



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114929360 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 19

(21) 申请号 202080090115.8

(22) 申请日 2020.10.29

(30) 优先权数据

62/928,303 2019.10.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.23

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/080476 2020.10.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/084050 EN 2021.05.06

(71) 申请人 朱诺治疗学有限公司

地址 德国慕尼黑

(72) 发明人 M·P·波尔托克 C·拉迪什

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

B01D 15/22 (2006.01)

G01N 30/54 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

B01D 15/20 (2006.01)

B01D 15/16 (2006.01)

权利要求书11页 说明书194页

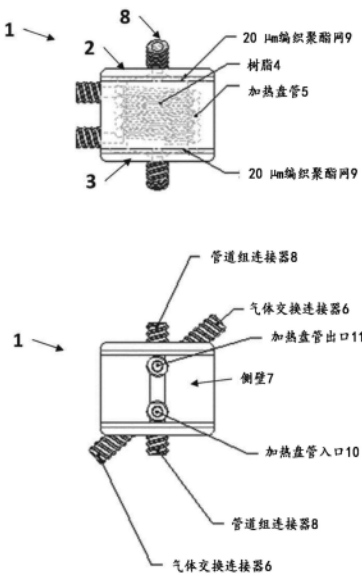
序列表48页 附图50页

(54) 发明名称

细胞选择和/或刺激装置及使用方法

(57) 摘要

本文提供用于使用柱色谱选择和刺激细胞样品中的多个细胞的装置和方法。在一些方面，提供一种装置，所述装置包含用于向色谱固定相提供热量的温度控制构件以及配置为在柱色谱期间向所述固定相提供空气的连接器。在一些方面，与现有装置和方法相比，本文提供的装置和方法缩短生成用于基因工程化且最终用于细胞疗法的选择并刺激的细胞群所需的时间。



1. 一种用于柱色谱的外壳组件,所述外壳组件包含:
入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;
配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及
配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。
2. 根据权利要求1所述的外壳组件,所述外壳组件还包含侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的外壳组件,其中所述连接器包含一个或多个过滤器。
4. 根据权利要求3所述的外壳组件,其中所述一个或多个过滤器是气体过滤器。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的外壳组件,其中所述入口外壳构件包含可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的一个或多个入口。
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的外壳组件,其中所述出口外壳构件包含可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物中的一个或多个出口。
7. 根据权利要求1-6中任一项所述的外壳组件,其中所述气体来源是或包含气体储器或外部环境。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的外壳组件,其中所述气体来源中的气体是无菌的。
9. 根据权利要求1-8中任一项所述的外壳组件,其中所述气体是空气。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的外壳组件,所述外壳组件还包含:
配置为分离所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件,其中所述第一多孔构件任选地位于所述入口外壳构件与所述侧壁构件之间;和/或
配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件,其中所述第二多孔构件任选地位于所述出口外壳构件与所述侧壁构件之间。
11. 根据权利要求10所述的外壳组件,其中所述第一多孔构件或所述第二多孔构件独立地为细胞滤网或细胞筛。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度。
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为将所述固定相加热至在约30℃与约39℃之间的目标温度。
14. 根据权利要求13所述的外壳组件,其中所述目标温度在约35℃与约39℃之间,任选地为或约37℃。
15. 根据权利要求13或权利要求14所述的外壳组件,其中所述温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在所述目标温度。
16. 根据权利要求1-15中任一项所述的外壳组件,所述外壳组件还包含配置为测量所述内部空腔中所述固定相的温度的温度传感器。
17. 根据权利要求1-16中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含热源。
18. 根据权利要求1-16中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为可操作地连接至在所述外壳组件外部的热源。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含一个加热元件或多个加热元件。

20. 根据权利要求19所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件配置为均匀地加热所述固定相。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含选自以下的加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含各自选自以下的多个加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个是电加热元件。

24. 根据权利要求23所述的外壳组件,其中所述电加热元件包含金属板、金属棒、金属丝或其组合。

25. 根据权利要求23或权利要求24所述的外壳组件,其中所述电加热元件配置为连接至在所述外壳组件外部的电源。

26. 根据权利要求19-25中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个是电磁感应加热元件,并且所述电磁感应加热元件包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的包围可磁化芯的感应加热线圈。

27. 根据权利要求19-26中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个是非电加热元件,并且所述非电加热元件包含含有用于受热流体的入口和出口的加热通道。

28. 根据权利要求27所述的外壳组件,其中所述加热通道是加热盘管。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的外壳组件,其中所述受热流体是受热的水。

30. 根据权利要求29所述的外壳组件,其中用于受热的水的所述入口配置为连接至受热的水的外部储器。

31. 根据权利要求19-30中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。

32. 根据权利要求19-31中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。

33. 根据权利要求19-32中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。

34. 根据权利要求19-33中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

35. 根据权利要求19-34中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个包围所述侧壁构件的至少一部分。

36. 根据权利要求19-35中任一项所述的外壳组件,其中所述多个加热元件均匀地或大致均匀地分布在所述侧壁构件的圆周周围。

37. 根据权利要求19-36中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件的至少一部分和/或所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分,任选地所述侧壁构件的至少一部分接触。

38. 根据权利要求34-37中任一项所述的外壳组件,其中所述外壳组件还包含在所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分之间的隔热层。

39. 根据权利要求38所述的外壳组件,其中所述隔热层包含气体,任选地空气,或者液体。

40. 根据权利要求19-39中任一项所述的外壳组件,其中所述多个加热元件包含包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分的多个加热通道。

41. 根据权利要求40所述的外壳组件,其中所述多个加热通道中的至少两个相互流体耦合。

42. 根据权利要求19-41中任一项所述的外壳组件,其中所述多个加热元件包含包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分的多个电加热元件。

43. 根据权利要求42所述的外壳组件,其中所述多个电加热元件中的至少两个相互电耦合。

44. 根据权利要求42或权利要求43所述的外壳组件,其中所述多个电加热元件中的至少一个配置为电连接至电源。

45. 根据权利要求19-44中任一项所述的外壳组件,其中所述外壳组件还包含夹套构件,所述夹套构件包含所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个,其中所述夹套构件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

46. 根据权利要求45所述的外壳组件,其中所述夹套构件可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

47. 根据权利要求45或权利要求46所述的外壳组件,其中所述夹套构件配置为包围所述侧壁构件的至少一部分,任选地配置为完全包围所述侧壁构件。

48. 根据权利要求45-47中任一项所述的外壳组件,其中所述夹套构件包含两个或更多个夹套部件,所述夹套部件配置为一起包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分,任选地完全包围所述侧壁构件。

49. 根据权利要求45-48中任一项所述的外壳组件,其中所述入口外壳构件的一个或多个入口的一部分和/或所述出口外壳构件的一个或多个出口的一部分通过夹套构件来暴露。

50. 根据权利要求45-49中任一项所述的外壳组件,其中所述入口外壳构件的一个或多个入口的一部分和/或所述出口外壳构件的一个或多个出口的一部分位于所述夹套构件外部。

51. 根据权利要求45-50中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个是含有用于受热流体的入口和出口的加热通道,并且所述夹套构件包含用于所述受热流体的入口的至少一个开口和用于所述受热流体的出口的至少一个开口。

52. 根据权利要求45-50中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个是电加热元件,并且所述夹套构件布置为使得所述电加热元件配置为电连接至电源。

53. 根据权利要求48-52中任一项所述的外壳组件,其中所述两个或更多个夹套部件配置为可释放地连接在一起。

54. 根据权利要求48-53中任一项所述的外壳组件,其中所述夹套构件包含多个加热元件,并且所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含所述多个加热元件中的至少一个。

55. 根据权利要求54所述的外壳组件,其中所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自还包含温度传感器。

56. 一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:

配置为包围色谱柱的至少一部分的一个或多个夹套部件;以及

一个或多个加热元件,其中所述一个或多个加热元件配置在所述一个或多个夹套部件中以向所述色谱柱提供热量。

57. 根据权利要求56所述的夹套构件,其中所述一个或多个夹套部件配置为可释放地连接在一起以包围所述色谱柱的至少一部分。

58. 根据权利要求56或权利要求57所述的夹套构件,其中所述色谱柱配置为容纳固定相。

59. 根据权利要求56-58中任一项所述的夹套构件,其中所述一个或多个加热元件配置为温度控制构件的部分,其中所述温度控制构件配置为调节或维持所述色谱柱的温度。

60. 根据权利要求59所述的夹套构件,其中所述温度控制构件配置为将所述色谱柱和/或所述固定相加热至在约30℃与约39℃之间的目标温度,任选地为或约37℃。

61. 根据权利要求59或权利要求60所述的夹套构件,其中所述温度控制构件进一步配置为将所述色谱柱和/或所述固定相维持在所述目标温度。

62. 根据权利要求56-61中任一项所述的夹套构件,其中所述夹套构件还包含配置为测量所述色谱柱和/或所述固定相的温度的温度传感器。

63. 根据权利要求59-62中任一项所述的夹套构件,其中所述温度控制构件包含热源。

64. 根据权利要求59-62中任一项所述的夹套构件,其中所述温度控制构件配置为可操作地连接至位于所述夹套构件外部的热源。

65. 根据权利要求56-64中任一项所述的夹套构件,其中所述夹套构件配置为使得可以在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱的至少一部分之间设置隔热层。

66. 根据权利要求56-65中任一项所述的夹套构件,其中所述夹套构件还包含隔热层,其中所述隔热层配置为设置在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱的至少一部分之间。

67. 根据权利要求56-66中任一项所述的夹套构件,其中所述一个或多个加热元件配置在所述一个或多个夹套部件中以均匀地加热所述色谱柱和/或所述固定相。

68. 根据权利要求56-67中任一项所述的夹套构件,其中所述一个或多个夹套部件中的

每一个包含所述一个或多个加热元件中的至少一个。

69. 根据权利要求56-68中任一项所述的夹套构件, 其中所述一个或多个加热元件各自选自电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。

70. 根据权利要求56-69中任一项所述的夹套构件, 其中所述一个或多个加热元件包含含有用于受热流体的入口和出口的加热通道, 任选地其中所述受热流体是受热的水。

71. 根据权利要求70所述的夹套构件, 其中所述入口配置为连接至所述受热流体的外部储器。

72. 根据权利要求56-71中任一项所述的夹套构件, 其中所述一个或多个加热元件包含电加热元件, 任选地其中所述电加热元件包含金属板。

73. 根据权利要求72所述的夹套构件, 其中所述电加热元件配置为电连接至电源。

74. 根据权利要求56-73中任一项所述的夹套构件, 其中所述夹套构件包含两个或更多个加热元件。

75. 根据权利要求74所述的夹套构件, 其中所述两个或更多个加热元件配置在所述一个或多个夹套部件中以均匀地或大致均匀地分布在所述色谱柱的圆周周围。

76. 根据权利要求56-75中任一项所述的夹套构件, 其中所述夹套构件包含两个或更多个加热通道, 所述加热通道各自包含用于受热流体的入口和出口, 任选地其中所述受热流体是受热的水。

77. 根据权利要求76所述的夹套构件, 其中所述两个或更多个加热通道配置为相互流体连接。

78. 根据权利要求56-77中任一项所述的夹套构件, 其中所述夹套构件包含两个或更多个电加热元件, 任选地包含金属板的两个或更多个电加热元件。

79. 根据权利要求78所述的夹套构件, 其中所述两个或更多个电加热元件配置为相互电耦合。

80. 根据权利要求78或权利要求79所述的夹套构件, 其中所述两个或更多个电加热元件中的至少一个配置为电连接至电源。

81. 根据权利要求56-80中任一项所述的夹套构件, 其中所述一个或多个夹套部件包含两个或更多个夹套部件。

82. 一种用于柱色谱的外壳组件, 所述外壳组件包含:

色谱柱, 所述色谱柱包含配置为容纳固定相的内部空腔; 以及

根据权利要求56-81中任一项所述的夹套构件, 其中所述夹套构件配置为包围所述色谱柱的至少一部分。

83. 根据权利要求82所述的外壳组件, 其中所述色谱柱包含入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件, 其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。

84. 根据权利要求82或权利要求83所述的外壳组件, 其中所述夹套构件可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

85. 根据权利要求82-84中任一项所述的外壳组件, 所述外壳组件还包含配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器, 从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部

空腔中的连接器。

86. 一种外壳组件组, 所述外壳组件组包含多个根据权利要求1-85中任一项所述的外壳组件。

87. 根据权利要求86所述的外壳组件组, 其中所述多个外壳组件中的至少两个顺序排列。

88. 根据权利要求86或87所述的外壳组件组, 其中所述多个外壳组件中的至少两个平行排列。

89. 一种色谱系统, 所述色谱系统包含根据权利要求1-55和82-85中任一项所述的外壳组件以及至少一个另外的色谱柱。

90. 一种色谱试剂盒, 所述色谱试剂盒包含根据权利要求1-85中任一项所述的外壳组件、根据权利要求86-88中任一项所述的外壳组件组或根据权利要求89所述的色谱系统, 以及柱色谱的固定相。

91. 一种色谱试剂盒, 所述色谱试剂盒包含根据权利要求56-81中任一项所述的夹套构件、色谱柱和柱色谱的固定相。

92. 一种色谱柱或色谱柱组, 所述色谱柱或色谱柱组包含根据权利要求1-85中任一项所述的外壳组件、根据权利要求86-88中任一项所述的外壳组件组或根据权利要求89所述的色谱系统, 其中一个或多个所述外壳组件的内部空腔包含柱色谱的固定相。

93. 一种色谱柱, 所述色谱柱包含根据权利要求56-81中任一项所述的夹套构件和色谱柱, 其中所述色谱柱的内部空腔包含柱色谱的固定相。

94. 一种色谱柱组, 所述色谱柱组包含至少一个根据权利要求56-81中任一项所述的夹套构件和多个色谱柱, 其中所述色谱柱中每一个的内部空腔包含柱色谱的固定相。

95. 根据权利要求94所述的色谱柱组, 其中所述多个色谱柱顺序或平行排列, 任选地其中所述多个色谱柱可操作地连接。

96. 根据权利要求94或权利要求95所述的色谱柱组, 其中所述多个色谱柱包含第一色谱柱和第二色谱柱, 其中所述至少一个夹套构件配置为包围所述第二色谱柱。

97. 根据权利要求90-96中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述固定相包含凝胶过滤基质。

98. 根据权利要求90-96中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述固定相包含亲和色谱基质。

99. 根据权利要求90-98中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述固定相包含或者是非磁性材料、非铁磁性材料或非顺磁性材料。

100. 根据权利要求90-99中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述固定相包含固定在其上的选择剂。

101. 根据权利要求100所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述选择剂能够与一个或多个细胞的表面上的选择标记特异性结合。

102. 根据权利要求101所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述一个或多个细胞是免疫细胞。

103. 根据权利要求102所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组, 其中所述一个或多个细胞是T细胞。

104. 根据权利要求101-103中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段;和/或

所述选择剂包含抗体片段;

所述选择剂是或包含Fab片段;

所述选择剂是或包含单结构域抗体,任选地VHH抗体;

所述选择剂选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段;

所述选择剂是选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段;和/或

所述选择剂是选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

105. 根据权利要求101-104中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中:

所述选择标记是T细胞共受体;

所述选择标记是或包含T细胞抗原受体复合物的成员;

所述选择标记是或包含CD3复合物;

所述选择标记是或包含CD3链;

所述选择标记是或包含CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ 链;

所述选择标记是或包含CD8;

所述选择标记是或包含CD4;

所述选择标记是或包含CD45RA;

所述选择标记是或包含CD27;

所述选择标记是或包含CD28;和/或

所述选择标记是或包含CCR7。

106. 根据权利要求101-105中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂与所述选择标记之间的特异性结合不诱导至所述T细胞的信号,或者不诱导至所述T细胞的刺激或激活或增殖信号。

107. 根据权利要求101-106中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂包含或者是抗CD3 Fab、抗CD8 Fab、抗CD4 Fab或抗CD27 Fab。

108. 根据权利要求101-107中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂通过与所述选择剂可逆结合的选择试剂与所述固定相间接结合。

109. 根据权利要求108所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择试剂包含或者是可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素的突变蛋白。

110. 根据权利要求92-109中任一项所述的色谱柱或色谱柱组,所述色谱柱或色谱柱组还包含能够递送刺激信号的一种或多种刺激剂,任选地其中所述一种或多种刺激剂固定在所述固定相上,任选地经由与链霉亲和素结合肽可逆结合的链霉亲和素的突变蛋白间接固定。

111. 根据权利要求90、91和97-109中任一项所述的色谱试剂盒,其中所述色谱试剂盒还包含刺激试剂,其中所述刺激试剂包含能够递送刺激信号的一种或多种刺激剂。

112. 根据权利要求110或权利要求111所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述刺激信号是经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。

113. 根据权利要求110-112中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述一种或多种刺激剂包含第一刺激剂,其中所述第一刺激剂能够递送所述刺激信号,并且所述一种或多种刺激剂还包含能够增强、减弱或修饰所述第一刺激剂的刺激信号的一种或多种第二刺激剂。

114. 根据权利要求113所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第二刺激剂中的至少一种能够与所述一个或多个T细胞上的共刺激分子特异性结合。

115. 根据权利要求113或权利要求114所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第一刺激剂是抗CD3 Fab,并且所述第二刺激剂是抗CD28 Fab。

116. 根据权利要求111-117中任一项所述的色谱试剂盒,其中所述刺激试剂包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,其中所述刺激试剂的大小包含i) 大于50nm的半径,ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii) 每个刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

117. 根据权利要求113-117中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂独立地还包含链霉亲和素结合肽。

118. 根据权利要求109-116中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述链霉亲和素结合肽选自Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

119. 根据权利要求109-118中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述链霉亲和素突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,或者所述链霉亲和素突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1的位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

120. 根据权利要求109-119中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述链霉亲和素突变蛋白的N末端氨基酸残基在SEQ ID NO:1的氨基酸10至16的区域中,并且所述链霉亲和素突变蛋白的C末端氨基酸残基在SEQ ID NO:1的氨基酸133至142的区域中。

121. 根据权利要求109-120中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述链霉亲和素突变蛋白包含SEQ ID NO:3-6、27、28、104和105中任一个所示的氨基酸序列。

122. 一种装置,所述装置包含根据权利要求1-55和82-85中任一项所述的外壳组件、根据权利要求86-88中任一项所述的外壳组件组或者根据权利要求89-121中任一项所述的色谱系统、色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,所述装置还包含经由所述入口外壳构件的入口可操作地连接至所述内部空腔的输入组合物储器。

123. 一种装置,所述装置包含根据权利要求56-81中任一项所述的夹套构件和色谱柱

或色谱柱组,其中所述色谱柱包含配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔,并且所述装置还包含可操作地连接至所述内部空腔的入口的输入组合物储器以允许将所述输入组合物储器中包含的输入组合物摄入所述内部空腔中。

124. 根据权利要求122或权利要求123所述的装置,其中所述装置还包含可操作地连接至所述内部空腔的出口的输出组合物储器以允许或实现从所述内部空腔排出所述输出组合物储器中包含的输出组合物。

125. 根据权利要求122-124中任一项所述的装置,所述装置位于封闭或无菌系统中。

126. 一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:

在根据权利要求92-110、112-115和117-121中任一项所述的色谱柱或色谱柱组中将包含多个T细胞的样品与一种或多种刺激剂一起孵育,以在所述多个T细胞的一个或多个T细胞中递送刺激信号,其中将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及

在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的输出组合物。

127. 根据权利要求126所述的方法,其中所述固定相包含与所述一个或多个T细胞的表面上的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与由所述一个或多个T细胞表达的选择标记的特异性结合实现将所述一个或多个T细胞固定在所述固定相上。

128. 一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:

(a) 将包含多个T细胞的样品添加至内部空腔,所述内部空腔包含根据权利要求92-110、112-115和117-121中任一项所述的色谱柱或色谱柱组的固定相,所述固定相包含与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上的选择标记结合的选择剂,从而将所述多个T细胞中的一个或多个固定在所述固定相上;以及

(b) 向所述色谱柱或色谱柱组中的固定相添加包含能够在所述多个T细胞中的一个或多个中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育;以及

(c) 在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的组合物。

129. 一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:

(a) 组合(i)包含多个T细胞的样品与(ii)根据权利要求90、91、97-109和111-121中任一项所述的色谱试剂盒中的固定相,所述固定相包含能够与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上表达的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与选择标记的特异性结合实现将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及

(b) 向所述固定相添加包含能够在T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,

其中所述组合步骤和/或所述添加步骤在所述色谱试剂盒的色谱柱或色谱柱组的内部空腔的内部或外部进行;以及

(c) 在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的组合物。

130. 根据权利要求126-129中任一项所述的方法,其中所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。

131. 根据权利要求126-130中任一项所述的方法,其中所述一个或多个T细胞是在所述孵育开始后4小时内、4.5小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、11小时内或12小时内从所述固定相收集的。

132. 根据权利要求126-131中任一项所述的方法,其中所述一个或多个T细胞是通过重力流从所述固定相收集的。

133. 根据权利要求132所述的方法,其中所述通过重力流收集包括将洗涤介质添加至包含所述固定相的色谱柱或外壳组件。

134. 根据权利要求133所述的方法,其中:

所述洗涤介质不包含用于从所述固定相洗脱所述一个或多个T细胞的竞争剂或游离结合剂;和/或

所述收集步骤在不添加用于从所述固定相洗脱所述一个或多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。

135. 根据权利要求134所述的方法,其中所述竞争剂或游离结合剂是与所述选择剂的链霉亲和素结合肽竞争结合至所述固定相上固定的链霉亲和素突变蛋白的药剂。

136. 根据权利要求135所述的方法,其中所述竞争剂或游离结合剂是生物素或生物素类似物,任选地其中所述生物素类似物是D-生物素。

137. 根据权利要求126-136中任一项所述的方法,其中所述刺激剂包含或者是含有以下的寡聚刺激试剂:(i) 多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,以及(ii) 能够在多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂,其中所述寡聚刺激试剂的大小包含i) 大于50nm的半径,ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii) 每个寡聚刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

138. 根据权利要求135-137中任一项所述的方法,其中:

按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;或者

按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

139. 根据权利要求126-138中任一项所述的方法,其中所述一种或多种刺激剂中的至少一种能够递送刺激信号,其中所述刺激信号是经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。

140. 根据权利要求139所述的方法,其中所述一种或多种刺激剂中的至少一种是能够递送所述刺激信号的第一刺激剂,并且所述一种或多种刺激剂还包含能够增强、减弱或修饰所述第一刺激剂的刺激信号的一种或多种第二刺激剂。

141. 根据权利要求140所述的方法,其中所述第二刺激剂能够与所述一个或多个T细胞上的共刺激分子特异性结合。

142. 根据权利要求141所述的方法,其中所述共刺激分子选自CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。

143. 根据权利要求140-142中任一项所述的方法,其中所述第二刺激剂能够与CD28特异性结合和/或所述共刺激分子是CD28。

144. 根据权利要求140-143中任一项所述的方法,其中所述第一刺激剂特异性结合CD3,并且所述第二刺激剂特异性结合CD28。

145. 根据权利要求140-144中任一项所述的方法,其中所述第一刺激剂包含与CD3结合的单价抗体片段,并且所述第二刺激剂包含与CD28结合的单价抗体片段。

146. 根据权利要求145所述的方法,其中所述单价抗体片段选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。

147. 根据权利要求140-146中任一项所述的方法,其中所述第一刺激剂是抗CD3 Fab,并且所述第二刺激剂是抗CD28 Fab。

148. 根据权利要求126-147中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件将所述固定相的温度调节至在约30℃与约39℃之间的目标温度。

149. 根据权利要求126-148中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件将固定相的温度维持在约30℃与约39℃之间的目标温度。

150. 根据权利要求148或权利要求149所述的方法,其中所述目标温度在约30℃与约39℃之间,任选地为或约37℃。

151. 根据权利要求126-150中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述连接器允许将气体摄入所述内部空腔中。

152. 根据权利要求151所述的方法,其中所述气体是无菌的并且是或包含空气。

153. 根据权利要求151或152所述的方法,其中将气体摄入所述内部空腔中在所述孵育期间是间歇的或连续的。

154. 根据权利要求126-153中任一项所述的方法,所述方法还包括将重组核酸分子引入所述组合物的刺激的T细胞中,其中所述核酸分子编码重组蛋白,从而产生包含转导的T细胞的组合物。

155. 根据权利要求154所述的方法,其中所述重组蛋白是抗原受体。

156. 根据权利要求154所述的方法,其中所述重组蛋白是嵌合抗原受体。

157. 根据权利要求154-156中任一项所述的方法,其中所述重组核酸的引入通过用编码所述重组蛋白的核酸的病毒颗粒转导来实现。

158. 根据权利要求154-157中任一项所述的方法,所述方法还包括在用于病毒整合的条件下孵育包含转导的细胞的所述组合物。

159. 根据权利要求154-158中任一项所述的方法,所述方法还包括在用于扩增所述T细胞的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物。

160. 根据权利要求126-159中任一项所述的方法,其中所述方法的至少一个或所有步骤在封闭系统中进行,任选地其中所述封闭系统是自动化的。

161. 根据权利要求126-160中任一项所述的方法,其中所述样品是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。

162. 根据权利要求161所述的方法,其中所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的。

163. 根据权利要求161所述的方法,其中所述单采术或白细胞单采术产物是从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻的。

细胞选择和/或刺激装置及使用方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求标题为“细胞选择和/或刺激装置及使用方法 (CELL SELECTION AND/OR STIMULATION DEVICES AND METHODS OF USE)”的2019年10月30日提交的美国临时申请 US 62/928,303的优先权,所述申请的内容出于所有目的通过引用以其整体并入。

通过引用并入序列表

[0002] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表以2020年10月28日创建的名称为735042020040SeqList.txt的文件提供,其大小为74,908字节。将电子格式的序列表的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0003] 本公开文本涉及细胞选择和/或刺激装置及使用方法。在一些方面,选择的和/或刺激的细胞可用于基因工程化,并最终用于细胞疗法。

背景技术

[0004] 多种细胞疗法方法可用于治疗疾病和病症。细胞疗法方法包括涉及免疫细胞如T细胞(例如,CD4+和CD8+ T细胞)的方法,所述免疫细胞可以用重组受体如嵌合抗原受体基因工程化。需要用于生成适用于例如细胞疗法中的细胞群的改进的装置和方法。提供满足这样的需要的装置、制品和方法。

发明内容

[0005] 在一些实施方案中,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件和出口外壳构件,至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中(例如,在色谱运行的至少一部分期间)的连接。在一些实施方案中,所述外壳组件还包含侧壁构件,并且所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。

[0006] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0007] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:色谱柱,所述色谱柱包含配置为容纳固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中,所述色谱柱包含入口外壳构

件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。

[0008] 在任何前述实施方案中,所述连接器可以设置在所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件上。

[0009] 在任何前述实施方案中,所述连接器可以在所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的任两者之间或所有三者之间形成。

[0010] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件可以包含多个所述连接器。

[0011] 在任何前述实施方案中,所述连接器可以是粘结式连接器、螺旋式连接器、鲁尔式(luer)连接器(例如,鲁尔锁连接器或鲁尔滑动连接器)、倒钩式连接器或其任何组合。在任何前述实施方案中,所述连接器可以是鲁尔锁连接器或鲁尔滑动连接器。在任何前述实施方案中,所述连接器可以包含公接头或母接头。在任何前述实施方案中,所述连接器可以配置为密封地接合与所述气体来源流体连通的管道。在任何前述实施方案中,所述连接器可以包含一个或多个阀。在任何前述实施方案中,所述连接器可以可操作地连接至包含一个或多个阀的管道。

[0012] 在任何前述实施方案中,所述连接器可以包含一个或多个过滤器。在任何前述实施方案中,所述连接器可以可操作地连接至包含一个或多个过滤器的管道。在任何前述实施方案中,所述一个或多个过滤器可以是气体过滤器,例如,空气过滤器。在任何前述实施方案中,所述一个或多个过滤器可以是空气过滤器。在任何前述实施方案中,所述一个或多个过滤器可以是无菌过滤器和/或用于通过过滤灭菌的灭菌过滤器。在任何前述实施方案中,所述一个或多个过滤器可以是无菌过滤器。在任何前述实施方案中,所述一个或多个过滤器可以是用于通过过滤灭菌的灭菌过滤器。

[0013] 在任何前述实施方案中,所述入口外壳构件可以包含所述外壳组件的上盖。在一些实施方案中,所述上盖可拆卸地附接至所述入口外壳构件或所述侧壁构件。在一些实施方案中,所述上盖与所述入口外壳构件或所述侧壁构件整体形成。在任何前述实施方案中,所述连接器可以设置在所述上盖上。

[0014] 在任何前述实施方案中,所述入口外壳构件可以包含可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的一个或多个入口。在一些实施方案中,所述一个或多个入口设置在所述上盖上。在一些实施方案中,所述连接器和所述一个或多个入口设置在所述上盖上相同或不同位置处。

[0015] 在任何前述实施方案中,通过所述一个或多个入口的流体路径可以与所述上盖呈约90度的角,而通过所述连接器的流体路径可以与所述上盖呈约45度的角。

[0016] 在任何前述实施方案中,所述出口外壳构件可以包含所述外壳组件的下盖。在一些实施方案中,所述下盖可拆卸地附接至所述出口外壳构件或所述侧壁构件,或者所述下盖与所述出口外壳构件或所述侧壁构件整体形成。

[0017] 在任何前述实施方案中,所述出口外壳构件可以包含可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物中的一个或多个出口。在一些实施方案中,所述一个或多个出口设置在所述下盖上。在一些实施方案中,所述连接器和所述一个或多个出口设置在所述下盖上相同或不同位置处。在一些实施方案中,通过所述一个或多个出口的流体路径与所述下盖呈约90度的角。

[0018] 在任何前述实施方案中,所述气体来源可以是或包含气体储器或外部环境。在任何前述实施方案中,所述气体来源中的气体可以是无菌的。在任何前述实施方案中,所述气体可以是或包含空气。

[0019] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含可操作地连接至所述气体来源的管道。在一些实施方案中,所述管道配置为将所述内部空腔无菌连接至所述气体来源。在任何前述实施方案中,所述管道可以包含一个或多个阀。在任何前述实施方案中,所述管道可以包含一个或多个过滤器。

[0020] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含一个或多个多孔构件,例如,细胞滤网或细胞筛。在一些实施方案中,所述一个或多个多孔构件可以是细胞滤网或细胞筛。在一些实施方案中,所述外壳组件包含配置为分离所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件,并且所述第一多孔构件任选地位于所述入口外壳构件与所述侧壁构件之间。在一些实施方案中,所述外壳组件还包含配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件,并且所述第二多孔构件任选地位于所述出口外壳构件与所述侧壁构件之间。

[0021] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件可以包含配置为分离所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件,其中所述第一多孔构件任选地位于所述入口外壳构件与所述侧壁构件之间;和/或配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件,其中所述第二多孔构件任选地位于所述出口外壳构件与所述侧壁构件之间。在一些实施方案中,所述第一多孔构件或所述第二多孔构件独立地为细胞滤网或细胞筛。

[0022] 在任何前述实施方案中,所述第一多孔构件可以位于所述入口外壳构件与所述侧壁构件之间。在任何前述实施方案中,所述第二多孔构件可以位于所述出口外壳构件与所述侧壁构件之间。

[0023] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个多孔构件可以具有约20 μ m的平均孔直径,或者所述一个或多个多孔构件可以包含具有约20 μ m的网目长度的网。

[0024] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度。在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为将所述内部空腔中的所述固定相从起始温度(例如,室温)加热至在约35 $^{\circ}$ C与约39 $^{\circ}$ C之间(例如,为或为约37 $^{\circ}$ C)的目标温度。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以是或为约37 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中,所述温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在所述目标温度。

[0025] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为将所述固定相加热至在约30 $^{\circ}$ C与约39 $^{\circ}$ C之间的目标温度。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以在约35 $^{\circ}$ C与约39 $^{\circ}$ C之间,任选地为或约37 $^{\circ}$ C。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以是或为约37 $^{\circ}$ C。在一些实施方案中,所述温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在所述目标温度。

[0026] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件可以包含配置为测量所述内部空腔中所述固定相的温度的温度传感器。所述温度传感器可以形成所述温度控制构件的一部分,或者与所述温度控制构件分开提供。在一些实施方案中,所述温度传感器配置为耦合至监测/显示单元。

[0027] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含热源。在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为可操作地连接至在所述外壳组件外部的热源。

[0028] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含一个加热元件或多个加热元件。

[0029] 在任何前述实施方案中,所述加热元件和/或所述多个加热元件可以配置为均匀地加热所述固定相。

[0030] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含选自以下的加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含各自选自以下的多个加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在一些实施方案中,所述加热元件是电加热元件。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个是电加热元件。在一些实施方案中,所述电加热元件包含金属板、金属棒、金属丝或其组合。在一些实施方案中,所述电加热元件可以配置为连接至在所述外壳组件外部的电源。在一些实施方案中,所述加热元件是电磁感应加热元件。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个是电磁感应加热元件。在一些实施方案中,所述电磁感应加热元件包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的包围可磁化芯的感应加热线圈。在一些实施方案中,所述加热元件是非电加热元件。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个是非电加热元件。在一些实施方案中,所述非电加热元件包含加热通道,所述加热通道包含用于受热流体(例如,受热液体或气体)的入口和出口。在一些实施方案中,所述受热流体可以是受热液体或受热气体。在一些实施方案中,所述加热通道可以是加热盘管。在一些实施方案中,所述受热流体可以是受热的水。在一些实施方案中,所述加热通道是加热盘管并且所述受热流体是受热的水。在一些实施方案中,用于受热的水的所述入口配置为连接至受热的水的外部储器。

[0031] 在任何前述实施方案中,所述加热元件可以沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。在任何前述实施方案中,所述加热元件可以设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。在任何前述实施方案中,所述加热元件可以设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的盘管。

[0032] 在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的加热通道。在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的加热盘管。在任何前述实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个可以沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。在任何前述实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个可以设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。在任何前述实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个可以设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。

[0033] 在任何前述实施方案中,所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个可以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在任何前述实施方案中,所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个可以包围所述侧壁构件的至少一部分。

[0034] 在任何前述实施方案中,所述多个加热元件可以均匀地或大致均匀地分布在所述侧壁构件的圆周周围。

[0035] 在任何前述实施方案中,所述加热元件的至少一部分和/或所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分可以与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分,任选地所述侧壁构件的至少一部分接触。在任何前述实施方案中,所述加热元件的至少一部分和/或所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分可以与所述侧壁构件的至少一部分接触。

[0036] 在任何前述实施方案中,所述加热元件的至少一部分和/或所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分可以不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。

[0037] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含在所述加热元件和/或所述多个加热元件中的至少一个与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分之间的隔热层。在一些实施方案中,所述隔热层可以包含气体,任选地空气,或者液体。在一些实施方案中,所述隔热层可以包含空气。

[0038] 在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含加热通道,并且所述加热通道可以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0039] 在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含加热盘管,并且所述加热盘管可以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0040] 在任何前述实施方案中,所述多个加热元件可以包含包围入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分的多个加热通道。在任何前述实施方案中,所述多个加热通道中的至少两个可以相互流体耦合。

[0041] 在任何前述实施方案中,所述多个加热元件可以是包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分的多个电加热元件。在任何前述实施方案中,所述多个电加热元件中的至少两个可以相互电耦合。在任何前述实施方案中,所述多个电加热元件中的至少一个可以配置为电连接至在所述外壳组件外部的电源。

[0042] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含夹套构件,所述夹套构件包含所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个,其中所述夹套构件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含夹套构件,所述夹套构件包含有所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个的所述温度控制构件,其中所述夹套构件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0043] 在一些实施方案中,所述夹套构件包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0044] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部

分。

[0045] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以配置为包围所述侧壁构件的至少一部分,任选地可以配置为完全包围所述侧壁构件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以配置为完全包围所述侧壁构件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包围所述侧壁构件的至少一部分,任选地可以完全包围所述侧壁构件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以配置为完全包围所述侧壁构件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以完全包围所述侧壁构件。

[0046] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含两个或更多个夹套部件,所述夹套部件配置为一起包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分,任选地完全包围所述侧壁构件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含两个或更多个夹套部件,所述夹套部件一起配置为包围所述侧壁构件的至少一部分。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含两个或更多个夹套部件,所述夹套部件一起配置为完全包围所述侧壁构件。

[0047] 在任何前述实施方案中,所述入口外壳构件的一个或多个入口的一部分和/或所述出口外壳构件的一个或多个出口的一部分可以通过所述夹套构件来暴露。在任何前述实施方案中,所述入口外壳构件的一个或多个入口的一部分和/或所述出口外壳构件的一个或多个出口的一部分可以位于所述夹套构件外部。

[0048] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件的至少一部分可以与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分,任选地所述侧壁构件的至少一部分接触。在任何前述实施方案中,所述夹套构件的至少一部分可以与所述侧壁构件的至少一部分接触。

[0049] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件的至少一部分可以不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。

[0050] 在任何前述实施方案中,所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个可以是加热通道,所述加热通道包含用于受热流体的入口和出口,并且所述夹套构件可以包含用于所述加热流体的入口的至少一个开口和用于所述受热流体的出口的至少一个开口。

[0051] 在任何前述实施方案中,所述加热元件或所述多个加热元件中的至少一个可以是电加热元件,并且所述夹套构件可以布置为使得所述电加热元件配置为电连接至在所述外壳组件外部的电源。

[0052] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件可以配置为可释放地连接在一起。

[0053] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含多个加热元件,并且所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含所述多个加热元件中的至少一个。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个还可以各自包含温度传感器。

[0054] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含含有用于受热流体(任选地受热的水)的入口和出口的加热通道。在一些实施方案中,所述受热流体可以是受热的水。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道可以相互流体连接。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道的至少一个入口可以配置为连接至受热的水的外部储器。

[0055] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含电加热元件,任选地包含金属板的电加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的电加热元件可以相互电耦合。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的电加热元件可以配置为电连接至在所述外壳组件外部的电源。

[0056] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为包围色谱柱的至少一部分的一个或多个夹套部件;以及一个或多个加热元件,其中:所述一个或多个加热元件配置在所述一个或多个夹套部件中以向所述色谱柱提供热量;所述色谱柱的。

[0057] 在一些实施方案中,所述一个或多个加热元件配置为温度控制构件的部分,其中所述温度控制构件配置为调节或维持所述色谱柱的温度。

[0058] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为包围色谱柱的至少一部分的一个或多个夹套部件;以及包含一个或多个加热元件的温度控制构件,其中:所述一个或多个加热元件配置在所述一个或多个夹套部件中以向所述固定相提供热量;并且所述温度控制构件配置为调节或维持所述色谱柱的温度。

[0059] 在一些实施方案中,所述一个或多个夹套部件可以配置为可释放地连接在一起以包围所述色谱柱的至少一部分。

[0060] 在任何前述实施方案中,所述色谱柱配置为容纳固定相。

[0061] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为将所述色谱柱和/或所述固定相加热至在约30℃与约39℃之间的目标温度。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以在约35℃与约39℃之间,任选地为或约37℃。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以是或约37℃。

[0062] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以进一步配置为将所述色谱柱和/或所述固定相维持在所述目标温度。

[0063] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件还可以包含配置为测量所述色谱柱和/或所述固定相的温度的温度传感器。在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件还可以包含配置为测量所述色谱柱和/或所述固定相的温度的温度传感器。

[0064] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含热源。在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为可操作地连接至位于所述夹套构件外部的热源。

[0065] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件和/或所述夹套构件的至少一部分可以配置为与所述色谱柱的至少一部分接触。在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件和/或所述夹套构件的至少一部分可以配置为不与所述色谱柱的至少一部分接触。

[0066] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以配置为使得可以在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱的至少一部分之间设置隔热层。

[0067] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件还可以包含隔热层,其中所述隔热层可以配置为设置在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱的至少一部分之间。

[0068] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件可以配置在所述一个或多个夹套部件中以均匀地加热所述固定相。

[0069] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件中的每一个包含所述一个或多

个加热元件中的至少一个。

[0070] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件可以各自选自电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件可以包含含有用于受热流体的入口和出口的加热通道,任选地其中所述受热流体是受热的水。在任何前述实施方案中,所述受热流体可以是受热的水。在一些实施方案中,所述入口可以配置为连接至所述受热流体的外部储器。

[0071] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含用于所述受热流体的入口的至少一个开口。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含用于所述受热流体的出口的至少一个开口。

[0072] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个加热元件可以包含电加热元件,任选地其中所述电加热元件包含金属板。在一些实施方案中,所述电加热元件包含金属板。在任何前述实施方案中,所述电加热元件可以配置为电连接至在所述夹套构件外部的电源。

[0073] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含两个或更多个加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个加热元件可以配置在所述一个或多个夹套部件中以均匀地或大致均匀地分布在所述色谱柱的圆周周围。

[0074] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含两个或更多个加热通道,所述加热通道各自包含用于受热流体的入口和出口,任选地其中所述受热流体是受热的水。在一些实施方案中,所述两个或更多个加热通道可以配置为相互流体连接。

[0075] 在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含两个或更多个电加热元件,任选地包含金属板的两个或更多个电加热元件。在任何前述实施方案中,所述夹套构件可以包含包含金属板的两个或更多个电加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个电加热元件可以配置为相互电耦合。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个电加热元件中的至少一个可以配置为电连接至在所述夹套构件外部的电源。

[0076] 在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件可以包含两个或更多个夹套部件。在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件可以包含两个夹套部件。在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件可以包含三个夹套部件。在任何前述实施方案中,所述一个或多个夹套部件包含四个夹套部件。

[0077] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件可以配置为可释放地连接在一起以包围所述色谱柱的至少一部分。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个还可以各自包含温度传感器。

[0078] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含含有用于受热流体(任选地受热的水)的入口和出口的加热通道。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含含有用于受热的水的入口和出口的加热通道。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道可以配置为相互流体连接。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道的至少一个入口可以配置为连接至受热的水的外部储器。

[0079] 在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个可以各自包含电加热元件,任选地包含金属板的电加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个

夹套部件中的至少两个可以各自包含包含金属板的电加热元件。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的电加热元件可以配置为相互电耦合。在任何前述实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个的至少一个电加热元件可以配置为电连接至在所述外壳组件外部的电源。

[0080] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量并且调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0081] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含加热元件并且配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量并且调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0082] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0083] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有金属板的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0084] 在一些实施方案中,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有加热盘管的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中,所述加热盘管包含用于受热的水的入口和出口。

[0085] 在任何前述实施方案中,所述加热盘管可以包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件。

[0086] 在一些实施方案中,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相

提供热量的加热元件的温度控制构件；以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器，从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中，所述气体过滤器是空气过滤器，并且所述无菌气体是无菌空气。在任何前述实施方案中，所述外壳组件还可以包含所述气体过滤器。

[0087] 在一些实施方案中，本文提供一种用于柱色谱的外壳组件，其包含：色谱柱，所述色谱柱包含配置为容纳固定相的内部空腔；以及前述实施方案中任一项的夹套构件，其中所述夹套构件配置为包围所述色谱柱的至少一部分。

[0088] 在一些实施方案中，所述色谱柱可以包含入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件，其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。在一些实施方案中，所述夹套构件可以可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在任何前述实施方案中，所述外壳组件还可以包含配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器，从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0089] 在一些实施方案中，本文提供一种用于柱色谱的外壳组件，其包含：入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件，其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔；配置为调节或维持所述固定相的温度的温度控制构件，其中所述温度控制构件包含配置为向所述固定相提供热量的加热盘管；包含所述加热盘管的夹套构件，其中所述夹套构件可释放地连接以包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的至少一部分；以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器，从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0090] 在一些实施方案中，所述加热盘管完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中，所述夹套构件可以包含第二加热盘管，并且所述加热盘管和所述第二加热盘管可以一起包围所述侧壁构件。

[0091] 在一些实施方案中，本文提供一种用于柱色谱的外壳组件，其包含：入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件，其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔；配置为调节或维持所述固定相的温度的温度控制构件，其中所述温度控制构件包含电加热元件，所述电加热元件包含金属板且配置为向所述固定相提供热量；包含所述电加热元件的夹套构件，其中所述夹套构件可释放地连接以包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的至少一部分；以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器，从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0092] 在一些实施方案中，所述夹套构件可以包含多个电加热元件，所述电加热元件包含金属板并且均匀地或大致均匀地分布在所述侧壁构件的圆周周围。

[0093] 在一些实施方案中，本文公开一种外壳组件组，其包含多个前述实施方案中任一项的外壳组件。在一些实施方案中，所述外壳组件组包含顺序排列的所述多个外壳组件中的至少两个。在任何前述实施方案中，所述外壳组件组可以包含平行排列的所述多个外壳组件中的至少两个。

[0094] 在一些实施方案中，本文提供一种色谱系统，其包含前述实施方案中任一项的外壳组件和至少一个另外的色谱柱。

[0095] 在一些实施方案中,本文提供一种色谱试剂盒,其包含前述实施方案中任一项的外壳组件或外壳组件组,和柱色谱的固定相。在一些实施方案中,本文提供一种色谱试剂盒,其包含前述实施方案中任一项的色谱系统,和柱色谱的固定相。在一些实施方案中,本文提供一种色谱试剂盒,其包含前述实施方案中任一项的夹套构件、色谱柱以及柱色谱的固定相。

[0096] 在一些实施方案中,本文提供一种色谱柱或色谱柱组,其包含前述实施方案中任一项的外壳组件或外壳组件组,以及在一个或多个外壳组件的内部空腔中的柱色谱的固定相。在一些实施方案中,本文提供一种色谱柱,其包含前述实施方案中任一项的夹套构件和色谱柱,其中所述色谱柱的内部空腔包含柱色谱的固定相。在一些实施方案中,本文提供一种色谱柱组,其包含至少一个前述实施方案中任一项的夹套构件和多个色谱柱,其中所述色谱柱中每一个的内部空腔包含柱色谱的固定相。在一些实施方案中,所述多个色谱柱可以顺序或平行排列,任选地其中所述多个色谱柱可操作地连接。在一些实施方案中,所述多个色谱柱可操作地连接。在任何前述实施方案中,所述多个色谱柱可以包含第一色谱柱和第二色谱柱,其中所述至少一个夹套构件可以配置为包围所述第二色谱柱。在一些实施方案中,所述固定相包含凝胶过滤基质。在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含亲和色谱基质。在任何前述实施方案中,所述固定相可以是或包含非磁性材料、非铁磁性材料或非顺磁性材料。在任何前述实施方案中,所述固定相可以是或包含选自以下的固定相:纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、多糖接枝二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮接枝二氧化硅、聚氧化乙烯接枝二氧化硅、聚(2-羟乙基天冬酰胺)二氧化硅、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺与二醇的共聚物、多糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物及其组合。在任何前述实施方案中,所述固定相可以是或包含单片式基质、微粒基质和/或平面基质。在一些实施方案中,所述微粒基质具有约5 μm 至约200 μm 、约5 μm 至约600 μm 或约5 μm 至约1500 μm 的平均粒径。在任何前述实施方案中,所述固定相可以具有约1nm至约500nm的平均孔径。

[0097] 在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含固定在其上的选择剂。在一些实施方案中,所述选择剂能够与一个或多个细胞的表面上的选择标记特异性结合。在任何前述实施方案中,所述一个或多个细胞可以是或包含免疫细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞是T细胞。

[0098] 在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含抗体片段。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含Fab片段。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段的选择剂。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0099] 在任何前述实施方案中,所述选择剂还可以包含生物素;与链霉亲和素或抗生物

素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以包含链霉亲和素结合肽。

[0100] 在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含T细胞共受体。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含T细胞抗原受体复合物的成员。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD3复合物。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD3链。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ 链。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD8。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD4。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD45RA。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD27。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CD28。在任何前述实施方案中,所述选择标记可以是或包含CCR7。

[0101] 在任何前述实施方案中,所述选择剂与所述选择标记之间的特异性结合可能不导致诱导信号(例如,诱导刺激或激活或增殖信号)至T细胞。

[0102] 在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含抗CD3 Fab、抗CD8 Fab或抗CD4 Fab。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以是或包含抗CD27 Fab。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以与所述固定相直接或间接结合。在任何前述实施方案中,所述选择剂可以经由与所述选择剂可逆结合的选择试剂与所述固定相间接结合。

[0103] 在任何前述实施方案中,所述选择试剂可以是或包含可逆结合生物素、生物素类似物或其生物活性片段的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素的突变蛋白;可逆结合链霉亲和素结合肽的抗生物素蛋白或链霉亲和素的突变蛋白;包含至少两个螯合基团K的试剂,其中所述至少两个螯合基团能够与过渡金属离子结合;能够与寡聚组氨酸亲和和标签结合的药剂;能够与谷胱甘肽-S-转移酶结合的药剂;钙调蛋白或其类似物;能够与钙调蛋白结合肽(CBP)结合的药剂;能够与FLAG肽结合的药剂;能够与HA标签结合的药剂;能够与麦芽糖结合蛋白(MBP)结合的药剂;能够与HSV表位结合的药剂;能够与myc表位结合的药剂;或者能够与生物素化的载体蛋白结合的药剂。在任何前述实施方案中,所述选择试剂可以是或包含可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素的突变蛋白。

[0104] 在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD4抗体(例如抗CD4 Fab),并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是抗CD8抗体(例如抗CD8 Fab)。在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD4 Fab,并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是抗CD8 Fab。

[0105] 在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD3抗体(例如抗CD3 Fab),并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是靶向CD45RA、CD27、CD28或CCR7的抗体,任选地抗CD27抗体(例如抗CD27 Fab)。在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD3 Fab,并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是抗CD27 Fab。

[0106] 在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD4抗体(例如抗CD4 Fab),固定在所述多个色谱柱中的至少另一个上的选择剂可以是抗CD8抗体(例如抗CD8 Fab),并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是靶向CD45RA、CD27、CD28或CCR7的抗体,任选地抗CD27抗体(例如抗CD27 Fab)。在任何前述实施方案中,固定在所述多个色谱柱中的至少一个的固定相上的选择剂可以是抗CD4 Fab,固定在所述多个色谱柱中的至少另一个上的选择剂可以是抗CD8 Fab,并且固定在所述多个色谱柱中的至少另一个的固定相上的选择剂可以是抗CD27 Fab。

[0107] 在任何前述实施方案中,所述色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组还可以包含能够在一个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂。在一些实施方案中,所述固定相包含所述一种或多种刺激剂中的至少一种。在一些实施方案中,所述一种或多种刺激剂固定在所述色谱柱或色谱柱组的固定相上。在一些实施方案中,所述一种或多种刺激剂间接固定。在一些实施方案中,所述一种或多种刺激剂经由与链霉亲和素结合肽可逆结合的链霉亲和素的突变蛋白间接固定。在一些实施方案中,所述色谱试剂盒可以包含刺激试剂,其中所述刺激试剂包含能够在一个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂。在一些实施方案中,至少一种刺激剂或所述一种或多种刺激剂中的至少一种是第一刺激剂,并且所述色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组还包含能够增强、减弱或修饰所述第一刺激剂的刺激信号的一种或多种第二刺激剂。在一些实施方案中,所述第二刺激剂中的至少一种能够与所述一个或多个T细胞上的共刺激分子(例如,CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo- /Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM) 特异性结合。在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含所述一种或多种第二刺激剂中的至少一种。

[0108] 在任何前述实施方案中,所述刺激信号可以经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。

[0109] 在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段。在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含抗体片段。在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含Fab片段。在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含选自自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段的刺激剂。在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段。在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂可以是或包含选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0110] 在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂还可以包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[0111] 在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含抗体片段。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含Fab片段。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段的刺激剂。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂可以独立地是或包含选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。在一些实施方案中,所述第一刺激剂是抗CD3Fab,并且所述第二刺激剂是抗CD28 Fab。

[0112] 在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂还可以独立地包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和第二刺激剂还可以独立地包含链霉亲和素结合肽。

[0113] 在任何前述实施方案中,所述链霉亲和素结合肽可以选自Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-

Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。

[0114] 在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂和所述第二刺激剂可以与包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子的寡聚刺激试剂可逆结合,其中所述寡聚刺激试剂的大小包含 i) 大于50nm的半径, ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或 (iii) 每个寡聚刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0115] 在任何前述实施方案中,所述刺激试剂可以包含多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,其中所述刺激试剂的大小包含 i) 大于50nm的半径, ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或 (iii) 每个刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[0116] 在任何前述实施方案中,所述链霉亲和素突变蛋白可以在对应于SEQ ID NO:1的位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,或者所述链霉亲和素突变蛋白可以在对应于SEQ ID NO:1的位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在任何前述实施方案中,所述链霉亲和素突变蛋白的N末端氨基酸残基可以在SEQ ID NO:1的氨基酸10至16的区域中,并且所述链霉亲和素突变蛋白的C末端氨基酸残基可以在SEQ ID NO:1的氨基酸133至142的区域中。在任何前述实施方案中,所述链霉亲和素突变蛋白可以包含SEQ ID NO:3-6、27、28、104和105中任一个所示的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,本文公开一种装置,其包含前述实施方案中任一项的外壳组件、外壳组件组或者色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,并且所述装置还包含经由入口外壳构件的入口可操作地连接至内部空腔的输入组合物储器。在一些实施方案中,本文公开一种装置,其包含前述实施方案中任一项的色谱系统,并且所述装置还包含经由入口外壳构件的入口可操作地连接至内部空腔的输入组合物储器。在一些实施方案中,本文公开一种装置,其包含前述实施方案中任一项的夹套构件和色谱柱或色谱柱组,其中所述色谱柱包含配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔,并且所述装置还包含可操作地连接至所述内部空腔的入口的输入组合物储器以允许将所述输入组合物储器中包含的输入组合物摄入所述内部空腔中。在一些实施方案中,所述输入组合物包含或者是血液或血液源样品。在一些实施方案中,所述输入组合物包含或者是全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的或者从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。

[0118] 在任何前述实施方案中,所述装置还可以包含经由所述出口外壳构件的出口可操作地连接至所述内部空腔的输出组合物储器。在任何前述实施方案中,所述装置还可以包含可操作地连接至所述内部空腔的出口的输出组合物储器以允许或实现从所述内部空腔排出所述输出组合物储器中包含的输出组合物。在一些实施方案中,所述输出组合物包含或者是富集的T细胞。在一些实施方案中,所述富集的T细胞已经在所述色谱柱上进行色谱期间经历刺激。在任何前述实施方案中,所述装置可以位于封闭或无菌系统中。

[0119] 在一些实施方案中,本文公开一种制备色谱柱或色谱柱组的方法,所述方法包括

将固定相引入前述实施方案中任一项的外壳组件或外壳组件组中。

[0120] 在一些实施方案中,本文公开一种制备色谱柱或色谱柱组的方法,所述方法包括将前述实施方案中任一项的色谱试剂盒的固定相引入所述色谱试剂盒的外壳组件或外壳组件组中。

[0121] 在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:在前述实施方案中任一项的色谱柱或色谱柱组中将包含多个T细胞的样品与一种或多种刺激剂一起孵育以在所述多个T细胞的一个或多个T细胞中递送刺激信号,其中所述多个T细胞固定在固定相上,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:在前述实施方案中任一项的色谱柱或色谱柱组中将包含多个T细胞的样品与一种或多种刺激剂一起孵育以在所述多个T细胞的一个或多个T细胞中递送刺激信号,其中所述多个T细胞固定在固定相上;以及在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述固定相包含与所述一个或多个T细胞的表面上的选择标记特异性结合的选择剂。在一些实施方案中,所述选择剂与由所述一个或多个T细胞表达的选择标记的特异性结合实现将所述一个或多个T细胞固定在所述固定相上。在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含与所述一个或多个T细胞的表面上的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与由所述一个或多个T细胞表达的选择标记的特异性结合可以实现将所述一个或多个T细胞固定在所述固定相上。在任何所提供的方法中,在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件将所述固定相的温度调节至高于室温的目标温度。在一些实施方案中,所述目标温度是将所述细胞的健康和活性最大化以提供在所述一个或多个T细胞中所述刺激信号的高效或有效递送的生理温度。

[0122] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括:在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。在任何前述实施方案中,所述一个或多个T细胞可以在开始所述孵育之后4小时内、4.5小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、11小时内或12小时内从所述固定相收集。在任何前述实施方案中,所述一个或多个T细胞可以通过重力流从所述固定相收集。在一些实施方案中,所述通过重力流收集可以包括将洗涤介质添加至包含所述固定相的色谱柱或外壳组件。在任何前述实施方案中,收集步骤可以在不添加用于从所述固定相洗脱所述多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。在任何前述实施方案中,所述洗涤介质可以不包含用于从所述固定相洗脱所述一个或多个T细胞的竞争剂或游离结合剂。

[0123] 在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是与所述选择剂的链霉亲和素结合肽竞争结合至所述固定相上固定的链霉亲和素突变蛋白的药剂。在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是生物素或生物素类似物,任选地其中所述生物素类似物是D-生物素。在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是D-生物素。

[0124] 在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a) 将包含多个T细胞的样品添加至前述实施方案中任一项的色谱柱或色谱柱组中的固定相,所述固定相包含与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上的选择标记结合的选择剂,从而将所述多个T细胞中的一个或多个固定在所述固定相上;以及(b) 向所述色谱柱或色谱柱组

中的固定相添加包含能够在所述多个T细胞中的一个或多个中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[0125] 在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a) 将包含多个T细胞的样品添加至包含前述实施方案中任一项的色谱柱或色谱柱组的固定相的内部空腔,所述固定相包含与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上选择标记结合的选择剂,从而将所述多个T细胞中的一个或多个固定在所述固定相上;以及(b) 向所述色谱柱或色谱柱组中的固定相添加包含能够在所述多个T细胞中的一个或多个中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育;以及(c) 在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的组合物。

[0126] 在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a) 组合(i) 包含多个T细胞的样品与(ii) 前述实施方案中任一项的色谱试剂盒中的固定相,所述固定相包含能够与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上表达的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与选择标记的特异性结合实现将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及(b) 向所述固定相添加包含能够在T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,其中所述组合步骤和/或所述添加步骤在所述色谱试剂盒的色谱柱或色谱柱组的内部空腔的内部或外部进行,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[0127] 在一些实施方案中,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a) 组合(i) 包含多个T细胞的样品与(ii) 前述实施方案中任一项的色谱试剂盒中的固定相,所述固定相包含能够与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上表达的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与选择标记的特异性结合实现将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及(b) 向所述固定相添加包含能够在T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,其中所述组合步骤和/或所述添加步骤在所述色谱试剂盒的色谱柱或色谱柱组的内部空腔的内部或外部进行;以及(c) 在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞,从而生成包含刺激的T细胞的组合物。

[0128] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括:在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。在任何前述实施方案中,所述一个或多个T细胞可以在开始所述孵育之后4小时内、4.5小时内、5小时内、6小时内、7小时内、8小时内、9小时内、10小时内、11小时内或12小时内从所述固定相收集。在任何前述实施方案中,所述一个或多个T细胞可以通过重力流从所述固定相收集。在一些实施方案中,所述通过重力流收集可以包括将洗涤介质添加至包含所述固定相的色谱柱或外壳组件。在任何前述实施方案中,所述收集步骤可以在不添加用于从所述固定相洗脱所述多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。在任何前述实施方案中,所述洗涤介质可以不包含用于从所述固定相洗脱所述一个或多个T细胞的竞争剂或游离结合剂。

[0129] 在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是与所述选择剂的链霉亲和素

结合肽竞争结合至所述固定相上固定的链霉亲和素突变蛋白的药剂。在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是生物素或生物素类似物,任选地其中所述生物素类似物是D-生物素。在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂可以是D-生物素。

[0130] 在任何前述实施方案中,所述刺激剂可以是或包含含有以下的寡聚刺激试剂:(i)多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,以及(ii)能够在一个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂,其中所述寡聚刺激试剂的大小包含i)大于50nm的半径,ii)至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii)每个寡聚刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;或者按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

[0131] 在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂中的至少一种可能能够递送刺激信号,其中所述刺激信号是经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。

[0132] 在任何前述实施方案中,所述一种或多种刺激剂中的至少一种可以是能够递送所述刺激信号的第一刺激剂,并且所述一种或多种刺激剂还可以包含能够增强、减弱或修饰所述第一刺激剂的刺激信号的一种或多种第二刺激剂。在一些实施方案中,所述第二刺激剂可能能够与所述一个或多个T细胞上的共刺激分子特异性结合。在一些实施方案中,所述共刺激分子可以选自CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在任何前述实施方案中,所述第二刺激剂可能能够与CD28特异性结合和/或所述共刺激分子是CD28。

[0133] 在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂可以特异性结合CD3,并且所述第二刺激剂可以特异性结合CD28。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂可以包含与CD3结合的单价抗体片段,并且所述第二刺激剂可以包含与CD28结合的单价抗体片段。在一些实施方案中,所述单价抗体片段可以选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。在任何前述实施方案中,所述第一刺激剂可以是抗CD3 Fab,并且所述第二刺激剂可以是抗CD28 Fab。

[0134] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件可以将所述固定相的温度调节至在约30℃与约39℃之间的目标温度。

[0135] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件可以将所述固定相的温度调节至在约35℃与约39℃之间的目标温度。

[0136] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件可以将所述固定相的温度维持在约30℃与约39℃之间的目标温度。

[0137] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件可以将所述固定相的温度维持在约35℃与约39℃之间的目标温度。

[0138] 在任何前述实施方案中,所述目标温度在约30℃与约39℃之间,任选地为或约37℃。在任何前述实施方案中,所述目标温度可以为37℃或约37℃。

[0139] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,所述连接器可以允许将气体摄入所述内部空腔中。在一些实施方案中,所述气体是无菌的并且是或包含空气。在任

何前述实施方案中,将气体摄入所述内部空腔中在所述孵育期间可以是间歇的或连续的。

[0140] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括用介质洗涤所述固定相,并且所述介质不包含用于从所述固定相洗脱所述T细胞的竞争剂或游离结合剂。

[0141] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括孵育包含刺激的T细胞的所述组合物。在一些实施方案中,所述进一步孵育是在为或约 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 进行;和/或所述进一步孵育是在能够将信号递送至T细胞的另一药剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述另一药剂能够增强或诱导T细胞、CD4⁺ T细胞和/或CD8⁺ T细胞的增殖。在任何前述实施方案中,所述另一药剂可以是或包含选自IL-2、IL-15和IL-7的细胞因子。在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含刺激的T细胞的所述组合物。在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括选择和/或刺激所述刺激的T细胞。在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括将重组核酸分子引入所述组合物的刺激的T细胞中,并且所述核酸分子编码重组蛋白,从而产生包含转导的T细胞的组合物。在一些实施方案中,所述重组蛋白是抗原受体。在一些实施方案中,所述重组蛋白是嵌合抗原受体。在一些实施方案中,所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,所述CAR还包含连接所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[0142] 在任何前述实施方案中,所述重组核酸的引入可以通过用病毒颗粒转导来实现。在任何前述实施方案中,所述重组核酸的引入通过用编码所述重组蛋白的核酸的病毒颗粒转导来实现。

[0143] 在任何前述实施方案中,可以在所述孵育之前、期间或之后将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。在一些实施方案中,在所述孵育期间将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。在一些实施方案中,在所述孵育之后将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。

[0144] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含所述转导的T细胞的组合物。

[0145] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括在用于病毒整合的条件下培育包含转导的细胞的组合物,从而产生包含培育的T细胞的组合物。在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括在用于病毒整合的条件下孵育包含转导的细胞的所述组合物。

[0146] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括在用于扩增T细胞的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物。

[0147] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括在基本上不扩增T细胞的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物。

[0148] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含培育的T细胞的所述组合物。

[0149] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括配制所述输出组合物的细胞用于低温保存和/或施用至受试者,任选地在药学上可接受的赋形剂的存在下进行。在一些实施方案中,在低温保护剂的存在下配制所述输出组合物的细胞。

[0150] 在任何前述实施方案中,所述方法的至少一个或所有步骤可以在封闭系统中进行。在一些实施方案中,所述封闭系统是自动化的。

[0151] 在任何前述实施方案中,所述样品可以是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周

血单个核细胞 (PBMC) 样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的。在一些实施方案中,所述单采术或白细胞单采术产物是从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。

附图说明

[0152] 图1A和图1B提供用于柱色谱的示例性外壳组件的示意图。图1A显示所述示例性外壳组件包含温度控制构件,所述温度控制构件包含具有用于外部热水供应的入口和出口的加热盘管;以及用于螺纹连接式 (screw-on) 空气过滤器的供气连接器。图1B显示在示例性柱色谱系统中的示例性外壳组件。

[0153] 图2提供用于刺激和选择靶细胞的示例性实施方案的示意图,其中所述刺激是通过细胞的孵育进行的,所述孵育至少部分在支持物36 (此处描绘为固定相) 的存在下进行,所述支持物上固定有用于细胞选择的选择试剂31的一个或多个组分 (小图A),所述选择试剂具有用于选择剂32的结合位点,所述选择剂能够与一些或所有靶细胞上存在的分子 (选择标记) 34结合。在选择试剂与选择剂借以可逆结合 (例如,经由结合位点) 的条件下将选择剂32添加至固定有选择试剂31的支持物,生成选择剂多聚化于其上的寡聚复合物 (小图B)。所述选择剂可以包括超过一种药剂。可替代地,可以将选择剂与选择试剂的可逆结合复合物作为用于固定的复合物添加至固定相。如所示,将包括靶细胞在内的细胞33与固定相和多聚化选择剂复合物组合,借此靶细胞经由选择剂32和试剂 (选择标记) 34变得可逆固定至支持物36 (小图C)。任选地,在刺激剂之前或在此之后去除未结合的细胞。在刺激剂35借之与靶细胞上的分子特异性结合的条件下添加含有与寡聚刺激试剂37可逆结合的多聚化刺激剂35的复合物,从而诱导或调节表达所述标记的固定的靶细胞中的信号 (小图D)。

[0154] 图3A和图3B显示对来自三个不同供体的T细胞的WST代谢测定的结果,所述T细胞与在不同批次的寡聚试剂上多聚化的抗CD3/抗CD28一起孵育。图3A总结与平均流体动力学半径为36nm或101nm的含有在寡聚骨架上多聚化的抗CD3/抗CD28的参考批次相比,所测试所有批次的如通过WST比率指示的WST代谢活性 (合并的)。单独测试批次和参考试剂的来自不同供体的T细胞的如通过平均WST比率指示的平均WST代谢活性显示于图3B中。

[0155] 图4提供示例性柱上T细胞选择和刺激过程的示意图。

[0156] 图5显示使用具有加热元件和供气元件的示例性热/气柱的洗脱效率是使用参考柱的洗脱效率的大约两倍。估计值 (灰色条形) 是假定100%效率下可以洗脱的捕获细胞的理论数量。

[0157] 图6显示在使用具有加热元件和供气元件的示例性柱进行柱上T细胞选择和刺激后,起始材料、阴性级分或阳性级分中的细胞的流式细胞术定量。将所述细胞用识别包括CD3、CD4、CD8、CD45和CD14的表面标记的抗体进行染色。

[0158] 图7A和图7B显示在使用具有加热元件和供气元件的示例性柱进行柱上选择和刺激后T细胞的结果。在将细胞用识别CD3、CD4、CD8以及激活标记CD69和CD25的抗体染色后,在随后的孵育期间的第1天、第2天和第3天,通过流式细胞术监测细胞的细胞数量和细胞表面表达,并且流式细胞术结果显示于图7A中。对随后的孵育之后的细胞数量和倍数扩增的评估显示,选择并刺激的T细胞在第3天已经开始增加数量,如图7B中所示,这与所述细胞增

殖的能力一致。

[0159] 图8A-图8C提供使用低温保存的单采术样品作为起始样品在示例性热/气柱上进行的柱上T细胞选择的结果。图8A显示,与新鲜单采术样品 (APH) 相比,低温保存的单采术样品 (CAPH) 通常具有高单核细胞含量 (大于20%,如通过活CD45+细胞的%所指示)。图8B描绘在起始材料和阳性级分中对CD3或CD14呈阳性的细胞的百分比。使用色谱柱选择的T细胞的数量显示于图8C中,其中进行针对CD3的两次顺序选择。

[0160] 图9提供使用顺序排列的两个相同的示例性热/气柱的选择和刺激运行 (运行1) 以及使用平行排列的两个相同的示例性热/气柱的选择和刺激 (运行2) 的示意图。

[0161] 图10A和图10B提供运行1和运行2中的T细胞选择和刺激的结果的比较。图10A显示对起始材料、阴性级分和阳性级分的流式细胞术分析,其中将细胞用识别包括CD3、CD4、CD8和CD14的表面标记的抗体染色。收获并孵育来自阳性级分的细胞,并且图10B左小图显示在孵育第1天激活标记CD25和CD69在所述细胞中的表达。在孵育期间运行1 (■) 和运行2 (●) 中的细胞数量的代表性结果显示于图10B右小图中。

[0162] 图11A和图11B提供使用浓缩血液样品作为起始样品进行的柱上T细胞选择的结果,其中CD3选择和刺激在平行排列的两个示例性热/气柱上进行。图11A显示对起始材料、阴性级分和阳性级分的流式细胞术分析,其中将细胞用识别包括CD3、CD4、CD8和CD14的表面标记的抗体进行染色。收获并孵育来自阳性级分的细胞,并且孵育的细胞的CD4/CD8和CD25/CD69表达显示于图11B中。

[0163] 图12提供使用 **Sephadex® G-50** 作为示例性热/气色谱柱中的树脂,从全血直接选择T细胞的示例性过程的结果。将来自CD3+ T细胞选择的起始材料、阴性级分和阳性级分用碘化丙啶 (PI) 和CD3抗体染色并通过流式细胞术定量。

[0164] 图13显示在使用相应分子作为选择标记将细胞固定在色谱柱的固定相上时,使用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的24小时柱上刺激对CD3、CD4和CD8表面表达的作用 (以平均荧光强度MFI来评估)。将表面表达模式与不涉及使用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的柱上刺激的对照条件相比较。从施加至固定相的单采术样品分离细胞。

[0165] 图14显示在使用CD3作为选择标记将细胞固定在柱上时,在用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂进行柱上刺激后,TCR/CD3复合物的下调和重新表达的示例性动力学。从施加至固定相的单采术样品分离细胞。使用针对 α - β TCR链的抗体来评估CD3/TCR复合物。

[0166] 图15A-图15B显示培养的T细胞的表型和功能特征,所述T细胞在用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂进行柱上刺激期间自发脱附。图15A从左到右显示在柱上刺激后24小时和5天的T细胞大小以及CD3、CD69和CD25表达。图15B显示自发脱附的培养的T细胞的增殖能力,如通过细胞数量和倍数扩增所指示。从施加至固定相的单采术样品分离细胞并使用洗涤步骤进行收集。

[0167] 图16A-图16D显示在存在或不存在化合物63的情况下将T细胞与抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂一起孵育对mTor信号传导和活力和生长动力学的示例性作用。图16A显示依据记忆子集,活CD8+ T细胞中的pS6表达。图16B显示依据如所指示的治疗,总CD8T细胞的pS6表达的平均荧光强度 (mfi)。图16C-图16D分别显示在刺激开始 (“输入”) 后,随培养时间 (如按天数指示;d1等) 变化的活力和总T细胞数量。在图16C-图16D中,黑线对应于在化合物63的存在下孵育的T细胞组合物,并且灰线对应于在不存在化合物63的情况下孵育的T细胞组

合物。

[0168] 图17A-图17F显示低温保存的CAR-T细胞的示例性功能和表型特性,所述CAR-T细胞是使用采用在存在或不存在化合物63的情况下与抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂一起孵育的方法生成的。图17A显示在解冻时胰蛋白酶的细胞内表达。图17B和图17D分别显示依据CD27和/或CCR7的子集表达,CD8 CAR-T细胞和CD4 CAR-T细胞表型谱。图17C和图17E分别显示在用携带抗原的靶标刺激的CD8 CAR-T细胞与CD4 CAR-T细胞中,细胞内IL2、IFN γ 或TNF(左小图)或者IL2和/或IFN γ 或TNF的组合(右小图)。图17F显示对于用抗CAR珠刺激的CAR-T细胞,12天中的扩增和存活(左小图)以及通过生长曲线下面积(AUC,右小图)计算的总扩增度量。

[0169] 图18A显示在使用柱上刺激过程或实施例11中描述的替代性过程进行细胞选择后,CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞产量。图18B-图18C显示在使用柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程后回收的细胞总数(图18B)和活细胞的百分比(图18C)。

[0170] 图19A-图19D显示对于柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程,在培养第5天(从所述过程开始的第8天),活细胞的百分比(例如,纯度;图19A)、表达示例性CAR的活细胞的百分比(图19B)、在选择时和在所述过程的第8天表达CD4的活细胞的百分比(图19C)以及每个供体的T细胞表型分布(百分比)(图19D)。

[0171] 图20显示在用使用柱上刺激或如实施例11中所述的替代性过程工程化的抗CD19 CAR T细胞培养期间以及在对照条件下,随时间而变的CD19+HEK细胞裂解。

[0172] 图21A-图21C显示使用柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程工程化的CD4和CD8 T细胞的抗原特异性CAR T细胞IFN γ (图21A)、IL-2(图21B)和TNF α (图21C)产生。

[0173] 图22A-图22C显示使用柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程生成的CD4:CD8比率(图22A)、工程化T细胞的转导效率(组合的CD4和CD8细胞;图22B)以及活细胞的百分比(图22C)。每种过程显示三次制造运行。

[0174] 图23显示在向小鼠注射(i.v.)B细胞淋巴瘤细胞系(Raji)之后6天以及在用CAR-T细胞组合物治疗小鼠之前,依据治疗组之间的平均辐射率获得的肿瘤大小。治疗组涉及对于柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程,通过三次制造运行产生的CAR-T细胞组合物。

[0175] 图24显示对于每个治疗组,在注射B细胞淋巴瘤细胞系(Raji)的小鼠中随时间变化的肿瘤负荷。显示对于柱上刺激或实施例11中描述的替代性过程以及三次制造运行(参见图22A-图22C)中每一次的CAR T细胞治疗效果。

[0176] 图25-图28提供用于柱色谱的示例性外壳组件的示意图。该示例性外壳组件包括入口外壳构件、出口外壳构件、侧壁构件和夹套构件,所述夹套构件包围所述侧壁构件以及所述入口外壳构件和所述出口外壳构件的部分。示例性外壳组件的夹套构件由两个夹套部件制得,每个夹套部件含有具有用于外部热水供应的入口和出口的加热盘管。两个夹套部件一起形成夹套构件。示例性外壳组件还包括用于螺纹连接式空气过滤器(未显示)的供气连接器,所述供气连接器连接至入口外壳构件的入口。图25显示示例性外壳组件的分解图。图26A-图26C显示一个夹套部件的内部(图26A)、侧面(图26B)和外部(图26C)的视图。图27显示示例性外壳组件的视图使得用于外部热水供应的入口以及入口外壳构件的入口的一部分是可见的。图28显示示例性外壳组件的视图使得用于外部热水供应的出口以及出口外壳构件的出口的一部分是可见的。该示例性外壳组件的可选特征(未显示)包括配置为分离

所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件(例如,编织聚酯网)、配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件(例如,编织聚酯网)以及管道组连接器。

[0177] 图29-图31提供用于柱色谱的示例性外壳组件的示意图。该示例性外壳组件包括入口外壳构件、出口外壳构件、侧壁构件和夹套构件,所述夹套构件包围所述侧壁构件以及所述入口外壳构件和所述出口外壳构件的部分。示例性外壳组件的夹套构件由三个夹套部件制得,每个夹套部件含有包括金属板的电加热元件。三个夹套部件一起形成夹套构件。示例性外壳组件还包括用于螺纹连接式空气过滤器(未显示)的供气连接器,所述供气连接器连接至入口外壳构件的入口。图29显示示例性外壳组件的分解图。图30A-图30C显示一个夹套部件的三个视图。图30D显示电加热元件。图31显示示例性外壳组件的视图使得电加热元件的电连接以及出口外壳构件的出口的一部分是可见的。该示例性外壳组件的可选特征(未显示)包括配置为分离所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件(例如,编织聚酯网)、配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件(例如,编织聚酯网)以及管道组连接器。

[0178] 图32显示在使用CD27作为选择标记将细胞固定在加热柱的固定相上并用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂进行柱上刺激之后,细胞的CD27表面表达。使用含有两个加热盘管的夹套构件加热所述柱,每个加热盘管具有用于外部热水供应的入口和出口。加热柱还包括用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器。作为对照,不使CD27选择的细胞经历使用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的柱上刺激。从施加至固定相的单采术样品分离细胞。

[0179] 图33显示使用两个单独的柱从单采术样品顺序分离的细胞的CD3和CD27表面表达。在第一柱中使用CD27作为选择标记,并且将第一柱的阳性级分传递到具有CD3选择标记的第二柱。用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂刺激第二柱中固定的细胞。使用含有两个加热盘管的夹套构件加热第二柱,每个加热盘管具有用于外部热水供应的入口和出口。加热柱还包括用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器。

[0180] 图34A-图34E显示在使用不同加热元件加热的色谱柱中进行柱上刺激后,细胞的CD3+耗尽(图34A)、CD4和CD8表达(图34B)、CD69表达(图34C)、活力(图34D)和活细胞数量(图34E)。使用含有两个加热盘管(水)或三个金属板作为电加热元件(金属)的夹套构件来加热柱。柱还包括用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器。

具体实施方式

[0181] 在一些方面,本文提供用于柱色谱的外壳组件。在一些方面,用于柱色谱的外壳组件包含入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:色谱柱,所述色谱柱包含配置为容纳固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中,所述色谱柱包含入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。在一些方面,所述温度控制构件包含一个或多

个加热元件。在一些方面,所述外壳组件还包含有所述温度控制构件的夹套构件,所述温度控制构件包含所述一个或多个加热元件中的至少一个。在一些方面,所述夹套构件包围所述入口外壳构件的至少一部分和/或所述出口外壳构件的至少一部分。在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件。在一些方面,所述夹套构件配置为包围色谱柱的至少一部分。在一些方面,本文提供一种装置,其包含色谱柱外壳组件和其中容纳的固定相以形成色谱柱。在一些方面,所述固定相配置为将靶细胞固定于其上。在一些方面,所述装置配置为选择和/或刺激细胞或细胞群。在一些实施方案中,一个或多个选择的和/或刺激的细胞可用于细胞制造过程中,例如,用于一个或多个细胞的基因工程化以制造细胞疗法。

[0182] 用于生成用于细胞疗法中的合适的细胞群(例如,选择的(富集的)和刺激的细胞群)的方法通常需要单独的选择和刺激步骤,这可能会延长制造过程。不同的试剂和系统可用于生成适用于细胞疗法中的细胞群,如工程化以表达重组蛋白(例如,嵌合抗原受体))的细胞。然而,在一些方面,使用这些试剂或系统可能需要长时间或相对长时间来生成细胞,至少部分是由于需要进行多个处理步骤所致。多个处理步骤还可能导致细胞应激,从而影响所述细胞在下游处理中的有用性。此外,选择技术可能涉及用选择相关颗粒(如例如,选择剂,如Fab片段)以及用于促进细胞从固定相脱附的竞争试剂和/或游离结合剂污染选择的细胞的步骤,因此需要另外的洗涤步骤和/或介质交换以纯化输出组合物。除了需要大量时间来完成以外,另外的处理步骤可能产生细胞应激,从而潜在地影响下游细胞处理或甚至细胞生物学。需要用于生成细胞组合物的另外的装置和方法。

[0183] 在一些方面,本文提供用于从包含靶细胞(例如,T细胞,如CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)的样品选择细胞和/或刺激选择的细胞的装置和使用所述装置的方法。在一些方面,所述装置包含入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些方面,所述固定相配置为将所述靶细胞固定于其上。在一些方面,所述温度控制构件包含一个或多个加热元件。在一些方面,所述装置还包含有所述温度控制构件的夹套构件,所述温度控制构件包含所述一个或多个加热元件。在一些方面,所述夹套构件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分和/或所述出口外壳构件的至少一部分。本文提供的装置还包括用于从包含靶细胞(例如,T细胞,如CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)的样品选择细胞和/或刺激选择的细胞的夹套构件。在一些方面,所述夹套构件包含配置为向色谱柱提供热量的温度控制构件。在一些方面,所述夹套构件配置为包围所述色谱柱的至少一部分。在一些方面,所述夹套构件包含一个或多个加热元件。

[0184] 在一个方面,本文中发现,当控制固定在柱色谱的内部空腔中的固定相上的细胞的温度以将所述温度维持在为或约37°C或37°C±约5°C时,靶细胞的柱上选择和/或刺激的方法有所改进。本文还发现,允许气体交换的柱配置(例如柱中空气的存在)也改进在柱上选择和/或刺激期间所述细胞的总体健康、适合度或状况。在特定实施方案中,所提供的装置能够通过所提供的柱上方法在细胞的选择和刺激期间控制柱中的温度(例如,37°C或37°C±约5°C)。在特定实施方案中,所提供的装置能够通过所提供的柱上方法在细胞的选择和刺激期间在柱中控制温度(例如,37°C或37°C±约5°C)并允许气体交换(例如,空气的存

在)。在一些方面,所提供的装置可以与用于细胞的选择和/或刺激的方法结合使用,以促进或改进细胞激活和细胞的下游处理,如细胞从固定相脱附或洗脱用于细胞的随后的基因工程化。

[0185] 在一个方面,温度控制构件配置为提供对于固定在柱色谱的内部空腔中的固定相上的靶细胞的选择和/或刺激适当的温度。出于此目的,可以在所述装置中或在包含所述装置的系统中提供加热和/或冷却手段。在一些实施方案中,温度控制构件配置为向所述固定相提供热量,从而调节或维持固定在其上的靶细胞的温度。在一些实施方案中,将靶细胞的温度调节至和/或维持在用于细胞选择和/或刺激的最佳温度。在一个方面,温度控制构件配置为将固定在固定相上的靶细胞的温度维持在用于通过刺激试剂进行刺激的最佳温度。在一些实施方案中,用于刺激的最佳温度高于约2℃、高于约4℃、高于约8℃、高于约12℃、高于约16℃、高于约20℃、高于约24℃、高于约28℃、高于约32℃或高于约36℃。在一些实施方案中,用于刺激的最佳温度为或为约37℃。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在恒定温度值(例如,最佳温度)。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在选定的温度值(例如,最佳温度)±约5℃、±约4℃、±约3℃、±约2℃、±约1℃或±约0.5℃。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在37℃±约5℃、±约4℃、±约3℃、±约2℃、±约1℃或±约0.5℃。

[0186] 在一个方面,所述装置包含配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一个方面,在固定在色谱柱的固定相上的靶细胞的刺激的至少一部分期间,在内部空腔中存在气体。在一些方面,所述气体包含空气。

[0187] 在一些方面,本文提供的装置和方法减少和/或最小化制造过程中的细胞操作和处理时间。在一些方面,所述装置包含配置为刺激固定相上固定的细胞(本文中也称为柱上刺激)的刺激剂。在一些方面,所述装置还包含一个或多个构件,如加热构件和/或供气构件,所述构件有利于或促进细胞激活,从而有利于或促进选择并刺激的细胞从固定相自发脱附。在一些方面,所述装置还包含配置为收集在不使用促进脱附的竞争剂或游离结合剂的情况下从固定相自发脱附(例如,由于刺激)的选择并刺激的细胞的一个或多个构件。在一些方面,本文提供的装置和方法能够组合细胞选择、刺激和/或收集步骤。在一些方面,本文提供的装置和方法不需要单独步骤来促进选择并刺激的细胞从固定相脱附。在一些方面,本文提供的装置和方法不需要单独的纯化步骤,例如,用于去除用于促进脱附的药剂(例如,竞争剂和/或游离结合剂)的步骤。因此,本文提供的装置和方法减少生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增、随后的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞组合物所需的处理步骤的数量,从而缩短制造时间,使潜在的细胞应激降至最低和/或减少污染的可能。在特定实施方案中,本文的装置和方法能够在设定量的时间内,如在24小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。

[0188] 所提供的装置和方法能够从其他组分(如从样品中的其他细胞)选择细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺ T细胞),并且将所述细胞固定在色谱柱的固定相上;刺激固定在固定相上的选择的细胞;以及在不存在用于使所述细胞从固定相脱附和去除用于促进所述脱附的药剂的处理步骤的情况下从选择并刺激的细胞的输出组合物收集选择并刺激的细胞。在特

定方面,与包括单独的选择和刺激步骤并且需要另外的步骤来使细胞从固定相脱附和去除用于促进脱附的药剂的方法相比,所提供的装置和方法能够在缩短量的时间中生成选择并刺激的细胞的群体。在某些方面,所提供的装置和方法能够在柱上开始刺激(本文中也称为柱上刺激)的24小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的繁育、刺激和/或选择)的选择并刺激的细胞输出群体(也称为组合物)。在一些实施方案中,本文的装置的方法涉及使用能够与细胞表面上的分子结合的刺激剂,从而将刺激信号递送至所述细胞。在一些实施方案中,所述刺激剂包含于可被添加至固定相的寡聚刺激试剂中。在一些实施方案中,所述刺激导致选择的细胞从固定相自发脱附,从而允许在不在于使细胞从固定相脱附和去除用于促进所述脱附的药剂的另外的处理步骤的情况下从输出刺激细胞组合物收集选择并刺激的细胞。在特定方面,所述方法成功地在开始柱上刺激的24小时内生成适合于进一步处理(例如,基因工程化、扩增、繁育或随后几轮的刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞的未污染的(例如,不含用于脱附的药剂(例如,竞争剂、游离结合剂)和/或选择剂)组合物。

[0189] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通过引用以其全文并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义矛盾或以其他方式不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0190] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题。

I. 用于细胞选择、刺激和/或工程化的装置和试剂盒

[0191] 在特定方面,本文所提供的装置和方法能够选择和刺激色谱柱的固定相上的靶细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞),其中刺激促进用于细胞选择的分子(即,选择标记)的下调,导致所述细胞从固定相自发脱附。在一些实施方案中,将色谱柱的固定相用能够与靶细胞表面上的分子(例如,选择标记)特异性结合的药剂(例如,选择剂)功能化。以这种方式,在组合包含含有选择标记(例如,CD3、CD4、CD8)的靶细胞的样品与固定相时,靶细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)间接固定至固定相。示例性选择剂和选择试剂描述于章节II-B-1和II-B-2中。在特定方面,靶细胞(例如,T细胞)在固定于固定相上时被刺激(例如,柱上刺激),例如,通过添加刺激剂、包含刺激剂的刺激试剂和/或经由直接或间接偶联至固定相的刺激剂进行刺激。示例性刺激剂和包含刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)描述于章节II-B-1和II-B-2中。因此,在一些方面,所提供的方法和其他实施方案的有利之处在于,它们精简了多个处理步骤(例如,选择和刺激)并且允许精简的过程在同一容器和/或封闭系统内进行,从而可以增加效率 and 无菌度。

[0192] 在某些方面,本文所提供的装置和方法涉及使用包含能够将刺激信号递送至靶细胞(例如,T细胞)的刺激剂的寡聚刺激试剂。用于在体外(如在不存在外源生长因子或少量外源生长因子的情况下)刺激T细胞的现有试剂是已知的(参见例如,美国专利6,352,694 B1和欧洲专利EP 0 700 430 B1)。通常,这样的试剂可以采用直径大于1 μ m的珠(例如,磁珠),各种结合剂(例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)固定至所述珠上。然而,在一些情形中,这样的磁珠例如难以整合至用于在临床试验或治疗目的需要的条件下刺激细胞的方法中,因为必须确保这些磁珠在将扩增的T细胞施加至受试者之前被完全去除。在一些方面,这样的去除(如通过使细胞暴露于磁场)可能减少可用于细胞疗法的活细胞的产量。在某些情形

中,必须将这样的试剂(例如,含有磁珠的刺激试剂)与细胞一起孵育最短时间量,以允许T细胞从刺激试剂充分脱附。此外,由于物理限制,试剂如珠与柱色谱不易相容。

[0193] 利用寡聚刺激试剂的本文所提供的装置和方法克服了这些潜在的限制。例如,在一些实施方案中,所提供的方法包括将未与固体支持物(例如,珠)结合的可溶寡聚试剂添加至固定相以开始刺激。在一些实施方案中,通过使用寡聚试剂来减低或避免通过所述方法生成或产生的残留试剂输出细胞的风险,因为竞争试剂或游离结合剂的添加可以用于从细胞解离(例如,破坏结合)包含刺激剂的寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,这也意味着,与其他方法(如其中必须采取额外措施以确保用于施用的最终群体不含珠的那些方法)相比,符合GMP标准的过程可能更易于建立。因此,在一些方面,如与基于珠的刺激试剂的去除或分离相比,从细胞去除或分离寡聚刺激试剂(如通过添加竞争剂或游离结合剂)导致极少或没有细胞损失。在一些方面,刺激试剂或寡聚刺激试剂去除或分离的时机不受限制或者受限少于基于珠的刺激试剂的去除或分离。因此,在一些方面,可以在所提供的方法期间的任何时间或步骤从细胞去除或分离刺激试剂或寡聚刺激试剂。

[0194] 在一些方面,所提供的装置是用于涉及固定在固定相上的靶细胞的分离、处理或操作的方法(例如,靶细胞的柱上选择和/或刺激的方法)的改进的装置。在一些方面,所提供的装置允许调节固定在固定相上的细胞的温度,例如,加热。在一些方面,所提供的装置允许维持固定的细胞的温度,例如维持在为或约37°C或37°C±约5°C。在一些方面,通过所提供的装置调节和维持细胞的温度改进固定的细胞的柱上刺激,例如,通过改进在柱上刺激期间固定的细胞的总体健康、适合度或状况。在一些方面,所提供的装置还允许气体交换,例如,固定相中空气的存在。在一些方面,如通过所提供的装置允许的气体交换改进在柱上刺激期间固定的细胞的总体健康、适合度或状况。因此,在一些方面,用于与所提供的装置结合使用的所提供的柱上选择和/或刺激的方法提供改进的(例如,更健康的)细胞用于随后的工程化,用于疗法(例如,自体细胞疗法)中。

[0195] 在一些实施方案中,本文提供的装置可以用于进行章节II中描述的任何方法。

[0196] 在特定方面,所提供的方法的持续时间可以从细胞(例如,输入细胞群或样品的T细胞)首次接触或暴露于刺激条件(例如,如本文例如在章节II-D中所述)时起测量,此时在本文中可替代地称为与刺激剂一起孵育或在刺激条件下的开始,例如,如在开始暴露于刺激试剂时。在一些实施方案中,收集含有刺激的靶细胞(例如,CD3+、CD4+、CD8+ T细胞)的输出群体(本文中也称为输出组合物)所需的持续时间是从小开始孵育(例如,添加刺激试剂或暴露于刺激试剂)时起测量。在特定实施方案中,孵育的持续时间为、为约或小于24小时、23小时、22小时、21小时、20小时、19小时、18小时、17小时、16小时、15小时、14小时、13小时、12小时、11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时、4小时、3小时或2小时。在一些实施方案中,所提供的孵育的持续时间为、为约或小于替代或现有过程的75%、60%、50%、40%、30%、25%、15%或10%。

[0197] 本文中考虑,可以进一步处理选择并刺激的细胞的输出组合物。例如,可以将输出细胞基因工程化以表达重组蛋白,如嵌合抗原受体,和/或输出细胞可以经历进一步孵育、刺激、扩增、选择(例如,精细纯化)和/或配制。

[0198] 在某些实施方案中,对样品(如例如,单采术、血沉棕黄层或全血)进行使用所提供的装置的方法。在一些实施方案中,所述样品是生物样品。在一些实施方案中,所述生物样

品是从人受试者收集的。在一些实施方案中,所述生物样品是从患有疾病或病症的患者收集的。在一些实施方案中,对先前从样品分离、富集或选择的细胞(例如,CD4⁺和CD8⁺ T细胞)的群体进行所述方法。在一些实施方案中,样品或从样品分离的细胞可以被低温保存。

[0199] 在一些实施方案中,本文提供用于细胞选择、刺激和/或工程化的装置、试剂盒、系统和/或制品。在一些实施方案中,提供一种用于色谱的固定相的布置。在一些实施方案中,所述布置还包含生物反应器。所述生物反应器适合于细胞的扩增,并且所述固定相适合于细胞分离和柱上刺激。在实施方案中,所述固定相是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含选择试剂,其中所述选择试剂包含与选择剂中包含的结合配偶体C1特异性结合的结合位点Z1,和/或所述选择试剂包含与第二选择剂中包含的结合配偶体C2特异性结合的结合位点Z2。所述固定相由此适合于将第一选择剂和/或第二选择剂、第一结合配偶体C1和/或第二结合配偶体C2固定于其上。另外,所述生物反应器与所述固定相流体连接。该布置可以用于连续扩增并且可以被整合至已知的细胞扩增系统中,所述细胞扩增系统如Quantum®细胞扩增系统或Xuri细胞扩增系统W25。

[0200] 在一些实施方案中,固定相包含于色谱柱中。所述布置还可以包含与第一固定相流体连接的第二固定相。第二固定相可以是凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中所述凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质包含选择试剂,从而适合于将多聚化试剂固定在固定相上。这种类型的布置可以促进靶细胞(例如,T细胞、CD4、CD3、CD8 T细胞)的顺序选择,其中一个柱也适合于如本文所述的柱上刺激。

[0201] 所提供的实施方案在一些方面涉及一种用于细胞组合物的纯化(例如选择)和培养(如刺激或扩增)的装置,其中所述装置包含生物反应器以及如上文所定义的用于色谱的第一固定相或第二固定相的至少一个布置。

[0202] 所述装置还可以包含串联流体连接的生物反应器和固定相的多个布置。

[0203] 所述装置可以包含与色谱的固定相流体连接的样品入口。所述装置还可以包含用于纯化的和刺激的靶细胞的样品出口,所述样品出口与生物反应器和色谱的固定相的至少一个布置中最后一个布置的固定相流体连接。

[0204] 在一些实施方案中,所述装置可以设计为功能封闭系统。

A. 色谱外壳组件

[0205] 在一些实施方案中,本文提供一种适合于本文公开的基于色谱的细胞选择和/或刺激方法的色谱外壳组件(本文中也称为用于柱色谱的外壳组件或外壳组件)。所述色谱外壳组件可以与或不与色谱的固定相一起提供。

[0206] 在一个方面,本文提供一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一个方面,用于柱色谱的外壳组件还包含侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。所述连接器可以设置在所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件上。所述连接器可以是粘结式连接器、螺旋式连接器、鲁尔式连接器(例如,鲁尔锁连接器或鲁尔滑动连接器)、倒钩式连接器或任何组合。在任何前述实施方案中,所述连接器可以配置为密封地接合与所述气体来源流

体连通的管道。在任何前述实施方案中,所述连接器可以包含一个或多个过滤器,和/或所述连接器可以可操作地连接至包含一个或多个过滤器的管道。所述一个或多个过滤器是气体过滤器,例如,空气过滤器。所述一个或多个过滤器可以是无菌过滤器和/或用于通过过滤灭菌的灭菌过滤器。在一个方面,在固定在色谱柱的固定相上的靶细胞的刺激的至少一部分期间,在内部空腔中存在气体。在一些方面,所述气体包含空气。在一个方面,在气体(例如,空气)的存在下刺激细胞(例如,淋巴细胞,如T细胞)促进细胞的细胞激活和下游处理,如细胞从固定相脱附或洗脱和/或细胞的基因工程化。

[0207] 在一些实施方案中,外壳组件的内部空腔可以容纳如下床体积:在或在约1与40mL之间,如在或在约1与35mL之间、1与30mL之间、1与25mL之间、1与20mL之间、1与15mL之间、1与10mL之间、1与5mL之间、5与40mL之间、5与35mL之间、5与30mL之间、5与25mL之间、5与20mL之间、5与15mL之间、5与10mL之间、10与40mL之间、10与35mL之间、10与30mL之间、10与25mL之间、10与20mL之间、10与15mL之间、15与40mL之间、15与35mL之间、15与30mL之间、15与25mL之间、15与20mL之间、20与40mL之间、20与35mL之间、20与30mL之间、20与25mL之间、25与40mL之间、25与35mL之间、25与30mL之间、30与40mL之间、30与35mL之间或35与40mL之间。在一些实施方案中,外壳组件的内部空腔可以容纳在或在约15与25mL之间的床体积。在一些实施方案中,外壳组件的内部空腔可以容纳在或在约15与20mL之间的床体积。在一些实施方案中,外壳组件的内部空腔可以容纳在或在约18与20mL之间的床体积。

