(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118786208 A
(43)申请公布日 2024.10.15

(21)申请号 202380024608.5

(22)申请日 2023.02.16

(30)优先权数据
63/310,778 2022.02.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2023/050200 2023.02.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/155009 EN 2023.08.24

(71)申请人 加拿大干细胞技术公司
地址 加拿大

(72)发明人 H·阿罗拉 M·布朗

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波

(51)Int.Cl.
C12N 5/078(2006.01)
C12N 5/02(2006.01)
C12N 5/0781(2006.01)
C12N 5/0783(2006.01)

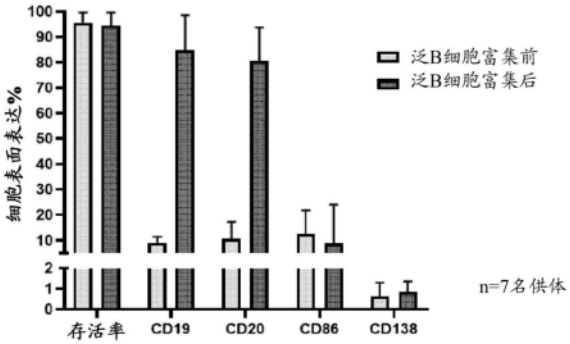
权利要求书3页 说明书22页 附图9页

(54)发明名称

用于扩增淋巴细胞的组合物和方法

(57)摘要

公开了用于扩增例如B细胞、T细胞或NK细胞等哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的培养基、补充剂和方法。所公开的培养基、补充剂和方法可用于扩增以单细胞形式或以一定克隆细胞密度平板接种的哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞。在一些实施方案中,所公开的培养基、补充剂和方法还可以在扩增过程中分化/活化所述淋巴细胞。本公开的培养基、补充剂和方法可用于无血清和无饲养层培养工作流程。



CN 118786208 A

1.一种用于扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的细胞培养基补充剂,所述补充剂包含:

以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子;以及

稀释剂。

2.如权利要求1所述的补充剂,还包含以下中的两者或更多者:所述CD40的配体、所述脂质混合物和所述一种或多种细胞因子。

3.如权利要求1或2所述的补充剂,其中所述稀释剂是水性的。

4.如权利要求1至3中任一项所述的补充剂,还包含第一类型的细胞外基质蛋白。

5.如权利要求4所述的补充剂,还包含第二类型的细胞外基质蛋白。

6.如权利要求5所述的补充剂,还包含第三类型的细胞外基质蛋白。

7.如权利要求4至6中任一项所述的补充剂,其中所述细胞外基质蛋白选自由以下组成的组:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC。

8.如权利要求4至7中任一项所述的补充剂,其中所述第一类型的细胞外基质蛋白、所述第二类型的细胞外基质蛋白或所述第三类型的细胞外基质蛋白的浓度范围在约1μg/mL至1mg/mL之间。

9.如权利要求4至8中任一项所述的补充剂,其中所述细胞外基质蛋白是重组的。

10.如权利要求1至9中任一项所述的补充剂,其中所述CD40的配体是人CD40的配体。

11.如权利要求1至10中任一项所述的补充剂,其中所述CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

12.如权利要求1至11中任一项所述的补充剂,其中所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21。

13.如权利要求1至12中任一项所述的补充剂,其中所述补充剂与基础培养基组合。

14.如权利要求1至13中任一项所述的补充剂,其中所述补充剂不含血清。

15.如权利要求1至14中任一项所述的补充剂,其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

16.如权利要求1至15中任一项所述的补充剂,其中所述淋巴细胞或其祖细胞是以单细胞形式或以克隆密度接种。

17.如权利要求1至16中任一项所述的补充剂,其中所述补充剂是浓缩的。

18.如权利要求17所述的补充剂,其中所述补充剂是10X或更高浓度。

19.一种用于扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的培养基,所述培养基包含:

基础培养基;以及

以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子。

20.如权利要求19所述的培养基,还包含以下中的两者或更多者:所述CD40的配体、所述脂质混合物和所述一种或多种细胞因子。

21.如权利要求19或20所述的培养基,还包含第一类型的细胞外基质蛋白。

22.如权利要求21所述的培养基,还包含第二类型的细胞外基质蛋白。

23.如权利要求22所述的培养基,还包含第三类型的细胞外基质蛋白。

24.如权利要求21至23中任一项所述的培养基,其中所述细胞外基质蛋白选自由以下组成的组:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或

SPARC。

25.如权利要求21至24中任一项所述的培养基,其中所述第一类型的细胞外基质蛋白、所述第二类型的细胞外基质蛋白或所述第三类型的细胞外基质蛋白的浓度范围在约1μg/mL至1mg/mL之间。

26.如权利要求21至25中任一项所述的培养基,其中所述细胞外基质蛋白是重组的。

27.如权利要求19至26中任一项所述的培养基,其中所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21。

28.如权利要求19至27中任一项所述的培养基,其中所述CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

29.如权利要求19至28中任一项所述的培养基,其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

30.如权利要求19至29中任一项所述的培养基,其中所述淋巴细胞或其祖细胞是以单细胞形式或以克隆密度接种。

31.如权利要求19至30中任一项所述的培养基,其中所述培养基不含血清。

32.如权利要求19至31中任一项所述的培养基,其中所述培养基支持淋巴细胞及其祖细胞的无饲养层扩增。

33.如权利要求19至32中任一项所述的培养基,其中所述培养基支持淋巴细胞及其祖细胞的无动物成分扩增。

34.一种扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的方法,所述方法包括:

将所述淋巴细胞或其祖细胞接种到培养环境中,所述培养环境包含以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子;以及

将接种的淋巴细胞或其祖细胞在所述培养环境中孵育超过一天。

35.如权利要求34所述的方法,还在所述培养环境中包括第一类型的细胞外基质蛋白。

36.如权利要求35所述的方法,还在所述培养环境中包括第二类型的细胞外基质蛋白。

37.如权利要求36所述的方法,还在所述培养环境中包括第三类型的细胞外基质蛋白。

38.如权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述细胞外基质蛋白是以下中的一者或多者:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC。

39.如权利要求35至38中任一项所述的方法,其中所述第一类型的细胞外基质蛋白、所述第二类型的细胞外基质蛋白或所述第三类型的细胞外基质蛋白的浓度范围在约1μg/mL至100μg/mL之间。

40.如权利要求34至39中任一项所述的方法,其中所述CD40的配体、所述脂质混合物和所述一种或多种细胞因子中的一者或多者被包含在培养基中。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述第一类型的细胞外基质蛋白和/或所述第二类型的细胞外基质蛋白和/或所述第三类型的细胞外基质蛋白被包含在所述培养基中。

42.如权利要求34至41中任一项所述的方法,其中所述CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

43.如权利要求34至42中任一项所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子选自IL2、IL4、IL6、IL10和IL21。

44.如权利要求34至43中任一项所述的方法,其中所述脂质混合物是化学成分确定的。

45.如权利要求34至44中任一项所述的方法,其中接种和孵育是在无饲养层条件下进行的。

46.如权利要求34至45中任一项所述的方法,其中所述淋巴细胞或其祖细胞是人或小鼠的。

47.如权利要求46所述的方法,其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

48.如权利要求47所述的方法,其中所述B细胞是记忆B细胞或浆母细胞。

49.如权利要求34至48中任一项所述的方法,还包括在所述培养环境中分化和/或活化所述淋巴细胞或其祖细胞。

50.如权利要求34至49中任一项所述的方法,其中所述孵育步骤持续至少3天。

51.如权利要求34至50中任一项所述的方法,其中所述淋巴细胞或其祖细胞是以单细胞形式或以克隆密度接种。

用于扩增淋巴细胞的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年2月16日提交的美国临时专利申请号63/310,778的权益,所述美国临时专利申请的完整内容特此以引用的方式整体并入。

技术领域

[0003] 本公开涉及细胞培养应用,并且更具体地说,涉及使用造血细胞的细胞培养应用,并且又更具体地说,涉及利用一种或多种淋巴细胞群体的细胞培养应用。

背景技术

[0004] 哺乳动物的血液由各种细胞类型组成,包括淋巴细胞、凝血细胞、红细胞以及它们的直接和间接前体。淋巴细胞可称为白细胞,并且这些细胞在宿主的免疫系统中发挥功能。淋巴细胞可进一步再分成B细胞、T细胞、NK细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞。

[0005] 与其他血细胞一样,淋巴细胞来源于能够自我更新和分化为每种血细胞谱系的造血干细胞(HSC)。T细胞是适应性免疫的核心组成部分,NK细胞在先天免疫中发挥重要作用,而B细胞是体液免疫的核心组成部分,在结合抗原后分泌抗体。

[0006] 鉴于淋巴细胞参与感测其环境中的抗原,并且在刺激后引发免疫反应,它们是引起浓厚研究和治疗兴趣的主题。特定的B细胞、NK细胞或T细胞克隆可能特别令人感兴趣,因为它们具有检测特定抗原或引发反应的能力,但从血液样本中存在的细胞背景中分离这些细胞极其困难。工程改造B细胞、NK细胞或T细胞以执行特定功能是解决分离问题的一种相对较新的方法。

[0007] 即使克服了获得单个特定淋巴细胞克隆的难题,仍会出现将这种细胞扩增到有意义的数量的独立问题。由于以单细胞形式或以克隆密度平板接种的淋巴细胞不易于在体外或离体扩增到足够多的数量,故需要用于克隆扩增单个淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)的试剂和方法。

发明内容

[0008] 本公开涉及用于扩增哺乳动物淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞的补充剂、培养基和方法。

[0009] 本公开的一个方面提供了用于扩增哺乳动物淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞的细胞培养基补充剂。本公开的补充剂可以包含以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物、一种或多种细胞因子以及稀释剂。在一个实施方案中,本公开的补充剂可以包含以下中的两者或更多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子。

[0010] 在一个实施方案中,稀释剂是水性的。在一个实施方案中,稀释剂是缓冲液。

[0011] 在一个实施方案中,本公开的补充剂还可以包含第一类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的补充剂还可以包含第二类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方

案中,本公开的补充剂还可以包含第三类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,所述细胞外基质蛋白中的任一者或全部是重组的。在一个实施方案中,所述细胞外基质蛋白中的任一者或全部都溶解于稀释剂中。

[0012] 在一个实施方案中,细胞外基质蛋白选自由以下组成的组:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC。在包含多种类型的细胞外基质蛋白的实施方案中,每种类型都是不同的。

[0013] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白(如果存在)或第三类型的细胞外基质蛋白(如果存在)的浓度范围在约1μg/mL至1mg/mL之间。

[0014] 在一个实施方案中,CD40的配体是人或小鼠CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

[0015] 在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21。在一个实施方案中,前述细胞因子各自包含在补充剂中。在一个实施方案中,补充剂中包含IL-2和IL-10,以及任选的IL-21。

[0016] 在一个实施方案中,脂质混合物是化学成分确定的。在一个实施方案中,脂质混合物不含动物成分。在一个实施方案中,脂质混合物被稳定化。

[0017] 在一个实施方案中,将补充剂与基础培养基组合。

[0018] 在一个实施方案中,补充剂不含动物成分和/或不含血清。

[0019] 在一个实施方案中,淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)或其祖细胞是以单细胞形式或以克隆密度接种。

[0020] 在一个实施方案中,补充剂是浓缩的。在一个实施方案中,补充剂是10X或更高浓度。

[0021] 本公开的另一个方面提供了用于扩增哺乳动物淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)或其祖细胞的培养基。本公开的培养基可以包含基础培养基以及以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子。因此,在另一方面,基础培养基和一种或多种补充剂可包含在试剂盒中。在一个实施方案中,培养基不接触表面结合的或固定的细胞外基质蛋白。

[0022] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含以下中的两者或更多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子。

[0023] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含第一类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含第二类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含第三类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞外基质蛋白是重组的。

[0024] 在一个实施方案中,细胞外基质蛋白选自由以下组成的组:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC。在包含多种类型的细胞外基质蛋白的实施方案中,每种类型都是不同的。

[0025] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白(如果存在)或第三类型的细胞外基质蛋白(如果存在)的浓度范围在约1μg/mL至1mg/mL之间。

[0026] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21。在一个实施方案

中,前述细胞因子各自包含在补充剂中。在一个实施方案中,补充剂中包含IL-2和IL-10,以及任选的IL-21。

[0027] 在一个实施方案中,CD40的配体是人或小鼠CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

[0028] 在一个实施方案中,脂质混合物是化学成分确定的。在一个实施方案中,脂质混合物不含动物成分。在一个实施方案中,脂质混合物被稳定化。

[0029] 在一个实施方案中,淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)或其祖细胞是以单细胞形式或以克隆密度接种。

[0030] 在一个实施方案中,培养基支持淋巴细胞及其祖细胞的无饲养层扩增。

[0031] 在一个实施方案中,培养基支持淋巴细胞及其祖细胞的无动物成分扩增。在一个实施方案中,所述培养基是无血清的。

[0032] 本公开的另一个方面提供了扩增哺乳动物淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)或其祖细胞的方法。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞可以单细胞形式或以克隆密度进行平板接种。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞不是以单细胞形式或以克隆密度进行平板接种。

[0033] 所述方法可以包括将淋巴细胞或其祖细胞接种到培养环境中,并在所述培养环境中孵育/培养接种的细胞或其祖细胞超过一天,所述培养环境包含以下中的一者或多者:CD40的配体、脂质混合物和一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,孵育/培养细胞可以包括扩增细胞。在一个实施方案中,细胞还可以在培养/孵育步骤期间分化和/或活化。

[0034] 在一个实施方案中,本公开的方法还可以在培养环境中包括第一类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的方法还可以在培养环境中包括第二类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的方法还可以在培养环境中包括第三类型的细胞外基质蛋白。

[0035] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白和/或第二类型的细胞外基质蛋白(如果存在)和/或第三类型的细胞外基质蛋白(如果存在)被包含在培养基中。

[0036] 在一个实施方案中,细胞外基质蛋白选自由以下组成的组:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC。在包含多种类型的细胞外基质蛋白的实施方案中,每种类型都是不同的。

[0037] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白(如果存在)或第三类型的细胞外基质蛋白(如果存在)的浓度范围在约1μg/mL至1mg/mL之间。

[0038] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可以包含一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子选自IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21。在一个实施方案中,前述细胞因子各自包含在补充剂中。在一个实施方案中,补充剂中包含IL-2和IL-10,以及任选的IL-21。

[0039] 在一个实施方案中,CD40的配体是人或小鼠CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体包含一种或多种蛋白质。

