



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101641
(43) 공개일자 2022년07월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01D 15/22 (2006.01) B01D 15/16 (2006.01)
B01D 15/20 (2006.01) G01N 30/54 (2006.01)
G01N 30/60 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
B01D 15/22 (2013.01)
B01D 15/161 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7017393
(22) 출원일자(국제) 2022년10월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/080476
(87) 국제공개번호 WO 2021/084050
국제공개일자 2021년05월06일
(30) 우선권주장
62/928,303 2019년10월30일 미국(US)
- (71) 출원인
주노 테라퓨틱스 게엠베하
독일 뮌헨 81675 그릴파르처슈트라쎄 10
- (72) 발명자
폴토락, 매츄즈 파웰
독일, 뮌헨 81675 그릴팔젤스트라쎄 10
라디시, 크리스티안
독일, 뮌헨 81675 그릴팔젤스트라쎄 10
- (74) 대리인
특허법인이룸리온

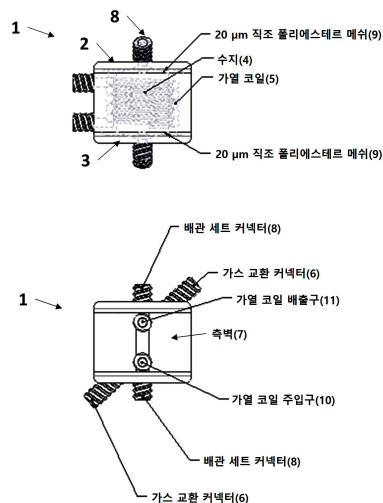
전체 청구항 수 : 총 163 항

(54) 발명의 명칭 세포 선택 및/또는 자극 장치 및 사용 방법

(57) 요약

컬럼 크로마토그래피를 사용하여 세포의 샘플에서 복수의 세포를 선택하고 자극하기 위한 장치 및 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 고정상에 열을 제공하기 위한 온도 조절 부재 및 컬럼 크로마토그래피 동안 고정상에 공기를 제공하도록 구성된 커넥터를 포함하는 장치가 제공된다. 일부 측면에서, 본원에서 제공된 장치 및 방법은 기존 장치 및 방법과 비교하여 유전자 조작 및 궁극적으로 세포 요법에 유용한 선택된 및 자극된 세포의 집단을 생성하는 데 필요한 시간을 감소시킨다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

B01D 15/20 (2013.01)

G01N 30/54 (2013.01)

G01N 30/6052 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리(housing assembly)로서,

주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)을 형성함;

상기 내부 캐비티 내의 상기 고정상에 열을 제공하도록 구성된, 온도 조절 부재(temperature control member); 및

상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된, 커넥터(connector);

를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 2

제1항에 있어서,

측벽 부재를 더 포함하고,

상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 상기 내부 캐비티를 형성하는, 하우징 어셈블리.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 하나 이상의 필터는 가스 필터인, 하우징 어셈블리.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 주입구 하우징 부재는 상기 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 상기 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 주입구를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배출구 하우징 부재는 상기 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용하거나 초래하도록 상기 내부 캐

비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가스 공급원은 가스 저장소 또는 외부 환경이거나 이를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가스 공급원 내의 가스는 멸균인, 하우징 어셈블리.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가스는 공기인, 하우징 어셈블리.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 고정상 및 상기 내부 캐비티의 주입구를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재, 여기서 상기 제1 다공성 부재는 선택적으로 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재 사이에 있음; 및/또는

상기 고정상 및 상기 내부 캐비티의 배출구를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재, 여기서 상기 제2 다공성 부재는 선택적으로 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재 사이에 있음;

을 더 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 제1 다공성 부재 또는 상기 제2 다공성 부재는 독립적으로 세포 여과기(strainer) 또는 세포 체(sieve)인, 하우징 어셈블리.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 내부 캐비티 내의 상기 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 상기 고정상을 가열하도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 목표 온도는 약 35℃ 내지 약 39℃, 선택적으로 (약) 37℃인, 하우징 어셈블리.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 고정상을 유지하도록 추가로 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 가열원을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 하우징 어셈블리의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 가열 요소 또는 복수의 가열 요소를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소는 상기 고정상을 균일하게 가열하도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 가열 요소를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택되는 복수의 가열 요소를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전기 가열 요소인, 하우징 어셈블리.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 전기 가열 요소는 금속판, 금속 막대, 금속 와이어 또는 이들의 조합을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서,

상기 전기 가열 요소는 상기 하우징 어셈블리의 외부의 전원에 연결되도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전자기 유도 가열 요소이고,

상기 전자기 유도 가열 요소는 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 자화 가능한 (magnetizable) 코어를 둘러싸는 유도 가열 코일을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 27

제19항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 비전기 가열 요소이고,

상기 비전기 가열 요소는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 28

제27항에 있어서,

상기 가열 채널은 가열 코일인, 하우징 어셈블리.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서,
상기 가열된 유체는 가열된 물인, 하우징 어셈블리.

청구항 30

제29항에 있어서,
상기 가열된 물에 대한 상기 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 31

제19항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 상기 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치되는, 하우징 어셈블리.

청구항 32

제19항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 상기 내부 캐비티의 내부, 상기 내부 캐비티의 외부 또는 상기 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치되는, 하우징 어셈블리.

청구항 33

제19항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 상기 측벽 부재의 내부, 상기 측벽 부재의 외부 또는 상기 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치되는, 하우징 어셈블리.

청구항 34

제19항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는, 하우징 어셈블리.

청구항 35

제19항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는, 하우징 어셈블리.

청구항 36

제19항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 복수의 가열 요소는 상기 측벽 부재의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포된, 하우징 어셈블리.

청구항 37

제19항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소의 적어도 일부 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부, 선택적으로 상기 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉하는, 하우징 어셈블리.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하우징 어셈블리는 상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나 내지 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부 사이에 절연층을 더 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 절연층은 가스, 선택적으로 공기 또는 액체를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 40

제19항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 복수의 가열 요소는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는 복수의 가열 채널을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 41

제40항에 있어서,

상기 복수의 가열 채널 중 적어도 2개는 서로 유체적으로 연결되는, 하우징 어셈블리.

청구항 42

제19항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 복수의 가열 요소는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는 복수의 전기 가열 요소를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 43

제42항에 있어서,

상기 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 2개는 서로 전기적으로 연결되는, 하우징 어셈블리.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서,

상기 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 45

제19항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하우징 어셈블리는 상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 재킷 부재를 더 포함하고,

여기서, 상기 재킷 부재는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 46

제45항에 있어서,

상기 재킷 부재는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록, 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결된, 하우징 어셈블리.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서,

상기 재킷 부재는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성되고, 선택적으로 상기 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 상기 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 상기 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 상기 측벽 부재의 적어도 일부를 함께 둘러싸도록, 선택적으로 상기 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 49

제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 일부 및/또는 상기 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 일부는 상기 재킷 부재에 의해 노출되는, 하우징 어셈블리.

청구항 50

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 일부 및/또는 상기 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 일부는 상기 재킷 부재의 외부에 있는, 하우징 어셈블리.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널이고,

상기 재킷 부재는 상기 가열된 유체에 대한 주입구에 대한 적어도 하나의 개구 및 상기 가열된 유체에 대한 배출구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 52

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전기 가열 요소이고,

상기 재킷 부재는 상기 전기 가열 요소가 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되기 위해 배열된, 하우징 어셈블리.

청구항 53

제48항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 2개 이상의 재킷 구성요소는 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성되는, 하우징 어셈블리.

청구항 54

제48항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 복수의 가열 요소를 포함하고,

상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 55

제54항에 있어서,

상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 온도 센서를 더 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 56

컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재로서,

크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된 하나 이상의 재킷 구성요소; 및

하나 이상의 가열 요소;

를 포함하고,

상기 하나 이상의 가열 요소는 상기 크로마토그래피 컬럼에 열을 제공하도록 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 내에 구성되는, 재킷 부재.

청구항 57

제56항에 있어서,

상기 하나 이상의 재킷 구성요소는 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸기 위해 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서,

상기 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 가열 요소는 온도 조절 부재의 일부가 되도록 구성되고,

상기 온도 조절 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 60

제59항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상을 약 30° C 내지 약 39° C, 선택적으로 (약) 37° C의 목표 온도로 가열하도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상을 유지하도록 더 구성되는, 재킷 부재.

청구항 62

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함하는, 재킷 부재.

청구항 63

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 가열원을 포함하는, 재킷 부재.

청구항 64

제59항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 온도 조절 부재는 상기 재킷 부재의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 65

제56항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 절연층이 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 및 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부 사이에 배치될 수 있도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 66

제56항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 절연층을 더 포함하고,

상기 절연층은 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 및 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부 사이에 배치되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 67

제56항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 가열 요소는 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상을 균일하게 가열하도록 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 내에 구성되는, 재킷 부재.

청구항 68

제56항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 재킷 구성요소 각각은 상기 하나 이상의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는, 재킷 부재.

청구항 69

제56항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 가열 요소는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택되는, 재킷 부재.

청구항 70

제56항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 가열 요소는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함하고, 선택적으로 상기 가열된 유체는 가열된 물인, 재킷 부재.

청구항 71

제70항에 있어서

상기 주입구는 상기 가열된 유체의 외부 저장소에 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 72

제56항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 가열 요소는 전기 가열 요소를 포함하고, 선택적으로 상기 전기 가열 요소는 금속판을 포함하는, 재킷 부재.

청구항 73

제72항에 있어서,

상기 전기 가열 요소는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 74

제56항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 2개 이상의 가열 요소를 포함하는, 재킷 부재.

청구항 75

제74항에 있어서,

상기 2개 이상의 가열 요소는 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 내에서 상기 크로마토그래피 컬럼의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 76

제56항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 각각 포함하는 2개 이상의 가열 채널을 포함하고, 선택적으로 상기 가열된 유체는 가열된 물인, 재킷 부재.

청구항 77

제76항에 있어서,

상기 2개 이상의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 78

제56항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재킷 부재는 2개 이상의 전기 가열 요소, 선택적으로 금속판을 포함하는 2개 이상의 전기 가열 요소를 포함하는, 재킷 부재.

청구항 79

제78항에 있어서,

상기 2개 이상의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서,
상기 2개 이상의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되는, 재킷 부재.

청구항 81

제56항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 하나 이상의 재킷 구성요소는 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함하는, 재킷 부재.

청구항 82

컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리(housing assembly)로서,
고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하는, 크로마토그래피 컬럼; 및
제56항 내지 제81항 중 어느 한 항의 재킷 부재, 여기서 상기 재킷 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성됨;
을 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 83

제82항에 있어서,
상기 크로마토그래피 컬럼은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 포함하고,
상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 상기 내부 캐비티를 형성하는, 하우징 어셈블리.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서,
상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결된, 하우징 어셈블리.

청구항 85

제82항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 상기 내부 캐비티 내로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 더 포함하는, 하우징 어셈블리.

청구항 86

하우징 어셈블리 세트로서,
제1항 내지 제85항 중 어느 한 항의 복수의 하우징 어셈블리를 포함하는, 하우징 어셈블리 세트.

청구항 87

제86항에 있어서,

상기 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개는 순차적으로 배열되는, 하우징 어셈블리 세트.

청구항 88

제86항 또는 제87항에 있어서,

상기 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개는 병렬로 배열되는, 하우징 어셈블리 세트.

청구항 89

크로마토그래피 시스템으로서,

제1항 내지 제55항 및 제82항 내지 제85항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리 및 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼을 포함하는, 크로마토그래피 시스템.

청구항 90

크로마토그래피 키트로서,

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리, 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리 세트 또는 제89항의 크로마토그래피 시스템, 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는, 크로마토그래피 키트.

청구항 91

크로마토그래피 키트로서,

제56항 내지 제81항 중 어느 한 항의 재킷 부재, 크로마토그래피 컬럼 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는, 크로마토그래피 키트.

청구항 92

크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트로서,

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리, 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리 세트 또는 제89항의 크로마토그래피 시스템을 포함하고,

상기 하나 이상의 하우징 어셈블리의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는,

크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 93

크로마토그래피 컬럼으로서,

제56항 내지 제81항 중 어느 한 항의 재킷 부재 및 크로마토그래피 컬럼을 포함하고,

상기 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는,

크로마토그래피 컬럼.

청구항 94

크로마토그래피 컬럼 세트로서,
제56항 내지 제81항 중 어느 한 항의 재킷 부재 및 복수의 크로마토그래피 컬럼을 포함하고,
각각의 상기 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는,
크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 95

제94항에 있어서,
상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 순차적으로 또는 병렬로 배열되고,
선택적으로 상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 작동 가능하게 연결되는, 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 96

제94항 또는 제95항에 있어서,
상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 제1 크로마토그래피 컬럼 및 제2 크로마토그래피 컬럼을 포함하고,
상기 적어도 하나의 재킷 부재는 상기 제2 크로마토그래피 컬럼을 둘러싸도록 구성되는, 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 97

제90항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 고정상은 겔 여과 매트릭스를 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 98

제90항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 고정상은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 99

제90항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 고정상은 비자성 물질, 비강자성 물질 또는 비상자성 물질이거나 이를 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 100

제90항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 고정상은 그 위에 고정된 선택제(selection agent)를 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 101

제100항에 있어서,
상기 선택제는 하나 이상의 세포 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 102

제101항에 있어서,
상기 하나 이상의 세포는 면역 세포인,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 103

제102항에 있어서,
상기 하나 이상의 세포는 T 세포인,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 104

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 선택제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함하고; 및/또는
상기 선택제는 항체 단편을 포함하고;
상기 선택제는 Fab 단편이거나 이를 포함하고;
상기 선택제는 단일 도메인 항체, 선택적으로 VHH 항체이거나 이를 포함하고;
상기 선택제는 F(ab')₂ 단편 및 2가 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되고;
상기 선택제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이고; 및/또는
상기 선택제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자인,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 105

제101항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서,

여기서:

상기 선택 마커는 T 세포 공수용체(coreceptor)이고;

상기 선택 마커는 T 세포 항원 수용체 복합체의 멤버이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD3 복합체이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD3 사슬이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 또는 CD3 ζ 사슬이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD8이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD4이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD45RA이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD27이거나 이를 포함하고;

상기 선택 마커는 CD28이거나 이를 포함하고; 및/또는

상기 선택 마커는 CCR7이거나 이를 포함하는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 106

제101항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선택제 및 선택 마커 사이의 특이적 결합은 T 세포에 대한 신호를 유도하지 않거나

T 세포에 대한 자극 또는 활성화 또는 증식 신호를 유도하지 않는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 107

제101항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선택제는 항-CD3 Fab, 항-CD8 Fab, 항-CD4 Fab 또는 항-CD27 Fab이거나 이를 포함하는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 108

제101항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 선택제는 가역적으로 결합하는 선택 시약을 통해 고정상에 간접적으로 결합되는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 109

제108항에 있어서,

상기 선택 시약은 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 뮤테인이거나 이를 포함

하는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 110

제92항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서,

자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 더 포함하고,

선택적으로 상기 하나 이상의 자극제는 고정상에 고정되고, 선택적으로 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 뮤테인을 통해 간접적으로 고정되는,

크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 111

제90항, 제91항 및 제97항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 크로마토그래피 키트는 자극 시약을 더 포함하고,

상기 자극 시약은 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는,

크로마토그래피 키트.

청구항 112

제110항 또는 제111항에 있어서,

상기 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한 것인,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 113

제110항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 자극제는 제1 자극제를 포함하고, 상기 제1 자극제는 자극 신호를 전달할 수 있으며, 및 상기 하나 이상의 자극제는 상기 제1 자극제의 자극 신호를 향상, 감소 또는 변형할 수 있는 하나 이상의 제2 자극제를 더 포함하는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 114

제113항에 있어서,

상기 제2 자극제 중 적어도 하나는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자에 특이적으로 결합할 수 있는,

크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서,

상기 제1 자극제는 항-CD3 Fab이고, 상기 제2 자극제는 항-CD28 Fab인,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 116

제111항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 자극 시약은 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하고,
여기서 상기 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과와 반경, ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii)
자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함하는,
크로마토그래피 키트.

청구항 117

제113항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제1 자극제 및 상기 제2 자극제는 독립적으로 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 118

제109항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17),
SAWSHPQFEKGGGSGGGGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 119

제109항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1의 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷을 포함하고, 또는
상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1의 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷을 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 120

제109항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트렙타비딘 뮤테인의 N-말단 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 10 내지 16의 영역에 있고,
상기 스트렙타비딘 뮤테인의 C-말단 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 133 내지 142의 영역에 있는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 121

제109항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 3-6, 27, 28, 104 및 105 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함하는,
크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트.

청구항 122

장치로서,
제1항 내지 제55항 및 제82항 내지 제85항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리, 제86항 내지 제88항 중 어느 한 항의 하우징 어셈블리 세트 또는 제89항 내지 제121항 중 어느 한 항의 크로마토그래피 시스템, 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하고,
주입구 하우징 부재의 주입구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함하는, 장치.

청구항 123

장치로서,
제56항 내지 제81항 중 어느 한 항의 재킷 부재 및 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하고,
여기서 상기 크로마토그래피 컬럼은 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하고,
상기 장치는 상기 내부 캐비티 내로의 투입 조성물 저장소 내에 포함된 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 상기 내부 캐비티의 주입구에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함하는, 장치.

청구항 124

제122항 또는 제123항에 있어서,
상기 장치는 상기 내부 캐비티로부터의 산출 조성물 저장소 내에 포함된 산출 조성물의 배출을 허용하거나 초래하도록 상기 내부 캐비티의 배출구에 작동 가능하게 연결된 산출 조성물 저장소를 더 포함하는, 장치.

청구항 125

제122항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서,
폐쇄 또는 멸균 시스템 내에 있는, 장치.

청구항 126

T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서,

상기 방법은:

제92항 내지 제110항, 제112항 내지 제115항 및 제117항 내지 제121항 중 어느 한 항의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 복수의 T 세포 중 하나 이상의 T 세포 내에 자극 신호를 전달하기 위해 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션 하는 단계, 여기서 상기 복수의 T 세포는 고정상에 고정화됨; 및

상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 상기 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생성하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 127

제126항에 있어서,

상기 고정상은 상기 하나 이상의 T 세포의 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합하는 선택제를 포함하고,

상기 하나 이상의 T 세포에 의해 발현된 상기 선택 마커에 대한 상기 선택제의 특이적 결합은 상기 고정상에 상기 하나 이상의 T 세포의 고정화를 초래하는, 방법.

청구항 128

T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서,

상기 방법은:

(a) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 제92항 내지 제110항, 제112항 내지 제115항 및 제117항 내지 제121항 중 어느 한 항의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 고정상을 포함하는 내부 캐비티에 첨가하여, 이로써 상기 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상을 고정화시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상의 선택 마커에 결합하는 선택제를 포함함; 및

(b) 상기 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 상기 자극 시약의 인큐베이션을 개시하는 단계; 및

(c) 상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 129

T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서,

상기 방법은:

(a) (i) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플 및 (ii) 제90항, 제91항, 제97항 내지 제109항 및 제111항 내지 제121항 중 어느 한 항의 크로마토그래피 키트 내의 고정상을 조합시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상에 발현된 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 선택제를 포함하고, 상기 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 상기 고정상에 복수의 T 세포의 고정화를 초래함; 및

(b) 상기 고정상에 T 세포 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 상기 자극 시약의 인큐베이션을 개시하는 단계, 여기서 상기 조합 단계 및/또는 상기 첨가 단계는 상기 크로마토그래피 키트의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트

의 내부 캐비티의 내부 또는 외부에서 수행됨; 및

(c) 상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계;

를 포함하는, 방법.

청구항 130

제126항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 상기 고정상으로부터 수집되는, 방법.

청구항 131

제126항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 후 4 시간 이내, 4.5 시간 이내, 5 시간 이내, 6 시간 이내, 7 시간 이내, 8 시간 이내, 9 시간 이내, 10 시간 이내, 11 시간 이내 또는 12 시간 이내에 상기 고정상으로부터 수집되는, 방법.

청구항 132

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 상기 고정상으로부터 수집되는, 방법.

청구항 133

제132항에 있어서,

상기 중력 흐름에 의한 수집은 상기 고정상을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 하우스징 어셈블리에 세척 배지를 첨가하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서,

상기 세척 배지는 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않고; 및/또는

상기 수집 단계는 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행되는, 방법.

청구항 135

제134항에 있어서,

상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 상기 고정상에 고정된 스트렙타비딘 뮤데인에 대한 선택제의 스트렙타비딘 결합 펩타이드와의 결합에 대해 경쟁하는 제제인, 방법.

청구항 136

제135항에 있어서,

상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 비오틴 또는 비오틴 유사체이고, 선택적으로 상기 비오틴 유사체는 D-비오틴인, 방법.

청구항 137

제126항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 자극제는 (i) 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자 및

(ii) 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약 이거나 이를 포함하고,

여기서 상기 올리고머 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과와 반경, ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 올리고머 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함하는, 방법.

청구항 138

제135항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷을 포함하고; 또는

상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷을 포함하는, 방법.

청구항 139

제126항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나는 자극 신호를 전달할 수 있고,

여기서 상기 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한 것인, 방법.

청구항 140

제139항에 있어서,

상기 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나는 자극 신호를 전달할 수 있는 제1 자극제이고, 상기 하나 이상의 자극제는 제1 자극제의 자극 신호를 향상, 감소 또는 변형할 수 있는 하나 이상의 제2 자극제를 더 포함하는, 방법.

청구항 141

제140항에 있어서,

상기 제2 자극제는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자에 특이적으로 결합할 수 있는, 방법.

청구항 142

제141항에 있어서,

상기 공자극 분자는 CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM 중에서 선택되는, 방법.

청구항 143

제140항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 자극제는 CD28에 특이적으로 결합할 수 있고, 및/또는

상기 공자극 분자는 CD28인, 방법.

청구항 144

제140항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 자극제는 CD3에 특이적으로 결합하고, 상기 제2 자극제는 CD28에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 145

제140항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 자극제는 CD3에 결합하는 1가 항체 단편을 포함하고, 상기 제2 자극제는 CD28에 결합하는 1가 항체 단편을 포함하는, 방법.

청구항 146

제145항에 있어서,

상기 1가 항체 단편은 Fab 단편, Fv 단편 및 단일쇄 Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택되는, 방법.

청구항 147

제140항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 자극제는 항-CD3 Fab이고, 상기 제2 자극제는 항-CD28 Fab인, 방법.

청구항 148

제126항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 조절하는, 방법.

청구항 149

제126항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도에서 유지하는, 방법.

청구항 150

제148항 또는 제149항에 있어서,

상기 목표 온도는 약 30℃ 내지 약 39℃, 선택적으로 (약) 37℃인, 방법.

청구항 151

제126항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 커넥터는 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하는, 방법.

청구항 152

제151항에 있어서,

상기 가스는 멸균이고, 공기이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 153

제151항 또는 제152항에 있어서,

상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입은 인큐베이션 동안 간헐적 또는 연속적인, 방법.

청구항 154

제126항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서,

제조합 핵산 분자를 상기 조성물의 자극된 T 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함하고, 여기서 상기 핵산 분자는 제조합 단백질을 암호화하고, 이로써 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산하는, 방법.

청구항 155

제154항에 있어서,

상기 제조합 단백질은 항원 수용체인, 방법.

청구항 156

제154항에 있어서,

상기 제조합 단백질은 키메라 항원 수용체인, 방법.

청구항 157

제154항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 핵산의 도입은 재조합 단백질을 암호화하는 핵산을 바이러스 입자로 형질도입에 의한 것인, 방법.

청구항 158

제154항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서,

바이러스 통합(viral integration)을 위한 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 인큐베이션하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 159

제154항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포를 증폭시키는 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 160

제126항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법의 단계를 중 적어도 하나 또는 전부는 폐쇄 시스템에서 수행되고, 선택적으로 상기 폐쇄 시스템은 자동화되는 것인, 방법.

청구항 161

제126항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 샘플은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술(apheresis) 생성물 또는 백혈구 성분채집술(leukapheresis) 생성물이거나 이를 포함하는, 방법.

청구항 162

제161항에 있어서,

상기 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 분리된 것인, 방법.

청구항 163

제161항에 있어서,

상기 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 “세포 선택 및/또는 자극 장치 및 사용 방법”이라는 명칭으로 2019.10.30 자 출원된 미국 가출원 제62/928,303호에 대한 우선권을 주장하며, 상기 내용은 모든 목적을 위하여 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 참조 포함

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2020.10.28 자 생성된 735042020040SeqList.txt라는 명칭의 파일로 제공되며, 이의 크기는 74,908 bytes이다. 서열 목록 내 전자 형식의 정보는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0005] 본 개시내용은 세포 선택 및/또는 자극 장치 및 사용 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 선택된 및/또는 자극된 세포는 유전자 조작에 그리고 궁극적으로 세포 요법에 유용하다.

배경 기술

[0006] 질병 및 병태를 치료하기 위한 다양한 세포 요법 방법이 이용 가능하다. 세포 요법 방법 중에는 제조할 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체로 유전적으로 조작될 수 있는 면역 세포, 예컨대 T 세포(예: CD4+ 및 CD8+ T 세포)를 포함하는 방법이 있다. 예를 들어, 세포 요법에 사용하기에 적합한 세포 집단을 생성하기 위한 개선된 장치 및 방법이 필요하다. 이러한 요구를 충족시키는 장치, 제조품 및 방법이 제공된다.

발명의 내용

[0007] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리(housing assembly)가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재(temperature control member); 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 예를 들어 크로마토그래피 실행의 적어도 일부 동안 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터(connector)를 포함한다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 측벽 부재를 더 포함하고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다.

[0008] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하는 크로마토그래피 컬럼; 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 포함하고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다.

[0010] 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재 상에 배치될 수 있다.

[0011] 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 중 임의의 2개 또는 3개 모두 사이에 형성될 수 있다.

[0012] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 복수의 커넥터를 포함할 수 있다.

[0013] 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 접합된 커넥터, 나사 커넥터, 루어(luer) 커넥터(예: 루어 락 커넥터 또는 루어 슬립 커넥터), 가시 커넥터, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 루어 락 커넥터 또는 루어 슬립 커넥터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 수형 이음쇠 또는 암형 이음쇠를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 가스 공급원과 유체 소통하는 배관(tubing)과 밀봉식으로 맞물리도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함하는 배관(tubing)에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0014] 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함하는 배관(tubing)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상

의 필터는 가스 필터, 예를 들어, 공기 필터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 공기 필터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 멸균 필터 및/또는 여과에 의한 멸균을 위한 멸균 필터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 멸균 필터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 여과에 의한 멸균을 위한 멸균 필터일 수 있다.

[0015] 임의의 이전 구현예에서, 주입구 하우징 부재는 하우징 어셈블리의 상부 덮개를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착된다. 일부 구현예에서, 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 상부 덮개 상에 배치될 수 있다.

[0016] 임의의 이전 구현예에서, 주입구 하우징 부재는 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 주입구를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 주입구는 상부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 주입구는 동일 또는 상이한 위치에서 상부 덮개 상에 배치된다.

[0017] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 주입구를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있을 수 있는 반면, 커넥터를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 45도의 각도에 있을 수 있다.

[0018] 임의의 이전 구현예에서, 배출구 하우징 부재는 하우징 어셈블리의 하부 덮개를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착되거나, 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다.

[0019] 임의의 이전 구현예에서, 배출구 하우징 부재는 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용 또는 초래하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 배출구는 하부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 배출구는 동일 또는 상이한 위치에서 하부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 배출구를 통한 유체 경로는 하부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있다.

[0020] 임의의 이전 구현예에서, 가스 공급원은 가스 저장소 또는 외부 환경일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가스 공급원 내의 가스는 멸균일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가스는 공기일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.

[0021] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 가스 공급원에 작동 가능하게 연결된 배관을 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 배관은 내부 캐비티를 가스 공급원에 멸균으로 연결하도록 구성된다. 임의의 이전 구현예에서, 배관은 하나 이상의 밸브를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 배관은 하나 이상의 필터를 포함할 수 있다.

[0022] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 하나 이상의 다공성 부재, 예를 들어, 세포 여과기(strainer) 또는 세포 체(sieve)를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 다공성 부재는 세포 여과기 또는 세포 체일 수 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 상기 고정상 및 내부 캐비티의 주입구를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재를 포함하고, 상기 제1 다공성 부재는 선택적으로 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 고정상 및 내부 캐비티의 배출구를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재를 더 포함하고, 상기 제2 다공성 부재는 선택적으로 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있다.

[0023] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 고정상 및 내부 캐비티의 주입구를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재, 여기서 상기 제1 다공성 부재는 선택적으로 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있음; 및/또는 고정상 및 내부 캐비티의 배출구를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재, 여기서 상기 제2 다공성 부재는 선택적으로 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있음을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 제1 다공성 부재 또는 상기 제2 다공성 부재는 독립적으로 세포 여과기(strainer) 또는 세포 체(sieve)이다.

[0024] 임의의 이전 구현예에서, 제1 다공성 부재는 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있을 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제2 다공성 부재는 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있을 수 있다.

[0025] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 평균 기공 직경을 가질 수 있거나, 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 메쉬 크기를 갖는 메쉬를 포함할 수 있다.

[0026] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 시작 온도(예: 실온)에서 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온

도(예: (약) 37° C)로 내부 캐비티 내의 고정상을 가열하도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 목표 온도는 (약) 37℃일 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 고정상을 유지하도록 추가로 구성된다.

- [0027] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 상기 고정상을 가열하도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 목표 온도는 약 35℃ 내지 약 39℃, 선택적으로 (약) 37℃일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 목표 온도는 (약) 37℃일 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 고정상을 유지하도록 추가로 구성된다.
- [0028] 임의의 이전 구현예에서, 하우스징 어셈블리는 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 포함할 수 있다. 온도 센서는 온도 조절 부재의 일부를 형성하거나 온도 조절 부재와 별도로 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 센서는 모니터링/디스플레이 유닛에 연결되도록 구성된다.
- [0029] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열원을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 하우스징 어셈블리의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0030] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열 요소 또는 복수의 가열 요소를 포함할 수 있다.
- [0031] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소는 상기 고정상을 균일하게 가열하도록 구성될 수 있다.
- [0032] 임의의 이전 구현예에서, 상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택되는 복수의 가열 요소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 상기 전기 가열 요소는 금속판, 금속 막대, 금속 와이어 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 하우스징 어셈블리의 외부의 전원에 연결되도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 전자기 유도 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전자기 유도 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 전자기 유도 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 자화 가능한(magnetizable) 코어를 둘러싸는 유도 가열 코일을 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 비전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 비전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 비전기 가열 요소는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 액체 또는 가스에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 가열된 유체는 가열된 액체 또는 가열된 가스일 수 있다. 일부 구현예에서, 가열 채널은 가열 코일일 수 있다. 일부 구현예에서, 가열된 유체는 가열된 물질일 수 있다. 일부 구현예에서, 가열 채널은 가열 코일이고, 가열된 유체는 가열된 물이다. 일부 구현예에서, 상기 가열된 물에 대한 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0033] 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 내부, 내부 캐비티의 외부 또는 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재의 내부, 측벽 부재의 외부 또는 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우스징 부재, 배출구 하우스징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 코일을 포함할 수 있다.
- [0034] 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우스징 부재, 배출구 하우스징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 가열 채널을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우스징 부재, 배출구 하우스징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 가열 코일을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 내부, 내부 캐비티의 외부 또는 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 내부, 측벽 부재의 외부 또는 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치될 수 있다.
- [0035] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 주입구 하우스징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우스징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러쌀 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러쌀 수 있다.

- [0036] 임의의 이전 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포될 수 있다.
- [0037] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소의 적어도 일부 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부, 선택적으로 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소의 적어도 일부 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉할 수 있다.
- [0038] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소의 적어도 일부 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않을 수 있다.
- [0039] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하우징 어셈블리는 상기 가열 요소 및/또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나 내지 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부 사이에 절연층을 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 절연층은 가스, 선택적으로 공기 또는 액체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 절연층은 공기를 포함할 수 있다.
- [0040] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소는 가열 채널을 포함할 수 있고, 상기 가열 채널은 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러쌀 수 있다.
- [0041] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소는 가열 코일을 포함할 수 있고, 상기 가열 코일은 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러쌀 수 있다.
- [0042] 임의의 이전 구현예에서, 상기 복수의 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는 복수의 가열 채널을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 가열 채널 중 적어도 2개는 서로 유체적으로 연결될 수 있다.
- [0043] 임의의 이전 구현예에서, 상기 복수의 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸는 복수의 전기 가열 요소일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 2개는 서로 전기적으로 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 하우징 어셈블리의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0044] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하우징 어셈블리는 상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 재킷 부재를 더 포함할 수 있고, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 하우징 어셈블리는 상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 재킷 부재를 더 포함할 수 있고, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다.
- [0046] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록, 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결될 수 있다.
- [0047] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성될 수 있고, 선택적으로 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러쌀 수 있고, 선택적으로 측벽 부재를 전체적으로 둘러쌀 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러쌀 수 있다.
- [0048] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 함께 둘러싸도록, 선택적으로 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 함께 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다.

- [0049] 임의의 이전 구현예에서, 상기 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 일부 및/또는 상기 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 일부는 상기 재킷 부재에 의해 노출될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 일부 및/또는 상기 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 일부는 상기 재킷 부재의 외부에 있을 수 있다.
- [0050] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부, 선택적으로 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉할 수 있다.
- [0051] 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않을 수 있다.
- [0052] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널일 수 있고, 상기 재킷 부재는 상기 가열된 유체에 대한 주입구에 대한 적어도 하나의 개구 및 가열된 유체에 대한 배출구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함할 수 있다.
- [0053] 임의의 이전 구현예에서, 상기 가열 요소 또는 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 전기 가열 요소일 수 있고, 상기 재킷 부재는 상기 전기 가열 요소가 하우징 어셈블리의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되기 위해 배열될 수 있다.
- [0054] 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소는 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0055] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 복수의 가열 요소를 포함하고, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 상기 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 온도 센서를 더 포함할 수 있다.
- [0056] 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열된 유체, 선택적으로 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가열된 유체는 가열된 물일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널의 적어도 하나의 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0057] 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 전기 가열 요소, 선택적으로 급속관을 포함하는 전기 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소는 하우징 어셈블리의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0058] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된 하나 이상의 재킷 구성요소; 및 크로마토그래피 컬럼의 하나 이상의 가열 요소, 여기서 상기 하나 이상의 가열 요소는 상기 크로마토그래피 컬럼에 열을 제공하도록 하나 이상의 재킷 구성요소 내에 구성됨,를 포함한다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 가열 요소는 온도 조절 부재의 일부가 되도록 구성되고, 상기 온도 조절 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된다.
- [0060] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된 하나 이상의 재킷 구성요소; 및 하나 이상의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 여기서 상기 하나 이상의 가열 요소는 상기 크로마토그래피 컬럼에 열을 제공하도록 하나 이상의 재킷 구성요소 내에 구성됨; 및 상기 온도 조절 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성됨,를 포함한다.
- [0061] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 재킷 구성요소는 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸기 위해 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0062] 임의의 이전 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성된다.
- [0063] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 고정상을 가열하도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 목표 온도는 약 35℃ 내지 약 39℃, 선택

적으로 (약) 37℃일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 목표 온도는 (약) 37℃일 수 있다.

- [0064] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상을 유지하도록 추가로 구성될 수 있다.
- [0065] 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 상기 크로마토그래피 컬럼 및/또는 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함할 수 있다.
- [0066] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열원을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 재킷 부재의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0067] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 가열 요소 및/또는 재킷 부재의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉되도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 가열 요소 및/또는 재킷 부재의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉되지 않도록 구성될 수 있다.
- [0068] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 절연층이 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 및 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부 사이에 배치될 수 있도록 구성될 수 있다.
- [0069] 임의의 이전 구현예에서, 상기 재킷 부재는 절연층을 더 포함하고, 상기 절연층은 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 및 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부 사이에 배치되도록 구성될 수 있다.
- [0070] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 가열 요소는 상기 고정상을 균일하게 가열하도록 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 내에 구성될 수 있다.
- [0071] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 각각은 상기 하나 이상의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0072] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 가열 요소는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 가열 요소는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함할 수 있고, 선택적으로 상기 가열된 유체는 가열된 물이다. 임의의 이전 구현예에서, 가열된 유체는 가열된 물일 수 있다. 일부 구현예에서, 주입구는 가열된 유체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0073] 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 주입구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 배출구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함할 수 있다.
- [0074] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 가열 요소는 전기 가열 요소를 포함할 수 있고, 선택적으로 상기 전기 가열 요소는 금속판을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 금속판을 포함한다. 임의의 이전 구현예에서, 전기 가열 요소는 재킷 부재의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0075] 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 2개 이상의 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 가열 요소는 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 내에서 크로마토그래피 컬럼의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포되도록 구성될 수 있다.
- [0076] 임의의 이전 구현예에서, 상기 온도 조절 부재는 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 각각 포함하는 2개 이상의 가열 채널을 포함할 수 있고, 선택적으로 상기 가열된 유체는 가열된 물이다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0077] 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 2개 이상의 전기 가열 요소, 선택적으로 금속판을 포함하는 2개 이상의 전기 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재킷 부재는 금속판을 포함하는 2개 이상의 전기 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 2개 이상의 가열 요소는 서로 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 2개 이상의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 재킷 부재의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0078] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 2개 이상의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 2개의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 3개의 재킷 구성요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 재

킷 구성요소는 4개의 재킷 구성요소를 포함한다.

- [0079] 일부 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소는 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸기 위해 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 온도 센서를 더 포함할 수 있다.
- [0080] 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열된 유체, 선택적으로 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결되도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널의 적어도 하나의 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0081] 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 전기 가열 요소, 선택적으로 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 하우징 어셈블리의 외부의 전원에 전기적으로 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0082] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하고 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 가열 요소를 포함하고 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하고 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0084] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 주위에 배치된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0085] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 금속판을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0086] 일부 구현예에서, 본원에서 개시되며, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 코일을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 코일은 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를

포함한다.

- [0087] 임의의 이전 구현예에서, 가열 코일은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 둘러쌀 수 있다.
- [0088] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 멸균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 멸균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 가스 필터는 공기 필터이고, 멸균 가스는 멸균 공기이다. 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 가스 필터를 더 포함할 수 있다.
- [0089] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하는 크로마토그래피 컬럼; 및 임의의 이전 구현예의 재킷 부재, 여기서 상기 재킷부재는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성됨,를 포함한다.
- [0090] 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 포함할 수 있고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다. 일부 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 멸균적으로 연결함으로써, 상기 내부 캐비티 내로의 멸균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 더 포함할 수 있다.
- [0091] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재, 상기 온도 조절 부재는 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 코일을 포함함; 가열 코일을 포함하는 재킷 부재, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 멸균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 멸균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 가열 코일은 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 제2 가열 코일을 포함할 수 있고, 가열 코일과 제2 가열 코일은 함께 측벽 부재를 둘러쌀 수 있다.
- [0093] 일부 구현예에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재, 상기 온도 조절 부재는 금속판을 포함하고 고정상에 열을 제공하도록 구성된 전기 가열 요소를 포함함; 전기 가열 요소를 포함하는 재킷 부재, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 멸균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 멸균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0094] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 금속판을 포함하고 측벽 부재의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포된 복수의 전기 가열 요소를 포함할 수 있다.
- [0095] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 복수의 하우징 어셈블리를 포함하는 하우징 어셈블리 세트가 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리 세트는 순차적으로 배열된 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개를 포함한다. 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리 세트는 병렬로 배열된 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개를 포함할 수 있다.
- [0096] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 하우징 어셈블리 및 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 시스템이 본원에서 제공된다.
- [0097] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 키트가 본원에서 제공된다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 크로마

토그래피 시스템 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 키트가 본원에서 제공된다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 재킷 부재, 크로마토그래피 컬럼 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 키트가 본원에서 제공된다.

[0098] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트 및 하나 이상의 하우징 어셈블리의 내부 캐비티 내의 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트가 본원에서 제공된다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 재킷 부재 및 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 컬럼이 본원에서 제공되며, 상기 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 재킷 부재 중 적어도 하나 및 복수의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 세트가 본원에서 제공되며, 상기 각각의 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 순차적으로 또는 병렬로 배열될 수 있고, 선택적으로 상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 작동 가능하게 연결된다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 제1 크로마토그래피 컬럼 및 제2 크로마토그래피 컬럼을 포함할 수 있고, 상기 적어도 하나의 재킷 부재는 상기 제2 크로마토그래피 컬럼을 둘러싸도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 고정상은 겔 여과 매트릭스를 포함한다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 비자성 물질, 비강자성 물질 또는 비상자성 물질이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 셀룰로오스 막, 플라스틱 막, 다당류 겔, 폴리 아크릴아미드 겔, 아가로스 겔, 다당류 그래프트 실리카, 폴리비닐피롤리돈 그래프트 실리카, 폴리에틸렌 옥사이드 그래프트 실리카, 폴리(2-히드록시 에틸 아스파타미드) 실리카, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 그래프트 실리카, 스티렌-디비닐벤젠 겔, 아크릴레이트 또는 아크릴아미드 및 디올의 공중합체, 다당류 및 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 모놀리식 매트릭스, 미립자 매트릭스, 및/또는 평면 매트릭스일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 미립자 매트릭스는 약 5 μm 내지 약 200 μm , 약 5 μm 내지 약 600 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 1500 μm 의 평균 입자 크기를 갖는다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 약 1 nm 내지 약 500 nm의 평균 기공 크기를 가질 수 있다.

[0099] 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 그 위에 고정된 선택제(selection agent)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 선택제는 하나 이상의 세포 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 세포는 면역 세포이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포는 T 세포이다.

[0100] 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체이거나; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 Fab 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 F(ab')₂ 단편 및 2가 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되는 것이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이거나 이를 포함할 수 있다.

[0101] 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHPQFEKGGSGGSGGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모듈린에 가역적으로 결합하는 칼모듈린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 포함할 수 있다.

- [0102] 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 T 세포 공수용체(coreceptor)이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 T 세포 항원 수용체 복합체의 멤버이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD3 복합체이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD3 사슬이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 또는 CD3 ζ 사슬이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD8이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD4이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD45RA이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD27이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CD28이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 마커는 CCR7이거나 이를 포함할 수 있다.
- [0103] 임의의 이전 구현예에서, 선택제 및 선택 마커 사이의 특이적 결합은 T 세포에 대한 신호의 유도, 예를 들어, 자극 또는 활성화 또는 증식 신호의 유도를 초래하지 않을 수 있다.
- [0104] 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 항-CD3 Fab, 항-CD8 Fab 또는 항-CD4 Fab이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 항-CD27 Fab이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 고정상에 직접 또는 간접적으로 결합될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택제는 가역적으로 결합하는 선택 시약을 통해 고정상에 간접적으로 결합될 수 있다.
- [0105] 임의의 이전 구현예에서, 선택 시약은 비오틴, 비오틴 유사체 또는 이의 생물학적 활성 단편에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘의 mutein; 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 mutein; 적어도 2개의 키레이트 작용기 K를 포함하는 시약, 여기서 상기 적어도 2개의 키레이트 작용기는 전이금속 이온에 결합할 수 있음; 올리고히스티딘 친화도 태그(affinity tag)에 결합할 수 있는 제제; 글루타치온-S-전이효소에 결합할 수 있는 제제; 칼모듈린 또는 이의 유사체; 칼모듈린 결합 펩타이드(CBP)에 결합할 수 있는 제제; FLAG-펩타이드에 결합할 수 있는 제제; HA-태그에 결합할 수 있는 제제; 말토 오스 결합 단백질(MBP)에 결합할 수 있는 제제; HSV 에피토프에 결합할 수 있는 제제; myc 에피토프에 결합할 수 있는 제제; 또는 비오틴화된 수송 단백질에 결합할 수 있는 제제이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 선택 시약은 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 mutein이거나 이를 포함할 수 있다.
- [0106] 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD4 항체(예: 항-CD4 Fab)일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD8 항체(예: 항-CD8 Fab)일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD4 Fab일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD8 Fab일 수 있다.
- [0107] 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD3 항체(예: 항-CD3 Fab)일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 CD45RA, CD27, CD28 또는 CCR7를 표적으로 하는 항체, 선택적으로 항-CD27 항체(예: 항-CD27 Fab)일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD3 Fab일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD27 Fab일 수 있다.
- [0108] 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD4 항체(예: 항-CD4 Fab)일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD8 항체(예: 항-CD8 Fab)일 수 있고, 및 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 추가의 하나의 고정상에 고정된 선택제는 CD45RA, CD27, CD28 또는 CCR7를 표적으로 하는 항체, 선택적으로 항-CD27 항체(예: 항-CD27 Fab)일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD4 Fab일 수 있고, 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 또 다른 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD8 Fab일 수 있고, 및 복수의 크로마토그래피 컬럼 중 적어도 추가의 하나의 고정상에 고정된 선택제는 항-CD27 Fab일 수 있다.
- [0109] 임의의 이전 구현예에서, 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트는 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 고정상은 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 고정상에 고정된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 간접적으로

고정된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 뮤테인을 통해 간접적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 키트는 자극 시약을 포함할 수 있고, 상기 자극 시약은 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나 또는 적어도 하나는 제1 자극제이고, 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트는 제1 자극제의 자극 신호를 향상, 감쇠 또는 변형할 수 있는 하나 이상의 제2 자극제를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 자극제 중 적어도 하나는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자, 예를 들어, CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM에 특이적으로 결합할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 하나 이상의 제2 자극제 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0110] 임의의 이전 구현예에서, 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한 것일 수 있다.

[0111] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체이거나; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 Fab 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 $F(ab')_2$ 단편 및 2가 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되는 것이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이거나 이를 포함할 수 있다.

[0112] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGGSGGSGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모듈린에 가역적으로 결합하는 칼모듈린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함할 수 있다.

[0113] 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체이거나; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 Fab 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 $F(ab')_2$ 단편 및 2가 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되는 것이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 자극 시약은 항-CD3 Fab이고, 제2 자극제는 항-CD28 Fab이다.

[0114] 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGGSGGSGSAWSHPQFEK (서열번호

16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모둘린에 가역적으로 결합하는 칼모둘린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함할 수 있다.

[0115] 임의의 이전 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGSGGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0116] 임의의 이전 구현예에서, 제1 자극제 및 제2 자극제는 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하는 올리고머 자극 시약에 가역적으로 결합될 수 있고, 상기 올리고머 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과 및 ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 올리고머 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함한다.

[0117] 임의의 이전 구현예에서, 상기 자극 시약은 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함할 수 있고, 상기 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과 및 ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함한다.

[0118] 임의의 이전 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1의 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 포함할 수 있고, 또는 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1의 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인의 N-말단 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 10 내지 16의 영역에 있을 수 있고, 상기 스트렙타비딘 뮤테인의 C-말단 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 133 내지 142의 영역에 있을 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 3-6, 27, 28, 104 및 105 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0119] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 하우징 어셈블리, 하우징 어셈블리 세트 또는 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하는 장치가 본원에서 개시되고, 상기 장치는 주입구 하우징 부재의 주입구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 시스템을 포함하는 장치가 본원에서 개시되고, 상기 장치는 주입구 하우징 부재의 주입구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 재킷 부재 및 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하는 장치가 본원에서 개시되고, 여기서 상기 크로마토그래피 컬럼은 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하고, 상기 장치는 내부 캐비티 내로의 투입 조성물 저장소 내에 포함된 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 내부 캐비티의 주입구에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 투입 조성물은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 투입 조성물은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 분리된 것이거나 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된 것이다.

[0120] 임의의 이전 구현예에서, 장치는 배출구 하우징 부재의 배출구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 산출 조성물 저장소를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 장치는 내부 캐비티로부터의 산출 조성물 저장소 내에 포함된 산출 조성물의 배출을 허용하거나 초래하도록 내부 캐비티의 배출구에 작동 가능하게 연결된 산출 조성물 저장소를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 산출 조성물은 농축된 T 세포이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포는 크로마토그래피 컬럼에서 크로마토그래피 동안 자극을 받았다. 임

의의 이전 구현예에서, 장치는 폐쇄 또는 멸균 시스템 내에 있을 수 있다.

- [0121] 일부 구현예에서, 임의의 이전 구현예의 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트에 고정상을 도입시키는 단계를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법이 본원에서 개시된다.
- [0122] 일부 구현예에서, 크로마토그래피 키트의 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트에 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 키트의 고정상을 도입시키는 단계를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법이 본원에서 개시된다.
- [0123] 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 복수의 T 세포 중 하나 이상의 T 세포 내에 자극 신호를 전달하기 위해 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션 하는 단계, 여기서 상기 복수의 T 세포는 고정상에 고정화됨, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 복수의 T 세포 중 하나 이상의 T 세포 내에 자극 신호를 전달하기 위해 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션 하는 단계, 여기서 상기 복수의 T 세포는 고정상에 고정화됨; 및 상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 고정상은 하나 이상의 T 세포의 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합하는 선택제를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포에 의해 발현된 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 하나 이상의 T 세포의 고정화를 초래한다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 하나 이상의 T 세포의 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합하는 선택제를 포함할 수 있고, 상기 하나 이상의 T 세포에 의해 발현된 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 하나 이상의 T 세포의 고정화를 초래할 수 있다. 임의의 제공된 방법에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 실온보다 높은 목표 온도로 조절한다. 일부 구현예에서, 목표 온도는 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호의 효율적이거나 효과적인 전달을 제공하기 위해 세포의 건강 및 활성을 최대화하는 생리학적 온도이다.
- [0124] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 인큐베이션 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 후 4 시간 이내, 4.5 시간 이내, 5 시간 이내, 6 시간 이내, 7 시간 이내, 8 시간 이내, 9 시간 이내, 10 시간 이내, 11 시간 이내 또는 12 시간 이내에 고정상으로부터 수집될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상으로부터 수집될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 중력 흐름에 의한 수집은 고정상을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 하우징 어셈블리에 세척 배지를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 수집 단계는 고정상으로부터 복수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 세척 배지는 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않을 수 있다.
- [0125] 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 고정상에 고정된 스트렙타비딘 뮤테인에 대한 선택제의 스트렙타비딘 결합 펩타이드와의 결합에 대해 경쟁하는 체제일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 비오틴 또는 비오틴 유사체일 수 있고, 선택적으로 상기 비오틴 유사체는 D-비오틴이다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 D-비오틴일 수 있다.
- [0126] 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 (a) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 첨가하여, 이로써 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상을 고정화시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상의 선택 마커에 결합하는 선택제를 포함함; 및 (b) 상기 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 (a) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 고

정상을 포함하는 내부 캐비티에 첨가하여, 이로써 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상을 고정화시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상의 선택 마커에 결합하는 선택제를 포함함; 및 (b) 상기 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하는 단계; 및 (c) 상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0128] 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 (a) (i) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플 및 (ii) 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 키트 내의 상기 고정상을 조합시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상에 발현된 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 선택제를 포함하고, 상기 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 복수의 T 세포의 고정화를 초래함; 및 (b) 상기 고정상에 T 세포 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계, 여기서 상기 조합 단계 및/또는 상기 첨가 단계는 크로마토그래피 키트의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 내부 캐비티의 내부 또는 외부에서 수행됨,를 포함한다.

[0129] 일부 구현예에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 (a) (i) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플 및 (ii) 임의의 이전 구현예의 크로마토그래피 키트 내의 상기 고정상을 조합시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상에 발현된 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 선택제를 포함하고, 상기 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 복수의 T 세포의 고정화를 초래함; 및 (b) 상기 고정상에 T 세포 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하는 단계, 여기서 상기 조합 단계 및/또는 상기 첨가 단계는 크로마토그래피 키트의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 내부 캐비티의 내부 또는 외부에서 수행됨; 및 (c) 상기 인큐베이션의 개시 후, 상기 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하여, 이로써 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0130] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 인큐베이션 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 후 4 시간 이내, 4.5 시간 이내, 5 시간 이내, 6 시간 이내, 7 시간 이내, 8 시간 이내, 9 시간 이내, 10 시간 이내, 11 시간 이내 또는 12 시간 이내에 고정상으로부터 수집될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상으로부터 수집될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 중력 흐름에 의한 수집은 고정상을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 하우징 어셈블리에 세척 배지를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 수집 단계는 고정상으로부터 복수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 세척 배지는 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않을 수 있다.

[0131] 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 고정상에 고정된 스트렙타비딘 뮤테인에 대한 선택제의 스트렙타비딘 결합 펩타이드와의 결합에 대해 경쟁하는 제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 비오틴 또는 비오틴 유사체일 수 있고, 선택적으로 상기 비오틴 유사체는 D-비오틴이다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 D-비오틴일 수 있다.

[0132] 임의의 이전 구현예에서, 상기 자극제는 (i) 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자 및 (ii) 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약이거나 이를 포함할 수 있고, 상기 올리고머 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과와 반경, ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 올리고머 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 포함하고; 또는 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 포함한다.

- [0133] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나는 자극 신호를 전달할 수 있고, 상기 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한 것이다.
- [0134] 임의의 이전 구현예에서, 상기 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나는 자극 신호를 전달할 수 있는 제1 자극제일 수 있고, 상기 하나 이상의 자극제는 제1 자극제의 자극 신호를 향상, 감소 또는 변형할 수 있는 하나 이상의 제2 자극제를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 제2 자극제는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 공자극 분자는 CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM 중에서 선택될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 제2 자극제는 CD28에 특이적으로 결합할 수 있고, 및/또는 상기 공자극 분자는 CD28이다.
- [0135] 임의의 이전 구현예에서, 상기 제1 자극제는 CD3에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 제2 자극제는 CD28에 특이적으로 결합할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 제1 자극제는 CD3에 결합하는 1가 항체 단편을 포함할 수 있고, 상기 제2 자극제는 CD28에 결합하는 1가 항체 단편을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 1가 항체 단편은 Fab 단편, Fv 단편 및 단일쇄 Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 제1 자극제는 항-CD3 Fab일 수 있고, 상기 제2 자극제는 항-CD28 Fab일 수 있다.
- [0136] 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 조절할 수 있다.
- [0137] 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 조절할 수 있다.
- [0138] 임의의 이전 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도에서 유지할 수 있다.
- [0139] 임의의 이전 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35℃ 내지 약 39℃의 목표 온도에서 유지할 수 있다.
- [0140] 임의의 이전 구현예에서, 상기 목표 온도는 약 30℃ 내지 약 39℃, 선택적으로 (약) 37℃이다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 목표 온도는 37℃ 또는 약 37℃일 수 있다.
- [0141] 임의의 이전 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 커넥터는 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 가스는 멸균이고, 공기이거나 이를 포함한다. 임의의 이전 구현예에서, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입은 인큐베이션 동안 간헐적 또는 연속적일 수 있다.
- [0142] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 고정상을 배지로 세척하는 단계를 더 포함할 수 있고, 배지는 고정상으로부터 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않는다.
- [0143] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 (약) 37℃ ± 2℃에서 수행되고; 및/또는 추가 인큐베이션은 T 세포에 신호를 전달할 수 있는 추가 제제의 존재 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 T 세포, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 증식을 향상시키거나 유도할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 추가 제제는 IL-2, IL-15, 및 IL-7 중에서 선택되는 사이토카인이거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 방법은 자극된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 방법은 자극된 T 세포를 선택 및/또는 자극하는 단계를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 방법은 재조합 핵산 분자를 조성물의 자극된 T 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함할 수 있고, 여기서 상기 핵산 분자는 재조합 단백질을 암호화하고, 이로써 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산한다. 일부 구현예에서, 재조합 단백질은 항원 수용체이다. 일부 구현예에서, 재조합 단백질은 키메라 항원 수용체이다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원-인식 도메인 및 ITAM을 포함하는 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 세포외 도메인과 세포내 신호 전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 더 포함한다.
- [0144] 임의의 이전 구현예에서, 재조합 핵산의 도입은 바이러스 입자를 이용한 형질도입에 의해 달성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 재조합 핵산의 도입은 재조합 단백질을 암호화하는 핵산을 바이러스 입자로 형질도입에 의한 것이다.
- [0145] 임의의 이전 구현예에서, 재조합 핵산은 인큐베이션 전, 동안 또는 후에 자극된 T 세포에 도입될 수 있다. 일부

구현예에서, 재조합 핵산은 인큐베이션 동안 자극된 T 세포에 도입된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 인큐베이션 후에 자극된 T 세포에 도입된다.

- [0146] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0147] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 바이러스 통합을 위한 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하여, 이로써 배양된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산하는 단계를 더 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 방법은 바이러스 통합을 위한 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0148] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 T 세포를 증폭시키는 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0149] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 T 세포를 실질적으로 증폭시키지 않는 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0150] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 배양된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0151] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 부형제의 존재 하에 동결보존 및/또는 대상체에 투여를 위한 산출 조성물의 세포를 제형화하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 동결보호제의 존재 하에 제형화된다.
- [0152] 임의의 이전 구현예에서, 방법의 단계들 중 적어도 하나 또는 전부는 폐쇄 시스템에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 폐쇄 시스템은 자동화된다.
- [0153] 임의의 이전 구현예에서, 상기 샘플은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술(apheresis) 생성물 또는 백혈구 성분채집술(leukapheresis) 생성물이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 단리된 것이다. 일부 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0154] 도 1a 및 1b는 예시적인 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리의 개략도를 제공한다. 도 1a는 외부 온수 공급을 위한 주입구 및 배출구가 있는 가열 코일, 및 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 예시적인 하우징 어셈블리를 도시한다. 도 1b는 예시적인 컬럼 크로마토그래피 시스템에서 예시적인 하우징 어셈블리를 도시한다.

도 2는 표적 세포를 자극하고 선택하기 위한 예시적인 구현예의 개략도를 제공하며, 여기서 자극은 표적 세포의 일부 또는 전부에 존재하는 분자(선택 마커)(34)에 결합할 수 있는 선택제(32)에 대한 결합 부위가 있는 세포 선택용 선택 시약(31)(패널 A)의 성분(들)이 고정된 지지체(36), 본원에서 고정상으로 도시됨,의 존재 하에 적어도 부분적으로 발생하는 세포의 인큐베이션에 의해 수행된다. 선택제(32)는 선택제 및 선택제가 가역적으로 결합하는 조건 하에 고정된 선택 시약(31)과 함께 지지체에 첨가되어, 예를 들어 결합 부위를 통해 선택제가 다량체화된 올리고머 복합체를 생성한다(패널 B). 선택제는 둘 이상의 제제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 선택제 및 선택 시약의 가역적으로 결합된 복합체는 고정화를 위한 복합체로서 고정상에 첨가될 수 있다. 도시된 바와 같이, 표적 세포를 포함하는 세포(33)는 고정상 및 다량체화된 선택제 복합체와 결합되고, 이로써 표적 세포는 선택제(32) 및 시약(선택 마커)(34)(패널 C)을 통해 지지체(36)에 가역적으로 고정된다. 선택적으로, 결합되지 않은 세포는 자극제의 첨가 이전에 또는 그 이후에 제거된다. 올리고머 자극제(37)에 가역적으로 결합된 다량체화된 자극제(35)를 함유하는 복합체는 자극제(35)가 표적 세포 상의 분자에 특이적으로 결합함으로써 마커를 발현하는 고정된 표적 세포에서 신호를 유도하거나 조절하는 조건 하에서 첨가된다(패널 D).

도 3a 및 3b는 올리고머 시약의 상이한 배치 상에서 다량체화된 항-CD3/항-CD28과 함께 인큐베이션된 3개의 상이한 기증자로부터의 T 세포의 WST 대사 검정의 결과를 나타낸다. 도 3a는 평균 유체역학적 반경이 36 nm 또는 101 nm인 올리고머 백본 상에 다량체화된 항-CD3/항-CD28을 함유하는 참조 배치와 비교하여 모든 시험 배치(폴

링)에 대한 WST 비율로 표시되는 WST 대사 활성을 요약한다. 개별 시험 배치 및 참조 시약에 대한 상이한 기준으로부터의 T 세포 사이의 평균 WST 비율로 표시되는 평균 WST 대사 활성은 도 3b에 도시되어 있다.

도 4는 예시적인 컬럼 상의 T 세포 선택 및 자극 과정의 개략도를 제공한다.

도 5는 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 예시적인 열/가스 컬럼을 사용한 용리 효율이 기준 컬럼을 사용한 것의 대략 2배임을 보여준다. 추정치(회색 막대)는 100% 효율을 가정할 때 용리될 수 있는 포획된 세포의 이론적 수였다.

도 6은 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 예시적인 컬럼을 사용하여 컬럼 상의 T 세포 선택 및 자극 후 출발 물질, 음성 분획 또는 양성 분획에서 세포의 유세포 분석 정량화를 나타낸다. 세포는 CD3, CD4, CD8, CD45 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 염색되었다.

도 7a 및 7b는 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 예시적인 컬럼을 사용하여 컬럼 상의 선택 및 자극 후 T 세포의 결과를 도시한다. CD3, CD4, CD8 및 활성화 마커 CD69 및 CD25를 인식하는 항체로 세포를 염색한 후 유세포 분석에 의해 세포 수 및 세포 표면 발현에 대해 후속 인큐베이션 동안 1일, 2일 및 3일에 세포를 모니터링 하였고, 유세포 분석 결과는 도 7a에 도시되어 있다. 후속 인큐베이션 후 세포 수 및 배수 증폭에 대한 평가는 도 7b에 도시된 바와 같이 선택되고 자극된 T 세포가 증식하는 세포의 능력과 일치하는 3일째에 수가 증가하기 시작했음을 보여주었다.

도 8a 내지 도 8c는 예시적인 열/가스 컬럼에서 개시 샘플로서 동결보존된 성분채집술 샘플을 사용하여 컬럼상 T 세포 선택의 결과를 제공한다. 도 8a는 동결보존 성분채집술 샘플(CAPH)이 신선한 성분채집술 샘플(APH)에 비해 일반적으로 높은 단핵구 함량(20% 초과, 살아있는 CD45+ 세포의 %로 표시됨)을 갖는다는 것을 보여준다. 도 8b는 출발 물질 및 양성 분획에서 CD3 또는 CD14에 대해 양성인 세포의 백분율을 도시한다. 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 선택된 T 세포의 수는 CD3에 대한 2개의 순차적인 선택이 수행된 도 8c에 도시되어 있다.

도 9는 순차적으로 배열된 2개의 동일한 예시적인 열/가스 컬럼을 사용한 선택 및 자극 실행(실행 1) 및 병렬로 배열된 2개의 동일한 예시적인 열/가스 컬럼을 사용한 선택 및 자극(실행 2)의 개략도를 제공한다.

도 10a 및 10b는 실행 1 및 실행 2에서 T 세포 선택 및 자극 결과의 비교를 제공한다. 도 10a는 CD3, CD4, CD8 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 세포를 염색한 출발 물질, 음성 분획 및 양성 분획의 유세포 분석을 나타낸다. 양성 분획으로부터의 세포를 수확하고 인큐베이션하였고, 도 10b(왼쪽 패널)은 인큐베이션 1일째에 세포에서 활성화 마커 CD25 및 CD69의 발현을 보여준다. 인큐베이션 동안 실행 1(■) 및 실행 2(●)에서 세포 수에 대한 대표적인 결과는 도 10b(오른쪽 패널)에 도시되어 있다.

도 11a 및 11b는 병렬로 배열된 2개의 예시적인 열/가스 컬럼에 대한 CD3 선택 및 자극과 함께, 농축 혈액 샘플을 출발 샘플로 사용하여 온-컬럼 T 세포 선택의 결과를 제공한다. 도 11a는 CD3, CD4, CD8 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 세포를 염색한 출발 물질, 음성 분획 및 양성 분획의 유세포 분석을 나타낸다. 양성 분획의 세포를 수확하여 인큐베이션하고, 인큐베이션된 세포의 CD4/CD8 및 CD25/CD69 발현은 도 11b에 도시되어 있다.

도 12는 예시적인 열/가스 크로마토그래피 칼럼에서 수지로서 Sephadex® G-50을 사용하여 전혈로부터 직접 T 세포를 선택하는 예시적인 과정의 결과를 제공한다. CD3+ T 세포 선택에서 출발 물질, 음성 분획 및 양성 분획을 프로피디움 요오드(PI) 및 CD3 항체로 염색하고 유세포 분석으로 정량화했다.

도 13은 각각의 분자가 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 세포를 고정시키기 위한 선택 마커로서 사용될 때, CD3, CD4 및 CD8 표면 발현(평균 형광 강도, MFI로 평가됨)에 대한 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 사용한 24시간 온-컬럼 자극의 효과를 나타낸다. 표면 발현 패턴을 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 사용한 온-컬럼 자극을 포함하지 않는 대조군 조건과 비교하였다. 세포는 고정상에 적용된 성분채집술 샘플로부터 분리되었다.

도 14는 CD3이 컬럼 상에 세포를 고정시키기 위한 선택 마커로서 사용되었을 때 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 온-컬럼 자극시 TCR/CD3 복합체의 하향조절 및 재발현의 예시적인 동역학을 나타낸다. 세포는 고정상에 적용된 성분채집술 샘플로부터 분리되었다. 알파-베타 TCR 사슬에 대한 항체를 사용하여 CD3/TCR 복합체를 평가하였다.

도 15a-15b는 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 사용한 온-컬럼 자극 동안 자발적으로 분리된 배양된 T 세포의 표현형 및 기능적 특성을 보여준다. 도 15a는 온-컬럼 자극 후 24시간 및 5일째에 T 세포 크기 및 CD3,

CD69 및 CD25 발현을 왼쪽에서 오른쪽으로 보여준다. 도 15b는 세포 수 및 배수 증폭에 의해 지시된 바와 같이 자발적으로 분리된 배양된 T 세포의 증식 능력을 나타낸다. 세포는 고정상에 적용된 성분채집술 샘플로부터 분리되었고 세척 단계를 사용하여 수집되었다.

도 16a-16d는 mTor 신호전달 및 생존을 및 성장 동역학에 대한 화합물 63의 존재 또는 부재 하에 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약과 함께 T 세포를 인큐베이션하는 예시적인 효과를 나타낸다. 도 16a는 기억 서브셋에 의한 살아있는 CD8+ T 세포에서의 pS6 발현을 보여준다. 도 16b는 표시된 바와 같은 처리에 의한 총 CD8 T 세포의 pS6 발현의 평균 형광 강도(mfi)를 나타낸다. 도 16c-16d는 자극 개시("투입") 후 배양물에서 시간 경과에 따른 생존율 및 총 T 세포 수(일수로 표시됨; d1 등)를 각각 나타낸다. 도 16c-16d에서, 검은색 선은 화합물 63의 존재 하에 인큐베이션된 T 세포 조성물에 상응하고, 회색 선은 화합물 63의 부재 하에 인큐베이션된 T 세포 조성물에 상응한다.

도 17a-17f는 화합물 63의 존재 또는 부재 하에 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약과의 인큐베이션을 사용하는 방법을 사용하여 생성된 동결보존된 CAR-T 세포의 예시적인 기능 및 표현형 특성을 보여준다. 도 17a는 해동 시 카스파제(Caspase)의 세포내 발현을 나타낸다. 도 17b 및 17d는 CD27 및/또는 CCR7의 부분집합 발현에 의한 CD8 CAR-T 세포 및 CD4 CAR-T 세포 표현형 프로파일을 각각 보여준다. 도 17c 및 17e는 항원-보유 표적으로 각각 자극된 CD8 CAR-T 세포 및 CD4 CAR-T 세포 중 세포내 IL2, IFN γ 또는 TNF(왼쪽 패널) 또는 IL2 및/또는 IFN γ 또는 TNF의 조합(오른쪽 패널)을 보여준다. 도 17f는 항-CAR 비드로 자극된 CAR-T 세포에 대한 12일에 걸친 증폭 및 생존(좌측 패널) 및 성장 곡선하 면적(AUC, 우측 패널)에 의해 계산된 총 증폭 메트릭을 나타낸다.

도 18a는 실시예 11에 기술된 컬럼상 자극 과정 또는 대안적 공정을 사용한 세포 선택 후 CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포 수율을 보여준다. 도 18b-18c는 실시예 11에 기술된 컬럼 상의 자극 또는 대안적 공정의 사용 후 회수된 세포의 총 수(도 18b) 및 살아있는 세포의 백분율(도 18c)을 보여준다.

도 19a-19d는 살아있는 세포의 백분율(예: 순도; 도 19a), 예시적인 CAR을 발현하는 살아있는 세포의 백분율(도 19b), 선택 시 및 공정의 8일째에 CD4를 발현하는 살아있는 세포의 백분율(도 19c), 및 온-컬럼 자극 또는 실시예 11에 기술된 대안적 공정을 위한 배양 5일째(공정 시작부터 8일째)에 각 기증자에 대한 T 세포 표현형 분포(백분율)(도 19d)를 보여준다.

도 20은 실시예 11에 기술된 바와 같이, 대조군 조건 하에 온-컬럼 자극 또는 대안적 공정을 사용하여 조작된 항-CD19 CAR T 세포와의 배양 동안 시간 경과에 따른 CD19+ HEK 세포 용해를 보여준다.

도 21a-21c는 온-컬럼 자극 또는 실시예 11에 기술된 대안적 공정을 사용하여 조작된 CD4 및 CD8 T 세포에 대한 항원-특이적 CAR T 세포 IFN γ (도 21a), IL-2(도 21b), 및 TNF α (도 21c) 생산을 보여준다.

도 22a-22c는 CD4:CD8 비율(도 22a), 조작된 T 세포의 형질도입 효율(CD4 및 CD8 세포 조합; 도 22b), 및 온-컬럼 자극 또는 실시예 11에 기술된 대안적 공정을 사용하여 생성된 생존 세포의 백분율(도 22c)을 보여준다. 각 공정에 대해 3개의 제조 실행이 표시된다.

도 23은 B 세포 림프종 세포주(Raji)를 마우스에 주사(i.v.)하고 CAR-T 세포 조성물로 마우스를 치료하기 전의 처리 그룹에 걸친 평균 광도에 의한 종양 크기를 나타낸다. 처리군은 실시예 11에 기재된 온-컬럼 자극 또는 대안적 공정 각각의 3회의 제조 실행에 의해 생성된 CAR-T 세포 조성물을 지칭한다.

도 24는 각 처리군에 대한 시간 경과에 따른 B 세포 림프종 세포주(Raji) 주사된 마우스의 종양 부하를 나타낸다. CAR T 세포 치료 효과는 실시예 11에 기재된 온-컬럼 자극 또는 대안적 공정, 및 3개의 제조 실행 각각에 대해 도시되어 있다(도 22a-22c 참조).

도 25-28은 예시적인 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리의 개략도를 제공한다. 이러한 예시적인 하우징 어셈블리는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재, 측벽 부재, 및 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재의 일부뿐만 아니라 측벽 부재를 둘러싸는 재킷 부재를 포함한다. 예시적인 하우징 어셈블리의 재킷 부재는 외부 온수 공급을 위한 주입구 및 배출구가 있는 가열 코일을 각각 포함하는 2개의 재킷 구성요소로 구성된다. 두 개의 재킷 구성 요소가 함께 재킷 부재를 형성한다. 예시적인 하우징 어셈블리는 또한 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터(도시되지 않음)를 포함하고, 상기 가스 공급 커넥터는 주입구 하우징 부재의 주입구에 연결된다. 도 25는 예시적인 하우징 어셈블리의 분해도를 도시한다. 도 26a-26c는 하나의 재킷 구성요소의 내부(도 26a), 측면(도 26b), 및 외부(도 26c)의 도면을 도시한다. 도 27은 외부 온수 공급을 위한 주입구 및 주입구 하우징 부재의 주입구의 일부가 보이도록 예시적인 하우징 어셈블리의 도면을 도시한다. 도 28은 외부 온수 공급을 위한 배출구 및 배출구 하우징 부재의 배출구의 일부가 보이도록 예시적인 하우징 어셈블리의 도면을 도시한다.

다. 이 예시적인 하우징 어셈블리에 대한 선택적 특징(도시되지 않음)은 고정상과 내부 캐비티의 주입구(예: 직조 폴리에스테르 메쉬)를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재, 고정상과 내부 캐비티의 배출구(예: 직조 폴리에스테르 메쉬)를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재 및 배관 세트 커넥터를 포함한다.

도 29-31은 예시적인 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리의 개략도를 제공한다. 이러한 예시적인 하우징 어셈블리는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재, 측벽 부재, 및 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재의 일부뿐만 아니라 측벽 부재를 둘러싸는 재킷 부재를 포함한다. 예시적인 하우징 어셈블리의 재킷 부재는 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 각각 포함하는 3개의 재킷 구성요소로 구성된다. 3개의 재킷 구성 요소가 함께 재킷 부재를 형성한다. 예시적인 하우징 어셈블리는 또한 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터(도시되지 않음)를 포함하고, 상기 가스 공급 커넥터는 주입구 하우징 부재의 주입구에 연결된다. 도 29는 예시적인 하우징 어셈블리의 분해도를 도시한다. 도 30a-30c는 하나의 재킷 구성요소의 3가지 도면을 도시한다. 도 30d는 전기 가열 요소를 도시한다. 도 31은 전기 가열 요소의 전기적 연결뿐만 아니라 배출구 하우징 부재의 배출구의 일부가 보이도록 하는 예시적인 하우징 어셈블리의 도면을 도시한다. 이 예시적인 하우징 어셈블리에 대한 선택적 특징(도시되지 않음)은 고정상과 내부 캐비티의 주입구(예: 직조 폴리에스테르 메쉬)를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재, 고정상과 내부 캐비티의 배출구(예: 직조 폴리에스테르 메쉬)를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재 및 배관 세트 커넥터를 포함한다.

도 32는 선택 마커로서 CD27을 사용하여 가열된 컬럼의 고정상에 세포를 고정화하고 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 온-컬럼 자극한 후의 세포의 CD27 표면 발현을 나타낸다. 컬럼은 외부 온수 공급을 위한 주입구와 배출구가 각각 2개의 가열 코일을 포함하는 재킷 부재를 사용하여 가열되었다. 또한, 가열된 컬럼은 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함하였다. 대조군으로서, CD27-선택된 세포는 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 온-컬럼 자극을 받지 않았다. 세포는 고정상에 적용된 성분채집술 샘플로부터 분리되었다.

도 33은 2개의 개별 컬럼을 사용하여 성분채집술 샘플로부터 순차적으로 분리된 세포의 CD3 및 CD27 표면 발현을 보여준다. CD27은 제1 컬럼에서 선택 마커로 사용되었고 제1 컬럼의 양성 분획은 CD3 선택 마커가 있는 제2 컬럼으로 전달되었다. 제2 컬럼의 고정된 세포를 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 자극했다. 제2 컬럼은 외부 온수 공급을 위한 주입구와 배출구가 각각 2개의 가열 코일을 포함하는 재킷 부재를 사용하여 가열되었다. 또한, 가열된 컬럼은 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함하였다.

도 34a-34e는 CD3+ 고갈(도 34a), CD4 및 CD8 발현(도 34b), CD69 발현(도 34c), 생존율(도 34d), 및 상이한 가열 요소를 사용하여 가열된 크로마토그래피 컬럼에서 온-컬럼 자극 후 세포의 생존 세포수(도 34e)를 보여준다. 컬럼은 2개의 가열 코일(물) 또는 3개의 금속판을 전기 가열 요소(금속)로 포함하는 재킷 부재를 사용하여 가열되었다. 또한, 컬럼은 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0155]

일부 측면에서, 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공된다. 일부 측면에서, 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리(housing assembly)는 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재(temperature control member); 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터(connector)를 포함한다. 일부 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 포함하는 크로마토그래피 컬럼; 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 포함하고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 하나 이상의 가열 요소를 포함한다. 일부 측면에서, 하우징 어셈블리는 하나 이상의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 재킷 부재를 더 포함한다. 일부 측면에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 측면에서, 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공된다. 일부 측면에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 컬럼 하우징 어셈블리 및 그 안에 수용되어 크로마토그래피 컬럼을 형성하는 고정상을 포함하는 장치가 본원에서 제공된다. 일부 측면에서, 고정상은 그 위에 표적

세포를 고정시키도록 구성된다. 일부 측면에서, 장치는 세포 또는 세포 집단을 선택 및/또는 자극하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 선택된 및/또는 자극된 세포 또는 세포들은 세포 제조 공정, 예를 들어, 세포 요법을 제조하기 위한 세포 또는 세포들의 유전자 조작에 유용하다.

[0156] 세포 요법에 사용하기 위한 적절한 세포 집단, 예를 들어, 선택된(농축된) 및 자극된 세포 집단을 생성하는 방법은 종종 제조 공정을 연장할 수 있는 별도의 선택 및 자극 단계를 필요로 한다. 재조합 단백질(예: 키메라 항원 수용체)을 발현하도록 조작된 세포와 같은 세포 요법에 사용하기에 적합한 세포 집단을 생성하기 위해 다양한 시약 및 시스템을 사용할 수 있다. 그러나, 일부 측면에서, 이러한 시약 또는 시스템을 사용하는 것은 적어도 부분적으로 다중 처리 단계를 수행할 필요가 있기 때문에 세포를 생성하는 데 오랜 시간 또는 비교적 긴 시간이 필요할 수 있다. 다중 처리 단계는 또한 세포 스트레스를 유발할 수 있으며, 따라서 다운스트림 처리에서 세포의 유용성에 영향을 미친다. 또한, 선택 기술은 선택-관련 입자, 예를 들어 Fab 단편 및 경쟁 시약과 같은 선택제 및/또는 고정상으로부터 세포의 분리를 촉진하는 데 사용되는 자유 결합제와 같은 선택-관련 입자로 선택된 세포를 오염시키는 단계를 포함할 수 있다. 따라서 산출 조성물을 정제하기 위해 추가 세척 단계 및/또는 배지 교환이 필요하다. 추가 처리 단계는 완료하는 데 상당한 시간이 필요할 뿐만 아니라 잠재적으로 다운스트림 세포 처리 또는 심지어 세포 생물학에 영향을 미치는 세포 스트레스를 유발할 수 있다. 세포 조성물을 생성하기 위한 추가 장치 및 방법이 필요하다.

[0157] 일부 측면에서, 표적 세포(예: CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포)를 포함하는 샘플에서 세포를 선택 및/또는 선택된 세포를 자극하기 위한 장치 및 장치를 사용하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 측면에서, 장치는 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재(temperature control member); 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터(connector)를 포함한다. 일부 측면에서, 고정상은 그 위에 상기 표적 세포를 고정시키도록 구성된다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 하나 이상의 가열 요소를 포함한다. 일부 측면에서, 장치는 하나 이상의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 재킷 부재를 더 포함한다. 일부 측면에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 또한, 본원에 제공된 장치는 표적 세포(예: CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포)를 포함하는 샘플에서 세포를 선택 및/또는 선택된 세포를 자극하는 데 사용하기 위한 재킷 부재를 포함한다. 일부 측면에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재를 포함한다. 일부 측면에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 측면에서, 재킷 부재는 하나 이상의 가열 요소를 포함한다.

[0158] 일 측면에서, 컬럼 크로마토그래피의 내부 캐비티에서 고정상에 고정된 세포의 온도가 (약) 37° C 또는 37° C ± 약 5° C의 온도를 유지하도록 조절될 때 표적 세포의 온-컬럼 선택 및/또는 자극 방법이 개선된다는 것이 본원에서 밝혀졌다. 또한, 가스 교환을 허용하는 컬럼 구성(예: 컬럼 내 공기의 존재)이 온-컬럼 선택 및/또는 자극 동안 세포의 전반적인 건강, 적합성 또는 상태를 개선하는 것으로 밝혀졌다. 특정 구현예에서, 제공된 장치는 제공된 온-컬럼 방법으로 세포를 선택하고 자극하는 동안 컬럼에서 온도(예: 37° C 또는 37° C ± 약 5° C)를 조절할 수 있다. 특정 구현예에서, 제공된 장치는 제공된 온-컬럼 방법으로 세포를 선택하고 자극하는 동안 컬럼에서 온도(예: 37° C 또는 37° C ± 약 5° C)를 조절하고 가스 교환, 예를 들어, 공기의 존재를 허용할 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 장치는 세포의 후속 유전자 조작을 위한 고정상으로부터 세포의 분리 또는 용리와 같은 세포 활성화 및 세포의 다운스트림 처리를 촉진하거나 개선하기 위한 세포의 선택 및/또는 자극 방법과 관련하여 사용될 수 있다.

[0159] 일 측면에서, 온도 조절 부재는 컬럼 크로마토그래피의 내부 캐비티에서 고정상에 고정된 표적 세포의 선택 및/또는 자극에 적절한 온도를 제공하도록 구성된다. 이를 위해 가열 및/또는 냉각 수단이 장치 또는 장치를 포함하는 시스템에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상에 열을 제공하여 그 위에 고정된 표적 세포의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 표적 세포의 온도는 세포 선택 및/또는 자극을 위한 최적 온도로 조절 및/또는 유지된다. 일 측면에서, 온도 조절 부재는 고정상에 고정된 표적 세포의 온도를 자극 시약에 의한 자극을 위한 최적 온도로 유지하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 자극을 위한 최적 온도는 약 2° C 초과, 약 4° C 초과, 약 8° C 초과, 약 12° C 초과, 약 16° C 초과, 약 20° C 초과, 약 24° C 초과, 약 28° C 초과, 약 32° C 초과, 또는 약 36° C 초과이다. 일부 구현예에서, 자극을 위한 최적 온도는 (약) 37° C이다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 일정한 온도 값(예:

최적 온도)으로 유지된다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 선택된 온도 값(예: 최적 온도) $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C으로 유지된다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 37° C $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C으로 유지된다.

[0160] 일 측면에서, 장치는 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일 측면에서, 가스는 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 고정된 표적 세포의 자극의 적어도 일부 동안 내부 캐비티에 존재한다. 일부 측면에서, 가스는 공기를 포함한다.

[0161] 일부 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 제조 공정에서 세포 처리 및 처리 시간을 감소 및/또는 최소화한다. 일부 측면에서, 장치는 고정상에 고정된 세포를 자극(본원에서 온-컬럼 자극이라고도 함)하도록 구성된 자극제를 포함한다. 일부 측면에서, 장치는 가열 부재 및/또는 가스 공급 부재와 같은 하나 이상의 부재를 더 포함하여 세포 활성화를 촉진하거나 증진하여, 이로써 고정상으로부터 선택되고 자극된 세포의 자발적인 분리를 촉진하거나 증진한다. 일부 측면에서, 장치는 분리를 촉진하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 사용 없이 고정상으로부터 자발적으로 분리되는(예를 들어, 자극으로 인해) 선택되고 자극된 세포를 수집하도록 구성된 하나 이상의 부재를 더 포함한다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 세포 선택, 자극 및/또는 수집 단계를 조합할 수 있다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 고정상으로부터 선택되고 자극된 세포의 분리를 촉진하기 위해 별도의 단계를 필요로 하지 않는다. 일부 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제(예: 경쟁제 및/또는 자유 결합제)를 제거하는 단계와 같은 별도의 정제 단계를 필요로 하지 않는다. 이와 같이, 본원에 제공된 장치 및 방법은 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭, 후속 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 조성물을 생성하는 데 필요한 처리 단계의 수를 감소시키고, 이로써 제조 시간을 감소시키고, 잠재적인 세포 스트레스를 최소화하고 및/또는 오염 가능성을 줄인다. 특정 구현예에서, 본원의 장치 및 방법은 24시간 내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성할 수 있다.

[0162] 제공된 장치 및 방법은 샘플의 다른 세포와 같은 다른 구성요소로부터 세포, 예를 들어, CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 선택하고 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 세포를 고정하고; 고정상에 고정된 선택된 세포를 자극하고; 및 고정상으로부터 세포를 분리하고 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물로부터 상기 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제를 제거하기 위한 처리 단계의 부재 하에 선택 및 자극된 세포를 수집할 수 있다. 특정 측면에서, 제공된 장치 및 방법은 별도의 선택 및 자극 단계를 포함하고 고정상으로부터 세포를 분리하고 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제를 제거하는 추가 단계를 필요로 하는 방법에 비해 짧은 시간에 선택 및 자극된 세포의 집단을 생성할 수 있다. 특정 측면에서, 제공된 장치 및 방법은 컬럼 상 자극(본원에서 온-컬럼 자극이라고도 함)의 개시 24시간 이내에, 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택)에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단(조성물이라고도 함)을 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에서 장치의 방법은 세포 표면의 분자에 결합하여 세포에 자극 신호를 전달할 수 있는 자극제의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극제는 고정상에 첨가될 수 있는 올리고머 자극 시약에 포함된다. 일부 구현예에서, 자극은 고정상으로부터 선택된 세포의 자발적인 분리를 초래하고, 따라서 고정상으로부터 세포를 분리하고 산출 자극된 세포 조성물로부터 상기 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제를 제거하기 위한 추가 처리 단계의 부재 하에 선택 및 자극된 세포의 수집을 허용한다. 특정 측면에서, 방법은 온-컬럼 자극의 개시 24시간 이내에, 추가 처리, 예를 들어, 유전자 조작, 증폭, 인큐베이션 또는 후속 라운드의 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱)에 적합한 선택 및 자극된 세포의 오염되지 않은(예: 분리에 사용되는 제제(예: 경쟁제, 자유 결합제) 및/또는 선택제가 없음) 조성물을 성공적으로 생성한다.

[0163] 본 출원에서 언급된 특허 문헌, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 출판물은 각각의 개별 출판물이 개별적으로 참조로 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다. 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 출판물에 제시된 정의와 상반되거나 달리 부합하지 않는 경우, 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0164] 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 구성을 위한 목적이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

I. 세포 선택, 자극 및/또는 조작을 위한 장치 및 키트

[0166] 특정 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 크로마토그래피 컬럼의 고정상에서 표적 세포(예: CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)를 선택하고 자극할 수 있으며, 여기서 자극은 세포 선택에 사용되는 분자(즉, 선택 마커)의 하

향 조절을 촉진하여 고정상에서 세포가 자발적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼의 고정상은 표적 세포 표면의 분자(예: 선택 마커)에 특이적으로 결합할 수 있는 제제(예: 선택제)로 기능화된다. 이러한 방식으로, 선택 마커(예를 들어, CD3, CD4, CD8)를 함유하는 표적 세포를 포함하는 샘플을 고정상과 조합할 때, 표적 세포(예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)는 고정상에 간접적으로 고정된다. 예시적인 선택제 및 선택 시약은 섹션 II-B-1 및 II-B-2에 설명되어 있다. 특정 측면에서, 표적 세포(예: T 세포)는 예를 들어, 자극제의 첨가, 자극제를 포함하는 자극 시약 및/또는 고정상에 직접 또는 간접적으로 연결된 자극 시약을 통해 고정상에 고정되어 있는 동안 자극된다(예: 온-컬럼 자극). 예시적인 자극제 및 자극제를 포함하는 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약)은 섹션 II-B-1 및 II-B-2에 설명되어 있다. 따라서, 일부 측면에서, 제공된 방법 및 다른 구현예는 다중 처리 단계(예: 선택 및 자극)를 압축하고 동일한 용기 및/또는 폐쇄된 시스템 내에서 압축된 프로세스가 발생하도록 하여 효율성 및 무균성을 증가시킬 수 있다는 점에서 유리하다.

[0167] 특정 측면에서, 본원에 제공된 장치 및 방법은 자극 신호를 표적 세포(예: T 세포)에 전달할 수 있는 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약의 사용을 포함한다. 외인성 성장 인자의 부재 또는 적은 양의 외인성 성장 인자의 경우와 같이 시험관 내에서 T 세포를 자극하는 데 사용하기 위한 기존 시약이 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 6,352,694 B1 및 유럽 특허 EP 0 700 430 B1 참조). 일반적으로, 이러한 시약은 다양한 결합제(예: 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체)가 고정된 직경 1 μ m보다 큰 비드, 예를 들어 자성 비드를 사용할 수 있다. 그러나, 일부 경우에, 이러한 자성 비드는 예를 들어 증폭된 T 세포를 대상체에게 투여하기 전에 이러한 자성 비드가 완전히 제거되었는지 확인해야 하기 때문에 임상 시험 또는 치료 목적에 필요한 조건에서 세포를 자극하는 방법에 통합하기 어렵다. 일부 측면에서, 자기장에 세포를 노출시키는 것과 같은 이러한 제거는 세포 요법에 사용할 수 있는 생존 세포의 수율을 감소시킬 수 있다. 특정 경우에, 이러한 시약, 예를 들어 자성 비드가 포함된 자극 시약은 자극 시약에서 T 세포가 충분히 분리될 수 있도록 최소한의 시간 동안 세포와 함께 인큐베이션 되어야 한다. 또한, 비드와 같은 시약은 물리적 제약으로 인해 컬럼 크로마토그래피와 쉽게 호환되지 않는다.

[0168] 올리고머 자극 시약을 사용하는 본원에 제공된 장치 및 방법은 이러한 잠재적인 한계를 극복한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제공된 방법은 고체 지지체(예: 비드)에 결합되지 않은 가용성 올리고머 시약을 고정상에 첨가하여 자극을 개시하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 경쟁 시약 또는 자유 결합제의 첨가가 세포에서 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약을 해리(예: 결합 방해)하기 위해 사용될 수 있기 때문에, 방법에 의해 생성되거나 생산된 잔류 시약 산출 세포의 위험은 올리고머 시약을 사용함으로써 감소되거나 피할 수 있다. 일부 구현예에서, 이것은 또한 GMP 표준을 준수하는 프로세스가 투여를 위한 최종 모집단에 비드가 없도록 하기 위해 추가 조치를 취해야 하는 것과 같은 다른 방법에 비해 더 쉽게 확립될 수 있음을 의미한다. 따라서, 일부 측면에서, 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가와 같이 세포로부터 올리고머 자극 시약의 제거 또는 분리는 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리와 비교하여 세포 손실을 거의 또는 전혀 초래하지 않는다. 일부 측면에서, 자극 시약 또는 올리고머 자극 시약 제거 또는 분리의 시기는 제한되지 않거나 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리보다 덜 제한된다. 따라서, 일부 측면에서, 자극 시약 또는 올리고머 자극 시약은 제공된 방법 중 임의의 시점 또는 단계에서 세포로부터 제거되거나 분리될 수 있다.

[0169] 일부 측면에서, 제공된 장치는 고정상에 고정된 표적 세포의 분리, 처리 또는 조작을 포함하는 방법(예: 표적 세포의 온-컬럼 선택 및/또는 자극 방법)을 위한 개선된 장치이다. 일부 측면에서, 제공된 장치는 고정상에 고정된 세포의 온도 조절, 예를 들어 가열을 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 장치는 고정된 세포의 온도를 예를 들어, (약) 37° C 또는 37° C $\pm$ 약 5° C로 유지할 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 장치에 의한 세포 온도의 조절 및 유지는 예를 들어 온-컬럼 자극 동안 고정된 세포의 전반적인 건강, 적합성 또는 상태를 개선함으로써 고정된 세포의 온-컬럼 자극을 개선한다. 일부 측면에서, 제공된 장치는 또한 가스 교환, 예를 들어 고정상에서 공기의 존재를 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 장치에 의해 허용된 가스 교환은 온-컬럼 자극 동안 고정된 세포의 전반적인 건강, 적합성 또는 상태를 개선한다. 따라서, 일부 측면에서, 제공된 장치와 함께 사용하기 위한 온-컬럼 선택 및/또는 자극의 제공된 방법은 요법, 예를 들어, 자가 세포 요법에 사용하기 위한 후속 조작을 위해 개선된, 예를 들어 더 건강한 세포를 제공한다.

[0170] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 장치는 섹션 II에 설명된 방법을 수행하는 데 사용할 수 있다.

[0171] 특정 측면에서, 제공된 방법의 기간은 세포, 예를 들어, 투입 세포 집단 또는 샘플의 T 세포가 처음 접촉되거나 자극 조건(예: 섹션 II-D에서와 같이 본원에서 설명됨)에 노출될 때, 대안적으로 본원에서 자극제와의 인큐베이션 개시 또는 자극 조건 하에서, 예를 들어, 자극 시약에 대한 노출이 개시될 때부터 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 자극된 표적 세포(예: CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)를 포함하는 산출 집단(본원에서 산출 조성물이라고도 함)을 수집하는 데 필요한 시간의 기간은 인큐베이션의 개시(예: 자극 시약 첨가 또는 자극 시약에 노출)

부터 측정된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션의 기간은 (약) 24시간, 23시간, 22시간, 21시간, 20시간, 19시간, 18시간, 17시간, 16시간, 15시간, 14시간, 13시간, 12시간, 11시간, 10시간, 9시간, 8시간, 7시간, 6시간, 5시간, 4시간, 3시간 또는 2시간이거나 이들 미만이다. 일부 구현예에서, 제공된 인큐베이션의 기간은 대체 또는 기존 프로세스의 (약) 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 15% 또는 10%이거나 이들 미만이다.

[0172] 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물이 추가로 처리될 수 있음이 본원에서 고려된다. 예를 들어, 산출 세포는 키메라 항원 수용체와 같은 재조합 단백질을 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있고, 및/또는 산출 세포는 추가 인큐베이션, 자극, 증폭, 선택(예: 폴리싱) 및/또는 제형화를 겪을 수 있다.

[0173] 특정 구현예에서, 제공된 장치를 사용하는 방법은 예를 들어, 성분채집술, 연막 또는 전혈과 같은 샘플에서 수행된다. 일부 구현예에서, 샘플은 생물학적 샘플이다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 인간 대상체로부터 수집된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 질병 또는 병태를 앓고 있는 환자로부터 수집된다. 일부 구현예에서, 방법은 이전에 샘플에서 분리, 농축 또는 선택된 세포, 예를 들어, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 집단에 수행된다. 일부 구현예에서, 샘플 또는 샘플에서 분리된 세포는 동결보존되었을 수 있다.

[0174] 일부 구현예에서, 본원에서 세포 선택, 자극 및/또는 조작을 위한 장치, 키트, 시스템 및/또는 제품이 제공된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피용 고정상의 배열이 제공된다. 일부 구현예에서, 배열은 생물반응기를 더 포함한다. 생물 반응기는 세포의 증폭에 적합하고, 고정상은 세포 분리 및 온-컬럼 자극에 적합하다. 구현예에서, 고정상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스이고, 상기 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 선택 시약을 포함하고, 상기 선택 시약은 선택제에 포함된 결합 파트너 C1에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z1을 포함하고 및/또는 선택 시약은 제2 선택제에 포함된 결합 파트너 C2에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z2를 포함한다. 이에 따라 고정상은 제1 선택제 및/또는 제2 선택제, 제1 결합 파트너 C1 및/또는 제2 결합 파트너 C2를 그 위에 고정하기에 적합하다. 또한 생물 반응기와 고정상은 유체적으로 연결된다. 이 배열은 연속 증폭에 사용할 수 있으며, Quantum® 세포 증폭 시스템) 또는 Xuri 세포 증폭 시스템 W25와 같은 알려진 세포 증폭 시스템에 통합할 수 있다.

[0175] 일부 구현예에서, 고정상은 크로마토그래피 컬럼에 포함된다. 배열은 제1 고정상에 유체적으로 연결되는 제2 고정상을 더 포함할 수 있다. 제2 고정상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스일 수 있으며, 상기 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 선택 시약을 포함하고, 이로써 고정상에 다량체화 시약을 고정하기에 적합하다. 이러한 유형의 배열은 표적 세포(예: T 세포, CD4, CD3, CD8 T 세포)의 순차적 선택을 용이하게 할 수 있으며, 상기 컬럼 중 하나는 또한 본원에 기재된 온-컬럼 자극에 적합하다.

[0176] 일부 측면에서 세포 조성물의 정제(예: 선택) 및 배양, 예를 들어, 자극 또는 증폭을 위한 장치에 관한 구현예가 제공되고, 상기 장치는 생물반응기의 적어도 하나의 배열 및 상기 정의된 크로마토그래피용 제1 고정상 또는 제2 고정상을 포함한다.

[0177] 장치는 직렬로 유체적으로 연결되는 고정상 및 생물반응기의 복수의 배열을 더 포함할 수 있다.

[0178] 장치는 크로마토그래피용 고정상에 유체적으로 연결되는 샘플 주입구를 포함할 수 있다. 또한, 장치는 정제 및 자극된 표적 세포에 대한 샘플 배출구를 포함할 수 있으며, 샘플 배출구는 생물반응기의 적어도 하나의 배열의 마지막의 고정상 및 크로마토그래피용 고정상에 유체적으로 연결된다.

[0179] 일부 구현예에서, 장치는 기능적으로 폐쇄된 시스템으로 설계될 수 있다.

[0180] A. 크로마토그래피 하우징 어셈블리

[0181] 일부 구현예에서, 본원에는 본원에 개시된 크로마토그래피 기반 세포 선택 및/또는 자극 방법에 적합한 크로마토그래피 하우징 어셈블리(컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리라고도 함)가 제공된다. 크로마토그래피 하우징 어셈블리는 크로마토그래피를 위한 고정상이 있거나 없이 제공될 수 있다.

[0182] 일 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재(temperature control member); 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터(connector)를 포함한다. 일 측면에서, 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는 측벽 부재를 더 포함하고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재

및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다. 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재 상에 배치될 수 있다. 커넥터는 접합된 커넥터, 나사 커넥터, 루어(luer) 커넥터(예: 루어 락 커넥터 또는 루어 슬립 커넥터) 가지 커넥터, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 가스 공급원과 유체 소통하는 배관(tubing)과 밀봉식으로 맞물리도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함할 수 있고, 및/또는 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함하는 배관에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 하나 이상의 필터는 가스 필터이고, 예를 들어, 공기 필터이다. 하나 이상의 필터는 멸균 필터 및/또는 여과에 의한 멸균을 위한 멸균 필터일 수 있다. 일 측면에서, 가스는 크로마토그래피 컬럼의 고정 상에 고정된 표적 세포의 자극의 적어도 일부 동안 내부 캐비티에 존재한다. 일부 측면에서, 가스는 공기를 포함한다. 일 측면에서, 가스(예: 공기)의 존재 하에서 세포(예: T 세포와 같은 림프구)의 자극은 세포 활성화 및 고정상으로부터 세포의 분리 또는 용리 및/또는 유전 공학과 같은 세포의 다운스트림 처리를 촉진한다.

[0183] 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리의 내부 캐비티는 (약) 1 내지 40 mL, 예컨대, (약) 1 내지 35 mL, 1 내지 30 mL, 1 내지 25 mL, 1 내지 20 mL, 1 내지 15 mL, 1 내지 10 mL, 1 내지 5 mL, 5 내지 40 mL, 5 내지 35 mL, 5 내지 30 mL, 5 내지 25 mL, 5 내지 20 mL, 5 내지 15 mL, 5 내지 10 mL, 10 내지 40 mL, 10 내지 35 mL, 10 내지 30 mL, 10 내지 25 mL, 10 내지 20 mL, 10 내지 15 mL, 15 내지 40 mL, 15 내지 35 mL, 15 내지 30 mL, 15 내지 25 mL, 15 내지 20 mL, 20 내지 40 mL, 20 내지 35 mL, 20 내지 30 mL, 20 내지 25 mL, 25 내지 40 mL, 25 내지 35 mL, 25 내지 30 mL, 30 내지 40 mL, 30 내지 35 mL 또는 35 내지 40 mL의 베드(bed) 부피를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리의 내부 캐비티는 (약) 15 내지 25mL의 베드 부피를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리의 내부 캐비티는 (약) 15 내지 20mL의 베드 부피를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리의 내부 캐비티는 (약) 18 내지 20mL의 베드 부피를 수용할 수 있다.

[0184] 일부 구현예에서, 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는 하나 이상의 커넥터, 예를 들어 2개 이상의 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는 2개의 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 커넥터는 적어도 주입구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 커넥터는 적어도 배출구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재 각각에 적어도 배치된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재 모두 그 위에 배치된 커넥터를 갖는다.

[0185] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 시작 온도(예: 실온)에서 약 30°C 내지 약 39°C의 목표 온도(예: (약) 37° C)로 내부 캐비티 내의 고정상을 가열하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상을 약 30°C 내지 약 39°C의 목표 온도로 가열하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 시작 온도는 약 2°C, 약 4°C, 약 8°C, 약 12°C, 약 16°C, 약 20°C, 약 24°C, 약 28°C, 약 32°C, 약 36° C 또는 약 36° C 초과이다. 일부 구현예에서, 자극을 위한 온도는 (약) 37° C이다. 일부 구현예에서, 표적 온도(예: 세포 자극을 위한 최적 온도)는 약 2°C 초과, 약 4°C 또는 그 초과, 약 8° C 또는 그 초과, 약 12° C 또는 그 초과, 약 16° C 또는 그 초과, 약 20° C 또는 그 초과, 약 24° C 또는 그 초과, 약 28° C 또는 그 초과, 약 32° C 또는 그 초과, 약 36° C 또는 그 초과, 약 37° C 또는 그 초과, 약 38° C 또는 그 초과, 약 39° C 또는 그 초과, 또는 약 40° C 또는 그 초과이다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 일정한 온도 값(예: 최적 온도)으로 유지된다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 선택된 온도 값(예: 최적 온도) $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C로 유지된다. 일부 구현예에서, 고정상에 고정된 표적 세포의 온도는 자극의 적어도 일부 동안 37° C $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C로 유지된다. 일부 측면에서, 최적 온도(예: 37° C 또는 37° C $\pm$ 약 5° C)에서 세포(예: T 세포와 같은 림프구)의 자극은 세포 활성화 및 고정상으로부터 세포의 분리 또는 용리 및/또는 유전 공학과 같은 세포의 다운스트림 처리를 촉진한다. 일부 측면에서, 최적 온도(예: 37° C 또는 37° C $\pm$ 약 5° C)에서 세포(예: T 세포와 같은 림프구)의 자극은 온-컬럼 자극 동안 세포의 건강을 보존하거나 유지한다.

[0186] 일부 측면에서, 최적 온도(예: 37° C 또는 37° C $\pm$ 약 5° C) 및 컬럼 내 공기(예: 공기)의 존재 하에서 세포(예: T 세포와 같은 림프구)의 자극은 세포 활성화 및 고정상으로부터 세포의 분리 또는 용리 및/또는 유전 공학과 같은 세포의 다운스트림 처리를 촉진한다.

