



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113474654 A

(43) 申请公布日 2021.10.01

(21) 申请号 201980088347.7

(22) 申请日 2019.12.04

(30) 优先权数据

62/775,073 2018.12.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.07.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/064535 2019.12.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/117975 EN 2020.06.11

(71) 申请人 伊索普莱克西斯公司

地址 美国康涅狄格

(72) 发明人 R·郑 S·麦凯

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

代理人 李程达

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

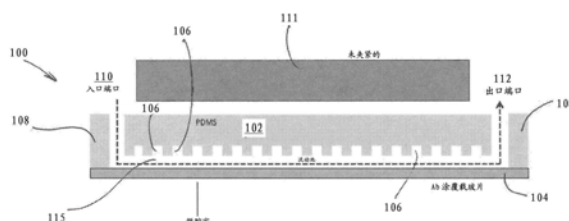
权利要求书5页 说明书27页 附图10页

### (54) 发明名称

用于鉴定、选择性消融和选择以及收集单细胞的系统、装置和方法

### (57) 摘要

本公开内容的实施方案涉及用于从异质细胞群中选择性收集细胞的系统、装置和方法,其包括分泌的和细胞内的大分子的高度多重化检测和被鉴定为针对给定生物标志物或表型呈阳性或阴性的细胞的靶向的激光辅助消融。产生的未消融的细胞可以单独收集或合并以形成同质细胞群以用于进一步处理,包括安全有效的细胞疗法。



1. 一种用于选择性收集和分选细胞中的至少一个操作的选择性细胞收集和/或分选方法,其包括:

将细胞和一定体积的流体装载或以其他方式放置到基板的多个分离的腔室中的每一个中,其中:

所述基板包括第一表面,所述第一表面可释放地偶联到具有第二表面的透明盖,从而形成组件,

所述第二表面具有多个捕获剂,以及

所述一定体积的流体与所述第二表面流体连通;

在一个或多个条件下维持每个细胞,所述条件足以允许:

通过每个细胞产生一个或多个细胞组分,以及

所述一个或多个细胞组分被配置为与所述表面的至少一个捕获剂结合以形成至少一个捕获剂细胞组分复合物;

对于每个细胞,检测所述至少一个捕获剂细胞组分复合物;

鉴定用于收集和去除中的至少一个操作的至少一个细胞;和

收集所述至少一个细胞。

2. 权利要求1的方法,其还包括消融被鉴定用于去除的细胞。

3. 权利要求2的方法,其中所述消融包括使包括用于去除的细胞的相应分离的腔室与激光接触。

4. 权利要求3的方法,其中所述激光被配置为裂解细胞。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中多个细胞包括异质细胞群。

6. 权利要求5的方法,其中所述异质细胞群是功能异质细胞群。

7. 权利要求6的方法,其中:

所述功能异质细胞群包含响应刺激而产生分泌蛋白组的至少两个细胞,

所述至少两个细胞中的第一个细胞产生第一分泌蛋白组,

所述至少两个细胞中的第二个细胞产生第二分泌蛋白组,和

其中所述第一分泌蛋白组和所述第二分泌蛋白组不相同。

8. 权利要求6的方法,其中所述功能异质细胞群包括一个或多个免疫细胞。

9. 权利要求8的方法,其中所述一个或多个免疫细胞包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。

10. 权利要求9的方法,其中所述T淋巴细胞包括天然T淋巴细胞、活化的T淋巴细胞、效应T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆性T淋巴细胞或记忆性干T淋巴细胞。

11. 权利要求9或10的方法,其中所述T淋巴细胞表达以下至少一个:

非天然存在的抗原受体;和

嵌合抗原受体(CAR)。

12. 权利要求9的方法,其中所述B淋巴细胞包括浆母细胞、浆细胞、记忆B淋巴细胞、调节性B细胞、滤泡B细胞或边缘区B细胞。

13. 权利要求6的方法,其中所述功能异质细胞群包括:

一个或多个神经元细胞,所述一个或多个神经元细胞包括神经元、神经胶质细胞、星形

胶质细胞、卫星细胞或肠神经胶质细胞；

一个或多个内分泌细胞，所述一个或多个内分泌细胞分离或衍生自松果体、垂体、胰腺、卵巢、睾丸、甲状腺、甲状旁腺、下丘脑或肾上腺；和

一个或多个外分泌细胞，所述一个或多个外分泌细胞分离或衍生自唾液腺、汗腺或胃肠道的组成部分。

14. 权利要求1-13中任一项的方法，其中所述一个或多个条件包括使每个细胞与刺激物接触。

15. 权利要求14的方法，其中所述刺激物选自：离子、小分子、核酸序列、肽、多肽、蛋白质、配体、受体、抗原、细胞或细胞器膜片、细胞或细胞器膜、细胞或其任何组合。

16. 权利要求14的方法，其中所述刺激物：

是天然存在的或非天然存在的；

可操作地连接到每个相应腔室的内表面；

是腔室中的所述一定体积的流体；

和/或

概括了接触靶细胞的对象细胞的作用。

17. 权利要求16的方法，其中所述靶细胞是有害细胞；和/或

所述靶细胞选自：增殖细胞、癌细胞、感染的细胞、外源细胞或免疫细胞。

18. 权利要求17的方法，其中所述外源细胞是细菌、酵母或微生物。

19. 权利要求16的方法，其中所述靶细胞是健康细胞。

20. 权利要求19的方法，其中所述健康细胞是B淋巴细胞。

21. 权利要求1-20中任一项的方法，其中所述一个或多个条件包括将所述多个细胞中的每一个维持在维持每个细胞的活力的细胞培养基中。

22. 权利要求1-21中任一项的方法，其中所述多个分离的腔室中的每一个中的所述一定体积的流体包括维持每个细胞的活力的细胞培养基。

23. 权利要求1-22中任一项的方法，其中：

所述捕获剂以重复图案布置在所述表面上，并且

所述基板和所述表面可释放地偶联，使得捕获剂的重复图案中的至少一个重复被包封在多个腔室的每个腔室中。

24. 权利要求1-23中任一项的方法，其中：

所述一个或多个细胞组分包含分泌蛋白组，和

所述分泌蛋白组包含指示减弱或降低的细胞功能或细胞活力的一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质。

25. 权利要求1-24中任一项的方法，其中：

所述一个或多个细胞组分包含分泌蛋白组，和

所述分泌蛋白组包含指示增强或增加的炎症或指示增加的细胞活性或细胞刺激的一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质。

26. 权利要求1-25中任一项的方法，其中所述鉴定步骤包括确定所述至少两个细胞中的每一个的多功能强度指数 (PSI)。

27. 权利要求26的方法，其中PSI是所述异质细胞群中多功能对象细胞的百分比与两个

或更多个细胞因子的平均信号强度的乘积。

28. 权利要求27的方法, 其中所述多功能对象细胞在单细胞水平上分泌至少两个细胞因子。

29. 权利要求28的方法, 其中由每个多功能对象细胞产生的至少两个细胞因子和平均信号强度的两个或更多个细胞因子包括相同的细胞因子。

30. 权利要求28的方法, 其中由每个多功能对象细胞产生的至少两个细胞因子和平均信号强度的两个或更多个细胞因子由相同的细胞因子组成。

31. 权利要求26-30中任一项的方法, 其中PSI的增加指示所述多功能对象细胞的效力增加。

32. 权利要求3-31中任一项的方法, 其中在所述消融步骤期间, 所述激光不直接接触被鉴定用于去除的细胞。

33. 权利要求3-32中任一项的方法, 其中所述激光选自: 二极管、氦-氟、氩、氙、氮、二氧化碳、一氧化碳、氟化氢、氟化氙、氦-镉、氦-汞、氦-硒、氦-银或氙-铜激光。

34. 权利要求1-33中任一项的方法, 其中所述收集包括将所述表面与所述基板分离, 并收集被鉴定用于收集的细胞。

35. 权利要求34的方法, 其中所述组件的分离的基板和盖形成入口和出口以及它们之间的流动通道。

36. 权利要求34或35的方法, 其中所述收集包括从每个相应的腔室中纳米吸移出被鉴定用于收集的每个细胞和使收集流体流动中的至少一个操作。

37. 权利要求36的方法, 其中使收集流体流动包括从入口到出口, 流体的流动被配置为保留被鉴定用于收集的收集细胞。

38. 权利要求36的方法, 其中使流体流动还包括机械振动所述基板, 以便将被鉴定用于收集的细胞移动到收集流体流中。

39. 权利要求34的方法, 其中含有收集的细胞的收集流体包含组合物。

40. 权利要求39的方法, 其中组合物包含收集的细胞。

41. 权利要求39-40中任一项的方法, 其还包括纯化所述组合物以去除刺激物、试剂、细胞培养基、一个或多个细胞组分、分泌蛋白组的一个或多个组分、分泌的蛋白、细胞内组分、细胞碎片或其任何组合中的一个或多个。

42. 权利要求39-41中任一项的方法, 其中所述组合物还包含维持细胞的活力或多功能性的培养基。

43. 权利要求1-42中任一项的方法, 其中所述方法还包括使收集的细胞与扩增组合物接触。

44. 权利要求1-43中任一项的方法, 其还包括分析收集的细胞或其组分。

45. 权利要求44的方法, 其中所述分析步骤包括DNA测序、RNA测序、基因组学分析和蛋白质组学分析中的一个或多个。

46. 权利要求1-45中任一项的方法, 其中检测包括:

将所述组件的盖暴露于光源, 所述光源被配置为使形成的复合物发荧光, 和针对发荧光的复合物对所述盖进行成像。

47. 权利要求46的方法, 其中对所述盖进行成像包括拍摄第一和第二表面两者的重叠

部分的多个图像。

48. 权利要求46或47的方法,其中所述第二表面被配置为具有多个基准线并且所述基板被配置为具有多个有组织的基准标志。

49. 权利要求48的方法,所述鉴定包括使用图像的荧光以及线条和标志来定位与所述荧光对应的一个或多个腔室。

50. 权利要求49的方法,其中最初将所述图像组装在一起。

51. 权利要求48-50中任一项的方法,其中所述基准线以重复的、预定义的图案布置在所述第二表面上。

52. 权利要求48-51中任一项的方法,其中每条基准线包括独特的颜色。

53. 权利要求48-52中任一项的方法,其中所述基准标志被布置在腔室的柱之间的第一表面上。

54. 权利要求53的方法,其中所述标志被配置为具有两个或更多个不同长度,它们之间具有相等间隔。

55. 权利要求54的方法,其中所述间隔之间的腔室被标记。

56. 一种选择性细胞分选和/或收集系统,其包括:

适用于接收装置的坞站,所述装置包括基板和具有第二表面的透明盖,其中:

所述基板包括多个分离的腔室以及第一表面;和

所述第二表面包括多个捕获剂,并且

所述基板和所述盖的偶联包封多个腔室中的每个腔室;

所述坞站包括被配置为可释放地偶联所述装置的基板和盖的夹具;

第一光学系统,其包括第一物镜并且被配置为:

沿X、Y和Z轴移动,以及

产生可见光和荧光中的至少一个;

任选地,第二光学系统,其包括第二物镜并且被配置为:

沿X、Y和Z轴移动,以及

产生消融激光束;

任选地对应于所述第一光学系统的第一检测器;和

处理器,其被配置为处理系统的信息和控制系统或其一个或多个部件中的至少一个操作;

其中所述第一光学系统可以定位在所述坞站和所述第一检测器之间。

54. 权利要求46的系统,其中所述激光选自:二极管氮-氦、氩、氙、氮、二氧化碳、一氧化碳、氟化氢、氟化氙、氦-镉、氦-汞、氦-硒、氦-银或氦-铜激光。

58. 权利要求53或54的系统,其中所述检测器包括数码相机。

59. 权利要求58的系统,其中:

所述第一光学系统被配置为将所述组件的盖暴露在荧光下,以使形成的复合物发荧光,并且

所述检测器针对发荧光的复合物对所述盖进行成像。

60. 权利要求53-59中任一项的系统,其中所述检测器获得第一和第二表面两者的重叠部分的多个图像。

61. 权利要求59或60的系统,其中所述第二表面被配置为具有多个基准线并且所述基板被配置为具有多个有组织的基准标志。

61. 权利要求48的系统,其中所述处理器被配置为处理图像信息以便鉴定在其上捕获到图像中的荧光的一个或多个腔室。

62. 权利要求61的系统,其中所述处理器使用图像的荧光以及线条和标志来定位一个或多个腔室。

63. 权利要求49的系统,其中所述处理器被配置为将相邻图像组装在一起。

64. 权利要求61-63中任一项的系统,其中所述基准线以重复的、预定义的图案布置在所述第二表面上。

65. 权利要求61-64中任一项的系统,其中每条基准线包括独特的颜色。

66. 权利要求61-65中任一项的系统,其中所述基准标志被布置在腔室的柱之间的第一表面上。

67. 权利要求66的系统,其中所述标志被配置为具有两个或更多个不同长度,它们之间具有相等间隔。

68. 权利要求67的系统,其中所述间隔之间的腔室被标记。

## 用于鉴定、选择性消融和选择以及收集单细胞的系统、装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年12月4日提交的题为“COMPOSITIONS AND METHODS FOR IDENTIFICATION, SELECTIVE ABLATION AND COLLECTION OF SINGLE CELLS”的美国临时申请号62/775,073的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开内容涉及用于恢复和回收生物材料的系统、装置和方法,更具体地,涉及根据通过(例如)来自单个孔/腔室中的单细胞的高度多重化的分泌的蛋白质鉴定的分泌的和细胞内的组分选择性收集(并且在一些实施方案中,消除)细胞的方法,以及用于进行此类鉴定的基准组合。在一些实施方案中,此类系统、装置和方法还可用于收集和/或消除同质细胞群。

### 背景技术

[0004] 在本领域中,分析免疫细胞通常包括分析分泌的蛋白质,特别是细胞因子,它们是免疫系统内细胞间通信的关键介质。稳态免疫反应需要严格调控的细胞因子合成和分泌。已经开发了许多分析技术来分析免疫反应期间的蛋白质分泌,但所使用的方法通常仅限于测量整个细胞群的平均分泌物。此类分析虽然有助于了解疾病发病机制和免疫过程,但不足以表征群体内细胞的单个子集的细胞因子活性。最近使用单细胞分析进行的研究表明,即使在具有相似表型的细胞中,免疫细胞也显示出高度异质性的细胞因子特征谱,进一步证明了仅关注大体积群体水平的细胞反应的显著局限性。群体中的这些异质细胞子集可能决定了细胞之间复杂的信号传导相互作用,其代表了疾病免疫治疗评估的重要检查和平衡。当细胞群的反应可以由细胞的稀有子集中的细胞间相互作用决定时,这一点尤其值得注意。因此,了解这些相互作用对于将来开发更有效的治疗方法至关重要。

[0005] 因此,在基于细胞的癌症免疫疗法中定义一致性且高质量功能的“药物”仍然存在挑战。尽管新兴的CAR-T癌症免疫疗法已证明具有优势,但仍有两个主要问题:(1)一致性地制造细胞疗法,以及(2)管理可能潜在危及生命的免疫毒性,例如细胞因子释放综合征。在基于细胞的疗法,例如嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法中,其中活细胞是“药物”,细胞制造仍然相对较新,并且即使存在标准化操作程序(SOP)以确保制造的一致性,产生的每个患者批次也可能显著不同。为临床医生和生物技术公司提供有效的细胞功能监测工具可以通过允许他们在注射前去除或修改不一致或不安全的细胞疗法而改变临床范式,从而显著降低患者的风险,并提高治疗成功的几率。

[0006] 为了评估用于免疫疗法的工程化T细胞或评估重新激活以对抗癌症或感染的内源性T细胞,T细胞的功能状态主要由一系列分泌的效应功能蛋白(例如,细胞因子)决定。在保护性免疫反应中,免疫细胞的“质量”与多功能性的程度(T细胞共分泌多个效应蛋白的能力)相关。虽然这些抗肿瘤细胞溶解、趋化细胞因子产生有效反应,但这些多功能细胞子集