[0040] 在一个实施方案中,脂质混合物是化学成分确定的。在一个实施方案中,脂质混合物不含动物成分。在一个实施方案中,脂质混合物被稳定化。

[0041] 在一个实施方案中,接种和孵育步骤是在无饲养层条件下进行的。在一个实施方

案中,接种和孵育步骤是在无血清条件下进行的。在一个实施方案中,接种和孵育步骤是在无动物成分条件下进行的。在一个实施方案中,接种和孵育步骤是在上述每个条件下进行的。

[0042] 在一个实施方案中,淋巴细胞或其祖细胞是人或小鼠的。

[0043] 在一个实施方案中,淋巴细胞是人或小鼠B细胞,并且所述B细胞是记忆B细胞或浆母细胞。

[0044] 在一个实施方案中,本公开的方法还可以包括在培养环境中分化淋巴细胞或其祖细胞。在一个实施方案中,本公开的方法还可以包括在培养环境中活化和/或分化淋巴细胞或其祖细胞。

[0045] 在一个实施方案中,孵育步骤持续至少3天。

[0046] 根据以下详细描述,本发明的其他特征和优点将变得显而易见。然而,应理解的是,尽管指示本发明的优选实施方案,但是详细描述和具体实施例仅通过说明的方式给出,因为从此详细描述中,本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员来说将变得显而易见。

[0047] 附图简述

[0048] 为了更好地理解本文所述的各种实施方案,并且为了更清楚地显示可如何实现这些各种实施方案,将以举例的方式参考附图,所述附图显示至少一个示例性实施方案并且现在加以描述。附图不打算限制本文所描述的教义的范围。

[0049] 图1显示了在B系细胞富集之前(浅灰色)或之后(深灰色)白细胞分离术样本中各细胞的标志物表达的条形图。

[0050] 图2显示了B系细胞在以单细胞形式平板接种时随时间而扩增的代表性图像。将来自供体的单个B细胞在对照条件和各种培养基条件下接种,所述对照条件不包括在培养基中稀释的外源添加的细胞外基质蛋白,而所述培养基条件包括外源添加的细胞外基质蛋白的不同组合。条件1、条件2和条件3包括三种细胞外基质蛋白的不同成对组合。条件4包括全部三种细胞外基质蛋白。第0天的单个细胞被圈出。

[0051] 图3显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自与图2中不同的供体的单个B细胞在包括图2中两种外源添加的细胞外基质蛋白的条件下扩增,这两种蛋白质在培养基中单独稀释(条件1和条件2)和呈组合形式(条件3)。比例尺代表200μm。

[0052] 图4显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自与图2和图3中不同的供体的单个B细胞在以下条件下扩增:包括在培养基中稀释的单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1、条件2和条件3)以及外源添加的细胞外基质蛋白中两者的成对组合(条件4和条件5)。比例尺代表200μm。

[0053] 图5显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自图4中同一供体的单个B细胞在培养基中稀释的单独外源添加的细胞外基质蛋白存在下以及在存在或不存在CD40的配体的情况下扩增。圈出的区域突出显示选定的扩增细胞簇。比例尺代表200μm。

[0054] 图6显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自图2中同一供体的单个B细胞在培养基中稀释的单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1和条

件2)存在下扩增,所述细胞外基质蛋白与图2至图5中测试的不同。比例尺代表200μm。

[0055] 图7显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自图2中同一供体的单个B细胞在培养基中稀释的单一外源添加的细胞外基质蛋白存在下且在另外存在或不存在所指示的不同脂质混合物的情况下扩增。比例尺代表200μm。

[0056] 图8显示了在存在两种不同的、单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1和条件2)以及组合(条件3)的情况下从单个B细胞扩增的B系细胞中细胞表面标志物表达的线图。条形代表2个孔的平均值。

[0057] 图9显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使单个B细胞在培养基中扩增,所述培养基包含单一外源添加的细胞外基质蛋白以及不同细胞因子组合:IL-2和IL-10(条件1)以及IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21(条件2)。对照条件包括:未添加补充剂的基础培养基(对照1);补充有细胞因子但未外源添加细胞外基质蛋白的基础培养基(对照2);以及补充有细胞外基质蛋白但未添加细胞因子的基础培养基(对照3)。比例尺代表200μm。

[0058] 图10显示了在以单细胞形式平板接种时B系细胞扩增情况的代表性图像。使单个B细胞在单一外源添加的细胞外基质蛋白存在下扩增,所述细胞外基质蛋白稀释于不同的市售基础培养基中,如所示。白色箭头指示细胞簇。比例尺代表200μm。

[0059] 图11显示了在以单细胞形式平板接种时人记忆B系细胞扩增情况的代表性图像。使来自新供体的单个记忆B细胞在以下条件下扩增,所述条件包括在培养基中稀释的两种细胞外基质蛋白的组合(条件1)或三种细胞外基质蛋白的组合(条件2)。比例尺代表200μm。

[0060] 图12显示了根据本公开扩增单个人记忆B细胞的结果。培养12天后的活细胞倍数扩增以9名供体的平均值±平均值的标准误差(SEM)显示(A)。通过ELISA确定的由扩增细胞产生的IgM和IgG以7名供体的平均值±SEM显示(B)。关于第12天扩增细胞的细胞表面标志物表达的流式细胞术分析以9名供体的平均值±SEM显示(C)。

[0061] 图13显示了根据本公开扩增单一人浆母细胞的结果。培养12天后的活细胞倍数扩增以5名供体的平均值±平均值的标准误差(SEM)显示(A)。通过ELISA确定的由扩增细胞产生的IgM和IgG以2名供体的平均值±SEM显示(B)。关于第12天扩增细胞的细胞表面标志物表达的流式细胞术分析以4名供体的平均值±SEM显示(C)。

[0062] 图14显示了在以单细胞形式平板接种时小鼠泛B细胞(pan-Bcell)扩增情况的代表性图像。使来自C57 BL/6小鼠的单个泛B细胞在存在两种外源添加的细胞外基质蛋白的两种不同组合(条件1和条件2)以及存在指定细胞因子混合物的情况下扩增。比例尺代表200μm。

[0063] 图15显示了根据本公开扩增单个小鼠记忆B细胞的结果。培养12天后的活细胞倍数扩增以5名供体的平均值±平均值的标准误差(SEM)显示(A)。通过ELISA确定的由扩增细胞产生的IgG以2名供体的平均值±SEM显示(B)。关于第12天扩增细胞的细胞表面标志物表达的流式细胞术分析以2-4名供体的平均值±SEM显示(C)。

[0064] 图16显示了根据本公开扩增单个小鼠浆母细胞的结果。培养12天后的活细胞倍数扩增以3名供体的平均值±平均值的标准误差(SEM)显示(A)。通过ELISA确定的由扩增细胞产生的IgG以2名供体的平均值±SEM显示(B)。关于第12天扩增细胞的细胞表面标志物表达的流式细胞术分析以2-3名供体的平均值±SEM显示(C)。

[0065] 图17显示了扩增以单细胞形式平板接种的T系细胞的结果。培养总计12天后,单个小鼠$CD3^+$T细胞的活细胞倍数扩增以2名供体的平均值±平均值的标准误差(SEM)显示(A)。关于(A)第12天扩增细胞的细胞表面标志物表达的流式细胞术分析以2-3名供体的平均值±SEM显示(B)。在基础培养基中稀释的单一外源添加的细胞外基质蛋白的存在下,扩增的以单细胞形式平板接种的人$CD3^+$T细胞的图像。比例尺代表200μm(C)。

具体实施方式

[0066] 本公开涉及培养基组合物(和/或要添加至培养基中的补充剂),以及用于培养T细胞、NK细胞或B细胞等淋巴细胞的方法。更具体地说,本公开涉及扩增T细胞、NK细胞或B细胞,所述细胞是以单细胞形式或以克隆细胞密度接种至本文所公开的培养基和补充剂中,并通过实践本文所公开的方法进行扩增。

[0067] 当在本公开中使用时,术语"淋巴细胞"是指哺乳动物造血系统中淋巴细胞谱系的细胞,例如T细胞、B细胞和/或NK细胞。哺乳动物淋巴细胞可以是人、小鼠、大鼠或其他动物的淋巴细胞。淋巴细胞可以来源于干细胞,例如造血干细胞(例如$CD34^+$干细胞),或来源于可以从脐带血、外周血或骨髓获得的任何其他干细胞。在一个实施方案中,淋巴细胞可以来源于多能干细胞。

[0068] 当在本公开中使用时,"B细胞(B cell)"或"B细胞(B cells)"是指哺乳动物B淋巴细胞或B淋巴细胞群。B细胞可以包含在样本中,并且这种样本可以包括一个或多个B细胞群、子群(subpopulation)或亚群(subset),包括但不限于初始B细胞、记忆B细胞、活化B细胞、B2细胞、B1细胞、生发中心B细胞、边缘区B细胞、调节性B细胞、滤泡B细胞、分离的泛B细胞、浆母细胞、浆细胞和/或其他B细胞谱系。例如,在样本中,基于生物标志物,例如B细胞表面标志物(例如在B细胞表面上表达的抗原,该抗原可以作为与其结合的剂的靶),可以将B细胞与非B细胞区分开来。示例性B细胞表面标志物包括:CD10、CD19、CD20(MS4A1)、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD27、CD38、CD40、CD53、CD72、CD73、CD79a、CD79b、CD80、CD86、CD138和TACI。示例性小鼠B细胞表面标志物包括:CD19、CD20、CD22、CD27、CD28、CD38、CD44、CD80、CD73、CD86、CD93、CD98、CD138、CD45R、B220和CD273。

[0069] 当在本公开中使用时,"T细胞(T cell)"或"T细胞(T cells)"是指哺乳动物T淋巴细胞或T淋巴细胞群。T细胞可以包含在样本中,并且这种样本可以包括一个或多个T细胞群、子群或亚群,包括但不限于泛T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、辅助T细胞、效应T细胞、细胞毒性T细胞和/或初始T细胞、CAR-T细胞、活化T细胞、Th1细胞、Th2细胞或其他T细胞谱系。例如,在样本中,基于生物标志物,例如T细胞表面标志物(例如在T细胞表面上表达的抗原,该抗原可以作为与其结合的剂的靶),可以将T细胞与非T细胞区分开来。T细胞的典型特征是:不存在NK特异性、B特异性和红系髓系特异性标志物;CD3和TCRαβ(或TCRγδ)以及CD4或CD8的表达;和其效应功能。不过,T细胞的一些亚群可以表达T细胞和NK细胞两者的特征,并且可以表达或可以不表达TCRαβ或TCRγδ,并且也可以表达或可以不表达CD4、CD8、CD56、CD16和NK1.1。T细胞的特征还可以是CD8α、CD8β、CD45RA和CD27的表达。

[0070] 当在本公开中使用时,"NK细胞(NK cell)"或"NK细胞(NK cells)"是指哺乳动物NK淋巴细胞或NK淋巴细胞群。NK细胞可以包含在样本中,并且这种样本可以包括一个或多

个NK细胞群、子群或亚群,包括但不限于泛NK细胞、耐受性NK细胞、细胞毒性NK细胞、调节性NK细胞、CAR-NK细胞或其他NK细胞谱系。例如,在样本中,基于生物标志物,例如NK细胞表面标志物(例如在NK细胞表面上表达的抗原,该抗原可以作为与其结合的剂的靶),可以将NK细胞与非NK细胞区分开来。NK细胞的典型特征是:不存在T和B细胞特异性标志物;CD56的表达,存在或不存在CD16的表达(低亲和力Fcγ受体3A,在NK细胞亚群上表达);和其效应功能。NK细胞的特征还可以是称为杀伤免疫球蛋白样受体(KIR)的活化和抑制受体的表达。

[0071] 当在本公开中使用时,术语"细胞外基质"是指为细胞提供结构和生化支持的一种或多种分子。众所周知,细胞外基质化合物能够促进细胞粘附、细胞间通讯以及给定组织内的分化或培养基中细胞的聚结。天然和合成的细胞外基质均涵盖在本公开内。已知许多不同的细胞外基质蛋白,包括但不限于:层粘连蛋白、胶原蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、ECM1、骨桥蛋白、纤连蛋白和SPARC。细胞外基质可以包含一种或多种细胞外基质蛋白。当细胞外基质仅包含一种细胞外基质蛋白时,可以说它包含一种类型的细胞外基质蛋白。当细胞外基质包含两种不同的细胞外基质蛋白时,可以说它包含两种类型的细胞外基质蛋白。当细胞外基质包含三种不同的细胞外基质蛋白时,可以说它包含三种类型的细胞外基质蛋白,诸如此类。细胞外基质的成分可以包括以下蛋白质中的一者或多者:纤连蛋白、层粘连蛋白、玻连蛋白、腱生蛋白、巢蛋白(entactin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、弹性蛋白、明胶、胶原蛋白、原纤维蛋白、分区蛋白(merosin)、锚蛋白、软骨粘连蛋白、连接蛋白、骨涎蛋白、骨钙蛋白、骨桥蛋白、表粘连蛋白(epinectin)、透明质粘连蛋白(hyaluronectin)、波蛋白(undulin)、表皮整联配体蛋白(epiligrin)、缰蛋白(kalinin)、基于合成聚合物的水凝胶(例如聚乙二醇、聚乙烯或其任何衍生物或类似物)和基于植物的水凝胶(例如纤维素、半纤维素、木质素、淀粉和果胶,或其任何衍生物或类似物)。本公开的细胞外基质蛋白可以包含在要添加到本公开的培养基中的补充剂中,或包含在本公开的培养基中。在这两种实施方案中,细胞外基质蛋白可以是可溶的或溶解的。

[0072] 当在本公开中使用时,术语"脂质混合物"是指脂质和/或脂质样物质的制剂。脂质混合物可以从商业供应商处购买,或者可以在临用前制备。可包含在脂质混合物中的脂质的实例包括但不限于丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一烷酸、月桂酸、十三烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、十九烷酸、花生酸、二十一烷酸、山嵛酸、二十三烷酸、二十四烷酸、二十五烷酸、蜡酸、二十七烷酸、褐煤酸、二十九烷酸、蜂花酸、三十一烷酸、紫胶蜡酸、叶虱酸(psyllic acid)、葛迪酸(geddic acid)、三十六烷酸(ceroplastic acid)、三十六烷酸(hexatriacontylic acid)、三十七烷酸或三十八烷酸;和/或选自不饱和脂肪酸群组,所述不饱和脂肪酸包含α-亚麻酸、十八碳四烯酸、二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸、亚油酸、γ-亚麻酸、二高-γ-亚麻酸、花生四烯酸、二十二碳四烯酸、棕榈油酸、十八碳烯酸、二十碳烯酸(paullinic acid)、油酸、反油酸、巨头鲸鱼酸(gondoic acid)、芥酸、神经酸或二十碳三烯酸。在一个实施方案中,脂质混合物可以包含在要添加到培养基中的浓缩制剂,例如补充剂中。在一个实施方案中,脂质混合物可能已经包括在本公开的基础培养基或完全培养基中。