[0208] 在一些实施方案中,用于柱色谱的外壳组件包括一个或多个连接器,例如,两个或更多个连接器。在一些实施方案中,用于柱色谱的外壳组件包括两个连接器。在一些实施方案中,所述两个或更多个连接器设置在至少入口外壳构件上。在一些实施方案中,所述两个或更多个连接器设置在至少出口外壳构件上。在一些实施方案中,连接器至少设置在入口外壳构件和出口外壳构件的每一个上。在一些实施方案中,入口外壳构件和出口外壳构件二者具有设置于其上的连接器。

[0209] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度。在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以配置为将所述内部空腔中的所述固定相从起始温度(例如,室温)加热至在约35°C与约39°C之间(例如,为或为约37°C)的目标温度。在一些实施方案中,所述温度控制构件可以配置为将所述固定相加热至在约30°C与约39°C之间的目标温度。在一些实施方案中,起始温度为约2°C、约4°C、约8°C、约12°C、约16°C、约20°C、约24°C、约28°C、约32°C、约36°C或高于约36°C。在一些实施方案中,用于刺激的温度为或为约37°C。在一些实施方案中,目标温度(例如,用于细胞刺激的最佳温度)为高于约2°C、为或高于约4°C、为或高于约8°C、为或高于约12°C、为或高于约16°C、为或高于约20°C、为或高于约24°C、为或高于约28°C、为或高于约32°C、为或高于约36°C、为或高于约37°C、为或高于约38°C、为或高于约39°C或者为或高于约40°C。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在恒定温度值(例如,最佳温度)。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在选定的温度值(例如,最佳温度)±约5°C、±约4°C、±约3°C、±约2°C、±约1°C或±约0.5°C。在一些实施方案中,在刺激的至少一部分期间,将固定在固定相上的靶细胞的温度保持在37°C±约5°C、±约4°C、±约3°C、±约2°C、±约1°C或±约0.5°C。在一些方面,在最佳温度(例如,37°C或37°C±约5°C)刺激细胞(例如,淋巴细胞,如T细胞)促进细

胞的细胞激活和下游处理,如细胞从固定相脱附或洗脱和/或细胞的基因工程化。在一些方面,在最佳温度(例如,37℃或37℃±约5℃)刺激(例如,淋巴细胞,如T细胞)在柱上刺激期间保存或维持细胞的健康。

[0210] 在一些方面,在最佳温度(例如,37℃或37℃±约5℃)且在柱中的空气(例如,空气)存在下刺激细胞(例如,淋巴细胞,如T细胞)促进细胞的细胞激活和下游处理,如细胞从固定相脱附或洗脱和/或细胞的基因工程化。

[0211] 图1A-图1B提供用于柱色谱的示例性外壳组件。在一些方面,外壳组件1包含入口外壳构件2和出口外壳构件3,并且至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相(如树脂4)的内部空腔。在一些方面,外壳组件还包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件,例如,包含加热盘管5的温度控制构件。在一些方面,外壳组件还包含配置为将内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器,例如,气体交换连接器6。在一些实施方案中,连接器设置在入口外壳构件上。在一些实施方案中,连接器设置在出口外壳构件上。在一些实施方案中,入口外壳构件和出口外壳构件二者具有设置于其上的连接器,例如,如图1A中所示,入口外壳构件2和出口外壳构件3二者具有设置于其上的气体交换连接器6。

[0212] 在一些实施方案中,外壳组件还包含侧壁构件。例如,如图1A中所示,入口外壳构件2、出口外壳构件3和侧壁构件7一起形成内部空腔。

[0213] 在一些实施方案中,连接器设置在入口外壳构件上。在一些实施方案中,连接器设置在出口外壳构件上。在一些实施方案中,连接器设置在侧壁构件上。在一些实施方案中,入口外壳构件和侧壁构件二者具有设置于其上的连接器。在一些实施方案中,出口外壳构件和侧壁构件二者具有设置于其上的连接器。在一些实施方案中,入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件中的每一个具有设置于其上的连接器。在一些实施方案中,入口外壳构件具有设置于其上的至少两个连接器。在一些实施方案中,出口外壳构件具有设置于其上的至少两个连接器。在一些实施方案中,侧壁构件具有设置于其上的至少两个连接器。

[0214] 在一些实施方案中,连接器在入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件的任两者之间或所有三者之间形成。在一些方面,连接器在入口外壳构件与出口外壳构件之间形成。在一些方面,连接器在入口外壳构件与侧壁构件之间形成。在一些方面,连接器在出口外壳构件与侧壁构件之间形成。在一些方面,至少一个连接器在入口外壳构件与侧壁构件之间形成,并且至少一个连接器在出口外壳构件与侧壁构件之间形成。

[0215] 在任何前述实施方案中,外壳组件可以包含配置为将内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的多个所述连接器,例如,气体交换连接器6。在一些实施方案中,至少一个连接器可操作地连接至气体来源(直接连接或经由管道间接连接,所述管道任选地包括一个或多个过滤器和/或一个或多个阀),而至少一个其他连接器配置为通气。

[0216] 在任何前述实施方案中,连接器可以是粘结式连接器、螺旋式连接器、鲁尔式(luer)连接器(例如,鲁尔锁连接器或鲁尔滑动连接器)、倒钩式连接器或其任何组合。

在任何前述实施方案中,连接器可以包含公接头或母接头。在任何前述实施方案中,连接器可以配置为密封地接合与所述气体来源流体连通的管道。在任何前述实施方案中,连接器可以包含一个或多个阀。在任何前述实施方案中,连接器可以可操作地连接至包

含一个或多个阀的管道。在任何前述实施方案中,连接器可以包含一个或多个过滤器。

在任何前述实施方案中,连接器可以可操作地连接至包含一个或多个过滤器的管道。在任何前述实施方案中,一个或多个过滤器可以是气体过滤器,例如,空气过滤器。在任何前述实施方案中,一个或多个过滤器可以是无菌过滤器和/或用于通过过滤灭菌的灭菌过滤器。

[0217] 在一些方面,外壳组件包含含有上盖的入口外壳构件。在一些实施方案中,所述上盖可拆卸地附接至所述入口外壳构件或所述侧壁构件。在一些实施方案中,所述上盖与所述入口外壳构件或所述侧壁构件整体形成。在一些实施方案中,连接器设置在上盖上。

[0218] 在任何前述实施方案中,入口外壳构件可以包含可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的一个或多个入口。例如,如图1A中所示,入口外壳构件2包含设置于上盖上的入口,例如,管道组连接器8。在一些实施方案中,连接器和一个或多个入口设置在上盖上的不同位置处,例如,如图1A(下小图)和图1B中所示。在一些实施方案中,连接器和一个或多个入口设置在上盖上的相同位置处。例如,一个或多个入口可以配置为将内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中,同时还配置为可操作地连接至内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中。一个或多个入口可以在色谱期间的某些时间点可控地开启或关闭用于摄入气体,并且在色谱期间的其他时间点可控地开启或关闭用于摄入输入组合物。

[0219] 在一些实施方案中,通过一个或多个入口的流体路径与上盖呈约90度的角,而通过连接器的流体路径与上盖呈约45度的角。

[0220] 在任何前述实施方案中,出口外壳构件可以包含外壳组件的下盖。在一些方面,下盖可拆卸地附接至出口外壳构件或侧壁构件。在其他方面,下盖与出口外壳构件或侧壁构件整体形成。

[0221] 在任何前述实施方案中,所述出口外壳构件可以包含可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物中的一个或多个出口。在一些方面,一个或多个出口设置在下盖上。在一些实施方案中,连接器和一个或多个出口设置在下盖上的不同位置处,例如,如图1A(下小图)中所示。在一些实施方案中,连接器和一个或多个出口设置在下盖上的相同位置处。例如,一个或多个出口可以配置为将内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中,同时还配置为可操作地连接至内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物。一个或多个出口可以在色谱期间的某些时间点可控地开启或关闭用于摄入气体,并且在色谱期间的其他时间点可控地开启或关闭用于从内部空腔排出输出组合物。在一些实施方案中,通过所述一个或多个出口的流体路径与所述下盖呈约90度的角。

[0222] 在任何前述实施方案中,所述气体来源可以是或包含气体储器或外部环境。在任何前述实施方案中,气体来源中的气体可以是无菌的。在任何前述实施方案中,所述气体可以是或包含空气。

[0223] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含可操作地连接至所述气体来源的管道。在一些实施方案中,所述管道配置为将所述内部空腔无菌连接至所述气体来源。在任何前述实施方案中,所述管道可以包含一个或多个阀。在任何前述实施方案中,所述管道可以包含一个或多个过滤器。

[0224] 在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含一个或多个多孔构件,例如,细胞滤网或细胞筛。例如,如图1A(上小图)中所示,外壳组件1包含编织聚酯网9。在一些实施方案中,外壳组件包含位于入口外壳构件2与侧壁构件7之间的第一多孔构件,例如,编织聚酯网9,其配置为分离固定相与内部空腔的入口。在一些实施方案中,外壳组件还包含位于出口外壳构件3与侧壁构件7之间的第二多孔构件,例如,编织聚酯网9,其配置为分离固定相与内部空腔的出口。

[0225] 在任何前述实施方案中,一个或多个多孔构件可以具有约20 μ m的平均孔直径。在任何前述实施方案中,一个或多个多孔构件可以包含具有约20 μ m的网目长度的网。

[0226] 在任何前述实施方案中,温度控制构件可以配置为调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度。在一些方面,温度控制构件配置为在色谱运行期间将所述内部空腔中的所述固定相从起始温度(例如,室温)加热至在约35 $^{\circ}$ C与约39 $^{\circ}$ C之间(例如,为或为约37 $^{\circ}$ C)的目标温度。在一些方面,温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在目标温度。

[0227] 在任何前述实施方案中,外壳组件还可以包含配置为测量所述内部空腔中所述固定相的温度的温度传感器。在一个方面,温度传感器配置为耦合至监测/显示单元。在一些实施方案中,温度传感器配置为电连接至电源。在一些实施方案中,电源位于外壳组件的外部。在一些实施方案中,外壳组件还包括电源。

[0228] 在任何前述实施方案中,温度控制构件可以包含热源。可替代地,在任何前述实施方案中,温度控制构件可以配置为可操作地连接至在外壳组件外部的热源。

[0229] 在一些实施方案中,温度控制构件包括加热元件。在一些实施方案中,加热元件配置为均匀地加热固定相。

[0230] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含选自以下的加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在一个方面,加热元件是电加热元件。在一些实施方案中,所述电加热元件包含金属板、金属棒、金属丝或其组合。在一个方面,加热元件是电磁感应加热元件。在一些实施方案中,所述电磁感应加热元件包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的包围可磁化芯的感应加热线圈。在一个方面,加热元件是非电加热元件。

[0231] 在一些实施方案中,所述非电加热元件包含加热通道,所述加热通道包含用于受热流体(例如,受热液体或气体)的入口和出口。在一些实施方案中,所述加热通道是加热盘管并且所述受热流体是受热的水。例如,如图1A中所示,外壳组件包含加热盘管入口10和加热盘管出口11。在一些实施方案中,用于受热的水的所述入口配置为连接至受热的水的外部储器。

[0232] 在一些实施方案中,加热元件是电加热元件。在一些实施方案中,电加热元件配置为电连接至电源。在一些实施方案中,电源位于外壳组件的外部。在一些实施方案中,外壳组件还包括电源。

[0233] 在一些实施方案中,电加热元件包括金属板。在一些实施方案中,金属板至少部分由导热金属(例如,铝或铜)制得。在一些实施方案中,金属板至少部分由铝制得,例如,完全由铝制得。在一些实施方案中,电加热元件还包括电绝缘层。在一些实施方案中,电绝缘层位于金属板的至少一部分与电加热元件的其他部件的至少一部分之间。

在一些实施方案中,电绝缘层内衬金属板的一个面的至少一部分,例如,完全内衬

金属板的一个面。

[0234] 在一些实施方案中,加热元件的至少一部分与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件的至少一部分与所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件的至少一部分与入口外壳构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件的至少一部分与出口外壳构件的至少一部分接触,例如,直接接触。

[0235] 在一些实施方案中,加热元件与入口外壳构件的至少一部分、出口外壳构件的至少一部分和/或侧壁构件接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件与所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件与侧壁构件接触,例如,直接接触。

[0236] 在一些实施方案中,加热元件的至少一部分不与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触。在一些实施方案中,加热元件不与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触。在一些实施方案中,加热元件不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。

[0237] 在任何前述实施方案中,加热元件可以沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。在一些方面,加热元件设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。在一些方面,加热元件设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。

[0238] 在一些实施方案中,加热元件设置在内部空腔内部。在一些实施方案中,加热元件包括设置在内部空腔内部的非电加热元件。在一些实施方案中,加热元件包括设置在内部空腔内部的加热通道。在一些实施方案中,加热通道包括用于受热流体(例如,受热的水)的入口和出口。在一些实施方案中,用于受热的水的入口配置为连接至受热的水的外部储器。

[0239] 在一些实施方案中,加热元件设置在内部空腔外部。在一些实施方案中,加热元件设置在侧壁构件外部。在一些实施方案中,加热元件包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,加热元件包围(例如,完全包围)侧壁构件。在一些实施方案中,加热元件包围入口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口(例如,可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的一个或多个入口)中的一个的至少一部分通过加热元件来暴露。在一些实施方案中,可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的入口外壳构件的一个或多个入口的至少一部分通过加热元件来暴露。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口中的一个的至少一部分位于加热元件外部。在一些实施方案中,加热元件包围出口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口(例如,可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物中的一个或多个出口)中的一个的至少一部分通过加热元件来暴露。在一些实施方案中,可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物中的一个或多个出口的至少一部分通过加热元件来暴露。在一些

实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口中的一个的至少一部分位于加热元件外部。

[0240] 在一些实施方案中,加热元件包括包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的至少一部分的加热通道。

[0241] 在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的盘管。在任何前述实施方案中,所述加热元件可以包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的加热通道。在任何前述实施方案中,加热元件可以包含包围所述侧壁构件的加热通道。

[0242] 在一些实施方案中,加热元件包围侧壁构件的至少一部分、出口外壳构件的至少一部分和/或入口外壳构件的至少一部分,并且外壳组件还包含在加热元件与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分之间的隔热层。在一些实施方案中,隔热层包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,隔热层包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,隔热层是固体层。在一些实施方案中,隔热层是液体层。在一些实施方案中,隔热层是气体层。在一些实施方案中,隔热层是空气层。

[0243] 在一些实施方案中,温度控制构件包括多个加热元件。在一些实施方案中,温度控制构件包括在或在约2个与10个之间的加热元件、在或在约2个与8个之间的加热元件、在或在约2个与6个之间的加热元件或者在或在约2个与4个之间的加热元件,每个都包含端值。在一些实施方案中,温度控制构件包括两个加热元件。在一些实施方案中,温度控制构件包括三个加热元件。在一些实施方案中,温度控制构件包括四个加热元件。

[0244] 在一些实施方案中,所述多个加热元件配置为均匀地加热所述固定相。在一些实施方案中,所述多个加热元件布置为均匀地加热所述固定相。

[0245] 在一些实施方案中,所述多个加热元件各自选自电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在一些实施方案中,所述多个加热元件是相同的。在一些实施方案中,所述多个加热元件是不同加热元件的组合。

[0246] 在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个非电加热元件。在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个加热通道。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的每一个具有用于受热流体(例如,受热的水)的入口和出口。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的至少两个相互流体耦合。在一些实施方案中,所述多个加热通道相互流体耦合。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的至少一个的入口配置为连接至受热流体(例如,受热的水)的外部储器。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的每一个的入口配置为连接至受热流体的外部储器。

[0247] 在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个电加热元件,例如,包含金属板的电加热元件。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少两个相互电耦合。在一些实施方案中,所述多个电加热元件相互电耦合。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的每一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0248] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与所述入口外

壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与入口外壳构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与出口外壳构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。

[0249] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个与所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个与侧壁构件接触,例如,直接接触。

[0250] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分不与入口外壳构件的至少一部分、出口外壳构件的至少一部分或侧壁构件的至少一部分接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。

[0251] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个设置在内部空腔内部,并且所述多个加热元件中的至少一个设置在内部空腔外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件设置在内部空腔内部。在一些实施方案中,所述多个加热元件设置在内部空腔外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件设置在侧壁构件外部。

[0252] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个设置在内部空腔外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,所述多个加热元件包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个包围入口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,所述多个加热元件包围入口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口的至少一部分通过所述多个加热元件来暴露。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口的至少一部分位于所述多个加热元件外部。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个包围出口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,所述多个加热元件包围出口外壳构件的至少一部分。在一些

实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口的至少一部分通过所述多个加热元件来暴露。在一些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口的至少一部分位于所述多个加热元件外部。

[0253] 在一些实施方案中,所述多个加热元件均匀地或大致均匀地分布在侧壁构件周围。在一些实施方案中,所述多个加热元件均匀地或大致均匀地分布在所述侧壁构件的圆周周围。

[0254] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个包围侧壁构件的至少一部分、出口外壳构件的至少一部分和/或入口外壳构件的至少一部分,并且外壳组件还包含在所述多个加热元件中的至少一个与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分之间的隔热层。在一些实施方案中,隔热层包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,隔热层包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,隔热层是液体层。在一些实施方案中,隔热层是气体层。在一些实施方案中,隔热层是空气层。

[0255] 在一些实施方案中,加热元件设置在侧壁构件外部,并且外壳组件还包括包含加热元件的夹套构件(本文中也称为夹套)。在一些实施方案中,夹套构件包括温度控制构件,所述温度控制构件包括设置在侧壁构件外部的加热元件。在一些实施方案中,夹套构件是如章节I-C中所述的任一种。

[0256] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个设置在侧壁构件外部,并且外壳组件还包括包含所述多个加热元件中的至少一个的夹套构件。在一些实施方案中,夹套构件包括温度控制构件,所述温度控制构件包括所述多个加热元件中的至少一个。在一些实施方案中,所述多个加热元件设置在侧壁构件外部,并且外壳组件还包括包含所述多个加热元件的夹套构件。在一些实施方案中,夹套构件包括温度控制构件,所述温度控制构件包括所述多个加热元件。

[0257] 在一些实施方案中,所述夹套构件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,所述夹套构件包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0258] 在一些实施方案中,夹套构件可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,夹套构件并非可释放地连接在一起。

[0259] 在一些实施方案中,夹套构件配置为包围所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,夹套构件配置为完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,夹套构件包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,夹套构件完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,夹套构件包围入口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口通过夹套构件来暴露。在一些实施方案中,可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的入口外壳构件的一个或多个入口通过夹套构件来暴露。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口位于夹套构件外部。在一些实施方案中,夹套构件包围出口外壳构件的至少一部分。在一

些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口通过夹套构件来暴露。在一些实施方案中,可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物的出口外壳构件的一个或多个出口通过夹套构件来暴露。在一些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口位于夹套构件外部。

[0260] 在一些实施方案中,夹套构件与所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,夹套构件与所述侧壁构件的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,夹套构件与侧壁构件接触,例如,直接接触。

[0261] 在一些实施方案中,夹套构件的至少一部分不与入口外壳构件的至少一部分、出口外壳构件的至少一部分或侧壁构件的至少一部分接触。在一些实施方案中,夹套构件的至少一部分不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。在一些实施方案中,夹套构件不与所述入口外壳构件、所述出口外壳构件或所述侧壁构件接触。

[0262] 在一些实施方案中,夹套构件包括非电加热元件,例如,包括用于受热流体的入口和出口的加热通道。在一些实施方案中,夹套构件包括多个非电加热元件。在一些实施方案中,夹套构件包括用于受热流体的入口的至少一个开口。在一些实施方案中,夹套构件包括用于受热流体的出口的至少一个开口。在一些实施方案中,夹套构件包括用于受热流体的一个或多个入口的至少两个开口。在一些实施方案中,夹套构件包括用于受热流体(例如,受热的水)的一个或多个出口的至少两个开口。在一些实施方案中,夹套构件配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0263] 在一些实施方案中,夹套构件包括电加热元件,例如,包括金属板的电加热元件。在一些实施方案中,夹套构件包括多个电加热元件。在一些实施方案中,夹套构件布置为使得电加热元件或多个电加热元件配置为电连接至电源。

[0264] 在一些实施方案中,夹套构件包括配置为测量内部空腔中的固定相的温度的至少一个温度传感器。在一些实施方案中,温度传感器配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0265] 在一些实施方案中,夹套构件包括一个或多个夹套部件。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为一起形成夹套构件。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件的至少一部分、所述出口外壳构件的至少一部分和/或所述侧壁构件的至少一部分。

[0266] 在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为包围所述侧壁构件的至少一部分,例如,完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为完全包围所述侧壁构件。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为包围入口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口通过一个或多个夹套部件来暴露。在一些实施方案中,入口外壳构件的一个或多个入口位于一个或多个夹套部件外部。在一些实施方案中,一个或多个夹套部件配置为包围出口外壳构件的至少一部分。在一些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口通过一个或多个夹套部件来暴露。在一些实施方案中,出口外壳构件的一个或多个出口位于一个或多个夹套部件外部。

[0267] 在一些实施方案中,夹套构件包括两个或更多个夹套部件,例如在或在约2个与10个之间的夹套部件、2个与8个之间的夹套部件、2个与6个之间的夹套部件或2个与4个之间的夹套部件,每个都包含端值。在一些实施方案中,夹套构件包括两个夹套部件。

在一些实施方案中,夹套构件包括三个夹套部件。在一些实施方案中,夹套构件包括四个夹套部件。

[0268] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包括加热元件。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括加热元件。

[0269] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包括温度传感器。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括温度传感器。

[0270] 在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包括非电加热元件。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包括用于受热流体(例如,受热的水)的具有入口和出口的加热通道。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括用于受热流体(例如,受热的水)的具有入口和出口的加热通道。

[0271] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道相互流体耦合。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的加热通道相互流体耦合。

[0272] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少一个包括用于受热流体(例如,受热的水)的入口的开口。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括用于流体(例如,受热的水)的入口的开口。

[0273] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的加热通道的至少一个入口配置为连接至受热流体的外部储器。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的加热通道的每个入口配置为连接至受热流体的外部储器。

[0274] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少一个包括用于受热流体(例如,受热的水)的出口的开口。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括用于流体(例如,受热的水)的出口的开口。

[0275] 图25-图28提供用于柱色谱的示例性外壳组件的示意图。图25中所示的示例性外壳组件1包括入口外壳构件2、出口外壳构件3和侧壁构件7,它们形成配置为容纳固定相的内部空腔。外壳组件1还包括用于螺纹连接式空气过滤器(未显示)的供气连接器以及包括加热盘管5的温度控制构件,如图26A-图26C中所示。加热盘管5含于由两个夹套部件12制得的夹套构件中。夹套部件12配置为一起完全包围侧壁构件7并包围入口外壳构件2和出口外壳构件3中的每一个的至少一部分。每个夹套部件12包括入口沟13,使得夹套构件暴露入口外壳构件2的入口。每个夹套部件12还包括出口沟14,使得夹套构件暴露出口外壳构件3的出口。

[0276] 图26A-图26C显示夹套部件12的内部、侧面和外部视图。如图26A-图26C中所示,每个夹套部件12包括用于受热流体(例如,受热的水)的加热盘管5。夹套构件的两个加热盘管5配置为一起完全包围侧壁构件7并包围入口外壳构件2和出口外壳构件3中的每一个的至少一部分。每个夹套部件12还包括加热盘管的加热盘管入口10和加热盘管出口11的开口。如图27中所示,加热盘管入口10与入口外壳构件2的入口平行。如图28中所示,加热盘管出口11与出口外壳构件3的出口平行。

[0277] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含电加热元件,

例如,包括金属板的电加热元件。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含电加热元件。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包含电加热元件。

[0278] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个的电加热元件相互电耦合。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的电加热元件相互电耦合。

[0279] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的每一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0280] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个的至少一个电加热元件配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的每个电加热元件配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0281] 图29-图31提供用于柱色谱的示例性外壳组件的示意图。图29中所示的示例性外壳组件1包括入口外壳构件2、出口外壳构件3和侧壁构件7,它们形成配置为容纳固定相的内部空腔。外壳组件1还包括用于螺纹连接式空气过滤器(未显示)的供气连接器以及包括包含金属板的电加热元件17的温度控制构件。电加热元件17是由三个夹套部件12制得的夹套构件的部分。夹套部件12配置为一起完全包围侧壁构件7并包围入口外壳构件2和出口外壳构件3中的每一个的至少一部分。每个夹套部件12包括入口沟13,使得夹套构件暴露入口外壳构件2的入口。每个夹套部件12还包括出口沟14,使得夹套构件暴露出口外壳构件3的出口。

[0282] 图30A-图30C显示夹套部件12的三个视图。每个夹套部件12包括电加热元件17和温度传感器18。每个电加热元件17配置为经由加热元件电连接16电连接至电源,并且每个温度传感器配置为经由温度传感器电连接20电连接至电源。如图30D中所示,电加热元件17还包括电绝缘层19和铝型材21。将每个电加热元件17安装至夹套部件12中的安装点15处。电加热元件17和夹套部件12配置为使得电加热元件17均匀地分布在侧壁构件7的圆周周围。如图29中所示,加热元件电连接16和温度传感器电连接20与出口外壳构件3的出口在夹套构件的同一面上暴露。

[0283] 在一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0284] 在一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为调节或维持所述固定相的温度并且包含沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0285] 在另一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有金属板的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0286] 在另一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为调节或维持所述固定相的温度的温度控制构件,其中所述温度控制构件包含配置为向所述固定相提供热量的两个加热盘管;包含有所述两个加热盘管的温度控制构件的夹套构件,其中所述夹套构件可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的至少一部分,并且所述两个加热盘管完全包围所述侧壁构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0287] 在另一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为调节或维持所述固定相的温度的温度控制构件,其中所述温度控制构件包含三个电加热元件,所述电加热元件各自包含金属板并且配置为向所述固定相提供热量;包含有所述三个电加热元件的温度控制构件的夹套构件,其中所述夹套构件可释放地连接在一起以包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的至少一部分,并且所述两个加热盘管完全包围所述侧壁构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0288] 在又另一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有加热盘管的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中,所述加热盘管包含用于受热的水的入口和出口。在一些方面,所述加热盘管包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件。

[0289] 在一个方面,本文公开一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的加热元件的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0290] 在任何前述实施方案中,所述气体过滤器可以是空气过滤器并且所述无菌气体可以是无菌空气。在任何前述实施方案中,所述外壳组件还可以包含所述气体过滤器。

[0291] 本文还公开一种外壳组件组,其包含多个本文公开的外壳组件。所述外壳组件组可以包含顺序排列的所述多个外壳组件中的至少两个。所述外壳组件组可以包含平行排列

的所述多个外壳组件中的至少两个。

[0292] 本文还公开一种色谱系统,其包含任何本文公开的外壳组件以及至少一个另外的色谱柱。在一些实施方案中,所述至少一个另外的色谱柱不包括温度控制构件。在一些实施方案中,所述至少一个另外的色谱柱不包括配置为将所述至少一个另外的色谱柱的内部空腔可操作地连接至气体来源的连接器的。

B. 色谱试剂盒、柱和柱组

[0293] 在一些实施方案中,本文还公开一种色谱试剂盒,其包含本文公开的外壳组件或外壳组件组和柱色谱的固定相。在一些实施方案中,所述外壳组件或所述外壳组件组是如章节I-A中所述的任一种。在一些实施方案中,所述色谱试剂盒还包含一种或多种刺激剂或刺激试剂。在一些实施方案中,所述一种或多种刺激剂或刺激试剂是如章节II-B-1或II-B-2中所述的任一种。

[0294] 在一些实施方案中,本文还公开一种色谱柱或色谱柱组,其包含本文公开的外壳组件或外壳组件组,以及在一个或多个所述外壳组件的内部空腔中的柱色谱的固定相。在一些实施方案中,所述外壳组件或所述外壳组件组是如章节I-A中所述的任一种。

[0295] 在一些实施方案中,本文还公开一种色谱柱,其包括夹套构件和色谱柱。在一些实施方案中,所述色谱柱的内部空腔包括柱色谱的固定相。在一些实施方案中,夹套构件是如章节I-C中所述的任一种。

[0296] 在一些实施方案中,本文还公开一种色谱柱组,其包括至少一个夹套构件和多个色谱柱。在一些实施方案中,所述夹套构件是如章节I-C中所述的任一种。在一些实施方案中,所述多个色谱柱中每一个的内部空腔包含柱色谱的固定相。在一些实施方案中,所述多个色谱柱顺序排列。在一些实施方案中,所述多个色谱柱平行排列。在一些实施方案中,所述多个色谱柱可操作地连接。

[0297] 在一些实施方案中,所述多个色谱柱包括第一色谱柱。在一些实施方案中,所述多个色谱柱包括第二色谱柱。在一些实施方案中,所述至少一个夹套构件配置为包围所述第二色谱柱。

[0298] 在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质。所述固定相可以包含非磁性材料、非铁磁性材料或非顺磁性材料。在其他方面,所述固定相选自纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、多糖接枝二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮接枝二氧化硅、聚氧化乙烯接枝二氧化硅、聚(2-羟乙基天冬酰胺)二氧化硅、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺与二醇的共聚物、多糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物及其组合。所述固定相可以包含或者是单片式基质、微粒基质和/或平面基质。

[0299] 在任何前述实施方案中,所述微粒基质可以具有约5 μm 至约200 μm 、约5 μm 至约600 μm 或约5 μm 至约1500 μm 的平均粒径。在任何前述实施方案中,所述固定相可以具有约1nm至约500nm的平均孔径。

[0300] 在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含固定于其上的章节II-B-1中所述的任何药剂。在一些实施方案中,所述药剂直接固定在所述固定相上。在一些实施方案中,所述药剂间接固定在所述固定相上。在一些实施方案中,所述药剂不可逆地固定在所述固定相上。在一些实施方案中,所述药剂可逆地固定在所述固定相上。在一些实施方案中,所述

药剂经由与链霉亲和素结合肽可逆结合的链霉亲和素的突变蛋白可逆地固定在所述固定相上。在一些实施方案中,所述链霉亲和素突变蛋白和/或所述链霉亲和素结合肽是如章节II-B-2中所述的任一种。

[0301] 在任何前述实施方案中,所述固定相可以包含固定在其上的选择剂。在一些方面,所述选择剂能够与一个或多个细胞的表面上的选择标记特异性结合。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞是免疫细胞。在一些方面,所述一个或多个细胞是T细胞。

[0302] 本文中公开一种设备,其包含外壳组件、外壳组件组或者色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,还包含经由入口外壳构件的入口可操作地连接至内部空腔的输入组合物储器。在一些实施方案中,所述输入组合物包含或者是血液或血液源样品。在一些实施方案中,所述输入组合物包含或者是全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的或者从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。在一些实施方案中,所述设备还包含经由所述出口外壳构件的出口可操作地连接至所述内部空腔的输出组合物储器。在一些方面,所述输出组合物包含或者是富集的T细胞。在其他方面,所述富集的T细胞已经在所述色谱柱上进行色谱期间经历刺激。在任何前述实施方案中,所述设备可以是封闭或无菌系统。包括示例性外壳组件1的示例性设备显示于图1B中。

[0303] 本文还公开一种制备色谱柱或色谱柱组的方法,所述方法包括将固定相引入本文公开的外壳组件或外壳组件组中。另外,本文公开一种制备色谱柱或色谱柱组的方法,所述方法包括将色谱试剂盒的固定相引入色谱试剂盒的外壳组件或外壳组件组中。

C. 用于色谱的夹套构件

[0304] 本文提供的装置还包括用于柱色谱的夹套构件。在一些方面,所提供的夹套构件是如下装置,所述装置允许改进的涉及固定在色谱柱的固定相上的靶细胞的分离、处理或操作的方法,例如,靶细胞的柱上选择和/或刺激的方法。在一些方面,所提供的夹套构件允许调节固定的细胞的温度,例如,加热。在一些方面,所提供的夹套构件允许维持固定的细胞的温度,例如维持在为或约37°C或37°C±约5°C。在一些方面,通过所提供的装置调节和维持细胞的温度改进固定的细胞的柱上操作,例如,刺激,例如通过改进在柱上操作期间固定的细胞的总体健康、适合度或状况。

[0305] 在一个方面,所述夹套构件包括配置为包围色谱柱的至少一部分的一个或多个夹套部件。在一些方面,所述色谱柱配置为容纳固定相。在一些方面,所述色谱柱包括固定相。在一些方面,所述夹套构件还包括一个或多个加热元件。在一些方面,所述一个或多个加热元件配置为向所述固定相提供热量。在一些实施方案中,所述一个或多个加热元件配置为温度控制构件的部分。在一些方面,所述温度控制构件配置为调节或维持所述固定相的温度。在一些实施方案中,所述一个或多个加热元件是如章节I-A中所述的任一种。在一些实施方案中,所述温度控制构件是如章节I-A中所述的任一种。

[0306] 在一些方面,所述一个或多个夹套部件配置为可释放地连接在一起以包围所述色谱柱的至少一部分。在其他实施方案中,所述一个或多个夹套部件配置为并非可释放地连接在一起。

[0307] 在一些实施方案中,所述夹套构件配置为包围色谱柱的至少一部分,所述部分可

以容纳如下床体积：在或在约1与40mL之间，如在或在约1与35mL之间、1与30mL之间、1与25mL之间、1与20mL之间、1与15mL之间、1与10mL之间、1与5mL之间、5与40mL之间、5与35mL之间、5与30mL之间、5与25mL之间、5与20mL之间、5与15mL之间、5与10mL之间、10与40mL之间、10与35mL之间、10与30mL之间、10与25mL之间、10与20mL之间、10与15mL之间、15与40mL之间、15与35mL之间、15与30mL之间、15与25mL之间、15与20mL之间、20与40mL之间、20与35mL之间、20与30mL之间、20与25mL之间、25与40mL之间、25与35mL之间、25与30mL之间、30与40mL之间、30与35mL之间或35与40mL之间。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为包围色谱柱的至少一部分，所述部分可以容纳在或在约15与25mL之间的床体积。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为包围色谱柱的至少一部分，所述部分可以容纳在或在约15与20mL之间的床体积。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为包围色谱柱的至少一部分，所述部分可以容纳在或在约18与20mL之间的床体积。

[0308] 在一些实施方案中，所述夹套构件的至少一部分配置为与色谱柱的至少一部分接触，例如，直接接触。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为与色谱柱的至少一部分接触，例如，直接接触。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为与所述色谱柱接触，例如，直接接触。

[0309] 在一些实施方案中，所述夹套构件的至少一部分配置为不与所述色谱柱的至少一部分接触。在一些实施方案中，所述夹套构件的至少一部分配置为不与所述色谱柱接触。在一些实施方案中，所述夹套构件配置为不与所述色谱柱接触。

[0310] 在一些实施方案中，所述夹套构件配置为使得可以在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱之间设置隔热层。在一些实施方案中，所述夹套构件还包括隔热层。在一些实施方案中，所述隔热层配置为设置在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱的至少一部分之间。在一些实施方案中，所述隔热层配置为设置在所述一个或多个夹套部件与所述色谱柱之间。在一些实施方案中，所述隔热层配置为包围所述色谱柱的至少一部分。

[0311] 在一些实施方案中，所述隔热层包括气体层，例如，空气层。在一些实施方案中，所述隔热层包括液体层。在一些实施方案中，所述隔热层包括固体层。

[0312] 在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将含于色谱柱中的固定相加热至在约30℃与约39℃之间（例如，在或在约37℃）的目标温度。在一些实施方案中，起始温度为约2℃、约4℃、约8℃、约12℃、约16℃、约20℃、约24℃、约28℃、约32℃、约36℃或高于约36℃。在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将所述固定相加热至或至约37℃。在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将所述固定相加热至为或高于约2℃、为或高于约4℃、为或高于约8℃、为或高于约12℃、为或高于约16℃、为或高于约20℃、为或高于约24℃、为或高于约28℃、为或高于约32℃、为或高于约36℃、为或高于约37℃、为或高于约38℃、为或高于约39℃或者为或高于约40℃。在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将所述固定相保持在目标温度。在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将所述固定相保持在目标温度±约5℃、±约4℃、±约3℃、±约2℃、±约1℃或±约0.5℃。在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为将所述固定相保持在37℃±约5℃、±约4℃、±约3℃、±约2℃、±约1℃或±约0.5℃。

[0313] 在一些实施方案中，所述温度控制构件可以配置为调节或维持含于色谱柱中的固定相的温度。在一些方面，所述温度控制构件配置为将所述固定相从起始温度（例如，室温）

加热(例如,均匀地加热)至在约30℃与约39℃之间(例如,在或在约37℃)的目标温度。在一些方面,所述温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在所述目标温度。

[0314] 在一些实施方案中,所述夹套构件还可以包括配置为测量所述内部空腔中所述固定相的温度的温度传感器。在一个方面,温度传感器配置为耦合至监测/显示单元。在一些实施方案中,温度传感器配置为电连接至电源。在一些实施方案中,所述电源位于所述夹套构件的外部。在一些实施方案中,所述夹套构件还包括所述电源。

[0315] 在任何前述实施方案中,温度控制构件可以包含热源。可替代地,在任何前述实施方案中,温度控制构件可以配置为可操作地连接至在外壳组件外部的热源。

[0316] 在一些实施方案中,温度控制构件包括加热元件。在一些实施方案中,加热元件配置为均匀地加热固定相。

[0317] 在任何前述实施方案中,所述温度控制构件可以包含选自以下的加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在一个方面,加热元件是电加热元件。在一些实施方案中,所述电加热元件包含金属板、金属棒、金属丝或其组合。在一个方面,加热元件是电磁感应加热元件。在一些实施方案中,所述电磁感应加热元件包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的包围可磁化芯的感应加热线圈。在一个方面,加热元件是非电加热元件。

[0318] 在一些实施方案中,所述非电加热元件包含加热通道,所述加热通道包含用于受热流体(例如,受热液体或气体)的入口和出口。在一些实施方案中,所述加热通道是加热盘管。在一些实施方案中,所述受热流体是受热的水。在一些实施方案中,用于受热的水的所述入口配置为连接至受热的水的外部储器。

[0319] 在一些实施方案中,加热元件是电加热元件。在一些实施方案中,电加热元件配置为电连接至电源。在一些实施方案中,所述电源位于所述夹套构件的外部。在一些实施方案中,所述夹套构件还包括所述电源。

[0320] 在一些实施方案中,电加热元件包括金属板。在一些实施方案中,金属板至少部分由导热金属(例如,铝或铜)制得。在一些实施方案中,金属板至少部分由铝制得,例如,完全由铝制得。在一些实施方案中,电加热元件还包括电绝缘层,例如,在金属板的至少一部分与电加热元件的其他部件的至少一部分之间。在一些实施方案中,电绝缘层内衬金属板的一个面的至少一部分,例如,完全内衬金属板的一个面。

[0321] 在一些实施方案中,加热元件的至少一部分配置为与所述色谱柱的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件配置为与所述色谱柱的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,加热元件配置为与所述色谱柱接触,例如,直接接触。

[0322] 在一些实施方案中,加热元件的至少一部分配置为不与所述色谱柱的至少一部分接触。在一些实施方案中,加热元件配置为不与所述色谱柱的至少一部分接触。在一些实施方案中,加热元件配置为不与所述色谱柱接触。

[0323] 在一些实施方案中,加热元件配置为包围所述色谱柱的至少一部分。

[0324] 在一些实施方案中,温度控制构件包括多个加热元件。在一些实施方案中,温度控制构件包括在或在约2个与10个之间的加热元件、在或在约2个与8个之间的加热元件、在或在约2个与6个之间的加热元件或者在或在约2个与4个之间的加热元件,每个都包含端值。在一些实施方案中,温度控制构件包括两个加热元件。在一些实施方案中,温度控制构件包

括三个加热元件。

[0325] 在一些实施方案中,所述多个加热元件配置为均匀地加热所述固定相。

[0326] 在一些实施方案中,所述多个加热元件各自选自电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。在一些实施方案中,所述多个加热元件是相同的。在一些实施方案中,所述多个加热元件是不同加热元件的组合。

[0327] 在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个非电加热元件。在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个加热通道。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的每一个具有用于受热流体(例如,受热的水)的入口和出口。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的至少两个相互流体耦合。在一些实施方案中,所述多个加热通道相互流体耦合。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的至少一个的入口配置为连接至受热液体的外部储器。在一些实施方案中,所述多个加热通道中的每一个的入口配置为连接至受热液体的外部储器。

[0328] 在一些实施方案中,所述多个加热元件包括多个电加热元件,例如,包含金属板的电加热元件。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少两个相互电耦合。在一些实施方案中,所述多个电加热元件相互电耦合。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的每一个配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0329] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分配置为与所述色谱柱的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个配置为与所述色谱柱的至少一部分接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个配置为与所述色谱柱接触,例如,直接接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件配置为与所述色谱柱接触,例如,直接接触。

[0330] 在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分配置为不与所述色谱柱的至少一部分接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个的至少一部分配置为不与所述色谱柱接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件中的至少一个配置为不与所述色谱柱接触。在一些实施方案中,所述多个加热元件配置为不与所述色谱柱接触。

[0331] 在一些实施方案中,所述多个加热元件配置为均匀地或大致均匀地分布在所述色谱柱周围,例如,所述色谱柱的圆周周围。

[0332] 在一些实施方案中,所述温度控制构件包括非电加热元件,例如,用于受热流体的加热通道。在一些实施方案中,所述温度控制构件包括多个非电加热元件。在一些实施方案中,所述夹套构件包括用于受热流体(例如,受热的水)的一个入口的至少开口和一个出口的至少一个开口。在一些实施方案中,所述夹套构件包括用于受热流体(例如,受热的水)的入口的至少两个开口和/或出口的至少两个开口。在一些实施方案中,夹套构件配置为电连接至电源,例如,位于外壳组件外部或包括在外壳组件中的电源。

[0333] 在一些实施方案中,夹套构件包括电加热元件,例如,包括金属板的电加热元件。在一些实施方案中,所述夹套构件包括多个电加热元件。在一些实施方案中,电加热元件配置为电连接至电源。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少一个配置为电连接

至电源。在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的每一个配置为电连接至电源。

[0334] 在一些实施方案中,所述多个电加热元件中的至少两个相互电耦合。在一些实施方案中,所述多个电加热元件相互电耦合。

[0335] 在一些实施方案中,夹套构件包括两个或更多个夹套部件,例如在或在约2个与10个之间的夹套部件、2个与8个之间的夹套部件、2个与6个之间的夹套部件或2个与4个之间的夹套部件,每个都包含端值。在一些实施方案中,夹套构件包括两个夹套部件。在一些实施方案中,夹套构件包括三个夹套部件。在一些实施方案中,夹套构件包括四个夹套部件。

[0336] 在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含加热元件。在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件各自包含加热元件。

[0337] 在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含温度传感器。在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件各自包含温度传感器。

[0338] 在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含非电加热元件。在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件中的至少两个各自包含用于受热流体(例如,受热的水)的具有入口和出口的加热通道。在一些实施方案中,所述两个或更多个夹套部件各自包含用于受热流体(例如,受热的水)的具有入口和出口的加热通道。

[0339] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少两个的加热通道相互流体耦合。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件的加热通道相互流体耦合。

[0340] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少一个包括用于受热流体(例如,受热的水)的入口的开口。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括用于流体(例如,受热的水)的入口的开口。

[0341] 在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件中的至少一个包括用于受热流体(例如,受热的水)的出口的开口。在一些实施方案中,两个或更多个夹套部件各自包括用于流体(例如,受热的水)的出口的开口。

[0342] 在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为可释放地连接以包围色谱柱的至少一部分的一个或多个夹套部件,其中所述色谱柱配置为容纳固定相;以及包含一个或多个加热元件的温度控制构件,其中:所述一个或多个加热元件配置为向所述固定相提供热量;并且所述温度控制构件配置为调节或维持所述固定相的温度。

[0343] 在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为可释放地连接以包围色谱柱的至少一部分的两个或更多个夹套部件,其中所述色谱柱配置为容纳固定相;以及包含一个或多个加热元件的温度控制构件,其中:所述一个或多个加热元件配置为向所述固定相提供热量;并且所述温度控制构件配置为调节或维持所述固定相的温度。

[0344] 在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为可释放地连接以包围色谱柱的至少一部分的两个夹套部件,其中所述色谱柱配置为容纳固定相;以及包含两个加热元件的温度控制构件,所述加热元件是加热盘管,其中:所述一个或多个加热元件配置为向所述固定相提供热量;并且所述温度控制构件配置为调节或维持所述固定相的温度。

[0345] 在一些方面,本文提供一种用于柱色谱的夹套构件,其包含:配置为可释放地连接以包围色谱柱的至少一部分的三个夹套部件,其中所述色谱柱配置为容纳固定相;以及包含三个加热元件的温度控制构件,所述加热元件是电加热元件,其中:所述一个或多个加热

元件配置为向所述固定相提供热量;并且所述温度控制构件配置为调节或维持所述固定相的温度。

II. 用于选择、刺激和/或工程化细胞的方法

[0346] 使用本文公开的装置,本文提供用于生成细胞的输出群体(也称为输出组合物)(如选择并刺激的CD3⁺ T、CD4⁺ T和/或CD8⁺ T细胞)的方法,所述方法包括用于选择、刺激和收集所述细胞的步骤。在某些实施方案中,本文提供的方法与制造、生成或产生细胞疗法结合使用。在一些实施方案中,生成或产生所述输出组合物(例如,选择并刺激的T细胞)的方法包括用于以下的一个或多个步骤:从受试者分离细胞、在刺激条件下孵育所述细胞以及基因工程化所述细胞。在一些实施方案中,所述方法包括按如下顺序进行的处理步骤,其中从生物样品分离(如选择或分开)输入细胞(例如原代CD4⁺和CD8⁺T细胞)并在刺激条件下孵育且在单一步骤中收集,随后进行基因工程化以将编码重组受体的重组多核苷酸引入所述细胞中,如通过转导或转染来进行;然后将其收集、收获或填充至容器(例如,袋或小瓶)中作为输出群体。在一些实施方案中,任选地在低温保存和储存所述细胞之后,将输出群体的细胞重新引入同一受试者体内。在一些实施方案中,工程化的细胞的输出群体适用于疗法(例如,自体细胞疗法)中。

[0347] 使用本文公开的装置,本文提供用于以下的方法:从包含靶细胞(例如,T细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)的样品选择细胞并将所述靶细胞固定在色谱柱的固定相上,刺激固定相上固定的细胞(本文中也称为柱上刺激),以及在不使用用于促进脱附的竞争剂或游离结合剂的情况下收集和/或洗脱从固定相自发脱附的选择并刺激的细胞。所提供的方法包括涉及以下的方法:从包含靶细胞(例如,T细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)的样品选择细胞并将所述靶细胞固定在色谱柱的固定相上,刺激固定相上固定的细胞,以及通过重力流收集和/或洗脱选择并刺激的细胞。在所提供的实施方案中,刺激色谱柱的固定相上的靶细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)促进用于细胞选择的分子(即,选择标记)的下调,从而导致细胞从固定相自发脱附或释放。细胞的释放或脱附可以在没有任何另外的步骤或试剂的情况下发生。在一些方面,可以通过重力流收集细胞,如通过将介质或其他溶液添加至色谱柱来收集。在特定实施方案中,所添加的介质或其他溶液不含用于促进细胞从固定相脱附的竞争剂或游离结合剂。

[0348] 在特定实施方案中,进行所提供的方法以选择并刺激T细胞。在一些实施方案中,通过将生物样品(例如单采术样品)的细胞添加至固定有或结合有对T细胞或其子集具有特异性的选择剂的亲和色谱基质(例如固定相),从所述样品选择T细胞,例如如章节II.B-1中所述。在所提供的实施方案中,所述方法包括在T细胞的一种或多种刺激剂的存在下刺激固定在固定相上的细胞。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂包括用于在T细胞中递送刺激信号的药剂。在一些实施方案中,刺激信号是经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。在一些实施方案中,刺激剂(例如第一刺激剂)是与CD3结合的药剂,如抗CD3抗体。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂还包括能够进一步刺激或增强T细胞中的信号的第二刺激剂。在一些实施方案中,第二刺激剂能够与一个或多个T细胞上的共刺激分子(例如,CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo- /Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM)特异性结合。在一些实施方案中,第二刺激剂是与CD28结合的药剂,如抗CD28抗体。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂包括抗CD3抗体和

抗CD28抗体,例如,抗CD3 Fab和抗CD28 Fab。在一些实施方案中,将一种或多种刺激剂固定或结合至添加至色谱柱的试剂(例如是刺激试剂)。在特定实施方案中,刺激试剂是可溶聚合或寡聚试剂。例如,将一种或多种刺激剂功能化至寡聚或聚合蛋白,如与固体表面(例如珠)相反。用于所提供的方法中的示例性寡聚刺激试剂描述于本文中,例如章节II.B-2。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是用一种或多种刺激剂(例如抗CD3 Fab和抗CD28 Fab)功能化或多聚化的寡聚链霉亲和素突变蛋白。在所提供的方法中,通过用重力流洗脱或洗涤选择并刺激的细胞来收集选择并刺激的T细胞。

[0349] 在一些实施方案中,所述收集包括用介质(例如无血清培养基)洗涤固定相,所述介质不含用于从固定相洗脱靶细胞(例如T细胞)的竞争剂或游离结合剂。在一些实施方案中,通过重力流收集包括将介质添加至固定相,所述介质不含用于从固定相洗脱T细胞的竞争剂或游离结合剂。在一些实施方案中,含有刺激的T细胞的所述组合物不含竞争剂或游离结合剂。在一些实施方案中,所述竞争剂或游离结合剂是或含有生物素或生物素类似物,例如作为D-生物素的生物素类似物。在一些实施方案中,竞争剂或游离结合剂是D-生物素。在一些实施方案中,用于洗涤柱以通过重力流洗脱细胞的介质是含有重组细胞因子(例如IL-2)的无血清培养基。

[0350] 在一些实施方案中,所述方法还包括将重组核酸分子引入组合物的刺激的T细胞中,其中所述核酸分子编码重组蛋白,从而产生包含转导的T细胞的组合物。在一些实施方案中,所述重组蛋白是抗原受体。在一些实施方案中,所述重组蛋白是嵌合抗原受体。

[0351] 在一些实施方案中,所述方法包括进一步孵育含有刺激的细胞(例如刺激的T细胞)的组合物。在一些实施方案中,所述方法包括进一步孵育含有引入重组受体(例如转导的T细胞)的细胞的组合物。在一些实施方案中,所述进一步孵育是在为或约 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 进行。在一些实施方案中,所述进一步孵育是在不扩增或基本上不扩增细胞的条件下进行。在一些实施方案中,所述进一步孵育是在用于细胞的扩增(例如增殖)的条件下进行。在一些实施方案中,所述进一步孵育是在能够将信号递送至T细胞的另一药剂的存在下进行。在一些实施方案中,所述另一药剂含于用于洗涤固定相的介质中。在一些实施方案中,所述另一药剂能够增强或诱导T细胞、CD4⁺ T细胞和/或CD8⁺ T细胞的增殖。在一些实施方案中,所述另一药剂是选自IL-2、IL-15和IL-7的细胞因子。在一些实施方案中,所述进一步孵育进行如下时间:72小时、不超过48小时、不超过24小时或者不超过12小时。

[0352] 在特定实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供与从细胞的初始或输入群体生成表达重组受体的细胞的输出群体相关的方法。在某些实施方案中,通过组合、混合和/或合并细胞来产生、生成和/或制备输入群体,所述细胞包括来自含有富集的T细胞、富集的CD4⁺ T细胞和/或富集的CD8⁺ T细胞的细胞群(下文中也分别称为富集的T细胞的群体、富集的CD4⁺ T细胞的群体和富集的CD8⁺ T细胞的群体)。在一些实施方案中,细胞的输入群体是组合的、混合的和/或合并的CD4⁺和CD8⁺ T细胞的群体。在某些实施方案中,所提供的方法与基因工程化选择并刺激的细胞(例如,通过转导或转染引入编码重组蛋白的多核苷酸)结合使用。在某些实施方案中,所述方法可以用于从生物样品(例如,全血、单采术)分离选择的细胞以生成富集的T细胞的输入群体,所述生物样品如从受试者获取、收集和/或获得的生物样品。在一些实施方案中,所提供的方法可以与在将细胞工程化、转导和/或培养后收获、收集和/或配制富集的T细胞的群体结合使用。

[0353] 在某些实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供与将异源或重组多核苷酸引入细胞中(例如,转导或转染细胞,如通过本文(例如,在章节II-F中)所述的方法)相关的方法。在特定实施方案中,在基因工程化细胞期间或之后孵育所述细胞,例如,持续足以允许整合编码重组蛋白的异源或重组多核苷酸或允许表达重组蛋白的时间量。在某些实施方案中,将细胞孵育设定或固定量的时间,如大于18小时或小于4天的时间量。在一些实施方案中,在从开始或起始刺激时起设定量的时间内,如在从细胞暴露于刺激剂时起24小时内,开始或起始工程化步骤。

[0354] 在一些实施方案中,一个或多个过程步骤至少部分在无血清培养基中进行。在一些实施方案中,所述无血清培养基是定义的或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,所述无血清培养基是受控培养基,其已经过处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,所述无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,所述无血清培养基可以含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。在一些实施方案中,所述无血清培养基包括细胞因子。在一些实施方案中,所述无血清培养基包括细胞因子或重组细胞因子。在一些实施方案中,所述无血清培养基包括重组IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些实施方案中,所述无血清培养基包括谷氨酰胺。在一些实施方案中,所述无血清培养基包括谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7。

[0355] 在一些实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供如下方法,所述方法的进行使得用于临床用途(例如,过继细胞疗法)的细胞的制备中的一个、多个或所有步骤在不使细胞暴露于非无菌条件的情况下进行。在一些实施方案中,对细胞进行选择、刺激、转导、洗涤和配制,都在封闭、无菌的系统或装置中进行。在一些实施方案中,一个或多个步骤是在封闭系统或装置之外进行。在一些这样的实施方案中,将细胞在无菌条件下从封闭系统或装置转移出去,如通过无菌转移将其转移到单独的封闭系统中。

[0356] 在一些实施方案中,本文提供的方法使用章节I中描述的任何装置来进行。

[0357] 在特定实施方案中,在如本文所提供的方法的任何阶段或步骤之前、期间或之后,可以将样品和/或样品的分离部分(例如,血沉棕黄层、富集的T细胞的群体)收集,配制用于低温保护,冷冻(例如,低温保护)和/或储存在低于0℃、低于-20℃或者等于或低于-70℃或-80℃。在一些实施方案中,可以将细胞储存1、2、3、4、5、6、7、8、9或10天以内的时间量,或1、2、3、4、5、6、7、8周以内的时间量,或至少1、2、3、4、5、6、7或8周的时间量,或者超过8周。在储存后,可以将样品或样品的分离部分解冻,并且可以从过程中的同一点恢复根据所述方法进行处理。在特定实施方案中,在例如作为自体细胞疗法被施用至受试者之前,对富集的T细胞的培育和/或配制的群体进行低温保护和储存。

[0358] 在特定实施方案中,在所述过程的任何阶段或步骤,可以对一部分细胞进行采样或收集,例如,可以在群体保留在封闭系统中时从细胞群(如T细胞群)获取细胞。在某些实施方案中,可以分析这样的细胞的标记、特征或特性,包括但不限于活力、细胞凋亡、激活、刺激、生长和/或消耗。在一些实施方案中,通过自动化过程对细胞进行采样或收集。在一些实施方案中,对采样或收集的细胞的分析是自动化的。在特定实施方案中,所述分析是在无菌条件下在封闭系统中进行。

[0359] 在一些实施方案中,可以将通过所提供的方法产生和/或处理的细胞或细胞群与通过示例性和/或替代性过程处理或产生的细胞或细胞群进行比较。在某些实施方案中,所

述替代性和/或示例性过程可以在一个或多个具体方面不同,但是在其他方面含有与示例性或替代性过程相比较的所提供方法的实施方案或方面的相似或相同的特征、方面、步骤、阶段、试剂或条件。例如,可以将通过所提供的方法生成的选择并刺激的细胞(例如,细胞的输出组合物)与用涉及单独的选择和刺激步骤的过程生成的细胞进行比较,所述过程需要使用竞争剂或游离结合剂来使选择的细胞从固定相脱附。在一些实施方案中,除非另外指定,否则所提供的方法与示例性或替代性过程在其他方面将是类似的和/或相同的,如具有相似或相同的用于选择、富集、刺激、工程化、转染、转导、培育和/或配制的步骤。在一些实施方案中,除非另外指定,否则所提供的方法与替代性过程从相同或相似类型的生物样品和/或相同细胞类型的过程细胞和/或输入细胞选择和/或富集细胞。

[0360] 在一些实施方案中,选择并刺激的细胞是含有刺激的T细胞的组合物,其中所述T细胞是从含有多个T细胞的生物样品(例如单采术或全血样品)选择的。在一些实施方案中,收集和/或洗脱从固定相自发脱附的选择并刺激的细胞是例如在洗涤步骤期间通过重力流来完成。本文提供的方法组合细胞选择、刺激以及收集和/或洗脱步骤,并且不需要促进选择并刺激的细胞从固定相脱附的单独步骤和去除用于促进脱附的药剂(例如,竞争剂和/或游离结合剂)的纯化步骤。因此,所述方法减少生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增、随后的孵育、刺激和/或选择(例如,初始选择和/或精细纯化))的选择并刺激的细胞组合物所需的处理步骤的数量,从而缩短制造时间,使潜在的细胞应激降至最低,并减少污染的可能。

[0361] 在特定实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在24小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在特定实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在或在约12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在特定实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在或在约6、5、4、3或2小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在6小时内或在小于约6小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在5.5小时内或在小于约5.5小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在5小时内或在小于约5小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在4.5小时内或在小于约4.5小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在4小时内或在小于约4小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在3小时内或在小于约3小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在3至6小时内或在小于约3至6小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在4至6小时内或在小于约4至6小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在5至6小时内或在小于约5至6小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法在设定量的时间内,如在4至5小时内或在小于约4至5小时内生成适合于下游处理的选择并刺激的细胞的输出组合物。在一些实施方案中,本文提供

的方法在5天内生成工程化的T细胞的组合物(例如,治疗性细胞组合物)。在一些实施方案中,本文提供的方法在或在约4至5天中生成工程化的T细胞的组合物(例如,治疗性细胞组合物)。在一些实施方案中,本文提供的步骤产生长度为或为约4或5天的制造过程。在一些实施方案中,本文提供的步骤产生长度为约4至5天的制造过程。在一些实施方案中,本文提供的步骤产生长度为或为约4天或长度为 96 ± 6 小时的制造过程。

[0362] 所提供的方法包括用于以下的方法:从其他组分(如从样品中的其他细胞)选择细胞(例如,CD3+、CD4+和CD8+ T细胞),并将所述细胞固定在色谱柱的固定相上;刺激固定在固定相上的选择的细胞;以及在不存在用于使细胞从固定相脱附并去除用于促进所述脱附的药剂(例如,竞争剂或游离结合剂)的处理步骤的情况下收集选择并刺激的细胞从选择并刺激的细胞的输出组合物。在特定实施方案中,所提供的方法包括用于以下的方法:从其他组分(如从样品中的其他细胞)选择细胞(例如,CD3+、CD4+和CD8+ T细胞),并将所述细胞固定在色谱柱的固定相上;刺激固定在固定相上的选择的细胞;以及通过重力流洗脱和/或收集选择并刺激的细胞。

[0363] 在特定方面,所提供的方法与用于生成如用于细胞疗法的工程化的细胞(例如T细胞)的许多现有方法相比有所改进,所述现有方法在细胞选择(例如基于免疫亲和力的选择)之后在刺激细胞之前包括一个或多个另外的步骤。在一些实施方案中,现有方法中存在的所述一个或多个另外的步骤可以包括用于回收或收集选择的细胞的使用竞争试剂或游离结合剂的一个或多个洗脱步骤和/或用于去除选择中所用试剂(例如磁珠试剂或抗体)的步骤。在一些实施方案中,这样的另外的步骤可能延长工程化用于细胞疗法的细胞的过程,和/或可能在所述过程期间产生细胞操作,所述操作可能影响所述细胞的分化状态、活力或细胞数。在特定方面,与包括单独的选择和刺激步骤并且需要另外的步骤来使细胞从固定相脱附和去除用于促进脱附的药剂的方法相比,所提供的方法在缩短量的时间中生成选择并刺激的细胞的群体。

[0364] 在某些方面,所述方法在开始在柱上刺激(本文中也称为柱上刺激)的24小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体(也称为输出组合物)。在一些实施方案中,所述方法在开始在柱上刺激的为或约12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体(例如,输出组合物)。在一些实施方案中,所述方法在或在约6、5、4、3或2小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约3至6小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约4至6小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约5至6小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约4至5小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实

施方案中,所述方法在或在约6小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约5.5小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约5小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约4.5小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约4小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。在一些实施方案中,所述方法在或在约3小时内生成适合于下游处理(例如,基因工程化、扩增和/或随后几轮的孵育、刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞输出群体。

[0365] 在一些实施方案中,所述方法涉及使用能够与细胞表面上的分子结合的刺激剂,从而将刺激信号递送至细胞。在一些实施方案中,刺激剂含于可以添加至固定相的寡聚刺激试剂(例如与抗CD3和抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚物)中。在一些实施方案中,所述刺激导致选择的细胞从固定相自发脱附,从而允许在不在于使细胞从固定相脱附并去除用于促进所述脱附的药剂的另外的处理步骤的情况下从输出刺激细胞组合物收集和/或洗脱选择并刺激的细胞。在一些实施方案中,所述刺激导致选择的细胞从固定相自发脱附或释放,从而允许通过重力流收集和/或洗脱选择并刺激的细胞。在一些实施方案中,依赖重力流从柱(例如,固定相)收集或洗脱自发脱附的细胞。在一些实施方案中,可以使用例如与重力流组合的洗涤步骤从柱(例如,固定相)洗脱自发脱附的细胞。在一些实施方案中,洗涤步骤可以仅包括将细胞培养基(例如无血清培养基)添加至柱,所述细胞培养基如在固定相上添加或固定细胞之前在细胞输入组合物中存在的相同培养基。在特定方面,所述方法成功地在开始柱上刺激的24小时内生成适合于进一步处理(例如,基因工程化、扩增、孵育或随后几轮的刺激和/或选择(例如,精细纯化))的选择并刺激的细胞的未污染的(例如,不含用于脱附的药剂(例如,竞争剂、游离结合剂)和/或选择剂)组合物。还提供制品及其设备

[0366] 可使用不同方法生成适合用于细胞疗法中的细胞群(例如,选择(富集)并刺激的细胞群,工程化以表达重组蛋白(例如,嵌合抗原受体))。然而,在一些方面,这些方法可能需要长或相对长的时间量来生成所述细胞,这至少部分是由于需要进行多个处理步骤所致。多个处理步骤还可能导致细胞应激,从而影响所述细胞在下游处理中的有用性。需要用于生成细胞组合物的另外的方法。

[0367] 在特定方面,所提供的方法是基于如下观察:选择并刺激色谱柱的固定相上的靶细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)(其中刺激促进用于细胞选择的分子(即,选择标记)的下调)导致细胞从固定相自发脱附。在一些实施方案中,将色谱柱的固定相用能够与靶细胞表面上的分子(例如,选择标记)特异性结合的药剂(例如,选择剂)功能化。以这种方式,在将包含含有选择标记(例如,CD3、CD4、CD8)的靶细胞的样品与固定相组合(例如,将样品添加至固定相)时,靶细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)被间接固定至固定相。在特定方

面,靶细胞(例如,T细胞)在固定于固定相上时被刺激(例如,柱上刺激),例如,通过添加刺激剂、包含刺激剂的刺激试剂和/或经由直接或间接偶联至固定相的刺激剂进行刺激。在特定实施方案中,刺激剂包括激活或刺激T细胞的药剂,如抗CD3/抗CD28抗体(例如Fab)药剂。因此,在一些方面,所提供的方法和其他实施方案的有利之处在于,它们精简了多个处理步骤(例如,选择和刺激)和/或消除了处理步骤(例如,去除用于促进脱附的选择试剂和/或药剂的步骤),并且允许精简的过程在同一容器和/或封闭系统中进行,从而可以提高效率 and 无菌度。

[0368] 在某些方面,所述方法涉及使用包含能够将刺激信号递送至靶细胞(例如,T细胞)的刺激剂的寡聚刺激试剂。示例性寡聚试剂包括与能够将刺激信号递送至靶细胞(例如T细胞)的一种或多种抗体或其片段可逆结合或缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是与抗CD3和抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。用于在体外(如在不存在外源生长因子或少量外源生长因子的情况下)刺激T细胞的现有试剂是已知的(参见例如,美国专利6,352,694B1和欧洲专利EP 0 700 430B1)。通常,这样的试剂可以采用直径大于1 μ m的珠(例如,磁珠),各种结合剂(例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)固定至所述珠上。然而,在一些情形中,这样的磁珠例如难以整合至用于在临床试验或治疗目的需要的条件下刺激细胞的方法中,因为必须确保这些磁珠在将工程化的T细胞施用至受试者之前被基本上或完全去除。在一些方面,这样的去除(如通过使细胞暴露于磁场)可能减少可用于细胞疗法的活细胞的产量。在某些情形中,必须将这样的试剂(例如,含有磁珠的刺激试剂)与细胞一起孵育最短时间量,以允许T细胞从刺激试剂充分脱附。此外,由于物理限制,试剂如珠与柱色谱不易相容。

[0369] 所提供的利用寡聚刺激试剂(例如与抗CD3抗体和抗CD28抗体(如Fab)缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚物)的方法克服了这样的潜在限制。例如,在一些实施方案中,所提供的方法包括将未与固体支持物(例如,珠)结合的可溶寡聚试剂添加至固定相以开始刺激。在一些实施方案中,所提供的方法可以包括减少或最小化在工程化用于细胞疗法的细胞的总体过程结束时可能存在的残留寡聚刺激试剂的量的步骤。在一些实施方案中,通过使用寡聚试剂来降低或避免在通过所述方法生成或产生的输出细胞(例如,工程化的细胞)中残留试剂的风险,因为可以使用添加竞争试剂或游离结合剂来将寡聚刺激试剂从含有所述细胞的组合物中的刺激剂解离(例如,破坏其结合)。在一些实施方案中,通过一个或多个洗涤步骤也足以从组合物中的细胞减少或去除寡聚刺激试剂,如不需要添加竞争试剂或游离结合剂,因为寡聚刺激试剂是可溶的。在一些实施方案中,这也意味着,与其他方法(如其中必须采取额外措施以确保用于施用的最终群体不含珠的那些方法)相比,符合GMP标准的过程可能更易于建立。因此,在一些方面,如与去除或分离基于珠的刺激试剂相比,如通过添加竞争剂或游离结合剂或通过一个或多个洗涤步骤从细胞去除或分离寡聚刺激试剂导致极少或没有细胞损失。在一些方面,减少、去除或分离刺激试剂或寡聚刺激试剂的时机不受限制或受限少于基于珠的刺激试剂的去除或分离。因此,在一些方面,可以在所提供的方法期间的任何时间或步骤从细胞减少、去除或分离刺激试剂或寡聚刺激试剂。

[0370] 还提供通过所述方法制备的细胞和群体,包括药用群体和配制品,以及用于进行所述方法的试剂盒、系统和装置。还提供通过所述方法制备的细胞和群体的使用方法,包括治疗方法,如用于过继细胞疗法的方法,以及用于施用至受试者的药用群体。

A. 样品和细胞制备

[0371] 在特定实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供包括从生物样品选择和/或富集细胞的方法。在一些实施方案中,所提供的方法包括从生物样品选择细胞或其群体,所述生物样品如从受试者获得或衍生的那些,所述受试者如患有特定疾病或病症或者需要细胞疗法或者将向其施用细胞疗法的受试者。在一些方面,所述受试者是人,如作为需要特定治疗干预的患者的受试者,所述特定治疗干预如针对其分离、处理和/或工程化细胞的过继细胞疗法。因此,在一些实施方案中,细胞是原代细胞,例如原代人细胞。样品包括直接取自受试者的组织、流体和其他样品。生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过处理的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括源自其的处理样品。

[0372] 在一些方面,样品是血液或血液来源的样品,或者是或源自单采术或白细胞单采术产物。示例性样品包括全血、外周血单个核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、粘膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或源自其的细胞。在细胞疗法(例如,过继细胞疗法)的情况下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0373] 在一些例子中,例如通过单采术或白细胞单采术获得来自受试者的循环血液的细胞。在一些方面,所述样品含有淋巴细胞(包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞)、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0374] 在一些实施方案中,样品是含有T细胞的样品。在一些实施方案中,样品是全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,样品是单采术样品。在一些实施方案中,样品是白细胞单采术样品。

[0375] 在一些实施方案中,洗涤从受试者收集的血细胞以例如去除血浆级分,并将细胞置于适当缓冲液或介质中以用于后续的处理步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞。在一些实施方案中,洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面,根据制造商的说明书,通过半自动“流通式”离心机(例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(如例如不含 Ca^{2+} / Mg^{2+} 的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将所述细胞直接重悬于培养基中。

[0376] 在一些实施方案中,洗涤含有细胞的样品(例如,单采术产物或白细胞单采术产物),以去除在单采术或白细胞单采术期间添加的一种或多种抗凝剂,如肝素。

[0377] 在一些实施方案中,将含有细胞的样品(例如,全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级的T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物、白细胞单采术产物)低温保存和/或低温保护(例如冷冻),并且然后在分离、选择、激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制细胞群和/或将所配制的细胞群施用至受试者的任何步骤之前进行解冻。

[0378] 在特定实施方案中,将单采术产物或白细胞单采术产物低温保存和/或低温保护

(例如冷冻),然后在进行如下所述的细胞选择或分离步骤(例如,T细胞选择或分离步骤)之前进行解冻。在一些实施方案中,使解冻的细胞组合物经历稀释(例如,用无血清培养基)和/或洗涤(例如,用无血清培养基),这在一些情形中可以去除或减少不需要或不期望的组分。在一些情形中,稀释和/或洗涤去除或减少含于解冻样品中的低温保护剂(例如DMSO)的存在,所述低温保护剂原本可能会在延长的室温暴露后对细胞活力、产量、回收率造成负面影响。在一些实施方案中,稀释和/或洗涤允许将解冻的低温保存的产物培养基交换至无血清培养基中,如本文中或在通过引用并入本文的PCT/US2018/064627中描述的无血清培养基。

[0379] 在一些实施方案中,无血清培养基包含补充有一种或多种补充剂的基础培养基(例如OpTmizer™T细胞扩增基础培养基(ThermoFisher))。在一些实施方案中,所述一种或多种补充剂不含血清。在一些实施方案中,无血清培养基包含补充有一种或多种另外的组分的基础培养基,所述另外的组分用于细胞(例如,T细胞)的维持、扩增和/或激活,如通过另外的补充剂(例如OpTmizer™T细胞扩增补充剂(ThermoFisher))所提供。在一些实施方案中,无血清培养基还包含血清替代物补充剂,例如,免疫细胞血清替代物,例如, ThermoFisher (#A2596101)、CTS™免疫细胞血清替代物或Smith等人Clin Transl Immunology.2015年1月;4(1):e31中所述的免疫细胞血清替代物。在一些实施方案中,无血清培养基还包含游离形式的氨基酸,如L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,无血清培养基还包含二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺),如Glutamax™(ThermoFisher)中的二肽。在一些实施方案中,无血清培养基还包含一种或多种重组细胞因子,如重组人IL-2、重组人IL-7和/或重组人IL-15。

[0380] 在一些实施方案中,在使低温保存的和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物经历T细胞选择或分离步骤之后,在任何随后步骤(如激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制细胞群和/或将所配制的细胞群施用至受试者的步骤)期间或之间,不再进行低温保存和/或低温保护步骤。例如,在解冻用于下游过程(如转导)之前,不再对选自解冻的低温保存的和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物的T细胞进行低温保存和/或低温保护。

[0381] 在特定实施方案中,对低温保存的和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物进行存放(例如,在冷冻样品之前不进行细胞选择),这在一些方面可以允许更灵活地进行随后的制造步骤。在一个方面,在选择前存放细胞增加用于下游过程的细胞产量,并且较早存放细胞可能意味着,所述细胞更健康并且可能更易于符合制造成功的标准。在另一个方面,一旦解冻,就可以使低温保存的和/或低温保护的单采术产物或白细胞单采术产物经历一种或多种不同的选择方法。这种方法的优点尤其在于,增强了用于治疗受试者的疾病或病症的细胞疗法的细胞的可用性、功效和/或其他方面,如在所述样品的供体和/或另一接受者中。

[0382] 在一些实施方案中,在供体被诊断为患有疾病或病症之后的时间,在细胞选择之前或在不进行在先细胞选择的情况下(例如,不进行在先T细胞选择,如通过色谱进行选择),收集样品(例如单采术或白细胞单采术样品)并进行低温保存和/或低温保护。在一些方面,低温保存的时间也在供体已经接受以下中的一种或多种之前:用于所述疾病或病症的任何初始治疗、用于所述疾病或病症的任何靶向治疗或针对治疗进行标记的任何治疗、

或者除了辐射和/或化学疗法以外的任何治疗。在一些实施方案中,在疾病的初始治疗后的首次疾病复发之后,以及在供体或受试者接受用于疾病的后续治疗之前,收集样品。所述初始和/或后续治疗可以是除了细胞疗法以外的疗法。在一些实施方案中,所收集的细胞可以用于初始和/或后续治疗后的细胞疗法中。在一个方面,在不进行在先细胞选择的情况下,低温保存的和/或低温保护的样品可以有助于降低前期费用,如与随机化临床试验中的非治疗患者相关的那些费用,所述患者可能发生交叉并且以后需要治疗。

[0383] 在一些实施方案中,在疾病的二线治疗后疾病第二次复发后,以及在供体或受试者接受用于所述疾病的后续治疗之前的时间,在细胞选择前或在不进行在先细胞选择的情况下(例如,不进行在先T细胞选择,如通过色谱进行的选择),收集样品(例如单采术或白细胞单采术样品)并进行低温保存和/或低温保护。在一些实施方案中,例如通过评估某些风险因子,将患者鉴定为可能在二线治疗后复发。在一些实施方案中,所述风险因子是基于疾病类型和/或遗传学,如双打击淋巴瘤、原发性难治性癌症、或激活的B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,所述风险因子是基于临床表现,如一线治疗后的早期复发,或者治疗后的其他不良预后指数(例如,IPI (国际预后指数)>2)。

[0384] 在一些实施方案中,在供体或受试者被诊断为患有疾病之前的时间,在细胞选择前或在不进行在先细胞选择的情况下(例如,不进行在先T细胞选择,如通过色谱进行的选择),收集样品(例如单采术或白细胞单采术样品)并进行低温保存和/或低温保护。在一些方面,可以确定供体或受试者具有患上疾病的风险。在一些方面,供体或受试者可以是健康受试者。在某些情形中,在被认为没有患上疾病的风险或被诊断为未患疾病的情况下,供体或受试者可以选择存放或储存细胞,以免在生命的后期需要细胞疗法。在一些实施方案中,可以基于诸如以下等因素,认为供体或受试者具有患上疾病的风险:基因突变、基因异常、基因破坏、家族病史、蛋白质异常(如蛋白质产生和/或加工的缺陷),以及可能增加患病风险的生活方式的选择。在一些实施方案中,收集细胞作为预防药。

[0385] 在一些实施方案中,将低温保存的和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品)(如尚未经在先细胞选择(例如,没有进行在先T细胞选择,如通过色谱进行的选择)的细胞样品)储存或存放大于或等于12小时、24小时、36小时或48小时的时间段。在一些实施方案中,将样品储存或存放大于或等于1周、2周、3周或4周的时间段。在一些实施方案中,将样品放置于长期储存或长期存放中。在一些方面,将样品储存如下时间段:大于或等于1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、20年、25年、30年、35年、40年或更久。

[0386] 在一些实施方案中,将从供体获取的单采术或白细胞单采术样品在冷却的环境中运输到储存或处理设施,和/或在储存设施中低温储存,或在处理设施中进行处理。在一些实施方案中,在运输之前,例如通过选择T细胞(如CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞)来处理样品。在一些实施方案中,在运输之后且在低温储存样品之前进行这种处理。在一些实施方案中,在低温储存后在使样品解冻后进行所述处理。

[0387] 通过允许供体在所述供体及因此其细胞尚未经过疾病的广泛治疗时和/或在患上疾病或病症或其诊断之前的阶段储存其细胞,与在一轮或多轮治疗后收获的细胞相比,这样的细胞可能具有用于细胞疗法的某些优点。例如,与已经历几轮治疗的细胞相比,在一轮

或多轮治疗之前收获的细胞可能更健康,可能展现更高水平的某些细胞活性,可能生长更快,和/或可能更易接受基因操作。根据本文所述的实施方案的优点的另一个例子可以包括便利性。例如,通过在细胞疗法需要供体细胞之前收集、任选地处理和储存所述供体细胞,如果接受者以后需要所述细胞以及在接受者以后需要所述细胞时,将容易获得所述细胞。这可以增加单采术实验室容量,从而为技术人员安排单采术收集过程提供更高灵活性。

[0388] 用于来自样品(如单采术样品)的细胞的低温储存和处理的示例性方法和系统可以包括国际公开申请号W0 2018170188中所述的那些。在一些实施方案中,所述方法和系统涉及在患者需要细胞疗法之前收集单采术,然后使单采术样品经历低温保存以供随后用于用重组受体(例如CAR)工程化细胞(例如T细胞)的过程中。在一些情形中,这样的过程可以包括本文所述的那些。在一些实施方案中,从受试者收集单采术样品,并且在细胞群的后续T细胞选择、激活、刺激、工程化、转导、转染、孵育、培养、收获、配制和/或将所配制的细胞群施用至受试者之前进行低温保存。在这样的例子中,在使样品经历一个或多个选择步骤(如本文所述的任何步骤)之前,将低温保存的单采术样品解冻。

[0389] 在一些实施方案中,将低温保存的和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品),如尚未经在先细胞选择(例如,不进行在先T细胞选择,如通过色谱进行的选择)的细胞样品解冻,之后将其用于制造用于细胞疗法的细胞群(例如,含有CAR⁺ T细胞的T细胞群)的下游过程中。在一些实施方案中,这种低温保存的和/或低温保护的细胞样品(例如单采术或白细胞单采术样品)与本文所提供的用于工程化T细胞疗法(如CAR⁺ T细胞疗法)的过程结合使用。在特定例子中,在收获/配制步骤之前或期间,不再进行其他低温保存步骤。

B. 药剂和试剂系统

[0390] 在实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供包括使用与生物样品中存在的细胞上的细胞表面标记结合的药剂(选择剂)从生物样品选择和/或富集细胞(例如T细胞)的方法。在所提供的实施方案中,所述生物样品是如章节II.A中所述的任一种。在一些实施方案中,所述生物样品是含有T细胞的样品。在所提供的实施方案中,所述选择剂结合或固定在本文提供的装置的色谱柱中所含的色谱基质(例如固定相)上,并且实现对目的靶细胞(例如T细胞)的特异性选择,如章节II.C中所述,从而将所述靶细胞(例如T细胞)固定至所述色谱基质(例如固定相)。在一些实施方案中,所述选择剂能够经由试剂(例如,选择试剂)与色谱基质(例如,固定相)间接结合。在一些实施方案中,所述选择试剂与柱的固定相共价或非共价结合。在一些实施方案中,所述选择试剂是将所述选择剂可逆固定在色谱基质(例如,固定相)上的试剂。与所提供的装置和方法结合使用的与选择剂结合的示例性选择试剂描述于章节II.B.2中。

[0391] 在一些实施方案中,与选择剂结合的选择试剂提供可逆系统,其中所述选择剂与所述试剂可逆地缔合。用于通过色谱选择细胞的示例性可逆系统包括W02013/124474中所述的那些。在如本文进一步描述的一些实施方案中,所述可逆系统采用由链霉亲和素突变蛋白分子构成的试剂,所述链霉亲和素突变蛋白分子经由选择剂所含的链霉亲和素结合肽结合配偶体与所述选择剂可逆地结合。在一些实施方案中,添加游离结合配偶体或竞争剂(也称为竞争物质)破坏选择剂与试剂之间的结合,从而逆转所述选择剂与所述试剂的结合并从所述选择试剂释放固定的细胞。例如,在链霉亲和素突变蛋白/链霉亲和素结合肽系统

的情形中,示例性竞争剂是生物素或生物素类似物(例如D-生物素)。

[0392] 在一些实施方案中,选择剂在色谱基质上的结合的可逆性不是必需的,因为如本文所提供的色谱基质上固定的细胞的柱上刺激促进用于细胞选择的分子(即,选择标记)的下调,从而导致细胞从固定相自发脱附或释放。因此,细胞的释放或脱附可以在没有任何另外的步骤或试剂的情况下发生。在一些方面,可以通过重力流收集细胞,如通过将介质或其他溶液添加至色谱柱来收集。在特定实施方案中,所添加的介质或其他溶液不含用于促进细胞从固定相脱附的竞争剂或游离结合剂。例如,在链霉亲和素突变蛋白/链霉亲和素结合肽系统的情形中,细胞的释放或脱附可以自发进行,使得可以在将洗涤剂或介质添加至柱之后通过重力流收集所述细胞,其中所述洗涤溶液或介质不含游离结合配偶体或竞争剂,如生物素或生物素类似物(例如D-生物素)。

[0393] 在实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供包括固定在色谱柱上的细胞(例如T细胞)的柱上刺激的方法,如通过选择剂或选择试剂来进行。在所提供的实施方案中,所述刺激使用一种或多种药剂来进行,所述药剂用于刺激细胞以与细胞上的一种或多种受体分子结合,以将信号递送至细胞(一种或多种刺激剂)。在一些实施方案中,所述一种或多种刺激剂用于刺激T细胞并提供初级信号至T细胞(例如经由TCR复合物信号传导)且提供共刺激信号至T细胞(例如经由来自共刺激受体的信号传导)。在一些实施方案中,选择剂和一种或多种刺激剂中的至少一种是不同的。在一些实施方案中,选择剂与一种或多种刺激剂中的每一种是不同的。在一些实施方案中,结合所提供的方法,药剂既可以用作选择剂也可以用作一种或多种刺激剂中的一种。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂结合在将刺激信号递送至细胞的试剂(例如刺激试剂)上。在一些实施方案中,所述试剂含有多个结合位点用于结合一种或多种刺激剂中的每一种,使得刺激剂在所述药剂上发生多聚化。在特定实施方案中,这样的刺激试剂是由多个单独分子,如多个蛋白质单元或复合物构成的寡聚或聚合试剂(例如四聚体)。与所提供的装置和方法结合使用的与一种或多种刺激剂结合的示例性刺激试剂(包括寡聚刺激试剂)描述于章节II.B.2中。在特定实施方案中,在适合于在细胞中递送信号条件下,将刺激试剂添加至含有固定的细胞的色谱柱。例如,柱上刺激是在如本文所述的适当温度下进行,通过将如本文所述和提供的装置加热至适于允许细胞中的细胞信号传导事件的生理温度,如为或约30℃与为或约39℃之间,例如为或约37℃±2℃,如为或约37℃的温度。

[0394] 在一些实施方案中,与一种或多种刺激剂结合的刺激试剂提供可逆系统,其中所述一种或多种刺激剂与所述试剂可逆地缔合。用于刺激细胞的示例性可逆系统包括W02015/158868、W0 2017068421或W0 2018/197949中所述的那些。在一些实施方案中,可逆系统采用由链霉亲和素突变蛋白的寡聚物或聚合物构成的试剂,所述寡聚物或聚合物经由一种或多种刺激剂所含的链霉亲和素结合肽结合配偶体与一种或多种刺激剂可逆地结合。在一些实施方案中,添加游离结合配偶体或竞争剂(也称为竞争物质)破坏一种或多种刺激剂与所述试剂之间的结合,从而逆转一种或多种刺激剂与所述试剂之间的结合,并且终止或破坏通过刺激试剂的一种或多种刺激剂递送的刺激信号。例如,在链霉亲和素突变蛋白/链霉亲和素结合肽系统的情形中,示例性竞争剂是生物素或生物素类似物(例如D-生物素)。

[0395] 在特定方面,使用本文公开的装置,本文提供采用可逆系统的方法,其中能够与细

胞表面上的分子(细胞表面分子)结合的至少一种药剂(例如,选择剂或刺激剂)与试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)可逆地缔合。在一些情形中,所述试剂含有能够与所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)可逆结合的多个结合位点。在一些情形中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是多聚化试剂。在一些实施方案中,至少一种药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有可以特异性结合所述分子的表位或区域的至少一个结合位点B并且还含有与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)的至少一个结合位点Z特异性结合的结合配偶体C。在一些情形中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些实施方案中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(如非共价相互作用)是可逆的。

[0396] 在一些实施方案中,可逆缔合可以在物质的存在下被介导,所述物质如竞争剂或游离结合剂,其是或含有也能够与至少一个结合位点Z结合的结合位点。通常,所述物质(例如竞争剂或游离结合剂)由于与结合配偶体C相比对所述试剂中存在的结合位点Z的结合亲和力更高和/或由于以更高浓度存在而可以用作竞争剂,从而使结合配偶体C从所述试剂脱离和/或解离。在一些实施方案中,所述物质(例如竞争剂或游离结合剂)对至少一个结合位点Z的亲和力大于所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)的结合配偶体C对至少一个结合位点Z的亲和力。因此,在一些情形中,所述试剂的结合位点Z与所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)的结合配偶体C之间的键可以通过添加所述物质(例如竞争剂或游离结合配偶体)来破坏,从而使所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)的缔合是可逆的。

[0397] 可以用于这样的可逆系统中的试剂在本领域中已有描述并且是已知的,参见例如,美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;以及国际公开的PCT申请号W02013/124474和W02014/076277。能够形成可逆相互作用的试剂和结合配偶体以及能够逆转这种结合的物质(例如竞争剂或游离结合剂)的非限制性例子描述于下文中。

1. 药剂

[0398] 在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)具有一个或多个结合位点B,用于与细胞表面上的分子(例如,细胞表面分子)结合。因此,在一些情况下,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有一个结合位点B或多个结合位点B,其中所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)与靶细胞表面上的分子之间的特异性结合含有B与所述分子之间的相互作用。在一些实施方案中,所述药剂仅含有单一结合位点,即是单价的。在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)具有能够与细胞表面分子结合的至少两个(如多个)结合位点B,包括三个、四个或五个结合位点B。在一些这样的方面,至少两个或多个结合位点B可以是相同的。在一些实施方案中,至少两个或多个结合位点B中的一个或多个可以是不同的(例如B1和B2)。

[0399] 在一些实施方案中,一种或多种不同药剂(例如一种或多种不同的例如选择剂或刺激剂或与细胞上的分子结合的其他药剂)与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)可逆结合。在一些实施方案中,至少2、3、4或更多种不同药剂(例如,选择剂或刺激剂)与相同试剂可逆结合。在一些实施方案中,至少两种不同药剂(例如,选择剂或刺激剂)与相同试剂可逆结合,由此每种药剂包含一个结合位点B或多个结合位点B用于所述药剂与所述分子之间

的特异性结合。在一些实施方案中,至少两种或更多种药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有相同结合位点B,例如用于结合相同或基本上相同的分子。在一些实施方案中,至少两种或更多种药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有不同结合位点B,例如用于与不同分子结合。在一些实施方案中,第一药剂(例如,第一选择剂或第一刺激剂)含有结合位点B1、B2、B3、B4等,并且第二药剂(例如,第二选择剂或第二刺激剂)含有结合位点B1、B2、B3、B4等中的另一个。在一些实施方案中,第一药剂(例如第一选择剂)含有结合位点B1,并且第二药剂(例如第二选择剂)含有结合位点B3。在一些实施方案中,第一药剂(例如第一刺激剂)含有结合位点B2,并且第二药剂(例如第二刺激剂)含有结合位点B4。在这样的实施方案中的任一个中,第一药剂和第二药剂可以含有结合配偶体C1或C2。在一些实施方案中,C1与C2可以是相同的。在一些实施方案中,C1与C2是不同的。在一些实施方案中,第一药剂和第二药剂含有相同结合配偶体C1。

[0400] 在一些情形中,所述药剂(例如,经由结合位点B)与所述试剂的结合位点Z之间的结合的解离常数(K_D)可以具有在以下范围中的值:约 10^{-2} M至约 10^{-13} M、或约 10^{-3} M至约 10^{-12} M、或约 10^{-4} M至约 10^{-11} M、或约 10^{-5} M至约 10^{-10} M。在一些实施方案中,结合剂与所述分子之间的结合的解离常数(K_D)具有低亲和力,例如,在约 10^{-3} 至约 10^{-7} M的 K_D 范围内。在一些实施方案中,结合剂与所述分子之间的结合的解离常数(K_D)具有高亲和力,例如,在约 10^{-7} 至约 1×10^{-10} M的 K_D 范围内。

[0401] 在一些实施方案中,所述药剂经由结合位点B与所述分子的结合的解离发生得足够快,例如,以在破坏所述试剂与所述药剂之间的可逆键后,允许靶细胞仅被所述药剂短暂染色或缔合。在一些情形中,当按照所述药剂(经由结合位点B)与所述分子之间的结合的 k_{off} 速率(也称为解离速率常数)来表述时, k_{off} 速率为约 $0.5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1.5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $2 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $3 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $4 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 、约 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $1 \times 10^{-2} \text{sec}$ 或更大、或约 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大。技术人员可熟练地凭经验确定适合于特定药剂与细胞分子相互作用的 k_{off} 速率范围(参见例如,美国公开的申请号US2014/0295458)。例如,可以使用具有例如大于 $4.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 的相当高 k_{off} 速率的药剂,使得在破坏结合复合物后,可以在一小时内去除或解离大部分所述药剂。在其他情形中,可以使用具有例如 $1.0 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 的较低 k_{off} 速率的药剂,使得在破坏结合复合物后,可以在约3个半小时内从细胞去除或解离大部分所述药剂。

[0402] 在一些实施方案中,此键的 K_D 以及在所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)的结合位点B与细胞表面分子之间形成的键的 K_D 、 k_{off} 和 k_{on} 速率可以通过任何合适的手段来确定,例如,通过荧光滴定、平衡透析或表面等离子共振来确定。

[0403] 在一些方面,细胞表面分子是药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以针对的分子。在一些实施方案中,细胞表面分子是肽或蛋白质,如受体,例如,膜受体蛋白。在一些实施方案中,所述受体是脂质、多糖或核酸。在一些实施方案中,作为蛋白质的细胞表面分子可以是外周膜蛋白或整合膜蛋白。在一些实施方案中,细胞表面分子可以具有一个或多个跨膜结构域。作为几个说明性例子,具有跨膜结构域的膜蛋白可以是G蛋白偶联受体,如气味受体、视紫质受体、视紫质信息素受体、肽激素受体、味觉受体、GABA受体、阿片受体、5-羟色胺受

体、Ca²⁺受体、黑视素、神经递质受体(如配体门控的、电压门控的或机械门控的受体,包括乙酰胆碱、烟碱、肾上腺素能、去甲肾上腺素、儿茶酚胺、L-DOPA-、多巴胺和5-羟色胺(生物胺、内啡肽/脑啡肽)神经肽受体)、受体激酶(如丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶)、孔蛋白/通道(如氯离子通道、钾通道、钠通道、OMP蛋白)、ABC转运蛋白(ATP结合盒-转运蛋白)(如氨基酸转运蛋白)、Na-葡萄糖转运蛋白、Na/碘离子转运蛋白、离子转运蛋白(如集光复合体)、细胞色素c氧化酶、ATP酶Na/K、H/K、Ca、细胞粘附受体(如金属蛋白酶)、整联蛋白或钙黏着蛋白。

[0404] 在一些实施方案中,细胞表面分子可以是限定所需细胞群或亚群的抗原,所述细胞群或亚群例如以下细胞的群体或亚群:血细胞,例如,淋巴细胞(例如,T细胞、T辅助细胞(例如,CD4⁺ T辅助细胞)、B细胞或自然杀伤细胞);单核细胞;或干细胞,例如,CD34阳性外周干细胞或Nanog或Oct-4表达干细胞。T细胞的例子包括诸如以下的细胞:CMV特异性CD8⁺ T-淋巴细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞和调节T细胞(Treg)。Treg的说明性例子是CD4 CD25⁺ CD45RA⁺ Treg细胞,并且记忆T细胞的说明性例子是CD62L⁺ CD8⁺特异性中枢记忆T细胞。细胞表面分子也可以是肿瘤细胞的标记。

[0405] 如上所述,在一些实施方案中,除了能够结合细胞表面分子的结合位点B以外,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)具有结合配偶体C。在一些方面,此结合配偶体C能够与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂))的结合位点Z结合,其中所述试剂具有用于结合配偶体C的一个或多个结合位点。在一些实施方案中,可以在所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂))的一个或多个结合位点Z之间形成的非共价键可以具有任何所需强度和亲和力,并且在进行所述方法的条件下可以是可破坏的或可逆的。所述药剂(例如,受体结合剂或选择剂)可以包括至少一个(包括两个、三个或更多个)另外的结合配偶体C,并且所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂))可以包括用于所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C的至少两个(如三个、四个、五个、六个、七个、八个或更多个)结合位点Z。如美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请W0 2002/054065中所述,结合配偶体C与具有一个或多个相应结合位点Z的试剂的任何组合可以被选择,例如使得结合配偶体C与结合位点Z能够在复合物中可逆结合,如以引起亲合力效应。

[0406] 所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C可以例如是基于烃的(包括聚合的),并且包括含氮基团、含磷基团、含硫基团、卡宾基团、卤素基团或拟卤素基团。在一些方面,它可以是醇、有机酸、无机酸、胺、膦、硫醇、二硫化物、烷烃、氨基酸、肽、寡肽、多肽、蛋白质、核酸、脂质、糖、寡糖或多糖。作为其他例子,它也可能是阳离子、阴离子、聚阳离子、聚阴离子、聚阳离子、电解质、聚电解质、碳纳米管或碳纳米泡沫。通常,这种结合配偶体C与所述试剂的结合位点的亲和力高于与其他物质的亲和力。相应结合配偶体C的例子包括但不限于冠醚、免疫球蛋白、其片段和具有抗体样功能的蛋白质性结合分子。

[0407] 在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C包括生物素,并且所述试剂包括与生物素可逆结合的链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C包括与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物,并且所述试剂包括与相应生物素类似物可逆结合的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。在一

些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C包括链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽,并且所述试剂包括与相应链霉亲和素或抗生物素蛋白结合肽可逆结合的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物。出于本文的目的,关于链霉亲和素(例如链霉亲和素类似物或链霉亲和素突变蛋白)或抗生物素蛋白(例如抗生物素蛋白类似物或抗生物素蛋白突变蛋白)的突变体形式,术语类似物与术语突变蛋白可互换使用。

[0408] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是或含有链霉亲和素,如包括上述任一种(例如SEQ ID NO:3-6中所示)的链霉亲和素突变蛋白,并且所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C可以包括链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽可以包括具有SEQ ID NO:9中所示的通式的序列,如含有SEQ ID NO:10中所示的序列。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽序列具有SEQ ID NO:11中所示的通式,如SEQ ID NO:12中所示。在一个例子中,链霉亲和素结合肽序列是Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称为**Strep-tag®**,SEQ ID NO:7中所示)。在一个例子中,链霉亲和素结合肽序列是Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为**Strep-tag® II**,SEQ ID NO:8中所示)。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列,其中在所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3个至8个氨基酸并且含有至少序列His-Pro-Xaa(SEQ ID NO:9),其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,并且其中另一个结合模块具有相同或不同的链霉亲和素肽配体,如在SEQ ID NO:11中所示(参见例如国际公开的PCT申请号WO 02/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽配体含有具有SEQ ID NO:13或14中任一个所示的式的序列。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽配体具有SEQ ID NO:15-19中任一个所示的氨基酸序列。在大多数情形中,所有这些链霉亲和素结合肽结合相同的结合位点,即链霉亲和素的生物素结合位点。如果使用一种或多种这样的链霉亲和素结合肽作为结合配偶体C(例如C1和C2),则多聚化试剂通常是链霉亲和素突变蛋白。