[0187] 도 1a-1b는 컬럼 크로마토그래피용 예시적인 하우징 어셈블리를 제공한다. 일부 측면에서, 하우징 어셈블리 (1)는 주입구 하우징 부재(2) 및 배출구 하우징 부재(3)를 포함하고, 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 수지(4)와 같은 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성

한다. 일부 측면에서, 하우징 어셈블리는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재, 예를 들어, 가열 코일(5)을 포함하는 온도 조절 부재를 더 포함한다. 일부 측면에서, 하우징 어셈블리는 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터, 예를 들어, 가스 교환 커넥터(6)를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터는 배출구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재 모두 그 위에 배치된 커넥터를 가지며, 예를 들어, 도 1a에 도시된 바와 같이, 주입구 하우징 부재(2) 및 배출구 하우징 부재(3) 모두 그 위에 배치된 가스 교환 커넥터(6)를 갖는다.

[0188] 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 측벽 부재를 더 포함한다. 예를 들어, 도 1a에 도시된 바와 같이, 주입구 하우징 부재(2), 배출구 하우징 부재(3), 및 측벽 부재(7)는 함께 내부 캐비티를 형성한다.

[0189] 일부 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터는 배출구 하우징 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터는 측벽 부재에 배치된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 모두 그 위에 배치된 커넥터를 갖는다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 모두 그 위에 배치된 커넥터를 갖는다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 각각은 그 위에 배치된 커넥터를 갖는다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재는 그 위에 배치된 적어도 2개의 커넥터를 갖는다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재는 그 위에 배치된 적어도 2개의 커넥터를 갖는다. 일부 구현예에서, 측벽 부재는 그 위에 배치된 적어도 2개의 커넥터를 갖는다.

[0190] 일부 구현예에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 중 임의의 2개 또는 3개 모두 사이에 형성된다. 일부 측면에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재 및 배출구 하우징 부재 사이에 형성된다. 일부 측면에서, 커넥터는 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 형성된다. 일부 측면에서, 커넥터는 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 형성된다. 일부 측면에서, 적어도 하나의 커넥터는 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 형성되고, 적어도 하나의 커넥터는 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 형성된다.

[0191] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 복수의 커넥터, 예를 들어, 가스 교환 커넥터(6)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 커넥터는 가스 공급원에 작동 가능하게 연결되고(선택적으로 하나 이상의 필터 및/또는 하나 이상의 밸브를 포함하는 배관을 통해 직접 또는 간접적으로), 적어도 하나의 다른 커넥터는 배출하도록 구성된다.

[0192] 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 집합된 커넥터, 나사 커넥터, 루어(luer) 커넥터(예: 루어 락 커넥터 또는 루어 슬립 커넥터), 가시 커넥터, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 수형 이음쇠 또는 암형 이음쇠를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 가스 공급원과 유체 소통하는 배관(tubing)과 밀봉식으로 맞물리도록 구성될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함하는 배관(tubing)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함하는 배관(tubing)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 가스 필터, 예를 들어, 공기 필터일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 필터는 멸균 필터 및/또는 여과에 의한 멸균을 위한 멸균 필터일 수 있다.

[0193] 일부 측면에서, 하우징 어셈블리는 상부 덮개를 포함하는 주입구 하우징 부재를 포함한다. 일부 구현예에서, 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착된다. 일부 구현예에서, 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다. 일부 구현예에서, 커넥터는 상부 덮개 상에 배치된다.

[0194] 임의의 이전 구현예에서, 주입구 하우징 부재는 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 주입구를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 1a에 도시된 바와 같이, 주입구 하우징 부재(2)는 상부 덮개 상에 배치된 주입구, 예를 들어 배관 세트 커넥터(8)를 포함한다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 주입구는 예를 들어, 도 1a(하부 패널) 및 도 1b에 도시된 상이한 위치에서 상부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 주입구는 동일한 위치에서 상부 덮개 상에 배치된다. 예를 들어, 하나 이상의 주입구는 내부 캐비티를 가스 소스에 작동 가능하게 연결하여 내부 캐비티로의 가스 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성될 수 있으며, 또한 내부 캐비티로의 투입 조성물의 흡입을 허용하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결하도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 주입구는 가스 흡입을 위한 크로마토그래피 동안 특정 시점에서 제어 가능하게 열리거나 닫힐 수 있고, 투입 조성물의 흡입을 위해 크로마토그래피 동안 다른 시점에서 조절 가능하게 열리거나 닫힐 수 있다.

- [0195] 일부 구현예에서, 하나 이상의 주입구를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있는 반면, 커넥터를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 45도의 각도에 있다.
- [0196] 임의의 이전 구현예에서, 배출구 하우징 부재는 하우징 어셈블리의 하부 덮개를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착된다. 다른 측면에서, 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다.
- [0197] 임의의 이전 구현예에서, 배출구 하우징 부재는 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용 또는 초래하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 배출구는 하부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 배출구는 예를 들어, 도 1a(하부 패널)에 도시된 상이한 위치에서 하부 덮개 상에 배치된다. 일부 구현예에서, 커넥터 및 하나 이상의 배출구는 동일한 위치에서 하부 덮개 상에 배치된다. 예를 들어, 하나 이상의 배출구는 내부 캐비티를 가스 소스에 작동 가능하게 연결하여 내부 캐비티로의 가스 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성될 수 있으며, 또한 내부 캐비티로부터의 산출 조성물의 배출을 허용하거나 초래하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결하도록 구성될 수 있다. 하나 이상의 배출구는 가스 흡입을 위한 크로마토그래피 동안 특정 시점에서 제어 가능하게 열리거나 닫힐 수 있고, 내부 캐비티로부터의 산출 조성물의 배출을 위해 크로마토그래피 동안 다른 시점에서 조절 가능하게 열리거나 닫힐 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 배출구를 통한 유체 경로는 하부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있다.
- [0198] 임의의 이전 구현예에서, 가스 공급원은 가스 저장소 또는 외부 환경일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가스 공급원 내의 가스는 멸균일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가스는 공기일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.
- [0199] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 가스 공급원에 작동 가능하게 연결된 배관을 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 배관은 내부 캐비티를 가스 공급원에 멸균으로 연결하도록 구성된다. 임의의 이전 구현예에서, 배관은 하나 이상의 밸브를 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 배관은 하나 이상의 필터를 포함할 수 있다.
- [0200] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 하나 이상의 다공성 부재, 예를 들어, 세포 여과기(strainer) 또는 세포 체(sieve)를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 1a(상부 패널)에 도시된 바와 같이, 하우징 어셈블리(1)는 직조 폴리에스테르 메쉬(9)를 포함한다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 고정상과 내부 캐비티의 주입구를 분리하도록 구성된 주입구 하우징 부재(2)와 측벽 부재(7) 사이에 제1 다공성 부재, 예를 들어 직조 폴리에스테르 메쉬(9)를 포함한다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 고정상과 내부 캐비티의 배출구를 분리하도록 구성된 배출구 하우징 부재(3)와 측벽 부재(7) 사이에 제2 다공성 부재, 예를 들어 직조 폴리에스테르 메쉬(9)를 더 포함한다.
- [0201] 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 평균 기공 직경을 가질 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 메쉬 크기를 갖는 메쉬를 포함할 수 있다.
- [0202] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성될 수 있다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 크로마토그래피 실행 중 시작 온도(예: 실온)에서 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도(예: (약) 37℃)로 내부 캐비티 내의 고정상을 가열하도록 구성된다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 목표 온도에서 고정상을 유지하도록 추가로 구성된다.
- [0203] 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함할 수 있다. 일 측면에서, 온도 센서는 모니터링/디스플레이 유닛에 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 온도 센서는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 전원은 하우징 어셈블리 외부에 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 전원을 더 포함한다.
- [0204] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열원을 포함할 수 있다. 대안적으로, 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 하우징 어셈블리의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0205] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 고정상을 균일하게 가열하도록 구성된다.
- [0206] 임의의 이전 구현예에서, 상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 가열 요소를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 가열 요소는 전기

가열 요소이다. 일부 구현예에서, 상기 전기 가열 요소는 금속판, 금속 막대, 금속 와이어 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 측면에서, 가열 요소는 전자기 유도 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 전자기 유도 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 자화 가능한(magnetizable) 코어를 둘러싸는 유도 가열 코일을 포함한다. 일 측면에서, 가열 요소는 비전기 가열 요소이다.

[0207] 일부 구현예에서, 비전기 가열 요소는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 액체 또는 가스에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 채널은 가열 코일이고, 가열된 유체는 가열된 물이다. 예를 들어, 도 1a에 도시된 바와 같이, 하우징 어셈블리는 가열 코일 주입구(10) 및 가열 코일 배출구(11)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 가열된 물에 대한 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.

[0208] 일부 구현예에서, 가열 요소는 전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 전원에 전기적으로 연결하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 전원은 하우징 어셈블리 외부에 있다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리는 전원을 더 포함한다.

[0209] 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 금속판을 포함한다. 일부 구현예에서, 금속판은 적어도 부분적으로 열전도성 금속, 예를 들어 알루미늄 또는 구리로 만들어진다. 일부 구현예에서, 금속판은 적어도 부분적으로 알루미늄으로 만들어지며, 예를 들어 전체가 알루미늄으로 만들어진다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 전기 절연층을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 절연층은 금속판의 적어도 일부와 전기 가열 요소의 다른 구성요소의 적어도 일부 사이에 있다. 일부 구현예에서, 전기 절연층은 금속판의 한 면의 적어도 일부를 라이닝하고, 예를 들어 금속판의 한 면을 전체적으로 라이닝한다.

[0210] 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다.

[0211] 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다.

[0212] 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않는다.

[0213] 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 내부, 내부 캐비티의 외부 또는 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다. 일부 측면에서, 가열 요소는 측벽 부재의 내부, 측벽 부재의 외부 또는 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다.

[0214] 일부 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 내부에 배치된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 내부에 배치된 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 내부에 배치된 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 채널은 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 가열된 물에 대한 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.

[0215] 일부 구현예에서, 가열 요소는 내부 캐비티의 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재의 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재를 예를 들어, 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구 중 하나의 적어도 일부, 예를 들어 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 주입구는 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 적어도 일부는 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구 중 하나의 적어도 일부는 가열 요소의 외부에 있다. 일부

구현예에서, 가열 요소는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구 중 하나의 적어도 일부, 예를 들어 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용 또는 초래하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구는 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용 또는 초래하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구의 적어도 일부는 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구 중 하나의 적어도 일부는 가열 요소의 외부에 있다.

[0216] 일부 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 가열 채널을 포함한다.

[0217] 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 코일을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 가열 채널을 포함할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재를 둘러싸는 가열 채널을 포함할 수 있다.

[0218] 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부, 및/또는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 하우징 어셈블리는 가열 요소와 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부, 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부 사이에 절연층을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 절연층은 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 절연층은 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 절연층은 고체 층이다. 일부 구현예에서, 절연층은 액체 층이다. 일부 구현예에서, 절연층은 가스 층이다. 일부 구현예에서, 절연층은 공기 층이다.

[0219] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 복수의 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 (약) 2 내지 10개의 가열 요소, (약) 2 내지 8개의 가열 요소, (약) 2 내지 6개의 가열 요소, 또는 (약) 2 내지 4개의 가열 요소(각 수치포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 2개의 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 3개의 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 4개의 가열 요소를 포함한다.

[0220] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 고정상을 균일하게 가열하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 고정상을 균일하게 가열하도록 배열된다.

[0221] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 동일하다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 상이한 가열 요소의 조합이다.

[0222] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널 각각은 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 갖는다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널 중 적어도 2개는 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널 중 적어도 하나의 주입구는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물의 외부 저장소에 연결하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 각각의 복수의 가열 채널의 주입구는 가열된 유체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.

[0223] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 전기 가열 요소, 예를 들어 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 2개는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 각각은 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다.

[0224] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다.

- [0225] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다.
- [0226] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않는다.
- [0227] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 내부, 내부 캐비티의 외부 또는 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 내부, 측벽 부재의 외부 또는 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 내부에 배치되고, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 내부 캐비티의 내부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 내부 캐비티의 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재의 외부에 배치된다.
- [0228] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 내부 캐비티의 외부에 배치된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 적어도 일부는 복수의 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구의 적어도 일부는 복수의 가열 요소의 외부에 있다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 적어도 일부는 복수의 가열 요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구의 적어도 일부는 복수의 가열 요소의 외부에 있다.
- [0229] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포된다.
- [0230] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부, 및/또는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 하우징 어셈블리는 복수의 가열 요소 중 적어도 하나와 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부, 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부 사이에 절연층을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 절연층은 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 절연층은 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 절연층은 액체 층이다. 일부 구현예에서, 절연층은 가스 층이다. 일부 구현예에서, 절연층은 공기 층이다.
- [0231] 일부 구현예에서, 가열 요소는 측벽 부재의 외부에 배치되고, 하우징 어셈블리는 가열 요소를 포함하는 재킷 부재(본원에서 재킷이라고도 함)를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재 외부에 배치된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 섹션 I-C에 설명된 바와 같다.
- [0232] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 측벽 부재 외부에 배치되고, 하우징 어셈블리는 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 재킷 부재를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 복수의 가열 요소 중 적어도 하나를 포함하는 온도 조절 부재를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 측벽 부재 외

부에 배치되고, 하우징 어셈블리는 복수의 가열 요소를 포함하는 재킷 부재를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 복수의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재를 포함한다.

[0233] 일부 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싼다.

[0234] 일부 구현예에서, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 함께 탈착 가능하게 연결되지 않는다.

[0235] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸고, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싼다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구는 재킷 부재에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구는 재킷 부재에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구는 재킷 부재의 외부에 있다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싼다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구는 재킷 부재에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용 또는 초래하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구는 재킷 부재에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구는 재킷 부재의 외부에 있다.

[0236] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 측벽 부재와 접촉, 예를 들어 직접 접촉한다.

[0237] 일부 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 또는 측벽 부재의 적어도 일부와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않는다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 접촉하지 않는다.

[0238] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 비전기 가열 요소, 예를 들어 가열된 유체에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 복수의 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 주입구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 배출구에 대한 적어도 하나의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체에 대한 하나 이상의 주입구에 대한 적어도 2개의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 하나 이상의 배출구에 대한 적어도 2개의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다.

[0239] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전기 가열 요소, 예를 들어 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 복수의 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전기 가열 요소 또는 복수의 전기 가열 요소가 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되도록 배열된다.

[0240] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 적어도 하나의 온도 센서를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 센서는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다.

[0241] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 하나 이상의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 함께 재킷 부재를 형성하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부, 배출구 하우징 부재의 적어도 일부 및/또는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게(releasably) 연결되도록

구성된다.

- [0242] 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록, 예를 들어, 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 주입구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구는 하나 이상의 재킷 구성요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 주입구 하우징 부재의 하나 이상의 주입구는 하나 이상의 재킷 구성요소의 외부에 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 배출구 하우징 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구는 하나 이상의 재킷 구성요소에 의해 노출된다. 일부 구현예에서, 배출구 하우징 부재의 하나 이상의 배출구는 하나 이상의 재킷 구성요소의 외부에 있다.
- [0243] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 2개 이상의 재킷 구성요소, 예를 들어 (약) 2 내지 10개의 재킷 구성요소, 2 내지 8개의 재킷 구성요소, 2 내지 6개의 재킷 구성요소, 또는 2 내지 4개의 재킷 구성요소(각 수치 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 2개의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 3개의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 4개의 재킷 구성요소를 포함한다.
- [0244] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열 요소를 포함한다.
- [0245] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 온도 센서를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 온도 센서를 함한다.
- [0246] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구가 있는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구가 있는 가열 채널을 포함한다.
- [0247] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다.
- [0248] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 하나는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구에 대한 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다.
- [0249] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 가열 채널의 적어도 하나의 주입구는 가열된 유체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 가열 채널의 주입구 각각은 가열된 유체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0250] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 하나는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다.
- [0251] 도 25-28은 예시적인 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리의 개략도를 제공한다. 도 25에 도시된 예시적인 하우징 어셈블리(1)는 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성하는 주입구 하우징 부재(2), 배출구 하우징 부재(3), 및 측벽 부재(7)를 포함한다. 또한, 하우징 어셈블리(1)는 도 26a-26c에 도시된 바와 같이 나사식 공기 필터에 대한 가스 공급 커넥터(도시되지 않음) 및 가열 코일(5)을 포함하는 온도 조절 부재를 포함한다. 가열 코일(5)은 2개의 재킷 구성요소(12)로 구성된 재킷 부재에 포함된다. 재킷 구성요소(12)는 측벽 부재(7)를 함께 전체적으로 둘러싸고 주입구 하우징 부재(2) 및 배출구 하우징 부재(3) 각각의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 각각의 재킷 구성요소(12)는 재킷 부재가 주입구 하우징 부재(2)의 주입구를 노출시키도록 주입구 홈(13)을 포함한다. 또한, 각각의 재킷 구성요소(12)는 재킷 부재가 배출구 하우징 부재(3)의 배출구를 노출시키도록 배출구 홈(14)을 포함한다.
- [0252] 도 26a-26c는 재킷 구성요소(12)의 내부, 측면 및 외부도를 도시한다. 도 26a-26c에 도시된 바와 같이, 각각의 재킷 구성요소(12)는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 가열 코일(5)을 포함한다. 재킷 부재의 2개의 가열 코일(5)은 측벽 부재(7)를 함께 전체적으로 둘러싸고 주입구 하우징 부재(2) 및 배출구 하우징 부재(3) 각각의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 또한, 각각의 재킷 구성요소(12)는 가열 코일의 가열 코일 주입구

(10) 및 가열 코일 배출구(11)에 대한 개구를 포함한다. 도 27에 도시된 바와 같이, 가열 코일 주입구(10)는 주입구 하우징 부재(2)의 주입구와 병렬이다. 도 28에 도시된 바와 같이, 가열 코일 배출구(11)는 배출구 하우징 부재(3)의 배출구와 병렬이다.

[0253] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 전기 가열 요소, 예를 들어 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 전기 가열 요소를 포함한다.

[0254] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결된다.

[0255] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 하나는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 각각은 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다.

[0256] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 전기 가열 요소 각각은 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다.

[0257] 도 29-31은 예시적인 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리의 개략도를 제공한다. 도 29에 도시된 예시적인 하우징 어셈블리(1)는 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성하는 주입구 하우징 부재(2), 배출구 하우징 부재(3), 및 측벽 부재(7)를 포함한다. 또한, 하우징 어셈블리(1)는 나사식 공기 필터에 대한 가스 공급 커넥터(도시되지 않음) 및 금속판을 포함하는 전기 가열 요소(17)를 포함하는 온도 조절 부재를 포함한다. 전기 가열 요소(17)는 3개의 재킷 구성요소(12)로 구성된 재킷 부재의 일부이다. 재킷 구성요소(12)는 측벽 부재(7)를 함께 전체적으로 둘러싸고 주입구 하우징 부재(2) 및 배출구 하우징 부재(3) 각각의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 각각의 재킷 구성요소(12)는 재킷 부재가 주입구 하우징 부재(2)의 주입구를 노출시키도록 주입구 홈(13)을 포함한다. 또한, 각각의 재킷 구성요소(12)는 재킷 부재가 배출구 하우징 부재(3)의 배출구를 노출시키도록 배출구 홈(14)을 포함한다.

[0258] 도 30a-30c는 재킷 구성요소(12)의 3가지 도면을 도시한다. 각각의 재킷 구성요소(12)는 전기 가열 요소(17) 및 온도 센서(18)를 포함한다. 각각의 전기 가열 요소(17)는 가열 요소 전기 연결부(16)를 통해 전원에 전기적으로 연결되도록 구성되고, 각각의 온도 센서는 온도 센서 전기 연결부(20)를 통해 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 도 30d에 도시된 바와 같이, 전기 가열 요소(17)는 또한 전기 절연층(19) 및 알루미늄 프로파일(21)을 포함한다. 각각의 전기 가열 요소(17)는 장착 지점(15)에서 재킷 구성요소(12)에 장착된다. 전기 가열 요소(17) 및 재킷 구성요소(12)는 전기 가열 요소(17)가 측벽 부재(7)의 둘레 주위에 균일하게 분포되도록 구성된다. 도 29에 도시된 바와 같이, 가열 요소 전기 연결부(16) 및 온도 센서 전기 연결부(20)는 배출구 하우징 부재(3)의 배출구와 같은 재킷 부재의 동일한 면에 노출되어 있다.

[0259] 일 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 주위에 배치된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0260] 일 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성되고 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 주위에 배치된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0261] 다른 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하

우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 금속판을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0262] 다른 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재, 상기 온도 조절 부재는 고정상에 열을 제공하도록 구성된 2개의 가열 코일을 포함함; 2개의 가열 코일을 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 재킷 부재, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게 연결되고, 2개의 가열 코일이 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0263] 다른 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 제공되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 고정상의 온도를 조절 또는 유지하도록 구성된 온도 조절 부재, 상기 온도 조절 부재는 각각 금속판을 포함하고 고정상에 열을 제공하도록 구성된 3개의 전기 가열 요소를 포함함; 3개의 전기 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재를 포함하는 재킷 부재, 상기 재킷 부재는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재의 적어도 일부를 둘러싸도록 함께 탈착 가능하게 연결되고, 2개의 가열 코일이 측벽 부재를 전체적으로 둘러싸; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0264] 또 다른 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 코일을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 코일은 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함한다. 일부 측면에서, 가열 코일은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 둘러싼다.

[0265] 일 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리가 본원에서 개시되며, 이는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 필터에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.

[0266] 임의의 이전 구현예에서, 가스 필터는 공기 필터일 수 있고 평균 가스는 평균 공기일 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 하우징 어셈블리는 가스 필터를 더 포함할 수 있다.

[0267] 또한, 본원에 개시된 복수의 하우징 어셈블리를 포함하는 하우징 어셈블리 세트가 본원에 개시된다. 하우징 어셈블리 세트는 순차적으로 배열된 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개를 포함할 수 있다. 하우징 어셈블리 세트는 병렬로 배열되는 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개를 포함할 수 있다.

[0268] 또한, 본원에 개시된 임의의 하우징 어셈블리 및 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 시스템이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼은 온도 조절 부재를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼은 적어도 하나의 추가 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결하도록 구성된 커넥터를 포함하지 않는다.

[0269] **B. 크로마토그래피 키트, 컬럼 및 컬럼 세트**

[0270] 일부 구현예에서, 또한, 본원에 개시된 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 키트가 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리 또는 하우징

어셈블리 세트는 섹션 I-A에 설명된 바와 같다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 키트는 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약은 섹션 II-B-1 또는 II-B-2에 설명된 것과 같다.

[0271] 일부 구현예에서, 또한, 본원에 개시된 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트 및 하나 이상의 하우징 어셈블리의 내부 캐비티 내의 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트가 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트는 섹션 I-A에 설명된 바와 같다.

[0272] 일부 구현예에서, 재킷 부재 및 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 컬럼이 또한 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 섹션 I-C에 설명된 바와 같다.

[0273] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재킷 부재 및 복수의 크로마토그래피 컬럼을 포함하는 크로마토그래피 컬럼 세트가 또한 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 섹션 I-C에 설명된 바와 같다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼 각각의 내부 캐비티는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 순차적으로 배열된다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 병렬로 배열된다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 크로마토그래피 컬럼은 작동 가능하게 연결된다.

[0274] 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 제1 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 제2 크로마토그래피 컬럼을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 재킷 부재는 제2 크로마토그래피 컬럼을 둘러싸도록 구성된다.

[0275] 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함할 수 있다. 고정상은 비자성 물질, 비강자성 물질 또는 비상자성 물질을 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 고정상은 셀룰로오스 막, 플라스틱 막, 다당류 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 아가로스 겔, 다당류 그래프트 실리카, 폴리비닐 피롤리돈 그래프트 실리카, 폴리에틸렌 옥사이드 그래프트 실리카, 폴리(2-히드록시 에틸 아스파타미드) 실리카, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 그래프트 실리카, 스티렌-디비닐벤젠 겔, 아크릴레이트 또는 아크릴아미드 및 디올의 공중합체, 다당류 및 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것이다. 고정상은 모놀리식 매트릭스, 미립자 매트릭스, 및/또는 평면 매트릭스이거나 이를 포함할 수 있다.

[0276] 임의의 이전 구현예에서, 미립자 매트릭스는 약 5 μm 내지 약 200 μm , 약 5 μm 내지 약 600 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 1500 μm 의 평균 입자 크기를 가질 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 약 1 nm 내지 약 500 nm의 평균 기공 크기를 가질 수 있다.

[0277] 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 섹션 II-B-1에 기술된 임의의 제제에 고정된 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제제는 고정상에 직접적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 제제는 고정상에 간접적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 제제는 고정상에 비가역적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 제제는 고정상에 가역적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 제제는 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 뮤테인을 통해 고정상에 가역적으로 고정된다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인 및/또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드는 섹션 II-B-2에 설명된 것과 같다.

[0278] 임의의 이전 구현예에서, 고정상은 그 위에 고정된 선택제(selection agent)를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 선택제는 하나 이상의 세포 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포는 면역 세포이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 세포는 T 세포이다.

[0279] 또한, 하우징 어셈블리, 하우징 어셈블리 세트 또는 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하고, 주입구 하우징 부재의 주입구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함하는 장치가 본원에서 개시된다. 일부 구현예에서, 투입 조성물은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 투입 조성물은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 단리된 것이거나 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된 것이다. 일부 구현예에서, 장치는 배출구 하우징 부재의 배출구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 산출 조성물 저장소를 더 포함한다. 일부 측면에서, 산출 조성물은 농축된 T 세포이거나

나 이를 포함한다. 다른 측면에서, 농축된 T 세포는 크로마토그래피 컬럼에서 크로마토그래피 동안 자극을 받았다. 임의의 이전 구현예에서, 장치는 폐쇄 또는 멸균 시스템일 수 있다. 예시적인 하우스징 어셈블리(1)를 포함하는 예시적인 장치가 도 1b에 도시되어 있다.

[0280] 또한, 본원에 개시된 하우스징 어셈블리 또는 하우스징 어셈블리 세트에 고정상을 도입시키는 단계를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법이 본원에서 개시된다. 또한, 크로마토그래피 키트의 하우스징 어셈블리 또는 하우스징 어셈블리 세트에 크로마토그래피 키트의 고정상을 도입시키는 단계를 포함하는 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법이 본원에서 개시된다.

[0281] C. 크로마토그래피용 재킷 부재

[0282] 본원에 제공된 장치는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재를 또한 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 고정된 표적 세포의 분리, 처리 또는 조작을 포함하는 개선된 방법(예: 표적 세포의 온-컬럼 선택 및/또는 자극 방법)을 허용하는 장치이다. 일부 측면에서, 제공된 재킷 부재는 고정된 세포의 온도 조절, 예를 들어 가열을 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 재킷 부재는 고정된 세포의 온도를 예를 들어, (약) 37° C 또는 37° C ± 약 5° C로 유지할 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 장치에 의한 세포 온도의 조절 및 유지는 예를 들어 온-컬럼 조작 동안 고정된 세포의 전반적인 건강, 적합성 또는 상태를 개선함으로써 고정된 세포의 온-컬럼 조작, 예를 들어 자극을 개선한다.

[0283] 일 측면에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된 하나 이상의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성된다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 포함한다. 일부 측면에서, 재킷 부재는 하나 이상의 가열 요소를 더 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 가열 요소는 고정상에 열을 제공하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 가열 요소는 온도 조절 부재의 일부로 구성된다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 가열 요소는 섹션 I-A에 설명된 바와 같다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 섹션 I-A에 설명된 바와 같다.

[0284] 일부 측면에서, 상기 하나 이상의 재킷 구성요소는 상기 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸기 위해 함께 탈착 가능하게 연결되도록 구성된다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 재킷 구성요소는 함께 탈착 가능하게 연결되지 않도록 구성된다.

[0285] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 (약) 1 내지 40 mL, 예컨대, (약) 1 내지 35 mL, 1 내지 30 mL, 1 내지 25 mL, 1 내지 20 mL, 1 내지 15 mL, 1 내지 10 mL, 1 내지 5 mL, 5 내지 40 mL, 5 내지 35 mL, 5 내지 30 mL, 5 내지 25 mL, 5 내지 20 mL, 5 내지 15 mL, 5 내지 10 mL, 10 내지 40 mL, 10 내지 35 mL, 10 내지 30 mL, 10 내지 25 mL, 10 내지 20 mL, 10 내지 15 mL, 15 내지 40 mL, 15 내지 35 mL, 15 내지 30 mL, 15 내지 25 mL, 15 내지 20 mL, 20 내지 40 mL, 20 내지 35 mL, 20 내지 30 mL, 20 내지 25 mL, 25 내지 40 mL, 25 내지 35 mL, 25 내지 30 mL, 30 내지 40 mL, 30 내지 35 mL 또는 35 내지 40 mL의 베드(bed) 부피를 수용할 수 있는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 (약) 15 내지 25mL의 베드 부피를 수용할 수 있는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 (약) 15 내지 20mL의 베드 부피를 수용할 수 있는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 (약) 18 내지 20mL의 베드 부피를 수용할 수 있는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다.

[0286] 일부 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼과 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다.

[0287] 일부 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다.

[0288] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 절연층이 상기 하나 이상의 재킷 구성요소 및 상기 크로마토그래피 컬럼 사이에 배치될 수 있도록 구성된다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 절연층을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 절연층은 하나 이상의 재킷 구성요소 및 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부 사이에 배치되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 절연층은 하나 이상의 재킷 구성요소 및 크로마토그래피 컬럼 사이에 배치되도록 구성된다. 일부 구현예에서,

서, 절연층은 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다.

- [0289] 일부 구현예에서, 절연층은 가스 층, 예를 들어 공기 층을 포함한다. 일부 구현예에서, 절연층은 액체 층을 포함한다. 일부 구현예에서, 절연층은 고체 층을 포함한다.
- [0290] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 크로마토그래피 컬럼에 포함된 고정상을 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도 (예: (약) 37° C)로 가열하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 시작 온도는 약 2℃, 약 4℃, 약 8℃, 약 12℃, 약 16℃, 약 20℃, 약 24℃, 약 28℃, 약 32℃, 약 36° C 또는 약 36° C 초과이다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상을 (약) 37℃로 가열하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상을 약 2℃ 또는 그 초과, 약 4℃ 또는 그 초과, 약 8° C 또는 그 초과, 약 12° C 또는 그 초과, 약 16° C 또는 그 초과, 약 20° C 또는 그 초과, 약 24° C 또는 그 초과, 약 28° C 또는 그 초과, 약 32° C 또는 그 초과, 약 36° C 또는 그 초과, 약 37° C 또는 그 초과, 약 38° C 또는 그 초과, 약 39° C 또는 그 초과, 또는 약 40° C 또는 그 초과로 가열하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 목표 온도에서 고정상을 유지하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상을 목표 온도 $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C로 유지하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 고정상을 37° C $\pm$ 약 5° C, $\pm$ 약 4° C, $\pm$ 약 3° C, $\pm$ 약 2° C, $\pm$ 약 1° C 또는 $\pm$ 약 0.5° C로 유지하도록 구성될 수 있다.
- [0291] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 크로마토그래피 컬럼에 함유된 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성될 수 있다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 시작 온도(예: 실온)에서 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도 (예: (약) 37° C)로 고정상을 가열, 예를 들어, 균일하게 가열하도록 구성된다. 일부 측면에서, 온도 조절 부재는 목표 온도에서 고정상을 유지하도록 추가로 구성된다.
- [0292] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함할 수 있다. 일 측면에서, 온도 센서는 모니터링/디스플레이 유닛에 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 온도 센서는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 전원은 재킷 부재의 외부에 있다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전원을 더 포함한다.
- [0293] 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열원을 포함할 수 있다. 대안적으로, 임의의 이전 구현예에서, 온도 조절 부재는 상기 하우징 어셈블리의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성될 수 있다.
- [0294] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 고정상을 균일하게 가열하도록 구성된다.
- [0295] 임의의 이전 구현예에서, 상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 가열 요소를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 가열 요소는 전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 상기 전기 가열 요소는 금속판, 금속 막대, 금속 와이어 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 측면에서, 가열 요소는 전자기 유도 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 전자기 유도 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 자화 가능한(magnetizable) 코어를 둘러싸는 유도 가열 코일을 포함한다. 일 측면에서, 가열 요소는 비전기 가열 요소이다.
- [0296] 일부 구현예에서, 비전기 가열 요소는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 액체 또는 가스에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 가열 채널은 가열 코일이다. 일부 구현예에서, 가열된 유체는 가열된 물이다. 일부 구현예에서, 상기 가열된 물에 대한 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0297] 일부 구현예에서, 가열 요소는 전기 가열 요소이다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 전원에 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 전원은 재킷 부재의 외부에 있다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전원을 더 포함한다.
- [0298] 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 금속판을 포함한다. 일부 구현예에서, 금속판은 적어도 부분적으로 열전도성 금속, 예를 들어 알루미늄 또는 구리로 만들어진다. 일부 구현예에서, 금속판은 적어도 부분적으로 알루미늄으로 만들어지며, 예를 들어 전체가 알루미늄으로 만들어진다. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 예를 들어, 금속판의 적어도 일부와 전기 가열 요소의 다른 구성요소의 적어도 일부 사이에 전기 절연층을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 절연층은 금속판의 한 면의 적어도 일부를 라이닝하고, 예를 들어 금속판의 한 면을 전체적으로 라이닝한다.

- [0299] 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼과 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다.
- [0300] 일부 구현예에서, 가열 요소의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다.
- [0301] 일부 구현예에서, 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 구성된다.
- [0302] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 복수의 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 (약) 2 내지 10개의 가열 요소, (약) 2 내지 8개의 가열 요소, (약) 2 내지 6개의 가열 요소, 또는 (약) 2 내지 4개의 가열 요소(각 수치포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 2개의 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 3개의 가열 요소를 포함한다.
- [0303] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 고정상을 균일하게 가열하도록 구성된다.
- [0304] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 각각 선택된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 동일하다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 상이한 가열 요소의 조합이다.
- [0305] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널 각각은 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 갖는다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널 중 적어도 2개는 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 복수의 가열 채널의 주입구는 가열된 액체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 각각의 복수의 가열 채널의 주입구는 가열된 액체의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0306] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 복수의 전기 가열 요소, 예를 들어 금속판을 포함하는 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 2개는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원으로부터 전기적으로 연결되도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 각각은 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원으로부터 전기적으로 연결되도록 구성된다.
- [0307] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 크로마토그래피 컬럼과 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼과 접촉, 예를 들어 직접 접촉하도록 구성된다.
- [0308] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부와 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나의 적어도 일부는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소 중 적어도 하나는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼과 접촉하지 않도록 구성된다.
- [0309] 일부 구현예에서, 복수의 가열 요소는 크로마토그래피 컬럼 주위, 예를 들어 크로마토그래피 컬럼의 둘레 주위에 균일하게 또는 대략 균일하게 분포되도록 구성된다.
- [0310] 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 비전기 가열 요소, 예를 들어 가열된 유체에 대한 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 온도 조절 부재는 복수의 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 물에 대한 하나의 주입구 및 하나의 배출구에 대한 하나 이상의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 물에 위한 주입구 및/또는 배출구에 대한 적어도 2개의 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전원, 예를 들어 하우징 어셈블리 외부에 있거나 하우징 어셈블리에 포함된 전원으로부터 전기적으로 연결되도록 구성된다.

- [0311] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 전기 가열 요소, 예를 들어 금속관을 포함하는 전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 복수의 전기 가열 요소를 포함한다.. 일부 구현예에서, 전기 가열 요소는 전원에 전기적으로 연결하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 하나는 전원에 전기적으로 연결하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 각각은 전원에 전기적으로 연결하도록 구성된다.
- [0312] 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소 중 적어도 2개는 서로 전기적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 복수의 전기 가열 요소는 서로 전기적으로 연결된다.
- [0313] 일부 구현예에서, 재킷 부재는 2개 이상의 재킷 구성요소, 예를 들어 (약) 2 내지 10개의 재킷 구성요소, 2 내지 8개의 재킷 구성요소, 2 내지 6개의 재킷 구성요소, 또는 2 내지 4개의 재킷 구성요소(각 수치 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 2개의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 3개의 재킷 구성요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 재킷 부재는 4개의 재킷 구성요소를 포함한다.
- [0314] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열 요소를 포함한다.
- [0315] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 온도 센서를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 온도 센서를 함한다.
- [0316] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 비전기 가열 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구가 있는 가열 채널을 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구가 있는 가열 채널을 포함한다.
- [0317] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 2개의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소의 가열 채널은 서로 유체적으로 연결된다.
- [0318] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 하나는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 주입구에 대한 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다.
- [0319] 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소 중 적어도 하나는 가열된 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 재킷 구성요소는 각각 유체, 예를 들어 가열된 물에 대한 배출구에 대한 개구를 포함한다.
- [0320] 일부 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결되도록 구성된 하나 이상의 재킷 구성요소, 상기 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성됨; 및 하나 이상의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 하나 이상의 가열 요소는 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성됨,를 포함한다.
- [0321] 일부 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결되도록 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소, 상기 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성됨; 및 하나 이상의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 하나 이상의 가열 요소는 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성됨,를 포함한다.
- [0322] 일부 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결되도록 구성된 2개 이상의 재킷 구성요소, 상기 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성됨; 및 가열 코일인 2개의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 하나 이상의 가열 요소는 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성됨,를 포함한다.
- [0323] 일부 측면에서, 다음을 포함하는 컬럼 크로마토그래피용 재킷 부재가 본원에서 제공되며, 이는 크로마토그래피 컬럼의 적어도 일부를 둘러싸도록 탈착 가능하게 연결되도록 구성된 3개 이상의 재킷 구성요소, 상기 크로마토그래피 컬럼은 고정상을 수용하도록 구성됨; 및 전기 가열 요소인 3개의 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 하나 이상의 가열 요소는 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 조절하

거나 유지하도록 구성됨,를 포함한다.

[0324]

II. 세포의 선택, 자극 및/또는 조작 방법

[0325]

본원에 개시된 장치를 사용하여 선택 단계를 포함하여 선택되고 자극된 CD3+ T, CD4+ T 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 세포의 산출 집단(산출 조성물이라고도 함)을 생성하는 방법이 본원에서 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 세포 요법의 제조, 생성 또는 생산과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 산출 조성물, 예를 들어 선택 및 자극된 T 세포를 생성 또는 생산하는 방법은 대상체로부터 세포를 분리하고, 자극 조건 하에 세포를 인큐베이션하고, 세포를 유전적으로 조작하는 단계 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 투입 세포(예: 1차 CD4+ 및 CD8+ T 세포)가 생물학적 샘플로부터 분리, 예를 들어 선택 또는 분리되고 자극 조건 하에 인큐베이션되고 단일 단계에서 수집되는 순서로 수행되는 처리 단계를 포함하며, 후속적으로, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해 세포 내로 재조합 수용체를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하도록 유전적으로 조작되고; 그 다음 수집, 수확 또는 산출 집단으로서 용기(예: 백 또는 바이알)에 채워진다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 선택적으로 세포를 동결보존하고 저장한 후 동일한 대상체에 다시 도입된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 산출 집단은 자가 세포 요법과 같은 요법에 사용하기에 적합하다.

[0326]

본원에 개시된 장치를 사용하여 표적 세포(예: T 세포, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)를 포함하는 샘플에서 세포를 선택하고 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 상기 표적 세포를 고정화하고, 고정상에 고정된 세포를 자극하고(본원에서 온-컬럼 자극이라고도 함), 및 분리를 촉진하기 위해 경쟁제 또는 자유 결합제를 사용하지 않고 고정상으로부터 자발적으로 분리되는 선택 및 자극된 세포를 수집 및/또는 용리하는 방법이 본원에서 제공된다. 제공된 방법 중에는 표적 세포(예: T 세포, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)를 포함하는 샘플로부터 세포를 선택하고 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 상기 표적 세포를 고정하고, 고정상에서 고정된 세포를 자극하고 및 중력 흐름에 의해 선택 및 자극된 세포를 수집 및/또는 용리하는 단계를 포함하는 방법이 있다. 제공된 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼의 고정상에서 표적 세포(예: CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)를 자극하는 것은 세포 선택에 사용되는 분자(즉, 선택 마커)의 하향 조절을 촉진하여 고정상에서 세포의 자발적인 분리 또는 방출을 초래한다. 세포의 방출 또는 분리는 추가 단계 또는 시약 없이 발생할 수 있다. 일부 측면에서, 세포는 크로마토그래피 컬럼에 배지 또는 기타 용액을 첨가하는 것과 같은 중력 흐름에 의해 수집될 수 있다. 특정 구현예에서, 첨가되는 배지 또는 기타 용액은 고정상으로부터 세포의 분리를 용이하게 하는 경쟁제 또는 자유 결합제를 함유하지 않는다.

[0327]

특정 구현예에서, 제공된 방법은 T 세포를 선택하고 자극하기 위해 수행된다. 일부 구현예에서, T 세포는 샘플의 세포를 T 세포 또는 이의 서브세트에 대해 특이적인 선택제, 예를 들어, 섹션 II.B-1에 설명된 대로, T 세포에 특이적인 선택제에 의해 고정되거나 결합된 친화성 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 첨가함으로써 생물학적 샘플(예: 성분채집물 샘플)로부터 선택된다. 제공된 구현예에서, 방법은 T 세포의 하나 이상의 자극제의 존재 하에 고정상에 고정된 세포를 자극하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 T 세포에서 자극 신호를 전달하기 위한 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한 것이다. 일부 구현예에서, 자극제(예: 제1 자극제)는 항-CD3 항체와 같은 CD3에 결합하는 제제이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 T 세포에서 신호를 추가로 자극하거나 향상시킬 수 있는 제2 자극제를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자, 예를 들어, CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas), CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 항-CD28 항체와 같은 CD28에 결합하는 제제이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체, 예를 들어 항-CD3 Fab 및 항-CD28 Fab를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 크로마토그래피 컬럼에 첨가되는 시약(예를 들어, 자극제)에 고정되거나 결합된다. 특정 구현예에서, 자극 시약은 가용성 고분자 또는 올리고머 시약이다. 예를 들어, 하나 이상의 자극제는 고체 표면(예: 비드)과 반대로 올리고머 또는 중합체 단백질로 기능화된다. 제공된 방법에 사용하기 위한 예시적인 올리고머 자극 시약은 본원, 예를 들어 섹션 II.B-2에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 하나 이상의 자극제(예: 항-CD3 Fab 및 항-CD28 Fab)로 기능화되거나 다량체화된 올리고머 스트랩타비딘 뮤테인이다. 제공된 방법에서, 선택되고 자극된 T 세포는 중력 흐름에 의해 선택되고 자극된 세포를 용리하거나 세척함으로써 수집된다.

[0328]

일부 구현예에서, 상기 수집은 고정상을 배지(예: 무혈청 배지)로 세척하는 것을 포함하며, 배지는 고정상으로부터 표적 세포(예: T 세포)를 용리하기 위해 경쟁제 또는 자유 결합제를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 중력 흐름에 의한 수집은 고정상에 배지를 첨가하는 것을 포함하며, 배지는 고정상으로부터 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 자극된 T 세포를 함유하는 상기 조성물은 경쟁제 또는 자유 결합제를 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 비오틴 또는

비오틴 유사체, 예를 들어, D-비오틴인 비오틴 유사체이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 경쟁제 또는 자유 결합제는 D-비오틴이다. 일부 구현예에서, 중력 흐름에 의해 세포를 용리하기 위한 세척 컬럼의 배지는 제조합 사이토카인(예: IL-2)을 포함하는 무혈청 배지이다.

[0329] 일부 구현예에서, 방법은 제조합 핵산 분자를 조성물의 자극된 T 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함하고, 여기서 상기 핵산 분자는 제조합 단백질을 암호화하고, 이로써 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산한다. 일부 구현예에서, 제조합 단백질은 항원 수용체이다. 일부 구현예에서, 제조합 단백질은 키메라 항원 수용체이다.

[0330] 일부 구현예에서, 상기 방법은 자극된 세포(예를 들어, 자극된 T 세포)를 함유하는 조성물을 추가로 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 제조합 수용체가 도입된 세포(예를 들어, 형질도입된 T 세포)를 함유하는 조성물을 추가로 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 약 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 수행된다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 세포를 증폭하지 않거나 실질적으로 증폭하지 않는 조건에서 수행된다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 세포의 증폭(예: 증식)을 위한 조건 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 T 세포에 신호를 전달할 수 있는 추가 제제의 존재 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 고정상 세척에 사용되는 매체에 포함된다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 T 세포, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 증식을 향상시키거나 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 제제는 IL-2, IL-15, 및 IL-7 중에서 선택되는 사이토카인이다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 72시간, 48시간 이하, 24시간 이하, 또는 12시간 이하인 시간 동안 수행된다.

[0331] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여, 개시 또는 투입 세포 집단으로부터 제조합 수용체를 발현하는 세포의 산출 집단을 생성하는 것과 관련된 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 투입 집단은 농축된 T 세포, 농축된 CD4+ T 세포 및/또는 농축된 CD8+ T 세포(이하, 각각 농축된 T 세포의 집단, 농축된 CD4+ T 세포의 집단, 및 농축된 CD8+ T 세포의 집단으로도 지칭됨)를 함유하는 세포 집단을 포함하는 세포를 조합, 혼합 및/또는 풀링함으로써 생산, 생성 및/또는 만들어진다. 일부 구현예에서, 세포의 투입 집단은 조합, 혼합 및/또는 풀링된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 집단이다. 특정 구현예에서, 제공된 방법은 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해 제조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 도입하기 위해 선택되고 자극된 세포를 유전적으로 조작하는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 방법은 생물학적 샘플(예: 전혈, 성분채집술)에서 선택된 세포를 분리하여 대상체로부터 채취, 수집 및/또는 수득한 생물학적 샘플과 같은 농축된 T 세포의 투입 집단을 생성하는 데 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포가 조작, 형질도입 및/또는 배양된 후 농축된 T 세포의 집단을 수확, 수집 및/또는 제형화하는 것과 관련하여 사용될 수 있다.

[0332] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 장치를 사용하여 이중 또는 제조합 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 도입하는 것과 관련된 방법, 예를 들어 섹션 II-F에서 본원에 기재된 방법에 의해 예를 들어, 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 것과 관련된 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 세포는 예를 들어, 제조합 단백질을 코딩하는 이중 또는 제조합 폴리뉴클레오타이드의 통합을 허용하거나 제조합 단백질의 발현을 허용하기에 충분한 시간 동안 세포를 유전적으로 조작하는 동안 또는 후에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 18시간 초과 또는 4 일 미만의 시간과 같이 설정되거나 고정된 시간 동안 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 조작 단계는 세포가 자극제에 노출된 때로부터 24시간 이내와 같이 자극이 시작되거나 개시될 때로부터 정해진 시간 내에 시작되거나 개시된다.

[0333] 일부 구현예에서, 하나 이상의 처리 단계는 적어도 부분적으로 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 한정된 또는 잘-한정된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 여과된 조절 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 사이토카인 또는 제조합 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 제조합 IL-2, IL-15, 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 글루타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 글루타민 및 제조합 IL-2, IL-15, 및/또는 IL-7을 포함한다.

[0334] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여, 예를 들어 임상 세포 요법에서 임상 사용을 위한 세포 제조의 하나, 그 이상 또는 모든 단계가 세포를 비멸균 상태에 노출시키지 않고 수행되도록 수행되는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 폐쇄된, 멸균 시스템 또는 장치 내에서 모두 선택, 자극, 형질도입, 세척, 및 제형화 된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단계는 폐쇄된 시스템 또는 디바이스와 별개로 수행된다. 일부

구현예에서, 세포는 별도의 폐쇄 시스템으로의 멸균 이송과 같은 멸균 조건 하에서 폐쇄 시스템 또는 장치로부터 별도로 이송된다.

[0335] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 섹션 I에 설명된 장치 중 하나를 사용하여 수행된다.

[0336] 특정 구현예에서, 샘플 및/또는 샘플의 분리된 부분(예: 연막, 농축 T 세포 집단)은 수집되고, 동결보호를 위해 제형화되고, 동결(예: 동결보호)되고, 및/또는 본원에 제공된 방법의 임의의 시기 또는 단계 전, 도중 또는 후에 0° C 미만, -20° C 미만 또는 -70° C 또는 -80° C 이하로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 미만의 시간 동안, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 미만의 시간 동안, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주의 시간 동안, 또는 8주 초과 동안 저장될 수 있다. 보관 후, 샘플 또는 샘플의 분리된 부분은 해동될 수 있으며 공정의 동일한 시점에서 방법에 따른 처리가 재개될 수 있다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 배양 및/또는 제형화된 집단은 예를 들어 자가 세포 요법으로서 대상체에게 투여되기 전에 동결 보호되고 저장된다.

[0337] 특정 구현예에서, 공정의 임의의 단계 또는 단계에서 세포의 일부는 샘플링 또는 수집될 수 있고, 예를 들어, 세포는 세포 집단(예: T 세포 집단)에서 채취할 수 있는 반면 집단은 폐쇄 시스템에 남아 있다. 특정 구현예에서, 이러한 세포는 생존율, 아포토시스, 활성화, 자극, 성장 및/또는 고갈을 포함하지만 이에 제한되지 않는 마커, 특징 또는 특성에 대해 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 자동화된 프로세스에 의해 샘플링되거나 수집된다. 일부 구현예에서, 샘플링되거나 수집된 세포의 분석은 자동화된다. 특정 구현예에서, 분석은 멸균 조건 하에서 폐쇄된 시스템으로 수행된다.

[0338] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 의해 생성 및/또는 처리된 세포 또는 세포 집단은 예시적 및/또는 대안적 공정에 의해 처리되거나 생성된 세포 또는 세포 집단과 비교될 수 있다. 특정 구현예에서, 대안적 및/또는 예시적 공정은 하나 이상의 특정 측면에서 다를 수 있지만, 그렇지 않으면 예시적 또는 대안적 공정과 비교되는 제공된 방법의 구현예 또는 측면의 유사하거나 동일한 특징, 측면, 단계, 시기, 시약 또는 조건을 포함한다. 예를 들어, 제공된 방법에 의해 생성된 선택 및 자극된 세포, 예를 들어 세포의 산출 조성물은 고정상에서 선택된 세포를 분리하기 위해 경쟁제 또는 자유 결합제의 사용을 필요로 하는 별도의 선택 및 자극 단계를 포함하는 공정으로 생성된 세포와 비교될 수 있다. 일부 구현예에서, 달리 명시되지 않는 한, 제공된 방법 및 예시적 또는 대안적 공정은 선택, 농축, 자극, 조작, 형질감염, 형질도입, 배양 및/또는 제형화를 위한 유사하거나 동일한 단계와 같이 달리 유사 및/또는 동일했을 것이다. 일부 구현예에서, 달리 명시되지 않는 한, 제공된 방법 및 대안적 공정은 동일하거나 유사한 유형의 생물학적 샘플 및/또는 공정 세포 및/또는 동일한 세포 유형의 투입 세포에서 세포를 선택 및/또는 농축한다.

[0339] 일부 구현예에서, 선택되고 자극된 세포는 T 세포가 복수의 T 세포를 포함하는 생물학적 샘플(예: 성분채집술 또는 전혈 샘플)로부터 선택된 자극된 T 세포를 포함하는 조성물이다. 일부 구현예에서, 고정상으로부터 자발적으로 분리되는 선택되고 자극된 세포의 수집 및/또는 용리는 예를 들어 세척 단계 동안 중력 흐름을 통해 수행된다. 본원에 제공된 방법은 세포 선택, 자극, 수집 및/또는 용리 단계를 조합하고, 고정상으로부터 선택된 및 자극된 세포의 분리를 촉진하기 위한 별도의 단계 및 분리를 촉진하기 위해 사용되는 체제(예를 들어, 경쟁제 및/또는 자유 결합제)를 제거하기 위한 정제 단계를 필요로 하지 않는다. 이와 같이, 방법은 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭, 후속 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 개시 선택 및/또는 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 조성물을 생성하는 데 필요한 처리 단계의 수를 감소시키고, 이로써 제조 시간을 감소시키고, 잠재적인 세포 스트레스를 최소화하고 및 오염 가능성을 줄인다.

[0340] 특정 구현예에서, 방법은 24시간 내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 방법은 (약) 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2시간 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 방법은 (약) 6, 5, 4, 3 또는 2시간 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 6시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 5.5시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 5시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 4.5시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 4시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에

다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 3시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 3 내지 6시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 4 내지 6시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 5 내지 6시간 이내 또는 그 미만 이내와 같이 정해진 시간 내에 다운스트림 처리에 적합한 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 5일 이내에 조작된 T 세포의 조성물(예를 들어, 치료 세포 조성물)을 생성한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 (약) 4 내지 5일 내에 조작된 T 세포의 조성물(예를 들어, 치료 세포 조성물)을 생성한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 단계는 길이가 (약) 4 또는 5일인 제조 공정을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 단계는 길이가 약 4 내지 5일인 제조 공정을 초래한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 단계는 길이가 (약) 4 또는 96 ± 6시간인 제조 공정을 초래한다.

[0341] 제공된 방법은 샘플의 다른 세포와 같은 다른 구성요소로부터 세포, 예를 들어, CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 선택하고 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 세포를 고정하고; 고정상에 고정된 선택된 세포를 자극하고; 및 고정상으로부터 세포를 분리하고 선택 및 자극된 세포의 산출 조성물로부터 상기 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)를 제거하기 위한 처리 단계의 부재 하에 선택 및 자극된 세포를 수집하는 방법을 포함한다. 특정 구현예에서, 제공된 방법은 샘플의 다른 세포와 같은 다른 성분으로부터 세포, 예를 들어 CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 선택하고, 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 세포를 고정시키고; 고정상에 고정된 선택된 세포를 자극하고; 및 중력 흐름에 의해 선택되고 자극된 세포를 용리 및/또는 수집하는 방법을 포함한다.

[0342] 특정 측면에서, 제공된 방법은 세포를 자극하기 전에 세포 선택(예: 면역친화성 기반 선택) 후 하나 이상의 추가 단계를 포함하는 세포 요법과 같은 조작된 세포(예: T 세포)를 생성하기 위한 많은 기존 방법과 비교하여 개선되었다. 일부 구현예에서, 기존 방법에 존재하는 하나 이상의 추가 단계는 선택된 세포를 회수 또는 수집하기 위한 경쟁 시약 또는 자유 결합제를 사용한 용리 단계 및/또는 선택에 사용된 시약(예: 자성 비드 시약 또는 항체)을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 그러한 추가 단계는 세포 요법을 위해 세포를 조작하는 공정을 연장할 수 있고/있거나 분화 상태, 생존율 또는 세포 수에 영향을 미칠 수 있는 공정 동안 세포의 조작을 초래할 수 있다. 특정 측면에서, 제공된 방법은 별도의 선택 및 자극 단계를 포함하고 고정상으로부터 세포를 분리하고 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제를 제거하는 추가 단계를 필요로 하는 방법에 비해 짧은 시간에 선택 및 자극된 세포의 집단을 생성한다.

[0343] 특정 측면에서, 제공된 방법은 컬럼 상 자극(본원에서 온-컬럼 자극이라고도 함)의 개시 24시간 이내에, 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단(산출 조성물이라고도 함)을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 컬럼 상 자극의 개시 (약) 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 6, 5, 4, 3 또는 2시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 3 내지 6시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 4 내지 6시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 5 내지 6시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 4 내지 5시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 6시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 5.5시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포

산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 5시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 4.5시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 4시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 (약) 3시간 이내에 다운스트림 처리(예: 유전자 조작, 증폭 및/또는 후속 라운드의 인큐베이션, 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱))에 적합한 선택 및 자극된 세포 산출 집단을 생성한다.

[0344]

일부 구현예에서, 방법은 세포 표면의 분자에 결합하여 세포에 자극 신호를 전달할 수 있는 자극제의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극제는 고정상에 첨가될 수 있는 올리고머 자극 시약(예를 들어, 항-CD3 및 항-CD28 Fab에 접합된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)에 포함된다. 일부 구현예에서, 자극은 고정상으로부터 선택된 세포의 자발적인 분리를 초래하고, 따라서 고정상으로부터 세포를 분리하고 산출 자극된 세포 조성물로부터 상기 분리를 촉진하는 데 사용되는 제제를 제거하기 위한 추가 처리 단계의 부재 하에 선택 및 자극된 세포의 수집 및/또는 용리를 허용한다. 일부 구현예에서, 자극은 고정상으로부터 선택된 세포의 자발적인 분리 또는 방출을 초래하여 중력 흐름에 의해 선택되고 자극된 세포의 수집 및/또는 용리를 허용한다. 일부 구현예에서, 중력 흐름은 컬럼(예: 고정상)에서 자발적으로 분리된 세포를 수집하거나 용리하는 데 의존한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 중력 흐름과 함께 세척 단계를 사용하여 컬럼(예: 고정상)에서 자발적으로 분리된 세포를 용리할 수 있다. 일부 구현예에서, 세척 단계는 고정상에 세포를 추가하거나 고정하기 전에 세포 투입 조성물에 존재하는 동일한 배지와 같은 세포 배지(예: 무혈청 배지)를 컬럼에 추가하는 것을 간단히 포함할 수 있다. 특정 측면에서, 방법은 온-컬럼 자극의 개시 24시간 이내에, 추가 처리, 예를 들어, 유전 공학, 증폭, 인큐베이션 또는 후속 라운드의 자극 및/또는 선택(예: 폴리싱)에 적합한 선택 및 자극된 세포의 오염되지 않은(예: 분리에 사용되는 제제(예: 경쟁제, 자유 결합제) 및/또는 선택제가 없음) 조성물을 성공적으로 생성한다. 또한 이의 제조품 및 장치가 제공된다.

[0345]

세포 요법(예: 선택된(농축된) 및 자극된 세포 집단, 제조품 단백질(예: 키메라 항원 수용체)을 발현하도록 조작됨)에 사용하기에 적합한 세포 집단을 생성하기 위해 다양한 방법을 사용할 수 있다. 그러나, 일부 측면에서, 이러한 방법은 적어도 부분적으로 다중 처리 단계를 수행할 필요가 있기 때문에 세포를 생성하는 데 오랜 시간 또는 비교적 긴 시간이 필요할 수 있다. 다중 처리 단계는 또한 세포 스트레스를 유발할 수 있으며, 따라서 다운스트림 처리에서 세포의 유용성에 영향을 미친다. 세포 조성물을 생성하기 위한 추가 방법이 필요하다.

[0346]

특정 측면에서, 제공된 방법은 크로마토그래피 컬럼의 고정상에서 표적 세포(예: CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)를 선택하고 자극하는 관찰을 기반으로 하며, 여기서 자극은 세포 선택에 사용되는 분자(즉, 선택 마커)의 하향 조절을 촉진하여 고정상에서 세포가 자발적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼의 고정상은 표적 세포 표면의 분자(예: 선택 마커)에 특이적으로 결합할 수 있는 제제(예: 선택제)로 기능화된다. 이러한 방식으로, 선택 마커(예를 들어, CD3, CD4, CD8)를 함유하는 표적 세포를 포함하는 샘플을 고정상과 조합(예: 고정상에 샘플을 첨가)할 때, 표적 세포(예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)는 고정상에 간접적으로 고정된다. 특정 측면에서, 표적 세포(예: T 세포)는 예를 들어, 자극제의 첨가, 자극제를 포함하는 자극 시약 및/또는 고정상에 직접 또는 간접적으로 연결된 자극 시약을 통해 고정상에 고정되어 있는 동안 자극된다(예: 온-컬럼 자극). 특정 구현예에서, 자극제는 항-CD3/항-CD28 항체(예: Fab) 제제와 같은 T 세포를 활성화하거나 자극하는 제제를 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 제공된 방법 및 다른 구현예는 다중 처리 단계(예: 선택 및 자극) 및/또는 제거 처리 단계(예: 분리를 촉진하는 데 사용되는 선택 시약 및/또는 제제를 제거하는 단계)를 압축하고, 동일한 용기 및/또는 폐쇄된 시스템 내에서 압축된 프로세스가 발생하도록 하여 효율성 및 무균성을 증가시킬 수 있다는 점에서 유리하다.

[0347]

특정 측면에서, 방법은 자극 신호를 표적 세포(예: T 세포)에 전달할 수 있는 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약의 사용을 포함한다. 예시적인 올리고머 시약은 자극 신호를 표적 세포, 예를 들어, T 세포에 전달할 수 있는 하나 이상의 항체 또는 이의 단편에 가역적으로 결합되거나 접합된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 항-CD3 및 항-CD28 Fab에 접합된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머이다. 외인성 성장 인자의 부재 또는 적은 양의 외인성 성장 인자의 경우와 같이 시험관 내에서 T 세포를 자극하는 데 사용하기 위한 기존 시약이 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 6,352,694 B1 및 유럽 특허 EP 0 700 430 B1 참조). 일반적으로, 이러한 시약은 다양한 결합제(예: 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체)가 고정된 직경 1 μm보다 큰 비드, 예를 들어 자성 비드를 사용할 수 있다. 그러나, 일부 경우에, 이러한 자성 비드는 예를 들어

조작된 T 세포를 대상체에게 투여하기 전에 이러한 자성 비드가 실질적으로 또는 완전히 제거되었는지 확인해야 하기 때문에 임상 시험 또는 치료 목적에 필요한 조건에서 세포를 자극하는 방법에 통합하기 어렵다. 일부 측면에서, 자기장에 세포를 노출시키는 것과 같은 이러한 제거는 세포 요법에 사용할 수 있는 생존 세포의 수율을 감소시킬 수 있다. 특정 경우에, 이러한 시약, 예를 들어 자성 비드가 포함된 자극 시약은 자극 시약에서 T 세포가 충분히 분리될 수 있도록 최소한의 시간 동안 세포와 함께 인큐베이션 되어야 한다. 또한, 비드와 같은 시약은 물리적 제약으로 인해 컬럼 크로마토그래피와 쉽게 호환되지 않는다.

[0348] 올리고머 자극 시약(예: Fab와 같은 항-CD3 및 항-CD28 항체에 접합된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)을 사용하는 제공된 방법은 이러한 잠재적 한계를 극복한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제공된 방법은 고체 지지체(예: 비드)에 결합되지 않은 가용성 올리고머 시약을 고정상에 첨가하여 자극을 개시하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포 요법을 위해 세포를 조작하는 전체 과정의 마지막에 존재할 수 있는 잔류 올리고머 자극 시약의 양을 감소 또는 최소화하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 경쟁 시약 또는 자유 결합체의 첨가가 세포 함유 조성물에서 자극제로부터 올리고머 자극 시약을 해리(예: 결합 방해)하기 위해 사용될 수 있기 때문에, 방법에 의해 생성되거나 생산된 산출 세포(예: 조작된 세포) 내 잔류 시약의 위험은 올리고머 시약을 사용함으로써 감소되거나 피할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 가용성이기 때문에 경쟁 시약 또는 자유 결합체를 첨가할 필요 없이 하나 이상의 세척 단계에 의해 조성물의 세포로부터 올리고머 자극 시약을 감소시키거나 제거하는 것만으로도 충분할 수 있다. 일부 구현예에서, 이것은 또한 GMP 표준을 준수하는 프로세스가 투여를 위한 최종 모집단에 비드가 없도록 하기 위해 추가 조치를 취해야 하는 것과 같은 다른 방법에 비해 더 쉽게 확립될 수 있음을 의미한다. 따라서, 일부 측면에서, 경쟁제 또는 자유 결합체의 첨가 또는 하나 이상의 세척 단계와 같이 세포로부터 올리고머 자극 시약의 제거 또는 분리는 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리와 비교하여 세포 손실을 거의 또는 전혀 초래하지 않는다. 일부 측면에서, 자극 시약 또는 올리고머 자극 시약 감소, 제거 또는 분리의 시기는 제한되지 않거나 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리보다 덜 제한된다. 따라서, 일부 측면에서, 자극 시약 또는 올리고머 자극 시약은 제공된 방법 중 임의의 시점 또는 단계에서 세포로부터 감소, 제거 또는 분리될 수 있다.

[0349] 또한, 약학적 집단 및 제형을 포함하는 방법, 및 상기 방법을 수행하기 위한 키트, 시스템 및 장치에 의해 제조된 세포 및 집단이 제공된다. 입양 세포 요법을 위한 방법과 같은 치료 방법을 포함하는 방법에 의해 제조된 세포 및 집단의 사용 방법, 및 대상체에게 투여하기 위한 약학적 집단이 추가로 제공된다.

[0350] A. 샘플 및 세포 제조

[0351] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여 생물학적 샘플에서 세포를 선택 및/또는 농축하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 특정 질환 또는 병태를 갖거나 세포 요법이 필요하거나 세포 요법이 투여될 대상체와 같은 대상체로부터 얻어지거나 유래된 것과 같은 생물학적 샘플로부터의 세포 또는 이의 집단을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 대상체는 세포가 단리, 가공 및/또는 조작되는 입양 세포 요법과 같은 특정 치료적 개입이 필요한 환자인 대상체와 같은 인간이다. 따라서, 일부 구현예에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체에서 직접 채취한 조직, 유체 및 기타 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 가공된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플에는 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀과 같은 체액, 조직 및 장기 샘플(이들로부터 유래된 가공 샘플 포함)이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

[0352] 일부 측면에서, 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나 또는 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 산물이거나 이로부터 유래한다. 예시적인 샘플에는 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 창자, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 기타 장기 및/또는 이들로부터 유래된 세포가 포함된다. 샘플에는 세포 요법, 예를 들어, 입양 세포 요법의 맥락에서 자가 및 동종이체 공급원으로부터의 샘플이 포함된다.

[0353] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는 예를 들어 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술에 의해 수득된다. 일부 측면에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한 림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.

[0354] 일부 구현예에서, 샘플은 T 세포 함유 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이다. 일부 구현예에서, 샘플은 성분채집술 샘플

이다. 일부 구현예에서, 샘플은 백혈구 성분채집술 샘플이다.

- [0355] 일부 구현예에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 처리 단계를 위한 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척한다. 일부 구현예에서, 세포는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액에는 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 반자동 "플로우-쓰루(flow-through)" 원심 분리기(예를 들어, Cobe 2991 셀 프로세서, Baxter)로 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 접선 유동 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 다양한 생체 적합성 완충제, 예를 들어 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이 없는 PBS에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고 이 세포는 배양 배지에서 직접 재현탁된다.
- [0356] 일부 구현예에서, 세포 함유 샘플(예: 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물)은 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 중에 추가된 헤파린과 같은 하나 이상의 항응고제를 제거하기 위해 세척된다.
- [0357] 일부 구현예에서, 세포 함유 샘플(예: 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술(apheresis) 생성물 또는 백혈구 성분채집술(leukapheresis) 생성물)은 동결보존 및/또는 동결보호(예를 들어, 동결)된 다음, 세포 집단을 단리, 선택, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질감염, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화하는 임의의 단계 및/또는 제형화된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계 전에 해동한다.
- [0358] 특정 구현예에서, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 하기에 기술된 바와 같이 세포 선택 또는 분리 단계(예: T 세포 선택 또는 단리 단계)를 거치기 전에 동결보존 및/또는 동결보호(예: 동결)된 다음 해동된다. 일부 구현예에서, 해동된 세포 조성물은 희석(예: 무혈청 배지 사용) 및/또는 세척(예: 무혈청 배지 사용)을 거치며, 이는 일부 경우에 원하지 않거나 원하지 않는 성분을 제거하거나 감소시킬 수 있다. 일부 경우에, 희석 및/또는 세척은 해동된 샘플에 포함된 동결보호제(예: DMSO)의 존재를 제거하거나 감소시키며, 그렇지 않으면 장기간 실온 노출 시 세포 생존율, 수율, 회복에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 희석 및/또는 세척은 해동된 동결보존된 생성물을 본원 또는 PCT/US2018/064627(이는 참조로 본원에 포함됨)에 기재된 것과 같은 무혈청 배지로 배지 교환을 허용한다.
- [0359] 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 하나 이상의 보충제가 보충된 기본 배지(예: OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium (ThermoFisher))를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 보충제는 무혈청이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 추가 보충제(예: OpTmizer™ T-Cell Expansion Supplement (ThermoFisher))에 의해 제공되는 것과 같은 세포(예: T 세포)의 유지, 증폭 및/또는 활성화를 위한 하나 이상의 추가 성분으로 보충된 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 대체 보충물, 예를 들어 면역 세포 혈청 대체물, 예를 들어 ThermoFisher, #A2596101, CTS™ Immune Cell Serum Replacement, 또는 Smith *et al. Clin Transl Immunology*. 2015 Jan; 4(1): e31에 기재된 면역 세포 혈청 대체물을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민과 같은 아미노산의 유리 형태를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민(예: L-알라닐-L-글루타민)의 디펩타이드 형태, 예를 들어 Glutamax™(ThermoFisher)의 디펩타이드를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 재조합 인간 IL-2, 재조합 인간 IL-7 및/또는 재조합 인간 IL-15와 같은 하나 이상의 재조합 사이토카인을 더 포함한다.
- [0360] 일부 구현예에서, 동결보존 및/또는 동결보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 T 세포 선택 또는 분리 단계를 거친 후, 추가적인 동결보존 및/또는 동결보호 단계는 세포 집단의 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질감염, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화 단계 및/또는 제형화된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계와 같은 후속 단계 중 또는 그 사이에 수행되지 않는다. 예를 들어, 해동된 동결보존 및/또는 동결보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 선택된 T 세포는 형질도입과 같은 다운스트림 처리를 위해 해동되기 전에 다시 동결보존 및/또는 동결보호되지 않는다.
- [0361] 특정 구현예에서, 동결보존 및/또는 동결보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이 (예: 샘플을 동결하기 전에 세포 선택 없이) 보관되고, 이는 일부 측면에서 후속 제조 단계에 대해 더 많은 유연성을 허용할 수 있다. 일 측면에서, 선택 전에 세포를 보관하면 다운스트림 처리의 세포 수율이 증가하고, 세포를 일찍 보관하면 더 건강하고 제조 성공 기준을 충족하기가 더 쉬울 수 있다. 다른 측면에서, 일단 해동되면, 동결보존 및/또는 동결보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 하나 이상의 상이한 선택 방법의 대상이 될 수 있다. 이 접근법의 장점은 무엇보다도 샘플의 기증자 및/또는 다른 수증자와 같은 대상체의 질병 또는

병태를 치료하기 위한 세포 요법의 세포의 가용성, 효능 및/또는 기타 측면을 향상시키는 것이다.

- [0362] 일부 구현예에서, 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 기증자가 질병 또는 병태의 진단을 받은 후 시점에 사전 세포 선택(예: 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 전 또는 없이 수집되고 동결보존 및/또는 동결보호된다. 일부 측면에서, 또한 동결보존 시간은 기증자가 다음 중 하나 이상을 받기 전이다: 질병 또는 병태에 대한 모든 초기 치료, 질병 또는 병태에 대한 치료로 라벨링된 모든 표적 치료 또는 모든 치료, 또는 방사선 및/또는 화학요법 이외의 모든 치료. 일부 구현예에서, 샘플은 질병에 대한 초기 치료 후 질병의 첫 번째 재발 후, 그리고 기증자 또는 대상체가 질병에 대한 후속 치료를 받기 전에 수집된다. 초기 및/또는 후속 치료는 세포 요법 이외의 요법일 수 있다. 일부 구현예에서, 수집된 세포는 초기 및/또는 후속 치료 후 세포 치료에 사용될 수 있다. 일 측면에서, 사전 세포 선택 없이 동결보존 및/또는 동결보호된 샘플은 교차하여 나중에 치료가 필요할 수 있는 무작위 임상 시험의 비치료 환자와 관련된 비용과 같은 선행 비용을 줄이는 데 도움이 될 수 있다.
- [0363] 일부 구현예에서, 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 사전 세포 선택 전 또는 없이(예: 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이), 질병에 대한 2차 치료 후 질병의 2차 재발 후, 그리고 기증자 또는 대상체가 질병에 대한 후속 치료를 받기 전에 수집되고 동결보존 및/또는 동결보호된다. 일부 구현예에서, 환자는 예를 들어 특정 위험 요소를 평가하여 2차 치료 후 재발할 가능성이 있는 것으로 식별된다. 일부 구현예에서, 위험 인자는 이중 히트 림프종, 원발성 불응성 암 또는 활성화된 B 세포 림프종과 같은 질병 유형 및/또는 유전학을 기반으로 한다. 일부 구현예에서, 위험 인자는 1차 치료 후 조기 재발 또는 치료 후 다른 불량한 예후 지표(예: IPI(International Prognostic Index) > 2)와 같은 임상적 표현을 기반으로 한다.
- [0364] 일부 구현예에서, 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 기증자 또는 대상체가 질병의 진단을 받기 전 시점에 사전 세포 선택(예: 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 전 또는 없이 수집되고 동결보존 및/또는 동결보호된다. 일부 측면에서, 기증자 또는 대상체는 질병 발병 위험이 있는 것으로 결정될 수 있다. 일부 측면에서, 기증자 또는 대상체는 건강한 대상체일 수 있다. 특정 경우에, 기증자나 대상체는 인생의 후기 단계에서 세포 치료가 필요한 경우 질병이 발병하거나 질병 진단을 받을 위험이 있는 것으로 간주되지 않고 세포를 보관하거나 저장할 수 있다. 일부 구현예에서, 기증자 또는 대상체는 유전적 돌연변이, 유전적 이상, 유전적 파괴, 가족력, 단백질 이상(예: 단백질 생산 및/또는 처리의 결핍) 및 질병 발병 위험을 증가시킬 수 있는 생활 방식 선택과 같은 요인에 기초하여 질병 발병 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 예방으로 수집된다.
- [0365] 일부 구현예에서, 동결보존 및/또는 동결보호된 세포 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플), 예를 들어 이전 세포 선택을 받지 않은(예: 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 세포 샘플은 12시간, 24시간, 36시간 또는 48시간 이상의 기간 동안 저장되거나 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플은 1주, 2주, 3주 또는 4주 이상의 기간 동안 저장되거나 보관된다. 일부 구현예에서, 샘플은 장기 저장 또는 장기 보관에 놓인다. 일부 측면에서, 샘플은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년 또는 그 이상의 기간 동안 저장된다.
- [0366] 일부 구현예에서, 기증자로부터 채취한 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플은 냉각된 환경에서 저장 또는 처리 시설로 운송되고/되거나 저장 시설에서 극저온으로 저장되거나 처리 시설에서 처리된다. 일부 구현예에서, 배송 전에 샘플은 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포를 선택하여 처리된다. 일부 구현예에서, 이러한 처리는 배송 후 샘플을 극저온으로 저장하기 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 극저온 보관 후 샘플을 해동한 후 처리가 수행된다.
- [0367] 기증자가 기증자의 세포를 질병에 대한 광범위한 치료를 받지 않은 단계에서 및/또는 질병이나 병태에 걸리거나 이의 진단을 받기 전에 기증자가 자신의 세포를 저장할 수 있게 함으로써, 이러한 세포는 1회 또는 다중 라운드의 치료 후에 수확된 세포와 비교하여 세포 요법에 사용하기 위한 특정 이점을 가질 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 치료 라운드 전에 수확된 세포는 더 건강할 수 있고, 특정 세포 활성의 더 높은 수준을 나타낼 수 있고, 더 빠르게 성장할 수 있고/있거나, 여러 라운드의 치료를 받은 세포보다 유전자 조작에 더 수용적일 수 있다. 본원에서 설명되는 구현예들에 따른 이점의 다른 예는 편의성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 치료에 필요하기 전에 기증자의 세포를 수집, 선택적으로 처리 및 저장하면 나중에 받는 사람이 필요로 할 때 세포를 쉽게 사용할 수 있다. 이것은 성분채집술 실험실 용량을 증가시켜 기술자에게 성분채집술 수집 공정 일정을 잡기 위한 더 큰 유연성을 제공할 수 있다.

[0368] 성분채집술 샘플과 같은 샘플에서 세포의 극저온 저장 및 처리를 위한 예시적인 방법 및 시스템은 국제 공개된 출원번호 W02018170188에 설명된 것들을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 방법 및 시스템은 환자가 세포 치료를 필요로 하기 전에 성분채집술을 수집한 다음 세포(예: T 세포)를 재조합 수용체(예: CAR)와 함께 조작하기 위한 공정에서 나중에 사용하기 위해 성분채집술 샘플을 동결보존하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 이러한 공정은 본원에 설명된 공정을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 성분채집술 샘플은 대상체로부터 수집되고, 세포 집단의 후속 T 세포 선택, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질감염, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화 및/또는 대상체에 제형화된 세포 집단의 투여 전에 동결보존된다. 그러한 예에서, 동결보존된 성분채집술 샘플은 샘플을 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 선택 단계에 적용하기 전에 해동된다.

[0369] 일부 구현예에서, 동결보존 및/또는 동결보호된 세포 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플), 예를 들어 사전 세포 선택을 받지 않은 세포 샘플(예: 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이)은 세포 요법을 위한 세포 집단, 예를 들어 CAR+ T 세포를 함유하는 T 세포 집단의 제조를 위한 다운스트림 공정에 사용하기 전에 해동된다. 일부 구현예에서, 이러한 동결보존 및/또는 동결보호된 세포 샘플(예: 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 CAR+ T 세포 요법과 같은 T 세포 요법을 조작하기 위해 본원에 제공된 과정과 관련하여 사용된다. 특정 예에서, 수확/제형화 단계 이전 또는 도중에 동결보존의 추가 단계가 수행되지 않는다.

[0370] B. 제제 및 시약 시스템

[0371] 구현예에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여 생물학적 샘플(선택제)에 존재하는 세포의 세포 표면 마커에 결합하는 제제를 사용하여 생물학적 샘플에서 세포(예: T 세포)를 선택 및/또는 농축하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 제공된 구현예에서, 생물학적 샘플은 섹션 II.A에 설명된 바와 같다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 T 세포를 함유하는 샘플이다. 제공된 구현예에서, 선택제는 본원에 제공된 장치의 크로마토그래피 컬럼에 포함된 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 결합되거나 고정되고, 섹션 II.C에 설명된 대로 목적하는 표적 세포(예: T 세포)의 특정 선택에 영향을 미치고, 이로써 표적 세포(예: T 세포)를 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 고정화할 수 있다. 일부 구현예에서, 선택제는 시약, 예를 들어 선택 시약을 통해 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 간접적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 컬럼의 고정상에 공유 또는 비공유 결합된다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에서 선택제를 가역적으로 고정시키는 시약이다. 제공된 장치 및 방법과 관련하여 선택제가 결합되는 예시적인 선택 시약은 섹션 II.B.2에 설명되어 있다.

[0372] 일부 구현예에서, 선택제가 결합된 선택 시약은 선택제가 시약과 가역적으로 연관되는 가역적 시스템을 제공한다. 크로마토그래피에 의한 세포 선택을 위한 예시적인 가역적 시스템은 W02013/124474에 기재된 것을 포함한다. 본원에 추가로 기재된 일부 구현예에서, 가역적 시스템은 선택제에 의해 함유된 스트렙타비딘-결합 펩타이드 결합 파트너를 통해 선택제에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 뮤테인 분자로 구성된 시약을 사용한다. 일부 구현예에서, 자유 결합 파트너 또는 경쟁제(경쟁 물질이라고도 함)를 추가하면 선택제와 시약 사이의 결합이 파괴되어 시약으로부터 선택제의 결합을 역전시키고 선택 시약이 없는 고정된 세포를 방출한다. 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인/스트렙타비딘 결합 펩타이드 시스템의 경우 예시적인 경쟁제는 비오틴 또는 비오틴 유사체(예: D-비오틴)이다.

[0373] 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스에 대한 선택제의 결합의 가역성은 필요하지 않은데, 이는 본원에 제공된 바와 같이 크로마토그래피 매트릭스에 고정된 세포의 온-컬럼 자극이 세포 선택에 사용되는 분자(즉, 선택 마커)의 하향조절을 촉진하여 고정상으로부터 세포의 자발적인 분리 또는 방출을 초래하기 때문이다. 따라서, 세포의 방출 또는 분리는 추가 단계 또는 시약 없이 발생할 수 있다. 일부 측면에서, 세포는 크로마토그래피 컬럼에 배지 또는 기타 용액을 첨가하는 것과 같은 중력 흐름에 의해 수집될 수 있다. 특정 구현예에서, 첨가되는 배지 또는 기타 용액은 고정상으로부터 세포의 분리를 용이하게 하는 경쟁제 또는 자유 결합제를 함유하지 않는다. 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인/스트렙타비딘 결합 펩타이드 시스템의 경우, 세포의 방출 또는 분리가 자발적으로 일어나서 세척액 또는 배지가 비오틴 또는 비오틴 유사체(예: D-비오틴)와 같은 자유 결합 파트너 또는 경쟁제를 함유하지 않는 컬럼에 세척액 또는 배지를 추가한 후 중력 흐름에 의해 세포를 수집할 수 있다.

[0374] 구현예에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여 선택제 또는 선택 시약과 같은 크로마토그래피 컬럼에 고정된 세포(예: T 세포)의 온-컬럼 자극을 포함하는 방법이 제공된다. 제공된 구현예에서, 자극은 신호를 세포에 전달하기 위해 세포 상의 하나 이상의 수용체 분자에 결합하도록 세포를 자극하기 위한 하나 이상의 제제(하나 이상의 자극제)를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 T 세포를 자극하기 위한 것이며 T 세포에 1차 신호를 제공하고(예를 들어, TCR 복합 신호전달을 통해), T 세포에 공자극 신호를 제공한다(예를 들어 공자

극 수용체로부터의 신호전달을 통해). 일부 구현예에서, 선택제 및 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나는 상이하다. 일부 구현예에서, 선택제 및 하나 이상의 자극제 각각은 상이하다. 일부 구현예에서, 제제는 선택제로서 그리고 제공된 방법과 관련하여 하나 이상의 자극제 중 하나로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 자극 신호를 세포에 전달하는 시약(예: 자극 시약)에 결합된다. 일부 구현예에서, 시약은 자극제가 제제 상에 다량체화되도록 하나 이상의 자극제 각각에 결합하기 위한 복수의 결합 부위를 함유한다. 특정 구현예에서, 이러한 자극 시약은 다중 단백질 단위 또는 복합체(예: 테트라머)와 같은 다중 개별 분자로 구성된 올리고머 또는 중합체 시약이다. 제공된 장치 및 방법과 관련하여 사용하기 위한 올리고머 자극 시약을 포함하여 하나 이상의 자극제가 결합된 예시적인 자극 시약은 섹션 II.B.2에 설명되어 있다. 특정 구현예에서, 자극 시약은 세포에서 신호를 전달하기에 적합한 조건 하에 고정된 세포를 함유하는 크로마토그래피 컬럼에 첨가된다. 예를 들어, 온-컬럼 자극은 본원에 기술되고 제공된 바와 같은 장치를 세포에서 세포 신호전달 이벤트를 허용하기에 적절한 생리학적 온도, 예컨대 (약) 30°C 내지 (약) 39°C의 온도, 예를 들어, (약) 37°C $\pm$ 2°C, 예컨대 (약) 37°C로 가열함으로써 본원에 기술된 적절한 온도에서 수행된다.

[0375] 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제가 결합된 자극제는 하나 이상의 자극제가 분비물과 가역적으로 연관되는 가역적 시스템을 제공한다. 세포 자극을 위한 예시적인 가역적 시스템은 W02015/158868, W02017068421, 또는 W02018/197949에 기재된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 가역적 시스템은 하나 이상의 자극제에 포함된 스트렙타비딘-결합 펩타이드 결합 파트너를 통해 하나 이상의 자극제에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 뮤테인의 올리고머 또는 중합체로 구성된 시약을 사용한다. 일부 구현예에서, 자유 결합 파트너 또는 경쟁제(경쟁 물질이라고도 함)를 첨가하는 것은 하나 이상의 자극제와 시약 사이의 결합을 방해하여, 시약으로부터 하나 이상의 자극제의 결합을 역전시키고 자극 시약의 하나 이상의 자극제에 의해 전달되는 자극 신호를 종료 또는 방해한다. 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인/스트렙타비딘 결합 펩타이드 시스템의 경우 예시적인 경쟁제는 비오틴 또는 비오틴 유사체(예: D-비오틴)이다.

[0376] 특정 측면에서, 본원에 개시된 장치를 사용하여, 세포 표면 상의 분자(세포 표면 분자)에 결합할 수 있는 적어도 하나의 제제(예: 선택제 또는 자극제)가 시약(예: 선택 시약 또는 자극제)과 가역적으로 연관되는 가역적 시스템을 사용하는 방법이 본원에 제공된다 일부 경우에, 시약은 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 포함한다. 일부 경우에, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 다량체화 시약이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 분자의 에피토프 또는 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 부위 B를 함유하고 또한 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)의 적어도 하나의 결합 부위 Z에 특이적으로 결합하는 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 경우에, 결합 파트너 C와 하나 이상의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 비공유 상호작용이다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C와 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용, 예컨대 비공유 상호작용은 가역적이다.

[0377] 일부 구현예에서, 가역적 결합은 적어도 하나의 결합 부위 Z에도 결합할 수 있는 결합 부위 또는 이를 함유하는 경쟁제 또는 자유 결합제와 같은 물질의 존재 하에 매개될 수 있다. 일반적으로 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)은 시약에 존재하는 결합 부위 Z에 대한 더 높은 결합 친화성 및/또는 결합 파트너 C보다 더 높은 농도로 존재하기 때문에 경쟁자로 작용할 수 있으며, 이로써 시약으로부터 결합 파트너 C가 분리 및/또는 해리된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 결합 부위 Z에 대한 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)의 친화도는 적어도 하나의 결합 부위 Z에 대한 제제(예: 선택제 또는 자극제)의 결합 파트너 C의 친화도보다 크다. 따라서, 일부 경우에, 시약의 결합 부위 Z와 제제(예: 선택제 또는 자극제)의 결합 파트너 C 사이의 결합은 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합 파트너)의 첨가에 의해 중단될 수 있으며, 이로써 제제(예: 선택제 또는 자극제) 및 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)의 결합(association)을 가역적으로 만들 수 있다.

[0378] 이러한 가역적 시스템에 사용될 수 있는 시약은 당업계에 기술 및 공지되어 있다, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; 및 국제 공개된 PCT 출원 번호 W02013/124474 및 W02014/076277 참조. 가역적 상호작용을 형성할 수 있는 시약 및 결합 파트너, 뿐만 아니라 이러한 결합을 역전시킬 수 있는 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)의 비제한적 예가 아래에 설명되어 있다.

[0379] 1. 제제

[0380] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 세포 표면 상의 분자(예: 세포 표면 분자)에 결합하기 위한 하나 이상의 결합 부위 B를 갖는다. 따라서, 일부 경우에, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 결합 부위 B 또는 복수의 결합 부위 B를 함유하며, 여기서 제제(예: 선택제 또는 자극제)와 표적 세포 표면의 분자 사이의 특이적

결합은 B와 분자 사이의 상호작용을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 단일 결합 부위, 즉, 1가만을 함유한다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 3개, 4개 또는 5개의 결합 부위 B를 포함하는 복수의 결합 부위 B와 같이 적어도 2개를 갖는다. 일부 그러한 측면에서, 적어도 2개 또는 복수의 결합 부위 B는 동일할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 2개 또는 복수의 결합 부위 B 중 하나 이상은 상이할 수 있다(예: B1 및 B2).

[0381] 일부 구현예에서, 하나 이상의 상이한 제제(예: 하나 이상의 상이한 예를 들어, 선택제 또는 자극제 또는 세포 상의 분자에 결합하는 다른 제제)는 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 가역적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 적어도 2, 3, 4개 또는 그 이상의 다른 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 동일한 시약에 가역적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 동일한 시약에 가역적으로 결합되고, 이로써 각각의 제제는 제제와 분자 사이의 특이적 결합을 위한 결합 부위 B 또는 복수의 결합 부위 B를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 예를 들어, 동일하거나 실질적으로 동일한 분자 결합에 대한 동일한 결합 부위 B를 함유한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 예를 들어, 상이한 분자에 대한 결합에 대한 상이한 결합 부위 B를 함유한다. 일부 구현예에서, 제1 제제(예: 제1 선택제 또는 제1 자극제)는 결합 부위 B1, B2, B3, B4 등을 함유하고, 제2 제제(예: 제2 선택제 또는 제2 자극제)는 결합 부위 B1, B2, B3, B4 등 중 다른 하나를 함유한다. 일부 구현예에서, 제1 제제(예: 제1 선택제)는 결합 부위 B1을 함유하고, 제2 제제(예: 제2 선택제)는 결합 부위 B3을 함유한다. 일부 구현예에서, 제1 제제(예: 제1 자극제)는 결합 부위 B2를 함유하고, 제2 제제(예: 제2 자극제)는 결합 부위 B4를 함유한다. 임의의 상기 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제는 결합 파트너, C1 또는 C2를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, C1 및 C2는 동일할 수 있다. 일부 구현예에서, C1 및 C2는 상이하다. 일부 구현예에서, 제1 제제 및 제2 제제는 동일한 결합 파트너 C1을 함유한다.

[0382] 일부 경우에, 제제(예: 결합 부위 B를 통한)와 시약의 결합 부위 Z 사이의 결합의 해리 상수(K_D)는 약 10^{-2} M 내지 약 10^{-13} M 또는 약 10^{-3} M 내지 약 10^{-12} M 또는 약 10^{-4} M 내지 약 10^{-11} M, 또는 약 10^{-5} M 내지 약 10^{-10} M 범위의 값을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 결합제와 분자 사이의 결합에 대한 해리 상수(K_D)는 예를 들어, 약 10^3 내지 약 10^7 M의 K_D 범위에서 낮은 친화도이다. 일부 구현예에서, 결합제와 분자 사이의 결합에 대한 해리 상수(K_D)는 예를 들어, 약 10^7 내지 약 1×10^{10} M의 K_D 범위에서 높은 친화도이다.

[0383] 일부 구현예에서, 결합 부위 B와 분자를 통한 제제의 결합 해리는 예를 들어, 시약과 제제 사이의 가역적 결합이 파괴된 후 표적 세포가 일시적으로만 염색되거나 제제와 결합될 수 있도록 충분히 빠르게 발생한다. 일부 경우에, k_{off} 속도(결합 부위 B를 통한 제제와 분자 간의 결합에 대한 해리 속도 상수라고도 함)로 표현되는 경우, k_{off} 속도는 약 $0.5 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $2 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $3 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $4 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $1.5 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $2 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $3 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $4 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$, 약 $5 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $1 \times 10^2 \text{ sec}$ 이상, 또는 약 $5 \times 10^1 \text{ sec}^{-1}$ 이상이다. 특정 제제 및 세포 분자 상호작용에 적합한 k_{off} 속도 범위를 경험적으로 결정하는 것은 숙련된 기술자의 수준 이내이다(예를 들어, 공개된 미국 출원 번호 US2014/0295458 참조). 예를 들어, 예를 들어 $4.0 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 이상보다 높은 k_{off} 속도를 갖는 제제를 사용하여, 결합 복합체가 파괴된 후 대부분의 제제가 1시간 이내에 제거되거나 해리될 수 있다. 다른 경우에, 예를 들어 $1.0 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 의 낮은 k_{off} 속도를 갖는 제제를 사용하여, 결합 복합체가 파괴된 후 대부분의 제제가 약 3시간 30분 이내에 세포로부터 제거되거나 해리될 수 있다.

[0384] 일부 구현예에서, 이 결합의 K_D 뿐만 아니라 제제(예: 선택제 또는 자극제)의 결합 부위 B와 세포 표면 분자 사이에 형성된 결합의 K_D , k_{off} 및 k_{on} 속도는 임의의 적절한 수단, 예를 들어, 형광 적정, 평형 투석 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정될 수 있다.

[0385] 일부 측면에서, 세포 표면 분자는 제제(예: 선택제 또는 자극제)가 지시될 수 있는 분자이다. 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 펩타이드 또는 단백질, 예컨대 수용체, 예를 들어, 막 수용체 단백질이다. 일부 구현예에서, 수용체는 지질, 다당류 또는 핵산이다. 일부 구현예에서, 단백질인 세포 표면 분자는 외재성 막 단백질 또는 내

재성 막 단백질일 수 있다. 세포 표면 분자는 일부 구현예에서 막을 가로지르는 하나 이상의 도메인을 가질 수 있다. 몇 가지 구체적인 예시로서, 막관통 도메인을 가지는 막 단백질은 후각 수용체와 같은 G-단백질 결합 수용체, 로돕신 수용체, 로돕신 페로몬 수용체, 펩타이드 호르몬 수용체, 미각 수용체, GABA 수용체, 아편 수용체, 세로토닌 수용체, Ca^{2+} 수용체, 멜라닌, 리간드 개폐형, 전압 개폐형 또는 기계적 개폐형 수용체와 같은, 아세틸콜린, 니코틴산, 아드레날린, 노르에피네프린, 카테콜아민, L-DOPA-, 도파민 및 세로토닌 (생체 아민, 엔도르핀/엔케팔린) 뉴로펩타이드 수용체를 포함하는 신경전달물질 수용체, 세린/트레오닌 키나제와 같은 수용체 키나제, 티로신 키나제, 염소 채널과 같은 포린/채널, 칼륨 채널, 나트륨 채널, OMP 단백질, 아미노산 수송체와 같은 ABC 수송체 (ATP-Binding Cassette-Transporter), Na-글루코오스 수송체, Na/요오드화물 수송체, 집광성복합체(Light Harvesting Complex)와 같은 이온 수송체, 사이토크롬 c 산화효소, ATPase Na/K, H/K, Ca, 메탈로프로테아제와 같은 세포 부착 수용체, 인테그린 또는 카드헤린(catherin)일 수 있다.

[0386] 일부 구현예에서, 세포 표면 분자는 바람직한 세포 집단 또는 하위 집단, 예를 들어 혈액 세포, 예컨대 림프구 (예: T 세포, 도움 T 세포, 예를 들어, $CD4^{+}$ 도움 T 세포, B 세포 또는 자연 살해 세포), 단핵세포, 또는 줄기 세포(예: $CD34^{+}$ 양성 말초 줄기 세포 또는 Nanog 또는 Oct-4 발현 줄기 세포)의 집단 또는 하위 집단을 한정하는 항원일 수 있다. T 세포의 예는 CMV 특이적 $CD8^{+}$ T 림프구, 세포 독성 T 세포, 기억 T 세포 및 조절 T 세포 (Treg)와 같은 세포를 포함한다. Treg의 예시적인 예는 $CD4$ $CD25$ $CD45RA$ Treg 세포이고, 기억 T 세포의 예시적인 예는 $CD62L$ $CD8^{+}$ 특이적 중앙 기억 T 세포이다. 또한, 세포 표면 분자는 중앙 세포에 대한 마커일 수 있다.

[0387] 전술한 바와 같이, 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 결합 부위 B 이외에, 결합 파트너 C를 갖는다. 일부 측면에서, 이 결합 파트너 C는 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약))의 결합 부위 Z에 결합할 수 있고, 여기서 상기 시약은 결합 파트너 C에 대한 하나 이상의 결합 부위를 갖는다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C와 시약 (예: 선택 시약 또는 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약))의 결합 부위(들) Z 사이에 형성될 수 있는 비공유 결합은 임의의 원하는 강도 및 친화도를 가질 수 있고, 상기 방법이 수행되는 조건 하에서 파괴될 수 있거나 가역적이다. 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 2, 3개 또는 그 이상을 포함하는 하나 이상의 추가적인 결합 파트너 C를 포함하며, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약))은 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C에 대한 적어도 2개, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8개 또는 그 이상의 결합 부위 Z를 포함할 수 있다. 미국 특허 7,776,562, 미국 특허 8,298,782 또는 국제 특허 출원 WO 2002/054065에 기술된 바와 같이, 결합 파트너 C 및 하나 이상의 상응하는 결합 부위 Z를 가지는 시약의 임의의 조합은 예를 들어 복합체에서 결합 파트너 C와 결합 부위 B가 가역적으로 결합하여, 예컨대 결합 효과(avidity effect)를 유발할 수 있다.

[0388] 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는, 예를 들어 탄화수소 기반(중합체 포함)일 수 있고, 질소-, 인-, 황-, 카르벤-, 할로젠- 또는 슈도할로젠 기를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 이는 알코올, 유기산, 무기산, 아민, 포스핀, 티올, 이황화물, 알칸, 아미노산, 펩타이드, 올리고펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 핵산, 지질, 당류, 올리고당류 또는 다당류일 수 있다. 추가 예로서, 이는 또한 양이온, 음이온, 다중 양이온, 다중 음이온, 다중 양이온, 전해질, 고분자 전해질, 탄소 나노튜브 또는 탄소 나노폼(nanofoam)일 수 있다. 일반적으로, 결합 파트너 C는 다른 물질보다 시약의 결합 부위에 대해 높은 친화도를 갖는다. 각각의 결합 파트너 C의 예는 크라운 에테르, 면역글로불린, 이의 단편 및 항체 유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0389] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 비오틴을 포함하고, 시약은 비오틴에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체를 포함하고, 시약은 개별 비오틴 유사체에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 스트렙타비딘 또는 아비딘 결합 펩타이드를 포함하고, 시약은 개별 스트렙타비딘 또는 아비딘 결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다. 본원의 목적을 위해, 용어 유사체(analog)는 스트렙타비딘(예: 스트렙타비딘 유사체 또는 스트렙타비딘 뮤테인) 또는 아비딘(예: 아비딘 유사체 또는 아비딘 뮤테인)의 돌연변이 형태와 관련하여 용어 뮤테인(mutein)과 상호교환적으로 사용된다.

[0390] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 스트렙타비딘, 예컨대 임의의 전술된 것(예: 서열번호 3 내지 6에 제시됨)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인이거나 이를 포함하며, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩

타이드는 예컨대 서열번호: 10에 제시된 서열을 함유하는, 서열번호 9에 제시된 일반 화학식을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 서열은 서열번호 11에 제시된, 예컨대 서열번호 12에 제시된 일반 화학식을 갖는다. 일 실시예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 서열은 Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(Strep-tag®라고도 함, 서열번호 7에 제시됨)이다. 일 실시예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 서열은 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(Strep-tag® II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨)이다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 리간드는 적어도 2개의 스트렙타비딘-결합 모듈의 순차적 배열을 함유하며, 상기 2개의 모듈 사이 거리는 적어도 0 내지 50개 이하의 아미노산이고, 상기 하나의 결합 모듈은 3 내지 8개의 아미노산을 가지며 적어도 His-Pro-Xaa (서열번호 9) 서열을 함유하고, 여기서 상기 Xaa는 글루타민, 아스파라긴 또는 메티오닌이며, 상기 기타 결합 모듈은 동일하거나 상이한 스트렙타비딘 펩타이드 리간드(예컨대, 서열번호 11에 제시됨)를 갖는다(예를 들어, 국제 공개된 PCT 출원 번호 W002/077018; 미국 특허 번호 7,981,632 참조). 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 리간드는 서열번호: 13 또는 14 중 어느 하나에 제시된 화학식을 갖는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드 리간드는 서열번호 15 내지 19 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 대부분의 경우에, 모든 스트렙타비딘 결합 펩타이드는 동일한 결합 부위, 즉 스트렙타비딘의 비오틴 결합 부위에 결합한다. 만일 하나 이상의 상기 스트렙타비딘 결합 펩타이드가 결합 파트너 C, 예를 들어 C1 및 C2로서 사용되면, 상기 다량체화 시약은 전형적으로 스트렙타비딘 뮤테인이다.

[0391] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 추가로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 니켈로 충전된 trisNTA(His-STREPPER 또는 His/Strep-tag®II Adapter라고도 함)와 컨쥬게이션된 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(Strep-tag® II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨) 펩타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0392] 일부 구현예에서, 제제(예: 수용체-결합제 및 자극제)의 결합 파트너 C는 친화도 태그로써 통상의 기술자에게 공지된 모이어티를 포함한다. 상기 구현예에서, 시약은 상응하는 결합 파트너, 예를 들어 친화도 태그에 결합하는 것으로 공지된 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다. 공지된 친화도 태그의 몇 가지 구체적인 예시로서, 상기 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 디니트로페놀 또는 디곡시게닌, 올리고히스티딘, 폴리히스티딘, 면역 글로불린 도메인, 말토스 결합 단백질, 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST), 키틴 결합 단백질 (CBP) 또는 티오레독신, 칼모듈린 결합 펩타이드 (CBP), FLAG '-펩타이드, HA-태그 (서열: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala) (서열번호 20), VSV-G-태그 (서열: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys) (서열번호 21), HSV-태그 (서열: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) (서열번호 22), T7 에피토프 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly) (서열번호 23), 말토스 결합 단백질 (MBP), 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D의 서열 Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (서열번호 24)의 HSV 에피토프, 서열 Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (서열번호 25)의 전사 인자 c-myc의 "myc" 에피토프, V5-태그 (서열: Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr) (서열번호 26) 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST)를 포함할 수 있다. 상기 구현예에서, 항체 또는 항체 단편일 수 있는 시약의 하나 이상의 결합 부위 Z와 항원 사이에 형성된 복합체는 자유 항원, 즉 자유 펩타이드(에피토프 태그) 또는 자유 단백질(예컨대 MBP 또는 CBP)을 첨가함으로써 경쟁적으로 파괴될 수 있다. 일부 구현예에서, 친화도 태그는 또한 올리고뉴클레오타이드 태그일 수 있다. 일부 경우에, 올리고뉴클레오타이드 태그는, 예를 들어, 시약에 연결되거나 포함된 상보적 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드와 혼성화하는 데 사용될 수 있다.

[0393] 적합한 결합 파트너 C의 추가적인 예는 렉틴, 단백질 A, 단백질 G, 금속, 금속 이온, 니트릴로 트리아세트산 유도체 (NTA), RGD-모티프, 텍스트란, 폴리에틸렌이민 (PEI), 산화환원 폴리머, 당단백질, 압타머, 염료, 아밀로오스, 말토스, 셀룰로오스, 키틴, 글루타티온, 칼모듈린, 젤라틴, 폴리믹신, 헤파린, NAD, NADP, 리신, 아르기닌, 벤즈아미딘, 폴리 U 또는 올리고-dT를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. Concanavalin A 등의 렉틴은 다당류 및 글리코실화된 단백질에 결합하는 것으로 알려져 있다. 염료의 구체적인 예시로는 Cibacron 블루 F3G-A (CB) 또는 Red HE-3B와 같은 트리아진 염료가 있으며, 이는 NADH-의존 효소에 특이적으로 결합한다. 전형적으로, Green A는 Co A 단백질, 인간 혈청 알부민 및 탈수소효소에 결합한다. 일부 경우에, 염료 7-아미노액노마인 D 및 4',6-디아미디노-2-페닐인들은 DNA에 결합한다. 일반적으로, Ni, Cd, Zn, Co 또는 Cu와 같은 금속의 양이온은 전형적으로 헥사히스티딘 또는 His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys 태그(MAT 태그) (서열번호 35)를 포함하는 올리고 히스티딘 함유 서열, 및 N-메타아크릴로일-(L)-시스테인 메틸 에스테르와 같은 친화도 태그에 결합하는 데 사용된다.