[0073] 当在本公开中使用时,术语"细胞因子(cytokine)"或"细胞因子(cytokines)"是指由细胞产生和释放的可溶性蛋白质。细胞因子的功能包括刺激或抑制直接或间接接触的原始细胞或其他细胞。例如,细胞因子可介导免疫反应的产生或调节。常见的细胞因子包

括:白细胞介素IL-1至IL-15;肿瘤坏死因子α和β;干扰素α、β和γ;TGF-β;集落刺激因子(CSF);以及粒细胞单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)。一种或多种细胞因子可包括在本公开的培养基或补充剂中,或用于扩增例如T细胞、NK细胞或B细胞等淋巴细胞的方法中。

[0074] 当在本公开中使用时,术语"克隆细胞密度"或"克隆密度"是指使一个或多个细胞能够形成个别集落或簇的密度。在一个特定实施方案中,细胞是以1个细胞/孔的密度接种。在一个实施方案中,细胞是以至少1个细胞/孔的密度接种。在一个实施方案中,细胞可以按1000个细胞/孔的密度接种于培养皿中,例如10cm培养皿中。在一个实施方案中,细胞是以足够低的密度接种,以便在平板接种于培养皿/孔中时有效分离单个、非碰撞的细胞。

[0075] 培养基和补充剂

[0076] 本公开的一个方面提供了用于扩增哺乳动物淋巴细胞(例如T细胞、B细胞或NK细胞)的培养基。本公开的一个方面提供了要添加至用于扩增哺乳动物淋巴细胞(例如T细胞、B细胞或NK细胞)或其祖细胞的培养基中的细胞培养基补充剂。培养基和补充剂都可以包括对扩增淋巴细胞(例如T细胞、B细胞或NK细胞)或其祖细胞很重要的因子和其他成分,无论是否以单细胞形式或以克隆细胞密度平板接种。在一些实施方案中,培养基和补充剂还可包括额外的因子和其他成分,以提高淋巴细胞或祖细胞扩增和/或分化和/或活化的效率,无论是否以单细胞形式或以克隆细胞密度平板接种。

[0077] 在一个实施方案中,哺乳动物B细胞是人B细胞。在一个实施方案中,人B细胞是记忆B细胞。在一个实施方案中,人B细胞是初始B细胞。在一个实施方案中,人B细胞是泛B细胞。在一个实施方案中,哺乳动物B细胞是浆母细胞。在一个实施方案中,哺乳动物B细胞是浆细胞。在一个实施方案中,哺乳动物B细胞是小鼠B细胞。然而,本领域的普通技术人员应容易了解,本公开的细胞培养基补充剂也可应用于其他细胞类型,例如T细胞或NK细胞。

[0078] 本公开的培养基将包含基础培养基。基础培养基可以是任何培养基,当经过适当补充时,所述培养基能够支持哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞(例如T细胞或B细胞)的扩增。在一个实施方案中,基础培养基可以是任何培养基,当经过适当补充时,所述培养基能够支持人哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞(例如T细胞或B细胞)的扩增。在一个实施方案中,基础培养基可以是任何培养基,当经过适当补充时,所述培养基能够支持啮齿动物(例如小鼠)哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞(例如T细胞或B细胞)的扩增。在一个实施方案中,基础培养基可以是能够支持人或小鼠记忆B细胞或浆母细胞扩增的任何培养基。

[0079] 本领域中已知多种基础培养基,并且其中有许多是可商购的。基础培养基的实例可包括RPMI、DMEM/F-12、IMDM、StemSpan™和ImmunoCult™-品牌的培养基。基础培养基通常包括以下中的一者或多者:碳水化合物、氨基酸、微量元素、脂质、缓冲液、盐、蛋白质(包括白蛋白)等。在一些实施方案中,基础培养基可能不包括前述类型的成分中的一者或多者,并且当配制完全培养基时,可以相应地进行补充。

[0080] 用于配制本公开的哺乳动物淋巴细胞扩增培养基的基础培养基可补充有额外的成分以制成完全培养基。在一个实施方案中,本公开的哺乳动物淋巴细胞扩增培养基可以作为完全培养基提供(即,不需要进一步补充)。在一个实施方案中,基础培养基可以与一种或多种补充剂一起提供(无论是以试剂盒形式还是以其他方式),这些补充剂将在使用前添加到基础培养基中以配制完全培养基。

[0081] 为了配制完全哺乳动物淋巴细胞扩增培养基,包括(或另外补充)以下中的一者或

多者可能是有益的和/或必要的:一种或多种生长因子、一种或多种细胞外基质蛋白,例如一种或多种细胞因子、一种或多种脂质、一种或多种激素、一种或多种盐、一种或多种维生素、其他蛋白质,包括一种或多种白蛋白、一种或多种小分子等。

[0082] 在一个实施方案中,本公开的培养基(例如哺乳动物淋巴细胞扩增培养基)包含基础培养基,以及脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子中的一者或多者。在一个实施方案中,本公开的培养基(例如哺乳动物淋巴细胞扩增培养基)包含基础培养基,以及脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子中的两者或更多者。在一个实施方案中,本公开的培养基(例如哺乳动物淋巴细胞扩增培养基)包含基础培养基,以及脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子中的每一者。

[0083] 在一个实施方案中,脂质混合物可以包括单一类型的脂质。在一个实施方案中,脂质混合物可以包括多种类型的脂质。在一个实施方案中,脂质混合物可以包含在基础培养基中。在一个实施方案中,脂质混合物可以包含在要添加到基础培养基中的补充剂中。

[0084] 在一个实施方案中,脂质混合物是化学成分确定的。在一个实施方案中,脂质混合物可以不含动物成分。

[0085] 本公开的培养基可包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子。在一个实施方案中,本公开的细胞培养基中包含的一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子的类型是根据要培养的细胞的具体类型,例如淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)选择的。

[0086] 在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子可以是IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的任一者或它们的组合。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞扩增培养基补充有IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的每一者。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞扩增培养基补充有IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的一者或多者。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞扩增培养基至少补充有IL-2和IL-10,且任选地补充IL-21。

[0087] 在具体实施方案中,哺乳动物B细胞或T细胞扩增培养基包含IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的每一者。在其他具体实施方案中,哺乳动物B细胞或T细胞扩增培养基至少包含IL-2和IL-10,并且任选地包含IL-21。

[0088] 本公开的培养基中包含的一种或多种细胞因子可以分别以约10ng/mL-200μg/mL,或约0.1-100μg/mL,或约1-50μg/mL,或约5-25μg/mL之间的浓度存在。在哺乳动物淋巴细胞扩增培养基中包括一种或多种前述细胞因子的小分子类似物的实施方案中,它们通常是以较低浓度使用。

[0089] 本公开的培养基可以包含CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体与CD40L受体结合以促进细胞活化。在一个实施方案中,CD40的配体是人CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体包含一种或多种蛋白质。在一个实施方案中,CD40的配体包含在蛋白质复合物中。在一个实施方案中,培养基中CD40L的配体的浓度范围在约0.1ng/mL至500ng/mL、约0.5ng/mL至100ng/mL或约1ng/mL至50ng/mL之间。

[0090] 本公开的培养基可以包含第一类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的培养基包含第一类型的细胞外基质蛋白和第二类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,本公开的培养基包含第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白和第三类型的细胞外基质蛋白。在一些实施方案中,本公开的培养基包含超过三种类型的细胞

外基质蛋白。在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白可选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白或SPARC。在包括第二类型、第三类型或其他类型的细胞外基质蛋白的实施方案中,它们可以选自但不限于胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白(例如层粘连蛋白-511、层粘连蛋白-511的片段(例如层粘连蛋白511-E8)、层粘连蛋白-521(也称为层粘连蛋白11)、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、SPARC或它们的组合。在一个优选实施方案中,本公开的培养基中包含的细胞外基质蛋白是ECM1、骨桥蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和层粘连蛋白中的一者或多者,并且更优选地是ECM1、骨桥蛋白和玻连蛋白中的一者或多者。

[0091] 在一个实施方案中,细胞外基质蛋白(无论是第一类型、第二类型、第三类型还是其他类型)的浓度范围在约0.1μg/mL至1mg/mL之间。在一个实施方案中,细胞外基质蛋白(无论是第一类型、第二类型、第三类型还是其他类型)的浓度范围在约1μg/mL至100μg/mL、约3μg/mL至50μg/mL、约5μg/mL至30μg/mL或约10μg/mL至20μg/mL之间。

[0092] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白或第三类型的细胞外基质蛋白被涂覆或固定在包含淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)的粒子/珠粒或培养容器/器皿的表面上。因此,在这种实施方案中,在容器中培养的细胞是在本公开的培养基的存在下以及第一类型的细胞外基质蛋白(以及任何其他类型的细胞外基质蛋白)的存在下培养的,所述第一类型的细胞外基质蛋白被涂覆于或结合于粒子/珠粒或细胞培养容器/器皿的表面上。

[0093] 在一个实施方案中,培养基中(或在粒子或容器上)包括的每一种细胞外基质蛋白都是重组的。在一个实施方案中,细胞外基质蛋白中的一些但非全部是重组的。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞外基质蛋白是重组人细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞外基质蛋白是重组小鼠细胞外基质蛋白。

[0094] 在一个实施方案中,一种或多种细胞外基质蛋白(例如可以包括在本公开的培养基中)可以是天然来源的,并且从人类、动物或植物组织中纯化得到。在一个实施方案中,一种或多种细胞外基质蛋白可以是经过基因工程改造的蛋白质和/或重组蛋白,或另外本质上是合成的。在一个实施方案中,一种或多种细胞外基质蛋白可以是完整蛋白质或其片段,例如肽片段。

[0095] 在一个实施方案中,本公开的培养基扩增以单细胞形式平板接种的哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞。当打算克隆某个特定细胞,例如已经历基因组编辑的细胞时,对以单细胞形式平板接种的细胞进行扩增可能非常重要。

[0096] 在一个实施方案中,本公开的培养基扩增以克隆密度平板接种的哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞。细胞可以克隆密度平板接种于微孔板中,并且在适用的实施方案中,选择一定细胞密度以使细胞间有足够的间隔非常重要。以克隆密度平板接种的细胞彼此接触的概率较低。以克隆细胞密度平板接种的细胞也可能不会对容器中的其他细胞产生旁分泌作用。例如,克隆密度可对应于1个细胞/cm^2、10个细胞/cm^2、100个细胞/cm^2或1000个细胞/cm^2的细胞密度。

[0097] 在一个实施方案中,本公开的培养基扩增并非以克隆密度平板接种的哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞。

[0098] 在一个实施方案中,使用前述补充剂和/或培养基配制物扩增的淋巴细胞或其祖细胞可用于依从性较高的应用,例如用于细胞疗法。在一个实施方案中,本公开的培养基是

化学成分确定的。在一个实施方案中,本公开的培养基可以是不含血清和/或不含动物成分的。不过,此类培养基可包括白蛋白,例如重组白蛋白。因此,本公开的培养基可支持淋巴细胞或其祖细胞的无血清和/或无动物成分扩增。

[0099] 在一个实施方案中,在本公开的培养基中培养的淋巴细胞或其祖细胞不与饲养层细胞或未限定的细胞载体(例如基质),如Matrigel™接触。因此,本公开的培养基可支持淋巴细胞或其祖细胞的无饲养层扩增。

[0100] 总体而言,本公开的培养基无论是作为完全培养基提供还是作为本文所描述的有待补充的基础培养基提供,都将支持哺乳动物淋巴细胞的扩增。在淋巴细胞是B细胞的实施方案中,它们可以是泛B细胞、记忆B细胞、初始B细胞、浆母细胞、浆细胞或其他B细胞谱系。在淋巴细胞是T细胞的实施方案中,它们可以是泛T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、辅助T细胞、效应T细胞、细胞毒性T细胞和/或初始T细胞、CAR-T细胞或其他T细胞谱系。在淋巴细胞是NK细胞的实施方案中,它们可以是泛NK细胞、细胞毒性NK细胞、调节性NK细胞、耐受性NK细胞、CAR-NK细胞。

[0101] 在一个实施方案中,本公开的哺乳动物淋巴细胞培养基将支持5次或更多、10次或更多、15次或更多、20次或更多、25次或更多、30次或更多、35次或更多、40次或更多、45次或更多、50次或更多、55次或更多,或者60次或更多的群体倍增次数。

[0102] 在一个实施方案中,使用本公开的培养基扩增的哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞表达哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的标志物。在一个实施方案中,超过30%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过50%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过60%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过70%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的标志物呈阳性。

[0103] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中的分化。在一个实施方案中,培养基支持10%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,培养基支持20%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,培养基支持30%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,培养基支持40%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,培养基支持50%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,培养基支持60%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。

[0104] 在一个实施方案中,本公开的培养基还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中的活化。

[0105] 本公开的另一方面提供了一种用于扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的细胞培养基补充剂。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞是以单细胞形式或以克隆细胞密度平板接种。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞不是以单细胞形式或以克隆细胞密度平板接种。

[0106] 在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包含以下中的一者或多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包

含稀释剂,以及以下中的一者或多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包含以下中的两者或更多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包含稀释剂,以及以下中的两者或更多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包含以下中的每一者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,细胞培养基补充剂可以包含稀释剂,以及以下中的每一者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。

[0107] 在一个实施方案中,稀释剂是生理性的,例如就pH值、盐浓度、渗透压、摩尔渗透压浓度等而言。在一个实施方案中,稀释剂是无机的。作为非限制性实例,稀释剂可以是水性的(例如水)。在一个实施方案中,稀释剂可以是缓冲液。在一个实施方案中,稀释剂溶解其中的成分,例如以下中的一者或者两者或更多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,稀释剂溶解可包含在补充剂中的一种或多种细胞外基质蛋白。

[0108] 在一个实施方案中,本公开的补充剂包含脂质混合物。以上关于脂质混合物及其在培养基中的浓度的描述可适用于本公开的补充剂。然而,在补充剂经过浓缩(例如>1X)的实施方案中,则浓度范围将进行适当调整。