[0409] 在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽可以被进一步修饰。在一些实施方案中,链霉亲和素结合肽可以包括与带镍的三NTA缀合的肽序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为**Strep-tag® II**,SEQ ID NO:8中所示)(也称为His-STREPPER或His/**Strep-tag® II**衔接子)。

[0410] 在一些实施方案中,所述药剂(例如,受体结合剂或选择剂)的结合配偶体C包括技术人员已知是亲和标签的部分。在这样的实施方案中,所述试剂可以包括已知与亲和标签结合的相应结合配偶体,例如,抗体或抗体片段。作为已知亲和标签的几个说明性例子,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C可以包括二硝基苯酚或地高辛、寡聚组氨酸、多组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、几丁质结合蛋白(CBP)或硫氧还蛋白、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG'-肽、HA标签(序列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)(SEQ ID NO:20)、VSV-G标签(序列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys)(SEQ ID NO:21)、HSV标签(序列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp)(SEQ ID NO:22)、T7表位(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)(SEQ ID NO:23)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、单纯疱疹病毒糖蛋白D的序列Gln-

Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (SEQ ID NO:24) 的HSV表位、序列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (SEQ ID NO:25) 的转录因子c-myc的“myc”表位、V5标签 (序列:Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (SEQ ID NO:26) 或谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)。在这样的实施方案中,在所述试剂 (其可以是抗体或抗体片段) 的一个或多个结合位点Z与抗原之间形成的复合物可以通过添加游离抗原 (即游离肽 (表位标签) 或游离蛋白质 (如MBP或CBP)) 被竞争性破坏。在一些实施方案中,亲和标签也可以是寡核苷酸标签。在一些情形中,这样的寡核苷酸标签可以例如用于与连接至所述试剂或所述试剂中包括的具有互补序列的寡核苷酸杂交。

[0411] 合适的结合配偶体C的其他例子包括但不限于凝集素、蛋白质A、蛋白质G、金属、金属离子、次氨基三乙酸衍生物 (NTA)、RGD基序、葡聚糖、聚乙烯亚胺 (PEI)、氧化还原聚合物、糖蛋白、适体、染料、直链淀粉、麦芽糖、纤维素、几丁质、谷胱甘肽、钙调蛋白、明胶、多粘菌素、肝素、NAD、NADP、赖氨酸、精氨酸、苯甲脒、聚U或寡聚dT。已知凝集素如伴刀豆凝集素A可结合至多糖和糖基化蛋白质。染料的说明性例子是三嗪染料,如辛巴蓝F3G-A (CB) 或辛巴红HE-3B,它们特异性结合NADH依赖性酶。通常,Green A与辅酶A蛋白、人血清白蛋白和脱氢酶结合。在一些情形中,染料7-氨基放线菌素D和4',6-二脒基-2-苯基吡啶结合至DNA。通常,金属 (如Ni、Cd、Zn、Co或Cu) 的阳离子通常用于结合亲和标签,如含有寡聚组氨酸的序列,包括六组氨酸或His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys标签 (MAT标签) (SEQ ID NO:35),以及N-甲基丙烯酰基-(L)-半胱氨酸甲基酯。

[0412] 在一些实施方案中,所述药剂 (例如,选择剂或刺激剂) 中包括的结合配偶体C与所述试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合在二价、三价或四价阳离子的存在下发生。就此而言,在一些实施方案中,所述试剂包括二价、三价或四价阳离子,通常借助合适的螯合剂来保持 (例如络合)。在一些实施方案中,所述药剂 (例如,选择剂或刺激剂) 中包括的结合配偶体C可以包括如下部分,所述部分包括 (例如络合) 二价、三价或四价阳离子。相应的金属螯合剂的例子包括但不限于乙二胺、乙二胺四乙酸 (EDTA)、乙二醇四乙酸 (EGTA)、二亚乙基三胺五乙酸 (DTPA)、N,N-双 (羧甲基) 甘氨酸 (也称为次氨基三乙酸,NTA)、1,2-双 (邻氨基苯氧基) 乙烷-N,N,N',N'-四乙酸 (BAPTA)、2,3-二巯基-1-丙醇 (二巯基丙醇)、卟啉和亚铁血红素。作为例子,EDTA与大多数单价、二价、三价和四价金属离子 (例如银 (Ag^+)、钙 (Ca^{2+})、锰 (Mn^{2+})、铜 (Cu^{2+})、铁 (Fe^{2+})、钴 (Co^{2+}) 和锆 (Zr^{4+})) 形成络合物,而BAPTA对 Ca^{2+} 具有特异性。作为说明性例子,本领域中使用的标准方法是在寡聚组氨酸标签与铜 (Cu^{2+})、镍 (Ni^{2+})、钴 (Co^{2+}) 或锌 (Zn^{2+}) 离子之间形成络合物,所述离子通过螯合剂次氨基三乙酸 (NTA) 呈现。

[0413] 在一些实施方案中,所述药剂 (例如,选择剂或刺激剂) 中包括的结合配偶体C包括钙调蛋白结合肽,并且所述试剂包括多聚钙调蛋白,例如如美国专利5,985,658中所述。在一些实施方案中,所述药剂 (例如,选择剂或刺激剂) 中包括的结合配偶体C包括FLAG肽,并且所述试剂包括与FLAG肽结合的抗体,所述FLAG肽例如如美国专利4,851,341中所述的与单克隆抗体4E11结合的FLAG肽。在一个实施方案中,所述药剂 (例如,选择剂或刺激剂) 中包括的结合配偶体C包括寡聚组氨酸标签,并且所述试剂包括结合寡聚组氨酸标签的抗体或过渡金属离子。在一些情形中,对所有这些结合复合物的破坏可以通过金属离子螯合 (例如,钙螯合) 来完成,例如通过添加EDTA或EGTA来完成。在一些实施方案中,钙调蛋白、抗体 (如4E11) 或螯合的金属离子或游离螯合剂可以通过常规方法多聚化,例如,通过以下方式

进行:在第一步骤中生物素化并与链霉亲和素或抗生物素蛋白或其寡聚物复合,或者将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中,基本上如Noguchi,A,等人Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137中所述;并在第二步骤中使用常规碳二亚胺化学将钙调蛋白或抗体或螯合的金属离子或游离螯合剂经由伯氨基连接至多糖(例如葡聚糖)骨架中的羧基。在一些这样的实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C与所述试剂的一个或多个结合位点Z之间的结合可以通过金属离子螯合来破坏。金属螯合可以例如通过添加EGTA或EDTA来完成。

[0414] 在一些实施方案中,与细胞表面分子特异性结合的所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以例如由抗体、其片段或具有抗体样功能的蛋白质性结合分子包含。在一些实施方案中,所述药剂的结合位点B是抗体组合位点,例如是或含有抗体的一个或多个互补决定区(CDR)。(重组)抗体片段的例子包括但不限于Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、二价抗体片段(如(Fab)₂'片段)、双抗体、三抗体(Iliades,P.,等人,FEB S Lett (1997) 409,437-441)、十抗体(Stone,E.,等人,Journal of Immunological Methods (2007) 318,88-94)和其他结构域抗体(Holt,L.J.,等人,Trends Biotechnol. (2003),21,11,484-490)。在一些实施方案中,所述药剂(例如,受体结合剂或选择剂)可以包含二价蛋白质性人工结合分子,如二聚脂质运载蛋白突变蛋白,也将其称为“双运载蛋白”。

[0415] 在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以具有单一结合位点B,即,其可以是单价的。单价药剂(例如,选择剂或刺激剂)的例子包括但不限于单价抗体片段、具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子或MHC分子。单价抗体片段的例子包括但不限于Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv),包括二价单链Fv片段。

[0416] 在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)是抗体或其抗原结合片段,如Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、二价抗体片段(如F(ab')₂片段)。在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)是或源自已知与目的细胞分子结合的亲本抗体。针对细胞表面分子的多种抗体分子或其片段是本领域中熟知的,并且可以使用多种这样的抗体分子或其片段中的任一种作为本文方法中的药剂。在一些实施方案中,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)是抗体或其片段,其含有亲本或参考抗体的可变重链中的一个或多个氨基酸替代,例如以生成具有改变的亲和力或如上所述展现足够快的解离速率的抗体。例如,这样的突变的例子在抗CD4抗体13B8.2的突变体的背景中是已知的(参见例如,美国专利号7,482,000、美国专利申请公开号US 2014/0295458或国际专利申请号WO 2013/124474),并且可以在亲本或参考抗体中生成这样的突变中的任一种。

[0417] 在一些方面,所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以是单价的,例如包含单价抗体片段或单价人工结合分子(蛋白质性或其他),如基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白(也称为“Anticalin®”),或者是二价分子,如其中保留两个结合位点的抗体或片段,如F(ab')₂片段。

[0418] 具有抗体样功能的蛋白质性结合分子的例子包括基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白(参见例如,WO 03/029462;Beste等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1999) 96,1898-1903)。通常,脂质运载蛋白(如后胆色素结合蛋白、人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、人载脂蛋白D或人泪液脂质运载蛋白)具有天然配体结合位点,所述天然配体结合位点可以被修饰,使得它们结合给定靶标。可以用作与细胞表面分子特异性结合的药剂

(例如,选择剂或刺激剂)的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子的其他例子包括但不限于所谓的格鲁体(参见例如,国际专利申请W0 96/23879)、基于锚蛋白支架的蛋白质(Mosavi,L.K.,等人,Protein Science (2004) 13,6,1435-1448)或结晶支架(例如国际专利申请W0 01/04144)、Skerra,J.Mol.Recognit. (2000) 13,167-187中所述的蛋白质、阿德奈汀蛋白、四连接素和阿维莫蛋白。通常,阿维莫蛋白(包括通过人受体结构域家族的外显子改组演化的多价阿维莫蛋白)含有所谓的A结构域,其作为多个结构域的串存在于几个细胞表面受体中(Silverman,J.,等人,Nature Biotechnology (2005) 23,1556-1561)。通常源自人纤连蛋白的结构域的阿德奈汀蛋白通常含有三个环,所述环可以被工程化用于与靶标的免疫球蛋白样结合(Gill,D.S.和Damle,N.K.,Current Opinion in Biotechnology (2006) 17,653-658)。通常源自相应人同三聚蛋白的四连接素通常在C型凝集素结构域中也含有环区域,所述环区域可以被工程化用于所需结合。在一些情形中可以用作蛋白质配体的类肽通常是寡(N-烷基)甘氨酸,其与肽的不同之处在于,侧链连接至酰胺氮而不是碳原子。类肽通常对蛋白酶和其他修饰酶有抗性,并且细胞渗透性可能远高于肽(参见例如,Kwon,Y.-U.和Kodadek,T.,J.Am.Chem.Soc. (2007) 129,1508-1509)。

[0419] 合适的蛋白质性结合分子的其他例子包括但不限于EGF样结构域、Kringle结构域、纤连蛋白I型结构域、纤连蛋白II型结构域、纤连蛋白III型结构域、PAN结构域、Gla结构域、SRCR结构域、Kunitz/牛胰腺胰蛋白酶抑制剂结构域、淀粉酶抑肽、Kazal型丝氨酸蛋白酶抑制剂结构域、车轴草(P型)结构域、血管性假血友病因子C型结构域、过敏毒素样结构域、CUB结构域、甲状腺球蛋白I型重复序列、LDL受体A类结构域、Sushi结构域、Link结构域、凝血酶敏感蛋白I型结构域、免疫球蛋白结构域或免疫球蛋白样结构域(例如,结构域抗体或骆驼重链抗体)、C型凝集素结构域、MAM结构域、血管性假血友病因子A型结构域、生长调节素B结构域、WAP型四二硫核心结构域、F5/8C型结构域、血液结合素结构域、SH2结构域、SH3结构域、层粘连蛋白型EGF样结构域、C2结构域、“κ体”(Ill.等人,Protein Eng (1997) 10,949-57)、所谓的“微型抗体”(Martin等人,EMBO J (1994) 13,5303-5309)、双抗体(Holliger等人,PNAS USA (1993) 90,6444-6448)、所谓的“Janusis”(Traunecker等人,EMBO J (1991) 10,3655-3659,或Traunecker等人,Int J Cancer (1992) 增刊7,51-52)、纳米抗体、微体、affilin、亲和体、打结素、泛素、锌指蛋白、自发荧光蛋白或富亮氨酸重复蛋白。在一些实施方案中,具有抗体样功能的核酸分子可以是适体。通常,适体折叠成限定的三维基序,并且显示对给定靶标结构的高亲和力。

a. 选择剂

[0420] 在某些方面,本文所提供的方法采用选择剂。在一些实施方案中,如章节II-B中所述的药剂是选择剂。在一些实施方案中,选择剂与细胞表面上的分子(如细胞表面分子)结合。在一些情况下,细胞表面分子是选择标记。在一些实施方案中,选择剂能够与样品中的一个或多个细胞表达的选择标记特异性结合。在一些实施方案中,在本公开文本通篇中提及与分子(如细胞表面分子或细胞表面受体)的特异性结合时,不一定意味着所述药剂仅与这种分子结合。例如,与分子特异性结合的药剂可以以通常显著更低的亲和力与其他分子结合,如通过例如免疫测定、BIAcore®、KinExA 3000仪器(Sapidyne Instruments,博伊西,爱达荷州)或其他测定所确定。在一些情形中,药剂在特异性结合条件下与靶分子结合的能力使得其亲和力或亲合力是相同药剂对具有足够统计学大小的一系列随机肽或多肽

的平均亲和力或亲合力的至少5倍,如至少10、20、30、40、50、100、250或500倍,或者甚至至少1000倍。

[0421] 在一些实施方案中,细胞(例如,靶细胞,例如,T细胞)在细胞表面上具有或表达分子(例如,选择标记),使得通过至少一种共有特异性分子(例如,选择标记)的存在来限定要选择选择的细胞。在一些实施方案中,含有靶细胞的样品也可以含有缺乏所述分子(例如,选择标记)的另外的细胞。例如,在一些实施方案中,T细胞可以选自含有多个细胞类型(例如,红细胞或B细胞)的样品。选择标记和受体分子可以在本文中可互换地用于指代细胞表面分子。

[0422] 在一些实施方案中,选择剂是或含有选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段;和/或选择剂含有抗体片段;选择剂是或含有Fab片段;选择剂选自自由F(ab)₂'片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段;选择剂是选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段;和/或选择剂是选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0423] 在一些实施方案中,选择剂还含有用于与所述试剂结合的结合配偶体C。在一些实施方案中,选择剂还含有生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[0424] 在一些实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白,并且选择剂含有能够结合这样的试剂的结合配偶体C,如生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,选择剂还包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。在特定实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素突变蛋白(例如SEQ ID NO:6中所示),并且结合配偶体C是链霉亲和素结合肽,如SEQ ID NO:8或15-19中任一个所示的任一种。在一些实施方案中,选择剂还包含具有序列

SAWSHPQFEKGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16) 的链霉亲和素结合肽。

[0425] 在一些方面,细胞表面分子(例如,选择标记)可以是限定所需细胞群或亚群的抗原,例如血细胞的群体或亚群,例如淋巴细胞(例如T细胞、T辅助细胞(例如,CD4+T辅助细胞)、B细胞或自然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,例如CD34阳性外周干细胞或者表达Nanog或Oct-4的干细胞。在一些实施方案中,选择标记可以是在T细胞或T细胞的子集的表面上表达的标记,如CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。T细胞的例子包括诸如以下的细胞:CMV特异性CD8+T-淋巴细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞和调节T细胞(Treg)。Treg的说明性例子包括CD4 CD25 CD45RA Treg细胞,并且记忆T细胞的说明性例子包括CD62L CD8+特异性中枢记忆T细胞。

[0426] 例如,在一些方面,通过阳性或阴性选择技术来分离T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD3+、CD127+、CD4+、CD8+、CD45RA+和/或CD45RO+ T细胞)。在一些实施方案中,通过与特异性结合至这样的标记的一种或多种选择剂一起孵育来选择这样的细胞。选择剂可以是与这样的表面标记结合以实现T细胞或其亚群的阳性或阴性选择的任何结合分子,如抗体或抗体片段。

[0427] 在一些实施方案中,通过非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞,如CD14)上表达的标记的阴性选择,将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面,CD4+或CD8+选择步骤用于分离CD4+辅助T细胞和CD8+细胞毒性T细胞。通过针对在一种或多种幼稚样、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记进行的阳性或阴性选择,可以将这样的CD4+和CD8+群体进一步分选为亚群。

[0428] 在一些实施方案中,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原进行阳性或阴性选择,将CD8+细胞针对幼稚、中央记忆、效应记忆和/或中央记忆干细胞进一步富集或耗尽。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(TCM)细胞进行富集以增加功效,如以改进施用后的长期存活、扩增和/或移植物植入,这在一些方面在这样亚群中特别稳健。参见Terakura等人,(2012) Blood. 1:72-82;Wang等人(2012) J Immunother. 35 (9):689-701。在一些实施方案中,组合富含TCM的CD8+ T细胞与CD4+ T细胞进一步增强功效。

[0429] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8+外周血淋巴细胞的CD62L+和CD62L-两个子集中。可以针对CD62L-CD8+和/或CD62L+CD8+级分富集或耗尽PBMC,如使用抗CD8和抗CD62L抗体作为选择剂。

[0430] 在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面,它是基于针对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面,分离富含TCM细胞的CD8+群体是通过耗尽表达CD4、CD14、CD45RA的细胞以及针对表达CD62L的细胞的阳性选择或富集来进行。在一个方面,中枢记忆T(TCM)细胞的富集从基于CD4表达所选择阴性细胞级分开始进行,所述阴性细胞级分经历基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择以及基于CD62L的阳性选择。这样的选择在一些方面是同时进行的,而在其他方面按任何顺序依序进行。在一些方面,将用于制备CD8+细胞群或亚群的基于CD4表达的相同选择步骤也用于生成CD4+细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性级分二者都被保留并用于所述方法的后续步骤中,任选地在一个或多个其他阳性或阴性选择步骤之后。在一些实施方案中,对CD4+细胞群的选择和对CD8+细胞群的选择同时进行。在一些实施方案中,CD4+细胞群和对CD8+细胞群的选

择以任一顺序依序进行。在一些实施方案中,用于选择细胞的方法可以包括如公开的美国申请号US20170037369中所述的那些,所述申请通过引用以其整体特此并入。

[0431] 在特定实施方案中,使生物样品(例如,PBMC或其他白细胞的样品)经历CD4⁺T细胞的选择,其中同时保留阴性和阳性级分。在某些实施方案中,CD8⁺T细胞选自阴性级分。在一些实施方案中,使生物样品经历CD8⁺T细胞的选择,其中同时保留阴性和阳性级分。在某些实施方案中,CD4⁺T细胞选自阴性级分。

[0432] 在一些实施方案中,分别使用特异性结合CD4的选择剂和特异性结合CD8的选择剂产生富含CD4⁺T细胞的群体和富含CD8⁺T细胞的群体。

[0433] 在特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品进行CD4⁺细胞的选择,其中保留了阴性和阳性级分。然后阴性级分基于CD14和CD45RA或CD19的表达进行阴性选择,并基于中枢记忆T细胞(如CD62L或CCR7)的标记特征进行阳性选择,其中按任何顺序进行阳性和阴性选择。

[0434] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,可以将CD4⁺T辅助细胞分选为幼稚、中枢记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方案中,幼稚CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺或CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0435] 在一些实施方案中,选择标记是T细胞共受体;选择标记是或含有T细胞抗原受体复合物的成员;选择标记是或含有CD3链;选择标记是或含有CD3 ζ 链;选择标记是或含有CD8;选择标记是或含有CD4;选择标记是或含有CD45RA;选择标记是或含有CD27;选择标记是或含有CD28;和/或选择标记是或含有CCR7。在一些实施方案中,选择标记选自CD3、CD4和CD8。在一些实施方案中,选择标记是CD3。

[0436] 在一些实施方案中,选择剂与选择标记之间的特异性结合不诱导至T细胞的信号,或者不诱导至T细胞的刺激或激活或增殖信号。在一些实施方案中,选择剂包括与CD3、CD8或CD4结合的单价抗体片段。在一些实施方案中,选择剂是抗CD3 Fab、抗CD8Fab或抗CD4 Fab。在一些实施方案中,选择剂是抗CD3 Fab。在一些实施方案中,抗CD3Fab包含OKT3抗体Fab片段。在一些实施方案中,抗CD3 Fab包含具有SEQ ID NO:31所示序列的可变重链以及具有SEQ ID NO:32所示序列的可变轻链。

[0437] 在一些实施方案中,选择标记可以是CD4,并且选择剂特异性结合CD4。在一些方面,特异性结合CD4的选择剂可以选自抗CD4抗体、抗CD4抗体的二价抗体片段、抗CD4抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD4结合分子。在一些实施方案中,抗CD4抗体(如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD4 Fab片段))可以源自抗体13B8.2或13B8.2的保留与CD4的特异性结合的功能活性突变体。例如,抗体13B8.2的示例性突变体或m13B8.2描述于以下文献中:美国专利号7,482,000、美国专利申请号US2014/0295458或国际专利申请号W0 2013/124474;以及Bes,C,等人J Biol Chem 278,14265-14273(2003)。名为“m13B8.2”的突变体Fab片段携带CD4结合鼠抗体13B8.2的可变结构域,以及含有重链的 γ 型恒定人CH1结构域和 κ 型恒定人轻链结构域的恒定结构域,如美国专利7,482,000中所述。在一些实施方案中,所述抗CD4抗体例如抗体13B8.2的突变体含有可变轻链中的氨基酸替代H91A、可变轻链中的氨基酸替代Y92A、可变重链中的氨基酸替代H35A和/或可变重链中的氨基酸替代R53A,其各自通过Kabat编号。在一些方面,与m13B8.2中13B8.2 Fab片段的可

变结构域相比,轻链中位置91 (SEQ ID NO:30中的位置93)的His残基突变为Ala,并且重链中位置53 (SEQ ID NO:29中的位置55)的Arg残基突变为Ala。在一些实施方案中,与抗CD4或其片段可逆结合的试剂可商业购得或者源自可商业购得的试剂(例如目录号6-8000-206或6-8000-205或6-8002-100;IBA GmbH,哥廷根,德国)。在一些实施方案中,选择剂包含抗CD4 Fab片段。在一些实施方案中,抗CD4 Fab片段包含具有SEQ ID NO:29所示序列的可变重链和具有SEQ ID NO:30所示序列的可变轻链。在一些实施方案中,抗CD4 Fab片段包含具有SEQ ID NO:29所示序列的可变重链的CDR和具有SEQ ID NO:30所示序列的可变轻链的CDR。

[0438] 在一些实施方案中,选择标记可以是CD8,并且选择剂特异性结合CD8。在一些方面,特异性结合CD8的选择剂可以选自抗CD8抗体、抗CD8抗体的二价抗体片段、抗CD8抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD8结合分子。在一些实施方案中,抗CD8抗体(如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD8 Fab片段))可以源自抗体OKT8(例如ATCC CRL-8014)或其保留与CD8的特异性结合的功能活性突变体。在一些实施方案中,与抗CD8或其片段可逆结合的试剂可商业购得或源自可商业购得的试剂(例如目录号6-8003或6-8000-201;IBA GmbH,哥廷根,德国)。在一些实施方案中,选择剂包含抗CD8 Fab片段。在一些实施方案中,抗CD8 Fab片段包含具有SEQ ID NO:36所示序列的可变重链和具有SEQ ID NO:37所示序列的可变轻链。在一些实施方案中,抗CD8 Fab片段包含具有SEQ ID NO:36所示序列的可变重链的CDR和具有SEQ ID NO:37所示序列的可变轻链的CDR。

[0439] 在一些实施方案中,选择标记可以是CD3,并且选择剂特异性结合CD3。在一些方面,特异性结合CD3的选择剂可以选自抗CD3抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD3结合分子。在一些实施方案中,抗CD3抗体(如二价抗体片段或单价抗体片段(例如CD3 Fab片段))可以源自抗体OKT3(例如ATCC CRL-8001;参见例如,Stemberger等人PLoS One.2012;7(4):e35798)或其保留与CD3的特异性结合的功能活性突变体。在一些实施方案中,与抗CD3或其片段可逆结合的试剂可商业购得或源自可商业购得的试剂(例如目录号6-8000-201、6-8001-100;IBA GmbH,哥廷根,德国)。在一些实施方案中,选择剂包含抗CD3 Fab片段。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含具有SEQ ID NO:31所示序列的可变重链和具有SEQ ID NO:32所示序列的可变轻链。在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段包含具有SEQ ID NO:31所示序列的可变重链的CDR和具有SEQ ID NO:32所示序列的可变轻链的CDR。

[0440] 在任何上文例子中,二价抗体片段可以是(Fab)2'片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可以选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。在任何上文例子中,具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子可以是适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0441] 在一些实施方案中,选择剂与固定相直接或间接结合。在一些实施方案中,选择剂通过与所述选择剂可逆结合的选择试剂与固定相间接结合。在一些实施方案中,选择试剂是或含有与生物素、生物素类似物或其生物活性片段可逆结合的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素的突变蛋白;与链霉亲和素结合肽可逆结合的抗生物素蛋白或链霉亲和素的突变蛋白;含有至少两个螯合基团K的试剂,其中所述至少两个螯合基团能够与过渡金属离子结合;能够与寡聚组氨酸亲和和标签结合的药剂;能够与谷胱甘肽-S-转移酶结合的药剂;钙调蛋白或其类似物;能够与钙调蛋白结合肽(CBP)结合的药剂;能够与FLAG-肽结合的

药剂;能够与HA标签结合的药剂;能够与麦芽糖结合蛋白(MBP)结合的药剂;能够与HSV表位结合的药剂;能够与myc表位结合的药剂;或者能够与生物素化的载体蛋白结合的药剂。

[0442] 在一些实施方案中,选择试剂是或含有与生物素或生物活性片段可逆结合的链霉亲和素突变蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白。在一些实施方案中,选择试剂是或含有与链霉亲和素结合肽可逆结合的链霉亲和素突变蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白。在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽可逆结合,或者能够与其可逆结合。

b. 刺激剂

[0443] 在某些方面,本文提供的方法采用刺激剂。在一些实施方案中,如章节II-B中所述的药剂是刺激剂。在一些实施方案中,刺激剂与细胞表面上的分子结合,所述刺激剂与所述分子之间的结合能够诱导、递送或调节细胞中的刺激信号。在一些情况下,细胞表面分子(例如受体)是信号传导分子。在一些这样的情形中,刺激剂能够与一种或多种靶细胞(例如,T细胞)表达的信号传导分子特异性结合。在一些情况下,刺激剂是在与细胞表面分子(如受体)结合后能够诱导或递送细胞(例如,T细胞)中的刺激信号的任何药剂。在一些实施方案中,刺激信号可以具有免疫刺激性,在所述情形中刺激剂能够诱导、递送或调节参与或刺激细胞(例如T细胞)的免疫应答(例如,增加免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞激活、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒性活性或者免疫细胞的一种或多种其他功能活性)的信号。在一些实施方案中,刺激信号可以具有抑制性,在所述情形中刺激剂能够诱导、递送或调节细胞(例如T细胞)中的刺激信号,所述刺激信号参与或抑制免疫应答,例如抑制或降低免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞激活、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒性活性或者免疫细胞的一种或多种其他功能活性。

[0444] 在一些实施方案中,刺激剂是第一刺激剂。在一些实施方案中,第一刺激剂与样品的选择的细胞的表面上的受体分子结合。因此,在一些情形中,第一刺激剂递送、诱导或调节刺激信号。在一些方面,第一刺激剂对刺激信号的递送、诱导或调节实现对细胞的刺激。因此,在一些情形中,第一刺激剂将刺激信号递送至细胞,从而刺激所述细胞。在一些实施方案中,第一刺激剂还诱导选择标记的下调。如本文所用,下调可以涵盖与较早时间点相比,选择标记的表达的减少。

[0445] 在一些实施方案中,靶细胞(例如,T细胞)包含TCR/CD3复合物和共刺激分子(如CD28)。在此情形中,第一刺激剂与TCR/CD3复合物结合,从而在T细胞中递送刺激信号,并且第二刺激剂与共刺激CD28分子结合。在特定方面,第一刺激剂和/或第二刺激剂进一步诱导选择标记(例如,用于固定靶细胞(例如,T细胞)的选择标记)的下调。

[0446] 在一些实施方案中,第一刺激剂在细胞(例如,T细胞)中递送TCR/CD3复合物相关刺激信号。在一些实施方案中,第一刺激剂与含有免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的分子特异性结合。在一些方面,第一刺激剂特异性结合CD3。在一些情形中,特异性结合CD3的第一刺激剂可以选自抗CD3-抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3-抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD3结合分子。二价抗体片段可以是F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可以选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。在一些情形中,具有抗体样结合特性的蛋白质性CD3结合分子可以是适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白或

阿维莫蛋白。

[0447] 在一些实施方案中,抗CD3 Fab片段可以源自由杂交瘤细胞系OKT3 (ATCC®CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549)产生的CD3结合单克隆抗体。抗CD3抗体OKT3的重链的可变结构域和轻链的可变结构域描述于Arakawa等人J.Biochem.120,657-662 (1996)中,并且分别包含SEQ ID NO:31和32中所示的氨基酸序列。

[0448] 在一些实施方案中,刺激剂是第二刺激剂。在一些实施方案中,第二刺激剂与细胞表面上的分子(如细胞表面分子,例如,受体分子)结合。在一些实施方案中,第二刺激剂能够增强、减弱或修饰经由第一刺激剂结合的分子递送的刺激信号。在一些实施方案中,第二刺激剂递送、诱导或调节刺激信号,例如,第二或另外的刺激信号。在一些方面,第二刺激剂增强或加强第一刺激剂诱导的刺激信号。在一些实施方案中,第二刺激剂与辅助分子结合和/或可以刺激或诱导细胞中的辅助或次级刺激信号。在一些方面,第二刺激剂与共刺激分子结合和/或提供共刺激信号。

[0449] 在一些实施方案中,刺激剂(其可以是第二刺激剂)与第二分子结合(例如,特异性结合),所述第二分子可以是共刺激分子、辅助分子、细胞因子受体、趋化因子受体、免疫检查点分子或者TNF家族或TNF受体家族的成员。

[0450] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是CD28,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD28。在一些方面,特异性结合CD28的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD28-抗体、抗CD28抗体的二价抗体片段、抗CD28抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD28结合分子。二价抗体片段可以是F(ab')₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可以选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。具有抗体样结合特性的蛋白质性CD28结合分子可以是适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0451] 在一些实施方案中,抗CD28 Fab片段可以源自抗体CD28.3(作为合成单链Fv构建体以GenBank登录号AF451974.1存放;还参见Vanhove等人,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页),其可变重链和轻链分别包含SEQ ID NO:33和34。

[0452] 在一些实施方案中,一种或多种刺激剂是抗CD3抗体和抗CD28抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂是抗CD3 Fab和抗CD28 Fab。

[0453] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子是CD90,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD90。在一些方面,特异性结合CD90的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD90抗体、抗CD90抗体的二价抗体片段、抗CD90抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD90结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。参见例如,抗CD90抗体G7 (Biolegend,目录号105201)。

[0454] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子是CD95,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD95。在一些方面,特异性结合CD95的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD95抗体、抗CD95抗体的二价抗体片段、抗CD95抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD95结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。例如,在一些方面,抗CD90抗体可以是单克隆小鼠抗人CD95 CH11 (Upstate Biotechnology,普莱西德湖,纽约州)或者可以是抗CD95 mAb7C11或抗APO-1,如Paulsen等

人Cell Death&Differentiation 18.4(2011):619-631中所述。

[0455] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞或B细胞)上的分子可以是CD137,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD137。在一些方面,特异性结合CD137的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD137抗体、抗CD137抗体的二价抗体片段、抗CD137抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD137结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。例如,抗CD137抗体可以是LOB12、IgG2a或LOB12.3、如Taraban等人Eur J Immunol.2002年12月;32(12):3617-27中所述的IgG1。还参见例如,US 6569997、US 6303121、Mittler等人Immunol Res.2004;29(1-3):197-208。

[0456] 在一些实施方案中,细胞(例如B细胞)上的分子可以是CD40,并且刺激剂(例如,刺激剂)(例如其可以是第二刺激剂,例如,第二刺激剂)特异性结合CD40。在一些方面,特异性结合CD40的刺激剂(其可以是第二刺激剂,例如,第二刺激剂)可以选自抗CD40抗体、抗CD40抗体的二价抗体片段、抗CD40抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD40结合分子。

[0457] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是CD40L(CD154),并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD40L。在一些方面,特异性结合CD40L的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD40L抗体、抗CD40L抗体的二价抗体片段、抗CD40L抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD40L结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。例如,在一些方面,抗CD40L抗体可以是Hu5C8,如Blair等人JEM第191卷第4期651-660中所述。还参见例如WO 1999061065、US 20010026932、US 7547438、WO 2001056603。

[0458] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是诱导型T细胞共刺激剂(ICOS),并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合ICOS。在一些方面,特异性结合ICOS的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗ICOS抗体、抗ICOS抗体的二价抗体片段、抗ICOS抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性ICOS结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。参见例如,US20080279851和Deng等人Hybrid Hybridomics.2004年6月;23(3):176-82。

[0459] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是T细胞激活接头(LAT),并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合LAT。在一些方面,特异性结合LAT的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗LAT抗体、抗LAT抗体的二价抗体片段、抗LAT抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性LAT结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。

[0460] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是CD27,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合CD27。在一些方面,特异性结合CD27的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗CD27抗体、抗CD27抗体的二价抗体片段、抗CD27抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性CD27结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。参加例如WO 2008051424。

[0461] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是OX40,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合OX40。在一些方面,特异性结合OX40的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗OX40抗体、抗OX40抗体的二价抗体片段、抗OX40抗体的单价抗体

片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性OX40结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。参见例如,WO 2013038191;Melero等人Clin Cancer Res.2013年3月1日;19(5):1044-53。

[0462] 在一些实施方案中,细胞(例如,T细胞)上的分子可以是HVEM,并且刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)特异性结合HVEM。在一些方面,特异性结合HVEM的刺激剂(例如其可以是第二刺激剂)可以选自抗HVEM抗体、抗HVEM抗体的二价抗体片段、抗HVEM抗体的单价抗体片段和具有抗体样结合特性的蛋白质性HVEM结合分子。抗体或抗原结合片段可以源自本领域中已知的任一种。参见例如,WO 2006054961、WO2007001459;Park等人Cancer Immunol Immunother.2012年2月;61(2):203-14。

[0463] 在任何上文例子中,二价抗体片段可以是(Fab)₂片段或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可以选自Fab片段、Fv片段和单链Fv片段(scFv)。在任何上文例子中,具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子可以是适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0464] 在一些方面,刺激剂特异性靶向靶细胞表面上表达的分子,其中所述分子是TCR、嵌合抗原受体或者包含免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM的分子。例如,靶细胞表面上表达的分子选自T细胞或B细胞抗原受体复合物、CD3链、CD3 ζ 、T细胞受体或B细胞受体的抗原结合部分、或者嵌合抗原受体。在一些情形中,刺激剂靶向肽:MHC I类复合物。

[0465] 在一些实施方案中,刺激剂与靶细胞表面上表达的分子的His标记的细胞外结构域结合。在一些情形中,刺激剂含有与带镍的三NTA缀合的肽序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称为Strep-tag® II,SEQ ID NO:8中所示)(也称为His-STREPPER或His/Strep-tag® II衔接子)。在一些实施方案中,靶细胞表面上表达的His标记的分子是CD19。

[0466] 在一些实施方案中,刺激剂与重组受体(例如,CAR)的抗体部分特异性结合。在一些情形中,重组受体的抗体部分包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,所述恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。在一些情形中,所述试剂加载有识别IgG4间隔子的 α IgG。

[0467] 在一些实施方案中,期望的靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中,期望的靶标是CD3。在某些实施方案中,期望的靶标是T细胞共刺激分子,例如,CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

[0468] 在一些实施方案中,例如在刺激剂不与刺激剂(例如,寡聚刺激试剂)或选择试剂结合时,所述刺激剂是抗体、二价抗体片段、F(ab)₂或二价单链Fv片段。

[0469] 在一些实施方案中,刺激剂或者一种或多种刺激剂中的每一种还含有用于与所述试剂结合的结合配偶体C。在一些实施方案中,刺激剂或者一种或多种刺激剂中的每一种还含有生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-

Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[0470] 在一些实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白,并且刺激剂或者一种或多种刺激剂中的每一种含有能够结合这样的试剂的结合配偶体C,如生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,刺激剂或者一种或多种刺激剂中的每一种还包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19)。在特定实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素突变蛋白(例如SEQ ID NO:6中所示),并且结合配偶体C是链霉亲和素结合肽,如SEQ ID NO:8或15-19中任一项中所示的任一种。在一些实施方案中,刺激剂或者一种或多种刺激剂中的每一种还包含具有序列SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)的链霉亲和素结合肽。

2. 试剂

[0471] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择剂或刺激剂)含有能够与药剂(例如,选择剂或刺激剂)包含的结合配偶体C可逆结合的一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,所述试剂含有多个结合位点Z,所述结合位点Z各自能够与所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中包括的结合配偶体C特异性结合,使得所述试剂能够与多种药剂(例如,选择剂或刺激剂)可逆结合,例如,是多聚化试剂(例如,选择试剂或刺激剂)。在一些实施方案中,所述试剂是单独分子(例如单体)的寡聚物或聚合物或者构成单独分的复合物子(例如四聚体),其各自含有至少一个结合位点Z。在一些实施方案中,所述试剂含有至少两个结合位点Z、至少三个结合位点Z、至少四个结合位点Z,如至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72或更多个结合位点Z。结合位点可以都是相同的,或者多个结合位点可以含有一个或多个不同的结合位点(例如,Z1、Z2、Z3等)。

[0472] 在一些实施方案中,两种或更多种药剂(例如,选择剂或刺激剂)与所述试剂(例如,选择试剂或刺激剂)缔合(如可逆结合),如经由所述试剂(例如,选择试剂或刺激剂)上存在的一个或多个结合位点Z来进行。在一些情形中,这导致所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)相互紧密布置,使得如果使具有(至少两个拷贝的)细胞表面分子的靶细胞与具有能够结合特定分子的一个或多个结合位点B的药剂(例如,选择剂或刺激剂)接触,则可以发生亲合力效应。

[0473] 在一些实施方案中,相同(即,含有相同结合位点B)的两种或更多种不同的药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以与所述试剂可逆结合。在一些实施方案中,可以使用至少两种

不同(种类的)药剂(例如,选择剂或刺激剂),并且在一些情形中,三种或四种不同(种类的)药剂,例如两种或更多种不同的选择剂和/或刺激剂。例如,在一些实施方案中,可以使所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)与含有结合位点B1、B2、B3或B4等的第一药剂(例如,选择剂或刺激剂)和含有另一个结合位点(例如,结合位点B1、B2、B3或B4中的另一个)的第二药剂(例如,选择剂或刺激剂)可逆结合。在一些情形中,第一药剂与第二药剂的结合位点可以是相同的。例如,在一些方面,至少两种药机(例如,选择剂或刺激剂)中的每一种可以与相同分子结合。在一些情形中,第一药剂与第二药剂的结合位点可以是不同的。在一些方面,至少两种药剂(例如,选择剂或刺激剂)中的每一种可以与不同分子(如第一分子、第二分子等)结合。在一些情形中,不同分子(如细胞表面分子)可以存在于相同靶细胞上。在其他情形中,不同分子(如细胞表面分子)可以存在于同一细胞群中存在的不同靶细胞上。在一些情形中,可以使第三药剂、第四药剂等药剂(例如,选择剂或刺激剂)与相同试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)缔合,所述试剂各自含有另一不同结合位点。

[0474] 在一些实施方案中,两种或更多种不同的药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有相同的结合配偶体C。在一些实施方案中,两种或更多种不同的药剂(例如,选择剂或刺激剂)含有不同的结合配偶体。在一些方面,第一药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以具有结合配偶体C1,所述结合配偶体C1可以与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)上存在的结合位点Z1特异性结合,并且第二药剂(例如,选择剂或刺激剂)可以具有结合配偶体C2,所述结合配偶体C2可以与所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)上存在的结合位点Z1或结合位点Z2特异性结合。因此,在一些情况下,所述试剂包含的多个结合位点Z包括结合位点Z1和Z2,它们分别能够与所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)包含的结合配偶体C1和C2可逆结合。在一些实施方案中,C1与C2是相同的,和/或Z1与Z2是相同的。在其他方面,多个结合位点Z中的一个或多个可以是不同的。在其他情况下,多个结合配偶体C中的一个或多个可以是不同的。熟练技术人员可以熟练地选择与含有结合位点Z的试剂相容的不同结合配偶体C的任何组合,只要每个结合配偶体C能够与结合位点Z之一相互作用(如特异性结合)。

[0475] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)或其混合物,其中这种试剂含有用于与结合配偶体C可逆缔合的一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,结合配偶体C可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够与链霉亲和素特异性结合的其他分子、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,所述试剂是或含有链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素的类似物或突变蛋白、或者抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白,其与生物素、生物素类似物或其生物活性片段可逆结合。在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是或含有可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素的类似物或突变蛋白或抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白。在一些实施方案中,所述物质(例如竞争剂或游离结合剂)可以是能够与结合配偶体C竞争结合一个或多个结合位点Z的生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽。在一些实施方案中,结合配偶体C与所述物质(例如竞争剂或游离结合剂)是不同的,并且与结合配偶体的亲和力相比,所述物质(例如竞争剂或游离结合剂)展现更高的对一个或多个结合位点Z的结合亲和力。

[0476] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白

或类似物(如链霉亲和素样多肽)。同样,在一些方面,抗生物素蛋白包括野生型抗生物素蛋白、或者抗生物素蛋白的突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白,所述中性抗生物素蛋白是具有修饰的精氨酸的去糖基化抗生物素蛋白,其通常展现更中性的 p_i 并且可用作天然抗生物素蛋白的替代物)。通常,去糖基化的中性形式的抗生物素蛋白包括例如那些可商购获得的形式,如可通过Sigma Aldrich公司获得的“Extravidin”,或可从Thermo Scientific或Invitrogen公司获得的“NeutrAvidin”。

[0477] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方案中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)具有Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882中披露的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。通常,链霉亲和素作为四个相同亚基的四聚体天然地存在,即,它是同四聚体,其中每个亚基含有用于生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的单一结合位点。链霉亲和素亚基的示例性序列是在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列,但是这种序列还可以包括在其来自其他链霉菌属(*Streptomyces*)物种的同源物中存在的序列。特定地,链霉亲和素的每个亚基可以展现对生物素的强结合亲和力,其平衡解离常数(K_D)大致为约 10^{-14} M。在一些情形中,链霉亲和素可以作为单价四聚体存在,其中四个结合位点中仅一个具有功能性(Howarth等人(2006)Nat. Methods, 3:267-73;Zhang等人(2015)Biochem.Biophys.Res.Comm.,463:1059-63);作为二价四聚体存在,其中四个结合位点中的两个具有功能(Fairhead等人(2013)J.Mol.Biol.,426:199-214);或者可以以单体或二聚形式存在(Wu等人(2005)J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等人(2010)Biochemistry, 50:8682-91)。

[0478] 在一些实施方案中,链霉亲和素可以是任何形式,如野生型或未经修饰的链霉亲和素,如来自链霉菌属物种的链霉亲和素或其功能活性片段,所述功能活性片段包括含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的结合位点的至少一个功能性亚基,如通常含有SEQ ID NO:1所示的来自阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)的野生型链霉亲和素的至少一个功能性亚基或其功能活性片段。例如,在一些实施方案中,链霉亲和素可以包括野生型链霉亲和素的片段,所述片段在N末端和/或C末端被缩短。这样的最小链霉亲和素包括在SEQ ID NO:1的氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在SEQ ID NO:1的氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止的任何链霉亲和素。在一些实施方案中,链霉亲和素的功能活性片段含有在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,如在SEQ ID NO:2中所示的链霉亲和素可以在对应于Ala13(其编号如SEQ ID NO:1中所示)的位置处进一步含有N末端甲硫氨酸。提及链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中的残基位置是参考SEQ ID NO:1中残基的编号。

[0479] 在一些方面,链霉亲和素突变蛋白包括如下多肽,所述多肽与未修饰或野生型链霉亲和素的序列相差一个或多个氨基酸取代、缺失或添加,但是包括含有用于生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的结合位点的至少一个功能性亚基。在一些方面,链霉亲和素样多肽和链霉亲和素突变蛋白可以是如下多肽,所述多肽本质上与野生型链霉亲和素是免疫学等同的,并且特别是能够以与wt-链霉亲和素相同或不同的亲和力结合生物素、生物素衍生物或生物素类似物。在一些情形中,链霉亲和素样多肽或链霉亲和素突变蛋白可以含有不是野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者它们可以仅包括野生型链霉

亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素样多肽是与野生型链霉亲和素不相同的多肽,因为宿主不具有为了将宿主产生的多肽转化为野生型链霉亲和素的结构所必需的酶。在一些实施方案中,链霉亲和素也可以作为链霉亲和素四聚体和链霉亲和素二聚体(特别是链霉亲和素同四聚体、链霉亲和素同二聚体、链霉亲和素异四聚体和链霉亲和素异二聚体)存在。通常,每个亚基通常具有针对生物素或生物素类似物或针对链霉亲和素结合肽的结合位点。链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白的例子在例如WO 86/02077、DE 19641876 A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中有提及。

[0480] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以含有不是未经修饰的或野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或者可以仅包括野生型或未经修饰的链霉亲和素的一部分。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有至少一个亚基,所述至少一个亚基与未经修饰的或野生型链霉亲和素的亚基相比(例如与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素亚基或例如在SEQ ID NO:2中所示的其功能活性片段相比)可以具有一个或多个氨基酸取代(替代)。在一些实施方案中,与野生型或未修饰的链霉亲和素相比,链霉亲和素突变蛋白的至少一个亚基可以具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸差异,和/或含有至少一个亚基,所述亚基包含展现与SEQ ID NO:1或2中所示氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,其中这种链霉亲和素突变蛋白展现结合生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的功能活性。在一些实施方案中,氨基酸替代(取代)是保守的或非保守的突变。链霉亲和素突变蛋白的例子是本领域中已知的,参见例如,美国专利号5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;或6,368,813;或者国际公开的PCT申请号WO 2014/076277。

[0481] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包括含有一个或多个一个功能性亚基(如两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个,以及在一些情形中,5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个或更多个功能性亚基)的蛋白质,所述功能性亚基含有针对生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白可以包括单体;二聚体,包括异二聚体或同二聚体;四聚体,包括同四聚体、异四聚体、单价四聚体或二价四聚体;或者可以包括更高级的多聚体或其寡聚物。

[0482] 在一些实施方案中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对肽配体结合配偶体的结合亲和力小于 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$,但通常大于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。例如,如美国专利号5,506,121中披露的肽序列(Strep-tag)可以用作生物素模拟物并显示对链霉亲和素的结合亲和力,例如, K_D 大约在 10^{-4}M 与 10^{-5}M 之间。在一些情形中,所述结合亲和力可以通过在链霉亲和素分子内进行突变来进一步改进,参见例如美国专利号6,103,493或国际公开的PCT申请号WO 2014/076277。在一些实施方案中,结合亲和力可以通过本领域已知的方法(例如下面描述的任何方法)来确定。

[0483] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂,如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白)展现对肽配体结合配偶体的结合亲和力,所述肽配体结合配偶体可以是所述药剂(例如,选择剂或刺激剂)中存在的结合配偶体C。在一些实施方案中,肽序列含有具有SEQ ID NO:9中所示通式的序列,如含有SEQ ID NO:10中所示的序列。在一些实施方案

中,肽序列具有SEQ ID NO:11中所示,如SEQ ID NO:12中所示的通式。在一个例子中,肽序列是Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly (也称为**Strep-tag®**,SEQ ID NO:7中所示)。在一个例子中,肽序列是Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (也称为**Strep-tag® II**,SEQ ID NO:8中所示)。在一些实施方案中,肽配体含有至少两个链霉亲和素结合模块的顺序排列,其中在所述两个模块之间的距离为至少0个且不大于50个氨基酸,其中一个结合模块具有3个至8个氨基酸并且含有至少序列His-Pro-Xaa (SEQ ID NO:9),其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,并且其中另一个结合模块具有相同或不同的链霉亲和素肽配体,如在SEQ ID NO:11中所示(参见例如国际公开的PCT申请号W002/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方案中,肽配体含有具有SEQ ID NO:13或14中任一所示的式的序列。在一些实施方案中,肽配体具有SEQ ID NO:15-19中任一所示的氨基酸序列。

[0484] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是或含有链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性部分相比,链霉亲和素突变蛋白含有一个或多个突变(例如氨基酸替代)。例如,链霉亲和素的生物活性部分可以包括在N末端和/或C末端处被缩短的链霉亲和素变体,其在一些情形中被称为最小链霉亲和素。在一些实施方案中,可以对其进行任何突变的N末端缩短的最小链霉亲和素,与在SEQ ID NO:1中所示的序列相比,在氨基酸位置10至16的区域中的N末端开始并且在氨基酸位置133至142的区域中的C末端终止。在一些实施方案中,可以对其进行任何突变的N末端缩短的链霉亲和素,含有在SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,最小链霉亲和素含有从位置Ala13至Ser139的氨基酸序列,并且任选地具有N末端甲硫氨酸残基而不是Ala13。出于本文的目的,氨基酸位置的编号始终是指SEQ ID NO:1中所示的wt-链霉亲和素的编号(例如Argarana等人,Nucleic Acids Res.14(1986),1871-1882,还参见图3)。

[0485] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白是如美国专利号6,103,493中所述的突变体。在一些实施方案中,基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列(如SEQ ID NO:1中所示),链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域含有至少一个突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在一个或多个残基44、45、46和/或47处含有突变。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有疏水性脂肪族氨基酸(例如Val、Ala、Ile或Leu)对野生型链霉亲和素的位置44处的Glu的替代、位置45处的任何氨基酸、位置46处的脂肪族氨基酸(如疏水性脂肪族氨基酸)和/或碱性氨基酸(例如Arg或Lys,如通常Arg)对位置47处的Val的替代。在一些实施方案中,Ala位于位置46和/或Arg位于位置47和/或Val或Ile位于位置44。在一些实施方案中,链霉亲和素突变体含有残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,如含有SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白(也称为链霉亲和素突变体1,SAM1)中所示。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,如含有SEQ ID NO:5或6中所示的氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白(也称为SAM2)中所示。在一些情形中,这样的链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中,并且可以商标**Strep-Tactin®**商购获得。

[0486] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白是如国际公开的PCT申请号W02014/076277中所述的突变体。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44至53的区域中含有至少两个半胱氨酸残基。在一些实施

方案中,所述半胱氨酸残基存在于位置45和52,以产生连接这些氨基酸的二硫桥。在这样的实施方案中,氨基酸44通常是甘氨酸或丙氨酸,并且氨基酸46通常是丙氨酸或甘氨酸,并且氨基酸47通常是精氨酸。在一些实施方案中,参考在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸残基115至121的区域中含有至少一个突变或氨基酸差异。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有在氨基酸位置117、120和121处的至少一个突变、和/或氨基酸118和119的缺失以及至少氨基酸位置121的取代。

[0487] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白在与位置117对应的位置处含有突变,所述突变可以是大的疏水性残基像Trp、Tyr或Phe,或者带电残基像Glu、Asp或Arg,或者亲水性残基像Asn或Gln,或者在一些情形中,疏水性残基Leu、Met或Ala,或者极性残基Thr、Ser或His。在一些实施方案中,位置117处的突变与以下突变组合:与位置120对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为小的残基像Ser或Ala或Gly),以及与位置121对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为疏水性残基,如庞大的疏水性残基像Trp、Tyr或Phe)。在一些实施方案中,在位置117处的突变与以下突变组合:与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性片段的位置120对应的位置处的突变(所述突变可以是疏水性残基如Leu、Ile、Met或Val,或通常Tyr或Phe),以及与在SEQ ID NO:1中所示的野生型链霉亲和素或其生物活性片段的位置相比的位置121对应的位置处的突变(所述突变可以是突变为小的残基像Gly、Ala或Ser,或突变为Gln,或突变为疏水性残基像Leu、Val、Ile、Trp、Tyr、Phe或Met)。在一些实施方案中,这样的突变蛋白还可以含有残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白含有残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰和Tyr¹²¹。在一些实施方案中,突变蛋白链霉亲和素含有SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列,或者展现与SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,含有残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰和Tyr¹²¹并且展现与生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽结合的功能活性。

[0488] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白可以以任何组合含有任何上文突变,并且所得链霉亲和素突变蛋白可以展现如下结合亲和力:对于肽配体(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly;也称为**Strep-tag®**,SEQ ID NO:7中所示),小于 2.7×10^{-4} M;和/或对于肽配体(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys;也称为**Strep-tag® II**,SEQ ID NO:8中所示),小于 1.4×10^{-4} M;和/或对于SEQ ID NO:7-19中任一个所示的任何肽配体,小于 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、 5×10^{-6} M或 1×10^{-7} M,但通常大于 1×10^{-13} M、 1×10^{-12} M或 1×10^{-11} M。

[0489] 在一些实施方案中,链霉亲和素突变蛋白展现SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个所示的氨基酸序列,或者展现与SEQ ID NO:3-6、27或28中任一个所示的氨基酸序列的至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列,并且展现如下结合亲和力:对于肽配体(Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly;也称为**Strep-tag®**,SEQ ID NO:7中所示),小于 2.7×10^{-4} M;和/或对于肽配体(Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys;也称为**Strep-tag® II**,SEQ ID NO:8中所示),小于 1.4×10^{-4} M;和/或对于SEQ ID NO:7-19中任一个所示的任何肽配体,小于 1×10^{-4} M、 5×10^{-4} M、 1×10^{-5} M、 5×10^{-5} M、 1×10^{-6} M、

$5 \times 10^{-6} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 但通常大于 $1 \times 10^{-13} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-12} \text{M}$ 或 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。

[0490] 在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白包含 SEQ ID NO: 3-6、27 或 28 中任一个所示的氨基酸序列, 并且链霉亲和素结合肽包含 SEQ ID NO: 7-19 中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白包含 SEQ ID NO: 6 中所示的氨基酸序列, 并且链霉亲和素结合肽包含 SEQ ID NO: 7-19 中任一个所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白包含 SEQ ID NO: 3-6、27 或 28 中任一个所示的氨基酸序列, 并且链霉亲和素结合肽包含 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白包含 SEQ ID NO: 6 中所示的氨基酸序列, 并且链霉亲和素结合肽包含 SEQ ID NO: 16 中所示的氨基酸序列。

[0491] 在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白还展现与其他链霉亲和素配体 (例如但不限于生物素、亚氨基生物素、硫辛酸、脱硫生物素、二氨基生物素、HABA (羟基偶氮苯-苯甲酸) 和/或二甲基-HABA) 的结合。在一些实施方案中, 链霉亲和素突变蛋白展现对另一种链霉亲和素配体 (如生物素或脱硫生物素) 的结合亲和力, 所述结合亲和力大于所述链霉亲和素突变蛋白对生物素模拟肽配体 (例如, 如 SEQ ID NO: 7-19 中任一个所示) 的结合亲和力。因此, 在一些实施方案中, 生物素或生物素类似物或衍生物 (例如脱硫生物素) 可以在所提供的方法中用作竞争剂。例如, 作为例子, 命名为 **Strep-tactin[®]** 的突变蛋白链霉亲和素 (例如含有 SEQ ID NO: 4 中所示序列) 与命名为 **Strep-tag[®] I** 的肽配体 (例如 SEQ ID NO: 8 中所示) 的相互作用的特征为, 与生物素-链霉亲和素相互作用的大约 10^{-13}M 相比, 其结合亲和力的 K_D 为大约 10^{-6}M 。在一些情形中, 能够以 K_D 在或在约 10^{-10} 与 10^{-13}M 之间的高亲和力结合 **Strep-tactin[®]** 的生物素可以与 **Strep-tag[®] II** 竞争结合位点。

[0492] 在一些情形中, 所述试剂 (例如, 选择试剂或刺激试剂) 含有可能能够与过渡金属离子结合的至少两个螯合基团 K。在一些实施方案中, 所述试剂 (例如, 选择试剂或刺激试剂) 可能能够结合至寡聚组氨酸亲和标签、谷胱甘肽-S-转移酶、钙调蛋白或其类似物、钙调蛋白结合肽 (CBP)、FLAG-肽、HA 标签、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、HSV 表位、myc 表位和/或生物素化的载体蛋白。

[0493] 在一些实施方案中, 所述试剂 (例如, 选择试剂或刺激试剂) 是寡聚物或聚合物。在一些实施方案中, 寡聚物或聚合物可以通过将蛋白质的单独分子按其天然存在的样子直接或间接地连接, 通过将单体的单独分子或构成单独分子的亚基复合物直接或间接地连接 (例如, 将蛋白质的二聚体、三聚体、四聚体等按其天然存在的样子直接或间接地连接) 来生成。例如, 链霉亲和素或抗生物素蛋白的四聚体或二聚体可以称为相应的寡聚物或聚合物的单独分子或最小构建块。在一些实施方案中, 寡聚物或聚合物可以含有蛋白质的至少 2 个单独分子的连接 (例如是 2 聚体), 或者可以是蛋白质的单独分子 (例如, 单体、四聚体) 的至少 3 聚体、4 聚体、5 聚体、6 聚体、7 聚体、8 聚体、9 聚体、10 聚体、11 聚体、12 聚体、13 聚体、14 聚体、15 聚体、16 聚体、17 聚体、18 聚体、19 聚体、20 聚体、25 聚体、30 聚体、35 聚体、40 聚体、45 聚体或 50 聚体。

[0494] 可以使用在本领域中已知的任何方法 (如在公布的美国专利申请号 US2004/0082012 中描述的任何方法) 来生成寡聚物。在一些实施方案中, 寡聚物或聚合物含有两个或更多个单独分子, 所述两个或更多个单独分子可以交联, 如通过多糖或双功能接头交联。

[0495] 在一些实施方案中,寡聚物或聚合物是通过在多糖的存在下使单独分子或构成单独分子的亚基复合物交联来获得。在一些实施方案中,寡聚物或聚合物可以通过将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中来制备。在一些方面,所述试剂的单独分子(例如,单体、四聚体)可以使用常规碳二亚胺化学经由内部赖氨酸残基的伯氨基和/或游离N末端与葡聚糖骨架中的羧基偶联。在一些实施方案中,以每摩尔葡聚糖约60摩尔所述试剂的单独分子(例如,单体、四聚体)的摩尔比进行偶联反应。

[0496] 在一些实施方案中,所述试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)是一种或多种链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素的任何类似物或突变蛋白(例如Strep-Tactin®或Strep-Tactin® XT)或者抗生物素蛋白的类似物或突变蛋白(例如中性抗生物素蛋白)的寡聚物或聚合物。在一些实施方案中,结合位点Z是抗生物素蛋白或链霉亲和素的天然生物素结合位点,对于其在单独分子中可以存在多达四个结合位点(例如四聚体含有四个结合位点Z),借此同四聚体可以含有多达4个相同的结合位点(即Z1),而异四聚体可以含有多达4个可能不同的结合位点,例如含有Z1和Z2。在一些实施方案中,寡聚物是从相同链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的多个单独分子(例如多个同四聚体)生成或产生,在所述情形中寡聚物的每个结合位点Z(例如Z1)是相同的。例如,在一些情形中,寡聚物可以含有多个结合位点Z1,如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个结合位点Z1。在一些实施方案中,寡聚物是从以下生成或产生的:多个单独分子,所述多个单独分子可以是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的异四聚体;和/或链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白的两种或更多种不同单独分子(例如不同的同四聚体)中的多种,所述单独分子的差异在于其结合位点Z(例如Z1和Z2),在所述情形中多个不同的结合位点Z(例如Z1和Z2)可能存在于寡聚物中。例如,在一些情形中,寡聚物可以含有多个结合位点Z1和多个结合位点Z,其组合可以包括至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个组合的结合位点Z1和Z2。

[0497] 在一些情形中,相应的寡聚物或聚合物可以通过多糖交联。在一个实施方案中,链霉亲和素或抗生物素蛋白或链霉亲和素类似物或抗生物素蛋白类似物(例如,中性抗生物素蛋白)的寡聚物或聚合物可以通过在第一步骤中将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)中来制备,基本上如Noguchi, A, 等人, Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137中所述。在一些这样的方面,然后可以在第二步骤中使用常规碳二亚胺化学将链霉亲和素或抗生物素蛋白或其类似物经由内部赖氨酸残基的伯氨基和/或游离N末端与葡聚糖骨架中的羧基连接。在一些情形中,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何类似物的交联寡聚物或聚合物还可以通过经由用作接头的双功能分子(如戊二醛)交联或者通过本领域中描述的其他方法来获得。

[0498] 在一些实施方案中,寡聚物或聚合物通过使用双功能接头或其他化学接头(如戊二醛)交联单独分子或构成单独分子的亚基复合物或者通过本领域已知的其他方法获得。在一些方面,链霉亲和素或抗生物素蛋白或者链霉亲和素或抗生物素蛋白的任何突变蛋白

或类似物的交联寡聚物或聚合物可以通过经由用作接头的双功能分子(如戊二醛)交联单独链霉亲和素或抗生物素蛋白分子或通过本领域中描述的其他方法获得。例如,有可能通过将硫醇基团引入链霉亲和素突变蛋白(例如,这可以通过使链霉亲和素突变蛋白与2-亚氨基硫杂环戊烷(Trauts试剂)反应并且通过例如在单独的反应中激活在链霉亲和素突变蛋白中可用的氨基来进行)来生成链霉亲和素突变蛋白的寡聚物。在一些实施方案中,氨基的这种激活可以通过使链霉亲和素突变蛋白与可商购获得的异双功能交联剂(如磺基琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-甲酸酯(磺基SMCC)或琥珀酰亚胺基-6-(β-马来酰亚胺丙酰胺基)己酸酯(SMPH))的反应来实现。在一些这样的实施方案中,将如此获得的两种反应产物混合在一起,通常导致在一批经修饰的链霉亲和素突变蛋白中包含的硫醇基团与另一批经修饰的链霉亲和素突变蛋白的激活的(如通过马来酰亚胺官能团)氨基酸反应。在一些情形中,通过这一反应,形成链霉亲和素突变蛋白的多聚体/寡聚物。这些寡聚物可以具有任何合适数量的单独分子,如至少2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、21个、22个、23个、24个、25个、26个、27个、28个、29个、30个、31个、32个、33个、34个、35个、40个、45个、50个或更多个,并且寡聚化程度可以根据反应条件而改变。

[0499] 在一些实施方案中,寡聚或聚合试剂(例如,选择试剂或刺激试剂)可以经由尺寸排阻色谱来分离,并且可以使用任何所需级分作为所述试剂。例如,在一些实施方案中,在2-亚氨基硫杂环戊烷和异双功能交联剂(如磺基SMCC)的存在下,使经修饰的链霉亲和素突变蛋白反应之后,可以经由尺寸排阻色谱法分离寡聚物或聚合物试剂,并且可以使用任何所希望的级分作为所述试剂。在一些实施方案中,寡聚物不具有(并且不需要具有)单一分子量,但是它们可以观察到统计权重分布,如高斯分布。在一些情形中,可以使用具有多于三个链霉亲和素或突变蛋白四聚体(例如同四聚体或异四聚体)的任何寡聚物作为可溶性试剂,如通常3个至50个四聚体(例如同四聚体或异四聚体)、10个至40个四聚体(例如,同四聚体或异四聚体)或25个至35个四聚体(例如同四聚体或异四聚体)。寡聚物可以具有例如3至25个链霉亲和素突变蛋白四聚体(例如,同四聚体或异四聚体)。在一些方面,在链霉亲和素突变蛋白的分子量为约50kDa的情况下,可溶性寡聚物可以具有如下的分子量:从约150kDa至约2000kDa、约150kDa至约1500kDa、约150kDa至约1250kDa、约150kDa至1000kDa、约150kDa至约500kDa或约150kDa至约300kDa、约300kDa至约2000kDa、约300kDa至约1500kDa、约300kDa至约1250kDa、约300kDa至1000kDa、约300kDa至约500kDa、约500kDa至约2000kDa、约500kDa至约1500kDa、约500kDa至约1250kDa、约500kDa至1000kDa、约1000kDa至约2000kDa、约1000kDa至约1500kDa、约1000kDa至约1250kDa、约1250kDa至约2000kDa或约1500kDa至约2000kDa。通常,因为每个链霉亲和素分子/突变蛋白具有四个生物素结合位点,所以这种试剂可以提供12个至160个结合位点Z,如12个至100个结合位点Z。

a. 寡聚刺激试剂

[0500] 在特定实施方案中,刺激试剂含有与一种或多种刺激剂缀合、连接或附接的寡聚刺激试剂,例如,链霉亲和素突变蛋白试剂。如上所述,在一些实施方案中,一种或多种刺激剂具有能够在特定结合位点(例如,结合位点Z)与寡聚刺激试剂结合的附接的结合结构域或结合配偶体(例如,结合配偶体C)。在一些实施方案中,多种刺激剂与寡聚刺激试剂可逆结合。在各种实施方案中,寡聚刺激试剂具有多个特定结合位点Z,所述结合位点Z在某些实

施方案中与多种刺激剂在结合结构域(例如,结合配偶体C)处可逆结合。在一些实施方案中,结合的药剂的量在竞争剂的存在下有所减少或降低,所述竞争剂例如也能够与特定结合位点(例如,结合位点Z)结合的药剂。

[0501] 在一些实施方案中,刺激试剂是或包括可逆系统,其中至少一种刺激剂(例如,能够在细胞(如T细胞)中产生信号的刺激剂)与寡聚刺激试剂缔合,例如,可逆缔合。在一些实施方案中,所述试剂含有能够与刺激剂结合(例如,可逆结合)的多个结合位点。在一些情形中,所述试剂是具有能够在细胞(如T细胞)中产生信号(例如,刺激信号)的至少一种附接药剂的寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,刺激剂含有可以特异性结合分子的表位或区域的至少一个结合位点(例如,结合位点B),并且还含有与寡聚刺激试剂的至少一个结合位点(例如,所述试剂的结合位点Z)特异性结合的结合配偶体(在本文中也称为结合配偶体C)。在一些实施方案中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些情形中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是共价相互作用。在一些实施方案中,结合配偶体C与至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(如非共价相互作用)是可逆的。

[0502] 可以在这样的可逆系统中用作寡聚刺激试剂的物质是已知的,参见例如,美国专利号5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;以及国际公开的PCT申请号W02013/124474和W02014/076277。能够形成可逆相互作用的试剂和结合配偶体以及能够逆转这种结合的物质(例如竞争剂)的非限制性例子描述于下文中。

[0503] 在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或类似物(如中性抗生物素蛋白)或其混合物的寡聚物,其中这种寡聚刺激试剂含有用于与刺激剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)可逆缔合的一个或多个结合位点。在一些实施方案中,刺激剂的结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够与链霉亲和素特异性结合的其他分子、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物。

[0504] 在某些实施方案中,一种或多种刺激剂(例如,能够在细胞如T细胞中产生信号的药剂)与寡聚刺激试剂缔合(如可逆地结合),如经由寡聚刺激试剂上存在的多个特定结合位点(例如,结合位点Z)。在一些情形中,这导致刺激剂相互紧密布置,使得如果使具有(至少两个拷贝的)被刺激剂结合或识别的细胞表面分子的靶细胞与所述药剂接触,则可以发生亲合力效应。

[0505] 在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是链霉亲和素寡聚物、链霉亲和素突变蛋白寡聚物、链霉亲和素类似物寡聚物、抗生物素蛋白寡聚物、由抗生物素蛋白突变蛋白或抗生物素蛋白类似物(如中性抗生物素蛋白)构成的寡聚物或其混合物。在特定实施方案中,寡聚刺激试剂含有能够与刺激剂的结合结构域(例如,结合配偶体C)结合的特定结合位点。在一些实施方案中,结合结构域可以是生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽或能够特异性结合链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物的其他分子。被认为包含寡聚刺激试剂系统的链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、链霉亲和素类似物、抗生物素蛋白、抗生物素蛋白突变蛋白或抗生物素蛋白类似物(如中性抗生物素蛋白)和结合结构域分子(例如,生物素、生物素衍生物或类似物、或

链霉亲和素结合肽或者能够与链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、抗生物素蛋白或抗生物素蛋白突变蛋白或类似物特异性结合的其他分子)的例子描述于章节II-B中。本文提供的方法还考虑到,寡聚刺激试剂可以包含能够与以下结合的分子:寡聚组氨酸亲和标签、谷胱甘肽-S-转移酶、钙调蛋白或其类似物、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG肽、HA标签、麦芽糖结合蛋白(MBP)、HSV表位、myc表位和/或生物素化的载体蛋白(参见章节II-B)。

[0506] 在本文提供的特定实施方案中,是由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚刺激试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚刺激试剂含有与一种或多种刺激剂可逆结合或能够可逆结合的多个结合位点。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂具有在70nm与125nm之间且包含端值的半径(例如,平均半径);在 1×10^7 g/mol与 1×10^9 g/mol且包含端值的分子量;和/或在1,000与5,000之间且包含端值的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂与一种或多种刺激剂(如与细胞表面上的分子(例如受体)结合的药剂)结合,例如,可逆结合。在某些实施方案中,一种或多种刺激剂是本文例如在章节II-B中所述的药剂。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂含有单价结合位点(例如,结合位点B)。在一些实施方案中,单价结合位点与CD3结合。在一些实施方案中,单价结合位点与共刺激分子结合,例如如本文所述。在一些实施方案中,单价结合位点与CD28结合。在一些实施方案中,一种或多种刺激剂含有能够与CD3和/或CD28结合的单价结合位点。在一些实施方案中,刺激剂是抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,如含有结合配偶体C(例如,链霉亲和素结合肽,例如**Strep-tag® II**)的抗体或其抗原片段。在特定实施方案中,一种或多种药剂是含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如**Strep-tag® II**)的抗CD3和/或抗CD28Fab。在特定实施方案中,一种或多种药剂包含基于链霉亲和素的寡聚物,如与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是如WO 2015/158868或WO 2018/197949中所述的任一种。

[0507] 在一些实施方案中,本文提供由多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体构成和/或含有多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚刺激试剂。在某些实施方案中,本文提供的寡聚刺激试剂含有与一种或多种刺激剂可逆结合或能够可逆结合的多个结合位点。在一些实施方案中,寡聚颗粒具有在80nm与120nm之间且包含端值的半径(例如,平均半径);在 7.5×10^6 g/mol与 2×10^8 g/mol之间且包含端值的分子量(例如,平均分子量);和/或在500与10,000之间且包含端值的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体的量(例如,平均量)。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂与一种或多种刺激剂(如与细胞表面上的分子(例如受体)结合的药剂)结合,例如,可逆结合。在某些实施方案中,一种或多种刺激剂是本文例如在章节II-B中所述的药剂。在一些实施方案中,刺激剂是抗CD3和/或抗CD28抗体或其抗原结合片段,如含有结合配偶体C(例如,链霉亲和素结合肽,例如**Strep-tag® II**)的抗体或其抗原片段。在特定实施方案中,一种或多种药剂是含有结合配偶体(例如,链霉亲和素结合肽,例如Twin-Strep-tag,例如,SEQ ID NO:16)的抗CD3和/或抗CD28 Fab。

[0508] 在一些实施方案中,在以下的存在下刺激细胞:每 10^6 个细胞为、为约或为至少0.01μg、0.02μg、0.03μg、0.04μg、0.05μg、0.1μg、0.2μg、0.3μg、0.4μg、0.5μg、0.75μg、1μg、2μg、2.2μg、2.4μg、2.6μg、2.8μg、3μg、4μg、5μg、6μg、7μg、8μg、9μg、或10μg的寡聚刺激试剂

(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在每 10^6 个细胞为或为约4 μ g的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或为约0.8 μ g的存在下刺激细胞。在某些方面,4 μ g寡聚刺激试剂是或包括3 μ g寡聚颗粒和1 μ g衔接药剂,例如,0.5 μ g抗CD3 Fab和0.5 μ g抗CD28 Fab。

[0509] 在一些实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约3 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约2.75 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约2.5 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约2.25 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约2 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约1.8 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约1.6 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约1.4 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约1.2 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约1 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在特定实施方案中,在以下的存在下对所述细胞进行刺激或使其经历刺激:每 10^6 个细胞为或为约0.8 μ g的寡聚刺激试剂(例如,基于链霉亲和素的寡聚物,如链霉亲和素突变蛋白寡聚物,其与Strep标记的抗CD3和Strep标记的抗CD28 Fab缀合)。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 10×10^8 、 9×10^8 、 8×10^8 、 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 、 2×10^8 、 1×10^8 寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 7×10^8 、 6×10^8 、 5×10^8 、 4×10^8 、 3×10^8 寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 7×10^8 至

3×10^8 寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 6×10^8 至 4×10^8 寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 6×10^8 至 5×10^8 寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,在以下的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激:为或为约 5×10^8 寡聚刺激试剂。

[0510] 在一些实施方案中,在以下比率的寡聚刺激试剂与细胞的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激或使其经历刺激:为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1。在特定实施方案中,寡聚刺激试剂与细胞的比率在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间、在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中,寡聚刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。在特定实施方案中,寡聚刺激试剂与细胞的比率为约0.3:1或为0.3:1。在特定实施方案中,寡聚刺激试剂与细胞的比率为约0.2:1或为0.2:1。

C. 通过色谱进行细胞选择

[0511] 使用本文公开的装置,本文提供如下方法,其中通过色谱分离(如通过柱色谱,包括亲和色谱或凝胶渗透色谱)来选择样品的细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,所述方法采用与位于靶细胞(例如,要分离、选择或富集的细胞)表面上的选择标记结合的选择剂。这样的方法可以被描述为(无痕)细胞亲和色谱技术(CATCH),并且可以包括PCT申请号WO 2013124474和WO 2015164675中描述的任何方法或技术,所述申请是通过引用以其整体特此并入。示例性选择剂描述于章节II-B-1中。

[0512] 在任何前述实施方案中,样品可以是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。在一些实施方案中,所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的。在其他实施方案中,单采术或白细胞单采术产物从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。在一些实施方案中,靶细胞是T细胞。

[0513] 在一些实施方案中,细胞(例如,靶细胞)在细胞表面上具有或表达如本文所述的选择标记,使得通过至少一种共有特异性受体分子的存在来限定要分离、选择或富集的细胞。在一些实施方案中,含有靶细胞的样品还含有全无选择标记的另外的细胞。例如,在一些实施方案中,从含有多个细胞类型(例如,红细胞或B细胞)的样品选择、分离或富集T细胞。

[0514] 在一些实施方案中,选择剂包含于色谱柱中,例如,与色谱基质(例如,固定相)直接或间接结合。在一些实施方案中,在将样品添加至柱时,选择剂存在于色谱基质(例如,固定相)上。在一些实施方案中,选择剂能够经由试剂(例如,选择试剂)与色谱基质(例如,固定相)间接结合。在一些实施方案中,选择试剂与柱的固定相共价或非共价结合。在一些实施方案中,选择试剂可逆地固定在色谱基质(例如,固定相)上。在一些情形中,选择试剂经由共价键固定在色谱基质(例如,固定相)上。在一些方面,选择试剂非共价地可逆地固定在色谱基质(例如,固定相)上。

[0515] 在一些实施方案中,在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)时,选择剂可以存在(例如,直接结合(例如,共价或非共价)或经由选择试剂间接结合)于色谱基质(例如,固定相)上。因此,在添加样品后,靶细胞可以被选择剂结合并固定在柱的色谱基质(例如,固定相)上。可替代地,在一些实施方案中,可以将选择剂添加至样品。按这种方式,选择剂与样

品中的靶细胞(例如,T细胞)结合,然后将样品添加至包含选择试剂的色谱基质(例如,固定相),其中已经与靶细胞结合的选择剂与选择试剂结合,从而将靶细胞固定在色谱基质(例如,固定相)上。在一些实施方案中,选择剂经由包含于选择剂中的如本文所述的结合配偶体C与如本文所述的选择试剂结合。

[0516] 在一些实施方案中,两种或更多种选择剂如经由存在于选择试剂上的一个或多个结合位点Z与所述选择试剂缔合(如可逆或不可逆地结合)。在一些情形中,这导致选择剂相互紧密布置,使得如果使具有(至少两个拷贝的)细胞表面分子(例如,选择标记)的靶细胞与能够结合特定分子(例如,选择标记)的选择剂接触,则可以发生亲合力效应。

[0517] 在一些实施方案中,相同的(即具有相同的选择标记结合特异性)的两种或更多种不同选择剂可以可逆地结合至选择试剂。在一些实施方案中,可以使用至少两种不同选择剂,并且在一些情形中,可以使用结合至不同选择标记的三种或四种不同选择剂。在一些方面,所述至少两种选择剂中的每一种可以结合至不同分子(例如,选择标记),如第一分子、第二分子等。在一些情形中,不同分子(例如,选择剂,如细胞表面分子)可以存在于同一靶细胞上。在其他情况下,不同分子(例如,选择标记,如细胞表面分子)可以存在于同一细胞群中存在的不同靶细胞上。在一些情形中,第三选择剂、第四选择剂等选择剂可以与相同试剂缔合,其各自含有另一不同结合位点。

[0518] 在一些实施方案中,所述两种或更多种不同选择剂含有相同的结合配偶体C。在一些实施方案中,所述两种或更多种不同选择剂含有不同的结合配偶体。在一些方面,第一选择剂可以具有结合配偶体C1,所述结合配偶体C1可以与存在于选择试剂上的结合位点Z1特异性结合,并且第二选择剂可以具有结合配偶体C2,所述结合配偶体C2可以与存在于选择试剂上的结合位点Z1或结合位点Z2特异性结合。因此,在一些情况下,选择试剂包含的多个结合位点Z包括结合位点Z1和Z2,它们分别能够可逆地结合至选择剂包含的结合配偶体C1和C2。在一些实施方案中,C1与C2是相同的,和/或Z1与Z2是相同的。在其他方面,多个结合位点Z中的一个或多个可以是不同的。在其他情况下,多个结合配偶体C中的一个或多个可以是不同的。熟练技术人员可以熟练地选择与含有结合位点Z的选择试剂相容的不同结合配偶体C的任何组合,只要每个结合配偶体C能够与结合位点Z之一相互作用(如特异性结合)。

[0519] 在一些实施方案中,在结合配偶体C与结合位点Z之间形成的可逆键可能被竞争剂和/或游离结合剂破坏。在一些实施方案中,竞争剂和/或游离结合剂可以是生物素、生物素衍生物或类似物或者链霉亲和素结合肽,其能够与结合配偶体C竞争结合一个或多个结合位点Z。在一些实施方案中,结合配偶体C与竞争剂和/或游离结合剂是不同的,并且竞争剂和/或游离结合剂展现与结合配偶体的亲和力相比更高的对一个或多个结合位点Z的结合亲和力。在本文所提供的任何方法的特定方面,将竞争剂和/或游离结合剂添加至色谱柱的固定相以破坏选择剂与选择试剂的结合并不是使靶细胞(例如,T细胞)从色谱基质(例如,固定相)脱附所需的。

[0520] 在一些实施方案中,可以从样品耗尽样品的细胞(例如,靶细胞),如通过从色谱基质(例如,固定相)冲洗、释放或洗涤剩余样品来进行。在一些实施方案中,使用一个或多个(例如,2、3、4、5、6)个洗涤步骤从色谱基质(例如,固定相)去除未结合的细胞和碎片。在一些实施方案中,在进行一个或多个洗涤步骤之前,允许样品将基质渗透至少或约5、10、16、

20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100或120分钟。

[0521] 可以采用任何材料作为色谱基质(例如,固定相)。通常,合适的色谱材料是基本上无害的,即对细胞活力无害,例如当在所希望的条件用于填充色谱柱时。在一些实施方案中,固定相保持在预定的定位中,如预定的位置,而样品的定位处于改变中。因此,在一些实施方案中,固定相是色谱系统的一部分,流动相流通(通过流通式或以分批模式)所述部分并且其中在各相之间出现液相中所含(溶解的或分散的)组分的分布。

[0522] 在一些实施方案中,色谱基质具有固相或半固相的形式,而含有要分离/分开的靶细胞的样品是流体相。色谱基质可以是颗粒材料(具有任何合适的大小和形状)或单片色谱材料,包括纸基底或膜。因此,在一些方面,所述色谱可以是柱色谱以及平面色谱二者。在一些实施方案中,除了标准色谱柱以外,允许双向流动的柱(如可从美国加利福尼亚州圣何塞的PhyNexus, Inc. 获得的PhyTip[®]柱)或移液器吸头可以用于基于柱/基于流通模式的方法。

因此,在一些情形中,可用于本发明方法中的色谱柱也包含移液器吸头或允许双向流动的柱。在一些情形中,例如在使用颗粒基质材料的情况下,所述颗粒基质材料可以例如具有约5 μm 至约200 μm 、或约5 μm 至约400 μm 、或约5 μm 至约600 μm 的平均粒径。在一些方面,色谱基质可以例如是或包括聚合物树脂或金属氧化物或类金属氧化物。在一些方面,如在使用平面色谱的情况下,基质材料可以是适合用于平面色谱的任何材料,如基于常规纤维素的或基于有机聚合物的膜(例如,纸膜、硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯(PVDF)膜)或二氧化硅涂布的玻璃板。在一个实施方案中,色谱基质/固定相是非磁性材料或不可磁化材料。

[0523] 在一些实施方案中,适合于本发明方法的非磁性或不可磁化色谱固定相包括衍生的二氧化硅或交联凝胶。在一些方面,交联凝胶可以是基于天然聚合物,例如基于在自然界中存在的聚合物类别。例如,色谱固定相可以基于的天然聚合物是多糖。在一些情形中,相应的多糖通常是交联的。多糖基质的例子包括但不限于琼脂糖凝胶(例如,可以以不同的珠尺寸和孔径商购获得的Superflow[™]琼脂糖或Sephacryl[®]材料,如Superflow[™]Sephacryl[®])或一种或多种交联葡聚糖的凝胶。另一个说明性例子是可商购获得(以各种珠尺寸和具有各种孔径)的葡聚糖共价键合的颗粒状交联琼脂糖基质,如 Sephadex[®]或Superdex[®],两者均可获自GE Healthcare。这样的色谱材料的另一个说明性例子是Sephacryl[®],其也可以不同的珠尺寸和孔径从GE Healthcare获得。

[0524] 在一些实施方案中,交联凝胶也可以基于合成聚合物,例如基于在自然界中不存在的聚合物类别。在一些方面,色谱固定相基于的这种合成聚合物是具有极性单体单元的聚合物,并且因此其本身是极性的。因此,在一些情形中,这样的极性聚合物是亲水性的。在一些方面,亲水性(也称为疏脂性)分子含有可以与水分子形成偶极-偶极相互作用的部分。通常,疏水性(也称为亲脂性)分子具有与水分离的倾向。

[0525] 通常,色谱方法是流体色谱,通常是液相色谱。在一些方面,色谱可以以流通模式进行,其中在柱的含有色谱基质的一端上例如通过重力流或通过泵施加含有细胞(例如,靶细胞)的流体样品,并且其中流体样品在柱的另一端存在于柱中。另外,色谱可以以“上下(up and down)”模式进行,其中在柱的含有填充在移液器吸头内的色谱基质的一端上例如通过移液器施加含有要分离的细胞的流体样品,并且其中流体样品在柱的另一端进入并存在于色谱基质/移液器吸头中。可替代地,色谱还可以以分批模式进行,其中将色谱材料(固

定相)与含有细胞的样品例如在流体样品的振荡、旋转或重复接触和去除(例如借助移液器)下一起孵育。

[0526] 在一些方面,在所提供的实施方案的情况下,可以采用任何材料作为色谱基质,只要所述材料适合于色谱分离(例如,细胞的选择)。在特定方面,合适的色谱材料是至少无害的或基本上无害的,例如,当在用于细胞分离和/或细胞分开的所需条件下在填充色谱柱中使用,对细胞活力无害。在一些方面,色谱基质保持在预定的定位中,通常在预定的位置中,而要分离的样品和其中包括的组分的定位处于改变中。因此,在一些方面,色谱基质是“固定相”。

[0527] 通常,相应色谱基质具有固相或半固相的形式,而含有要分离/分开的靶细胞的样品是流体相。用于实现色谱分离的流动相同样是流体相。色谱基质可以是颗粒材料(具有任何合适的大小和形状)或单片色谱材料,包括纸基底或膜。因此,色谱可以是柱色谱以及平面色谱两者。除了标准色谱柱以外,允许双向流动或移液管吸头的柱可以用于如本文所述的细胞的基于柱/基于流通模式的色谱分离。在一些方面,使用颗粒基质材料,并且所述颗粒基质材料可以例如具有约5 μm 至约200 μm 、或约5 μm 至约400 μm 、或约5 μm 至约600 μm 的平均粒径。在一些方面,使用平面色谱,并且基质材料可以是适合于平面色谱的任何材料,如常规的基于纤维素的或基于有机聚合物的膜(例如,纸膜、硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯(PVDF)膜)或二氧化硅涂布的玻璃板。

[0528] 在一些方面,色谱基质/固定相是非磁性材料或不可磁化材料。这样的材料可以包括衍生的二氧化硅或交联的凝胶。交联的凝胶(其通常以珠形式来制造)可以基于天然聚合物,如交联的多糖。合适的例子包括但不限于琼脂糖凝胶或者一种或多种交联葡聚糖的凝胶。交联的凝胶也可以基于合成聚合物,即基于在自然界中不存在的聚合物类别。通常,用于细胞分离的色谱固定相所基于的这种合成聚合物是具有极性单体单元,且因此本身具有极性的聚合物。

[0529] 合适的合成聚合物的说明性例子是一种或多种聚丙烯酰胺、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶、以及丙烯酸酯和二醇的共聚物或丙烯酰胺和二醇的共聚物。说明性例子是聚甲基丙烯酸酯凝胶,可作为Fractogel®商业购得。另一个例子是乙二醇与甲基丙烯酸酯的共聚物,可作为Toyoparl®商业购得。在一些实施方案中,色谱固定相还可以包括天然和合成聚合物组分,如多糖与琼脂糖的复合物基质或复合物或共聚物(例如聚丙烯酰胺/琼脂糖复合物)或多糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的复合物基质或复合物或共聚物。葡聚糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物的说明性例子是上文所提及的Sephacryl®系列材料。衍生的二氧化硅可以包括与合成或天然聚合物偶联的二氧化硅颗粒。这样的实施方案的例子包括但不限于多糖接枝的二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮接枝的二氧化硅、聚氧化乙烯接枝的二氧化硅、聚(2-羟乙基天冬酰胺)二氧化硅和聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝的二氧化硅。

[0530] 样品中存在的其他组分(如刺激剂和/或刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂))可以具有低于孔的排阻极限的大小并且这可以进入尺寸排阻色谱基质的孔中。在能够部分或完全进入孔体积中的这样的组分中,较少进入孔体积中的较大分子通常将首先洗脱,而最小的分子最后洗脱。在一些实施方案中,尺寸排阻色谱基质的排阻极限被选择为低于靶细胞的最大宽度。因此,可进入孔体积中的组分通常将在尺寸排阻色谱基质中/上保持比靶细胞更

长的时间。因此,可以在色谱柱的洗脱物中与样品的其他物质/组分分开收集靶细胞。因此,组分(如刺激试剂)在晚于靶细胞的时间点从凝胶过滤基质洗脱。

[0531] 所提供的实施方案中采用的色谱基质还可以包括磁性可吸引的物质,如一种或多种磁性可吸引的颗粒或铁磁流体。相应的磁性可吸引的颗粒可以包含具有结合位点的选择试剂(例如,选择剂),其能够结合至靶细胞并将所述靶细胞固定在色谱基质上。磁性可吸引的颗粒可以含有反磁性、强磁性、顺磁性或超顺磁性材料。超顺磁性材料响应于磁场,其感应磁场不会导致永久磁化。仅举几例,基于氧化铁磁性颗粒例如可以以Dynabeads®从DynaL Biotech商业购得,作为磁性微珠从Miltenyi Biotec商业购得,作为磁性多孔玻璃珠从CPG Inc.商业购得,以及从多个其他来源商业购得,如Roche Applied Science、BIOCLON、BioSource International Inc.、micromod、AMBION、Merck、Bangs Laboratories、Polysciences或Novagen Inc.。基于超顺磁性Co和FeCo以及强磁性Co纳米晶体的磁性纳米颗粒已经描述于例如Hütten, A.等人(J. Biotech. (2004), 112, 47-63)中。然而,在一些实施方案中,所提供的实施方案中采用的色谱基质没有任何磁性可吸引的物质。

[0532] 根据作为W0 2013/011011公开的共同未决的国际专利申请PCT/EP2012/063969(其全部内容出于所有目的通过引用并入本文),选择剂与靶细胞上的选择标记之间的结合强度对靶细胞经由选择剂与选择试剂结合的可逆性而言可能不是必需的。相反,不论结合强度如何,意味着不论选择剂经由结合位点B与选择标记之间的结合的解离常数(K_D)具有低亲和力(例如, K_D 在约 10^{-3} 至约 10^{-7} M的范围内)还是具有高亲和力(例如, K_D 在约 10^{-7} 至约 1×10^{-10} M的范围内),靶细胞都可以进行可逆染色,只要选择剂经由结合位点B与受体分子的结合的解离发生得足够快。就此而言,选择剂经由结合位点B与选择剂之间的结合的解离速率常数(k_{off})可以具有约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大的值(此解离速率常数是表征受体结合试剂的结合位点B与靶细胞的表面上的受体分子之间形成的复合物的解离反应的常数)。选择剂的结合位点B与靶细胞表面上的选择标记之间的缔合反应的缔合速率常数(k_{on})可以具有任何值。为了确保选择标记与选择剂之间的结合足够可逆,有利地选择结合平衡的 k_{off} 值以具有如下值:约 $3 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大、约 $5 \times 10^{-5} \text{sec}^{-1}$ 或更大,如或如约 $1 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、 $5 \times 10^{-4} \text{sec}^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、 $5 \times 10^{-3} \text{sec}^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ 或更大、 $1 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大或者 $5 \times 10^{-1} \text{sec}^{-1}$ 或更大。此处应注意,如本文所用的动力学和热力学常数的值涉及大气压(即1.013巴)和室温(即25°C)的条件。

[0533] 在一些实施方案中,进行多轮细胞选择步骤,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经历另一选择步骤,如后续阳性或阴性选择。在某些实施方案中,用于选择、分离和富集的方法、技术和试剂描述于例如PCT申请号W0 2015164675中,所述申请通过引用以其整体特此并入。

[0534] 在一些实施方案中,可以使用单一选择步骤从样品分离靶细胞(例如,CD3+ T细胞)。在一些实施方案中,所述单一选择步骤可以在单一色谱柱上进行。在一些例子中,单一选择步骤可以耗尽同时表达多种标记的细胞。同样,可以同时多种细胞类型进行阳性选择。在某些实施方案中,将选择步骤重复进行和/或进行多于一次,其中使来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经历相同的选择步骤,如重复的阳性或阴性选择。在一些例子中,将单一选择步骤重复进行和/或进行多于一次,例如以增加所选细胞的纯度和/或从阴性选择

的级分进一步去除和/或耗尽阴性选择的细胞。在某些实施方案中,将一个或多个选择步骤进行两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或超过十次。在某些实施方案中,将一个或多个选择步骤进行和/或重复一次与十次之间、一次与五次之间或三次与五次之间。在一些实施方案中,进行两个选择步骤。

[0535] 细胞选择可以使用一个或多个色谱柱来进行。在一些实施方案中,一个或多个色谱柱包括在封闭系统中。在一些实施方案中,所述封闭系统是自动化封闭系统,例如需要最少或不需要用户(例如,人)输入。在一些实施方案中,细胞选择是依序进行(例如,顺序选择技术)。在一些实施方案中,一个或多个色谱柱是顺序排列。例如,第一柱的定向可以使得可以例如经由连接管道将所述柱的输出(例如,洗脱液)进给至第二色谱柱。在一些实施方案中,多个色谱柱可以顺序排列。在一些实施方案中,细胞选择可以通过进行连续阳性和阴性选择步骤来实现,后一步骤使来自前一步骤的阴性和/或阳性级分经历进一步选择,其中整个过程在同一管或管道组中进行。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的一种,并且使用来自第一选择的未选择细胞作为第二选择的细胞来源,以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的另一种。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的一种或两种的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)呈阳性或高水平表达的细胞。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD3⁺群体,并且使用所选细胞作为第二选择的细胞来源,用于富集CD3⁺群体。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以在第一固定相上(例如,在第一色谱柱中)富集CD3⁺群体,并且使用含有未结合细胞的流出物作为第二选择的细胞来源,以在第二固定相上(例如,在第二色谱柱中)富集CD3⁺群体,其中第一和第二固定相顺序排列。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)呈阳性或高水平表达的细胞。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD3⁺群体,并且使用所选细胞作为第二选择的细胞来源,以富集CD4⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺CD4⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)呈阳性或高水平表达的细胞。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD3⁺群体,并且使用所选细胞作为第二选择的细胞来源,以富集CD8⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺CD8⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)呈阳性或高水平表达的细胞。考虑到在一些方面,通过阳性或阴性顺序选择技术选择T细胞的特定亚群(例如,CD3⁺细胞),如一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞,例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞。顺序选择的方法可以按任一顺序来进行。

[0536] 在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中在第一固定相上(例如,在第一色谱柱中)实现第一选择以富集CD3⁺群体,并且使用选择的细胞作为在第二固定

相上(例如,在第二色谱柱中)的第二选择的细胞来源以富集CD3⁺群体的亚群,其中所述第一固定相和所述第二固定相顺序排列。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)呈阳性或高水平表达的细胞。

[0537] 在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历顺序选择,其中在第一固定相上(例如,在第一色谱柱中)实现第一选择以富集中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)的标记,并且使用选择的细胞作为在第二固定相上(例如,在第二色谱柱中)的第二选择的细胞来源以富集CD3⁺群体的亚群,其中所述第一固定相和所述第二固定相顺序排列。

[0538] 在一些实施方案中,细胞选择是平行进行(例如,平行选择技术)。在一些实施方案中,一个或多个色谱柱平行排列。例如,两个或更多个柱的排列可以使得将样品经由管道同时加载至两个或更多个柱上,所述管道允许将样品添加至每个柱,例如无需样品穿过第一柱。例如,使用平行选择技术,细胞选择可以通过例如在封闭系统中同时进行阳性和/或阴性选择步骤来实现,其中整个过程在同一管或管道组中进行。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历平行选择,其中将样品加载至两个或更多个色谱柱上,其中每个柱实现细胞群的选择。在一些实施方案中,两个或更多个色谱柱单独实现CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺群体的选择。在一些实施方案中,两个或更多个色谱柱(包括亲和色谱或凝胶渗透色谱)独立实现相同细胞群的选择。例如,两个或更多个色谱柱可以实现CD3⁺细胞的选择。在一些实施方案中,两个或更多个色谱柱(包括亲和色谱或凝胶渗透色谱)独立实现不同细胞群的选择。例如,两个或更多个色谱柱可以独立地实现CD3⁺细胞、CD4⁺细胞和CD8⁺细胞的选择。在一些实施方案中,可以例如使用顺序选择技术实现一次或多次进一步选择,以富集经由平行选择而选择的一个或所有细胞群的亚群。例如,可以针对中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)进一步选择选择的细胞。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经受平行选择,其中在两个或更多个柱上实现平行选择以富集CD3⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集亚CD3⁺群体的群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经受平行选择,其中在两个或更多个柱上独立地实现选择以富集CD3⁺群体和CD4⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺和CD4⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经受平行选择,其中实现平行选择以富集CD3⁺群体和CD8⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺和CD8⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)。在一些实施方案中,使含有靶细胞的样品经历平行选择,其中实现

平行选择以富集CD4⁺群体和CD8⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD4⁺和CD8⁺群体的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞、幼稚T细胞和/或对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺)。考虑到在一些方面,通过阳性或阴性平行选择技术来选择T细胞的特定亚群(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞),如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞,例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺ T细胞。在一些实施方案中,顺序和平行选择技术可以组合使用。