[0394] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C와 시약의 하나 이상의 결합 부위 Z 사

이의 결합은 2가, 3가 또는 4가 양이온의 존재 하에서 발생한다. 이와 관련하여, 일부 구현예에서 시약은 전형적으로 적합한 킬레이터에 의해 잡혀 있는, 예컨대 복합체화된 2가, 3가 또는 4가 양이온을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 2가, 3가 또는 4가 양이온을 포함하는, 예를 들어 복합체화하는 모이어티를 포함할 수 있다. 개별 금속 킬레이터의 예는, 에틸렌디아민, 에틸렌-디아민테트라아세트산 (EDTA), 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA), 디에틸렌트리-아민펜타아세트산 (DTPA), N,N-비스(카복시메틸)글리신 (니트릴로트리아세트산, NTA라고도 함), 1,2-비스(o-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산 (BAPTA), 2,3-다이머-캡토-1-프로판올 (다이머카프롤), 포르핀 및 헴을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일 예시로서, EDTA는 대부분의 1가, 2가, 3가 및 4가 금속 이온, 예컨대 은 (Ag^+), 칼슘 (Ca^{2+}), 망간 (Mn^{2+}), 구리 (Cu^{2+}), 철 (Fe^{2+}), 코발트 (Co^{+}) 및 지르코늄 (Zr^{4+})과 복합체를 형성하는 반면, BAPTA는 Ca^{2+} 에 특이적이다. 구체적인 예시로서, 해당 기술 분야에서 사용되는 표준 방법은 올리고히스티딘 태그와 구리 (Cu^{2+}), 니켈 (Ni^{2+}), 코발트 (Co^{2+}), 또는 아연 (Zn^{2+}) 이온 사이의 복합체의 형성에 사용되며, 이들은 킬레이터 니트릴로트리아세트산 (NTA)에 의해 나타난다.

[0395] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 칼모둘린 결합 펩타이드를 포함하고, 시약은 예를 들어, 미국 특허 5,985,658에 기술된 다량체(multimeric) 칼모둘린을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 FLAG 펩타이드를 포함하고, 시약은 예를 들어, 미국 특허 4,851,341에 기술된 단클론 항체 4E11에 결합하는 FLAG 펩타이드인, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체를 포함한다. 일 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C는 올리고히스티딘 태그를 포함하고, 시약은 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체 또는 전이 금속 이온을 포함한다. 일부 경우에, 이러한 모든 결합 복합체의 파괴는 예를 들어 EDTA 또는 EGTA를 첨가함으로써 금속 이온 킬레이트화(예: 칼슘 킬레이트화)에 의해 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 칼모둘린, 4E11와 같은 항체 또는 킬레이트화된 금속 이온 또는 유리 킬레이터는 통상적인 방법에 의해, 예컨대 비오틴화 및 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 이들의 올리고머와의 복합체화에 의해, 또는 Noguchi, A, *et al.* Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137에 기재된 바와 같이 첫 단계에서 필수적으로 다당류(예: 텍스트란)에 카르복실 잔기를 도입하고, 및 두 번째 단계에서 통상적인 카르보디이미드 화학을 사용하여 칼모둘린 또는 항체 또는 킬레이트화된 금속 이온 또는 유리 킬레이터를 1차 아미노 그룹을 통해 다당류(예: 텍스트란) 백본의 카르복실 그룹에 연결함으로써 다량체화 될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C와 시약의 하나 이상의 결합 부위 Z 사이의 결합은 금속 이온 킬레이트화에 의해 파괴될 수 있다. 금속 킬레이트화는, 예를 들어 EGTA 또는 EDTA의 첨가에 의해 달성될 수 있다.

[0396] 일부 구현예에서, 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 예컨대 항체, 이의 단편 또는 항체 유사 기능이 있는 단백질성 결합 분자에 의해 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제의 결합 부위 B는 예컨대 항체의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDRs)이거나 이를 포함하는 항체 결합 부위이다. (재조합) 항체 단편의 예는 Fab 단편, Fv 단편, 단일 사슬 Fv 단편(scFv), 2가 항체 단편, 예컨대 (Fab) $_2$ -단편, 다이머바디(diabodies), 트리어바디(triabodies)(Iliades, P., *et al.*, FEB Lett (1997) 409, 437-441), 데카바디(Stone, E., *et al.*, Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88- 8211;94) 및 기타 도메인 항체(Holt, L.J., *et al.*, Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 제제(예: 수용체-결합제 또는 선택제)는 2가 단백질성의 인공 결합 분자, 예컨대 "듀오칼린(duocalin)"으로도 공지된 이량체 리포칼린 뮤테인을 포함할 수 있다.

[0397] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 단일 결합 부위 B를 가질 수 있으며, 즉, 이는 1가일 수 있다. 1가 제제(예: 선택제 또는 자극제)의 예는 1가 항체 단편, 항체 유사 결합 특성이 있는 단백질성 결합 분자 또는 MHC 분자를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 1가 항체 단편의 예는 Fab 단편, Fv 단편 및 2가 단일 사슬 Fv 단편을 포함하는 단일 사슬 Fv 단편 (scFv)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0398] 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 항체 또는 이의 항체 단편, 예를 들어 Fab 단편, Fv 단편, 단일 사슬 Fv 단편 (scFv), F(ab') $_2$ -단편과 같은 2가 항체 단편이다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 목적 세포 분자에 결합하는 것으로 공지된 모체 항체이거나 이로부터 유래한 것이다. 세포 표면 분자에 대한 다양한 항체 분자 또는 이의 단편은 해당 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 이들의 여러 가지 중 하나는 본원의 방법에서 제제로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 모체 항체 또는 기준 항체의 가변 중사슬에서 하나 이상의 아미노산 치환을 함유하는 항체 또는 이의 단편이며, 예를 들어 전술한

바와 같이 변형된 친화도를 가지면서 충분히 빠른 off 속도를 나타내는 항체를 생성한다. 예를 들어, 이러한 돌연변이의 예시는 항-CD4 항체 13B8.2의 돌연변이체의 맥락으로 알려져 있으며(예를 들어, 미국 특허 7,482,000, 미국 특허 출원 공보 US2014/0295458 또는 국제 특허 출원 W02013/124474 참조), 이러한 돌연변이 중 하나는 또 다른 모체 항체 또는 기존 항체에서 생성될 수 있다.

[0399] 일부 측면에서, 1가일 수 있는 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 예를 들어 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드("Anticalin®"으로도 공지)에 기초한 뮤테인과 같은 1가 항체 단편 또는 1가 인공 결합 분자(단백질성 또는 기타), 또는 $F(ab')_2$ 단편과 같이 양 결합 부위가 유지되는 항체 또는 단편과 같은 2가 분자를 포함한다.

[0400] 항체 유사 기능을 가지는 단백질성 결합 분자의 예는 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인을 포함한다(예를 들어, WO 03/029462, Beste et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903 참조). 일반적으로, 빌린(bilin) 결합 단백질, 인간 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린, 인간 Apo 지질단백질 D 또는 인간 눈물 리포칼린과 같은 리포칼린은, 주어진 표적을 결합하도록 변형될 수 있는 천연 리간드 결합 부위를 갖는다. 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 제제(예: 선택제 또는 자극제)로서 사용될 수 있는 항체 유사 결합 성질이 있는 단백질성 결합 분자의 추가적인 예는, 소위 글루바디(예를 들어, 국제 특허 출원 WO 96/23879 참조), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질 (Mosavi, L.K., et al., Protein Science(2004) 13, 6, 1435-1448) 또는 크리스탈린 스캐폴드(예를 들어, 국제 특허 출원 WO 01/04144), Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187에 기술된 단백질, 아드넥틴 (AdNectins), 테트라넥틴 및 아비머를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 인간 수용체 도메인 패밀리의 엑손 서플링에 의해 진화된 다가 아비머 단백질을 비롯한 아비머는, 여러 세포 표면 수용체에서 다중 도메인 줄로 발생하는 소위 A도메인을 함유한다(Silverman, J., et al, Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561). 일반적으로 인간 피브로넥틴 도메인으로부터 유래된 아드넥틴은, 전형적으로 표적에 대한 면역글로불린-유사 결합을 위하여 조작될 수 있는 3개의 루프를 함유한다(Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658). 일반적으로 개별 인간 호모트라이머 단백질로부터 유래된 테트라넥틴은, 마찬가지로 전형적으로 원하는 결합을 위하여 조작될 수 있는 C-형 렉틴 도메인에 루프 영역을 함유한다. 일부 경우에, 단백질 리간드로 작용할 수 있는 펩타이드(peptoids)는, 전형적으로 측사슬이 탄소 원자보다는 아미드 질소에 연결된다는 점에서 펩타이드와 상이한 올리고(N-알킬) 글리신이다. 펩타이드는 전형적으로 프로테아제 및 기타 변형 효소(modifying enzymes)에 대하여 내성이며, 펩타이드보다 훨씬 높은 세포 투과성을 가질 수 있다(예를 들어, Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 1508-1509 참조).

[0401] 적합한 단백질성 결합 분자의 추가적인 예는 EGF 유사 도메인, 크링글 도메인(Kringle-domain), 피브로넥틴 유형 I 도메인, 피브로넥틴 유형 II 도메인, 피브로넥틴 유형 III 도메인, PAN 도메인, Gla 도메인, SRCR 도메인, Kunitz/Bovine 췌장 트립신 억제제 도메인, 텐다미스타트(tendamistat), Kazal-유형 세린 프로테아제 억제제 도메인, Trefoil(P-유형) 도메인, von Willebrand 인자 유형 C 도메인, 아나필라톡신 유사 도메인, CUB 도메인, 타이로글로불린(thyroglobulin) 유형 I 반복, LDL-수용체 클래스 A 도메인, Sushi 도메인, 결합 도메인, 트롬보스폰딘(Thrombospondin) 유형 I 도메인, 면역 글로불린 도메인 또는 면역 글로불린 유사 도메인 (예를 들어, 도메인 항체 또는 낙타 중쇄 항체), C-유형 렉틴 도메인, MAM 도메인, von Willebrand 인자 유형 A 도메인, 소마토메딘(Somatomedin) B 도메인, WAP-유형 4개의 이황화물 코어 도메인, F5/8 유형 C 도메인, 헤모펙신(Hemopexin) 도메인, SH2 도메인, SH3 도메인, 라미닌-유형 EGF 유사 도메인, C2 도메인, "카파바디(Kappabodies)"(Ill et al. Protein Eng (1997) 10, 949-57, 소위 "미니바디(minibody)"(Martin et al, EMBO J (1994) 13, 5303-5309), 디아바디(Holliger et al, PNAS USA (1993)90, 6444-6448), 소위 "야누시스(Janusis)"(Traunecker et al, EMBO J (1991) 10, 3655-3659 또는 Traunecker et al, Int J Cancer (1992) Suppl 7, 51-52), 나노바디, 마이크로바디, 아필린(affilin), 아피바디(affibody), 크노틴(knottin), 유비퀴틴, 징크-핑거 단백질, 자가형광 단백질 또는 류신-리치 반복 단백질을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 항체 유사 기능을 갖는 핵산 분자는 압타머일 수 있다. 일반적으로, 압타머는 정의된 3차원 모티프로 접히고, 주어진 표적 구조에 대해 높은 친화도를 나타낸다.

[0402] a. 선택제

[0403] 진술한 바와 같이, 특정 측면에서, 본원에 제공된 방법은 선택제를 이용한다. 일부 구현예에서, 섹션 II-B에 기재된 제제는 선택제이다. 일부 구현예에서, 선택제는 세포 표면 분자와 같은 세포의 표면 상의 분자에 결합한다. 일부 예에서, 세포 표면 분자는 선택 마커이다. 일부 구현예에서, 선택제는 샘플에서 하나 이상의 세포에 의해 발현되는 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 개시 전체에 걸쳐 세포 표면 분

자 또는 세포 표면 수용체와 같은 분자에 대한 특이적 결합에 대한 언급은 제제가 이러한 분자에만 결합한다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 예를 들어, 분자에 특이적으로 결합하는 제제는 일반적으로 예를 들어 면역 분석, BIAcore®, KinExA 3000 기기(Sapidyne Instruments, Boise, ID), 또는 기타 분석에 의해 결정된 훨씬 낮은 친화도로 다른 분자에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 특정 결합 조건 하에서, 표적 분자에 결합하는 제제의 능력, 그것의 친화도 또는 결합력(avidity)은 충분한 통계적 크기의 무작위 펩타이드 또는 폴리펩타이드의 집합에 대한 동일한 제제의 평균 친화도 또는 결합력보다 적어도 5 배 크고, 예컨대 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 또는 500 배 더 크거나 심지어 적어도 1000 배 더 크다.

[0404] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 표적 세포(예를 들어, T 세포)는 세포 표면 상에 분자, 예를 들어 선택 마커를 갖거나 발현하여, 선택될 세포가 적어도 하나의 공통 특정 분자(예를 들어, 선택 마커)의 존재에 의해 정의되도록 한다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 또한 분자(예를 들어, 선택 마커)가 없는 추가 세포를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, T 세포는 다중 세포 유형, 예를 들어 적혈구 또는 B 세포를 함유하는 샘플로부터 선택될 수 있다. 선택 마커 및 수용체 분자는 세포 표면 분자를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0405] 일부 구현예에서, 선택제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체로 구성된 군에서 선택되는 제제; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편이거나 이를 함유하고; 및/또는 선택제는 항체 단편을 함유하고; 선택제는 Fab 단편이거나 이를 함유하고; 선택제는 $F(ab)_2$ -단편 및 2가 단일 사슬 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되고; 선택제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이고; 및/또는 선택제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이다.

[0406] 일부 구현예에서, 선택제는 시약에 결합하기 위한 결합 파트너 C를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 선택제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWHPQFEKGGGSGGSGSAWHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모듈린에 가역적으로 결합하는 칼모듈린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함한다.

[0407] 일부 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인이거나 이를 함유하고, 선택제는 비오틴, 비오틴 유사체 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드와 같은 시약에 결합할 수 있는 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 구현예에서, 선택제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWHPQFEKGGGSGGSGSAWHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함한다. 특정 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘 뮤테인이거나 이를 함유하고(예: 서열번호 6에 제시됨), 결합 파트너 C는 서열번호 8 또는 15-19 중 어느 하나에 제시된 임의의 것과 같은 스트렙타비딘-결합 펩타이드다. 일부 구현예에서, 선택제는 서열 SAWHPQFEKGGGSGGSGSAWHPQFEK (서열번호 16)을 갖는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함한다.

[0408] 일부 측면에서, 세포 표면 분자(예: 선택 마커)는 바람직한 세포 집단 또는 하위 집단, 예를 들어 혈액 세포, 예컨대 림프구(예: T 세포, 도움 T 세포, 예를 들어, CD4+ 도움 T 세포, B 세포 또는 자연 살해 세포), 단핵세포, 또는 줄기 세포(예: CD34-양성 말초 줄기 세포 또는 Nanog 또는 Oct-4 발현 줄기 세포)의 집단 또는 하위 집단을 한정하는 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 T 세포 또는 T 세포의 서브 세트의 표면 상에

발현된 마커, 예컨대 CD25, CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA 및/또는 CD45RO일 수 있다. T 세포의 예는 CMV 특이적 CD8+ T 림프구, 세포 독성 T 세포, 기억 T 세포 및 조절 T 세포(Treg)와 같은 세포를 포함한다. Treg의 예시적인 예는 CD4 CD25 CD45RA Treg 세포를 포함하고, 기억 T 세포의 예시적인 예는 CD62L CD8+ 특이적 중앙 기억 T 세포를 포함한다.

[0409] 예를 들어, 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD3+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상기 마커에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 선택제와의 인큐베이션에 의해 선택된다. 선택제는 T 세포 또는 이의 하위집단의 양성 또는 음성 선택을 수행하기 위해 이러한 표면 마커에 결합하는 항체 또는 항체 단편과 같은 임의의 결합 분자일 수 있다.

[0410] 일부 구현예에서, T 세포는 B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구, 예컨대 CD14와 같은 비-T 세포 상에서 발현되는 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4+ 또는 CD8+ 선택 단계는 CD4+ 헬퍼 및 CD8+ 세포 독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 상기 CD4+ 및 CD8+ 집단은, 하나 이상의 나이브(naive), 기억 및/또는 효과기(effector) T 세포 하위 집단 상에서 발현되거나 상대적으로 보다 높은 정도로 발현되는 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위 집단으로 추가 분류될 수 있다.

[0411] 일부 구현예에서, CD8+ 세포는 예컨대 각각의 하위 집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중앙 기억, 효과기 기억 및/또는 중앙 기억 줄기세포에 대해 추가로 농축되거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(TCM) 세포의 농축은 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후의 장기간 생존, 증폭 및/또는 생착을 향상하기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 상기 하위 집단에서 특히 건고하다. Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701 참조. 일부 구현예에서, TCM-농축 CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포의 조합은 효능을 더욱 증진한다.

[0412] 일부 구현예에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 서브세트 모두에 존재한다. PBMC는 예컨대 선택제로서 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여 CD62L-CD8+ 및/또는 CD62L+CD8+ 분획에 대해 농축되거나 고갈될 수 있다.

[0413] 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포의 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 양성 또는 고도의 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대해 농축된 CD8+ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중앙 기억 T(TCM) 세포에 대한 농축은 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 시작하여 수행되며, 이는 CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택, 및 CD62L에 기초한 양성 선택을 거친다. 일부 측면에서, 상기 선택은 동시에 수행되며, 다른 측면에서, 순차적으로, 어떠한 순서로든 수행된다. 일부 측면에서, CD8+ 세포의 집단 또는 하위 집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현 기반 선택 단계가 CD4+ 세포의 집단 또는 하위 집단을 생성하는 데 또한 사용되어, CD4 기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 모두가 유지되고, 선택적으로 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계 후에 방법의 후속 단계에서 사용된다. 일부 구현예에서, CD4+ 세포의 집단에 대한 선택 및 CD8+ 세포의 집단에 대한 선택은 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, CD4+ 세포의 집단에 대한 선택 및 CD8+ 세포의 집단에 대한 선택은 어느 순서로든 순차적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 세포를 선택하는 방법은 본원에 그 전체가 참조로 포함된 공개된 미국 출원 번호 US20170037369에 기술된 것을 포함할 수 있다.

[0414] 특정 구현예에서, 생물학적 샘플, 예를 들어 PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은 음성 및 양성 분획 모두가 유지되는 CD4+ T 세포의 선택을 거친다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포가 음성 분획으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 음성 및 양성 분획 모두가 유지되는 CD8+ T 세포의 선택을 거친다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포가 음성 분획으로부터 선택된다.

[0415] 일부 구현예에서, CD4에 특이적으로 결합하는 선택제 및 CD8에 특이적으로 결합하는 선택제는 각각 CD4+ T 세포가 농축된 집단 및 CD8+ T 세포가 농축된 집단을 생성하는 데 사용된다.

[0416] 특정 예에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은 음성 및 양성 분획이 모두 유지되는 CD4+ 세포의 선택에 노출된다. 이어서 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L 또는 CCR7과 같은 중앙 기억 T 세포의 특유한 마커에 기초한 양성 선택을 거치고, 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.

- [0417] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포의 집단을 식별하여 나이트, 중앙 기억 및 작동체 세포로 분류될 수 있다. CD4+ 림프구는 표준 방법으로 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이트 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ 또는 CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 효과기 CD4+ 세포는 CD62L- 및 CD45RO-이다.
- [0418] 일부 구현예에서, 상기 선택 마커는 T 세포 공수용체(coreceptor)이고; 상기 선택 마커는 T 세포 항원 수용체 복합체의 멤버이거나 이를 함유하며; 상기 선택 마커는 CD3 사슬이거나 이를 함유하고; 상기 선택 마커는 CD3 제타 사슬이거나 이를 함유하며; 상기 선택 마커는 CD8이거나 이를 함유하며; 상기 선택 마커는 CD4이거나 이를 함유하고; 상기 선택 마커는 CD45RA이거나 이를 함유하고; 상기 선택 마커는 CD27이거나 이를 함유하며; 상기 선택 마커는 CD28이거나 이를 함유하고; 및/또는 상기 선택 마커는 CCR7이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 CD3, CD4 및 CD8로 구성된 군에서 선택된다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 CD3이다.
- [0419] 일부 구현예에서, 선택제 및 선택 마커 간 특이적 결합은 상기 T 세포에 대한 신호를 유도하지 않거나, 또는 자극 또는 활성화 또는 증식 신호를 유도하지 않는다. 일부 구현예에서, 선택제는 CD3, CD8 또는 CD4에 결합하는 1가 항체 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택제는 항-CD3 Fab, 항-CD8 Fab 또는 항-CD4 Fab이다. 일부 구현예에서, 선택제는 항-CD3 Fab이다. 일부 구현예에서, 상기 항-CD3 Fab은 OKT3 항체 Fab 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항-CD3 Fab은 서열번호 31에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄 및 서열번호 32에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄를 포함한다.
- [0420] 일부 구현예에서, 선택 마커는 CD4일 수 있고, 선택제는 CD4에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD4에 특이적으로 결합하는 선택제는 항-CD4 항체, 항-CD4 항체의 2가 항체 단편, 항-CD4 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD4 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD4 항체, 예컨대 2가 항체 단편 또는 1가 항체 단편(예: CD4 Fab 단편)은 13B8.2 항체 또는 CD4에 대한 특이적 결합을 유지하는 13B8.2의 기능적 활성 돌연변이체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 13B8.2 항체 또는 m13B8.2의 예시적인 돌연변이체는 미국 특허 번호 7,482,000, 미국 특허 출원 번호 US2014/0295458 또는 국제 특허 출원 번호 W02013/124474; 및 Bes, C, *et al.* J Biol Chem 278, 14265-14273 (2003)에 기재되어 있다. "m13B8.2"로 명명된 돌연변이체 Fab 단편은, 미국 특허 7,482,000에 기재된 바와 같이, CD4 결합 무린 항체 13B8.2의 가변 도메인 및 중쇄에 대해 감마 유형의 인간 불변 CH1 도메인 및 카파 유형의 인간 불변 경쇄 도메인을 함유하는 불변 도메인을 갖는다. 일부 구현예에서, 항-CD4 항체, 예를 들어 13B8.2 항체의 돌연변이체는 카바트(Kabat) 넘버링에 의해 각각, 가변 경쇄에서 H91A 아미노산 대체, 가변 경쇄에서 Y92A 아미노산 대체, 가변 중쇄에서 H35A 아미노산 대체 및/또는 가변 중쇄에서 R53A 아미노산 대체를 함유한다. 일부 측면에서, m13B8.2에서 13B8.2 Fab 단편의 가변 도메인에 비해, 경쇄의 91번 위치(서열번호 30의 93번 위치)에서 His 잔기가 Ala으로 돌연변이되고, 중쇄의 53번 위치(서열번호 29의 55번 위치)에서 Arg 잔기는 Ala으로 돌연변이된다. 일부 구현예에서, 항-CD4 또는 이의 단편에 가역적으로 결합하는 시약은 상업적으로 이용 가능하거나 상업적으로 이용 가능한 시약(예: 카탈로그 번호 6-8000-206 또는 6-8000-205 또는 6-8002-100; IBA GmbH, Göttingen, Germany)에서 유래된다. 일부 구현예에서, 선택제는 항-CD4 Fab 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항-CD4 Fab 단편은 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄 및 서열번호 30에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD4 Fab 단편은 서열번호 29에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄의 CDRs 및 서열번호 30에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄의 CDRs를 포함한다.
- [0421] 일부 구현예에서, 선택 마커는 CD8일 수 있고, 선택제는 CD8에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD8에 특이적으로 결합하는 선택제는 항-CD8 항체, 항-CD8 항체의 2가 항체 단편, 항-CD8 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD8 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD8 항체, 예컨대 2가 항체 단편 또는 1가 항체 단편(예: CD8 Fab 단편)은 OKT8 항체(예: ATCC CRL-8014) 또는 CD8에 대한 특이적 결합을 유지하는 이의 기능적 활성 돌연변이체로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD8 또는 이의 단편에 가역적으로 결합하는 시약은 상업적으로 이용 가능하거나 상업적으로 이용 가능한 시약(예: 카탈로그 번호 6-8003 또는 6-8000-201; IBA GmbH, Göttingen, Germany)에서 유래된다. 일부 구현예에서, 선택제는 항-CD8 Fab 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항-CD8 Fab 단편은 서열번호 36에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄 및 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD8 Fab 단편은 서열번호 36에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄의 CDRs 및 서열번호 37에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄의 CDRs를 포함한다.
- [0422] 일부 구현예에서, 선택 마커는 CD3일 수 있고, 선택제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD3에 특이적으로 결합하는 선택제는 항-CD3 항체, 항-CD3 항체의 2가 항체 단편, 항-CD3 항체의 1가 항체 단편 및 항체

유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD3 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체, 예컨대 2가 항체 단편 또는 1가 항체 단편(예: CD3 Fab 단편)은 OKT3 항체(예: ATCC CRL-8001; 예: Stemberger *et al.* PLoS One. 2012; 7(4): e35798 참조) 또는 CD3에 대한 특이적 결합을 유지하는 이의 기능적 활성 돌연변이체로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD3 또는 이의 단편에 가역적으로 결합하는 시약은 상업적으로 이용 가능하거나 상업적으로 이용 가능한 시약(예: 카탈로그 번호 6-8000-201, 6-8001-100; IBA GmbH, Göttingen, Germany)에서 유래된다. 일부 구현예에서, 선택제는 항-CD3 Fab 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항-CD3 Fab 단편은 서열번호 31에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄 및 서열번호 32에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD3 Fab 단편은 서열번호 31에 제시된 서열을 갖는 가변 중쇄의 CDRs 및 서열번호 32에 제시된 서열을 갖는 가변 경쇄의 CDRs를 포함한다.

[0423] 임의의 상기 예에서, 2가 항체 단편은 (Fab)₂'-단편 또는 2가 단일

[0424] 사슬 Fv 단편일 수 있는 반면, 1가 항체 단편은 Fab 단편, Fv 단편 및 단일 사슬

[0425] Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 임의의 상기 예에서, 항체 유사 결합 특성을 가진 단백질성 결합 분자는 아파타머(aptamer), 리포칼린(lipocalin) 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인(mutein), 글루바디(glubody), 안키린(ankyrin) 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 아드넥틴(adnectin) 및 아비머(avimer)일 수 있다.

[0426] 일부 구현예에서, 선택제는 고정상에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 선택제는 가역적으로 결합하는 선택 시약을 통해 고정상에 간접적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 비오틴, 비오틴 유사체 또는 이의 생물학적 활성 단편에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘의 뮤테인; 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 뮤테인; 적어도 2개의 킬레이트 작용기 K를 함유하는 시약, 여기서 상기 적어도 2개의 킬레이트 작용기는 전이금속 이온에 결합할 수 있음; 올리고히스티딘 친화도 태그(affinity tag)에 결합할 수 있는 제제; 글루타치온-S-전이효소에 결합할 수 있는 제제; 칼모듈린 또는 이의 유사체; 칼모듈린 결합 펩타이드(CBP)에 결합할 수 있는 제제; FLAG-펩타이드에 결합할 수 있는 제제; HA-태그에 결합할 수 있는 제제; 말토오스 결합 단백질(MBP)에 결합할 수 있는 제제; HSV 에피토프에 결합할 수 있는 제제; myc 에피토프에 결합할 수 있는 제제; 또는 비오틴화된 수송 단백질에 결합할 수 있는 제제이거나 이를 함유할 수 있다.

[0427] 일부 구현예에서, 선택 시약은 비오틴 또는 생물학적 활성 단편에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 아비딘 뮤테인이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 아비딘 뮤테인이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자는 비오틴, 비오틴 유사체 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하거나 가역적으로 결합할 수 있다.

[0428] b. 자극제

[0429] 전술한 바와 같이, 특정 측면에서, 본원에 제공된 방법은 자극제를 이용한다. 일부 구현예에서, 섹션 II-B에 기재된 제제는 자극제이다. 일부 구현예에서, 자극제는 세포 표면 상의 분자에 결합하며, 자극제와 분자 사이의 결합은 세포에서 자극 신호를 유도, 전달 또는 조절(modulating)할 수 있다. 일부 예에서, 세포 표면 분자(예: 수용체)는 신호 분자(signaling molecule)이다. 일부 상기 경우에, 자극제는 하나 이상의 표적 세포(예: T 세포)에 의해 발현되는 신호 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 예에서, 자극제는 수용체와 같은 세포 표면 분자에 결합할 때, 세포(예: T 세포)에 자극 신호를 유도 또는 전달할 수 있는 임의의 제제이다. 일부 구현예에서, 자극 신호는 면역 자극성일 수 있으며, 이 경우 자극제는 상기 세포(예: T 세포)에 의한 면역 반응에 관여하거나 면역 반응을 자극하는, 예를 들어, 면역 세포 증식 또는 증폭, 면역 세포 활성화, 면역 세포 분화, 사이토카인 분비, 세포 독성 활성 또는 면역 세포의 하나 이상의 기타 기능적 활성을 증가시키는 신호를 유도, 전달, 또는 조절(modulating)할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 신호는 억제성일 수 있으며, 이 경우 자극제는 면역 반응에 관여하거나 면역 반응을 저해하는, 예를 들어, 면역 세포 증식 또는 증폭, 면역 세포 활성화, 면역 세포 분화, 사이토카인 분비, 세포 독성 활성 또는 면역 세포의 하나 이상의 기타 기능적 활성을 저해 또는 감소시키는 세포(예: T 세포)에서 자극 신호를 유도, 전달 또는 조절(modulating)할 수 있다.

[0430] 일부 구현예에서, 자극제는 제1 자극제이다. 일부 구현예에서, 제1 자극제는 샘플의 선택된 세포의 표면 상에 수용체 분자와 결합한다. 따라서, 일부 경우에, 제1 자극제는 자극 신호를 전달, 유도, 또는 조절한다. 일부 측면에서, 제1 자극제에 의한 자극 신호의 전달, 유도, 또는 조절은 세포의 자극을 초래한다. 따라서, 일부 경우

에, 제1 자극제는 세포에 자극 신호를 전달하며, 이로써 세포를 자극시킨다. 일부 구현예에서, 제1 자극제는 선택 마커의 하향조절을 추가로 유도한다. 본원에 사용된 바와 같이, 하향조절은 이전 시점과 비교하여 선택 마커의 발현의 감소를 포함할 수 있다.

- [0431] 일부 구현예에서, 표적 세포(예: T 세포)는 TCR/CD3 복합체 및 공자극분자, 예컨대 CD28을 포함한다. 이 경우에, 제1 자극제는 TCR/CD3 복합체에 결합하고, 이로써 T 세포에 자극 신호를 전달하고, 제2 자극제는 공자극 CD28 분자에 결합한다. 특정 측면에서, 제1 자극제 및/또는 제2 자극제는 선택 마커(예: 표적 세포(예: T 세포)의 고정을 위해 사용된 선택 마커)의 하향조절을 추가로 유도한다.
- [0432] 일부 구현예에서, 제1 자극제는 세포(예: T 세포)에 TCR/CD3 복합체-연관 자극 신호를 전달한다. 일부 구현예에서, 제1 자극제는 면역수용체 타이로신-기반 활성 모티프 또는 ITAM을 함유하는 분자에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, 제1 자극제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 자극제는 항-CD3 항체, 항-CD3 항체의 2가 항체 단편, 항-CD3 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD3 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 2가 항체 단편은 F(ab')₂-단편 또는 2가 단일 사슬 Fv 단편일 수 있는 반면, 1가 항체 단편은 Fab 단편, FV 단편 및 단일 사슬 Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 일부 경우에, 항체 유사 결합 특성을 가진 단백질성 CD3 결합 분자는 aptamer(aptamer), 리포칼린(lipocalin) 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 mutein(mutein), 글루바디(glubody), 안키린(ankyrin) 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 아드넥틴(adnectin) 또는 아비머(avimer)일 수 있다.
- [0433] 일부 구현예에서, 항-CD3 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3(ATCC®CRL-8001™; 또한 미국 특허 번호 4,361,549 참조)에 의해 생산된 CD3 결합 단클론 항체로부터 유래될 수 있다. 중사슬의 가변 도메인 및 항-CD3 항체 OKT3의 경사슬의 가변 도메인은 Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)에 기술되어 있으며, 각각 서열번호 31 및 32에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0434] 일부 구현예에서, 자극제는 제2 자극제이다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 세포 표면 분자(예: 수용체 분자)와 같은 세포의 표면 상의 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 제1 자극제에 의해 결합된 분자를 통해 전달된 자극 신호를 향상, 약화 또는 변형할 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 자극 신호, 예를 들어 제2 또는 추가적인 자극 신호를 전달, 유도, 또는 조절한다. 일부 측면에서, 제2 자극제는 제1 자극제에 의해 유도된 자극 신호를 향상 또는 강화(potentiate)한다. 일부 구현예에서, 제2 자극제는 보조 분자(accessory molecule)에 결합하고/거나 세포에서 보조 또는 2차 자극신호를 유도한다. 일부 측면에서, 제2 자극제는 공자극 분자에 결합하고/하거나 공자극 신호를 제공한다.
- [0435] 일부 구현예에서, 제2 자극제일 수 있는 자극제는 공자극 분자, 보조 분자, 사이토카인 수용체, 케모카인 수용체, 면역체크포인트 분자, 또는 TNF
- [0436] 패밀리나 TNF 수용체 패밀리의 멤버일 수 있는 제2 분자에 결합, 예를 들어 특이적으로 결합한다.
- [0437] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 CD28일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD28에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD28에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD28 항체, 항-CD28 항체의 2가 항체 단편, 항-CD28 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD28 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 2가 항체 단편은 F(ab')₂-단편 또는 2가 단일 사슬 Fv 단편일 수 있는 반면, 1가 항체 단편은 Fab 단편, FV 단편 및 단일 사슬 Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 유사 결합 특성을 가진 단백질성 CD28 결합 분자는 aptamer(aptamer), 리포칼린(lipocalin) 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 mutein(mutein), 글루바디(glubody), 안키린(ankyrin) 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 아드넥틴(adnectin) 및 아비머(avimer)일 수 있다.
- [0438] 일부 구현예에서, 항-CD28 Fab 단편은 항체 CD28.3으로부터 유래될 수 있으며 (GenBank 수탁번호 AF451974.1 하에 합성 단일 사슬 Fv 구조물로서 기탁됨; Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol.102, No. 2, pages 564-570도 참조), 이의 가변 중쇄 및 경쇄는 각각 서열번호 33 및 34를 포함한다.
- [0439] 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 항-CD3 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 항-CD3 Fab 및 항-CD28 Fab이다.
- [0440] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 CD90이고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD90에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD90에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD90 항체, 항-CD90 항체의 2가 항체 단편, 항-CD90 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성

CD90 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항-CD90 항체 G7 (Biolegend, cat. no. 105201) 참조.

[0441] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 CD95이고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD95에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD95에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD95 항체, 항-CD95 항체의 2가 항체 단편, 항-CD95 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD95 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 항-CD90 항체는 단클론성 마우스 항-인간 CD95 CH11일 수 있거나 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) 또는 예컨대, Paulsen et al. Cell Death & Differentiation 18.4 (2011): 619-631에 기술된 항-CD95 mAb 7C11 또는 항-AP0-1일 수 있다.

[0442] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포 또는 B 세포) 상의 분자는 CD137일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD137에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD137에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD137 항체, 항-CD137 항체의 2가 항체 단편, 항-CD137 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD137 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항-CD137 항체는 Taraban et al. Eur J Immunol. 2002 Dec;32(12):3617-27에 기술된 LOB12, IgG2a 또는 LOB12.3, IgG1일 수 있다. 예를 들어, US6569997, US6303121, Mittler et al. Immunol Res. 2004;29(1-3):197-208도 참조.

[0443] 일부 구현예에서, 세포(예: B 세포) 상의 분자는 CD40일 수 있고, 자극제, 예를 들어, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음, 예: 제2 자극제)는 CD40에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD40에 특이적으로 결합하는 자극제(제2 자극제일 수 있음, 예: 제2 자극제)는 항-CD40 항체, 항-CD40 항체의 2가 항체 단편, 항-CD40 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD40 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0444] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 CD40L(CD154)일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD40L에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD40L에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD40L 항체, 항-CD40L 항체의 2가 항체 단편, 항-CD40L 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD40L 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 항-CD40L 항체는 경우에 따라, Blair et al. JEM vol. 191 no. 4 651-660에 기술된 Hu5C8일 수 있다. 예를 들어, W01999061065, US20010026932, US7547438, W02001056603도 참조.

[0445] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 유도성 T 세포 공자극자(ICOS)일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 ICOS에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, ICOS에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항- ICOS 항체, 항- ICOS 항체의 2가 항체 단편, 항-ICOS 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 ICOS 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, US20080279851 및 Deng et al. Hybrid Hybridomics. 2004 Jun;23(3):176-82 참조.

[0446] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 T 세포 활성화를 위한 링커(LAT)일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 LAT에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, LAT에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-LAT 항체, 항-LAT 항체의 2가 항체 단편, 항-LAT 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 LAT 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다.

[0447] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 CD27일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 CD27에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, CD27에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-CD27 항체, 항-CD27 항체의 2가 항체 단편, 항-CD27 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD27 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, W02008051424 참조.

[0448] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 OX40일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 OX40에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, OX40에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-OX40 항체, 항-OX40 항체의 2가 항체 단편, 항-OX40 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 OX40 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것

으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, W02013038191, Melero *et al.* Clin Cancer Res. 2013 Mar 1;19(5):1044-53 참조.

- [0449] 일부 구현예에서, 세포(예: T 세포) 상의 분자는 HVEM 일 수 있고, 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 HVEM에 특이적으로 결합한다. 일부 측면에서, HVEM에 특이적으로 결합하는 자극제(예: 제2 자극제일 수 있음)는 항-HVEM 항체, 항-HVEM 항체의 2가 항체 단편, 항-HVEM 항체의 1가 항체 단편 및 항체 유사 결합 특성을 갖는 단백질성 HVEM 결합 분자로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 항체 또는 항원-결합 단편은 당업계에 공지된 임의의 것 으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, W02006054961, W02007001459, Park *et al.* Cancer Immunol Immunother. 2012 Feb;61(2):203-14 참조.
- [0450] 임의의 상기 예에서, 2가 항체 단편은 (Fab)₂'-단편 또는 2가 단일
- [0451] 사슬 Fv 단편일 수 있는 반면, 1가 항체 단편은 Fab 단편, Fv 단편 및 단일 사슬
- [0452] Fv 단편(scFv)으로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 임의의 상기 예에서, 항체 유사 결합 특성을 가진 단백질성 결합 분자는 aptamer(아프타머), 리포칼린(lipocalin) 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인(mutein), 글루바디(glubody), 안키린(ankyrin) 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정성 스캐폴드에 기초한 단백질, 아드넥틴(adnectin) 및 아비머(avimer)일 수 있다.
- [0453] 일부 측면에서, 자극제는 표적 세포의 표면 상에 발현된 분자를 특이적으로 표적하며, 상기 분자는 TCR, 키메라 항원 수용체, 또는 면역수용체 타이로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM을 포함하는 분자이다. 예를 들어, 표적 세포의 표면 상에 발현되는 분자는 T 세포 또는 B 세포 항원 수용체 복합체, CD3 사슬, CD3 제타, T 세포 또는 B 세포의 항원 결합 부분, 또는 키메라 항원 수용체로부터 선택된다. 일부 경우에, 자극제는 펩타이드:MHC 클래스 I 복합체를 표적으로 한다.
- [0454] 일부 구현예에서, 자극제는 표적 세포 표면 상에 발현된 분자의 His-태그된 세포의 도메인에 결합한다. 일부 구현예에서, 자극제는 니켈로 충전된 trisNTA(His-STREPPER 또는 His/Strep-tag®II Adapter라고도 함)와 컨주게이션된 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(Strep-tag® II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨) 펩타이드 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, His-태그된 표적 세포의 표면 상에 발현된 분자는 CD19이다.
- [0455] 일부 구현예에서, 자극제는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR의 항체 일부에 특이적으로 결합한다. 일부 경우에, 재조합 수용체의 항체 일부는 면역글로불린 불변 영역, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어, IgG4 힌지 영역의 적어도 일부, 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 경우에, 시약은 IgG4 스페이서를 인식하는 α IgG로 로드된다.
- [0456] 일부 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 수용체 및/또는 T 세포 수용체의 성분이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 CD3이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 공자극 분자, 예를 들어 CD28, CD137(4-1-BB), OX40 또는 ICOS이다.
- [0457] 일부 구현예에서, 예를 들어 자극제가 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약) 또는 선택 시약에 결합하지 않는 경우, 자극제는 항체, 2가 항체 단편, F(ab)₂, 또는 2가 단일 사슬 Fv 단편이다.
- [0458] 일부 구현예에서, 자극제, 또는 하나 이상의 자극제 각각은 시약에 결합하기 위한 결합 파트너 C를 더 함유한다. 일부 구현예에서, 자극제, 또는 하나 이상의 자극제 각각은 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모듈린에 가역적으로 결합하는 칼모듈린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 함유한다.
- [0459] 일부 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인이거나 이를 함유하고, 자극제, 또는 하나 이상의 자극제 각각은 비오틴, 비오틴 유사체 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드와 같은 시약에 결합할 수 있는 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 구현예에서, 자극제, 또는 하나 이상의 자극제 각각은 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-

Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGGSGGSGGSAWSHQPFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함한다. 특정 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘 뮤테인이거나 이를 함유하고(예: 서열번호 6에 제시됨), 결합 파트너 C는 서열번호 8 또는 15-19 중 어느 하나에 제시된 임의의 것과 같은 스트렙타비딘-결합 펩타이드다. 일부 구현예에서, 자극제, 또는 하나 이상의 자극제 각각은 서열 SAWSHQPFEKGGGSGGSGGSAWSHQPFEK (서열번호 16)을 갖는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 더 포함한다.

2. 시약

일부 구현예에서, 시약(예: 선택제 또는 자극 시약)은 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C에 가역적으로 결합할 수 있는 하나 또는 복수의 결합 부위 Z를 함유한다. 일부 구현예에서, 시약은 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C에 각각이 특이적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위 Z를 함유하여, 시약이 복수의 제제(예: 선택제 또는 자극제), 예를 들어 다량체화 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 가역적으로 결합할 수 있도록 한다. 일부 구현예에서, 시약은 각각 하나 이상의 결합 부위 Z를 함유하는 개별 분자(예를 들어, 모노머)의 올리고머 또는 폴리머 또는 개별 분자로 구성된 복합체(예를 들어, 테트라머)이다. 일부 구현예에서, 시약은 적어도 2개의 결합 부위 Z, 적어도 3개의 결합 부위 Z, 적어도 4개의 결합 부위 Z, 예컨대 적어도 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, 72개의 결합 부위 Z를 함유할 수 있다. 결합 부위들은 모두가 동일하거나 또는 복수의 결합 부위는 하나 이상의 상이한 결합 부위(예: Z1, Z2, Z3 등)를 함유할 수 있다.

일부 구현예에서, 2개 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 예컨대 시약 상에 존재하는 하나 또는 복수의 결합 부위 Z를 통해 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)과 연관, 예컨대 가역적으로 결합된다. 일부 경우에, 이는 상기 제제(예: 선택제 또는 자극제)가 서로 밀접하게 배열되도록 하여, (적어도 2개 카피의) 세포 표면 분자를 가지는 표적 세포가 특정 분자에 결합할 수 있는 하나 이상의 결합 부위 B를 갖는 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 접촉하게 되는 경우, 결합 효과(avidity effect)를 발생할 수 있도록 한다.

일부 구현예에서, 동일한, 즉 동일한 결합 부위 B를 함유하는 2개 이상의 상이한 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 상기 시약에 가역적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 (종류의) 제제(예: 선택제 또는 자극제)를 사용할 수 있고, 일부 경우에는 3개 또는 4개의 상이한 (종류의) 제제, 예를 들어 2개 이상의 상이한 선택제 및/또는 자극제를 사용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 결합 부위 B1, B2, B3 또는 B4 등을 함유하는 제1 제제(예: 선택제 또는 자극제) 및 또 다른 결합 부위, 예컨대 결합 부위 B1, B2, B3 또는 B4를 함유하는 제2 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 가역적으로 결합될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 제1 제제 및 제2 제제의 결합 부위는 동일할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 2개 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제) 각각은 동일한 분자에 결합할 수 있다. 일부 경우에서, 상기 제1 제제 및 제2 제제의 결합 부위는 상이할 수 있다. 일부 측면에서, 2개 이상의 제제(예: 선택제 또는 자극제) 각각은 제1 분자, 제2 분자 등과 같은 상이한 분자에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 세포 표면 분자와 같은 상이한 분자는 동일한 표적 세포 상에 존재할 수 있다. 다른 경우에, 세포 표면 분자와 같은 상이한 분자는 동일한 세포 집단에 존재하는 상이한 표적 세포에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 제3, 제4 등의 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 각각 추가로 상이한 결합 부위를 함유하는 동일한 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 연관될 수 있다.

일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 동일한 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 상이한 결합 파트너를 함유한다. 일부 측면에서, 제1 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 존재하는 결합 부위 Z1에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너 C1을 가질 수 있고, 제2 제제(예: 선택제 또는 자극제)는 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 존재하는 결합 부위 Z1 또는 결합 부위 Z2에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너 C2를 가질 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)에 포함된 복수의 결합 부위 Z는 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 포함된 결합 파트너 C1 및 C2에 각각 가역적으로 결합할 수 있는 결합 부위 Z1 및 Z2를 포함한다. 일부 구현예에서, C1 및 C2는 동일하고/거나 Z1 및 Z2는 동일하다. 다른 측면에서, 하나 이상의 복수의 결합 부위 Z는 상이할 수 있다. 다른 경우에, 하나 이상의 복수의 결합 부위 C는 상이할 수 있다.

각각의 결합 파트너 C가 하나의 결합 부위 Z를 가지고 특이적으로 결합하는 것과 같은 상호 작용을 할 수 있는 한, 결합 부위 Z를 함유하는 시약과 호환되는 상이한 결합 파트너 C의 임의의 조합을 선택하는 것은 통상의 기술자 수준 내이다.

[0465] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘, 아비딘 뮤테인 또는 유사체 (예컨대, 뉴트라비딘) 또는 이들의 혼합물이며, 상기 시약은 결합 파트너 C와의 가역적인 결합을 위한 하나 이상의 결합 부위 Z를 함유한다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드; 또는 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 기타 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 시약은 비오틴, 비오틴 유사체 또는 그의 생물학적 활성 단편에 가역적으로 결합하는, 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘 유사체 또는 뮤테인, 또는 아비딘 유사체 또는 뮤테인이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 스트렙타비딘 결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 유사체 또는 뮤테인 또는 아비딘의 유사체 또는 뮤테인이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)은 하나 이상의 결합 부위 Z에 대한 결합 파트너 C와의 결합에 경쟁할 수 있는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C 및 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)은 상이하고, 상기 물질(예: 경쟁제 또는 자유 결합제)은 결합 파트너의 친화도에 비해 하나 이상의 결합 부위 Z에 대해 더 높은 결합 친화도를 나타낸다.

[0466] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 야생형 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 예컨대 스트렙타비딘 유사 폴리펩타이드일 수 있다. 이와 유사하게, 일부 측면에서, 아비딘은 야생형 아비딘 또는 아비딘의 뮤테인 또는 유사체, 예를 들어 뉴트라비딘, 전형적으로 보다 중성인 pI를 나타내고 천연 아비딘의 대안으로서 이용 가능한 조작된 아르기닌을 가지는 데글리코실화된 아비딘을 포함한다. 일반적으로, 데글리코실화된 중성 형태의 아비딘은 Sigma Aldrich를 통해 상업적으로 이용 가능한 "Extravidin" 또는 Thermo Scientific 또는 Invitrogen에서 이용 가능한 "NeutrAvidin"과 같은 형태를 포함한다.

[0467] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체이다. 일부 구현예에서, 야생형 스트렙타비딘(wt-스트렙타비딘)은 Argarana et al, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 1871-1882에 개시된 아미노산 서열(서열번호 1)을 가진다. 일반적으로, 스트렙타비딘은 4개의 동일한 서브유닛의 테트라머로서 자연적으로 발생하고, 즉, 각 서브유닛은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체를 위한 단일 결합 부위를 함유하는 호모-테트라머이다. 스트렙타비딘 서브유닛의 예시적인 서열은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열이지만, 상기 서열은 또한 기타 *Streptomyces* 종으로부터의 상동체에 존재하는 서열을 포함할 수 있다. 특히, 스트렙타비딘의 각 서브유닛은 약 10^{-14} M 정도의 평형 해리 상수(K_D)를 가지는 비오틴에 대한 강한 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 스트렙타비딘은 1가 테트라머로 존재할 수 있으며, 4개의 결합 부위 중 오직 1개만이 기능적이고(Howarth et al. (2006) *Nat. Methods*, 3:267-73; Zhang et al. (2015) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 463:1059-63)), 2가 테트라머는 4개의 결합 부위 중 2개가 기능적이며(Fairhead et al. (2013) *J. Mol. Biol.*, 426:199-214), 또는 모노머 또는 다이머 형태로 존재할 수 있다(Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280:23225-31; Lim et al. (2010) *Biochemistry*, 50:8682-91).

[0468] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 임의의 형태, 예컨대 야생형 또는 조작되지 않은 스트렙타비딘, 예컨대 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 종으로부터의 스트렙타비딘 또는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체에 대한 결합 부위를 함유하는 하나 이상의 기능적 서브유닛을 포함하는 그의 기능적 활성 단편, 예컨대 서열번호 1에 기재된 스트렙토마이세스 아비딘(*Streptomyces avidinii*)로부터의 야생형 스트렙타비딘의 기능적 서브유닛 또는 그의 기능적 활성 단편을 하나 이상 함유하는 형태일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 N- 및/또는 C-말단이 짧아진 야생형 스트렙타비딘의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 미니멀 스트렙타비딘은 서열번호 1의 아미노산 위치 10 내지 16의 영역에서 N-말단으로 시작하고 서열번호 1의 아미노산 위치 133 내지 142의 영역에서 C-말단으로 종결되는 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘의 기능적 활성 단편은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 서열번호 2에 제시된 스트렙타비딘은 서열번호 1에 제시된 넘버링으로 Ala13에 상응하는 위치에 N-말단 메티오닌을 더 함유할 수 있다. 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 내의 잔기의 위치에 대한 기준은 서열번호 1에서 잔기 넘버링과 관련이 있다.

[0469] 일부 측면에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입에 의하여, 야생형 또는 조작되지 않은 스트렙타비딘의 서열과 구별되지만, 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 스트렙타비딘 결합

펩타이드에 대한 결합 부위를 함유하는 하나 이상의 기능적 서브유닛을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 측면에서, 스트렙타비딘 유사 폴리펩타이드 및 스트렙타비딘 뮤테인은 본질적으로 야생형 스트렙타비딘과 면역학적으로 동등한 폴리펩타이드일 수 있으며, 특히 이들은 wt-스트렙타비딘과 동일하거나 상이한 친화도를 가지는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 비오틴 유사체와 결합할 수 있다. 일부 경우에, 스트렙타비딘 유사 폴리펩타이드 또는 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 일부가 아닌 아미노산을 함유할 수 있거나, 또는 야생형 스트렙타비딘의 일부만을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 유사 폴리펩타이드는 숙주가 숙주-생성된 폴리펩타이드를 야생형 스트렙타비딘의 구조로 변형시키는 데 필요한 효소를 가지지 않기 때문에, 야생형 스트렙타비딘과 동일하지 않은 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 또한 스트렙타비딘 테트라머 및 스트렙타비딘 다이머, 특히 스트렙타비딘 호모테트라머, 스트렙타비딘 호모다이머, 스트렙타비딘 헤테로테트라머 및 스트렙타비딘 헤테로다이머로서 존재할 수 있다. 일반적으로, 각각의 서브유닛은 통상적으로 비오틴 또는 비오틴 유사체에 대한, 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드에 대한 결합 부위를 가진다. 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 예시는 예를 들어, WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6,022,951, WO 98/40396 또는 WO 96/24606에 언급되어 있다.

[0470] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 또는 변형되지 않은 스트렙타비딘의 일부가 아닌 아미노산을 함유할 수 있거나, 또는 야생형 또는 변형되지 않은 스트렙타비딘의 일부만을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 또는 변형되지 않은 스트렙타비딘의 서브유닛에 비하여, 예컨대 서열번호 1에 제시된 야생형 스트렙타비딘 서브유닛 또는 예컨대 서열번호 2에 제시된 이의 기능적 활성 단편에 비하여, 하나 이상의 아미노산 치환(대체)을 가질 수 있는 적어도 하나의 서브유닛을 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인의 적어도 하나의 서브유닛은 야생형 또는 변형되지 않은 스트렙타비딘과 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 개 아미노산이 상이하고, 및/또는 서열번호 1 또는 2에 제시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과인 아미노산 서열이 포함된 하나 이상의 서브유닛을 함유하며, 여기서 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체와 결합하는 기능적 활성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 아미노산 치환(대체)는 보존적 또는 비보존적 돌연변이이다. 스트렙타비딘 뮤테인의 예시는 해당 기술 분야에 공지되어 있으며, 예컨대, 미국 특허 5,168,049; 5,506,121; 6,022,951; 6,156,493; 6,165,750; 6,103,493; 또는 6,368,813; 또는 국제 공개된 PCT 출원 WO2014/076277를 참조한다.

[0471] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드에 대한 하나 이상의 결합 부위 Z를 함유하는 하나 이상의 기능적 서브유닛, 예컨대 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 및 경우에 따라, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 이상의 기능적 서브유닛을 함유하는 단백질질을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인은 모노머; 헤테로다이머 또는 호모다이머를 포함하는 다이머; 호모테트라머, 헤테로테트라머, 1가 테트라머 또는 2가 테트라머를 포함하는 테트라머를 포함할 수 있거나; 또는 고차 다량체 또는 이들의 올리고머를 포함할 수 있다.

[0472] 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드 결합 파트너에 대한 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 결합 친화도는 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M 또는 1×10^{-7} M 미만이지만, 일반적으로 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M을 초과한다. 예를 들어, 예컨대 미국 특허 제5,506,121호에 기술된 펩타이드 서열(Strep-태그)은 비오틴 모방체로서 작용할 수 있고, 스트렙타비딘에 대한 결합 친화도는, 예컨대 대략 10^{-4} M 내지 10^{-5} M의 K_D 로 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 결합 친화도는 스트렙타비딘 분자 내 돌연변이를 만들어서 추가로 개선시킬 수 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제6,103,493호 또는 국제 공개된 PCT 출원 제 WO2014/076277호를 참조한다. 일부 구현예에서, 결합 친화도는 해당 기술 분야에 공지된 방법, 예컨대 아래에 기술된 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0473] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약), 예를 들어 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인은, 펩타이드 리간드 결합 파트너에 대한 결합 친화도를 나타내며, 상기 펩타이드 리간드 결합 파트너는 제제(예: 선택제 또는 자극제)에 존재하는 결합 파트너 C 일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 예컨대 서열번호: 10에 제시된 서열을 함유하는, 서열번호 9에 제시된 일반 화학식을 갖는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩타이드 서열은 서열번호 11에 제시된, 예컨대 서열번호 12에 제시된 일반 화학식을 갖는다. 일 실시예에서, 결합 펩타이드 서열은 Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(Strep-tag®라고도 함, 서열번호 7에 제시됨)이다. 일 실시예에서, 결합 펩타이드 서열은 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(Strep-tag® II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨)이다. 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 적어도 2개의 스트렙타비딘-결합 모듈의 순차적 배열을

함유하며, 상기 2개의 모듈 사이 거리는 적어도 0 내지 50개 이하의 아미노산이고, 상기 하나의 결합 모듈은 3 내지 8개의 아미노산을 가지며 적어도 His-Pro-Xaa (서열번호 9) 서열을 함유하고, 여기서 상기 Xaa는 글루타민, 아스파라긴 또는 메티오닌이며, 상기 기타 결합 모듈은 동일하거나 상이한 스트렙타비딘 펩타이드 리간드(예컨대, 서열번호 11에 제시됨)를 갖는다(예를 들어, 국제 공개된 PCT 출원 번호 W002/077018; 미국 특허 번호 7,981,632 참조). 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 서열번호: 13 또는 14 중 어느 하나에 제시된 화학식을 갖는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 서열번호 15 내지 19 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0474] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 스트렙타비딘 뮤테인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 야생형 스트렙타비딘 또는 이의 생물학적 활성 부분과 비교하여, 하나 이상의 돌연변이(예: 아미노산 치환)를 함유한다. 예를 들어, 스트렙타비딘의 생물학적 활성 부분은 N- 및/또는 C-말단에서 짧아진 스트렙타비딘 변이체를 포함할 수 있으며, 이는 경우에 따라 미니멀 스트렙타비딘이라고 불린다. 일부 구현예에서, 임의의 돌연변이가 생성될 수 있는 N-말단 단축 미니멀 스트렙타비딘은, 서열번호 1에 제시된 서열과 비교하여 아미노산 위치 10 내지 16의 영역에서 N-말단으로 시작하고 아미노산 위치 133 내지 142의 영역에서 C-말단으로 종결된다. 일부 구현예에서, 임의의 돌연변이가 생성될 수 있는 N-말단 단축 스트렙타비딘은 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 미니멀 스트렙타비딘은 위치 Ala13 내지 Ser139의 아미노산 서열을 함유하고, 선택적으로 Ala13 대신 N-말단 메티오닌 잔기를 가진다. 본원의 목적을 위하여, 아미노산 위치의 넘버링은 서열번호 1에 제시된 wt-스트렙타비딘의 넘버링을 기준으로 한다(예를 들어, Argarana et al., *Nucleic Acids Res.* 14 (1986), 1871-1882, 도 3 참조).

[0475] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 미국 특허 제6,103,493호에 기술된 바와 같은 돌연변이이다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 서열, 예컨대 서열번호 1에 제시된 서열에 기초한, 아미노산 위치 44 내지 53의 영역 내에서 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 하나 이상의 잔기 44, 45, 46 및/또는 47에서 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 위치 44에서 Glu를 소수성 지방족 아미노산, 예컨대 Val, Ala, Ile 또는 Leu, 위치 45의 임의의 아미노산, 위치 46의 소수성 지방족 아미노산과 같은 지방족 아미노산으로의 치환 및/또는 위치 47에서 Val을 염기성 아미노산, 예컨대 Arg 또는 Lys, 일반적으로 Arg으로의 치환을 함유한다. 일부 구현예에서, Ala는 위치 46에 있고 및/또는 Arg은 위치 47에 있고 및/또는 Val 또는 Ile은 위치 44에 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호: 3 또는 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 예시적 스트렙타비딘 뮤테인(스트렙타비딘 뮤테인 1, SAM1로도 알려짐)으로 제시된 것과 같은, 잔기 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호: 5 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 예시적 스트렙타비딘 뮤테인(SAM2로도 알려짐)으로 제시된 것과 같은, 잔기 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷를 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 예컨대 미국 특허 6,103,493에 기술된 것 및 상표 Strep-Tactin®으로 상업적으로 이용 가능한 것이다

[0476] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 국제 공개된 PCT 출원 제W0 2014/076277호에 기술된 바와 같은 돌연변이체이다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 기재된 아미노산 위치를 기준으로 아미노산 위치 44 내지 53의 영역에 적어도 2개의 시스테인 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, 시스테인 잔기들은 위치 45 및 52에 존재하여 이들 아미노산을 연결하는 이황화 결합을 생성한다. 그러한 구현예에서, 아미노산 44는 전형적으로 글리신 또는 알라닌이고, 아미노산 46은 전형적으로 알라닌 또는 글리신이며, 아미노산 47은 전형적으로 아르기닌이다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 기재된 아미노산 위치를 기준으로 아미노산 잔기 115 내지 121의 영역에서 적어도 하나의 돌연변이 또는 아미노산 차이를 가진다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 아미노산 위치 117, 120 및 121에서 적어도 하나의 돌연변이, 및/또는 118 및 119 아미노산의 결실 및 적어도 아미노산 위치 121에서의 치환을 함유한다.

[0477] 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 위치 117에 상응하는 위치에서 Trp, Tyr 또는 Phe과 같은 큰 소수성 잔기 또는 Glu, Asp 또는 Arg과 같은 하전된 잔기 또는 Asn 또는 Gln과 같은 친수성 잔기, 또는 경우에 따라, Leu, Met 또는 Ala과 같은 소수성 잔기, 또는 Thr, Ser 또는 His과 같은 극성 잔기가 될 수 있는 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 위치 117에서의 돌연변이는, 위치 120에 상응하는 위치에서의 Ser 또는 Ala 또는 Gly과 같은 작은 잔기일 수 있는 돌연변이, 및 위치 121에 상응하는 위치에서의 Trp, Tyr 또는 Phe과 같은 부피가 큰 소수성 잔기 등의 소수성 잔기일 수 있는 돌연변이와 조합된다. 일부 구현예에서, 위치 117에서의 돌연변이는, 서열번호 1에 제시된 야생형 스트렙타비딘 또는 그의 생물학적 활성 단편의 위치 120에 상응하는 위

치에서의 Leu, Ile, Met 또는 Val, 또는 일반적으로는 Tyr 또는 Phe과 같은 소수성 잔기일 수 있는 돌연변이, 및 서열번호 1에 제시된 야생형 스트렙타비딘 또는 그의 생물학적 활성 단편의 위치와 비교하여 위치 121에 상응하는 위치에서의 Gly, Ala 또는 Ser과 같은 작은 잔기, 또는 Gln, 또는 Leu, Val, Ile, Trp, Tyr, Phe 또는 Met과 같은 소수성 잔기일 수 있는 돌연변이와 조합된다. 일부 구현예에서, 이러한 뮤테인은 또한 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 잔기 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 잔기를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 Val⁴⁴, Thr⁴⁵, Ala⁴⁶, Arg⁴⁷, Glu¹¹⁷, Gly¹²⁰ 및 Tyr¹²¹ 잔기를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 뮤테인 스트렙타비딘은 서열번호 27 또는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 27 또는 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과인 아미노산 서열을 함유하고, Val⁴⁴, Thr⁴⁵, Ala⁴⁶, Arg⁴⁷, Glu¹¹⁷, Gly¹²⁰ 및 Tyr¹²¹ 잔기를 함유하며 비오틴, 비오틴 유사체 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드에 결합하는 기능적 활성을 나타낸다.

[0478] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 임의의 조합으로 임의의 상기 돌연변이를 함유할 수 있고, 생성된 스트렙타비딘 뮤테인은 펩타이드 리간드

[0479] (Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; Strep-tag®라고도 함, 서열번호 7에 제시됨)에 대해 2.7×10^{-4} M 미만 및/또는 펩타이드 리간드 (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; Strep-tag®II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨)에 대해 1.4×10^{-4} M 미만, 및/또는 임의의 서열번호 7 내지 19에 제시된 임의의 펩타이드 리간드에 대해 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M 또는 1×10^{-7} M 미만, 그러나 일반적으로 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M 초과인 결합 친화도를 나타낼 수 있다.

[0480] 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 3 내지 6, 27 또는 28 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 3 내지 6, 27 또는 28 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열과의 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 아미노산 서열을 나타내며, 펩타이드 리간드 (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag®라고도 함, 서열번호 7에 제시됨)에 대해 2.7×10^{-4} M 미만 및/또는 펩타이드 리간드 (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag®II라고도 함, 서열번호 8에 제시됨)에 대해 1.4×10^{-4} M 미만, 및/또는 임의의 서열번호 7 내지 19에 제시된 임의의 펩타이드 리간드에 대해 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M 또는 1×10^{-7} M 미만, 그러나 일반적으로 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M 초과인 결합 친화도를 나타낼 수 있다.

[0481] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 3 내지 6, 27 또는 28 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열번호 7 내지 19 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열번호 7 내지 19 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 3 내지 6, 27 또는 28 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열번호 16에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0482] 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 또한 기타 스트렙타비딘 리간드, 예컨대 비오틴, 이미노비오틴, 리포산, 테스티오비오틴, 디아미노비

[0483] 오틴, HABA (hydroxyazobenzene-benzoic acid) 및/또는 디메틸-HABA 등에 대한 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 기타 스트렙타비딘 리간드, 예컨대 비오틴 또는 테스티오비오틴에 대한 결합 친화도를 나타내며, 이는 서열번호 7 내지 19 중 임의의 것에 제시된 것과 같은 비오틴 모방체 펩타이드 리간드에 대한 스트렙타비딘 뮤테인의 결합 친화도보다 크다. 따라서, 일부 구현예에서, 비오틴 또는 비오틴 유사체 또는 유도체(예: 테스티오비오틴)가 상기 제공된 방법에서 경쟁제로 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 예시로서, Strep-tactin®으로 명명된 뮤테인 스트렙타비딘(예: 서열번호 4에 제시된 서열을 함유함)과 Strep-tag® II로 명명된 펩타이드 리간드(예: 서열번호 8에 제시됨)의 상호 작용은 비오틴-스트렙타비딘 상호 작용에 대한 대략 10^{-13} M과 비교하여 대략 10^{-6} M의 K_D 의 결합 친화도를 특징으로 한다. 일부 경우에, Strep-tactin®에 대해 (약)

10^{-10} 내지 10^{-13} M의 K_D 의 높은 친화도로 결합할 수 있는 비오틴은 결합 부위에 대해 Strep-tag® II와 경쟁할 수 있다.

- [0484] 일부 경우에, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 전이 금속 이온에 결합할 수 있는 적어도 2개의 킬레이트 그룹 K를 함유한다. 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 올리고히스티딘 친화도 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 칼모둘린 또는 이의 유사체, 칼모둘린 결합 펩타이드(CBP), FLAG-펩타이드, HA-태그, 말토오스 결합 단백질(MBP), HSV 에피토프, myc 에피토프 및/또는 비오틴화 수송 단백질에 결합할 수 있다.
- [0485] 일부 구현예에서, 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 올리고머 또는 폴리머이다. 일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 모노머의 개별 분자들 또는 개별 분자를 구성하는 서브유닛들의 복합체를 직접적으로 또는 간접적으로 연결함으로써, 자연적으로 존재하는 단백질의 개별 분자를 직접적으로 또는 간접적으로 연결함으로써(예컨대, 자연적으로 존재하는 단백질의 다이머, 트라이머, 테트라머 등을 직접적으로 또는 간접적으로 연결함으로써) 생성될 수 있다. 예를 들어, 스트렙타비딘 또는 아비딘의 테트라머 호모다이머 또는 헤테로다이머는 개별 올리고머 또는 폴리머의 분자 또는 가장 작은 구성 요소 각각으로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 단백질의 적어도 2개의 개별 분자(예: 2-mer)의 연결을 함유할 수 있거나, 또는 단백질의 개별 분자(예: 모노머, 테트라머)의 적어도 3-mer, 4-mer, 5-mer, 6-mer, 7-mer, 8-mer, 9-mer, 10-mer, 11-mer, 12-mer, 13-mer, 14-mer, 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 25-mer, 30-mer, 35-mer, 40-mer, 45-mer 또는 50-mer일 수 있다.
- [0486] 올리고머는 해당 기술 분야에 공지된 임의의 방법, 예컨대 공개된 미국 특허 출원 번호 US2004/0082012에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 다당류 또는 이작용성 링커 등에 의해 가교 결합될 수 있는 개별 분자를 2개 이상 함유한다.
- [0487] 일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 다당류의 존재 하에 개별 분자 또는 개별 분자를 구성 하는 서브유닛의 복합체를 가교 결합함으로써 수득된다. 일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 다당류(예: 텍스트란)에 카복실 잔기를 도입함으로써 제조될 수 있다. 일부 측면에서, 시약의 개별 분자(예: 모노머, 테트라머)는 통상적인 카르보디이미드 화학을 사용하여 내부 리신 잔기의 1차 아미노 그룹 및/또는 유리된 N-말단을 통해 텍스트란 백본의 카복실 그룹에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 연결 반응은 텍스트란 1몰 당 약 60몰의 시약의 개별 분자(예: 모노머, 테트라머)의 몰비로 수행된다.
- [0488] 일부 구현예에서, 시약은 하나 이상의 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 임의의 유사체 또는 뮤테인(예: Strep-Tactin® 또는 Strep-Tactin®XT) 또는 아비딘의 유사체 또는 뮤테인(예: 뉴트라비딘)의 올리고머 또는 폴리머이다. 일부 구현예에서, 결합 부위 Z는 개별 분자(예: 4개의 결합 부위 Z를 함유하는 테트라머) 내에 4개 이하의 결합 부위가 존재할 수 있는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 천연 비오틴 결합 부위이고, 여기서 호모-테트라머는 4개 이하의 동일한, 즉, Z1인 결합 부위를 함유할 수 있는 반면, 헤테로-테트라머는 4개 이하의 상이한, 예를 들어, Z1 및 Z2를 함유하는 결합 부위를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고머는 동일한 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인의 복수의 개별 분자(예: 복수의 호모-테트라머)로부터 생성되거나 제조되며, 이 경우에서 올리고머의 각각의 결합 부위 Z(예: Z1)은 동일하다. 예를 들어, 일부 경우에, 올리고머는 복수의 결합 부위 Z1, 예컨대 적어도 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, 50개 또는 그 이상의 결합 부위 Z1을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 올리고머는 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인의 헤테로-테트라머일 수 있는 복수의 개별 분자 및/또는 결합 부위 Z(예: Z1 및 Z2)가 상이한 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인의 복수의 상이한 개별 분자(예: 상이한 호모-테트라머) 2개 이상으로부터 생성되거나 제조되며, 이 경우에서 복수의 상이한 결합 부위 Z(예: Z1 및 Z2)는 올리고머에 존재할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 올리고머는 복수의 결합 부위 Z1 및 복수의 결합 부위 Z를 포함할 수 있으며, 이들은 조합하여, 적어도 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, 50개 또는 그 이상의 조합된 결합부위 Z1 및 Z2를 함유할 수 있다.
- [0489] 일부 경우에, 개별 올리고머 또는 폴리머는 다당류에 의해 가교 결합될 수 있다. 일 구현예에서, 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 유사체 또는 아비딘의 유사체(예: 뉴트라비딘)의 올리고머 또는 폴리머는 다당류(예: 텍스트란)에 카복실 잔기를 도입함으로써 제조될 수 있으며, 이는 제1 단계에서 Noguchi, A, et al, Bioconjugate Chemistry (1992) 3,132-137에 필수적으로 기술된 바와 같다. 그러한 일부 측면에서, 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 이들의 유사체는 이후 통상적인 카르보디이미드 화학을 사용하여 내부 리신 잔기의 1차 아

미노 그룹 및/또는 유리 N-말단을 통해 텍스트란 백본의 카복실 그룹에 연결될 수 있다. 일부 경우에, 가교 결합된 스트랩타비딘 또는 아비딘 또는 스트랩타비딘 또는 아비딘의 임의의 유사체의 올리고머 또는 폴리머는 또한 글루타르디알데하이드와 같은 링커로서 작용하는 이작용성 분자를 통해 가교 결합함으로써, 또는 해당 기술 분야에서 기술된 기타 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0490]

일부 구현예에서, 올리고머 또는 폴리머는 글루타르디알데하이드와 같은 이작용성 링커 또는 기타 화학적 링커를 사용하여 개별 분자를 개별 분자를 구성하는 서브유닛들의 복합체를 가교 결합함으로써, 또는 해당 기술 분야에 공지된 기타 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 측면에서, 가교 결합된 스트랩타비딘 또는 아비딘 또는 스트랩타비딘 또는 아비딘의 임의의 뮤테인 또는 유사체의 올리고머 또는 폴리머는 글루타르디알데하이드와 같은 링커로 작용하는 이작용성 분자를 통해 개별 스트랩타비딘 또는 아비딘 분자들을 교차 결합함으로써, 또는 해당 기술 분야에 기술된 기타 방법에 의해 수득될 수 있다. 예를 들어, 스트랩타비딘 뮤테인에 티올 그룹을 도입함으로써 (이는, 예컨대 스트랩타비딘 뮤테인을 2-이미노티올란 (Trauts 시약)으로 반응시킴으로써 수행될 수 있음), 및 예를 들어 별개의 반응으로, 스트랩타비딘 뮤테인에서 아미노 그룹을 이용 가능하도록 활성화시킴으로써 스트랩타비딘 뮤테인의 올리고머를 생성하는 것이 가능하다. 일부 구현예에서, 아미노 그룹의 이러한 활성화는 스트랩타비딘 뮤테인과 상업적으로 이용 가능한 헤테로 이작용성 가교 결합 제제, 예컨대 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트 (술포 SMCC) 또는 석신이미딜-6-[(β 말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트] (SMPH)와의 반응에 의해 달성될 수 있다. 일부 그러한 구현예에서, 이와 같이 수득된 두 반응의 산물은 함께 혼합되어, 조작된 스트랩타비딘 뮤테인의 한 배치에 함유된 티올 그룹과 조작된 스트랩타비딘 뮤테인의 또 다른 배치의 (예컨대, 말레이미드 기능에 의해) 활성화된 아미노산의 반응을 전형적으로 유도한다. 일부 경우에, 상기 반응에 의해, 스트랩타비딘 뮤테인의 멀티머/올리고머가 형성된다. 이들 올리고머는 개별 분자의 임의의 적절한 수, 예컨대 적어도 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, 50개 또는 그 이상을 가질 수 있고, 상기 올리고머화 정도는 반응 조건에 따라 바뀔 수 있다.

[0491]

일부 구현예에서, 상기 올리고머 또는 폴리머 시약(예: 선택 시약 또는 자극 시약)은 크기 배제 크로마토그래피를 통해 분리될 수 있고, 임의의 원하는 분획은 시약으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 스트랩타비딘 뮤테인을 2-이미노티올란 및 술포 SMCC와 같은 헤테로 이작용성 가교 결합 제제의 존재 하에 반응시킨 후, 상기 올리고머 또는 폴리머 시약은 크기 배제 크로마토그래피를 통해 분리될 수 있으며, 임의의 원하는 부분은 시약으로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머는 단일 분자량을 가지지 않으나 (가질 필요도 없음), Gaussian 분포 등의 통계적 중량 분포를 관찰할 수 있다. 일부 경우에, 3개 이상의 스트랩타비딘 또는 뮤테인 테트라머, 예컨대 호모테트라머 또는 헤테로테트라머를 가지는 임의의 올리고머는 일반적으로 3 내지 50 테트라머, 예컨대 호모테트라머 또는 헤테로테트라머, 10 내지 40 테트라머, 예컨대 호모테트라머 또는 헤테로테트라머, 또는 25 내지 35 테트라머, 예컨대 호모테트라머 또는 헤테로테트라머인 가용성 시약으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 올리고머는 3 내지 25 개의 스트랩타비딘 뮤테인 테트라머, 예컨대 호모테트라머 또는 헤테로테트라머를 가질 수 있다. 일부 측면에서, 스트랩타비딘 뮤테인에 대해 약 50 kDa의 분자량을 가지는 가용성 올리고머는 약 150 kDa 내지 약 2000 kDa, 약 150 kDa 내지 약 1500 kDa, 약 150 kDa 내지 약 1250 kDa, 약 150 kDa to 1000 kDa, 약 150 kDa 내지 약 500 kDa or 약 150 kDa 내지 약 300 kDa, 약 300 kDa 내지 약 2000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 1500 kDa, 약 300 kDa 내지 약 1250 kDa, 약 300 kDa to 1000 kDa, 약 300 kDa 내지 약 500 kDa, 약 500 kDa 내지 약 2000 kDa, 약 500 kDa 내지 약 1500 kDa, 약 500 kDa 내지 약 1250 kDa, 약 500 kDa to 1000 kDa, 약 1000 kDa 내지 약 2000 kDa, 약 1000 kDa 내지 약 1500 kDa, 약 1000 kDa 내지 약 1250 kDa, 약 1250 kDa 내지 약 2000 kDa 또는 약 1500 kDa 내지 약 2000 kDa의 분자량을 가질 수 있다. 일반적으로, 각각의 스트랩타비딘 분자/뮤테인은 4개의 비오틴 결합 부위를 가지기 때문에, 이러한 시약은 12 내지 160개의 결합 부위 Z, 예컨대 12 내지 100개의 결합 부위 Z를 제공할 수 있다.

[0492]

a. 올리고머 자극 시약

[0493]

특정 구현예에서, 자극 시약은 하나 이상의 자극제에 콘쥬게이트, 연결(linked) 또는 부착된 올리고머 자극 시약, 예를 들어 스트랩타비딘 뮤테인 시약을 함유한다. 전술된 것과 같이, 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)에서 올리고머 자극 시약에 결합할 수 있는 부착된 결합 도메인 또는 결합 파트너(예를 들어, 결합 파트너C)를 갖는다. 일부 구현예에서, 복수의 자극제는 올리고머 자극 시약에 가역적으로 결합된다. 다양한 구현예에서, 올리고머 자극 시약은, 특정 구현예에서 결합 도메인(예를 들어, 결합 파트너 C)에서 복수의 자극제에 가역적으로 결합되는 복수의 특정 결합 부위, Z를 갖는다. 일부 구현예에서, 결합된 제제의 양은, 경쟁제, 예를 들어 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)에 또한 결합할 수 있는 제제

의 존재 하에 감소하거나 줄어든다.

- [0494] 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은, 적어도 하나의 자극제(예를 들어, 세포, 예컨대 T 세포에서 신호를 생성할 수 있는 자극제)가 올리고머 자극
- [0495] 시약과 연합, 예를 들어 가역적으로 연합하는 가역적 시스템이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 시약은 자극제에 결합, 예를 들어 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 경우에, 시약은, T 세포와 같은 세포에서 신호(예를 들어, 자극 신호)를 생성할 수 있는 하나 이상의 부착된 체제를 갖는 올리고머 자극 시약이다. 일부 구현예에서, 자극제는 분자의 에피토프 또는 영역(예컨대, 세포 표면 분자 또는 수용체)에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 부위, 예를 들어 결합 부위 B를 함유하고, 올리고머 자극 시약의 적어도 하나의 결합 부위, 예를 들어 시약의 결합 부위 Z에 특이적으로 결합하는 결합 파트너(여기에서 결합 파트너 C로도 지칭됨)를 또한 함유한다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C와 하나 이상의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 비공유 상호작용이다. 일부 경우에, 결합 파트너 C와 하나 이상의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 공유 상호작용이다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C와 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용, 예컨대 비공유 상호작용은 가역적이다.
- [0496] 상기 가역적 시스템에서 올리고머 자극 시약으로 사용될 수 있는 물질은 공지되어 있다, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; 및 국제 공개된 PCT 출원 번호 W02013/124474 및 W02014/076277 참조. 가역적 상호작용을 형성할 수 있는 시약 및 결합 파트너, 뿐만 아니라 이러한 결합을 역전시킬 수 있는 물질(예: 경쟁제)의 비제한적 예가 아래에 설명되어 있다.
- [0497] 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘, 아비딘 뮤테인 또는 유사체(예컨대 뉴트라비딘) 또는 이의 혼합물의 올리고머이고, 여기에서 상기 올리고머 자극 시약은 자극제(예를 들어, 결합 파트너 C)의 결합 도메인과 가역적 연합을 위한 하나 이상의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 자극제의 결합 도메인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드; 또는 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 기타 분자일 수 있다.
- [0498] 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극제(예를 들어, T 세포와 같은 세포에서 신호를 생성할 수 있는 체제)는 예컨대, 올리고머 자극 시약에 존재하는 복수의 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)를 통해 올리고머 자극 시약에 가역적으로 결합하는 것과 같이 연합한다. 일부 경우에, 이는 자극제가 서로 밀접하게 배열되는 결과를 초래하여, 만일 자극제에 의해 인식되거나 결합되는 (2 이상의 카피의) 세포 표면 분자를 갖는 표적 세포가 체제와 접촉이 야기될 경우 결합 효과가 발생할 수 있다.
- [0499] 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 스트렙타비딘 올리고머, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머, 스트렙타비딘 유사체 올리고머, 아비딘 올리고머, 아비딘 뮤테인 또는 아비딘 유사체(예컨대 뉴트라비딘)로 구성된 올리고머 또는 이의 혼합물이다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 자극제의 결합 도메인(예를 들어, 결합 파트너 C)에 결합할 수 있는 특정 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘 결합 펩타이드; 또는 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 기타 분자일 수 있다. 올리고머 자극 시약 시스템에 포함되는 것으로 고려되는 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 스트렙타비딘 유사체, 아비딘, 아비딘 뮤테인, 아비딘 유사체(예컨대 뉴트라비딘) 및 결합 도메인 분자(예를 들어, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 스트렙타비딘 결합-펩타이드 또는 기타 분자)의 예는 섹션 II-B에 설명되어 있다. 본원에서 제공된 방법은 올리고머 자극 시약은 올리고히스티딘 친화도 태그, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 칼모듈린 또는 이의 유사체, 칼모듈린 결합 펩타이드(CBP), FLAG-펩타이드, HA-태그, 말토오스 결합 단백질(MPB), HSV 에피토프, myc 에피토프 및/또는 비오틴화 수송 단백질(섹션 II-B 참조)에 결합할 수 있는 분자를 포함할 수 있음이 추가로 고려된다.
- [0500] 특정 구현예에서, 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머로 구성되고/거나 이를 함유하는 올리고머 자극 시약이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 올리고머 자극 시약은 하나 이상의 자극제에 가역적으로 결합하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 반경, 예를 들어, 70 nm 내지 125 nm(수치포함)의 평균 반경; 1×10^7 g/mol 내지 1×10^9 g/mol(수치포함)의 분자량; 및/또는 1,000 내지 5,000개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머(수

치포함)를 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 분자, 예컨대 세포의 표면 상의 수용체에 결합하는 제제와 같은 하나 이상의 자극제에 결합, 예를 들어 가역적으로 결합된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 본원, 예를 들어 섹션 II-B에 기술된 제제이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 1가 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 B)를 함유한다. 일부 구현예에서, 1가 결합부위는 CD3에 결합한다. 일부 구현예에서, 1가 결합 부위는 예를 들어, 본원에 기술된 공자극 분자에 결합한다. 일부 구현예에서, 1가 결합부위는 CD28에 결합한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 CD3 및/또는 CD28에 결합할 수 있는 1가 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 자극제는 예를 들어 결합 파트너, C, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예컨대 Strep-tag® II를 함유하는 항체 또는 이의

[0501] 항원 결합 단편과 같은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어 Strep-tag® II를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 W02015/158868 또는 W02018/197949에 기재된 바와 같은 임의의 것이다.

[0502] 일부 구현예에서, 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머로 구성되고/거나 이를 함유하는 올리고머 자극 시약이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 올리고머 자극 시약은 하나 이상의 자극제에 가역적으로 결합하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 올리고머 입자는 반경, 예를 들어, 80 nm 내지 120 nm(수치포함)의 평균 반경; 분자량, 예를 들어, 7.5×10^6 g/mol 내지 2×10^8 g/mol(수치포함)의 평균 분자량; 및/또는 양, 예를 들어, 500 내지 10,000개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머(수치포함)의 평균량을 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 분자, 예를 들어 세포의 표면 상의 수용체에 결합하는 제제와 같은 하나 이상의 자극제에 결합, 예를 들어 가역적으로 결합된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극제는 본원, 예를 들어 섹션 II-B에 기술된 제제이다. 일부 구현예에서, 자극제는 예를 들어 결합 파트너, C, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예컨대 Strep-tag® II를 함유하는 항체 또는 이의

[0503] 항원 결합 단편과 같은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어 Twin-Strep-태그, (예를 들어, 서열번호 16)를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab이다.

[0504] 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 0.01 µg, 0.02 µg, 0.03 µg, 0.04 µg, 0.05 µg, 0.1 µg, 0.2 µg, 0.3 µg, 0.4 µg, 0.5 µg, 0.75 µg, 1 µg, 2 µg, 2.2 µg, 2.4 µg, 2.6 µg, 2.8 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 또는 10 µg 또는 적어도 0.01 µg, 0.02 µg, 0.03 µg, 0.04 µg, 0.05 µg, 0.1 µg, 0.2 µg, 0.3 µg, 0.4 µg, 0.5 µg, 0.75 µg, 1 µg, 2 µg, 2.2 µg, 2.4 µg, 2.6 µg, 2.8 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 또는 10 µg의 올리고머 자극 시약

[0505] (예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 4 µg의 존재 하에 자극된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 0.8 µg의 존재 하에 자극된다. 특정 측면에서, 4 µg의 올리고머 자극 시약은 3 µg의 올리고머 입자 및 1 µg의 부착제, 예를 들어 0.5 µg의 항-CD3 Fab 및 0.5 µg의 항-CD28 Fab이거나 이를 포함한다.

[0506] 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 3 µg의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 2.75 µg의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 2.5 µg의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 2.25 µg의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨쥬게이트된 스트렙타비

단-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 2 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 1.8 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 1.6 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 1.4 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 1.2 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 1 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 0.8 μg 의 올리고머 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 컨주게이트된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 10×10^8 , 9×10^8 , 8×10^8 , 7×10^8 , 6×10^8 , 5×10^8 , 4×10^8 , 3×10^8 , 2×10^8 , 1×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 7×10^8 , 6×10^8 , 5×10^8 , 4×10^8 , 3×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 7×10^8 내지 3×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 6×10^8 내지 4×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 6×10^8 내지 5×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 5×10^8 의 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다.

[0507] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 샘플의 선택된 세포는 (약) 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1.25:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 0.9:1, 0.8:1, 0.75:1, 0.67:1, 0.5:1, 0.3:1, 또는 0.2:1 비율의 올리고머 자극 시약 대 세포 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약 대 세포의 비율은 2.5:1 내지 0.2:1, 2:1 내지 0.5:1, 1.5:1 내지 0.75:1, 1.25:1 내지 0.8:1, 1.1:1 내지 0.9:1이다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 1:1이다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 0.3:1이다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 0.2:1이다.

[0508] C. 크로마토그래피에 의한 세포 선택

[0509] 본원에 개시된 장치를 사용하여, 샘플의 세포, 예를 들어 T 세포가 크로마토그래피 분리, 예컨대 친화성 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 선택되는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 표적 세포, 예를 들어 분리, 선택 또는 농축될 세포의 표면에 위치하는 선택 마커에 결합하는 선택제를 사용한다. 이러한 방법은 (흔적없는(traceless)) 세포 친화성 크로마토그래피 기술(CATCH)로 기술될 수 있으며, PCT 출원번호 W02013124474 및 W02015164675에 기술된 임의의 방법 또는 기술을 포함할 수 있으며, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 선택제의 예는 섹션 II-B-1에 기재되어 있다.

[0510] 임의의 이전 구현예에서, 상기 샘플은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술(apheresis) 생성물 또는 백혈구 성분채집술(leukapheresis) 생성물이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 분리된 것이다. 다른 구현예에서, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동

된 것이다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 T 세포이다.

- [0511] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어, 표적 세포는 세포 표면 상에 본원에 기재된 바와 같은 선택 마커를 갖거나 발현하여, 단리, 선택 또는 농축될 세포가 적어도 하나의 공통 특이적 수용체 분자의 존재에 의해 정의된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 또한 선택 마커 없는 추가 세포를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, T 세포는 다중 세포 유형, 예를 들어 적혈구 또는 B 세포를 함유하는 샘플로부터 선택, 단리 또는 농축된다.
- [0512] 일부 구현예에서, 선택제는 크로마토그래피 컬럼에 포함되고, 예를 들어 상기 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 선택제는 샘플이 컬럼에 첨가될 때 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 존재한다. 일부 구현예에서, 선택제는 시약, 예를 들어 선택 시약을 통해 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 간접적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 컬럼의 고정상에 공유 또는 비공유 결합된다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상) 상에 가역적으로 고정된다. 일부 경우에, 선택 시약은 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상) 상에 공유결합을 통해 고정된다. 일부 구현예에서, 선택 시약은 비공유적으로 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상) 상에 가역적으로 고정된다.
- [0513] 일부 구현예에서, 선택제는 예를 들어, 샘플이 크로마토그래피 컬럼 (예를 들어, 고정상)에 첨가될 때 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상) 상에 직접적(예를 들어 공유 또는 비공유) 또는 선별 시약을 통하여 간접적으로 결합하여 존재할 수 있다. 따라서, 샘플을 첨가하면 표적 세포는 선택제에 의해 결합되고 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상) 상에 고정될 수 있다. 대안적으로, 일부 구현예에서, 선택제는 샘플에 첨가될 수 있다. 이러한 방식으로, 선택제는 샘플에서 표적 세포(예를 들어, T 세포)에 결합하고, 샘플은 선택 시약을 포함하는 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 첨가될 수 있으며, 여기서 선택제는 이미 상기 표적 세포에 결합되며, 선택 시약에 결합하고, 이에 의해 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상) 상에 표적 세포를 고정한다. 일부 구현예에서, 선택제는 선택제에 포함된 본원에 기술된 바와 같은 결합 파트너 C를 통해 본원에 기술된 선택 시약에 결합한다.
- [0514] 일부 구현예에서, 2 개 이상의 선택제는 예를 들어 선택 시약에 존재하는 하나 또는 복수의 결합 부위 Z를 통해 선택 시약에 가역적으로 또는 비가역적으로 결합되는 것과 같이 결합한다. 일부 경우에, 이는 세포 표면 분자(예를 들어, 선택 마커)를 (적어도 2부(two copies)) 갖는 표적 세포가 특정 분자(예를 들어, 선택 마커)에 결합할 수 있는 선택제에 접촉되면 결합 효과가 발생할 수 있도록 선택제가 서로 밀접하게 배열되도록 한다.
- [0515] 일부 구현예에서, 동일한, 즉 동일한 선택 마커 결합 특이성을 갖는
- [0516] 둘 이상의 상이한 선택제는 선택 시약에 가역적으로 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 선택제, 및 일부 경우에는 상이한 선택 마커에 결합하는 3 개 또는 4 개의 상이한 선택제를 사용하는 것이 가능하다. 일부 측면에서, 적어도 2개의 선택제 각각은 제1 분자, 제2분자 등과 같은 상이한 분자(예를 들어, 선택 마커)에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 세포 표면 분자와 같은 상이한 분자(예: 선택제)는 동일한 표적 세포 상에 존재할 수 있다. 다른 경우에, 세포 표면 분자와 같은 상이한 분자(예: 선택 마커)는 동일한 세포 집단에 존재하는 상이한 표적 세포에 존재할 수 있다. 일부 경우에, 제3, 제4 등의 선택제는 각각 추가로 상이한 결합 부위를 함유하는 동일한 시약에 연관될 수 있다.
- [0517] 일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 선택제는 동일한 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 상이한 선택제는 상이한 결합 파트너 C를 함유한다. 일부 측면에서, 제1 선택제는 선택 시약에 존재하는 결합 부위 Z1에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너 C1을 가질 수 있고, 제2 선택제는 선택 시약에 존재하는 결합 부위 Z1 또는 결합 부위 Z2에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너 C2를 가질 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 선택 시약에 포함된 복수의 결합 부위 Z는 선택제에 포함된 결합 파트너 C1 및 C2에 각각 가역적으로 결합할 수 있는 결합 부위 Z1 및 Z2를 포함한다. 일부 구현예에서, C1 및 C2는 동일하고/거나 Z1 및 Z2는 동일하다. 다른 측면에서, 하나 이상의 복수의 결합 부위 Z는 상이할 수 있다. 다른 경우에, 하나 이상의 복수의 결합 부위 C는 상이할 수 있다. 각각의 결합 파트너 C가 하나의 결합 부위 Z를 가지고 특이적으로 결합하는 것과 같은 상호 작용을 할 수 있는 한, 결합 부위 Z를 함유하는 선택 시약과 호환되는 상이한 결합 파트너 C의 임의의 조합을 선택하는 것은 통상의 기술자 수준 내이다.
- [0518] 일부 구현예에서, 결합 파트너 C 및 결합 부위 Z 사이에 형성된 가역적 결합은 경쟁제 및/또는 자유 결합제에 의해 파괴될 수 있다. 일부 구현예에서, 경쟁제 및/또는 자유 결합제는 하나 이상의 결합 부위 Z에 대한 결합

파트너 C와의 결합에 경쟁할 수 있는 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드일 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C 및 경쟁제 및/또는 자유 결합체는 상이하고, 상기 경쟁제 및/또는 자유 결합체는 결합 파트너의 친화도에 비해 하나 이상의 결합 부위 Z에 대해 더 높은 결합 친화도를 나타낸다. 본원에 제공된 임의의 방법의 특정 측면에서, 선택 시약에 선택제의 결합을 파괴하기 위하여 크로마토그래피 컬럼의 고정상에 경쟁제 및/또는 자유 결합체를 추가하는 것은 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)로부터 표적 세포(예를 들어, T 세포)를 분리하는 데 필요하지 않다.

[0519] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 샘플의 표적 세포는 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)로부터 남아 있는 샘플을 행구거나, 방출하거나, 세척함으로써 샘플로부터 대폭 감소할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6)의 세척 단계는 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)으로부터 비결합 세포 및 파편을 제거하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 샘플은 하나 이상의 세척 단계가 수행되기 전에 적어도 5, 10, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 120 분, 또는 약 5, 10, 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 120 분 동안 매트릭스에 침투하도록 허용된다.

[0520] 임의의 물질은 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)로서 사용될 수 있다. 일반적으로, 적합한 크로마토그래피 물질은 필수적으로 무해하며, 즉 원하는 조건 하에서 패킹된 크로마토그래피 컬럼에서 사용될 때와 같이 세포 생존율에 해롭지 않다. 일부 실시예에서, 상기 고정상은 미리 정의된 적소(position)와 같은 미리 정의된 위치(location)에 남아있는 반면, 샘플의 위치(location)는 변경된다. 따라서, 일부 구현예에서 상기 고정상은 이동상이 플로우-쓰루(flow through)에 의해 또는 배치 모드로 통과하며, 상 사이에 (용해된 또는 분산된) 액체상에 함유된 성분의 분포가 발생하는 크로마토그래피의 일부이다.

[0521] 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 고상 또는 반고상 형태를 갖는 반면에, 단리/분리될 표적 세포를 함유하는 샘플은 유체상이다. 크로마토그래피 매트릭스는 미립자 물질(임의의 적절한 크기 및 형상) 또는 종이 기재 또는 멤브레인을 포함하는 모놀리식 크로마토그래피 물질일 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 크로마토그래피는 평면 크로마토그래피 뿐만 아니라 컬럼 크로마토그래피 일 수 있다. 일부 구현예에서, 표준 크로마토그래피 컬럼에 더하여, PhyNexus, Inc. San Jose, CA, U.S.A.에서 입수 할 수 있는 PhyTip[®] 컬럼과 같은 양방향 흐름을 허용하는 컬럼 또는 파이펫 팁은 컬럼 기반/플로우 스루 모드 기반 방법에 사용할 수 있다. 따라서, 일부 경우에, 파이펫 팁 또는 양방향 흐름을 허용하는 컬럼 또한 본 방법에 유용한 크로마토그래피 컬럼에 포함된다. 일부 경우에, 예를 들어 미립자 매트릭스 물질이 사용되는 경우, 미립자 매트릭스 물질은 예를 들어 약 5 μm 내지 약 200 μm, 또는 약 5 μm 내지 약 400 μm, 또는 약 5 μm 내지 약 600 μm의 평균 입자 크기를 가질 수 있다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 매트릭스는 예를 들어 폴리머 레진 또는 금속 산화물 또는 준금속 산화물 이거나 또는 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 평면 크로마토그래피가 사용되는 경우와 같이, 매트릭스 물질은 통상적인 셀룰로스-기반 또는 유기 폴리머 기반 멤브레인(예를 들어, 종이 멤브레인, 니트로셀룰로스 멤브레인 또는 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF) 멤브레인) 또는 실리카 코팅 유리판과 같은 평면 크로마토그래피에 적합한 임의의 물질 일 수 있다. 일 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스/고정상은 비-자성 물질 또는 비-자화성(non-magnetizable) 물질이다.

[0522] 일부 구현예에서, 본 방법에 적합한 비-자성 또는 비-자화성 크로마토그래피 고정상은 유도된(derivatized) 실리카 또는 가교 결합된 겔을 포함한다. 일부 측면에서, 가교 결합된 겔은 자연에서 발생하는 폴리머 부류와 같은 천연 폴리머를 기반으로 할 수 있다. 예를 들어, 상기 크로마토그래피 고정상이 기반으로 할 수 있는 천연 폴리머는 다당류이다. 일부 경우에, 각각의 다당류는 일반적으로 가교된다. 다당류 매트릭스의 예는 아가로오스 겔(예를 들어, 상이한 비드 및 기공 크기로 시판되는 Superflow[™] Sepharose[®]와 같은 Superflow[™] 아가로스 또는 Sepharose[®] 재료) 또는 가교된 텍스트란(들)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 추가의 구체적인 예시로는 텍스트란이 공유 결합된 미립자 가교 결합 아가로스 매트릭스가 있으며, 이는 Sephadex[®] 또는 Superdex[®]로 (다양한 비드 크기 및 다양한 공극 크기로) 상업적으로 이용 가능하고, 모두 GE Healthcare에서 이용 가능하다. 이러한 크로마토그래피 물질의 또 다른 구체적인 예시로는 GE Healthcare로부터 상이한 비드 및 공극 크기로 또한 이용 가능한 Sephacryl[®]이 있다.

[0523] 일부 구현예에서, 가교 결합된 겔은 자연에서 발생하지 않는 폴리머 부류와 같은 합성 폴리머를 기반으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 고정상이 기반으로 하는 그러한 합성 폴리머는 극성 모노머 유닛을 가지며, 따라서 그 자체가 극성인 폴리머이다. 따라서, 일부 경우에, 그러한 극성 폴리머는 친수성이다. 소수성이라고도 하는 친수성 분자는, 일부 측면에서 물 분자와 쌍극자-쌍극자 상호 작용을 형성할 수 있는 부분을 함유한다. 일반적으로, 친유성이라고도 하는 소수성 분자는, 물로부터 분리되는 경향이 있다.

- [0524] 일반적으로, 크로마토그래피 방법은 유체 크로마토그래피, 전형적으로 액체 크로마토그래피이다. 일부 측면에서, 크로마토그래피는, 세포, 예를 들어 표적 세포를 함유하는 유체 샘플이, 예를 들어 중력 흐름에 의해 또는 크로마토그래피 매트릭스를 함유하는 컬럼의 한쪽 말단에서 펌프에 의해 적용되고, 상기 유체 샘플이 컬럼의 나머지 말단의 컬럼에 존재하는 플로우 스루 모드(flow through mode)로 수행될 수 있다. 또한, 크로마토그래피는, 단리될 세포를 함유하는 유체 샘플이, 예를 들어 파이펫 팁 내에 패키징된 크로마토그래피 매트릭스를 함유하는 컬럼의 한쪽 말단에서 파이펫에 의해 적용되고, 상기 유체 샘플이 들어가서 컬럼의 나머지 다른 말단에 있는 크로마토그래피 매트릭스/파이펫 팁에 존재하는 “상하(up and down)” 방식으로 수행될 수 있다. 대안적으로, 상기 크로마토그래피는 또한 크로마토그래피 물질(고정상)이, 예를 들어 흔들기, 회전 또는 예를 들어 파이펫에 의해 유체 샘플의 반복적인 접촉 및 제거 하에서 세포를 함유하는 샘플과 인큐베이션 되는 배치 모드(batch mode)로 수행될 수 있다.
- [0525] 일부 측면에서, 물질이 세포의 크로마토그래피 단리, 예를 들어 세포의 선택에 적합한 한, 임의의 물질이 본 발명의 맥락에서 크로마토그래피 매트릭스로 사용될 수 있다. 특정 측면에서, 적합한 크로마토그래피 물질은, 세포 단리 및/또는 세포 분리를 위해 원하는 조건 하에서 패키징된 크로마토그래피 컬럼으로 사용될 경우, 세포 생존 능력에 적어도 무해하거나 본질적으로 무해하거나, 예를 들어 유해하지 않다. 일부 측면에서, 크로마토그래피 매트릭스는 미리 정의된 위치(location), 전형적으로 미리 정의된 적소(position)에 남아있는 반면, 분리될 샘플 및 그 안에 포함된 성분의 위치는 변경된다. 따라서, 일부 측면에서, 크로마토그래피 매트릭스는 “고정상(stationary phase)” 이다.
- [0526] 전형적으로 각각의 크로마토그래피 매트릭스는 고상 또는 반-고상 형태를 갖는 반면에, 단리/분리될 표적 세포를 함유하는 샘플은 유체상이다. 크로마토그래피 분리를 달성하는 데 사용되는 이동상은 마찬가지로 유체상이다. 크로마토그래피 매트릭스는 미립자 물질(임의의 적절한 크기 및 형상) 또는 종이 기재 또는 멤브레인을 포함하는 모놀리식 크로마토그래피 물질일 수 있다. 따라서, 크로마토그래피는 평면 크로마토그래피 뿐만 아니라 컬럼 크로마토그래피 일 수 있다. 표준 크로마토그래피 컬럼 외에, 본원에 기재된 바와 같은 컬럼 기반/플로우 스루 모드 기반 세포의 크로마토그래피 분리를 위해 양방향 흐름 또는 파이펫 팁을 허용하는 컬럼이 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 예를 들어 미립자 매트릭스 물질이 사용되는 경우, 미립자 매트릭스 물질은 예를 들어 약 5 μm 내지 약 200 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 400 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 600 μm 의 평균 입자 크기를 가질 수 있다. 일부 측면에서, 평면 크로마토그래피가 사용되고, 매트릭스 물질은 통상적인 셀룰로스-기반 또는 유기 폴리머 기반 멤브레인(예를 들어, 종이 멤브레인, 니트로셀룰로스 멤브레인 또는 폴리비닐리덴디플루오라이드(PVDF) 멤브레인) 또는 실리카 코팅 유리판과 같은 평면 크로마토그래피에 적합한 임의의 물질 일 수 있다.
- [0527] 일부 측면에서, 크로마토그래피 매트릭스/고정상은 비-자성 물질 또는 비-자화성(non-magnetisable) 물질이다. 이러한 물질은 유도된 실리카 또는 가교 결합된 겔을 포함할 수 있다. (전형적으로 비드 형태로 제조된) 가교 결합된 겔은 가교결합된 다당류와 같은 천연 폴리머 기반일 수 있다. 적합한 예시는 아가로오스 겔 또는 가교 결합된 텍스트란(들)의 겔을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 가교 결합된 겔은 합성 폴리머, 즉, 자연에서 발생하지 않는 폴리머 부류를 기반으로 할 수 있다. 일반적으로, 세포 분리를 위하여 크로마토그래피 고정상을 기반으로 하는 그러한 합성 폴리머는 극성 모노머 유닛을 갖는 폴리머이며, 따라서 그 자체가 극성인 폴리머이다.
- [0528] 적합한 합성 중합체의 예시적인 예는 폴리아크릴아미드(들), 스티렌-디비닐벤젠 겔 및 아크릴레이트 및 디올의 공중합체 또는 아크릴아미드 및 디올의 공중합체이다. 예시적인 예는 Fractogel®로 상업적으로 이용가능한, 폴리메타크릴레이트 겔이다. 추가 예는 Toyopearl®로 상업적으로 이용가능한, 에틸렌 글리콜 및 메타크릴레이트의 공중합체이다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 고정상은 또한 천연 및 합성 폴리머 성분, 예컨대 복합 매트릭스 또는 복합물 또는 다당류 및 아가로오스의 공중합체, 예를 들어 폴리아크릴아미드/아가로오스 복합물 또는 다당류 및 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체를 포함할 수 있다. 텍스트란 및 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체의 예시적인 예는 상기 언급된 Sephacryl® 계열 물질이다. 유도된 실리카는 합성 또는 천연 폴리머에 결합된 실리카 입자를 포함할 수 있다. 이러한 구현예의 예시는 다당류 그래프트된 실리카, 폴리비닐-피롤리돈 그래프트된 실리카, 폴리에틸렌 옥사이드 그래프트된 실리카, 폴리(2-히드록시에틸아스파르트아미드) 실리카 및 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 그래프트된 실리카를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0529] 예컨대, 자극제 및/또는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)과 같은 샘플에 존재하는 다른 성분은 기공의 배제 한계 미만의 크기를 가질 수 있고, 이것은 크기 배제 크로마토그래피 매트릭스의 기공에 들어갈 수 있게 한다. 기공 부피에 부분적으로 또는 완전히 들어갈 수 있는 상기 성분 중, 기공 부피에 덜 접근하는 보다 큰

분자는 일반적으로 먼저 용리되는 반면, 가장 작은 분자는 마지막에 용리된다. 일부 구현예에서, 크기 배제 크로마토그래피 매트릭스의 배제 한계는 표적 세포의 최대 폭 미만인 되도록 선택된다. 그러므로, 기공 부피에 접근하는 성분은, 일반적으로 표적 세포 보다 크기 배제 크로마토그래피 매트릭스 내(in)/상(on)에서 더 오래 머무를 것이다. 따라서, 표적 세포는 샘플의 다른 물질/성분과 별개로 크로마토그래피 컬럼의 용리액에서 수집될 수 있다. 따라서, 자극 시약과 같은 성분은 표적 세포보다 겔 여과 매트릭스에서 보다 나중 시점에 용리된다.

