(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년03월16일
(11) 등록번호 10-0888915
(24) 등록일자 2009년03월10일

(51) Int. Cl.
C12N 5/02 (2006.01) *C12N 5/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7028426(분할)
(22) 출원일자 2007년12월05일
심사청구일자 2007년12월05일
번역문제출일자 2007년12월05일
(65) 공개번호 10-2007-0122579
(43) 공개일자 2007년12월31일
(62) 원출원 특허 10-2004-7002212
원출원일자 2004년02월13일
심사청구일자 2005년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2002/008298
국제출원일자 2002년08월15일
(87) 국제공개번호 WO 2003/016511
국제공개일자 2003년02월27일
(30) 우선권주장
JP-P-2001-00246747 2001년08월15일 일본(JP)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
WO 97/32970 (1997. 9. 12.)*
Immunolgy Vol.91:186-192 (1997)*
J. of Immunology Vol.153:21-31 (1994)*
Eur. J. Immunol. 21:1559-1562 (1991)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다카라 바이오 가부시키가이샤
일본 시가 520-2193 오츠시 세타 3쵸메 4-1
(72) 발명자
사가와 히로아끼
일본 시가껭 구사쯔시 니시시부까와 2쵸메 6-32
이데노 미쯔꼬
일본 교또후 교또시 우꾜꾸 누즈마사이누이쵸 28 반찌 7
가또 이꾸노신
일본 시가껭 고까-군 시가라끼-쵸 나가노 1454-15
(74) 대리인
특허법인코리아나

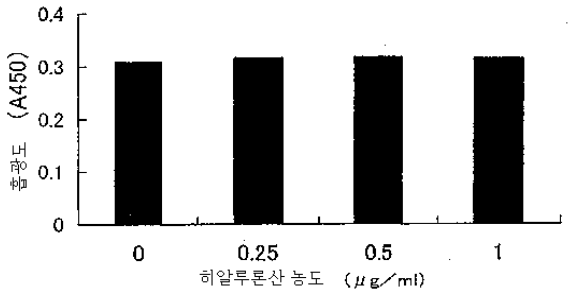
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 안규정

(54) 항원특이적 세포상해성 T 세포 확대배양방법

(57) 요 약

본 발명은 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 유도하는 방법, 이 세포를 유지하는 방법, 이 세포를 계속 배양하는 방법, 이 세포를 확대배양하는 방법으로, (A) CD44 에 결합활성을 가진 물질, (B) CD44 리간드가 CD44 에 결합함으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질, (C) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질, (D) 성장인자의 성장인자 리셉터에 결합함으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질, (E) 피브로넥틴, 그 프래그먼트 또는 이들의 혼합물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질의 존재하에 세포상해성 T 세포를 배양하는 방법이다.

대 표 도 - 도1



(30) 우선권주장
JP-P-2001-00376966 2001년12월11일 일본(JP)
JP-P-2002-00084428 2002년03월25일 일본(JP)

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 확대배양하는 방법으로,

(A) 항 간세포증식인자 항체, 항 인슐린양 증식인자-1 항체 및 항 인슐린양 증식인자-2 항체로 이루어지는 군에서 선택되는 항 성장인자 항체,

(B) 피브로넥틴의 프래그먼트로서,

(a) 서열번호 : 2 에 기재된 아미노산 서열,

(b) 서열번호 : 1 에 기재된 아미노산 서열, 및

(c) 서열번호 : 3 에 기재된 아미노산 서열

로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 아미노산 서열로 이루어지는 피브로넥틴의 프래그먼트 또는 이들의 혼합물,

로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질의 존재하에 세포상해성 T 세포를 인큐베이트하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 공정에 있어서, 다시 항 CD3 항체의 존재하에 세포상해성 T 세포를 인큐베이트하는 방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 공정에 있어서, 세포상해성 T 세포를 피더 세포와 함께 인큐베이트하는 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 피더 세포가 비바이러스 감염세포인 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 4 항, 제 5 항, 제 6 항, 또는 제 7 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 얻어진 세포상해성 T 세포함유 배양물로부터, 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포집단을 선택하는 공정을 포함하는 세포상해

성 T 세포의 회수 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 의료분야에서 유용한, 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 유도, 유지 및 확대배양하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 생체는 주로 면역응답에 의해 이물로부터 지켜지고 있고, 면역시스템은 각종 세포와 이것이 만들어내는 가용성의 인자에 의해 성립된다. 이 중에서도 중심적인 역할을 하는 것이 백혈구, 특히 림프구이다. 이 림프구는 B 림프구 (이하 B 세포로 기재하는 경우가 있음) 와 T 림프구 (이하 T 세포로 기재하는 경우가 있음) 와 같은 2 종류의 주요한 타입으로 나누어지고, 모두 항원을 특이적으로 인식하고, 이것에 작용하여 생체를 방어한다.