不能分泌NK或CAR-T细胞中普遍存在的免疫毒性炎症或调节性细胞因子(最多15个)。为了检测CAR单细胞子集的这种“质量”有效和安全反应的一致性性能,需要对单个T细胞中的免疫效应蛋白进行高度多重化测量。

[0007] 单参数ELISpot测定仍然是用于T细胞活化测定的最新技术,但不测量多功能性。基于平均微珠的多重化平台(基于Luminex)测量多个细胞因子,但未达到所需的单细胞水平。基于荧光的多色流式细胞术是一个强大的单细胞分析工具,并已被用于通过阻断囊泡转运来保留和染色细胞质内的蛋白质来检测细胞因子。可以同时测量的蛋白质数量受与ICS(细胞内细胞因子染色)的荧光光谱重叠的限制。

[0008] 飞行时间质谱仪偶联的流式细胞术(CyTOF)最近已被CAR-T公司使用,尽管不如在试验中那样经常使用。与荧光流式细胞术类似,它不测量真正的分泌,并且到目前为止,部分由于ICS的高背景,CyTOF在单细胞中共同测量的细胞因子数量有限(例如,11)。在研究实验室中正在开发的其他单细胞技术(例如,显微雕刻(microengraving))在灵敏度和测定速度方面具有优势,但在多重化能力方面仍然受到限制(通常<5)。

[0009] 过继细胞疗法和其他免疫介导的疗法带来风险。细胞因子释放综合征(CRS)是一种由于免疫疗法(例如CART细胞疗法)从免疫系统的过度激活导致的非抗原特异性、危及生命的毒性。尽管CART细胞是有效的中靶杀手,但它们激活免疫系统至远高于自然发生的水平,并且由于其设计的性质,具有很大程度的“中靶、肿瘤外”毒性。基于最近临床试验中的死亡率水平,已变得明显的是在引入患者之前必须了解个体CAR-T细胞的细胞因子特征谱。本公开内容的系统和方法确定了每个单细胞的落入以下组的多达42种细胞因子的丰度:效应、刺激、炎性和调节性。该信息允许用户鉴定传统方法可能会遗漏的在群体中的任何潜在的毒性细胞子集(促炎或调节性),从而提供在引入患者之前监测免疫疗法的更安全、更有效的手段。

[0010] 因此,本领域对从细胞的异质样品中鉴定、分选和收集单细胞或同质细胞群的系统、装置和/或方法存在长期感觉到但未满足的需求。本公开内容包括系统、装置和方法的实施方案以解决这种长期感觉到但未满足的需求。

[0011] 至少一些实施方案的概述

[0012] 本公开内容的实施方案提供了用于根据细胞的所鉴定的分泌的和细胞内组分选择性收集/分选(并且在一些实施方案中,消除)细胞的系统、装置和方法。特别地,本公开内容的至少一些实施方案的目的是为来自确定细胞的蛋白质组表达提供受控的鉴定和回收/提取。在一些实施方案中,这允许收集一个或多个细胞的特定分泌蛋白质组学信息,或基于其细胞内组分(来自细胞的分泌蛋白或细胞内组分可以通篇互换使用)鉴定一个或多个细胞。此外,在一些实施方案中,选择性激光消融可用于保留和回收/收集一个或多个细胞用于下游分析的目的。因此,在一些实施方案中,提供了系统、装置和方法,其通过例如细胞(或多个细胞)真实的多点分泌蛋白质组学特征谱(其可用于递送/收集特定的所需细胞)产生细胞分选系统。

[0013] 因此,在一些实施方案中,提供了用于选择性收集和分选细胞中的至少一个操作的选择性细胞收集和/或分选方法,并且包括将细胞和一定体积的流体装载或以其他方式放置到基板的多个分离的腔室中的每一个中。基板包括第一表面,所述第一表面可释放地偶联到具有第二表面的透明盖,从而形成组件,所述第二表面具有多个捕获剂,并且所述一



定体积的流体与所述第二表面流体连通。所述方法还包括在一个或多个条件下维持每个细胞,所述条件足以允许通过每个细胞产生一个或多个细胞组分以及所述一个或多个细胞组分被配置为与所述表面的至少一个捕获剂结合以形成至少一个捕获剂细胞组分复合物。所述方法还包括对于每个细胞,检测所述至少一个捕获剂细胞组分复合物,并鉴定用于收集和去除中的至少一个操作的至少一个细胞。所述方法还可以包括收集所述至少一个细胞。

[0014] 上述实施方案还可以包括消融被鉴定用于去除的细胞,其中消融可以包括使包括用于去除的细胞的相应分离的腔室与激光接触。此外,在一些实施方案中,激光被配置为裂解细胞。

[0015] 这样的实施方案可以包括以下附加步骤、特征、相关结构、功能和/或说明中的一个和/或另一个(并且在一些实施方案中,其多个,并且在更进一步的实施方案中,其大部分或全部),从而产生本公开内容的更进一步的实施方案:

[0016] -每个细胞是从多个细胞中选出的;

[0017] -腔室可以以行和/或列排列;

[0018] -多个细胞包括异质细胞群,以及异质细胞群可以是功能异质细胞群,其包括:

[0019] 响应刺激产生分泌蛋白组的至少两个细胞,并且所述至少两个细胞中的第一个细胞产生第一分泌蛋白组,所述至少两个细胞中的第二个细胞产生第二分泌蛋白组,并且所述第一分泌蛋白组和所述第二分泌蛋白组不相同;

[0020] 一个或多个免疫细胞,其可以包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞,并且T淋巴细胞可以包括天然T淋巴细胞、活化的T淋巴细胞、效应T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆性T淋巴细胞或记忆性干T淋巴细胞,

[0021] 其中T淋巴细胞可以表达,例如,非天然存在的抗原受体或嵌合抗原受体(CAR);

[0022] 其中B淋巴细胞可以包括浆母细胞、浆细胞、记忆B淋巴细胞、调节性B细胞、滤泡B细胞或边缘区B细胞;

[0023] 一个或多个神经元细胞,其可包括神经元、神经胶质细胞、星形胶质细胞、卫星细胞或肠神经胶质细胞;

[0024] 功能异质细胞群包含一个或多个内分泌细胞,其可以分离或衍生自松果体、垂体、胰腺、卵巢、睾丸、甲状腺、甲状旁腺、下丘脑或肾上腺;

[0025] 一个或多个外分泌细胞,其可以分离或衍生自唾液腺、汗腺或胃肠道的组成部分,其中胃肠道的组成部分可以是口、胃、小肠和大肠;

[0026] -一个或多个条件可以是,例如,使每个细胞与刺激物接触,其中刺激:

[0027] 可选自:离子、小分子、核酸序列、肽、多肽、蛋白质、配体、受体、抗原、细胞或细胞器膜片、细胞或细胞器膜、细胞或其任何组合;

[0028] 可以是天然存在的或非天然存在的;

[0029] 可以可操作地连接到每个相应腔室的内表面;

[0030] 腔室中的所述一定体积的流体可以对应/成为刺激物;

[0031] 概括了接触靶细胞的对象细胞的作用,其中靶细胞:

[0032] 可以是有害细胞,并且可以选自:增殖细胞、癌细胞、感染的细胞、外来细胞或免疫

细胞,其中外来细胞是细菌、酵母或微生物,

[0033] 是健康细胞,其可以是B淋巴细胞;

[0034] -一个或多个条件可以包括将至少两个细胞中的每一个维持在维持每个细胞的活力的细胞培养基中;

[0035] -至少两个分离的腔室中的每一个中的所述一定体积的流体包括维持每个细胞的活力的细胞培养基;

[0036] -所述捕获剂可以以重复图案排列在所述表面上,

[0037] -所述基板和所述表面可以可释放地偶联,使得捕获剂的重复图案中的至少一个重复被包封在多个腔室的每个腔室中;

[0038] -一个或多个细胞组分可包含分泌蛋白组,并且分泌蛋白组可包含指示减弱或降低的细胞功能或细胞活力的一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质;

[0039] -一个或多个细胞组分包含分泌蛋白组,其中分泌蛋白组可包括一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质,其指示:

[0040] 增强或增加的炎症;和

[0041] 增加的细胞活性或细胞刺激;

[0042] -鉴定步骤可以包括确定至少两个细胞中的每一个的多功能强度指数 (PSI), 其中:

[0043] PSI可以是所述异质细胞群中多功能对象细胞的百分比与两个或更多个细胞因子的平均信号强度的乘积,并且多功能对象细胞在单细胞水平上可以分泌至少两个细胞因子(其可以是相同的细胞因子,也可以不同);和

[0044] PSI的增加指示多功能对象细胞的效力增加;

[0045] -在消融步骤期间,激光不直接接触被鉴定用于去除的细胞;

[0046] -激光选自:二极管、氦-氖、氩、氙、氮、二氧化碳、一氧化碳、氟化氢、氟化氙、氦-镉、氦-汞、氦-硒、氦-银或氙-铜激光;

[0047] -收集步骤可包括:使收集流体流过包含被鉴定用于收集的细胞的分离的腔室以产生包含细胞的组合物,和/或使用移液管或纳米移液管捕获被鉴定用于收集的至少一个细胞;

[0048] 组合物可包含捕获的细胞。

[0049] 可以纯化组合物以去除刺激物、试剂、细胞培养基、一个或多个细胞组分、分泌蛋白组的一个或多个组分、分泌的蛋白质、细胞内组分、细胞碎片或它们的任何组合中的一个或多个;

[0050] 组合物可以包括维持细胞的活力或多功能性的培养基;

[0051] -使收集的细胞与扩增组合物接触;

[0052] -分析收集的细胞或其组成部分,其中分析可以包括DNA测序、RNA测序、基因组学分析和蛋白质组学分析中的一个或多个;

[0053] -检测可以包括将所述组件的盖暴露于被配置为使形成的复合物发荧光的光源和针对发荧光的复合物对所述盖进行成像中的至少一个操作;

[0054] -对所述盖进行成像可以包括拍摄第一和第二表面两者的重叠部分的多个图像;

[0055] -第二表面可被配置为具有多个基准线并且基板被配置为具有多个有组织的基准

标志。

[0056] -鉴定可以包括使用图像的荧光以及线条和标志来定位与所述荧光对应的一个或多个腔室；

[0057] -图像可以组装在一起(最初或在例如处理之后)；

[0058] -基准线可以以重复的、预定义的图案布置在第二表面上；

[0059] 每条基准线都可以包含独特的颜色；

[0060] 和

[0061] -基准标志可以被布置在腔室的柱之间的第一表面上；

[0062] 标志可以被配置为具有两个或更多个不同长度,它们之间具有相等间隔;和

[0063] 可以标记间隔之间的腔室。

[0064] 在一些实施方案中,提供了选择性细胞收集系统并且其包括适用于接收装置的坞站,其在一些实施方案中包括夹具,所述装置包括基板和具有第二表面的透明盖。基板包括多个分离的腔室和第一表面,第二表面包括多个捕获剂,基板和盖的偶联包封多个腔室中的每个腔室,并且坞站被配置为可释放地偶联装置的基板和盖。所述系统还包括,第一光学系统,其包括第一物镜并且被配置为沿X、Y和Z轴(或其至少一个)移动,并产生可见光和荧光中的至少一个(优选地,在一些实施方案中,至少是荧光,并且可以是激光)。所述系统还任选地包括第二光学系统,该第二光学系统包括第二物镜并且被配置为沿X、Y和Z轴(或其至少一个)移动,并产生消融激光束,任选地对应于所述第一光学系统的第一检测器(例如,照相机),以及被配置为处理系统的信息和控制系统或其一个或多个部件中的至少一个操作的处理器。第一光学系统可以定位在坞站和第一检测器之间。

[0065] 这样的实施方案可以包括以下附加步骤、特征、相关结构、功能和/或说明中的一个和/或另一个(并且在一些实施方案中,其多个,并且在更进一步的实施方案中,其大部分或全部),从而产生本公开内容的更进一步的实施方案:

[0066] -激光(对于任一光学系统)选自:二极管氮-氦、氦、氩、氙、氮、二氧化碳、一氧化碳、氟化氢、氟化氙、氦-镉、氦-汞、氦-硒、氦-银或氦-铜激光;

[0067] -检测器包括数码相机和/或类似物;

[0068] -第一光学系统可以被配置为将所述组件的盖暴露在荧光下,以使形成的复合物发荧光,

[0069] -检测器可以被配置为针对发荧光的复合物对所述盖进行成像;

[0070] -检测器可以被配置为获得第一和第二表面两者的重叠部分的多个图像;

[0071] -第二表面可以被配置为具有多个基准线并且基板被配置为具有多个有组织的基准标志;

[0072] -处理器可以被配置(例如通过在其上运行的计算机指令配置)为使处理器处理图像信息以便鉴定在其上捕获到图像中的荧光的一个或多个腔室;

[0073] -处理器可以使用图像的荧光以及线条和标志(例如,来自第一和第二表面)来定位一个或多个腔室;

[0074] -处理器可以被配置为将相邻图像组装在一起;

[0075] -基准线可以以重复的、预定义的图案布置在第二表面上;

[0076] -每条基准线可以是独特的颜色;

- [0077] -基准标志可以被布置在例如腔室的柱之间的第一表面上；
- [0078] -标志可以被配置为具有两个或更多个不同长度，它们之间具有相等间隔；
- [0079] 和
- [0080] -可以标记间隔之间的腔室。
- [0081] 参考随后的详细描述以及与其对应的任何关联附图，这些和其他实施方案将变得更加明显，附图的简要描述在下面阐述。
- [0082] 附图简要说明
- [0083] 专利或申请文件包含至少一幅彩色绘图。本专利或专利申请出版物的带有彩色附图的副本将由专利局根据要求和支付必要费用后提供。
- [0084] 图1A-1B是根据本公开内容的一些实施方案的用于细胞选择系统的装置的示意性横截面侧视图，示出了第一“未夹紧/未偶联”配置(图1A)和夹紧/偶联配置(图1B)；
- [0085] 图2A是根据本公开内容的一些实施方案的图1A-B的装置的ab涂覆的盖/载玻片部分的俯视图，其包括载玻片的一部分的放大图；
- [0086] 图2B是根据本公开内容的一些实施方案的相对于图1A-B的装置的基板布置在图2A的载玻片上的抗体的示意性透视图；
- [0087] 图2C是根据一些实施方案的图1A-B的载玻片部分的示意性透视图，描绘了例如细胞因子捕获和捕获的细胞组分的鉴定，该透视图还示出了孔/腔室图案；
- [0088] 图3A-D是根据一些实施方案的装置/组件/芯片的示意性侧视图，描绘了根据一些实施方案的用于鉴定/选择腔室/孔中的一个或多个细胞的一个过程；
- [0089] 图4A是根据本公开内容的一些实施方案的描绘相对于一对光源的图1A-B的装置的配置的示意性横截面侧视图。
- [0090] 图4B是根据一些实施方案的图1A-1B的装置的基板的单个腔室的示意性横截面图，示出了载玻片从其解偶联，并示出了在腔室中的单个细胞；
- [0091] 图4C是根据一些实施方案的图1A-1B的装置的基板的单个腔室的示意性横截面图，示出了打开的腔室，以及从腔室中纳米吸移出单细胞；
- [0092] 图4D是根据一些实施方案的图1A-1B的装置的基板的单个腔室的示意性横截面图，示出了打开的腔室，以及使用机械力将细胞推出腔室；
- [0093] 图5是根据一些实施方案的图1A-1B的装置的基板的单个腔室的示意性横截面图，示出了打开的腔室，以及从腔室中纳米吸移出单细胞，其在一些实施方案中包括实时成像系统；和
- [0094] 图6A是根据本公开内容的一些实施方案的多腔室装置的示意性横截面图，其包括可容纳细胞群的腔室(其也可称为孔，术语孔和腔室可互换使用)。
- [0095] 图6B是根据本公开内容的一些实施方案的多腔室装置的示意性横截面图，其包括容纳个体细胞的腔室(也可称为孔，术语孔和腔室可互换使用)，以及多个用于注入此类细胞(或包含此类细胞的流体)的端口。
- [0096] 图7A-C是根据一些实施方案的(例如)图1A-B的装置的盖/载玻片的表面和基板表面(图7C)上提供的各种标记/基准线的示意图。根据一些实施方案，图7A-B示出了盖/载玻片的示例基准线，并且图7C示出了基准线和基准标志的图像捕获。
- [0097] 至少一些实施方案的详细描述