[0530] 제공된 구현예에서 사용되는 크로마토그래피 매트릭스는 또한 하나 이상의 자기적 유인 가능 입자 또는 자성 유체와 같은 자기적 유인 가능 물질을 포함할 수 있다. 각각의 자기적 유인 가능 입자는 크로마토그래피 매트릭스 상에 표적 세포에 결합할 수 있고 고정되는 결합 부위를 갖는 선택 시약(예를 들어, 선택제)을 포함할 수 있다. 자기적 유인 가능 입자는 반자성, 강자성, 상자성 또는 초상자성 물질을 함유할 수 있다. 초상자성 물질은 영구 자화를 초래하지 않으면서 유도 자기장이 있는 자기장에 반응한다. 산화철을 기반으로 한 자성 입자는, 예를 들어 Dynal Biotech의 Dynabeads®, Miltenyi Biotec의 자성 마이크로비드, CPG Inc.의 자성 다공성 유리 비드뿐만 아니라 예컨대 Roche Applied Science, BIOCLON, BioSource International Inc., micromod, AMBION, Merck, Bangs Laboratories, Polysciences 또는 Novagen Inc.와 같은 다양한 다른 출처로부터 상업적으로 이용 가능하다. 초상자성 Co 및 FeCo에 기초한 자성 나노 입자 및 강자성 Co 나노 결정은 예를 들어, Hutten, A. et al. (J. Biotech. (2004), 112, 47-63)에 기재되어 있다. 그러나, 일부 구현예에서 본 발명에 이용된 크로마토그래피 매트릭스는 임의의 자기적 유인 가능 물질이 없다.

[0531] 국제 특허 출원 PCT/EP2012/063969(WO 2013/011011로 공개됨)에 따라 (모든 목적을 위해 이의 전문이 여기에 참조로 포함됨), 선택제와 표적 세포 상의 선택 마커 사이의 결합 강도는, 선택제를 통해 선택 시약에 대한 표적 세포의 결합 가역성에 필수적이지 않을 수 있다. 오히려, 결합의 강도와 관계없이, 결합 부위 B를 통한 선택제와 선택 마커 사이의 결합에 대한 해리 상수(K_D)가, 예를 들어, 약 10^{-3} 내지 약 10^{-7} M의 K_D 범위로 낮은 친화성인지, 예를 들어, 약 10^{-7} 내지 약 1×10^{-10} M의 K_D 범위로 높은 친화도인지를 의미하며, 표적 세포는 결합 부위 B를 통한 선택 시약과 수용체 분자의 결합의 해리가 충분히 빠르게 발생하는 한 가역적으로 염색될 수 있다. 이와 관련하여 결합 부위 B를 통한 선택제와 선택제 사이의 결합에 대한 해리 속도 상수(k_{off})는 약 $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 이상의 값을 가질 수 있다(상기 해리 속도 상수는 선택제의 결합 부위 B와 표적 세포 표면 상의 선택 마커 사이에 형성된 복합체의 해리 반응을 특징짓는 상수이다). 선택제의 결합 부위 B와 표적 세포 표면 상의 선택 마커 사이의 결합 반응에 대한 결합 속도 상수(k_{on})는 임의의 값을 가질 수 있다. 선택 마커와 선택제 사이의 충분히 가역적인 결합을 보장하기 위해, 약 $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 이상, 약 $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 이상, 예컨대 (약) $1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 이상, $1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 이상, $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 이상, a $1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 이상, $1 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이상 또는 $5 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 이상의 값을 갖는 결합 평형의 k_{off} 값을 선택하는 것이 유리하다. 본원에 사용된 동역학 및 열역학 상수의 값은 대기압, 즉 1.013 bar 및 실온, 즉 25 °C의 조건을 의미한다는 점에 유의한다.

[0532] 일부 구현예에서, 다수 라운드의 세포 선택 단계가 수행되고, 여기서 한 단계에서 양성 또는 음성 선택된 분획은 후속 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 선택 단계를 거친다. 특정 구현예에서, 선택, 단리, 및 농축을 위한 방법, 기술, 및 시약은 예를 들어 PCT 출원 번호 W02015164675에 기재되며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0533] 일부 구현예에서, 단일 선택 단계는 샘플로부터 표적 세포(예를 들어, CD3+ T 세포)를 단리시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 선택 단계는 단일 크로마토그래피 컬럼에서 수행될 수 있다. 일부 예에서, 단일 선택 단계는 다중 마커를 동시에 발현하는 세포를 대폭으로 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, 여러 세포 유형은 동시에 양성 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 선택 단계가 반복되고 또는 1회 이상 수행되며, 여기서 한 단계로부터 양성 또는 음성 선택된 분획은 반복할 양성 또는 음성 선택과 같은 동일한 선택 단계를 거친다. 일부 예에서, 단일 선택 단계는 반복되고 및/또는 1회 이상 수행되어, 예를 들어 선택된 세포의 순도를 증가시키고 및/또는 음성으로 선택된 분획으로부터 음성으로 선택된 세포를 추가로 제거 및/또는 대폭 감소시킨다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 선택 단계는 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 또는 10회 초과 수행된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 선택 단계는 1회 내지 10회 사이로, 1회 내지 5회 사이로, 또는 3회 내지 4회 사이로 수행되고/거나 반복된다. 일부 구현예에서, 2회의 선택 단계가 수행된다.

- [0534] 세포 선택은 하나 이상 크로마토그래피 컬럼을 이용해 수행된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 폐쇄 시스템에 포함된다. 일부 구현예에서, 폐쇄 시스템은 예를 들어 사용자(예를 들어, 인간) 입력을 최소화하거나 전혀 요구하지 않는 자동화된 폐쇄 시스템이다. 일부 구현예에서, 세포 선택은 순차적으로 수행된다(예를 들어, 순차적 선택 기술). 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 순차적으로 배열된다. 예를 들어, 제1 컬럼은 예를 들어 연결된 배관을 통해서 컬럼의 산출(예를 들어, 용리액)이 제2 크로마토그래피 컬럼에 공급될 수 있도록 배향될 수 있다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼은 순차적으로 배열될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 선택은 순차적인 양성 및 음성 선택 단계를 수행함으로써 달성 될 수 있으며, 후속 단계는 이전 단계의 음성 및/또는 양성 분획을 추가 선택을 처리하고, 여기서 전체 공정은 동일한 튜브 또는 튜브 세트에서 수행된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나를 농축시키기 위해 제1 선택이 수행되고, 제1 선택으로부터 비-선택된 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 다른 것을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로써 사용되는 순차적 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나 또는 둘 모두의 하위 집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 제1 선택이 CD3+ 집단을 농축시키기 위해 수행되며, 선택된 세포가 CD3+ 집단을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로써 사용되는 순차적 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 제1선택이 제1 고정상(예를 들어, 제1 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 CD3+ 집단을 농축시키기 위해 수행되고, 결합되지 않은 세포를 함유하는 흐름이 제2 고정상(예를 들어, 제2 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 CD3+ 집단을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로써 사용되며, 여기서 제1 및 제2 고정상이 순차적으로 배열되는 순차 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3 + 집단의 하위 집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 제1 선택이 CD3+ 집단을 농축시키기 위해 수행되며, 선택된 세포가 CD4+ 집단을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로써 사용되는 순차적 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3+CD4+ 집단의 하위 집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포와 같은, T 세포(예를 들어, CD3+ 세포)의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 순차적 선택 기술에 의해 선택되는 것이 고려된다. 순차 선택 방법은 어느 순서로든 수행될 수 있다.
- [0535] 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 제1선택이 제1 고정상(예를 들어, 제1 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 CD3+ 집단을 농축시키기 위해 수행되고, 선택된 세포는 제2 고정상(예를 들어, 제2 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 CD3+ 집단의 하위집단을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로서 사용되며, 여기서 제1 및 제2 고정상이 순차적으로 배열되는 순차 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3 + 집단의 하위 집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다.
- [0536] 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 제1선택이 제1 고정상(예를 들어, 제1 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+의 마커를 농축시키기 위해 초래되고, 선택된 세포는 제2 고정상(예를 들어, 제2 크로마토그래피 컬

럼에서) 상에 CD3+ 집단의 하위집단을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로서 사용되며, 여기서 제1 및 제2 고정상이 순차적으로 배열되는 순차 선택에 적용된다.

[0537]

일부 구현예에서, 세포 선택은 병렬로 수행된다(예를 들어, 병렬 선택 기술). 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼은 병렬로 배열된다. 예를 들어, 2개 이상의 컬럼은 예를 들어 샘플이 제1 컬럼을 통해 통과할 필요 없이, 샘플이 각 컬럼에 추가될 수 있도록 허용하는 배관을 통해 동시에 2개 이상의 컬럼에 로드될 수 있다. 예를 들어, 병렬 선택 기술을 사용하는 세포 선택은 예를 들어 전체 공정이 동일한 튜브 또는 튜브 세트에서 수행되는 폐쇄 시스템에서, 양성 및/또는 음성 선택 단계를 동시에 수행함으로써 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 샘플이 2 개 이상의 크로마토그래피 컬럼에 로드되는 병렬 선택에 적용되며, 여기서 각 컬럼은 세포 집단의 선택에 영향을 미친다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 개별적으로 CD3+, CD4+, 또는 CD8+ 집단의 선택에 영향을 미친다. 일부 구현예에서, 친화도 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함하는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 동일한 세포 집단의 선택에 영향을 미친다. 예를 들어, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 CD3+ 세포의 선택에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 친화도 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함하는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 상이한 세포 집단들의 선택에 영향을 미친다. 예를 들어, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 CD3+ 세포, CD4+ 세포, 및 CD8+ 세포의 선택에 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 순차적 선택 기술을 사용하는 추가 선택 또는 선택들은 병렬 선택을 통해 선택된 하나 또는 모든 세포 집단의 하위-집단을 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 선택된 세포는 중앙 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예컨대 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+에 대해 추가로 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 병렬 선택이 2개 이상의 컬럼 상에 CD3+ 집단을 농축시키기 위하여 영향을 받는 병렬 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3+ 집단의 하위 집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 선택이 2개 이상의 컬럼 상에 CD3+ 집단 및 CD4+ 집단을 농축시키기 위하여 독립적으로 영향을 받는 병렬 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3+ 및 CD4+ 집단의 하위 집단, 예를 들어, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 병렬 선택이 CD3+ 집단 및 CD8+ 집단을 농축시키기 위하여 영향을 받는 병렬 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD3+ 및 CD8+ 집단의 하위 집단, 예를 들어, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플은 병렬 선택이 CD4+ 집단 및 CD8+ 집단을 농축시키기 위하여 영향을 받는 병렬 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택은 CD4+ 및 CD8+ 집단의 하위 집단, 예를 들어, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 마커에 양성이거나 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+를 농축시키기 위해 영향을 받을 수 있다. 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포와 같은, T 세포(예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 병렬 선택 기술에 의해 선택되는 것이 고려된다. 일부 구현예에서, 순차적 또는 병렬 선택 기술은 조합되어 사용될 수 있다.

[0538]

일부 구현예에서, 2개 컬럼은 병렬 선택을 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 2개 컬럼은 동일한 세포 유형(예를 들어, 동일한 선택 마커)을 선택한다. 일부 구현예에서, 2개 컬럼은 각각 CD3+ T 세포를 선택한다.

[0539]

일부 구현예에서, 세포 선택은 CD57+ 세포를 고갈시키고 T 세포를 농축하기 위해 양성 또는 음성 선택에 의해 수행된다. CD57+ 세포를 고갈시키는 예시적인 방법은 W02020/097132에 기재되어 있다. 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포, 예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+, 또는 CD57+ T 세포의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 단리된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상기 마커에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 선택제, 예컨대 항체 또는 항체 단편과의 인큐베이션에 의

해 선택된다. 특정 구현예에서, CD57+ 세포는 CD57 발현에 대해 양성인 세포의 음성 선택에 의해 샘플에서 고갈되고, 선택되지 않은 세포(CD57-세포)는 제2 고정상(예: 제2 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 T 세포를 농축하기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용되며, 여기서 제1 및 제2 고정상은 순차적으로 배열된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CD57+ 세포는 CD57 발현에 대해 양성인 세포의 음성 선택에 의해 샘플에서 고갈되고, 선택되지 않은 세포(CD57-세포)는 제2 고정상(예: 제2 크로마토그래피 컬럼에서) 상에 CD3+ 집단을 농축하기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용되며, 여기서 제1 및 제2 고정상은 순차적으로 배열된다.

[0540] 다수의 컬럼을 사용하는 구현예에서, 예를 들어, 순차적 선택, 예컨대, 제1 크로마토그래피 컬럼 및 제2 크로마토그래피 컬럼에서, 제공된 방법은 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약이 세포의 하위 집단의 선택 또는 농축의 최종 단계에서 사용되는 마지막 크로마토그래피 컬럼(예: 제2 크로마토그래피 컬럼)에 첨가되도록 수행된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약이 첨가되는 크로마토그래피 컬럼은 본원에 제공된 장치를 사용하여 가열된다. 예를 들어, 온도 조절 부재는 세포의 하위집단을 선택하거나 농축하는 데 사용되는 마지막 또는 최종 크로마토그래피 컬럼(예: 제2 크로마토그래피 컬럼)의 실온보다 높은 목표 온도로 온도를 조절하도록 구성되고, 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약을 추가해야 한다. 일부 구현예에서, 목표 온도는 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호의 효율적이거나 효과적인 전달을 제공하기 위해 세포의 건강 및 활성을 최대화하는 생리학적 온도이다.

[0541] 일반적으로 고정상(예: 선택 수지)의 결합 능력은 특정 수의 표적 모이어티, 예를 들어 T 세포와 같은 표적 세포를 선택하기 위해 필요한 고정상의 양에 영향을 미친다. 결합 능력, 예를 들어, 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 mL 당 고정될 수 있는 표적 세포의 수는 하나 이상의 컬럼에서 포획된 표적 세포의 수를 결정하거나 제어하는 데 사용될 수 있다. 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼이 본원에 개시된 온-컬럼 세포 선택 및 자극을 위해 사용될 수 있다. 다수의 컬럼이 사용되는 경우 그것들을 순차적으로, 병렬로 또는 적절한 조합으로 배열할 수 있다. 따라서, 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 상기 결합 능력은 단일 컬럼 접근법에서 시약 양을 표준화하거나 다중 컬럼 접근법에서 각 컬럼에 대한 시약 양을 표준화하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 1 mL의 고정상은 최대 1억 ± 2,500 만개의 세포를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 고정상은 (약) 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 또는 40 mL이다. 일부 구현예에서, 고정상은 (약) 10 mL이고, 최대 10억 ± 2억 5,000 만개의 세포를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 고정상은 (약) 20 mL이고, 최대 20억 ± 5억개의 세포를 수용할 수 있다. 일부 구현예에서, 고정상은 (약) 40 mL이고, 약 30억 내지 약 50억개의 세포를 수용할 수 있다.

[0542] 일부 구현예에서, 본원에서 사용된 고정상의 결합 능력은 과량의 표적 세포가 고정상에 로드될 때, 주어진 용매 및 세포 농도 조건에서 고정상에 결합된 표적 세포(예: CD3+ T 세포, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포)의 최대 수입니다. 일부 구현예에서, 결합 능력은 (약) 고정상의 mL당 약 1억 ± 2,500만 표적 세포(예: T 세포)이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 정적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 7,500 만 내지 약 1억 2,500 만 개의 범위이다. 일 측면에서, 온-컬럼 세포 선택 및 자극을 위해 본원에 사용된 고정상의 결합 능력은 정적 결합 능력이다. 일부 구현예에서, 정적 결합 능력은 예를 들어, 특정 용매 및 세포 농도 조건에서 고정상에 고정될 수 있는 세포의 최대량이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 정적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 500만 내지 약 1억 개의 범위이다. 일부 구현예에서, 정적 결합 능력은 (약) 고정상의 mL당 약 1억 ± 2,500만 표적 세포(예: T 세포)이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 정적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 7,500 만 내지 약 1억 2,500 만 개의 범위이다. 일부 구현예에서, 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 정적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 1천만 내지 약 2천만개 사이, 약 2천만 내지 약 3천만개 사이, 약 3천만 내지 약 4천만개 사이, 약 4천만 내지 약 5천만개 사이, 약 5천만 내지 약 6천만개 사이, 약 6천만 내지 약 7천만개 사이, 약 7천만 내지 약 8천만개 사이, 약 8천만 내지 약 9천만개 사이, 약 9천만 내지 약 1억개사이, 약 1억 내지 약 1억 천만개 사이, 약 1억 천만 내지 약 1억 2천만개 사이, 약 1억 2천만 내지 약 1억 3천만개 사이, 약 1억 3천만 내지 약 1억 4천만개 사이, 약 1억 4천만 내지 약 1억 5천만개 사이, 약 1억 5천만 내지 약 1억 6천만개 사이, 약 1억 6천만 내지 약 1억 7천만개 사이, 약 1억 7천만 내지 약 1억 8천만개 사이, 약 1억 8천만 내지 약 1억 9천만개 사이, 또는 약 1억 9천만 내지 약 2억개 사이일 수 있다.

[0543] 일부 구현예에서, 본원에 사용된 고정상의 결합 능력은 결합되지 않은 표적 세포의 상당한 돌파가 일어나기 전에 주어진 유동 조건 하에서 정지상에 결합하는 표적 세포(예를 들어, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, 또는 CD8+ T 세포)의 수이다. 일 측면에서, 온-컬럼 세포 선택 및 자극을 위해 본원에 사용된 고정상의 결합 능력은 동적 결합 능력, 즉 샘플 적용 동안 충전된 크로마토그래피 컬럼에서 작동 조건 하에서의 결합 능력이다. 일부 구현

예에서, 동적 결합 능력은 공지된 농도의 표적 세포를 함유하는 샘플을 로딩하고 플로우-쓰루(flow-through)를 모니터링함으로써 결정되며, 표적 세포는 결합되지 않은 표적 세포가 컬럼을 통과하기 전에 특정 중단점에 고정상에 결합할 것이다. 일부 구현예에서, 동적 결합 능력은 (약) 고정상의 mL당 약 1억 ± 2,500만 표적 세포(예: T 세포)이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 동적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 (약) 7,500 만 내지 약 1억 2,500 만 개이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 동적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 500만 내지 약 1억 개의 범위이다. 일부 구현예에서, 고정상(예를 들어, 선택 수지)의 동적 결합 능력은 고정상 mL 당 표적 세포 약 1천만 내지 약 2천만개 사이, 약 2천만 내지 약 3천만개 사이, 약 3천만 내지 약 4천만개 사이, 약 4천만 내지 약 5천만개 사이, 약 5천만 내지 약 6천만개 사이, 약 6천만 내지 약 7천만개 사이, 약 7천만 내지 약 8천만개 사이, 약 8천만 내지 약 9천만개 사이, 약 9천만 내지 약 1억개사이, 약 1억 내지 약 1억 천만개 사이, 약 1억 천만 내지 약 1억 2천만개 사이, 약 1억 2천만 내지 약 1억 3천만개 사이, 약 1억 3천만 내지 약 1억 4천만개 사이, 약 1억 4천만 내지 약 1억 5천만개 사이, 약 1억 5천만 내지 약 1억 6천만개 사이, 약 1억 6천만 내지 약 1억 7천만개 사이, 약 1억 7천만 내지 약 1억 8천만개 사이, 약 1억 8천만 내지 약 1억 9천만개 사이, 또는 약 1억 9천만 내지 약 2억개 사이일 수 있다.

[0544] 일부 구현예에서, 고정상은 20mL이다. 일부 구현예에서, 고정상은 20억 ± 5억개 세포의 결합 능력을 갖는다.

[0545] 일부 구현예에서, 하나 이상(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6)의 세척 단계를 사용하여 크로마토그래피 매트릭스(예: 정지상)에서 결합되지 않은 세포 및 파편을 제거하여 크로마토그래피 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스에 고정된 선택된 세포의 농축된 집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 단리 및/또는 선택은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 (약) 100% T 세포 또는 서브세트 또는 이의 하위집단을 포함하는 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스에 고정된 농축 T 세포의 하나 이상의 집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 단리 및/또는 선택은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 (약) 100% CD3+ T 세포 또는 서브세트 또는 이의 하위집단을 포함하는 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스에 고정된 농축 T 세포의 하나 이상의 집단을 생성한다.

[0546] D. 자극을 이용한 온-컬럼 세포 선택

[0547] 본원에 개시된 장치를 사용하여 섹션 II.C에 설명된 컬럼 크로마토그래피 단계에 의한 세포 선택과 자극을 결합하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 샘플의 세포는 섹션 II-B-1에 설명된 예시적인 선택제 중 하나를 사용하여 선택된다. 따라서, 특정 측면에서, 자극은 세포가 컬럼에 고정될 때 선택 단계 동안 수행된다(예: 선택제에 의해). 일부 구현예에서, 자극 조건은 세포, 예를 들어 CD3+, CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 자극하고/하거나 자극 신호를 전달할 수 있는 조건을 포함한다. 예를 들어, 선택은 T 세포 또는 이의 특정 하위 집합을 농축하거나 선택하는 것이며, 자극 조건은 TCR 복합체(예: CD3) 및/또는 공자극 분자(예: CD28)의 구성요소로부터 생성된 신호를 자극하는 조건을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 크로마토그래피 매트릭스(예: 정지상)에 고정된 표적 세포(예: T 세포)를 자극제, 예를 들어 자극 신호를 전달하거나 자극 신호를 전달할 수 있는 제제와 함께 인큐베이션하고, 이로써 선택된 세포를 자극하는 것이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선택된 세포는 T 세포 또는 이의 서브세트이고 자극제는 TCR 복합체(예: CD3) 및/또는 공자극 분자(예: CD28)의 성분에 결합하고 이를 자극 및/또는 활성화한다. 특정 구현예에서, 자극 조건 하에 세포 집단을 자극하는 것은 선택되고 자극된 세포 집단(여기에서 자극된 세포 집단으로도 지칭됨)을 생성하거나 생산한다.

[0548] 특정 구현예에서, 샘플의 세포는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 세포에 도입하기 전에, 예를 들어 섹션 II-F에 기술된 방법, 단계 또는 기술에 의해 선택되고 자극된다.

[0549] 특정 측면에서, 자극의 개시(본원에서 인큐베이션 개시라고도 함)는 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 고정된 샘플의 표적 세포(예: T 세포)가 자극제에 먼저 접촉되거나 노출될 때 발생한다. 제공된 구현예에서, 자극을 시작하기 전에 표적 세포(예: T 세포)를 포함하는 샘플을 섹션 II.C에 설명된 대로 관심 표적 세포의 특정 선택을 위해 선택제가 결합되거나 고정된 크로마토그래피 매트릭스를 포함하는 컬럼에 추가하고, 세포는 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 표적 세포를 고정하기 위한 조건 하에 인큐베이션되도록 한다. 일부 구현예에서, 세포는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극시약) 또는 자극제의 첨가 전에 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100 또는 120분 동안 컬럼에 침투되도록 허용된다. 일부 구현예에서, 컬럼은 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극시약) 또는 자극제의 첨가 전에 적어도 1(1, 2, 3, 4, 5)회 이상 세척된다. 일부 구현예에서, 상기 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 크

로마토그래피 컬럼(예를 들어 고정상)에 첨가된 후, (약) 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60분에, 또는 적어도 30, 35, 40, 45, 50, 55, 또는 60분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 120분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 100분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 90분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 80분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 70분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 60분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 50분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 40분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 15 내지 약 30분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 120분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 100분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 90분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 80분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 70분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 60분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 50분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 샘플이 컬럼에 첨가된 후 약 30 내지 약 40분에 첨가된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 세척 단계는 컬럼에 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)을 첨가하기 전에 수행된다.

[0550] 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 1일 동안, 또는 1일 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 시간 동안, 또는 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 시간 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 2 내지 24, 3 내지 24, 4 내지 24, 5, 내지 24, 6 내지 24, 7 내지 24, 8 내지 24, 9 내지 24, 10 내지 24, 11 내지 24, 12 내지 24, 13 내지 24, 14 내지 24, 15 내지 24, 16 내지 24, 17 내지 24, 18 내지 24, 19 내지 24, 20 내지 24, 21 내지 24, 22 내지 24, 23 내지 24, 2 내지 23, 2 내지 22, 2 내지 21, 2 내지 20, 2 내지 19, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 또는 2 내지 3 시간에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 24시간 동안, 또는 24시간 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 12시간 동안, 또는 12시간 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 5시간 동안, 또는 5시간 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 4시간 동안, 또는 4시간 미만 동안에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건에서 고정된 세포를 인큐베이션 하는 것은 (약) 2시간 동안, 또는 2시간 미만 동안에 수행된다.

[0551] 특정 구현예에서, 샘플로부터 선택된 (약) 또는 적어도 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 , 200×10^6 , 250×10^6 , 300×10^6 , 350×10^6 , 400×10^6 , 450×10^6 , 500×10^6 , 550×10^6 , 600×10^6 , 700×10^6 , 800×10^6 , 900×10^6 , $1,000 \times 10^6$, 1250×10^6 , 1500×10^6 , 1750×10^6 , 2000×10^6 , 2250×10^6 , 2500×10^6 , 2750×10^6 , 3000×10^6 , 3250×10^6 , 3500×10^6 , 3750×10^6 , 4000×10^6 , 4250×10^6 , 4500×10^6 , 4750×10^6 , 또는 5000

$\times 10^6$ 양의 세포는 자극, 예를 들어 자극 조건 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 선택된 세포는 (예를 들어, 크로마토그래피 매트릭스가 함유된) 단일 컬럼 상에 고정된다. 예를 들어, 샘플로부터 선택된 세포의 총량이 단일 컬럼 상에 고정되고 단일 컬럼 상에 고정된 세포는 자극 조건 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 선택된 세포는 (예를 들어, 크로마토그래피 매트릭스가 각각 함유된) 2개 컬럼 상에 고정된다. 예를 들어, 샘플로부터 선택된 세포 총량은 (예를 들어, 각 컬럼(예를 들어 크로마토그래피 매트릭스)은 상기 상에 고정된 전체 세포의 절반 또는 약 절반을 함유함) 2개 컬럼 상에 고정되고 2개 컬럼 상에 고정된 세포는 자극 조건 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상) 상에 고정된 선택된 세포(예를 들어, T 세포)는 자극, 예컨대 (약) 또는 적어도 0.01×10^6 cells/mL, 0.1×10^6 cells/mL, 0.5×10^6 cells/mL, 1.0×10^6 cells/mL, 1.5×10^6 cells/mL, 2.0×10^6 cells/mL, 2.5×10^6 cells/mL, 3.0×10^6 cells/mL, 4.0×10^6 cells/mL, 5.0×10^6 cells/mL, 10×10^6 cells/mL, 50×10^6 cells/mL, 75×10^6 cells/mL, 100×10^6 cells/mL, 125×10^6 cells/mL, 150×10^6 cells/mL, 또는 200×10^6 cells/mL의 밀도에서 자극제의 존재와 같은 자극 조건 하에서 인큐베이션 된다. 특정 구현예에서, 고정상 상에 고정된 세포, 예를 들어, 선택된 세포(예를 들어, T 세포)는 예를 들어, 자극, 예컨대 (약) 또는 적어도 3.0×10^6 cells/mL의 밀도에서 자극제의 존재와 같은 자극 조건 하에서 인큐베이션 된다. 특정 구현예에서, 고정상 상에 고정된 세포, 예를 들어, 선택된 세포(예를 들어, T 세포)는 자극되거나 자극의 대상, 예를 들어, (약) $100 \pm 2,500$ 만 cells/mL의 밀도에서 자극제의 존재와 같은 자극 조건 하에서 인큐베이션 된다. 특정 구현예에서, 선택된 세포는 생존 세포다.

[0552] 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함한 자극 시약은 1×10^6 세포 당 (약) 또는 적어도 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3 μg 의 농도로 컬럼에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함한 자극 시약은 1×10^6 세포 당 (약) 또는 적어도 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25 μg 의 농도로 고정된 세포를 함유하는 컬럼에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극제 또는 자극제를 포함한 자극 시약은 1×10^6 세포 당 (약) 1 내지 2 μg 의 농도로 컬럼에 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 섹션 II.B-2에 설명된 것과 같은 올리고머 자극 시약이다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 1×10^6 세포 당 (약) 1 내지 2 μg 의 농도로 고정된 세포를 함유하는 컬럼에 첨가된다. 일부 구현예에서, 5×10^8 의 올리고머 자극 시약은 고정된 세포를 함유하는 컬럼에 첨가된다. 2 개 이상의 컬럼이 자극을 위해 고정된 세포를 포함하는 경우, 본원에 기술된 농도 또는 양의 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극시약)이 각 컬럼에 추가되거나 적용된다.

[0553] 일부 구현예에서, 자극을 위한 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인(chemokines), 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화시키기 위해 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 온도는 (약) 37°C 이다. 일부 구현예에서, 산소 및 이산화탄소 함량은 가스 교환기를 사용해 조절된다.

[0554] 특정 구현예에서, 자극 조건은 세포, 예를 들어 샘플로부터 선택된 세포를 하나 이상의 사이토카인과 함께 및/또는 존재 하에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 선택된 세포(예를 들어, T 세포)에 대해 내인성이고/거나 선택된 세포(예를 들어, T 세포)에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식 세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-2이거나 이를 포함한다.

[0555] 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인의 양 또는 농도는 국제 단위(IU)로 측정되고/거나 정량화 된다. 국제

단위는 비타민, 호르몬, 사이토카인, 백신, 혈액 산물, 및 유사 생물학적 활성 물질을 정량하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, IU는 특정 중량 및 강도의 국제 참조 표준, 예를 들어, 인간 IL-2, 86/504에 대한 WHO 제1 국제 표준과 비교한 생물학적 제제의 효능의 측정 단위이거나 이를 포함한다. 국제 단위는 공개되고 국제적인 협력 연구 노력에서 유래된 생물학적 활성 단위를 보고하는 유일한 인식되고 표준화된 방법이다. 특정 구현예에서, 사이토카인의 집단, 샘플 또는 소스에 대한 IU는 유사한 WHO 표준 생성물과의 생성물 비교 테스트를 통해 취득될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 인간 재조합 IL-2, IL-7 또는 IL-15 집단, 샘플 또는 소스의 IU/mg는 WHO 표준 IL-2 생성물(NIBSC 코드: 86/500), WHO 표준 IL-17 생성물(NIBSC 코드: 90/530) 및 WHO 표준 IL-15 생성물(NIBSC 코드: 95/554)과 각각 비교된다.

[0556] 일부 구현예에서, IU/mg으로 생물학적 활성은 (ng/ml에서 ED50)-1x106과 동등하다. 특정 구현예에서, 재조합 인간 IL-2 또는 IL-15의 ED50은 CTLL-2 세포로 세포 증식(XTT 절단)의 최대 절반 자극에 필요한 농도와 동일하다. 특정 구현예에서, 재조합 인간 IL-7의 ED50은 PHA-활성화 인간 말초 혈액 림프구의 증식을 위한 최대 절반 자극에 필요한 농도와 동등하다. IL-2에 대한 IU의 분석 및 계산에 관한 세부 사항은 Wadhwa et al., Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7; 및 Gearing and Thorpe, Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9에서 논의되고; IL-15에 대한 IU의 분석 및 계산에 관한 세부 사항은 Soman et al. Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94에서 논의된다.

[0557] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 1 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 10 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 250 IU/mL 내지 500 IU/mL 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 농도에서 사이토카인(예를 들어, 재조합 인간 사이토카인)의 존재 하에서 자극된다.

[0558] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL 또는 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-2의 존재 하에서 자극된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 자극된다.

[0559] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 500 IU/mL 내지 750 IU/mL, 750 IU/mL 내지 1,000 IU/mL 또는 550 IU/mL 내지 650 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7의 존재 하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 투입 세포)는 (약) 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 또는 1,000 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-7의 존재 하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 (약) 600 IU/mL의 IL-7의 존재 하에서 자극된다.

[0560] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15의 존재 하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL 또는 200 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-15의 존재 하에서 자극된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 자극된다.

[0561] 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15의 존재로 자극 조건 하에서 자극된다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 재조합이다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 샘플의 선택된 세포)는 재조합 IL-2, IL-7 및 IL-15의 존재로 자극 조건 하에서 자극된다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 글루타민을 더 포함한다.

[0562] 상기 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산,

항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인(chemokines), 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화시키기 위해 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0563] 일부 측면에서, 자극은 예컨대 미국 특허 번호 6,040,177 Riddell et al., Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82 및/또는 Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701에 기술된 기술에 따라 수행된다.

[0564] 일부 구현예에서, 자극은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 한정된 및/또는 잘-한정된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 여과된 조절 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 포함할 수 있다.

[0565] 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건 하에서 인큐베이션은 실온(예를 들어, (약) 23 ° C)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 자극, 예를 들어 자극 조건 하에서 인큐베이션은 약 30° C 내지 약 39° C, 예컨대, (약) 37 ° C에서 수행된다. 특정 구현예에서, 온-컬럼 자극 방법은 본원에 제공된 장치를 사용하여 수행되어 크로마토그래피 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 고정되거나 결합된 세포가 자극 동안 약 30℃ 내지 약 39℃, 예컨대, (약) 37 ° C의 온도에 노출되도록 한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 장치는 온도를 초기 시작 온도(예: 실온)에서 목표 온도로 증가시키는 것과 같이 약 30° C 내지 약 39° C, 예컨대, (약) 37 ° C의 목표 온도로 온도를 조절한다. 일부 구현예에서, 본원에 제공된 장치는 온도를 약 30° C 내지 약 39° C, 예컨대, (약) 37 ° C의 목표 온도로 유지하며, 예를 들어 컬럼에서 세포를 자극하는 동안 일정하거나 거의 일정한 목표 온도를 제공한다.

[0566] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 (약) 37 ° C에서 수행된다.

[0567] 1. 온-컬럼 자극을 위한 자극제 및 자극 시약을 이용한 인큐베이션

[0568] 본원에 개시된 장치를 사용하여 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상)에 고정된 표적 세포(예: T 세포)를 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 제공된다. 자극제의 예는 섹션 II-B-1에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 자극 시약에 포함된다. 자극 시약의 예는 섹션 II-B-2에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 자극제는, 크로마토그래피 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 자극제는 크로마토그래피 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에, 예를 들어 상기 기술된 자극 시약 또는 본원에 기술된 자극 시약을 통해 간접적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 자극제는 자극 시약에 포함된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 크로마토그래피 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 결합된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상) 상에 공유 결합된다. 일부 구현예에서, 자극제는 크로마토그래피 매트릭스(예: 고정상) 상에 비공유 결합된다.

[0569] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 고체 지지체, 고정상, 비드, 마이크로입자, 자성 입자, 및/또는 매트릭스(예를 들어, 크로마토그래피 매트릭스)에 결합되지 않거나 연관되지 않는다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 유연하고, 금속 또는 자성 코어를 함유하지 않으며, 유기 다량체를 전체적으로 또는 주로 포함하며, 및/또는 단단하지 않다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 가용성이다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 올리고머 자극 시약이다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 가용성이다. 따라서, 일부 구현예에서, 자극 시약, 예컨대, 올리고머 자극 시약은 컬럼에 연관되지 않는다. 일부 구현예에서, 자극 시약, 예컨대, 올리고머 자극 시약은 컬럼에 첨가된다.

[0570] 특정 구현예에서, 자극의 개시는 세포가 인큐베이션 되거나 자극제에 접촉할 때 발생한다. 따라서, 자극제가 직접 또는 간접적으로 예컨대 선택 시약 또는 자극 시약을 통해서 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 정지상)에 결합되는 일부 구현예에서, 표적 세포를 포함하는 샘플이 컬럼의 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 첨가 시 자극의 개시는 발생한다. 일부 구현예에서, 자극 시약에 포함된 자극제가 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어 고정상)와 연관되지 않을 경우, 자극의 개시는 자극 시약(예를 들어 올리고머 자극시약)이 샘플의 표적 세포가 고정된 고정상에 첨가될 때 발생한다. 일부 구현예에서, 자극제가 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 직접 또는 간접적으로 결합되지 않고 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)에 포함되지 않은 경우, 자극의 개시는 자극제가 크로마토그래피 매트릭스(예를 들어, 고정상)에 첨가될 때 발생한다.

[0571] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 TCR 복합체의 세포내 신호 전달

도메인을 자극할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에서 고려되는 자극 시약 제제는 RNA, DNA, 단백질(예를 들어, 효소), 항원, 다클론 항체, 단클론 항체, 항체 단편, 탄수화물, 지질, 렉틴 또는 원하는 표적에 대한 친화도를 갖는 임의의 기타 생체 분자를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 수용체 및/또는 T 세포 수용체의 성분이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 CD3이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 공자극 분자, 예를 들어 CD28, CD137(4-1-BB), OX40 또는 ICOS이다.

[0572] 일부 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 세포(예를 들어, T 세포) 상에 다음과 같은 하나 이상의 거대 분자와 결합하는 하나 이상의 자극제를 함유한다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-감마R, TNF-알파R, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-셀렉틴), CD29/CD49d (VLA-4), 노치 리간드 (예: 델타 유사 1/4, Jagged 1/2 등), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7 및 CXCR3 또는 상기 거대 분

[0573] 자 또는 이의 단편에 상응하는 리간드를 포함하는 이의 단편. 일부 구현예에서, 자극제는 세포(예를 들어, T 세포) 상에 다음과 같은 하나 이상의 거대 분자와 특이적으로 결합한다: CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, 및/또는 CD45RO.

[0574] 일부 구현예에서, 자극제는 T 세포 수용체의 하나 이상의 성분에 결합 및/또는 인식하는 항체이다. 특정 구현예에서, 자극제는 항-CD3 항체이다. 특정 구현예에서, 자극제는 공자극 분자에 결합 및/또는 인식하는 항체이다. 특정 구현예에서, 자극제는 항-CD28 항체이다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-CD28 항체 및 항-CD3 항체(예를 들어, 자극제)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 자극제는 예를 들어 본원에 기술된 항-CD3 Fab이고, 제2 자극제는 예를 들어 본원에 기술된 항-CD28 Fab이다.

[0575] 임의의 이전 구현예에서, 자극 시약은 (i) 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자 및 (ii) 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약을 포함할 수 있거나 이들을 포함할 수 있고, 상기 올리고머 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과와 반경, ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 올리고머 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 테트라머를 포함한다. 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 을 포함할 수 있다. 실시예, 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-CD28 항체 및 항-CD3 항체(예를 들어, 자극제)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 자극제는 예를 들어 본원에 기술된 항-CD3 Fab이고, 제2 자극제는 예를 들어 본원에 기술된 항-CD28 Fab이다.

[0576] 일부 구현예에서, 예를 들어 자극제가 자극 시약(예: 올리고머 자극 시약) 또는 선택 시약에 결합하지 않는 경우, 자극제는 항체, 2가 항체 단편, F(ab)₂, 또는 2가 단일 사슬 Fv 단편이다.

[0577] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 샘플의 선택된 세포는 (약) 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1.25:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 0.9:1, 0.8:1, 0.75:1, 0.67:1, 0.5:1, 0.3:1, 또는 0.2:1 비율의 자극 시약 대 세포 존재 하에 자극된다. 특정 구현예에서, 자극 시약 대 세포의 비율은 2.5:1 내지 0.2:1, 2:1 내지 0.5:1, 1.5:1 내지 0.75:1, 1.25:1 내지 0.8:1, 1.1:1 내지 0.9:1이다. 특정 구현예에서, 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 1:1이다. 특정 구현예에서, 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 0.3:1이다. 특정 구현예에서, 자극 시약 대 세포의 비율은 (약) 0.2:1이다.

[0578] 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 또는 적어도 0.01 μ g, 0.02 μ g, 0.03 μ g, 0.04 μ g, 0.05 μ g, 0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.3 μ g, 0.4 μ g, 0.5 μ g, 0.75 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g, 5 μ g, 6 μ g, 7 μ g, 8 μ g, 9 μ g, 또는 10 μ g의 자극 시약의 존재 하에 자극된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 4 μ g의 자극 시약의 존재 하에 자극된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 0.8 μ g의 자극 시약의 존재 하에 자극된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) 3 μ g의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극

의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $2.5 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $2 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $1.8 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $1.6 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $1.4 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $1.2 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $1 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다. 특정 구현예에서, 세포는 10^6 세포 당 (약) $0.8 \mu\text{g}$ 의 자극 시약의 존재 하에 자극되거나 자극의 대상이 된다.

[0579] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 장치를 사용하여, 표적 세포(예: T 세포)의 온-컬럼 선택 및 자극하는 본원에 제공된 방법은 본원에 개시된 바와 같은 열/가스 컬럼(예: 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리)을 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 T 세포의 온-컬럼 선택 및 자극 방법 중 임의의 방법은 본원에 기술된 장치를 사용하여 수행된다.

[0580] 일부 구현예에서, 온-컬럼 선택 및 자극은 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피용 하우징 어셈블리를 포함하는 컬럼 세트를 사용하여 수행되며, 여기서 크로마토그래피 컬럼의 고정상은 표적 세포(예: T 세포)를 선택하거나 농축하기 위한 선택제로 기능화된다. 온-컬럼 선택 및 자극 방법에 기반한 제공된 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는 또한 컬럼의 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절 및/또는 유지하기 위한 온도 조절 부재(예: 하나 이상의 가열 요소 함유), 및 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스 흡입을 허용 및/또는 초래하도록 구성된 커넥터를 함유한다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 컬럼은 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member)를 함유하고, 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티(internal cavity)를 형성한다. 임의의 이전 구현예에서 사용하기 위한 컬럼 크로마토그래피용 예시적인 하우징 어셈블리는 섹션 I-A에 기재되어 있다. 임의의 이전 구현예에서 사용하기 위한 예시적인 크로마토그래피 컬럼 및 크로마토그래피 컬럼 세트는 섹션 I-B에 기재되어 있다.

[0581] 일부 측면에서, 방법은 본원에 개시된 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 복수의 T 세포 중 하나 이상의 T 세포 내에 자극 신호를 전달하기 위해 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션 하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 복수의 T 세포는 고정상에 고정화되고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성한다. 일 측면에서, 고정상은 하나 이상의 T 세포의 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합하는 선택제를 포함한다. 일 측면에서, 하나 이상의 T 세포에 의해 발현된 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 하나 이상의 T 세포의 고정화를 초래한다.

[0582] 또한, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 일부 구현예에서 본원에 개시된다: (a) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 본원에 개시된 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 첨가하여, 이로써 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상을 고정화시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상의 선택 마커에 결합하는 선택제를 포함함; 및 (b) 상기 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0583] 다른 측면에서, 다음 단계를 포함하는 T 세포의 온-컬럼 자극 방법이 본원에서 개시되며, 그 방법은 (a) (i) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플 및 (ii) 본원에 개시된 크로마토그래피 키트 내의 상기 고정상을 조합시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상에 발현된 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 선택제를 포함하고, 상기 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 복수의 T 세포의 고정화를 초래함; 및 (b) 상기 고정상에 T 세포 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계,

여기서 상기 조합 단계 및/또는 상기 첨가 단계는 크로마토그래피 키트의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 내부 캐비티의 내부 또는 외부에서 수행됨,를 포함한다. 일부 구현예에서 방법은 인큐베이션 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상로부터 수집되고, 수집 단계는 고정상으로부터 다수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행된다.

[0584] 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 실온보다 높은 목표 온도로 조절할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약과 함께 인큐베이션하는 동안 세포에 생리학적 온도를 제공하는 목표 온도로 고정상의 온도를 조절할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 조절할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 조절할 수 있다. 예를 들어, 목표 온도는 (약) 37° C이다.

[0585] 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 실온보다 높은 목표 온도로 유지할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 하나 이상의 자극제 또는 자극 시약과 함께 인큐베이션하는 동안 세포에 생리학적 온도를 제공하는 목표 온도로 고정상의 온도를 유지할 수 있다. 임의의 이전 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도로 유지할 수 있다.. 일부 측면에서, 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35℃ 내지 약 39℃의 목표 온도에서 유지한다. 예를 들어, 목표 온도는 (약) 37° C이다.

[0586] 임의의 이전 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 커넥터는 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용할 수 있다. 예를 들어, 가스는 멸균이고, 공기이거나 이를 포함하며, 내부 캐비티로의 가스 흡입은 인큐베이션 동안 간헐적이거나 연속적일 수 있다.

[0587] E. 용리

[0588] 임의의 이전 구현예에서, 방법은 인큐베이션 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상으로부터 수집된다.

[0589] 임의의 이전 구현예에서, 수집 단계는 고정상로부터 복수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행될 수 있다.

[0590] 본원에 개시된 장치를 사용하여, 본원에 기술된 경쟁제 또는 자유 결합제의 사용 없이 달성된 크로마토그래피 컬럼으로부터 자극제와 함께 인큐베이션 후 세포, 예를 들어 표적 세포(예컨대, T 세포)의 용리를 포함하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 구현예에서, 용리는 예를 들어, 세척 배지를 사용하는 세척 단계를 포함하거나, 이로 필수적으로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.

[0591] 일부 구현예에서, 자극제와 함께 인큐베이션 하는 동안에 크로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 세포는 자발적으로 선택제로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 자발적 분리는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2시간 내에 발생한다. 일부 구현예에서, 자발적인 분리는 자극제와 함께 인큐베이션 시작 후 약 2 내지 24, 3 내지 24, 4 내지 24, 5, 내지 24, 6 내지 24, 7 내지 24, 8 내지 24, 9 내지 24, 10 내지 24, 11 내지 24, 12 내지 24, 13 내지 24, 14 내지 24, 15 내지 24, 16 내지 24, 17 내지 24, 18 내지 24, 19 내지 24, 20 내지 24, 21 내지 24, 22 내지 24, 23 내지 24, 2 내지 23, 2 내지 22, 2 내지 21, 2 내지 20, 2 내지 19, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 또는 2 내지 3 시간 이내에 일어난다. 일부 구현예에서, 컬럼으로부터 분리는 자극제와 함께 인큐베이션 시작 후 (약) 4 내지 5시간, 예를 들어 4.5 시간 이내에 발생한다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 복수의 표적 세포(예를 들어 T세포)의 대다수는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 24시간 미만에 분리된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 복수의 표적 세포(예를 들어 T세포)의 대다수는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 12시간 미만에 분리된다. 일부 구현예에서, 크

로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 복수의 표적 세포(예를 들어 T세포)의 대다수는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 5시간 미만에 분리된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 복수의 표적 세포(예를 들어 T세포)의 대다수는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 4시간 미만에 분리된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피 매트릭스(예컨대, 고정상) 상에 선택제를 통해 고정된 복수의 표적 세포(예를 들어 T세포)의 대다수는 자극제와 함께 인큐베이션 시작으로부터 2시간 미만에 분리된다.

[0592] 일부 구현예에서, 자발적으로 분리된 세포는 크로마토그래피 컬럼으로부터 중력 흐름을 통해서 용리되고/거나 수집된다. 일부 구현예에서, 자발적으로 분리된 세포는 세척 단계를 사용하여 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 세척 단계는 자극제 또는 자극제를 함유하는 자극 시약과 함께 인큐베이션의 개시 후 (약) 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간에 수행된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세척 단계는 자극제 또는 자극제를 함유하는 자극 시약과 함께 인큐베이션의 개시 후 (약) 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간에 수행된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세척 단계는 자극제 또는 자극제를 포함하는 자극 시약과 함께 인큐베이션의 개시 후 약 2 내지 24, 3 내지 24, 4 내지 24, 5, 내지 24, 6 내지 24, 7 내지 24, 8 내지 24, 9 내지 24, 10 내지 24, 11 내지 24, 12 내지 24, 13 내지 24, 14 내지 24, 15 내지 24, 16 내지 24, 17 내지 24, 18 내지 24, 19 내지 24, 20 내지 24, 21 내지 24, 22 내지 24, 23 내지 24, 2 내지 23, 2 내지 22, 2 내지 21, 2 내지 20, 2 내지 19, 2 내지 18, 2 내지 17, 2 내지 16, 2 내지 15, 2 내지 14, 2 내지 13, 2 내지 12, 2 내지 11, 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 또는 2 내지 3 시간 이내에 수행된다.

[0593] 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극 후 용리 및/또는 수집 단계는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 고정상)에 샘플이 첨가된 후 (약) 2 일 이내에 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극 후 용리 및/또는 수집 단계는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 고정상)에 샘플이 첨가된 후 (약) 1 내지 2 일 이내에 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극 후 용리 및/또는 수집 단계는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 고정상)에 샘플이 첨가된 후 (약) 1 일 이내에 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극 후 용리 및/또는 수집 단계는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 고정상)에 샘플이 첨가된 후 (약) 48, 36, 24, 12, 6, 4, 또는 2 시간(수치 포함) 이내에 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극 후 수집 또는 용리 단계는 크로마토그래피 컬럼(예를 들어, 고정상)에 샘플이 첨가된 후 (약) 2 내지 48, 2 내지 36, 2 내지 24, 2 내지 12, 2 내지 6, 2 내지 4, 4 내지 48, 4 내지 36, 4 내지 24, 4 내지 12, 4 내지 6, 6 내지 48, 6 내지 36, 6 내지 24, 6 내지 12, 12 내지 48, 12 내지 36, 12 내지 24, 24 내지 48, 24 내지 36, 또는 36 내지 48 이내에 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 48, 36, 24, 12, 6, 4, 또는 2 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 36 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 24 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 12 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 7 시간 또는 7 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 6.5 시간 또는 6.5 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 6 시간 또는 6 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 5.5 시간 또는 5.5 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 5 시간 또는 5 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 4.5 시간 또는 4.5 시간 미만이다. 일부 구현예에서, 선택 및 온-컬럼 자극으로부터 용리 또는 수집까지의 단계에 포함된 공정 기간은 또는 (약) 4 시간 또는 4 시간 미만이다.

[0594] 일부 구현예에서, 자발적으로 분리된 세포는 크로마토그래피 컬럼으로부터 중력 흐름을 통해서 수집된다. 일부 구현예에서, 자발적으로 분리된 세포는 세척 단계를 사용하여 크로마토그래피 컬럼으로부터 용리된다. 일부 구현예에서, 세척 배지는 배양 배지이다. 따라서, 일부 구현예에서, 용리된 세포는 다운스트림 처리(예를 들어, 후속 선택 단계, 자극 단계, 인큐베이션 단계, 유전자 조작)으로 직접 진행될 수 있다. 일부 구현예에서, 세척

배지는 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15, 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지를 포함한다.

[0595] 일부 구현예에서, 용리액은 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)을 포함한다. 일부 구현예에서, 수집된 세포는 여전히 자극제(예를 들어, 올리고머 자극 시약에 결합된 자극제)에 결합된다. 따라서, 수집된 세포는 자극 조건 하에서 여전히 고려될 수 있다. 일부 구현예에서, 용리액에 함유된 자극제는 용리된 세포 및 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)에 결합된다. 따라서, 수집 및/또는 용리된 세포는 자극 조건 하에서 여전히 고려될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리 및 용리된 세포는 (예를 들어, 여전히 자극되는) 자극 조건 하에 있다. 일부 구현예에서, 용리된 세포는 예를 들어, 섹션 II-D에 기술된 것과 같이, 자극 조건 하에서 계속될 수 있다.

[0596] 일부 구현예에서, 컬럼 및 수집 컨테이너는 폐쇄 시스템에 연결된다. 일부 구현예에서, 폐쇄 시스템은 멸균이다. 일부 구현예에서, 선택, 자극, 및 용리 단계는 사람, 작동, 또는 간섭과 같이 수동이 거의 없거나 전혀 없는 자동화된 시스템에 의해 수행된다.

[0597] F. 유전자 조작

[0598] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 세포(예를 들어, 산출 조성물)를 유전적으로 조작하는 것, 예를 들어 재조합 단백질을 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 본원에 개시된 장치를 사용하여 선택되고 자극된 세포에 도입하는 것을 포함한다. 상기 재조합 단백질은 섹션 III에 기재된 임의의 것과 같은 재조합 수용체를 포함할 수 있다. 예를 들어 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드와 같은 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 세포로 도입시키는 것은 임의의 다수의 공지된 벡터를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 벡터는 렌티바이러스 및 감마레트로바이러스가 포함된 바이러스 시스템을 포함한다. 예시적인 방법은 예를 들어 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 통한 형질 도입을 포함한 수용체를 암호화 하는 이중 폴리뉴클레오타이드의 전달을 위한 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극된 세포 집단(예를 들어, 산출 조성물)은 재조합 수용체를 암호화 하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 것과 같이 유전자 조작되고, 이로써 형질 전환된 세포 집단(여기서 형질 전환된 집단의 세포로도 지칭)을 생성한다.

[0599] 특정 구현예에서, 세포는 예컨대 본원, 예를 들어 섹션 II-D에 제공된 임의의 방법에 의한 것과 같은 온-컬럼 자극을 수행한 후 세포(예를 들어, T 세포, CD3+, CD4+ T 세포)는 유전자 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 예컨대 본원, 예를 들어 섹션 II-D에 제공된 임의의 방법에 의한 것과 같은 온-컬럼 자극 및 예를 들어 섹션 II.E에서 중력 흐름에 의한 수집을 수행한 후 세포(예를 들어, T 세포, CD3+, CD4+ T 세포)는 유전자 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극된 집단은 이전에 동결 보호 및 보관되었고, 세포를 유전자 조작, 형질 전환, 형질 감염 또는 형질도입하기 전에 해동된다.

[0600] 특정 구현예에서, 세포가 자극되거나 자극의 대상 또는 자극 조건(예를 들어, 온-컬럼 자극) 하에서 배양된 후에, 세포(예를 들어, T 세포, CD3+, CD4+ T 세포)는 유전자 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극 개시로부터 (약) 72 시간, 60 시간, 48 시간, 36 시간, 24 시간, 12 시간, 5 시간, 4 시간, 또는 2 시간 또는 72 시간, 60 시간, 48 시간, 36 시간, 24 시간, 12 시간, 5 시간, 4 시간, 또는 2 시간 이내 (수치 포함)에 유전적으로 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 온-컬럼 자극의 개시로부터 (약) 2, 3, 4, 5, 또는 6 시간에 유전적으로 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 온-컬럼 자극의 개시로부터 (약) 4 내지 5 시간에 유전적으로 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 동안에 여전히 자극 조건 하에 있다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 2 시간 내지 6 시간 또는 6 시간 내지 12 시간 사이에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극 개시 후 (약) 12 시간 내지 48 시간, 16 시간 내지 36 시간, 또는 18 시간 내지 30 시간 사이에 유전자적으로 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 18 시간 내지 30 시간에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 22 시간 또는 24 시간에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 6 시간 또는 12 시간에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 4 시간 또는 5 시간에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 후 (약) 2 시간 또는 3 시간에 유전적으로 조작, 형질 전환, 또는 형질 도입된다.

[0601] 특정 구현예에서, 유전자 조작 방법은 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드와 하나 이상의 세포 집단(예: 산출 조성물)을 접촉 또는 도입시킴으로써 수행된다. 특정 구현예에서, 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포에 대해 이중이다. 특정 구현예에서, 이중 핵산 분자 또는 이중 폴리뉴클레오타이드는 세포에 고유하지 않다. 특정 구현예에서, 이중 핵산 분자 또는 이중 폴리뉴클레오타이드는 세포에 의해 고유하게 발현되지 않는 단백질, 예를 들어 재조합 단백질을 암호화한다. 특정 구현

예에서, 이중 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드는 접촉 또는 도입 전에 세포에서 발견되지 않는 핵산 서열이거나 이를 함유한다.

[0602] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 산출 조성물은, 형질 도입 보조제의 존재 하에 조작, 예를 들어 형질 도입된다. 예시적인 형질 도입 보조제는 다가양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴-유래 단편 또는 변이체 및 레트로넥틴(RetroNectin)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 세포는 다가양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴-유래 단편 또는 변이체 및/또는 레트로넥틴의 존재 하에 조작된다. 특정 구현예에서, 세포는 폴리브렌, DEAE-덱스트란, 프로타민 설페이트, 폴리-L-리신 또는 양이온성 리포솜인 다가양이온의 존재 하에 조작된다. 특정 구현예에서, 세포는 프로타민 설페이트의 존재 하에 조작된다.

[0603] 일부 구현예에서, 유전자 조작, 예를 들어, 형질도입은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 한정된 또는 잘-한정된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 여과된 조절 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 배지는 글루타민을 포함한다.

[0604] 특정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 조작된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식 세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-12이거나 이를 포함한다.

[0605] 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 자극된 세포)는 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15의 존재로 자극 조건 하에서 조작된다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 재조합이다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 조작, 예를 들어 형질도입되거나 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재 하에서 자극 조건하에서 조작된다.

[0606] 일부 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재했던 것과 동일하거나 유사한 배지의 존재 하에 유전적으로 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재하는 배지와 동일한 사이토카인을 갖는 배지에서 유전적으로 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재하는 배지와 동일한 농도로 동일한 사이토카인을 갖는 배지에서 유전적으로 조작, 형질 전환 또는 형질 도입된다.

[0607] 1. 형질도입

[0608] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 본원에 개시된 장치를 사용하여 선택되고 자극된 세포에 형질도입함으로써 폴리뉴클레오타이드, 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입함으로써 세포(예를 들어, 산출 조성물)를 유전적으로 조작하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 형질도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 감마레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 기술되어 있다.

[0609] 일부 구현예에서, 형질도입은 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자와 하나 이상의 세포 집단(예: 산출 조성물)을 접촉시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 회전 접촉(예를 들어, 원심 분리 접촉)과 같은 원심분리로 달성될 수 있다. 상기 방법은 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기재된 바와 같은 임의의 것을 포함한다. 예시적인 원심분리 챔버는 Biosafe SA에 의해 생산 및 판매되는 챔버를 포함하며, Sepax® 및 Sepax® 2 시스템과 함께 사용하기 위한 챔버를 포함하고, A-200/F 및 A-200 원심분리 챔버 및 상기 시스템과 함께 사용하기 위한 다양한 키트를 포함한다. 예시적인 챔버, 시스템 및 공정 기기 및 캐비닛은

예를 들어 문헌[미국 특허 번호 6,123,655, 미국 특허 번호 6,733,433 및 미국 특허 출원 공개 번호 US2008/0171951, 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/38762]에 기재되어 있고, 각각의 내용은 본 명세서에 그 전체가 참조로 포함된다. 상기 시스템과 함께 사용하기 위한 예시적인 키트는 제품 이름 CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 또는 CS-900.2로 BioSafe SA에서 판매되는 일회용 키트를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0610] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 바이러스 벡터를 자극된 세포 집단 중 (약) 300×10^6 개 또는 이의 미만의 세포, 예를 들어, 자극된 세포 집단의 생존 가능한 T 세포로 형질도입하는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 자극된 세포 집단 중 (약) 100×10^6 개의 세포, 예를 들어, 생존 가능한 T 세포가 형질도입 된다. 일부 구현예에서, mL 당 1×10^6 개의 세포, 예를 들어, 자극된 세포 집단 중 생존 가능한 T 세포가 형질 도입되거나 형질 도입의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 투여량(dose)은 세포 1×10^6 개 당 (약) 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 μ L이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 투여량(dose)은 세포 1×10^6 개 당 (약) 6 내지 4 μ L이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 투여량(dose)은 세포 1×10^6 개 당 (약) 5 μ L이다.

[0611] 일부 구현예에서, 형질도입은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재 하에서 수행된다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포 집단(예를 들어, 산출 조성물)의 세포는, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인 세포의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 함유한다. 일부 구현예에서, 형질도입은 24 내지 48 시간, 36 내지 12 시간, 18 내지 30 시간 또는 (약) 24 시간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 형질도입 단계는, 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건 하의 인큐베이션 시작 또는 개시의 2 일 이내, 36 시간 이내, 30 시간 이내, 24 시간 이내, 12 시간 이내, 5 시간 이내, 4 시간 이내 또는 2 시간 이내에 개시된다. 일부 구현예에서, 형질도입 후 인큐베이션을 포함하는 형질도입은 (약) 72 ± 6 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 (약) 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 (약) 0.5, 1, 1.5, 또는 2 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 (약) 0.5 내지 1.5 시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 (약) 1 시간 동안 수행된다.

[0612] 특정 구현예에서, 형질도입 단계는, 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건 하의 인큐베이션 시작 또는 개시의 2 일 이내, 36 시간 이내, 30 시간 이내, 24 시간 이내, 12 시간 이내, 5 시간 이내, 4 시간 이내 또는 2 시간 이내에 개시된다. 특정 구현예에서, 형질 도입 단계는, 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건 하의 인큐베이션의 시작 또는 개시의 4 내지 5시간 내에 개시된다. 특정 구현예에서, 형질 도입 단계는, 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건 하의 인큐베이션의 시작 또는 개시의 약 20시간에 개시된다. 특정 구현예에서, 형질 도입 단계는, 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건 하의 인큐베이션의 시작 또는 개시의 (약) 4 내지 5시간에 개시된다.

[0613] 일부 구현예에서, 시스템은 시스템에서 수행되는 형질도입 단계 및 하나 이상의 다양한 다른 처리 단계, 예를 들어 본 명세서 또는 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기재된 바와 같은 원심분리 챔버 시스템으로 수행되거나 이와 관련하여 수행될 수 있는 하나 이상의 처리 단계의 측면을 작동, 자동화, 제어 및/또는 모니터링하기 위한 기기를 포함하여 다른 기기와 공동으로 포함되고/거나 이와 공동으로 배치된다. 일부 구현예에서 상기 기기는 캐비닛 내에 포함되어 있다. 일부 구현예에서, 기기에는 제어 회로, 원심분리기, 커버, 모터, 펌프, 센서, 디스플레이 및 사용자 인터페이스를 수용한 하우징을 포함한 캐비닛이 포함된다. 예시적인 디바이스가 문헌 [미국 특허 번호 6,123,655, 미국 특허 번호 6,733,433 및 US 2008/0171951]에 기재되어 있다.

[0614] 일부 구현예에서, 시스템은 일련의 용기, 예를 들어 백, 튜브, 스톱콕, 클램프, 커넥터 및 원심분리 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 백과 같은 용기는 동일한 백 또는 별도의 백과 같은 동일한 용기 또는 별도의 용기에 형질도입될 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 백과 같은 하나 이상의 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 챔버 내로 들어오는 희석제 및/또는 세척 용액 및/또는 방법 중에 성분 및/또는 집단을 희석, 재현탁 및/또는 세척하기 위한 기타 성분 같은 배지를 함유하는, 백 같은 하나 이상의 용기를 더 포함한다. 용기는 시스템의 하나 이상의 위치에, 예컨대 입력 라인, 희석 라인, 세척 라인, 폐기물 라인 및/또는 출력 라인에 대응하는 위치에 연결될 수 있다.

[0615] 일부 구현예에서, 챔버는 예컨대 회전축 주위로 챔버를 회전시킬 수 있는 원심분리기와 결합되어 있다. 회전은 세포의 형질도입과 관련하여 및/또는 다른 처리 단계 중 하나 이상에서 인큐베이션 이전, 도중 및/또는 이후에 발생할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 하나 이상의 다양한 처리 단계는 예를 들어, 특정 힘으로 회전되면서 수행된다. 챔버는 챔버가 원심분리 중에 수직으로 위치하고 측면 벽과 축은 수직 또는 일반적으로 수직이며,

말단 벽은 수평 또는 일반적으로 수평이 되도록, 챔버는 전형적으로 수직 또는 일반적으로 수직 회전할 수 있다.

- [0616] 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기는 캐비티에 집단을 제공하기 전에 결합 또는 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기는 별도로 제공되고, 캐비티에서 결합 또는 혼합된다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단, 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기는 임의의 순서로 내부 캐비티에 제공될 수 있다. 임의의 상기 일부 구현예에서, 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단은, 원심분리 챔버 내부 또는 외부에서 결합 또는 혼합되고/거나 세포 및 바이러스 벡터 입자가 원심분리 챔버에 같이 또는 별도로, 예컨대 동시에 또는 순차적으로 제공되든지 상관없이 일단 결합 또는 서로 혼합되면 투입 집단이 된다.
- [0617] 일부 구현예에서, 공기와 같은 가스 부피의 흡입은, 형질 도입 방법에서 회전과 같은 세포 및 바이러스 벡터 입자를 인큐베이션 하기 전에 발생한다. 일부 구현예에서, 공기와 같은 가스 부피의 흡입은, 형질 도입 방법에서 회전과 같은 세포 및 바이러스 벡터 입자를 인큐베이션 하는 동안 발생한다.
- [0618] 일부 구현예에서, 형질 도입 집단을 구성하는 세포 또는 바이러스 벡터 입자의 액체 부피, 및 선택적으로 공기의 부피는 미리 결정된 부피일 수 있다. 상기 부피는 시스템과 관련된 회로에 의해 프로그램되고/거나 제어되는 부피일 수 있다.
- [0619] 일부 구현예에서, 형질 도입 집단 및 선택적으로 공기와 같은 가스의 유입은, 원하는 또는 미리 결정된 부피가 챔버의 내부 캐비티로 유입될 때까지 수동, 반자동 및/또는 자동으로 제어된다. 일부 구현예에서, 시스템과 관련된 센서는, 예컨대 색상, 유속 및/또는 밀도를 통해 원심분리기 챔버로 흘러가고 오는 액체 및/또는 가스를 검출할 수 있고, 상기 원하는 또는 미리 결정된 부피의 유입이 달성될 때까지 필요에 따라 유입을 중지하거나 계속하기 위해 관련 회로와 통신할 수 있다. 일부 측면에서, 가스(예를 들어 공기)가 아닌 시스템의 액체만을 검출하도록 프로그램되거나 검출할 수 있는 센서는 유입을 중단시키지 않고 시스템으로 공기와 같은 가스의 통과가 가능하도록 제조될 수 있다. 상기 일부 구현예에서, 불투명한 튜브 조각이 공기와 같은 가스의 유입이 필요한 동안 센서 근처의 라인에 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 공기와 같은 가스의 유입을 수동으로 제어할 수 있다.
- [0620] 제공된 방법의 측면에서, 원심분리기 챔버의 내부 캐비티는 고속 회전에 노출된다. 일부 구현예에서, 회전은 액체 투입 집단, 및 선택적으로 공기의 유입과 전, 동시에, 후속적으로 또는 간헐적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 액체 입력 집단 및 선택적으로 공기의 유입 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 내부 캐비티의 측면의 내부 표면 및/또는 세포의 표면 층에서 (약) 또는 적어도 (약) 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 1000 g, 1100 g, 1500, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g, 3500 g 또는 4000 g의 상대적인 원심력으로 원심분리기 챔버의 원심분리에 의한다. 일부 구현예에서, 회전은 약 1100 g 또는 초과, 예컨대 약 1200 g 또는 초과, 약 1400 g 또는 초과, 약 1600 g 또는 초과, 약 1800 g 또는 초과, 약 2000 g 또는 초과, 약 2400 g 또는 초과, 약 2800 g 또는 초과, 약 3000 g 또는 초과 또는 약 3200 g 또는 초과한 힘의 원심분리에 의한다. 특정 구현예에서, 원심분리에 의한 회전은 600 g 내지 800 g의 힘에 의한다. 특정 구현예에서, 원심분리에 의한 회전은 (약) 693 g의 힘에 의한다. 일부 구현예에서, 회전은 (약) 1600 g 힘의 원심분리에 의한다.
- [0621] 일부 구현예에서, 챔버의 캐비티에 있는 공기와 같은 가스가 챔버에서 배출된다. 일부 구현예에서, 공기와 같은 가스가 원심 분리 챔버를 가진 폐쇄 시스템의 일부로서 작동 가능하게 연결된 컨테이너로 배출된다. 일부 구현예에서, 컨테이너는 비어있는 또는 빈 컨테이너이다. 일부 구현예에서, 챔버의 캐비티에 있는 가스와 같은 공기는 멸균 튜브 라인을 경유하여 챔버의 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 필터를 통해 배출된다. 일부 구현예에서, 공기는 수동, 반자동 또는 자동 프로세스를 사용하여 배출된다. 일부 구현예에서, 공기는, 인큐베이션된 세포 및 바이러스 벡터 입자, 예컨대 형질 도입이 개시된 세포 또는 챔버의 캐비티에서 바이러스 벡터로 형질 도입된 세포를 함유하는 산출 집단을 발현하기 전, 동시에, 간헐적으로 또는 후속 적으로 챔버에서 배출된다.
- [0622] 일부 구현예에서, 형질 도입 및/또는 다른 인큐베이션은 연속 또는 반-연속 프로세스로서 또는 상기의 일부로서 수행된다. 일부 구현예에서, 연속 프로세스는 세포 및 바이러스 벡터 입자, 예를 들어 형질 도입 조성물 (단일 기존 조성물로서 또는 동일한 컨테이너, 예를 들어 캐비티로의 연속 유입에 의해 및 이로써 상기 일부의 혼합)의 연속 유입 및/또는 배양의 적어도 일부 동안, 예를 들어 원심 분리 동안 컨테이너에서 액체의 연속적인 발현 또는 배출 및 선택적으로 가스(예를 들어, 공기)의 배출을 수반한다. 일부 구현예에서, 연속 유입 및 연속 발현

은 적어도 부분적으로 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, 연속 유입은 인큐베이션의 일부 중, 예를 들어, 원심 분리의 일부 중 발생하고, 연속 발현은 인큐베이션의 별개의 부분 중 발생한다. 둘은 번갈아가며 할 수 있다. 따라서, 인큐베이션을 수행하는 동안, 연속 유입 및 발현은 전반적인 보다 많은 부피의 샘플의 가공, 예를 들어, 형질 도입을 가능하게 할 수 있다.

[0623] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 연속 프로세스의 일부이며, 방법은 적어도 인큐베이션의 일부 중, 챔버의 회전 중 캐비티로 상기 형질 도입 조성물의 연속 유입을 달성하고, 인큐베이션의 일부 중, 챔버의 회전 중 1회 이상의 개방을 통해 캐비티에서 액체의 연속 발현 및 선택적으로 가스(예를 들어 공기)의 배출을 달성하는 것을 포함한다.

[0624] 일부 구현예에서, 반연속 인큐베이션은 캐비티로 조성물의 유입, 인큐베이션, 캐비티에서 액체의 발현 및 선택적으로 캐비티에서, 예컨대 산출 컨테이너로 가스(예를 들어 공기)의 배출을 수행하고 이어서 보다 많은 세포 및 프로세싱을 위한 다른 시약, 예를 들어 바이러스 벡터 입자를 함유하는 후속적인(예를 들어, 제2, 제3 등) 조성물의 유입 및 상기 프로세스의 반복을 교대로 함으로써 수행된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 인큐베이션은 반연속 프로세스의 일부이고, 방법은 인큐베이션 전, 상기 1회 이상의 개방을 통해 캐비티로 형질 도입 조성물의 유입 및 후속적인 인큐베이션을 수행, 캐비티에서 액체의 발현을 수행하고; 상기 내부 캐비티로 세포 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 또 다른 형질 도입 조성물의 유입을 수행하고; 조건 하에서 상기 내부 캐비티의 또 다른 형질 도입 조성물을 인큐베이션함으로써, 상기 또 다른 형질 도입 조성물의 상기 세포가 상기 벡터로 형질 도입되거나 형질 도입의 대상이 되는 것을 포함한다. 프로세스는 여러 번의 추가 라운드에 대해 반복적인 방식으로 계속될 수 있다. 이 측면에서, 반연속 또는 연속적인 방법은 훨씬 더 많은 부피 및/또는 세포 수의 생산을 허용할 수 있다.

[0625] 일부 구현예에서, 형질 도입 인큐베이션의 일부는, 회전 또는 원심분리를 포함하는 조건 하에서 수행되는 원심 분리 챔버에서 수행된다.

[0626] 특정 구현예에서, 바이러스 벡터로 세포의 형질 도입은 회전 접종, 예를 들어, 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 혼합물의 원심분리이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 조성물을 일반적으로 상대적으로 작은 힘 또는 낮은 속도, 예컨대 세포를 펠릿화하기 위해 사용되는 것보다 더 낮은 속도, 예컨대 (약) 600 rpm 내지 1700 rpm(예를 들어 (약) 또는 적어도 600 rpm, 1000 rpm 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm)으로 회전시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 회전은 예를 들어 챔버 또는 캐비티의 내벽 또는 외벽에서 측정된 바와 같은, (약) 100g 내지 4000g의 힘(예를 들어 (약) 또는 적어도 (약) 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g 또는 3500 g)으로, 예를 들어, 상대 원심력으로 수행된다.

[0627] 일부 구현예에서, 세포는 (약) 100 g 내지 4000 g, 200 g 내지 1,000 g, 500 g 내지 1200 g, 1000 g 내지 2000 g, 600 g 내지 800 g, 1200 g 내지 1800 g 또는 1500 g 내지 1800 g의 힘, 예를 들어, 상대적인 원심력에서 바이러스 벡터로 회전 접종된다. 특정 구현예에서, 세포는 (적어도 또는 약) 100 g, 200 g, 300 g, 400 g, 500 g, 600 g, 700 g, 800 g, 900 g, 1000 g, 1200g, 1500 g, 1600g, 2000 g, 2500 g, 3000 g, 3200 g, 또는 3500 g 동안 바이러스 벡터 입자로 회전 접종된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 692 g의 힘에서 바이러스 벡터로 형질도입 된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 1600 g의 힘에서 바이러스 벡터로 형질도입 된다. 일부 구현예에서, 힘은 내부 캐비티의 측벽의 내부 표면 및/또는 세포의 표면 층에서의 힘이다.

[0628] 특정 구현예에서, 세포는 회전 접종, 예를 들어, 세포 및 바이러스 벡터를 함유하는 세포 조성물이 약 5 분 또는 초과, 예컨대 약 10 분 또는 초과, 약 15 분 또는 초과, 약 20 분 또는 초과, 약 30 분 또는 초과, 약 45 분 또는 초과, 약 60 분 또는 초과, 약 90 분 또는 초과 또는 약 120 분 또는 초과; 또는 (약) 5 분 내지 120 분, 30 분 내지 90 분, 15 분 내지 60 분, 15 분 내지 45 분, 30 분 내지 60 분 또는 45 분 내지 60 분(각각의 수치 포함) 동안 회전된다. 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 30분 동안 회전 접종된다. 특정 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 60분 동안 회전 접종된다.

[0629] 일부 구현예에서, 형질 도입 방법은, 약 5 분 또는 초과, 예컨대 약 10 분 또는 초과, 약 15 분 또는 초과, 약 20 분 또는 초과, 약 30 분 또는 초과, 약 45 분 또는 초과, 약 60 분 또는 초과, 약 90 분 또는 초과 또는 약 120 분 또는 초과 동안 회전 접종, 예를 들어, 원심분리기 챔버에서 형질 도입 조성물 및 선택적으로 공기의 회전 또는 원심분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질 도입 조성물, 및 선택적으로 공기는 5 분 초과이나 60 분 이내, 45 분 이내, 30 분 이내 또는 15 분 이내 동안 원심분리기 챔버에서 회전되거나 원심분리된다. 특정 구현예에서, 형질 도입은 (약) 60 분 동안 회전 또는 원심분리를 포함한다.

- [0630] 일부 구현예에서, 형질 도입 방법은 (약) 10 분 내지 60 분, 15 분 내지 60 분, 15 분 내지 45 분, 30 분 내지 60 분 또는 45 분 내지 60 분(각 수치포함) 동안 내부 캐비티의 측면 벽의 내부 표면 및/또는 세포의 표면 층에서 (약) 1000 g, 1100 g, 1200 g, 1400 g, 1500 g, 1600 g, 1800 g, 2000 g, 2200 g, 2400 g, 2800 g, 3200 g 또는 3600 g의 힘으로 원심분리기 챔버에서 형질 도입 조성물 및 선택적으로 공기의 회전 또는 원심분리를 포함한다. 특정 구현예에서, 형질 도입 방법은, (약) 1600 g에서 (약) 60 분 동안 형질 도입 조성물, 예를 들어 세포 및 바이러스 벡터 입자의 회전 또는 원심분리를 포함한다.
- [0631] 일부 구현예에서, 형질도입의 방법은 회전 또는 원심분리를 포함하지 않는다.
- [0632] **2. 바이러스 벡터 입자**
- [0633] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에서 형질도입을 위해, 재조합 핵산은 예를 들어, 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)로부터 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여 세포내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 전달된다(예를 들어 문헌[Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557] 참조).
- [0634] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열(long terminal repeat sequence, LTR), 예를 들어 몰로니 무린 백혈병 바이러스(MoMLV), 골수증식 육종바이러스(myeloproliferative sarcoma virus, MPSV), 무린 배아줄기세포 바이러스(murine embryonic stem cell virus, MESV), 무린 줄기세포 바이러스(murine stem cell virus, MSCV), 비장 병소 형성 바이러스(spleen focus forming virus, SFFV) 또는 아데노 연관 바이러스(AAV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터를 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 무린 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 공급원으로부터 유래된 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 인간을 포함하여 몇몇 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미하는, 암포트로픽(amphotropic)이다. 일 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스의 gag(갭), pol(폴) 및/또는 env(엔브) 서열을 대체한다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 문헌[예를 들어, 미국 특허 번호 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109]에 기술되어 있다.
- [0635] 바이러스 벡터 유전체는 전형적으로 패키징 또는 생산자 세포주로 형질주입될 수 있는 플라스미드 형태로 작제된다. 상기 예 중 어느 하나에서, 재조합 수용체와 같은 재조합 단백질을 암호화하는 핵산은 일반적으로 바이러스 게놈의 비필수 영역에서와 같이 바이러스 벡터의 영역으로 삽입되거나 위치된다. 일부 구현예에서, 핵산은 특정 바이러스 서열 대신 바이러스 게놈으로 삽입되어 복제 결함이 있는 바이러스를 생성한다.
- [0636] 유전체가 바이러스 벡터 유전체의 RNA 카피를 함유하는 레트로바이러스 입자를 생성하기 위해 다양한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 성분이 바이러스 기반 유전자 전달 시스템을 만드는 데 관여하는데, 첫째, 바이러스 벡터 입자를 생성하는 데 필요한 효소뿐만 아니라 구조 단백질을 포함하는 패키징 플라스미드이고, 둘째, 바이러스 벡터 자체, 즉, 전달될 유전 물질이다. 생물학적 안전성 보호 장치를 상기 성분 중 하나 또는 둘 다의 설계에 도입할 수 있다.
- [0637] 일부 구현예에서, 패키징 플라스미드는 외피 단백질 이외의 HIV-1과 같은 모든 레트로바이러스 단백질을 함유할 수 있다(Naldini et al., 1998). 다른 구현예에서, 바이러스 벡터에는 독성과 관련된 유전자, 예를 들어 vpr, vif, vpu 및 nef 및/또는 Tat, 즉 HIV의 1차 전이 활성 인자(transactivator)와 같은 추가 바이러스 유전자와 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, HIV 기반 렌티바이러스 벡터와 같은 렌티바이러스 벡터는 모 바이러스의 3가지 유전자: gag, pol 및 rev만을 포함하며, 이는 재조합을 통한 야생형 바이러스의 재구성 가능성을 감소시키거나 제거한다.
- [0638] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 유전체는 바이러스 벡터 유전체로부터 전사된 바이러스 유전체 RNA를 바이러스 입자로 패키징하는 데 필요한 모든 성분을 함유하는 패키징 세포주에 도입된다. 대안적으로, 바이러스 벡터 유전체는 하나 이상의 관심 서열, 예를 들어, 재조합 핵산뿐만 아니라 바이러스 성분을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 측면에서, 표적 세포에서 유전체의 복제를 방지하기 위하여, 복제에 필

요한 내인성 바이러스 유전자는 제거되고 패키징 세포주에 별도로 제공된다.

- [0639] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 입자를 생성하는 데 필요한 성분을 함유하는 하나 이상의 플라스미드 벡터로 형질주입된다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 LTR, 시스-작용(cis-acting) 패키징 서열 및 관심 서열, 즉 CAR과 같은 항원 수용체를 암호화하는 핵산; 및 바이러스의 효소 성분 및/또는 구조 성분, 예컨대 Gag, pol 및/또는 rev를 암호화하는 하나 이상의 헬퍼 플라스미드를 포함한 바이러스 벡터 유전체를 함유하는 플라스미드로 형질주입된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터 입자를 생성하는 다양한 유전 성분을 분리하기 위해 다중 벡터가 이용된다. 상기 일부 구현예에서, 패키징 세포에 별도의 벡터를 제공하는 것은 달리 복제 가능 바이러스를 생성할 수 있는 재조합 사건의 기회를 감소시킨다. 일부 구현예에서, 모든 레트로바이러스 성분을 갖는 단일 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다.
- [0640] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터 입자는 숙주 세포의 형질도입 효율을 증가시키기 위한 유사형이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 레트로바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터 입자는 VSV-G 당단백질을 갖는 유사형이고, 이는 형질도입될 수 있는 세포 유형을 확장하여 광범위한 세포 숙주 범위를 제공한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 예컨대 신드비스(Sindbis) 바이러스 외피, GALV 또는 VSV-G와 같은 이종향성(xenotropic), 다방성(polytropic) 또는 암포트로픽(amphotropic) 외피를 포함하는 비천연 외피 당단백질을 암호화하는 플라스미드 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질주입된다.
- [0641] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 바이러스 유전체 RNA를 렌티바이러스 벡터 입자로 패키징하기 위해 트랜스에서 요구되는 바이러스 조절 및 구조 단백질을 포함한 성분을 제공한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 렌티바이러스 단백질을 발현하고 기능성 렌티바이러스 벡터 입자를 생성할 수 있는 임의의 세포주일 수 있다. 일부 측면에서, 적합한 패키징 세포주에는 293(ATCC CCL X), 293T, HeLA(ATCC CCL 2), D17(ATCC CCL 183), MDCK(ATCC CCL 34), BHK(ATCC CCL-10) 및 Cf2Th(ATCC CRL 1430) 세포가 포함된다.
- [0642] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 안정적으로 바이러스 단백질(들)을 발현한다. 예를 들어, 일부 측면에서, gag, pol, rev 및/또는 기타 구조 유전자를 함유하나 LTR 및 패키징 성분은 함유하지 않는 패키징 세포주가 작제될 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 이종 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및/또는 외피 당단백질을 암호화하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터 유전체와 함께 하나 이상의 바이러스 단백질을 암호화하는 핵산 분자로 일시적으로 형질주입될 수 있다.
- [0643] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 및 패키징 및/또는 헬퍼 플라스미드는 패키징 세포주 내로 형질주입 또는 감염을 통해 도입된다. 패키징 세포주는 바이러스 벡터 유전체를 함유하는 바이러스 벡터 입자를 생산한다. 형질주입 또는 감염을 위한 방법은 잘 알려져 있다. 비제한적인 예에는 인산 칼슘, DEAE-텍스트란 및 리포펙션(lipofection) 방법, 전기 천공법 및 미세주입이 포함된다.
- [0644] 재조합 플라스미드, 및 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열이 특수 세포주로(예를 들어, 인산 칼슘 침전에 의해) 도입될 때, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사물이 바이러스 입자로 패키징되도록 허용할 수 있으며, 이어서 이는 배양 배지로 분비될 수 있다. 이어서 일부 구현예에서 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지가 수집되고, 선택적으로 농축 및 유전자 전달을 위해 사용된다. 예를 들어, 일부 측면에서, 패키징 플라스미드 및 전달 벡터를 패키징 세포주로 공형질주입 후, 바이러스 벡터 입자는 배양 배지로부터 회수되어 당업자들에 의해 사용되는 표준 방법에 의해 적정된다.
- [0645] 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자의 생성을 허용하는 플라스미드의 도입에 의해 예시적인 HEK 293T 세포주와 같은 패키징 세포주에서 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징 세포는 형질주입되고/거나 gag 및 pol을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체(예를 들어, CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 rev 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 선택적 및/또는 추가적으로 형질주입되고/거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 VSV-G와 같은 비천연 외피 당단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 임의적 및/또는 추가적으로 형질주입되고/거나 이를 함유한다. 일부 상기 구현예에서, 세포(예를 들어, HEK 293T 세포)의 형질주입 후 대략 2일 후에, 세포 상층액은 재조합 렌티바이러스 벡터를 함유하고 이는 회수되어 적정될 수 있다.
- [0646] 회수 및/또는 생성된 레트로바이러스 벡터 입자는 기술된 바와 같은 방법을 사용하여 표적 세포를 형질도입하는데 사용될 수 있다. 일단 표적 세포에서, 바이러스 RNA는 역전사되고, 핵으로 들어가서 안정적으로 숙주 유전체에 통합된다. 바이러스 RNA의 통합 후 1 또는 2일 후, 재조합 단백질(예를 들어, 항원 수용체, 예컨대 CAR)의

발현이 검출될 수 있다.

[0647] 3. 세포의 인큐베이션

[0648] 예컨대 바이러스 벡터로 세포(예를 들어, 산출 조성물)의 형질 전환(예를 들어 형질 도입)에 의한 유전자 조작을 포함하는 본원의 방법의 구현예에서, 방법은 세포를 바이러스 벡터와 도입 또는 접촉시킨 후 세포를 인큐베이션하는 하나 이상의 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어, 형질 전환된 세포 집단의 세포는 세포로 바이러스 벡터를 도입시키기 위하여 세포의 유전자 조작, 형질 전환, 형질 도입 또는 형질 감염을 위한 후속적인 프로세스에서 인큐베이션 된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 인큐베이션된 세포의 집단(여기서 인큐베이션된 세포 집단으로도 지칭)을 초래한다.

[0649] 일부 구현예에서, 이종 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 바이러스 벡터 입자의 도입이 세포의 추가적인 프로세싱 없이 수행된 후에, 세포는 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션 전에 세포는 세척되어 예컨대, 회전 접종 후 유전자 조작 프로세스 후에 배지에 남아있는 것과 같은 이종 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 바이러스 벡터 입자를 암호화하는 외인성 또는 남아있는 폴리뉴클레오타이드를 제거하거나 실질적으로 제거한다.

[0650] 상기 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션이 하나 이상의 세포의 숙주 계층으로 바이러스 벡터의 통합을 초래하는 조건 하에서 수행된다. 인큐베이션이 숙주 계층으로 바이러스 벡터 입자의 통합을 초래했는지 여부를 평가하거나 결정하고, 따라서 추가 인큐베이션에 대한 조건을 경험적으로 결정하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 숙주 계층으로 바이러스 벡터의 통합은, 인큐베이션 후 바이러스 벡터 입자의 계층에 함유된 핵산에 의해 암호화된 이종 단백질과 같은 재조합 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 재조합 분자의 발현 수준을 평가하기 위한 다수의 잘 알려진 방법으로, 예컨대 유세포 분석에 의해 예를 들어, 세포 표면 단백질의 맥락에서 예컨대, 친화도 기반 방법, 예를 들어, 면역 친화도 기반 방법에 의한 검출이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 발현은 형질 도입 마커 및/또는 리포터 작제물의 검출에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 절단형 표면 단백질을 암호화하는 핵산은 벡터 내에 포함되고, 발현 및/또는 이의 증진 마커로서 사용된다.

[0651] 특정 구현예에서, 인큐베이션은 원심 분리, 멸립, 회전, 흔들림 또는 관류, 예를 들어 배지의 연속 또는 반 연속 관류를 수반하지 않는 조건과 같은 정적 조건 하에서 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션 개시 전 또는 직후, 예를 들어 5 분, 15 분 또는 30 분 이내에, 세포는 백 또는 바이알과 같은 컨테이너로 전달(예를 들어, 멸균 조건 하에서 전달)되고, 인큐베이터에 배치된다.

[0652] 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는 예를 들어, 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기재된 바와 같은 원심분리기 챔버의 내부 캐비티에서 수행된다.

[0653] 일부 구현예에서, 이종 또는 재조합 폴리펩타이드, 예를 들어, 바이러스 벡터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 도입되었던 세포는 인큐베이션을 위한 컨테이너로 전달된다. 일부 측면에서, 컨테이너는 바이알(vial)이다. 일부 측면에서, 컨테이너는 백(bag)이다. 일부 구현예에서, 세포 및 선택적으로 이종 또는 재조합 폴리펩타이드는 폐쇄되거나 또는 멸균 조건 하에서 컨테이너로 전달된다. 일부 구현예에서, 이어서 컨테이너, 예를 들어, 바이알 또는 백은 인큐베이션의 전부 또는 일부를 위해 인큐베이터에 배치된다. 특정 구현예에서, 인큐베이터는 (약) 16℃, 24℃ 또는 35℃ 또는 적어도 16℃, 24℃ 또는 35℃로 설정된다. 일부 구현예에서, 인큐베이터는 (약) 37℃ 또는 37℃ ±2℃, ±1℃, ±0.5℃ 또는 ±0.1℃로 설정된다.

[0654] 일부 측면에서, 인큐베이션을 위한 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 인큐베이션 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인(chemokines), 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화시키기 위해 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0655] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 한정된 및/또는 잘-한정된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 여과된 조절 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 포함할 수 있다.

[0656] 특정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수

용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식 세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-12이거나 이를 포함한다.

[0657] 특정 구현예에서, 세포는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 재조합이다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0658] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 10 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 250 IU/mL 내지 500 IU/mL 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 농도에서 사이토카인(예를 들어, 재조합 인간 사이토카인)과 함께 인큐베이션된다.

[0659] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2와 함께 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL 또는 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-2와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0660] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 500 IU/mL 내지 750 IU/mL, 750 IU/mL 내지 1,000 IU/mL 또는 550 IU/mL 내지 650 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7과 함께 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 또는 1,000 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-7과 함께 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 600 IU/mL의 IL-7의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0661] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15와 함께 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL 또는 200 IU/mL의 농도에서 재조합 IL-15와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질 전환된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0662] 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어, 형질 전환된 세포는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 재조합이다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0663] 일부 구현예에서, 세포는 예컨대 상기 기재된 자극(예를 들어 온-컬럼 자극) 방법 또는 프로세스와 관련하여 수행된 세포의 자극 중에 존재했던 것과 동일하거나 유사한 배지의 존재 하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 예컨대 상기 기재된 자극 방법 또는 프로세스와 관련하여 수행된 세포의 자극 중에 존재한 배지와 동일한 사이토카인을 갖는 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 예컨대 상기 기재된 자극 방법 또는

프로세스와 관련하여 수행된 세포의 자극 중에 존재한 배지와 동일한 농도로 동일한 사이토카인을 갖는 배지에서 인큐베이션된다.

[0664] 일부 구현예에서, 세포는 재조합 사이토카인의 부재에서 인큐베이션된다.

[0665] 일부 구현예에서, 인큐베이션의 전부 또는 일부는 기본 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 무기염, 설탕, 아미노산 및 선택적으로 비타민, 유기산 및/또는 완충제 또는 기타 잘 알려진 세포 배양 영양소의 혼합물을 함유한다. 영양소 외에 배지는 또한 pH와 오스몰 농도 유지를 돕는다. 일부 측면에서, 기본 배지 시약은 세포 성장, 증식 및/또는 증폭을 지원한다. 상업적으로 이용 가능한 다양한 기본 배지가 당업자에게 잘 알려져 있으며, DMEM(Dulbeccos' Modified Eagles Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), Iscove modified Dulbeccos' 배지 및 Hams 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 이스코브의 변형 돌백코 배지(Iscove's Modified Dulbeccos' Medium), RPMI-1640 또는 α -MEM이다.

[0666] 일부 구현예에서, 기본 배지는 균형 잡힌 염용액(예를 들어, PBS, DPBS, HBSS, EBSS)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), F-10, F-12, RPMI 1640, GMEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), 알파 MEM(alpha Minimal Essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 및 M199로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 복합 배지(예를 들어, RPMI-1640, IMDM)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 OpTmizer™ CTS™ T 세포 증폭 기본 배지(ThermoFisher)이다.

[0667] 특정 구현예에서, 기본 배지는 추가 첨가제로 보충된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 임의의 추가 첨가제로 보충되지 않는다. 세포 배양 배지에 대한 첨가제는 영양소, 당, 예를 들어 글루코스, 아미노산, 비타민, 또는 첨가제, 예컨대 ATP 및 NADH를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0668] 일부 구현예에서, 기본 배지는 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간 단백질(예를 들어, 인간 혈청 단백질)이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 혈청이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간으로부터 유래된 혈청이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지에는 재조합 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간 단백질과 재조합 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간 단백질과 재조합 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상 또는 모든 사이토카인이 없다.

[0669] 일부 구현예에서, 예를 들어, 비증폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가 임의의 추가 첨가제 또는 재조합 사이토카인이 없는 기본 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 임의의 추가 첨가제 또는 재조합 사이토카인이 없는 CTS OpTmizer 기본 배지(ThermoFisher)이다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 비증폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가 기본 배지 및 글루타민을 포함하는 배지, 예를 들어 글루타민을 갖는 CTS OpTmizer 기본 배지(ThermoFisher)에서 수행된다.

[0670] 일부 구현예에서, 예를 들어, 비증폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가, 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 재조합 인간 IL-2, 재조합 인간 IL-7 및/또는 재조합 인간 IL-15가 없는 기본 배지(예를 들어, CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher))를 포함하는 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배지는 하나 이상의 추가 비혈청 성분으로 보충된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 보충제는 무혈청이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민과 같은 아미노산의 유리 형태를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 대체 보충물을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 디펩타이드 형태의 L-글루타민(예를 들어, L-알라닐-L-글루타민)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 임의의 재조합 사이토카인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는, T 세포 보충물 및 유리 형태의 L-글루타민으로 보충된 기본 배지를 포함하고, 임의의 면역 세포 혈청 대체제, 임의의 디펩타이드 형태의 L-글루타민 또는 임의의 재조합 사이토카인을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 기본 배지(예를 들어 OpTmizer™ T 세포 증폭 기본 배지 보충된), L-글루타민 및 보충물(예를 들어 OpTmizer™ T 세포 증폭 보충물)에 의해 제공되는 것과 같은 하나 이상의 추가 성분을 포함한다.

[0671] 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL, 0.5×10^6 cells/mL, 0.75×10^6 cells/mL, 1.0×10^6 cells/mL, 1.25×10^6 cells/mL, 1.5×10^6 cells/mL, 1.75×10^6 cells/mL, 또는 2.0×10^6 cells/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 1.0×10^6 cell/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 0.75×10^6 cell/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.5×10^6 cells/mL 내지

0.75×10^6 cell/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 0.5×10^6 cell/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.75×10^6 cells/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.5×10^6 cells/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 18 시간 내지 30 시간 동안이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24 시간 또는 (약) 1 일 동안이다.

[0672] 특정 구현예에서, 세포는 사이토카인의 부재에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 임의의 재조합 사이토카인의 부재에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 부재 하에서 인큐베이션된다.

[0673] 일부 구현예에서, 예를 들어, 비중폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가 기본 배지, 글루타민, 및 하나 이상 재조합 사이토카인의 포함하는 배지, 예를 들어 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15을 갖는 CTS OpTmizer 기본 배지(ThermoFisher)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 비중폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가 기본 배지, 글루타민, 하나 이상 재조합 사이토카인, 및 T 세포 보충물을 포함하는 배지, 예를 들어 글루타민, 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15, 및 OpTmizer® 보충물(Thermofisher)을 갖는 CTS OpTmizer 기본 배지(ThermoFisher)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 비중폭 프로세스 중 인큐베이션의 전부 또는 일부가 기본 배지, 글루타민, 하나 이상 재조합 사이토카인, T 세포 보충물 및 하나 이상 혈청-대체 단백질을 포함하는 배지, 예를 들어 글루타민, 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15, OpTmizer® 보충물(Thermofisher), 및 하나 이상의 알부민, 인슐린, 트랜스페린과 같은 혈청-대체 단백질을 갖는 CTS OpTmizer 기본 배지(ThermoFisher)에서 수행된다.

[0674] 일부 구현예에서, 기본 배지는 L-글루타민과 같은 글루타민을 포함한다. 일부 측면에서, 글루타민은 L-글루타민과 같은, 유리 형태의 글루타민이다. 일부 구현예에서, 기본 배지에서 글루타민, 예컨대, L-글루타민의 농도는 약 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM 또는 4.5mM-5mM(각각의 수치 포함) (미만)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지에서 글루타민, 예컨대, L-글루타민의 농도는 적어도 약 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지에서 글루타민, 예컨대, L-글루타민의 농도는 최대 약 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 5mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지에서 글루타민, 예컨대, L-글루타민의 농도는 약 2 mM이다.

[0675] 일부 구현예에서, 기본 배지는 단백질 또는 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단백질은 비포유류 기원이 아니다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단백질은 인간 또는 인간 유래 단백질이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단백질은 재조합이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 단백질은 알부민, 트랜스페린, 인슐린, 피브로넥틴, 아프로티닌 또는 페투인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 하나 이상의 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린, 선택적으로 하나 이상의 인간 또는 재조합 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린을 포함한다.

[0676] 일부 구현예에서, 단백질은 알부민 또는 알부민 대체제이다. 일부 구현예에서, 알부민은 인간 유래 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 재조합 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 천연 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 재조합 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 인간이 아닌 공급원으로부터의 재조합 알부민이다. 알부민 대체제는 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드 공급원일 수 있다. 상기 단백질 또는 폴리펩타이드 샘플의 예로는 소 뇌하수체 추출물, 식물 가수분해물(예를 들어, 쌀 가수분해물), 태아 송아지 알부민(페투인), 달걀 알부민, 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA) 또는 다른 동물 유래 알부민, 병아리 추출물, 소 배아 추출물, AlbuMAX® I 및 AlbuMAX® II를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 트랜스페린을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 피브로넥틴(fibronectin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 아프로티닌(aprotinin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 페투인(fetuin)을 포함한다.

[0677] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 단백질은 기본 배지에 첨가된 혈청 대체 보충물의 일부이다. 혈청 대체 보충물의 예는, 예를 들어 면역 세포 혈청 대체제(ThermoFisher, #A2598101) 또는 Smith *et al.* Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31에 기재된 것을 포함한다.

