个抗原呈递珠子添加至所述多个活化T细胞中。

325.实施方案323或324的方法,其中当第一抗原呈递合成表面包括抗原呈递晶片或抗原呈递微流体设备时,则使所述多个活化T细胞与所述第二抗原呈递合成表面接触包括将多个抗原呈递珠子引入所述多个活化T细胞中。

326.实施方案321-325中任一项的方法,其还包括在第二培养期期间添加第二多个生长刺激性分子配体。

327.实施方案326的方法,其中所述第二多个生长刺激性分子配体连接至与所述抗原呈递珠子不同的珠子的表面。

328.实施方案321-327中任一项的方法,其中在第二培养期的剩余时间内,添加多个IL-2分子和多个IL-7分子以接触所述活化T细胞。

329.实施方案321-328中任一项的方法,其中与所述第二抗原呈递合成表面接触的培养进行约4天至约7天的时间。

330.实施方案321-329中任一项的方法,其还包括:完成与所述第二抗原呈递合成表面接触的第二活化期;使扩增的多个活化T细胞与第三抗原呈递合成表面接触,该表面包括多个主活化分子配体和其每一个包括T细胞受体(TCR)共活化分子或辅助物质TCR活化分子的多个共活化的分子配体;以及使与所述第三抗原呈递合成表面接触的所述扩增的多个活化T细胞进行第三期培养,从而提供多个高度活化T细胞。

331.实施方案330的方法,其中所述第三抗原呈递合成表面是实施方案1-96中任一项的抗原呈递珠子、抗原呈递晶片或抗原呈递微流体设备或是实施方案中181-264任一项的产物。

332.实施方案330或331的方法,其还包括在第三培养期期间添加第三多个生长刺激性分子配体。

333.实施方案332的方法,其中所述第三多个生长刺激性分子配体连接至与所述第三抗原呈递珠子不同的珠子的表面。

334.实施方案330-333中任一项的方法,其中在所述第三培养期的剩余时间内添加多个IL-2分子和多个IL-7分子以接触所述活化T细胞。

335.实施方案330-334中任一项的方法,其中与所述第三抗原呈递合成表面接触的培养进行约4天至约7天的时间。

336.实施方案265-335中任一项的方法,其中所述活化T细胞是CD45RO+。

337.实施方案265-336中任一项的方法,其中所述活化T细胞是CD28阳性的。

338.用于活化T淋巴细胞(T细胞)的试剂盒,包括:实施方案1-96中任一项的抗原呈递合成表面。

339.实施方案338的试剂盒,其中所述抗原呈递合成表面是抗原呈递珠子、抗原呈递晶片、抗原呈递管或抗原呈递微流体设备。

340.实施方案338或339的试剂盒,其还包括多个共价修饰珠子,其包括多个生长刺激性分子配体,其中每个所述生长刺激性分子配体包括生长因子受体配体。

341.实施方案340的试剂盒,其中所述生长因子受体配体包括细胞因子或其片段。

342.实施方案341的试剂盒,其中所述细胞因子包括IL-21或其片段。

343.实施方案340-342中任一项的试剂盒,其还包括一个或多个另外的生长刺激性分子。

344.实施方案343的试剂盒,其中所述另外的生长刺激性分子包括IL2和/或IL7或其片段。

345.实施方案344的试剂盒,其中所述第二或更多生长刺激性分子附接至共价修饰珠子。

346.进行抗原特异性细胞毒性测定的方法,包括:

将一个或多个靶细胞加载至微流控设备的隔离围栏中;

在隔离围栏中加载一个或多个T细胞,以使所述一个或多个T细胞能接触所述一个或多个靶细胞;

使所述靶细胞与标记凋亡细胞的可检测标记物接触;和

检测所述靶细胞是否凋亡。

347.实施方案346的方法,其中所述微流体设备还包括微流体通道,并且其中所述隔离围栏包括通向所述微流体通道的开口,使得所述隔离围栏流体连接至所述微流体通道。

348.实施方案346的方法,其中所述微流体设备还包括用于容纳第一流体介质流的流动区域;并且所述隔离围栏包括用于容纳第二流体介质的分离区域,所述分离区域具有单个开口,其中所述隔离围栏的分离区域是微流体设备的未被扫过区域;和将所述分离区域流体连接至所述流动区域的连接区域;任选地,其中流动区域是微流体通道。

349.实施方案346-348中任一项的方法,其中将多个靶细胞加载至所述隔离围栏中。

350.实施方案346-348中任一项的方法,其中将单个靶细胞加载至所述隔离围栏中。

351.实施方案346-350中任一项的方法,其中将单个T细胞加载至所述隔离围栏中。

352.实施方案346-350中任一项的方法,其中将多个T细胞加载至所述隔离围栏中。

353.实施方案346-352中任一项的方法,其中将所述靶细胞和/或T细胞加载至所述隔离围栏中包括:

使所述靶细胞和/或T细胞流入所述微流体通道;和

倾斜所述微流体设备,使得重力能够将所述靶细胞和/或T细胞拉入所述隔离围栏中。

354.实施方案346至353中任一项的方法,其中所述微流体设备包括DEP构造,并且DEP力用于将靶细胞和/或T细胞加载至隔离围栏中。

355.实施方案354的方法,其中所述DEP力由结构化光活化。

356.实施方案346至355中任一项的方法,其中在流过所述微流体通道的溶液中提供所述可检测标记物,随后所述可检测标记物可从所述微流体通道扩散到所述隔离围栏中并与所述靶细胞接触。

357.实施方案346至356中任一项的方法,其中所述可检测标记物是酶底物。

358.实施方案346至357中任一项的方法,其中所述可检测标记物是胱天蛋白酶-3底物。

359.实施方案346至356中任一项的方法,其中所述可检测标记物是与凋亡细胞和/或凋亡小体特异性结合的标记抗体。

360.实施方案346至359中任一项的方法,其中定期地检测所述靶细胞是否凋亡。

361.实施方案346-360中任一项的方法,其中在使所述靶细胞与所述可检测标记物接触2小时或更多小时之后,检测所述靶细胞是否凋亡。

362.实施方案346至361中任一项的方法,其中所述靶细胞是癌细胞。

363.实施方案346至362中任一项的方法,其中所述靶细胞是来自表达癌相关或癌特异性抗原的细胞系的细胞。

364.实施方案346至363中任一项的方法,其中所述靶细胞表达与黑素瘤、乳腺癌或肺癌相关的抗原。

365.实施方案346至364中任一项的方法,其中所述T细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。

366.实施方案346-365中任一项的方法,其中所述T细胞不表达嵌合抗原受体。

367.用于进行抗原特异性细胞毒性测定的试剂盒,包括:

微流体设备;和

用于检测凋亡细胞的试剂。

368.实施方案367的试剂盒,其中所述微流体设备是实施方案61-96中任一项的抗原呈递微流体设备。

369.实施方案367或368的试剂盒,其中用于检测凋亡细胞的试剂是酶促底物。

370.实施方案369的试剂盒,其中所述酶促底物是胱天蛋白酶-3底物。

371.实施方案367或368的试剂盒,其中用于检测凋亡细胞的试剂是特异性结合凋亡细胞和/或凋亡小体的标记抗体。

372.前述实施方案中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述表面是微流体设备的内表面,并且所述内表面的至少一部分在所述微流体设备的隔离围栏中。

373.实施方案372的表面、试剂盒或方法,或实施方案346-371中任一项的试剂盒

或方法,其中所述微流体设备还包括用于容纳第一流体介质流的流动区域;和所述隔离围栏包括用于容纳第二流体介质的分离区域,所述分离区域具有单个开口,其中所述隔离围栏的分离区域是微流体设备的未被扫过区域;以及将所述分离区域流体连接至所述流动区域的连接区域;任选地其中所述微流体设备包括包含至少一部分流动区域的微流体通道。

374.实施方案373的表面、试剂盒或方法,其中所述微流体设备包括包含至少一部分所述流动区域的微流体通道,并且所述连接区域包括宽度在约20微米至约100微米范围内的通向进入所述微流体通道的近端开口和通向进入所述分离区域的远端开口,并且其中,所述连接区域的从近端开口到远端开口的长度L_{con}是所述连接区域的近端开口的宽度W_{con}的至少1.0倍。

375.实施方案373的表面、试剂盒或方法,其中,所述连接区域的从近端开口到远端开口的长度L_{con}是所述连接区域的近端开口的宽度W_{con}的至少1.5倍

376.实施方案373的表面、试剂盒或方法,其中,所述连接区域的从近端开口到远端开口的长度L_{con}是所述连接区域的近端开口的宽度W_{con}的至少2.0倍

377.实施方案373-376中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述连接区域的近端开口的宽度W_{con}在约20微米至约60微米的范围内。

378.实施方案373-376中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述连接区域的从近端开口到远端开口的长度L_{con}在约20微米至约500微米之间。

379.实施方案373-378中任一项的表面、试剂盒或方法,其中在所述连接区域的近端开口处的微流体通道的宽度在约50微米至约500微米之间。

380.实施方案373-379中任一项的表面、试剂盒或方法,其中在所述连接区域的近端开口处的微流体通道的高度在20微米至100微米之间。

381.实施方案373-380中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述分离区域的体积为约2×10^4至约2×10^6立方微米。

382.实施方案373-381中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述连接区域的近端开口平行于所述第一介质在所述流动区域中的流动方向。

383.实施方案363-382中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述微流体设备包括:包括基部的外壳,布置在所述基部上的微流体管路结构,以及共同限定了微流体管路的盖,并且所述微流体管路包括所述流动区域、所述微流体通道和所述隔离围栏。

384.实施方案383的表面、试剂盒或方法,其中所述微流体管路还包括一个或多个入口,第一介质可通过所述一个或多个入口输入到所述流动区域中,以及一个或多个出口,所述第一介质可通过所述一个或多个出口从所述流动区域中去除。

385.实施方案383或384的表面、试剂盒或方法,其中所述盖是微流体管路结构的集成部分。

386.实施方案383-385中任一项的表面、试剂盒或方法,其中限定微流体隔离围栏的屏障从微流体设备的基部的表面延伸至微流体设备的盖的表面。

387.实施方案383-386中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述盖和所述基部是介电电泳(DEP)机制的一部分,其用于选择性地在微物体上诱导DEP力。

388.实施方案383-387中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述微流体设备还包括第一电极、电极活化衬底和第二电极,其中所述第一电极是所述外壳的第一壁的一部分,

并且所述电极活化衬底和所述第二电极是外壳的第二壁的一部分,其中电极活化衬底包括光电导材料、半导体集成电路或光电晶体管。

389.实施方案388的表面、试剂盒或方法,其中所述微流体设备的第一壁是盖,并且其中所述微流体设备的第二壁是基部。

390.实施方案388或389的表面、试剂盒或方法,其中所述电极活化衬底包括光电晶体管。

391.实施方案383-390中任一项的表面、试剂盒或方法,其中所述盖和/或所述基部对光是透明的。

392.通过实施方案265至337中任一项的方法产生的一个或多个活化T细胞。

393.包括通过实施方案265-337中任一项的方法产生的活化T细胞的T细胞群。

394.实施方案392或393的细胞或群,其中所述活化T细胞是CD45RO+。

395.实施方案392-394中任一项的细胞或群,其中所述活化T细胞是CD28+。

396.实施方案265-337或392-395中任一项的细胞、群或方法,其中所述活化T细胞是$CD28^{high}$。

397.实施方案265-337或392-396中任一项的细胞、群或方法,其中所述活化T细胞是CD127+。

398.实施方案265-337或392-397中任一项的细胞、群或方法,其中所述活化T细胞是CD197+。

399.实施方案265-337或392-398中任一项的细胞、群或方法,其中所述活化T细胞是CD8+。

400.包括实施方案392-399中任一项的细胞或群的微流体设备。

401.实施方案61-96中任一项的微流体设备,其包括实施方案392-399中任一项的细胞或群。

402.包括实施方案392-399中任一项的细胞或群的药物组合物。

403.实施方案257-327、362-381或382-389中任一项的方法,其中所述方法产生T细胞群,其中至少1%、1.5%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%的T细胞群是抗原特异性T细胞,其中每个前述值都用“约”修饰。

404.实施方案403的方法,其中所述T细胞的1%-2%、2%-3%、3%-4%、4%-5%、5%-6%、6%-7%、7%-8%、8%-9%、9%-10%、10%-11%或11%-12%是抗原特异性T细胞,其中每个前述值都用“约”修饰。

405.实施方案403或404的方法,其中至少65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%的抗原特异性T细胞是CD45RO+/CD28High细胞,其中每个前述值均用“约”修饰。

406.治疗需要治疗癌症的受试者的方法;包括:从受试者获得多个T淋巴细胞(T细胞);使所述多个T细胞与抗原呈递合成表面接触,所述抗原呈递合成表面包括被构造为结合至所述多个T细胞中的每一个的T细胞受体的多个主要组织相容性复合体(MHC)I分子,其中所述MHC分子包括对受试者的癌症特异的抗原,并且其中所述抗原呈递合成表面是实施方案1-96中任一项的抗原呈递合成表面或根据实施方案181-264中任一项的方法产生的抗原呈递合成表面;产生多个活化T细胞,其中所述活化被构造为对所述受试者的癌症具有特

异性;将多个特异性活化T细胞与未活化的细胞分离;以及,将多个抗原特异性活化T细胞引入所述受试者。

407.实施方案406的方法,其中使用实施方案365-337中任一项的方法活化所述T细胞。

408.实施方案406或407的方法,其还包括在使T淋巴细胞与共价修饰的合成表面接触之前富集包括T淋巴细胞的样品。

409.实施方案406-408中任一项的方法,其中所述分离多个抗原特异性活化T细胞还包括检测所述抗原特异性活化T细胞的多个表面生物标记物。

410.实施方案409的方法,其中所述多个表面生物标记物包括CD45RO+。

411.实施方案409或410的方法,其中所述多个表面生物标记物包括CD28+。

412.实施方案409-411中任一项的方法,其中所述多个表面生物标记物包括$CD28^{high}$。

413.实施方案409-412中任一项的方法,其中所述多个表面生物标记物包括CD8。

414.实施方案409-413中任一项的方法,其中所述多个表面生物标记物包括CD127。

415.实施方案409-414中任一项的方法,其中所述多个表面生物标记物包括CD197。

416.实施方案406-415中任一项的方法,其还包括快速扩增所述抗原特异性活化T细胞以提供所述抗原特异性活化T细胞的扩增群。

417.实施方案416的方法,其中在将特异性活化T细胞与未活化T细胞分离之后进行所述快速扩增。

418.实施方案406-417中任一项的方法,其中所述治疗受试者的方法延迟或停止受试者中癌症的进展。

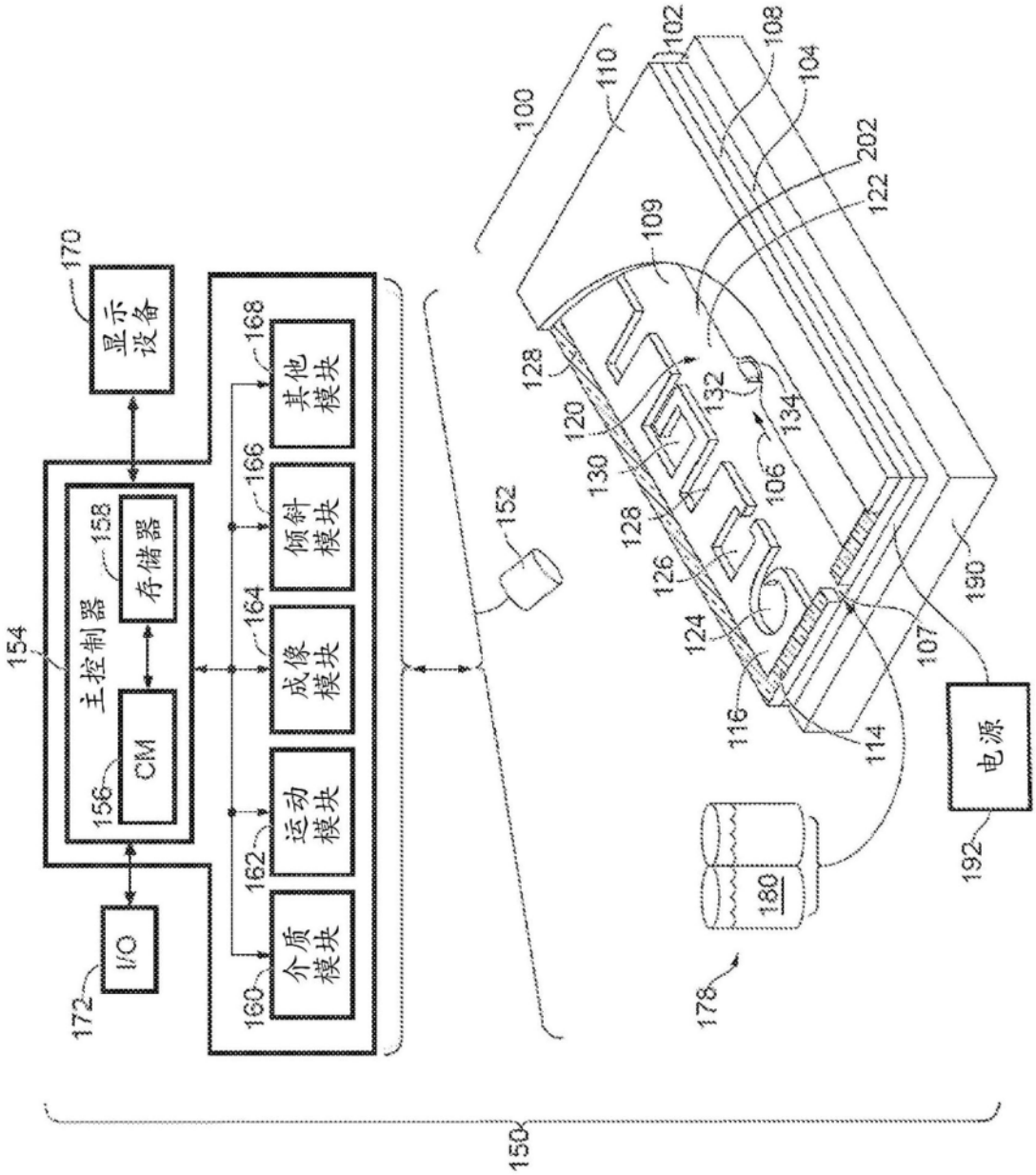

显示设备
主控制器
存储器
CM
I/O
介质模块
运动模块
成像模块
倾斜模块
其他模块
电源
100
102
104
106
107
108
109
110
114
116
120
122
124
126
128
130
132
134
150
152
154
156
158
160
162
164
166
168
170
172
178
180
190
192
202