[0098] 本公开内容提供了系统和方法,其被配置为在一些实施方案中,以下中的至少一个,并且在一些实施方案中,以下中的多个,以及在一些实施方案中,以下中的所有:

[0099] -使单个细胞在根据一些实施方案的装置的基板上的多个孔/腔室中的单个孔/腔室(和在一些实施方案中,单个孔内的细胞群)中流动或以其他方式布置在其中;

[0100] -在孔内提供材料以使细胞能够继续至少正常的细胞活动,以便例如表达蛋白质等;

[0101] -将基板与盖(例如,载玻片)偶联,从而形成装置/组件,其中载玻片包括以预先安排的图案布置(根据一些实施方案)的抗体/捕获剂,使得至少一些抗体布置在每个孔/腔室上(前述也可称为抗体组);

[0102] -孵育细胞/孔使得细胞(或多个细胞)产生细胞组分(例如,蛋白质、细胞因子和/或类似物);

[0103] -可以将细胞组分配置为与布置在相应孔上的相关抗体结合,从而形成复合物;

[0104] -细胞组分与每个孔/腔室附近的捕获剂结合;

[0105] -光学系统和/或类似物可以将来自光源的光引导到载玻片中以产生形成的复合物的荧光;

[0106] -对载玻片成像以捕获载玻片表面和基板表面之一或两者上的标记/基准线/标志,以鉴定至少一个或优选所有的荧光复合物和标记/基准线/标志,

[0107] -处理一个或多个图像以鉴定与发荧光的复合物相对应的特定孔/腔室;和

[0108] -收集已鉴定或未鉴定(即,不包括发荧光的复合物的孔/腔室)的孔/腔室的细胞或细胞组分和消融/消除已鉴定或未鉴定的孔/腔室的细胞或细胞组分中的至少一个操作。

[0109] 细胞的细胞组分与相关抗体/试剂的结合使得能够实现从孔/腔室中测量、鉴定、消除、收集和/或去除一个或多个特定细胞(或细胞群)中的至少一个操作。此类实施方案使得能够实现高度多重化反应,包括例如具有数百个独特捕获剂的数千个单细胞反应。在一些实施方案中,至少一个细胞组分与相关抗体结合所得的复合物在暴露于特定波长的光时发荧光[美国专利教导荧光]。

[0110] 例如,在一些实施方案中,本公开内容的装置、系统和方法可以在单细胞水平上同时测量多个(例如,42个)关键效应蛋白。因此,本公开内容的一些实施方案可以例如直接由基于细胞的疗法的大规模开发者用于管道药物开发和/或CAR-T评估。由本公开内容的装置、系统和方法测量的多重化参数可以涵盖例如完整范围的相关免疫效应功能,包括刺激性、促炎性、调节性(阴性)、化学吸引性、促生长和细胞溶解(有效的)。此外,一旦鉴定出特定的细胞类型或行为,本公开内容的一些实施方案可以被配置为从旨在用于消融/消除的不需要的细胞分选/选择旨在用于随后收集的需要的细胞。因为,在一些实施方案中,每个细胞被隔离在包封的腔室中,所以细胞消融可以通过例如将激光与包含细胞本身的腔室中的任何表面或任何体积的流体/组分接触来实现(尽管,在一些实施方案中,当细胞被鉴定用于去除时,不需要与细胞接触来裂解细胞)。在不需要的细胞被破坏之后,剩余的需要的细胞可以作为一个群体或作为个体细胞通过纳米移液管从它们各自的腔室中收集,并单独储存或合并以形成同质细胞群。可选择地,将可释放地偶联的基板/盖稍微分开,并且收集流体以足以驱逐腔室内的完整细胞的体积流过基板,并收集含有同质细胞群的流体用于进一步分析或处理。

[0111] 根据一些实施方案,用于细胞消融的激光可以包括但不限于二极管氦-氖、氩、氩、氮、二氧化碳、一氧化碳、氟化氢、氟化氙、氦-镉、氦-汞、氦-硒、氦-银或氦-铜激光。在一些实施方案中,基于激光的细胞裂解是通过引导激光接触(其也可用于照射)容纳被鉴定用于裂解的细胞的腔室来进行的。在一些实施方案中,通过本公开内容的激光进行细胞裂解不需要将激光聚焦在待裂解的个体细胞上。用于消融给定腔室中的细胞的裂解激光无需接触或照射相邻腔室,从而使相邻腔室中的细胞完好无损、健康且在其他方面未受扰动。

[0112] 因此,可以收集被鉴定为具有高于预定阈值的一个或多个蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞。可释放地偶联的装置(例如,包含腔室和细胞的基板以及包含多个捕获剂的盖/载玻片/表面)可以被分离。然后可以通过纳米移液管从它们各自的腔室中收集个体细胞,并单独储存或合并以形成同质细胞群。

[0113] 在某些实施方案中,收集被鉴定具有高于预定阈值的蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞。包含腔室和细胞的可释放地偶联的基板以及包含多个捕获剂的表面被分离。收集流体以足以驱逐腔室内的完整细胞的体积流过基板,并收集含有同质细胞群的流体用于进一步分析或处理。

[0114] 因此,在一些实施方案中,提供了一种用于多重化检测来自单个细胞的至少一个和在一些实施方案中多个化合物的装置(以及与其他元件的系统),并且其包括阵列(其可以也称为基板),其包括可释放地偶联到捕获剂的盖或板(其可以是载玻片)的多个腔室。优选的捕获剂包括抗体,然而,捕获剂可以包括与本公开内容的细胞组分特异性结合的任何可检测实体。例如,可检测实体可包括可检测标记。可检测标记可包括但不限于荧光标记。

[0115] 腔室(也可以称为孔,这些术语在全文中可互换使用,尽管孔通常可以指基板中的凹部以及腔室,凹部由盖包封)优选以均匀的布置分布在基板上,并且在一些实施方案中,各自包括大于50 $\mu\text{m}$ 的长度,并且任选地,可以被配置为在纳升体积(在一些实施方案中,亚纳升体积)的内容物中包含分离的单个细胞。腔室的数量可以是任意数量,包括例如:1、2、6、12、24、48、96、384或1536个腔室,包括10个腔室、100个腔室、1000个腔室、10,000个腔室、100,000个腔室、1,000,000个腔室或介于两者之间的任意数量的腔室的阵列。

[0116] 在一些实施方案中,每个腔室包括多个表面(2至8个,取决于实施方案),并且可以是弯曲的或多面的(例如,多表面的,其中至少一个表面是“底部”和至少一个表面是“侧面”。如上所述,具有孔的阵列的基板可以可释放地偶联到盖,其是附加的表面(例如,腔室的“顶部”),从而在所有侧面上包封腔室。在一些实施方案中,腔室可以被配置为矩形并且包括至少五个表面或由至少五个表面组成,其中至少一个表面是底部并且至少一个表面是侧面。

[0117] 根据一些实施方案,捕获剂板包括多个固定的捕获剂,每个固定的捕获剂能够特异性结合多个细胞组分中的一个。优选地,固定的捕获剂布置在均匀的捕获剂板中。优选地,固定的捕获剂以可重复的图案附着于表面,其中图案的每个重复与多个腔室中的一个腔室对齐。阵列和捕获剂板偶联以形成多个包封的体积(见上文),每个包封的体积包括腔室和捕获剂板,使得每个腔室的内容物可接近捕获剂板的每一个捕获剂。

[0118] 根据一些实施方案的阵列的腔室可以采取任何形状并且可以具有任何尺寸,然而,在一些实施方案中,该阵列包括至少2个腔室,但是也可以包括5、10、15、20、25、50、100、150、500、1000、1500、2000个腔室或它们之间的任何整数个腔室。每个腔室可具有1 $\mu\text{m}$ 至

2000 $\mu\text{m}$ 的深度/高度、1 $\mu\text{m}$ 至2000 $\mu\text{m}$ 的直径、1 $\mu\text{m}$ 至2000 $\mu\text{m}$ 的宽度和/或1 $\mu\text{m}$ 至2000 $\mu\text{m}$ 的长度。阵列的任何两个腔室之间的距离可以是1 $\mu\text{m}$ 至2000 $\mu\text{m}$ 。在一些实施方案中,至少一个腔室包括高纵横比矩形孔,其具有长度为约1-2mm和深度为约5-50 $\mu\text{m}$ 的尺寸。在一些实施方案中,每个腔室是长度为约10-2000 $\mu\text{m}$ 、宽度为约10-100 $\mu\text{m}$ 和深度为约10-100 $\mu\text{m}$ 的矩形。

[0119] 在一些实施方案中,捕获剂板可包含3至50个不同的捕获剂,从而允许检测3至50个不同的细胞组分(例如),但可包括多于10个不同的捕获剂,从而允许检测超过10个不同的细胞组分,或者可以包含超过42个不同的捕获剂,从而允许检测超过42个不同的细胞组分,或者可以包含超过50、100、150、200、250、300、350、400、450、500个或它们之间的任何数量的不同的捕获剂,从而允许检测超过50、100、150、200、250、300、350、400、450、500个或它们之间的任何数量的不同的细胞组分。在某些实施方案中,阵列包括约200个微腔室/ $\text{cm}^2$ 至约20,000个微腔室/ $\text{cm}^2$ 的腔室密度。

[0120] 因此,如图1A-1B所示,装置100包括基板102和盖104,在一些实施方案中,盖104包括载玻片。基板可以由PDMS(聚二甲基硅氧烷)组成,并且可以被配置为包括多个腔室106(其可以有组织的图案布置)。还包括侧壁108,其围绕基板102,其在通过坞站/夹具111偶联或以其他方式夹紧到盖104时用于入口110(其也可称为入口端口)以及出口112(其在其他方面也可以称为出口端口)。在将基板102偶联到盖104之前,可以建立细胞流以从入口流到出口,从而建立通道115。未偶联的基板102和盖104的间隔使得仅单行细胞在它们之间散布。因此,根据一些实施方案,腔室106的尺寸使得它们只能容纳单个细胞105,以及在一些实施方案中,流体和/或其他材料以将细胞保持在可存活的条件下来产生细胞组分。因此,当基板和盖偶联/夹紧在一起时,该配置导致每个细胞被相应的孔捕获(以及,在一些实施方案中,维持孔内的细胞所必需的材料,其也可以存在于流中)。夹紧/偶联配置如图1B所示。

[0121] 图2A-C示出了来自图1A-B的盖104的各种示意图,其在图2A-C中被称为盖204。在图2A中,盖204被配置为具有捕获剂/抗体230的空间布置,以建立高多重化试剂/抗体(Ab)板。如上所述的这种布置是在特定的图案中的(在一些实施方案中),包括对应于捕获剂位置/线242的基准线240,使得抗体可以匹配到基板中的各个孔。特定图案可以存储在数据库/查找表中,使得可以容易地鉴定产生结合特定抗体(其位置已知)的细胞组分的孔/细胞。

[0122] 因此,图2B示出了一排孔和具有抗体230的盖的部分的透视图。最后,图2C是盖204(例如,载玻片)的透视图,示出了孔/腔室图案,其中产生与盖的经鉴定的抗体结合的细胞组分的某些细胞与捕获剂/抗体(显示为附图标记230)结合。具体地,并且例如,分析盖/载玻片204的例如蛋白质、细胞因子被捕获剂/抗体230的捕获,并且鉴定感兴趣的细胞205(鉴定的细胞/孔/腔室235)。

[0123] 图3A-3D对应于根据本公开内容的一些实施方案的使用根据图1A-B的装置/系统鉴定细胞的过程。因此,在图3A中,细胞样品(在一些实施方案中,其包括例如细胞表达一个或多个蛋白质所需的一定体积的流体)经由入口端口310被装载到装置300中。细胞样品从入口流到出口312。此后,基板302和盖304经由对接装置301(如图3B所示,其可以包括夹具311)偶联在一起以形成组件。图3A-3D中的至少一些附图标记对应于图1A-1B中的附图标记,除了是以“3”开头。

[0124] 一段时间后,松开组件,如图3C所示,并且在裂解缓冲液中的流动从入口310缓慢流入到装置中并流到出口312,缓冲液被配置成从细胞释放细胞内内容物(即裂解缓冲液)。细胞通过重力(组件“倒置”)、离心力和在盖表面上的亲水表面标志物特异性涂层中的至少一种固定就位。可选择地,如图3D所示,当装置被偶联/夹紧时,应用物理方法来裂解细胞(例如,通过超声装置326的超声场,和/或经由UV源的UV暴露)。在一些实施方案中,用于产生物理力的工具可以放置在盖/载玻片附近。在这两个程序中,此后,盖/载玻片捕获释放的细胞内组分(例如磷蛋白、代谢物),然后可以对其进行分析(在一些实施方案中)。

[0125] 图4A是根据本公开内容的一些实施方案的描绘相对于一对光源的图1A-B的装置的配置的示意性横截面侧视图。如所示的,包括荧光光源422(例如,第一激光器)的第一光学装置/系统420(其可以称为物镜I)被配置为引导光通过盖(例如,载玻片),以便在装置400中的相应孔中使复合物(即,来自孔的细胞组分与盖上的抗体结合)发荧光。第一光学系统420还可以包括成像系统480以对荧光复合物成像,或检测复合物或图像或检测分泌的或细胞内的组分。第二光学装置/系统450(其可称为物镜II),其包括用于通过盖裂解特定孔中的细胞的激光器452。两个光学系统都被配置为在三个维度(根据一些实施方案)和一个维度或两个维度(根据一些实施方案)中移动。在一些实施方案中,任何成像功能性/系统/装置可以是或包括数码相机和/或数码扫描仪,以便获得例如表面的扫描荧光图像(例如,包括多个捕获剂/复合物)。例如,两个颜色通道488(蓝色,PMT 350,Power 90)和635(红色,PMT 600,Power 90)可用于收集荧光信号。然后可以导出和处理获得的图像,以量化细胞分泌蛋白组的组分(即细胞组分)的表达水平。

[0126] 图4B是根据一些实施方案的图1A-1B的装置的基板402的单个腔室406的示意性横截面图,示出了盖404从其解偶联,并且示出了在腔室406中的单细胞405。如图4C所示,可以将单细胞吸移出细胞(例如,经由例如1-100纳升的纳米移液管460)。在一些实施方案中,代替从装置完全移除盖,它可以简单地与基板间隔开(以配置为使得细胞能够移动到通道中的距离,以及施加到基板的机械力(例如,在一些实施方案中,微打孔器、脉冲激光器中的至少一个)。在这样的实施方案中,如图4D所示,机械力可用于选择性地细胞从相应的孔中推出,以通过装置出口(例如)流出。

[0127] 处理器或控制器(可互换使用的术语)470可以被包括以控制系统的一个或多个部件(例如,光学系统、激光器、光源、成像器、接口、输出和输入装置)和处理信息中的至少一个操作。因此,处理器可以与各种部件包括例如用户界面472和输出工具474通信(有线或无线)。处理器还可以被配置为与计算机网络(例如,内联网或互联网)通信以进行访问。图4A-4D中的至少一些附图标记对应于图1A-1B中的附图标记,除了是以“4”开头。

[0128] 图5示出了根据一些实施方案的图1A-1B的装置500的基板502的单个腔室510的示意性横截面图,示出了打开的腔室510和从腔室中纳米吸移511出单细胞505(类似于图4C),以及实时成像系统580。这样的实时成像系统可以相对于图1A-B的装置安装,以便在三个(或在一些实施方案中,小于三个)维度中是可移动的。优选地,实时成像系统可以被配置为具有例如1 $\mu$ m的分辨率。图5中的至少一些附图标记对应于图1A-1B中的附图标记,除了是以“5”开头。

[0129] 图6A是根据本公开内容的一些实施方案的未偶联的多腔室装置600(其包括可容纳细胞群的孔)的示意性截面图,其类似于图1A-1B。因此,基板602(例如,PDMS)和盖604在