- [0678] 특정 구현예에서, 세포는, 이중 또는 재조합 단백질, 예를 들어 바이러스 벡터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입 후에 (약 또는 적어도) 18 시간, 24 시간, 30 시간, 36 시간, 40 시간, 48 시간, 54 시간, 60 시간, 72 시간, 84 시간, 96 시간 또는 96 시간 초과 동안 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 유전자 조작 전 30 분 내지 2 시간, 1 시간 내지 8 시간, 6 시간 내지 12 시간, 12 시간 내지 18 시간, 16 시간 내지 24 시간, 18 시간 내지 30 시간, 24 시간 내지 48 시간, 24 시간 내지 72 시간, 42 시간 내지 54 시간, 60 시간 내지 120 시간 96 시간 내지 120 시간, 90 시간 내지 1 일 내지 7 일, 3 일 내지 8 일, 1 일 내지 3 일, 4 일 내지 6 일 또는 4 일 내지 5 일의 시간량 동안 인큐베이션이 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 18 시간 내지 30 시간 동안이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24 시간 동안이다.
- [0679] 특정 구현예에서, 인큐베이션의 총 지속 기간은 (약 또는 적어도) 12 시간, 18시간, 24 시간, 30 시간, 36 시간, 42 시간, 48 시간, 54 시간, 60 시간, 72 시간, 84 시간, 96 시간, 108 시간 또는 120 시간이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 84 시간, 72 시간, 60 시간, 54 시간, 48 시간, 42 시간, 36 시간, 30 시간, 24 시간, 18 시간 또는 12 시간 (이내)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 총 지속 기간은 (약) 12 시간 내지 120 시간, 18 시간 내지 96 시간, 24 시간 내지 72 시간 또는 24 시간 내지 48 시간(수치 포함)이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 총 지속 기간은 (약) 1 시간 내지 48 시간, 4 시간 내지 36 시간, 8 시간 내지 30 시간 또는 12 시간 내지 24 시간(수치 포함)이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24 시간, 48 시간 또는 72 시간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 24 시간 $\pm$ 6 시간, 48 시간 $\pm$ 6 시간, 또는 72 시간 $\pm$ 6 시간 동안 수행된다.
- [0680] 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약 또는 적어도) 12 시간, 18시간, 24 시간, 30 시간, 36 시간, 42 시간, 48 시간에 개시된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 84 시간, 72 시간, 60 시간, 54 시간, 48 시간, 42 시간, 36 시간, 30 시간, 24 시간, 18 시간 또는 12 시간 (이내)에 개시된다.
- [0681] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약) 24 시간 내지 120 시간, 36 시간 내지 108 시간, 48 시간 내지 96 시간 또는 48 시간 내지 72 시간(수치 포함)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 72 시간, 48 시간 또는 36 시간(이내)에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 24 시간 $\pm$ 6 시간, 48 시간 $\pm$ 6 시간 또는 72 시간 $\pm$ 6 시간 후에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 72 시간 또는 (약) 3 일 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 세포의 계층으로 이중 또는 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 통합이 허용되기 위한 충분한 지속기간 동안 수행된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약 또는 적어도) 12 시간, 18 시간, 24 시간, 30 시간, 36 시간, 42 시간, 48 시간에 개시된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약 또는 적어도) 0.5 일, 1 일, 1.5 일 또는 2 일에 개시된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 84 시간, 72 시간, 60 시간, 54 시간, 48 시간, 42 시간, 36 시간, 30 시간, 24 시간, 18 시간 또는 12 시간 (이내)에 개시된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시의 (약) 11 시간, 10 시간, 9 시간, 8 시간, 7 시간, 6 시간, 5 시간, 또는 4 시간(이내)에 개시된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시의 (약) 5 일, 4 일, 3 일, 2 일, 1 일 또는 0.5 일(이내)에 개시된다.
- [0682] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 (약) 24 시간 내지 120 시간, 36 시간 내지 108 시간, 48 시간 내지 96 시간 또는 48 시간 내지 72 시간(수치 포함)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 72 시간, 48 시간 또는 36 시간(이내)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 5 일, 4.5 일, 4 일, 3 일, 2 일 또는 1.5 일(이내)에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 후 24 시간 $\pm$ 6 시간, 48 시간 $\pm$ 6 시간 또는 72 시간 $\pm$ 6 시간 후에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 72 시간 또는 (약) 3 일 후에 완료된다.
- [0683] 임의의 상기 구현예 중 일부에서, 조작된 세포는 세포 집단(예를 들어, 생존 가능한 T 세포 수)을 증폭시키기 위한 배양 조건 하에서 인큐베이션 되지 않는다. 임의의 상기 구현예 중 일부에서, 세포는 인큐베이션 또는 배양 동안에 생존 세포의 양을 증가시키는 배양 조건 하에서 인큐베이션 되지 않는다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포는 인큐베이션의 초기에 총 생존 세포 수에 대비해 인큐베이션 말기에 총 생존 세포 양을 증가시키는 조건 (예를 들어, 배양 조건) 하에서 인큐베이션 되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 증폭을 초래할 수 있는 조건 하에서 인큐베이션 되지만, 인큐베이션 조건은 세포 집단을 증폭시키기 위한 목적으로 수행되지 않는다. 일부 구현예에서, 증폭 또는 증식을 촉진 또는 용이하게 하지 않는 조건 하에서 인큐베이션된 세포는 비-증폭 또는 최소한으로 증폭된으로 지칭될 수 있다.

- [0684] 일부 구현예에서, 형질도입 또는 조작된 세포는 유전자 조작 단계 이후에, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해 재조합 폴리펩타이드를 세포에 도입하는 단계 이후에 증식 및/또는 증폭을 증진하는 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드)로 세포가 형질도입되거나 형질감염된 후, 배양된다. 일부 구현예에서, 배양은 조작된 T 세포의 하나 이상의 배양 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 배양 조건은 집단 내에서 세포의 증식, 증폭, 활성화, 및/또는 생존을 유도하도록 설계될 수 있다. 특정 구현예에서, 배양 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포의 성장, 분열, 및/또는 증폭을 촉진하도록 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건 하에서 인큐베이션된 세포는 증폭된 세포로 지칭될 수 있다.
- [0685] 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL, 0.5×10^6 cells/mL, 0.75×10^6 cells/mL, 1.0×10^6 cells/mL, 1.25×10^6 cells/mL, 1.5×10^6 cells/mL, 1.75×10^6 cells/mL, 또는 2.0×10^6 cells/mL의 농도로 (예컨대, 배양되는) 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 1.0×10^6 cell/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 0.75×10^6 cell/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.5×10^6 cells/mL 내지 0.75×10^6 cell/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 cells/mL 내지 0.5×10^6 cell/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.75×10^6 cells/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 0.5×10^6 cells/mL의 농도로 배양 조건 하에서 인큐베이션된다.
- [0686] 일부 구현예에서, 조작된 세포는 첨가된 세포의 배양을 위한 세포 배지 및/또는 세포로, 예를 들어, 급이 포트(feed port)를 통해, 채워질 수 있는 컨테이너에서 배양(cultivated, 예컨대 cultured)된다. 세포의 배양이 예를 들어, 세포의 증폭 및/또는 증식을 위해 바람직한 임의의 세포 공급원으로부터 세포가 유래될 수 있다.
- [0687] 일부 측면에서, 배양 배지는 T 세포와 같은 세포의 성장, 배양, 증폭 또는 증식을 지원하는 적응된 배양 배지이다. 일부 측면에서, 배지는 염, 아미노산, 비타민, 설탕 또는 이의 임의의 조합물의 혼합물을 함유하는 액체일 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 예컨대 인큐베이션 동안 세포의 증폭 또는 증식을 자극하기 위한 하나 이상의 자극 조건 또는 제제를 더 함유한다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 예컨대, IL-2, IL-7 또는 IL-15로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식 세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-12이거나 이를 포함한다.
- [0688] 일부 구현예에서, 배양 동안 배양 배지에서 하나 이상의 사이토카인의 농도는 독립적으로 (약) 1 IU/mL 내지 1500 IU/mL, 예컨대 (약) 1 IU/mL 내지 100 IU/mL, 2 IU/mL 내지 50 IU/mL, 5 IU/mL 내지 10 IU/mL, 10 IU/mL 내지 500 IU/mL, 50 IU/mL 내지 250 IU/mL 또는 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 1500 IU/mL, 100 IU/mL 내지 1000 IU/mL 또는 200 IU/mL 내지 600 IU/mL이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인의 농도는 독립적으로 (약) 1 IU/mL, 5 IU/mL, 10 IU/mL, 50 IU/mL, 100 IU/mL, 200 IU/mL, 500 IU/mL, 1000 IU/mL 또는 1500 IU/mL 이상이다.
- [0689] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 조성물은 25 내지 38°C, 예컨대 30 내지 37°C, 예를 들어, (약) 37°C $\pm$ 2°C의 온도에서 배양된다. 일부 구현예에서, 배양 조건(cultivating condition)은 배양(culture)(예를 들어, 육성(cultivation) 또는 증폭)이 원하는 또는 임계 밀도, 농도, 세포 수 또는 세포의 단위 용량으로 귀결될 때까지

의 기간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 배양(예를 들어, 육성 또는 증폭)이 원하는 또는 임계 밀도, 농도, 생존 세포 수 또는 생존 세포의 단위 용량으로 귀결될 때까지의 기간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 그 이상 초과 또는 약 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 그 이상 초과 또는 약 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 그 이상 동안 수행된다.

[0690] 일부 구현예에서, 세포는 세포 배양 중 이산화탄소의 표적량을 유지하기 위한 조건 하에서 인큐베이션 또는 배양된다. 일부 측면에서, 이는 성장 중 세포의 최적 배양, 증폭 및 증식을 보장한다. 일부 측면에서, 이산화탄소 (CO_2)의 양은 상기 가스의 10% 내지 0% (v/v) 사이, 예컨대 상기 가스의 8% 내지 2% (v/v)사이, 예를 들어 (약) 5% (v/v) CO_2 의 양이다.

[0691] 특정 구현예에서, 배양은 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 특정 구현예에서, 배양은 멸균 조건 하에서 폐쇄된 시스템으로 수행된다. 일부 구현예에서 조작된 세포의 조성물은 폐쇄된 시스템에서 제거되어 배양을 위한 생물 반응기에 배치되고/거나 연결된다. 배양에 적합한 생물 반응기의 예에는 GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems 및 Pall XRS Bioreactor Systems이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 생물 반응기는 배양 단계 중 적어도 일부 동안 세포를 관류 및/또는 혼합하는 데 사용된다.

[0692] 일부 구현예에서, 생물 반응기로 둘러싸인, 연결된 및/또는 제어 하에 배양된 세포는 생물 반응기 없이 배양된 세포, 예를 들어 예컨대 혼합, 흔들림, 이동 및/또는 관류 없이 정적 조건 하에서 배양된 세포보다 배양 도중 더 빠르게 증폭이 된다. 일부 구현예에서, 생물 반응기로 둘러싸인, 연결된 및/또는 제어 하에 배양된 세포는 14일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간 또는 12시간 내에 임계 증폭, 세포 수 및/또는 밀도에 도달하거나 이를 달성한다. 일부 구현예에서, 생물 반응기로 둘러싸인, 연결된 및/또는 제어 하에 배양된 세포는 생물 반응기로 둘러싸인, 연결된 및/또는 제어 하에 세포가 배양되지 않은 예시적 및/또는 대안 적 공정에서 배양된 세포보다 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배 임계 증폭, 세포 수 및/또는 밀도에 도달하거나 이를 달성한다.

[0693] 일부 구현예에서, 혼합은 흔들림 및/또는 움직임이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 생물 반응기와 관련하여 사용되는 용기(예를 들어, 백)를 사용하여 인큐베이션된다. 일부 경우에, 생물 반응기는 움직임이나 흔들림을 거칠 수 있고, 이는 일부 측면에서, 산소 전달을 증가시킬 수 있다. 생체 반응기를 움직이는 것은 수평 축을 따라 회전하는 것, 수직 축을 따라 회전하는 것, 생물 반응기의 경사진 또는 기울어진 수평 축을 따라 흔들리는 움직임 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는 흔들리면서 수행된다. 흔들리는 속도 및 흔들리는 각도는 원하는 교환을 달성하기 위해 조정될 수 있다. 일부 구현예에서 흔들기 각도는 (약) 20° , 19° , 18° , 17° , 16° , 15° , 14° , 13° , 12° , 11° , 10° , 9° , 8° , 7° , 6° , 5° , 4° , 3° , 2° 또는 1° 이다. 특정 구현예에서, 흔들기 각도는 $6-16^\circ$ 이다. 다른 구현예에서, 흔들기 각도는 $7-16^\circ$ 이다. 다른 구현예에서, 흔들기 각도는 $8-12^\circ$ 이다. 일부 구현예에서, 흔들기 속도는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm이다. 일부 구현예에서, 흔들기 속도는 4 내지 12rpm, 예컨대 4 내지 6rpm(수치 포함) 사이이다. 세포 배양 증폭의 적어도 일부는 흔들림 동작, 예컨대 5° 내지 10° 사이, 예컨대 6° 의 각도에서, 일정한 흔들림 속도, 예컨대 5 내지 15RPM 사이, 예컨대 6RMP 또는 10RPM의 속도로 수행된다.

[0694] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포, 조작된 CD3+ T 세포, 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T 세포를 포함하는 조성물은, 계면활성제의 존재 하에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 세포를 배양하는 것은 예를 들어 혼합, 락킹, 모션, 및/또는 관류에 기인하여 상기 배양 도중에 발생할 수 있는 전단 응력의 양을 감소시킨다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포, 예를 들어, 조작된 CD3+ T 세포, 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T 세포의 조성물은 계면활성제와 함께 배양되며 배양이 종료된 후 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 7일 초과 동안, 또는 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 7일 초과 동안 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.9%의 T 세포가 생존, 예를 들어 생존 가능하고/거나 피사, 프로그램된 세포 사멸, 또는 세포자연사되지 않는다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포, 예를 들어, 조작된 CD3+ T 세포, 조작된 CD4+ T 세포 또는 조작된 CD8+ T

세포의 조성물은 계면활성제의 존재 하에서 배양되고 50 % 미만, 40 % 미만, 30 % 미만, 25 % 미만, 20 % 미만, 15 % 미만, 10 % 미만, 5 % 미만, 1 % 미만, 0.1 % 미만 또는 0.01 % 미만의 세포가 예를 들어 전단 또는 전단 유도 스트레스로 인해 세포 사멸, 예를 들어 프로그램된 세포 사멸, 세포자연사 및/또는 괴사를 겪는다.

- [0695] 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포, 예를 들어, 조작된 CD4⁺ T 세포 또는 조작된 CD8⁺ T 세포의 조성물은 0.1 μ
- [0696] l/ml 내지 10.0 μ l/ml, 0.2 μ l/ml 내지 2.5 μ l/ml, 0.5 μ l/ml 내지 5 μ l/ml, 1 μ l/ml 내지 3 μ l/ml, 또는 2 μ l/ml 내지 4 μ l/ml 의 계면활성제 존재 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포, 예컨대 조작된 T 세포,
- [0697] 예를 들어, 조작된 CD4⁺ T 세포 또는 조작된 CD8⁺ T 세포의 조성물은 (약 또는 적어도) 0.1 μ l/ml, 0.2 μ l/ml, 0.4 μ l/ml, 0.6 μ l/ml, 0.8 μ l/ml, 1 μ l/ml, 1.5 μ l/ml, 2.0 μ l/ml, 2.5 μ l/ml, 5.0 μ l/ml, 10 μ l/ml, 25 μ l/ml, 또는 50 μ l/ml의 계면활성제 존재 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 2 μ l/ml 의 계면활성제의 존재 하에서 배양된다.
- [0698] 일부 구현예에서, 계면활성제는 액체 및/또는 고체의 표면 장력을 감소시키는 제제이거나 이를 포함한다. 예를 들어, 계면활성제는 지방 알코올(예를 들어 스테릴 알코올), 폴리옥시에틸렌 글리콜 옥틸페놀 에테르(예를 들어 Triton X-100) 또는 폴리옥시에틸렌 글리콜 소르비탄 알킬 에스테르(예를 들어 폴리소르베이트 20, 40, 60)를 포함한다. 특정 구현예에서, 계면활성제는 폴리소르베이트(Polysorbate) 80(PS80), 폴리소르베이트 20(PS20), 폴록사머(poloxamer) 188(P188)로 구성된 군에서 선택된다. 예시적인 구현예에서, 화학적으로 정의된 공급 배지에서 계면 활성제의 농도는 PS80의 약 0.0025 % 내지 약 0.25 % (v / v); PS20의 약 0.0025 % 내지 약 0.25 % (v / v); 또는 P188의 약 0.1 % 내지 약 5.0 % (w / v)이다.
- [0699] 일부 구현예에서, 계면 활성제는 음이온성 계면 활성제, 양이온성 계면 활성제, 양쪽이온성 계면 활성제 또는 이에 첨가된 비이온성 계면활성제이거나 이를 포함한다. 적합한 음이온성 계면 활성제는 알킬 설포네이트, 알킬 포스페이트, 알킬 포스포네이트, 포타슘 라우레이트, 트리에탄올 아민 스테아레이트, 소듐 라우릴설페이트, 소듐 도데실설페이트, 알킬 폴리옥시에틸렌 설페이트, 소듐 알기네이트, 디옥틸 소듐 설포석시네이트, 포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜 이노신, 포스파티딜이노시톨, 디포스파티딜 글리세롤, 포스파티딜세린, 포스파티드산 및 이들의 염, 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 콜산 및 다른 담즙산(예를 들어, 콜산, 데옥시콜산, 글리코콜산, 타우로콜산, 글리코데옥시 콜산) 및 이의 염 (예를 들어, 데옥시콜레이트 나트륨)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0700] 일부 구현예에서, 적합한 비이온성 계면 활성제는 다음을 포함한다:
- [0701] 글리세릴 에스테르, 폴리옥시에틸렌 지방 알코올 에테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 (폴리소르베이트), 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 소르비탄 에스테르, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 세틸 알코올, 세토스테아릴 알코올, 스테아릴 알코올, 아릴 알킬 폴리에테르 알코올, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌 공중 합체 (폴록사머), 폴록사민, 메틸셀룰로스, 하이드록시메틸 셀룰로스, 하이드록시 프로필 셀룰로스, 하이드록시 프로필메틸 셀룰로스, 비결정질 셀룰로스, 전분 및 전분 유도체를 포함하는 다당류 예를 들어 하이드록시에틸 전분 (hydroxyethylstarch, HES), 폴리비닐알코올 및 폴리비닐피롤리돈. 특정 구현예에서, 비이온성 계면 활성제는 폴리 옥시 에틸렌 및 폴리 옥시 프로필렌 공중합체, 바람직하게는 프로필렌 글리콜 및 에틸렌 글리콜의 블록 공중합체이다. 이러한 중합체는 PLURONIC®F68 또는 Kolliphor®P188이라고도 하는 상표명 POLOXAMER로 판매된다. 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르 중에는 알킬 사슬이 짧은 것이 포함된다. 이러한 계면활성제의 일례는 SOLUTOL®HS 15, 폴리에틸렌-660-하이드록시스테아레이트이다.
- [0702] 일부 구현예에서, 적합한 양이온성 계면 활성제는 천연 인지질, 합성 인지질, 4 급 암모늄 화합물, 벤즈 알코늄 클로라이드, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드, 키토산, 라우릴 디메틸 벤질 암모늄 클로라이드, 아실 카르니틴 히드록클로라이드, 디메틸 디옥타데실 브롬화 암모늄 (DDAB), 디올레올트리메틸 암모늄 프로판(DOTAP), 디미리스토일 트리메틸 암모늄 프로판 (DMTAP), 디메틸 아미노에탄 카르바모일 콜레스테롤 (DC-Chol), 1,2- 디아실 글리세로-3-(0-알킬) 포스포콜린, 0- 알킬 포스파티딜콜린 알킬 퍼리디늄 할라이드, 또는 장쇄 알킬 아민, 예를 들어 n-옥틸 아민 및 올레일 아민을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0703] 양쪽이온성 계면 활성제는 전기적으로 중성이지만 동일한 분자 내에 국소 양전하 및 음전하를 갖는다. 적합한 양쪽이온성 계면 활성제는 양쪽이온성 인지질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적합한 인지질은 포스파티

딜콜린, 포스파티딜 에탄올 아민, 디아실-글리세로 포스포 에탄올 아민 (예를 들어 디미리스토일-글리세로 포스포 에탄올 아민 (DMPE), 디팔미토일-글리세로-포스포 에탄올 아민 (DPPE), 디스테아로일-글리세로 포스포 에탄올 아민 (DSPE), 및 다이올레오일-글리세로-포스포에탄올 아민 (dioleoyl-glycerophosphoethanolamine DOP E))을 포함한다. 음이온성 및 양쪽이온성 인지질을 포함하는 인지질의 혼합물이 본 발명에 이용될 수 있다. 이러한 혼합물은 리소 인지질, 난 (egg) 또는 대두 인지질 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 음이온성, 양쪽이온성 또는 인지질의 혼합물이든 간에 인지질은 가염(salted)되거나 또는 탈염될 수 있고, 수소화되거나 또는 부분 수소화 되거나 또는 천연 반-합성 또는 합성될 수 있다.

[0704]

특정 구현예에서, 상기 계면활성제는 폴록사머, 예를 들어 폴록사머 188이다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 0.1 $\mu\text{l/ml}$ 내지 10.0 $\mu\text{l/ml}$, 0.2 $\mu\text{l/ml}$ 내지 2.5 $\mu\text{l/ml}$, 0.5 $\mu\text{l/ml}$ 내지 5 $\mu\text{l/ml}$, 1 $\mu\text{l/ml}$ 내지 3 $\mu\text{l/ml}$, 또는 2 $\mu\text{l/ml}$ 내지 4 $\mu\text{l/ml}$ 의 폴록사머 존재 하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 (약 또는 적어도) 0.1 $\mu\text{l/ml}$, 0.2 $\mu\text{l/ml}$, 0.4 $\mu\text{l/ml}$, 0.6 $\mu\text{l/ml}$, 0.8 $\mu\text{l/ml}$, 1 $\mu\text{l/ml}$, 1.5 $\mu\text{l/ml}$, 2.0 $\mu\text{l/ml}$, 2.5 $\mu\text{l/ml}$, 5.0 $\mu\text{l/ml}$, 10 $\mu\text{l/ml}$, 25 $\mu\text{l/ml}$, 또는 50 $\mu\text{l/ml}$ 의 계면활성제 존재 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 2 $\mu\text{l/ml}$ 의 폴록사머의 존재 하에서 배양된다.

[0705]

일부 측면에서, 조작된 T 세포 집단(예컨대, CD4, CD8)은 그들 각각이 임계치 양 또는 세포 밀도에 도달할 때까지 별개로 증폭되거나 또는 함께 증폭될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포가 임계치 양, 농도, 및/또는 증폭에 도달할 때, 배양은, 예를 들어 세포를 수확함으로써 종료된다. 특정 구현예에서, 배양은, 예를 들어, 배양의 시작 또는 개시 시 세포의 밀도의 양과 관련하여, 세포가 (약 또는 적어도) 1.5 배 증폭, 2 배 증폭, 2.5 배 증폭, 3 배 증폭, 3.5 배 증폭, 4 배 증폭, 4.5 배 증폭, 5 배 증폭, 6 배 증폭, 7 배 증폭, 8 배 증폭, 9 배 증폭, 10 배 증폭 또는 10 배 초과 증폭을 달성할 때 종료된다. 일부 구현예에서, 임계치 증폭은 예를 들어 배양의 시작 또는 개시 시 세포의 밀도의 양에 대하여 및/또는 이와 관련하여 4 배 증폭이다. 일부 구현예에서, 세포가 임계치 총량의 세포, 예를 들어 임계치 세포 수를 달성할 때, 예를 들어 세포를 수확함으로써 배양이 종료된다. 일부 구현예에서, 배양은 세포가 임계치의 총 유핵 세포 (total nucleated cell, TNC) 수를 달성할 때 종료된다. 일부 구현예에서, 배양은 세포가 임계치의 생존 가능한 양의 세포, 예를 들어 임계치의 생존 세포 수를 달성할 때 종료된다. 일부 구현예에서, 임계 세포 수(threshold cell count)는 (약 또는 적어도) 50×10^6 cells, 100×10^6 cells, 200×10^6 cells, 300×10^6 cells, 400×10^6 cells, 600×10^6 cells, 800×10^6 cells, 1000×10^6 cells, 1200×10^6 cells, 1400×10^6 cells, 1600×10^6 cells, 1800×10^6 cells, 2000×10^6 cells, 2500×10^6 cells, 3000×10^6 cells, 4000×10^6 cells, 5000×10^6 cells, $10,000 \times 10^6$ cells, $12,000 \times 10^6$ cells, $15,000 \times 10^6$ cells 또는 $20,000 \times 10^6$ cells, 또는 생존 세포의 상기 임계치 중 임의의 값이다.

[0706]

특정 구현예에서, 배양은 세포가 임계치의 세포 수를 달성할 때 종료된다. 일부 구현예에서, 배양은 임계치의 세포 수가 달성된 후, (약) 6 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일 또는 7 일 또는 그 이상의 기간(이내)에 종료된다. 특정 구현예에서, 배양은 임계치의 세포 수 달성 후 (약) 1 일 후에 종료된다. 특정 구현예에서, 임계 밀도는 (약 또는 적어도) 0.1×10^6 cells/ml, 0.5×10^6 cells/ml, 1×10^6 cells/ml, 1.2×10^6 cells/ml, 1.5×10^6 cells/ml, 1.6×10^6 cells/ml, 1.8×10^6 cells/ml, 2.0×10^6 cells/ml, 2.5×10^6 cells/ml, 3.0×10^6 cells/ml, 3.5×10^6 cells/ml, 4.0×10^6 cells/ml, 4.5×10^6 cells/ml, 5.0×10^6 cells/ml, 6×10^6 cells/ml, 8×10^6 cells/ml, 또는 10×10^6 cells/ml, 또는 생존 세포의 상기 임계치 중 임의의 값이다. 특정 구현예에서, 배양은 세포가 임계치의 밀도를 달성할 때 종료된다. 일부 구현예에서, 배양은 임계치의 밀도가 달성된 후, (약) 6 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일 또는 7 일 또는 그 이상의 기간(이내)에 종료된다. 특정 구현예에서, 배양은 임계치의 밀도 달성 후 (약) 1 일 후에 종료된다.

[0707]

일부 구현예에서, 배양의 적어도 일부는 정적 조건 하에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양의 적어도 일부는 예컨대 배양 중에 소비된 배지를 외부로 관류하고 신선한 배지를 안으로 관류하는 관류로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 예컨대 급이 포트를 통해 세포 배양에 신선한 배양 배지를 관류하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 관류 중에 추가된 배양 배지는 하나 이상의 자극제, 예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15를 함유한다. 일부 구현예에서, 관류 중에 첨가된 배양 배지는 정적 인큐베이션 중에 사용된 것과 동일한 배양 배지이다.

- [0708] 일부 구현예에서, 인큐베이션 이후, 용기(예를 들어, 백)는 원심분리 챔버를 보유한 시스템에 다시 연결되는 것과 같이, 세포 요법을 제조, 생성 또는 생산하기 위한 하나 이상의 다른 처리 단계를 수행하기 위한 시스템에 다시 연결된다. 일부 측면에서, 배양된 세포는 배양된 세포의 제형을 위해 백에서 챔버의 내부 캐비티로 전달된다.
- [0709] 일부 구현예에서, 세포는 인큐베이션 단계 동안, 예를 들어 증폭(예: 배양) 또는 최소 증폭/비-증폭(예: 인큐베이션) 하에 모니터링된다. 모니터링은 예를 들어, 세포 형태, 세포 표현형, 세포 생존율, 세포 사멸 및/또는 세포 농도(예를 들어, 생존 세포 농도)를 확인(예를 들어, 측정, 정량화)하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 모니터링은 작업자와 같이 수동으로 수행된다. 일부 구현예에서, 모니터링은 자동화된 시스템에 의해 수행된다. 자동화 시스템은 배양된 세포를 모니터링하기 위해 최소한의 수동 입력이 필요하거나 전혀 필요하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 모니터링은 수동 및 자동화 시스템 모두에서 수행된다.
- [0710] **G. 세포의 수확 및 수집**
- [0711] 일부 구현예에서, 세포는 수확되거나 수집된다. 특정 구현예에서, 세포는 예를 들어 섹션 II-F에 기재된 것과 같이 인큐베이션 완료 후에 수집 또는 수확된다. 특정 구현예에서, 수집 또는 수확된 세포는 산출 집단의 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 집단은 생존가능한, CD3+, CD4+, CD8+ 및/또는 재조합 수용체에 양성인, 예를 들어 CAR+세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 수확된 CD4+ T 세포 및 제형화된 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 제형화된 세포 집단, 예를 들어 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제형화된 집단은 산출 세포 집단, 예를 들어 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 산출 집단이다.
- [0712] 일부 구현예에서, 수확, 수집 또는 제형화된 세포 또는 세포 집단은 임의의 증폭, 예를 들어 세포가 인큐베이션 또는 배양 중 생존 세포의 양이 증가되는 조건 하에서 인큐베이션 또는 배양되는 임의의 조건을 거치지 않는다. 예를 들어, 일부 측면에서, 수확된 세포는, 인큐베이션 또는 배양 초기의 생존 가능한 총 세포 수에 비해 인큐베이션 또는 배양 말기에 생존 가능한 총 세포의 양이 증가되는 임의의 인큐베이션 또는 배양을 거치지 않았다. 일부 구현예에서, 수집, 수확 또는 제형화된 세포는, 세포가 인큐베이션 또는 배양의 전부 또는 일부 동안 흔들림, 회전, 떨림 또는 관류되는 조건 하에서 또는 생물 반응기에서 수행된 인큐베이션 또는 배양을 이전에 거치지 않았다.
- [0713] 일부 구현예에서, 세포 선택, 단리, 분리, 농축 및/또는 정제 단계는, 세포 또는 세포 집단이 수확, 수집 또는 제형화되기 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 세포 선택, 단리, 분리, 농축 및/또는 정제 단계는, 본원에 개시된 바와 같은 크로마토그래피를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피에 의한 T 세포 선택 단계는 T 세포 형질 도입 후이나 세포의 수확 전, 수집 전 및/또는 제형화 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 크로마토그래피에 의한 T 세포 선택 단계는 세포의 수확 직전에 수행된다.
- [0714] 특정 구현예에서, 자극의 개시(예: 온-컬럼 자극)에서 세포의 수집, 수확 또는 제형화까지의 시간량은 (약) 24 시간, 36 시간, 42 시간, 48 시간, 54 시간, 60 시간, 72 시간, 84 시간, 96 시간, 108 시간 또는 120 시간 (미만) 이다. 일부 구현예에서, 자극의 개시에서 세포의 수집, 수확 또는 제형화까지 조작된 세포를 생성하기 위해 자극의 개시에서 세포의 수집, 수확 또는 제형화까지의 시간량은 (약) 12 시간 내지 24시간, 36시간 내지 120 시간, 48시간 내지 96시간 또는 48 시간 내지 72시간 (수치포함)이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션의 개시에서 세포의 수확, 수집 또는 제형화까지의 시간량은 (약) 48 시간, 72 시간 또는 96 시간 (미만) 이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션의 개시에서 세포의 수확, 수집 또는 제형화까지의 시간량은 48 시간 $\pm$ 6 시간, 72 시간 $\pm$ 6 시간 또는 96 시간 $\pm$ 6 시간이다.
- [0715] 특정 구현예에서, 하나 이상의 농축된 T 세포 집단이 제형화된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 농축된 T 세포 집단은, 하나 이상의 집단이 조작 및/또는 배양된 후에 제형화된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 집단은 투입 집단 또는 산출 조성물(예를 들어, 선택 및 자극된 세포)이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 투입 집단 또는 산출 조성물은 이전에 동결 보호되고 저장되었고, 세포를 인큐베이션(예를 들어, 본원 섹션 I-F에 기재된 바와 같은 인큐베이션) 하기 전에 해동된다.
- [0716] 특정 구현예에서, 세포는 세포 집단의 (약 또는 적어도) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 집단의 배가(예를 들어, 인큐베이션 중에 발생하는 배가) 전에 수확된다.
- [0717] 특정 구현예에서, 세포는, 총 세포 수, 예를 들어 인큐베이션된 세포 또는 인큐베이션(예를 들어, 본원 섹션 II-F에 기재된 바와 같은 인큐베이션)을 경험하는 세포의 총 수가, 투입 집단의 세포 수, 예를 들어 자극 시약과 접촉되었던 총 세포 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 20 배 이상을 초과하기 전의 시기에 수확

또는 수집된다. 일부 구현예에서, 세포는, 인큐베이션된 총 세포 수가 형질 전환, 형질 도입 또는 회전 접종되었던 총 세포 수, 예를 들어 바이러스 벡터와 접촉되었던 총 세포 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 20 배 이상을 초과하기 전의 시기에 수확 또는 수집된다. 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 생존 가능한 T 세포, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CAR 발현 T 세포 또는 상기 중 임의의 조합물이다. 특정 구현예에서, 세포는 총 세포 수가 투입 집단의 총 세포 수를 초과하기 전의 시기에 수확 또는 수집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 생존 가능한 CD3+ T 세포의 총 수가 투입 집단의 생존 가능한 CD3+ 세포의 총 수를 초과하기 전의 시기에 수확 또는 수집된다. 특정 구현예에서, 세포는, 총 세포 수가 형질 전환, 형질 도입 또는 회전 접종된 세포의 총 수를 초과하기 전의 시기에 수확 또는 수집된다. 다양한 구현예에서, 세포는, 생존 가능한 CD3+ T 세포의 총 수가 형질 전환, 형질 도입 또는 회전 접종된 세포의 생존 가능한 CD3+ 세포의 총 수를 초과하기 전의 시기에 수확 또는 수집된다.

[0718] 특정 구현예에서, 제형화된 세포는 산출 세포이다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 제형화된 집단은 농축된 T 세포의 산출 집단이다. 특정 구현예에서, 제형화된 CD4+ T 세포 및 제형화된 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 제형화된 세포 집단, 예를 들어 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제형화된 집단은 산출 세포 집단, 예를 들어 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 산출 집단이다.

[0719] 일부 구현예에서, 세포는 백이나 바이알 같은 용기 내로 제형화될 수 있다.

[0720] 일부 구현예에서, 세포는 약학적으로 허용 가능한 완충제로 제형화되며, 이는 일부 측면에서, 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공정은 약학적으로 허용 가능하거나 대상체에 투여하기에 바람직한 배지 또는 제형 완충제로 배지의 교환을 포함한다. 일부 구현예에서, 처리 단계는 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있는 약학적으로 허용 가능한 완충제에서 세포를 교체하기 위해 형질도입 및/또는 증폭된 세포를 세척하는 것을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함한 상기 약학적 형태의 예는 대상체에 세포 및 조성물을 투여하기에 허용 가능한 형태와 함께 하기에 기재된 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 세포를 함유한다.

[0721] “약학적으로 허용 가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)”는 활성 성분 외의 약학적 제형 안에 있는 성분을 지칭하고, 이는 대상체에 무독성이다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0722] 일부 측면에서, 담체의 선택은 특정 세포 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 적합한 제형이 다양하게 존재한다. 예를 들어, 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들어, 메틸 파라벤, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨 및 염화 벤잘코늄을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2개 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.0001% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 운반체는, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 사용된 용량 및 농도에서 일반적으로 수용체(recipient)에게 무독성이며, 인산염, 구연산염 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로 헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 마노스 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 설탕; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온 계면활성제가 포함되나 이에 한정되지 않는다.

[0723] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제에는 예를 들어, 구연산, 구연산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 다른 산 및 염이 포함된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.001중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0724] 제형에는 수용액이 포함될 수 있다. 제형 또는 조성물은 또한 세포, 바람직하게는 세포에 상보적인 활성을 가진

것으로 치료될 특정 징후, 질병 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성이 서로 악영향을 미치지 않는다. 상기 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약학 조성물은 화학 요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젬시타빈, 히드록시우레아, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맙, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴과 같은 다른 약학적 활성제 또는 약물을 더 포함한다.

[0725] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀션, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조성물은 예를 들어, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 담체를 포함할 수 있다. 멸균 주사용 용액은 적합한 운반체, 희석제 또는 멸균수, 생리 식염수, 포도당, 텍스트로스 등과 같은 부형제와의 혼합물과 같은 용매에 세포를 통합함으로써 제조될 수 있다. 조성물은 투여 경로 및 원하는 제조 경로에 따라 습윤제, 분산제 또는 유화제(예를 들어, 메틸셀룰로오스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 향상 첨가제, 방부제, 향미제 및/또는 색소와 같은 보조 물질을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 적합한 제조를 위하여 표준 텍스트를 참조할 수 있다.

[0726] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이팅제 및 완충제를 포함한, 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제를 첨가할 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 및 소르브산에 의해 보장될 수 있다. 주사용 약학적 형태의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 초래될 수 있다.

[0727] 일부 구현예에서, 제형 완충제는 냉동 보존제를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 1.0% 내지 30% DMSO 용액, 예컨대 5% 내지 20% DMSO 용액 또는 5% 내지 10% DMSO 용액을 함유하는 냉동 보존 용액으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 냉동 보존 용액은 예를 들어, 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 기타 적합한 세포 동결 배지를 함유하는 PBS이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 냉동 보존 용액은 예를 들어 적어도 또는 약 7.5% DMSO이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 처리 단계는 냉동 보존 용액에서 세포를 교체하기 위해 형질도입된 및/또는 증폭된 세포를 세척하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 최종 농도가 (약) 12.5%, 12.0%, 11.5%, 11.0%, 10.5%, 10.0%, 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0%, 7.5%, 7.0%, 6.5%, 6.0%, 5.5%, 또는 5.0% DMSO, 또는 1% 내지 15%, 6% 내지 12%, 5% 내지 10%, 또는 6% 내지 8% DMSO인 배지 및/또는 용액에서 동결, 예를 들어 냉동 보호 또는 냉동 보존된다. 일부 구현예에서, 세포는 최종 농도가 (약) 5.0%, 4.5%, 4.0%, 3.5%, 3.0%, 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.5%, 또는 0.25% HSA, 또는 0.1% 내지 -5%, 0.25% 내지 4%, 0.5% 내지 2%, 또는 1% 내지 2% HSA인 배지 및/또는 용액에서 동결, 예를 들어 냉동 보호 또는 냉동 보존된다.

[0728] 특정 구현예에서, 농축된 T 세포, 예를 들어 자극, 조작 및/또는 배양된 T 세포 조성물은 제형화, 동결 보호되고, 이어서 시간량 동안 보관된다. 특정 구현예에서, 제형화, 동결보호된 세포는 세포가 주입을 위해 방출될 때까지 보관된다. 특정 구현예에서, 제형화 동결 보호된 세포는 1 일 내지 6 개월, 1 개월 내지 3 개월, 1 일 내지 14 일, 1 일 내지 7 일, 3 일 내지 6 일, 6 개월 내지 12 개월 또는 12 개월보다 더 오래 동안 보관된다. 일부 구현예에서, 세포는 (약) 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일 또는 7 일 (미만) 동안 동결 보호 및 보관된다. 특정 구현예에서, 세포는 해동되고 보관 후에 대상체에 투여된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 5 일 동안 보관된다.

[0729] 일부 구현예에서, 제형화는 배양 또는 증폭된 세포와 같은 세포를 세척, 희석 또는 농축시키는 것을 포함하는 하나 이상의 처리 단계를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 공정은 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여를 위한 세포의 수를 포함하는 단위 용량 형태 조성물과 같은 원하는 농도 또는 수로 세포의 희석 또는 농축을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 처리 단계는 부피 감소를 통해 원하는 대로 세포의 농도를 증가시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 처리 단계는 부피 증가를 통해 원하는 대로 세포의 농도를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공정은 형질도입 및/또는 증폭된 세포에 제형 완충제의 부피를 추가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형 완충제의 부피는 (약) 10mL 내지 1000mL, 예컨대 적어도 (약) 50mL, 100mL, 200mL, 300mL, 400mL, 500mL, 600mL, 700mL, 800mL, 900mL 또는 1000mL이다.

[0730] 일부 구현예에서, 세포 조성물을 제형화하기 위한 상기 처리 단계는 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 예시적인 상기 처리 단계는 Sepax® 또는 Sepax 2® 세포 처리 시스템과 사용하기 위한 것을 포함하여 Biosafe SA에 의해 생산 및 판매되는 원심분리 챔버와 같은 세포 처리 시스템과 관련된 하나 이상의 시스템 또는 키트와 함께 원심분리 챔버를 사용하여 수행될 수 있다. 예시적인 시스템 및 공정이 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 기재된 바와 같이, 상기 구현예 중 어느 하나에서 제형 완충제, 예컨대

약학적으로 허용 가능한 완충제에서 제형화된 세포의 생성된 조성물인 제형화된 조성물을 원심분리 챔버의 내부 캐비티로부터 발현을 달성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형화된 조성물의 발현은 원심 분리 챔버를 가진 폐쇄 시스템의 일부로서 작동적으로 연결된 백과 같은 컨테이너이다. 일부 구현예에서, 백과 같은 컨테이너는 산출 라인 또는 산출 위치에서 시스템에 연결된다.

[0731] 일부 구현예에서, 예컨대 원심분리 챔버 또는 세포 처리 시스템에 결합된, 폐쇄된 시스템은, 하나 또는 다수의 용기가 제형화된 조성물의 발현을 위해 연결될 수 있는 포트를 갖는 튜브 라인의 각 끝에 결합된 다방향 튜브 매니폴드를 함유하는 다중 포트 출력 키트를 포함한다. 일부 측면에서, 원하는 수 또는 복수의 산출 컨테이너, 예를 들어 백은 다중 포트 출력 중 하나 이상, 일반적으로 둘 이상, 예컨대 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 이상의 포트에 평균적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 용기, 예를 들어, 백은 포트들에 또는 모든 수 미만의 포트에 부착될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 시스템은 복수의 산출 백 내로 출력 조성물의 발현을 달성할 수 있다.

[0732] 일부 측면에서, 세포는 투여 용량, 예컨대 단일 단위 투여 용량 또는 다중 투여 용량을 위한 양으로 하나 이상의 복수의 산출 백으로 발현될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 산출 백 각각은 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 함유할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 각 백은 투여를 위한 단일 단위 용량을 함유할 수 있거나 또는 원하는 용량의 분획을 함유하여 하나 이상의 복수의 산출 백, 예컨대 2개의 산출 백 또는 3개의 산출 백이 함께 투여를 위한 용량을 구성할 수 있다.

[0733] 따라서, 컨테이너, 예를 들어 산출 백은 일반적으로 투여될 세포, 예를 들어, 이의 하나 이상의 단위 용량을 함유한다. 단위 용량(unit dose)은 대상체에 투여될 세포의 양 또는 수 또는 투여될 세포의 수의 두배(또는 그 이상)일 수 있다. 이는 대상체에 투여될 세포의 최저 용량 또는 가능한 최저 용량일 수 있다.

[0734] 일부 구현예에서, 각각의 컨테이너, 예를 들어 백은 개별적으로 세포의 단위 용량을 포함한다. 따라서 일부 구현예에서, 각 용기는 동일한 또는 대략 또는 실질적으로 동일한 수의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 각 단위 용량은 적어도 (약) 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 조작된 세포, 총 세포, T 세포, 또는 PBMC를 함유한다. 일부 구현예에서, 각 백에서 제형화된 세포 조성물의 부피는 10 mL 내지 100 mL, 예컨대 적어도 (약) 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL 또는 100 mL이다.

[0735] 일부 구현예에서, 본 방법에 의해 생산된 상기 세포 또는 상기 세포를 포함하는 조성물은 질병 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에 투여된다.

[0736] H. 자극 시약의 제거

[0737] 일부 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 세포를 수집, 수확 또는 제형화하기 전에 세포 또는 세포 집단에서 제거되거나 분리된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 크로마토그래피 컬럼으로부터 수집, 예를 들어 본원 예컨대 섹션 II-F에 기재된 바와 같은 용리 및 세포 수집의 단계 후에 세포 또는 세포 집단에서 제거되거나 분리된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 인큐베이션, 예를 들어 본원, 예컨대 섹션 II-F에 기재된 바와 같은 인큐베이션 후 또는 중에 세포 또는 세포 집단에서 제거되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후이나 세포의 수집, 수확 또는 제형화 단계 전에 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)을 제거하기 위한 프로세스, 절차, 단계 또는 기술을 거친다. 특정 구현예에서, 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)을 제거하기 위한 프로세스, 절차, 단계 또는 기술을 거친다. 일부 측면에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)이 인큐베이션 중 세포에서 분리 또는 제거된 경우, 세포는 나머지 인큐베이션 기간 동안 분리 또는 제거 전과 동일한 인큐베이션 조건으로 돌아간다.

[0738] 특정 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 세포에서 제거 및/또는 분리된다. 이론에 구속되지 않을 수 있지만, 특정 구현예는 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)과 세포 사이의 결합 및/또는 연합이 일부 상황에서 인큐베이션 동안 시간이 지남에 따라 감소될 수 있음을 고려한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제가 자극 시약과 세포 사이의 결합 및/또는 연합을 감소시키도록 추가될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 배양(culture) 조건의 변화, 예를 들어 제제(예를 들어, 예컨대, 경쟁제 또는 자유 결합제와 같은 물질)의 첨가는 자극 시약과 세포 사이의 결합 및/또는 연합을 감소시킬 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 또한 예를 들어, 인큐베이션, 세포 배양 시스템 및/또는 용액에서 세포를 제거하지 않고 세포와 별개로 인큐베이션, 세포 배양시스템 및/또는 용액에서 제거될 수 있다.

[0739] 특정 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은 소정의 시간 후에 세포에서 분리 및/또는 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 소정의 시간은 자극이 개시로부터의 시간 양이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션의

시작은 세포가 자극 시약 및/또는 자극 시약을 함유하는 배지 또는 용액과 접촉하는 시점 또는 대략적인 시점으로 간주된다. 특정 구현예에서, 자극 시약은 자극 개시의 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 84 시간, 72 시간, 60 시간, 48 시간, 36 시간, 24 시간, 12 시간, 6 시간, 5시간, 4시간, 3시간, 또는 2시간 (수치 포함) 이내에 세포에서 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 자극 시약(예를 들어, 올리고머 자극 시약)은, 자극이 개시된 후 (약) 48 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 자극 시약은 자극이 개시된 후 (약) 72 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 자극이 개시된 후 (약) 96 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다.

[0740] 1. 올리고머 자극 시약의 제거

[0741] 일부 구현예에서, 자극된 세포(즉, 본원에서 기술된 바와 같은 컬럼 크로마토그래피로 선택 및 온-컬럼 자극되었던 세포)의 집단은 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 생산 또는 생성되었으며, 올리고머 자극 시약을 제거하고 및/또는 세포에서 신호를 전달하는 올리고머 자극 시약의 능력을 감소시키도록 처리된다. 예를 들어, 시약의 스트렙타비딘 뮤테인에 대한 하나 이상의 제제의 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 통해 시약에 결합된 하나 이상의 자극제의 가역성은 상호 작용을 방해하기 위해 경쟁제 또는 자유 결합 파트너를 사용하여 수행될 수 있다. 그 결과, 시약 상에 다량체화된 하나 이상의 자극제가 시약 백본으로부터 방출되고 자극 신호를 전달하는 그들의 능력이 감소되거나 종결된다.

[0742] 특정 구현예에서, 하나 이상의 자극제(예를 들어, TCR 및/또는 공자극 분자를 자극 또는 활성화하는 제제)는, 예컨대 올리고머 시약에 존재하는 복수의 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)를 통해 올리고머 시약에 가역적으로 결합하는 것과 같이 연합한다. 일부 경우에, 이는 자극제가 서로 밀접하게 배열되는 결과를 초래하여, 만일 자극제에 의해 인식되거나 결합되는 (2 이상의 카피의) 세포 표면 분자를 갖는 표적 세포가 제제와 접촉이 야기될 경우 결합 효과가 발생할 수 있다. 일부 측면에서, 자극제는 결합 부위 B에서 세포의 분자를 향한 낮은 친화도를 가져서, 수용체 결합 시약은 경쟁 시약의 존재 하에 세포에서 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, 자극제는 경쟁 시약의 존재 하에 세포에서 제거된다.

[0743] 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 항-CD3 및 항-CD28 Fab에 가역적으로 부착된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머이다. 일부 구현예에서, 부착된 Fab는, 예를 들어 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머에 대한 가역적 부착을 가능하게 하는 스트렙타비딘 결합 도메인을 함유한다. 일부 경우에, 항-CD3 및 항-CD28 Fab는 서로 밀접하게 배열되어, CD3 및/또는 CD28을 발현하는 T 세포가 가역적으로 부착된 Fab를 갖는 올리고머 자극 시약과 접촉하게 될 경우 결합 효과(avidity effect)가 발생할 수 있다. 일부 측면에서, Fab는 CD3 및 CD28에 대해 낮은 친화도를 가져서, Fab는 경쟁 시약, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 변이체 또는 유사체의 존재 하에 세포에서 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, Fab는 경쟁 시약, 예를 들어 D-비오틴의 존재 하에 세포에서 제거되거나 해리된다.

[0744] 일부 구현예에서, 자극된 세포(즉, 본원에서 기술된 바와 같은 컬럼 크로마토그래피로 선택 및 온-컬럼 자극되었던 세포)의 집단은 제공되고, 예컨대 경쟁제 또는 자유 결합제와 같은 물질이 첨가되어 자극제 또는 제제들의 신호 전달을 예컨대 완화 및/또는 종료시켰다. 일부 구현예에서, 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가는 본원(색선 II-E 참조)에 기술된 바와 같은 용리 단계 후에 발생한다. 일부 구현예에서, 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가는 본원에 기술된 바와 같은 유전자 조작 단계 후에 발생한다. 일부 구현예에서, 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가는 본원에 기술된 바와 같은 수확 단계 후에 발생한다.

[0745] 따라서, 일부 구현예에서, 자극된 세포의 집단은 물질, 예를 들어 경쟁제, 예컨대, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴의 존재를 함유한다. 일부 구현예에서, 경쟁제, 예컨대 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴과 같은 물질은, 상기 물질이 전술된 단계 중 어느 하나 동안에 외인성으로 첨가되지 않은 참조 집단 또는 배양된(cultured) 세포(예를 들어, T 세포)의 조제(preparation)에서 상기 물질의 양보다 적어도 1.5 배 초과, 적어도 2 배, 적어도 3 배, 적어도 4 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 100 배, 적어도 1000 배 또는 그 이상을 초과한 양으로 존재한다. 일부 구현예에서, 자극된 세포의 집단에서 경쟁제, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴과 같은 물질의 양은, (약) 10 μ M 내지 100 μ M, 100 μ M 내지 1 mM, 100 μ M 내지 500 μ M 또는 10 μ M 내지 100 μ M이다. 일부 구현예에서, (약) 10 μ M의 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴이 세포 또는 세포 집단에 첨가되어 세포 또는 세포 집단에서 올리고머 자극 시약이 분리 또는 제거된다.

[0746] 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어, 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은 세포를 수확 또는 제형화하기 전에 세포 또는 세포 집단에서 제거되거나 분리된다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예

를 들어 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은, 인큐베이션, 예를 들어 본원 예컨대 섹션 II-D에 기재된 바와 같은 인큐베이션 중 또는 후에 경쟁 시약, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 노출 또는 접촉시킴으로써 세포 또는 세포 집단에서 제거되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후, 세포를 유전자 조작, 수확 또는 제형화하는 단계 전에 올리고머 자극 시약, 예를 들어 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약을 제거하기 위하여 경쟁 시약, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출된다. 특정 구현예에서, 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후 올리고머 자극 시약, 예를 들어 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약을 제거하기 위하여 경쟁 시약, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출된다. 일부 측면에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약이, 예를 들어 경쟁 시약, 예를 들어 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 대한 접촉 또는 노출에 의해 인큐베이션 중 세포에서 제거 또는 분리된 경우, 세포는 나머지 인큐베이션 기간 동안 분리 또는 제거 전과 동일한 인큐베이션 조건으로 돌아간다.

[0747] 일부 구현예에서, 세포는, 세포에서 올리고머 자극 시약을 제거 또는 분리하기 위하여 (약 또는 적어도) 0.01 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 0.01 μ M, 1 mM, 또는 10 mM의 경쟁 시약과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는, 세포로부터 가역적으로 접촉된 항-CD3 및 항-CD28 Fab를 갖는 자극성 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 제거 또는 분리하기 위하여 (약 또는 적어도) 0.01 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 0.01 μ M, 1 mM, 또는 10 mM의 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴과 접촉된다.

[0748] 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은 자극 개시의 (약) 120 시간, 108 시간, 96 시간, 84 시간, 72 시간, 60 시간, 48 시간, 36 시간, 24 시간 또는 12 시간(수치 포함) 이내에 세포에서 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어, 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은 자극이 개시된 후 (약) 48 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어, 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은 자극이 개시된 후 (약) 72 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약, 예를 들어, 올리고머 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약은 자극이 개시된 후 (약) 96 시간에 세포에서 제거 또는 분리된다.

[0749] 일부 구현예에서, 세포를 예를 들어, 세포 배지로 세척하여 세포 조성물로부터 하나 이상의 자극제(예: 항-CD3/항-CD28 Fab), 시약(예: 스트렙타비딘 뮤테인) 및/또는 경쟁제를 제거하거나 회석할 수 있다.

[0750] I. 순차 선택 및 연마

[0751] 본원에 제공된 방법은 표적 세포 집단(예를 들어, T 세포, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)의 단리 및/또는 농축시키기 위하여 예를 들어 컬럼 크로마토그래피에 의한 다중 선택 단계를 허용한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 선택 단계는 하나 이상의 시점 또는 산출 치료 세포 조성물을 생성시키기 위한 공정, 예를 들어 상기 섹션에 기재된 바와 같은 공정의 특정 단계에 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 섹션 I-C에 기재된 바와 같은 초기 세포 선택 후에 발생하는 선택 단계는 연마(polishing) 단계로 지칭된다. 연마 단계는 다양한 목적을 위해 수행될 수 있고, 세포 조성물의 추가 정제, 특정 세포 서브타입(예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포)의 선택, 죽은 세포의 제거(예를 들어, 생존 세포의 선택), 성공적으로 조작된 세포(예를 들어, 전이 유전자(예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 등)를 발현하는 세포)의 선택, 또는 특정 세포 타입의 비율, 총 수 또는 농도(예를 들어, CD4+ 대 CD8+ 세포, CAR+ 또는 TCR+ 세포 대 CAR- 또는 TCR- 세포 또는 CD4+, CD8+, CAR+, TCR+ 및/또는 생존 세포의 총 수 또는 농도) 조정을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 선택 단계(예를 들어, 연마 단계)는 생성물 제어를 증가시키고/거나 환자 간의 변이를 감소시키는 데 유용하다.

[0752] 일부 구현예에서, 선택 단계(예를 들어, 초기 선택 단계 및/또는 연마 단계)는, 예를 들어 세포 조성물의 추가 정제, 특정 세포 서브 타입의 선택, 생존 세포의 선택, 조작된 세포의 선택 및/또는 세포의 비율, 총 수 또는 농도를 조정하기 위한 다중 선택 단계를 포함한다.

[0753] 본원에 제공된 방법은 표적 세포 집단(예를 들어, T 세포, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)의 단리 및/또는 농축시키기 위하여 예를 들어 컬럼 크로마토그래피에 의한 다중 선택 단계(예를 들어, 초기 선택 단계 및/또는 연마 단계)를 허용한다. 일부 측면에서, 상기 방법은, 본원에 제공된 바와 같은 샘플에서 복수의 상이한 세포 집단이 농축 및/또는 단리되는 순차적 선택을 이용함으로써 폐쇄 시스템에서와 같은 단일 프로세스 흐름으로 달성된다. 일부 구현예에서, 동일한 용기 또는 용기 세트, 예를 들어, 튜브 세트에서 분리 또는 단리의 수행은 순차적인 양성 및 음성 선택 단계를 수행함으로써 달성될 수 있으며, 후속 단계는 이전 단계의 음성 및/또는 양성 분획을

추가 선택을 처리하고, 여기서 전체 공정은 동일한 튜브 또는 튜브 세트에서 수행된다. 일 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플(예를 들어, 자극 및/또는 조작된, 예컨대 형질도입된 세포의 조성물)은 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나를 농축시키기 위해 제1 선택이 수행되고, 제1 선택으로부터 비-선택된 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 다른 것을 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포 공급원으로써 사용되는 순차적 선택에 적용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들을 수행하여 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나 또는 둘 다의 하위-집단, 예를 들어 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포 또는 나이브 T 세포를 농축할 수 있다. 일 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 샘플(예를 들어, 자극 및/또는 조작된, 예컨대 형질도입된 세포의 조성물)은, CD3+ 집단을 농축하기 위해 수행되는 제1 선택인 후속 선택의 대상이 된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들은 CD3+ 집단의 하위-집단, 예를 들어 CD4+ 세포를 농축시키는 결과를 가져올 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들은 CD3+ 집단의 하위-집단, 예를 들어 CD8+ 세포를 농축시키는 결과를 가져올 수 있다. 일부 구현예에서, 예컨대 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포와 같은, T 세포(예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+ T 세포)의 특정 하위 집단은 선택 단계(예: 초기 선택 단계 및/또는 연마 단계) 동안 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 선택된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유하는 세포 집단(예를 들어, 자극 및/또는 조작된, 예컨대 형질도입된 세포의 조성물)은 연마 단계에서 생존 세포를 선택하는 순차적 선택을 받게 된다. 일부 구현예에서, 생존 세포의 선택은 세포 집단(예를 들어, 자극 및/또는 조작된 세포의 산출 조성물 또는 이의 하위 집단)에서 죽은 세포를 제거하는 것을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 연마 단계는 세포 조성에서 세포의 비율 또는 총 수를 제어하거나 조정하는 것을 허용한다.

[0754] 일부 구현예에서, 제1 선택 단계는 본원에 기재된 바와 같은 선택제로 표지된 비드를 사용하여 수행될 수 있고, 제1 선택 단계로부터 양성 및 음성 분획은 유지될 수 있으며, 이어 예컨대 제2 선택제로 표지된 비드를 사용하거나 또는 상기 기재된 바와 같은 컬럼 크로마토그래피에 양성 분획을 적용시키는 것에 의해 제2 선택 마커를 농축하도록 양성 분획의 추가 양성 선택이 계속된다.

[0755] 본원에 제공된 방법은 성공적으로 자극 및 조작 또는 형질도입된 세포의 선택 및 농축을 추가로 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 기재된 순차 선택, 병렬 선택 또는 단일 선택 절차가 사용되어 재조합 수용체(예를 들어, CARs, TCRs)를 발현하는 자극 세포를 확인할 수 있다. 조작된 세포(예: CAR 또는 TCR 조작된 세포)를 선택하거나 농축하기 위한 선택제는 조작된 세포의 대리(surrogate) 마커 또는 재조합 수용체에 결합할 수 있는 임의의 선택제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내로 도입되는 재조합 수용체를 코딩하는 핵산은 재조합 수용체와 함께 조작된 세포에서 공동-발현될 대리 마커를 공동-발현하기 위해 생성된다. 일부 구현예에서, 대리 마커는 본원에 기재된 바와 같은 절단된 수용체이다. 특정 구현예에서, 절단된 수용체는 절단된 EGFR(EGFRt)이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포(예: CAR)를 선택하거나 농축하기 위한 선택제는 CAR의 항원 결합 도메인에 대한 항-이디오타입 항체이다. 다양한 항-이디오타입 항체가 알려져 있다. FMC63 또는 SJ25C1과 같은 항-CD19 결합 도메인에 대한 예시적인 항-이디오타입 항체는 WO2018/023100에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예: CAR)를 발현하는 세포는 하위 집단 세포, 예를 들어, CD4+ CAR+ T 세포, CD8+ CAR+ T 세포, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD45RA+, CD45RO+ T 세포, 및/또는 생존 세포에 대해 추가로 농축(예: 연마)될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하는 세포는 CD57+에 대해 추가로 고갈(예: 연마)될 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 단계(예: 초기 선택 및/또는 연마 단계)를 통해 재조합 수용체(예: CAR, TCR) 및/또는 이의 하위집단을 발현하는 세포의 비율, 농도 또는 총 수를 제어하거나 조정할 수 있다. 일부 구현예에서, 농축(예를 들어, 연마)된 집단은 세포 요법을 위한 사용(예를 들어, 투여)을 위해 제형화될 수 있다.

[0756] 일부 측면에서, 단일 또는 동일한 단리 또는 분리 용기 또는 용기 세트, 예컨대 단일 컬럼 또는 컬럼 세트 및/또는 동일한 튜브 또는 배관 세트 또는 동일한 분리 매트릭스 또는 배지 또는 시약, 예컨대, 동일한 자기 매트릭스, 친화성 표지 고체 지지체, 또는 항체 또는 기타 결합 파트너에서 복수의 집단을 분리하는 것은 분리를 간소화하는 특징, 예를 들어 비용, 시간, 복잡성, 샘플 취급 필요성, 자원, 시약 또는 장비 사용을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 이러한 기능은 방법과 관련된 비용, 효율성, 시간 및/또는 복잡성을 최소화하고/하거나 감염, 오염 및/또는 온도 변화로 인한 피해와 같은 세포 제품에 대한 잠재적인 피해를 방지한다는 점에서 유리하다. 본원에서 제공되는 방법은 온-컬럼 자극과 조합된 세포 선택 전 또는 후에 표적 집단을 농축시키는 다중 선택 단계를 허용한다.

[0757] 본원에 제공된 방법은 성공적으로 자극 및 조작된 세포의 선택 및 농축을 추가로 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 기재된 순차적 선택 절차를 사용하여 재조합 수용체(예: CAR)를 발현하는 자극된 세포를

확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하는 세포는 하위 집단 세포, 예를 들어, CD4+ CAR+ T 세포, CD8+ CAR+ T 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 농축된 집단은 세포 요법을 위한 사용(예를 들어, 투여)을 위해 제형화될 수 있다.

[0758] **III. 재조합 단백질**

[0759] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 장치를 사용한 방법에 의해 처리, 가공, 조작 및/또는 생산된 세포는 재조합 단백질, 예컨대 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 함유하거나 발현하거나, 함유 또는 발현하도록 조작된다. 특정 구현예에서, 본 명세서에 제공된 방법은 재조합 단백질을 발현하거나 함유하도록 조작된 세포를 함유하고/거나 이로 농축된 세포, 집단 또는 조성물을 생산하고/거나 생산할 수 있다.

[0760] **A. 재조합 수용체**

[0761] 일부 구현예에서, 하나 이상의 재조합 수용체를 발현하는 T 세포와 같은 면역 세포와 같은 조작된 세포가 제공된다. 수용체 중에는 항원 수용체 및 하나 이상의 이의 성분을 함유하는 수용체가 있다. 재조합 수용체는 리간드 결합 도메인 또는 이의 결합 단편 및 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역, 기능성 비-TCR 항원 수용체, 키메라 항원 수용체(CAR) 및 재조합 또는 전이 유전자 TCR과 같은 T 세포 수용체(TCR), 키메라 자가 항체 수용체(chimeric autoantibody receptor, CAAR) 및 상기 중 어느 하나의 성분을 함유하는 것과 같은 키메라 수용체를 포함할 수 있다. CAR과 같은 재조합 수용체는 일반적으로 하나 이상의 세포내 신호 전달 성분에, 일부 측면에서 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 연결된 세포외 항원(또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 상이한 성분, 도메인 또는 영역을 함유하는 둘 이상의 재조합 수용체를 발현한다. 일부 측면에서, 둘 이상의 재조합 수용체는 재조합 수용체의 특이성, 활성, 항원(또는 리간드) 결합, 기능 및/또는 발현의 공간적 또는 시간적 조절 또는 제어를 허용한다.

[0762] **1. 키메라 항원 수용체(CAR)**

[0763] 제공된 방법의 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체와 같은 키메라 수용체는 원하는 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 특이성을 제공하는 리간드-결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 항체 단편)을 세포내 신호 전달 도메인과 결합하는 하나 이상의 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 T 세포 활성화 도메인과 같은 활성화 세포내 도메인 부분이고, 1차 활성화 신호를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 효과기 기능을 촉진하기 위한 공자극 신호 전달 도메인을 함유하거나 더 함유한다. 일부 구현예에서, 면역 세포로 유전자 조작될 때 키메라 수용체는 T 세포 활성을 조절할 수 있고, 일부 경우에, T 세포 분화 또는 항상성을 조절할 수 있으며, 이로써 예컨대 입양 세포 요법 방법에서 사용하기 위해, 생체 내 수명, 생존 및/또는 지속성이 향상된 유전자 조작된 세포를 초래한다.

[0764] CAR을 포함하는 예시적 항원 수용체 및 상기 수용체를 조작하고 세포 내로 도입하는 방법은 예를 들어 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 번호 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 번호 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 및 8,479,118 및 유럽 특허 출원 번호 EP2537416]에 기재된 것들 및/또는 문헌[Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190]에 기재된 바와 같은 CAR 및 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO/2014055668 A1]에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예로는 전술한 간행물 중 어느 하나, 예컨대 문헌[WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190, 미국 특허 번호 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)]에 개시된 바와 같은 CAR이 포함된다. 또한 문헌[WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190 및 미국 특허 번호 8,389,282]을 참조한다.

[0765] CAR과 같은 키메라 수용체는 일반적으로 항체 분자의 부분과 같은 세포외 항원 결합 도메인, 일반적으로 항체의 가변 중쇄(VH) 영역 및/또는 가변 경쇄(VL) 영역, 예를 들어, scFv 항체 단편을 포함한다.

[0766] 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 이는 탄수화물 또는

다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원은 정상 또는 비-표적화 세포 또는 조직과 비교하여 질병 또는 병태의 세포 상에서, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.

[0767]

일부 구현예에서, 항원은 $\alpha v \beta 6$ 인테그린($\alpha v \beta 6$ integrin), B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수효소 9(CA9, CAIX 또는 G250으로도 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 공지), 암배아 항원(CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), 타입 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 상피 당단백질 2(EPG-2), 상피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPHA2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 동족체 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 5D(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α 2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8족 A 멤버를 함유하는 류신 풍부 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 무린 시토메갈로 바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 자연 살생 2 그룹 D 멤버(NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나아제 유사 희귀 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 5T4로도 공지), 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나아제 관련 단백질 1(TRP1, TYRP1 또는 gp75로도 공지), 티로시나아제 관련 단백질 2(TRP2, 도파크롬 타우토메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로도 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원, 또는 보편적 꼬리표(universal tag) 관련 항원, 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 다수의 공지된 B 세포 마커 중 어느 하나와 같은 B 세포 악성 종양과 연관된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원(예컨대 HIV, HCV, HBV 등으로부터 유래된 바이러스 항원), 세균 항원 및/또는 기생 항원이다.

[0768]

일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 다수의 공지된 B 세포 마커 중 어느 하나와 같은 B 세포 악성 종양과 연관된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이다.

[0769]

일부 구현예에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 CD19이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD19에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 VH 및 VL을 함유한다. 일부 구현예에서, CD19에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 FMC63 및 SJ25C1과 같은 마우스 유래 항체이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어, 문헌[미국 특허 공개 번호 US 2016/0152723]에 기재된 바와 같은 인간 항체이다.

[0770]

본 명세서에서 용어 “항체(antibody)”는 가장 넓은 의미로 사용되며, 온전한 항체 및 기능성(항원-결합) 항체 단편을 포함하는 다클론 및 단클론 항체를 포함하며, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단편 항원 결합(Fab) 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 가변 중쇄(V_H) 영역, 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한 단일 사슬 항체 단편 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디(nanobody)) 단편을 포함한다. 상기 용어는 유전자 조작된 및/또는 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예컨대 인트라바디(intrabodies), 펩티바디(peptibodies), 키메라 항체, 완전한 인간 항체, 인간화된 항체 및 이중 접합 항체, 다중 특이적(예를 들어, 이중 특이적 또는 삼중 특이적) 항체, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies), 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 “항체”는 본 명세서에서 “항원 결합 단편(antigen-binding fragment)”으로도 지칭되는 이의 기능성 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 IgG 및 이의 하위 클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 클래스 또는 하위 클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포괄한다.

[0771] 용어 “초가변 영역(hypervariable region)” 또는 “HVR” 과 동의어인 “상보성 결정 영역(complementarity determining region)” 및 “CDR”은 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 비인접 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 있고 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 있다. “프레임워크 영역(framework region)” 및 “FR”은 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 전장 중쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)이 있고, 각각의 전장 경쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 있다.

[0772] 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌[Kabat *et al.* (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“Kabat” 넘버링 체계); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (“Chothia” 넘버링 체계); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (“Contact” 넘버링 체계); Lefranc MP *et al.*, “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (“IMGT” 넘버링 체계); Honegger A and Plückthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (“Aho” 넘버링 체계); 및 Martin *et al.*, “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (“AbM” 넘버링 체계)]에 기재된 것을 포함한 다수의 잘 알려진 체계 중 어느 하나를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0773] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 식별에 사용된 체계에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, Kabat 체계는 구조적 정렬을 기반으로 하는 반면 Chothia 체계는 구조 정보를 기반으로 한다. Kabat 및 Chothia 체계 모두에 대한 넘버링은 삽입 문자, 예를 들어 “30a”에 의해 수용되는 삽입(insertion) 및 일부 항체에서 나타나는 결실(deletion)이 있는 가장 일반적인 항체 영역 서열 길이에 기반한다. 이 두 체계는 상이한 위치에 특정 삽입 및 결실(“삽입-결실(indel)”)을 배치하여 차이가 있는 넘버링이 된다. Contact 체계는 복잡한 결정 구조의 분석에 기반하며 여러 측면에서 Chothia 넘버링 체계와 유사하다. AbM 체계는 Oxford Molecular’s AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된 것에 기반한 Kabat와 Chothia 정의 사이의 절충안이다.

[0774] 하기 표 1은 Kabat, Chothia, AbM 및 Contact 체계에 의해 각각 확인된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 및 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3의 예시적인 위치 경계를 열거한다. CDR-H1의 경우, Kabat 및 Chothia 넘버링 체계 둘 다를 사용하여 잔기 넘버링이 나열된다. FR들은 예를 들어 CDR-L1 앞에 위치한 FR-L1, CDR-L1과 CDR-L2 사이에 위치한 FR-L2, CDR-L2와 CDR-L3 사이에 위치한 FR-L3과 같은 식으로 CDR들 사이에 위치한다. 도시된 Kabat 넘버링 체계는 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문에, 도시된 Kabat 넘버링 관례를 사용하여 넘버링될 때 Chothia CDR-H1 루프의 끝은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변한다.

표 1

[0775] 다양한 넘버링 체계에 따른 CDR의 경계

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat 넘버링 ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 넘버링 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0776] 1 - Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

- [0777] 2 - Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948
- [0778] 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 “CDR” 또는 “상보적 결정 영역(complementary determining region)” 또는 개별 지정 CDR(예를 들어, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)은 전술한 체계 중 어느 하나 또는 다른 공지된 체계에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 상보성 결정 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 특정 CDR(예를 들어, CDR-H3)이 주어진 V_H 또는 V_L 영역 아미노산 서열에 있는 해당 CDR의 아미노산 서열을 함유한다고 언급될 경우, 상기 CDR은 전술한 체계 중 어느 하나 또는 다른 공지된 체계에 의해 정의된 바와 같은 가변 영역 내의 해당 CDR(예를 들어, CDR-H3)의 서열을 갖는다고 이해된다. 일부 구현예에서, 특정 CDR 서열이 명시된다. 제공된 항체의 예시적인 CDR 서열은 다양한 넘버링 체계를 사용하여 기재되지만, 제공된 항체는 전술한 다른 넘버링 체계 중 어느 하나 또는 당업자에게 공지된 다른 넘버링 체계에 따라 기재된 바와 같은 CDR을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.
- [0779] 마찬가지로, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 FR 또는 개별 지정 FR(들)(예를 들어, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)은 공지된 체계 중 어느 하나에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 프레임워크 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, CDR과 같은 특정 CDR, FR 또는 FR들 또는 CDR들의 식별을 위한 체계는 Kabat, Chothia, AbM 또는 Contact 방법 또는 다른 공지된 체계에 의해 정의된 바와 같이 명시된다. 다른 경우에, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 제공된다.
- [0780] 용어 “가변 영역(variable region)” 또는 “가변 도메인(variable domain)”은 항체가 항원에 결합하는 데 관여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L) 가변 영역은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(framework region, FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. (예를 들어, 문헌[Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다). 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 상보적 V_L 또는 V_H 도메인 라이브러리를 각각 선별하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.
- [0781] 제공된 CAR에 포함된 항체 중에는 항체 단편이 있다. “항체 단편(antibody fragment)” 또는 “항원 결합 단편(antigen-binding fragment)”은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab' -SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 중쇄 가변(V_H) 영역, scFv와 같은 단일 사슬 항체 분자 및 V_H 영역만을 포함하는 단일 도메인 항체; 및 항체 단편들로 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 CAR에 있는 항원 결합 도메인은 가변 중쇄(V_H) 및 가변 경쇄(V_L) 영역을 포함하는 항체 단편이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 항체는 scFv와 같은 중쇄 가변(V_H) 영역 및/또는 경쇄 가변(V_L) 영역을 포함하는 단일 사슬 항체 단편이다.
- [0782] 일부 구현예에서, scFv는 FMC63으로부터 유래된다. FMC63은 일반적으로 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론성 IgG1 항체를 지칭한다(Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, FMC63 항체는 서열번호 51 및 52에 각각 제시된 CDRH1 및 H2 및 서열번호 53 또는 54에 제시된 CDRH3 서열번호 55에 제시된 CDRL1 및 서열번호 55 또는 57에 제시된 CDR L2 및 서열번호 58 또는 59에 제시된 CDR L3을 포함한다. 일부 구현예에서, FMC63 항체는 서열번호 60의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 61의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.
- [0783] 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 55의 CDRL1 서열, 서열번호 56의 CDRL2 서열, 및 서열번호 58의 CDRL3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열번호 51의 CDRH1 서열, 서열번호 52의 CDRH2 서열, 및 서열번호 53의 CDRH3 서열을 함유하는 가변 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 60에 제시된 가변 중쇄 영역 및 서열번호 61에 제시된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 62에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는 V_H , 링커 및 V_L 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 V_L , 링커 및 V_H 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 63에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 서열번호 63에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서,

scFv는 서열번호 64에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 64에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0784] 일부 구현예에서, scFv는 SJ25C1로부터 유래된다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론성 IgG1 항체이다(Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 서열번호 65-67에 각각 제시된 CDRH1, H2 및 H3 및 서열번호 68-70에 각각 제시된 CDRL1, L2 및 L3 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 서열번호 71의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 72의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0785] 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 73의 CDRL1 서열, 서열번호 74의 CDRL2 서열, 및 서열번호 75의 CDRL3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열번호 76의 CDRH1 서열, 서열번호 77의 CDRH2 서열, 및 서열번호 78의 CDRH3 서열을 함유하는 가변 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 71에 제시된 가변 중쇄 영역 및 서열번호 72에 제시된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 79에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는 V_H, 링커 및 V_L을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 V_L, 링커 및 V_H를 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 80에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 80에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0786] 일부 구현예에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 BCMA이다. 일부 구현예에서, scFv는 BCMA에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L을 함유한다. 일부 구현예에서, BCMA에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/090327 및 WO 2016/090320]에 제시된 항체 또는 항체 단편으로부터의 V_H 및 V_L이거나 이를 함유한다.

[0787] 일부 구현예에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 GPRC5D이다. 일부 구현예에서, scFv는 GPRC5D에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L을 함유한다. 일부 구현예에서, GPRC5D에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/090329 및 WO 2016/090312]에 제시된 항체 또는 항체 단편으로부터의 V_H 및 V_L이거나 이를 함유한다.

[0788] 일부 구현예에서, 항원은 CD20이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD20에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L을 함유한다. 일부 구현예에서, CD20에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 리톡시맙이거나 이로부터 유래된 리톡시맙 scFv와 같은 항체이다.

[0789] 일부 구현예에서, 항원은 CD22이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD22에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L을 함유한다. 일부 구현예에서, CD22에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 m971이거나 이로부터 유래된 m971 scFv와 같은 항체이다.

[0790] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 항체 단편을 함유하는 세포외 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 단편을 함유하는 세포외 부분 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 scFv를 포함한다.

[0791] 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)의 항체 부분은 면역글로불린 불변 영역, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어, IgG4 힌지 영역의 적어도 일부, 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 일부는 항원-인식 성분, 예를 들어, scFv와 막관통 도메인 사이에서 스페이서 영역으로 기능한다. 스페이서는 스페이서의 부재와 비교하여 항원 결합 후에 세포의 반응성 증가를 제공하는 길이의 것일 수 있다. 예시적인 스페이서는 문헌[Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, 국제 특허 출원 공개 번호 W02014031687, 미국 특허 번호 8,822,647 또는 특허 출원 공개 번호 US2014/0271635]에 기재된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0792] 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 (서열번호 81에 제시된) 서열 ESKYGPPCPPCP를 가지며, 서열번호 82에 제시된 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 83에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 84에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 85에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 81, 83, 84 또는 85 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 86-94에 제시된 서열

을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 86-94 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0793] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 세포의 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된 세포내 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 도메인과 세포내 신호 전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 ITAM을 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 항원 인식 도메인(예를 들어, 세포외 도메인)은 일반적으로 CAR의 경우에 TCR 복합체와 같은 항원 수용체 복합체를 통한 활성화 및/또는 다른 세포 표면 수용체를 통한 신호를 모방하는 신호 전달 성분과 같은 하나 이상의 세포내 신호 전달 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 키메라 수용체는 세포외 도메인(예를 들어, scFv) 및 세포내 신호 전달 도메인 사이에 연결되거나 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원 결합 성분(예를 들어, 항체)은 하나 이상의 막관통 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인에 연결된다.

[0794] 일 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR에 있는 도메인 중 하나와 자연적으로 회합하는 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 상기 도메인의 결합을 피하도록 아미노산 치환에 의해 변형되거나 선택되어 수용체 복합체의 다른 멤버와의 상호 작용이 최소화된다.

[0795] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래된다. 공급원이 천연인 경우, 일부 측면에서, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래된다. 막 관통 영역은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154로부터 유래된 것을 포함한다(즉 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 측면에서, 합성 막관통 도메인은 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에서, 연결은 링커, 스페이서 및/또는 막관통 도메인에 의한 것이다. 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분을 함유한다.

[0796] 일부 구현예에서, 세포외 도메인과 막관통 도메인은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 도메인과 막관통은 본원에 기술된 임의의 것과 같은 스페이서에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 수용체는 막관통 도메인이 유래된 분자의 세포외 부분, 예컨대 CD28 세포외 부분을 함유한다.

[0797] 세포내 신호 전달 도메인 중에는 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공자극 수용체와 조합으로 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 공자극 수용체 단독을 통한 신호를 모방하거나 이와 유사한 것이 있다. 일부 구현예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 예를 들어 글리신 및 세린, 예를 들어 글리신-세린 더블렛(doublet)을 함유하는 것과 같은 2 내지 10개 아미노산 길이의 링커가 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호 전달 도메인 사이에 존재하고 연결을 형성한다.

[0798] 일부 측면에서, T 세포 활성화는 두 종류의 세포질 신호 전달 서열, 즉 TCR을 통한 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 서열(1차 세포질 신호 전달 서열) 및 항원-비의존적 방식으로 작용하여 2차 또는 공자극 신호를 제공하는 서열(2차 세포질 신호 전달 서열)에 의해 매개되는 것으로 설명된다. 일부 측면에서, CAR은 상기 신호 전달 성분 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다.

[0799] 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로 적어도 하나의 세포내 신호 전달 성분 또는 성분들을 포함한다. 일부 측면에서, CAR은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호 전달 서열을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호 전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호 전달 서열을 함유하는 ITAM의 예에는 CD3 제타 사슬, FcR 감마, CD3 감마, CD3 델타 및 CD3 엡실론으로부터 유래된 것이 포함된다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 신호 전달 분자(들)은 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호 전달 도메인, 이의 부분, 또는 서열을 함유한다.

[0800] 일부 구현예에서, 수용체는 T-세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬, 예를 들어 CD3 제타 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포내 성분을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 항원 결합 부분은 하나 이상의 세포 신호 전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 신호 전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포내 신호 전달 도메인 및/또는 기타 CD3 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR은 또한 Fc 수용체 γ , CD8, CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가 분자의 일부를 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, CAR 또는 다른 키메라 수용체는 CD3-제타(CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와 CD8, CD4, CD25 또는 CD16 사이에 키메

라 분자를 포함한다.

- [0801] 일부 구현예에서, CAR 또는 다른 키메라 수용체의 결합시, 수용체의 세포질 도메인 또는 세포내 신호 전달 도메인은 면역 세포, 예를 들어 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포의 정상 효과기 기능 또는 반응 중 적어도 하나를 활성화시킨다. 예를 들어, 일부 맥락에서, CAR은 T 세포의 기능, 예컨대 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예컨대 사이토카인 또는 기타 인자의 분비를 유도한다. 일부 구현예에서, 항원 수용체 성분 또는 공자극 분자의 세포내 신호 전달 도메인의 절단 부분은 예를 들어 그것이 효과기 기능 신호를 전달하는 경우 온전한 면역 자극 사슬 대신에 사용된다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인 또는 도메인들은 T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열 및 일부 측면에서 천연 맥락에서 항원 수용체 결합 후에 신호 전달을 개시하기 위해 상기 수용체와 협력하여 작용하는 공-수용체의 세포질 서열을 또한 포함한다.
- [0802] 천연 TCR의 맥락에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호 전달뿐만 아니라 공자극 신호가 필요하다. 따라서, 일부 구현예에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분이 CAR에 또한 포함된다. 다른 구현예에서, CAR은 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 추가의 CAR이 동일한 세포에서 발현되고 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 제공한다.
- [0803] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 및 ICOS와 같은 공자극 수용체의 신호 전달 도메인 및/또는 막관통 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 동일한 CAR은 활성화 및 공자극 성분 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공자극 분자로부터 유래된 세포내 도메인 또는 이의 기능적 변이체를, 예컨대 막관통 도메인과 세포내 신호 전달 도메인 사이에 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공자극 분자는 CD28 또는 41BB이다.
- [0804] 일부 구현예에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공자극 성분은 다른 항원을 인식하는 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, CAR은 활성화 또는 자극성 CAR, 공자극 CAR을 포함하며, 둘 다 동일한 세포 상에서 발현된다(WO2014/055668 참조). 일부 측면에서, 세포는 하나 이상의 자극성 또는 활성화 CAR 및/또는 공자극 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 억제성 CAR(iCAR, Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) 참조), 예컨대 질병 또는 병태에 특이적이고/거나 이와 관련된 것 외의 항원을 인식하는 - 이로써 질병 표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 신호가 예를 들어 표적의 효과를 감소시키도록 이의 리간드에 대한 억제성 CAR의 결합에 의해 감소 또는 억제되는 - CAR을 더 포함한다.
- [0805] 일부 구현예에서, 2개의 수용체는 각각 세포에 활성화 및 억제 신호를 세포에 유도하여, 항원에 수용체 중 하나의 결합은 세포를 활성화하거나 반응을 유도하지만, 항원에 제2 억제성 수용체의 결합은 반응을 억제하거나 약화시키는 신호를 유도한다. 활성화 CAR 및 억제성 CAR(iCAR)을 조합하는 예가 있다. 예를 들어, 상기 전략은 활성화 CAR이 질병 또는 병태에서 발현되거나 정상 세포에서도 발현되는 항원에 결합하고 억제성 수용체는 정상 세포에서 발현되거나 질병 또는 병태의 세포에서는 발현되지 않는 별개의 항원에 결합하는 맥락에서 표적외 효과의 가능성을 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0806] 일부 측면에서, 키메라 수용체는 억제성 CAR(예를 들어 iCAR)이거나 이를 포함하고 면역 반응, 예컨대 세포에서 ITAM- 및/또는 공자극-촉진 반응을 약화 또는 억제하는 세포내 성분을 포함한다. 상기 세포내 신호 전달 성분의 예는 PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 수용체, A2AR을 포함한 EP2/4 아데노신 수용체를 포함한 면역 관문 분자에서 발견되는 것이다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 상기 억제 분자의 또는 이로부터 유래된 신호 전달 도메인을 포함하는 억제성 CAR를 포함하여, 이것이 예를 들어, 활성화 및/또는 공자극 CAR에 의해 유도되는 세포의 반응을 약화시키는 역할을 한다.
- [0807] 특정 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CD3(예를 들어, CD3-제타) 세포내 도메인에 연결된 CD28 막관통 및 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인에 연결된 키메라 CD28 및 CD137(4-1BB, TNFRSF9) 공자극 도메인을 포함한다.
- [0808] 일부 구현예에서, CAR은 세포질 부분에서 하나 이상의, 예를 들어 2개 이상의 공자극 도메인 및 활성화 도메인, 예를 들어 1차 활성화 도메인을 포함한다. 예시적인 CAR에는 CD3-제타, CD28 및 4-1BB의 세포내 성분이 포함된다.
- [0809] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 마커를 더 포함하고, 및/또는 CAR 또는 다른 항원 수용체를 발현하는 세포는 수용체를 발현하기 위한 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하는 데 사용될 수 있는 대리 마커, 예컨대 세포 표면 마커를 더 포함한다. 일부 측면에서, 마커는 CD34, NGFR, 또는 표피 성장 인자 수용체, 예컨대 이러한 세포 표면 수용체(예: tEGFR)의 절단된 버전의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태)를 포함한다. 일부 구현예에서,

마커를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열(예를 들어, T2A)과 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 마커 및 임의적으로 링커 서열은 문헌[특허 출원 번호 WO2014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, 마커는 선택적으로 링커 서열, 예컨대 T2A 절단 가능한 링커 서열에 연결된 절단형 EGFR(tEGFR)일 수 있다.

[0810] 절단형 EGFR(예를 들어, tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 서열번호 43 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 43 또는 44에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 T2A 링커 서열은 서열번호 47 또는 48에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 47 또는 48에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0811] 일부 구현예에서, 마커는 T 세포에서 자연적으로 발견되지 않거나 또는 T 세포 표면에서 자연적으로 발견되지 않는 분자(예를 들어, 세포 표면 단백질) 또는 이의 부분이다. 일부 구현예에서, 분자는 비자기(non-self) 분자, 예를 들어 비자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 “자기(self)”로 인식되지 않는 분자이다.

[0812] 일부 구현예에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않고/거나 유전자 조작, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것 외에 다른 효과를 생성하지 않는다. 다른 구현예에서, 마커는 치료적 분자 또는 달리 일부 원하는 효과를 나타내는 분자, 예컨대 생체 내에서 세포가 조우하게 될 리간드, 예컨대 입양 전달 및 리간드와의 조우시 세포의 반응을 강화하고/거나 약화시키는 공자극 또는 면역 관문 분자일 수 있다.

[0813] 일부 경우에, CAR은 제1, 제2 및/또는 제3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합 시 CD3 사슬 유도 신호만을 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제2 세대 CAR은 상기 신호 및 CD28 또는 CD137과 같은 공자극 수용체로부터의 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 것과 같은 공자극 신호를 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제3 세대 CAR은 상이한 공자극 수용체의 다중 공자극 도메인을 포함하는 것이다.

[0814] 예를 들어, 일부 구현예에서, CAR은 항체(예를 들어, 항체 단편, 예컨대, 기술된 임의의 것을 포함하는 항원에 특이적인 scFv), CD28의 막관통 부분 또는 이의 기능적 변이체이거나 이를 함유하는 막관통 도메인, 및 CD28의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체와 CD3 제타의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포내 신호 전달 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체(예를 들어, 항체 단편, 예컨대, 기술된 임의의 것을 포함하는 항원에 특이적인 scFv), CD28 또는 이의 기능적 변이체의 막관통 부분이거나 이를 함유하는 막관통 도메인, 및 4-1BB 또는 이의 기능적 변이체의 신호 전달 부분과 CD3 제타 또는 이의 기능적 변이체의 신호 전달 부분을 함유하는 세포내 신호 전달 도메인을 함유한다. 일부 상기 구현예에서, 수용체는 Ig 분자의 일부, 예컨대 인간 Ig 분자, 예컨대 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 예컨대 힌지 단독 스페이서를 함유하는 스페이서를 더 포함한다.

[0815] 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)의 막관통 도메인은 인간 CD28(예를 들어, 수탁 번호 P01747.1) 또는 이의 변이체의 막관통 도메인, 예컨대 서열번호 95에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 95에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막관통 도메인이거나 이를 포함하고; 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 일부를 함유하는 막관통 도메인은 서열번호 96에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0816] 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)의 세포내 신호 전달 성분(들)은 인간 CD28의 세포내 공자극 신호 전달 도메인 또는 이의 기능적 변이체 또는 부분, 예컨대 천연 CD28 단백질의 위치 186-187에 LL의 GG로의 치환이 있는 도메인을 함유한다. 예를 들어, 세포내 신호 전달 도메인은 서열번호 97 또는 98에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 97 또는 98에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 도메인은 4-1BB(예를 들어, 수탁 번호: Q07011.1)의 세포내 공자극 신호 전달 도메인 또는 이의 기능적 변이체 또는 부분, 예컨대 서열번호 99에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 99에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0817] 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)의 세포내 신호 전달 도메인은 인간 CD3 제타 자극성 신호 전달 도메인 또는 이의 기능적 변이체, 예컨대 인간 CD3 ζ (수탁 번호: P20963.2)의 이소형 단백질 3의 112 AA 세포질 도메인 또는 문헌[미국 특허 번호: 7,446,190 또는 미국 특허 번호 8,911,993]에 기재된 바와 같은 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 서열번호 100, 101 또는 102에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 100, 101 또는 102에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0818] 일부 측면에서, 스페이서는 IgG의 힌지 영역 단독, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 힌지 단독, 예컨대 서열번호 81에 제시된 힌지 단독 스페이서를 함유한다. 다른 구현예에서, 스페이서는 CH2 및/또는 CH3 도메인에 임의적으로 연결된 Ig 힌지, 예를 들어, IgG4-유래 힌지이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 84에 제시된 바와 같이 CH2 및 CH3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열번호 83에 제시된 바와 같이 CH3 도메인에만 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신-세린 풍부 서열 또는 공지된 가요성 링커(flexible linker)와 같은 다른 가요성 링커이거나 이를 포함한다.
- [0819] 예를 들어, 일부 구현예에서, CAR은 scFv를 포함한 항체 단편과 같은 항체, 스페이서, 예컨대 면역글로불린 분자의 부분, 예컨대 힌지 영역을 및/또는 중쇄 분자의 하나 이상의 불변 영역을 함유한 스페이서, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서, CD28-유래 막관통 도메인의 전부 또는 일부를 함유한 막관통 도메인, CD28-유래 세포내 신호 전달 도메인, 및 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 scFv와 같은 항체 또는 단편, 임의의 Ig-힌지 함유 스페이서와 같은 스페이서, CD28-유래 막관통 도메인, 4-1BB-유래 세포내 신호 전달 도메인, 및 CD3 제타-유래 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [0820] 예시적인 대리 마커는, 비기능적이며 신호 또는 일반적으로 전장 형태의 세포 표면 폴리펩타이드에 의해 전달되는 신호를 전달할 수 없거나 전달하지 않고/거나 내재화될 수 없거나 내재화되지 않는 절단 형태와 같은, 세포 표면 폴리펩타이드의 절단 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단된 세포 표면 폴리펩타이드는 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(tHER2), 절단된 표피 성장 인자 수용체(tEGFR, 43 또는 44에 제시된 예시적인 tEGFR 서열) 또는 전립선-특이적 막 항원(PSMA) 또는 이의 변형된 형태와 같은 성장 인자 또는 다른 수용체의 절단 형태를 포함한다. tEGFR은 항체 세특시맵(Erbixx®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 tEGFR 작제물 및 암호화된 외인성 단백질을 발현하도록 조작된 세포를 식별 또는 선택하기 위해 및/또는 암호화된 외인성 단백질을 발현하는 세포를 제거 또는 분리하기 위해 사용될 수 있다. 문헌[미국 특허 번호 8,802,374 및 Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다. 일부 측면에서, 마커(예를 들어, 대리 마커)에는 CD34의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태), NGFR, CD19 또는 절단된 CD19(예를 들어, 절단된 비-인간 CD19), 또는 표피 성장 인자 수용체(예를 들어, tEGFR)가 포함된다. 일부 구현예에서, 마커는 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화된 및/또는 강화된 변이체를 포함하여, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예컨대 슈퍼-폴드 GFP(super-fold GFP, sfGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청록 형광 단백질(blue green fluorescent protein, BFP), 강화된 청색 형광 단백질(EBFP) 및 노랑 형광 단백질(YFP) 및 이들의 변이체와 같은 형광 단백질이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 루시페라아제, 대장균(*E. Coli*)의 lacZ 유전자, 알칼리 포스파타아제, 분비 배아 알칼리 포스파타아제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(CAT)와 같은 효소이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자에는 루시페라아제(luc), β -갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), β -글루쿠로니다아제(GUS) 또는 이들의 변이체가 포함된다.
- [0821] 일부 구현예에서, 마커는 내성 마커 또는 선택 마커이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 외인성 제제 또는 약물에 대한 내성을 부여하는 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 포유류 세포에 대해 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 푸로마이신 내성 유전자, 히그로마이신 내성 유전자, 블라스티사이드 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 게네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이들의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.
- [0822] 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열(예를 들어, T2A)과 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 마커 및 선택적으로 링커 서열은 문헌[국제

출원 공개 번호 WO2014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다.

- [0823] 일부 구현예에서, 상기 CAR 작제물을 암호화하는 핵산 분자는 T2A 리보솜 스킵 요소 및/또는 tEGFR 서열, 예를 들어, CAR을 암호화하는 서열의 하류를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 서열은 서열번호 47 또는 48에 제시된 T2A 리보솜 스킵 요소, 또는 서열번호 47 또는 48에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 암호화한다.
- [0824] 일부 구현예에서, 항원 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하는 T 세포는 또한 (예를 들어, 동일한 작제물로부터 두 개의 단백질을 발현하도록 T2A 리보솜 스위치에 의해 분리된 CAR 및 EGFRt를 암호화하는 작제물의 도입에 의해) 비-면역원성 선택 에피토프로서 절단형 EGFR(EGFRt)을 발현하도록 생성될 수 있고, 그런 후 이는 상기 세포를 검출하는 마커로 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 8,802,374] 참조). 일부 구현예에서, 상기 서열은 서열번호 43 또는 44에 제시된 tEGFR 서열, 또는 서열번호 43 또는 44에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 암호화한다. 일부 경우에, T2A와 같은 펩타이드는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰도록(리보솜 스킵핑) 유발할 수 있으며, 이는 2A 서열의 말단과 다음(next) 펩타이드 하류 사이의 분리로 이어진다(예를 들어, 문헌[de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) and deFelipe *et al. Traffic* 5:616-626 (2004)] 참조). 많은 2A 요소가 공지되어 있다. 본원에 개시된 방법 및 핵산에 사용될 수 있는 2A 서열의 예에는 문헌[미국 특허 공개 번호 20070116690]에 기술된 바와 같은 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열번호 45), 말 비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열번호 46), 토세아 아시그나 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열번호 47 또는 48) 및 돼지 테스코 바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열번호 49 또는 50)이 있으며, 하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0825] 대상체에 투여되는 세포에 의해 발현되는 CAR과 같은 재조합 수용체는 일반적으로 치료하는 질병 또는 병태 또는 그 세포에서 발현되고, 그와 연관되고 및/또는 이에 특이적인 분자를 인식하거나 그 분자에 특이적으로 결합한다. 분자(예를 들어, 항원)에 특이적 결합 시, 수용체는 일반적으로 면역 자극 신호, 예컨대 ITAM-변환 신호를 세포에 전달하여 질병 또는 병태에 표적화된 면역 반응을 촉진한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포는 질병 또는 병태의 또는 질병 또는 병태와 관련된 세포 또는 조직에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현한다.
- [0826] **2. 키메라 자가항체 수용체(CAAR)**
- [0827] 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)이다. 일부 구현예에서, CAAR은 자가항체에 결합(예를 들어, 특이적으로 결합)하거나 이를 인식한다. 일부 구현예에서, CAAR을 발현하도록 조작된 T 세포와 같은 CAAR을 발현하는 세포는 정상적인 항체 발현 세포가 아닌 자가항체 발현 세포에 결합하여 이를 사멸하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포는 자가면역 질환과 같은 자가항원 발현과 관련된 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포는 궁극적으로 자가항체를 생산하고 세포 표면에 자가항체를 나타내는 B 세포를 표적화할 수 있고, 치료적 개입을 위한 질병 특이적 표적으로 상기 B 세포를 표지할 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포는 항원 특이적 키메라 자가항체 수용체를 이용하여 질병을 유발하는 B 세포를 표적화함으로써 자가면역 질환에서 병원성 B 세포를 효율적으로 표적화하고 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 US 2017/0051035]에 기술된 어느 하나와 같은 CAAR이다.
- [0828] 일부 구현예에서, CAAR은 자가항체 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호 전달 영역 또는 도메인(상호 교환적으로 세포질 신호 전달 도메인 또는 영역으로도 불림)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 영역은 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 도메인은 1차 신호 전달 도메인, T 세포에서 1차 활성화 신호를 자극 및/또는 유도할 수 있는 신호 전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 성분의 신호 전달 도메인(예를 들어, CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 세포내 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능적 변이체 또는 신호 전달 부분), 및/또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호 전달 도메인이거나 이를 포함한다.
- [0829] 일부 구현예에서, 자가항체 결합 도메인은 자가항원 또는 이의 단편을 포함한다. 자가항원의 선택은 표적화되는 자가항체의 유형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 자가항원은 특정 질병 상태, 예를 들어 자가면역 질환, 예컨대 자가항체 매개 자가면역 질환과 관련된 B 세포와 같은 표적 세포 상의 자가항체를 인식하기 때문에 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 자가면역 질환은 심상성 천포창(pemphigus vulgaris, PV)을 포함한다. 예시적인 자

가항원은 데스모글레인 1(desmoglein 1, Dsg1) 및 Dsg3을 포함한다.

[0830]

3. T 세포 수용체(TCR)

[0831]

일부 구현예에서, 종양, 바이러스 또는 자가 면역 단백질의 항원과 같은 표적 폴리펩타이드의 펩타이드 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 인식하는 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 항원 결합 부분을 발현하는 T 세포와 같은 조작된 세포가 제공된다.

[0832]

일부 구현예에서, “T 세포 수용체(T cell receptor)” 또는 “TCR”은 가변 α 및 β 사슬(각각 TCR α 및 TCR β 로도 공지) 또는 가변 γ 및 δ 사슬(각각 TCR γ 및 TCR δ 로도 공지) 또는 이의 항원 결합 부분을 함유하는 분자이고 이는 MHC 분자에 결합된 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태이다. 통상적으로, $\alpha\beta$ 및 $\gamma\delta$ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만, 이들을 발현하는 T 세포는 구별되는 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있다. 일반적으로 TCR은 T 세포(또는 T 림프구)의 표면 상에서 발견되며, 이는 일반적으로 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원의 인식을 담당한다.

[0833]

달리 언급되지 않는 한, 용어 “TCR”은 완전한(full) TCR뿐만 아니라 이의 항원 결합 부분 또는 항원 결합 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태 또는 $\gamma\delta$ 형태의 TCR을 포함하는 온전한 또는 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 전장 미만의 TCR이지만 MHC-펩타이드 복합체에 결합하는 것과 같이 MHC 분자에서 결합된 특정 펩타이드에 결합하는 항원 결합 부분이다. 일부 경우에, TCR의 항원 결합 부분 또는 단편은 전장 또는 온전한 TCR의 구조적 도메인의 일부만을 함유할 수 있으나, 그럼에도 완전한 TCR이 결합하는 MHC-펩타이드 복합체와 같은 펩타이드 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 항원 결합 부분은 특정 MHC-펩타이드 복합체에 결합하기 위한 결합 부위를 형성하기에 충분한, TCR의 가변 α 사슬 및 가변 β 사슬과 같은 TCR의 가변 도메인을 함유한다. 일반적으로, TCR의 가변 사슬은 펩타이드, MHC 및/또는 MHC-펩타이드 복합체의 인식에 관여하는 상보성 결정 영역을 함유한다.

[0834]

일부 구현예에서, TCR의 가변 도메인은 추가변 루프 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하며, 이는 일반적으로 항원 인식 및 결합 능력 및 특이성에 대한 1차 기여자이다. 일부 구현예에서, TCR의 CDR 또는 이의 병용은 주어진 TCR 분자의 항원 결합 부위의 전부 또는 실질적으로 전부를 형성한다. TCR 사슬의 가변 영역 내의 다양한 CDR은 일반적으로 CDR에 비해 TCR 분자 중에서 일반적으로 가변성을 덜 나타내는 프레임워크 영역(FR)으로 분리된다(예를 들어, 문헌[Jores et al., Proc. Nat’l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988 참조; 또한 Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003] 참조). 일부 구현예에서, CDR3은 항원 결합 또는 특이성을 담당하는 주요 CDR이거나, 항원 인식을 위한 및/또는 펩타이드-MHC 복합체의 가공된 펩타이드 부분과의 상호작용을 위한 주어진 TCR 가변 영역상에서 3개의 CDR 중 가장 중요한 CDR이다. 일부 맥락에서, 알파 사슬의 CDR1은 특정 항원 펩타이드의 N-말단 부분과 상호작용할 수 있다. 일부 맥락에서, 베타 사슬의 CDR1은 상기 펩타이드의 C-말단 부분과 상호작용할 수 있다. 일부 맥락에서, CDR2는 MHC-펩타이드 복합체의 MHC 부분과의 상호작용 또는 이의 인식을 담당하는 1차 CDR이거나 이에 가장 강력하게 기여한다. 일부 구현예에서, β 사슬의 가변 영역은 추가 추가변 영역(CDR4 또는 HVR4)을 함유할 수 있으며, 이는 일반적으로 항원 인식이 아닌 초항원 결합에 관여한다(Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0835]

일부 구현예에서, TCR은 또한 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다(예를 들어, 문헌[Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997] 참조). 일부 측면에서, TCR의 각 사슬은 1개의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 1개의 면역글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C-말단 끝에 짧은 세포질 꼬리를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 신호 전달 매개에 관여하는 CD3 복합체의 불변 단백질과 회합한다.

[0836]

일부 구현예에서, TCR 사슬은 하나 이상의 불변 도메인을 함유한다. 예를 들어, 주어진 TCR 사슬(예를 들어, α -사슬 또는 β -사슬)의 세포외 부분은 세포막에 인접한 2개의 면역글로불린 유사 도메인, 예컨대 가변 도메인(예를 들어, V α 또는 V β ; 전형적으로 Kabat 넘버링 Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.에 기초한 1 내지 116 아미노산) 및 불변 도메인(예를 들어 α 사슬 불변 도메인 즉 C α , 전형적으로 Kabat 넘버링에 기초한 사슬의 117 내지 259 위치 또는 β 사슬 불변 도메인 또는 C β , 전형적으로 Kabat에 기초한 사슬의 117 내지 295 위치)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2개의 사슬에 의해 형성된 TCR의 세포외 부분은 2개의 막 근위 불변 도메인과 2개의 막 원위 가변 도메인을 함유하고, 상기 가변 도메인 각각은 CDR을 함유한다. TCR의 불변 도메인은 시스테인 잔기가 이황화 결합을 형성하여 이로써 2개의 TCR 사슬을 연

결하는 짧은 연결 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 각각의 α 및 β 사슬에 추가 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, TCR은 불변 도메인에 2개의 이황화 결합을 함유한다.

[0837] 일부 구현예에서, TCR 사슬은 막관통 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 양으로 하전된다. 일부 경우에, TCR 사슬은 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우에, 이 구조는 TCR이 CD3 및 ζ 의 서브유닛과 같은 다른 분자와 회합하도록 허용한다. 예를 들어, 막관통 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막에 단백질을 고정하고 CD3 신호 전달 장치 또는 복합체의 불변 서브유닛과 회합할 수 있다. CD3 신호 전달 서브유닛(예를 들어 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 및 CD3 ζ 사슬)의 세포내 꼬리는 TCR 복합체의 신호 전달 용량에 관여하는 하나 이상의 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 즉 ITAM을 함유한다.