[0109] 在一个实施方案中,本公开的补充剂包含CD40的配体。以上关于CD40配体及其在培养基中的浓度的描述可适用于本公开的补充剂。然而,在补充剂经过浓缩(例如>1X)的实施方案中,则浓度范围将进行适当调整。

[0110] 在一个实施方案中,本公开的补充剂包含一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子。以上关于细胞因子及其在培养基中的浓度的描述可适用于本公开的补充剂。然而,在补充剂经过浓缩(例如>1X)的实施方案中,则浓度范围将进行适当调整。

[0111] 在一个实施方案中,补充剂可以包含至少第一类型的细胞外基质蛋白和以下中的一者或多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,补充剂可以包含至少第一类型的细胞外基质蛋白和以下中的两者或更多者:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,补充剂可以包含至少第一类型的细胞外基质蛋白和以下全部:CD40的配体;脂质混合物;以及一种或多种细胞因子。

[0112] 在一个实施方案中,补充剂包含第一类型的细胞外基质蛋白和第二类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,补充剂包含第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白和第三类型的细胞外基质蛋白。在一些实施方案中,本公开的补充剂包含超过三种类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,至少一种细胞外基质蛋白包含在用于配制本公开的完全扩增培养基的补充剂中。

[0113] 在本公开的补充剂的实施方案中,以上对一种、两种或三种或更多种类型的细胞外基质蛋白及其在培养基中的浓度的描述可适用于本公开的补充剂。然而,在补充剂经过浓缩(例如>1X)的实施方案中,则浓度范围将进行适当调整。

[0114] 举例来说,补充剂中包含的一种、两种、三种或更多种类型的细胞外基质蛋白可以选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白或SPARC。在包括第二类型、第三类型或其他类型的细胞外基质蛋白的实施方案中,它们可以选自但不限于胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白(例如层粘连蛋白-511、层粘连蛋白-511的片段(例如层粘连蛋白511-

E8)、层粘连蛋白-521(也称为层粘连蛋白11))、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、SPARC或它们的组合。在一个优选实施方案中,本公开的补充剂中包含的细胞外基质蛋白是ECM1、骨桥蛋白、玻连蛋白、胶原蛋白和层粘连蛋白中的一者或多者,并且更优选地是ECM1、骨桥蛋白和玻连蛋白中的一者或多者。

[0115] 在一个实施方案中,本公开的补充剂可以是浓缩的。在一个实施方案中,补充剂是约2X浓度、约5X浓度、约10X浓度、约15X浓度、约20X浓度、约25X浓度、约50X浓度、约100X浓度、约200X浓度、约500X浓度或更高浓度。

[0116] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(当配制于哺乳动物淋巴细胞扩增培养基中时)将支持5次或更多、10次或更多、15次或更多、20次或更多、25次或更多、30次或更多、35次或更多、40次或更多、45次或更多、50次或更多、55次或更多,或者60次或更多的群体倍增次数。

[0117] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(当配制于哺乳动物淋巴细胞扩增培养基中时)还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中的分化/成熟(例如从更原始到更具体的命运)。在一个实施方案中,10%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,20%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,30%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,40%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,50%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。

[0118] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(当配制于哺乳动物淋巴细胞扩增培养基中时)还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中的活化。

[0119] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(以及与补充剂组合的培养基)以及在其存在下培养的细胞不与饲养层细胞或未限定的细胞载体(例如基质),例如Matrigel™接触。因此,本公开的补充剂(以及与补充剂组合的培养基)可支持淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)或其祖细胞的无饲养层扩增。

[0120] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(以及与补充剂组合的培养基)不含动物成分。因此,本公开的补充剂(以及与补充剂组合的培养基)可支持淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)或其祖细胞的无动物成分扩增。

[0121] 在一个实施方案中,本公开的补充剂(以及与补充剂组合的培养基)可以不含血清。不过,本公开的无血清补充剂(以及与补充剂组合的培养基)可包括白蛋白,例如重组白蛋白。

[0122] 方法

[0123] 本公开的另一方面提供了扩增哺乳动物淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)或其祖细胞的方法。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞是以单细胞形式或以克隆密度平板接种。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞不是以单细胞形式或以克隆密度平板接种。

[0124] 可以从混合样本,例如从血液或白细胞分离术样本中分离/富集在本文所描述的方法中接种/培养的淋巴细胞。在淋巴细胞是B细胞的实施方案中,所述方法可涉及接种泛B细胞、记忆B细胞、初始B细胞、浆母细胞和/或浆细胞。在淋巴细胞是T细胞的实施方案中,所述方法可涉及接种泛T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、记忆T细胞、调节性T细胞、辅助T细胞、效应T细胞、细胞毒性T细胞、初始T细胞、CAR-T细胞。在淋巴细胞是NK细胞的实施方案中,所述

方法可涉及接种泛NK细胞、细胞毒性NK细胞、调节性NK细胞、耐受性NK细胞或CAR-NK细胞。尽管如此,本领域的普通技术人员将容易地了解,本公开的培养基/补充剂和方法可以用于其他淋巴细胞亚群或群体。

[0125] 在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞是人的。在一个实施方案中,哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞是啮齿动物(例如小鼠)的。

[0126] 在一个实施方案中,扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的方法包括将淋巴细胞(例如B细胞或T细胞群,或其祖细胞)以单细胞形式或以克隆密度接种到培养环境中。在一个实施方案中,扩增哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞的方法包括将淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞群,或其祖细胞)以大量细胞而非单细胞形式或以克隆密度接种到培养环境中。接种细胞后,所述方法可以包括将接种的细胞或其祖细胞在培养环境中孵育(例如培养)一段足以使淋巴细胞或其祖细胞扩增至所需数量的时间。

[0127] 在一个实施方案中,将哺乳动物淋巴细胞或其祖细胞接种到培养瓶、培养皿、器皿、培养板或其孔中。在克隆操作中,淋巴细胞的平板接种可能非常重要,例如当其基因组经过编辑时或当细胞具有所需表型或执行所需功能时。在哺乳动物B细胞或其祖细胞是以克隆密度平板接种的实施方案中,选择细胞密度以使细胞之间有足够的间隔很重要。以克隆密度平板接种的细胞彼此接触的概率较低。理想地,以一定克隆细胞密度平板接种的细胞不会对容器中的其他细胞产生旁分泌作用。例如,克隆密度可对应于6孔板、24孔板、48孔板或96孔板中1个细胞/孔的细胞密度。在一个实施方案中,细胞可以按至多10个、100个、1000个细胞/孔或cm^2的密度接种于培养皿中,例如10cm培养皿中。如上所述,在一些应用中,细胞不是以单细胞形式或以一定克隆细胞密度平板接种。例如,细胞可以按大于1000个细胞/孔或cm^2的密度平板接种。

[0128] 在本文所公开的方法的一个实施方案中,将接种的细胞在培养环境中孵育足以将淋巴细胞或其祖细胞扩增至所需数量的任何时间。在一个实施方案中,孵育步骤可以是至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少8天、至少9天、至少10天、至少11天、至少12天、至少13天或至少14天,或更长时间。

[0129] 在一个实施方案中,孵育步骤可分成几个阶段。例如,孵育/扩增的第一阶段可以是在第一培养环境(例如培养基配制物)中保持1-10天。在一个实施方案中,孵育/扩增的第一阶段是在第一培养环境(例如培养基配制物)中保持约1-5天,或约3-10天。在一个实施方案中,孵育/扩增的第二阶段是在第二培养环境(例如培养基配制物)中保持约1-10天。在一个实施方案中,孵育/扩增的第二阶段是在第二培养环境(例如培养基配制物)中保持约1-5天,或约3-10天。

[0130] 接种淋巴细胞(以及孵育淋巴细胞)的培养环境可以包含以下中的一者或多者:培养基、容器、温度和大气条件等。

[0131] 关于培养基(以及要添加到培养基中以制成完全培养基的补充剂),以上描述适用。例如,培养环境(例如培养基)可以包含以下中的一者或多者:脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,培养环境(例如培养基)可以包含以下中的两者或更多者:脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子。在一个实施方案中,培养环境(例如培养基)可以包含以下中的每一者:脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子。

[0132] 在一个实施方案中,脂质混合物包含单一类型的脂质。在一个实施方案中,脂质混合物包含多种类型的脂质。在一个实施方案中,脂质混合物可以是稳定的和/或不含动物成分。

[0133] 在一个实施方案中,CD40的配体是人CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体是小鼠或大鼠CD40的配体。在一个实施方案中,CD40的配体包含一种或多种蛋白质。在一个实施方案中,CD40的配体包含在蛋白质复合物中。

[0134] 在一个实施方案中,CD40的配体包含在培养基中。在一个实施方案中,CD40的配体以其他方式包括在培养环境中,例如涂覆于容器的表面上。

[0135] 如上所述,本公开的细胞培养环境(例如细胞培养基)中包含的一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子的类型是根据要培养的细胞的具体类型来选择。

[0136] 在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子可以是IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的任一者或它们的组合。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子包含IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21中的每一者。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子或生长因子至少包含IL-2和IL-10,并且任选地包含IL-21。

[0137] 在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子被包含在培养基中。在一个实施方案中,所述一种或多种细胞因子和/或一种或多种生长因子是以其他方式包含在培养环境中,例如涂覆于容器的表面上。

[0138] 在一个实施方案中,培养环境包括含有培养基(如本文详细描述的)的容器(如上所描述)。在一个实施方案中,培养环境还可以包含容器表面上的涂层。在一个实施方案中,培养环境不包含容器表面上的涂层。

[0139] 在一个实施方案中,培养环境(例如培养基)还可以包含第一类型的细胞外基质蛋白。第一类型的细胞外基质蛋白可以包含在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白可以溶解在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。

[0140] 在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白可选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白或SPARC。在一个实施方案中,第一类型的细胞外基质蛋白是ECM1、玻连蛋白或骨桥蛋白。

[0141] 在一个实施方案中,培养环境(例如培养基)还可以包含第二类型的细胞外基质蛋白。第二类型的细胞外基质蛋白可以包含在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。在一个实施方案中,第二类型的细胞外基质蛋白可以溶解在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。

[0142] 在一个实施方案中,第二类型的细胞外基质蛋白不同于第一类型的细胞外基质蛋白并且可以选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白或SPARC。在一个实施方案中,第二类型的细胞外基质蛋白是ECM1、玻连蛋白或骨桥蛋白。

[0143] 在一个实施方案中,培养环境(例如培养基)还可以包含第三类型的细胞外基质蛋白。第三类型的细胞外基质蛋白可以包含在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。在一个实施方案中,第三类型的细胞外基质蛋白可以溶解在培养基(或要添加到其中的补充剂)中。

[0144] 在一个实施方案中,第三类型的细胞外基质蛋白不同于第一类型的细胞外基质蛋

白和第二类型的细胞外基质蛋白,并且可以选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白、玻连蛋白或SPARC。在一个实施方案中,第三类型的细胞外基质蛋白是ECM1、玻连蛋白或骨桥蛋白。

[0145] 在一个实施方案中,第二类型和第三类型的细胞外基质蛋白可以选自胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白(例如层粘连蛋白-511、层粘连蛋白-511的片段(例如层粘连蛋白511-E8)、层粘连蛋白-521(也称为层粘连蛋白11))、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、SPARC或它们的组合。

[0146] 因此,在培养环境包含培养基的方法的实施方案中,培养基中可以包含至少第一类型的细胞外基质蛋白以及以下中的一者或多者:脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子。如果培养环境中包括额外的细胞外基质蛋白(例如第二类型、第三类型和其他类型细胞外基质蛋白),则此类细胞外基质蛋白也可以包含在培养基中。

[0147] 在一个实施方案中,培养环境(例如培养基或添加到其中的补充剂)包含至少第一类型的细胞外基质蛋白、任选地第二类型的细胞外基质蛋白,以及脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子中的仅一者。在一个实施方案中,培养环境(例如培养基或添加到其中的补充剂)包含至少第一类型的细胞外基质蛋白、任选地第二类型的细胞外基质蛋白,以及脂质混合物、CD40的配体和一种或多种细胞因子中的两者。

[0148] 孵育/培养步骤可以在不同的或分阶段的培养环境中进行,例如包括第一阶段或培养环境和第二阶段或培养环境。在一个实施方案中,孵育/培养的第一阶段可以在第一培养环境中进行,其中这种第一培养环境包含至少第一类型的细胞外基质蛋白,并且孵育/培养的第二阶段可以在第二培养环境中进行,其中这种第二培养环境不包含至少第一类型的细胞外基质蛋白。在一个实施方案中,孵育/培养的第一阶段可以在第一培养环境中进行,其中这种第一培养环境不包含至少第一类型的细胞外基质蛋白,并且孵育/培养的第二阶段可以在第二培养环境中进行,其中这种第二培养环境包含至少第一类型的细胞外基质蛋白。

[0149] 应当注意,就本文所公开的任何培养环境成分/条件而言,第一和第二(或其他)阶段或培养环境可能彼此不同。例如,各阶段或环境可能在以下方面有所不同:i)脂质混合物;ii)CD40的配体;iii)一种或多种细胞因子;iv)不是第一类型的细胞外基质蛋白,而是第二和/或第三类型的细胞外基质蛋白;v)容器的涂层;和/或vi)它们的持续时间。

[0150] 在一个实施方案中,培养环境还包含施加到容器表面的涂层或功能化。在培养环境包含培养基和施加到容器表面的涂层/功能化的实施方案中,容器表面上的涂层可以包含第一类型的细胞外基质蛋白、第二类型的细胞外基质蛋白和第三类型的细胞外基质蛋白中的一者或多者。在这种实施方案中,培养基还可以包含一种或多种类型的细胞外基质蛋白。

[0151] 在一个实施方案中,使用本公开的方法培养的淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞不与饲养层细胞或未限定的细胞载体(例如基质),例如Matrigel™接触。因此,本公开的方法可支持淋巴细胞或其祖细胞的无饲养层扩增。

[0152] 在一个实施方案中,使用本公开的方法培养的淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞不与动物来源的成分接触。因此,本公开的方法可支持淋巴细胞或其祖细胞的无动物成分扩增。在一个实施方案中,无动物成分工作流程可以是无血清工作流程。

[0153] 总体而言,本公开的方法的实践(和培养基的使用)可以产生扩增的哺乳动物淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞群体。更具体地说,本公开的方法的实践(和培养基的使用)可使哺乳动物淋巴细胞(例如B细胞、NK细胞或T细胞)或其祖细胞增加高达1000倍,或高达5000倍,或高达10,000倍,或高达15,000倍,或高达20,000倍,或高达25,000倍或更高倍数。

