



등록특허 10-2714469



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월11일
(11) 등록번호 10-2714469
(24) 등록일자 2024년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/00 (2006.01) *C07K 14/36* (2006.01)
C12M 1/36 (2006.01) *C12N 5/0781* (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12M 47/12 (2013.01)
C07K 14/36 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7036837(분할)

(22) 출원일자(국제) 2015년04월16일
심사청구일자 2022년11월16일

(85) 번역문제출일자 2022년10월21일

(65) 공개번호 10-2022-0150988

(43) 공개일자 2022년11월11일

(62) 원출원 특허 10-2016-7031915
원출원일자(국제) 2015년04월16일
심사청구일자 2020년04월07일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/058339

(87) 국제공개번호 WO 2015/158868
국제공개일자 2015년10월22일

(30) 우선권주장
61/980,506 2014년04월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌
Journal of Nanobiotechnology 2004, 2:5
US06103493 A*
US20070238169 A1*
WO2013011011 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 30 항

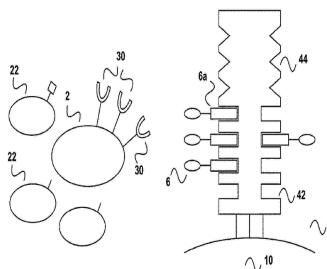
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 세포 집단의 증대를 위한 방법, 키트 및 장치

(57) 요 약

본 발명은 세포 집단을 포함하는 시료를 다양체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하는, 램프구와 같은 세포 집단을 증대시키는 시험관 내 방법에 관한 것이다. 다양체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제, 및 선택적으로, 동시-자극 신호를 자극하는 제2 제제를 갖는다. 본 발

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1a

명은 또한 세포 증대를 위한 다양체화 시약, 키트, 배열 및 장치를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12M 41/48 (2013.01)

C12N 5/0635 (2023.05)

C12N 5/0636 (2023.05)

C12N 5/0646 (2023.05)

C12N 2501/51 (2013.01)

C12N 2501/515 (2013.01)

C12N 2501/52 (2013.01)

C12N 2537/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생물반응기(bioreactor)와 크로마토그래피용 정지상의 배열(arrangement)을 포함하는 장치로서,

(a) 생물반응기는 림프구를 자극할 수 있는 다량체화 시약을 사용한 림프구의 증대를 위한 것이되,

(i) 다량체화 시약은 가용성 형태이고 (1) 세포 표면상의 CD3 분자에 특이적으로 결합하는 제1 항체 또는 항체 단편에 제1 스트렙타비딘-결합 웨티드를 통하여 가역적으로 결합하고 (2) 세포 표면상의 CD28 분자에 특이적으로 결합하는 제2 항체 또는 항체 단편에 제2 스트렙타비딘-결합 웨티드를 통하여 가역적으로 결합하며, 여기서 제1 항체 또는 항체 단편은 림프구 표면상의 수용체 분자에 결합하여 림프구에 일차 활성화 신호를 제공하고, 제2 항체 또는 항체 단편은 림프구 표면상의 보조 분자에 결합하여 림프구에서 보조 신호를 자극하고,

(ii) 다량체화 시약은 제1 및 제2 스트렙타비딘-결합 웨티드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하고,

(b) 정지상은 제1 항체 또는 항체 단편과 제2 항체 또는 항체 단편의 제거를 위한 크로마토그래피 칼럼 내에 포함되고, 여기서 정지상은, 제1 및 제2 스트렙타비딘-결합 웨티드에 특이적으로 결합할 수 있는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하는 친화성 시약을 포함하고, 친화성 시약은 림프구가 통과하는 동안 제1 및 제2 항체 또는 항체 단편을 정지상에 고정시키기 위한 것이고,

(c) 생물반응기와 정지상은 유체 연결되는 것이고,

(a) 또는 (b)의 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘에 대한 상대적인 위치로, 위치 44에서 Glu 대신에 소수성 지방족 아미노산, 위치 45에서 임의의 아미노산, 위치 46에서 소수성 지방족 아미노산, 및 위치 47에서 Val 대신에 염기성 아미노산을 포함하는, 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 정지상이 겔 여과 매트릭스를 포함하는 것인, 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 다량체화 시약이 비오틴에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 친화성 시약이 스트렙타비딘을 포함하는 것인, 장치.

청구항 5

제1항에 있어서, 친화성 시약이 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하는 것인, 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 $^{44}-\text{Val}$ $^{45}-\text{Thr}$ $^{46}-\text{Ala}$ $^{47}-\text{Arg}$ 또는 $^{44}-\text{Ile}$ $^{45}-\text{Gly}$ $^{46}-\text{Ala}$ $^{47}-\text{Arg}$ 을 포함하는 것인, 장치.

청구항 7

제6항에 있어서, 스트렙타비딘 뮤테인의 N-말단 아미노산 잔기가 야생형 스트렙타비딘 아미노산 서열의 아미노산 10 내지 16의 영역 내에 있고, 스트렙타비딘 뮤테인의 C-말단 아미노산 잔기가 야생형 스트렙타비딘 아미노산 서열의 아미노산 133 내지 142의 영역 내에 있는 것인, 장치.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 정지상이 제1 정지상이고, 상기 배열이 제2 정지상을 추가로 포함하고, 여기서 제2 정지상은 제1 정지상에 유체 연결되는 것인, 장치.

청구항 9

제8항에 있어서, 제2 정지상이 겔 여과 매트릭스를 포함하는 것인, 장치.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 친화성 시약이 제1 친화성 시약이고, 제2 정지상은 상기 다양체화 시약의 결합 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너를 포함하는 제2 친화성 시약을 포함하고, 그로써 상기 다양체화 시약을 제2 정지상에 고정하는 데 적합한 것인, 장치.

청구항 11

제10항에 있어서, 제2 친화성 시약의 결합 파트너는 스트렙타비딘에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 장치.

청구항 12

제10항에 있어서, 제2 친화성 시약의 결합 파트너는 비오틴을 포함하는 것인, 장치.

청구항 13

제8항에 있어서, 제2 정지상과 생물반응기는 서로 유체 연결되는 것인, 장치.

청구항 14

생물반응기와 크로마토그래피용 정지상의 배열을 포함하는 장치로서,

(a) 생물반응기는 림프구를 자극할 수 있는 다양체화 시약을 사용한 림프구의 증대를 위한 것이되,

(i) 다양체화 시약은 가용성 형태이고 (1) 세포 표면상의 CD3 분자에 특이적으로 결합하는 제1 항체 또는 항체 단편에 제1 스트렙타비딘-결합 웨티드를 통하여 가역적으로 결합하고 (2) 세포 표면상의 CD28 분자에 특이적으로 결합하는 제2 항체 또는 항체 단편에 제2 스트렙타비딘-결합 웨티드를 통하여 가역적으로 결합하며, 여기서 제1 항체 또는 항체 단편은 림프구 표면상의 수용체 분자에 결합하여 림프구에 일차 활성화 신호를 제공하고, 제2 항체 또는 항체 단편은 림프구 표면상의 보조 분자에 결합하여 림프구에서 보조 신호를 자극하고,

(ii) 다양체화 시약은 제1 및 제2 스트렙타비딘-결합 웨티드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하고,

(b) 정지상은 다양체화 시약의 제거를 위한 크로마토그래피 칼럼 내에 포함되고, 여기서 정지상은, 다양체화 시약에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 파트너를 포함하는 친화성 시약을 포함하고, 친화성 시약은 림프구가 통과하는 동안 다양체화 시약을 정지상에 고정시키기 위한 것이고,

(c) 생물반응기와 정지상은 유체 연결되는 것이고,

(a)의 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘에 대한 상대적인 위치로, 위치 44에서 Glu 대신에 소수성 지방족 아미노산, 위치 45에서 임의의 아미노산, 위치 46에서 소수성 지방족 아미노산, 및 위치 47에서 Val 대신에 염기성 아미노산을 포함하는, 장치.

청구항 15

제14항에 있어서, 정지상이 겔 여과 매트릭스를 포함하는 것인, 장치.

청구항 16

제14항에 있어서, 결합 파트너가 스트렙타비딘에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 장치.

청구항 17

제14항에 있어서, 결합 파트너가 비오틴을 포함하는 것인, 장치.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 정지상이 제1 정지상이고, 상기 배열이 제2 정지상을 추가로 포함하고, 여기서 제2 정지상은 제1 정지상에 유체 연결되는 것인, 장치.

청구항 19

제18항에 있어서, 제2 정지상이 겔 여과 매트릭스를 포함하는 것인, 장치.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 친화성 시약이 제1 친화성 시약이고, 제2 정지상은 제1 및 제2 스트렙타비딘-결합 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하는 제2 친화성 시약을 포함하고, 그로써 친화성 시약은 제1 및 제2 항체 또는 항체 단편을 정지상에 고정시키는 데 적합하고,

스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘에 대한 상대적인 위치로, 위치 44에서 Glu 대신에 소수성 지방족 아미노산, 위치 45에서 임의의 아미노산, 위치 46에서 소수성 지방족 아미노산, 및 위치 47에서 Val 대신에 염기성 아미노산을 포함하는, 장치.

청구항 21

제20항에 있어서, 제2 친화성 시약의 결합 부위는 비오틴에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 장치.

청구항 22

제20항에 있어서, 제2 친화성 시약이 스트렙타비딘을 포함하는 것인, 장치.

청구항 23

제20항에 있어서, 제2 친화성 시약이 스트렙타비딘 뮤테인을 포함하는 것인, 장치.

청구항 24

제23항에 있어서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ 또는 Ile⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷을 포함하는 것인, 장치.

청구항 25

제24항에 있어서, 스트렙타비딘 뮤테인의 N-말단 아미노산 잔기가 야생형 스트렙타비딘 아미노산 서열의 아미노산 10 내지 16의 영역 내에 있고, 스트렙타비딘 뮤테인의 C-말단 아미노산 잔기가 야생형 스트렙타비딘 아미노산 서열의 아미노산 133 내지 142의 영역 내에 있는 것인, 장치.

청구항 26

제18항에 있어서, 제2 정지상과 생물반응기는 서로 유체 연결되는 것인, 장치.

청구항 27

제1항 내지 제7항 및 제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 생물반응기가 T 세포의 증대를 위한 것인, 장치.

청구항 28

제1항 또는 제14항에 있어서, 생물반응기에 유체 연결된 시료 주입구를 포함하는 것인, 장치.

청구항 29

제1항 또는 제14항에 있어서, 정제 및 증대된 표적 세포를 위한 시료 배출구를 포함하고, 여기서 시료 배출구는 정지상에 유체 연결된 것인, 장치.

청구항 30

제1항 또는 제14항에 있어서, 기능적으로 폐쇄된 시스템인, 장치.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

관련 출원의 교차 참조

[0001] 본 발명은 그의 내용이 모든 목적을 위해 온전히 참조로서 본원에 포함되는, 미국특허청에 2014년 4월 16일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/980,506호 "세포 집단의 증대를 위한 방법, 키트 및 장치"의 우선권 이익을 주장한다.

기술 분야

[0004] 본 발명은 림프구 집단과 같은 세포 집단의 증대 (expansion) (증식: proliferation)과 관련이 있다. 본 발명은 일반적으로 세포 표면상의 수용체 분자에 대한 수용체 결합 분자 (예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 제1 제제)의 결합을 요구하고, 그로써 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 세포 집단의 증대 (증식)을 위한 신규한 방법 및 시약을 제공한다. 본 발명은 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제를 이용한다. 이 일차 활성화 신호는 증대/증식하도록 세포를 활성화시키기에 그 자체로서 충분할 수 있다. 이 제1 제제는 다양체화 시약에 가역적으로 또는 또한 비가역적으로 결합할 수 있다. 다양체화 시약은 또한 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 가질 수 있다. 세포 표면상의 보조 분자에 결합하는 경우, 제2 제제는 그로써 활성화된 세포가 증대하도록 자극할 수 있다. 또한 이 제2 제제는 다양체화 시약에 가역적으로 또는 또한 비가역적으로 결합할 수 있다. 다양체화 시약은 고체 지지체 상에 고정되거나 가용성일 수 있다. 일 측면에서, 본원에 기술된 방법은 림프구의 완전한 집단이 자극되고/증대되는 세포 집단의 일련의 증대가고, 이 증대에 필요한 시약은 그 후에 적합한 정지상에서 크로마토그래피에 의해 제거되며, 증대된/자극된 세포는 선택적으로, 예를 들어, T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)로 형질감염되고 도입된 T 세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체에 결합하는 상이한 자극 분자를 이용해 제2 자극 증대에 적용된다. 본 발명은 또한 선택된 세포 집단의 증대를 위한 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 시험관 내에서 T 세포 집단을 증식시키는 (propagating) 기술의 개발은 항원의 T 세포 인식 및 T 세포 활성화의 이해에 있어서 다수의 진보에 결정적이었다. 인간 항원-특이적 T 세포 클론의 생성을 위한 배양 방법의 개발은 다양한 인간 질환을 치료하기 위해 면역요법 방법을 확립하도록 T 세포에 의해 인식되는 병원체 및 종양에 의해 발현되는 항원을 정의하는데 유용하였다. 항원-특이적 T 세포는 이러한 T 세포의 주입이 종양-보유 숙주에서 항-종양 반응성을 갖는 것으로 나타났던 입양 세포 면역요법 (adoptive cellular immunotherapy) 또는 암요법에 사용하기 위해 시험관 내에서 증대될 수 있다. 나아가, 입양 면역요법은 또한 면역손상된 개인에서 바이러스 감염을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0006] 최근 몇 년간 확립되어 온 외인성 성장 인자 및 보조 세포의 부재하에서 인간 T 세포를 증대하는 시험관 내 방법이 미국특허 제6,352,694 B1호 및 유럽특허 제EP 0 700 430 B1호에 기술되어 있다. T 세포 집단이 증식하도록 유도하는 시험관 내 방법이 이를 특허에 기술되어 있다. 이 방법은 그 위에 직접적으로 고정된: (a) T 세포에 일차 활성화 신호를 제공하여, 그로써 T 세포를 활성화하는 제1 제제; 및 (b) T 세포 표면의 보조 분자를 자극하여, 그로써 활성화된 T 세포를 자극하는 제2 제제를 갖는 고체상 표면을 T 세포 집단과 접촉시키는 것을 포함한다. T 세포에 대한 제1 제제와 제2 제제의 결합은 T 세포가 증식/증대하도록 유도한다. 미국특허 제6,352,694 B1호 및 유럽특허 제EP 0 700 430 B1호에 기술된 바람직한 제1 제제는 TCR/CD3 (TCR = T 세포 수용체) 복합체에 결합하여 그로써 T 세포에서 TCR/CD3 복합체-연관 신호를 자극하는 단클론 항-CD3 항체이다. 이들 두 특허에 따른 바람직한 제2 제제는 T 세포 상에 존재하는 보조 분자 CD28에 결합하는 단클론 항-CD28 항체이다. CD28 보조 분자에 대한 제2 제제의 결합은 활성화된 T 세포의 증대/증식을 위해 필요한 필수적인 공-자극 (co-stimulus)을 제공한다. 한편, T 세포 증대를 위해 Dynabeads® CD3/CD28 (Invitrogen)이 상업적으로 이용가능하다. Dynabeads® CD3/CD28 CTS™은 인간 T 세포에서 CD3 및 CD28 세포 표면 분자에 대한 친화도 정제된 단클론 항체의 혼합물로 코팅된 균질한, 4.5 μm 초상자성 (superparamagnetic), 멸균, 비-발열성 폴리스티렌 비드이다.

[0007] 그러나, 이를 자성 비드는 증대된 T 세포를 환자에 투여하기 전에 완전히 제거된다는 것이 확인되어야만 하기 때문에, 이러한 자석 비드는, 예를 들어, 임상 시험 또는 치료적 목적에 요구되는 조건하에서 세포를 증대시키는 방법 내로 통합되기가 어렵다. 따라서, 본 발명은 연구, 진단 및 특히 치료적 목적을 위해 조절 T 세포 또는 중심 기억 T 세포와 같은 세포 집단을 증대시키는 대안적인 방법을 제공하는 것을 목표로 한다. 이상적으로, 이 신규한 방법은 또한 치료적 응용을 위해 목적한 세포 집단의 신속하고 용이한 증대를 위해 사용될 수 있는 자동화 과정 내로의 통합에 상용성이어야 한다.

[0008] 이 목적은 독립항의 청구대상, 그 중에서도 독립항에 언급된 바와 같은 방법, 키트, 배열 (arrangement) 및 장치에 의해 해결된다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 적합한 제제의 결합 시 세포 집단에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 증대 (증식)을 위해 세포 집단을 활성화시킬 수 있는 수용체 분자를 그의 표면에 갖는, 요구되는 세포 집단의 시험관 내 증대를 위한 방법, 키트, 배열, 및 장치를 제공한다. 따라서, 본 발명의 방법은 또한 세포 집단의 증식을 유도하기 위해 사용된다.

[0010] 제1 측면에 따르면, 본 발명은 세포 집단을 포함하는 시료를 다양체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 집단을 증대시키는 시험관 내 방법을 제공하고, 여기서

[0011] 다양체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제를 갖고;

[0012] 다양체화 시약은 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0013] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되고,

[0014] 제1 제제는 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다.

[0015] 제2 측면에 따르면, 본 발명은 세포 집단을 포함하는 시료를 다양체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포

집단을 증대시키는 시험관 내 방법을 제공하고, 여기서,

[0016] 다양체화 시약은 가용성 형태이고 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제를 가지며;

[0017] 다양체화 시약은 제1 제제의 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0018] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 결합 부위 Z1에 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되고,

[0019] 제1 제제는 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다.

[0020] 제3 측면에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는, 세포 집단의 증대를 위한 시약 키트를 제공한다:

[0021] (i) 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z를 포함하는, 다양체화 시약,

[0022] (ii) 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다.

[0023] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되는 것인, 제1 제제,

[0024] (iii) 세포 표면의 보조 분자를 자극하는 제2 제제로서,

[0025] 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다양체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되고, 제2 제제는 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 활성화된 세포를 자극하는 것인, 제2 제제.

[0026] 제4 측면에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는, 세포 집단의 증대를 위한 시약 키트를 제공한다:

[0027] (i) 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z를 포함하는, 다양체화 시약,

[0028] (ii) 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다.

[0029] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 결합 부위 Z1에 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되는 것인, 제1 제제.

[0030] 제5 측면에 따르면, 본 발명은 T 세포를 포함하는 럼프구 집단을 연속적으로 증대시키는 시험관 내 방법을 제공하고, 이 방법은 럼프구 집단을 포함하는 T 세포를 포함하는 시료를 다양체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서

[0031] 다양체화 시약은 가용성 형태이고 그 위에 가역적으로 고정된, (i) T 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제 및 (ii) T 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 가지고,

[0032] 다양체화 시약은 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0033] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되고,

[0034] 다양체화 시약은 제2 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z2를 포함하고,

[0035] 제2 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다양체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되고,

[0036] 제1 제제는 T 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 T 세포를 활성화시키고,

[0037] 제2 제제는 T 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 활성화된 세포를 자극하고, 그로써 제1 제제와 제2 제제가

함께 T 세포의 증대를 유도한다.

[0038] 제6 측면에 따르면, 본 발명은 생물반응기 (bioreactor) 및 크로마토그래피용 정지상의 배열을 제공하고, 여기서 생물반응기는 세포의 증대에 적합하고,

[0039] 정지상은 세포 분리 및 시약의 제거에 적합하고, 정지상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스이며, 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 친화성 시약을 포함하고, 친화성 시약은 제1 제제에 포함된 결합 파트너 C1에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z1을 포함하고/하거나 친화성 시약은 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C2에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z2를 포함하여, 그로써 제1 제제 및/또는 제2 제제, 제1 결합 파트너 C1 및/또는 유리 제2 결합 파트너 C2를 정지상 상에 고정하는데 적합하고,

[0040] 생물반응기 및 정지상은 유체 연결된다.

[0041] 제7 측면에 따르면, 본 발명은 제6 측면에 따른 생물반응기 및 크로마토그래피용 정지상의 적어도 하나의 배열을 포함하는 세포 집단의 경제 및 증대를 위한 장치를 제공한다.

[0042] 제8 측면에 따르면, 본 발명은 세포 집단을 증대시킬 수 있는 다양체화 시약을 제공하고, 여기서

[0043] 다양체화 시약은 가용성이고 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0044] 다양체화 시약은 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 상기 제1 제제를 갖고;

[0045] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고,

[0046] 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합된다.

[0047] 제9 측면에 따르면, 본 발명은 하기를 포함하는, 세포 집단을 증대시킬 수 있는 조성물을 제공한다:

[0048] (i) 제1 다양체화 시약으로서,

[0049] 제1 다양체화 시약은 가용성 형태이고 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0050] 제1 다양체화 시약은 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 상기 제1 제제를 갖고;

[0051] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다양체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되는 것인, 제1 다양체화 시약, 및

[0052] (ii) 제2 다양체화 시약으로서,

[0053] 제2 다양체화 시약은 가용성 형태이고 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z2를 포함하고,

[0054] 다양체화 시약은 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 상기 제2 분자를 갖고,

[0055] 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다양체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z2에 결합할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다양체화 시약에 결합되는 것인, 제2 다양체화 시약.

도면의 간단한 설명

[0056] 본 발명은 비-제한적 실시예 및 첨부의 도면과 함께 고려될 때 상세한 설명을 참조하여 더욱 잘 이해될 것이다. 도면은 본 발명에 따른 방법의 실시양태를 설명한다. 이론에 의해 구속됨이 없이, 도면은 기본적인 증대 기전에 관한 결론을 포함한다. 이 결론은 단지 예시적인 목적으로 제공되며 단지 분자적 수준에서 달성가능한 증대 방법의 가시화를 허용하기 위해 제공된다.

도 1은 세포 표면 수용체를 갖는 세포 집단을 증대하는 시험관 내 방법의 실시양태를 도시한 것으로, 제1 제제에 의한 이의 결합은 세포를 증대시키기 위한 활성화 신호를 제공할 수 있다.

도 1a에 나타난 바와 같이, 표면 수용체 분자 (30)를 운반하는 세포 집단 (2)을 포함하는 시료를 다양체화 시약 (4)과 접촉시킨다. 세포 집단 (2)은 표면 수용체 분자 (30)가 결여된 다른 세포 집단 (22)과의 혼합물이다. 다양체화 시약 (4)은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성 신호를 제공하는 제1 제제 (6)를 갖는다. 다양체화 시약 (4)은 제1 제제 (6)의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1 (42)를 포함하고, 제1 제제 (6)는 다양체화 시약의 결합 부위 Z1 (44)에 가역적으로 결합할 수 있는 결합 파트너 C1 (6a)를 포함한다. 따라서, 고정화를 위해, 제1 제제 (6)는 결합 파트너 C1 (6a)과 결합 부위 Z1 (42) 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다양체화 시약 (4)에 결합된다. 도 1에 나타난 실시예에서, 다양체화 시약 (4)은 이 실시예에 사용되지 않은 제2 결합 부위 Z2 (44)를 갖는다. 다양체화 시약 (4)은 자성 비드, 폴리머 비드, 또는 세포 배양 플레이트 또는 반응기의 표면과 같은 고체 지지체 (10)에 스스로 고정된다. 세포 집단 (2)은, 예를 들어, CD40 수용체를 통해 활성화될 수 있는 B 세포 집단과 같은 램프구 세포 집단일 수 있다 (예를 들어, Carpenter et al, *Journal of Translational Medicine* 2009, 7: 93 "Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation 참조). 이 경우에, 세포 표면 분자 (30)는 CD40이고 제1 제제 (6)는 요구되는 활성화 신호를 제공하는 임의의 CD40 결합 분자, 예를 들어, 단클론 항체 CP-870,893 또는 일가 Fab 단편과 같은 이의 항체 결합 단편일 수 있다. 제1 제제 (6)의 결합 파트너 C1은, 예를 들어, 항체 분자의 두 폴리펩티드 쇄 (중쇄 또는 경쇄) 중 하나의 C-말단에 융합 또는 접합되는 임의의 친화성 웨პ티드일 수 있다. 결합 파트너 C1 (6a)은, 예를 들어, 미국특허 제5,506,121호에 기술된, "Strep-tag®"로도 알려진, 웨პ티드 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호: 1)와 같은 스트렙타비딘-결합 웨პ티드, 또는 국제특허공개 제WO 02/077018호 또는 미국특허 제7,981,632호에 기술된 바와 같은 2개 이상의 개별 결합 분자의 연속된 배열을 갖는 스트렙타비딘 결합 웨პ티드일 수 있다. 결합 파트너 C1로서 스트렙타비딘 결합 웨პ티드를 사용하는 경우, 다양체화 시약 (4)은 도 1에 도식적으로 나타난 스트렙타비딘 웨პ티드 (=제1 결합 파트너 C1 (6a))가 그의 (비오틴) 결합 부위 Z1 (42)을 통해 그에 가역적으로 결합하는 임의의 스트렙타비딘 뮤테인일 수 있다. 이러한 다양체화 시약은 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에서 아미노산 서열 $Va1^{44-}Thr^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}$ (서열번호: 2)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 (유사체) 또는 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 $11e^{44}-Gly^{45}-Ala^{46}-Arg^{47}$ (서열번호: 3)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 (유사체)일 수 있고, 이 둘 모두는, 예를 들어, 미국특허 제6,103,493호에 기술되어 있고, 상품명 Strep-Tactin®으로 상업적으로 이용가능하다. 도 1의 실시예에서, 다양체화 시약 (4)은 멀티머 칼로듈린 또는 글루타치온-S-트랜스퍼라제를 추가로 포함할 수 있는데, 이 둘 모두는 칼모듈린 결합 웨პ티드 또는 글루타치온과 가역적 결합을 형성한다. 따라서, 결합 부위 Z2 (44)는 칼모듈린 또는 글루타치온-S-트랜스퍼라제에 의해 형성될 수 있다. 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인과 칼모듈린의 이러한 단백질 접합체는, 예를 들어, 이관능성 링커를 사용함으로써 표준 단백질 화학에 의해 제조될 수 있다.

도 1b에 나타난 바와 같이, 세포 집단 (2)을 다양체화 시약 (4)과 접촉시키고 세포 집단을 다양체화 시약 (4)과 통상적으로 인큐베이션한 후, 세포 집단 (2)은 제1 제제 (6)를 통해 다양체화 시약과 복합체를 형성하고/이에 결합된다. 제1 제제는 이 실시예에서 CD40과 같은 세포 표면 수용체 분자에 특이적으로 결합하고, 예를 들어, B 세포의 세포 증대를 위한 활성화 신호를 제공한다. 특이적 세포 표면 분자 (30)가 결여된 초기 시료에 함유된 다른 세포 집단 (22)은 다양체화 시약에 결합하지 않는다. 이 측면에서, 세포 집단 (2)이 통상 그의 표면상에 복수 카페의 세포 표면 분자 (30)를 가지며 이들 복수 카페의 결합이 전형적으로 활성화에 요구된다는 점이 주목된다. 따라서, 다양체화 시약 (4)은 복수의 제1 제제 (6)가 제1 제제의 "다양체화"를 달성하기 위해 가역적으로 결합할 수 있도록 전형적으로 1개 초과의 결합 부위 Z1을 제공하고, 이는 세포 집단 (2)에 대해 충분한 밀도로 제1 제제가 제시되어야 함을 의미한다 (도 1의 모식도에는 나타나지 않음). 이 측면에서, 본원에 사용된 바와 같은 다양체화 시약이 그와 같이 복수의 결합 부위 Z1을 갖는 것일 수 있고, 예를 들어, 그의 자연 상태에서 4개의 이러한 결합 부위 Z1을 갖는 스트렙타비딘 뮤테인 (호모-테트라머임)일 수 있음이 주목된다. 그러나 다양체화 시약이 그와 같이 결합 파트너 C1의 가역적 결합을 위한 단 하나의 결합 부위 Z1을 갖는 화합물을 기반으로 하는 것이 또한 가능하다. 이러한 예시가 멀티머 칼모듈린이다. 칼모듈린은 그와 같이 칼모듈린 결합 웨პ티드를 위해 단 하나의 결합 부위를 갖는다. 그러나, 칼모듈린은 비오틴화되고 그 후에 스트렙타비딘-올리고머와 반응할 수 있으며 (또한 하기 참조), 그로써 복수의 칼모듈린 분자가 "스캐폴드" 상에 고밀도로 제시되는 다양체화 시약을 제공하고, 그로써 멀티머 칼모듈린을 제공한다.

도 1c에 나타난 바와 같이, 인큐베이션 (통상 요구되는 세포 집단의 증대를 달성하기에 적합한 기간에 걸쳐서 수행됨) 후, 제1 제제 (6)의 결합 파트너 C1 (6a)과 다양체화 시약 (4)의 결합 부위 Z1 사이의 결합은 각각의 가역적 결합의 파괴에 의해 파괴된다. 이 파괴는 다양체화 시약에 결합되어 있는 세포 집단 (2)을 함유하는 인

큐베이션/반응 혼합물에 경쟁자를 첨가함으로써 달성될 수 있다. 제1 제제의 결합 파트너 C1 (6a)과 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 (22) 사이의 가역적 결합의 경쟁적 과정 (경쟁적 용출로 이해될 수 있음)을 위해, 인큐베이션 혼합물/세포 집단을 제1 결합 파트너 C1 (6a)과 결합 부위 Z1 (22) 사이의 결합을 파괴할 수 있는 유리 제1 결합 파트너 C1 (20) 또는 상기 제1 결합 파트너 C의 유사체와 접촉시킬 수 있다. 결합 파트너 C1이 스트렙타비딘의 비오틴 결합 부위에 결합하는 스트렙타비딘 결합 웹티드인 실시예에서, 제1 유리 결합 파트너 C1 (20)은 경쟁적으로 결합하는 상응하는 유리 스트렙타디빈 결합 웹티드 또는 유사체일 수 있다. 이러한 유사체는, 예를 들어, 비오틴 또는 데스티오비오틴 (desthiobiotin)과 같은 비오틴 유사체일 수 있다.

도 1d에 나타난 바와 같이, 제1 유리 파트너 (20) 또는 이의 유사체의 첨가는 다량체화 시약 (4)으로부터 결합 파트너 C1 (6a)의 변위 (displacement)를 초래하고, 따라서, 결합 파트너 C1이 제1 제제 (6)에 포함되어 있으므로, 다량체화 시약 (4)으로부터 제1 제제 (6)가 변위된다. 특히 제1 제제와 세포 표면 수용체 (30) 사이의 결합 친화도가 10^{-2} M 내지 10^{-13} M의 범위인 해리 상수 (K_d)를 갖고 그로써 또한 가역적이라면, 제1 제제 (6)의 변위는 이어서 세포 표면 수용체 (30)로부터 제1 제제 (6)의 해리를 초래한다. 이 해리로 인해, 세포 집단 (2)의 자극이 또한 종료된다. 따라서, 본 발명은 세포 집단의 자극 또는 증대의 기간이 정확히 제어될 수 있고 그로써 또한 세포 집단의 기능적 상태가 면밀하게 제어될 수 있다는 이점을 제공한다. 이 맥락에서, 예를 들어, 이 실시예에서 CD40과 같은 세포 표면 수용체 분자를 비롯한, 이들의 항원에 대한 항체 분자의 결합 친화도가 일반적으로 10^{-7} M 내지 10^{-13} M의 K_d 의 친화도 범위인 것이 주목된다. 따라서, 통상의 단클론 항체가 본 발명에서 제1 제제 (및 또한 하기에 설명된 바와 같이 제2 제제)로서 사용될 수 있다. 더 강한 결합을 초래하는 임의의 불필요한 결합력 (avidity) 효과를 회피하기 위하여, 단클론 항체는 또한 Fab-단편 또는 단체 Fv 단편과 같은 이들의 일가 항체 단편의 형태로 사용될 수 있다.

또한, 세포 표면 분자 (30)로부터 제1 제제의 해리로 인해, 본 발명은 자극된 세포 집단이 자극 기간의 말기에 자극제가 결여되고, 생물반응기 표면 또는 자성 비드와 같은 고체 치치제 상에 고정된 다량체화 시약 (4)은 그대로 유지되면서, 방법에 사용된 모든 다른 제제, 즉 제1 제제 (6)뿐만 아니라 결합 파트너 C1 또는 이의 유사체의 유리 제1 파트너 (20)가 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 기술된 "제거 카트리지 (removal cartridge)"를 통해 자극된 세포 집단 (2)으로부터 용이하게 제거될 수 있다는 이점을 갖는다. 따라서, WO 2013/124474의 "제거 카트리지"에 대한 기술에 따라서, 제1 제제 (6) 및 유리 제1 파트너 (20)의 제거로 되돌아가면 (예를 들어, 도 4를 인용 참조함), 여기서 도 1d에서 수득된 용출 시료를 WO 2013/124474의 제2 크로마토그래피 칼럼 상에 로딩할 수 있다. 이 크로마토그래피 칼럼은 친화성 크로마토그래피 매트릭스이고, 동시에, 젤 투과 매트릭스로도 작용할 수 있는 적합한 정지상을 갖는다. 이 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 그 위에 고정된 친화성 시약을 갖는다. 친화성 시약은, 본 실시예의 경우에, 예를 들어, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘, 아비딘 뮤테인 또는 이의 혼합물일 수 있다. 제1 제제 (6), 결합 파트너 C1의 제1 유리 파트너 (20) (이는 또한 본원에서 "경쟁 시약 (competition reagent)"으로 불림)는 친화성 시약에 결합하여, 그로써 크로마토그래피 매트릭스 상에 고정된다. 그 결과, 단리되고 증대된 세포 집단 (2)을 함유하는 용출 시료에서 제1 제제 (6) 및 경쟁 시약 (20)이 고갈된다. 임의의 반응물이 결여된, 증대된 세포 집단 (2)은 이제 추가 사용, 예를 들어, 진단적 응용 (예를 들어, 추가의 FACSTM 분류) 또는 임의의 세포 기반 진단적 응용을 위한 상태에 놓이게 된다.

도 2는 본 발명의 증대 방법의 추가의 실시양태를 나타낸다. 도 2a에 나타난 바와 같이, 시료는 2개의 특이적 세포 표면 분자 (30) 및 (32)를 보유하는 세포 집단 (2)을 포함한다. 세포 표면 분자 (30)는 세포 집단에 대한 일차 활성화 신호에 관여하는 반면, 세포 표면 분자 (32)는 세포에 자극을 제공하는데 관여하는 세포 표면상의 보조 분자이다. 세포 집단은, 예를 들어, 세포 표면 분자 (30)가 TCR/CD3 복합체이고 세포 표면 분자 (32)가 보조 분자 CD28인 T 세포 집단일 수 있다. 일차 활성화 신호로서 TCR/CD3 복합체 및 공-자극제로서 CD28 둘 모두의 결합이 T 세포의 증대/증식에 요구된다. T 세포 집단 (2)은 표면 수용체 분자 (30) 및 (32)가 결여된 다른 세포 집단 (22)과의 혼합물이다. 또한 이 실시양태에서, 세포 집단 (2)은 다량체화 시약 (4)과 접촉한다. 다량체화 시약 (4)은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제 (6)를 갖는다. 또한, 다량체화 제제는 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상의 보조 분자로서 CD28을 자극하는 제2 제제 (8)를 갖는다.

다량체화 시약 (4)은 제1 제제 (6)의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1 (42)을 포함하고 제1 제제 (6)는 적어도 하나의 결합 파트너 C1 (6a)을 포함하며, 결합 파트너 C1 (6a)은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 (44)에 가역적으로 결합할 수 있다. 따라서, 고정화를 위해, 제1 제제 (6)는 결합 파트너 C1 (6a)과 결합

부위 Z1 (42) 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약 (4)에 결합된다. 또한, 도 2에 예시된 실시예에서, 제2 제제 (8)는 결합 파트너 C2 (8a)를 포함하는 반면, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z2 (44)에 가역적으로 결합할 수 있다. 제2 제제 (8)는 결합 파트너 C2 (8a)와 결합 부위 Z2 (44) 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약 (4)에 결합된다. 이 실시예에서, 제1 제제 (6)는 단클론 항-CD3-항체 또는 Fab 단편과 같은 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 제2 제제 (8)는 단클론 항-CD28 항체 또는 Fab 단편과 같은 이의 항원 결합 단편일 수 있다. 제1 결합 파트너 (6a)는 항-CD3 항체 또는 항-CD3 항체 단편에 융합 또는 접합된 스트렙타비딘 결합 펩티드 (6a)일 수 있다. 제2 결합 파트너 (8a)는 또한 CD28 항체 또는 CD28 결합 항체 단편에 접합 또는 융합된 칼모듈린 결합 펩티드일 수 있다. 이 맥락에서, 예를 들어, CD3 또는 CD28에 대한 단클론 항체는 잘 알려져 있고 (예를 들어, 상기에 논의된, 미국특허 제6,352,694 B호 또는 유럽특허 제EP 0 700 430 B1호 참조), 단지 일부만 언급하자면, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Life Technologies, (Carlsbad, CA, USA), BD Biosciences (San Jose, CA, USA), Biologics (San Diego, CA, USA) 또는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)와 같은 다수의 공급업체로부터 상업적으로 이용가능함이 주목된다. 따라서, 이러한 단클론 항체는 제1 및 제2 제제로서 사용될 수 있고, 예를 들어, 결합 파트너 C1 또는 C2와 화학적으로 결합 (접합)될 수 있다. 대안적으로, 하이브리도마 세포주로부터 가변 도메인의 유전자를 클로닝하거나 그의 아미노산 서열이 공지된 항체를 이용하여 재조합적으로 Fab 단편 또는 Fv와 같은 각각의 항체 단편을 또한 생산할 수 있다. 하이브리도마 세포주 OKT3 (ATCC® CRL-8001™, 미국특허 제4,361,549호에 기술됨) 단클론 항-CD3 항체를 생산함) 및 문헌 [Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570] 및 GenBank 등재번호 AF451974.1로 기술된 항-CD28 항체 28.3 둘 모두에 대해 실시에 항목에서 본원에 기술된 바와 같이 이러한 접근법을 사용하는 경우, 결합 파트너 C1 및 C2는 항체 단편이 경쇄 또는 중쇄 중 하나의 C-말단에 융합 펩티드로서 결합 파트너 C1 또는 C2를 보유하도록 재조합 생산에 사용되는 각각의 밸현 백터에 의해 편리하게 제공된다 (이 맥락에서, 문헌 [Arakawa et al. J. Biochem. 120, 657-662 (1996)]에 기술된 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열이 첨부하는 서열목록에 서열번호: 17 및 18로서 예시를 목적으로 제공되는 반면, 문헌 [Vanhove et al, 상동]에 기재된 항-CD28 항체 28.3의 가변 도메인의 아미노산 서열은 첨부하는 서열목록에 서열번호: 19 (VH) 및 20 (VL)으로 제공됨). 또한 항체 분자의 가변 도메인을 클로닝하고 각각의 항체 단편을 재조합적으로 생산하는 이 방법은 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는데, 예를 들어, 문헌 [Skerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. Gene 141, 79-84, or Skerra, A. (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. Curr Opin Immunol. 5, 256-562]을 참고한다. 마지막으로, 파아지 디스플레이 (예컨대, Kay, B.K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins A Laboratory Manual*, 1st Ed., Academic Press, New York NY; Lowman, H.B. (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-424, or Rodi, D.J., and Makowski, L. (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87-93에서 논의됨), 리보솜 디스플레이 (Amstutz, P. et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 400-405에서 논의됨) 또는 문헌 [Wilson, D.S. et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3750-3755]에 보고된 바와 같은 mRNA 디스플레이와 같이 잘 알려진 진화적 방법에 의해 도 2의 실시예에서와 같이 소정의 표적, 예컨대 CD3 또는 CD28에 대해 항체 유사 특성을 갖는 인공 결합 분자의 항체 분자를 또한 생성할 수 있다.

도 2에 나타난 실시예의 경우에, 다량체화 시약 (4)은 2개의 상이한 결합 부위 Z1 (42) 및 Z2 (44)를 갖는다. 결합 파트너 C1 (6a)이 스트렙타비딘 결합 펩티드인 경우, 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z1 (42)은 그에 스트렙타비딘 펩티드 (6a)가 가역적으로 결합하는 적합한 스트렙타비딘 뮤테인에 의해 제공된다. 결합 C2가 칼모듈린 결합 펩티드이므로, 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z2 (44)는 멀티머 칼모듈린에 의해 제공된다. 다량체화 시약 (4)은 단일 분자, 예를 들어 멀티머 칼모듈린과 스트렙타비딘의 접합체 (이 대안은 가용성 다량체화의 경우에 보통 사용될 것임)이거나 또한 2개의 독립적인 분자로 이루어질 수 있다. 후자 방안은 다량체화 시약 (44)이 도 2에 나타난 바와 같이 고체 지지체 상에 고정된 경우에 바람직하다. 이 경우에, 스트렙타비딘 뮤테인과 칼모듈린의 혼합물은, 예를 들어, 결합 부위 Z1 및 Z2에 대해 1:1 몰비로 고체 지지체 상에 코팅 (고정)될 수 있다. 이 맥락에서, 고체 지지체의 표면상에 칼모듈린의 고정화로 인해, 상기에 설명된 바와 같은 멀티머 칼모듈린을 제조할 필요는 없지만 표면상의 칼모듈린의 고정화는 상기에 언급된 바와 같이, 세포 집단 (2)의 결합을 보장하기에 충분히 높은 밀도로, (칼모듈린 결합 펩티드에 대한 단일 결합 부위만을 갖는) 칼모듈린을 제시하기에 충분함이 주목된다. 예를 들어, 이 경우에, CD28에 대해 2개의 결합 부위를 갖는 이가 항체 단편 또는 그 자체로 2개의 동일한 결합 부위를 갖는 무손상 항체가 제2 시약 (8)으로서 사용될 수 있다.

