



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108474791 B

(45) 授权公告日 2022. 07. 08

(21) 申请号 201680075273.X

(22) 申请日 2016.10.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108474791 A

(43) 申请公布日 2018.08.31

(30) 优先权数据
62/245,249 2015.10.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2016/001650 2016.10.20

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/068425 EN 2017.04.27

(73) 专利权人 朱诺治疗学有限公司
地址 德国墨尼黑

(72) 发明人 L·戈尔梅洛斯 C·斯蒂姆贝格尔
P·格拉夫

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
专利代理师 杨昀 陶家蓉

(51) Int.Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
C12N 5/0775 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

(56) 对比文件
JP 2006524991 A, 2006.11.09
CN 103797028 A, 2014.05.14
CN 103797028 A, 2014.05.14
CN 104254780 A, 2014.12.31

审查员 王晓媛

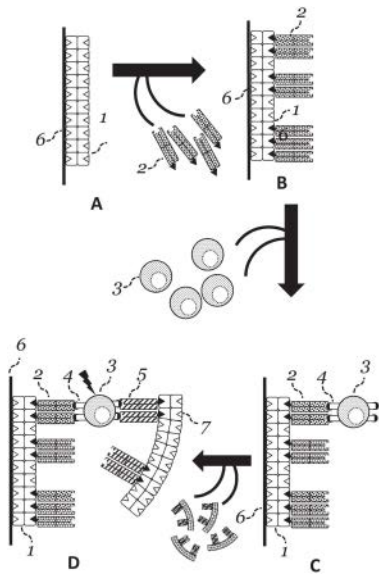
权利要求书7页 说明书124页
序列表25页 附图34页

(54) 发明名称

培养细胞的方法及用于该方法的试剂盒和设备

(57) 摘要

本文提供了培养细胞的方法,包括刺激或扩增(增殖)细胞组合物中的多个细胞,例如淋巴细胞群。在一些方面中,提供了用于培养细胞(例如用于刺激或扩增(增殖)细胞群)的方法和反应剂,涉及使作用剂结合细胞表面上的分子,从而向细胞提供一种或多种信号。在一些情况下,反应剂是多聚化反应剂,一个或多个作用剂通过与反应剂的可逆结合而多聚化。在一些方面,多聚化的作用剂能用于细胞群的扩增或增殖或其他刺激,随后此类刺激剂可通过可逆键的破坏被移除。还提供了其使用方法、组合物和设备。



1. 调节T细胞的方法,所述方法包括:

在第一刺激剂和第二刺激剂的存在下孵育包含目标T细胞的组合物,其中:

(a) 在孵育的至少部分期间,至少多个目标T细胞可逆固定于固定相上,所述固定相为位于色谱柱中的色谱基质,其中特异性结合至少多个目标T细胞表达的选择标记物的选择剂与固定相结合,使得所述至少多个目标T细胞可逆固定到所述固定相上;

(b) 各第一刺激剂和第二刺激剂可逆结合可溶性多聚化反应剂,所述多聚化反应剂包含3个或更多个链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚物或聚合物,其中:

(i) 所述第一刺激剂包含特异性结合CD3的抗体或抗体片段;

(ii) 所述第二刺激剂包含特异性结合CD28的抗体或抗体片段;

(iii) 各第一刺激剂和第二刺激剂还包含可逆结合所述多聚化反应剂的链霉亲和素结合肽,其中所述链霉亲和素结合肽包含如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列;以及

(iv) 所述链霉亲和素突变蛋白在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;以及

(c) 所述孵育影响所述目标T细胞的刺激并在如下条件下进行:

(i) 使所述第一刺激剂特异性结合目标T细胞表面上表达的CD3,从而在所述目标T细胞中诱导主要活化信号以调节日标T细胞;以及

(ii) 所述第二刺激剂特异性结合目标T细胞表面上表达的CD28,从而诱导所述目标T细胞中的共刺激信号。

2. 调节T细胞的方法,所述方法包括:

(1) 使(a)含有目标T细胞的组合物与(b)选择剂接触,所述选择剂(i)特异性结合至少多个目标T细胞表达的选择标记物,且(ii)固定于固定相上,所述固定相为位于色谱柱中的色谱基质,由此所述至少多个目标T细胞中的一个或多个通过所述选择剂可逆固定到所述固定相上;以及

(2) 在第一刺激剂和第二刺激剂存在下孵育固定化的所述至少多个目标T细胞,其中:

(a) 各第一刺激剂和第二刺激剂可逆结合可溶性多聚化反应剂,所述多聚化反应剂包含3个或更多个链霉亲和素突变蛋白四聚体的寡聚物或聚合物,其中:

(i) 所述第一刺激剂包含特异性结合CD3的抗体或抗体片段;

(ii) 所述第二刺激剂包含特异性结合CD28的抗体或抗体片段;

(iii) 各第一刺激剂和第二刺激剂还包含可逆结合所述多聚化反应剂的链霉亲和素结合肽;以及

(iv) 所述链霉亲和素突变蛋白在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;以及;以及

(b) 所述孵育影响所述目标T细胞的刺激且在如下条件下进行:

(i) 使所述第一刺激剂特异性结合目标T细胞表面表达的CD3,从而在所述目标T细胞中诱导主要活化信号以调节所述目标T细胞;以及

(ii) 所述第二刺激剂特异性结合目标T细胞表面上表达的CD28,从而诱导所述目标T细胞中的共刺激信号。

3. 如权利要求2所述的方法,所述方法还包括:在所述接触之后,将组合中其他细胞从固定化的目标T细胞分离和/或去除。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述分离和/或去除步骤在所述孵育开始之前进行。

5. 如权利要求1所述的方法,其中,所述目标T细胞为人T细胞。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述选择剂在固定相上的固定是可逆的。

7. 如权利要求1所述的方法,其中,所述选择剂可逆结合固定在固定相上的第二反应剂,其中:

所述第二反应剂包含链霉亲和素突变蛋白;且

所述选择剂还包含使选择剂可逆结合第二反应剂的链霉亲和素结合肽。

8. 如权利要求2所述的方法,其中,所述选择剂可逆结合固定在固定相上的第二反应剂,其中:

所述第二反应剂包含链霉亲和素突变蛋白;且

所述选择剂还包含使选择剂可逆结合第二反应剂的链霉亲和素结合肽。

9. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,

其中,所述选择剂仅包含特异性结合选择标志物的一个结合位点;和/或

所述选择剂以单价方式特异性结合所述选择标志物。

10. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述选择剂和选择标志物的结合的解离常数(K_D)为 10^{-3}M ~ 10^{-7}M 。

11. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述选择剂为选自下组的作用剂:抗体片段、具有抗体样结合功能的蛋白质类结合分子、包含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、及前述中任一者的结合片段。

12. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述选择剂包含抗体片段。

13. 如权利要求12所述的方法,其中,所述抗体片段为选自下组的二价抗体片段: $(\text{Fab})_2'$ 片段和二价单链Fv片段;或

所述抗体片段为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv。

14. 如权利要求12所述的方法,其中,所述抗体片段为Fab片段。

15. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述选择剂为具有抗体样结合特征的蛋白质性结合分子,其选自下组:适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋白和阿维多聚体。

16. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述选择标志物为T细胞抗原受体复合物的成员。

17. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中所述选择标志物是T细胞共受体。

18. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中所述选择标志物是CD3、CD8或CD4。

19. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述第一刺激剂仅包含特异性结合CD3的一个结合位点;和/或所述第一刺激剂以单价方式特异性结合于CD3。

20. 如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中:所述第一刺激剂包含抗体片段。

21. 如权利要求20所述的方法,其中:所述抗体片段为选自下组的二价抗体片段: $(\text{Fab})_2'$ 片段和二价单链Fv片段;或

所述抗体片段为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv。

22.如权利要求20所述的方法,其中:所述抗体片段为Fab。

23.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中所述目标T细胞包括抗原特异性T细胞或其细胞群、辅助T细胞或其细胞群、细胞毒T细胞或其细胞群、记忆T细胞或其细胞群或者调节T细胞或其细胞群。

24.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中:

所述孵育增加T细胞的增殖、细胞因子表达、细胞毒活性或一种或多种其他功能活性;
和/或

所述孵育改变T细胞的分化。

25.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述孵育使得目标T细胞中细胞因子的表达提高。

26.如权利要求25所述的方法,其中,所述细胞因子是IL-2、IFN- γ 和/或IL-4。

27.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中:

所述第二刺激剂包含特异性结合CD28的单个结合位点;和/或

所述第二刺激剂以单价方式特异性结合CD28。

28.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述第一刺激剂与CD3的结合和/或所述第二刺激剂与CD28的结合的解离常数(K_D)为 $10^{-3}M \sim 10^{-7}M$ 。

29.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,第二刺激剂包含抗体片段。

30.如权利要求29所述的方法,其中,所述抗体片段为选自下组的二价抗体片段:
(Fab) $_2$ 片段和二价单链Fv片段;或

所述抗体片段为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv。

31.如权利要求29所述的方法,其中,所述抗体片段为Fab。

32.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,第一刺激剂包括抗CD3抗体片段,且第二刺激剂包括抗CD28抗体片段。

33.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,第一刺激剂包括抗CD3 Fab,且第二刺激剂包括抗CD28 Fab。

34.如权利要求1-5、7和8中任一项所述的方法,其中,所述链霉亲和素结合肽和第一反应剂和/或第二反应剂的可逆结合的解离常数(K_D)为 $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ 。

35.如权利要求1所述的方法,其中,所述第一刺激剂与多聚化反应剂之间的可逆结合以及所述第二刺激剂与多聚化反应剂之间的可逆结合能够通过加入物质被破坏。

36.如权利要求2所述的方法,其中,所述第一刺激剂与多聚化反应剂之间的可逆结合以及所述第二刺激剂与多聚化反应剂之间的可逆结合能够通过加入物质被破坏。

37.如权利要求7所述的方法,其中,所述第一刺激剂和多聚化反应剂间、所述第二刺激剂和多聚化反应剂间、以及所述选择剂和第二反应剂间的可逆结合能够通过加入物质被破坏。

38.如权利要求8所述的方法,其中,所述第一刺激剂和多聚化反应剂间、所述第二刺激剂和多聚化反应剂间、以及所述选择剂和第二反应剂间的可逆结合能够通过加入物质被破坏。

坏。

39. 如权利要求35-38中任一项所述的方法,其中所述物质为竞争剂。

40. 如权利要求35-38中任一项所述的方法,其中,

所述物质对所述目标T细胞或大部分目标T细胞无害;

与在相同条件下但不加入所述物质相比,向所述目标T细胞加入所述物质不降低存活目标T细胞的百分比至少于90%、80%、70%、60%或50%。

41. 如权利要求35-38中任一项所述的方法,其中,所述物质包括选自下组的分子:链霉亲和素结合肽;生物素;以及生物素类似物。

42. 如权利要求35-38中任一项所述的方法,其中,所述物质包括D-生物素。

43. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,

所述寡聚物或聚合物通过多糖或双功能化接头交联。

44. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,所述链霉亲和素突变蛋白的N末端起始于野生型链霉亲和素氨基酸序列的氨基酸10-16的区域中,C末端终止于野生型链霉亲和素氨基酸序列的氨基酸133-142的区域中。

45. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,所述链霉亲和素突变蛋白的序列如SEQ ID NO:3-6和27-28中任一项所述,或者为具有N末端甲硫氨酸且序列如SEQ ID NO:3-6和27-28中任一项所述的序列。

46. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,所述链霉亲和素突变蛋白的序列如SEQ ID NO:4所示或为具有N末端甲硫氨酸和如SEQ ID NO:4所示序列的序列。

47. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,所述链霉亲和素突变蛋白的序列如SEQ ID NO:6所示或为具有N末端甲硫氨酸和如SEQ ID NO:6所示序列的序列。

48. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,

所述链霉亲和素结合肽的序列如SEQ ID NO:8和13-19中任一项所示。

49. 如权利要求1-5、7、8和35-38中任一项所述的方法,其中,

所述第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

所述第二刺激剂包括抗CD28 Fab;以及

所述链霉亲和素结合肽的序列如SEQ ID NO:8和13-19中任一项所示。

50. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包含:

破坏多聚化反应剂与第一刺激剂和/或多聚化反应剂与第二刺激剂的结合。

51. 如权利要求2所述的方法,所述方法还包含:

破坏多聚化反应剂与第一刺激剂和/或多聚化反应剂与第二刺激剂的结合。

52. 如权利要求7所述的方法,还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合、多聚化反应剂与第二刺激剂之间的结合和/或第二反应剂与选择剂之间的结合。

53. 如权利要求8所述的方法,还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合、多聚化反应剂与第二刺激剂之间的结合和/或第二反应剂与选择剂之间的结合。

54. 如权利要求1所述的方法,其中:

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab;以及

所述方法还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合和/或多聚化反应剂与第

二刺激剂之间的结合。

55. 如权利要求2所述的方法, 其中:

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab; 以及

所述方法还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合和/或多聚化反应剂与第二刺激剂之间的结合。

56. 如权利要求1所述的方法, 其中:

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab;

所述链霉亲和素结合肽的序列如SEQ ID NO:8和13-19中任一项所示; 以及

所述方法还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合和/或多聚化反应剂与第二刺激剂之间的结合。

57. 如权利要求2所述的方法, 其中:

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab;

所述链霉亲和素结合肽的序列如SEQ ID NO:8和13-19中任一项所示; 以及

所述方法还包括破坏多聚化反应剂与第一刺激剂之间的结合和/或多聚化反应剂与第二刺激剂之间的结合。

58. 如权利要求50-57中任一项所述的方法, 其中,

所述破坏在所述孵育后进行, 或在开始所述孵育后开始。

59. 如权利要求50-57中任一项所述的方法, 其中,

所述破坏引起终止或减少所述目标T细胞的刺激。

60. 如权利要求50-57中任一项所述的方法, 其中, 所述破坏包括将包含物质的组合物引入所述目标T细胞, 其中:

所述物质对目标T细胞或对大部分目标T细胞无害; 和/或

与在相同条件下但不加入所述物质相比, 将所述物质加到目标T细胞不降低存活目标T细胞的百分比至少于90%、80%、70%、60%或50%。

61. 如权利要求50-57中任一项所述的方法, 其中,

所述破坏包括将含有物质的组合物导向目标T细胞, 所述物质包含选自下组的分子: 链霉亲和素结合肽; 生物素; 生物素类似物。

62. 如权利要求61所述的方法, 其中, 所述物质包括D-生物素。

63. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法, 所述方法还包括在所述孵育之前, 扩增包含于目标T细胞群中的细胞, 或其中, 在所述孵育前已在体外扩增包含在目标T细胞群中的细胞。

64. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法, 其中, 所述方法还包括在所述孵育的至少一个时间, 改变培养基或补充物质。

65. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法, 所述方法还包括以反复的方式, 重复所述方法的一个或多个步骤, 由此一个或多个群中的细胞在至少两个循环中被连续分离和扩增。

66. 如权利要求65所述的方法,其中,所述方法包括在两个不同的接触步骤的每一步中分别使群中的目标T细胞接触至少两种不同的选择剂,所述选择剂特异性结合两种不同的选择标志物,其中,所述孵育的至少部分在与所述两种不同的选择剂接触间进行。

67. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其还包括将重组核酸分子导入目标T细胞群,其中该核酸分子编码重组蛋白,由此所述目标T细胞表达该重组蛋白。

68. 如权利要求67所述的方法,其中,所述导入在所述孵育之后或期间进行和/或当目标T细胞固定于固定相上时进行。

69. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其中,

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab;以及

所述方法还包括将重组核酸导入目标T细胞群,其中该核酸编码重组蛋白,由此所述目标T细胞表达该重组蛋白;

其中所述导入在所述孵育之后或期间进行和/或当目标T细胞固定于固定相上时进行。

70. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其中,

第一刺激剂包括抗CD3 Fab;

第二刺激剂包括抗CD28 Fab;

所述链霉亲和素结合肽的序列如SEQ ID NO:8和13-19中任一项所示;以及

所述方法还包括将重组核酸导入目标T细胞群,其中该核酸编码重组蛋白,由此所述目标T细胞表达该重组蛋白;

其中所述导入在所述孵育之后或期间进行和/或当目标T细胞固定于固定相上时进行。

71. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其中,在所述孵育的至少部分期间,所述目标T细胞表达离体导入的重组蛋白。

72. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其中,在所述孵育之后,所述方法还包括将所述组合物中的目标T细胞转移到不同环境中,所述环境适于细胞培养或扩增。

73. 如权利要求72所述的方法,其中,如此转移的目标T细胞在封闭系统或封闭容器中转移入不同环境中;或所述转移包括从第一容器中取出如此转移的目标T细胞,并将所述目标T细胞转移入第二容器。

74. 如权利要求72所述的方法,其中,所述不同环境在一个孵育器中。

75. 如权利要求72所述的方法,其中,所述转移在封闭系统中进行,其中,所述转移包括将包含目标T细胞的无菌封闭容器转移到无菌环境中或转移到所述封闭容器中的不同环境,和/或所述转移在无菌环境中进行或在无菌条件下进行。

76. 如权利要求72所述的方法,其还包括:在所述转移后,通过破坏所述可逆结合将目标T细胞从固定相分离。

77. 如权利要求76所述的方法,其还包括将所述目标T细胞从固定相的存在下移除和扩增所述移除的目标T细胞。

78. 如权利要求1-5、7、8、35-38和50-57中任一项所述的方法,其中,在至少部分所述孵育期间,控制pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或温度。

79. 如权利要求72所述的方法,其中,当目标T细胞在适于扩增的环境中时,将营养物供

给目标T细胞。

培养细胞的方法及用于该方法的试剂盒和设备

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年10月22日提交的发明名称为“培养细胞的方法及用于该方法的试剂盒和设备”的美国临时专利申请号62/245,249的优先权,其内容通过引用全文纳入本文。

[0003] 通过引用纳入序列列表

[0004] 本申请与电子格式的序列列表一同提交。所提供的序列列表名称为735042002740SeqList.txt,创建于2016年10月17日,其文件大小为39,887字节。该序列列表的电子格式的信息通过引用其全文纳入本文。

技术领域

[0005] 本公开在一些方面中涉及细胞(例如目标细胞)及其组合物的孵育或培养,还涉及从其他组分(例如从组合物中的其他细胞)富集、分离和/或选择细胞(包括用于该孵育中的目标细胞)。孵育和分离步骤可以不同顺序进行,或可在时间上交叠。方法通常涉及使用反应剂、作用剂和彼此可逆结合(和/或包含彼此可逆结合的组分)的复合物,其中该结合一般可通过加入某种物质来逆转。因此,在一些实施方式中,在孵育和/或选择之后或期间,通过加入物质来解离反应剂以实现下游处理,后续轮次的刺激或分离,和/或控制细胞所接收的信号转导的质或量。在一些方面中,方法涉及反应剂与细胞表面上分子的结合,由此向细胞提供一种或多种信号。方法通常采用包含针对作用剂(agent)的多个结合位点的反应剂(reagent)(如多聚化反应剂),由此一个或多个作用剂通过与该反应剂的可逆结合而多聚化,例如由此产生其上多聚化有刺激剂或选择剂的刺激性反应剂(多聚化的作用剂)和/或选择性反应剂(多聚化的选择剂)。在一些实施方式中,孵育在支持物(如固定相或固相)的存在下进行,在一些情况中,所述支持物为结合选择剂的固定相或固相。在一些实施方式中,待刺激的细胞固定于(通常直接,通过提供反应剂)固定相。还提供了其使用方法、组合物和设备。

背景技术

[0006] 可获得体外刺激和/或富集细胞和细胞群的各种策略。可获得的策略包括用于如下的策略:体外富集和/或扩增抗原特异性T细胞以用于过继细胞免疫治疗或癌症治疗,在这些治疗中灌注此类T细胞已在荷肿瘤宿主中显示抗肿瘤反应性,或者用于给予病毒感染患者的治疗。需要体外培养和富集和选择细胞和细胞群的改进策略,包括用于研究、诊断和治疗目的的改进策略。提供满足此类需求的反应剂、方法、制品和试剂盒。

发明内容

[0007] 提供了涉及生产、培养和/或加工细胞(例如目标细胞)和/或其组合物的方法。还提供了用于所述方法中(如用于任何所述方法中)的组合物、作用剂、反应剂和设备,以及制品。所述方法总体涉及细胞的孵育(例如培养),例如以刺激细胞。

[0008] 例如,在一些实施方式中,方法包括:在可逆结合于反应剂的刺激剂的存在下,孵育包含目标细胞的组合物。在一些方面中,反应剂含有多个刺激剂结合位点,所述位点能够可逆结合刺激剂。孵育可在一定条件下进行,通过所述条件使得刺激剂特异性结合目标表面上表达的分子,由此在目标细胞中诱导或调节信号。

[0009] 在一些实施方式中,方法还包括富集或选择细胞及其组合物,如待刺激和/或已被刺激或正被刺激的目标细胞。在一些实施方式中,方法涉及对细胞的孵育(例如刺激)和富集或选择,例如以选择特定目标细胞群和在选择后或同时刺激或培养此类细胞。在一些实施方式中,富集或选择或刺激依序(以任何顺序)进行、在时间上至少部分交叠进行、或同时进行。

[0010] 在一些实施方式中,方法的各步骤(和/或方法整体)在封闭系统(如无菌系统)中进行;所提供的设备和制品包括用于在此类封闭或无菌系统中进行所述方法的那些。在一些实施方式中,所述细胞是T细胞。

[0011] 在一些方面中,方法涉及:在作用剂(在一些情况中可被称为第一作用剂,例如以将其与用于所述方法或反应剂的其他作用剂(例如,第二、第三作用剂等)区分开)和/或包含所述作用剂的复合物(例如多聚化的作用剂或包含多聚形式作用剂的反应剂)的存在下,孵育包含T细胞的组合物。作用剂与反应剂可为可逆固定。在一些方面中,多个刺激剂结合位点包括一个或多个结合位点Z1,其能够可逆结合于结合伴侣C1;和/或,刺激剂还包含一个或多个结合伴侣C1。在一些方面中,多个刺激剂结合位点包括两个或更多个结合位点Z1和/或还包含一个或多个结合位点Z2,其能可逆结合于结合伴侣C1;和/或,刺激剂包含包含两个或更多个结合伴侣C1。刺激剂还可包含结合位点B2,其中刺激剂与目标细胞表面上分子间的特异性结合包括B2和该分子间的相互作用。

[0012] 在一些方面中,作用剂为受体结合剂,例如刺激剂,如能够向目标细胞递送或诱导或调节目标信号的刺激剂。受体结合剂(例如刺激剂)可逆结合包含多个结合位点的反应剂,所述结合位点能够可逆结合于该受体结合剂并由此能够用作多聚化反应剂,从而形成该作用剂在寡聚反应剂上的多聚体。在一些方面,受体结合剂能够特异性结合于细胞(如T细胞)表面上的分子,例如以诱导或调节组合物中细胞(如T细胞)的信号的方式结合。

[0013] 在一些实施方式中,与刺激剂(在一些情况中,其复合物可被称为刺激反应剂)结合的反应剂实质上是寡聚但可溶的,其不结合固体支持物、珠、刚性颗粒、球形或基本球形颗粒、或固定相。在一些方面中,反应剂的大小为小于20nm、小于10nm、小于5nm或小于1nm。在一些情况下,反应剂的密度小于 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 或小于 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 。

[0014] 在一些实施方式中,在孵育期间,该刺激剂(例如第一作用剂)不是固体支持物、固定相、珠、微粒、磁性颗粒和/或基质,也不与固体支持物、固定相、珠、微粒、磁性颗粒和/或基质结合或联合;和/或,刺激剂是柔性的,不含金属或磁性核心,完全或主要由有机多聚体组成,不为球形,基本上不为球形或形状不均一,和/或不坚硬。

[0015] 在一些实施方式中,包括如下实施方式,其中:反应剂不结合所述的固相或珠或其他组分,但是刺激在支持物(例如固定相和/或固相)的存在下进行。在一些方面中,在孵育的至少部分期间,至少多个目标细胞固定于该支持物上。固定可选为可逆固定。

[0016] 在一些实施方式中,刺激和可逆固定于支持物通过同一反应剂进行,例如反应剂用于分离和刺激。例如,所述方法可包括:(a)合并(combining)包含目标细胞的组合物和可

逆结合于反应剂的刺激剂,所述反应剂固定在支持物上且包含多个刺激剂结合位点,这些位点各自能够结合所述刺激剂且能够特异性结合目标细胞表面上表达的分子,从而将目标细胞固定在支持物上;以及(b)从固定的目标细胞分离或去除组合物中的其他细胞;以及(c)在刺激剂的存在下,在至少多个目标细胞中诱导或调节信号的条件下,孵育至少部分固定化的目标细胞。

[0017] 在一些情况中,支持物为固定相或包含固定相;和/或支持物为固体支持物或包含固体支持物。在一些方面中,刺激剂是第一作用剂,至少部分孵育在第二反应剂的存在下进行,所述第二反应剂固定于支持物和选择剂上,所述选择剂可逆结合所述第二反应剂且能够结合细胞上的分子,由此促进细胞在孵育期间可逆固定于支持物上。第二反应剂可包括多个选择剂结合位点,如一个或多个(例如两个或更多个)结合位点Y1,它们各自能够可逆结合选择剂,如通过选择剂所包含的结合伴侣D1可逆结合。在一些实施方式中,选择剂还包含结合位点Y2,其也能够结合于D1。在一些实施方式中,选择剂还包含结合位点B1,例如从而使得选择剂和选择标志物间的特异性结合包括B1和选择标志物间的相互作用。

[0018] 在一些实施方式中,在所述合并时,第二反应剂和选择剂一起可逆结合于复合物中,其中该合并通过合并细胞和复合物进行。在其他实施方式中,在所述合并时,第二反应剂和选择剂不在复合物中,其中该合并通过分别加入第二反应剂和选择剂进行。因此,作用剂可与细胞或其他化合物或组合物预结合,或并未预先与细胞或其他化合物或组合物合并。

[0019] 在一些实施方式中,方法还包括富集或选择,如通过合并如下物质:至少多个目标细胞;选择剂,其(i)能够特异性结合所述至少多个目标细胞中的一个或多个所表达的选择标志物且(ii)直接或间接固定于或能够被直接或间接固定于支持物上;和(c)支持物,由此至少多个目标细胞中的一个或多个通过该选择剂被固定于支持物上。

[0020] 方法还可包括从固定的目标细胞合并、分离和/或去除组合物中的其他细胞,进行洗涤步骤,其可在所述孵育开始前进行。

[0021] 支持物可包含固定相和/或为或包含固体支持物。

[0022] 在一些方面中,富集和刺激依序或同时或部分交叠进行;在一些方面中,孵育在合并前进行和/或开始;或孵育在合并后进行和/或开始。在一些方面中,合并孵育的至少部分期间进行。

[0023] 在一些方面中,实施方式中各种组分间的可逆结合(例如第一作用剂或刺激剂与反应剂(如多聚化反应剂)间和/或选择剂和第二反应剂间的可逆结合,或任何或全部描述为可逆结合的那些)能够通过加入某种物质被破坏。在一些方面中,该物质为或包含游离结合伴侣;或该物质为或包含竞争剂;和/或该物质使得除了通过竞争所述结合以外的破坏结合的变化发生。因此,通过该物质的破坏可通过竞争方式,如通过一种组分与另一种具有更佳的结合性质的组分竞争结合。在一些方面中,该物质是对目标细胞无害或对大多数目标细胞无害的物质,从而细胞可用于一些所需的下游应用。在一些方面中,以一定量向目标细胞加入该物质,所述量足以使得所述破坏发生,且与相同条件下但不含该物质相比,所述量不使细胞存活和/或增殖能力降低至少于或约90%、80%、70%、60%或50%。示例为肽或多肽物质或者包含肽或多肽的物质,如结合链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白和/或其结合其生物素结合位点的那些。

[0024] 该物质可包括选自下组的分子：链霉亲和素结合分子；生物素；D-生物素；特异性结合链霉亲和素或链霉亲和素类似物的生物素类似物，所述链霉亲和素类似物在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷；以及包含SEQ ID NO:1、4、5和7所示序列的肽，或由SEQ ID NO:1、4、5和7所示序列组成的肽。在其他实施方式中，该物质为或包含金属螯合剂，其可选为EDTA或EGTA。

[0025] 在一些方面中，作用剂为单体，如它们仅包括一个给定的结合位点，如仅包含结合位点B2之一的刺激剂和/或仅包含B1之一的选择剂。例如，在一些情况中，刺激剂仅包含特异性结合所述分子的单个结合位点，该刺激剂以单价方式特异性结合该分子，和/或刺激剂仅包含单个特异性结合选择标志物的结合位点；和/或选择剂以单价方式特异性结合选择标志物。

[0026] 用于可逆结合刺激反应剂/刺激剂的结合位点（例如C和Z）可分别相同或不同，或可通过与破坏选择反应剂/选择剂上结合位点（例如D和Y结合位点）的相同或不同物质破坏。第一和第二反应剂可基本上相同，且可选地与其他物质（例如选择剂结合反应剂）不同，不固定于支持物上。

[0027] 还提供了作用剂、反应剂、复合物、以及包含所述作用剂、反应剂或复合物的组合物或制品（例如试剂盒），如用于进行任何方法实施方式的那些。例如，提供了一种组合物，其包含可逆结合于多聚化反应剂（其可选为第一反应剂）的刺激剂，其中，实施刺激剂能够以诱导或调节目标细胞中信号的方式特异性结合目标细胞表面上的分子。

[0028] 在一些实施方式中，组合物和/或制品还包含：支持物；固定于该支持物上的第二反应剂；以及选择剂，其能够可逆结合第二反应剂且能够特异性结合目标细胞上的选择标志物。

[0029] 组合物还可包含目标细胞和/或非目标细胞，其不表达（第一）选择标志物和/或第二选择标志物，且目标细胞可选包含重组分子或表达重组分子的核酸，实施重组分子可选为嵌合受体。组合物还可包含能够破坏结合的物质。

[0030] 在一些实施方式中，制品包含：刺激剂、与其可逆结合的反应剂、以及可选的第二反应剂（其与选择剂结合）以及可选的选择剂、以及可选的支持物（含或不含预固定于其上的反应剂）。组分可在分开的容器中或相同容器中或其组合。能够可逆结合的反应剂可在制品中与作用剂预结合，或与作用剂分开以用于后续的以作用剂功能化反应剂。在一些方面中，支持物和第二支持物存在于分开的容器中，其中实施不同的容器可选彼此流体连接，使得细胞悬液流经或通过一个支持物，然后再流经或通过另一支持物；制品还可包含能够破坏一种或多种反应剂和一种或多种作用剂间可逆结合的物质。

[0031] 在一些实施方式中，容器中还包含第二反应剂；和/或容器中还包含（第一）选择剂和/或第二选择剂；和/或制品还包含第二容器，可选地包含（第一）刺激剂和/或第二刺激剂，和/或第一反应剂；和/或制品还包含第三容器，其中包含第二选择剂和/或第三反应剂；和/或制品还包含第四容器，其中包含所述物质。

[0032] 还提供了实施所提供方法（如所提供的任何方法实施方式）的设备。在一些实施方式中，该设备可包含任何所提供的组合物或所提供的制品。设备可包含或还可包含流体入口，如与组合物或与设备的一个或多个组件流体连接的流体入口，和/或流体出口，其与组

合物和/或与设备的一个或多个组件流体连接。

[0033] 在一些实施方式中,设备包含:(a)刺激剂,其能够以诱导或调节目标细胞中信号的方式特异性结合目标细胞表面上的分子;(b)第一反应剂,其能够可逆结合刺激剂;(c)第二反应剂;(d)支持物;(e)选择剂,其能够可逆结合第二反应剂且能够特异性结合目标细胞上的选择标志物。在一些方面中,组分(a)~(e)存在于多个容器中,其中至少一些流体连接,可选在封闭或无菌系统中,由此一种或多种组分通过设备中的一个容器到达设备中的另一个容器。在一些方面中,设备还包含样品出口,如与至少一个支持物(例如用于色谱法的固定相)流体连接的样品出口。

[0034] 在一些实施方式中,制品或设备是功能性密闭系统。设备还可包含一个或多个控制器,能够调节或调整进行一个或多个不同步骤的环境中的一个或多个特征,如调节或调整一个或多个容器或其组件和/或至少一个用于色谱法的固定相中的至少一个的pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或恒温控制器。

[0035] 一些情形中,制品或设备还可具有与包含培养基和/或一种或多种营养物和/或一个或多个碳源的容器的流体连接,由此该连接能够将所述培养基、营养物和/或碳源递送给设备内的细胞,可选地,所述细胞固定于用于色谱法的固定相上。在一些方面中,容器是产出容器或形成容器,例如包含缓冲剂或适于形成细胞的其他组分。在一些实施方式中,至少一个所述组件/组分和/或包含该组件/组分或用于容纳该组件/组分的容器可以无菌或净化的方式从所述设备取下。

[0036] 在一些实施方式中,方法全部或部分以自动化形式进行。因此,在一些实施方式中,设备或制品能够以自动化方式实施所述方法,如在一个或多个步骤期间减少或消除对用户控制或互动的需求。

[0037] 在一些实施方式中,孵育在所述合并后进行,且方法还包括将组合物中的目标细胞转移到不同环境中,所述环境适于细胞培养或扩增。在一些情况中,将细胞从封闭系统或封闭容器转移入不同环境中;或其中该转移包括从第一容器中取出如此转移的细胞,并将细胞转移入第二容器。不同环境可位于孵育器中在一些方面中,转移在封闭系统中进行,其中,所述转移包括将包含细胞的无菌密闭容器转移到无菌环境或转移到该封闭容器中的不同环境中,和/或其中,所述转移在无菌环境中进行或在无菌条件下进行。

[0038] 在一些实施方式中,在转移后,通过破坏所述可逆结合将细胞从固定相分离,并可选地将所述细胞从固定相的存在下移除。在一些情况中,所去除的细胞被进一步扩增。在一些方面中,在所述孵育的至少一部分期间,可选地以自动化的方式,控制环境(例如pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或温度),和/或将营养物加给包含于所述至少一个用于色谱法的固定相中的至少一个中且位于适于扩增的环境中的细胞。为了扩增转移到合适的环境可包括:使得固定相与细胞分离,而所述固定相存在于设备中。

[0039] 在一些实施方式中,该方法包括特征,如具体步骤、具体作用剂的选择和/或具体反应剂的选择,这些特征实现了对经由反应剂的信号接受或调节的时长或强度或类型的控制或调整,和/或实现了对由该方法最终产生的产出组合物或细胞群的性质的控制或调整。在一些实施方式中,这些特征由于作用剂和反应剂的有益性能而成为可能,所述有益性能为例如:作用剂或反应剂各组分结合的可逆性,以及由此多聚化的作用剂与细胞结合的可逆性。可利用反应剂的这些性能实现多途径的控制。例如,在一些实施方式中,通过可逆结

合,该方法包括对信号施加按时控制(temporal control),控制细胞与多聚化的作用剂的接触过程的持续时间,和/或由此诱导的信号转导的持续时间。

[0040] 在一些实施方式中,方法涉及控制(如精确控制)此类作用剂与细胞结合的时长。例如,这可通过如下方式实现:在特定时间点主动逆转该结合,且在一些情况下同时还能在其他培养条件下(例如在生理温度下和/或包含各种营养物下孵育)的额外时间段中维持细胞。因此,与仅涉及终止细胞所接受的所有或基本上所有信号的其他方法相反,本文提供的方法在一些方面中实现了特异性终止或中断通过特定反应剂递送的信号。

[0041] 同样,在一些实施方式中,可逆性使得反应剂实质上模块化,在诱导可逆结合的条件下,允许其一个或多个组分的替换而无需工程化改造的或新的反应剂,例如仅通过逆转结合和联合其他作用剂或反应剂。例如,通过能够使同一多聚化反应剂可逆结合各种刺激剂(不论同时或不同时),所提供方法和组合物的使用者可根据所需的结果,调节所递送特定信号的性质,例如通过将一种或多种刺激剂替换为另一种或多种刺激剂,从而诱导更强或更弱或性质不同的信号。

[0042] 在一些实施方式中,按时控制和调节结合使用,例如通过在一种作用剂的存在下孵育细胞一定时间段,通过破坏诱导结合逆转,然后在另一种或多种不同作用剂或反应剂的存在下进行孵育。例如,在一个实施方式中,先用一种反应剂刺激T细胞以递送特定强度或性质的信号,在一定时间段后,破坏该信号,用性质或数量不同的信号(例如更强或更弱或激活不同的信号转导途径或已知对不同分化途径重要的信号)替代之。在一些实施方式中,该控制提供例如如下优点:允许用户最大化所需结果(例如扩增或保持)而避免不希望的结果(例如耗尽或无效能)。

[0043] 在一些实施方式中,按时控制通过破坏反应剂或作用剂的可逆结合(例如通过加入一种物质)实现。例如,在一些实施方式中,在开始孵育后的一定时间段中(如5天内)和/或在孵育总时长的一定百分比内(例如在时长的1/5、1/4、1/3或1/2内),破坏受体结合剂和反应剂的可逆结合。因此,在一些情况下,该方法使得培养T细胞产生。

[0044] 在一些方面中,孵育在一定条件下进行,在该条件下受体结合剂特异性结合分子,由此诱导或调节组合物中一个或多个T细胞中的信号。

[0045] 在一些实施方式中,对受体结合剂和反应剂间结合的破坏在开始孵育后多于30分钟实现。例如,在一些方面,受体结合剂和反应剂间结合的破坏在孵育开始后的1小时至4天时实现,在孵育开始后的6小时至3天时实现,在孵育开始后的12小时至2天时实现,或在孵育开始后的1天至3天时实现。在一些情况中,受体结合剂和反应剂间结合的破坏在孵育开始后的约1小时至约4天时实现,在孵育开始后的约6小时至约3天时实现,在孵育开始后的约12小时至约2天时实现,或在孵育开始后的约1天至约3天时实现。在一些方面,该破坏在所述孵育开始后的大于或等于约1小时且在孵育开始后的1天、2天、3天或4天内实现。

[0046] 在一些实施方式中,受体结合剂能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关的信号。在一些方面,受体结合剂特异性结合TCR/CD3复合物成员。在一些情况下,受体结合剂特异性结合CD3。

[0047] 在一些实施方式中,分子(T细胞表面上的分子)是TCR/CD3复合物的组成部分或是CD3。在一些方面,该分子是第一分子,且受体结合剂能进一步特异性结合一个或多个T细胞表面上的第二分子。在一些情况下,该第二分子能够诱导或促进、抑制、或调节通过T细胞中

所述第一分子递送的信号。

[0048] 在一些方面,受体结合剂包含结合伴侣C1。在一些方面,反应剂包含的多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1。在一些情况下,两个或多个结合位点Z1各自能够结合于结合伴侣C1以在受体结合剂和反应剂之间形成可逆键。

[0049] 在一些实施方式中,对受体结合剂和反应剂之间结合的破坏包括:将含有能逆转受体结合剂和反应剂之间键的物质的组合物加入细胞。

[0050] 在一些情况中,受体结合剂是第一受体结合剂,且孵育在第二受体结合剂的存在下进一步进行。在一些此类情况中,第二受体结合剂能够特异性结合一个或多个T细胞表面上的第二分子。在一些方面中,该第二分子能够促进、抑制、或调节通过T细胞中所述第一分子递送的信号。

[0051] 在一些实施方式中,反应剂包含能够可逆结合第二受体结合剂的多个结合位点。在一些此类情况下,第二受体结合剂可逆地结合该反应剂。在一些方面,能够可逆结合第一受体结合剂的多个结合位点与能够可逆结合第二受体结合剂的多个结合位点可相同或不同。

[0052] 在一些方面,第二受体结合剂包括结合伴侣C1或C2,其能够可逆结合两个或更多个结合位点Z1。在一些此类情况下,第一和第二受体结合剂通过两个或更多个结合位点Z1可逆结合于反应剂。在一些情况中,第二受体结合剂包含结合伴侣C2,且反应剂进一步包含多个结合位点Z2。多个结合位点Z2可具有结合于结合伴侣C2以形成第二受体结合剂和反应剂之间可逆键的能力。在一些方面,C2和C1相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分。在一些方面,Z2和Z1相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分。

[0053] 在一些情况中,反应剂是第一反应剂,孵育在至少一种第二反应剂的存在下进行,该第二反应剂可逆结合第二受体结合剂。

[0054] 在一些实施方式中,孵育在第二受体结合剂特异性结合第二分子的条件下进行。在一些如此的方面中,第二受体结合剂与第二分子的结合诱导或调节信号,例如增强、抑制或改变T细胞中通过第一分子递送的信号。

[0055] 在一些任何此类实施方式中,对第一和第二受体结合剂与反应剂之间结合的破坏终止或减弱了通过第一受体结合剂诱导或调节的信号,并终止或减弱了由第二受体结合物诱导或调节的信号。

[0056] 本文的一些实施方式中提供了用于培养T细胞的方法,其包括在第一受体结合剂的存在下孵育包含T细胞的组合物,所述第一受体结合剂能够特异性结合T细胞表面上表达的第一分子。在一些方面,第一受体结合剂与第一分子的结合诱导或调节了T细胞中TCR/CD3复合物相关的信号。在一些此类实施方式中,组合物还在第二受体结合剂的存在下被进一步孵育,该第二受体结合剂可逆结合含有能够可逆结合第二受体结合剂的多个结合位点的反应剂。在一些方面,第二受体结合剂能够特异性结合T细胞表面上的第二分子。在一些情况下,第二受体结合剂与第二分子的结合诱导或调节T细胞中的第二信号,以例如提高、抑制或改变通过第一分子递送的信号。在一些方面,在开始孵育后5天内破坏第二受体结合剂和反应剂之间的可逆结合,由此产生培养的T细胞。

[0057] 在一些实施方式中,在第一受体结合剂特异性结合第一分子和/或第二受体结合剂特异性结合第二分子的条件下进行孵育,由此诱导或调节T细胞中的一种或多种信号。

[0058] 在一些实施方式中,第二受体结合剂包含结合伴侣C1。在一些此类实施方式中,反应剂所包含的多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1以形成第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。

[0059] 在一些方面中,第二信号是除了TCR/CD3复合物相关信号以外的其他信号。在一些情况中,第二信号能够增强或加强TCR/CD3复合物相关信号。

[0060] 在一些实施方式中,第二分子是共刺激分子、辅助分子、细胞因子受体、趋化因子受体、免疫检查点分子,或是TNF家族或TNF受体家族成员。在一些情况下,第二分子为:CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些此类情况中,第二分子是CD28。在一些实施方式中,反应剂的模块性质实现了在给定孵育期间一种或多种共刺激和/或活化反应剂的取代,包括按时取代。为了选择目的,模块性还能实现系列选择和/或刺激,其中反应剂在步骤间被移除。

[0061] 在一些方面中,对第二受体结合剂和反应剂之(其可为第二反应剂)间结合的破坏包括:将含有能逆转该第二受体结合剂和反应剂(其可为第二反应剂)之间键的物质的组合物加入细胞。在一些实施方式中,破坏终止或减弱了通过第二受体结合剂诱导或调节的信号,或额外分子为CD28且破坏终止或减弱了T细胞中的CD28共刺激信号。

[0062] 在一些方面中,在破坏后,进一步孵育包含T细胞的组合物。在一些此类方面中,孵育和进一步孵育在同一器皿中进行。在一些情况中,进一步孵育在所述物质的存在下进行。在一些情况中,方法不包括:在进一步孵育前,从细胞组合物中去除所述物质、受体结合剂、第二受体结合剂和/或反应剂。在一些实施方式中,所述孵育和/或进一步孵育在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 或约 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行。在一些情况中,所述孵育和/或进一步孵育在能够将信号递送到T细胞的其他作用剂的存在下进行。在一些实施方式中,所述其他作用剂能够增强或诱导T细胞、CD4+细胞和/或CD8+细胞增殖。在一些方面中,所述其他作用剂是细胞因子,例如IL-2、IL-15或IL-7。在一些实施方式中,进一步孵育的进行时间不超过14天、不超过12天、不超过10天、不超过8天或不超过6天。

[0063] 在本文的一些实施方式中提供了一种培养T细胞的方法,包括:在特异性结合T细胞表面上CD28分子的受体结合剂的存在下,在细胞中实现通过CD28的信号转导的条件下,孵育包含T细胞的组合物。在一些此类方面中,在所述孵育开始后5天内,消除或减少所述受体结合剂和CD28分子的结合,由此终止或减弱所述细胞中的CD28信号转导,从而产生培养的T细胞。

[0064] 在一些情况中,所述消除或减弱在开始孵育后4天内、3天内、2天内或1天内实现。在一些情况下,消除或减弱包括洗涤细胞,由此从组合物中去除或减少未特异性结合CD28的任何受体结合剂。在一些方面中,消除包括逆转受体结合剂和CD28分子间的结合相互作用,还包括洗涤细胞以去除或减少组合物中的受体结合剂。

[0065] 在一些方面,在孵育的至少部分期间和/或在孵育后,在特异性结合TCR/CD3复合物的分子的作用剂的存在下,孵育组合物中的T细胞,由此减弱或调节细胞中TCR/CD3复合物相关的信号。

[0066] 本文在一些方面提供了一种培养T细胞的方法,其包括:在受体结合剂的存在下,孵育包含T细胞的组合物。在一些实施方式中,受体结合剂可逆结合包含能够可逆结合受体结合剂的多个结合位点的反应剂。在一些情况中,受体结合剂能够以诱导或调节T细胞中信

号的方式特异性结合T细胞表面上除了CD28或CD3以外的分子,从而产生培养的T细胞。

[0067] 在一些方面,孵育在一定条件下进行,在该条件下受体结合剂特异性结合于所述分子,由此诱导或调节T细胞中的信号。在一些实施方式中,所述信号不是TCR/CD3复合物相关信号。

[0068] 在一些实施方式中,受体结合剂包含结合伴侣C1,在一些此类实施方式中,反应剂的多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1以形成受体结合剂和反应剂之间的可逆键。

[0069] 在一些实施方式中,受体结合剂为第二受体结合剂,所述分子为第二分子。在一些此类实施方式中,在能够特异性结合一个或多个T细胞表面上第一分子的第一受体结合剂的存在下进行进一步孵育,其中所述第一分子能够诱导或调节组合物中一个或多个T细胞中的第一信号。在一些方面中,第一受体结合剂可逆结合于反应剂,所述反应剂包含针对第一受体结合剂和第二受体结合剂的多个结合位点。在一些情况中,第一受体结合剂可逆结合包含能够可逆结合该第一受体结合剂的多个结合位点的第二反应剂。

[0070] 在一些实施方式中,第一受体结合剂能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关的信号。在一些方面,第一受体结合剂特异性结合TCR/CD3复合物成员。在一些情况下,第一受体结合剂特异性结合CD3。

[0071] 在一些实施方式中,第二受体结合剂与第二分子的特异性结合能够增强、抑制或改变通过第一分子递送的信号。在一些情况下,第二受体结合剂与第二分子的特异性结合能够增强或强化TCR/CD3复合物相关的信号。

[0072] 在本文的一些实施方式中,提供了一种培养T细胞的方法,所述方法包括在第一受体结合剂的存在下孵育包含T细胞的组合物,其中所述第一受体结合剂可逆结合反应剂,所述反应剂包含能够可逆结合第一受体结合剂的多个结合位点。在一些情况下,第一受体结合剂能够特异性结合T细胞表面上的第一分子,如以诱导或调节该组合物中T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号。在一些实施方式中,所述方法包括在第二受体结合剂的存在下孵育包含T细胞的组合物,其中所述第二受体结合剂可以可逆结合进一步包含针对该第二受体结合剂的多个结合位点的反应剂,或可以可逆结合包含能够可逆结合该第二受体结合剂的多个结合位点的第二反应剂。在一些方面,第二受体结合剂能够特异性结合T细胞表面上的第二分子,以例如诱导或调节该组合物中T细胞中的第二信号。在一些方面,第二分子不是CD28。在一些实施方式中,所述孵育在如下条件下进行:所述条件使得信号和/或第二信号在组合物中的T细胞中被诱导或调节,由此产生培养的T细胞。

[0073] 在一些实施方式中,第一受体结合剂特异性结合TCR/CD3复合物成员和/或第一受体结合剂特异性结合CD3。在一些情况下,第二受体结合剂与第二分子的特异性结合能够诱导或调节除TCR/CD3复合物相关信号以外的其他信号。在一些方面,第二受体结合剂与第二分子的特异性结合能够增强、抑制或改变通过第一分子递送的信号。在一些实施方式中,第二受体结合剂与第二分子的特异性结合能够增强或强化TCR/CD3复合物相关的信号。

[0074] 在一些实施方式中,所述分子(其可为第二分子)为:CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137、(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些方面,受体结合剂(其可为第二受体结合剂)特异性结合:CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137、(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些实施方式中,所述分子(其可为第二分

子)不是CD137,和/或所述受体结合剂(其可为第二受体结合剂)不特异性结合CD137。

[0075] 在一些方面中,第一受体结合剂和第二受体结合剂可逆结合反应剂。在一些实施方式中,第一受体结合剂和第二受体结合剂各自独立地包含结合伴侣C1,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1以形成第一和第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。在一些实施方式中,第一受体结合剂包含结合伴侣C1,第二受体结合剂包含结合伴侣C2,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1和结合伴侣C2以形成第一和第二受体结合剂与反应剂之间的可逆键。在其他一些实施方式中,第一受体结合剂包含结合伴侣C1,第二受体结合剂包含结合伴侣C2,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1以及两个或多个结合位点Z2,其中Z1各自能够结合于结合伴侣C1以形成第一受体结合剂和反应剂之间的可逆键,Z2各自能够结合于结合伴侣C2以形成第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。

[0076] 本文在一些方面提供了一种培养T细胞的方法,其包括:在受体结合剂的存在下,孵育包含T细胞的组合物。受体结合剂可以可逆结合反应剂,该反应剂是包含能够与该受体结合剂可逆结合的多个结合位点的链霉亲和素类似物或突变蛋白。在一些情况下,受体结合剂能够特异性结合目标细胞表面上的分子,以例如诱导或调节该组合物中目标细胞中的信号。在一些方面中,链霉亲和素突变蛋白包含净负电荷。

[0077] 在本文的一些方面中,提供了一种培养目标细胞的方法,所述方法包括在受体结合剂的存在下孵育包含目标细胞的组合物,其中所述受体结合剂可逆结合于反应剂,所述反应剂为包含能够可逆结合该受体结合剂的多个结合位点的链霉亲和素类似物或突变蛋白。在一些实施方式中,受体结合剂能够特异性结合目标细胞表面上的分子,其结合形式能够诱导或调节该组合物中目标细胞中的信号。在一些情况下,链霉亲和素类似物或突变蛋白对包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)的链霉亲和素结合肽的亲合力高于包含SEQ ID NO:1-6中任一所示氨基酸序列的链霉亲和素或突变蛋白,由此产生培养的目标细胞。

[0078] 在一些实施方式中,孵育在如下条件下进行:在该条件下,受体结合剂特异性结合所述分子,由此诱导或调节组合物中一个或多个目标细胞中的信号。

[0079] 在一些情况下,反应剂的多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1。

[0080] 在一些情况下,受体结合剂包含结合伴侣C1,其能够可逆结合于结合位点Z1,其中C1和Z1之间的可逆结合实现受体结合剂和反应剂之间的可逆结合。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白包含多个结合位点Z1,且多个受体结合剂可逆结合该反应剂。

[0081] 在一些实施方式中,目标细胞包括血细胞、白细胞、淋巴细胞、B细胞、B细胞群、T细胞、T细胞群和/或天然杀伤(NK)细胞。在一些实施方式中,目标细胞包含抗原特异性T细胞或其细胞群、辅助T细胞或其细胞群、细胞毒性T细胞或其细胞群、记忆T细胞或其细胞群、调节T细胞或其细胞群、NK细胞或其细胞群、抗原特异性B细胞或其细胞群、记忆B细胞或其细胞群、调节B细胞或其细胞群。在一些实施方式中,目标细胞是T细胞。

[0082] 在一些实施方式中,所述分子递呈在T细胞表面上,且受体结合剂能够诱导或调节组合物中T细胞中的信号。在一些方面,受体结合剂能够引发T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号和/或受体结合剂特异性结合TCR/CD3复合物成员。在一些情况下,受体结合剂特异性结合CD3。在一些情况下,该分子是第一分子,且受体结合剂能够特异性结合该第一分子以

及(在一些情况下)一个或多个目标细胞表面上的第二分子。在一些实施方式中,第二分子的结合能够增强、减弱或改变通过第一分子递送的信号。

[0083] 在一些情况中,受体结合剂是第一受体结合剂,且孵育在第二受体结合剂的存在下进一步进行。第二受体结合剂可能特异性结合一个或多个目标细胞表面上的第二分子。在一些情况下,第二受体结合剂与第二分子的结合诱导或调节信号以提高、抑制或改变通过第一分子递送的信号。

[0084] 在一些实施方式中,孵育在如下条件下进行:在该条件下,第二受体结合剂特异性结合第二分子,由此诱导或调节组合物中目标细胞中的信号,从而增强、减弱或改变通过第一分子递送的信号。在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白或类似物包括能够可逆结合第二受体结合剂的多个结合位点,由此该第二受体结合剂可逆结合该链霉亲和素突变蛋白或类似物。

[0085] 在一些实施方式中,第二受体结合剂包含结合伴侣C1或C2,其能够可逆结合链霉亲和素类似物或突变蛋白中存在的两个或更多个结合位点Z2。

[0086] 在一些情况下,其他分子为:CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些实施方式中,第二受体结合剂特异性结合CD28、CD90 (Thy-1)、CD95 (Apo-/Fas)、CD137 (4-1BB)、CD154 (CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些方面中,额外的分子为CD40或CD137。在一些情况下,第二受体结合剂特异性结合CD40或CD137。

[0087] 在一些实施方式中,第二受体结合剂包括多种不同的受体结合剂,其各自能够独立地结合组合物中T细胞表面上相同或不同的第二分子,从而共同诱导或调节细胞中的一个或多个信号。

[0088] 在一些实施方式中,所述方法还包括破坏第一和/或第二受体结合剂和反应剂之间的可逆结合。在一些方面中,该破坏在开始孵育后14天内实现,在开始孵育后12天内实现,在开始孵育后10天内实现,在开始孵育后8天内实现,或在开始孵育后6天内实现。

[0089] 在一些实施方式中,至少一部分孵育在能够将信号递送到T细胞的其他作用剂的存在下进行。一些情形中,所述其他作用剂能够增强或诱导T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的增殖。在一些实施方式中,所述其他作用剂是细胞因子,例如IL-2、IL-15或IL-7。在一些情况中,所述其他作用剂不特异性结合CD28和/或诱导CD28信号转导。

[0090] 在一些实施方式中,T细胞或目标细胞为来自对象的原代细胞。在一些情况下,T细胞或目标细胞直接分离自对象。在一些实施方式中,T细胞为未分级分离的T细胞、富含CD3+T细胞或为分离的CD3+T细胞、富含CD4+T细胞或为分离的CD4+T细胞、或者富含CD8+T细胞或为分离的CD8+T细胞。在一些实施方式中,在孵育前,T细胞不富含CD62L+细胞和/或不富含初始T细胞。在一些情况下,T细胞或目标细胞是人细胞。

[0091] 在一些实施方式中,在孵育过程中,反应剂不结合支持物或固体支持物。在其他实施方式中,在孵育的至少部分过程中,反应剂结合于支持物,由此在孵育的至少部分过程中多个T细胞或目标细胞可逆固定在支持物上。在一些此类实施方式中,支持物为固体支持物或固定相。

[0092] 在一些实施方式中,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)仅包含一个结合位点,例如B2。在一些方面中,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)以单价方式特异性结合于该

分子。在一些实施方式中,第二受体结合剂仅包含一个结合位点,例如B4。在一些情况下,第二受体结合剂以单价方式特异性结合于该分子。在一些实施方式中,结合位点(例如B2或B4)包括抗体结合位点(antibody combining site)。

[0093] 在一些方面中,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂各自独立地为抗体片段、单价抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子、包含Ig结构域分子、细胞因子、趋化因子、适体、或MHC分子、或其结合片段。在一些此类方面中,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂包括抗体片段、Fab片段、二价抗体片段,例如F(ab')₂片段或二价单链Fv(scFv)片段。在一些情况下,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂是单价抗体片段,例如Fab片段、Fv片段或scFv片段。在一些情况下,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂为具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子,例如适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体(glubody)、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋白(adnectin)或阿维多聚体(avimer)。

[0094] 在一些实施方式中,受体结合剂(其可为第一受体结合剂)包括特异性结合CD3的作用剂。特异性结合CD3的作用剂可为抗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、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD3结合分子。在一些实施方式中,第二受体结合剂包括特异性结合如下物质的作用剂:CD28、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40和/或HVEM。所述作用剂特异性结合于CD28、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40和/或HVEM,其可为:抗CD28抗体、抗CD28抗体的二价抗体片段、抗CD28抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD28结合分子、抗CD90抗体、抗CD90抗体的二价抗体片段、抗CD90抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD90结合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体的二价抗体片段、抗CD95抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD95结合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体的二价抗体片段、抗CD154抗体的单价抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD154结合分子、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、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD137结合分子、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体的二价抗体片段、抗ICOS抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类ICOS结合分子、抗LAT抗体、抗LAT抗体的二价抗体片段、抗LAT抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类LAT结合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体的二价抗体片段、抗CD27抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD27结合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体的二价抗体片段、抗OX40抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类OX40结合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体的二价抗体片段、抗HVEM抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类HVEM结合分子、4-1BB配体、或其任何混合物。

[0095] 一些此类实施方式中,反应剂是或含: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、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白;可逆结合链霉亲和素结合肽的亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白;包含至少两个螯合基团K的反应剂,其中所述至少两个螯合基团能够结合过渡金属离子;能够结合寡聚组氨酸亲和标签的反应物;能够结合谷胱甘肽-S转移酶的反应物;钙调蛋白或其类似物;能够结合钙调蛋白结合肽(CBP)的反应物;能够结合FLAG肽的反应物;能够结合HA标签的反应物;能够结合麦芽糖结合蛋白(MBP)的反应物;能够结合HSV表位的反应物;能够结合myc表位的反应物;或能够结合生物

素化载体蛋白的反应物。

[0096] 在一些实施方式中,反应剂为或包含:可逆结合生物素的链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白;可逆结合生物素类似物或其生物活性片段的链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白;和/或,可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白。

[0097] 在一些实施方式中,反应剂为:可逆结合生物素或其生物活性片段的链霉亲和素类似物或突变蛋白、亲和素、链霉亲和素的寡聚物或多聚物;可逆结合链霉亲和素结合肽的亲和素或链霉亲和素类似物或突变蛋白;包含至少两个螯合基团K的反应物,其中所述至少两个螯合基团能够结合过渡金属离子;能够结合寡聚组氨酸亲和标签的反应物;能够结合谷胱甘肽-S-转移酶的反应物;钙调蛋白或其类似物;能够结合钙调蛋白结合肽(CBP)的反应物;能够结合FLAG肽的反应物;能够结合HA标签的反应物;能够结合麦芽糖结合蛋白(MBP)的反应物;能够结合HSV表位的反应物;能够结合myc表位的反应物;或能够结合生物素化载体蛋白的反应物。

[0098] 在一些实施方式中,反应剂包括:链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白的寡聚物或多聚物。在一些方面中,寡聚物或多聚物中的个体分子通过多糖或二官能性接头交联。

[0099] 在一些实施方式中,多个结合位点Z包括至少2、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、72或更多个结合位点。

[0100] 在一些方面中,链霉亲和素结合肽是Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 或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)。

[0101] 在一些实施方式中,反应剂包括链霉亲和素类似物或突变蛋白,其在对应于SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的链霉亲和素的第44-47位的序列位置处包含氨基酸序列Val44-Thr45-Ala46-Arg47或Ile44-Gly45-Ala46-Arg47。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白在对应于SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的链霉亲和素的第44-47位的序列位置处包含氨基酸序列Val44-Thr45-Ala46-Arg47。

[0102] 在一些实施方式中,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白具有SEQ ID NO:3-6中任一项所示的氨基酸序列。在一些方面中,链霉亲和素类似物或突变蛋白包括氨基酸序列与SEQ ID NO:3-6中任一项显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性,且包含对应于Val44-Thr45-Ala46-Arg47或Ile44-Gly45-Ala46-Arg47的氨基酸序列。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白可逆结合生物素或其生物活性形式、生物素类似物或突变蛋白或其生物活性片段或链霉亲和素结合肽。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白结合如上所述任何序列的功能性片段,所述功能性片段可逆结合生物素或其生物活性形式、生物素类似物或突变蛋白或其生物活性片段或链霉亲和素结合肽。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白具有一处或多处氨基酸置换,位置对应于SEQ ID NO:1所示氨基酸序列中

链霉亲和素内第117、120和/或121位。在一些实施方式中,所示氨基酸取代选自:Glu117、Asp117、Arg117、Ser120、Ala120、Gly120、Trp121、Tyr121或Phe121。在一些实施方式中,一个或多个氨基酸取代为Glu117、Gly120或Tyr121。

[0103] 在一些实施方式中,所述链霉亲和素类似物或突变蛋白包含SEQ ID NO:27或28所示的氨基酸序列。在一些方面中,链霉亲和素类似物或突变蛋白包含与SEQ ID NO:28显示至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的氨基酸序列,且包含对应于Val44、Thr45、Ala46、Arg47、Glu117、Gly120和Tyr121的氨基酸序列。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白可逆结合生物素或其生物活性片段、生物素类似物或突变蛋白或其生物活性片段、或链霉亲和素结合肽。在一些实施方式中,链霉亲和素类似物或突变蛋白可逆结合如上所述任何序列的功能性片段,所述功能性片段可逆结合生物素或其生物活性片段、生物素类似物或突变蛋白或其生物活性片段、或链霉亲和素结合肽。

[0104] 在一些方面中,结合伴侣C1和/或结合伴侣C2独立地包括链霉亲和素结合肽,例如Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)或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)。

[0105] 在一些实施方式中,所述破坏包括:将组合物加入细胞,该组合物含有能逆转受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂与反应剂之间的键的物质。在一些实施方式中,所述物质是游离结合伴侣和/或为竞争剂。在一些实施方式中,所述物质在组合物中对T细胞或对目标细胞无害。在一些方面中,与在可比或相同条件下不含该物质分别孵育T细胞或目标细胞相比,加入该物质并未将存活T细胞或目标细胞的百分比降低到小于90%、80%、70%、60%或50%。在一些实施方式中,该破坏终止或减少T细胞或目标细胞中由受体结合剂或第二受体结合剂中一者或两者诱导或调节的信号。

[0106] 在一些实施方式中,反应剂为或包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白、或其生物活性片段。在一些实施方式中,所述物质包含链霉亲和素结合肽、生物素或其生物活性片段、可选地D-生物素、或生物素类似物或生物活性片段。

[0107] 在一些实施方式中,所述物质是链霉亲和素结合肽,例如:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys ((SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18)或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)。在一些实施方式中,所述物质为C1或其类似物,或者为C2或其类似物。

[0108] 在一些实施方式中,结合位点Z1和结合伴侣C1之间可逆结合的解离常数(K_D)和/或结合位点Z2和结合伴侣C2之间可逆结合的解离常数(K_D)为 $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ 。

[0109] 在一些实施方式中,在孵育前,细胞与特异性结合组合物中T细胞或目标细胞所含

标志物的选择剂接触,从而产生或获得含有T细胞或目标细胞的组合物。在一些实施方式中,至少部分孵育在选择剂的存在下进行,所述选择剂特异性结合组合物中T细胞或目标细胞所含标志物,培养的T细胞富集了含有该标志物的T细胞或目标细胞。

[0110] 在一些实施方式中,选择剂可逆结合反应剂,且反应剂还包含能够特异性结合该选择剂的多个结合位点。在一些方面中,选择剂可逆结合第二反应剂,该第二反应剂包含能够特异性结合该选择剂的多个结合位点。

[0111] 在一些实施方式中,与没有信号的诱导或调节下的T细胞孵育相比,该信号的诱导或调节使得培养T细胞的扩增(繁殖)和/或活化增加。在一些实施方式中,所述增加是至少2倍、3倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍、10-倍或更多倍。在一些实施方式中,与没有额外信号或第二信号的诱导或调节下的T细胞孵育相比,额外信号或第二信号的诱导或调节使得培养T细胞的扩增(繁殖)和/或活化增加。在一些实施方式中,所述增加是至少2倍、3倍、4-倍、5-倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍、10-倍或更多倍。

[0112] 在一些实施方式中,所述方法提高了组合物(例如通过所述方法产生的产出组合物)中T细胞或其特定亚组的扩增和/或增殖和/或存活和/或分化,改变了组合物中此类T细胞或亚组的代谢谱,改变了组合物中CD8+T细胞亚组;和/或提高了组合物中长寿记忆T细胞的百分比。在一些实施方式中,该提高是与起始组合物相比,例如与孵育前的细胞相比。在一些方面中,其与在一些特定方式上不同的条件下进行的类似刺激相比,所述不同的条件例如为:除了直至孵育结束都不破坏结合(例如无按时控制)以外其余均相同的条件,和/或除了采用不同的刺激剂组合以外其余均相同的条件,如其中共刺激剂为多聚化作用剂之一且不同于所研究刺激剂中一种或多种或任何共刺激分子的条件。例如,当所研究刺激剂包含除CD28结合分子以外的共刺激剂的情况下,对比条件或比拟条件组可为涉及用不包含特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号转导的刺激剂或反应剂孵育,且可选包括与所研究反应剂相同的另一作用剂,如抗CD3作用剂。

[0113] 在一些实施方式中,与孵育前、孵育后但未进行破坏、或在类似或可比条件下但在特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号转导的作用剂的存在下进行孵育后的组合物中的CD3+T细胞、CD4+T细胞或CD8+细胞数量或百分比分别相比,所述方法获得的培养T细胞中CD3+T细胞、CD4+T细胞或CD8+细胞的数量或百分比提高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0114] 在一些实施方式中,与孵育前、孵育后但未进行破坏、或在类似或可比条件下但在特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号转导的作用剂的存在下进行孵育后的组合物中的CD8+细胞比例或相对比例或标准化比例相比,所述方法获得的培养T细胞中CD8+T细胞的比例或相对比例或标准化比例提高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0115] 在一些实施方式中,所述方法使得具有特定表型细胞的数量或相对数量(例如比例)更大,如显示长寿性质的细胞和/或少分化细胞群,如长寿记忆或干细胞样群,如表达高水平CD62L、CD127、CCR7、Sca1和/或CD27的那些,和/或表达或包含增殖指示以及原初或静息表型指示的那些,如具有低T-bet染色和/或IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+和LFA-1+表型的如上所述中的任何。与孵育前、孵育后但未进行破坏、或在类似但在特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号转导的作用剂存在下进行孵育后的组合物中的相应细胞群(CD62L+、长寿记忆T细胞或记忆型干细胞(T_{scm}))的数量或百分比相比,组合物中CD62L+、可

选的长寿记忆T细胞或记忆干细胞 T_{scm} 的数量或百分比提高至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些实施方式中,与类似方法或反应剂相比,刺激产生更多的少分化长寿表型但经扩增或维持的细胞,从而产生所需数量的细胞。

[0116] 在一些实施方式中,培养T细胞包含多于35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%含CD62L表面阳性表型(CD62L⁺)的T细胞亚组,以占组合物中总T细胞或占组合物中总细胞的百分比计。

[0117] 在一些实施方式中,T细胞亚组还包括如下表型:包括CD127⁺的表型;和/或CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2R β ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种表型。

[0118] 在一些实施方式中,T细胞亚组包括低水平的TCR重排删除环(TREC);和/或表达增殖标志物,该标志物可为Ki-67;和/或,在刺激剂的存在下具有增殖能力;和/或在刺激剂的存在下具有产生细胞因子(例如IFN- γ 、TNF或IL-2)的能力。

[0119] 在一些实施方式中,刺激剂是抗原、稳态细胞因子,例如IL-15和/或IL-17,或者是能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号的作用剂。

[0120] 在一些实施方式中,T细胞亚组为长寿记忆T细胞,或包含长寿记忆T细胞。在一些实施方式中,T细胞亚组为T记忆干细胞(T_{scm}),或包含T记忆干细胞。

[0121] 在一些实施方式中,所述方法还包括将重组核酸分子导入细胞群的T细胞或目标细胞。在一些此类方面中,核酸分子可编码重组蛋白,由此细胞表达该重组蛋白。在一些实施方式中,重组受体是嵌合抗原受体或转基因T细胞受体(TCR)。在一些方面中,该方法离体或在体外进行。

[0122] 在一些实施方式中,该方法还包括将培养细胞给予患有疾病或具有症状的对象。

[0123] 在本文的一些方面中,提供了一种组合物,其包含通过本文所提供的方法生产的多个培养T细胞或目标细胞,以及可选的药学上可接受的赋形剂。

[0124] 在一些实施方式中,加入所述物质后,细胞未在体外或离体于高于30℃的温度下孵育超过24小时、超过48小时、超过72小时或超过96小时。

[0125] 本文在一些方面中提供了可逆反应剂,其包括含能够可逆结合受体结合剂的多个结合位点的反应剂。在一些实施方式中,受体结合剂可逆结合所述反应剂,且能够以诱导或调节T细胞中信号的形式特异性结合T细胞表面上的分子,其中,例如所述分子不是CD28或CD3。

[0126] 在一些实施方式中,结合该分子诱导或调节T细胞中的信号,该信号不是TCR/CD3复合物相关信号;和/或结合该分子增强或加强TCR/CD3复合物相关信号。

[0127] 在一些实施方式中,分子为:CD28、CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM。在一些情况中,该分子不是CD137。

[0128] 在一些实施方式中,用于方法和组合物中的反应剂是包含链霉亲和素类似物或突变蛋白且通常包含其寡聚物的那些,其中突变蛋白包含能够结合作用剂(通常为可逆结合该作用剂)的多个结合位点。还提供了此类反应剂。在一些情况下,链霉亲和素类似物或突变蛋白包含净负电荷和/或对包含氨基酸序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(SEQ ID NO:8)的链霉亲和素结合肽的亲和力高于包含SEQ ID NO:1-6中任一所示氨基酸序列的链

霉亲和素或突变蛋白。在一些实施方式中,所述作用剂可逆结合反应剂,且能特异性结合细胞表面上的分子。还提供了此类反应剂、作用剂以及组合/复合物。

[0129] 在一些实施方式中,受体结合剂包括结合伴侣C1。在一些方面中,多个结合位点包含两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1以形成受体结合剂或作用剂与反应剂之间的可逆键。

[0130] 在一些实施方式中,受体结合剂是第二受体结合剂,所述分子为第二分子,且所述反应剂还包括:c)能够可逆结合第一受体结合剂的多个结合位点,以及d)第一受体结合剂,其i)可逆结合反应剂,且ii)能够特异性结合T细胞表面上的第一分子。

[0131] 在一些实施方式中,该作用剂或第一受体结合剂特异性结合TCR/CD3复合物成员和/或第一受体结合剂特异性结合CD3。

[0132] 在一些实施方式中,第一受体结合剂和第二受体结合剂各自独立地包含结合伴侣C1,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1以形成第一和第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。在一些实施方式中,第一受体结合剂包含结合伴侣C1,第二受体结合剂包含结合伴侣C2,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1,它们各自能够结合于结合伴侣C1和结合伴侣C2以形成第一和第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。在一些实施方式中,第一受体结合剂包含结合伴侣C1,第二受体结合剂包含结合伴侣C2,且多个结合位点包括两个或多个结合位点Z1以及两个或多个结合位点Z2,其中Z1各自能够结合于结合伴侣C1以形成第一受体结合剂和反应剂之间的可逆键,Z2各自能够结合于结合伴侣C2以形成第二受体结合剂和反应剂之间的可逆键。

[0133] 在一些实施方式中,反应剂的大小为小于20nm、小于10nm、小于5nm或小于1nm。在一些实施方式中,反应剂的密度小于 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 或小于 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 。在一些实施方式中,反应剂不结合支持物或固体支持物。在一些情况下,反应剂结合或固定于支持物。在一些情况下,支持物为固体支持物或为固定相。在一些方面中,支持物包括珠、颗粒、纳米颗粒或微球。