一些实施方案中包括载玻片。基板包括多个大体积腔室607 (其可以以有组织的图案布置) 和围绕基板602的侧壁608, 其偶联或以其他方式夹紧到盖604时, 用于入口610a (其也可称为入口端口) 和出口512 (其也可称为出口端口)。在将基板502偶联到盖504之前, 可以建立细胞流以从入口流到出口。图6A中所示的实施方案包括多个样品注入端口610b-e, 其中一个提供在一端 (另一个是出口/端口612), 以及四个 (一个或多个) 沿基板的距离 (尽管任何端口中的一个或多个可以是入口或出口)。图6B对应于图6A的实施方案, 包括多个样品注入端口610b-e, 但还包括大体积孔/腔室607, 其还包括单细胞腔室606以仅容纳单个细胞。

[0130] 未偶联的基板602和盖604的间隔 (其也适用于图1A-5中所示的实施方案) 使得仅单行细胞在它们之间散布。因此, 根据一些实施方案, 孔的尺寸被设计成使得它们容纳确定数量的细胞, 以及在一些实施方案中, 流体和/或其他材料以将细胞保持在可存活的条件下来产生细胞组分。因此, 当基板和盖偶联/夹紧在一起时, 该配置导致预定数量的细胞被相应的孔捕获 (以及, 在一些实施方案中, 维持孔内的细胞所必需的材料, 其也可以存在于流中)。

[0131] 在一些实施方案中, 提供了一种高度多重化的方法 (以及相关的装置/系统, 其实例在上文和本公开内容全文中已提及) 用于评估例如在与靶细胞或刺激剂接触后功能异质群中的个体细胞的分泌蛋白组。为此, 对象细胞的分泌蛋白组的组成的分析可用于当在基于细胞的治疗中使用时, 确定对象细胞的以下的至少一项: 身份、活力、安全性和功效。细胞疗法可包括自体或同种异体细胞。细胞疗法可包括修饰的细胞, 包括但不限于表达至少一种人工或嵌合抗原受体的T细胞。

[0132] 参考图7A-C解释高度多重化过程的一些实施方案。基准线以重复的、预定义的图案打印 (或以其他方式提供) (例如, 基准线F-1-2-3-4); 参见例如图7A。每条基准线可以包括独特的颜色 (例如, 绿色、红色, 由例如着色染料和/或荧光染料标记)。一旦可以通过其独特的颜色鉴定基准线, 其余的线 (在之前和之后的) (在一些实施方案中, 它们可以是与基准相同的颜色, 而在其他实施方案中, 它们可以是不同的颜色) 可以鉴定腔室的相关内容物 (在细胞组分与其结合时); 参见, 例如, 图7B。因此, 对于单细胞条码芯片 (SCBC) 图案, 基准线前后的线顺序是相反的。

[0133] 在一些这样的实施方案中, 一个或多个基准标志、点或划线 (关于基准标志这些术语可互换使用) 被布置或以其他方式提供/打印在基板的腔室的柱之间 (图7C)。在一些实施方案中, 在它们之间具有相等的间隔的两个或更多个不同长度的点 (在一些实施方案中), 例如, 点、划线、点、划线 (例如, 类似于摩尔斯电码)。然后可以标记此间隔之间的腔室 (例如, A1、B1, 类似于电子表格)。当对组件成像时 (具体地, 根据一些实施方案, 从载玻片成像以观察基准线和基准线两者), 所述方法和系统被配置为使得每个图像包括至少两 (2) 个基准划线, 图像可以独立于彼此相同的腔室拼接在一起。因此, 相对于基准线和点/划线的组合, 可以容易地鉴定和/或跟踪包含特定细胞的特定腔室。

[0134] 本领域技术人员将理解, 前文的图案化方法不限于抗体涂层, 实际上, 所述方法还可与例如用于DNA/RNA捕获和邻近连接测定的DNA探针涂层一起使用。

[0135] 因此, 使用成像装置 (例如, 数码相机, 在一些实施方案中, 例如, 参见例如图4A, 以及首先/同时将Ab载玻片暴露于荧光光源 (例如, 与使抗体与细胞/其细胞组分之间形成的复合物发荧光有关的已知波长的激光) 通过载玻片对组件成像, 然后通过成像工具 (数码相机

机等)对Ab载玻片成像,可以确定在其上细胞组分与抗体结合的具有细胞的孔/腔室。这可以通过使用上文讨论的基准线和标志、其抗体的位置和图案(所有这些都提供给处理器)来完成。已知抗体的位置和图案以及它们相对于基板的孔/腔室的位置存储在查找表中,该查找表本身存储在处理器(或处理器的一部分)可访问的存储器中。处理器包括有效操作的指令以使处理器处理图像、访问查找表中的信息、鉴定具有与Ab载玻片的特定已知抗体形成复合物的细胞组分的孔/腔室,以便实现回收/收集特定细胞和/或消除其他细胞(例如,消融它们)中的至少一个操作。

[0136] 在本公开内容的一些实施方案中,对孔施加刺激,使得对象细胞产生一个或多个细胞组分。在一些实施方案中,刺激是实际接触孔内的细胞的另一个细胞。在每个腔室包含对象细胞和靶细胞的情况下,靶细胞可以可操作地连接至腔室的表面或部件,使得收集步骤包括捕获对象细胞而不是靶细胞,因为在一些实施方案中,靶细胞不能通过流入流动通道而离开腔室。在一些实施方案中,对象细胞和靶细胞被明显且可检测地标记(或对象细胞上的细胞表面标志物和靶细胞上的细胞表面标志物被明显且可检测地标记),并且在可见光或荧光下观察对象细胞和靶细胞时,可以通过例如移液管或纳米移液管选择性地捕获对象细胞作为个体细胞。

[0137] 例如,在一些实施方案中,提供了一种鉴定来自异质细胞群中的对象细胞的分泌蛋白组的方法,并且其包括在布置在基板内的多个腔室的至少一个腔室中使对象细胞与靶细胞或刺激剂接触,其中腔室与抗体组流体连通,该抗体组可去除地附着至腔室。所述方法还包括在足以允许对象细胞分泌肽、多肽和蛋白质中的至少一个以及特异于至少一个蛋白质的抗体组的至少一个抗体结合至少一个肽、多肽或蛋白质的条件下,将对象细胞和靶细胞和/或刺激剂维持在腔室中,从而形成抗体:分泌的肽、抗体:分泌的多肽或抗体:分泌的蛋白质复合物中的至少一个。所述方法还包括将抗体组从基板上偶联或以其他方式去除,并对肽、多肽或蛋白质中的至少一个进行成像,从而形成抗体:分泌的肽、抗体:分泌的多肽或抗体:分泌的蛋白质复合物中的至少一个。通过成像,当对象细胞接触靶细胞或刺激剂时,可鉴定对象细胞的分泌蛋白组。

[0138] 在一些实施方案中,提供了一种鉴定来自异质细胞群中的对象细胞的分泌蛋白组的方法,并且其包括在足以允许刺激对象细胞的条件下使对象细胞和靶细胞或刺激剂接触,将对象细胞引入到布置在基板中的多个腔室中的至少一个腔室,其中每个腔室与抗体组流体连通(见上文)并且抗体组可去除地附着/偶联至腔室/基板。所述方法还包括在足以允许对象细胞分泌肽、多肽和蛋白质中的至少一个以及特异于至少一个蛋白质的抗体组的至少一个抗体结合至少一个肽、多肽或蛋白质的条件下,将对象细胞维持在腔室中,从而形成抗体:分泌的肽、抗体:分泌的多肽或抗体:分泌的蛋白质复合物中的至少一个。所述方法还包括将抗体组从腔室去除,并对肽、多肽或蛋白质中的至少一个进行成像,从而形成抗体:分泌的肽、抗体:分泌的多肽或抗体:分泌的蛋白质复合物中的至少一个。成像允许在与靶细胞或刺激剂接触后鉴定对象细胞的分泌蛋白组。在一些实施方案中,所述方法还包括以下至少一个:破坏对象细胞与靶细胞或刺激剂之间的接触,和对象细胞和靶细胞或刺激剂包含在组合物中。在一些实施方案中,对象细胞和靶细胞或刺激剂流体连通,对象细胞和靶细胞或刺激剂包含在组合物中。在这样的实施方案中,对象细胞和靶细胞或刺激剂流体连通,并且所述方法还包括从组合物中去除靶细胞或刺激剂的步骤。

[0139] 在一些实施方案中,异质细胞群是功能异质细胞群,其中功能异质细胞群可包含至少两个细胞,其响应刺激产生分泌蛋白组,并且第一细胞产生第一分泌蛋白组,和第二细胞产生第二分泌蛋白组。在一些实施方案中,所述第一分泌蛋白组和所述第二分泌蛋白组不相同。在一些实施方案中,分泌蛋白组包含一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质,其指示减弱或降低的细胞功能或细胞活力。

[0140] 本公开内容的分泌蛋白组可以包含一个或多个肽、多肽、蛋白质、小分子和/或离子。当分泌蛋白组包含小分子或离子时,除抗体外或代替抗体,可使用可检测标记来鉴定、定量或以其他方式分析分泌蛋白组的小分子和离子。此外,本公开内容的分泌蛋白组可以主动或被动地从对象细胞释放。例如,本公开内容的分泌蛋白组可以通过囊泡、细胞间间隙连接和/或跨膜通道或泵从对象细胞释放。在一些实施方案中,分泌蛋白组包含一个或多个不同的肽、多肽或蛋白质,其指示增强或增加的炎症,和/或增加的细胞活性或细胞刺激。

[0141] 在一些实施方案中,功能异质细胞群包含一个或多个免疫细胞,其中所述一个或多个免疫细胞可包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。在某些实施方案中,T淋巴细胞包括幼稚T淋巴细胞、活化的T淋巴细胞、效应T淋巴细胞、辅助性T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆T淋巴细胞或记忆干T淋巴细胞。在一些实施方案中,T淋巴细胞表达非天然存在的抗原受体。在某些实施方案中,T淋巴细胞表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0142] 在一些实施方案中,功能异质细胞群包含一个或多个免疫细胞,其中所述一个或多个免疫细胞可包含T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。在一些实施方案中,B淋巴细胞包括浆母细胞、浆细胞、记忆B淋巴细胞、调节性B细胞、滤泡B细胞或边缘区B细胞。

[0143] 在一些实施方案中,对象细胞是免疫细胞,其可以包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。在某些实施方案中,T淋巴细胞包括幼稚T淋巴细胞、活化T淋巴细胞、效应T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆T淋巴细胞或记忆干T淋巴细胞。在一些实施方案中,T淋巴细胞表达非天然存在的抗原受体,并且T淋巴细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0144] 在一些实施方案中:

[0145] -对象细胞是免疫细胞,其可以包括T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞;

[0146] -B淋巴细胞可以包括浆母细胞、浆细胞、记忆B淋巴细胞、调节性B细胞、滤泡B细胞或边缘区B细胞;

[0147] -功能异质细胞群(见上文)或对象细胞可以包括:

[0148] 一个或多个神经元细胞(例如,神经元、神经胶质细胞、星形胶质细胞、卫星细胞或肠神经胶质细胞);

[0149] 一个或多个内分泌细胞(例如,分离或衍生自松果体、垂体、胰腺、卵巢、睾丸、甲状腺、甲状旁腺、下丘脑或肾上腺);

[0150] 一个或多个外分泌细胞(例如,分离或衍生自唾液腺、汗腺或胃肠道的组成部分-其可包括口、胃、小肠和大肠)。

- [0151] 在一些实施方案中,在腔室中使对象细胞和靶细胞(或刺激剂)接触的步骤包括:
- [0152] -对象细胞与靶细胞或刺激剂的直接接触;
- [0153] -对象细胞与靶细胞或刺激剂的间接接触(例如,对象细胞与靶细胞或刺激剂之间的流体连通,对象细胞与靶细胞或刺激剂之间通过天然或人工细胞外基质的连通,其中对象细胞与靶细胞或刺激剂之间的连通可以通过中间细胞进行);
- [0154] 在一些实施方案中,靶细胞是以下中的至少一个:
- [0155] -癌细胞(例如,原代癌细胞,其可以是转移性消除细胞)或培养的癌细胞、B淋巴细胞,
- [0156] -细菌、酵母或微生物,感染的细胞(例如,可能已经接触或可能已经暴露于病毒、细菌、酵母或微生物的感染的细胞),以及
- [0157] -宿主细胞(例如,从与对象细胞相同的个体分离或衍生的任何细胞;在一些实施方案中,宿主细胞使自身免疫反应持续存在)。
- [0158] 术语“功能”细胞旨在描述不会促成宿主中的疾病或病症的活细胞。可选择地或另外地,术语“功能”细胞可描述没有导致宿主中的疾病或病症的任何已知突变的细胞。例如,功能细胞可以是非癌性的和/或非自身免疫性的。
- [0159] 在一些实施方案中,刺激剂包含可以是单克隆抗体的刺激性抗体,其可以是:
- [0160] -完全人抗体,
- [0161] -人源化抗体,
- [0162] -嵌合抗体,
- [0163] -重组抗体或修饰抗体,例如:与具有相同表位特异性的完全人源抗体相比时的一个或多个序列变异,一个或多个修饰或合成的氨基酸,或增强刺激功能的化学部分;刺激性抗体特异性结合(在一些实施方案中)T细胞调节蛋白的表位(在一些实施方案中,T细胞调节蛋白包括程序性细胞死亡蛋白I(PD-I)),以及纳武单抗(Nivolumab)或其生物类似物。
- [0164] 在一些实施方案中,刺激剂包含刺激配体(例如,程序性死亡配体I(PD-LI))。
- [0165] 在一些实施方案中:
- [0166] -抗体组的每个抗体附着至表面,该表面可去除地附着至腔室;
- [0167] -抗体组的每个抗体附着至表面以形成重复图案,并且在一些实施方案中,基板多个腔室中的每个腔室包括图案的重复;
- [0168] 根据一些实施方案,抗体组形成图案,其中每个重复包含指定抗体的完整组。例如,如果抗体组包含抗体“a”、“b”和“c”,则图案的每个重复也包含抗体“a”、“b”和“c”中的至少一个。图案只需要具有尺寸标度,使得每个腔室与图案的至少一个重复对齐。在一些实施方案中,图案只需要具有尺寸标度,使得每个腔室与图案的一个重复对齐。当额外的可检测标记被添加到组中以鉴定、捕获或量化分泌的小分子和/或离子时,可检测标记也按照为抗体图案设定的相同规则重复。
- [0169] 在一些实施方案中,足以允许对象细胞中的至少一个分泌肽、多肽和蛋白质中的至少一个,以及特异于至少一个蛋白质的抗体组的至少一个抗体结合至少一个肽、多肽或蛋白质,从而形成抗体:分泌的肽、抗体:分泌的多肽或抗体:分泌的蛋白质复合物中的至少一个的条件可包括5%CO<sub>2</sub>和37℃持续2小时、约2小时或至少2小时的时间段。可选择地,该时间段可以是4小时、约4小时或至少4小时;8小时、约8小时或至少8小时;12小时、约12小时

或至少12小时;16小时、约16小时或至少16小时;或24小时、约24小时或至少24小时。在某些实施方案中,该时间段是16小时、约或至少16小时。

[0170] 在一些实施方案中,基板的多个腔室中的至少一个腔室包含细胞培养基,其在多个步骤(例如,从使对象细胞和靶细胞或刺激剂接触到去除包含与从对象细胞分泌的肽、多肽或蛋白质中的一个或多个的抗体复合物的抗体组)中保持对象细胞的活力。

[0171] 在一些实施方案中,提供了确定多功能强度指数 (PSI) 的步骤(其可以作为一个步骤包括在一个和/或另一个公开的方法的实施方案中)。多功能性是旨在用于细胞疗法的细胞的功效和效力的量度。特别有价值的是多功能强度指数 (PSI),它是样品中细胞的多功能性以及每个细胞分泌的细胞因子的信号强度的指标。它是通过将样品的多功能细胞(分泌两个或更多个细胞因子的单细胞)的百分比乘以这些细胞因子的平均信号强度得出的。关于PSI的其他信息可以在W02018/049418(其内容以其整体并入本文中)中找到。