[0154] 在一个实施方案中,本公开的方法将支持5次或更多、10次或更多、15次或更多、20次或更多、25次或更多、30次或更多、35次或更多、40次或更多、45次或更多、50次或更多、55次或更多,或者60次或更多的群体倍增次数。

[0155] 在一个实施方案中,使用本公开的方法扩增的哺乳动物淋巴细胞(例如T细胞、NK细胞或B细胞)或其祖细胞表达扩增的淋巴细胞谱系特有的标志物。在一个实施方案中,超过30%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞和/或T细胞谱系特有的一种或多种标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过40%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞和/或T细胞谱系特有的一种或多种标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过50%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞和/或T细胞谱系特有的一种或多种标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过60%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞和/或T细胞谱系特有的一种或多种标志物呈阳性。在一个实施方案中,超过70%的扩增细胞对哺乳动物B细胞、NK细胞或T细胞谱系特有的一种或多种标志物呈阳性。

[0156] 在一个实施方案中,本公开的方法还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中(例如在扩增期间)的分化/成熟(例如从更原始的命运到更具体的命运)。在一个实施方案中,10%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,20%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,30%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,40%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。在一个实施方案中,50%或更多的B细胞、NK细胞或T细胞或者其祖细胞分化/成熟。

[0157] 在一个实施方案中,本公开的方法(所述方法可支持淋巴细胞(例如B细胞或T细胞)或其祖细胞在培养环境中分化)涉及孵育步骤。在一个实施方案中,孵育步骤是1-15天。在一个实施方案中,孵育步骤超过1天。在一个实施方案中,孵育步骤是至少3天。

[0158] 在一个实施方案中,本公开的方法还可支持淋巴细胞或其祖细胞在培养环境中(例如在培养基中孵育时),例如在扩增和/或分化期间的活化。

[0159] 以下非限制性实施例说明本公开。

[0160] 实施例

[0161] 实施例1:处理血液样本以富集B系细胞

[0162] 使用EasySep™人泛B细胞富集试剂盒(STEMCELL Technologies)从人外周血单核细胞(PBMC,即白细胞分离术样本)中富集泛B细胞。在使用荧光DRAQ7染料染色后,通过流式细胞术分析评估白细胞分离术样本中的细胞以及自其富集的B系细胞的存活率(图1)。此外,使用针对表面标志物CD19、CD20、CD86和CD138的荧光标记抗体,通过流式细胞术评估从白细胞分离术样本中富集的B系细胞的纯度和活化状态(图1)。

[0163] 实施例2:接种和培养富集的B系细胞

[0164] 按照实施例1所描述,富集泛B细胞,并将单个泛B细胞分选到96孔板的相应孔中

(BD FACSAria™Fusion细胞分选仪)。除非另有指示,否则每个孔均包括ImmunoCult™-XF B细胞基础培养基(STEMCELL Technologies),所述培养基补充有人CD40的配体(多个供应商,包括STEMCELL Technologies)、一种或多种细胞外基质蛋白(STEMCELL Technologies和其他商业来源)、脂质混合物(STEMCELL Technologies)以及一种或多种细胞因子(STEMCELL Technologies)。本研究中显示的用于扩增单个细胞的细胞外基质蛋白包括胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中的一者或多者,并且优选胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中的一者或多者。在扩展方案期间,使用Olympus Q Colour 3显微镜以40X放大率定期对孔进行成像。

[0165] 实施例3:单个B细胞在外源添加的可溶性细胞外基质蛋白存在下明显扩增

[0166] 基本上按照实施例1和2中所描述富集泛B细胞并接种,并藉由使用Solentim Cell Metric显微镜在40X放大率下成像来确认在第0天时每个孔中平板接种了一个泛B细胞(以白色圆圈表示)(图2)。培养9天和12天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜以40X放大率对各孔进行成像(图2)。将单个B细胞接种并培养于培养基配制物中,所述培养基配制物包括三种外源添加的细胞外基质蛋白的不同成对组合(条件1、2和3)以及全部三种蛋白(条件4)。在第9天和第12天观察时,条件1、2、3和4分别表现出明显的扩增。相比之下,在第9天,在含有仅接种到基础培养基中的细胞的孔中无法轻易观察到扩增。用于实施本实施例的细胞外基质蛋白可以从胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中选出,并且优选从胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中选出。

[0167] 实施例4:单个B细胞在外源添加的单独细胞外基质蛋白存在下明显扩增

[0168] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例3中所用不同的白细胞分离术样本中富集泛B细胞并接种。在培养5天和12天后,用Olympus Q Colour 3显微镜在40X放大率下对各个孔进行成像(图3)。将单个B细胞接种并培养于培养基配制物中,所述培养基配制物包括不同的单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1和2)以及两种蛋白质的组合(条件3)。在两个时间点,所有测试条件均引起接种细胞的扩增(图3)。用于实施本实施例的细胞外基质蛋白可以从胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中选出,并且优选从胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中选出。

[0169] 实施例5:细胞外基质蛋白组合的协同作用

[0170] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例3和4中所用不同的白细胞分离术样本中富集泛B细胞并接种。在培养5天和12天后,用Olympus Q Colour 3显微镜在40X放大率下对各个孔进行成像(图4)。将单个B细胞接种并培养于培养基配制物中,所述培养基配制物包括不同的单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1、2和3)以及两种蛋白质的不同成对组合(条件4和5)。在两个时间点,所有测试条件都引起接种细胞的扩增,但组合处理看来产生更多的扩增(图4)。用于实施本实施例的细胞外基质蛋白可以从胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中选出,并且优选从胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中选出。

[0171] 实施例6:单个B细胞在人CD40配体存在下的扩增增强

[0172] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例5中所用相同的白细胞分离术样本中富集泛B细胞并接种。在培养5天和12天后,用Olympus Q Colour 3显微镜在40X放大率下对各个孔进行成像(图5)。将单个B细胞接种到培养基中,所述培养基包括单独外源添加的

细胞外基质蛋白(从实施例2中列举的优选清单中选择),但包括或缺乏外源添加的人CD40的配体。在两种条件下和两个时间点均观察到接种的单个B细胞的扩增,但其扩增在CD40配体存在下得到增强(图5)。

[0173] 实施例7:单个B细胞在其他单独可溶性细胞外基质蛋白存在下扩增

[0174] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例3中相同的供体富集泛B细胞并接种。在培养7天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜在40X放大率下对各孔进行成像(图6)。条件1和2包括与本文先前实施例中所测试不同的单独外源添加的细胞外基质蛋白,但测试的细胞外基质蛋白仍然选自:胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC,并且优选地选自胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白。到第7天时,两种测试条件都引起接种细胞的明显扩增(图6)。

[0175] 实施例8:脂质在单个B细胞扩增中的作用

[0176] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例3中相同的供体富集泛B细胞并接种。在培养5天和12天后,使用Olympus Q Colour3显微镜在40X放大率下对各孔进行成像(图7)。为了评估脂质在B细胞扩增中的作用,将单个B细胞接种到培养基配制物中,所述培养基配制物包含不同的脂质补充剂(不含动物成分的脂质混合物1和稳定的脂质混合物2,均来自STEMCELL Technologies),但除此之外,还包括相同的单一外源添加的细胞外基质蛋白(从实施例2中列举的优选清单中选择)。培养12天后,单个B细胞在脂质存在下表现出扩增,但在无脂质存在下没有明显的扩增(图7)。

[0177] 实施例9:扩增B细胞的分化和活化

[0178] 基本上按照实施例1和2中所描述,从与实施例3中相同的供体富集泛B细胞并接种。使细胞在培养基中培养扩增13天,所述培养基包括不同的单独外源添加的细胞外基质蛋白(条件1和2)(图8)。用于实施本实施例的细胞外基质蛋白可以从胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中选出,并且优选从胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中选出。

[0179] 经过13天的培养方案后,使用针对CD19、CD20、CD86和CD138的荧光标记抗体,通过流式细胞术评估产生的细胞的活化和分化状态(图8)。在全部三种测试条件下,接种的泛B细胞均活化并从原始表型分化为更成熟的表型。B细胞活化标志物CD86的水平升高表明泛B细胞的活化。泛B细胞向B系细胞的分化是通过CD19和CD20表面标志物的表达水平降低以及分化标志物CD138的表达水平增加显示。

[0180] 实施例10:细胞因子对单个B细胞扩增的影响

[0181] 基本上按照实施例1和2中所描述富集泛B细胞并接种。在培养13天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜在40X放大率下对各孔进行成像(图9)。用于实施本实施例的细胞外基质蛋白可以从胶原蛋白、ECM1、E-钙粘蛋白、层粘连蛋白、骨桥蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白或SPARC中选出,并且优选从胶原蛋白、ECM1、层粘连蛋白、骨桥蛋白和玻连蛋白中选出。

[0182] 为了评估细胞因子在单个B细胞扩增中的作用,将细胞接种到培养基中,所述培养基包括单独外源添加的细胞外基质蛋白(从实施例2中列举的优选清单中选择),但其中包括的细胞因子有所不同:IL-2和IL-10(条件1);以及IL-2、IL-4、IL-6、IL-10和IL-21(条件2)。对照条件包括:未添加补充剂的基础培养基(对照1);补充有细胞因子但未外源添加细

胞外基质蛋白的基础培养基(对照2);以及补充有细胞外基质蛋白但未添加细胞因子的基础培养基(对照3)。培养13天后,单个B细胞在条件1和2下表现出明显的扩增,但在对照条件1中没有明显的扩增(图9)。

[0183] 实施例11:定量单个B细胞的扩增

[0184] 基本上按照实施例1和2中所描述,富集泛B细胞并接种。在培养13天后,使扩增的细胞沉淀以去除上清液,用冷PBS洗涤并用胰蛋白酶消化。然后,使用细胞刮刀收获细胞,并使用Nucleocounter计数以评估从单个B细胞的扩增情况。在第一个实验中,测试了三个不同的外源添加的细胞外基质蛋白组合,并且扩增的细胞的近似数量范围在2400-15,000个细胞/输入细胞之间(未显示数据)。在第二个实验中,测试了单一细胞外基质蛋白和两种细胞外基质蛋白的组合,并且扩增的细胞的近似数量范围在2000-7000个细胞/输入细胞之间(未显示数据)。在第三个实验中,测试了单一细胞外基质蛋白和两种细胞外基质蛋白的组合,并且扩增的细胞的近似数量范围在15000-46000个细胞/输入细胞之间(未显示数据)。因此,即使考虑到完全解离扩增细胞的潜在困难,仍可在各种培养基条件下实现令人印象深刻的扩增水平。

[0185] 实施例12:单个B细胞在不同基础培养基中的扩增

[0186] 基本上按照实施例1和2中所描述,富集泛B细胞并接种。在单独外源添加的细胞外基质蛋白(从实施例2中列举的优选清单中选择)存在下,将单个B细胞接种并培养于不同的市售基础培养基中,如图10中所示。在培养13天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜以40X放大率对各细胞进行成像(图10)。在未补充细胞外基质蛋白的基础培养基的对照条件下未观察到生长。相比之下,当外源添加的细胞外基质蛋白在RPMI或DMEM F-12中稀释时观察到明显扩增(图10,白色箭头),而当在IMDM或ImmunoCult™ XF中稀释时观察到明显扩增(图10)。

[0187] 实施例13:单个人记忆B细胞在外源添加的细胞外基质蛋白存在下扩增

[0188] 使用EasySep™人记忆B细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)从白细胞分离样本中富集并分离人记忆B细胞。将单个记忆B细胞接种(如上所述)到培养基中,所述培养基包括两种不同的、外源添加的细胞外基质蛋白(条件1)或三种不同的、外源添加的细胞外基质蛋白(条件2)。在培养13天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜以40X放大率对孔中的细胞进行成像(图11)。在条件1和条件2下都观察到单个记忆B细胞的明显扩增。

[0189] 实施例14:单个人记忆B细胞的扩增

[0190] 用CD19、CD27、CD38、CD138、IgM、IgG和DRAQ7抗体对按照实施例1所描述从PBMC分离的人泛B细胞进行染色。在第0天,将单个活的$CD19^{+}CD27^{+}CD38^{-}CD138^{-}IgM^{+}IgG^{-}$-记忆B细胞分选到96孔板的相应孔中(BD FACSAria™Fusion细胞分选仪),并在实施例2所包含的培养基中培养长达4天,所述培养基包含单独外源添加的细胞外基质蛋白。在第5天,将每个孔中的细胞转变为基本上如实施例2所包含的培养基配制物,但该培养基配制物中没有补充外源添加的细胞外基质蛋白。从第5天起,每2-3天进行一次全培养基更换。在总计培养12天后,收获输出细胞并计数(基本上如实施例11中所描述),并计算出活细胞倍数扩增为25,000±1549个(图12A)。另外,通过ELISA测试第12天的扩增人体细胞,并检测到抗体标志物IgM和IgG的明显分泌(图12B)。最后,通过流式细胞术评估第0天的分选单细胞和第12天的扩增人体细胞中各种细胞表面标志物的表达。结果表明,单个记忆B细胞扩增成包含记忆B

细胞、抗体分泌细胞和浆母细胞的B细胞群(图12C)。结果还显示,在第12天的扩增细胞中:i)人B细胞标志物CD38的表达增加,这与抗体分泌细胞的增加相关;ii)抗体标志物IgG增加且IgM减少,表明B细胞类别转换;iii)活化标志物CD86增加(未显示);以及iv)分化标志物CD138增加,表明记忆B细胞分化为浆母细胞。

[0191] 实施例15:单个人浆母细胞的扩增

[0192] 基本上按照实施例14所描述,分离人泛B细胞并用抗体染色。在第0天,将单个活的$CD19^{+}CD27^{-}CD138^{+}$人浆母细胞分选到96孔板的相应孔中,并按照实施例14中所描述进行培养。在总计培养12天后,收获输出细胞并计数(基本上如实施例11中所描述),并计算出活细胞倍数扩增为9,000±1645个(图13A)。另外,通过ELISA测试第12天的扩增人体细胞,并检测到抗体标志物IgM和IgG的明显分泌(图13B)。最后,通过流式细胞术评估第0天的分选单细胞和第12天的扩增人体细胞中各种细胞表面标志物的表达。结果表明,单个人浆母细胞扩增成包含记忆B细胞、抗体分泌细胞和浆母细胞的B细胞群(图13C)。结果还显示,在第12天的扩增细胞中:i)人浆母细胞标志物CD38和CD27的表达增加,表明抗体分泌细胞增加;ii)抗体标志物IgG增加且IgM减少,表明B细胞类别转换;以及iii)分化标志物CD138的表达减少。

