



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119790140 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 08

(21) 申请号	202380062588.0	(74) 专利代理机构	北京市金杜律师事务所
(22) 申请日	2023.06.26		11256
(30) 优先权数据		专利代理师	杨宏军 田川婷
	2022-102986 2022.06.27 JP	(51) Int.Cl.	
(85) PCT国际申请进入国家阶段日			C12N 5/0783 (2006.01)
	2025.02.27		A61K 35/15 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据			A61K 35/17 (2006.01)
	PCT/JP2023/023664 2023.06.26		A61K 35/545 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据			A61P 35/00 (2006.01)
	W02024/004960 JA 2024.01.04		
(71) 申请人	武田药品工业株式会社		
地址	日本大阪府		
(72) 发明人	桑江忍 松野圭悟		

权利要求书2页 说明书27页 附图5页

(54) 发明名称

细胞培养方法

(57) 摘要

本发明旨在提供一种即使在无血清培养基或低血清培养基中也能够充分增殖细胞,特别是免疫活性细胞的方法,以及待用于所述方法的培养基添加剂和培养基组合物。通过含有硼酸或其盐,即使在无血清培养基或低血清培养基中,也可获得与在含血清培养基中培养所达到的可比的维持和促进细胞增殖的效果。

1. 一种用于培养细胞的方法,其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养细胞的步骤。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中培养基中硼酸或其盐的最终浓度为0.1mM至0.9mM。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中培养基中硼酸或其盐的最终浓度为0.3mM至0.6mM。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中细胞是免疫活性细胞。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中免疫活性细胞选自树突状细胞、B细胞、T细胞和自然杀伤细胞。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中免疫活性细胞是T细胞。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中细胞源自多能干细胞。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中多能干细胞是iPS细胞。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基进一步包含牛磺酸。
11. 一种用于增殖细胞的方法,其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养细胞的步骤。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述培养基进一步包含牛磺酸。
14. 一种用于产生其中扩增了期望的细胞的数量细胞群的方法,其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养包含所述期望的细胞的细胞群的步骤。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述培养基进一步包含牛磺酸。
17. 一种药物,其包含通过根据权利要求14所述的方法获得的细胞群。
18. 根据权利要求17所述的药物,所述药物用于预防和/或治疗癌症。
19. 一种培养基添加剂,其特征在于,所述培养基添加剂包含硼酸或其盐,该培养基是无血清培养基或低血清培养基。
20. 根据权利要求19所述的添加剂,其中所述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
21. 根据权利要求19所述的添加剂,其中所述培养基进一步包含牛磺酸。
22. 一种培养基组合物,其包含硼酸或其盐,其中所述组合物是通过将根据权利要求19所述的培养基添加剂添加到无血清培养基或低血清培养基中获得的。
23. 根据权利要求22所述的培养基组合物,其中所述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
24. 根据权利要求22所述的培养基组合物,其进一步包含牛磺酸。
25. 一种用于预防和/或治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用通过根据权利要求14所述的方法获得的细胞群。
26. 一种细胞群,其通过根据权利要求14所述的方法获得,所述细胞群用于预防和/或治疗癌症。

27.通过根据权利要求14所述的方法获得的细胞群在生产用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途。

细胞培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于在无血清培养基或低血清培养基中培养/增殖细胞的方法,以及用于所述方法的培养基添加剂和培养基组合物。本发明涉及一种用于在无血清或低血清培养基中产生其中扩增了期望的细胞的数量细胞群的方法,以及含有通过所述方法获得的细胞群的药物。

背景技术

[0002] 按常规,细胞培养是使用含有血清的培养基(以下也称为“含血清培养基”)来进行的。例如,胎牛血清(FBS)作为细胞增殖的重要添加剂,广泛用于细胞培养。然而,当培养细胞或其衍生物用于医疗目的时,异种组分可能成为血源性病原体或异源抗原的感染源。另外,血清批次之间的差异可能造成培养结果的变化。出于此原因,近年来,尽可能减少要使用的血清量以及使用具有明确化学组成的培养基(化学成分确定的培养基)培养细胞已成为主流,并且无血清培养基和低血清培养基的开发正在进行中。

[0003] 近来,嵌合抗原受体(CAR)T细胞(以下简称为CAR-T细胞)疗法已被开发为癌症患者的免疫疗法之一,其中对细胞毒性T细胞(CTL)的T细胞受体(TCR)进行遗传修饰以使CTL直接并选择性地识别肿瘤细胞,并且发挥了抗肿瘤作用。使用CAR-T细胞的癌症疗法基于不同于常规抗癌药物和放射疗法的机制杀伤癌细胞,并因此期望对顽固性或难治性癌症有效。目前的CAR-T细胞疗法一般使用自体CAR-T细胞疗法进行,其中将CAR基因离体引入到从患者收集的T细胞中,并且然后将由此产生的CAR-T细胞施用至患者,如在美国获批的Kymriah(商品名称)和Yescarta(商品名称)。然而,此方法需要经过长时间段的多个步骤,诸如T细胞的活化/增殖、病毒载体的制备以及向T细胞中的基因转移,并且因此由于细胞培养和病毒载体的制备所需的成本而存在制造成本高的问题。因此,已经开发出能够实现同种异体CAR-T疗法的iPS细胞来源的CAR-T细胞。在此方法中,在产生iPS细胞来源的CAR-T细胞的过程中,特别是在扩增培养过程中,也使用含血清的培养基,以达到充分的细胞增殖效果。然而,从GMP(良好生产规范)的观点来看,培养基优选为xeno-free的,即不含有异种组分,且最好是无血清或低血清的。另外,考虑到与原代T细胞相比,源自iPS细胞的T细胞特别容易受到洗涤压力的影响,因此对不需要大量洗涤的无血清或低血清培养基的需求强烈。

[0004] 关于在细胞培养中维持期望的细胞增殖效果或促进细胞增殖效果的方法已有很多报道。例如,也有关于硼酸经其转运蛋白NaBC1发挥细胞增殖作用的报道(非专利文献1)。然而,这里使用的培养基是含血清培养基,并且在无血清培养基或低血清培养基中是否能达到同样的细胞增殖效果尚不清楚。专利文献1中描述了一种含有硼酸盐并且适合用于培养二倍体细胞的无血清培养基。另外,非专利文献2中描述了,牛磺酸转运蛋白Taut对T细胞的回忆反应很重要。

[0005] [引文列表]

[0006] [专利文献]

[0007] [专利文献1]

- [0008] 中国专利号105462912
- [0009] [非专利文献]
- [0010] [非专利文献1]
- [0011] Park, Meeyoung等人, Mol Cell. 2004年11月5日; 16(3): 331-41。
- [0012] [非专利文献2]
- [0013] Kaesler, Susanne等人, Eur. J. Immunol. 2012 42: 831-841

发明内容

[0014] [技术问题]

[0015] 本发明旨在提供一种用于在无血清培养基或低血清培养基中培养并且充分增殖细胞、特别是免疫活性细胞的方法, 以及待用于所述方法的培养基添加剂和培养基组合物。此外, 本发明旨在提供一种用于在无血清培养基或低血清培养基中产生具有扩增的期望的细胞、特别是免疫活性细胞的数量的细胞群的方法, 以及含有通过所述方法获得的细胞群的药物。

[0016] [问题的解决方案]

[0017] 鉴于上述问题, 本发明人制备了待添加到无血清或低血清培养基中的各种因子, 并研究了它们对细胞培养或增殖的影响。作为结果, 通过添加硼酸或其盐, 即使当使用无血清培养基或低血清培养基时, 也证实了与在含血清培养基中培养所达到的可比的维持和促进细胞增殖的效果。基于这些发现, 他们找到了更优选的培养条件并且完成了本发明。

[0018] 因此, 本发明提供了以下内容。

[0019] [1] 一种用于培养细胞的方法, 其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养所述细胞的步骤。

[0020] [2] 如上述[1]所述的方法, 其中所述培养基中所述硼酸或其盐的最终浓度为0.1mM至0.9mM。

[0021] [3] 如上述[1]所述的方法, 其中所述培养基中所述硼酸或其盐的最终浓度为0.3mM至0.6mM。

[0022] [4] 如上述[1]至[3]中任一项所述的方法, 其中前述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。

[0023] [5] 如上述[1]至[4]中任一项所述的方法, 其中所述细胞是免疫活性细胞。

[0024] [6] 如上述[5]所述的方法, 其中所述免疫活性细胞选自树突状细胞、B细胞、T细胞和自然杀伤细胞。

[0025] [7] 如上述[6]所述的方法, 其中所述免疫活性细胞是T细胞。

[0026] [8] 如上述[1]至[7]中任一项所述的方法, 其中所述细胞源自多能干细胞。

[0027] [9] 如上述[8]所述的方法, 其中所述多能干细胞是iPS细胞。

[0028] [10] 如上述[1]至[9]中任一项所述的方法, 其中前述培养基进一步包含牛磺酸。

[0029] [11] 一种用于增殖细胞的方法, 其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养所述细胞的步骤。

[0030] [12] 如上述[11]所述的方法, 其中前述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。

- [0031] [13]如上述[11]或[12]所述的方法,其中前述培养基进一步包含牛磺酸。
- [0032] [14]一种用于产生其中扩增了期望的细胞的数量细胞群的方法,其包括在包含硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养包含所述期望的细胞的细胞群的步骤。
- [0033] [15]如上述[14]所述的方法,其中前述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
- [0034] [16]如上述[14]或[15]所述的方法,其中前述培养基进一步包含牛磺酸。
- [0035] [17]一种药物,其包含通过如上述[14]至[16]中任一项所述的方法获得的细胞群。
- [0036] [18]如上述[17]所述的药物,其用于预防和/或治疗癌症。
- [0037] [19]一种培养基添加剂,其包含硼酸或其盐,其中所述培养基是无血清培养基或低血清培养基。
- [0038] [20]如上述[19]所述的添加剂,其中前述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
- [0039] [21]如上述[19]或[20]所述的添加剂,其中前述培养基进一步包含牛磺酸。
- [0040] [22]一种培养基组合物,其包含硼酸或其盐,其中所述组合物是通过将如上述[19]至[21]中任一项所述的培养基添加剂添加到无血清培养基或低血清培养基中获得的。
- [0041] [23]如上述[22]所述的培养基组合物,其中前述无血清培养基或低血清培养基是无血清培养基。
- [0042] [24]如上述[22]所述的培养基组合物,其进一步包含牛磺酸。
- [0043] [25]一种用于预防和/或治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用通过如上述[14]至[16]中任一项所述的方法获得的细胞群。
- [0044] [26]一种细胞群,其通过如上述[14]至[16]中任一项所述的方法获得,所述细胞群用于预防和/或治疗癌症。
- [0045] [27]通过如上述[14]至[16]中任一项所述的方法获得的细胞群在生产用于预防和/或治疗癌症的药物中的用途。
- [0046] [发明的有利效果]
- [0047] 根据本发明,即使当使用无血清培养基或低血清培养基时,也可获得与在含血清培养基中培养可比的维持-促进细胞增殖的效果。具体而言,对于受到因诸如细胞洗涤等操作而造成的压力的影响的细胞,优选在不需要大量洗涤的无血清培养基或低血清培养基中进行培养,并且细胞适合在此类条件下进行培养。

附图说明

- [0048] [图1]
- [0049] 图1是示出iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞增殖测试结果的图,所述结果验证了将0.3mM硼酸添加到含1% FBS培养基中的效果。上行示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数,以及下行示出细胞活力的测量结果。w/o;不含,w/;含有
- [0050] [图2]
- [0051] 图2是示出iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞增殖测试结果的图,所述结果验证了将0.3mM硼酸添加到无血清扩增培养基中的效果。上行示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍

数,以及下行示出细胞活力的测量结果。w/o;不含,w/;含有

[0052] [图3]

[0053] 图3是示出在当将硼酸以不同浓度添加到无血清扩增培养基中时iPS细胞来源的CAR-T细胞的增殖测试结果的图。上行示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数,以及下行示出细胞活力的测量结果。

[0054] w/o;不含,w/;含有

[0055] [图4]

[0056] 图4是示出iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞增殖测试结果的图,所述结果验证了将ITS-X单独添加以及将ITS-X与牛磺酸组合添加到含有0.3mM硼酸的无血清培养基中的效果。上行示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数,以及下行示出细胞活力的测量结果。