도 2b에 나타난 바와 같이, T 세포 집단 (2)을 다량체화 시약 (4)과 접촉시키고 세포 집단을 다량체화 시약

(4)과 통상적으로 인큐베이션한 후, T 세포 집단 (2)은 제1 제제 (6)와 제2 제제 (8)를 통해 다량체화 제제와 복합체를 형성하고/이에 결합된다. 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)는 TCR/CD3 복합체 및 보조 분자 CD28에 특이적으로 결합하여, T 세포의 증식/증대를 유도한다.

도 2c에 나타난 바와 같이, 인큐베이션 (요구되는 세포 집단의 증대를 달성하기에 적합한 시간에 걸쳐서 통상적으로 수행됨) 후, 제1 제제 (6)의 결합 파트너 C1 (6a)과 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z1 사이의 결합은 각각의 가역적 결합을 파괴함으로써 파괴된다. 유사하게, 제2 제제 (8)의 결합 파트너 C2 (8a)와 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z2 사이의 결합은 각각의 가역적 결합을 파괴함으로써 파괴된다. 제1 제제 (6)의 결합 파트너 C1 (6a)과 결합 부위 Z1 사이의 가역적 결합은 비오틴 (제1 유리 파트너의 유사체 (20)로 작용함)에 의해 파괴될 수 있는 반면, 칼모듈린 결합 펩티드에 대한 칼모듈린의 결합은 칼슘 이온 (Ca^{2+}) 의존적이기 때문에 제1 제제 (8)의 결합 파트너 C2 (8a)와 결합 부위 Z2 사이의 가역적 결합은 EDTA 또는 EGTA와 같은 금속 킬레이트화제 (칼슘 킬레이트화제) (제2 유리 파트너의 유사체 (20)로서 작용함)의 첨가에 의해 파괴될 수 있다. 이는 물론 세포 집단 (2)의 접촉이 Ca^{2+} 함유 완충제 중에서 수행되는 것을 의미한다.

도 2d에 나타난 바와 같이, 제1 유리 파트너 및 제2 유리 파트너의 유사체 (20)의 첨가는, 각각 다량체화 시약 (4)으로부터 결합 파트너 C1 (6a) 및 C2 (8a)의 변위를 초래하고, 그로써 다량체화 시약 (4)으로부터 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)의 변위를 초래한다. 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)의 이 변위는 이어서 TCR/CD3 복합체 및 보조 분자 CD28로부터 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)의 해리를 초래하여, 세포 집단 (2)의 자극/증대를 종료시킨다. 따라서, 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명은 T 세포 집단의 자극 또는 증대 기간을 정확히 제어할 수 있고 따라서 또한 T 세포 집단의 기능적 상태를 면밀하게 제어할 수 있다는 이점을 제공한다. 도 1d에 예시된 바와 같이 세포의 용출 후, 제1 제제 (6), 제2 시약 (8)뿐만 아니라 결합 파트너 C1의 유리 제1 파트너 및 결합 파트너 C2의 제2 유리 파트너의 유사체 (20)는 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 기술된 "제거 카트리지"를 통해 자극된 세포 집단 (2)로부터 용이하게 제거될 수 있다. 또한, 중요하게도, 초기 시료가, 예를 들어, Ficoll 구배로부터 수득된 PMBC의 형태로 럼프구 집단이었던 경우에, T 세포 집단 (2)은 이제 본원에 정의된 바와 같은 연속 증대에 이용될 수 있다. 증대된 세포 집단은 (예컨대, CD3/CD28을 통한 초기 자극에 의해), 증대 동안에, 예컨대, T 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR, 인공 T 세포 수용체로도 알려짐)를 이용한 형질감염될 수 있기 때문에, 유전적으로 변형된 세포가 그 후에 초기 자극으로부터 유리될 수 있고 이어서, 예컨대, 드 노보 (de novo) 도입된 수용체를 통해 제2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 이들 제2 자극은 펩티드/MHC 분자 형태의 항원성 자극, 유전적으로 도입된 수용체의 동족 (교차-결합) 리간드 (예컨대, CAR의 천연 리간드) 또는 새로운 수용체의 골격 내부에 (예컨대, 수용체 내부의 불변 영역을 인식함으로써) 직접적으로 결합하는 임의의 리간드 (예컨대, 항체)의 형태로 항원성 자극을 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 일련의 증대로부터 수득된 T 세포 집단은 선별적 세포 전달 (adoptive cell transfer)에 이용될 수 있다.

도 3은 본 발명의 증대 방법의 추가의 실시양태를 나타낸다. 이 실시예에 사용된 시료 또한 2개의 특이적 세포 표면 분자 (30) 및 (32)를 운반하는 T 세포 집단 (2)을 포함하고, 이들 세포 표면 분자 (30)는 TCR/CD3 복합체이고 세포 표면 분자 (32)는 보조 분자 CD28이다. 도 3a에서, T 세포 집단 (2)은 다량체화 시약 (4)과 접촉된 후에 보여진다. 또한 이 실시예에서, 다량체화 시약 (4)은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 제1 제제 (6)로서 T 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, 제2 제제 (8)로서 보조 분자, CD28을 자극하는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 갖는다.

도 3의 실시예에 나타낸 다량체화 시약 (4)은 제1 제제 (6)와 제2 제제 (8) 둘 모두의 가역적 결합을 위한 단일 유형의 결합 부위 Z1 (42)만을 단지 포함한다. 제1 제제 (6)와 제2 제제 (8) 둘 모두는 적어도 하나의 결합 파트너 C1 (6a, 8a)을 포함하고, 결합 파트너 C1 (6a)과 결합 파트너 (8a) 둘 모두는 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 (44)에 가역적으로 결합할 수 있다. 따라서, 고정화를 위해, 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)는 각각 결합 파트너 C1 (6a) 및 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z1 (42) 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약 (4)에 결합된다. 결합 파트너 C1 및 C2는 상이하거나 동일할 수 있다. 예를 들어, 결합 파트너 C1은 서열 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호: 1), "Strep-tag®")의 스트렙타비딘 결합 펩티드일 수 있고, 결합 파트너 C2는 문헌 [Junttila et al., Proteomics 5 (2005), 1199-1203] 또는 미국특허 제7,981,632호에 개시된 서열 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₃-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호: 4), "di-tag3"으로도 알려짐) 또는 서열 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호: 5), "di-tag2"로도 알려짐)의 스트렙타비딘 결합 펩티드일 수 있다. 이들 모든 스트렙타비딘 결합 펩티드는 동일한 결합 부위, 즉 스트렙타비딘의 비오틴결합 부위에 결합한다. 이러한 스트렙타비딘 결

합 패티드의 하나 이상이 결합 파트너 C1 및 C2로 사용되는 경우, 다량체화 시약 (4)은 스트렙타비딘 뮤테인이다. 도 3에 나타난 바와 같이, 가용성 다량체화 시약 (4)이 사용된다. 스트렙타비딘 뮤테인의 경우, 이 가용성 다량체화 시약은, 예를 들어, 스트렙타비딘 또는 아비딘의 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 임의의 뮤테인 (유사체)의 올리고머 또는 폴리머일 수 있다. 올리고머는 스트렙타비딘, 아비딘 또는 이의 뮤테인의 3개 이상의 모노머를 포함할 수 있다. 올리고머 또는 폴리머는 다당류에 의해 교차결합될 수 있다. 스트렙타비딘 또는 아비딘의 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 뮤테인의 이러한 올리고머 또는 폴리머는 본질적으로 문헌 ["Noguchi, A., Takahashi, T., Yamaguchi, T., Kitamura, K., Takakura, Y., Hashida, M. & Sezaki, H. (1992), Preparation and properties of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin C dextran conjugate. Bioconjugate Chemistry 3,132-137"]에 기술된 바와 같이, 첫 번째 단계에서 다당류, 예컨대 텍스트란 내로 카르복실 잔기의 도입에 의해 제조될 수 있다. 두 번째 단계에서, 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 이의 뮤테인은 통상의 카보디이미드 화학을 이용하여 텍스트란 골격 내의 카르복실기에 내부 리신 잔기 및/또는 유리 N-말단의 일차 아미노기를 통해 결합된다. 대안적으로, 스트렙타비딘 또는 아비딘의 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 임의의 뮤테인의 교차-결합된 올리고머 또는 폴리머는 또한 글루타르알데히드와 같은 이관능성 링커를 통한 교차결합에 의해 또는 문헌에 기술된 다른 방법에 의해 수득될 수 있다.

결합 파트너 C1 및 C2로서 사용하는 경우, 다량체화 제제의 동일한 결합 부위 (42)에 결합하는 모이어티는, 도 3b에 나타난 바와 같이, (제1 결합 파트너 C1의, 그리고 또한 제2 결합 파트너 C2의) 동일한 유리 파트너 또는 이의 유사체가 T 세포 집단 (2)의 증대를 종료시키고 다량체화 제제로부터 T 세포 집단 (2)을 방출시키는데 사용될 수 있다는 이점을 갖는다. 도 3의 실시예에서, 비오틴 또는 비오틴 유사체 (이미노비오틴 또는 데스티오비오틴)와 같은 제1 및 제2 파트너 C1 및 C2의 유사체는 T 세포 집단 (2)의 증대의 종료 및 용출에 편리하게 사용될 수 있다.

도 3c에 나타난 바와 같이, 도 1d에 예시된 바와 같은 세포의 용출 후, 제1 제제 (6), 제2 시약 (8), 뿐만 아니라 결합 파트너 C1의 제1 유리 파트너 및 결합 파트너 C2의 제2 유리 파트너의 유사체로서 비오틴은 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 기술된 "제거 카트리지"를 통해 자극된 세포 집단 (2)으로부터 용이하게 제거될 수 있다. 또한, 가용성 다량체화 시약 (4)을 사용하는 실시양태는 자성 비드와 같은 임의의 고체 지지체를 회피할 수 있다는 추가의 이점을 갖는다. 이는 이러한 자성 비드에 의한 활성화된 T 세포의 오염 위험성이 존재하지 않음을 의미한다. 이는 또한 GMP 표준에 순응하는 과정이 최종 증대된 T 세포 집단에 자성 비드가 결여됨을 보증하기 위해 부가적인 측정이 취해져야만 하는 Dynabeads®의 사용과 같은 공지의 방법에 비해 훨씬 용이하게 확립될 수 있음을 의미한다. 나아가, 가용성 다량체화 시약의 사용은, 세포를 원심분리에 의해 간단히 침강시킬 수 있고 가용성 다량체화 제제를 포함하는 상청액을 제거할 수 있기 때문에 활성화된 세포 집단 (T 세포, B 세포 또는 또한 자연 살해 세포)로부터 이의 제거를 더 용이하게 만든다. 대안적으로, 가용성 다량체화 제제는 국제특허공개 제WO 2013/124474호의 제거 카트리지의 젤 투파 매트릭스에서 증대된 세포 집단으로부터 제거될 수 있다. 고체상 (예컨대, 자성 비드)이 전혀 존재하지 않기 때문에, 본 발명은 또한 GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom)로부터 입수 가능한 Xuri 세포 증대 시스템 W25 및 WAVE 생물반응기 2/10 System, 또는 TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA)로부터 입수 가능한 Quantum® 세포 증대 시스템과 같은 공지의 세포 증대 시스템 내로 통합될 수 있는 세포의 증대를 위한 자동화된 폐쇄 시스템을 제공한다.

도 4는 CD3+ T 반응기 (responder) 세포가 스트렙타비딘 뮤테인 Strep-tactin®으로 코팅된 비드 상에 가역적으로 고정된 α CD3 및 α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극한 후 증식시킨 실험의 결과를 나타낸다. 도 4A는 자극된 세포의 크기-분포 (전방 산란)을 보여주는 히스토그램이고, 도 4B는 도 4B의 상부에 표시된 세포 분열당 세포의 수에 따른 증식 정도를 나타내는 히스토그램을 도시하고 (0은 미분열 세포를 나타내고; 5는 적어도 5회 분열을 거친 세포를 나타냄), 도 4C는 4일의 자극 후 배양 접시의 사진을 나타낸다.

도 5는 Strep-tactin® (또한 본원에서는 Fab 멀티머로도 언급됨)으로 다량체화된 α CD3 항체 OKT3 또는 OKT3의 Fab 단편 중 하나로 표지된 Jurkat 세포에서 차동적 세포내 칼슘 동원의 결과를 나타낸다. 도 5A: Jurkat 세포를 칼슘-감수성 염료 Indo-1-AM과 함께 로딩하였고, PBS의 주입 (도립 백색 삼각형)에 의해 사전 D-비오틴 과피의 존재 또는 부재 (각각 짙은 회색 삼각형 및 밝은 회색 원형) 하에 α CD3 mAb (흑색 네모) 또는 α CD3 OKT3 Fab 멀티머 (모체 세포주 OKT3으로부터 유래함) 중 하나의 주입에 의해 칼슘 방출을 촉발하였다. 이노마이신의 적용이 양성 대조군으로 제공되었다. 세포내 Ca^{2+} 농도의 시-분해 (time-resolved) 변화를 FL6/FL7 비의 변화를 토대로 유세포 분석기로 모니터링하였다. 도 5B: Indo-1-AM-표지된 Jurkat 세포를 도 4a에 기술된 바와 같이 상이한 α CD3 자극으로 활성화시키고 (OKT3: 상부 그래프 및 α CD3 Fab-멀티머: 중간 그래프), 이어서

(t=140s) α CD3 Fab-멀티머 신호전달의 D-비오틴 매개 파괴가 수반되었다. PBS (하부 그래프) 및 이노마이신의 주입은 음성 또는 양성 대조군으로 제공되었다. 데이터는 3회 상이한 실험의 대표이다.

도 6은 항 CD3 OKT3 Fab-멀티머에 의한 가역적 염색의 결과를 보여준다. 신선하게 단리된 PBMC를 단클론 항체 (좌측 닷 플롯, Fab-멀티머에 대한 모체 클론) 또는 동족의 PE-표지된 Fab-멀티머 중 하나로 염색하였고 D-비오틴으로의 처리 전 (두 번째 좌측 칼럼) 또는 처리 후 (중간 칼럼)에 분석하였다. 신선한 PE-표지된 Strep-Tactin® (두 번째 좌측 칼럼)을 사용한 후속 세척 단계 후 잔여 Fab 모노머를 그 후에 검출하였다. 가역적으로 염색된 세포의 이차 Fab-멀티머 염색을 대조군 (우측 칼럼)으로 제공하였다. 오로지 생 (PI^{음성}) 세포만이 보여진다. 닷 플롯에서의 수는 게이트 내부의 세포 비율을 나타낸다.

도 7은 형광 표지로서 피코에리쓰린 (phycoerythrin)으로 표지된 Strep-Tactin®으로 다량체화된 항-CD28 Fab 단편의 가역적 결합에 의한 세포의 단리를 나타낸다. CD28+ 세포를 국제특허공개 제WO2013/011011호에 기술된 바와 같이 신선하게 단리된 PMBC로부터 Fab-멀티머 자성 세포 선별에 의해 선별/단리하였다. 선별 전에, 세포를 동족 형광 α CD28-멀티머 (좌측 닷 블롯) 또는 면역글로불린 카파 경쇄에 대해 제시된 항체 (두 번째 좌측 닷 플롯, α -Ig kappa mAb) 중 하나로 대조군 염색하였다. 선별 후, 세포를 D-비오틴으로 처리하고 이어서 자성 비드 및 Fab-멀티머를 제거하기 위해 세척하였다. 유리된 CD28+ 세포를 이어서 잠재적으로 잔존하는 Fab-모노머를 검출하기 위해 CD28 Fab-멀티머 (두 번째 좌측 닷 플롯) 또는 α -Ig kappa mAb (우측 닷 플롯)으로 (재-)염색하였다. 생 (PI^{음성}) CD3+ 세포만이 나타났다. 닷 플롯 내 수는 게이트 내부의 세포 비를 나타낸다.

도 8은 CD3+ T 반응기 세포를 가용성 다량체화 시약으로 작용하는 가용성 올리고머 Strep-tactin® 상에 가역적으로 고정된 가역적 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극시킨 후 중식시킨 실험의 결과를 나타낸다. 그의 결과가 도 8에 나타난 실험의 경우, 300.000개의 CD3+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 2 μ M 카복시플루오레세인 석시니미딜 에스테르 (Carboxyfluorescein succinimidyl ester: CFSE)로 표지하고 그 위에 둘 모두 경쇄에 스트렙타비딘 결합 웨პ티드로서 Strep-tag를 보유하는 α CD3 Fab 단편과 α CD28 Fab의 조합이 고정되어 있는 다양한 양의 가용성 Strep-tactin 올리고머의 제조물로 자극시켰다. ("1x"는 0.5 μ g α CD3- 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 3 μ g의 다량체화된 Strep-tactin에 상응하고; 수는 "1x"의 배수 양을 나타낸다). Tresp 세포를 비자극 상태로 놔두거나 음성 대조군으로 제공된 블랭크 Strep-tactin 멀티머 (Fab 부재)로 자극시켰다. Tresp 세포를 20 U/ml 인터류킨 2 (IL-2)가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중의 300.000개의 CD3 음성 자가 영양 세포 (autologous feeder cells) (30Gy로 조사됨)와 함께 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 배지 교환 없이 37°C에서 인큐베이션하고 FACS 분석으로 5일 후 CFSE 회색에 따라 증식을 분석하였다 (도 8B). 도 8A는 5일 간의 배양 후 세포의 크기 분포를 나타낸다. 히스토그램은 생 CD3+ 세포를 나타내는 반면, 도 8C는 1 mM D-비오틴으로 처리 후 자극 시약에 의해 유리되고 세척된 배양 후 세포를 나타낸다. 모노머 Fab 단편의 해리 및 제거를 형광 표지로서 피코에리쓰린 (ST-PE)으로 표지된 Strep-Tactin®으로 재염색하여 분석하였고 대표적인 히스토그램을 나타내었다. 도 8D는 Neubauer 계수 캠버를 사용하여 계수되고 각각의 자극 조건에 대해 플롯팅된 5일 후 생 (트립판 블루 음성) 세포의 절대 수를 나타낸다. 중간 세포 수를 도 8D에 나타내었고; 오류 막대는 표준 편차 (SD)를 나타낸다. 도 8E는 자극 5일 후 배양 접시의 사진을 보여준다.

도 9는 본 발명의 일련의 증대 방법의 예시를 도시하고 (도 9a) 도 9b는 일련의 증대의 일부 특징 및 이점을 간략히 기술한다.

도 10은 본 발명의 증대 방법과 함께 사용될 수 있는 본 발명의 배열을 보여준다. 이 배열 (100)은 생물반응기 (50), 제1 "제거 카트리지" (70) 및 제2 "제거 카트리지" (90)를 포함한다. 생물반응기 (50)는 제1 제거 카트리지 (70)에 유체 연결되고, 제1 제거 카트리지는 제2 제거 카트리지 (90)에 유체 연결된다. 이 배열 (100)은 본원에 기술된 바와 같은 자동화 세포 증대 및 정제를 위한 장치의 일부일 수 있다.

생물반응기 (50)에서 본원에 기술된 바와 같은 증대 방법, 예를 들어, 가용성 다량체화 시약을 이용하는 도 3에 예시된 증대 방법이 수행된다. 이 경우에, 경쟁자 (20) (결합 파트너 C1 또는 이의 유사체의 유리 파트너)의 첨가에 의해 세포 집단 (2)의 활성화/증대의 종료 후, 생물반응기로부터 방출된 세포 혼합물을 증대된 세포 집단 (2), 제1 제제 (6), 제2 제제 (8), 뿐만 아니라 가용성 다량체화 시약 (4)을 함유한다. 이 실시예에서, 제1 제제 (6)는 결합 파트너 C1로 스트렙타비딘 결합 웨პ티드를 포함하는 CD3 결합 항체 단편이고, 제2 제제 (8)는 결합 파트너 C1로 스트렙타비딘 결합 웨პ티드를 포함하는 CD28 결합 항체 단편이고, 경쟁자 (20) (결합 파트너 C1의 유리 유사체)는 비오틴이다. 이 반응 혼합물을 제1 제거 카트리지 (70) 상에 적용한다. 이 제1 제거 카트리지 (70)는 적합한 정지상을 구비한 크로마토그래피 칼럼을 포함하는 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 개시된 바와 같은 제거 카트리지이다. 정지상은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 제공할 수 있고, 동시에, 젤

투과 매트릭스로 작용할 수 있다. 이 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 그 위에 고정된 친화성 시약을 갖는다. 이 실시예의 경우에, 친화성 시약은, 예를 들어, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인, 아비딘, 아비딘 뮤테인 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 따라서, 제1 제제 (6) 및 제2 제제 (8)는 이들의 스트렙타비딘 결합 웹 티드를 통해 친화성 시약에 결합한다. 또한 경쟁자 (20)로서 비오틴이 친화성 시약에 결합한다. 따라서, 이들 3종의 시약은 모두 제1 제거 카트리지의 크로마토그래피 매트릭스 위에 고정되는 반면 증대된 세포 집단 (2) 및 가용성 다량체화 시약 (4)은 정지상을 통과한다. 이 "관류 (flow through)"는 그 후에 제2 제거 카트리지 (90) 위에 적용된다. 또한 이 제2 제거 카트리지 (90)는 정지상을 포함한다. 이 정지상은 그 위에 다량체화 시약 (4)의 결합 부위 Z1 (42)에 결합할 수 있는 제2 친화성 시약을 포함한다. 이 친화성 시약은, 예를 들어, 정지 상에 공유적으로 결합된 비오틴일 수 있다. 이러한 정지상은, 예를 들어, Affiland S.A. (Ans-Liege, Belgium)로부터 입수 가능한 d-비오틴 세파로스™일 수 있다. 따라서, 가용성 다량체화 시약 (4)은 제2 제거 카트리지 (90)의 정지상 상에 결합 (보유)될 것인 반면 증대된 세포 집단 (2)은 정지상을 통과하고 임의의 반응물이 없는 상태가 된다. 세포 집단 (2)은 이제 임의의 추가 사용, 예를 들어, 진단적 적용 (예를 들어, 추가의 FACS™ 분류) 또는 임의의 세포 기반 치료적 적용을 위한 상태에 놓이게 된다. 여기서 물론, 배열 (100) 내 제1 "제거 카트리지" (70) 및 제2 "제거 카트리지" (90)의 순서를 변경하여, 생물반응기 (50)가 제2 제거가능 카트리지 (90)에 (직접적으로) 유동적으로 연결되고, 제1 제거 카트리지 (70)가 그 다음에 배열되어 제2 제거 카트리지 (90)에 유체 연결되도록 하는 것이 또한 가능함이 주목된다. 이 배열에서는, 다량체화 시약 (4)이 먼저 세포 집단 (2)으로부터 제거되고 이어서 제1 제제 (6), 제2 (8) 및 예컨대 경쟁자 (20)가 제거될 것이다. 이러한 배열이 또한 본 발명에 포함되고 본원에 기술된 바와 같은 자동화 세포 증대 및 정제를 위한 장치의 일부일 수 있다.

도 11은 본 발명의 증대 방법과 함께 사용될 수 있는 본 발명의 배열의 추가 실시양태를 나타낸다. 이 배열 (110)은 생물반응기 (50), 제1 "제거 카트리지" (70) 및 제2 "제거 카트리지" (90)를 포함한다. 생물반응기 (50)는 제1 제거 카트리지 (70)에 유체 연결되고, 제1 제거 카트리지는 제2 제거 카트리지 (90)에 유체 연결된다. 또한, 제2 제거 카트리지 (110)는 생물반응기 (50)에 유체 연결된다. 이 배열 (110)은 또한 본원에 기술된 바와 같은 자동화 세포 증대 및 정제용 장치의 일부일 수 있다. 예를 들어, 가용성 다량체화 시약 (4)을 이용하는 증대 방법과 함께 이용되는 경우, 정제된 증대된 세포 집단 (2)은 제2 제거 카트리지 (90)의 용출액으로서 수득된다. 제거 카트리지 (90)가 생물반응기 (50)에 유체 연결되기 때문에, 세포 집단 (2)은, 예를 들어, T 세포 수용체의 유전자를 이용한 세포 집단의 형질감염 및 본 발명의 증대 방법을 이용한 후속 추가의 (제2) 증대에 의한, 본원에 기술된 바와 같은 일련의 클론 증대를 위해 생물반응기 (50) 내로 다시 전달될 수 있다.

도 12는 본 발명의 증대 방법과 함께 사용될 수 있는 본 발명의 추가의 실시양태를 나타낸다. 이 배열 (120)은 생물반응기 (50), 제1 "제거가능 카트리지" (70) 및 제2 "제거 카트리지" (90)를 포함한다. 생물반응기 (50)는 제1 제거 카트리지 (70)에 유체 연결되고, 제1 제거 카트리지는 제2 제거 카트리지 (90)에 유체 연결된다. 도 11에 나타난 실시양태와 유사하게, 제2 제거 카트리지 (110)는 생물반응기 (50)에 유체 연결된다. 그러나, 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 기술된 바와 같은 "선별 카트리지 (selection cartridge)" (92)가 제2 제거 카트리지 (90)와 생물반응기 (50) 사이에 배열된다. 따라서, 세포 집단 (2) 내에 포함된 세포 아집단 (2a)이 WO 2013/124474에 기술된 바와 같은 이 "선별 카트리지" (92)를 통해 선발/농축될 수 있다. 이 세포 아집단 (2a)은 또한, 예를 들어, 본원에 기술된 일련의 증대를 거치기 위해 생물반응기 (50) 내로 전달될 수 있다. 대안적으로 (나타내지 않음), 이 세포 아집단 (2a)은 세포 기반 요법에 사용될 수 있다. 여기서 다시 본원에 기술된 바와 같은 가용성 다량체화 시약의 사용이 기능적으로 폐쇄되고 그로써 오염되기 쉽지 않은 자동화 세포 정제 및 증대 장치의 고안을 허용함이 주목된다. 또한, 가용성 다량체화 시약은 자성 비드와 같은 고체상 재료에 대한 요구를 회피하기 때문에, 이러한 세포 정제 장치는 연속 유동 장치로서 고안될 수 있다.

도 13은 가용성 다량체화 시약으로 작용하는 2종의 가용성 올리고머 Strep-tactin® 뮤테인 위에 가역적으로 고정되어 있는 α CD3/ α CD28 Fab 단편 또는 α CD3/ α CD28/ α CD8 중 하나로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 (Tresp) 증식의 증대 동역학을 나타낸다. 올리고머 Strep-tactin®의 첫 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$)의 분획 (본원에서는 또한, 도 13에서 팀-다운 (tip down)을 갖는 삼각형 기호로 표시된, "통상의 Streptactin® 콜격"으로도 언급됨)이었고, 가용성 다량체화 시약으로 사용된 이 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 두 번째 종류는 비오틴화된 인간 혈청 알부민 (HSA)를 갖는 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인과의 반응에 의해 수득된 올리고머였다 (이 HSA 기반 가용성 다량체화 시약은 또한 본원에서 "거대 Streptactin® 콜격"으로서 언급된다). 도 13의 실현에서, 배지 교환 없이 증대를 실시하였다. CD4+ T 반응기 세포의 결과를 도 13A에 나타내고, CD8+ T 반응기 세포의 결과를 도 13B에 나타내었

다. 이 맥락에서, 제1 제제, 및 선택적으로 제2 및 제3 제제를 가역적으로 결합함으로써 관능화되었던 실험적으로 사용된 가용성 다량체화 시약이 도면에서 "Streptamer® 멀티머"로서 언급됨이 주목된다.

도 14는 가용성 다량체화 시약으로서 작용하는 2 종류의 가용성 올리고머 Strep-tactin®으로 가역적으로 고정된 가역적으로 고정된 단편인 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 (Tresp) 증식의 증대 동역학을 나타낸다. 올리고머 Strep-tactin®의 첫 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$)의 분획 (또한 도 14에서 상부에 텁을 갖는 삼각형 기호로 표시되는, "통상의 Streptactin® 골격"으로도 언급됨)이었고, 가용성 다량체화 시약으로 사용된 이 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 두 번째 종류는 HSA 기반 가용성 다량체화 제제 (상기에 언급된 "거대 Streptactin® 골격")였다. 도 14의 실험에서는, 배지 교환 없이 증대를 실시하였다. CD4+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 14에 나타내고, CD8+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 14B에 나타내었다.

도 15는 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 정제의 증대 동역학에 대해 도 13 및 14에서 수득된 결과부터의 조합된 데이터를 나타내는데, 도 15A는 CD4+ T 세포에 대한 결과를, 도 15B는 CD8+ T 세포에 대한 결과를 나타낸다. 직선이 3일째에 배지가 교환된 배양에 대해 사용된 반면, 점선은 3일째에 배지 교환 없이 증대의 정도에 대해 수득된 값을 나타낸다. 도 15에 나타난 데이터는 주입된 세포 수에 대해 표준화된다. 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인으로 자극된 Tresp ($n \geq 3$), 상업적으로 이용가능한 Dynabeads로 자극된 Tresp (양성 대조군) 및 비자극 T 세포 (음성 대조군)에 대한 데이터만이 나타나지만 "거대 Streptactin® 골격"을 이용한 다량체화 시약에 대한 데이터는 나타나지 않는다.

도 16은 실시예 5에 기술된 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$) 상에 가역적으로 고정되었던 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내로 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포의 활성화 후 T 세포의 조기 군집 형성을 나타낸다. 도 16A는 CD4+ T 세포에 대한 결과를 나타내고 도 16B는 CD8+ T 세포에 대한 결과를 나타낸다. 가용성 다량체화 시약 (올리고머 스트렙타비딘 뮤테인)으로 자극된 Tresp, 상업적으로 이용가능한 Dynabeads로 자극된 Tresp (양성 대조군) 및 비자극 T 세포 (음성 대조군)에 대한 데이터만이 나타난다.

도 17은 실시예 5에 기술된 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$) 상에 가역적으로 고정되었던 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 다클론성으로 자극된 CD3+ 중심 기억 T 세포 (Tcm) (CD3+CD62L+CD45RA-Tcm)의 증대 동역학 및 표현형을 나타낸다. 도 17에 나타난 그래프는 시점당 수확된 세포의 수에 따른 증식의 정도를 나타내는데, 도 17A는 단지 IL-2 보충 배지에서의 증식을 나타내고 도 17B는 IL-2 및 IL-15 보충 배지에서의 증식을 나타낸다. 도 17C는 다양한 사이토카인 환경에서 14일의 배양 후 CD62L 및 CD127 표면 발현의 유세포 측정 분석을 나타낸다.

도 18은 웨티드:MHC 분자 복합체 (세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제로 작용함) 및 α CD28 Fab 단편 (세포 표면상의 보조 분자에 결합하는 제2 제제로 작용함) 둘 모두로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 세포의 대량 집단으로부터 선택적 항원-특이적 (Ag-특이적) 증대의 동역학을 나타내고 비자극 T 세포 (음성 대조군)을 나타낸다. MHC 분자를 갖는 항원-특이적 웨티드 복합체 및 α CD28 Fab 단편 모두 실시예 5에 기술된 동일한 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$) 상에 가역적으로 고정되었다. 도 18A에서 항원-특이적 증대에 사용된 웨티드는 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 특이적인 HLA-C7/IE-1 에피토프를 제시하는 HLA-C702 MHC 분자 (문헌 [Ameres et al, PLOS Pathogens, May 2013, vol. 9, issue 5, e1003383]에 기술됨)에 의해 제한된 즉시-초기 1 단백질의 아미노산 309-317인, 웨티드 CRVLCCYVL (서열번호: 6)이었다. 이 웨티드를 제시하는 MHC I 분자는 그의 중쇄 C-말단에 스트렙타비딘 결합 웨티드 (SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (서열번호: 7)를 보유하고, 이는 IBA GmbH (Gottingen, Germany)로부터 "Twin-Strep-tag®"로서 상업적으로 입수 가능하다. 도 18A는 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 상에 가역적으로 고정된 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제로서 이 HLA-C7/IE-1 에피토프에 특이적인 웨티드:MHC-I 복합체를 사용하여 증식된 Ag-특이적 세포의 분획에 대한 예시적인 유세포 분석을 나타낸다. 도 18B 내지 도 18E의 그래프는 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 상에 가역적으로 고정된 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제로서 MHC I 분자를 갖는 항원-특이적 웨티드의 별개의 복합체를 이용한 도 18A와 유사하게 시점당 수확된 특이적인 웨티드:MHC I 멀티머-양성 세포의 수에 따른 추가의 Ag-특이성의 증대 동역학을 설명한다. 보다 상세히, 도 18B는 CMV의 pp65 에피토프 (HLA-A2402에 의해 제한된 아미노산 341-350 (QYDPVAALF, (서열번호: 8)))에 특이적인 웨티드:MHC-I 복합체를 사용하여 증대된 Ag-특이적 세포의 증대를 나타내고, 도 18C는 CMV의 pp65 에피토프 (HLA-B702에 의해 제한된 아미노산 265-274 RPHERNNGFTV, (서열번호: 9)))에 특이적인 또 다른 웨티드:MHC-I 복합체를 사용하여 증대된 Ag-특이적 세포의 증대를 나타내며, 도 18D는 아데노바이러

스의 헥손 (hexon) 5 에피토프 (HLA-B702에 의해 제한된 아미노산 114-124 (CPYSGTAYNSL, (서열번호: 10)))에 특이적인 웨티드:MHC-I 복합체를 사용하여 증식된 Ag-특이적 세포의 증대를 나타내고, 도 18E는 CMV의 HLA-B7/IE-1₃₀₉₋₃₁₇ 에피토프에 특이적인 웨티드:MHC-I 복합체를 사용하여 증식된 Ag-특이적인 세포의 증대를 나타낸다 (예시적 FACS 데이터, 상기 도 18A 참조). Twin Strep®-tag를 보유하는 모든 웨티드:MHC 분자는 IbaGmbH로부터 상업적으로 입수 가능하다. 이 맥락에서, 그들의 C-말단에 "Twin-Strep-tag®"를 보유하는 HLA-A*2402, HLA-B*0702 및 HLA-C*0702 분자의 아미노산 서열은 첨부하는 서열목록에 서열번호: 21, 22 및 23으로 표시되고, β_2 마이크로글로불린의 아미노산 서열 (이는 α 쇄와 함께 형성하는데, HLA 암호화된 분자가 각각의 MHC I 분자임을 의미함)은 첨부하는 서열목록에서 서열번호: 24로 표시된다. 또한, 도 18F는 도 18D로부터 HLA-B7/헥손 5₁₁₄₋₁₂₄ 자극된/증대된 세포에 대한 14일의 배양 후 CD62L 및 CD127 표면 발현의 예시적인 유세포 분석을 나타낸다.

도 19는 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 위에 제1 및 제2 제제로서 가역적으로 고정되어 있는 a) 항원 특이적 웨티드 MHC I 복합체 및 b) α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 세포로부터 선택적 Ag-특이적 증대의 동역학을 보여준다. 이를 위해, 500.000개의 CD3+CD62L+CD45RA-반응기 Tcm 세포 (Tresp)를 스트렙타비딘 결합 웨티드 (이 특이적 웨티드는 HLA-B0702로 제한된 아데노바이러스의 헥손 5 단백질의 아미노산 114-124 (CPYSGTAYNSL, 서열번호: 10)를 나타냄, 상기 참조)가 구비된 0.5 μ g 웨티드:MHC 클래스 I 복합체 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 3 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물을 사용하여 Ag-특이적으로 자극시켰다. 대안으로서, 4.5 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물을 0.5 μ g의 이 웨티드:MHC 클래스 I 복합체, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 함께 로딩하였다. 비교를 위해, 0.5 μ g α CD3 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합이 또한 로딩된 3 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 (1 mg/ml)을 사용하여 다클론성 자극을 수행하였다. 또한, 상기에 기술된 대안적 자극 조건으로서, 0.5 μ g α CD3 Fab, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab이 로딩된 4.5 μ l의 Streptactin 멀티머의 제조물을 사용하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads로 다클론 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 보충된 1 ml 세포 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 매 3일마다 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 7일 및 14일 후에 세포 수를 분석하였다. 도 19에 나타난 사진은 아데노바이러스의 HLA-B7/헥손 5 에피토프에 대해 예시된 바와 같은 Ag-특이적 자극에 대해 5일째 군집 형성의 정도를 나타낸다.

도 20은 그 위에 가용성 다량체화 시약으로 작용하는 2종류의 가용성 올리고머 Strep-tactin®이 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD8+ T 반응기 세포 증대의 수율 및 표현형을 보여준다. 올리고머 Strep-tactin®의 첫 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 분획 (통상의 골격)이었고, 가용성 다량체화 시약으로 사용된 이 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 두 번째 종류는 상기에 언급된 "거대" Streptactin® 골격으로 본원에 언급된 가용성 올리고머였다. 이를 실험에서, 단일 Fab 단편 (도 20A 및 도 20B에서 세 번째 막대) 또는 α CD3 및 α CD28 Fab-단편의 조합 중 하나로 관능화된 통상의 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 분획 ($n \geq 3$)을 또한 다량체화 시약으로 사용하였다. α CD3/ α CD28 Fab 단편을 이용한 조합된 자극에 추가로, 또한 특이적 T 세포 아집단을 선호적으로 자극할 수 있는지 여부를 검사하기 위하여 부가적인 α CD8 Fab 단편 (IBA GmbH (Gottingen, Germany)로부터 상업적으로 이용가능함)이 고정되었다. 도 20 A는 음성 대조군 (비자극된 정제된 CD8+ T 반응기 세포)에 대비되고 양성 대조군 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정된 비드)로 자극된 정제된 CD8+ T 반응기에 대해 표준화된, 6일째에 수확된 세포 수에 따른 증식 정도를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 도 20B는 세포 배양 후 CD8 및 T 세포 표면 분자 CD45RO (이는 T 세포 증식 및 활성화를 나타냄)의 표면 발현의 유세포 분석을 보여준다. 다양한 자극 조건을 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 이용하여 비교하였고 유의미한 차이 (n.s.)는 검출되지 않았다.

도 21은 단일 Fab 단편 또는 Fab-단편들의 조합 (상기에 이미 기술된 바와 같음) 중 하나로 관능화된 가용성 다량체화 시약으로서 작용하는 가용성 올리고머 Strep-tactin® 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극된 정제된 CD8+ T 반응기 세포의 증대에 대한 수율 및 표현형을 보여준다. 이를 실험에서, CD8+ T 반응기 세포를 선택적으로 상기에 기술된 α CD8 Fab 단편과 함께, 다양한 양의 α CD3 및 α CD28 Fab 단편으로 관능화된 가용성 다량체화 시약 (실시예 5의 가용성 올리고머 Strep-tactin® (1 mg/ml))으로 자극시켰다. 용어 "1x"는 0.5 μ g α CD3 Fab 단편 단독으로 관능화된 1.5 μ g 다량체화된 Streptactin 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단독으로 관능화된 1.5 μ g 다량체화된 Streptactin, 또는 0.5 μ g α CD3 Fab 단편 및 0.5 μ g α CD28 Fab이 로딩된 3 μ l의 올리고머 Streptactin의 제조물, 또는 0.5 μ g strep-태그된 α CD3, 0.5 μ g strep-태그된

α CD8 및 0.5 μ g strep-태그된 α CD28 Fab이 로딩된 4.5 μ l의 Streptactin 멀티머의 제조물에 상응한다. 따라서, 용어 "2x"는 1 μ g α CD3 Fab 단편 단독으로 관능화된 3.0 μ g 다양체화된 Streptactin 및 1 μ g α CD28 Fab 단독으로 관능화된 3.0 μ g 다양체화된 Streptactin에 상응하고, 이는 고정된 α CD3 Fab 단편의 양이 2배 사용되었음을 의미한다. 비처리된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 상업적으로 이용가능한 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정된 비드)로 자극된 정제된 CD8+ T 반응기를 양성 대조군으로 제공하였다. 도 21A는 음성 대조군에 대비되고 양성 대조군에 대해 표준화된, 5일째에 수확된 세포 수에 따른 증식 정도를 나타내는 막대 그래프를 보여준다. 도 21B는 세포 배양 후 CD8 및 CD45RO 표면 발현의 FACS 분석을 나타낸다.