[0172] 因此,在一些实施方案中,PSI是所述异质细胞群中多功能对象细胞的百分比与两个或更多个细胞因子的平均信号强度的乘积。两个或更多个细胞因子的平均信号强度可以是两个或更多个不同细胞因子(即AB相对AA)的平均信号强度。在一些实施方案中,多功能对象细胞在单细胞水平上分泌至少两个细胞因子,它们可以是不同的细胞因子(即AB相对AA)或是相同的(例如AB和AB)。在一些实施方案中,PSI的增加指示多功能对象细胞的效力增加。

[0173] 在一些实施方案中,受刺激的细胞可以表现出比未受刺激的细胞高1x、2x、3x、4x、5x、10x、25x、50x、100x或1000x的PSI。PSI可以进一步分解为定义的细胞因子组,从而说明特定细胞因子组对细胞多功能性的影响。在某些实施方案中,效应细胞因子是多功能性的主要驱动因素,因为它们占样品细胞的总PSI的约75%。可以分析每个个体细胞因子对细胞的整体PSI的贡献。因此,在某些实施方案中,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个细胞因子可以驱动样品相对于细胞的整体分泌蛋白组的多功能强度(尽管在一些实施方案中,其他细胞因子对样品的PSI的贡献程度较小)。

[0174] 在一些实施方案中,通过一种和/或另一种公开的方法产生的分泌蛋白组用于鉴定表达特异性结合靶细胞上呈递的抗原的CAR、特异性结合刺激剂的CAR或特异性结合靶细胞上呈递的抗原并特异性结合刺激剂的CAR的T淋巴细胞;

[0175] 在一些实施方案中,通过本公开内容的一种和/或另一种方法产生的分泌蛋白组可用于评估细胞疗法的安全性,其中细胞疗法包含对象细胞和:

[0176] -细胞疗法旨在响应靶细胞或刺激剂;当分泌蛋白组缺乏刺激免疫系统、指示降低的细胞活力以及指示对靶细胞的选择性反应中的至少一个的一个或多个肽、多肽或蛋白质时,细胞疗法被认为是安全的;

[0177] -对象细胞是表达嵌合抗原受体 (CAR) 的T细胞,并且细胞疗法旨在响应靶细胞或刺激剂,其中靶细胞是表达嵌合抗原受体 (CAR) 所特异性结合的抗原的癌细胞,并且在结合抗原后,嵌合抗原受体 (CAR) 刺激T细胞。当分泌蛋白组包含刺激免疫系统到高于第一阈值的一个或多个肽、多肽或蛋白质时,细胞疗法被认为是有效的,其中一个或多个肽、多肽或蛋白质包含一个或多个细胞因子,并且所述一个或多个细胞因子选自效应、刺激性或趋化细胞因子。当分泌蛋白组包含介导有害过程的一个或多个肽、多肽或蛋白质时,细胞疗法被认为是安全的,其中所述一个或多个肽、多肽或蛋白质包含一个或多个细胞因子,并且其中

所述一个或多个细胞因子选自调节性和炎性细胞因子。在该用途的一些实施方案中,效应细胞因子选自颗粒酶B、IFN- $\gamma$ 、MIP-1a、Performin、TNF- $\alpha$ 和TNF- $\beta$ 。

[0178] 在上述用途的一些实施方案中:

[0179] -刺激性细胞因子可以选自GM-CSF、IL-12、IL-15、IL-2、IL-21、IL-5、IL-7、IL-8和IL-9,

[0180] -趋化细胞因子可以选自CCL-11、IP-10、MIP-1和RANTES;

[0181] -调节性细胞因子可以选自IL-10、IL-13、IL-22、IL-4、TGF-1、sCD137和sCD40L;

[0182] -炎性细胞因子可以选自IL-17A、IL-17F、IL-1、IL-6、MCP-1和MCP-4;

[0183] -有害过程可能包括炎症;

[0184] -有害过程可能包括自身免疫反应;和/或

[0185] -有害过程包括对靶细胞的非选择性反应。

[0186] 在一些实施方案中,提供了一种鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法的方法,并且其包括根据本公开内容的鉴定来自对象细胞的分泌蛋白组的方法检测对象细胞群的每个对象细胞的分泌蛋白组的至少一个组分,鉴定对象细胞群的多功能细胞亚群,其中对象细胞群的对象细胞的多功能细胞分泌两个或更多个信号传导分子,计算对象细胞群的多功能性的百分比,其中多功能性的百分比是对象细胞群内多功能细胞的百分比,测量对象细胞群的每个多功能细胞的分泌蛋白组的第一信号传导分子的信号强度,测量对象细胞群的每个多功能细胞的分泌蛋白组的第二信号传导分子的信号强度,计算对象细胞群的每个多功能细胞的多功能强度指数(PSI),其中PSI包括(a)对象细胞群的多功能性百分比与第一信号传导分子的信号强度的乘积和(b)对象细胞群的多功能性百分比与第二信号传导分子的信号强度的乘积,当PSI指示对象细胞群中至少50%的对象细胞是多功能的、第一信号传导分子的信号强度指示腔室内的第一信号传导分子的浓度在2pg/ml和10,000pg/ml之间(包括终点)并且第二信号传导分子的信号强度指示腔室内的第二信号传导分子的浓度在2pg/ml和10,000pg/ml之间(包括终点)时,鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法。所述方法还可以包括当PSI指示对象细胞群中少于50%的对象细胞是多功能的、第一信号传导分子的信号强度指示腔室内的第一信号传导分子的浓度小于2pg/ml和第二信号传导分子的信号强度指示腔室内的第二信号传导分子的浓度小于2pg/ml时,鉴定对象细胞群不能有效用于过继细胞疗法。

[0187] 在用于鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法的一些实施方案中,对象细胞群包含多个免疫细胞,所述免疫细胞可以是T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或其组合。T淋巴细胞可以是天然T淋巴细胞、活化T淋巴细胞、效应T淋巴细胞、辅助T淋巴细胞、细胞毒性T淋巴细胞、 $\gamma$ - $\delta$ T淋巴细胞、调节性T淋巴细胞、记忆T淋巴细胞,或记忆干T淋巴细胞。此外,T淋巴细胞可以表达非天然存在的抗原受体和/或嵌合抗原受体(CAR)。

[0188] 在一些实施方案中,鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法:

[0189] -对象细胞群包括:

[0190] 多个神经元细胞(例如,神经元、神经胶质细胞、星形胶质细胞、卫星细胞、肠神经胶质细胞或其组合);

[0191] 多个内分泌细胞(例如,从松果体、垂体、胰腺、卵巢、睾丸、甲状腺、甲状旁腺、下丘

脑或肾上腺分离或衍生的一个或多个细胞) ;和/或

[0192] 多个外分泌细胞(例如,从唾液腺、汗腺或胃肠道的组成部分分离或衍生的一个或多个细胞,其中胃肠道的组成部分包括口、胃、小肠和大肠)。

[0193] -靶细胞:

[0194] 是癌细胞(例如,原发癌细胞/转移细胞或培养的癌细胞);

[0195] 是B淋巴细胞;

[0196] 是细菌、酵母或微生物;

[0197] 是感染的细胞(例如,可能已经接触或可能已经暴露于病毒、细菌、酵母或微生物的细胞);

[0198] 是宿主细胞(例如,从与对象细胞相同的个体分离或衍生的任何细胞;宿主细胞可能会或可能不会使自身免疫反应持续存在,并且宿主细胞可以是功能性细胞);

[0199] 在一些实施方案中,鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法:

[0200] -第一信号传导分子是肽、多肽或蛋白质(例如细胞因子),和/或第二信号传导分子是肽、多肽或蛋白质(例如细胞因子);

[0201] -对象细胞群包含多个T淋巴细胞,其中靶细胞是癌细胞、感染的细胞或使自身免疫反应持续存在的宿主细胞,第一信号传导分子包含效应细胞因子、刺激性细胞因子或趋化细胞因子,第二信号传导分子包括效应细胞因子、刺激性细胞因子或趋化细胞因子。在一些实施方案中:

[0202] 多个T淋巴细胞中的至少一个T淋巴细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR),其中多个T淋巴细胞中的每个T淋巴细胞表达嵌合抗原受体(CAR);和/或

[0203] 效应细胞因子可以是颗粒酶B、IFN- $\gamma$ 、MIP-1 $\alpha$ 、Performin、TNF- $\alpha$ 或TNF- $\beta$ 。在某些实施方案中,刺激性细胞因子是GM-CSF、IL-12、IL-15、IL-2、IL-21、IL-5、IL-7、IL-8和IL-9(在一些实施方案中,趋化细胞因子是CCL-11、IP-10、MIP-1或RANTES);

[0204] 在一些实施方案中,鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法,所述方法可以还包括当发生以下时,鉴定对象细胞群安全用于过继细胞疗法:

[0205] -PSI指示对象细胞群中至少50%的对象细胞是多功能的,

[0206] -第一信号传导分子的信号强度指示腔室内的第一信号传导分子的浓度小于2pg/ml,

[0207] -第二信号传导分子的信号强度指示腔室内的第二信号传导分子的浓度小于2pg/ml,

[0208] -对象细胞群包含多个T淋巴细胞,

[0209] -第一信号传导分子包含调节性细胞因子或炎性细胞因子,并且

[0210] -第二信号传导分子包含调节性细胞因子或炎性细胞因子;和

[0211] 因此,在一些这样的实施方案中:

[0212] -调节性细胞因子可以是IL-10、IL-13、IL-22、IL-4、TGF-1、sCD137和sCD40L;

[0213] -炎性细胞因子可以是IL-17A、IL-17F、IL-1、IL-6、MCP-1和MCP-4;

[0214] -多个T淋巴细胞中的至少一个T淋巴细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR),并且多个T淋巴细胞中的每个T淋巴细胞可以表达嵌合抗原受体(CAR)。

[0215] 在一些实施方案中,当鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法时,对象细胞群可

包含至少100个细胞、至少500个细胞、至少1000个细胞或至少5000个细胞。

[0216] 在鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法中,在一些实施方案中,检测步骤包括检测来自对象细胞群的每个对象细胞的分泌蛋白组的组分,包括对象细胞群的至少2个组分,至少10个组分,至少20个组分,至少30个组分;至少50个组分或至少100个组分。

[0217] 在一些实施方案中,在鉴定对象细胞群有效用于过继细胞疗法中:

[0218] -多功能细胞的百分比包括分泌两个或更多个信号传导分子的多功能细胞的第一百分比,分泌三个或更多个信号传导分子的多功能细胞的第二百分比,分泌四个或更多个信号传导分子的多功能细胞的第三百分比,分泌五个或更多个信号传导分子的多功能细胞的第四百分比,以及分泌递增数量的信号传导分子的多功能细胞的后续百分比;和/或

[0219] -信号强度的测量包括分别检测来自特异于第一或第二信号传导分子的抗体与第一或第二信号传导分子的复合物的荧光信号,并针对参考信号标准化每个荧光信号以确定相对荧光单位(RFU)值(在一些实施方案中,参考信号是最大信号、最小信号或来自具有恒定或已知浓度的分泌蛋白组的组分的信号,和/或参考信号是对象细胞的分泌蛋白组的最丰富的组分);和/或

[0220] -并且所述方法还包括以下一项或多项:

[0221] 测量每个多功能细胞的分泌蛋白组的第三个或后续信号传导分子;和

[0222] 确定第一个信号传导分子、第二个信号传导分子或后续信号传导分子对多功能细胞亚群对靶细胞或刺激剂的反应的相对贡献,其中相对贡献是来自每个多功能细胞的第一个信号传导分子、第二个信号传导分子或后续信号传导分子的每个多功能细胞的PSI的百分比的平均值和多功能细胞亚群的总PSI的乘积。

[0223] 可以在PCT/US2017/051223(公开为W02018/049418,其内容通过引用整体并入本文)中找到对本公开内容的一些所述功能性的支持。

[0224] 因此,在一些实施方案中,靶细胞和/或刺激细胞可以在具有无血清细胞培养基的细胞培养瓶中培养过夜。任选地,培养基可以补充有丙酮酸钠、MEM维生素溶液、HEPES、人AB血清、抗生素和细胞因子。过夜恢复后,可以分离细胞。然后可以在37℃、5%CO<sub>2</sub>在补充的细胞培养基中培养细胞。

[0225] 第一个非限制性实施例:使用激光裂解捕获细胞

[0226] 细胞培养。细胞在具有无血清细胞培养基的细胞培养瓶中在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养过夜。培养基补充有丙酮酸钠、MEM维生素溶液、HEPES、人AB血清、抗生素和细胞因子。

[0227] 单细胞分析。分析单细胞以鉴定其组成蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子。在进行单细胞测定之前,对本公开内容的包含多个分离的腔室的基板进行等离子体处理以增加亲水性。然后将基板在BSA/PBS中封闭30分钟,然后收集细胞,用抗人蛋白抗体和抗人蛋白荧光抗体染色并孵育。然后通过离心将细胞沉淀并重新悬浮在新鲜培养基中。紧接在测定之前,将包含多个分离的腔室的基板用培养基冲洗并使用压缩空气干燥。然后将包含多个捕获剂的表面定位在载玻片上并固定到定制的夹持系统/装置中。将细胞悬浮液吸移到包含多个捕获剂的表面上,其中所述表面包括附着于其上的抗体/捕获剂的重复图案。然后将表面与基板接触,使得抗体的重复图案面向包含多个分离的腔室的基板并且使得图案的每个重复与阵列的腔室对齐。然后在定制的夹持系统中将基板/盖表面紧紧地夹紧在一起。然后将个体细胞分离到腔室中,并立即通过荧光成像方法成像。



[0228] 荧光细胞分析。然后通过荧光成像分析单个细胞以鉴定组成蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子。荧光显微镜用于获取包含多个含有细胞的分离的腔室的基板的明场和荧光图像。可以使用数码相机拍摄整个基板的图像。

[0229] 抗体图案化表面的成像。使用数字扫描仪获得包含多个捕获剂的表面的扫描荧光图像。两个颜色通道488(蓝色,PMT350,Power90)和635(红色,PMT600,Power90)可用于收集荧光信号。然后将获得的图像导出并处理以量化每个分离的腔室中细胞的组分的表达水平。

[0230] 个体细胞的激光消融。被鉴定具有低于预定阈值的蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞被靶向用于通过激光裂解消融。通过具有足够功率的激光器照射容纳被靶向用于消融的细胞的整个腔室,以导致全部细胞裂解。激光不需要聚焦在腔室内的个体细胞上,因为整个腔室的照射足以导致细胞裂解。

[0231] 完整和活细胞的收集。收集被鉴定具有高于预定阈值的蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞。可释放地偶联的包含腔室和细胞的基板和包含多个捕获剂的表面被分离。使足够体积的收集流体流过基板以驱逐腔室内的完整细胞,并且收集含有同质细胞群的流体用于进一步分析或处理。

[0232] 第一个非限制性实施例:通过纳米吸移捕获细胞

[0233] 细胞培养。细胞在具有无血清细胞培养基的细胞培养瓶中在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养过夜。培养基补充有丙酮酸钠、MEM维生素溶液、HEPES、人AB血清、抗生素和细胞因子。

[0234] 单细胞分析。分析单细胞以鉴定其组成蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子。在进行单细胞测定之前,对本公开内容的包含多个分离的腔室的基板进行等离子体处理以增加亲水性。然后将包含多个分离的腔室的基板在BSA/PBS中封闭30分钟。然后收集细胞,用抗人蛋白抗体和抗人蛋白荧光抗体染色并孵育。然后通过离心将细胞沉淀并重新悬浮在新鲜培养基中。紧接在测定之前,可以用培养基冲洗包含多个分离的腔室的基板并使用压缩空气干燥。然后可以将包含多个捕获剂的表面定位在载玻片上并固定到定制的夹持系统中。然后可以将细胞悬浮液吸移到包含多个捕获剂的表面上。具有附着于其上的抗体的重复图案的表面(也称为包含多个捕获剂的表面)可以与包含多个分离的腔室的基板接触,使得抗体的重复图案面向包含多个分离的腔室的基板并且使得图案的每个重复与阵列的腔室对齐。包含多个分离的腔室的基板和包封阵列的表面(具有抗体图案)可以在定制的夹持系统中紧紧地夹紧在一起。然后将个体细胞分离到腔室中,并立即通过荧光成像方法成像。