[0134] 在一些方面中,作用剂、受体结合剂(其可为第一受体结合剂)和/或第二受体结合剂各自独立地为抗体片段、单价抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子、包含Ig结构域分子、或其结合片段。

[0135] 在一些实施方式中,该作用剂,受体结合剂(其可为第二受体结合剂)和/或第一受体结合剂包含抗体片段。在一些方面中,该作用剂,受体结合剂(其可为第二受体结合剂)和/或第一受体结合剂包含Fab片段。在一些情况下,作用剂,受体结合剂(其可为第二受体结合剂)和/或第一受体结合剂是二价抗体片段(例如 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 片段)或二价单链Fv(scFV)片段。在一些实施方式中,作用剂,受体结合剂(其可为第二受体结合剂)和/或第一受体结合剂是单价抗体片段,其选自Fab片段、Fv片段或scFV片段。

[0136] 在一些实施方式中,作用剂或第一受体结合剂包括特异性结合CD3的作用剂。在一些实施方式中,特异性结合CD3的作用剂为抗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、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD3结合分子。在一些实施方式中,作用剂或受体结合剂(其可为第二受体结合剂)包括特异性结合于CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40和/或HVEM的作用剂,例如:抗CD90抗体、抗CD90抗体的二价抗体片段、抗CD90抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD90结合分子、抗CD95抗体、抗CD95抗体的二价抗体片段、抗CD95抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD95

结合分子、抗CD154抗体、抗CD154抗体的二价抗体片段、抗CD154抗体的单价抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD154结合分子、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、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD137结合分子、抗ICOS抗体、抗ICOS抗体的二价抗体片段、抗ICOS抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类ICOS结合分子、抗LAT抗体、抗LAT抗体的二价抗体片段、抗LAT抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类LAT结合分子、抗CD27抗体、抗CD27抗体的二价抗体片段、抗CD27抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类CD27结合分子、抗OX40抗体、抗OX40抗体的二价抗体片段、抗OX40抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类OX40结合分子、抗HVEM抗体、抗HVEM抗体的二价抗体片段、抗HVEM抗体的抗体片段、具有抗体样结合特征的蛋白质类HVEM结合分子、或其任何混合物。

[0137] 在一些实施方式中，反应剂为或包含：链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、和/或亲和素类似物或突变蛋白。在一些实施方式中，反应剂包括：链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、或和亲和素类似物或突变蛋白的寡聚物或聚合物。

[0138] 本文的一些方面中提供了一种试剂盒，其包含本文所描述的反应剂以及可选的使用说明书。在一些实施方式中，试剂盒包含能够逆转受体结合剂和反应剂之间键的物质。在一些实施方式中，试剂盒包含反应剂，该反应剂包含能够可逆结合受体结合剂的多个结合位点。在一些方面中，受体结合剂可逆结合反应剂，且能特异性结合目标细胞表面上表达的分子。在一些情况下，结合该分子诱导或调节目标细胞中的信号。在一些情况下，试剂盒包含能够逆转受体结合剂和反应剂之间键的物质。

[0139] 在一些实施方式中，目标细胞是T细胞。在一些实施方式中，反应剂为或包含：链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、和/或亲和素类似物或突变蛋白。在一些实施方式中，反应剂包括：链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、或和亲和素类似物或突变蛋白的寡聚物或多聚物。

[0140] 在一些实施方式中，所述物质包含链霉亲和素结合肽、生物素或其生物活性片段、可选地D-生物素、或生物素类似物或生物活性片段。

[0141] 在一些实施方式中，反应剂的大小为小于20nm、小于10nm、小于5nm或小于1nm。在一些实施方式中，反应剂的密度小于1.2g/cm³或小于1.0g/cm³。在一些实施方式中，反应剂不结合支持物或固体支持物。

[0142] 在本文的一些方面中提供了一种组合物，其包含经基因工程化以表达重组受体的多个T细胞，该重组受体特异性结合目标抗原。在一些情况下，以占组合物中总T细胞或占组合物中总细胞的百分比计，大于35%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞包括包含如下表型的T细胞亚组：CD3+、CD4+或CD8+和CD62L+，以及CD127+、CD45RA+、CD45RO-、CCR7+和CD27+中的一种或多种，以及t-bet^低、IL-7Ra+、CD95+、IL-2Rβ+、CXCR3+和LFA-1+中的一种或多种。在一些实施方式中，在基因工程化改造之前或过程中，包含T细胞亚组的多个T细胞未在GSK-P抑制剂的存在下孵育；未在重组稳态细胞因子，可选地IL-7或IL-15的存在下孵育；或未富集CD62L+细胞。在一些实施方式中，组合物不含GSK-P抑制剂或重组稳态细胞因子，可选地IL-7或IL-15。

[0143] 在一些实施方式中，T细胞亚组包含至少5×10⁶、至少1×10⁶或至少2×10⁶个细胞。

[0144] 在本文的一些方面中提供了一种组合物，其包含经基因工程化改造以表达重组受

体的多个T细胞,该重组受体特异性结合目标抗原。在一些方面中,基因工程化改造T细胞源自转导含T细胞亚组的T细胞群,该T细胞亚组包含如下表面表型:CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺和CD62L⁺,以及CD127⁺、CD45RA⁺、CD45RO⁻、CCR7⁺和CD27⁺中的一种或多种,以及t-bet^低、IL-7Ra⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的一种或多种。在一些实施方式中,与包含分离或富集自人对象(基于表型包含的一种或多种标志物的表面表达)的原代T细胞的细胞群相比,所述T细胞亚组以占细胞群中总T细胞更高的百分比存在或以占细胞群中总T细胞更多的数量存在。在一些实施方式中,与GSK-P抑制剂存在下孵育的T细胞群相比,所述T细胞亚组以占细胞群中总T细胞更高的百分比存在或以占细胞群中总T细胞更多的数量存在。在一些实施方式中,与重组稳态细胞因子(可选地IL-7或IL-15)存在下孵育的T细胞群相比,所述T细胞亚组以占细胞群中总T细胞更高的百分比存在或以占细胞群中总T细胞更多的数量存在。在一些实施方式中,与用抗CD3和抗CD8刺激但刺激或活化不大于1天、2天、3天、4天或5天和/或该刺激在生物素或生物素类似物存在下不被破坏的T细胞群相比,所述T细胞亚组以占细胞群中总T细胞更高的百分比存在或以占细胞群中总T细胞更多的数量存在。

[0145] 在一些实施方式中,T细胞亚组以占细胞群中总T细胞等于或约大于35%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的百分比存在。在一些实施方式中,T细胞亚组包含至少 5×10^6 个细胞、至少 1×10^6 个细胞、至少 2×10^6 个细胞或更多个细胞。

[0146] 在一些实施方式中,组合物是药物组合物。

[0147] 本文一些方面中提供了一种治疗方法,其包括给予患病或有症状的对象本文所述的组合物,即药物组合物。

[0148] 在一些实施方式中,细胞包含重组受体,例如嵌合抗原受体(CAR)或TCR。在一些方面中,重组受体(例如CAR或转基因TCR)特异性结合与疾病或症状有关的抗原。

[0149] 在一些实施方式中,疾病或症状是癌症以及自身免疫性疾病或异常,或为感染性疾病。

附图说明

[0150] 图1A-E提供了示例性实施方式的示意图。

[0151] 图1A显示含有用于可逆结合于作用剂的多个结合位点的反应剂(或其代表性部分)。此图中,反应剂表现为能够可逆结合两个作用剂,这两个作用剂各自能够特异性结合细胞上的分子。该反应剂具有多个结合位点(包括多个结合位点Z1),它们各自能够可逆结合于作用剂。第一和第二反应剂,在有些情况下可相同,在示意图中显示为各自包含至少一个结合伴侣C1。结合伴侣C1可逆结合于结合位点Z1。第一和第二作用剂各自还含有结合位点B2,B2能特异性结合细胞表面上的分子,在有些情况下,所述分子可在同一细胞上。在此,第一和第二作用剂示为特异性结合于同一细胞上的分子。

[0152] 图1B显示含有能够可逆结合于第一和第二作用剂的多个结合位点的反应剂的示意图,其中第一和第二作用剂各自能够分别特异性结合第一和第二细胞上的分子。反应剂具有多个结合位点Z1,其各自能够可逆结合作用剂。第一和第二作用剂(在有些情况下可相同)各自包含结合伴侣C1,其可逆结合于结合位点Z1。第一和第二作用剂各自含有结合位点B2,B2能特异性结合细胞表面上的分子,在有些情况下,所述分子可在同一细胞上或在不同细胞上。在此,第一作用剂结合第一细胞表面上的分子,第二作用剂结合第二细胞表面上的

分子。

[0153] 图1C显示能够可逆结合第一和第二作用剂的反应剂,所述作用剂各自能够分别特异性结合第一和第二细胞上的分子。反应剂含有多个结合位点Z1和Z2,其可相同或不同,它们各自能够可逆结合作用剂中的一种或两种。第一作用剂包含可逆结合Z1的结合伴侣C1;第二作用剂包含能可逆结合Z2的结合伴侣C2。一些情形中,C1和C2不同。一些情形中,C1和C2相同或基本上相同。第一作用剂包含结合位点B1,B1能特异性结合细胞表面上的分子,第二作用剂包含至少一个结合位点B3,B3能特异性结合细胞表面上的分子。一些情形中,结合位点B1和B3结合两种不同细胞表面分子、或同一分子上的不同表位、或不同细胞表面上的相同或不同分子。在此,第一作用剂显示为通过B1结合第一细胞表面上的分子,第二作用剂通过B3结合第二细胞表面上的分子。

[0154] 图1D显示能够可逆结合第一和第二作用剂(例如选择剂)的反应剂,所述作用剂各自能够特异性结合细胞上的分子。反应剂具有多个结合位点(包括Z1和Z2),其可相同或不同,它们各自能够可逆结合于作用剂。第一作用剂包含能特异性结合于结合位点Z1的结合伴侣C1,第二作用剂包含能特异性结合于结合位点Z2的结合伴侣C2。一些情形中,C1和C2不同。一些情形中,C1和C2相同或基本上相同。第一作用剂包含能特异性结合细胞表面上分子的结合位点B1,第二作用剂包含能特异性结合细胞表面上分子的结合位点B3。在一些实施方式中,第一作用剂和第二作用剂可为选择剂。结合位点B1和B3能结合细胞表面上的相同或不同分子(例如受体)、同一分子上的相同或不同表位、或不同细胞表面上的相同或不同分子在此,第一作用剂结合细胞表面上的第一分子,第二作用剂结合同一细胞表面上的第二分子。

[0155] 图1E显示可逆结合第一和第二作用剂的反应剂,所述作用剂各自能够特异性结合细胞上的分子。反应剂具有多个结合位点(包括Z1和Z2),其可相同或不同,它们各自能够可逆结合于作用剂。第一作用剂包含能够可逆结合反应剂的Z1的结合伴侣C1,第二作用剂包含能够可逆结合Z2的结合伴侣C2。一些情形中,C1和C2不同。一些情形中,C1和C2相同或基本上相同。第一作用剂包含能特异性结合细胞表面上分子的至少一个结合位点B2,第二作用剂包含能特异性结合细胞表面上分子的至少一个结合位点B4。在一些实施方式中,第一作用剂和第二作用剂可为刺激剂。结合位点B2和B4能结合细胞表面上的相同或不同分子、分子上的相同或不同表位、或不同细胞表面上的相同或不同分子。在此,第一作用剂结合细胞表面上的第一分子,第二作用剂结合同一细胞表面上的第二分子。

[0156] 图2(A-E)提供分别如图1A-E所示示例性实施方式的示意图,区别在于反应剂显示为固定和支持物(例如固定相)上。

[0157] 图3提供了示例性实施方式的示意图,其中将寡聚反应剂用于使刺激剂多聚化,将所得复合物与细胞一起孵育以将信号递送给细胞,然后逆转结合。图A显示寡聚反应剂1,其示为未结合于任何支持物且为柔性。此处显示作为Fab片段且能够特异性结合细胞表面上分子的刺激剂2,其与反应剂合并。该作用剂包含能够可逆结合于反应剂上结合位点(例如结合位点Z)的结合伴侣(例如结合伴侣C),使得作用剂多聚化。图B描绘了结合伴侣可逆结合反应剂上的结合位点。将细胞3加入系统中。图C描绘了多聚化的作用剂(Fab片段)特异性结合细胞3上的分子4。在图C中,所绘作用剂是刺激性受体结合剂(例如第一受体结合剂和/或第二受体结合剂),当作用剂结合细胞上的分子时,它们能诱导或调节细胞中的信号。如

图D所示,将物质5(如竞争性反应剂,例如生物素)加入组合物,其可为对反应剂上的结合位点比所述作用剂上的结合伴侣具有更高结合亲和力的物质,由此破坏反应剂1和作用剂2之间的可逆结合。在一些情况下,所述作用剂(例如Fab片段)还能从其与细胞3上分子4的相互作用中解离。一些情形中,这能破坏、减弱和/或终止细胞中的信号转导。

[0158] 图4提供了连接于支持物(例如固体支持物或表面,包括固定相)的可逆系统的示例性实施方式示意图。图A显示了包含反应剂1的支持物6。将能够特异性结合细胞表面上分子的作用剂2(例如Fab片段)加入该系统。作用剂2(例如Fab片段)包含能够可逆结合于反应剂上结合位点(例如结合位点Z)的结合伴侣(例如结合伴侣C)。图B描绘了结合伴侣可逆结合反应剂上的结合位点。将细胞3加入系统中。图C描绘了作用剂2(例如,Fab片段)结合细胞3表面上的分子4。在一些实施方式中,scFv包括受体结合剂或选择剂。在一些实施方式中,所述作用剂(例如Fab片段)可为受体结合剂或选择剂。在图C描绘了示例性的一种或多种受体结合剂(例如第一受体结合剂和/或第二受体结合剂),当作用剂(例如Fab片段)结合细胞上的分子时,它们能诱导或调节细胞中的信号。加入物质5(例如竞争性反应剂,如生物素),其可为对反应剂上的结合位点比对所述作用剂(例如Fab片段)上的结合伴侣具有更高结合亲和力的物质,由此破坏反应剂和作用剂之间的可逆结合。图D描绘了作用剂2(例如Fab片段)和反应剂之间结合的破坏,由此使得反应剂从所述作用剂解离,从而从细胞解离。在一些情况下,所述作用剂(例如Fab片段)还能从其与细胞3上分子4的相互作用中解离。一些情形中,这能破坏、减弱和/或终止细胞中的信号转导。

[0159] 图5提供了刺激和富集目标细胞的示例性实施方式的示意图,其中如下进行刺激:至少部分在支持物6(此处绘作固定相)的存在下孵育细胞,该支持物上固定有用于细胞选择的反应剂1的组分(图A),该反应剂具有针对选择剂2的结合位点,而选择剂2能够结合部分或全部目标细胞上展示的分子4。在使得反应剂和作用剂可逆结合(例如通过结合位点)的条件下,将选择剂2加到固定有反应剂1的支持物,产生具有多聚化于其上的作用剂的寡聚复合物(图B)。该选择剂可包括多于一种作用剂。或者,可将作用剂与反应剂的可逆结合复合物作为用于固定的复合物加到固定相。如所示,将细胞3(包括目标细胞)与固定相和多聚化的选择剂复合物合并,由此使得目标细胞通过选择剂2和反应剂6可逆固定于支持物6(图C)。可选地,在加入刺激剂前或其后,去除未结合的细胞。在刺激剂5特异性结合目标细胞表面上分子4的条件下,加入包含多聚化的刺激剂5的复合物,所述刺激剂5可逆结合于寡聚反应剂7,由此诱导或调节表达标志物的固定化目标细胞中的信号(图D)。在一些实施方式中,不同作用剂与反应剂间的可逆结合通过相同物质被逆转的情况下,可加入该物质以破坏可逆结合从而从固定相去除细胞并停止刺激,例如通过加入单一物质。

[0160] 图6A显示在如下步骤后观察到的总细胞计数:(i)富集PBMC样品中表达各种指定选择标志物之一的细胞(CD3+富集、CD4+富集、CD8+富集),和(ii)在培养基和IL-2(单独,空心柱)或有可逆结合抗CD3和抗CD28Fab片段的多聚化反应剂(填充柱)的存在下,孵育经富集的细胞。孵育在固定相的存在下在柱上进行,所述固定相上通过特异于相应选择标志物的作用剂可逆固定有细胞。

[0161] 图6B显示在如下步骤后观察到的CD4+和CD8+细胞上CD45RA和CD45RO的表面表达:(i)富集PBMC样品中表达各种指定选择标志物之一的细胞(CD3+富集、CD4+富集、CD8+富集),和(ii)在培养基和IL-2(单独,无刺激(no stim))或有可逆结合抗CD3和抗CD28Fab片

段的多聚化反应剂(α -CD3, α -CD28)的存在下,孵育经富集的细胞。孵育在固定相的存在下在柱上进行,所述固定相上通过特异于相应选择标志物的作用剂可逆固定有细胞。顶行显示选择或孵育前的染色。

[0162] 图6C显示在如下步骤后观察到的CD4+和CD8+细胞上CD62L和CD69的表面表达:(i)富集PBMC样品中表达各种指定选择标志物之一的细胞(CD3+富集、CD4+富集、CD8+富集),和(ii)在培养基和IL-2(单独,无刺激(no stim))或有可逆结合抗CD3和抗CD28Fab片段的多聚化反应剂(α -CD3, α -CD28)的存在下,孵育经富集的细胞。孵育在固定相的存在下在柱上进行,所述固定相上通过特异于相应选择标志物的作用剂可逆固定有细胞。

[0163] 图7A-C显示如下试验的结果:在该试验中,CD3+T应答细胞在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激后增殖,所述片段可逆固定于包被有链霉亲和素突变蛋白Strep-tactin®的珠上。图7A是显示经刺激细胞尺寸分布的直方图(正向散射)。图7B描绘代表了增殖程度的直方图,该增殖程度按照如图7B顶部所示的每次细胞分裂的细胞数(0表示未分裂的细胞;5代表经过至少5次分裂的细胞),图7C显示了刺激4天后的培养皿的图片。

[0164] 图8A-E显示如下试验的结果:在该试验中,CD3+T应答细胞在体外用可逆 α CD3/ α CD28Fab片段刺激后增殖,所述片段可逆固定于用作可溶反应剂的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白。在试验结果示于图8A-E中的试验中,将300,000个CD3+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)以2 μ M羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)标记,并用各种量的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物刺激,在该突变蛋白上固定有 α CD3Fab片段和 α CD28Fab的组合,所述片段在重链上均携带作为链霉亲和素结合肽的Strep-标签。“1 $\times$ ”对应于用0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab功能化的3 μ g寡聚链霉亲和素突变蛋白;数字表示1 $\times$ 的倍数)。 $T_{\text{应答}}$ 细胞未被刺激,或者被作为阴性对照的空白寡聚链霉亲和素突变蛋白(无Fab)刺激。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞与300,000个CD3阴性自体饲养细胞(用30Gy辐照)一起接种在48孔板上补充有20U/ml白介素2(IL-2)的1ml细胞培养基中。将细胞在37℃下孵育而不更换培养基,通过FACS分析法在5天后根据CFSE稀释分析增殖(图8B)。图8A显示5天后培养物中的细胞尺寸分布。直方图显示活的CD3+细胞,而图8C显示培养后的细胞,所述细胞用1mM D-生物素处理后通过刺激性反应剂释放并被洗涤。用藻红蛋白标记的链霉亲和素突变蛋白(ST-PE)作为荧光标志物复染分析单体Fab片段的解离和去除,显示了代表性直方图。图8D显示5天后的活细胞(台盼蓝阴性)绝对数量,采用纽氏计数室进行计数,针对相应刺激条件进行作图。图8D中示出中位细胞数;误差线表示标准误差(SD)。图8E显示了刺激5天后的培养皿的图片。

[0165] 图9A-B显示经纯化的CD4+和CD8+T应答细胞($T_{\text{应答}}$)的扩增动力学,所述细胞在体外用可逆固定于作为可溶反应剂的两类可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的 α CD3/ α CD28Fab片段或 α CD3/ α CD28/ α CD8Fab刺激。第一类寡聚链霉亲和素突变蛋白是在实施例3中获得的寡聚链霉亲和素突变蛋白级分($n \geq 3$,本文中也称为“常规”或“较小”寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架),在图9A和9B中以倒三角标记显示;用作可溶反应剂的第二类该寡聚链霉亲和素突变蛋白为通过可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白与生物素化人血清白蛋白(HSA)反应获得的寡聚物。该基于HAS的可溶反应剂在本文中也称为“较大”寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架。在图9A和9B的试验中,扩增在不更换培养基的情况下进行。关于CD4+T应答细胞的结果示于图9A中,关于CD8+T应答细胞的结果示于图9B中。在本文的上下文中,应注意试验中使用的通过可逆结合第一作用剂以及可选的第二和第三作用剂功能化的可溶反应剂在图中被称为“多

聚化作用剂”。

[0166] 图10A-B显示经纯化的CD4+和CD8+T应答细胞($T_{\text{应答}}$)增殖的扩增动力学,所述细胞在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激,所述片段可逆固定于作为可溶反应剂的两类可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白。第一类寡聚**Strep-tactin®**是在实施例3中获得的寡聚链霉亲和素突变蛋白级分(本文中也称为“常规寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架”),在图10A-B中以尖端向上的三角标记显示;用作可溶反应剂的第二类该寡聚链霉亲和素突变蛋白为基于HAS的可溶反应剂,即上述的“大骨架”。在图10A-B的试验中,扩增在不更换培养基的情况下进行。关于CD4+T应答细胞的结果示于图10A中,关于CD8+T应答细胞的结果示于图10B中。

[0167] 图11A-B显示获自图9-10中关于纯化的CD4+和CD8+T应答细胞增殖的扩增动力学结果的组合数据,图11A描绘了关于CD4+T细胞的结果,图11B描绘了关于CD8+T细胞的结果。直线用于表示在第3天更换培养基的培养,虚线表示在第3天不更换培养基获得的扩增程度值。图11A-B中所示数据基于投入细胞数标准化。仅显示了用寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 、用市售抗CD3/抗CD28珠(阳性对照)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 以及未刺激的T细胞(阴性对照)的数据,而未提供关于具有“大骨架”反应剂的数据。

[0168] 图12A-C显示在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段多克隆刺激的CD3+中心记忆T细胞(T_{CM})(CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM})的扩增动力学和表型,其中所述片段可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$)上(如实施例3中所述)。图12A-B所示图表代表根据每个时间点收获的细胞数的增殖程度,图12A显示仅补充IL-2培养基中的增殖,图12B显示补充IL-2和IL-15的培养基中的增殖。图12C显示在这些可变细胞因子环境中培养14天后CD62L和CD127表面表达的流式细胞分析。

[0169] 图13A-B显示在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激的经纯化CD8+T应答细胞的扩增表型和产率,所述片段可逆固定于用作可溶反应剂的两类可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白。第一类寡聚链霉亲和素突变蛋白是寡聚链霉亲和素突变蛋白级分(在实施例3中获得(常规骨架));用作可溶反应剂的第二类该寡聚链霉亲和素突变蛋白为如前所述的可溶寡聚物,在本文中称为“大”骨架。在这些试验中,还将寡聚常规链霉亲和素突变蛋白级分($n \geq 3$)用作反应剂,所述反应剂以单个Fab片段(图13A和13B中的第三柱)功能化或以 α CD3Fab和 α CD28Fab的组合功能化。除了用 α CD3/ α CD28Fab片段组合刺激以外,还固定了额外的 α CD8Fab片段(市售获自IBA股份有限公司,德国哥廷根(**Göttingen**))以测试是否可能优先刺激特定的T细胞亚群。图13A显示了代表根据第6天收获的细胞数的增殖程度的柱状图,该扩增程度与阴性对照(未刺激的纯化CD8+T应答细胞)相比,并针对阳性对照(用市售抗CD3/抗CD28珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的纯化CD8+T应答细胞)标准化。图13B显示细胞培养后T细胞表面分子CD45RO(其指示T细胞的增殖和活化)和CD8表面表达的流式细胞分析。用单向ANOVA比较各种刺激条件,未检测到显著差异(n.s.)。

[0170] 图14A-B显示在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激的经纯化CD8+T应答细胞的扩增表型和产率,所述片段可逆固定于用作可溶反应剂的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白,该可溶反应剂以单个Fab片段功能化或以Fab片段的组合功能化(如前已述)。在这些试验中,CD8+T应答细胞用可溶反应剂(实施例3的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白(1mg/ml))刺激,该可溶反应剂以不同量的 α CD3Fab和 α CD28Fab片段(可选联同 α CD8Fab)功能化。术语“1×”对应于:1.5 μ g寡聚链霉亲和素突变蛋白,其以单独的0.5 μ g α CD3Fab片段功能化,以及1.5 μ g寡聚链

霉亲和素突变蛋白,其以单独的0.5 μ g α CD28Fab功能化,或者3 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物,其加载有0.5 μ g α CD3Fab片段和0.5 μ g α CD28Fab,或者4.5 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物,其加载有0.5 μ g strep-标签的 α CD3Fab、0.5 μ g strep-标签的 α CD8Fab和0.5 μ g strep-标签的 α CD28Fab。相应的,术语“2 $\times$ ”对应于:3.0 μ g寡聚链霉亲和素突变蛋白,其以单独的1 μ g α CD3Fab片段功能化,以及3.0 μ g寡聚链霉亲和素突变蛋白,其以单独的1 μ g α CD28Fab功能化,意味着用了两倍量的固定化 α CD3Fab片段。将未处理的T_{应答}细胞作为阴性对照,将用市售抗CD3/抗CD8珠(在珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的纯化CD8+T应答细胞作为阳性对照。图14A显示其中柱代表增殖程度的图,该增殖程度根据与阴性对照相比并基于阳性对照标准化的第5天收集的细胞数。图14B显示细胞培养后CD8和CD45RO表面表达的FACS分析。

[0171] 图15A-B显示在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激的经纯化CD3+T应答细胞的扩增,所述片段可逆固定于作为可溶反应剂的实施例3的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白。在一个试验中,除了 α CD3/ α CD28Fab片段,还将 α CD8Fab片段(市售获自IBA股份有限公司(德国哥廷根Göttingen),产品目录号6-8000-203)固定于链霉亲和素突变蛋白的可溶寡聚物上,以测试是否可能采用其上还可逆固定有 α CD8Fab片段的反应剂在大量CD3+培养物中优先体外刺激CD8+T细胞亚群。更具体而言,将500,000个纯化的CD3+应答T细胞(T_{应答})以3 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物(1mg/ml)刺激,该突变蛋白加载有0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab的组合。作为或选的方法,用0.5 μ g α CD3Fab、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab加载4.5 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白(如前所述)。将未处理的T_{应答}细胞作为阴性对照,将用抗CD3/抗CD8珠(在珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的T_{应答}作为阳性对照。图15A显示各条件下培养物中细胞计数(扩增程度)的图。图15B显示各刺激条件下CD4+和CD8+细胞的比例。

[0172] 图16A-B显示Jurkat细胞中的差示胞内钙动员结果,所述细胞用 α CD3抗体OKT3标记或用以Strep-tactin®多聚化的OKT3Fab片段(本文中也称为Fab多聚体)标记。对于图16A中的试验,以钙敏感染料Indo-1-AM加载Jurkat细胞,如下引发钙释放:注入 α CD3mAb OKT3(黑色方形)或 α CD3OKT3Fab多聚体(衍生自亲本细胞系OKT3),之前进行或不进行D-生物素破坏(分别为深灰色三角形和浅灰色圆形),与注入PBS(白色倒三角形)进行比较。施加离子霉素作为阳性对照。胞内Ca²⁺浓度的时间分辨变化以流式细胞术基于FL6/FL7比例进行监测。对于图16B中的试验,将Indo-1-AM标记的Jurkat细胞用如实施例11所述的不同 α CD3刺激物活化(OKT3:上图; α CD3Fab-多聚体:中图),然后进行后续(t=140s)的 α CD3Fab-多聚体信号转导的D-生物素介导的破坏。将用D-生物素(下图)预解离的 α CD3Fab多聚体和离子霉素作为阴性或阳性对照。数据代表3次独立实验。

[0173] 图17显示用抗CD3OKT3Fab多聚体可逆染色细胞的结果。将刚分离的PBMC用单克隆抗体(左侧点图,Fab多聚体的亲本克隆)或同源PE标记的Fab多聚体染色,在用D-生物素处理之前(左起第二点图)或处理之后(中部点图)进行分析。然后在后续用新鲜PE标记的Strep-Tactin®的洗涤步骤之后检测剩余的Fab单体。将可逆染色细胞的二次Fab多聚体染色作为对照(右侧点图)。仅显示活(PI^{阴性})细胞。点图上的数字表示门控中的细胞百分比。

[0174] 图18显示通过可逆结合抗CD28Fab片段分离的细胞,所述片段用以藻红蛋白作为荧光标志物标记的Strep-Tactin®多聚化。通过Fab多聚体磁性细胞选择从刚分离的PBMC中

选择/分离CD28+细胞(如国际专利申请公开号No.WO2013/011011中所述)。在选择前,细胞用同源荧光 α CD28多聚体(左侧点图)或用抗免疫球蛋白 κ 轻链的抗体(左起第二点图, α -Ig κ mAb)受控染色。选择后,用D-生物素处理细胞,然后洗涤以去除磁珠和Fab单体。然后,用 α CD28Fab-多聚体(右起第二点图)或用 α -Ig κ mAb(右侧点图)对释放的CD28+细胞进行(复)染色,以检测可能剩余的Fab单体。仅显示活($PI^{阴性}$)CD3+细胞。点图上的数字表示门控中的细胞百分比。

[0175] 图19A-B显示在体外用 α CD3/ α CD28Fab片段刺激的经纯化CD4+和CD8+T应答细胞活化后的T细胞早期集落形成,所述片段可逆固定于实施例3中所述的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$)。图19A描绘了关于CD4+T细胞的结果,图19B描绘了关于CD8+T细胞的结果。显示了用可溶多聚化反应剂(寡聚链霉亲和素突变蛋白)刺激的 $T_{应答}$ 、用市售抗CD3/抗CD28珠(阳性对照)刺激的 $T_{应答}$ 以及未刺激的T细胞(阴性对照)的数据。

[0176] 图20A-B显示了从在体外用两种物质刺激的纯化的CD3+CD62L+CD45RA- T_{CM} 应答细胞大群中选择性抗原特异性(Ag-特异性)扩增的动力学,所述两种物质为:肽:MHC分子复合物(用作第一作用剂,向细胞提供主要活化信号(primary activation signal))和 α CD28Fab片段(用作第二作用剂,其结合细胞表面上的辅助分子),且显示了未刺激T细胞(阴性对照)。抗原特异性肽与MHC分子的复合物以及 α CD28Fab片段均可逆固定于同一可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$)上(如实施例3中所述)。用于图20A中抗原特异性扩增的肽为:肽CRVLCCYVL (SEQ ID NO:38),受限与HLA-C702MHC分子的立即早期1蛋白的氨基酸309-317(描述于Ameres等,PLoS Pathogens,2013年5月,第9卷,第5期,e1003383),其递呈特异于巨细胞病毒(CMV)的HLA-C7/IE-1表位。递呈所述肽的MHC I分子在其重链C末端携带链霉亲和素结合肽(SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16),其由德国哥廷根的IBA股份有限公司作为“Twin-Strep-tag®”市售)。图20A显示Ag特异性细胞级分的示例性流式细胞分析,该级分细胞的扩增采用特异于该HLA-C7/IE-1表位的肽:MHC-I复合物作为第一作用剂,所述作用剂为可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的细胞提供主要活化信号。图20B-图20E中的图表显示根据每个时间点收获的特异性肽:MHC I多聚体阳性细胞数的进一步Ag特异性扩增动力学,其中比照图20A采用抗原特异性肽与MHC I分子的不同复合物作为第一作用剂为可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白上的细胞提供主要活化信号。更具体而言,图20B显示Ag特异性细胞的扩增,该细胞采用特异于CMV的pp65表位(氨基酸341-350(QYDPVAALF) (SEQ ID NO:39)受限与HLA-A2402)的肽:MHC-I复合物扩增,图20C显示Ag特异性细胞的扩增,该细胞采用另一特异于CMV的pp65表位(氨基酸265-274(RPHERNGFTV) (SEQ ID NO:40)受限与HLA-B702)的肽:MHC-I复合物扩增,图20D显示Ag特异性细胞的扩增,该细胞采用特异于腺病毒六邻体5表位(氨基酸114-124(CPYSGTAYNSL) (SEQ ID NO:41)受限与HLA-B702)的肽:MHC-I复合物扩增,图20E显示Ag特异性细胞的扩增,该细胞采用特异于CMV的HLA-B7/IE-1₃₀₉₋₃₁₇表位的肽:MHC-I复合物增殖(示例性FACS数据参见如上的图20A)。所有携带Twin Strep®-标签的肽:MHC分子均购自IBA股份有限公司。在该上下文中,携带“Twin-Strep-tag®”作为其C末端的HLA-A*2402、HLA-B*0702和HLA-C*0702的氨基酸序列如所附序列表中SEQ ID NO:42、43和44所示, β_2 微球蛋白(其与 α 链一起形成,这意味着HLA编码的分子各自的MHC I分子)的氨基酸序列如所附序列表中SEQ ID NO:45所示。此外,

图20F显示图20D的HLA-B7/六邻体5₁₁₄₋₁₂₄刺激/扩增细胞培养14天后CD62L和CD127表面表达的示例性流式细胞分析。

[0177] 图21显示纯化的CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}应答细胞的选择性Ag特异性扩增动力学,所述细胞在体外用如下物质刺激:a) 抗原特异性肽MHC I复合物,和b) αCD28Fab片段,其可逆固定于可溶性寡聚链霉亲和素突变蛋白上作为第一和第二作用剂。出于该目的,对500,000个CD3+CD62L+CD45RA-应答T_{CM}细胞(T_{应答})进行Ag特异性刺激,采用了3μl Streptactin多聚化反应剂制备物,其用0.5μg装配有链霉亲和素结合肽的肽:MHC I类复合物(特异性肽代表受限于HLA-B0702的六邻体5蛋白的氨基酸114-124(CPYSGTAYNSL,SEQ ID NO:41),参见上文)以及0.5μgαCD28Fab功能化。或者,采用加载有0.5μg该肽:MHC I型复合物、0.5μgαCD8Fab和0.5μgαCD28Fab的4.5μl Streptactin多聚化反应剂。作为比较,采用加载有0.5μgαCD3Fab和0.5μgαCD28Fab的3μl Streptactin多聚化反应剂制备物(1mg/ml)进行多克隆刺激,。同样,作为上述的替代刺激条件,采用加载有0.5μgαCD3Fab、0.5μgαCD8Fab和0.5μgαCD28Fab的4.5μl Streptactin多聚体制备物。将未处理(未刺激)的T_{应答}细胞用作阴性对照,用抗CD3/抗CD28珠多克隆刺激的T_{应答}细胞作为阳性对照。将T_{应答}细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2和5ng/ml IL-15)中。在37℃孵育细胞,每3天更换培养基,在7天和14天后进行细胞计数分析。图21中所示的照片代表以腺病毒HLA-B7/六邻体5表位为示例的Ag特异性刺激第5天的集落形成程度。

[0178] 图22A-B显示经转导Jurket细胞胞内信号转导级联的活化,所述细胞经修饰以表达αCD19嵌合抗原受体(CAR),并用作为可溶多聚化反应剂的实施例3的寡聚**Strep-tactin®**刺激。CAR的特异性源自于由特异性结合目标/肿瘤相关抗原(例如CD19)的单克隆抗体(mAb)抗原结合区组装的scFv区,并将其与T细胞特异性信号转导相连(描述于Hudecek等, Clin Cancer Res, 2013年6月15日;19(12):3153-3164)。在试验中,包含CD19CAR天然配体的CD19胞外结构域(ECD)以及识别αCD19-CAR内IgG4间隔子的多克隆αIgG F(ab)₂片段(驴抗人F(ab)₂,市售获自Jackson Immuno Research公司)都在该试验中作为第一作用剂为Jurkat细胞提供主要活化信号。与可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的可逆固定由融合于CD19ECD的C末端的链霉亲和素肽SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16)提供,或由αIgG的生物素化(Fab)₂片段提供(由于链霉亲和素突变蛋白“m2”与生物素的结合亲和力减弱,该结合可逆且能(例如)通过加入过量的游离生物素被撤换)。在图22A的对照试验中,用各种量的以αCD3Fab和αCD28Fab功能化的寡聚Streptactin(1mg/ml)制备物的混合物刺激300,000个CD3+Jurkat应答细胞(J_{应答}) (“×1”对应于3μg多聚化Streptactin,其以0.5μg CD3Fab和0.5μg CD28Fab-多克隆多聚化作用剂功能化)。在图22B的试验中,将3μl寡聚Streptactin制剂以0.5μg(×1)或1μg(×2) CD19胞外结构域(ECD)官能化,或使3μl寡聚Streptactin制剂加载识别IgG4间隔子的0.5μg(×1)或1μg(×2) αIgG(两者均为CAR-特异性多聚化作用剂)。用抗CD3/抗CD28珠(珠上可逆固定αCD3和αCD28单克隆抗体)或PMA刺激的J_{应答}和离子霉素作为阳性对照。将J_{应答}细胞接种在1.5ml Eppendorf管中200μl细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,刺激0-20分钟后置于冰上并裂解。磷酸化ERK的检测指示活化的MAPK信号转导,管家蛋白β-肌动蛋白的染色指示各条件和时间点下等量总蛋白质的加载。

具体实施方式

[0179] 本文提供了孵育(培养)细胞组合物和/或从细胞组合物中富集或选择细胞的方法。例如,所提供的实施方式包括如下方法:用于使目标细胞扩增、活化、促进存活或分化(或使之缺乏)的方法,和/或在目标细胞中诱导各种其他效果的方法;和/或,将目标细胞与其他细胞和/或其他组分分离的方法,或与此类其他组分相比,使目标细胞富集的方法在一些方面中,细胞为T细胞,如大量T细胞(bulk T cells)或特定T细胞亚组的细胞。

[0180] 本发明中提及的所有出版物,包括专利文件、学术论文和数据集,均以各个体出版物好似独立地通过引用纳入的相同程度通过引用其全文纳入本文用于所有目的。如果本文所示的定义与通过引用纳入本文的专利、公开申请和其它出版物中所示的定义不同或其它情况下不一致,则相对于通过引用纳入本文的文件中的定义,以本文所示的定义为主。例如,国际PCT申请No. PCT/EP2015/058339的内容通过引用全文纳入本文。

[0181] 本文所用章节标题仅用于组织目的,而不应理解为限制所述客体。

[0182] I. 方法、系统和反应剂概述

[0183] 本文提供了用于孵育(培养)细胞以使目标细胞扩增、活化、促进其存活或分化(或使之缺乏)和/或以在目标细胞中诱导其他效果的方法。在一些实施方式中,所提供的方法还包括一个或多个其他处理步骤,包括一个或多个选择、分离、富集和/或选择细胞(从细胞组合物中)和/或转导细胞(的步骤)。在一些实施方式中,所提供的方法在多聚化的作用剂存在下进行,在所述多聚化的作用剂中一个或多个结合剂(例如抗体片段,如Fab)可能结合多聚化反应剂,例如寡聚链霉亲和素突变蛋白反应剂。

[0184] 在一些实施方式中,细胞的培养和/或富集全部或部分在支持物(如固定相和/或固体支持物)的存在下进行和/或在细胞位于支持物(如固定相和/或固体支持物)上进行。在一些实施方式中,支持物是色谱基质,如在细胞位于包含固定相的柱中进行孵育的情况下。在一些实施方式中,在细胞固定于(通常为直接固定于)支持物(例如柱)上的情况下进行所述方法。固定通常是可逆的,从而在孵育后可将细胞从支持物移除。

[0185] 在一些实施方式中,支持物提供了在孵育期间、之前或之后,富集组合物中细胞或选择特定细胞的能力。例如,在一些实施方式中,采用了以特异于一个或多个目标细胞(例如T细胞标志物,如CD3)的作用剂功能化的固体支持物,所需T细胞与该支持物合并且与该支持物结合,从而被间接固定。在一些方面中,目标细胞在固定于支持物上时被刺激,例如通过加入多聚化反应剂和/或通过偶联于支持物的作用剂被刺激。因此,在一些方面中,所提供的方法和其他实施方式具有如下优势:它们可使得多个处理步骤(例如刺激和选择)在同一容器和/或一个或多个封闭系统中进行,这可提供提高效率 and 安全的特性。示例性的实施方式示于图5。

[0186] 在一些实施方式中,所述方法采用了能够结合目标细胞表面上分子的可逆反应剂系统,如包含受体结合分子(例如刺激剂)的反应剂,由此能为细胞提供信号,所述信号在一些情况中可为主要活化信号。在一些实施方式中,所述方法采用了反应剂,其可为其上结合有一或多个/种作用剂(例如刺激剂,如第一作用剂、第二作用剂等)的多聚化反应剂,其为细胞提供信号,例如主要活化信号和/或辅助或共刺激信号。在一些实施方式中,主要活化信号可足以活化细胞以扩增/增殖。该第一作用剂能可逆结合或非可逆结合多聚化反应剂。多聚化反应剂还可具有结合于其上的第二作用剂,该第二作用剂刺激细胞表面上的辅助分

子。第二作用剂结合于细胞表面上的辅助分子时,可由此刺激活化的细胞扩增。同样,该第二作用剂能可逆结合或非可逆结合多聚化反应剂。多聚化反应剂可固定于固体支持物或为可溶形式。在一些实施方式中,多聚化反应剂位于支持物上,该支持物为固定相,且至少部分孵育在包含该固定相的柱中进行。

[0187] 在一个方面,本文所公开的方法是细胞群的系列扩增,其中淋巴细胞完整群体被刺激/扩增,然后通过适合固定相上的色谱法去除该扩增所需的反应剂。在一些实施方式中,可选地用例如T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)转染扩增/被刺激的细胞(其为培养的细胞),且在一些方面中,可用结合导入的T细胞受体或嵌合抗原受体的不同刺激分子对细胞进行二次刺激扩增。

[0188] 在不含外源生长因子或低量外源生长因子的情况下体外扩增T细胞群的方法在本领域中是已知的(参见例如美国专利6,352,694B1和欧洲专利EP 0 700 430B1)。一般而言,这些方法采用其上固定有各种大于1 μ M结合剂(例如抗CD3抗体和/或抗CD28抗体)的固相表面。例如,CD3/CD28Dyna珠[®](Invitrogen公司)是市售可获得的用于T细胞扩增的反应剂,其为均匀的4.5 μ m超顺磁无菌无热源聚苯乙烯珠,珠上包被有针对人T细胞上CD3和CD28细胞表面分子的亲和纯化单克隆抗体的混合物。然而,在一些情况下,此类磁珠(例如)难以整合到在临床试验或治疗目的所需的条件下扩增细胞的方法中,这是因为需确保将扩增的T细胞给予患者前,这些磁珠被完全去除。

[0189] 在一些实施方式中,本文所提供的方法解决了这些问题。在一些方面中,所提供的反应剂是可逆的,从而刺激剂能从细胞组合物中移除。同时,在一些方面中,结合刺激剂的反应剂(例如多聚化反应剂)未固定在支持物上,例如未固定在固体支持物或表面上。因此,在一些方面中,反应剂(例如多聚化反应剂)是柔性的而非刚性。在一些实施方式中,反应剂能顺应或匹配细胞表面。在一些实施方式中,可将反应剂固定在支持物(例如固体支持物,包括固定相)上。在一些实施方式中,这些方法能与选择剂一起使用,采用类似的选择剂,其中一种或多种目标细胞可被选择且同时或依序接触刺激剂。因此,在一些方面中,特定细胞或细胞亚组的刺激可通过在刺激的同时进行选择或分离发生偏移。

[0190] 在一些实施方式中,所提供的方法涉及用结合一个或多个受体结合剂(例如刺激剂)的反应剂(例如多聚化反应剂)培养(例如接触)细胞组合物(参见图4A和B)。在一些实施方式中,将细胞组合物与多聚化反应剂接触并通常用该多聚化反应剂孵育细胞群之后,细胞群通过第一作用剂与多聚化反应剂形成复合物/结合。初始样品中所含缺乏特异性细胞表面分子的其他细胞群不与该多聚化反应剂结合。在此方面中,应注意细胞群通常在其表面上具有多拷贝的该细胞表面分子,结合这些多拷贝通常为刺激或活化所需。

[0191] 因此,多聚化反应剂通常提供多于一个结合位点(例如Z1),一些情形中,多个作用剂能可逆结合这些结合位点从而将第一作用剂、第二作用剂和/或其他作用剂以足够的密度递呈给细胞群。在此方面中,应注意到多聚化反应剂可具有多个结合位点(例如Z1),例如链霉亲和素突变蛋白(且为同四聚体)在其天然状态下具有4个该结合位点(例如Z1),且能进一步被寡聚化。在一些情况下,反应剂可仅具有一个结合位点(例如Z1)以可逆结合于结合伴侣(例如C1)。此类例子为多聚的钙调蛋白。钙调蛋白仅具有针对钙调蛋白结合肽的一个结合位点。然而,钙调蛋白能被生物素化,进而与链霉亲和素寡聚体(还可参见下文)反应,由此提供在“骨架”上存在高密度的多个钙调蛋白分子的多聚化反应剂,从而提供多聚

的钙调蛋白。

[0192] 在一些实施方式中, 孵育后或在需要破坏刺激的其他适宜时间, 可逆结合作用剂的结合伴侣C (例如C1) 与多聚化反应剂的结合位点Z (例如Z1) 之间的结合通过破坏相应的可逆键而被破坏。一些情形中, 破坏可通过在含有结合于多聚化反应剂的细胞群的孵育/反应混合物中加入竞争物来实现。对于可逆结合剂的结合伴侣C (例如C1) 与多聚化反应剂的结合位点Z (例如Z1) 之间可逆键的竞争性破坏 (其可理解为是竞争性洗脱), 可使细胞群/孵育混合物与能够破坏第一结合伴侣和结合位点Z (例如Z1) 之间的键的游离第一结合伴侣C (例如C1) 或所述第一结合伴侣C的类似物接触。在结合伴侣C (例如C1) 为链霉亲和素结合肽 (其结合链霉亲和素的生物素结合位点) 的实例中, 第一游离伴侣可为相应的游离链霉亲和素结合肽或竞争性结合的类似物。此类类似物可为例如生物素或生物素衍生物, 例如脱硫生物素。

[0193] 在一些实施方式中, 加入游离伴侣或其类似物使得结合伴侣C (例如C1) 从多聚化反应剂上被置换下来, 因此, 由于结合伴侣包含于可逆结合剂中, 实现了从多聚化反应剂置换该可逆结合剂。这一作用剂置换进而导致第一作用剂从细胞表面分子解离, 尤其是如果第一作用剂与细胞表面受体之间连键的结合亲和力的解离常数 (K_D) 为 $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ 因此也是可逆的。在一些方面中, 由于该解离, 对细胞群的刺激也被终止了。

[0194] 在一些实施方式中, 抗体分子与其抗原 (包括例如细胞表面受体分子) 的结合亲和力一般为 $10^{-7}M$ 至约 $10^{-13}M$ 的 K_D 。因此可将常规单克隆抗体用作作用剂 (第一或第二作用剂, 受体结合剂, 例如刺激剂, 或选择剂)。在一些实施方式中, 为了避免会导致较强结合的任何不为所需的亲和力影响, 单克隆抗体也可以其单价抗体片段 (例如Fab片段或单链Fv片段) 的形式使用。

[0195] 因此, 所提供的方法具有如下优点: 细胞群刺激或扩增的时长能被精确控制, 由此能够严密控制细胞群的功能状态。在一些方面中, 在刺激后5天内通过加入某种物质 (如竞争剂, 例如生物素或类似物) 使细胞 (例如T细胞) 短期活化使得细胞增殖和被刺激, 但改变了细胞的一种或多种特征或特性, 如改变了CD4或CD8T细胞百分比、CD8/CD4比例、表型标志物和/或分化状态。例如, 在一些方面中, 采用所提供反应剂的实施方式按时控制信号的能力可使得较少分化的长寿T细胞群 (例如长寿记忆T细胞) 增加。在一些情况下, 信号的按时控制 (例如采用竞争性物质通过破坏多聚化作用剂的结合) 能用于相对于其他亚群, 定制或调整特定亚群的扩增和/或维持 (例如CD4+之于CD8+)。

[0196] 在一些实施方式中, 由于一种或多种可逆结合剂从细胞表面分子解离, 所提供方法的优点还包括: 在刺激过程结束时, 经刺激细胞群不含刺激剂。并且, 在一些实施方式中, 用于该方法的所有其他物质, 即作用剂 (例如第一或第二作用剂, 受体结合剂, 例如刺激剂, 或选择剂) 以及结合伴侣C (例如C1) 的竞争性反应剂或其类似物, 可通过“移除盒 (removal cartridge)”从经刺激的细胞群被轻易移除 (参见例如国际专利申请No. WO 2013/124474中所述)。在一些情况下, 例如在多聚化反应剂固定于固体支持物 (例如生物反应器表面或磁珠) 上的情况下, 其被控制 (held back)。因此, 使用移除盒来移除游离作用剂和竞争性反应剂可包括: 将洗脱样品 (例如破坏可逆结合后获得的样品) 加载到第二色谱柱上。

[0197] 在一些实施方式中, 该色谱柱具有合适的固定相, 该固相既是亲和色谱基质, 同时也能用作凝胶渗透基质。在一些方面中, 该亲和色谱基质具有固定于其上的亲和反应剂。在

一些实施方式中,亲和反应剂可为例如链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素、亲和素突变蛋白或其混合物。在一些实施方式中,作用剂(例如第一或第二受体结合剂,如刺激剂,或选择剂)、结合伴侣C(C1)的竞争性反应剂结合于亲和反应剂,由此被固定在色谱基质上。由此,含有分离的扩增细胞群的洗脱样品中的作用剂(例如第一或第二受体结合剂,如刺激剂,或选择剂)和竞争性反应剂被消耗。在一些实施方式中,培养的组合物不含任何反应剂,在一些方面中,在与诊断应用(例如,进一步FACS™分选)联合使用或用于任何基于细胞的治疗性应用时具有优势。

[0198] 在一些实施方式中,从组合物中清除反应剂和其他组分的能力还具有能够避免任何固体支持物(例如磁珠)的优点。在一些实施方式中,这意味着活化T细胞没有被此类磁珠污染的风险或被磁珠污染的风险最小。在一些实施方式中,这也意味着与其他方法相比,例如与采用Dyna珠而需采取额外措施来确保最终的扩增T细胞群不含磁珠相比,更易于建立符合GMP标准的工艺。此外,在一些实施方式中,采用可溶多聚化作用剂使其更易于从活化细胞群(T细胞、B细胞或还有天然杀伤细胞)移除,这是因为细胞能够通过离心简单沉淀,而含有该可溶多聚化作用剂的上清液则可弃去。或者,可在移除盒的凝胶渗透基质中从扩增细胞群移除可溶多聚化反应剂,例如,如上所述(例如国际专利申请公开号No.WO 2013/124474)。在一些实施方式中,例如在其中不存在固相(例如磁珠)的那些实施方式中,还提供了一种用于扩增细胞的自动化封闭系统,该系统可整合到已知细胞扩增系统中,所述已知细胞扩增系统为例如Xuri细胞扩增系统W25和WAVE生物反应器2/10系统,可市售购自GE Healthcare公司(英国白金汉郡小恰尔文(Little Chalfont,Buckinghamshire,United Kingdom)),或则Quantum®细胞扩增系统,可市售购自TerumoBCT有限公司(雷克伍德,CO,USA)。在一些实施方式中,采用固相和/或固定相时,刺激在固定相或固相的存在下进行或细胞可在固定时被刺激的事实使得整个选择和/或刺激过程能在无菌或封闭系统中的容器(例如柱)中进行。

[0199] 在一些方面中,本文所提供的方法可包括带有至少两个特异性细胞表面分子的细胞群。在一些实施方式中,第一细胞表面分子涉及细胞群的主要活化信号,而第二细胞表面分子是细胞表面上的辅助分子,其涉及为细胞提供刺激物。在一些实施方式中,细胞群与其中可逆结合第一作用剂和第二作用剂的多聚化反应剂接触,该第一作用剂为细胞提供主要活化信号,该第二作用剂诱导或调节额外的信号,例如刺激细胞表面上的辅助分子。细胞群可例如为:细胞表面分子为TCR/CD3复合物和细胞表面分子为辅助分子CD28的T细胞群。此外,如本文所述,还包括靶向其他辅助分子,例如如下分子中的一种或多种:CD90(Thy-1)、CD95(Apo-/Fas)、CD137(4-1BB)、CD154(CD40L)、ICOS、LAT、CD27、OX40和HVEM。在一些方面中,通过此类其他辅助分子的刺激可导致与通过CD28常规刺激相比,分化较少且(在一些情况下)长寿的T细胞群(例如长寿记忆T细胞)增加。在一些实施方式中,结合TCR/CD3复合物作为主要活化信号以及结合辅助分子(例如CD28或其他辅助分子)可为T细胞扩增/增殖所需。

[0200] 在一些实施方式中,多聚化反应剂包含至少一个结合位点Z(例如Z1)以可逆结合第一作用剂,第一作用剂还包含至少一个结合伴侣C(例如C1),其中结合伴侣C(例如C1)能够可逆结合多聚化反应剂的结合位点Z(例如Z1)。因此,第一作用剂在与多聚化反应剂接触或一起孵育时,能通过结合伴侣C(例如C1)和结合位点Z(例如Z1)之间形成的可逆键与多聚

化反应剂可逆结合。此外,第二反应剂可包括结合伴侣C(例如C2),结合伴侣C2对应地可逆结合多聚化反应剂的结合位点Z(例如Z2)。优选实施方式,第二作用剂在与多聚化反应剂接触或一起孵育时,通过结合伴侣C(例如C1)和结合位点Z(例如Z2)之间形成的可逆键与多聚化反应剂可逆结合。一些情形中,C1和C2可相同或基本相同、和/或包含相同或基本相同的部分。一些情形中,Z1和Z2可相同或基本相同、和/或包含相同或基本相同的部分。

[0201] 在一些实施方式中,采用结合多聚化反应剂相同结合位点的结合伴侣C1和C2部分具有如下优点:可采用同样的竞争性反应剂(既针对第一结合伴侣C1,也针对第二结合伴侣C2)或其类似物破坏(在一些情况下,终止)目标细胞(例如T细胞)群的扩增,并从多聚化反应剂释放该目标细胞(如T细胞)群。

[0202] 在一些情况下,为生产包含结合伴侣C的结合剂(例如第一、第二和/或额外受体结合剂,如刺激剂,或选择剂),可采用提供结合伴侣C(例如C1或C2)的相应表达载体重组生产该作用剂(例如抗体片段),从而使得结合伴侣C(例如C1或C2)成为融合蛋白的一部分且该作用剂位于N末端或C末端。在一些实施方式中,在作用剂为抗体或抗原结合片段的情况下,结合伴侣C(例如C1或C2)可位于轻链或重链的C末端。同时,克隆重组蛋白(例如抗体分子可变结构域)和重组生产相应蛋白质(例如抗体片段)的方法是本领域技术人员熟知的(参见例如Skerra,A.(1994))。在一些实施方式中,可产生具有针对给定目标(例如所述CD3或CD28或其他辅助或刺激剂分子)的抗体样特性的人工结合分子的抗体分子,例如可通过熟知的发展性方法,例如噬菌体展示(例如在如下文献中综述:Kay,B.K.等(1996) *Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual* (“肽和蛋白质的噬菌体展示——实验室指南”),第一版,学术出版社,纽约,NY;Lowman,H.B.(1997) *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 26,401-424,或Rodi,D.J.,和Makowski,L.(1999) *Curr.Opin.Biotechnol.* 10,87-93)、核糖体展示(在如下文献中综述:Amstutz,P.等,(2001) *Curr.Opin.Biotechnol.* 12,400-405)、或mRNA展示(如下文献中所报导:Wilson,D.S.等,(2001) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 98,3750-3755)。

[0203] II.可逆反应剂系统及相关应用

[0204] 在一些实施方式中,所述方法采用可逆系统,其中能够结合细胞表面上的分子(细胞表面分子)的至少一种作用剂(例如受体结合剂或选择剂)与反应剂可逆关联。在一些情况下,反应剂包含能够可逆结合于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的多个结合位点。一些情况中,反应剂是多聚化反应剂。在一些实施方式中,至少一种作用剂(例如受体结合剂或选择剂)包含能特异性结合于分子的表位或结构域的至少一个结合位点B,还包含特异性结合反应剂的至少一个结合位点Z的结合伴侣C。一些情形中,结合伴侣C和至少一个结合位点Z之间的结合相互作用是非共价相互作用。在一些实施方式中,结合伴侣C和至少一个结合位点Z之间的结合相互作用(例如非共价相互作用)是可逆的。

[0205] 在一些实施方式中,可以在例如竞争剂(又称洗脱剂)之类物质存在下介导可逆关联,所示竞争剂是或含结合位点,也能结合至少一个结合位点Z。通常,所述物质(如竞争剂)的作用是竞争者,因其对反应剂结合位点Z的结合亲和力高于结合伴侣C且/或因其存在浓度高于结合伴侣C而结合伴侣C从反应剂脱落和/或解离。在一些实施方式中,该物质(例如竞争性反应剂)对至少一个结合位点Z的亲和力高于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C对所述至少一个结合位点Z的亲和力。因此,在一些情况下,反应剂的结合位点Z

与作用剂(如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C之间的键可通过加入该物质(例如竞争性反应剂)被破坏,从而使得作用剂(例如受体结合剂或选择剂)和反应剂的关联可逆。

[0206] 可用于该可逆系统的反应剂在本领域中已有记载且已知,参见例如:美国专利号No.5,168,049;5,506,121;6,103,493;7,776,562;7,981,632;8,298,782;8,735,540;9,023,604;和国际公开PCT申请No.W02013/124474和W02014/076277。以下描述了能够形成可逆相互作用的反应剂和结合伴侣、以及能够逆转该结合的物质(例如竞争性反应剂)的非限制性例子。

[0207] A. 反应剂

[0208] 在一些实施方式中,反应剂包含一个或多个结合位点Z,所述Z能够可逆结合作用剂(例如受体结合剂或选择剂)所包含的结合伴侣C。在一些实施方式中,反应剂包含多个结合位点Z,它们各自能够特异性结合包含在作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C,从而使得反应剂能够可逆结合多个作用剂(例如受体结合剂或选择剂),例如所述反应剂为多聚化反应剂。在一些实施方式中,反应剂是各自包含至少一个结合位点Z的个体分子(例如单体)或组成个体分子的复合物(例如四聚体)的寡聚物或聚合物。在一些实施方式中,反应剂包含至少两个结合位点Z,至少3个结合位点Z,至少4个结合位点Z,至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72或更多个结合位点Z。结合位点可全部相同,或多个结合位点可包括一个或多个不同的结合位点(例如Z1、Z2、Z3等)。

[0209] 在一些实施方式中,两个/种或多个/种作用剂(例如受体结合剂或选择剂)例如通过反应剂上存在的一个或多个结合位点于反应剂关联,例如可逆连接于反应剂。在一些情况下,这使得所述作用剂(例如受体结合剂或选择剂)彼此紧密排列,从而若具有细胞表面分子的目标细胞与具有能够结合该特定分子的一个或多个结合位点B的作用剂(例如受体结合剂或选择剂)接触,则发生亲和力作用。

[0210] 在一些实施方式中,相同(即包含相同结合位点B)的两种或多种不同作用剂(例如受体结合剂或选择剂)能可逆结合该反应剂。在一些实施方式中,可以采用至少两种(类)作用剂(例如受体结合剂或选择剂),在一些情况下,三种(类)或四种(类)不同的作用剂,例如两种或更多种不同的受体结合剂和/或选择剂。例如,在一些实施方式中,反应剂能可逆包含结合位点B1、B2、B3或B4等的第一作用剂(例如受体结合剂或选择剂)和包含其他结合位点(例如结合位点B1、B2、B3或B4中的另一种)的第二作用剂(例如受体结合剂或选择剂)。一些情形中,第一作用剂和第二作用剂的结合位点可相同。例如,在一些方面中,至少两种作用剂(例如受体结合剂或选择剂)各自均能结合相同分子。在一些情况下,第一作用剂和第二作用剂的结合位点可不同。在一些方面中,至少两种作用剂(例如受体结合剂或选择剂)各自能结合不同的分子,例如第一分子、第二分子等。一些情形中,不同分子(例如细胞表面分子)可存在于相同目标细胞上。在其他情况下,不同分子(例如细胞表面分子)可存在于同一细胞群中的不同靶细胞上。在一些情况下,第三、第四等作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可与相同反应剂关联,其各自含有其他不同的结合位点。

[0211] 在一些实施方式中,两种或多种不同作用剂(例如受体结合剂或选择剂)包含相同的结合伴侣C。在一些实施方式中,两种或多种不同作用物(例如受体结合剂或选择剂)包含不同的结合伴侣C。在一些方面中,第一作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有能特异性

结合反应剂上所存在结合位点Z1的结合伴侣C1,第二作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有能特异性结合反应剂上所存在结合位点Z1或结合位点Z2的结合伴侣C2。因此,在一些情况下,反应剂所包含的多个结合位点Z包括结合位点Z1和Z2,它们能够分别可逆结合于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)所包含的结合伴侣C1和C2。在一些实施方式中,C1和C2相同,和/或Z1和Z2相同。在其他方面中,多个结合位点Z中的一个或多个可不同。在其他情况中,多个结合伴侣C中的一个或多个可不同。选择能与含有结合位点Z的反应剂相容的结合伴侣C的任何组合在本领域技术人员的能力范围内,只要各结合伴侣C能够与结合位点Z之一相互作用(例如特异性结合)。

[0212] 在一些实施方式中,反应剂是链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物(例如中性亲和素)或其组合,其中该反应剂包含用于可逆关联结合伴侣C的一个或多个结合位点Z。在一些实施方式中,结合伴侣C可为生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽、或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、亲和素、亲和素突变蛋白或类似物的其他分子。在一些实施方式中,反应剂为或包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或突变蛋白、或亲和素类似物或突变蛋白,其可逆结合生物素、生物素类似物或其生物活性片段。在一些实施方式中,反应剂为或包含链霉亲和素突变蛋白或类似物、或亲和素突变蛋白或类似物,其可逆结合链霉亲和素结合肽。在一些实施方式中,所述物质(例如竞争性反应剂)可为生物素、生物素衍生物或类似物、或链霉亲和素结合肽,其能够与结合伴侣C竞争结合一个或多个结合位点Z。在一些实施方式中,结合伴侣C和该物质(例如竞争性反应剂)是不同的,该物质(例如竞争性反应剂)对一个或多个结合位点Z的亲合力高于对结合伴侣的亲合力。

[0213] 在一些实施方式中,链霉亲和素可为野生型链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白或类似物,例如链霉亲和素样多肽。类似地,在一些方面中,亲和素可包括野生型亲和素、或亲和素突变蛋白或类似物,例如中性亲和素,一种具有修饰的精氨酸的去糖基化生物素,其通常具有更中性pI且可用作天然生物素的替代品。通常,生物素的去糖基化中性形式包括市售可获得的那些形式,例如“Extravidin”可获自Sigma Aldrich公司,或例如“NeutrAvidin”可获自Thermo Scientific公司或Invitrogen。

[0214] 在一些实施方式中,反应剂为链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白或类似物。在一些实施方式中,野生型链霉亲和素(wt-链霉亲和素)的氨基酸序列如Argarana等,Nucleic Acids Res.14(1986)1871-1882所公开(SEQ ID NO:1)。总体而言,链霉亲和素天然存在为四个相同亚基的四聚体,即其为同四聚体,其中各亚基包含针对生物素、生物衍生物或类似物或生物素模拟物的单个结合位点。示例性的链霉亲和素亚基是SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,但该序列还可包含与其同源的来自其他链霉菌(*Streptomyces*)种系的序列。就具体情况而言,链霉亲和素的各亚基对生物素有高亲合力,平衡常数(K_D)约为 10^{-14} M数量级。有时,链霉亲和素呈单价四聚体存,四个结合位点中仅一个有功能(Howarth等,(2006) Nat.Methods,3:267-73;Zhang等,(2015) Biochem.Biophys.Res.Commun.,463:1059-63)),有时呈作二价四聚体,四个结合位点中的两个有功能(Fairhead等.(2013) J.Mol.Biol.,426:199-214)、或呈单体或二聚体形式存在(Wu等,(2005) J.Biol.Chem.,280:23225-31;Lim等,(2010) Biochemistry,50:8682-91)。

[0215] 在一些实施方式中,链霉亲和素可为任何形式,例如野生型或未修饰的链霉亲和

素,例如来自链霉菌种系的链霉亲和素或其功能活性片段,其包含针对生物素、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,例如通常包含SEQ ID NO:1所示的来自亲和素链霉菌(*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,在一些实施方式中,链霉亲和素可包含野生型链霉亲和素的片段,其在N-末端和/或C-末端截短。此类最小的链霉亲和素包括如下任一:N末端起始于SEQ ID NO:1的氨基酸位置10-16的区域中,C末端终止于SEQ ID NO:1的氨基酸位置133-142的区域中的最小的链霉亲和素。在一些实施方式中,链霉亲和素功能活性片段包含SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。在一些实施方式中,所述未修饰的链霉亲和素,例如SEQ ID NO:2所示的,还可包含位于对应于Ala13(按照SEQ ID NO:1所示编号)的位置处的N末端甲硫氨酸。本文提供的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白中的残基位置编号参照SEQ ID NO:1中残基的编号。

[0216] 在一些方面中,链霉亲和素突变蛋白包括与未修饰或野生型链霉亲和素序列相比存在一个或多个氨基酸取代、缺失或添加的多肽,但所述多肽包含至少一个功能性亚基,所述功能性亚基包含针对生物素、生物素衍生物或类似物或链霉亲和素结合肽的结合位点。在一些方面中,链霉亲和素样多肽和链霉亲和素突变蛋白可为本质上是野生型链霉亲和素免疫等价物的多肽,且尤其是能够以与野生型链霉亲和素相同或不同亲和力结合生物素、生物素衍生物或生物素类似物的多肽。在一些情况中,链霉亲和素样多肽或链霉亲和素突变蛋白可包含非野生型链霉亲和素的一部分的氨基酸,或它们可仅包含野生型链霉亲和素的一部分。在一些实施方式中,链霉亲和素样多肽是与野生型链霉亲和素不同的多肽,这是由于宿主不含将宿主产生的多肽转化为野生型链霉亲和素结构所需的酶。在一些实施方式中,链霉亲和素还可作为链霉亲和素四聚体和链霉亲和素二聚体存在,尤其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。通常,各亚基一般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 19641876A1、US 6,022,951、WO 98/40396或WO 96/24606中提及。

[0217] 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白可包含一些氨基酸它们不是未修饰或野生型链霉亲和素的一部分,或可仅包含野生型或非修饰链霉亲和素的一部分。在一些实施方式中,与未修饰或野生型链霉亲和素亚基(例如SEQ ID NO:1所示的野生型链霉亲和素亚基或其功能活性片段,例如SEQ ID NO:2所示)相比,链霉亲和素突变蛋白包含可具有一个或多个氨基酸取代(置换)的至少一个亚基。在一些实施方式中,与野生型或未修饰链霉亲和素相比,链霉亲和素突变蛋白的至少一个亚基可具有至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个不同氨基酸,和/或包含至少一个亚基,其所含氨基酸序列与SEQ ID NO:1或2所示氨基酸序列具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列相同性,其中,此链霉亲和素突变蛋白具有结合生物素、生物素衍生物或类似物或生物素模拟物的功能活性。在一些实施方式中,所述氨基酸置换(取代)是保守或非保守性突变。链霉亲和素突变蛋白的例子在本领域中已知,参见例如美国专利No.5,168,049;5,506,121;6,022,951;6,156,493;6,165,750;6,103,493;或6,368,813;或国际公开PCT申请No.WO2014/076277。

[0218] 在一些实施方式中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白包括:含一个或多于一个

功能性亚基的蛋白质,所述亚基包含针对生物素、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,例如含2个或更多个、三个或更多个、四个或更多个,在一些情况中,5、6、7、8、9、10、11、12或更多个功能性亚基的蛋白质。在一些实施方式中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白可包括:单体;二聚体,包括异二聚体或同二聚体;四聚体,包括同四聚体、异四聚体、单价四聚体或二价四聚体;或可包括其更高级别的多聚体或寡聚体。

[0219] 在一些实施方式中,链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白对肽配体结合伴侣的结合亲和力小于 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 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,肽序列(Strep-标签),如美国专利No.5,506,121中所公开的那些肽序列,可用作生物素模拟物,并显示对链霉亲和素具有结合亲和力,例如 K_D 为约 $10^{-4} \text{M} \sim 10^{-5} \text{M}$ 。在一些情况中,结合亲和力可通过在链霉亲和素分子中进行突变得到进一步改善,参见例如美国专利No.6,103,493或国际公开PCT申请No.WO2014/076277。在一些实施方式中,结合亲和性可通过本领域已知的方法确定,例如下文所述的任一种。

[0220] 在一些实施方式中,反应剂(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白)对肽配体结合伴侣具有结合亲和力,该肽配体结合伴侣可为存在于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C。在一些实施方式中,肽序列包含具有SEQ ID NO:9所示通式的序列,例如包含SEQ ID NO:10所示序列。10. 在一些实施方式中,肽序列具有SEQ ID NO:11所示的通式,例如SEQ ID NO:12所示。在一个实例中,肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称**Strep-tag®**,如SEQ ID NO:7所示)。在一个实例中,肽序列为Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称**Strep-tag® II**,如SEQ ID NO:8所示)。在一些实施方式中,肽配体包含依次排列的至少两个链霉亲和素-结合模块,其中,所述两个模块之间的距离是至少0个且不大于50个氨基酸,其中,一个结合模块具有3~8个氨基酸且至少包含序列His-Pro-Xaa(SEQ ID NO:9),其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,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,例如如SEQ ID NO:11所示(参见例如国际公开的PCT申请公开号WO02/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方式中,肽配体包含SEQ ID NO:13或14中任一所示的序列。在一些实施方式中,所述肽配体具有SEQ ID NO:15-19中任一项所示的氨基酸序列。

[0221] 在一些实施方式中,反应剂为或包含链霉亲和素突变蛋白。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:1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包含一个或多个突变(例如氨基酸替代)。例如,链霉亲和素的生物活性部分包括N末端和/或C末端截短的链霉亲和素变体,其在一些情况中被称为最小链霉亲和素。在一些实施方式中,与SEQ ID NO:1的序列相比,N末端截短的最小链霉亲和素(可对其进行任何突变)在N末端起始于氨基酸位置10~16区域,在C末端终止于氨基酸位置133~142区域。在一些实施方式中,可使N末端截短的链霉亲和素(可对其进行任何突变)包含SEQ ID NO:2所示的序列。在一些实施方式中,最小链霉亲和素包含从位置Ala13~Ser139的氨基酸序列,且可选地具有替代Ala13的N末端甲硫氨酸残基。为了本文的目的,氨基酸位置的编号全部参考SEQ ID NO:1所示野生型链霉亲和素的编号(例如Argarana等,Nucleic Acids Res.14(1986),1871-1882,也可参见图3)。

[0222] 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白是美国专利No.6,103,493所述的突变体。在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44~53区域内包含至少一个突

变,基于野生型链霉亲和素的氨基酸序列,例如如SEQ ID NO:1所示。在一些实施方式中,所述链霉亲和素突变蛋白在44、45、46和/或47中的一个或多个残基处包含突变。在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白在野生型链霉亲和素第44位处用疏水脂族氨基酸(例如Val、Ala、Ile或Leu)替代Glu,在第45位用任何氨基酸替代,在第46位用脂族氨基酸(例如疏水脂族氨基酸)替代,和/或在第47位用碱性氨基酸(例如Arg或Lys,如通常为Arg)替代Val。在一些实施方式中,在第46位为Ala和/或在第47位为Arg和/或在第44位为Val或Ile。在一些实施方式中,链霉亲和素突变体包含残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,例如在包含如SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示(也称为链霉亲和素突变蛋白1, SAM1)。在一些实施方式中,链霉亲和素突变体包含残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷,例如在包含如SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的示例性链霉亲和素突变蛋白中所示(也称为SAM2)。在一些情况中,此类链霉亲和素突变蛋白描述于例如美国专利6,103,493中,且可以Strep-Tactin®的商品名市售获得。