도 22는 α CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형되었고, 가용성 다양체화 시약으로서 실시예 5의 올리고머 Strep-tactin®을 사용하여 자극된 형질도입된 Jurkat 세포내 신호전달 캐스케이드의 활성화를 보여준다. CAR의 특이성은 CD19와 같은 표적/종양 연관 항원에 특이적으로 결합하고 이를 T 세포 특이적 신호전달에 연결하는 단클론 항체 (mAb)의 항원-결합 영역으로부터 조립된 scFv 영역으로부터 전형적으로 유래한다 (Hudecek et al, Clin Cancer Res. 2013 June 15; 19(12): 3153-3164에 기술됨). 이 실험에서, α CD19 CAR의 자연적 리간드뿐만 아니라 α CD19-CAR 내부의 IgG4 스페이서 (당나귀-항-인간 F(ab)₂는 Jackson Immuno Research로부터 상업적으로 이용가능함)를 인식하는 단클론 α IgG F(ab)₂ 단편을 함유하는, CD19의 세포외 도메인 (ECD)이 또한 이 실험에서 Jurkat 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제로서 사용하였다. 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인에의 가역적 고정은 CD19의 ECD의 C-말단에 융합된 스트렙타비딘 웨티드 SAWSHPQFEK(GGGS)GGSAWSPQFEK (서열번호: 7)에 의해서 또는 α IgG의 비오틴화된 (Fab)₂ 단편에 의해 제공되었다 (스트렙타비딘 뮤테인 "m2"가 감소된 친화도로 비오틴에 결합하므로, 이 반응은 가역적이고, 예를 들어 과량의 유리 비오틴의 첨가에 의해 치환될 수 있음). 도 22A의 대조군 실험에서, 300.000개의 CD3+ Jurkat 반응기 세포 (Jresp)를 α CD3 Fab 및 α CD28 Fab으로 관능화된 올리고머 Streptactin (1 mg/ml)의 제조물의 상이한 양의 혼합물로 자극시켰다 ("x1"은 0.5 μ g α CD3- 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 3 μ g 다양체화된 Streptactin에 상응함 - 단클론성 Streptamer 멀티머). 도 22B의 실험에서, 3 μ l의 올리고머 Streptactin의 제조물을 0.5 μ g (x1) 또는 1 μ g (x2)의 CD19의 세포외 도메인 (ECD)으로 또는 IgG4 스페이서를 인식하는 0.5 μ g (x1) 또는 1 μ g (x2) α IgG가 로딩된 3 μ l의 올리고머 Streptactin의 제조물 (둘 모두 CAR-특이적 Streptamer® 멀티머임)로 관능화시켰다. Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정된 비드) 또는 PMA 및 이노마이신으로 자극된 Jresp를 양성 대조군으로 제공하였다. Jresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 200 μ l 세포 배양 배지 중에서 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 접종하였다. 세포를 37°C에서 인큐베이션하고 얼음 중에 넣은 후 자극 0분 및 20분 후에 용해시켰다.

도 23은 가용성 다양체화 시약으로 제공된 실시예 5의 가용성 올리고머 Strep-tactin® 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD3⁺ T 반응기 세포의 증대를 보여준다. 일 실험에서는, α CD3/ α CD28 Fab 단편에 추가로, 또한 그 위에 가역적으로 고정된 α CD8 Fab 단편을 갖는 본 발명의 다양체화 시약을 이용해 대량의 CD3⁺ 배양액 내에서 CD8⁺ T 세포 아집단을 시험관 내에서 선호적으로 자극할 수 있는지 여부를 검사하기 위하여, IBA GmbH (Göttingen, Germany, 카탈로그 번호 6-8000-203)로부터 상업적으로 이용가능한 α CD8 Fab 단편을 스트렙타비딘 뮤테인의 가용성 올리고머 위에 고정시켰다. 더욱 상세히, 500.000개의 정제된 CD3⁺ 반응기 T 세포 (Tresp)를 0.5 μ g의 α CD3 및 0.5 μ g의 α CD28 Fab의 조합으로 로딩된 3 μ l의 올리고머 스트렙타비딘의 제조물 (1 mg/ml)로 자극시켰다. 대안적 접근법으로서, 4.5 μ l의 Streptactin 올리고머를 상기에 기술된 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 로딩하였다. 비자극된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정된 비드)로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공하였다.

도 24는 본 발명의 가용성 다양체화 시약으로 사용될 수 있는 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 생성을 위한 예시적인 전략을 도시한다. 도 24A는, 제1 단계에서, 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 11e⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (서열번호: 3)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 "m2" (SAm2)가 "통상의 골격"을 갖는 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 생성을 위해 사용됨을 보여준다. 제2 단계에서, "거대 골격"을 갖는 올리고머 가용성 스트렙타비딘 뮤테인이 스트렙타비딘 뮤테인의 인간 혈청 알부민 (HAS)과 같은 비오틴화된 캐리어 단백질과의 커플링에 의해 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 PEG와 같은 합성 캐리어와의 커플링에 의해 생성될 수 있다. 도 24B: 인간 혈청 알부민 (HSA)의 비오틴화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 본 발명은 세포 집단의 증대 또는 T 세포 집단의 증식을 유도하기 위한 방법, 키트 및 장치를 제공한다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포 집단"은 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제가 세포 표면 수용체 결합함으로써 증대될 수 있는 모든 세포를 포함한다. 세포 집단의 증대를 위해, 제2 세포 표면 수용체 (보조 분자)에 제2 제제의 결합이 세포의 증대에 필요한 동시-자극 신호를 생산하기 위해 요구될 수 있음이 또한 가능하다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은, 이로 제한되는 것은 아니지만, B 세포 집단, T 세포 집단 또는 자연 살해 세포를 비롯한 림프구 집단일 수 있다. 세포 집단의 실증적 예시는 CD40 또는 CD137을 보유하는 B 세포 (두 세포 집단 모두 활성화 신호, 예를 들어 4-1BB 리간드; 또는 α CD40 항체 분자 또는 α CD137 항체 분자를 제공하는 오로지 제1 제제의 결합 시에만 증식할 수 있음 (예를 들어, Zhang et al., 2010, J Immunol, 184: 787-795 참조))이다. B 세포의 증대에 사용될 수 있는 (제1 또는 제2) 제제의 다른 실증적 예시는 IgG, CD19, CD28 또는 CD14, 예를 들어 α CD19, α IgG, α CD28, 또는 α CD14 항체 분자에 결합하는 제제이다. B 세포의 증대를 위한 제1 또는 제2 제제는 toll 유사 수용체 또는 IL-21와 같은 인터류킨에 대한 리간드를 포함할 수 있음이 또한 고려된다 (예를 들어, Dienz O, et al. 2009, J. Exp. Med. 206: 69 참조). 지질다당류가 또한 제1 제제로 사용될 수 있고 본원에 사용된 바와 같은 결합 파트너 C1으로 구축될 수 있기 때문에, B 세포의 지질다당류 의존성 활성화가 또한 본 발명에 포함됨이 주목된다. 적합한 세포 집단의 다른 실증적 예시에는 TCR/CD3에의 제1 제제의 결합 및 CD28과 같은 T 세포 상의 보조 분자에의 제2 제제의 결합에 의해 활성화된 후 증대하는 T 세포 집단을 포함한다. 이 경우에, 제1 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체-연관 신호를 자극하고 제2 제제는 보조 분자로서 CD28의 결합에 의한 이차 자극을 제공한다. T 세포의 증대에 사용될 수 있는 제제는 또한 IL-2, IL-7, IL-15, 또는 IL-21와 같은 인터류킨 (예를 들어, Cornish et al. 2006, Blood. 108(2): 600-8, Bazdar and Sieg, 2007, Journal of Virology, 2007, 81(22): 12670-12674, Battalia et al., 2013, Immunology, 139(1): 109-120 참조)를 포함할 수 있다. T 세포의 증대에 사용될 수 있는 제제의 다른 실증적 예시는 CD8, CD45 또는 CD90에 결합하는 제제, 예컨대 α CD8, α CD45 또는 α CD90 항체이다. T 세포 집단의 실증적 예시는 항원-특이적 T 세포, T 헬퍼 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포 (기억 T-세포의 실증적 예시는 CD62L⁺CD8⁺ 특이적 중심 기억 T 세포임) 또는 조절 T 세포 (Treg의 실증적 예시는 CD4⁺CD25⁺CD45RA⁺ Treg 세포임)가 포함된다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "T 세포 (집단)"는 또한 인공적 T 세포 수용체 또는 키메라 T 세포 수용체로도 알려진 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 T 세포를 포함한다. 따라서, 키메라 항원 수용체를 포함하는 T 세포 집단은 또한 본 발명의 방법, 시약 및 장치를 사용하여 증대될 수 있다. 이와 관련하여 키메라 CD19 특이적 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 Jurkat 세포가 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용하여 자극되었던 실시예 15를 참조한다. 적합한 세포 집단의 또 다른 실증적 예시에는, 예를 들어 CD16 또는 CD56에 결합하는 제제, 예컨대, 예를 들어 α CD16 또는 α CD56 항체를 이용해 증대될 수 있는 자연 살해 세포 (NK 세포)가 포함된다. 이러한 α CD16 항체의 실증적 예시는 서열번호: 25로 개시된 VH 서열 및 서열번호: 26으로 개시된 VL 서열을 갖는 항체 3G8 (예를 들어, Hoshino et al., Blood. 1991 Dec 15; 78(12): 3232-40 참조)이다. NK 세포의 증대에 사용될 수 있는 다른 제제는 IL-15 (예를 들어, Vitale et al. 2002, The Anatomical Record. 266: 87-92 참조)일 수 있다. 적합한 세포 집단의 또 다른 실증적 예시에는, 예를 들어, CD14에 결합하는 제제, 예컨대 α CD14 항체 분자를 사용해 증대될 수 있는 단핵구가 포함된다. 세포 집단은, 이로 제한되는 것은 아니지만, 인간, 토끼, 기니아 피그, 다람쥐, 햄스터, 고양이, 개, 여우원숭이, 염소, 돼지, 말, 붉은털 원숭이, 마카크 (macaque), 또는 침팬지를 비롯한 임의의 포유동물 기원일 수 있다.

[0059] 따라서, 상기와 유사하게, 본 발명은 림포카인과 같은 외인성 성장 인자 및 보조 세포의 부재하에서 B 세포, T 세포 또는 자연 살해 세포와 같은 세포 집단의 생체 외 증대를 선택적으로 유도하는 방법에 관한 것이다. 또한, B 세포 또는 T 세포와 같은 이들 세포의 증식은 항원을 필요로 하지 않으면서 유도될 수 있고, 따라서 항원 반응성에 관해 다클론성 T 세포 집단과 같은 증대된 세포 집단을 제공한다. 본원에 기술된 방법은 최초 (original) T 세포 집단에 비해 이들 세포 수에서 다수-배수의 증가를 양산하기 위해 연장된 기간에 걸쳐서 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포와 같은 선택된 T 세포 집단의 지속적인 증식을 제공할 수 있다. 일반적으로, 본원에 기술된 바와 같이 림프구 집단의 (클론) 증대의 경우에, 모든 자손 (progeny)은 증대를 위해 선택되었던 세포 집단과 동일한 항원 특이성을 공유할 수 있다.

[0060] 또한, 상기와 유사하게, 본 발명은 항원 특이적 T 세포 집단을 증대하는 방법을 제공한다. 항원 특이적 T 세포 집단을 생산하기 위해, T 세포는 T 세포에서 일차 활성화 신호를 촉발하는데 적합한 형태인 항원과 접촉되는데, 즉 신호가 TCR/CD3 복합체를 통해 T 세포에서 촉발되도록 항원이 T 세포에 제시된다. 예를 들어, 항원은 MHC

분자와 함께 항원 제시 세포에 의해 T 세포에 제시될 수 있다. B 세포, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르만스 세포, 또는 T 세포에 대한 항원을 제시할 수 있는 다른 세포와 같은 항원 제시 세포를, 항원 제시 세포가 T 세포에 항원을 제시하도록 항원 (예컨대, 가용성 항원)의 존재하에서 T 세포와 함께 인큐베이션할 수 있다. 대안적으로, 관심 항원을 발현하는 세포를 T 세포와 함께 인큐베이션할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포 발현 종양-연관 항원이 종양-특이적 반응을 유도하기 위해 T세포와 함께 인큐베이션될 수 있다. 유사하게, 병원체, 예를 들어 바이러스에 감염되어 그 병원체의 항원을 제시하는 세포를 T 세포와 함께 인큐베이션할 수 있다. T 세포 집단의 항원 특이적 활성화 후에, 세포는 본 발명의 방법에 따라서 증대될 수 있다. 예를 들어, 항원 특이성이 확립된 후, T 세포는 본원에 기술된 방법에 따라서 항-CD3 항체 (제1 제제로 사용됨) 및 항-CD28 항체 (제2 제제로 사용됨)와의 배양에 의해 증대될 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 제제는 항원 특이적 T 세포 집단에 결합하는 MHC I:펩티드 복합체일 수 있다. 이러한 실시양태에서, 각각의 MHC I 분자와 착체화될 수 있는 공지된 임의의 항원 특이적 펩티드가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 대량의 CD3+ 중심 기억 T 세포에서 Tcm 반응기 세포의 선택적 항원-특이적 증대가 4종의 다른 항원-특이적 세포에 대해 예시된 실시예 11 및 12를 참조한다. 대안적으로, 세포 증대를 촉발하는 수용체의 자연 리간드가 또한 제1 제제로 사용될 수 있다. 이와 관련하여 CD19의 세포외 도메인이 키메라 CD19 결합 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 변형된 형질도입된 Jurkat 세포의 세포내 신호전달 캐스케이드의 활성화를 야기하였던 실시예 15를 참조한다.

[0061] 세포 집단의 시료는 임의의 적합한 공급원 유래, 전형적으로 체조직 또는 체액, 예컨대 혈액과 같은 모든 시료로부터일 수 있다. 후자의 경우에, 시료는, 예를 들어, 혈액 세포의 피콜 구배와 같은 표준 분리 방법에 의해 수득될 수 있는 말초혈액 단핵세포 (PBMC)의 집단일 수 있다. 그러나 증대되는 세포 집단은 또한 정제된 형태일 수 있고 미국특허 제7,776,562호, 미국특허 제8,298,782호, 국제특허공개 제W002/054065호 또는 국제특허공개 제W02013/011011호에 기술된 바와 같은 가역적 세포 염색/단리 기술을 이용하여 분리되었을 수 있다. 대안적으로, 세포 집단은 또한 미국특허 제6,352,694 B1호 또는 유럽특허 제EP 0 700 430 B1호에 기술된 바와 같은 음 자성 면역흡착 (negative magnetic immunoadherence)을 통한 세포 분류에 의해 수득될 수 있다. 본원에 기술된 단리 방법이 기초 연구에 사용되는 경우, 시료는 시험관 내 세포 배양 실험의 세포일 수 있다. 시료는 전형적으로 용액 또는 분산액과 같은 액체의 형태로 제조될 것이다.

[0062] 상기와 유사하게, 일 실시양태에서, 본 발명은 세포 집단을 포함하는 시료를 다량체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포 집단을 증대시키는 시험관 내 방법을 제공한다. 다량체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제를 가지며, 다량체화 시약은 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함한다. 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있으며, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합된다. 제1 제제는 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다.

[0063] 다른 실시양태에서, 본 발명은 다량체화 제제가 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상에 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 갖는, 방법을 제공한다. 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있으며, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합된다. 제2 제제는 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 그로써 활성화된 세포를 자극한다. 이 실시양태에서, 제1 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체-연관 신호를 자극할 수 있고 CD3에 특이적으로 결합하는 결합 제제일 수 있다. 이 실시양태에서, T 세포 상의 보조 분자는 CD28일 수 있고 보조 분자에 결합하는 제2 제제는 CD28에 특이적으로 결합하는 결합 시약이다. 이 경우에, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 제제는 항-CD3-항체, 항-CD3 항체의 이가 항체 단편, 항-CD3-항체의 일가 항체 단편, 및 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD3 결합 분자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 또한 CD28에 특이적으로 결합하는 제2 제제는 항-CD28-항체, 항-CD28 항체의 이가 항체 단편, 항-CD28 항체의 일가 항체 단편, 및 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD28 결합 분자로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 이가 항체 단편은 (Fab)2'-단편, 또는 이가 단체 Fv 단편일 수 있는 반면, 일가 항체 단편은 Fab 단편, Fv 단편, 및 단체 Fv 단편 (scFv)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD3 또는 CD28 결합 분자는 앱타머, 리포칼린 (lipocalin) 패밀리의 폴리펩티드를 기반으로 하는 뮤테인 (mutein), 글루바디 (glubody), 앙키린 (ankyrin) 스캐폴드를 기반으로 하는 단백질, 결정 스캐폴드를 기반으로 하는 단백질, 애드넥틴 (adnectin), 및 아비머 (avimer)일 수 있다.

[0064] 일반적으로, 본 발명에 사용되는 제1 및 제2 제제는, 예를 들어, 항체, 이의 단편 및 항체-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자일 수 있다. (재조합) 항체 단편의 예시는 Fab 단편, Fv 단편, 단체 Fv 단편 (scFv), 이가 항

체 단편, 예컨대 (Fab)2'-단편, 디아바디, 트리아바디 (Iliades, P., et al., *FEBS Lett* (1997) 409, 437-441), 데카바디 (Stone, E., et al., *Journal of Immunological Methods* (2007) 318, 88-94) 및 다른 도메인 항체 (Holt, L.J., et al., *Trends Biotechnol.* (2003), 21, 11, 484-490)이다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제의 하나 이상의 결합 부위는 "듀오칼린 (duocalin)"으로도 알려진 다이머 리포칼린 뮤테인과 같은 이가 단백질성 인공 결합 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용체 결합 시약은 단일 제2 결합 부위를 가질 수 있고, 즉, 이는 일가일 수 있다. 일가 제1 또는 제2 제제의 예시에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 일가항체 단편, 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자 또는 MHC 분자가 포함된다. 일가 항체 단편의 예시에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, Fab 단편, Fv 단편, 및 이가 단체 Fv 단편을 비롯한 단체 Fv 단편 (scFv)이 포함된다.

[0065]

상기에 언급된 바와 같이, 항체-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자의 예시는 리포칼린 패밀리의 폴리펩티드를 기반으로 하는 뮤테인 (예를 들어, WO 03/029462, Beste et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1999) 96, 1898-1903 참조)이다. 리포칼린, 예컨대 빌린 (bilin) 결합 단백질, 인간 호중구 젤라틴분해효소-연관 리포칼린, 인간 아포리포단백질 D 또는 인간 눈물 (tear) 리포칼린은 이들이 소정의 표적에 결합하도록 변형될 수 있는 자연 리간드-결합 부위를 보유한다. 수용체 분자에 특이적으로 결합하는 수용체 결합 시약으로서 사용될 수 있는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 결합 분자의 추가적인 예시에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 소위 글루바디 (예컨대, 국제특허공개 제WO 96/23879호), 앙기린 스캐폴드에 근거한 단백질 (Mosavi, L.K., et al., *Protein Science* (2004) 13, 6, 1435-1448) 또는 결정 스캐폴드 (예컨대, 국제특허공개 제WO 01/04144호), 문헌 (Skerra, J. *Mol. Recognit.* (2000) 13, 167-187)에 기술된 단백질, 애드넥틴, 테트라넥틴 및 아비머가 포함된다. 인간 수용체 도메인 패밀리의 엑손 셔플링 (exon shuffling)에 의해 진화된 다가 아비머 단백질을 포함하는, 아미버는 여러 세포 표면 수용체에서 다수 도메인의 가닥으로서 야기되는 소위 A-도메인을 함유한다 (Silverman, J., et al., *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1556-1561). 인간 피브로넥틴의 도메인으로부터 유래한, 애드넥틴은 표적에의 면역글로불린-유사 결합을 위해 조작될 수 있는 3개의 루프 (loops)를 함유한다 (Gill, D.S. & Damle, N.K., *Current Opinion in Biotechnology* (2006) 17, 653-658). 각각 인간 호모트리머 (homotrimeric) 단백질로부터 유래한, 테트라넥틴은 유사하게 목적하는 결합 (ibid.)을 위해 조작될 수 있는 C-유형 렉틴 도메인에 루프 영역을 함유한다. 단백질 리간드로 작용할 수 있는, 펩토이드 (peptoid)는 측쇄가 a 탄소 원자가 아닌 아미드 질소에 연결된 펩티드와 상이한 올리고(N-알킬) 글리신이다. 펩토이드는 전형적으로 단백분해효소 및 다른 변형 효소에 내성이고 펩티드보다 훨씬 더 높은 세포 투과성을 가질 수 있다 (예컨대, Kwon, Y.-U., and Kodadek, T., *J. Am. Chem. Soc.* (2007) 129, 1508-1509 참조). 적합한 단백질성 결합 분자의 또 다른 예시는 EGF-유사 도메인, 크링글 (Kringle)-도메인, 피브로넥틴 유형 I 도메인, 피브로넥틴 유형 II 도메인, 피브로넥틴 유형 III 도메인, PAN 도메인, G1a 도메인, SRCR 도메인, 쿠니츠/소 (Kunitz/Bovine) 쿠니츠 트립신 억제제 도메인, 텐다미스탓 (tendamistat), 카잘-유형 (Kazal-type) 세린 프로테아제 억제제 도메인, 트레포일 (Trefoil) (P-유형) 도메인, 본 빌레브란드 (von Willebrand) 인자 유형 C 도메인, 아나필락시스 (Anaphylatoxin)-유사 도메인, CUB 도메인, 티로글로불린 (thyroglobulin) 유형 I 반복, LDL-수용체 클래스 A 도메인, 스시 (Sushi) 도메인, 링크 (Link) 도메인, 트롬보스폰딘 유형 I 도메인, 면역글로불린 도메인 또는 면역글로불린-유사 도메인 (예를 들어, 도메인 항체 또는 낙타 중쇄 항체), C-유형 렉틴 도메인, MAM 도메인, 본 빌레브란드 인자 유형 A 도메인, 소마토메딘 (Somatomedin) B 도메인, WAP-유형 4 이황화 코어 도메인, F5/8 유형 C 도메인, 혈모페신 (Hemopexin) 도메인, SH2 도메인, SH3 도메인, 라미닌-유형 EGF-유사 도메인, C2 도메인, "카파바디 (Kappabodies)" (cf. Ill. et al., *Protein Eng* (1997) 10, 949-57, 소위 "미니바디" (Martin et al., *EMBO J* (1994) 13, 5303-5309), 디아바디 (cf. Holliger et al., *PNAS USA* (1993) 90, 6444-6448), 소위 "야누시스 (Janusis)" (cf. 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), 노틴 (knottin), 유비퀴틴 (ubiquitin), 징크-핑거 단백질, 자가형광 단백질 또는 류신-풍부 반복 단백질이다. 항체-유사 기능을 갖는 혼산 분자의 예시는 앱타머이다. 앱타머는 정의된 3차원 모티프 내로 중첩하고 소정의 표적 구조에 높은 친화도를 보여준다.

[0066]

다량체화 시약으로 다시 돌아와서, 다량체화 제제의 결합 부위 Z1 및 Z2는 동일할 수 있다 (또한 도 3의 실시예 참조). 이 경우에, 단일 다량체화 제제가 사용될 수 있다.

[0067]

가역적으로 결합된 제1, 및 선택적으로, 제2 제제가 사용된 실시양태에서, 다량체화 시약은 고체 표면상에 고정될 수 있다. 임의의 고체 표면 (지지체)이 다량체화 시약의 고정화를 위해 사용될 수 있다. 그 위에 다량체화 시약이 고정될 수 있는 고체 표면의 실증적 예시에는 자성 비드, 폴리머 비드, 세포 배양 플레이트, 미세역가 플레이트, 막, 또는 중공 섬유가 포함된다. 중공 섬유는, 예를 들어, TerumoBCT Inc. (Lakewood, CO, USA)로부터

터 이용가능한 Quantum® 세포 증대 시스템에서 생물반응기로 사용될 수 있다. 다량체화 시약은 통상 고체 지지체에 공유적으로 부착되지만, 비-공유적 상호작용이 또한, 요구되는 경우, 예를 들어 플라스틱 기질 위에의 고정에 사용될 수 있다. 또한, 하기에 더욱 상세히 설명되는 바와 같이, 다량체화 시약은, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 웨პ티드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 또는 아비딘 뮤테인일 수 있다. 이러한 스트렙타비딘 뮤테인은 임의의 표면, 예를 들어, 크로마토그래피 정제에 사용되는 수지 (비드)에 공유적으로 부착될 수 있고, 예를 들어, *Strep-Tactin®* 세파로스, *Strep-Tactin® Superflow®*, *Strep-Tactin® Superflow®* 고용량 또는 *Strep-Tactin® MacroPrep®*과 같이 IBA GmbH, Gottingen으로부터 이러한 형태로 상업적으로 이용가능하다. 상업적으로 용이하게 입수가능한 다량체화 시약의 다른 실증적 예시는, 일반적으로, 본원에서 의미하는, 제1 결합 파트너 C1 또는 제2 결합 파트너 C2로서 펜타- 또는 헥사-히스티딘 태그와 같은 올리고히스티딘 태그를 보유하는 제1 또는 제2 제제의 가역적 결합을 위한 올리고-히스티딘 태그된 (히스-태그된) 단백질의 가역적 고정화에 사용될 수 있는 고정된 금속 친화성 크로마토그래피 (IMAC) 수지, 예컨대 TALON® 수지 (Westburg, Leusden, The Netherlands)이다. 다량체화 시약의 다른 예시는, 그에 글루타치온이 결합된, 결합 파트너 C1 또는 C2로서 칼모듈린 결합 웨პ티드 또는 세파로스를 포함하는 제1 또는 제2 제제와 함께 사용될 수 있는 GE Life Sciences로부터 이용가능한 칼모듈린 세파로스이다. 이 경우에, 결합 파트너 C1 또는 C2가 글루타치온-S-트랜스퍼라제이다.

[0068]

본 발명에 따른 방법의 다른 실시양태에서, 다량체화 시약은 가용성 형태일 수 있다. 원칙적으로, 동일한 다량체화 제제는 고체 지지체 위에 고정된 다량체화 시약의 경우에 사용될 수 있다. 다량체화 시약은 가용성 형태이고, 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머, 칼모듈린 올리고머, 적어도 2개의 킬레이팅기 K를 제공하는 화합물 (올리고머) (여기서 적어도 2개의 킬레이팅기는 전이 금속 이온에 결합할 수 있고, 그로써 모이어티 A가 올리고히스티딘 친화성 태그에 결합할 수 있게 함), 멀티머 글루타치온-S-트랜스퍼라제, 또는 비오틴화된 캐리어 단백질일 수 있다.

[0069]

상기에 설명된 바와 같이, 제1 및 제2 제제는, 각각의 세포 표면 수용체 분자에 결합할 수 있는 결합 부위에 덧붙여, 결합 파트너 C1 또는 C2 (용이한 참조를 위해 하기에서는 "결합 파트너 C"로 언급될 것임)를 갖는다. 이 결합 파트너 C는 다량체화 시약의 결합 부위 Z (Z는 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 또는 결합 부위 Z2 중의 하나를 의미함)에 결합할 수 있다. 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C와 다량체화 시약의 결합 부위(들) Z 사이에 형성된 비-공유 결합은, 본 발명의 방법이 수행되는 조건하에서 파괴될 수 있거나 역전될 수 있는 한, 임의의 목적하는 강도 및 친화도일 수 있다. 수용체 결합 시약에 포함된 결합 파트너 C와 다량체화 시약의 결합 부위 Z 사이의 결합의 해리 상수 (K_D)는 약 10^{-2} M 내지 10^{-13} M의 범위 내 값을 가질 수 있다. 따라서, 이 가역적 결합은, 예를 들어, 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} M의 K_D 값을 가질 수 있다. 이 결합의 K_D 뿐만 아니라 수용체 결합 시약의 결합 부위 B와 수용체 분자 사이에 형성된 결합의 K_D , k_{off} 및 k_{on} 속도는 임의 적합한 수단, 예를 들어, 형광 적정, 평형 투석 또는 표면 플라즈마 공명에 의해 결정될 수 있다. 수용체 분자 결합 시약은 2개, 3개 또는 그 이상을 비롯해, 적어도 하나의 제2 결합 파트너 C를 포함할 수 있고 친화성 시약은 수용체 분자 결합 시약에 포함된 결합 파트너를 위해 적어도 2개, 예컨대 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 또는 그 이상의 결합 부위를 포함할 수 있다. 미국특허 제7,776,562호, 미국특허 제8,298,782호 또는 국제특허공개 제WO 2002/054065호에 기술된 바와 같이, 결합 파트너 C 및 친화도 제제의 결합 부위 Z가 (다가) 복합체에서 가역적으로 결합하거나 다량체화될 수 있고, 이것이 전형적으로 친화력 (avidity) 효과와 동조하는 한, 결합 파트너 C 및 하나 이상의 상응하는 결합 부위 Z를 갖는 친화성 제제의 임의의 조합이 선택될 수 있다.

[0070]

제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너는 올리고웨პ티드, 폴리웨პ티드, 단백질, 핵산, 지질, 당류, 올리고당류, 또는 다당류일 수 있다. 이러한 결합 파트너는 다른 물질에 비해 다량체화 시약의 결합 부위에 더 높은 친화도를 갖는다. 각각의 결합 파트너의 예시에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 면역글로불린 분자, 이의 단편 및 항체-유사 기능을 갖는 단백질성 결합 분자가 포함된다.

[0071]

일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 비오틴을 포함하고 친화성 시약은 비오틴에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다.

[0072]

일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 스트렙타비딘 또는 아비딘에 가역적으로 결합하는 비오틴 유사체를 포함하고, 친화성 시약은 각각의 비오틴 유사체에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다.

[0073] 일부 추가의 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 스트렙타비딘 또는 아비딘 결합 펩티드를 포함하고 친화성 시약은 각각의 스트렙타비딘 또는 아비딘 결합 펩티드에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘, 아비딘, 스트렙타비딘 유사체 또는 아비딘 유사체를 포함한다.

[0074] 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너는 스트렙타비딘-결합 펩티드 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (서열번호: 1)을 포함할 수 있고 친화성 시약은 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에서 아미노산 서열 $^{44}\text{Val}^{45}\text{Thr}^{46}\text{Ala}^{47}\text{Arg}$ (서열번호: 2)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 (유사체) 또는 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에서 아미노산 서열 $^{44}\text{Ile}^{45}\text{Gly}^{46}\text{Ala}^{47}\text{Arg}$ (서열번호: 3)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 (유사체)를 포함할 수 있고, 이를 모두는 미국특허 제6,103,493호에 기술되어 있고, 예를 들어, 상품명 Strep-Tactin®으로 상업적으로 이용가능하다. 스트렙타비딘 결합 펩티드는, 예를 들어, 미국특허 제5,506,121호에 기술된 "Strep-tag®"와 같은 단일 펩티드, 또는 국제특허공개 제WO 02/077018호 또는 미국특허 제7,981,632호에 기술된 바와 같은 2개 이상의 개별적 결합 분자의 연속 배열을 갖는 스트렙타비딘 결합 펩티드일 수 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제의 결합 파트너 C는 친화성 태그로서 통상의 기술자에 공지된 모이어티를 포함한다. 이러한 실시양태에서, 친화성 시약은 상응하는 결합 파트너, 예를 들어, 친화성 태그에 결합하는 것으로 알려진 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 공지된 친화성 태그의 몇몇 실증적 예시로서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너는 올리고히스티딘, 면역글로불린 도메인, 말토스-결합 단백질, 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (GST), 키틴 결합 단백질 (CBP) 또는 티오레독신, 칼모듈린 결합 펩티드 (CBP), FLAG'-펩티드, HA-태그 (서열: Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala, (서열번호: 11)), VSV-G-태그 (서열: Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lys, (서열번호: 12)), HSV-태그 (서열: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp, (서열번호: 13)), T7 에피토프 (Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Met-Gly, (서열번호: 14)), 말토스 결합 단백질 (MBP), 허페스 심플렉스 바이러스 당단백질 D의 서열 Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp (서열번호: 13)의 HSV 에피토프, 서열 Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu (서열번호: 15)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: 16), 또는 글루타치온-S-트랜스퍼라제 (GST)를 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 다량체화 시약의 하나 이상의 결합 부위들, 이 경우에 항체 또는 항체 단편과 항원 사이에 형성된 복합체는 유리 항원, 즉 유리 펩티드 (에피토프 태그) 또는 유리 단백질 (예컨대 MBP 또는 CBP)의 첨가에 의해 경쟁적으로 파괴될 수 있다. 친화성 태그는 또한 올리고뉴클레오티드 태그일 수 있다. 이러한 올리고뉴클레오티드 태그는, 예를 들어, 친화성 시약에 연결되거나 그에 포함된, 상보성 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드에 혼성화하기 위해 사용될 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C와 다량체화 시약의 하나 이상의 결합 부위 사이의 결합은 이가, 3가 또는 4가 양이온의 존재하에서 일어난다. 이와 관련하여, 일부 실시양태에서, 다량체화 시약은 전형적으로 적합한 퀄레이트화제에 의해 보유된, 예컨대 착체화된, 이가, 3가 또는 4가 양이온을 포함한다. 수용체 결합 시약에 포함된 결합 파트너는 이러한 실시양태에서, 예를 들어, 복합체, 이가, 3가 또는 4가 양이온을 포함하는 모이어티를 포함할 수 있다. 각각의 금속 퀄레이트화제의 예시에는, 이로 제한되는 것은 아니지만, 에틸렌디아민, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 에틸렌 글리콜 테트라아세트산 (EGTA), 디에틸렌리아민펜타아세트산 (DTPA), N,N-비스(카복시메틸)글리신 (소위 니트릴로트리아세트산, NTA), 또는 1,2-비스(o-아미노페놀식)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산 (BAPTA)이 포함된다. 예로서, EDTA는, 예를 들어 칼슘 (Ca^{2+}), 망간 (Mn^{2+}), 구리 (Cu^{2+}), 철 (Fe^{2+}), 코발트 (Co^{3+}) 및 지르코늄 (Zr^{4+})과 같은 대부분의 일가, 이가, 3가 및 4가 금속 이온과 복합체를 형성하는 반면, BAPTA는 Ca^{2+} 에 특이적이다. 실증적 예시로서, 당해 분야에 사용되는 표준 방법은 올리고히스티딘 태그와 구리 (Cu^{2+}), 니켈 (Ni^{2+}), 코발트 (Co^{2+}), 또는 아연 (Zn^{2+}) 이온 사이의 복합체 형성으로, 이는 퀄레이트화제 니트릴로아세트산 (NTA)을 이용하여 제시된다.

[0077] 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 칼모듈린 결합 펩티드를 포함하고 친화성 시약은 미국특허 제5,985,658호에 기술된 바와 같거나 또는, 예를 들어, 도 2를 참조하여 본원에 기술된 바와 같은 멀티미 칼모듈린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 FLAG 펩티드를 포함하고 친화성 시약은 FLAG 펩티드에 결합하는 항체, 예를 들어, 미국특허 제4,851,341호에 기술된 바와 같은 단클론 항체 4E11에 결합하는 FLAG 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C는 올리고히스티딘 태그를 포함하고 친화성 시약은 올리고히스티딘 태그에 결합하는 항체 또는 전이금속 이온을 포함한다. 이를 모든 결합 복합체의 파괴는 칼슘 퀄레이트화제와 같은 금속 이온 퀄레이트화에 의

해, 예를 들어, EDTA 또는 EGTA (상동)의 첨가에 의해 달성될 수 있다. 칼모듈린, 4E11와 같은 항체 또는 킬레이트된 금속 이온 또는 유리 킬레이트화제는 통상의 방법에 의해, 예를 들어 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 이들의 멀티머와의 비오틴화 및 치화에 의해, 또는 본질적으로 문헌 [Noguchi, A, et al. Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137]에 기술된 바와 같이 제1 단계에서 텍스트란과 같은 다당류 내로 카르복실 잔기의 도입 및 제2 단계에서 통상의 카보디이미드 화학을 이용하여 텍스트란과 같은 다당류 골격에서 카르복실기에 일차 아미노기를 통한 칼모듈린 또는 항체 또는 킬레이트된 금속 이온 또는 유리 킬레이트화제의 연결에 의해 다량체화될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 제1 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C와 다량체화 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.

[0078] 일부 실시양태에서, 특히, 다량체화 시약이 가용성 형태이고 스트렙타비딘 또는 아비딘에 근거하는 경우, 이는 스트렙타비딘 또는 아비딘, 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 임의의 뮤테인 (유사체)의 올리고머 또는 폴리머이다. 결합 부위 Z는 아비딘 또는 스트렙타비딘의 자연적 비오틴 결합이다. 각각의 올리고머 또는 폴리머는 다당류에 의해 교차결합될 수 있다. 일 실시양태에서, 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 뮤테인 (유사체)의 올리고머 또는 폴리머는 본질적으로 문헌 [Noguchi, A, et al. Bioconjugate Chemistry (1992) 3, 132-137]에 기술된 바와 같이 제1 단계에서 텍스트란과 같은 다당류 내로 카르복실 잔기의 도입에 의해 제조된다. 그 후에 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 이의 유사체는 제2 단계에서 통상의 카보디이미드 화학을 이용해 텍스트란 골격에서 카르복실기에 내부 리신 잔기 및/또는 유리 N-말단의 일차 아민기를 통해 연결될 수 있다. 또한, 스트렙타비딘 또는 아비딘 또는 스트렙타비딘 또는 아비딘의 임의의 뮤테인 (유사체)의 교차결합된 올리고머 또는 폴리머는 또한 링커로서 제공되는, 글루타르알데히드와 같은 이관능성 분자를 통해서 또는 당해 분야에 기술된 다른 방법에 의해 개별 스트렙타비딘 또는 아비딘 분자 (스트렙타비딘 또는 아비딘의 테트라머 호모디아미는 본원에서 각각의 올리고머 또는 폴리머의 "개별 분자" 또는 가장 작은 빌딩 블록으로 언급됨)를 교차결합시킴으로써 수득될 수 있다. 예를 들어, 제1 단계에서 스트렙타비딘 뮤테인 내로 티올기를 도입 (이는, 예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인 2-이미노티올란 (Trauts 시약)의 반응에 의해 수행될 수 있음)하고 별도의 반응에서 스트렙타비딘 뮤테인 내 이용가능한 아미노기를 활성화시킴으로써 스트렙타비딘 뮤테인의 올리고머를 생성할 수 있다. 이러한 아미노기의 활성화는 스트렙타비딘 뮤테인과 설포석시니미딜 4-(N-말레이이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트 (설포 SMCC) 또는 석시니미딜-6-[(β-말레이이미도프로파온아미도)헥사노에이트 (SMPH)와 같은 상업적으로 이용가능한 헤테로이관능성 교차결합제의 반응에 의해 달성될 수 있다. 제2 반응에서, 그렇게 수득된 2개의 반응 산물을 함께 혼합하여, 한 배치 (batch)의 변형된 스트렙타비딘 뮤테인에 함유된 티올기와 다른 배치의 변형된 스트렙타비딘 뮤테인의 (말레이이미드 기능에 의해) 활성화된 아미노산의 반응을 초래한다. 이 반응에 의해, 스트렙타비딘 뮤테인의 멀티머/올리고머가 형성된다. 이들 올리고머는 3개 초과의 "개별 분자" 또는 스트렙타비딘 "빌딩 블록"의 임의의 적합한 수를 가질 수 있고 올리고머화 정도는 반응 조건에 따라 달라질 수 있다 (도 24 참조). 변형된 스트렙타비딘 뮤테인의 이들 두 배치를 반응시킨 후, 올리고머 가용성 다량체화 시약은 전형적으로 크기 배제 크로마토그래피를 통해 분리되고 임의의 바람직한 분획이 다량체화 시약으로 사용될 수 있다. 전형적으로, 올리고머는 단일 분자량을 갖지 않지만 (가질 필요도 없지만) 이들은 보통 구아시안 (Gaussian) 분포와 같은 통계학적 중량 분포를 관찰한다. 3개 초과의 스트렙타비딘 호모테트라머 (빌딩 블록; $n \geq 3$)를 갖는 임의의 올리고머가 가용성 다량체화 시약으로 사용될 수 있다. 올리고머는, 예를 들어 3개 내지 25개 스트렙타비딘 뮤테인 호모테트라머를 가질 수 있다. 하기에서 더욱 상세히 기술되는 뮤테인 "m1" 또는 "m2"와 같이 약 50 kDa의 분자량을 갖는 스트렙타비딘 뮤테인의 경우, 이들 가용성 올리고머는 약 150 kDa 내지 약 1250 kDa의 분자량을 갖는다. 각각의 스트렙타비딘 분자/뮤태인이 4개의 비오틴 결합 부위를 갖기 때문에 이러한 다량체화 시약은 본원에 기술된 바와 같이 12개 내지 100개 결합 부위 Z1 (및 Z2)를 제공한다.