[0539] 在一些实施方案中,使用两个柱进行平行选择。在一些实施方案中,两个柱选择相同的细胞类型(例如,相同的选择标记)。在一些实施方案中,两个柱各自选择CD3⁺T细胞。

[0540] 在一些实施方案中,通过阳性或阴性选择进行细胞选择以耗尽CD57⁺细胞并富集T细胞。用于耗尽CD57⁺细胞的示例性方法描述于W02020/097132中。在一些实施方案中,通过阳性或阴性选择技术分离T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞,例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺或CD57⁺ T细胞。在一些实施方案中,通过与特异性结合至这样的标记的一种或多种选择剂(如抗体或抗体片段)一起孵育来选择这样的细胞。在某些实施方案中,通过对CD57表达呈阳性的细胞的阴性选择从样品(例如PBMC样品)耗尽CD57⁺细胞,并且使用未选择细胞(CD57⁻细胞)作为在第二固定相上(例如,在第二色谱柱中)的第二选择的细胞来源以富集T细胞,其中所述第一固定相和所述第二固定相顺序排列。例如,在一些实施方案中,通过对CD57表达呈阳性的细胞的阴性选择从样品(例如PBMC样品)耗尽CD57⁺细胞,并且使用未选择细胞(CD57⁻细胞)作为在第二固定相上(例如,在第二色谱柱中)的第二选择的细胞来源以富集CD3⁺群体,其中所述第一固定相和所述第二固定相顺序排列。

[0541] 在使用多个柱(例如,在顺序选择中,如第一色谱柱和第二色谱柱)的实施方案中,进行所提供的方法使得将一种或多种刺激剂或刺激试剂添加至选择或富集细胞亚群的最终步骤中使用的最后一个色谱柱(例如第二色谱柱)。在特定实施方案中,使用本文所提供的装置使被添加所述一种或多种刺激剂或刺激试剂的色谱柱经历加热。例如,温度控制构件配置为将用于细胞亚群的选择或富集且被添加所述一种或多种刺激剂或刺激试剂的最后或最终色谱柱(例如第二色谱柱)的温度调节至高于室温的目标温度。在一些实施方案中,所述目标温度是将所述细胞的健康和活性最大化以提供在所述一个或多个T细胞中所述刺激信号的高效或有效递送的生理温度。

[0542] 通常,固定相(例如,选择树脂)的结合容量影响需要多少固定相来选择某个数量的靶部分,例如,靶细胞,如T细胞。可以使用结合容量(例如,每mL固定相(例如,选择树脂)可以固定的靶细胞的数量)来确定或控制在一个或多个柱上捕获的靶细胞的数量。可以使用一个或多个色谱柱进行本文公开的柱上细胞选择和刺激。在使用多个柱时,它们可以依序、平行或以其合适的组合来排列。因此,可以使用固定相(例如,选择树脂)的结合容量来标准化单柱方法中的试剂量或多柱方法中每个柱的试剂量。在一些实施方案中,1mL固定相能够容纳多达1亿±2500万个细胞。在一些实施方案中,固定相为或为约5mL、10mL、15mL、20mL、25mL、30mL、35mL或40mL。在一些实施方案中,固定相为或为约10mL并且能够容纳多达10亿±2.5亿个细胞。在一些实施方案中,固定相为或为约20mL并且能够容纳多达20亿±5亿个细胞。在一些实施方案中,固定相为或为约40mL并且能够容纳约30亿个细胞与约50亿

细胞之间。

[0543] 在一些实施方案中,本文所用固定相的结合容量是在将过量靶细胞加载至固定相上时,在给定的溶剂和细胞浓度条件下,与固定相结合的靶细胞(例如,CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞)的最大数量。在一些实施方案中,结合容量是每mL固定相为或为约1亿±2500万个靶细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,本文公开的固定相(例如,选择树脂)的静态结合容量的范围是每mL固定相在约7500万个靶细胞与约1.25亿个靶细胞之间。在一个方面,本文用于柱上细胞选择和刺激的固定相的结合容量是静态结合容量。在一些实施方案中,所述静态结合容量是例如在某些溶剂和细胞浓度条件下,能够固定在固定相上的最大细胞量。在一些实施方案中,本文公开的固定相(例如,选择树脂)的静态结合容量的范围是每mL固定相在约5000万个靶细胞与约1亿个靶细胞之间。在一些实施方案中,所述静态结合容量是每mL固定相为或为约1亿±2500万个靶细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,本文公开的固定相(例如,选择树脂)的静态结合容量的范围是每mL固定相在约7500万个靶细胞与约1.25亿个靶细胞之间。在一些实施方案中,固定相(例如,选择树脂)的静态结合容量是每mL固定相在约1000万与约2000万之间、在约2000万与约3000万之间、在约3000万与约4000万之间、在约4000万与约5000万之间、在约5000万与约6000万之间、在约6000万与约7000万之间、在约7000万与约8000万之间、在约8000万与约9000万之间、在约9000万与约1亿之间、在约1亿1000万与约1亿2000万之间、在约1亿2000万与约1亿3000万之间、在约1亿3000万与约1亿4000万之间、在约1亿4000万与约1亿5000万之间、在约1亿5000万与约1亿6000万之间、在约1亿6000万与约1亿7000万之间、在约1亿7000万与约1亿8000万之间、在约1亿8000万与约1亿9000万之间、或在约1亿9000万与约2亿之间的靶细胞。

[0544] 在一些实施方案中,本文所用固定相的结合容量是在未结合靶细胞发生显著突破之前,在给定流动条件下与固定相结合的靶细胞(例如,CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞)的数量。在一个方面,本文用于柱上细胞选择和刺激的固定相的结合容量是动态结合容量,即,在样品施加期间,在填充色谱柱中在操作条件下的结合容量。在一些实施方案中,动态结合容量是通过以下方式来确定:加载含有已知浓度的靶细胞的样品,并监测流出物,并且靶细胞将结合固定相至某个转折点(break point),之后未结合靶细胞将流出柱。在一些实施方案中,动态结合容量是每mL固定相为或为约1亿±2500万个靶细胞(例如,T细胞)。在一些实施方案中,本文公开的固定相(例如,选择树脂)的动态结合容量是每mL固定相在或在约7500万个靶细胞与约1.25亿个靶细胞之间。在一些实施方案中,本文公开的固定相(例如,选择树脂)的动态结合容量的范围是每mL固定相在约5000万个靶细胞与约1亿个靶细胞之间。在一些实施方案中,固定相(例如,选择树脂)的动态结合容量是每mL固定相在约1000万与约2000万之间、在约2000万与约3000万之间、在约3000万与约4000万之间、在约4000万与约5000万之间、在约5000万与约6000万之间、在约6000万与约7000万之间、在约7000万与约8000万之间、在约8000万与约9000万之间、在约9000万与约1亿之间、在约1亿1000万与约1亿2000万之间、在约1亿2000万与约1亿3000万之间、在约1亿3000万与约1亿4000万之间、在约1亿4000万与约1亿5000万之间、在约1亿5000万与约1亿6000万之间、在约1亿6000万与约1亿7000万之间、在约1亿7000万与约1亿8000万之间、在约1亿8000万与约1亿9000万之间、或在约1亿9000万与约2亿之间的靶细胞。

[0545] 在一些实施方案中,固定相是20mL。在一些实施方案中,固定相的结合容量为20亿

±5亿个细胞。

[0546] 在一些实施方案中,使用一个或多个(例如,2、3、4、5、6)个洗涤步骤从色谱基质(例如,固定相)去除未结合的细胞和碎片,得到固定在色谱柱的色谱基质上的选择的细胞的富集的群体。在某些实施方案中,分离和/或选择得到固定在柱的色谱基质上的富集的T细胞的一个或多个群体,所述群体包括至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或者为或为约100%T细胞或其子集或亚群。在某些实施方案中,分离和/或选择得到固定在柱的色谱基质上的富集的T细胞的一个或多个群体,所述群体包括至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.9%或者为或为约100%CD3⁺ T细胞或其子集或亚群。

D. 柱上细胞选择和刺激

[0547] 使用本文公开的装置,本文提供包括将如章节II.C中所述通过柱色谱步骤进行的细胞选择与刺激组合的方法。在某些实施方案中,使用章节II-B-1中所述的任何示例性选择剂选择样品的细胞。因此,在某些方面,在细胞固定在柱上(例如,通过选择剂)时,在选择步骤期间进行刺激。在一些实施方案中,刺激条件包括刺激细胞(例如,CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)和/或能够在细胞中递送刺激信号的条件。例如,所述选择用于富集或选择T细胞或其某些子集,并且刺激条件包括刺激从TCR复合物的组分(例如CD3)和/或共刺激分子(例如CD28)生成的信号的条件。在一些实施方案中,刺激条件是或包括将固定在色谱基质(例如,固定相)上的靶细胞(例如,T细胞)与刺激剂(例如,递送刺激信号或者能够递送刺激信号的药剂)一起孵育,从而刺激选择的细胞。在一些实施方案中,选择的细胞是T细胞或其子集,并且刺激剂结合至并刺激和/或激活TCR复合物的组分(例如CD3)和/或共刺激分子(例如CD28)。在某些实施方案中,在刺激条件下刺激细胞群生成或产生选择并刺激的细胞的群体(本文中也称为刺激的细胞群)。

[0548] 在某些实施方案中,在将异源或重组多核苷酸引入细胞中之前选择并刺激样品的细胞,如通过本文例如在章节II-F中所述的方法、步骤或技术。

[0549] 在特定方面,刺激的开始(本文中也称为孵育的开始)在固定在色谱基质(例如,固定相)上的样品的靶细胞(例如,T细胞)首次接触或暴露于刺激剂时发生。在所提供的实施方案中,在刺激开始之前,将含有靶细胞(例如T细胞)的样品添加至含有色谱基质的柱,选择剂结合或固定至所述色谱基质用于目的靶细胞的特异性选择,如章节II.C中所述,并且允许在用于将靶细胞固定至色谱基质(例如固定相)上的条件下孵育细胞。在一些实施方案中,在添加刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)或刺激剂之前,允许细胞将柱渗透约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100或120分钟。在一些实施方案中,在添加刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)或刺激剂之前,将柱洗涤至少一(1、2、3、4、5)次。在一些实施方案中,在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为、为约或至少30、35、40、45、50、55或60分钟,添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约120分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约100分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约90分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激

剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约80分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约70分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约60分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约50分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约40分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约15至约30分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约120分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约100分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约90分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约80分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约70分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约60分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约50分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将样品添加至柱之后约30至约40分钟之间(包含端值),添加刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在将刺激剂或包括刺激剂的试剂(例如,寡聚刺激试剂)添加至柱之前,进行至少一个洗涤步骤。

[0550] 在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于一天。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2小时。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育选择的细胞)进行在或在约2至24、3至24、4至24、5至24、6至24、7至24、8至24、9至24、10至24、11至24、12至24、13至24、14至24、15至24、16至24、17至24、18至24、19至24、20至24、21至24、22至24、23至24、2至23、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3小时之间。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于24小时。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于12小时。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于5小时。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于4小时。在一些实施方案中,将刺激(例如在刺激条件下孵育固定的细胞)进行为、为约或少于2小时。

[0551] 在特定实施方案中,在刺激条件下刺激(例如,孵育)量为、为约或为至少至少 50×10^6 、 100×10^6 、 150×10^6 、 200×10^6 、 250×10^6 、 300×10^6 、 350×10^6 、 400×10^6 、 450×10^6 、 500×10^6 、

550x10⁶、600x10⁶、700x10⁶、800x10⁶、900x10⁶、1,000x10⁶、1250x10⁶、1500x10⁶、1750x10⁶、2000x10⁶、2250x10⁶、2500x10⁶、2750x10⁶、3000x10⁶、3250x10⁶、3500x10⁶、3750x10⁶、4000x10⁶、4250x10⁶、4500x10⁶、4750x10⁶或5000x10⁶的选自样品的细胞。在一些实施方案中,将选择的细胞固定在单一柱(例如,含有色谱基质)上。例如,将从样品选择的细胞的总量固定在单一柱上,并且在刺激条件下孵育单一柱上固定的细胞。在一些实施方案中,将选择的细胞固定在两个柱(例如,各自含有色谱基质)上。例如,将从样品选择的细胞的总量固定在两个柱(例如,每个柱(例如,色谱基质)含有固定于其上的细胞总量的一半或约一半),并且在刺激条件下孵育两个柱上固定的细胞。在某些实施方案中,对固定在色谱基质(例如,固定相)上的细胞(例如,选择的细胞,例如,T细胞)进行刺激(例如,在刺激条件下,如在刺激剂的存在下进行孵育),所述细胞的密度为、为约或至少0.01x10⁶个细胞/mL、0.1x10⁶个细胞/mL、0.5x10⁶个细胞/mL、1.0x10⁶个细胞/mL、1.5x10⁶个细胞/mL、2.0x10⁶个细胞/mL、2.5x10⁶个细胞/mL、3.0x10⁶个细胞/mL、4.0x10⁶个细胞/mL、5.0x10⁶个细胞/mL、10x10⁶个细胞/mL、50x10⁶个细胞/mL、75x10⁶个细胞/mL、100x10⁶个细胞/mL、125x10⁶个细胞/mL、150x10⁶个细胞/mL或200x10⁶个细胞/mL。在某些实施方案中,对固定在固定相上的细胞(例如,选择的细胞,例如,T细胞)进行刺激(例如,在刺激条件下,如在刺激剂的存在下进行孵育),所述细胞的密度为、为约或至少3.0x10⁶个细胞/mL。在某些实施方案中,对固定在固定相上的细胞(例如,选择的细胞,例如,T细胞)进行刺激或使其经历刺激(例如,在刺激条件下,如在刺激剂的存在下进行孵育),所述细胞的密度为或为约1亿±2500万个细胞/mL。在某些实施方案中,选择的细胞是活细胞。

[0552] 在一些实施方案中,将刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂以如下浓度添加至柱:为、为约或至少0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3μg/1x10⁶个细胞。在一些实施方案中,将刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂以如下浓度添加至含有固定的细胞的柱:为、为约或至少0.75、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25μg/1x10⁶个细胞。在一些实施方案中,将刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂以如下浓度添加至柱:为或为约1至2μg/1x10⁶个细胞。在一些实施方案中,刺激试剂是寡聚刺激试剂,如章节II.B-2中所述。在一些实施方案中,将寡聚刺激试剂以如下浓度添加至含有固定的细胞的柱:在或在约1至2μg/1x10⁶个细胞之间。在一些实施方案中,将5x10⁸寡聚刺激试剂添加至含有固定的细胞的柱。在两个或更多个柱含有用于刺激的固定的细胞的情况下,将所述浓度或量的本文所述的刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)添加或施加至每个柱。

[0553] 在一些实施方案中,用于刺激的条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶受体和设计为激活细胞的任何其他药剂))。在一些实施方案中,温度为或为约37℃。在一些实施方案中,使用气体交换来控制氧和二氧化碳含量。

[0554] 在特定实施方案中,刺激条件包括将细胞(例如,样品的选择的细胞)与一种或多种细胞因子一起孵育和/或在一种或多种细胞因子的存在下孵育。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,一种或多种细胞因子结合至和/或能够结合至选择的细胞(例如,T细胞)表达的受体和/或对于选择的细胞(例如,T细胞)为内源的受体。在特定实施方案中,

一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白介素2 (IL-2)、白介素4 (IL-4)、白介素7 (IL-7)、白介素9 (IL-9)、白介素12 (IL-12)、白介素15 (IL-15)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-2。

[0555] 在某些实施方案中,一种或多种细胞因子的量或浓度是用国际单位 (IU) 测量和/或定量的。国际单位可以用于定量维生素、激素、细胞因子、疫苗、血液制品和类似的生物活性物质。在一些实施方案中,IU是或包括通过与具有特定重量和强度的国际参考标准(例如,针对IL-2的WHO第一国际标准(WHO 1st International Standard for Human IL-2), 86/504) 相比的生物制剂效力的度量单位。国际单位是报告生物活性单位的唯一公认且标准化的方法,所述生物活性单位公开和源自国际合作研究工作。在特定实施方案中,可以通过与类似的WHO标准产品进行产品比较测试来获得细胞因子的群体、样品或来源的IU。例如,在一些实施方案中,将人重组IL-2、IL-7或IL-15的群体、样品或来源的IU/mg分别与WHO标准IL-2产品(NIBSC代码:86/500)、WHO标准IL-17产品(NIBSC代码:90/530) 和WHO标准IL-15产品(NIBSC代码:95/554) 进行比较。

[0556] 在一些实施方案中,以IU/mg计的生物活性等同于(以ng/ml计的ED50) -1×10^6 。在特定实施方案中,重组人IL-2或IL-15的ED50等同于使用CTLL-2细胞的细胞增殖的半最大刺激(XTT切割) 所需的浓度。在某些实施方案中,重组人IL-7的ED50等同于PHA激活的人外周血淋巴细胞增殖的半最大刺激所需的浓度。与IL-2的IU的测定和计算相关的细节论述于Wadhwa等人,Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7; 和Gearing和Thorpe,Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9中; 与IL-15的IU的测定和计算相关的细节论述于Soman等人Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94中。

[0557] 在一些实施方案中,在细胞因子(例如,重组人细胞因子) 的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞) 进行刺激,所述细胞因子的浓度为在1IU/mL与1,000IU/mL之间、在10IU/mL与50IU/mL之间、在50IU/mL与100IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间、在100IU/mL与500IU/mL之间、在250IU/mL与500IU/mL之间或在500IU/mL与1,000IU/mL之间。

[0558] 在一些实施方案中,在IL-2(例如,人重组IL-2) 的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞) 进行刺激,所述重组IL-2的浓度在1IU/mL与500IU/mL之间、在10IU/mL与250IU/mL之间、在50IU/mL与200IU/mL之间、在50IU/mL与150IU/mL之间、在75IU/mL与125IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间或在10IU/mL与100IU/mL之间。在特定实施方案中,在重组IL-2的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞) 进行刺激,所述重组IL-2的浓度为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL或100IU/mL。在一些实施方案中,在为或为约100IU/mL的重组IL-2(例如,人重组IL-2) 的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞) 进行刺激。

[0559] 在一些实施方案中,在重组IL-7(例如,人重组IL-7) 的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞) 进行刺激,所述重组IL-7的浓度在100IU/mL与2,000IU/mL之间、在500IU/mL

与1,000IU/mL之间、在100IU/mL与500IU/mL之间、在500IU/mL与750IU/mL之间、在750IU/mL与1,000IU/mL之间或在550IU/mL与650IU/mL之间。在特定实施方案中,在如下浓度的IL-7存在下对细胞(例如,输入细胞)进行刺激:为或为约50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、或1,000IU/mL。在特定实施方案中,在为或为约600IU/mL的IL-7的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激。

[0560] 在一些实施方案中,在重组IL-15(例如,人重组IL-15)的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激,所述重组IL-2的浓度在1IU/mL与500IU/mL之间、在10IU/mL与250IU/mL之间、在50IU/mL与200IU/mL之间、在50IU/mL与150IU/mL之间、在75IU/mL与125IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间或在10IU/mL与100IU/mL之间。在特定实施方案中,在重组IL-15的存在下对细胞(例如,输入群体的细胞)进行刺激,所述重组IL-15的浓度为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL或200IU/mL。在一些实施方案中,在为或为约100IU/mL的重组IL-15(例如,人重组IL-2)的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激。

[0561] 在特定实施方案中,在刺激条件下在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激。在一些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在刺激条件下在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下对细胞(例如,样品的选择的细胞)进行刺激。在一些实施方案中,刺激条件还包含谷氨酰胺。

[0562] 所述条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶受体和设计为激活细胞的任何其他药剂))。

[0563] 在一些方面,根据多种技术进行刺激,所述技术如以下文献中所述的那些:Riddell等人的美国专利号6,040,177;Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35 (9):651-660;Terakura等人(2012) *Blood*. 1:72-82;和/或Wang等人(2012) *J Immunother.* 35 (9):689-701。

[0564] 在一些实施方案中,刺激是在无血清培养基中进行。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,所述无血清培养基是受控培养基,其已经过处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,所述无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,所述无血清培养基可以含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0565] 在一些实施方案中,刺激(例如,在刺激条件下孵育)是在室温(例如,为或约23°C)下进行。在一些实施方案中,刺激(例如,在刺激条件下孵育)是在约30°C与约39°C之间(如为或约37°C)进行。在特定实施方案中,柱上刺激的方法是使用本文提供的装置进行,使得固定或结合至色谱柱的色谱基质(例如固定相)的细胞在刺激期间暴露于在约30°C与约39°C之间(如为或约37°C)的温度。在一些实施方案中,本文提供的装置将温度调节至在约30

℃与约39℃之间(如为或约37℃)的目标温度,如将温度从最初的起始温度(例如室温)上升至所述目标温度。在一些实施方案中,本文提供的装置将温度维持在约30℃与约39℃之间(如为或约37℃)的目标温度,例如,在柱上的细胞的刺激时间期间提供恒定或接近恒定的目标温度。

[0566] 在一些实施方案中,本文提供的方法在或在约37℃进行。

1. 与刺激剂和用于柱上刺激的试剂一起孵育

[0567] 使用本文公开的装置,本文提供包括将固定在色谱基质(例如,固定相)上的靶细胞(例如,T细胞)与一种或多种刺激剂一起孵育的方法。示例性刺激剂描述于章节II-B-1中。在一些实施方案中,刺激剂包含于刺激试剂中。示例性刺激试剂描述于章节II-B-2中。在一些实施方案中,刺激剂与色谱柱的色谱基质(例如,固定相)直接或间接结合。在一些实施方案中,刺激剂与色谱柱的色谱基质(例如,固定相)间接结合,例如经由如上文所述的选择试剂或如本文所述的刺激试剂来结合。在一些实施方案中,刺激剂包含于刺激试剂中。在一些实施方案中,刺激试剂与色谱柱的色谱基质(例如,固定相)结合。在一些实施方案中,刺激试剂与色谱基质(例如,固定相)共价结合。在一些实施方案中,刺激剂与色谱基质(例如,固定相)非共价结合。

[0568] 在一些实施方案中,刺激试剂不与固体支持物、固定相、珠、微粒、磁性颗粒和/或基质结合或缔合。在一些实施方案中,刺激试剂是柔性的,不含金属或磁性核心,完全或部分由有机多聚体构成,和/或不是刚性的。在一些实施方案中,刺激试剂是可溶的。在一些实施方案中,刺激试剂是寡聚刺激试剂。在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是可溶的。因此,在一些实施方案中,刺激试剂如寡聚刺激试剂不与柱缔合。在一些实施方案中,将刺激试剂如寡聚刺激试剂添加至柱。

[0569] 在某些实施方案中,刺激的开始在将细胞与刺激剂一起孵育或接触时发生。因此,在一些实施方案中,在刺激剂与柱的色谱基质(例如,固定相)直接或间接(例如,经由选择试剂或刺激试剂)结合的情况下,刺激的开始在将包含靶细胞的样品添加至柱的色谱基质(例如,固定相)时发生。在一些实施方案中,在刺激剂包含于不与色谱基质(例如,固定相)缔合(例如,结合)的刺激试剂中时,刺激的开始在将刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)添加至样品的靶细胞固定于其上的固定相时发生。在一些实施方案中,在刺激剂不与色谱基质(例如,固定相)直接或间接结合并且不包含于刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)中时,刺激的开始在将刺激剂添加至色谱基质(例如,固定相)时发生。

[0570] 在一些实施方案中,刺激条件或刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)包括一种或多种刺激剂,所述刺激剂能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,如本文所考虑的刺激试剂剂可以包括但不限于RNA、DNA、蛋白质(例如,酶)、抗原、多克隆抗体、单克隆抗体、抗体片段、碳水化合物、脂质、凝集素或具有对期望的靶标的亲和力的任何其他生物分子。在一些实施方案中,期望的靶标是T细胞受体和/或T细胞受体的组分。在某些实施方案中,期望的靶标是CD3。在某些实施方案中,期望的靶标是T细胞共刺激分子,例如,CD28、CD137(4-1-BB)、OX40或ICOS。

[0571] 在一些实施方案中,刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)含有与细胞(例如,T细胞)上的一种或多种以下大分子结合的一种或多种刺激剂:CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD25、CD27、CD28、CD29、CD31、CD44、CD45RA、CD45RO、CD54(ICAM-1)、CD127、MHCI、MHCII、CTLA-4、ICOS、

PD-1、OX40、CD27L (CD70)、4-1BB (CD137)、4-1BBL、CD30L、LIGHT、IL-2R、IL-12R、IL-1R、IL-15R；IFN- γ R、TNF- α R、IL-4R、IL-10R、CD18/CD11a (LFA-1)、CD62L (L-选择蛋白)、CD29/CD49d (VLA-4)、Notch配体 (例如 δ 样1/4、Jagged 1/2等)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR7和CXCR3或其片段,包括这些大分子的相应配体或其片段。在一些实施方案中,刺激剂与细胞 (例如T细胞) 上的一种或多种以下大分子特异性结合:CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。

[0572] 在一些实施方案中,刺激剂是结合至和/或识别T细胞受体的一种或多种组分的抗体。在特定实施方案中,刺激剂是抗CD3抗体。在某些实施方案中,刺激剂是结合至和/或识别共刺激分子的抗体。在某些实施方案中,刺激剂是抗CD28抗体。在一些实施方案中,刺激试剂包含抗CD28抗体和抗CD3抗体 (例如,刺激剂)。在一些实施方案中,第一刺激剂是抗CD3 Fab,例如如本文所述,并且第二刺激剂是抗CD28 Fab,例如如本文所述。

[0573] 在任何前述实施方案中,刺激试剂可以包含或者是含有以下的寡聚刺激试剂: (i) 多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,以及 (ii) 能够在一个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂,其中所述寡聚刺激试剂的大小包含 i) 大于50nm的半径, ii) 至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或 (iii) 每个寡聚刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。例如,按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,链霉亲和素突变蛋白可以在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在其他例子中,按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在一些实施方案中,刺激试剂包含抗CD28抗体和抗CD3抗体 (例如,刺激剂)。在一些实施方案中,第一刺激剂是抗CD3 Fab,例如如本文所述,并且第二刺激剂是抗CD28 Fab,例如如本文所述。

[0574] 在一些实施方案中,例如在刺激剂不与刺激试剂 (例如,寡聚刺激试剂) 或选择试剂结合时,刺激剂是抗体、二价抗体片段、F(ab)₂或二价单链Fv片段。

[0575] 在一些实施方案中,在如下比率的刺激试剂与细胞的存在下对细胞 (例如,样品的选择的细胞) 进行刺激:为或为约3:1、2.5:1、2:1、1.5:1、1.25:1、1.2:1、1.1:1、1:1、0.9:1、0.8:1、0.75:1、0.67:1、0.5:1、0.3:1或0.2:1。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为在2.5:1与0.2:1之间、在2:1与0.5:1之间、在1.5:1与0.75:1之间、在1.25:1与0.8:1之间、在1.1:1与0.9:1之间。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为约1:1或为1:1。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为约0.3:1或为0.3:1。在特定实施方案中,刺激试剂与细胞的比率为约0.2:1或为0.2:1。

[0576] 在一些实施方案中,在每 10^6 个细胞为、为约或为至少0.01 μ g、0.02 μ g、0.03 μ g、0.04 μ g、0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g、0.3 μ g、0.4 μ g、0.5 μ g、0.75 μ g、1 μ g、2 μ g、3 μ g、4 μ g、5 μ g、6 μ g、7 μ g、8 μ g、9 μ g或10 μ g的刺激试剂的存在下刺激细胞。在一些实施方案中,在每 10^6 个细胞为或为约4 μ g的刺激试剂的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或为约0.8 μ g的刺激试剂的存在下刺激细胞。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约3 μ g的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约2.5 μ g的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约2 μ g的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在

每 10^6 个细胞为或约 $1.8\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约 $1.6\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约 $1.4\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约 $1.2\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约 $1\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。在特定实施方案中,在每 10^6 个细胞为或约 $0.8\mu\text{g}$ 的刺激试剂的存在下对细胞进行刺激或使其经历刺激。

[0577] 在一些实施方案中,使用本文公开的装置,本文提供的靶细胞(例如T细胞)的柱上选择和刺激的方法使用如本文所公开的热/气柱(例如,用于柱色谱的外壳组件)来进行。在一些实施方案中,本文所述的T细胞的柱上选择和刺激的方法中的任一种是使用本文所公开的装置来进行。

[0578] 在一些实施方案中,柱上选择和刺激是使用含有用于色谱的外壳组件的色谱柱或柱组来进行,其中所述色谱柱的固定相用选择剂功能化用于选择或富集靶细胞(例如T细胞)。用于所提供的基于色谱的柱上选择和刺激方法的外壳组件还含有用于调节和/或维持柱的内部空腔中的固定相的温度的温度控制构件(例如含有一个或多个加热元件),以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。在一些实施方案中,色谱柱含有入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔。用于前述实施方案中任一项的用于柱色谱的示例性外壳组件描述于章节I-A中。用于前述实施方案中任一项的示例性色谱柱和色谱柱组描述于章节I-B中。

[0579] 在一个方面,所述方法包括在本文公开的色谱柱或色谱柱组中将包含多个T细胞的样品与一种或多种刺激剂一起孵育以在所述多个T细胞的一个或多个T细胞中递送刺激信号,其中所述多个T细胞固定在固定相上,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。在一个方面,所述固定相包含与所述一个或多个T细胞的表面上的选择标记特异性结合的选择剂。在一个方面,所述选择剂与由所述一个或多个T细胞表达的选择标记的特异性结合实现将所述一个或多个T细胞固定在所述固定相上。

[0580] 本文在一些实施方案中还公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a)将包含多个T细胞的样品添加至本文公开的色谱柱或色谱柱组中的固定相,所述固定相包含与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上的选择标记结合的选择剂,从而将所述多个T细胞中的一个或多个固定在所述固定相上;以及(b)向所述色谱柱或色谱柱组中的固定相添加包含能够在所述多个T细胞中的一个或多个中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[0581] 在另一个方面,本文公开一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a)组合(i)包含多个T细胞的样品与(ii)本文公开的色谱试剂盒中的固定相,所述固定相包含能够与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与选择标记的特异性结合实现将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及(b)向所述固定相添加包含能够在T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,其中所述组合步骤和/或所述添加

步骤在所述色谱试剂盒的色谱柱或色谱柱组的内部空腔的内部或外部进行,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。在一些实施方案中,所述方法还包括:在孵育开始之后,从固定相收集一个或多个T细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。在一些方面,通过重力流从固定相收集一个或多个T细胞,并且收集步骤在不添加用于从固定相洗脱多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。

[0582] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度调节至高于室温的目标温度。在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度调节至目标温度,从而在与一种或多种刺激剂或刺激试剂一起孵育期间向所述细胞提供生理温度。在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度调节至在约30℃与约39℃之间的目标温度。在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度调节至在约35℃与约39℃之间的目标温度。例如,目标温度是37℃或约37℃。

[0583] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度维持至高于室温的目标温度。在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度维持至目标温度,从而在与一种或多种刺激剂或刺激试剂一起孵育期间向细胞提供生理温度。在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件可以将固定相的温度维持至在约30℃与约39℃之间的目标温度。在一些方面,在所述孵育的至少一部分期间,温度控制构件将固定相的温度维持在约35℃与约39℃之间的目标温度。例如,目标温度是37℃或约37℃。

[0584] 在任何前述实施方案中,在所述孵育的至少一部分期间,连接器可以允许将气体摄入内部空腔中。例如,气体是无菌的并且是或包含空气,并且将气体摄入内部空腔中在所述孵育期间可以是间歇的或连续的。

E. 洗脱

[0585] 在任何前述实施方案中,所述方法还可以包括:在所述孵育开始之后,从固定相收集一个或多个T细胞。在一个方面,一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从固定相收集的。在一些实施方案中,一个或多个T细胞是通过重力流从固定相收集的。

[0586] 在任何前述实施方案中,收集步骤可以在不添加用于从所述固定相洗脱所述多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。

[0587] 使用本文公开的装置,本文提供包括在与刺激剂一起孵育后从色谱柱洗脱细胞(例如,靶细胞(例如,T细胞))方法,这是在不使用如本文所述的竞争剂或游离结合剂的情况下完成的。在一些实施方案中,所述洗脱包括洗涤步骤(例如,使用洗涤介质),基本上由其组成或由其组成。

[0588] 在一些实施方案中,在与刺激剂一起孵育期间,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的细胞从选择剂自发脱附。在一些实施方案中,自发脱附发生在从开始与刺激剂一起孵育的24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2小时内。在一些实施方案中,自发脱附发生在开始与刺激剂一起孵育后约2至24、3至24、4至24、5至24、6至24、7至24、8至24、9至24、10至24、11至24、12至24、13至24、14至24、15至24、16至24、17至24、18至24、19至24、20至24、21至24、22至24、23至24、2至23、2至22、2至21、2至

20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3小时内。在一些实施方案中,从柱脱附发生在开始与刺激剂一起孵育后为或为约4至5小时(例如,4.5小时)内。在一些实施方案中,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的多个靶细胞(例如,T细胞)中的大部分在从开始与刺激剂一起孵育的少于24小时中脱附。在一些实施方案中,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的多个靶细胞(例如,T细胞)中的大部分在从开始与刺激剂一起孵育的少于12小时中脱附。在一些实施方案中,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的多个靶细胞(例如,T细胞)中的大部分在从开始与刺激剂一起孵育的少于5小时中脱附。在一些实施方案中,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的多个靶细胞(例如,T细胞)中的大部分在从开始与刺激剂一起孵育的少于4小时中脱附。在一些实施方案中,经由选择剂固定在色谱基质(例如,固定相)上的多个靶细胞(例如,T细胞)中的大部分在从开始与刺激剂一起孵育的少于2小时中脱附。

[0589] 在一些实施方案中,经由重力流从色谱柱洗脱和/或收集自发脱附的细胞。在一些实施方案中,使用洗涤步骤从色谱柱洗脱自发脱附的细胞。在一些实施方案中,至少一个洗涤步骤在开始与刺激剂或含有刺激剂的刺激试剂一起孵育后为、为约或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时进行。在一些实施方案中,一个或多个洗涤步骤在开始与刺激剂或含有刺激剂的刺激试剂一起孵育后为、为约或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时进行。在一些实施方案中,一个或多个洗涤步骤在开始与刺激剂或包括刺激剂的刺激试剂一起孵育后约2至24、3至24、4至24、5至24、6至24、7至24、8至24、9至24、10至24、11至24、12至24、13至24、14至24、15至24、16至24、17至24、18至24、19至24、20至24、21至24、22至24、23至24、2至23、2至22、2至21、2至20、2至19、2至18、2至17、2至16、2至15、2至14、2至13、2至12、2至11、2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3小时内进行。

[0590] 在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的洗脱和/或收集步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为或为约2天内进行。在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的洗脱和/或收集步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为或为约1至2天内进行。在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的洗脱和/或收集步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为或为约1天内进行。在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的洗脱和/或收集步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后小于1天进行。在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的洗脱和/或收集步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为或为约48、36、24、12、6、4或2小时(包含端值)内进行。在一些实施方案中,在选择和柱上刺激步骤之后的收集或洗脱步骤在将样品添加至色谱柱(例如,固定相)之后为或为约2至48、2至36、2至24、2至12、2至6、2至4、4至48、4至36、4至24、4至12、4至6、6至48、6至36、6至24、6至12、12至48、12至36、12至24、24至48、24至36或36至48小时内进行。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)少于48、36、24、12、6、4或2小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)少于36小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)少于24小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)少于12小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括

从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于7小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于6.5小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于6小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于5.5小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于5小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于4.5小时。在一些实施方案中,过程持续时间(包括从选择和柱上刺激至洗脱或收集的步骤)为、为约或小于4小时。

[0591] 在一些实施方案中,经由重力流从色谱柱收集自发脱附的细胞。在一些实施方案中,使用洗涤步骤从色谱柱洗脱自发脱附的细胞。在一些实施方案中,洗涤介质是培养基。因此,在一些实施方案中,洗脱的细胞可以直接继续进行下游处理(例如,随后的选择步骤、刺激步骤、孵育步骤、基因工程化)。在一些实施方案中,洗涤介质包含含有谷氨酰胺和重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基。

[0592] 在一些实施方案中,洗脱物包含刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,收集的细胞仍与刺激剂(例如,与寡聚刺激试剂结合的刺激剂)结合。因此,收集的细胞仍然可以被认为处于刺激条件下。在一些实施方案中,含于洗脱物中的刺激剂与洗脱的细胞和刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)结合。因此,收集和/或洗脱的细胞仍然可以被认为处于刺激条件下。在一些实施方案中,脱附并洗脱的细胞处于刺激条件下(例如,仍在被刺激)。在一些实施方案中,洗脱的细胞可以继续处于刺激条件下,例如如章节II-D中所述。

[0593] 在一些实施方案中,柱和收集容器在封闭系统中连接。在一些实施方案中,封闭系统是无菌的。在一些实施方案中,选择、刺激和洗脱步骤是通过自动化系统进行,所述自动化系统具有最少或无人工(如人)操作或干涉。

F. 基因工程化

[0594] 在一些实施方案中,本文提供如下方法,其包括将细胞(例如,输出组合物)基因工程化,例如,将编码重组蛋白的异源或重组多核苷酸引入已经使用本文公开的装置选择并刺激的细胞中。这样的重组蛋白可以包括重组受体,如章节III中所述的任一种。将编码重组蛋白的多核苷酸(例如,异源或重组多核苷酸)引入细胞中可以使用多种已知载体中的任一种来进行。这样的载体包括病毒系统,包括慢病毒和 γ 逆转录病毒系统。示例性方法包括用于转移编码受体的异源多核苷酸的那些方法,包括经由病毒(例如,逆转录病毒或慢病毒)转导。在一些实施方案中,将刺激的细胞群(例如,输出组合物)基因工程化,如以引入编码重组受体的异源或重组多核苷酸,从而产生转化的细胞的群体(本文中也称为转化的细胞群)。

[0595] 在特定实施方案中,在细胞已经经历柱上刺激(如通过本文例如在章节II-D中提供的任何方法)后,将细胞(例如,T细胞、CD3+、CD4+ T细胞)基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中,在细胞已经经历柱上刺激(如通过本文例如在章节II-D中提供的任何方法)和通过重力流收集(例如,在章节II.E中)之后,将细胞(例如,T细胞、CD3+、CD4+ T细胞)基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中,一个或多个刺激的群体先前已经进行低温保护和储存,并且在基因工程化、转化、转染或转导细胞之前解冻。

[0596] 在特定实施方案中,在刺激条件下刺激或培养(例如,柱上刺激)细胞后,将细胞

(例如, T细胞、CD3+、CD4+ T细胞) 基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在从刺激开始的以下时间、约以下时间或以下时间内, 将细胞基因工程化、转化或转导: 72小时、60小时、48小时、36小时、24小时、12小时、5小时、4小时或2小时, 包含端值。在一些实施方案中, 在从柱上刺激开始起为或为约2、3、4、5或6小时, 将细胞基因工程化。在一些实施方案中, 在从柱上刺激开始起为或为约4至5小时, 将细胞基因工程化。在一些实施方案中, 在基因工程化期间, 细胞仍处于刺激条件下。在某些实施方案中, 在刺激开始后为或为约2小时与6小时之间或6小时与12小时之间, 将细胞基因工程化、转化或转导。在某些实施方案中, 在刺激开始后为或为约12小时与48小时之间、16小时与36小时之间或18小时与30小时之间, 将细胞基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在刺激开始后为或为约18小时与30小时之间, 将细胞基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在刺激开始后为或为约22小时或24小时, 将细胞基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在刺激开始后为或为约6小时或12小时, 将细胞基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在刺激开始后为或为约4小时或5小时, 将细胞基因工程化、转化或转导。在特定实施方案中, 在刺激开始后为或为约2小时或3小时, 将细胞基因工程化、转化或转导。

[0597] 在某些实施方案中, 用于基因工程化的方法通过以下方式进行: 使群体(例如, 输出组合物)的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如, 重组受体)的核酸分子或多核苷酸接触, 或将所述核酸分子或多核苷酸引入所述细胞中。在某些实施方案中, 所述核酸分子或多核苷酸对于所述细胞是异源的。在特定实施方案中, 异源核酸分子或异源多核苷酸对于所述细胞并非天然的。在某些实施方案中, 所述异源核酸分子或异源多核苷酸编码并非由所述细胞天然表达的蛋白质(例如, 重组蛋白)。在特定实施方案中, 所述异源核酸分子或多核苷酸是或含有在所述接触或引入之前在所述细胞中未发现的核酸序列。

[0598] 在一些实施方案中, 将细胞(例如, 输出组合物)工程化, 例如, 转导, 或在转导佐剂的存在下进行。示例性转导佐剂包括但不限于聚阳离子、纤连蛋白或源自纤连蛋白的片段或变体以及RetroNectin。在某些实施方案中, 在聚阳离子、纤连蛋白或纤连蛋白来源的片段或变体和/或RetroNectin的存在下将所述细胞工程化。在特定实施方案中, 在聚阳离子的存在下将所述细胞工程化, 所述聚阳离子是聚凝胺、DEAE-葡聚糖、硫酸鱼精蛋白、聚-L-赖氨酸或阳离子脂质体。在特定实施方案中, 在硫酸鱼精蛋白的存在下将所述细胞工程化。

[0599] 在一些实施方案中, 基因工程化(例如, 转导)是在无血清培养基中进行。在一些实施方案中, 无血清培养基是定义的或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中, 无血清培养基是受控培养基, 其已经过处理, 例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中, 无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中, 无血清培养基可以含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。在一些实施方案中, 培养基包含谷氨酰胺。

[0600] 在特定实施方案中, 在一种或多种细胞因子的存在下将细胞工程化。在某些实施方案中, 一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中, 一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中, 一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中, 一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中, 细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素7(IL-7)、白介素9(IL-9)、白介素12

(IL-12)、白介素15 (IL-15)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。

[0601] 在特定实施方案中,在刺激条件下在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下将细胞(例如,刺激的细胞)工程化。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,将细胞工程化,例如转导,或在刺激条件下在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下进行。

[0602] 在一些实施方案中,在与刺激期间存在的培养基相同或相似的培养基的存在下将细胞基因工程化、转化或转导。在一些实施方案中,在具有与刺激期间存在的培养基相同的细胞因子的培养基中将细胞基因工程化、转化或转导。在某些实施方案中,在以相同浓度具有与刺激期间存在的培养基相同的细胞因子的培养基中将细胞基因工程化、转化或转导。

1. 转导

[0603] 在一些实施方案中,本文提供如下方法,其包括通过将多核苷酸(例如,异源或重组多核苷酸)通过转导引入已经使用本文公开的装置选择并刺激的细胞中将细胞(例如,输出组合物)基因工程化。在一些实施方案中,用病毒载体转导细胞。在特定实施方案中,用病毒载体转导细胞。在一些实施方案中,所述病毒是逆转录病毒载体,如 γ 逆转录病毒载体或慢病毒载体。慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如以下文献中:Wang等人(2012) *J. Immunother.* 35 (9):689-701;Cooper等人(2003) *Blood*. 101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009) *Methods Mol Biol*. 506:97-114;以及Cavalieri等人(2003) *Blood*. 102 (2):497-505。

[0604] 在一些实施方案中,转导是通过使群体(例如,输出组合物)的一个或多个细胞与编码重组蛋白(例如重组受体)的核酸分子接触来进行。在一些实施方案中,接触可以通过离心(如旋转接种,例如离心接种)来实现。这样的方法包括如国际公开号W02016/073602中所述的那些方法中的任一种。示例性离心室包括由Biosafe SA生产和销售的那些,包括用于Sepax®和Sepax® 2系统的那些,包括A-200/F和A-200离心室以及用于这样的系统的各种试剂盒。示例性室、系统以及处理仪器和机柜描述于例如以下文献中:美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和公开的美国专利申请公开号US2008/0171951,以及公开的国际专利申请公开号W0 00/38762,将其各自的内容通过引用以其全文并入本文。用于这样的系统的示例性试剂盒包括但不限于由BioSafe SA以产品名CS-430.1、CS-490.1、CS-600.1或CS-900.2销售的一次性试剂盒。

[0605] 在一些实施方案中,所提供的方法与将含有编码重组受体的多核苷酸的病毒载体转导至、至约或至少于 300×10^6 个细胞(例如,受刺激细胞群的活T细胞)中结合使用。在某些实施方案中,转导为或约 100×10^6 个细胞(例如,刺激的细胞群的活T细胞)。在一些实施方案中,对每mL 1×10^6 个细胞(例如,刺激的细胞群的活T细胞)进行转导或使其经历转导。在一些实施方案中,病毒载体剂量是每 1×10^6 个细胞为或为约10、9、8、7、6、5、4、3、2或1 μ L。在一些实施方案中,病毒载体剂量是每 1×10^6 个细胞在或在约6至4 μ L之间。在一些实施方案中,病毒载体剂量是每 1×10^6 个细胞为或为约5 μ L。

[0606] 在一些实施方案中,在无血清培养基中进行转导。在一些实施方案中,在IL-2、IL-7和IL-15的存在下进行转导。在特定实施方案中,细胞(例如,刺激的细胞群(例如,输出组合物)的细胞)含有至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的是CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞的细胞。在一些实施方案中,转导进行24与48小时之间、36与12小时之间、18与30小时之间,或者持续为或约24小时。在某些实施方案中,在开始或起始孵育(例如,在刺激条件下孵育)的两天内、36小时内、30小时内、24小时内、12小时内、6小时内、5小时内、4小时内或2小时内,起始转导步骤。在一些实施方案中,转导(包括转导后孵育)进行为或为约72小时±6小时。在一些实施方案中,转导进行为或为约0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5小时。在一些实施方案中,转导进行为或为约0.5、1、1.5或2小时。在一些实施方案中,转导进行为或为约0.5至1.5小时。在一些实施方案中,转导进行为或为约1小时。

[0607] 在某些实施方案中,在开始或起始孵育(例如,在刺激条件下孵育)的两天内、36小时内、30小时内、24小时内、12小时内、6小时内、5小时内、4小时内或2小时内,起始转导步骤。在某些实施方案中,在开始或起始孵育(例如,在刺激条件下孵育)的4至5小时内,起始转导步骤。在某些实施方案中,在开始或起始孵育(例如,在刺激条件下孵育)的约20小时,起始转导步骤。在某些实施方案中,在开始或起始孵育(例如,在刺激条件下孵育)的为或为约4至5小时,起始转导步骤。

[0608] 在一些实施方案中,将系统与其他仪器一起包括和/或置于与其他仪器相关联,所述其他仪器包括用于操作、自动化、控制和/或监测转导步骤以及在系统中进行的一个或多个各种其他处理步骤(例如,可以使用或结合如本文或在国际公开号W0 2016/073602中所述的离心室系统的一个或多个处理步骤)的方面的仪器。在一些实施方案中,这种仪器容纳于机柜中。在一些实施方案中,所述仪器包括机柜,所述机柜包括外壳,所述外壳含有控制电路、离心机、罩、电机、泵、传感器、显示器和用户界面。示例性装置描述于美国专利号6,123,655、美国专利号6,733,433和US 2008/0171951中。

[0609] 在一些实施方案中,所述系统包含一系列容器,例如袋、管、旋塞、夹子、连接器和离心室。在一些实施方案中,所述容器(如袋)包括一个或多个容器(例如袋),其在一容器或单独容器(例如同袋或单独袋)中含有要转导的细胞和病毒载体颗粒。在一些实施方案中,所述系统还包括一个或多个容器(例如袋),所述容器含有介质,如稀释剂和/或洗涤溶液,在所述方法期间将所述介质抽入室和/或其他组件中以稀释、重悬和/或洗涤组分和/或群体。所述容器可以连接在系统中的一个或多个位置,例如连接在对应于输入管线、稀释剂管线、洗涤管线、废液管线和/或输出管线的位置。

[0610] 在一些实施方案中,所述室与离心机相关联,离心机能够实现所述室的旋转,例如围绕其旋转轴旋转。可以在与细胞转导结合的孵育之前、期间和/或之后和/或在一个或多个其他处理步骤中,进行旋转。因此,在一些实施方案中,多个处理步骤中的一个或多个在旋转下(例如在特定力下)进行。所述室通常能够垂直或大致垂直地旋转,使得所述室在离心期间垂直放置,并且侧壁和轴是垂直或大致垂直的,且一个或多个端壁是水平或大致水平的。

[0611] 在一些实施方案中,在将群体提供至空腔之前,可以将含有细胞的群体和含有病毒载体颗粒的群体和任选地空气组合或混合。在一些实施方案中,含有细胞的群体和含有病毒载体颗粒的群体和任选地空气是单独提供并且在空腔中组合并混合。在一些实施方案

中,可以按任何顺序将含有细胞的群体、含有病毒载体颗粒的群体和任选地空气提供至内部空腔中。在这样的一些实施方案中的任一个中,含有细胞和病毒载体颗粒的群体在组合或混合在一起后就是输入群体,不论是在离心室内部还是外部组合或混合的,和/或不论细胞和病毒载体颗粒是一起还是单独(如同时或依序)提供至离心室中。

[0612] 在一些实施方案中,在转导方法中,在孵育细胞和病毒载体颗粒(如旋转)之前,进行一定体积的气体(如空气)的摄入。在一些实施方案中,在转导方法中,在细胞和病毒载体颗粒的孵育(如旋转)期间,进行一定体积的气体(如空气)的摄入。

[0613] 在一些实施方案中,构成转导群体的细胞或病毒载体颗粒的液体体积、以及任选地空气的体积可以是预定体积。所述体积可以是被编程到与系统相关的电路中和/或由与所述系统相关的电路控制的体积。

[0614] 在一些实施方案中,手动、半自动和/或自动地控制转导群体和任选地气体(如空气)的摄入,直到已经将所需或预定的体积摄入室的内部空腔中为止。在一些实施方案中,与系统相关的传感器可以例如经由液体和/或气体的颜色、流速和/或密度来检测流入和流出离心室的液体和/或气体,并且可以与相关电路通信,以按照需要停止或继续摄入,直到已经实现这种所需或预定体积的摄入为止。在一些方面,可以使被编程或仅能够检测系统中的液体而非气体(例如空气)的传感器能够在不停止摄入的情况下允许气体(如空气)通过进入系统中。在一些这样的实施方案中,当需要气体(如空气)摄入时,可以将一条不透明的管道放置在传感器附近的线中。在一些实施方案中,可以手动地控制气体(如空气)的摄入。

[0615] 在所提供的方法的方面,使离心室的内部空腔经受高速旋转。在一些实施方案中,在摄入液体输入群体和任选地空气之前、同时、之后或间歇地实现旋转。在一些实施方案中,在摄入液体输入群体和任选地空气之后实现旋转。在一些实施方案中,旋转通过离心室的离心来进行,其在内部空腔的侧壁内表面处和/或在细胞的表面层处的相对离心力为或约或者至少为或至少约200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、1000g、1100g、1500、1600g、1800g、2000g、2200g、2500g、3000g、3200g、3500g或4000g。在一些实施方案中,旋转通过离心进行,其力大于或大于约1100g,如大于或大于约1200g、大于或大于约1400g、大于或大于约1600g、大于或大于约1800g、大于或大于约2000g、大于或大于约2400g、大于或大于约2800g、大于或大于约3000g或者大于或大于约3200g。在特定实施方案中,通过离心进行的旋转的力在600g与800g之间。在特定实施方案中,通过离心进行的旋转的力为或为约693g。在一些实施方案中,旋转通过离心进行,其力为或为约1600g。

[0616] 在一些实施方案中,将室的空腔中的气体(如空气)从室中排出。在一些实施方案中,将气体(如空气)排出到容器,所述容器作为封闭系统的一部分与离心室可操作地连接。在一些实施方案中,容器是自由或空的容器。在一些实施方案中,室的空腔中的空气(如气体)通过过滤器排出,所述过滤器经由无菌管组线与室的内部空腔可操作地连接。在一些实施方案中,使用手动、半自动或自动过程排出空气。在一些实施方案中,在从室的空腔中输送(express)含有孵育的细胞和病毒载体颗粒(如已经开始转导的细胞或已经用病毒载体转导的细胞)的输出群体之前、同时、间歇地或随后将空气从室中排出。

[0617] 在一些实施方案中,转导和/或其他孵育作为连续或半连续过程或作为所述连续或半连续过程的一部分进行。在一些实施方案中,连续过程涉及连续摄入细胞和病毒载体

颗粒,例如转导组合物(作为单一预先存在的组合物,或者通过连续抽入同一容器(例如空腔)中,从而混合其部分),和/或在孵育的至少一部分期间(例如,在离心的同时),从容器中连续输送或排出液体,以及任选地排出气体(例如空气)。在一些实施方案中,至少部分同时进行连续摄入和连续输送。在一些实施方案中,连续摄入发生在部分孵育期间,例如在部分离心期间,并且连续输送发生在孵育的单独部分期间。两者可以交替进行。因此,在进行孵育的同时,连续摄入和输送可以允许处理(例如转导)总体积更大的样品。

[0618] 在一些实施方案中,孵育是连续过程的一部分,所述方法包括在孵育的至少一部分期间,实现在室旋转期间以及在孵育的一部分期间将所述转导组合物连续摄入空腔中,实现在室的旋转期间通过至少一个开口从空腔中连续输送液体并任选地排出气体(例如空气)。

[0619] 在一些实施方案中,通过在以下步骤之间交替来进行半连续孵育:实现将组合物摄入空腔中,孵育,从空腔中输送液体和任选地从空腔中排出气体(例如空气),如到输出容器,然后摄入含有更多细胞和用于处理的其他试剂(例如,病毒载体颗粒)的后续(例如第二、第三等)组合物,并重复所述过程。例如,在一些实施方案中,孵育是半连续过程的一部分,所述方法包括在孵育之前,实现通过所述至少一个开口将转导组合物摄入空腔中,并在孵育之后,实现从空腔中输送流体;实现将包含细胞和病毒载体颗粒的另一种转导组合物摄入所述内部空腔中;并且在将所述另一种转导组合物中的所述细胞用所述载体转导的条件下在所述内部空腔中孵育所述另一种转导组合物。所述过程能以迭代的方式继续进行许多另外的回合。在此方面,半连续或连续方法可以允许产生甚至更大体积和/或数量的细胞。

[0620] 在一些实施方案中,转导孵育的一部分在离心室中进行,在包括旋转或离心的条件下进行。

[0621] 在特定实施方案中,用病毒载体转导细胞是或包括旋转接种,例如,含有细胞和病毒颗粒的混合物的离心。在一些实施方案中,可以使含有细胞和病毒颗粒的组合物旋转,通常以相对较低的力或速度旋转,如速度低于用于沉淀细胞的速度,如从或从约600rpm至1700rpm(例如,为或约或至少600rpm、1000rpm、或1500rpm、或1700rpm)。在一些实施方案中,旋转以如下力(例如,相对离心力)进行:从或从约100g至4000g(例如为或约或者至少为或至少约100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1500g、2000g、2500g、3000g或3500g),如例如在室或空腔的内壁或外壁处所测量。

[0622] 在一些实施方案中,将所述细胞用病毒载体以如下力(例如,相对离心力)旋转接种:在或在约100g与4000g之间、200g与1,000g之间、500g与1200g之间、1000g与2000g之间、600g与800g之间、1200g与1800g之间、或1500g与1800g之间。在某些实施方案中,将细胞用病毒载体颗粒以如下力旋转接种:为、为至少或为约100g、200g、300g、400g、500g、600g、700g、800g、900g、1000g、1200g、1500g、1600g、2000g、2500g、3000g、3200g、或3500g。在一些实施方案中,用病毒载体以为或为约692g的力对细胞进行转导。在特定实施方案中,用病毒载体以为或为约1600g的力对细胞进行转导。在一些实施方案中,所述力是在内部空腔的侧壁的内表面处和/或在细胞的表面层处的力。

[0623] 在某些实施方案中,将所述细胞旋转接种,例如,使含有细胞和病毒载体的细胞组合物旋转,进行大于或大于约5分钟,如大于或大于约10分钟、大于或大于约15分钟、大于或

大于约20分钟、大于或大于约30分钟、大于或大于约45分钟、大于或大于约60分钟、大于或大于约90分钟或者大于或大于约120分钟;或者在或在约5分钟与120分钟之间、30分钟与90分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间,每个都包含端值。在一些实施方案中,将所述细胞用病毒载体旋转接种,进行为或为约30分钟。在某些实施方案中,将所述细胞用病毒载体旋转接种,进行为或为约60分钟。

[0624] 在一些实施方案中,转导方法包括转导组合物和任选地空气在离心室中的旋转接种(例如,旋转或离心),持续大于或大于约5分钟,如大于或大于约10分钟、大于或大于约15分钟、大于或大于约20分钟、大于或大于约30分钟、大于或大于约45分钟、大于或大于约60分钟、大于或大于约90分钟或者大于或大于约120分钟。在一些实施方案中,将转导组合物和任选地空气在离心室中旋转或离心,持续大于5分钟,但持续不超过60分钟、不超过45分钟、不超过30分钟或不超过15分钟。在特定实施方案中,转导包括旋转或离心持续或持续约60分钟。

[0625] 在一些实施方案中,转导方法包括转导组合物和任选地空气在离心室中旋转或离心,进行在或在约10分钟与60分钟之间、15分钟与60分钟之间、15分钟与45分钟之间、30分钟与60分钟之间或45分钟与60分钟之间,每个都包含端值,并且其在内部空腔的侧壁的内表面处和/或在细胞的表面层处的力为、为约或在1000g、1100g、1200g、1400g、1500g、1600g、1800g、2000g、2200g、2400g、2800g、3200g或3600g。在特定实施方案中,转导方法包括转导组合物(例如,细胞和病毒载体颗粒)以为或为约1600g旋转或离心,进行为或为约60分钟。

[0626] 在一些实施方案中,转导方法不包括旋转或离心。

2. 病毒载体颗粒

[0627] 在一些实施方案中,对于本文提供的方法中的转导,使用重组感染性病毒颗粒(例如,源自猿猴病毒40 (SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV))将重组核酸转移至细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移至T细胞中(参见例如,Koste等人(2014) *Gene Therapy* 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000) *Exp Hematol* 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29日(11):550-557)。

[0628] 在一些实施方案中,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如,源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干个物种的宿主细胞。在一个实施方案中,要表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多例示性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989) *BioTechniques* 7:980-990;Miller, A.D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14;Scarpa等人(1991) *Virology* 180:849-852;Burns等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993)

Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109)。

[0629] 病毒载体基因组通常以质粒形式构建,其可以转染到包装细胞系或生产细胞系中。在任何这样的例子中,将编码重组蛋白(如重组受体)的核酸插入或定位在病毒载体的区域中,例如通常在病毒基因组的非必需区域中。在一些实施方案中,将核酸插入病毒基因组的某些病毒序列的位置中以产生具有复制缺陷的病毒。

[0630] 可以使用多种已知方法中的任何一种来产生逆转录病毒颗粒,其基因组含有病毒载体基因组的RNA拷贝。在一些实施方案中,至少两种组分参与制备基于病毒的基因递送系统:第一,包装质粒,包括结构蛋白以及产生病毒载体颗粒所必需的酶,第二,病毒载体本身,即,要转移的遗传物质。可以在设计这些组分之一或两者时引入生物安全保护措施。

[0631] 在一些实施方案中,包装质粒可以含有除了包膜蛋白以外的所有逆转录病毒(如HIV-1)蛋白(Naldini等人,1998)。在其他实施方案中,病毒载体可能缺少另外的病毒基因(例如与毒力有关的那些,例如vpr、vif、vpu和nef和/或Tat(HIV的主要反式激活因子))。在一些实施方案中,慢病毒载体(例如基于HIV的慢病毒载体)仅包含亲本病毒的三种基因:gag、pol和rev,这减少或消除了野生型病毒通过重组而重构的可能性。

[0632] 在一些实施方案中,将病毒载体基因组引入包装细胞系中,所述细胞系含有将从病毒载体基因组转录的病毒基因组RNA包装至病毒颗粒中所需的所有组分。可替代地,除了一种或多种目的序列(例如重组核酸)以外,病毒载体基因组可包含一种或多种编码病毒组分的基因。然而,在一些方面,为了防止基因组在靶细胞中复制,将复制所需的内源病毒基因去除,并且在包装细胞系中单独提供。

[0633] 在一些实施方案中,用含有产生颗粒所必需的组分的一种或多种质粒载体转染包装细胞系。在一些实施方案中,用含有病毒载体基因组(包括LTR、顺式作用包装序列和目的序列,即编码抗原受体(例如CAR)的核酸)的质粒;以及编码病毒酶和/或结构组分(例如Gag、pol和/或rev)的一种或多种辅助质粒转染包装细胞系。在一些实施方案中,利用多个载体分离产生逆转录病毒载体颗粒的各种遗传组分。在一些这样的实施方案中,向包装细胞提供单独的载体减少了原本可能生成有复制能力的病毒的重组事件的机会。在一些实施方案中,可以使用具有所有逆转录病毒组分的单个质粒载体。

[0634] 在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(例如慢病毒载体颗粒)假型化以增加宿主细胞的转导效率。例如,在一些实施方案中,将逆转录病毒载体颗粒(例如慢病毒载体颗粒)用VSV-G糖蛋白假型化,其提供宽细胞宿主范围,从而扩展可以转导的细胞类型。在一些实施方案中,用编码非天然包膜糖蛋白的质粒或多核苷酸转染包装细胞系,以例如包括嗜异性、多嗜性或双嗜性包膜,如辛德比斯病毒包膜、GALV或VSV-G。

[0635] 在一些实施方案中,包装细胞系提供将病毒基因组RNA包装至慢病毒载体颗粒中反式作用所需的组分,包括病毒调节蛋白和结构蛋白。在一些实施方案中,包装细胞系可以是能够表达慢病毒蛋白并产生功能性慢病毒载体颗粒的任何细胞系。在一些方面,合适的包装细胞系包括293(ATCC CCL X)、293T、HeLA(ATCC CCL 2)、D17(ATCC CCL 183)、MDCK(ATCC CCL 34)、BHK(ATCC CCL-10)和Cf2Th(ATCC CRL 1430)细胞。

[0636] 在一些实施方案中,包装细胞系稳定地表达一种或多种病毒蛋白质。例如,在一些方面,可以构建含有gag、pol、rev和/或其他结构基因但没有LTR和包装组分的包装细胞系。在一些实施方案中,可以用编码一种或多种病毒蛋白的核酸分子以及含有编码异源蛋白的

核酸分子的病毒载体基因组和/或编码包膜糖蛋白的核酸对包装细胞系进行瞬时转染。

[0637] 在一些实施方案中,将病毒载体和包装质粒和/或辅助质粒通过转染或感染引入包装细胞系中。包装细胞系产生含有病毒载体基因组的病毒载体颗粒。用于转染或感染的方法是众所周知的。非限制性例子包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖和脂质转染方法、电穿孔和显微注射。

[0638] 在将重组质粒和逆转录病毒LTR和包装序列引入特殊细胞系(例如,通过磷酸钙沉淀)中时,包装序列可以允许要包装至病毒颗粒中的重组质粒的RNA转录,然后所述病毒颗粒可能会被分泌到培养基中。在一些实施方案中,随后收集含有重组逆转录病毒的培养基,任选地将其浓缩,并用于基因转移。例如,在一些方面,在将包装质粒和转移载体共转染至包装细胞系后,从培养基回收病毒载体颗粒,并通过本领域技术人员使用的标准方法进行滴定。

[0639] 在一些实施方案中,可以通过引入质粒以允许产生慢病毒颗粒,而在包装细胞系(例如示例性HEK 293T细胞系)中产生逆转录病毒载体,例如慢病毒载体。在一些实施方案中,包装细胞被转染和/或含有编码gag和pol的多核苷酸,以及编码重组受体(例如抗原受体,例如CAR)的多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系任选地和/或另外地被含有编码rev蛋白的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些实施方案中,包装细胞系被任选地和/或另外用编码非天然包膜糖蛋白(例如VSV-G)的多核苷酸转染和/或含有所述多核苷酸。在一些这样的实施方案中,在转染细胞(例如HEK 293T细胞)后大约两天,细胞上清液含有可以回收并滴定的重组慢病毒载体。

[0640] 所回收和/或产生的逆转录病毒载体颗粒可以用于使用如所述的方法转导靶细胞。一旦进入靶细胞中,病毒RNA就被逆转录,进入细胞核中并稳定整合到宿主基因组中。在病毒RNA整合后一天或两天,可以检测到重组蛋白(例如抗原受体,如CAR)的表达。

3. 孵育细胞

[0641] 在包括用病毒载体将细胞(例如输出组合物)基因工程化(如通过转化,例如转导)的本文方法的实施方案中,所述方法还可以包括在细胞中引入病毒载体或使细胞接触病毒载体之后孵育所述细胞的一个或多个步骤。在一些实施方案中,在用于基因工程化、转化、转导或转染细胞以将病毒载体引入细胞中的过程之后,孵育细胞(例如,转化的细胞群的细胞)。在特定实施方案中,所述孵育得到孵育细胞的群体(本文中也称为孵育的细胞群)。

[0642] 在一些实施方案中,在不对细胞进行进一步处理的情况下进行引入异源或重组多核苷酸(例如,病毒载体颗粒)后,孵育细胞。在特定实施方案中,在孵育前,洗涤细胞,如以去除或基本上去除外源或剩余的编码异源或重组多核苷酸的多核苷酸,例如病毒载体颗粒,如在旋转接种后在基因工程化过程后在培养基中剩余的那些。

[0643] 在一些这样的实施方案中,进一步孵育是在一定条件下实现,以使病毒载体整合到一个或多个细胞的宿主基因组中。评估或确定孵育是否已经导致病毒载体颗粒整合到宿主基因组中,并且因此凭经验确定进一步孵育的条件是在技术人员的水平内。在一些实施方案中,可以通过测量在孵育后由病毒载体颗粒基因组中含有的核酸编码的重组蛋白(如异源蛋白)的表达水平来评估病毒载体在宿主基因组中的整合。可以使用多种熟知方法来评价重组分子的表达水平,例如在细胞表面蛋白的情况下,例如通过基于亲和力的方法(例如基于免疫亲和力的方法)来检测,例如通过流式细胞术进行。在一些例子中,通过检测转

导标记和/或报道基因构建体来测量表达。在一些实施方案中,编码截短的表面蛋白的核酸包括在载体内并用作其表达和/或增强的标记。

[0644] 在某些实施方案中,孵育是在静态条件(如不涉及培养基的离心、振荡、旋转、摇摆或灌注(例如,连续或半连续灌注)的条件)下进行。在一些实施方案中,在开始孵育之前或之后不久,例如,在5、15或30分钟内,将细胞转移(例如,在无菌条件下转移)至容器如袋或小瓶中,并置于孵育器中。

[0645] 在一些实施方案中,孵育的至少一部分在离心室的内部空腔中进行,如国际公开号WO 2016/073602中所述。

[0646] 在一些实施方案中,将已经引入编码异源或重组多肽的多核苷酸(例如,病毒载体)的细胞转移至用于孵育的容器中。在一些实施方案中,容器是小瓶。在特定实施方案中,容器是袋。在一些实施方案中,将细胞和任选地异源或重组多肽在封闭或无菌条件下转移至容器中。在一些实施方案中,然后将容器(例如小瓶或袋)置入孵育器中进行孵育的全部或一部分。在特定实施方案中,将孵育器设定在为、为约或至少16°C、24°C或35°C。在一些实施方案中,将孵育器设定在37°C、约37°C或37°C±2°C、±1°C、±0.5°C或±0.1°C。

[0647] 在一些方面,用于孵育的条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的药剂))。

[0648] 在一些实施方案中,在无血清培养基中进行孵育。在一些实施方案中,无血清培养基是定义的和/或明确定义的细胞培养基。在某些实施方案中,无血清培养基是受控培养基,其已经过处理,例如被过滤以去除抑制剂和/或生长因子。在一些实施方案中,无血清培养基含有蛋白质。在某些实施方案中,无血清培养基可以含有血清白蛋白、水解产物、生长因子、激素、载体蛋白和/或附着因子。

[0649] 在特定实施方案中,在一种或多种细胞因子存在下孵育细胞。在某些实施方案中,一种或多种细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素7(IL-7)、白介素9(IL-9)、白介素12(IL-12)、白介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。

[0650] 在特定实施方案中,在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下孵育细胞。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下孵育细胞。

[0651] 在一些实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的细胞因子(例如,重组人细胞因子)一起孵育:在1IU/mL与1,000IU/mL之间、在10IU/mL与50IU/mL之间、在50IU/mL与100IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间、在100IU/mL与500IU/mL之间、在250IU/mL

与500IU/mL之间、或在500IU/mL与1,000IU/mL之间。

[0652] 在一些实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的IL-2(例如,人重组IL-2)一起孵育:在1IU/mL与500IU/mL之间、在10IU/mL与250IU/mL之间、在50IU/mL与200IU/mL之间、在50IU/mL与150IU/mL之间、在75IU/mL与125IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间、或在10IU/mL与100IU/mL之间。在特定实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的重组IL-2一起孵育:为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或100IU/mL。在一些实施方案中,在为或为约100IU/mL重组IL-2(例如,人重组IL-2)的存在下孵育细胞(例如,转化的细胞)。

[0653] 在一些实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的重组IL-7(例如,人重组IL-7)一起孵育:在100IU/mL与2,000IU/mL之间、在500IU/mL与1,000IU/mL之间、在100IU/mL与500IU/mL之间、在500IU/mL与750IU/mL之间、在750IU/mL与1,000IU/mL之间、或在550IU/mL与650IU/mL之间。在特定实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的IL-7一起孵育:为或为约50IU/mL、100IU/mL、150IU/mL、200IU/mL、250IU/mL、300IU/mL、350IU/mL、400IU/mL、450IU/mL、500IU/mL、550IU/mL、600IU/mL、650IU/mL、700IU/mL、750IU/mL、800IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、750IU/mL、或1,000IU/mL。在特定实施方案中,在为或为约600IU/mL IL-7的存在下孵育细胞(例如,转化的细胞)。

[0654] 在一些实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的重组IL-15(例如,人重组IL-15)一起孵育:在1IU/mL与500IU/mL之间、在10IU/mL与250IU/mL之间、在50IU/mL与200IU/mL之间、在50IU/mL与150IU/mL之间、在75IU/mL与125IU/mL之间、在100IU/mL与200IU/mL之间、或在10IU/mL与100IU/mL之间。在特定实施方案中,将细胞(例如,转化的细胞)与如下浓度的重组IL-15一起孵育:为或为约50IU/mL、60IU/mL、70IU/mL、80IU/mL、90IU/mL、100IU/mL、110IU/mL、120IU/mL、130IU/mL、140IU/mL、150IU/mL、160IU/mL、170IU/mL、180IU/mL、190IU/mL、或200IU/mL。在一些实施方案中,在为或为约100IU/mL重组IL-15(例如,人重组IL-2)的存在下孵育细胞(例如,转化的细胞)。

[0655] 在特定实施方案中,在IL-2、IL-7和/或IL-15的存在下孵育细胞(例如,转化的细胞)。在一些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是重组的。在某些实施方案中,IL-2、IL-7和/或IL-15是人的。在特定实施方案中,所述一种或多种细胞因子是或包括人重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在某些实施方案中,在重组IL-2、IL-7和IL-15的存在下孵育细胞。

[0656] 在一些实施方案中,在与细胞刺激期间存在的培养基相同或相似的培养基的存在下孵育细胞,如与上述刺激(例如,柱上刺激)的方法或过程结合进行。在一些实施方案中,在具有与细胞刺激期间存在的培养基相同的细胞因子的培养基中孵育细胞,如与上述刺激方法或过程结合进行。在某些实施方案中,在以相同浓度具有与细胞刺激期间存在的培养基相同的细胞因子的培养基中孵育细胞,如与上述刺激方法或过程结合进行。

[0657] 在一些实施方案中,在不存在重组细胞因子的情况下孵育细胞。

[0658] 在一些实施方案中,在基础培养基中进行孵育的全部或一部分。在一些实施方案中,基础培养基含无机盐、糖、氨基酸和任选地维生素、有机酸和/或缓冲液或其他熟知的细胞培养营养素的混合物。除了营养素外,培养基还有助于维持pH和渗透压。在一些方面,基础培养基的试剂支持细胞生长、增殖和/或扩增。多种可商业购得的基础培养基对本领域

技术人员而言是熟知的,并且包括达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、罗斯威尔公园纪念学院培养基(Roswell Park Memorial Institute Medium,RPMI)、伊斯科夫改良的达尔伯克培养基和哈氏(Hams)培养基。在一些实施方案中,基础培养基是伊斯科夫改良的达尔伯克培养基、RPMI-1640或 α -MEM。

[0659] 在一些实施方案中,基础培养基是平衡盐溶液(例如,PBS、DPBS、HBSS、EBSS)。在一些实施方案中,基础培养基选自达尔伯克改良的伊格尔培养基(DMEM)、最小必需培养基(MEM)、伊格尔基础培养基(BME)、F-10、F-12、RPMI 1640、格拉斯哥最小必需培养基(GMEM)、 α 最小必需培养基(α MEM)、伊斯科夫改良的达尔伯克培养基和M199。在一些实施方案中,基础培养基是复合培养基(例如,RPMI-1640、IMDM)。在一些实施方案中,基础培养基是OpTmizerTMCTSTM细胞扩增基础培养基(ThermoFisher)。

[0660] 在某些实施方案中,基础培养基补充有另外的添加剂。在一些实施方案中,基础培养基未补充任何另外的添加剂。细胞培养基的添加剂可以包括但不限于营养素、糖(例如,葡萄糖)、氨基酸、维生素或添加剂(如ATP和NADH)。

[0661] 在一些实施方案中,基础培养基不含蛋白质。在一些实施方案中,基础培养基不含人蛋白(例如,人血清蛋白)。在一些实施方案中,基础培养基不含血清。在一些实施方案中,基础培养基不含源自人的血清。在一些实施方案中,基础培养基不含重组蛋白。在一些实施方案中,基础培养基不含人蛋白和重组蛋白。在一些实施方案中,基础培养基不含人蛋白和重组蛋白。在一些实施方案中,基础培养基不含如本文所述的一种或多种或所有细胞因子。

[0662] 在一些实施方案中,例如用于非扩增过程的全部或部分孵育是在不含任何另外的添加剂或重组细胞因子的基础培养基中进行。在一些实施方案中,基础培养基是不含任何另外的添加剂或重组细胞因子的CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher)。在一些实施方案中,例如用于非扩增过程的全部或部分孵育是在包含以下的培养基中进行:基础培养基和谷氨酰胺,例如,CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher)和谷氨酰胺。

[0663] 在一些实施方案中,例如非扩增过程的孵育的全部或一部分在包含以下的培养基中进行:不含一种或多种重组细胞因子如重组人IL-2、重组人IL-7和/或重组人IL-15的基础培养基(例如,CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher))。在一些实施方案中,培养基补充有一种或多种另外的非血清组分。在一些实施方案中,所述一种或多种补充剂不含血清。在一些实施方案中,无血清培养基还包含游离形式的氨基酸,如L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,无血清培养基不包含血清替代物补充剂。在一些实施方案中,无血清培养基不包含二肽形式的L-谷氨酰胺(例如,L-丙氨酰-L-谷氨酰胺)。在一些实施方案中,无血清培养基不包含任何重组细胞因子。在一些实施方案中,无血清培养基包含补充有T细胞补充剂和游离形式的L-谷氨酰胺的基础培养基,并且不含任何免疫细胞血清替代物、任何二肽形式的L-谷氨酰胺或任何重组细胞因子。在一些实施方案中,无血清培养基包含基础培养基(例如有补充的OpTmizerTMT细胞扩增基础培养基)、L-谷氨酰胺以及如由补充剂(例如OpTmizerTMT细胞扩增补充剂)提供的一种或多种另外的组分。

[0664] 在特定实施方案中,在如下浓度的无血清培养基中孵育细胞:为或为约 0.25×10^6 个细胞/mL、 0.5×10^6 个细胞/mL、 0.75×10^6 个细胞/mL、 1.0×10^6 个细胞/mL、 1.25×10^6 个细胞/mL、 1.5×10^6 个细胞/mL、 1.75×10^6 个细胞/mL、或 2.0×10^6 个细胞/mL。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 1.0×10^6 个细

胞/mL之间。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 0.75×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:在或在约 0.5×10^6 个细胞/mL至 0.75×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 0.5×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:为或为约 0.75×10^6 个细胞/mL。在特定实施方案中,以如下浓度在无血清培养基中孵育细胞:为或为约 0.5×10^6 个细胞/mL。在一些实施方案中,孵育持续为或为约18小时与30小时之间。在特定实施方案中,孵育持续为或为约24小时或者持续为或为约一天。

[0665] 在特定实施方案中,在不存在细胞因子的情况下孵育细胞。在特定实施方案中,在不存在任何重组细胞因子的情况下孵育细胞。在特定实施方案中,在不存在一种或多种重组细胞因子如重组IL-2、IL-7和/或IL-15的情况下孵育细胞。

[0666] 在一些实施方案中,例如用于非扩增过程的全部或部分孵育是在包含以下的培养基中进行:基础培养基、谷氨酰胺和一种或多种重组细胞因子,例如,CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher)和谷氨酰胺和重组IL-2、IL-7和/或IL-15。在一些实施方案中,例如用于非扩增过程的全部或部分孵育是在包含以下的培养基中进行:基础培养基、谷氨酰胺、一种或多种重组细胞因子和T细胞补充剂,例如,CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher)和谷氨酰胺、重组IL-2、IL-7和/或IL-15以及OpTmizer®补充剂(Thermofisher)。在一些实施方案中,例如用于非扩增过程的全部或部分孵育是在包含以下的培养基中进行:基础培养基、谷氨酰胺、一种或多种重组细胞因子、T细胞补充剂和一种或多种血清取代蛋白,例如,CTS OpTmizer基础培养基(Thermofisher)和谷氨酰胺、重组IL-2、IL-7和/或IL-15、OpTmizer®补充剂(Thermofisher)以及血清取代蛋白(如白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种)。

[0667] 在一些实施方案中,基础培养基还包含谷氨酰胺,如L-谷氨酰胺。在一些方面,谷氨酰胺是游离形式的谷氨酰胺,如L-谷氨酰胺。在一些实施方案中,谷氨酰胺如L-谷氨酰胺在基础培养基中的浓度为约或小于约0.5mM-1mM、0.5mM-1.5mM、0.5mM-2mM、0.5mM-2.5mM、0.5mM-3mM、0.5mM-3.5mM、0.5mM-4mM、0.5mM-4.5mM、0.5mM-5mM、1mM-1.5mM、1mM-2mM、1mM-2.5mM、1mM-3mM、1mM-3.5mM、1mM-4mM、1mM-4.5mM、1mM-5mM、1.5mM-2mM、1.5mM-2.5mM、1.5mM-3mM、1.5mM-3.5mM、1.5mM-4mM、1.5mM-4.5mM、1.5mM-5mM、2mM-2.5mM、2mM-3mM、2mM-3.5mM、2mM-4mM、2mM-4.5mM、2mM-5mM、2.5mM-3mM、2.5mM-3.5mM、2.5mM-4mM、2.5mM-4.5mM、2.5mM-5mM、3mM-3.5mM、3mM-4mM、3mM-4.5mM、3mM-5mM、3.5mM-4mM、3.5mM-4.5mM、3.5mM-5mM、4mM-4.5mM、4mM-5mM、或4.5mM-5mM,每个都包含端值。在一些实施方案中,谷氨酰胺如L-谷氨酰胺在基础培养基中的浓度为至少约0.5mM、1mM、1.5mM、2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、或5mM。在一些实施方案中,谷氨酰胺(如L-谷氨酰胺)在基础培养基中的浓度为至多约2mM、2.5mM、3mM、3.5mM、4mM、4.5mM、5mM。在一些实施方案中,谷氨酰胺(如L-谷氨酰胺)在基础培养基中的浓度为约2mM。

[0668] 在一些实施方案中,基础培养基还可以包含蛋白质或肽。在一些实施方案中,至少一种蛋白质不是非哺乳动物来源的。在一些实施方案中,至少一种蛋白质是人蛋白质或源自人。在一些实施方案中,至少一种蛋白质是重组的。在一些实施方案中,至少一种蛋白质包括白蛋白、转铁蛋白、胰岛素、纤连蛋白、抑肽酶或胎球蛋白。在一些实施方案中,蛋白质

包含白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种,任选人或重组白蛋白、胰岛素或转铁蛋白中的一种或多种。

[0669] 在一些实施方案中,蛋白质是白蛋白或白蛋白取代物。在一些实施方案中,白蛋白是人源白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是天然人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是重组人血清白蛋白。在一些实施方案中,白蛋白是来自非人来源的重组白蛋白。白蛋白取代物可以是任何蛋白质或多肽来源。这样的蛋白质或多肽样品的例子包括但不限于牛垂体提取物、植物水解物(例如,大米水解物)、胎牛白蛋白(胎球蛋白)、卵白蛋白、人血清白蛋白(HSA)或另一种动物来源的白蛋白、鸡提取物、牛胚胎提取物、AlbuMAX® I和AlbuMAX® II。在一些实施方案中,蛋白质或肽包括转铁蛋白。在一些实施方案中,蛋白质或肽包括纤连蛋白。在一些实施方案中,蛋白质或肽包括抑肽酶。在一些实施方案中,蛋白质包括胎球蛋白。

[0670] 在一些实施方案中,一种或多种另外的蛋白质是被添加至基础培养基中的血清替代物补充剂的一部分。血清替代物补充剂的例子包括例如免疫细胞血清替代物(ThermoFisher, #A2598101)或Smith等人Clin Transl Immunology.2015年1月;4(1):e31中所述的那些。

[0671] 在某些实施方案中,在引入编码异源或重组蛋白的多核苷酸(例如,病毒载体)之后将细胞孵育为、为约或为至少18小时、24小时、30小时、36小时、40小时、48小时、54小时、60小时、72小时、84小时、96小时、或超过96小时。在一些实施方案中,在基因工程化之前,所述孵育进行如下时间量:在30分钟与2小时之间、在1小时与8小时之间、在6小时与12小时之间、在12小时与18小时之间、在16小时与24小时之间、在18小时与30小时之间、在24小时与48小时之间、在24小时与72小时之间、在42小时与54小时之间、在60小时与120小时之间、在96小时与120小时之间、在90小时与在1天与7天之间之间、在3天与8天之间、在1天与3天之间、在4天与6天之间、或在4天与5天之间。在一些实施方案中,孵育持续为或为约18小时与30小时之间。在特定实施方案中,孵育持续为或为约24小时。

[0672] 在某些实施方案中,孵育的总持续时间为、为约或为至少12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时、54小时、60小时、72小时、84小时、96小时、108小时、或120小时。在特定实施方案中,孵育在以下时间、在约以下时间或在以下时间内完成:120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、54小时、48小时、42小时、36小时、30小时、24小时、18小时或12小时。在一些实施方案中,孵育的总持续时间在或在约12小时与120小时之间、18小时与96小时之间、24小时与72小时之间、或24小时与48小时之间,包含端值。在一些实施方案中,孵育的总持续时间在或约在1小时与48小时之间、4小时与36小时之间、8小时与30小时之间或12小时与24小时之间,包含端值。在特定实施方案中,孵育进行为或为约24小时、48小时或72小时。在特定实施方案中,孵育进行24小时 $\pm$ 6小时、48小时 $\pm$ 6小时或72小时 $\pm$ 6小时。

[0673] 在特定实施方案中,孵育在刺激开始之后在、在约或至少12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时开始。在特定实施方案中,孵育在刺激开始的以下时间、在约以下时间或在以下时间内开始:120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、54小时、48小时、42小时、36小时、30小时、24小时、18小时、或12小时。

[0674] 在一些实施方案中,孵育在刺激开始之后的以下时间完成:在或在约24小时与120

小时之间、36小时与108小时之间、48小时与96小时之间、或48小时与72小时之间,包含端值。在一些实施方案中,孵育在从刺激开始起的以下时间、约以下时间或以下时间内完成:120小时、108小时、96小时、72小时、48小时或36小时。在特定实施方案中,孵育在刺激开始之后的以下小时后完成:24小时 $\pm$ 6小时、48小时 $\pm$ 6小时或72小时 $\pm$ 6小时。在特定实施方案中,孵育进行为或为约72小时或者为或为约3天。在一些实施方案中,孵育进行足以允许将编码异源或重组蛋白的多核苷酸整合至细胞基因组中的持续时间。在特定实施方案中,孵育在刺激开始后为、为约或至少12小时、18小时、24小时、30小时、36小时、42小时、48小时开始。在特定实施方案中,孵育在刺激开始后为、为约或至少0.5天、一天、1.5天或2天开始。在特定实施方案中,孵育在刺激开始的以下时间、在约以下时间或在以下时间内开始:120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、54小时、48小时、42小时、36小时、30小时、24小时、18小时、或12小时。在特定实施方案中,孵育在刺激开始的以下时间、在约以下时间或在以下时间内开始:11小时、10小时、9小时、8小时、7小时、6小时、5小时或4小时。在特定实施方案中,孵育在刺激开始的以下时间、在约以下时间或在以下时间内开始:5天、4天、3天、2天、一天或0.5天。

[0675] 在一些实施方案中,孵育在刺激开始之后的以下时间完成:在或在约24小时与120小时之间、36小时与108小时之间、48小时与96小时之间、或48小时与72小时之间,包含端值。在一些实施方案中,孵育在从刺激开始起的以下时间、约以下时间或以下时间内完成:120小时、108小时、96小时、72小时、48小时或36小时。在一些实施方案中,孵育在从刺激开始的以下时间、约以下时间或以下时间内完成:5天、4.5天、4天、3天、2天、或1.5天。在特定实施方案中,孵育在刺激开始之后的以下小时后完成:24小时 $\pm$ 6小时、48小时 $\pm$ 6小时或72小时 $\pm$ 6小时。在一些实施方案中,孵育在或在约72小时后或者在或在约3天后完成。

[0676] 在上文任何实施方案中的一些中,不在用于扩增细胞群(例如,活T细胞计数)的培育条件下孵育工程化的细胞。在任何上文实施方案中的一些中,不在孵育或培育期间增加活细胞的量的培育条件下孵育细胞。例如,在一些方面,不在如下条件(例如,培育条件)下孵育细胞:如与孵育开始时总活细胞的数量相比,在孵育结束时增加总活细胞的量。在一些实施方案中,在可以导致扩增的条件下孵育细胞,但是孵育条件的进行并非出于扩增细胞群的目的。在一些实施方案中,已经在不促进或有利于扩增和增殖的条件下孵育的细胞可以被称为未扩增的或最小扩增的。

[0677] 在一些实施方案中,在基因工程化(例如,通过转导或转染将重组多肽引入细胞中)的步骤后,在促进增殖和/或扩增的培育条件下孵育转导或工程化的细胞。在特定实施方案中,在已经用重组多核苷酸(例如,编码重组受体的多核苷酸)转导或转染细胞后,培育细胞。在一些实施方案中,所述培育产生工程化T细胞的一种或多种培育的组合物。在一些实施方案中,这样的培育条件可以设计为诱导群体中细胞的增殖、扩增、激活和/或存活。在特定实施方案中,培育条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、药剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶受体和设计为促进细胞的生长、分裂和/或扩增的任何其他药剂))。在一些实施方案中,已经在促进增殖和/或扩增的条件下孵育的细胞可以被称为扩增的细胞。

[0678] 在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育(例如,培育)细胞:为或为约

0.25×10^6 个细胞/mL、 0.5×10^6 个细胞/mL、 0.75×10^6 个细胞/mL、 1.0×10^6 个细胞/mL、 1.25×10^6 个细胞/mL、 1.5×10^6 个细胞/mL、 1.75×10^6 个细胞/mL或 2.0×10^6 个细胞/mL。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 1.0×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 0.75×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:在或在约 0.5×10^6 个细胞/mL至 0.75×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:在或在约 0.25×10^6 个细胞/mL至 0.5×10^6 个细胞/mL之间。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:为或为约 0.75×10^6 个细胞/mL。在特定实施方案中,在培育条件下以如下浓度孵育细胞:为或为约 0.5×10^6 个细胞/mL。

[0679] 在一些实施方案中,在容器中培育(例如,培养)工程化的细胞,所述容器可以例如经由进料端口填充用于培养所添加细胞的细胞培养基和/或细胞。细胞可以来自任何细胞来源,对于所述细胞来源需要培养细胞例如用于扩增和/或增殖细胞。

[0680] 在一些方面,培养基是支持细胞(如T细胞)的生长、扩增或增殖的适应性培养基。在一些方面,培养基可以是含有盐、氨基酸、维生素、糖或其任何组合的混合物的液体。在一些实施方案中,培养基还含有一种或多种刺激条件或刺激剂,如以在孵育期间刺激细胞的扩增或增殖。在一些实施方案中,刺激条件是或包括如选自IL-2、IL-7或IL-15的一种或多种细胞因子。在一些实施方案中,细胞因子是重组细胞因子。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是人重组细胞因子。在某些实施方案中,一种或多种细胞因子结合和/或能够结合由T细胞表达的和/或对T细胞而言内源的受体。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员。在一些实施方案中,细胞因子的4- α -螺旋束家族的成员包括但不限于白介素2(IL-2)、白介素4(IL-4)、白介素7(IL-7)、白介素9(IL-9)、白介素12(IL-12)、白介素15(IL-15)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-15。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括IL-7。在特定实施方案中,一种或多种细胞因子是或包括重组IL-2。

[0681] 在一些实施方案中,在培育期间一种或多种细胞因子在培养基中的浓度独立地为从或从约1IU/mL至1500IU/mL,如从或从约1IU/mL至100IU/mL、2IU/mL至50IU/mL、5IU/mL至10IU/mL、10IU/mL至500IU/mL、50IU/mL至250IU/mL或100IU/mL至200IU/mL、50IU/mL至1500IU/mL、100IU/mL至1000IU/mL或200IU/mL至600IU/mL。在一些实施方案中,一种或多种细胞因子的浓度独立地为至少或至少约1IU/mL、5IU/mL、10IU/mL、50IU/mL、100IU/mL、200IU/mL、500IU/mL、1000IU/mL或1500IU/mL。

[0682] 在一些实施方案中,在25至38°C,如30至37°C,例如为或约 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度下培育工程化的细胞的组合物。在一些实施方案中,培育条件进行一定时间段,直至培养(例如,培育或扩增)得到所需或阈值密度、浓度、数量或剂量的细胞为止。在一些实施方案中,孵育进行一段时间,直至培养(例如培育或扩增)得到所需或阈值,密度、浓度、数量或剂量的活细胞为止。在一些实施方案中,孵育大于或大于约或为约或为24小时、48小时、72小时、96小时、5天、6天、7天、8天、9天或更长时间。

[0683] 在一些实施方案中,在用于维持细胞培养物中目标量的二氧化碳的条件下孵育或培育细胞。在一些方面,这确保了细胞在生长期间的最佳培育、扩增和增殖。在一些方面,二

氧化碳(CO₂)的量在所述气体的10%与0%(v/v)之间,如在所述气体的8%与2%(v/v)之间,例如为或约5%(v/v)CO₂的量。

[0684] 在特定实施方案中,在封闭系统中进行培育。在某些实施方案中,在无菌条件下在封闭系统中进行培育。在一些实施方案中,从封闭系统去除工程化的细胞的组合物并置于生物反应器中和/或与生物反应器连接以供培育。合适的用于培育的生物反应器的例子包括但不限于GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统和Pall XRS生物反应器系统。在一些实施方案中,在培育步骤的至少一部分期间,使用生物反应器灌注和/或混合细胞。

[0685] 在一些实施方案中,在封闭的、连接的生物反应器中和/或在生物反应器的控制下培育的细胞在培育期间比没有生物反应器的情况下培育的细胞(例如在静态条件下(例如在没有混合、摇摆、运动和/或灌注的情况下)培育的细胞)经历更快的扩增。在一些实施方案中,在封闭、连接和/或在生物反应器的控制下的同时培育的细胞在14天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天、2天、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时内达到或实现阈值扩增、细胞计数和/或密度。在一些实施方案中,与在其中未在封闭、连接和/或在生物反应器的控制下的同时培育细胞的示例性和/或替代性过程中培育的细胞相比,在封闭、连接和/或在生物反应器的控制下的同时培育的细胞达到或实现至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少150%、至少1倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍的阈值扩增、细胞计数和/或密度。

[0686] 在一些实施方案中,混合是或包括摇摆和/或运动。在一些实施方案中,使用与生物反应器结合使用的容器(例如,袋)孵育细胞。在一些情况下,生物反应器可以经历运动或摇摆,其在一些方面可以增加氧气传递。使生物反应器运动可以包括但不限于沿着水平轴线旋转、沿着竖直轴线旋转、沿着生物反应器的倾斜(tilted或inclined)的水平轴线的摇摆运动、或其任何组合。在一些实施方案中,在摇摆的情况下进行孵育的至少一部分。可以调整摇摆速度和摇摆角度以实现所需的搅动。在一些实施方案中,摇摆角度为或为约20°、19°、18°、17°、16°、15°、14°、13°、12°、11°、10°、9°、8°、7°、6°、5°、4°、3°、2°或1°。在某些实施方案中,摇摆角度在6-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在7-16°之间。在其他实施方案中,摇摆角度在8-12°之间。在一些实施方案中,摇摆速率为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40rpm。在一些实施方案中,摇摆速率在4rpm与12rpm之间,例如在4rpm与6rpm之间并包含端值。在摇摆运动下进行细胞培养扩增的至少一部分,如以在5°与10°之间(如6°)的角度,以恒定摇摆速度(如在5RPM与15RPM之间,如6RPM或10RPM的速度)摇摆。

[0687] 在一些实施方案中,在表面活性剂的存在下培育包含细胞(如工程化的细胞,例如工程化的T细胞、工程化的CD3⁺ T细胞、工程化的CD4⁺ T细胞或工程化的CD8⁺ T细胞)的组合物。在特定实施方案中,培育组合物的细胞减少在培育期间例如由于混合、摇摆、运动和/或灌注可能发生的剪切应力的量。在特定实施方案中,将细胞(如工程化的细胞,例如工程化的T细胞、工程化的CD3⁺ T细胞、工程化的CD4⁺ T细胞或工程化的CD8⁺ T细胞)的组合物与表面活性剂一起培育,并且在培育完成后为或至少1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或超过7天期间,至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或至少99.9%的T细胞存活,例如,是活的和/或不经历坏死、程序性细胞死

亡或细胞凋亡。在特定实施方案中,在表面活性剂的存在下培育细胞(如工程化T细胞,例如工程化CD3⁺ T细胞、工程化CD4⁺ T细胞或工程化CD8⁺ T细胞)的组合物,并且少于50%、少于40%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、少于1%、少于0.1%或少于0.01%的细胞经历如由于剪切或剪切诱导的应力所致的细胞死亡(例如,程序性细胞死亡、细胞凋亡和/或坏死)。

[0688] 在特定实施方案中,在以下的存在下培育细胞(如工程化T细胞,例如工程化CD4⁺ T细胞或工程化CD8⁺ T细胞)的组合物:在0.1 μ l/ml与10.0 μ l/ml之间、在0.2 μ l/ml与2.5 μ l/ml之间、在0.5 μ l/ml与5 μ l/ml之间、在1 μ l/ml与3 μ l/ml之间或在2 μ l/ml与4 μ l/ml之间的表面活性剂。在一些实施方案中,在以下的存在下培育细胞(如工程化T细胞,例如工程化CD4⁺ T细胞或工程化CD8⁺ T细胞)的组合物:为、为约、或至少0.1 μ l/ml、0.2 μ l/ml、0.4 μ l/ml、0.6 μ l/ml、0.8 μ l/ml、1 μ l/ml、1.5 μ l/ml、2.0 μ l/ml、2.5 μ l/ml、5.0 μ l/ml、10 μ l/ml、25 μ l/ml、或50 μ l/ml的表面活性剂。在某些实施方案中,在为或为约2 μ l/ml的表面活性剂的存在下培育细胞的组合物。

[0689] 在一些实施方案中,表面活性剂是或包括降低液体和/或固体的表面张力的试剂。例如,表面活性剂包括脂肪醇(例如,甾基醇)、聚氧乙二醇辛基酚醚(例如Triton X-100)或聚氧乙二醇脱水山梨糖醇烷基酯(例如聚山梨醇酯20、40、60)。在某些实施方案中,表面活性剂选自聚山梨醇酯80(PS80)、聚山梨醇酯20(PS20)、泊洛沙姆188(P188)。在示例性实施方案中,化学确定的进料培养基中的表面活性剂的浓度为约0.0025%至约0.25%(v/v)的PS80;约0.0025%至约0.25%(v/v)的PS20;或约0.1%至约5.0%(w/v)的P188。