[0193] 实施例16:单个小鼠泛B细胞在外源添加的细胞外基质蛋白存在下扩增

[0194] 使用EasySep™小鼠泛B细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies)从C57 BL/6小鼠中富集小鼠泛B细胞。在第0天,将单个B细胞分选到96孔板的相应孔中(BD FACSAria™Fusion细胞分选仪),并在基本上如实施例2中所描述的培养基配制物中培养,所述培养基配制物包含一种外源添加的细胞外基质蛋白(从实施例2中列举的优选清单选择)。在培养13天后,使用Olympus Q Colour 3显微镜以40X放大率对孔中的细胞进行成像(图14)。小鼠单个B细胞看来在两种测试条件下均扩增。

[0195] 实施例17:单个小鼠记忆B细胞的扩增

[0196] 使用EasySep™小鼠泛B分离试剂盒(STEMCELL Technologies)从C57 BL/6小鼠中富集并分离小鼠泛B细胞,并用CD19、CD45R、CD138和DRAQ7抗体染色。在第0天,将单个活的$CD19^{+}CD45R^{+}CD138^{-}$小鼠记忆B细胞分选到96孔板的相应孔中(BD FACSAria™Fusion细胞分选仪),并在实施例16所包含的培养基中培养长达4天,所述培养基包含单独的外源添加的细胞外基质蛋白。在第5天,将每个孔中的细胞转变为基本上如实施例2所包含的培养基配制物,但该培养基配制物中没有补充外源添加的细胞外基质蛋白。从第5天起,每2-3天进行一次全培养基更换。在总计培养12天后,收获输出细胞并计数(基本上如实施例11中所描述),并计算出活细胞倍数扩增为10,000±1423个(图15A)。另外,通过ELISA测试第12天的扩增小鼠记忆B细胞,并检测到抗体标志物IgG的明显分泌(图15B)。最后,通过流式细胞术评估第0天的分选单细胞和第12天的扩增小鼠细胞中各种细胞表面标志物的表达。结果表明,单个记忆B细胞扩增成包含记忆B细胞、抗体分泌细胞和浆母细胞的B细胞群(图15C)。结果还显示,在第12天的扩增细胞中:i)CD45R减少且CD138增加,表明记忆细胞分化为浆母细胞;ii)抗体标志物IgG增加且IgM减少,表明B细胞类别转换;以及iii)分化标志物CD138增加。

[0197] 实施例18:单个小鼠浆母细胞的扩增

[0198] 基本上按照实施例17所描述,分离小鼠泛B细胞并用抗体染色。在第0天,将单个活

的CD19^{+}CD138^{+}小鼠浆母细胞分选到96孔板的相应孔中(BD FACSAria^{TM}Fusion细胞分选仪),并按照实施例17中所描述进行培养。在总计培养12天后,收获输出细胞并计数(基本上如实施例11中所描述),并计算出活细胞倍数扩增为13,000±600个(图16A)。另外,通过ELISA测试第12天的扩增小鼠记忆B细胞,并检测到抗体标志物IgG的明显分泌(图16B)。最后,通过流式细胞术评估第0天的分选单细胞和第12天的扩增小鼠细胞中各种细胞表面标志物的表达。结果表明,单个记忆B细胞扩增成B细胞群,所述细胞群包含记忆B细胞、抗体分泌细胞和浆母细胞(图16C)。结果还显示,在第12天的扩增细胞中:i)浆母细胞标志物CD38的表达增加,表明抗体分泌细胞增加;ii)抗体标志物IgG增加且IgM减少,表明B细胞类别转换;以及iii)分化标志物CD138的表达减少。

[0199] 实施例19:单个T细胞的扩增

[0200] 从C57 BL/6小鼠分离出小鼠脾细胞,并用CD3和DRAQ7抗体染色。在第0天,将单个活的CD3^{+}小鼠T细胞分选到96孔板的相应孔中(BD FACSAria^{TM}Fusion细胞分选仪),并在实施例16所包含的培养基中培养长达4天,所述培养基包含单独的外源添加的细胞外基质蛋白。在第5天,将每个孔中的细胞转变为基本上如实施例2所包含的培养基配制物,但该培养基配制物中没有补充外源添加的细胞外基质蛋白。从第5天起,每2-3天进行一次全培养基更换。转变为第二培养环境之后7天(共12天),收获输出细胞并计数(基本上如实施例11中所描述),并计算出活细胞倍数扩增>10,000±1423个(图17A)。此外,在培养12天后,通过流式细胞术分析输出细胞中CD8a(T细胞标志物)、CD25(T细胞活化标志物)和CD69(T细胞活化标志物)的表面表达(图17B)。在使用CD3和DRAQ7抗体对PBMC样本染色后,对分选的人T细胞执行与本实施例中所描述类似的工作流程。图17C描绘了单个活的人CD3+T细胞的扩增规模,所述细胞被分选到96孔板的孔中,并在基本上如实施例2中所描述的培养基中培养12天。

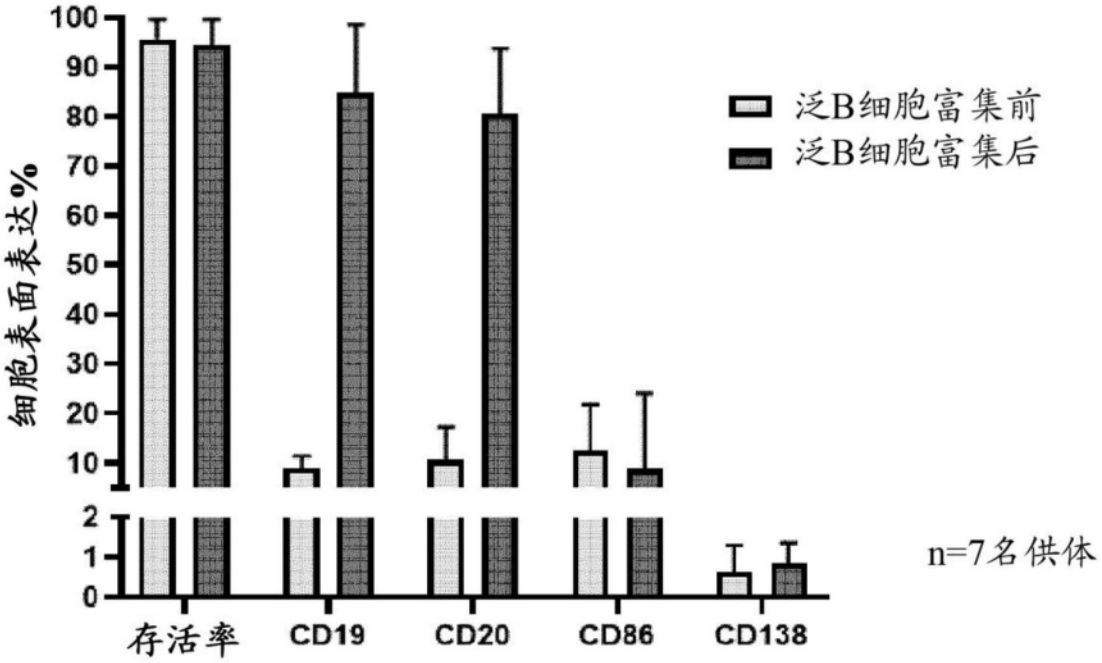

细胞表面表达%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
2
1
0
泛B细胞富集前
泛B细胞富集后
n=7名供体
存活率
CD19
CD20
CD86
CD138