[0079] 상기 기술에 따라서, 단지 교차결합된 스트렙타비딘 호모테트라머만을 함유하는 이러한 올리고머 다량체화 시약에 덧붙여, 본 발명에 사용되는 다량체화 시약을 수득하기 위해 캐리어에 테트라머 스트렙타비딘 뮤테인을 반응시킬 수 있다. 다당류를 이용한 상기에 기술된 반응에 더하여, 캐리어 단백질로서 혈청 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 소 혈청 알부민 (BSA))과 같이 생리학적으로 또는 약제학적으로 허용가능한 단백질을 또한 사용할 수 있다. 이러한 경우에, 스트렙타비딘 뮤테인 (개별적 호모-테트라머로서 또는 또한 $n \geq 3$ 을 갖는 올리고머의 형태로서 중 하나임)은 비-공유 상호작용을 통해 캐리어 단백질에 결합될 수 있다. 이를 위해, 비오틴화된 BSA (몇몇만 말하자면, ThermoFisher Scientific, Sigma Aldrich 또는 Vectorlabs와 같은 다양한 공급자로부터 상업적으로 이용가능함)는 스트렙타비딘 뮤테인과 반응될 수 있다. 그렇게 하면, 스트렙타비딘 올리고머의 일부가 하나 이상의 비오틴 결합 부위 (Z1, Z2)를 통해 비오틴화된 캐리어 단백질에 비-공유적

으로 결합할 것이고, 이는 올리고머의 결합 부위 (Z1, Z2)의 대부분을 본원에 기술된 바와 같은 제1 제제 및 선택적으로 제2 제제 및 임의의 추가 제제와 같은 제제의 결합을 위해 남겨둔다. 따라서, 이러한 접근법에 의해 다수의 결합 부위 Z1을 갖는 가용성 다량체화 시약이 편리하게 제조될 수 있다 (도 24 참조). 대안적으로, 스트렙타비딘 뮤테인 (개별적 호모-테트라머로서 또는 또한 $n \geq 3$ 인 올리고머의 형태로서 중 하나임)은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 분자와 같은 합성 캐리어에 공유적으로 결합될 수 있다. PEG 분자 및 각각의 다량체화 시약이 가용성인 한 임의의 적합한 PEG 분자가 이를 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, 최대 분자량 1000 Da의 PEG 분자는 모두 물 또는 본 발명에 사용될 수 있는 배양 배지에 가용성이다. 이러한 PEG계 다량체화 시약은 스트렙타비딘 뮤테인의 아미노기를 갖는 상업적으로 이용가능한 활성화된 PEG 분자 (예를 들어, NOF North America Corporation, Irvine, California, USA로부터 이용가능한 PEG-NHS 유도체, 또는 Creative PEGWorks, Chapel Hills, North Carolina, USA로부터 이용가능한 활성화된 PEG 유도체)를 이용해 용이하게 제조될 수 있다.

[0080]

스트렙타비딘 또는 야생형 스트렙타비딘 (wt-스트렙타비딘)의 경우에, 문헌 [Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882]에 기술된 아미노산 서열이 인용된다. 스트렙타비딘 뮤테인은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 부가에 의해 야생형 스트렙타비딘의 서열과 구별되고 wt-스트렙타비딘의 결합 특성을 보유하는 폴리펩티드이다. 스트렙타비딘-유사 폴리펩티드 및 스트렙타비딘 뮤테인은 본질적으로 야생형 스트렙타비딘과 면역학적으로 등가이고 특히 wt-스트렙타비딘과 같거나 상이한 친화도로 비오틴, 비오틴 유도체 또는 비오틴 유사체에 결합할 수 있는 폴리펩티드이다. 스트렙타비딘-유사 폴리펩티드 또는 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 일부가 아닌 아미노산을 함유할 수 있거나 이들은 오로지 야생형 스트렙타비딘의 일부만을 포함할 수 있다. 숙주가 숙주-생산된 폴리펩티드를 야생형 스트렙타비딘의 구조로 전환시키기 위해 요구되는 효소를 갖지 않기 때문에, 스트렙타비딘-유사 폴리펩티드는 또한 야생형 스트렙타비딘과 동일하지 않은 폴리펩티드이다. 용어 "스트렙타비딘"은 또한 스트렙타비딘 테트라머 및 스트렙타비딘 다이머, 특히 스트렙타비딘 호모테트라머, 스트렙타비딘 호모다이머, 스트렙타비딘 헤테로테트라머 및 스트렙타비딘 헤테로다이머를 포함한다. 각 서브유닛은 보통 비오틴 또는 비오틴 유사체에 대한 또는 스트렙타비딘-결합 웹티드에 대한 결합 부위를 갖는다. 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.

[0081]

바람직한 실시양태에서, 다량체화 시약으로 사용되는 스트렙타비딘 뮤테인은 미국특허 제6,103,493호 및 또한 독일특허 제DE 196 41 876.3호에 기술된 그러한 스트렙타비딘 뮤테인이다. 이들 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 서열을 기준으로, 아미노산 위치 44 내지 53의 영역 내에 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 10 내지 16의 영역에서 N-말단이 시작하고 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 133 내지 142의 영역에서 C-말단이 종결되는데, 최소 스트렙타비딘의 뮤테인이 선호된다. 이러한 바람직한 스트렙타비딘 뮤테인의 예시는 위치 44에서 Glu 대신에 소수성 지방족 아미노산, 위치 45에서 임의의 아미노산, 위치 46에서 소수성 지방족 아미노산 또는/및 위치 47에서 Val 대신에 염기성 아미노산을 갖는다. 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 Val⁴⁴-Thr⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (서열 번호: 2)을 포함하는 뮤테인 또는 야생형 스트렙타비딘의 서열 위치 44 내지 47에 아미노산 서열 11e⁴⁴-Gly⁴⁵-Ala⁴⁶-Arg⁴⁷ (서열번호: 3)을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인 (유사체)일 수 있다. 이러한 뮤테인은 미국특허 제6,103,493호에 기술되어 있고, 예를 들어, 상품명 Strep-Tactin® 하에 뮤테인 "m1" 및 뮤테인 "m2"의 형태로 IBA GmbH로부터 상업적으로 이용가능하다.

[0082]

일부 실시양태에서 본 발명에 따른 방법은 이전에 세포 중대에 사용되었던 시약의 시료를 고갈시키기 위해 사용될 수 있다. 제1 또는 제2 제제 및 각각의 유리 파트너 (경쟁 제제)는, 예를 들어, 상기에 기술된 바와 같은 중대 방법의 용출액에 포함되어 제시될 수 있다. 본 발명에 따른 방법을 이용하여 이러한 시약이 적어도 본질적으로, 시료로부터, 예컨대 세포 집단으로부터 완전히 제거될 수 있다. 실증적 예시로서, 상기에 정의된 바와 같은 제1 또는 제2 제제는, 예컨대 FACS 또는 웨스턴 블로트의 검출 한계 이하인 수준으로 시료로부터 고갈될 수 있다. 경쟁 시약 (유리 제1 또는 제2 결합 파트너 또는 이의 유사체)은 중대를 종료하고 제어하며 다량체화 제제로부터 세포 집단을 방출하기 위해 사용될 수 있다. 이 경쟁 시약은 WO 2013/124474의 "제거 카트리지" 내에서 친화성 시약의 결합 부위 Z에 특이적으로 결합할 수 있는 결합 부위를 가질 수 있다. 이러한 실시양태에서 본 발명의 각각의 방법은 또한 제1 및 제2 제제 및 경쟁 시약을 제거하는 것을 비롯해 이들을 고갈시키는데 또한 제공될 수 있다.

[0083]

본 발명에 따른 방법은 세포 집단의 생존능이 적어도 본질적으로 손상되지 않는 (uncompromised) 임의의 온도에서 수행될 수 있다. 생존능에 적어도 본질적으로 해롭지 않고 유해하지 않거나 적어도 본질적으로 이를 손상시

키지 않는 조건에 대한 참조가 본원에서 이루어질 때, 그 조건 하에서 최대 생존능으로 증대되어지는 세포 집단의 비율이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5%인 조건이 언급된다. 일부 실시양태에서 본 발명에 따른 방법은 약 20°C 이상의 온도에서 수행된다. 증대되는 세포 집단에 따라서, 적합한 온도 범위는, 예를 들어 약 20°C 내지 약 45°C, 약 25°C 내지 약 40°C, 또는 약 32°C 내지 37°C일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법은 일정한 온도 값에서, 또는 선택된 온도 값 ± 약 5°C, ± 약 4°C, ± 약 3°C, ± 약 2°C, ± 약 1°C 또는 ± 약 0.5°C에서 수행된다. 통상의 기술자는 세포의 성질 및 증대 조건을 고려하여, 적합한 온도를 실증적으로 결정할 수 있다. 전형적으로 인간 세포는 37°C와 같은 온도에서 증대된다.

[0084] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 세포 집단을 포함하는 시료를 다량체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하는 세포 집단을 증대시키는 시험관 내 방법을 제공하고, 다량체화 시약은 가용성 형태이고 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제를 갖는다. 다량체화 시약은 제1 제제의 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고, 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 결합할 수 있다. 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되고, 제1 제제는 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고, 그로써 세포를 활성화시킨다. 가용성 다량체화 제제가 사용되는 경우, 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이의 결합이 가역적일 필요가 없음이 여기서 명백히 주목된다.

[0085] 이 두 번째의 일 실시양태에서 다량체화 제제는 그 위에 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상에 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 가지며, 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 결합 부위 Z2에 결합될 수 있다. 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되고, 제2 제제는 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 그로써 활성화된 세포를 자극한다.

[0086] 이 두 번째 방법의 일 실시양태에서, 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 결합은 비가역적일 수 있고 /하거나 또한 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합은 비가역적일 수 있다.

[0087] 이 두 번째 방법의 다른 실시양태에서, 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 결합은 가역적일 수 있다. 또한 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합은 가역적일 수 있다. 이 경우에, 상기 결합 부위 Z1과 상기 결합 파트너 C1 사이의 가역적 결합 및/또는 상기 결합 부위 Z2와 상기 결합 파트너 C2 사이의 가역적 결합에 대한 해리 상수 (K_d)는 10^{-2} M 내지 10^{-13} M의 범위일 수 있다.

[0088] 가용성 다량체화 시약을 토대로 하는 이 두 번째 방법에서, 제1 및 제2 시약뿐만 아니라 다량체화 시약 및 모든 다른 시약 및 세포 집단은 다르게는 제1 또는 제2 제제와 다량체화 시약 사이의 가역성을 이용하는 방법에 대해 상기에 기술된 바와 동일한 방식으로 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명은 하기를 포함하는, 세포 집단의 증대를 위한 시약 키트를 추가로 제공한다:

[0090] (i) 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z를 포함하는 다량체화 시약,

[0091] (ii) 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고 그로써 세포를 활성화시키는 제1 제제로서, 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되는 것인, 제1 제제, 및

[0092] (iii) 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제로서, 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되고, 제2 제제는 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 그로써 활성화된 세포를 자극하는 것인, 제2 제제.

[0093] 본 발명은 또한 하기를 포함하는, 세포 집단의 증대를 위한 시약 키트를 제공한다:

[0094] (i) 가용성 형태이고, 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z를 포함하는 다량체화 시약, 및

[0095] (ii) 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고 그로써 세포를 활성화시키는 제1 제제로서, 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합

을 통해 다량체화 시약에 결합되는 것인, 제1 제제.

[0096] 이 두 번째 시약 키트는 (iii) 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 추가로 포함할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합된다.

[0097] 본원에 기술된 바와 같은 키트는 특히 세포 집단이 림프구 집단인 경우에 사용된다.

[0098] 상기 기술에 따라서, 본 발명은 또한 세포 집단을 증대시킬 수 있는 신규한 다량체화 시약 및 다량체화 시약을 포함하는 신규한 조성물을 제공한다. 세포 집단을 증대시킬 수 있는 이러한 다량체화 시약은 가용성 형태이고 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1를 포함하는 다량체화 시약이고, 다량체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 상기 제1 제제를 가지며; 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합된다. 이러한 다량체화 제제가 본원에 기술된 임의의 제1 제제 위에 고정될 수 있음이 여기서 주목된다.

[0099] 본 발명의 다량체화 시약은 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z2를 추가로 포함할 수 있고, 다량체화 시약은 그 위에 가역적으로 결합된 (그에 결합된), 세포 표면상에 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 가지며, 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z2에 결합할 수 있다. 이 실시양태에서, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합된다.

[0100] 또한, 상기에 제공된 기술에 따라서, 이러한 다량체화 시약은 림프구 집단 또는 림프구 집단에 함유된 아집단을 증대시킬 수 있다. 증대되는 림프구 집단은 임의의 적합한 집단, 예를 들어, B 세포 집단, T 세포 집단, 또는 자연 살해 세포 집단일 수 있다. T-세포 집단은 항원-특이적 T 세포 집단, T 헬퍼 세포 집단, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 또는 자연 살해 T 세포 집단일 수 있다. 따라서, 이러한 다량체화 시약의 실시양태에서, 제1 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체-연관 신호를 자극할 수 있다. 다량체화 시약에 존재하는 제1 제제는 따라서 CD3에 특이적으로 결합하는 결합 시약일 수 있는 반면, 보조 분자에 결합하는 제2 제제는 CD28 또는 CD137에 특이적으로 결합하는 결합 제제일 수 있다.

[0101] 다량체화 시약의 실시양태에서, CD3에 특이적으로 결합하는 제1 제제는 항-CD3-항체, 항-CD3 항체의 이가 항체 단편, 항-CD3-항체의 일가 항체 단편, 및/또는 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD3 결합 분자일 수 있다. 이들 실시양태에서, CD28 또는 CD137에 특이적으로 결합하는 제2 제제는 항-CD28-항체, 항-CD28 항체의 이가 항체 단편, 항-CD28 항체의 일가 항체 단편, 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD28 결합 분자, 항-CD137-항체, 항-CD137 항체의 이가 항체 단편, 항-CD137-항체의 일가 항체 단편, 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD137 결합 분자, 4-1BB 리간드, 및 이들의 혼합물일 수 있다. 따라서, 본 발명의 다량체화 시약은 일반적으로 그 위에 고정된 한 종류의 제1 제제 및 제2 제제의 혼합물, 예를 들어, 제1 제제로서 항-CD3 항체 및, 예를 들어, (공동) 제2 제제로서 항-CD28 항체 및 4-1BB 리간드를 가질 수 있다.

[0102] 다량체화 시약이 B 세포의 증대를 위해 사용되는 경우, 다량체화 시약 위에 고정된 제1 제제는 CD40 또는 CD137에 특이적으로 결합하는 결합 시약일 수 있다. 본원에 제공된 기술에 따라서, 이러한 실시양태에서, CD40 또는 CD137에 특이적으로 결합하는 제1 결합 시약은 항-CD40-항체, 항-CD40 항체의 이가 항체 단편, 항-CD40 항체의 일가 항체 단편, 및 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD40 결합 분자 또는 항-CD137-항체, 항-CD137 항체의 이가 항체 단편, 항-CD137-항체의 일가 항체 단편, 항체-유사 결합 특성을 갖는 단백질성 CD137 결합 분자, 및 CD40 리간드 (CD154)로부터 선택될 수 있다.

[0103] 또한, 본 발명의 일반적인 기술에 따르면, 본원에 기술된 바와 같은 다량체화 시약에서, 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 및 Z2는 동일할 수 있다. 상기에 기술된 바와 같이, 이러한 다량체화 시약은 스트렙타비딘의 올리고머 또는 폴리머, 아비딘의 올리고머 또는 폴리머, 비오틴에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘의 유사체의 올리고머 또는 폴리머, 비오틴에 가역적으로 결합하는 유사체 아비딘의 올리고머 또는 폴리머, 적어도 2개의 키헤이팅 기 K를 포함하는 시약, (여기서 적어도 2개의 키헤이팅기는 전이 금속 이온에 결합할 수 있고, 그로써 시약이 올리고히스티딘 친화성 태그에 결합할 수 있게 함), 멀티머 글루타치온-S-트랜스퍼라제, 멀티머 칼모듈린 및 비오틴화된 캐리어 단백질을 포함할 수 있다.

[0104] 본원에 제공된 세포 집단을 증대시킬 수 있는 신규한 조성물은 하기를 포함할 수 있다:

[0105] (i) 가용성 형태이고 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하는 제1 다량체화 시약으로서, 제1 다량체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 상기 제1 제제를 갖고, 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되는 것인, 제1 다량체화 시약, 및

[0106] (ii) 가용성 형태이고 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z2를 포함하는 제2 다량체화 시약으로서, 다량체화 시약은 그 위에 가역적으로 고정된 (그에 결합된), 세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 상기 제2 제제를 가지며, 제2 제제는 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 적어도 하나의 결합 부위 Z2에 결합할 수 있고, 제2 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되는 것인, 제2 다량체화 시약.

[0107] 이러한 신규 조성물은, 예를 들어, 2개의 별개의 다량체화 시약이 α CD3 Fab 단편 단독 또는 α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화되어 있는 실시예 13에 사용된 반응 혼합물이다. 이 맥락에서, 이러한 조성물이 실시예 13에서 그 위에 제1 제제 및 제2 제제가 함께 고정된 단일 다량체화 시약과 동일한 증대 효율을 갖는 것으로 나타났음이 주목된다. 따라서, 오로지 한 유형의 시약 (예를 들어, 하나의 제1 또는 하나의 제2 제제)으로 개별적으로 관능화된 2개 이상의 다량체화 시약의 조합된 사용은 그 위에 제1 제제 및 제2 제제 둘 모두가 고정되어 있는 하나의 공동 다량체화 시약을 증대를 위해 사용하는 것과 기능적으로 동가이다. 이 맥락에서, 본 발명의 다량체화 시약이 선택된 세포 집단의 증대를 위해 사용되는 것으로 의도되는 다수의 제제 (예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 그 이상의 제제)로 관능화됨이 또한 주목된다. 제3 또는 제4 제제는, 예를 들어, 세포의 바람직한 아집단의 증대를 위한 자극을 제공할 수 있다. 이 맥락에서, 예를 들어, CD3+ T 세포 (림프구) 집단의 시료에서 CD8+ T 세포의 아집단을 농축하기 위해 가용성 다량체화 시약이 3개의 시약, 즉 제1 시약으로서 α CD3 Fab 단편, 제2 시약으로서 α CD28 Fab 단편 및 제3 시약으로서 α CD8 Fab 단편으로 가역적으로 관능화되었던 실시예 13을 참조한다. 모두가 동일한 다량체화 시약 위에 가역적으로 고정될 수 있는 이러한 제제의 조합을 사용함으로써, 본 발명은, 예를 들어, 다양한 상이한 아집단을 포함하는 시료로부터 임의의 목적하는 세포 (아)집단을 선호적으로 증대시키거나 선택적으로 농축할 수 있는 가능성을 허용한다. 이 맥락에서, 그러나 이 목적을 위해 3개의 상이한 다량체화 시약, 예를 들어, 오로지 α CD3 Fab 단편으로만 관능화된 제1 다량체화 시약, α CD28 Fab 단편으로 관능화된 제2 다량체화 시약 및 α CD8 Fab 단편으로 관능화된 제3 다량체화 시약을 사용하는 것이 또한 가능함이 주목된다. 유사하게, 오로지 α CD3 Fab 단편만으로 관능화된 제1 다량체화 시약 및 α CD28 Fab 단편 및 α CD8 Fab 단편 둘 모두로 관능화된 제2 다량체화 시약인, 단지 2개의 다량체화 시약을 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 모듈 방식으로 임의의 종류의 요구된 증대 시약의 고안을 가능케 한다.

[0108] 본 발명은 또한 T 세포를 포함하는 림프구 집단을 연속적으로 증대하는 시험관 내 방법을 제공한다. 이 방법은 림프구 집단을 포함하는 T 세포를 포함하는 시료를 다량체화 시약과 접촉시키는 것을 포함하고,

[0109] 다량체화 시약은 가용성 형태이고 그 위에 가역적으로 고정된 (i) T 세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제 및 (ii) T 세포의 표면상에 보조 분자를 자극하는 제2 제제를 가지며,

[0110] 다량체화 시약은 제1 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z1을 포함하고,

[0111] 제1 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C1을 포함하고, 결합 파트너 C1은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되고,

[0112] 다량체화 시약은 제2 제제의 가역적 결합을 위한 적어도 하나의 결합 부위 Z2를 포함하고,

[0113] 제2 제제는 적어도 하나의 결합 파트너 C2를 포함하고, 결합 파트너 C2는 다량체화 시약의 결합 부위 Z2에 가역적으로 결합할 수 있고, 제1 제제는 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이에 형성된 가역적 결합을 통해 다량체화 시약에 결합되고,

[0114] 제1 제제는 T 세포 표면상의 수용체 분자에 결합하여, 세포에 일차 활성화 신호를 제공하고 그로써 T 세포를 활성화시키며,

[0115] 제2 제제는 T 세포 표면상의 보조 분자에 결합하여, 활성화된 세포, 제1 제제 및 제2 제제를 자극하고, 그로써 함께 T 세포가 증대하도록 유도한다.

[0116] 이 방법에서, 램프구 집단을 함유하고 이는 다시 T 세포 집단을 함유하는 시료를 그 위에 제1 및 제2 제제가 고정되어 있는 가용성 다량체화 시약과 접촉시키는 것은 다량체화 시약에 T 세포의 특이적 결합을 초래한다.

[0117] 램프구 집단을 포함하는 T 세포를 포함하는 시료와 다량체화 시약의 접촉은 중공 섬유 생물반응기 (예컨대, Quantum® 세포 증대 시스템의 중공 섬유 생물반응기) 또는 플라스틱 백 생물반응기 (예컨대, GE Healthcare의 Xuri 세포 증대 시스템 W25에 사용되는 Cellbag®)와 같은 생물반응기 내에서 수행될 수 있다.

[0118] 이 방법은 램프구 집단 (제1 제제 및 제2 제제를 통해 다량체화 시약에 결합된 T 세포를 함유하는 반응 혼합물)을 (i) 제1 결합 파트너 C1과 결합 부위 Z1 사이의 결합을 파괴할 수 있는 유리 제1 결합 파트너 C1 또는 이의 유사체 및 (ii) 제2 결합 파트너 C2와 결합 부위 Z2 사이의 결합을 파괴할 수 있는 유리 제2 결합 파트너 C2 또는 이의 유사체와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 이렇게 함으로써 제1 제제의 상기 결합 파트너 C1과 상기 결합 부위 Z1 사이의 가역적 결합뿐만 아니라 제2 제제의 상기 결합 파트너 C2와 상기 다량체화 시약의 상기 결합 부위 Z2 사이의 가역적 결합이 파괴되고, 그로써 제1 제제 및 제2 제제를 통해 다량체화 시약에 결합된 T 세포를 용출액 내로 방출시키고 T 세포의 증대를 중단시킨다.

[0119] 이 방법에서, 증대된 T 세포 집단을 함유하는 용출액 (증대 반응이 유리 제1 파트너(들) 또는 이의 유사체(들)의 첨가에 의해 종료되었던 반응 혼합물)을 적합한 (제1) 정지상 위의 크로마토그래피에 노출시킬 수 있다. (제1) 정지상은 국제특허공개 제WO 2013/124474호에 기술된 바와 같은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스일 수 있다. 이 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 친화성 시약을 포함하고, 친화성 시약은 제1 제제 또는 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C1 및/또는 C2에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z1 및/또는 Z2를 포함한다. 그렇게 함으로써, 제1 제제, 제2 제제, 제1 결합 파트너 C1 및/또는 유리 제2 결합 파트너 C2가 정지상 상에 고정된다. 이 방법에서, 제1 정지상은 생물반응기에 유체 연결된다.

[0120] 이 연속 증대의 일 실시양태에서, 다량체화 제제의 결합 부위 Z1 및 Z2는 동일하다. 또한, 단일 다량체화 제제가 사용될 수 있다. 가용성 다량체화 제제가 사용되는 경우, T 세포 집단 (또는 일반적으로 증대된 세포 집단)은 가용성 다량체화 시약으로부터 분리된다. 분리/제거는 제2 정지상을 이용하여 수행될 수 있다. 이를 위해서, T 세포 및 가용성 다량체화 시약을 포함하는 혼합물이, 상기에 기술된 제1 정지상 상에 적용되기 전에 또는 그 후에, 적합한 제2 정지상 위의 크로마토그래피에 노출된다. 이 제2 정지상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스일 수 있고, 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 친화성 시약을 포함한다. 크로마토그래피 수지상에 포함된 친화성 시약은, 존재하는 경우, 다량체화 시약의 결합 부위 Z1 및/또는 결합 부위 Z2에 (특이적으로) 결합하는 결합 파트너 D를 포함하고, 그로써 정지상 상에 다량체화 시약을 고정시킨다. 스트렙타비딘-기반 다량체화 제제가 사용되고 제1 및 제2 제제 둘 모두가 결합 파트너 C1 또는 C2로서 스트렙타비딘 결합 웹티드를 갖는 경우, 제2 정지상의 친화성 시약에 포함된 결합 파트너 D는 비오틴일 수 있다. 다량체화 시약으로 사용되는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 가용성 울리고머가 그 후에, 상업적으로 이용가능한 비오틴-세파로스™와 같은 크로마토그래피 매트릭스에 통상 공유적으로 결합된 비오틴에 결합한다.

[0121] 이 일련의 증대 방법에 있어서, 제1 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 복합체-연관 신호를 자극할 수 있고 제1 제제는 따라서 CD3에 특이적으로 결합하는 결합 시약일 수 있다. 또한, T 세포 상의 보조 분자는 CD28일 수 있다. 이 경우에, 보조 분자에 결합하는 제2 제제는 CD28에 특이적으로 결합하는 결합 시약이다.

[0122] 이 일련의 증대 방법에 있어서, T 세포는 증대 도중 또는 그 후에, 예컨대 T 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR, 인공적 T 세포 수용체로도 알려짐)로 형질감염될 수 있다. 목적하는 수용체 유전자의 도입을 위한 이 형질감염은, 예를 들어, 임의의 적합한 레트로바이러스 백터를 이용하여 수행될 수 있다. 유전적으로 변형된 세포 집단은 그 후에 초기 자극 (예를 들어, CD3/CD28 자극)으로부터 유리되고 이어서, 예컨대 드 노보 (de novo) 도입된 수용체를 통해 제2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 이 제2 유형의 자극은 웹티드/MHC 분자, 유전적으로 도입된 수용체의 동족 (교차결합) 리간드 (예컨대, CAR의 자연적 리간드) 또는 새로운 수용체의 틀 내에 (예컨대, 수용체 내의 불변 영역을 인식함으로써) 직접적으로 결합하는 임의의 리간드 (예컨대, 항체)의 형태로 항원성 자극을 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 문헌 [Cheadle et al., "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907: 645-66 or Barrett et al., Chimeric antigen receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)]을 참조한다.

[0123] 이 방법에서, T 세포를 포함하는 램프구 집단은 말초혈액 단핵세포 (PBMC) 집단 또는 농축되거나 정제된 T 세포 집단일 수 있다. 램프구 집단은, 예를 들어, 전혈, 또는 비-동원 혈장교환 (non-mobilized apheresis) 산물 또

는 냉동된 조직 표본으로부터 유래할 수 있다.

[0124] 가용성 다량체화 시약을 토대로 하는 일련의 증대 방법에 있어서, 제1 및 제2 시약뿐만 아니라 다량체화 시약 및 모든 다른 시약 및 세포 집단은 다르게는 제1 또는 제2 제제 및 다량체화 시약 사이의 가역성을 이용하는 방법에 대해 상기에 기술된 바와 동일한 방식으로 사용될 수 있다.

[0125] 본 발명은 추가로 생물반응기 및 크로마토그래피용 제1 정지상의 배열에 관한 것이다. 생물반응기는 세포의 증대에 적합하고, 정지상은 세포의 분리 및 시약의 제거에 적합하다. 제1 정지상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스이고, 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 친화성 시약을 포함하고, 친화성 시약은 제1 제제에 포함된 결합 파트너 C1에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z1을 포함하고/하거나 친화성 시약은 제2 제제에 포함된 결합 파트너 C2에 특이적으로 결합하는 결합 부위 Z2를 포함한다. 제1 정지상은 그로 인해 그 위에 제1 제제 및/또는 제2 제제, 제1 결합 파트너 C1 및/또는 유리 제2 결합 파트너 C2를 고정하기에 적합하다. 또한, 생물반응기 및 정지상은 유체 연결된다. 이 배열은 상기에 설명된 바와 같은 일련의 증대에 사용될 수 있고 Quantum® 세포 증대 시스템 또는 Xuri 세포 증대 시스템 W25과 같은 공지의 세포 증대 시스템 새로 통합될 수 있다.

[0126] 이 배열에서, 제1 정지상은 크로마토그래피 칼럼 내에 포함되거나 또는 평면 (planar) 정지상이다. 배열은 추가로 제1 정지상에 유체 연결된 제2 정지상을 포함할 수 있다. 제2 정지상은 겔 여과 매트릭스 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스일 수 있고, 겔 여과 및/또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 친화성 시약을 포함한다. 이 친화성 시약은 다량체화 시약의 결합 부위 Z1에 (특이적으로) 결합하는 결합 파트너 D를 포함하여, 그로써 정지상 상에 다량체화 시약을 고정하기에 적합할 수 있다.

[0127] 본 발명은 추가로 상기에 정의된 바와 같은 생물반응기 및 크로마토그래피용 제1 정지상 또는 제2 정지상의 적어도 하나의 배열을 포함하는, 세포 집단의 정제 및 증대를 위한 장치에 관한 것이다.

[0128] 장치는 추가로 일렬로 유체 연결된 생물반응기 및 정지상의 다수의 배열을 포함할 수 있다.

[0129] 장치는 생물반응기 및 크로마토그래피용 정지상의 배열의 생물반응기에 유체 연결된 시료 주입구를 포함할 수 있다. 장치는 또한 정제 및 증대된 표적 세포를 위한 시료 배출구를 포함하고, 시료 배출구는 생물반응기 및 크로마토그래피용 정지상의 적어도 하나의 배열의 마지막 정지상에 유체 연결된다.

[0130] 마지막으로, 장치는 기능적으로 폐쇄된 시스템으로 고안될 수 있다.

[0131] 통상의 기술자는 본 발명의 기술로부터 용이하게 인식할 것이기 때문에, 본원에 기술된 상응하는 예시적 실시양태와 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 현존하거나 이후에 개발될 물질, 수단, 방법, 또는 단계의 다른 구성이 마찬가지로 본 발명에 따라 이용될 수 있다.

실현적 실시예

[0133] 실시예 1: 스트렙타비딘 뮤테인 Strep-tactin®으로 코팅된 비드 상에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편을 이용한 CD3+ T 반응기 세포의 자극/증대

[0134] 300.000개의 CD3+CD62L-반응기 T 세포 (Tresp, 비)-동원된 공여자 혈장교환 (apheresis) 산물로부터 일련의 자성 농축에 의해 분리됨)를 3 μ M CFSE로 표지하고 0.5 μ g α CD3 Fab 단편 단독, 0.5 μ g α CD28 Fab 단편 단독 또는 0.5 μ g α CD3 Fab 단편과 0.5 μ g α CD28 Fab의 혼합물 중 하나로 로딩된 Streptactin® 비드의 15 μ l 제조물의 5 μ l (10 mg 자성 입자/ml, 35 μ g Streptactin®/mg 비드가 로딩됨)로 자극하였다.

[0135] 사용된 α CD3 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산된 CD3 결합 단클론 항체로부터 유래하였다. 하이브리도마 세포주 OKT3 및 OKT3 항체는 미국특허 제4,361,549호에 기술되어 있고, 세포주는 등재번호 ATCC® CRL-8001™로 기록되어 있다. 사용된 CD28 Fab은 단클론 항-인간 CD28 항체 CD28.3으로부터 유래하였다 (Vanhove et al, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570). 이 항체 CD28.3의 가변 도메인의 핵산 서열은 GenBank 등재번호 AF451974.1로서 합성 단쇄 Fv 불변 항-인간 CD28 항체 scFv28.3의 형태로 GenBank에 기록되어 있다.

[0136] 두 Fab 단편 모두는 불변 도메인 (CH1 및 Ckappa)으로서 IgG1 보존적 서열을 보유하는 국제특허공개 제 WO2013/011011호 및 제WO 2013/124474호에 기술된 바와 같은 *E. coli*에서 재조합적으로 생산되었다. 두 Fab 단편 모두의 중쇄는 2개 스트렙타비딘 결합 분자 (SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK, (서열번호: 7))의 순차적 배열로 카르복시-말단 융합되었고, 이는 IBA GmbH (Göttingen, Germany)로부터 "Twin-Strep-tag®"로 상업적으로

이용가능하다. α CD3 Fab 단편을 결합 파트너 C1을 제공하는 스트렙타비딘 결합 펩티드를 갖는 제1 제제로 사용하였고 α CD28 Fab 단편을 결합 파트너 C2로서 제공하는 스트렙타비딘 결합 펩티드를 갖는 제2 제제로 사용하였다. (테트라머) 스트렙타비딘 뮤테인 "Strep-tactin®"을 그 위에 두 Fab 단편이 가역적으로 고정된 다량체화 시약으로 제공한다.

[0137] 증대 실험에서, 블랭크 비드 (Fab 부재)로 자극된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 10 U/ml 인터류킨 2 (IL-2)가 보충된 3 ml 완전 세포 배양 배지 (10% (v/v) 송아지 태아 혈청, L-글루타민, b-머캅토 에탄올, HEPES, 페니실린, 스트렙토마이신 및 젠타마이신이 보충된 RPMI (Gibco))에서 300.000개의 CD3 세포 자가 영양 세포 (autologous feeder cell) (30 Gy로 방사능 조사됨)와 함께 48-웰 플레이트에 3회 접종하였다. 세포를 배지 교환 없이 37°C에서 인큐베이션하고 4일 후 FACS 분석으로 분석하였다. FACS 염색 및 분석은 100 μ M D-비오틴과의 10분 인큐베이션 후 실시하였다. 각 조건에 대해 하나의 대표적인 플롯을 도 4에 나타내었다. 플롯은 생/사 구별을 위해 프로피디움 요오드화물 (PI)로 염색된 생 CD3+ 세포를 보여준다. 도 4a는 자극된 세포의 크기-분포 (전방 산란)를 보여주는 히스토그램이다. 도 4a는 스트렙타비딘 뮤테인 Strep-tactin®으로 코팅된 비드 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극된 후, 0.5 μ g α CD3 Fab 단편과 0.5 μ g α CD28 Fab의 혼합물이 그 위에 고정되어 있는 비드의 존재하에서 인큐베이션된 경우에, Tresp 세포의 특이적 세포 집단이 자극되고 증대되었음 (비자극된 "비드 단독" 대조군에 비해 크기/수의 증가)을 보여준다. 도 4B는 세포 분열당 세포의 수에 따라서 증식 정도를 나타내는 증식 염료 CFSE의 희석액의 히스토그램을 나타낸다 (도 4B의 상부에 나타남, 0은 비분열된 세포를 나타내고; 5는 적어도 5회 분열을 거쳤던 세포를 나타냄). 도 4B로부터, 0.5 μ g α CD3 Fab 단편과 0.5 μ g α CD28 Fab의 혼합물이 그 위에 고정되어 있는 비드로 자극된 T 세포 집단이 3회 세포 분열을 거쳤고 단일 자극 단독에 비해 균일한 증식 양상을 나타냄 (비분열된 피크 "0" 내의 소수의 세포)을 알 수 있다. 증식의 증가된 절대량 (더 많은 세포가 α CD3 및 α CD28 판능화된 비드로 4d 자극된 후 균일하게 증식하였음)이 또한 도 4C에서 노란색으로의 지시약 색깔 변화에 의해 나타난 바와 같이 배지의 더욱 강렬한 소비에 의해 표시된다.

실시예 2: Jurkat 세포에서 차등적 세포내 칼슘 동원 분석

[0139] α CD3 항체 클론 OKT3 또는 Strep-tactin®으로 다량체화된 OKT3의 Fab 단편 중 하나로 표지된 Jurkat 세포에서 유도된 차등적 세포내 칼슘 동원의 실시간 저-세포측정 분석을 본 실시예에서 조사하였다.

[0140] 이를 위해, Jurkat 세포를 칼슘-감수성 염료 Indo-1-AM과 함께 로딩하고, 피코에리쓰린으로 형광 접합된 가용성 Strep-Tactin에 그의 스트렙타비딘 결합 펩티드의 가역적 결합에 의해 다량체화된 α CD3 단클론 항체 OKT3 (하이브리도마 세포주 OKT3에 의해 생산됨, 상기 참조, 흑색 네모) 또는 α CD3 Fab 단편 (모체 세포주 OKT3으로부터 유래함) 중 하나의 주입에 의해 칼슘 방출을 촉발하였다. 온전한 멀티머 OKT3 Fab-Strep-Tactin 복합체의 경우에, 모체 항체 클론 (짙은 회색 삼각형)을 이용한 경우와 동일한 기간에 걸쳐서 칼슘 방출을 촉발하였다. 세포의 활성화는 PBS 음성 대조군 (도립 백색 삼각형)의 주입과 동일한 D-비오틴 처리된, 사전-분리된 (pre-dissociated) Fab-Strep-Tactin 복합체 (밝은 회색 원형)의 주입에 의해 완전히 회피될 수 있다. 이노마이신의 적용을 칼슘 유입의 양성 대조군으로 제공하였다. 세포내 Ca^{2+} 농도에 있어서의 시-분해 (time-resolved) 변화를 FL6/FL7 비율의 변화를 토대로 유세포분석에 의해 모니터링하였다. 도 5A로부터 모체 항체 OKT3뿐만 아니라 OKT3의 다량체화된 일가 Fab 단편 둘 모두 칼슘 방출에 영향을 미쳤고, 이는 OKT3의 다량체화된 일가 Fab 단편이 본질적으로 모체 항체만큼 기능적임을 의미함을 알 수 있다. 놀랍게도, Strepactin-OKT3 Fab 단편의 첨가 전에 그 위에 OKT3 Fab 단편이 고정되어 있는 Strep-tactin에 비오틴을 첨가하는 경우, 멀티머 OKT3 Fab 단편은 칼슘 방출을 촉발할 수 없었다. 이 경우에, 비오틴은 다량체화 제제로서 Strep-tactin과 OKT3 Fab 단편 사이에 형성된 가역적 결합을 파괴하였다. 따라서 일가 Fab 단편은 다량체화 제제로부터 대체되고 분리 후에는 Jurkat 세포의 CD3에 결합함으로써 칼슘 방출을 촉발할 수 없었다.

[0141] 도 5B에 나타난 실험에서, indo-1-AM-표지된 Jurkat 세포를 도 5A에 기술된 바와 같이 OKT3 유래 α CD3 Fab-Strep-Tactin-복합체로 활성화시켰다. 온전한 (상부 그래프) 또는 사전-분리된 복합체 (하부 그래프)의 주입을 각각 양성 또는 음성 대조군으로 제공하였다. 또한, D-비오틴의 후속 주입에 이은 온전한 Fab-Strep Tactin-복합체로의 세포 자극 ($t=140s$ 에서의 피크 활성화 근처)은 α CD3 Fab-멀티머 신호전달 (중간 그래프)의 갑작스러운 파괴를 초래하였다. 사전-분리된 Fab 복합체 그룹 내로의 이노마이신의 주입을 양성 대조군으로 제공하였다. 데이터는 3회 상이한 실험을 대표한다. 중요하게도, 도 5B는 시료에 D-비오틴의 첨가가 Strep-tactin 다량체화 제제로부터 Fab 단편을 신속하게 분리시키고, 그로써 칼슘 자극이 진행 중인 상태에서 조차 칼슘 방출을 효과적으로 종료시키고 분리된 OKT3 Fab 단편이 더 이상 생물학적으로 활성이 아니라는 사실을 입증

함을 보여준다. 유사하게, 멀티머 OKT3 Fab 단편은 또한, Jurkat 세포에 Streptactin-OKT3 Fab 시료의 첨가 전에 비오틴이 Strep-tactin-OKT3 Fab 단편 멀티머에 첨가되는 경우 칼슘 방출을 촉발할 수 없었다.

[0142] **실시예 3: CD3 Fab-멀티머에 의한 세포의 가역적 염색**

[0143] 이 실시예는 CD3 Fab-멀티머에 의한 세포의 가역적 염색을 조사한다. 신선하게 분리된 PBMC를 α CD3 단클론 항체 클론 OKT3 (좌측 닷 플롯, Fab-멀티머에 대한 모체 클론) 또는 동족 피코에리쓰린 (PE)-표지된 OKT3 Fab-멀티머 중 하나로 염색하고 D-비오틴의 처리 전 (두 번째 좌측 칼럼) 또는 그 후에 (중간 칼럼) 분석하였다. 그 후에 잔여 Fab 모노머를 신선하게 PE-표지된 Strep-Tactin®을 이용한 후속 세척 단계 후 검출하였다 (두 번째 우측 칼럼). 가역적으로 염색된 세포의 이차 Fab-멀티머 염색을 대조군 (우측 칼럼)으로 제공하였다. 생/사 구별을 위해 프로피디움 요오드화물 (PI)을 이용한 염색에서 음성인 생 CD3 세포만이 도 6에 나타난다. 닷 플롯에서의 수는 게이트 내에서 세포의 비율을 나타낸다. 이 실험은 다양체화 시약으로서 Streptactin으로 다양체화된 항-CD3 Fab 단편을 이용한 CD3+ PBMC의 염색이 D-비오틴의 첨가에 의해 완전히 가역적이고 일가 Fab 단편 단독은 PBMC 상에 존재하는 CD3 분자에 결합하지 않음을 보여준다.