[0838] 일부 구현예에서, TCR은 2개의 사슬 α 및 β (또는 선택적으로 γ 및 δ)의 이종이량체이거나 단일 사슬 TCR 자체일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 예컨대 이황화 결합 또는 이황화 결합들에 의해 연결되는 2개의 별개의 사슬(α 및 β 사슬 또는 γ 및 δ 사슬)을 함유하는 이종이량체이다.

[0839] 일부 구현예에서, TCR은 $V\alpha$, β 사슬의 서열과 같은 공지된 TCR 서열(들)로부터 생성될 수 있으며, 이에 대해 실질적으로 전장 코딩 서열이 용이하게 이용가능하다. V 사슬 서열을 포함한 전장 TCR 서열을 세포 공급원으로부터 획득하는 방법은 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 핵산은 예컨대 주어진 세포 또는 세포들 내의 또는 이로부터 단리된 TCR 암호화 핵산의 증합효소연쇄반응(PCR) 증폭에 의해 또는 공개적으로 이용가능한 TCR DNA 서열의 합성에 의해 다양한 공급원으로부터 획득될 수 있다.

[0840] 일부 구현예에서, TCR은 생물학적 공급원, 예컨대 세포, 예컨대 T 세포(예를 들어, 세포 독성 T 세포), T 세포 혼성세포 또는 기타 공개적으로 이용 가능한 공급원으로부터 획득된다. 일부 구현예에서, T 세포는 생체 내 단리된 세포로부터 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 흉선에서 선택된 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 네오에피토프 제한(neoepitope-restricted) TCR이다. 일부 구현예에서, T 세포는 배양된 T 세포 혼성세포(hybridoma) 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 α 및 β 의 항원 결합 부분 또는 α 및 β 의 항원 결합 단편은 TCR 서열에 대한 지식을 이용해 합성하여 생성될 수 있다.

[0841] 일부 구현예에서, TCR은 표적 폴리펩타이드 항원 또는 α 및 β 의 표적 T 세포 에피토프에 대한 후보 TCR의 라이브러리를 스크리닝하여 식별되거나 선택된 TCR로부터 생성된다. TCR 라이브러리는 PBMC, 비장 또는 기타 림프구 기관에 존재하는 세포를 포함하여 대상체로부터 단리된 T 세포로부터의 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 레퍼토리를 증폭하여 생성될 수 있다. 일부 경우에, T 세포는 종양 침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 라이브러리는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포로부터 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 정상적인 건강한 대상체의 T 세포 공급원, 즉 정상 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 유병 대상체의 T 세포 공급원, 즉 유병 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간으로부터 획득된 T 세포와 같은 샘플에서 예컨대 RT-PCR에 의해 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 의 유전자 레퍼토리를 증폭시키기 위해 퇴화(degenerate) 프라이머가 사용된다. 일부 구현예에서, scTv 라이브러리는 증폭된 산물이 클로닝되거나 결집되어 링커에 의해 분리되는 나이브(naive) $V\alpha$ 및 $V\beta$ 라이브러리로부터 결집될 수 있다. 대상체와 세포의 공급원에 따라, 라이브러리는 HLA 대립유전자 특이적일 수 있다. 대안적으로, 일부 구현예에서, TCR 라이브러리는 모체(parent) 또는 지지체(scaffold) TCR 분자의 돌연변이 유발 또는 다양화에 의해 생성될 수 있다. 일부 측면에서, TCR은 예를 들어 α 또는 β 사슬의 예컨대 돌연변이 유발에 의해 유도 진화를 거친다. 일부 측면에서, TCR의 CDR 내 특정 잔기가 변경된다. 일부 구현예에서, 선택된 TCR은 친화도 성숙에 의해 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 특이적 T 세포는 예컨대, 스크리닝에 의해 펩타이드에 대한 CTL 활성을 산정하여 선택될 수 있다. 일부 측면에서, 예를 들어 항원 특이적 T 세포에 존재하는 TCR은 예컨대 결합 활성, 예를 들어 항원에 대한 특정 친화도 또는 친화력에 의해 선택될 수 있다.

[0842] 일부 구현예에서, TCR 또는 α 및 β 의 항원 결합 부분은 변형되었거나 조작된 것이다. 일부 구현예에서, 특정 MHC-펩타이드 복합체에 대한 더 높은 친화도를 갖는 것과 같은 변경된 특성을 갖는 TCR을 생성하기 위해 유도 진화 방법이 사용된다. 일부 구현예에서, 유도 진화는 효모 디스플레이(Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), 파지 디스플레이(Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) 또는 T 세포 디스플레이(Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84)를 포함하되 이에 한정되지 않는 디스플레이 방법에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 디스플레이 접근법은 공지된 모체(parent) 또는 기준 TCR을 조작 또는 변형하는 것을 수반한다. 예를 들어, 일부 경우에, 하나 이상의 CDR 잔기에서 돌연변이된 돌연변이를 일으킨 TCR을 생성하기 위한 주형(template)으로 야생형 TCR이 사용될 수 있고, 원하는 변경된 특성, 예컨대 원하는 표적 항원에 대한 보다 높은 친화도를 갖는 돌연변이가 선택된다.

- [0843] 일부 구현예에서, 관심 TCR의 제조 또는 생성에 사용하기 위한 표적 폴리펩타이드의 펩타이드는 공지되어 있거나 용이하게 식별될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 항원 결합 부분을 생성하는 데 사용하기에 적합한 펩타이드는 하기 기재된 표적 폴리펩타이드와 같은 관심 표적 폴리펩타이드에서 HLA 제한 모티프의 존재에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드는 이용 가능한 컴퓨터 예측 모델을 사용하여 식별된다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 결합 부위를 예측하기 위해, 상기 모델은 ProPred1(Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237) 및 SYFPEITHI(Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007 참조)를 포함되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, MHC 제한 에피토프는 HLA-A0201이며, 이는 모든 백인의 약 39-46%에서 발현되고 따라서, TCR 또는 다른 MHC-펩타이드 결합 분자를 제조하는 데 사용하기 위한 MHC 항원의 적합한 선택을 의미한다.
- [0844] 컴퓨터 예측 모델을 사용한 프로테아좀 및 면역 프로테아좀에 대한 HLA-A0201 결합 모티프 및 절단 부위는 공지되어 있다. MHC 클래스 I 결합 부위를 예측하기 위해, 상기 모델은 ProPred1(Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237 2001에 보다 상세하게 기재됨) 및 SYFPEITHI(Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, vol 409(1): 75-93 2007 참조)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0845] 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원 결합 부분은 결합 특성과 같은 하나 이상의 특성이 변경된 재조합으로 생산된 천연 단백질 또는 이의 돌연변이 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 인간, 마우스, 랫트 또는 기타 포유동물과 같은 다양한 동물 중 중 하나에서 유래될 수 있다. TCR은 세포 결합 또는 가용성 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법의 목적을 위해, TCR은 세포의 표면 상에 발현된 세포 결합 형태이다.
- [0846] 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 항원 결합 부분이다. 일부 구현예에서, TCR은 2량체 TCR(dTCR)이다. 일부 구현예에서, TCR은 단일 사슬 TCR(sc-TCR)이다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR은 문헌[WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186]에 기술된 바와 같은 구조를 가지고 있다.
- [0847] 일부 구현예에서, TCR은 막관통 서열에 해당하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 세포질 서열에 해당하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 CD3과 TCR 복합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR을 포함하여 임의의 TCR은 T 세포 표면 상에 활성 TCR을 생성하는 신호 전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 세포의 표면 상에 발현된다.
- [0848] 일부 구현예에서 dTCR은 TCR α 사슬 가변 영역 서열에 해당하는 서열이 TCR α 사슬 불변 영역 세포의 서열에 해당하는 서열의 N 말단에 융합된 제1 폴리펩타이드, 및 TCR β 사슬 가변 영역 서열에 해당하는 서열이 TCR β 사슬 불변 영역 세포의 서열에 해당하는 N 말단 서열에 융합된 제2 폴리펩타이드를 함유하고, 제1 및 제2 폴리펩타이드는 이황화 결합에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 이 결합은 천연 이량체 $\alpha\beta$ TCR에 존재하는 천연 사슬 간 이황화 결합에 해당할 수 있다. 일부 구현예에서, 사슬 간 이황화 결합은 천연 TCR에 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 시스테인이 dTCR 폴리펩타이드 쌍의 불변 영역 세포의 서열에 편입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비천연 이황화 결합이 모두 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 막에 고정하는 막관통 서열을 함유한다.
- [0849] 일부 구현예에서, dTCR은 가변 α 도메인, 불변 α 도메인 및 이 불변 α 도메인의 C-말단에 부착된 제1 2량체화(dimerization) 모티프를 함유하는 TCR α 사슬, 및 가변 β 도메인, 불변 β 도메인 및 이 불변 β 도메인의 C-말단에 부착된 제2 2량체화 모티프를 포함하는 TCR β 사슬을 함유하고, 여기에서 제1 및 제2 2량체화 모티프는 용이하게 상호작용하여 TCR α 사슬과 TCR β 사슬을 서로 연결하는 제1 2량체화 모티프에 있는 아미노산과 제2 2량체화 모티프에 있는 아미노산 사이에서 공유결합을 형성한다.
- [0850] 일부 구현예에서, TCR은 scTCR이다. 전형적으로, scTCR은 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Soo Hoo, W. F. et al. *PNAS (USA)* 89, 4759 (1992); Wülfing, C. and Plückthun, A., *J. Mol. Biol.* 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. *PNAS (USA)* 90 3830 (1993); 국제 출원 공개 번호 WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; 및 Schlueter, C. J. et al. *J. Mol. Biol.* 256, 859 (1996)] 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 도입된 비천연 사슬 간 이황화 결합을 함유하여 TCR 사슬의 회합을 용이하게 한다(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO 03/020763 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 비이황화물 연결 절단형 TCR이며 여기에서 이종 류신 지퍼(heterologous leucine zipper)가 이의 C-말단에 융합하여 사슬 결합을 촉진한다(예를 들어, 국제 출원 공개 번호 WO99/60120 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 펩타

이드 링커를 통해 TCR β 가변 도메인에 공유적으로 연결된 TCR α 가변 도메인을 함유하고 있다(예를 들어, 국제출원 공개 번호 W099/18129 참조).

- [0851] 일부 구현예에서, scTCR은 TCR α 사슬 가변 영역에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 제1 분절, TCR β 사슬 불변 도메인 세포의 서열에 해당하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 사슬 가변 영역 서열에 해당하는 아미노산 서열로 구성된 제2 분절, 및 제2 분절의 N 말단에 제1 분절의 C 말단을 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0852] 일부 구현예에서, scTCR은 α 사슬 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 α 사슬 가변 영역 서열로 구성된 제1 분절, 및 β 사슬 세포의 불변 및 막관통 서열의 N 말단에 융합된 β 사슬 가변 영역 서열로 구성된 제2 분절, 및 선택적으로 제2 분절의 N 말단에 제1 분절의 C 말단을 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0853] 일부 구현예에서, scTCR은 β 사슬 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 사슬 가변 영역 서열로 구성된 제1 분절, 및 α 사슬 세포의 불변 및 막관통 서열의 N 말단에 융합된 α 사슬 가변 영역 서열로 구성된 제2 분절, 및 선택적으로 제2 분절의 N 말단에 제1 분절의 C 말단을 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0854] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 TCR 분절을 연결하는 scTCR의 링커는 TCR 결합 특이성을 유지하면서 단일 폴리펩타이드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 예를 들어, 화학식 -P-AA-P-를 가질 수 있고, 여기서 P는 프롤린이고 AA는 아미노산 서열을 나타내며 여기서 아미노산은 글리신과 세린이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 분절은 이의 가변 영역 서열이 상기 결합을 향해 배향되도록 쌍을 이룬다. 따라서, 일부 경우에, 링커는 제1 분절의 C 말단과 제2 분절의 N 말단 사이(또는 그 반대)의 거리를 포괄할 수 있는 충분한 길이를 가지나 표적 리간드와 scTCR의 결합을 차단하거나 감소시킬 정도로 너무 길지 않다. 일부 구현예에서, 링커는 (약) 10 내지 45개의 아미노산, 예컨대 10 내지 30개의 아미노산 또는 26 내지 41개의 아미노산 잔기, 예를 들어 29, 30, 31 또는 32개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 화학식 -PGGG-(SGGGG) 5-P-을 갖고 여기서 P는 프롤린이고, G는 글리신이고 S는 세린이다(서열번호 38). 일부 구현예에서, 링커는 서열 GSADDAKKDAKKDGKS(서열번호 39)를 갖는다.
- [0855] 일부 구현예에서, scTCR은 β 사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기에 α 사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기를 연결하는 공유 이황화 결합을 함유한다. 일부 구현예에서, 천연 TCR에서 사슬 간 이황화 결합은 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 시스테인이 scTCR 폴리펩타이드의 제1 및 제2 분절의 불변 영역 세포의 서열로 편입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비천연 이황화 결합이 모두 바람직할 수 있다.
- [0856] 도입된 사슬 간 이황화 결합을 함유하는 dTCR 또는 scTCR의 일부 구현예에서, 천연 이황화 결합은 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 천연 사슬 간 이황화 결합을 형성하는 천연 시스테인 중 하나 이상이 다른 잔기, 예컨대 세린 또는 알라닌으로 치환된다. 일부 구현예에서, 도입된 이황화 결합은 제1 및 제2 분절에 있는 비시스테인 잔기를 시스테인으로 돌연변이시키므로써 형성될 수 있다. TCR의 예시적인 비천연 이황화 결합은 문헌[국제출원 공개 번호 W02006/000830]에 기술되어 있다.
- [0857] 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원 결합 단편은 표적 항원에 대해 (약) 10⁻⁵ 내지 10⁻¹² M 및 그 안의 모든 개별 수치 및 범위의 평형 결합 상수를 갖는 친화도를 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 MHC-펩타이드 복합체 또는 리간드이다.
- [0858] 일부 구현예에서, α 및 β 사슬과 같은 TCR을 암호화하는 핵산 또는 핵산들은 PCR, 클로닝 또는 기타 적합한 수단에 의해 증폭되어 적합한 발현 벡터 또는 벡터들로 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질전환하거나 형질주입시키는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 플라스미드 및 바이러스와 같이 증식 및 증폭 또는 발현 또는 둘 모두를 위해 설계된 것을 포함한다.
- [0859] 일부 구현예에서, 벡터는 pUC 시리즈(Fermentas Life Sciences), pBluescript 시리즈(Stratagene, LaJolla, Calif.), pET 시리즈(Novagen, Madison, Wis.), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 또는 pEX 시리즈(Clontech, Palo Alto, Calif.)의 벡터일 수 있다. 일부 경우에, λ G10, λ GT11, λ ZapII(Stratagene), λ EMBL4 및 λ NM1149와 같은 박테리오파지 벡터도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 발현 벡터가 사용될 수 있고 식물 발현 벡터에는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(Clontech)가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 동물 발현 벡터에는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)가 포함된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터가 사용된다.
- [0860] 일부 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 벡

터는 벡터가 도입되어야 하는 숙주 유형(예를 들어, 박테리아, 곰팡이, 식물 또는 동물)에 특이적인 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을, 벡터가 DNA 기반인지 또는 RNA 기반인지 고려하여 적절한 것으로 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 TCR 또는 항원 결합 부분(또는 다른 MHC-펩타이드 결합 분자)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 비천연 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 시토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터 및 뮤린 줄기세포 바이러스의 긴 말단 반복에서 발견되는 프로모터와 같은 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터일 수 있다. 기타 공지된 프로모터도 고려된다.

[0861] 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 벡터를 생성하기 위해, 관심 TCR을 발현하는 T 세포 클론으로부터 단리된 총 cDNA로부터 α 및 β 사슬이 PCR 증폭되고 발현 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, α 및 β 사슬은 동일한 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, α 및 β 사슬은 상이한 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 생성된 α 및 β 사슬은 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스, 벡터로 편입된다.

[0862] B. 유전자 조작을 위한 핵산, 벡터 및 방법

[0863] 본원에 개시된 장치를 사용하여 세포, 예를 들어 T 세포가 재조합 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작되는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 조작은 재조합 수용체 또는 그 일부나 성분을 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 수행된다. 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 핵산 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터 또는 작제물이 또한 제공된다.

[0864] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 함유한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 2개, 3개 이상의 프로모터를 함유한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드가 도입되어야 하는 숙주 유형(예를 들어, 박테리아, 곰팡이, 식물 또는 동물)에 특이적인 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈과 같은 조절 서열을, 폴리뉴클레오타이드가 DNA 기반인지 또는 RNA 기반인지 고려하여 적절한 것으로 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, Kozak 공통서열, 내부 리보솜 유입점(IRES), 2A 서열 및 스플라이스 수용체 또는 도너와 같은 조절/제어 요소를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체 및/또는 하나 이상의 추가 폴리펩타이드(들)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 비천연 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA pol I, pol II 또는 pol III 프로모터 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 중합효소 II(예를 들어, CMV, SV40 초기 영역 또는 아데노바이러스 주요 후기 프로모터)에 의해 인식된다. 다른 구현예에서, 프로모터는 RNA 중합효소 III(예를 들어, U6 또는 H1 프로모터)에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 시토메갈로 바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터 및 뮤린 줄기세포 바이러스의 긴 말단 반복에서 발견되는 프로모터와 같은 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터일 수 있다. 기타 공지된 프로모터도 고려된다.

[0865] 일부 구현예에서, 프로모터는 구성적 프로모터이거나 이를 포함한다. 예시적인 구성적 프로모터에는 예를 들어 시미안 바이러스 40 초기 프로모터(SV40), 시토메갈로 바이러스 즉석 초기 프로모터(CMV), 인간 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1 α 프로모터(EF1 α), 마우스 포스포글리세린산 키나아제 1 프로모터(PGK) 및 CMV 초기 인핸서와 결합한 β -액틴 프로모터(CAGG)가 포함된다. 일부 구현예에서, 구성적 프로모터는 합성 또는 변형된 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 골수증식 육종바이러스 인핸서가 있는 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터인 MND 프로모터이거나 이를 포함한다(문헌 [Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755] 참조). 일부 구현예에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 다른 구현예에서, 프로모터는 바이러스 프로모터이다. 다른 구현예에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터이다. 일부 구현예에서, 예시적인 프로모터에는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 α) 프로모터 또는 이의 변형된 형태 또는 MND 프로모터가 포함될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0866] 다른 구현예에서, 프로모터는 조절되는 프로모터(예를 들어, 유도성 프로모터)이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터 또는 억제성 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 Lac 작동유전자 서열, 테트라사이클린 작동유전자 서열, 갈락토스 작동유전자 서열 또는 독시사이클린 작동유전자 서열을 포함하거나 또는 이의 유사체이거나 Lac 억제인자 또는 테트라사이클린 억제인자 또는 이의 유사체에 의해 결합되거나 인식될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 조절 요소, 예를 들어, 프로모터를 포함하지 않는다.

[0867] 일부 경우에, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩타이드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 천연 폴리펩타이드로부터 유래된 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 다른 측면에서,

신호 서열은 서열번호 41에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고 서열번호 40에 제시된 GMCSFR 알파 사슬의 예시적인 신호 펩타이드와 같은 이중 또는 비천연 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩타이드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 비 제한적인 예시적인 신호 펩타이드에는 예를 들어, 서열번호 40에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고 서열번호 40에 제시된 GMCSFR 알파 사슬 신호 펩타이드 또는 서열번호 42에 제시된 CD8 알파 신호 펩타이드가 포함된다.

[0868] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 추가 폴리펩타이드, 예를 들어, 하나 이상의 마커(들) 및/또는 하나 이상의 작동제(effector) 분자를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커(들)는 형질도입 마커, 대리 마커 및/또는 내성 마커 또는 선택 마커를 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 추가 폴리펩타이드(들)를 암호화하는 도입된 추가 핵산 서열 중에는 예컨대 전달된 세포의 생존을 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선할 수 있는 핵산 서열; 예컨대 생체 내 생존 또는 국소화를 평가하기 위한 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 핵산 서열; 문헌[Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); and Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)]에 기술된 바와 같이 예를 들어 생체 내에서 음성 선택에 세포를 예민하게 만들어 안정성을 개선하기 위한 핵산 서열이 포함되고; 또한 우성의 양성 선택 가능한 마커를 음성 선택 가능한 마커와 융합시켜 유래된 2작용성 선택 가능한 융합 유전자의 용도를 기술하는 문헌[WO 1992008796 및 WO 1994028143와 미국 특허 번호 6,040,177]을 참조한다.

[0869] 일부 구현예에서, 마커는 형질도입 마커 또는 대리 마커이다. 형질도입 마커 또는 대리 마커는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 형질도입 마커는 세포의 변형을 나타내거나 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 대리 마커는 재조합 수용체(예를 들어, CAR)와 함께 세포 표면 상에 공발현되도록 만들어진 단백질이다. 구체적인 구현예에서, 상기 대리 마커는 거의 또는 전혀 활성을 갖지 않도록 변형된 표면 단백질이다. 특정 구현예에서, 대리 마커는 재조합 수용체를 암호화하는 동일한 폴리뉴클레오타이드 상에 암호화된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은, 임의적으로 내부 리보솜 유입점(IRES)에 의해 분리되는, 마커를 암호화하는 핵산 서열에 또는 자가 절단 펩타이드 또는 2A 서열과 같은 리보솜 스킵핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된다. 외인성 표지 유전자는 일부 경우에 세포의 검출 또는 선택을 허용하도록 조작된 세포와 관련하여 사용될 수 있고, 일부 경우에 세포 제거 및/또는 세포 자살을 촉진하도록 조작된 세포와 관련하여 또한 사용될 수 있다.

[0870] 예시적인 대리 마커는, 비기능적이며 신호 또는 일반적으로 전장 형태의 세포 표면 폴리펩타이드에 의해 전달되는 신호를 전달할 수 없거나 전달하지 않고/거나 내재화될 수 없거나 내재화되지 않는 절단 형태와 같은, 세포 표면 폴리펩타이드의 절단 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단된 세포 표면 폴리펩타이드는 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(tHER2), 절단된 표피 성장 인자 수용체(tEGFR, 서열번호 43 또는 44에 제시된 예시적인 tEGFR 서열) 또는 전립선-특이적 막 항원(PSMA) 또는 절단된 PSMA(tPSMA)와 같은 이의 변형 형태와 같은 성장 인자 또는 다른 수용체의 절단 형태를 포함한다. 일부 측면에서, tEGFR은 항체 세톡시맙(Erbix®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 tEGFR 작제물 및 암호화된 외인성 단백질로 조작된 세포를 확인 또는 선택하기 위해 및/또는 암호화된 외인성 단백질을 발현하는 세포를 제거 또는 분리하기 위해 사용될 수 있다. 문헌[미국 특허 번호 8,802,374 및 Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다. 일부 측면에서, 마커(예를 들어, 대리 마커)에는 CD34의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태), NGFR, CD19 또는 절단된 CD19(예를 들어, 절단된 비-인간 CD19)가 포함된다. 절단된 EGFR(예를 들어, tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 서열번호 43 또는 44에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 43 또는 44에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0871] 일부 구현예에서, 마커는 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 코돈-최적화된, 안정화된 및/또는 강화된 변이체를 포함하여, 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예컨대 슈퍼-폴드 GFP(super-fold GFP, sfGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청록 형광 단백질(blue green fluorescent protein, BFP), 강화된 청색 형광 단백질(EBFP) 및 노랑 형광 단백질(YFP) 및 이들의 변이체와 같은 형광 단백질과 같은 검출 가능한 단백질이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 루시페라아제, 대장균(*E. Coli*)의 lacZ 유전자, 알칼리 포스파타아제, 분비 배아 알칼리 포스파타아제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(CAT)와 같은 효소이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리

포터 유전자에는 루시페라아제(luc), β -갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), β -글루쿠로니다아제(GUS) 또는 이들의 변이체가 포함된다. 일부 측면에서, 효소의 발현은 효소의 발현 및 기능적 활성 시 검출될 수 있는 기질의 첨가에 의해 검출될 수 있다.

[0872] 일부 구현예에서, 마커는 내성 마커 또는 선택 마커이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 외인성 제제 또는 약물에 대한 내성을 부여하는 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 포유류 세포에 대해 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 내성 마커 또는 선택 마커는 푸로마이신 내성 유전자, 히그로마이신 내성 유전자, 블라스티사이드 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 게네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이들의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.

[0873] 본원에 기술된 임의의 재조합 수용체 및/또는 추가 폴리펩타이드는 임의의 조합, 방향 또는 배열에서 재조합 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 함유하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어, 하나, 둘 또는 셋 이상의 폴리뉴클레오타이드는 하나, 둘 또는 셋 이상의 상이한 폴리펩타이드(예를 들어, 재조합 수용체), 또는 이의 부분 또는 성분, 및/또는 하나 이상의 추가 폴리펩타이드(예를 들어, 마커 및/또는 작동체(effector) 분자)를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나의 폴리뉴클레오타이드는 CAR과 같은 재조합 수용체 또는 이의 부분 또는 성분을 암호화하는 핵산 서열, 및 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나의 벡터 또는 작제물은 CAR과 같은 재조합 수용체 또는 이의 부분 또는 성분을 암호화하는 핵산 서열을 함유하고, 그리고 개별 벡터 또는 작제물은 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 상부에 존재한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 하부에 존재한다.

[0874] 특정 경우에, 하나의 폴리뉴클레오타이드는 둘 이상의 상이한 폴리펩타이드 사슬, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열, 및 하나 이상의 추가 폴리펩타이드(예를 들어, 마커 및/또는 작동체 분자)를 함유한다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 상이한 폴리펩타이드 사슬, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열, 및 하나 이상의 추가 폴리펩타이드가 두 개의 개별 폴리뉴클레오타이드에 존재한다. 예를 들어, 두 개의 개별 폴리뉴클레오타이드가 제공되고, 각각은 세포내 발현을 위해 세포로 개별적으로 전달되거나 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 마커를 암호화하는 핵산 서열은 세포의 게놈 내의 상이한 위치에 존재하거나 이에 삽입된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 마커를 암호화하는 핵산 서열은 2개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0875] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드가 제1 및 제2 핵산 서열을 함유하는 것과 같이 각각의 상이한 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 코딩 서열은 동일하거나 상이할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 둘 이상의 상이한 폴리펩타이드 사슬의 발현을 구동하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 다중 시스트론(이중 시스트론 또는 삼중 시스트론, 예를 들어, 미국 특허 번호 6,060,273 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열 및 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고 임의적으로 내부 리보솜 유입점(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드 또는 2A 요소와 같은 리보솜 스킵핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산에 의해 분리된다. 예를 들어, 예시적인 표지자 및 임의적으로 리보솜 스킵핑 서열 서열은 문헌[국제 출원 공개 번호 W02014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다.

[0876] 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터의 메시지에 의해(예를 들어, 재조합 수용체 및 추가 폴리펩타이드를 암호화하는) 유전자 산물의 동시 발현을 허용하는 IRES를 함유하는 이중 시스트론 단위로 조작될 수 있다. 대안적으로, 일부 경우에, 단일 프로모터는 단일 오픈 리딩 프레임(open reading frame, ORF)에 자가-절단 펩타이드(예를 들어, 2A 서열) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어, 푸린)를 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된, 2 개 또는 3 개의 유전자(예를 들어, 마커 암호화 및 재조합 수용체 암호화)를 함유하는 RNA의 발현을 지시할 수 있다. 따라서, ORF는 번역 동안(2A의 경우) 또는 번역 후에 개별 단백질로 가공되는 단일 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 경우에, T2A와 같은 펩타이드는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰도록(리보솜 스킵핑) 유발할 수 있으며, 이는 2A 서열의 말단과 다음 펩타이드 하부 사이의 분리로 이어진다(예를 들어, de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) and de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004) 참조). 다양한 2A 요소가 공지되어 있다. 본원에 개시된 방법 및 시스템에 사용될 수 있는 2A 서열

의 예에는 문헌[미국 특허 공개 번호 20070116690]에 기술된 바와 같은 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열 번호: 45), 말 비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열번호: 46), 토세아 아시그나 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열번호: 47 또는 48) 및 돼지 테스코 바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열번호: 49 또는 50)이 있으며, 하지만 이에 한정되지 않는다.

[0877] 일부 구현예에서, 재조합 수용체 및/또는 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 벡터에 포함되거나 하나 이상의 벡터(들)로 클로닝될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 벡터(들)가 숙주 세포, 예를 들어, 조작을 위한 세포를 형질변환하거나 형질주입할 수 있다. 예시적인 벡터로는 플라스미드 및 바이러스 벡터와 같이 도입, 증식 및 증폭 또는 발현 또는 둘 모두를 위해 설계된 벡터가 포함된다. 일부 측면에서, 벡터는 발현 벡터, 예를 들어 재조합 발현 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다.

[0878] 일부 구현예에서, 벡터는 pUC 시리즈(Fermentas Life Sciences), pBluescript 시리즈(Stratagene, LaJolla, Calif.), pET 시리즈(Novagen, Madison, Wis.), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 또는 pEX 시리즈(Clontech, Palo Alto, Calif.)의 벡터일 수 있다. 일부 경우에, λ G10, λ GT11, λ ZapII(Stratagene), λ EMBL4 및 λ NM1149와 같은 박테리오파지 벡터도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 발현 벡터가 사용될 수 있고 식물 발현 벡터에는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19(Clontech)가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 동물 발현 벡터에는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)가 포함된다.

[0879] 일부 구현예에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체 및/또는 추가 폴리펩타이드(들)를 암호화 하는 폴리뉴클레오타이드는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터, 또는 트랜스포손을 통해 세포에 도입된다(예를 들어, Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:1748-1757; and Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy* 18:674-683 참조).

[0880] 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus, AAV)로부터 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)는 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 도입된다(예를 들어 문헌[Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557] 참조).

[0881] 일부 구현예에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 일부 측면에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열(long terminal repeat sequence, LTR), 예를 들어 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 골수증식 육종바이러스(myeloproliferative sarcoma virus, MPSV), 뮤린 배아줄기세포 바이러스(murine embryonic stem cell virus, MESV), 뮤린 줄기세포 바이러스(murine stem cell virus, MSCV), 비장 병소 형성 바이러스(spleen focus forming virus, SFFV) 또는 아데노 연관 바이러스(AAV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터를 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 공급원으로부터 유래된 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 인간을 포함하여 몇몇 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미하는, 암프트로픽(amphotropic)이다. 일 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스의 gag(궤), pol(폴) 및/또는 env(엔브) 서열을 대체한다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 문헌[예를 들어, 미국 특허 번호 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109]에 기술되어 있다.

[0882] 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood*. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) *Blood*. 102(2): 497-505]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체 및/또는 하나 이상의 추가 폴리펩타이드(들)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 레트로바이러스 형질 도입, 형질 감염 또는 형질 전환에 의해 배양된 세포를 함유하는 조성물로 도입된다.

[0883] 일부 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)는 전기 천공법을 사용하여 T 세포 내로 도입된다(예를 들어, 문헌[Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 및 Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy*

7(16): 1431-1437] 참조). 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전위(transposition)를 통해 T 세포로 전달된다(예를 들어, 문헌[Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; and Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126] 참조). 면역 세포 내로 유전 물질, 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 벡터를 도입하고 발현시키는 다른 방법은 인산칼슘 형질주입(예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.에 기재된 바와 같음), 원형질체 융합, 양이온성 리포솜-매개 형질주입; 텅스텐 입자 촉진 미세 입자 충격(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); 및 인산스트론튬 DNA 공동 침전(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)) 및 국제 특허 출원 공개번호 WO 2014055668 및 미국 특허 번호 7,446,190에 기재된 다른 방법을 포함된다.

[0884] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들) 또는 벡터(들), 및/또는 추가 폴리펩타이드(들)가 증폭 도중 또는 후에 세포(예를 들어, T 세포)에 도입될 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드(들) 또는 벡터(들)의 도입은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 이어서 그 결과로 생성된 유전자 조작된 세포는 초기 자극(예를 들어, 항-CD3/항-CD28 자극)으로부터 유리될 수 있으며, 후속적으로 제2 유형의 자극의 존재 하에(예를 들어, 새로이 도입된 재조합 수용체를 통해) 자극될 수 있다. 상기 제2 유형의 자극은 새로운 수용체의 프래임워크 내에서 직접 결합하는(예를 들어, 수용체 내의 불변 영역을 인식함으로써) 유전자 도입된 수용체의 펩타이드/MHC 분자, 즉 동종(교차 결합) 리간드(예를 들어, CAR의 천연 항원 및/또는 리간드) 또는 임의의 리간드(예컨대 항체) 형태의 항원 자극을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cheadle et al, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 또는 Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)]을 참조한다.

[0885] 일부 경우에, 세포, 예를 들어, T 세포가 활성화되는 것이 필요하지 않은 벡터를 사용할 수 있다. 일부 상기의 경우에, 세포는 활성화되기 전에 선택 및/또는 형질도입될 수 있다. 따라서, 세포는 세포 배양 이전에 또는 이후에 조작될 수 있고, 일부 경우에는 배양의 적어도 일부와 동시에 또는 그 동안에 조작될 수 있다.

[0886] IV. 조성물, 제형 및 투여 방법

[0887] 자극 및 선택된 세포, 선택적으로 유전적으로 조작된(예: 조작된 항원 수용체), 예컨대 CAR 또는 TCR을 함유하는 조성물, 및 약학 조성물 및 제형을 포함하는 세포를 함유하는 조성물이 또한 제공된다. 또한, 항원이 발현되는 질병, 병태 및 장애의 치료에서, 또는 검출, 진단 및 예후 방법에서와 같은 조성물의 사용 방법 및 용도가 제공된다.

[0888] A. 조성물 및 제형

[0889] 용어 “약학적 제형(pharmaceutical formulation)”은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적인 수 있도록 하는 형태이고, 상기 제형이 투여되는 대상체에 허용 가능하지 않을 정도로 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 조제품(preparation)을 지칭한다.

[0890] “약학적으로 허용 가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)”는 활성 성분 외의 약학적 제형 안에 있는 성분을 지칭하고, 이는 대상체에 무독성이다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0891] 일부 측면에서, 운반체의 선택은 특정 세포 또는 제제 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 적합한 제형이 다양하게 존재한다. 예를 들어, 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨 및 염화 벤잘코늄을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2개 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.0001% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 운반체는, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 사용된 용량 및 농도에서 일반적으로 수용체(recipient)에게 무독성이며, 인산염, 구연산염 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로 헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 마노스 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과

같은 설탕; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온 계면활성제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0892] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제에는 예를 들어, 구연산, 구연산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 다른 산 및 염이 포함된다. 일부 측면에서, 2개 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.001중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0893] 제형 또는 조성물은 또한 세포 또는 제제로 예방 또는 치료될 특정 징후, 질병 또는 병태에 유용한 하나보다 많은 활성 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성이 서로 악영향을 미치지 않는다. 상기 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약학 조성물은 화학 요법제, 예를 들어 아스파라기나아제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 켈미타빈, 히드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맙, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등과 같은 다른 약학적 활성제 또는 약물을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포는 염의 형태, 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여된다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염은 염산, 브롬화 수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산과 같은 무기산, 및 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴술폰산, 예를 들어 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0894] 일부 구현예에서 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 제제 또는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서 치료적 또는 예방적 효능은 치료받은 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라 며칠 또는 그 이상에 걸쳐 반복 투여되는 경우, 질병 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다. 원하는 투여량이 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여 또는 조성물의 지속적인 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0895] 제제 또는 세포는, 임의의 적합한 수단, 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내(intraocular) 주사, 안구주위(periocular) 주사, 망막하(subretinal) 주사, 유리체내(intravitreal) 주사, 중격-경유성(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전방내(intracameral) 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection, subconjunctival injection), 서브 테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후부 점막 주사(posterior juxtascleral) 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이는 비경구, 폐내 및 비강내 및 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 단위 용량이 세포 또는 제제의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 이는 예를 들어, 3일 이내의 기간에 걸쳐 세포 또는 제제의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포 또는 제제의 지속적인 주입 투여에 의해 투여된다.

[0896] 질병의 예방 또는 치료를 위한, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 제제의 유형, 세포 또는 제조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 진행 경과, 제제 또는 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지, 선행 요법, 대상체의 임상 이력과 제제 또는 세포에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서 조성물은 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.

[0897] 세포 또는 제제는 표준 투여 기술, 제형 및/또는 디바이스를 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 저장 및 투여를 위해 주사기 및 바이알과 같은 제형 및 디바이스가 제공된다. 세포에 관하여, 투여는 자가 조직 또는 이종 기원일 수 있다. 예를 들어, 면역 반응성 세포 또는 전구체(progenitor)는 하나의 대상체로부터 수득될 수 있고, 동일한 대상체 또는 상이하고, 양립 가능한 대상체에 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 면역 반응성 세포 또는 이의 자손(예를 들어, 생체 내, 생체 외 시험 또는 시험관 내 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥내 주사 또는 비경구 투여를 포함하는 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예를 들어, 신경 독성의 증상을 치료 또는 개선하는 유전자 변형 면역 반응성 세포 또는 제제를 함유하는 약학 조성물)을 투여할 때, 일반적으로 이는 주사 가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액, 에멀션)로 제형화될 것이다.

[0898] 제형에는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 볼, 설하 또는 좌약 투여를 위한 것이 포함된다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 비경구적으로 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 “비

경구(parenteral)”는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에 투여된다.

[0899] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀션, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조가 보다 용이하다. 또한, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 적절한 점도 범위 내에서 제형화되어 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예를 들어, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 운반체를 포함할 수 있다.

[0900] 멸균 주사용 용액은 적합한 멸균수, 생리 식염수, 포도당, 텍스트로스 등과 같은 부형제, 운반체 또는 희석제와 혼합하는 것과 같이 용매에 제제 또는 세포를 통합함으로써 제조될 수 있다.

[0901] 생체 내 투여에 사용될 제형은 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0902] B. 치료 방법 및 용도

[0903] 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조작된 세포(예: CAR-발현 세포) 또는 조작된 세포(예: CAR-발현 세포)를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 본원에서 제공된다. 일부 측면에서, 본원에 기술된 임의의 조작된 세포(예: CAR-발현 세포) 또는 조작된 세포를 함유하는 임의의 조성물을 대상체에, 예컨대 질병 또는 장애가 있는 대상체에 투여하는 방법이 또한 제공된다. 일부 측면에서, 질병 또는 장애의 치료를 위한 본원에 기재된 임의의 조작된 세포(예: CAR-발현 세포) 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물의 용도가 또한 제공된다. 일부 측면에서, 질병 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 본원에 기재된 임의의 조작된 세포(예를 들어, CAR-발현 세포) 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물의 용도가 또한 제공된다. 일부 측면에서, 질병 또는 장애의 치료에 사용하기 위한, 또는 질병 또는 장애를 갖는 대상체에 투여하기 위한, 본원에 기재된 임의의 조작된 세포(예: CAR-발현 세포) 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물이 또한 제공된다.

[0904] 입양 세포 요법을 위한 세포의 투여 방법은 공지되어 있으며 제공된 방법 및 조성물과 연결하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법 방법은 예를 들어 문헌[미국 특허 출원 공개 번호2003/0170238(Gruenberg et al.); 미국 특허 번호 4,690,915(Rosenberg); Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)]에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338] 참조.

[0905] 치료되는 질병 또는 병태는 항원의 발현이 질병, 병태 또는 장애의 병인과 관련되고/거나 병인에 수반되는, 예를 들어, 상기 질병, 병태 또는 장애를 일으키거나, 악화하거나 또는 그렇지 않으면 그에 수반되는, 임의의 것일 수 있다. 예시적인 질병 및 병태는 악성 종양 또는 세포의 형질전환(예를 들어, 암), 자가면역 또는 염증성 질환 또는 예를 들어 세균, 바이러스 또는 기타 병원체로 인한 전염병과 관련된 질병 또는 병태를 포함할 수 있다. 치료할 수 있는 다양한 질병 및 병태와 관련된 항원을 포함하는 예시적인 항원들이 상기에 기술되어 있다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체 또는 형질전환 TCR은 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다.

[0906] 질병, 병태 및 장애 중에는 고형 종양, 혈액성 악성 종양 및 흑색종을 포함한 종양이 있고, 국소화 및 전이성 종양, 감염병, 예컨대 바이러스 또는 기타 병원체, 예를 들어 HIV, HCV, HBV, CMV, HPV로 인한 감염 및 기생충병 및 자가면역 질환 및 염증성 질환이 포함된다. 일부 구현예에서, 질병, 장애 또는 병태는 종양, 암, 악성 종양, 신생물 또는 기타 증식성 질병 또는 장애이다. 상기 질병은 백혈병, 림프종, 예를 들어, 급성 골수성(또는 골수형성) 백혈병(acute myeloid (or myelogenous) leukemia, AML), 만성 골수성(또는 골수형성) 백혈병(chronic myeloid (or myelogenous) leukemia, CML), 급성 림프구성(또는 림프모구) 백혈병(acute lymphocytic (or lymphoblastic) leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 모발 세포 백혈병(hairy cell leukemia, HCL), 소형 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma, SLL), 외투 세포 림프종(Mantle cell lymphoma, MCL), 변연부 림프종, 버킷 림프종, 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma, HL), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma, NHL), 역형성 거대 세포 림프종(Anaplastic large cell lymphoma, ALCL), 여포성 림프종(follicular lymphoma), 불응성 여포성 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 및 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에

서, 질병 또는 병태는 급성 림프모구 백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL), 성인 ALL, 만성 림프모구 백혈병(chronic lymphoblastic leukemia, CLL), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma, NHL) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL)에서 선택된 B 세포 악성 종양이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 NHL이고 상기 NHL은 공격적인 NHL, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), NOS(비활동성으로부터 다시 형질전환됨), 1차 종격동 거대 B 세포 림프종(primary mediastinal large B cell lymphoma, PMBCL), T 세포/조직세포 풍부 거대 B 세포 림프종(T cell/histocyte-rich large B cell lymphoma, TCHRBCL), 버킷 림프종, 외투 세포 림프종(MCL) 및/또는 여포성 림프종(FL), 임의적으로, 여포성 림프종 3B 등급(follicular lymphoma Grade 3B, FL3B)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0907]

일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 바이러스, 레트로바이러스, 박테리아 및 원생 동물 감염, 면역결핍, 시토메갈로 바이러스(Cytomegalovirus, CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스 같은 감염성 질병 또는 병태이나, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 자가면역 또는 염증성 질병 또는 병태, 예컨대 관절염, 예를 들어 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA), I 형 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 염증성 장질환, 건선, 피부 경화증, 자가면역 갑상선 질환, 그레이브병, 크론병, 다발성 경화증, 천식 및/또는 이식과 관련된 질병 또는 병태이다.

[0908]

일부 구현예에서, 질병 또는 장애와 관련된 항원은 $\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린($\alpha\text{v}\beta 6$ integrin), B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9; CAIX 또는 G250으로도 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 IB (CTAG; NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 공지), 암배아 항원(CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모터프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 표피 성장 인자 단백질(EGFR), 절단형 표피 성장 인자 단백질(tEGFR), 타입 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 상피 당단백질 2(EPG-2), 상피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPha2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 동족체 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 염산 결합 단백질(FBP), 염산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPCR5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α 2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8족 A 멤버를 함유하는 류신 풍부 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 자연 살생 2 그룹 D 멤버(NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나아제 유사 회귀 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 5T4로도 공지), 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나아제 관련 단백질 1(TRP1; TYRP1 또는 gp75로도 공지), 티로시나아제 관련 단백질 2(TRP2; 도파크롬 타우토크라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로도 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원, 또는 보편적 꼬리표(universal tag) 관련 항원, 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 다수의 공지된 B 세포 마커 중 어느 하나와 같은 B 세포 악성 종양과 연관된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원(예를 들어, HIV, HCV, HBV로부터의 바이러스 항원), 박테리아 항원, 및/또는 기생충 항원과 같은 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원이거나 이를 포함한다.

[0909]

일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, scFv 또는 V_{H} 도메인)은 CD19와 같은 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편으로부터 유래하거나 이의 변이체이다. 일부 구현예에서, 세포 요법(예를 들어, 입양 T 세포 요법)은 자가 전달에 의해 수행되며, 세포는 세포 요법을 받을 대상체 또는 상기 대상체로부터 유래된 샘플로부터 단리 및/또는 달리 제조된다. 따라서, 일부 측면에서, 세포는 치료가 필요한 대상체, 예를 들어, 환자로부터 유래되고, 세포는 단리 및 가공 후에 동일한 대상체에 투여된다.

- [0910] 세포는, 임의의 적합한 수단, 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내(intraocular) 주사, 안구주위(periorcular) 주사, 망막하(subretinal) 주사, 유리체내(intravitreal) 주사, 중격-경유성(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전방내(intracameral) 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection, subconjunctival injection), 서브 테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후부 점막 주사(posterior juxtasclear) 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이는 비경구, 폐내 및 비강내 및 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 단위 용량이 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 이는 예를 들어, 3일 이내의 기간에 걸쳐 세포의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포의 지속적인 주입 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 단위 용량 또는 임의의 추가 요법, 예를 들어 림프구 고갈 요법, 개입 요법 및/또는 병용 요법의 투여는 통원 전달을 통해 수행된다.
- [0911] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 진행 경과, 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 대상체의 임상 이력과 세포에 대한 반응 및 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서 조성물 및 세포는 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.
- [0912] 일부 구현예에서, 세포의 단위 용량이 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 단위 용량의 크기 또는 투여 시기는 대상체에서 특정 질병 또는 병태에 대한 작용으로서 결정된다. 일부 경우에, 제공된 기재의 측면에서 특정 질병에 대한 단위 용량의 크기 또는 투여 시기는 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0913] 일부 구현예에서, 세포의 단위 용량은 (약) 2×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 2×10^6 개 세포/kg, 예컨대 (약) 4×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 1×10^6 개 세포/kg 또는 (약) 6×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 8×10^5 개 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 단위 용량은 대상체 체중 1 킬로그램 당 2×10^5 이내의 세포(예를 들어 항원 발현, 예컨대 CAR 발현 세포)(세포/kg), 예컨대 (약) 3×10^5 이내의 세포/kg, (약) 4×10^5 이내의 세포/kg, (약) 5×10^5 이내의 세포/kg, (약) 6×10^5 이내의 세포/kg, (약) 7×10^5 이내의 세포/kg, (약) 8×10^5 이내의 세포/kg, (약) 9×10^5 이내의 세포/kg, (약) 1×10^6 이내의 세포/kg 또는 (약) 2×10^6 이내의 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 단위 용량은 대상체의 체중 1 킬로그램 당 약 또는 적어도 (약) 2×10^5 의 세포(예를 들어 항원 발현, 예컨대 CAR 발현 세포)(세포/kg), 예컨대 약 또는 적어도 (약) 3×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 4×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 5×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 6×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 7×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 8×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 9×10^5 세포/kg, 약 또는 적어도 (약) 1×10^6 세포/kg, 또는 약 또는 적어도 (약) 2×10^6 의 세포/kg를 포함한다.
- [0914] 일부 구현예에서, 세포의 단위 용량은 세포의 단위 용량이 대상체의 체표면적 또는 체중에 결부되거나 그에 기초하지 않는 균일한 세포 단위 용량 또는 고정된 세포 단위 용량이다.
- [0915] 일부 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우에, 단위 용량은 약 5×10^8 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를, 예를 들어, 약 1×10^6 내지 5×10^8 개의 상기 세포 수 범위내에서, 예컨대, 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 또는 5×10^8 개의 총 상기 세포 수의 범위내에서, 또는 전술한 수치 중 임의의 두 개 수치 사이의 범위내에서 포함한다.
- [0916] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 단위 용량은 (약) 1×10^5 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 2.5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 1×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 5×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 2.5×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 내지 1×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내

지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 2.5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 1×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 5×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 내지 2.5×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 2.5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 1×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 내지 5×10^6 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 2.5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 내지 1×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 내지 2.5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 내지 5×10^7 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 내지 1×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^8 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 1×10^8 내지 2.5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포, 또는 2.5×10^8 내지 5×10^8 개의 총 CAR-발현 T 세포를 포함한다.

[0917] 일부 구현예에서, 세포는 다른 치료적 개입, 예컨대 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 제제, 예컨대 세포 독성제 또는 치료제와 예컨대 동시에 또는 순차적으로, 임의 순서로 병용 치료의 일부로서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 또는 다른 치료적 개입과 관련하여 동시이든 순차적이든 임의의 순서로 공동-투여된다. 일부 맥락에서, 세포는 세포의 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 강화하도록(또는 그 역으로 강화하도록) 하는 데 충분히 가까운 시점에 다른 요법과 공동-투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제보다 앞서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 제제는 예를 들어, 지속성을 향상시키기 위해 IL-2와 같은 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 화학적 치료제의 투여를 포함한다.

[0918] 일부 구현예에서, 본 방법은 예를 들어 투여 전에 종양 부담을 감소시키기 위한 화학요법제, 예를 들어, 조절 화학요법제의 투여를 포함한다.

[0919] 일부 측면에서 면역 고갈(예를 들어, 림프구 고갈) 요법으로 대상체를 사전 조절하면 입양 세포 요법(ACT)의 효과를 향상시킬 수 있다.

[0920] 따라서, 일부 구현예에서, 본 방법은 세포 요법의 개시 전에 대상체에 사이클로포스파미드, 플루다라빈 또는 이의 조합물과 같은 림프구 고갈제 또는 화학 요법제와 같은 사전 조절제를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 대상체는 세포 요법을 개시하기 적어도 2일 전, 예컨대 적어도 3, 4, 5, 6 또는 7일 전에 사전 조절제를 투여받을 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 세포 요법의 개시 7일 이내 전, 예컨대 6, 5, 4, 3 또는 2일 이내 전에 사전 조절제를 투여받는다.

[0921] 일부 구현예에서, 대상체는 (약) 20mg/kg 내지 100mg/kg, 예컨대 (약) 40mg/kg 내지 80mg/kg의 단위 용량의 사이클로포스파미드로 사전 조절된다. 일부 측면에서, 대상체는 (약) 60mg/kg의 사이클로포스파미드로 사전 조절된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 단일 단위 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 단위 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 1일 또는 2일 동안 매일 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 사이클로포스파미드를 포함하는 경우, 대상체에 (약) 100mg/m^2 내지 500mg/m^2 , 예컨대 (약) 200mg/m^2 내지 400mg/m^2 또는 250mg/m^2 내지 350mg/m^2 (수치 포함)의 단위 용량으로 사이클로포스파미드가 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 약 300mg/m^2 의 사이클로포스파미드를 투여한다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 단일 단위 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 단위 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 예컨대 1 내

지 5일 동안, 예를 들어 3 내지 5일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 세포 요법의 개시 전 3일 동안 매일 약 300mg/m²의 사이클로포스파미드가 투여된다.

[0922] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 플루다라빈을 포함하는 경우, 대상체에 (약) 1mg/m² 내지 100mg/m², 예컨대 (약) 10mg/m² 내지 75mg/m², 15mg/m² 내지 50mg/m², 20 mg/m² 내지 40 mg/m² 또는 24mg/m² 내지 35mg/m²(수치 포함)의 단위 용량으로 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 약 30mg/m²의 플루다라빈이 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 단일 단위 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 단위 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 예컨대 1 내지 5일 동안, 예를 들어 3 내지 5일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 세포 요법의 개시 전 3일 동안 매일 약 30mg/m²의 플루다라빈이 투여된다.

[0923] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제는 사이클로포스파미드 및 플루다라빈의 조합물과 같은 제제의 조합물을 포함한다. 따라서, 제제의 조합물은 상기 기재된 바와 같은 임의의 단위 용량 또는 투여 일정의 사이클로포스파미드 및 상기 기재된 바와 같은 임의의 단위 용량 또는 투여 일정의 플루다라빈을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 대상체에 제1 또는 후속 단위 용량 전에 60mg/kg(~2g/m²)의 사이클로포스파미드 및 25mg/m² 플루다라빈의 3 내지 5 단위 용량이 투여된다.

[0924] 일부 구현예에서 세포의 투여 후에, 조작된 세포의 집단의 생물학적 활성이 예를 들어, 공지된 다수의 방법 중 하나에 의해 측정된다. 산정 매개변수는 생체 내에서, 예를 들어 영상화에 의해 또는 생체 외 시험에서, 예를 들어 ELISA 또는 유세포 분석에 의해 항원에 조작된 또는 천연 T 세포 또는 다른 면역 세포를 특이적으로 결합하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 조작된 세포가 표적 세포를 파괴하는 능력은 예를 들어 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), 및 Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기술된 세포 독성 분석과 같은 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포의 생물학적 활성은 하나 이상의 사이토카인, 예컨대 CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 분석하여 측정된다. 일부 측면에서, 생물학적 활성은 종양 부담 또는 부하 감소와 같은 임상 결과를 산정하여 측정된다.

[0925] 특정 구현예에서, 조작된 세포는 이들의 치료적 또는 예방적 효능이 증가하도록 임의의 수의 방법으로 추가 변형된다. 예를 들어, 집단에 의해 발현된 조작된 CAR 또는 TCR은 표적화 모이어티에 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 표적화 모이어티에 접합시키는 실시는 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) 및 미국 특허 5,087,616]을 참조한다.

[0926] 일부 구현예에서, 세포는 다른 치료적 개입, 예컨대 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 제제, 예컨대 세포 독성제 또는 치료제와 예컨대 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로 병용 치료의 일부로서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 또는 다른 치료적 개입과 관련하여 동시이든 순차적이든 임의의 순서로 공동-투여된다. 일부 맥락에서, 세포는 세포의 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 강화하도록(또는 그 역으로 강화하도록) 하는 데 충분히 가까운 시점에 다른 요법과 공동-투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제보다 앞서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 제제는 예를 들어, 지속성을 향상시키기 위해 IL-2와 같은 사이토카인을 포함한다.

[0927] V. 정의

[0928] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 기술 및 과학 용어 또는 전문 용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에 상기 정의를 포함하는 것이 당업계에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 반드시 해석되는 것은 아니다.

[0929] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태(“a”, “an” 및 “the”)는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어, 단수 형태(“a” 또는 “an”)는 “적어도 하나(at least one)” 또는 “하나 이상(one or more)”을 의미한다. 본원에 기재된 측면 및 변형은 측면 및 변형으로 “구성되는

(consisting)” 및/또는 “필수적으로 포함하여 구성되는(consisting essentially of)” 을 포함하는 것으로 이해된다.

[0930] 본 개시 내용 전체에서, 청구된 주제의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 기재는 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 기재는 모든 가능한 하위 범위 및 상기 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 값의 범위가 제공되는 경우, 상기 범위의 상한 내지 하한 사이 각각의 사이에 오는 값과 상기 언급된 범위에서 임의의 다르게 언급되거나 사이에 오는 값은 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 상기 더 작은 범위의 상한 내지 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 청구된 주제 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 상기 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 청구된 주제에 포함된다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0931] 본원에 사용된 용어 “약(about)” 은 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 “약(about)” 의 값 또는 매개변수에 대한 언급은 상기 값 또는 매개변수 자체에 관한 구현예를 포함(및 기술)한다. 예를 들어, “약 X” 를 지칭하는 기재는 “X” 의 기재를 포함한다.

[0932] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포의 집단이 특정 마커에 대해 “양성(positive)” 이라는 진술은 특정 마커, 통상적으로 표면 마커가 세포 상에 또는 세포 내에 검출 가능하게 존재함을 지칭한다. 표면 마커를 언급할 때, 상기 용어는 유세포 분석에 의해, 예를 들어, 이 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출된 바와 같은 표면 발현의 존재를 지칭하며, 이 염색은 달리 동일한 조건 하에서 동종형-매칭된 대조군으로 같은 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유세포 분석에 의해 검출 가능하다.

[0933] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포의 집단이 특정 마커에 대해 “음성(negative)” 이라는 진술은 특정 마커, 통상적으로 표면 마커가 세포 상에 또는 세포 내에 실질적으로 검출 가능하게 존재하지 않음을 지칭한다. 표면 마커를 언급할 때, 상기 용어는 유세포 분석에 의해, 예를 들어, 이 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출된 바와 같은 표면 발현의 부재를 지칭하며, 이 염색은 달리 동일한 조건 하에서 동종형-매칭된 대조군으로 같은 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 낮은 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 비교하여 실질적으로 유사한 수준에서 유세포 분석에 의해 검출되지 않는다.

[0934] 본원에 사용된 바와 같이, 조성물(composition)은 세포를 포함하여 둘 이상의 산물, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이들의 임의의 조합물일 수 있다.

[0935] 본원에 사용된 바와 같이, “대상체(subject)” 는 인간 또는 다른 동물과 같은 포유동물이며, 통상적으로 인간이다.

[0936] VI. 예시적인 구현예

[0937] 제공되는 구현예 중에는 하기가 있다:

[0938] 1. 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리(housing assembly)는: 주입구 하우징 부재(inlet housing member) 및 배출구 하우징 부재(outlet housing member), 여기서 적어도 상기 주입구 하우징 부재 및 상기 배출구 하우징 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 온도 조절 부재(temperature control member); 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 연결함으로써, 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터(connector)를 포함한다.

[0939] 2. 구현예 1의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 측벽 부재를 더 포함하고, 상기 주입구 하우징 부재, 상기 배출구 하우징 부재 및 상기 측벽 부재는 내부 캐비티를 형성한다.

[0940] 3. 구현예 1 또는 2의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재 상에 배치될 수 있다.

- [0941] 4. 구현예 1 또는 2의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 중 임의의 2개 또는 3개 모두 사이에 형성된다.
- [0942] 5. 구현예 1-4 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 복수의 커넥터를 포함한다.
- [0943] 6. 구현예 1-5 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 집합된 커넥터, 나사 커넥터, 루어(luer) 커넥터(예: 루어 락 커넥터 또는 루어 슬립 커넥터), 가시 커넥터, 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0944] 7. 구현예 1-6 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 수 피팅(male fitting) 또는 암 피팅(female fitting)을 포함한다.
- [0945] 8. 구현예 1-7 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 가스 공급원과 유체 소통하는 튜브와 밀봉식으로 맞물리도록 구성된다.
- [0946] 9. 구현예 1-8 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함한다.
- [0947] 10. 구현예 1-9 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 하나 이상의 밸브를 포함하는 튜브에 작동 가능하게 연결된다.
- [0948] 11. 구현예 1-10 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함한다.
- [0949] 12. 구현예 1-11 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 하나 이상의 필터를 포함하는 튜브에 작동 가능하게 연결된다.
- [0950] 13. 구현예 11 또는 12의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 필터는 가스 필터, 예를 들어 공기 필터이다.
- [0951] 14. 구현예 11-13 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 필터는 멸균 필터 및/또는 여과에 의한 멸균을 위한 멸균 필터이다.
- [0952] 15. 구현예 1-14 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 주입구 하우징 부재는 하우징 어셈블리의 상부 덮개를 포함한다.
- [0953] 16. 구현예 15의 하우징 어셈블리에서, 상기 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착된다.
- [0954] 17. 구현예 15의 하우징 어셈블리에서, 상기 상부 덮개는 주입구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다.
- [0955] 18. 구현예 15-17 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터는 상부 덮개 상에 배치된다.
- [0956] 19. 구현예 1-18 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 주입구 하우징 부재는 내부 캐비티로 투입 조성물의 흡입을 허용하기 위해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 주입구를 포함한다.
- [0957] 20. 구현예 19의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 주입구는 상부 덮개 상에 배치된다.
- [0958] 21. 구현예 20의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터 및 하나 이상의 주입구는 동일 또는 상이한 위치에서 상부 덮개 상에 배치된다.
- [0959] 22. 구현예 20 또는 21의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 주입구를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있는 반면, 커넥터를 통한 유체 경로는 상부 덮개에 대해 약 45도의 각도에 있다.
- [0960] 23. 구현예 1-22 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 배출구 하우징 부재는 하우징 어셈블리의 하부 덮개를 포함한다.
- [0961] 24. 구현예 23의 하우징 어셈블리에서, 상기 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재에 제거 가능하게 부착되거나, 상기 하부 덮개는 배출구 하우징 부재 또는 측벽 부재와 일체로 형성된다.
- [0962] 25. 구현예 1-24 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 배출구 하우징 부재는 내부 캐비티로부터 산출 조성물의 배출을 허용하거나 초래하도록 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 배출구를 포함한다.
- [0963] 26. 구현예 25의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 배출구는 하부 덮개 상에 배치된다.
- [0964] 27. 구현예 26의 하우징 어셈블리에서, 상기 커넥터 및 하나 이상의 배출구는 동일 또는 상이한 위치에서 하부 덮개 상에 배치된다.

- [0965] 28. 구현예 27의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 배출구를 통한 유체 경로는 하부 덮개에 대해 약 90도의 각도에 있다.
- [0966] 29. 구현예 1-28 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가스 공급원은 가스 저장소 또는 외부 환경이거나 이를 포함한다.
- [0967] 30. 구현예 1-29 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가스 공급원 내의 가스는 멸균이다.
- [0968] 31. 구현예 1-30 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가스는 공기이다.
- [0969] 32. 구현예 1-31 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 가스 공급원에 작동 가능하게 연결된 튜브를 더 포함한다.
- [0970] 33. 구현예 32의 하우징 어셈블리에서, 상기 튜브는 내부 캐비티를 가스 공급원에 멸균으로 연결하도록 구성된다.
- [0971] 34. 구현예 32 또는 33의 하우징 어셈블리에서, 상기 튜브는 하나 이상의 밸브를 포함한다.
- [0972] 35. 구현예 32-34 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 튜브는 하나 이상의 필터를 포함한다.
- [0973] 36. 구현예 1-35 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 하나 이상의 다공성 부재, 예를 들어, 세포 여과기(strainer) 또는 세포 체(sieve)를 더 포함한다.
- [0974] 37. 구현예 36의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 상기 고정상 및 내부 캐비티의 주입구를 분리하도록 구성된 제1 다공성 부재를 포함하고, 상기 제1 다공성 부재는 선택적으로 주입구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있다.
- [0975] 38. 구현예 37의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 고정상 및 내부 캐비티의 배출구를 분리하도록 구성된 제2 다공성 부재를 더 포함하고, 상기 제2 다공성 부재는 선택적으로 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재 사이에 있다.
- [0976] 39. 구현예 36-38 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 평균 기공 직경을 갖거나, 상기 하나 이상의 다공성 부재는 약 20 μ m의 메쉬 크기를 갖는 메쉬를 포함한다.
- [0977] 40. 구현예 1-39 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 내부 캐비티 내의 고정상의 온도를 조절하거나 유지하도록 구성된다.
- [0978] 41. 구현예 1-40 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 시작 온도(예: 실온)에서 약 30℃ 내지 약 39℃의 목표 온도(예: (약) 37℃)로 내부 캐비티 내의 고정상을 가열하도록 구성된다.
- [0979] 42. 구현예 41의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 상기 목표 온도에서 상기 고정상을 유지하도록 추가로 구성된다.
- [0980] 43. 구현예 1-42 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 내부 캐비티 내 상기 고정상의 온도를 측정하도록 구성된 온도 센서를 더 포함한다.
- [0981] 44. 구현예 43의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 센서는 모니터링/디스플레이 유닛에 연결되도록 구성된다.
- [0982] 45. 구현예 1-44 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 가열원을 포함한다.
- [0983] 46. 구현예 1-44 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 상기 하우징 어셈블리의 외부에 있는 가열원에 작동 가능하게 연결되도록 구성된다.
- [0984] 47. 구현예 1-46 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 온도 조절 부재는 전기 가열 요소, 전자기 유도 가열 요소, 비전기 가열 요소 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 가열 요소를 포함한다.
- [0985] 48. 구현예 47의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 전기 가열 요소이다.
- [0986] 49. 구현예 48의 하우징 어셈블리에서, 상기 전기 가열 요소는 금속판, 금속 막대, 금속 와이어 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0987] 50. 구현예 47의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 유도 가열 요소이다.
- [0988] 51. 구현예 50의 하우징 어셈블리에서, 상기 전자기 유도 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하

도록 구성된 자화 가능한(magnetizable) 코어를 둘러싸는 유도 가열 코일을 포함한다.

- [0989] 52. 구현예 47의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 비전기 가열 요소이다.
- [0990] 53. 구현예 52의 하우징 어셈블리에서, 비전기 가열 요소는 가열된 유체, 예를 들어, 가열된 액체 또는 가스에 대한 주입구 및 배출구를 포함하는 가열 채널을 포함한다.
- [0991] 54. 구현예 53의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 채널은 가열 코일이고, 가열된 유체는 가열된 물이다.
- [0992] 55. 구현예 54항의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열된 물에 대한 주입구는 가열된 물의 외부 저장소에 연결되도록 구성된다.
- [0993] 56. 구현예 47-55 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 그 주위에 배치된다.
- [0994] 57. 구현예 47-56 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 내부 캐비티의 내부, 내부 캐비티의 외부 또는 내부 캐비티의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다.
- [0995] 58. 구현예 47-57 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 측벽 부재의 내부, 측벽 부재의 외부 또는 측벽 부재의 부분적으로 내부 및 부분적으로 외부에 배치된다.
- [0996] 59. 구현예 47-58 중 어느 하나의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 요소는 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및/또는 측벽 부재를 둘러싸는 코일을 포함한다.
- [0997] 60. 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는: 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 내부 캐비티의 중심 축을 따라 및/또는 주위에 배치된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재, 상기 가열 요소는 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성됨; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0998] 61. 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는: 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 금속판을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [0999] 62. 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는: 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 코일을 포함하는 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [1000] 63. 구현예 62의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 코일은 가열된 물에 대한 주입구 및 배출구를 포함한다.
- [1001] 64. 구현예 62 또는 63의 하우징 어셈블리에서, 상기 가열 코일은 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재를 둘러싼다.
- [1002] 65. 컬럼 크로마토그래피용 하우징 어셈블리는: 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재, 상기 주입구 하우징 부재, 배출구 하우징 부재 및 측벽 부재는 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 수용하도록 구성된 내부 캐비티를 형성함; 상기 내부 캐비티 내의 고정상에 열을 제공하도록 구성된 가열 요소를 포함하는 온도 조절 부재; 및 상기 내부 캐비티를 가스 공급원에 작동 가능하게 및 평균적으로 연결함으로써, 내부 캐비티로의 평균 가스의 흡입을 허용하거나 초래하도록 구성된 커넥터를 포함한다.
- [1003] 66. 구현예 65의 하우징 어셈블리에서, 상기 가스 필터는 공기 필터이고, 평균 가스는 평균 공기이다.
- [1004] 67. 구현예 65 또는 66의 하우징 어셈블리에서, 상기 하우징 어셈블리는 가스 필터를 더 포함한다.
- [1005] 68. 하우징 어셈블리 세트는 구현예 1-67 중 어느 하나의 복수의 하우징 어셈블리를 포함한다.
- [1006] 69. 구현예 68의 하우징 어셈블리 세트에서, 상기 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개는 순차적으로 배열된

다.

- [1007] 70. 구현예 68 또는 69의 하우징 어셈블리 세트에서, 상기 복수의 하우징 어셈블리 중 적어도 2개는 병렬로 배열된다.
- [1008] 71. 크로마토그래피 키트는 구현예 1-67 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 또는 구현예 68-70 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 세트, 및 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다.
- [1009] 72. 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트는 구현예 1-67 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 또는 구현예 68-70 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 세트, 및 하나 이상의 하우징 어셈블리의 내부 캐비티 내의 컬럼 크로마토그래피용 고정상을 포함한다.
- [1010] 73. 구현예 71의 크로마토그래피 키트 또는 구현예 72의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 겔 여과 매트릭스를 포함한다.
- [1011] 74. 구현예 71-73 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함한다.
- [1012] 75. 구현예 71-74 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 비자성 물질, 비강자성 물질 또는 비상자성 물질이거나 이를 포함한다.
- [1013] 76. 구현예 71-75 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 셀룰로오스 막, 플라스틱 막, 다당류 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 아가로스 겔, 다당류 그래프트 실리카, 폴리비닐피롤리돈 그래프트 실리카, 폴리에틸렌 옥사이드 그래프트 실리카, 폴리(2-히드록시 에틸 아스파타미드) 실리카, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드) 그래프트 실리카, 스티렌-디비닐벤젠 겔, 아크릴레이트 또는 아크릴아미드 및 디올의 공중합체, 다당류 및 N,N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 물질이거나 이를 포함한다.
- [1014] 77. 구현예 71-76 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 모놀리식 매트릭스, 미립자 매트릭스, 및/또는 평면 매트릭스이거나 이를 포함한다.
- [1015] 78. 구현예 77의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 미립자 매트릭스는 약 5 μm 내지 약 200 μm , 약 5 μm 내지 약 600 μm , 또는 약 5 μm 내지 약 1500 μm 의 평균 입자 크기를 갖는다.
- [1016] 79. 구현예 71-78 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 약 1 nm 내지 약 500 nm의 평균 기공 크기를 갖는다.
- [1017] 80. 구현예 71-79 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 그 위에 고정된 선택제(selection agent)를 포함한다.
- [1018] 81. 구현예 80의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 하나 이상의 세포 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1019] 82. 구현예 81의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 하나 이상의 세포는 면역 세포이다.
- [1020] 83. 구현예 82의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 하나 이상의 세포는 T 세포이다.
- [1021] 84. 구현예 80-83 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함하고; 및/또는 선택제는 항체 단편을 포함하고; 선택제는 Fab 단편이거나 이를 포함하고; 선택제는 F(ab')₂ 단편 및 2가 단일 사슬 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되고; 선택제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이고; 및/또는 선택제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이다.

- [1022] 85. 구현예 84의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHPQFEKGGGGGGGSAWSHPQFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모둘린에 가역적으로 결합하는 칼모둘린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함한다.
- [1023] 86. 구현예 81-85 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택 마커는 T 세포 공수용체(coreceptor)이고; 상기 선택 마커는 T 세포 항원 수용체 복합체의 멤버이거나 이를 포함하며; 상기 선택 마커는 CD3 복합체이거나 이를 포함하고; 상기 선택 마커는 CD3 사슬이거나 이를 포함하며; 상기 선택 마커는 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , 또는 CD3 ζ 사슬이거나 이를 포함하며; 상기 선택 마커는 CD8이거나 이를 포함하고; 상기 선택 마커는 CD4이거나 이를 포함하고; 상기 선택 마커는 CD45RA이거나 이를 포함하고; 상기 선택 마커는 CD27이거나 이를 포함하며; 상기 선택 마커는 CD28이거나 이를 포함하고; 및/또는 상기 선택 마커는 CCR7이거나 이를 포함한다.
- [1024] 87. 구현예 81-86 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제 및 선택 마커 사이의 특이적 결합은 T 세포에 대한 신호를 유도하지 않거나, T 세포에 대한 자극 또는 활성화 또는 증식 신호를 유도하지 않는다.
- [1025] 88. 구현예 80-87 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 항-CD3 Fab, 항-CD8 Fab, 또는 항-CD4 Fab이거나 이를 포함한다.
- [1026] 89. 구현예 80-88 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 고정상에 직접 또는 간접적으로 결합된다.
- [1027] 90. 구현예 80-89 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 선택제는 가역적으로 결합하는 선택 시약을 통해 고정상에 간접적으로 결합된다.
- [1028] 91. 구현예 90의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 선택 시약은 비오틴, 비오틴 유사체 또는 이의 생물학적 활성 단편에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘의 mutein; 스트렙타비딘-결합 펩타이드에 가역적으로 결합하는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 mutein; 적어도 2개의 키레이트 작용기 K를 포함하는 시약, 여기서 상기 적어도 2개의 키레이트 작용기는 전이금속 이온에 결합할 수 있음; 올리고히스티딘 친화도 태그(affinity tag)에 결합할 수 있는 제제; 글루타치온-S-전이효소에 결합할 수 있는 제제; 칼모둘린 또는 이의 유사체; 칼모둘린 결합 펩타이드(CBP)에 결합할 수 있는 제제; FLAG-펩타이드에 결합할 수 있는 제제; HA-태그에 결합할 수 있는 제제; 말토오스 결합 단백질(MBP)에 결합할 수 있는 제제; HSV 에피토프에 결합할 수 있는 제제; myc 에피토프에 결합할 수 있는 제제; 또는 비오틴화된 수송 단백질에 결합할 수 있는 제제이거나 이를 포함한다.
- [1029] 92. 구현예 71-91 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트는 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 더 포함한다.
- [1030] 93. 구현예 92의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 고정상은 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나를 포함한다.
- [1031] 94. 구현예 93의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 적어도 하나의 자극제는 제1 자극제이고, 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트는 제1 자극제의 자극 신호를 향상, 감소 또는 변형할 수 있는 하나 이상의 제2 자극제를 더 포함한다.
- [1032] 95. 구현예 94의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 제2 자극제 중 적어도 하나는 하나 이상의 T 세포 상의 공자극 분자, 예를 들어, CD28, CD90 (Thy-1), CD95 (Apo-/Fas),

CD137 (4-1BB), CD154 (CD40L), ICOS, LAT, CD27, OX40 또는 HVEM에 특이적으로 결합할 수 있다.

- [1033] 96. 구현예 94 또는 95의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 고정상은 하나 이상의 자극제 중 적어도 하나를 포함한다.
- [1034] 97. 구현예 92-96 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 자극 신호는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체, T 세포에서 CD3-함유 복합체 및/또는 T 세포에서 ITAM-함유 분자를 통한다.
- [1035] 98. 구현예 92-97 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 하나 이상의 자극제는 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함하고; 및/또는 하나 이상의 자극제는 항체 단편을 포함하고; 하나 이상의 자극제는 Fab 단편이거나 이를 포함하고; 하나 이상의 자극제는 F(ab')₂ 단편 및 2가 단일 사슬 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되고; 하나 이상의 자극제는 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이고; 및/또는 자극제는 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이다.
- [1036] 99. 구현예 92-98 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 자극제는 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모둘린에 가역적으로 결합하는 칼모둘린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함한다.
- [1037] 100. 구현예 94-99 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 항체 단편, 1가 항체 단편, 면역글로불린-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자, Ig 도메인 함유 분자, 사이토카인, 케모카인, 압타머, MHC 분자, MHC-펩타이드 복합체; 수용체 리간드; 및 이의 결합 단편으로 구성된 군에서 선택되는 제제이거나 이를 포함하고; 및/또는 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 항체 단편을 포함하고; 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 Fab 단편이거나 이를 포함하고; 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 F(ab')₂ 단편 및 2가 단일 사슬 Fv(scFv) 단편으로 구성된 2가 항체 단편의 군에서 선택되고; 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 Fab 단편, Fv 단편 및 scFv로 구성된 군에서 선택되는 1가 항체 단편이고; 및/또는 제1 및 제2 자극제는 독립적으로 압타머, 리포칼린 패밀리의 폴리펩타이드에 기초한 뮤테인, 글루바디(glubodies), 안키린 스캐폴드에 기초한 단백질, 결정질 스캐폴드에 기초한 단백질, 애드넥틴(adnectins) 및 아비머(avimers)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이다.
- [1038] 101. 구현예 100의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 제1 자극 시약은 항-CD3 Fab이고, 상기 제2 자극제는 항-CD28 Fab이다.
- [1039] 102. 구현예 94-101 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 상기 제1 자극제 및 제2 자극제는, 독립적으로, 비오틴, 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체, Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 8), Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 15), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 17), SAWSHQPFEKGGSGGGSGGSAWSHQPFEK (서열번호 16), Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 18) 및 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂Gly-Gly-Ser-Ala-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호 19)로 구성된 군에서 선택되는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자이다.

호 19)로 구성된 군에서 선택되는 스트렙타비딘-결합 펩타이드, 칼모둘린에 가역적으로 결합하는 칼모둘린 결합 펩타이드, FLAG 펩타이드에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 FLAG 펩타이드, 및 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체에 가역적으로 결합하는 올리고히스티딘 태그를 더 포함한다.

- [1040] 103. 장치는 구현예 1-67 중 어느 하나의 하우징 어셈블리, 구현예 68-70 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 세트 또는 구현예 71-102 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트, 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트를 포함하고, 주입구 하우징 부재의 주입구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 투입 조성물 저장소를 더 포함한다.
- [1041] 104. 구현예 103의 장치에서, 상기 투입 조성물은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나 이를 포함한다.
- [1042] 105. 구현예 104의 장치에서, 상기 투입 조성물은 전혈 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플 104, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이거나 이를 포함한다.
- [1043] 106. 구현예 105의 장치에서, 상기 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 분리된 것이거나 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된 것이다.
- [1044] 107. 구현예 103-106 중 어느 하나의 장치에서, 장치는 배출구 하우징 부재의 배출구를 통해 내부 캐비티에 작동 가능하게 연결된 산출 조성물 저장소를 더 포함한다.
- [1045] 108. 구현예 107의 장치에서, 상기 산출 조성물은 농축된 T 세포이거나 이를 포함한다.
- [1046] 109. 구현예 108의 장치에서, 상기 농축된 T 세포는 크로마토그래피 컬럼에서 크로마토그래피 동안 자극을 받는다.
- [1047] 110. 구현예 103-109 중 어느 하나의 장치는 폐쇄 또는 멸균 시스템 내에 있다.
- [1048] 111. 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법은 구현예 1-67 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 또는 구현예 68-70 중 어느 하나의 하우징 어셈블리 세트에 고정상을 도입시키는 단계를 포함한다.
- [1049] 112. 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 제조 방법은 크로마토그래피 키트의 하우징 어셈블리 또는 하우징 어셈블리 세트에 구현예 71 및 73-102 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트의 고정상을 도입시키는 단계를 포함한다.
- [1050] 113. T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서, 상기 방법은: 구현예 72-102 중 어느 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트에서, 복수의 T 세포 중 하나 이상의 T 세포 내에 자극 신호를 전달하기 위해 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 하나 이상의 자극제와 함께 인큐베이션 하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 복수의 T 세포는 고정상에 고정화되고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 출력 조성물으로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성한다.
- [1051] 114. 구현예 113의 방법에서, 상기 고정상은 하나 이상의 T 세포의 표면 상의 선택 마커에 특이적으로 결합하는 선택제를 포함한다.
- [1052] 115. 구현예 114의 방법에서, 하나 이상의 T 세포에 의해 발현된 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 하나 이상의 T 세포의 고정화를 초래한다.
- [1053] 116. 구현예 113-115 중 어느 하나의 방법에서, 상기 방법은: 인큐베이션의 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함한다.
- [1054] 117. 구현예 116의 방법에서, 상기 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다.
- [1055] 118. 구현예 116 또는 117의 방법에서, 상기 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상으로부터 수집된다.
- [1056] 119. 구현예 116-118 중 어느 하나의 방법에서, 상기 수집 단계는 고정상로부터 복수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행된다.
- [1057] 120. T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서, 상기 방법은: (a) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플을 구현예 72-102 중 어느 하나의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 첨가하여, 이로써 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상을 고정화시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상의 선택

마커에 결합하는 선택제를 포함함; 및 (b) 상기 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트 내의 고정상에 복수의 T 세포 중 하나 이상 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.

- [1058] 121. T 세포의 온-컬럼 자극 방법으로서, 상기 방법은: (a) (i) 복수의 T 세포를 포함하는 샘플 및 (ii) 구현예 71 및 73-102 중 어느 하나의 크로마토그래피 키트 내의 상기 고정상을 조합시키는 단계, 상기 고정상은 복수의 T 세포 중 하나 이상의 표면 상에 발현된 선택 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 선택제를 포함하고, 상기 선택 마커에 대한 선택제의 특이적 결합은 고정상에 복수의 T 세포의 고정화를 초래함; 및 (b) 상기 고정상에 T 세포 내에 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 자극 시약을 첨가하여, 이로써 하나 이상의 T 세포와 함께 자극 시약의 인큐베이션을 개시하고, 이로써 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 산출 조성물로서 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 생성하는 단계, 여기서 상기 조합 단계 및/또는 상기 첨가 단계는 크로마토그래피 키트의 크로마토그래피 컬럼 또는 크로마토그래피 컬럼 세트의 내부 캐비티의 내부 또는 외부에서 수행됨,를 포함한다.
- [1059] 122. 구현예 120 또는 121의 방법에서, 방법은 인큐베이션 개시 후, 고정상으로부터 하나 이상의 T 세포를 수집하는 단계를 더 포함한다.
- [1060] 123. 구현예 122의 방법에서, 상기 하나 이상의 T 세포는 상기 인큐베이션의 개시 24 시간 이내에 고정상으로부터 수집된다.
- [1061] 124. 구현예 122 또는 123의 방법에서, 상기 하나 이상의 T 세포는 중력 흐름에 의해 고정상으로부터 수집된다.
- [1062] 125. 구현예 122-124 중 어느 하나의 방법에서, 상기 수집 단계는 고정상로부터 복수의 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제의 첨가 없이 수행된다.
- [1063] 126. 구현예 113-125 중 어느 하나의 방법에서, 상기 자극제는 (i) 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 mutein 분자 및 (ii) 하나 이상의 T 세포에서 자극 신호를 전달할 수 있는 하나 이상의 자극제를 포함하는 올리고머 자극 시약이거나 이를 포함하고, 여기서 상기 올리고머 자극 시약의 크기는 i) 50 nm 초과와 반경, ii) 적어도 5×10^6 g/mol의 분자량; 및/또는 (iii) 올리고머 자극 시약 당 적어도 100개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 mutein 테트라머를 포함한다.
- [1064] 127. 구현예 126의 방법에서, 상기 스트렙타비딘 mutein은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 을 포함하고; 또는 상기 스트렙타비딘 mutein은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열에서 스트렙타비딘의 위치와 관련하여 위치 44 내지 47에 상응하는 서열 위치에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 을 포함한다.
- [1065] 128. 구현예 113-127 중 어느 하나의 방법에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35°C 내지 약 39°C의 목표 온도로 조절한다.
- [1066] 129. 구현예 113-128 중 어느 하나의 방법에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 온도 조절 부재는 고정상의 온도를 약 35°C 내지 약 39°C의 목표 온도에서 유지한다.
- [1067] 130. 구현예 128 또는 129의 방법에서, 상기 목표 온도는 37° C 또는 약 37° C 이다.
- [1068] 131. 구현예 113-130 중 어느 하나의 방법에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 상기 캐क्टर는 내부 캐비티로의 가스의 흡입을 허용한다.
- [1069] 132. 구현예 131의 방법에서, 상기 가스는 멸균이고, 공기이거나 이를 포함한다.
- [1070] 133. 구현예 131 또는 132의 방법에서, 상기 내부 캐비티로의 가스의 흡입은 인큐베이션 동안 간헐적 또는 연속적이다.
- [1071] 134. 구현예 113-133 중 어느 하나의 방법에서, 방법은 고정상을 배지로 세척하는 단계를 더 포함하고, 배지는 고정상으로부터 T 세포를 용리하기 위한 경쟁제 또는 자유 결합제를 포함하지 않는다.

- [1072] 135. 구현예 113-134 중 어느 하나의 방법에서, 방법은 자극된 T 세포를 포함하는 조성물을 인큐베이션하는 단계를 더 포함한다.
- [1073] 136. 구현예 135의 방법에서, 추가 인큐베이션은 (약) $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 수행되고; 및/또는 추가 인큐베이션은 T 세포에 신호를 전달할 수 있는 추가 제제의 존재 하에 수행된다.
- [1074] 137. 구현예 136의 방법에서, 상기 추가 제제는 T 세포, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 증식을 향상시키거나 유도할 수 있다.
- [1075] 138. 구현예 136 또는 137의 방법에서, 상기 추가 제제는 IL-2, IL-15 및 IL-7 중에서 선택되는 사이토카인이다.
- [1076] 139. 구현예 134-138 중 임의의 방법에서, 방법은 자극된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함한다.
- [1077] 140. 구현예 113-141 중 임의의 방법에서, 방법은 자극된 T 세포를 선택 및/또는 자극하는 단계를 더 포함한다.
- [1078] 141. 구현예 113-140 중 어느 하나의 방법에서, 방법은 재조합 핵산 분자를 조성물의 자극된 T 세포 내로 도입하는 단계를 더 포함하고, 여기서 상기 핵산 분자는 재조합 단백질을 암호화하고, 이로써 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산한다.
- [1079] 142. 구현예 141의 방법에서, 상기 재조합 단백질은 항원 수용체이다.
- [1080] 143. 구현예 142의 방법에서, 상기 재조합 단백질은 키메라 항원 수용체이다.
- [1081] 144. 구현예 143의 방법에서, 상기 키메라 항원 수용체(CAR)는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원 인식 도메인 및 ITAM을 포함하는 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [1082] 145. 구현예 144의 방법에서, 상기 CAR은 세포외 도메인과 세포내 신호 전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 더 포함한다.
- [1083] 146. 구현예 141-145 중 어느 하나의 방법에서, 상기 재조합 핵산의 도입은 바이러스 입자를 이용한 형질도입에 의해 달성된다.
- [1084] 147. 구현예 141-146 중 어느 하나의 방법에서, 상기 재조합 핵산은 인큐베이션 전, 동안 또는 후에 자극된 T 세포에 도입된다.
- [1085] 148. 구현예 147의 방법에서, 상기 재조합 핵산은 인큐베이션 동안 자극된 T 세포에 도입된다.
- [1086] 149. 구현예 147의 방법에서, 상기 재조합 핵산은 인큐베이션 후에 자극된 T 세포에 도입된다.
- [1087] 150. 구현예 141-149 중 임의의 방법에서, 방법은 형질도입된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함한다.
- [1088] 151. 구현예 141-150 중 임의의 방법에서, 방법은 바이러스 통합을 위한 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하여, 이로써 배양된 T 세포를 포함하는 조성물을 생산하는 단계를 더 포함한다.
- [1089] 152. 구현예 141-151 중 임의의 방법에서, 방법은 T 세포를 증폭시키는 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하는 단계를 더 포함한다.
- [1090] 153. 구현예 141-151 중 임의의 방법에서, 방법은 T 세포를 실질적으로 증폭시키지 않는 조건 하에 형질도입된 세포를 포함하는 조성물을 배양하는 단계를 더 포함한다.
- [1091] 154. 구현예 141-153 중 임의의 방법에서, 방법은 배양된 T 세포를 포함하는 조성물에 경쟁제 또는 자유 결합제를 첨가하는 단계를 더 포함한다.
- [1092] 155. 구현예 113-154 중 임의의 방법에서, 방법은 선택적으로 약학적으로 허용 가능한 부형제의 존재 하에 동결 보존 및/또는 대상체에 투여를 위한 산출 조성물의 세포를 제형화하는 단계를 더 포함한다.
- [1093] 156. 구현예 155의 방법에서, 상기 산출 조성물의 세포는 동결보호제의 존재 하에 제형화된다.
- [1094] 157. 구현예 113-156 중 임의의 방법에서, 상기 방법의 단계들 중 적어도 하나 또는 전부는 폐쇄 시스템에서 수행되고, 선택적으로 상기 폐쇄 시스템은 자동화된다.

- [1095] 158. 구현예 113-157 중 임의의 방법에서, 상기 샘플은 전체 혈액 샘플, 연막(buffy coat) 샘플, 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집술(apheresis) 생성물 또는 백혈구 성분 채집술(leukapheresis) 생성물이거나 이를 포함한다.
- [1096] 159. 구현예 158의 하우징 어셈블리에서, 상기 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 대상체로부터 신선하게 분리된다.
- [1097] 160. 구현예 158의 하우징 어셈블리에서, 상기 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 동결보존된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 해동된다.
- [1098] **VII. 실시예**
- [1099] 하기 실시예들은 예시적인 목적으로만 포함되며 본 발명의 범위를 한정하려는 의도는 아니다.
- [1100] **실시예 1: 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하는 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머 시약의 제조 방법.**
- [1101] 올리고머 시약은 STREP-TACTIN® M2로 명명된 예시적인 스트렙타비딘 뮤테인(서열번호 6에 제시된 아미노산의 뮤테인 서열을 함유하는 스트렙타비딘 호모테트라머, 예를 들어, 미국 특허번호 6,103,493 및 Voss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-982, 및 Argarana et al. (1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882 참조)을 중합하여 제조하였다. 올리고머화를 위한 스트렙타비딘 뮤테인을 제조하기 위해, 하나 이상의 반응성 티올기를 함유하는 스트렙타비딘 뮤테인을 말레이미드 활성화 스트렙타비딘 뮤테인과 함께 인큐베이션하였다. 티올화 스트렙타비딘 뮤테인을 제조하기 위해, 약 100mg의 스트렙타비딘 뮤테인을 2.6 mL의 총 부피에서 100mM 봉산염 완충액에서 1시간 동안 24°C에서 약 8.5의 pH에서 1:100의 물비로 2-이미노티올란 염산염과 인큐베이션함으로써 티올화시켰다. 활성화 반응을 위해, 약 400mg의 스트렙타비딘 뮤테인을 인산나트륨 완충액에 약 10.4mL의 총 부피에서 석신이미딜-6-[(β-말레이미도프로피온아미도) 헥사노에이트(SMPH)와 1:2의 물비로 24°C에서 1시간 동안 pH 약 7.2에서 인큐베이션하였다. 티올화 반응과 활성화 반응이 거의 동시에 시작되도록 조정되었고, 반응 시간이 조절되었다.
- [1102] 반응 후, PD-10 탈염 컬럼(GE Healthcare)을 사용하여 샘플을 개별적으로 겔 여과하여 샘플에서 2-이미노티올란 염산염 및 SMPH를 제거하였다. 각 2.5mL 부피의 샘플에 대해 1mL PD-10 컬럼을 평형화하고 티올화 뮤테인 스트렙타비딘 또는 말레이미드 뮤테인 스트렙타비딘으로 로딩하고 3.5mL의 연결 완충액(100 mM NaH₂P₄, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.2)을 추가하여 용리를 수행했다. 말레이미드 뮤테인 스트렙타비딘의 겔 여과를 4개 컬럼에서 수행하여 > 10mL 부피를 설명하고 용리액을 모았다. 활성화 및 티올화 반응의 타이밍과 활성화 및 티올화 반응의 종료와 올리고머화 반응의 시작 사이의 타이밍은 주의 깊게 제어되었다. 일반적으로, 겔 여과의 시작, 즉 활성화 및 티올화 반응의 종료로부터 올리고머화 반응이 개시될 때까지 10분 이상 경과하지 않았다.
- [1103] 올리고머화를 위해, 말레이미드 스트렙타비딘 뮤테인 및 티올화 스트렙타비딘 뮤테인 샘플을 약 17.5mL의 전체 부피로 합하고 약 600rpm의 교반 조건 하에 24°C에서 pH 7.2에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 4배 더 많은 스트렙타비딘 뮤테인이 2-이미노티올란 염산염보다 SMPH와 함께 인큐베이션되었기 때문에 티올화 스트렙타비딘 뮤테인과 말레이미드 스트렙타비딘 뮤테인의 물비는 올리고머화 반응 동안 1:4였다. 반응 후, 올리고머화된 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 나머지 SH 그룹을 N-에틸말레이미드(NEM)와 함께 24°C에서 15분 동안 교반하면서(약 600rpm) 인큐베이션하여 포화시킨 다음 4에서 추가로 16-20시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다.
- [1104] NEM으로 인큐베이션한 후, 올리고머화된 스트렙타비딘 뮤테인을 함유하는 샘플을 원심분리하고 상등액을 0.45 μm 멤브레인(Merck Millopore의 Millex-HP 0.45 μm)을 통해 여과했다. 그 다음, 여과된 용액을 AKTA Explorer 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)이 있는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)용 컬럼(Sephacryl S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare)에 로딩했다. 1500 mAU보다 크거나 같은 밀리 흡광도 단위(mAU)를 가진 분수를 모았다.
- [1105] 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인을 함유하는 폴링된 샘플을 실온에서 15분 동안 pH 6.35에서 100mM 히드록실아민으로 처리하였다. 처리 후 하이드록실아민을 제거하기 위해 샘플을 PD10 컬럼(컬럼당 2.5mL)에 로드하고, 100 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.2를 함유하는 버퍼 3.5mL로 용리했다. PD10 용리물을 폴링하고 0.45 μm 필터에 이어 0.22 μm 필터로 멸균 여과한 다음 샘플을 동결하고 -80°C에서 보관했다. 동결 전에 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 최종 농도를 측정하고 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 크기를 동적 광산란(DLS)에 의해 결정했다.

[1106] 올리고머화 과정의 일관성을 평가하기 위해 5가지 상이한 로트의 스트렙타비딘 뮤테인(SAM)에서 위에서 설명한 방법을 사용하여 10개의 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약을 제조했다. 올리고머의 평균 크기, 수율 퍼센트 (280 nm에서 흡광도를 기준선 보정 없이 측정하여 결정) 및 활성(비오틴 결합)을 평가하고 결과를 표 E1에 나타내었다. 결과는 생성된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약이 $97 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ 의 평균 반경 및 $40 \text{ nmol/mg} \pm 3 \text{ nmol/mg}$ 의 비오틴 결합으로 이러한 매개변수에서 일치함을 나타낸다.

[1107] 표 E1: 다른 배치에서 올리고머화된 STREP-TACTIN의 비교.

	SAM lot	반경 (nm)	수율(%)	비오틴 결합 (nmol/mg)
Batch 1	1	92	74	41
Batch 2	2	100	68	40
Batch 3	2	106	82	37
Batch 4	2	94	73	39
Batch 5	3	87	79	41
Batch 6	3	90	81	39
Batch 7	4	97	84	43
Batch 8	4	97	76	43
Batch 9	5	102	85	42
Batch 10	5	87	63	42

[1108]

[1109] 상기 기술된 바와 같이 생성된 3개의 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 평균 분자량(MW)은 UV 검출 (Agilent UV detector coupled with MALLS DAWN HELEOS (Wyatt))이 있는 HPLC 시스템(AGILENT 1100 및 Wyatt ECLIPSE DUALTEC)으로 수행된 비대칭 유동장-유동 분별(AF4)에 의해 측정되었다. AF4에 의한 측정은 $52,500 \text{ g/mol}$ (52.5 kDa)의 스트렙타비딘 뮤테인 사량체의 평균 분자량을 가정하여 각 올리고머 시약에서 스트렙타비딘 뮤테인 사량체의 평균 수 계산을 허용했다(표 E2).

[1110] 표 E2: 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 크기 및 분자량

반경 (nm)	MW (g/mol)	테트라머의 수
102	1.65×10^8	3150
82	1.08×10^8	2050
92	1.26×10^8	2280

[1111]

[1112] 자극제(항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편)는 상기 기재된 바와 같이 생성된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약에 대한 가역적 결합에 의해 다량체화되었다. 항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편은 각 Fab 단편에 융합된 스트렙타비딘 펩타이드-결합 파트너를 통해 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머에 가역적으로 결합되었다. 항-CD3 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산된 CD3 결합 모노클로날 항체로부터 유래되었으며(ATCC® CRL-8001™; 또한 미국 특허번호 4,361,549 참조), Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)에 기재된 항-CD3 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 함유하였다. 이들 서열은 서열번호 31 및 32에 각각 제시되어 있다. 항-CD28 Fab 단편은 항체 CD28.3으로부터 유래되었고 (GenBank 수탁번호 AF451974.1 하에 합성 단일 사슬 Fv 구조물로서 기탁됨; Vanhove et al., BLOOD, 15 July 2003, Vol.102, No. 2, pages 564-570도 참조), 서열번호 33 및 34에 각각 제시된 항-CD28 항체 CD28.3의 가변 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하였다. Fab 단편은 아미노산 서열 SAWSHPQFEKGGGSGGSAWSHPQFEK (서열번호 16)을 갖는 2개의 스트렙타비딘 결합 모듈의 순차적인 배열을 함유하는 스트렙타비딘 펩타이드-결합 서열에 그들의 중쇄의 카르복시-말단에서 개별적으로 융합되었다. 펩타이드 태그된 Fab 단편은 제조합적으로 생산되었다(국제 특허출원 공개번호 WO 2013/011011 및 WO 2013/124474 참조).

- [1113] 가역적 결합을 수행하기 위해, 펩타이드-태그된 항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편을 대략 실온에서 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약과 혼합하여 Fab 단편 상의 쌍-스트랩-태그 간의 상호작용을 통해 시약에 가역적으로 결합시키고, 이는 시약의 결합 부위에 가역적으로 결합할 수 있는 결합 파트너였다. 일부 경우에, 펩타이드-태그된 Fab 단편은 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약에 고정화되기 전에 미리 혼합되었으며, 이는 일부 경우에 상이한 Fab 분자의 보다 균일한 분포를 초래할 수 있다. 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약에 대한 펩타이드-태그된 항-CD3 및 항-CD28의 결합은 D-비오틴의 첨가에 의해 파괴되거나 역전될 수 있다. D-비오틴은 스트렙타비딘 뮤테인의 결합 파트너에 결합하기 위해 제제의 스트랩 태그와 경쟁하여 결합을 방해한다.
- [1114] **실시예 2: 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머에 가역적으로 결합된 올리고머화된 항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편의 활성 평가.**
- [1115] 실시예 1에 기재된 공정에 의해 표 E1에 기재된 각각의 배치로부터의 다양한 올리고머성 스트렙타비딘 시약에 가역적으로 결합된 항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편을 T 세포를 자극하는 능력에 대해 평가하였다. 이들 올리고머성 스트렙타비딘 시약은 약 95 nm의 평균 반경을 가졌다. 세포 증식의 지표로서 세포의 대사 활성은 안정한 테트라졸륨 염 WST-1이 가용성 포르마잔 염료 복합체로 절단되는 것을 비색 모니터링에 의해 평가하였다.
- [1116] 3개의 상이한 기증자로부터의 T 세포를 올리고머 스트렙타비딘 시약에 가역적으로 결합된 항-CD3/항-CD28 다량체화된 Fab 단편과 함께 인큐베이션하였다. 세포는 또한 항-CD3/항-CD28 Fab 단편에 가역적으로 결합된 평균 반경이 101(내부 참조) 또는 36 nm인 대조군 올리고머 시약과 함께 인큐베이션되었다.
- [1117] 인큐베이션 후 WST-1 시약을 세포에 적용하고 450 nm에서의 흡광도를 판독값으로 측정하여 대사 활성 수준을 평가했다. 결과는 분석되는 배양액의 세포 수로 정규화되고 세포 수당 WST-1의 비율로 표시된다.
- [1118] 도 3b에 도시된 바와 같이, 테스트된 시약 각각으로 자극된 T 세포의 평균 WST-1 활성(WST 비율)은 비슷했다. 더욱이, 자극의 정도는 시험된 모든 시약에 대해 유사했고 유사한 크기의 내부 참조 시약과 비슷했다(일반적으로 ± 2 표준 편차 내에서 다양함). 도 3a는 각 시약에 대한 별도의 데이터 포인트로 묘사된 WST-1 활성(WST 비율)을 보여준다. 도 3a 및 도 3b는 WST-1 활성에 의해 관찰된 바와 같이 T 세포의 자극이 더 작은 36 nm 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약 백본 상에 다량체화된 항-CD3/항-CD28 Fab를 사용하여 더 낮았다는 것을 나타낸다.
- [1119] **실시예 3: 컬럼 크로마토그래피를 통한 T 세포의 선택 및 자극.**
- [1120] 컬럼 크로마토그래피를 통해 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극을 수행하고, 하기에 상세히 설명된 바와 같이 선택 및 자극된 T 세포를 수집하였다. 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극의 예시적인 과정이 도 4에 도시되어 있다.
- [1121] **A. 컬럼 제조**
- [1122] Sephadex® G-50(Sigma)은 고정상으로 사용되었으며 컬럼 활성화를 위해 CNBr(시아노젠 브로마이드) 방법을 사용하여 Strep-tactin® M2(서열번호 6)와 공유 결합되었다. Sephadex® G-50 수지의 50% 현탁액은 수지 비드 현탁액 mL당 공유 결합된 Strep-tactin® 약 70 µg를 함유했다.
- [1123] Sephadex® G-50 수지에 Strep-tactin®을 고정화한 후, 고정된 Strep-tactin®이 있는 Sephadex® G-50 현탁액 2mL를 T 세포 표면 선택 마커에 특이적인 선택제 10 µg과 함께 4° C에서 20분 동안 인큐베이션했다. 선택제는 항-CD3 Fab 단편을 포함하였다. CD3 결합 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산된 CD3 결합 모노클로날 항체로부터 유래되었으며(ATCC® CRL-8001™; 또한 미국 특허번호 4,361,549 참조), Arakawa *et al* J. Biochem. 120, 657-662 (1996)에 기재된 항-CD3 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인(서열번호 31) 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 32)을 함유하였다. 이 실시예에서, CD3 결합 Fab 단편의 중쇄는 수지 상에 고정된 Strep-tactin®에 대한 CD3 결합 Fab 단편의 결합을 촉진하는 2개의 스트렙타비딘 결합 모듈의 순차적인 배열을 함유하는 Twin Strep-Tag®(SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK, 서열번호 16)와 카르복시 말단으로 융합되었다.
- [1124] 그 다음, 수지 현탁액을 바닥에 90 마이크로미터 프릿이 있는 열/가스 컬럼에 채웠다. 이 실시예에서 사용된 열/가스 컬럼은 열/가스 컬럼이 가열 요소 및 가스 공급 요소를 포함한다는 점에서 기존 컬럼과 다르다. 가열 요소는 외부 온수 공급을 위한 주입구 및 배출구가 있는 가열 코일로 구성되었으며 가스 공급 요소는 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터로 구성되었다(예를 들어, 도 1a 및 도 1b 참조). 열/가스 컬럼을 0.5% 소 혈청 알부민(PBSA 완충액)을 함유하는 PBS(인산염 완충 식염수)로 평형화하여 1mL의 베드 부피를 획득하였다. 열/가스 컬럼은 하기에 설명된 대로 컬럼에서 수집하기 전에 T 세포 선택 및 자극에 사용되었다.

[1125] **B. 온-컬럼 선택 및 자극**

[1126] 인간 기증자의 성분채집술 샘플을 친화성 컬럼에 로딩하고, 샘플의 CD3+ T 세포가 수지에 고정된 CD3 결합 Fab 단편과 상호작용하도록 하였다. 컬럼을 PBSA 완충액으로 2회 세척하여 고정된 CD3 결합 Fab 단편과 상호작용하지 않는 세포를 제거하였다. 샘플을 컬럼에 로딩한 후 약 15분 후, 적어도 400 µg의 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약(올리고머 스트렙타비딘 퓨테인 시약에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 Fab 단편 및 항-CD28 Fab 단편 자극제)을 컬럼에 로딩하여 자극 시약을 컬럼에 첨가하였고, 상기 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이, 글루타민 및 제조함 IL-2, IL-15, 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 3mL에 세포를 자극하는 조건 하에 컬럼 상에서 세포를 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안 컬럼의 가열 요소는 가열 코일을 통과하는 물의 온도를 약 37 ° C의 온도로 유지하고, 가스 교환 요소는 인큐베이션 중에 연결된 개방형 멸균 필터의 제어하에 공기를 공급하였다.