[0223] 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白是描述于国际公开的PCT申请No. WO 2014/076277的突变体。在一些实施方式中,参照SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置44~53的区域中包含至少两个半胱氨酸残基。1. 在一些实施方式中,所述半胱氨酸残基位于位置45和52处以产生连接这些氨基酸的二硫桥。在此处的实施方式中,氨基酸44通常是甘氨酸或丙氨酸,且氨基酸46通常是丙氨酸或甘氨酸,且氨基酸47通常是精氨酸。在一些实施方式中,参照SEQ ID NO:1所示的氨基酸位置,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸残基115~121的区域中包含至少一个突变或氨基酸差异。1. 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白在氨基酸位置117、120和121处含有至少一个突变,和/或,氨基酸118和119缺失,且至少氨基酸位置121处有取代。

[0224] 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白在对应于117位的位置包含突变,该突变可为:大的疏水性残基(如Try、Tyr或Phe)或带电荷残基(如Glu、Asp或Arg)或疏水残基(如Asn或Gln),或者,在一些情况中,疏水残基Leu、Met或Ala,或极性残基Thr、Ser或His。在一些实施方式中,117位的突变与如下突变组合:对应于120位的位置的突变,该突变可为小残基(如Ser或Ala或Gly);对应于121位的位置的突变,该突变可为疏水性残基(例如大的疏水性残基,如Trp、Tyr或Phe)。在一些实施方式中,117位处的突变与以下突变组合:对应于SEQ ID NO:1所示野生型链霉亲和素或其生物活性片段第120位的位置处的突变,该突变可为疏水性残基(例如Leu、Ile、Met或Val,或通常Tyr或Phe;以及,对应于SEQ ID NO:1所示野生型链霉亲和素或其生物活性片段第121位的位置处的突变,该突变可为小残基(如Gly、Ala或Ser)或Gln或疏水性残基(如Leu、Val、Ile、Trp、Tyr、Phe或Met)。在一些实施方式中,此类突变蛋白还能包含残基Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或残基Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷。在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白包含残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰和Tyr¹²¹。在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白包含SEQ ID NO:27或28所示的氨基酸序列,或显示出与SEQ ID NO:27或28所示氨基酸序列至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高序列相同性的氨基酸序列,其包含残基Val⁴⁴、Thr⁴⁵、Ala⁴⁶、Arg⁴⁷、Glu¹¹⁷、Gly¹²⁰和Tyr¹²¹,且显示结合生物素、生物素类似物或链霉亲和素结合肽的功能活性。

[0225] 在一些实施方式中,链霉亲和素突变蛋白可包含任何组合形式的任何上述突变,

且所得的链霉亲和素突变蛋白可显示对肽配体 (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 也称 **Strep-tag®**, 如SEQ ID NO:7所示) 的结合亲和力小于 $2.7 \times 10^{-4} \text{M}$; 和/或, 对肽配体 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 也称 **Strep-tag® II**, 如SEQ ID NO:8所示) 的结合亲和力小于 $1.4 \times 10^{-4} \text{M}$; 和/或, 对SEQ ID NO:7-19中任一项所示的任一肽配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 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。

[0226] 在一些实施方式中, 链霉亲和素突变蛋白具有SEQ ID NO:3~6、27或28所示的氨基酸序列, 或与SEQ ID NO:3~6、27或28任一所示的氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列相同性, 且对肽配体 (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 也称 **Strep-tag®**, 如SEQ ID NO:7所示) 的结合亲和力小于 $2.7 \times 10^{-4} \text{M}$; 和/或, 对肽配体 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 也称 **Strep-tag® II**, 如SEQ ID NO:8所示) 的结合亲和力小于 $1.4 \times 10^{-4} \text{M}$; 和/或, 对SEQ ID NO:7-19中任一所示的任一肽配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 $1 \times 10^{-11} \text{M}$ 。

[0227] 在一些实施方式中, 链霉亲和素突变体还可结合至其它链霉亲和素配体, 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) 或/和二甲基-HABA。在以下实施方式中, 链霉亲和素突变蛋白对其他链霉亲和素配体 (例如生物素或脱硫生物素) 的结合亲和力大于该链霉亲和素突变蛋白对生物素模拟肽配体 (例如SEQ ID NO:7-19任一所示) 的结合亲和力。因此, 在一些实施方式中, 生物素或生物素类似物或衍生物 (例如脱硫生物素) 在本文所提供的方法中可用作竞争性反应剂。例如, 与生物素-链霉亲和素相互作用约 10^{-13}M 的结合亲和力相比, 命名为 **Strep-tactin®** 的链霉亲和素突变蛋白 (例如包含SEQ ID NO:4所示序列) 与命名为 **Strep-tag® II** 的肽配体 (例如, 如SEQ ID NO:8所示) 的相互作用的特征在于 K_D 为约 10^{-6}M 的结合亲和力。在一些情况中, 能以 K_D 为 $10^{-10} \sim 10^{-13} \text{M}$ 或约 $10^{-10} \sim 10^{-13} \text{M}$ 的高亲和力结合 **Strep-tactin®** 的生物素能与 **Strep-tag® II** 竞争结合位点。

[0228] 在一些情况中, 反应剂包含可能能够结合过渡金属离子的至少两个螯合基团K。在一些实施方式中, 反应剂能够结合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、麦芽糖结合肽 (MBP)、HSV表位、myc表位、和/或生物素化载体蛋白。

[0229] 在一些实施方式中, 反应剂是寡聚体或多聚体。在一些实施方式中, 寡聚物或聚合物可通过如下方式产生: 直接或间接连接天然存在状态的蛋白质个体分子、或者直接或间接连接形成个体分子的单体或亚基复合物 (例如, 直接或间接连接天然存在状态的蛋白质的二聚体、三聚体、四聚体等)。例如, 链霉亲和素或亲和素的四聚化同二聚体或异二聚体可被视为相应寡聚物或聚合物的最小构建区块或个体分子。在一些实施方式中, 寡聚物或聚合物可包含至少2个蛋白质个体分子连接 (例如, 为2聚体), 或可为蛋白质个体分子 (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。

[0230] 寡聚物可采用本领域已知的任何方法产生,例如描述于公开的美国专利申请公开号US2004/0082012中的任何方法。在一些实施方式中,寡聚物或聚合物包含两个或更多个个体分子,它们可以是交联的,例如通过多聚糖或二官能接头交联。

[0231] 在一些实施方式中,寡聚物或聚合物通过多糖的存在下交联个体分子或作为个体分子的亚基的复合物而获得。在一些实施方式中,可通过在多糖(例如葡聚糖)中引入羧基残基来制备寡聚物或聚合物。在一些方面中,反应剂的个体分子(例如单体或四聚体)可通过内部赖氨酸残基的伯胺基团偶联,和/或通过葡聚糖骨架中游离N末端与羧基偶联,所采用的是本领域常规的碳二亚胺化学法。在一些实施方式中,偶联反应进行的摩尔比为约60摩尔反应剂个体分子(例如单体或四聚体)/摩尔葡聚糖。

[0232] 在一些实施方式中,反应剂是一个或多个链霉亲和素、或亲和素、或链霉亲和素类似物或突变蛋白(如**Strep-Tactin®**或**Strep-Tactin®XT**)、或亲和素类似物或突变蛋白(例如中性亲和素)的寡聚物或聚合物。在一些实施方式中,结合位点Z是亲和素或链霉亲和素的天然生物素结合位点,其在个体分子中可具有多至4个结合位点(例如包含4个结合位点Z的四聚体),从而同四聚体可包含多至4个相同的结合位点(即Z1),而异四聚体可包含4个可能不同的结合位点,例如包含Z1和Z2。在一些实施方式中,寡聚物由相同的链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白的多个个体分子(例如多个同四聚体)形成或产生,在该情况下,寡聚物的各结合位点Z(例如Z1)相同。例如,一些情形中,寡聚物可包含多个结合位点Z1,例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50或更多个结合位点Z1。在一些实施方式中,寡聚物由作为链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白异四聚体的多个个体分子形成或产生,和/或由结合位点Z不同(例如Z1和Z2)的链霉亲和素、链霉亲和素突变蛋白、亲和素或亲和素突变蛋白的两个或多个不同个体分子形成或产生,在该情况下,多个不同结合位点Z(例如Z1和Z2)可存在于寡聚物之中。例如,一些情形中,寡聚物可包含多个结合位点Z1和多个结合位点Z,两者的组合可包括至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50或更多个组合的结合位点Z1和Z2。

[0233] 在一些情况下,寡聚物或聚合物可分别通过多糖交联。在一些实施方式中,链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物、或亲和素类似物(例如中性亲和素)的寡聚物或聚合物可通过将羧基残基引入多糖(例如葡聚糖)制备,其第一步基本如Noguchi, A等, *Bioconjugate Chemistry* (1992) 3, 132-137中所述。在一些此类方面中,然后可使链霉亲和素或亲和素或其类似物通过内部赖氨酸残基的伯胺基团连接,和/或通过游离N末端连接到葡聚糖骨架中的羧基,在该第二步中所采用的是常规的碳二亚胺化学法。在一些方面中,可通过采用用作接头的二官能分子(例如戊二醛)或通过本领域所描述的其他方法交联个体链霉亲和素或亲和素分子来获得链霉亲和素、或亲和素、或链霉亲和素或亲和素的任何突变蛋白或类似物的交联寡聚物或聚合物。

[0234] 在一些实施方式中,通过采用二官能接头或其他化学接头(例如戊二醛)或其他本领域已知的方法交联个体分子或组成个体分子的单体复合物来获得寡聚物或聚合物。在一些方面中,可通过采用用作接头的二官能分子(例如戊二醛)或通过本领域所描述的其他方

法交联个体链霉亲和素或亲和素分子来获得链霉亲和素、或亲和素、或链霉亲和素或亲和素的任何突变蛋白或类似物的交联寡聚物或聚合物。例如,可以如下产生链霉亲和素突变蛋白的寡聚物:将巯基引入链霉亲和素突变蛋白(该步骤可例如通过使链霉亲和素突变蛋白与2-亚氨基氯化硫醇(Traut反应剂)反应来实现),以及活化(例如在另一独立的反应中)链霉亲和素突变蛋白中可及的氨基基团。在一些实施方式中,氨基基团的该活化可通过使链霉亲和素突变蛋白与市售可获得的异二官能交联剂(例如磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(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))反应来实现。一些此类实施方式中,将如此获得的两反应的产物混合在一起,通常会导致修饰链霉亲和素突变蛋白产物所含巯基与另一修饰链霉亲和素突变蛋白产物所含活化(例如通过马来酰亚胺功能化)氨基酸反应。一些情形中,通过该反应形成链霉亲和素突变蛋白的多聚体/寡聚物。这些寡聚物可具有适当数量的个体分子,例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45、50个或更多个个体分子,寡聚化程度可根据反应条件而不同。

[0235] 在一些实施方式中,寡聚或聚合反应剂可通过尺寸排阻层析分离,且任何所需级分可用作反应剂。例如,在一些实施方式中,在2-亚氨基氯化硫醇和异二官能交联剂(例如磺基SMCC)的存在下使修饰的链霉亲和素突变蛋白反应后,可通过尺寸排阻层析分离寡聚反应剂或聚合反应剂,且任何所需级分可用于反应剂。在一些实施方式中,寡聚物不具有(且不必具有)单一分子量,但它们可具有统计学重量分布,例如高斯分布。在一些情况下,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)的任何寡聚物可用作可溶反应剂,例如通常为3~50个四聚体(例如同四聚体或异四聚体)、10~40个四聚体(例如同四聚体或异四聚体)、或25~35个四聚体(例如同四聚体或异四聚体)。该寡聚物可具有(例如)3~25个链霉亲和素突变蛋白四聚体(例如同四聚体或异四聚体)。在一些方面中,链霉亲和素突变蛋白的分子量约为50kDa,可溶寡聚物的分子量可为约150kDa~约2000kDa、约150kDa~约1500kDa、约150kDa~约1250kDa、约150kDa~1000kDa、约150kDa~约500kDa or 约150kDa~约300kDa、约300kDa~约2000kDa、约300kDa~约1500kDa、约300kDa~约1250kDa、约300kDa~1000kDa、约300kDa~约500kDa、约500kDa~约2000kDa、约500kDa~约1500kDa、约500kDa~约1250kDa、约500kDa~1000kDa、约1000kDa~约2000kDa、约1000kDa~约1500kDa、约1000kDa~约1250kDa、约1250kDa~约2000kDa或约1500kDa~约2000kDa。通常,由于各链霉亲和素分子/突变蛋白具有四个生物素结合位点,该反应剂可提供12~160个结合位点Z,例如12~100个结合位点Z。

[0236] 1. 反应剂形式

[0237] a. 支持物

[0238] 在一些实施方式中,反应剂包含在支持物上,所述支持物为例如固体支持物或表面(例如珠)或固定相(色谱基质)。在一些此处的实施方式中,反应剂可逆固定在支持物上。一些情形中,反应剂通过共价键固定于支持物。一些情形中,反应剂通过非共价键可逆固定于支持物。

[0239] 在一些实施方式中,支持物是固体支持物。可将任何固体支持物(表面)用于可逆固定反应剂。其上可固定反应剂的示例性固体支持物包括磁珠、多聚珠、细胞培养板、微量滴定板、膜或中空纤维。在一些方面中,可在Quantum®细胞扩增系统(可购自TerumoBCT有

限公司(雷克武德,CO,USA)中将中空纤维用作生物反应器。在一些实施方式中,反应剂共价连接于固体支持物。在其他实施方式中,也可采用非共价相互作用进行固定,例如固定在塑料基板上。在一些实施方式中,反应剂可为例如可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素或亲和素突变蛋白。此类链霉亲和素突变蛋白可共价连接任何表面,例如用于色谱纯化的树脂(珠),它们以该形式市售获自IBA有限公司(哥廷根),例如作为**Strep-Tactin®**琼脂糖、**Strep-Tactin® Superflow®**、高容量**Strep-Tactin® Superflow®**或**Strep-Tactin® MacroPrep®**。其他易于市售获得的示例性例子是固定化的金属亲和色谱(IMAC),例如可用于寡聚组氨酸标签(his-标签)蛋白的可逆固定**TALON®**树脂(Westburg公司,荷兰雷斯登),例如用于可逆固定包含作为结合伴侣C的寡聚组氨酸标签(例如五或六组氨酸标签)的作用剂(例如受体结合剂或选择剂)。其他例子包括购自GE生命科学(GE Life Sciences)的钙调蛋白琼脂糖,其可与包含作为结合伴侣C的钙调蛋白结合肽的作用剂(例如受体结合剂或选择剂)或与偶联了谷胱甘肽的琼脂糖一起使用。在一些此类情况中,结合伴侣C是谷胱甘肽-S-转移酶。

[0240] 在一些实施方式中,支持物包含固定相。因此,在一些实施方式中,反应剂包含于固定相(也称为色谱基质)上。在一些此处的实施方式中,反应剂可逆固定在固定相上。一些情形中,反应剂通过共价键可逆固定于固定相。在一些方面中,反应剂通过非共价键可逆固定于固定相。

[0241] 可将任何材料用作色谱基质。通常,适合的色谱材料本质上无害,即例如当在所需条件下用于装填的色谱柱中时,对细胞活力无不利影响,在一些实施方式中,固定相保持在预定的定位(例如预定位置),而样品的定位可改变。因此,在一些实施方式中,固定相是色谱系统的一部分,流动相流过该部分(通过流经或批次形式),液相中所含的组分(溶解或分散形式)发生相间分布。

[0242] 在一些实施方式中,色谱基质具有固相或半固相形式,而含有待分离/分隔目标细胞的样品则是液相。色谱基质可为颗粒材料(具有任何适宜的尺寸和形状)或整体色谱材料,包括纸基质或膜。因此,在一些方面中,色谱法既可以是柱色谱法,也可以是平面色谱法。在一些实施方式中,除了标准色谱柱,还可将允许双向流的柱(例如**PhyTip®**柱,可购自PhyNexus有限公司,圣何塞(San Jose,CA,U.S.A)或移液器尖头用于基于柱/基于流通模式(flow through mode)的方法中。因此,在一些情况中,可用于本文方法中的色谱柱还包括移液器尖头或允许双向流的柱。一些情形中,例如采用颗粒基质材料时,该颗粒基质材料的平均粒径可为例如约5 μm ~约200 μm ,或约5 μm ~约400 μm ,或约5 μm ~约600 μm 。在一些方面中,色谱基质可为或可包括例如聚合树脂或金属氧化物或类金属氧化物。在一些方面中,例如采用平面色谱时,基质材料可为任何适于平面色谱的材料,例如常规纤维素基或有机聚合物基膜(例如纸膜、硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯(PVDF))或二氧化硅包被的玻璃板。在一个实施方式中,色谱基质/固定相是非磁性材料或不可磁化的材料。

[0243] 在一些实施方式中,适于本文方法的非磁性或不可磁化色谱固定相包括衍生化二氧化硅或交联凝胶。在一些方面中,交联凝胶可基于天然聚合物,例如基于自然界存在的聚合物类。例如,可作为色谱固定相基础的天然聚合物为多糖。一些情形中,所用多糖大体交联的。多糖基质的例子包括但不限于:琼脂糖凝胶(例如,Superflow™琼脂糖或

Sepharose®材料,例如以不同珠和孔径可市售获得的**Superflow™ Sepharose®**)或交联葡聚糖凝胶。另一示例性的例子是微粒交联琼脂糖基质,其共价结合有葡聚糖,可作为**Sephadex®** or **Superdex®**市售购自GE Healthcare公司(以不同尺寸和不同孔径)。此类色谱材料的另一示例性实例是**Sephacryl®**,其也可以不同珠和孔径获自GE Healthcare公司。

[0244] 在一些实施方式中,交联凝胶可基于合成的聚合物,例如基于自然界中不存在的聚合物类。在一些方面中,色谱固定相所基于的此类合成的聚合物具有极性单体单元,因此其本身具有极性。因此,在一些情况中,该极性聚合物是亲水性的。在一些方面中,亲水性分子(也称疏油性)包含能与水分子形成偶极-偶极相互作用的部分。通常,疏水性分子(也称亲脂性)具有与水分离的趋势。

[0245] 适合的合成聚合物的示例性例子是:聚丙烯酰胺类、苯乙烯-二乙烯基苯凝胶和丙烯酸酯和二醇的共聚物或丙烯酰胺与二醇的共聚物。示例性的例子是聚甲基丙烯酸凝胶(作为**Fractogel®**市售可获得)。另一例子是乙二醇和甲基丙烯酸酯的共聚物,作为**Toyopearl®**市售可获得。在一些实施方式中,色谱固定相还可包含天然和合成聚合物组分,例如多糖和琼脂糖的复合基质或复合物或共聚物(例如聚丙烯酰胺/琼脂糖复合物),或多糖和N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的复合基质或复合物或共聚物。葡聚糖与N,N'-亚甲基双丙烯酰胺共聚物的示例性例子是如上所述的**Sephacryl®**系列材料。在一些实施方式中,衍生的二氧化硅可包括偶联于合成或天然聚合物的二氧化硅颗粒。此处的实施方式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、聚环氧乙烷接枝的二氧化硅、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。

[0246] 在一些实施方式中,色谱基质是凝胶过滤基质,例如当如本文所述用于清除盒中时。通常,凝胶过滤的特征在于其设计目的。因此,凝胶过滤基质在一些方面主要基于细胞或其他生物实体的尺寸实现对它们的分离。这些方面中,相应色谱基质通常是如上所述的微粒状多孔材料。色谱基质可具有一定的排除极限,通常用分子量定义,即大于该极限的分子绝对不进入孔中。在一些实施方式中,界定尺寸排阻极限的相应分子量可选择为小于相应的靶细胞。此类该实施方式中,目标细胞被阻止进入尺寸排阻色谱基质的孔中。类似地,固定相可具有尺寸小于所选目标细胞的孔。在示例性实施方式中,色谱基质的平均孔径为0~约500nm。

[0247] 在一些实施方式中,样品中存在的组分,例如作用剂(如受体结合剂或选择剂)或竞争性反应剂可具有小于孔的排阻限制的尺寸,从而能够进入色谱基质的孔中。在一些方面中,能够部分或全部进入孔容的此类组分中,分子越大进孔越少于是先洗脱,而最小的分子通常最后被洗脱。在一些实施方式中,色谱基质的排阻极限可选为低于目标细胞的最大宽度。因此,在一些方面中,进入孔容的组分比目标细胞在色谱基质中/上滞留更久。因此,在一些情况中,可从色谱柱的洗脱物中收集与样品中其他物质/组分分离的目标细胞。因此,在一些方面中,组分,例如作用剂(例如受体结合剂或选择剂)或可用时的竞争性反应剂,可比目标细胞从凝胶过滤基质中在更晚的时间点洗脱出。在一些实施方式中,例如若凝胶渗透基质包含具有能结合作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合位点Z的反应剂(例如共价结合于其上)和/或样品中存在竞争性反应剂,该效果可被进一步增强。在一些情况

中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)和/或竞争性反应剂可通过反应剂的结合位点Z结合,从而固定在基质上。在一些方面中,该方法在清除盒中进行。

[0248] 在一些实施方式中,用于本文方法中的色谱基质还可包括磁力可吸引物质,例如一种或多种磁力可吸引颗粒或铁磁流体。各磁力可吸引颗粒可包括具有能结合目标细胞的结合位点的反应剂。在一些情况中,磁力可吸引颗粒可包含抗磁性、铁磁性、顺磁性或超顺磁性材料。通常,超顺磁性材料以诱导磁场响应磁场而不会导致永久磁化。基于铁氧化物的磁性颗粒例如市售可获得的:Dyn珠(Dynal Biotech公司)、磁性MicroBeads(Miltenyi Biotec公司)、磁性多孔玻璃珠(CPG有限公司)、以及获自各自其他来源,例如Roche Applied Science公司、BIOCLON公司、BioSource国际有限公司、micromod公司、AMBION公司、Merck公司、Bangs Laboratories公司、Polysciences公司或Novagen有限公司,以上并非穷举。基于超顺磁Co和FeCo的磁性纳米颗粒以及铁磁性Co纳米晶体已有描述,例如Hutten,A等(J.Biotech.(2004),112,47-63)。在其他实施方式中,用于本文方法的色谱基质没有任何磁力可吸引物质。

[0249] 在一些实施方式中,提供了包含至少一个第一固定相和第二固定相排列的设备,市售第一固定相和第二固定相例如用于选择细胞的色谱柱(选择盒)和用于移除反应剂的第二色谱柱(移除盒)。该设备可包括串联流体相连的多种第一和第二固定相(色谱柱)配置。该设备可包括样品入口,该入口与第一和第二固定相的第一配置中的第一固定相流体连通。在一些实施方式中,该设备还可包含细胞的样品出口,该样品出口与至少一个第一第二色谱固定相组合中最后一个组合中的第二固定相流体连通。在一些方面中,该设备还可包括竞争性反应剂容器,其与第一第二固体相组合中的至少一个第一固体相流体连通。

[0250] b.可溶性

[0251] 在一些实施方式中,反应剂不结合于固体支持物,即其以可溶形式存在或是可溶的。原则上,可采用与固定于支持物(例如固体支持物或固定相)的反应剂相同的反应剂。例如,任何如上所述的示例性反应剂均可使用而无需将该反应剂固定或附着于支持物,例如不附着于固体支持物或固定相。在一些实施方式中,反应剂包含多个结合位点Z以通过与结合伴侣C的相互作用可逆结合于结合剂。在一些情况中,反应剂是个体分子的寡聚物或聚合物,或是形成个体分子的亚基的复合物的寡聚物或聚合物(例如二聚体蛋白、三聚体蛋白或四聚体蛋白的共聚体或多聚体)。在一些实施方式中,反应剂可为例如链霉亲和素突变蛋白寡聚体、钙调蛋白寡聚体、提供至少两个螯合基团K的化合物(寡聚体),其中所述至少两个螯合基团能够结合过渡金属离子,由此使得反应剂能够结合寡组氨酸亲和标签、多聚谷胱甘肽-S-转移酶或生物素化载体蛋白。

[0252] 在一些实施方式中,反应剂的特征是不含附着于该反应剂的固体支持物(表面)。例如,在一些实施方式中,反应剂不含或不附着于(直接或间接)颗粒、珠、纳米颗粒、微球或其他固体支持物。在一些实施方式中,反应剂不是刚性、非柔性或硬性的,或不含或不附着于刚性、非柔性或硬表面。在一些实施方式中,反应剂是柔性的或基本上柔性。在一些情况中,反应剂能够调节或匹配以适应细胞表面的形式。在一些实施方式中,反应剂的形状不是球形或基本球形,或不包含球形或基本球形的形状。

[0253] 在一些实施方式中,基本全部,即多于80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的反应剂为有机材料、由有机材料组成或包含有机材

料。例如,在一些实施方式中,多于80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的反应剂为脂质、碳水化合物、蛋白质、肽或它们的混合物,由脂质、碳水化合物、蛋白质、肽或它们的混合物组成,或包含脂质、碳水化合物、蛋白质、肽或它们的混合物。在一些实施方式中,反应剂基本上缺少如下物质、基本不由如下物质组成或基本不含如下物质:无机材料、无机核心(例如金属,如铁)、合成或无机聚合物(例如苯乙烯聚合物,如聚苯乙烯)、乳胶、二氧化硅或磁性核心。例如,在一些实施方式中,反应剂的无机材料或组成反应剂一部分的无机材料的相对百分比少于20%、5%、10%、5%或更少。

[0254] 在一些实施方式中,水性溶液中反应剂总体积的大部分(即多于50%,例如多于60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多)由反应剂所包含的个体蛋白分子组成,例如个体分子或形成个体分子的亚基的复合物(例如四聚体分子)的寡聚物或聚合物。在一些实施方式中,可溶反应剂的总密度小于 $1.2\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.1\text{g}/\text{cm}^3$ 、 $1.0\text{g}/\text{cm}^3$ 或更小。

[0255] 在一些实施方式中,可溶反应剂(例如不附着于支持物或固体支持物,如不附着于珠)具有相对小的尺寸,例如尺寸通常小于或约小于20nm,例如小于或约小于15nm,小于或约小于10nm,小于或约小于5nm或更小。

[0256] 在一些实施方式中,可溶反应剂(例如不附着于支持物或固体支持物,如不附着于珠)是生物惰性的,即其对活细胞无毒性。在一些实施方式中,反应剂可生物降解,例如,其可通过酶活性降解或被吞噬细胞清除。

[0257] 在一些实施方式中,可使反应剂(例如链霉亲和素或突变蛋白,如四聚化链霉亲和素突变蛋白)与载体(例如有机载体)反应。在一些方面中,除了与多糖的反应以外,还可将生理学或药学上可接受的蛋白质例如血清白蛋白(如人血清白蛋白(HSA)或牛血清白蛋白(BSA))用作载体蛋白。在此情况中,反应剂(例如链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白,个体四聚体或寡聚体形式)可通过非共价相互作用与载体蛋白偶联。在一些此类实施方式中,生物素化BSA(可通过不同供应商市售获得,例如ThermoFisher Scientific公司、Sigma Aldrich公司或Vectorlabs公司,并非穷举)可与反应剂(例如链霉亲和素突变蛋白)反应。在一些方面中,反应剂寡聚物(例如链霉亲和素寡聚物)中的一些可通过一个或多个结合位点Z非共价结合于生物素化载体蛋白,而将寡聚物的大部分结合位点Z留出用于结合于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)以及本文所述的任何其他作用剂。因此,可由此制备具有多个结合位点Z的可溶反应剂。

[0258] 在其他实施方式中,反应剂(例如链霉亲和素突变蛋白,个体四聚体或寡聚体形式)可共价偶联合成的载体,例如聚乙二醇(PEG)分子。例如,可将任何合适的PEG分子用于该目的,PEG分子和相应的反应剂可以是可溶性。通常,分子量最高达1000Da的PEG分子在水或可用于本文所述方法的培养基中可溶。在一些情况中,此类基于PEG的反应剂可采用市售可获得的活化PEG分子(例如,PEG-NHS衍生物,可获自NOF North America公司,美国加利福尼亚州爱文;或活化的PEG衍生物,可获自Creative PEGWorks,美国北卡罗来纳州教堂山)与链霉亲和素突变蛋白的氨基基团制备。

[0259] B. 作用剂

[0260] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)具有用于结合细胞表面上的分子(例如细胞表面分子)的一个或结合位点B。因此,在一些情况中,用于剂(例如受体结合剂或选择剂)包含一个结合位点B或多个结合位点B,其中作用剂(例如受体结合剂或选择

剂)与目标细胞表面上分子的特异性结合包括B和分子之间的相互作用。在一些实施方式中,作用剂仅包含单个结合位点,即为单价。在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)具有能够结合细胞表面分子的至少两个,例如多个结合位点B,包括3、4或5个结合位点B。在一些此类方面中,所述至少两个或多个结合位点B可相同。在一些实施方式中,一个或多个所述至少两个或多个结合位点B可不同(例如B1和B2)。

[0261] 在一些实施方式中,一种或多种不同作用剂(例如一种或多种不同受体结合剂、选择剂或结合细胞上分子的其他作用剂)可逆结合反应剂。在一些实施方式中,至少2、3、4或更多种不同作用剂与相同的反应剂可逆结合。在一些实施方式中,至少两种不同作用剂与相同的反应剂可逆结合,由此各反应剂包含一个结合位点B或多个结合位点B用于所述作用剂和所述分子之间的特异性结合。在一些实施方式中,所述至少两种或更多种作用剂包含相同的结合位点B,例如用于结合相同或基本相同的分子。在一些实施方式中,所述至少两种或更多种作用剂包含不同结合位点B,例如用于结合不同的分子。在一些实施方式中,第一作用剂(例如第一受体结合剂或第一选择剂)包含结合位点B1、B2、B3、B4等,第二作用剂(例如第二受体结合剂或第二选择剂)包含其他结合位点B1、B2、B3、B4等。在一些实施方式中,第一作用剂(例如第一选择剂)包含结合位点B1,第二作用剂(例如第二选择剂)包含结合位点B3。在一些实施方式中,第一作用剂(例如第一受体结合剂)包含结合位点B2,第二剂(例如第二受体结合剂)包含结合位点B4。在任何此类实施方式中,第一作用剂和第二作用剂可包含结合伴侣,C1或C2。在一些实施方式中,C1和C2可相同。在一些实施方式中,C1和C2不同。在一些实施方式中,第一作用剂和第二作用剂包含相同的结合伴侣C1。

[0262] 在一些情况中,作用剂(例如通过结合位点B)与反应剂的结合位点Z之间的结合解离常数的值可为约 10^{-2} M~约 10^{-13} M,或约 10^{-3} M~约 10^{-12} M,或约 10^{-4} M~约 10^{-11} M,或约 10^{-5} M~约 10^{-10} M。在一些实施方式中,结合剂和分子之间结合的解离常数(K_D)为低亲和力,例如 K_D 为约 10^{-3} ~约 10^{-7} M。在一些实施方式中,结合剂和分子之间结合的解离常数(K_D)为高亲和力,例如 K_D 为约 10^{-7} ~约 1×10^{-10} M。

[0263] 在一些实施方式中,作用剂通过结合位点B与分子结合的解离发生得足够迅速,例如在反应剂和作用剂间的可逆键被破坏后,解离迅速得足以使得目标细胞仅被瞬时染色或与作用剂关联。在一些情况中,当用 k_{off} 速率(也称为解离速率常数)表示作用剂(通过结合位点B)与分子的结合时, k_{off} 速率可为 0.5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 1×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 2×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 3×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 4×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 5×10^{-4} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 1×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 1.5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 2×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 3×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 4×10^{-3} 秒 $^{-1}$,约 5×10^{-3} 秒 $^{-1}$ 或更大,约 1×10^{-2} 秒或更大,或约 5×10^{-1} 秒 $^{-1}$ 或更大。本领域技术人员具有凭经验确定适于具体作用剂和细胞分子相互作用的 k_{off} 速率范围的水平(参见例如美国申请公开号US2014/0295458)。例如,可使用具有较高 k_{off} 速率(例如高于 4.0×10^{-4} 秒 $^{-1}$)的作用剂,从而在破坏结合复合物后,可在一小时内去除或解离大部分作用剂。在其他情况中,可使用具有较低 k_{off} 速率(例如 1.0×10^{-4} 秒 $^{-1}$)的作用剂,从而在破坏结合复合物后,可在约3个半小时内从细胞去除或解离大部分该作用剂。

[0264] 在一些实施方式中,该键的 K_D 以及作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合位点B与细胞表面分子之间形成的键的 K_D 、 K_A 、 $k_{\text{关}}$ (k_{off})和 $k_{\text{开}}$ (k_{on})速率可通过任何合适的方法确定,例如通过荧光滴定、平衡透析或表面等离子共振。

[0265] 在一些方面中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)所针对的分子可以是细胞表面分子。在一些实施方式中,细胞表面分子是肽或蛋白质,例如受体,如膜受体蛋白。在一些实施方式中,受体为脂质、多糖或核酸。在一些实施方式中,细胞表面分子为蛋白质,其可为外周膜蛋白或整合膜蛋白。在一些实施方式中,细胞表面分子可具有一个或多个跨膜结构域。作为一些示例性例子,具有跨膜结构域的膜蛋白可为:G蛋白偶联受体,例如气味受体,视紫红质受体、视紫红质信息素受体,肽激素受体、味觉受体、GABA受体、鸦片受体,血清素受体, Ca^{2+} 受体,黑视素,神经递质受体,例如配体门控、电压门控或机械门控受体,包括乙酰胆碱、尼古丁、肾上腺素、去甲肾上腺素、儿茶酚胺、L-DOPA-、多巴胺和血清素(生物胺,内啡肽/脑啡肽)神经肽受体,受体激酶,例如丝氨酸/苏氨酸激酶、酪氨酸激酶、孔蛋白/通道(例如氯通道、钾通道、钠通道),OMP蛋白,ABC转运蛋白(ATP-结合盒转运蛋白),例如氨基酸转运蛋白,Na-葡萄糖转运蛋白,Na/碘转运蛋白,例子转运蛋白,如光收获复合物(Light Harvesting Complex),细胞色素氧化酶,ATP酶Na/K、H/K、Ca,细胞附着受体,例如金属蛋白酶,整合素或钙粘素。

[0266] 在一些实施方式中,细胞表面分子可为限定所需细胞群或亚群的抗原,所述细胞群或亚群为例如血细胞群或亚群,如淋巴细胞(例如T细胞、T辅助细胞,如CD4+T辅助细胞,B细胞或天然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,例如CD34+外周干细胞或表达Nanog或Oct-4的干细胞。T细胞的例子包括如下细胞:例如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的示例性例子为CD4CD25CD45RA Treg细胞,记忆T细胞的示例性例子是CD62L CD8+特异性中心记忆T细胞。细胞表面分子可为肿瘤细胞标志物。

[0267] 如前所述,在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)除了具有能结合细胞表面分子的结合位点B以外,还具有结合伴侣C。在一些方面中,该结合伴侣C能够结合反应剂的结合位点Z,其中,反应剂具有针对结合伴侣C的一个或多个结合位点。在一些实施方式中,包含于作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中的结合伴侣C与反应剂的一个或多个结合位点Z之间可形成非共价键,该非共价键可为任何强度和亲和力,且可在实施该方法的条件下被破坏或逆转。作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可包括至少1个、至少2个、3个或更多个额外的结合伴侣C,反应剂可包括至少2个,例如3、4、5、6、7、8或更多个针对作用剂(例如受体结合剂或选择剂)所含结合伴侣C的结合位点Z。如美国专利7,776,562、美国专利8,298,782或国际专利申请公开号No.WO 2002/054065中所述,可选择结合伴侣和具有一个或多个相应结合位点Z的反应剂的任何组合,例如使得结合伴侣C和结合位点Z能够在复合物中可逆结合,以例如产生亲合力(avidity)效果。

[0268] 作用剂(例如受体结合剂或选择剂)所包含的结合伴侣C可例如基于烃的(包括聚合的),且包括氮-、磷-、硫-、碳-、卤素-或拟卤素基团。在一些方面中,其可为醇、有机酸、无机酸、胺、磷、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。作为进一步的例子,其还可为阳离子、阴离子、聚阳离子、聚阴离子、聚合阳离子、电解质、聚电解质、碳纳米管或碳纳米泡沫。通常,该结合伴侣C对反应剂结合位点的亲和力高于对其他物质的亲和力。相应结合伴侣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类结合分子。

[0269] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括生物素,反应剂包括可逆结合生物素的链霉亲和素类似物或亲和素类似物。在一些实施

方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括可逆结合链霉亲和素或亲和素的生物素类似物,反应剂包括可逆结合相应生物素类似物的链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物。在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括链霉亲和素或亲和素结合肽,反应剂包括可逆结合相应链霉亲和素或亲和素结合肽的链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物。

[0270] 在一些实施方式中,反应剂是链霉亲和素,例如任何如上所述的链霉亲和素突变蛋白(例如,如SEQ ID NO:3-6所示),作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C可包括链霉亲和素结合肽。在一些实施方式中,链霉亲和素结合肽可包含SEQ ID NO:9所示通式的序列,例如包含SEQ ID NO:10所示序列。在一些实施方式中,肽序列具有SEQ ID NO:11所示的通式,例如SEQ ID NO:12所示。在一个实例中,肽序列为Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(也称**Strep-tag®**,如SEQ ID NO:7所示)。在一个实例中,肽序列为Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称**Strep-tag® II**,如SEQ ID NO:8所示)。在一些实施方式中,肽配体包含依次排列的至少两个链霉亲和素-结合模块,其中,所述两个模块之间的距离是至少0个且不大于50个氨基酸,其中,一个结合模块具有3~8个氨基酸且至少包含序列His-Pro-Xaa(SEQ ID NO:9),其中Xaa是谷氨酰胺、天冬酰胺或甲硫氨酸,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,例如如SEQ ID NO:11所示(参见例如国际公开的PCT申请公开号W002/077018;美国专利号7,981,632)。在一些实施方式中,肽配体包含SEQ ID NO:13或14中任一所示的序列。在一些实施方式中,所述肽配体具有SEQ ID NO:15-19中任一项所示的氨基酸序列。在大部分情况中,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。如果将一个或多个链霉亲和素结合肽用作结合伴侣C(例如C1和C2),则多聚化反应剂通常为链霉亲和素突变蛋白。

[0271] 在一些实施方式中,链霉亲和素结合肽可被进一步修饰。在一些实施方式中,链霉亲和素结合肽可包括肽序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称**Strep-tag® II**,如SEQ ID NO:8所示),该肽序列偶联于镍填充的trisNTA(也称为His-STREPPE或His/**Strep-tag® II**衔接体)。

[0272] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的结合伴侣C包括本领域技术人员已知作为亲和标签的部分。此类实施方式中,反应剂可包括已知结合该亲和标签的相应结合伴侣,例如抗体或抗体片段。作为已知亲和标签的一些示例性例子,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C可包括:二硝基苯酚或地高辛、寡聚组氨酸、多聚组氨酸、免疫球蛋白结构域、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、甲壳素结合蛋白(CBP)或硫氧还蛋白、钙调蛋白结合肽(CBP)、FLAG-肽、HA-标签(序列:Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala)(SEQ ID NO:20)、VSV-G-标签(序列:Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys)(SEQ ID NO:21)、HSV-标签(序列:Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp)(SEQ ID NO:22)、T7表位(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)(SEQ ID NO:22)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、单纯疱疹病毒糖蛋白D的序列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp(SEQ ID NO:24)的HSV表位、序列为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)。在此类实施方式中,反应剂(可为抗体或抗体片段)的一个或多个结合位点Z和抗原之间形成的复合物能通过加入游离抗原(即游离肽(表位标签))或游离蛋白质(例如MBP或CBP)被竞争性破坏。在一些实施方式中,亲和标签还可为寡核苷酸标签。在一些情况中,该寡核苷酸标签可例如用于杂交反应剂中所连接或包含的具有互补序列的寡核苷酸。

[0273] 适合的结合伴侣C的其他例子包括但不限于:凝集素、蛋白A、蛋白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、甲壳素、谷胱甘肽、钙调蛋白、明胶、多粘菌素、肝素、NAD、NADP、赖氨酸、精氨酸、苄脒、多聚U、或寡聚-dT。凝集素(例如伴刀豆蛋白A)已知可结合多糖或糖基化蛋白。染料的示例性例子是三嗪染料染料,例如Cibacron蓝F3G-A(CB)或Red HE-3B,其特异性结合NADH依赖性酶类。通常,Green A结合Co A蛋白、人血清白蛋白以及脱氢酶。在一些情况中,染料7-氨基放线菌素D和4',6-二脒基-2苯基吡啶结合DNA。通常,金属(例如Ni、Cd、Zn、Co或Cu)的阳离子常被用于结合亲和标签,例如包含寡聚组氨酸的序列,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)和N-甲基丙烯酰基-(L)-半胱氨酸甲酯。

[0274] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C与反应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,在一些实施方式中,反应剂包括二价、三价或四价阳离子,通常由合适的螯合剂容纳(例如复合)。在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C可包括含(例如复合)二价、三价或四价阳离子的部分。相应金属螯合剂的例子包括但不限于:乙二胺、乙二胺四乙酸盐(EDTA)、乙二醇四乙酸(ETGA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、N,N-双(羧甲基)甘氨酸(也称次氨基三乙酸,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)、吡吩和亚铁血红素。作为例子,EDTA与大部分单价、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^+)和锆(Zr^{4+}))形成复合物,而BAPTA特异于 Ca^{2+} 。作为示例性的离子,用于本领域的标准方法是形成寡聚组氨酸标签与铜(Cu^{2+})、镍(Ni^{2+})、钴(Co^{2+})或锌(Zn^{2+})离子之间的复合物,这些离子由螯合剂次氨基三乙酸(NTA)呈递。

[0275] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括钙调蛋白结合肽,反应剂包括多聚化钙调蛋白,例如如美国专利5,985,65中所描述。在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括FLAG肽,反应剂包括结合FLAG肽的抗体,例如结合单克隆抗体4E11的FLAG肽,如美国专利4,851,341中所述。在一个实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C包括寡聚组氨酸标签,反应剂包括结合该寡聚组氨酸标签的抗体或过渡金属离子。在一些情况中,对所有这些结合复合物的破坏可通过金属离子螯合(例如钙螯合,如通过加入EDTA或EGTA)完成。在一些实施方式中,钙调蛋白、抗体(例如4E11)或螯合的金属离子或游离螯合剂可通过常规方法多聚化,例如在第一步中基本如Noguchi,A等,Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137所述,通过生物素化以及与链霉亲和素或亲和素或其寡聚物的络合,或通过多糖(例如葡聚糖)中引入羧基残基,并在第二步中采用常规的碳二亚胺化学法,通过伯氨基团将钙调蛋白或抗体或螯合的金属离子或游离螯合剂连接于多糖(如葡聚糖)骨架中的羧基。

在一些此类实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)中所包含的结合伴侣C与反应剂的一个或多个结合位点Z之间的结合通过金属离子螯合被破坏。金属螯合可例如通过加入EGTA或EDTA完成。

[0276] 在一些实施方式中,特异性结合细胞表面分子的作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可例如包括抗体、其片段、或具有抗体样功能的蛋白质类结合分子。在一些实施方式中,作用剂的结合位点B是抗体结合位点,如为或包含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,例如F(ab)₂'-片段、双抗体、三抗体(Iliades,P.等.,FEB S Lett (1997) 409,437-441)、八抗体(Stone,E.等,Journal of Immunological Methods (2007) 318,88-94)和其他结构域抗体(Holt,L.J.等,Trends Biotechnol. (2003),21,11,484-490)。在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可包括二价蛋白质类人工结合分子,例如二聚脂质运载蛋白突变蛋白(也称双运载蛋白“duocalin”)。

[0277] 在一些实施方式中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可具有单个结合位点B,即其可为单价。单价作用剂(例如受体结合剂或选择剂)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类结合分子或MHC分子。单价抗体片段的例子包括但不限于:Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv),包括二价单链Fv片段。

[0278] 在一些实施方式中,作用剂为抗体或其抗原结合片段,例如Fab片段、Fv片段、单链Fv片段(scFv)、二价抗体片段,如F(ab')₂片段。在一些实施方式中,作用剂为或衍生自已知结合感兴趣细胞分子的亲本抗体。各种抗细胞表面分子的抗体分子或其片段在本领域中是熟知的,此种任何均可用作本文所述方法中的作用剂。在一些实施方式中,作用剂是在其亲本或参考抗体的可变重链中具有一个或多个氨基酸替代的抗体或其片段,例如以产生具有如上所述的改变的亲和力或显示足够快速的解离速率的抗体。例如,此类突变的示例已知以抗CD4抗体13B8.2为背景(参见例如美国专利No.7,482,000、美国专利申请公开No.US2014/0295458或国际专利申请公开No.WO2013/124474),可在其他亲本或参比抗体中产生任何此类突变。

[0279] 在一些方面中,作用剂(例如受体结合剂或选择剂)可为单价,例如包含单价抗体片段或单价人工结合分子(蛋白质类或其他),例如基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白(也称“Anticalin®),或为二价分子,例如两个结合位点均保留的抗体或片段(如F(ab')₂片段)。

[0280] 具有抗体样功能的蛋白质类结合分子的例子包括基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白(参见例如WO 03/029462,Beste等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. (1999) 96,1898-1903)。通常,脂质运载蛋白,如胆汁三烯结合蛋白(bilin binding protein)、人嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、人Apo脂质蛋白D或人泪液脂质运载蛋白,具有的天然配体结合位点可被修饰的从而使其结合所定目标。可用作特异性结合细胞表面分子的作用剂(例如受体结合剂或选择剂)的具有抗体样功能的蛋白质类结合分子的其他例子包括但不限于:所谓的糖体(参见例如国际专利申请公开No.WO 96/23879)、基于锚蛋白骨架的蛋白质(Mosavi,L.K.等,Protein Science (2004) 13,6,1435-1448)或基于晶体骨架的蛋白质(例如国际专利申请公开No.WO01/04144)、Skerra所描述的蛋白质(J.Mol.Recognit. (2000) 13,167-187)、阿迪连接素(AdNectins)、四连接素和阿维多聚体(avimers)。通常,包

括由人受体结构域家族的外显子改组而成的多价阿维多聚体蛋白的阿维多聚体包含所谓的A-结构域,该结构域在数种细胞表面受体中呈现为多个结构域的串(Silverman,J.等,Nature Biotechnology (2005) 23,1556-1561)。阿迪连接素(通常衍生自人纤连蛋白结构域)代表性地包含3个环,其可被工程化改造用于免疫球蛋白样结合靶标(Gill,D.S.& Damle,N.K.,Current Opinion in Biotechnology (2006) 17,653-658)。四连接素(通常衍生自相应的人同三聚蛋白)同样代表性地包含C型连接素结构域中包含环结构域,其可被工程化改造用于所需的结合。在一些情况中可用作蛋白质配体的类肽通常为寡聚(N-烷基)甘氨酸,其与肽的去边在于侧链与酰胺氮连接而非与碳原子连接。类肽通常耐受蛋白酶和其他修饰酶,且可比肽具有高得多的细胞穿透性(参见例如Kwon,Y.-U.和Kodadek,T.,J.Am.Chem.Soc. (2007) 129,1508-1509)。

[0281] 合适的蛋白质类结合分子的其他例子包括但不限于:EGF样结构域、环状(Kringle)结构域、I型纤连蛋白结构域、II型纤连蛋白结构域、III型纤连蛋白结构域、PAN结构域、Gla结构域、SRCR结构域、库尼茨(Kunitz)/牛胰脏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、三叶草(P型)结构域、C型血管性血友病因子结构域、过敏毒素样结构域、CUB结构域、I型甲状腺球蛋白重复、LDL受体A类结构域、寿司(Sushi)结构域、连接(Link)结构域、I型血小板反应蛋白结构域、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型连接素结构域、MAM结构域、A型血管性血友病因子结构域、生长调节素B结构域、WAP型四二硫化物核心结构域、C型F5/8结构域、血液结合素结构域、SH2结构域、SH3结构域、层连蛋白型EGF样结构域、C2结构域、“κ体(Kappabodies)”(Ill等,Protein Eng (1997) 10,949-57)、所谓“迷你体”(Martin等,EMBO J (1994) 13,5303-5309)、双抗体(Holliger等,PNAS USA (1993) 90,6444-6448)、所谓“Janusis”(Traunecker等,EMBO J (1991) 10,3655-3659或Traunecker等,Int J Cancer (1992) 增刊7,51-52)、纳米体、微体、粘合素(affilin)、亲和体、绳结蛋白(knottin)、泛素、锌指蛋白、自荧光蛋白或富亮氨酸重复蛋白。在一些实施方式中,具有抗体样功能的核酸分子可为适体。通常,适体折叠成确定的三维基序,并对给定目标结构具有高亲和力。

[0282] 1. 受体结合剂

[0283] 在一些实施方式中,作用剂为受体结合剂。在一些实施方式中,受体结合剂结合于细胞表面上的分子(例如受体),该作用剂与该分子之间的结合能够诱导或调节细胞中的信号。在一些情况中,细胞表面分子(例如受体)是信号转导分子。在一些此类情况中,受体结合剂能够特异性结合由一个或多个细胞表达的信号转导分子。在一些情况中,受体结合剂是刺激剂,其可为结合细胞表面分子(例如受体)时能够诱导细胞(例如T细胞)中信号的任何作用剂。在一些实施方式中,信号可为免疫刺激信号,在该情况中,受体结合剂或刺激剂能够诱导或调节涉及或刺激细胞(例如T细胞)免疫应答的信号,所述免疫应答为例如增加免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞活化、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒活性或免疫细胞的一种或多种其他功能性活性。在一些实施方式中,信号可为抑制性信号,在该情况中,受体结合剂或刺激剂能够诱导或调节细胞(例如T细胞)中涉及或抑制免疫应答的信号,例如抑制或减少免疫细胞增殖或扩增、免疫细胞活化、免疫细胞分化、细胞因子分泌、细胞毒活性或免疫细胞的一种或多种其他功能性活性。

[0284] 在一些实施方式中,受体结合剂(例如刺激剂)是第一受体结合剂(例如第一刺激

剂)。在一些方面,第一受体结合剂结合细胞表面的受体分子。因此,在一些情况中,第一受体结合剂(例如第一刺激剂)诱导或调节信号。在一些方面中,通过第一受体结合剂(例如第一刺激剂)的信号诱导或调节影响细胞活化、刺激和/或扩增(增殖)。因此,在一些情况中,第一受体结合剂(例如第一刺激剂)为细胞提供主活化,从而活化细胞。

[0285] 在一些实施方式中,细胞群可以是淋巴细胞群,包括B细胞群、T细胞群或天然杀伤细胞群。细胞群的示例性例子是带有CD40或CD137的B细胞(两种细胞群可在仅结合提供活化信号的第一作用剂如4-1BB配体; α CD40抗体分子或 α CD137抗体分子时活化(参见例如Zhang等,2010,J Immunol,184:787-795))。可用于B细胞扩增的作用剂(第一或第二)的其他示例性例子为结合IgG、CD19、CD28或CD14的作用剂,例如 α CD19、 α IgG、 α CD28或 α CD14抗体分子或其抗原结合片段。还预期用于B细胞扩增的第一或第二作用剂可包括针对tol1样受体或白介素(例如IL-21)的配体(参见例如Dienz 0等,2009.J.Exp.Med.206:69)。尤其,本发明的实施方式中还包括脂多糖依赖性B细胞活化,因为脂多糖也可用作第一作用剂,且能配置本文所用的结合伴侣C1。

[0286] 适合的细胞群的其他示例性例子包括:第一作用剂与TCR/CD3结合且第二作用剂与T细胞上辅助分子(例如CD28)结合而活化后扩增的T细胞群。此外,第一作用剂刺激T细胞中TCR/CD3复合物相关信号,第二作用剂通过结合作为辅助分子的CD28提供第二刺激。可用于T细胞扩增的作用剂还可包括白介素,例如IL-2、IL-7、IL-15或IL-21(参见例如Cornish等,2006,Blood.108(2):600-8,Bazdar和Sieg,2007,Journal of Virology,2007,81(22):12670-12674,Battalia等,2013,Immunology,139(1):109-120)。可用于T细胞扩增的作用剂的其他示例性例子是结合CD8、CD45或CD90的作用剂,例如 α CD8、 α CD45或 α CD90抗体。T细胞群的示例性例子包括:抗体特异性T细胞、T辅助细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(记忆T细胞的示例性例子是CD62L⁺CD8⁺特异性中心记忆T细胞)或调节性T细胞(Treg的示例性例子为CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺Treg细胞)。

[0287] 适合的细胞群的其他示例性例子包括:天然杀伤细胞(NK细胞),其可例如用结合CD16或CD56的作用剂(例如 α CD16或 α CD56抗体)扩增。此类 α CD16抗体的示例性例子是抗体3G8,其VH序列如SEQ ID NO:36所示,VL序列如SEQ ID NO:37所示(参见例如Hoshino等,Blood.1991Dec 15;78(12):3232-40.)。可用于NK细胞扩增的其他作用剂可为IL-15(参见例如Vitale等,2002.The Anatomical Record.266:87-92)。适合的细胞群的其他示例性例子包括单核细胞,例如,其可用结合CD14的作用剂(例如 α CD14抗体分子)扩增。

[0288] 在一些实施方式中,第一受体结合剂(例如第一刺激剂)可在细胞(例如T细胞)中刺激TCR/CD3复合物相关的信号。在一些方面中,第一受体结合剂(例如第一刺激剂)可为特异性结合CD3的结合剂。在一些情况中,特异性结合于CD3的第一受体结合剂(例如第一刺激剂)可选自下组:抗CD3抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD3结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段、或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自下组:Fab片段、Fv片段以及单链Fv片段(scFv)。一些情形中,具有抗体样结合特性的蛋白质类CD3结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、阿迪连接素或阿维多聚体。

[0289] 在一些实施方式中,抗CD3Fab片段可衍生自由淋巴瘤细胞系OKT3(ATCC® CRL-

8001TM；也可参见美国专利No.4,361,549)生产的CD3结合单克隆抗体。抗CD3抗体OKT3的重链可变区和轻链可变区可见Arakawa等, J.Biochem.120,657-662 (1996), 且分别包含SEQ ID NO:31和32所示的氨基酸序列。

[0290] 在一些实施方式中,受体结合剂(例如刺激剂)是第二受体结合剂(例如第二刺激剂)。在一些情况中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)结合细胞表面上的分子(如细胞表面分子,例如受体分子)。在一些实施方式中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)能够增强、减弱或改变通过第一分子递送的信号。在一些实施方式中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)诱导或调节信号(例如第二或额外信号)。在一些方面中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)可增强或加强由第一受体结合剂(例如第一刺激剂)诱导的信号。在一些实施方式中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)结合辅助分子和/或能刺激或诱导细胞中的辅助或第二信号。在一些方面中,第二受体结合剂(例如第二刺激剂)结合共刺激分子和/或提供共刺激信号。

[0291] 一些实施例中,受体结合剂(例如刺激剂),其可为第二受体结合剂(例如第二刺激剂),结合(例如特异性结合)第二分子,该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、免疫检查点或TFN家族或TNF受体家族的成员。

[0292] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为CD28,且受体结合剂,例如刺激剂(例如其可为第二受体结合剂,如第二刺激剂)特异性结合CD28。在一些方面中,特异性结合于CD28的受体结合剂(例如刺激剂),例如其可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂),可选自下组:抗CD28抗体、抗CD28抗体的二价抗体片段、抗CD28抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD28结合分子。二价抗体片段可为F(ab')₂片段、或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自下组:Fab片段、Fv片段以及单链Fv片段(scFv)。具有抗体样结合特性的蛋白质类CD28结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、阿迪连接素和阿维多聚体。

[0293] 在一些实施方式中,抗CD28Fab片段可衍生自抗体CD28.3(作为合成单链Fv构建体保藏,GenBank登录号No.AF451974.1;还可参见Vanhove等,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页),其重链和轻链分别包含SEQ ID NO:33和34。

[0294] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为CD90,且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD90。在一些方面中,特异性结合于CD90的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组:抗CD90抗体、抗CD90抗体的二价抗体片段、抗CD90抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD90结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。参见例如,抗CD90抗体G7(Biolegend公司,目录号105201)。

[0295] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为CD95,且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD95。在一些方面中,特异性结合于CD95的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组:抗CD95抗体、抗CD95抗体的二价抗体片段、抗CD95抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD95结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。例如,在一些方面中,抗CD90抗体可为单克隆小鼠抗人CD95CH11(Upstate Biotechnology公司,普莱西德湖(Lake Placid),NY),或可为抗CD95mAb 7C11或

抗-AP0-1,例如Paulsen等,Cell Death&Differentiation(“细胞死亡和分化”)18.4(2011):619-631中所描述。

[0296] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞或B细胞)表面上的分子可为CD137,且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD137。在一些方面中,特异性结合于CD137的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组:抗CD137抗体、抗CD137抗体的二价抗体片段、抗CD137抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD137结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。例如,抗CD137抗体可为LOB12、IgG2a或LOB12.3、IgG1(如Taraban等,Eur J Immunol.2002年12月;32(12):3617-27中所描述)。还可参见例如US6569997、US6303121、Mittler等,Immunol Res.2004;29(1-3):197-208。

[0297] 在一些实施方式中,细胞(例如B细胞)表面上的分子可为CD40,且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD40。在一些方面中,特异性结合于CD40的受体结合剂(其可为第二受体结合剂,如第二刺激剂)可选自下组:抗CD40抗体、抗CD40抗体的二价抗体片段、抗CD40抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD40结合分子。

[0298] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为CD40L(CD154),且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD40L。在一些方面中,特异性结合于CD40L的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组:抗CD40L抗体、抗CD40L抗体的二价抗体片段、抗CD40L抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD40L结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。例如,在一些方面中,抗CD40L抗体可为Hu5C8,如Blair等,JEM第191卷,第4期,651-660中所述。还可参见例如W01999061065、US20010026932、US7547438、W02001056603。

[0299] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为诱导型T细胞共刺激因子(ICOS),且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合ICOS。在一些方面中,特异性结合于ICOS的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组: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、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类ICOS结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。参见例如US20080279851和Deng等,Hybrid Hybridomics.2004Jun;23(3):176-82。

[0300] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为活化T细胞的接头(LAT),且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合LAT。在一些方面中,特异性结合于LAT的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)可选自下组: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、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类LAT结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。

[0301] 在一些实施方式中,细胞(例如T细胞)表面上的分子可为CD27,且受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二刺激剂)特异性结合CD27。在一些方面中,特异性结合于CD27的受体结合剂(例如刺激剂)(其例如可为第二受体结合剂,例如第二

刺激剂) 可选自下组: 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、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD27结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。参见例如W02008051424。

[0302] 在一些实施方式中, 细胞(例如T细胞) 表面上的分子可为OX40 (CD134), 且受体结合剂(例如刺激剂) (其例如可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 特异性结合OX40。在一些方面中, 特异性结合于OX40的受体结合剂(例如刺激剂) (其例如可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 可选自下组: 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、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类OX40结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。参见例如W02013038191、Melero等, Clin Cancer Res. 2013年3月1日; 19 (5): 1044-53。

[0303] 在一些实施方式中, 细胞(例如T细胞) 表面上的分子可为HVEM, 且受体结合剂(例如刺激剂) (其例如可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 特异性结合HVEM。在一些方面中, 特异性结合于HVEM的受体结合剂(例如刺激剂) (其例如可为第二受体结合剂, 例如第二刺激剂) 可选自下组: 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、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类HVEM结合分子。抗体或抗原结合片段可衍生自本领域中已知的任何一种。参见例如W02006054961、W02007001459、Park等, Cancer Immunol Immunother. 2012年2月; 61 (2): 203-14。

[0304] 以上任一例举中, 二价抗体片段可为F(ab')₂片段、或二价单链Fv片段, 而单价抗体片段可选自下组: Fab片段、Fv片段以及单链Fv片段(scFv)。以上任一例举中, 具有抗体样结合特性的蛋白质类结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、阿迪连接素和阿维多聚体。

[0305] 在一些方面中, 受体结合剂(例如刺激剂) 特异性靶向目标细胞表面上表达的分子, 其中所述分子为TCR或嵌合抗原受体。例如, 目标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、CD3ζ、T细胞受体或B细胞受体的抗原结合部分、或嵌合抗原受体。在一些情况中, 受体结合剂靶向肽: MHC I类复合物。

[0306] 在一些实施方式中, 刺激剂结合目标细胞表面上表达的分子的带His-标签胞外区。在一些情况中, 刺激剂包含肽序列Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(也称**Strep-tag® II**, 如SEQ ID NO: 8所示), 该肽序列偶联于镍填充的trisNTA(也称为His-STREPPE或His/**Strep-tag® II**衔接体)。在一些实施方式中, 带有His标签的目标细胞表面表达分子是CD19。

[0307] 在一些方面中, 受体结合剂(例如刺激剂) 特异性结合重组受体(例如CAR) 的抗体部分。在一些情况中, 重组受体的抗体部分包括免疫球蛋白恒定区的至少部分, 如铰链区, 例如, IgG4铰链区, 和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方式中, 恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1) 的。在一些情况中, 反应剂加载有识别IgG4间隔子的αIgG。

[0308] 2. 选择剂

[0309] 在一些实施方式中, 作用剂是选择剂。在一些实施方式中, 选择剂结合细胞表面上的分子例如细胞表面分子。在一些情况中, 细胞表面分子是选择标志物。在一些情况中, 选择剂能够特异性结合一个或多个细胞表达的选择标志物。在一些实施方式中, 能够可逆结合反应剂的一种或多种选择剂可用于促进细胞的选择或分离。

[0310] 在一些方面中,细胞表面分子(例如选择标志物)可为限定所需细胞群或亚群的抗原,所述细胞群或亚群为例如血细胞群或亚群,如淋巴细胞(例如T细胞、T辅助细胞,如CD4+T辅助细胞,B细胞或天然杀伤细胞)、单核细胞或干细胞,例如CD34+外周干细胞或表达Nanog或Oct-4的干细胞。在一些实施方式中,选择标志物可为T细胞或T细胞亚组表面表达标志物,例如CD25、CD28、CD62L、CCR7、CD27、CD127、CD3、CD4、CD8、CD45RA和/或CD45RO。T细胞的例子包括如下细胞:例如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的示例性例子包括CD4CD25CD45RA Treg细胞,记忆T细胞的示例性例子包括CD62L CD8+特异性中心记忆T细胞。细胞表面分子(例如选择标志物)也可作为肿瘤细胞标志物。

[0311] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD4,且选择剂特异性结合CD4。在一些方面中,特异性结合CD4的选择剂可选自下组:抗CD4抗体、抗CD4抗体的二价抗体片段、抗CD4抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD4结合分子。在一些实施方式中,抗CD4抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD4Fab片段)可衍生自抗体13B8.2或保持特异性结合CD4的13B8.2功能活性突变体。例如,抗体13B8.2或m13B8.2的示例性突变体描述于美国专利No.482,000、美国专利申请No.US2014/0295458或国际专利申请公开号No.WO2013/124474;以及Bes,C等,J Biol Chem 278,714265-14273(2003)。命名为“m13B8.2”的突变Fab片段带有结合CD4的小鼠抗体13B8.2可变区,并且其恒定区包含人恒定CH1区,重链为 γ 型,轻链为 κ 型(如美国专利7,482,000中所述)。在一些实施方式中,抗CD4抗体(例如抗体13B8.2的突变体)在可变轻链中包含氨基酸替代H91A,在可变轻链中包含氨基酸替代Y92A、在可变重链中包含氨基酸替代H35A和/或在可变重链中包含氨基酸替代R53A,以上各自均按照Kabat编号。在一些方面中,与13B8.2Fab片段的可变区相比,在m13B8.2中,轻链第91位的His残基(SEQ ID NO:30的第93位)突变为Ala,重链第53位的Arg残基(SEQ ID NO:29的第55位)突变为Ala。在一些实施方式中,可逆结合抗CD4或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-206或6-8000-205或6-8002-100;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0312] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD8,且选择剂特异性结合CD8。在一些方面中,特异性结合CD8的选择剂可选自下组:抗CD8抗体、抗CD8抗体的二价抗体片段、抗CD8抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD8结合分子。在一些实施方式中,抗CD8抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD8Fab片段)可衍生自抗体OKT8(例如ATCC CRL-8014)或其保持特异性结合CD8的功能活性突变体。在一些实施方式中,可逆结合抗CD8或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8003或6-8000-201;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0313] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD3,且选择剂特异性结合CD3。在一些方面中,特异性结合CD3的选择剂可选自下组:抗CD3抗体、抗CD3抗体的二价抗体片段、抗CD3抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD3结合分子。在一些实施方式中,抗CD3抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD3Fab片段)可衍生自抗体OKT3(例如ATCC CRL-8001;参见例如Stemberger等,PLoS One.2012;7(4):e35798)或仍然特异性结合CD3的其功能活性突变体。在一些实施方式中,可逆结合抗CD3或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-201、6-8001-100;IBA有限公

司,德国哥廷根)。

[0314] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD25,且选择剂特异性结合CD25。在一些方面,特异性结合CD25的选择剂可选自下组:抗CD25抗体、抗CD25抗体的二价抗体片段、抗CD25抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD25结合分子。在一些实施方式中,抗CD25抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD25Fab片段)可衍生自抗体FRT5(参见例如Stemberger等,20128)或仍然特异性结合CD25的其功能活性突变体。在一些实施方式中,可逆结合抗CD4或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-205或6-8000-207或6-8004-050;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0315] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD62L,且选择剂特异性结合CD62L。在一些方面,特异性结合CD62L的选择剂可选自下组:抗CD62L抗体、抗CD62L抗体的二价抗体片段、抗CD62L抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD62L结合分子。在一些实施方式中,抗CD62L抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD25Fab片段)可衍生自抗体DREG56(如ATCC HB300,见Stemberger等,2012)或仍然特异性结合CD62L的其功能活性突变体。在一些实施方式中,可逆结合抗CD62L或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-204或6-8005-050;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0316] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD45RA,且选择剂特异性结合CD45RA。在一些方面,特异性结合CD45RA的选择剂可选自下组:抗CD45RA抗体、抗CD45RA抗体的二价抗体片段、抗CD45RA抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD45RA结合分子。在一些实施方式中,抗CD45RA抗体(例如二价抗体片段或单价抗体片段,如CD45RA Fab片段)可衍生自抗体MEM56(如Millipore 05-1413,见Stemberger等,2012)或仍然特异性结合CD45RA的其功能活性突变体。在一些实施方式中,可逆结合抗CD45RA或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-208或6-8007-050;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0317] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD45RO,而选择剂特异性结合CD45RO。在一些方面,特异性结合CD45RO的选择剂可选自下组:抗CD45RO抗体、抗CD45RO抗体的二价抗体片段、抗CD45RO抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD45RO结合分子。在一些实施方式中,可逆结合抗CD45RO或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-209或6-8012-020;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0318] 在一些实施方式中,选择标志物可为CD154,而选择剂特异性结合CD154。在一些方面,特异性结合CD154的选择剂可选自下组:抗CD154抗体、抗CD154抗体的二价抗体片段、抗CD154抗体的单价抗体片段、以及具有抗体样结合特性的蛋白质类CD154结合分子。在一些实施方式中,可逆结合抗CD154或其片段的反应剂是市售可获得的或衍生自市售可获得的反应剂(例如目录号6-8000-202或6-5510-050;IBA有限公司,德国哥廷根)。

[0319] 以上任一例举中,二价抗体片段可为F(ab')₂片段、或二价单链Fv片段,而单价抗体片段可选自下组:Fab片段、Fv片段以及单链Fv片段(scFv)。以上任一例举中,具有抗体样结合特性的蛋白质类结合分子可为适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、阿迪连接素和阿维多聚体。

[0320] III. 培养细胞的方法

[0321] 提供了通过在受体结合剂(例如刺激剂)的存在下培养或孵育包含目标细胞(例如

T细胞)的组合物来调节一个或多个细胞的方法,其中所述受体结合剂可逆结合反应剂,所述反应剂包含能够可逆结合该受体结合剂(例如刺激剂)的多个结合位点。在一些实施方式中,所述方法在一定条件下进行,通过所述条件使得刺激剂特异性结合目标细胞表面上表达的分子,由此在目标细胞中诱导或调节信号。

[0322] 在一些实施方式中,所提供的方法在支持物上进行,在该支持物中在至少部分孵育或培养过程中,多个目标细胞被固定在该支持物上。在一些方面中,能够与目标细胞相关或结合的多聚化反应剂或其他多聚化反应剂被固定在支持物上,从而多个目标细胞通过多聚化反应剂的结合剂与目标细胞间的结合固定在该支持物上。在一些实施方式中,反应剂可逆结合特异性结合目标细胞表面上分子的结合剂(如选择剂)。在一些实施方式中,固定于支持物(例如固定相(如柱))上的多聚化反应剂是与受体结合剂(例如刺激剂)可逆结合的可逆反应剂。在一些实施方式中,可逆结合受体结合剂(例如刺激剂)的多聚化反应剂是第一反应剂,而固定在支持物(例如于固定相(例如柱)中)的多聚化反应剂是第二反应剂。在一些方面中,第一反应剂可为加载于柱上的可溶反应剂。在一些方面中,第一反应剂也可固定于支持物上(例如于固定相(例如柱)中)。

[0323] 在一些实施方式中,所提供的培养细胞的方法包括:在作用剂(例如第一、第二受体结合剂,例如刺激剂或选择剂)的存在下,孵育包含目标细胞(例如T细胞)的组合物,其中,所述作用剂能够结合组合物中目标细胞(例如T细胞)表面上的分子、且可逆结合包含能够可逆结合该作用剂的多个结合位点的反应剂。在一些实施方式中,孵育在该作用剂结合(例如特异性结合)细胞上所述分子的条件下进行。在一些情况中,如所描述,对于一些受体结合剂(例如刺激剂),该结合可诱导或调节组合物中目标细胞(例如T细胞)中的信号,例如主要信号或辅助信号。在一些实施方式中,作用剂与所述分子的结合造成如下一种或多种影响:组合物中目标细胞的刺激、活化、扩增(增殖)和/或分化。

[0324] 在一些实施方式中,所提供的方法能够用于选择性诱导细胞群(例如B细胞、T细胞或天然杀伤细胞)的离体扩增。在一些情况中,刺激可在没有外源性生长因子(例如淋巴因子)和辅助细胞的条件下进行。在一些实施方式中,无需抗原即可诱导这些细胞(例如B细胞或T细胞)的增殖,因此提供了一种扩增的细胞群(例如T细胞群),其就抗原反应性而言是多克隆的。提供本文所公开的方法可用于所选T细胞(例如CD4⁺或CD8⁺T细胞)群在延长时间段上的持续增殖,以使这些细胞的数量相对于原始T细胞群获得多倍增长。通常,在如本文所述的淋巴细胞群(克隆)扩增情况下,所有子代可与所选用于扩增的细胞群具有相同的抗原特异性。

[0325] 在一些实施方式中,所述方法涉及扩增抗原特异性T细胞群。在一些实施方式中,为了生产抗原特异性T细胞,使T细胞接触适于在T细胞中引发主要活化信号的抗原,即将该抗原递呈给T细胞从而在T细胞中通过TCR/CD3复合物引发信号。例如,可通过与MHC分子偶联的抗原递呈细胞将抗原递呈给T细胞。可将抗原递呈细胞(例如B细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞、或能将抗原递呈给T细胞的其他细胞)在抗原(例如可溶性抗原)的存在下与T细胞一起孵育,从而该抗原递呈细胞将该抗原递呈给该T细胞。或者,可将表达感兴趣抗原的细胞与T细胞一起孵育。例如,可将表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞与T细胞一起孵育以诱导肿瘤特异性应答。类似地,可将病原体(例如病毒)感染的细胞(其递呈该病原体的抗原)与T细胞一起孵育。在T细胞群的抗原特异性活化之后,可根据所提供的方