<3> T 세포는 CD (Cluster Designation) 4 마커를 갖고 주로 항체산생의 보조나 각종 면역응답의 유도에 관여하는 헬퍼 T 세포 (이하 T_H), CD8 마커를 갖고 주로 세포상해활성을 나타내는 세포상해성 T 세포 [T_C ; 세포상해성 T 림프구 (cytotoxic T lymphocyte), 킬러 T 세포로도 불린다. 이하 CTL 로 기재하는 경우가 있음] 로 아분류된다. 종양세포나 바이러스 감염 세포 등을 인식하여 파괴, 제거하는 데에 가장 중요한 역할을 하는 CTL 은, B 세포와 같이 항원에 대해 특이적으로 반응하는 항체를 산생하는 것이 아니고, 표적세포막 표면상에 존재하는 주요 조직 적합 복합체 (major histocompatibility complex, MHC : 인간의 경우에는 인간백혈구항원 (human leukocyte antigen, HLA) 으로 불리기도 함) 클래스 I 분자에 회합한 표적세포유래의 항원 (항원성 펩티드) 을 직접 인식하여 작용한다. 이 때, CTL 막 표면의 T 세포 리셉터 (T cell receptor, 이하 TCR 이라고 함) 가 상기 서술한 항원성 펩티드 및 MHC 클래스 I 분자를 특이적으로 인식하여 항원성 펩티드가 자기유래의 것인지 혹은 비자기유래의 것인지를 판단한다. 그리고 비자기유래로 판단된 표적세포는 CTL 에 의해 특이적으로 파괴, 제거된다.

<4> 최근 약제치료법이나 방사선치료법과 같이 환자에게 무거운 육체적 부담이 있는 치료법이 다시 검토되어, 환자의 육체적 부담이 가벼운 면역치료법에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 면역기능이 정상인 인간 유래의 CTL 또는 T 세포로부터 목적하는 항원에 대해 특이적으로 반응하는 CTL 을 생체외 (인비트로) 에서 유도한 후, 환자에게 이입하는 양자면역치료의 유효성이 주목되고 있다. 예를 들어 동물 모델을 사용한 양자면역요법이 바이러스 감염 및 종양에 대해 유효한 치료법인 것이 시사되어 있고 [그린버그 (Greenberg, P. D.) 저, 어드밴시즈 인 이뮤놀로지 (Advances in Immunology), 1992 년 발행], 또한 면역부전 환자에게 CTL 을 투여함으로써, 독성을 나타내지 않고, 급속하고 지속적으로 사이토메갈로바이러스가 배제되는 특이적 CTL 응답이 재구축된 [로이젤 P. 등 (Reusser P., et al.), 블러드 (Blood), 제 78 권, 제 5 호, 제 1373 ~ 1380 면 (1991)] 점 등에서, 선천성, 후천성 및 의원성에 의한 T 세포 면역부전증 환자에 대한 사용도 주목되고 있다. 이 치료법에서는 CTL 의 항원특이적 상해활성을 유지 혹은 증강시킨 상태에서 그 세포수를 유지 혹은 증가시키는 것이 중요하다.

<5> 또 CTL 의 세포수의 유지 및 증가에 대해서는 동물 모델을 이용한 연구를 통해 인간의 양자면역요법에 유효한 세포수를 추측하면, 10^9 ~ 10^{10} 개의 항원특이적 T 세포가 필요하게 되어 있다 [그린버그 저, 어드밴시즈 인 이뮤놀로지, 1992 년 발행]. 즉 양자면역요법에서는 인비트로에서 이들의 세포수를 단시간에 얻는 것이 최대의 문제라고 할 수 있다.

<6> CTL 의 항원특이적 상해활성의 유지 및 증강에 대해서는, CTL 의 항원에 특이적인 응답을 유도할 때에, 목적으로 하는 항원을 사용한 자극을 반복하는 방법이 일반적이다. 그러나 이 방법은 일시적으로는 세포수가 증가하는 경우도 있으나, 최종적으로는 세포수가 줄어 필요로 하는 세포수를 얻을 수 없다. 이 대응책으로서는 항원에 의한 자극을 반복하는 초기 단계에서 세포를 동결보존시키거나, 클로닝을 실행하여 얻어진 항원특이적 CTL 클론의 일부를 동결보존한 후, 장기배양에 의해 세포수나 항원특이적 상해활성이 저하되었을 때에, 동결된 세포를 융해하여 다시 항원자극을 반복할 수밖에 없는 것이 현 실정이다.