[0235] 荧光细胞分析。然后通过荧光成像分析单个细胞,它鉴定组成蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子。荧光显微镜用于获取包括多个含有细胞的分离的腔室的基板的明场和荧光图像。可以使用数码相机拍摄整个基板的图像。

[0236] 抗体图案化表面的成像。使用数字扫描仪获得包含多个捕获剂的表面的扫描荧光图像。两个颜色通道488(蓝色,PMT350,Power90)和635(红色,PMT600,Power90)可用于收集荧光信号。然后将获得的图像导出并处理以量化每个分离的腔室中细胞的组分的表达水平。

[0237] 个体细胞的激光消融。被鉴定具有低于预定阈值的蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞被靶向用于通过激光裂解消融。通过具有足够功率的激光器照射容纳被靶向用于消融的细胞的整个腔室,以导致全部细胞裂解。激光不需要聚焦在腔室

内的个体细胞上,因为整个腔室的照射足以导致细胞裂解。

[0238] 完整和活细胞的收集。收集被鉴定具有高于预定阈值的蛋白质、肽、多肽、核酸、小分子和大分子的表达水平的细胞。可释放地偶联的包含腔室和细胞的基板和包含多个捕获剂的表面被分离。然后可以通过纳米移液管从它们各自的腔室中收集个体细胞,并单独储存或合并以形成同质细胞群。

[0239] 定义

[0240] 除非另有定义,否则使用的与本公开内容相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,而复数术语应包括单数。通常,使用的与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡核苷酸或多核苷酸化学和杂交相关的命名法和技术是本领域众所周知和常用的那些。标准技术用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术根据制造商的说明书或如本领域中通常完成的或如本文所述的进行。除非特别相反地指出,本公开内容的至少一些实施方案的实践可以采用本领域技术范围内的病毒学、免疫学、微生物学、分子生物学和重组DNA技术的常规方法,出于说明目的,其中许多在下面进行了描述。这些技术在文献中有充分的解释。参见,例如,Sambrook,等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第2版,1989);Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1982);DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(D.Glover, ed.);Oligonucleotide Synthesis(N.Gait,ed.,1984);Nucleic Acid Hybridization(B.Hames&S.Higgins,eds.,1985);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,eds.,1984);Animal Cell Culture(R.Freshney,ed.,1986);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984)。

[0241] 如本文所用的术语“抗体”(Ab)包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所需的生物学活性即可。术语“免疫球蛋白”(Ig)与本文的“抗体”可互换使用。

[0242] “分离的抗体”是已经从其天然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染组分是会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,并且可包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至:(1)通过Lowry法测定的抗体的大于95重量%,以及最优选大于99重量%;(2)通过使用旋转杯测序仪足以获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或者(3)使用考马斯蓝或优选银染色在还原或非还原条件下通过SDS-PAGE是具有均一性的。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为抗体的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的抗体。

[0243] 本公开内容的捕获剂可包含一种或多种单克隆抗体。如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可能以少量存在的可能的天然发生的突变之外,构成群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点还在于它们可以在未被其他抗体污染的情况下合成。

[0244] 本文考虑的单克隆抗体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而其余部分所述链与

衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这些抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性即可。本文主要感兴趣的嵌合抗体包括具有一个或多个抗原结合序列(例如CDR)并含有一个或多个衍生自非人抗体的序列的抗体,例如FR或C区序列。另外,本文主要感兴趣的嵌合抗体包括包含一个抗体类或亚类的人可变结构域抗原结合序列和另一个序列的嵌合抗体,例如衍生自另一抗体类或亚类的FR或C区序列。本文感兴趣的嵌合抗体还包括含有与本文所述相关的可变结构域抗原结合序列或衍生自不同物种的那些,例如非人灵长类动物(例如,旧大陆猴,猿等)。嵌合抗体还包括灵长类化和人源化抗体。

[0245] 本公开内容的捕获剂可包含人源化抗体。“人源化抗体”通常被认为是具有从非人源引入的一个或多个氨基酸残基的人抗体。这些非人氨基酸残基通常称为“导入”残基,其通常取自“导入”可变结构域。传统上通过用导入的高变区序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。因此,这种“人源化”抗体是嵌合抗体,其中基本上少于完整的人可变结构域已经被来自非人物种的相应序列取代。

[0246] “人抗体”是仅含有存在于人天然产生的抗体中的序列的抗体。然而,如本文所用,人抗体可包含在天然存在的人抗体中未发现的残基或修饰,包括本文所述的那些修饰和变体序列。这些通常用于进一步改善或增强抗体性能。

[0247] 本公开内容的捕获剂可包含完整抗体。“完整”抗体是包含抗原结合位点以及CL和至少重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如,人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。优选地,完整抗体具有一种或多种效应功能。

[0248] 本公开内容的捕获剂可包含抗体片段。“抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0249] 本公开内容的捕获剂可包含抗体的功能片段或类似物。短语抗体的“功能片段或类似物”是具有与全长抗体相同的定性生物学活性的化合物。例如,抗IgE抗体的功能片段或类似物是能够以这样的方式结合IgE免疫球蛋白的那些,以便防止或基本上降低这种分子具有的以下能力:结合高亲和力受体FcγRI的能力。

[0250] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,和残留的“Fe”片段,这一名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由整个L链以及H链的可变区结构域(VH)和一条重链(CH1)的第一恒定结构域组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的,即它具有单个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生单个大的F(ab')<sub>2</sub>片段,其大致对应于具有二价抗原结合活性的两个二硫键连接的Fab片段,并且仍然能够交联抗原。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于在CH1结构域的羧基末端具有额外的少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中Fab'的名称,其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离巯基。F(ab')<sub>2</sub>抗体片段最初是作为Fab'片段对产生的,它们之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0251] “Fe”片段包含通过二硫化物保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应功能由Fe区中的序列确定,该区域也是在某些类型的细胞上发现的Fe受体(FcR)识别的部分。

[0252] “Fv”是含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中产生六个高变环(各来自H和L链的三个环),其贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原特异的CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于整个结合位点。

[0253] 本公开内容的捕获剂可包含单链抗体(也称为scFv)。“单链Fv”也缩写为“sFv”或“scFv”,其是包含连接成单一多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。

[0254] 优选地,sFv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,其使sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994); Borrebaeck 1995, 见下文。

[0255] 本公开内容的捕获剂可包含双抗体。术语“双抗体”是指通过构建具有VH和VL结构域之间的短接头(约5~10个残基)的sFv片段(参见前段)制备的小抗体片段,使得实现V结构域的链间但不是链内配对,产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的VH和VL结构域存在于不同的多肽链上。双抗体更全面地描述于例如EP 404,097; WO 93/11161; 和Hollinger等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)。

[0256] 本公开内容的捕获剂可包含双特异性抗体。在某些实施方案中,抗体是双特异性或多特异性的。双特异性抗体是对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以结合单个抗原的两个不同表位。其他此类抗体可以将第一抗原结合位点与第二抗原的结合位点组合。制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类,这些杂交瘤(四源杂交瘤)quadromas产生十种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物收率低。

[0257] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选地,融合体具有Ig重链恒定结构域,其包含至少部分铰链、CH2和CH3区域。优选具有包含轻链键合所需位点的第一重链恒定区(CH1)存在于至少一种融合体中。将编码免疫球蛋白重链融合体和免疫球蛋白轻链(如果需要)的DNA插入单独的表达载体中,并共转染到合适的宿主细胞中。当在构建体中使用的三条多肽链的不等比例提供所需双特异性抗体的最佳产率时,这在调节实施方案中三种多肽片的相互比例方面提供了更大的灵活性。然而,当以相等比例表达至少两条多肽链导致高产率或当比率对期望的链组合的产量没有显著影响时,可以将两条或所有三条多肽链的编码序列插入单一表达载体中。

[0258] 如本文所用,如果抗体与抗原以可检测水平反应,优选具有大于或等于约 $10^4 \text{M} \cdot 1$ 、或大于或等于约 $10^5 \text{M} \cdot 1$ 、大于或等于约 $10^6 \text{M} \cdot 1$ 、大于或等于约 $10^7 \text{M} \cdot 1$ 、或大于或等于 $10^8 \text{M} \cdot 1$ 的亲合常数 $K_a$ ,则称抗体是“免疫特异性的”、“特异性的”或“特异性结合”抗原。抗体对其同源抗原的亲和力通常也表示为解离常数 $K_D$ ,并且在某些实施方案中,如果抗体以小于或等于 $10^{-4} \text{M}$ 、小于或等于约 $10^{-5} \text{M}$ 、小于或等于约 $10^{-6} \text{M}$ 、小于或等于 $10^{-7} \text{M}$ 、或小于或

等于10<sup>-8</sup>M的KD结合,则抗体特异性结合分泌蛋白组的组分。可以使用常规技术容易地测定抗体的亲和力,例如,Scatchard等人描述的那些技术。(Ann.N.Y.Acad.Sci.USA 51:660 (1949))。

[0259] 本公开内容的对象细胞和靶细胞可以从任何物种(包括任何哺乳动物)分离、衍生或制备。用于治疗感染的“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括人,家畜和农场动物,以及动物园,竞技动物或宠物动物,例如狗,猫,牛,马,绵羊,猪,山羊,兔等,优选地,哺乳动物是人。

[0260] 本公开内容的对象细胞可以用于细胞疗法中以治疗疾病或病症。“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“缓解”是指治疗性治疗和预防性(prophylactic)或预防性(preventative)措施;其中目的是预防或减缓(减轻)目标病理状况或病症。需要治疗的患者包括已患有该病症的患者以及易患该病症的患者或需要预防该病症的患者。当接受使用本公开内容的受试细胞的细胞疗法后,患者显示可观察和/或可测量的减少或不存在以下一种或多种时,可以成功地“治疗”受试者或哺乳动物:减少一种或多种与疾病或病症有关的症状;降低发病率和死亡率,改善生活质量问题。用于评估成功治疗和疾病改善的上述参数可通过医生熟悉的常规程序容易地测量。本公开内容的方法可用于在开始治疗受试者之前、期间或之后确定细胞疗法的安全性和/或功效。

[0261] 可以使用一种或多种工具标记本公开内容的捕获剂以使其可检测。如本文所用,“标记”是指可检测的化合物或组合物,其直接或间接与捕获剂(例如抗体)缀合,以产生“标记的”捕获剂(例如抗体)。标记本身可以是可检测的(例如荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0262] 本公开内容的捕获剂可以选择性地或特异性地鉴定、捕获和/或定量分泌蛋白组中的一种或多种小分子。“小分子”在本文中定义为具有低于约500道尔顿的分子量。

[0263] 本公开内容的捕获剂可包括核酸或标记的核酸。术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用,指单链或双链RNA、DNA或混合聚合物。多核苷酸可包括基因组序列、基因组外和质粒序列,以及表达或可适于表达多肽的较小工程化基因区段。

[0264] “分离的核酸”是基本上与其他基因组DNA序列分离的核酸以及天然地伴随天然序列的蛋白质或复合物,例如核糖体和聚合酶。该术语包括已从其天然存在的环境中除去的核酸序列,包括重组或克隆的DNA分离物和由异源系统生物合成的化学合成的类似物或类似物。基本上纯的核酸包括分离形式的核酸。当然,这是指最初分离的核酸,并不排除随后通过人工添加到分离的核酸中的基因或序列。

[0265] 术语“多肽”以其常规含义使用,即作为氨基酸序列使用。多肽不限于产品的特定长度。肽、寡肽和蛋白质包括在多肽的定义内,并且除非另有明确说明,否则这些术语可在本文中互换使用。该术语也不涉及或排除多肽的表达后修饰,例如,糖基化,乙酰化,磷酸化等,以及本领域已知的天然存在的和非天然存在的其他修饰。多肽可以是完整蛋白质或其子序列。

[0266] “分离的多肽”是已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的多肽。在优选的实施方案中,将分离的多肽纯化至(1)通过Lowry法测定的多肽的大于95重量%,以及最优选大于99重量%,(2)通过使用旋转杯测序仪足以获得N-末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或者(3)使用考马斯蓝或优选银染色在还原或非还原条件下通过SDS-

PAGE是具有均一性的。分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽,因为多肽的天然环境的至少一种组分将不存在。然而,通常,通过至少一个纯化步骤制备分离的多肽。

[0267] “天然序列”多核苷酸是与衍生自自然界的多核苷酸具有相同核苷酸序列的多核苷酸。“天然序列”多肽是与衍生自自然界(例如,来自任何物种)的多肽(例如抗体)具有相同氨基酸序列的多肽。这些天然序列多核苷酸和多肽可以从自然界分离,或者可以通过重组或合成方法产生。

[0268] 本文使用的术语多核苷酸“变体”是通常因一个或多个取代、缺失、添加和/或插入而与本文具体公开的多核苷酸不同的多核苷酸。此类变体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过修饰根据本公开内容的一些实施方案的一个或多个多核苷酸序列并评估如本文所述的编码多肽的一种或多种生物活性和/或使用任何多种本领域众所周知的技术。

[0269] 本文使用的术语多肽“变体”是通常因一个或多个取代、缺失、添加和/或插入而与本文具体公开的多肽不同的多肽。此类变体可以是天然存在的或可以是合成产生的,例如,通过修饰本公开内容的至少一些实施方案的一种或多种上述多肽序列并评估如本文所述的多肽的一种或多种生物活性和/或使用任何多种本领域众所周知的技术。可以在本公开内容的多核苷酸和多肽的结构中进行修饰,并且仍然获得编码具有所需特征的变体或衍生多肽的功能分子。当需要改变多肽的氨基酸序列以产生本公开内容的至少一些实施方案的多肽的等效物或甚至改善的变体或部分时,本领域技术人员通常会改变一个或多个编码DNA序列的密码子。

[0270] 例如,某些氨基酸可以取代蛋白质结构中的其他氨基酸,而不会明显丧失其结合其他多肽(例如抗原)或细胞的能力。由于蛋白质的结合能力和性质决定了蛋白质的生物功能活性,因此可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列取代,当然,也可以在其基础DNA编码序列中进行,但获得具有类似性质的蛋白质。因此,预期可以对公开的组合物的肽序列或编码所述肽的相应DNA序列进行各种改变,而不会明显丧失其生物学效用或活性。

[0271] 在许多情况下,多肽变体将含有一个或多个保守取代。“保守取代”是其中氨基酸取代具有类似性质的另一种氨基酸,使得肽化学领域的技术人员预期多肽的二级结构和亲水性质基本上不变。

[0272] 在进行这种改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水性氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用生物学功能方面的重要性通常在本领域中被理解(Kyte和Doolittle,1982)。可以接受的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,这又决定了蛋白质与其他分子的相互作用,例如酶,底物,受体,DNA,抗体,抗原等。根据其疏水性和电荷特征,每种氨基酸都被赋予了亲水指数(Kyte和Doolittle,1982)。这些值是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[0273] 某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或分数的其他氨基酸取代,并且仍然产生具有类似生物活性的蛋白质,即仍然获得生物学功能等同的蛋白质。在进行这种改变时,优选其亲水指数在 $\pm 2$ 以内的氨基酸的取代,特别优选 $\pm 1$ 以内的氨基酸,甚至更特别地优选 $\pm$

0.5以内的氨基酸。可以基于亲水性有效地取代相似的氨基酸。蛋白质的最大局部平均亲水性由其相邻氨基酸的亲水性决定,与蛋白质的生物学特性相关。

[0274] 以下亲水性值分配给氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0 $\pm$ 1);谷氨酸(+3.0 $\pm$ 1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5 $\pm$ 1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);色氨酸(-3.4)。应当理解,氨基酸可以取代具有相似亲水性值的另一种氨基酸,并且仍然获得生物学上等同的,特别是免疫学上等同的蛋白质。在这种变化中,优选亲水性值在 $\pm$ 2以内的氨基酸的取代,特别优选 $\pm$ 1以内的氨基酸取代,甚至更特别地优选 $\pm$ 0.5以内的氨基酸取代。