[0690] 在一些实施方案中,表面活性剂是或包括添加到其中的阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂或非离子表面活性剂。合适的阴离子表面活性剂包括但不限于烷基磺酸盐、烷基磷酸盐、烷基膦酸盐、月桂酸钾、硬脂酸三乙醇胺、月桂基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、烷基聚氧乙烯硫酸盐、海藻酸钠、二辛基磺基琥珀酸钠、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、双磷脂酰甘油、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸及其盐、羧甲基纤维素钠、胆酸和其他胆汁酸(例如胆酸、脱氧胆酸、甘氨酸胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸脱氧胆酸)及其盐(例如脱氧胆酸钠)。

[0691] 在一些实施方案中,合适的非离子表面活性剂包括:甘油酯、聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯(聚山梨醇酯)、聚氧乙烯脂肪酸酯、脱水山梨糖醇酯、单硬脂酸甘油酯、聚乙二醇、聚丙二醇、鲸蜡醇、鲸蜡基硬脂醇、硬脂醇、芳基烷基聚醚醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物(泊洛沙姆)、泊洛沙胺、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、非结晶纤维素、多糖(包括淀粉和淀粉衍生物,如羟乙基淀粉(HES))、聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮。在某些实施方案中,非离子表面活性剂是聚氧乙烯和聚氧丙烯共聚物,并且优选是丙二醇和乙二醇的嵌段共聚物。这样的聚合物以商标名泊洛沙姆出售,有时也被称为PLURONIC®F68或Kolliphor®P188。聚氧乙烯脂肪酸酯包括具有短烷基链的那些。这样的表面活性剂的一个例子是SOLUTOL®HS 15,即聚乙烯-660-羟基硬脂酸酯。

[0692] 在一些实施方案中,合适的阳离子表面活性剂可以包括但不限于天然磷脂、合成磷脂、季铵化合物、苯扎氯铵、十六烷基三甲基溴化铵、壳聚糖、月桂基二甲基苄基氯化铵、酰基肉碱盐酸、二甲基双十八烷基溴化铵(DDAB)、二油酰基三甲基铵丙烷(DOTAP)、双十四酰基三甲基铵丙烷(DMTAP)、二甲基氨基乙烷氨基甲酰基胆固醇(DC-Chol)、1,2-二酰基甘

油-3-(0-烷基)磷酸胆碱、0-烷基磷脂酰胆碱、烷基吡啶鎓卤化物或长链烷基胺(例如正辛胺和油酰胺)。

[0693] 两性离子表面活性剂是电中性的,但在同一分子内具有局部正电荷和负电荷。合适的两性离子表面活性剂包括但不限于两性离子磷脂。合适的磷脂包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、二酰基-甘油-磷酸乙醇胺(如双十四酰基-甘油-磷酸乙醇胺(DMPE)、二棕榈酰基-甘油-磷酸乙醇胺(DPPE)、二硬脂酰基-甘油-磷酸乙醇胺(DSPE)和二油酰基-甘油-磷酸乙醇胺(DOPE))。在本发明中可以使用磷脂(包括阴离子磷脂和两性离子磷脂)的混合物。这样的混合物包括但不限于溶血磷脂、卵磷脂或大豆磷脂或其任何组合。磷脂(无论是阴离子的磷脂、两性离子磷脂还是磷脂的混合物)可以被盐化或脱盐、氢化或部分氢化或者是天然半合成的或合成的。

[0694] 在某些实施方案中,表面活性剂是泊洛沙姆,例如,泊洛沙姆188。在一些实施方案中,在以下的存在下培育细胞的组合物:0.1 μ l/ml与10.0 μ l/ml之间、0.2 μ l/ml与2.5 μ l/ml之间、0.5 μ l/ml与5 μ l/ml之间、1 μ l/ml与3 μ l/ml之间或2 μ l/ml与4 μ l/ml之间的泊洛沙姆。在一些实施方案中,在以下的存在下培育细胞的组合物:为、为约或至少0.1 μ l/ml、0.2 μ l/ml、0.4 μ l/ml、0.6 μ l/ml、0.8 μ l/ml、1 μ l/ml、1.5 μ l/ml、2.0 μ l/ml、2.5 μ l/ml、5.0 μ l/ml、10 μ l/ml、25 μ l/ml或50 μ l/ml的表面活性剂。在某些实施方案中,在为或为约2 μ l/ml的泊洛沙姆的存在下培育细胞的组合物。

[0695] 在一些方面,工程化T细胞群(例如,CD4、CD8)可以单独扩增或一起扩增,直至它们各自达到阈值量或细胞密度。在特定实施方案中,当细胞实现阈值量、浓度和/或扩增时,培育结束,如通过收获细胞来结束。在特定实施方案中,当例如关于和/或相对于培育开始或起始时细胞密度的量,细胞实现或实现约或至少1.5倍扩增、2倍扩增、2.5倍扩增、3倍扩增、3.5倍扩增、4倍扩增、4.5倍扩增、5倍扩增、6倍扩增、7倍扩增、8倍扩增、9倍扩增、10倍扩增或大于10倍扩增时,培育结束。在一些实施方案中,阈值扩增是例如关于和/或相对于培养开始或起始时的细胞密度的量的4倍扩增。在一些实施方案中,当细胞实现阈值总细胞量(例如阈值细胞计数)时,培育结束,如通过收获细胞来结束。在一些实施方案中,当细胞实现阈值总有核细胞(TNC)计数时,培育结束。在一些实施方案中,当细胞实现阈值活细胞量(例如阈值活细胞计数)时,培育结束。在一些实施方案中,阈值细胞计数为或为约或为至少50 $\times 10^6$ 个细胞、100 $\times 10^6$ 个细胞、200 $\times 10^6$ 个细胞、300 $\times 10^6$ 个细胞、400 $\times 10^6$ 个细胞、600 $\times 10^6$ 个细胞、800 $\times 10^6$ 个细胞、1000 $\times 10^6$ 个细胞、1200 $\times 10^6$ 个细胞、1400 $\times 10^6$ 个细胞、1600 $\times 10^6$ 个细胞、1800 $\times 10^6$ 个细胞、2000 $\times 10^6$ 个细胞、2500 $\times 10^6$ 个细胞、3000 $\times 10^6$ 个细胞、4000 $\times 10^6$ 个细胞、5000 $\times 10^6$ 个细胞、10,000 $\times 10^6$ 个细胞、12,000 $\times 10^6$ 个细胞、15,000 $\times 10^6$ 个细胞或20,000 $\times 10^6$ 个细胞,或前述活细胞阈值中的任一项。

[0696] 在特定实施方案中,当细胞实现阈值细胞计数时,培育结束。在一些实施方案中,在实现阈值细胞计数后的以下时间、在约以下时间或在以下时间内,培育结束:6小时、12小时、24小时、36小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在特定实施方案中,在实现阈值细胞计数后1天或约1天,培育结束。在某些实施方案中,阈值密度为、为约或为至少0.1 $\times 10^6$ 个细胞/ml、0.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml、1 $\times 10^6$ 个细胞/ml、1.2 $\times 10^6$ 个细胞/ml、1.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml、1.6 $\times 10^6$ 个细胞/ml、1.8 $\times 10^6$ 个细胞/ml、2.0 $\times 10^6$ 个细胞/ml、2.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml、3.0 $\times 10^6$ 个细胞/ml、3.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml、4.0 $\times 10^6$ 个细胞/ml、4.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml、5.0 $\times 10^6$ 个细

胞/ml、 6×10^6 个细胞/ml、 8×10^6 个细胞/ml、或 10×10^6 个细胞/ml,或前述活细胞阈值中的任一项。在特定实施方案中,当细胞实现阈值密度时,培育结束。在一些实施方案中,在实现阈值密度后的以下时间、在约以下时间或在以下时间内,培育结束:6小时、12小时、24小时、36小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多天。在特定实施方案中,在实现阈值密度后1天或约1天,培育结束。

[0697] 在一些实施方案中,至少一部分培育是在静态条件下进行。在一些实施方案中,至少一部分培育是在灌注的情况下进行,如以在培养期间灌注出用过的培养基并灌注进新鲜培养基。在一些实施方案中,所述方法包括如经由进料端口将新鲜培养基灌注至细胞培养中的步骤。在一些实施方案中,在灌注期间添加的培养基含有一种或多种刺激剂,例如一种或多种重组细胞因子,如IL-2、IL-7和/或IL-15。在一些实施方案中,在灌注期间添加的培养基是在静态孵育期间使用的相同培养基。

[0698] 在一些实施方案中,在孵育之后,将容器(例如,袋)重新连接到进行用于制造、产生或生产细胞疗法的一个或多个其他加工步骤的系统上,例如重新连接到含有离心室的系统上。在一些方面,将培养的细胞从袋转移到室的内部腔中用于配制培养的细胞。

[0699] 在一些实施方案中,在孵育步骤期间,例如,在扩增(例如,培育)或最小扩增/非扩增(例如,孵育)下监测细胞。可以进行监测以例如查明(例如,测量、定量)细胞形态、细胞表型、细胞活力、细胞死亡和/或细胞浓度(例如,活细胞浓度)。在一些实施方案中,监测是手动进行,如由人操作者进行。在一些实施方案中,监测通过自动化系统进行。自动化系统可能需要最少的人工输入或不需要人工输入来监测培育的细胞。在一些实施方案中,监测是手动和通过自动化系统进行的。

G. 收获并收集细胞

[0700] 在一些实施方案中,收获或收集细胞。在特定实施方案中,在如章节II-F中所述的孵育完成后,收集或收获细胞。在某些实施方案中,收集或收获的细胞是输出群体的细胞。在一些实施方案中,输出群体包括如下细胞:是活的、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺和/或对重组受体呈阳性(例如,CAR⁺)。在特定实施方案中,收获的CD4⁺ T细胞和配制的CD8⁺ T细胞是输出CD4⁺和CD8⁺ T细胞。在特定实施方案中,配制的细胞群(例如,富集的CD4⁺和CD8⁺细胞的配制群体)是输出细胞群,例如,富集的CD4⁺和CD8⁺细胞的输出群体。

[0701] 在一些实施方案中,收获、收集或配制的细胞或细胞群尚未经任何扩增,例如,如下任何条件:其中在一定条件下孵育或培育细胞,并在所述孵育或培育期间增加活细胞的量。例如,在一些方面,收获的细胞尚未经任何孵育或培育,其中如与所述孵育或培育开始时总活细胞的数量相比,在所述孵育或培育结束时总活细胞的量增加。在一些实施方案中,收集、收获或配制的细胞先前尚未经任何在如下生物反应器中或在如下条件下进行的孵育或培育:其中在孵育或培育的全部或部分中摇摆、旋转、振荡或灌注细胞。

[0702] 在一些实施方案中,细胞选择、分离、分开、富集和/或纯化步骤在收获、收集或配制细胞或细胞群之前进行。在一些实施方案中,细胞选择、分离、分开、富集和/或纯化步骤使用如本文所公开的色谱进行。在一些实施方案中,通过色谱进行的T细胞选择步骤在T细胞转导之后,但在收获之前、在收集之前和/或在配制细胞之前进行。在一些实施方案中,通过色谱进行的T细胞选择步骤在即将收获细胞之前进行。

[0703] 在某些实施方案中,从开始刺激(例如,柱上刺激)至收集、收获或配制细胞的时间

量为、为约或为小于24小时、36小时、42小时、48小时、54小时、60小时、72小时、84小时、96小时、108小时或120小时。在一些实施方案中,从开始刺激至收集、收获或配制细胞用于生成工程化的细胞、从起始刺激至收集、收获或配制细胞的时间量为在或在约12小时与24小时之间、36小时与120小时之间、48小时与96小时之间或48小时与72小时之间,包含端值。在特定实施方案中,从开始孵育至收获、收集或配制细胞的时间量为、为约或为小于48小时、72小时或96小时。在特定实施方案中,从开始孵育至收获、收集或配制细胞的时间量为48小时 $\pm$ 6小时、72小时 $\pm$ 6小时或96小时 $\pm$ 6小时。

[0704] 在某些实施方案中,配制富集的T细胞的一个或多个群体。在特定实施方案中,在已经工程化和/或培育一个或多个群体之后,配制富集的T细胞的一个或多个群体。在特定实施方案中,所述一个或多个群体是输入群体或输出组合物。在一些实施方案中,所述一个或多个输入群体或输出组合物先前已经进行低温保护和储存,并且在孵育(例如,如章节I-F中所述的孵育)前解冻。

[0705] 在某些实施方案中,在细胞群的为、为约或至少一次、两次、三次、四次、五次、六次、八次、十次、二十次或更多次细胞倍增(例如,在孵育期间发生的倍增)之前,收获细胞。

[0706] 在特定实施方案中,在细胞总数(例如,孵育的细胞或经历孵育(例如,如章节II-F中所述的孵育)的细胞的总数)是输入群体的细胞数量(例如,与刺激试剂接触的细胞总数)的大于或大于约一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍或超过二十倍之前的时间,收获或收集细胞。在一些实施方案中,在孵育细胞的总数量是转化、转导或旋转接种的细胞的总数量(例如,与病毒载体接触的细胞的总数量)的大于或大于约一倍、两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、八倍、十倍、二十倍或超过二十倍之前的时间,收获或收集细胞。在某些实施方案中,所述细胞是T细胞、活T细胞、CD3⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、表达CAR的T细胞、或前述任一项的组合。在特定实施方案中,在细胞总数大于输入群体中细胞的总数量之前的时间,收获或收集细胞。在各种实施方案中,在活CD3⁺ T细胞的总数量大于输入群体中活CD3⁺细胞的总数量之前的时间,收获或收集细胞。在特定实施方案中,在细胞总数大于转化、转导或旋转接种的细胞中细胞的总数量之前的时间,收获或收集细胞。在各种实施方案中,在活CD3⁺ T细胞的总数大于转化、转导或旋转接种的细胞中活CD3⁺的总数之前的时间,收获或收集细胞。

[0707] 在某些实施方案中,配制的细胞是输出细胞。在一些实施方案中,富集的T细胞的配制群体是富集的T细胞的输出群体。在特定实施方案中,配制的CD4⁺ T细胞和配制的CD8⁺ T细胞是输出CD4⁺和CD8⁺ T细胞。在特定实施方案中,配制的细胞群(例如,富集的CD4⁺和CD8⁺细胞的配制群体)是输出细胞群,例如,富集的CD4⁺和CD8⁺细胞的输出群体。

[0708] 在一些实施方案中,可以将细胞配制到容器如袋或小瓶中。

[0709] 在一些实施方案中,将细胞配制在药学上可接受的缓冲液中,所述药学上可接受的缓冲液在一些方面可以包括药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,处理包括将介质交换成药学上可接受的或向受试者施用所需的介质或配制缓冲液。在一些实施方案中,处理步骤可以涉及洗涤转导的和/或扩增的细胞以替代药学上可接受的缓冲液中的细胞,所述药学上可接受的缓冲液可以包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。包括药学上可接受的载体或赋形剂的这样的药物形式的例子可以是下文与将细胞和组合物施用至受试者可接受的形式结合描述的任何形式。在一些实施方案中,药物组合物含

有有效治疗或预防疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的细胞。

[0710] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0711] 在一些方面,载体的选择部分取决于特定细胞和/或施用方法。因此,存在多种合适的配制品。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物重量的约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol, A. 编辑(1980)中。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0712] 在一些方面,在组合物中包括缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及各种其他酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如以下文献中:Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版(2005年5月1日)。

[0713] 配制品可以包括水溶液。配制品或组合物还可以含有用于用细胞治疗的特定适应症、疾病或病症的超过一种活性成分,优选地活性与所述细胞互补的那些成分,其中相应成分不会互相有不良影响。这样的活性成分以对既定目的有效的量以合适的方式组合存在。因此,在一些实施方案中,药物组合物还包括其他药物活性药剂或药物,例如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱。

[0714] 在一些实施方案中,组合物是作为无菌液体制剂(例如,等渗水性溶液、悬浮液、乳液、分散液或粘性组合物)来提供,在一些方面可以将其缓冲至所选pH。液体组合物可以包含载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。无菌可注射溶液可以通过在溶剂中掺入细胞来制备,所述溶剂如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂和/或颜料,这取决于施用途和所需的制剂。在一些方面,可以查阅标准文本来制备合适的制剂。

[0715] 可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲液。可以通过各种抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁

醇、苯酚和山梨酸)来确保防止微生物的作用。可以通过使用延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长吸收。

[0716] 在一些实施方案中,配制缓冲液含有低温保存剂。在一些实施方案中,用含有1.0%至30%DMSO溶液,如5%至20%DMSO溶液或5%至10%DMSO溶液的低温保存溶液来配制细胞。在一些实施方案中,低温保存剂溶液是或含有例如含有20%DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS、或其他合适的细胞冷冻介质。在一些实施方案中,低温保存溶液是或含有例如至少或约7.5%DMSO。在一些实施方案中,处理步骤可以涉及洗涤转导的和/或扩增的细胞以替代在低温保存剂溶液中的细胞。在一些实施方案中,将细胞在介质和/或溶液中冷冻(例如,低温保护或低温保存),所述介质和/或溶液具有终浓度为或为约12.5%、12.0%、11.5%、11.0%、10.5%、10.0%、9.5%、9.0%、8.5%、8.0%、7.5%、7.0%、6.5%、6.0%、5.5%或5.0%的DMSO,或者在1%与15%之间、在6%与12%之间、在5%与10%之间或在6%与8%之间的DMSO。在特定实施方案中,将细胞在介质和/或溶液中冷冻(例如,低温保护或低温保存),所述介质和/或溶液具有最终浓度为或为约5.0%、4.5%、4.0%、3.5%、3.0%、2.5%、2.0%、1.5%、1.25%、1.0%、0.75%、0.5%、或0.25%的HSA,或者在0.1%与-5%之间、在0.25%与4%之间、在0.5%与2%之间、或在1%与2%之间的HSA。

[0717] 在特定实施方案中,将富集的T细胞(例如已经进行刺激、工程化和/或培育的T细胞)的组合物配制,低温保护,然后储存一定时间量。在某些实施方案中,储存配制的低温保护的细胞,直至释放细胞用于输注。在特定实施方案中,将配制的低温保护的细胞储存1天与6个月之间、1个月与3个月之间、1天与14天之间、1天与7天之间、3天与6天之间、6个月与12个月之间、或长于12个月。在一些实施方案中,将细胞低温保护并储存为、为约或为小于1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天。在某些实施方案中,在储存后,将细胞解冻并施用至受试者。在某些实施方案中,将细胞储存为或为约5天。

[0718] 在一些实施方案中,使用一个或多个处理步骤进行配制,所述步骤包括洗涤、稀释或浓缩细胞,如培养或扩增的细胞。在一些实施方案中,处理可以包括将细胞稀释或浓缩至所需浓度或数量,如包括用于以给定剂量或其部分用的细胞数量的单位剂型组合物。在一些实施方案中,处理步骤可以包括减小体积,从而根据需要增加细胞的浓度。在一些实施方案中,处理步骤可以包括增加体积,从而根据需要减小细胞的浓度。在一些实施方案中,处理包括向转导的和/或扩增的细胞添加一定体积的配制缓冲液。在一些实施方案中,配制缓冲液的体积是从或从约10mL至1000mL,如至少或约至少或为约或为50mL、100mL、200mL、300mL、400mL、500mL、600mL、700mL、800mL、900mL或1000mL。

[0719] 在一些实施方案中,用于配制细胞组合物的这样的处理步骤在封闭系统中进行。这样的处理步骤的例子可以使用与一种或多种系统或试剂盒结合的离心室进行,所述系统或试剂盒与细胞处理系统相关联,如由Biosafe SA生产和出售的离心室,包括与Sepax®或Sepax 2®细胞处理系统一起使用的那些。示例性系统和过程描述于国际公开号W02016/073602中。在一些实施方案中,所述方法包括实现自离心室的内部空腔压出经配制组合物,所述经配制组合物是在如所述的任何以上实施方案中、在配制缓冲液(如药学上可接受的缓冲液)中配制的所得细胞组合物。在一些实施方案中,将所配制的组合物输送到容器,如作为封闭系统的一部分与离心室可操作地连接的袋。在一些实施方案中,容器(如袋)在输出线或输出位置处与系统连接。

[0720] 在一些实施方案中,如与离心室或细胞处理系统相关联的封闭系统包括多端口输出试剂盒,所述试剂盒含有在管线的每个末端与端口相关联的多路歧管,所述端口可以连接至一个或多个容器以供输送配制的组合物。在一些方面,可以将所需数量或多个输出容器(例如,袋)无菌地连接至多端口输出的一个或多个(通常两个或更多个,如至少3、4、5、6、7、8个或更多个)端口。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个容器(例如,袋)附接至端口,或者附接至少于所有端口。因此,在一些实施方案中,所述系统可以实现将输出组合物输送到多个输出袋中。

[0721] 在一些方面,可以将细胞以用于剂量施用(如用于单一单位剂量施用或多剂量施用)的量输送到多个输出袋中的一个或多个中。例如,在一些实施方案中,输出袋可以各自含有用于以给定剂量或其部分施用的细胞数量。因此,在一些方面,每个袋可以含有用于施用的单一单位剂量或可以含有所需剂量的一部分,使得多个输出袋中的超过一个(例如两个输出袋、或3个输出袋)一起构成用于施用的剂量。

[0722] 因此,容器(例如输出袋)通常含有要施用的细胞,例如,其一个或多个单位剂量。单位剂量可以是要施用至受试者的细胞的量或数量,或者是要施用的细胞的数量两倍(或更多数量)。它可以是要施用至受试者的细胞的最低剂量或最低可能剂量。

[0723] 在一些实施方案中,每个容器(例如,袋)单独包含单位剂量的细胞。因此,在一些实施方案中,每个容器包含相同或大致或基本相同数量的细胞。在一些实施方案中,每个单位剂量含有至少或约至少 1×10^6 、 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 个或 1×10^8 个工程化的细胞、总细胞、T细胞或PBMC。在一些实施方案中,每个袋中的经配制的细胞组合物的体积是10mL至100mL,如至少或约至少20mL、30mL、40mL、50mL、60mL、70mL、80mL、90mL或100mL。

[0724] 在一些实施方案中,将通过所述方法产生的这样的细胞或包含这样的细胞的组合物施用至受试者以治疗疾病或病症。

H. 刺激试剂的去除

[0725] 在一些实施方案中,在收集、收获或配制细胞后,从收集的细胞或细胞群去除或分离刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在一些实施方案中,在从色谱柱收集后(例如,在如章节II-E中所述的洗脱和细胞收集的步骤之后),从细胞或细胞群去除或分离刺激试剂。在一些实施方案中,在孵育(例如,本文如在章节II-F中所述的孵育)之后或期间,从细胞或细胞群去除或分离刺激试剂。在某些实施方案中,在孵育后但在用于收集、收获或配制细胞的步骤之前,使细胞或细胞群经历用于去除刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)的过程、程序、步骤或技术。在特定实施方案中,在孵育后,使细胞或细胞群经历用于去除刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)的过程、程序、步骤或技术。在一些方面,当在孵育期间从细胞分离或去除刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)时,将细胞返回至与分离或去除之前相同的孵育条件下,以进行孵育的剩余持续时间。

[0726] 在某些实施方案中,从细胞去除和/或分离刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。不希望受理论束缚,特定实施方案考虑,在一些情况下,刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)与细胞之间的结合和/或缔合可能在孵育期间随时间而减少。在某些实施方案中,可以添加一种或多种药剂以减少刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。在特定实施方案中,细胞培养条件的变化(例如,添加药剂(例如,物质,如竞争剂或游离结合剂))可以减少刺激试剂与细胞之间的结合和/或缔合。因此,在一些实施方案中,可以与细胞分开地从孵育、细胞培养系统

和/或溶液去除刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂),例如,不会也从孵育、细胞培养系统和/或溶液去除细胞。

[0727] 在某些实施方案中,在一定时间量后从细胞分离和/或去除刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在特定实施方案中,所述时间量是从起始刺激起的时间量。在特定实施方案中,孵育的开始被认为是在或约在细胞与刺激试剂和/或含有刺激试剂的培养基或溶液接触的时候。在特定实施方案中,在刺激开始的为或为约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时、12小时、6小时、5小时、4小时、3小时或2小时(包含端值)内,从细胞去除或分离刺激试剂。在特定实施方案中,在开始刺激后为或为约48小时,从细胞去除或分离刺激试剂(例如,寡聚刺激试剂)。在某些实施方案中,在开始刺激后为或为约72小时,从细胞去除或分离刺激试剂。在一些实施方案中,在开始刺激后为或为约96小时,从细胞去除或分离刺激试剂。

1. 寡聚试剂的去除

[0728] 在一些实施方案中,处理根据本文提供的任何方法产生或生成的刺激的细胞(即,已经经历如本文所述的用柱色谱选择和柱上刺激的细胞)的群体以去除寡聚刺激试剂和/或降低寡聚刺激试剂在细胞中递送信号的能力。例如,经由针对试剂的streptactin突变蛋白的一种或多种药剂的链霉亲和素结合肽与所述试剂结合的一种或多种刺激剂的可逆性可以通过使用竞争剂或游离结合配偶体破坏相互作用来进行。因此,使可以在所述试剂上多聚化的一种或多种刺激剂从试剂骨架释放,并且其递送刺激信号的能力被降低或终止。

[0729] 在某些实施方案中,一种或多种刺激剂(例如,刺激或激活TCR和/或共刺激分子的药剂)如经由寡聚试剂上存在的多个特定结合位点(例如,结合位点Z)与寡聚试剂缔合(如可逆结合)。在一些情形中,这导致刺激剂相互紧密布置,使得如果使具有(至少两个拷贝的)被刺激剂结合或识别的细胞表面分子的靶细胞与所述药剂接触,则可以发生亲合力效应。在一些方面,刺激剂在结合位点B对细胞的分子具有低亲和力,使得受体结合试剂在竞争试剂的存在下与细胞解离。因此,在一些实施方案中,在竞争试剂的存在下从细胞去除刺激剂。

[0730] 在一些实施方案中,寡聚刺激试剂是具有可逆地附接的抗CD3和抗CD28 Fab的链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些实施方案中,所附接的Fab含有链霉亲和素结合结构域,例如,其允许可逆地附接至链霉亲和素突变蛋白寡聚物。在一些情况下,抗CD3和抗CD28 Fab相互紧密布置,使得如果使表达CD3和/或CD28的T细胞与具有可逆地附接的Fab的寡聚刺激试剂接触,则可能发生亲合力作用。在一些方面,Fab对CD3和CD28具有低亲和力,使得Fab在竞争试剂(例如生物素或生物素变体或类似物)的存在下从细胞中解离。因此,在一些实施方案中,在竞争试剂(例如D-生物素)的存在下将Fab从细胞去除或解离。

[0731] 在一些实施方案中,向刺激的细胞(即,已经经历如本文所述的用柱色谱选择和柱上刺激的细胞)的群体提供或添加物质,如竞争剂或游离结合剂,例如以减少和/或终止一种或多种刺激剂的信号传导。在一些实施方案中,竞争剂或游离结合剂的添加在如本文所述的洗脱步骤后进行(参见章节II-E)。在一些实施方案中,竞争剂或游离结合剂的添加在如本文所述的基因工程化步骤后进行。在一些实施方案中,竞争剂或游离结合剂的添加在如本文所述的收获步骤后进行。

[0732] 因此,在一些实施方案中,刺激的细胞的群体含有物质(如竞争剂,例如生物素或

生物素类似物,例如D-生物素)的存在。在一些实施方案中,所述物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)存在的量比所述物质在培养的细胞(例如,T细胞)的参考群体或制剂(其中在一个前述步骤期间没有外源添加所述物质)中的量大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少10倍、至少100倍、至少1000倍或更多倍。在一些实施方案中,所述物质(如竞争剂,例如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)在刺激的细胞的群体中的量是从或从约 $10\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 至 1mM 、 $100\mu\text{M}$ 至 $500\mu\text{M}$ 或 $10\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$ 。在一些实施方案中,将 $10\mu\text{M}$ 或约 $10\mu\text{M}$ 的生物素或生物素类似物(例如,D-生物素)添加至细胞或细胞群,以从所述细胞或细胞群分离或去除寡聚刺激试剂。

[0733] 在一些实施方案中,在收获或配制细胞前,从细胞或细胞群去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些实施方案中,在孵育(例如,本文如在章节II-D中所述的孵育)之后或期间,通过接触或暴露于竞争试剂(例如,生物素或生物素类似物,如D-生物素)从细胞或细胞群去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在某些实施方案中,在孵育之后但在用于基因工程化、收获或配制细胞的步骤之前,使细胞或细胞群接触或暴露于竞争试剂(例如,生物素或生物素类似物,如D-生物素),以去除寡聚刺激试剂(例如,刺激性寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂)。在特定实施方案中,在孵育后,使细胞或细胞群接触或暴露于竞争试剂(例如,生物素或生物素类似物,如D-生物素),以去除寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些方面,当在孵育期间例如通过接触或暴露于竞争试剂(例如,生物素或生物素类似物,如D-生物素)将寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)从细胞分离或去除时,使细胞返回到与分离或去除之前相同的孵育条件,持续孵育的剩余持续时间。

[0734] 在一些实施方案中,使细胞与为、为约或为至少 $0.01\mu\text{M}$ 、 $0.05\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $4\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $500\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 、 1mM 或 10mM 的竞争试剂接触,以从细胞去除或分离寡聚刺激试剂。在各种实施方案中,使细胞与为、为约或为至少 $0.01\mu\text{M}$ 、 $0.05\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $4\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $500\mu\text{M}$ 、 $0.01\mu\text{M}$ 、 1mM 或 10mM 的生物素或生物素类似物如D-生物素接触,以将具有可逆地附接的抗CD3和抗CD28 Fab的刺激性链霉亲和素突变蛋白寡聚物从细胞去除或分离。

[0735] 在特定实施方案中,在刺激开始的为或为约120小时、108小时、96小时、84小时、72小时、60小时、48小时、36小时、24小时或12小时(包含端值)内,从细胞去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在特定实施方案中,在开始刺激后为或为约48小时,从细胞去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在某些实施方案中,在开始刺激后为或为约72小时,从细胞去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。在一些实施方案中,在开始刺激后为或为约96小时,从细胞去除或分离寡聚刺激试剂(例如,寡聚刺激性链霉亲和素突变蛋白试剂)。

[0736] 在一些实施方案中,可以洗涤细胞,例如用细胞培养基洗涤,以从细胞组合物去除或稀释一种或多种刺激剂(例如抗CD3/抗CD28 Fab)、试剂(例如streptactin突变蛋白)和/或竞争剂。

I. 顺序选择和精细纯化

[0737] 本文所提供的方法允许例如通过柱色谱进行多个选择步骤,以分离和/或富集靶细胞群(例如,T细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)。在一些实施方案中,在用于产生输出治疗性

细胞组合物的过程(例如如上文章节所述的过程)中一个或多个时间点或在某些步骤之后进行一个或多个选择步骤。在一些实施方案中,在初始细胞选择(例如,如章节I-C中所述)之后进行的选择步骤被称为精细纯化步骤。精细纯化步骤的进行可以用于多种目的,包括但不限于进一步纯化细胞组合物,选择特定细胞亚型(例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞),去除死细胞(例如,选择活细胞),选择成功工程化的细胞(例如,表达转基因(例如,嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)等)的细胞),或用于调整特定细胞类型的比率、总数量或浓度(例如,CD4⁺与CD8⁺细胞、CAR⁺或TCR⁺细胞与CAR⁻或TCR⁻细胞、或者CD4⁺、CD8⁺、CAR⁺、TCR⁺和/或活细胞的总数量或浓度)。在一些实施方案中,选择步骤(例如,精细纯化步骤)可用于增强产品控制和/或减小患者间差异。

[0738] 在一些实施方案中,选择步骤(例如,初始选择步骤和/或精细纯化步骤)包括多个选择步骤,其用于例如进一步纯化细胞组合物,选择特定细胞亚型,选择活细胞,选择工程化细胞,和/或调整细胞的比率、总数量或浓度。

[0739] 本文提供的方法允许多个选择步骤(例如初始选择和/或精细纯化步骤),例如通过柱色谱进行,以分离和/或富集靶细胞群(例如,T细胞、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ T细胞)。在一些方面,这样的方法通过单一过程物流来实现,如在封闭系统中进行,通过采用顺序选择,在所述顺序选择中富集和/或分离如本文所提供的来自样品的多个不同的细胞群。在一些方面,在同一容器或容器组(例如,管道组)中进行分开或分离是通过进行顺序阳性和阴性选择步骤来实现,后一步骤使来自前一步骤的阴性和/或阳性级分经受进一步选择,其中整个过程在同一管或管道组中进行。在一个实施方案中,使含有靶细胞(例如刺激的和/或工程化的(如转导的)细胞的组合物)的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的一种,并且使用来自第一选择的未选择细胞作为第二选择的细胞来源,以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的另一种。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD4⁺或CD8⁺群体中的一种或两种的亚群,例如,中枢记忆T(T_{CM})细胞或幼稚T细胞。在一个实施方案中,使含有靶细胞(例如刺激的和/或工程化的(如转导的)细胞的组合物)的样品经历顺序选择,其中实现第一选择以富集CD3⁺群体。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺群体的亚群,例如,CD4⁺细胞。在一些实施方案中,可以实现一次或多次进一步选择以富集CD3⁺群体的亚群,例如,CD8⁺细胞。在一些实施方案中,在选择步骤(例如,初始选择步骤和/或精细纯化步骤)期间,通过阳性或阴性选择技术选择T细胞的特定亚群(例如,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞),如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞,例如,CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺ T细胞。在一些实施方案中,使含有靶细胞的细胞群(例如,刺激的和/或工程化的细胞(如转导的细胞)的组合物)经历顺序选择,其中精细纯化步骤选择活细胞。在一些实施方案中,选择活细胞包括从细胞群(例如,刺激的和/或工程化的细胞或其亚群的输出组合物)去除死细胞或由其组成。在一些实施方案中,精细纯化步骤允许控制或调整细胞组合物中细胞的比率或总数量。

[0740] 在一些实施方案中,第一选择步骤可以使用以如本文所述的选择剂标记的珠来进行,并且可以保留第一选择步骤的阳性和阴性级分,之后如通过使用以第二选择剂标记的珠或通过使阳性级分经历如上所述的柱色谱来对阳性级分进行进一步阳性选择以富集第二选择标记。

[0741] 本文提供的方法还允许选择和富集成功刺激的和工程化的或转导的细胞。例如, 在一些实施方案中, 上述顺序选择、平行选择或单一选择程序可以用于鉴定或富集用重组受体 (例如, CAR、TCR) 工程化的 (例如转导的) 细胞。用于选择或富集工程化的细胞 (例如 CAR 或 TCR 工程化的细胞) 的选择剂包括能够与工程化的细胞的替代标记或与重组受体结合的任何选择剂。在一些实施方案中, 生成被引入细胞中的编码重组受体的核酸以共表达将在工程化的细胞上与重组受体共表达的替代标记。在一些实施方案中, 所述替代标记是截短的受体, 如本文所述。在特定实施方案中, 所述截短的受体是截短的 EGFR (EGFRt)。在一些实施方案中, 用于选择或富集工程化的细胞 (例如 CAR) 的选择剂是针对 CAR 的抗原结合结构域的抗独特型抗体。多种抗独特型抗体是已知的。针对抗 CD19 结合结构域的示例性抗独特型抗体如 FMC63 或 SJ25C1 描述于 W02018/023100 中。在一些实施方案中, 表达重组受体 (例如, CAR) 的细胞可以针对亚群细胞 (例如, CD4+CAR+ T 细胞、CD8+CAR+ T 细胞、CD28+、CD62L+、CCR7+、CD27+、CD127+、CD45RA+、CD45RO+ T 细胞和/或活细胞) 进行进一步富集 (例如, 精细纯化)。在一些实施方案中, 表达重组受体 (例如, CAR) 的细胞可以针对 (例如, 精细纯化的) CD57+ 进行进一步耗尽。在一些实施方案中, 选择步骤 (例如, 初始选择和/或精细纯化步骤) 允许控制或调整表达重组受体 (例如, CAR、TCR) 和/或其亚群的细胞的比率、浓度或总数量。在一些实施方案中, 可以配制富集的 (例如, 精细纯化的) 群体以供在细胞疗法中使用 (例如, 施用)。

[0742] 在一些方面, 在单一或同一分离或分开容器或容器组 (如单一柱或柱组和/或同一管或管道组) 中或使用相同分开基质或介质或试剂 (如相同磁性基质、亲和力标记的固体支持物或者抗体或其他结合配偶体) 分离多个群体包括精简所述分离的特征, 例如, 导致降低的成本、时间、复杂性、对样品操作的需要、对资源、试剂或设备的利用。在一些方面, 这样的特征的有利之处在于, 它们使与所述方法相关的成本、效率、时间和/或复杂性降至最低, 和/或避免对细胞产物的潜在损伤, 如感染、污染和/或温度变化引起的损伤。本文所提供的方法允许在与柱上刺激组合的细胞选择之前或之后进行多个选择步骤来富集靶群体。

[0743] 本文所提供的方法还允许选择并富集成功刺激和工程化的细胞。例如, 在一些实施方案中, 上述顺序选择程序可以用于鉴定表达重组受体 (例如, CAR) 的刺激细胞。在一些实施方案中, 表达重组受体 (例如, CAR) 的细胞可以针对亚群细胞 (例如, CD4+CAR+ T 细胞、CD8+CAR+ T 细胞) 进行富集。在一些实施方案中, 可以配制富集的群体以供用于 (例如, 施用) 细胞疗法。

III. 重组蛋白

[0744] 在一些实施方案中, 通过所述方法使用本文提供的装置处理、加工、工程化和/或产生的细胞含有或表达, 或者被工程化以含有或表达重组蛋白, 如重组受体, 例如嵌合抗原受体 (CAR) 或 T 细胞受体 (TCR)。在某些实施方案中, 本文提供的方法产生和/或能够产生被工程化以表达或含有重组蛋白的细胞或含有和/或富集所述细胞的群体或组合物。

A. 重组受体

[0745] 在一些实施方案中, 提供工程化细胞, 如免疫细胞, 如 T 细胞, 所述细胞表达一种或多种重组受体。所述受体包括抗原受体以及含有其一种或多种组分的受体。重组受体可以包括嵌合受体 (如含有配体结合结构域或其结合片段和细胞内信号传导结构域或区域的那些)、功能性非 TCR 抗原受体、嵌合抗原受体 (CAR)、T 细胞受体 (TCR) (如重组或转基因 TCR)、

嵌合自身抗体受体 (CAAR) 和前述任一项的组分。重组受体 (如CAR) 通常包括 (在一些方面经由接头和/或一个或多个跨膜结构域) 与一个或多个细胞内信号传导组分连接的细胞外抗原 (或配体) 结合结构域。在一些实施方案中, 工程化的细胞表达含有不同组分、结构域或区域的两种或更多种受体。在一些方面, 两种或更多种受体允许在空间或时间上调节或控制重组受体的特异性、活性、抗原 (或配体) 结合、功能和/或表达。

1. 嵌合抗原受体 (CAR)

[0746] 在所提供的方法的一些实施方案中, 嵌合受体 (如嵌合抗原受体) 含有一个或多个结构域, 所述一个或多个结构域将提供对所需抗原 (例如, 肿瘤抗原) 的特异性的配体结合结构域 (例如抗体或抗体片段) 与细胞内信号传导结构域组合。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域是激活性细胞内结构域部分, 如T细胞激活结构域, 从而提供初级激活信号。在一些实施方案中, 细胞内信号传导结构域含有或另外含有共刺激信号传导结构域以促进效应子功能。在一些实施方案中, 嵌合受体在被基因工程化至免疫细胞中时, 可以调节T细胞活性, 并且在一些情况下可以调节T细胞分化或稳态, 由此产生在体内具有改善的寿命、存活和/或持久性的基因工程化的细胞, 如用于过继细胞治疗方法。

[0747] 示例性抗原受体 (包括CAR) 和用于将这样的受体工程化和引入细胞中的方法包括例如以下文献中所述的那些: 国际专利申请公开号WO 200014257、WO 2013126726、WO 2012/129514、WO 2014031687、WO 2013/166321、WO 2013/071154、WO 2013/123061; 美国专利申请公开号US 2002131960、US 2013287748、US 20130149337; 美国专利号: 6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118; 和欧洲专利申请号EP2537416; 和/或以下文献中所述的那些: Sadelain等人, *Cancer Discov.* 2013年4月; 3(4): 388-398; Davila等人 (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle等人, *Curr. Opin. Immunol.*, 2012年10月; 24(5): 633-39; Wu等人, *Cancer*, 2012年3月18日 (2): 160-75。在一些方面, 抗原受体包括如美国专利号7,446,190中所述的CAR, 以及国际专利申请公开号WO/2014055668A1中所述的那些。CAR的例子包括如前述出版物中任一项中披露的CAR, 所述出版物如WO2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282; Kochenderfer等人, 2013, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10, 267-276 (2013); Wang等人 (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; 和Brentjens等人, *Sci Transl Med.* 2013 5(177)。还参见WO 2014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US2013/0149337、美国专利号7,446,190和美国专利号8,389,282。

[0748] 嵌合受体 (如CAR) 通常包括细胞外抗原结合结构域, 如抗体分子的一部分, 通常是抗体的可变重 (VH) 链区和/或可变轻 (VL) 链区, 例如scFv抗体片段。

[0749] 在一些实施方案中, 受体靶向的抗原是多肽。在一些实施方案中, 其是碳水化合物或其他分子。在一些实施方案中, 与正常或非靶向细胞或组织相比, 抗原在疾病或病症的细胞 (例如, 肿瘤或致病细胞) 上选择性表达或过表达。在其他实施方案中, 抗原在正常细胞上表达和/或在工程化细胞上表达。

[0750] 在一些实施方案中, 抗原是或包括 $\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白 ($\alpha\text{v}\beta 6$ 整联蛋白)、B细胞成熟抗原 (BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9 (CA9, 也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原1B (CTAG, 也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原 (CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、

C-C基序趋化因子配体1 (CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、硫酸软骨素蛋白聚糖4 (CSPG4)、表皮生长因子蛋白 (EGFR)、表皮生长因子受体III型突变体 (EGFR vIII)、上皮糖蛋白2 (EPG-2)、上皮糖蛋白40 (EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2 (EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5 (FCRL5; 也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体 (胎儿AChR)、叶酸结合蛋白 (FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2 (OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100 (gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (GPC3)、G蛋白偶联受体5D (GPRC5D)、Her2/neu (受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3 (erb-B3)、Her4 (erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1 (HLA-A1)、人白细胞抗原A2 (HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2 (IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体 (kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子 (L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A (LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原 (MAGE) -A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素 (MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒 (CMV)、粘蛋白1 (MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D (NKG2D) 配体、黑色素A (MART-1)、神经细胞粘附分子 (NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、肾母细胞瘤1 (WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化的分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中, 由受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原, 如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中, 抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。在一些实施方案中, 抗原是或包括病原体特有的或病原体表达的抗原。在一些实施方案中, 抗原是病毒抗原 (如来自HIV、HCV、HBV等的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0751] 在一些实施方案中, 由受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原, 如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中, 由受体靶向的抗原是CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。

[0752] 在一些实施方案中, 抗原或抗原结合结构域是CD19。在一些实施方案中, scFv含有源自对CD19具有特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中, 结合CD19的抗体或抗体片段是小鼠来源的抗体, 如FMC63和SJ25C1。在一些实施方案中, 抗体或抗体片段是人抗体, 例如如美国专利公开号US 2016/0152723中所述。

[0753] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用, 并且包括多克隆和单克隆抗体, 包括完整抗体和功能性 (抗原结合) 抗体片段, 包括片段抗原结合 (Fab) 片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG (rIgG) 片段、能够特异性地结合抗原的重链可变 (V_H) 区、单链抗体片段 (包括单链可变片段 (scFv)) 以及单结构域抗体 (例如, sdAb、sdFv、纳米抗体) 片段。所述术语涵盖免疫球蛋白的基因工程化的和/或以其他方式修饰的形式, 如胞内抗体、肽体、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体、多特异性 (例如, 双特异性或三特异性) 抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联双scFv、串联三scFv。除非另有说明, 否则术语“抗体”

应当理解为涵盖其功能抗体片段,在本文也称为“抗原结合片段”。所述术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0754] 术语“互补决定区”和“CDR”与“高变区”或“HVR”同义,在本领域中是已知的,是指抗体可变区内的非连续氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。通常,在每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区”和“FR”在本领域中是已知的,指代重链和轻链的可变区的非CDR部分。通常,在每个全长重链可变区中有四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中有四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。

[0755] 给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可以使用多种熟知方案中的任一种容易地确定,所述方案包括以下文献中所述的那些:Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions:Contact analysis and binding site topography,”J.Mol.Biol.262,732-745.(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,”Dev Comp Immunol,2003Jan;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool,”J Mol Biol,2001Jun 8;309(3):657-70,(“Aho”编号方案);和Martin等人,“Modeling antibody hypervariable loops:a combined algorithm,”PNAS,1989,86(23):9268-9272,(“AbM”编号方案)。

[0756] 给定CDR或FR的边界可能根据用于鉴定的方案而变化。例如,Kabat方案基于结构比对,而Chothia方案基于结构信息。Kabat和Chothia方案的编号都基于最常见的抗体区域序列长度,其中通过插入字母(例如“30a”)提供插入,并且在一些抗体中出现缺失。这两种方案将某些插入和缺失(“插入缺失(indel)”)放在不同的位置,从而产生不同的编号。Contact方案基于对复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与Chothia编号方案相似。AbM方案是Kabat与Chothia定义之间的折衷,是基于Oxford Molecular's AbM抗体建模软件使用的方案。

[0757] 下表1列出了分别通过Kabat、Chothia、AbM和Contact方案鉴定的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3以及CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的示例性位置边界。对于CDR-H1,使用Kabat和Chothia两种编号方案列出残基编号。FR位于CDR之间,例如,FR-L1位于CDR-L1之前,FR-L2位于CDR-L1与CDR-L2之间,FR-L3位于CDR-L2与CDR-L3之间,等等。应注意,因为所示的Kabat编号方案在H35A和H35B处放置插入,所以当使用所示的Kabat编号惯例进行编号时,Chothia CDR-H1环的末端根据环的长度在H32与H34之间变化。

表1.根据不同编号方案的CDR边界。

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat编号 ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia编号 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1-Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”第5版Public Health Service,National Institutes of Health,贝塞斯达,马里兰州

2-Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948

[0758] 因此,除非另有规定,否则应当理解给定抗体或其区域(如其可变区)的“CDR”或“互补决定区”或单独指定的CDR(例如,CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)涵盖如由任何前述方案或其他已知方案所定义的一个(或特定的)互补决定区。例如,在声明特定的CDR(例如,CDR-H3)含有给定 V_H 或 V_L 区氨基酸序列中的相应CDR的氨基酸序列的情况下,应理解,这种CDR具有在可变区内的相应CDR(例如,CDR-H3)的序列,如由任何前述方案或其他已知方案所定义的。在一些实施方案中,指定了特定的CDR序列。使用各种编号方案描述所提供抗体的示例性CDR序列,但应当理解,所提供抗体可以包括如根据任何其他上述编号方案或熟练技术人员已知的其他编号方案所描述的CDR。

[0759] 同样,除非另有规定,否则给定抗体或其区域如其可变区的FR或单独指定的一个或多个FR(例如,FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)应理解为涵盖如任何已知方案所定义的一个(或特定)框架区。在一些情况下,指定用于鉴定特定CDR、FR或多个特定FR或CDR的鉴定方案,如通过Kabat、Chothia、AbM或Contact方法或其他已知方案定义的CDR。在其他情况下,给出了CDR或FR的特定氨基酸序列。

[0760] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链中参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变区(分别为 V_H 和 V_L)通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的 V_H 或 V_L 结构域分离结合所述特定抗原的抗体,以分别筛选互补的 V_L 或 V_H 结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0761] 包括在所提供的CAR中的抗体包括抗体片段。“抗体片段”或“抗原结合片段”是指除了完整抗体以外的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;重链可变(V_H)区、单链抗体分子(如scFv)和仅含有 V_H 区的单结构域抗体;和由抗体片段形成的多特异性抗体。在一些实施方案中,所提供的CAR中的抗原结合结构域是或包括含有可变重链(V_H)区和可变轻链(V_L)区的抗体片段。在特定实施方案中,抗体是包含重链可变(V_H)区和/或轻链可变(V_L)区的单链抗体片段(例如scFv)。

[0762] 在一些实施方案中,scFv源自FMC63。FMC63通常是指针对表达人源CD19的Na1m-1

和-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.,等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,FMC63抗体包含分别在SEQ ID NO:51和52中所示的CDRH1和H2,以及SEQ ID NO:53或54中所示的CDRH3、和SEQ ID NO:55中所示的CDRL1、和SEQ ID NO:55或57中所示的CDR L2、和SEQ ID NO:58或59中所示的CDR L3。在一些实施方案中,FMC63抗体包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0763] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:55的CDRL1序列、SEQ ID NO:56的CDRL2序列和SEQ ID NO:58的CDRL3序列的可变轻链,和/或含有SEQ ID NO:51的CDRH1序列、SEQ ID NO:52的CDRH2序列和SEQ ID NO:53的CDRH3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:60中所示的可变重链区和SEQ ID NO:61中所示的可变轻链区。在一些实施方案中,可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:62所示。在一些实施方案中,scFv按顺序包含 V_H 、接头和 V_L 。在一些实施方案中,scFv按顺序包含 V_L 、接头和 V_H 。在一些实施方案中,scFv由SEQ ID NO:63中所示的核苷酸序列或展现与SEQ ID NO:63至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:64中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:64至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0764] 在一些实施方案中,scFv源自SJ25C1。SJ25C1是针对人来源的表达CD19的Nalm-1和Nalm-16细胞产生的小鼠单克隆IgG1抗体(Ling,N.R.等人(1987).Leucocyte typing III.302)。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含分别在SEQ ID NO:65-67中所示的CDRH1、H2和H3,以及分别在SEQ ID NO:68-70中所示的CDRL1、L2和L3序列。在一些实施方案中,SJ25C1抗体包含含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的重链可变区(V_H)和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的轻链可变区(V_L)。

[0765] 在一些实施方案中,scFv包含含有SEQ ID NO:73的CDRL1序列、SEQ ID NO:74的CDRL2序列和SEQ ID NO:75的CDRL3序列的可变轻链和/或含有SEQ ID NO:76的CDRH1序列、SEQ ID NO:77的CDRH2序列和SEQ ID NO:78的CDRH3序列的可变重链。在一些实施方案中,scFv包含如SEQ ID NO:71所示的可变重链区和如SEQ ID NO:72所示的可变轻链区。在一些实施方案中,可变重链和可变轻链通过接头连接。在一些实施方案中,接头如SEQ ID NO:79所示。在一些实施方案中,scFv按顺序包含 V_H 、接头和 V_L 。在一些实施方案中,scFv按顺序包含 V_L 、接头和 V_H 。在一些实施方案中,scFv包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:80的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0766] 在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是BCMA。在一些实施方案中,scFv含有源自对BCMA具有特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合BCMA的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090327和WO 2016/090320中所述的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。

[0767] 在一些实施方案中,抗原或抗原结合结构域是GPCR5D。在一些实施方案中,scFv含有源自对GPCR5D具特异性的抗体或抗体片段的 V_H 和 V_L 。在一些实施方案中,结合GPCR5D的抗体或抗体片段是或含有来自国际专利申请公开号WO 2016/090329和WO 2016/090312中

所述的抗体或抗体片段的VH和VL。

[0768] 在一些实施方案中,抗原是CD20。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD20具有特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中,结合CD20的抗体或抗体片段是或源自利妥昔单抗的抗体,如是利妥昔单抗scFv。

[0769] 在一些实施方案中,抗原是CD22。在一些实施方案中,scFv含有源自对CD22具有特异性的抗体或抗体片段的VH和VL。在一些实施方案中,结合CD22的抗体或抗体片段是或源自m971的抗体,例如是m971 scFv。

[0770] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括含有抗体或抗体片段的细胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括含有抗体或片段的细胞外部分和细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,抗体或片段包括scFv。

[0771] 在一些实施方案中,重组受体(例如CAR)的抗体部分还包括免疫球蛋白恒定区的至少一部分,如铰链区(例如IgG4铰链区)和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,所述恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。在一些方面,恒定区的部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在间隔子的情况下相比,间隔子的长度可以提供抗原结合后增强的细胞反应性。示例性间隔子包括但不限于以下文献中所述的那些:Hudecek等人(2013)Clin.Cancer Res.,19:3153;国际专利申请公开号W0 2014031687、美国专利号8,822,647或公开的申请号US 2014/0271635。

[0772] 在一些实施方案中,所述恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的恒定区或部分。在一些实施方案中,间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP (SEQ ID NO:81中所示),并且是由SEQ ID NO:82中所示的序列编码。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:83所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:84所示的序列。在一些实施方案中,所述恒定区或部分属于IgD。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:85所示的序列。在一些实施方案中,间隔子具有展现与SEQ ID NO:81、83、84或85中的任一者至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,间隔子具有SEQ ID NO:86-94中所示的序列。在一些实施方案中,所述间隔子具有展现与SEQ ID NO:86-94中的任一个至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0773] 在一些实施方案中,抗原受体包含与细胞外结构域直接或间接连接的细胞内结构域。在一些实施方案中,嵌合抗原受体包括连接细胞外结构域和细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含ITAM。例如,在一些方面,抗原识别结构域(例如细胞外结构域)通常与一种或多种细胞内信号传导组分(如在CAR的情况下模拟经由抗原受体复合物(如TCR复合物)进行激活和/或经由另一种细胞表面受体传导信号的信号传导组分)连接。在一些实施方案中,嵌合受体包含在细胞外结构域(例如scFv)与细胞内信号传导结构域之间连接或融合的跨膜结构域。因此,在一些实施方案中,抗原结合组分(例如,抗体)与一种或多种跨膜结构域和细胞内信号传导结构域连接。

[0774] 在一个实施方案中,使用与受体(例如CAR)中的结构域之一天然地缔合的跨膜结构域。在一些情况下,通过氨基酸取代选择或修饰跨膜结构域,以避免这样的结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以使与受体复合物的其他成员的相互作用最小化。

[0775] 在一些实施方案中,跨膜结构域源自天然或合成来源。在来源是天然的情况下,所述结构域在一些方面源自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括源自以下(即包含其至少一个或多个跨膜区)的那些:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154。可替代地,在一些实施方案中,跨膜结构域是合成的。在一些方面,合成跨膜结构域主要包含疏水性残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,所述连接是通过接头、间隔子和/或一个或多个跨膜结构域来实现。在一些方面,跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。

[0776] 在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜结构域可以直接或间接连接。在一些实施方案中,细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,受体含有衍生出跨膜结构域的分子的细胞外部分,如CD28细胞外部分。

[0777] 细胞内信号传导结构域包括模拟或接近以下的那些:通过天然抗原受体的信号、通过这种受体与共刺激受体的组合的信号、和/或仅通过共刺激受体的信号。在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个氨基酸之间的接头,如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体)存在于CAR的跨膜结构域与细胞质信号传导结构域之间并在其间形成连接。

[0778] 在一些方面,将T细胞激活描述为由两个类别的胞质信号传导序列来介导:通过TCR起始抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列),以及以非抗原依赖性方式作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。在一些方面,CAR包括这样的信号传导组分中的一种或两种。

[0779] 受体(例如,CAR)通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。在一些方面,CAR包括调节TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其称为免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM)。含有ITAM的初级胞质信号传导序列的例子包括源自CD3 ζ 链、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 的那些。在一些实施方案中,CAR中的一种或多种胞质信号传导分子含有衍生自CD3 ζ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0780] 在一些实施方案中,受体包括TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面,抗原结合部分连接一个或多个细胞信号传导模块。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD3跨膜结构域。在一些实施方案中,受体(例如,CAR)还包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面,CAR或其他嵌合受体包括CD3-zeta(CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0781] 在一些实施方案中,在连接CAR或其他嵌合受体后,所述受体的胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活免疫细胞(例如工程化以表达所述CAR的T细胞)的正常效应子功能或应答中的至少一种。例如,在一些情况下,CAR诱导T细胞的功能,如细胞溶解活性或T辅助活性,如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分(例如,如果其转导效应子功能信号的话)代替完整的免疫刺激链。在一些实施方案中,一个或多个细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,并且在一些方面还包括共受体的那些胞质序列,所述共受体在自然环境中与

这样的受体协同作用以启动抗原受体接合后的信号转导。

[0782] 在天然TCR的情况下,完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成次级或共刺激信号的组分也被包括在所述CAR中。在其他实施方案中,CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。

[0783] 在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域。在一些实施方案中,CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面,相同的CAR包括激活组分和共刺激组分两者。在一些实施方案中,嵌合抗原受体含有源自T细胞共刺激分子的细胞内结构域或其功能变体,如位于跨膜结构域与细胞内信号传导结构域之间。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0784] 在一些实施方案中,激活结构域包括于一个CAR内,而共刺激组分是由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,CAR包括均在同一细胞上表达的激活或刺激CAR、共刺激CAR(参见WO 2014/055668)。在一些方面,细胞包括一种或多种刺激或激活性CAR和/或共刺激CAR。在一些实施方案中,细胞还包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)),如识别除了与疾病或病症相关和/或为所述疾病或病症所特有的抗原以外的抗原的CAR,其中通过靶向疾病的CAR递送的激活信号由于抑制性CAR与其配体的结合而有所减小或被抑制,例如以减小脱靶效应。

[0785] 在一些实施方案中,这两种受体分别将激活和抑制信号诱导至细胞,使得一种受体与其抗原的连接激活细胞或诱导反应,但是第二抑制性受体与其抗原的连接诱导抑制或减弱该反应的信号。例子是激活CAR与抑制性CAR(iCAR)的组合。例如,这种策略可以用于例如降低在如下背景中的脱靶效应的可能性,在所述背景中激活CAR结合在疾病或病症中表达但也在正常细胞上表达的抗原,并且抑制性受体结合在正常细胞上表达但不在所述疾病或病症的细胞上表达的单独抗原。

[0786] 在一些方面,嵌合受体是或包括抑制性CAR(例如iCAR),并且包括减弱或抑制免疫反应(如细胞中ITAM和/或共刺激促进的反应)的细胞内组分。这样的细胞内信号传导组分的示例是在免疫检查点分子(包括PD-1、CTLA4、LAG3、BTLA、OX2R、TIM-3、TIGIT、LAIR-1、PGE2受体、EP2/4腺苷受体(包括A2AR))上发现的那些。在一些方面,工程化细胞包括抑制性CAR,所述抑制性CAR包含这种抑制性分子的信号传导结构域或源自这种抑制性分子的信号传导结构域,使得其用于减弱例如由激活和/或共刺激CAR诱导的细胞反应。

[0787] 在某些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含与CD3(例如,CD3- ζ)细胞内结构域连接的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含连接至CD3 ζ 细胞内结构域的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0788] 在一些实施方案中,CAR涵盖在胞质部分中的一个或多个(例如,两个或更多个)共刺激结构域和激活结构域(例如,初级激活结构域)。示例性CAR包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分。

[0789] 在一些实施方案中,抗原受体还包括标记,和/或表达CAR或其他抗原受体的细胞还包括替代标记(如细胞表面标记),所述替代标记可以用于确认细胞的转导或工程化以表达受体。在一些方面,标记包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体的全部或部分(例如截短形式),如这种细胞表面受体的截短形式(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,编码标记的核酸

可操作地连接至编码接头序列(如可切割接头序列,例如T2A)的多核苷酸。例如,标记以及任选地接头序列可以是如公开的专利申请号W0 2014031687中所披露的任一种。例如,标记可以是截短的EGFR(tEGFR),其任选地连接至接头序列,如T2A可切割接头序列。

[0790] 截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:43或16中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:43或44的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。示例性T2A接头序列包含SEQ ID NO:47或48所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:47或48的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0791] 在一些实施方案中,标记是并非在T细胞上天然发现的或并非在T细胞表面上天然发现的分子(例如,细胞表面蛋白)或其部分。在一些实施方案中,分子是非自身分子,例如非自身蛋白,即不被将过继转移细胞的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。

[0792] 在一些实施方案中,标记不提供任何治疗功能和/或不产生除了用作基因工程化标记(例如,用于选择成功工程化的细胞)以外的作用。在其他实施方案中,标记可以是治疗性分子或原本发挥一定所需作用的分子,如在体内所遇到的细胞的配体,如共刺激或免疫检查点分子,以增强和/或减弱细胞在过继转移和遇到配体后的反应。

[0793] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面,第一代CAR是在抗原结合后仅提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,例如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面,第三代CAR是包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0794] 例如,在一些实施方案中,CAR含有对抗原(包括如所述的任一种)具有特异性的抗体(例如抗体片段,如scFv)、是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域、以及含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR含有对抗原(包括如所述的任一种)具有特异性的抗体(例如抗体片段,如scFv)、是或含有CD28的跨膜部分或其功能变体的跨膜结构域、以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些这样的实施方案中,受体还包括含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分(如Ig铰链,例如IgG4铰链)的间隔子,如仅铰链间隔子。

[0795] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的跨膜结构域是或包括人CD28(例如登录号P01747.1)的跨膜结构域或其变体,如包含SEQ ID NO:95中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:95至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域;在一些实施方案中,重组受体的含有跨膜结构域的部分包含SEQ ID NO:96中所示的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:96至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0796] 在一些实施方案中,重组受体(例如CAR)的一个或多个细胞内信号传导组分含有人CD28的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL至GG取代的结构域。例如,细胞内信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:97或98中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:97或98至少85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,细胞内结构域包含4-1BB(例如,登录号Q07011.1)的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如SEQ ID NO:99所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:99的至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性的氨基酸序列。

[0797] 在一些实施方案中,重组受体(例如,CAR)的细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 刺激信号传导结构域或其功能变体,如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的亚型3的112个AA的胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导结构域。例如,在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:100、101或102中所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:100、101或102至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0798] 在一些方面,间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:81中所示的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,间隔子是或含有任选地与CH2和/或CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4衍生的铰链。在一些实施方案中,间隔子是与CH2和CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:84中所示。在一些实施方案中,间隔子是仅与CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:83中所示。在一些实施方案中,间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸的序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

[0799] 例如,在一些实施方案中,CAR包括抗体(如抗体片段,包括scFv)、间隔子(如含有免疫球蛋白分子的一部分(如铰链区和/或重链分子的一个或多个恒定区)的间隔子,如含有Ig铰链的间隔子)、含有CD28衍生的跨膜结构域的全部或部分的跨膜结构域、CD28衍生的细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,CAR包括抗体或片段(如scFv)、间隔子(如任何含Ig铰链的间隔子)、CD28衍生的跨膜结构域、4-1BB衍生的细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 衍生的信号传导结构域。

[0800] 示例性替代标记可以包括细胞表面多肽的截短的形式,如以下截短的形式,其是非功能性的,并且不转导或不能转导信号或通常由细胞表面多肽的全长形式转导的信号,和/或不内化或不能内化。示例性截短的细胞表面多肽包括生长因子或其他受体的截短形式,如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(tEGFR,在43或44中所示的示例性tEGFR序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其修饰形式。tEGFR可以含有抗体西妥昔单抗(Erbix®)或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,所述表位可以用于鉴定或选择已经工程化以表达tEGFR构建体和编码的外源蛋白质的细胞,和/或用于消除或分离表达所编码的外源蛋白质的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech.2016年4月;34(4):430-434。在一些方面,标记(例如,替代标记)包括全部或部分(例如,截短形式的)CD34、NGFR、CD19或截短型CD19(例如,截短型非人CD19)或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)。在一些实施方案中,标记是或包含荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(例如超折叠GFP(sfGFP))、红色荧光蛋白(RFP)(例如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2)、青色荧光蛋白(CFP)、蓝绿色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)和黄色荧光蛋白(YFP)及其变体,包括荧光蛋白的物种变体、单体变体和密码子优化的和/或增强的变体。在一些实施方案中,标记是或包含酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌的胚胎碱性磷酸酶

(SEAP)、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶 (luc)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶 (CAT)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS) 或其变体。

[0801] 在一些实施方案中,标记是抗性标记或选择标记。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是或包含赋予对外源药剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是赋予哺乳动物细胞抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是或包含嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博来霉素抗性基因或其修饰形式。

[0802] 在一些实施方案中,编码标记的核酸与编码接头序列(如可切割接头序列,例如 T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记和任选地接头序列可以是如PCT公开号W0 2014031687中所披露的任一种。

[0803] 在一些实施方案中,编码这样的CAR构建体的核酸分子例如在编码CAR的序列的下游还包括编码T2A核糖体跳跃元件的序列和/或tEGFR序列。在一些实施方案中,所述序列编码SEQ ID NO:47或48所示的T2A核糖体跳跃元件或展现与SEQ ID NO:47或48至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0804] 在一些实施方案中,还可以产生表达抗原受体(例如CAR)的T细胞以表达截短的EGFR (EGFRt) 作为非免疫原性选择表位(例如,通过引入编码由T2A核糖体开关隔开的CAR和EGFRt的构建体以从相同构建体表达两种蛋白质),然后可以使用所述截短的EGFR作为标记来检测这样的细胞(参见例如,美国专利号8,802,374)。在一些实施方案中,所述序列编码SEQ ID NO:43或44所示的tEGFR序列或展现与SEQ ID NO:43或44至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些情况下,肽(如T2A)可导致核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),导致2A序列末端与下游的下一个肽之间分离(参见例如,de Felipe. Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) 和deFelipe等人Traffic 5:616-626 (2004))。许多2A元件是已知的。可以用于本文公开的方法和核酸中的2A序列的例子包括但不限于来自以下的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如SEQ ID NO:45)、马鼻肺炎病毒(E2A,例如SEQ ID NO:46)、明脉扁刺蛾 β 四体病毒(Thosea asigna virus) (T2A,例如SEQ ID NO:47或48)以及猪捷申病毒-1 (P2A,例如SEQ ID NO:49或50),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0805] 由向受试者施用的细胞表达的重组受体(如CAR)通常识别或特异性结合在所治疗的疾病或病症或其细胞中表达、与所治疗的疾病或病症或其细胞相关和/或为所治疗的疾病或病症或其细胞所特有的分子。在与分子(例如抗原)特异性结合后,所述受体通常将免疫刺激信号(如ITAM转导的信号)递送到细胞中,从而促进靶向所述疾病或病症的免疫反应。例如,在一些实施方案中,所述细胞表达与抗原特异性地结合的CAR,所述抗原由所述疾病或病症的细胞或组织表达或与所述疾病或病症相关。

2. 嵌合自身抗体受体 (CAAR)

[0806] 在一些实施方案中,重组受体是嵌合自身抗体受体 (CAAR)。在一些实施方案中,CAAR结合(例如特异性结合)或识别自身抗体。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞(如工程化以表达CAAR的T细胞)可以用于结合至并杀伤表达自身抗体的细胞,而不是表达正常抗体

的细胞。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于治疗与自身抗原的表达相关的自身免疫性疾病,例如自身免疫性疾病。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以靶向最终产生自身抗体并在其细胞表面上展示自身抗体的B细胞,将这些B细胞标记为用于治疗性干预的疾病特异性靶标。在一些实施方案中,表达CAAR的细胞可以用于通过使用抗原特异性嵌合自身抗体受体靶向引起疾病的B细胞,有效靶向和杀死自身免疫疾病中的致病性B细胞。在一些实施方案中,重组受体是CAAR,如美国专利申请公开号US 2017/0051035中所述的任一种。

[0807] 在一些实施方案中,CAAR包含自身抗体结合结构域、跨膜结构域和一个或多个细胞内信号传导区或结构域(也可互换地称为胞质信号传导结构域或区域)。在一些实施方案中,细胞内信号传导区包含细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,细胞内信号传导结构域是或包含初级信号传导结构域、能够在T细胞中刺激和/或诱导初级激活信号的信号传导结构域、T细胞受体(TCR)组分的信号传导结构域(例如CD3-Zeta (CD3 ζ) 链的细胞内信号传导结构域或区域或其功能变体或信号传导部分) 和/或包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)的信号传导结构域。

[0808] 在一些实施方案中,自身抗体结合结构域包含自身抗原或其片段。自身抗原的选择可以取决于所靶向的自身抗体的类型。例如,自身抗原的选择可能是由于其识别与特定疾病状态(例如,自身免疫性疾病,例如自身抗体介导的自身免疫性疾病) 相关的靶细胞(例如,B细胞) 上的自身抗体。在一些实施方案中,自身免疫性疾病包括寻常型天疱疮(PV)。示例性自身抗原包括桥粒芯糖蛋白1(Dsg1) 和Dsg3。

3.T细胞受体(TCR)

[0809] 在一些实施方案中,提供工程化的细胞(如T细胞),其表达识别靶多肽(如肿瘤、病毒或自身免疫蛋白的抗原) 的肽表位或T细胞表位的T细胞受体(TCR) 或其抗原结合部分。

[0810] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β) 或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR α 和TCR β) 的分子或其抗原结合部分,并且其能够特异性地结合与MHC分子结合的肽。在一些实施方案中,TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR在结构上大体类似,但是表达它们的T细胞可能具有不同的解剖学位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,在T细胞(或T淋巴细胞) 的表面上发现TCR,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC) 分子结合的抗原。

[0811] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,TCR是如下抗原结合部分,其小于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合(如与MHC-肽复合物结合)。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构域的一部分,但是仍能够结合完整TCR所结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有对肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别中所涉及的互补决定区。

[0812] 在一些实施方案中,TCR的可变结构域含有超变环或互补决定区(CDR),它们通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各个CDR通常由

框架区 (FR) 隔开, 与CDR相比, 所述框架区通常在TCR分子之间展示较低可变性 (参见例如, Jores等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia等人, EMBO J. 7:3745, 1988; 还参见Lefranc等人, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003)。在一些实施方案中, CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR, 或者在给定TCR可变区上在三个CDR中对于抗原识别和/或对于与肽-MHC复合物的加工的肽部分的相互作用最重要。在一些情况下, α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N末端部分相互作用。在一些情况下, β 链的CDR1可以与所述肽的C末端部分相互作用。在一些情况下, CDR2对与MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中, β 链的可变区可以含有另外的高变区 (CDR4或HVR4), 其通常参与超抗原结合而非抗原识别 (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426)。

[0813] 在一些实施方案中, TCR还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾 (参见例如, Janeway等人, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 第3版, Current Biology Publications, 第4:33页, 1997)。在一些方面, TCR的每条链可以具有一个N末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和位于C末端的短胞质尾。在一些实施方案中, TCR与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。

[0814] 在一些实施方案中, TCR链含有一个或多个恒定结构域。例如, 给定TCR链 (例如, α 链或 β 链) 的细胞外部分可以含有与细胞膜相邻的两个免疫球蛋白样结构域, 如可变结构域 (例如, V α 或V β ; 通常为基于Kabat编号的氨基酸1至116, Kabat等人, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 第5版) 和恒定结构域 (例如, α 链恒定结构域或C α , 通常为基于Kabat编号的链的位置117至259; 或 β 链恒定结构域或C β , 通常为基于Kabat的链的位置117至295)。例如, 在一些情况下, 由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域, 所述可变结构域各自含有CDR。TCR的恒定结构域可以含有短连接序列, 其中半胱氨酸残基形成二硫键, 由此连接TCR的两条链。在一些实施方案中, TCR可以在 α 链和 β 链中的每一个中具有另外的半胱氨酸残基, 使得TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。

[0815] 在一些实施方案中, TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中, 跨膜结构域带正电荷。在一些情况下, TCR链含有胞质尾。在一些情况下, 所述结构允许TCR与其他分子 (如CD3及其亚基) 缔合。例如, 含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将所述蛋白质锚定在细胞膜中并与CD3信号传导装置或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基 (例如, CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链) 的细胞内尾含有TCR复合物的信号传导能力中所涉及的一个或多个免疫受体酪氨酸激活基序或ITAM。

[0816] 在一些实施方案中, TCR可以是两条链 α 和 β (或者任选地 γ 和 δ) 的异二聚体, 或者其可以是单链TCR构建体。在一些实施方案中, TCR是含有两条单独链 (α 和 β 链或 γ 和 δ 链) 的异二聚体, 所述链是通过例如一个或多个二硫键连接。

[0817] 在一些实施方案中, TCR可以从一个或多个已知的TCR序列 (如V α , β 链的序列) 产生, 所述一个或多个已知的TCR序列的基本上全长的编码序列是易于获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列 (包括V链序列) 的方法是熟知的。在一些实施方案中, 编码TCR的核酸可以从多种来源获得, 如通过一种或多种给定细胞内的或从所述一种或多种给定细胞分离的

编码TCR的核酸的聚合酶链式反应(PCR)扩增获得,或者通过公众可用的TCR DNA序列的合成获得。

[0818] 在一些实施方案中,TCR是从生物来源获得,如来自细胞(如来自T细胞(例如细胞毒性T细胞))、T细胞杂交瘤或其他公众可用的来源。在一些实施方案中,T细胞可以从体内分离的细胞获得。在一些实施方案中,TCR是胸腺选择的TCR。在一些实施方案中,TCR是新表位限制性TCR。在一些实施方案中,T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分或其抗原结合片段可以根据对所述TCR序列的知识以合成方式产生。

[0819] 在一些实施方案中,TCR是从通过针对靶多肽抗原或其靶T细胞表位筛选候选TCR文库而鉴定或选择的TCR生成的。TCR文库可以通过扩增来自T细胞的V α 和V β 库来生成,所述T细胞是从受试者中分离的,包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增。在一些实施方案中,可以从CD4⁺或CD8⁺ T细胞生成TCR文库。在一些实施方案中,TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源即正常TCR文库扩增。在一些实施方案中,TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V α 和V β 的基因库,如通过在从人获得的样品(如T细胞)中进行RT-PCR。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V α 和V β 文库组装,其中扩增的产物被克隆或组装以通过接头隔开。根据所述受试者和细胞的来源,文库可以是HLA等位基因特异性的。可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化来生成。在一些方面,使TCR经历例如 α 或 β 链的定向进化,如通过诱变来进行。在一些方面,TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,所选TCR可以通过亲和力成熟来修饰。在一些实施方案中,可以选择抗原特异性T细胞,如通过筛选以评估针对所述肽的CTL活性。在一些方面,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过对抗原的结合活性(例如特定亲和力或亲合力)来选择。

[0820] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分是已经修饰或工程化的。在一些实施方案中,使用定向进化方法来产生具有改变的特性如具有较高的对特定MHC-肽复合物的亲和力的TCR。在一些实施方案中,通过展示方法实现定向进化,所述展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人(2003) *Nat Immunol*, 4, 55-62;Holler等人(2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5387-92);噬菌体展示(Li等人(2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54)或T细胞展示(Chervin等人(2008) *J Immunol Methods*, 339, 175-84)。在一些实施方案中,展示方法涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。

[0821] 在一些实施方案中,用于产生或产生目的TCR的靶多肽的肽是已知的或者可以容易地鉴定。在一些实施方案中,适用于在产生TCR或抗原结合部分中使用的肽可以基于目的靶多肽(如下文所述的靶多肽)中HLA限制性基序的存在来确定。在一些实施方案中,使用可用的计算机预测模型来鉴定肽。在一些实施方案中,对于预测MHC I类结合位点,这样的模型包括但不限于ProPred1 (Singh和Raghava (2001) *Bioinformatics* 17 (12):1236-1237) 和 SYFPEITHI (参见Schuler等人(2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409 (1):75-93 2007)。在一些实施方案中,MHC限制性表位是HLA-A0201,其在所有

高加索人的大约39%-46%中表达,并且因此代表用于制备TCR或其他MHC-肽结合分子的MHC抗原的合适选择。

[0822] 使用计算机预测模型的蛋白酶体和免疫蛋白酶体的HLA-A0201结合基序和切割位点是已知的。对于预测MHC I类结合位点,这样的模型包括但不限于ProPred1(更详细地描述于以下文献中:Singh和Raghava,ProPred:prediction of HLA-DR binding sites.BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001),和SYFPEITHI(参见Schuler等人SYFPEITHI,Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction.,Immunoinformatics Methods in Molecular Biology,第409卷(1):75-93 2007)。

[0823] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白或其突变形式,其中一种或多种特性(如结合特征)已经发生改变。在一些实施方案中,TCR可以源自各种动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0824] 在一些实施方案中,TCR是全长TCR。在一些实施方案中,TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,TCR是二聚TCR(dTCR)。在一些实施方案中,TCR是单链TCR(sc-TCR)。在一些实施方案中,dTCR或scTCR具有如WO 03/020763、WO 04/033685、WO 2011/044186中所述的结构。

[0825] 在一些实施方案中,TCR含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中,TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,TCR能够与CD3形成TCR复合物。在一些实施方案中,任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与信号传导结构域连接,从而在T细胞表面上产生活性TCR。在一些实施方案中,TCR在细胞的表面上表达。

[0826] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽,其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合;和第二多肽,其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合,所述第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,所述键可以对应于天然二聚 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,所述链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键二者。在一些实施方案中,TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0827] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链,所述TCR α 链含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接至恒定 α 结构域C末端的第一二聚化基序;以及TCR β 链,所述TCR β 链包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接至恒定 β 结构域C末端的第一二聚化基序,其中所述第一和第二二聚化基序易于相互作用以在第一二聚化基序的氨基酸与第二二聚化基序的氨基酸之间形成共价键,从而将TCR α 链与TCR β 链连接在一起。

[0828] 在一些实施方案中,TCR是scTCR。通常,可以使用已知的方法产生scTCR,参见例如,Soo Hoo, W.F.等人PNAS(USA) 89,4759(1992);Wülfing, C.和Plückthun, A., J.Mol.Biol.242,655(1994);Kurucz, I.等人PNAS(USA) 90 3830(1993);国际公开的PCT号WO 96/13593、WO 96/18105、WO 99/60120、WO 99/18129、WO 03/020763、WO2011/044186;和Schlueter, C.J.等人J.Mol.Biol.256,859(1996)。在一些实施方案中,scTCR含有引入的非天然链间二硫键以促进TCR链的缔合(参见例如,国际公开的PCT号WO 03/020763)。在一些

实施方案中,scTCR是非二硫键连接的截短的TCR,其中与其C末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如,国际公开PCT号W0 99/60120)。在一些实施方案中,scTCR含有经由肽接头与TCR β 可变结构域共价连接的TCR α 可变结构域(参见例如,国际公开PCT号W0 99/18129)。

[0829] 在一些实施方案中,scTCR含有由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成的第一区段、由对应于TCR β 链可变区序列的氨基酸序列构成的第二区段(融合至对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端)以及将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端的接头序列。

[0830] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0831] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 β 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCR β 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 α 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将第一区段的C末端连接至第二区段的N末端)。

[0832] 在一些实施方案中,scTCR的连接第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中,接头序列可以例如具有式-P-AA-P-,其中P是脯氨酸并且AA表示氨基酸序列,其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中,第一和第二区段配对,使得其可变区序列被定向用于这种结合。因此,在一些情况下,接头具有足够的长度以跨越第一区段的C末端与第二区段的N末端之间的距离,或反之亦然,但是不能太长以阻断或减少scTCR与靶配体的结合。在一些实施方案中,接头可以含有从10至45个氨基酸或从约10至约45个氨基酸,如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基,例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中,接头具有式-PGGG-(SGGGG)5-P-,其中P是脯氨酸,G是甘氨酸并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:38)。在一些实施方案中,接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO:39)。

[0833] 在一些实施方案中,scTCR含有共价二硫键,所述共价二硫键将 α 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基连接至 β 链的恒定结构域的免疫球蛋白区域的残基。在一些实施方案中,不存在天然TCR中的链间二硫键。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入scTCR多肽的第一和第二区段的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键二者。

[0834] 在含有引入的链间二硫键的dTCR或scTCR的一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,将形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸取代为另一种残基,如取代为丝氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,引入的二硫键可以通过使第一和第二区段上的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成。TCR的示例性非天然二硫键描述于公开的国际PCT号W0 2006/000830中。

[0835] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段展现的对靶抗原的亲合力具有如下平衡结合常数:在或在约 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单独值和范围。在一些实施方案中,靶抗原是MHC-肽复合物或配体。

[0836] 在一些实施方案中,编码TCR(如 α 和 β 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的手段扩增,并且将其克隆到一种或多种合适的表达载体中。表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于所述二者的那些,如质粒和病毒。

[0837] 在一些实施方案中,载体可以是以下的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,如逆转录病毒载体。

[0838] 在一些实施方案中,重组表达载体可以使用标准的重组DNA技术来制备。在一些实施方案中,载体可以含有调节序列,如转录和翻译起始和终止密码子,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌、植物或动物)的类型具有特异性,酌情并考虑所述载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,载体可以含有非天然启动子,所述启动子与编码TCR或抗原结合部分(或其他MHC-肽结合分子)的核苷酸序列可操作地连接。在一些实施方案中,启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还考虑其他已知的启动子。

[0839] 在一些实施方案中,为了生成编码TCR的载体,将 α 和 β 链从自表达目的TCR的T细胞克隆分离的总cDNA进行PCR扩增,并克隆至表达载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,将 α 和 β 链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中,将生成的 α 和 β 链掺入逆转录病毒(例如,慢病毒)载体中。

B. 用于基因工程化的核酸、载体和方法

[0840] 使用本文公开的装置,本文提供如下方法,其中将细胞(例如,T细胞)基因工程化以表达重组受体。在一些实施方案中,工程化是通过引入编码重组受体或其部分或组分的一种或多种多核苷酸来进行。还提供编码重组受体的多核苷酸,以及含有这样的核酸和/或多核苷酸的载体或构建体。

[0841] 在一些实施方案中,编码重组受体的多核苷酸含有至少一个启动子,所述启动子可操作地连接以控制所述重组受体的表达。在一些例子中,多核苷酸含有两个、三个或更多个启动子,所述启动子可操作地连接以控制所述重组受体的表达。在一些实施方案中,多核苷酸可以含有对引入所述多核苷酸的宿主的类型(例如,细菌、真菌、植物或动物)具有特异性的调节序列(如转录和翻译起始和终止密码子),酌情并考虑所述多核苷酸是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,多核苷酸可以含有调节/控制元件,如启动子、增强子、内含子、多腺苷酸化信号、Kozak共有序列、内部核糖体进入位点(IRES)、2A序列和剪接受体或供体。在一些实施方案中,多核苷酸可以含有与编码重组受体和/或一种或多种另外的多肽的核苷酸序列可操作地连接的非天然启动子。在一些实施方案中,启动子选自RNA pol I、pol II或pol III启动子。在一些实施方案中,启动子由RNA聚合酶II识别(例如,CMV、SV40早期区域或腺病毒主要晚期启动子)。在另一个实施方案中,启动子由RNA聚合酶III识别(例如

U6或H1启动子)。在一些实施方案中,启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还考虑其他已知的启动子。

[0842] 在一些实施方案中,启动子是或包含组成型启动子。示例性组成型启动子包括例如猿病毒40早期启动子(SV40)、巨细胞病毒立即早期启动子(CMV)、人泛素C启动子(UBC)、人延伸因子1 α 启动子(EF1 α)、小鼠磷酸甘油酸激酶1启动子(PGK)、和与CMV早期增强子偶联的鸡 β -肌动蛋白启动子(CAGG)。在一些实施方案中,组成型启动子是合成或修饰的启动子。在一些实施方案中,启动子是或包含MND启动子,它是一种含有具有骨髓增生性肉瘤病毒增强子的经修饰的MoMuLV LTR的U3区的合成启动子(参见Challita等人(1995) J. Virology 69 (2):748-755)。在一些实施方案中,启动子是组织特异性启动子。在另一个实施方案中,启动子是病毒启动子。在另一个实施方案中,启动子是非病毒启动子。在一些实施方案中,示例性启动子可以包括但不限于人延伸因子1 α (EF1 α) 启动子或其修饰形式或MND启动子。

[0843] 在另一个实施方案中,启动子是受调节的启动子(例如诱导型启动子)。在一些实施方案中,启动子是诱导型启动子或阻抑型启动子。在一些实施方案中,启动子包含Lac操纵子序列、四环素操纵子序列、半乳糖操纵子序列或多西环素操纵子序列,或者是其类似物,或者能够被Lac阻遏子或四环素阻遏子或其类似物结合或识别。在一些实施方案中,多核苷酸不包括调节元件,例如,启动子。

[0844] 在一些情况下,编码重组受体的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。在一些方面,信号序列可以编码源自天然多肽的信号肽。在其他方面,信号序列可以编码异源或非天然信号肽,例如SEQ ID NO:40所示的并且由SEQ ID NO:41所示的核苷酸序列编码的GMCSFR α 链的示例性信号肽。在一些情况下,编码重组受体(例如,嵌合抗原受体(CAR))的核酸序列含有编码信号肽的信号序列。非限制性示例性的信号肽包括例如SEQ ID NO:40中所示的并且由SEQ ID NO:40中所示的核苷酸序列编码的GMCSFR α 链信号肽,或SEQ ID NO:42中所示的CD8 α 信号肽。

[0845] 在一些实施方案中,多核苷酸含有编码一种或多种另外的多肽(例如一种或多种标记和/或一种或多种效应分子)的核酸序列。在一些实施方案中,一种或多种标记包括转导标记、替代标记和/或选择标记。所引入的例如编码一种或多种另外的多肽的另外的核酸序列包括:可以例如通过促进所转移细胞的活力和/或功能来改善疗法的功效的核酸序列;提供用于选择和/或评价细胞(如评估体内存活或定位)的遗传标记的核酸序列;例如通过使细胞对体内阴性选择敏感来提高安全性的核酸序列,如以下文献中所述:Lupton S.D.等人, Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); 和 Riddell 等人, Human Gene Therapy 3:319-338 (1992); 还参见 WO 1992008796 和 WO 1994028143 (描述源自将显性阳性可选标记与阴性可选标记融合的双功能可选融合基因的用途), 以及美国专利号 6,040,177。

[0846] 在一些实施方案中,标记是转导标记或替代标记。转导标记或替代标记可用于检测已经引入多核苷酸(例如,编码重组受体的多核苷酸)的细胞。在一些实施方案中,转导标记可以指示或确认对细胞的修饰。在一些实施方案中,替代标记是经制备在细胞表面上与重组受体(例如,CAR)共表达的蛋白质。在特定实施方案中,这种替代标记是已经被修饰以具有极少或无活性的表面蛋白。在一些实施方案中,替代标记是在编码重组受体的相同多核苷酸上编码。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序列与编码标记的核酸序列可操

作地连接,任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自我切割肽或引起核糖体跳跃的肽如2A序列的核酸隔开。在一些情形中,外在标记基因可以与工程化细胞结合用于允许检测或选择细胞,并且在一些情形中,还可以用于促进细胞消除和/或细胞自杀。

[0847] 示例性替代标记可以包括细胞表面多肽的截短的形式,如以下截短的形式,其是非功能性的,并且不转导或不能转导信号或通常由细胞表面多肽的全长形式转导的信号,和/或不内化或不能内化。示例性截短的细胞表面多肽包括生长因子或其他受体的截短形式,如截短的人表皮生长因子受体2(tHER2)、截短的表皮生长因子受体(tEGFR,SEQ ID NO:43或44所示的示例性tEGFR序列)或前列腺特异性膜抗原(PSMA)或其修饰形式(如截短的PSMA(tPSMA))。在一些方面,tEGFR可以含有抗体西妥昔单抗(Erbix®)或其他治疗性抗EGFR抗体或结合分子识别的表位,其可以用于鉴定或选择已经用tEGFR构建体和编码的外源蛋白质工程化的细胞,和/或用于消除或分离表达所编码的外源蛋白质的细胞。参见美国专利号8,802,374和Liu等人,Nature Biotech.2016年4月;34(4):430-434。在一些方面,标记(例如替代标记)包括全部或部分(例如,截短形式)的CD34、NGFR、CD19或截短的CD19(例如,截短的非人CD19)。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:43或44所示的氨基酸序列或展现与SEQ ID NO:43或44至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列同一性的氨基酸序列。

[0848] 在一些实施方案中,标记是或包含可检测蛋白,如荧光蛋白,如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)(如超折叠GFP(sfGFP))、红色荧光蛋白(RFP)(如tdTomato、mCherry、mStrawberry、AsRed2、DsRed或DsRed2)、青色荧光蛋白(CFP)、蓝绿色荧光蛋白(BFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)和黄色荧光蛋白(YFP)及其变体,包括荧光蛋白的物种变体、单体变体、经密码子优化的、稳定的和/或增强的变体。在一些实施方案中,标记是或包含酶(如萤光素酶)、来自大肠杆菌的lacZ基因、碱性磷酸酶、分泌的胚胎碱性磷酸酶(SEAP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)。示例性发光报告基因包括萤光素酶(luc)、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)或其变体。在一些方面,酶的表达可以通过添加底物来检测,所述底物可以根据所述酶的表达和功能活性来检测。

[0849] 在一些实施方案中,标记是抗性标记或选择标记。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是或包含赋予对外源药剂或药物的抗性的多肽。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是抗生素抗性基因。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是赋予哺乳动物细胞抗生素抗性的抗生素抗性基因。在一些实施方案中,抗性标记或选择标记是或包含嘌呤霉素抗性基因、潮霉素抗性基因、杀稻瘟菌素抗性基因、新霉素抗性基因、遗传霉素抗性基因或博来霉素抗性基因或其修饰形式。

[0850] 本文所述的重组受体和/或一种或多种另外的多肽中的任一种可以由一种或多种多核苷酸编码,所述多核苷酸含有呈任何组合、定向或排列的编码重组受体的一个或多个核酸序列。例如,一种、两种、三种或更多种多核苷酸可以编码一种、两种、三种或更多种不同多肽(例如,重组受体或其部分或组分)和/或一种或多种另外的多肽(例如,标记和/或效应分子)。在一些实施方案中,一种多核苷酸含有编码重组受体(例如,CAR)或其部分或组分的核酸序列,以及编码一种或多种另外的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,一种载体或构建体含有编码重组受体(例如,CAR)或其部分或组分的核酸序列,并且单独载体或构建体含有编码一种或多种另外的多肽的核酸序列。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序

列和编码一种或多种另外的多肽的核酸序列可操作地连接至两种不同启动子。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸存在于编码一种或多种另外的多肽的核酸的上游。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸存在于编码一种或多种另外的多肽的核酸的下游。

[0851] 在某些情况下,一种多核苷酸含有的核酸序列编码两种或更多种不同多肽链,例如,重组受体和一种或多种另外的多肽,例如,标记和/或效应分子。在一些实施方案中,编码两种或更多种不同多肽链(例如,重组受体和一种或多种另外的多肽)的核酸序列存在于两种单独多核苷酸中。例如,提供两种单独多核苷酸,并且每一种可以单独地转移至或引入细胞中以供在细胞中表达。在一些实施方案中,编码标记的核酸序列和编码重组受体的核酸序列存在于或插入于细胞基因组内的不同位置。在一些实施方案中,编码标记的核酸序列和编码重组受体的核酸序列可操作地连接至两种不同启动子。

[0852] 在一些实施方案中,如多核苷酸含有第一和第二核酸序列的那些实施方案中,编码不同多肽链中的每一种的编码序列可以与相同或不同的启动子可操作地连接。在一些实施方案中,核酸分子可以含有驱动两条或更多条不同多肽链表达的启动子。在一些实施方案中,这样的核酸分子可以是多顺反子的(双顺反子的或三顺反子的,参见例如美国专利号6,060,273)。在一些实施方案中,编码重组受体的核酸序列和编码一种或多种另外的多肽的核酸序列可操作地连接至相同启动子,并且任选地由内部核糖体进入位点(IRES)或者编码自我切割肽或引起核糖体跳跃的肽(如2A元件)的核酸隔开。例如,示例性标记和任选的核糖体跳跃序列可以是PCT公开号WO 2014031687中披露的任一种。

[0853] 在一些实施方案中,可以将转录单元工程化为含有IRES的双顺反子单元,其允许基因产物(例如编码重组受体和另外的多肽)通过来自单一启动子的信息共表达。可替代地,在一些情况下,单一启动子可引导RNA的表达,所述RNA在单一开放阅读框(ORF)中含有两个或三个基因(例如编码标记和编码重组受体),所述基因由编码自切割肽(例如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此隔开。ORF由此编码单一多肽,所述多肽在翻译期间(在2A的情况下)或在翻译后被处理为单独蛋白质。在一些情况下,肽(如T2A)可以引起核糖体跳过2A元件C末端处肽键的合成(核糖体跳跃),从而导致2A序列末端与下游的下一个肽之间隔开(参见例如,de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) 以及de Felipe等人 *Traffic* 5:616-626 (2004))。各种2A元件是已知的。可以用于本文所公开的方法和系统中的2A序列的例子包括但不限于来自以下病毒的2A序列:口蹄疫病毒(F2A,例如,SEQ ID NO:45)、马鼻炎A病毒(E2A,例如,SEQ ID NO:46)、明脉扁刺蛾β四体病毒(T2A,例如,SEQ ID NO:47或48)和猪捷申病毒-1(P2A,例如,SEQ ID NO:49或50),如美国专利公开号20070116690中所述。

[0854] 在一些实施方案中,编码重组受体和/或另外的多肽的多核苷酸含于载体中或可以被克隆至一种或多种载体中。在一些实施方案中,一种或多种载体可以用于转化或转染宿主细胞,例如用于工程化的细胞。示例性载体包括设计用于引入、增殖和扩增或用于表达或用于两者的载体,如质粒和病毒载体。在一些方面,载体是表达载体,例如重组表达载体。在一些实施方案中,重组表达载体可以使用标准的重组DNA技术来制备。

[0855] 在一些实施方案中,载体可以是以下的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利

福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII (Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。

[0856] 在一些实施方案中,载体是病毒载体,如逆转录病毒载体。在一些实施方案中,将编码重组受体和/或一种或多种另外的多肽的多核苷酸经由逆转录病毒或慢病毒载体或者经由转座子引入细胞中(参见例如,Baum等人(2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*.13:1050-1063;Frecha等人(2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757;以及Hackett等人(2010) *Molecular Therapy* 18:674-683)。

[0857] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒(如例如,源自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将一种或多种多核苷酸引入细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将一种或多种多核苷酸引入T细胞中(参见例如,Koste等人(2014) *Gene Therapy* 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25;Carlens等人(2000) *Exp Hematol* 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29日(11):550-557)。

[0858] 在一些实施方案中,载体是逆转录病毒载体。在一些方面,逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如,源自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体源自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,逆转录病毒包括源自任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干个物种的宿主细胞。在一个实施方案中,要表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多例示性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989) *BioTechniques* 7:980-990;Miller,A.D.(1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14;Scarpa等人(1991) *Virology* 180:849-852;Burns等人(1993) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993) *Cur.Opin.Genet.Develop.*3:102-109)。

[0859] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如以下文献中:Wang等人(2012) *J.Immunother.*35(9):689-701;Cooper等人(2003) *Blood*.101:1637-1644;Verhoeyen等人(2009) *Methods Mol Biol*.506:97-114;以及Cavalieri等人(2003) *Blood*.102(2):497-505。在一些实施方案中,如通过逆转录病毒转导、转染或转化将编码重组受体和/或一种或多种另外的多肽的多核苷酸引入含有培养细胞的组合物中。

[0860] 在一些实施方案中,使用电穿孔将一种或多种多核苷酸引入T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013) *PLoS ONE* 8(3):e60298;以及Van Tedeloo等人(2000) *Gene Therapy* 7(16):1431-1437)。在一些实施方案中,通过转座将重组核酸转移至T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010) *Hum Gene Ther* 21(4):427-437;Sharma等人(2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2,e74;以及Huang等人(2009) *Methods Mol Biol* 506:115-126)。在免疫细胞中引入并表达遗传物质(例如,多核苷酸和/或载体)的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如 *Current Protocols in Molecular Biology*,John Wiley&Sons,纽约,纽约州中所述)、原

生质体融合、阳离子脂质体介导的转染；钨粒子促进的微粒轰击 (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990))；以及磷酸锶DNA共沉淀 (Brash等人, Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)) 以及例如国际专利申请公开号W0 2014055668和美国专利号7,446,190中所述的其他方法。