[1127] 컬럼에 올리고머 시약을 첨가한 후 컬럼 내용물을 37° C까지 가열하고 완전한 활성화 과정 동안 온도를 유지했다. 컬럼 내의 온도는 온도 센서에 의해 지속적으로 모니터링되었다. 멸균 필터를 수동 요소로 사용하여 전체 선택 절차 동안 가스 교환을 계속했다.

[1128] 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약과 함께 배양하는 동안, 선택된 CD3+ T 세포는 세포와 수지 사이의 결합을 방해하기 위해 경쟁 시약을 추가할 필요 없이 활성화 유도 분리(AID)에 의해 컬럼에서 자발적으로 분리되었다. 자극제를 첨가한 후 약 4.5시간 이내에 글루타민 및 제조함 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 약 80mL를 컬럼에 통과시켜 컬럼에서 자발적으로 분리된 세포를 단일 단계로 수집하였고, 중력 흐름에 의해 세포를 수집하였다. 중력 흐름에 의한 수집 전에 컬럼 상의 세포 결합을 방해하기 위해 컬럼에 더 이상의 경쟁 물질을 첨가하지 않았다.

[1129] 온-컬럼 선택 및 열/가스 컬럼을 사용한 자극 후 수집된 CD3+ T 세포의 수를 결정하고 이론적인 추정치, 대조군 및 가열 요소와 가스 공급 요소가 포함되지 않은 기준 컬럼을 사용하여(즉, 세포와 외부 환경 사이의 공기 교환 없이 실온에서 기준 컬럼에서 세포를 배양함) 유사한 과정을 통해 수집된 것과 비교하였다. 대조군에서, 성분채집술 샘플은 CD3+ T 세포의 선택을 위한 표준 항-CD3 친화성 컬럼에 로딩되었지만, 세포는 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약의 존재하에 인큐베이션되지 않았고; 4.5시간 후, D-비오틴을 첨가하여 항-CD3 Fab의 Twin Strep-Tag®와 수지 상의 Strep-tactin® 간의 결합을 방해함으로써 컬럼 수지로부터 선택된 CD3+ T 세포를 방출시켰다.

[1130] 결과는 도 5에 도시되어 있고, 추정치(회색 막대)는 100% 효율을 가정할 때 용리될 수 있는 포획된 세포의 이론적 수였다. 도 5에 도시된 바와 같이, 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 예시적인 열/가스 컬럼을 사용한 용리 효율은 기준 컬럼을 사용한 것의 대략 2배이다. 도 5는 가열 요소 및 가스 공급 요소가 있는 열/가스 컬럼이 기준 컬럼에 비해 온-컬럼 T 세포 선택 및 수지로부터 자극된 T 세포의 실질적으로 더 효율적인 수집을 지원함을 나타낸다. 또한 열/가스 컬럼은 대조군과 비교하여 유사한 T 세포 회수를 달성하지만 결합을 방해하기 위한 추가 경쟁 물질이 필요하지 않다. 따라서, 열/가스 컬럼을 사용하여 T 세포 선택 및/또는 자극에 필요한 시간을 크게 줄이는 동시에 선택 및 자극된 T 세포의 높은 회수율을 유지할 수 있다.

[1131] **실시예 4: 컬럼 크로마토그래피를 통한 선택 및 자극 동안 및 이후의 T 세포 분석.**

[1132] 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 컬럼을 사용하여 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극을 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실질적으로 실시예 3에 기재된 바와 같이, 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 첨가하기 전에 출발 물질로서 인간 기증자로부터의 성분채집술 샘플을 CD3 Fab-로딩된 수지를 갖는 친화성 컬럼 상에 로딩하였다. 선택 및 자극된 세포를 실시예 3에 기술된 바와 같이 경쟁 물질의 첨가 없이 중력 흐름 하에 배양 백에 수집하였다.

[1133] 출발 물질의 세포, 음성 분획(자극 시약을 로딩하기 전에 세척된 결합되지 않은 세포) 또는 양성 분획(실시예 3에 기술된 과정에 의해 수집된 세포)을 분석했다. 세포를 CD3, CD4, CD8, CD45 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 염색하였고, 유세포 분석에 의해 정량화하였다. 잔해는 제외되었고 샘플은 CD45+ 살아있는 세포에 미리 게이트되었다.

[1134] 유세포 분석 결과는 도 6에 도시되어 있고, 출발 샘플에서 모든 CD3+ 세포의 약 64%가 농축되어 양성 분획에 존재하고 나머지 세포는 음성 분획에 있었다. 양성 분획의 세포 중 94% 이상이 CD4+ 및 CD8+ T 세포였다.

[1135] 배양 백에 수집된 세포를 최대 3일 동안 글루타민 및 제조함 IL-2, IL-15 및 IL-7이 포함된 무혈청 기본 배지에

서 37° C에서 추가로 배양했다. 인큐베이션 동안 올리고머 자극 시약은 제거되지 않았고; 그러나, 추가 자극 시약은 추가되지 않았다.

[1136] CD3, CD4, CD8 및 활성화 마커 CD69 및 CD25를 인식하는 항체로 세포를 염색한 후 유세포 분석에 의해 세포 수 및 세포 표면 발현에 대해 후속 인큐베이션 동안 1일, 3일 및 3일에 세포를 모니터링하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 3일째 배양된 세포의 98.8%가 CD3+였으며, 활성화 마커 CD25 및 CD69의 표면 발현도 대부분의 T 세포에서 관찰되었다. CD3+ 세포의 순도는 컬럼에서 수확할 때와 비교하여 3일째에 증가했지만 CD4:CD8 T 세포의 비율은 유지되었다. 후속 인큐베이션 후 세포 수 및 배수 증폭에 대한 평가는 3일째에 선택되고 자극된 T 세포가 활성화 마커를 발현하고 증식하는 세포의 능력과 일치하는 수가 증가하기 시작했음을 보여주었다(도 7b). 이들 결과는 실시예 3에 기재된 온-컬럼 공정에 의한 선택 및 자극 후 컬럼으로부터 직접 수집된 T 세포가 배양에서 그들의 지속적인 증식을 지지하는 특징을 나타낸다는 것을 입증한다.

[1137] **실시예 5: 동결보존된 성분채집술 출발 샘플에서 T 세포의 온-컬럼 선택.**

[1138] 온-컬럼 T 세포 선택은 출발 샘플로서 동결보존된 성분채집술 샘플을 사용하는 것을 제외하고는 본질적으로 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 동결보존된 성분채집술 샘플은 일반적으로 단핵구 함량이 높다(20% 이상). 결과는 신선한 성분채집술 샘플에 대해 수행된 프로세스와 비교되었다. 동결보존된 성분채집술 샘플 및 신선한 성분채집술 샘플의 단핵구 함량(살아있는 CD45+ 세포의 %)은 복수의 상이한 기증자에 대해 도 8a에 도시되어 있다.

[1139] 컬럼에서 수집된 양성 분획의 출발 물질 및 농축 세포를 CD3 및 CD14(단핵구 마커)를 인식하는 항체로 염색하고 유세포 분석으로 정량화했다. 도 8b는 출발 물질 및 양성 분획에서 CD3 또는 CD14에 대해 양성인 세포의 백분율을 도시한다. 도시된 바와 같이, 출발 물질의 단핵구 함량은 높았지만 양성 분획은 1% CD14+ 단핵구가 검출된 CD3+ T 세포의 94% 순도를 가져왔고, 이는 단핵구:T 세포 비가 0.33에서 0.01로 감소함을 나타낸다. 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 선택한 T 세포의 수를 도 8c에 나타내었다.

[1140] **실시예 6: 순차 또는 병렬 컬럼을 사용한 T 세포의 선택 및 자극.**

[1141] 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극은 본질적으로 가열 요소 및 가스 공급 요소를 갖는 컬럼을 사용하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행되었으며, 여기에는 세포 선택을 위한 고정화된 항-CD3 Fab 단편이 있었다. 한 연구에서는 두 개의 동일한 컬럼이 순차적으로 배열된 시스템에서 선택과 자극을 수행한 반면, 다른 연구에서는 두 개의 동일한 컬럼이 병렬로 배열된 시스템에서 선택과 자극을 수행했다(도 9 참조). 각 연구에서 동일한 기증자의 성분채집술 샘플의 약 1/5을 출발 물질로 각 컬럼 시스템에 로드했다.

[1142] 출발 물질, 음성 분획 및 양성 분획을 CD3, CD4, CD8 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 염색하고 유세포 분석으로 정량화하였다. 유세포 분석 결과를 도 10a에 나타내었다. 도시된 바와 같이, CD3+ T 세포의 유사한 농축이 두 전략에 의해 달성되었다.

[1143] 양성 분획으로부터의 세포(병렬 또는 순차 컬럼을 사용하는 것을 제외하고 실시예 3에 기재된 방법에 의해 수집된 세포)를 배양 백으로 수거하였고, 각 연구에서 수집된 세포는 글루타민과 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7이 포함된 무혈청 기본 배지에서 최대 6일 동안 37° C에서 배양되었다. 인큐베이션 동안 올리고머 자극 시약은 제거되지 않았고; 그러나, 추가 항-CD3/항-CD28 자극 시약은 추가되지 않았다.

[1144] CD3, CD4, CD8 및 활성화 마커 CD69 및 CD25를 인식하는 항체로 세포를 염색한 후 유세포 분석에 의해 세포 수 및 세포 표면 발현에 대해 후속 인큐베이션 동안 0일, 1일, 2일, 3일 및 6일에 세포를 모니터링하였다. 도 10b에 도시된 바와 같이, 왼쪽 패널에서, 각 크로마토그래피 연구로부터의 세포는 1일째에 활성화 마커의 유사한 발현을 나타내었고, 세포 수는 인큐베이션 동안 유사하게 증가하기 시작했다. 실험 1(■) 및 실험 2(●)에서 세포 수에 대한 대표적인 결과를 도 10b, 오른쪽 패널에 나타내었다.

[1145] 이러한 결과는 순차 또는 병렬 컬럼 크로마토그래피가 T 세포의 컬럼 선택 및 자극에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[1146] **실시예 7: 농축된 혈액에서 T 세포의 온-컬럼 선택 및 자극.**

[1147] 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극은 출발 샘플로서 농축된 혈액을 사용하는 것을 제외하고는 본질적으로 실시예 3에 기재된 바와 같이 수행하였다. 또한, 실질적으로 실시예 6에 기재된 바와 같은 시스템을 사용하여 병렬 CD3 선택 및 자극을 수행하였다. 혈소판 및 혈청 함량이 감소된 가법제 농축된 전혈을 PBSA 완충액에 1:1로 미리 희석했다. 적혈구 용해는 수행되지 않았다. 희석된 샘플 160mL(컬럼당 80mL)를 각각 4mL의 CD3 Fab-로딩된 수지를

포함하는 두 개의 병렬 컬럼에 로드하고, 컬럼을 세척한 다음 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 각 컬럼에 첨가했다.

- [1148] CD3+ T 세포 선택에서 출발 물질의 세포, 음성 분획 및 양성 분획을 CD45, CD3, CD4, CD8 및 CD14를 포함하는 표면 마커를 인식하는 항체로 염색하고 유세포 분석에 의해 정량화했다. 유세포 분석 결과를 도 11a에 나타내었다. 도식된 바와 같이, 양성 분획의 세포(2개의 병렬 컬럼을 사용하여 실시예 3에 기재된 공정에 의해 수집된 세포)는 93% 초과 CD3+ T 세포 순도를 갖는 CD3+ T 세포의 고농축을 나타내었다.
- [1149] 양성 분획으로부터의 세포(병렬 컬럼을 사용하는 것을 제외하고 실시예 3에 기재된 방법에 의해 수집된 세포)를 배양 백으로 수거하였고, 글루타민과 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7이 포함된 무혈청 기본 배지에서 최대 6일 동안 37° C에서 인큐베이션되었다. 인큐베이션 동안 올리고머 자극 시약은 제거되지 않았고; 그러나, 추가 항-CD3/항-CD28 자극 시약은 추가되지 않았다. CD4 및 CD8 및 활성화 마커 CD69 및 CD25의 세포 표면 발현에 대한 후속 인큐베이션 개시 후 72시간에 세포를 모니터링하였다. 도 11a에 도식된 바와 같이, 생성된 세포는 후속 인큐베이션 전에 양성 분획에 존재하는 CD4 및 CD8 T 세포의 비율을 유지하였고(도 11a 및 도 11b의 양성 분획 비교, 왼쪽 패널), 대부분의 세포는 활성화 마커 CD25 및/또는 CD69에 대해 양성이었다(도 11b, 오른쪽 패널).
- [1150] **실시예 8: 전혈에서 직접 T 세포 선택.**
- [1151] Sephadex® G-50을 수지로서 사용하여 실시예 3에 기술된 것과 유사한 공정에 의해, Twin Strep-Tag® (SAWSHPQFEK(GGGG)₂GGSAWSHPQFEK, 서열번호 16)와 카르복시 말단 융합된 항-CD3 Fab 단편의 고정화를 위해 아가로스 수지(100 μl 수지)를 Strep-tactin®으로 기능화했다. 1mL의 새로운 희석되지 않은 혈액을 컬럼에 로드했다. 적혈구 용해는 수행되지 않았다. 컬럼을 세척하고 음성 분획을 수집했다. 항-CD3 Fab의 Twin Strep-Tag®와 수지 상의 Strep-tactin® 간의 결합을 방해하기 위해 D-비오틴을 첨가하여 양성 분획의 컬럼 수지로부터 선택된 CD3+ T 세포를 방출했다.
- [1152] CD3+ T 세포 선택에서 출발 물질, 음성 분획 및 양성 분획을 프로피디움 요오드(PI) 및 CD3 항체로 염색하고 유세포 분석으로 정량화했다. 유세포 분석 결과를 도 12에 나타내었다. 양성 분획은 희석되지 않은 신선한 전혈의 0.182% CD3+ 세포와 비교하여 >80% CD3+ 세포를 함유했다. 이 결과는 신선한 혈액에서 직접 온-컬럼 T 세포 선택의 가능성을 뒷받침한다.
- [1153] 이 결과는 온-컬럼 T 세포 선택이 전혈 샘플에서 잘 수행됨을 나타낸다.
- [1154] **실시예 9: 컬럼 크로마토그래피를 통한 T 세포의 선택 및 자극.**
- [1155] 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극제의 존재 하에 온-컬럼 자극으로 컬럼 기반 친화성 크로마토그래피에 의해 T 세포를 농축하기 위한 연구가 수행되었다.
- [1156] 이 연구에서 Sephadex G50(Sigma)은 고정상으로 사용되었으며 CNBr(cyanogen bromide) 활성화 수지를 사용하여 STREP-TACTIN® M2(서열번호 6)와 공유 결합되었다. Sephadex G50의 50% 현탁액은 약 70 μg의 공유 결합된 7 Strep-tactin®/mL의 비드 현탁액을 함유했다. STREP-TACTIN®을 고정상에 고정한 후, Strep-tactin®이 포함된 Sephadex G50 현탁액 2mL를 고정된 Strep-tactin® 시약에 Fab 단편의 결합을 허용하기 위해, 4° C에서 20 분 동안 T 세포 표면 선택 마커에 특이적인 선택제 10 μg과 함께 인큐베이션했다. 그 다음, 현탁액을 바닥에 90 마이크로미터 프릿이 있는 플라스틱 미니컬럼에 채웠다. 컬럼을 0.5% 소 혈청 알부민(PBSA 완충액)을 함유하는 PBS(인산염 완충 식염수)로 평형화하여 1mL의 베드 부피를 수득하였다.
- [1157] 이들 연구에서, 선택제로 항-CD3 결합 Fab 단편, 항-CD4 결합 Fab 단편, 또는 항-CD8 결합 Fab 단편을 선택제로 사용하여 실험을 수행하였다. CD3 결합 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산된 CD3 결합 모노클로날 항체로부터 유래되었으며(ATCC® CRL-8001™; 또한 미국 특허번호 4,361,549 참조), Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)에 기재된 항-CD3 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인(서열번호 31) 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 32)을 함유하였다. CD4 결합 Fab 단편은 m13B8.2(예: 미국 특허 7,482,000)에서 수득하였고, 항-CD4 항체 m13B8의 중쇄 가변 도메인(서열번호 29) 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 30)을 함유했다. CD8 결합 Fab 단편은 OKT8(예: ATCC CRL-8014)에서 수득하였고, 항-CD8 항체 OKT8의 중쇄 가변 도메인(서열번호 9) 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 10)을 함유했다. Fab 단편 각각의 중쇄는 2개의 스트렙타비딘 결합 모듈의 순차적 배열을 함유하는 Twin Strep-Tag®(서열번호 16)와 카르복시-말단적으로 융합되었다.
- [1158] 인간 기증자의 성분채집술 샘플을 친화성 컬럼에 로딩하고 두 번의 세척 단계를 수행하였다. 샘플을 로딩한 후 30분 이상이 경과한 후, 실시예 1에서와 같이 생성된 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약(항-CD3/항-CD28 올

리고머 시약)에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 항-CD28 Fab 단편 40 μg 을 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 3 mL의 컬럼에 로딩하였고, 37° C에서 인큐베이션하였다. 약 24시간 후, 컬럼을 통해 결합을 방해하는 추가 경쟁 물질의 첨가 없이 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 약 80mL의 무혈청 기본 배지를 통과시켜 단일 단계로 컬럼으로부터 세포를 수집하였다. 대조군으로서 성분 채집술 샘플을 항-CD3 친화성 컬럼에 로딩했지만 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약의 존재하에 인큐베이션하지 않았다. 대조군 조건의 경우, 24시간 후 D-비오틴을 첨가하여 항-CD3 Fab의 Twin Strep-Tag®와 STREP-TACTIN® 간의 결합을 파괴하고, 방출된 세포를 중력 흐름에 의해 수집하였다.

[1159] 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 자극을 개시하고 대략 24시간 후에, 수집된 세포를 선택 마커의 표면 발현에 대해 분석하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, CD3, CD4 및 CD8의 하향조절은 선택 마커에 특이적인 각각의 선택제를 사용한 온-컬럼 선택 및 자극 시약과의 인큐베이션 후 24시간에 관찰되었다. 대조적으로, 올리고머 자극 시약과 함께 배양되지 않은 대조군 조건에서는 선택 마커의 수용체 하향 조절이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 항-CD3/항-CD8 자극제를 사용한 T 세포의 자극이 수용체의 표면 발현의 하향조절을 초래하여 경쟁 시약의 추가가 필요 없이 컬럼으로부터 세포의 자발적인 분리를 허용한다는 관찰과 일치한다.

[1160] 항-CD3 STREP-TACTIN® 친화성 컬럼에서 T 세포를 선택하고 위에서 설명한 대로 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 온-컬럼 자극을 받는 유사한 연구가 수행되었다. 올리고머 자극 시약을 첨가한 후 다양한 시간에 중력 흐름에 의해 세포를 수집하였다. 수집된 세포를 알파-베타 TCR 사슬에 대한 항체로 즉시 염색하고 유세포 분석으로 모니터링하여 CD3의 표면 발현을 검출했다. 도 14는 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약의 존재 하에 자극의 개시 후 CD3/TCR 복합체 하향조절 및 재발현의 예시적인 동역학을 예시한다. 도시된 바와 같이, CD3/TCR 복합체 표면 발현의 급속한 하향조절은 자극의 처음 24시간 동안 관찰되었으며, CD3/TCR 복합체 표면 발현의 최대 감소는 단 12시간 후에 관찰되었다. 올리고머 자극 시약의 존재 하에 36시간 이상 배양하면 자극 시약으로 자극을 시작한 후 약 72시간 이내에 달성된 최대 CD3/TCR 복합체 표면 재발현과 함께 표면 CD3/TCR 복합체의 재발현이 발생했다. 이러한 결과는 온-컬럼 자극 매개 자발적 T 세포 분리가 4~6시간 내에 발생할 수 있고, 최대 방출은 자극 시약과 함께 컬럼 내 인큐베이션이 시작된 후 대략 12시간에 발생함을 뒷받침한다.

[1161] 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약을 첨가한 후 약 24시간에 자발적으로 분리된 세포를 글루타민과 재조합 IL-2, IL-15, IL-7이 포함된 무혈청 기본 배지에서 최대 9일 동안 37° C에서 배양하였다. 인큐베이션 동안 올리고머 자극 시약은 제거되지 않았고; 그러나, 인큐베이션 동안 세포가 계속 증폭됨에 따라 희석되었다. CD3 및 활성화 마커 CD69 및 CD25의 크기 및 발현에 대해 24시간 및 후속 인큐베이션 동안 5일에 세포를 모니터링하였다. 도 15a에 도시된 바와 같이, 최대 5일 동안의 추가 인큐베이션은 24시간에 관찰된 CD3 초기 하향조절 후 CD3의 재발현을 초래하였다. 또한, 세포 크기의 증가(도 15a의 왼쪽 패널) 및 활성화 마커 CD25 및 CD69의 표면 발현도 24시간 시점과 비교하여 5일에서 관찰되었다. 최대 9일 동안의 후속 인큐베이션 후 세포 수 및 배수 증폭에 대한 평가는 자발적으로 분리된 세포가 높은 증식 능력을 나타냄을 보여주었다(도 15b). 이러한 결과는 온-컬럼 선택 및 단기 자극을 받은 T 세포가 원하는 자극, 활성화 및/또는 증폭을 달성하기 위해 추가로 인큐베이션될 수 있다는 관찰과 일치한다.

[1162] 이러한 결과는 조작된 T 세포 조성물을 생산하기 위한 다운스트림 처리(예: 형질도입) 전에 또는 이와 관련하여 표적 세포를 분리하고 자극하는 신속한 수단(예: 24시간 미만)으로서 온-컬럼 선택 및 자극의 사용을 뒷받침한다.

[1163] **실시예 10: 소분자 mTOR 키나제 억제제의 존재 하에 생산된 조작된 T 세포의 T 세포 표현형 및 기능 평가.**

[1164] CD4+ 및 CD8+ T 세포는 인간 기증자 대상의 백혈구 성분채집술 샘플에서 면역친화성 기반 농축에 의해 분리되었다. 1일에, 분리된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 1:1로 혼합하고 1 μM 의 2-(3-히드록시페닐)-9-(2-이소프로필페닐)-8-옥소-8,9-디히드로-7H-퓨린-6-카복사미드 (화합물 63)의 유무에 관계없이, 재조합 IL-2(100 IU/mL), 재조합 IL-7(600 IU/mL) 및 재조합 IL-15(100 IU/mL)가 보충된 무혈청 배지에서 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 자극하였다. 화합물 63과 함께 또는 화합물 63 없이 배양된 T 세포를 37° C에서 밤새(약 24시간) 인큐베이션한 다음, 항-CD19 CAR를 코딩하는 렌티바이러스 벡터와 함께 화합물 63이 없는 (1mM) 무혈청 배양 배지에서 형질도입하였다. 상기 CAR는 CD19(FMC63 유래)에 특이적인 scFv 항원 결합 도메인, CD28 막관통 영역, 4-1BB 공자극 신호 전달 영역 및 CD3-제타 유래 세포 내 신호 전달 도메인을 함유했다. 형질도입 후, 세포를 재조합 사이토카인이 없는 무혈청 배지(기본 배지) 및 화합물 63(1mM)의 유무에 관계없이 배양하고, 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약으로 자극 개시 (공정 5일까지) 후 최대 96시간 동안 인큐베이터에서 약 37.0° C에서 인큐베이션되도록 하였다. 인큐베이션 시작 후 대략 24시간(공정 3일째)에 1mM 비오틴을 첨가하

였다. 인큐베이션 후 각 기증자의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 수확하고, 제형화하고, 냉동시켰다.

[1165] 동결된 조작된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 해동하고, T 세포를 세포내 S6 인산화, 리보솜 단백질 및 mTOR 억제 마커에 대해 평가하고 CD4 또는 CD8의 표면 발현 및 기억 서브세트 마커로서의 CCR7 및 CD45RA에 대해 공동 염색했다. 기억 서브세트에 의한 살아있는 CD8+ T 세포에서의 pS6 발현은 도 16a에 도시된 바와 같이 CCR7 및 CD45RA의 발현에 의해 나타내었다. 도시된 바와 같이, 화합물 63과의 인큐베이션은 자극된 기억 T 세포 서브세트, Temra, Tem 및 Tcm 세포의 평균 형광 강도를 감소시켰으며, 이는 mTOR의 억제를 나타내는 반면, 시간 경과에 따른 생존 세포의 백분율 또는 총 수에는 유의한 영향을 미치지 않았다. CD8+ T 세포에서 PS6의 평균 형광 강도(MFI)를 도 16b에 나타내었다. 도 16c 및 도 16d에 도시된 바와 같이, 화합물 63의 존재(검은색 선) 또는 부재(회색 선)는 생성된 조성물에서 각각 생존 세포 퍼센트 또는 총 살아있는 세포에 영향을 미치지 않았다.

[1166] 설명된 과정에 의해 생성된 해동된 세포는 세포자멸사 마커(예: 카스파제 양성 CAR-T 세포의 백분율), 표현형 프로파일, PMA/이오노마이신 및 골지 억제제로 자극한 후 세포내 사이토카인을 생산하는 능력에 대해 평가되었다. 도 17a에 도시된 바와 같이, 화합물 63과 함께 인큐베이션된 샘플로부터의 T 세포는 화합물 63과 함께 인큐베이션되지 않은 것보다 세포내 카스파제 발현이 더 적었으며, 이는 조작된 세포를 생성하는 과정 동안 화합물 63의 존재가 T 세포 조성물의 전체 세포 건강을 개선했음을 나타낸다. 해동된 세포는 또한 유세포 분석에 의해 CD27 및 CCR7의 표면 발현에 대해 염색되었다. 도 17b(CD8+ T 세포) 및 도 17d(CD4+ T 세포)에 도시된 바와 같이, 화합물 63과의 인큐베이션은 CD27 및/또는 CCR7의 발현에 의해 평가된 바와 같이 세포의 표현형 서브세트 프로파일을 실질적으로 변경하지 않았다. 세포내 사이토카인 IL2, IFN γ 또는 TNF의 수준에 의해 입증된 바와 같이, 화합물 63의 존재 하에 생성된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 기능적 활성화는 화합물 63의 존재 하에 생산된 조작된 CD8+ T 세포(도 17c) 및 CD4+ T 세포(도 17e) 둘 모두에서 실질적으로 개선되었다.

[1167] 세포의 기능적 활성을 추가로 평가하기 위해, 생성된 T 세포 조성물을 항-CD19 CAR에 대한 항-이디오타입(ID) 항체와 접합된 비드로 12일에 걸쳐 장기간 자극하고, 세포의 증폭 및 생존을 관찰하였다(도 17f, 왼쪽 패널) 및 전체 증폭 메트릭을 성장 곡선 아래 면적으로 계산했다(도 17f, 오른쪽 패널, AUC). 도시된 바와 같이, 화합물 63의 부재 하에 세포의 자극은 CAR의 만성 자극 및 장기간 자극 후 지속된 기능의 상실과 일치하는 시간 경과에 따른 세포의 감소된 증폭을 초래하였다. 결과는 화합물 63의 존재 하에 생산된 조작된 세포에서 장기간 CAR-특이적 자극 후에 T 세포의 개선된 기능이 관찰되었음을 보여준다.

[1168] **실시예 11: 조합된 선택 및 온-컬럼 자극 프로세스를 사용한 조작된 T 세포의 표현형 및 기능적 특성 평가.**

[1169] 크로마토그래피 컬럼에서 선택 및 자극 단계를 조합하는 공정(온-컬럼 선택 및 자극)은 실질적으로 실시예 9에 기술된 바와 같이 더 큰 규모로 수행되었다. 온-컬럼 선택 및 자극 프로세스는 실질적으로 유사하지만 자극 단계가 선택 및 용액에서 별도로 수행되는 대안 프로세스와 비교되었다.

[1170] **A. 온-컬럼 선택 및 자극.**

[1171] 0일째에, 브롬화 시아노젠(CNBr) 활성화 수지를 사용하여 StrepTactin®(SEQ ID NO: 6)에 공유 결합된 Sephadex G50(Sigma) 고정상을 포함하는 친화성 컬럼에 인간 기증자의 성분채집 샘플을 로딩했다. 20mL 고정상은 최대 20억 $\pm$ 5억 개의 세포를 수용할 수 있다. 실시예 3에 기재된 바와 같은 항-CD3 결합 Fab 단편인 선택제를 StrepTactin에 결합할 수 있는 중쇄 카르복시 말단 융합된 스트렙타비딘 결합 펩타이드(Twin Strep-Tag®; 서열번호 16)를 통해 고정상에 고정화시켰다.

[1172] 샘플을 로딩한 시간으로부터 약 60분 후, 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약(항-CD3/항-CD28 올리고머 시약)에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 항-CD28 Fab 단편을 재조합 IL-2(예: 100IU/mL), IL-15(예: 100IU/mL) 및 IL-7(예: 600IU/mL)을 함유하는 무혈청 배지에서 0.2-0.3x(1-2 μ g/1 백만 세포)의 고정 용량으로 컬럼에 로딩하였고, 컬럼에서 37°C에서 약 4.5시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안, 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 자극하면 컬럼 상의 선택제로부터 고정된 세포가 분리되거나 방출되었다. 동일한 무혈청 배지를 사용하여 중력 흐름에 의해 컬럼으로부터 방출된 세포를 용리시켰다. 배지에는 고정상에 있는 StrepTactin®과 컬럼의 고정상에 세포를 고정시키는 데 사용되는 항-CD3 항체에 융합된 스트렙타비딘 결합 펩타이드 사이의 결합을 방해하는 비오틴 또는 경쟁 물질이 포함되지 않았다.

[1173] 이어서, 방출 및 수집된 세포를 형질도입하여 예시적인 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터와 함께 동일한 무혈청 배지에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시켰다. 예시적인 CAR은 뮤린 항체 FMC63로부터 유래한 항-CD19 scFv, 면역글로불린 스페이스, CD28로부터 유래한 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래한 공자극 영역 FMC63, 및 CD3-제타 세포내 신호 전달 도메인을 함유하였다. 형질도입을 위해 배양 부

피를 1×10^6 cells/mL로 조정했다.

- [1174] 형질도입된 세포를 세척한 다음 37℃에서 추가로 인큐베이션하였다. 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 온-컬럼 자극을 시작한 지 약 48시간 후, 1.0mM D-비오틴을 첨가하고 세포와 혼합하여 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약으로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab를 해리시켰다.
- [1175] 비오틴을 첨가한 후, 세포를 추가로 약 24시간 동안 37℃에서 추가로 인큐베이션하였다. 그 다음 세포를 두 개의 서브세트로 나눴다. 제1 서브세트에서, 세포는 동결 보호제로 직접 제형화되었다. 제2 서브세트에서, 세포의 부피는 배양 및 형질도입 단계 동안 사용된 IL-2, IL-7 및 IL-15 농도의 2배를 함유하는 무혈청 배지에서 0.5×10^6 cells/mL로 조정되었다. 이 제2 서브세트의 세포를 배지 교환과 함께 정적 배양에서 37℃에서 또 다른 5일 동안 배양하여 증폭을 위해 추가로 배양한 다음 동결 보호제와 함께 제형화했다.
- [1176] **B. 대안적 공정: 분리된 선택과 자극(용액 내).**
- [1177] 대안적 공정은 일반적으로 위에서 설명한 대로 진행되었지만 선택 및 자극 단계는 컬럼에서 결합되지 않았다. 동일한 인간 기증자로부터의 성분채집 샘플을 CD3+ T 세포의 선택에 대해 위에서 설명한 바와 같이 항-CD3 선택 시약을 포함하는 친화성 컬럼에 로딩했다. 선택된 세포를 용리하기 위해 1.0mM D-비오틴을 컬럼에 첨가하고 용리된 세포를 수집하였다. D-비오틴은 항-CD3 Fab에 용합된 스트렙타비딘 결합 펩타이드와 고정상에 있는 StrepTactin® 사이의 결합을 방해하여 컬럼에서 세포를 방출하는 경쟁 물질과 항-CD3 Fab의 역할을 하는 D-비오틴이다.
- [1178] 대안적 공정의 0일째에, 선택된 세포를 세척하고, 1×10^6 /mL로 희석하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성된 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약과 함께 고정 용량(0.3x, 약 2 µg/1백만 세포)에서 항온처리하여 자극하였다. 자극은 재조합 IL-2 (예: 100 IU/mL), 재조합 IL-7 (예: 600 IU/mL), 및 재조합 IL-15 (예: 100 IU/mL)를 함유하는 무혈청 배지에서 약 18-30시간(24 ± 6 시간) 동안 수행되었다.
- [1179] 자극 후, 세포는 상기 기재된 바와 같은 동일한 예시적인 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 갖는 동일한 무혈청 배지에서 30분 동안 회전 접종에 의해 형질도입되었다.
- [1180] 회전 접종 후, 세포를 세척한 다음 37℃에서 추가로 인큐베이션하였다. 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 자극을 시작한 지 약 48 ± 6 시간 후, 1.0mM D-비오틴을 첨가하고 세포와 혼합하여 올리고머 스트렙타비딘 시약으로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab를 해리시켰다.
- [1181] 비오틴을 첨가한 후, 세포를 추가로 약 24시간 동안 37℃에서 추가로 인큐베이션하였다. 그 다음 세포를 위와 유사한 두 개의 서브세트로 나눴다. 제1 서브세트에서, 세포는 동결 보호제로 직접 제형화되었다. 제2 서브세트에서, 세포는 배지 교환과 함께 정적 배양에서 37℃에서 추가 5일 동안 배양에 의해 증폭을 위해 추가로 배양된 다음 동결보호제와 함께 제형화되었다.
- [1182] **C. 세포 회복 및 표현형의 평가**
- [1183] 온-컬럼 선택 및 자극 후 컬럼에서 방출된 CD3+, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 수율은 세포를 방출하기 위해 비오틴을 추가하여 컬럼에서 선택만 수행된 대안적 공정에서 컬럼에서 방출된 세포와 비교되었다. 도 18a에 도시된 바와 같이, CD3+ T 세포 수율, 뿐만 아니라 CD4+ 및 CD8+ T 세포 수율은 두 공정에서 유사하였다. 온-컬럼 선택 및 자극 후 컬럼에서 방출된 세포 중 자극 후 살아있는 세포의 총 세포 수 및 백분율을 대안적 공정에서 선택된 세포의 개별 자극 후 세포와 비교하였다. 도 18b 및 도 18c는 두 공정 모두에 대한 자극 후의 총 세포 수 및 살아있는 세포의 백분율을 각각 나타낸다. 이 실험에서, 세포 회복은 온-컬럼 자극을 사용하는 공정에서 더 컸다.
- [1184] 추가 5일 배양을 포함하는 프로세스의 경우, 각 프로세스에 의해 조작된 세포 집단의 품질 및 표현형이 배양 5일차(프로세스 시작부터 8일차)에 평가되었다. 도 19a 및 도 19b는 각각의 공정에 대해 각각 회수된 살아있는 T 세포의 백분율 및 예시적인 CAR(CAR+)을 발현하는 살아있는 세포의 백분율을 나타낸다. 5일 동안(공정 시작 후 8일째) 추가 배양 후 두 공정에서 생성된 조성물의 샘플을 CD4, CD8, CD27 및 CCR7을 포함하는 마커의 표면 발현에 대해 유세포 분석에 의해 평가했다. 도 19c는 추가 배양 후(5일째) 배양 마지막 날에 세포 조성물에 존재하는 살아있는 CD4+ T 세포의 백분율에 대한 선택 단계(대안적 공정) 또는 조합된 선택 및 자극 단계(온-컬럼 자극)로부터 수득된 CD4+ T 세포의 백분율의 비교를 제공한다.
- [1185] 도 19d는 온-컬럼 자극 공정에 의해 생성된 조성물에서 CD27-CCR7-, CD27+CCR7-, CD27+CCR7+ 및 CD27-CCR7+ T

세포의 백분율이 대안적 공정에 의해 생성된 세포 조성물에 존재하는 백분율과 유사함을 보여준다

[1186] **D. 온-컬럼 자극을 사용한 제조된 조작된 T 세포의 기능 평가**

[1187] 온-컬럼 자극을 포함하는 공정을 사용하여 제조된 조작된 T 세포의 기능적 능력은 시험관 내 및 생체 내 모두에서 평가되었다. 결과는 대안적 공정을 사용하여 제조된 조작된 T 세포와 비교되었다.

[1188] **1. 시험관 내 기능 분석**

[1189] 세포용해 활성은 5:1의 이펙터 대 표적 비율에서 CD19(HEK CD19)를 발현하는 HEK 세포와 조작된 항-CD19 CAR T 세포를 공동 배양함으로써 평가되었다. 세포 용해는 배양 중 여러 시점에서 수행된 임피던스 측정에 의해 결정되었다. 대조군 조건은 다른 표적(BCMA)에 대해 지시된 대체 CAR을 발현하는 T 세포(HEK CD19+ BCMA CAR), 표적 세포만(HEK CD19+만), 또는 항-CD19 CAR T 세포와 인큐베이션된 비-표적 세포(HEK CD19- & CD19 CAR)의 인큐베이션을 포함하였다. 도 20에 도시된 바와 같이, 세포용해 활성(HEK 세포 용해로 표시됨)은 표적 세포에 특이적이었고, 온-컬럼 자극 공정에 의해 제조된 CAR T 세포는 대체 공정에 의해 조작된 세포와 유사한 강력한 세포용해 활성을 나타내었다. 이러한 데이터는 온-컬럼 자극을 사용하여 제조된 조작된 T 세포가 대안적 공정을 사용하여 제조된 조작된 T 세포와 유사한 효능을 갖는다는 것을 입증한다.

[1190] 조작된 T 세포의 사이토카인 활성은 골지 억제제의 존재 하에 표적 세포주(CD19+ HEK 세포)로 항원 특이적 자극 후 사이토카인 축적을 모니터링함으로써 평가되었다. 표면 CD4, CD8 또는 항-CD19 CAR에 대해 공동 염색된 세포에서 IFN γ , IL-2 및 TNF- α 에 대한 세포내 사이토카인 염색 후 유세포 분석에 의해 사이토카인 생산을 평가했다. 도 21a-21c는 각각 IFN γ , IL-2, 및 TNF- α 를 발현하는 각각의 제조 공정으로부터 유래된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 서브세트의 백분율을 나타낸다. 두 가지 방법에 따라 제조되었지만 CAR 발현이 결여된 T 세포를 대조군으로 사용하였다. 이러한 데이터는 CAR T 세포 항원 특이적 사이토카인 생산이 제조 공정 사이에서 생산된 세포에서 유사함을 보여준다.

[1191] **2. 생체 내 기능 분석**

[1192] 온-컬럼 자극 및 대안적 조작 과정으로부터 생성된 항-CD19 CAR T 세포를 함유하는 T 세포 조성물의 항종양 활성을 생체내에서 비교하였다.

[1193] 면역저하된 NSG 마우스에 0일째에 5×10^5 B 세포 림프종 세포주(Raji)를 주사(i.v.)했다. 7일째에, 마우스에 온-컬럼 자극 또는 대체 공정에 의해 생성된 CAR+ 조작된 조성물로부터의 0.75×10^6 CAR+ T 세포를 주사하였다. 3명의 다른 기증자로부터 각 공정에 대해 3개의 제조 실행이 완료되었으며, 각각 생산된 조작된 CAR+ T 치료 세포 조성물이 테스트되었다. 도 22a-22c는 주사 전 각각의 조작된 치료 조성물의 CD4:CD8 비율, 형질도입 효율, 및 생존 세포의 백분율을 각각 나타낸다. 도시된 바와 같이, 비록 약간의 기증자 가변성이 관찰되었지만, 두 공정의 세포는 각 기증자에 대해 필적하는 조작된 세포를 생산하였다.

[1194] 종양 부담은 CAR-T 세포 투여 후 최대 41일까지 다양한 시점에서 생체 내 발광 영상화에 의해 측정되었다. 종양 주사 6일 후, 모든 처리 그룹의 동물은 유사한 종양 부담을 나타냈다(도 23). 도 24에 도시된 바와 같이, 종양 부담은 모든 처리 그룹에 걸쳐 시간이 지남에 따라 실질적으로 감소되었다. 이들 결과는 제조 공정에 의해 생산된 CAR+ 조작된 치료 T 세포 사이에 필적할만한 항종양 효능을 입증한다.

[1195] **E. 결론**

[1196] 동시에, 이러한 데이터는 선택된 T 세포가 형질도입을 포함한 공정의 후속 단계에서 사용하기 위해 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 자극의 개시 후 4.5시간 이내에 컬럼에서 수집되는 프로세스를 포함하여 조작된 T 세포(예: CAR+ T 세포)를 생산하는 프로세스에서 온-컬럼 선택 및 자극이 사용될 수 있음을 나타낸다. 상기 결과는 온-컬럼 선택 및 자극 프로세스가 대안적 공정에 필적하는 표현형 및 기능적 특징을 나타내지만, 단일 단계에서 선택 및 자극을 조합하는 능력으로 인해 더 효율적이고 더 짧은 시간에 수행될 수 있는 조작된(예: CAR+ 세포) 세포 조성물을 초래한다는 것을 입증한다.

[1197] **실시예 12: 컬럼 크로마토그래피를 통한 T 세포의 선택 및 자극.**

[1198] 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극제의 존재 하에 온-컬럼 자극으로 컬럼 기반 친화성 크로마토그래피에 의해 T 세포를 농축하기 위한 연구가 수행되었다. 이 연구는 추가의 예시적인 세포 표면 마커 CD27을 사용한 선택이 온-컬럼 자극에 의해 유도된 자발적인 세포 분리를 허용하는지 여부를 조사했다. 이 연구는 또한 크로마토그래피 컬럼 요소 외부에 구성된 가열 요소에 의해 가열된 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 온-컬럼 T 세포 선택 및 자

극에 의해 T 세포를 선택하고 자극하는 능력을 조사했다.

- [1199] 인간염 완충 식염수(PBS) 완충액에서, 다량체화된 스트렙타빈 뮤테인(예: STREP-TACTIN® M2, 서열번호 6) 10mg은 용매에 노출된 1차 아민기를 통해 8g(초기 건조 중량 기준)의 예폭시 활성화 폴리스티렌 수지(CY17030; Cytosorbents)에 연결되었다. 이어서, Fab 단편의 중쇄에 카르복실-말단 융합된 스트렙타비딘 결합 펩타이드(예: Twin-Strep-tag®, 서열번호 16)를 포함하는 항-CD27 Fab 선택제 1.8 mg을 STREP-TACTIN®-코팅 수지의 50% 현탁액(수지 총 부피 대 총 부피)에 첨가하였다. Twin-Strep-tag®를 통해 고정된 STREP-TACTIN® M2 다량체 시약에 대한 Fab 단편의 가역적 결합을 허용하기 위해 현탁액을 실온에서 1시간 동안 부드러운 진탕(gentle shaking) 하에 인큐베이션했다. 그 다음 항-CD27 Fab 단편 작용기화된 수지를 플라스틱 전체 규모 컬럼에 첨가하여 18-20mL의 베드 부피를 제공하였다. 사용하기 전에 컬럼을 0.5% 소 혈청 알부민(PBSA 완충액)을 함유하는 PBS로 평형화했다. 컬럼은 또한 가스 공급 요소, 특히 컬럼에 공기가 존재하도록 하기 위해 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함했다.
- [1200] 컬럼의 가열 요소는 컬럼을 둘러싸도록 설계된 재킷 부재의 일부였다. 재킷 부재는 컬럼을 둘러싸기 위해 함께 연결된 두 개의 재킷 구성 요소를 포함하였고, 각 재킷 구성 요소는 내부 표면을 따라 배열된 가열 코일을 함유하였다. 각 가열 코일은 외부 온수 공급을 위한 주입구와 배출구를 가졌다. 가열 코일이 있는 각 재킷 구성 요소는 위에서 아래로 컬럼 둘레의 절반을 둘러싸도록 설계되었으며, 재킷 구성 요소 내의 가열 코일도 마찬가지로 컬럼의 절반을 둘러쌌다. 재킷 구성 요소와 가열 코일은 함께 컬럼을 둘러싸고 있으며, 단, 세포와 시약이 컬럼 안팎으로 유입 및 유출될 수 있도록 하는 개구부를 제외하고는 컬럼을 둘러싸고 있다. 예를 들어, 예시적인 개략도는 도 25-28을 참조한다.
- [1201] 인간 기증자의 성분채집술 샘플을 친화성 컬럼에 로딩하고 두 단계의 세척을 수행했다. 샘플을 로딩한 후 30분 이상 경과한 후, 실시예 1에서와 같이 생성된 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약(항-CD3/항-CD28 올리고머 시약)에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 Fab 단편 및 항-CD28 Fab 단편 2000μg을 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 20 mL의 컬럼에 로딩하였고, 재킷 부재에 함유된 가열 코일을 통해 37° C에서 인큐베이션하였다. 약 4시간 후, 컬럼을 통해 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 약 80mL의 무혈청 기본 배지를 통과시켜 단일 단계로 컬럼으로부터 세포를 수집하였다. 항-CD27 Fab 선택제의 스트렙타비딘-결합 펩타이드(예: Twin Strep-Tag®)의 스트렙타비딘 뮤테인(예: STREP-TACTIN®)-코팅된 고정상 수지에 대한 결합을 방해하기 위해 추가 경쟁 물질을 첨가하지 않고(예를 들어, D-비오틴을 첨가하지 않고) 세포를 수집하였다. 대조군으로서 성분채집술 샘플을 항-CD27 친화성 컬럼에 로딩했지만 항-CD3/항-CD28 올리고머 자극 시약의 존재하에 인큐베이션하지 않았다. 대조군 조건의 경우, 선택 단계 후, D-biotin을 경쟁 물질로서 첨가하여 항-CD3 Fab의 Twin Strep-Tag®와 STREP-TACTIN® 간의 결합을 파괴하고, 방출된 세포를 중력 흐름에 의해 수집하였다.
- [1202] 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약으로 온-컬럼 자극을 개시하고 대략 4시간 후에, 수집된 세포를 CD27의 표면 발현에 대해 분석하였다. 도 32에 도시된 바와 같이, CD27의 하향조절은 항-CD27 선택제를 사용하여 친화성 컬럼에 고정된 T 세포의 온-컬럼 자극 후 4시간 동안 살아있는 CD45+ 세포에서 관찰되었다. 대조적으로, 항-CD27 친화성 컬럼에 고정된 세포가 올리고머 자극 시약과 함께 인큐베이션되지 않은 대조군 조건의 경우, D-비오틴을 사용한 용리에 의해 수집된 세포는 CD27의 양성 발현을 유지하는 대조군 샘플에서 수집된 T 세포의 높은 백분율에 의해 입증되는 바와 같이 CD27 하향조절을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 항-CD3/항-CD28 자극 시약으로 T 세포를 자극하면 선택된 수용체의 표면 발현이 하향 조절되어 친화성 컬럼에 대한 세포의 결합을 분리하거나 방해하기 위해 경쟁 시약을 추가가 필요 없이 컬럼에서 세포가 자발적으로 분리된다는 관찰과 일치한다.
- [1203] 이러한 결과는 세포를 선택하는 데 사용되는 세포 표면 마커가 세포 표면 마커를 통해 친화성 컬럼에 고정되어 있는 동안 세포의 온-컬럼 자극에 의해 하향조절될 수 있고, 이로써 세포 수집을 위해 세포를 방출하는 경쟁 물질을 사용하지 않고 컬럼으로부터 세포의 방출을 허용할 수 있음을 추가로 뒷받침한다. 이러한 결과는 또한 가열 요소를 포함하고 세포의 온-컬럼 자극 동안 컬럼 온도를 유지하고 가열하기 위해 컬럼을 둘러싸도록 구성된 재킷 부재의 유용성을 나타낸다.
- [1204] **실시예 13: 다중 선택 마커를 사용한 순차적 컬럼 크로마토그래피를 통한 T 세포의 선택 및 자극.**
- [1205] 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극은 2개의 개별 컬럼을 사용하여 수행되었다. 각 컬럼은 서로 다른 예시적인 선택제를 사용하여 준비하였으며, 제2 컬럼에서만 컬럼 온도를 약 37°C로 유지하기 위한 가열 장치로 구성된 온-컬럼 자극을 수행하였다. 제2 컬럼은 가스 공급 요소를 포함하고 실시예 12에 기술된 바와 같이 2개의 가열 코일을 포함하는 재킷 부재로 가열되었다.

- [1206] 실시예 12에 기재된 바와 같이 항-CD27 Fab를 사용하여 제1 컬럼을 제조하였다. 인간 기증자의 성분채집술 샘플을 제1 컬럼에 로딩하고 컬럼을 세척하였다. 샘플을 로딩한 후 30분 이상 경과한 후 D-biotin을 첨가하여 항-CD27 Fab의 Twin Strep-Tag®와 STREP-TACTIN®의 결합을 방해하여 제1 컬럼의 세포를 유리시켰다. 방출된 세포를 중력 흐름에 의해 수집하고, 세척하여 잔류 D-비오틴 오염을 제거하고, 선택제로 항-CD3 Fab를 사용하지만 실시예 12에서와 같이 제조된 제2 컬럼으로 통과시켰다. CD3 결합 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산된 CD3 결합 모노클로날 항체로부터 유래되었으며(ATCC® CRL-8001™; 또한 미국 특허번호 4,361,549 참조), Arakawa et al J. Biochem. 120, 657-662 (1996)에 기재된 항-CD3 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인(서열번호 31) 및 경쇄 가변 도메인(서열번호 32)을 함유하였다. 방출된 세포를 제2 컬럼으로 로딩한 후 30분 이상 경과한 후, 실시예 1에서와 같이 생성된 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약(항-CD3/항-CD28 올리고머 시약)에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 Fab 단편 및 항-CD28 Fab 단편 2000 μ g을 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 20 mL의 제2 컬럼에 로딩하였고, 재킷 부재에 함유된 가열 코일을 통해 37° C에서 인큐베이션하였다. 약 4시간 후, 제2 컬럼을 통해 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 약 80mL의 무혈청 기본 배지를 통과시켜 단일 단계로 제2 컬럼으로부터 선택된 세포를 수집하였다. 항-CD3 Fab 선택제의 스트렙타비딘-결합 펩타이드(예: Twin Strep-Tag®)의 스트렙타비딘 뮤테인(예: STREP-TACTIN®)-코팅된 고정상 수지에 대한 결합을 방해하기 위해 추가 경쟁 물질을 첨가하지 않고(예를 들어, D-비오틴을 첨가하지 않고) 세포를 수집하였다.
- [1207] 성분채집술 샘플의 세포와 각 컬럼의 양성 분획을 표면 CD3 및 CD27을 인식하는 항체로 염색하고 유세포 분석으로 정량화했다. 유세포 분석 결과를 도 33에 나타내었다. 성분채집술 샘플에서, 세포의 32.3%는 CD3+CD27+였다. CD27 및 CD3 선택은 CD27 선택 후 87.5%의 순도 및 CD3 선택 후 96.2%의 순도로 CD3+CD27+ 세포의 고농축으로 이어졌다. 제2 컬럼의 온-컬럼 자극은 CD3 표면 발현의 하향 조절로 이어진 반면, CD27 표면 발현은 상대적으로 보존되었다. 이러한 결과는 표면 수용체 발현의 자극 유도된 하향조절이 온-컬럼 자극 동안 선택된 세포가 결합되는 수용체에 특이적이라는 관찰과 일치한다.
- [1208] **실시예 14: 상이한 가열 구성을 사용한 T 세포의 선택 및 자극.**
- [1209] 온-컬럼 T 세포 선택 및 크로마토그래피 컬럼 요소 외부에 배치된 가열 요소의 상이한 구성에 의해 가열된 크로마토그래피 컬럼을 사용한 자극에 의해 T 세포를 선택하고 자극하는 능력을 평가했다. 각 컬럼은 실시예 13에 기술된 바와 같이 T 세포의 선택을 위한 항-CD3 Fab로 준비되었으며, 각 컬럼은 가스 공급 요소, 특히 나사식 공기 필터용 가스 공급 커넥터를 포함했다.
- [1210] 각 컬럼의 가열 요소는 컬럼을 둘러싸도록 설계된 재킷 부재의 일부였다. 하나의 구성에서, 재킷 부재는 실시예 12에 기재된 바와 같았다. 예를 들어, 예시적인 개략도는 도 25-28을 참조한다.
- [1211] 제2 구성의 경우 재킷 부재에는 컬럼 둘레의 3분의 1을 위에서 아래로 감싸도록 설계된 3개의 재킷 구성 요소가 포함되어 있으며, 함께 재킷 구성 요소를 연결하여 컬럼을 둘러싸도록 했다. 각 재킷 구성 요소는 전기 온도 센서와 전기 가열 요소로서 금속판을 포함하였다. 각각의 금속판은 알루미늄 프로파일을 갖고, 전기 절연층은 각 금속판과 알루미늄 프로파일 사이에 배치되었다. 각 금속판은 재킷 구성 요소의 내부 표면에 장착되었으며 각 재킷 구성 요소에는 온도 센서와 금속판에 대한 전기 연결 지점이 있다. 동시에, 세 개의 금속 판이 컬럼의 둘레 주위에 균등하게 이격되어 있고 재킷의 내부가 컬럼과 직접 접촉되도록, 재킷 구성 요소는 세포와 시약의 주입구와 배출구를 컬럼 안쪽으로 허용하는 개구부를 제외하고 컬럼을 둘러싸고 있었다. 예를 들어, 예시적인 개략도는 도 29-31을 참조한다.
- [1212] 온-컬럼 T 세포 선택 및 자극은 컬럼의 내부 캐비티를 가열하는 조건 하에 상기 재킷 성분 각각이 컬럼 주위에 구성되는 컬럼 기반 친화성 크로마토그래피를 사용하여 수행되었다. 각 구성된 컬럼에 대하여, 인간 기증자의 성분채집술 샘플을 친화성 컬럼에 로딩하고, 샘플의 CD3+ T 세포가 수지에 고정된 CD3 결합 Fab 단편과 상호작용하도록 하였다. 컬럼을 PBSA 완충액으로 2회 세척하여 고정된 CD3 결합 Fab 단편과 상호작용하지 않는 세포를 제거하였다. 샘플을 컬럼에 로딩한 후 약 15분 후, 적어도 2000 μ g의 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약(올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 시약)에 가역적으로 결합된 다량체화된 항-CD3 Fab 단편 및 항-CD28 Fab 단편(자극제)을 컬럼에 로딩하여 자극 시약을 컬럼에 첨가하였고, 상기 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이, 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15, 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 20mL에 세포를 자극하는 조건 하에 컬럼 상에서 세포를 인큐베이션하였다. 인큐베이션 동안 금속 기반 가열 요소를 사용하여 가열된 컬럼은 30° C, 35° C 또는 37° C의 온도에서 유지되었다. 참고로, 가열 코일(예: 물-기반 가열 요소)을 이용하여 가열한 컬럼은 37° C로 일정하게 유지하였다. 가스 공급 요소는 인큐베이션 중에 연결된 개방형 멸균 필터의 제어 하에 공기를 공급했다.

- [1213] 항-CD3/항-CD28 올리고머 시약과 함께 온-컬럼 자극하는 동안, 선택된 CD3+ T 세포는 세포와 수지 사이의 결합을 방해하기 위해 경쟁 시약을 추가할 필요 없이 컬럼에서 자발적으로 분리되었다. 자극제를 첨가한 후 약 4.5 시간 이내에 글루타민 및 재조합 IL-2, IL-15 및 IL-7을 함유하는 무혈청 기본 배지 약 80mL를 컬럼에 통과시켜 컬럼에서 자발적으로 분리된 세포를 단일 단계로 수집하였고, 중력 흐름에 의해 세포를 수집하였다. 항-CD3 Fab 선택제의 스트렙타비딘-결합 펩타이드(예: Twin Strep-Tag®)와 스트렙타비딘 뮤테인(예: STREP-TACTIN®)-코팅된 고정상 수지의 상호작용을 통해 중력 흐름에 의해 수집되기 전에, 컬럼에 세포의 결합을 방해하기 위해 더 이상의 경쟁 물질(예: D-비오틴 첨가 없음)을 컬럼에 추가하지 않았다. 그런 다음 수집된 세포를 염색하고 CD3, CD4, CD8 및 CD69 표면 발현뿐만 아니라 생존 세포의 수 및 백분율에 대해 정량화했다.
- [1214] 도 34a-34e에 도시된 바와 같이, 온-컬럼 선택 및 세포 자극 후 컬럼으로부터 수집된 세포의 CD3+ 고갈 효율(도 34a), CD4 및 CD8 발현(도 34b), 및 CD69 발현(도 34c)은 재킷 부재(물 및 금속 기반 가열 요소)가 있는 컬럼을 사용하여 유사했다. 결과는 또한 30° C와 37° C 사이의 인큐베이션 온도에서 일관되었다. 도 34d 및 도 34e에 도시된 바와 같이, 인큐베이션 온도 전반에 걸쳐 금속 기반 가열 요소가 있는 컬럼을 사용하여 수집된 생존 세포의 수(도 34e) 및 백분율(도 34d)에서 더 많은 변동이 있었다.
- [1215] 위의 예의 결과와 함께 이러한 결과는 세포의 온-컬럼 자극 동안 컬럼 온도를 가열하고 유지하기 위한 다양한 유형의 가열 요소 및 구성의 유용성을 나타낸다.
- [1216] 본 발명은 본 발명의 다양한 측면을 설명하기 위해, 예를 들어 제공되는 특정 개시된 구현예로 범위를 제한하려는 것이 아니다. 기술된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본 명세서의 기재 및 가르침에서 명백해질 것이다. 상기 변형은 본 개시의 진정한 범위와 정신에서 벗어나지 않고 실시될 수 있으며, 본 개시의 범위에 속하도록 의도된다.

[1217] 서열

번호	서열	설명
1	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFI VTAGADGALTGTYESAVGNAESR YVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	스트렙타비딘 종: 스트렙토마 이세스 아비디니 UniProt No. P22 629
2	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIl eValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValG lyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAla ThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTy rArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaG luAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsn AlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSe rAlaAlaSer	최소 스트렙타비 딘 종: 스트렙토 마이세스 아비디 니
3	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFI VTAGADGALTGTYYTARGNAESR YVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	뮤테인 스트렙타 비딘 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ - Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 종: 스트렙토마 이세스 아비디니
4	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIl eValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgG lyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAla ThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTy rArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaG luAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsn AlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSe rAlaAlaSer	뮤테인 스트렙타 비딘 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ - Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 종: 스트렙토마 이세스 아비디니
5	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFI VTAGADGALTGTIYGARGNAESR YVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINT QWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDA AKKAGVNNGNPLDAVQQ	뮤테인 스트렙타 비딘 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ - Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 종: 스트렙토마 이세스 아비디니
6	MetGluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIl eValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgG lyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAla ThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTy rArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaG luAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsn AlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSe rAlaAlaSer	뮤테인 스트렙타 비딘 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ - Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ 종: 스트렙토마 이세스 아비디니
7	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	스트렙타비딘 결 합 펩타이드, St rep-tag®

[1218]

8	WSHPQFEK	Strep-tag® II
9	His-Pro-Xaa	스트렙타비딘 결합 펩타이드 Xaa는 Gln, Asp, 및 Met에서 선택됨
10	His-Pro-Gln-Phe	스트렙타비딘-결합 펩타이드
11	Xaa ₁ -Xaa ₂ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₃ -Xaa ₄	스트렙타비딘-결합 펩타이드 Xaa ₁ 는 Trp, Lys 또는 Arg임; Xaa ₂ 는 임의의 아미노산임; Xaa ₃ 는 Gly 또는 Glu임 Xaa ₄ 는 Gly, Lys 또는 Arg임
12	-Trp-Xaa ₁ -His-Pro-Gln-Phe-Xaa ₂ -Xaa ₃ -	스트렙타비딘-결합 펩타이드 Xaa ₁ 는 임의의 아미노산임; Xaa ₂ 는 Gly 또는 Glu임 Xaa ₃ 는 Gly, Lys 또는 Arg임
13	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	스트렙타비딘-결합 펩타이드의 순차 모듈 Xaa는 임의의 아미노산임; n은 8 또는 12임
14	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	스트렙타비딘-결합 펩타이드의 순차 모듈 n은 2 또는 3임
15	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
16	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
17	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
18	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
19	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	Twin-Strep-tag
20	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	HA-tag

[1219]

21	Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys	VSV-G-tag
22	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV-tag
23	Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	T7 에피토프
24	Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp	HSV 에피토프
25	Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Myc 에피토프
26	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	V5-tag
27	EAGITGTWYNQLGSTFIIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYENAHSAATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ and Glu ¹¹⁷ , Gly ¹²⁰ , Tyr ¹²¹ (뮤테인 m1-9) 종: 스트렙토마이세스 아비디니
28	DPSKDSKAQWSAAEAGITGTWYNQLGSTFIIVTAGADGALTGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYENAHSAATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ and Glu ¹¹⁷ , Gly ¹²⁰ , Tyr ¹²¹ (뮤테인 m1-9) 종: 스트렙토마이세스 아비디니
29	AMQVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFS LTTFGVHWR QSPGKGLEW L GVIWASGITD YNVPFMSRLS ITKDNSKSQV FFKLNSLQPD DTAIYYC AKN DPGTGFAVWG QGTLVTVSAG STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALG CLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSQVH TTPAVLQSSG LYSLSVVTV PSS SLGTQTY ICNVNHPKSN TKVDKKVEPK SCGSAWSHPQ FEKGGGSGGG S GGSWSHPQ FEK	Fab 단편 m13B8. 2의 가변 중쇄
30	AMDIQMTQSP ASLSASVGET VTFTCRASEM IYSYLAWYQQ KQGKSPQLL V HDAKTLAEGV PSRFSGGGSG TQFSLKINTL QPEDFGTYIC QAHYGNP PTF GGGTKLEIKR GIAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLN FYPRE AKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLSKADYEK HKV YACEVTH QGLSSPVTKS FNRGECGS	Fab 단편 m13B8. 2의 가변 경쇄
31	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg P ro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Ty r 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 L ys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Ty r 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	항-CD3 항체 OKT 3의 가변 중쇄

[1220]

32	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	항-CD3 항체 OKT 3의 가변 경쇄
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	항-CD28 항체 CD 28.3의 가변 중쇄
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	항-CD28 항체 CD 28.3의 가변 경쇄
35	His-Asn-His-Arg-His-Lys-His-Gly-Gly-Gly-Cys	MAT tag
36	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr ⁶⁵ Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	huOKT3의 가변 중쇄

[1221]

37	Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala S er Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Ar g Ser Ile Ser Gln Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pr o Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln P ro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Gl u Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	huOKT8의 가변 경쇄
38	-PGGG-(SGGGG) ₅ -P-	링커 P는 프롤린, G는 글리신 및 S는 세린임
39	GSADDAKKDAAKDKGS	링커
40	MLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR 알파 사 슬 (아미노산)
41	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacacccagcatt cctcctgatccca	GMCSFR 알파 사 슬 (핵산)
42	MALPVTALLPLALLHA	CD8 알파 신호 펩타이드
43	MLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTS ISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRDL HAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLESKEISDGDWIIISGNKNC YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDC VSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPRFVENSEICQHPECLPQAMNITCTGRGP DNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCT GPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMVALLLLVVALGIGLFM	잘린 표피 성장 인자 수용체 (tE GFR)
44	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI S GDLHILPVAFRGDSFTHTPP LDPOELDI LKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLA VVSLNITSLGLESKEISDGDWIIISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGE PRFVENSEICQHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATGMV GALLLLVVALGIGLFM	잘린 표피 성장 인자 수용체 (tE GFR)
45	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
46	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
47	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A
48	EGRGSLTTCGDVEENPGP	T2A
49	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
50	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
51	DYGVS	CDR H1
52	VIWGETTYNSALKS	CDR H2
53	YAMDYWG	CDR H3

[1222]

54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	RASQDISKYLN	CDR L1
56	SRLHSGV	CDR L2
57	HTSRLHS	CDR L2
58	GNTLPYTFG	CDR L3
59	QQGNTLPYT	CDR L3
60	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWG SETTYNNSALKSRLTIKDNKSKQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYGGSYA MDYWGQGTSTVTSS	VH
61	DIQMTQTTSSLASLGDEVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEI T	VL
62	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	링커
63	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgagccg ggtgacatcagctgccggccagccaggacatcagcaagtaactggaactggt atcagcagaagcccagcgcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccgg ctgcacagcggcgtgccagccggttagcggcagcggctccggcaccgacta cagcctgacatctccaacctggaacaggaagatatcgccaactactttggc agcaggsgcaacacactgcctacacctttggcggcggaacaagctggaatc accggcagcacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcgaccacaa ggcgaggtgaagctgaggaaagcgccctggcctggtggccccagccaga gcctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgcccactacggcgtg agctgcatccggcagccccccaggaaggcctggaatggtggcgtgatctg ggcagcggagaccactactacaacagcgcctgaagagccggctgacctca tcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc gacgacaccgcatctactactgcgccaagcactactactacggcgagccta cgccatggactactggggccaggcgaccagcgtgacctgagcagc	scFv 암호화 서 열
64	DIQMTQTTSSLASLGDEVTISCRASQDI SKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSR LHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEI TGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGV SWIRQPPRKGLEWLGVIWGETTYNNSALKSRLTIKDNKSKQVFLKMNSLQ TDDITAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTSS	scFv
65	SYWMN	CDR H1
66	QIYPGDGDTNNGKFKG	CDR H2
67	KTISSVVDFFFDY	CDR H3
68	QQYNRYPYT	CDR L3
69	SYWMN	CDR H1
70	QIYPGDGDTNNGKFKG	CDR H2
71	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWKQRPQGGLWIGQIYP GDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVD FFFDYWGQGTSTVTSS	VH

[1223]

72	DI ELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAVYQQKPGQSPKPLIYSATY RNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEI KR	VL
73	KASQNVGTINVA	CDR L1
74	SATYRNS	CDR L2
75	QQYNRYPYT	CDR L3
76	SYWMN	CDR H1
77	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
78	KTISSVVDFFDY	CDR H3
79	GGGSGGGSGGGGS	링커
80	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGGLWIGQIYP GDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVD FYFDYWGGGTTVTSSGGGSGGGSGGGGSDIELTQS PKFMSTSVGDRVSVT CKASQNVGTNVAVYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
81	ESKYGPPCPPCP	스페이서 (IgG4 힌지) (aa) 호모 사파엔스
82	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCTTGCCT	스페이서 (IgG4 힌지) (nt) 호모 사파엔스
83	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	힌지-CH3 스페이 서 호모 사파엔스
84	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SKGGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK	힌지-CH2-CH3 스 페이서 호모 사파엔스
85	RWPESPKAQASVPTAQPAEGSLAKATTAPATRTNTRGGGEEKKEKEKEEQ EERETKTPECSHTQPLGVYLLT PAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTW EVAGKVPTGGVEEGLLEHNSNGSQSHSRLTLPSLWNAGTSVTCTLNHPSLP PQRLMALREPAQAAPVKLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLE DQREVNTSGFAPARPPPPQGSTTFWAWSVLEVPAPSPQPATYTCVVSHEDSR TLNLSRSLEVSIVTDH	IgD-힌지-Fc 호모 사파엔스
86	Glu Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys P ro	예시적인 IgG 힌 지
87	X ₁ PPX ₂ P X ₁ 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌임 X ₂ 는 시스테인 또는 트레오닌임	예시적인 IgG 힌 지
88	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro C ys Pro	예시적인 IgG 힌 지

[1224]

89	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	예시적인 IgG 힌지
90	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDT PPPCPRCP	예시적인 IgG 힌지
91	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	예시적인 IgG 힌지
92	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	예시적인 IgG 힌지
93	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	예시적인 IgG 힌지
94	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	예시적인 IgG 힌지
95	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁번호 P10747의 아미노산 153-179) Homo sapien
96	IEVMYPPPYLDNEK.SNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWWLVVVGGVLACY SLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁번호 P10747의 아미노산 114-179) 호모 사피엔스
97	RSKRSRLHSDYMNMTPRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYES	CD28 (P10747의 아미노산 180-220) 호모 사피엔스
98	RSKRSRGHSDYMNMTPRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYES	CD28 (LL to GG) 호모 사피엔스
99	KRGKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFP EEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1의 아미노산 214-255) 호모 사피엔스
100	RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPENGGKPRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스
101	RVKFSRSAEPPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPENGGKPRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스
102	RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVL DKRRGRDPENGGKPRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스

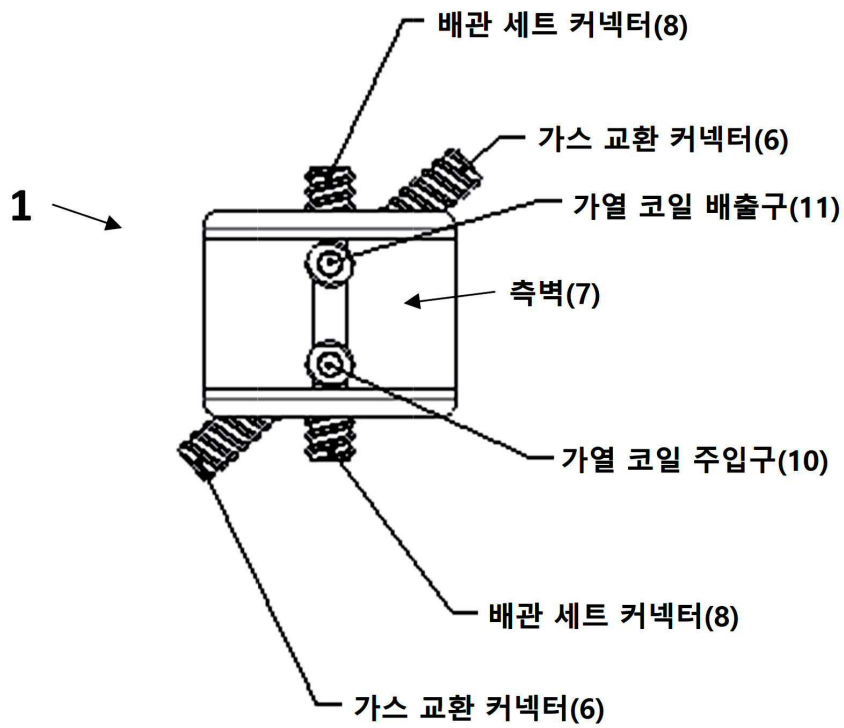
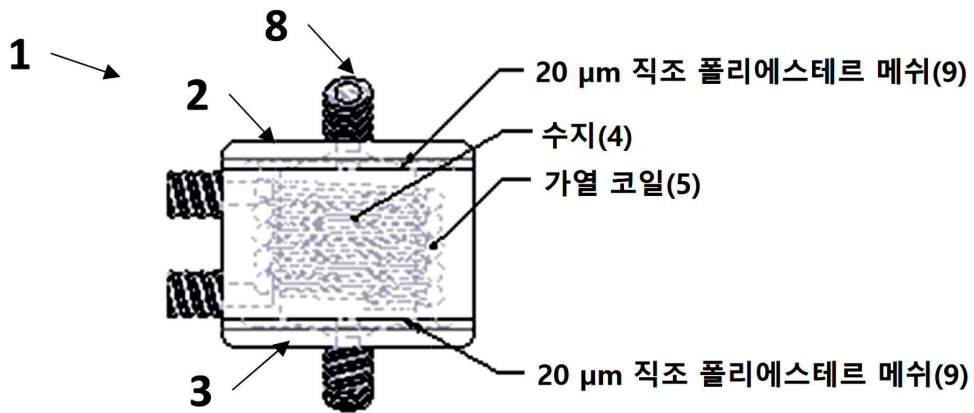
[1225]

103	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrGluSerAlaValGlyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	초기 메티오닌 없는 최소 스트렙타비딘 종: 스트렙토마이세스 아비디니
104	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrValThrAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	류테인 스트렙타비딘 Val ⁴⁴ -Thr ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ , 초기 메티오닌 없음 종: 스트렙토마이세스 아비디니
105	GluAlaGlyIleThrGlyThrTrpTyrAsnGlnLeuGlySerThrPheIleValThrAlaGlyAlaAspGlyAlaLeuThrGlyThrTyrIleGlyAlaArgGlyAsnAlaGluSerArgTyrValLeuThrGlyArgTyrAspSerAlaProAlaThrAspGlySerGlyThrAlaLeuGlyTrpThrValAlaAlaTrpLysAsnAsnTyrArgAsnAlaHisSerAlaThrThrTrpSerGlyGlnTyrValGlyGlyAlaGluAlaArgIleAsnThrGlnTrpLeuLeuThrSerGlyThrThrGluAlaAsnAlaTrpLysSerThrLeuValGlyHisAspThrPheThrLysValLysProSerAlaAlaSer	류테인 스트렙타비딘 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ -Ala ⁴⁶ -Arg ⁴⁷ , 초기 메티오닌 없음 종: 스트렙토마이세스 아비디니
106	ASTKGPSVFPLAPCSSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKVERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI SVEWESNGQPENNYKTTTPMILDS DGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK	인간 IgG2 Fc (Uniprot P01859)
107	ASTKGPSVFPLAPCSSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSLRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSLGK	인간 IgG4 Fc (Uniprot P01861)
108	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGKKMDS SRDNRKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL E	FKBP

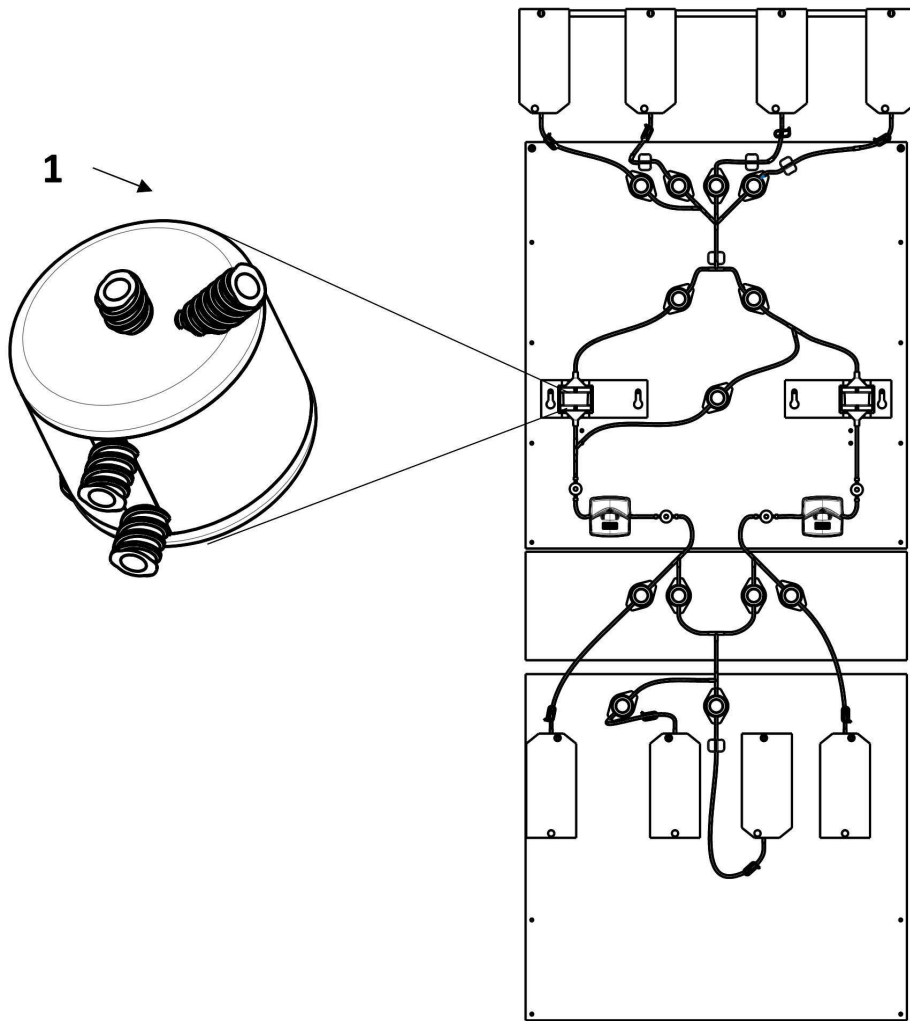
109	GVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLDGKKVDS SRDNRKPFK FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAYGATGHPGII PPHATLVFDVELLKL E	FKBP12v36
110	MGSNKS KPKDASQRER	변형된 아실화 모티프
111	Met-Gly-Cys-Xaa-Cys	이중 아실화 모티프
112	Cys-Ala-Ala-Xaa	아실화 영역