[0057] w/o;不含,w/;含有

[0058] [图5]

[0059] 图5是示出人来源的原代T细胞来源的CAR-T细胞的细胞增殖测试结果的图,所述结果验证了将牛磺酸单独添加到含有0.3mM硼酸的无血清培养基中的效果。上行示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数,以及下行示出细胞活力的测量结果。w/o;不含,w/;含有

具体实施方式

[0060] 以下对本发明进行描述。除非另有说明,否则本说明书中使用的术语具有相关领域中一般使用的含义。

[0061] (1) 细胞培养方法(以下也称为“本发明的培养方法”)、细胞增殖方法(以下也称为“本发明的增殖方法”)

[0062] 本发明的培养方法或增殖方法包括在含有硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养细胞的步骤。

[0063] 1-1. 细胞

[0064] 本发明的培养方法和增殖方法中,作为培养目标的细胞的类型没有特别限制。细胞类型的实例包括生殖细胞,诸如精子和卵子、组成活生物体的体细胞、干细胞(多能干细胞等)和自干细胞诱导分化的细胞、祖细胞、自活生物体分离的癌细胞、自活生物体分离的获得永生能力并在体外稳定维持的细胞的细胞(细胞系)、自活生物体分离的经人工遗传修饰的细胞,以及自活生物体分离的并具有人工交换的细胞核的细胞。组成活生物体的体细胞和自干细胞诱导分化的细胞的实例包括但不限于免疫活性细胞(自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B细胞、T细胞等)、成纤维细胞、骨髓细胞、红细胞、血小板、骨细胞、周细胞、角质形成细胞、脂肪细胞、间充质细胞、上皮细胞、表皮细胞、内皮细胞、血管内皮细胞、肝实质细胞、软骨细胞、卵丘细胞、神经系统细胞、神经胶质细胞、神经元、少突胶质细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞、心脏细胞、食道细胞、肌肉细胞(例如,平滑肌细胞或骨骼肌细胞)、胰腺 β 细胞、黑色素细胞、造血祖细胞(例如,源自脐带血的CD34阳性细胞)和单核细胞。体细胞包括从任何组织获得的细胞,诸如皮肤、肾、脾、肾上腺、肝、肺、卵巢、胰腺、子宫、胃、结肠、小肠、大肠、膀胱、前列腺、睾丸、胸腺、肌肉、结缔组织、骨、软骨、血管组织、血液(包括脐带血)、骨髓、心脏、眼、脑或神经组织。

[0065] 干细胞是具有自我复制能力并分化为其他多种细胞谱系的细胞。其实例包括但不限于胚胎肿瘤细胞、多能干细胞、神经干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、肌肉干细胞、生殖系干细胞、肠道干细胞、癌症干细胞和毛囊干细胞。

[0066] “多能干细胞”是指具有自我复制和分化/增殖能力,并且具有分化为构成活生物体所有组织和细胞的能力的细胞。多能干细胞的实例包括胚胎干细胞(ES细胞)、胚胎生殖细胞(EG细胞)、诱导性多能干细胞(iPS细胞)和通过压力或细胞刺激诱导和选择的多能干细胞。通过培养通过体细胞的细胞核的核移植产生的早期胚胎建立的干细胞也优选作为多能干细胞(Nature, 385, 810 (1997); Science, 280, 1256 (1998); Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999); Nature Genetics, 24, 109 (2000))。在本发明中, iPS细胞被优选作为多能干细胞。由于iPS细胞的未分化性质, 因此可使用未分化标志物作为指示物来鉴别iPS细胞。未分化标志物的实例包括碱性磷酸酶、Oct3/4、Sox2、Nanog、ERas、Esg1等。用于检测这些未分化标志物的方法包括用于检测mRNA的方法(使用引物和探针)、免疫学检测方法(使用抗体和标记)等。

[0067] 自干细胞诱导分化的细胞(分化诱导的细胞)是任何经过诱导干细胞分化为特定细胞类型的分化诱导处理的细胞。

[0068] 细胞系是通过人工操作在活生物体外部获得无限增殖能力的细胞。其实例包括但不限于CHO(中国仓鼠卵巢细胞系)、HCT116、Huh7、HEK293(人胚胎肾细胞)、HeLa(人子宫癌细胞系)、HepG2(人肝癌细胞系)、UT7/TP0(人白血病细胞系)、MDCK、MDBK、BHK、C-33A、HT-29、AE-1、3D9、Ns0/1、Jurkat、NIH3T3、PC12、S2、Sf9、Sf21、High Five(商品名称)、Vero等。

[0069] 在一个优选实施方案中, 作为培养目标的细胞是免疫活性细胞。免疫活性细胞是指参与体内各种免疫反应的细胞。免疫活性细胞的实例包括自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、肥大细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、B细胞和T细胞, 并且优选地选自树突状细胞、B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞。更优选地, 免疫活性细胞是T细胞。

[0070] T细胞包括CD4阳性CD8阴性T细胞、CD4阴性CD8阳性T细胞、 $\alpha\beta$ -T细胞、 $\gamma\delta$ -T细胞、调节性T细胞和NKT细胞。T细胞可为亚群, 诸如初始T细胞、效应T细胞、记忆T细胞等。

[0071] 免疫活性细胞可为自人(原代细胞)分离的细胞或通过自干细胞分化获得的细胞, 所述干细胞诸如多能干细胞(例如, iPS细胞、ES细胞)、造血干细胞和间充质干细胞, 并且优选为原代细胞和通过自多能干细胞(特别是iPS细胞)分化获得的细胞。作为原代细胞, 优选源自人的原代T细胞。可通过本领域已知的方法来进行自干细胞到免疫活性细胞的分化诱导, 具体取决于所用干细胞的类型和感兴趣的免疫活性细胞的类型。在一个实施方案中, 自iPS细胞到T细胞的分化诱导和自iPS细胞到NK细胞的分化诱导可通过实施例描述的方法进行。

[0072] 另外, 作为目标的细胞可为自体细胞或同种异体细胞。在本发明中, “自体细胞”是指从接受通过本发明的培养方法或本发明的方法产生的细胞群(下文所述)的受试者获得的细胞, 或源自所获得的细胞的细胞, 并且“同种异体细胞”是指不是上述“自体细胞”的细胞。

[0073] 在本发明中, 作为培养目标的细胞可为经人工遗传修饰的细胞。此类细胞的实例

包括引入了CAR基因的免疫活性细胞(引入了CAR基因的T细胞和引入了CAR基因的自然杀伤细胞)、引入了外源性T细胞受体(TCR)的T细胞,以及引入了表达细胞因子和/或趋化因子的基因的免疫活性细胞。

[0074] CAR是一种自蛋白质的N端侧到C端侧,包括对靶标有特异性的胞外结构域、跨膜结构域和用于免疫细胞效应功能的胞内信号结构域的结构,并且CAR基因是编码此种受体的基因。胞外结构域含有表现出对靶标的特异性结合特性的抗原识别位点。跨膜结构域位于胞外结构域和胞内信号结构域之间。胞内信号结构域传递免疫细胞发挥其效应功能所必需的信号。即,使用当胞外结构域与靶抗原结合时能够传递活化免疫细胞所必需的信号的胞内信号结构域。已有多项关于使用CAR的实验、临床研究等的报道(例如,Rossig C,等人Mol Ther10:5-18,2004;Dotti G,等人Hum gene Ther 20:1229-1239,2009;Ngo MC,等人Hum Mol Genet 20(R1):R93-99,2011;Ahmed N,等人Mol Ther 17:1779-1787,2009;Pule MA,等人Nat Med 14:1264-1270,2008;Louis CU,等人Blood 118:6050-6056,2011;Kochenderfer JN,等人Blood 116:4099-4102,2010;Kochenderfer JN,等人Blood 119:2709-2720,2012;Porter DL,等人N Engl J Med 365:725-733,2011;Kalos M,等人Sci Transl Med 3:95ra73,2011;Brentjens RJ,等人Blood118:4817-4828,2011;Brentjens RJ,等人Sci Transl Med 5:177ra38,2013),并且本发明中的CAR可通过参考这些报道进行构建。

[0075] 应用本发明的培养方法和增殖方法的细胞的优选的一个实施方案包括引入了CAR基因的T细胞(CAR-T细胞)和引入了CAR基因的NK细胞(CAR-NK细胞),更优选为源自多能干细胞的CAR-T细胞和CAR-NK细胞,进一步优选为源自iPS细胞的CAR-T细胞和源自iPS细胞的CAR-NK细胞,并且进一步更优选为源自iPS细胞的CAR-T细胞。CAR-T细胞和CAR-NK细胞可分别通过将CAR基因引入到T细胞和NK细胞,或其前体细胞(诸如多能干细胞)中来获得。例如,CAR-T细胞可为通过将CAR基因引入到通过将细胞(诸如iPS细胞、ES细胞、造血干细胞和间充质干细胞)分化为T细胞获得的细胞中所获得的细胞,或通过将引入了CAR基因的iPS细胞分化为T细胞所获得的细胞。优选地,CAR-T细胞源自iPS细胞并通过将引入了CAR基因的iPS细胞分化为T细胞获得,或者CAR-T细胞源自iPS细胞并通过将CAR基因引入到通过分化iPS细胞获得的T细胞中而获得,并且有时这些细胞统称为“iPS细胞来源的CAR-T细胞”。更优选地,CAR-T细胞源自iPS细胞并通过将CAR基因引入到通过分化iPS细胞获得的T细胞中而获得。例如,就CAR-NK细胞而言,CAR-NK细胞可为通过将CAR基因引入到通过将细胞(诸如iPS细胞、ES细胞、造血干细胞和间充质干细胞)分化为NK细胞获得的细胞中所获得的细胞,或通过将引入了CAR基因的iPS细胞分化为NK细胞所获得的细胞。优选地,CAR-NK细胞源自iPS细胞并通过将引入了CAR基因的iPS细胞分化为NK细胞获得,或者CAR-NK细胞源自iPS细胞并通过将CAR基因引入到通过分化iPS细胞获得的NK细胞中而获得,并且有时这些细胞统称为“iPS细胞来源的CAR-NK细胞”。更优选地,CAR-NK细胞源自iPS细胞并通过将CAR基因引入到通过分化iPS细胞获得的NK细胞中而获得。

[0076] 诱导iPS细胞(当期望时,其中可引入CAR基因)分化为T细胞,或诱导iPS细胞(当期望时,其中可引入CAR基因)分化为NK细胞可使用已知的方法进行,具体而言,通过实施例中描述的方法进行。

[0077] CAR基因一般使用CAR表达载体引入到细胞中。CAR表达载体意指能够将编码CAR基

因的核酸分子转运到细胞中的核酸分子。其可为DNA或RNA,并且对其形式和来源没有特别限制,并且可使用各种类型的载体。载体可为病毒载体或非病毒载体。病毒载体的实例包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体、疱疹病毒载体、仙台病毒(Sendai viral)载体和痘苗病毒载体。其中,逆转录病毒载体、慢病毒载体和腺相关病毒载体中,整合到载体中的靶基因被整合到宿主染色体中,并且可期待稳定和长期表达。各病毒载体可根据常规方法或使用商业上可获得的专用试剂盒来生产。非病毒载体的实例包括质粒载体、脂质体载体、带正电荷的脂质体载体(Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M.等人, Proc.Natl.Acad.Sci., 84:7413-7417, 1987)、YAC载体、BAC载体和人工染色体载体。

[0078] 在一个实施方案中,可通过实施例描述的方法将CAR基因引入到细胞中。

[0079] 1-2.培养基

[0080] 本发明的培养方法和增殖方法中待使用的培养基是含有硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基(以下有时统称为“本发明的培养基”)。