[0861] 在一些实施方案中,可以在扩增期间或之后将编码重组受体和/或一种或多种另外的多肽的一种或多种多核苷酸或载体引入细胞(例如,T细胞)中。例如,一种或多种多核苷酸或载体的该引入可以用任何合适的逆转录病毒载体来进行。然后可以使所得基因工程化细胞摆脱初始刺激物(例如,抗CD3/抗CD28刺激物),随后在第二种类型的刺激物(例如,经由从头引入的重组受体)的存在下进行刺激。该第二种类型的刺激物可以包括呈肽/MHC分子形式的抗原刺激物、遗传引入的受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然抗原和/或配体)或在新受体的框架内直接结合(例如通过识别受体内的恒定区)的任何配体(如抗体)。参见例如,Cheadle等人,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907: 645-66; 或Barrett等人, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine第65卷: 333-347 (2014)。

[0862] 在一些情况下,可以使用不需要激活细胞(例如,T细胞)的载体。在一些此类情况下,可以在激活之前选择和/或转导细胞。因此,可以在培养细胞之前或之后,并且在一些情况下在培养的至少一部分的同时或期间,将细胞工程化。

IV. 组合物、配制品和施用方法

[0863] 还提供含有刺激并选择的细胞(任选地基因工程化,例如,工程化的抗原受体,如CAR或TCR)的组合物,以及含有所述细胞的组合物,包括药物组合物和配制品。还提供所述组合物的使用方法和用途,如用于其中表达抗原的疾病、病症和障碍的治疗中,或者用于检测、诊断和预后方法中。

A. 组合物和配制品

[0864] 术语“药物配制品”是指如下制剂,其呈使得其中所含活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对施用配制品的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0865] “药学上可接受的载体”是指药物配制品中除了活性成分之外对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲液、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0866] 在一些方面,载体的选择部分取决于特定细胞或药剂和/或施用方法。因此,存在多种合适的配制品。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物通常以总组合物重量的约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编辑(1980)中。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于: 缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵; 六甲氯铵; 苯扎氯铵; 苄索氯铵; 苯酚、丁醇或苄醇; 烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(少于约10个残基)多肽; 蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂,如EDTA; 糖类,如

蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐抗衡离子，如钠；金属络合物（例如锌-蛋白质络合物）；和/或非离子表面活性剂，如聚乙二醇（PEG）。

[0867] 在一些方面，在组合物中包括缓冲剂。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及各种其他酸和盐。在一些方面，使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。示例性方法更详细地描述于例如以下文献中：Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版（2005年5月1日）。

[0868] 配制品或组合物还可以含有超过一种活性成分，其可用于用细胞或药剂预防或治疗的特定适应症、疾病或病症，其中各自的活性不会相互产生不利影响。这样的活性成分以对既定目的有效的量以合适的方式组合存在。因此，在一些实施方案中，药物组合物还包括其他药学活性剂或药物，如化学治疗剂，例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。在一些实施方案中，将所述药剂或细胞以盐（例如，药学上可接受的盐）的形式施用。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸（如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸，硝酸和硫酸）和有机酸（如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸，例如对甲苯磺酸）的那些盐。

[0869] 在一些实施方案中，药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量（如治疗有效量或预防有效量）的药剂或细胞。在一些实施方案中，通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复施用，根据病症，重复所述治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而，其他给药方案可能有用并且可以被确定。所需剂量可以通过单次推注施用组合物、通过多次推注施用组合物或通过连续输注施用组合物来递送。

[0870] 药剂或细胞可以通过任何合适的方式施用，例如通过推注输注，通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下（subconjunctival）注射、结膜下（subconjunctival）注射、眼球筋膜囊下（sub-Tenon）注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜（posterior juxtасcleral）递送。在一些实施方案中，将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及（如果局部治疗需要）病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中，给定剂量通过细胞或药剂的单次推注给药来施用。在一些实施方案中，给定剂量是通过细胞或药剂例如在不超过3天的时间段中多次推注施用来施用，或者通过细胞或药剂的连续输注施用来施用。

[0871] 对于疾病的预防或治疗，适当的剂量可以取决于要治疗的疾病类型、一种或多种药剂的类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、施用药剂或细胞是用于预防目的还是治疗目的、先前疗法、受试者的临床病史和对药剂或细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中，将组合物一次性或在一系列治疗中合适地施用至受试者。

[0872] 细胞或药剂可以使用标准施用技术、配制品和/或装置来施用。提供用于储存和施用组合物的配制品和装置，如注射器和小瓶。关于细胞，施用可以是自体的或异源的。例如，免疫反应细胞或祖细胞可以从一名受试者获得，并且将其施用至同一受试者或不同的相容受试者。外周血来源的免疫反应细胞或其后代（例如，体内、离体或体外来源的）可以经由局

部注射施用,包括导管施用、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外施用。当施用治疗性组合物(例如,含有基因修饰的免疫应答细胞或治疗或改善神经毒性症状的药剂的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0873] 配制品包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方案中,肠胃外施用所述药剂或细胞群。如本文所用的术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送向受试者施用所述药剂或细胞群。

[0874] 在一些实施方案中,组合物是作为无菌液体制剂(例如,等渗水性溶液、悬浮液、乳液、分散液或粘性组合物)来提供,在一些方面可以将其缓冲至所选pH。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。另外,液体组合物稍微更方便施用,特别是通过注射。另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包含载体,所述载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0875] 无菌可注射溶液可以通过以下方式制备:将药剂或细胞掺入溶剂中,如掺入与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)的混合物中。

[0876] 用于体内施用的配制品通常是无菌的。可以例如通过经无菌滤膜过滤容易地实现无菌性。

B. 治疗方法和用途

[0877] 本文提供治疗方法,例如,所述方法包括施用本文所述的工程化的细胞(例如CAR表达细胞)或含有工程化的细胞(例如CAR表达细胞)的组合物中的任一种。在一些方面,还提供将本文所述的工程化的细胞(例如CAR表达细胞)或含有工程化的细胞的组合物中的任一种施用至受试者(如患有疾病或障碍的受试者)的方法。在一些方面,还提供本文所述的工程化的细胞(例如CAR表达细胞)或含有工程化的细胞的组合物中的任一种用于疾病或障碍的治疗的用途。在一些方面,还提供本文所述的工程化的细胞(例如CAR表达细胞)或含有工程化的细胞的组合物中的任一种用于制造用于疾病或障碍的治疗的药物的用途。在一些方面,还提供本文所述的工程化的细胞(例如CAR表达细胞)或含有工程化的细胞的组合物中的任一种,其用于疾病或障碍的治疗中,或者用于施用至患有疾病或障碍的受试者。

[0878] 用于过继细胞疗法的细胞的施用方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物结合使用。例如,过继T细胞治疗方法描述于例如以下文献中:Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85。参见例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0879] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病、病症或障碍的病因相关和/或参与所述病因,例如引起、加重或以其他方式参与这种疾病、病症或障碍。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如,癌症)、自身免疫性疾病或炎性疾病或者例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。示例性抗原(其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原)描述于上文中。在特定实施方案

中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性结合至与疾病或病症相关的抗原。

[0880] 疾病、病症和障碍包括肿瘤,包括实体瘤、血液恶性肿瘤和黑色素瘤,并且包括局部和转移性肿瘤;感染性疾病,如病毒或其他病原体的感染,例如HIV、HCV、HBV、CMV、HPV和寄生虫病;以及自身免疫性和炎性疾病。在一些实施方案中,疾病、障碍或病症是肿瘤、癌症、恶性肿瘤、肿瘤或其他增殖性疾病或障碍。这样的疾病包括但不限于白血病、淋巴瘤,例如,急性髓样(或髓性)白血病(AML)、慢性髓样(或髓性)白血病(CML)、急性淋巴细胞(或成淋巴细胞)白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病(HCL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、滤泡性淋巴瘤、难治性滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和多发性骨髓瘤(MM)。在一些实施方案中,疾病或病症是选自以下的B细胞恶性肿瘤:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、成人ALL、慢性成淋巴细胞性白血病(CLL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,疾病或病症是NHL,并且NHL选自侵袭性NHL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL) NOS型(从头的和从惰性转化的)、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤(TCHRBCL)、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)和/或滤泡性淋巴瘤(FL)(任选地,3B级滤泡性淋巴瘤(FL3B))。

[0881] 在一些实施方案中,疾病或病症是感染性疾病或病症,例如但不限于病毒、逆转录病毒、细菌和原生动物感染、免疫缺陷、巨细胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些实施方案中,疾病或病症是自身免疫性或炎性疾病或病症,如关节炎(例如,类风湿性关节炎(RA))、I型糖尿病、系统性红斑狼疮(SLE)、炎性肠病、银屑病、硬皮病、自身免疫性甲状腺疾病、格雷夫斯病、克罗恩病、多发性硬化症、哮喘和/或与移植相关的疾病或病症。

[0882] 在一些实施方案中,与疾病或障碍相关的抗原是或包括 α v β 6整联蛋白(α v β 6整联蛋白)、B细胞成熟抗原(BCMA)、B7-H3、B7-H6、碳酸酐酶9(CA9,也称为CAIX或G250)、癌症-睾丸抗原、癌症/睾丸抗原_{1B}(CTAG,也称为NY-ESO-1和LAGE-2)、癌胚抗原(CEA)、细胞周期蛋白、细胞周期蛋白A2、C-C基序趋化因子配体1(CCL-1)、CD19、CD20、CD22、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD123、CD133、CD138、CD171、表皮生长因子蛋白(EGFR)、截短的表皮生长因子蛋白(tEGFR)、表皮生长因子受体III型突变体(EGFR vIII)、上皮糖蛋白2(EPG-2)、上皮糖蛋白40(EPG-40)、肝配蛋白B2、肝配蛋白受体A2(EPHa2)、雌激素受体、Fc受体样蛋白5(FCRL5;也称为Fc受体同源物5或FCRH5)、胎儿乙酰胆碱受体(胎儿AChR)、叶酸结合蛋白(FBP)、叶酸受体 α 、神经节苷脂GD2、O-乙酰化GD2(OGD2)、神经节苷脂GD3、糖蛋白100(gp100)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)、G蛋白偶联受体5D(GPCR5D)、Her2/neu(受体酪氨酸激酶erb-B2)、Her3(erb-B3)、Her4(erb-B4)、erbB二聚体、人高分子量黑色素瘤相关抗原(HMW-MAA)、乙型肝炎表面抗原、人白细胞抗原A1(HLA-A1)、人白细胞抗原A2(HLA-A2)、IL-22受体 α (IL-22R α)、IL-13受体 α 2(IL-13R α 2)、激酶插入结构域受体(kdr)、 κ 轻链、L1细胞粘附分子(L1-CAM)、L1-CAM的CE7表位、含有富亮氨酸重复序列的蛋白8家族成员A(LRRC8A)、Lewis Y、黑色素瘤相关抗原(MAGE)-A1、MAGE-A3、MAGE-A6、MAGE-A10、间皮素(MSLN)、c-Met、鼠类巨细胞病毒(CMV)、粘蛋白1(MUC1)、MUC16、自然杀伤细胞2族成员D(NKG2D)配体、黑色素A(MART-1)、神经细胞粘附分子(NCAM)、癌胚胎抗原、黑色素瘤优先表

达抗原 (PRAME)、孕酮受体、前列腺特异性抗原、前列腺干细胞抗原 (PSCA)、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR1)、存活蛋白、滋养层糖蛋白 (TPBG, 也称为5T4)、肿瘤相关糖蛋白72 (TAG72)、酪氨酸酶相关蛋白1 (TRP1, 也称为TYRP1或gp75)、酪氨酸酶相关蛋白2 (TRP2, 也称为多巴色素互变异构酶、多巴色素 δ 异构酶或DCT)、血管内皮生长因子受体 (VEGFR)、血管内皮生长因子受体2 (VEGFR2)、肾母细胞瘤1 (WT-1)、病原体特有的或病原体表达的抗原、或与通用标签相关的抗原、和/或生物素化分子、和/或由HIV、HCV、HBV或其他病原体表达的分子。在一些实施方案中, 由受体靶向的抗原包括与B细胞恶性肿瘤相关的抗原, 如许多已知B细胞标记中的任一种。在一些实施方案中, 抗原是或包括CD20、CD19、CD22、ROR1、CD45、CD21、CD5、CD33、Ig κ 、Ig λ 、CD79a、CD79b或CD30。在一些实施方案中, 抗原是或包括病原体特有的或病原体表达的抗原, 如病毒抗原 (例如, 来自HIV、HCV、HBV的病毒抗原)、细菌抗原和/或寄生虫抗原。

[0883] 在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段 (例如, scFv或V_H结构域) 特异性识别抗原, 如CD19。在一些实施方案中, 抗体或抗原结合片段源自与CD19特异性结合的抗体或抗原结合片段或者是其变体。在一些实施方案中, 细胞疗法 (例如, 过继T细胞疗法) 通过自体转移进行, 其中从接受细胞疗法的受试者或从源自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备细胞。因此, 在一些方面, 细胞源自需要治疗的受试者 (例如, 患者), 并且在分离和处理后将细胞施用至同一受试者。

[0884] 可以将细胞通过任何合适的方式施用, 例如通过推注输注, 通过注射例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房注射、结膜下 (subconjunctival) 注射、结膜下 (subconjunctival) 注射、眼球筋膜囊下 (sub-Tenon) 注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜 (posterior juxtasclear) 递送。在一些实施方案中, 将它们通过肠胃外、肺内和鼻内以及 (如果局部治疗需要) 病灶内施用来施用。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。在一些实施方案中, 给定剂量通过细胞的单次推注施用来施用。在一些实施方案中, 给定剂量通过例如在不超过3天的时间段内细胞的多次推注施用, 或通过细胞的连续输注施用来施用。在一些实施方案中, 细胞剂量或任何其他疗法 (例如, 淋巴细胞清除疗法、干预疗法和/或组合疗法) 的施用是经由门诊递送进行的。

[0885] 对于疾病的预防或治疗, 适当的剂量可取决于要治疗的疾病类型、细胞或重组受体的类型、疾病的严重程度和病程、是针对预防目的还是针对治疗目的而施用细胞、先前治疗、受试者的临床病史和对细胞的反应以及主治医师的决断。在一些实施方案中, 将组合物和细胞以合适的方式一次或经一系列治疗施用至受试者。

[0886] 在一些实施方案中, 根据所提供的方法和/或用所提供的制品或组合物向受试者施用一定剂量的细胞。在一些实施方案中, 剂量的大小或时间安排根据受试者的特定疾病或病症确定。在一些情况下, 可以根据所提供的描述凭经验确定用于特定疾病的剂量的大小或时间安排。

[0887] 在一些实施方案中, 细胞的剂量包含在为或约 2×10^5 个细胞/kg与为或约 2×10^6 个细胞/kg之间, 如在为或约 4×10^5 个细胞/kg与为或约 1×10^6 个细胞/kg之间或在为或约 6×10^5 个细胞/kg与为或约 8×10^5 个细胞/kg之间。在一些实施方案中, 细胞的剂量包含不超过 2×10^5 个细胞 (例如, 抗原表达细胞, 如CAR表达细胞) /千克受试者体重 (细胞/kg), 如不超过或不超

过约 3×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 4×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 5×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 6×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 7×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 8×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 9×10^5 个细胞/kg、不超过或不超过约 1×10^6 个细胞/kg、或者不超过或不超过约 2×10^6 个细胞/kg。在一些实施方案中,细胞的剂量包含至少或至少约或为或约 2×10^5 个细胞(例如,抗原表达细胞,如CAR表达细胞)/公斤受试者体重(细胞/kg),如至少或至少约或为或约 3×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 4×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 5×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 6×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 7×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 8×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 9×10^5 个细胞/kg、至少或至少约或为或约 1×10^6 个细胞/kg、或至少或至少约或为或约 2×10^6 个细胞/kg。

[0888] 在一些实施方案中,细胞的剂量是细胞的平剂量或细胞的固定剂量,使得细胞的所述剂量无关于或不基于受试者的体表面积或体重。

[0889] 在一些实施方案中,例如,在受试者是人的情况下,剂量包括少于约 5×10^8 个总重组受体(例如CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如在约 1×10^6 到 5×10^8 个此类细胞的范围内,如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 或 5×10^8 个总此类细胞,或任两个前述值之间的范围。

[0890] 在一些实施方案中,基因工程化的细胞的剂量包含从或从约 1×10^5 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 1×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 5×10^6 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 2.5×10^6 个总CAR表达T细胞、 1×10^5 至 1×10^6 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 1×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 5×10^6 个总CAR表达T细胞、 1×10^6 至 2.5×10^6 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 1×10^7 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^6 至 5×10^6 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、 5×10^6 至 1×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^7 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^7 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^7 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^7 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 1×10^7 至 2.5×10^7 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^7 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^7 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^7 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 2.5×10^7 至 5×10^7 个总CAR表达T细胞、 5×10^7 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞、 5×10^7 至 2.5×10^8 个总CAR表达T细胞、 5×10^7 至 1×10^8 个总CAR表达T细胞、 1×10^8 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞或 2.5×10^8 至 5×10^8 个总CAR表达T细胞。

[0891] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗性干预(如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂))同时施用或按任何顺序依序施用。在一些实施方案中,将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或按任何顺序依次施用)。在一些情况下,将细胞与另一种疗法在时

间上足够接近地共施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之后施用细胞。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂包括细胞因子(例如IL-2),例如以增强持久性。在一些实施方案中,所述方法包括施用化学治疗剂。

[0892] 在一些实施方案中,所述方法包括在施用之前施用化学治疗剂(例如,调理性化学治疗剂),例如以降低肿瘤负荷。

[0893] 在一些方面,用免疫清除(例如,淋巴细胞清除)疗法预调理受试者可以改善过继细胞疗法(ACT)的效果。

[0894] 因此,在一些实施方案中,所述方法包括在开始细胞疗法之前将预调理剂施用至受试者,所述预调理剂如淋巴细胞清除剂或化学治疗剂,如环磷酰胺、氟达拉滨或其组合。例如,可以在开始细胞疗法之前至少2天(如之前至少3、4、5、6或7天),向受试者施用预调理剂。在一些实施方案中,在开始细胞疗法之前不超过7天(如之前不超过6、5、4、3或2天),向受试者施用预调理剂。

[0895] 在一些实施方案中,用环磷酰胺以在或在约20mg/kg与100mg/kg之间,如在或在约40mg/kg与80mg/kg之间的剂量对受试者进行预调理。在一些方面,用或用约60mg/kg的环磷酰胺对受试者进行预调理。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单一剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每天、每隔一天或每三天给予。在一些实施方案中,每天一次施用环磷酰胺,持续一天或两天。在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含环磷酰胺的情况下,按以下剂量向所述受试者施用环磷酰胺:在或在约100mg/m²与500mg/m²之间,如在或在约200mg/m²与400mg/m²之间或者250mg/m²与350mg/m²之间,包含端值。在一些情形中,向受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺。在一些实施方案中,可以将环磷酰胺按单一剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每天、每隔一天或每三天给予。在一些实施方案中,每天施用环磷酰胺,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始细胞疗法之前,每天向受试者施用约300mg/m²的环磷酰胺,持续3天。

[0896] 在一些实施方案中,在淋巴细胞清除剂包含氟达拉滨的情况下,按以下剂量向受试者施用氟达拉滨:在或在约1mg/m²与100mg/m²之间,如在或在约10mg/m²与75mg/m²之间、15mg/m²与50mg/m²之间、20mg/m²与40mg/m²之间或24mg/m²与35mg/m²之间,包含端值。在一些情形中,向受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨。在一些实施方案中,可以将氟达拉滨按单一剂量施用或者可以按多个剂量施用,如每天、每隔一天或每三天施用。在一些实施方案中,每天施用氟达拉滨,如持续1-5天,例如持续3至5天。在一些情形中,在开始细胞疗法之前,每天向受试者施用约30mg/m²的氟达拉滨,持续3天。

[0897] 在一些实施方案中,淋巴细胞清除剂包含药剂的组合,如环磷酰胺与氟达拉滨的组合。因此,药剂的组合可以包括按任何剂量或施用时间表(如上述那些)的环磷酰胺以及按任何剂量或施用时间表(如上述那些)的氟达拉滨。例如,在一些方面,在第一剂量或后续剂量之前,向受试者施用60mg/kg(约2g/m²)的环磷酰胺和3至5个剂量的25mg/m²氟达拉滨。

[0898] 在一些实施方案中,在施用细胞后,例如通过许多已知方法中的任一种测量工程化细胞群的生物学活性。要评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的特异性结合,其在体内例如通过成像进行评估,或离体例如通过ELISA或流式细胞术进行评估。在某些实施方案中,工程化的细胞破坏靶细胞的能力可以使用任何合适的已知方法来

测量,所述方法例如描述于例如以下文献中的细胞毒性测定:Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),以及Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在一些实施方案中,通过测定一种或多种细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量细胞的生物学活性。在一些方面,通过评估临床结果(如肿瘤负荷或负担的降低)来测量生物活性。

[0899] 在某些实施方案中,将工程化的细胞以任何数量的方式进一步修饰,使得其治疗或预防功效增加。例如,可以将群体表达的工程化的CAR或TCR直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践在本领域是已知的。参见例如,Wadwa等人,J.Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0900] 在一些实施方案中,将细胞作为组合治疗的一部分施用,如与另一种治疗性干预(如抗体或工程化细胞或受体或药剂(如细胞毒性剂或治疗剂))同时施用或按任何顺序依序施用。在一些实施方案中,将细胞与一种或多种另外的治疗剂共同施用或与另一种治疗性干预联合施用(同时或按任何顺序依次施用)。在一些情况下,将细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共施用,使得细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之前施用细胞。在一些实施方案中,在一种或多种另外的治疗剂之后施用细胞。在一些实施方案中,一种或多种另外的药剂包括细胞因子(如IL-2),例如以增强持久性。

V. 定义

[0901] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号以及其他技术和科学术语或用辞意图具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情形中,为了清楚和/或为了便于引用而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含此类定义不一定应当被解释为代表与本领域通常所理解的含义有实质性差异。

[0902] 除非上下文另有明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物。例如,“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”意指“至少一个/至少一种”或“一个或多个/一种或多种”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0903] 在整个本公开文本中,要求保护的主体的各个方面以范围形式呈现。应当理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应当被解释为对所要求保护的主体范围的不能转变的限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,在提供值的范围的情况下,应理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所述值或中间值都涵盖在所要求保护的主体内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在所述较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主体内,受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述范围包括所述限值中的之一或两者的情况下,排除那些所包括限值中的任何一个或两个的范围也被包括在所要求保护的主体内。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0904] 如本文所用的术语“约”是指容易知道的相应值的通常误差范围。本文提及“约”一值或参数时包括(并描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0905] 如本文所用,细胞或细胞群体针对特定标记呈“阳性”的陈述是指,特定标记(通常是表面标记)在细胞上或细胞中的可检测存在。当提及表面标记物时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的存在,例如通过用与所述标记物特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上与已知对所述标记物呈阳性的细胞的水平相似,和/或所述水平基本上高于已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平。

[0906] 如本文所用,细胞或细胞群体对特定标记呈“阴性”的陈述是指,特定标记(通常是表面标记)在细胞上或细胞中不存在基本上可检测的存在。当提及表面标记物时,所述术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的不存在,例如通过用与所述标记物特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中所述染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到,所述水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或所述水平基本上低于已知对所述标记物呈阳性的细胞的水平,和/或所述水平与已知对所述标记物呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0907] 如本文所用,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。它可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性的、非水性的或其任何组合。

[0908] 如本文所用,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。

VI. 示例性实施方案

[0909] 所提供的实施方案包括:

[0910] 1. 一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件和出口外壳构件,其中至少所述入口外壳构件和所述出口外壳构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地连接至气体来源,从而允许或实现将气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0911] 2. 根据实施方案1所述的外壳组件,其还包含侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成所述内部空腔。

[0912] 3. 根据实施方案1或2所述的外壳组件,其中所述连接器设置在所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件上。

[0913] 4. 根据实施方案1或2所述的外壳组件,其中所述连接器在所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件的任两者之间或所有三者之间形成。

[0914] 5. 根据实施方案1-4中任一项所述的外壳组件,其包含多个所述连接器。

[0915] 6. 根据实施方案1-5中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器是粘结式连接器、螺旋式连接器、鲁尔式连接器(例如,鲁尔锁连接器或鲁尔滑动连接器)、倒钩式连接器或其任何组合。

[0916] 7. 根据实施方案1-6中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器包含公接头或母接头。

[0917] 8. 根据实施方案1-7中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器配置为密封地接合与所述气体来源流体连通的管道。

[0918] 9. 根据实施方案1-8中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器包含一个或多个阀。

- [0919] 10.根据实施方案1-9中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器可操作地连接至包含一个或多个阀的管道。
- [0920] 11.根据实施方案1-10中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器包含一个或多个过滤器。
- [0921] 12.根据实施方案1-11中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器可操作地连接至包含一个或多个过滤器的管道。
- [0922] 13.根据实施方案11或12所述的外壳组件,其中所述一个或多个过滤器是气体过滤器,例如,空气过滤器。
- [0923] 14.根据实施方案11-13中任一项所述的外壳组件,其中所述一个或多个过滤器是无菌过滤器和/或用于通过过滤灭菌的灭菌过滤器。
- [0924] 15.根据实施方案1-14中任一项所述的外壳组件,其中所述入口外壳构件包含所述外壳组件的上盖。
- [0925] 16.根据实施方案15所述的外壳组件,其中所述上盖可拆卸地附接至所述入口外壳构件或所述侧壁构件。
- [0926] 17.根据实施方案15所述的外壳组件,其中所述上盖与所述入口外壳构件或所述侧壁构件整体形成。
- [0927] 18.根据实施方案15-17中任一项所述的外壳组件,其中所述连接器设置在所述上盖上。
- [0928] 19.根据实施方案1-18中任一项所述的外壳组件,其中所述入口外壳构件包含可操作地连接至所述内部空腔以允许将输入组合物摄入所述内部空腔中的一个或多个入口。
- [0929] 20.根据实施方案19所述的外壳组件,其中所述一个或多个入口设置在所述上盖上。
- [0930] 21.根据实施方案20所述的外壳组件,其中所述连接器和所述一个或多个入口设置在所述上盖上相同或不同位置处。
- [0931] 22.根据实施方案20或21所述的外壳组件,其中通过所述一个或多个入口的流体路径与所述上盖呈约90度的角,而通过所述连接器的流体路径与所述上盖呈约45度的角。
- [0932] 23.根据实施方案1-22中任一项所述的外壳组件,其中所述出口外壳构件包含所述外壳组件的下盖。
- [0933] 24.根据实施方案23所述的外壳组件,其中所述下盖可拆卸地附接至所述出口外壳构件或所述侧壁构件,或者其中所述下盖与所述出口外壳构件或所述侧壁构件整体形成。
- [0934] 25.根据实施方案1-24中任一项所述的外壳组件,其中所述出口外壳构件包含可操作地连接至所述内部空腔以允许或实现从所述内部空腔排出输出组合物的一个或多个出口。
- [0935] 26.根据实施方案25所述的外壳组件,其中所述一个或多个出口设置在所述下盖上。
- [0936] 27.根据实施方案26所述的外壳组件,其中所述连接器和所述一个或多个出口设置在所述下盖上相同或不同位置处。
- [0937] 28.根据实施方案27所述的外壳组件,其中通过所述一个或多个出口的流体路径

与所述下盖呈约90度的角。

[0938] 29.根据实施方案1-28中任一项所述的外壳组件,其中所述气体来源是或包含气体储器或外部环境。

[0939] 30.根据实施方案1-29中任一项所述的外壳组件,其中所述气体来源中的气体是无菌的。

[0940] 31.根据实施方案1-30中任一项所述的外壳组件,其中所述气体是空气。

[0941] 32.根据实施方案1-31中任一项所述的外壳组件,其还包含可操作地连接至所述气体来源的管道。

[0942] 33.根据实施方案32所述的外壳组件,其中所述管道配置为将所述内部空腔无菌连接至所述气体来源。

[0943] 34.根据实施方案32或33所述的外壳组件,其中所述管道包含一个或多个阀。

[0944] 35.根据实施方案32-34中任一项所述的外壳组件,其中所述管道包含一个或多个过滤器。

[0945] 36.根据实施方案1-35中任一项所述的外壳组件,其还包含一个或多个多孔构件,例如,细胞滤网或细胞筛。

[0946] 37.根据实施方案36所述的外壳组件,其包含配置为分离所述固定相与所述内部空腔的入口的第一多孔构件,其中所述第一多孔构件任选地位于所述入口外壳构件与所述侧壁构件之间。

[0947] 38.根据实施方案37所述的外壳组件,其还包含配置为分离所述固定相与所述内部空腔的出口的第二多孔构件,其中所述第二多孔构件任选地位于所述出口外壳构件与所述侧壁构件之间。

[0948] 39.根据实施方案36-38中任一项所述的外壳组件,其中所述一个或多个多孔构件具有约20 μm 的平均孔直径,或者其中所述一个或多个多孔构件包含具有约20 μm 的网目长度的网。

[0949] 40.根据实施方案1-39中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为调节或维持所述内部空腔中所述固定相的温度。

[0950] 41.根据实施方案1-40中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为将所述内部空腔中的所述固定相从起始温度(例如,室温)加热至在约35 $^{\circ}\text{C}$ 与约39 $^{\circ}\text{C}$ 之间(例如,为或为约37 $^{\circ}\text{C}$)的目标温度。

[0951] 42.根据实施方案41所述的外壳组件,其中所述温度控制构件进一步配置为将所述固定相维持在所述目标温度。

[0952] 43.根据实施方案1-42中任一项所述的外壳组件,其还包含配置为测量所述内部空腔中所述固定相的温度的温度传感器。

[0953] 44.根据实施方案43所述的外壳组件,其中所述温度传感器配置为耦合至监测/显示单元。

[0954] 45.根据实施方案1-44中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含热源。

[0955] 46.根据实施方案1-44中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件配置为可操作地连接至在所述外壳组件外部的热源。

- [0956] 47. 根据实施方案1-46中任一项所述的外壳组件,其中所述温度控制构件包含选自以下的加热元件:电加热元件、电磁感应加热元件、非电加热元件及其任何组合。
- [0957] 48. 根据实施方案47所述的外壳组件,其中所述加热元件是电加热元件。
- [0958] 49. 根据实施方案48所述的外壳组件,其中所述电加热元件包含金属板、金属棒、金属丝或其组合。
- [0959] 50. 根据实施方案47所述的外壳组件,其中所述加热元件是电磁感应加热元件。
- [0960] 51. 根据实施方案50所述的外壳组件,其中所述电磁感应加热元件包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的包围可磁化芯的感应加热线圈。
- [0961] 52. 根据实施方案47所述的外壳组件,其中所述加热元件是非电加热元件。
- [0962] 53. 根据实施方案52所述的外壳组件,其中所述非电加热元件包含加热通道,所述加热通道包含用于受热流体(例如,受热液体或气体)的入口和出口。
- [0963] 54. 根据实施方案53所述的外壳组件,其中所述加热通道是加热盘管并且所述受热流体是受热的水。
- [0964] 55. 根据实施方案54所述的外壳组件,其中用于受热的水的所述入口配置为连接至受热的水的外部储器。
- [0965] 56. 根据实施方案47-55中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置。
- [0966] 57. 根据实施方案47-56中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件设置在所述内部空腔内部,在所述内部空腔外部,或者部分在所述内部空腔内部且部分在所述内部空腔外部。
- [0967] 58. 根据实施方案47-57中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件设置在所述侧壁构件内部,在所述侧壁构件外部,或者部分在所述侧壁构件内部且部分在所述侧壁构件外部。
- [0968] 59. 根据实施方案47-58中任一项所述的外壳组件,其中所述加热元件包含包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和/或所述侧壁构件的盘管。
- [0969] 60. 一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含沿所述内部空腔的中心轴和/或在所述中心轴周围设置的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。
- [0970] 61. 一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有金属板的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。
- [0971] 62. 一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含含有加热盘管的加热元件的温度控制构件,所述加热元件配置为

向所述内部空腔中的所述固定相提供热量;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体来源,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0972] 63.根据实施方案62所述的外壳组件,其中所述加热盘管包含用于受热的水的入口和出口。

[0973] 64.根据实施方案62或63所述的外壳组件,其中所述加热盘管包围所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件。

[0974] 65.一种用于柱色谱的外壳组件,其包含:入口外壳构件、出口外壳构件和侧壁构件,其中所述入口外壳构件、所述出口外壳构件和所述侧壁构件形成配置为容纳柱色谱的固定相的内部空腔;包含配置为向所述内部空腔中的所述固定相提供热量的加热元件的温度控制构件;以及配置为将所述内部空腔可操作地且无菌地连接至气体过滤器,从而允许或实现将无菌气体摄入所述内部空腔中的连接器。

[0975] 66.根据实施方案65所述的外壳组件,其中所述气体过滤器是空气过滤器并且所述无菌气体是无菌空气。

[0976] 67.根据实施方案65或66所述的外壳组件,其还包含所述气体过滤器。

[0977] 68.一种外壳组件组,其包含多个根据实施方案1-67中任一项所述的外壳组件。

[0978] 69.根据实施方案68所述的外壳组件组,其中所述多个外壳组件中的至少两个顺序排列。

[0979] 70.根据实施方案68或69所述的外壳组件组,其中所述多个外壳组件中的至少两个平行排列。

[0980] 71.一种色谱试剂盒,其包含根据实施方案1-67中任一项所述的外壳组件或根据实施方案68-70中任一项所述的外壳组件组以及柱色谱的固定相。

[0981] 72.一种色谱柱或色谱柱组,其包含根据实施方案1-67中任一项所述的外壳组件或根据实施方案68-70中任一项所述的外壳组件组,以及一个或多个所述外壳组件的内部空腔中的柱色谱的固定相。

[0982] 73.根据实施方案71所述的色谱试剂盒或根据实施方案72所述的色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含凝胶过滤基质。

[0983] 74.根据实施方案71-73中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含亲和色谱基质。

[0984] 75.根据实施方案71-74中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含或者是非磁性材料、非铁磁性材料或非顺磁性材料。

[0985] 76.根据实施方案71-75中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含或者是选自以下的材料:纤维素膜、塑料膜、多糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、琼脂糖凝胶、多糖接枝二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮接枝二氧化硅、聚氧化乙烯接枝二氧化硅、聚(2-羟乙基天冬酰胺)二氧化硅、聚(N-异丙基丙烯酰胺)接枝二氧化硅、苯乙烯-二乙烯苯凝胶、丙烯酸酯或丙烯酰胺与二醇的共聚物、多糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的共聚物及其组合。

[0986] 77.根据实施方案71-76中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含或者是单片式基质、微粒基质和/或平面基质。

[0987] 78.根据实施方案77所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述微粒基质具

有约5 μ m至约200 μ m、约5 μ m至约600 μ m或约5 μ m至约1500 μ m的平均粒径。

[0988] 79. 根据实施方案71-78中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相具有约1nm至约500nm的平均孔径。

[0989] 80. 根据实施方案71-79中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含固定在其上的选择剂。

[0990] 81. 根据实施方案80所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂能够与一个或多个细胞的表面上的选择标记特异性结合。

[0991] 82. 根据实施方案81所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述一个或多个细胞是免疫细胞。

[0992] 83. 根据实施方案82所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述一个或多个细胞是T细胞。

[0993] 84. 根据实施方案80-83中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段;和/或所述选择剂包含抗体片段;所述选择剂是或包含Fab片段;所述选择剂选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段;所述选择剂是选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段;和/或所述选择剂是选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[0994] 85. 根据实施方案84所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂还包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[0995] 86. 根据实施方案81-85中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中:所述选择标记是T细胞共受体;所述选择标记是或包含T细胞抗原受体复合物的成员;所述选择标记是或包含CD3复合物;所述选择标记是或包含CD3链;所述选择标记是或包含CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ 链;所述选择标记是或包含CD8;所述选择标记是或包含CD4;所述选择标记是或包含CD45RA;所述选择标记是或包含CD27;所述选择标记是或包含CD28;和/或所述选择标记是或包含CCR7。

[0996] 87. 根据实施方案81-86中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂与所述选择标记之间的特异性结合不诱导至所述T细胞的信号,或者不诱导至所述T细胞的刺激或激活或增殖信号。

[0997] 88. 根据实施方案80-87中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂包含或者是抗CD3 Fab、抗CD8 Fab或抗CD4 Fab。

[0998] 89. 根据实施方案80-88中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂与所述固定相直接或间接结合。

[0999] 90. 根据实施方案80-89中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择剂经由与所述选择剂可逆结合的选择试剂与所述固定相间接结合。

[1000] 91. 根据实施方案90所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述选择试剂包含或者是可逆结合生物素、生物素类似物或其生物活性片段的链霉亲和素、抗生物素蛋白、链霉亲和素的突变蛋白;可逆结合链霉亲和素结合肽的抗生物素蛋白或链霉亲和素的突变蛋白;包含至少两个螯合基团K的试剂,其中所述至少两个螯合基团能够与过渡金属离子结合;能够与寡聚组氨酸亲和标签结合的药剂;能够与谷胱甘肽-S-转移酶结合的药剂;钙调蛋白或其类似物;能够与钙调蛋白结合肽(CBP)结合的药剂;能够与FLAG肽结合的药剂;能够与HA标签结合的药剂;能够与麦芽糖结合蛋白(MBP)结合的药剂;能够与HSV表位结合的药剂;能够与myc表位结合的药剂;或者能够与生物素化的载体蛋白结合的药剂。

[1001] 92. 根据实施方案71-91中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其还包含能够在一个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂。

[1002] 93. 根据实施方案92所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含所述一种或多种刺激剂中的至少一种。

[1003] 94. 根据实施方案93所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述至少一种刺激剂是第一刺激剂,并且所述色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组还包含能够增强、减弱或修饰所述第一刺激剂的刺激信号的一种或多种第二刺激剂。

[1004] 95. 根据实施方案94所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第二刺激剂中的至少一种能够与所述一个或多个T细胞上的共刺激分子(例如,CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM)特异性结合。

[1005] 96. 根据实施方案94或95所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述固定相包含所述一种或多种第二刺激剂中的至少一种。

[1006] 97. 根据实施方案92-96中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述刺激信号是经由T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中的含CD3复合物和/或T细胞中的含ITAM分子。

[1007] 98. 根据实施方案92-97中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中:

[1008] 所述一种或多种刺激剂是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段;和/或所述一种或多种刺激剂包含抗体片段;所述一种或多种刺激剂是或包含Fab片段;所述一种或多种刺激剂选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段;所述一种或多种刺激剂是选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段;和/或所述刺激剂是选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[1009] 99. 根据实施方案92-98中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所

述刺激剂还包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[1010] 100.根据实施方案94-99中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中:所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地是或包含选自以下的药剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性结合分子、含有Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、MHC分子、MHC-肽复合物;受体配体;及其结合片段;和/或所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地包含抗体片段;所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地是或包含Fab片段;所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地选自由F(ab')₂片段和二价单链Fv(scFv)片段组成的二价抗体片段;所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地是选自Fab片段、Fv片段和scFv的单价抗体片段;和/或所述第一刺激剂和第二刺激剂独立地是选自以下的具有抗体样结合特性的蛋白质性结合分子:适体、基于脂质运载蛋白家族的多肽的突变蛋白、格鲁体、基于锚蛋白支架的蛋白质、基于结晶支架的蛋白质、阿德奈汀蛋白和阿维莫蛋白。

[1011] 101.根据实施方案100所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第一刺激剂是抗CD3 Fab,并且所述第二刺激剂是抗CD28 Fab。

[1012] 102.根据实施方案94-101中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,其中所述第一刺激剂和所述第二刺激剂独立地还包含生物素;与链霉亲和素或抗生物素蛋白可逆结合的生物素类似物;选自以下的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:15)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 和Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:19);与钙调蛋白可逆结合的钙调蛋白结合肽;与结合FLAG肽的抗体可逆结合的FLAG肽;以及与结合寡聚组氨酸标签的抗体可逆结合的寡聚组氨酸标签。

[1013] 103.一种装置,其包含根据实施方案1-67中任一项所述的外壳组件、根据实施方案68-70中任一项所述的外壳组件组或者根据实施方案71-102中任一项所述的色谱试剂盒、色谱柱或色谱柱组,所述装置还包含经由入口外壳构件的入口可操作地连接至内部空腔的输入组合物储器。

[1014] 104.根据实施方案103所述的装置,其中所述输入组合物包含或者是血液或血液源样品。

[1015] 105. 根据实施方案104所述的装置, 其中所述输入组合物包含或者是全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞 (PBMC) 样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。

[1016] 106. 根据实施方案105所述的装置, 其中所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的或者从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。

[1017] 107. 根据实施方案103-106中任一项所述的装置, 其还包含经由所述出口外壳构件的出口可操作地连接至所述内部空腔的输出组合物储器。

[1018] 108. 根据实施方案107所述的装置, 其中所述输出组合物包含或者是富集的T细胞。

[1019] 109. 根据实施方案108所述的装置, 其中所述富集的T细胞已经在所述色谱柱上进行色谱期间经历刺激。

[1020] 110. 根据实施方案103-109中任一项所述的装置, 其位于封闭或无菌系统中。

[1021] 111. 一种制备色谱柱或色谱柱组的方法, 所述方法包括将固定相引入根据实施方案1-67中任一项所述的外壳组件或根据实施方案68-70中任一项所述的外壳组件组中。

[1022] 112. 一种制备色谱柱或色谱柱组的方法, 所述方法包括将根据实施方案71和73-102中任一项所述的色谱试剂盒的固定相引入所述色谱试剂盒的外壳组件或外壳组件组中。

[1023] 113. 一种T细胞的柱上刺激的方法, 所述方法包括:

[1024] 在根据实施方案72-102中任一项所述的色谱柱或色谱柱组中将包含多个T细胞的样品与一种或多种刺激剂一起孵育, 以在所述多个T细胞的一个或多个T细胞中递送刺激信号, 其中所述多个T细胞固定在固定相上,

[1025] 从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[1026] 114. 根据实施方案113所述的方法, 其中所述固定相包含与所述一个或多个T细胞的表面上的选择标记特异性结合的选择剂。

[1027] 115. 根据实施方案114所述的方法, 其中所述选择剂与由所述一个或多个T细胞表达的选择标记的特异性结合实现将所述一个或多个T细胞固定在所述固定相上。

[1028] 116. 根据实施方案113-115中任一项所述的方法, 其还包括:

[1029] 在所述孵育开始之后, 从所述固定相收集所述一个或多个T细胞。

[1030] 117. 根据实施方案116所述的方法, 其中所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。

[1031] 118. 根据实施方案116或117所述的方法, 其中所述一个或多个T细胞是通过重力流从所述固定相收集。

[1032] 119. 根据实施方案116-118中任一项所述的方法, 其中所述收集步骤在不添加用于从所述固定相洗脱所述多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。

[1033] 120. 一种T细胞的柱上刺激的方法, 所述方法包括: (a) 将包含多个T细胞的样品添加至根据实施方案72-102中任一项所述的色谱柱或色谱柱组中的固定相, 所述固定相包含与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上的选择标记结合的选择剂, 从而将所述多个T细胞中的一个或多个固定在所述固定相上; 以及 (b) 向所述色谱柱或色谱柱组中的固定相添加包含能够在所述多个T细胞中的一个或多个中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激

试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[1034] 121.一种T细胞的柱上刺激的方法,所述方法包括:(a)组合(i)包含多个T细胞的样品与(ii)根据实施方案71和73-102中任一项所述的色谱试剂盒中的固定相,所述固定相包含能够与所述多个T细胞中的一个或多个的表面上表达的选择标记特异性结合的选择剂,其中所述选择剂与选择标记的特异性结合实现将所述多个T细胞固定在所述固定相上;以及(b)向所述固定相添加包含能够在T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂的刺激试剂,从而开始将所述刺激试剂与所述一个或多个T细胞一起孵育,其中所述组合步骤和/或所述添加步骤在所述色谱试剂盒的色谱柱或色谱柱组的内部空腔的内部或外部进行,从而生成包含刺激的T细胞的组合物作为所述色谱柱或色谱柱组的输出组合物。

[1035] 122.根据实施方案120或121中任一项所述的方法,其还包括:在所述孵育开始之后,从所述固定相收集所述一个或多个T细胞。

[1036] 123.根据实施方案122所述的方法,其中所述一个或多个T细胞是在开始所述孵育的24小时内从所述固定相收集的。

[1037] 124.根据实施方案122或123所述的方法,其中所述一个或多个T细胞是通过重力流从所述固定相收集。

[1038] 125.根据实施方案122-124中任一项所述的方法,其中所述收集步骤在不添加用于从所述固定相洗脱所述多个T细胞的竞争剂或游离结合剂的情况下进行。

[1039] 126.根据实施方案113-125中任一项所述的方法,其中所述刺激剂包含或者是含有以下的寡聚刺激试剂:(i)多个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白分子,以及(ii)能够在—个或多个T细胞中递送刺激信号的一种或多种刺激剂,其中所述寡聚刺激试剂的大小包含i)大于50nm的半径,ii)至少 5×10^6 g/mol的分子量;和/或(iii)每个寡聚刺激试剂至少100个链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白四聚体。

[1040] 127.根据实施方案126所述的方法,其中:按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;或者按照链霉亲和素在SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列中的位置,所述链霉亲和素突变蛋白在对应于位置44至47的序列位置包含氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。

[1041] 128.根据实施方案113-127中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件将所述固定相的温度调节至在约35℃与约39℃之间的目标温度。

[1042] 129.根据实施方案113-128中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述温度控制构件将固定相的温度维持在约35℃与约39℃之间的目标温度。

[1043] 130.根据实施方案128或129所述的方法,其中所述目标温度是37℃或约37℃。

[1044] 131.根据实施方案113-130中任一项所述的方法,其中在所述孵育的至少一部分期间,所述连接器允许将气体摄入所述内部空腔中。

[1045] 132.根据实施方案131所述的方法,其中所述气体是无菌的并且是或包含空气。

[1046] 133.根据实施方案131或132所述的方法,其中将气体摄入所述内部空腔中在所述孵育期间是间歇的或连续的。

[1047] 134.根据实施方案113-133中任一项所述的方法,其还包括用介质洗涤所述固定

相,所述介质不包含用于从所述固定相洗脱所述T细胞的竞争剂或游离结合剂。

[1048] 135.根据实施方案113-134中任一项所述的方法,其还包括孵育包含刺激的T细胞的所述组合物。

[1049] 136.根据实施方案135所述的方法,其中:

[1050] 所述进一步孵育是在为或约 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 进行;和/或

[1051] 所述进一步孵育是在能够将信号递送至T细胞的另一药剂的存在下进行。

[1052] 137.根据实施方案136所述的方法,其中所述另一药剂能够增强或诱导T细胞、CD4⁺ T细胞和/或CD8⁺ T细胞的增殖。

[1053] 138.根据实施方案136或137所述的方法,其中所述另一药剂是选自IL-2、IL-15和IL-7的细胞因子。

[1054] 139.根据实施方案134-138中任一项所述的方法,其还包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含刺激的T细胞的所述组合物。

[1055] 140.根据实施方案113-141中任一项所述的方法,其还包括选择和/或刺激所述刺激的T细胞。

[1056] 141.根据实施方案113-140中任一项所述的方法,其还包括将重组核酸分子引入所述组合物的刺激的T细胞中,其中所述核酸分子编码重组蛋白,从而产生包含转导的T细胞的组合物。

[1057] 142.根据实施方案141所述的方法,其中所述重组蛋白是抗原受体。

[1058] 143.根据实施方案142所述的方法,其中所述重组蛋白是嵌合抗原受体。

[1059] 144.根据实施方案143所述的方法,其中所述嵌合抗原受体(CAR)包含与靶抗原特异性结合的细胞外抗原识别结构域和包含ITAM的细胞内信号传导结构域。

[1060] 145.根据实施方案144所述的方法,其中所述CAR还包含连接所述细胞外结构域与所述细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。

[1061] 146.根据实施方案141-145中任一项所述的方法,其中所述重组核酸的引入是通过用病毒颗粒转导来实现。

[1062] 147.根据实施方案141-146中任一项所述的方法,其中在所述孵育之前、期间或之后将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。

[1063] 148.根据实施方案147所述的方法,其中在所述孵育期间将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。

[1064] 149.根据实施方案147所述的方法,其中在所述孵育之后将所述重组核酸引入所述刺激的T细胞中。

[1065] 150.根据实施方案141-149中任一项所述的方法,其还包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含所述转导的T细胞的组合物。

[1066] 151.根据实施方案141-150中任一项所述的方法,其还包括在用于病毒整合的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物,从而产生包含培育的T细胞的组合物。

[1067] 152.根据实施方案141-151中任一项所述的方法,其还包括在用于扩增T细胞的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物。

[1068] 153.根据实施方案141-151中任一项所述的方法,其还包括在基本上不扩增T细胞的条件下培育包含转导的细胞的所述组合物。

[1069] 154. 根据实施方案141-153中任一项所述的方法, 其还包括将竞争剂或游离结合剂添加至包含培育的T细胞的所述组合物。

[1070] 155. 根据实施方案113-154中任一项所述的方法, 其还包括配制所述输出组合物的细胞用于低温保存和/或施用至受试者, 任选地在药学上可接受的赋形剂的存在下进行。

[1071] 156. 根据实施方案155所述的方法, 其中在低温保护剂的存在下配制所述输出组合物的细胞。

[1072] 157. 根据实施方案113-156中任一项所述的方法, 其中所述方法的至少一个或所有步骤在封闭系统中进行, 任选地其中所述封闭系统是自动化的。

[1073] 158. 根据实施方案113-157中任一项所述的方法, 其中所述样品是或包含全血样品、血沉棕黄层样品、外周血单个核细胞(PBMC)样品、未分级T细胞样品、淋巴细胞样品、白细胞样品、单采术产物或白细胞单采术产物。

[1074] 159. 根据实施方案158所述的外壳组件, 其中所述单采术或白细胞单采术产物是从受试者新鲜分离的。

[1075] 160. 根据实施方案158所述的外壳组件, 其中所述单采术或白细胞单采术产物是从低温保存的单采术或白细胞单采术产物解冻。

VII. 实施例

[1076] 以下实施例仅出于说明性目的而被包括, 并且不意图限制本发明的范围。

实施例1: 用于制备包含链霉亲和素突变蛋白的抗CD3/抗CD28Fab缀合的寡聚试剂的方法。

[1077] 通过聚合示例性链霉亲和素突变蛋白来制备寡聚试剂, 所述链霉亲和素突变蛋白命名为STREP-TACTIN®M2 (含有SEQ ID NO:6所示突变蛋白氨基酸序列的链霉亲和素同源四聚体, 参见例如美国专利号6,103,493; 以及Voss和Skerra (1997) Protein Eng., 1: 975-982; 以及Argarana等人 (1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882)。为了制备用于寡聚化的链霉亲和素突变蛋白, 将含有一个或多个反应性硫醇基的链霉亲和素突变蛋白与马来酰亚胺激活的链霉亲和素突变蛋白一起孵育。为了制备硫醇化的链霉亲和素突变蛋白, 通过在总体积为2.6mL的100mM硼酸盐缓冲液中与2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐以1:100的摩尔比在约8.5的pH下在24℃下一起孵育1小时, 将约100mg链霉亲和素突变蛋白硫醇化。对于激活反应, 在总体积为约10.4mL的磷酸钠缓冲液中将约400mg链霉亲和素突变蛋白与琥珀酰亚胺基-6-[(β-马来酰亚胺基丙酰胺基) 己酸酯 (SMPH) 以1:2的摩尔比在约7.2的pH下在24℃下一起孵育1小时。协调硫醇化和激活反应以在大致相同的时间开始, 并控制所述反应的持续时间。

[1078] 在反应后, 通过用PD-10脱盐柱 (GE Healthcare) 单独进行样品的凝胶过滤, 从样品去除2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐和SMPH。对于每2.5mL体积的样品, 平衡1mL PD-10柱并加载硫醇化突变蛋白链霉亲和素或马来酰亚胺突变蛋白链霉亲和素, 并且通过添加3.5mL偶联缓冲液 (100mM NaH₂P₄, 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.2) 进行洗脱。在4个柱上进行马来酰亚胺突变蛋白链霉亲和素的凝胶过滤以占据>10mL体积, 并合并洗脱物。谨慎控制激活和硫醇化反应的时间安排以及激活和硫醇化反应的结束与寡聚化反应的开始之间的时间安排。通常, 从凝胶过滤的开始 (即, 激活和硫醇化反应的结束) 至开始寡聚化反应时, 允许经过不超过十分钟。

[1079] 对于寡聚化,然后将马来酰亚胺链霉亲和素突变蛋白和硫醇化链霉亲和素突变蛋白样品组合为约17.5mL的总体积并在7.2的pH下在24℃下在约600rpm的搅拌条件下孵育1小时。因为与SMPH一起孵育的链霉亲和素突变蛋白是与2-亚氨基硫杂环戊烷盐酸盐一起孵育的链霉亲和素突变蛋白的四倍,在寡聚化反应期间,硫醇化链霉亲和素突变蛋白与马来酰亚胺链霉亲和素突变蛋白的摩尔比为1:4。在反应后,通过与N-乙基马来酰亚胺(NEM)在24℃搅拌(约600rpm)下一起孵育15min,之后在4℃下一起再孵育16-20小时,使寡聚化的链霉亲和素突变蛋白试剂的剩余SH基团饱和。

[1080] 在与NEM一起孵育后,将含有寡聚化的链霉亲和素突变蛋白的样品离心,并将上清液经由0.45μm膜(Millex-HP 0.45μm,来自Merck Millopore)过滤。然后将过滤的溶液加载至柱(Sephacryl S-300HR HiPrep 26/60,GE Healthcare)中,用于使用AKTA Explorer色谱系统(GE Healthcare)进行尺寸排阻色谱(SEC)。合并毫吸光度单位(mAU)大于或等于1500mAU的级分。

[1081] 将含有寡聚链霉亲和素突变蛋白的合并样品用100mM羟胺在6.35的pH下在室温下处理15分钟。为了在处理去除羟胺,将样品加载至PD10柱(每个柱2.5mL)上并用3.5mL含有100mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、1mM EDTA的缓冲液(pH 7.2)洗脱。将PD10洗脱液合并,并用0.45μm过滤器之后用0.22μm过滤器进行无菌过滤,然后将样品冷冻并储存于-80℃下。在冷冻前,测量寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的终浓度,并通过动态光散射(DLS)确定寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的大小。

[1082] 为了评价寡聚化过程的一致性,使用上述方法从五批不同的链霉亲和素突变蛋白(SAM)制备10种寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂。评估寡聚物的平均大小、产率百分比(通过测量在280nm处的吸光度来确定,不进行基线校正)和活性(生物素结合),并且将结果显示于表E1中。结果表明,所得寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的这些参数是一致的,其中平均半径为97nm±10nm,并且生物素结合为40nmol/mg±3nmol/mg。

表E1:来自不同批次的寡聚化的STREP-TACTIN的比较。

	SAM批号	半径 (nm)	产率 (%)	生物素结合 (nmol/mg)
批次1	1	92	74	41
批次2	2	100	68	40
批次3	2	106	82	37
批次4	2	94	73	39
批次5	3	87	79	41
批次6	3	90	81	39
批次7	4	97	84	43
批次8	4	97	76	43
批次9	5	102	85	42
批次10	5	87	63	42

[1083] 通过用HPLC系统(AGILENT 1100和Wyatt ECLIPSE DUALTEC)和UV检测(Agilent UV检测器,与MALLS DAWN HELEOS(Wyatt)偶联)进行的不对称流动场流分离(AF4)测量如上所述生成的三种寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的平均分子量(MW)。通过AF4进行测量允许计算每个寡聚试剂中链霉亲和素突变蛋白四聚体的平均数量,假定链霉亲和素突变蛋白四

聚体的平均分子量为52,500g/mol (52.5kDa) (表E2)。

表E2:寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的大小和分子量

半径 (nm)	MW (g/mol)	四聚体的数量
102	1.65×10^8	3150
82	1.08×10^8	2050
92	1.26×10^8	2280

[1084] 通过与如上所述生成的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂可逆结合,将刺激剂(抗CD3和抗CD28 Fab片段)多聚化。抗CD3和抗CD28 Fab片段经由与每个Fab片段融合的链霉亲和素肽结合配偶体与链霉亲和素突变蛋白寡聚物可逆地结合。抗CD3 Fab片段源自杂交瘤细胞系OKT3(ATCC®CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549)产生的CD3结合单克隆抗体,并且含有Arakawa等人J.Biochem.120,657-662(1996)中所述的抗CD3抗体OKT3的重链可变结构域和轻链可变结构域。这些序列分别示于SEQ ID NO:31和32中。抗CD28 Fab片段源自抗体CD28.3(作为合成单链Fv构建体以GenBank登录号AF451974.1存放;还参见Vanhove等人,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页),并且含有分别示于SEQ ID NO:33和34中的抗CD28抗体CD28.3的重链和轻链可变结构域。Fab片段在其重链的羧基端与链霉亲和素肽结合序列单独融合,所述链霉亲和素肽结合序列含有顺序排列的两个链霉亲和素结合模块,所述结合模块具有氨基酸序列SAWSHPQFEKGGGSGGSGGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16)。肽标记的Fab片段是重组产生的(参见国际专利申请公开号WO 2013/011011和WO 2013/124474)。

[1085] 为了实现可逆结合,将肽标记的抗CD3和抗CD28 Fab片段与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂在大约室温下混合,从而将所述片段经由Fab片段上的twin-strep-tag之间的相互作用与所述试剂可逆地结合,所述twin-strep-tag是能够可逆地结合至所述试剂上的结合位点的结合配偶体。在一些情况下,将肽标记的Fab片段在固定至寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂上之前预混合,这在一些情况下可以导致不同Fab分子更均匀的分布。肽标记的抗CD3和抗CD28与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂的结合可以通过添加D-生物素而被破坏或逆转。D-生物素与所述药剂上的strep-tag竞争结合至链霉亲和素突变蛋白上的结合配偶体,从而破坏结合。

实施例2:对与链霉亲和素突变蛋白寡聚物可逆结合的寡聚化的抗CD3和抗CD28Fab片段的活性评估。

[1086] 评估通过实施例1中所述过程与来自表E1中所述每个批次的各种寡聚链霉亲和素试剂可逆结合的抗CD3和抗CD28 Fab片段刺激T细胞的能力。这些寡聚链霉亲和素试剂的平均半径为约95nm。通过比色法监测稳定四唑盐WST-1切割为可溶甲臍(formazan)染料复合物来评估细胞的代谢活性作为细胞增殖的指示物。

[1087] 将来自三名不同供体的T细胞与可逆结合在寡聚链霉亲和素试剂上的抗CD3/抗CD28多聚化Fab片段一起孵育。还将细胞与对照寡聚试剂一起孵育,所述对照寡聚试剂的平均半径为101nm(内部参考)或36nm,它也与抗CD3/抗CD28 Fab片段可逆地结合。

[1088] 在孵育后,将WST-1试剂施加至细胞,并且通过测量作为读出的在450nm下的吸光度来评估代谢活性的水平。将结果针对所测定培养物中的细胞数量进行归一化,并且描绘为WST-1与细胞数量的比率。

[1089] 如图3B中所示,用所测试的每种试剂刺激的T细胞的平均WST-1活性(WST比率)是相当的。此外,刺激程度对于所测试的所有试剂是相似的,并且与大小类似的内部参考试剂相当(差异通常在 ± 2 个标准差内)。图3A显示每种试剂的描绘为单独数据点的WST-1活性(WST比率)。图3A和图3B表明,如通过WST-1活性所观察,使用在较小36nm寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂骨架上多聚化的抗CD3/抗CD28 Fab时,对T细胞的刺激较低。

实施例3:经由柱色谱对T细胞的选择和刺激。

[1090] 柱上T细胞选择和刺激是经由柱色谱来进行,并且收集选择并刺激的T细胞,如下文所详述。柱上T细胞选择和刺激的示例性过程显示于图4中。

[1091] A. 柱制备。

[1092] 使用Sephadex®G-50 (Sigma) 作为固定相,并且使用溴化氰(CNBr) 方法将其与Strep-tactin®M2 (SEQ ID NO:6) 共价偶联用于柱激活。Sephadex®G-50树脂的50%悬浮液含有每mL树脂珠悬浮液大约70 μ g共价偶联的Strep-tactin®。

[1093] 在将Strep-tactin®固定至Sephadex®G-50树脂上之后,将固定有Strep-tactin®的Sephadex®G-50的2mL悬浮液与10 μ g对T细胞表面选择标记具有特异性的选择剂在4℃一起孵育20min。所述选择剂包含抗CD3 Fab片段。CD3结合Fab片段源自杂交瘤细胞系OKT3 (ATCC®CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549) 产生的CD3结合单克隆抗体,并且含有Arakawa等人,J.Biochem.120,657-662 (1996) 中所述抗CD3抗体OKT3的重链可变结构域(SEQ ID NO:31) 和轻链可变结构域(SEQ ID NO:32)。在这个实施例中,CD3结合Fab片段的重链在羧基端与含有顺序排列的两个链霉亲和素结合模块的TwinStrep-Tag® (SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK,SEQ ID NO:16) 融合,从而促进CD3结合Fab片段与所述树脂上固定的Strep-tactin®的结合。

[1094] 然后将树脂悬浮液填充至在底部具有90微米筛板的加热/气体柱中。此实施例中使用的加热/气体柱与参考柱的不同之处在于,所述加热/气体柱包含加热元件和供气元件。加热元件包含具有用于外部热水供应的入口和出口的加热盘管,并且供气元件包含用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器(参见例如,图1A和图1B)。将加热/气体柱用含有0.5%牛血清白蛋白的PBS(磷酸盐缓冲盐水)(PBSA缓冲液)平衡以得到1mL床体积。将加热/气体柱用于T细胞选择和刺激,之后如下文所述从所述柱收集所述T细胞。

[1095] B. 柱上选择和刺激

[1096] 将来自人供体的单采术样品加载至亲和柱上,并且允许样品中的CD3⁺ T细胞与固定在树脂上的CD3结合Fab片段相互作用。将所述柱用PBSA缓冲液洗涤两次以去除没有与固定的CD3结合Fab片段相互作用的细胞。从将样品加载至柱上起大约15分钟后,通过向柱上加载在3mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中的至少400 μ g上文实施例1和实施例2中所述的抗CD3/抗CD28寡聚试剂(与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂可逆结合的多聚化的抗CD3 Fab片段和抗CD28 Fab片段刺激剂) 将刺激试剂添加至柱,并且在所述柱上在用于刺激细胞的条件下孵育细胞。在孵育期间,柱的加热元件将通过加热盘管的水的温度维持至约37℃的温度,并且气体交换元件在孵育期间连接的开放的无菌过滤器的控制下供应空气。

[1097] 在将寡聚试剂添加至柱之后,将柱内容物加热至37℃并且在整个激活过程期间维

持所述温度。始终通过温度传感器监测柱内温度。在整个选择程序过程中使用无菌过滤器作为无源元件持续进行气体交换。

[1098] 在与抗CD3/抗CD28寡聚试剂一起孵育期间,所选CD3⁺ T细胞通过激活诱导的脱附(AID)从柱自发脱附,不需要添加竞争试剂以破坏细胞与树脂之间的结合。在添加刺激试剂后大约4.5小时内,在单一步骤中通过使大约80mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基通过柱而从柱收集自发脱附的细胞,并且通过重力流收集所述细胞。在通过重力流收集细胞之前,不向柱添加其他竞争物质以破坏所述细胞在柱上的结合。

[1099] 确定在使用热/气柱进行柱上选择和刺激后收集的CD3⁺ T细胞的数量并与理论估计值、对照组以及通过类似过程但使用不含加热元件和供气元件的参考柱收集的细胞(即,将细胞在参考柱中在室温下孵育,在细胞与外部环境之间不进行空气交换)进行比较。在对照组中,将单采术样品加载至标准抗CD3亲和柱上以供选择CD3⁺ T细胞,但是不在抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的存在下孵育细胞;在4.5小时后,添加D-生物素以破坏抗CD3 Fab的TwinStrep-Tag®与树脂上的Strep-tactin®之间的结合,从而从柱树脂释放所选CD3⁺ T细胞。

[1100] 结果显示于图5中,其中估计值(灰色条形)是假定100%效率下可以洗脱的捕获细胞的理论数量。如图5中所示,使用具有加热元件和供气元件的热/气柱的洗脱效率是使用参考柱的洗脱效率的大约两倍。图5中的结果表明,如与参考柱相比,具有加热元件和供气元件的热/气柱支持柱上T细胞选择以及显著更有效地从树脂收集刺激的T细胞。另外,热/气柱实现如与对照组相比类似的T细胞回收,但是不需要另外的竞争物质来破坏结合。因此,热/气柱可以用于显著缩短T细胞选择和/或刺激所需的时间,同时维持选择并刺激的T细胞的高回收率。

实施例4:在经由柱色谱进行选择 and 刺激期间和之后对T细胞的分析。

[1101] 柱上T细胞选择和刺激如实施例3中所述使用具有加热元件和供气元件的柱来进行。将来自人供体的单采术样品作为起始材料加载至具有加载CD3 Fab的树脂的亲和柱上,之后添加基本上如实施例3中所述的抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂。在不添加如实施例3中所述的竞争剂的情况下,将选择并刺激的细胞在重力流下收集至培养袋中。

[1102] 分析起始材料、阴性级分(在加载刺激试剂之前洗涤的未结合的细胞)或阳性级分(通过实施例3中所述的过程收集的细胞)中的细胞。将所述细胞用识别表面标记(包括CD3、CD4、CD8、CD45和CD14)的抗体染色并通过流式细胞术定量。排除碎片并针对CD45⁺活细胞对样品进行预门控。

[1103] 流式细胞术结果显示于图6中,其中起始样品中所有CD3⁺细胞的约64%被富集且存在于阳性级分中,并且其余细胞存在于阴性级分中。在阳性级分中的细胞中,大于94%的细胞是CD4⁺和CD8⁺ T细胞。

[1104] 将收集至培养袋中的细胞在37℃下在含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中进一步孵育长达3天。在孵育期间,不添加寡聚刺激试剂;然而,不添加另外的刺激试剂。

[1105] 在用识别CD3、CD4、CD8以及激活标记CD69和CD25的抗体将细胞染色后,在随后的孵育期间的第1天、第3天和第3天,通过流式细胞术监测细胞的细胞数量和细胞表面表达。如图7A中所示,在第3天98.8%的培养的细胞是CD3⁺,并且在大多数T细胞中还观察到激活标记CD25和CD69的表面表达。与从柱收获时相比,CD3⁺细胞的纯度在第3天升高,同时维持

CD4:CD8 T细胞的比率。对随后的孵育之后的细胞数量和倍数扩增的评估显示,在第3天,选择并刺激的T细胞表达激活标记并且数量已经开始增加,与所述细胞增殖的能力一致(图7B)。这些结果证实,在通过实施例3中所述的柱上过程选择和刺激后直接从柱收集的T细胞展现支持其在培养中的持续增殖的特征。

实施例5:来自低温保存的单采术起始样品的T细胞的柱上选择。

[1106] 柱上T细胞选择基本上如实施例3中所述来进行,但使用低温保存的单采术样品作为起始样品。低温保存的单采术样品通常具有高单核细胞含量(大于20%)。将结果与对新鲜单采术样品进行的过程相比较。对于多个不同供体,低温保存的单采术样品和新鲜单采术样品的单核细胞含量(活CD45+细胞%)显示于图8A中。

[1107] 将起始材料和从柱收集的阳性级分中富集的细胞用识别CD3和CD14(单核细胞标记)的抗体染色并通过流式细胞术定量。图8B描绘在起始材料和阳性级分中对CD3或CD14呈阳性的细胞的百分比。如所示,尽管起始材料中的单核细胞含量高,阳性级分得到94%纯度的CD3+ T细胞,仅检测到1%CD14+单核细胞,这表示单核细胞:T细胞比率从0.33降至0.01。使用色谱柱选择的T细胞的数量显示于图8C中。

实施例6:使用顺序或平行柱对T细胞的选择和刺激。

[1108] 柱上T细胞选择和刺激基本上如实施例3中所述使用具有加热元件和供气元件的柱来进行,所述柱中固定了抗CD3 Fab片段以供选择细胞。在一项研究中,选择和刺激是在包括顺序排列两个相同的柱的系统中进行,而在另一项研究中,选择和刺激是在具有平行排列的两个相同的柱的系统中进行(参见图9)。在每项研究中,将大约1/5的来自同一供体的单采术样品加载至柱的每个系统中作为起始材料。

[1109] 将起始材料、阴性级分和阳性级分用识别包括CD3、CD4、CD8和CD14的表面标记的抗体染色并通过流式细胞术定量。流式细胞术结果显示于图10A中。如所示,通过任一策略实现CD3+ T细胞的类似富集。

[1110] 将来自阳性级分的细胞(通过实施例3中所述的过程但使用平行或顺序柱收集的细胞)收获至培养袋中,并且将从每项研究收集的细胞在37℃下在含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中孵育长达6天。在孵育期间,不添加寡聚刺激试剂;然而,不添加另外的抗CD3/抗CD28刺激试剂。

[1111] 在用识别CD3、CD4、CD8和激活标记CD69和CD25的抗体对细胞进行染色后,在孵育期间的第0天、第1天、第2天、第3天和第6天,通过流式细胞术监测细胞的细胞数量和细胞表面表达。如图10B左小图中所示,来自每项色谱研究的细胞在第1天展现类似的激活标记的表达,并且在孵育期间细胞数量类似地开始增加。运行1(■)和运行2(●)中细胞数量的代表性结果显示于图10B右小图中。

[1112] 这些结果表明,顺序或平行柱色谱可以用于T细胞的柱上选择和刺激。

实施例7:来自浓缩血液的T细胞的柱上选择和刺激。

[1113] 柱上T细胞选择和刺激基本上如实施例3中所述来进行,但使用浓缩血液样品作为起始样品。另外,使用基本上如实施例6中所述的系统进行平行的CD3选择和刺激。将凝血细胞含量下降的轻度浓缩的全血和血清在PBSA缓冲液中以1:1预稀释。未进行红细胞裂解。将160mL(80mL/柱)稀释的样品加载至各自含有4mL加载CD3 Fab的树脂的两个平行柱上,洗涤柱,然后将抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂添加至每个柱。

[1114] 将来自CD3⁺ T细胞选择的起始材料、阴性级分和阳性级分中的细胞用识别表面标记(包括CD45、CD3、CD4、CD8和CD14)的抗体染色并通过流式细胞术定量。流式细胞术结果显示于图11A中。如所示,阳性级分中的细胞(通过实施例3中所述的过程使用两个平行柱收集的细胞)显示CD3⁺ T细胞的高度富集,且CD3⁺ T细胞的纯度大于93%。

[1115] 将来自阳性级分的细胞(通过实施例3中所述的过程但使用平行柱收集的细胞)收获至培养袋中,并且在37℃下在含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中孵育长达6天。在孵育期间,不添加寡聚刺激试剂;然而,不添加另外的抗CD3/抗CD28刺激试剂。在随后的孵育开始后72小时监测细胞的CD4和CD8以及激活标记CD69和CD25的细胞表面表达。如图11A中所示,在随后的孵育之前所得细胞维持阳性级分中存在的CD4和CD8 T细胞的比率(比较图11A和图11B左小图的阳性级分),并且大多数细胞对激活标记CD25和/或CD69呈阳性(图11B,右小图)。

实施例8:直接从全血选择T细胞。

[1116] 通过与实施例3中所述使用Sephadex® G-50作为树脂类似的过程,将琼脂糖树脂(100μl树脂)用Strep-tactin® 功能化,用于固定在羧基端与Twin Strep-Tag® (SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK, SEQ ID NO:16)融合的抗CD3 Fab片段。将1mL新鲜的未稀释的血液抽取物加载至柱上。未进行红细胞裂解。洗涤柱并收集阴性级分。添加D-生物素以破坏抗CD3 Fab的Twin Strep-Tag® 与树脂上的Strep-tactin® 之间的结合,从而在阳性级分中从柱树脂释放选择的CD3⁺ T细胞。

[1117] 将来自CD3⁺ T细胞选择的起始材料、阴性级分和阳性级分用碘化丙啶(PI)和CD3抗体染色并通过流式细胞术定量。流式细胞术结果显示于图12中。如与新鲜的未稀释的全血中0.182%CD3⁺细胞相比,阳性级分含有>80%CD3⁺细胞。此结果支持直接从新鲜血液进行柱上T细胞选择的可行性。

[1118] 结果表明,用全血样品进行柱上T细胞选择表现良好。

实施例9:经由柱色谱对T细胞的选择和刺激。

[1119] 通过基于柱的亲色谱和柱上刺激在抗CD3/抗CD28寡聚刺激剂的存在下进行研究以富集T细胞。

[1120] 在此项研究中,使用Sephadex G50 (Sigma)作为固定相,并且使用溴化氰(CNBr)激活的树脂与STREP-TACTIN® M2 (SEQ ID NO:6)共价偶联。Sephadex G50的50%悬浮液含有大约70μg共价偶联的7 Strep-tactin® mL的珠悬浮液。在将STREP-TACTIN® 固定至固定相上之后,将2mL具有Strep-tactin® 的Sephadex G50悬浮液与10μg对T细胞表面选择标记具有特异性的选择剂在4℃下一起孵育20min,以允许Fab片段与固定的 Strep-tactin® 试剂结合。然后将悬浮液填充于在底部具有90微米玻璃料的塑料微型柱中。将所述柱用含有0.5%牛血清白蛋白的PBS(磷酸盐缓冲盐水)(PBSA缓冲液)平衡,以得到1mL床体积。

[1121] 在这些研究中,使用作为选择剂的抗CD3结合Fab片段、抗CD4结合Fab片段或抗CD8结合Fab片段作为选择剂进行实验。CD3结合Fab片段源自由杂交瘤细胞系OKT3 (ATCC® CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549)产生的CD3结合单克隆抗体,并且含有Arakawa等人J.Biochem.120,657-662(1996)中所述抗CD3抗体OKT3的重链可变结构域(SEQ ID NO:31)和轻链可变结构域(SEQ ID NO:32)。CD4结合Fab片段是从m13B8.2(例如美国专利7,

482,000) 获得,并且含有抗CD4抗体m13B8.2的重链可变结构域(SEQ ID NO:29)和轻链可变结构域(SEQ ID NO:30)。CD8结合Fab片段是从OKT8(例如ATCC CRL-8014)获得,并且含有抗CD8抗体OKT8的重链可变结构域(SEQ ID NO:9)和轻链可变结构域(SEQ ID NO:10)。每个Fab片段的轻链在羧基端与含有顺序排列的两个链霉亲和素结合模块的TwinStrep-Tag®(SEQ ID NO:16)融合。

[1122] 将来自人供体的单采术样品加载至亲和柱上并进行两个洗涤步骤。在从加载样品的时间经过超过30分钟后,将40μg如实施例1中所述生成的与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂(抗CD3/抗CD28寡聚试剂)可逆结合的多聚化抗CD3抗CD28 Fab片段加载至柱上的3mL含有谷氨酰胺和重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中,并在37℃下孵育。在大约24小时后,在不添加用于破坏结合的另一竞争物质的情况下,在单一步骤中通过使大约80mL含有谷氨酰胺和重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基经过柱来从柱收集细胞。作为对照,将单采术样品加载至抗CD3亲和柱上,但不在抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的存在下进行孵育。对于对照条件,在24小时后,添加D-生物素以破坏抗CD3 Fab的TwinStrep-Tag®与STREP-TACTIN®之间的结合,并且通过重力流收集释放的细胞。

[1123] 在开始用抗CD3/抗CD28寡聚试剂刺激后大约24小时,针对选择标记的表面表达分析收集的细胞。如图13中所示,在使用对选择标记具有特异性的相应选择剂进行柱上选择并与刺激试剂一起孵育后24小时,观察到CD3、CD4和CD8的下调。相比之下,对于其中不将细胞与寡聚刺激试剂一起孵育的对照条件,未观察到选择标记的受体下调。这些结果与如下观察一致:用抗CD3/抗CD8刺激试剂刺激T细胞导致受体的表面表达下调,从而允许细胞从柱自发脱附而无需添加竞争试剂。

[1124] 进行类似研究,其中在抗CD3 STREP-TACTIN®亲和柱上选择T细胞,并如上所述用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂使其经历柱上刺激。在添加寡聚刺激试剂后的不同时间,通过重力流收集细胞。将收集的细胞立即用针对α-βTCR链的抗体染色,并通过流式细胞术监测以检测CD3的表面表达。图14说明在抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的存在下开始刺激后,CD3/TCR复合物下调和重新表达的示例性动力学。如图所示,在刺激的前24小时期间,观察到CD3/TCR复合物表面表达快速下调,且在仅12小时后观察到CD3/TCR复合物表面表达的最大下降。在寡聚刺激试剂的存在下孵育超过36小时导致表面CD3/TCR复合物的重新表达,且在开始用刺激试剂刺激后约72小时内实现最大CD3/TCR复合物表面重新表达。这些结果支持,实质性柱上刺激介导的自发T细胞脱附可以在4至6小时内发生,且最大释放发生在开始与刺激试剂一起柱上孵育后为或大约为12小时。

[1125] 将在添加抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂后约24小时自发脱附的细胞在37℃下在含有谷氨酰胺和重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中培养长达9天。在孵育期间,不除去寡聚刺激试剂;然而,其随着细胞在孵育期间持续扩增而被稀释。在随后的孵育期间,在24小时和在5天监测细胞的大小以及CD3和激活标记CD69和CD25的表达。如图15A中所示,在24小时观察到CD3早期下调后,进一步孵育长达5天导致CD3的重新表达。另外,与24小时时间点相比,在5天时也观察到细胞大小(图15A的左小图)以及激活标记CD25和CD69的表面表达的增加。在随后孵育长达9天后对细胞数量和倍数扩增的评估显示,自发脱附的细胞显示高增殖能力(图15B)。这些结果与如下观察一致:已经经历柱上选择和短期刺激的T细胞能够进行进一步孵育以实现所需的刺激、激活和/或扩增。

[1126] 这些结果支持在用于产生工程化T细胞组合物的下游过程(例如转导)之前或与所述下游过程结合使用柱上选择和刺激作为快速分离并刺激靶细胞的手段(例如,少于24小时)。

实施例10:对在小分子mTOR激酶抑制剂的存在下产生的工程化的T细胞中的T细胞表型和功能的评估。

[1127] 通过基于免疫亲和力的富集从来自人供体受试者的白细胞单采术样品分离CD4⁺和CD8⁺ T细胞。在第1天,将分离的CD4⁺和CD8⁺ T细胞以1:1混合,并在无血清培养基中用如实施例1中所述生成的抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂进行刺激,所述无血清培养基补充有重组IL-2 (100IU/mL)、重组IL-7 (600IU/mL)和重组IL-15 (100IU/mL),且含有或不含1 μ M的2-(3-羟苯基)-9-(2-异丙基苯基)-8-氧代-8,9-二氢-7H-嘌呤-6-甲酰胺(化合物63)。将与或不与化合物63一起培养的T细胞在37°C下孵育过夜(大约24h),然后在含有或不含化合物63 (1mM)的无血清培养基中用编码抗CD19 CAR的慢病毒载体进行转导。CAR含有对CD19具有特异性的scFv抗原结合结构域(源自FMC63)、CD28跨膜区、4-1BB共刺激信号传导区域、和源自CD3- ζ 的细胞内信号传导结构域。在转导后,在不含重组细胞因子并且含有或不含化合物63 (1mM)的无血清培养基(基础培养基)中孵育细胞,并且允许在开始用抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂刺激之后在约37.0°C下在孵育器中孵育长达96小时(直至所述过程的第5天)。在开始孵育后大约24小时(所述过程的第3天),添加1mM生物素。在孵育后,从每名供体收获CD4⁺和CD8⁺ T细胞,对其进行配制和低温冷冻。

[1128] 使低温冷冻的工程化CD4⁺和CD8⁺ T细胞解冻,并且评估T细胞的细胞内S6磷酸化、核糖体蛋白和mTOR抑制的标记,并且针对CD4或CD8的表面表达和针对作为记忆子集的标记的CCR7和CD45RA进行共染色。通过CCR7和CD45RA的表达按记忆子集显示活CD8⁺ T细胞中的pS6表达,如图16A所示。如图所示,与化合物63一起孵育减小刺激的记忆T细胞子集(即Temra、Tem和Tcm细胞)的平均荧光强度,表明对mTOR的抑制,同时对活细胞随时间变化的百分比或总数量没有显著影响。CD8⁺ T细胞中PS6的平均荧光强度(MFI)显示于图16B中。如图16C和图16D中所示,化合物63的存在(黑线)或不存在(灰线)分别未影响生成的组合物中的活细胞百分比或总活细胞。

[1129] 在用PMA/离子霉素和高尔基体抑制剂刺激后,评估解冻的通过所述过程产生的细胞的细胞凋亡标记(例如,LAT阳性CAR-T细胞的百分比)、表型谱以及产生细胞内细胞因子的能力。如图17A中所示,来自与化合物63一起孵育的样品的T细胞展现的细胞内半胱天冬酶表达少于未与化合物63一起孵育的那些,表明在用于产生工程化细胞的过程期间化合物63的存在改进T细胞组合物的总体细胞健康。还通过流式细胞术将解冻细胞针对CD27和CCR7的表面表达进行染色。如图17B(CD8⁺ T细胞)和图17D(CD4⁺ T细胞)中所示,与化合物63一起孵育没有显著改变细胞的表型子集谱,如通过CD27和/或CCR7的表达所评估。如通过细胞内细胞因子IL2、IFN γ 或TNF的水平所证明,在化合物63的存在下产生的CD4⁺和CD8⁺ T细胞的功能活性在已经在化合物63的存在下产生的工程化CD8⁺ T细胞(图17C)和CD4⁺ T细胞(图17E)两者中都得到显著改进。

[1130] 为了进一步评估细胞的功能活性,将所产生的T细胞组合物在12天中用与针对抗CD19 CAR的抗独特型(ID)抗体缀合的珠进行长期刺激,并且监测细胞的扩增和存活(图17F,左小图)以及通过曲线下面积计算的总扩增度量(图17F,右小图,AUC)。如图所示,在不

存在化合物63的情况下刺激细胞导致与CAR的慢性刺激一致的随时间降低的细胞扩增,以及长期刺激后持续功能的损失。结果显示,在已经在化合物63的存在下产生的工程化细胞中,在长期CAR特异性刺激后,观察到改进的T细胞功能。

实施例11:对使用组合的选择和柱上刺激过程工程化的T细胞的表型和功能特性的评估。

[1131] 基本上如实施例9中所述进行在色谱柱中组合选择和刺激步骤的过程(柱上选择和刺激),但规模更大。将柱上选择和刺激过程与替代性过程相比较,所述替代性过程基本上相似,但其中刺激步骤是与选择分开地在溶液中进行。

A. 柱上选择和刺激。

[1132] 在第0天,将来自人供体的单采术样品加载至含有使用溴化氰(CNBr)激活的树脂与StrepTactin® (SEQ ID NO:6)共价偶联的Sephadex G50 (Sigma)固定相的亲和柱上。20mL固定相能够容纳多达20亿±5亿个细胞。将选择剂(如实施例3中所述的抗CD3结合Fab片段)经由能够与StrepTactin结合的重链羧基端融合的链霉亲和素结合肽(TwinStrep-Tag®; SEQ ID NO:16)固定在固定相上。

[1133] 在从加载样品的时间起大约60分钟后,将如实施例1中所述生成的与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂(抗CD3/抗CD28寡聚试剂)可逆结合的多聚化抗CD3抗CD28 Fab片段以0.2-0.3x (1-2μg/1百万个细胞)的固定剂量加载至柱上的无血清培养基中,所述无血清培养基含有重组IL-2 (例如100IU/mL)、IL-15 (例如100IU/mL)和IL-7 (例如600IU/mL),并且在37°C下在柱中孵育大约4.5小时。在孵育期间,用抗CD3/抗CD28寡聚试剂刺激导致固定的细胞从柱上的选择剂脱附或释放。通过重力流用相同的无血清培养基从柱洗脱释放的细胞。所述培养基不包括生物素或用于破坏固定相上的StrepTactin®与融合至用于将细胞固定在柱固定相上的抗CD3抗体的链霉亲和素结合肽之间的结合的任何竞争物质。

[1134] 然后通过含有编码示例性抗CD19 CAR的慢病毒载体的相同无血清培养基中孵育1小时,转导释放并收集的细胞以表达嵌合抗原受体(CAR)。示例性CAR含有源自鼠抗体FMC63的抗CD19 scFv、免疫球蛋白间隔子、源自CD28的跨膜结构域、源自4-1BB的共刺激区和CD3-ζ细胞内信号传导结构域。对于转导,将培养体积调整为 1×10^6 个细胞/mL。

[1135] 洗涤转导的细胞,然后在37°C下进一步孵育。在开始用抗CD3/抗CD28寡聚试剂柱上刺激后约48小时,添加1.0mM D-生物素并与细胞混合,以从可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂解离抗CD3和抗CD28 Fab。

[1136] 添加生物素后,将细胞在37°C下进一步孵育另外约24小时。然后将细胞分为两个子集。在第一子集中,直接用低温保护剂配制细胞。在第二子集中,在含有如在孵育和转导步骤期间所用两倍浓度的IL-2、IL-7和IL-15的无血清培养基中,将细胞体积调整至 0.5×10^6 个细胞/mL。通过在进行培养基交换的静置培养中在37°C下再培育5天,进一步孵育此第二子集的细胞以供扩增,然后用低温保护剂配制。

B. 替代性过程:单独的选择和刺激(在溶液中)。

[1137] 替代性过程大体上如上所述进行,但是不在柱中组合用于选择和刺激的步骤。如上文针对CD3+ T细胞的选择所述,将来自相同人供体的单采术样品加载至含有抗CD3选择试剂的亲和柱上。为了洗脱选择的细胞,将1.0mM D-生物素添加至柱并收集洗脱的细胞。D-

生物素用作竞争物质以破坏融合至抗CD3 Fab的链霉亲和素结合肽与固定相上的StrepTactin®之间的结合,以从柱和抗CD3Fab释放细胞。

[1138] 在替代性过程的第0天,洗涤选择的细胞,将其稀释至 1×10^6 /mL,并且通过与如实施例1中所述生成的抗CD3/抗CD28 Fab缀合的寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂以固定剂量(0.3x, 大约2 μ g/1百万个细胞)一起孵育来进行刺激。将所述刺激在含有重组IL-2(例如100IU/mL)、重组IL-7(例如600IU/mL)和重组IL-15(例如100IU/mL)的无血清培养基中进行约18-30小时(24 $\pm$ 6小时)之间。

[1139] 刺激后,通过在如上所述含有编码相同示例性抗CD19 CAR的慢病毒载体的相同无血清培养基中旋转接种30分钟来转导细胞。

[1140] 旋转接种后,洗涤细胞,然后在37°C下进一步孵育。在开始用抗CD3/抗CD28寡聚试剂刺激后约48 $\pm$ 6小时,添加1.0mM D-生物素并与细胞混合,以从寡聚链霉亲和素试剂解离抗CD3和抗CD28 Fab。

[1141] 添加生物素后,将细胞在37°C下进一步孵育另外约24小时。然后将细胞分为与上文类似的两个子集。在第一子集中,直接用低温保护剂配制细胞。在第二子集中,通过在培养基交换的静置培养中在37°C下再培育5天,进一步孵育细胞以供扩增,然后用低温保护剂配制。

C. 对细胞回收率和表型的评估。

[1142] 将在柱上选择和刺激后已经从柱释放的CD3+、CD4+和CD8+ T细胞的产量与在替代性过程中已经从柱释放的细胞相比较,在所述替代性过程中仅在柱上进行选择且添加生物素以释放细胞。如图18A中所示,在两种过程中,CD3+ T细胞产量以及CD4+和CD8+ T细胞产量是相似的。将在柱上选择和刺激后已经从柱释放的细胞之间刺激后的总细胞计数和活细胞百分比与在替代性过程中单独刺激选择的细胞后的细胞相比较。图18B和图18C分别显示两种过程在刺激后的总细胞计数和活细胞百分比。在此实验中,使用柱上刺激的过程的细胞回收率更高。

[1143] 对于包括另外5天培育的过程,在培养第5天(从过程开始第8天)评估通过每种过程工程化的细胞群的质量和表型。图19A和图19B分别显示每种过程中回收的活T细胞的百分比以及表达示例性CAR(CAR+)的活细胞的百分比。通过流式细胞术针对包括CD4、CD8、CD27和CCR7的标记的表面表达来评估来自在进一步培育5天后(从过程开始起第8天)从两种过程生成的组合物的样品。图19C提供从选择步骤(替代性过程)或组合的选择与刺激步骤(柱上刺激)获得的CD4+ T细胞百分比与在进一步培育后培养的最后一天(第5天)细胞组合物中存在的活CD4+ T细胞百分比的比较。

[1144] 图19D显示通过柱上刺激过程生成的组合物中CD27-CCR7-、CD27+CCR7-、CD27+CCR7+和CD27-CCR7+ T细胞的百分比与通过替代性过程产生的细胞组合物中存在的所述百分比是相似的。

D. 评估使用柱上刺激制造的工程化的T细胞的功能。

[1145] 在体外和体内两种情况下评估使用包括柱上刺激的过程制造的工程化的T细胞的功能能力。将结果与使用替代性过程制造的工程化的T细胞相比较。

1. 体外功能分析

[1146] 通过将工程化的抗CD19 CAR T细胞与表达CD19的HEK细胞(HEK CD19)以5:1的效

应子与靶标比率共培养,评估细胞裂解活性。通过在培养期间的多个时间点进行的阻抗测量来确定细胞裂解。对照条件包括孵育表达针对不同靶标(BCMA)的替代性CAR的T细胞(HEK CD19+BCMA CAR)、仅靶细胞(仅HEK CD19+)或与抗CD19 CAR T细胞一起孵育的非靶细胞(HEK CD19-和CD19 CAR)。如图20中所示,细胞裂解活性(如通过HEK细胞裂解所指示)对靶细胞具有特异性,并且通过柱上刺激过程制造的CAR T细胞展现与通过替代性过程工程化的细胞类似的强效细胞裂解活性。这些数据表明,使用柱上刺激制造的工程化的T细胞的效力与使用替代性过程制造的工程化的T细胞相当。

[1147] 通过在高尔基体抑制剂的存在下用靶细胞系(CD19+HEK细胞)进行抗原特异性刺激后监测细胞因子积累,评估工程化的T细胞的细胞因子活性。在还针对表面CD4、CD8或抗CD19 CAR共染色的细胞中针对IFN γ 、IL-2和TNF- α 进行细胞内细胞因子染色后,通过流式细胞术评估细胞因子产生。图21A-图21C分别显示源自每种制造过程的表达IFN γ 、IL-2和TNF- α 的CD4+和CD8+ T细胞子集的百分比。使用根据两种方法制造但缺少CAR表达的T细胞作为对照。这些数据表明,CAR T细胞抗原特异性细胞因子产生在所述制造过程之间产生的细胞中是相当的。

2. 体内功能分析

[1148] 在体内比较含有从柱上刺激和替代性工程化过程生成的抗CD19 CAR T细胞的T细胞组合物的抗肿瘤活性。

[1149] 在第0天向免疫低下的NSG小鼠注射(i.v.) 5×10^5 个B细胞淋巴瘤细胞系(Raji)。在第7天,向小鼠注射 0.75×10^6 个CAR+ T细胞,所述CAR+ T细胞来自通过柱上刺激或替代性过程产生的CAR+工程化组合物。每种过程从三个不同的供体完成三次制造运行,并且测试所产生的每种工程化CAR+ T治疗性细胞组合物。图22A-图22C分别显示在注射前每种工程化治疗组合物的CD4:CD8比率、转导效率和活细胞的百分比。如所示,来自两种过程的细胞对于每个供体产生相当的工程化的细胞,但观察到一定供体变异性。

[1150] 在直至施用CAR-T细胞后41天的不同时间点,在体内通过活体发光成像测量肿瘤负荷。在肿瘤注射后六天,所有治疗组的动物都显示类似的肿瘤负荷(图23)。如图24中所示,在所有治疗组中,肿瘤负荷随时间显著降低。这些结果证实,通过所述制造过程产生的CAR+工程化治疗性T细胞之间的抗肿瘤功效相当。

E. 结论

[1151] 总之,这些数据表明,柱上选择和刺激可以用于产生工程化T细胞(例如CAR+T细胞)的过程中,包括如下过程:其中在开始用抗CD3/抗CD28寡聚试剂刺激后4.5小时内从柱收集选择的T细胞,用于随后包括转导的过程步骤中。所述结果证实,柱上选择和刺激过程得到工程化的(例如CAR+细胞)细胞组合物,所述细胞组合物展现的表型和功能特征与替代性过程相当,且由于在单一步骤中组合选择与刺激的能力,所述柱上选择和刺激过程仍可以更有效且地在更短时间内进行。

实施例12:经由柱色谱对T细胞的选择和刺激。

[1152] 通过基于柱的亲色谱和柱上刺激在抗CD3/抗CD28寡聚刺激剂的存在下进行研究以富集T细胞。这项研究检查使用另一示例性细胞表面标记CD27进行的选择是否允许如通过柱上刺激诱导的自发细胞脱附。这项研究还检查使用通过配置在色谱柱元件外部的加热元件加热的色谱柱通过柱上T细胞选择和刺激来选择并刺激T细胞的能力。

[1153] 在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 缓冲液中, 将10mg多聚化链霉亲和素突变蛋白 (例如 STREP-TACTIN®M2, SEQ ID NO:6) 经由溶剂暴露的伯胺基团偶联至8g (根据初始干重) 环氧激活的聚苯乙烯树脂 (CY17030; Cytosorbents)。随后, 将1.8mg包含与Fab片段的重链羧基端融合的链霉亲和素结合肽 (例如, Twin-Strep-tag®, SEQ ID NO:16) 的抗CD27 Fab选择剂添加至STREP-TACTIN®涂布的树脂的50%悬浮液 (树脂床体积相对于总体积)。将悬浮液在温和振荡下在室温下孵育1小时以允许Fab片段经由 Twin-Strep-tag® 与固定的 STREP-TACTIN®M2多聚体试剂的可逆结合。然后将抗CD27Fab片段功能化的树脂添加至塑料全尺寸柱以得到18-20mL的床体积。在使用前, 用含有0.5%牛血清白蛋白的PBS (PBSA 缓冲液) 平衡柱。柱还包括供气元件, 特别是用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器, 以在柱中允许空气的存在。

[1154] 用于柱的加热元件是设计为封闭柱的夹套构件的部分。夹套构件包括两个夹套部件, 所述夹套部件连接在一起以包围柱, 其中每个夹套部件含有沿其内表面布置的加热盘管。每个加热盘管具有用于外部热水供应的入口和出口。每个具有加热盘管的夹套部件设计为从顶部至底部包围柱的圆周的一半, 并且夹套部件内的加热盘管也类似地包围柱的一半。总之, 夹套部件和由此加热盘管封闭柱, 但开口除外, 以允许细胞和试剂进入和离开柱的入口和出口。对于示例性示意图, 参见例如图25-图28。

[1155] 将来自人供体的单采术样品加载至亲和柱上并进行两个洗涤步骤。从加载样品时起经过大于30分钟后, 将2000μg如实施例1中所述生成的与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂可逆结合的多聚化的抗CD3 Fab片段和抗CD28 Fab片段 (抗CD3/抗CD28寡聚试剂) 在20mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中加载至柱上, 并经由夹套构件中所含的加热盘管在37℃下孵育。大约4小时后, 在单一步骤中通过使大约80mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基通过柱来从柱收集细胞。在不添加另一种竞争物质 (例如不添加D-生物素) 以破坏抗CD27 Fab选择剂的链霉亲和素结合肽 (例如 Twin Strep-Tag®) 与链霉亲和素突变蛋白 (例如STREP-TACTIN®) 涂布的固定相树脂的结合的情况下, 收集细胞。作为对照, 将单采术样品加载至抗CD27亲和柱上但不在抗CD3/抗CD28寡聚刺激试剂的存在下进行孵育。对于对照条件, 在选择步骤后, 将D-生物素作为竞争物质添加以破坏抗CD3 Fab的Twin Strep-Tag® 与 STREP-TACTIN®之间的结合, 并通过重力流收集释放的细胞。