<7> 마우스 T 세포를 사용하여 장기배양에 의해 T 세포를 수립하는 방법 [폴 W.E. 등 (Paul W. E., et al), 네이처 (Nature), 제 294 권, 제 5843 호, 제 697 ~ 699 면 (1981)] 이 보고되어 있으나, 이것은 T 세포를 단리·주화하는 방법으로, 이 방법으로 T 세포를 10^9 ~ 10^{10} 개의 세포까지 증식시키기는 불가능하다. 다음으로, 미국특허 제 5,057,423 호에는 인터로이킨2 (IL-2) 를 고농도로 대량으로 사용하여 림포카인 활성화 킬러 (LAK) 세포를 유도하여, 3 ~ 4 일간에 세포수를 100 배까지 늘리는 방법이 개시되어 있다. 이것은 통상 1 개의 세포가 분열되어 2 개로 증식되는 데에 약 24 시간이 걸리는 것을 고려하면 비약적인 세포수이다. 또 동일하게 고농도의 IL-2 를 사용하여 종양침윤 림프구 (TIL) 를 유도하여 양자면역요법을 시도하고 있다 [로젠버그 S. A. 등 (Rosenberg S. A., et al.), 뉴 잉글랜드 저널 오브 메디신 (N. Engl. J. Med.), 제 313 권, 제 23 호, 제 1485 ~ 1492 (1985) ; 로젠버그 S. A. 등 (Rosenberg S. A., et al.), N. Engl. J. Med., 제 319 권, 제 25 호, 제 1676 ~ 1680 면 (1988) ; 호 M. 등 (Ho M., et al.), Blood, 제 81 권, 제 8 호, 제 2093 ~ 2101 면 (1993)]. 그러나 전자는 항원에 대해 비특이적인 T 세포의 취득법이고, 후자는 활성화되어 있는 폴리클로날인 림프구 집단을 사용하기 때문에 특이성이 있었다고 해도 약간이다. 또한 상기 방법에서는 모두 세포증식을 촉진시키기 위해 고농도의 IL-2 를 사용하고 있고, 고농도의 IL-2 로 처리된 T 세포가 IL-2 비존재하에서 특이적 항원자극을 받은 경우에 아포토시스 (세포사) 를 일으킬 가능성이 있다는 보고 [레나도 M. J. 등 (Lenardo M. J., et al.), Nature, 제 353 권, 제 6347 호, 제 858 ~ 861 면 (1991) ; 보메 S. A. 등 (Boehme S. A., et al.), 유로피언 저널 오브 이뮤놀로지 (Eur. J. Immunol.), 제 23 권, 제 7 호, 제 1552 ~ 1560 면 (1993)] 로부터 상기 방법으로 얻어진 LAK 세포나 TIL 의 유효성에는 문제가 있다.

<8> 또 T 세포를 T 세포증식인자와 IL-2 존재하에서 저밀도 (5×10^3 ~ 1×10^4 개/㎖) 로 배양하면 7 일간에 걸쳐 급속하게 증식되고, 최종적으로는 세포수가 3 ~ 5×10^5 개/㎖ 의 포화밀도까지 증식된다. 그러나 일단 이 포화밀도에 도달하면 세포가 항상 죽어버린다는 보고도 있다 [길리스 S. 등 (Gillis S. et al), 이뮤놀로지컬 리뷰즈 (Immunol. Rev), 제 54 권, 제 81 ~ 109 면 (1981)]. 따라서 LAK 세포, TIL 및 저밀도에 의한 T 세포배양방법은 실용면에서나 유용면에서도 문제를 갖고 있다.

<9> 다음으로, 항원특이적인 CTL 에 관해서는, 동계 이종 유래의 사이토메갈로바이러스 (CMV) 특이적 CTL 을 인비트로에서 5 ~ 12 주간 배양하여 CTL 을 증식시킨 후, 면역부전의 환자에게 정맥내 투여하는 양자면역요법 [리델 S. A. 등 (Riddell S. A. et al.), Science, 제 257 권, 제 5067 호, 제 238 ~ 240 면 (1992)]. 자기 CMV 감염 선유아세포와 IL-2 [리델 A. S. 등 (Riddell S. A. et al.), 저널 오브 이뮤놀로지 (J. Immunol), 제 146 권, 제 8 호, 제 2795 ~ 2804 면 (1991)] 및 항 CD3 모노클로날 항체 (항 CD3mAb) 와 IL-2 [리델 S. A. 등 (Riddell S. A. et al.), 저널 오브 이뮤놀로지 메소드 (J. Immunol. Methods), 제 128 권, 제 2 호, 제 189 ~ 201 면 (1990)] 를 이용하여 CMV 특이적 CTL 클론을 단리 및 대량 배양하는 방법이 보고되어 있다. 그러나 이들 방법에는 큰 문제점이 존재한다. 즉 1×10^9 개/㎖ 의 항원특이적 CTL 을 얻는데에 약 3 개월을 필요로 하고, 그 동안에 환자의 증상이 진행되어 버리기 때문에 상황에 따른 대응을 취하기가 어렵다.