图1A

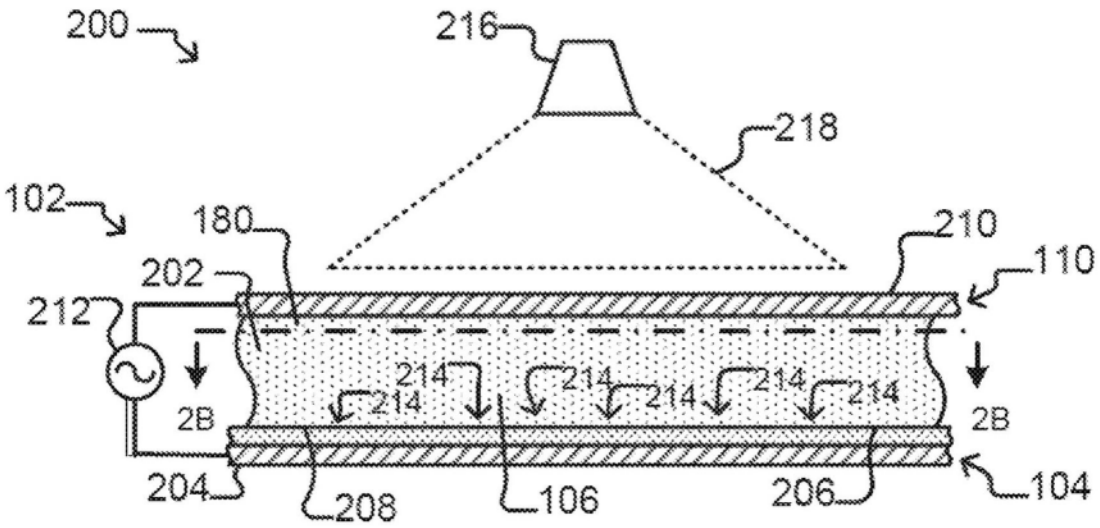

200
216
218
102
180
210
110
202
212
214
214
214
214
214
214
2B
2B
204
208
106
206
104

图1B

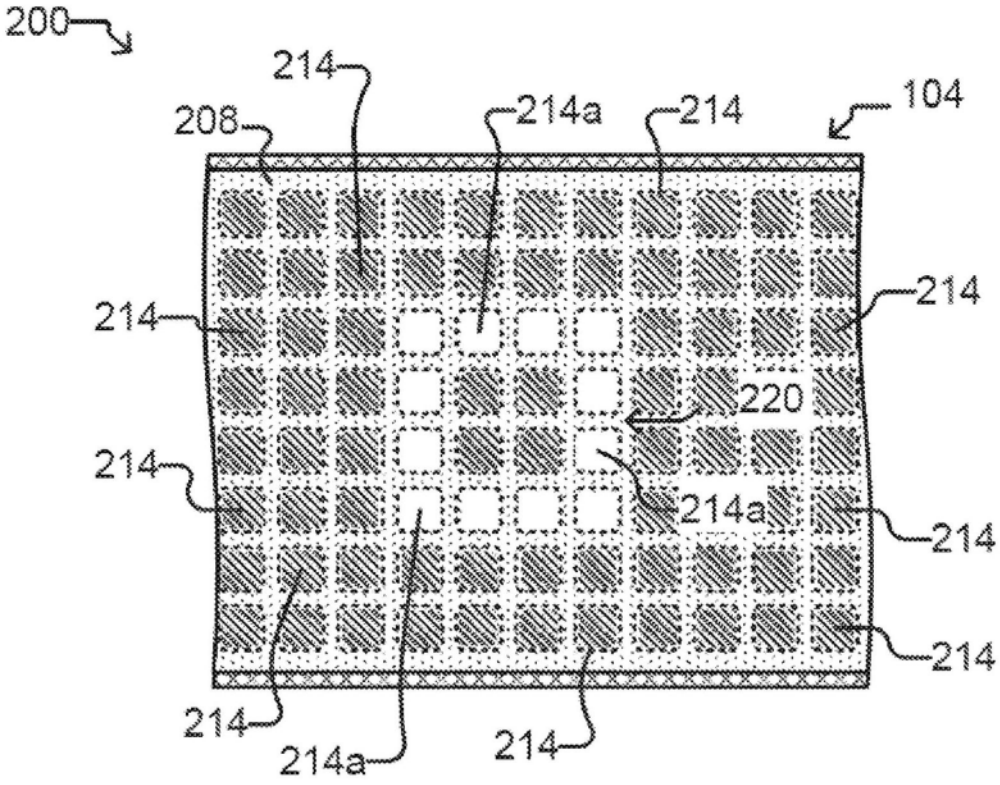

200
214
208
214a
214
104
214
214
220
214
214a
214
214
214
214a
214

图1C

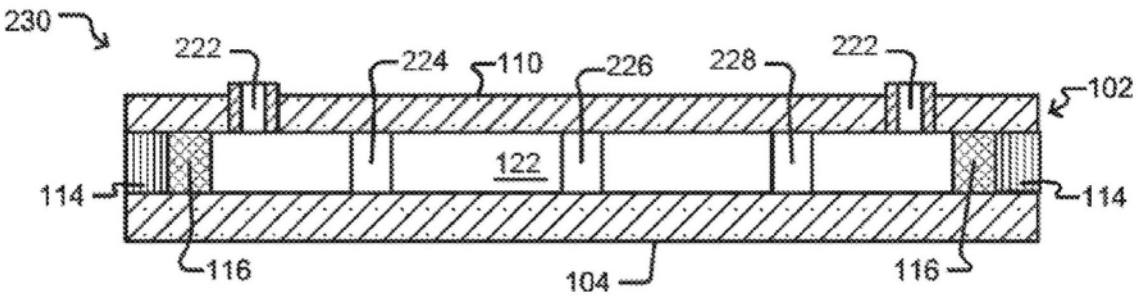

230
222
224
110
226
228
222
102
122
114
114
116
104
116

图2A

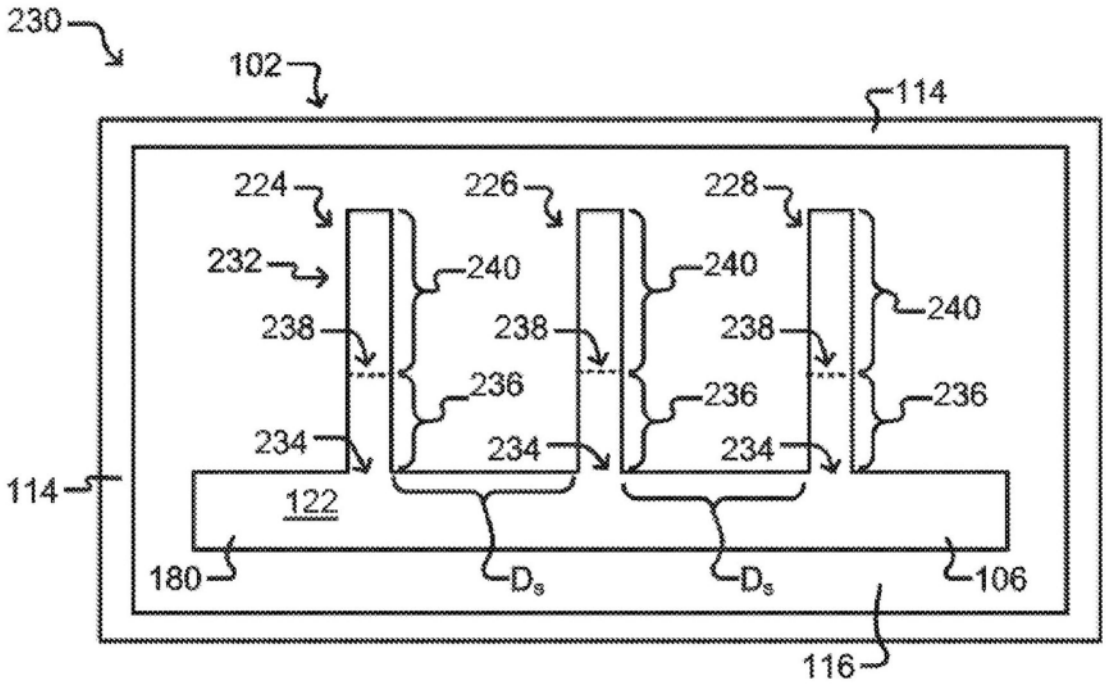

230
102
114
224
226
228
232
240
240
240
238
238
238
236
236
236
234
234
234
114
122
180
D_s
D_s
106
116

图2B

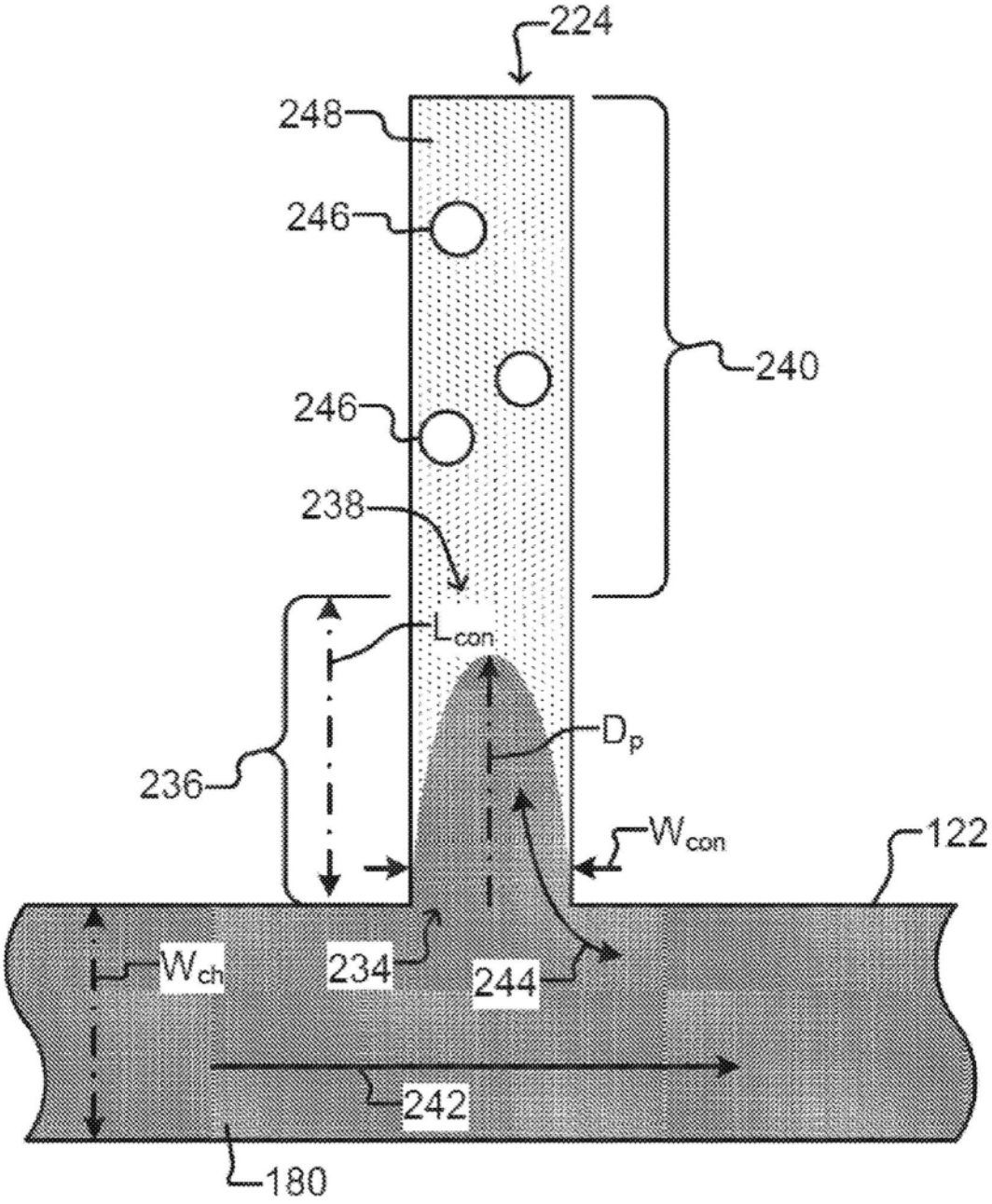


图2C

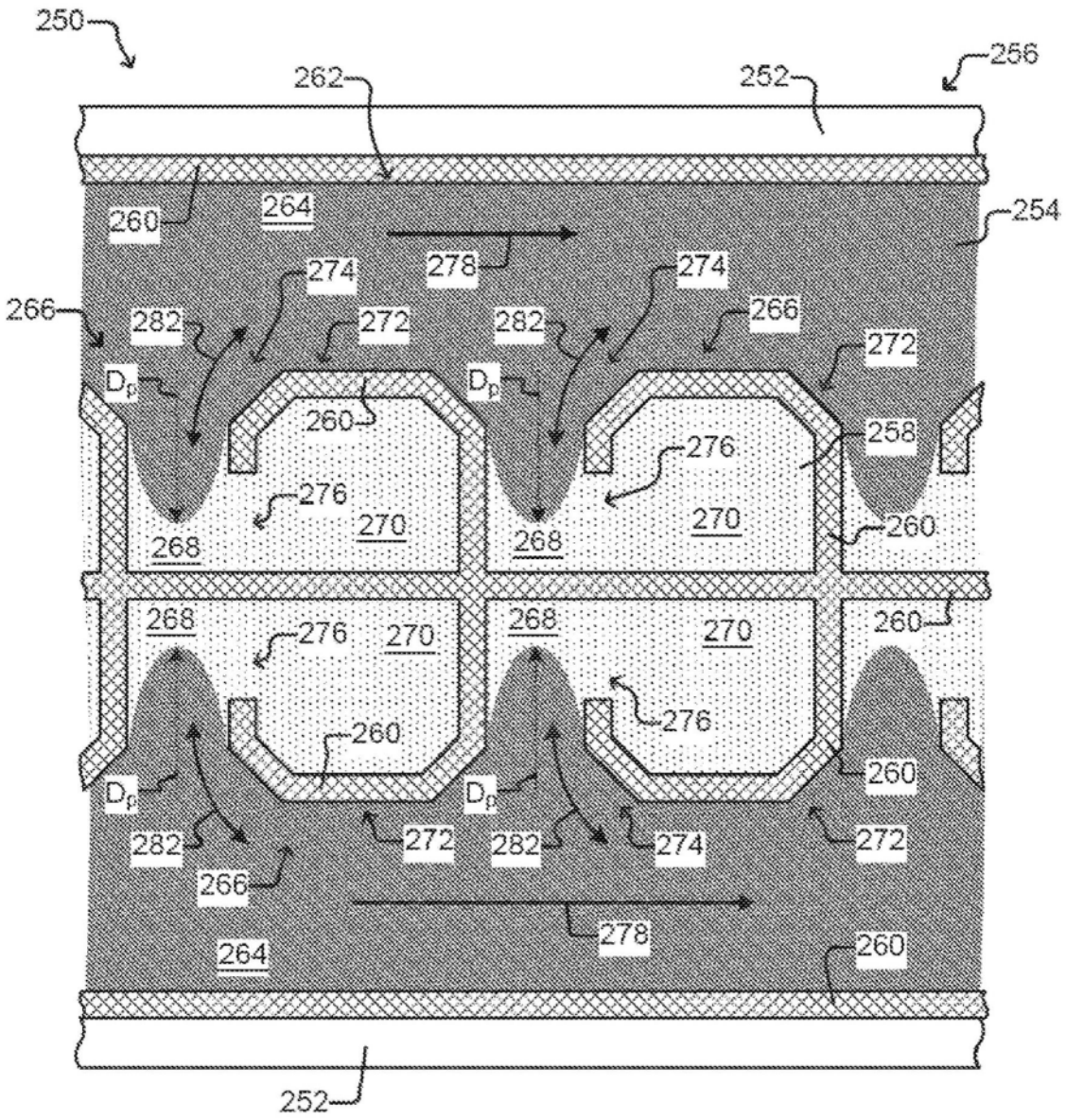

250
262
252
256
260
264
254
278
274
274
266
282
272
282
266
272
D_p
D_p
260
276
258
276
270
270
268
268
260
268
276
270
268
270
260
276
260
D_p
D_p
260
282
272
282
274
272
266
278
264
260
252

图2D

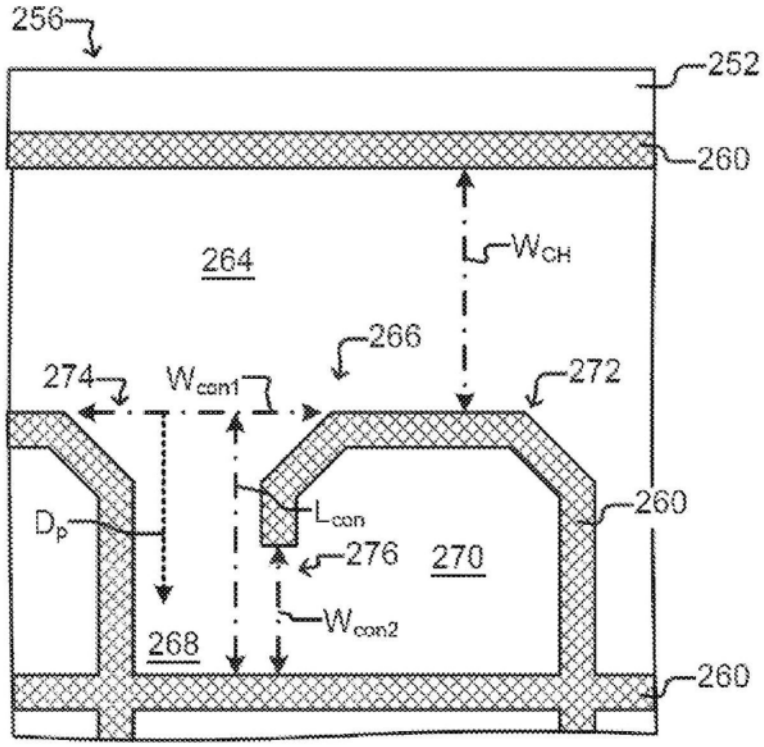

256
252
260
264
W_{CH}
266
274
W_{con1}
272
L_{con}
260
D_p
276
270
W_{con2}
268
260

图2E

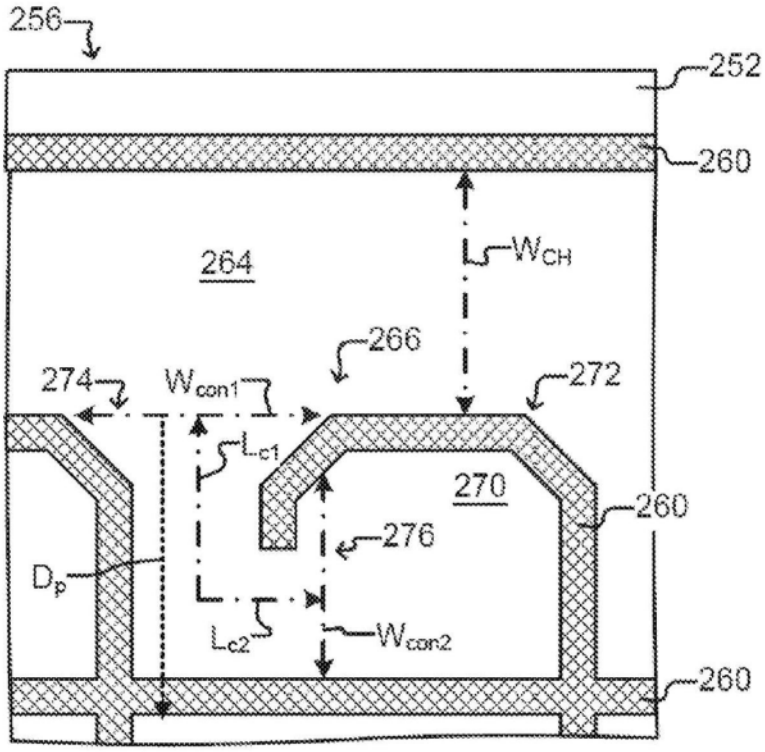

256
252
260
264
W_{CH}
266
274
W_{con1}
272
L_{c1}
270
260
276
D_p
L_{c2}
W_{con2}
260