[0081] 在本说明书中,硼酸只要其是药学上可接受的,则无特别限制,并且其实例包括原硼酸、偏硼酸和四硼酸。这些硼酸中,优选使用原硼酸。硼酸的盐只要它们是药学上可接受的,则无特别限制,并且其实例包括碱金属盐,诸如钠盐和钾盐;碱土金属盐,诸如钙盐和镁盐;铝盐;以及具有有机胺的盐,诸如三乙胺、三乙醇胺、吗啉、哌嗪和吡咯烷。另外,硼酸或其盐可为水合物的形式,诸如硼砂。培养基中硼酸或其盐的浓度没有特别限制,只要获得期望的效果即可。一般为0.1mM至0.9mM,优选为0.2mM至0.8mM,进一步优选为0.2mM至0.7mM,特别优选为0.3mM至0.6mM。除非另有说明,否则本说明书中硼酸或其盐的浓度为转换成硼酸的浓度。当浓度过高时,其影响细胞活力,并且当浓度过低时促进细胞增殖的效果弱。

[0082] 在本说明书中,“无血清培养基”意指基本上不含、优选不含未调节或未纯化的血清的培养基,并且被纯化的血液来源组分或动物组织来源组分(例如生长因子)污染的培养基被认为是无血清培养基。作为培养基,一般使用用于培养动物细胞的培养基(为方便起见,以下也称为基础培养基)或用于灌流培养的培养基。这里的“基本上不含”意指完全不含有,或者即使含有,也是在检测限以下。

[0083] 基础培养基的实例包括但不限于BME培养基、BGJb培养基、CMRL 1066培养基、Glasgow MEM培养基、改良的MEM ZincOption培养基、IMDM培养基、Medium 199培养基、伊格尔(Eagle)MEM培养基、 α MEM培养基、DMEM培养基、Ham's培养基、RPMI 1640培养基、Fischer's培养基、F12培养基及其混合培养基(例如,改良型DMEM/F12培养基)。

[0084] 灌流培养是向含有细胞的培养体系中连续供应培养基,同时从培养体系中连续去除等量的无细胞培养上清以维持培养体系处于稳定状态的培养方法。由于灌流培养需要比一般培养方法要高的细胞密度,因此用于灌流培养的培养基一般比基础培养基具有更高的营养组分浓度。

[0085] 这些培养基可购自Invitrogen、SIGMA、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation、Sumitomo Pharma等,并且无论制造商如何,相同名称或相同产品名称的培养基具有相同的组成。

[0086] 在本说明书中,“低血清培养基”是指其中将血清添加到基础培养基中并且其特征为血清浓度与一般使用的含血清培养基(血清浓度:5%-20%(本说明书中血清浓度以体积/体积%表示)相比有所降低的培养基。低血清培养基的血清浓度可低于5%,低于2%,低

于1%,低于0.1%,低于0.01%或低于0.001%,但一般为0.1%或更高,或者1%或更高。具体而言,上述血清浓度优选为0.1%或更高并且小于5%,更优选为1%或更高并且小于4%。

[0087] 此步骤中使用的培养基也可含有血清替代品。血清替代品的实例包括白蛋白(例如,富脂质白蛋白)、转铁蛋白、脂肪酸、胶原蛋白前体、胰岛素、微量元素(例如,锌、硒等)、ITS补充剂(胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸盐的混合物)、B-27补充剂、N2补充剂、敲除血清替代品、2-巯基乙醇或3'-硫代甘油或其等效物。这些血清替代品也是商业上可获得的。敲除血清替代品可购自Invitrogen。其他血清替代品可购自Invitrogen、SIGMA、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation、Sumitomo Pharma等,并且无论制造商如何,相同名称或商品名称的试剂或添加剂的组分都是等效的。

[0088] 本发明的培养基除基础培养基以外,可进一步含有有利于细胞增殖的组分。此类组分的实例包括糖类,诸如葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖;氨基酸或氨基酸衍生物,诸如甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、茶氨酸、瓜氨酸、牛磺酸、甜菜碱、肉碱、肌酸和泛酸;蛋白质,诸如白蛋白和转铁蛋白;肽,诸如甘氨酸甘氨酸甘氨酸和大豆肽;血清;胆碱、维生素,诸如维生素B族(硫胺素、核黄素、吡哆醇、氰钴胺素、生物素、叶酸、泛酸、烟酰胺等)、维生素C(抗坏血酸)和维生素C衍生物;脂肪酸,诸如油酸、花生四烯酸和亚油酸;脂质,诸如胆固醇;核苷,诸如腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷和肌苷;肌苷酸;次黄嘌呤;无机盐,诸如氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁和磷酸二氢钠;微量元素,诸如锌、铜、硒、钒、锰、镍、硅、锡、钼、镉、铬、银、铝、钡、钴、锗、碘、溴、氟、铷和锶;缓冲剂,诸如N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)和N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(Tricine);抗生素,诸如两性霉素B、卡那霉素、庆大霉素和链霉素;细胞粘附因子和胞外基质组分,诸如I型胶原蛋白、II型胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白、聚-L-赖氨酸和聚-D-赖氨酸;细胞因子和生长因子,诸如白细胞介素、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、转化生长因子(TGF)- α 、转化生长因子(TGF)- β 、血管内皮生长因子(VEGF)和活化素A;以及激素,诸如地塞米松(dexamethasone)、氢化可的松(hydrocortisone)、雌二醇、孕酮、胰高血糖素和胰岛素。可根据待培养的细胞类型选择适当的组分并以适当的浓度使用。具体而言,可添加氨基酸衍生物类型之一的牛磺酸来提高细胞的活力和增殖,并且其可以一般为0.5mM至10mM,优选为2mM至5mM的最终浓度使用。生长因子可来自人以外的动物物种,但优选来自人来源(其可为重组的)。

[0089] 培养基可进一步含有支持细胞存活和增殖的添加剂因子。添加剂因子可为1型细胞因子家族成员、2型细胞因子家族成员、TNF超家族细胞因子、IL-1家族细胞因子或其他细胞因子(TNF- β 等),具体为IL-1至IL-41等,优选为IL-1、IL-2、IL-7、IL-15、IL-18、IL-21等。添加剂因子可根据常规方法制备,或可使用商业上可获得的产品。添加剂因子可来自人以外的动物物种,但优选来自人来源(其可为重组的)。

[0090] 本说明书中,“xeno-free”是指在其中排除了源自待培养细胞的生物体以外的生物体的组分的状态。

[0091] 1-3. 细胞培养

[0092] 本发明还提供了一种用于培养细胞的方法,其特征为在本发明的培养基(如上所述)中培养细胞(以下有时称为“本发明的培养方法”)。

[0093] 待用于培养细胞的孵育箱只要其能够培养细胞,则无特别限制,并且孵育箱的实例包括烧瓶、组织培养瓶、培养皿、皮氏培养皿(Petri dish)、组织培养皿、多皿、微孔板(microplate)、微孔板(microwell plate)、多板、多孔板、微量载玻片、腔式载玻片、皮氏培养皿、试管、托盘、培养袋、滚瓶和生物反应器。根据目标细胞选择适当的孵育箱。

[0094] 孵育箱可为细胞粘附性的或细胞非粘附性的,并且根据目的适当选择。细胞粘附性孵育箱可涂覆有任何支持细胞的基质,诸如胞外基质(ECM),以提高孵育箱表面对细胞的粘附性。支持细胞的基质可为任何用于细胞粘附的物质。

[0095] 其他培养条件可适当设定。例如,培养温度没有特别限制,并且可为约30℃至40℃,优选为约37℃。CO₂浓度可为约1%至10%,优选为约2%至5%。氧气分压可为1%至21%。

[0096] 细胞培养中培养基更换频率和培养时间段一般通过综合考虑各种条件来确定,诸如细胞密度、培养方式(贴壁培养/悬浮培养)、待培养细胞的类型、培养基组成、培养条件(温度、气体浓度)、培养基待更换量(总量/部分量)、培养基成本和操作人员的生活方式。培养基更换一般每2至3天进行一次、每天一次或每天多次(例如,每天两次),并且本发明的培养方法和增殖方法中可以这样的频率进行培养基更换。此外,可通过灌流培养连续进行培养基交换。培养时间段一般为约4天至4周,优选为约4天至3周,更优选为约1周至2周。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,待在含有硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基(即本发明的培养基)中培养的细胞是免疫活性细胞,优选选自树突状细胞、B细胞、T细胞和自然杀伤(NK)细胞,更优选为T细胞和NK细胞,进一步优选为T细胞。在本发明的另一个实施方案中,待在本发明的培养基中培养的细胞是原代T细胞和源自多能干细胞(特别是iPS细胞)的T细胞,更优选为原代T细胞来源的和多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-T细胞,进一步优选为多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-T细胞。在本发明的另一个实施方案中,待在本发明的培养基中培养的细胞是原代NK细胞和多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的NK细胞,更优选为原代NK细胞来源的和多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-NK细胞,进一步优选为多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-NK细胞。

[0098] 在本发明的一个实施方案中,培养包括活化步骤和扩增步骤。当使用冷冻保存的细胞时,可包括恢复步骤。本发明中,当培养目标是冷冻保存的细胞时,细胞培养的概念包括由恢复步骤组成的恢复培养、由活化步骤组成的活化培养,以及由扩增步骤组成的扩增培养中的任何一者、两者或所有三者。优选地,目标是扩增培养。本发明的另一个实施方案是CAR-T细胞和CAR-NK细胞,优选多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-T细胞和多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-NK细胞的培养,其包括活化步骤和扩增步骤,并且在必要时包括恢复步骤(就使用冷冻保存的细胞而言等)。

[0099] (恢复步骤/恢复培养)

[0100] 此步骤在解冻冷冻保存的细胞后进行。由于细胞长时间暴露于冷冻保护剂中可造成损伤,因此在解冻后应立即将冷冻保护剂从细胞中去除。然后,修复冻融造成的细胞损伤和细胞功能障碍。此步骤/培养方法根据目标细胞、所用的冷冻保护剂、解冻方法等而变化。大多数细胞一般通过在不含冷冻保护剂的培养基中培养它们数天,优选1天至5天,更优选约3天即可正常恢复。

[0101] (活化步骤/活化培养)

[0102] 此步骤的方法没有特别限制,只要可获得对细胞的期望的效果即可,并且例如,其可通过与刺激物质接触来进行。一般而言,将细胞在刺激物质的存在下,具体在含有刺激物质的培养基中培养数天,优选1天至5天,更优选约3天。刺激物质是通过诸如自分泌、旁分泌或内分泌的方法控制细胞活性的信号分子,并且可为可由培养体系中含有的所有细胞分泌的物质,或可为从外部添加的物质。具体而言,通过与配体结合的基质接触、或通过含有配体的培养基中培养等来进行所述步骤。

[0103] 例如,CAR-T细胞,优选多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-T细胞的活化培养中使用的配体没有特别限制,只要其是与CAR-T细胞的表面分子相互作用并促进其活化的分子即可。实例包括CD3,其与TCR偶合并负责经由TCR的信号转导;以及特异性结合至被称为T细胞活化的共刺激因子的表面分子(诸如CD28、ICOS、CD137、OX40、CD27、GITR、BAFFR、TACI、BMCA和CD40L)并具有将活化信号传递到T细胞中的功能的分子。此类分子可为上述T细胞表面分子的生理性配体(或受体)或具有激动活性的非生理性配体(或受体)。非生理性配体的优选实例是激动剂抗体。

[0104] 更优选地,本发明中待使用的T细胞活化配体是针对CD3的抗体。针对CD3的抗体可为完整抗体或其片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Fv、还原抗体(rIgG)、dsFv、sFv、双抗体、三抗体等),只要其具有特异性结合至诱导活化的目标T细胞中表达的CD3并刺激这些T细胞的表面分子将信号传递到T细胞中的能力。

[0105] 例如,CAR-NK细胞,优选多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-NK细胞的活化培养中使用的分子没有特别限制,只要其是与CAR-NK细胞的表面分子相互作用并促进其活化的分子即可。例如,其可为上述NK细胞表面分子的生理性配体(或受体)或具有激动活性的非生理性配体(或受体)。其也可能是细胞因子。非生理性配体的优选实例是针对CD3的抗体。抗体可为完整抗体或其片段(例如,Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、Fv、还原抗体(rIgG)、dsFv、sFv、双抗体、三抗体等)。细胞因子的实例包括IFN- α/β 、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18和IL-21。

[0106] (扩增步骤/扩增培养)