图1

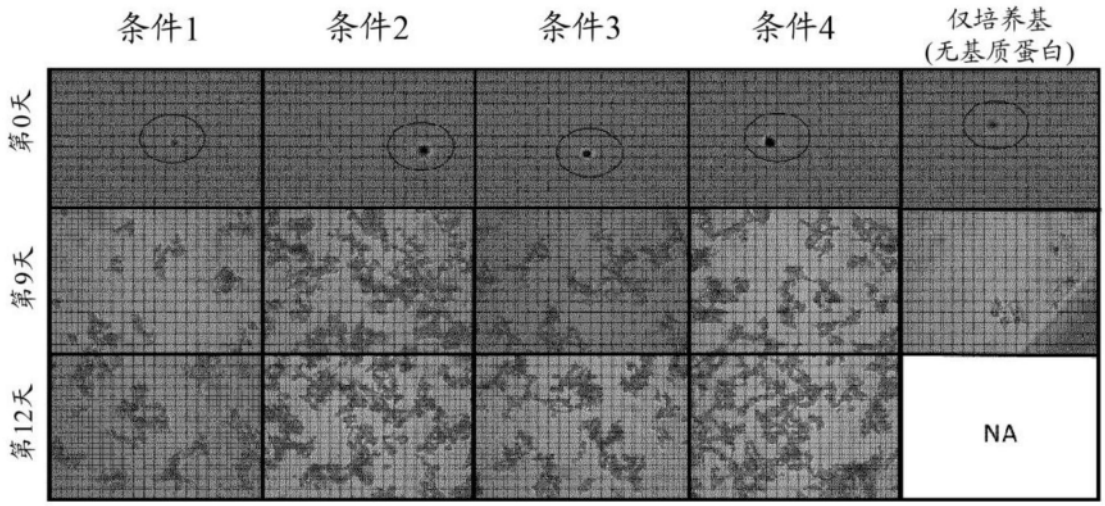

条件1
条件2
条件3
条件4
仅培养基
(无基质蛋白)
第0天
第9天
第12天
NA

图2

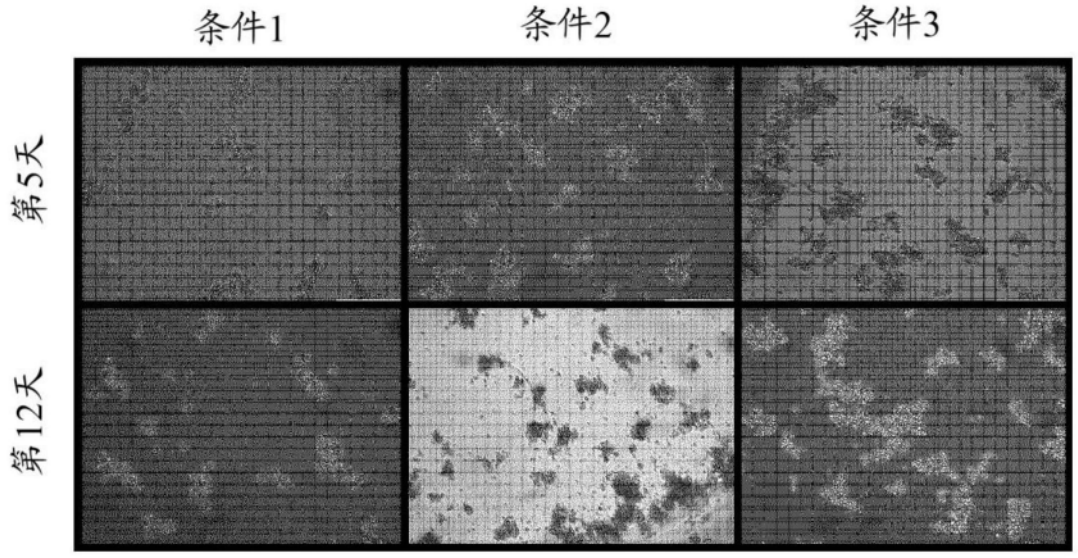


图3

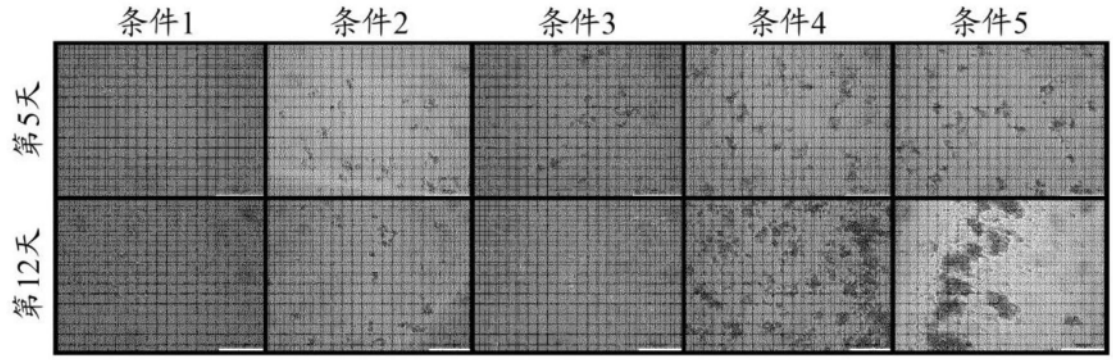


图4

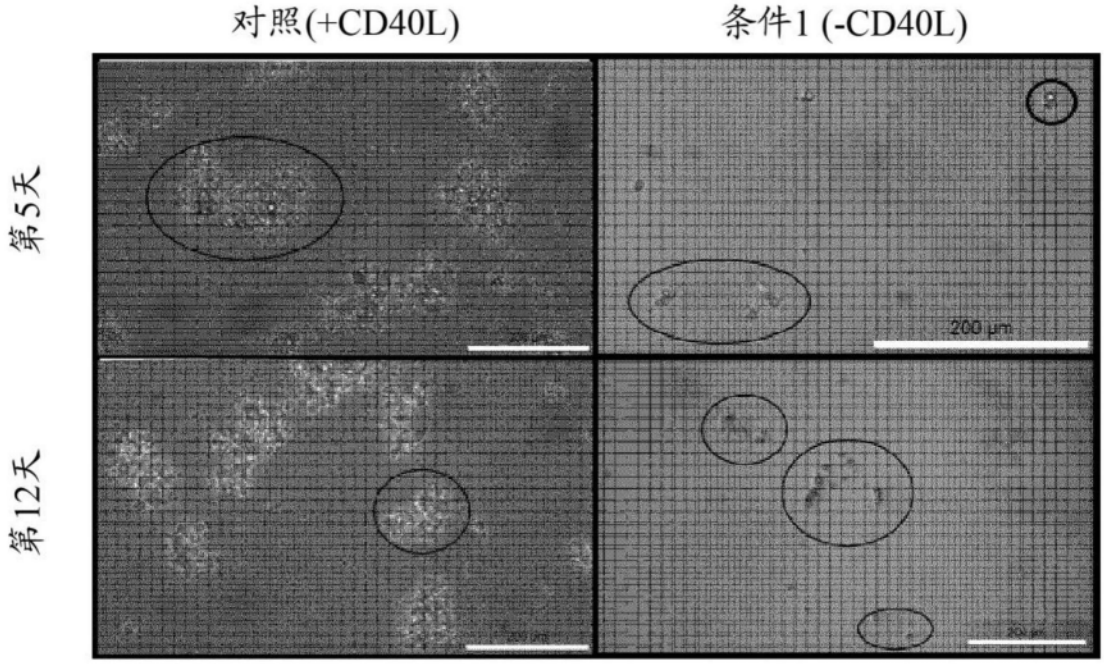

对照(+CD40L)
条件1 (-CD40L)
第5天
第12天
200 μm

图5

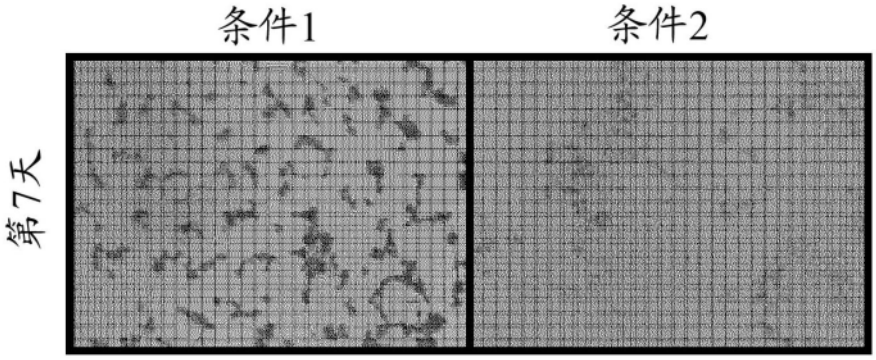

条件1
条件2
第7天

图6

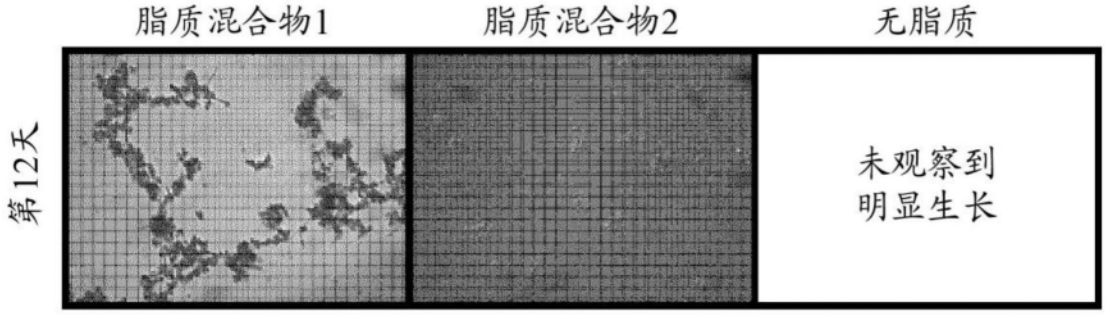

脂质混合物1
脂质混合物2
无脂质
第12天
未观察到
明显生长

图7

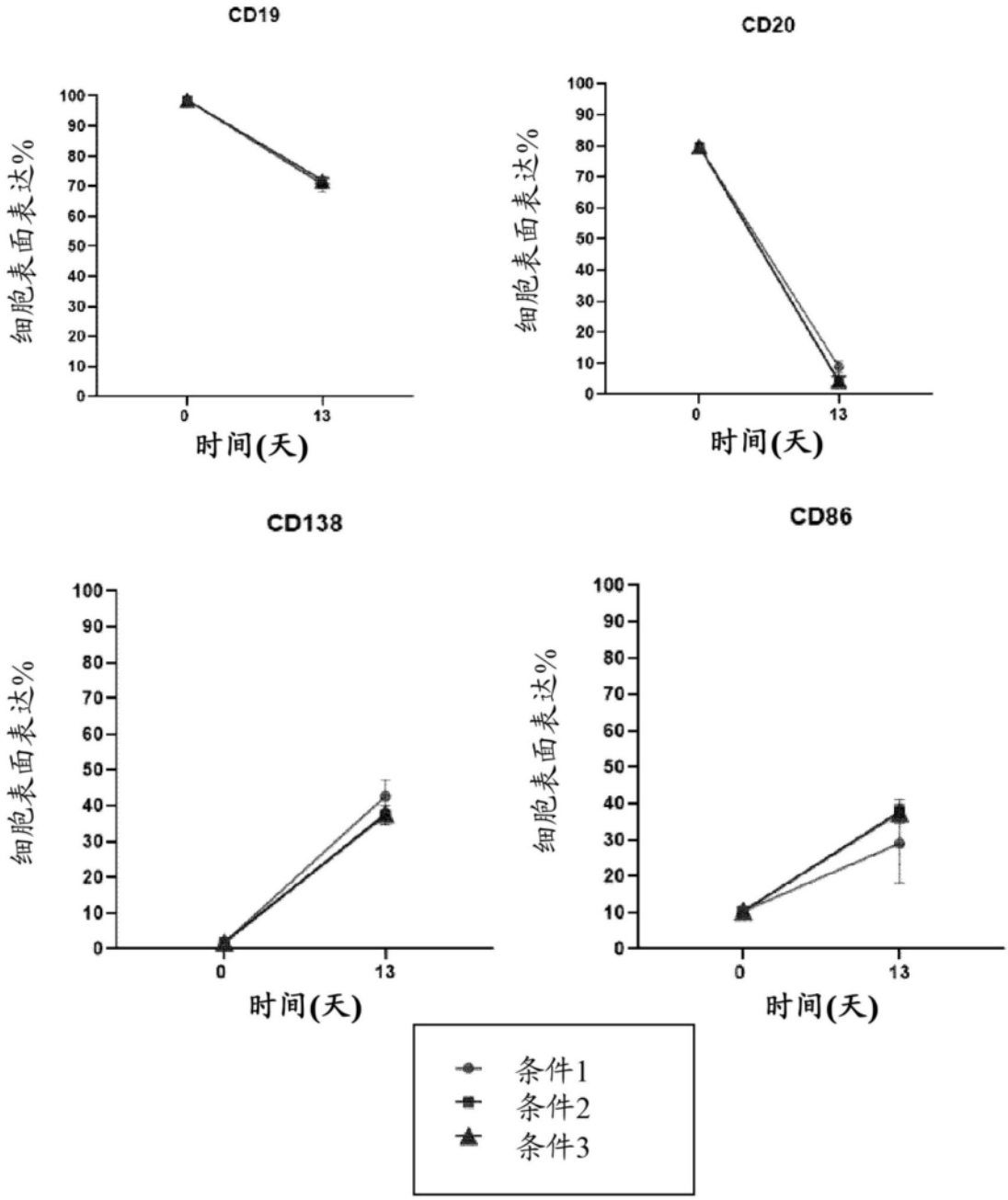

CD19
CD20
CD138
CD86
细胞表面表达%
时间(天)
0
13
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
条件1
条件2
条件3

图8

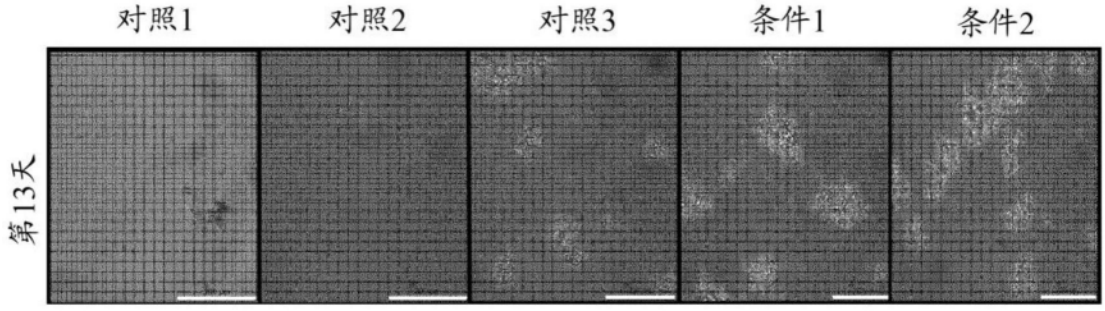

对照1
对照2
对照3
条件1
条件2
第13天

图9

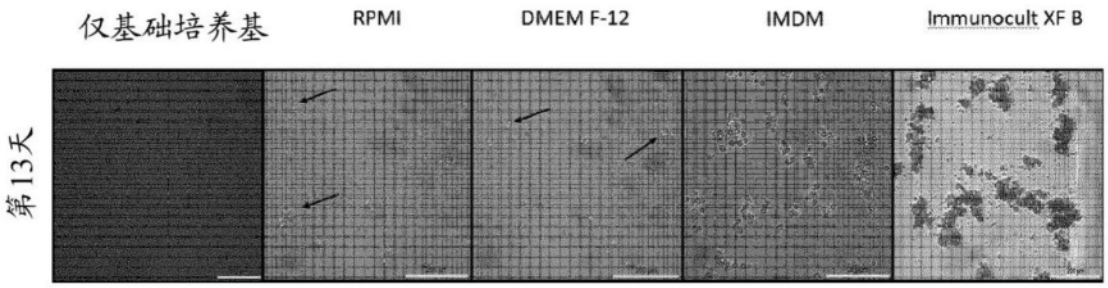

仅基础培养基
RPMI
DMEM F-12
IMDM
Immunocult XF B
第13天

图10

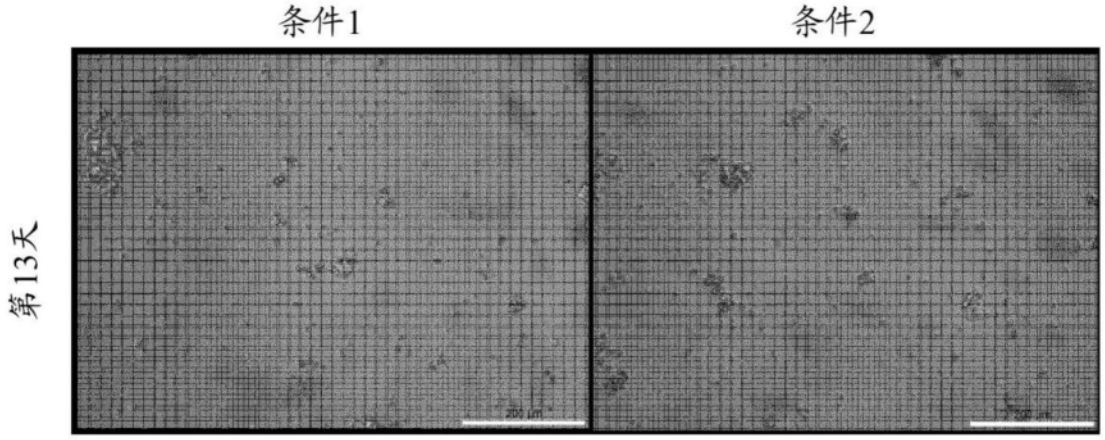

条件1
条件2
第13天

图11

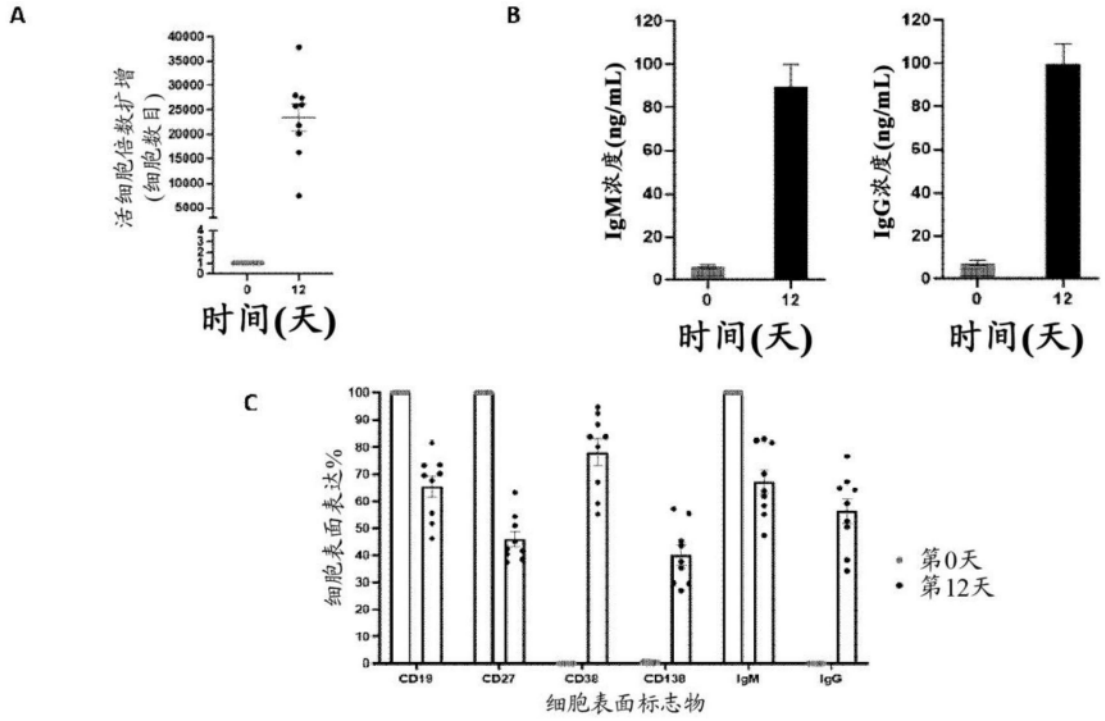

A
活细胞倍数扩增
(细胞数目)
时间(天)
B
IgM浓度(ng/mL)
IgG浓度(ng/mL)
时间(天)
C
细胞表面表达%
CD19
CD27
CD38
CD138
IgM
IgG
细胞表面标志物
第0天
第12天