图2F

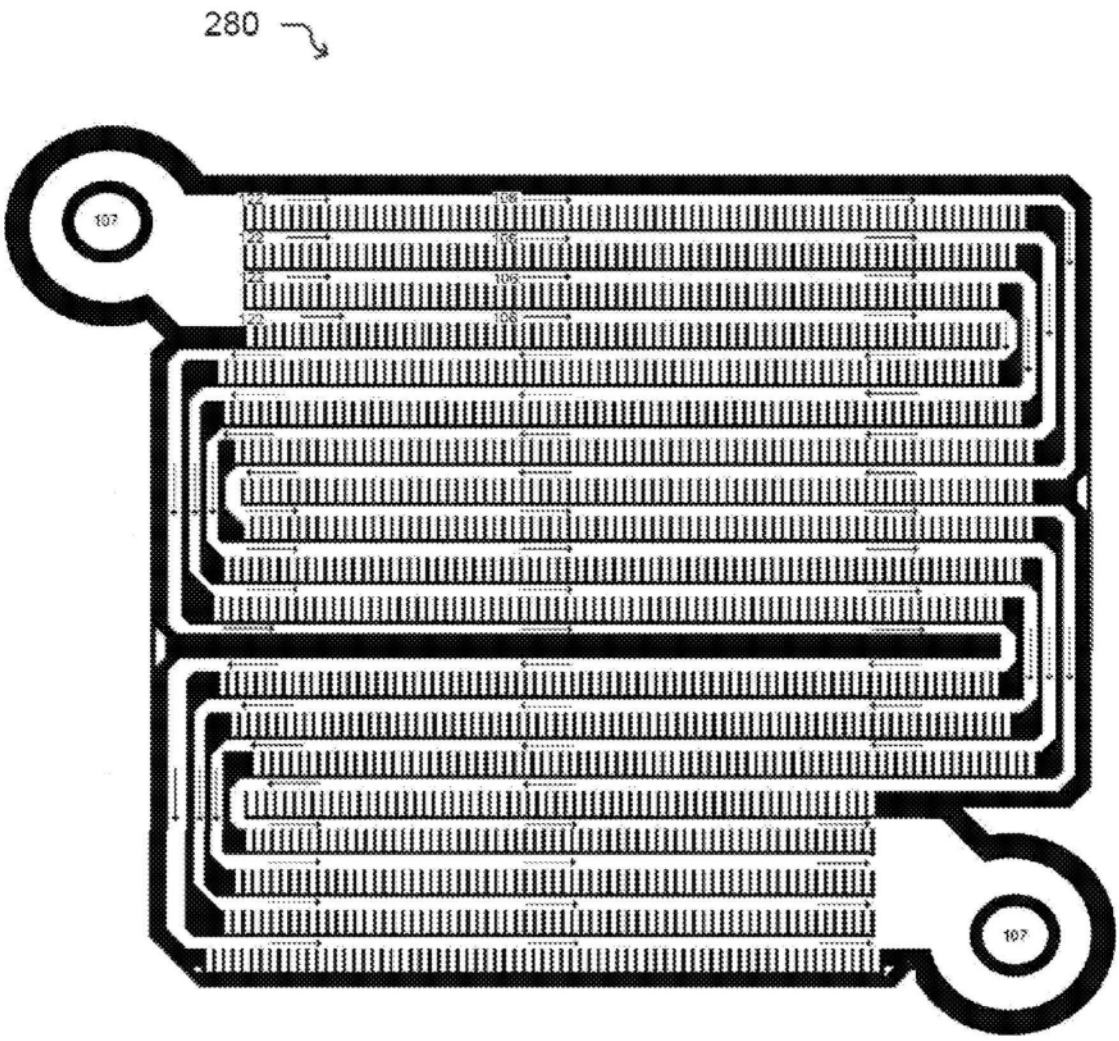


图2G

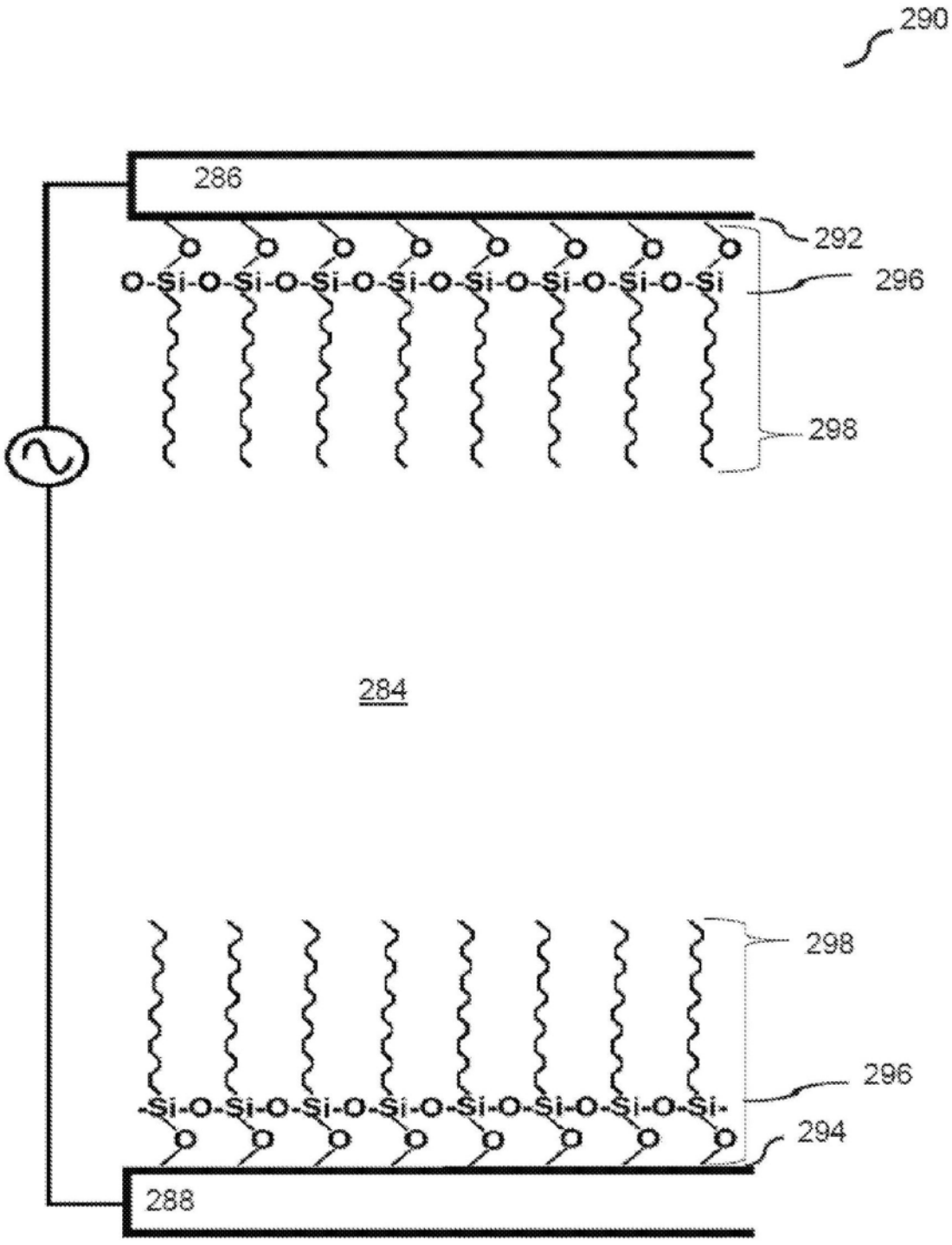


图2H

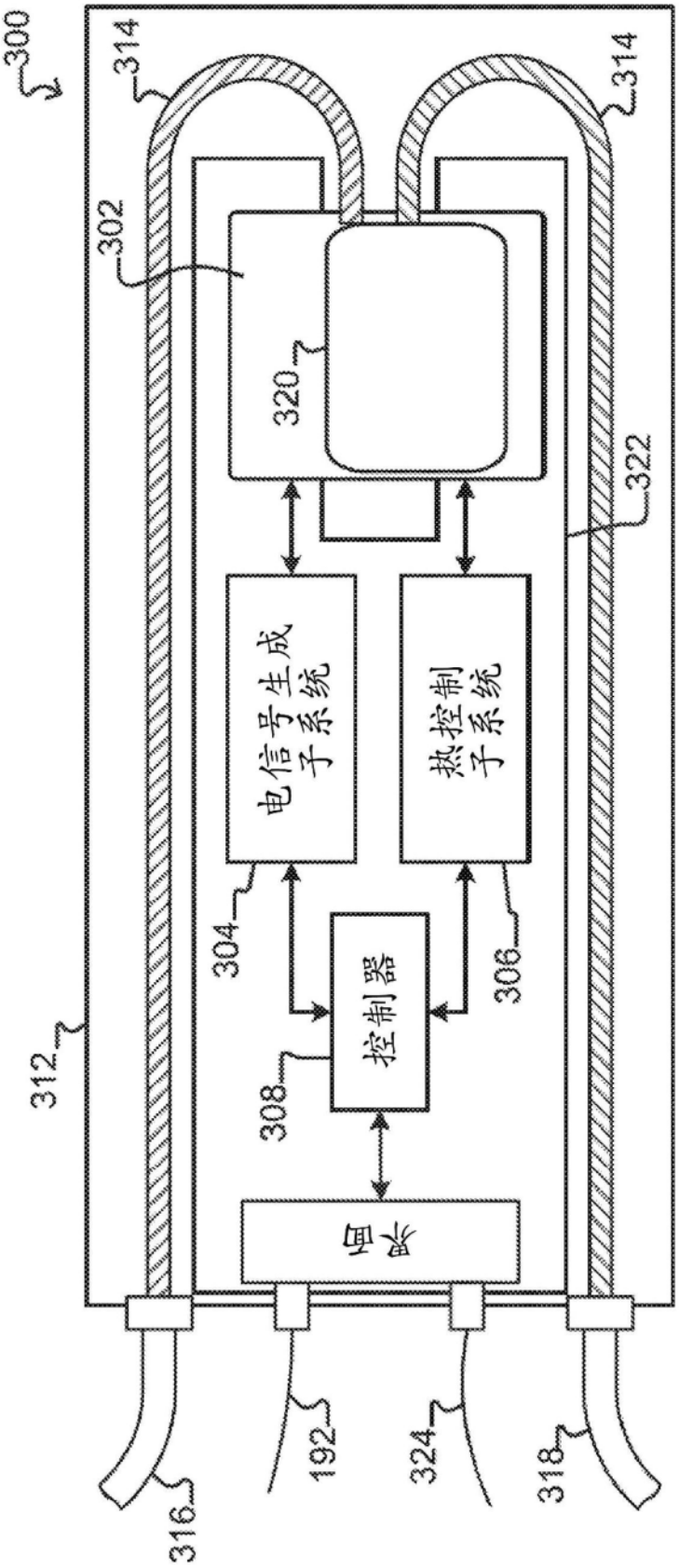

300
314
314
302
320
322
电信号生成子系统
热控制子系统
304
306
312
308
控制器
光面
316
192
324
318

图3A

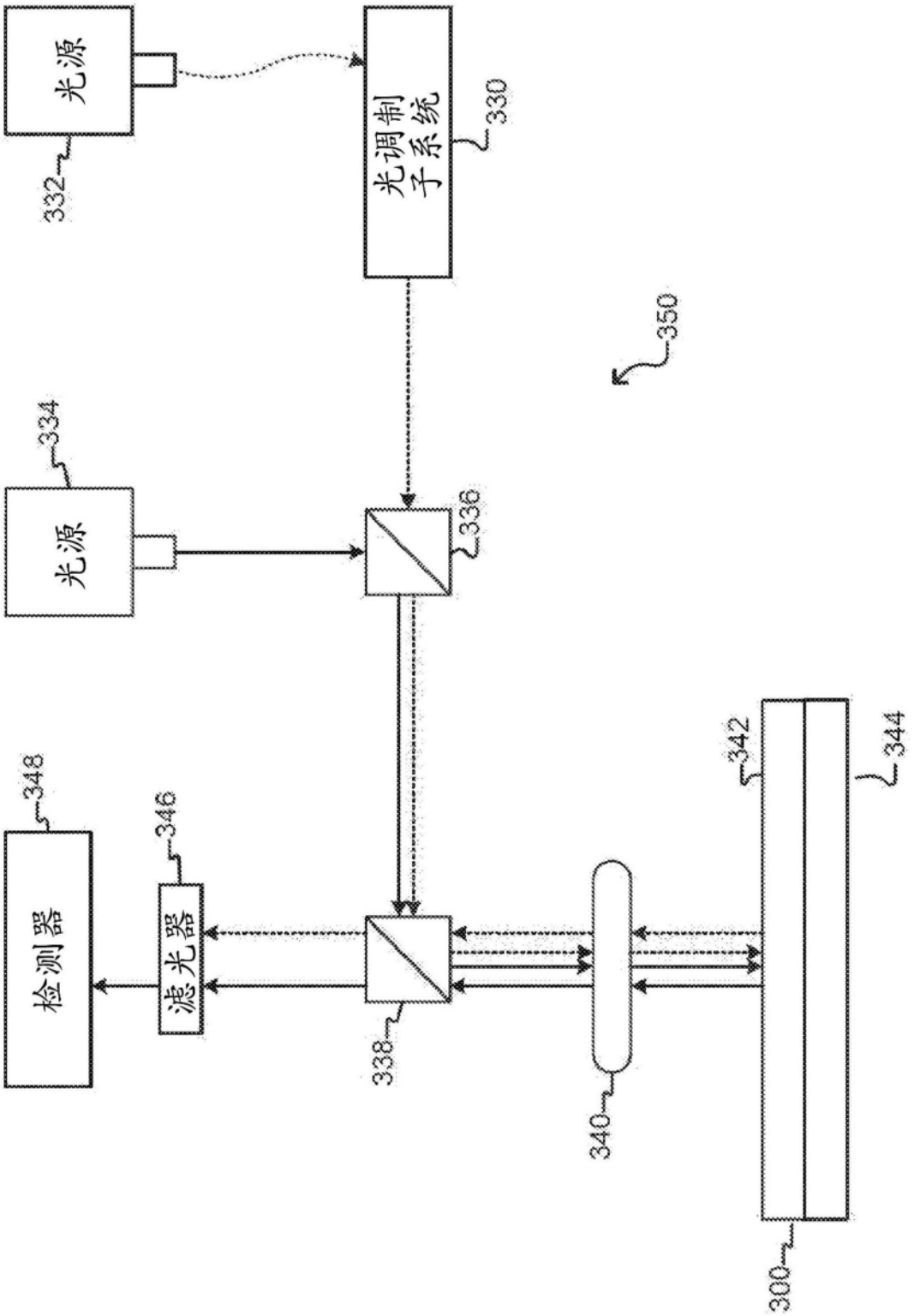

光源
332
光调制子系统
330
350
光源
334
336
检测器
348
滤光器
346
338
340
342
344
300

图3B

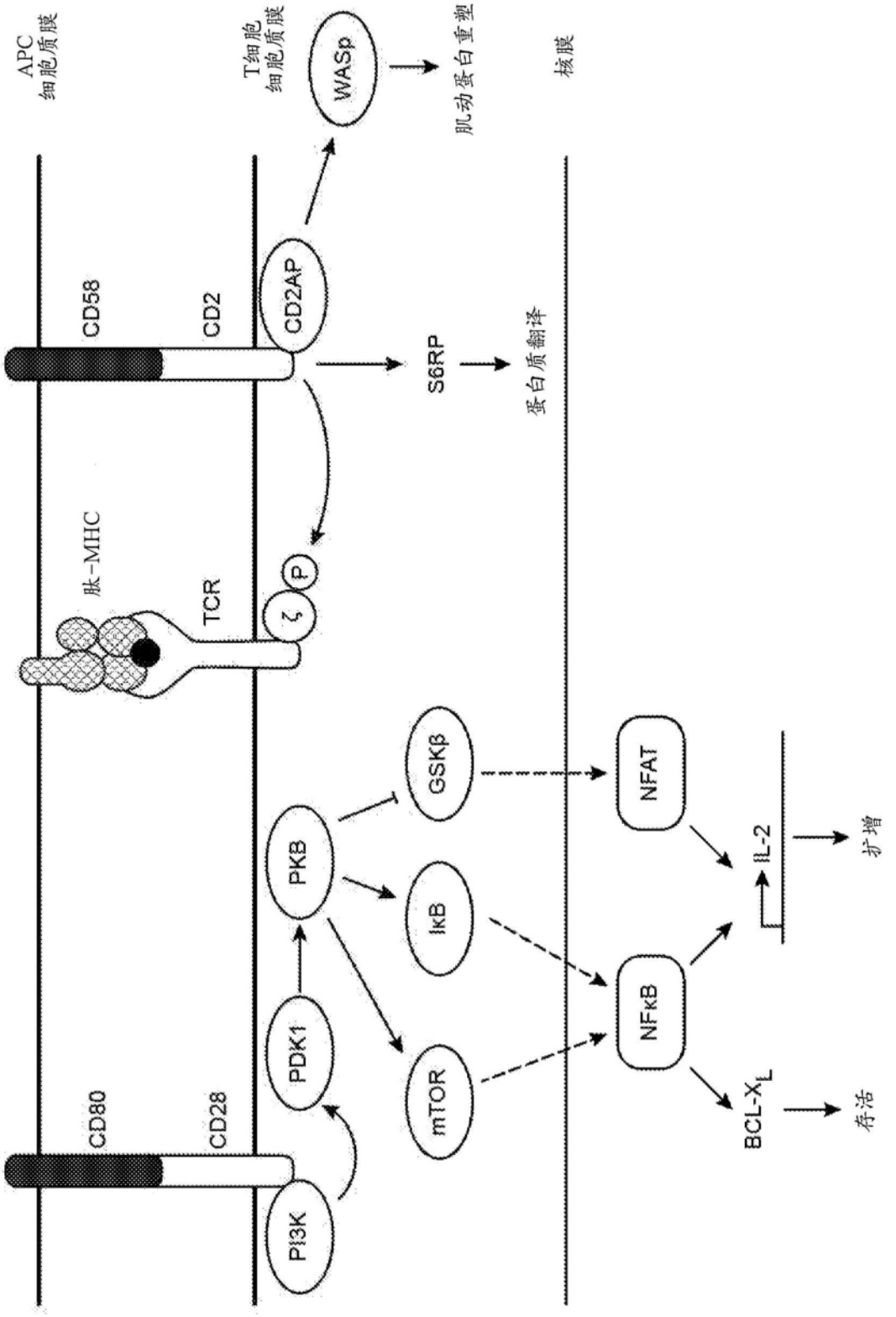
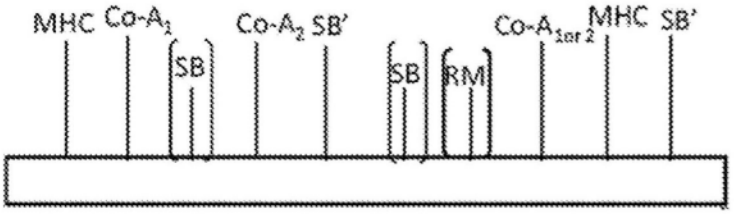

APC
细胞质膜
T细胞
细胞质膜
WASp
肌动蛋白重塑
核膜
CD58
CD2
CD2AP
S6RP
蛋白质翻译
肽-MHC
TCR
ζ
P
GSKβ
NFAT
PKB
IκB
IL-2
扩增
NFκB
PDK1
mTOR
BCL-XL
存活
CD80
CD28
PI3K

图4



抗原呈递表面

~ MHC是主活化配体

~ $Co-A_1$ 共活化配体

~ $Co-A_2$ 共活化配体

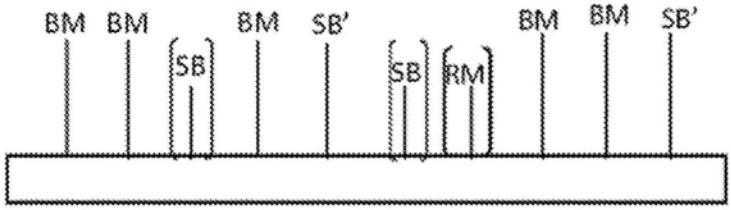
~ $CO-A_1$ =/≠ $Co-A_2$

~ 共活化配体

~ TCR共活化

~ TCR辅助活化

活化配体试剂



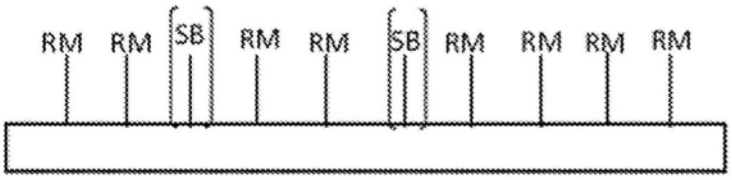
共价官能化表面

~ BM 结合部分

~ SB 表面封闭分子

~ SB =/≠ SB'