[0107] 在此步骤中,使如上所述活化的细胞增殖。扩增培养的方法没有特别限制,只要获得对活化的细胞的期望的效果即可,并且本领域技术人员可在监测细胞数量等的同时适当调整所述方法。当目的是增加细胞数量时,可在含有上述添加剂等的培养基中培养细胞,例如,培养2天或更长,优选3天或更长,更优选4天或更长,进一步优选5天或更长,并且进一步更优选6天或更长。可在监测细胞数量等的同时培养细胞并适当调整,例如,7天或更长、9天或更长或11天或更长。另外,通过交替重复活化培养和扩增培养来继续培养可使细胞数量成指数增加。培养时间段的上限没有特别限制,并且例如为28天或更短,优选21天或更短。例如,就活化的CAR-T细胞,优选活化的多能干细胞(特别是iPS细胞)来源的CAR-T细胞而言,可在含有细胞因子(诸如IL-7、IL-15和IL-2)的培养基中扩增培养细胞例如2天或更长,优选3天或更长,更优选4天或更长,进一步优选5天或更长,并且进一步更优选6天或更长。当目标细胞是原代T细胞(特别是CAR-T细胞)或NK细胞(优选多能干细胞(特别是iPS细胞来源的)来源的NK细胞(特别是CAR-NK细胞)),并且目的是增加细胞数量时,可在含有细胞因子(诸如IL-7、IL-15、IL-21和IL-2)的培养基中扩增培养细胞例如2天或更长,优选4天或更长,更优选6天或更长,进一步优选8天或更长,进一步更优选10天或更长,并且甚至进一步

更优选11天或更长。

[0108] (2) 用于生产细胞群的方法(以下也称为“本发明的生产方法”)和含有所述细胞群的药物(以下也称为“本发明的药物”)

[0109] 本发明的生产方法是用于生产其中扩增了期望的细胞的数量细胞群的方法,并且所述方法包括在含有硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基中培养含有所述期望的细胞的细胞群的步骤。

[0110] “含有硼酸或其盐的无血清培养基或低血清培养基”与如上述(1)中的本发明的培养方法和本发明的增殖方法中所述的相同。

[0111] 期望的细胞是旨在增殖的细胞,并且包括上述(1)中的小节“1-1.细胞”中例示的那些细胞。优选为免疫活性细胞,更优选为T细胞或NK细胞,特别优选为引入了CAR基因的T细胞,即CAR-T细胞,以及引入了CAR基因的NK细胞,即CAR-NK细胞。CAR-T细胞和CAR-NK细胞优选源自多能干细胞,优选为iPS细胞,并且甚至更优选为源自多能干细胞(特别是iPS细胞)的CAR-T细胞。

[0112] “含有期望的细胞的细胞群”的来源没有特别限制,只要含有期望的细胞即可,并且细胞群可为天然来源的或人工制备的。例如,当期望免疫活性细胞(诸如T细胞)时,细胞群可例示为自体液诸如血液(外周血、脐带血等)和骨髓液中收集、分离、纯化或诱导的含有外周血单核细胞(PBMC)、血细胞、造血干细胞、脐带血单核细胞等的细胞群。这些细胞可从活体收集,或者通过离体培养获得,并且例如,可提及通过本发明的生产方法获得的细胞群,无论是原样的还是冷冻的。另外,细胞群不限于单细胞的细胞群,并且可为通过活检获得的组织块切片,优选为单个细胞的细胞群。就体液细胞群而言,不限于源自单一组织的细胞群,并且可为源自不同组织的细胞群的混合体系。“含有期望的细胞的细胞群”优选为含有免疫活性细胞的细胞群,更优选为含有T细胞或NK细胞的细胞群,并且特别优选为含有引入了CAR基因的T细胞,即CAR-T细胞的细胞群,或含有引入了CAR基因的NK细胞,即CAR-NK细胞的细胞群。甚至更优选含有源自多能干细胞(优选为iPS细胞)的CAR-T细胞的细胞群,或含有源自多能干细胞(优选为iPS细胞)的CAR-NK细胞的细胞群。

[0113] “扩增了期望的细胞的数量”是指与对照,诸如扩增之前或未实施本发明而获得的细胞数量相比,细胞群中期望的细胞的数量有所增加,并且意指与对照相比至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%的增加。在本发明的一个具体实施方案中,通过本发明产生的细胞群中期望的细胞的数量被扩增以达到与对照中的细胞数量相比至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%或1000%的增加。

[0114] 当期望的细胞是CAR-T细胞或CAR-NK细胞时,细胞通过如上所述的活化培养和扩增培养(以及必要时的恢复培养)而增加数量,即被扩增。扩增培养后,洗涤并收集细胞。当使用本发明的培养方法和增殖方法进行培养或增殖时,由于所用的培养基是无血清培养基或低血清培养基,因此与当使用一般使用的含血清培养基(血清浓度:5%至20%)进行培养或增殖时相比,洗涤操作更加简便,并且可缩短洗涤所需的时间。

[0115] 例如,当使用(i)移液和离心或(ii)封闭体系自动化细胞处理装置洗涤和收集细胞时,使用诸如(i)移液和离心或(ii)封闭体系离心/旋转膜过滤/中空纤维膜过滤的技术

的连续自动化处理需要重复多次,直到血清中所含的BSA达到施用于人可接受的量。当使用本发明的培养方法和增殖方法进行培养或增殖时,无需多次重复(带入培养体系中的源自血清的BSA的量本来就很少)。替代地,与当使用含血清培养基(血清浓度:5%至20%)时相比,可通过更少的重复收集期望的细胞群。

[0116] 在一个优选实施方案中,在收集操作之前进行在刺激物质的存在下培养细胞的步骤(扩增培养后)。此步骤允许高效的扩增培养,并且还具有提高细胞活力的优点。当期望时,可使扩增培养后的CAR-T细胞群或CAR-NK细胞群经过洗涤操作和使用珠子分离等的细胞分离步骤。此实施方案使得能够以更高的效果提高CAR-T细胞群或CAR-NK细胞群的纯度。同时在此实施方案中,当使用本发明的培养方法和增殖方法进行培养或扩增时,可简化洗涤操作和/或可缩短洗涤所需的时间。

[0117] 以此方式,在通过本发明的生产方法获得的细胞群中扩增了期望的细胞的数量。

[0118] 通过本发明的生产方法产生的“其中扩增了期望的细胞的数量细胞群”可根据细胞的功能适当地生产药物。当细胞是CAR-T细胞或CAR-NK细胞时,通过本发明的培养方法和增殖方法产生的含有CAR-T细胞或CAR-NK细胞的细胞群可用于治疗癌症,特别是表达CAR表达性免疫细胞的靶抗原的癌症。癌症可为实体肿瘤或血液肿瘤。癌症的具体实例包括但不限于各种B细胞淋巴瘤(滤泡性恶性淋巴瘤、弥漫性大B细胞恶性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、MALT淋巴瘤、血管内B细胞淋巴瘤、CD20阳性霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)等)、骨髓增生性肿瘤、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤(CMML、JMML、CML、MDS/MPN-UC)、骨髓增生异常综合征、急性髓细胞白血病、神经母细胞瘤、脑肿瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、骨和软组织肉瘤、肾癌、胰腺癌、恶性间皮瘤、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌和结直肠癌。在一个优选实施方案中,癌症是实体肿瘤。实体肿瘤的实例包括神经母细胞瘤、脑瘤、尤文氏肉瘤、骨肉瘤、视网膜母细胞瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、卵巢癌、横纹肌肉瘤、骨和软组织肉瘤、肾癌、胰腺癌、恶性间皮瘤、前列腺癌、乳腺癌、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌和结直肠癌。

[0119] 本发明的药物以根据受试者的年龄、体重、体表面积、症状等适当确定的治疗有效量进行施用。本公开的受试者是哺乳动物,具体地,一般是人,并且优选是癌症患者。本发明的药物可以例如每次施用 1×10^4 个细胞至 1×10^{10} 个细胞的量进行施用。施用途径没有特别限制,并且可肿瘤内、肿瘤周、脑室内、静脉内、动脉内、门静脉内、皮内、皮下、肌肉内或腹腔内施用。本公开的细胞群可全身或局部施用。局部施用包括直接注射到目标组织、内脏或器官中。施用时间表根据受试者的年龄、体重、体表面积、症状等适当确定,并且可为单次施用或者连续或定期多次施用。本发明的药物可用于自体移植或同种异体移植。其也可与其他药物组合使用。

[0120] 具体而言,本发明的药物除待向受试者施用的细胞群以外还可含有以下组分,诸如出于保护细胞的目的的二甲基亚砜(DMSO)或血清白蛋白、出于防止细菌污染的目的的抗生素,以及出于细胞的活化、增殖或诱导分化的目的的各种组分(维生素、细胞因子、生长因子、类固醇等)。组合物可通过常规方法(例如,日本药典等中描述的方法)制备。

[0121] (3) 培养基添加剂(以下也称为“本发明的培养基添加剂”)和含有培养基添加剂的培养基组合物(以下也称为“本发明的培养基组合物”)

[0122] 本发明的培养基添加剂含有硼酸或其盐。本发明的培养基添加剂用于添加于无血

清培养基或低血清培养基中。“硼酸或其盐”与如上述(1)中的本发明的培养方法和本发明的增殖方法中所述的相同。待添加到培养基添加剂中的硼酸或其盐的量没有特别限制,只要获得期望的效果即可。可一般为0.01重量%至100重量%,优选为0.1重量%至100重量%,更优选为1重量%至100重量%,进一步优选为5重量%至100重量%,特别优选为10重量%至100重量%。

[0123] 本发明的培养基组合物是含有通过将本发明的培养基添加剂添加到无血清培养基或低血清培养基中获得的培养基组分的组合物。如本文所用,“无血清培养基或低血清培养基”具有与本发明的培养方法和本发明的增殖方法中上述(1)中所述的“无血清培养基或低血清培养基”含义相同,除了硼酸或其盐已被去除之外。将本发明的培养基添加剂添加到“无血清培养基或低血清培养基”中,使得培养基组合物中硼酸或其盐的浓度在0.1mM至0.9mM范围内,优选0.2mM至0.8mM,进一步优选0.2mM至0.7mM,特别优选0.3mM至0.6mM。

[0124] 以下使用实施例对本发明进行详细的描述,但本发明不受任何方式的限制。除非另有说明,否则待使用的试剂和材料均为商业上可获得的或可根据已知文献等来制备。此外,本领域技术人员应理解,可替代地使用任何具有相似效果或作用的物质。

[0125] [实施例]

[0126] (缩写列表)

[0127] BMP-4:骨形态发生蛋白-4

[0128] bFGF:碱性成纤维细胞生长因子

[0129] VEGF:血管内皮生长因子

[0130] SCF:干细胞因子

[0131] TPO:血小板生成素

[0132] FLT3L:Fms相关酪氨酸激酶3配体

[0133] Fc-DLL4:重组人DLL4 Fc嵌合蛋白

[0134] DLL4:δ样蛋白4

[0135] IL7:白细胞介素-7

[0136] SDF1α:基质细胞衍生因子1α

[0137] αMEM:α改良伊格尔最低必需培养基

[0138] TCR:T细胞受体

[0139] 实施例1

[0140] 1.iPS细胞来源的CAR-T细胞的制备

[0141] 使用慢病毒载体将TCR基因引入到由京都大学iPS细胞研究与应用中心(CiRA)提供的iPS细胞系QHJI01S04中。将引入了TCR基因的iPS细胞参考描述于Nature Communication 2021;12:430中的已知方法分化为造血祖细胞。具体而言,将iPS细胞在CHIR99021、SB431542、BMP-4、bFGF、VEGF的存在下培养4天,以诱导分化为中胚层。此外,造血细胞因子SCF、TPO和FLT3L被用于分化为造血祖细胞。将获得的造血祖细胞分化为细胞毒性T淋巴细胞(CTL),根据已知专利方法(WO2017/221975)和文献信息(Nature Communication 2021;12:430)进行。具体而言,从获得的造血祖细胞中,使用磁珠(Myltenyi Biotec)纯化CD34阳性细胞,并在固定有Fc-DLL4和RetroNectin(重组人纤连蛋白片段,TakaraBio)的板上在含有SCF、TPO、FLT3L、IL7、SDF1α和SB203580的α-MEM培养基中