[0275] 如上所述,氨基酸取代因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,它们的疏水性,亲水性,电荷,大小等。本领域技术人员熟知考虑到各种前述特征的示例性取代,其包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;和缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸。

[0276] 可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性进一步进行氨基酸取代。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;具有相似亲水性值的不带电荷的极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸;甘氨酸和丙氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;和丝氨酸,苏氨酸,苯丙氨酸和酪氨酸。可代表保守变化的其他氨基酸组包括:(1) ala、pro、gly、glu、asp、gln、asn、ser、thr;(2) cys、ser、tyr、thr;(3) val、ile、leu、met、ala、phe;(4) lys、arg、his;和(5) phe、tyr、trp、his。变体还可以或可选择地包含非保守变化。在一个优选的实施方案中,变体多肽与天然序列的不同之处在于取代、缺失或添加五个或更少的氨基酸。变体也可以(或可选择地)通过例如缺失或添加对多肽的免疫原性、二级结构和亲水性质具有最小影响的氨基酸进行修饰。

[0277] 当比较多核苷酸和多肽序列时,如果两个序列中的核苷酸或氨基酸序列在最大对应性比对时是相同的,则称两个序列是“相同的”,如下所述。通常通过在比较窗口上比较序列来鉴定和比较序列相似性的局部区域来进行两个序列之间的比较。如本文所用的“比较窗口”是指至少约20个连续位置的片段,通常为30至约75、40至约50,其中在两个序列最佳对齐后序列可与连续位置的相同数量的参考序列进行比较。

[0278] 用于比较的序列的最佳比对可以使用Lasergene生物信息学软件套件(DNASTAR, Inc., Madison, WI)中的Megalign程序,使用默认参数进行。该程序体现了以下参考文献中描述的几种比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships. Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol.5, Suppl.3, pp.345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp.626-645 Methods in Enzymology vol.183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. 和 Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. 和 Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. 和 Sokal, R.R. (1973)

Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. 和 Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

[0279] 可选择地, 可以如下进行用于比较的序列的最佳比对: 通过 Smith 和 Waterman (1981) Add APL Math 2:482 的局部同一性算法, 通过 Needleman 和 Wunsch (1970) J Mol Biol. 48:443 的同一性比对算法, 通过 Pearson 和 Lipman (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85:2444 的寻找相似性的方法, 通过这些算法的计算机化实施 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI 中的 GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA 和 TFASTA), 或通过检查。

[0280] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的一个优选实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 其分别在 Altschul 等人, (1977) Nucl. Acids Res. 25:3389-3402 和 Altschul 等人, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 中描述。可以使用 BLAST 和 BLAST 2.0, 例如使用本文所述的参数, 以确定根据本公开内容的一些实施方案的多核苷酸和多肽的序列同一性百分比。用于进行 BLAST 分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。

[0281] “同源性”是指在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比同源性后, 多核苷酸或多肽序列变体中的残基与非变体序列相同的百分比。在特定实施方案中, 多核苷酸和多肽变体与本文所述的多核苷酸或多肽具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 的多核苷酸或多肽同源性。

[0282] 附加说明

[0283] 虽然已在本文中描述和说明了本发明的各种实施方案, 但本领域普通技术人员将容易地设想用于进行所述功能和/或获得本文所述的结果和/或一个或多个有利方面的各种其它方法和/或结构, 并且这样的变化和/或修改的每一种被认为在本文描述的本发明的实施方案的范围内。更通常地, 本领域技术人员将容易地理解, 本文所述的所有参数、尺度、材料和构型意欲为一个实例并且实际参数、尺度、材料和构型将取决于对其使用本发明的教导的具体一个或多个应用。本领域技术人员将认可或能够确定本文所述的特定的本发明的实施方案的许多等同物 (使用不超过常规实验)。因此, 应理解, 前述实施方案仅通过举例的方式提出, 并且在所附权利要求、其等同物和本公开内容支持的任何权利要求的范围内, 本发明的实施方案可按与明确描述和要求保护的方式不同的方式来实现。本公开内容的发明性实施方案涉及本文所述的各种个体特性、系统、物品、材料、试剂盒、方法和步骤。另外, 如果这样的特性、系统、物品、材料、试剂盒、方法和步骤不是相互矛盾的, 则两个或更多个这样的特性、系统、物品、材料、试剂盒、方法和步骤的任意组合包括在本公开内容的范围内。在此公开的实施方案还可以与一个或多个特征以及完整的系统、装置和/或方法组合, 以产生其他实施方案和发明。此外, 一些实施方案可以通过具体地缺少在特定现有技术参考文献中公开的一个和/或另一特征而与现有技术区分开来; 即, 一些实施方案的权利要求可以通过包括一个或多个负面限制与现有技术区分开来。

[0284] 此外, 各种发明概念可以体现为一种或多种方法, 已经提供了其实例。作为方法的一部分执行的动作可以以任何合适的方式进行排序。因此, 实施方案可以被构造为以不同于所示出的顺序执行动作, 这可以包括同时执行一些动作, 即使在示例性实施方案中显示为顺序动作。



[0285] 在本申请的任何地方呈现的对出版物或其他文件的任何和所有参考,包括但不限于专利、专利申请、文章、网页、书籍等,通过引用整体并入本文。此外,所有定义应当被理解为优先于词典定义、通过引用并入的文献中的定义和/或所定义的术语的一般含义。

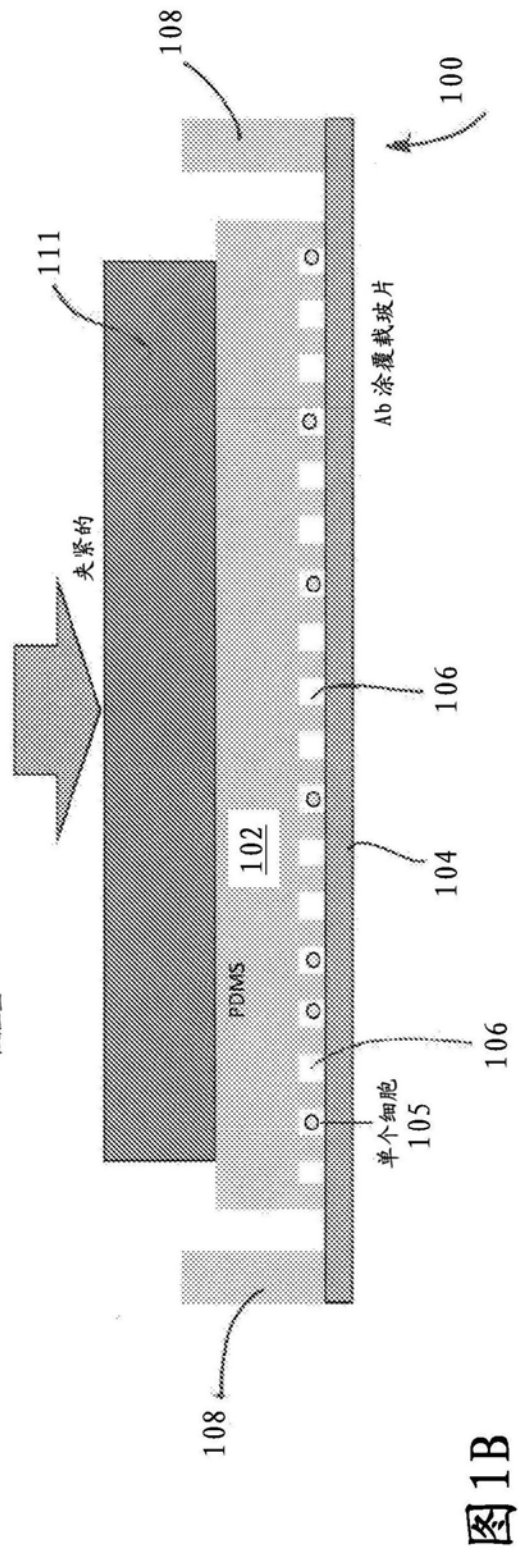
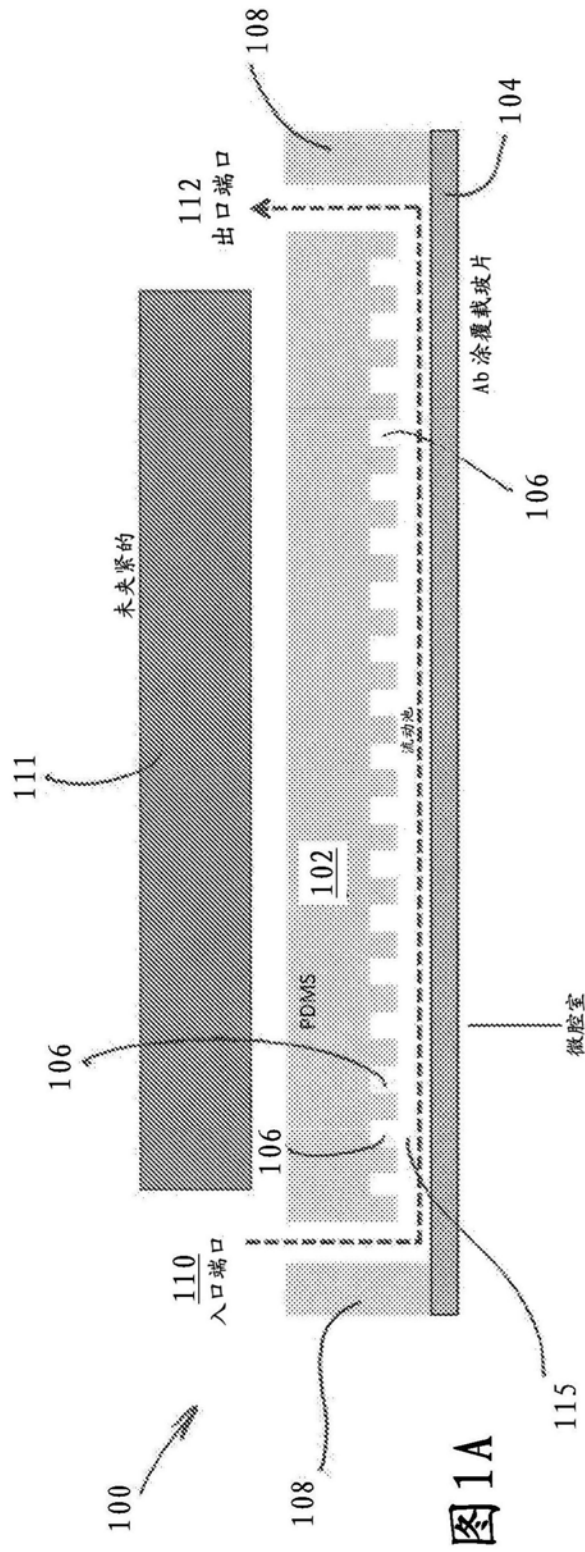
[0286] 除非明确地指示与之相反,否则不定冠词“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”,如本文中在说明书和权利要求中所用,应当被理解为意指“至少一个/一种”。

[0287] 短语“和/或”,如在本文中在说明书和权利要求中所用,应当被理解为意指所连接的元素的“任一个或两者”,即元素在一些情况下结合地存在以及在其它情况下分离地存在。利用“和/或”列出的多个元素应当以相同的方式来解释,即所连接的元素的“一个或多个”。除通过“和/或”从句明确确定的元素外,还可任选地存在其它元素,无论与明确确定的那些元素相关还是无关。因此,作为非限定性实例,对“A和/或B”的提及,当与开放性措辞诸如“包含/包括”结合使用时,在一个实施方案中可仅指A(任选地包括除B以外的元素);在另一个实施方案中可仅指B(任选地包括除A以外的元素);在另一个实施方案中,可指A和B(任选地包括其它元素);依此类推。

[0288] 如本文中在说明书和权利要求中所用,“或”应当被理解为具有与如上定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分开各项时,“或”或“和/或”应当被理解为是包含性的,即包含至少一个,但也包括许多个元素或一系列元素中的多于一个,以及任选地,包括另外未列出的项。只有明确地指明相反的术语,例如“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”或当用于权利要求中时的“由……组成”将指包含多个元素或一系列元素中的正好一个元素。一般地,如本文中所用的术语“或”应当仅在冠有排他性的术语诸如“任一”、“……之一”、“……中的仅一个”或“……中的恰好一个”时被解释为表示排他性选择(即“一个或另一个但非两个”)。在权利要求中使用,“基本上由……组成”应具有专利法领域中使用的普通含义。

[0289] 如本文中在说明书和权利要求中所用,关于一系列一个或多个元素的短语“至少一个”应当被理解为意指选自一系列元素中的任何一个或多个元素的至少一个元素,但不一定包括元素列表内明确列出的每一个元素的至少一个并且不排除元素列表中的元素的任何组合。该定义还允许可任选地存在除短语“至少一个”所指的元素列表内明确确定的元素外的元素,无论与那些明确确定的元素相关还是不相干。因此,作为非限定性实例,“A和B的至少一个”(或,等同地,“A或B的至少一个”或,等同地“A和/或B的至少一个”)可在一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A而无B存在(且任选地包括除B以外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)B而无A存在(且任选地包括除A以外的元素);在另一个实施方案中指至少一个(任选地包括不止一个)A和至少一个(任选地包括不止一个)B(且任选地包括其它元素);依此类推。

[0290] 在权利要求中,以及在上述说明书中,所有过渡短语诸如“包含”、“包括”、“携带”、“具有”、“含有”、“拥有”、“牵涉”、“持有”、“由……组成”等被理解为开放性的,即意指包括但不限于。只有过渡短语“由……组成”和“基本上由……组成”应当分别是封闭性的或半封闭性的过渡短语,如美国专利局专利审查程序手册第2111.03节中所示的。