官能化试剂

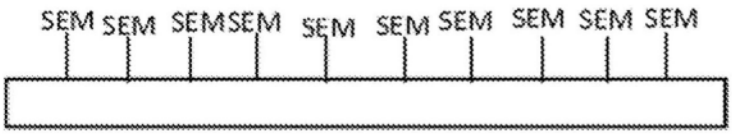


中间反应层

~ RM 反应部分

~ SB 表面封闭分子

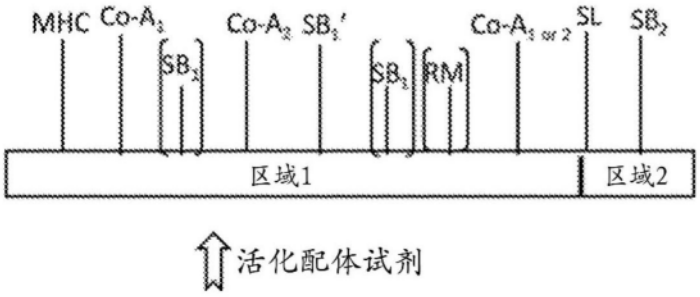
制备试剂



合成反应性表面

~ SEM = 表面暴露部分

图5A



活化配体试剂

抗原呈递合成表面

~ MHC是主活化配体

~ Co-A_1 共活化配体

~ Co-A_2 共活化配体

~ CO-A_1=/≠Co-A_2

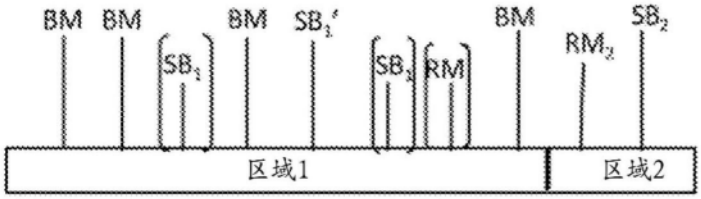
~ 共活化配体

~ TCR共活化

~ TCR辅助活化

~ SL是次要配体

~ SB_1 =/≠SB_1' =/≠SB_2



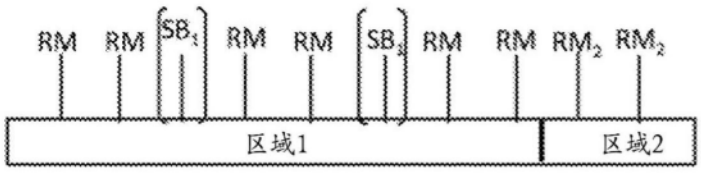
官能化试剂

共价官能化表面

~ BM 结合部分

~ SB 表面封闭分子

~ SB_1 =/≠SB_1' =/≠SB_2

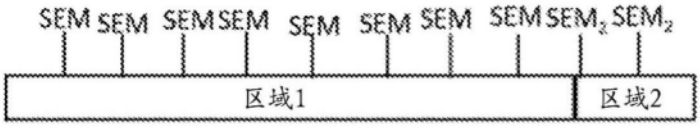


制备试剂

中间反应层

~ RM 反应部分

~ SB_1 表面封闭分子



合成反应性表面

~ SEM = 表面暴露部分

图5B

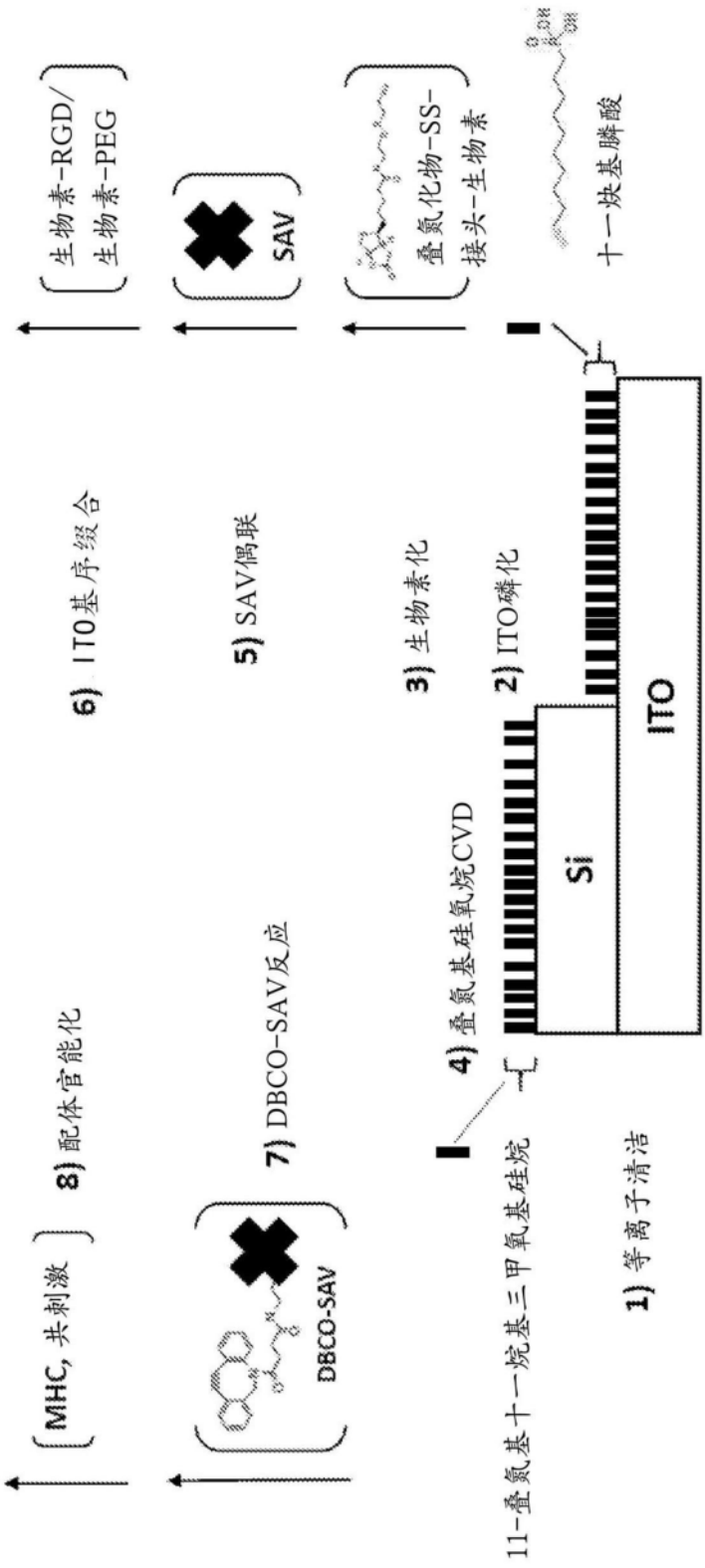

1) 等离子清洁
11-叠氮基十一烷基三甲氧基硅烷
4) 叠氮基硅氧烷CVD
2) ITO磷化
3) 生物素化
5) SAV偶联
6) ITO基序级合
7) DBCO-SAV反应
8) 配体官能化
十一炔基膦酸
叠氮化物-SS-接头-生物素
SAV
生物素-RGD/生物素-PEG
DBCO-SAV
MHC, 共刺激
Si
ITO

图6

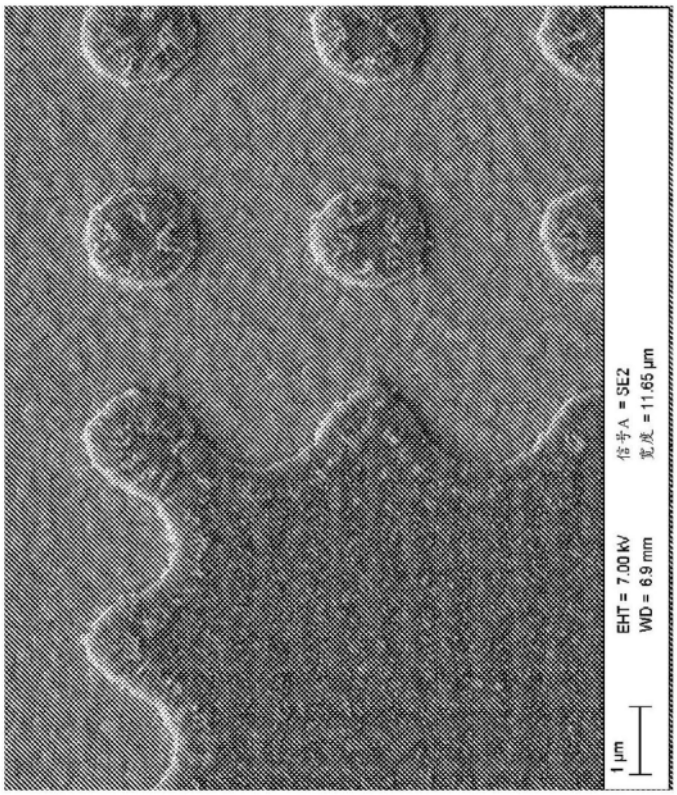


图7A

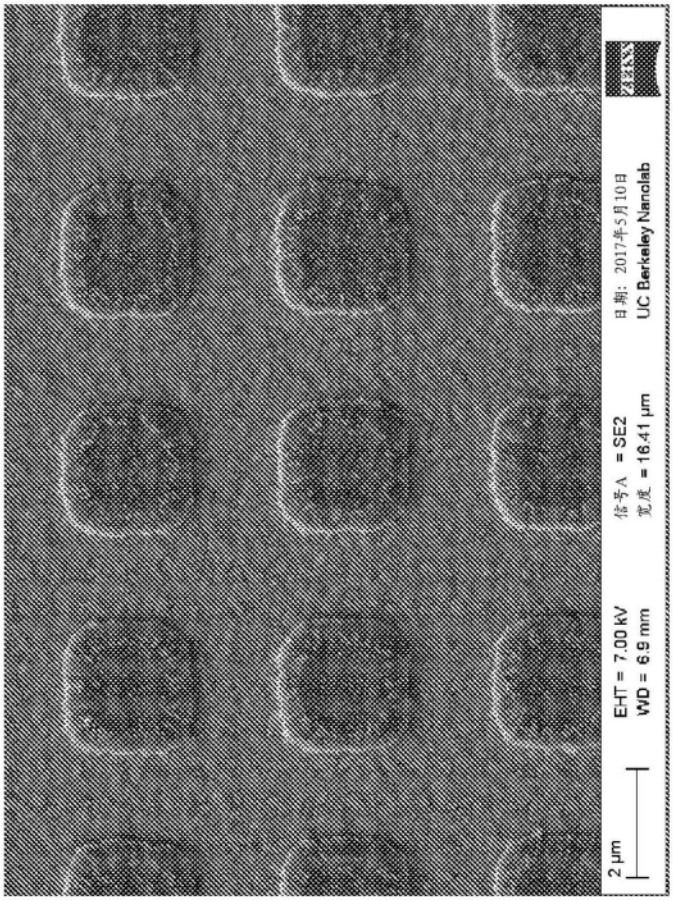

2 μm
EHT = 7.00 kV
WD = 6.9 mm
信号A = SE2
宽度 = 16.41 μm
日期: 2017年5月10日
UC Berkeley Nanolab

图7B

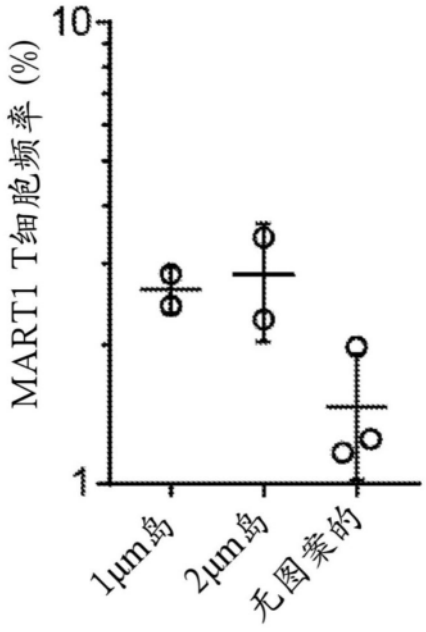

MART1 T细胞频率 (%)
10
1
1μm岛
2μm岛
无图案的

图8A

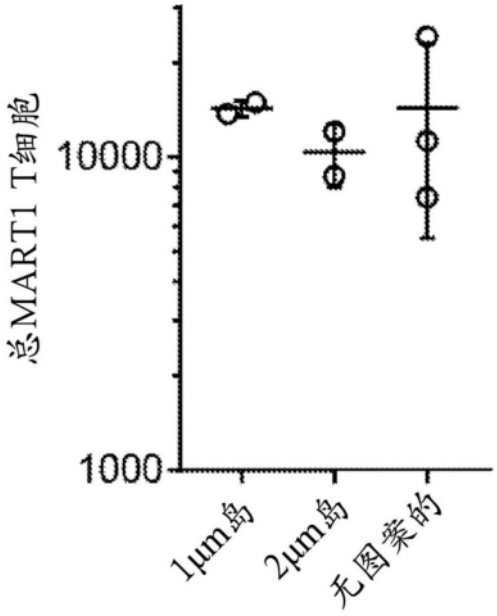

总MART1 T细胞
10000
1000
1μm岛
2μm岛
无图案的

图8B

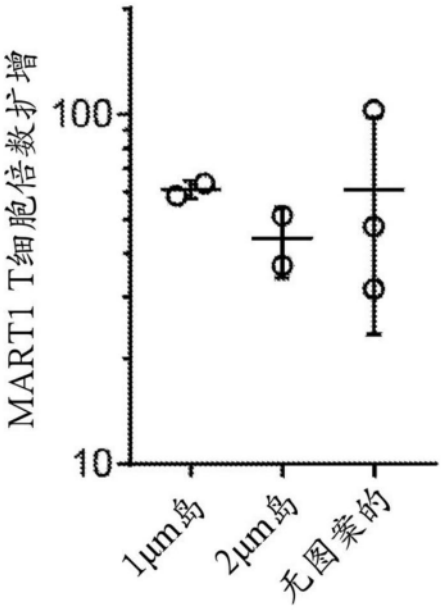

MART1 T细胞倍数扩增
100
10
1μm岛
2μm岛
无图案的

图8C

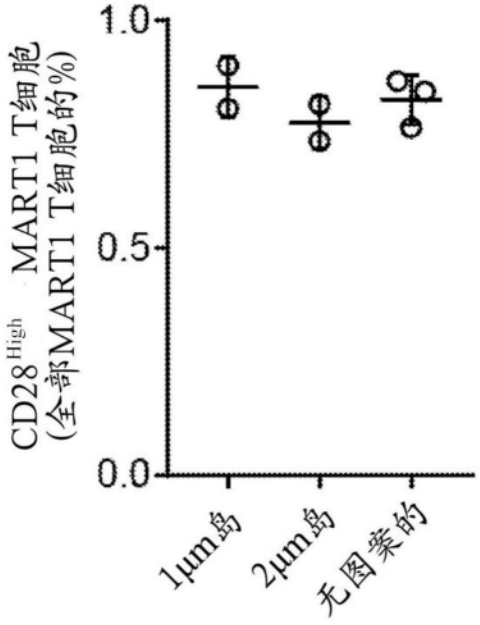
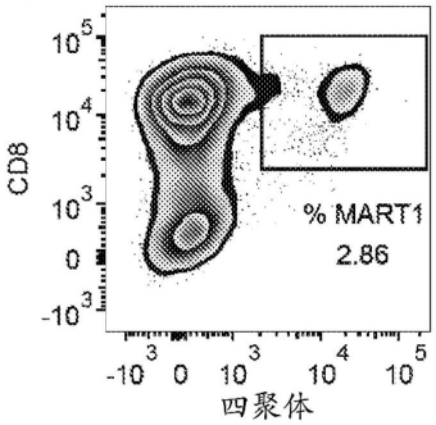
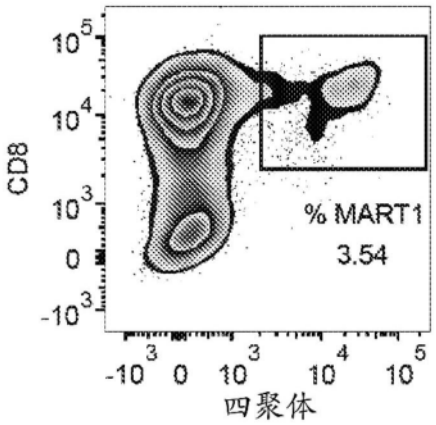


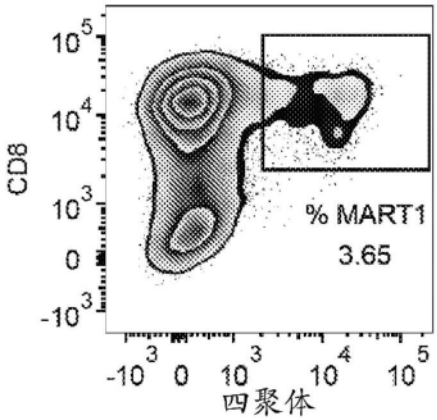
图8D

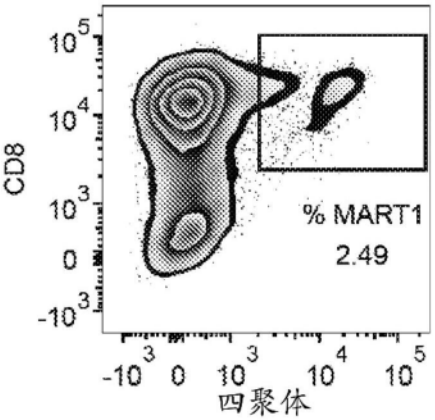
1μm岛，3μm节点



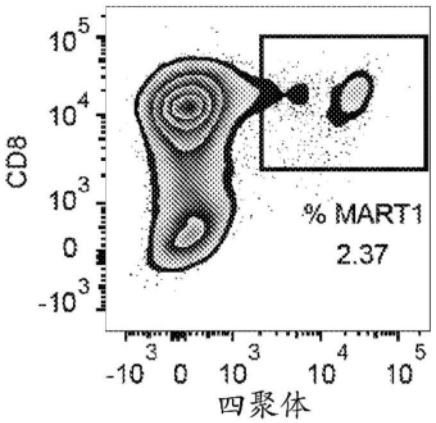


2μm岛，4μm节点





无图案的



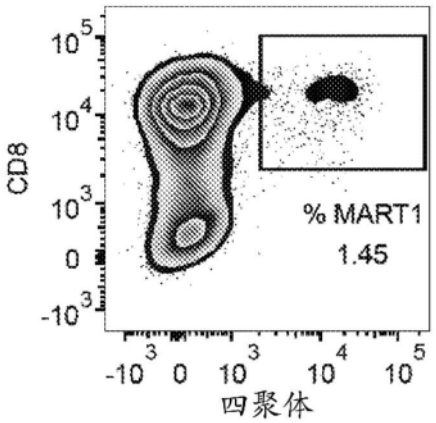


图9

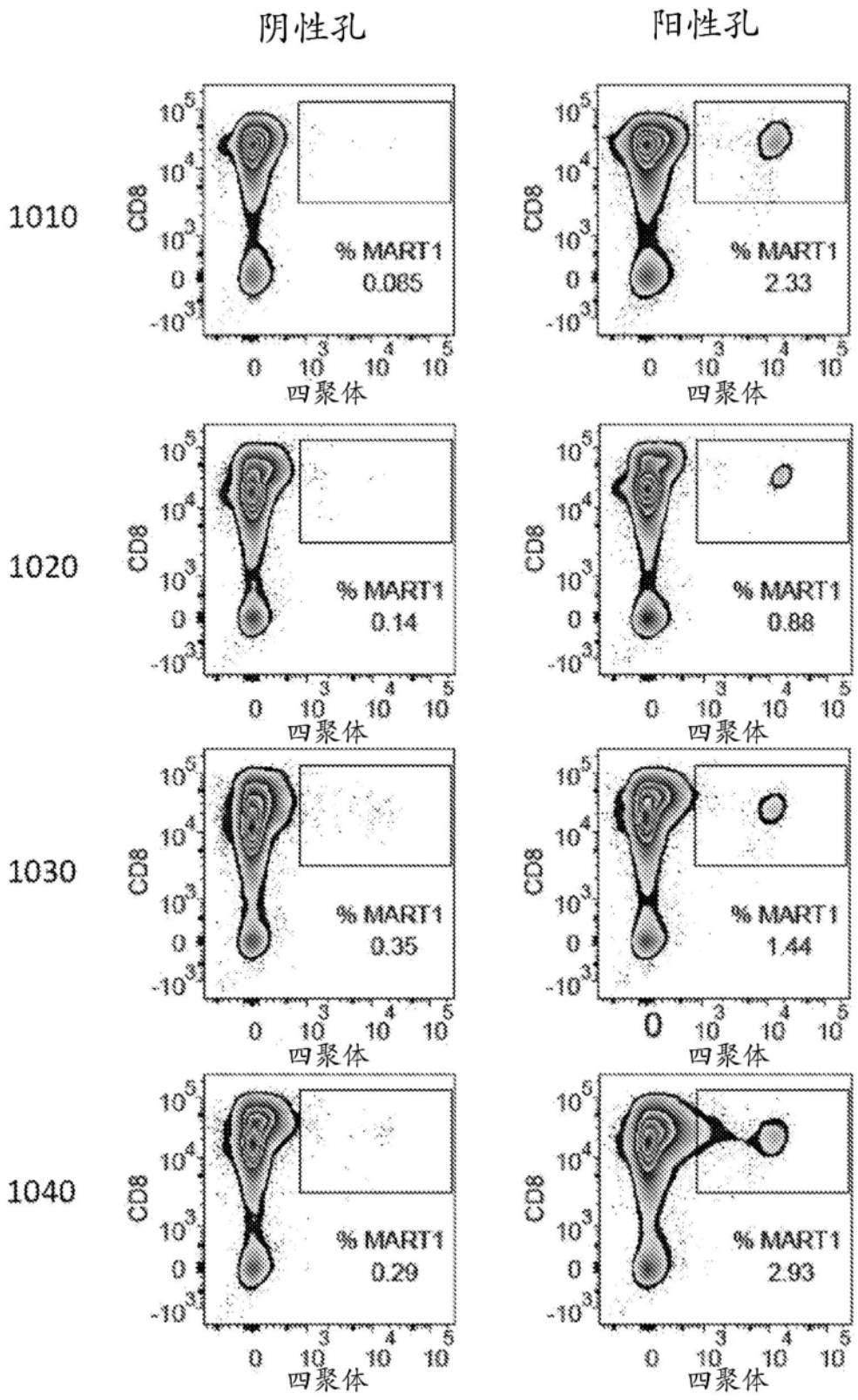

阴性孔
阳性孔
1010
1020
1030
1040
CD8
四聚体
% MART1
0.085
2.33
0.14
0.88
0.35
1.44
0.29
2.93