[0144] **실시예 4: CD28 Fab-멀티머에 의한 세포의 가역적 분리**

[0145] 이 실시예는 Strep-Tactin® 자성 입자 (자성 입자는 IBA GmbH (Gottingen, Germany)로부터 입수 가능함)로 다양체화된 항-CD28 Fab 단편의 가역적 결합에 의한 세포 단리를 보여준다. 상기 실시예 1에 기술된 항체 CD28.3 으로부터 유래한 Fab 단편을 이 목적을 위해 사용하였다. CD28+ 세포를 본질적으로 국제특허공개 제 WO2013/011011호에 기술된 바와 같이, 신선하게 분리된 PMBC로부터의 Fab-멀티머 자성 세포 선택에 의해 선별/분리하였다. 선별 전에, 세포를 대조군 염색으로서 동족의 형광 α CD28-멀티머 (좌측 닷 플롯) 또는 면역글로불린 카파 경쇄에 대해 지시된 항체 (두 번째 좌측 닷 플롯, α -Ig kappa mAb) 중 하나로 대조군 염색하였다. 선별 후, CD28+ 세포를 D-비오틴으로 처리하고 이어서 자성 비드 및 Fab-모노머를 제거하기 위해 세척하였다. 유리된 CD28+ 세포를 이어서 잠재적으로 잔존하는 Fab-모노머를 검출하기 위해 CD28 Fab-멀티머 (두 번째 좌측 닷 플롯) 또는 α -Ig kappa mAb (우측 닷 플롯) 중 하나로 (재-) 염색하였다. 오로지 생 (PI^{음성}) CD3+ 세포만이 보여진다. 닷 플롯 내 수는 게이트 내 세포의 비율을 나타낸다. 도 7은 CD28+ 세포가 이러한 다양체화된 항-CD28 Fab 단편을 사용하여 PMBC로부터 단리될 수 있고 항 CD28 Fab-모노머를 포함하는 모든 분리 시약이 선별 후 제거될 수 있음을 보여준다.

[0146] **실시예 5: 가용성 Strep-tactin 상에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편을 이용한 CD3+ T 반응기 세포의 자극/증대**

[0147] 이 실시예에서, CD3+ T 반응기 세포 (피콜 구배로부터 수득된 신선한 PBMC의 시료로부터 자성 선별에 의해 단리됨)를 가용성 다양체화 시약으로 작용하는 가용성 올리고머 Strep-tactin® 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내에서 자극 후 증대시켰다. 올리고머 Strep-tactin®을 제조사 (Thermo Scientific)의 프로토콜에 따라서 설포 SMCC (설포석시니미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카복실레이트, 제품 # 22122 Thermo Scientific) 및 이미노티올란 (제품 # 26101 Thermo Scientific)으로 Strep-tactin®을 중합하여 수득하였다. 올리고머 스트렙타비딘을 크기 배제 크로마토그래피에 의해 모노머 (비반응) 및 다이머 스트렙타비딘 뮤테인으로부터 분리하고 그렇게 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 분획 ($n \geq 3$)을 가용성 다양체화 시약으로 사용하였다.

[0148] 시험관 내 증대를 위해, 300.000 CD3+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 2 μ M 카복시플루오르세인 석시니미딜 에스테르 (CFSE)로 표지하고, 그 위에 상기에 기술된 항체 28.3의 α CD3 OKT3 Fab 단편 및 α CD28 Fab 단편 (둘 모두 중쇄에 스트렙타비딘 결합 웹티드로서 상기에 언급된 Twin-Strep-tag®를 보유함)이 고정되어 있는 가용성 Strep-tactin® 올리고머의 제조물의 양을 달리하면서 자극하였다. ("1x"는 0.5 μ g의 α CD3- 및 0.5 μ g의 α CD28 모노머 Fab 단편으로 관능화된 3 μ g 다양체화된 Streptactin에 상응하고, 수 "0.5x", "2x" 및 "5x"는 "1x"의 각각의 n -배 양을 나타냄). Tresp 세포를 비자극 상태로 남겨두거나 음성 대조군으로 제공된 블랭크 Strep-tactin 멀티머 (Fab 부재)로 자극시켰다. Tresp 세포를 20 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에 300.000개의 CD3 음성 자가 영양 세포 (30 Gy로 방사선 조사됨)와 함께 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 배지 교환 없이 37°C에서 인큐베이션하였고 증식을 5일 후 FACS 분석으로 CFSE 희석에 따라서 분석하였다. 도 8A는 음성 대조군에 비해 5일 후 배양액 중의 증식하는 세포의 크기 분포에 있어서의 증가를 나타낸다. 도 8B는 CD3+ Tresp 세포가 적절히 자극되었고 그 위에 α CD3 Fab와 α CD28 Fab 단편의 혼합물이 고정되어 있는 가용성 올리고머 Strep-tactin®과 함께 인큐베이션되었을 때 (도 4에서 고체 Streptactin 자성 입자에 비해) 강력하게 증식하였음을 보여준다. 도 8a 및 8b의 결과는 이들 시험관 내 조건하에서 대부분의 CD3+ T 반응기 세포가 가

용성 Strep-tactin® 올리고머 위에 가역적으로 고정된 α CD3 및 α CD28 Fab 단편을 이용한 표면 CD28 및 TCR/CD3 복합체의 진입 (engagement) 후 분열 (2 내지 5회 세포 분열)하였다. 시험관 내 증대 후 가용성 Fab-Strep-Tactin 자극 시약을 분리하였고 D-비오틴 처리 후 제거하였다. 모노머 Fab 단편의 분리 및 제거는 피코에리쓰린 표지 Strep-Tactin® (ST-PE)으로 세포를 재염색함으로써 유세포측정으로 분석하였다. 대표적인 히스토그램 (짙은 회색 히스토그램)이 적합한 ST-PE 유일 음성 대조군 (밝은 회색 히스토그램)에 대비하여 보여진다. 도 8C로부터 두 Fab 단편 모두가 완전히 분리되고 증대된 세포로부터 전부 제거되었음을 알 수 있다. 도 8D는 5일 후 생 (트립판 블루 음성) 세포의 절대 수를 나타낸다. Neubauer 계수 챔버를 사용하여 수를 세었고 각각의 자극 조건에 대해 플롯팅하였다. 중앙 세포 수를 도 8D에 나타내었고; 오류 막대는 표준 편차 (SD)를 나타낸다. 도 8D는 가용성 Strep-tactin 다양체화 시약 위에 고정되어 있는 α CD3 Fab 단편 및 α CD28 Fab 단편의 혼합물 모두가 CD3+ 세포를 증대하는데 동등하게 효과적이었고 절대 세포수의 대략 4-배 증가를 초래하였음을 보여준다.

[0149] 실시예 6: 배지 교환 없이 가역적 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer 멀티머로 시험관 내 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 증식의 동력학

[0150] 이 실시예에서, 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 (Tresp) 증식의 증대 동역학을 조사하였다. 이 목적을 위해, 2종의 상이한 크기의 가용성 올리고머 Strep-tactin® 뮤테인을 가용성 다양체화 시약으로 제공하였다. 올리고머 Strep-tactin®의 첫 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 분획 ($n \geq 3$)이었다 (또한, 본원에서는, 도 13에서 텁 온 탑을 갖는 삼각형 기호로 표시되는, "통상의 Streptactin® 골격"으로 언급됨). 가용성 다양체화 시약으로 사용된 이 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 두 번째 종류는 비오틴화된 인간 혈청 알부민과 반응된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$)이었다 (또한 본원에서 "거대 Streptactin® 골격"으로 언급됨).

[0151] 이 실시예에서는, 500.000개의 정제된 CD4+ 또는 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 상기에 설명된 바와 같은 이들 2종의 상이한 Streptamer 멀티머로, 즉 실시예 5의 Streptactin 골격 (1 mg 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인/ml의 농도를 갖는 용액을 사용함) 또는 거대 Streptactin 골격 (0.1 mg/ml) 중 하나로 각각 자극시켰다. 3 μ l의 두 상이한 골격을 또한 Fab 단편의 중쇄 C-말단에 스트렙타비딘 결합 펩티드 SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (서열 번호: 7)를 보유하는 앞선 실시예에 사용된 0.5 μ g의 α CD3 및 0.5 μ g의 α CD28 Fab의 조합으로 로딩하였다. 또한, 4.5 μ l의 통상의 Streptactin 골격을 0.5 μ g α CD3 Fab 단편, 0.5 μ g α CD8 Fab 단편 (IBA GmbH Gottingen, Fab 단편의 C-말단에 스트렙타비딘 결합 펩티드 SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK (서열번호: 7)를 또한 보유함) 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편과 함께 로딩하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 상업적으로 입수가능한 Dynabeads (α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 그 위에 비가역적으로 고정된 비드)로 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 (10% (v/v) 송아지 태아 혈청, 0.025% (w/v) L-글루타민, 0.025% (w/v) L-아르기닌, 0.1% (w/v) HEPES, 0.001% (w/v) 젠타마이신, 0.002% (w/v) 스트렙토마이신, 0.002% (w/v) 페니실린이 보충된 RPMI 1640 (Gibco)) 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 배지 교환 없이 37°C에서 인큐베이션하고 1, 3 및 6일 후에 세포 수를 분석하였다. 도 13의 실험에서는, 배지 교환 없이 증대를 수행하였다. CD4+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 13A에 나타내고, CD8+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 13B에 나타내었으며, 그래프는 CD4+ Tresp (도 13A) 및 도 13B에서 CD8+ Tresp에 대한 시점당 수화된 세포의 수에 따른 증식 정도를 나타낸다.

[0152] 도 13A에서 알 수 있는 바와 같이, 그 위에 α CD3 및 α CD28 Fab 단편이 가역적으로 고정화되어 있는 "더 작은" 가용성 다양체화 시약이 Dynabeads (현재까지 T 세포 증대를 위한 표준 시약임)와 동일한 양의 CD4+ T 세포의 증대를 제공한 반면, "더 큰" 올리고머 가용성 streptactin은 Dynabead에 비해 훨씬 더 우수한 증대를 제공하였다. 이러한 개선은 "더 작은" 가용성 올리고머보다 동시에 더 많은 T 세포에 결합할 수 있고, 그로써 "더 작은" 올리고머보다 더 많이 CD4+ T 세포를 자극할 수 있는 가용성 "더 큰 올리고머 다양체화 시약"에 의해 야기되는 것일 수 있다.

[0153] 도 13B에서 자명한 바와 같이, 본 발명의 가용성 다양체화 시약의 사용은 적어도 Dynabeads와 같이 효과적으로 처음 3일 이내에 CD8+ T 세포를 증대시킬 수 있었다. 놀랍게도, 이 기간에, (제1 및 제2 제제로서) α CD3 및 α CD28 Fab 단편에 더하여 그 위에 가역적으로 고정된 α CD8 Fab 단편을 보유하는 가용성 다양체화 시약을 사용한 증대 실험은 이들 배양 조건 하에서 최상의 증대 정도를 나타내었다. 이는 증대의 선택성을 증가 또는 조절하기 위해 세포의 특정 아집단에 특이적인 자극 (여기서는 α CD8 Fab 단편)을 사용할 수 있고, 그로써 목적하는

더 많은 양의 세포 (아)집단을 수득할 수 있음을 나타낸다.

[0154] 따라서, 상기에 요약한 바와 같이, 실시예 6은 T 세포의 증대를 촉발하는 측면에서 본 발명에 사용된 가용성 다량체화 시약의 기능성이 이 목적을 위해 Dynabeads를 사용하는 현재의 표준 방법에 상응함을 보여준다. 그러나, 제1 및 제2 제제와 다량체화 시약 사이의 가역적 결합에 근거한 스트렙타비딘의 경우에 비오틴과 같은 경쟁자를 첨가함으로써 자극이 제어 (원한다면, 종료)될 수 있기 때문에, 본 발명은 증대 조건이 최적화될 수 있으므로 (예를 들어, 도 13B의 실험에서 3일 후 자극을 중단할 수 있을 것임) Dynabeads 기술에 비해 유의미한 이점을 제공한다. 또한, 가용성 다량체화 시약이 반응으로부터 용이하게 제거될 수 있기 때문에 (예를 들어, 증대 반응 후 비오틴화된 칼럼 상에 시약을 고정시킴으로써), 본 발명의 증대 방법은, 예를 들어, Dynabeads와 같은 비드의 제거를 다루지 않으면서, 치료 목적을 위한 세포의 GMP 생산에 필요한 폐쇄 시스템 내에서 수행되고 자동화될 수 있다.

[0155] **실시예 7: 배지를 교환하면서 가역적 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer 멀티머로 시험관 내 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포의 증식 동역학**

[0156] 또한, 이 실시예에서는, 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포 (Tresp)의 증대 동역학을 조사하였다. 이를 위해, 2종의 상이한 크기의 가용성 올리고머 Strep-tactin® 뮤테인을 가용성 다량체화 시약으로 제공하였다. 올리고머 Strep-tactin®의 첫 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 분획 ($n \geq 3$)이었다 (본원에서는 또한, 도 13에서 텁 다운을 갖는 삼각형 기호로 표시되는, "통상의 Streptactin® 골격"으로 언급됨). 가용성 다량체화 시약으로 사용된 이 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인의 두 번째 종류는 실시예 5에서 수득된 올리고머 Strep-tactin ($n \geq 3$)을 비오틴화된 인간 혈청 알부민과 반응시켜 수득하였다. 이 가용성 올리고머 다량체화 시약은 또한 본원에서 "거대 Streptactin® 골격"으로 언급된다.

[0157] 이 실시예에서는, 400.000개의 정제된 CD4+ 또는 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 개별적으로 상기에 설명된 바와 같은 이들 2종의 상이한 Streptamer 멀티머, 즉 실시예 5의 Streptactin 골격 (1.0 mg/ml) 또는 거대 Streptactin 골격 (0.1 mg/ml) 중 하나로 자극시켰다. 3 μ l의 두 상이한 골격 모두를 또한 상기에 기술된 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편과 조합하여 로딩하였다. 또한, 4.5 μ l의 실시예 5의 Streptactin 골격을 상기에 기술된 바와 같은 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편과 함께 로딩하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정됨)로 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 3일째에 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 1, 3 및 6일 후에 세포 수를 분석하였다. CD4+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 14A에 나타내고, CD8+ T 반응기 세포에 대한 결과를 도 14B에 나타내었으며, 그래프는 CD4+ Tresp (도 14A) 및 도 14B에서 CD8+ Tresp에 대한 시점당 수확된 세포의 수에 따른 증식 정도를 나타낸다.

[0158] 도 14A에 나타난 바와 같이, 그 위에 α CD3 및 α CD28 Fab 단편이 가역적으로 고정되어 있는 본 발명의 가용성 다량체화 시약은 Dynabeads보다 더 우수한 CD4+ T 세포의 증대를 제공하였다.

[0159] 도 14B로부터 자명한 바와 같이, 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용하면 CD8+ T 세포가 처음 6일 이내에 적어도 Dynabeads만큼 효율적으로 증대될 수 있었다. 놀랍게도, 이 시점에서, (제1 및 제2 제제로서) α CD3 및 α CD28 Fab 단편을 보유하는 더 큰 가용성 다량체화 시약을 사용한 증대 실험은 이들 배양 조건하에서 최고 수준의 증대를 나타내었다. 이는 다시 "더 작은" 가용성 올리고머보다 동시에 더 많은 T 세포에 결합할 수 있고, 그로써 "더 작은" 올리고머보다 더 많은 CD4+ T 세포를 자극할 수 있는 가용성 "더 큰 올리고머 다량체화 시약"에 의해 야기된 것일 수 있다.

[0160] **실시예 8: 배지 교환 유무에 따른 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증대 동역학**

[0161] 이 실시예에서는, 실시예 6 및 7로부터 조합된 데이터를 "더 작은" 가용성 다량체화 시약 및 양성 및 음성 대조군에 대해 주입된 세포 수에 대해 표준화하였다. "더 큰" 다량체화 시약에 대해서는 표준화 데이터를 수득하지 못하였다. 실시예 6 및 7에 설명된 바와 같이, 400.000 내지 500.000개의 CD4+ 또는 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 그 위에 0.5 μ g α CD3 Fab 단편 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편이 고정되어 있는 3 μ l의 Streptactin 멀티머의 제조물 (1 mg/ml)로 자극하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads로 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양

배지 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 3일째에 배지를 교환하면서 (도 15에서 직선) 또는 배지 교환 없이 (도 15에서 점선) 37°C에서 인큐베이션하고 1, 3 및 6일 후에 세포 수를 분석하였다. 도 15a의 표준화 데이터로부터 자명한 바와 같이, 그 위에 α CD3 및 α CD28 Fab 단편이 가역적으로 고정된 "더 작은" 가용성 다량체화 시약은 CD4+ T 세포의 약 2.5배 증대를 양산한 반면, Dynabeads를 이용한 증대은 약 1.8배 증대 비를 양산하였다. 따라서, 본 발명의 가용성 다량체화 시약의 사용은 심지어 Dynabeads에 비해 CD4+ T 세포의 증대에 개선을 제공하였다. 유사하게, 도 15b는 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용하여 CD8+ T 세포가 처음 3일 이내에 Dynabeads만큼 효율적으로 증대될 수 있음을 확인한다.

[0162] **실시예 9: 가역적 α CD3/ α CD28 Fab-Streptamer 멀티머를 이용해 시험관 내 자극된 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 반응기 세포의 활성화 후 초기 군집 형성**

[0163] 이 실시예에서는, 400.000개의 CD4+ 또는 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 0.5 μ g α CD3- 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 조합하여 로딩된 3 μ l의 올리고머 Streptactin 다량체화 시약 제조물 (1 mg/ml)로 자극하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads로 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 37°C에서 인큐베이션하고 1 및 2일 후에 현미경으로 분석하였다. CD4+ Tresp (도 16A) 및 CD8+ Tresp (도 16B)의 자극이 각각 Dynabeads (중간 줄) 및 Streptamer 멀티머 (아래 줄) 각각에 대해 나타난다. 사진은 군집 형성 정도를 나타낸다: 더 나은 가시성을 위해 예시적인 군집을 도 16A 및 도 16B에서 가용성 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머로의 자극에 대해 원형으로 표시하다. Dynabead 자극 내의 군집은 짙은 자극성 입자의 축적에 의해 용이하게 식별된다. 명백한 바와 같이, CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 모두에 대해 가용성 올리고머 다량체화 시약을 사용하는 본 발명의 증대 방법을 이용하는 경우에 초기 군집이 형성되었다.

[0164] **실시예 10: 다클론 활성화된/증대된 대량 CD3+ 중심 기억 T 세포 (Tcm)의 증대 동역학 및 표현형**

[0165] 이 실시예에서는, 500.000개의 CD3+CD62L+CD45RA-반응기 Tcm 세포 (Tresp)를 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합과 함께 또한 로딩된 실시예 5의 가용성 올리고머 Streptactin의 제조물 3 μ l (1 mg/ml)로 자극시켰다. 나아가, 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 함께 로딩된 Streptactin 멀티머의 제조물 4.5 μ l를 부가적인 자극 조건으로 사용하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 가역적으로 고정됨)로 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2 단독 또는 30 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 매 3일마다 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 7일 및 14일 후 세포 수를 분석하였다. 그래프는 도 17A에서 IL-2만이 보충된 배지 및 도 17B에서 IL-2 및 IL-15가 보충된 배지에서 시점당 수확된 세포의 수에 따른 증식 정도를 나타낸다. 도 17A 및 도 17B 둘 모두로부터 알 수 있는 바와 같이, 그 위에 가역적으로 결합된 CD3 Fab 단편 및 α CD28 Fab 단편을 갖는 가용성 다량체화 시약은 Dynabeads보다 더 우수한 세포 증대를 양산한다. 도 17C의 다양한 사이토킨 환경에서 14 일의 배양 후 CD62L 및 CD127 표면 발현의 유세포 분석에 의해 추가로 나타난 바와 같이, 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용한 실험적 접근법은, 본원에서 선택된 두 조건 모두 하에서, Dynabeads를 이용한 증대보다 더 높은 함량의 CD127-발현 장기간 생존하는 기억 T 세포를 보유한다. 이는 본 발명의 방법의 이점을 추가로 설명한다.

[0166] **실시예 11: 대량 CD3+ 중심 기억 T 세포 (동역학 & 표현형)로부터 Tcm 반응기 세포의 선택적 항원-특이적 증대**

[0167] 이 실시예에서는, 정제된 CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 세포로부터 선택적 항원 특이적 (Ag-특이적) 증대의 동역학 및 표현형을 조사하였다.

[0168] 더욱 상세히, CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 세포를 웨프티드:MHC 분자 복합체 (세포에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제로 작용함) 및 α CD28 Fab 단편 (세포 표면상의 보조 분자를 자극하는 제2 시약으로 작용함) 둘 모두로 시험관 내 자극시켰다. MHC 분자 및 α CD28 Fab 단편을 갖는 항원 특이적 웨프티드의 복합체 둘 모두를 실시예 5에 기술된 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 ($n \geq 3$) 위에 가역적으로 고정시켰다. 항원 특이적 증대에 사용되었던 웨프티드는 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 특이적인 HLA-C7/IE-1 에피토프를 나타내는 즉시-초기 (immediate-early) 1 단백질의 아미노산 309-317 (Ameres et al, PLOS Pathogens, May 2013, vol. 9, issue 5, e1003383에 기술됨)인, 웨프티드 CRVLCCYVL (서열번호: 6)이었다. 이 웨프티드를 제시하는 MHC I 분자는 α 쇄 (중쇄)의 C-말단에 스트렙타비딘 결합 웨프티드 (IBA GmbH (Göttingen, Germany)로부터 "Twin-Strep-tag®"로 상업적으로 입수가능한 SAWSHPQFEK(GGGS)₂GGSAWSHPQFEK, (서열번호: 7))를 보유한다.

[0169]

이를 위해, 500.000개의 CD3+CD62L+CD45RA-반응기 Tcm 세포 (Tresp)를 상기에 기술된 스트렙타비딘 결합 웨티드가 구비된 0.5 μ g의 웨티드:MHC 클래스 I 복합체 및 0.5 μ g의 α CD28 Fab으로 관능화된 가용성 올리고머 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 3 μ l를 사용하여 Ag-특이적으로 자극시켰다. 대안으로서, 4.5 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물을 0.5 μ g의 이들 웨티드:MHC 클래스 I 복합체, 0.5 μ g CD8 α Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 함께 로딩하였다. 비교를 위해, 0.5 μ g α CD3 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합과 함께 로딩된 3 μ l의 Streptactin 다량체화 시약 (1 mg/ml)의 제조물을 사용하여 다클론성 자극을 수행하였다. 다시 상기에 기술된 대안적인 자극 조건으로서, 0.5 μ g α CD3 Fab, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 가역적으로 로딩된 4.5 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물을 사용하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 가역적으로 고정된 비드)로 다클론 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 매 3일마다 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하였고 7일 및 14일 후 세포 수를 분석하였다. 그 위에 HLA-C7/IE-1 에피토프 (CMV용)에 대한 웨티드:MHC-I 복합체가 고정되어 있는 가용성 streptactin 올리고머를 통해 자극되고/증대되었던 Ag-특이적 세포의 분획에 대한 예시적인 유세포 분석 (도 18A)은 이들 항원-특이적 T 세포가 특이적으로 증대되었음을 보여준다. 도 18B 내지 도 18E의 그래프 (도 18A에 나타난 증대 실험과 유사하게 시점당 수확된 웨티드:MHC-I 멀티머-양성 세포의 수에 따른 명백한 Ag-특이성의 증대 정도를 나타냄)는, Ag-특이적 웨티드 및 MHC 1 분자의 각각의 복합체를 사용하는 다량체화 시약이 가장 높은 수의 증대된 세포 (HLA-A2402에 의해 제한된 CMV의 pp65 에피토프 (아미노산 341-350 (QYDPVAAALF, (서열번호: 8)))를 인식하는 Ag-특이적 세포에 대한 세포 수에 있어서의 20배 증가 (도 18B 참조) 내지 CMV의 HLA-B7/IE-1₃₀₉₋₃₁₇ 에피토프 (CRVLCCYVL (서열번호: 6))를 인식하는 Ag-특이적 세포의 수에 있어서 98배 증가 (도 18E 참조) 범위임)를 제공함을 나타내고, 그로써 본 발명의 증대 방법이 Ag-특이적 세포의 증대에 완전히 적용가능함을 보여준다. 마지막으로, 도 18F에 나타난 HLA-B7/헥손5 에피토프 (아데노바이러스용)에 대한 14일의 배양 후 CD62L 및 CD127 표면 발현의 예시적인 유세포 분석은 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용한 실험적 접근법이 다클론성 및 Ag-특이적 자극 조건에서 높은 함량의 CD127-발현 장기간 생존된 기억 T 세포를 보유함을 추가로 확인한다.

[0170]

실시예 12: 대량의 중심 기억 T 세포의 선택적 Ag-특이적 증대 동역학 & 표현형

[0171]

이 실시예는 제1 및 제2 제제로서 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 위에 가역적으로 고정된 a) 항원 특이적 웨티드 MHC I 복합체 및 b) α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 세포의 선택적 Ag-특이적 증대의 동역학을 조사한다.

[0172]

이를 위해, 500.000개의 CD3+CD62L+CD45RA-반응기 Tcm 세포 (Tresp)를 스트렙타비딘 결합 웨티드 (이 특이적 웨티드는 HLA-B07로 제한된 아데노바이러스 헥손 5 단백질의 아미노산 114-124 (CPYSGTAYNSL, 서열번호: 10)을 나타냄)가 구비된 0.5 μ g 웨티드:MHC 클래스 I 복합체 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 3 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물로 Ag-특이적으로 자극시켰다. 대안적으로, 4.5 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물을 0.5 μ g의 이 웨티드:MHC 클래스 I 복합체, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 함께 로딩하였다. 비교를 위해, 0.5 μ g α CD3 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합과 함께 또한 로딩된 3 μ l의 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 (1 mg/ml)을 사용하여 다클론성 자극을 수행하였다. 다시 상기에 기술된 대안적인 자극 조건으로, 0.5 μ g α CD3 Fab, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab과 함께 로딩된 4.5 μ l의 Streptactin 멀티머의 제조물을 사용하였다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads로 다클론 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 매 3일마다 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 7일 및 14일 후에 세포 수를 분석하였다. 도 19에 나타난 사진은 5일째 군집 형성의 정도를 나타내고, 예시적인 Ag-특이적 자극이 아데노바이러스의 HLA-B7/헥손 5 에피토프에 대해 도시된다. 도 19로부터 알 수 있는 바와 같이, 이러한 아데노바이러스 항원 특이적 세포는 최초 CD3+CD62L+CD45RA-Tcm 반응기 집단으로부터 특이적으로 증대될 수 있다.

[0173]

실시예 13: 증대된 CD8+ T 세포의 수율 및 표현형 - 가용성 다량체화 시약의 크기 변화 및 자극용 α CD8-Fab의 첨가

[0174]

이 실시예에서는, 가역적으로 고정된 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인이었던 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD8+ T 반응기 세포의 증대를 조사하였다. 또한, CD8+ T 세포에 대한 증대 특이성을 증가시키기 위해 다량체화 시약에 α CD8-Fab의 첨가 효과를 조사하였다.

[0175]

이를 위해, 300.000개의 정제된 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 2종의 상이한 Streptactin 기반 다량체화 시약, 즉 실시예 5의 작은 올리고머 Streptactin 다량체화 시약 (1 mg/ml) 또는 상기에 기술된 더 큰 Streptactin 올리고머 (0.1 mg/ml) 중 하나로 개별적으로 자극시켰다. 3 μ l의 둘 모두의 상이한 다량체화 시약 (골격)을 또한 상기에 기술된 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편의 조합과 함께 로딩하였다. 또한, 4.5 μ l의 더 작은 Streptactin 다량체화 시약 (골격)을 상기에 기술된 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편과 함께 로딩하였다. 나아가, 단지 0.5 μ g α CD3 Fab 단편 단독 또는 0.5 μ g α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화된 3 μ l의 "더 작은" Streptactin 다량체화 시약 (골격)을 사용하였다. 비자극된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 중복 접종하였다. 세포를 3일 후에 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하였고 6일 후에 분석하였다. 도 20 A는 음성 대조군과 대비되고 양성 대조군에 대해 표준화된 6일째에 수확된 세포의 수에 따른 증식 정도를 나타낸다. 도 20 A는 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 사용하는 CD8+ T 세포의 증대가 dynabeads를 사용한 증대에 비해 더 높은 수율의 CD8+ T 세포를 초래함을 보여준다. 세포 배양 후 CD8 표면 밸현 (도 20B) 및 CD45RO 표면 밸현 (도 20C)의 FACS 분석은 CD8+ T 세포의 동일한 표현형이 본 발명의 다량체화 시약 또는 Dynabeads (다양한 자극 조건이 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 이용하여 비교하였고 유의미한 차이 (n.s.)가 검출되었음) 중 하나에 의해 증대되었음을 보여준다. Dynabeads에 비해 본 발명의 증대 방법을 이용한 CD8+ 세포의 향상된 수율은 가용성 다량체화 시약이 Dynabeads 위에 고정된 항체보다 더 잘 세포 표면상에 이들의 표적 수용체에 접근할 수 있다는 사실에 기인할 것이다. 이 향상된 수율은 초기 시료로부터 세포 집단이 드물게 증대되는 경우 매우 유리해질 것이다.

[0176]

또한, 그 위에 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편 둘 모두가 함께 고정되어 있는 다량체화 제제를 이용해 수득된 증대 수율 (도 20 B에서 좌측으로부터 두 번째 칼럼)과 오로지 α CD3 Fab 단편 단독 또는 α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화되어 있는 2종의 다량체화 시약을 이용한 수율 (도 20B의 좌측으로부터 세 번째 칼럼)을 비교하면, 두 실험 모두 동일한 증대 효율을 가짐을 알 수 있다. 따라서, 이들 실험은 그 위에 제1 제제 및 제2 제제 둘 모두가 함께 고정된 하나의 다량체화 시약의 사용이 증대를 위해 단지 제1 제제 및 제2 제제 각각으로 로딩된 2개의 별개 다량체화 시약을 이용하는 것과 기능적으로 동등함을 보여준다.

[0177]

실시예 14: 증대된 CD8+ T 세포의 수율 & 표현형 - 그 위에 고정된 α CD3- 및 α CD28 Fab 단편의 상이한 비율을 갖는 별개의 가용성 다량체화 시약의 적정

[0178]

이 실시예에서는, 가용성 올리고머 스트렙타비딘 뮤테인 위에 상이한 양으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극시킨 증대된 CD8+ T 반응기 세포 (Tresp)의 수율 및 표현형을 조사하였다.

[0179]

이를 위해, 300.000개의 CD8+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 α CD3 Fab 단독 및 α CD28 Fab 단독으로 관능화된 "작은" 올리고머 Streptactin 다량체화 시약 (1 mg/ml)의 제조물의 혼합물의 다양한 양 ("1x"는 0.5 μ g α CD3 단독으로 관능화된 1.5 μ g Streptactin 다량체화 시약 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화된 1.5 μ g 다량체화 Streptactin에 상응함), 또는 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 로딩된 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 3 μ l, 또는 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g strep-태그된 α CD8 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 로딩된 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 4.5 μ l로 자극시켰다. 비처리된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종하였다. 세포를 배지 교환 없이 37°C에서 인큐베이션하였고 5일 후에 분석하였다. 도 21A는 음성 대조군에 대비되고 양성 대조군에 표준화된 5일째 수확된 세포 수에 따른 증식 정도를 나타낸다. 도 21A는 본 발명의 다양한 가용성 다량체화 시약을 사용한 CD8+ T 세포의 증대가 dynabeads를 사용한 증대에 비해 더 높은 수율의 CD8+ T 세포를 초래함을 보여준다 (구체적으로, 5x 조건의 누적 총 시약 양은 특히 시간의 경과에 따른 세포의 최적 증대/세포 분열의 개시에 의한 총 세포에 있어서의 증가를 초래함). 세포 배양 후 CD8 표면 밸현 (도 21B) 및 CD45RO 표면 밸현 (도 21C)의 FACS 분석은 동일한 표현형의 CD8+ T 세포가 본 발명의 다양한 다량체화 시약 또는 상업적으로 이용가능한 Dynabeads 중 하나에 의해 증대되었음을 보여준다.

[0180]

실시예 15: α CD19-CAR 형질도입된 Jurkat 세포의 Streptamer 멀티머 자극 후 세포내 신호전달 캐스케이드의 활성화

[0181]

이 실시예에서는, 종양-특이적 키메라 항원 수용체 (CAR), 즉 본원에서는 CD19를 발현하도록 변형되고 가용성 다량체화 시약으로서 실시예 5의 올리고머 Strep-tactin®을 사용해 자극된 형질도입된 Jurkat 세포내 신호전달 캐스케이드의 활성화를 조사하였다.

[0182]

이를 위해, 300.000개의 Jurkat 반응기 세포 (Jresp)를 (A) 본원에 기술된 α CD3 Fab 및 α CD28 Fab 단편으로 관능화된 Streptactin 다량체화 시약 (1 mg/ml)의 다양한 양의 제조물 ("x1"은 0.5 μ g α CD3- 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 3 μ g Streptactin 다량체화 시약에 상응함 - 이는 "다클론 Streptactin 기반 다량체화 시약"을 제공함), 또는 (B) 0.5 μ g (x1) 또는 1 μ g (x2)의 CD19의 세포외 도메인 (ECD)으로 관능화된 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 3 μ l (α CD19-CAR에 대한 자연적 리간드 - 이는 "CAR-특이적 Streptactin 기반 다량체화 시약"을 제공함), 또는 α CD19-CAR 내부의 IgG4 스페이서를 인식하는 0.5 μ g (x1) 또는 1 μ g (x2) α IgG와 함께 로우?된 Streptactin 다량체화 시약의 제조물 3 μ l (이는 또한 "CAR-특이적 스트렙타비딘 뮤테인 기반 다량체화 시약을 제공함)로 자극시켰다. 혼합하고 실온에서 15분간 인큐베이션함으로써 스트렙타비딘 기반 다량체화 시약에의 결합을 위해 관능화시켰다. His-STREPPER (IBA GmbH, Germany, Order number 2-0920-005)와 혼합하고 실온에서 15분간 인큐베이션함으로써 스트렙타비딘 및 스트렙타비딘 결합 펩티드에 결합하는 키클레이트화 부분을 함유하고, 그로써 일시적으로 표적 분자, 여기서 CD19의 ECD에 스트렙타비딘 뮤테인 기반 다량체화 시약에 가역적으로 결합할 수 있는 스트렙타비딘 결합 펩티드를 제공할 수 있다. Dynabeads (그 위에 α CD3- 및 α CD28- 단클론 항체가 비가역적으로 고정되어 있는 비드) 또는 PMA 및 이노마이신으로 자극된 Jresp를 양성 대조군으로 제공하였다. Jresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 200 μ l 세포 배양 배지 중의 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 접종하였다. 세포를 37°C에서 인큐베이션하고 얼음에 넣은 후 자극 0분 내지 20분 후에 용해시켰다. 인산화된 ERK의 검출은 활성 MAPK 신호전달을 나타내고, 하우스키퍼 (housekeeper) β -액틴의 염색은 조건 및 시점당 총 단백질의 동량의 로딩을 나타낸다. "다클론성 Streptactin 다량체화 시약"을 통한 Jurkat 세포의 활성화를 보여주는 도 22A 및 2종의 "CAR-특이적 Streptactin 기반 다량체화 시약"을 통한 Jurkat 세포의 활성화를 보여주는 도 22B의 비교로부터 알 수 있는 바와 같이, Jurkat 세포는 CD19 특이적 키메라 항원 수용체에의 CD19 세포외 도메인의 결합을 통해 활성화/증대될 수 있다. T 세포의 유전적 하류 프로세싱이 사전-선택된 세포 집단에 대해 거의 독점적으로 수행되기 때문에, IgG4 스페이서 도메인을 통한 도입된 CAR의 교차-결합을 통한 일반적 활성화 (이는 상이한 특이성으로 다양한 CAR 내에서 보존적임)는 이들의 시험관 내 세포-프로세싱 상황에서 가역적 세포 자극/증대에 대한 적용가능성을 확장한다.

[0183]

따라서, 이 실험은 원칙적으로 세포 집단에 일차 활성화 신호를 제공하는 시약 (리간드)의 결합에 의해 활성화되는 임의의 세포 집단이 본원에 기술된 바와 같은 다량체화 시약에 가역적으로 고정된 제1 제제를 사용하여 증대될 수 있음을 보여준다.

[0184]

실시예 16: 자극용 α CD8-Fab의 첨가를 이용한 증대된 CD3+ T 세포의 수율 및 아집단 조성물

[0185]

실험은 가용성 다량체화 시약으로 제공된 실시예 5의 가용성 올리고머 Strep-tactin® 위에 가역적으로 고정된 α CD3/ α CD28 Fab 단편으로 시험관 내 자극된 정제된 CD3⁺ T 반응기 세포의 증대를 보여준다. 일 실험에서, α CD3/ α CD28 Fab 단편에 추가로, IBA GmbH (Gottingen, Germany, 카탈로그 번호 6-8000-203)로부터 상업적으로 이용가능한 α CD8 Fab 단편을 또한, 가역적 aCD3/aCD28 Fab-Streptamer 멀티머를 이용해 특이적 T 세포 아집단을 선호적으로 시험관 내에서 자극시키는 것이 가능한지 여부를 검사하기 위해 스트렙타비딘 뮤테인의 가용성 올리고머 위에 고정시켰다. 더욱 상세히, 500.000개의 정제된 CD3⁺ 반응기 T 세포 (Tresp)를 0.5 μ g의 α CD3 및 0.5 μ g의 α CD28 Fab의 조합으로 로딩된 올리고머 스트렙타비딘 (1mg/ml)의 제조물 3 μ l로 자극시켰다. 대안적 접근법으로서, 4.5 μ l의 Streptactin 올리고머를 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g strep-태그된 α CD8 Fab 및 0.5 μ g strep-태그된 α CD28 Fab와 함께 로딩하였다. 비자극된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하였고 Dynabeads (그 위에 α CD3 및 α CD28 단클론 항체가 비가역적으로 고정된 비드)로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공하였다. 도 23A로부터 알 수 있는 바와 같이, α CD3 Fab 단편, α CD28 Fab 단편 및 또한 α CD8 Fab 단편과 함께 가역적으로 로딩된 다량체화 시약은 가장 많은 수의 증대된 CD3+ T 세포를 제공하였다. $1 \times 1 \times 10^6$ 의 증대된 세포 수로, 수율은 상업적으로 이용가능한 Dynabeads를 이용한 이들 T 세포의 증대보다 30% 더 높았다. 또한, 더 중요하게, α CD3 Fab 단편, α CD28 Fab 단편 및 α CD8 Fab 단편을 보유하는 이 다량체화 시약을 이용한 도 23B에 나타난 바와 같이, Dynabeads 또는 본원에 기술된 바와 같이 제1 및 제2 제제로서 단지 α CD3 Fab 단편 및 α CD28 Fab 단편을 보유하는 본 발명의 가용성 다량체화 시약을 이용한 증대 모두에 비해서, CD8+ T 세포의 양이 가장 높았다. 따라서, 또한 이 실험은, 목적하는 세포 집단에 일차 활성화 신호를 제공하는 제1 제제 및 선택적으로 공-자극 신호를 자극하는 제2 제제에 덧붙여, 목적하는 세포 집단의 활성화에 특이적인 추가 제제가 다량체화 시약 위에 고정될 수 있다는 본 발명의 이점을 보여준다. 따라서, 그렇게 함으로써, 본 발

명은, 예를 들어, 다양한 상이한 아집단을 포함하는 시료로부터 임의의 목적하는 세포 (아)집단을 선호적으로 증대시키거나 선택적으로 농축할 수 있는 가능성을 제공한다.

[0186] **실시예 17: 단일 풀로부터 Tcm 반응기 세포의 병렬 항원-특이적 증대**

이 실시예에서는, 다수의 가역적 웨티드:MHC/ α CH28 Fab-Streptamer 멀티머를 이용해 시험관 내에서 자극된 T 반응기 세포의 단일 풀로부터 병렬 항원 특이적 (Ag-특이적) 증대의 동역학을 조사한다.

500.000개의 CD3+CD62L+CD45RA-반응기 Tcm 세포 (Tresp)를 각각의 특이성에 대해, 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유하는 0.5 μ g의 각각의 웨티드:MHC 클래스 I 복합체로 관능화된 3 μ l의 Streptactin 멀티머, 및 또한 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유하는 0.5 μ g α CD28 Fab을 사용하여 다수의 Ag-특이성에 대해 동시에 자극시켰다. 대안적인 접근법으로서, 본원에 기술된 바와 같이 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유하는 0.5 μ g 웨티드:MHC 클래스 I 복합체, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 관능화된 4.5 μ l의 Streptactin 기반 다양체화 시약을 각 특이성에 대해 사용한다. 비교를 위해, 0.5 μ g α CD3 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합으로 또한 가역적으로 로딩된 Streptactin 기반 다양체화 시약 (1 mg/ml)의 제조물 3 μ l를 사용하여 다클론성 자극을 수행한다. 다시 상기에 기술된 대안적인 자극 조건으로서, 0.5 μ g α CD3 Fab, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab (이들 각각은 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유함)으로 가역적으로 로딩된 Streptactin 기반 다양체화 시약의 제조물 4.5 μ l를 사용할 수 있다. 비처리된 (비자극된) Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads (α CD3- 및 α CD28-mAb 코팅된 비드)로 다클론 자극된 Tresp 세포를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 보충된 1 ml 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종한다. 세포를 매 3일마다 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 7일 및 14일 후에 세포 수를 분석하였다.