培养3周。通过使用逆转录病毒载体将识别特定抗原的CAR基因引入到获得的TCR阳性CTL中。接下来,将细胞冷冻保存在液氮中,并用作iPS细胞来源的CAR-T细胞。

[0142] 2.iPS细胞来源的CAR-T细胞的恢复培养

[0143] 将iPS细胞来源的CAR-T细胞以500,000个细胞/mL悬浮于向其中添加表1中“恢复培养基”列中所示的添加剂的含有15%胎牛血清(FBS)的IMDM培养基中,接种于G-Rex(注册商标)10M(Wilson Wolf)上,并在5% CO₂/37°C下培养3天。

[0144] [表1]

[0145]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度	恢复培养基	活化培养基	扩增培养基
	L-谷氨酰胺(200 mM)	Thermo Fisher	2 mM	+	+	+
	硫酸链霉素	MEIJI	100 µg/mL	+	+	+
	ITS (100x) (胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1x	+	+	
	抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma-Aldrich	50 µg/mL	+	+	+
	IL-7	Peptrotech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-15	Peptrotech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-2	Peptrotech	100 ng/mL	+	+	+
	IL-18	MBL	50 ng/mL		+	
	IL-21	Peptrotech	20 ng/mL		+	
	胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK	R&D	10 µM		+	
	人 CD30 抗体	R&D	300 ng/mL		+	
	人血清白蛋白 12.5 g/50 mL	CSL Behring	2 g/L			+

[0146] 每组添加的添加剂以+表示。

[0147] 3. 试剂、抗体

[0148] RetroNectin(商品名称)购自Takara Bio Inc.所用的抗CD3激动剂抗体是抗CD3 mAb GMP级,购自Takara Bio Inc的抗CD3单克隆抗体(克隆:OKT3)。

[0149] 4. 培养板上抗CD3激动剂抗体和RetroNectin(商品名称)的固定

[0150] 将以所需浓度溶解于PBS中的抗CD3激动剂抗体(OKT3,最终浓度3µg/mL)和RetroNectin(商品名称)(最终浓度150µg/mL)添加到T225烧瓶并在4°C放置过夜。用PBS洗涤之后,对细胞进行测试。

[0151] 5.iPS细胞来源的CAR-T细胞的活化培养

[0152] 将恢复培养后的iPS细胞来源的CAR-T细胞以133,333个细胞/mL悬浮于向其中添加表1中“活化培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于固定有抗CD3激动剂抗体(OKT3)和RetroNectin(商品名称)的T225烧瓶中,并在5% CO₂/37°C下培

养3天。

[0153] 6.在两种类型的含1% FBS培养基中iPS细胞来源的CAR-T细胞的扩增培养

[0154] 共制备两种类型的扩增培养基(添加0mM硼酸的培养基和添加0.3mM硼酸的培养基):含有1% FBS,并且进一步含有表1中“扩增培养基”列中所示的添加剂的改良型DMEM/F12培养基(Thermo Fisher),以及进一步添加有0.3mM硼酸(Sigma-Aldrich)的所述培养基。活化培养3天后,从T225烧瓶中收集细胞,并将其以40,000个细胞/mL悬浮于两种类型的扩增培养基的每一种中,并使用G-Rex(注册商标)10M(Wilson Wolf)在5% CO₂/37°C下培养。然后,在培养第五天,从G-Rex(注册商标)10M中回收一些细胞并进行细胞计数,并将培养基替换为相应培养基。在培养第六天,从G-Rex(注册商标)10M中回收一些细胞并进行细胞计数。在培养第七天,从板中回收一些细胞,进行计数,并将其以1,375,000个细胞/mL接种于含有各培养基的G-Rex(注册商标)24孔板(Wilson Wolf)上。此后,在培养第10天,从G-Rex(注册商标)24孔板中收集一些细胞,进行计数,并将其以50,000个细胞/mL接种于含有相应培养基的G-Rex(注册商标)24孔板(Wilson Wolf)中。在培养第12天和第14天,相似地从G-Rex(注册商标)24孔板中收集一些细胞,进行计数,并将培养基替换为各培养基。

[0155] 实验实施例1

[0156] 验证将0.3mM硼酸添加到含1% FBS培养基中的效果的增殖测试

[0157] 在实施例1中项6的扩增培养中,在培养第3、5、6、7、12和14天测量iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞数量和活力。图1示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数。通过将0.3mM硼酸添加到含1%FBS培养基中促进了iPS细胞来源的CAR-T细胞的增殖(图1)。

[0158] 实施例2

[0159] 1.iPS细胞来源的CAR-T细胞的恢复培养

[0160] 将iPS细胞来源的CAR-T细胞以500,000个细胞/mL悬浮于向其中添加表2中“恢复培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于G-Rex(注册商标)10M(Wilson Wolf)上,并在5% CO₂/37°C下培养3天。

[0161] [表2]

[0162]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度	恢复培养基	活化培养基	扩增培养基
	L-谷氨酰胺(200 mM)	Thermo Fisher	2 mM	+	+	+
	硫酸链霉素	MEIJI	100 µg/mL	+	+	+
	ITS (100x) (胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1x	+	+	
	抗坏血酸 2-磷	Sigma-	50 µg/mL	+	+	+

[0163]	酸酯	Aldrich				
	IL-7	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-15	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-2	Peprtech	100 ng/mL	+	+	+
	IL-18	MBL	50 ng/mL		+	
	IL-21	Peprtech	20 ng/mL		+	
	胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK	R&D	10 μ M		+	
	人 CD30 抗体	R&D	300 ng/mL		+	
	人血清白蛋白 12.5 g/50 mL	CSL Behring	2 g/L			+

[0164] 每组添加的添加剂以+表示。

[0165] 2. 试剂、抗体

[0166] RetroNectin (商品名称) 购自Takara Bio Inc.所用的抗CD3激动剂抗体是抗CD3 mAb GMP级,购自Takara Bio Inc的抗CD3单克隆抗体 (克隆:OKT3)。

[0167] 3. 培养板上抗CD3激动剂抗体和RetroNectin (商品名称) 的固定

[0168] 将以所需浓度溶解于PBS中的抗CD3激动剂抗体 (OKT3, 最终浓度3 μ g/mL) 和 RetroNectin (商品名称) (最终浓度150 μ g/mL) 添加到T225烧瓶并在4 $^{\circ}$ C放置过夜。用PBS洗涤之后,对细胞进行测试。

[0169] 4. iPS细胞来源的CAR-T细胞的活化培养

[0170] 将恢复培养后的iPS细胞来源的CAR-T细胞以133,333个细胞/mL悬浮于向其中添加表2中“活化培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于固定有抗CD3激动剂抗体 (OKT3) 和RetroNectin (商品名称) 的T225烧瓶中,并在5% CO₂/37 $^{\circ}$ C下培养3天。

[0171] 5. 在两种类型的无血清培养基中iPS细胞来源的CAR-T细胞的扩增培养

[0172] 共制备两种类型的扩增培养基:为含有表2中“扩增培养基”列中所示的添加剂的改良型DMEM/F12培养基的扩增培养基 (不添加硼酸),以及进一步添加有0.3mM硼酸的所述培养基。活化培养3天后,从T225烧瓶中收集细胞,并将其以40,000个细胞/mL悬浮于两种类型的扩增培养基的每一种中,并使用G-Rex (注册商标) 10M (Wilson Wolf) 在5% CO₂/37 $^{\circ}$ C下培养。然后,在培养第五天,从G-Rex (注册商标) 10M中收集一些并进行计数,并将培养基替换为各培养基。在培养第7天和第10天,用相似的方法进行细胞计数,以50,000个细胞/mL将其接种于G-Rex (注册商标) 24孔板中,并在各培养基中培养。在培养第12天和第14天,相似地从板中收集一些细胞,进行计数,并将培养基替换为各培养基。

[0173] 实验实施例2

[0174] 验证将硼酸添加到无血清扩增培养基中的效果的增殖测试

[0175] 为了验证硼酸的添加对无血清扩增培养基的影响,在实施例2中项5的扩增培养中,在培养第3、5、6、7、10、12和14天测量iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞数量和活力。图2示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数。通过将0.3mM硼酸添加到无血清培养基中促进了

iPS细胞来源的CAR-T细胞的增殖(图2)。

[0176] 实施例3

[0177] 1. iPS细胞来源的CAR-T细胞的恢复培养

[0178] 将iPS细胞来源的CAR-T细胞以500,000个细胞/mL悬浮于向其中添加表3中“恢复培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于G-Rex(注册商标)10M(Wilson Wolf)上,并在5% CO₂/37°C下培养3天。

[0179] [表3]

培养基的添加剂	制造商	最终浓度	恢复培养基	活化培养基	扩增培养基
L-谷氨酰胺(200 mM)	Thermo Fisher	2 mM	+	+	+
硫酸链霉素	MEIJI	100 µg/mL	+	+	+
ITS (100x) (胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1x	+	+	
抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma-Aldrich	50 µg/mL	+	+	+
IL-7	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
IL-15	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
IL-2	Peprtech	100 ng/mL	+	+	+
IL-18	MBL	50 ng/mL		+	
IL-21	Peprtech	20 ng/mL		+	
胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK	R&D	10 µM		+	
人 CD30 抗体	R&D	300 ng/mL		+	
人血清白蛋白 12.5 g/50 mL	CSL Behring	2 g/L			+

[0181] 每组添加的添加剂以+表示。

[0182] 2. 试剂、抗体

[0183] RetroNectin(商品名称)购自Takara Bio Inc.所用的抗CD3激动剂抗体是抗CD3 mAb GMP级,购自Takara Bio Inc的抗CD3单克隆抗体(克隆:OKT3)。

[0184] 3. 培养板上抗CD3激动剂抗体和RetroNectin(商品名称)的固定

[0185] 将以所需浓度溶解于PBS中的抗CD3激动剂抗体(OKT3,最终浓度3µg/mL)和RetroNectin(商品名称)(最终浓度150µg/mL)添加到T225烧瓶并在4°C放置过夜。用PBS洗涤之后,对细胞进行测试。

[0186] 4. iPS细胞来源的CAR-T细胞的活化培养

[0187] 将恢复培养后的iPS细胞来源的CAR-T细胞以133,333个细胞/mL悬浮于向其中添加表3中“活化培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于固定有抗CD3激动剂抗体(OKT3)和RetroNectin(商品名称)的T225烧瓶中,并在5% CO₂/37°C下培

养3天。

[0188] 5.在五种类型的无血清培养基中iPS细胞来源的CAR-T细胞的扩增培养

[0189] 共制备五种类型的扩增培养基:含有表3中“扩增培养基”列中所示的添加剂,并且各自进一步含有0.2mM、0.3mM、0.4mM、0.6mM或0.9mM的硼酸的改良型DMEM/F12培养基。活化培养3天后,从T225烧瓶中收集细胞,并将其以50,000个细胞/mL悬浮于五种类型的扩增培养基的每一种中,并使用G-Rex (注册商标) 24孔板 (Wilson Wolf) 在5% CO₂/37°C下培养。然后,在培养第五天,从G-Rex (注册商标) 24孔板中回收一些细胞并进行细胞计数,并将培养基替换为相应培养基。在培养第7天,用相似的方法进行细胞计数,将其以50,000个细胞/mL接种于新鲜的G-Rex (注册商标) 24孔板中,并在各培养基中培养。在培养第10天和第12天,相似地从板中收集一些细胞,进行计数,并将培养基替换为各培养基。

[0190] 实验实施例3

[0191] 当将不同浓度的硼酸添加到无血清扩增培养基中时对iPS细胞来源的CAR-T细胞的增殖测试

[0192] 为了验证待添加到无血清扩增培养基中的硼酸的最佳浓度,在实施例3中项5的扩增培养中,随着时间的推移,对iPS细胞来源的CAR-T细胞的数量进行计数。图3示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数。当硼酸的最终浓度在0.3mM至0.6mM范围内时,增殖倍数最大化。还证实了在0.2mM至0.9mM的硼酸浓度范围内细胞活力不受影响(图3)。

[0193] 实施例4

[0194] 1.iPS细胞来源的CAR-T细胞的恢复培养

[0195] 将iPS细胞来源的CAR-T细胞以500,000个细胞/mL悬浮于向其中添加表4中“恢复培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于G-Rex (注册商标) 10M (Wilson Wolf) 上,并在5% CO₂/37°C下培养3天。

[0196] [表4]