图10

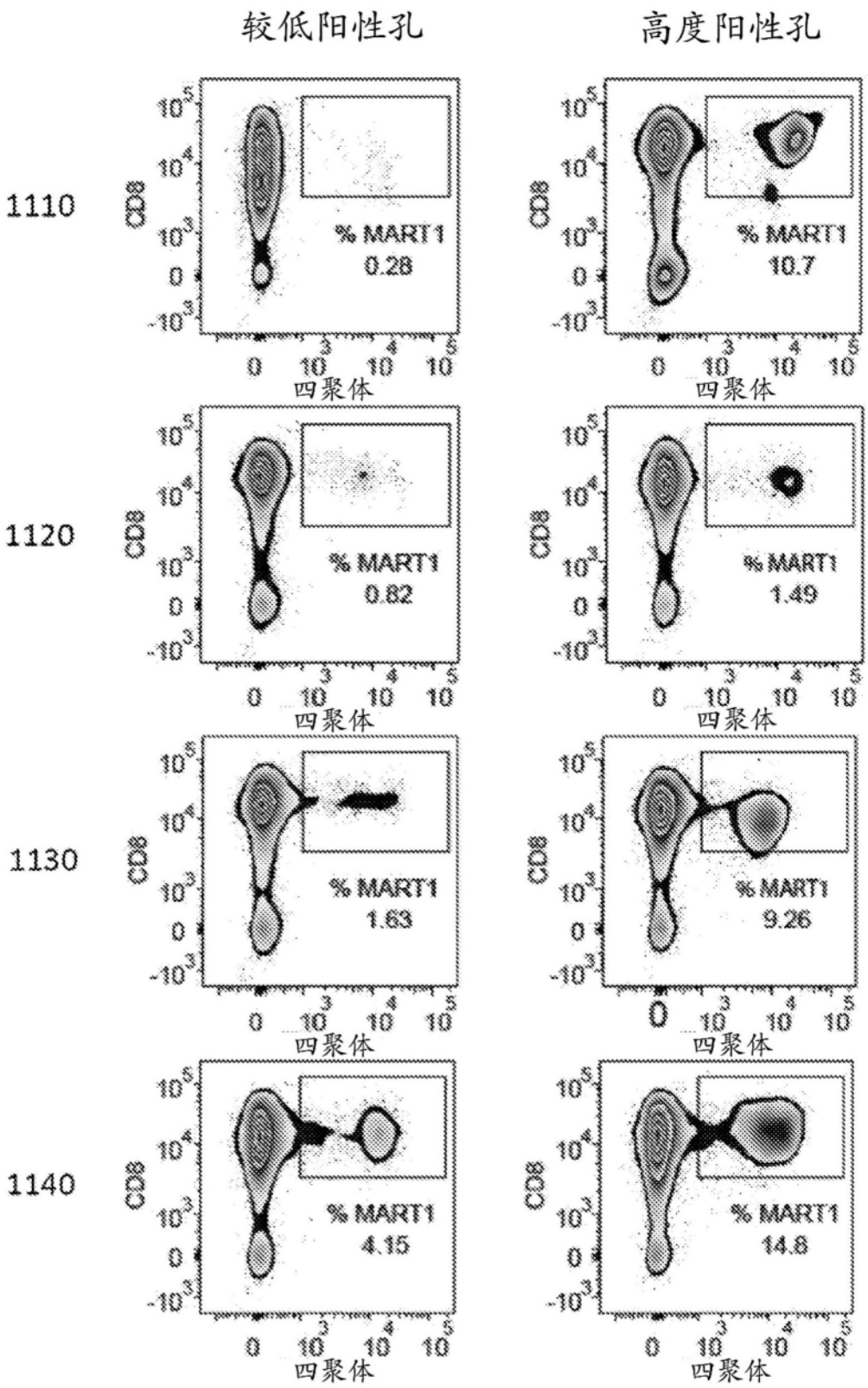

较低阳性孔
高度阳性孔
1110
1120
1130
1140
CD8
四聚体
% MART1
0.28
10.7
0.82
1.49
1.63
9.26
4.15
14.8

图11

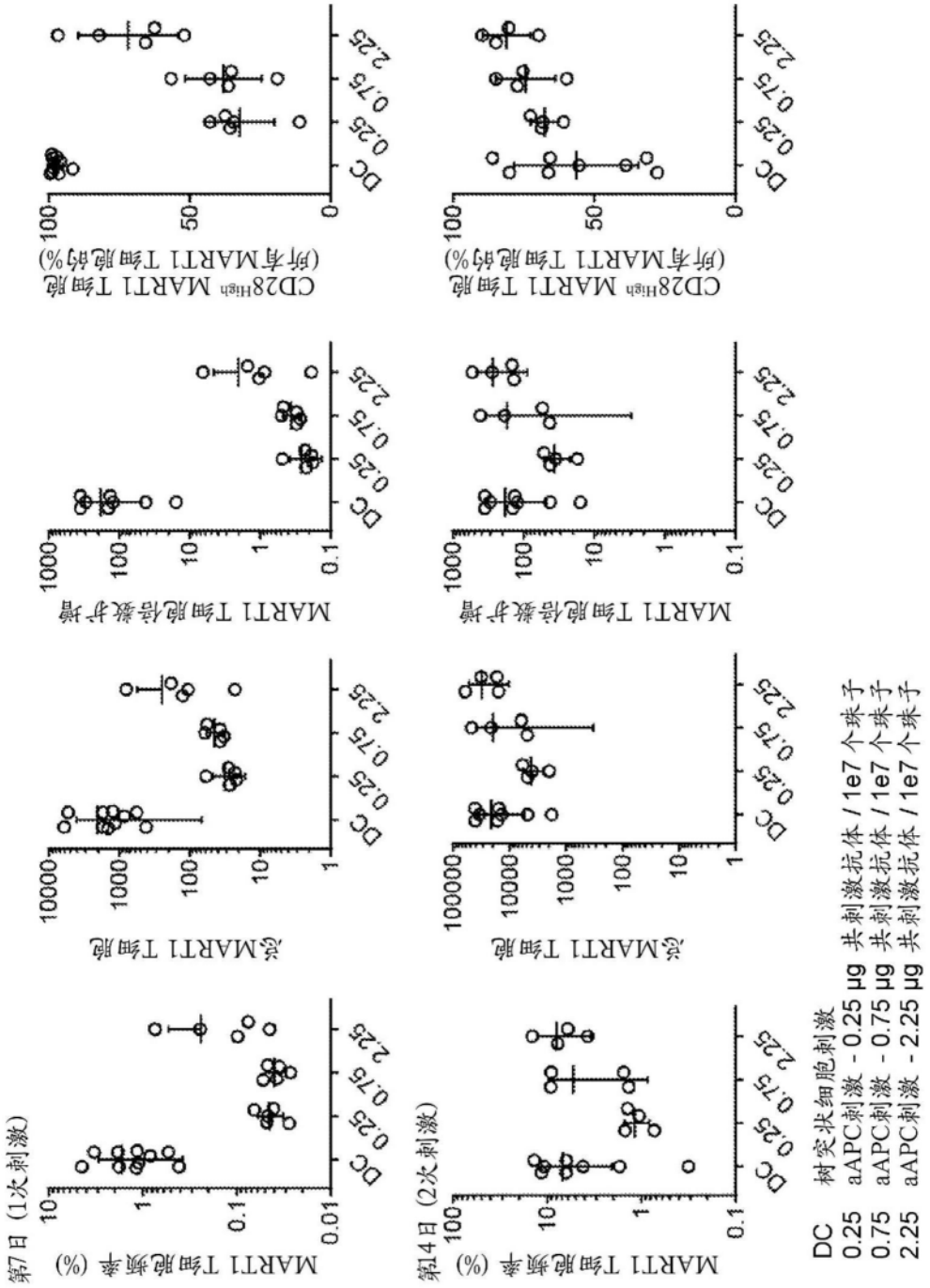

第7日 (1次刺激)
第14日 (2次刺激)
MART1 T细胞频率 (%)
总MART1 T细胞
MART1 T细胞倍数扩增
CD28High MART1 T细胞 (所有MART1 T细胞的%)
DC 树突状细胞刺激
0.25 aAPC刺激 - 0.25 µg 共刺激抗体 / 1e7 个珠子
0.75 aAPC刺激 - 0.75 µg 共刺激抗体 / 1e7 个珠子
2.25 aAPC刺激 - 2.25 µg 共刺激抗体 / 1e7 个珠子

图12

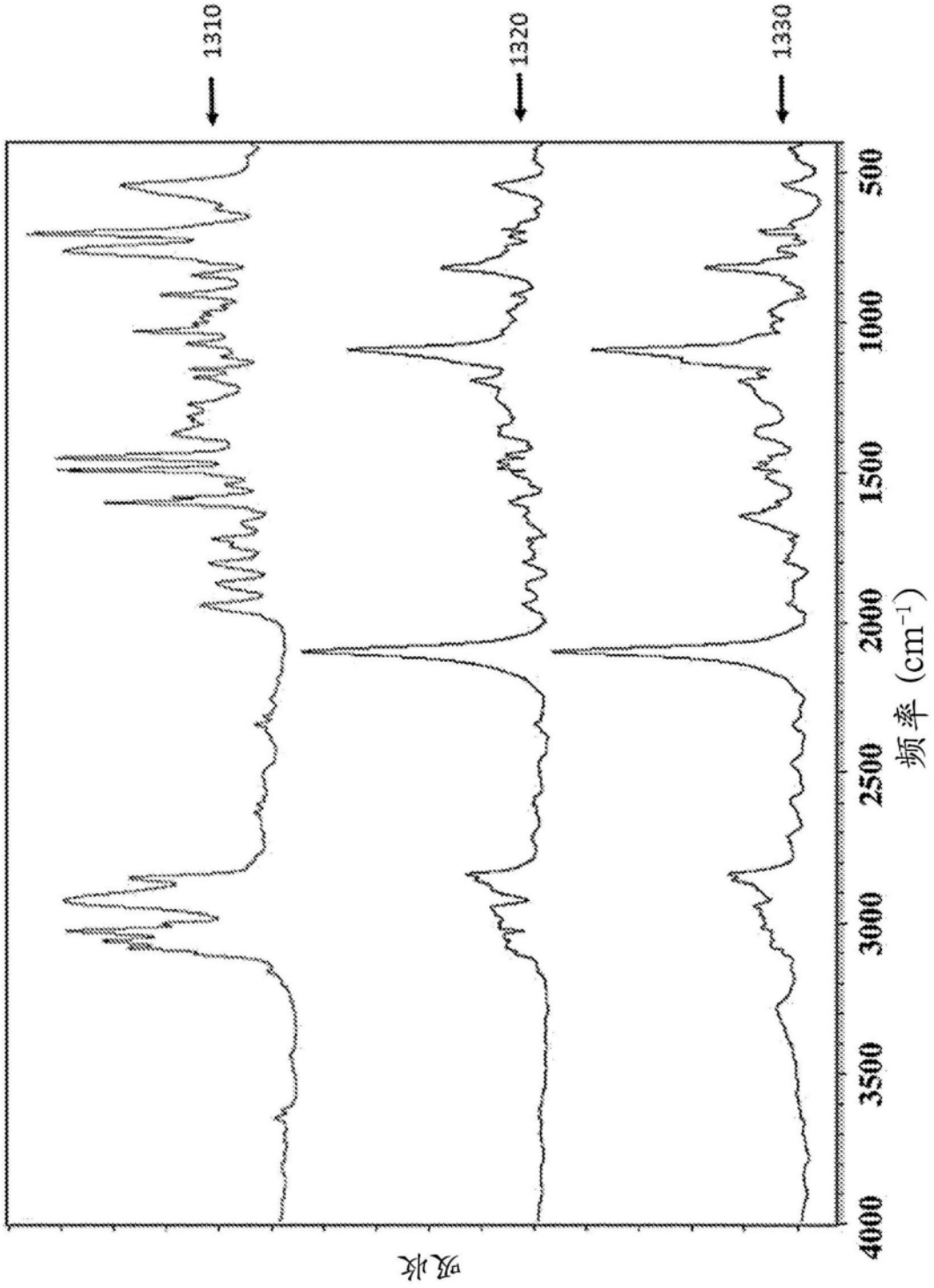

1310
1320
1330
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
频率 (cm^{-1})
吸收

图13

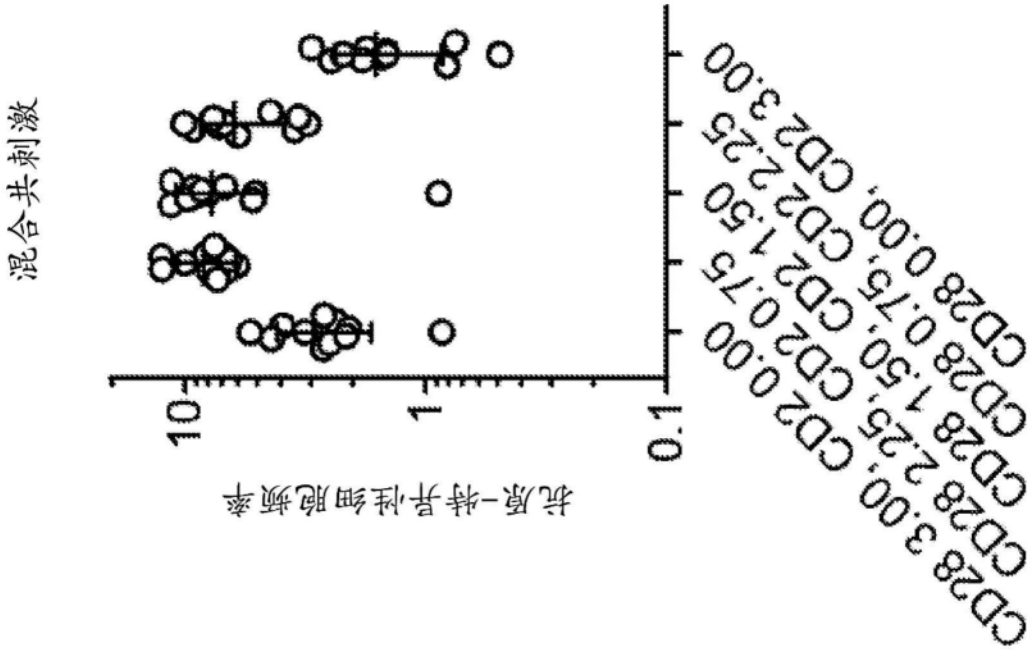

混合共刺激
抗原-特异性细胞频率
10
1
0.1
CD28 3.00, CD2 0.00
CD28 2.25, CD2 0.75
CD28 1.50, CD2 1.50
CD28 0.75, CD2 2.25
CD28 0.00, CD2 3.00

图14A

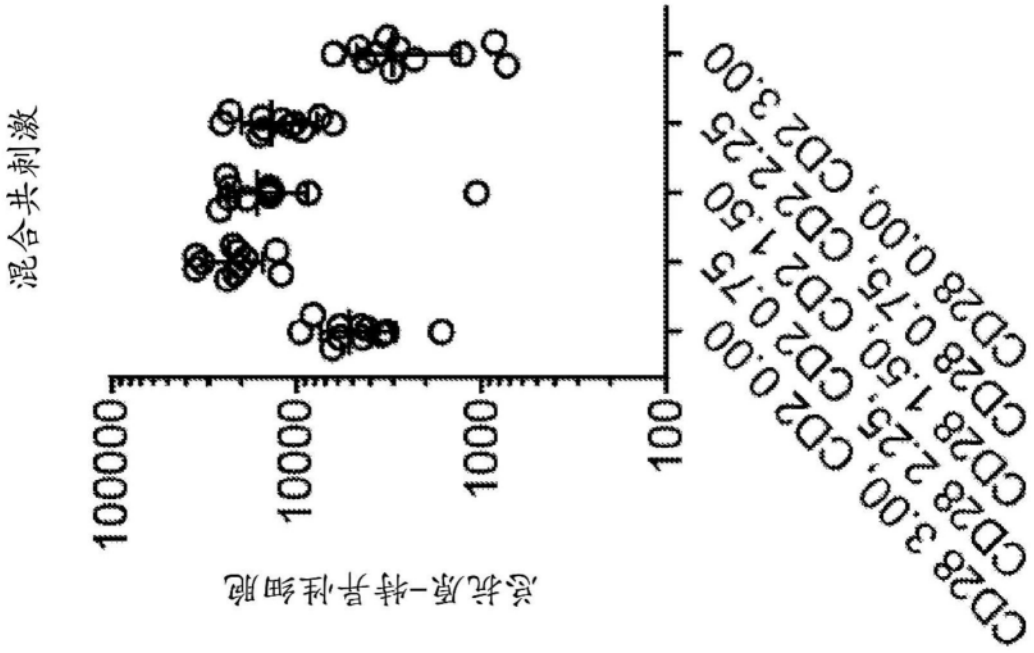

混合共刺激
总抗原-特异性细胞
100000
10000
1000
100
CD28 3.00, CD2 0.00
CD28 2.25, CD2 0.75
CD28 1.50, CD2 1.50
CD28 0.75, CD2 2.25
CD28 0.00, CD2 3.00