[0189] **실시예 18: α CD3/ α CD8/ α CD28 Fab 단편으로 가역적으로 관능화된 스트렙타비딘 기반 다양체화 시약으로 시험관 내 자극된 CD3+ T 반응기 세포 중에서 CD8+ T 세포의 선호적 증식**

300.000개의 CD3+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 Streptactin 다양체화 (1 mg/ml)의 제조물 3 μ l 또는 0.5 μ g α CD3 및 0.5 μ g α CD28 Fab의 조합으로 로딩된 거대 Streptactin 골격 (0.1 mg/ml)을 사용하는 다양체화 시약의 제조물 3 μ l, 또는 0.5 μ g α CD3, 0.5 μ g α CD8 Fab 및 0.5 μ g α CD28 Fab으로 로딩된 Streptactin 기반 다양체화 시약의 제조물 4.5 μ l, 또는 0.5 μ g α CD3 Fab 단독 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단독을 갖는 Streptactin 기반 다양체화 시약의 제조물의 혼합물 3 μ l (각각의 Fab 단편은 다시 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유함)으로 자극시킨다. 비처리된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads (α CD3- 및 α CD28-mAb 코팅된 비드)으로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공하였다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml의 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종한다. 세포를 3일 후 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 6일 후 분석하였다.

[0191] **실시예 19: α CD3 및 α CD28 Fab 단편으로 가역적으로 관능화된 스트렙타비딘 기반 다양체화 시약으로 시험관 내 자극된 CD3+ T 반응기 세포 중에서 CD8+ T 세포의 선호적 증식**

300.000개의 CD3+ 반응기 T 세포 (Tresp)를 α CD3 Fab 단편 단독 및 α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화된 Streptactin 기반 다양체화 시약 (1 mg/ml)의 제조물의 혼합물 (0.5 μ g α CD3 Fab 단편 단독으로 관능화된 1.5 μ g Streptactin 기반 다양체화 시약 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편 단독으로 관능화된 1.5 μ g Streptactin 기반 다양체화 시약)의 다양한 양으로, 또는 α CD8 Fab 단편의 존재 또는 부재하에서 α CD3 Fab 단편 및 α CD28 Fab 단편으로 관능화된 Streptactin 기반 다양체화 시약의 제조물의 혼합물 (각각의 Fab 단편은 또한 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유함) (0.5 μ g α CD3- 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편으로 관능화된 3 μ g Streptactin 기반 다양체화 시약 - α CD8 Fab 단편 부재, 또는 0.5 μ g α CD3 Fab 단편, 0.5 μ g α CD8 Fab 단편 및 0.5 μ g α CD28 Fab 단편과 함께 로딩된 4.5 μ l의 Streptactin 다양체화 시약의 제조물로, Fab 단편은 또한 스트렙타비딘 결합 웨티드를 보유함)의 다양한 양으로 자극시킨다. 비처리된 Tresp 세포를 음성 대조군으로 제공하고 Dynabeads (α CD3- 및 α CD28-mAb 코팅된 비드)로 자극된 Tresp를 양성 대조군으로 제공한다. Tresp 세포를 30 U/ml IL-2가 보충된 1 ml의 세포 배양 배지 중에서 48-웰 플레이트에 접종한다. 세포를 3일 후 배지를 교환하면서 37°C에서 인큐베이션하고 6일 후 분석하였다.

[0193] 본 명세서 내의 이미 공개된 문헌의 인용 또는 논의가 반드시 이 문헌이 당해 분야의 상태의 일부이거나 통상의 주지 기술임을 인정하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0194] 본원에 예시적으로 기술된 본 발명은 본원에 구체적으로 기술되지 않은, 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에서 적절히 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 용어 "포함하는 (comprising)", "포함하는

(including)", "함유하는 (containing)" 등은 제한 없이 광범위하게 해석되어야 한다. 부가적으로, 본원에 사용된 용어 및 표현은 제한이 아닌 서술의 측면에서 사용되었으며, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어 보여지고 기술된 특징의 임의의 등가물, 또는 이의 일부를 배제하는 것을 의도하지 않지만, 다양한 변형이 청구된 발명의 범주 내에서 가능함이 인식된다. 따라서, 본 발명이 예시적인 실시양태에 의해 구체적으로 기술되었다고 하더라도 본원에 기술된 그 안에 구현된 본 발명의 선택적 특징, 변형 및 변화가 통상의 기술자에 의해 의존될 수 있고, 이러한 변형 및 변화는 이 발명의 범주 내인 것으로 고려된다.

[0195]

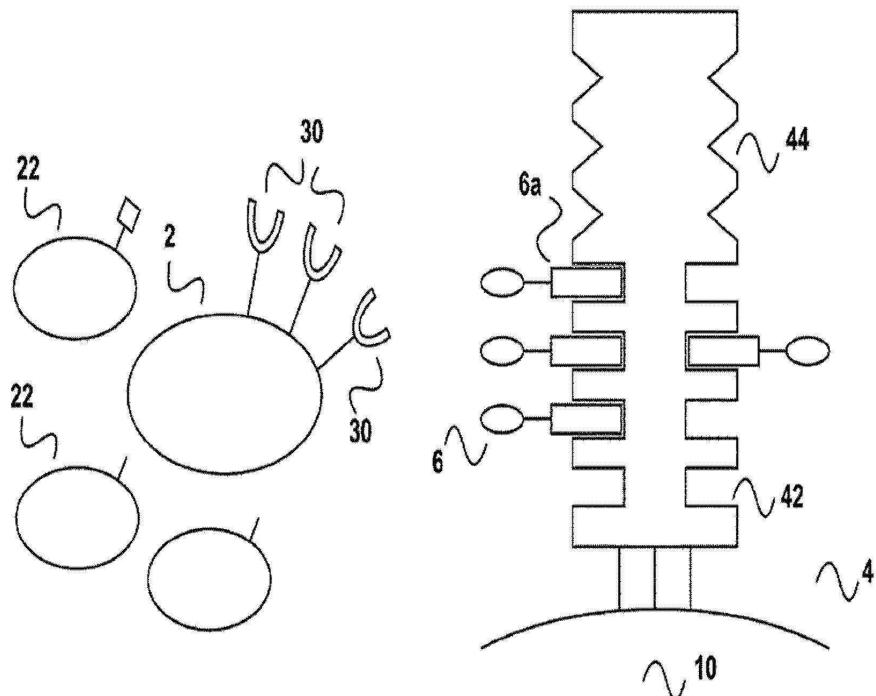
본 발명은 본원에 광범위하고 일반적으로 기술되어 있다. 일반적 서술에 속하는 각각의 더 좁은 종 및 아속 (subgeneric) 집단화가 또한 발명의 일부를 형성한다. 이는 삭제된 재료가 본원에 구체적으로 언급되는지 여부와 무관하게, 속으로부터 임의의 대상을 제거하는 조건 또는 부정적 제한 없이 본 발명의 일반적 서술을 포함한다.

[0196]

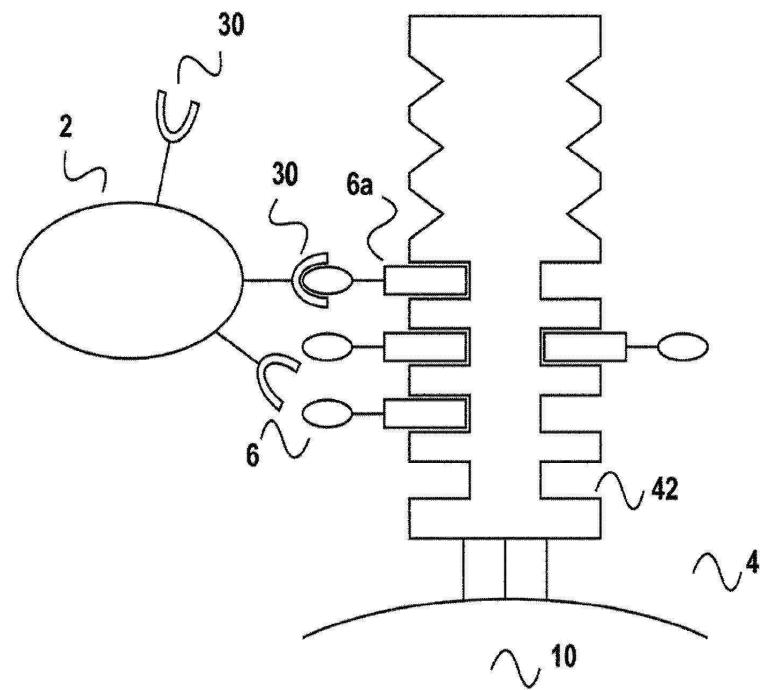
다른 실시양태가 하기 청구범위 내이다. 또한, 본 발명의 특징 또는 측면이 마쿠시 그룹의 측면으로 기술되는 경우에, 통상의 기술자는 본 발명이 그로써 마쿠스 그룹의 임의의 개별적 멤버 또는 멤버들의 아그룹의 측면에서 기술되는 것임을 또한 인식할 것이다.