[0197]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度	恢复培养基	活化培养基	扩增培养基
	L-谷氨酰胺 (200 mM)	Thermo Fisher	2 mM	+	+	+
	硫酸链霉素	MEIJI	100 µg/mL	+	+	+
	ITS (100x) (胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1x	+	+	
	抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma-Aldrich	50 µg/mL	+	+	+
	IL-7	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-15	Peprtech	10 ng/mL	+	+	+
	IL-2	Peprtech	100 ng/mL	+	+	+
	IL-18	MBL	50 ng/mL		+	
	IL-21	Peprtech	20 ng/mL		+	
	胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK	R&D	10 µM		+	
	人 CD30 抗体	R&D	300 ng/mL		+	
	人血清白蛋白 12.5 g/50 mL	CSL Behring	2 g/L			+

[0198] 每组添加的添加剂以+表示。

[0199] 2. 试剂、抗体

[0200] RetroNectin(商品名称) 购自Takara Bio Inc.所用的抗CD3激动剂抗体是抗CD3 mAb GMP级,购自Takara Bio Inc的抗CD3单克隆抗体(克隆:OKT3)。

[0201] 3. 培养板上抗CD3激动剂抗体和RetroNectin(商品名称)的固定

[0202] 将以所需浓度溶解于PBS中的抗CD3激动剂抗体(OKT3,最终浓度3µg/mL)和RetroNectin(商品名称)(最终浓度150µg/mL)添加到T225烧瓶并在4°C放置过夜。用PBS洗涤之后,对细胞进行测试。

[0203] 4. iPS细胞来源的CAR-T细胞的活化培养

[0204] 将恢复培养后的iPS细胞来源的CAR-T细胞以133,333个细胞/mL悬浮于向其中添加表4中“活化培养基”列中所示的添加剂的含有15% FBS的IMDM培养基中,接种于固定有抗CD3激动剂抗体(OKT3)和RetroNectin(商品名称)的T225烧瓶中,并在5% CO₂/37°C下培养3天。

[0205] 5. 在五种类型的无血清培养基中iPS细胞来源的CAR-T细胞的扩增培养

[0206] 共制备五种类型的扩增培养基:含有表4中“扩增培养基”列中所示的添加剂的改良型DMEM/F12培养基(Thermo Fisher),以及进一步添加有0.3mM硼酸(Sigma-Aldrich)、0.3mM硼酸和1×ITS-X((胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺补充剂)Gibco)、0.3mM硼酸和1×ITS-X以及1mM牛磺酸(Sigma-Aldrich)、或0.3mM硼酸和1×ITS-X以及3mM牛磺酸的所述培养基(仅补充有表4中的添加剂的培养基、补充有表4中的添加剂+0.3mM硼酸的培养基、补充

有表4中的添加剂+0.3mM硼酸+ITS-X的培养基、补充有表4中的添加剂+0.3mM硼酸+ITS-X+1mM牛磺酸的培养基、补充有表4中的添加剂+0.3mM硼酸+ITS-X+3mM牛磺酸的培养基)。活化培养3天后,从T225烧瓶中收集细胞,并将其以40,000个细胞/mL悬浮于五种类型的扩增培养基的每一种中,并使用G-Rex (注册商标) 10M (Wilson Wolf) 在5% CO₂/37°C下培养。然后,在培养第五天,从G-Rex (注册商标) 10M中回收一些细胞并进行细胞计数,并将培养基替换为相应培养基。在培养第六天,从G-Rex (注册商标) 10M中回收一些细胞并进行细胞计数。在培养第七天和第10天,从板中回收一些细胞,进行计数,并将其以50,000个细胞/mL接种于含有各培养基的G-Rex (注册商标) 24孔板 (Wilson Wolf) 上。在培养第12天和第14天,相似地从G-Rex (注册商标) 24孔板中收集一些细胞,进行计数,并将培养基替换为各培养基。

[0207] 实验实施例4

[0208] 验证将添加剂ITS-X和牛磺酸添加到含0.3mM硼酸的无血清培养基中的效果的增殖测试

[0209] 在实施例4中项5的扩增培养中,在培养第3、5、6、7、10、12和14天测量iPS细胞来源的CAR-T细胞的细胞数量和活力。图4示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数。通过进一步将1×ITS-X和1mM或3mM牛磺酸添加到含0.3mM硼酸的无血清培养基中促进了iPS细胞来源的CAR-T细胞的增殖(图4),并且通过将1mM或3mM牛磺酸添加到培养基中提高了1%至4%的活力(表5)。

[0210] [表5]

添加剂条件	活力(%)					
	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天
(1) 不含 0.3 mM 硼酸	85.4	86.1	86.5	91.7	90.3	87.9
(2) 含有 0.3 mM 硼酸	88.7	88.6	87.5	90.3	90.4	88.3
[0211] (3) 含有 0.3 mM 硼酸、ITS-X	87.3	88.6	86.8	90.6	90.9	90.3
(4) 含有 0.3 mM 硼酸、ITS-X、1 mM 牛磺酸	90.2	90.2	87.6	91.2	92.1	91.2
(5) 含有 0.3 mM 硼酸、ITS-X、3 mM 牛磺酸	89.6	89.6	89.3	94.3	92.8	91.6
(3): 不添加牛磺酸与(4)或(5): 添加牛磺酸之间的最	2.9	1.6	2.5	3.7	1.9	1.3

[0212]	大差异(%)					
--------	--------	--	--	--	--	--

[0213] 粗体数字表示每个测量日期的最大值。

[0214] 实施例5

[0215] 1. 人来源的原代T细胞的活化培养

[0216] 将人来源的原代T细胞 (Leukopak-SoloPak, Charles River Laboratories Cell Solutions) 以1,000,000个细胞/mL悬浮于含有2% CTS免疫细胞SR (Thermo Fisher) 和表6中活化培养基中所示的添加剂的OpTmizer培养基 (Thermo Fisher) 中,接种于PL240袋 (OriGen) 中,并在5% CO₂/37°C下培养2天。

[0217] [表6]

培养基的添加剂	制造商	最终浓度	活化培养基	转导培养基	扩增培养基1	扩增培养基2
OpTmizer 扩增基础补充剂	Thermo Fisher		+	+	+	
TransACT	Miltenyi Biotec	5.4%	+			
L- 谷氨酰胺 (200 mM)	Thermo Fisher	2 mM	+	+	+	+
硫酸链霉素	MEIJI	100 $\mu\text{g/mL}$	+	+	+	+
ITS-X (100x) (胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺补充剂)	Gibco	1x				+
抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma-Aldrich	50 $\mu\text{g/mL}$				+
IL-2	Miltenyi Biotec	40 IU/mL	+	+	+	+
人血清白蛋白 12.5 g/50 mL	CSL Behring	2 g/L				+

[0219] 每组添加的添加剂以+表示。

[0220] 2. 试剂

[0221] RetroNectin(商品名称)购自Takara Bio Inc。

[0222] 3. 培养板上RetroNectin(产品名称)和逆转录病毒的固定

[0223] 将以必要浓度溶解于PBS中的RetroNectin(最终浓度150 $\mu\text{g/mL}$)添加到PL120袋中,并在室温下放置2小时。用PBS洗涤后,添加逆转录病毒溶液并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下以50rpm摇动的同时固定过夜。用含有1.5% HSA的PBS洗涤后,对板进行测试。

[0224] 4. 人来源的原代T细胞的转导培养

[0225] 将活化培养后的人来源的原代T细胞以722,222个细胞/mL悬浮于含有2% CTS免疫细胞SR和表6中转导培养基中所示的添加剂的OpTmizer培养基中,接种于固定有RetroNectin(商品名称)和含有识别特定抗原的CAR基因的逆转录病毒载体的PL120袋中,并在5%CO₂/37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养一天。

[0226] 5. 在四种类型的无血清培养基中人来源的原代T细胞来源的CAR-T细胞的扩增培养

[0227] 共制备四种类型的扩增培养基:为含有2% CTS免疫细胞SR和表6中扩增培养基1中所示的添加剂的OpTmizer培养基的扩增培养基,为含有表7中所示的组分(以下称为BM220720)和表6中扩增培养基2中所示的添加剂的培养基的扩增培养基,进一步添加有0.3mM硼酸(Sigma-Aldrich)的所述培养基,以及进一步添加有0.3mM硼酸和3mM牛磺酸(Sigma-Aldrich)的所述培养基(仅含有表6中的添加剂的OpTmizer培养基,以及含有(i)仅表6中的添加剂、(ii)表6中的添加剂+0.3mM硼酸,或(iii)表6中的添加剂+0.3mM硼酸和3mM

牛磺酸的BM220720培养基)。转导培养一天后,从PL120袋中收集细胞,并将其以220,000个细胞/mL悬浮于扩增培养基的每一种中,并使用G-Rex (注册商标) 6M(Wilson Wolf) 在5% CO₂/37°C下培养。然后,在培养第七天,从G-Rex (注册商标) 6M中回收一些细胞并进行细胞计数,并向各培养基中添加40IU的IL-2。在培养的第九天,从G-Rex (注册商标) 6M中回收一些细胞并进行细胞计数,并将其以220,000个细胞/mL接种于含有相应培养基的新鲜的G-Rex (注册商标) 6M中。相似地,在第十三天和第十四天,从G-Rex (注册商标) 6M中回收一些细胞并进行细胞计数。

[0228] [表7]

[0229]

组分名称	浓度 (mg/L)
甘氨酸	30
L-丙氨酸	25
L-精氨酸盐酸盐	84
L-天冬酰胺(游离碱)	25
L-天冬氨酸	30
L-胱氨酸2HCl	91.4
L-谷氨酸	75
L-组氨酸盐酸盐-H ₂ O	42
L-异亮氨酸	105
L-亮氨酸	105
L-赖氨酸盐酸盐	146
L-甲硫氨酸	30
L-苯丙氨酸	66
L-脯氨酸	40
L-丝氨酸	42
L-苏氨酸	95
L-色氨酸	16
L-酪氨酸 2Na 2H ₂ O	121
L-缬氨酸	94
L-抗坏血酸2-磷酸酯倍半镁盐	2.5
生物素	0.013
氯化胆碱	8.98
D-泛酸钙	4
叶酸	4
烟酰胺	4
盐酸吡哆醇	2.013
核黄素	0.4

[0230]

盐酸硫胺素	4
维生素B12	0.68
i-肌醇	12.6
氯化钙 (CaCl_2) (无水)	165
硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0013
硝酸铁 ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0.05
硫酸铁 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.417
硫酸镁 (MgSO_4) (无水)	97.67
氯化钾 (KCl)	330
碳酸氢钠 (NaHCO_3)	3024
氯化钠 (NaCl)	4350
磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	125
硫酸锌 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.864
亚硒酸钠	0.005
D-葡萄糖(右旋糖)	4500
HEPES	5958
乙醇胺	1.9
次黄嘌呤Na	2.39
亚油酸	0.042
硫辛酸	0.105
腐胺 2HCl	0.081
丙酮酸钠	110
胸苷	0.365
还原型L-谷胱甘肽	1
偏钒酸铵	0.0003
四水氯化锰 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0.00005

[0231] 实验实施例5

[0232] 验证将硼酸和牛磺酸添加到人来源的原代T细胞来源的CAR-T细胞中的效果的增殖测试

[0233] 为了验证将硼酸和牛磺酸添加到无血清扩增培养基中对不同细胞类型(人来源的原代T细胞)的效果,在实施例5的项5中所述的扩增培养中,在第4、6、10和11天测量人来源的原代T细胞来源的CAR-T细胞的细胞数量和活力。图5示出自扩增培养第0天的细胞增殖倍数。通过将0.3mM硼酸或0.3mM和3mM牛磺酸添加到无血清培养基中促进了人来源的原代T细胞来源的CAR-T细胞的增殖(图5)。

[0234] 实施例6

[0235] 1. iPS细胞来源的NK细胞的制备

[0236] 将由京都大学iPS细胞研究与应用中心(CiRA)提供的iPS细胞系FfI01s04根据已知方法(例如,W02021/174004中描述的方法)分化为NK细胞。将获得的细胞冷冻并保存在液氮中,并用作iPS细胞来源的NK细胞。