[1156] 在开始用抗CD3/抗CD28寡聚试剂进行柱上刺激后大约4小时, 分析收集的细胞的CD27的表面表达。如图32中所示, 在已经使用抗CD27选择剂固定至亲和柱的T细胞的柱上刺激后4小时, 在活CD45+细胞中观察到CD27的下调。相比之下, 对于其中未将固定在抗CD27亲和柱上的细胞与寡聚刺激试剂一起孵育的对照条件, 通过用D-生物素洗脱收集的细胞未展现CD27下调, 如通过对照样品中高百分比的收集的T细胞保留CD27的阳性表达所证实。这些结果与如下观察一致: 用抗CD3/抗CD28刺激试剂刺激T细胞导致选中的 (selected-for) 受体的表面表达下调, 从而允许细胞从柱自发脱附, 而无需添加竞争试剂以使细胞从亲和柱脱附或破坏细胞与亲和柱的结合。

[1157] 这些结果进一步支持, 用于选择细胞的细胞表面标记可以通过细胞在经由细胞表面标记固定至亲和柱时的柱上刺激被下调, 从而允许在不使用竞争物质释放细胞用于细胞

收集的情况下从柱释放细胞。这些结果还表明含有加热元件且配置为包围柱的夹套构件用于在细胞的柱上刺激期间加热并维持柱温的效用。

实施例13:经由顺序柱色谱用多种选择标记对T细胞的选择和刺激。

[1158] 柱上T细胞选择和刺激使用两个单独的柱来进行。每个柱使用不同的示例性选择剂来制备,并且配置有加热装置以将柱温维持在约37℃的柱上刺激仅在第二柱中进行。第二柱包括供气元件并且用含有两个加热盘管的夹套构件来加热,如实施例12中所述。

[1159] 第一柱是使用抗CD27 Fab来制备,如实施例12中所述。将来自人供体的单采术样品加载于第一柱上,并洗涤柱。在从加载样品时起经过大于30分钟后,添加D-生物素以破坏抗CD27 Fab的Twin Strep-Tag®与STREP-TACTIN®之间的结合以从第一柱释放细胞。通过重力流收集释放的细胞,洗涤以去除残留的D-生物素污染,并使其通过如实施例12中所述来制备但是使用抗CD3 Fab作为选择剂的第二柱。CD3结合Fab片段源自由杂交瘤细胞系OKT3(ATCC®CRL-8001™;还参见美国专利号4,361,549)产生的CD3结合单克隆抗体,并且含有Arakawa等人J.Biochem.120,657-662(1996)中所述抗CD3抗体OKT3的重链可变结构域(SEQ ID NO:31)和轻链可变结构域(SEQ ID NO:32)。在从将释放的细胞加载至第二柱中时起经过大于30分钟后,将2000μg如实施例1中所述生成的与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂可逆结合的多聚化的抗CD3 Fab片段和抗CD28 Fab片段(抗CD3/抗CD28寡聚试剂)在20mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基上加载至第二柱上,并经由夹套构件中所含的加热盘管在37℃下孵育。在大约4小时后,在单一步骤中通过将大约80mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基通过第二柱来从第二柱收集选择的细胞。在不添加另一种竞争物质(例如不添加D-生物素)以破坏抗CD3 Fab选择剂的链霉亲和素结合肽(例如Twin Strep-Tag®与链霉亲和素突变蛋白(例如STREP-TACTIN®)涂布的固定相树脂的结合的情况下,收集细胞。

[1160] 将来自单采术样品和每个柱的阳性级分的细胞用识别表面CD3和CD27的抗体染色并通过流式细胞术定量。流式细胞术结果显示于图33中。在单采术样品中,32.3%的细胞是CD3+CD27+。CD27和CD3选择导致CD3+CD27+细胞的高度富集,在CD27选择后纯度为87.5%且在CD3选择后纯度为96.2%。第二柱中的柱上刺激导致CD3表面表达的下调,而CD27表面表达相对地被保存。这些结果与如下观察一致:刺激诱导的表面受体表达的下调对在柱上刺激与选择的细胞结合的受体具有特异性。

实施例14:使用不同加热配置对T细胞的选择和刺激。

[1161] 评估使用通过设置在色谱柱元件外部的不同配置的加热元件加热的色谱柱通过柱上T细胞选择和刺激来选择并刺激T细胞的能力。每个柱如实施例13中所述用于选择T细胞的抗CD3 Fab来制备,并且每个柱包括供气元件,特别是用于螺纹连接式空气过滤器的供气连接器。

[1162] 用于每个柱的加热元件是设计为封闭柱的夹套构件的部分。在一种配置中,夹套构件如实施例12中所述。对于示例性示意图,参见例如图25-图28。

[1163] 对于第二种配置,夹套构件包括三个夹套部件,所述夹套部件各自设计为从顶部至底部包围柱的圆周的三分之一,并且所述夹套部件连接在一起以包围柱。每个夹套部件包括电温度传感器和作为电加热元件的金属板。每个金属板具有铝型材,并且在每个金属板与其铝型材之间放置电绝缘层。将每个金属板安装在其夹套部件的内表面处,并且每个

夹套部件具有用于其温度传感器和金属板的电连接点。总之，夹套部件封闭柱，但开口除外，以允许细胞和试剂进入和离开柱的入口和出口，使得三个金属板在柱的圆周周围等距间隔，并且夹套内部与柱直接接触。对于示例性示意图，参见例如图29-图31。

[1164] 柱上T细胞选择和刺激是使用基于柱的亲色谱来进行，其中上文夹套部件中的每一个配置在柱的周围在加热柱的内部空腔的条件下。对于每个配置的柱，将来自人供体的单采术样品加载至亲和柱上，并且允许样品中的CD3⁺ T细胞与固定在树脂上的CD3结合Fab片段相互作用。将柱用PBSA缓冲液洗涤两次以去除没有与固定的CD3结合Fab片段相互作用的细胞。从将样品加载至柱上起大约15分钟后，通过向柱上加载在20mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基中的至少2000μg上文实施例1和实施例2中所述的抗CD3/抗CD28寡聚试剂（与寡聚链霉亲和素突变蛋白试剂可逆结合的多聚化的抗CD3 Fab片段和抗CD28 Fab片段刺激剂）将刺激试剂添加至柱，并且在所述柱上在用于刺激细胞的条件下孵育细胞。在孵育期间，将使用基于金属的加热元件加热的柱维持在30℃、35℃或37℃的温度下。例如，将使用加热盘管（例如，基于水的加热元件）加热的柱保持在恒定的37℃下。供气元件在孵育期间连接的开放的无菌过滤器的控制下供应空气。

[1165] 在用抗CD3/抗CD28寡聚试剂进行柱上刺激期间，选择的CD3⁺ T细胞从柱自发脱附而无需添加竞争试剂以破坏细胞与树脂之间的结合。在添加刺激试剂后大约4.5小时内，在单一步骤中通过使大约80mL含有谷氨酰胺以及重组IL-2、IL-15和IL-7的无血清基础培养基通过柱而从柱收集自发脱附的细胞，并且通过重力流收集所述细胞。在通过重力流收集细胞之前，不将另一种竞争物质（例如不添加D-生物素）添加至柱以破坏细胞经由抗CD3 Fab选择剂的链霉亲和素结合肽（例如Twin**Strep-Tag**®）与链霉亲和素突变蛋白（例如**STREP-TACTIN**®）涂布的固定相树脂的相互作用在柱上的结合。然后将收集的细胞染色并针对CD3、CD4、CD8和CD69表面表达以及针对活细胞的数量和百分比定量。

[1166] 如图34A-图34E中所示，使用具有夹套构件（基于水和基于金属的加热元件）的任一种柱，在细胞的柱上选择和刺激后从柱收集的细胞的CD3⁺耗尽效率（图34A）、CD4和CD8表达（图34B）和CD69表达（图34C）是类似的。在30℃与37℃之间的孵育温度之间，结果也是一致的。如图34D和图34E中所示，在孵育温度之间，使用具有基于金属的加热元件的柱收集的活细胞的百分比（图34D）和数量（图34E）具有更高可变性。

[1167] 连同上文实施例中的结果，这些结果表明不同类型的加热元件和配置用于在细胞的柱上刺激期间加热和维持柱温的效用。

[1168] 本发明并不旨在限于具体公开的实施方案的范围，所提供的实施方案例如是为了说明本发明的各个方面。根据本文的描述和传授，对所述组合物和方法的各种修改将变得清楚。可以在不脱离本公开文本的真实范围和精神的情况下实践这些变化，并且这些变化旨在落入本公开文本的范围内。

序列

编号	序列	描述
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYE SAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAANKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>) UniProt编号P22629
2	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThr AlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValGlyAsnAlaGluSer ArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAla LeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTr pSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSe rGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLy sValLysProSerAlaAlaSer	最小链霉亲和素 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>)
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY TARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAANKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和 素 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Ar g ⁴⁷ 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>)
4	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThr AlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgGlyAsnAlaGluSe rArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAl aLeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrT rpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrS erGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrL ysValLysProSerAlaAlaSer	突变蛋白链霉亲和 素 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Ar g ⁴⁷ 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>)
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYY GARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAANKAGVNNGNPLDAVQQ	突变蛋白链霉亲和 素 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>)
6	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThr AlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSer ArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAla LeuGlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTr pSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSe rGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLy sValLysProSerAlaAlaSer	突变蛋白链霉亲和 素 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 物种: 阿维丁链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>)
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	链霉亲和素结合肽, Strep-tag®
8	WSHPQFEK	Strep-tag® II
9	His-Pro-Xaa	链霉亲和素结合肽 Xaa选自Gln、Asp和 Met
10	His-Pro-Gln-Phe	链霉亲和素结合肽
11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	链霉亲和素结合肽 Xaa ₁ 是Trp、Lys或 Arg; Xaa ₂ 是任何氨基酸; Xaa ₃ 是Gly或Glu

		Xaa ₄ 是Gly、Lys或Arg
12	-Trp-Xaa ₁ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₂ -Xaa ₃ -	链霉亲和素结合肽 Xaa ₁ 是任何氨基酸； Xaa ₂ 是Gly或Glu Xaa ₃ 是Gly、Lys或Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉亲和素结合肽的顺序模块 Xaa是任何氨基酸； n是8或12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉亲和素结合肽的顺序模块 n是2或3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK	Twin-Strep-tag
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWHPQFEK	Twin-Strep-tag
18	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA标签
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-标签
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-标签
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7表位
24	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV表位
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc表位
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-标签
27	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLT GRYDSAPATDGSALTGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGG AEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 和Glu ¹¹⁷ 、Gly ¹²⁰ 、Tyr ¹²¹ （突变蛋白m1-9） 物种：阿维丁链霉菌（ <i>Streptomyces avidinii</i> ）
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSALTGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	突变蛋白链霉亲和素 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 和Glu ¹¹⁷ 、Gly ¹²⁰ 、Tyr ¹²¹ （突变蛋白m1-9） 物种：阿维丁链霉菌（ <i>Streptomyces avidinii</i> ）
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYCAKN DPGTGFAIWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTYSW NSGALTSQVH TFPVQLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG SGGSAWSHPQ FEK	Fab片段m13B8.2的可变重链
30	AMDIQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLLV HDAKTLAEGV PSRFSGGSGG TQFSLKINTL QPEDFGTYYC QAHYGNPPTF GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF	Fab片段m13B8.2的可变轻链

	PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	抗CD3抗体OKT3的 可变重链
32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	抗CD3抗体OKT3的 可变轻链
33	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	抗CD28抗体CD28.3 的可变重链
34	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	抗CD28抗体CD28.3 的可变轻链
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT标签
36	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr ⁶⁵ Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	huOKT8的可变重链
37	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	huOKT8的可变轻链
38	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P-	接头 P是脯氨酸，G是甘 氨酸并且S是丝氨酸
39	GSADDAKKDAAKKDGKS	接头
40	MLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR α 链（氨基 酸）
41	atgcttctcctgtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatccca	GMCSFR α 链（核 酸）
42	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 α 信号肽

43	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKH FKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLR SLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGEN SCKATGQVCHALCSPEGWCWPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCN LLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYI DGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLGCPNTNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM	截短的表皮生长因子受体 (tEGFR)
44	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIGDLHILPVAFRGDS FTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIR GRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYAN TINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGWCW PEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECL PQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLGCPNTNGPKIPSIATGM VGALLLLLVVALGIGLFM	截短的表皮生长因子受体 (tEGFR)
45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
46	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
47	LEGGEGGRSLLTCGDVEENPGPR	T2A
48	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
49	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
50	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
51	DYGV	CDR H1
52	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
53	YAMDYWG	CDR H3
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	RASQDISKYL	CDR L1
56	SRLHSGV	CDR L2
57	HTSRLHS	CDR L2
58	GNTLPYTFG	CDR L3
59	QQGNTLPYT	CDR L3
60	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	VH
61	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEIT	VL
62	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	接头
63	gacatccagatgaccagaccactccagcctgagcgccagcctgggcgaccgggtgaccatcagct gccgggcccagcaggacatcagcaagtacgtgaactggatcagcagaagcccagcgccacgtca agctgctgatctaccacaccagcggctgcacagcggcgtgccagccgggttagcgcgagcggctc cggcaccgactacagcctgaccatctccaacctggaacaggaagatatgccacctactttgcccagca gggcaacacactgccctacacctttggcgccggaacaaagctggaatcaccggcagcacctccggc agcggcaagcctggcagcggcgagggcagcaccaaggcgaggtgaagctgcaggaaagcggc cctggcctggtggccccagccagcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgccc gactacggcgtgagctggatccggcagccccccaggaaggcctggaatggctggcggtgatctgg ggcagcagaccactactacaacagcgcctgaagagcggctgaccatcatcaaggacaacagc aagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgcatctactactgcgcaa gcactactactacggcgagctacgccatggactactggggccaggccaccagcgtgaccgtgag cagc	编码scFv的序列
64	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVK LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPG LVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSE TTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYY YGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	scFv
65	SYWMN	CDR H1
66	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2

67	KTISSVDFYFDY	CDR H3
68	QQYNRYPYT	CDR L3
69	SYWMN	CDR H1
70	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
71	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQ GLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
72	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSP KPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDLADYFCQ QYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
73	KASQNVGTNVA	CDR L1
74	SATYRNS	CDR L2
75	QQYNRYPYT	CDR L3
76	SYWMN	CDR H1
77	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
78	KTISSVDFYFDY	CDR H3
79	GGGGSGGGSGGGGS	接头
80	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQ GLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQ QKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFLTITNVQSKDL ADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
81	ESKYGPPCPPCP	间隔子 (IgG4铰链) (aa) 智人 (Homo sapiens)
82	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	间隔子 (IgG4铰链) (nt) 智人 (Homo sapiens)
83	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK	铰链-CH3间隔子 智人 (Homo sapiens)
84	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQK LSLSLGLK	铰链-CH2-CH3间隔 子 智人 (Homo sapiens)
85	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGEEK KKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKA TFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQ HSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVK LSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSG FAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSIVTDH	IgD-铰链-Fc 智人 (Homo sapiens)
86	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链
87	X ₁ PPX ₂ P X ₁ 是甘氨酸、半胱氨酸或精氨酸 X ₂ 是半胱氨酸或苏氨酸	示例性IgG铰链
88	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链
89	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链
90	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPE PKSCDTPPPCPRCP	示例性IgG铰链
91	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	示例性IgG铰链
92	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链
93	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链

94	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	示例性IgG铰链
95	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747的氨基酸 153-179) 智人(Homo sapiens)
96	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (登录号 P10747的氨基酸 114-179) 智人(Homo sapiens)
97	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747的氨基酸 180-220) 智人(Homo sapiens)
98	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL至GG) 智人(Homo sapiens)
99	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1的 氨基酸214-255) 智人(Homo sapiens)
100	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人(Homo sapiens)
101	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人(Homo sapiens)
102	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ 智人(Homo sapiens)
103	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGly AlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValGlyAsnAlaGluSerArgTyr ValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeu GlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSer GlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGly ThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysVal LysProSerAlaAlaSer	没有起始甲硫氨酸 的最小链霉素亲和素 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
104	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGly AlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgGlyAsnAlaGluSerArg TyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeu GlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSer GlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGly ThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysVal LysProSerAlaAlaSer	没有起始甲硫氨酸 的突变蛋白链霉素 亲和素 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
105	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGly AlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyr ValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeu GlyTrpThrValAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSer GlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGly ThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysVal LysProSerAlaAlaSer	没有起始甲硫氨酸 的突变蛋白链霉素 亲和素 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 物种: 阿维丁链霉菌 (Streptomyces avidinii)
106	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPS NTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST	人IgG2 Fc (Uniprot P01859)

	FRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPE NNYKTTTPMLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	
107	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSSFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLK	人IgG4 Fc (Uniprot P01861)
108	GVQVETISPGDGRFTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKMDSSRDRN KPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG HPGIIPPHATLVFDVELLKE	FKBP
109	GVQVETISPGDGRFTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVDSSRDRN KPFKFMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATG HPGIIPPHATLVFDVELLKE	FKBP12v36
110	MGSNKSQPKDASQRRR	修饰的酰化基序
111	Met-Gly-Cys-Xaa-Cys	双重酰化基序
112	Cys-Ala-Ala-Xaa	酰化区

序列表

- <110> 朱诺治疗学有限公司
 <120> 细胞选择和/或刺激装置及使用方法
 <130> 735042020040
 <140> 尚未分配
 <141> 同时随同提交
 <150> US 62/928,303
 <151> 2019-10-30
 <160> 112
 <170> 用于Windows的FastSEQ 4.0版
 <210> 1
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> 阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)
 <220>
 <223> 链霉亲和素 (UniProt编号P22629)
 <400> 1

```

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1           5           10           15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
          20           25           30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
          35           40           45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
          50           55           60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65           70           75           80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
          85           90           95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
          100          105          110
Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
          115          120          125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
          130          135          140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145          150          155

```

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 最小链霉亲和素

<400> 2

```

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
1           5           10           15
Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
          20           25           30
Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
          35           40           45
Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
          50           55           60
Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
65           70           75           80
Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
          85           90           95
Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
          100          105          110
Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
          115          120          125

```

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 3

```

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1           5           10           15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
          20           25           30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
          35           40           45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
          50           55           60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65           70           75           80

```


Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser	Gly	Gln	Tyr	
				85					90					95		
Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu	Leu	Thr	Ser	
				100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val	Gly	His	Asp	
				115					120					125		
Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	
				130					135					140		
Lys	Ala	Gly	Val	Asn	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Asp	Ala	Val	Gln	Gln		
				145					150					155		

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 4

Met	Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr		
1				5				10				15					
Phe	Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val		
				20					25					30			
Thr	Ala	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr		
				35					40					45			
Asp	Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr		
				50					55					60			
Val	Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp		
65					70					75					80		
Ser	Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp		
				85					90					95			
Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu		
				100					105					110			
Val	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser			
				115					120					125			

<210> 5

<211> 159

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala46-Arg47

<400> 5

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

<210> 6

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala46-Arg47

<400> 6

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile
 20 25 30
 Gly Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
 50 55 60
 Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

	85		90		95										
Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu
	100						105						110		
Val	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser	
	115						120						125		

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽, Strep-tag

<400> 7

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Strep-tag II

<400> 8

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽

<220>

<221> 变体

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa选自Gln、Asp和Met

<400> 9

His Pro Xaa

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 链霉亲和素结合肽
<400> 10
His Pro Gln Phe
1
<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 链霉亲和素结合肽
<220>
<221> 变体
<222> (1) ... (1)
<223> Xaa是Trp、Lys或Arg
<220>
<221> 变体
<222> (2) ... (2)
<223> Xaa是任何氨基酸
<220>
<221> 变体
<222> (3) ... (3)
<223> Xaa是Gly或Glu
<220>
<221> 变体
<222> (4) ... (4)
<223> Xaa是Gly、Lys或Arg
<400> 11
Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
1 5
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 链霉亲和素结合肽
<220>
<221> 变体

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 变体

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa是Gly或Glu

<220>

<221> 变体

<222> (3) ... (3)

<223> Xaa是Gly、Lys或Arg

<400> 12

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽的顺序模块

<220>

<221> 变体

<222> (9) ... (9)

<223> Xaa是任何氨基酸

<220>

<221> 重复

<222> (9) ... (9)

<223> Xaa重复8或12次

<400> 13

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

1 5 10 15

Lys

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 链霉亲和素结合肽的顺序模块

<220>

<221> 重复

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20	25
<210> 18	
<211> 24	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Twin-Strep-tag	
<400> 18	
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
20	
<210> 19	
<211> 28	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Twin-Strep-tag	
<400> 19	
Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	
1 5 10 15	
Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
20 25	
<210> 20	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> HA-标签	
<400> 20	
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala	
1 5	
<210> 21	
<211> 11	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> VSV-G-标签	
<400> 21	

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HSV-标签

<400> 22

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T7表位

<400> 23

Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HSV表位

<400> 24

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Myc表位

<400> 25

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> V5-标签

<400> 26

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47和

Glu117、Gly120、Tyr121 (突变蛋白m1-9)

<400> 27

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 28

<211> 139

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47和

Glu117、Gly120、Tyr121 (突变蛋白m1-9)

<400> 28

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 130 135

<210> 29

<211> 253

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Fab片段m13B8.2的可变重链

<400> 29

Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro
 50 55 60
 Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
 65 70 75 80
 Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly

100				105				110							
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
115				120				125							
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
130				135				140							
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145				150				155				160			
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
165				170				175							
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
180				185				190							
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
195				200				205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Gly	Ser
210				215				220							
Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
225				230				235				240			
Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Trp	Ser	His	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys			
245				250											

 $\langle 210 \rangle$ 30

218

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 Fab片段m13B8.2的可变轻链

 $\langle 400 \rangle$ 30

Ala	Met	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
1				5					10					15	
Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Met	Ile	Tyr
			20					25					30		
Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu
		35					40					45			
Leu	Val	His	Asp	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Thr	Leu
65					70					75					80
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	His	Tyr	Gly	Asn
				85					90					95	
Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Ile

100	105	110
Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
115	120	125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
130	135	140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
145	150	155
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
165	170	175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
180	185	190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
195	200	205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser		
210	215	
<210> 31		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 抗CD3抗体OKT3的可变重链		
<400> 31		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr		
20	25	30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
100	105	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 32		

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD3抗体OKT3的可变轻链

<400> 32

Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr
		35				40					45				
Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu
65					70				75					80	
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn						
			100						105						

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28抗体CD28.3的可变重链

<400> 33

Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Arg
1				5					10					15	
Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr	Ile	Ile	His
			20					25					30		
Trp	Ile	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Trp	Phe
		35				40					45				
Tyr	Pro	Gly	Ser	Asn	Asp	Ile	Gln	Tyr	Asn	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys
	50					55					60				
Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Val	Tyr	Met	Glu	Leu
65					70				75					80	
Thr	Gly	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg
				85					90					95	

Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val
115

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗CD28抗体CD28.3的可变轻链

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> MAT标签

<400> 35

His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys
1 5 10

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huOKT8的可变重链

<400> 36

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Val	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
			20					25					30		
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Asp	Asn	Thr	Leu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Val	Phe	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100					105					110		
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> huOKT8的可变轻链

<400> 37

Asp	Val	Gln	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Gln	Tyr
			20					25					30		
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
		35					40					45			
Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70				75					80	
Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu
				85					90				95		
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys					
			100					105							

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<220>

<221> 重复

<222> (5) ... (9)

<223> SGGGG重复5次

<400> 38

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 39

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GMCSFR α 链

<400> 40

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 41

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> GMCSFR α 链

<400> 41

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
atccca 66

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CD8 α 信号肽

<400> 42

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala

<210> 43

<211> 357

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短的表皮生长因子受体 (tEGFR)

<400> 43

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr			
145	150	155	160
Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys			
	165	170	175
Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly			
	180	185	190
Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu			
	195	200	205
Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys			
	210	215	220
Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu			
225	230	235	240
Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met			
	245	250	255
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala			
	260	265	270
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val			
	275	280	285
Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His			
	290	295	300
Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro			
305	310	315	320
Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala			
	325	330	335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly			
	340	345	350
Ile Gly Leu Phe Met			
	355		

<210> 44

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短的表皮生长因子受体 (tEGFR)

<400> 44

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu			
1	5	10	15
Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile			
	20	25	30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe		
35	40	45
Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr		
50	55	60
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn		
65	70	75
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg		
	85	90
Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile		
	100	105
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val		
	115	120
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp		
	130	135
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn		
145	150	155
Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu		
	165	170
Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser		
	180	185
Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu		
	195	200
Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln		
	210	215
Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly		
225	230	235
Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro		
	245	250
His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr		
	260	265
Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His		
	275	280
Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro		
	290	295
Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala		
305	310	315
Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met		
	325	330
		335

<210> 45

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> F2A

<400> 45

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E2A

<400> 46

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 47

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T2A

<400> 48

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15

Gly Pro

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 49

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> P2A

<400> 50

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H1

<400> 51

Asp Tyr Gly Val Ser
1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 52

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 53

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 54

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L1

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L2

<400> 56

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L2

<400> 57

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L3

<400> 58

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L3

<400> 59

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH

<400> 60

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

<400> 62

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 63

<211> 735

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 63

gacatccaga tgacccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga ccgggtgacc 60
 atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
 gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
 cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240
 gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccctacac ctttggcggc 300
 ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
 ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420
 cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggctgagcc tgcccgacta cggcgtgagc 480
 tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
 accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600
 agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
 gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
 gtgaccgtga gcagc 735

<210> 64

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly			
	100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys			
	115	120	125
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser			
	130	135	140
Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser			
145	150	155	160
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile			
	165	170	175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu			
	180	185	190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn			
	195	200	205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr			
	210	215	220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser			
225	230	235	240
Val Thr Val Ser Ser			
	245		

<210> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H1

<400> 65

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 66

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 67

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L3

<400> 68

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H1

<400> 69

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 70

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH

<400> 71

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 72

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VL

<400> 72

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 73

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L1

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L2

<400> 74

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser
1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR L3

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H1

<400> 76

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H2

<400> 77

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDR H3

<400> 78

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 80

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> scFv

<400> 80

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1	5	10	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35	40	45	
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe			
50	55	60	
Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
85	90	95	
Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly			
115	120	125	
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser			
130	135	140	
Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys			
145	150	155	160
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys			
165	170	175	
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn			
180	185	190	
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
195	200	205	
Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe			
210	215	220	
Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys			
225	230	235	240
Leu Glu Ile Lys Arg			
245			

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 间隔子 (IgG4铰链)

<400> 81

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10
 <210> 82
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> 间隔子 (IgG4铰链)
 <400> 82
 gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgccct 36
 <210> 83
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> 铰链-CH3间隔子
 <400> 83
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
 1 5 10 15
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 20 25 30
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 115
 <210> 84
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> 铰链-CH2-CH3间隔子
 <400> 84

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 85
 <211> 282
 <212> PRT
 <213> 智人(Homo sapiens)
 <220>
 <223> IgD-铰链-Fc
 <400> 85
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15

Gln	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala	Pro	Ala
20				25				30							
Thr	Thr	Arg	Asn	Thr	Gly	Arg	Gly	Gly	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys	Glu	Lys
35				40				45							
Glu	Lys	Glu	Glu	Gln	Glu	Glu	Arg	Glu	Thr	Lys	Thr	Pro	Glu	Cys	Pro
50				55				60							
Ser	His	Thr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Gln
65				70				75				80			
Asp	Leu	Trp	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Val	Gly
85				90				95							
Ser	Asp	Leu	Lys	Asp	Ala	His	Leu	Thr	Trp	Glu	Val	Ala	Gly	Lys	Val
100				105				110							
Pro	Thr	Gly	Gly	Val	Glu	Glu	Gly	Leu	Leu	Glu	Arg	His	Ser	Asn	Gly
115				120				125							
Ser	Gln	Ser	Gln	His	Ser	Arg	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	Trp	Asn
130				135				140							
Ala	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Cys	Thr	Leu	Asn	His	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro
145				150				155				160			
Gln	Arg	Leu	Met	Ala	Leu	Arg	Glu	Pro	Ala	Ala	Gln	Ala	Pro	Val	Lys
165				170				175							
Leu	Ser	Leu	Asn	Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Asp	Pro	Pro	Glu	Ala	Ala	Ser
180				185				190							
Trp	Leu	Leu	Cys	Glu	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Pro	Pro	Asn	Ile	Leu	Leu
195				200				205							
Met	Trp	Leu	Glu	Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Asn	Thr	Ser	Gly	Phe	Ala	Pro
210				215				220							
Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Gly	Ser	Thr	Thr	Phe	Trp	Ala	Trp	Ser
225				230				235				240			
Val	Leu	Arg	Val	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Pro	Gln	Pro	Ala	Thr	Tyr	Thr
245				250				255							
Cys	Val	Val	Ser	His	Glu	Asp	Ser	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Ala	Ser	Arg
260				265				270							
Ser	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Val	Thr	Asp	His						
275				280											

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 86

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<220>

<221> 变体

<222> (1) ... (1)

<223> Xaa是甘氨酸、半胱氨酸或精氨酸

<220>

<221> 变体

<222> (2) ... (2)

<223> Xaa是半胱氨酸或苏氨酸

<400> 87

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 88

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 89

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 90

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 90

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro

1 5 10 15

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

20 25 30

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

35 40 45

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

50 55 60

<210> 91

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 91

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 92

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 93

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性IgG铰链

<400> 94

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 95

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28 (登录号P10747的氨基酸153-179)

<400> 95

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 96

<211> 66

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28 (登录号P10747的氨基酸114-179)

<400> 96

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 97

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28 (P10747的氨基酸180-220)

<400> 97

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
			20					25					30		
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
		35					40								

<210> 98

<211> 41

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD28 (LL至GG)

<400> 98

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
			20					25					30		
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
		35					40								

<210> 99

<211> 42

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 4-1BB (Q07011.1的氨基酸214-255)

<400> 99

Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
1				5					10					15	
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
			20					25					30		
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						

35	40
<210> 100	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<223> CD3ζ	
<400> 100	
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
20 25 30	
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
35 40 45	
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
50 55 60	
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
65 70 75 80	
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala	
85 90 95	
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
100 105 110	
<210> 101	
<211> 112	
<212> PRT	
<213> 智人(Homo sapiens)	
<220>	
<223> CD3ζ	
<400> 101	
Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly	
1 5 10 15	
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr	
20 25 30	
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys	
35 40 45	
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys	
50 55 60	
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg	
65 70 75 80	

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> CD3ζ

<400> 102

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 103

<211> 126

<212> PRT

<213> 阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*)

<220>

<223> 没有起始甲硫氨酸的最小链霉亲和素

<400> 103

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser
 20 25 30
 Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50	55	60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
65	70	75
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		80
85	90	95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
100	105	110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
115	120	125
<210> 104		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 没有起始甲硫氨酸的突变蛋白链霉亲和素Val144-Thr45-Ala46-Arg47		
<400> 104		
Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe		
1	5	10
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr		15
20	25	30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp		
35	40	45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val		
50	55	60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
65	70	75
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		80
85	90	95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
100	105	110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
115	120	125
<210> 105		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 没有起始甲硫氨酸的突变蛋白链霉亲和素Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47		
<400> 105		

Glu	Ala	Gly	Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe
1				5					10					15	
Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Ile	Gly
			20					25					30		
Ala	Arg	Gly	Asn	Ala	Glu	Ser	Arg	Tyr	Val	Leu	Thr	Gly	Arg	Tyr	Asp
		35					40					45			
Ser	Ala	Pro	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Trp	Thr	Val
	50					55					60				
Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser
65					70				75					80	
Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu
				85					90					95	
Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu	Val
			100					105					110		
Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser		
		115					120					125			
<210> 106															
<211> 326															
<212> PRT															
<213> 智人(Homo sapiens)															
<220>															
<223> 人IgG2 Fc (Uniprot P01859)															
<400> 106															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			

Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
130							135					140			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195						200				205				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245						250					255	
Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
			260					265					270		
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			275					280					285		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	290					295					300				
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
305					310					315					320
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
				325											

<210> 107

<211> 327

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<223> 人IgG4 Fc (Uniprot P01861)

<400> 107

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr		
65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro		
	100	105
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
	115	120
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
	130	135
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe		
	165	170
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
	180	185
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu		
	195	200
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
	210	215
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
	245	250
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
	260	265
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
	275	280
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
	290	295
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
	325	

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FKBP

<400> 108

Gly	Val	Gln	Val	Glu	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro
1				5					10					15	
Lys	Arg	Gly	Gln	Thr	Cys	Val	Val	His	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Glu	Asp
			20					25					30		
Gly	Lys	Lys	Met	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Lys	Pro	Phe	Lys	Phe
			35					40					45		
Met	Leu	Gly	Lys	Gln	Glu	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Glu	Glu	Gly	Val	Ala
			50				55				60				
Gln	Met	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Tyr
65					70					75					80
Ala	Tyr	Gly	Ala	Thr	Gly	His	Pro	Gly	Ile	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Thr
				85					90					95	
Leu	Val	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu					
				100					105						

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FKBP12v36

<400> 109

Gly	Val	Gln	Val	Glu	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Arg	Thr	Phe	Pro
1				5					10					15	
Lys	Arg	Gly	Gln	Thr	Cys	Val	Val	His	Tyr	Thr	Gly	Met	Leu	Glu	Asp
			20					25					30		
Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Arg	Asn	Lys	Pro	Phe	Lys	Phe
			35					40					45		
Met	Leu	Gly	Lys	Gln	Glu	Val	Ile	Arg	Gly	Trp	Glu	Glu	Gly	Val	Ala
			50				55				60				
Gln	Met	Ser	Val	Gly	Gln	Arg	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile	Ser	Pro	Asp	Tyr
65					70					75					80
Ala	Tyr	Gly	Ala	Thr	Gly	His	Pro	Gly	Ile	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Thr
				85					90					95	
Leu	Val	Phe	Asp	Val	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu					
				100					105						

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 修饰的酰化基序

<400> 110

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg

1 5 10 15

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 双重酰化基序

<220>

<221> 变体

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa是任何氨基酸

<400> 111

Met Gly Cys Xaa Cys

1 5

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 酰化区

<220>

<221> 变体

<222> (4) ... (4)

<223> Xaa是任何氨基酸

<400> 112

Cys Ala Ala Xaa

1

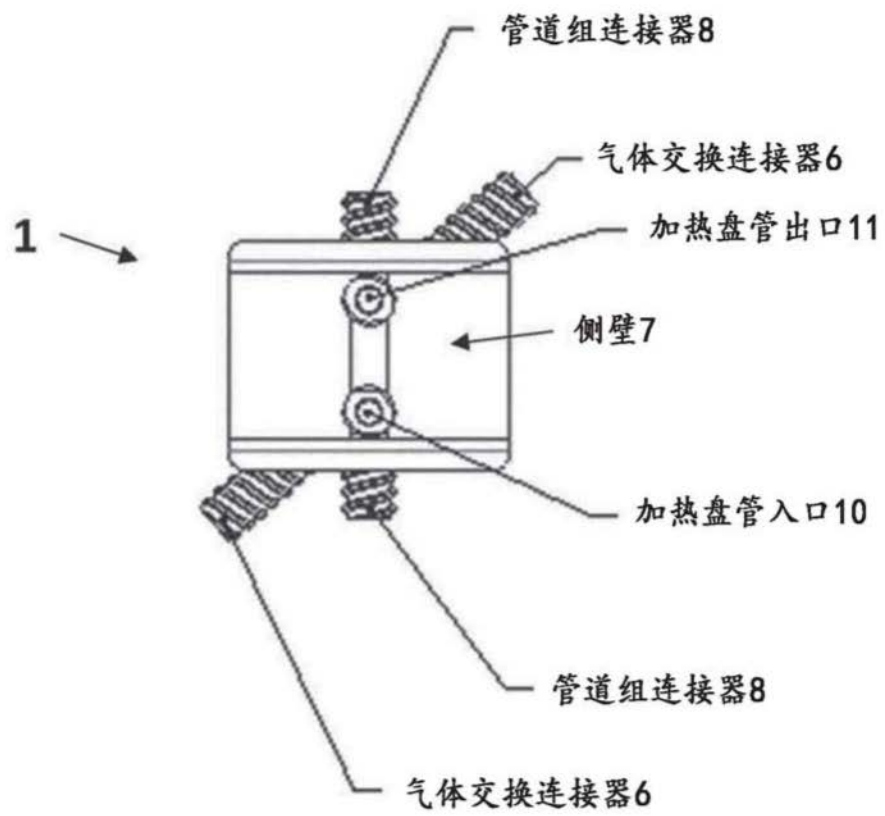
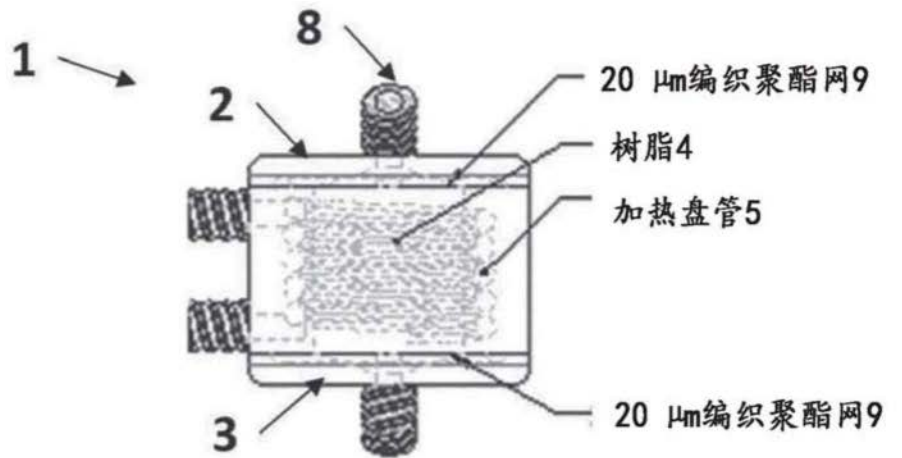