도면

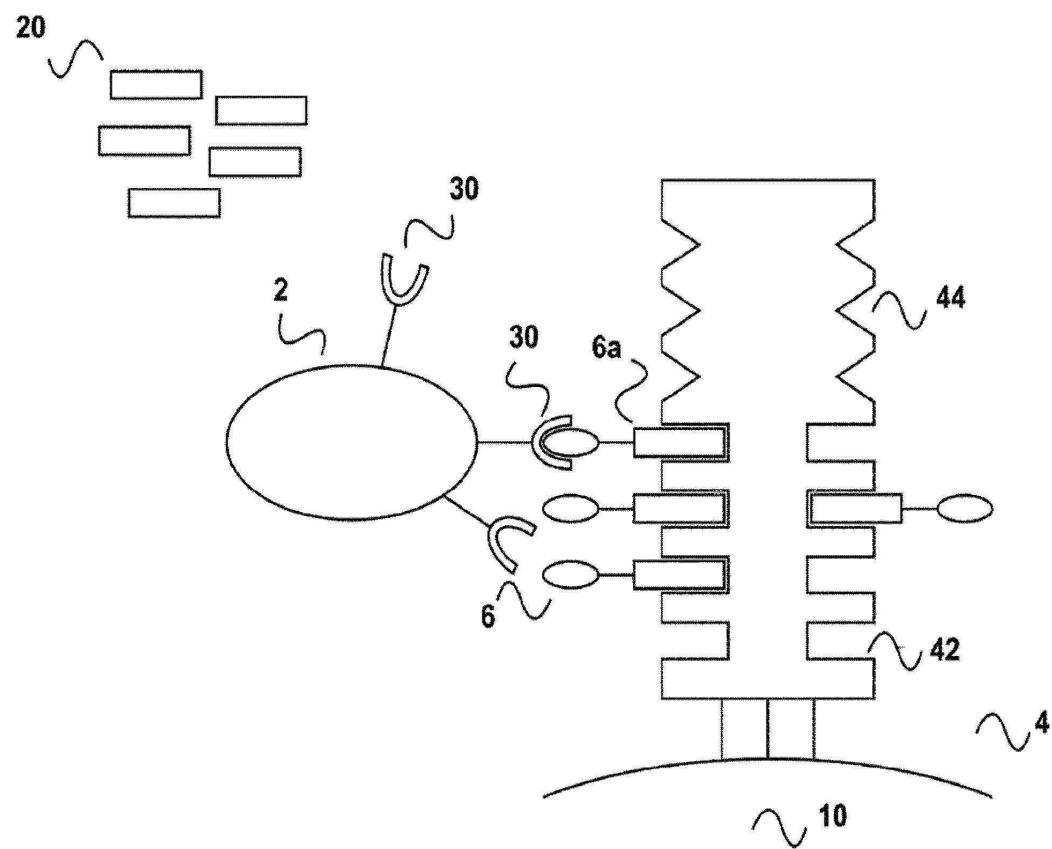
도면 1a



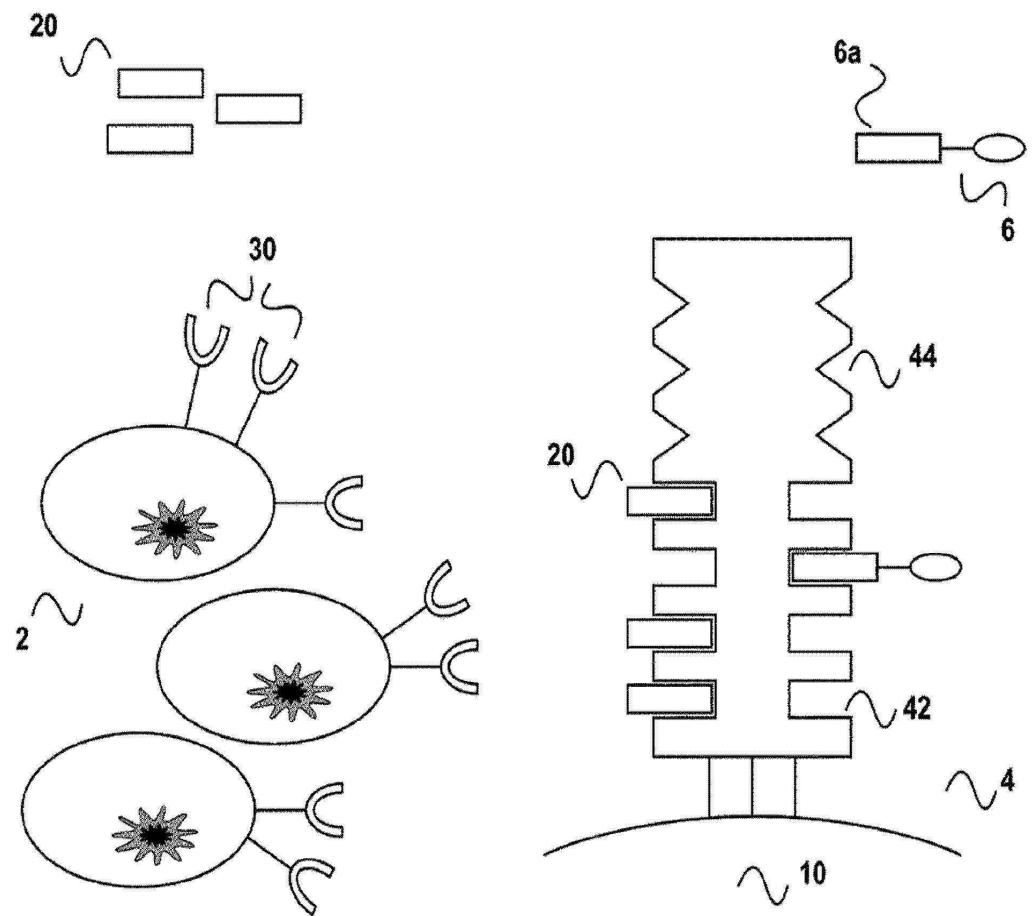
도면 1b



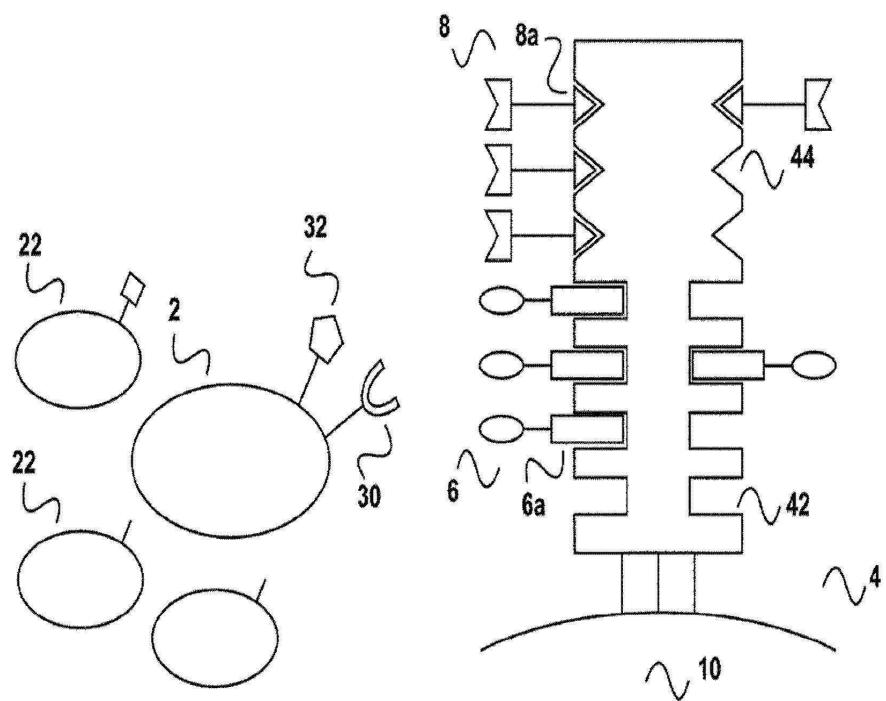
도면 1c



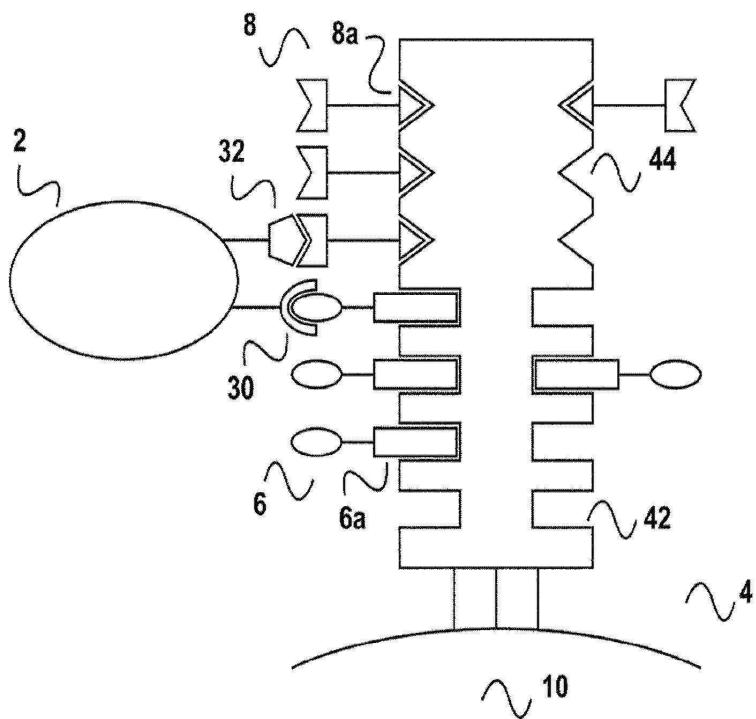
도면 1d



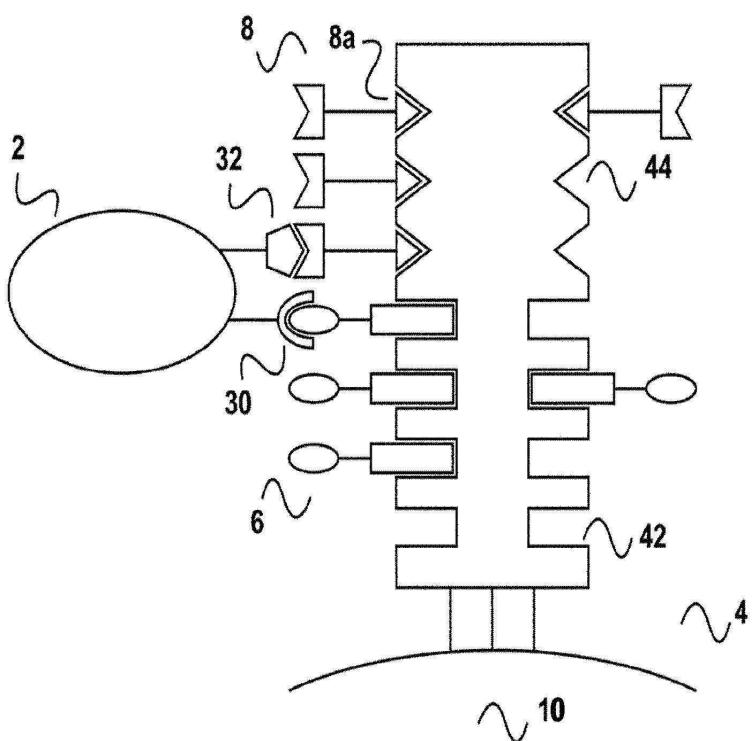
도면 2a



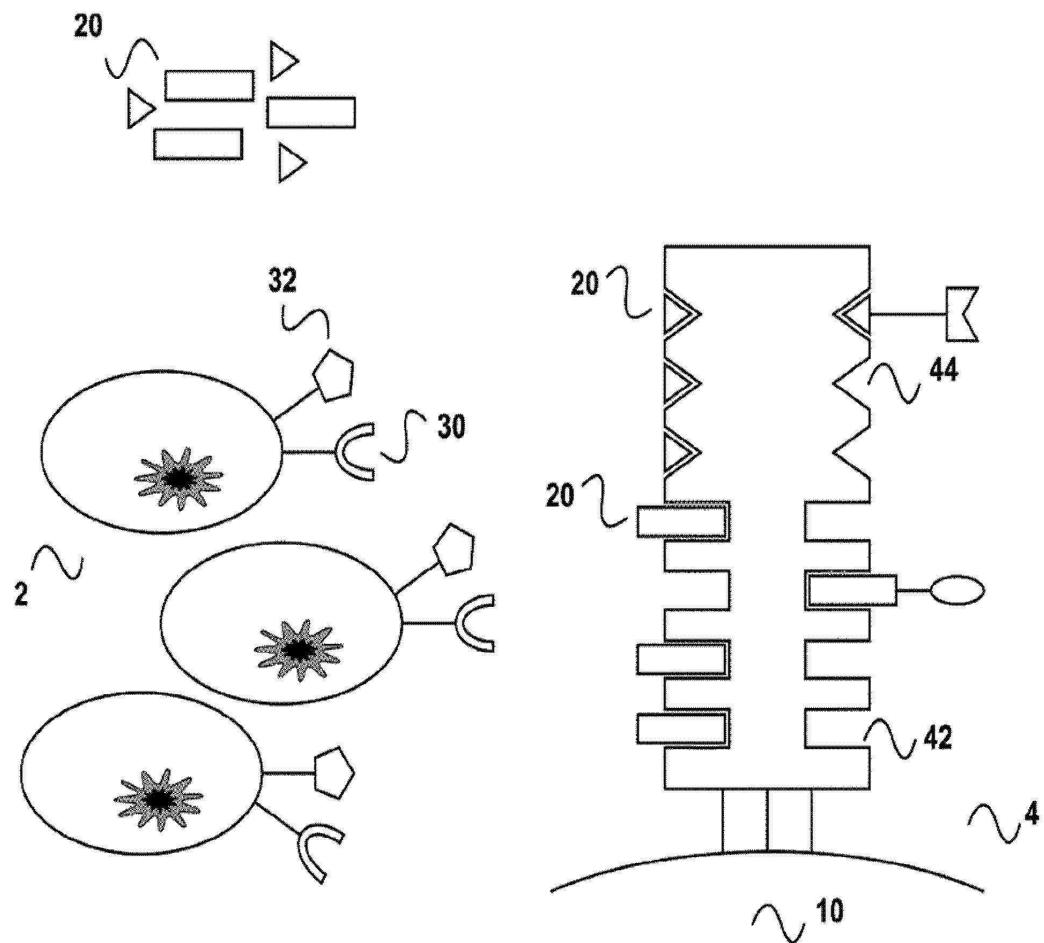
도면2b



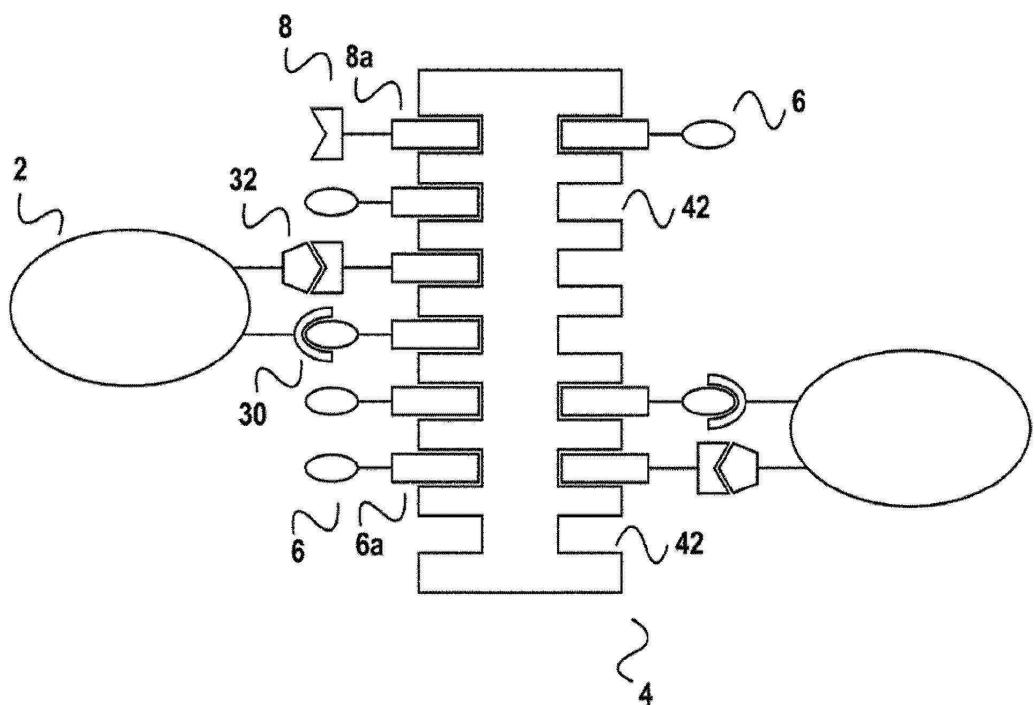
도면2c



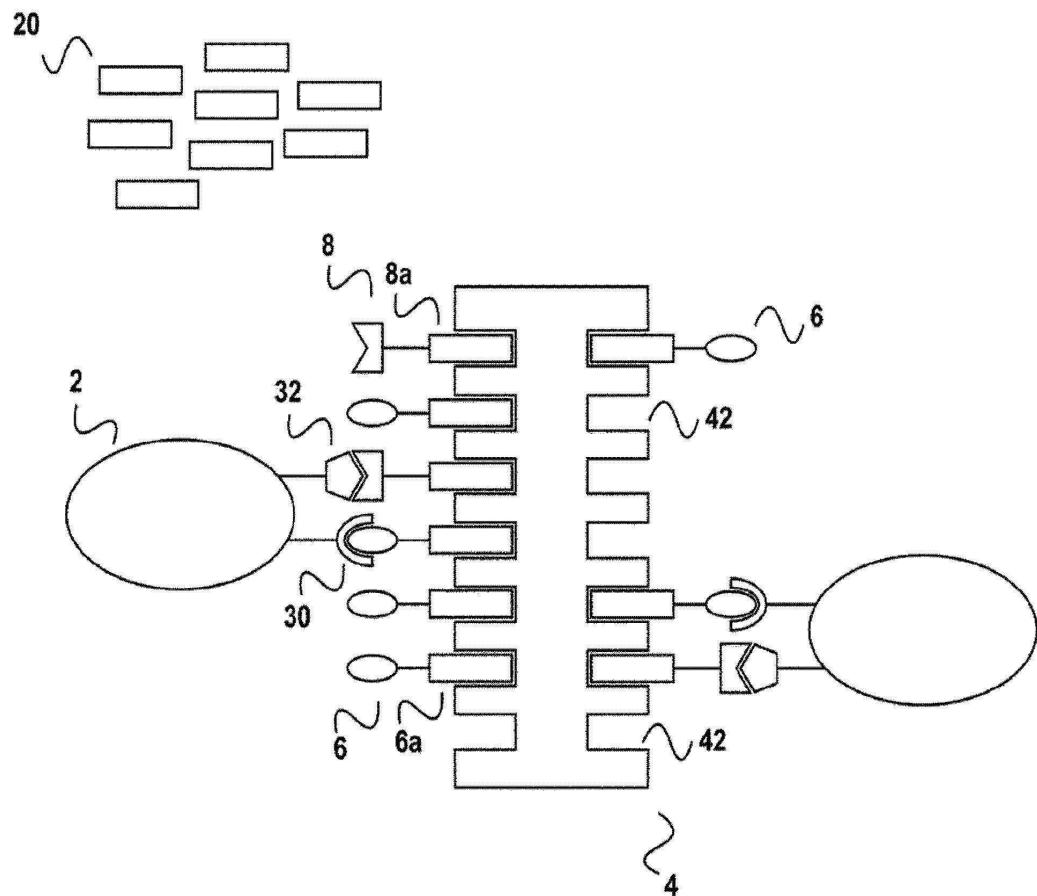
도면2d



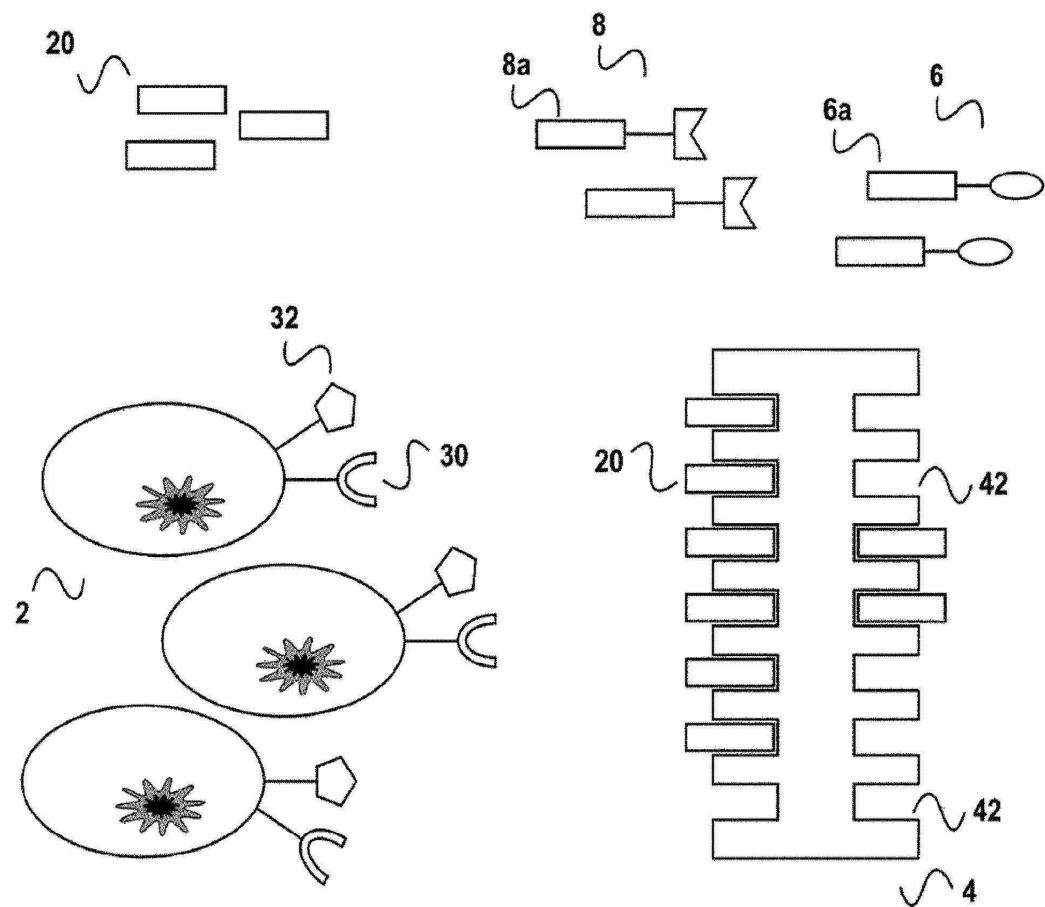
도면3a



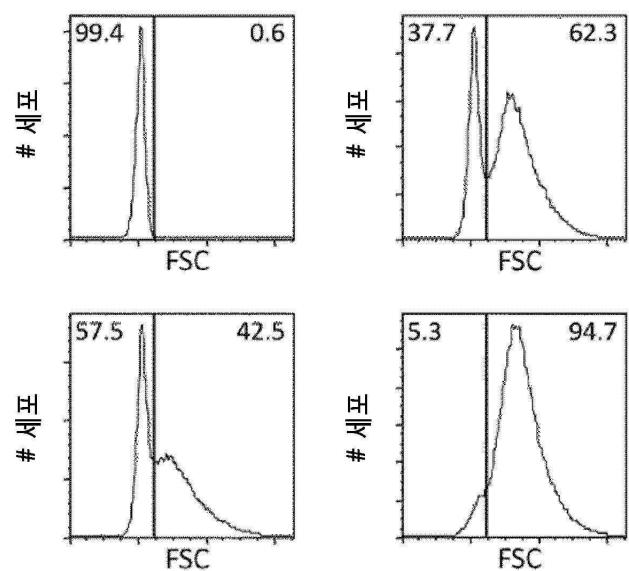
도면3b



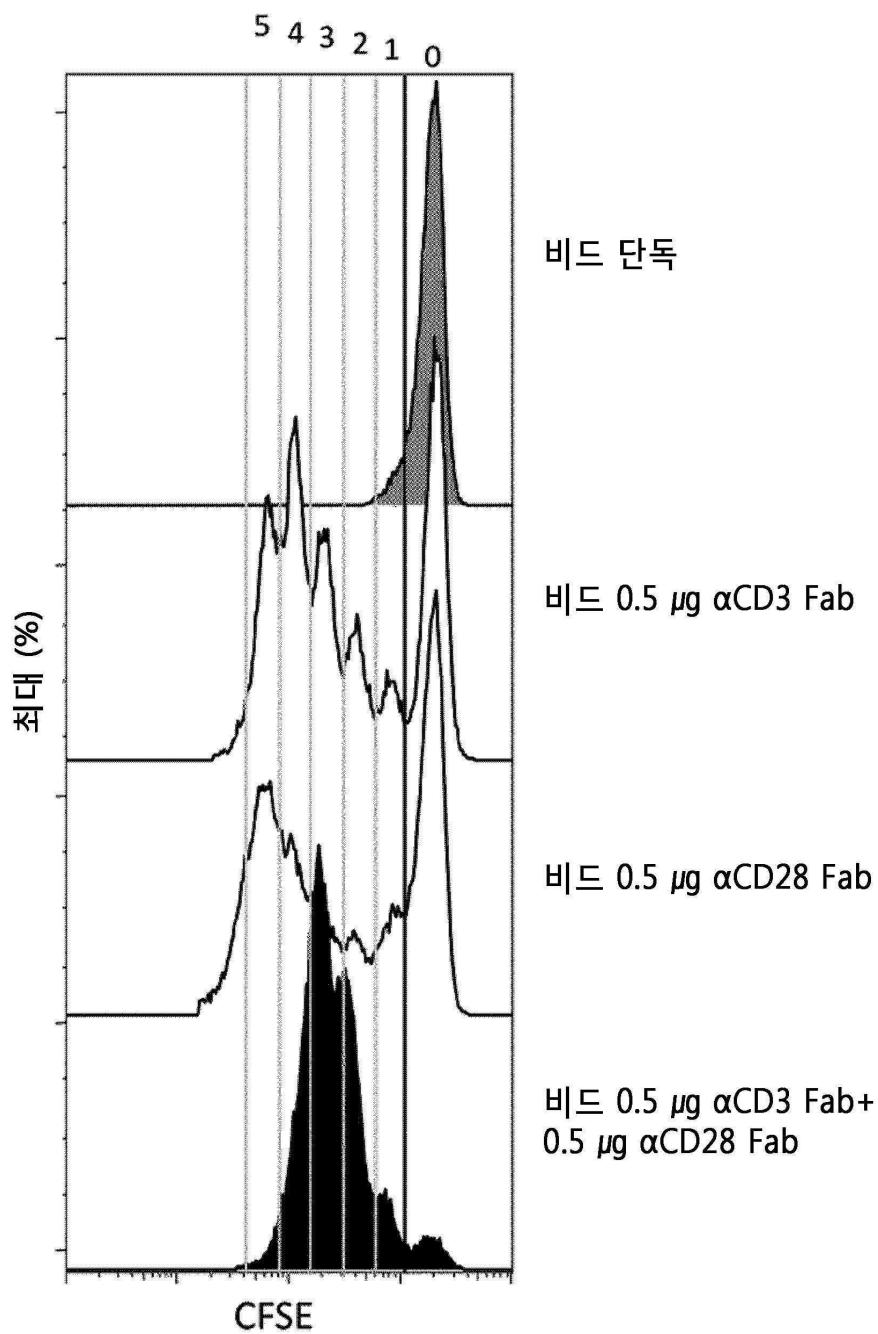
도면3c



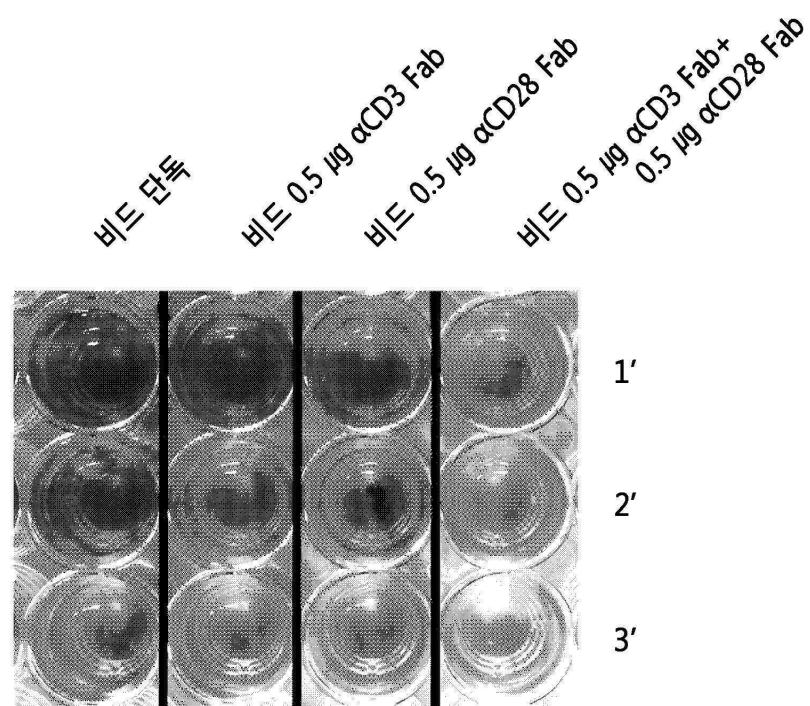
도면4a



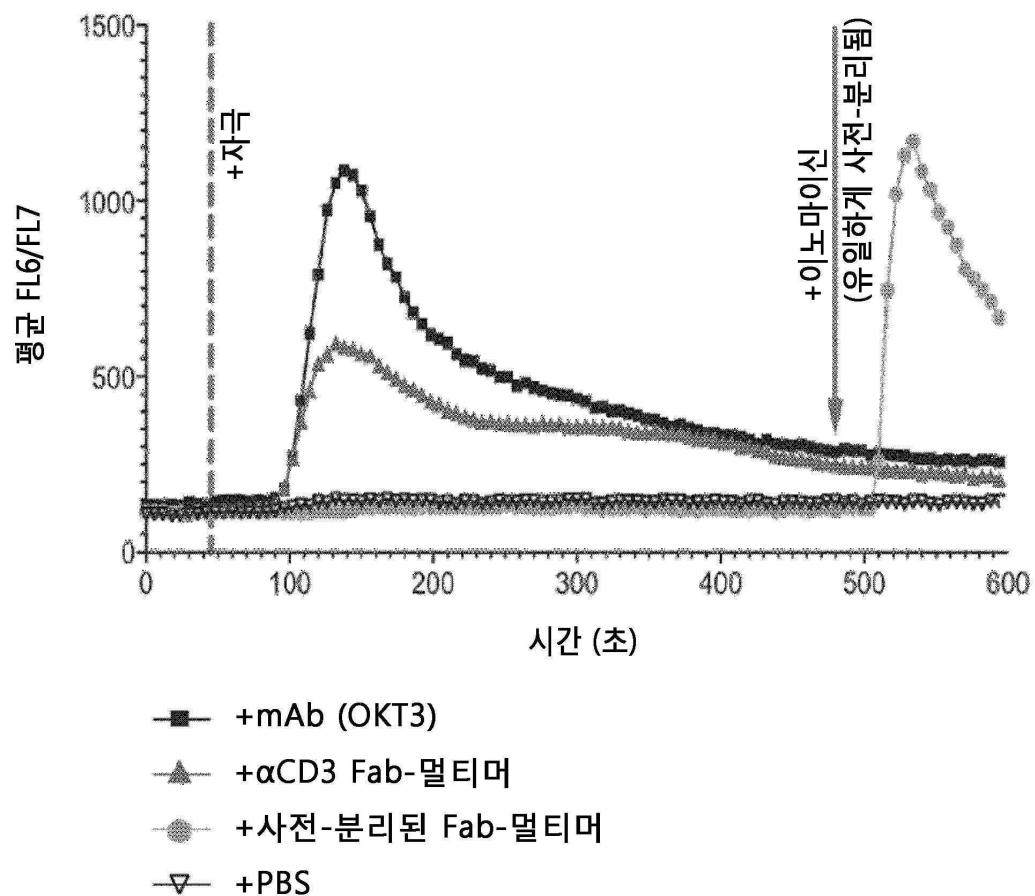
도면4b



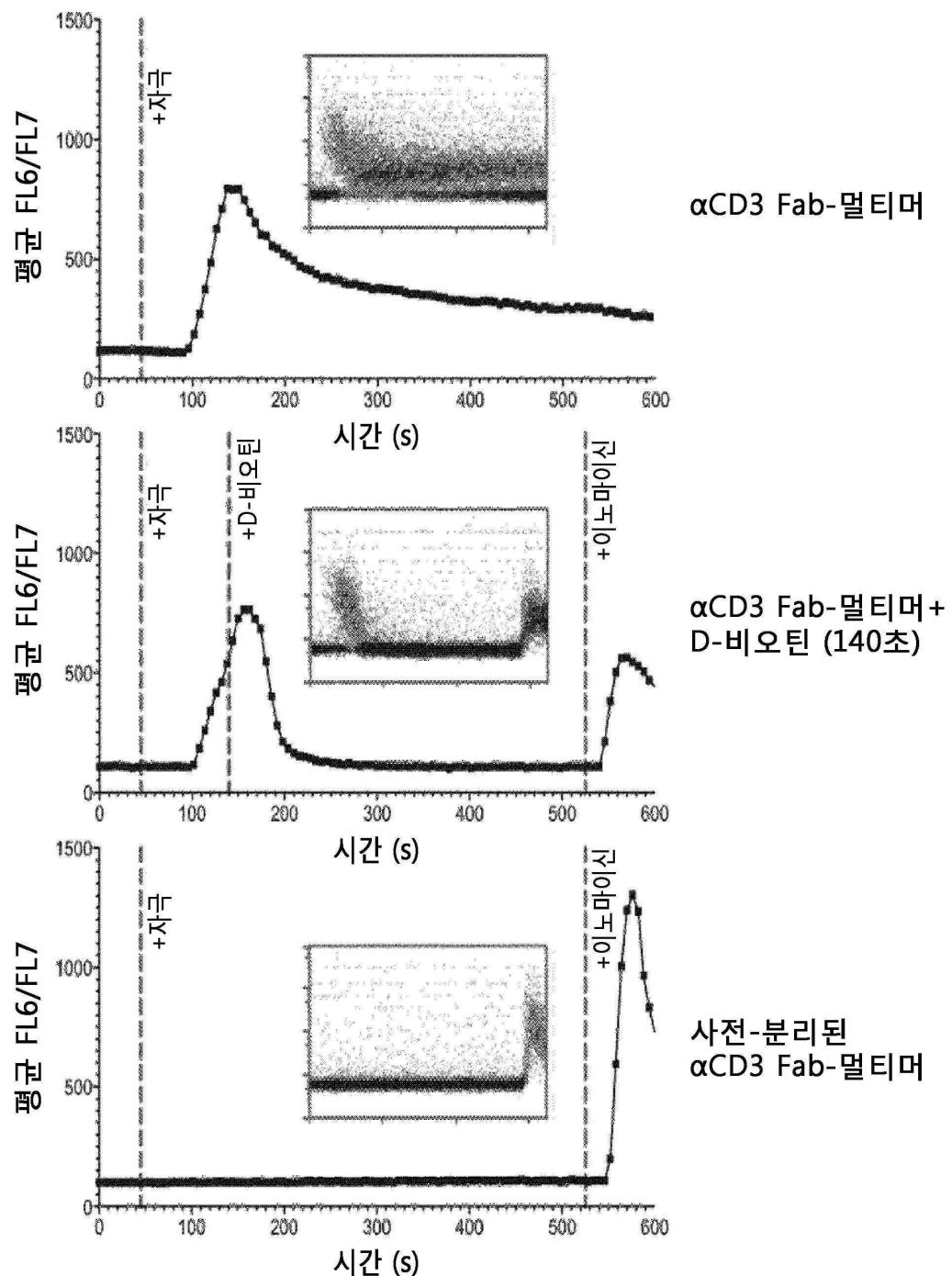
도면4c



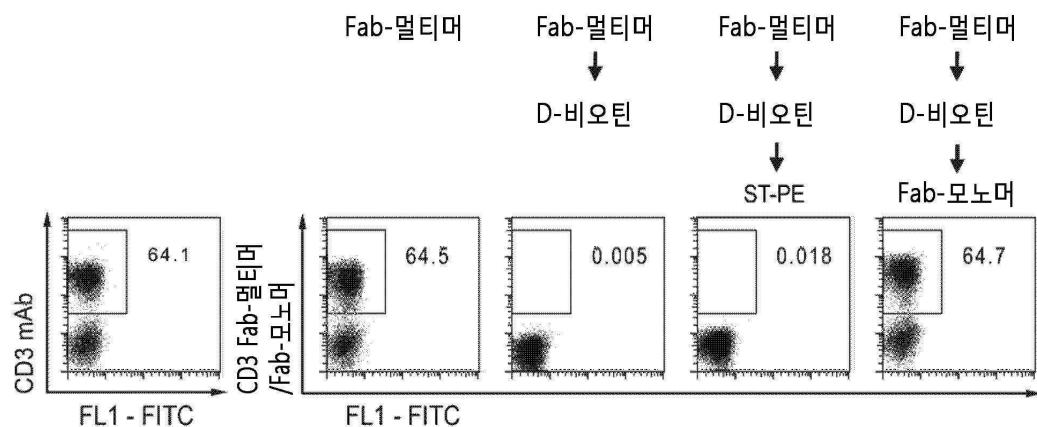
도면5a



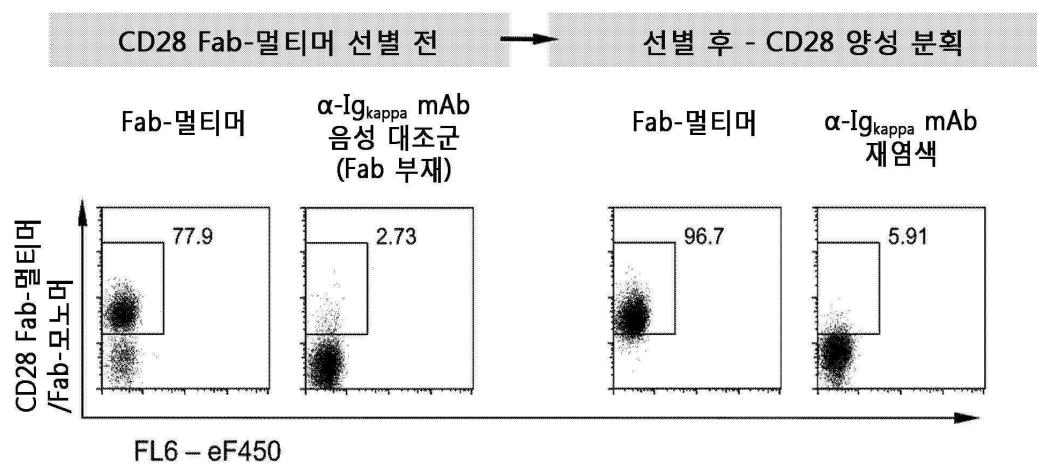
도면5b



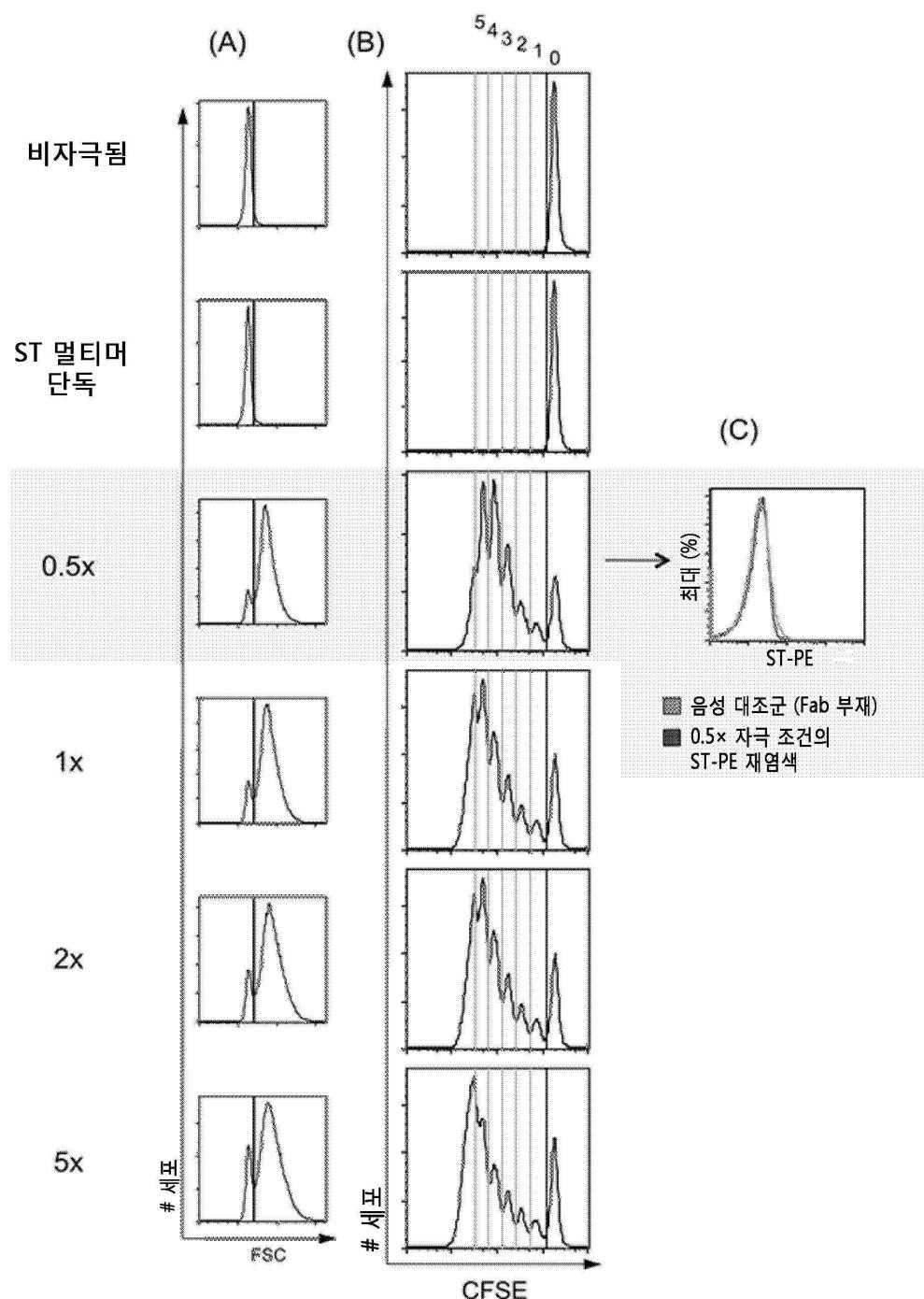
도면6



도면7

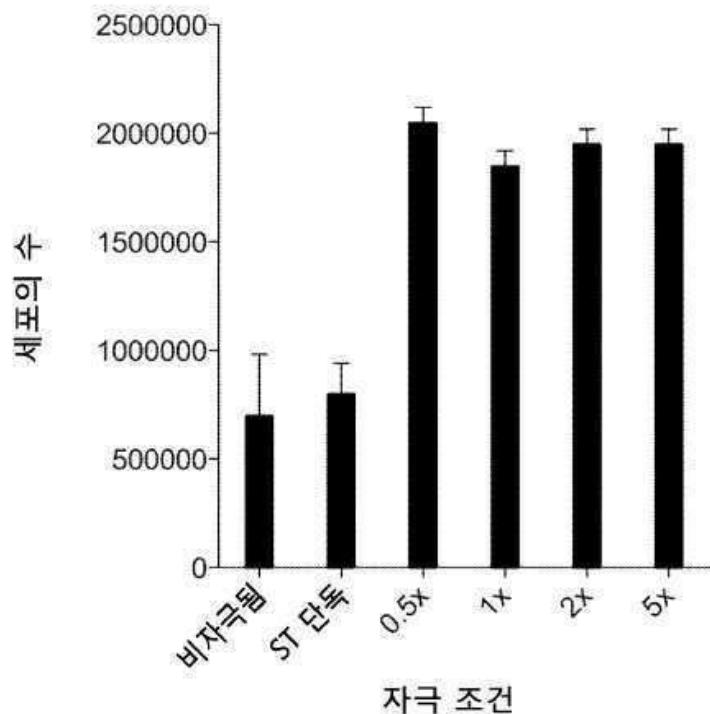


도면8a



도면8b

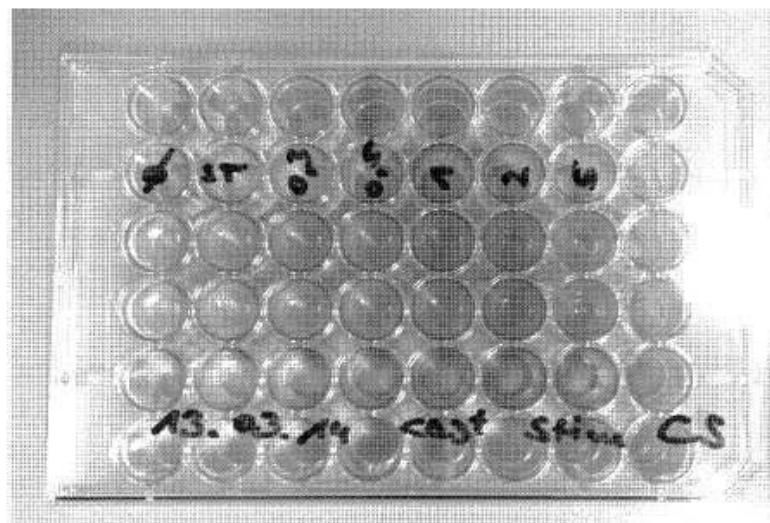
(D)



도 8(계속)

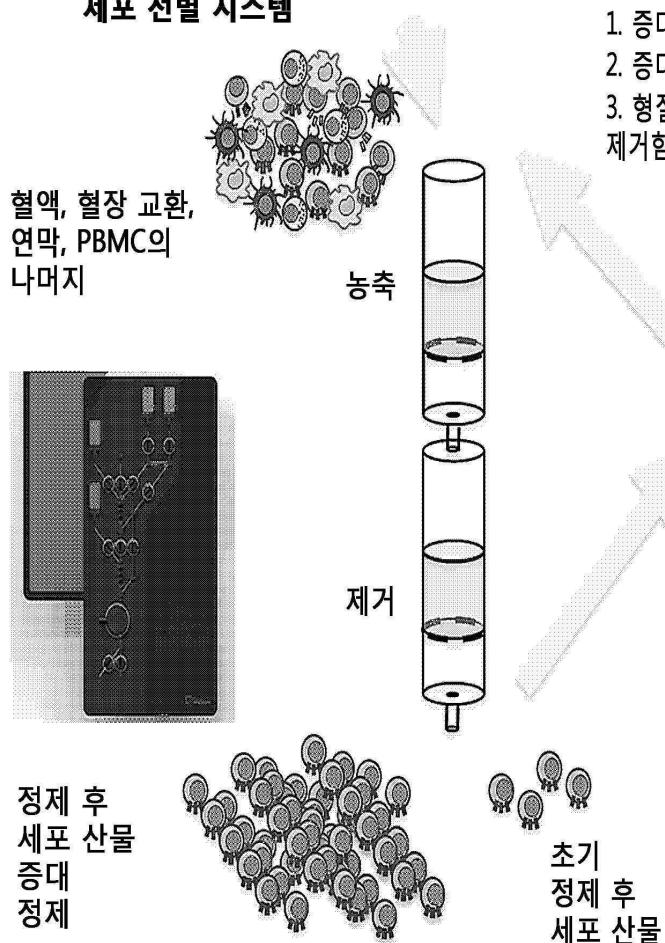
도면8c

(E)



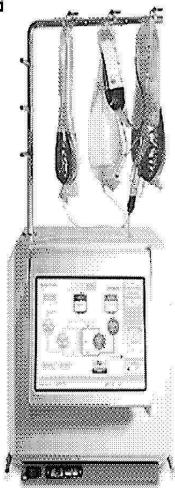
도 8(계속)

도면9a

단계 우월 (Stage Excellence)
세포 선별 시스템

예컨대, Quantum 세포 증대 시스템

1. 증대된 세포를 정제함
2. 증대 시약을 제거함
3. 형질도입 시약을 제거함



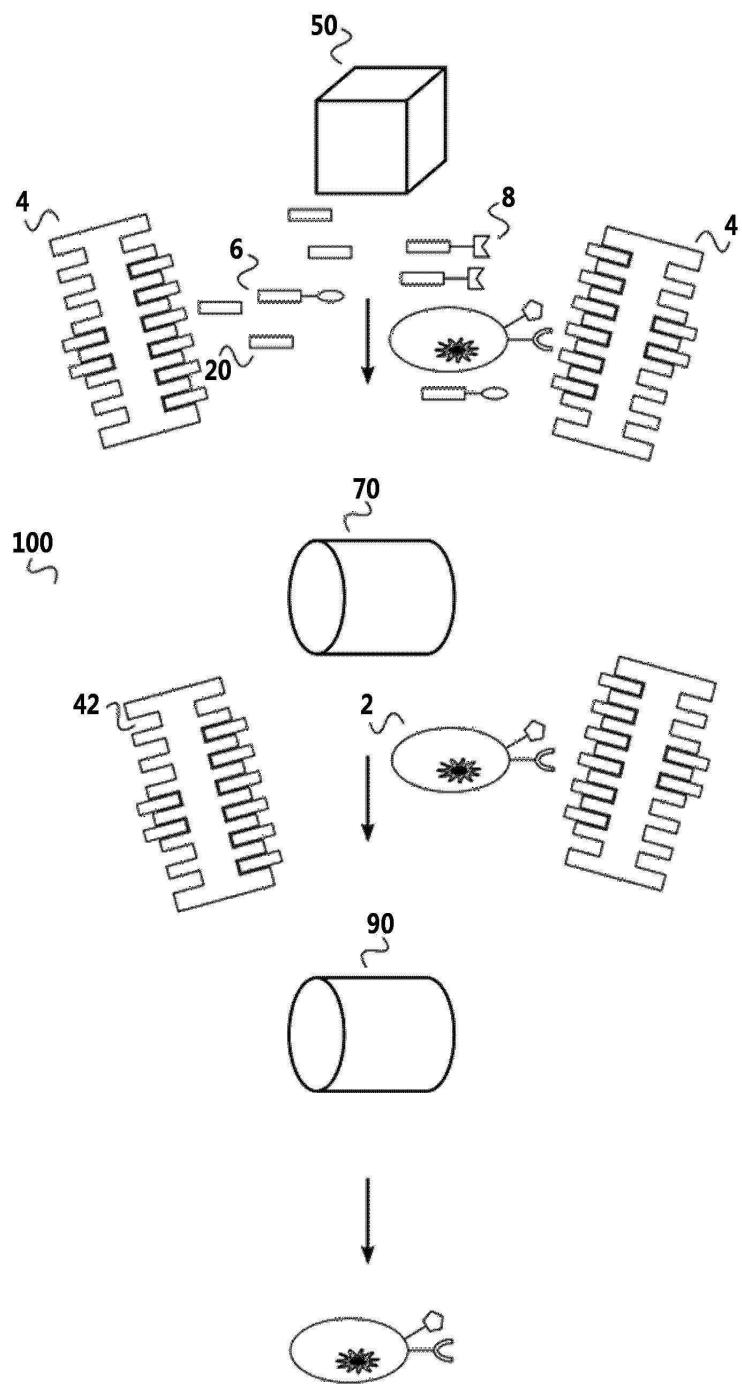
1. 균질한 단계의 CD3/CD28 시스템을 이용한 증대
2. 초기 증대 동안의 형질감염
3. 자극 시약의 분리를 위해 비오틴을 첨가함; 자극의 중단 및 제어

도면9b

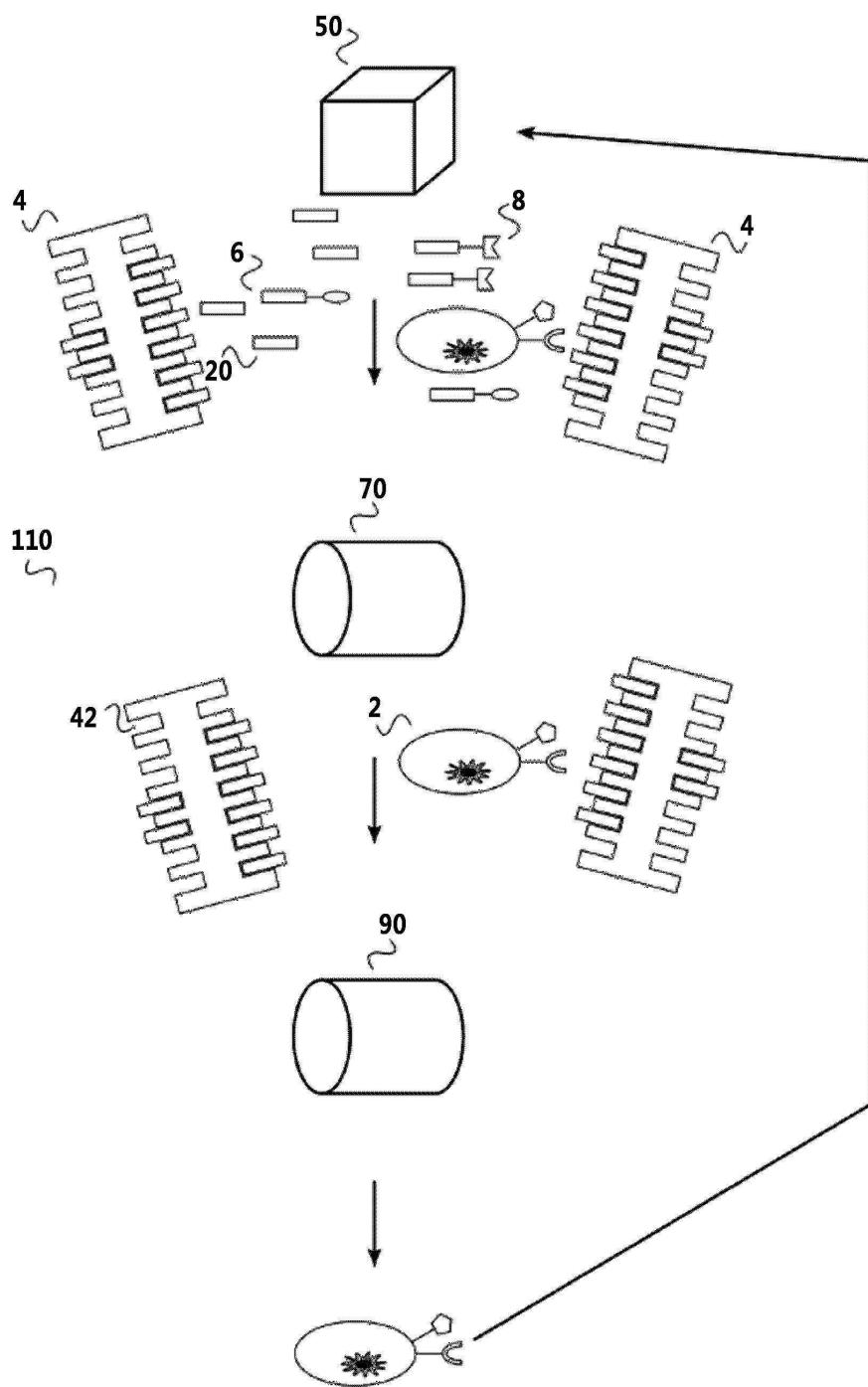
균질한 세포 증대를 이용한 CATCH 선별의 커플링

- 하나의 공정에서 정제로부터 팽창으로의 세포 왕복을 가능케 하는 폐쇄 시스템
- 자성 비드가 제거될 필요가 없으므로 이 폐쇄 시스템에 이상적으로 적합한 균질한 단계 CD3/CD28 (비드 포함되지 않음)을 이용한 증대
- 형질감염이 폐쇄 공정에 통합될 수 있음
- 자극 시약의 분리를 위한 비오틴 첨가: 자극의 중단 및 제어
- 연속적인 유전적 (CD3/CD28) 및 수용체-특이적 증대를 가능케 하는 균질한 분석