法扩增细胞。例如,建立其抗原特异性之后,可根据本文所述方法通过与抗CD3抗体(用作第一作用剂)和抗CD28抗体(用作第二作用剂)一起培养使T细胞扩增。在另一实施方式中,第一作用剂可为MHC I:肽复合物,其结合抗原特异性T细胞群。在该实施方式中,可使用任何已知且能与相应MHC I分子复合的抗原特异性肽。或者,也可将引发细胞扩增的受体的天然配体用作第一作用剂。例如,CD19胞外结构域可用于引起经转导而表达嵌合CD19结合抗原受体(CAR)的细胞的胞内信号转导级联活化。以上的示例性方面在实施例展示。

[0326] 在一些实施方式中,提供了培养细胞群的体外方法,其包括使包含组合物的样品与多聚化反应剂接触,其中所述组合物包含多个细胞。多聚化反应剂上具有可逆固定(结合于其上)的作用剂(第一或第二受体结合剂,例如刺激剂或选择剂),其可用于细胞的选择、刺激、扩增和/或分化。在一些实施方式中,作用剂为细胞提供主要活化信号,其中多聚化反应剂包含用于可逆结合该第一作用剂的至少一个结合位点Z。第一作用剂包含至少一个结合伴侣C1,其中该结合伴侣C1能够可逆结合多聚化反应剂的结合位点Z1,其中第一作用剂通过在结合伴侣C1和结合位点Z1之间的可逆键结合多聚化反应剂。第一作用剂结合细胞表面上的受体分子,从而为细胞提供主要活化信号,由此活化该细胞。

[0327] 在一些实施方式中,多聚化反应剂固定在支持物(例如固体表面)上。在一些实施方式中,多聚化反应剂不结合于支持物,例如不结合于固体表面或固定相。

[0328] 例如,在一些实施方式中,提供了扩增细胞群的体外方法,其包括:使包含细胞群的样品与多聚化反应剂接触,其中,该多聚化反应剂未固定在固体支持物上(即为可溶性形式)且结合了作用剂(第一或第二受体结合剂,例如刺激剂或选择剂),其可用于细胞的选择、刺激、扩增和/或分化。在一些实施方式中,为细胞提供主要活化信号的作用剂(例如第一作用剂)可逆结合多聚化反应剂。多聚化反应剂包含用于结合第一作用剂的至少一个结合位点(例如Z1),其中第一作用剂包含至少一个结合伴侣(例如C1),其中结合伴侣C1能够结合多聚化反应剂的结合位点Z1。在一些实施方式中,第一作用剂通过结合伴侣C1和结合位点Z1之间形成的键结合多聚化反应剂,且第一作用剂结合细胞表面上的受体分子,从而为该细胞提供主要活化信号,由此活化该细胞。在一些实施方式中,当使用可溶多聚化反应剂时,结合伴侣C(例如C1)与结合位点Z(例如Z1)之间的键无需为可逆键。

[0329] 例如,在一些实施方式中,所提供的方法还包括采用其上结合有第二作用剂(如辅助或共刺激分子)的多聚化反应剂,所述第二作用剂刺激细胞表面上的辅助分子。在一些情况中,多聚化反应剂固定在支持物(例如固体支持物或固定相)上。在一些实施方式中,多聚化反应剂未固定在支持物上,即为可溶性形式。在一些实施方式中,第二作用剂包含结合伴侣(例如C2),其中结合伴侣(例如C2)能够可逆结合多聚化反应剂的结合位点(例如Z2),其中第二作用剂通过结合伴侣C2和结合位点Z2之间形成的可逆键连接多聚化反应剂。在一些实施方式中,结合伴侣C1和结合位点Z1之间形成的键可为可逆键,结合伴侣C2和结合位点Z2之间形成的键可为可逆键。在该情况中,所述结合位点Z1和所述结合伴侣C1间可逆结合和/或所述结合位点Z2和所述结合伴侣C2间可逆结合的解离常数(Kd)可为 $10^{-2}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 。在一些方面中,如当多聚化反应剂未结合于支持物(例如不结合于固体支持物或固定相)时,结合伴侣C1和结合位点Z1之间形成的键可为不可逆键,和/或结合伴侣C2和结合位点Z2之间形成的键也可不可逆键。

[0330] 在一些情况中,第二作用剂结合细胞表面上的辅助分子,从而刺激细胞活化。在该

实施方式中,第一作用剂可刺激T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号,且可为特异性结合CD3的结合剂。在该实施方式中,T细胞上的辅助分子可为CD28,结合该辅助分子的第二作用剂是特异性结合CD28的结合剂。或者,在一些实施方式中,发现也可采用靶向其他辅助分子,在一些情况下,其可例如改善培养细胞的一种或多种特征、性质或特点。在一些实施方式中,辅助分子可为如下分子中的一种或多种:CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM(例如,分别为抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、和抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体或抗HVEM抗体)。示例性作用剂,例如受体结合剂(如刺激剂)如下所述。

[0331] 在一些实施方式中,所提供的方法可在细胞群的活力至少基本不受影响的任何温度下进行。在一些实施方式中,孵育或培养进行的条件包括至少基本无害、没有不利或至少基本不影响活力的任何条件,例如在该条件下,以完全活力扩增的细胞群的百分比为至少70%,包括至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%。在一些实施方式中,所提供的方法在约20℃或更高的温度下进行。根据待扩增细胞群,适合的温度范围可为例如从约20℃~约45℃,包括从约25℃~约40℃,或从约32℃~37℃。在一些实施方式中,根据本发明的方法在恒定温度值下进行,或在所选温度值±约5℃、±约4℃、±约3℃、±约2℃、±约1℃或±约0.5℃下进行。本领域技术人员能够考虑细胞的性质和扩增条件,凭经验确定合适的温度。人细胞扩增的温度通常为例如37℃。

[0332] 根据本文所公开的内容,还提供了能够扩增细胞群的包含多聚化反应剂的组合物或多聚化的作用剂。能够扩增细胞群的该多聚化的作用剂是多聚化反应剂,该多聚化反应剂未结合于支持物(例如为可溶形式)、且包含用于可逆结合向细胞提供主要活化信号的第一作用剂的至少一个结合位点Z(例如Z1),其中该多聚化反应剂具有与其可逆结合的向细胞提供主要活化信号的所述第一作用剂;其中,该第一作用剂包含至少一个结合伴侣C(例如C1),其中该结合伴侣C1能够可逆结合多聚化反应剂的至少一个结合位点Z1,其中第一作用剂通过结合伴侣C1和结合位点Z1之间形成的可逆键结合多聚化反应剂。应注意到该多聚化反应剂可具有固定于其上的本文所述的任何第一作用剂。

[0333] 在一些实施方式中,本文所提供的多聚化的作用剂还可包含至少一个结合位点Z2以可逆结合刺激细胞表面上辅助分子的第二作用剂,其中多聚化反应剂具有与其可逆结合的刺激细胞表面上辅助分子的第二作用剂,其中第二作用剂包含结合伴侣(例如C2),其中结合伴侣C2能够结合多聚化反应剂的至少一个结合位点Z2。在该实施方式中,第二结合剂通过结合伴侣C2和结合位点Z2之间形成的键结合多聚化反应剂。在一些实施方式中,第二作用剂可结合如下分子中的一种或多种:CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM(例如,分别为抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、和抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体或抗HVEM抗体)。

[0334] 在一些实施方式中,在多聚化的作用剂(例如抗CD3/抗CD28链霉亲和素突变蛋白或其寡聚体)的存在下培养包含目标细胞(例如T细胞)的组合物可在生物反应器中进行,所述生物反应器为例如中空纤维生物反应器(例如Quantum®细胞扩增系统的中空纤维生物反应器)或塑料袋生物反应器(例如用于Xuri细胞扩增系统W25的Cellbag®,获自GE Healthcare公司)。

[0335] 在一些实施方式中,方法还包括使反应混合物(例如包含目标细胞,如T细胞,其通过例如第一作用剂和第二作用剂结合于多聚化反应剂)中的目标细胞(例如T细胞)接触:(i)竞争性反应剂,例如游离第一结合伴侣C(例如C1),或其能够破坏第一结合伴侣(例如C1)和结合位点(例如Z1)之间键的类似物,和/或(例如若需要)(ii)第二竞争性反应剂,例如游离第二结合伴侣(例如C2),或其能够破坏第二结合伴侣(例如C2)和结合位点(例如Z2)之间键的类似物。通过如此操作,第一作用剂的所述结合伴侣C1和所述结合位点Z1之间的可逆键、以及第二作用剂的所述结合伴侣C2和所述多聚化反应剂的结合位点Z2之间的可逆键被破坏,由此在洗脱液中释放通过第一作用剂和第二作用剂连接多聚化反应剂的T细胞,并停止对T细胞的刺激和/或扩增。

[0336] 在一些实施方式中,竞争性反应剂(例如第一和/或第二竞争性反应剂)在起始孵育后5天内加入,例如在起始孵育后的4天、3天、2天或1天内加入。因此,通过控制停止刺激的时间,从多聚化的作用剂洗脱的培养T细胞的一种或多种特定特征可被改变(如本文所述)。

[0337] 在一些实施方式中,方法还包括在成分的可逆解离后,分离或去除一种或多种剩余的成分。在一些实施方式中,培养的目标细胞(例如T细胞)中的任何未结合或残留的生物素可被分离或去除。在一些实施方式中,多聚化反应剂从培养的目标细胞组合物中的细胞移除或分离。例如,在一些实施方式中,分离/去除可采用第二固定相进行。为了该目的,包含目标细胞(例如T细胞)和多聚化反应剂的混合物在施加到如前所述的第一固定相上之前或之后,暴露于适当第二固定相上的色谱。该第二固定相可为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中该凝胶过滤和/或亲和色谱基质包含亲和反应剂。包含在色谱树脂上的亲和反应剂包括(特异性)结合多聚化反应剂的结合位点Z1和/或结合位点Z2(若存在)的结合伴侣D,从而将多聚化反应剂固定在固定相上。如果采用基于链霉亲和素的多聚化反应剂以及具有作为结合伴侣C1或C2的链霉亲和素结合肽的第一和第二作用剂,包含该第二固定相的亲和反应剂中的结合伴侣D可为生物素。然后,将用作多聚化反应剂的链霉亲和素或链霉亲和素突变蛋白可溶性寡聚体结合于通常共价偶联于色谱基质的生物素,所述色谱基质例如市售可获得的biotin-sepharoseTM。一些此类实施方式中,可从多聚化反应剂分离回收培养的细胞(例如培养的T细胞)。

[0338] A. 细胞

[0339] 在一些实施方式中,细胞群的样品可来自任何合适的来源,通常所有样品来自身体组织或体液,例如血液。在后者的情况中,样品可为例如外周血单核细胞(PBMC)群,其可通过标准分离方法(例如血细胞的Ficoll梯度)获得。待刺激或扩增的细胞群还可为纯化形式,可已采用可逆细胞染色/分离技术分离,如以下专利文献中所述:美国专利7,776,562、美国专利8,298,782、国际专利申请公开号W002/054065或国际专利申请公开号W02013/011011。或者,细胞群还可通过经负磁性免疫粘附细胞分选获得(如美国专利6,352,694B1或欧洲专利0 700 430B1中所述)。如果将本文所述的分离方法用于基础研究,则样品可为体外细胞培养试验的细胞。样品通常将被制备成流体形式,例如溶液或分散液。

[0340] 包含目标细胞的组合物中所含的细胞一般是真核细胞,例如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方式中,细胞衍生自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,或是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如,骨髓或淋巴样细胞,包括淋巴细胞,一般是T细

胞和/或NK细胞。其他示例性的细胞包括干细胞,如多能(multipotent)和多潜能(pluripotent)干细胞,包括诱导性多潜能干细胞(iPSC)。细胞一般是原代细胞,如直接从对象分离和/或从对象分离并冷冻的那些细胞。

[0341] 在一些实施方式中,本文所提供的可逆结合剂(例如多聚化的作用剂)能扩增淋巴细胞群或淋巴细胞群中所包含的亚群。待扩增的淋巴细胞群可为任何适合的群,例如B细胞群、T细胞群或天然杀伤细胞群。T细胞群可为抗原特异性T细胞群,T辅助细胞群、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、调节T细胞或天然杀伤T细胞群。因此,在此类多聚化的作用剂的实施方式中,第一作用剂能够刺激T细胞中的TCR/CD3复合物相关信号。多聚化的作用剂递呈的第一作用剂可由此为特异性结合CD3的结合反应剂,而结合辅助分子的第二作用剂,例如可为特异性结合CD28、CD137、CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM的结合剂。

[0342] 在一些实施方式中,细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个亚组,如全T细胞群、CD3⁺、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,如由功能、活化状态、成熟、分化潜力、扩增、再循环、定位、和/或持续能力、抗原特异性、抗原受体类型、特定器官或区室中的存在、标志物或细胞因子分泌概况,和/或分化程度限定的那些。关于待治疗的对象,细胞可以是同种异体和/或自体的。方法包括现成的方法。在一些方面,如对于现成的技术,细胞是多潜能和/或多能的,如干细胞,如诱导性多潜能干细胞(iPSC)。在一些实施方式中,该方法包括从对象分离细胞,对其进行制备、处理、培养和/或工程改造,如本文所述,并且在冷冻保存前或后将其回输给同一患者。

[0343] 在一些实施方式中,T细胞,例如CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺细胞未对其他标志物进一步富集。在一些实施方式中,T细胞未进一步富集CD62L⁺细胞。

[0344] T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺T细胞的亚型和亚群包括:原初T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFF})、记忆T细胞及其亚型,如记忆T干细胞(T_{SCM})、中心记忆T细胞(T_{CM})、效应记忆T细胞(T_{EM})、或终末分化的效应记忆T细胞、肿瘤-浸润性淋巴细胞(TIL)、不成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粘膜相关的非变体T(MAIT)细胞、天然产生的和过继性调节T(Treg)细胞、辅助T细胞,如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡辅助T细胞、 α/β T细胞,和 δ/γ T细胞。

[0345] 在一些实施方式中,细胞是自然杀伤(NK)细胞。在一些实施方式中,细胞是单核细胞或粒细胞,例如,骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞,和/或嗜碱性粒细胞。

[0346] 细胞的制备

[0347] 在一些实施方式中,细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。细胞可分离自样品,例如生物样品,如从对象获得或衍生自对象的样品。在一些实施方式中,从中分离细胞的对象是患有特定疾病或病症或需要细胞治疗或将接受细胞治疗的对象。在一些实施方式中,对象是需要特定治疗性介入的人,如过继细胞疗法,用于该疗法的细胞是经分离、加工和/或经工程改造的。

[0348] 因此,在一些实施方式中,所述细胞是原代细胞,例如,原代人细胞。所述样品包括直接取自对象的组织、液体和其它样品,以及获自一个或多个处理步骤,例如分离、离心、遗传工程改造(例如采用病毒载体的转导)、清洗和/或孵育的样品。所述生物样品可以是直接获自生物来源的样品或经处理的样品。生物样品包括但不限于,体液,例如血液、血浆、血

清、脑脊髓液、滑膜液、尿液和汗液,组织和器官样品,包括源自它们的经处理的样品。

[0349] 在一些方面,作为衍生或分离细胞来源的样品是血液或血液源性的样品,或者为或衍生自血浆分离置换法或白细胞去除术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检物、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关的淋巴样组织、粘膜相关的淋巴样组织、脾、其它淋巴样组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳腺、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其它器官,和/或源自其中的细胞。在细胞治疗(例如,过继细胞治疗)的情况下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0350] 在一些实施方式中,所述细胞源自细胞系,例如,T细胞系。在一些实施方式中,细胞获自异种异体来源,例如,获自小鼠、大鼠、非人灵长类或猪。

[0351] 在一些实施方式中,细胞的分离包括一个或多个制备和/或非基于亲和性的细胞分离步骤。在一些实施例中,细胞在一种或多种反应剂的存在下经清洗、离心和/或孵育,例如,以去除不需要的组分,富集所需组分,裂解或去除对一些反应剂敏感的细胞。在一些实施例中,细胞基于一种或多种特性如密度、粘附性质、尺寸、对一些组分的敏感性和/或抗性来分离。

[0352] 在一些实例中,例如,通过血浆分离置换法或白细胞去除术,获得来自对象循环血液的细胞。在一些方面,所述样品包括淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其它有核血液白细胞、血红细胞和/或血小板,在一些方面包括血红细胞和血小板之外的细胞。

[0353] 在一些实施方式中,从所述对象收集的血液细胞经清洗,例如,以移除血浆部分,并将该细胞置于合适的缓冲液或培养基中以供后续处理步骤。在一些实施方式中,所述细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗。在一些实施方式中,清洗溶液不含钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面中,清洗步骤按照生产商说明,通过半自动化的“流通”离心法(例如,Cobe 2991细胞处理器,百特公司(Baxter))完成。在一些方面中,清洗步骤按照生产商说明,通过内切流过滤(TFF)完成。在一些实施方式中,在清洗后,所述细胞在多种生物相容缓冲液中重悬,例如,无 Ca^{++} / Mg^{++} PBS。在某些实施方式中,血液细胞样品中的组分去除后细胞直接重悬于培养基中。

[0354] 在一些实施方式中,所述方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解血红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心来从外周血制备血液白细胞。

[0355] 在一些实施方式中,所述分离方法包括,基于细胞中一种或多种特定分子(例如表面标志物,如表面蛋白,胞内标志物或核酸)的表达或存在来分离不同的细胞类型。在一些实施方式中,可采用任何基于此类标志进行分离的已知方法。分离方法可包括本文所公开分离方法中的任何一种,包括采用可逆反应剂系统的方法,例如如本文所述,采用作用剂(如受体结合剂或选择剂)和反应剂的方法。

[0356] 在一些实施方式中,所述分离是基于亲和力或基于免疫亲和力的分离。例如,在一些方面,所述分离包括基于细胞的一种或多种标志物(通常是细胞表面标志物)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如,通过与特异性地结合此类标志物的抗体或结合伴侣孵育,随后通常是清洗步骤,将已结合所述抗体或结合伴侣的细胞与从未结合至所述抗体或结合伴侣的那些细胞分离。

[0357] 此类分离步骤可基于正选择,保留已结合所述反应剂的细胞被用于后续应用,和/或负选择,保留未结合至所述抗体或结合伴侣的细胞。在一些实施例中,两种级份均保留用

于后续应用。在一些方面,当没有可用于在异质群中特异性地鉴定细胞类型的抗体时,负选择可能是特别有用的,这样,分离最好是基于细胞表达的标志而不是基于想要的细胞群。

[0358] 所述分离的结果无需为特定细胞群或表达特定标志物的细胞的100%的富集或清除。例如,特定类型细胞(如表达某标志物的细胞)的正选择或富集指的是提高此类型细胞的数量或百分数,其结果不必是不表达该标志物的细胞完全消失。同样地,特定类型细胞(如表达某标志物的细胞)的负选择、清除或消除指的是减少此类细胞的数量或百分数,其结果不必是此类细胞的完全清除。

[0359] 在一些实施例中,进行多轮分离步骤,其中,对来自一个步骤的正或负选择的级份进行另一分离步骤,例如后续的正或负选择。在一些实施例中,单个分离步骤同时消除表达多种标志物的细胞,例如通过将细胞与分别对负选择目标标志具有特异性的多种抗体或结合伴侣一同孵育。同样地,可同时正选择多种细胞类型,通过将细胞与不同类型细胞上表达的多种抗体或结合伴侣一同孵育。

[0360] 例如,在一些方面中,T细胞的特定亚群,例如一种或多种表面标志物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,通过正或负选择技术分离。

[0361] 例如,CD3⁺、CD28⁺T细胞可以采用CD3/CD28磁珠(例如,DYNABEADS® M-450CD3/CD28T细胞扩增仪)来正选择。

[0362] 在一些实施方式中,分离通过如下方式进行:通过正选择富集特定细胞群,或通过负选择消除特定细胞群。在一些实施方式中,正或负选择通过将细胞与特异性地结合一种或多种表面标志物的一种或多种抗体或其它结合剂一同孵育来完成,所述一种或多种表面标志物分别在正选择或负选择的细胞上表达(标志物⁺)或高表达(标志物^高)。

[0363] 在一些实施方式中,通过对非T细胞(例如B细胞、单核细胞或其它血液白细胞)上表达的标志物(例如CD14)进行负选择来从PBMC样品分离T细胞。在一些方面,使用CD4⁺或CD8⁺选择步骤来分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过针对一种或多种原初、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对高表达的标志物进行正或负选择,可将此类CD4⁺和CD8⁺群进一步分选成亚群。

[0364] 在一些实施方式中,在CD8⁺细胞中进一步富集或消耗原初、中心记忆、效应记忆和/或中心记忆干细胞,例如通过基于相应亚群相关表面抗原的正选择或负选择。在一些实施方式中,富集中心记忆T(T_{CM})细胞以提高功效,如以改善长期存活、扩增和/或给予后的植入,在一些方面,其在此类亚群中特别强势。参见Terakura等.(2012) Blood. 1:72-82;Wang等(2012) J Immunother. 35 (9):689-701。在一些实施方式中,将T_{CM}-富集的CD8⁺T细胞与CD4⁺T细胞合并进一步增强功效。

[0365] 在实施方式中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻亚组。可在PBMC中富集或消除CD62L-CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺部分,例如采用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0366] 在一些实施方式中,针对中心记忆T(T_{CM})细胞的富集基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面中,其基于对CD45RA和/或粒酶B表达或高度表达的细胞进行负选择。在一些方面中,分离CD8⁺T_{CM}细胞富集群是通过如下方式进行:消除CD4、CD14、CD45RA表达细胞,并正选择或富集CD62L表达细胞。某一方面,富集中心记忆T(T_{CM})细胞从基于CD4表达的负选择细胞级分开始,对该级分进行基于CD14和CD45RA

表达的负选择和基于CD62L的正选择。在一些方面,这些选择同时进行,而在其它方面的内容中,这些选择按任意顺序依次进行。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用于产生CD4⁺细胞群或亚群,这样,基于CD4分离的阳性和阴性级分均被保留用于后续步骤,可以是任选地继以一种或多种进一步的正选择或负选择步骤之后。

[0367] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将辅助CD4⁺T细胞分选成原初、中心记忆和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可通过标准方法获得。在一些实施方式中,原初CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD4⁺T细胞。在一些实施方式中,中心记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺和CD45RO⁺。在一些实施方式中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻和CD45RO⁻。

[0368] 在某一实施例中,为了通过负选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物(cocktail)通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方式中,使所述抗体或结合伴侣结合至固体支持物或基质如磁珠或顺磁珠,从而能够分离正选择和/或负选择的细胞。例如,在一些实施方式中,所述细胞和细胞群采用免疫磁性(或亲和性磁性)分离技术分开(separated)或分离(isolated)(综述参见《分子医学方法》(Methods in Molecular Medicine),第58卷:代谢研究方法(Metastasis Research Protocols),第2卷:细胞体外和体内性能(Cell Behavior In Vitro and In Vivo),第17-25页,S.A.Brooks和U.Schumacher编© 新泽西州托托华的胡玛纳出版社(Humana Press Inc.))。

[0369] 在一些方面中,使待分离的样品或细胞组合物与小的可磁化或磁响应性材料(如磁响应性颗粒或微粒,例如顺磁珠(例如,Dynal珠或MACS珠))一起孵育。所述磁响应性材料(例如,颗粒)一般直接或间接连接结合伴侣(例如,抗体),其特异性地结合分子,例如需要分离(例如,需要进行负或正选择)的一种或多种细胞或细胞群上存在的表面标志物。

[0370] 在一些实施方式中,所述磁性颗粒或珠包括磁响应性材料,其结合特异性的结合部分,例如抗体或其它结合伴侣。有多种熟知的磁响应性材料用于磁性分离方法。合适的磁性颗粒包括描述于Molday,美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342B中的那些,其通过引用纳入本文。胶体定形的颗粒(Colloidal sized particles),例如描述于Owen美国专利号4,795,698的那些,而Liberti等,美国专利号5,200,084是其它实例。

[0371] 孵育一般在一定条件下进行,所述条件下所述抗体或结合伴侣或分子(如二抗或其它反应剂,其特异性地结合所述抗体或结合伴侣)连接所述磁性颗粒或珠,特异性地结合所述样品中的细胞上的细胞表面分子(如果存在)。

[0372] 在一些方面,将所述样品置于磁场中,并且,具有与其连接的磁性响应或可磁化颗粒的那些细胞将被磁体吸引,并与未标记的细胞分离。对于正选择而言,保留被磁体吸引的细胞;对于负选择而言,保留不被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面,在同一选择步骤过程中进行正和负选择的组合,其中,保留阳性和阴性部分,并进一步处理或进行进一步分离步骤。

[0373] 在某些实施方式中,磁响应性颗粒外包被一抗或其它结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素。在某些实施方式中,磁性颗粒通过一抗覆层连接细胞,所述一抗对一种或多种标志具有特异性。在某些实施方式中,所述细胞(而非珠)用一抗或结合伴侣标记,然后,添加细胞类型特异性的二抗或其它结合伴侣(例如,链霉亲和素)被覆的磁性颗粒。在某些实施方式中,链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化一抗或二抗联用。

[0374] 在一些实施方式中,使所述磁响应性颗粒连接和留在待后续孵育、培养和/或工程改造的细胞;在一些方面,使所述颗粒连接留在用于给予患者的细胞。在一些实施方式中,从所述细胞去除可磁化的或磁响应性颗粒。用于从细胞移去可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括,例如,采用竞争性非标记的抗体、可磁化颗粒或连接至可切割接头的抗体等。在一些实施方式中,可磁化颗粒是生物可降解的。

[0375] 在一些实施方式中,基于亲和性的选择通过磁性活化细胞分选(MACS)(加利福尼亚奥本的美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech))进行。磁性活化细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择其上连接有磁化颗粒的细胞。在某些实施方式中,MACS以如下模式操作:在施加外部磁场之后,依次洗脱非目标和目标物质。即,使连接磁化颗粒的细胞保持在原位,而洗脱未连接的物质。然后,在该第一洗脱步骤完成后,将滞留在磁场中且防止被洗脱的物质以使得它们可被洗脱和回收的某种方式释放。在某些实施方式中,标记非靶细胞并将其从异质细胞群中消除。

[0376] 在某些实施方式中,分离(isolation)或分开(separation)采用系统、器械或设备来进行,它们实施所述方法分离、细胞制备、分开、处理、孵育、培养和/或配制步骤中的一个或多个步骤。在一些方面,系统用以在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一步骤,为的是例如尽可能减少误差、用户操作和/或污染。在某一实施例中,所述系统是国际专利申请公开号W02009/072003或US 20110003380A1中描述的系统。

[0377] 在一些实施方式中,所述系统或设备在整合或自含独立系统中,和/或以自动化的或可编程的形式,进行例如分离、处理、工程改造和配制步骤中的一个或多个步骤,例如,全部步骤。在一些方面,所述系统或设备包括与所述系统或设备信息连通的计算机和/或计算机程序,其允许用户编程、控制、评估所述处理、分离、工程改造和配制步骤的结果,和/或调节所述处理、分离、工程改造和配制步骤的各方面。

[0378] 在一些方面中,使用CliniMACS系统(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotec))进行所述分离和/或其它步骤,例如,以供在封闭和无菌系统中进行临床级别水平的细胞的自动化分离。组件可包括整合的微型计算机、磁性分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面,集成计算机控制仪器的所有组件,并指示所述系统以标准化的顺序进行重复操作。在一些方面,磁性分离单元包括可移动的永久磁体和用于选择柱的握持装置(holder)。蠕动泵控制贯穿通过管组的流速,并且与夹管阀一起确保通过所述系统的缓冲液和连续细胞悬液的受控流速。

[0379] 在一些方面,CliniMACS系统使用以无菌、无热源溶液形式提供的抗体-偶联的可磁化颗粒。在一些实施方式中,在用磁性颗粒标记细胞之后,清洗细胞以去除过量的颗粒。然后,将细胞制备袋连与管组相连,管组再连接含缓冲液的袋和细胞收集袋。所述管组由预组装的无菌管道组成,包括前置柱和分离柱,并且仅用于单次使用。在分离程序启动之后,系统自动将细胞样品上样到分离柱。带标记的细胞保留在柱中,而未标记细胞则经一系列清洗步骤去除。在一些实施方式中,用于本文所述方法的细胞群是未标记的,不留在柱中。在一些实施方式中,用于本文所述方法的细胞群是经标记的,并且留在柱中。在一些实施方式中,撤去磁场之后从柱上洗脱用于本文所述方法的细胞群,并将其收集在细胞收集袋中。

[0380] 在某些实施方式中,分离和/或其它步骤采用CliniMACS Prodigy系统(美天旎生物技术公司)进行。在一些方面,CliniMACS Prodigy系统装配有细胞处理单元,所述细胞处

理单元允许自动化清洗和离心分级分离细胞。CliniMACS Prodigy系统还可包括内置相机和图像识别软件,通过辨别来源细胞产物的肉眼可见层来确定最优选细胞分级分离终点。例如,外周血可被自动分离成红细胞、血液白细胞和血浆层。CliniMACS Prodigy系统还可包括整合的细胞培育腔室,其完成细胞培养方案,例如,细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可允许无菌排出和补充培养基,细胞可采用整合的显微镜来监测。参见例如Klebanoff等.(2012) *J Immunother.* 35 (9) :651-660, Terakura等.(2012) *Blood.* 1:72-82, 和Wang等.(2012) *J Immunother.* 35 (9) :689701。

[0381] 在一些实施方式中,本文所述细胞群通过流式细胞术收集和富集(或消除),其中细胞经多种表面标志物染色并携载于流体流中。在一些实施方式中,本文所述的细胞群通过制备规模(FACS)-分选法收集和富集(或消除)。在某些实施方式中,本文所述的细胞群通过采用微电机系统(MEMS)芯片联合基于FACS的检测系统来收集和富集(或消耗)(参见例如,WO 2010/033140, Cho等(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 和Godin等(2008) *J Biophoton.* 1 (5) :355-376。在这两种情况中,细胞都可用多种标志物标记,以允许以高纯度分离明确的T细胞亚组。

[0382] 在一些实施方式中,抗体或结合伴侣用一种或多种可检测标志物标记,以利于正选择和/或负选择的分离。例如,分离可基于与荧光标记抗体的结合。在一些实例中,将基于对一种或多种细胞表面标志物具有特异性的抗体或其它结合伴侣的结合所进行的细胞分离携载于流体流中,例如通过荧光活化的细胞分选(FACS)(其包括制备规模(FACS)和/或微电机系统(MEMS)芯片),如与流式细胞术检测系统联合。此类方法允许进行基于多种标志物的同时正选择和负选择。

[0383] 在一些实施方式中,制备方法包括:冷冻步骤,例如,在分离、孵育和/或工程改造之前或之后,冻存所述细胞。在一些实施方式中,所述冷冻和后续融化步骤去除细胞群中的粒细胞,并且一定程度去除细胞群中的单核细胞。在一些实施方式中,例如,在清洗步骤以移除血浆和血小板之后,将所述细胞悬浮于冷冻溶液中。可采用各种已知冷冻溶液和一些方面的参数。例子质疑用到包含20%DMSO和8%人血清白蛋白(HAS)的PBS,或是其它合适的细胞冷冻培养基。然后,用培养基1:1将其稀释,使得DMSO和HSA的终浓度分别是10%和4%。然后,以1℃/分钟的速率将细胞冷冻至-80℃,并贮存在液氮储罐的汽相中。

[0384] 在一些实施方式中,在基因工程改造之前或与基因工程改造一起孵育和/或培养细胞。孵育步骤可包括培养、孵化、刺激、活化、和/或增殖。在一些实施方式中,在刺激条件或刺激剂存在下孵育细胞或组合物。这类条件包括设计成诱导群中细胞增殖、繁殖、活化,和/或存活,模拟抗原接触,和/或细胞预备以备基因工程化改造如导入重组抗原受体的那些条件。

[0385] 所述条件可包括如下一种或多种:具体培养基、温度、含氧量、二氧化碳含量、时间、试剂,例如,营养物、氨基酸、抗生素、离子,和/或刺激因子,例如细胞因子、趋化因子、抗原、结合伴侣、融合蛋白、重组可溶性受体,和经设计以活化细胞的任何其它试剂。

[0386] 在一些实施方式中,刺激条件或作用剂包括一种或多种作用剂,例如,配体,其能够活化TCR复合物的胞内信号转导结构域。在一些方面,作用剂打开或启动T细胞中的TCR/CD3胞内信号转导级联。这样的作用剂可包括抗体,例如对TCR组分和/或共刺激受体具有特异性的那些,例如,抗-CD3、抗-CD28,例如,其结合至固体支持物,例如珠,和/或一种或多种

细胞因子。任选地,扩增方法还可包括如下步骤:向培养基(如以至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体。在一些实施方式中,刺激剂包括IL-2和/或IL-15,例如,至少约10单位/mL浓度的IL-2。

[0387] 在一些方面,进行孵育的技术例如授予Riddell等的美国专利号6,040,177, Klebanoff等.(2012) J Immunother.35 (9):651-660, Terakura等.(2012) Blood.1:72-82 和/或Wang等.(2012) J Immunother.35 (9):689-701中所述的那些。

[0388] 在一些实施方式中,T细胞群通过如下方式扩增:在组合中添加饲养细胞,如非分裂型外周血单核细胞(PBMC), (例如,从而针对待扩增的初始群中的各T淋巴细胞,所得细胞群包含至少约5、10、20或40或更多PBMC饲养细胞);并孵育所述培养物(例如,培养足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面,所述非分裂型饲养细胞可包括经 γ -辐照的PBMC饲养细胞。在一些实施方式中,所述PBMC用约3000-3600拉德范围内的 γ 射线辐照以防止细胞分裂。在一些方面,所述饲养细胞在添加T细胞群之前添加至培养基。

[0389] 在一些实施方式中,刺激条件包括适于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约25摄氏度,一般至少约30度,且一般是或约是37摄氏度。可选地,孵育还可包括添加非分裂型EBV-转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。LCL可以用约6000-10000拉德范围内的 γ 射线辐照。在一些方面,LCL饲养细胞以任何合适的量提供,例如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率是至少约10:1。

[0390] 在一些实施方式中,通过用抗原刺激原初或抗原特异性T淋巴细胞来获得抗原特异性T细胞,如抗原特异性CD4⁺和/或CD8⁺T细胞。例如,抗原特异性T细胞系或克隆可针对巨细胞病毒抗原产生,通过从感染的对象分离T细胞并采用相同抗原体外刺激细胞来进行。

[0391] B.设备和制品

[0392] 在一些实施方式中,还提供了设备或制品。在一些实施方式中,提供了生物反应器和用于色谱法的第一固定相的组合件。该生物反应器适用于扩增细胞,而该固定相则适用于细胞分离和去除反应剂。第一固定相为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中凝胶过滤和/或亲和色谱基质包括亲和反应剂,其中所述亲和反应剂包含特异性结合第一作用剂所包含的结合伴侣C1的结合位点Z1和/或所述亲和反应剂包含特异性结合第二作用剂所包含的结合伴侣C2的结合位点Z2。第一固定相由此适于在其上固定第一作用剂和/或第二作用剂,第一结合伴侣C1和/或第二结合伴侣C2。此外,生物反应器和固定相流体连接。这样的配置可用于前文所述的系列扩增,并可整合到已知细胞扩增系统中,例如Quantum®细胞扩增系统或Xuri细胞扩增系统W25。

[0393] 在该组合件中,第一固定相包含在色谱柱中或为平面固定相。该组合件还可包含第二固定相,其与第一固定相流体连接。该第二固定相可为凝胶过滤基质和/或亲和色谱基质,其中该凝胶过滤和/或亲和色谱基质包含亲和反应剂。该亲和反应剂可包含结合(特异性结合)多聚化反应剂的结合位点Z1的结合伴侣D,由此适于将多聚化反应剂固定在固定相上。

[0394] 在一些实施方式中,本发明还涉及了一种用于纯化(例如选择)和培养(例如刺激或扩增)细胞组合物的设备,该设备包含至少一个如上所定义的生物反应器和用于色谱法的第一固定相或第二固定相的组合件。

[0395] 该设备还可包括串联流体连接的生物反应器和固定相的多个组合件。

[0396] 该设备可包含与组合件的生物反应器流体连接的样品进口,该组合件为生物反应器和用于色谱法的固定相的组合件。该设备还可包含用于目标细胞纯化和扩增的样品出口,该样品出口与至少一个组合件中的最后一个组合件的固定相流体连接,所述组合件为生物反应器和用于色谱法的固定相的组合件

[0397] 最后,该设备可被设计为功能性封闭系统。

[0398] C. 经培养细胞的示例性特征

[0399] 在一些实施方式中,经培养的目标细胞(例如经培养的T细胞),其可包括根据本文所提供方法产生或生产的经培养细胞,基于或相对于它们增殖能力、表面标志物表达、分化状态、活化状态和/或代谢概况,显示一种或多种特定的表型和/或功能特征。在一些实施方式中,与根据本文所提供方法孵育之前的组合物中的对应或相应细胞功能或表型相比,根据所提供的任何方法培养目标细胞(例如培养T细胞)可使得细胞与功能(例如提高或降低功能活性)或表型(例如一种或多种标志物的更高或更低表达)相关的参数发生变化。在一些实施方式中,经培养的T细胞显示与如下参数相关的变化:扩增和/或增殖能力、CD4+/CD8+T细胞分布或比例、表面标志物表达、功能活性或代谢概况。

[0400] 在一些实施方式中,在经培养T细胞中测得的参数变化是与在参考T细胞组合物或制剂中测得的相同或类似参数相比,或是以其为参照。通常,参比T细胞组合物或制剂中的T细胞包含或衍生自与可逆结合剂(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉素亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)一起孵育前的相同或基本相同的T细胞组合物,除了未对这些细胞进行孵育或对这些细胞进行了不同的孵育。在一些实施方式中,采用基本上相同的方案或条件(例如孵育中刺激剂的类型、刺激剂的形式、基本上相同的起始细胞数量、洗涤、存在额外反应剂与否、时间、温度)对参比T细胞制剂进行孵育,除了在参比T细胞制剂该孵育的至少一方面,在一些情况中仅一方面不同于产生经培养T细胞的孵育。

[0401] 在一些实施方式中,参比T细胞组合物或制备物是如下的组合物:与可逆结合剂(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉素亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)一起孵育之前的包含T细胞的组合物。

[0402] 在一些实施方式中,经培养T细胞如下产生:与可逆结合剂(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉素亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)一起孵育少于5天和/或该作用剂与细胞上一种或多种分子的连接被破坏(例如在竞争性反应剂如生物素或生物素类似物的存在下),例如在开始与该作用剂一起孵育起的5天内进行破坏。例如,在一些方面中,经培养T细胞按照如下产生或生产:如本文所述,与可逆结合剂(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉素亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)一起孵育,其中,所述孵育在起始该孵育后的5天内终止和/或被破坏(例如在约4、3、2或1天内,或更短时间内),和/或在起始该孵育后的5天内(例如在约4、3、2或1天内,或更短时间内)向孵育细胞加入从细胞解离可逆结合剂的竞争剂(如生物素)。在一些实施方式中,参比T细胞制备物按照如下产生或生产:与相同或基本相同的可逆结合剂(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉素亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)一起孵育,但其中,所述孵育进行5天以上,并不终止和/或破坏以减弱或终止细胞中的信号诱导或调节,和/或其中T细胞制备物的生产不加入从细胞解离反应剂的竞争剂(如生物素或生物素类似物)。

[0403] 在一些实施方式中,经培养T细胞如下产生:与可逆结合剂一起孵育(例如多聚化

的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中,受体结合剂(例如刺激剂)是不结合CD28和/或诱导信号转导的受体结合剂,不是抗CD28抗体或其片段。例如,在一些实施方式中,经培养T细胞在如下步骤后产生或生产:与其中一种或多种刺激剂与链霉亲和素突变蛋白可逆结合的可逆结合剂一起孵育,其中至少一种刺激剂特异于CD3(例如抗CD3抗体或其片段),且第二刺激剂可特异于CD90、CD95、CD137、CD154、ICOS、LAT、CD27、OX40或HVEM中的一种或多种(例如,分别为抗CD90抗体、抗CD95抗体、抗CD137抗体、和抗CD154抗体、抗ICOS抗体、抗LAT抗体、抗CD27抗体、抗OX40抗体或抗HVEM抗体,或其抗原结合片段)。在一些实施方式中,参比T细胞制备物是如下步骤后产生或生产的T细胞培养物:与可逆结合剂一起孵育(如多聚化的作用剂,例如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),但其中,该作用剂包含特异性结合CD28和/或诱导或调节CD28信号转导的作用剂。例如,在一些实施方式中,参比T细胞制备物在如下步骤后产生或生产:将T细胞组合物与抗CD3/抗CD28Dynabeads®、抗CD3/抗CD28ExPact®珠或其他抗CD3/抗CD28刺激剂一起孵育。在一些实施方式中,该其他抗CD3/抗CD28刺激剂是其中抗体反应剂结合于支持物(例如固体支持物,如珠、颗粒、磁性颗粒或珠、纳米颗粒或微球)的作用剂。在一些实施方式中,经培养T细胞通过与可溶(即不结合于支持物(如固体支持物))的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,例如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)制备。

[0404] 例如,在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞组合物或制备物相比,具有增强的扩增和/或增殖能力。在一些实施方式中,该增强的扩增和/或增殖能力包括:与参比T细胞组合物或制备物中的相应CD3+T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的数量百分比相比,经培养的T细胞中的CD3+T细胞、CD4+T细胞和/或CD8+T细胞的数量百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍)。

[0405] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞培养物相比,具有增强的CD3+T细胞扩增和/或增殖能力。在一些实施方式中,该增强的扩增和/或增殖能力包括:与参比T细胞组合物或制备物中的相应CD3+T细胞的数量或百分比相比,经培养的T细胞中的CD3+T细胞的数量或百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0406] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞组合物或制备物相比,具有增强的CD4+T细胞扩增和/或增殖能力。在一些实施方式中,该增强的扩增和/或增殖能力包括:与参比T细胞组合物或制备物中的相应CD4+T细胞的数量或百分比相比,经培养的T细胞中的CD4+T细胞的数

量或百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0407] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞组合物或制备物相比,具有增强的CD8+T细胞扩增和/或增殖能力。在一些实施方式中,该增强的扩增和/或增殖能力包括:与参比T细胞组合物或制备物中的相应CD8+T细胞的数量或百分比相比,经培养的T细胞中的CD8+T细胞的数量或百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0408] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞组合物或制备物相比,具有改变的CD8+/CD4+T细胞分布或标准化T细胞分布,例如改变的CD8+/CD4+比例或标准化CD8+/CD4+T细胞比例。该CD8+/CD4+比例或标准化比例可提高或降低。在一些实施方式中,相对于参比组合物或制备物中的CD8+T细胞的数量或百分比或标准化数量或百分比、或与之相比,改变的CD8+/CD4+T细胞比例使得经培养T细胞中CD8+T细胞的数量或百分比或标准化数量或百分比提高。在一些实施方式中,与参比组合物或制备物中的CD8+T细胞的数量或百分比或CD8+T细胞标准化数量或百分比相比,经培养的T细胞中的CD8+T细胞的数量提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或制备物中的CD8+/CD4+T细胞比例或标准化CD8+/CD4+比例相比,CD8+/CD4+T细胞比例或标准化CD8+/CD4+比例提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。在一些实施方式中,经培养T细胞中或者组合物或制备物中的数量、百分比或比例基于孵育前包含T细胞的起始组合物中的数量、百分比或比例标准化。

[0409] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞,例如根据本文所提供的任何方法制备,其中该经培养的T细胞在如下步骤后产生或生产:与如本文所述的可逆结合剂一起孵育(例如多聚化的作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育),其中该经培养的T细胞的特征为:与参比T细胞组合物或制备物相比,改变的表面标志物表达概况。在一些实施方式中,该改变的表面标志物表达概况归因于一种或多种T细胞亚组的数量或百分比的改变,所述T细胞亚组的一种或多种选自下组的表面标志物为阳性、阴性、高或低:CD45RA、CD45RO、CD62L、CD69、CCR7、CD27、CD28、CD122、t-bet、IL-7R α 、CD95、IL-2R β 、CXCR3、LFA-1、KLRG1。在一些实施方式中,与参比组合物或制备物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组的数量或百分比提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0410] 在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或制备物相比,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如与参比组合物或制备物相比,经培养T细胞中增加的T细胞亚组)具有降低或减少的分化或活化状态。在一些实施方式中,T细胞亚组不是或不包含效应T细胞(T_E)或效应记忆T

细胞(T_{EM})表型。在一些实施方式中,T细胞亚组包含如下中一种或多种表面表型:CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD28⁺或KLRG1^{低/-}。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0411] 在一些实施方式中,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如与参比组合物或制备物相比,经培养T细胞中有所增加的T细胞亚组)为CD62L和/或IL-7R α (CD127) 阳性和/或阴性或t-bet低。在一些实施方式中,T细胞亚组为CD45RA阳性和/或影响或CD45RA低。在一些实施方式中,T细胞亚组为CCR7、CD45RA、CD62L、CD27、CD28、IL-7R α (CD127)、CD95、IL-2R β 、CXCR3和LFA-1中的一种或多种阳性,和/或CD45RO阴性。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0412] 在一些实施方式中,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如与参比组合物或制备物相比,经培养T细胞中有所增加的T细胞亚组)为CD62L阳性(CD62L⁺)细胞或包含CD62L阳性(CD62L⁺)细胞。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0413] 在一些实施方式中,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如与参比组合物或制备物相比,经培养T细胞中有所增加的T细胞亚组)是或包含具有如下特征的细胞:CD62L⁺,且a) CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺和CD27⁺中的任何一种或多种,且b) t-bet^低、IL-7R α (CD127⁺)、CD95⁺、IL-2R β 、CXCR3⁺和LFA-1⁺中的任何一种或多种。在一些实施方式中,T细胞亚组还可为CD3⁺、CD4⁺或CD8⁺。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0414] 在一些实施方式中,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如CD62L⁺T细胞亚组)为或包括记忆T细胞或其具体亚组(例如长寿记忆T细胞),或与记忆T细胞或其具体亚组(例如长寿记忆T细胞)具有相同的表型特征。在一些实施方式中,此类记忆T细胞是中心记忆T细胞(T_{CM})或T记忆干细胞(T_{SCM})细胞。在一些实施方式中,所述记忆T细胞是 T_{SCM} 细胞。与其他记忆T细胞亚组相比或与原初T细胞相比, T_{SCM} 细胞可被描述为具有一种或多种表型差异或功能性特征,例如更少分化或更原初化(参见例如Ahlers和Belyakov (2010) Blood, 115:1678); Cieri等, (2015) Blood, 125:2865; Flynn等, (2014) Clinical&Translational Immunology, 3,e20; Gattinoni等, (2012) Nat. Med., 17:1290-1297; Gattinoni等, (2012) Nat. Reviews, 12:671; Li等, (2013) PLOS ONE, 8:e67401;以及公开的PCT申请No. W02014/039044)。在一些情况中, T_{SCM} 细胞被认为是唯一一种能产生效应T细胞和所有三个记忆T细胞亚组(T_{SCM} , T_{CM} , and T_{EM})的记忆T细胞。在一些方面中,在所有记忆T细胞亚组中, T_{SCM} 细胞具有针对抗原或稳态刺激的最高增殖应答和存活,以及缺乏关联抗原的最少消耗。在一些实施方式中,在过继转移后,与其他记忆T细胞相比,分化较少的 T_{SCM} 细胞可具有更大的扩增、长寿活力以及目标细胞破坏,由此与用 T_{CM} 或 T_{EM} 细胞可能需要的细胞相比,可能以更少的转移细胞介导更有效治疗。

[0415] 在一些方面中,已报导或已知的 T_{SCM} 细胞功能特性或表型的例子包括,例如,此类

细胞:a)为CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、IL-7Rα⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和LFA-1⁺;b)为CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺和CD95⁺;c)为CD45RA⁺、CD45RO⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺和IL-2Rβ⁺;d)为CD45RO⁻、CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺和CD95⁺;e)为CD45RA⁺、CD44^{+/+}、CD62L⁺、CD127⁺、IL-2Rβ⁺、CD28⁺、CD43⁻、KLRG1⁻、Peforin⁻和颗粒酶B⁻;f)CCR7、CD62L、CD27和CD28表达水平高,CD95和IL-2Rβ表达水平中等,CD45RA低水平且不表达CD45RO或KLRG-1;或g)高表达CD62L、低水平CD44和t-bet,且为Sca-1⁺;和/或具有中等IL-2产生能力,低IFNγ产生能力,低细胞毒性和高自我更新能力。

[0416] 在一些实施方式中,经培养T细胞中的T细胞亚组(例如与参比组合物或制备物相比,经培养T细胞中有所增加的T细胞亚组)为或包含记忆T细胞,例如长寿记忆T细胞。在一些实施方式中,所述记忆T细胞是中心记忆(T_{CM})T细胞。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺和CD122⁺和/或KLRG1^低。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0417] 在一些实施方式中,所述记忆T细胞是T中心记忆干(T_{SCM})细胞。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD122⁺和/或KLRG1⁻。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺、CD122⁺和/或KLRG1⁻。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RO⁻、CCR7⁺、CD45RA⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、IL-7Rα⁺、CD95⁺、IL-2Rβ⁺、CXCR3⁺和/或LFA-1⁺。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺和/或CD95⁺。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA⁺、CD45RO⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD95⁺、和/或IL-2Rβ⁺。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RO⁻、CD45RA⁺、CCR7⁺、CD62L⁺、CD27⁺、CD28⁺、CD127⁺和/或CD95⁺。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:CD45RA⁺、CD44^{+/+}、CD62L⁺、CD127⁺、IL-2Rβ⁺、CD28⁺、CD43⁻、KLRG1⁻、Peforin⁻和/或颗粒酶B⁻。在一些实施方式中,T细胞亚组表达高水平的CCR7、CD62L、CD27和/或CD28,中等水平的CD95和/或IL-2Rβ,低水平的CD45RA和/或不表达CD45RO和/或KLRG-1。在一些实施方式中,T细胞亚组表达高水平的CD62L,低水平的CD44和t-bet,和/或为Sca-1⁺。在一些实施方式中,T细胞亚组具有表型特征:中等IL-2生产的能力,低IFNγ生产能力,低细胞毒性,和/或高自我更新能力。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或培养物中的T细胞亚组的数量或百分比相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组提高至少约2倍(例如提高至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一者)。

[0418] 在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或制备物相比,经培养的T细胞中该T细胞亚组(例如如前所描述的任何T细胞亚组)存在于经培养的T细胞中的占总T细胞的百分比更大,或在经培养T细胞中占总T细胞的数量更大。在一些实施方式中,经培养T细胞中T细胞亚组的百分比占总T细胞百分比或占培养物中总细胞的至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方式中,与从人对象中基于表型所包含的一种或多种标志物的表面表达直接分离或富集、但不经孵育或培养的T细胞组合物中T细胞中的相应细胞亚组百分比相比,经培养细胞中T细胞亚组(例如如前所描述的任何T细胞亚组)的百分比更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5

倍或大更多。在一些实施方式中,与参比T细胞组合物或制备物(例如如上所述的任何参比T细胞组合物或制备物,如根据本文所提供任何方法与可逆结合剂一起孵育前(例如多聚化作用剂,如与可逆结合寡聚链霉亲和素突变蛋白的刺激剂一起孵育)的T细胞组合物)中的T细胞亚组总数、相对数目或标准化数目相比,经培养细胞中T细胞亚组(例如如前所描述的任何T细胞亚组)的总数、相对数目或标准化数目更大,例如大至少1.5倍、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或大更多。在一些实施方式中,对应于T细胞培养物中所存在的T细胞亚组的T细胞数为至少或至少约 1×10^6 个细胞、 2×10^6 个细胞、 3×10^6 个细胞、 4×10^6 个细胞、 5×10^6 个细胞或更多。

[0419] 在一些实施方式中,T细胞亚组为CD62L⁺和/或IL-7R α ⁺(CD127⁺),且经培养T细胞中CD62L⁺和/或IL-7R α ⁺(CD127⁺)亚组的百分比(以占培养物中总T细胞或总细胞的百分比计)为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方式中,T细胞亚组为CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1^低,且经培养T细胞中CD45RA⁻、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1^低亚组的百分比(以占培养物中总T细胞或总细胞的百分比计)为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。在一些实施方式中,T细胞亚组为CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1⁻,且经培养T细胞中CD45RA^{低/+}、CD45RO^{低/+}和/或KLRG1⁻亚组的百分比(以占培养物中总T细胞或总细胞的百分比计)为至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0420] 在一些实施方式中,T细胞亚组为T_{CM}细胞,或包含T_{CM}细胞。在一些实施方式中,经培养T细胞中T_{SCM}细胞亚组的百分比占总T细胞百分比或占培养物中总细胞的至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0421] 在一些实施方式中,T细胞亚组为T_{SCM}细胞,或包含T_{SCM}细胞。在一些实施方式中,经培养T细胞中T_{SCM}细胞亚组的百分比占总T细胞百分比或占培养物中总细胞的至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多。

[0422] 在一些实施方式中,T细胞亚组,例如CD62L⁺T细胞具有或显示:a)低水平的TCR重排删除环(TREC);和/或b)表达增殖标志物(例如Ki-67);和/或c)在刺激剂的存在下的增殖能力;和/或d)在刺激剂的存在下产生选自IFN- γ 、TNF和IL-2的细胞因子的能力;和/或e)在缺乏刺激剂时对损耗有耐性(refractory);和/或f)能够产生T_{SCM}、T_{CM}、T_{EM}和T_{EFF}细胞;和/或g)低细胞毒性;和/或h)在过继转移比用T_{CM}或T_{em}细胞更少的细胞后,能够产生相同或更大的应答。在一些实施方式中,刺激剂是抗原、稳态细胞因子(例如IL-15或IL-17),或者是能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号的作用剂。在一些实施方式中,产生细胞因子的能力包括产生IFN γ 的低能力和/或产生IL-2的中等能力。

[0423] 在一些实施方式中,提供了经培养的T细胞(例如根据本文所提供的任何方法制备),其中经培养的T细胞在如本文所提供的孵育后产生或生产,且其中经培养的T细胞的特征在于与参比T细胞组合物或制备物相比,具有改变的功能活性谱。在一些实施方式中,与参比组合物或制备物相比或与参比组合物或制备物中的T细胞亚组相比,培养物中的经培养的T细胞或特定的T细胞亚组显示改变的功能活性谱,例如功能活性改变(例如提高或降低)至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍。在一些实施方式中,功能活性选自以下中的一种或多种:a)低水平的TCR重排删除环(TREC);和/或b)表达增殖标志物(例如

Ki-67);和/或c)在刺激剂的存在下的增殖能力;和/或d)在刺激剂的存在下产生选自IFN- γ 、TNF和IL-2的细胞因子的能力;和/或e)在缺乏刺激剂时对损耗有耐性;和/或f)能够产生T_{SCM}、T_{CM}、T_{EM}和T_{EFF}细胞;和/或g)低细胞毒性。在一些实施方式中,刺激剂是抗原、稳态细胞因子(例如IL-15或IL-17),或者是能够在T细胞中引发TCR/CD3复合物相关信号的作用剂。在一些实施方式中,产生细胞因子的能力包括产生IFN γ 的低能力和/或产生IL-2的中等能力。在一些实施方式中,在经培养的T细胞中的T细胞亚组包括记忆T细胞,例如长寿记忆T细胞。在一些实施方式中,所述记忆T细胞是T_{SCM}细胞。

[0424] 在一些实施方式中,与采用参比组合物或制备物或采用参比组合物或制备物中的T细胞亚组进行过继转移所获得的应答相比,用更少的培养物中所存在的经培养的T细胞或特定T细胞亚组进行细胞过继转移后,能产生相同或更大的应答。在一些实施方式中,该应答采用用至少约2倍(例如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一)的细胞获得。在一些实施方式中,该应答提高或增大至少约2倍(例如至少约3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍或更多倍中的任一)。

[0425] 在一些实施方式中,与在GSK-P抑制剂存在下在T细胞制备物中孵育的相应细胞亚组相比,经培养细胞中该T细胞亚组的百分比(例如如上所述的任何T细胞亚组)更大,例如大至少1.5倍,至少2倍,至少3倍,至少4倍,至少5倍或更大。在一些实施方式中,经培养T细胞的组合物不含GSK-P抑制剂。

[0426] 在一些实施方式中,与在重组稳态细胞因子(可选地IL-7或IL-15)存在下孵育的相应细胞亚组相比,经培养细胞中该T细胞亚组的百分比(例如如上所述的任何T细胞亚组)更大,例如大至少1.5倍,至少2倍,至少3倍,至少4倍,至少5倍或更大。在一些实施方式中,经培养T细胞的组合物不含重组(例如外源)IL-7细胞因子或重组(例如外源)IL-15细胞因子。

[0427] 在一些实施方式中,经培养T细胞的组合物根据本文所提供的任何方法生产或产生,其中将物质,例如竞争剂加入T细胞以破坏(例如减少和/或终止)一种或多种刺激剂的信号转导。在一些实施方式中,经培养T细胞的组合物包含某种物质(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。在一些实施方式中,与在孵育中未外源加入该物质的参比组合物或经培养T细胞中该物质的量相比,该物质(例如竞争剂,如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)的存在量大至少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倍或更大。在一些实施方式中,经培养T细胞的组合物中该物质(例如竞争剂,如生物素或生物素类似物,例如D-生物素)的量为或约为10 μ M~100 μ M、100 μ M~1mM、100 μ M~500 μ M或10 μ M~100 μ M。

[0428] IV. 经培养细胞、抗原受体和基因工程化改造细胞的基因工程化改造方法

[0429] 在一些实施方式中,对细胞的工程化改造可在如本文所述培养细胞(例如选择、富集和/或刺激)之前或之后,在一些情况中,在培养或孵育的至少一部分的期间或同时。在一些实施方式中,待工程化改造的细胞是经培养的细胞,或在一些情况中,细胞可在进行如本文所述的培养前被转导。

[0430] 在一些实施方式中,所述方法包括将重组核酸导入目标细胞群,其中该核酸编码重组蛋白,由此所述细胞表达该重组蛋白。在一些方面中,细胞为原代细胞且该导入是离体的。在一些实施方式中,导入在所述孵育之后或期间进行和/或当细胞固定于支持物上时进

行。在一些实施方式中,工程化改造细胞的方法在细胞孵育或培养的至少部分过程中且当细胞固定于固体支持物时进行。在一些实施方式中,此类方法包括:将包含编码重组蛋白的核酸分子的病毒颗粒加载或加到固定于支持物上的细胞和/或加载或加到孵育或培养后从该支持物上获得或解离的细胞。此类方法获得了表达重组蛋白的细胞,在一些方面中,表达在孵育的至少一部分过程中发生。

[0431] 在一些实施方式中,经培养细胞包含或经工程化改造而包含:工程化改造的受体,例如工程化改造抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR),或T细胞受体。还提供了此类细胞的群,包含此类细胞的组合物和/或富含此类细胞的组合物,例如其中某一类型的细胞(如T细胞或CD8+或CD4+细胞)被富集或选择。组合物包括用于给药的药物组合物和制剂,如用于过继细胞治疗。还提供将所述细胞和组合物给予对象(例如患者)的治疗方法。

[0432] 因此,在一些实施方式中,经培养的细胞包括通过基因工程改造导入的一种或多种核酸,并由此表达所述核酸的重组或经基因工程改造的产物。在一些实施方式中,基因转移通过如下方式进行:首先,刺激培养的细胞,例如,通过将其与刺激物合并,所述刺激物诱导响应,例如增殖、存活和/或活化,例如,通过细胞因子或活化标志物的表达来检测,然后转导该活化的细胞,并且在培养物中扩增至足以供于临床应用的量。

[0433] 在一些情况中,刺激因子(例如,淋巴因子或细胞因子)的过表达可能对对象具有毒性。因此,在一些情况中,工程改造的细胞包含使细胞对体内负选择易感的基因区段(例如在过继免疫治疗中给予后)。例如在一些方面中,培养细胞经工程改造,从而它们可因它们所给予的患者的体内状况中的变化而被消除。可负选择的表型可通过插入赋予对所给予物质(例如,化合物)敏感性的基因来产生。可负选择的基因包括:单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等,Cell 11:223,1977),其提供更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因,细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因,细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。在一些方面中,经培养细胞还经工程改造以促进细胞因子或其他因子的表达。

[0434] A. 编码抗原受体(例如嵌合抗原受体)的核酸

[0435] 还提供了用于产生基因工程改造的细胞的方法、核酸、组合物和试剂盒。基因工程改造一般涉及将编码重组或工程改造部分的核酸导入含有经培养细胞的组合物中,例如,通过逆转录病毒转导、转染或转化进行。

[0436] 在一些实施方式中,核酸是异源性的,即,通常不存在于细胞或从该细胞获得的样品中,如从另一个生物体或细胞获得的样品,其例如在待工程改造中的细胞和/或这类细胞来源的生物体中通常未发现。在一些实施方式中,核酸不是天然存在的,如核酸不是自然中发现的,包括包含编码来自多种不同细胞类型的各种结构域的核酸的嵌合组合。

[0437] 1. 嵌合抗原受体(CAR)

[0438] 细胞通常表达重组受体,如抗原受体,包括功能性非TCR抗原受体,例如,嵌合抗原受体(CAR),和其它抗原结合受体如转基因T细胞受体(TCR)。受体还包括其他嵌合受体。

[0439] 示例性的抗原受体,包括CAR,以及用于工程改造和将受体导入细胞中的方法,包括例如,在国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,

592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353、和8,479,118,和欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些,和/或Sadelain等,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等,(2013) PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等,Cancer,2012年3月18(2):160-75中所述的那些。在一些方面中,所述抗原受体包括美国专利号7,446,190中所述的CAR,和国际专利申请公开号W0/2014055668A1中所述的那些。CAR的实例包括任何上述出版物中公开的CAR,例如W02014031687,US8,339,645,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,2013,Nature Reviews Clinical Oncology,10,267-276(2013);Wang等,(2012) J.Immunother.35(9):689-701;和Brentjens等,Sci Transl Med.2013 5(177)。还参见W02014031687、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。嵌合受体,例如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(V_H)链区和/或可变轻(V_L)链区,例如,scFv抗体片段。

[0440] 在一些实施方式中,受体靶向的抗原是多肽。在一些实施方式中,其是碳水化合物或其他分子。在一些实施方式中,与正常或非目标细胞或组织相比,抗原在疾病或病症的细胞,例如,肿瘤或致病性细胞上选择性表达或过表达。在其他实施方式中,抗原在正常细胞上表达和/或在工程改造的细胞上表达。

[0441] 在一些实施方式中,受体靶向的抗原包括孤儿酪氨酸激酶受体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、间皮素、CEA、和乙型肝炎表面抗原、抗叶酸受体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、OEPHa2、ErbB2、3、或4、FBP、胎儿乙酰胆碱e受体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R- α 、IL-13R- α 2、kdr、 κ 轻链、Lewis Y、L1-细胞粘附分子、MAGE-A1、间皮素、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2D配体、NY-ESO-1、MART-1、gp100、癌胚抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原、PSMA、Her2/neu、雌激素受体、孕酮受体、酪氨酸蛋白激酶B2、CD123、c-Met、GD-2,和MAGE A3、CE7、维尔姆斯瘤(WT-1)、细胞周期蛋白如细胞周期蛋白A1(CCNA1)和/或生物素化分子,和/或通过HIV、HCV、HBV或其它病原体表达的分子。

[0442] 在一些实施方式中,CAR结合病原体特异性抗原。在一些实施方式中,所述CAR对病毒抗原(例如HIV,HCV,HBV等),细菌抗原,和/或寄生性抗原具有特异性。

[0443] 在一些实施方式中,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。在一些实施方式中,恒定区或部分是人IgG(如IgG4或IgG1)的。在一些方面中,恒定区的部分作为抗原-识别组分(例如,scFv)和跨膜结构域之间的间隔物区域。间隔子的长度可以是:与没有间隔子相比,该长度的间隔子提高抗原结合之后的细胞响应。示例性间隔物,例如,铰链区,包括描述于国际专利申请公开号W02014031687中的那些。在一些实例中,间隔物长度为或约为12个氨基酸或长度不超过12个氨基酸。示例性的间隔子包括具有如下长度的那些:至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸,并且包括上述所列范围的任何端点之间的整数。在一些实施方式中,间隔区具有约12个氨基酸或更短,约119个氨基酸或更短或

约229个氨基酸或更短。示例性间隔子包括单IgG4铰链, IgG4铰链连CH2和CH3结构域, 或IgG4铰链连CH3结构域。

[0444] 该抗原识别结构域一般连接至一个或多个胞内信号转导组分, 例如在CAR的情况下, 模拟通过抗原受体复合物(例如TCR复合物)的活化的信号转导组分, 和/或通过另一细胞表面受体的信号。因此, 在一些实施方式中, 抗原-结合组分(例如, 抗体)与一个或多个跨膜和胞内信号转导结构域连接。在一些实施方式中, 跨膜结构域融合于胞外结构域。在一个实施方式中, 使用天然与受体(例如CAR)中的结构域之一关联的跨膜结构域。在一些情况中, 跨膜结构域经氨基酸取代选择或修饰, 以避免这类结构域结合相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域, 尽可能减少与受体复合物其它成员的相互作用。

[0445] 在一些实施方式中, 所述跨膜结构域源自天然或合成来源。当所述来源是天然来源时, 在一些方面, 所述结构域源自任何膜结合或跨膜蛋白。跨膜区包括源自T-细胞受体 α 、 β 或 ζ 链, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CDS, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137和/或CD 154的那些(即包含至少它们的跨膜区域)。或者, 在一些实施方式中, 所述跨膜结构域是合成的。在一些方面, 合成跨膜结构域以疏水残基为主, 例如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面, 合成跨膜结构域的各末端会有苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方式中, 连接是通过接头、间隔子和/或跨膜结构域。

[0446] 胞内信号转导结构域包括模拟或近似通过天然抗原受体的信号、通过此类受体联合共刺激受体的信号, 和/或仅通过共刺激受体的信号的那些。在一些实施方式中, 存在短的寡肽或多肽接头(例如, 长度为2~10个氨基酸的接头, 例如包含甘氨酸和丝氨酸的接头(例如, 甘氨酸-丝氨酸双联体)), 并在CAR的胞质信号转导结构域和跨膜结构域之间形成连接。

[0447] 所述受体(例如, CAR), 一般包括至少一种的一个或多个胞内信号转导组分。在一些实施方式中, 受体包括TCR复合物的胞内组分, 例如介导T-细胞活化和细胞毒性的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转导模块。在一些实施方式中, 细胞信号转导模块包括CD3跨膜结构域、CD3胞内信号转导结构域, 和/或其它CD跨膜结构域。在一些实施方式中, 所述受体, 例如, CAR, 还包括一种或多种其它分子(例如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的部分。例如, 在一些方面, CAR或其它嵌合受体包括CD3 ζ (CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16的嵌合分子。

[0448] 在一些实施方式中, 在CAR或其它嵌合受体连接时, 受体的胞质结构域或胞内信号转导结构域活化免疫细胞(例如经工程改造以表达CAR的T细胞)的至少一种正常效应功能或应答。例如, 在一些情况中, CAR诱导T细胞诸如溶细胞活性或辅助性T细胞活性等功能, 如分泌细胞因子或其它因子。在一些实施方式中, 采用抗原受体部分或共刺激分子的胞内信号转导结构域的截短部分来替代完整免疫刺激链, 例如, 如果其转导效应物功能信号的话。在一些实施方式中, 一个或多个胞内信号转导结构域包括T细胞受体(TCR)的胞质序列, 并且在一些方面中, 还包括天然情况下存在与这些受体一致作用以在抗原受体接合后启动信号转导的共受体。

[0449] 就天然TCR而言, 完全活化一般不仅需要通过TCR的信号转导, 而且还需要共刺激信号。因此, 在一些实施方式中, 为了促进完全活化, CAR还包括用于产生次或共刺激信号的组分。在其他实施方式中, CAR不包括用于产生共刺激信号的组分。在一些方面, 同一细胞表

达另一CAR来提供用于产生次或共刺激信号的组分。

[0450] 在一些方面, T细胞活化被认为通过两类胞质信号转导序列介导: 引发通过TCR的抗原依赖性主活化的那些(主胞质信号转导序列)和以非抗原依赖性方式作用提供次或共刺激信号的那些(次胞质信号转导序列)。在一些方面, CAR包括这些信号转导组分之一或两者。

[0451] 在一些方面, CAR包括主胞质信号转导序列, 其调控TCR复合物的主活化。以刺激方式作用的主胞质信号转导序列可包含信号转导基序, 这些基序又称基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM。ITAM的实例包括主胞质信号转导序列, 其包括源自如下的那些: TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CDS、CD22、CD79a、CD79b、和CD66d。在一些实施方式中, CAR中的胞质信号转导分子包含胞质信号转导结构域, 其部分, 或源自CD3 ζ 的序列。

[0452] 在一些实施方式中, CAR包括共刺激受体(例如CD28、4-1BB、OX40、DAP10, 和ICOS)的跨膜部分和/或信号转导结构域。在一些方面, 同一CAR即包含活化组分有包含共刺激组分。

[0453] 在一些实施方式中, 活化结构域包括在一个CAR内, 而共刺激组分由识别另一种抗原的另一CAR提供。在一些实施方式中, CAR包括活化或刺激性CAR、共刺激CAR, 其均表达在同一细胞上(参见W02014/055668)。在一些方面, 细胞包括一种或多种刺激或活化CAR和/或共刺激CAR。在一些实施方式中, 细胞还包括抑制性CAR(iCAR, 参见Fedorov等, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013年12月)), 如识别除了与疾病或病症相关和/或对疾病或病症特异性以外抗原的CAR, 由此通过疾病靶向CAR递送的活化信号通过抑制性CAR与其配体结合而减少或抑制, 例如减少脱靶效应。

[0454] 在某些实施方式中, 所述胞内信号转导结构域包含CD28跨膜和信号转导结构域, 其连接至CD3(例如, CD3- ζ)胞内结构域。在一些实施方式中, 胞内信号转导结构域包括了嵌合CD28和CD137(4-1BB, TNFRSF9)共刺激结构域, 其连接CD3 ζ 胞内结构域。

[0455] 在一些实施方式中, CAR涵盖一个或多个, 例如, 两个或更多个, 共刺激结构域和活化结构域, 例如, 胞质部分中的初始活化结构域。示例性的CAR含有CD3- ζ 、CD28和4-1BB的胞内部分。

[0456] 在一些实施方式中, CAR或其它抗原受体还包括标志物, 例如细胞表面标志物, 其可用于确定使细胞表达受体(例如细胞表面受体的截短形式, 例如截短的EGFR(tEGFR))的转导或工程改造。在一些方面中, 标志物包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如tEGFR)的全部或部分(例如截短形式)。在一些实施方式中, 编码标志物的核酸可操作性地连接编码接头序列(例如可切割接头序列, 例如, T2A)的多核苷酸。参见W02014031687。

[0457] 在一些实施方式中, 标志物是分子, 例如, 细胞表面蛋白, 其不在T细胞上或T细胞表面上天然可见, 或其部分。

[0458] 在一些实施方式中, 所述分子是非自体分子, 例如, 非自体蛋白, 即, 不被待向其过继转移所述细胞的宿主的免疫系统识别为自身摄的蛋白质。

[0459] 在一些实施方式中, 所述标志物无治疗性功能和/或除了用作基因工程改造的标志物(例如, 用于选择成功地工程改造的细胞)之外没有任何作用。在其它实施方式中, 标志物可以是治疗性分子或发挥一些所需效果的分子, 如待在体内遇到的细胞的配体, 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之后的应答。

[0460] 在一些情况中,CAR被称为第一、第二和/或第三代CAR。在一些方面中,第一代CAR是在抗原结合时仅提供CD3链诱导信号的CAR;在一些方面中,第二代CAR是提供此信号和共刺激信号的CAR,如包括来自共刺激受体(例如CD28或CD137)的胞内信号转导结构域的CAR;在一些方面中,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。