[0237] 2. iPS细胞来源的NK细胞的恢复培养

[0238] 将iPS细胞来源的NK细胞以 1.25×10^5 个细胞/mL悬浮于为含有15%胎牛血清(FBS)和表8中所示的添加剂的IMDM培养基(Thermo Fisher Scientific)的恢复培养基中,接种于G-Rex(注册商标)6孔板(Wilson Wolf)中,并在5% CO₂/37°C孵育箱中培养3天(培养的第0天至第3天)。

[0239] [表8]

[0240]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度
	L-谷氨酰胺-青霉素-链霉素溶液	Sigma Aldrich	1%
	ITS(100x)(胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1×
	抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma Aldrich	50 µg/mL
	IL-2	Peptotech	10 ng/mL
	IL-7	Peptotech	10 ng/mL
	IL-15	Peptotech	10 ng/mL

[0241] 3. iPS细胞来源的NK细胞的活化培养

[0242] 恢复培养后,将iPS细胞来源的NK细胞以 1.84×10^5 个细胞/mL悬浮于含有15%胎牛血清(FBS)和表9中所示的添加剂的IMDM培养基(Thermo Fisher Scientific)的活化培养基中,接种于6孔板(TPP)中,并在5% CO₂/37°C孵育箱中培养3天(培养的第3天至第6天)。

[0243] [表9]

[0244]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度
	L-谷氨酰胺-青霉素-链霉素溶液	Sigma Aldrich	1%
	ITS (100x)(胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1×
	抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma Aldrich	50 µg/mL
	IL-2	Peptotech	10 ng/mL
	IL-7	Peptotech	10 ng/mL
	IL-12	Proteintech Group	50 ng/mL
	IL-15	Peptotech	10 ng/mL
	IL-18	MBL	50 ng/mL
	IL-21	Peptotech	20 ng/mL
	人激动剂抗体	R&D Systems	300 ng/mL
	泛胱天蛋白酶抑制剂 Z-VAD-FMK	R&D Systems	10 µM

[0245] 4. 在五种类型的无血清培养基中iPS细胞来源的NK细胞的扩增培养

[0246] 3天后,通过以下操作来产生共五种类型的扩增培养基:向表7中的BM220720培养基中添加2g/L人血清白蛋白(Albuminer(商品名称),CSL Behring),进一步向所述基础培养基中添加0.3mM硼酸(Sigma Aldrich)、0.3mM硼酸+1mM牛磺酸(Sigma Aldrich),以及0.3mM硼酸+3mM牛磺酸以得到四种类型的基础培养基,以及一种类型的X-VIVO(商标)15培养基(Lonza)。向这五种类型的基础培养基中添加表9中所示的添加剂以得到五种类型的扩增培养基。将已活化培养三天的细胞以 1.25×10^5 个细胞/mL悬浮于五种类型的扩增培养基的每一种中,重新接种于G-Rex(注册商标)24孔板(Wilson Wolf)中,并在5% CO₂/37°C孵育箱中培养两天(培养的第6天至第8天)。

[0247] 两天后,将培养基替换为补充有表10中所示的添加剂的五种类型的基础培养基,并将细胞在5% CO₂/37°C孵育箱中培养两天(培养的第8天至第10天)。

[0248] 此后,每2-3天将细胞以 1.25×10^5 个细胞/mL于相同的培养基中重新接种于G-Rex(注册商标)24孔板(Wilson Wolf)上,并在5%CO₂/37°C孵育箱中继续培养直至培养的第17天。

[0249] [表10]

[0250]	培养基的添加剂	制造商	最终浓度
	L-谷氨酰胺-青霉素-链霉素溶液	Sigma Aldrich	1%
	ITS(100x)(胰岛素-转铁蛋白-硒补充剂)	Gibco	1×
	抗坏血酸 2-磷酸酯	Sigma Aldrich	50 µg/mL
	IL-2	Peptotech	10 ng/mL
	IL-7	Peptotech	10 ng/mL
	IL-15	Peptotech	10 ng/mL
	IL-21	Peptotech	20 ng/mL

[0251] 实验实施例6

[0252] 验证添加剂硼酸和牛磺酸对iPS细胞来源的NK细胞的效果的增殖测试

[0253] 为了验证将硼酸和牛磺酸添加到无血清扩增培养基中对iPS细胞来源的NK细胞的效果,在实施例6的项4中的扩增培养期间,随着时间的推移测量iPS细胞来源的NK细胞的细胞数量和活力。扩增培养第11天的增殖倍数和细胞活力如表11中所示。通过将0.3mM硼酸和1mM牛磺酸或3mM牛磺酸添加到无血清基础培养基中促进了iPS细胞来源的NK细胞的增殖(表11)。

[0254] [表11]

[0255]	用于扩增培养的基础培养基	11 天的增殖倍数	扩增培养第 11 天的细胞活力(%)
	X-VIVO-15	71	97.4
	BM220720+2 g/L HSA	210	97.3
	BM220720+2 g/L HSA+0.3 mM 硼酸	212	96.8
	BM220720+2 g/L HSA+0.3 mM 硼酸+1 mM 牛磺酸	238	97.2
	BM220720+2 g/L HSA+0.3 mM 硼酸+3 mM 牛磺酸	253	96.7

[0256] [工业适用性]

[0257] 根据本发明,即使当使用无血清培养基或低血清培养基时,也可获得与在含血清培养基中培养可比的细胞增殖维持-促进效果。具体而言,对于受到因诸如细胞洗涤等操作而造成的压力的影响的细胞,优选在不需要大量洗涤的无血清培养基或低血清培养基中进行培养,并且本发明适合在此类条件下进行培养。