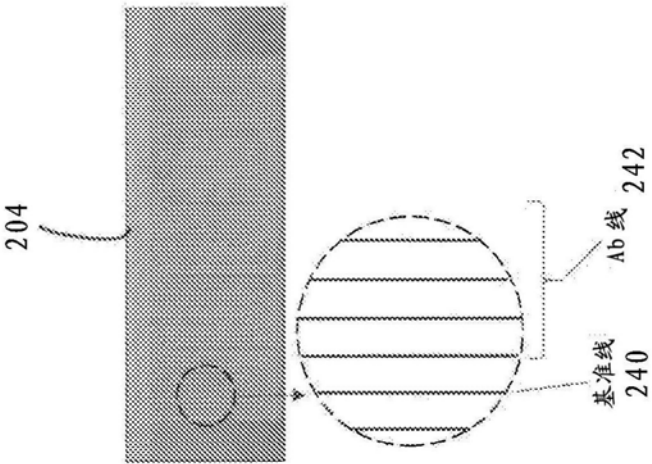


图2A

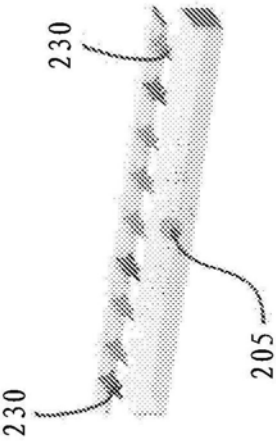


图2B

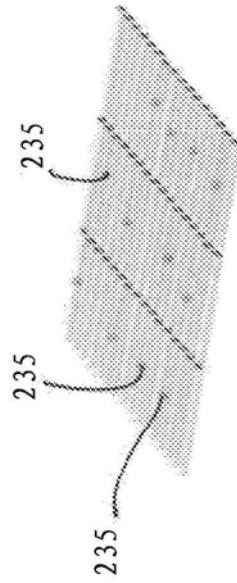
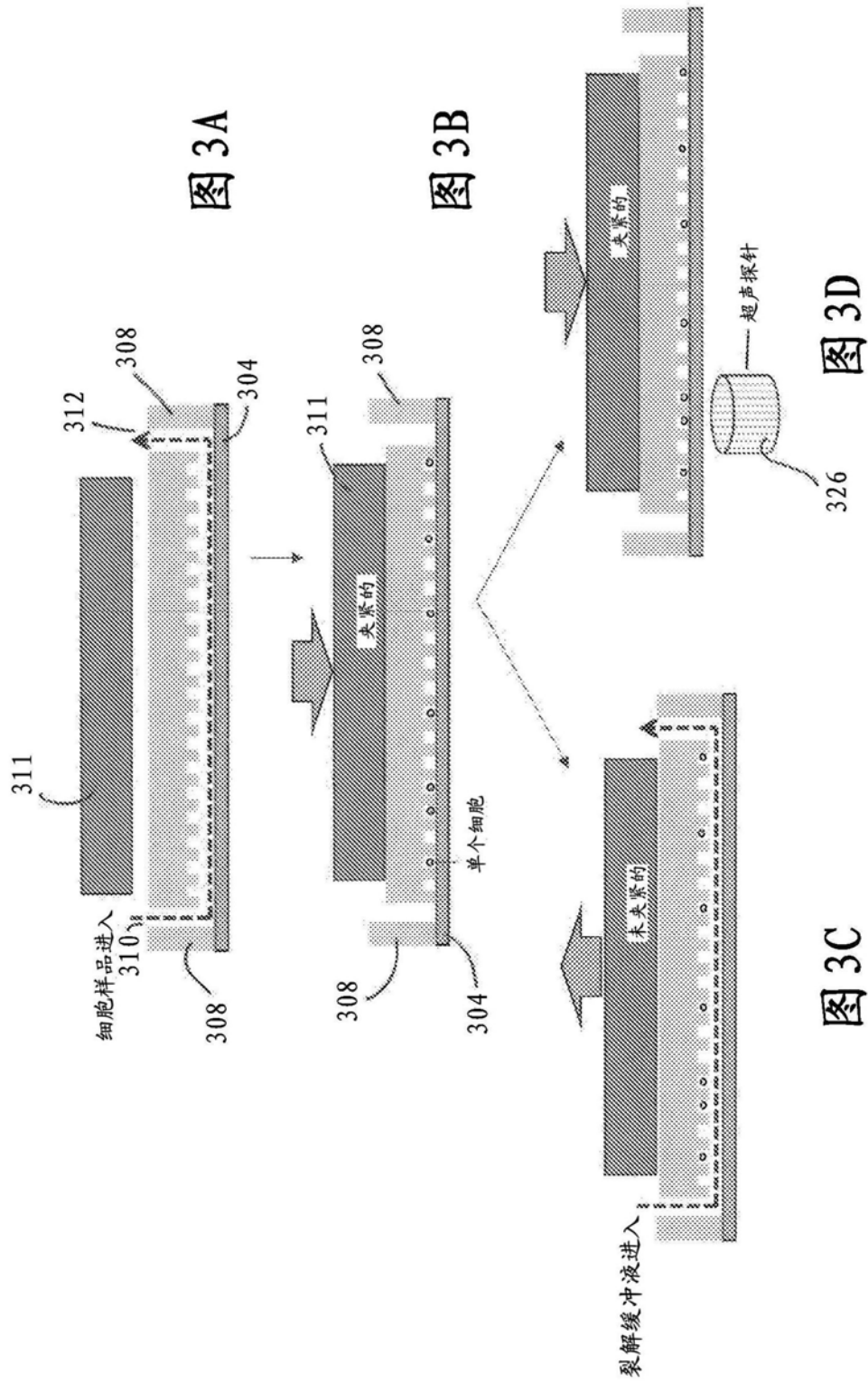
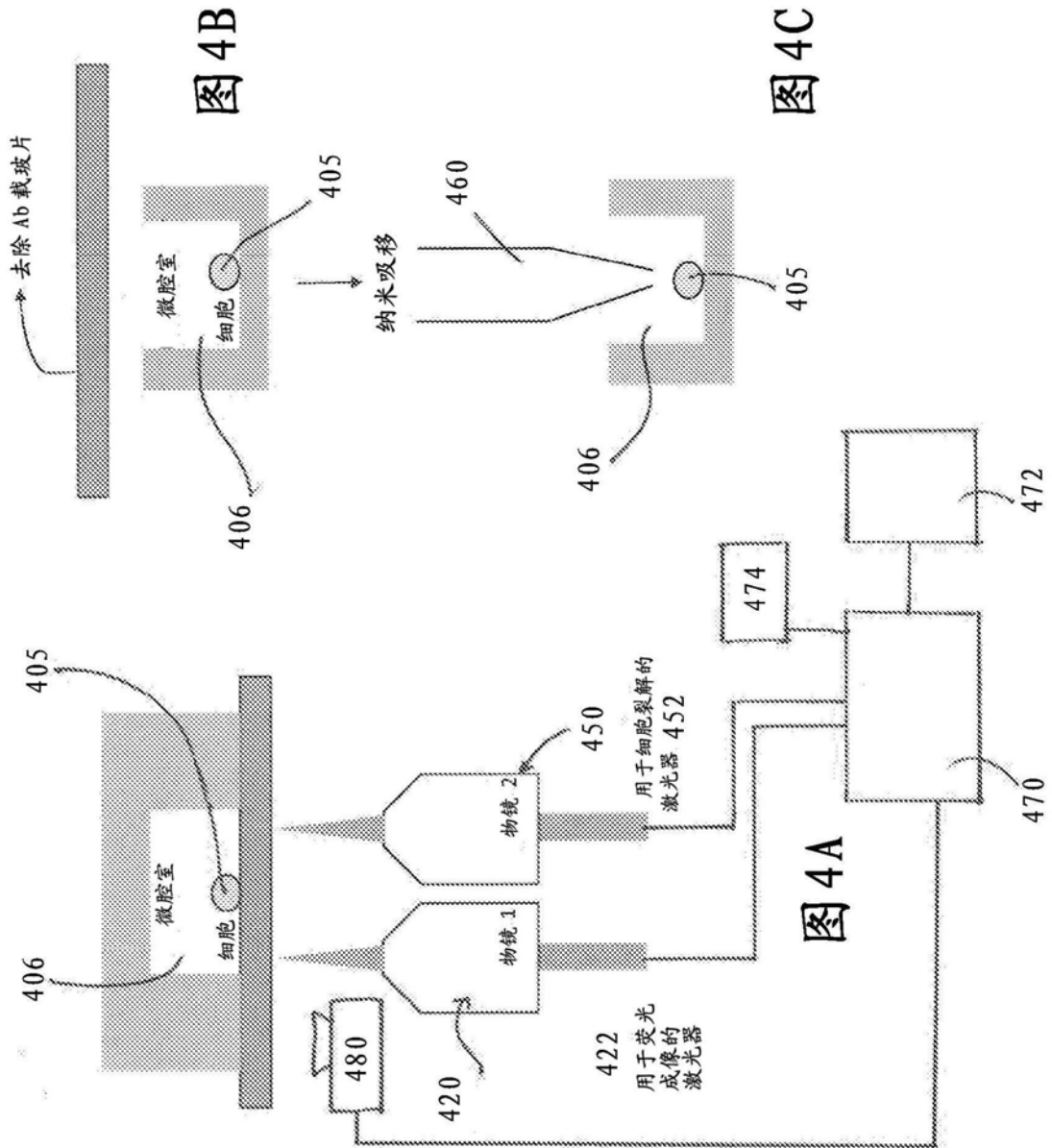


图2C





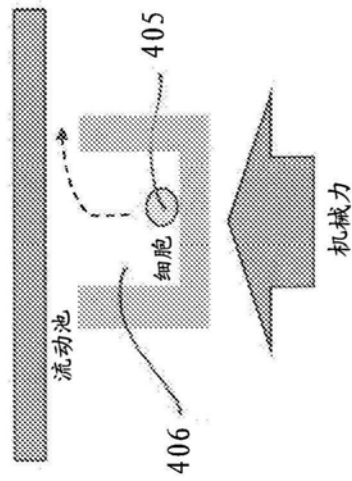


图4D

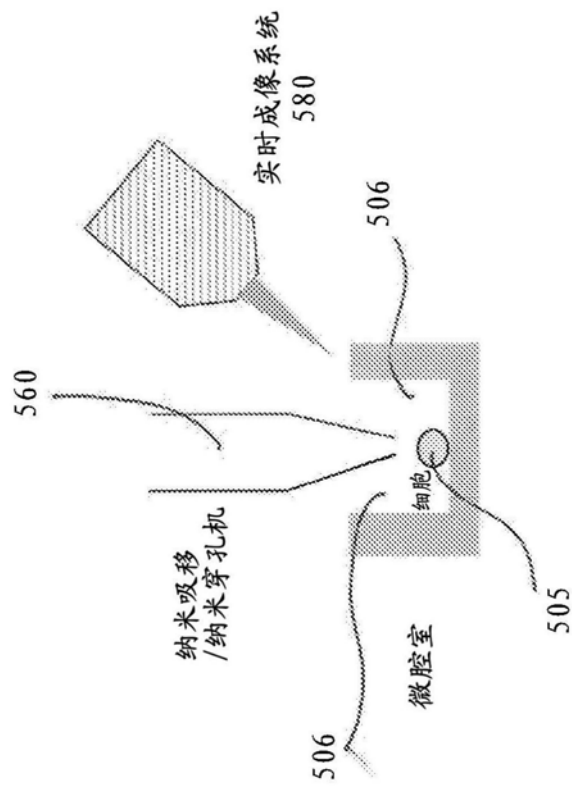


图5

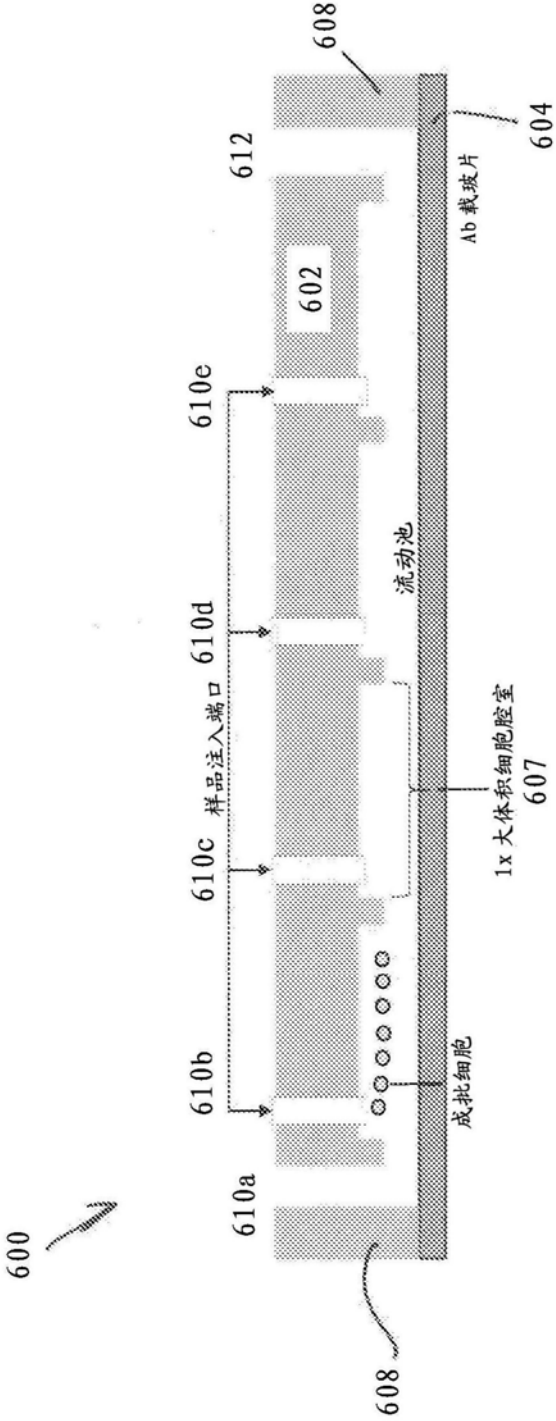


图6A



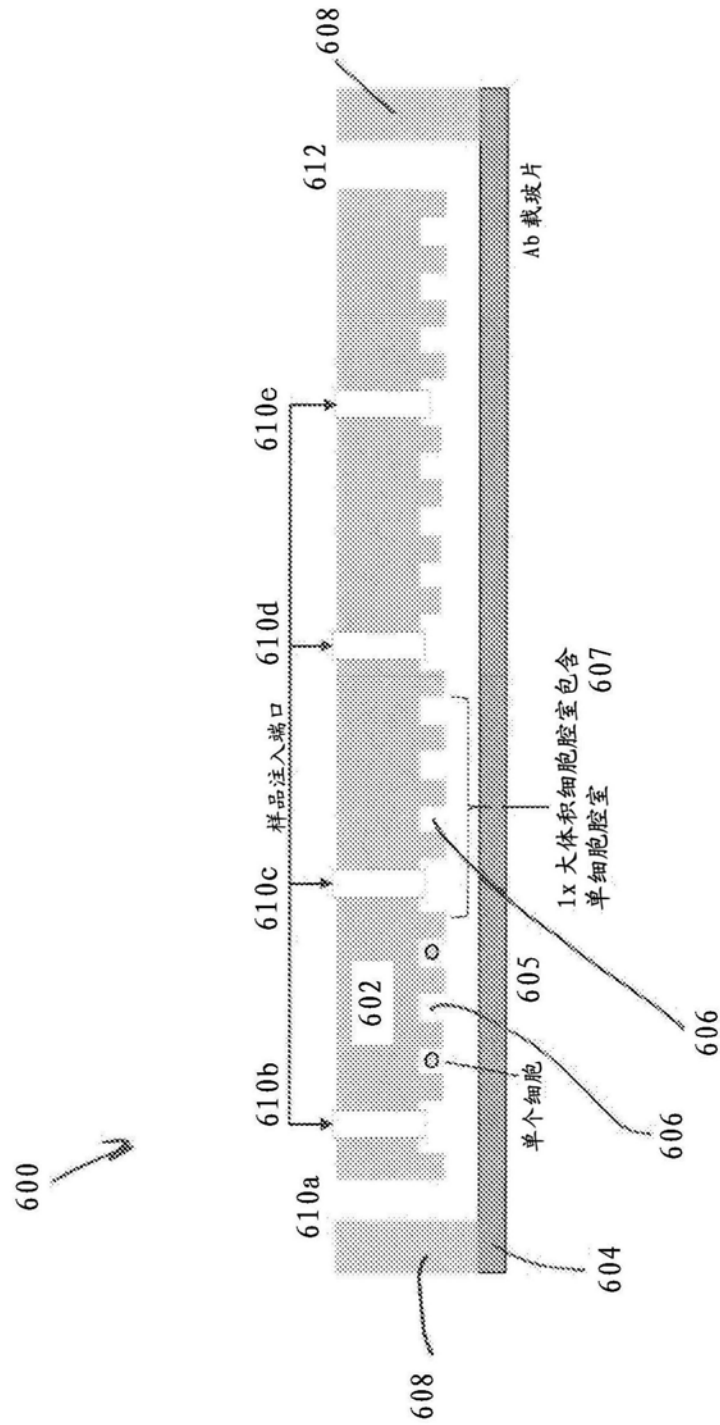


图6B



图7A



图7B

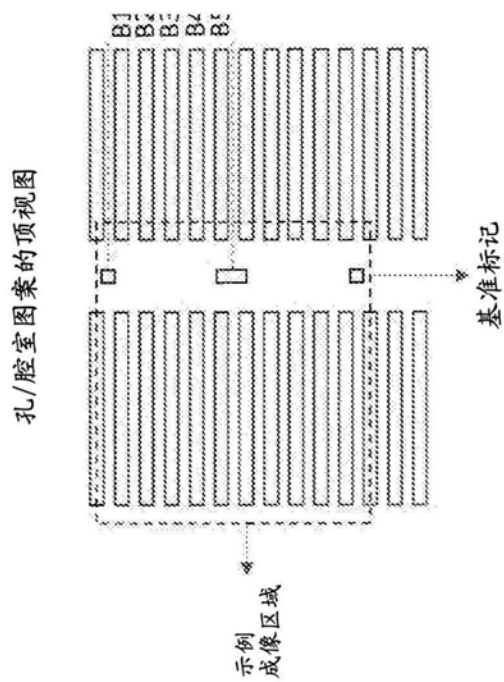


图7C