[0461] 在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括包含抗体或抗体片段的胞外部分。在一些方面,嵌合抗原受体包括包含抗体或片段的胞外部分和胞内信号转导结构域。在一些实施方式中,抗体或片段包括scFv,且胞内结构域包含ITAM。在一些方面,胞内信号转导结构域包括CD3- ζ 链的 ζ 链的信号转导结构域。在一些实施方式中,嵌合抗原受体包括跨膜结构域,其连接胞外结构域和胞内信号转导结构域。在一些方面中,所述跨膜结构域包含CD28的跨膜部分。在一些实施方式中,所述嵌合抗原受体包含T细胞共刺激分子的胞内结构域。在一些方面,T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0462] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,表示氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。包括提供的受体和其他多肽(例如接头或肽)的多肽可以包括氨基酸残基,包括天然和/或非天然氨基酸残基。该术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化和磷酸化。在一些方面中,所述多肽可包含对原始或天然序列进行的修饰,只要该蛋白质保留所需活性即可。这些修饰可以有意的,例如通过定点诱变,或者可以是偶然的,例如通过产生蛋白质的宿主突变或PCR扩增所致的误差。

[0463] 在一些实施方式中,由连续剂量的细胞表达的受体(例如,CAR)包含由第一剂量的细胞表达的受体(例如,CAR)的至少一种免疫反应性表位。在一些方面,由以连续剂量给予的细胞表达的受体(例如CAR)与例如由第一剂量表达的受体(例如CAR)相同,或者与由第一剂量给予的细胞表达的受体(例如CAR)基本相同。

[0464] 由以各种剂量给予对象的细胞表达的重组受体(例如CAR)通常识别或特异性结合被治疗的疾病或病症或细胞中所表达的、与之相关的和/或特异性的分子。在特异性结合于分子(例如抗原)时,受体通常将免疫刺激性信号(例如ITAM转导的信号)递送到细胞中,从而促进靶向疾病或病症的免疫应答。例如,在一些实施方式中,第一剂量中的细胞表达CAR,所述CAR特异性结合由疾病或病症的细胞或组织表达的抗原或与疾病或病症相关的抗原。

[0465] 2. TCR

[0466] 在一些实施方式中,基因工程化改造的抗原受体包括:重组T细胞受体(TCR)和/或从天然存在的T细胞克隆的TCR。在一些实施方式中,从患者鉴定、分离针对目标抗原(例如,癌抗原)的高亲和力T细胞克隆,并导入细胞。在一些实施方式中,针对目标抗原的TCR克隆已在用人免疫系统基因(例如,人白细胞抗原系统,或HLA)工程改造的转基因小鼠中产生。参见例如,肿瘤抗原(参见例如,Parkhurst等,(2009) Clin Cancer Res.15:169-180和Cohen等.(2005) J Immunol.175:5799-5808)。在一些实施方式中,用噬菌体展示来分离针对靶抗原的分离TCR(参见例如,Varela-Rohena等,(2008) Nat Med.14:1390-1395和Li (2005) Nat Biotechnol.23:349354)。

[0467] 在一些实施方式中,获得T细胞克隆后,将TCR α 和 β 链分离并克隆入基因表达载体。在一些实施方式中,TCR α 和 β 基因通过小核糖核酸病毒2A核糖体跳跃肽(skip peptide)连接,使得两条链共表达。在一些实施方式中,TCR的基因转移通过逆转录病毒或慢病毒载体,或通过转座子完成(参见例如,Baum等,(2006) Molecular Therapy:The Journal of the

American Society of Gene Therapy.18:1748-1757;和Hackett等,(2010)Molecular Therapy:The Journal of the American Society of Gene Therapy.18:674-68)。

[0468] 3.多靶向

[0469] 在一些实施方式中,细胞和方法包括多靶向策略,如在细胞上表达两种或更多种基因工程改造的受体,其各自识别相同或不同抗原,并且一般各自包含不同的胞内信号转导组成部分。这类多靶向策略描述于,例如,国际专利申请公开号W0 2014055668A1(描述活化和共刺激性CAR的组合,例如,靶向在脱靶,例如正常细胞上独立存在但仅在待治疗的疾病或病症的细胞上一起存在的2种不同抗原)和Fedorov等,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)(描述表达活化和抑制性CAR的细胞,如其中活化CAR结合至在正常或非疾病细胞以及待治疗疾病或病症的细胞上同时表达的抗原,并且抑制性CAR结合至仅在不希望治疗的一种或多种正常细胞上表达的另一种抗原的那些策略)。

[0470] 例如,在一些实施方式中,细胞包括表达第一基因工程改造的抗原受体(例如,CAR或TCR)的受体,其一般在特异性结合至由第一受体识别的抗原(例如第一抗原)之后,能够诱导针对该细胞的活化信号。在一些实施方式中,细胞还包括第二基因工程改造的抗原受体(例如,CAR或TCR),例如,嵌合共刺激受体,其一般在特异性结合至由第二受体识别的第二抗原之后,能够诱导针对免疫细胞的共刺激信号。在一些实施方式中,第一抗原和第二抗原是不同的。在一些实施方式中,第一抗原和第二抗原是不同的。

[0471] 在一些实施方式中,第一和/或第二基因工程改造的抗原受体(例如,CAR或TCR)能够诱导针对细胞的活化信号。在一些实施方式中,受体包括包含ITAM或ITAM-样基序的胞内信号转导组成部分。在一些实施方式中,由第一受体诱导的活化包括细胞中的蛋白质表达改变或信号转导,其导致引发免疫应答,如ITAM磷酸化和/或引发ITAM-介导的信号转导级联,位于结合受体(例如,CD4或CD8等)附近分子的簇集和/或形成免疫学突触,一种或多种转录因子(如NF- κ B和/或AP-1)的活化,和/或诱导因子(如细胞因子)的基因表达,增殖和/或存活。

[0472] 在一些实施方式中,第一和/或第二受体包括共刺激受体(如CD28、CD137(4-1BB)、OX40、和/或ICOS)的胞内信号转导结构域。在一些实施方式中,第一和第二受体包括不同的共刺激受体的胞内信号转导结构域。在一实施方式中,第一受体包含CD28共刺激信号转导区域,而第二受体包含4-1BB共刺激信号转导区域,或反之亦然。

[0473] 在一些实施方式中,第一和/或第二受体包括包含ITAM或ITAM-样基序的胞内信号转导结构域以及共刺激受体的胞内信号转导结构域。

[0474] 在一些实施方式中,第一受体包括包含ITAM或ITAM-样基序的胞内信号转导结构域,而所述第二受体包含共刺激受体的胞内信号转导结构域。与在相同细胞内诱导的活化信号结合的共刺激信号导致了免疫应答,如稳健且持续的免疫应答,如增加的基因表达、细胞因子和其他因子的分泌,和T细胞介导的效应功能,如细胞杀伤。

[0475] 在一些实施方式中,仅连接第一受体或仅连接第二受体都不会诱导稳健的免疫应答。在一些方面中,如果仅连接一个受体,细胞变得耐受或对抗原无应答,或者被抑制,和/或不被诱导增殖或分泌因子或发挥效应物功能。然而,在一些这类实施方式中,当连接多个受体时,如在表达第一和第二抗原的细胞的相遇之后,实现所需的应答,如全免疫活化或刺激,例如,由一种或多种细胞因子的分泌、增殖、持续、和/或进行免疫效应功能(如细胞毒性

杀伤目标细胞)所示。

[0476] 在一些实施方式中,两种受体分别诱导针对细胞的活化和抑制信号,使得受体之一与其抗原的结合活化细胞或诱导应答,但是第二抑制性受体与其抗原的结合诱导阻抑或减弱该应答的信号。示例是活化CAR与抑制性CAR或iCAR的组合。可使用这种策略,例如,其中活化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,而抑制性受体结合在正常细胞上表达但不在疾病或病症的细胞上表达的单独抗原。

[0477] 在一些实施方式中,在如下情况中使用多靶向策略,瞬时(例如,在与基因工程改造相关的刺激下)或永久地在非疾病细胞上表达和/或工程改造的细胞本身上表达与特定疾病或病症相关的抗原。在这种情况下,通过要求连接2个分离并单独特异性的抗原受体,可改善特异性、选择性和/或功效。

[0478] 在一些实施方式中,多种抗原(例如,第一和第二抗原)在所靶向的细胞、组织、或者疾病或病症上(如癌细胞上)表达。在一些方面中,细胞、组织、疾病或病症是多发性骨髓瘤或多发性骨髓瘤细胞。在一些实施方式中,多种抗原中的一种或多种一般也在不希望用细胞治疗靶向的细胞(如正常或非疾病细胞或组织)和/或工程改造的细胞本身上表达。在这类实施方式中,通过需要连接多个受体来实现细胞应答,实现了特异性和/或功效。

[0479] B.用于基因工程改造的方法和载体

[0480] 用于引入基因工程改造的组成部分(例如,抗原受体,例如,CAR或TCR)的各种方法是熟知的,并可用于本文提供的方法和组合物。示例性方法包括用于转移编码受体的核酸的那些,包括通过病毒(例如,逆转录病毒或慢病毒),转导,转座子,和电穿孔的转移方法。

[0481] 在一些实施方式中,采用重组感染性病毒颗粒(例如,源自猿病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移进入培养的细胞。在一些实施方式中,采用重组感染性病毒颗粒(例如,源自猿病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移进入培养的细胞。(2014) Gene Therapy 2014Apr 3.doi:10.1038/gt.2014.25; Carlens等,(2000) Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等,(2013) Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等,Trends Biotechnol.2011年11月,29(11):550-557。

[0482] 在一些实施方式中,所述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。在一些实施方式中,逆转录病毒包括源自任何禽或哺乳动物细胞来源的那些。逆转录病毒通常是兼嗜性的,这意味着它们能够感染数种物种(包括人类)的宿主细胞。在一个实施方式中,用待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已描述许多示例性逆转录病毒系统(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(1991) Virology 180:849-852;Burns等(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;和Boris-Lawrie和Temin(1993) Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-10。

[0483] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于,例如,Wang等,(2012) J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等,(2003) Blood.101:1637-1644;Verhoeyen等,(2009) Methods Mol Biol.506:97-114;和Cavalieri等,(2003) Blood.102(2):497-50。

[0484] 在一些实施方式中,通过电穿孔将重组核酸转移进入T细胞(参见例如,Chicaybam等,(2013) PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等.(2000) Gene Therapy 7(16):1431-14)。在一些实施方式中,通过转位将重组核酸转移进入T细胞(参见例如,Manuri等(2010) Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等,(2013) Molec Ther Nucl Acids 2,e74;和Huang等,(2009) Methods Mol Biol 506:115-12)。在免疫细胞中引入和表达遗传物质的其它方法包括磷酸钙转染(例如,描述于《分子生物学方案新编》(Current Protocols in Molecular Biology),约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),纽约州纽约)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染;钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990));和磷酸铈DNA共沉淀(Brash等,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0485] 用于转移编码重组产物的核酸的其他方法和载体是描述于,例如,国际专利申请公开号W02014055668和美国专利号7,446的那些。

[0486] 在一些实施方式中,可在扩增期间或之后,用T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)转染细胞(例如T细胞)。用于引入所需受体基因的该转染可用任何合适的逆转录病毒载体进行(例如)。然后,可从起始刺激物(例如CD3/CD28刺激物)释放基因修饰的细胞群,随后用第二类刺激物(例如通过从头诱导的受体(*de novo* introduced receptor))刺激。该第二类刺激物可包括:肽/MHC分子形式的抗原性刺激物,遗传引入受体的同源(交联)配体(例如CAR的天然配体)或任何直接结合新受体框架内的任何配体(如抗体)(例如同识别受体内的恒定区)。参见,例如,Cheadle等,“Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy”(“用于基于T细胞的治疗的嵌合抗原受体”)2012;907:645-66或Barrett等,Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer(“癌症的嵌合抗原受体治疗”)Annual Review of Medicine Vol.65:333-347(2014)。

[0487] 用于引入的其他核酸(例如基因)包括:用于提高疗效的那些,例如通过促进被转移细胞的存活和/或功能;提供用于细胞的选择和/或评估的标志物(例如体内评估存活或定位)的基因;改善安全性(例如通过使得细胞对体内负选择敏感)的基因,如Lupton S.D.等,Mol.and Cell Biol.,11:6(1991);和Riddell等,Human Gene Therapy 3:319-338(1992);还可参见Lupton等的公开PCT/US91/08442和PCT/US94/05601,其中描述了采用双官能可选择融合基因,其源自主要可正选择标志物与可负选择标志物的融合。参见例如Riddell等,美国专利号6,040,177,第14-17栏处。

[0488] 在一些情况中,可采用无需细胞(例如T细胞)被活化的载体。在一些此类情况中,在活化前,可对细胞进行选择和/或转导。

[0489] V. 其他细胞培养和扩增

[0490] 在一些实施方式中,从被孵育支持物表达的细胞(如在一种或多种刺激条件下混合或与一种或多种刺激剂混合),在支持物外被进一步孵育。在一些实施方式中,所述方法还涉及将组合物的目标细胞转移到不同的环境中。例如,适于细胞培养或扩增的环境。在一些实施方式中,细胞在封闭系统或封闭的容器中被转移到不同的环境中。在一些情况中,转移涉及将细胞从第一容器移动至第二容器。在一些情况中,不同环境在一个孵育器中。

[0491] 在一些实施方式中,转移在封闭系统中进行。在一些情况中,将包含细胞的无菌密封物转移到无菌环境或转移到密封容器中的不同环境。在一些实施方式中,转移在无菌环境或在无菌条件下进行。

[0492] 在一些实施方式中,破坏刺激剂和反应剂的可逆结合,然后将目标细胞转移至不同环境。在一些实施方式中,通过破坏作用剂和反应剂间的可逆结合来从支持物转移和移除细胞。在一些情况中,破坏通过加入生物素完成。在一些方面中,破坏从固定化的反应剂释放了目标细胞。在一些实施方式中,破坏从反应剂释放了目标细胞,然后对该目标细胞进行进一步孵育和扩增。在一些实施方式中,目标细胞从反应剂和竞争剂分离,然后进行进一步孵育和扩增。

[0493] 在一些其他实施方式中,将目标细胞转移至不同环境之前,不破坏刺激剂和反应剂的可逆结合。在一些实施方式中,将结合于作用剂的目标细胞转移到不同的环境中进行扩增,所述作用剂可逆结合反应剂。在一些方面中,对细胞进一步孵育和扩增后,加入破坏反应剂和作用剂间可逆结合的竞争剂。在一些情况中,破坏通过加入生物素完成。因此,在一些实施方式中,对目标细胞进行进一步孵育和/或扩增后,通过破坏从反应剂释放目标细胞。

[0494] 在一些实施方式中,进一步孵育和扩增在高于室温的温度下进行,如高于或高于约25℃,如一般高于或高于约32℃、35℃或37℃。在一些实施方式中,进一步孵育的温度是或约为37℃±2℃,如为或约为37℃。在一些实施方式中,进一步孵育的时间为或约为12~96小时,如至少或至少约12小时、24小时、36小时、48小时、72小时或96小时。

[0495] 在一些实施方式中,进一步孵育和扩增在封闭系统中进行。在一些实施方式中,在细胞从固定相表达后孵育细胞,如与一种或多种刺激条件或刺激剂混合,如在容器中(如袋中),包含细胞的容器进一步孵育部分时间。在一些实施方式中,所述容器(如袋)的孵育温度为或约为37℃±2℃,时长为或约为1小时至48小时、4小时至36小时、8小时至30小时或12小时至24小时,包括端点值。

[0496] 在一些实施方式中,生物反应器摇动器能摇动或晃动容器(如袋),由此提供移动(例如曝气和混合)袋中的细胞以促进细胞培养。生物反应器的摇动或晃动还能从气液表面提供充分的气体交换。本文所公开的具有与生物反应器袋组件相容的摇动平台的生物反应器的例子包括但不限于:GE Xuri W25、GE Xuri W5、Sartorius公司的BioSTAT RM 20|50、Finesse SmartRocker生物反应器系统、以及Pall XRS生物反应器系统。

[0497] VI. 组合物、制剂和施用方法

[0498] 本文还提供了包含表达重组蛋白(如重组受体(例如工程化改造抗原受体(如CAR或TCR))的工程化改造细胞的组合物,以及包含工程化改造细胞的组合物,包括药物组合物和制剂。本文还提供了使用这些组合物的方法以及这些组合物的用途,如在表达该抗原的疾病、病症和异常的治疗中的使用和用途,以及在检测、诊断和预防方法中的应用。

[0499] A. 组合物/制剂

[0500] 术语“药物制剂”指此类形式的制备物:所述其中所含活性成分的生物学活性有效,并且不含对待接受该制剂的对象具有不可接受的毒性的其他成分。

[0501] “药学上可接受的运载体”指药物制剂中的一种成分,其不是活性成分,其对对象无毒。药学上可接受的运载体包括但是不限于,缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0502] 在一些方面,运载体的选择部分决定于具体的细胞和/或给药方法。因此,存在多种合适的配方。例如,所述药物组合物可包含防腐剂。合适的防腐剂可包括,例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,采用两种或更多种防腐

剂的混合物。防腐剂或其混合物的存在量通常是约0.0001%至约2% (以组合物总重量计)。运载体描述于,例如,《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,Osol, A. 编(1980)。在所用剂量和浓度下,药学上可接受的运载体通常是对受者无毒的,包括但不限于:缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸缓冲剂;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;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁基或苄基醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)的多肽;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、谷胺酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它糖,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的抗衡离子,如钠;金属络合物(如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,例如聚乙二醇(PEG)。

[0503] 在一些方面,所述组合物包含缓冲剂。合适的缓冲剂包括,例如,柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和多种其他酸和盐。在一些方面,采用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物的存在量通常是约0.001%至约4% (以组合物总重量计)。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法具体描述于,例如,《雷明顿:药物科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy), LWW公司(Lippincott Williams & Wilkins);第21版(2005年5月1日)。

[0504] 所述制剂或组合物还可包含超过一种对于待接受细胞治疗的具体适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选活性与所用细胞互补的那些,这些活性成分各自的活性不会对彼此产生不利影响。这类活性成分适合以有效用于所需目的的用量联合存在。因此,在一些实施方式中,所述药物组合物还包含其它药学活性物质或药物,例如化疗剂,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,长春新碱等。在一些实施方式中,所述细胞或抗体以盐,例如,药学上可接受的盐,的形式给予。合适的药学上可接受的酸加成盐包括源自无机酸的那些,例如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,和有机酸,例如酒石酸、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。

[0505] 活性成分可包封在微囊剂中,在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在大乳液(macroemulsion)中。在某些实施方式中,所述药物组合物配制成包结复合物(例如环糊精包结复合物)或脂质体。脂质体可用以靶向宿主细胞(例如,T细胞或NK细胞)至具体组织。许多方法可用于制备脂质体,例如描述于,例如,Szoka等,Ann.Rev.Biophys.Bioeng.,9:467(1980)和美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中的那些。

[0506] 在一些方面,药物组合物采用定时-释放、延迟释放和持续释放递送系统,这样,组合物的递送发生在治疗部位敏化之前发生,并且有足够的时间造成该部位敏化。许多类型的释放递送系统是可得并已知的。此类系统能避免重复给予所述组合物,由此提高对象和医师的便利度。

[0507] 在一些实施方式中,药物组合物包含有效治疗或预防疾病或病症的量如治疗有效或预防有效量的细胞。在一些实施方式中,通过定期评估治疗的对象来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给药,可根据所述病症重复治疗直至疾病症状得到所需阻

遇。然而,其它剂量方案可能是有用的并可以确定。所需剂量的递送可以通过单次推注(bolus)给予所述组合物,通过多次推注给予所述组合物或通过连续输注给予组合物。

[0508] 可采用标准给药技术、制剂和/或器械给予细胞。本文提供了用于储存和给予组合物的制剂和装置,如注射器和瓶。所述细胞的给予可以是自体同源或是异源的。例如,可以从一个对象获取免疫抑制细胞或祖细胞,给予同一对象或不同的相容对象。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可通过局部注射给予,包括导管给药、全身注射、局部注射、静脉注射、或胃肠外给药。当给予治疗性组合物(例如,含有基因修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,其通常被配制成单位剂型的可注射形式(溶液、悬液、乳液)。

[0509] 制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺、透皮、肌肉内、鼻内、粘膜、舌下或栓剂给药的那些。在一些实施方式中,所述细胞群胃肠外给予。本文所用的术语“胃肠外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方式中,所述细胞群通过静脉内、腹膜内或皮下注射采用外围全身递送给予对象。

[0510] 在一些实施方式中,组合物以无菌液体制剂的形式提供,例如,等渗水性溶液、悬液、乳液、分散体或粘性组合物,其在一些方面中可缓冲至选择的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,液体组合物一定程度上多少更便于给药,尤其是通过注射给药。在另一方面,粘性组合物可配制在合适的粘度范围以延长与特定组织的接触时间。液体或粘性组合物可包括运载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多羟基化合物(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及以上合适的混合物。

[0511] 可通过将所述细胞纳入溶剂中,例如与合适的运载体、稀释剂、或赋形剂如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等活化,来制备无菌可注射溶液。也可将该组合物冻干。组合物可含有辅助性物质,如润湿、分散、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、风味剂、色素等,取决于所需的给药和制备途径。在一些方面,可查阅标准文件来制备合适制备物。

[0512] 可添加增强组合物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、螯合剂和缓冲剂。也可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)确保避免微生物作用。可通过使用延迟吸收的物质(如单硬脂酸铝和明胶)延长可注射药物形式的吸收。

[0513] 可制备缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括:包含抗体的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质是成型制品的形式,例如膜或微胶囊。

[0514] 用于体内给药的制剂一般为无菌的。无菌可例如通过无菌滤膜过滤来容易地实现。

[0515] B. 给药方法

[0516] 本文提供给予所述细胞、群和组合物的方法,所述细胞、群和组合物用于治疗或防止疾病、病症和紊乱,包括癌症的应用。在一些实施方式中,将所述细胞、群和组合物给予具有具体待治疗(例如,通过过继细胞治疗,例如过继T细胞治疗)的疾病或病症的对象或患者。在一些实施方式中,将本文提供的方法制备的细胞和组合物(例如在孵育和/或其它处理步骤之后工程改造的组合物和生产终末组合)给予对象,如具有所述疾病或病症或有风

险患上所述疾病或病症的对象。在一些方面中,所述方法由此治疗,例如,减轻所述疾病或病症的一种或多种症状,例如通过减小肿瘤负荷来减轻,其中该肿瘤表达由工程改造的T细胞识别的抗原的癌症中的。

[0517] 给予过继细胞治疗所用细胞的方法是已知的,可与本文方法和组合物联用。例如,过继T细胞治疗方法描述于,例如,Gruenberg等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.(2013) Nat Biotechnol.31 (10):928-933;Tsukahara等.(2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1):84-9;Davila等.(2013) PLoS ONE 8 (4):e61338。

[0518] 本文中所用的“对象”是哺乳动物,例如人或其它动物,并且通常是人。在一些实施方式中,被给予所述细胞、细胞群或组合物的对象(例如,患者)是哺乳动物,通常是灵长类,例如人。在一些实施方式中,所述灵长类是猴子或猿。所述对象可以是男性或女性,并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿,少年,青少年,成人和老年对象。在一些实施方式中,所述对象是非灵长类哺乳动物,例如啮齿类。

[0519] 本文中所用的术语“治疗”(及其语法变化形式例如“治疗的”和“治疗性”)指完全或部分减轻或减少疾病或病症或紊乱或与其相关的症状、不利作用或后果或表型。所需的治疗效果包括但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少疾病的任何直接或间接病理学结果、防止转移、减缓疾病进展速度、改善或减轻疾病状态和减轻或改善预后。该术语不表示完全治愈疾病或完全消除任一症状或作用或所有症状或后果。

[0520] 本文中所用的延迟疾病的发展表示推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定、遏制和/或拖延所述疾病(例如癌症)的发展。延缓可有不同的时间长度,这取决于疾病的病史和/或待治疗的个体。如本领域技术人员所知,实际上,充分或显著的延缓可涵盖预防(对于未发展成所述疾病的个体而言)。例如,晚期癌症(例如转移的发展)可被延缓。

[0521] 本文中所用的“预防”包括对于在倾向于发展成某疾病但尚未被诊断为该病的对象中对疾病发生或复发的预防。在一些实施方式中,所提供的细胞和组合物用于延缓疾病发展或减缓疾病进展。

[0522] 本文中,“阻抑”某功能或活性指相比其他相同仅目标条件或参数不同的情况或者相比另一情况,功能或活性降低。例如,与没有细胞条件下的肿瘤生长速率相比,阻抑肿瘤生长的细胞降低了肿瘤的生长速度。

[0523] 物质(例如,药物制剂、细胞或组合物),在给予中的“有效量”是指在一定剂量/量下、且作用必要的时间长度时,有效获得所需结果(例如治疗或预防结果)的量。

[0524] 物质(例如,药物制剂或细胞)的“治疗有效量”是指在剂量上和必需时程上,有效获得所需治疗结果(例如疾病、病症或紊乱的治疗)和/或该治疗的药物动力学或药代动力学效果的量。治疗有效量可根据多种因素而不同,例如疾病状态、年龄、性别,和对象体重,以及给予的细胞群。在一些实施方式中,所提供的方法涉及给予有效量(例如,治疗有效量)的所述细胞和/或组合物。

[0525] “预防有效量”指某一个量,其按照一定数量的剂量和必要时程,能够有效实现所需预防效果。通常但非一定,由于预防剂量在疾病的早期或之前用于对象,预防有效量将小于治疗有效量。

[0526] 所治疗的疾病或病症可为其中抗原的表达与疾病状况或紊乱的病因相关和/或涉

及疾病状况或紊乱的病因的任何疾病或病因,例如抗原表达造成、加剧或者涉及该疾病、病症或紊乱。示例性的疾病和病症可包括与细胞恶性化或转化的疾病或病症(例如肿瘤)、自身免疫性或炎性疾病、或传染性疾病,例如由细菌、病毒或其他病原体所致。示例性的抗原,包括与可接受治疗的各自疾病和病症关联的抗原,如前文所描述。一些具体实施方式中,嵌合抗原受体或转基因TCR特异性结合与疾病或病症相关抗原。

[0527] 因此,本文方法和应用包括用于过继细胞疗法的方法和应用。在一些实施方式中,该方法包括向对象、组织或细胞(如患有、易患或疑患某疾病、病症或紊乱的对象、组织或细胞)给予细胞或含有该细胞的组合物。在一些实施方式中,将所述细胞、群和组合物给予具有具体待治疗(例如,通过过继细胞治疗,例如过继T细胞治疗)的疾病或病症的对象。在一些实施方式中,给予对象(如患有、易患或疑患疾病或病症的对象)细胞或组合物以缓解疾病或病症的一种或多种症状。

[0528] 在一些实施方式中,细胞治疗(例如,过继T细胞治疗)通过自体转移进行,其中所述细胞分离自和/或在其它情况中制备自接受所述细胞治疗的对象,或从源自该对象的样品分离和/或制备。因此,在一些方面中,所述细胞源自需要治疗和所述细胞的对象(例如,患者),其在分离和加工之后给予同一对象。

[0529] 在一些实施方式中,所述细胞治疗(例如,过继T细胞治疗)通过同种异体转移进行,其中所述细胞分离自和/或在其它情况中制备自与待接受或最终接受所述细胞治疗的对象(例如,第一对象)不同的对象。在此类实施方式中,然后将所述细胞给予相同物种的不同对象,例如,第二对象。在一些实施方式中,所述第一和第二对象遗传相同。在一些实施方式中,所述第一和第二对象遗传学相似。在一些实施方式中,所述第二对象表达与第一对象病毒相同的HLA类或超型。可用任何合适的手段给予细胞。给药和给予可部分取决于该给予是短期还是长期的。不同给药方案包括但不限于在不同时间点单次或多次给予、推注给予和脉冲输注。

[0530] 在某些实施方式中,所述细胞,或细胞亚型的个体群,以如下范围给予所述对象:约100万至约1000亿个细胞和/或每千克体重约100万至约1000亿个细胞,例如,100万至约500亿个细胞(例如,约5百万个细胞,约2500万个细胞,约5亿个细胞,约10亿个细胞,约50亿个细胞,约200亿个细胞,约300亿个细胞,约400亿个细胞,或前述任何两个值之间确定的范围),例如约1000万至约1000亿个细胞(例如,约2000万个细胞,约3000万个细胞,约4000万个细胞,约6000万个细胞,约7000万个细胞,约8000万个细胞,约9000万个细胞,约100亿个细胞,约250亿个细胞,约500亿个细胞,约750亿个细胞,约900亿个细胞,或前述任何两个值之间确定的范围),和在一些情况中,约1亿个细胞至约500亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞,约2.5亿个细胞,约3.5亿个细胞,约4.5亿个细胞,约6.5亿个细胞,约8亿个细胞,约9亿个细胞,约30亿个细胞,约300亿个细胞,约450亿个细胞),或这些范围和/或每千克体重之间任何值。同样,剂量可根据疾病或紊乱和/或患者和/或其它治疗的具体属性而不同。在一些实施方式中,细胞作为联合治疗的一部分给予,例如与另一治疗性干预(如抗体或经工程改造的细胞或受体或药剂(如细胞毒性或治疗行药剂))同时或以任何顺序依次给予。在一些实施方式中,细胞与一种或多种其它治疗剂共同给予或与另一治疗干预联合给予,或者同时或者以任何顺序依次进行。在一些情况中,所述细胞与其他治疗共同给予,时间上足够接近从而细胞群增强一种或多种其它治疗剂的作用,反之亦然。在一些实施方式中,细胞在一种

或多种其它治疗剂之前给予。在一些实施方式中,细胞在一种或多种其它治疗剂之后给予。在一些实施方式中,一种或多种其他治疗剂包括细胞因子如IL-2,例如用于以增强持久性。在一些实施方式中,方法包括给予化疗剂。

[0531] 在给予细胞之后,在一些实施方式中,检测工程改造的细胞群的生物活性,例如,通过任何数量的已知方法进行。用以评估的参数包括:工程改造的或天然T细胞或其它免疫细胞与抗原的特异性体内结合,体内方式(例如,通过成像)或离体方式(例如,通过ELISA或流式细胞术)。在某些实施方式中,工程改造的细胞破坏目标细胞的能力可采用本领域已知的任何合适的方法来检测,例如描述于如下文献的细胞毒性试验,例如,Kochenderfer等,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009),和Herman等.J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)。在某些实施方式中,通过测定一种或多种细胞因子例如CD 107a、IFN γ 、IL-2和TNF的表达和/或分泌来检测细胞的生物活性。在一些方面,生物活性通过评估临床效果来检测,例如肿瘤负荷或负载的减少。

[0532] 在某些实施方式中,所述工程改造的细胞以各种方式进一步修饰,从而增加其治疗或预防功效。例如,通过细胞群表达的工程CAR或TCR可通过接头直接或间接地偶联靶向部件。将化合物(例如,CAR或TCR)偶联至靶向部分的实践是本领域已知的。参见例如,Wadwa等,J.Drug Targeting 3:1 1 1(1995),和美国专利5,087,616。

[0533] VII. 定义

[0534] 除非另外定义,本文使用的所有专业术语、符号和其它技术和科学术语或专有词汇旨在具有本发明所属领域技术人员通常所理解的相同含义。在一些情况中,本文出于阐明和/或便于引用目的对具有常规理解含义的术语加以限定,本文中包括此类限定不应理解为表示与本领域常规理解的有显著差异。

[0535] 如本文所用,单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括复数指代对象,除非文本中另有明确说明。例如,“一种”或“一个”指“至少一种或一个”或“一种(个)或多种(个)”。应理解本文中所述的方面和变化形式包括:由“(这些方面和变化形式)组成”和/或“基本由(这些方面和变化形式)组成。”

[0536] 本公开内容中,请求保护的主题的各个方面均以范围形式呈现。应当理解,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应被解释为对所要求保护的主题的范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,在提供值的范围的情况下,应当理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所述范围内的任何其他所述的或中间的值均被包括在要求保护的主题内。所述较小范围内可独立地包含这些较小范围的上下限,它们也属于请求保护的主题的范围,除非明确地排除所述范围的上下限。设定范围包含一个或两个限值时,请求保护的主题也包括排除所述限值之一或两个的范围。这普遍适用,与范围宽度无关。

[0537] 本文使用的术语“约”是指本技术领域技术人员容易知晓的各值的通常误差范围。提及值或参数时的“约”包括(并公开)涉及该值或参数本身的实施方式。例如,提及约“X”的描述包括“X的描述。”

[0538] 本文所用术语“载体”指能够扩增与之相连的另一核酸的一种核酸分子。该术语包括自复制核酸结构形式的载体,已经进入宿主细胞(载体引入其中的细胞)基因组的载体。一些载体能够引导与之操作性连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。载

体包括病毒颗粒,如逆病毒颗粒,如 γ 逆病毒和慢病毒载体。

[0539] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化株”和“转化细胞”,其包括原代转化细胞及其衍生的子代,不计传代次数。子代的核酸含量与亲本细胞未必完全相同,并可包含突变。本文包括功能或生物活性与在原代转化细胞中筛选或选择的功能或生物活性相同的突变子代。

[0540] 本文中所用的组合物指,两种或更多种产物、物质或化合物,包括细胞,的任何混合物。组合物可以是溶液、悬液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任意组合。

[0541] 当谈及一种或多种具体细胞类型或细胞群时,本文中所用的富集指,所述细胞类型或群的数量或百分数的增加,例如,相比于组合物中的总细胞数量或所述组合物的体积,或相对于其它细胞类型,例如通过基于由所述群或细胞表达的标志物的正选择,或通过基于不存在于待消耗的细胞群或细胞上的标志物的负选择。该术语不需要从所述组合物完全去除其它细胞、细胞类型或群,并且不需要如此富集的细胞在组合物中占100%或甚至接近100%。

[0542] 本文中,称细胞或细胞群就特定标志呈“阳性”指所述细胞上或细胞中存在可测水平的该特定标志物(通常是表面标志)。说到表面标志,该术语指据流式细胞术检测到的表面表达,例如用特异性结合该标志物的抗体染色并检测该抗体,其中,该染色可被流式细胞术以一定水平检测到,该水平显著高于用同型(同种型)对照(除该对照之外条件完全相同)用相同方法所得染色水平,和/或基本近似已知对标志阳性的细胞的水平,和/或显著高于已知该标志阴性的细胞的水平。

[0543] 本文中,称细胞或细胞群就具体标志呈“阴性”指所述细胞上或细胞中没有可测水平的该标志通常是表面标志。说到表面标志,该术语指据流式细胞术检测到的表面表达,例如用特异性结合该标志的抗体染色并检测该抗体,其中,该染色没有能被流式细胞术以以下所述的水平检测到,该水平显著高于用相同同种型的对照—除该对照之外条件完全相同—用相同方法所得染色水平,和/或检测到的水平显著低于已知该标志阳性的细胞的水平和/或实质性近似已知该标志阴性的细胞的水平。

[0544] 本文所用术语“表达”是指基于核酸分子编码序列(例如基因)产生多肽的过程。该过程可包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任意组合。

[0545] 本文中所用的对象包括任何活的生物体,例如人类和其它哺乳动物。哺乳动物,包括但不限于,人类和非人动物,包括农场动物,体育动物,啮齿类和宠物。

[0546] 如本文所用,对照是指与测试样品基本相同的样品,区别在于对照未用测试参数处理,或者,如果是血浆样品,对照可以来自未受目标条件/病症影响的正常志愿者。对照也可作为内部对照。

[0547] VII. 示例性实施方式

[0548] 提供的实施方式包括:

[0549] 1. 一种调节细胞的方法,所述方法包括:在可逆结合反应剂的刺激剂的存在下,孵育包含目标细胞的组合物,所述反应剂可选为第一反应剂,所述反应剂包含能够可逆结合所述刺激剂的多个刺激剂结合位点,所述孵育在使所述刺激剂特异性结合目标细胞表面上表达的分子的条件下进行,从而在所述目标细胞中诱导或调节信号。

- [0550] 2.如实施方式1所述的方法,其中:
- [0551] 多个刺激剂结合位点包括一个或多个结合位点Z1,其能够可逆结合于结合伴侣C1;以及
- [0552] 所述刺激剂还含有一个或多个结合伴侣C1。
- [0553] 3.如实施方式2所述的方法,其中:
- [0554] 多个刺激剂结合位点包括两个或多个结合位点Z1和/或还包括一个或多个结合位点Z2,其能够可逆结合于结合伴侣C1;和/或
- [0555] 所述刺激剂还含有两个或多个结合伴侣C1。
- [0556] 4.如实施方式1-3中任一项所述的方法,其中,所述刺激剂还含有结合位点B2,所述刺激剂与目标细胞表面上分子间的特异性结合包括B2与所述分子之间的相互作用。
- [0557] 5.如实施方式1-4中任一项所述的方法,其中,在孵育的至少部分过程中,至少多个目标细胞固定在支持物上,其中所述固定可选为可逆固定。
- [0558] 6.如实施方式5所述的方法,其中:
- [0559] 所述支持物是或含固定相;和/或
- [0560] 所述支持物是或含固体支持物。
- [0561] 7.如实施方式5或6所述的方法,其中,所述反应剂是第一反应剂,且至少部分孵育过程在如下物质的存在进行:(a) 第二反应剂,其固定于支持物上,和(b) 选择剂,其可逆结合所述第二反应剂。
- [0562] 其中,选择剂与至少多个目标细胞所表达的选择标志物的特异性结合实现所述至少多个目标细胞在支持物上的可逆固定。
- [0563] 8.如实施方式7所述的方法,其中,第二反应剂含有多个选择剂结合位点,它们各自能够可逆结合选择剂。
- [0564] 9.如实施方式8或14所述的方法,其中:
- [0565] 多个选择剂结合位点包括一个或多个结合位点Y1,其能够可逆结合于结合伴侣D1;以及
- [0566] 所述选择剂还含有一个或多个结合伴侣D1。
- [0567] 10.如实施方式9所述的方法,所述多个选择剂结合位点包括两个或多个结合位点Y1和/或还包括一个或多个结合位点Y2,其能够可逆结合于结合伴侣D1;和/或
- [0568] 所述选择剂含有两个或多个结合伴侣D1。
- [0569] 11.如实施方式5或6所述的方法,其中,在所述至少部分孵育过程中,通过将反应剂可逆固定在所述支持物上促进所述至少多个目标细胞的可逆固定。
- [0570] 12.如实施方式1-10中任一项所述的方法,其中:
- [0571] 所述孵育期间,第一反应剂不是且不结合于或不关联固体支持物、固定相、珠、微粒、磁性颗粒和/或基质;和/或
- [0572] 第一反应剂是柔性的,不含金属或磁性核心,仅含或主要含由有机多聚体构成,不为球形,基本上不为球形或形状不均一,和/或非刚性。
- [0573] 13.如实施方式1-4中任一项所述的方法,所述方法还包括合并:
- [0574] (a) 至少多个目标细胞;
- [0575] (b) 选择剂,其(i)能够特异性结合一个或多个所述至少多个目标细胞表达的选择

标志物;且(ii)直接或间接固定于或能够被直接或间接固定于支持物上;以及

[0576] (c)所述支持物;

[0577] 由此,所述至少多个目标细胞中的一个或多个通过所述选择剂被固定于所述支持物上。

[0578] 14.一种方法,所述方法包括:

[0579] (1)合并(a)含有目标细胞的组合物,(b)选择剂,所述选择剂(i)能够特异性结合至少多个目标细胞中的一个或多个表达的选择标志物,且(ii)直接或间接固定于或能够直接或间接固定于支持物上,和(c)所述支持物,由此,所述至少多个目标细胞中的一个或多个通过所述选择剂固定到所述支持物上;以及

[0580] (2)在可逆结合于反应剂的刺激剂存在下培养所述至少多个目标细胞,所述反应剂可选为第一反应剂,所述(第一)反应剂含有多个刺激剂结合位点,所述结合位点各自能够在令所述刺激剂特异性结合目标细胞表面表达的分子的条件结合所述刺激剂,从而诱导或调节目标细胞内的信号。

[0581] 15.如实施方式13或14所述的方法,其中:

[0582] 所述选择剂还含有一个或多个结合伴侣D1,其可选能够与结合位点Z1可逆结合;和/或

[0583] 所述选择剂还含有一个或多个结合伴侣D1,其可选能够与结合位点Y1可逆结合。

[0584] 16.如实施方式10-11中任一项所述的方法,所述方法还包括:在所述合并之后,还包括将组合物中其他细胞从固定化的目标细胞分离和/或去除。

[0585] 17.如实施方式16或17所述的实施方式,还包括清洗步骤。

[0586] 18.如实施方式15-17中任一项所述的方法,所述分离和/或所述清洗步骤在所述孵育开始之前进行。

[0587] 19.如实施方式13-18中任一项所述的方法,其中,所述支持物是或含固定相和/或是或包含固体支持物。

[0588] 20.如实施方式13-19中任一项所述的方法,其中:

[0589] 所述孵育在所述合并之前进行和/或开始;

[0590] 所述孵育在所述合并之后进行和/或开始;

[0591] 21.如实施方式13-20中任一项所述的方法,其中,所述合并至少在部分所述孵育期间进行。

[0592] 22.如实施方式13-21中任一项所述的方法,其中,选择剂在支持物上的固定是可逆的。

[0593] 23.如实施方式14-22中任一项所述的方法,其中,多个刺激剂结合位点包括一个或多个结合位点Z1,其能够可逆结合于结合伴侣C1;以及

[0594] 所述刺激剂还含有一个或多个结合伴侣C1。

[0595] 24.如实施方式23所述的方法,其中:

[0596] 多个刺激剂结合位点包括两个或多个结合位点Z1和/或还包括一个或多个结合位点Z2,其能够可逆结合于结合伴侣C1;和/或

[0597] 所述刺激剂还含有两个或多个结合伴侣C1。

[0598] 25.如实施方式13-24中任一项所述的方法,其中,所述刺激剂还含有结合位点B2,

所述刺激剂与目标细胞表面上分子间的特异性结合包括B2与所述分子之间的相互作用。

[0599] 26.如实施方式13-25中任一项所述的方法,其中:

[0600] 所述反应剂是第一反应剂;且

[0601] 所述选择剂通过其与固定于所述支持物上的第二反应剂的可逆结合间接固定于所述支持物。

[0602] 27.如实施方式26所述的方法,其中,第二反应剂含有多个选择剂结合位点,它们能够可逆结合所述选择剂。

[0603] 28.如实施方式27所述的方法,其中,所述多个选择剂结合位点包含结合位点Y1,其能够结合于结合伴侣D1,所述结合伴侣D1中的一个或多个包含于所述选择剂。

[0604] 29.如实施方式28所述的方法,其中:

[0605] 所述多个刺激剂结合位点包括两个或多个结合位点Y1和/或还包括一个或多个结合位点Y2,其能够可逆结合于结合伴侣D1;和/或

[0606] 所述选择剂含有两个或多个结合伴侣D1。

[0607] 30.如实施方式26-29中任一项所述的方法,其中,在所述合并时,第二反应剂和选择剂一起可逆结合于复合物中,其中所述合并通过合并细胞和所述复合物进行。

[0608] 31.如实施方式26-30中任一项所述的方法,其中,在所述合并时,第二反应剂和选择剂不在复合物中,其中该合并通过分别加入第二反应剂和选择剂进行。

[0609] 32.如实施方式7-10和13-31中任一项所述的方法,其中,所述选择剂还包含结合位点B1,且所述选择剂与选择标志物的特异性结合包括B1和选择标志物间的相互作用。

[0610] 33.如实施方式1-32或45-72中任一项所述的方法,其中:

[0611] 所述刺激剂与第二反应剂之间的可逆结合能够通过添加某种物质被破坏;和/或

[0612] 所述选择剂与第一反应剂或所述选择剂与第二反应剂间的可逆结合能够通过添加某种物质被破坏;和/或

[0613] 所述刺激剂和第一反应剂间的可逆结合、以及所述选择剂和第二反应剂和/或第一反应剂间的可逆结合各自能够通过加入某种物质被破坏;

[0614] 第二刺激剂与第二反应剂或第四反应剂间的可逆结合能够通过添加某种物质被破坏;和/或

[0615] 第二选择剂和第一反应剂和/或第二选择剂与第二反应剂和/或第二选择剂与第三反应剂间的可逆结合能够通过加入某种物质被破坏;和/或

[0616] 第二刺激剂和第一反应剂或第四反应剂间的可逆结合、以及第二选择剂和第一反应剂、第二反应剂和/或第三反应剂间的可逆结合各自能够通过加入某种物质被破坏。

[0617] 34.如实施方式33或100所述的方法,或如实施方式120所述的组合物,或如实施方式128所述的制品或如实施方式131所述的设备,其中:

[0618] 所述物质为或包含游离结合伴侣;或

[0619] 所述物质为或包含竞争剂;和/或

[0620] 所述物质实现除了竞争所述结合以外的破坏结合的变化。

[0621] 35.如实施方式34所述的方法,其中,所述物质对所述目标细胞或大部分目标细胞无害,和/或与在相同条件下但不加入所述物质相比,以足以实现所述破坏的量向所述目标细胞加入所述物质对细胞存活和/或增殖能力的降低少于或少于约90%、80%、70%、60%

或50%。

[0622] 36.如实施方式37所述的方法,其中,所述物质为或包含肽或多肽。

[0623] 37.如实施方式33-36中任一项所述的方法,其中,

[0624] 所述物质可包括选自下组的分子:链霉亲和素结合分子;生物素;D-生物素;特异性结合链霉亲和素或链霉亲和素类似物的生物素类似物,所述链霉亲和素类似物在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;以及包含SEQ ID NO:1、4、5和7所示序列的肽,或由SEQ ID NO:1、4、5和7所示序列组成的肽;或

[0625] 所述物质包括金属螯合剂,其可选为EDTA或EGTA。

[0626] 38.如实施方式1-27中任一项所述的方法,其中,

[0627] 刺激剂仅包含所述结合位点B2之一;

[0628] 其中,所述刺激剂仅包含特异性结合所述分子的一个结合位点;

[0629] 其中,所述刺激剂以单价方式特异性结合于所述分子;

[0630] 其中,所述选择剂仅包含所述结合位点B1之一;

[0631] 其中,所述选择剂仅包含特异性结合选择标志物所述分子的一个结合位点;和/或

[0632] 其中,所述选择剂以单价方式特异性结合所述选择标志物。

[0633] 39.如实施方式4-13和25-38中任一项所述的方法,其中,

[0634] 所述结合位点B2包括抗体结合位点;和/或

[0635] 所述结合位点B1包括抗体结合位点。

[0636] 40.如实施方式1-39中任一项所述的方法,其中:

[0637] 所述刺激剂为或包含选自下组的作用剂:抗体片段、单价抗体片段、具有抗体样结合功能的蛋白质类结合分子、包含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

[0638] 所述刺激剂包含抗体片段;

[0639] 所述刺激剂为或包含Fab片段;

[0640] 所述刺激剂为选自下组的二价抗体片段:(Fab)₂'片段和二价单链Fv(scFv)片段;

[0641] 所述刺激剂为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv;和/或所述刺激剂为具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子,其选自下组:适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋白和阿维多聚体;和/或

[0642] 所述选择剂为或包含选自下组的作用剂:抗体片段、单价抗体片段、具有抗体样结合功能的蛋白质类结合分子、包含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

[0643] 所述选择剂包含抗体片段;

[0644] 所述选择剂为或包含Fab片段;

[0645] 所述选择剂为选自下组的二价抗体片段:(Fab)₂'片段和二价单链Fv(scFv)片段;

[0646] 所述选择剂为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv;和/或所述选择剂为具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子,其选自下组:适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋

白和阿维多聚体。

[0647] 41. 如实施方式1-40中任一项所述的方法, 其中:

[0648] 目标细胞表面上表达的所述分子是蛋白质或多肽; 和/或

[0649] 所述选择标志物是蛋白质或多肽。

[0650] 42. 如实施方式1-41中任一项所述的方法, 其中:

[0651] 目标细胞表面上表达的所述分子是或包含T细胞或B细胞抗原受体复合物的成员;

[0652] 目标细胞表面上表达的所述分子是或包含CD3链;

[0653] 目标细胞表面上表达的所述分子是或包含CD3 ζ ;

[0654] 目标细胞表面上表达的所述分子是或包含T细胞受体或B细胞受体的抗原结合部分;

[0655] 目标细胞表面上表达的所述分子是或包含嵌合抗原受体;

[0656] 所述刺激剂和所述分子的特异性结合能够将主要信号递送到T细胞或B细胞。

[0657] 43. 如实施方式7-42中任一项所述的方法, 其中:

[0658] 所述选择标志物是B细胞或T细胞共受体;

[0659] 所述选择标志物是或包含T细胞或T细胞抗原受体复合物的成员;

[0660] 所述选择标志物是或包含CD3链;

[0661] 所述选择标志物是或包含CD3 ζ 链;

[0662] 所述选择标志物是或包含CD8;

[0663] 所述选择标志物是或包含CD4; 和/或

[0664] 所述选择剂与所述选择标志物之间的特异性结合不诱导给向目标细胞的信号, 或者不包括向目标细胞传递刺激或活化或增殖信号。

[0665] 44. 如实施方式1-43中任一项所述的方法, 其中:

[0666] 所述刺激剂包含MHC-I: 肽复合物或其功能性部分、MHC-II: 肽复合物或其功能性部分, 和/或能够通过T细胞中的TCR/CD3复合物、T细胞中含CD3的复合物和/或T细胞中含ITAM的分子来传递刺激信号。

[0667] 对所述信号的所述诱导或调节使得目标细胞中的细胞因子表达提高, 所述细胞因子可选为IL-2、IFN- γ 和/或IL-4。

[0668] 45. 如实施方式1-44中任一项所述的方法, 其中, 目标细胞表面上表达的所述分子是第一分子, 且所述刺激剂还能结合至少多个目标分子表面上表达的第二分子。

[0669] 46. 如实施方式1-44中任一项所述的方法, 其中, 目标细胞表面上表达的所述分子是第一分子, 所述刺激剂是第一刺激剂, 且在第二刺激剂的存在进行进一步孵育, 所述第二刺激剂能够结合至少多个目标细胞表面上表达的第二分子。

[0670] 47. 如实施方式46所述的方法, 其中, 第二刺激剂可逆结合第一反应剂或可逆结合第四反应剂。

[0671] 48. 如实施方式46或47所述的方法, 其中:

[0672] 第二刺激剂包含一个或多个结合伴侣C1;

[0673] 第二刺激剂包含一个或多个结合伴侣C2, 所述结合伴侣C2能够结合于刺激剂结合位点; 和/或

[0674] 第二刺激剂包含一个或多个结合伴侣C2, 所述结合伴侣C2能够结合于结合位点

Z2,且所述反应剂还包含一个或多个结合位点Z2。

[0675] 49.如实施方式48所述的方法,其中:

[0676] C2和C1相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分;

[0677] Z1和Z2相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分。

[0678] 50.如实施方式46-49中任一项所述的方法,其中,所述第二刺激剂包含一个或多个结合位点B4,其促进第二刺激剂与第二分子之间的特异性结合。

[0679] 51.如实施方式45所述的方法,其中,所述刺激剂还包含一个或多个结合位点B4,其促进所述刺激剂与第二分子之间的特异性结合。

[0680] 52.如实施方式45-51中任一项所述的方法,其中,所述作用剂或第二作用剂与第二分子的特异性结合能够增强、抑制或改变通过第一分子递送的信号。

[0681] 53.如实施方式45-52中任一项所述的方法,其中:

[0682] 第二分子是共刺激分子;

[0683] 第二分子是辅助分子;第二分子是细胞因子受体;

[0684] 第二分子是趋化因子受体;

[0685] 第二分子是免疫检查点分子;或

[0686] 第二分子是TNF家族或TNF受体家族的成员。

[0687] 54.如实施方式1-53中任一项所述的方法,其中:

[0688] 所述(第一)分子,其为第一分子,是共刺激分子、细胞因子受体、趋化因子受体、免疫检查点分子、TNF家族或TNF受体家族的成员、或前述任一的功能性部分;

[0689] 所述(第一)分子包括CD28、CD137、或CD40配体、或CD40、或OX40、或ICOS、或前述任一的功能性部分;和/或

[0690] 第二分子包括CD28、CD137、或CD40配体、或CD40、或OX40、或ICOS、或前述任一的功能性部分。

[0691] 55.如实施方式1-54中任一项所述的方法,其中:

[0692] 所述(第一)刺激剂或第二刺激剂特异性结合CD3,且可选地选自下组:抗CD3抗体、抗CD3抗体的单价抗体片段、抗CD3抗体的二价抗体片段、和具有抗体样结合特征的蛋白质类CD3结合分子,和/或

[0693] 所述(第一)刺激剂或第二刺激剂特异性结合CD28,且可选地选自下组:抗CD28抗体、抗CD28抗体的单价抗体片段、抗CD28抗体的二价抗体片段、和蛋白质类CD28结合分子、B7家族成员或其部分、及其混合物;

[0694] 所述(第一)刺激剂或第二刺激剂特异性结合CD137,且可选地选自下组:抗CD137抗体、抗CD28抗体的单价抗体片段、抗CD137抗体的二价抗体片段、蛋白质类CD137结合分子、4-1BB配体或其CD137结合部分、及其混合物;和/或

[0695] 所述(第一)刺激剂和/或第二作用剂包括特异性结合CD40的作用剂,且可选地选自下组:抗CD40抗体、抗CD40抗体的单价抗体片段、抗CD40抗体的二价抗体片段、和蛋白质类CD40结合分子、CD40配体(CD154)、及其混合物。

[0696] 56.如实施方式7-55中任一项所述的方法,其中,所述选择标志物是第一选择标志物,且所述选择剂还能够结合表达于至少多个目标细胞表面上的第二选择标志物。

[0697] 57.如实施方式7-55中任一项所述的方法,所述选择剂是第一选择剂,选择标志物

是第一选择标志物,并且还在第二选择剂存在下进行孵育,所述第二选择剂能够特异性结合至少多个靶细胞表面表达的第二选择标志物。

[0698] 58.如实施方式57所述的方法,其中:

[0699] 第二选择剂可逆结合第二反应剂,或

[0700] 第二选择剂可逆结合固定于所述支持物或其他支持物上的第三反应剂。

[0701] 59.如实施方式57或58所述的方法,其中:

[0702] 第二选择剂含有一个或多个结合伴侣D1;和/或

[0703] 第二选择剂含有一个或多个结合伴侣D2,所述结合伴侣D2能够与结合位点Y1结合;和/或

[0704] 第二选择剂含有一个或多个结合伴侣D2,所述结合伴侣D2能够与结合位点Y2结合,且第二反应剂还含有一个或多个结合位点Y2。

[0705] 60.如实施方式59所述的方法,其中:

[0706] D1和D2相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分;

[0707] Y1和Y2相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分;

[0708] C1和D1相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分;和/或

[0709] Z1和Y1相同或基本相同、或者包含相同或基本相同的部分。

[0710] 61.如实施方式57-60中任一项所述的方法,其中,第二选择剂含有一个或多个结合位点B3,其促进第二选择剂与第二选择标志物之间的特异性结合。

[0711] 62.如实施方式56和58-61中任一项所述的方法,其中,所述选择剂还包含一个或多个结合位点B3,其促进所述选择剂与第二选择标志物之间的特异性结合。

[0712] 63.如实施方式45-62中任一项所述的方法,

[0713] 其中,第二刺激剂仅包含所述结合位点B4之一;

[0714] 其中,第二刺激剂仅包含特异性结合第二分子的单个结合位点;

[0715] 其中,第二刺激剂以单价方式特异性结合于所述分子;

[0716] 其中,第二刺激剂仅包含所述结合位点B3之一;

[0717] 其中,第二选择剂仅包含特异性结合第二选择标志物的单个结合位点;和/或

[0718] 其中,第二选择剂以单价方式特异性结合第二选择标志物。

[0719] 64.如实施方式50-63中任一项所述的方法,其中:

[0720] 所述结合位点B4包括抗体结合位点;和/或

[0721] 所述结合位点B3包括抗体结合位点。

[0722] 65.如实施方式45-64中任一项所述的方法,其中:

[0723] 第二刺激剂为或包含选自下组的作用剂:抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质类结合分子、包含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

[0724] 第二刺激剂包含抗体片段;

[0725] 所述刺激剂为或包含Fab片段;

[0726] 第二刺激剂为选自下组的二价抗体片段:(Fab)₂'片段和二价单链Fv(scFv)片段;

[0727] 第二刺激剂为选自下组的单价抗体片段:Fab片段、Fv片段和scFv;和/或第二刺激剂为具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子,其选自下组:适体、基于脂质运载蛋白家族

多肽的突变蛋白、糖体、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋白和阿维多聚体；和/或

[0728] 第二选择剂为或包含选自下组的作用剂：抗体片段、单价抗体片段、具有免疫球蛋白样功能的蛋白质类结合分子、包含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

[0729] 第二选择剂包含抗体片段；

[0730] 第二选择剂为或包含Fab片段；

[0731] 第二选择剂为选自下组的二价抗体片段： $(\text{Fab})_2$ 片段和二价单链Fv (scFv) 片段；

[0732] 第二选择剂为选自下组的单价抗体片段：Fab片段、Fv片段和scFv；和/或第二选择剂为具有抗体样结合特征的蛋白质类结合分子，其选自下组：适体、基于脂质运载蛋白家族多肽的突变蛋白、糖体、基于锚定蛋白骨架的蛋白质、基于晶体骨架的蛋白质、附着连接蛋白和阿维多聚体。

[0733] 66. 如实施方式45-65中任一项所述的方法，其中：

[0734] 目标细胞表面上表达的第二分子是蛋白质或多肽；和/或

[0735] 第二选择标志物为或包含蛋白质或多肽。

[0736] 67. 如实施方式56-66中任一项所述的方法，其中：

[0737] 第二选择标志物是B细胞或T细胞共受体；

[0738] 第二选择标志物是或包含T细胞或T细胞抗原受体复合物的成员；

[0739] 第二选择标志物是或包含CD3链；

[0740] 第二选择标志物是或包含CD3 ζ 链；

[0741] 第二选择标志物是或包含CD8；

[0742] 第二选择标志物是或包含CD4；和/或

[0743] 第二选择剂与第二选择标志物之间的特异性结合不诱导给向目标细胞的信号，或者不包括对目标细胞诱导刺激或活化或增殖信号。

[0744] 68. 一种调节细胞的方法，所述方法包括：

[0745] (a) 将包含目标细胞的组合物与可逆结合反应剂的刺激剂合并，所述反应剂固定于支持物上，其中所述反应剂包含多个刺激剂结合位点，这些位点各自能够可逆结合所述刺激剂，且能够特异性结合目标细胞表面上表达的分子，

[0746] 从而将所述目标细胞固定在所述支持物上；和

[0747] (b) 从固定化的目标细胞分离或去除组合物中的其他细胞；以及

[0748] (c) 在刺激剂的存在下孵育至少一些固定的目标细胞，所述孵育的条件使得信号在至少多个所述目标细胞中被诱导或调节。

[0749] 69. 如实施方式69所述的方法，其中，所述支持物是或含固体支持物和/或固定相。

[0750] 70. 如实施方式68或69所述的方法，其中，多个刺激剂结合位点包括一个或多个结合位点Z1，其能够可逆结合于结合伴侣C1；以及

[0751] 所述刺激剂还含有一个或多个结合伴侣C1。

[0752] 71. 如实施方式70所述的方法，其中：

[0753] 多个刺激剂结合位点包括两个或多个结合位点Z1和/或还包括一个或多个结合位点Z2，其能够可逆结合于结合伴侣C1；和/或

[0754] 所述刺激剂含有两个或多个结合伴侣C1。

[0755] 72.如实施方式68-71中任一项所述的方法,其中,所述刺激剂还含有结合位点B2,其中,所述刺激剂与目标细胞表面上所述分子间的特异性结合包括B2与所述分子之间的相互作用。

[0756] 73.如实施方式2-72中任一项所述的方法,其中:

[0757] 所述支持物包含树脂或基质;

[0758] 所述支持物包含凝聚过滤基质;

[0759] 所述支持物包含色谱基质;和/或

[0760] 所述支持物包含基于纤维素或基于有机聚合物的膜。

[0761] 74.如实施方式72所述的方法,其中,所述色谱基质位于柱中,和/或其中,所述色谱是柱色谱或平面色谱。

[0762] 75.如实施方式2-74中任一项所述的方法,其中,所述支持物包含微粒、刚性颗粒、磁性颗粒或珠。

[0763] 76.如实施方式77所述的方法,其中,所述支持物是固定相,在所述孵育和/或所述接触的全程或部分期间包含于容器中。

[0764] 78.如实施方式76所述的方法,其中,所述容器包括选自以下所述的容器:柱、适合双向流的容器、移液管吸头、管、和适合液体样品流动通过的柱。

[0765] 79.如实施方式1-78中任一项所述的方法,其中:

[0766] 所述目标细胞包括血细胞;

[0767] 所述目标细胞包括白细胞;

[0768] 所述目标细胞包括淋巴细胞;

[0769] 所述目标细胞包括B细胞;

[0770] 所述目标细胞包括B细胞群;

[0771] 所述目标细胞包括T细胞;

[0772] 所述目标细胞包括T细胞群;和/或

[0773] 所述目标细胞包括天然杀伤(NK)细胞。

[0774] 80.如实施方式79所述的方法,其中,目标细胞包括:抗原特异性T细胞或其细胞群、辅助T细胞或其细胞群、细胞毒T细胞或其细胞群、记忆T细胞或其细胞群、调节T细胞或其细胞群、NK细胞或其细胞群、抗原特异性B细胞或其细胞群、记忆性B细胞或其细胞群、或者调节B细胞或其细胞群。

[0775] 81.如实施方式1-80中任一项所述的方法,其中,所述信号的诱导或调节诱导、阻遏、抑制或增强了活化、增殖、存活和/或扩增。

[0776] 82.如实施方式1-81中任一项所述的方法,其中:

[0777] 第一反应剂是或含:链霉亲和素、亲和素、可逆结合生物素的链霉亲和素类似物、可逆结合生物素的亲和素类似物、包含能够结合过渡金属离子的至少两个螯合基团K的反应剂、能够结合寡聚组氨酸亲和标签的反应物、能够结合谷胱甘肽-S转移酶的反应物、钙调蛋白或其类似物、能够结合钙调蛋白结合肽(CBP)的反应物;能够结合FLAG肽的反应物;能够结合HA标签的反应物;能够结合麦芽糖结合蛋白(MBP)的反应物;能够结合HSV表位的反应物;能够结合myc表位的反应物;和/或能够结合生物素化载体蛋白的反应物;和/或

[0778] 第二反应剂是或含：链霉亲和素、亲和素、可逆结合生物素的链霉亲和素类似物、可逆结合生物素的亲和素类似物、包含能够结合过渡金属离子的至少两个螯合基团K的反应剂、能够结合寡聚组氨酸亲和标签的反应物、能够结合谷胱甘肽-S转移酶的反应物、钙调蛋白或其类似物、能够结合钙调蛋白结合肽 (CBP) 的反应物；能够结合FLAG肽的反应物；能够结合HA标签的反应物；能够结合麦芽糖结合蛋白 (MBP) 的反应物；能够结合HSV表位的反应物；能够结合myc表位的反应物；和/或能够结合生物素化载体蛋白的反应物。

[0779] 82. 如实施方式81所述的方法，其中：

[0780] 第一反应剂包括寡聚物或聚合物；和/或

[0781] 第二反应剂包括寡聚物或聚合物；和/或

[0782] 第三反应剂包括寡聚物或聚合物。

[0783] 83. 如实施方式1-82中任一项所述的方法，其中：

[0784] 第一反应剂包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物的寡聚物或聚合物，所述寡聚物或聚合物包含通过多糖或双功能化接头交联的链霉亲和素、亲和素或类似物单体；和/或

[0785] 第二反应剂包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物的寡聚物或聚合物，所述寡聚物或聚合物包含通过多糖或双功能化接头交联的链霉亲和素、亲和素或类似物单体；和/或

[0786] 第三反应剂包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物的寡聚物或聚合物，所述寡聚物或聚合物包含通过多糖或双功能化接头交联的链霉亲和素、亲和素或类似物单体；

[0787] 第四反应剂包含链霉亲和素、亲和素、链霉亲和素类似物或亲和素类似物的寡聚物或聚合物，所述寡聚物或聚合物包含通过多糖或双功能化接头交联的链霉亲和素、亲和素或类似物单体。

[0788] 84. 如实施方式1-83中任一项所述的方法，其中：

[0789] 第二反应剂包含三个或更多个链霉亲和素单体或者三个或更多个链霉亲和素突变蛋白单体；和/或

[0790] 第三反应剂包含三个或更多个链霉亲和素单体或者三个或更多个链霉亲和素突变蛋白单体；和/或

[0791] 第四反应剂包含三个或更多个链霉亲和素单体或者三个或更多个链霉亲和素突变蛋白单体；和/或

[0792] 第五反应剂包含三个或更多个链霉亲和素单体或者三个或更多个链霉亲和素突变蛋白单体。

[0793] 85. 如实施方式1-84中任一项所述的方法，其中，第一反应剂与第二反应剂和/或第一反应剂与第三反应剂和/或第一反应剂与第四反应剂是相同的或基本相同。

[0794] 86. 如实施方式1-85中任一项所述的方法，其中：

[0795] 第一反应剂和第二反应剂不同；

[0796] 第一反应剂和第三反应剂不同；和/或

[0797] 第二反应剂和第三反应剂不同；和/或

[0798] 第一反应剂和第四反应剂不同；和/或

- [0799] 第二反应剂和第四反应剂不同;和/或
- [0800] 第三反应剂和第四反应剂不同。
- [0801] 87.如实施方式1-86中任一项所述的方法,其中:
- [0802] 结合伴侣C1、结合伴侣C2、结合伴侣D1和/或结合伴侣D2独立地包含生物素、可逆结合链霉亲和素或亲和素的生物素类似物;和/或
- [0803] 结合伴侣C1和结合伴侣C2各自独立地包含生物素、可逆结合链霉亲和素或亲和素的生物素类似物;和/或
- [0804] 结合伴侣D1和结合伴侣D2各自独立地包含生物素、可逆结合链霉亲和素或亲和素的生物素类似物。
- [0805] 88.如实施方式1-87中任一项所述的方法,其中:
- [0806] 所述(第一)反应剂物质包含可逆结合生物素的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;
- [0807] 所述(第一)反应剂包含可逆结合生物素类似物的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;和/或
- [0808] 所述(第一)反应剂物质包含可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;和/或
- [0809] 所述(第一)反应剂包含可逆结合选自下组的链霉亲和素结合肽的链霉亲和素类似物或亲和素类似物:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 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)。
- [0810] 89.如实施方式1-88中任一项所述的方法,其中:
- [0811] 第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含可逆结合生物素的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;
- [0812] 第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含可逆结合生物素类似物的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;和/或
- [0813] 第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含可逆结合链霉亲和素结合肽的链霉亲和素类似物或亲和素类似物;和/或
- [0814] 第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含可逆结合选自下组的链霉亲和素结合肽的链霉亲和素类似物或亲和素类似物:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 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)。
- [0815] 90.如实施方式1-89中任一项所述的方法,其中:
- [0816] 结合伴侣C1、结合伴侣C2、结合伴侣D1和/或结合伴侣D2独立地包含选自下组的链霉亲和素结合肽:Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-

Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 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) ;

[0817] 结合伴侣C1和/或结合伴侣C2各自独立地包含选自下组的链霉亲和素结合肽: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 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) ;

[0818] 结合伴侣D1和/或结合伴侣D2各自独立地包含选自下组的链霉亲和素结合肽: Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:8)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)3-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:17)、Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)2-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (SEQ ID NO:18) 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) ;

[0819] 91.如实施方式1-90中任一项所述的方法,其中:

[0820] 所述(第一)反应剂包含链霉亲和素类似物,所述链霉亲和素类似物在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;和/或

[0821] 第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含链霉亲和素类似物,所述链霉亲和素类似物在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷或在对应于野生型链霉亲和素第44~47位的位置上具有氨基酸序列Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷;和/或

[0822] 结合位点Z1、结合位点Z2、结合位点Y1和/或结合位点Z2各自包含氨基酸序列Val-Thr-Ala-Arg和/或包含氨基酸序列Ile-Gly-Ala-Arg。

[0823] 92.如实施方式1-91中任一项所述的方法,其中,所述结合伴侣C1和/或结合伴侣C2分别与所述结合位点Z1和/或Z2间的结合能够在二价阳离子的存在下发生和/或不能在缺乏二价阳离子的情况下发生和/或通过去除二价阳离子被破坏。

[0824] 93.如实施方式1-92中任一项所述的方法,其中:

[0825] 所述结合伴侣C1和/或C2各自和/或所述结合伴侣D1和/或D2各自独立地包含钙调蛋白结合肽,且所述(第一)反应剂和/或第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含钙调蛋白,或

[0826] 所述结合伴侣C1和/或C2各自和/或所述结合伴侣D1和/或D2各自独立地包含FLAG肽,且所述(第一)反应剂和/或第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含结合FLAG肽的抗体,或

[0827] 所述结合伴侣C1和/或C2各自和/或所述结合伴侣D1和/或D2各自独立地包含寡聚组氨酸标签,且所述(第一)反应剂和/或第二反应剂和/或第三反应剂和/或第四反应剂包含结合寡聚组氨酸标签的抗体。

[0828] 94.如实施方式1-93中任一项所述的方法,其中,所述结合伴侣C1和所述结合位点Z1间的结合、和/或所述结合伴侣C2和所述结合位点Z2间的结合、和/或所述结合伴侣D1和所述结合位点Y1间的结合、和/或所述结合伴侣D2和所述结合位点Y2间的结合能够被金属离子螯合所破坏,所述金属离子螯合可选地通过加入EDTA或EGTA完成。

[0829] 95.如实施方式1-94中任一项所述的方法,其中:

[0830] 结合伴侣C1和C2不同和/或其与所述(第一)反应剂的相互作用可通过加入不同的物质被破坏,或不可通过加入相同的物质被破坏;

[0831] 结合伴侣D1和D2不同和/或其与第二反应剂的相互作用可通过加入不同的物质被破坏,或不可通过加入相同的物质被破坏;

[0832] 结合伴侣C1和/或C2与结合伴侣D1和/或D2不同,和/或其分别与第一反应剂和第二反应剂的相互作用可通过加入不同的物质被破坏,或不可通过加入相同的物质被破坏。

[0833] 96.如实施方式1-94中任一项所述的方法,其中:

[0834] 所述结合伴侣C1和C2相同或基本相同,和/或其与第一反应剂的相互作用可通过加入相同的物质被破坏;

[0835] 所述结合伴侣D1和D2相同或基本相同,和/或其与第二反应剂的相互作用可通过加入相同的物质被破坏;

[0836] 结合伴侣C1和/或C2与结合伴侣D1和/或D2相同或基本相同,和/或其分别与第一反应剂和第二反应剂的相互作用可通过加入相同的物质被破坏。

[0837] 97.如前所述的任一实施方式中所述的方法,所述方法还包括:

[0838] 破坏一方面的所述(第一)刺激剂和/或第二刺激剂与另一方面的所述(第一)反应剂和/或第四反应剂的可逆结合。

[0839] 98.如实施方式2-97中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[0840] 破坏一方面的所述(第一)选择剂和/或第二选择剂与另一方面的第二反应剂和/或第三反应剂的可逆结合。

[0841] 99.如实施方式98所述的方法,其中:

[0842] 所述破坏在所述孵育后进行,或在开始所述孵育后开始;和/或

[0843] 所述破坏还破坏了所述(第一)刺激剂和/或第二刺激剂与第一反应剂之间的可逆结合;和/或

[0844] 所述合并并在孵育开始前进行,且所述选择剂和第二反应剂的可逆结合在所述开始前不被破坏。

[0845] 100.如实施方式98或实施方式99所述的方法,其中,所述破坏通过引入破坏结合伴侣C1和/或C2与结合位点Z1和/或Z2之间的相互作用的物质进行。

[0846] 101.如实施方式98-100中任一项所述的方法,其中,所述破坏引起:

[0847] 终止或减少通过刺激剂之一递送的信号;或

[0848] 终止或减少细胞的刺激、活化或扩增。

[0849] 102.如实施方式98-101中任一项所述的方法,其中,所述破坏包括将含有所述物质的组合物引至细胞。

[0850] 103.如实施方式1-102中任一项所述的方法,其中:

[0851] 所述结合位点Z1和所述结合伴侣C1之间可逆结合的解离常数(K_D)和/或所述结合

位点Z2和所述结合伴侣C2之间可逆结合的解离常数(K_D)为 $10^{-2}M \sim 10^{-13}M$ 。

[0852] 104.如前任一实施方式所述的方法,其中,与第二反应剂接触的所述组合物还包含非目标细胞,所述非目标细胞不包含选择标志物、所述分子、所述第二分子和/或所述第二选择标志物,且所述方法还包括将目标细胞与非目标细胞分离。

[0853] 105.如前实施方式中任一项所述的方法,所述方法还包括在所述孵育之前,扩增包含于目标细胞群中的细胞,或其中,在所述孵育前已在体外扩增细胞。

[0854] 106.如前实施方式中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括在所述孵育的至少一个时间,改变培养基或补充物质。

[0855] 107.如前实施方式中任一项所述的方法,所述方法还包括:以反复的方式(aniterative fashion),重复所述方法的一个或多个步骤,由此一个或多个群中的细胞在至少两个循环中被连续分离和扩增,其中,所述方法可选地包括:在两个不同的接触步骤的每一步中分别使群中的目标细胞接触至少两种不同的选择剂,所述选择剂特异性结合两种不同的选择标志物,其中,所述孵育的至少部分在与所述两种不同的选择剂接触间进行。

[0856] 108.如实施方式1-107中任一项所述的方法,其中:

[0857] 还包括将重组核酸引入群的目标细胞,所述核酸编码重组蛋白,由此所述细胞表达所述重组蛋白,其中,所述引入可选地在所述孵育之后或期间进行且/或当细胞固定于所述支持物时进行;或

[0858] 其中,在所述孵育的至少部分期间,所述细胞表达离体导入的重组蛋白。

[0859] 109.如实施方式108所述的方法,其中,所述核酸的导入在多个所述至少两个接触步骤间进行。

[0860] 110.如实施方式109所述的方法,其中,所述至少两种选择剂之一特异性结合所述重组蛋白和/或所述刺激剂之一特异性结合所述重组蛋白。

[0861] 111.如实施方式1-110中任一项所述的方法,其中,所述第一反应剂不固定于所述支持物上。

[0862] 112.一种组合物,其包含可逆结合于反应剂(其可选为第一反应剂)的刺激剂,所述反应剂可选为第一反应剂,其中,所述刺激剂能够以诱导或调节目标细胞中信号的方式特异性结合所述目标细胞表面上的分子。

[0863] 113.如实施方式112所述的组合物,其中,所述(第一)反应剂含有多个刺激剂结合位点,它们各自能够可逆结合所述刺激剂。

[0864] 114.如实施方式113所述的组合物,其中,所述反应剂是第一反应剂,所述组合物还包含:

[0865] (a) 支持物;

[0866] (c) 第二反应剂,其固定于所述支持物上;和

[0867] (d) 选择剂,其能够可逆结合第二反应剂并能够特异性结合目标细胞上的选择标志物。

[0868] 115.如实施方式114所述的组合物,其中,所述支持物是或含固定相和/或固体支持物。

[0869] 116.如实施方式112-115中任一项所述的组合物,其中,所述选择剂可逆结合于第二反应剂。

[0870] 117.如实施方式114-116中任一项所述的组合物,其中,所述(第一)反应剂不结合于所述支持物。

[0871] 118.如实施方式114-117中任一项所述的组合物,其中,第一反应剂和第二反应剂相同或基本相同。

[0872] 119.如实施方式112-118中任一项所述的组合物,所述组合物还包含目标细胞和/或还包含非目标细胞,所述非目标细胞不表达所述(第一)选择标志物和/或第二选择标志物,其中,所述目标细胞可选包含重组分子或表达重组分子的核酸,所述重组分子可选为嵌合受体。

[0873] 120.如实施方式112-118中任一项所述的组合物,所述组合物还包含能够破坏第二反应剂与所述选择剂之间可逆结合且/或能够在第一反应剂与所述刺激剂之间造成破坏的物质。

[0874] 121.一种用于纯化和调节目标细胞的制品,所述制品包含:

[0875] (a) 刺激剂,其能够以诱导或调节目标分子中信号的方式特异性结合所述目标细胞表面上的分子;

[0876] (b) 反应剂,其可选为第一反应剂,所述反应剂包含多个刺激剂结合位点,所述结合位点各自能够可逆结合所述刺激剂。

[0877] 122.如实施方式121所述的制品,所述制品还包含:

[0878] (c) 第二反应剂;

[0879] (d) 支持物,其可选为或包含固定相和/或固体支持物;和

[0880] (e) 选择剂,其能够可逆结合第二反应剂且能够特异性结合目标细胞上的选择标志物。

[0881] 123.如实施方式122所述的制品,其中,所述第二反应剂固定于所述支持物上。

[0882] 124.如实施方式121-123中任一项所述的制品,其中,所述(第一)反应剂可逆结合所述刺激剂,和/或其中,所述选择剂可逆结合第二反应剂。

[0883] 125.如实施方式112-120中任一项所述的组合物或如实施方式121-124中任一项所述的制品,其还包含:

[0884] 第二刺激剂,其能够特异性结合所述目标细胞表面上的第二分子且能够可逆结合第二反应剂和/或能够可逆结合第四反应剂;和/或

[0885] 第二选择剂,其能够特异性结合第二选择标志物,所述第二选择标志物:(i) 包含于所述目标细胞,或(ii) 包含于其他目标细胞,其可选表达所述(第一)刺激剂和/或第二刺激剂特异性结合的分子。

[0886] 126.如实施方式125所述的组合物或制品,其中,第二选择剂能够可逆结合第二反应剂,或所述制品还包含能够特异结合第二选择剂的第三反应剂,所述第三反应剂可选固定于所述支持物上或固定于其他支持物上。

[0887] 127.如实施方式126所述的制品,其中,所述支持物和第二支持物存在于分离的容器中,其中,所述不同的容器可选彼此流体连接,使得细胞悬液逐一流过或流经所述支持物之一和另一支持物。

[0888] 128.如实施方式121-127中任一项所述的制品,所述制品还包含能够破坏一种或多种反应剂与一种或多种作用剂之间可逆结合的物质。

[0889] 129.如实施方式122-128中任一项所述的制品,其中,所述支持物是固定相,所述固定相是或含色谱基质,其中,所述制品还包含容器,所述容器可选为第一容器,其中容纳全部或部分所述色谱基质,所述(第一)容器可选为柱。

[0890] 130.如实施方式129中所述的制品,其中:

[0891] 第二反应剂进一步包含于所述容器中;和/或

[0892] 所述(第一)选择剂和/或第二选择剂进一步包含于所述容器中;和/或

[0893] 所述制品还包含第二容器,其可选地容纳所述(第一)刺激剂和/或第二刺激剂,和/或第一反应剂。

[0894] 131.如实施方式130中所述的制品,其中:

[0895] 所述制品还包含第三容器,其容纳第二选择剂和/或第三反应剂;和/或

[0896] 所述制品还包含第四容器,其中容纳所述物质。

[0897] 132.一种设备,其包含实施方式112-120中任一项所述的组合物或实施方式131所述的制品,且可选地还包含流体入口和/或流体出口,所述入口流体连接所述组合物或流体连接所述设备的一个或多个组件,所述出口流通连接所述组合物和/或流体连接所述设备的一个或多个组件。

[0898] 133.一种设备,所述设备包含:

[0899] (a) 刺激剂,其能够以诱导或调节目标分子中信号的方式特异性结合所述目标细胞表面上的分子;

[0900] (b) 第一反应剂,其能够可逆结合所述刺激剂;

[0901] (c) 第二反应剂;

[0902] (d) 支持物;

[0903] (e) 选择剂,其能够可逆结合第二反应剂且能够特异性结合目标细胞上的选择标志物。

[0904] 134.如实施方式133所述的设备,其中,组分(a)~(e)存在于多个容器中,其中至少一些流体相连,可选地,处于封闭或无菌系统中,由此一种或多种组分在所述设备中由一个容器通往另一个容器。

[0905] 135.如实施方式121-134中任一项所述的制品或设备,其还包含样品出口,所述出口与至少一个色谱固定相之一流体连接。

[0906] 136.如实施方式121-135中任一项所述的制品或设备,所述设备是功能性封闭系统。

[0907] 137.如实施方式121-136中任一项所述的制品或设备,其还包含一个或多个控制机制,所述控制机制能够调节或调整一个或多个容器或其组件的pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或温控,或可选地能够调节或调整所述至少一个色谱固定相中至少一个的pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或温控。

[0908] 138.如实施方式121-137-190中任一项所述的制品或设备,其还包括与含培养基和/或一种或多种营养物和/或一个或多个碳源的容器的流体连接,由此该连接能够将所述培养基、营养物和/或碳源递送给设备内的细胞,可选地,所述细胞固定于色谱固定相上。

[0909] 139.如实施方式121-138中任一项所述的制品或设备,其中,所述至少一个组件和/或其所在容器能够以无菌或净化方式从所述设备卸除。

[0910] 140.如实施方式134-139中任一项所述的设备、如实施方式121-120中任一项所述

的组合、或如实施方式121-133中任一项所述的制品,其可用于或能够进行实施方式1-111或142-150中任一项所述的方法,其中,所述方法可选以自动化方式进行。

[0911] 141.如实施方式134-139中任一项所述的设备、如实施方式121-120中任一项所述的组合、或如实施方式121-133中任一项所述的制品,其可用于实施方式1-111或142-150中任一项所述的方法中,其中,所述方法可选以自动化方式进行。

[0912] 142.如实施方式13-111中任一项所述的方法,其中,所述孵育在所述合并后进行,且方法还包括将所述组合物中的目标细胞转移到不同环境中,所述环境适于细胞培养或扩增。

[0913] 143.如实施方式142所述的方法,其中,如此转移的细胞在封闭系统或封闭容器中转移入不同环境中;或其中,所述转移包括从第一容器中取出如此转移的细胞,并将所述细胞转移入第二容器。

[0914] 144.如实施方式142或143所述的方法,其中,所述不同环境在一个孵育器中。

[0915] 145.如实施方式142-144中任一项所述的方法,其中,所述转移在封闭系统中进行,其中,所述转移包括将包含细胞的无菌封闭容器转移到无菌环境中或转移到所述封闭容器的不同环境中,和/或其中,所述转移在无菌环境中进行或在无菌条件下进行。

[0916] 146.如实施方式145所述的方法,其还包括:在转移后,通过破坏所述可逆结合将细胞从固定相分离,并可选地将所述细胞从固定相的存在下移除。

[0917] 147.如实施方式146所述的方法,其还包括扩增所述移除的细胞。

[0918] 148.如实施方式1-111和142-147中任一项所述的方法,其中,在至少部分所述孵育期间,可选以自动化形式,控制温度、pH、 pO_2 、 pCO_2 和/或温度。

[0919] 149.如实施方式142-148所述的方法,其中,当细胞在适于扩增的环境中时,将营养物供给包含于所述至少一个色谱固定相的至少一个中的细胞。

[0920] 150.如实施方式142-149中任一项所述的方法,其中,所述固定相存在于实施方式134-141中任一项所述的设备中,其中,为了扩增转移到合适的环境包括在所述固定相存在于所述设备中时,将所述细胞与所述固定相分离。

[0921] VIII. 实施例

[0922] 下面的实施例仅是为了阐述,而不是用来限制本发明的范围。

[0923] 实施例1-含有可逆结合可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的抗CD3和抗CD28Fab片段的可溶多聚作用剂的产生

[0924] 通过将抗CD3和抗CD28Fab片段可逆结合于用作多聚化反应剂的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白,使抗CD3和抗CD28Fab片段多聚化。可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白根据制造商的说明书(Thermo Scientific公司),通过如下物质的聚合制备:命名为**Strep-tactin®** m1(链霉亲和素同四聚体,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸突变序列,参见例如,美国专利号6,103,493和Voss和Skerra(1997)Protein Eng.,1:975-982)与磺基-SMCC(磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯,产品编号#22122Thermo Scientific公司)和亚氨基氯化硫醇(iminothiolan,产品编号#26101Thermo Scientific公司)。寡聚链霉亲和素突变蛋白分子与单体(未反应)和二聚链霉亲和素突变蛋白通过尺寸排阻色谱分离。

[0925] 抗CD3和抗CD28Fab片段通过融合于各Fab片段的可溶链霉亲和素肽结合伴侣与该

寡聚链霉亲和素突变蛋白可逆结合。抗CD3Fab片段衍生自杂交瘤细胞系OKT3(ATCC® CRL-8001™;也可参见美国专利No.4,361,549)生产的CD3结合单克隆抗体。抗CD3抗体OKT3的重链可变区和轻链可变区可见Arakawa等,J.Biochem.120,657-662(1996),且分别包含SEQ ID NO:31和32所示的氨基酸序列。抗CD28Fab片段衍生自抗体CD28.3(作为合成单链Fv构建体保藏,GenBank登录号No.AF451974.1;还可参见Vanhove等,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页)。抗CD28抗体CD28.3的重链可变区和轻链可变区分别如SEQ ID NO:33和34所示。两种Fab片段均包含人IgG1CH1和C_Lκ区,且各自独立地在其重链羧基末端融合于链霉亲和素结合肽序列,所示序列包含依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SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16;作为“Twin-Strep-tag®”市售获自IBA股份有限公司,德国哥廷根)。在大肠杆菌(E.coli)中重组产生带有肽标签的Fab片段(如国际专利申请公开号W0 2013/011011和W0 2013/124474中所述)。

[0926] 在接近室温的条件下,使带有肽标签的抗CD3和抗CD28Fab片段与可溶寡聚骨架混合,从而使得抗CD3和抗CD28Fab片段在可溶寡聚骨架表面上通过Fab链霉亲和素肽结合伴侣与寡聚链霉亲和素突变蛋白之间的相互作用多聚化。在示例性的实施方式中,在室温下,将约0.5μg带有肽标签的抗CD3Fab片段和约0.5μg带有肽标签的抗CD28Fab片段加到约3μg可溶寡聚Strep-tactin®。在一些情况下,预混合该带有肽标签的Fab片段,然后使其可逆结合于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架上,在一些情况下,这可使得不同Fab分子的分布更均匀。将所得可溶抗CD3/抗CD28多聚的作用剂直接用于刺激T细胞。若需要,在刺激细胞前,将所得可溶抗CD3/抗CD28多聚的作用剂储存在冰上。

[0927] 实施例2:用可逆固定于链霉亲和素突变蛋白Strep-tactin®包被的珠上的αCD3/αCD28Fab片段对CD3+T应答细胞的刺激及该细胞的扩增

[0928] 将300,000个CD3+CD62L应答T细胞(Tresp,从非动员供体血浆分离产物中通过系列磁性富集分离)用3μM CFSE标记,并用5μl的15μl Streptactin®珠(10mg磁性颗粒/ml,加载有35μg Streptactin®/mg珠)制备物,所述珠加载有如下之一:仅0.5μgαCD3Fab片段,仅0.5μgαCD28Fab片段,或0.5μgαCD3Fab片段和0.5μgαCD28Fab的混合物。

[0929] 所用αCD3Fab片段衍生自杂交瘤细胞系OKT3所产生的结合CD3的单克隆抗体。杂交瘤细胞系OKT3和OKT3抗体见美国专利4,361,549,该细胞系已以登录号ATCC® CRL-8001™保藏。所用αCD28Fab衍生自单克隆抗人CD28抗体CD28.3(Vanhove等,BLOOD,2003年7月15日,第102卷,第2期,第564-570页)。该抗体CD28.3的可变区核苷酸序列已以合成单链Fv构建体抗人CD28抗体scFv28.3的形式存于GenBank(GenBank登录号AF451974.1)。

[0930] 两Fab片段均是在大肠杆菌(E.coli)中重组产生(如国际专利申请公开号W02013/011011和W0 2013/124474中所述),携带作为恒定区(CH1和C_κ)的IgG1共有序列。两Fab片段的轻链在羧基末端与依序排列的两个链霉亲和素结合模块(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)(SEQ ID NO:16,市售作为“Twin-Strep-tag®”获自IBA有限公司,德国哥廷根)融合。将αCD3Fab片段用作第一作用剂并以链霉亲和素结合肽作为结合伴侣C1,将αCD28Fab片段用作第二作用剂并以链霉亲和素结合肽作为结合伴侣C2。将(四聚化)链霉亲

和素突变蛋白“**Strep-tactin®**”用作反应剂,其上可逆固定有两种Fab片段。

[0931] 在扩增试验中,将用空白珠(无Fab)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞用作阴性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞与300,000个CD3细胞自体饲养细胞(用30Gy辐照)一起接种到48孔板中的3ml补充有10U/ml白介素2(IL-2)的完全细胞培养基(RPMI (Gibco公司),其补充有10% (v/v) 胎牛血清、L-谷氨酰胺、b-巯基乙醇、HEPES、青霉素、链霉素和庆大霉素)中,一式三份。在37℃下孵育细胞,不更换培养基,4天后进行FACS分析。用100μM D-生物素孵育10分钟后进行FACS染色和分析。图7A中显示了各条件下的一个代表性曲线。曲线显示:活CD3+细胞被碘化丙啶(PI)染色,该染色用于活/死区分。图7B是显示刺激细胞尺寸分布的直方图(正向散射)。图7B显示:当在其上固定有0.5μgαCD3Fab片段和0.5μgαCD28Fab的混合物的珠的存在下孵育并用可逆结合在包被有链霉亲和素突变蛋白**Strep-tactin®**的珠上的αCD3/αCD28Fab片段体外刺激后, $T_{\text{应答}}$ 细胞的特定细胞群被刺激并扩增(与未刺激仅珠对照相比,尺寸/数量均增加)。图7B显示增殖染料CDSE稀释液的直方图,其代表了根据细胞数/次细胞分裂的增殖程度(显示于图7B顶部,0代表未分裂细胞;5代表经过至少5次分裂的细胞)。由图7B可以看出,用其上固定有0.5μgαCD3Fab片段和0.5μgαCD28Fab混合物的珠刺激的T细胞群几乎都经历了三次细胞分裂,这与仅采用单一刺激物(有少量细胞落入未分裂峰“0”)相比,表示增殖模式更均一。增殖绝对量的提高(用αCD3和αCD28功能化的珠刺激4天后,更多细胞已一致地增殖)也体现在更强烈的培养基消耗,如指示剂的颜色变为黄色所示(表现为图7C中孔中更浅的液体)。

[0932] 实施例3:用可逆固定于可溶Strep-tactin的αCD3/αCD28 Fab片段对CD3+T应答细胞的刺激及该细胞的扩增

[0933] 本实施例中,用可逆固定于可溶寡聚**Strep-tactin®**(用作可溶反应剂)的αCD3/αCD28 Fab片段体外刺激后,CD3+T应答细胞(通过磁分选从获自Ficoll梯度的新鲜PBMC样品中分离)扩增。寡聚链霉亲和素突变蛋白如下获得:根据生产商(Thermo Scientific公司)方案,使**Strep-tactin®**与磺基SMCC(磺基琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯,产品编号#22122 Thermo Scientific公司)和亚氨基氯化硫醇(iminothiolan,产品编号#26101 Thermo Scientific公司)聚合。将寡聚链霉亲和素突变蛋白与单体(未反应)和二聚链霉亲和素突变蛋白通过尺寸排阻色谱分离,将所得寡聚链霉亲和素突变蛋白级份($n \geq 3$)用作可溶反应剂。

[0934] 对于体外扩增,将300,000个CD3+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)以2μM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记,并用各种量的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白制剂刺激,在该突变蛋白上固定有如上所述的αCD3 OKT3 Fab片段和抗体28.3的αCD28 Fab片段的组合(所述片段在重链上均携带作为链霉亲和素结合肽的如上所述的**Twin-Strep-tag®**)。 (“1×”对应于用0.5μgαCD3和0.5μgαCD28单体Fab片段官能化的3μg寡聚链霉亲和素突变蛋白;数字“0.5×”、“2×”和“5×”表示“1×”的相应n倍)。不受刺激或用空白寡聚链霉亲和素突变蛋白(无Fab)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞和300,000个CD3阴性自体饲养细胞(用30Gy辐照)一起接种到48孔板上1 ml细胞培养基中,该培养基补充有20 U/ml白介素2(IL-2)。细胞在37℃下孵育,不更换培养基,5天后用FACS根据CFSE稀释分析增殖。图8A显示与阴性对照相比培养物中5天后增殖细胞尺寸分布的提升。图8B显示用其上固定有αCD3 Fab和αCD28 Fab片段

混合物的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白(与图7A-C和实施例2中的固体链霉亲和素磁珠相比)孵育时,CD3+T_{应答}细胞被适当刺激且强烈增殖。图8A和8B中的结果表明:在这些体外条件下,在表面CD28和TCR/CD3复合物与可逆固定在可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白上的 α CD3和 α CD28 Fab片段啮合后,大部分CD3+T细胞分裂(2~5次细胞分裂)。在体外扩增后,在D-生物素处理后,解离并去除可溶多聚化作用剂。用藻红蛋白标记的**Strep-Tactin®** (ST-PE) 复染细胞,用流式细胞术分析Fab片段单体的解离和清除。代表性的直方图(深灰直方图)与仅适当ST-PE的阴性对照(浅灰直方图)对比显示。由图8C可以看出,两种Fab片段从扩增细胞上彻底解离且完全清除。图8D显示5天后活(台盼蓝阴性)细胞绝对数量。采用Neubauer计数室计数,并针对各相应刺激条件制作曲线。图8D中示出中位细胞数;误差线表示标准误差(SD)。图8D显示:固定在可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白反应剂上的所有 α CD3Fab片段和 α CD28Fab片段混合物对于CD3+细胞的扩增同等有效,绝对细胞数提高约4倍。

[0935] 实施例4:用可逆 α CD3/ α CD28Fab-链霉亲和素多聚体体外刺激(不换培养基)的纯化CD4+和CD8+T应答细胞的增殖动力学

[0936] 在本实施例中,研究了可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的 α CD3/ α CD28Fab片段体外刺激的纯化CD4+和CD8+T应答细胞(T_{应答})增殖的扩增动力学。为此,用两种不同尺寸的可溶寡聚**Strep-tactin®**突变蛋白作为可溶反应剂。第一类寡聚**Strep-tactin®**是实施例3中获得的寡聚链霉亲和素突变蛋白级份($n \geq 3$,在本文中也称为“常规寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架”,在图9A和9B中以尖端向上的三角标记显示)。用作可溶反应剂的第二类该寡聚链霉亲和素突变蛋白是与生物素化人血清白蛋白反应的寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$) (在文本中也称为“大寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架”)。

[0937] 在本实施例中,将500,000个纯化的CD4+或CD8+应答T细胞(T_{应答})分别用如上所述两种不同的Streptamer多聚体刺激,即用实施例3的寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架(采用浓度为1mg寡聚链霉亲和素突变蛋白/ml的溶液)刺激或用大寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架刺激(0.1mg/ml)。在3 μ l两种不同骨架上加载之前实施例中所用的0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab的组合,其在Fab片段重链C末端携带了链霉亲和素结合肽SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16)。此外,在4.5 μ l常规寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架上加载0.5 μ g α CD3Fab片段,0.5 μ g α CD8Fab片段(IBA有限公司,哥廷根,Fab片段C末端携带链霉亲和素结合肽SAWSHPQFEK(GGGS)2GGSAWSHPQFEK(SEQ ID NO:16))和0.5 μ g α CD28Fab片段。无处理(不刺激)T_{应答}细胞作为阴性对照,用市售抗CD3/抗CD8珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的T_{应答}作为阳性对照。将T_{应答}细胞接种在48孔板上补充有30U/ml IL-2的1ml细胞培养基中(RPMI 1640(Gibco公司),补充有10%(v/v)胎牛血清,0.025%(w/v)L-谷氨酰胺,0.025%(w/v)L-精氨酸,0.1%(w/v)HEPES,0.001%(w/v)庆大霉素,0.002%(w/v)链霉素,0.002%(w/v)青霉素),一式两份。在37℃孵育细胞,不更换培养基,在1天、3天和6天后进行细胞计数分析。在图9A和9B的试验中,扩增在不更换培养基的情况下进行。CD4+T应答细胞的结果见图9A,CD8+T应答细胞的结果见图9B,其中的图表示以各时间点收获的CD4+T_{应答}细胞数(图9A)和CD8+T_{应答}细胞数(图9B)为依据的增殖程度。

[0938] 由图9A可见,其上可逆固定有 α CD3Fab和 α CD28Fab片段的“较小”可溶反应剂提供了与抗CD3/抗CD28珠(其为迄今为止用于T细胞扩增的标准反应剂)相同的CD4+T细胞扩增量,而“较大”可溶多聚作用剂与Dyna珠相比则甚至于可提供更佳扩增。该改进可能是优于

可溶较大的多聚体能够比较小的多聚作用剂同时结合更多T细胞,从而能够比“较小”多聚作用剂刺激更多CD4+T细胞。

[0939] 如图9B所见,采用本文可溶多聚作用剂,CD8+T细胞能在前3天扩增,扩增效率至少与用抗CD3/抗CD28珠一样。应注意到在该时间段中,采用不仅携带可逆固定于其上的 α CD3Fab和 α CD28Fab片段(作为第一和第二作用剂)还携带可逆固定于其上的 α CD8Fab片段的可溶反应剂的扩增试验在这些培养条件下显示最佳的扩增程度。这表明:能够通过采用特异于具体细胞亚群的刺激物(此处为 α CD8Fab片段)来提高或调节扩增的选择性,从而能够获得更大量的所需细胞(亚)群。

[0940] 因此,综上所述,实施例4显示可溶多聚作用剂在引发T细胞扩增方面的功能与目前采用抗CD3/抗CD28珠的同功用标准方法相当。然而,由于可以通过加入竞争剂(例如,就基于链霉亲和素的第一和第二作用剂与反应剂之间可逆相互作用而言是生物素)来控制(和终止,若需要),本文所述的组合物和方法相比抗CD3/抗CD28珠技术具有显著优势,因为因可优化扩增条件(例如,可以在图13B所示的试验中在3天后停止刺激)而提供了超越的显著优势,因为可对扩增条件进行优化(例如,可以在图9B所示试验中在3天后停止刺激)。此外,由于可溶反应剂能方便地从反应中去除(例如通过在扩增反应后令反应剂固定于生物素化的柱上),本文扩增方法可在封闭系统中进行或自动化,举例来说,这能够满足治疗目的细胞的GMP生产要求,无需进行珠(例如抗CD3/抗CD28珠)的去除。

[0941] 实施例5:用可逆 α CD3/ α CD28Fab-链霉亲和素多聚体体外刺激(更换培养基)的纯化CD4+和CD8+T应答细胞的增殖动力学

[0942] 在本实施例中,研究了用可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白上的 α CD3/ α CD28Fab片段体外刺激的纯化CD4+和CD8+T应答细胞($T_{\text{应答}}$)增殖的扩增动力学。为此,用两种不同尺寸的可溶寡聚Strep-tactin®突变蛋白作为可溶反应剂。第一类寡聚Strep-tactin®是实施例3中获得的寡聚链霉亲和素突变蛋白级份($n \geq 3$,在本文中也称为“常规寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架”,在图9A和9B中以尖端向下的三角标记显示)。用作可溶反应剂的第二种该寡聚链霉亲和素突变蛋白是将实施例3中所得寡聚Strep-tactin($n \geq 3$)与生物素化人血清白蛋白反应所得。该可溶寡聚反应剂在本文中也称为“大寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架”。

[0943] 在本实施例中,将400,000个纯化的CD4+或CD8+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)分别用上述两种不同的寡聚链霉亲和素突变蛋白刺激,即用实施例3的寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架(1.0mg/ml)刺激或用大寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架刺激(0.1mg/ml)。用如上所述的0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab片段组合加载3 μ l两种不同的骨架。此外,给4.5 μ l实施例3的寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架加载前文所述0.5 μ g α CD3,0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab片段。将无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,将用抗CD3/抗CD8珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,在第3天更换培养基,在1天、3天和6天后进行细胞计数分析。CD4+T应答细胞的结果见图10A,CD8+T应答细胞的结果见图10B,其中的图表示以各时间点收获的CD4+ $T_{\text{应答}}$ 细胞数(图10A)和CD8+ $T_{\text{应答}}$ 细胞数(图10B)为依据的增殖程度。

[0944] 由图10A可见,其上可逆固定有 α CD3Fab和 α CD28Fab片段的可溶反应剂(多聚化作用剂)提供了比抗CD3/抗CD28珠更佳的CD4+T细胞扩增。

[0945] 如图10B所见,采用多聚作用剂,CD8+T细胞可在前6天内扩增,扩增效率至少与用抗CD3/抗CD28珠一样。应注意到在该时间段中,采用携带 α CD3Fab和 α CD28Fab片段(作为第一和第二作用剂)的较大可溶反应剂的扩增试验在这些培养条件下显示最佳的扩增程度。这可能同样是因为可溶性较大多聚作用剂能够比较小多聚化作用剂同时结合更多T细胞,从而能够比“较小”多聚作用剂刺激更多CD4+T细胞。

[0946] 实施例6:更换或不更换培养基的纯化CD4+和CD8+T细胞的扩增动力学

[0947] 在本实施例中,将实施例4和5数据或合并,基于较小多聚作用剂、阳性和阴性对照的输入细胞数进行标准化。没有获取“较大”多聚作用剂的标准化数据。如实施例4和5中所述,用3 μ l多聚作用剂(1mg/ml;其上固定有0.5 μ g α CD3Fab片段和0.5 μ g α CD28Fab片段)的制备物刺激400,000~500,000个CD4+或CD8+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)。无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中,一式两份。在37℃孵育细胞,第3天更换培养基(图11A-B中的直线)或不更换培养基(图11A-B中的虚线),在1天、3天和6天后分析细胞计数。如图11A的标准化数据所证明,其上可逆固定有 α CD3Fab和 α CD28Fab片段的“较小”可溶反应剂获得了约2.5倍扩增的CD4+T细胞,而采用抗CD3/抗CD28珠的扩增获得了约1.8倍的扩增率。因此,采用多聚作用剂甚至提供了比抗CD3/抗CD28珠更好的CD4+T细胞扩增。同样,图11B证实,采用多聚作用剂,CD8+T细胞在前3天内扩增,扩增效率至少与用抗CD3/抗CD28珠一样。

[0948] 实施例7:多克隆活化/扩增的大量CD3+中心记忆T细胞(T_{CM})的扩增动力学和表型

[0949] 在本实施例中,将500,000个CD3+CD62L+CD45RA应答 T_{CM} 细胞($T_{\text{应答}}$)以3 μ l实施例3的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白制剂(1mg/ml)刺激,该突变蛋白加载有0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab的组合。此外,给4.5 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白制剂加载0.5 μ g α CD3,0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab作为额外的刺激条件。将无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,将用抗CD3/抗CD8珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2和5ng/ml IL-15)中。在37℃孵育细胞,每3天更换培养基,在7天和14天后进行细胞计数分析。图表示以各时间点收获的细胞数为依据的增殖程度,图12A为仅补充IL-2的培养基,图12B为补充IL-2和IL-15的培养基。如图12A和图12B中可见:其上可逆结合 α CD3Fab片段和 α CD28Fab片段的可溶反应剂比抗CD3/抗CD28珠获得了更佳的细胞扩增。如图12C的可变细胞因子环境中培养14天后CD62L和CD127表面表达的流式细胞分析进一步所示,与采用抗CD3/抗CD28珠的扩增相比,采用多聚化作用剂的试验方法在本实施例所选的两种条件下均保持更高的CD127表达长寿记忆T细胞含量。这证明了本文方法和组合物的又一优势。

[0950] 实施例8:扩增CD8+T细胞的产率和表型——可溶反应剂的尺寸变化以及用于刺激的 α CD8-Fab的加入

[0951] 在本实施例中,研究了用可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白的 α CD3/ α CD28Fab片段体外刺激的纯化CD8+T应答细胞($T_{\text{应答}}$)的扩增。此外,还研究了将 α CD8-Fab加入反应剂以提高CD8+T细胞扩增的效果。

[0952] 为此,300,000个纯化CD8+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)分别用两种不同的基于Streptactin的反应剂刺激,即实施例3的小多聚作用剂(1mg/ml)或前文所述大多聚作用剂(0.1mg/ml)。用如上所述的0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab片段组合加载3 μ l两种寡聚链霉亲和素突变蛋

白骨架以形成多聚化作用剂。此外,用如上所述的 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3}$, $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD8Fab}$ 和 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 片段加载 $4.5\mu\text{l}$ 的较小寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架。此外,还采用了仅用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3Fab}$ 片段或仅用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 片段功能化的 $3\mu\text{l}$ “较小”寡聚链霉亲和素突变蛋白骨架。以无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上 1ml 细胞培养基(补充有 30U/ml IL-2)中。在 37°C 孵育细胞,3天后更换培养基,6天后进行分析。图13A显示以第6天收获的细胞数为依据的增殖程度,与阴性对照对比,并基于阳性对照标准化。图13A显示,与采用抗CD3/抗CD28珠的扩增相比,采用多聚作用剂的CD8+T细胞扩增获得更高的CD8+T细胞产率。细胞培养后的CD8表面表达和CD45RO表面表达FACS分析显示(图13B):采用多聚作用剂或采用抗CD3/抗CD8珠扩增相同表型的CD8+T细胞(采用单向ANOVA比较各种刺激条件,未检测到显著差异(n.s.))。与采用抗CD3/抗CD28珠相比,采用本文方法扩增的CD8+细胞产率改善,这可能是因为可溶多聚作用剂能比固定在抗CD3/抗CD28珠上的抗体更好地接近细胞表面的目标受体。在由初始样品扩增稀有细胞群时,这一产率改善可变得极具优势。

[0953] 此外,比较采用其上共同固定有 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3Fab}$ 和 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 片段的反应剂所获得的扩增产率(图13B中左起第二柱)与采用仅用 αCD3Fab 片段或仅用 $\alpha\text{CD28Fab}$ 片段功能化的两种反应剂的产率(图13B中左起第三柱),可发现两种试验具有相同的扩增效力。因此,这些试验显示,采用其上共同固定有第一作用剂和第二作用剂的同一反应剂在功能上等同于同时采用分别仅加载有第一作用剂和仅加载有第二作用剂的两反应剂进行扩增。

[0954] 实施例9:扩增的CD8+T细胞的产率和表型——具有固定于其上的不同比例 $\alpha\text{CD3-}$ 和 $\alpha\text{CD28Fab}$ 片段的各单独可溶反应剂的效价

[0955] 在本实施例中,研究了用可逆固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白上不同量 $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28Fab}$ 片段体外刺激扩增的CD8+T应答细胞($T_{\text{应答}}$)的产率和表型。

[0956] 为此,将 $300,000$ 个CD8+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)用不同量的寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物混合物(仅用 αCD3Fab 和仅用 $\alpha\text{CD28Fab}$ 功能化的“小”寡聚链霉亲和素突变蛋白(1mg/ml) (“ $1\times$ ”对应于仅用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3Fab}$ 片段功能化的 $1.5\mu\text{g}$ 寡聚链霉亲和素突变蛋白和仅用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 片段功能化的 $1.5\mu\text{g}$ 寡聚链霉亲和素突变蛋白)),或用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3Fab}$ 和 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 加载的 $3\mu\text{l}$ 寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物,或用 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD3}$ 、 $0.5\mu\text{g strep}$ 标签的 αCD8 和 $0.5\mu\text{g}\alpha\text{CD28Fab}$ 加载的 $4.5\mu\text{l}$ 寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物刺激。无处理 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上 1ml 细胞培养基(补充有 30U/ml IL-2)中。在 37°C 孵育细胞,不更换培养基,5天后进行分析。图14A显示以第5天收获的细胞数为依据的增殖程度,与阴性对照对比,并基于阳性对照标准化。图14A采用各种多聚作用剂的CD8+T细胞扩增所得CD8+T细胞产率高于抗CD3/抗CD8珠扩增(尤其, $5\times$ 条件的总反应剂累积量获得了与时间相关的最佳细胞/通过启动细胞分裂致总细胞数增长)。细胞培养后的CD8表面表达和CD45RO(图14B)表面表达FACS分析显示:采用多聚作用剂或采用市售抗CD3/抗CD8珠扩增相同表型的CD8+T细胞。

[0957] 实施例10:加入 $\alpha\text{CD8-Fab}$ 刺激的扩增CD3+T细胞的亚组组成和产率

[0958] 试验显示在体外用 $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28Fab}$ 片段刺激的经纯化CD3+T应答细胞的扩增,所述片段可逆固定于作为可溶性反应剂的实施例3的可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白。在一个试验中,除了 $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28Fab}$ 片段以外,还将 αCD8Fab 片段(市售获自IBA有限公司,德国哥廷

根,目录号6-8000-203)固定于可溶寡聚链霉亲和素突变蛋白上,以测试是否能够用可逆 α CD3/ α CD28多聚化作用剂在体外优先刺激特定T细胞亚群。更具体而言,将500,000个纯化的CD3⁺应答T细胞($T_{\text{应答}}$)以3 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白制备物(1mg/ml)刺激,该突变蛋白加载有0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab的组合。作为或选的方法,给4.5 μ l寡聚链霉亲和素突变蛋白加载0.5 μ g α CD3Fab、0.5 μ g strep加标的 α CD8Fab和0.5 μ g strep加标的 α CD28Fab。无处理的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD8珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 作为阳性对照。由图15A可看出,可逆加载 α CD3Fab片段、 α CD28Fab片段以及 α CD8Fab片段的反应剂提供了最高的扩增CD3⁺T细胞数。约 1×10^6 个扩增细胞数量的产率比采用市售可获得的抗CD3/抗CD8珠的这些T细胞的扩增高出约30%。此外且更重要的是,如图15B所示,与采用抗CD3/抗CD8珠或仅携带 α CD3Fab片段和 α CD28Fab片段作为第一和第二作用剂(如本文所述)的两种扩增相比,采用携带 α CD3Fab片段、 α CD28Fab片段和 α CD8Fab片段的该反应剂的CD8⁺T细胞量最高。因此,该试验还显示本文所述方法和组合物的优势:在向所选细胞群提供主要活化信号的第一作用剂和提供共刺激信号的可选第二作用剂之外,还可将专性活化所需细胞群的其他作用剂固定在反应剂上。因此,通过如此实施,本文所述的方法和组合物提供了从样品(例如包含各种不同亚群的样品)中优先扩增或选择性富集任何所需细胞群或亚群的可能性。

[0959] 实施例11:采用基于链霉亲和素突变蛋白(用第一和第二受体结合剂(α CD3和 α CD28Fab片段)可逆功能化的多个结合位点)的固定相固定化的T细胞的柱上培养

[0960] 本研究的进行证明了在色谱柱中固定相的存在下,用多聚化的刺激剂孵育细胞使得固定化的T细胞成功扩增。所述作用剂可逆结合具有针对各所述作用剂的多个结合位点的反应剂。该方法涉及在多聚的作用剂的存在下,孵育固定于固定相上的T细胞,使其活化或扩增。然后通过破坏结合,从所述固定相去除细胞。

[0961] 在该研究中,含人PBMC的样品通过Ficoll梯度从健康人供体的血液中分离。在一些情况中,PBMC用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记以评估孵育后的细胞分裂。将基于柱的亲亲和色谱用于富集PBMC样品中的特定细胞群(CD3⁺细胞、CD4⁺和/或CD8⁺细胞)。将特异于此类细胞的选择剂可逆固定于柱中的固定相上。具体地,为了产生带有固定相的柱,用固定相(200 μ l琼脂糖树脂)预填充1.2ml吸头(tips),在该固定相上固定具有针对所述选择剂的多个结合位点的反应剂(链霉亲和素突变蛋白寡聚物“m1”)。加入6微克各单独的选择剂(分别能够特异性结合CD3、CD4和CD8的Fab片段,其各自含有能够可逆结合选择反应剂结合位点的结合伴侣(twin-strep标签序列,如SEQ ID NO:16所示(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK)),使其可逆结合于固定于柱上的反应剂,从而将作用剂通过反应剂固定在固定相(琼脂糖树脂)上,从而产生固定于固定相的选择剂。用电动移液器将各自样品和缓冲剂加到柱中并在柱中操作。

[0962] 使含PBMC的样品(分别将 1×10^7 个细胞、 2×10^7 个细胞和 4.5×10^7 个细胞用于富集CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺目标细胞群)通过一个或多个柱以选择合适的细胞群。该步骤促进样品中表达相应选择标志物(CD3、CD4和/或CD8)的T细胞特异性结合固定相上的相应选择剂。清洗柱。未表达相应标志物的细胞通常通过该操作被移除。

[0963] 然后,在各种条件下,在固定相的存在下,仍然在柱中培养(孵育)被选择的目标细胞。因此,细胞在培养的全部或部分过程中被固定在固定相上。具体地,为了进一步在固定

相上培养固定化的T细胞,不加入D-生物素来破坏与树脂的可逆结合直至孵育完成。相反,将包含固定相且固定有所选细胞的各柱(吸头)转移到15mL的圆锥离心管中。在各自配备有宽松的盖的相应圆锥管中且置于CO₂潮湿培养箱中,在柱上孵育细胞(在补充有IL-2的1mL培养基的存在下)。在柱上孵育细胞,在选择后静置6天。

[0964] 对于细胞扩增,在能够将活化和共刺激信号递送给T细胞的多聚化刺激剂的存在下(抗CD3、抗CD28)进行该孵育。在该孵育前,使多聚化反应剂(寡聚链霉亲和素突变蛋白, m1)可逆结合分别特异性结合CD3和CD28的两种不同的Fab片段,这些片段各自包含SEQ ID NO:16所示的twin-strep标签。具体地,将0.5微克各Fab片段与3微克寡聚突变蛋白混合。将所得多聚刺激剂复合物加到柱作为多克隆T细胞活化物用于孵育。在某些(未刺激)对照样品中,不加入该多克隆活化反应剂进行孵育。

[0965] 在孵育后,通过加入含1mM D-生物素的培养基从柱洗脱细胞。洗脱后,对细胞计数、各种表面标志物的表面表达以及增殖(通过CFSE稀释法测定)进行评估。结果如图6A、6B和6C所示。

[0966] 在多聚化刺激剂(CD3/CD28Fab)存在下,在柱中孵育不同的T细胞群后,观察到细胞计数支架(图6A)和CFSE稀释(数据未示出),这表明在这些条件下的细胞扩增。

[0967] 此外,用多聚化刺激剂孵育后,观察到CD45RO⁺细胞百分比的提高(图6B),这表明从原初状态分化到了记忆细胞样状态。CD69表面表达提高和CD62L表达水平维持(图6C)与促进活化但未终末分化的细胞群的产生和/或维持的条件相一致。基于培养基的颜色,肉眼观察培养物显示用多聚化刺激剂孵育的样品中发生pH变化,这与胞外环境酸化相关的代谢变化相一致。

[0968] 实施例12: Jurkat细胞中差示胞内钙移动的分析

[0969] 本实施例研究用 α CD3抗体克隆OKT3或用OKT3的Fab片段(用Strep-tactin[®]多聚化)标记的Jurkat细胞中诱导的差异胞内钙动员实时流式细胞分析。

[0970] 为此,用钙敏感染料Indo-1-AM加载Jurkat细胞,通过注入 α CD3单克隆抗体OKT3(由杂交瘤细胞系OKT3产生,见上方,黑色方块)或通过其链霉亲和素结合肽可逆结合可溶Strep-Tactin(与藻红蛋白荧光偶联)而多聚化的 α CD3Fab片段(衍生自亲本细胞系OKT3)引发钙释放。在完整多聚OKT3Fab-Strep-Tactin复合物的情况中,引发钙释放的时长与用亲本抗体克隆(深灰三角)相同。通过注入D-生物素处理的预解离Fab-Strep-Tactin复合物(浅灰圆圈)可完全避免细胞活化,这与注入PBS阴性对照(白色倒三角)相同。施用离子霉素作为钙离子流阳性对照。胞内Ca²⁺浓度的随时间变化用流式细胞术基于FL6/FL7比进行监测。由图16A可以看出,亲本抗体OKT3和多聚化OKT3单价Fab片段均能引起钙释放,这意味着多聚化OKT3单价Fab抗体实质上与亲本抗体功能相同。值得注意的是,如果在加入Streptactin-OKT3Fab片段前,将生物素加入其上固定OKT Fab片段的Strep-tactin,则多聚化OKT3Fab片段不能引发钙释放。此时,生物素破坏Strep-tactin作为多聚化作用剂与OKT3Fab片段之间形成的可逆连键。由此,单价Fab片段从多聚化作用剂被置换下来,在解离后不能通过结合Jurkat细胞的CD3引发钙释放。

[0971] 在图16B所示的试验中,indo-1-AM标记的Jurkat细胞通过OKT3衍生的 α CD3Fab-Strep-Tactin复合物被活化(如图16A所述)。注入完整复合物(上图)或预解离复合物(下图)分别作为阳性和阴性对照。此外,用完整Fab-Strep Tactin复合物刺激细胞然后注入D-

生物素(靠近 $t=140$ 秒的峰值活化)造成 α CD3Fab多聚体信号转导的骤然破坏。在预解离Fab复合物组中注入离子霉素作为阳性对照。数据代表3次独立实验。重要的是,图16B显示,在样品中加入D-生物素迅速将Fab片段从Strep-tactin多聚化作用剂上置换下来,由此有效终止了钙释放,即便钙刺激正在进行中,这表明解离的OKT3Fab片段不再具有生物学活性。同样,将Streptactin-OKT3Fab样品加到Jurkat细胞前,将生物素加入Strep-tactin-OKT3Fab片段多聚体时,多聚化OKT3Fab片段也不能引发钙释放。

[0972] 实施例13:用 α CD3Fab多聚体对细胞的可逆染色

[0973] 本实施例考察了用 α CD3Fab多聚体对细胞的可逆染色。将刚分离的PBMC用 α CD3单克隆抗体克隆OKT3(左侧点图,Fab多聚体的亲本克隆)或同源藻红蛋白(PE)标记的OKT3Fab多聚体染色,在用D-生物素处理之前(左起第二点图)或处理之后(中部点图)进行分析。然后在后续用新鲜PE标记的**Strep-Tactin®**的洗涤步骤之后检测剩余的Fab单体。将可逆染色细胞的二次Fab多聚体染色作为对照(右侧点图)。图17中仅显示在用碘化丙啶(PI)染色区分活/死细胞的染色中阴性的活CD3细胞。点图上的数字表示门控内细胞百分比。该试验显示,用Streptactin作为多聚化反应剂多聚化的抗CD3Fab片段对CD3+PBMC进行的染色可通过添加D-生物素完全逆转,且单价Fab片段单独不结合PBMC上的CD3分子。

[0974] 实施例14:用CD28Fab多聚体对细胞的可逆分离

[0975] 本实施例显示通过与用**Strep-Tactin®**磁性颗粒(该磁性颗粒可获自IBA有限公司,德国哥廷根)多聚化的抗CD28Fab片段可逆结合进行的细胞分离。为此采用前文实施例7中所述衍生自抗体28.3的Fab片段。通过Fab多聚物磁性细胞选择从刚分离的PBMC中选择/分离CD28+细胞(基本如国际专利申请公开号No. WO2013/011011中所述)。结果见图22。在选择前,细胞用同源荧光 α CD28多聚体(左侧点图)或用抗免疫球蛋白 κ 轻链的抗体(左起第二点图, α -Ig κ mAb)作为对照染色。选择后,用D-生物素处理CD28+细胞,然后洗去磁珠和Fab单体。然后,用 α CD28Fab-多聚体(右起第二点图)或用 α -Ig κ mAb(右侧点图)对释放的CD28+细胞进行(复染)染色,以检测可能剩余的Fab单体。仅显示活($PI^{\text{阴性}}$)CD3+细胞。点图上的数字表示门控内细胞百分比。图18显示:可采用这样多聚化的抗CD28Fab片段从PBMC分离CD28+细胞,且包含抗CD28Fab单体在内所有的分离反应剂均可在选择后清除。

[0976] 实施例15:用可逆 α CD3/ α CD28Fab-Streptamer多聚体体外刺激的纯化CD4+和CD8+T应答细胞活化后的早期集落(cluster)形成

[0977] 在本实施例中,将400,000个CD4+或CD8+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)用3 μ l寡聚链霉亲和素多聚化反应剂的制备物(1mg/ml)刺激,该反应剂加载有0.5 μ g α CD3与0.5 μ g α CD28Fab的组合。无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,在1和2天后显微镜检分析。对CD4+ $T_{\text{应答}}$ (图19A)和CD8+ $T_{\text{应答}}$ (图19B)的刺激分别显示为针对抗CD3/抗CD28珠(中间行)和多聚化作用剂(下行)。照片代表了细胞簇形成程度。为清楚起见,在图19A和19B中,用圆圈指示用可溶链霉亲和素突变蛋白寡聚体刺激的代表性集落。Dyna珠刺激的细胞簇很容易看见,根据深色刺激颗粒的累积。可见,采用可溶性寡聚体多聚化反应剂的本发明扩增方法,CD4+和CD8+T细胞都形成了早期集落。

[0978] 实施例16:从大量CD3+中心记忆T细胞中选择性抗原特异性扩增出 T_{CM} 应答细胞(动力学和表型)

[0979] 在本实施例中,考察了选择性抗原特异性(Ag特异性)扩增出纯化CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}应答细胞的动力学和表型。

[0980] 更详细而言,在体外用肽:MHC分子复合物(用作第一作用剂,其为细胞提供初级活化信号)和 α CD28Fab片段(用作第二反应剂,其刺激细胞表面上的辅助分子)刺激CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}应答细胞。抗原特异性肽与MHC分子的复合物以及 α CD28Fab片段均可逆固定于可溶性寡聚链霉亲和素突变蛋白($n \geq 3$)上(如实施例3中所述)。用于抗原特异性扩增的肽为:肽CRVLCCYVL (SEQ ID NO:38),对应于立即早期蛋白1的氨基酸309-317(见Ameres等, PLOS Pathogens, 2013年5月,第9卷,第5期,e1003383),代表巨细胞病毒(CMV)特异性的HLA-C7/IE-1表位。递呈肽的MHC I分子在其 α 链(重链)C末端带有链霉亲和素结合肽(SAWSHPQFEK (GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (SEQ ID NO:16),其由德国哥廷根的IBA有限公司作为“Twin-Strep-tag®”市售)。

[0981] 出于该目的,采用3 μ l可溶寡聚链霉亲和素多聚化反应剂的制剂(用0.5 μ g配备有链霉亲和素结合肽的肽:MHC I类复合物和0.5 μ g α CD28Fab如上所述功能化),对500,000个CD3+CD62L+CD45RA-应答T_{CM}细胞(T_{应答})进行Ag特异性刺激。或者,用0.5 μ g的所述肽:MHC I类复合物、0.5 μ g CD8 α Fab和0.5 μ g α CD28Fab加载4.5 μ l Streptactin多聚化反应剂制备物。为了进行比较进行了多克隆刺激,采用加载有0.5 μ g α CD3Fab与0.5 μ g α CD28Fab组合的3 μ l Streptactin多聚化反应剂(1mg/ml)制备物。同样,作为上述的替代刺激条件,采用加载有0.5 μ g α CD3Fab、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab的4.5 μ l Streptactin多聚体制备物。无处理(不刺激)的T_{应答}细胞作为阴性对照,用抗CD3/抗CD8珠(珠上可逆固定了 α CD3和 α CD28单克隆抗体)刺激的T_{应答}作为阳性对照。将T_{应答}细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2和5ng/ml IL-15)中。在37℃孵育细胞,每3天更换培养基,在7天和14天后进行细胞计数分析。用固定有HLA-C7/IE-1表位(CMV)特异性肽:MHC-I复合物的可溶strept-tactin寡聚体刺激/扩增的Ag特异性细胞级分的流式细胞分析例显示这些抗原特异性T细胞被特异性扩增。图20B-20E(代表不同Ag特异性的扩增程度,依据的是各时间点收获的肽:MHC I多聚体阳性细胞数量,比照图20A的扩增实验)显示,采用相应Ag特异性肽和MHC I分子的多聚化反应剂产生最高数量的扩增细胞:从识别HLA-A2402限制性CMV pp65表位(氨基酸341-350(QYDPVAALF, (SEQ ID NO:39))的Ag特异性细胞数量的20倍提高(图20B)到识别CMV HLA-B7/IE-1₃₀₉₋₃₁₇表位(CRVLCCYVL (SEQ ID NO:38))的Ag特异性细胞数量的98倍提高(图20E),由此表明,本发明的扩增方法完全能够用于Ag特异性细胞扩增。最后,HLA-B7/六邻体5表位(腺病毒)特异性培养物的14天后CD62L和CD127表面表达的流式细胞分析例(图20F)进一步确证:本发明采用可溶多聚化反应剂的试验方法,在多克隆和Ag特异性刺激条件下,保留了高含量的CD127表达长寿记忆T细胞。

[0982] 实施例17:大量中心记忆T细胞的选择性Ag特异性扩增动力学和表型

[0983] 本实施例考察了纯化的CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}应答细胞中的选择性Ag特异性扩增动力学,所述细胞在体外用如下物质刺激:a) 抗原特异性肽MHC I复合物,和b) α CD28Fab片段,其可逆固定于可溶性寡聚链霉亲和素突变蛋白上作为第一和第二作用剂。

[0984] 出于该目的,对500,000个CD3+CD62L+CD45RA-应答T_{CM}细胞(T_{应答})进行Ag特异性刺激,采用了3 μ l Streptactin多聚化反应剂制剂,其用0.5 μ g装配有链霉亲和素结合肽的肽:MHC I类复合物(特异性肽代表受限于HLA-B07的腺病毒六邻体5蛋白的氨基酸114-124

(CPYSGTAYNSL, SEQ ID NO:41))以及0.5 μ g α CD28Fab官能化。或者,采用加载有0.5 μ g所述肽:MHC I型复合物、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab的4.5 μ l Streptactin多聚化反应剂。为了进行比较进行了多克隆刺激,采用加载有0.5 μ g α CD3Fab与0.5 μ g α CD28Fab组合的3 μ l Streptactin多聚化反应剂(1mg/ml)制备物。同样,作为上述的替代刺激条件,采用加载有0.5 μ g α CD3Fab、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab的4.5 μ l Streptactin多聚体制备物。无处理(不刺激)的T_{应答}细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠多克隆刺激的T_{应答}细胞作为阳性对照。将T_{应答}细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2和5ng/ml IL-15)中。在37℃孵育细胞,每3天更换培养基,在7天和14天后进行细胞计数分析。图21中的照片显示第5天的细胞簇形成程度,例举的是腺病毒HLA-B7/六邻体5表位的Ag特异性刺激。由图21可见,该腺病毒抗原特异性细胞可从原先的CD3+CD62L+CD45RA-T_{CM}应答细胞群中被特异性扩增。

[0985] 实施例18:用Streptamer多聚体刺激CD19-CAR转导的Jurkat细胞后的胞内信号级联活化

[0986] 在本实施例中,考察了被转导Jurket细胞胞内信号转导级联活化,所述细胞经修饰而表达肿瘤特异性嵌合抗原受体(CAR),在此即CD19,并用作为可溶多聚化反应剂的实施例3的寡聚Strep-tactin®刺激。

[0987] 为此,300,000个Jurkat应答细胞(J_{应答})用如下物质刺激:(A)不同量的Streptactin多聚化反应剂制备物的混合物(1mg/ml),所述反应剂用 α CD3Fab片段和 α CD28Fab片段如本文所述地官能化(“ $\times 1$ ”对应于3 μ g Streptactin多聚化反应剂用0.5 μ g α CD3-和0.5 μ g α CD28-Fab官能化,由此产生“基于多克隆链霉亲和素的多聚化反应剂”),或(B)3 μ l Streptactin多聚化反应剂制备物(1mg/ml),所述反应剂用0.5 μ g($\times 1$)或1 μ g($\times 2$)的CD19胞外结构域(ECD)官能化(CD19是 α CD19-CAR的天然配体,由此产生“CAR-特异性的基于Streptactin的多聚化反应剂”),或3 μ l Streptactin多聚化反应剂制备物,所述反应剂加载有0.5 μ g($\times 1$)或1 μ g($\times 2$)识别 α CD19-CAR内IgG4间隔子的 α IgG,由此产生“CAR-特异性的基于链霉亲和素突变蛋白的多聚化反应剂”。带有六组氨酸标签的CD19的ECD获自Sino Biological/Life technologies公司(SEQ ID NO:49),为了结合基于链霉亲和素的多聚化反应剂进行如下官能化:按1:1的分子比混合CD19的ECD和衔接分子His-STREPPER(IBA有限公司,德国,订购号2-0920-005)并在室温孵育15分钟。His-STREPPER衔接分子包含结合六组氨酸标签的螯合部分和链霉亲和素结合肽,由此为靶分子(在此即CD19ECD)临时性提供了链霉亲和素结合肽,该结合肽能够可逆结合基于链霉亲和素突变蛋白的多聚化反应剂。用抗CD3/抗CD28珠(珠上可逆固定 α CD3和 α CD28单克隆抗体)或PMA刺激J_{应答},将离子霉素刺激作为阳性对照。将J_{应答}细胞接种在1.5ml Eppendorf管内200 μ l细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,刺激0-20分钟后冰上裂解。磷酸化ERK的检测指示活跃MAPK信号转导,管家蛋白 β -肌动蛋白染色指示各条件各时间点的等量总蛋白加载。由图22A—显示采用“多克隆Streptactin多聚化反应剂”的Jurkat细胞活化—和图22B—显示采用两种“CAR特异性的基于链霉亲和素的多聚化反应剂”的Jurkat细胞活化—可见:Jurkat细胞可通过CD19胞外结构域与CD19特异性嵌合抗原受体的结合被活化/扩增。由于在预选择细胞群上进行T细胞基因下游加工几乎被排除,通过经IgG4间隔结构域(这在具有不同特异性的各种CAR中是保守的)引入的CAR的交联的普遍活化扩展了在这些体外细胞加工情况下的可逆细

胞刺激/扩展的适用性。

[0988] 因此,该试验表明:原则上,任何细胞群通过结合向细胞提供主要活化信号的作用剂(配体)而活化后都可采用本文所述可逆固定于多聚化反应剂的第一作用剂来扩增。

[0989] 实施例19:从单个库中平行抗原特异性扩增出 T_{CM} 应答细胞

[0990] 在本实施例中,考察了从用多种可逆肽:MHC/ α CD28Fab-Streptamer多聚体体外刺激的单个T应答细胞库中平行抗原特异性(Ag特异性)扩增出TCM应答细胞的动力学。

[0991] 将500,000个CD3+CD62L+CD45RA-应答 T_{CM} 细胞(T应答)同时针对多种Ag特异性进行刺激,对于各特异性,采用3 μ l Streptactin多聚体(用携带链霉亲和素结合肽的0.5 μ g相应肽:MHC I类复合物和同样携带链霉亲和素结合肽的0.5 μ g α CD28Fab功能化)。作为另一种方法,4.5 μ l基于Streptactin的多聚化反应剂用0.5 μ g带链霉亲和素结合肽的肽:MHC I类复合物、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab功能化,如本文所述,用于各特异性。为了比较而进行了多克隆刺激,采用可逆加载有0.5 μ g α CD3Fab与0.5 μ g α CD28Fab组合的3 μ l Streptactin多聚化反应剂的制备物(1mg/ml)。同样,作为上述的替代刺激条件,采用可逆加载有0.5 μ g α CD3Fab、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab(各自带有链霉亲和素结合肽)的4.5 μ l基于Streptactin的多聚化反应剂的制备物。无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞用作阴性对照,抗CD3/抗CD28珠多克隆刺激的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2和5ng/ml IL-15)中。在37℃孵育细胞,每3天更换培养基,在7天和14天后进行细胞计数分析。

[0992] 实施例20:用以 α CD3/ α CD8/ α CD28Fab片段可逆功能化的基于链霉亲和素的多聚化反应剂体外刺激的CD3+T应答细胞中的CD8+T细胞的优先增殖

[0993] 用如下物质刺激300,000个CD3+应答T细胞($T_{\text{应答}}$):3 μ l链霉亲和素多聚化制备物或采用大链霉亲和素骨架的多聚化反应剂(0.1mg/ml),其各自加载了0.5 μ g α CD3Fab和0.5 μ g α CD28Fab的组合,或4.5 μ l基于链霉亲和素的多聚化反应剂的制备物,其加载了0.5 μ g α CD3、0.5 μ g α CD8Fab和0.5 μ g α CD28Fab,或3 μ l基于Streptactin的多聚化反应剂的制备物混合物,其仅加载了0.5 μ g α CD3Fab和仅加载了0.5 μ g α CD28Fab(各Fab片段同样携带链霉亲和素结合肽)。无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$ 细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠(α CD3-和 α CD28-mAb包被的珠)刺激的 $T_{\text{应答}}$ 作为阳性对照。将 $T_{\text{应答}}$ 细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,3天后更换培养基,6天后进行分析。

[0994] 实施例21:用以 α CD3Fab和 α CD28Fab片段可逆功能化的基于链霉亲和素的多聚化反应剂体外刺激的CD3+T应答细胞中的CD8+T细胞的优先增殖

[0995] 300,000个CD3+应答T细胞($T_{\text{应答}}$)用如下物质刺激:不同量的如下所述基于Streptactin的多聚化反应剂制备物的混合物(1mg/ml),仅用 α CD3Fab片段和仅用 α CD28Fab片段官能化(1.5 μ g基于Streptactin的多聚化反应剂用0.5 μ g仅 α CD3Fab片段官能化,1.5 μ g基于Streptactin的多聚化反应剂用0.5 μ g仅 α CD28Fab官能化);或不同量的如下所述基于Streptactin的多聚化反应剂制备物的混合物(1mg/ml),用 α CD3Fab片段和 α CD28Fab片段同时用或不用 α CD8Fab片段官能化(各Fab片段同样带有链霉亲和素结合肽)(3 μ g基于Streptactin的多聚化反应剂用0.5 μ g α CD3和0.5 μ g α CD28Fab片段一无 α CD8Fab片段一官能化,或者,4.5 μ g基于Streptactin的多聚化反应剂加载0.5 μ g α CD3Fab片段、0.5 μ g α CD8Fab片段和0.5 μ g α CD28Fab片段(各Fab片段同样带有链霉亲和素结合肽)。无处理(不刺激)的 $T_{\text{应答}}$

细胞作为阴性对照,抗CD3/抗CD28珠(α CD3-和 α CD28-mAb包被的珠)刺激的T_{应答}作为阳性对照。将T_{应答}细胞接种于48孔板上1ml细胞培养基(补充有30U/ml IL-2)中。在37℃孵育细胞,3天后更换培养基,6天后进行分析。

[0996] 本发明并不意在将范围限制于具体公开的实施方式,这些实施方式仅为提供,例如,对于本发明不同方面的说明。本文所述的组合物和方法的各种修饰将在本文的说明和启示后变得显而易见。可实施这类变化而不偏离本公开的真正范围和精神,并且落入本发明的范围内。

[0997] 序列

[0998]

No.	序列	描述
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	链霉亲和素种系：亲和素链霉菌 (<i>Streptomyces avidinii</i>) UniProt No. P22629
2	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	最小链霉亲和素种系：亲和素链霉菌
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT VT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素突变蛋白 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 种系：亲和素链霉菌
4	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT VT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	链霉亲和素突变蛋白 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 种系：亲和素链霉菌
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT IG ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	链霉亲和素突变蛋白 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 种系：亲和素链霉菌
6	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT IG ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	链霉亲和素突变蛋白 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 种系：亲和素链霉菌
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

[0999]

11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	链霉亲和素-结合肽 Xaa ₁ 为 Trp, Lys 或 Arg; Xaa ₂ 为任何氨基酸; Xaa ₃ 为Gly或Glu Xaa ₄ 为 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 为任何氨基酸; Xaa ₂ 为Gly或Glu Xaa ₃ 为 Gly, Lys 或 Arg
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	链霉亲和素-结合肽的顺序模块 (Sequential modules) Xaa为任何氨基酸; n 为8或12
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	链霉亲和素-结合肽顺序模块 n为2或3
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-标签
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-标签
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-标签
18	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-标签
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-标签
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-标签
21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-标签
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

[1000]

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	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTGYVTARGNAESRYV LTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQY VGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	链霉亲和素突变蛋白 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 和 Glu117、Gly120、Try121 (突变蛋白m1-9) 种系: 亲和素链霉菌
28	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTGY VTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYR NAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVG HDTFTKVKPSAAS	链霉亲和素突变蛋白 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47 和 Glu117、Gly120、Try121 (突变蛋白m1-9) 种系: 亲和素链霉菌
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWVR QSPGKGLEWL GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYCAKN DPGTGFAFWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH 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 HDAKTLAGV PSRFSGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYTC QAHYGNPPTF GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	Fab 片段 m13B8.2 的可变轻链
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 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

[1001]

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 Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	α CD16抗体3G8 VH
37	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	α CD16抗体3G8 VL
38	CRVLCCYVL	抗原特异性肽
39	QYDPVAALF	CMV 的 pp65 表位 (氨基酸341-350)
40	RIPHERNGFTV	CMV 的 pp65 表位 (氨基酸265-274)
41	CPYSGTAYNSL	腺病毒的六邻体5表位 (氨基酸114-124)
42	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu	HLA-A*2402

[1002]

	Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Pro Pro Lys Thr His Met Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
43	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	HLA-B*0702
44	Met Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Cys Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Asp Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser	HLA-C*0702

[1003]

	Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Lys Tyr Lys Arg Gln Ala Gln Ala Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Asp Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Ser Gly Cys Asp Leu Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asp Gln Ser Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Leu Glu Ala Ala Arg Ala Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Glu Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Leu Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Met Gln His Glu Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
45	Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met	β_2 微球蛋白
46	YTDIEMNRLGK	VSV-G标签
47	WREPGRMELN	来自血管性血友病 因子的胶原结合结 构域的10氨基酸标 签
48	GGGS	接头肽
49	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFL KLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKA WQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPPSSPS GKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNSQLSQDLTMA PGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDR PARDMWVMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITA RPVLWHWLLRTGGWKAHHHHHHHHHHH	带有 His- 标签 的人 CD19胞外结构域

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 朱诺治疗学有限公司(Juno Therapeutics GmbH)
- [0003] L·戈尔梅洛斯(Lothar GERMEROTH)
- [0004] C·斯蒂姆贝格尔(Christian STEMBERGER)
- [0005] P·格拉夫(Patricia GRAEF)
- [0006] <120> 培养细胞的方法及用于该方法的试剂盒和设备 (METHODS FOR CULTURING CELLS AND KITS AND
- [0007] APPARATUS FOR SAME)
- [0008] <130> 735042002740
- [0009] <140> 未授予
- [0010] <141> 共同附于此
- [0011] <150> 62/245,249
- [0012] <151> 2015-10-22
- [0013] <160> 49
- [0014] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 159
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 亲和素链霉菌(*Streptomyces avidinii*)
- [0019] <220>
- [0020] <223> 链霉亲和素
- [0021] <300>
- [0022] <308> UniProt No. P22629
- [0023] <309> 1991-08-01
- [0024] <400> 1
- [0025] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
- [0026] 1 5 10 15
- [0027] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
- [0028] 20 25 30
- [0029] Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
- [0030] 35 40 45
- [0031] Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
- [0032] 50 55 60
- [0033] Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
- [0034] 65 70 75 80
- [0035] Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
- [0036] 85 90 95
- [0037] Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

[0038]	100	105	110
[0039]	Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp		
[0040]	115	120	125
[0041]	Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys		
[0042]	130	135	140
[0043]	Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln		
[0044]	145	150	155
[0045]	<210> 2		
[0046]	<211> 126		
[0047]	<212> PRT		
[0048]	<213> 亲和素链霉菌(<i>Streptomyces avidinii</i>)		
[0049]	<220>		
[0050]	<223> 最小的链霉亲和素		
[0051]	<400> 2		
[0052]	Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe		
[0053]	1	5	10
[0054]	Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser		
[0055]	20	25	30
[0056]	Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp		
[0057]	35	40	45
[0058]	Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val		
[0059]	50	55	60
[0060]	Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
[0061]	65	70	75
[0062]	Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		
[0063]	85	90	95
[0064]	Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
[0065]	100	105	110
[0066]	Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
[0067]	115	120	125
[0068]	<210> 3		
[0069]	<211> 159		
[0070]	<212> PRT		
[0071]	<213> 亲和素链霉菌(<i>Streptomyces avidinii</i>)		
[0072]	<220>		
[0073]	<223> 链霉亲和素突变蛋白Val44-Thr45-Ala46-Arg47		
[0074]	<400> 3		
[0075]	Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly		
[0076]	1	5	10

[0077]	Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
[0078]	20 25 30
[0079]	Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
[0080]	35 40 45
[0081]	Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
[0082]	50 55 60
[0083]	Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
[0084]	65 70 75 80
[0085]	Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
[0086]	85 90 95
[0087]	Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
[0088]	100 105 110
[0089]	Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
[0090]	115 120 125
[0091]	Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
[0092]	130 135 140
[0093]	Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
[0094]	145 150 155
[0095]	<210> 4
[0096]	<211> 126
[0097]	<212> PRT
[0098]	<213> 亲和素链霉菌(<i>Streptomyces avidinii</i>)
[0099]	<220>
[0100]	<223> 链霉亲和素突变蛋白Val144-Thr45-Ala46-Arg47
[0101]	<400> 4
[0102]	Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
[0103]	1 5 10 15
[0104]	Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
[0105]	20 25 30
[0106]	Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
[0107]	35 40 45
[0108]	Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
[0109]	50 55 60
[0110]	Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
[0111]	65 70 75 80
[0112]	Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
[0113]	85 90 95
[0114]	Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
[0115]	100 105 110

[0116] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 [0117] 115 120 125
 [0118] <210> 5
 [0119] <211> 159
 [0120] <212> PRT
 [0121] <213> 亲和素链霉菌(*Streptomyces avidinii*)
 [0122] <220>
 [0123] <223> 链霉亲和素突变蛋白Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 [0124] <400> 5
 [0125] Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 [0126] 1 5 10 15
 [0127] Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 [0128] 20 25 30
 [0129] Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 [0130] 35 40 45
 [0131] Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 [0132] 50 55 60
 [0133] Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 [0134] 65 70 75 80
 [0135] Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 [0136] 85 90 95
 [0137] Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 [0138] 100 105 110
 [0139] Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 [0140] 115 120 125
 [0141] Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 [0142] 130 135 140
 [0143] Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 [0144] 145 150 155
 [0145] <210> 6
 [0146] <211> 126
 [0147] <212> PRT
 [0148] <213> 亲和素链霉菌(*Streptomyces avidinii*)
 [0149] <220>
 [0150] <223> 链霉亲和素突变蛋白Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 [0151] <400> 6
 [0152] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 [0153] 1 5 10 15
 [0154] Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly

[0155]	20	25	30
[0156]	Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp		
[0157]	35	40	45
[0158]	Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val		
[0159]	50	55	60
[0160]	Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser		
[0161]	65	70	75
[0162]	Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu		
[0163]	85	90	95
[0164]	Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val		
[0165]	100	105	110
[0166]	Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
[0167]	115	120	125
[0168]	<210> 7		
[0169]	<211> 8		
[0170]	<212> PRT		
[0171]	<213> 人工序列		
[0172]	<220>		
[0173]	<223> 链霉亲和素结合肽Strep标签		
[0174]	<400> 7		
[0175]	Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly		
[0176]	1	5	
[0177]	<210> 8		
[0178]	<211> 8		
[0179]	<212> PRT		
[0180]	<213> 人工序列		
[0181]	<220>		
[0182]	<223> Strep标签 II		
[0183]	<400> 8		
[0184]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0185]	1	5	
[0186]	<210> 9		
[0187]	<211> 3		
[0188]	<212> PRT		
[0189]	<213> 人工序列		
[0190]	<220>		
[0191]	<223> 链霉亲和素结合肽		
[0192]	<220>		
[0193]	<221> 变体		