[0258] 本申请基于在日本提交的专利申请号2022-102986(申请日:2022年6月27日),其内容全部并入本文。

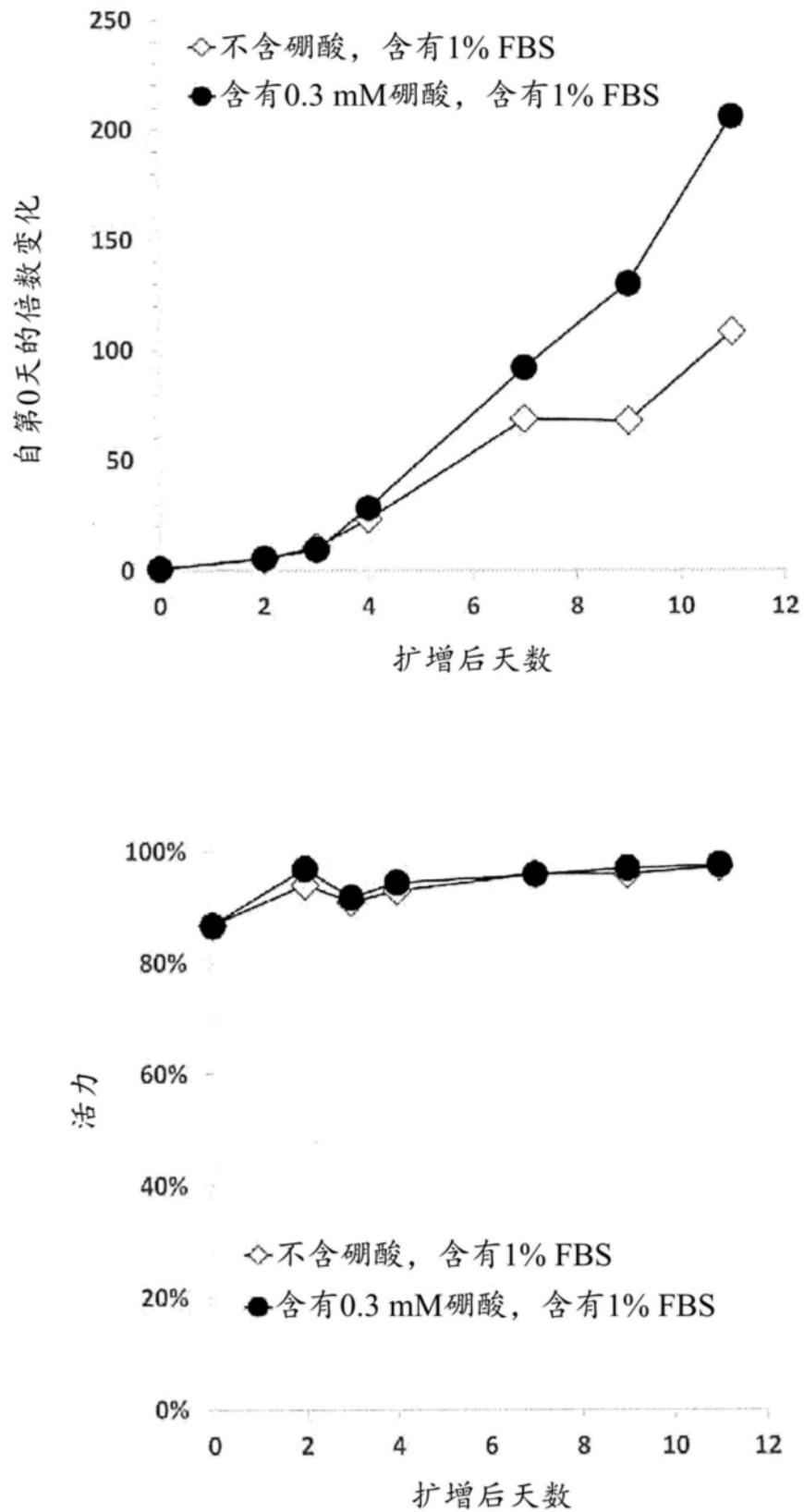


图1

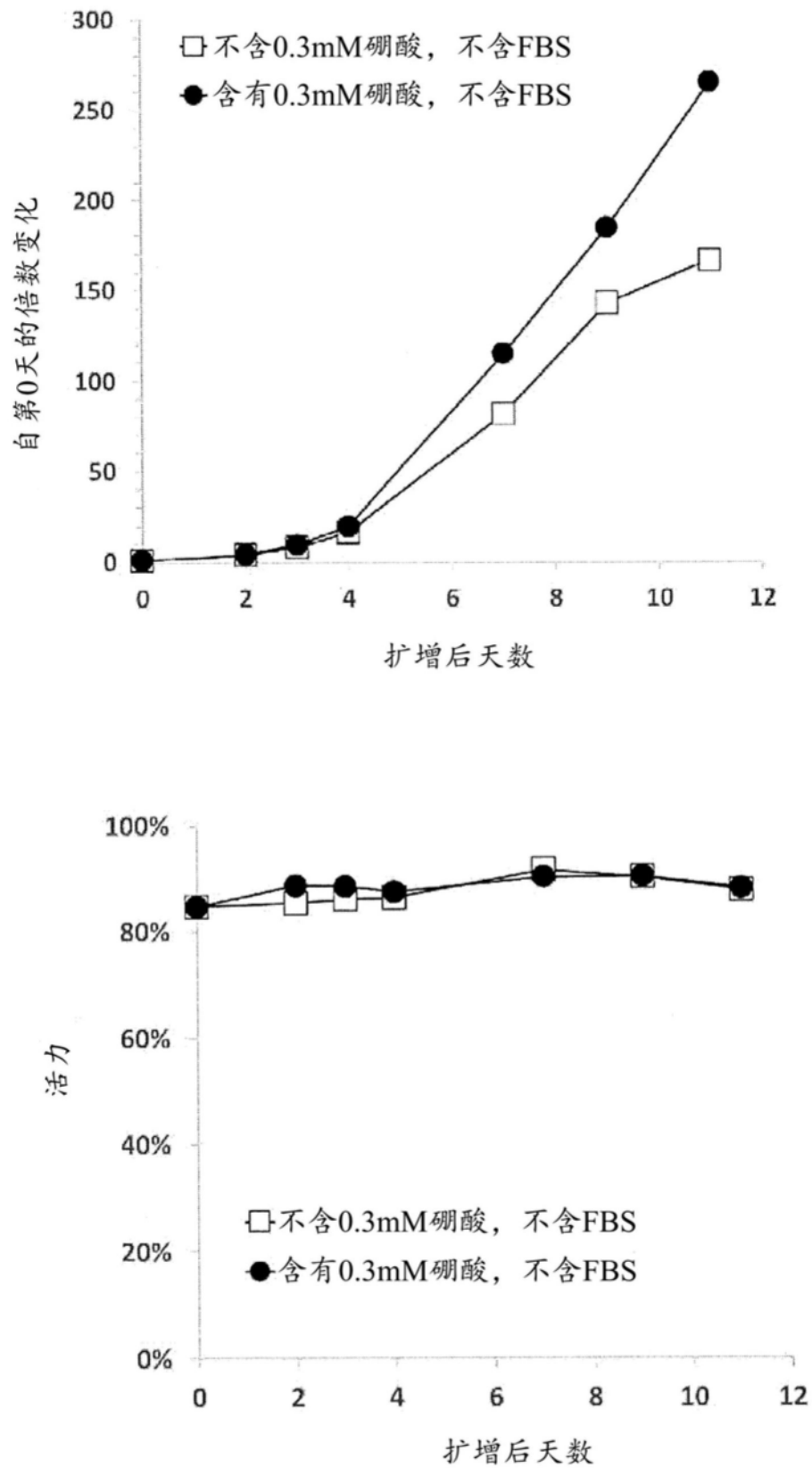


图2

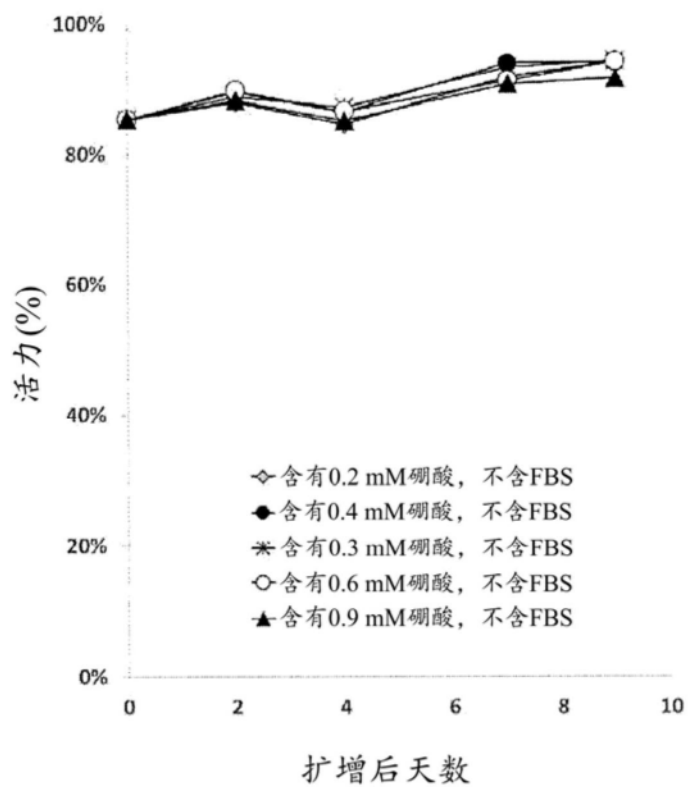
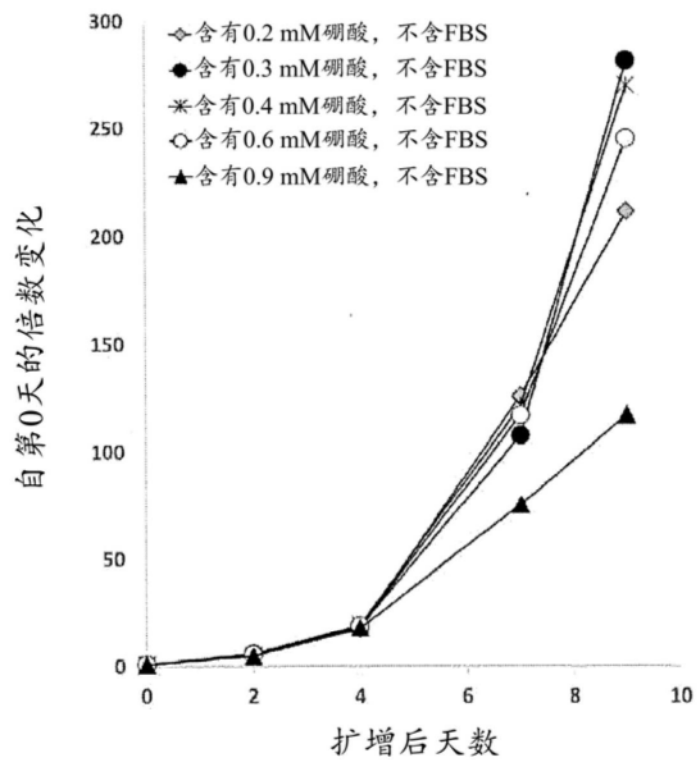


图3

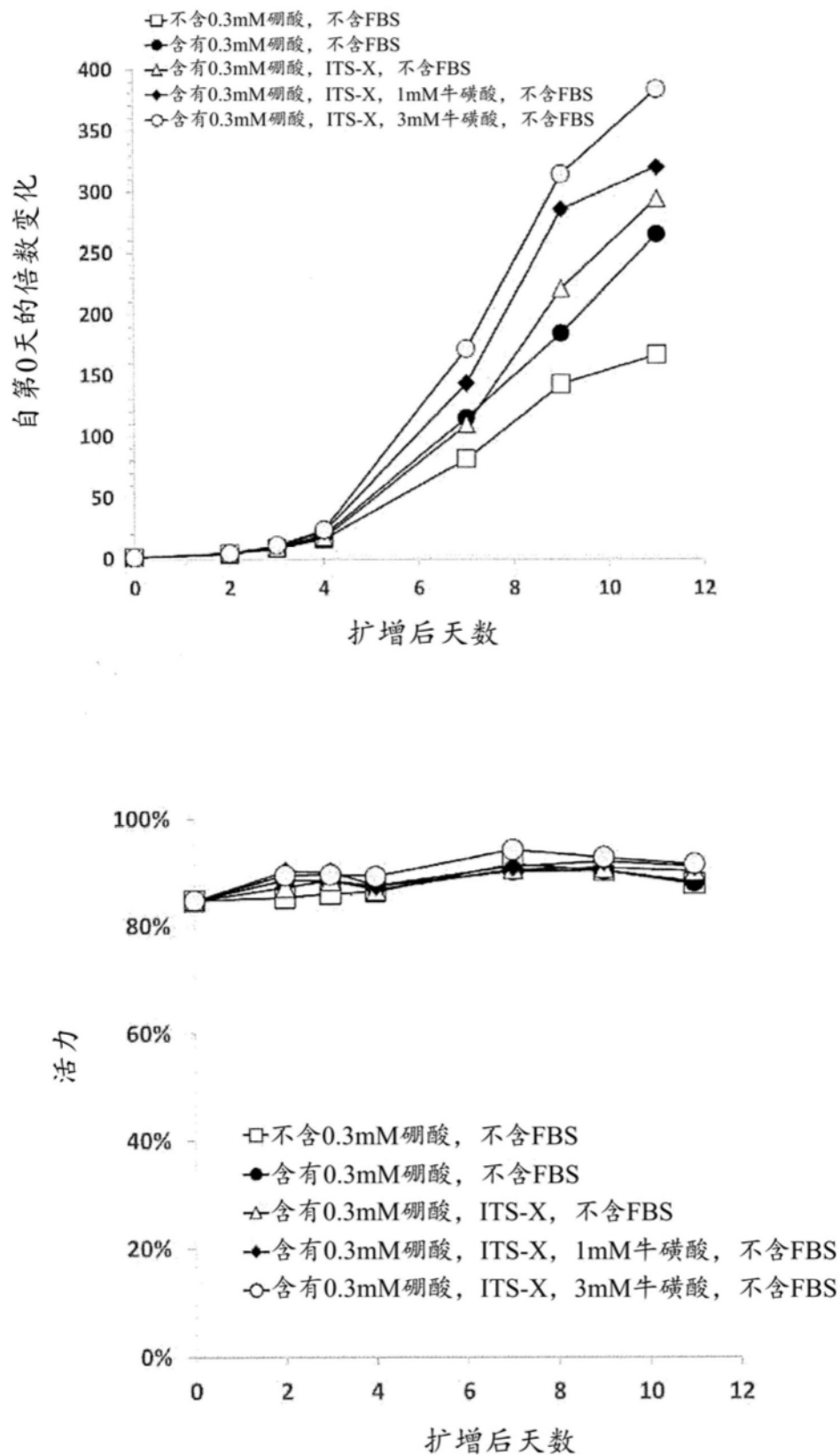


图4

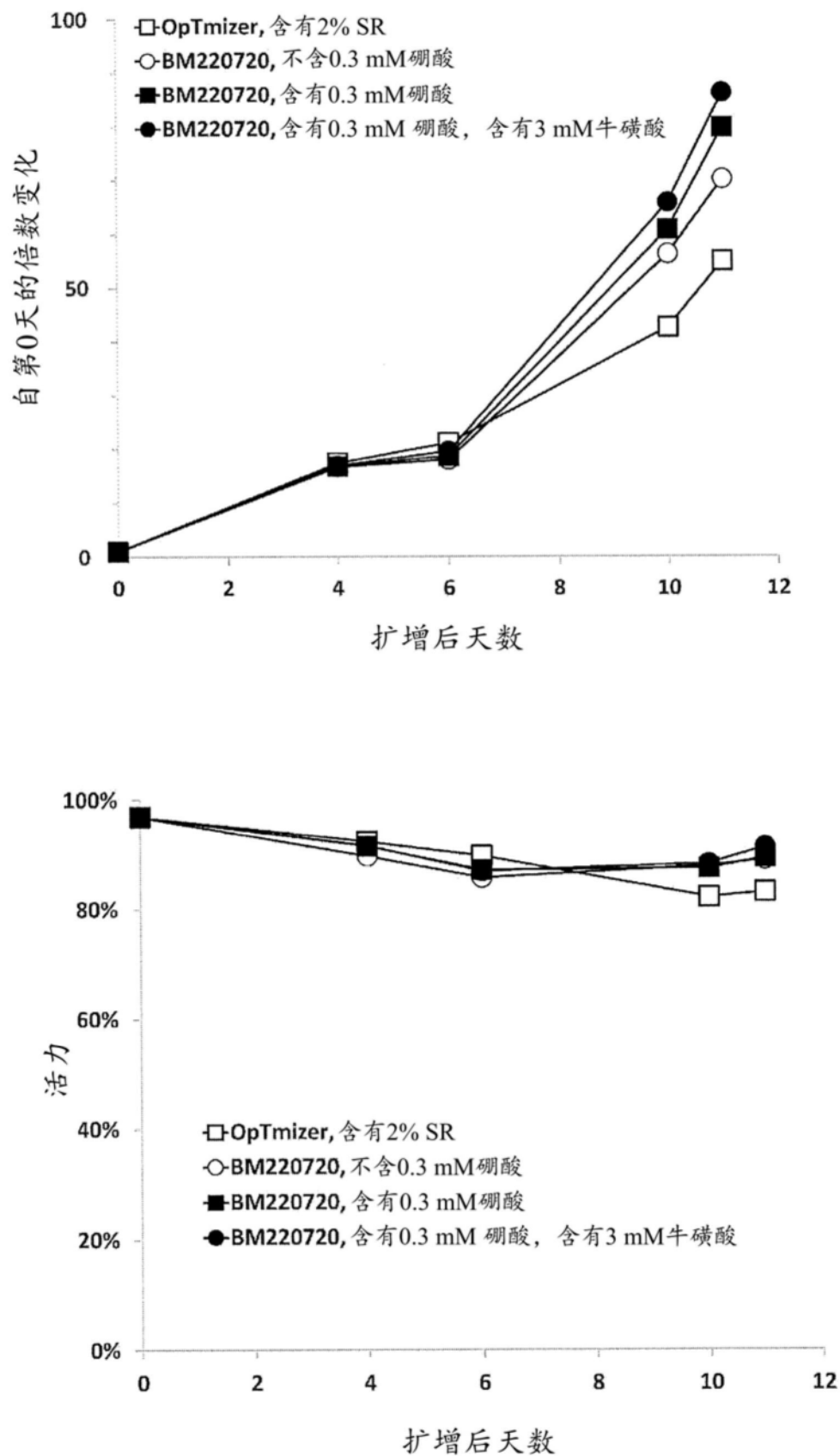


图5