FIG. 1A

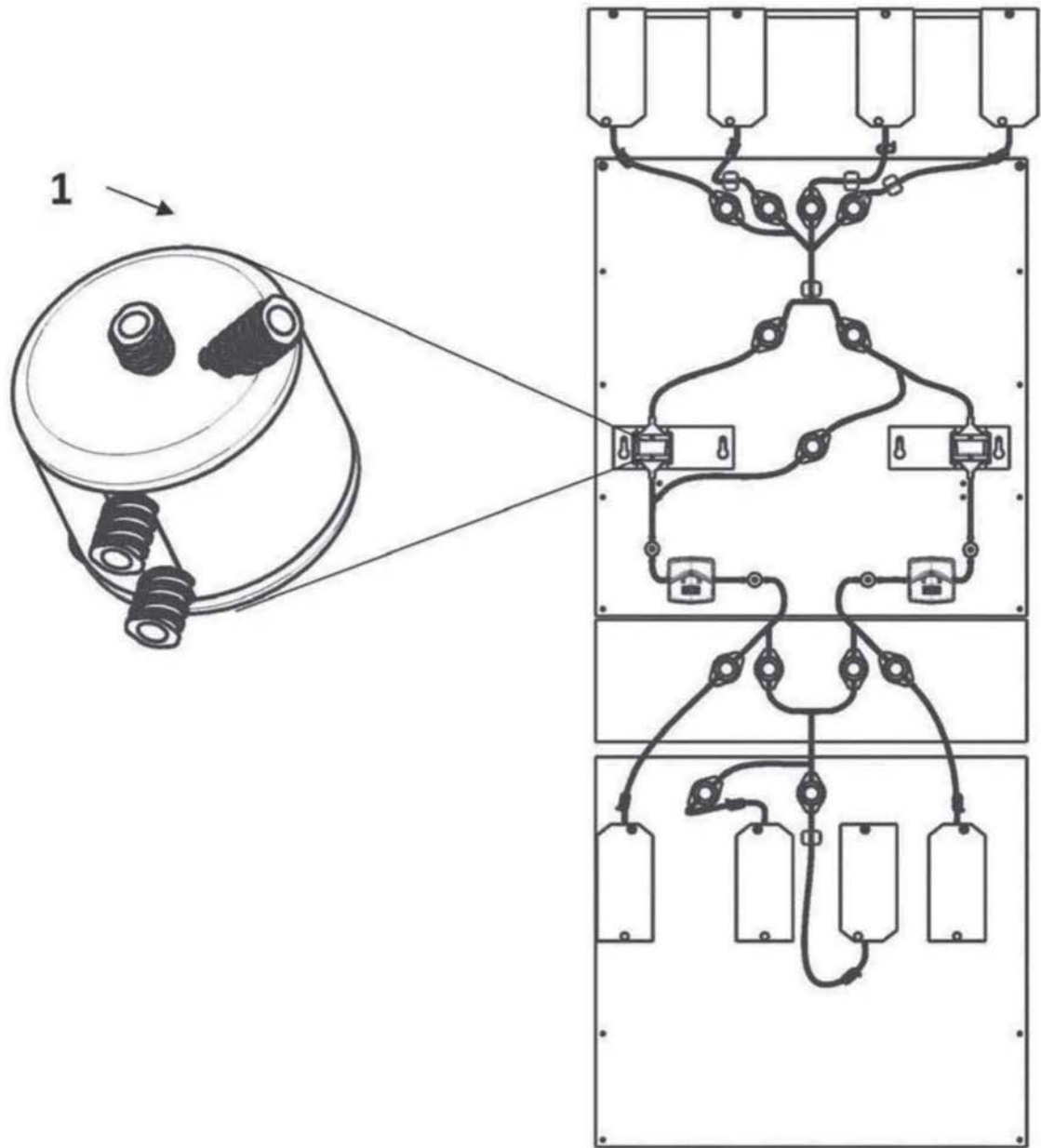


FIG.1B

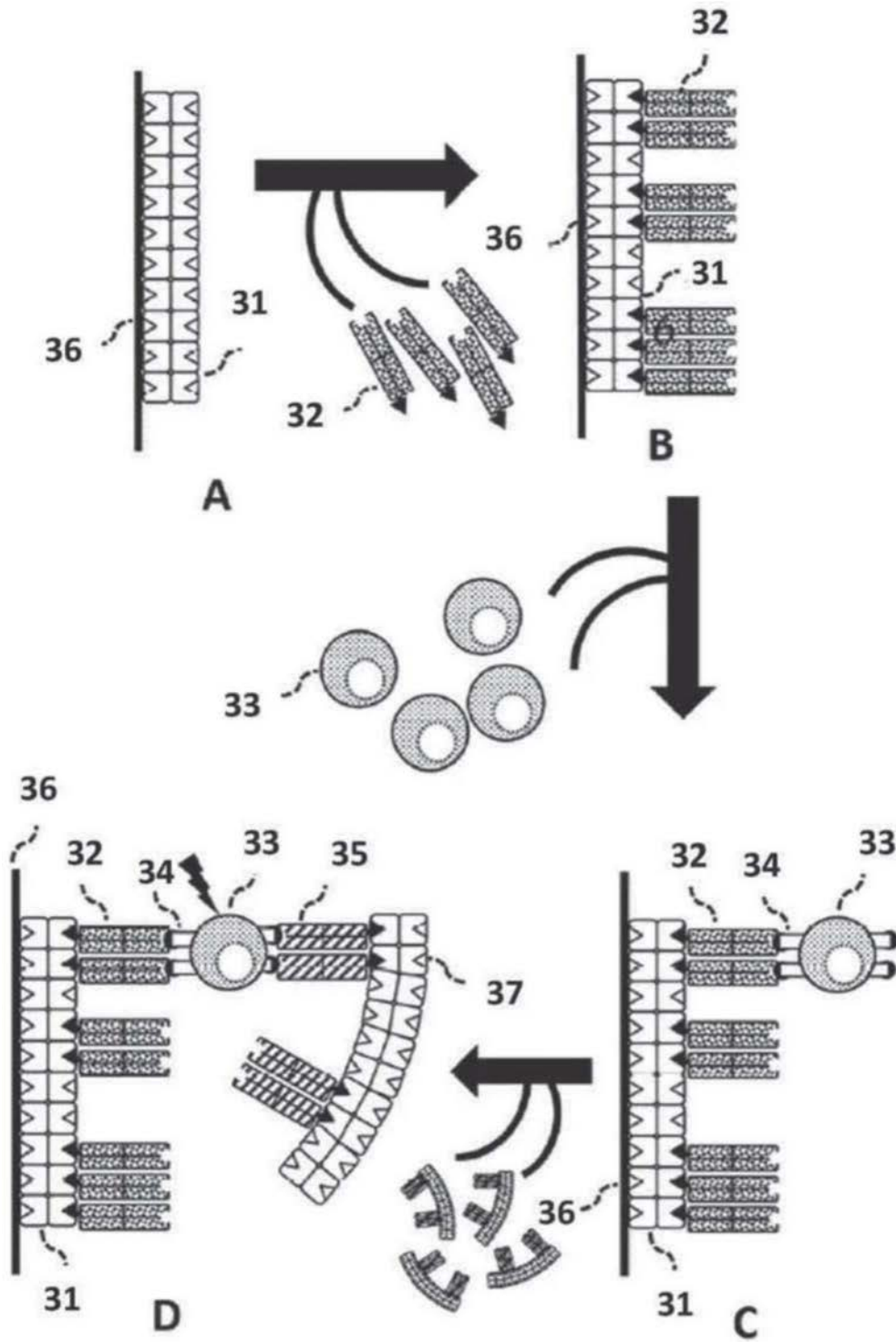


FIG. 2

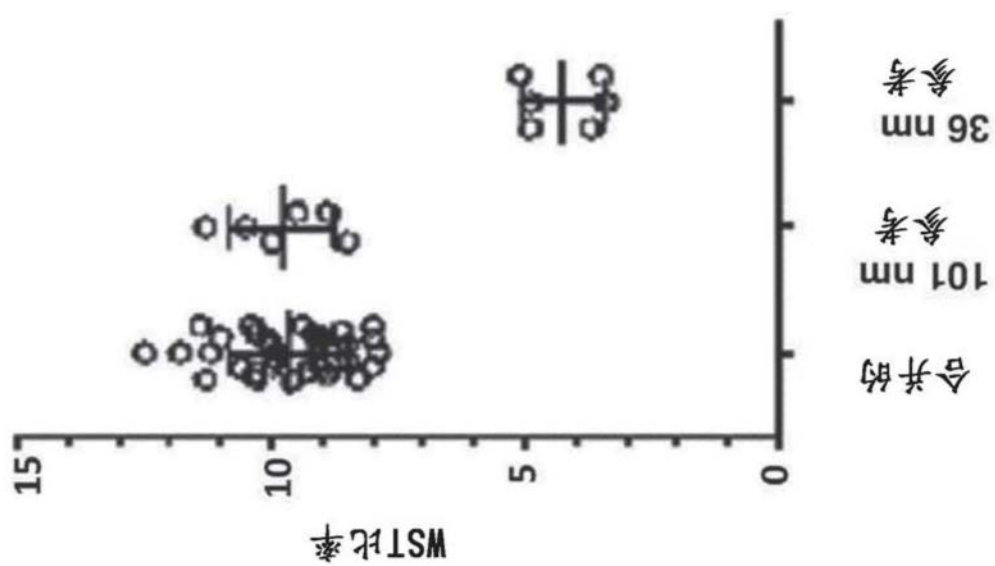


FIG.3A

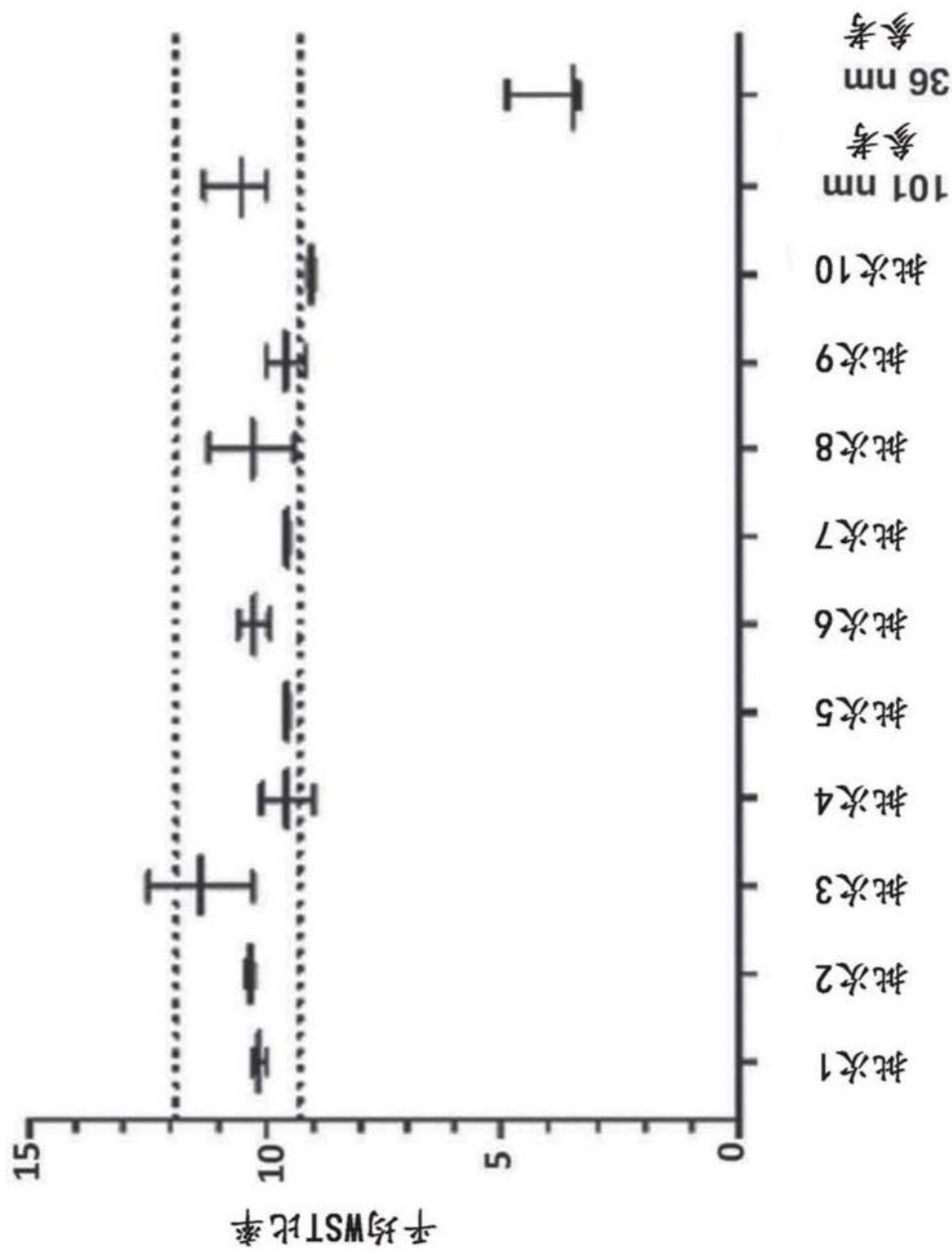


FIG.3B

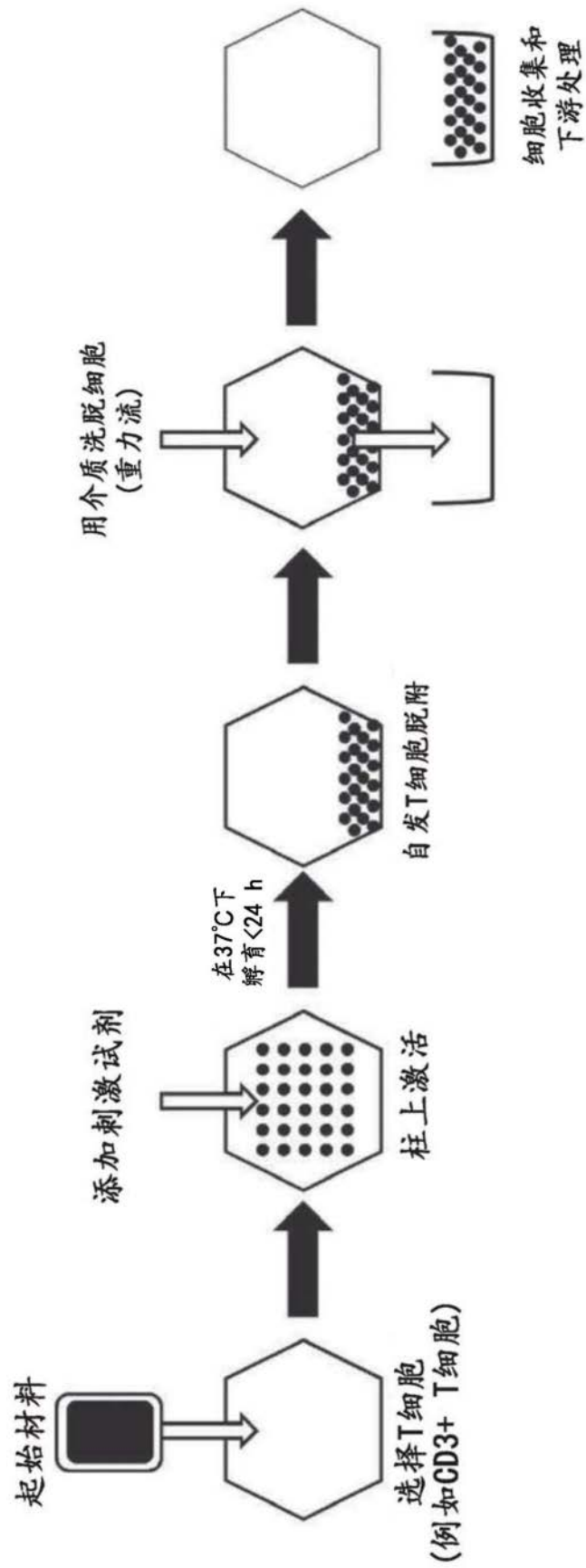


FIG.4

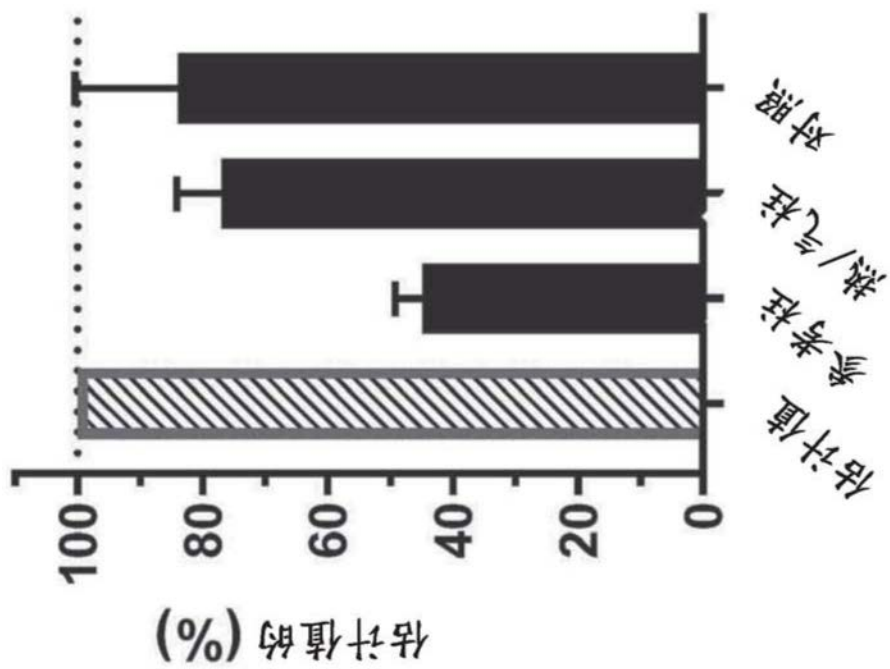


FIG.5

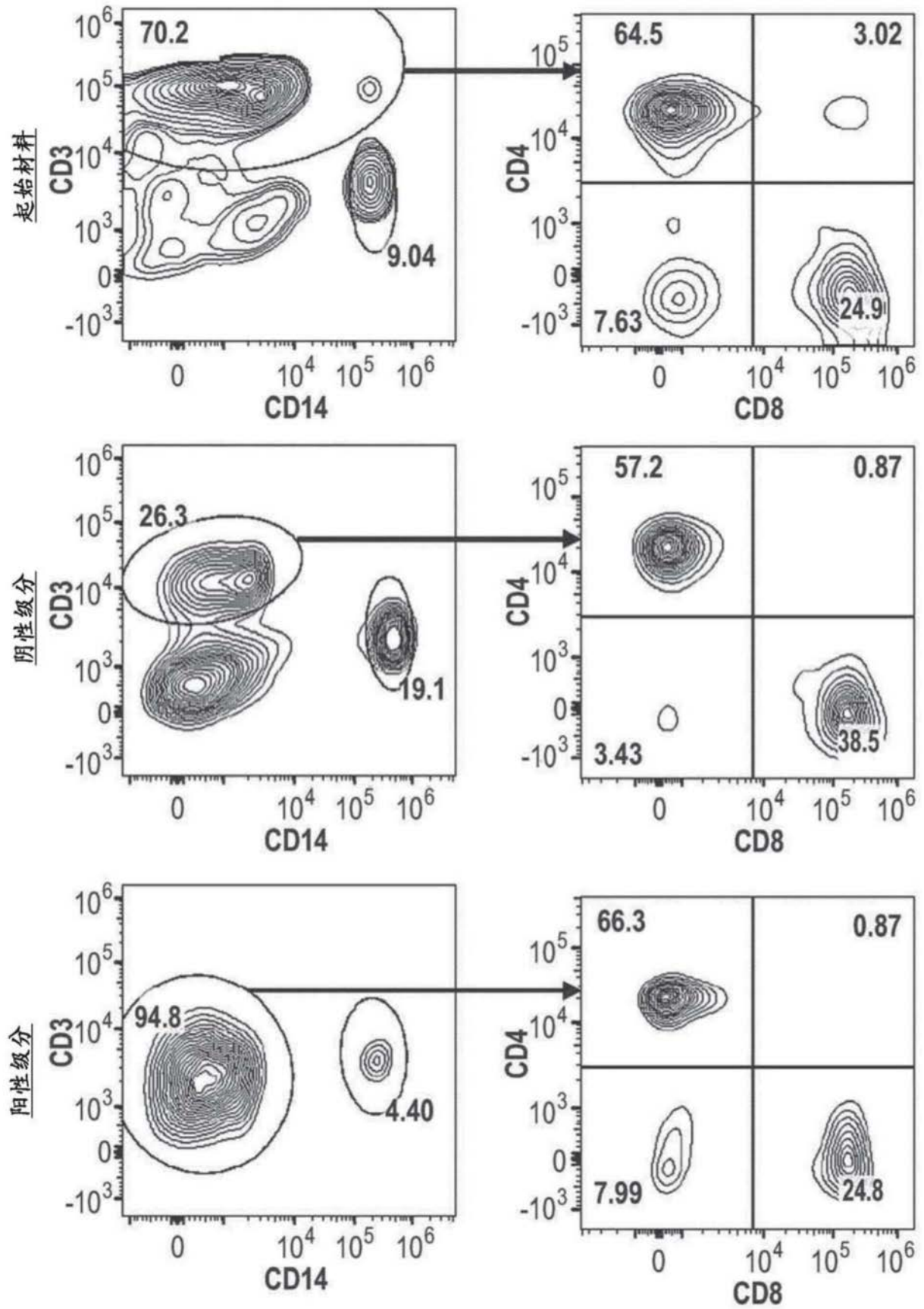


FIG.6

第3天

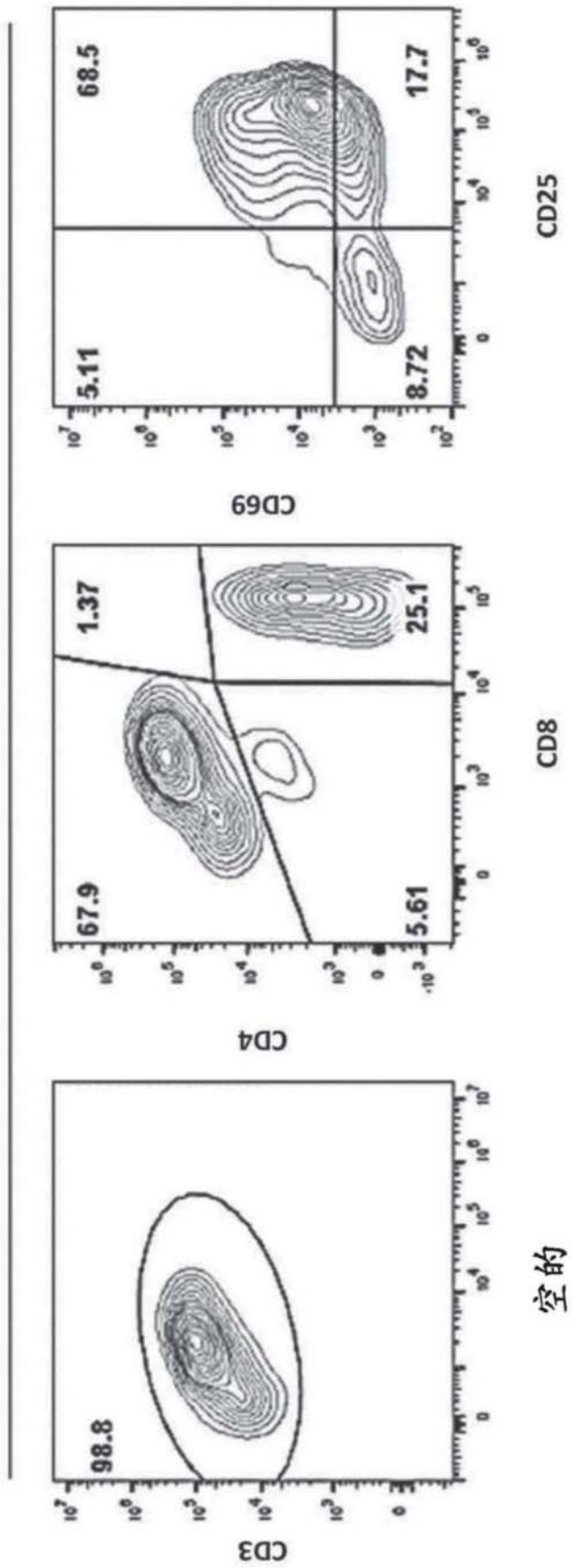


FIG.7A

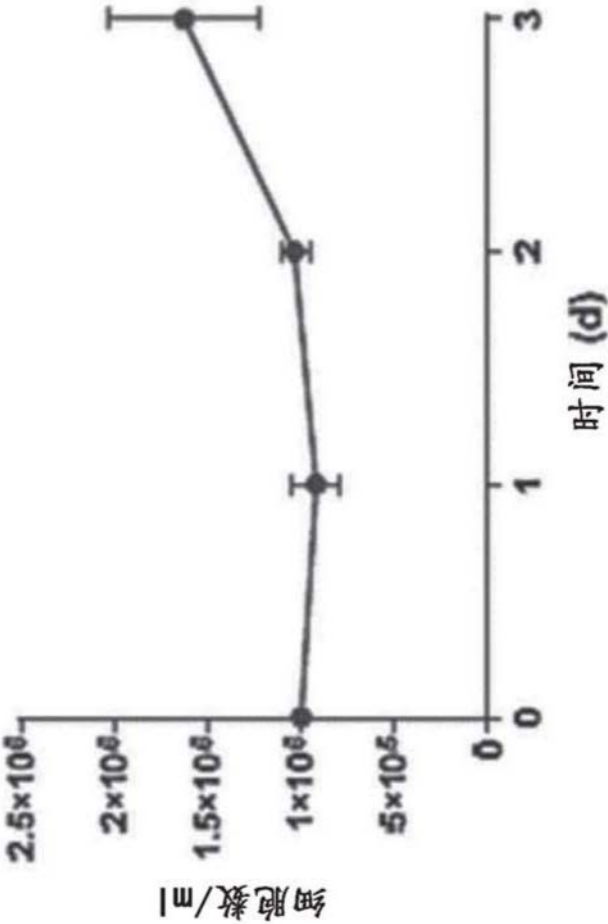


FIG.7B

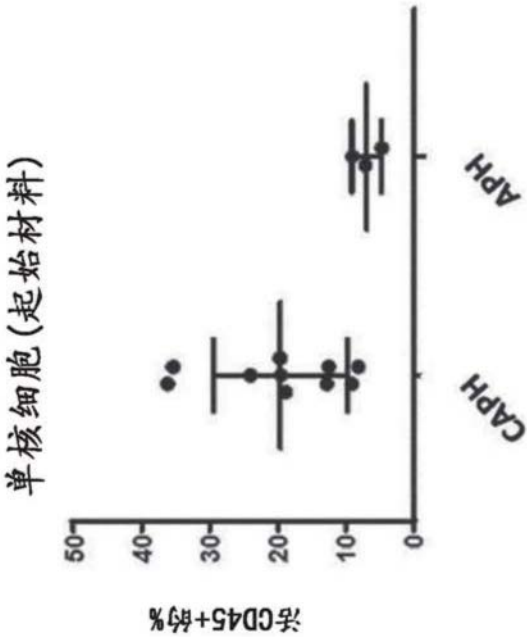


FIG.8A

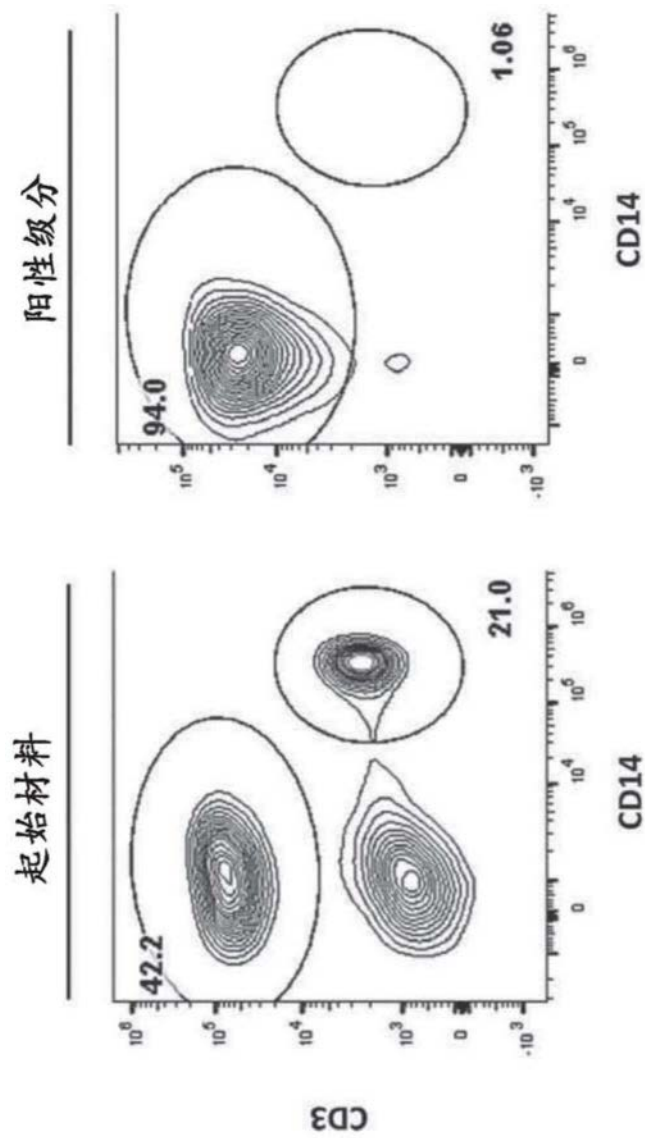


FIG.8B

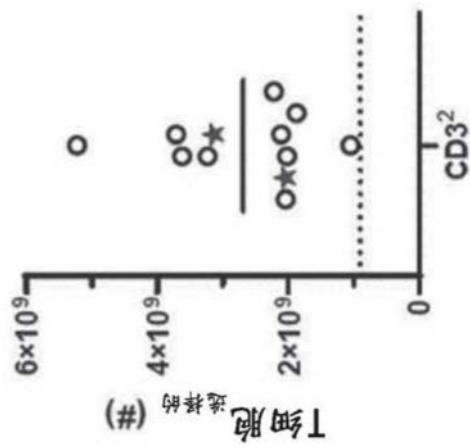


FIG.8C

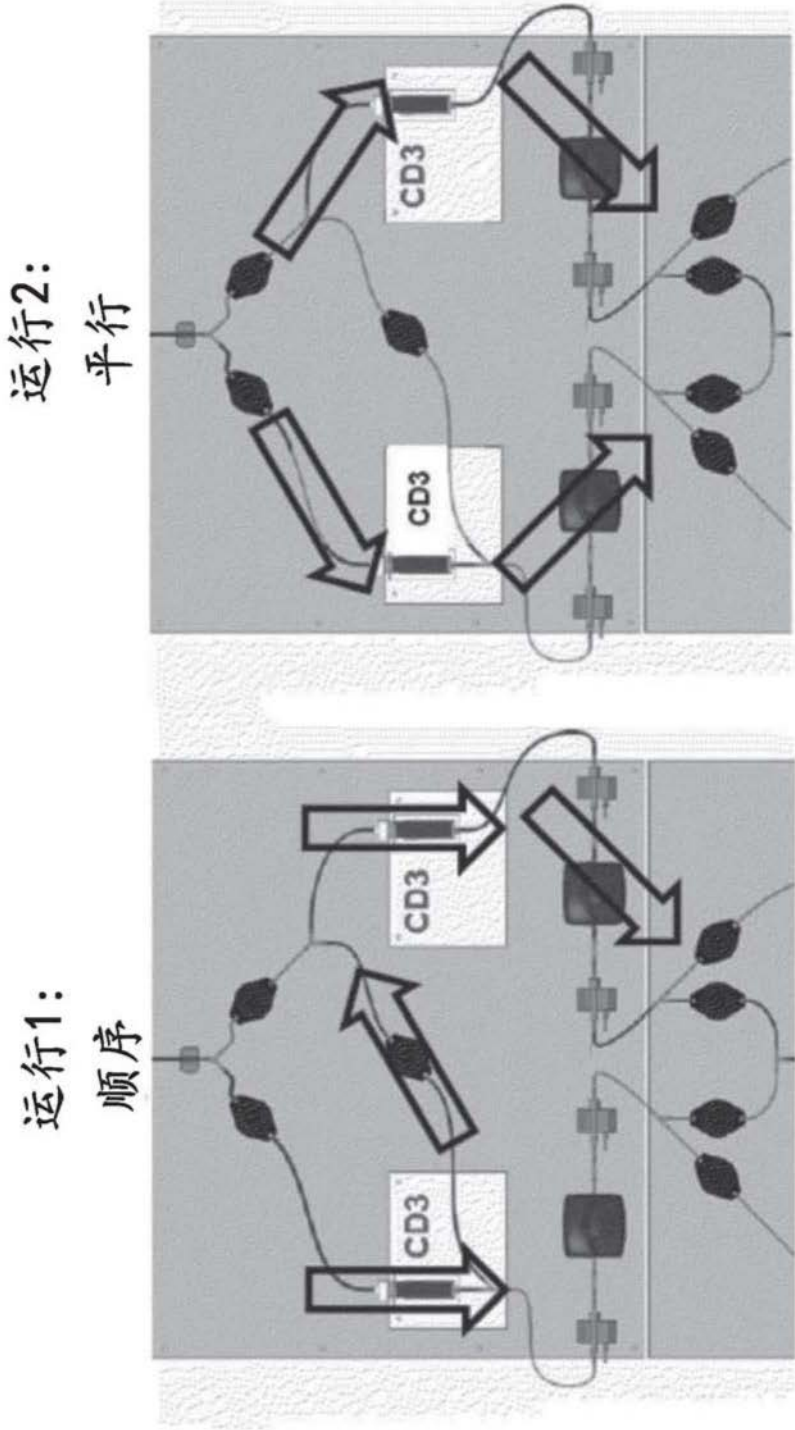


FIG.9

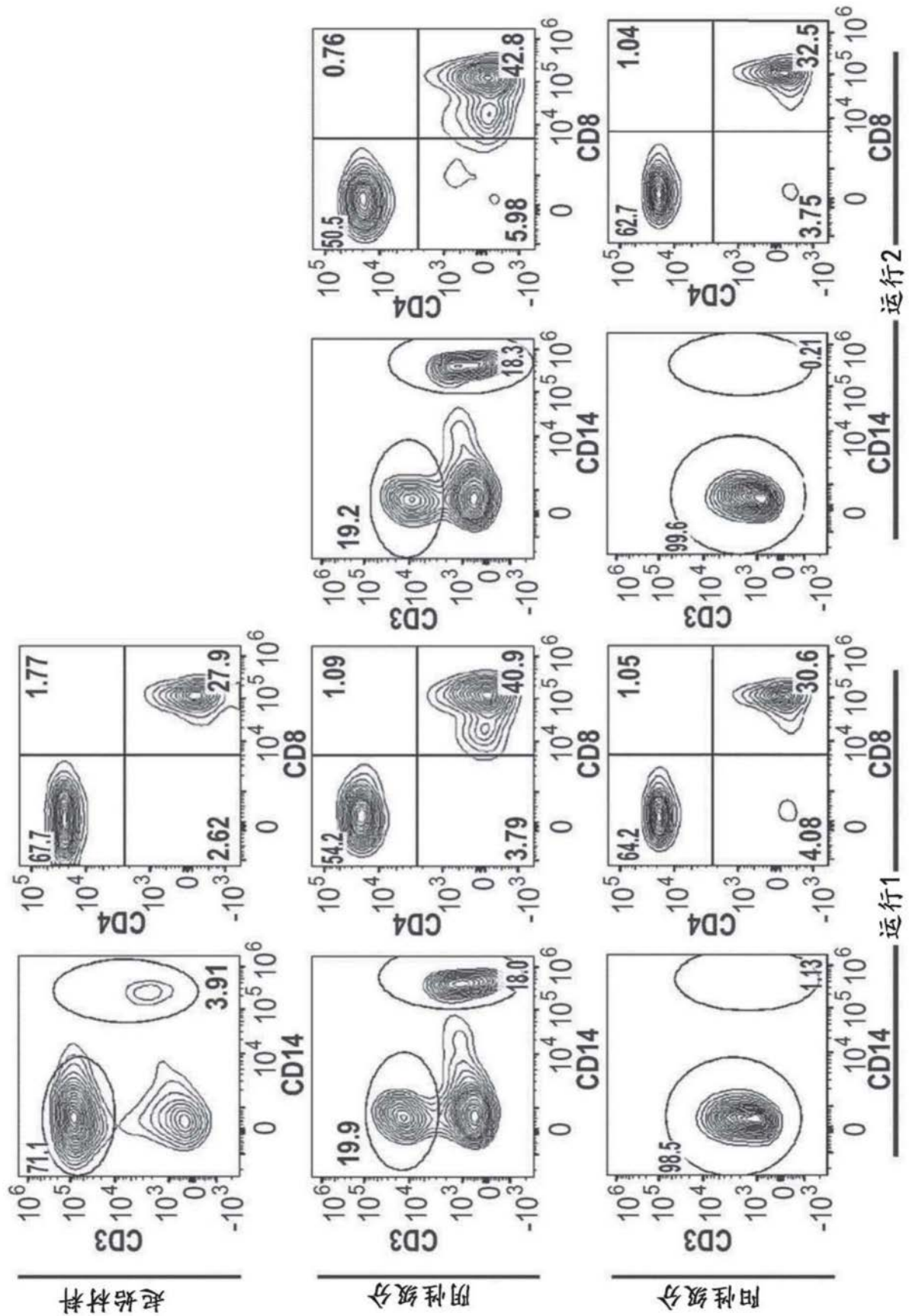


FIG.10A

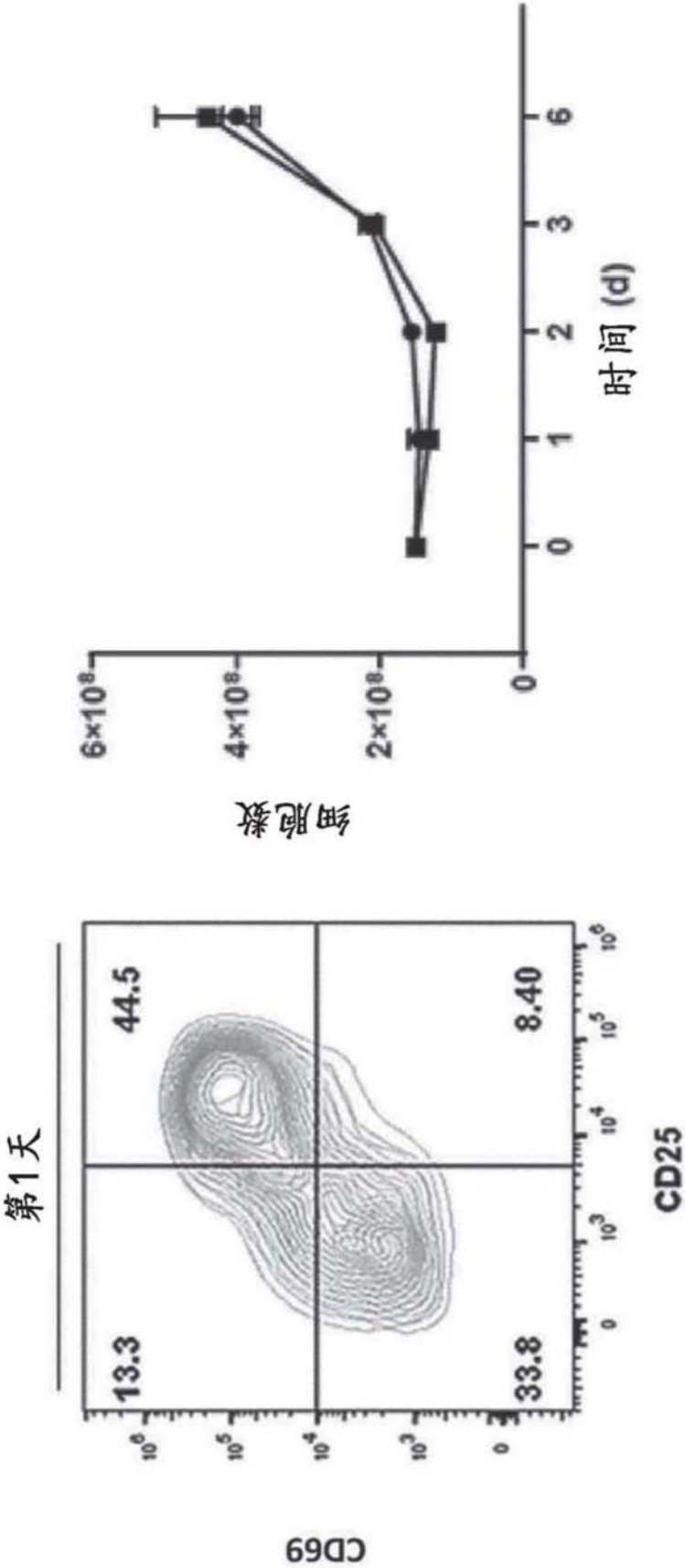


FIG. 10B

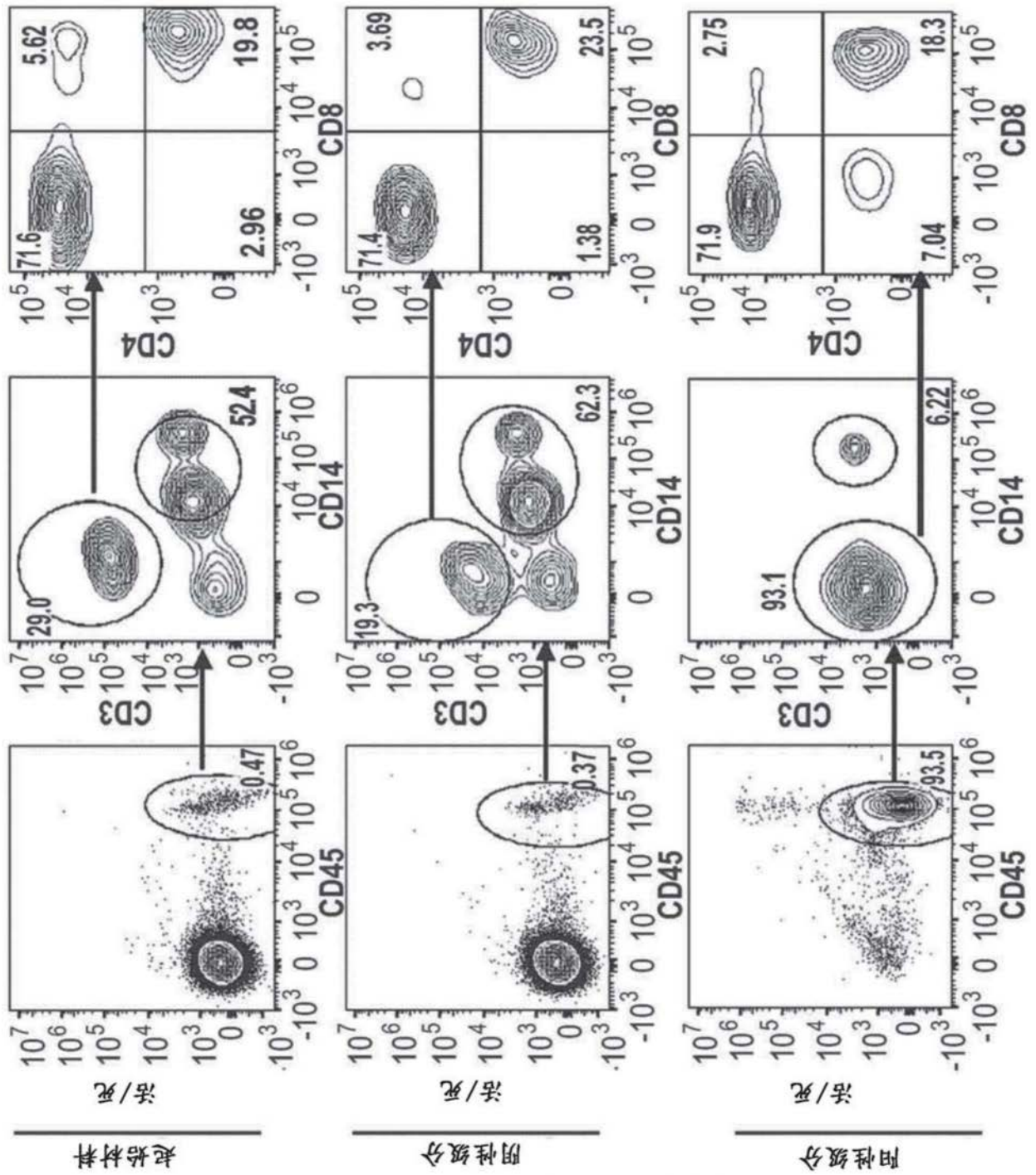


FIG.11A

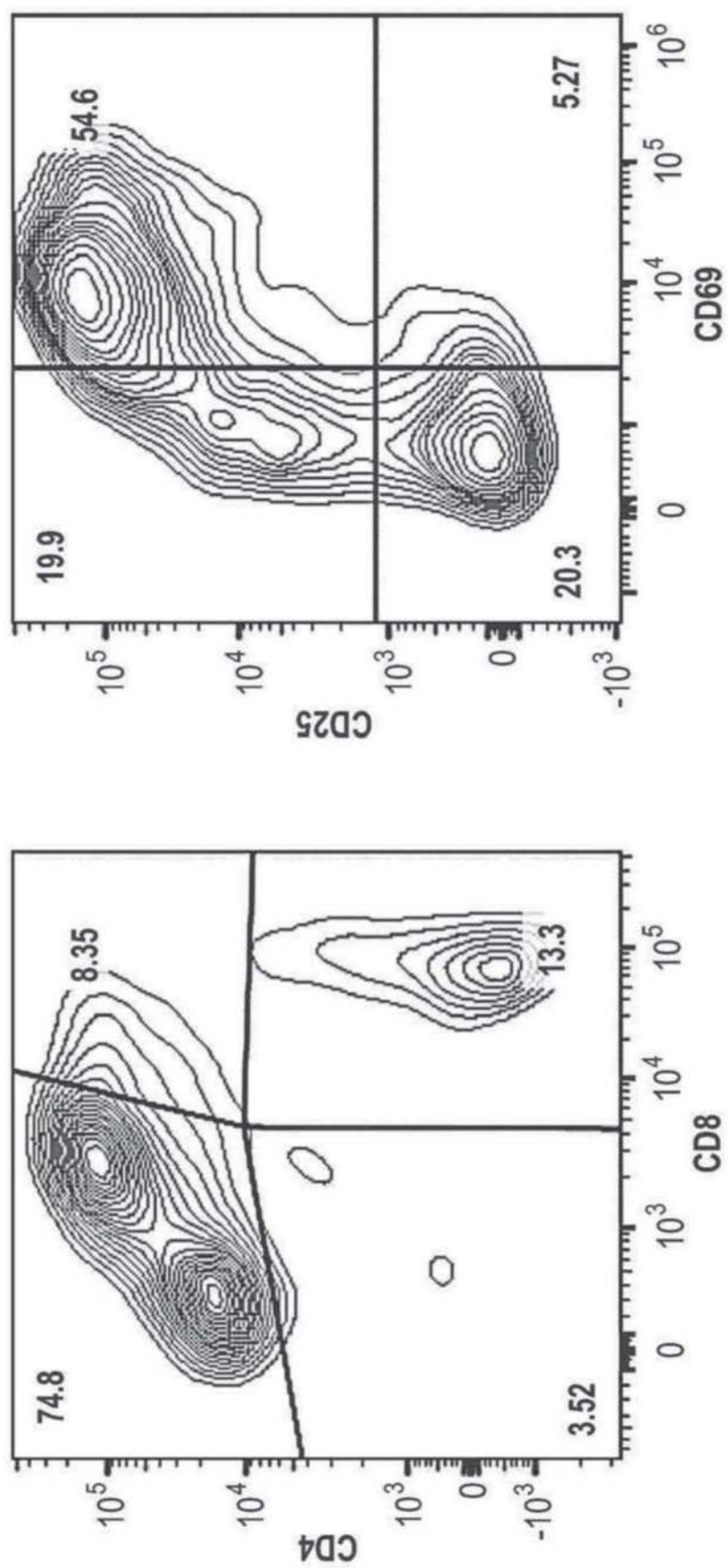


FIG.11B

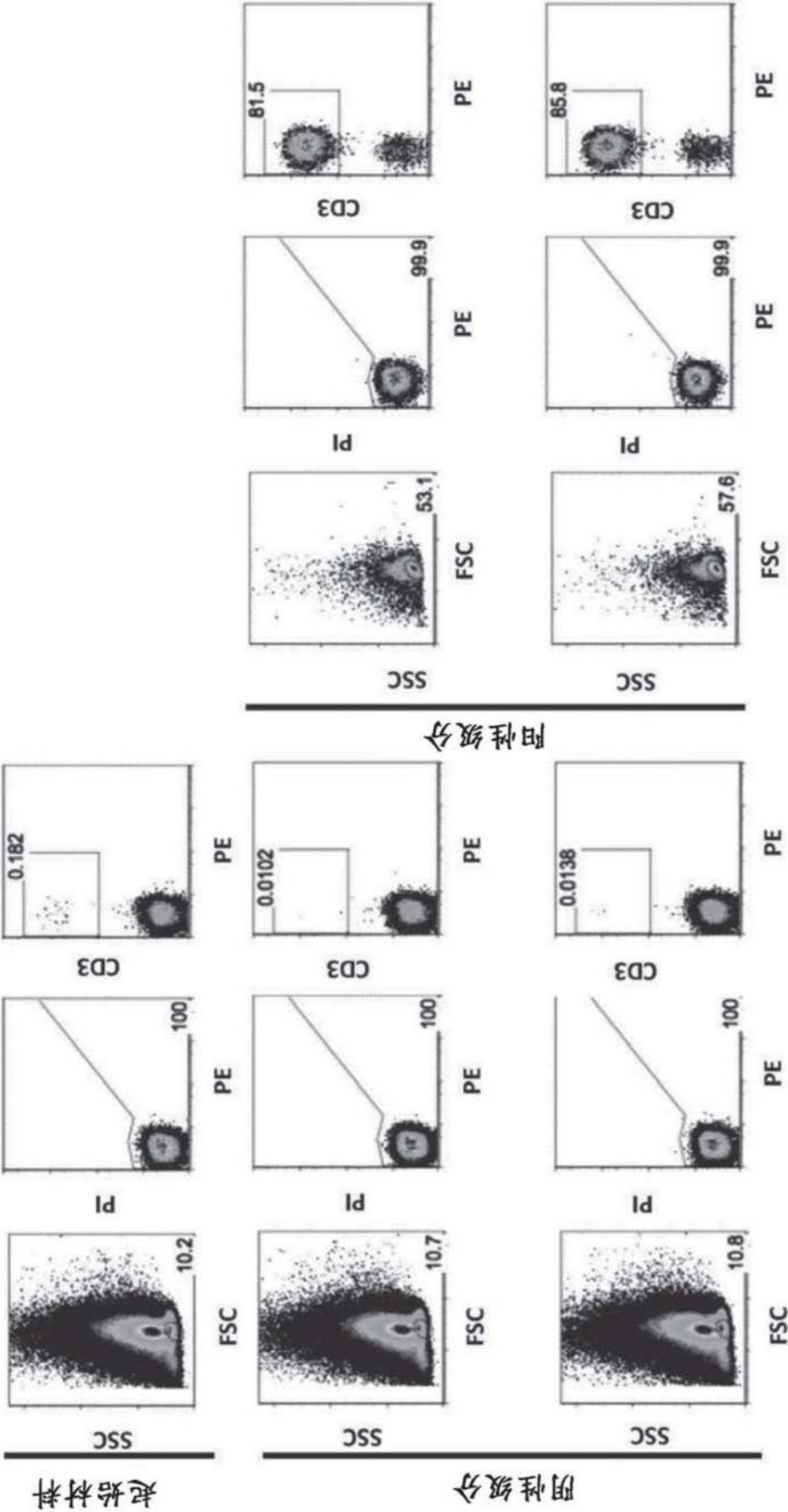


FIG.12

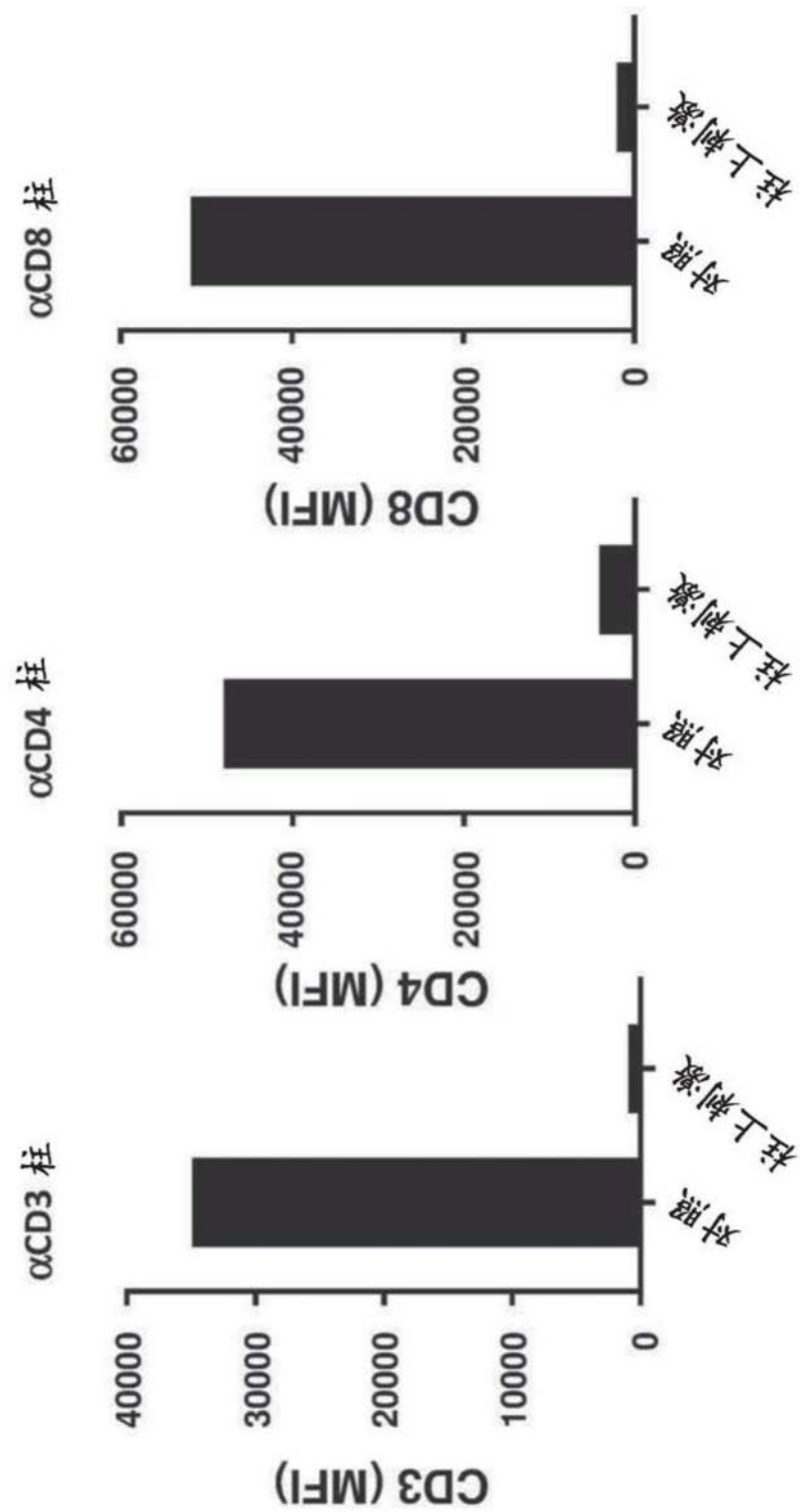


FIG.13

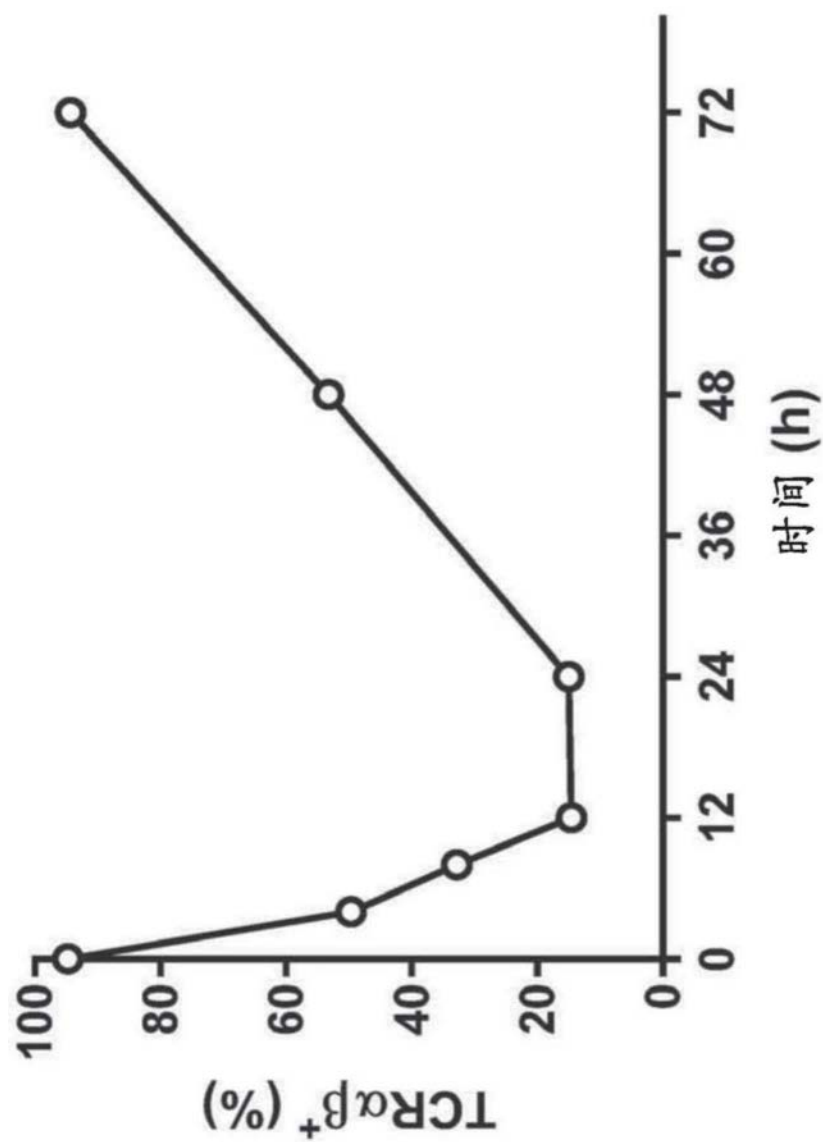


FIG.14

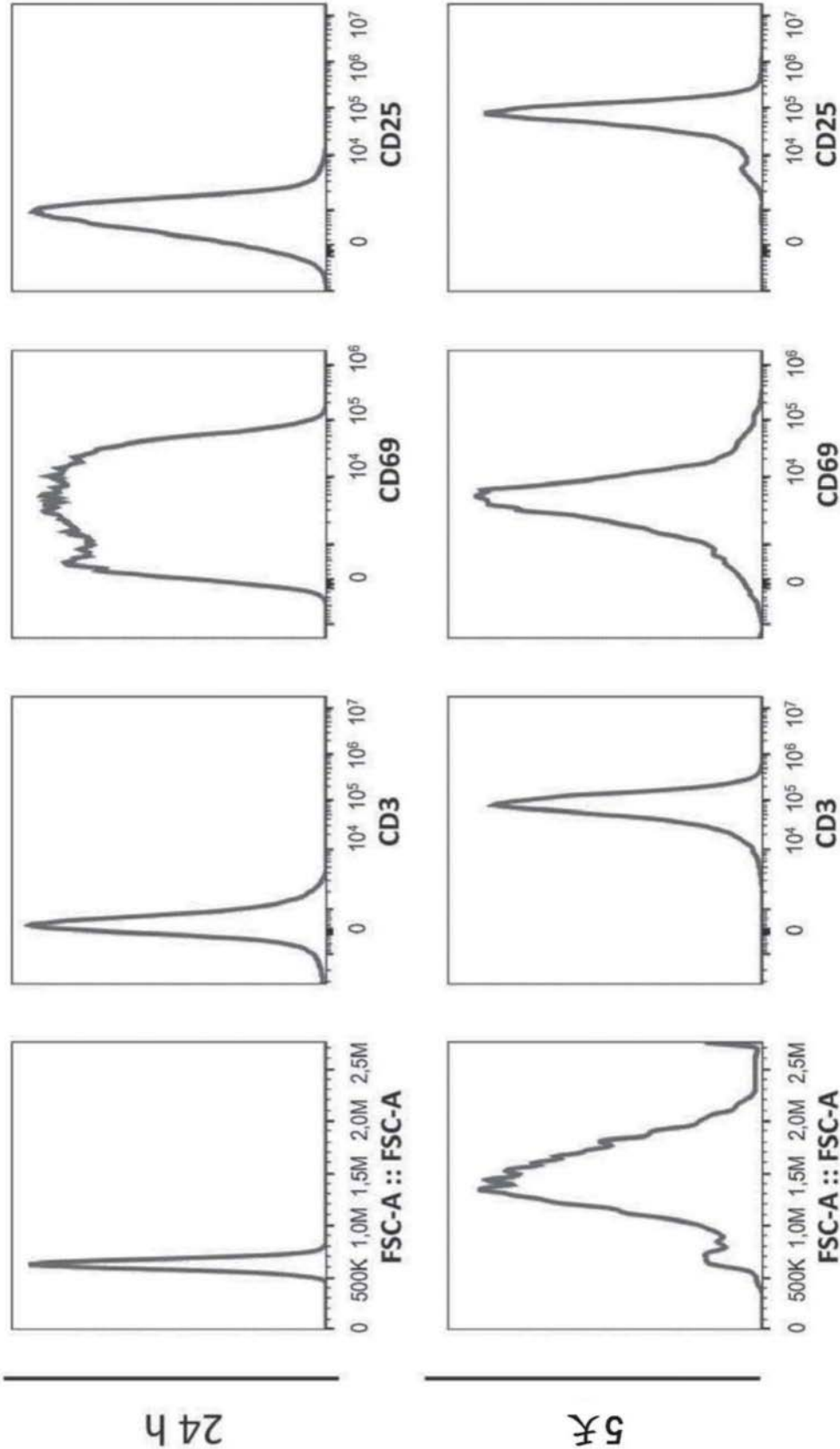


FIG. 15A

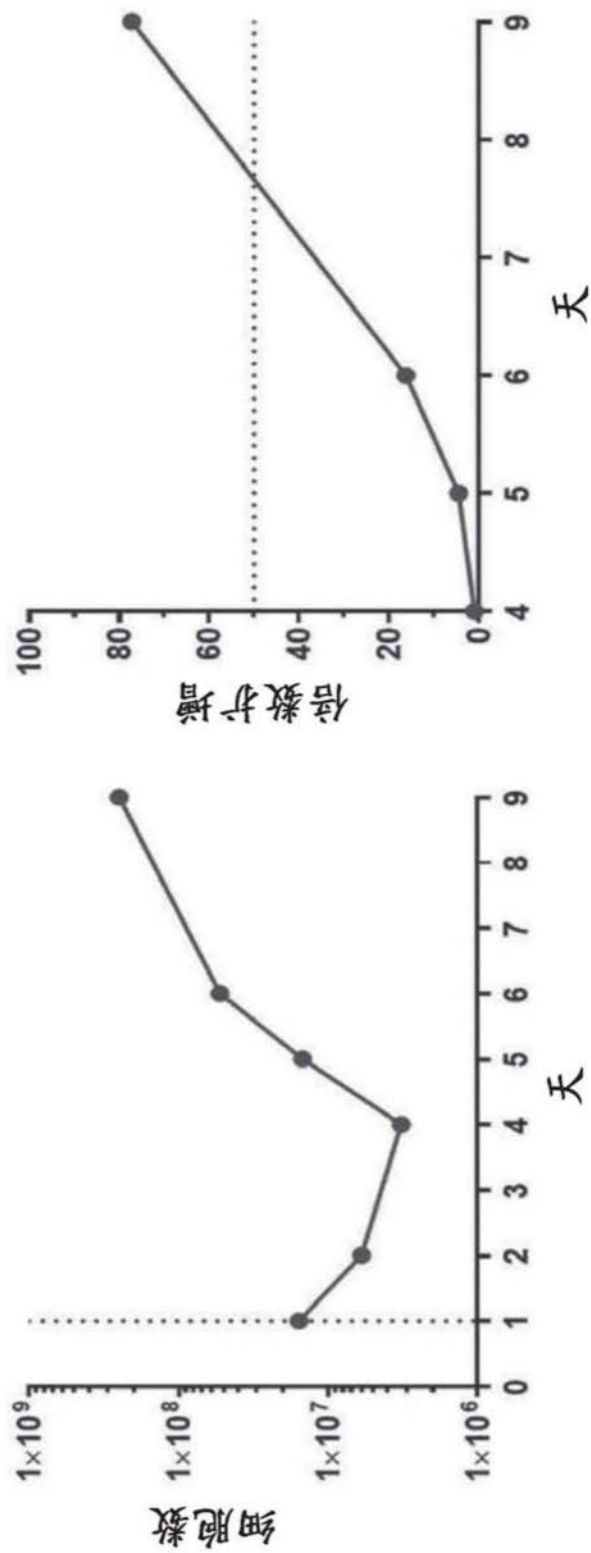


FIG.15B

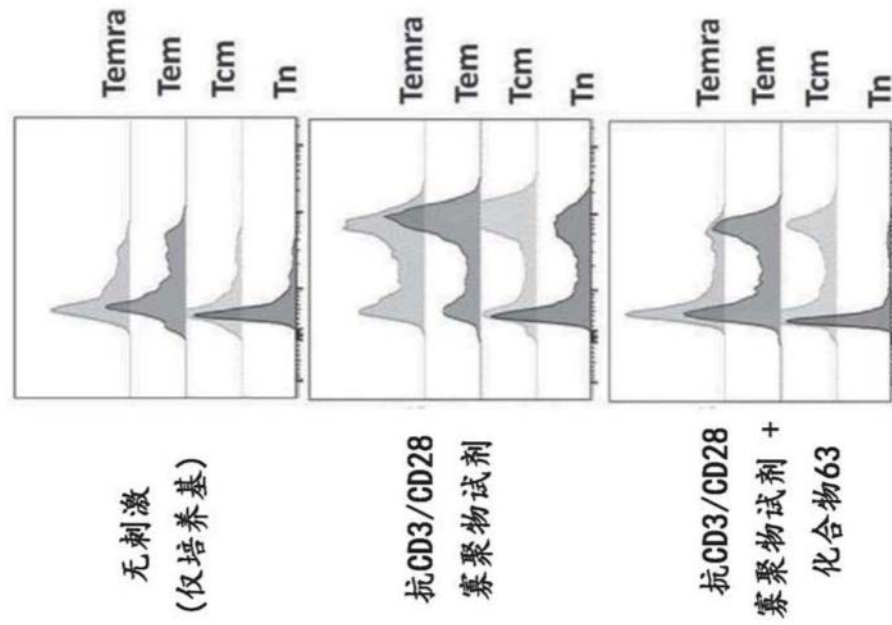


FIG. 16A

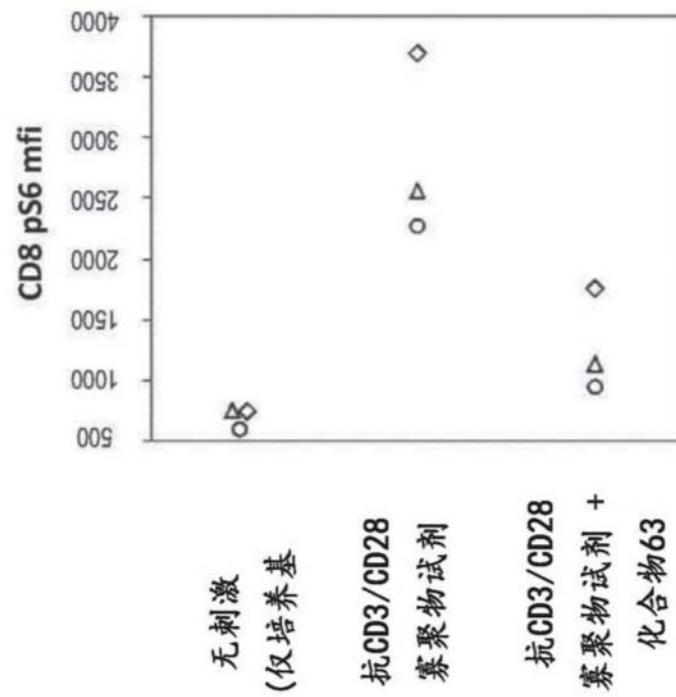


FIG. 16B

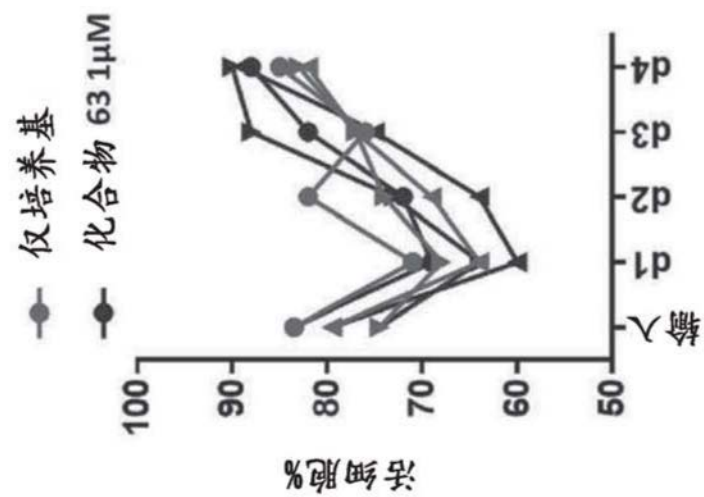


FIG.16C

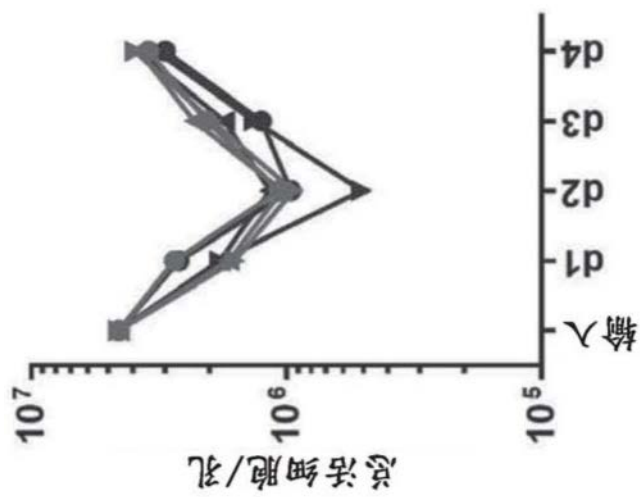


FIG.16D

○ 没有化合物63
● 具有化合物63

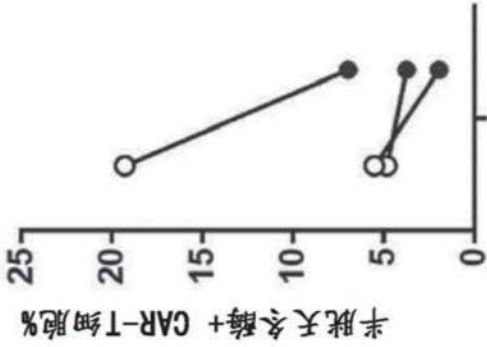


FIG. 17A

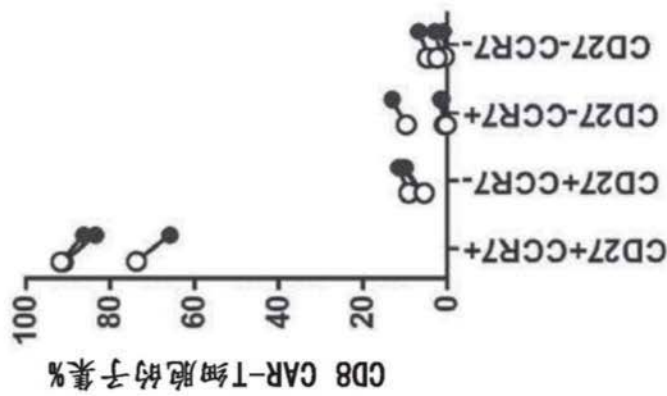


FIG. 17B

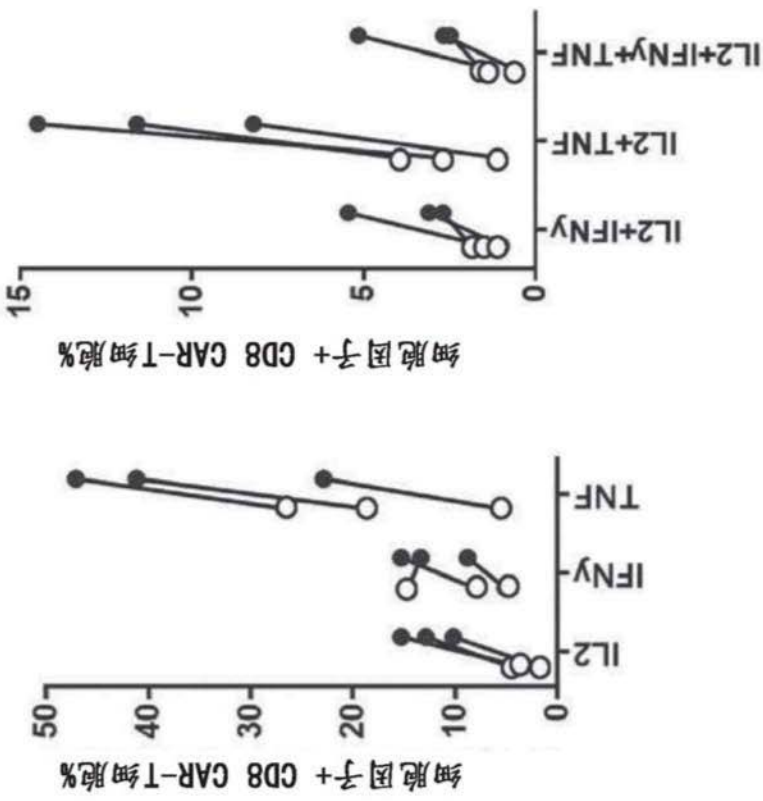


FIG. 17C

○ 没有化合物63
● 具有化合物63

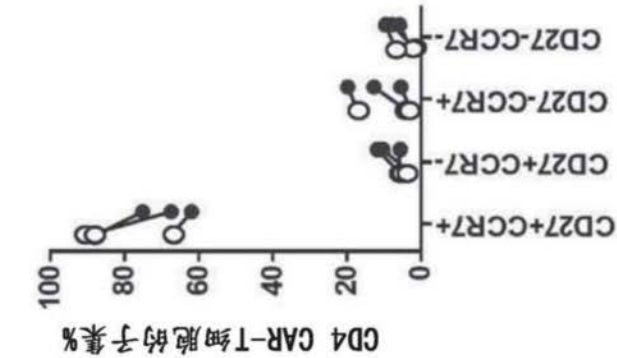


FIG. 17D

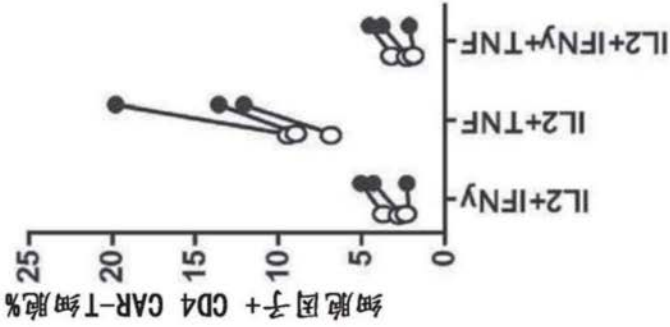
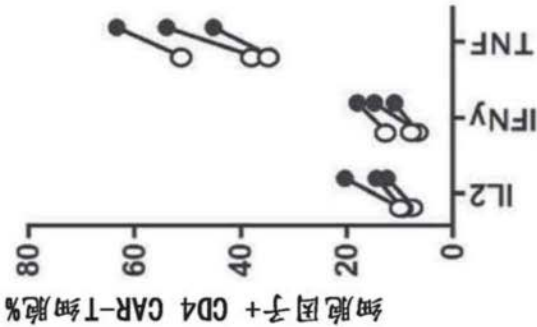


FIG. 17E

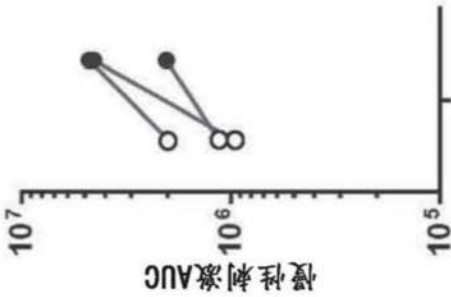
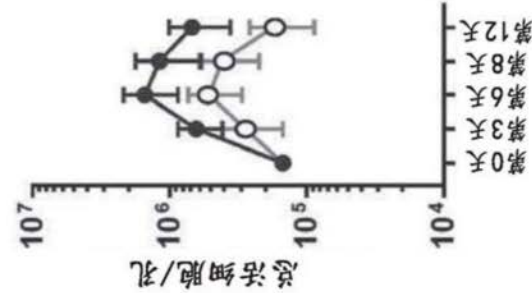


FIG. 17F

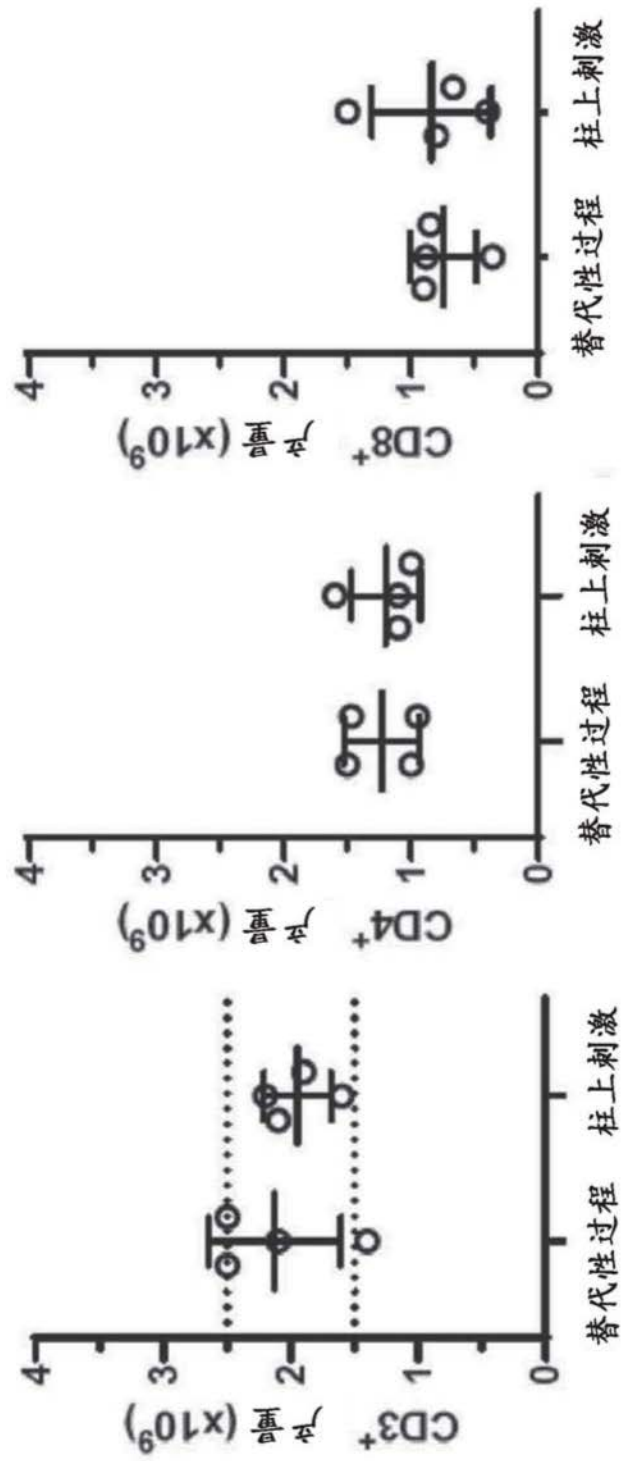


FIG.18A

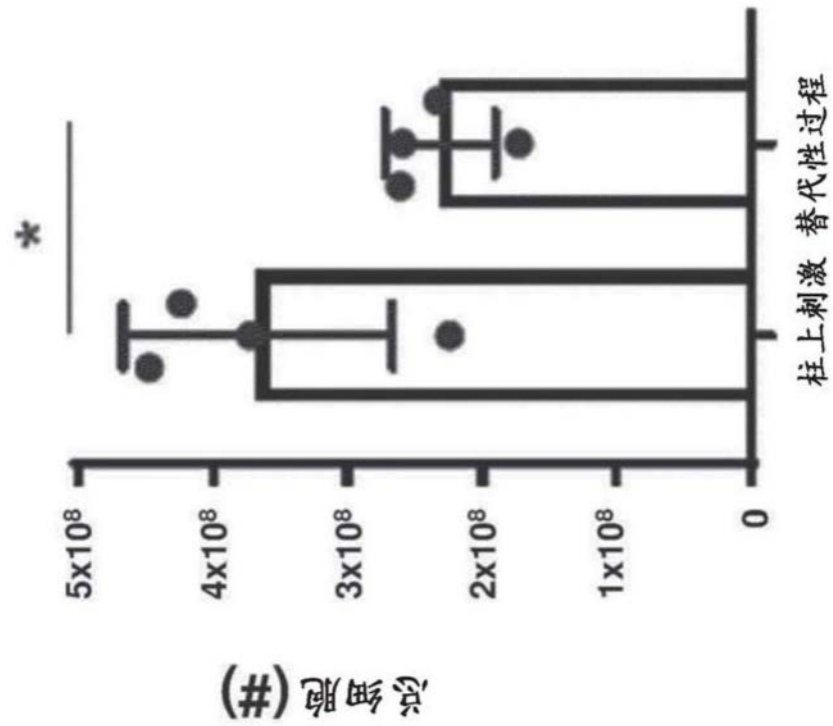


FIG.18B

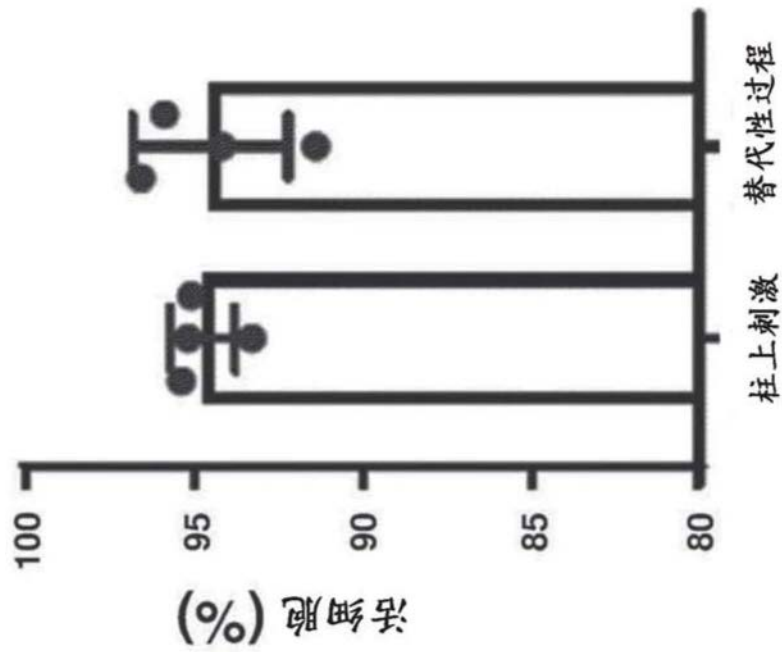


FIG.18C

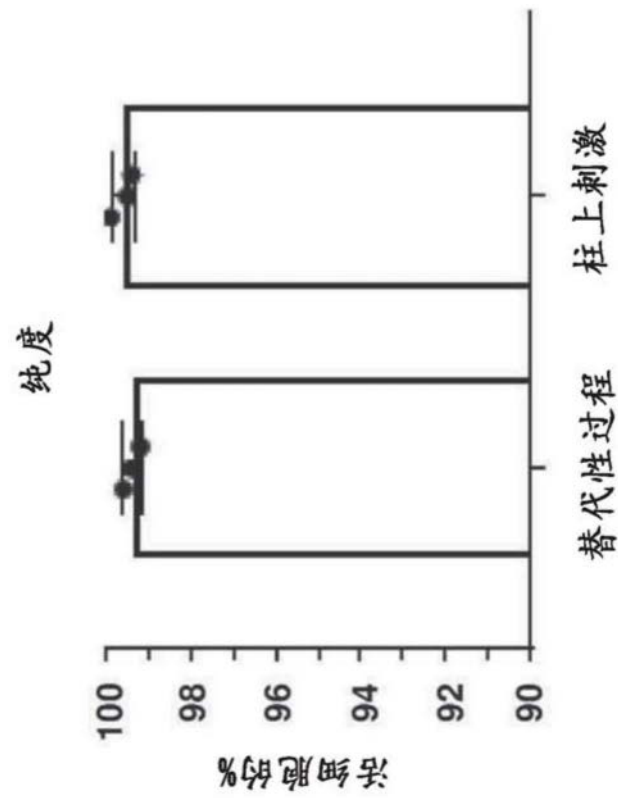


FIG. 19A

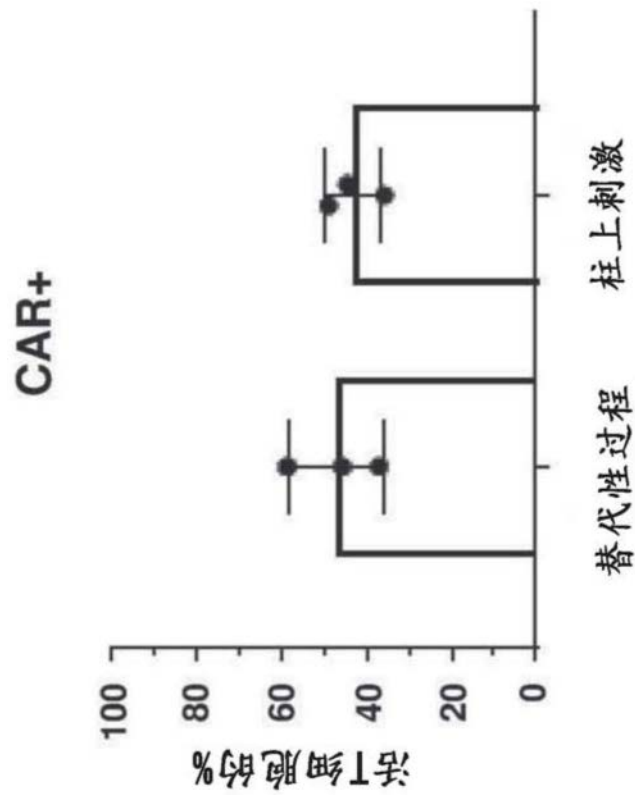


FIG. 19B

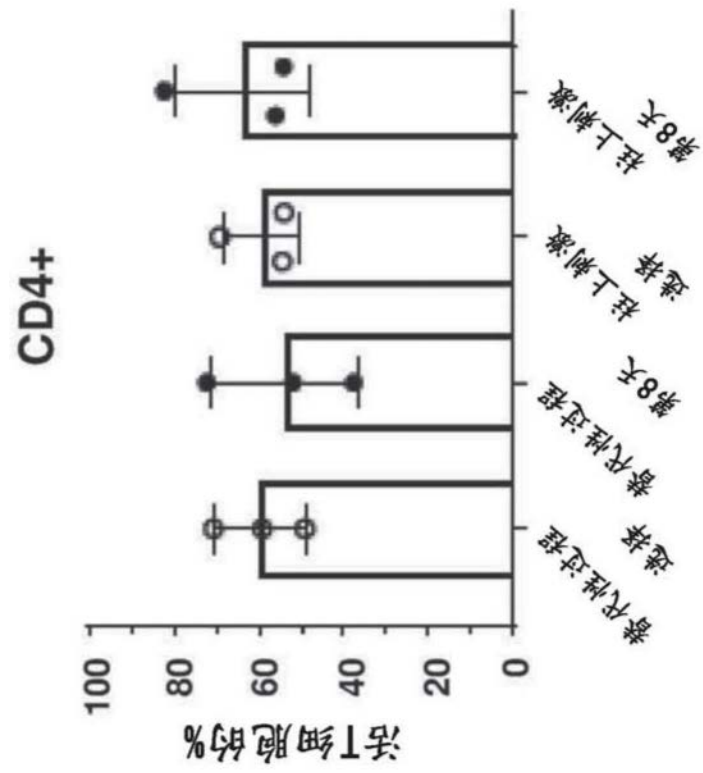


FIG. 19C

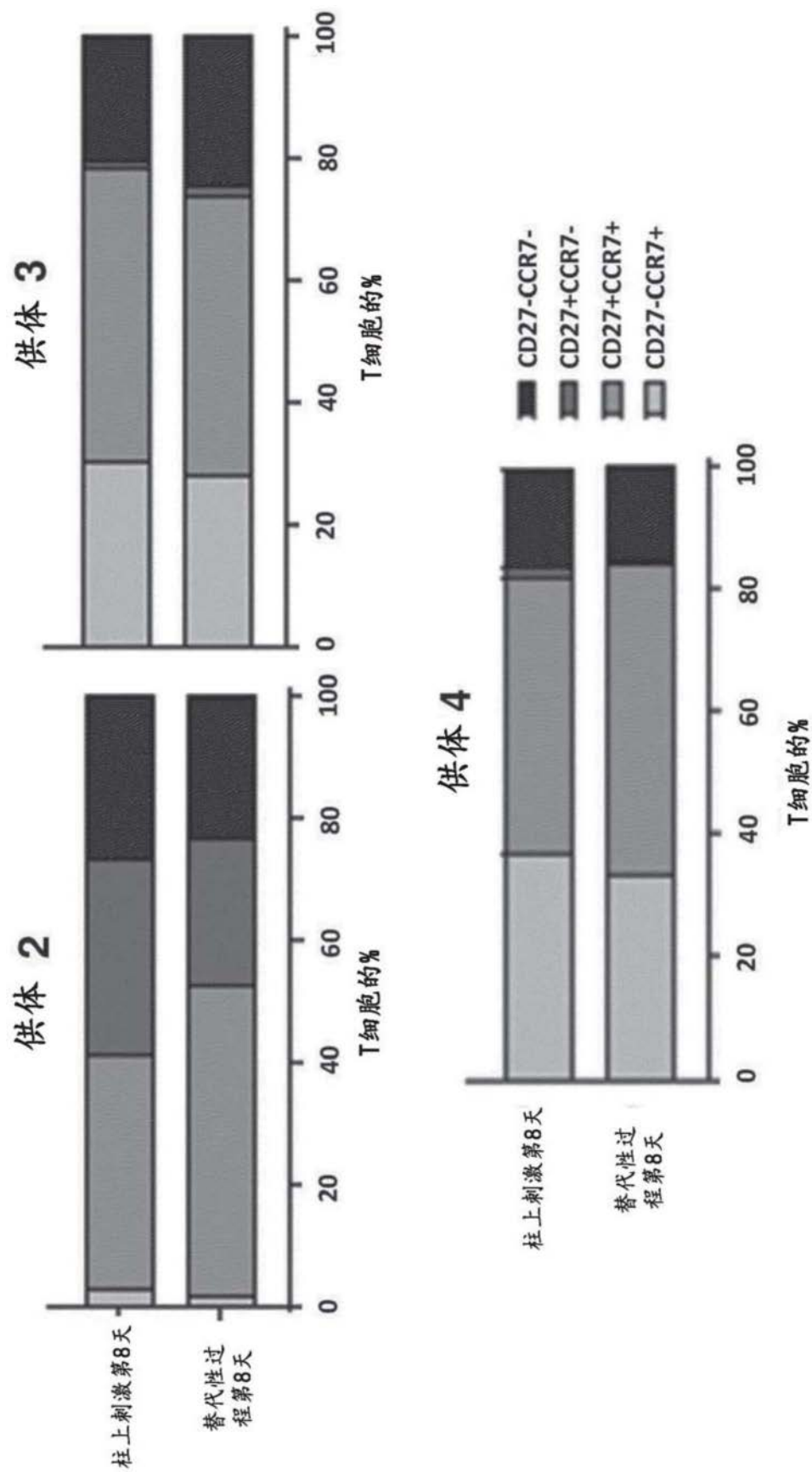


FIG.19D

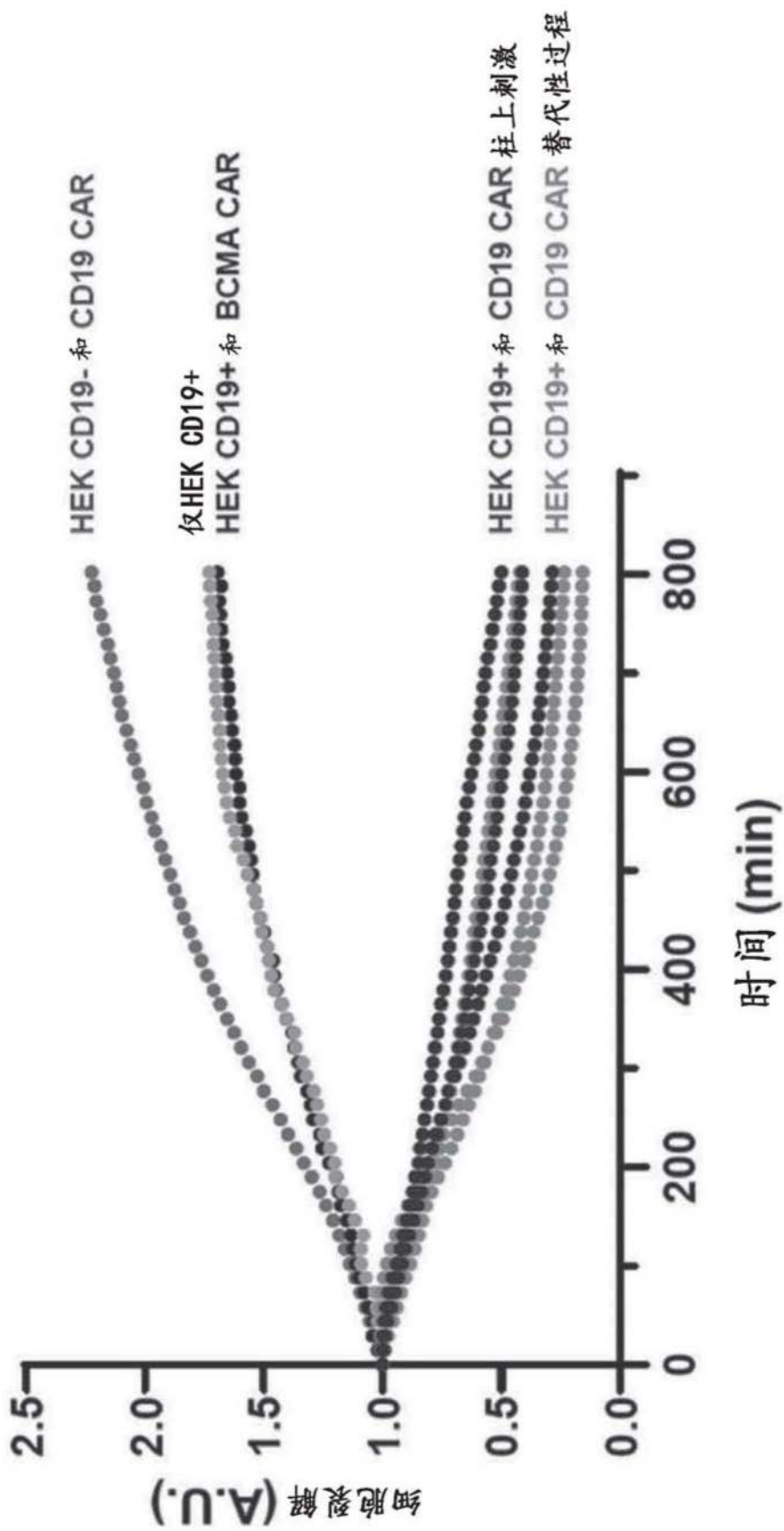


FIG.20

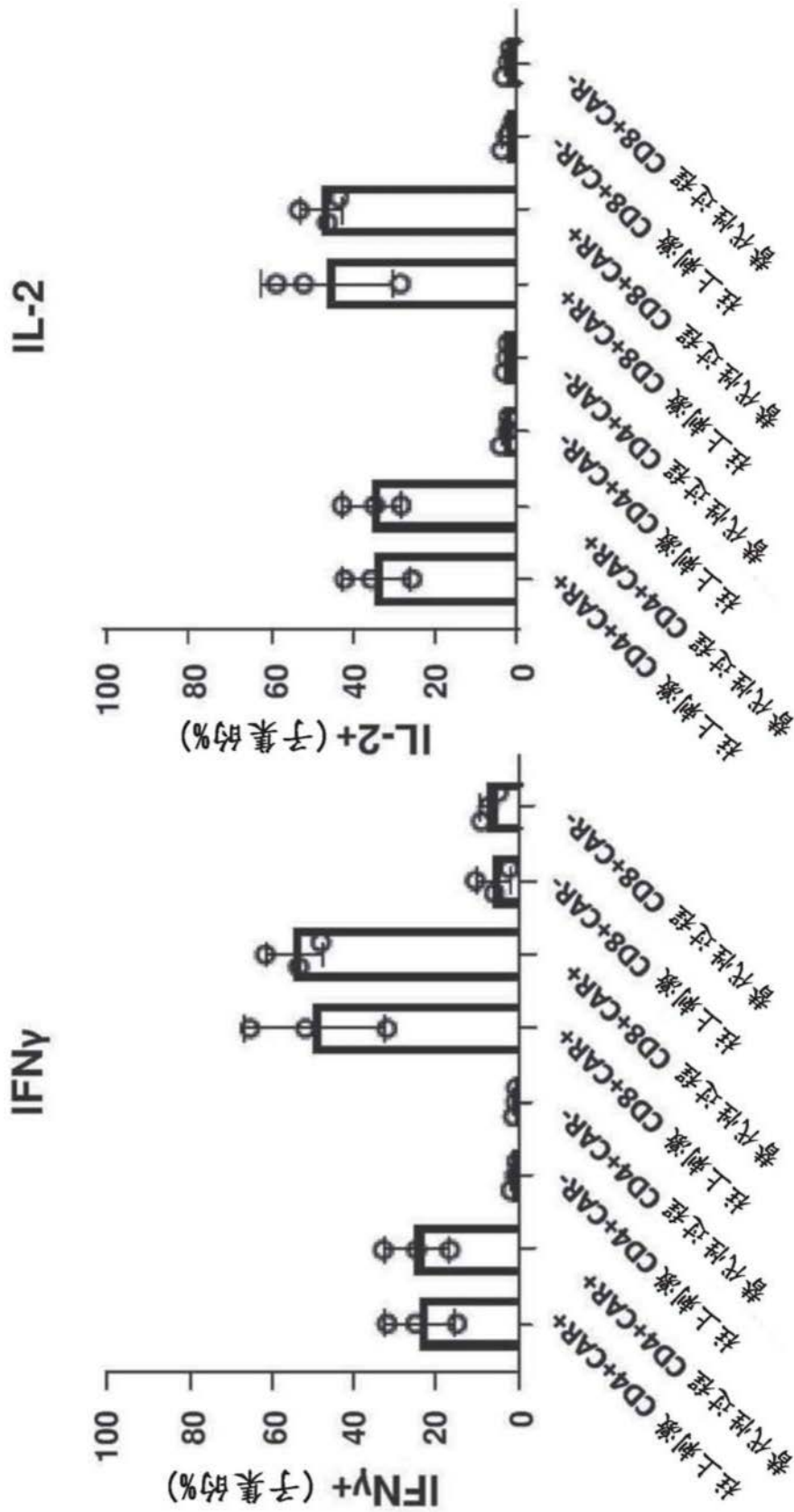


FIG. 21B

FIG. 21A

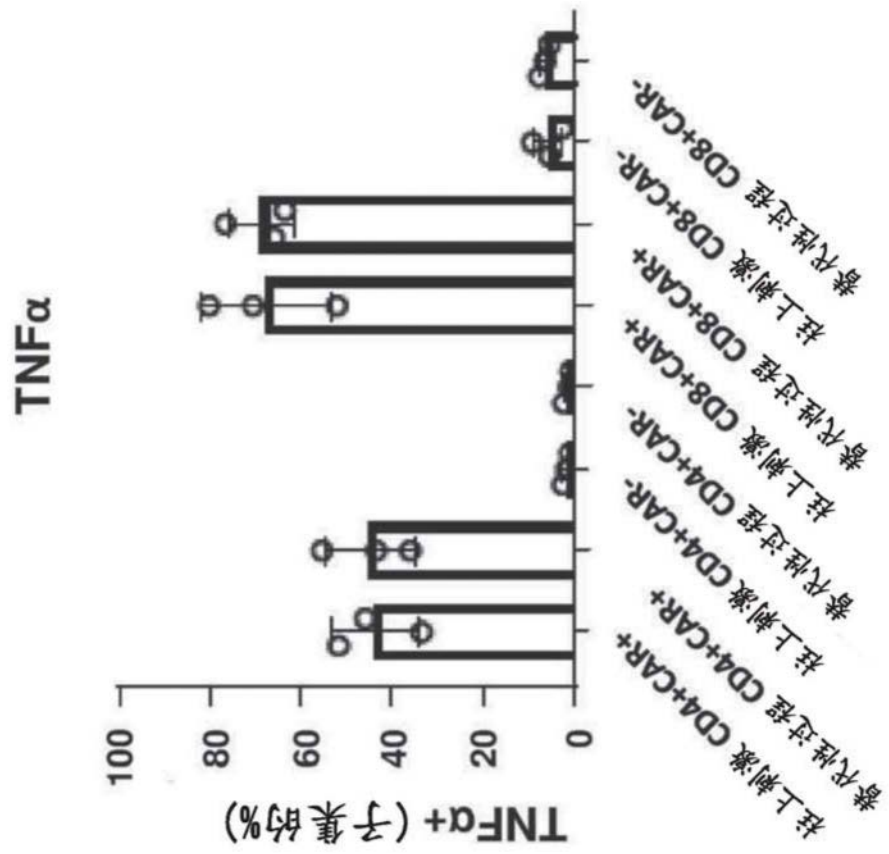


FIG. 21C

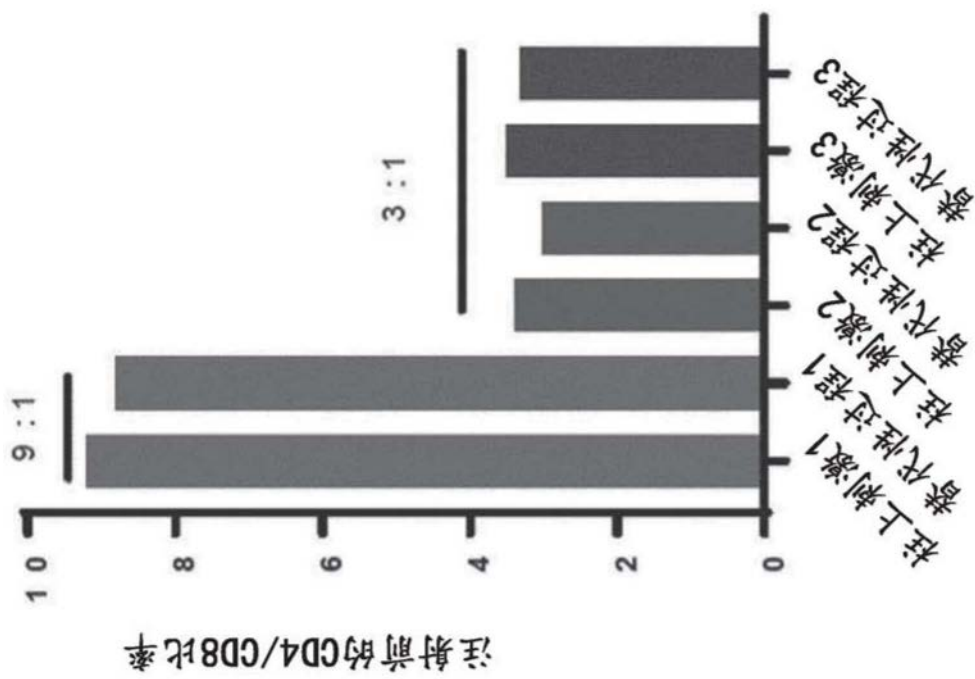


FIG. 22A

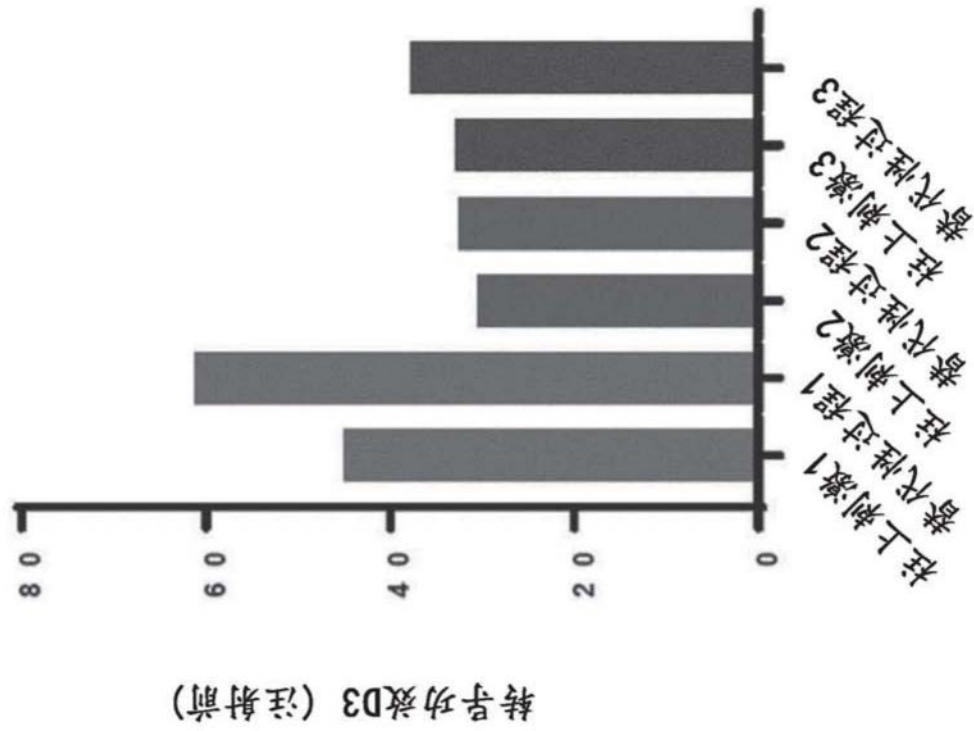


FIG. 22B

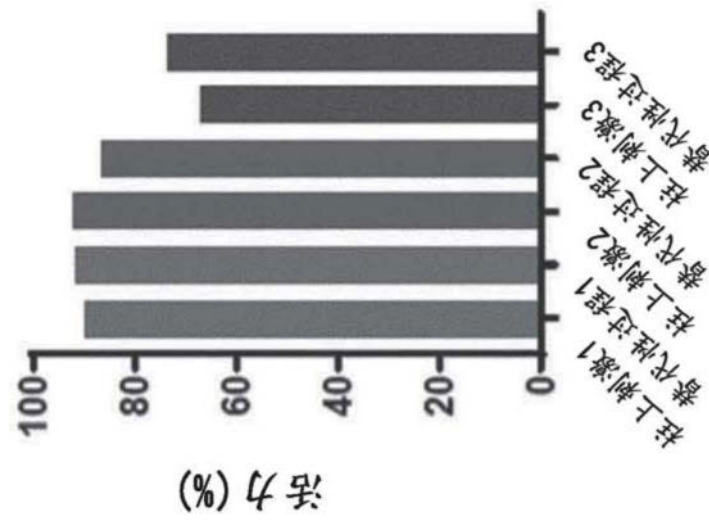


FIG. 22C

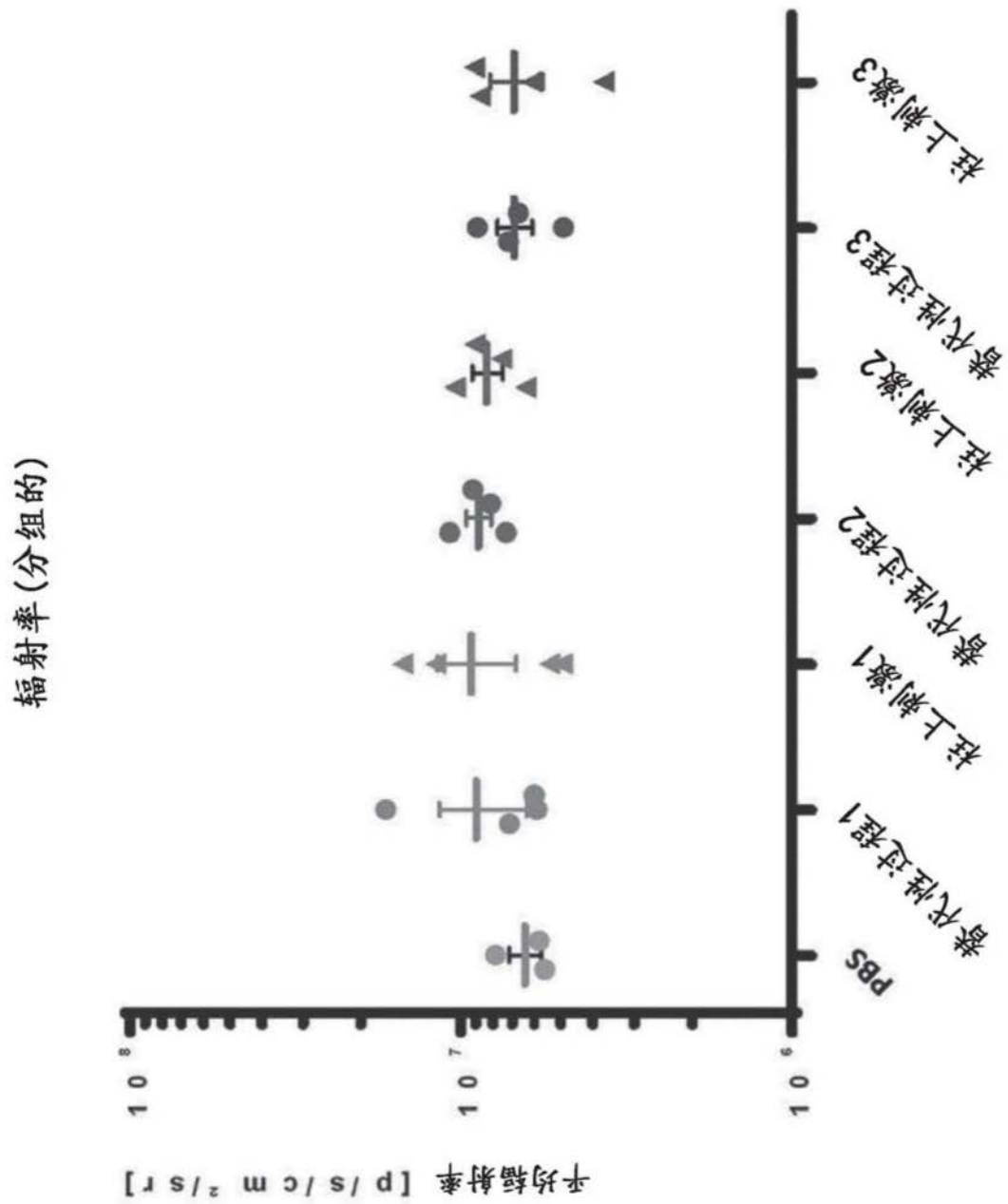


FIG.23

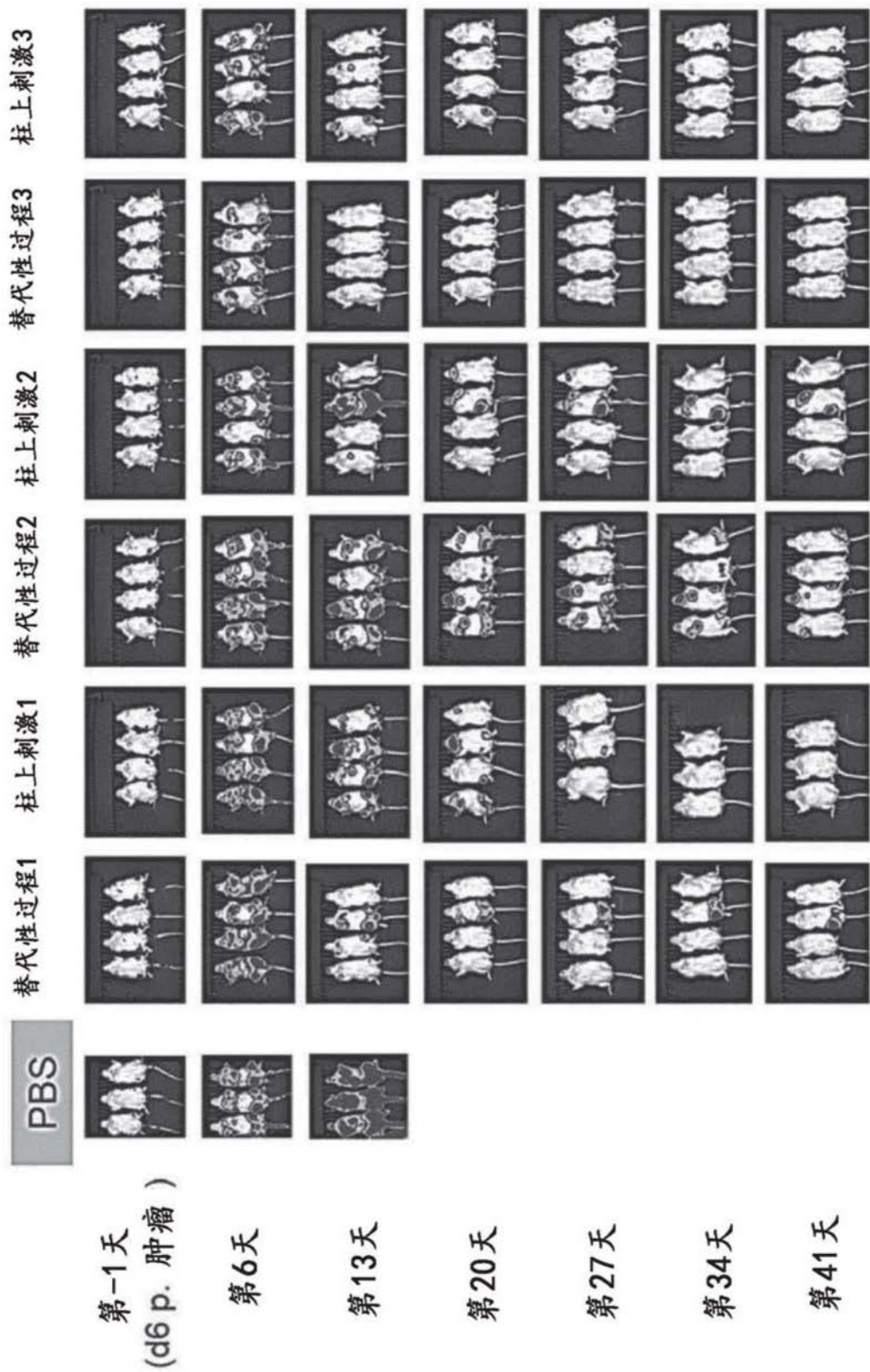


FIG.24

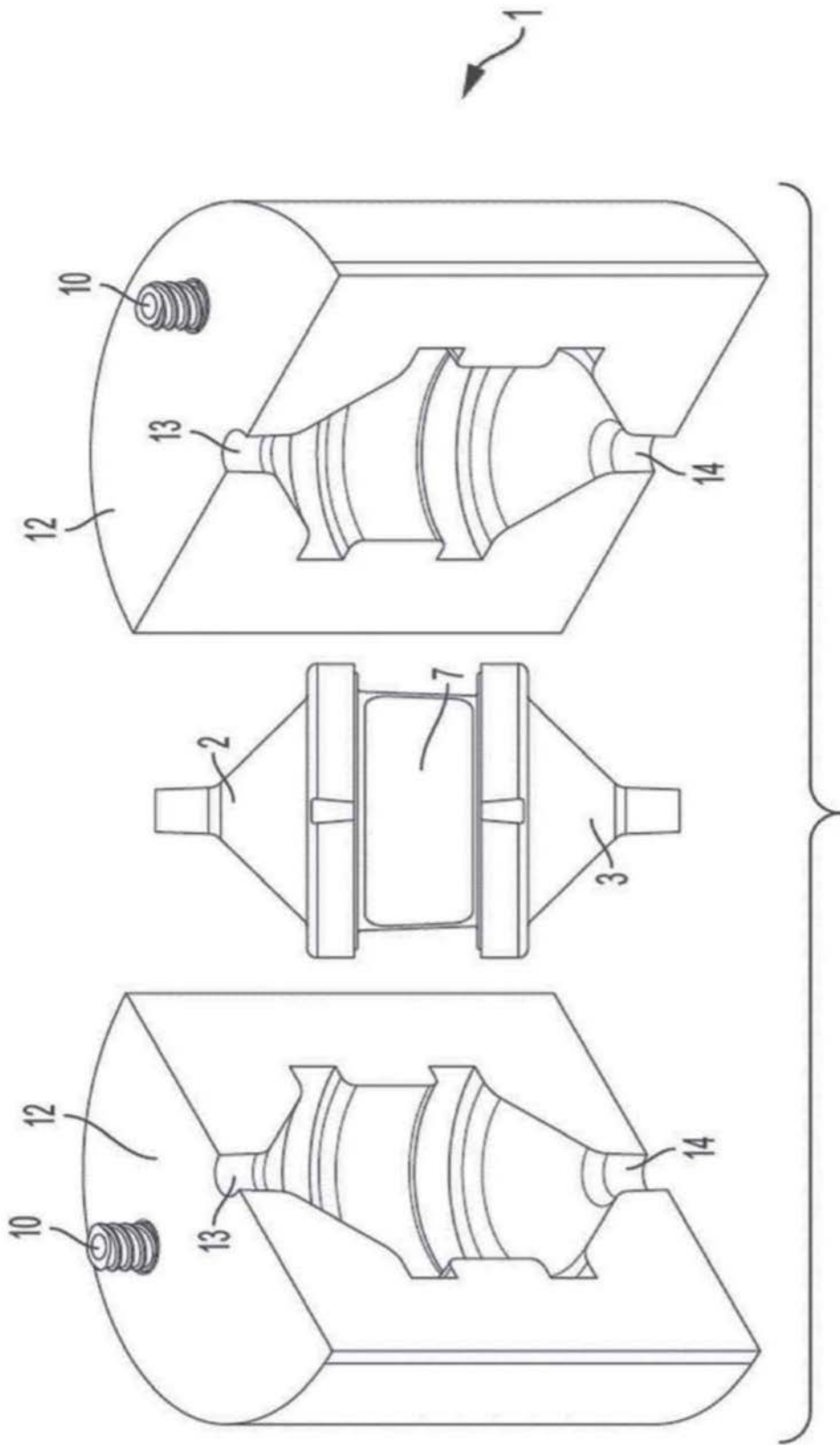


FIG. 25

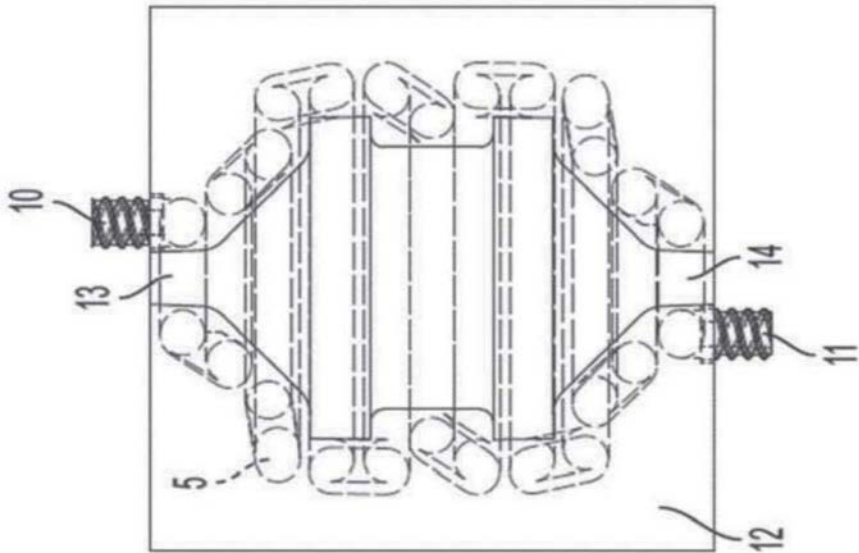


FIG. 26A

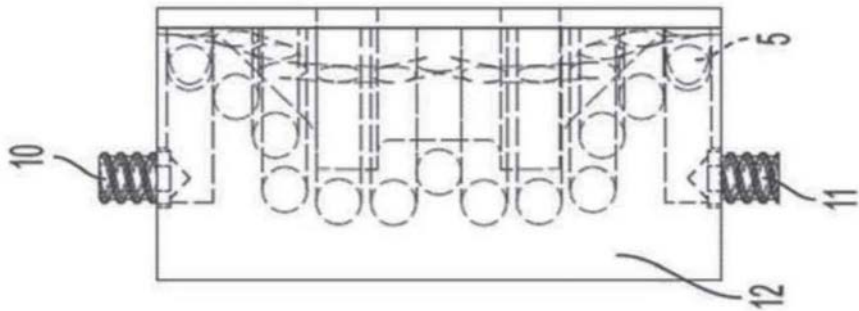


FIG. 26B

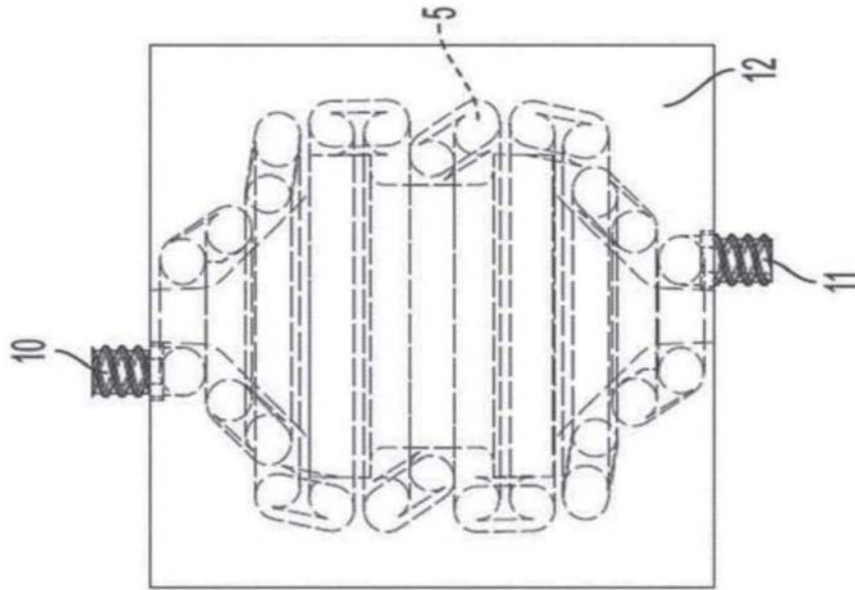


FIG. 26C

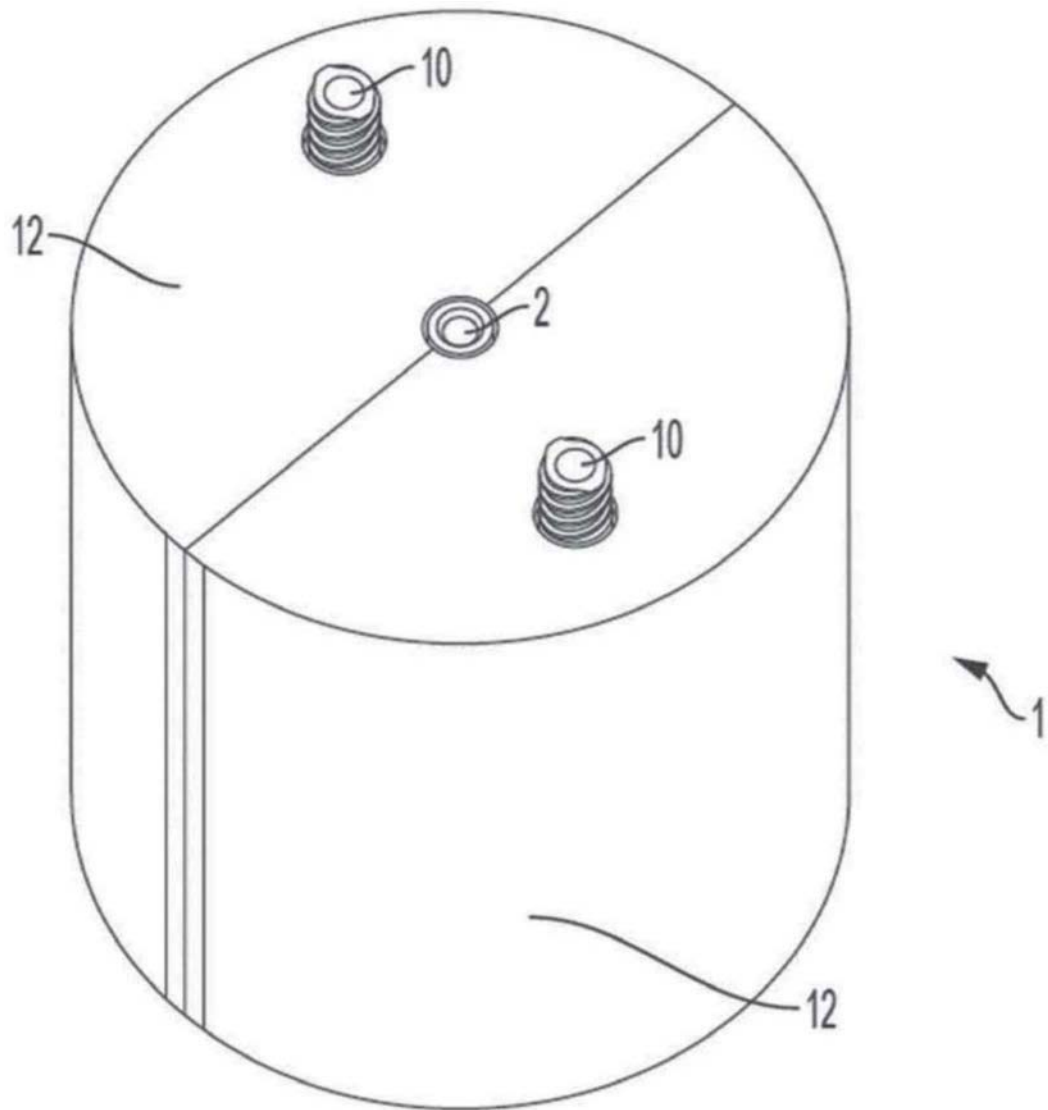


FIG. 27

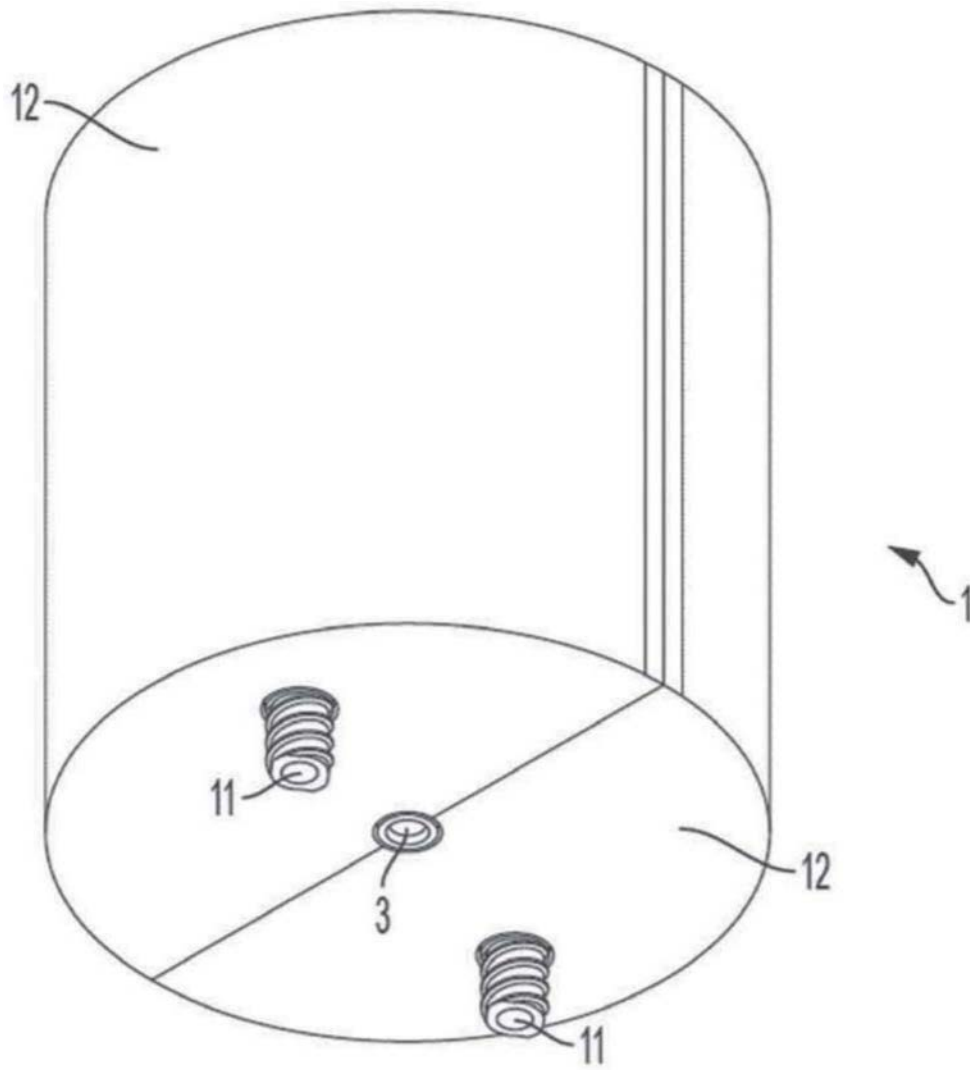


FIG. 28

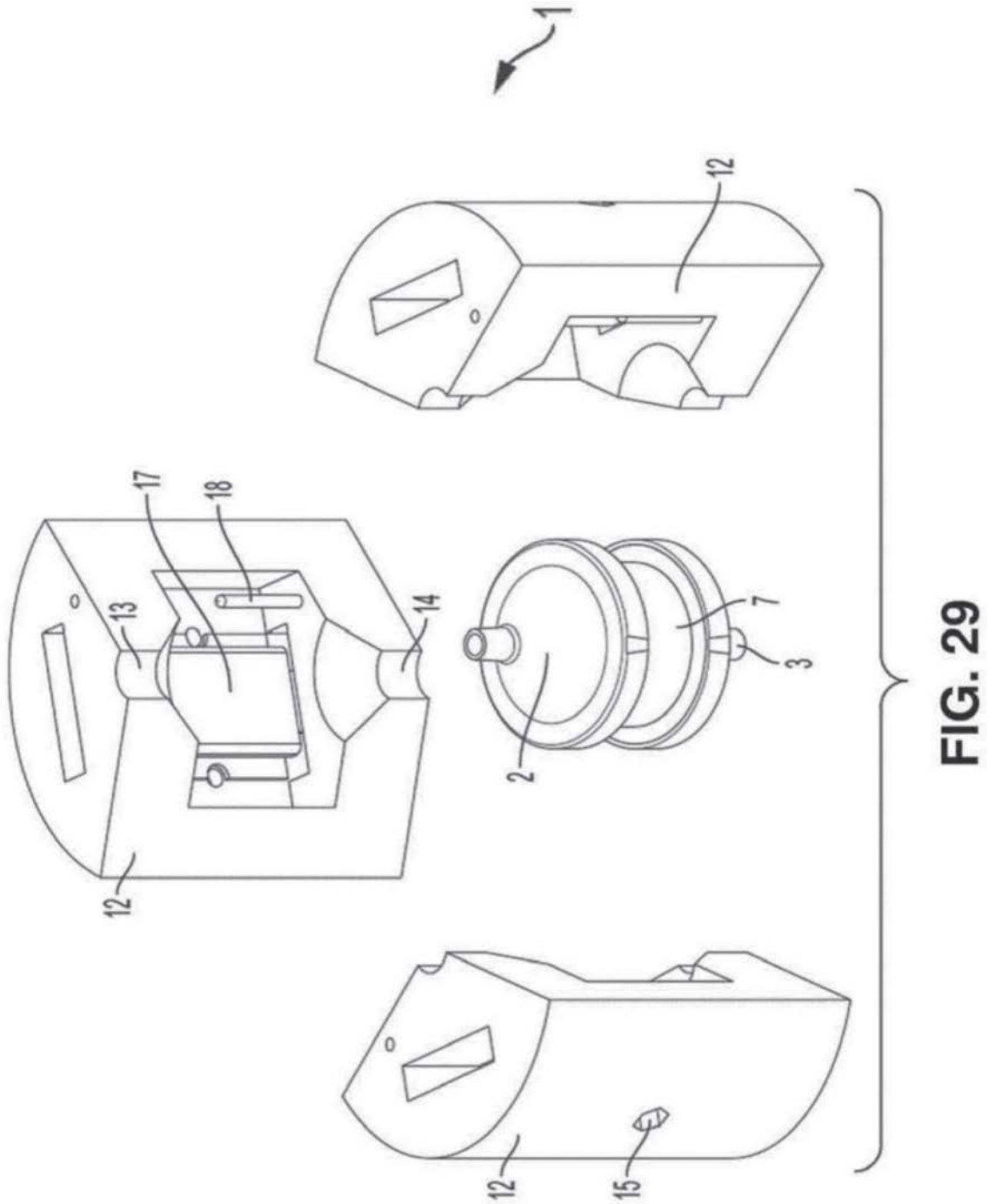


FIG. 29

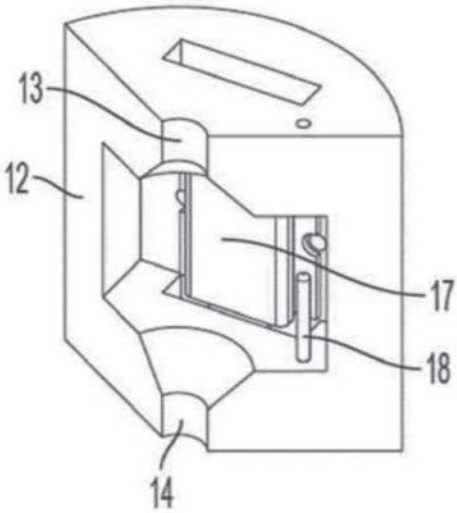


FIG. 30A

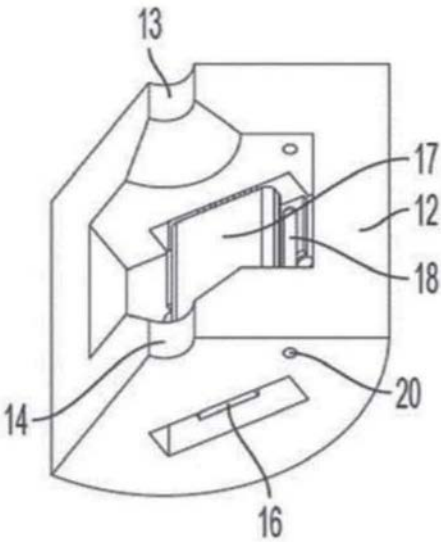


FIG. 30B

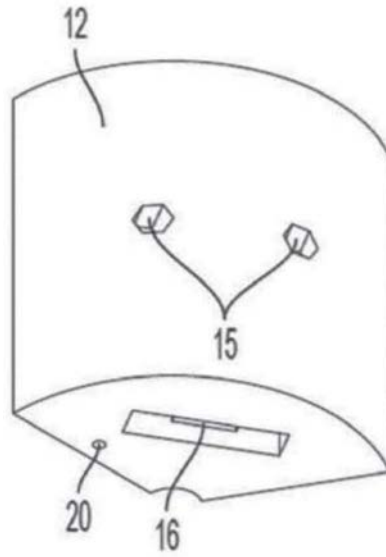


FIG. 30C

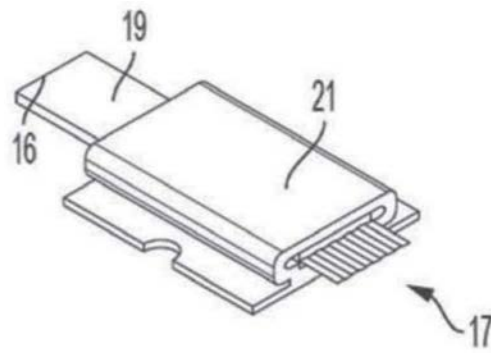


FIG. 30D

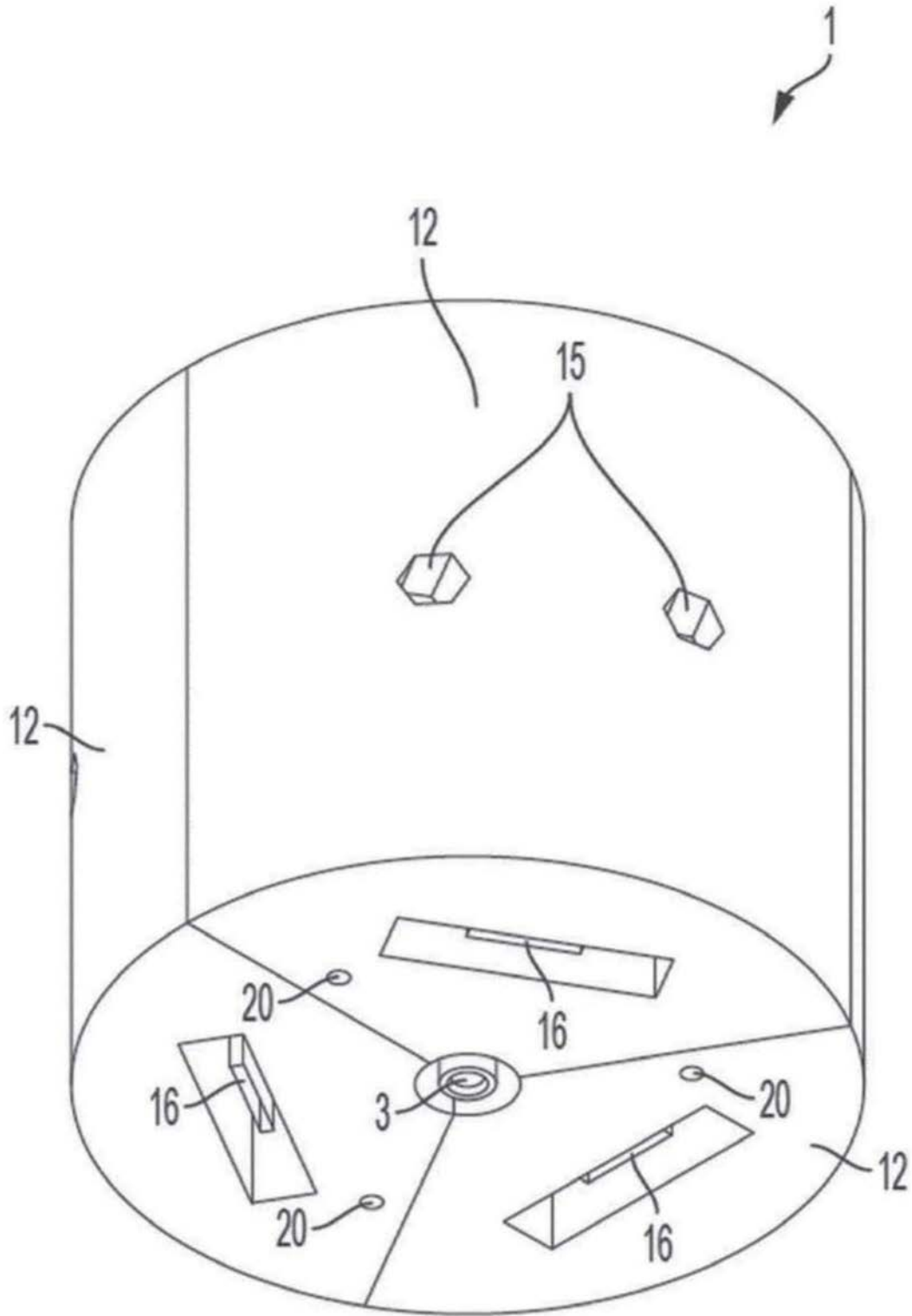


FIG. 31

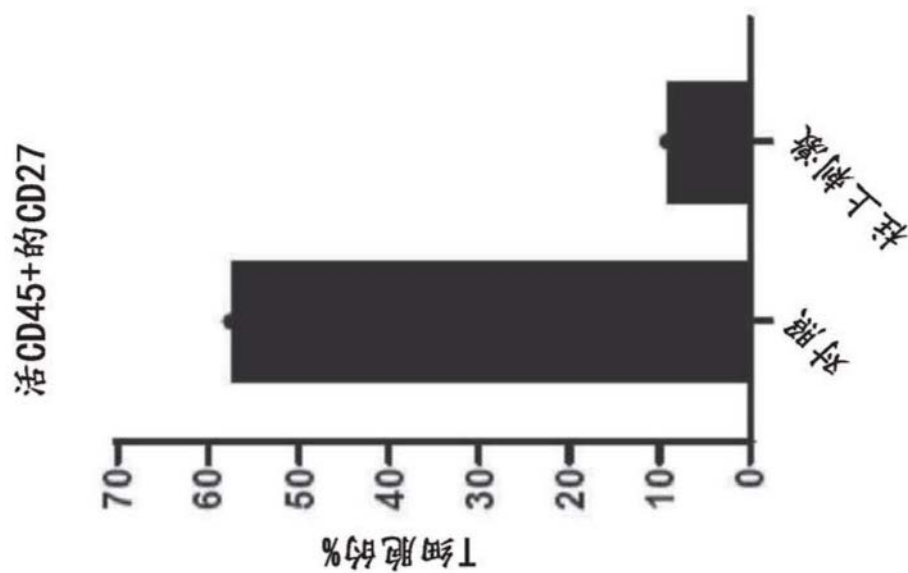


FIG.32

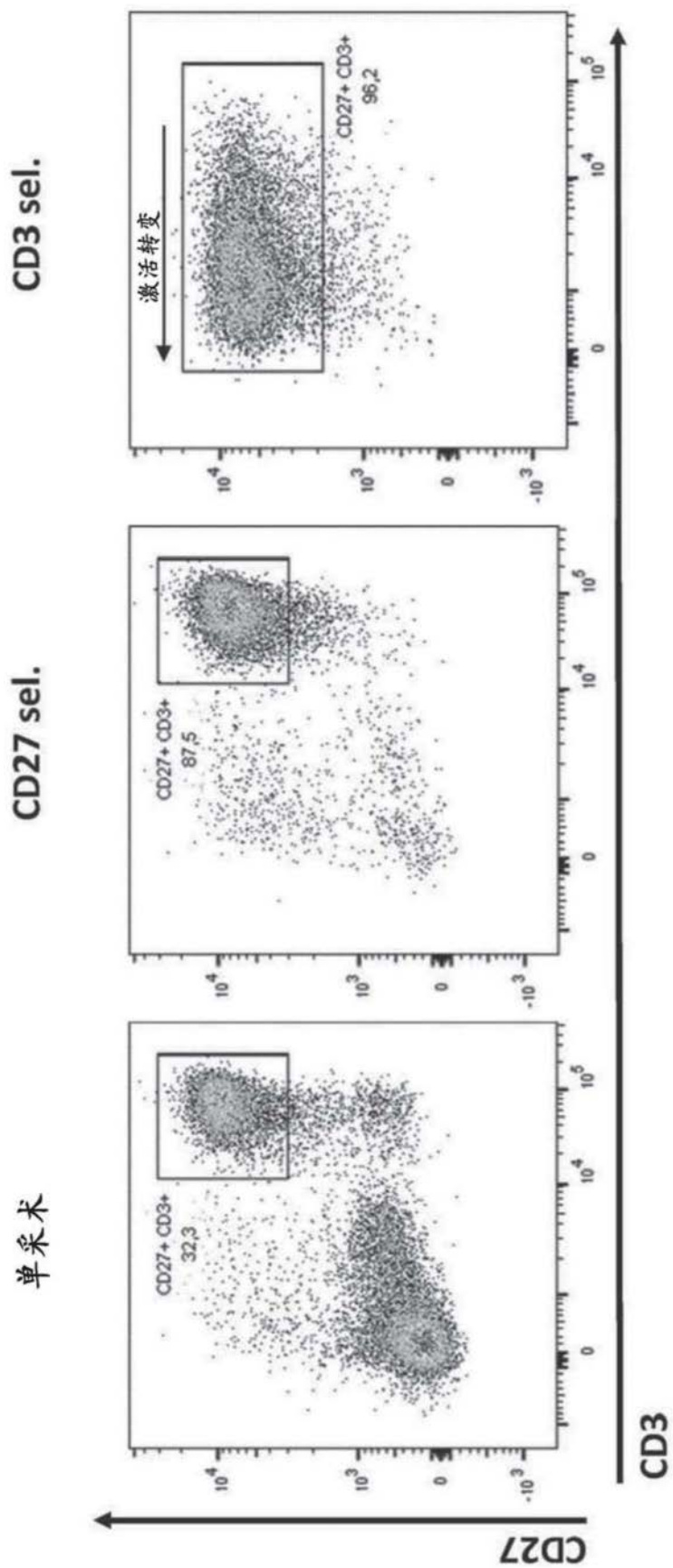


FIG.33

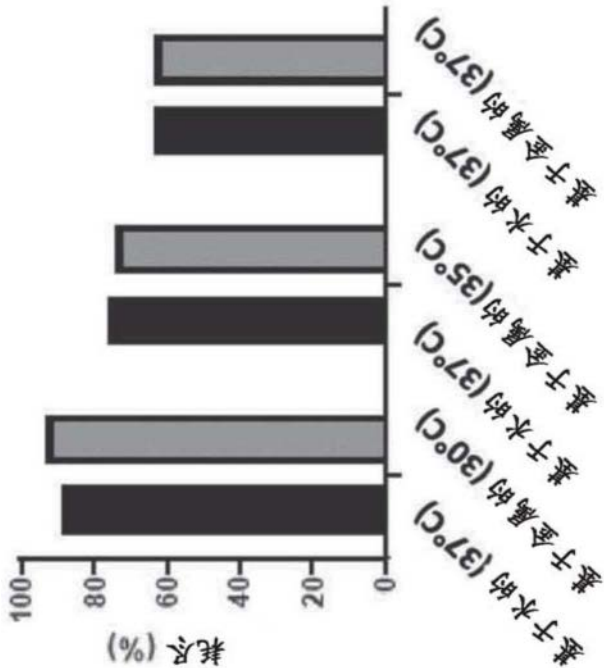


FIG. 34A

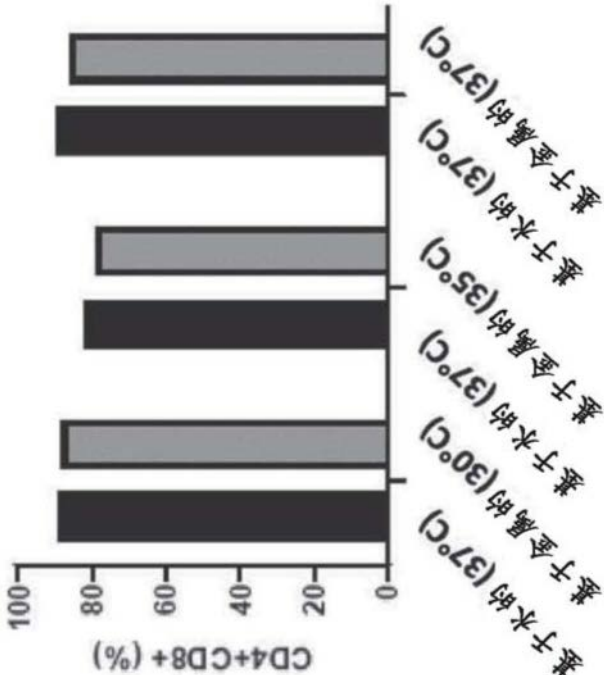


FIG. 34B

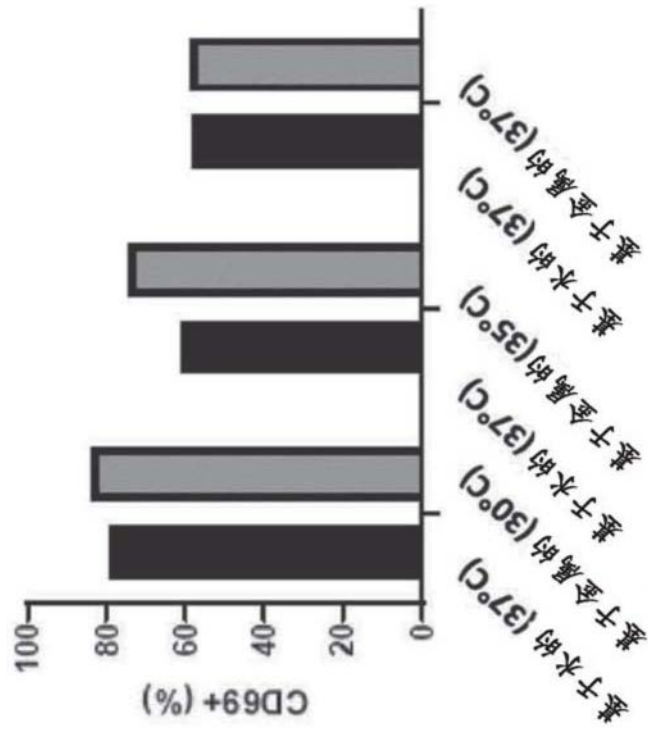


FIG.34C

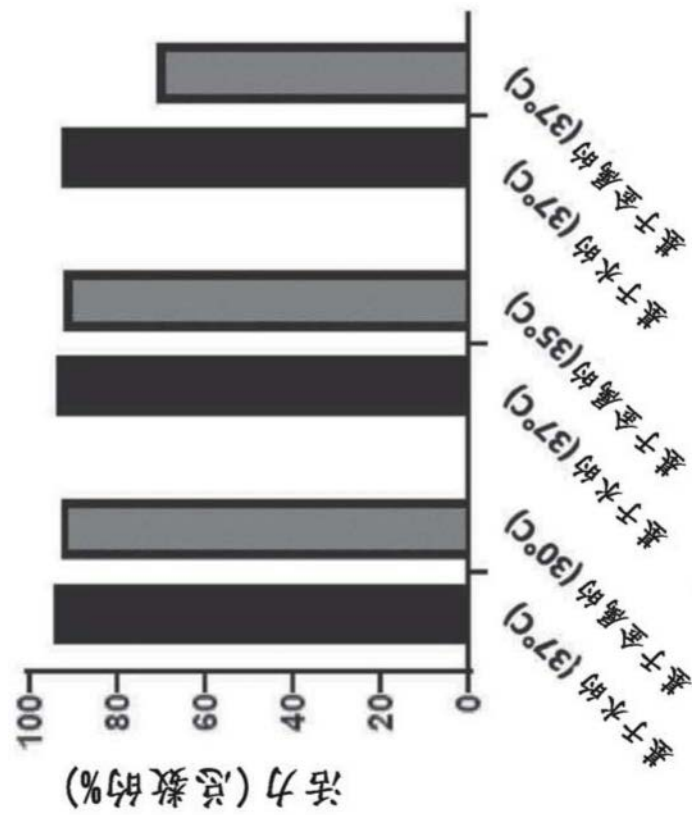


FIG.34D

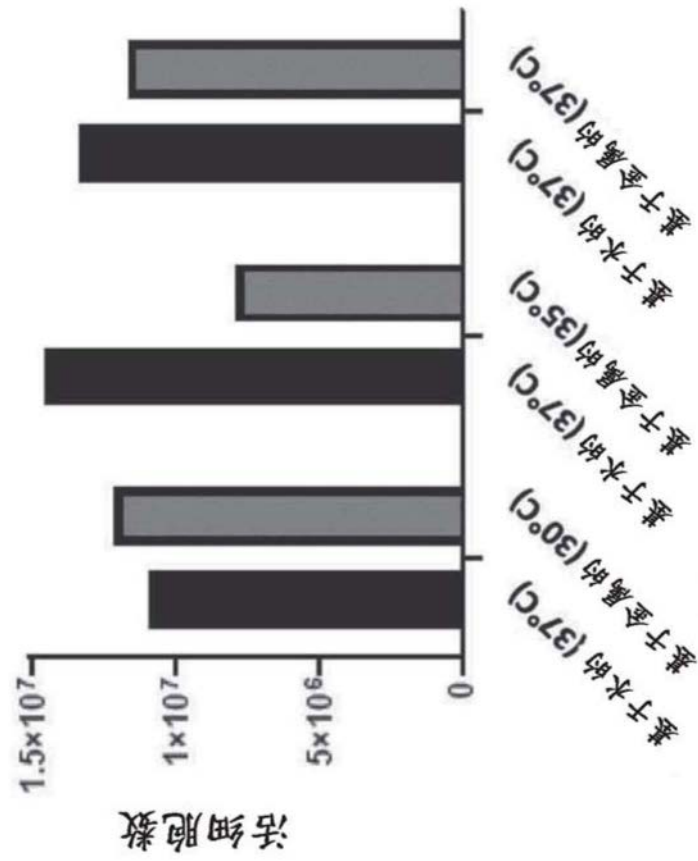


FIG.34E