图14B

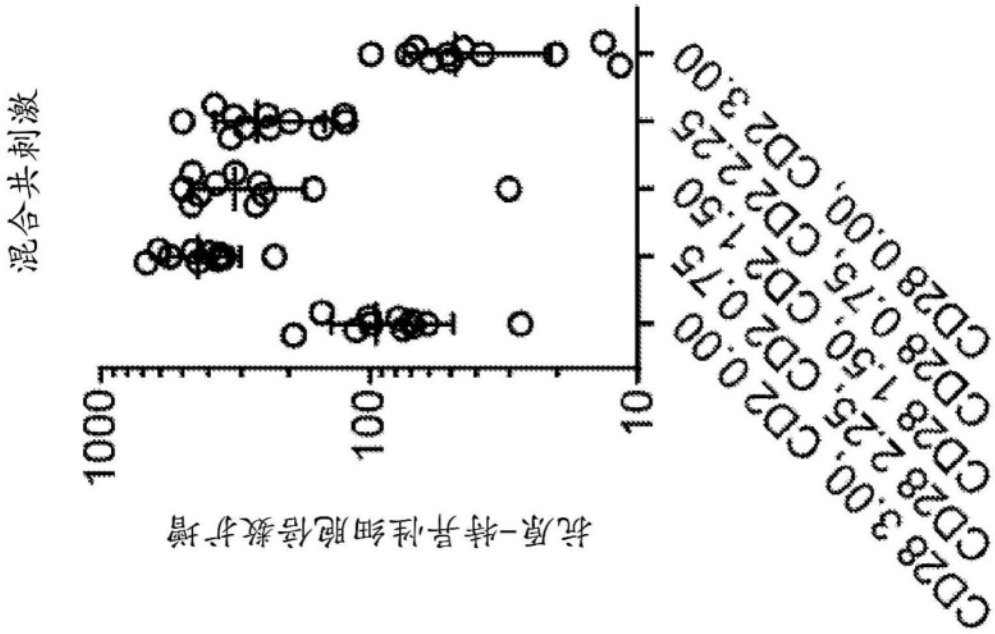

混合共刺激
抗原-特异性细胞倍数扩增
1000
100
10
CD28 3.00, CD2 0.00
CD28 2.25, CD2 0.75
CD28 1.50, CD2 1.50
CD28 0.75, CD2 2.25
CD28 0.00, CD2 3.00

图14C

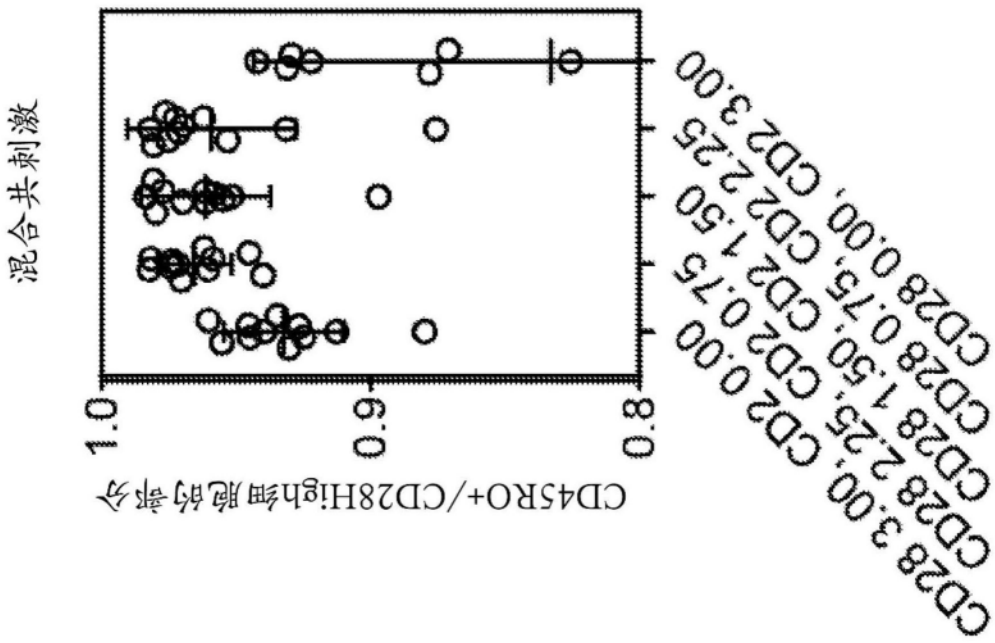

混合共刺激
CD45RO+/CD28High细胞的部分
1.0
0.9
0.8
CD28 3.00, CD2 0.00
CD28 2.25, CD2 0.75
CD28 1.50, CD2 1.50
CD28 0.75, CD2 2.25
CD28 0.00, CD2 3.00

图14D

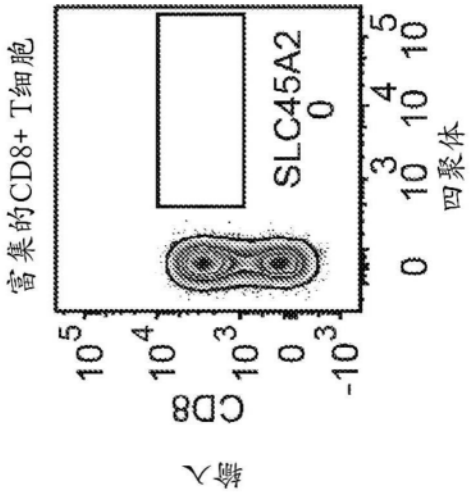


图15A

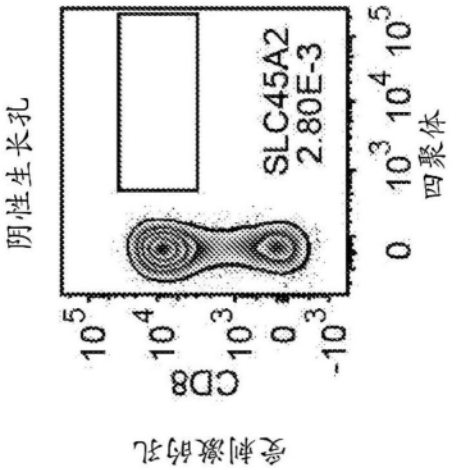


图15B

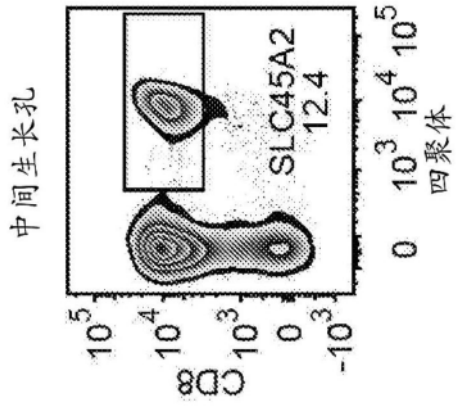


图15C

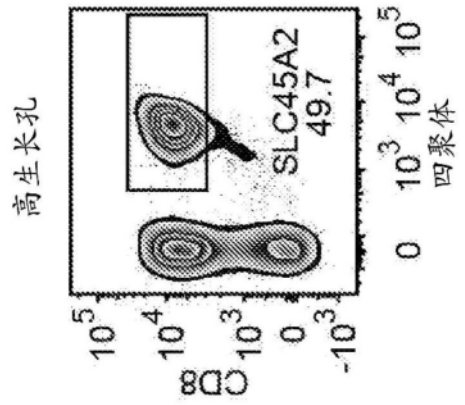


图15D

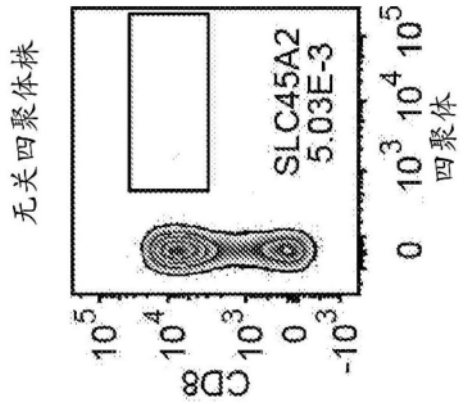


图15E

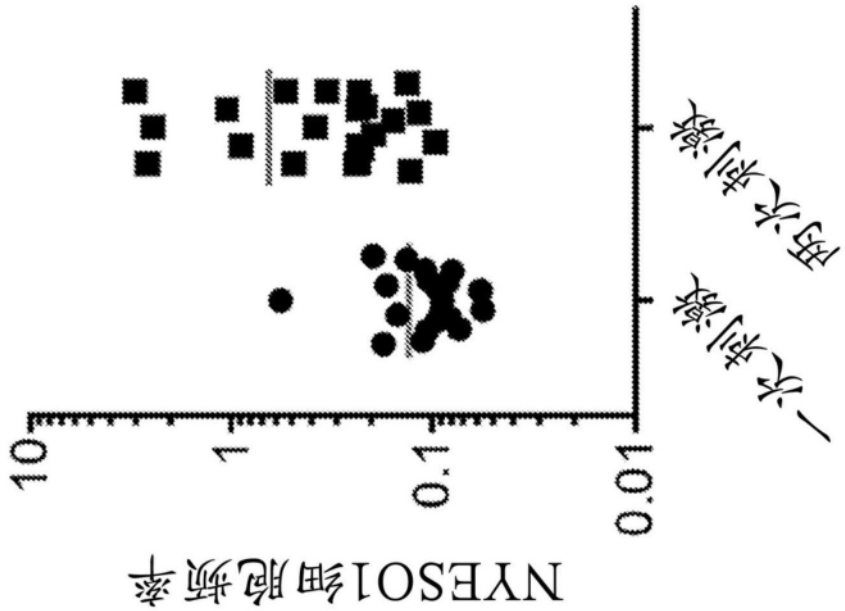


图16

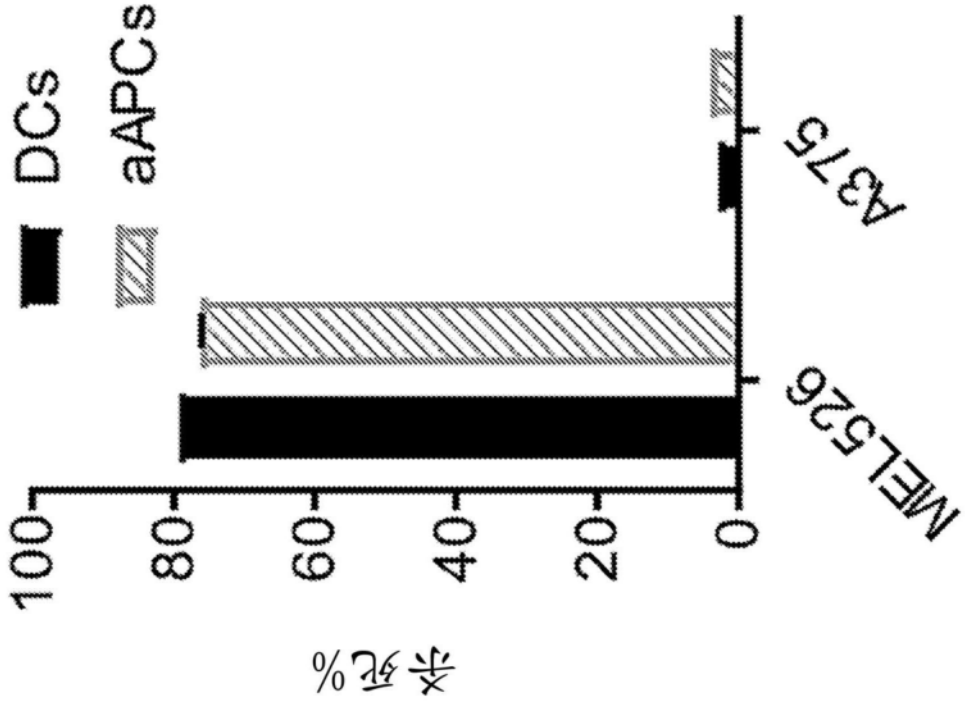

DCs
aAPCs
A375
MEL526
100
80
60
40
20
0
杀死%

图17

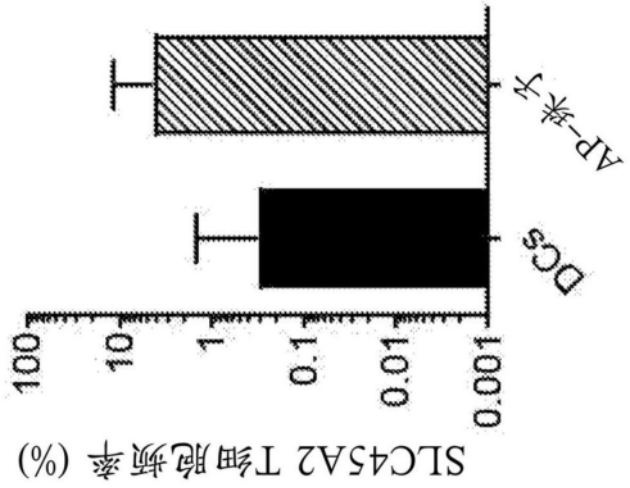

AP-朱子
DCs
100
10
1
0.1
0.01
0.001
SLC45A2 T细胞频率 (%)

图18A

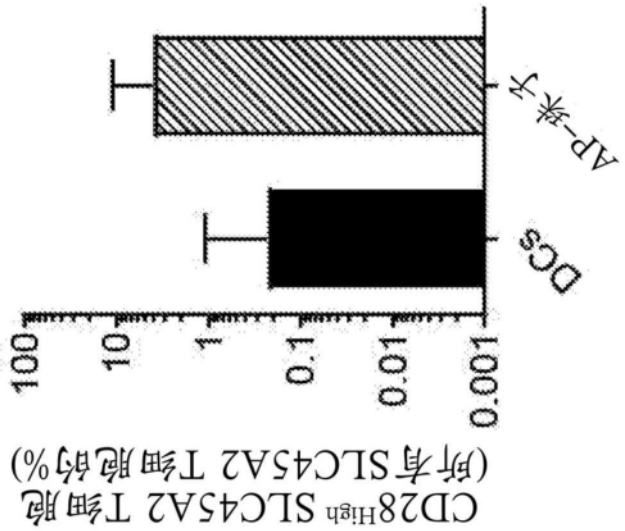

AP-朱子
DCs
100
10
1
0.1
0.01
0.001
CD28High SLC45A2 T细胞
(所有SLC45A2 T细胞的%)

图18B

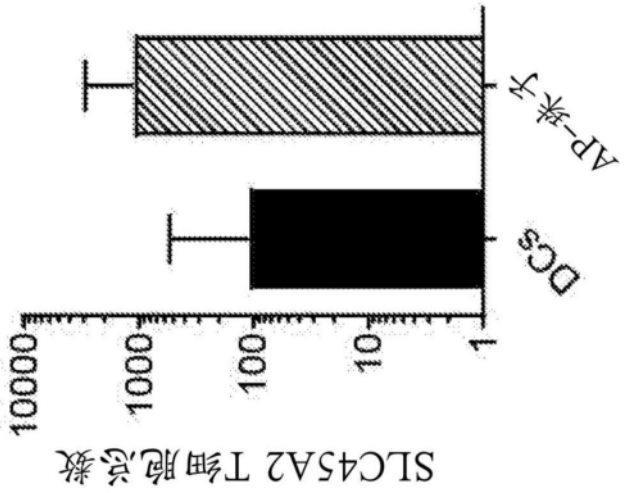

AP-朱子
DCs
10000
1000
100
10
1
SLC45A2 T细胞总数

图18C

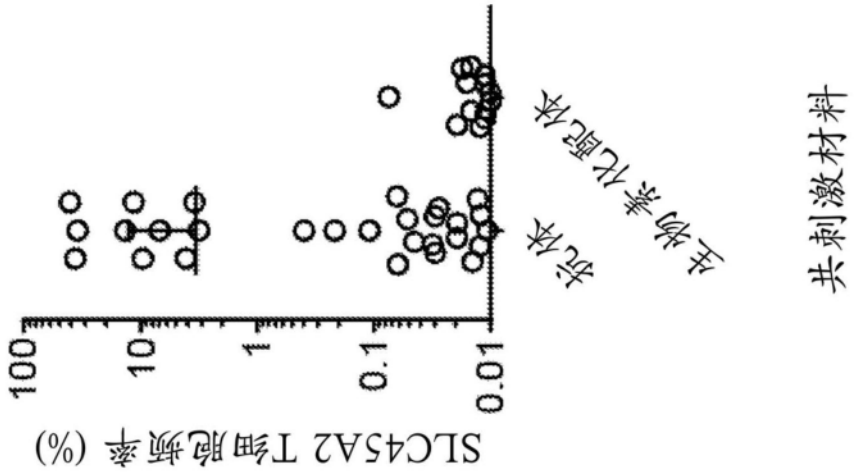

SLC45A2 T细胞频率 (%)
100
10
1
0.1
0.01
供体
患病受试者
共刺激材料

图19A

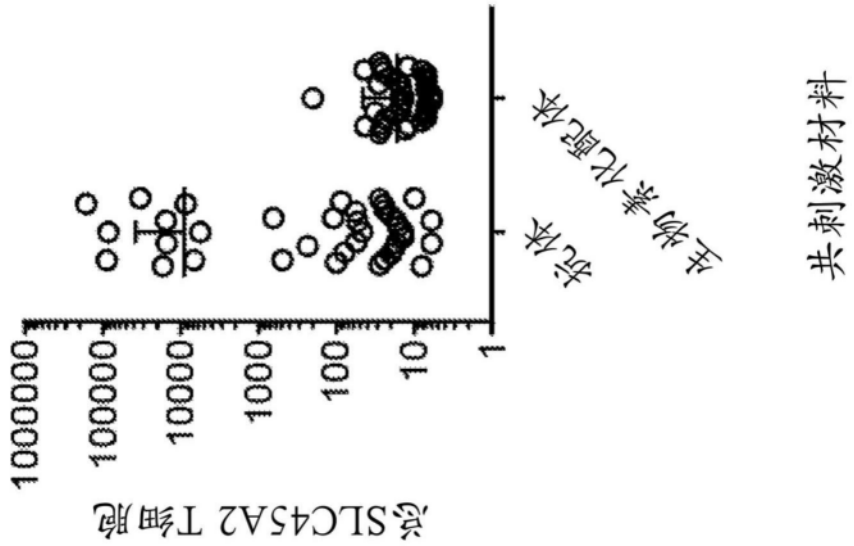

总SLC45A2 T细胞
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
供体
患病受试者
共刺激材料