도면

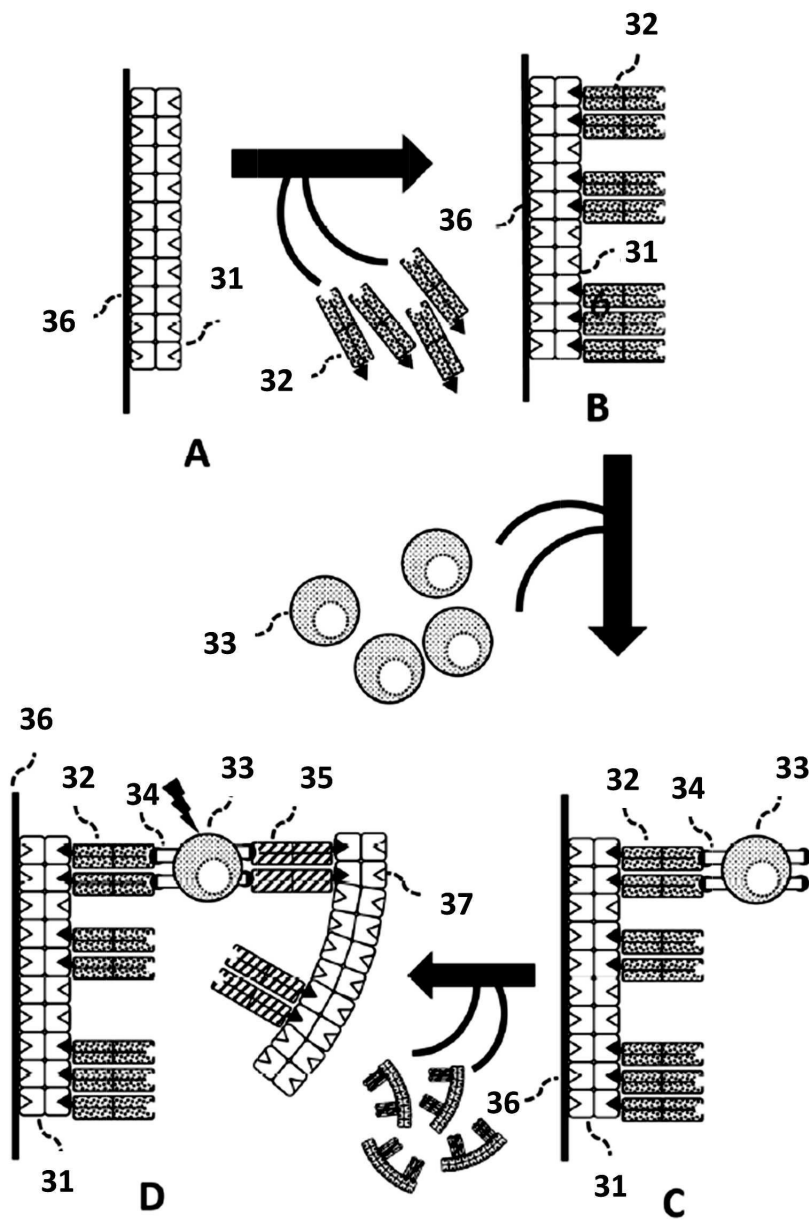
도면1a



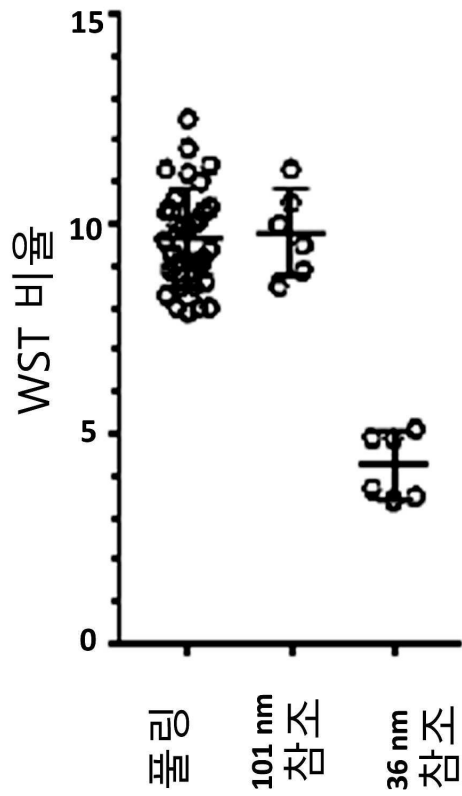
도면1b



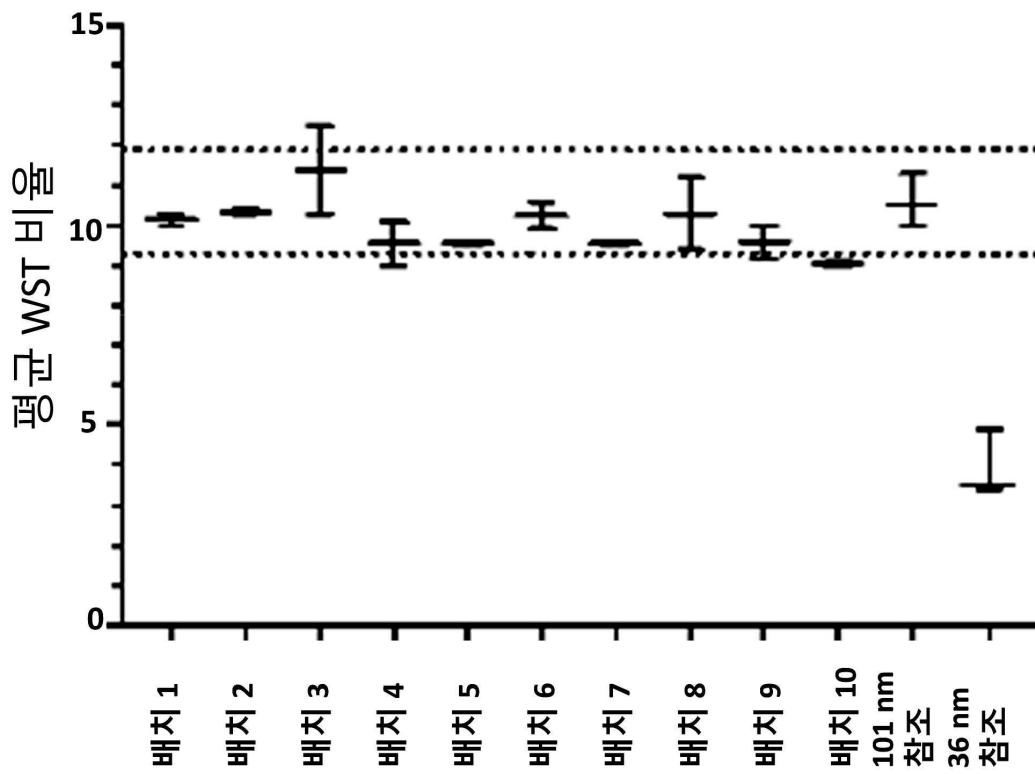
도면2



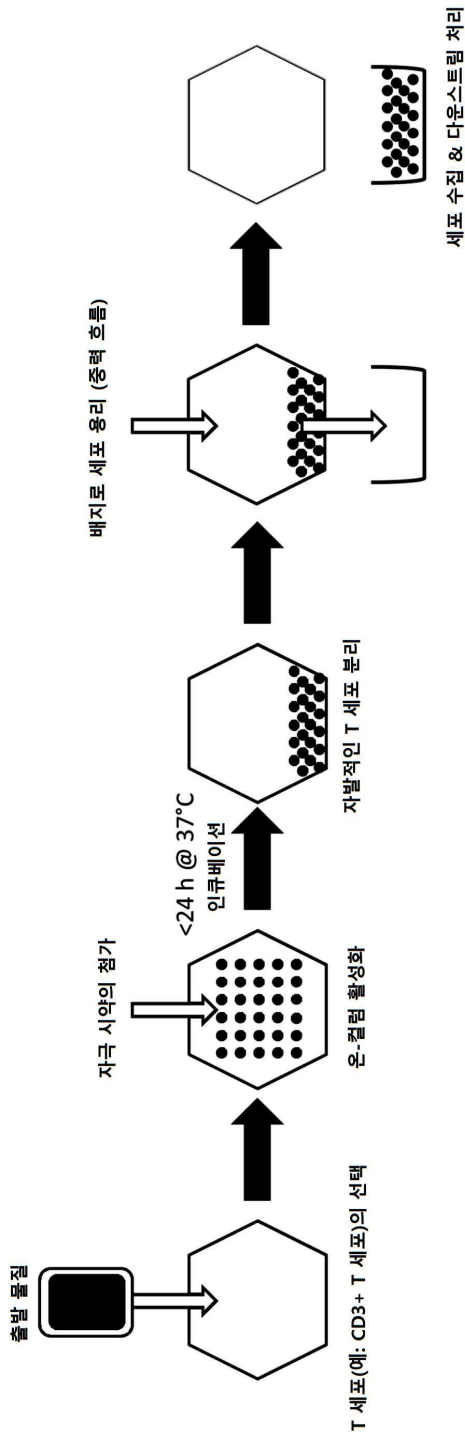
도면3a



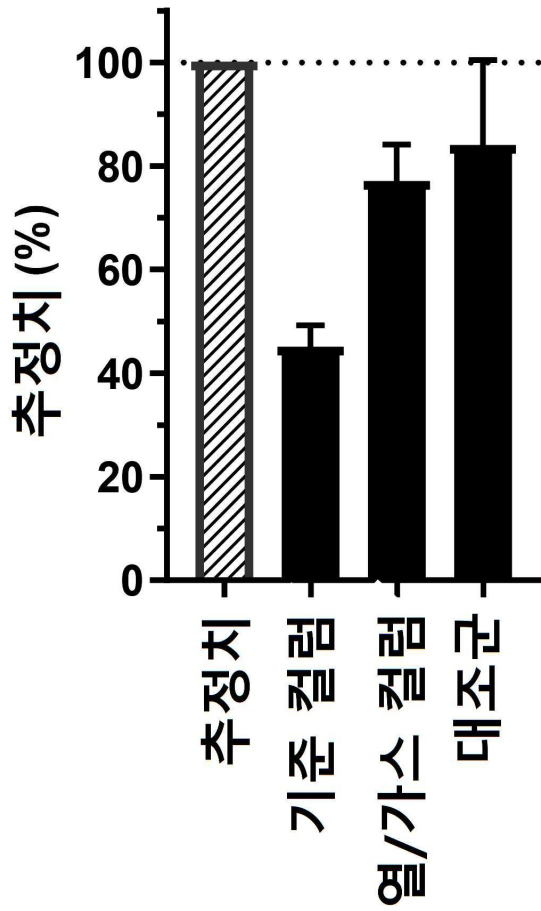
도면3b



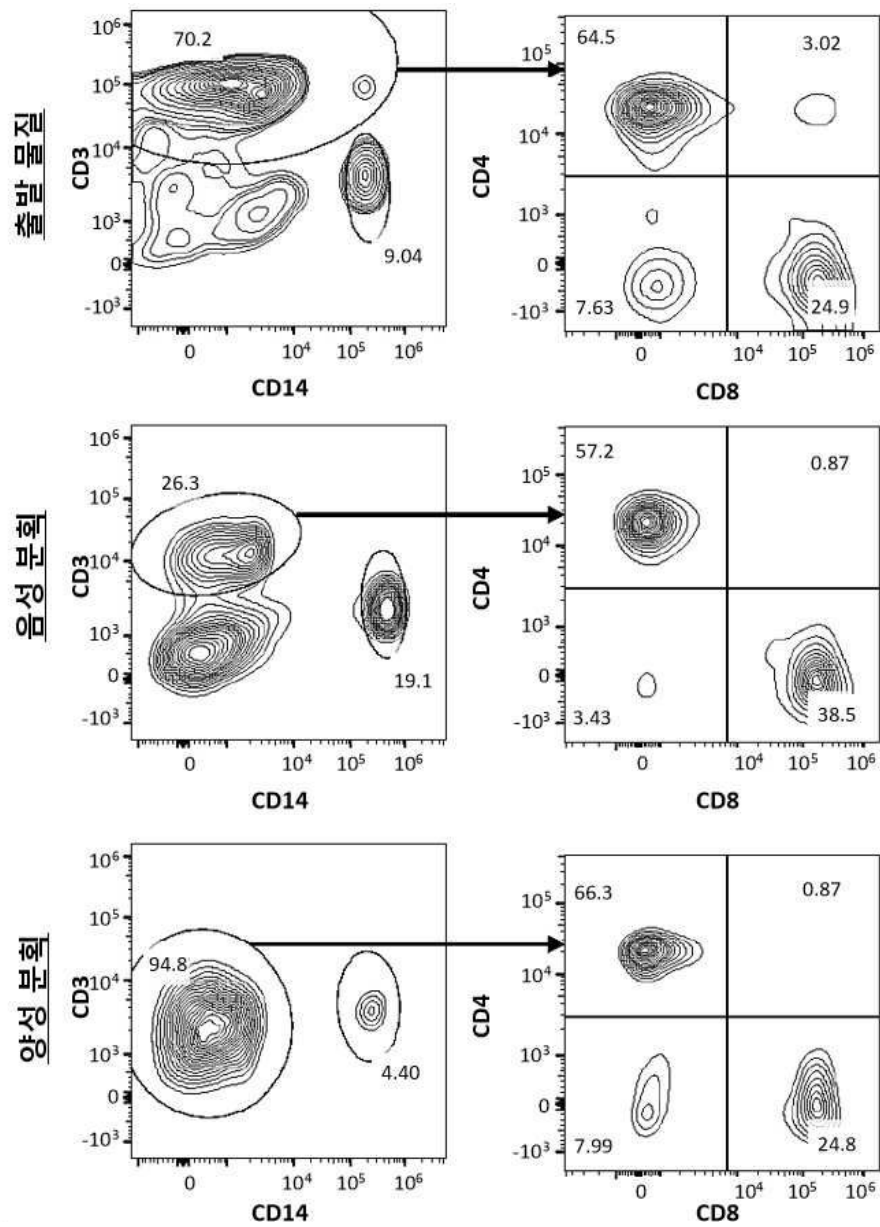
도면4



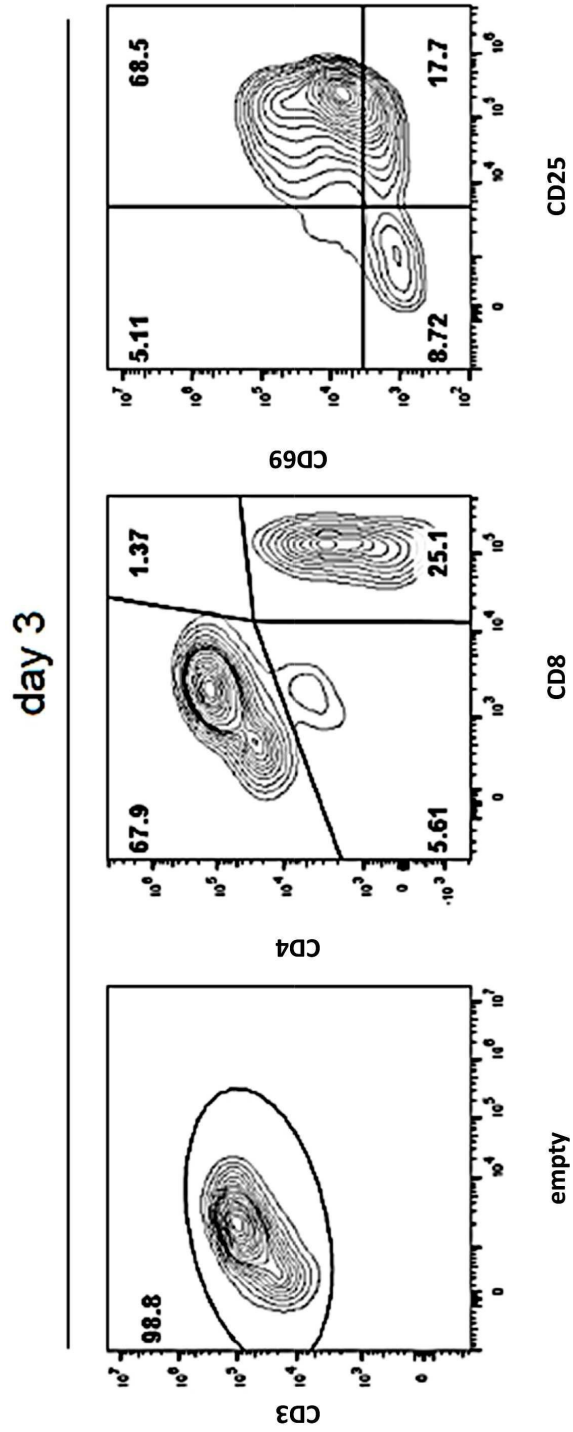
도면5



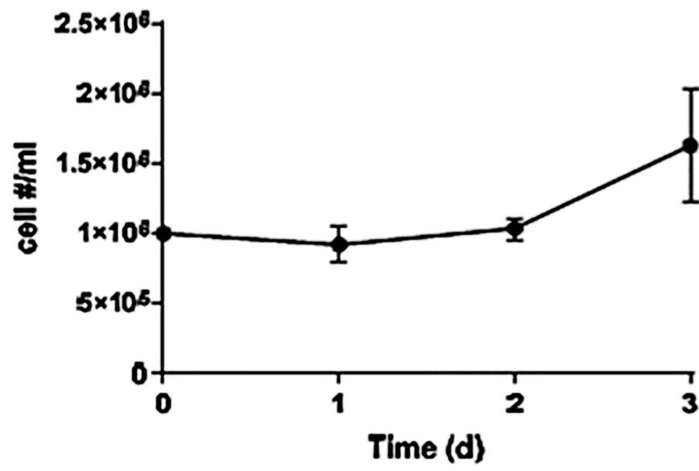
도면6



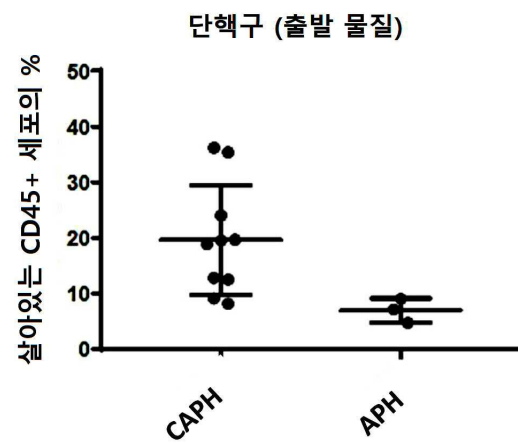
도면7a



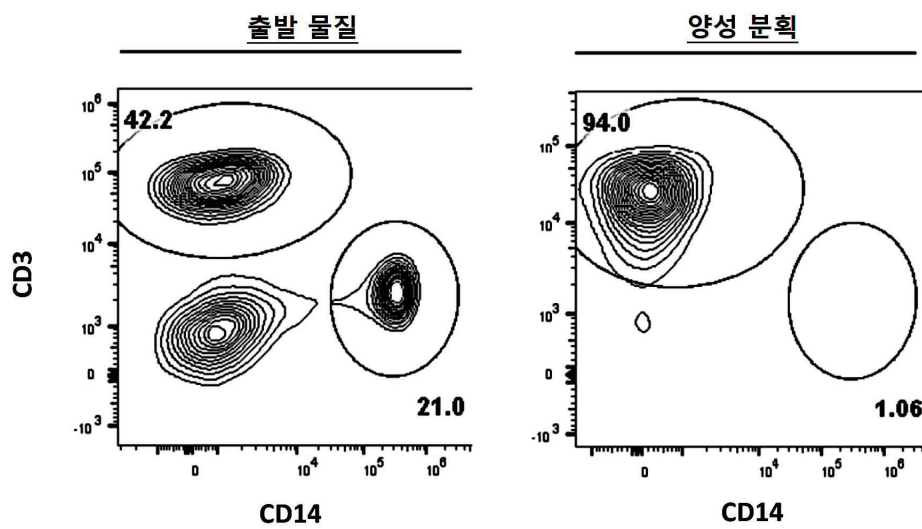
도면7b



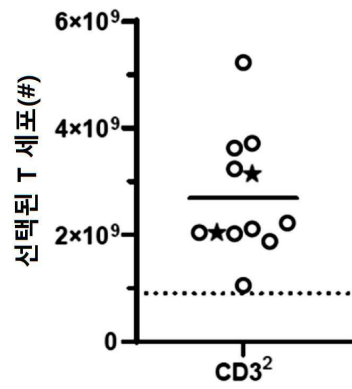
도면8a



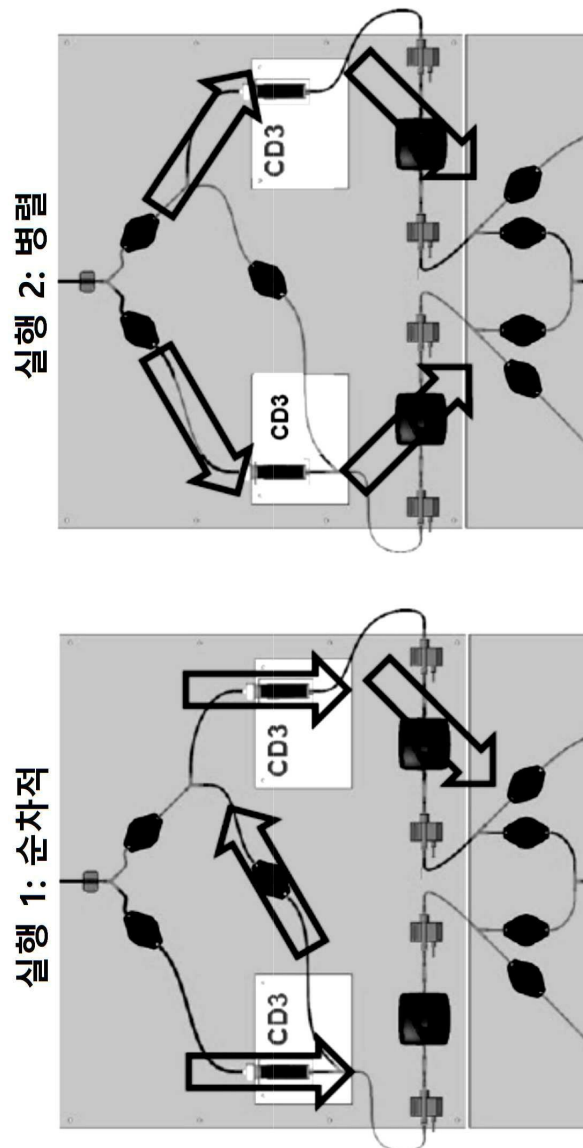
도면8b



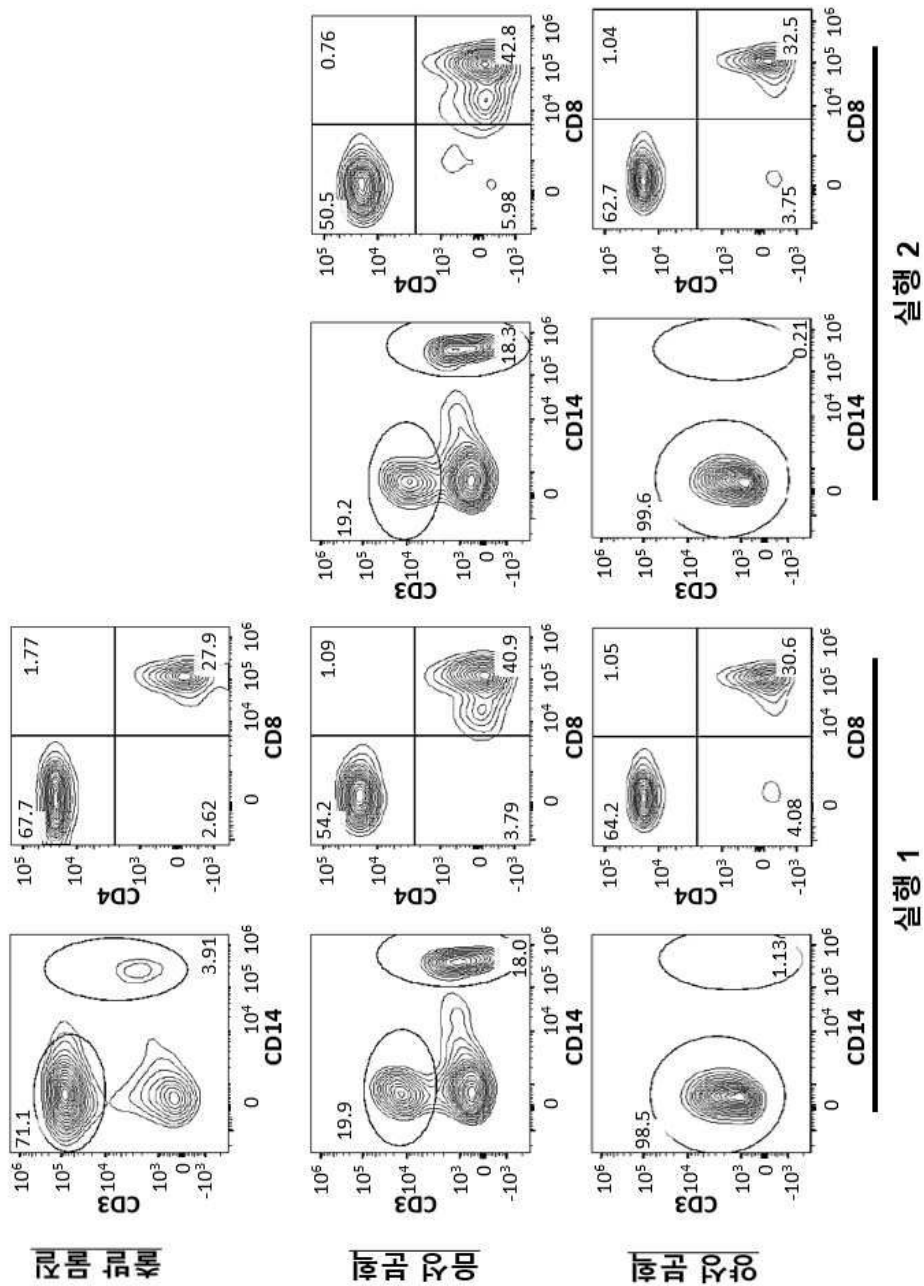
도면8c



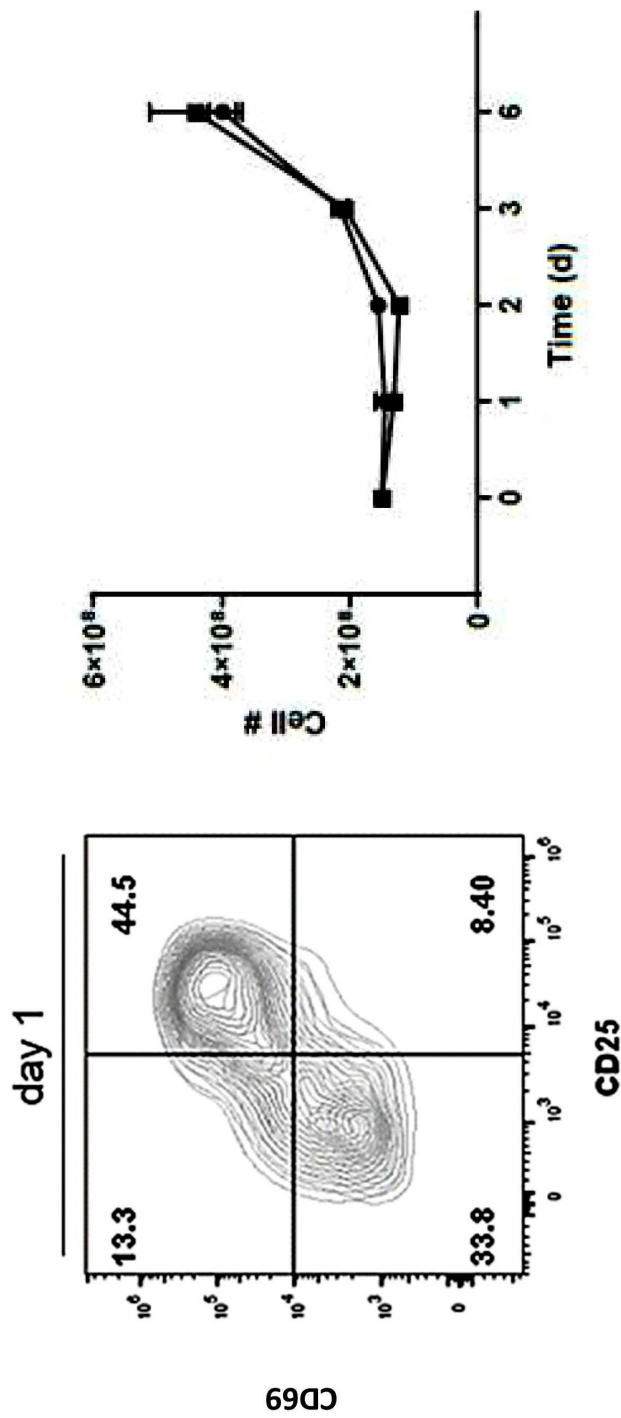
도면9



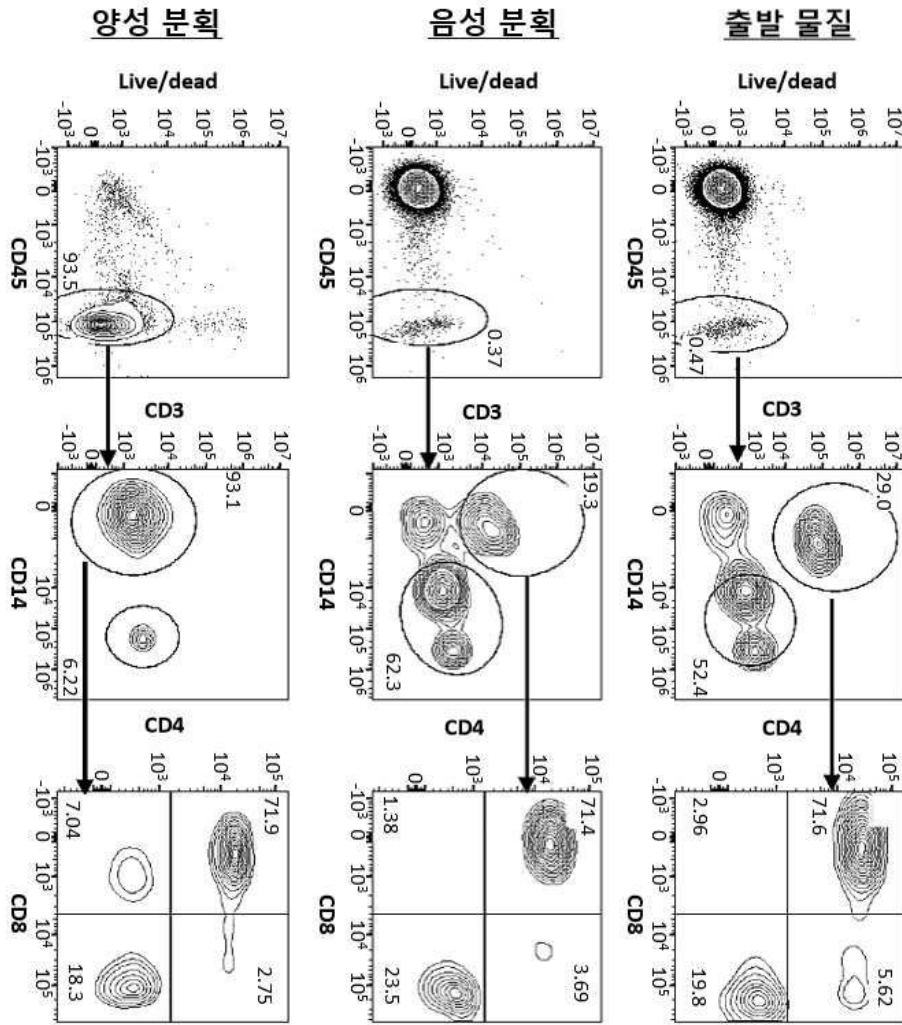
도면10a



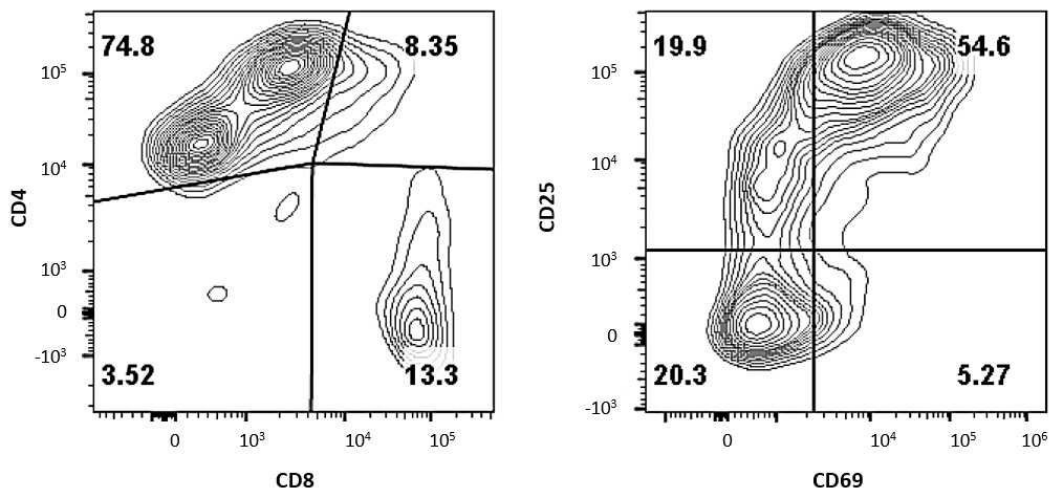
도면10b



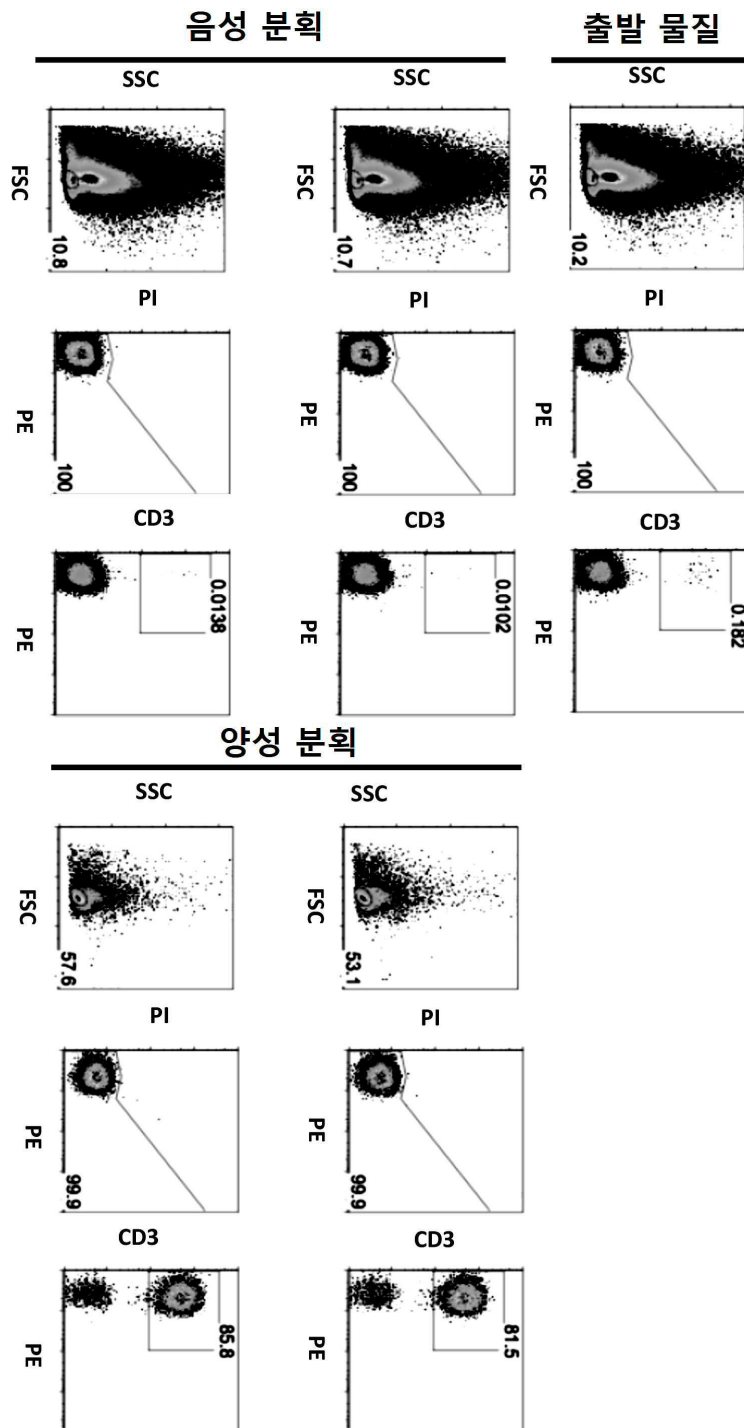
도면11a



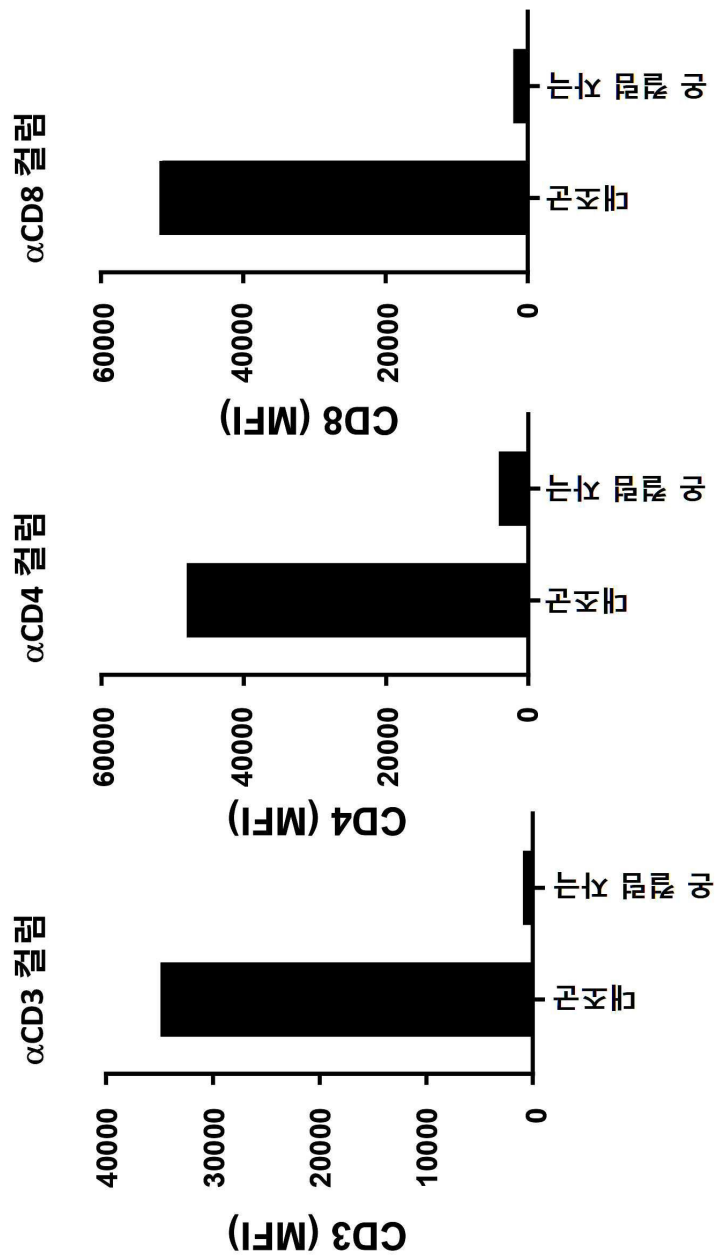
도면11b



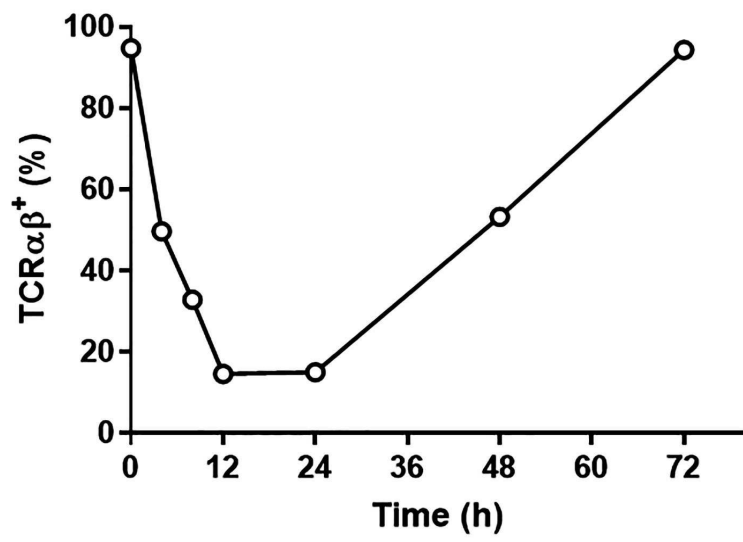
도면12



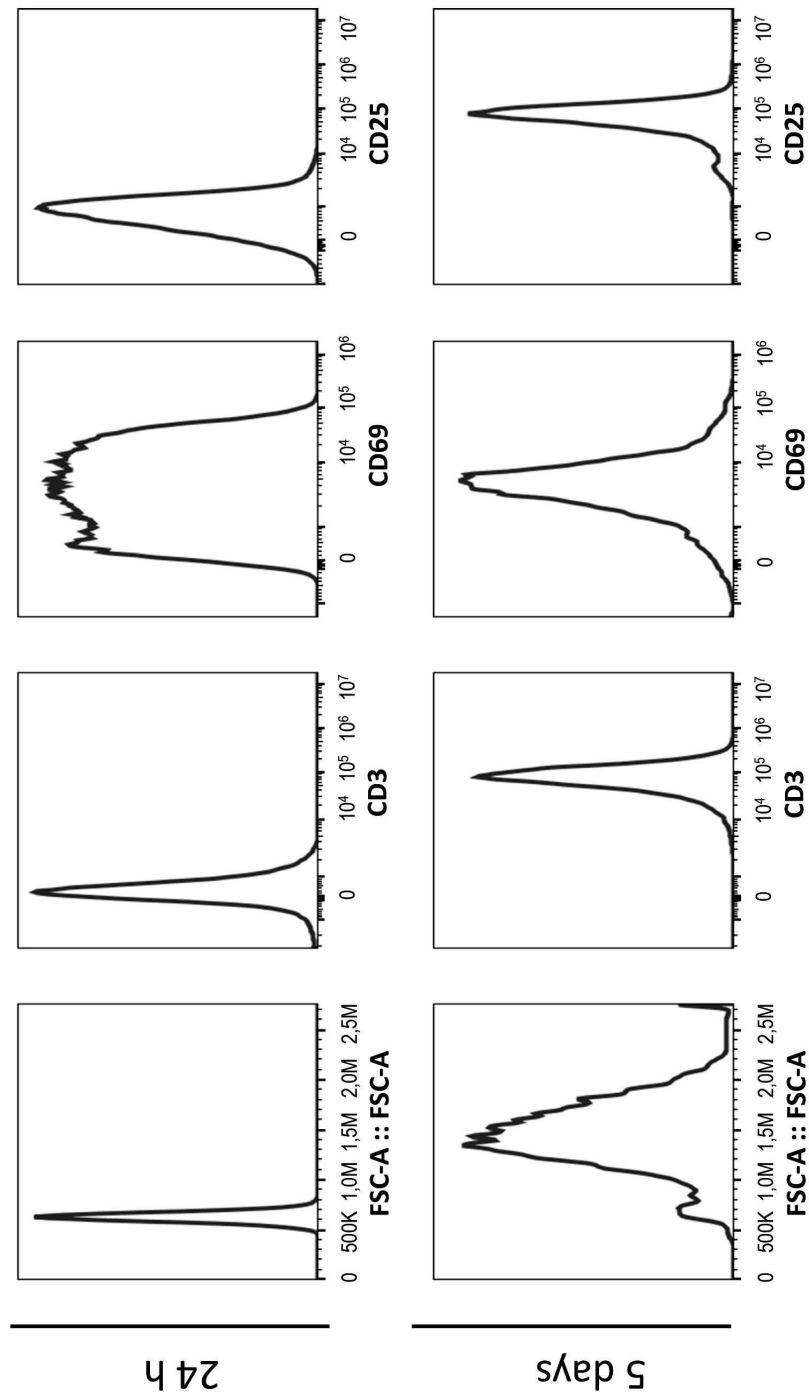
도면13



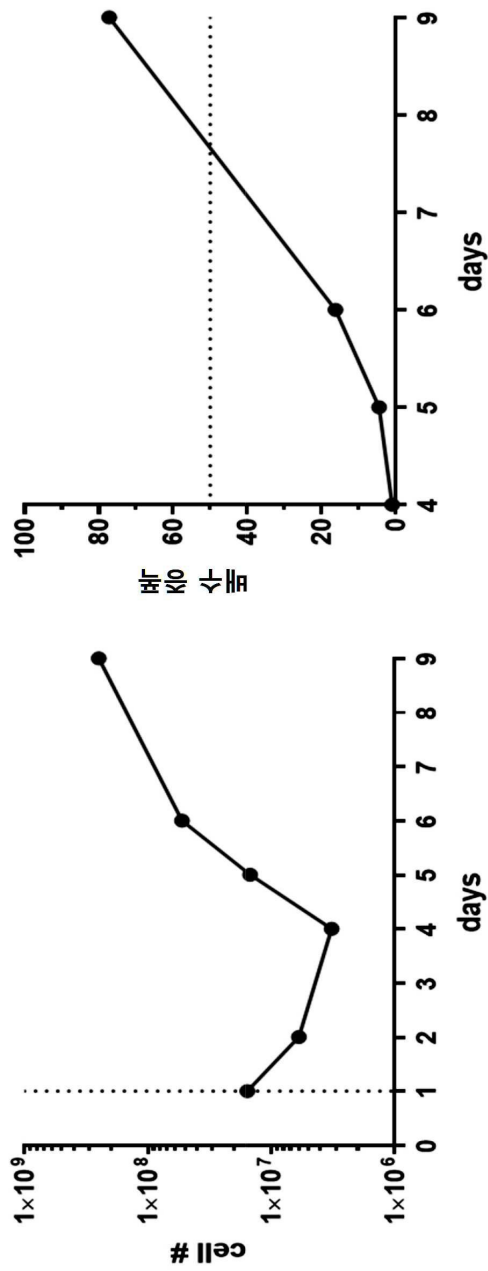
도면14



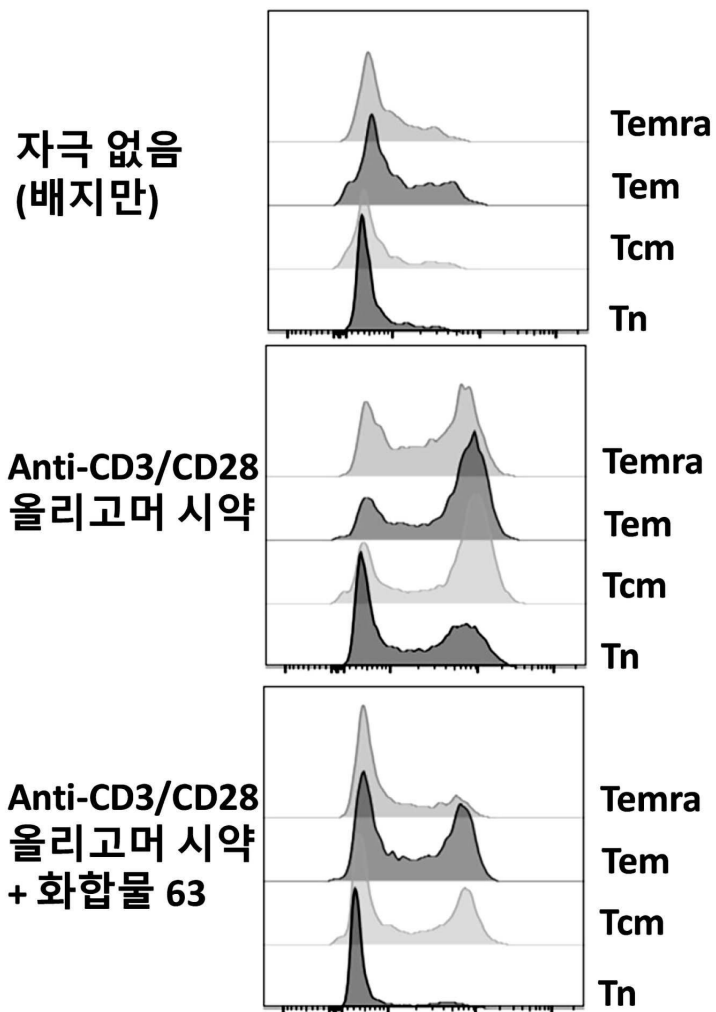
도면15a



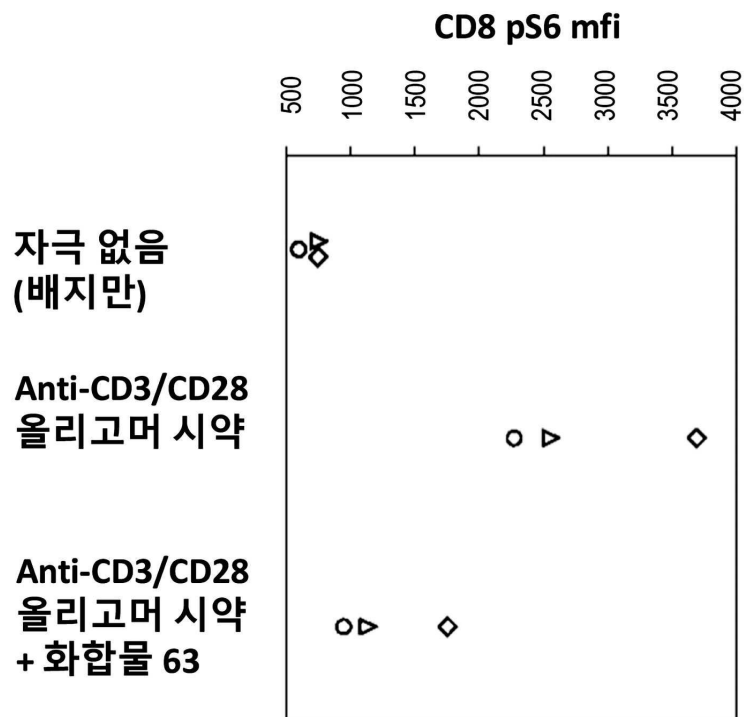
도면15b



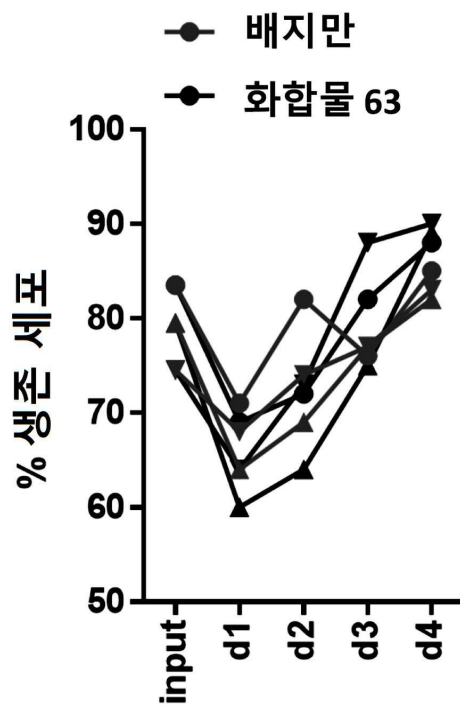
도면16a



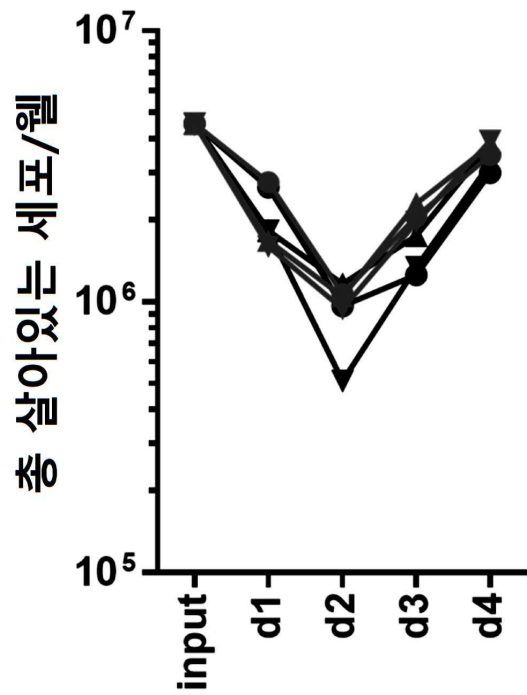
도면16b



도면16c

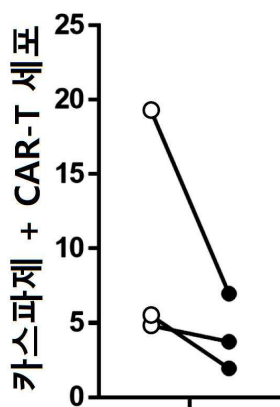


도면16d



도면17a

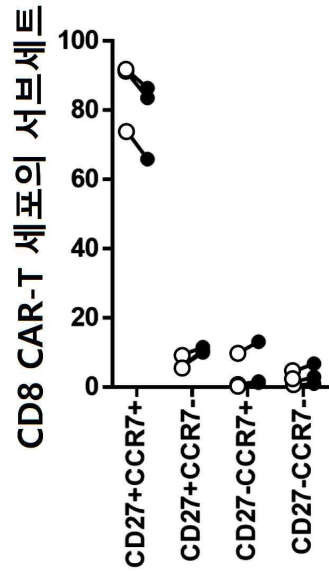
- 화합물 63 없음
- 화합물 63 있음



도면17b

○ 화합물 63 없음

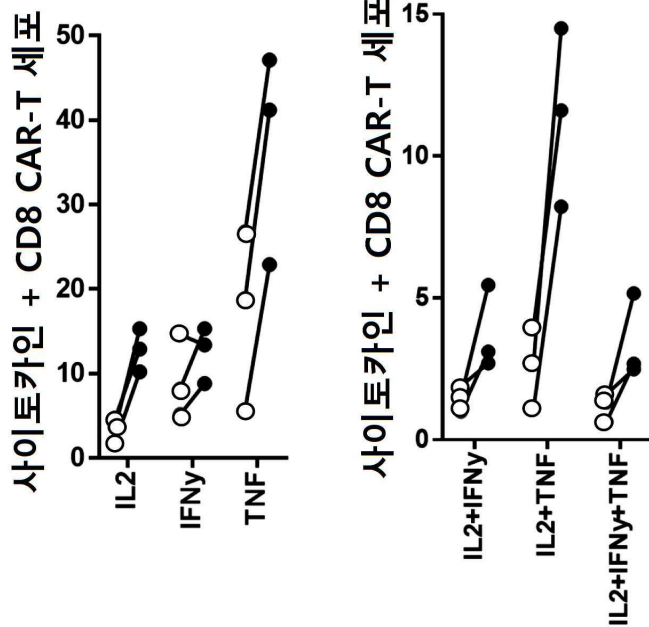
● 화합물 63 있음



도면17c

○ 화합물 63 없음

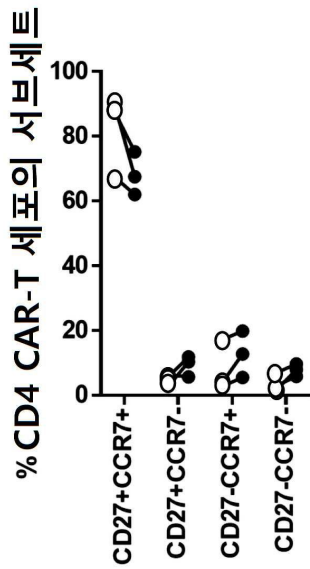
● 화합물 63 있음



도면17d

○ 화합물 63 없음

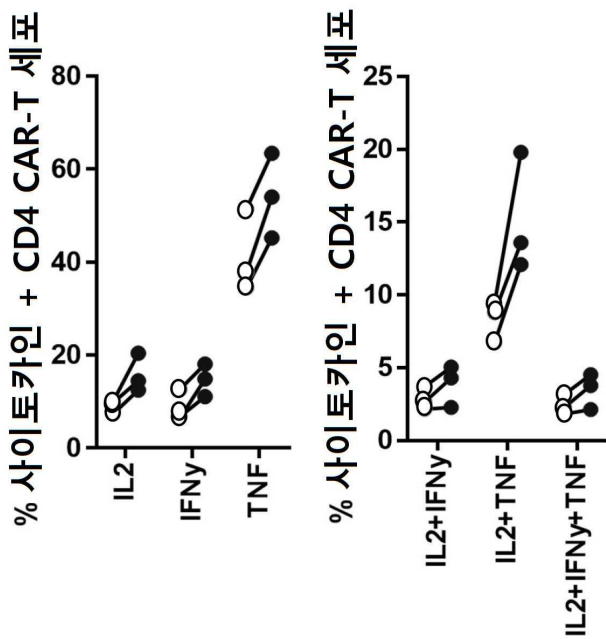
● 화합물 63 있음



도면17e

○ 화합물 63 없음

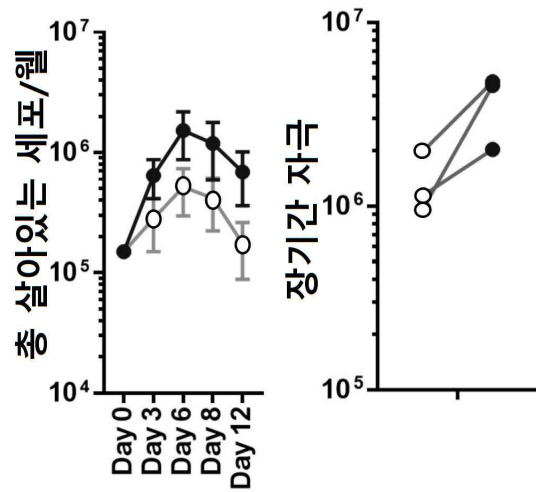
● 화합물 63 있음



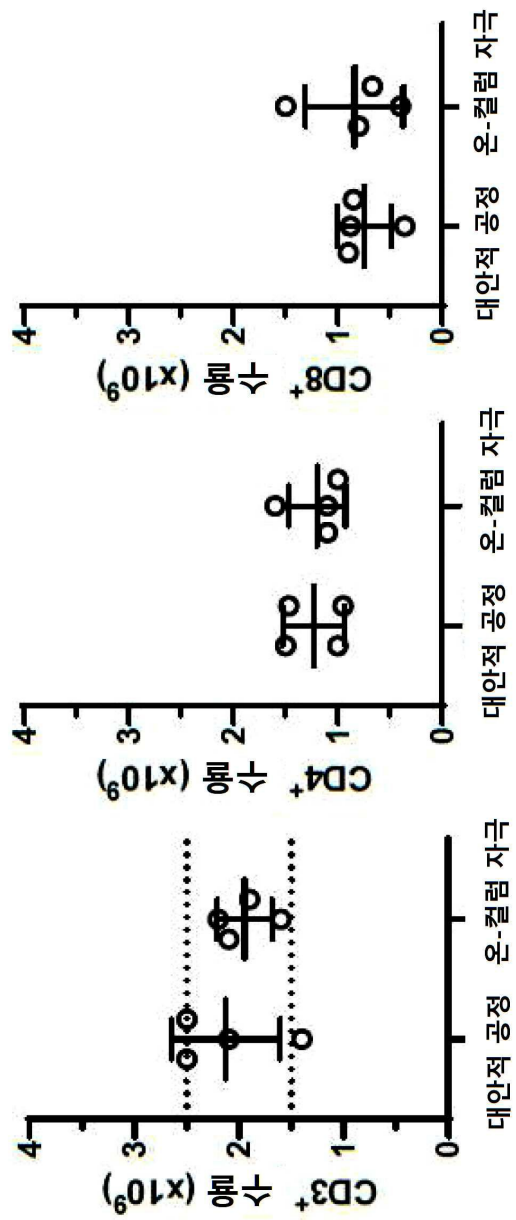
도면17f

○ 화합물 63 없음

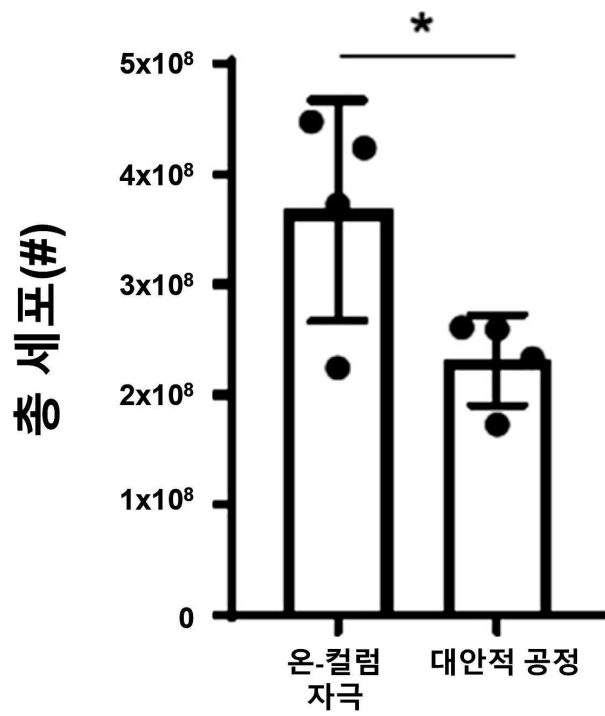
● 화합물 63 있음



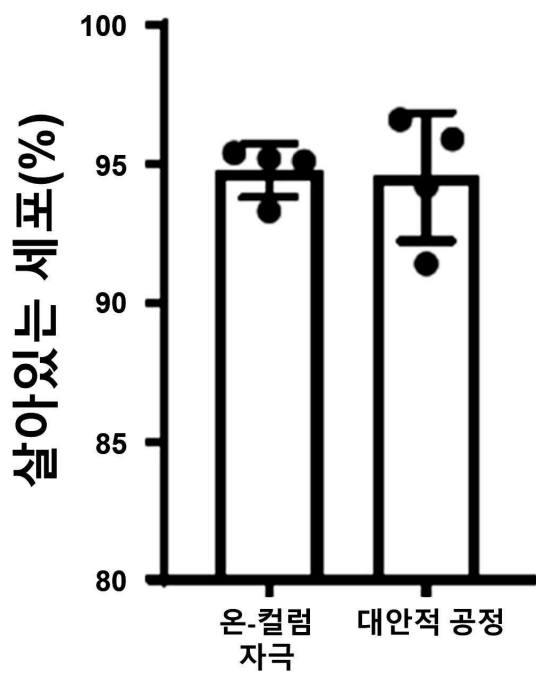
도면18a



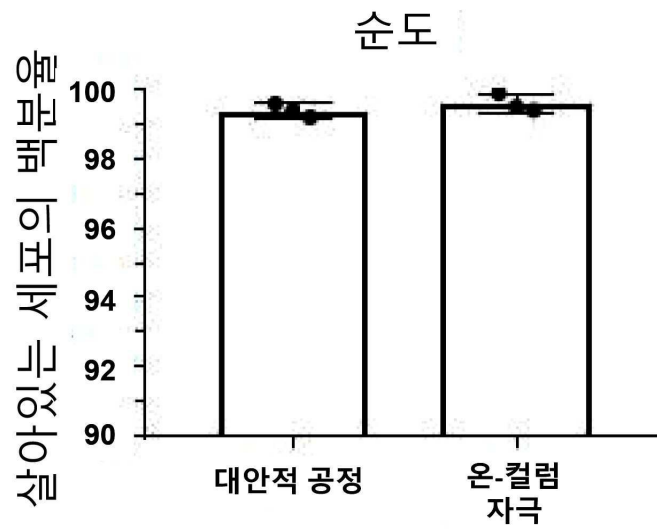
도면18b



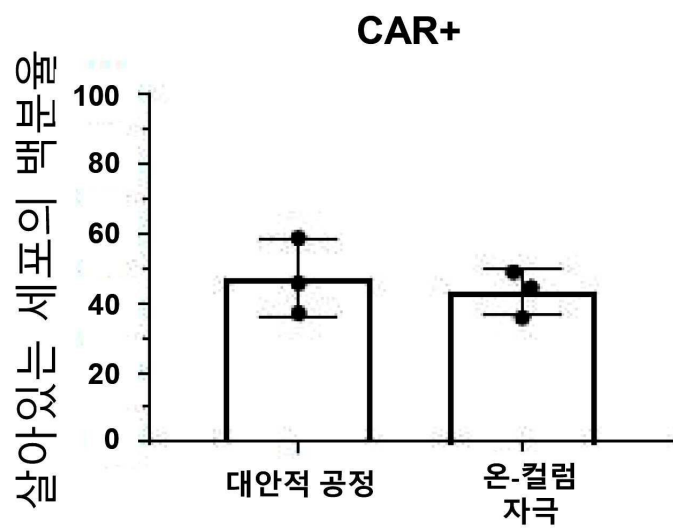
도면18c



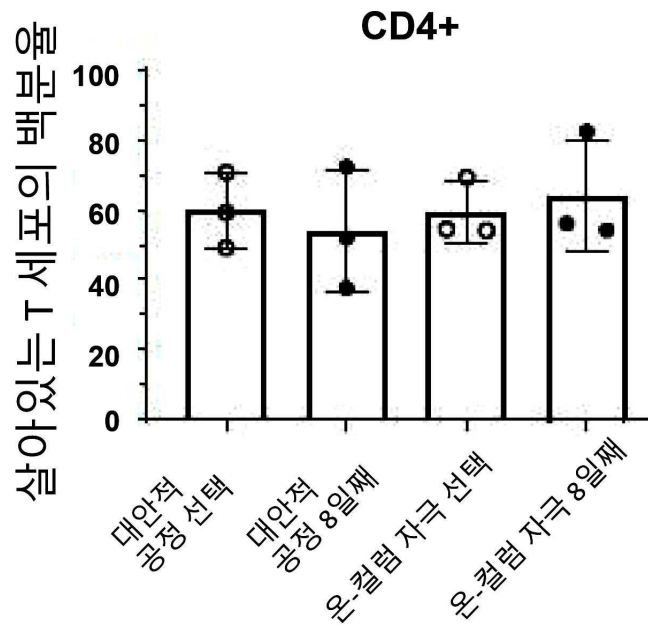
도면19a



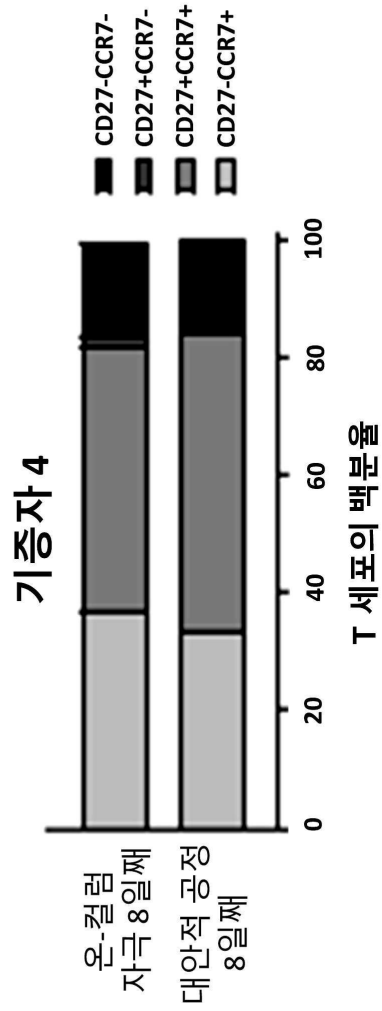
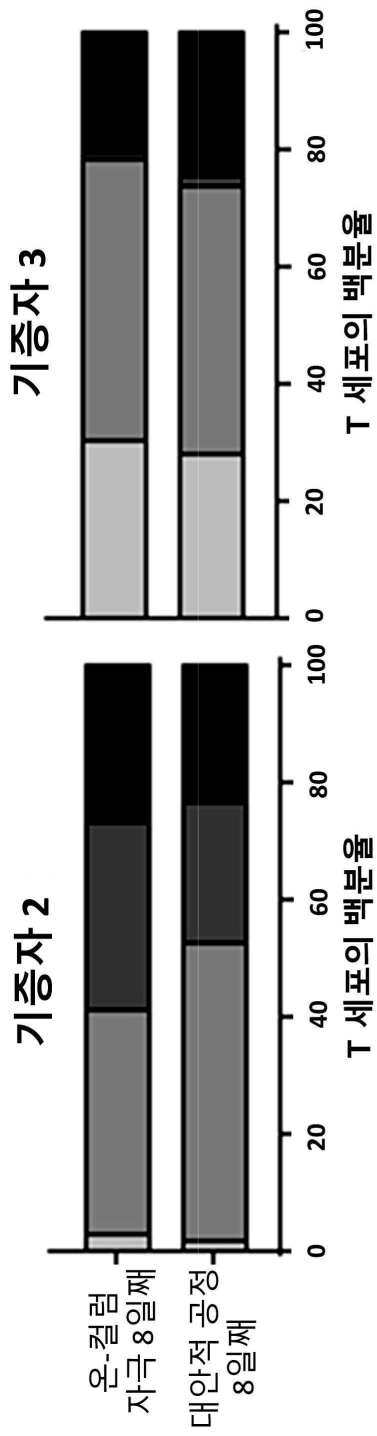
도면19b



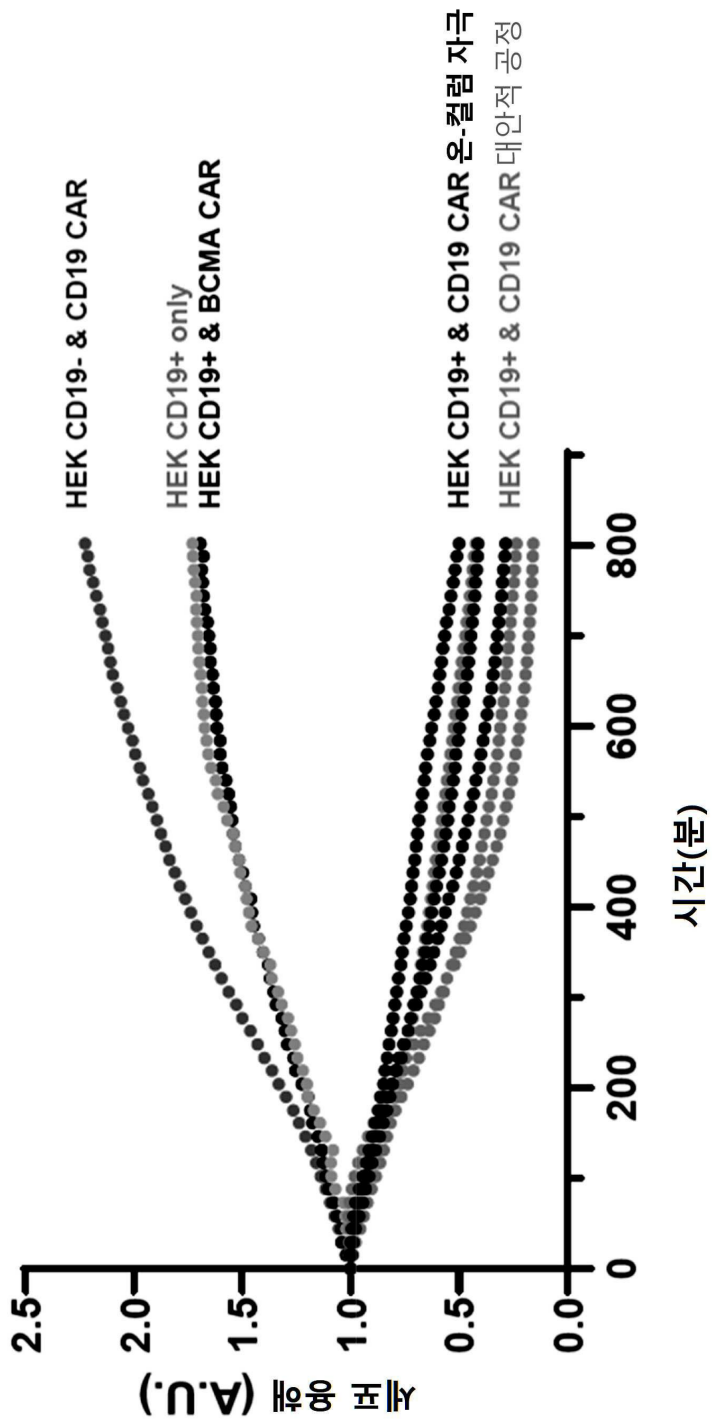
도면19c



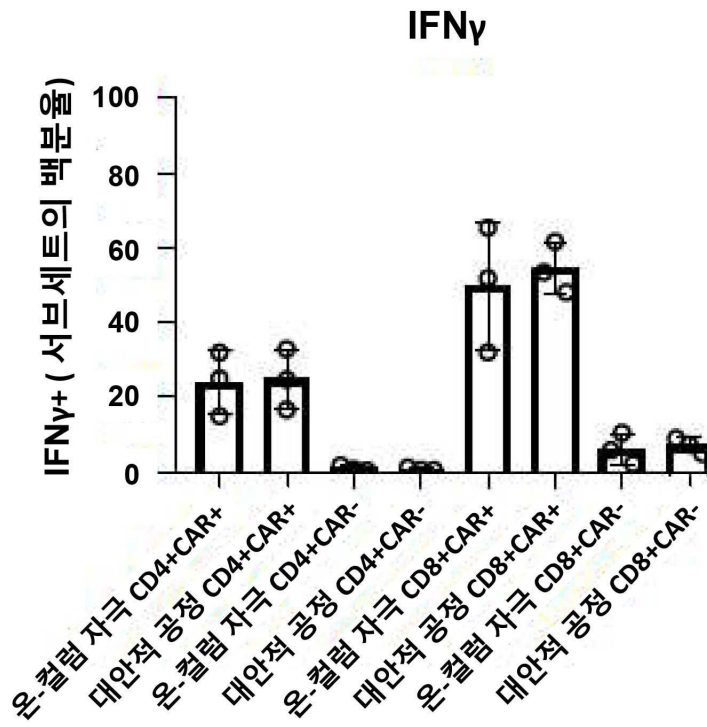
도면19d



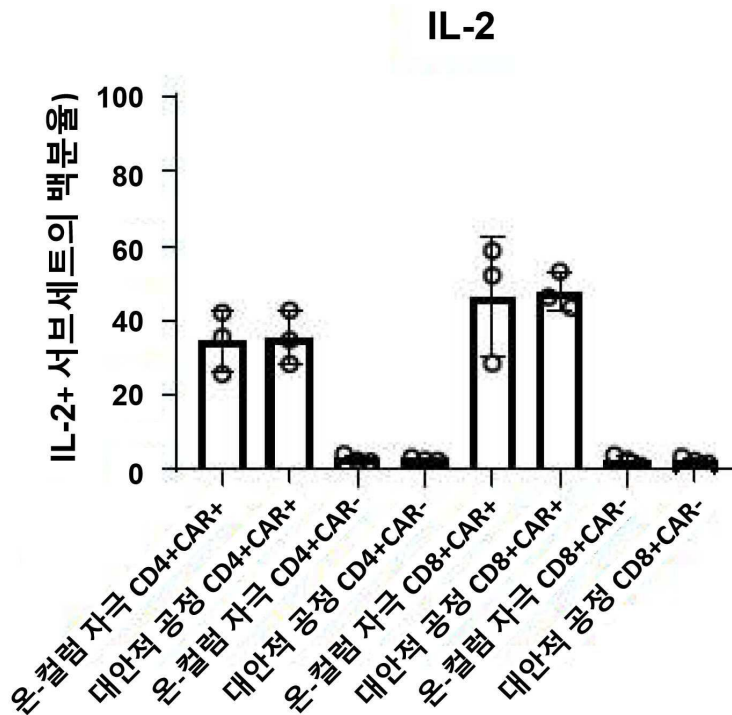
도면20



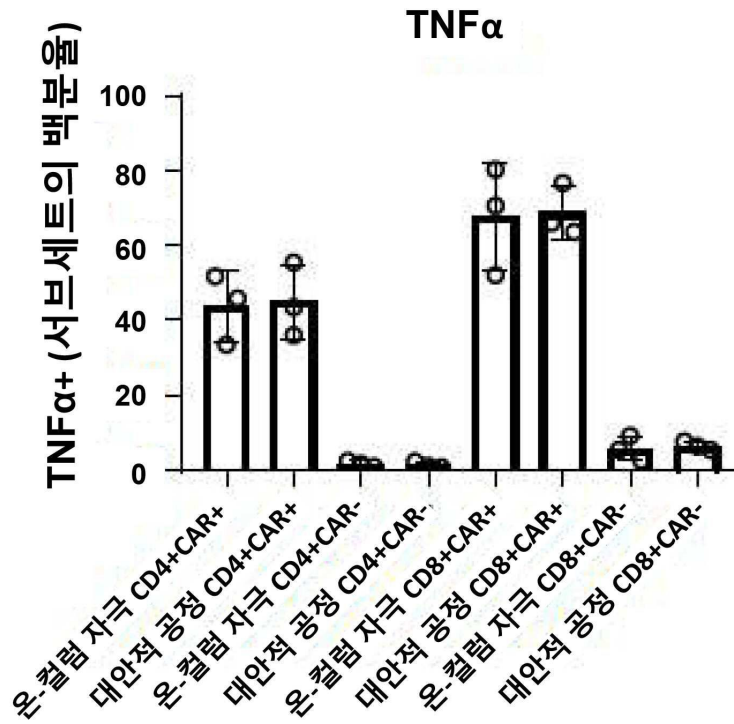
도면21a



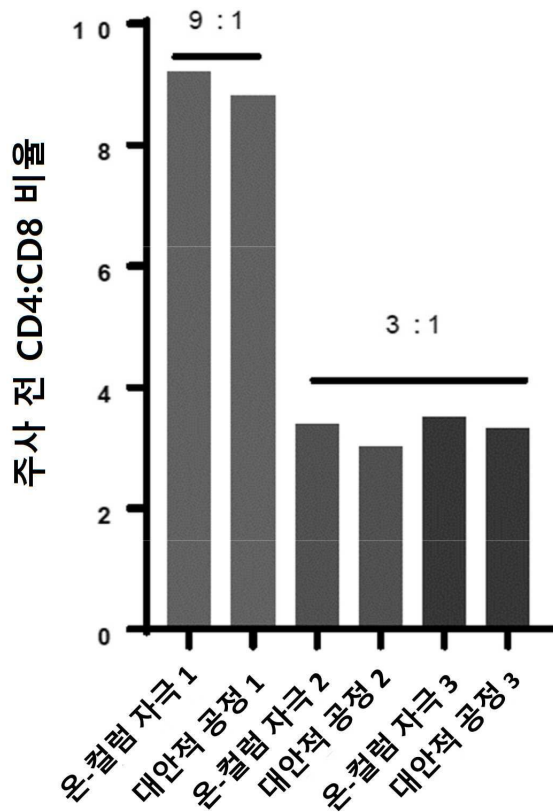
도면21b



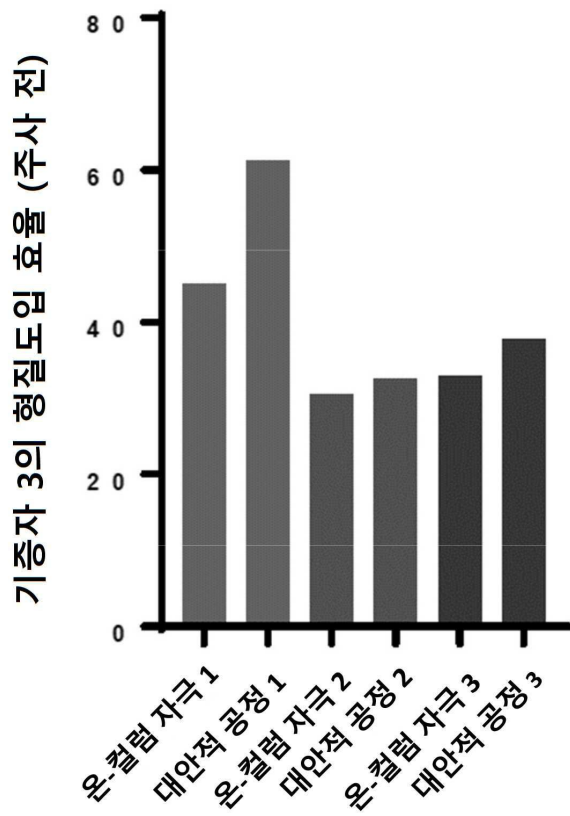
도면21c



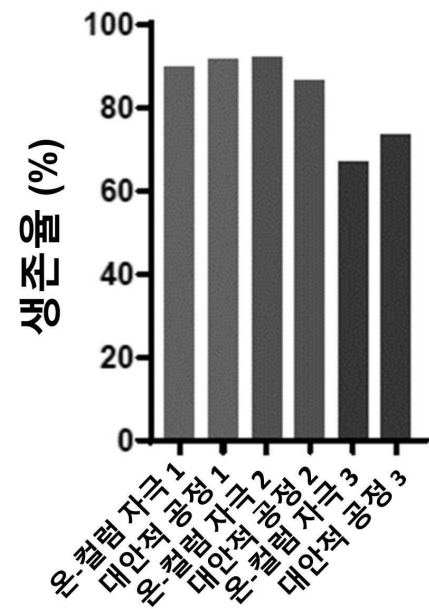
도면22a



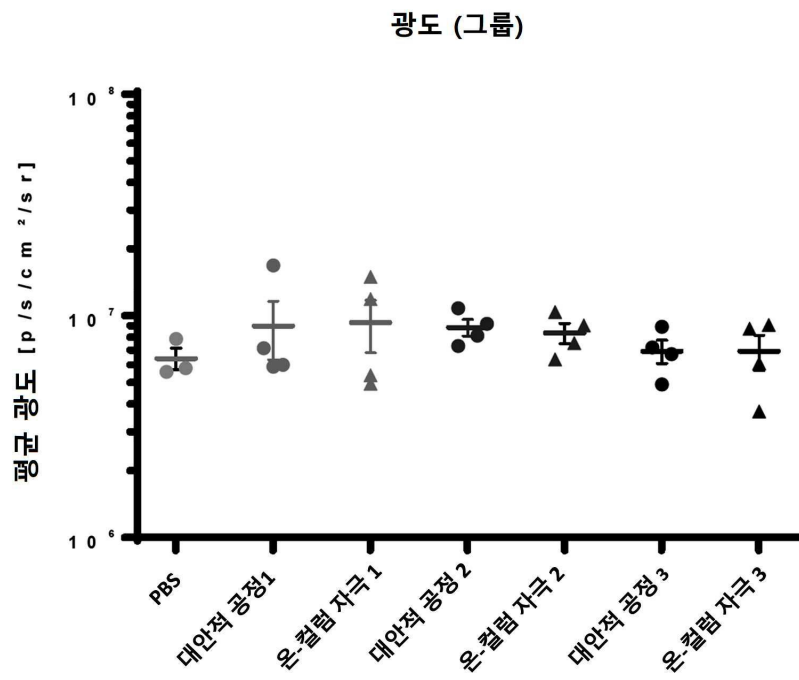
도면22b



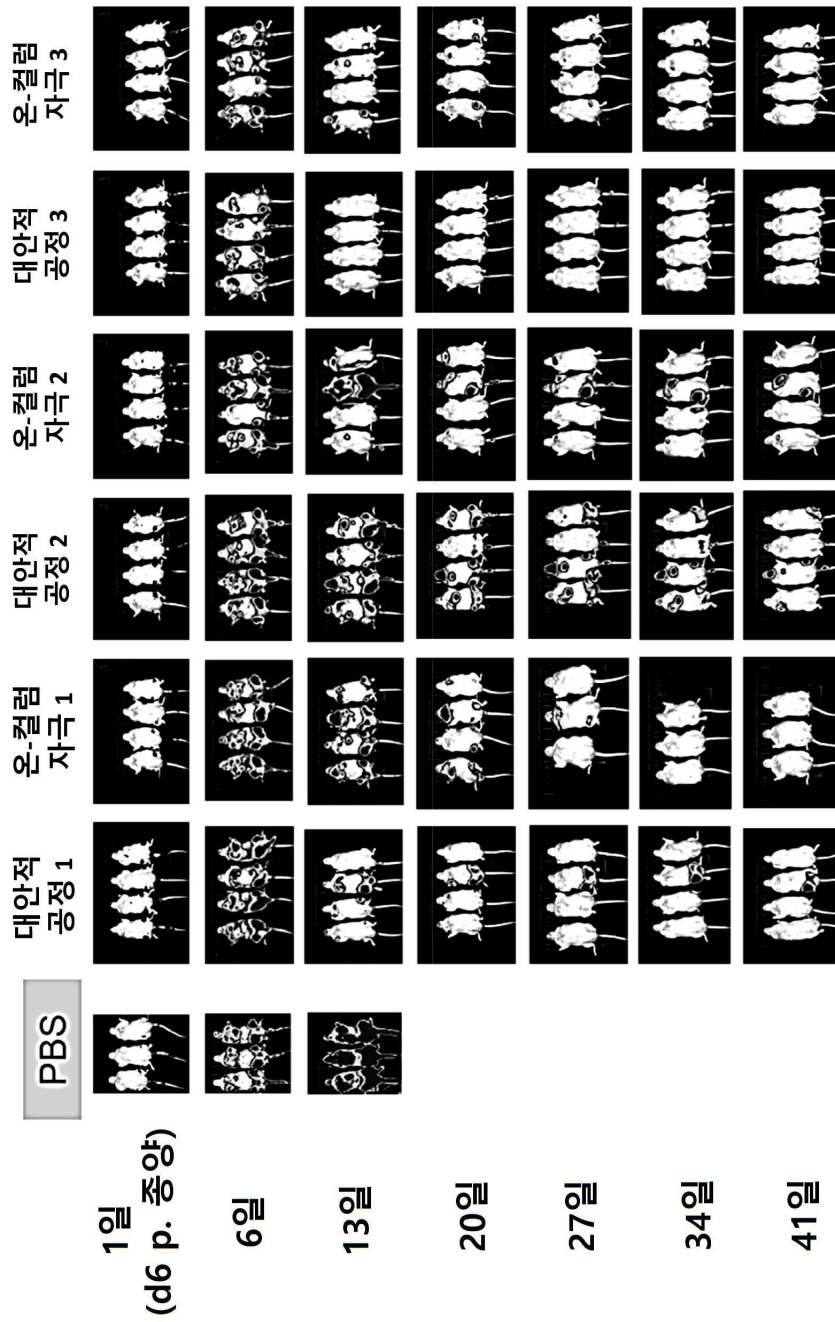
도면22c



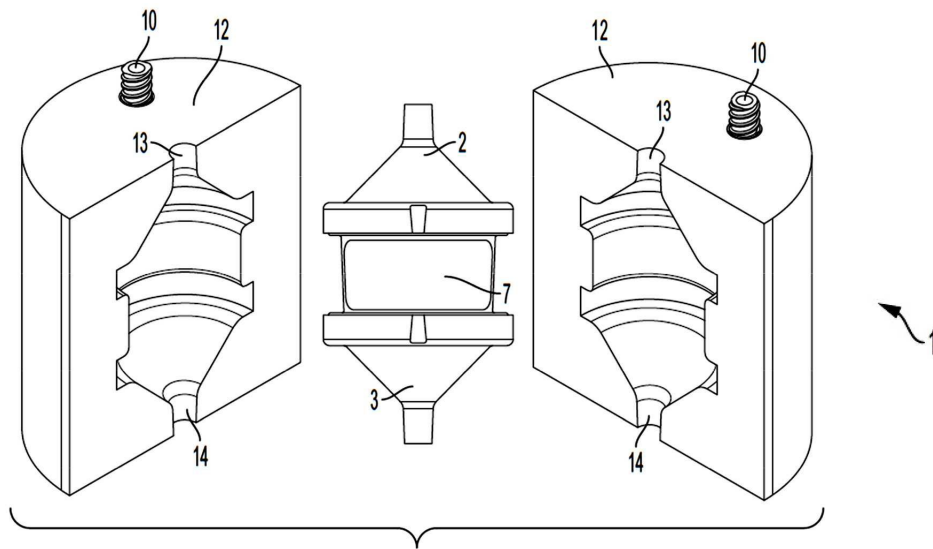
도면23



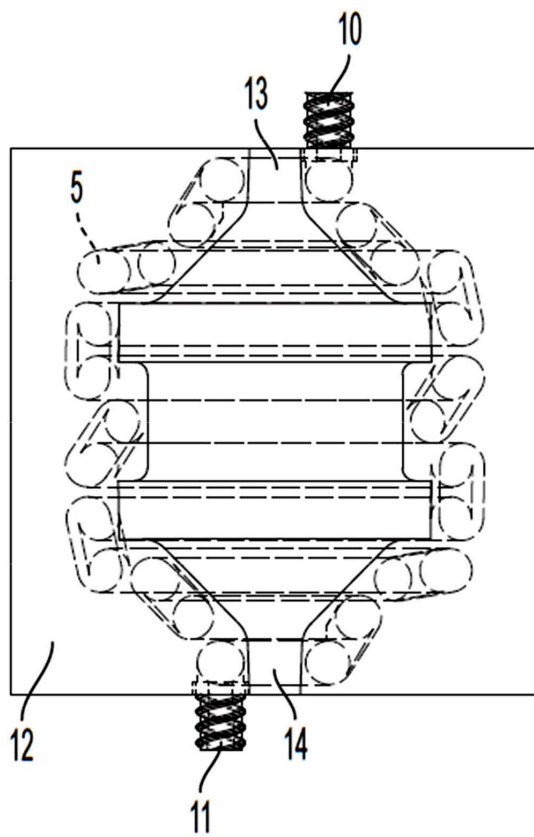
도면24



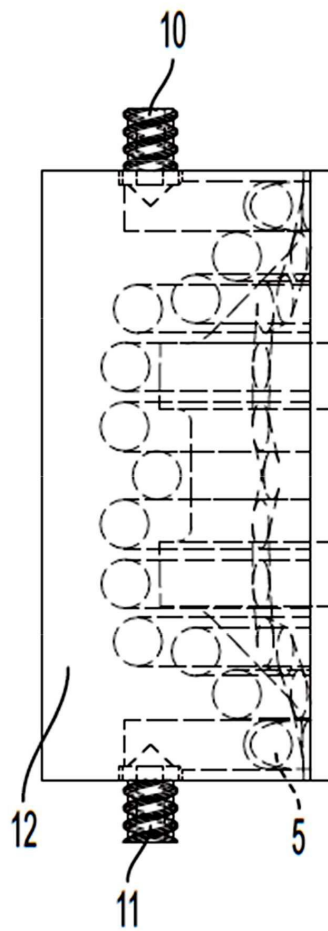
도면25



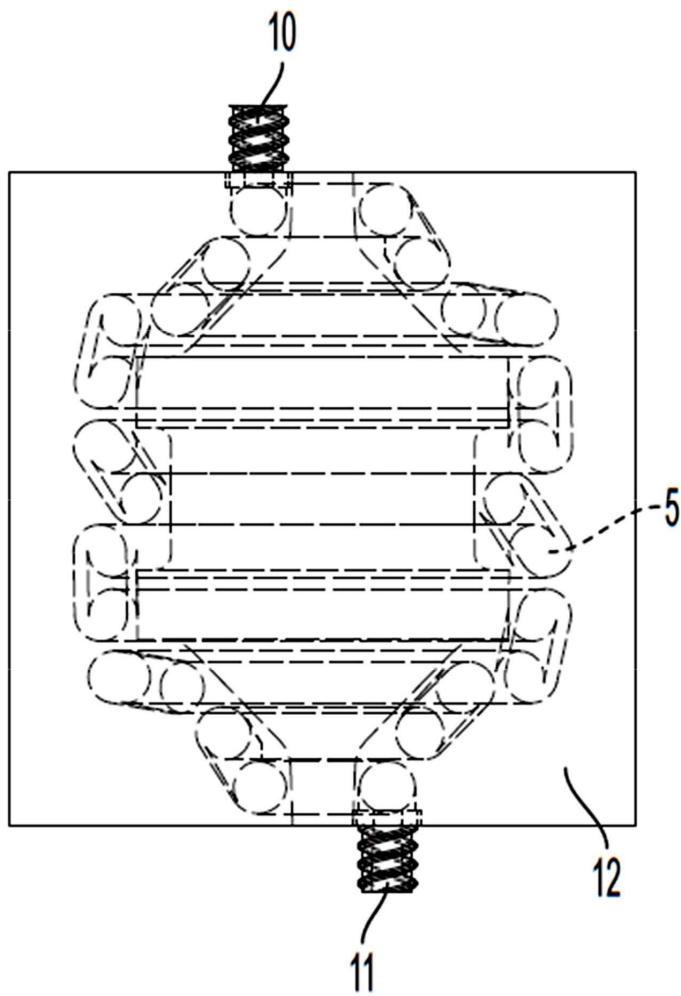
도면26a



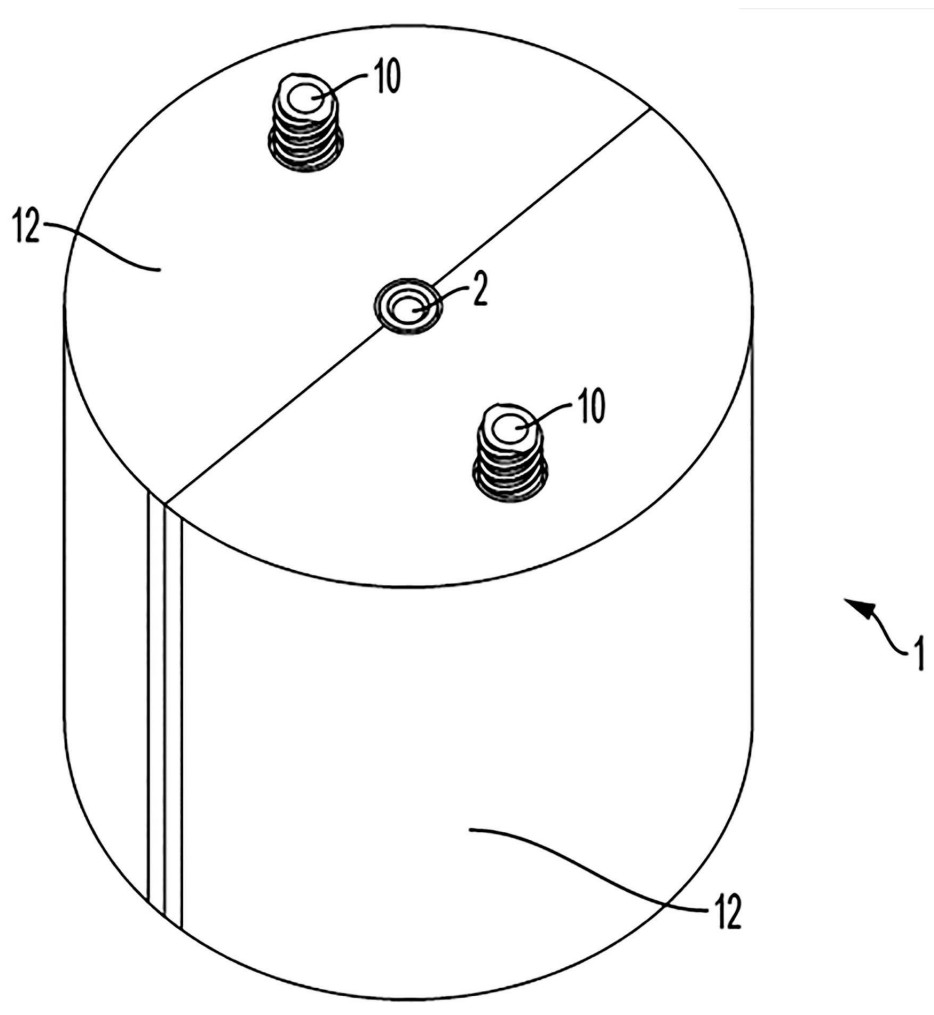
도면26b



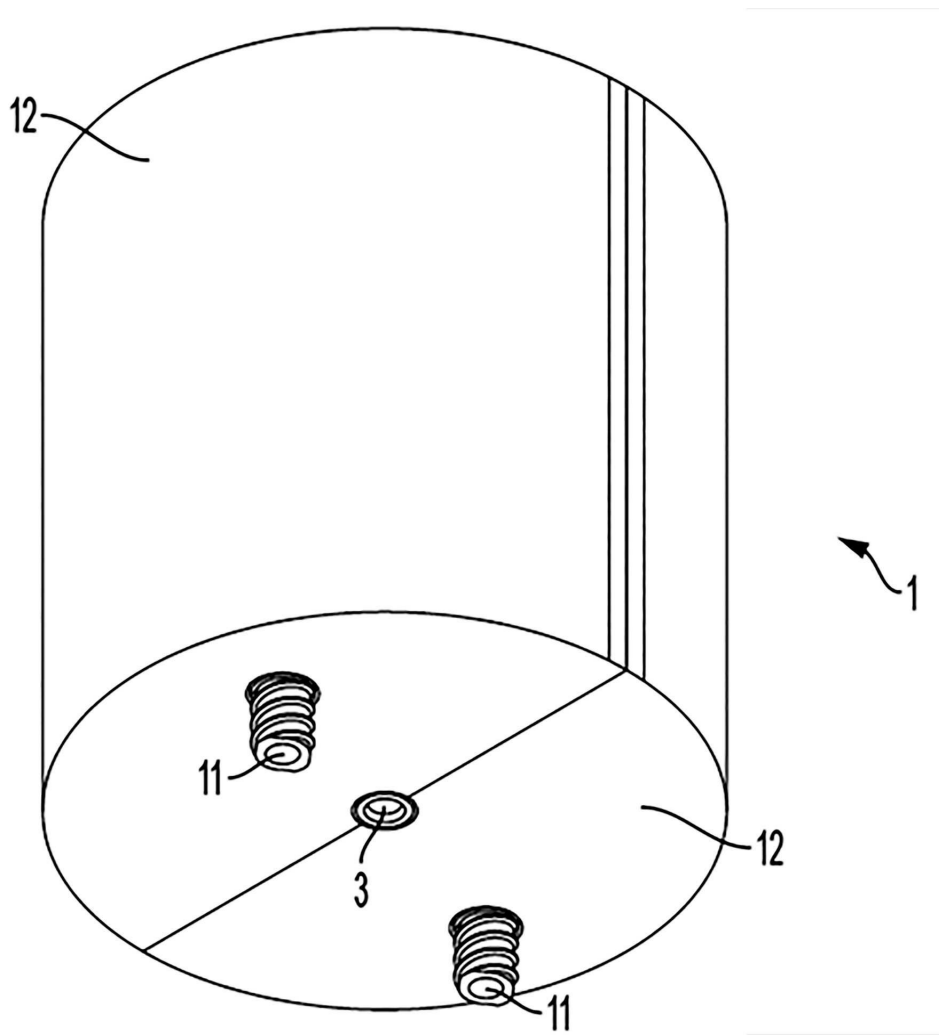
도면26c



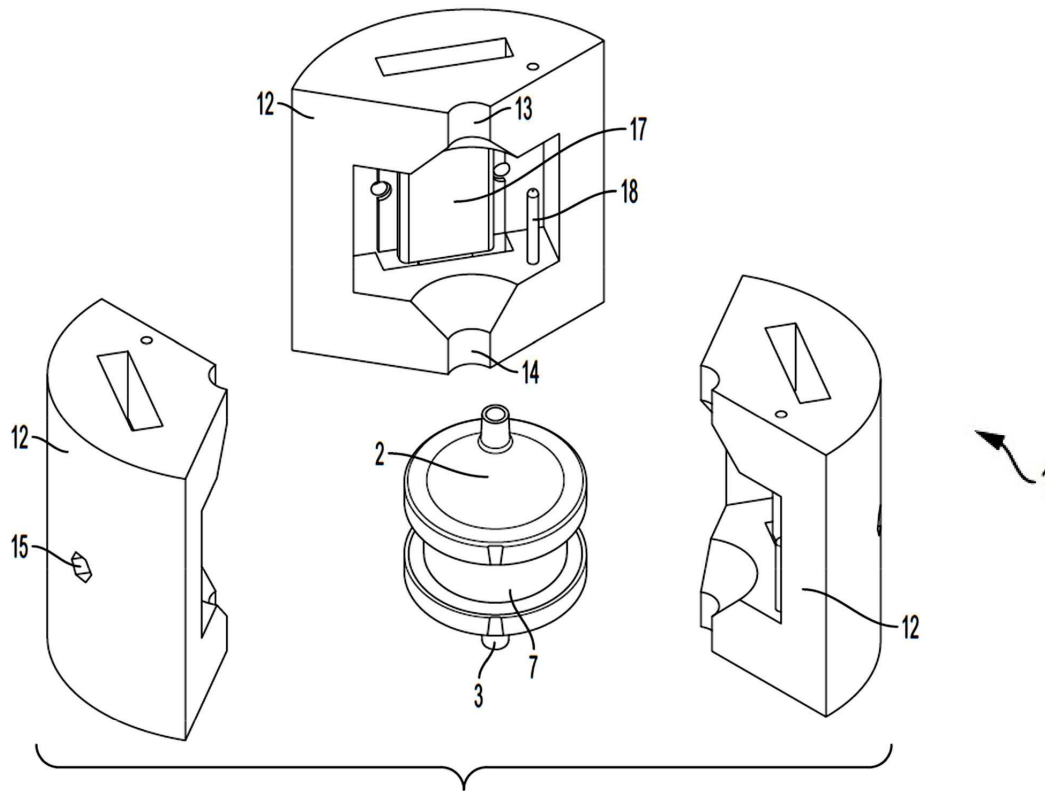
도면27



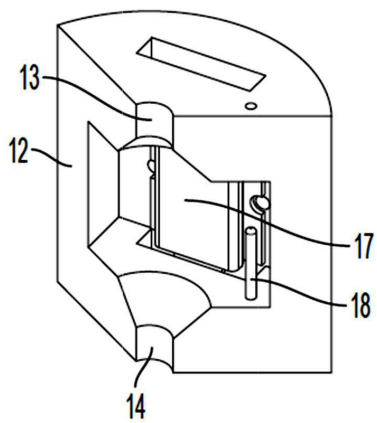
도면28



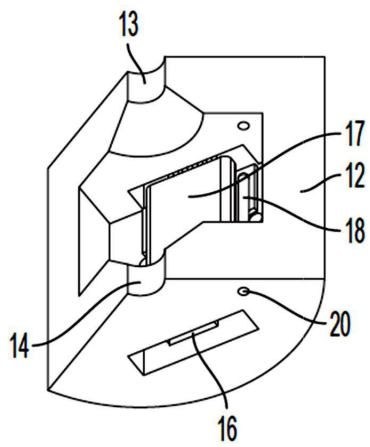
도면29



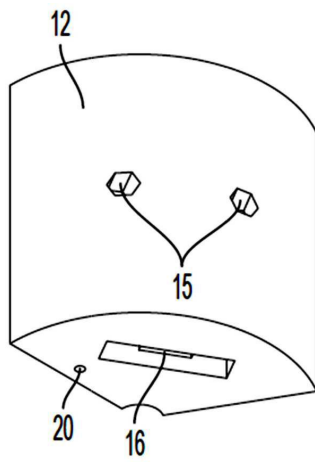
도면30a



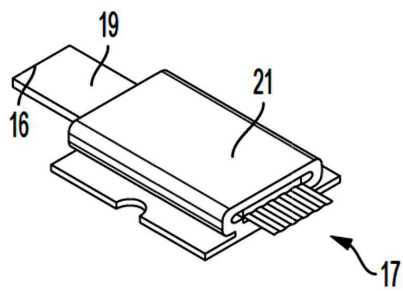
도면30b



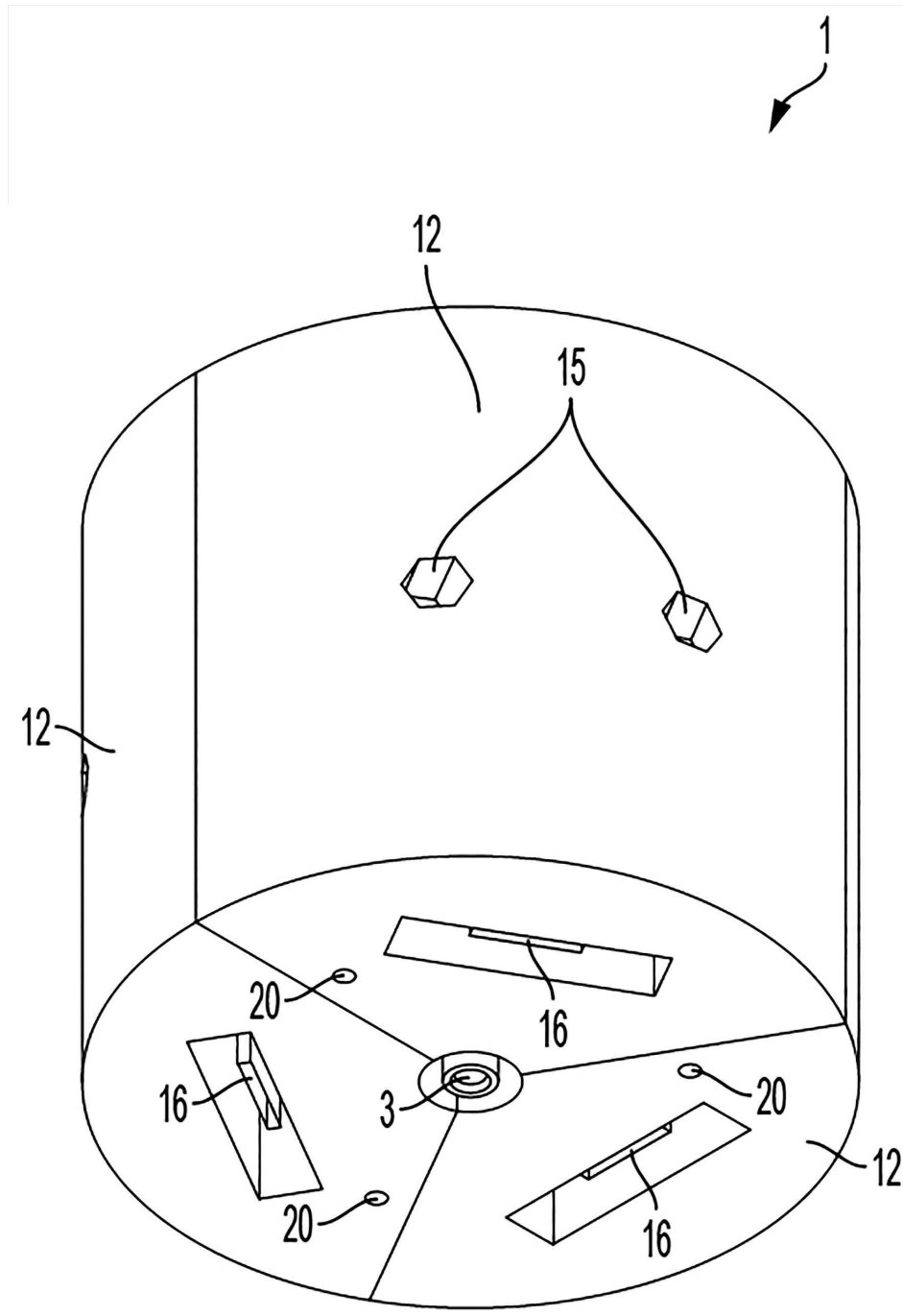
도면30c



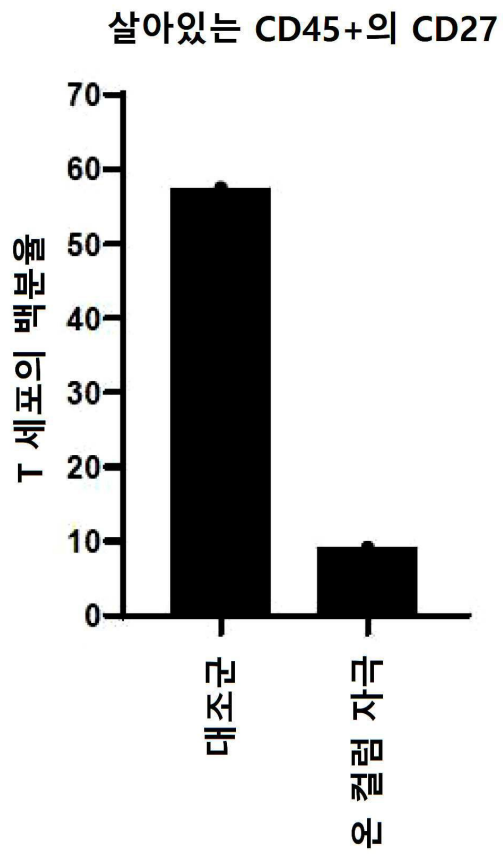
도면30d



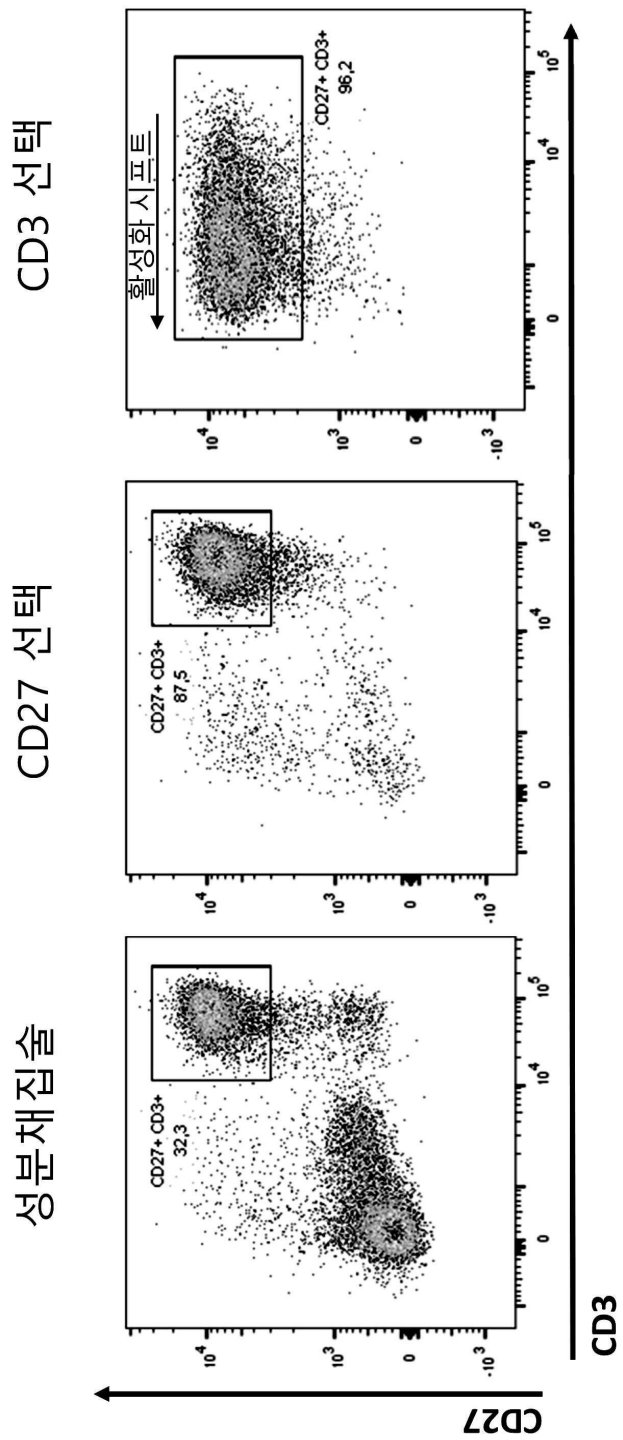
도면31



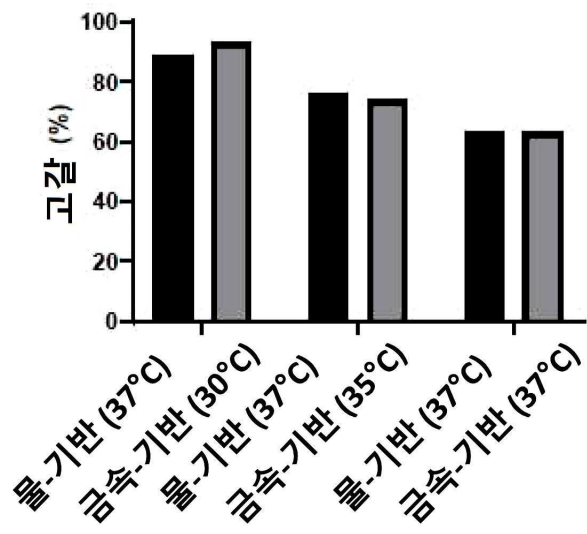
도면32



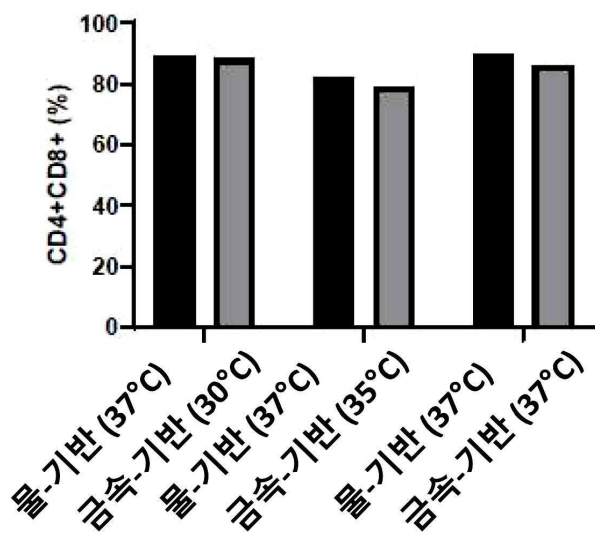
도면33



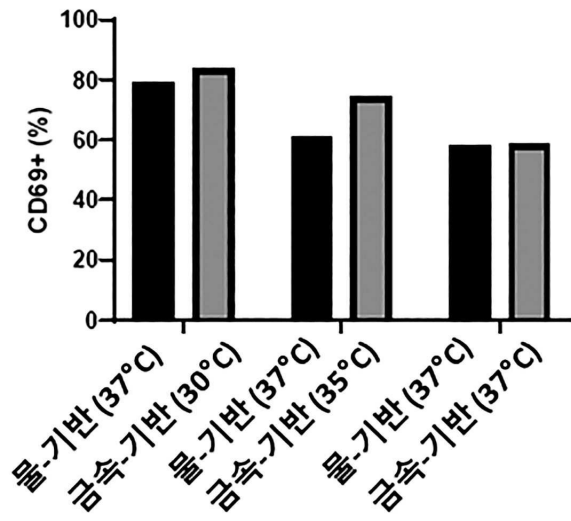
도면34a



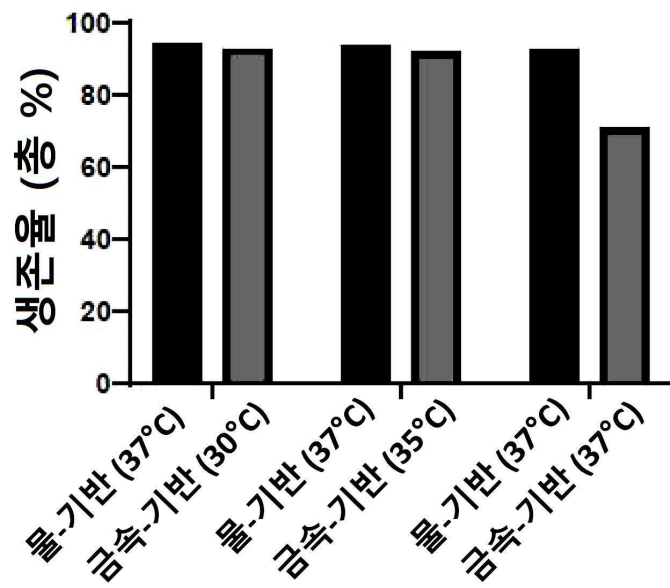
도면34b



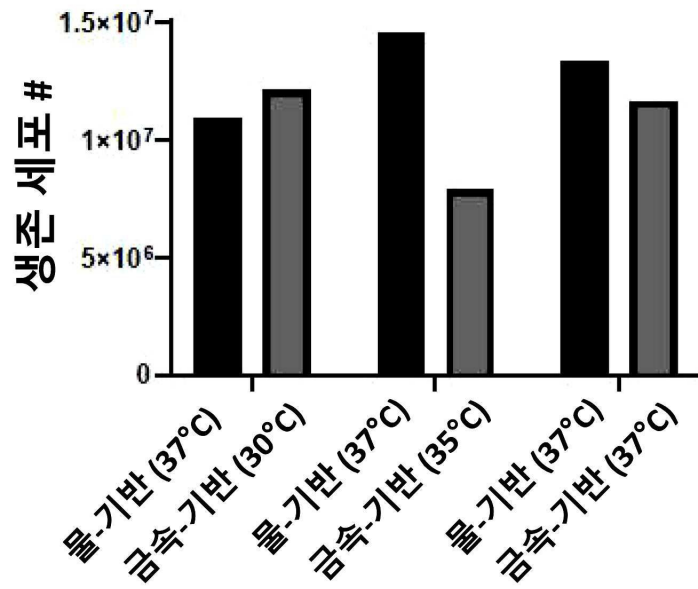
도면34c



도면34d



도면34e



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics GmbH

<120> CELL SELECTION AND/OR STIMULATION

DEVICES AND METHODS OF USE

<130> 735042020040

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/928,303

<151> 2019-10-30

<160> 112

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Streptavidin (UniProt No. P22629)

<400> 1

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1

5

10

15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 2

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
 20 25 30
 Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60
Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
65 70 75 80
Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
85 90 95
Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu

100 105 110
Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 3

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 3

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
1 5 10 15
Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30
Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
35 40 45
Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60
Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110
Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 4

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val

20 25 30

Thr Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45

Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60

Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

65 70 75 80

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

85 90 95

Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu

100 105 110

Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 5

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala46-Arg47

<400> 5

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly

35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155

<210> 6

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala46-Arg47

<400> 6

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile

20 25 30
Gly Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45
Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60
Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

65 70 75 80
Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

85 90 95
Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu

100 105 110
Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin binding peptide, Strep-tag

<400> 7

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Strep-tag II

<400> 8

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 9

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Streptavidin Binding peptide
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (3)...(3)
 <223> Xaa is selected from Gln, Asp, and Met
 <400> 9
 His Pro Xaa
 1
 <210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Streptavidin-binding peptide
 <400> 10
 His Pro Gln Phe
 1
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Streptavidin-binding peptide

 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa is Trp, Lys or Arg
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (2)...(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa is Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is Gly, Lys or Arg

<400> 11

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa is Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa is Gly, Lys or Arg

<400> 12

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 13

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide
 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa is any amino acid

<220>
 <221> REPEAT
 <222> (9)...(9)
 <223> Xaa is repeated 8 or 12 times
 <400> 13

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
 1 5 10 15
 Lys

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide
 <220>
 <221> REPEAT
 <222> (9)...(12)
 <223> GlyGlyGlySer is repeated 2 or 3 times
 <400> 14

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro
 1 5 10 15
 Gln Phe Glu Lys
 20

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 15

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 16

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 19

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HA-tag

<400> 20

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VSV-G-tag

<400> 21

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HSV-tag

<400> 22

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T7 epitope

<400> 23

Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HSV epitope

<400> 24

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Myc epitope

<400> 25

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> V5-tag

<400> 26

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glul17, Gly120, Tyr121 (mutein m1-9)

<400> 27

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50				55				60							
Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp	Ser
65				70				75				80			
Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp	Leu
				85				90				95			
Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Glu	Asn	Ala	Gly	Tyr	Ser	Thr	Leu	Val
100				105				110							

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 28

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glu117, Gly120, Tyr121 (mutein m1-9)

<400> 28

Asp	Pro	Ser	Lys	Asp	Ser	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly
1				5					10					15	
Ile	Thr	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asn	Gln	Leu	Gly	Ser	Thr	Phe	Ile	Val	Thr
				20					25					30	

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
65 70 75 80
Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 130 135
 <210> 29
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Variable Heavy chain of Fab fragment m13B8.2
 <400> 29
 Ala Met Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro

 1 5 10 15
 Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 Thr Phe Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Ser Gly Ile Thr Asp Tyr Asn Val Pro
 50 55 60
 Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val

 65 70 75 80
 Phe Phe Lys Leu Asn Ser Leu Gln Pro Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Lys Asn Asp Pro Gly Thr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu

 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro

195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Gly Ser

210 215 220

Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

225 230 235 240

Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

245 250

<210> 30

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of Fab Fragment m13B8.2

<400> 30

Ala Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser

1 5 10 15

Val Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser Glu Met Ile Tyr

20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu

35 40 45

Leu Val His Asp Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Thr Leu

65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala His Tyr Gly Asn

85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Ile

100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys

115 120 125
Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130 135 140
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn

145 150 155 160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser

165 170 175
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys

180 185 190
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr

195 200 205
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Ser

210 215
<210> 31

<211> 119
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Variable Heavy chain of anti-CD3 antibody OKT3
<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 32

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of anti-CD3 antibody OKT3

<400> 32

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn

100 105

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Heavy chain of anti-CD28 antibody CD28.3

<400> 33

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
20 25 30

Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe
35 40 45

Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys
50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
65 70 75 80

Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg
85 90 95

Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val
115

<210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of anti-CD28 antibody CD28.3

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MAT tag

<400> 35

His Asn His Arg His Lys His Gly Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 36

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Heavy chain of huOKT8

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala Ser Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of huOKT8

<400> 37

Asp Val Gln Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<

220>

<221> REPEAT

<222> (5)...(9)

<223> SGGGG is repeated 5 times

<400> 38

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 39

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain

<400> 40

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 41

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain

<400> 41

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccagc attcctcctg 60
atccca 66

<210> 42

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

>

<223> CD8 alpha signal peptide

<400> 42

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

His Ala

<210> 43

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> truncated epidermal growth factor receptor (tEGFR)

<400> 43

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

325 330 335
Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly

340 345 350
Ile Gly Leu Phe Met

355
<210> 44
<211> 335
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> truncated epidermal growth factor receptor (tEGFR)
<400> 44

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu
1 5 10 15
Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile
20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe
35 40 45
Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr
50 55 60
Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn
65 70 75 80
Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg
85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile
100 105 110
Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val
115 120 125
Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp
130 135 140
Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

145 150 155 160

 Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
 165 170 175
 Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
 180 185 190
 Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu
 195 200 205
 Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
 210 215 220

 Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
 225 230 235 240
 Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
 245 250 255
 His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
 260 265 270
 Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
 275 280 285

 Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
 290 295 300
 Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
 325 330 335

 <210> 45
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> F2A
 <400> 45

 Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E2A

<400> 46

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 47

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 47

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 48

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 49

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 50

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 51

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 52

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 52

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 53

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 54

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 56

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 57

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 58

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 59

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 59

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 60

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr	Ile Ser Cys Arg	Ala Ser Gln Asp	Ile Ser Lys Tyr
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr	Gln Gln Lys Pro	Asp Gly Thr Val	Lys Leu Leu Ile
35	40	45	
Tyr His Thr Ser	Arg Leu His Ser	Gly Val Pro Ser	Arg Phe Ser Gly
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly	Thr Asp Tyr Ser	Leu Thr Ile Ser	Asn Leu Glu Gln

65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala	Thr Tyr Phe Cys	Gln Gln Gly Asn	Thr Leu Pro Tyr
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly	Gly Thr Lys Leu	Glu Ile Thr	
100	105		

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 62

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Lys Gly

<210> 63

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 63

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga cgggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgccacg 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctcaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgcctacac ctttggcggc 300
ggaacaaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360

ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccgaacta cggcgtgagc 480
tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600
agccagggtg tctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgaccgtga gcagc 735

<210> 64

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys
 115 120 125
 Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
 130 135 140
 Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
 165 170 175
 Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
 210 215 220
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210

> 65

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 65

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 66

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 67

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 68

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 69

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 70

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 71

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 71

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 72

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 72

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser

65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 73

<211>

> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 73

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 74

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 75

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 76

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 77

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 78

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 79

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 80

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 80

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95
Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
130 135 140
Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys

145 150 155 160
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
180 185 190
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
195 200 205
Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe

210 215 220
Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 81

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 82

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223>

> spacer (IgG4hinge)

<400> 82

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 83

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 83

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

50 55 60

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

85 90 95

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

115

<210> 84

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 84

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210

> 85

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgD-hinge-Fc

<400> 85

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln

65 70 75 80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly

85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val

100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly

115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn

130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro

145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys

165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser

180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu

195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro

210 215 220

Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser

225 230 235 240

Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr

245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg

260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His

275 280

<210> 86

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<400> 86

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is glycine, cysteine or arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa is cysteine or threonine

<400> 87

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<400> 88

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<400> 89

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1	5	10	
<210> 90			
<211> 61			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220>			
<223> Exemplary IgG Hinge			
<400> 90			
Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro			
1	5	10	15
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu			

20						25						30					
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro		
35						40						45					
Lys	Ser	Cys	Asp	Thr	Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro					
50						55						60					

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Exemplary IgG Hinge
<400> 91
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1	5	10
<210>	92	
<211>	12	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Exemplary IgG Hinge	
<400>	92	
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro		

1 5 10

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<400> 93

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Exemplary IgG Hinge

<400> 94

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 95

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 153-179 of Accession No. P10747)

<400> 95

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 96

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 114-179 of Accession No. P10747)

<400> 96

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15
 Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30
 Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60

Trp Val

65

<210> 97

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 180-220 of P10747)

<400> 97

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 98

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (LL to GG)

<400> 98

Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Gly	Gly	His	Ser	Asp	Tyr	Met	Asn	Met	Thr
1				5					10					15	
Pro	Arg	Arg	Pro	Gly	Pro	Thr	Arg	Lys	His	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Ala	Pro
				20					25					30	
Pro	Arg	Asp	Phe	Ala	Ala	Tyr	Arg	Ser							
				35					40						

<210> 99

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB (amino acids 214-255 of Q07011.1)

<400> 99

Lys	Arg	Gly	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Gln	Pro	Phe	Met
1				5					10					15	
Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
				20					25					30	
Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						
				35					40						

<210> 100

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 100

Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
1					5					10					15
Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
				20						25				30	
Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
				35						40				45	

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 101

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 101

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 102

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 102

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 103

<211> 126

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Minimal streptavidin without initial methionine

<400> 103

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser

20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

[illegible]

<210> 104

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

 $\langle 220 \rangle$

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

without initial methionine

<400> 104

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1					5					10					15				
Ile	Val	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Thr	Tyr	Val	Thr				
				20					25					30					

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

65 70 75 80
 85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 105

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
without initial methionine

<400> 105

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
1 5 10 15
Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly
20 25 30
Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
35 40 45
Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
50 55 60
Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 106

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IgG2 Fc (Uniprot P01859)

<400> 106

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255
 Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 107

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IgG4 Fc (Uniprot P01861)

<400> 107

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FKBP

<400> 108

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp
20 25 30

Gly Lys Lys Met Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr
85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
100 105

<210> 109

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FKBP12v36

<400> 109

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro
1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp

20 25 30

Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe
35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala
50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr
 65 70 75 80
 Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr

85 90 95
 Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu
 100 105

<210> 110

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Modified acylation motif

<400> 110

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 111

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> dual acylation motif

<220>

>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 111

Met Gly Cys Xaa Cys

1 5

<210> 112

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> acylation region

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 112

Cys Ala Ala Xaa

1