图12

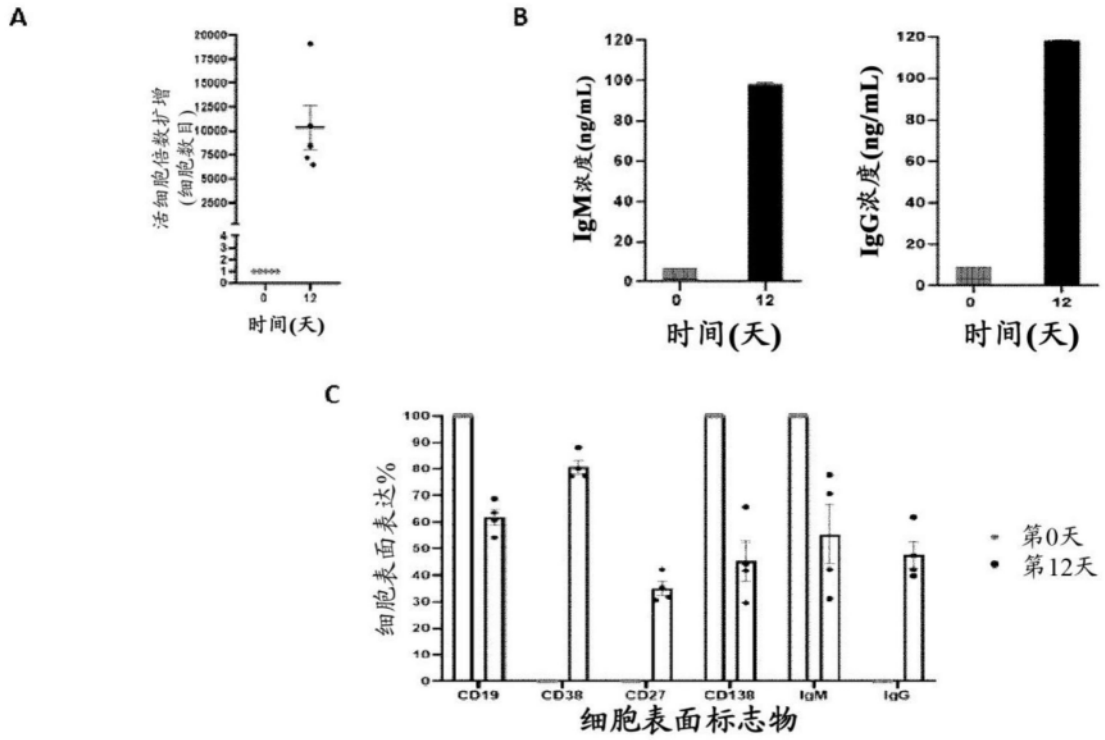

A
活细胞倍数扩增
(细胞数目)
时间(天)
B
IgM浓度(ng/mL)
IgG浓度(ng/mL)
时间(天)
C
细胞表面表达%
CD19
CD38
CD27
CD138
IgM
IgG
细胞表面标志物
第0天
第12天

图13

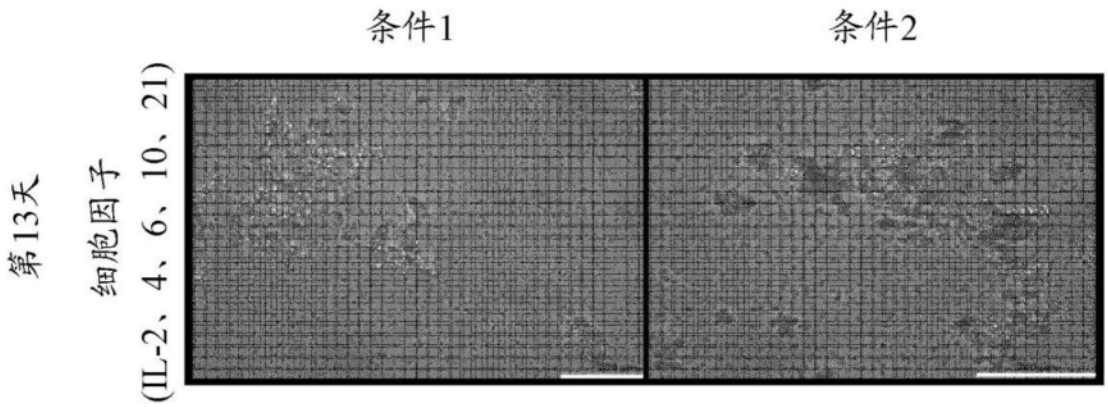

条件1
条件2
第13天
细胞因子
(IL-2、4、6、10、21)

图14

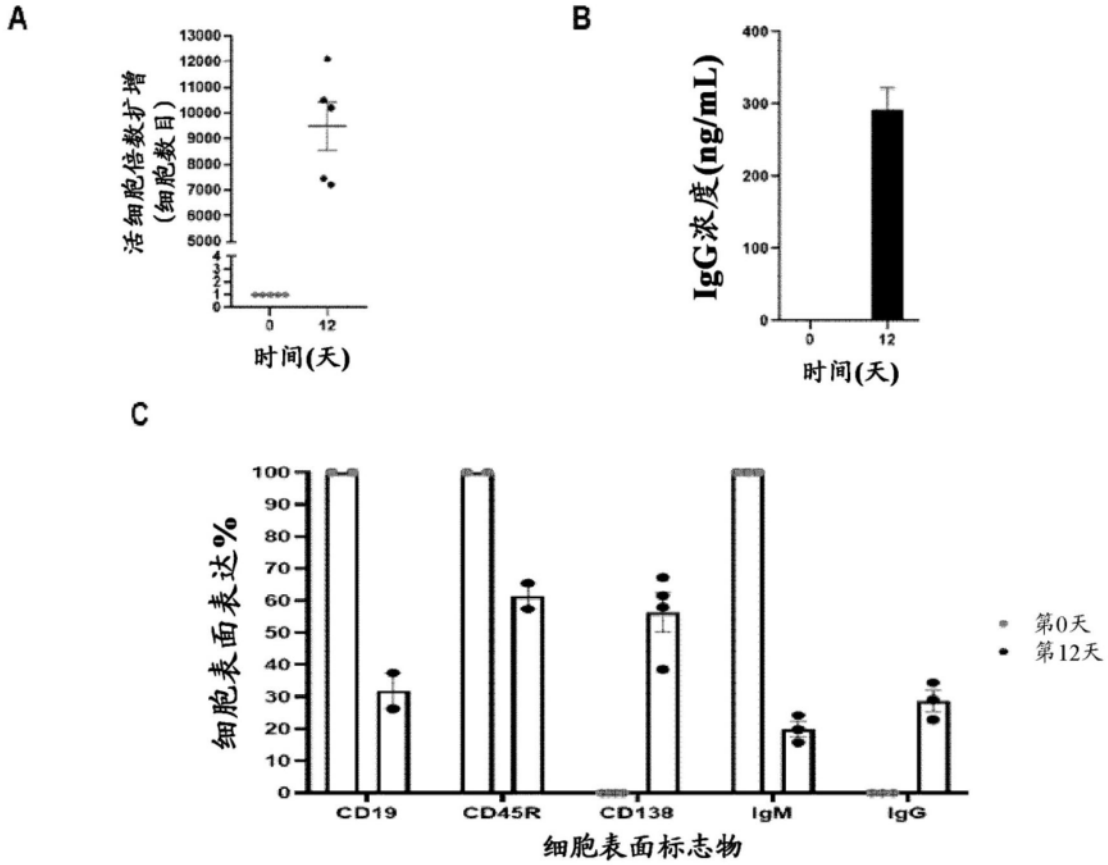

A
活细胞倍数扩增
(细胞数目)
时间(天)
B
IgG浓度(ng/mL)
时间(天)
C
细胞表面表达%
CD19
CD45R
CD138
IgM
IgG
细胞表面标志物
第0天
第12天

图15

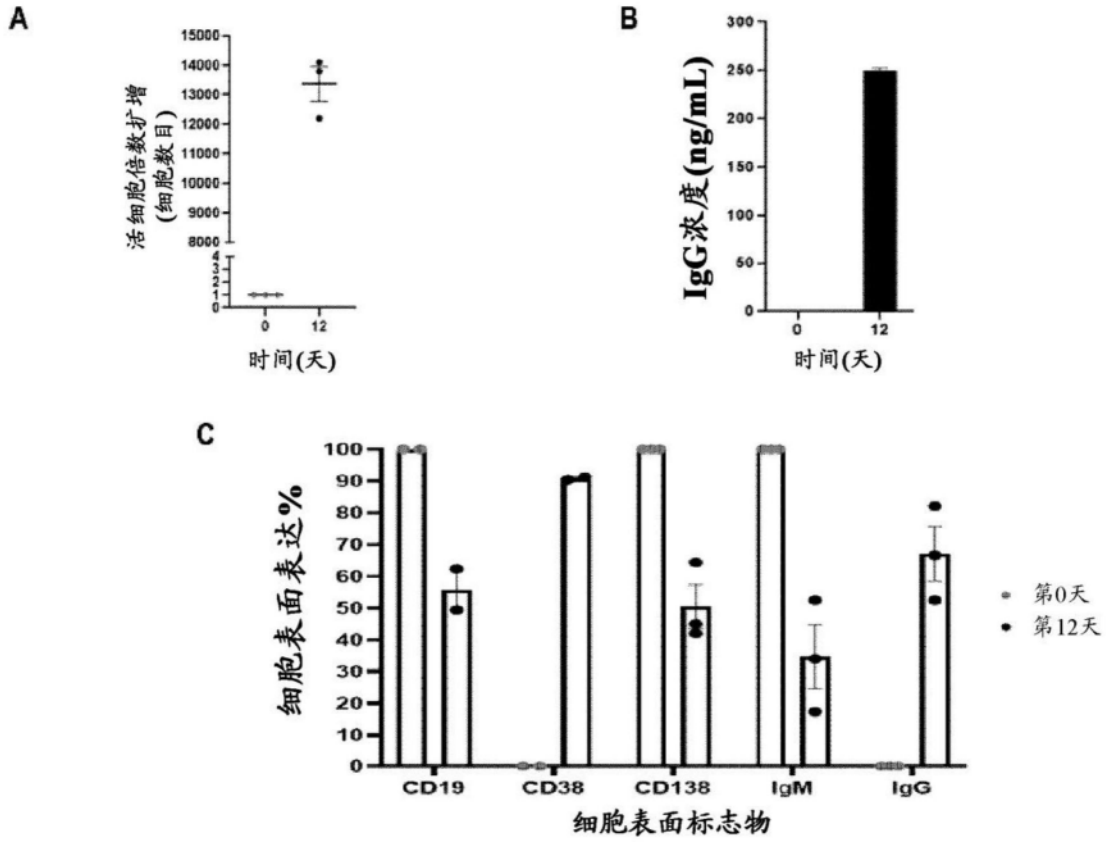

A
活细胞倍数扩增
(细胞数目)
15000
14000
13000
12000
11000
10000
9000
8000
0
12
时间(天)
B
IgG浓度(ng/mL)
300
250
200
150
100
50
0
0
12
时间(天)
C
细胞表面表达%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD19
CD38
CD138
IgM
IgG
细胞表面标志物
第0天
第12天

图16

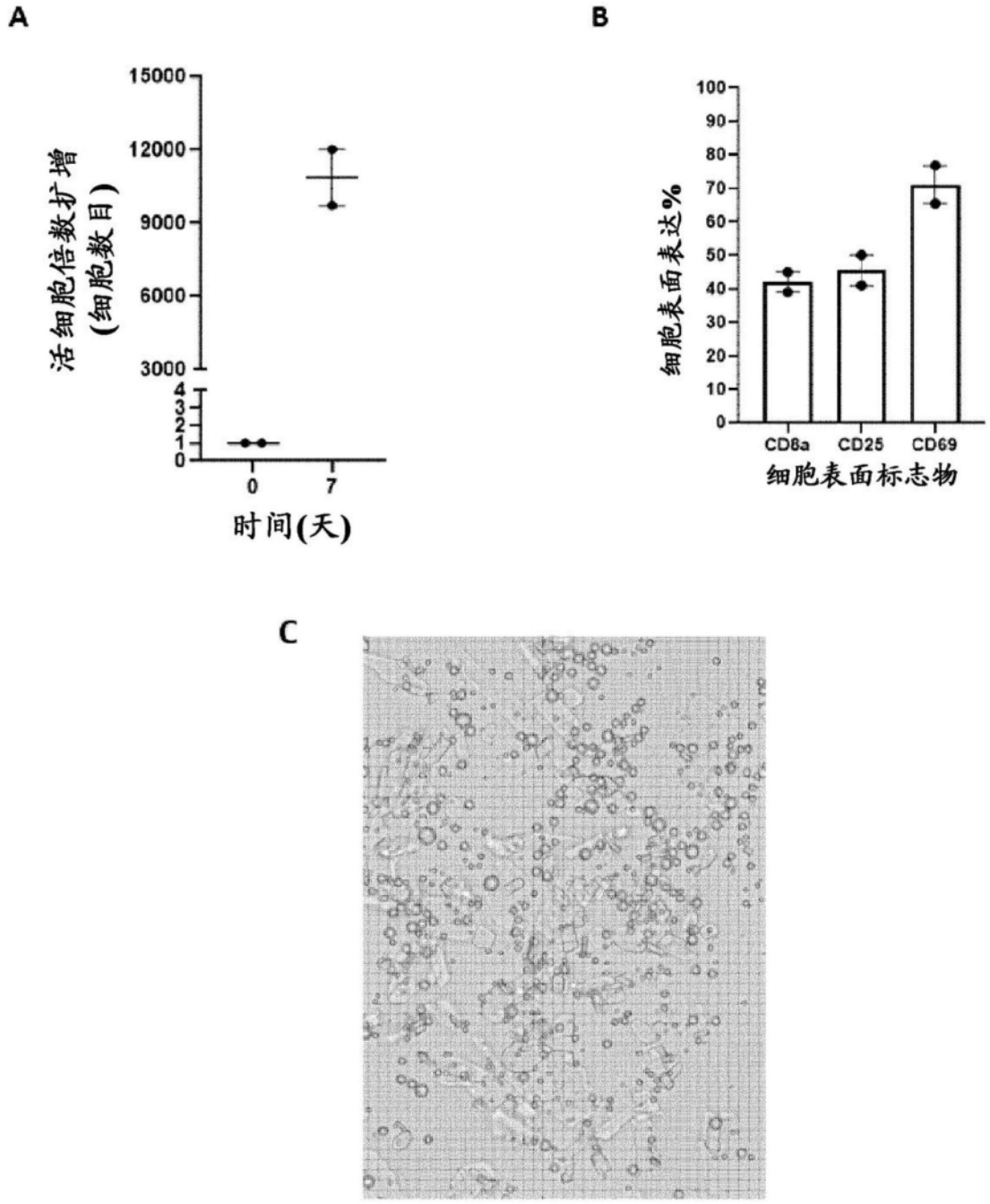

A
活细胞倍数扩增
(细胞数目)
15000
12000
9000
6000
3000
4
3
2
1
0
0
7
时间(天)
B
细胞表面表达%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD8a
CD25
CD69
细胞表面标志物
C

图17