[0194]	<222> (3) ... (3)
[0195]	<223> Xaa为Gln, Asp或Met
[0196]	<400> 9
[0197]	His Pro Xaa
[0198]	1
[0199]	<210> 10
[0200]	<211> 4
[0201]	<212> PRT
[0202]	<213> 人工序列
[0203]	<220>
[0204]	<223> 链霉亲和素结合肽
[0205]	<400> 10
[0206]	His Pro Gln Phe
[0207]	1
[0208]	<210> 11
[0209]	<211> 8
[0210]	<212> PRT
[0211]	<213> 人工序列
[0212]	<220>
[0213]	<223> 链霉亲和素结合肽
[0214]	<220>
[0215]	<221> 变体
[0216]	<222> (1) ... (1)
[0217]	<223> Xaa为Trp, Lys或Arg
[0218]	<220>
[0219]	<221> 变体
[0220]	<222> (2) ... (2)
[0221]	<223> Xaa为任何氨基酸
[0222]	<220>
[0223]	<221> 变体
[0224]	<222> (7) ... (7)
[0225]	<223> Xaa为Gly或Glu
[0226]	<220>
[0227]	<221> 变体
[0228]	<222> (8) ... (8)
[0229]	<223> Xaa为Gly, Lys或Arg
[0230]	<400> 11
[0231]	Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0232]	1 5

[0233]	<210> 12
[0234]	<211> 8
[0235]	<212> PRT
[0236]	<213> 人工序列
[0237]	<220>
[0238]	<223> 链霉亲和素结合肽
[0239]	<220>
[0240]	<221> 变体
[0241]	<222> (2) ... (2)
[0242]	<223> Xaa为任何氨基酸
[0243]	<220>
[0244]	<221> 变体
[0245]	<222> (7) ... (7)
[0246]	<223> Xaa为Gly或Glu
[0247]	<220>
[0248]	<221> 变体
[0249]	<222> (8) ... (8)
[0250]	<223> Xaa为Gly, Lys或Arg
[0251]	<400> 12
[0252]	Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa
[0253]	1 5
[0254]	<210> 13
[0255]	<211> 17
[0256]	<212> PRT
[0257]	<213> 人工序列
[0258]	<220>
[0259]	<223> 链霉亲和素-结合肽的顺序模块
[0260]	<220>
[0261]	<221> 变体
[0262]	<222> (9) ... (9)
[0263]	<223> Xaa为任何氨基酸
[0264]	<220>
[0265]	<221> 重复
[0266]	<222> (9) ... (9)
[0267]	<223> 重复8或12次
[0268]	<400> 13
[0269]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
[0270]	1 5 10 15
[0271]	Lys

[0272]	<210>	14
[0273]	<211>	20
[0274]	<212>	PRT
[0275]	<213>	人工序列
[0276]	<220>	
[0277]	<223>	链霉亲和素-结合肽的顺序模块
[0278]	<220>	
[0279]	<221>	重复
[0280]	<222>	(9) ... (12)
[0281]	<223>	重复2或3次
[0282]	<400>	14
[0283]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro	
[0284]	1 5 10 15	
[0285]	Gln Phe Glu Lys	
[0286]	20	
[0287]	<210>	15
[0288]	<211>	30
[0289]	<212>	PRT
[0290]	<213>	人工序列
[0291]	<220>	
[0292]	<223>	Twin-Strep标签
[0293]	<400>	15
[0294]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
[0295]	1 5 10 15	
[0296]	Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
[0297]	20 25 30	
[0298]	<210>	16
[0299]	<211>	30
[0300]	<212>	PRT
[0301]	<213>	人工序列
[0302]	<220>	
[0303]	<223>	Twin-Strep标签
[0304]	<400>	16
[0305]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
[0306]	1 5 10 15	
[0307]	Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
[0308]	20 25 30	
[0309]	<210>	17
[0310]	<211>	28

[0311] <212> PRT
 [0312] <213> 人工序列
 [0313] <220>
 [0314] <223> Twin-Strep标签
 [0315] <400> 17
 [0316] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 [0317] 1 5 10 15
 [0318] Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 [0319] 20 25
 [0320] <210> 18
 [0321] <211> 24
 [0322] <212> PRT
 [0323] <213> 人工序列
 [0324] <220>
 [0325] <223> Twin-Strep标签
 [0326] <400> 18
 [0327] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 [0328] 1 5 10 15
 [0329] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 [0330] 20
 [0331] <210> 19
 [0332] <211> 28
 [0333] <212> PRT
 [0334] <213> 人工序列
 [0335] <220>
 [0336] <223> Twin-Strep标签
 [0337] <400> 19
 [0338] Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 [0339] 1 5 10 15
 [0340] Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 [0341] 20 25
 [0342] <210> 20
 [0343] <211> 9
 [0344] <212> PRT
 [0345] <213> 人工序列
 [0346] <220>
 [0347] <223> HA标签
 [0348] <400> 20
 [0349] Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

[0350]	1	5	
[0351]	<210>	21	
[0352]	<211>	11	
[0353]	<212>	PRT	
[0354]	<213>	人工序列	
[0355]	<220>		
[0356]	<223>	VSV-G标签	
[0357]	<400>	21	
[0358]	Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys		
[0359]	1	5	10
[0360]	<210>	22	
[0361]	<211>	11	
[0362]	<212>	PRT	
[0363]	<213>	人工序列	
[0364]	<220>		
[0365]	<223>	HSV标签	
[0366]	<400>	22	
[0367]	Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp		
[0368]	1	5	10
[0369]	<210>	23	
[0370]	<211>	10	
[0371]	<212>	PRT	
[0372]	<213>	人工序列	
[0373]	<220>		
[0374]	<223>	T7表位	
[0375]	<400>	23	
[0376]	Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly		
[0377]	1	5	10
[0378]	<210>	24	
[0379]	<211>	11	
[0380]	<212>	PRT	
[0381]	<213>	人工序列	
[0382]	<220>		
[0383]	<223>	HSV表位	
[0384]	<400>	24	
[0385]	Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp		
[0386]	1	5	10
[0387]	<210>	25	
[0388]	<211>	10	

[0389] <212> PRT
 [0390] <213> 人工序列
 [0391] <220>
 [0392] <223> Myc表位
 [0393] <400> 25
 [0394] Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 [0395] 1 5 10
 [0396] <210> 26
 [0397] <211> 14
 [0398] <212> PRT
 [0399] <213> 人工序列
 [0400] <220>
 [0401] <223> V5标签
 [0402] <400> 26
 [0403] Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
 [0404] 1 5 10
 [0405] <210> 27
 [0406] <211> 126
 [0407] <212> PRT
 [0408] <213> 亲和素链霉菌(*Streptomyces avidinii*)
 [0409] <220>
 [0410] <223> 链霉亲和素突变蛋白Val144-Thr45-Ala46-Arg47和
 [0411] Glu117, Gly120, Try121 (突变蛋白m1-9)
 [0412] <400> 27
 [0413] Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 [0414] 1 5 10 15
 [0415] Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
 [0416] 20 25 30
 [0417] Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 [0418] 35 40 45
 [0419] Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 [0420] 50 55 60
 [0421] Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 [0422] 65 70 75 80
 [0423] Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 [0424] 85 90 95
 [0425] Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val
 [0426] 100 105 110
 [0427] Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

[0428]	115	120	125
[0429]	<210> 28		
[0430]	<211> 139		
[0431]	<212> PRT		
[0432]	<213> 亲和素链霉菌(<i>Streptomyces avidinii</i>)		
[0433]	<220>		
[0434]	<223> 链霉亲和素突变蛋白Val44-Thr45-Ala46-Arg47和		
[0435]	Glu117, Gly120, Try121 (突变蛋白m1-9)		
[0436]	<400> 28		
[0437]	Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly		
[0438]	1 5 10 15		
[0439]	Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr		
[0440]	20 25 30		
[0441]	Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly		
[0442]	35 40 45		
[0443]	Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro		
[0444]	50 55 60		
[0445]	Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys		
[0446]	65 70 75 80		
[0447]	Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr		
[0448]	85 90 95		
[0449]	Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser		
[0450]	100 105 110		
[0451]	Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp		
[0452]	115 120 125		
[0453]	Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser		
[0454]	130 135		
[0455]	<210> 29		
[0456]	<211> 253		
[0457]	<212> PRT		
[0458]	<213> 人工序列		
[0459]	<220>		
[0460]	<223> Fab片段m13B8.2的可变重链		
[0461]	<400> 29		
[0462]	Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro		
[0463]	1 5 10 15		
[0464]	Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr		
[0465]	20 25 30		
[0466]	Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu		

[0467]	35	40	45
[0468]	Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro		
[0469]	50	55	60
[0470]	Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val		
[0471]	65	70	75
[0472]	Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr		
[0473]	85	90	95
[0474]	Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0475]	100	105	110
[0476]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		
[0477]	115	120	125
[0478]	Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu		
[0479]	130	135	140
[0480]	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp		
[0481]	145	150	155
[0482]	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu		
[0483]	165	170	175
[0484]	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser		
[0485]	180	185	190
[0486]	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro		
[0487]	195	200	205
[0488]	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser		
[0489]	210	215	220
[0490]	Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
[0491]	225	230	235
[0492]	Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0493]	245	250	
[0494]	<210> 30		
[0495]	<211> 218		
[0496]	<212> PRT		
[0497]	<213> 人工序列		
[0498]	<220>		
[0499]	<223> Fab片段m13B8.2的可变轻链		
[0500]	<400> 30		
[0501]	Ala Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser		
[0502]	1	5	10
[0503]	Val Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Glu Met Ile Tyr		
[0504]	20	25	30
[0505]	Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu		

[0506]	35	40	45
[0507]	Leu Val His Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe		
[0508]	50	55	60
[0509]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu		
[0510]	65	70	75
[0511]	Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn		
[0512]	85	90	95
[0513]	Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile		
[0514]	100	105	110
[0515]	Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys		
[0516]	115	120	125
[0517]	Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg		
[0518]	130	135	140
[0519]	Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn		
[0520]	145	150	155
[0521]	Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser		
[0522]	165	170	175
[0523]	Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys		
[0524]	180	185	190
[0525]	Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr		
[0526]	195	200	205
[0527]	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser		
[0528]	210	215	
[0529]	<210> 31		
[0530]	<211> 119		
[0531]	<212> PRT		
[0532]	<213> 人工序列		
[0533]	<220>		
[0534]	<223> 抗CD3抗体OKT3的可变重链		
[0535]	<400> 31		
[0536]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
[0537]	1	5	10
[0538]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr		
[0539]	20	25	30
[0540]	Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile		
[0541]	35	40	45
[0542]	Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0543]	50	55	60
[0544]	Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		

[0545]	65	70	75	80
[0546]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0547]		85	90	95
[0548]	Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0549]		100	105	110
[0550]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[0551]		115		
[0552]	<210> 32			
[0553]	<211> 106			
[0554]	<212> PRT			
[0555]	<213> 人工序列			
[0556]	<220>			
[0557]	<223> 抗CD3抗体OKT3的可变轻链			
[0558]	<400> 32			
[0559]	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly			
[0560]	1	5	10	15
[0561]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met			
[0562]		20	25	30
[0563]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr			
[0564]		35	40	45
[0565]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser			
[0566]		50	55	60
[0567]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu			
[0568]	65	70	75	80
[0569]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr			
[0570]		85	90	95
[0571]	Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn			
[0572]		100	105	
[0573]	<210> 33			
[0574]	<211> 116			
[0575]	<212> PRT			
[0576]	<213> 人工序列			
[0577]	<220>			
[0578]	<223> 抗CD28抗体CD28.3的可变重链			
[0579]	<400> 33			
[0580]	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg			
[0581]	1	5	10	15
[0582]	Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His			
[0583]		20	25	30

[0584] Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe
 [0585] 35 40 45
 [0586] Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys
 [0587] 50 55 60
 [0588] Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
 [0589] 65 70 75 80
 [0590] Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg
 [0591] 85 90 95
 [0592] Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0593] 100 105 110
 [0594] Met Val Thr Val
 [0595] 115
 [0596] <210> 34
 [0597] <211> 108
 [0598] <212> PRT
 [0599] <213> 人工序列
 [0600] <220>
 [0601] <223> 抗CD28抗体CD28.3的可变轻链
 [0602] <400> 34
 [0603] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 [0604] 1 5 10 15
 [0605] Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 [0606] 20 25 30
 [0607] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 [0608] 35 40 45
 [0609] Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 [0610] 50 55 60
 [0611] Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
 [0612] 65 70 75 80
 [0613] Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys
 [0614] 85 90 95
 [0615] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0616] 100 105
 [0617] <210> 35
 [0618] <211> 11
 [0619] <212> PRT
 [0620] <213> 人工序列
 [0621] <220>
 [0622] <223> MAT标签

[0623]	<400> 35																	
[0624]	His	Asn	His	Arg	His	Lys	His	Gly	Gly	Gly	Cys							
[0625]	1					5					10							
[0626]	<210> 36																	
[0627]	<211> 118																	
[0628]	<212> PRT																	
[0629]	<213> 人工序列																	
[0630]	<220>																	
[0631]	<223> 抗CD16抗体3G8 VH																	
[0632]	<400> 36																	
[0633]	Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gln		
[0634]	1					5					10					15		
[0635]	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Thr	Ser		
[0636]					20					25					30			
[0637]	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu		
[0638]					35					40					45			
[0639]	Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asn	Pro	Ala		
[0640]					50					55					60			
[0641]	Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Val		
[0642]					65					70					75			
[0643]	Phe	Leu	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Asp	Thr	Ala	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr		
[0644]					85					90					95			
[0645]	Cys	Ala	Gln	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
[0646]					100					105					110			
[0647]	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
[0648]					115													
[0649]	<210> 37																	
[0650]	<211> 111																	
[0651]	<212> PRT																	
[0652]	<213> 人工序列																	
[0653]	<220>																	
[0654]	<223> 抗CD16抗体3G8 VL																	
[0655]	<400> 37																	
[0656]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly		
[0657]	1					5					10					15		
[0658]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp		
[0659]					20					25					30			
[0660]	Gly	Asp	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro		
[0661]					35					40					45			

[0662]	Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
[0663]	50 55 60
[0664]	Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
[0665]	65 70 75 80
[0666]	Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
[0667]	85 90 95
[0668]	Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0669]	100 105 110
[0670]	<210> 38
[0671]	<211> 9
[0672]	<212> PRT
[0673]	<213> 人工序列
[0674]	<220>
[0675]	<223> 抗原特异性肽
[0676]	<400> 38
[0677]	Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu
[0678]	1 5
[0679]	<210> 39
[0680]	<211> 9
[0681]	<212> PRT
[0682]	<213> 人工序列
[0683]	<220>
[0684]	<223> CMV的pp65表位(氨基酸341-350)
[0685]	<400> 39
[0686]	Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
[0687]	1 5
[0688]	<210> 40
[0689]	<211> 10
[0690]	<212> PRT
[0691]	<213> 人工序列
[0692]	<220>
[0693]	<223> CMV的pp65表位(氨基酸265-274)
[0694]	<400> 40
[0695]	Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val
[0696]	1 5 10
[0697]	<210> 41
[0698]	<211> 11
[0699]	<212> PRT
[0700]	<213> 人工序列

[0701]	<220>
[0702]	<223> 腺病毒的六邻体5表位(氨基酸114-124)
[0703]	<400> 41
[0704]	Cys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ser Leu
[0705]	1 5 10
[0706]	<210> 42
[0707]	<211> 314
[0708]	<212> PRT
[0709]	<213> 人工序列
[0710]	<220>
[0711]	<223> HLA-A*2402
[0712]	<400> 42
[0713]	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro
[0714]	1 5 10 15
[0715]	Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
[0716]	20 25 30
[0717]	Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro
[0718]	35 40 45
[0719]	Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu
[0720]	50 55 60
[0721]	Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg
[0722]	65 70 75 80
[0723]	Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu
[0724]	85 90 95
[0725]	Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg
[0726]	100 105 110
[0727]	Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys
[0728]	115 120 125
[0729]	Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr
[0730]	130 135 140
[0731]	Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr
[0732]	145 150 155 160
[0733]	Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly
[0734]	165 170 175
[0735]	Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Pro Pro Lys Thr His Met Thr His
[0736]	180 185 190
[0737]	His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly
[0738]	195 200 205
[0739]	Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp

[0740]	210	215	220
[0741]	Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly		
[0742]	225	230	235 240
[0743]	Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln		
[0744]	245	250	255
[0745]	Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr		
[0746]	260	265	270
[0747]	Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro		
[0748]	275	280	285
[0749]	Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
[0750]	290	295	300
[0751]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys		
[0752]	305	310	
[0753]	<210> 43		
[0754]	<211> 314		
[0755]	<212> PRT		
[0756]	<213> 人工序列		
[0757]	<220>		
[0758]	<223> HLA-B*0702		
[0759]	<400> 43		
[0760]	Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro		
[0761]	1	5	10 15
[0762]	Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr		
[0763]	20	25	30
[0764]	Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro		
[0765]	35	40	45
[0766]	Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn		
[0767]	50	55	60
[0768]	Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg		
[0769]	65	70	75 80
[0770]	Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu		
[0771]	85	90	95
[0772]	Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg		
[0773]	100	105	110
[0774]	Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn		
[0775]	115	120	125
[0776]	Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr		
[0777]	130	135	140
[0778]	Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr		

[0779]	145	150	155	160
[0780]	Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly			
[0781]		165	170	175
[0782]	Lys Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His			
[0783]		180	185	190
[0784]	His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly			
[0785]		195	200	205
[0786]	Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp			
[0787]		210	215	220
[0788]	Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg			
[0789]	225	230	235	240
[0790]	Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln			
[0791]		245	250	255
[0792]	Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr			
[0793]		260	265	270
[0794]	Leu Arg Trp Glu Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro			
[0795]		275	280	285
[0796]	Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser			
[0797]		290	295	300
[0798]	Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys			
[0799]	305	310		
[0800]	<210> 44			
[0801]	<211> 321			
[0802]	<212> PRT			
[0803]	<213> 人工序列			
[0804]	<220>			
[0805]	<223> HLA-C*0702			
[0806]	<400> 44			
[0807]	Met Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Cys Ser His Ser Met Arg Tyr Phe			
[0808]	1	5	10	15
[0809]	Asp Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser			
[0810]		20	25	30
[0811]	Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala			
[0812]		35	40	45
[0813]	Ala Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly			
[0814]		50	55	60
[0815]	Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Lys Tyr Lys Arg Gln Ala Gln			
[0816]	65	70	75	80
[0817]	Ala Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser			

[0818]		85		90		95
[0819]	Glu Asp Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Ser Gly Cys Asp Leu Gly					
[0820]		100		105		110
[0821]	Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asp Gln Ser Ala Tyr Asp Gly					
[0822]		115		120		125
[0823]	Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala					
[0824]		130		135		140
[0825]	Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Leu Glu Ala Ala Arg Ala					
[0826]		145		150		155
[0827]	Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu					
[0828]		165		170		175
[0829]	Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Glu Pro					
[0830]		180		185		190
[0831]	Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Leu Ser Asp His Glu Ala Thr					
[0832]		195		200		205
[0833]	Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr					
[0834]		210		215		220
[0835]	Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu					
[0836]		225		230		235
[0837]	Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val					
[0838]		245		250		255
[0839]	Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Met Gln His Glu					
[0840]		260		265		270
[0841]	Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro					
[0842]		275		280		285
[0843]	Thr Ile Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly					
[0844]		290		295		300
[0845]	Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu					
[0846]		305		310		315
[0847]	Lys					320
[0848]	<210> 45					
[0849]	<211> 100					
[0850]	<212> PRT					
[0851]	<213> 人工序列					
[0852]	<220>					
[0853]	<223> B2微球蛋白					
[0854]	<400> 45					
[0855]	Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala					
[0856]		1		5		10
						15

[0857]	Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His
[0858]	20 25 30
[0859]	Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu
[0860]	35 40 45
[0861]	Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr
[0862]	50 55 60
[0863]	Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala
[0864]	65 70 75 80
[0865]	Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp
[0866]	85 90 95
[0867]	Asp Arg Asp Met
[0868]	100
[0869]	<210> 46
[0870]	<211> 11
[0871]	<212> PRT
[0872]	<213> 人工序列
[0873]	<220>
[0874]	<223> VSV-G标签
[0875]	<400> 46
[0876]	Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
[0877]	1 5 10
[0878]	<210> 47
[0879]	<211> 10
[0880]	<212> PRT
[0881]	<213> 人工序列
[0882]	<220>
[0883]	<223> 来自血管性血友病因子的胶原结合结构域的10氨基酸标签
[0884]	<400> 47
[0885]	Trp Arg Glu Pro Gly Arg Met Glu Leu Asn
[0886]	1 5 10
[0887]	<210> 48
[0888]	<211> 4
[0889]	<212> PRT
[0890]	<213> 人工序列
[0891]	<220>
[0892]	<223> 接头肽
[0893]	<400> 48
[0894]	Gly Gly Gly Ser
[0895]	1

[0896]	<210> 49															
[0897]	<211> 283															
[0898]	<212> PRT															
[0899]	<213> 人工序列															
[0900]	<220>															
[0901]	<223> 带有His-标签的人CD19胞外结构域															
[0902]	<400> 49															
[0903]	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Lys	Val	Glu	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Val
[0904]	1				5					10					15	
[0905]	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Asp	Gly	Pro	Thr	Gln	Gln	Leu	Thr
[0906]				20					25					30		
[0907]	Trp	Ser	Arg	Glu	Ser	Pro	Leu	Lys	Pro	Phe	Leu	Lys	Leu	Ser	Leu	Gly
[0908]			35					40					45			
[0909]	Leu	Pro	Gly	Leu	Gly	Ile	His	Met	Arg	Pro	Leu	Ala	Ile	Trp	Leu	Phe
[0910]		50					55				60					
[0911]	Ile	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Gln	Met	Gly	Gly	Phe	Tyr	Leu	Cys	Gln	Pro
[0912]	65					70				75					80	
[0913]	Gly	Pro	Pro	Ser	Glu	Lys	Ala	Trp	Gln	Pro	Gly	Trp	Thr	Val	Asn	Val
[0914]					85				90						95	
[0915]	Glu	Gly	Ser	Gly	Glu	Leu	Phe	Arg	Trp	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly
[0916]				100					105				110			
[0917]	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Lys	Asn	Arg	Ser	Ser	Glu	Gly	Pro	Ser	Ser	Pro
[0918]			115					120					125			
[0919]	Ser	Gly	Lys	Leu	Met	Ser	Pro	Lys	Leu	Tyr	Val	Trp	Ala	Lys	Asp	Arg
[0920]		130					135				140					
[0921]	Pro	Glu	Ile	Trp	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Cys	Leu	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser
[0922]	145					150					155					160
[0923]	Leu	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Asp	Leu	Thr	Met	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr
[0924]					165					170					175	
[0925]	Leu	Trp	Leu	Ser	Cys	Gly	Val	Pro	Pro	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Gly	Pro
[0926]				180					185					190		
[0927]	Leu	Ser	Trp	Thr	His	Val	His	Pro	Lys	Gly	Pro	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser
[0928]			195					200					205			
[0929]	Leu	Glu	Leu	Lys	Asp	Asp	Arg	Pro	Ala	Arg	Asp	Met	Trp	Val	Met	Glu
[0930]		210					215				220					
[0931]	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Ala	Gly	Lys	Tyr
[0932]	225					230					235					240
[0933]	Tyr	Cys	His	Arg	Gly	Asn	Leu	Thr	Met	Ser	Phe	His	Leu	Glu	Ile	Thr
[0934]					245					250					255	

[0935]	Ala	Arg	Pro	Val	Leu	Trp	His	Trp	Leu	Leu	Arg	Thr	Gly	Gly	Trp	Lys
[0936]					260				265						270	
[0937]	Ala	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His				
[0938]					275				280							

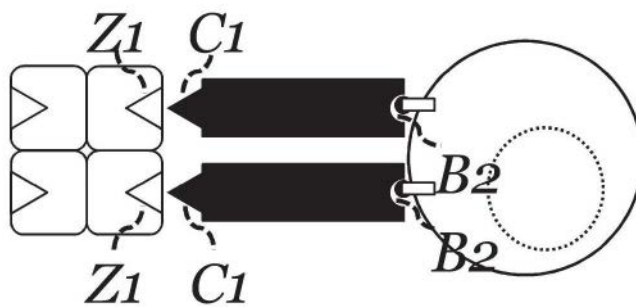


图1A

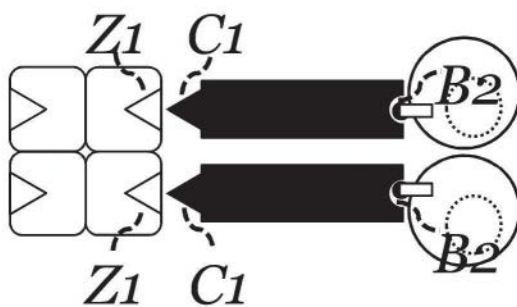


图1B

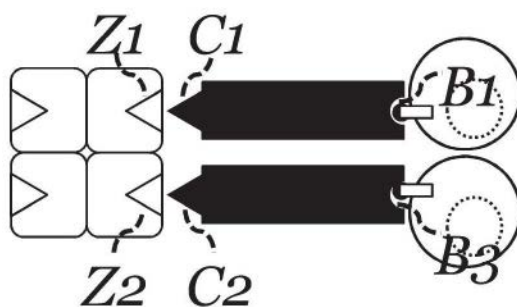


图1C

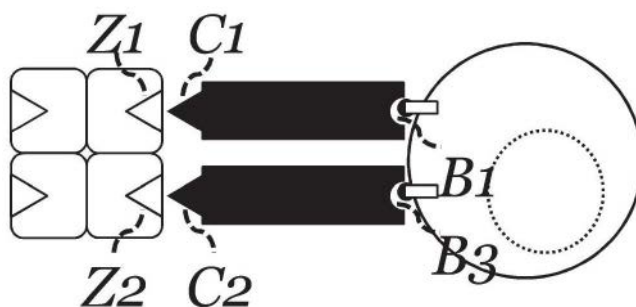


图1D

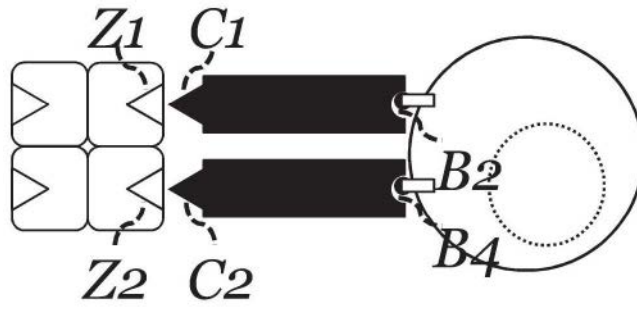


图1E

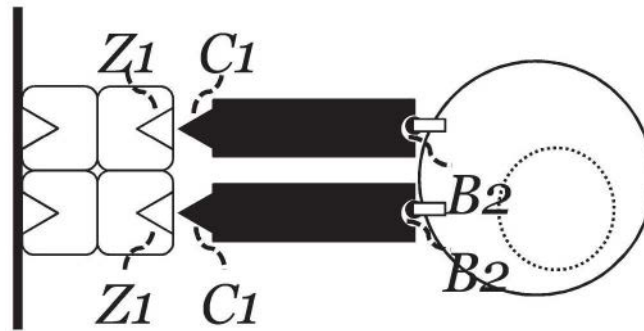


图2A

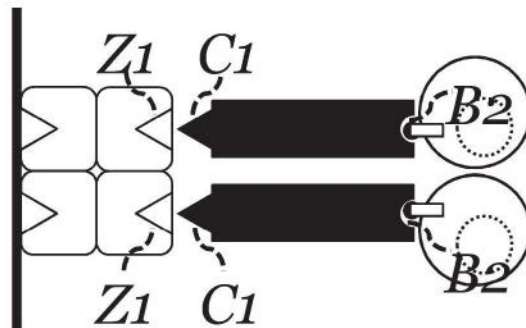


图2B

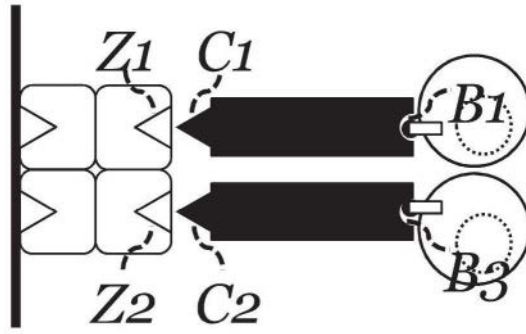


图2C

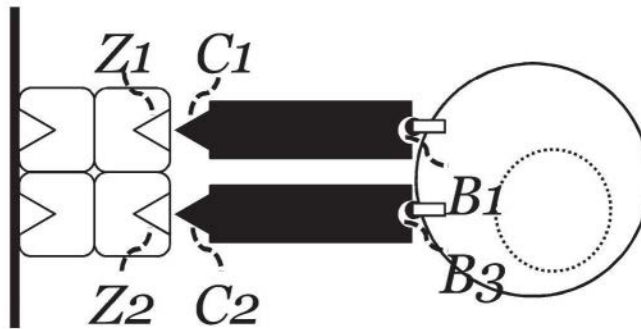


图2D

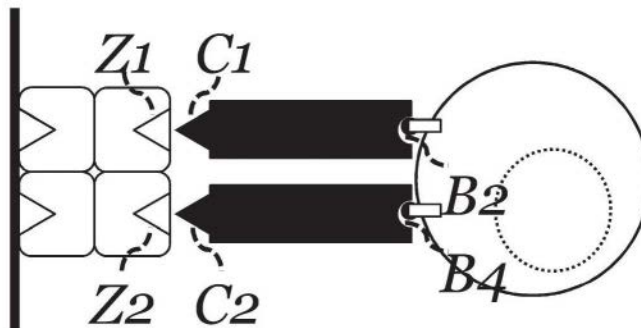


图2E

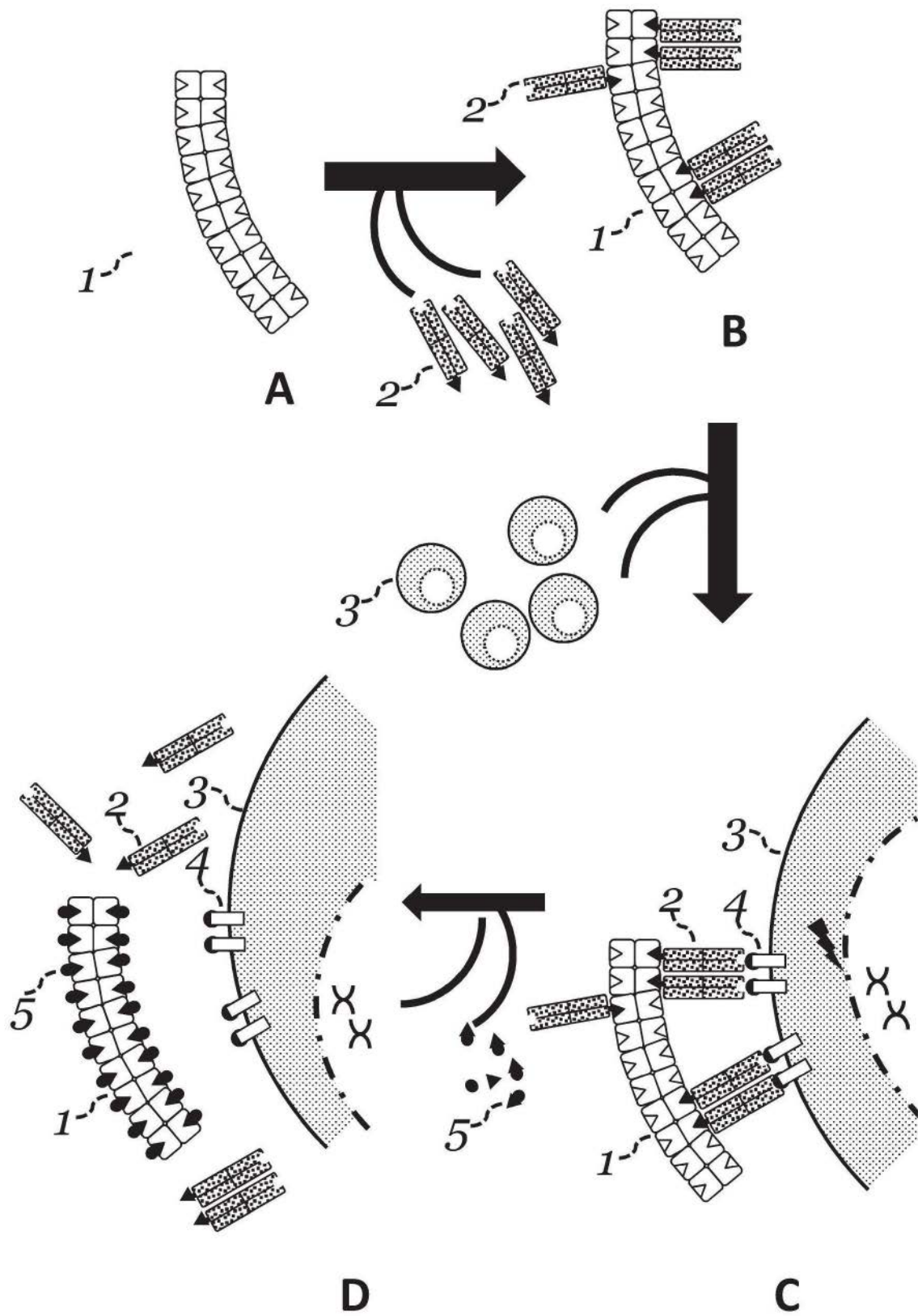


图3

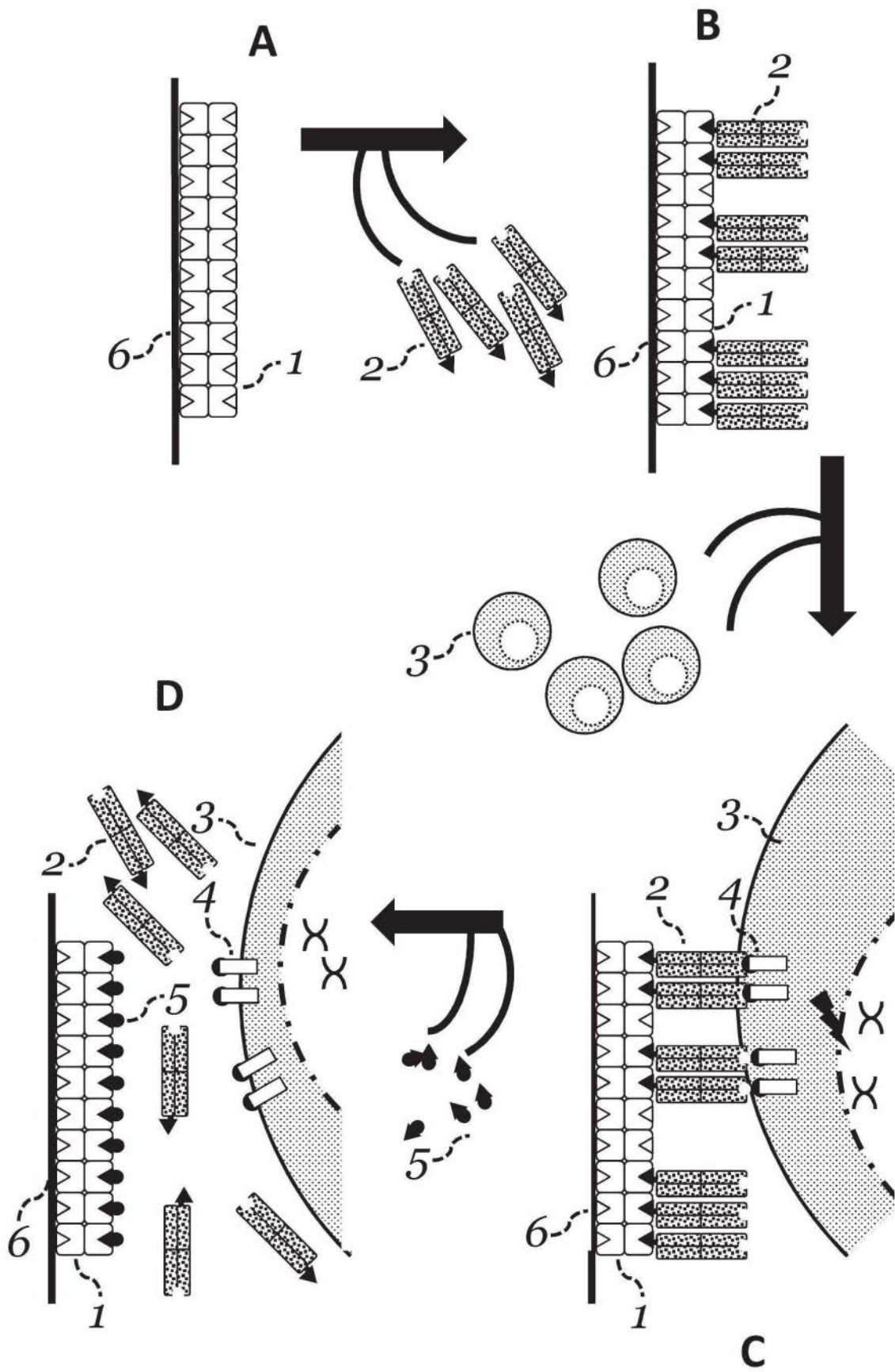


图4

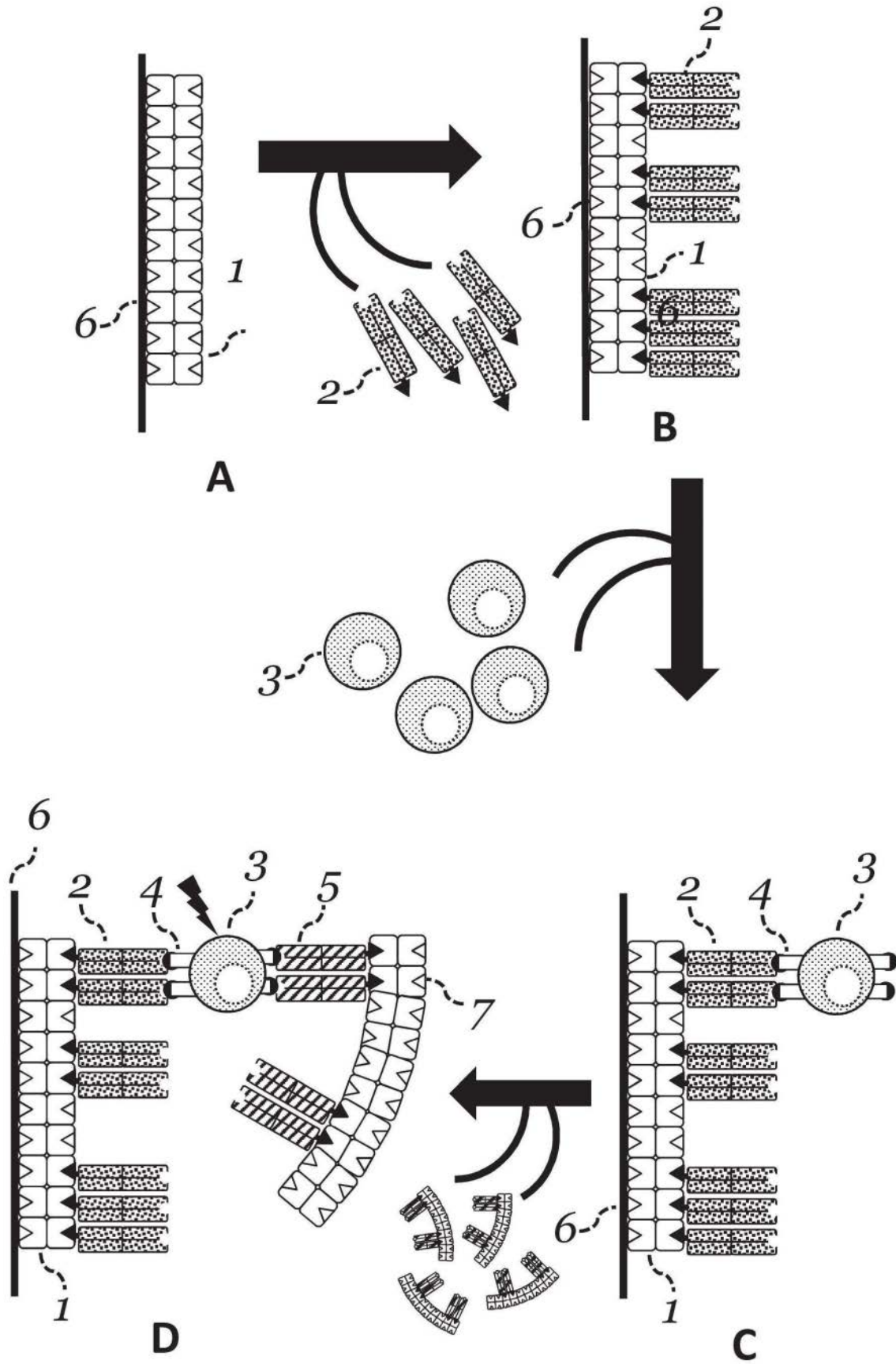


图5

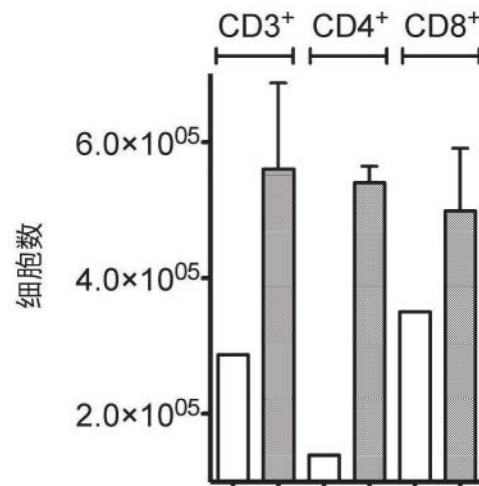


图6A

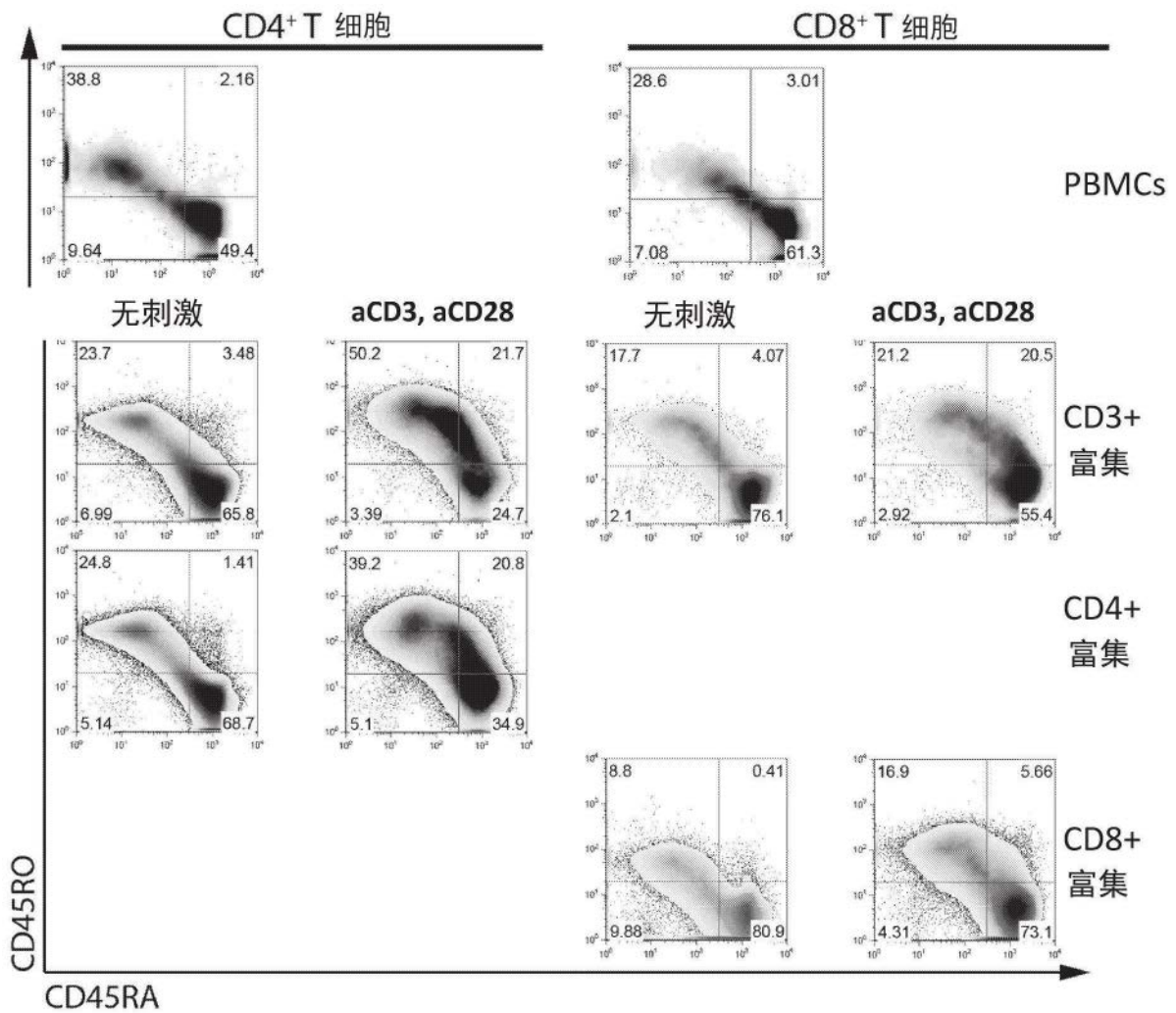


图6B

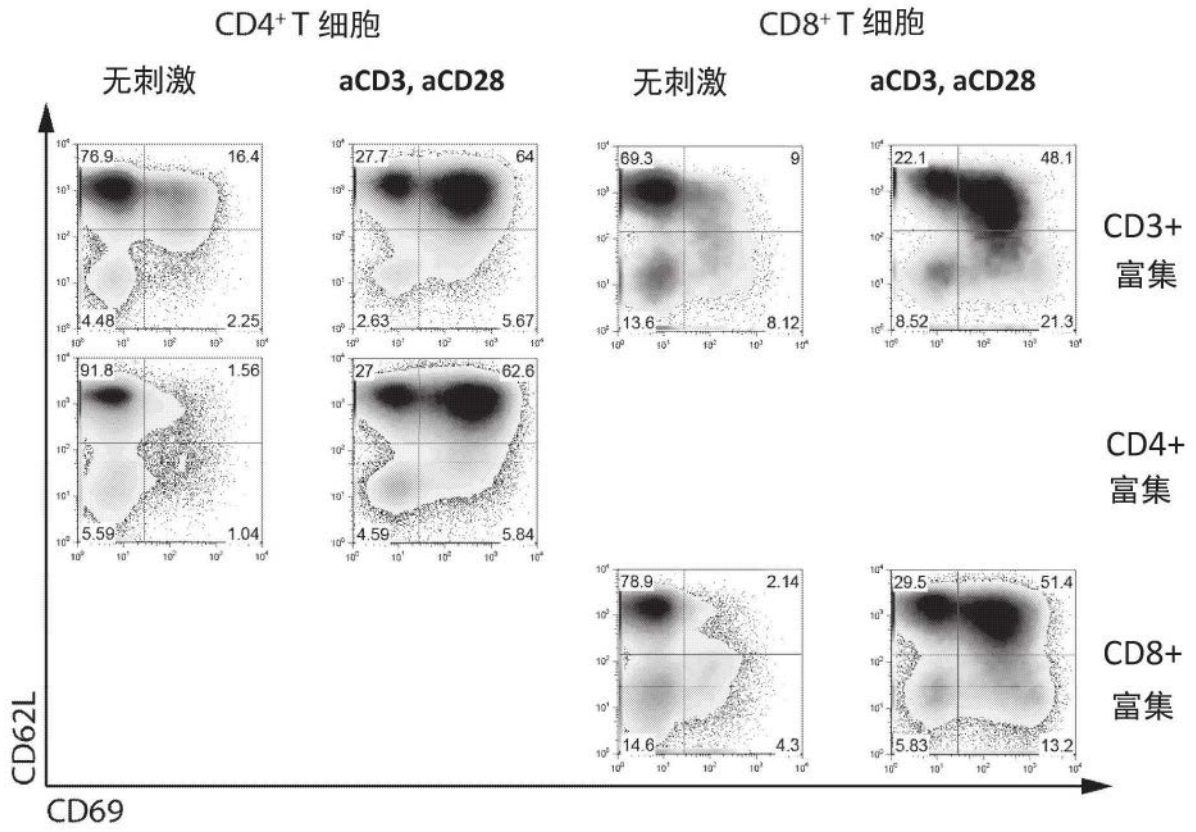


图6C

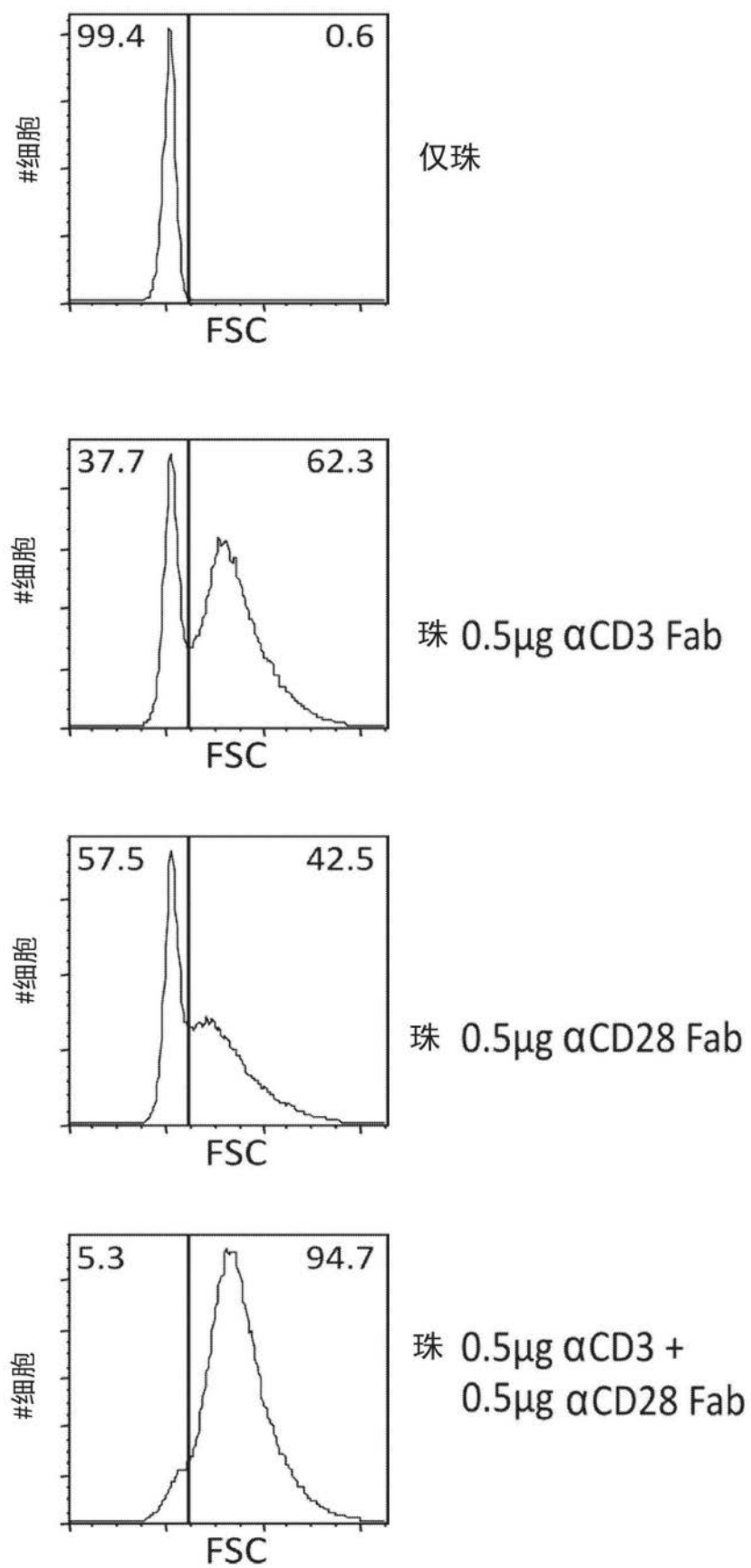


图7A

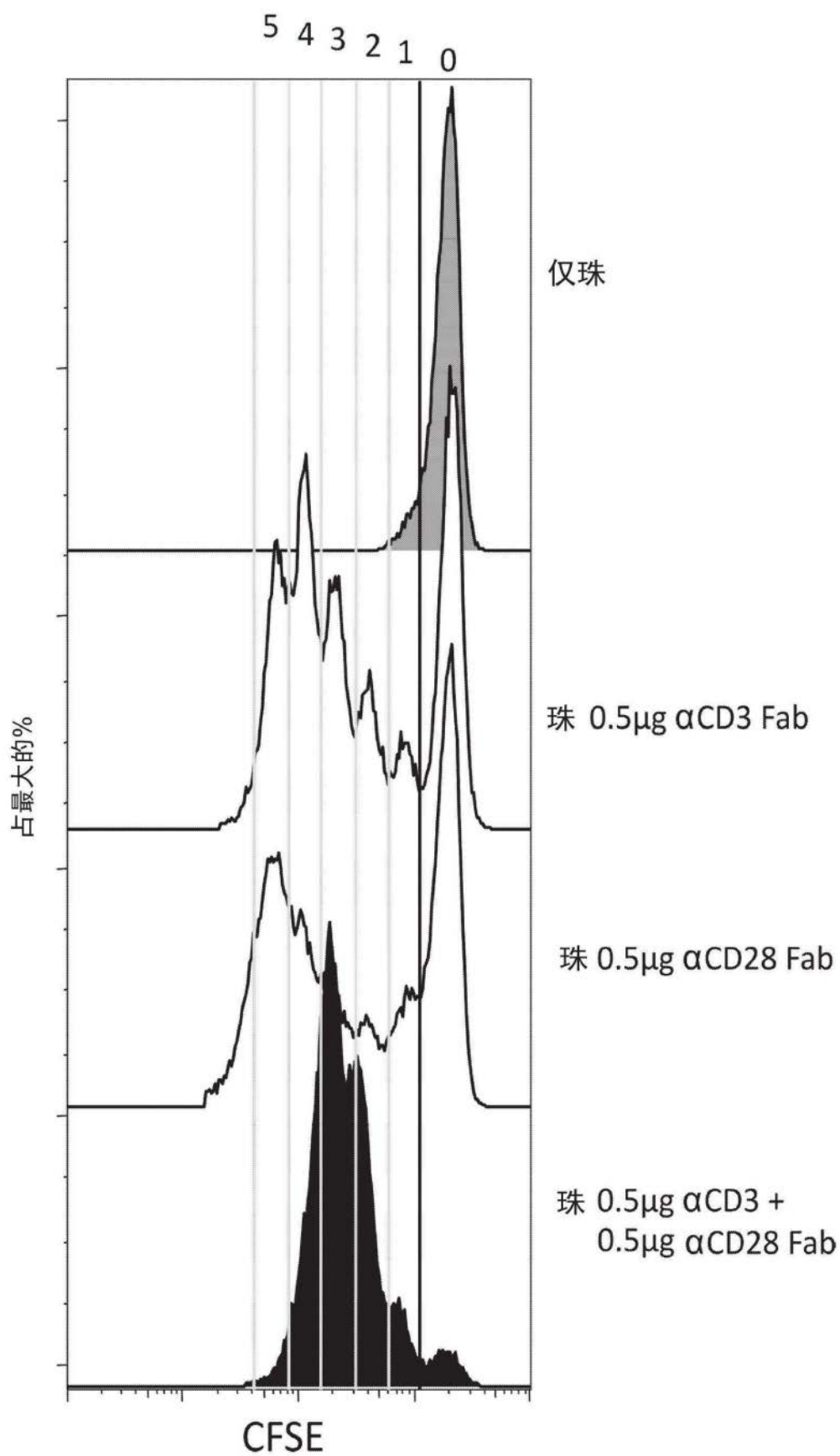


图7B

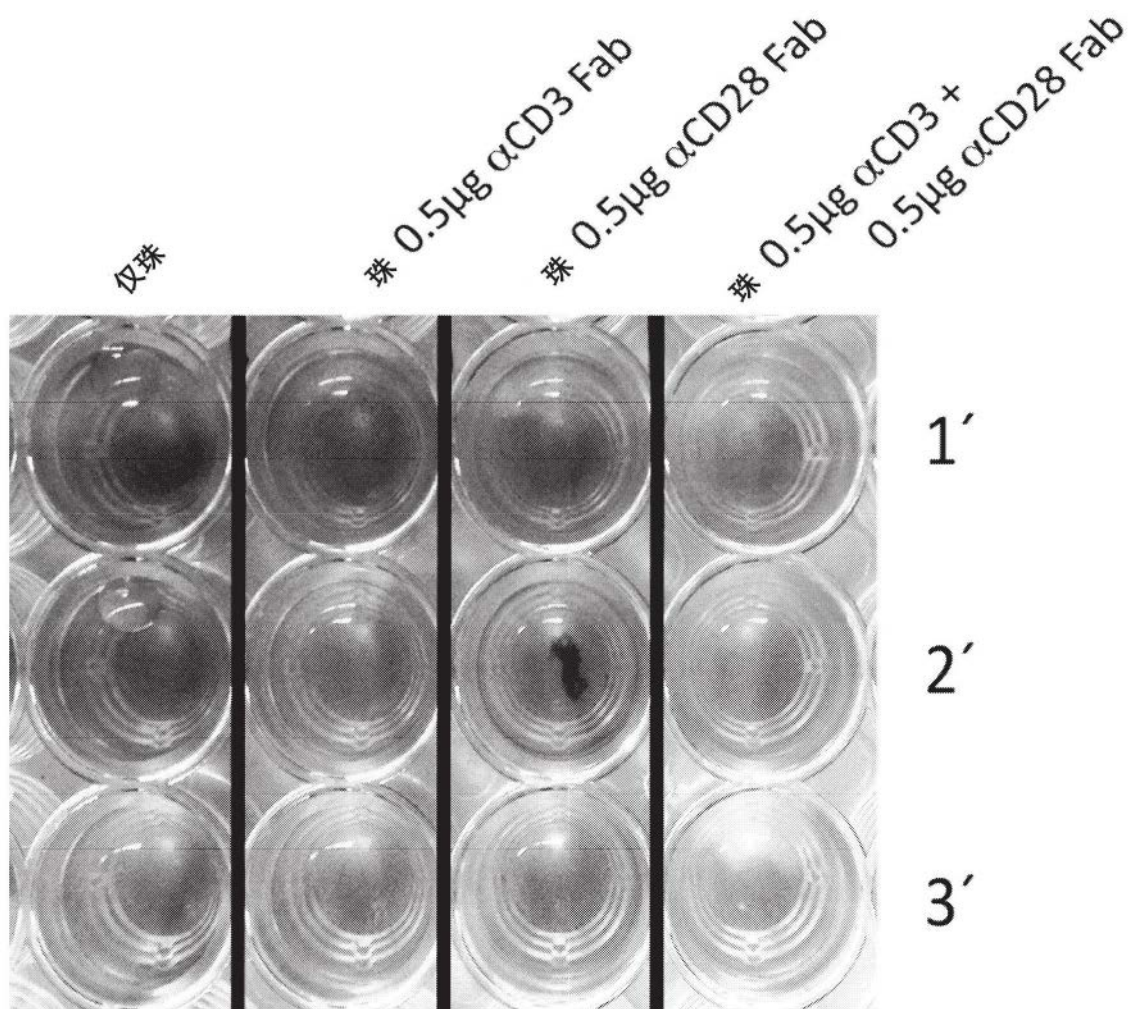
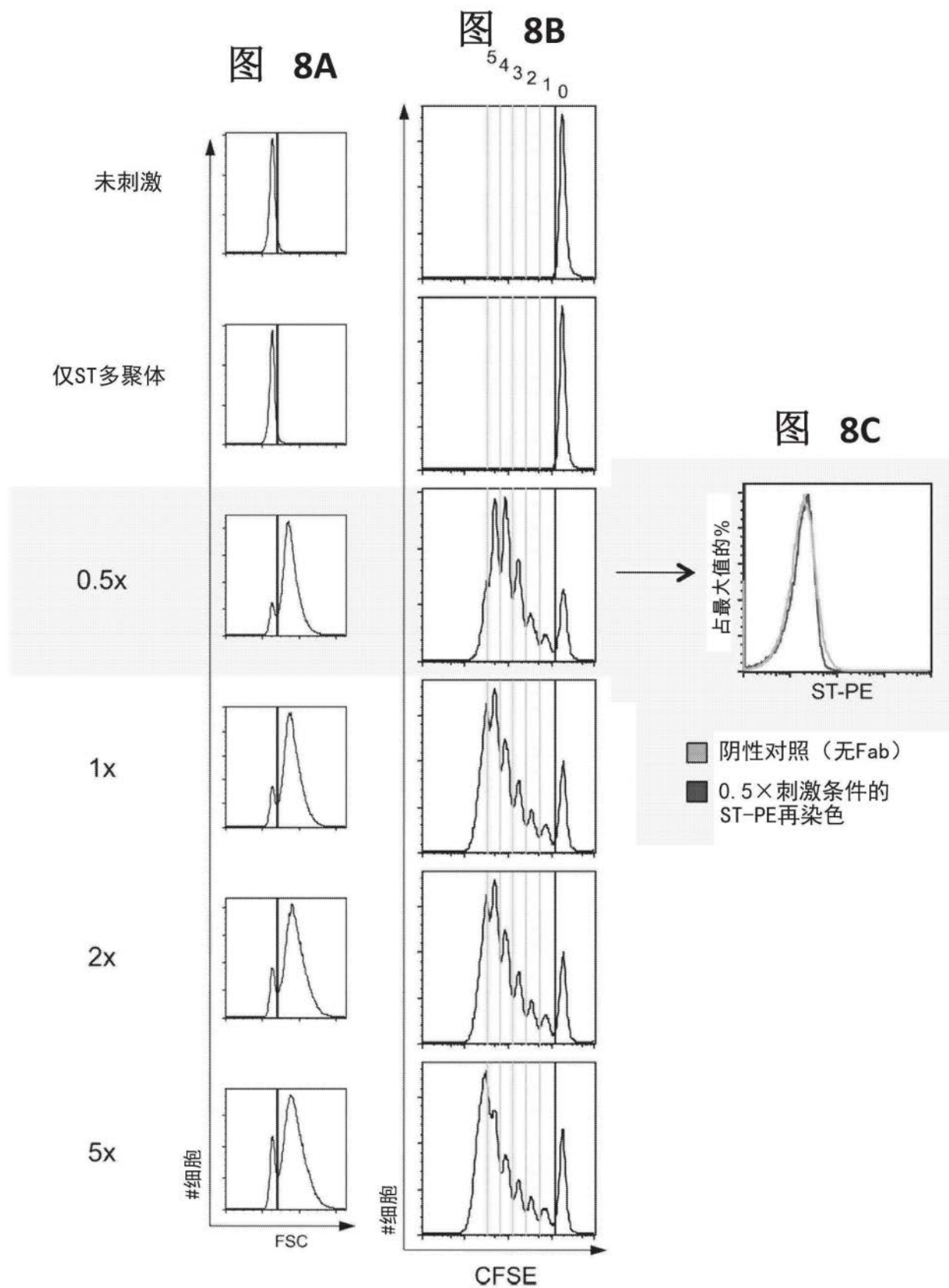