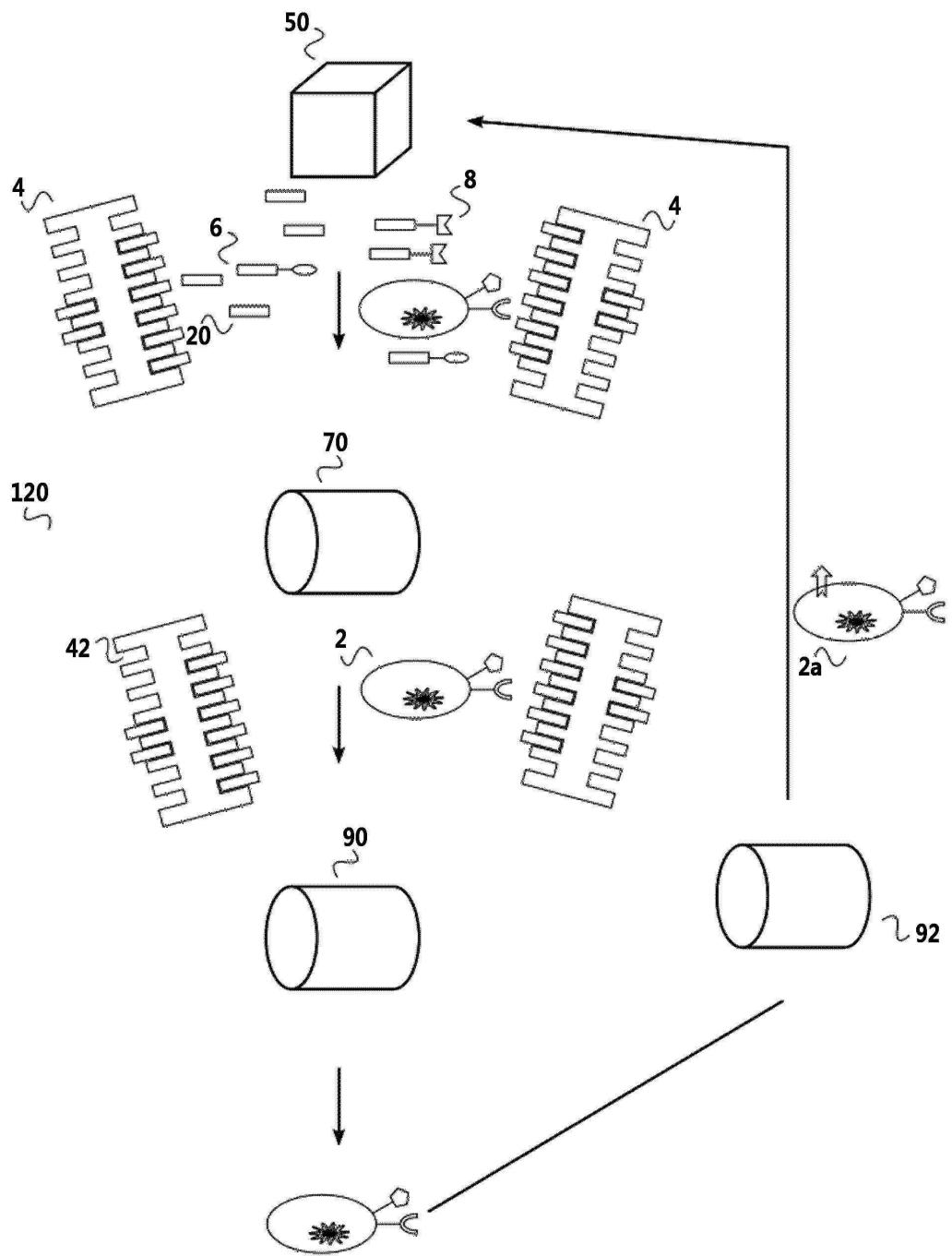
도면10



도면11

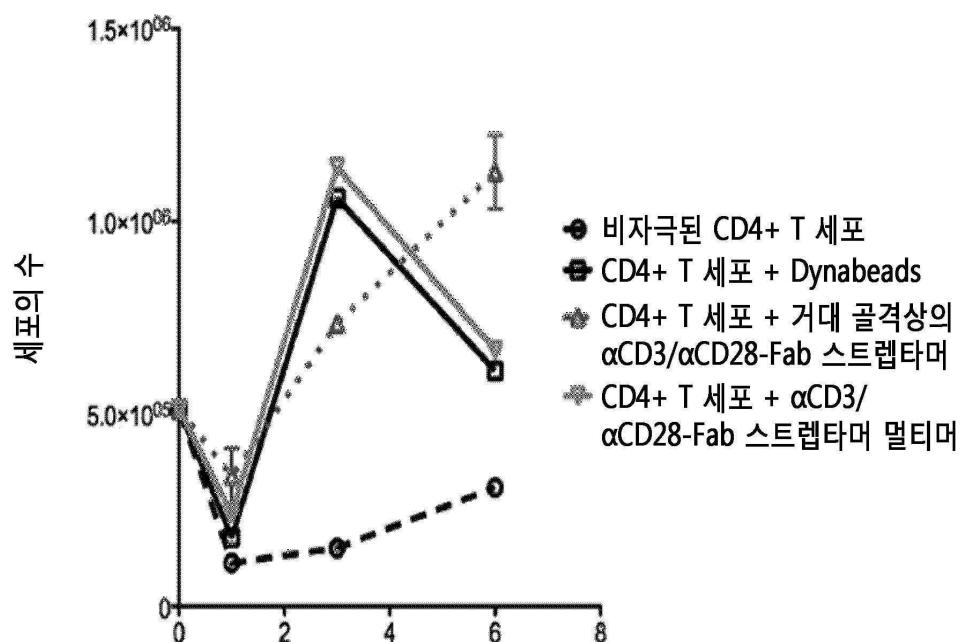


도면12

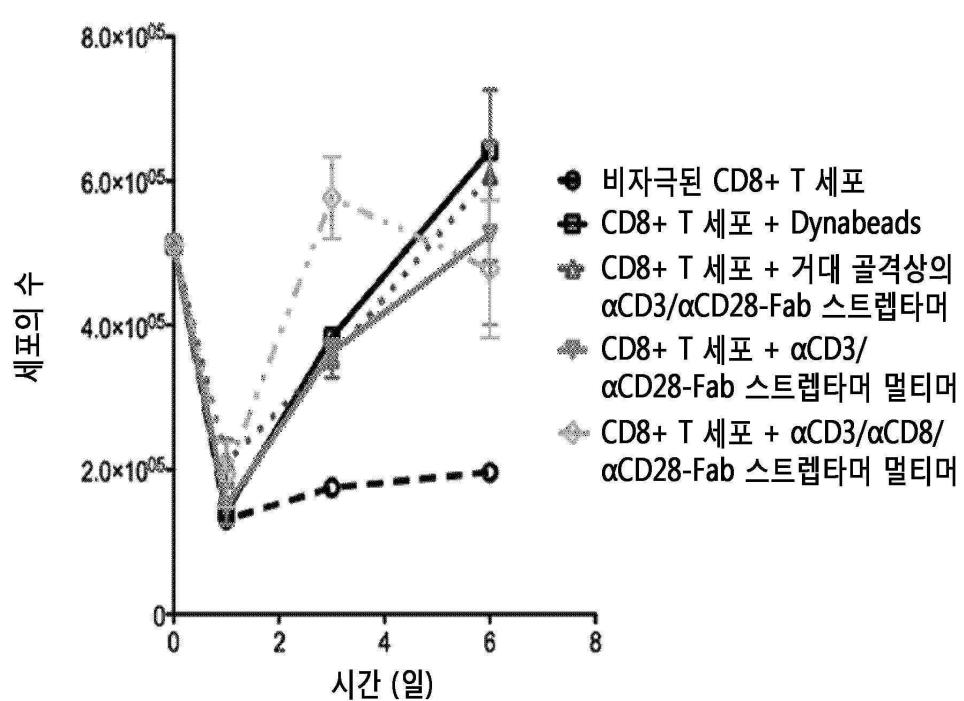


도면13

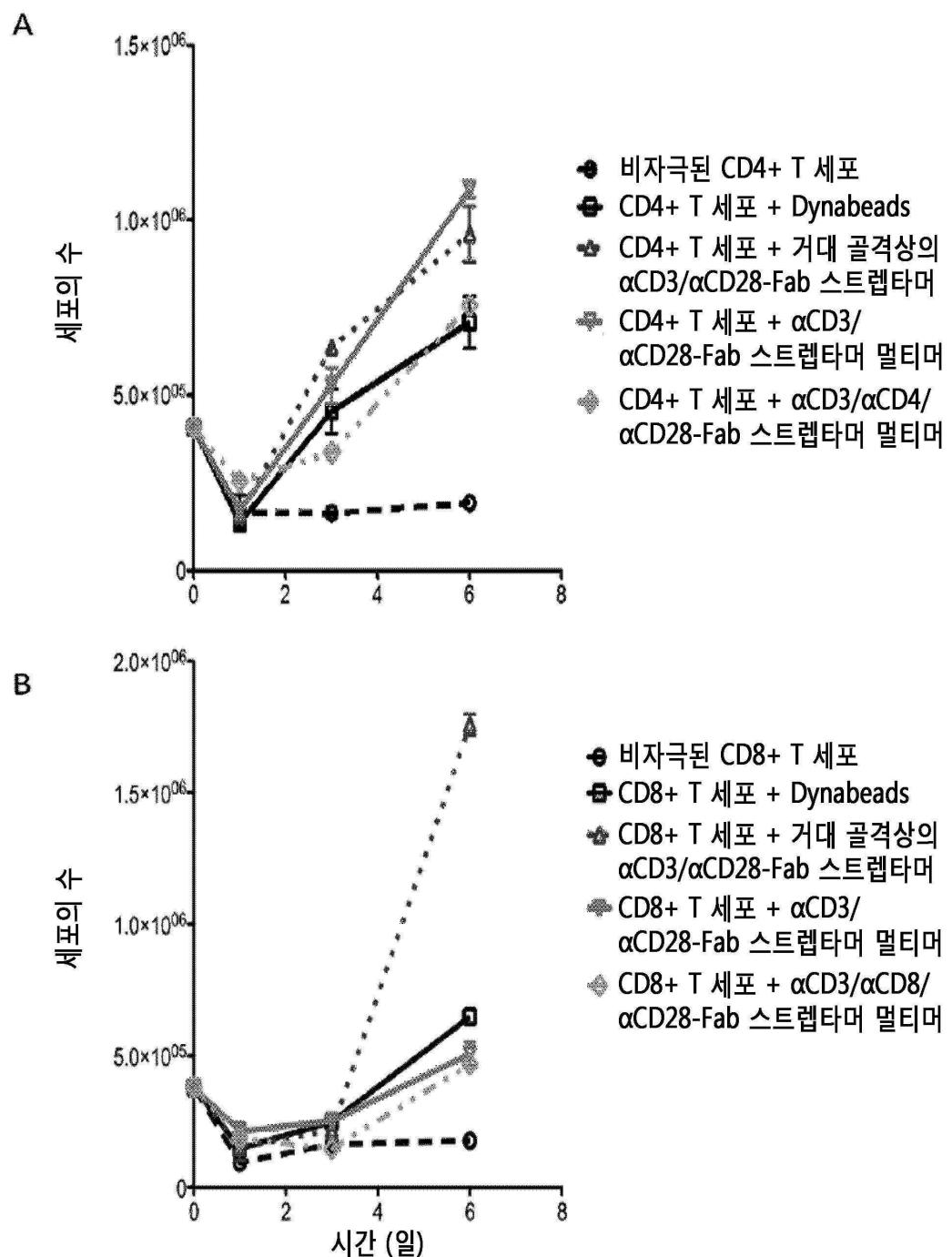
A



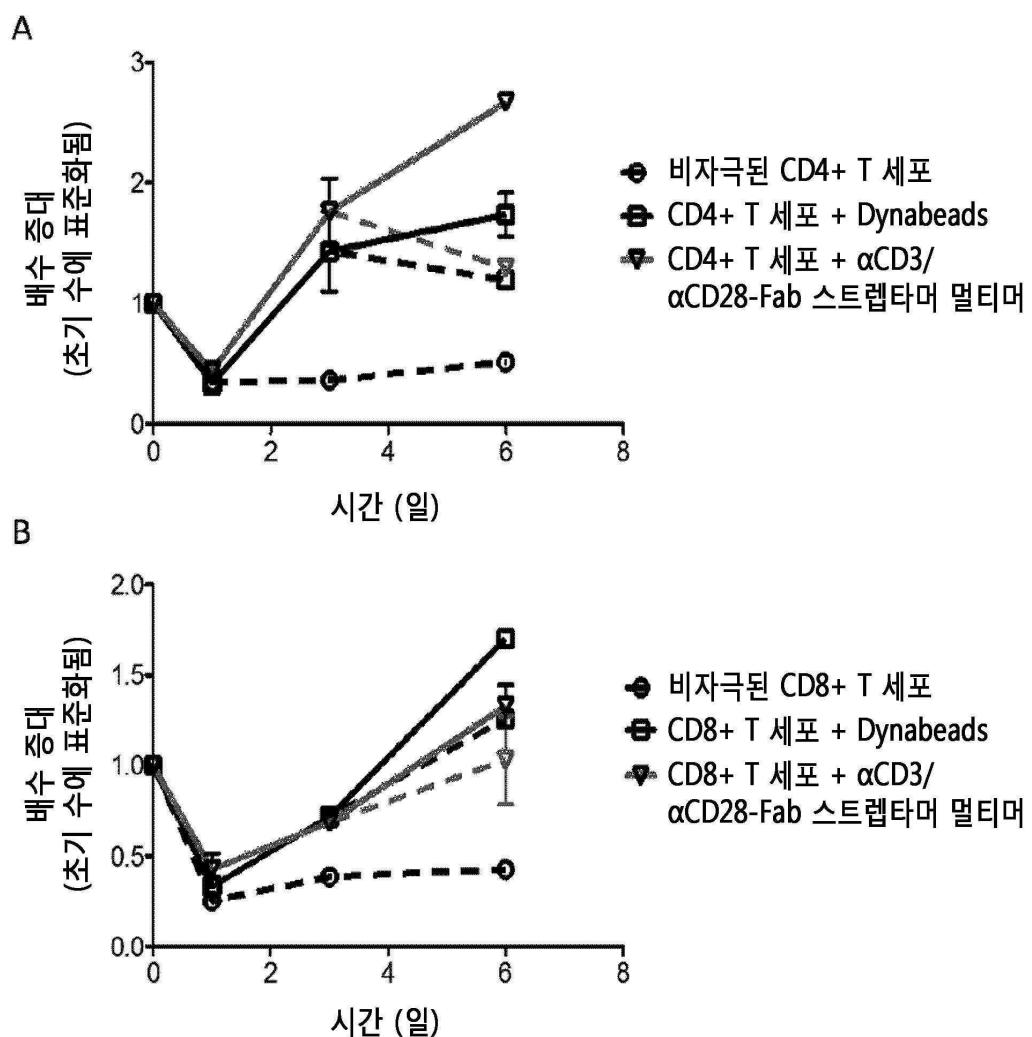
B



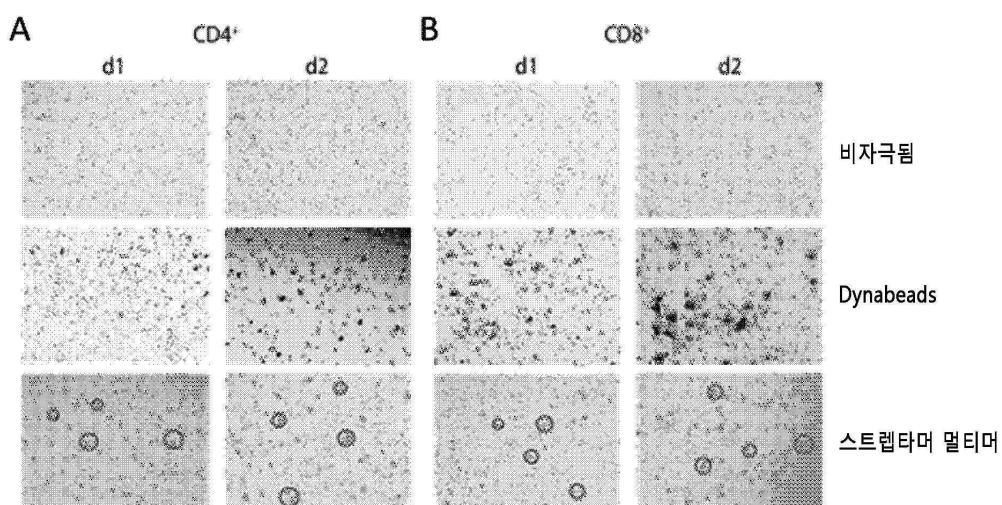
도면14



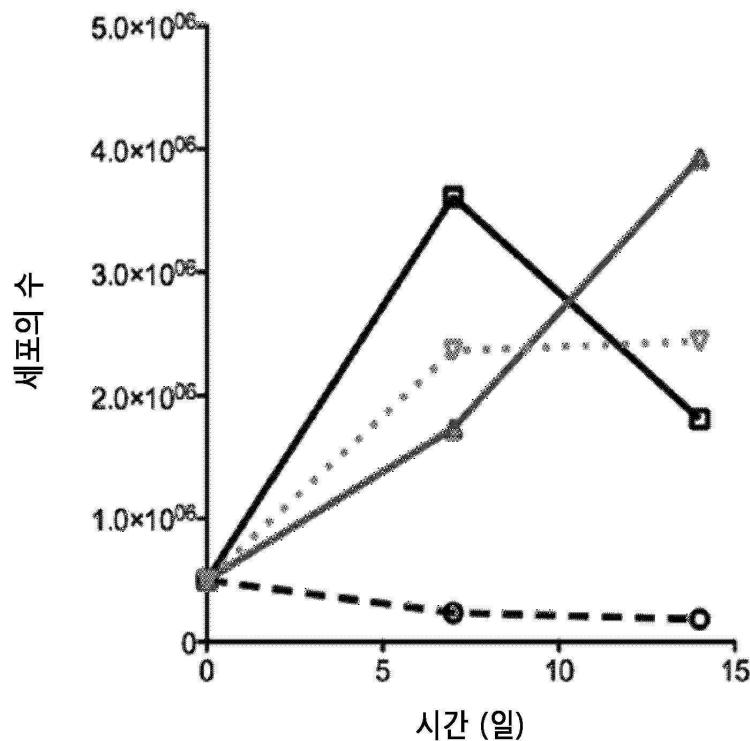
도면15



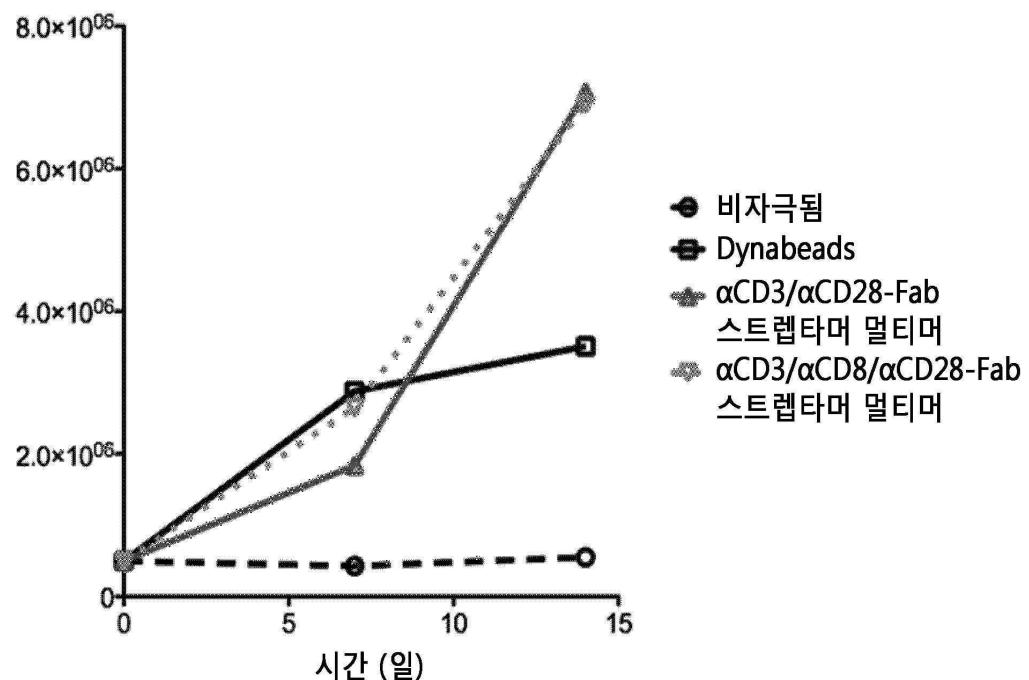
도면16



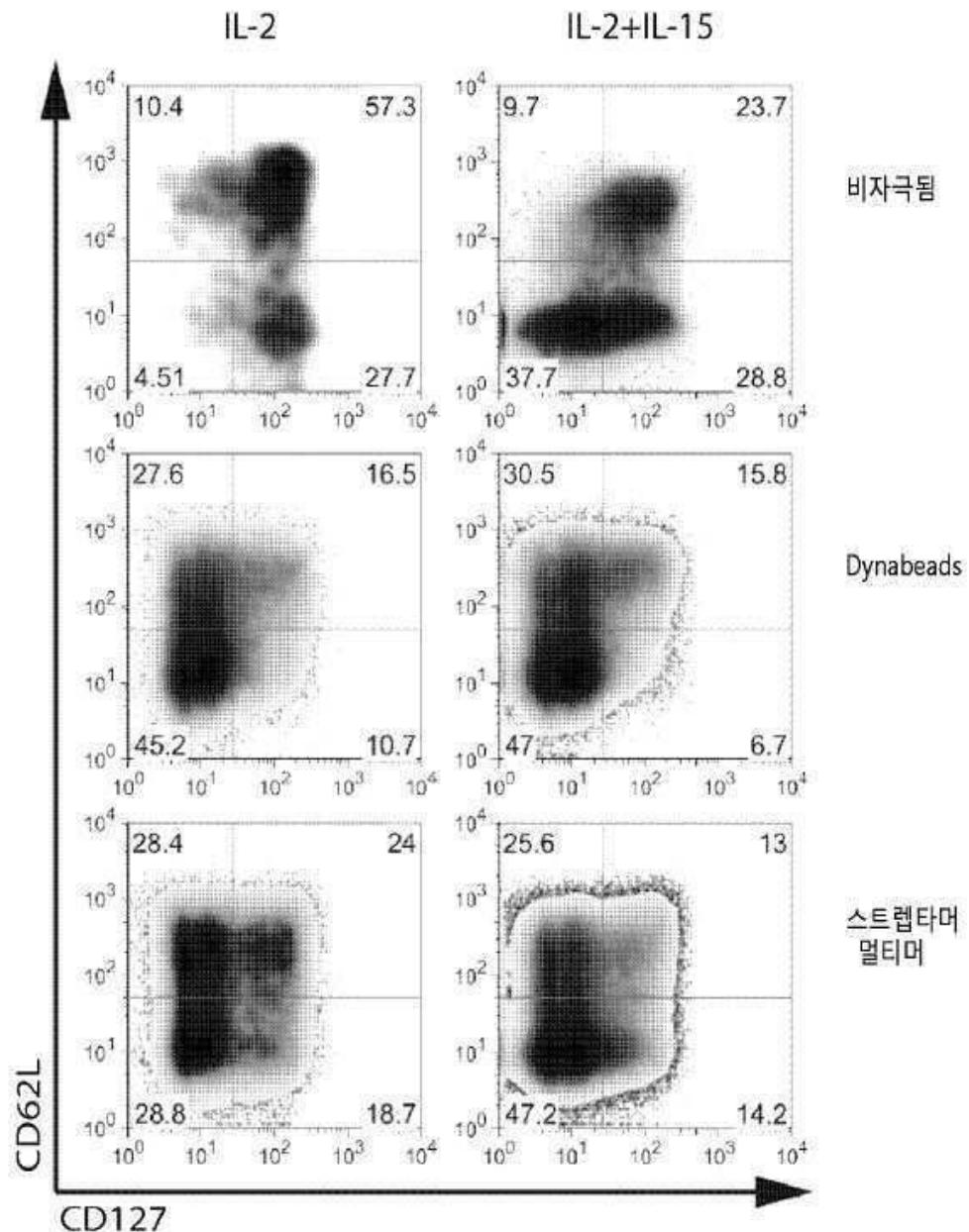
도면17a



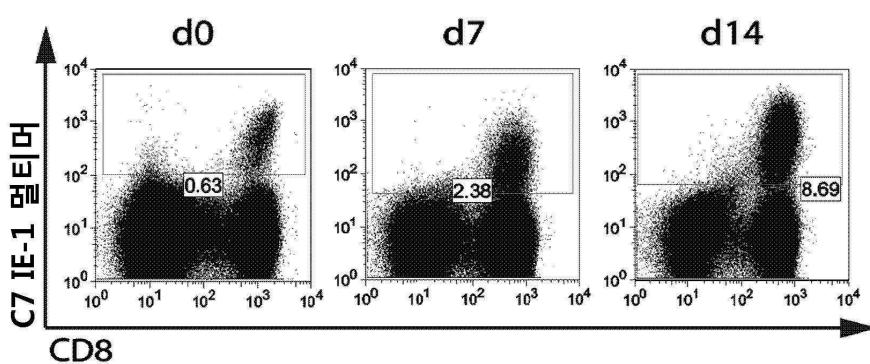
도면17b



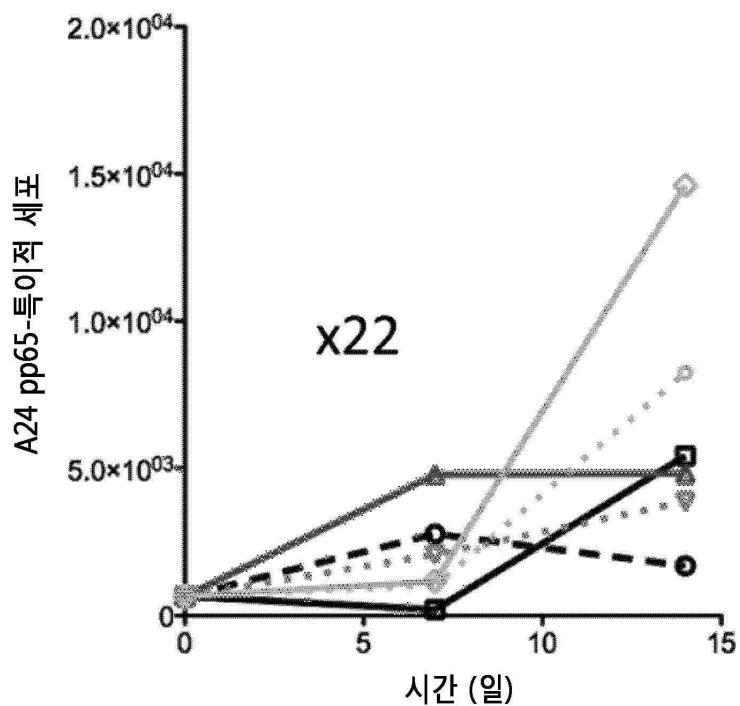
도면17c



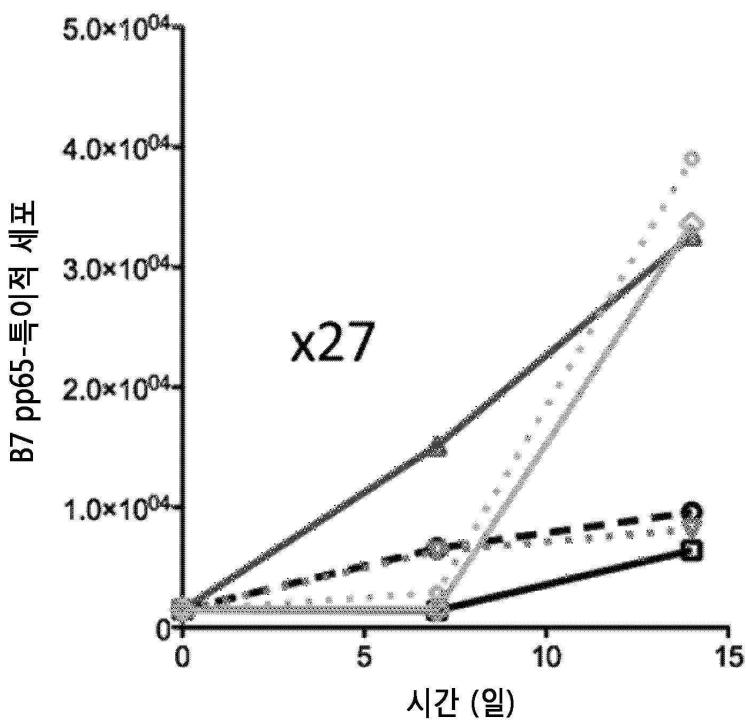
도면18a



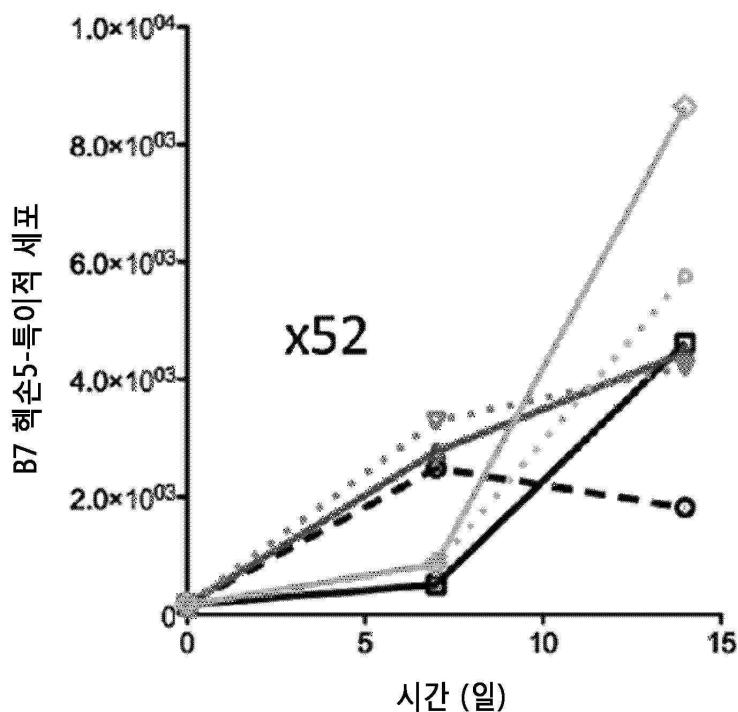
도면 18b



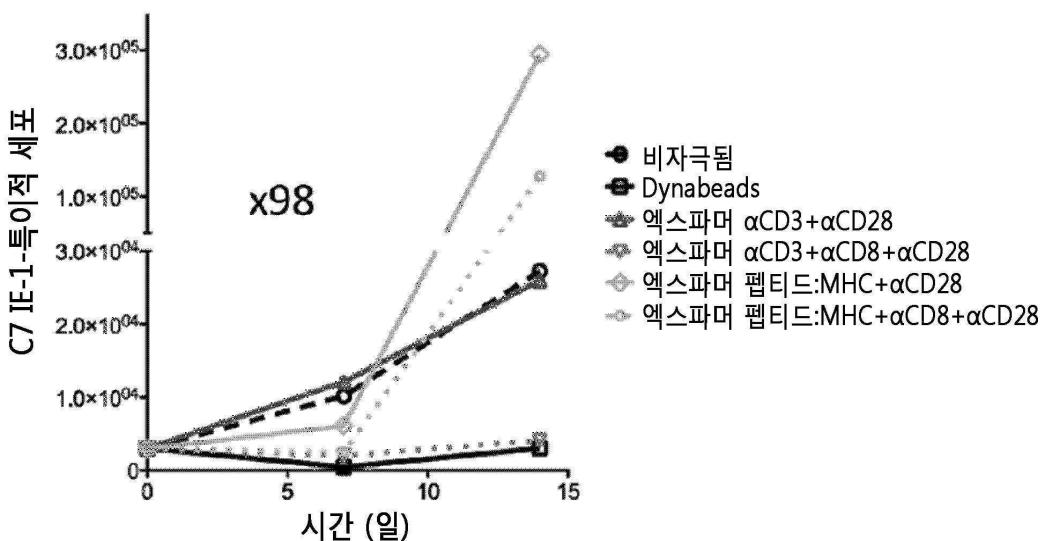
도면 18c



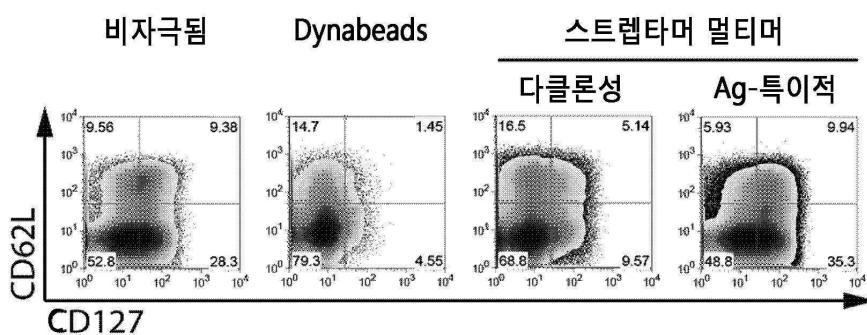
도면18d



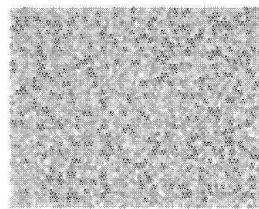
도면18e



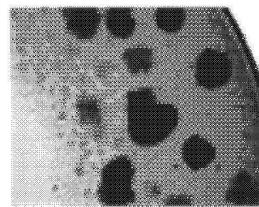
도면18f



도면19

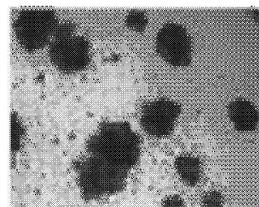


비자극됨

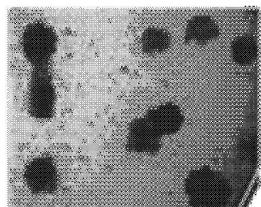


Dynabeads

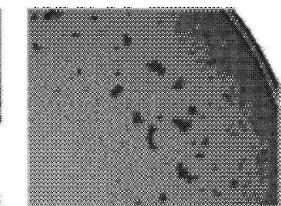
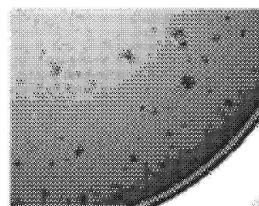
+ α CD8-Fab



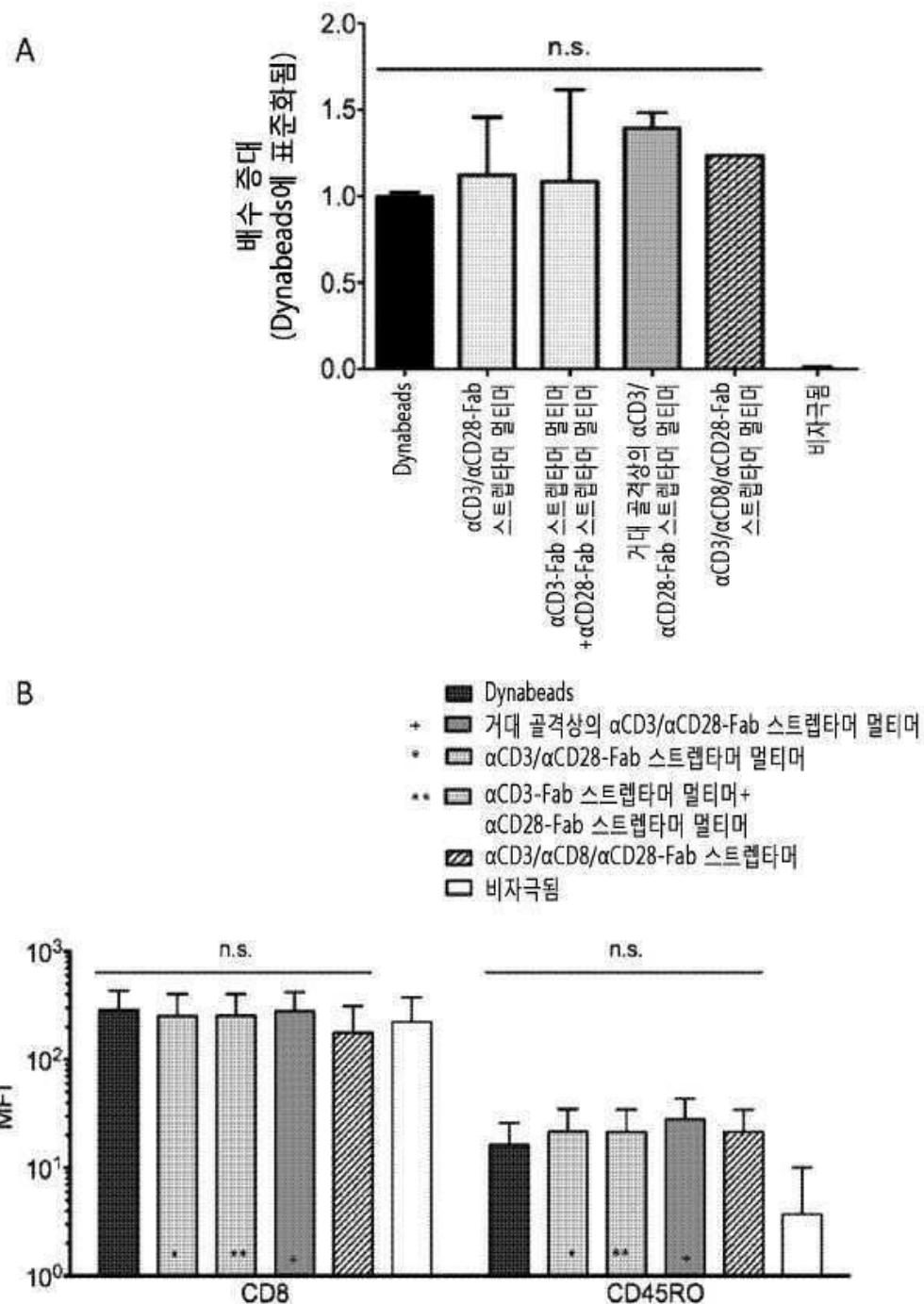
다클론성
스트렙타머 멀티머



Ag-특이적
스트렙타머 멀티머

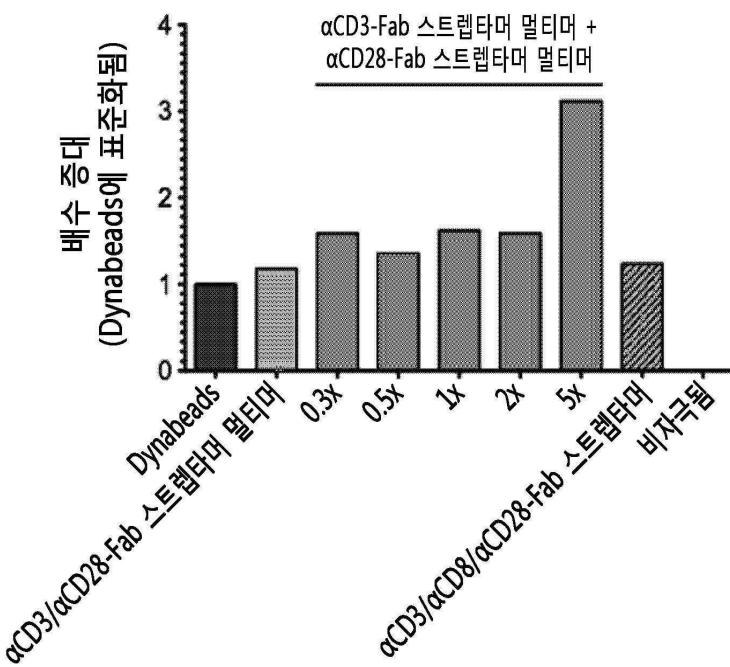


도면20

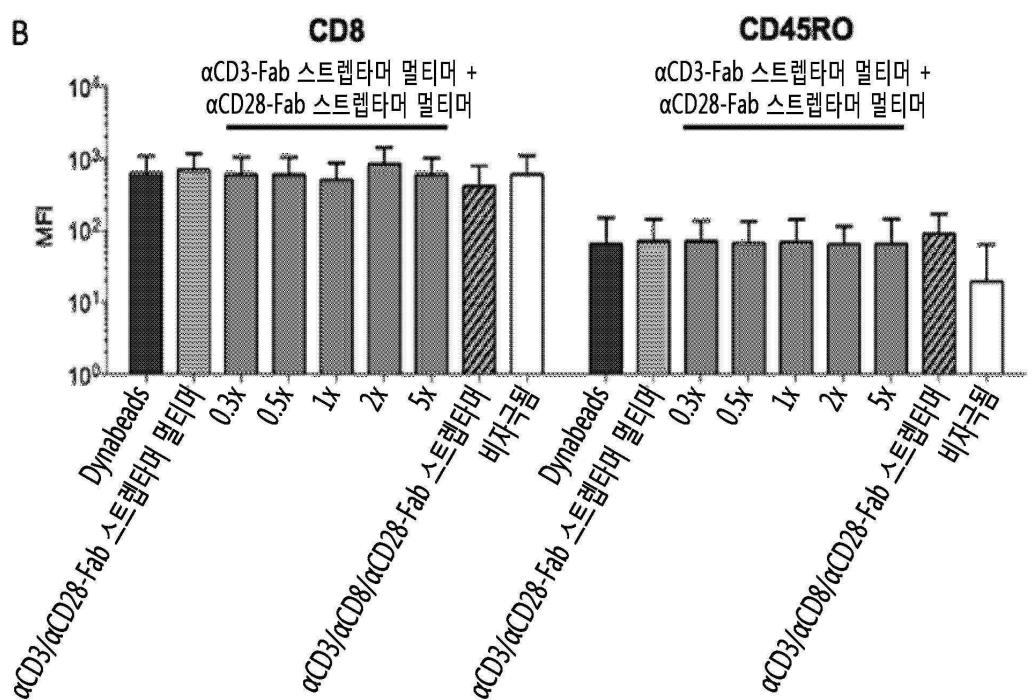


도면21

A

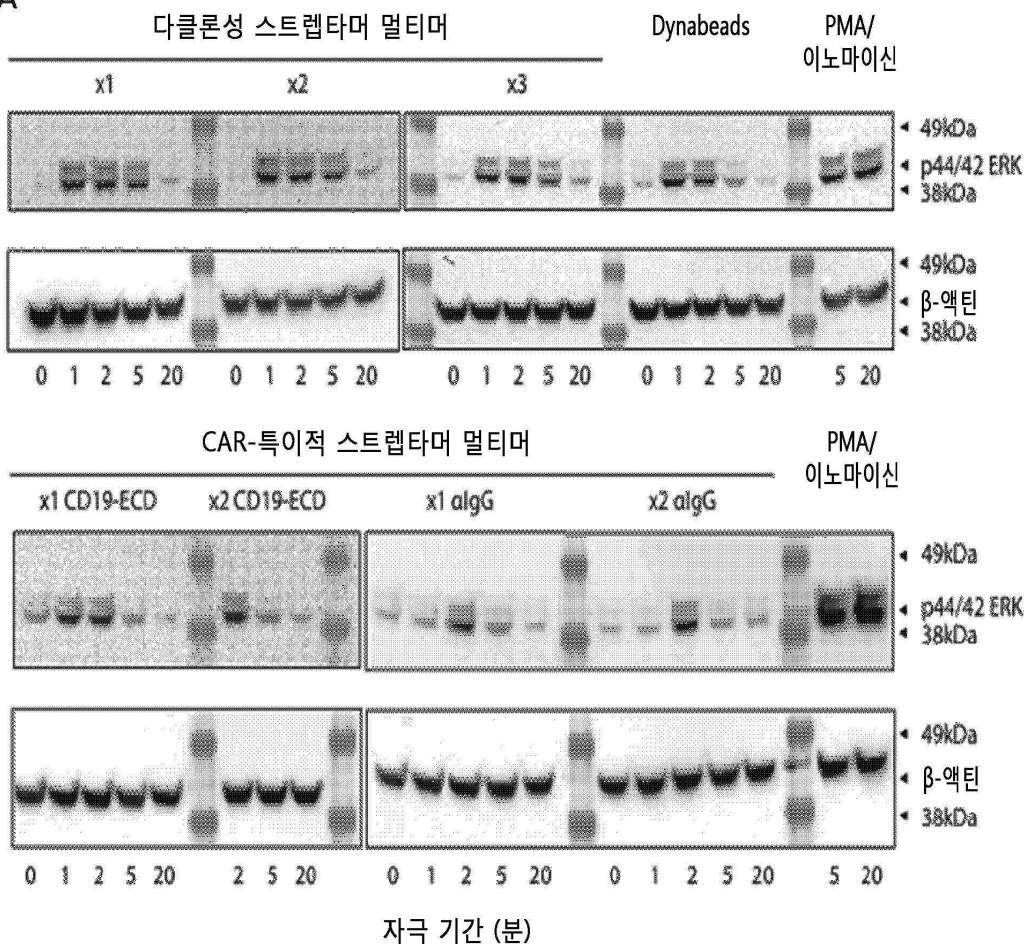


B

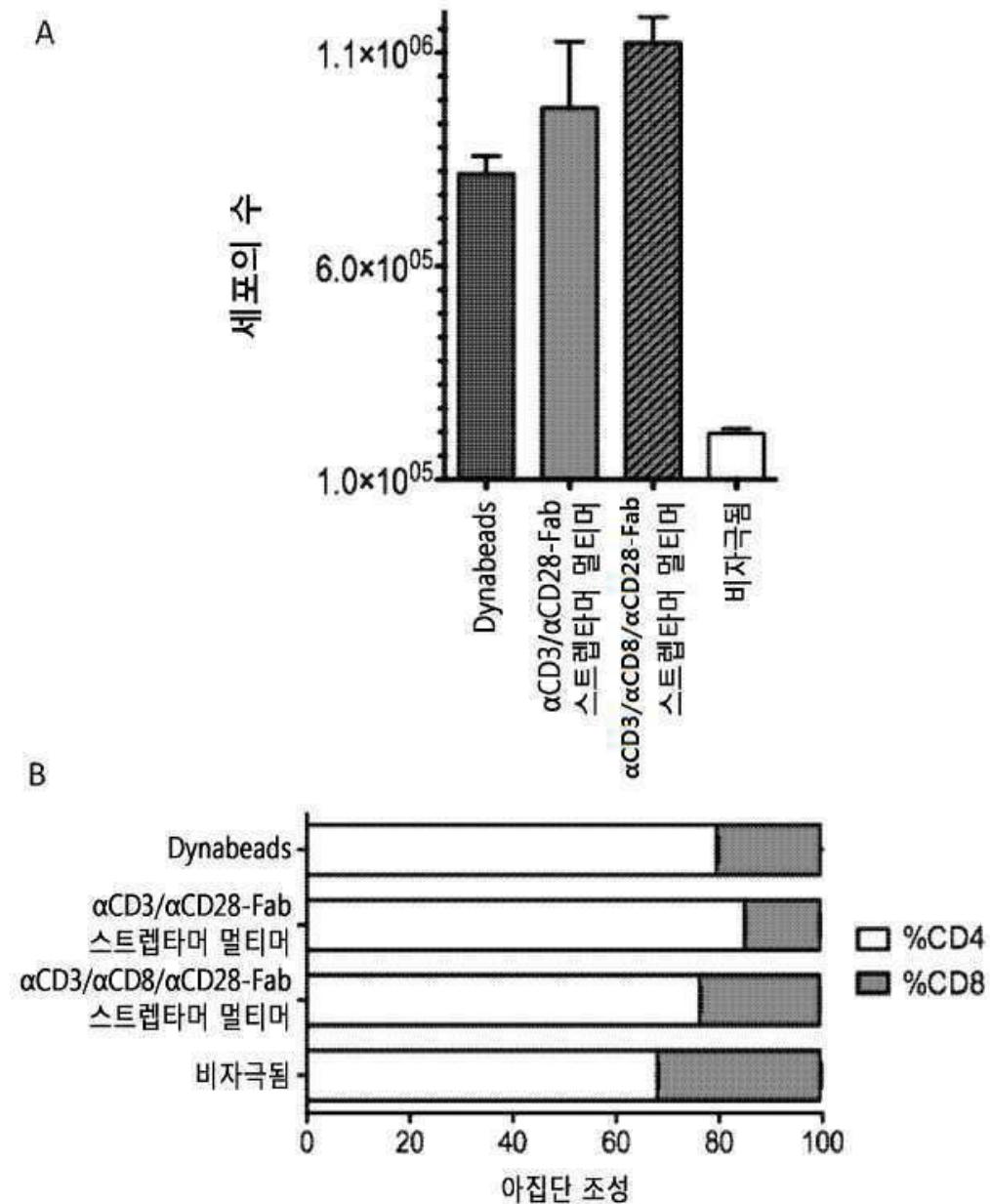


도면22

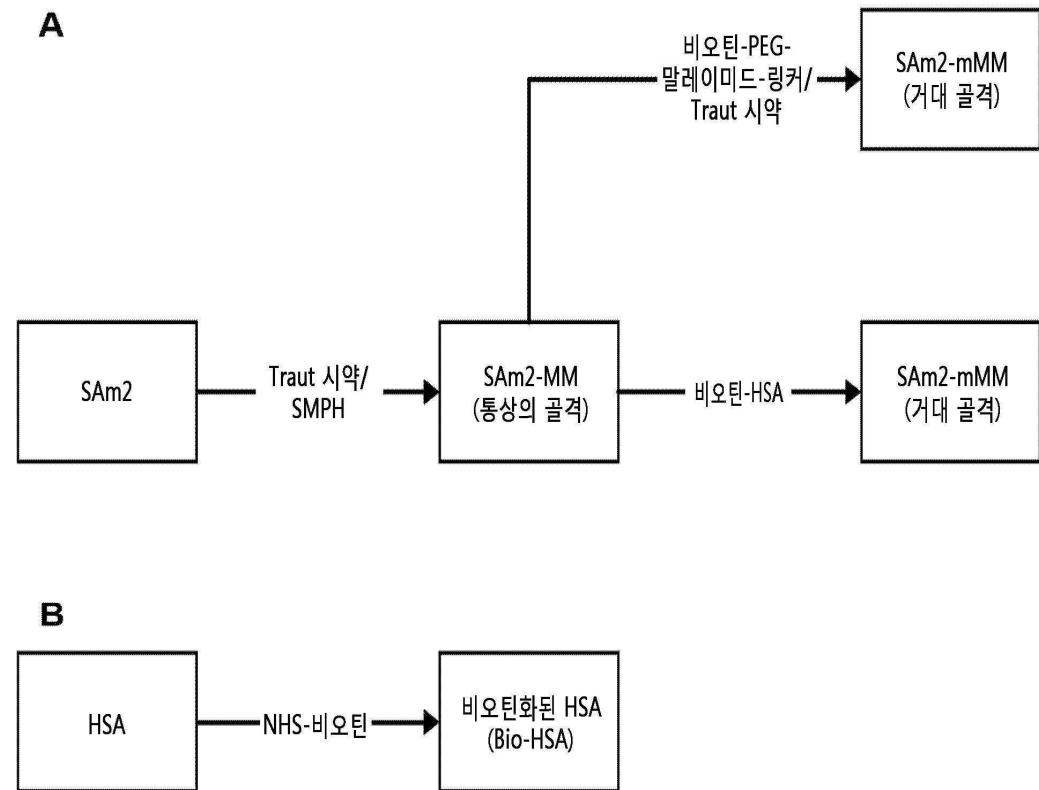
A



도면23



도면24



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics GmbH

<120> METHODS, KITS AND APPARATUS FOR EXPANDING A POPULATION OF CELLS

<130> IPA161424-DE-D1

<150> US 61/980,506

<151> 2014-04-16

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> Strep-tag

<400> 1

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

<210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> streptavidin mutein (analog) 1
 <400> 2
 Val Thr Ala Arg

1
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> streptavidin mutein (analog) 2
 <400> 3
 Ile Gly Ala Arg

1
 <210> 4
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> di-tag3
 <400> 4

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

<210> 5
 <211> 24

<212> PRT
 <213> artificial
 <220><223> di-tag2
 <400> 5
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> immediate-early 1 protein (amino acids 309-317)

<400> 6

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

1 5

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213>

> artificial

<220><223> Twin-Strep-tag

<400> 7

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> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> pp65 epitope of CMV (amino acids 341-350)

<400> 8

Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> pp65 epitope of CMV (amino acids 265-274)

<400> 9

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> hexon 5 epitope of adenovirus (amino acids 114-124)

<400> 10

Lys Pro Tyr Ser Gly Thr Ala Tyr Asn Ala Leu

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HA-tag

<400

> 11

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VSV-G-tag

<400> 12

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HSV-tag

<400> 13

Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<

220><223> T7 epitope

<400> 14

Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> myc epitope

<400> 15

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> V5-tag

<400> 16

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr

1 5 10

<210>

17

<211> 119

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 17

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> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 18

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> 19
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <400> 19

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> 20
 <211> 108
 <212> PRT

<213> mus musculus
 <400> 20

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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 21

<211> 314

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HLA-A*2402

<400> 21

Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Thr Ser Val Ser Arg Pro
 1 5 10 15
 Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr

20 25 30

Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro
 35 40 45
 Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu
 50 55 60

Thr Gly Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr Asp Arg Glu Asn Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Ala Leu Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu

85 90 95

Gln Met Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Phe Leu Arg
 100 105 110
 Gly Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys
 115 120 125
 Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Ile Thr

130	135	140	
Lys Arg Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Gln Arg Ala Tyr			
145	150	155	160
Leu Glu Gly Thr Cys Val Asp Gly Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly			
165	170	175	
Lys Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Pro Pro Lys Thr His Met Thr His			
180	185	190	
His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly			
195	200	205	
Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp			
210	215	220	
Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly			
225	230	235	240
Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Gln			
245	250	255	
Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Leu Pro Lys Pro Leu Thr			
260	265	270	
Leu Arg Trp Glu Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro			
275	280	285	
Gln Phe Glu Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser			
290	295	300	
Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys			
305	310		
<210> 22			
<211> 314			
<212> PRT			
<213> artificial			
<220><223> HLA-B*0702			
<400> 22			
Met Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro			
1	5	10	15

Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr
 20 25 30
 Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro
 35 40 45
 Arg Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn
 50 55 60
 Thr Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg
 65 70 75 80

 Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu
 85 90 95
 Gln Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg
 100 105 110
 Gly His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn
 115 120 125
 Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr
 130 135 140

 Gln Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr
 145 150 155 160
 Leu Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly
 165 170 175
 Lys Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His
 180 185 190
 His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly
 195 200 205

 Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp
 210 215 220
 Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg
 225 230 235 240
 Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln
 245 250 255
 Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr

260 265 270

Leu Arg Trp Glu Pro Pro Ser Gly Ser Ser Ala Trp Ser His Pro

275 280 285

Gln Phe Glu Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

290 295 300

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

305 310

<210> 23

<211> 321

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HLA-C*0702

<400> 23

Met Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Cys Ser His Ser Met Arg Tyr Phe

1 5 10 15

Asp Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser

20 25 30

Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala

35 40 45

Ala Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly

50 55 60

Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr Gln Lys Tyr Lys Arg Gln Ala Gln

65 70 75 80

Ala Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser

85 90 95

Glu Asp Gly Ser His Thr Leu Gln Arg Met Ser Gly Cys Asp Leu Gly

100 105 110

Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr Asp Gln Ser Ala Tyr Asp Gly

115 120 125

Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala

130 135 140

Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg Lys Leu Glu Ala Ala Arg Ala
 145 150 155 160
 Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu
 165 170 175
 Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu Thr Leu Gln Arg Ala Glu Pro
 180 185 190
 Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro Leu Ser Asp His Glu Ala Thr
 195 200 205

Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr
 210 215 220
 Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu
 225 230 235 240
 Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val
 245 250 255
 Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Met Gln His Glu
 260 265 270

Gly Leu Gln Glu Pro Leu Thr Leu Ser Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro
 275 280 285
 Thr Ile Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly
 290 295 300
 Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu
 305 310 315 320
 Lys

<210> 24
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 24

Met Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala

1 5 10 15
 Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His

20	25	30
Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu		
35	40	45
Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr		
50	55	60
Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala		

65	70	75	80
Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp			
85	90	95	
Asp Arg Asp Met			

100

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 25

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Arg Thr Ser			
20	25	30	

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu			
35	40	45	

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala

50	55	60	
----	----	----	--

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val			
65	70	75	80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85	90	95	
----	----	----	--

Cys Ala Gln Ile Asn Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100	105	110	

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 26

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 27

<211> 283

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> human CD19 extracellular domain with His-Tag

<400> 27

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val

1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr

20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly

35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe

50	55	60
Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro		
65	70	75
Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val		
85	90	95
Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly		
100	105	110
Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro		
115	120	125
Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg		
130	135	140
Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser		
145	150	155
Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr		
165	170	175
Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro		
180	185	190
Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser		
195	200	205
Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu		
210	215	220
Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr		
225	230	235
Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr		
245	250	255
Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys		
260	265	270
Ala His His His His His His His His		
275	280	