图19B

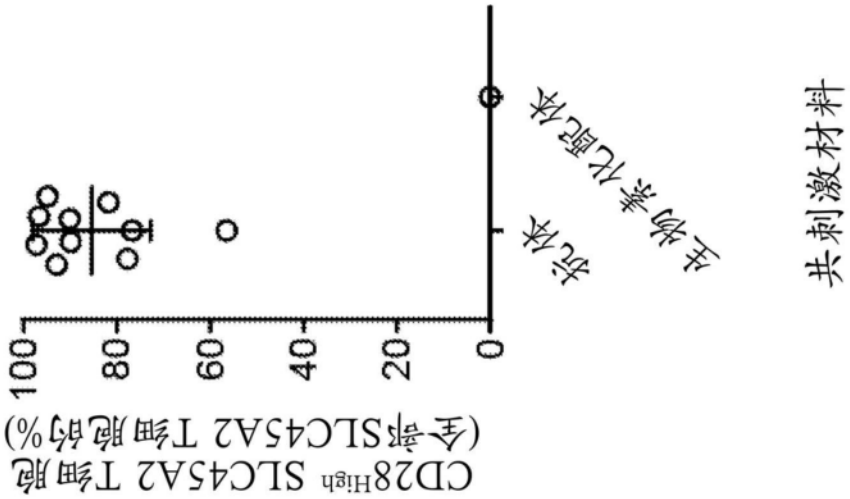

CD28High SLC45A2 T细胞
(全部SLC45A2 T细胞的%)
100
80
60
40
20
0
载体
未结合配体
共刺激材料

图19C

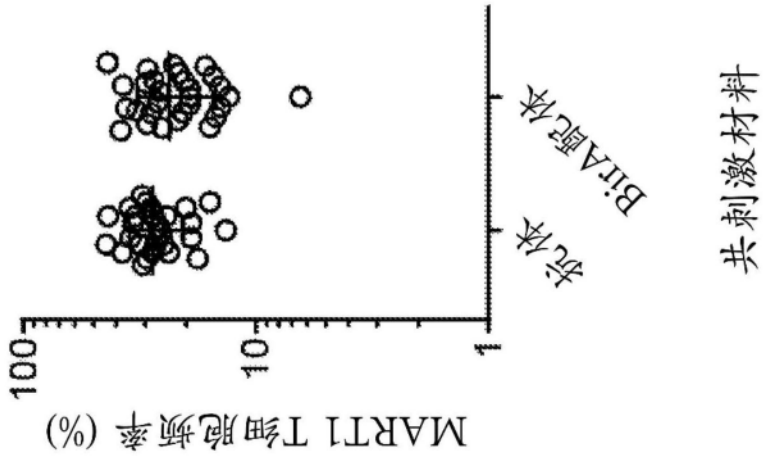

MART1 T细胞频率 (%)
100
10
1
载体
BirA配体
共刺激材料

图19D

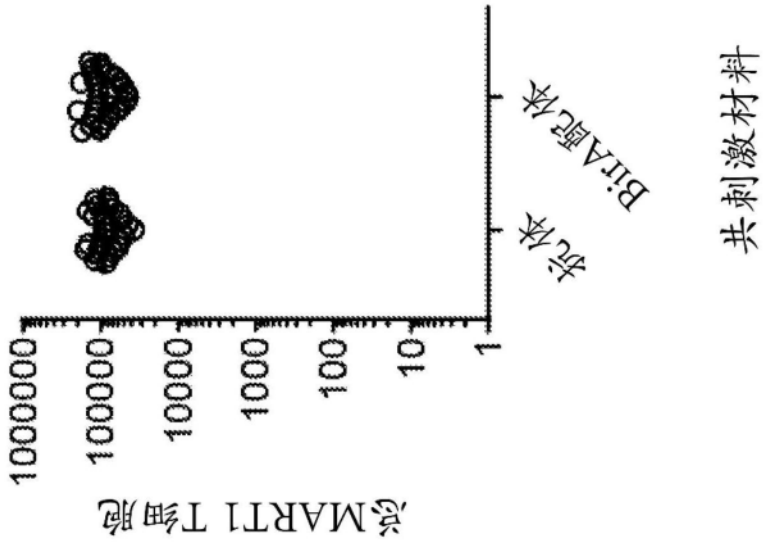

总MART1 T细胞
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
无
BiTA靶向
共刺激材料

图19E

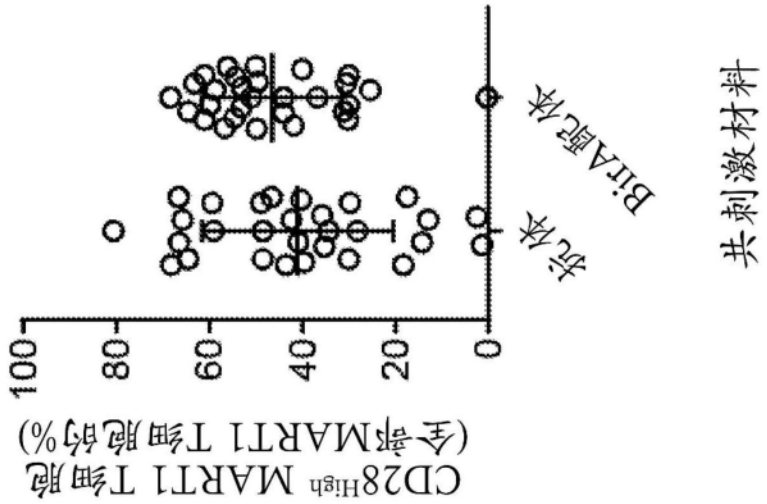

CD28High MART1 T细胞
(全部MART1 T细胞的%)
100
80
60
40
20
0
无
BiTA靶向
共刺激材料

图19F

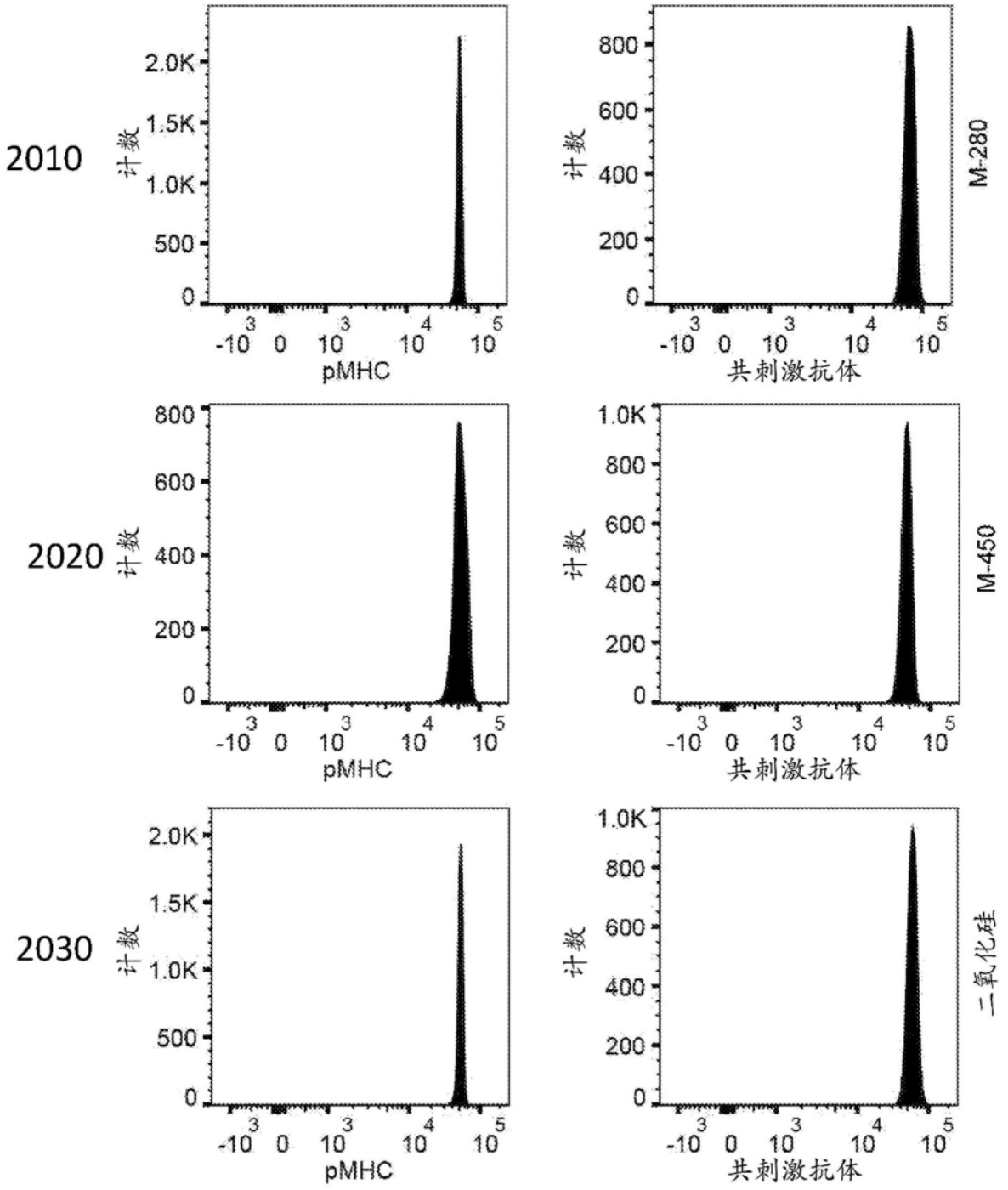


图20A

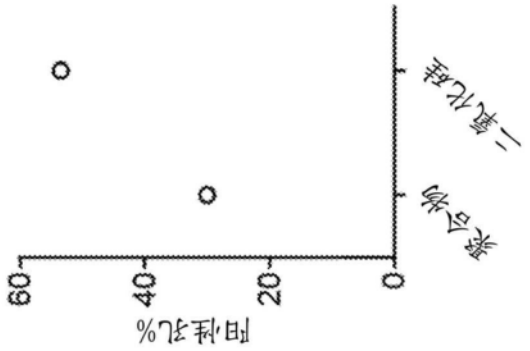
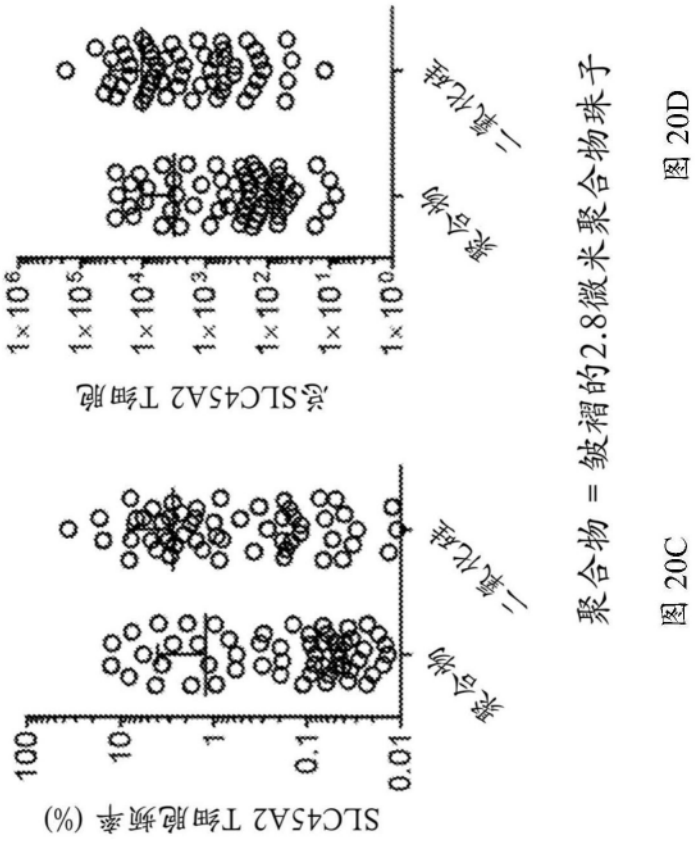


图20B



聚合物 = 皱褶的2.8微米聚合物珠子

图 20C

图 20D

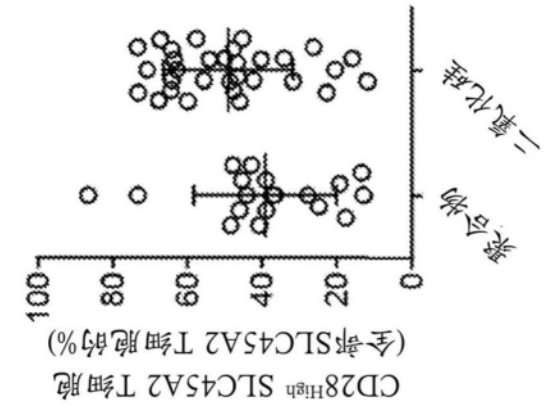


图20E

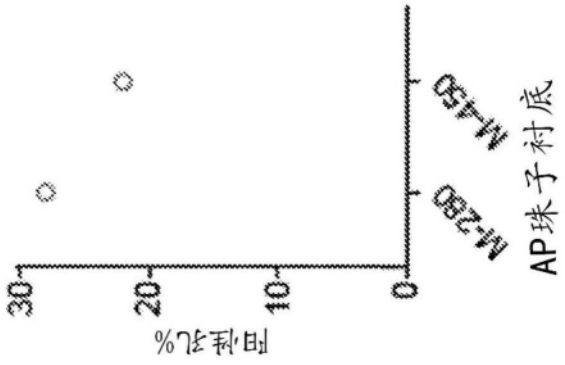


图20F

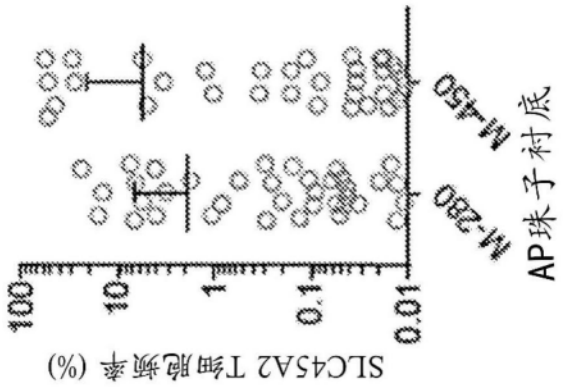


图20G

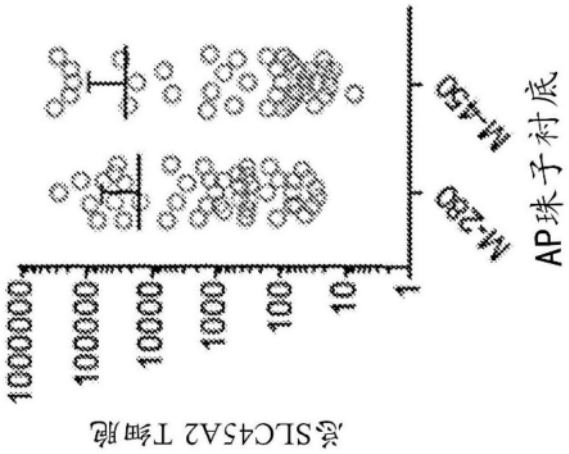

总SLC45A2 T细胞
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
M-280
M-450
AP珠子衬底

图20H

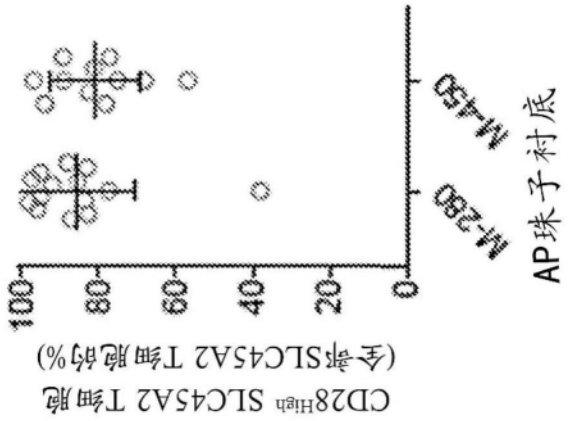

CD28Hiph SLC45A2 T细胞
(全部SLC45A2 T细胞的%)
100
80
60
40
20
0
M-280
M-450
AP珠子衬底

图20I

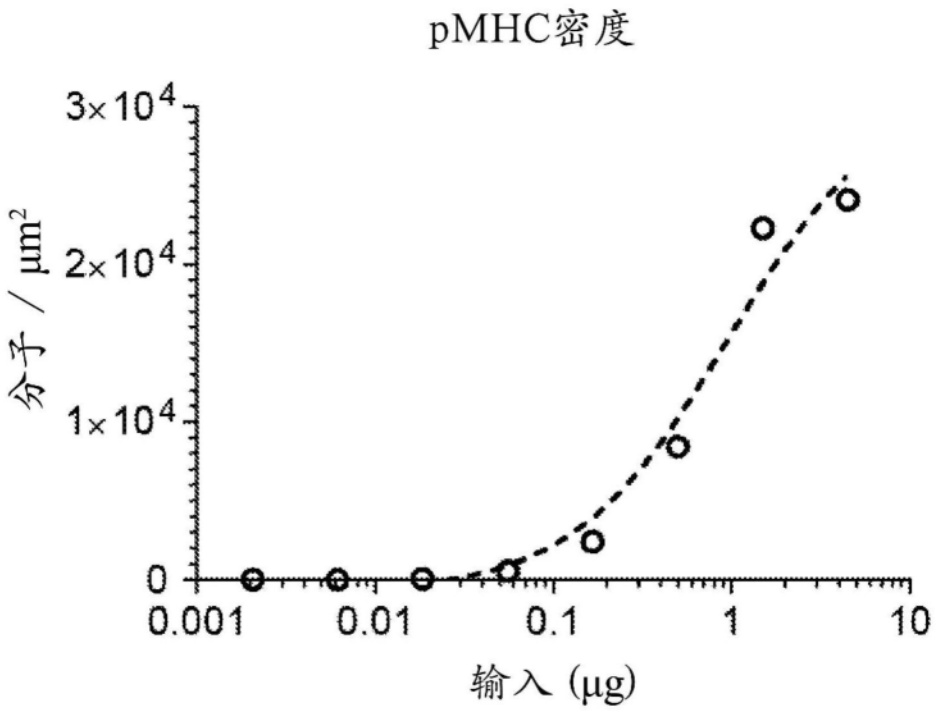

pMHC密度
3×10^4
2×10^4
1×10^4
0
分子 / μm²
0.001
0.01
0.1
1
10
输入 (μg)

图21A

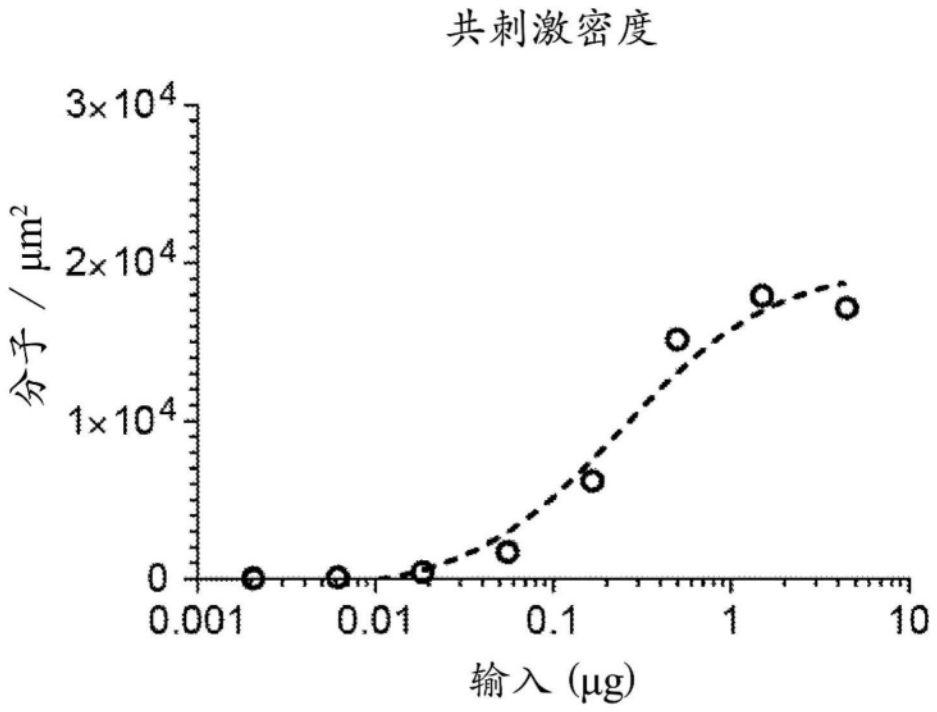

共刺激密度
3×10^4
2×10^4
1×10^4
0
分子 / μm²
0.001
0.01
0.1
1
10
输入 (μg)