图7C



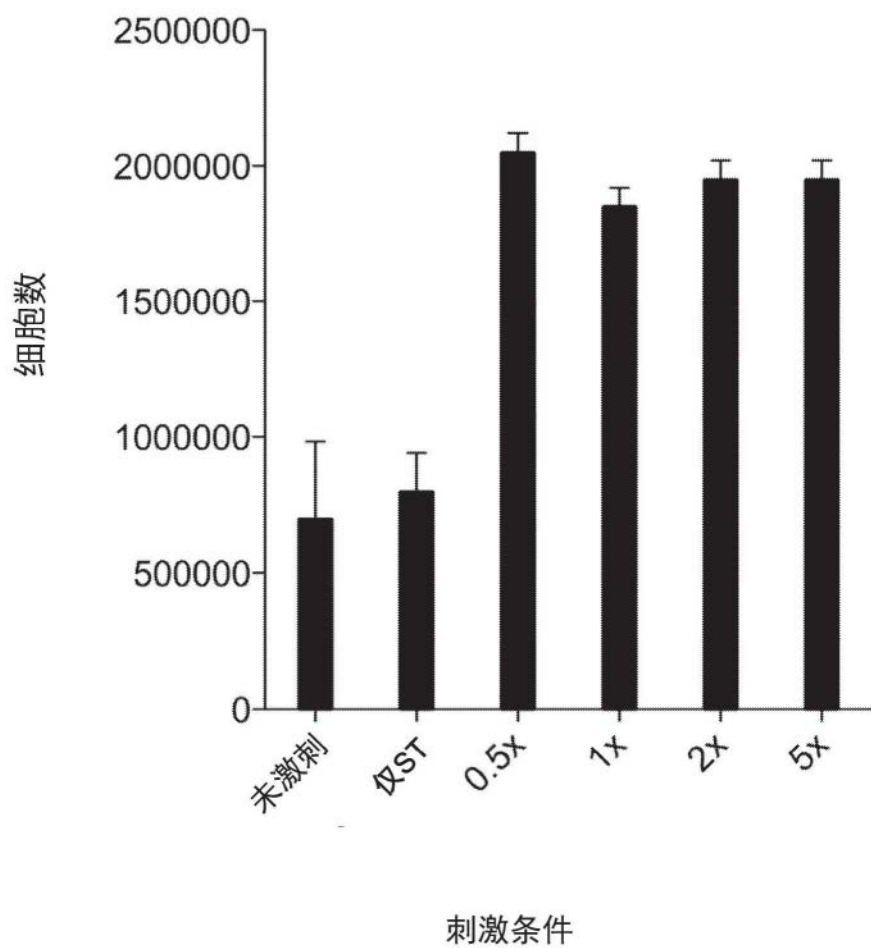


图8D



图8E

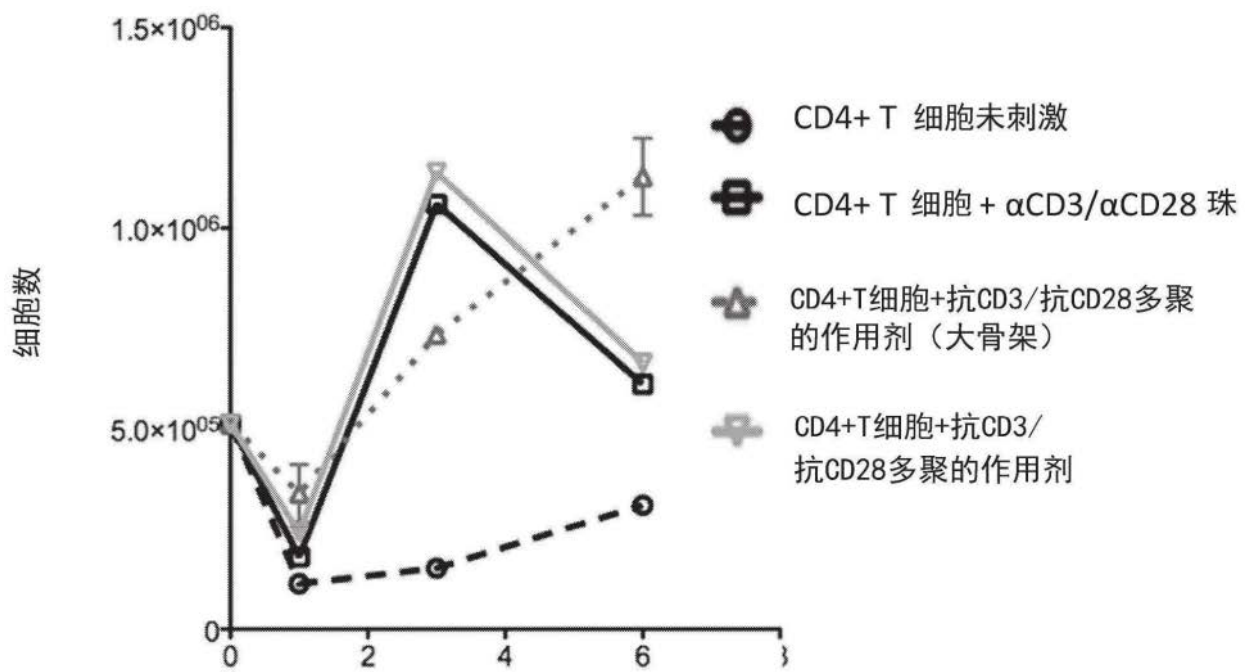


图9A

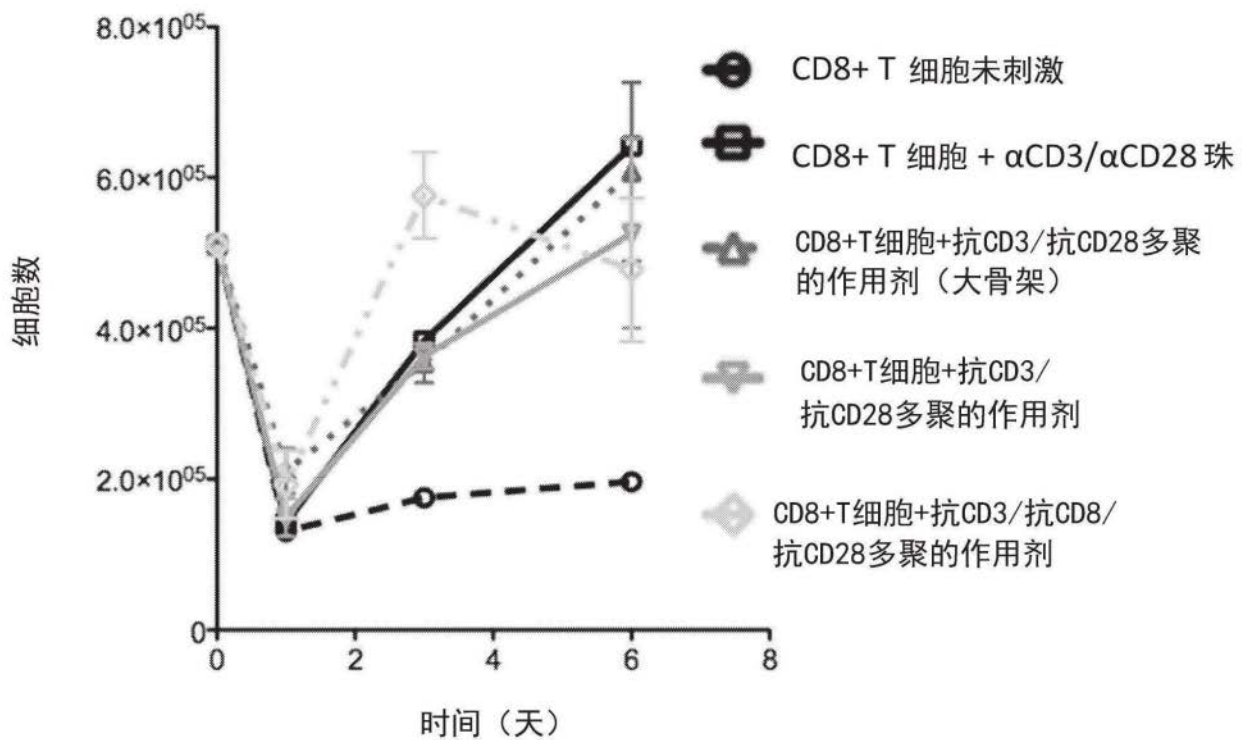


图9B

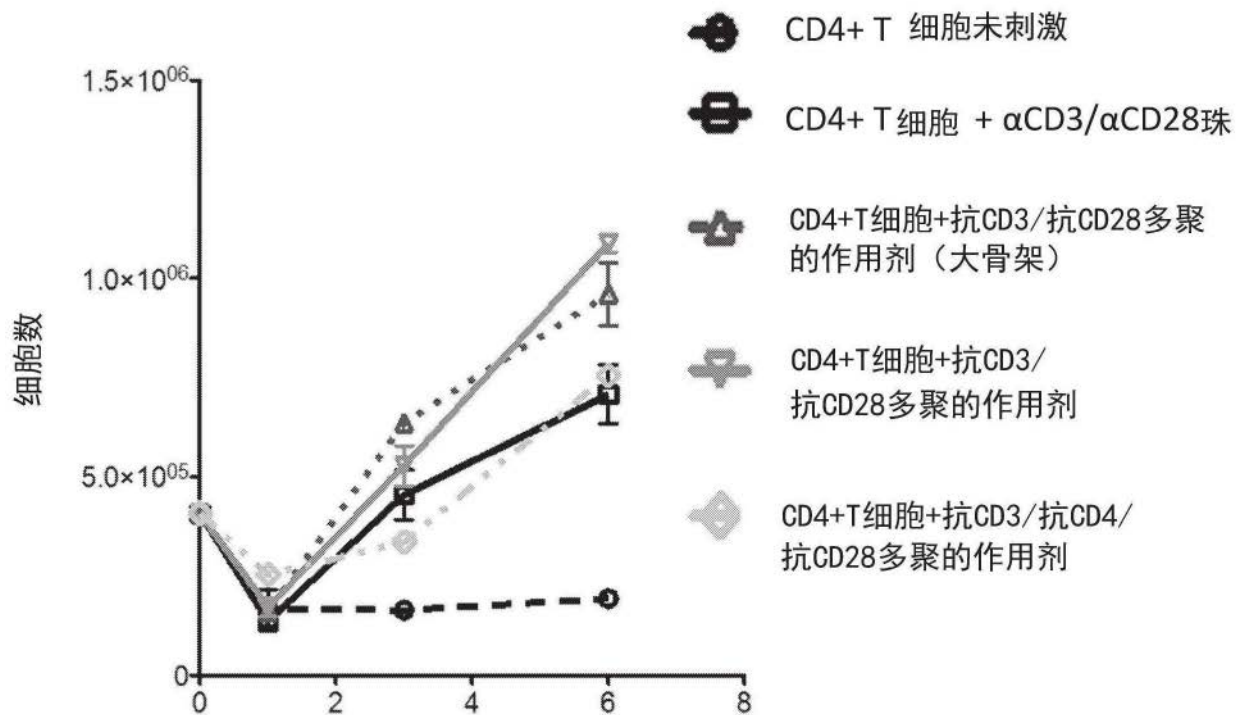


图10A

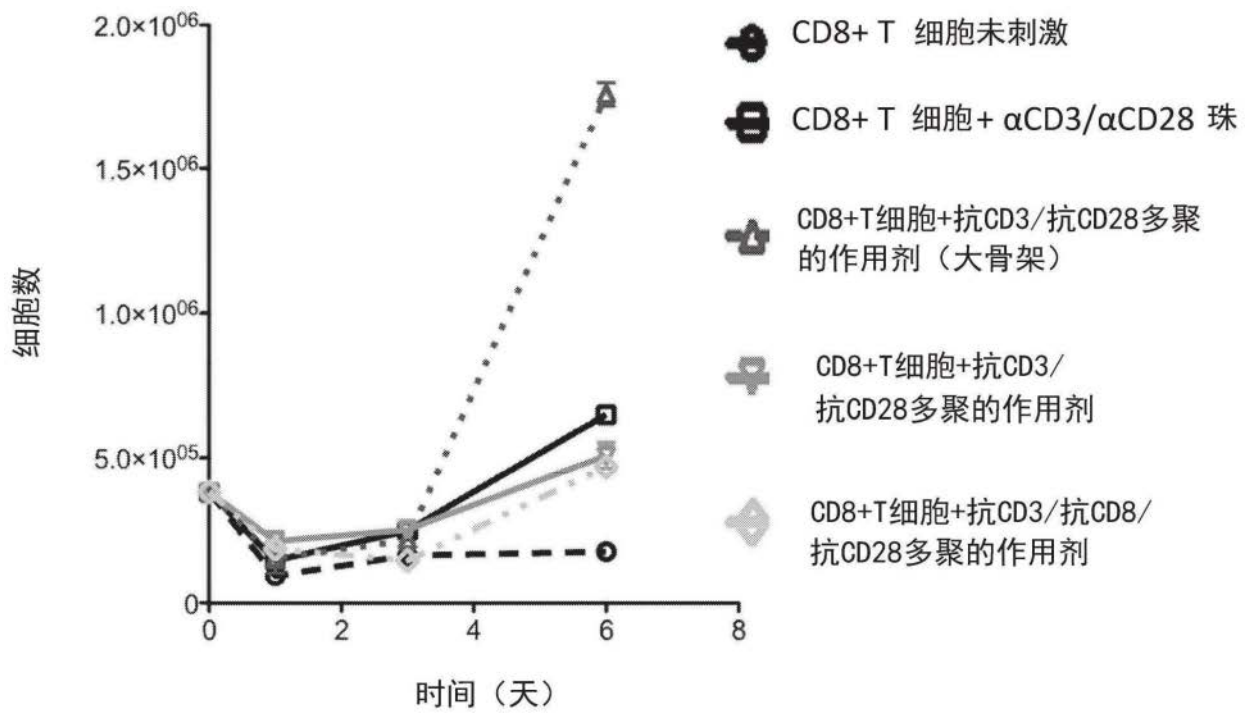


图10B

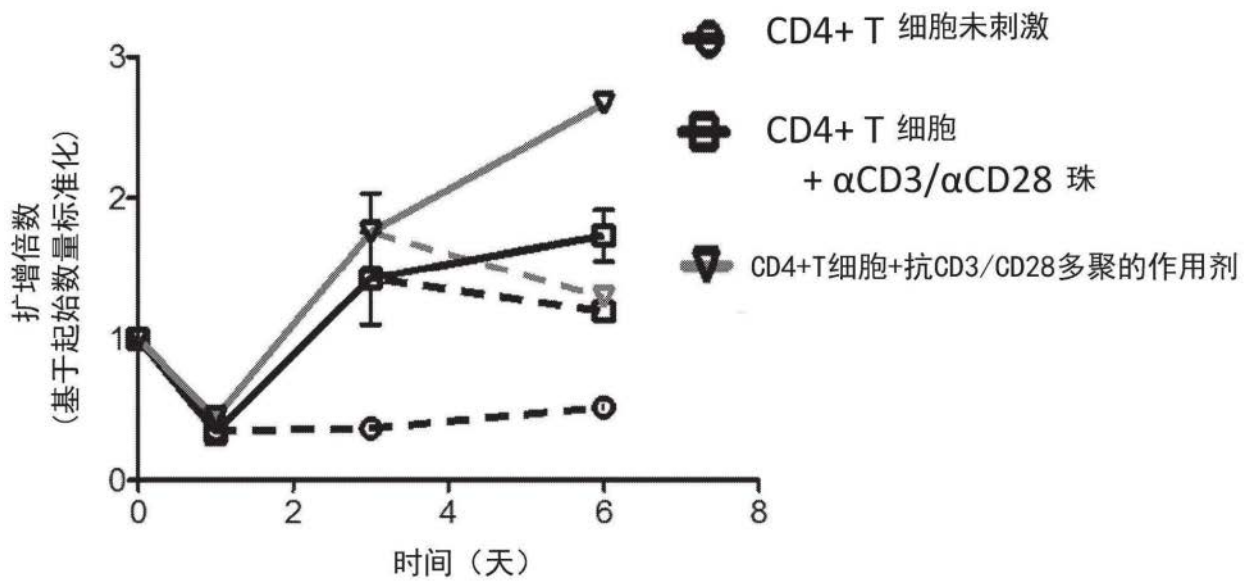


图11A

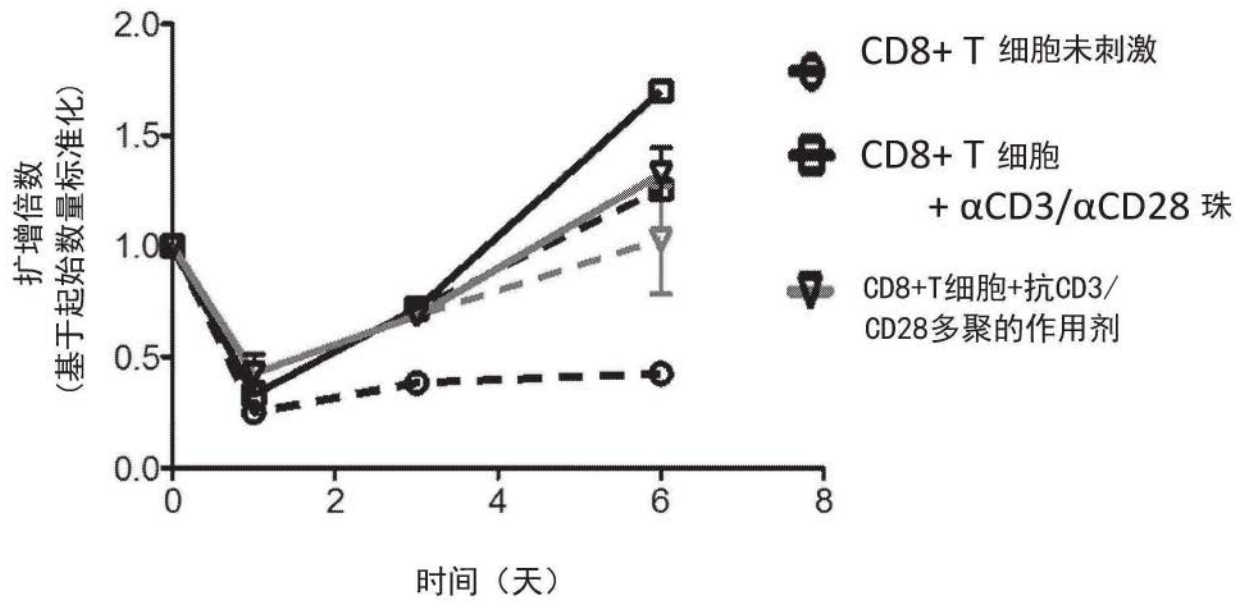


图11B

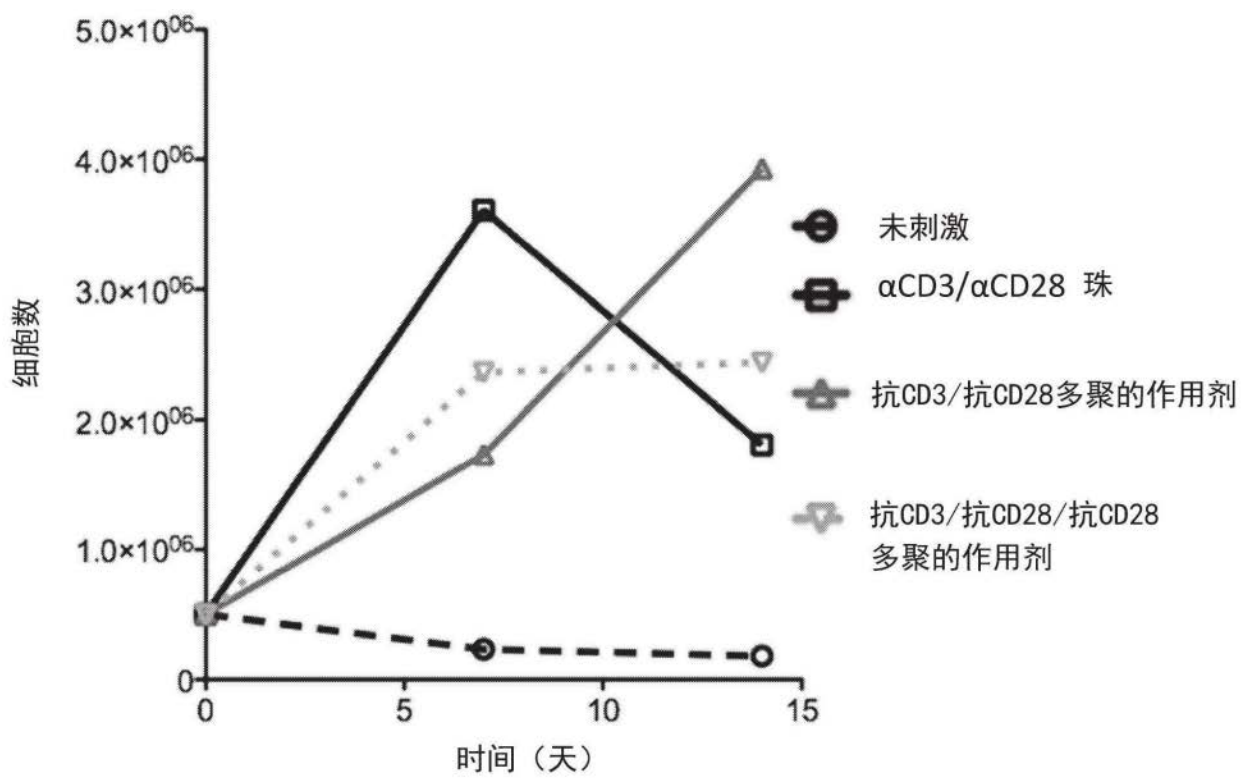


图12A

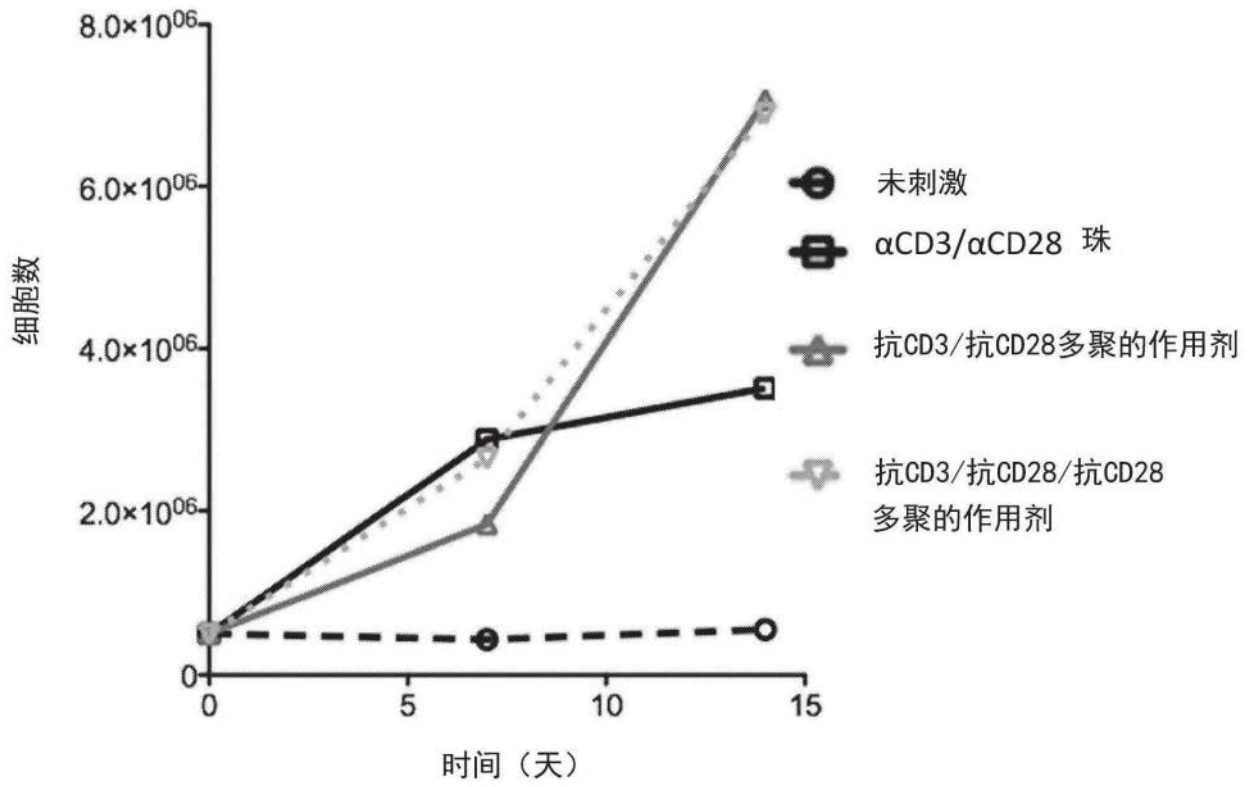


图12B

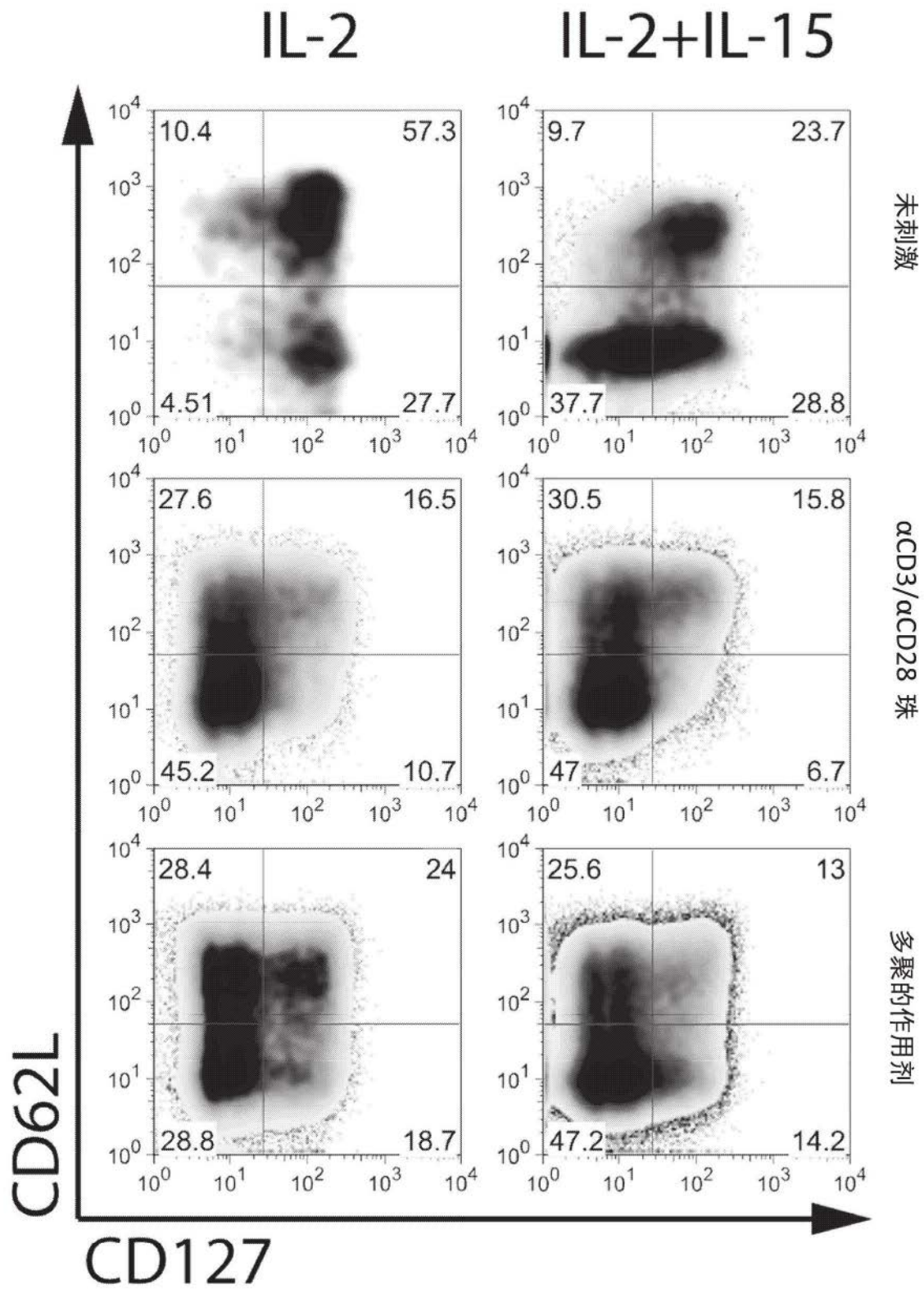


图12C

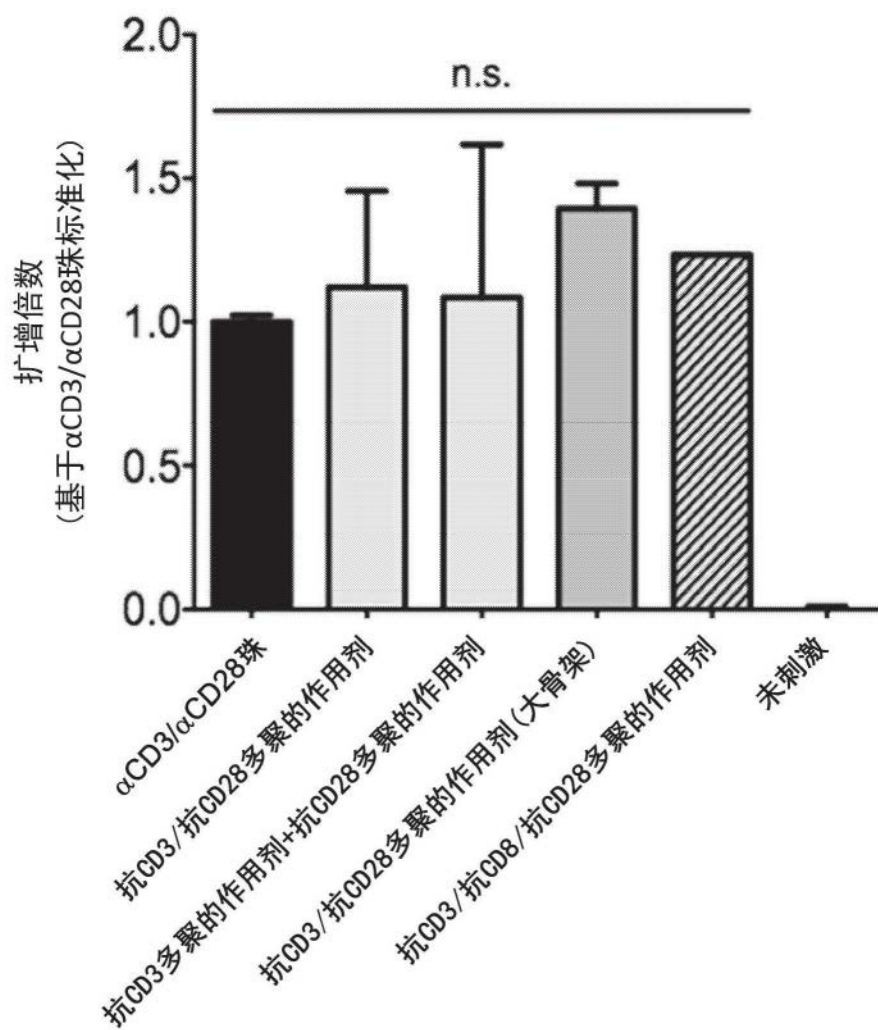


图13A

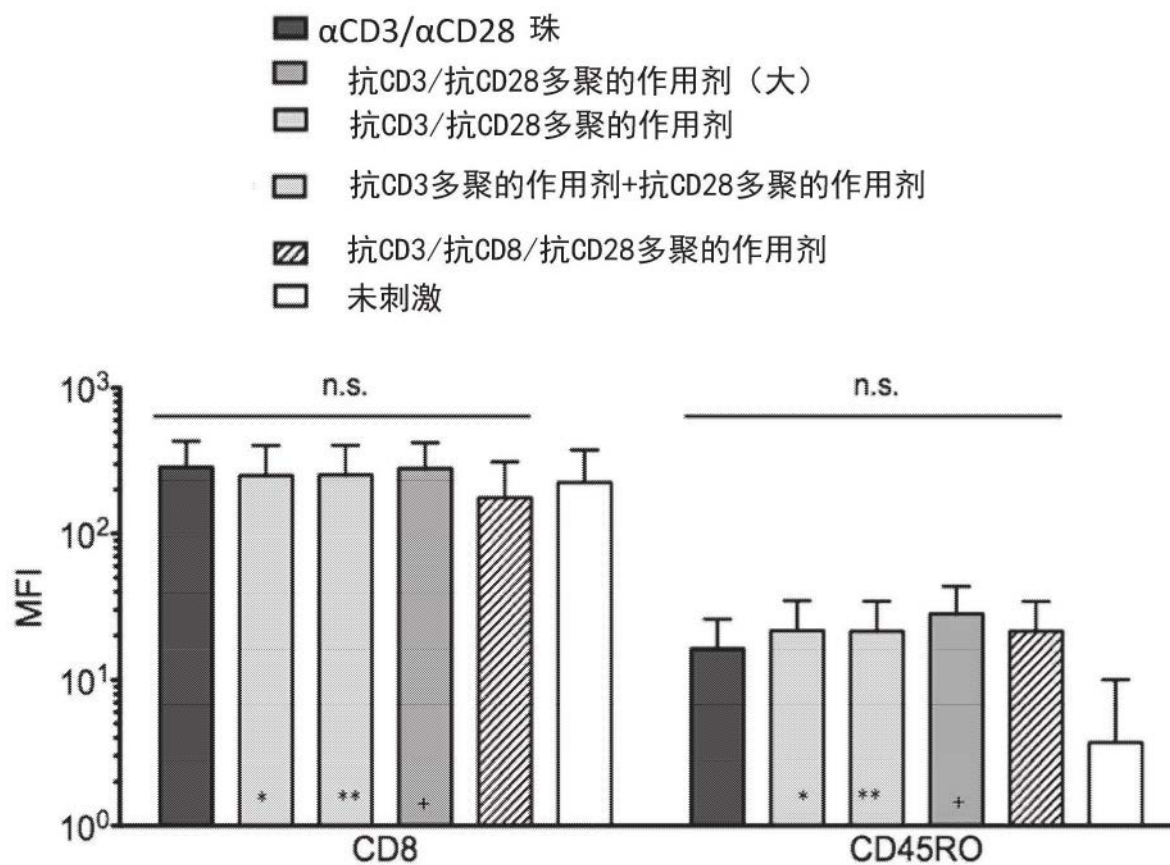


图13B

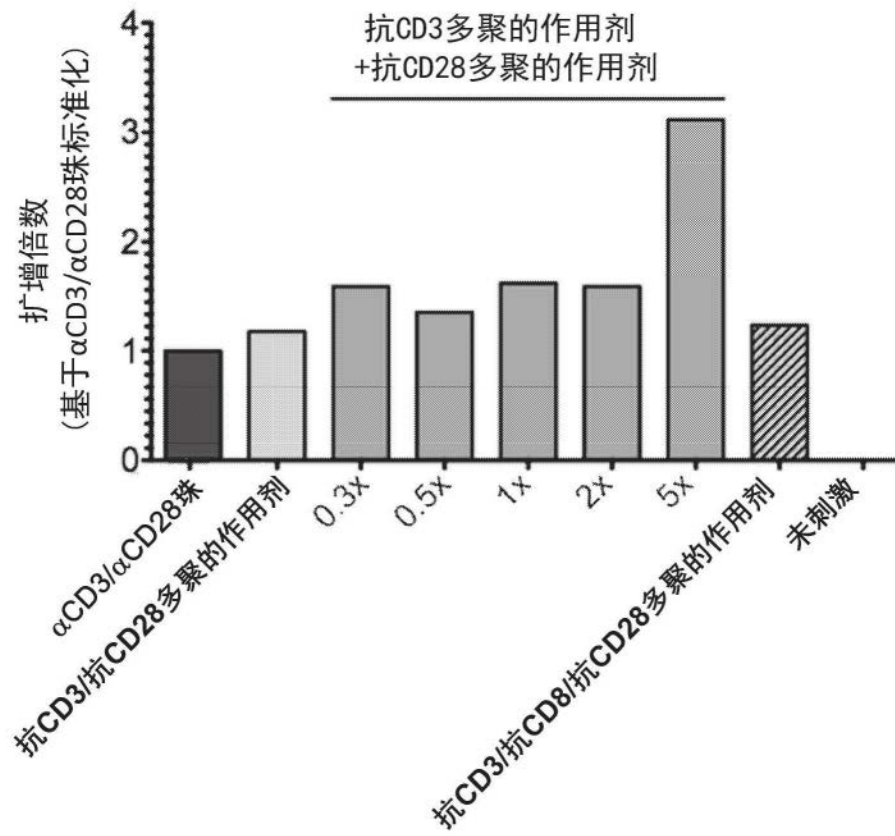


图14A

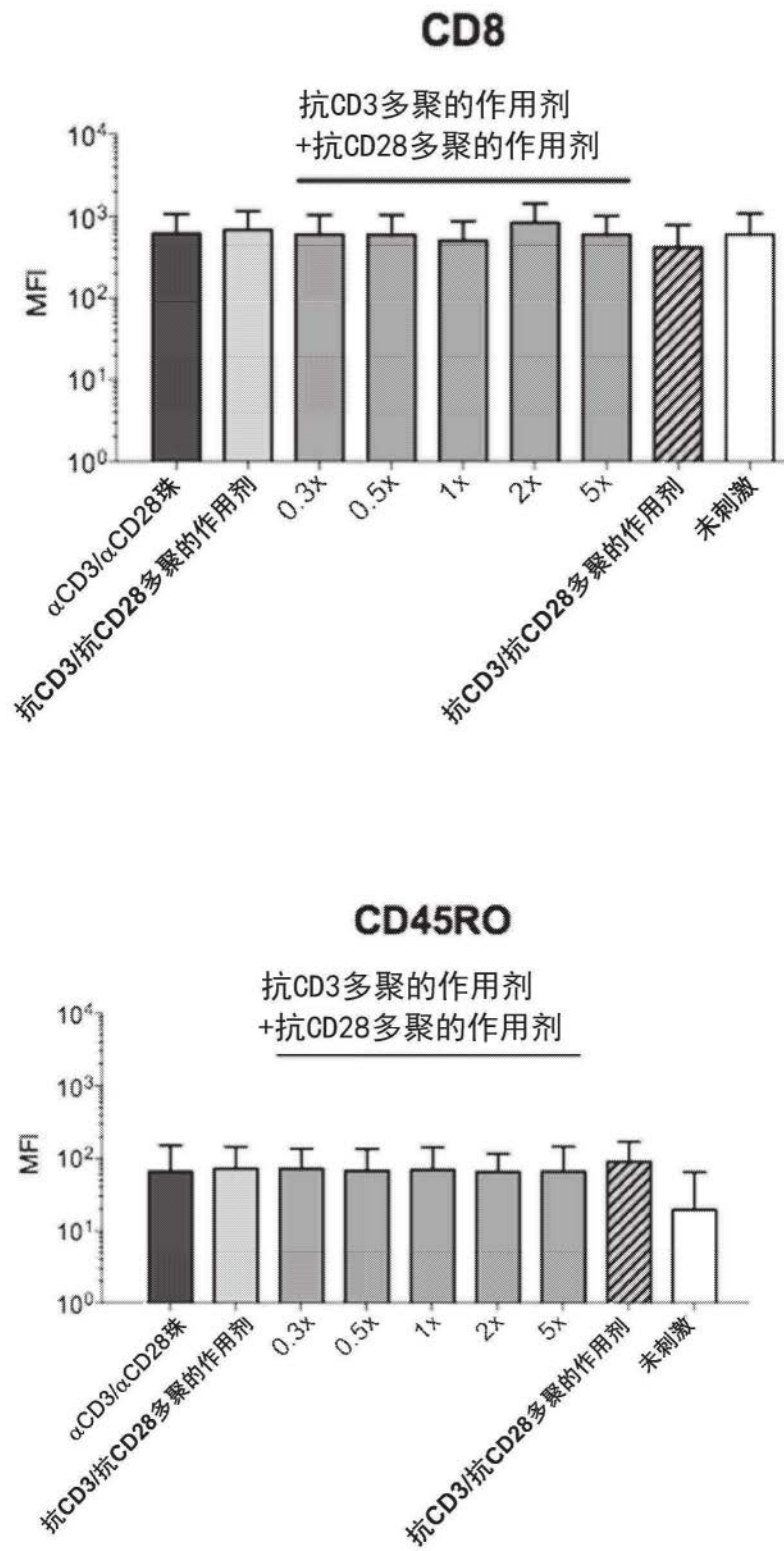


图14B

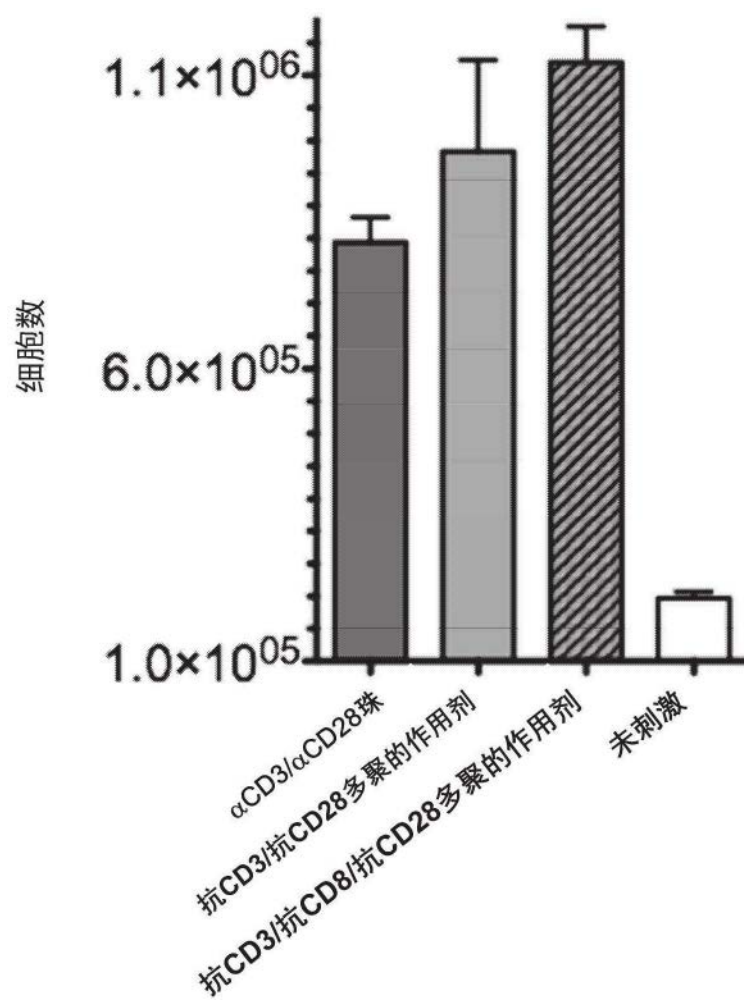


图15A

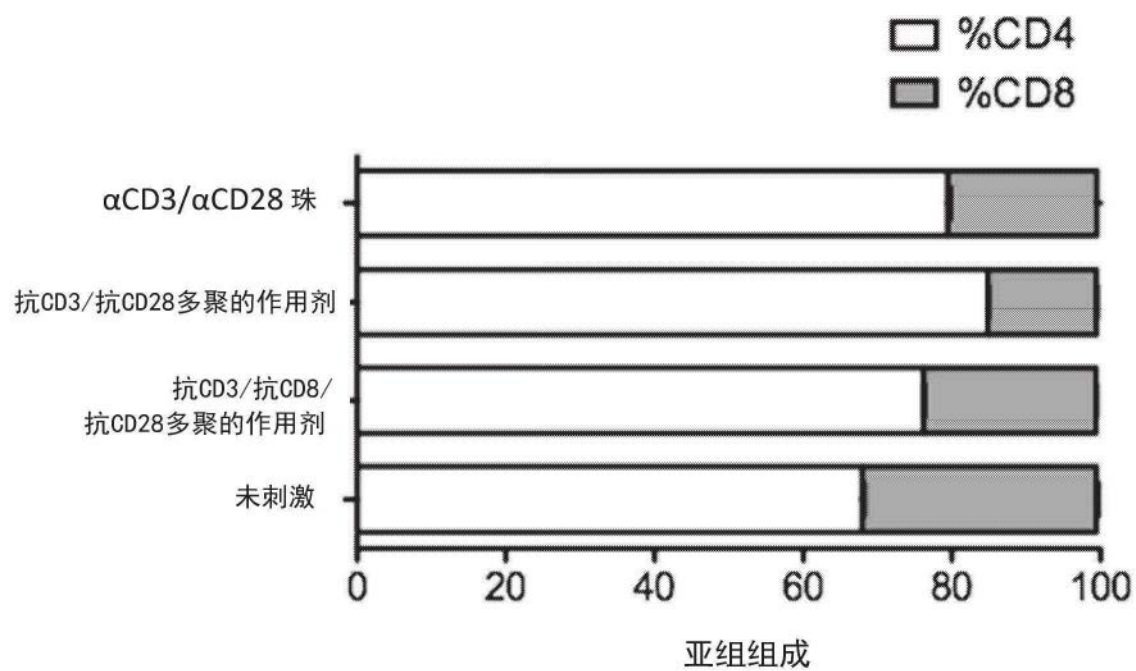


图15B

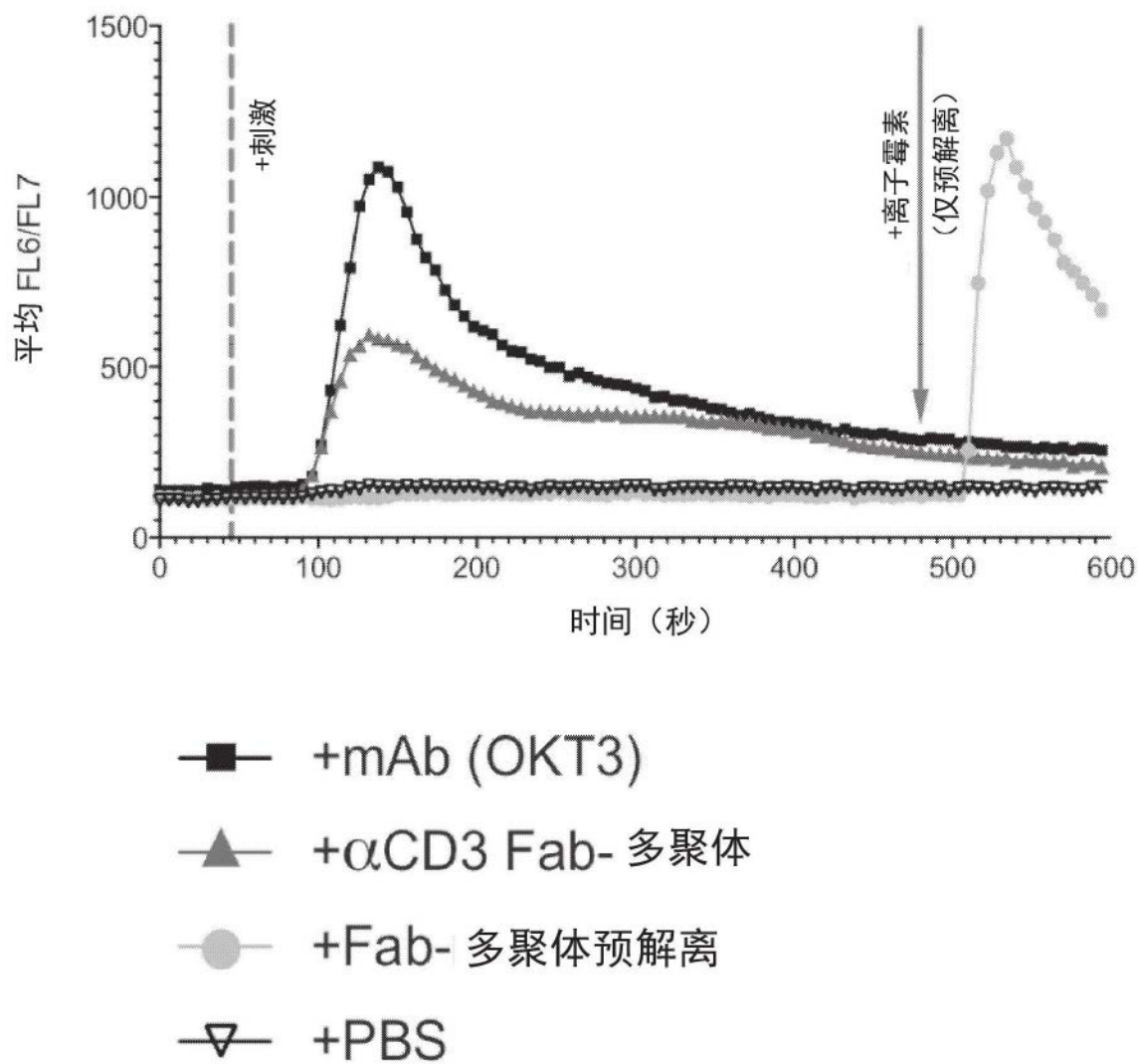


图16A

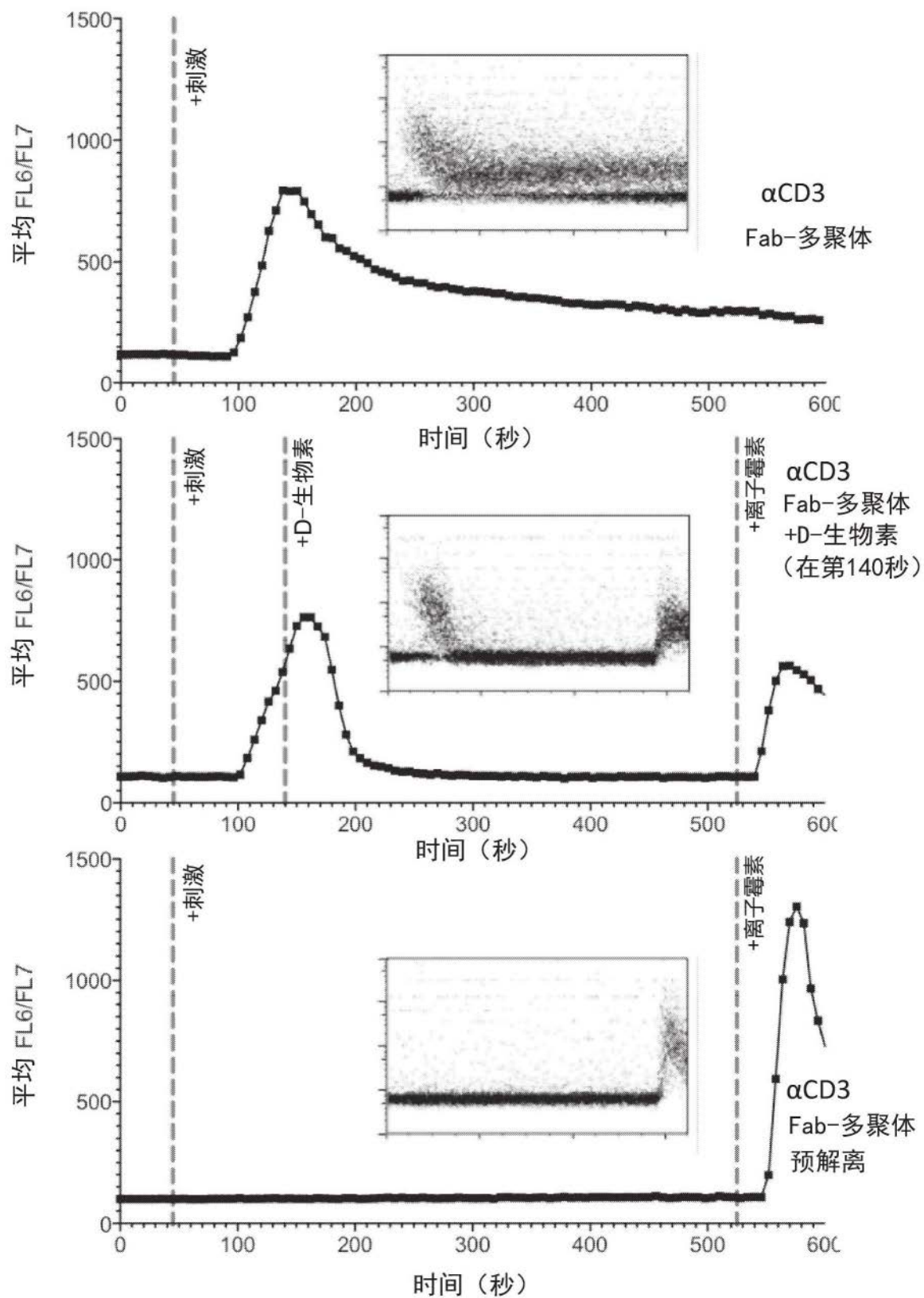


图16B

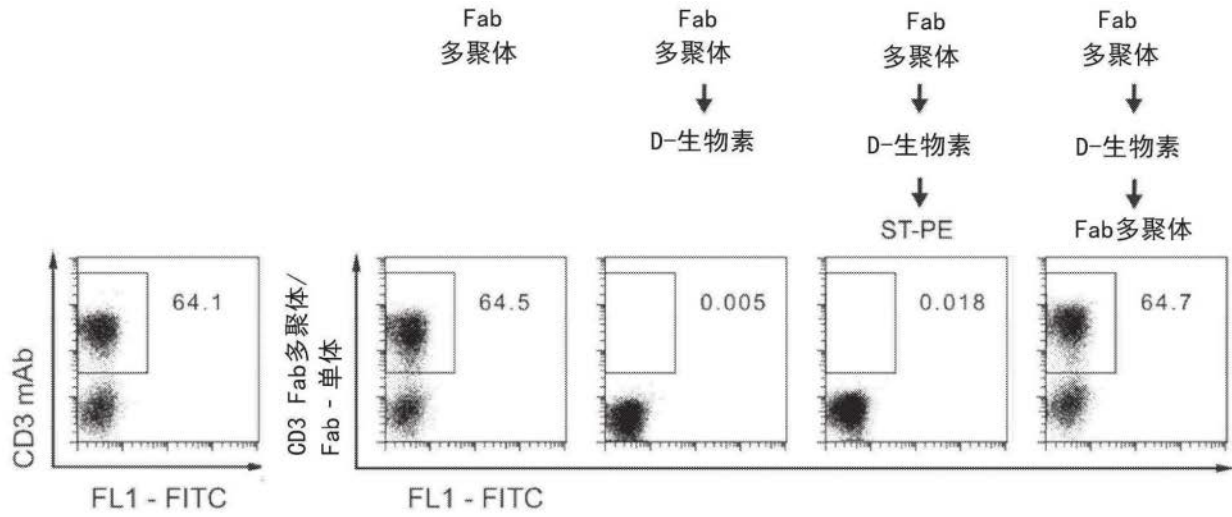


图17

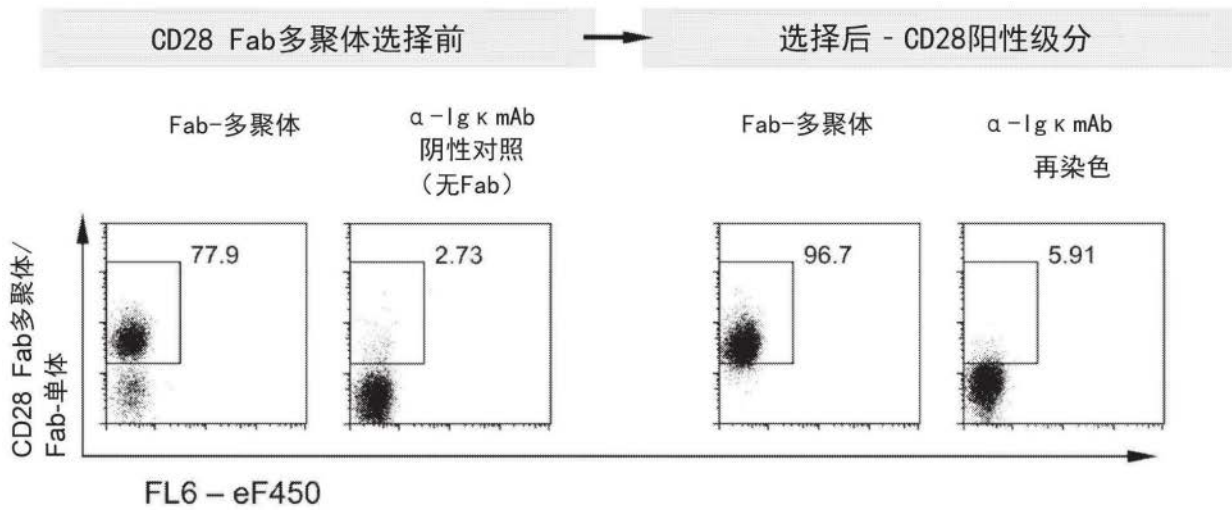


图18

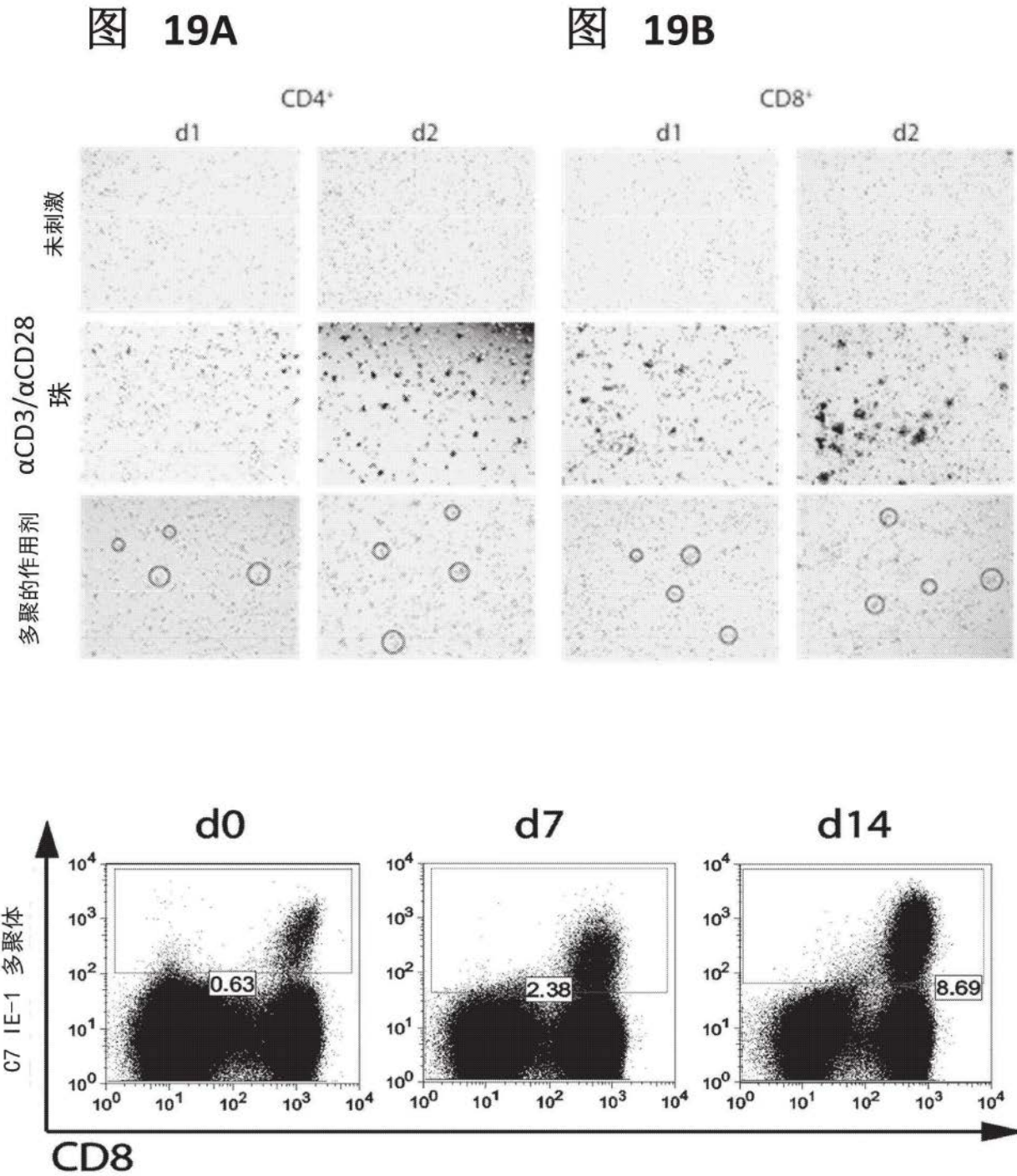


图20A

图 20B

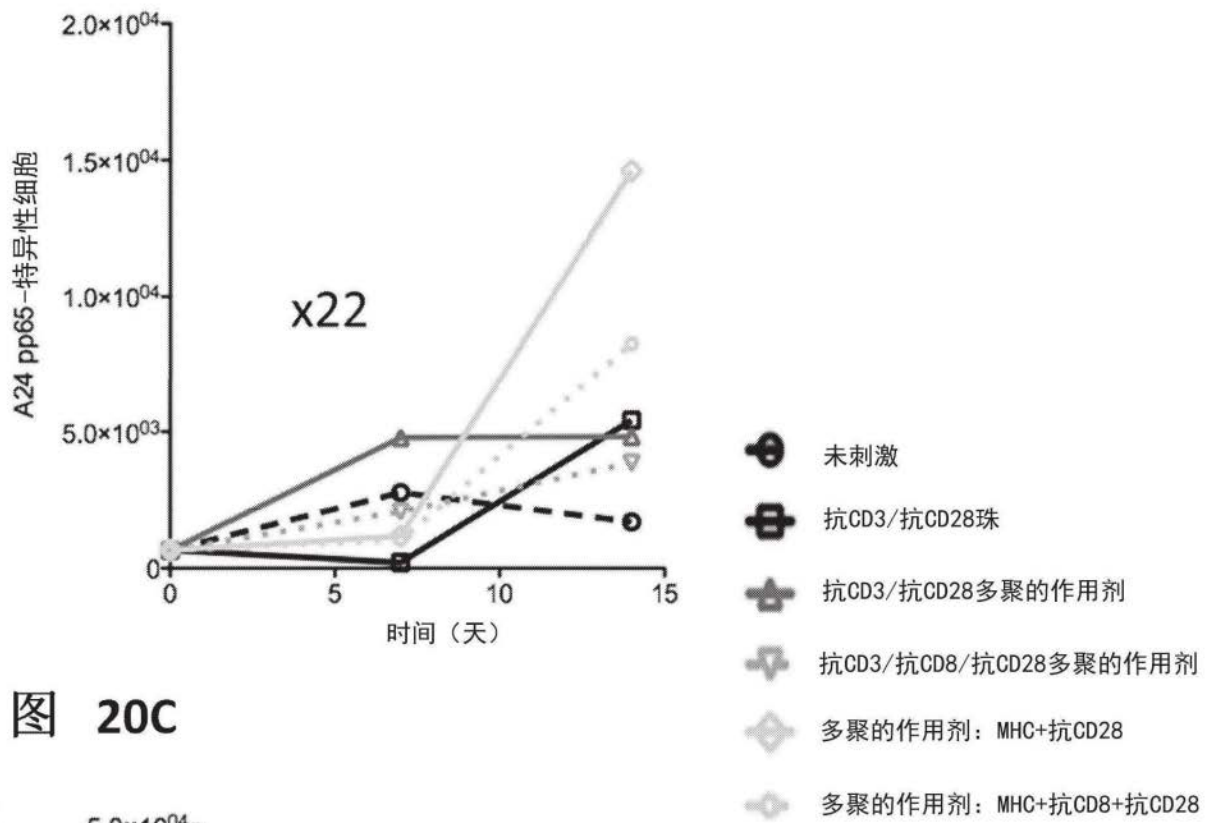
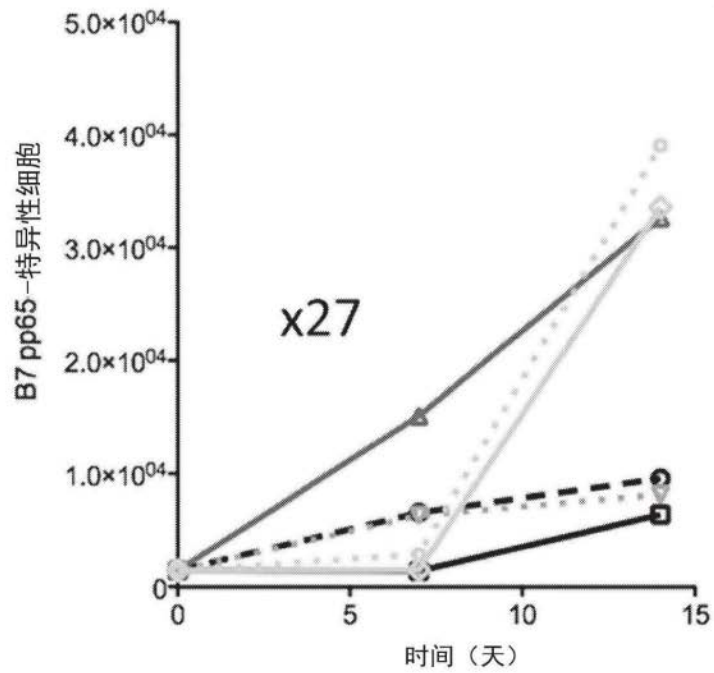


图 20C



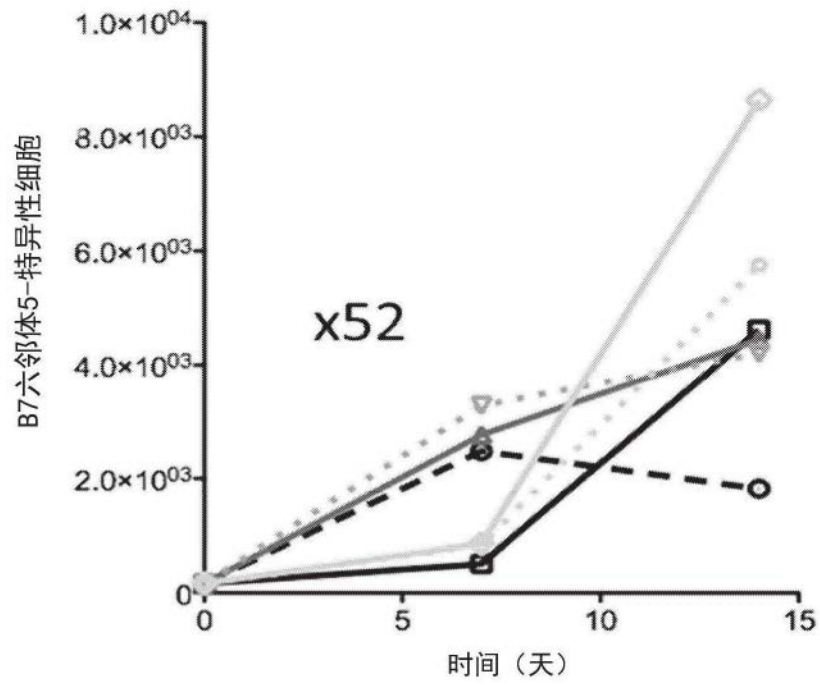


图20D

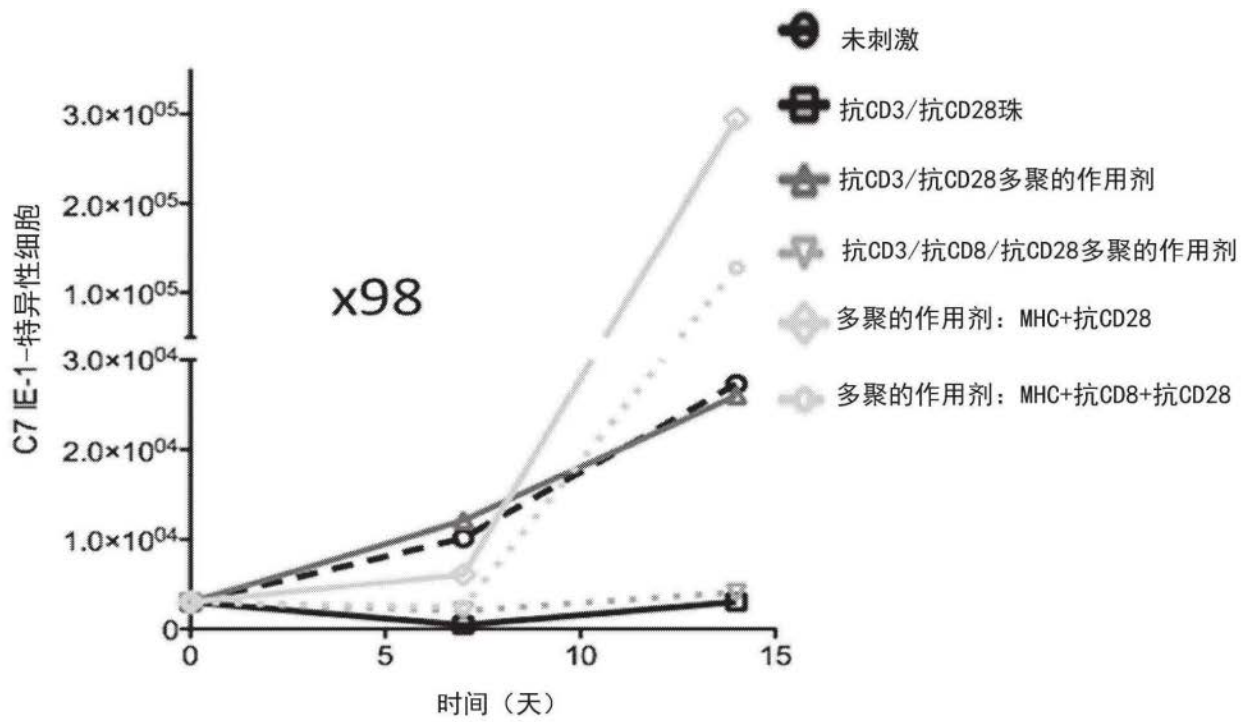


图20E

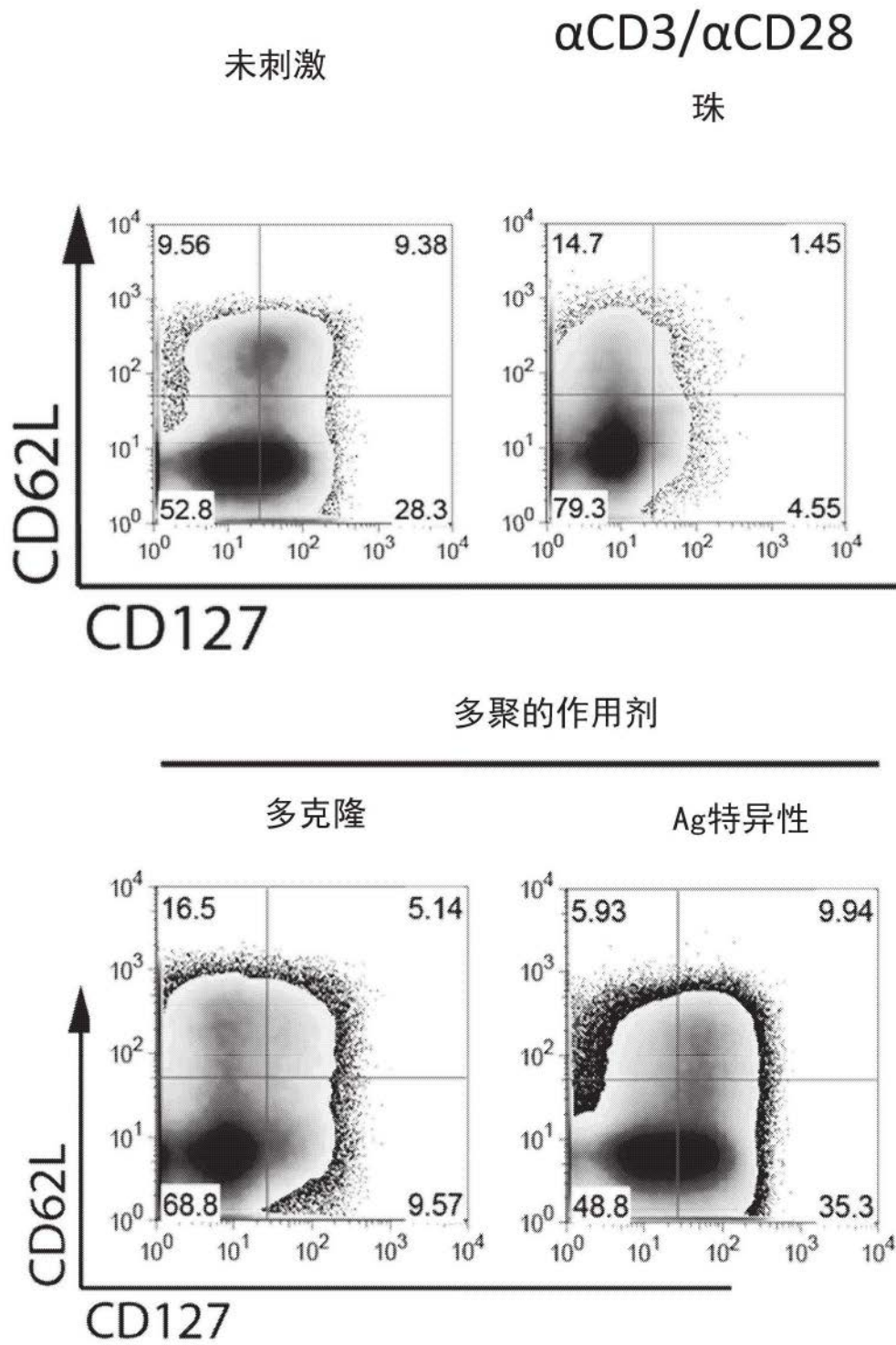


图20F

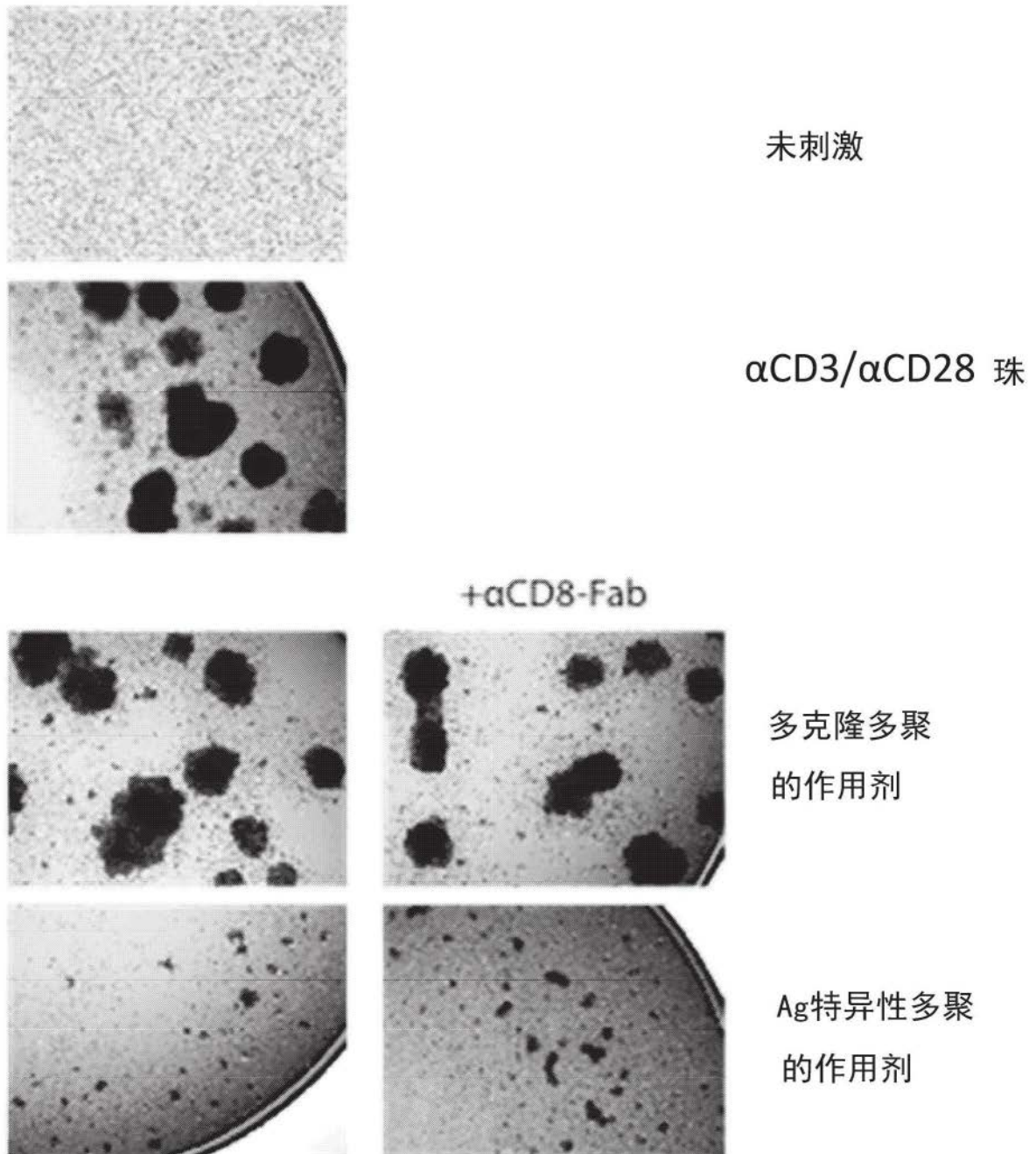


图21

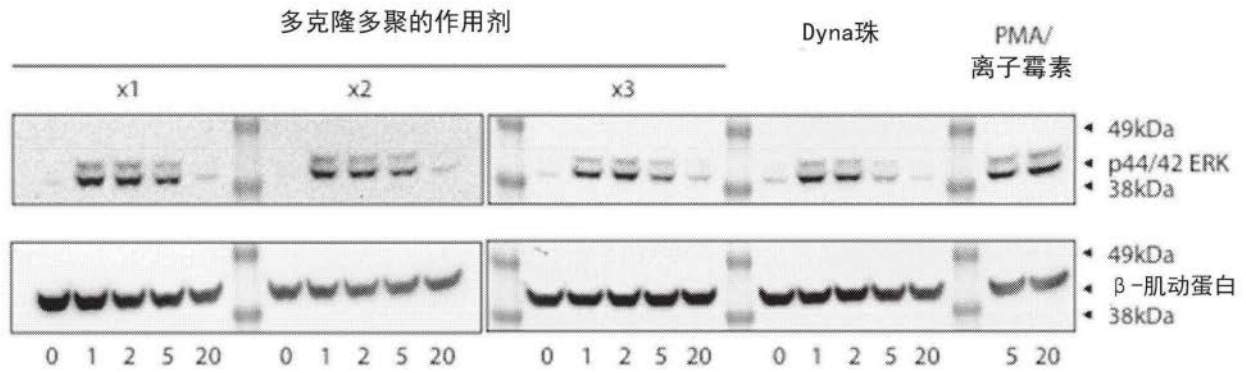


图22A

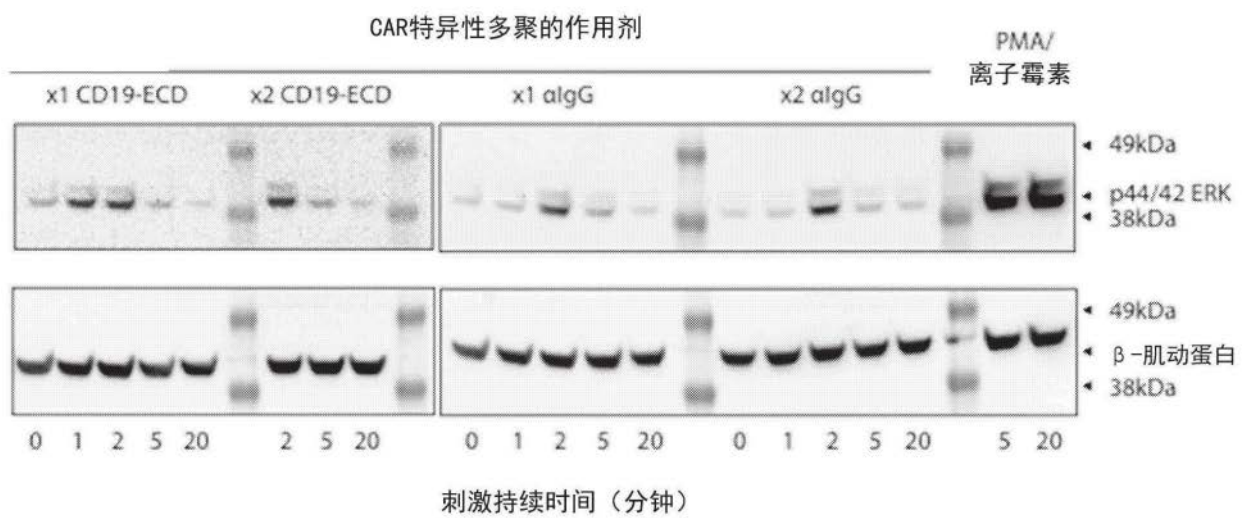


图22B