图21B

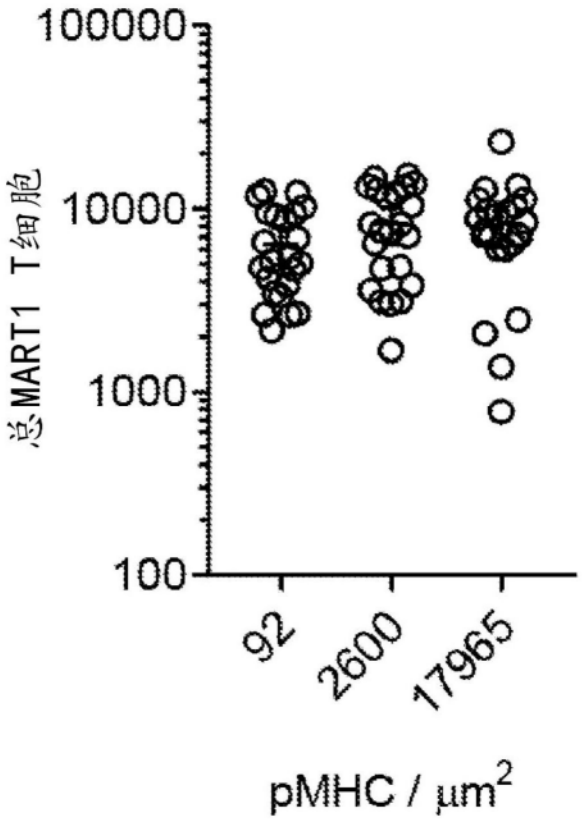


图21C

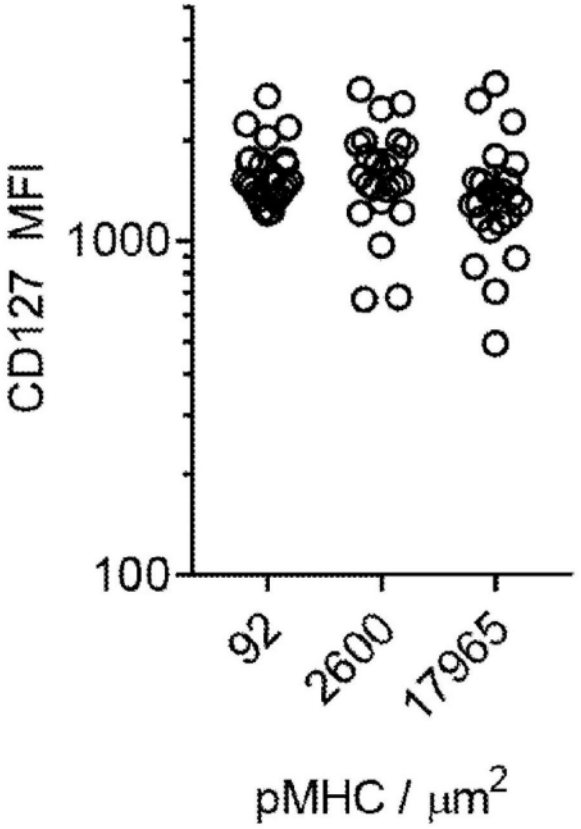

CD127 MFI
1000
100
92
2600
17965
pMHC / μm²

图21D

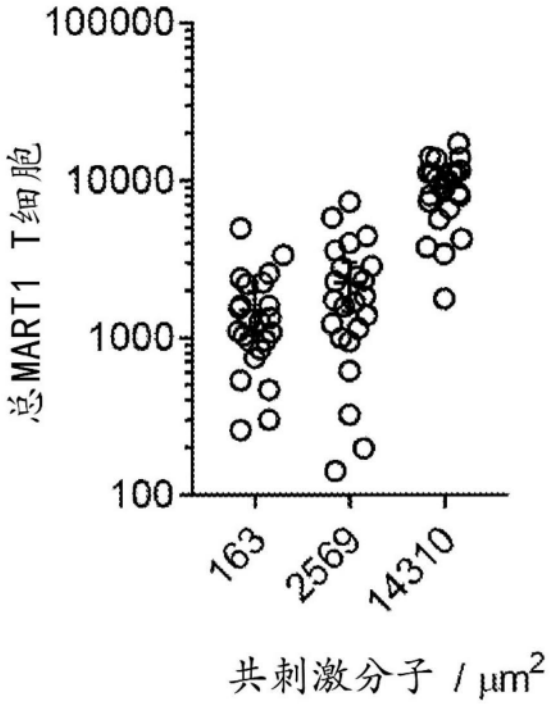

100000
10000
1000
100
总MART1 T细胞
163
2569
14310
共刺激分子 / μm²

图21E

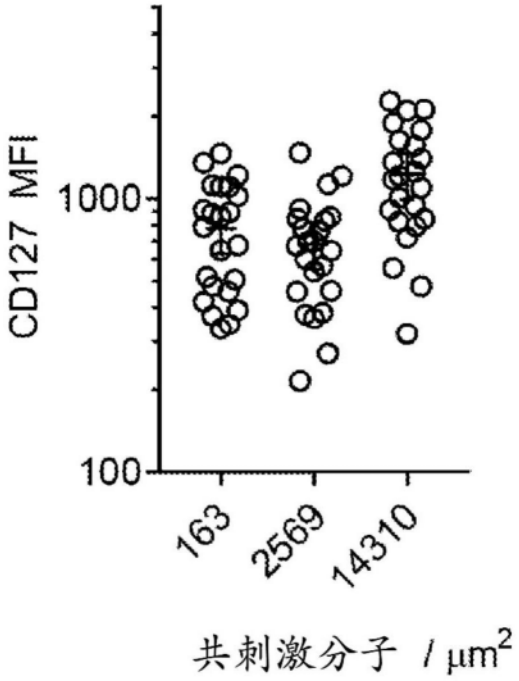


图21F

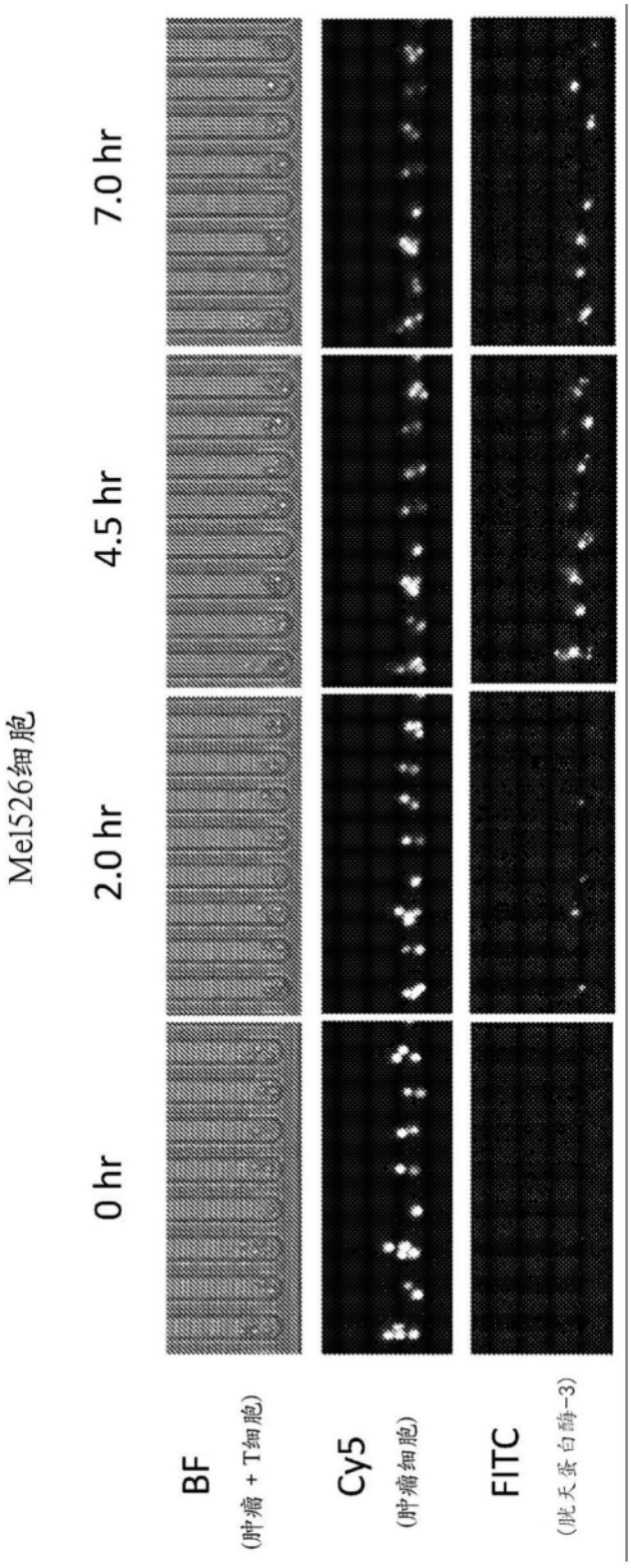


图22A

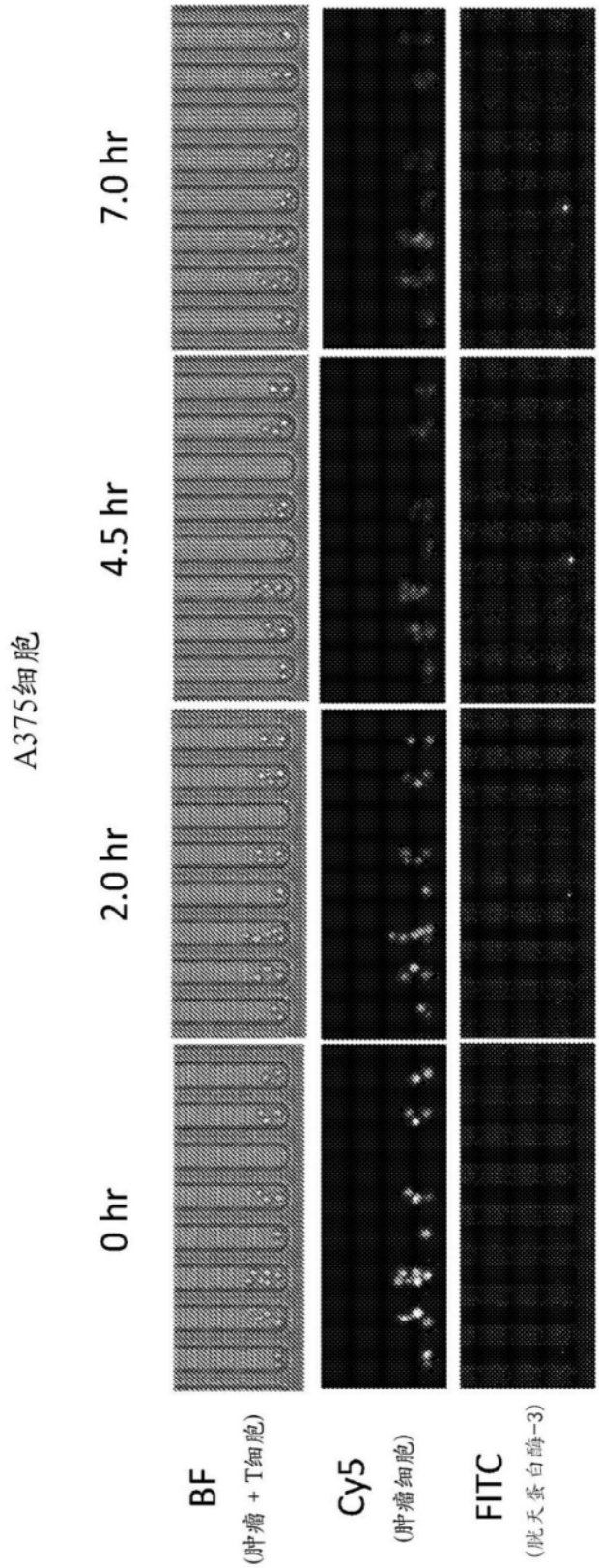


图22B

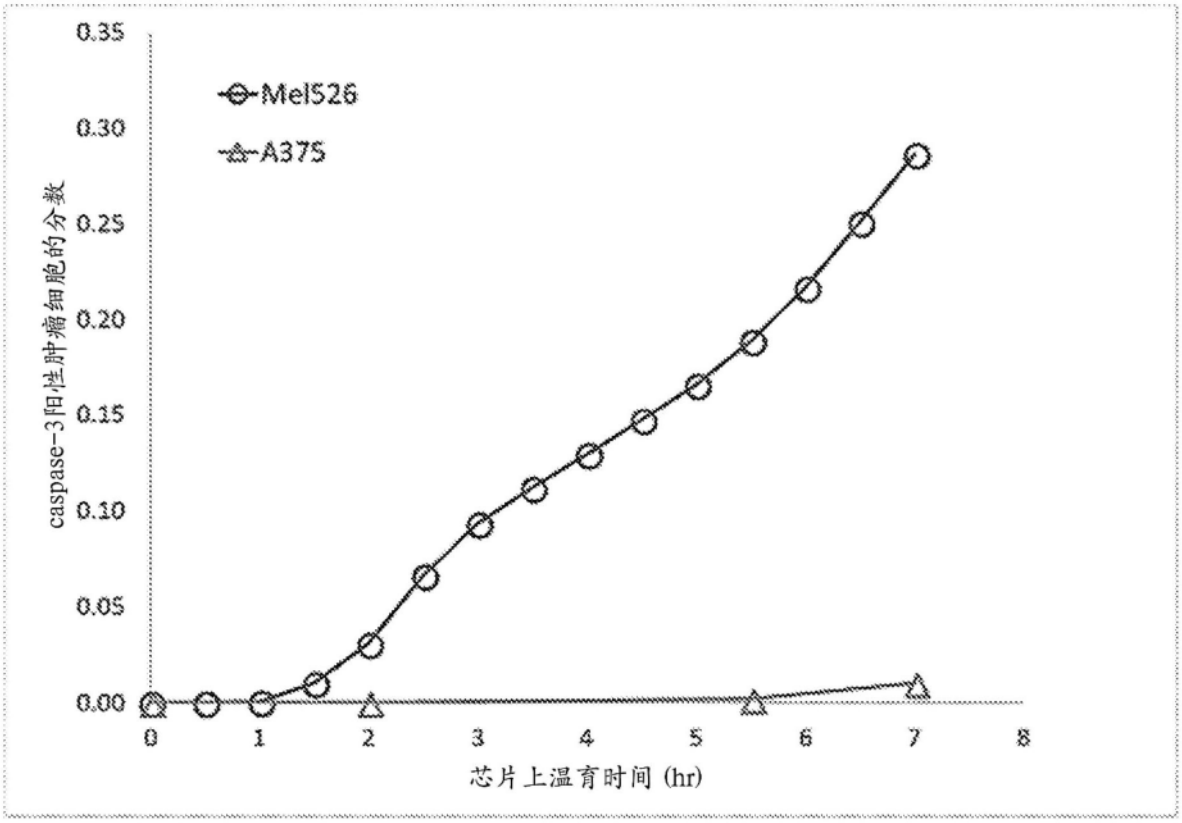

0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
caspase-3阳性肿瘤细胞的分数
Mel526
A375
0
1
2
3
4
5
6
7
8
芯片上温育时间 (hr)

图22C

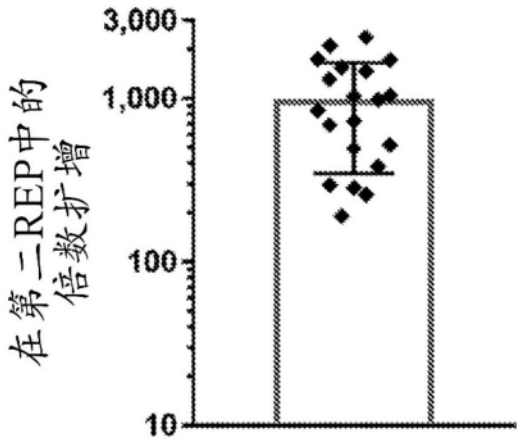

3,000
1,000
100
10
在第二REP中的
倍数扩增

图23A

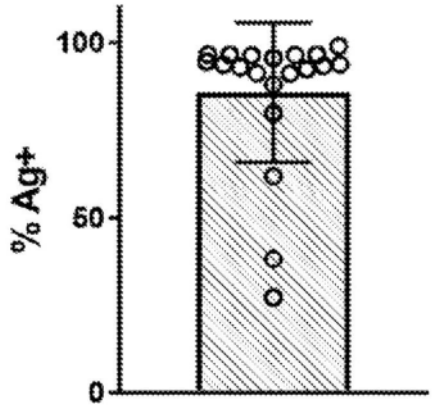


图23B

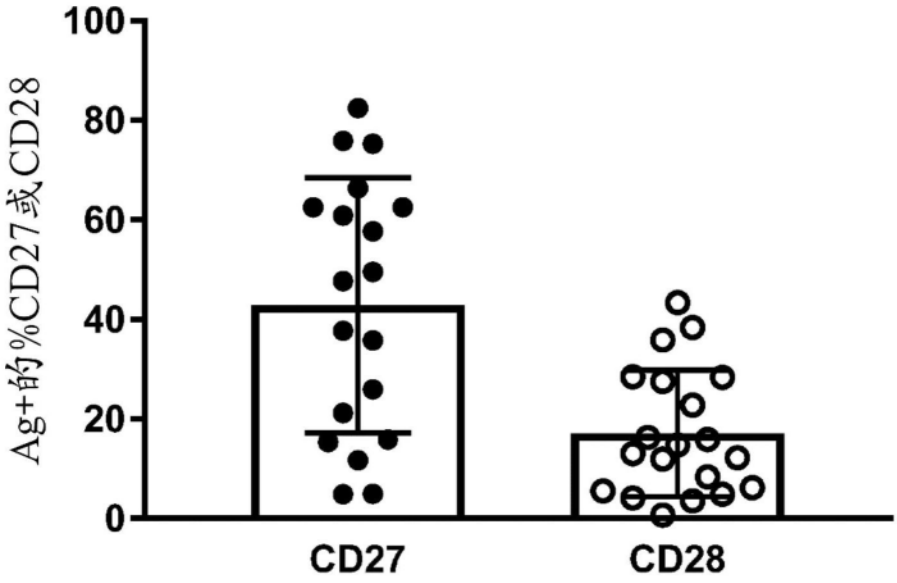


图23C

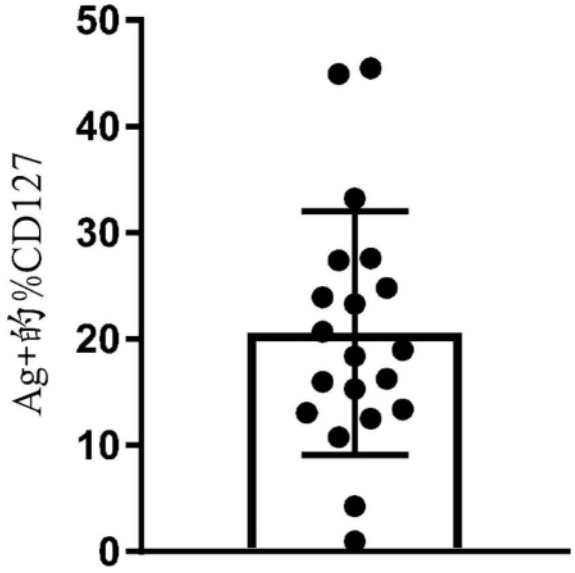


图23D

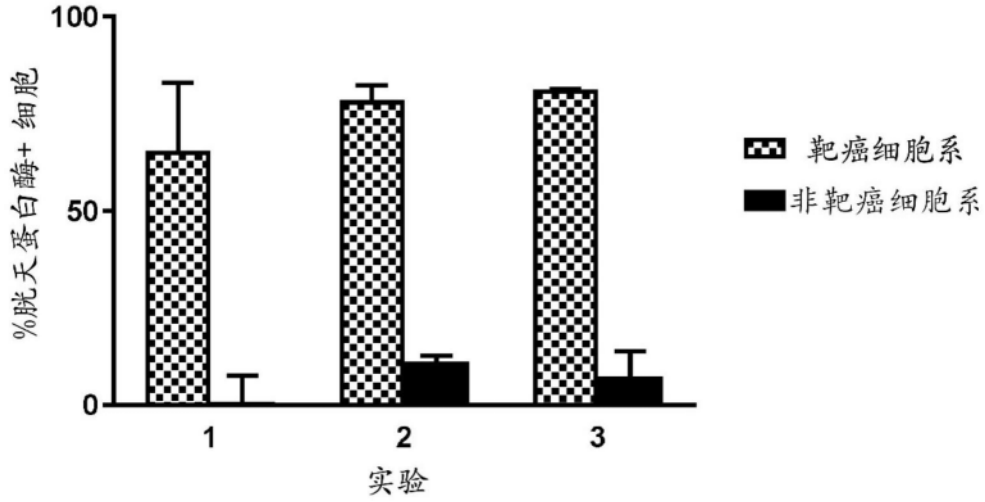


图23E