<10> 이와 같은 문제점을 해결하는 방법으로서 국제공개 제 96/06929 호 팜플렛에는 REM 법 (rapid expansion method) 이 개시되어 있다. 이 REM 법은 항원특이적 CTL 및 T_H 를 함유하는 T 세포의 초기집단을 단기간에 증식 (Expand) 시키는 방법이다. 즉, 개개의 T 세포 클론을 증식시켜 대량의 T 세포를 제공할 수 있는 점이 특징이지만 다음과 같은 문제점이 존재한다. REM 법에서는 항 CD3 항체, IL-2 및 방사선조사에 의해 증식성을 없앤 PBMC (peripheral blood mononuclear cell, 말초혈단핵세포) 와 엡스타인 바르 바이러스 (Epstein-Barr virus, 이하 EBV 라고 약칭함) 감염세포를 사용하여 항원특이적 CTL 수를 증식시키고 있으나, T 세포로의 EBV 트랜스폼 B 세포 (EBV-B 세포) 의 혼입 위험성이 부정되지 않는 점 (안정성의 문제), 피더 세포로서 대량의 PBMC (필요로 하는 항원특이적 CTL 수의 적어도 약 40 배의 PBMC) 가 필요한 점, 증식된 CTL 의 항원특이적 세포상해활성을 충분히 만족시킬 수 없는 점, T 세포 클론 이외의 T 세포집단을 사용하여 증식시킨 경우, T 세포가 가진 항원특이적인 세포상해활성은 세포의 증식과 함께 저하되는 점, 등의 문제를 가진다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 즉, 종래의 항원특이적 CTL 조제법에서는 치료로의 사용에 유효한 항원특이적인 세포상해활성을 가진 CTL 을 단기간에 또한 충분한 양을 조제한다는 양자면역요법에서 필요불가결한 문제가 아직 해결되어 있지 않은 것이 현실정이다.

과제 해결수단

<12> 발명의 개시

<13> 본 발명의 목적은, 양자면역요법에 사용하기에 적합한 항원특이적인 세포상해활성을 높은 레벨로 유지한 CTL 을 유도, 유지 및 확대배양하는 방법을 제공하는 것에 있다.

<14> 즉, 본 발명은

<15> (1) 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 유도하기 위한 방법으로,

<16> (A) CD44 에 결합활성을 가진 물질,

<17> (B) CD44 리간드가 CD44 에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질,

<18> (C) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질,

<19> (D) 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질 및

<20> (E) 피브로넥틴, 그 프래그먼트 또는 이들의 혼합물

<21> 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질의 존재하에 세포상해성 T 세포에 대한 분화능을 가진 전구세포를 항원제시세포와 함께 인큐베이트하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법,

<22> (2) CD44 에 결합활성을 가진 물질이 CD44 리간드 및/또는 항 CD44 항체인 상기 (1) 에 기재된 방법,

<23> (3) CD44 리간드가 히알루론산인 상기 (2) 에 기재된 방법,

<24> (4) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질이 성장인자에 결합활성을 가진 물질인 상기 (1) 에 기재된 방법,

<25> (5) 성장인자에 결합활성을 가진 물질이 항 성장인자 항체인 상기 (4) 에 기재된 방법,

<26> (6) 성장인자가 간세포증식인자, 인슐린양(様) 증식인자-1 및 인슐린양(様) 증식인자-2 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 성장인자인 상기 (1), (4) 및 (5) 중 어느 한 항에 기재된 방법,

<27> (7) 피브로넥틴의 프래그먼트가,

<28> (a) VLA-4 결합 도메인,

<29> (b) VLA-5 결합 도메인 및

<30> (c) 헤파린 결합 도메인

<31> 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 도메인을 가진 프래그먼트인 상기 (1) 에 기재된 방법,

<32> (8) 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 유지하기 위한 방법으로, 상기 (1) 에 기재된 (A) ~ (E) 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질의 존재하에 세포상해성 T 세포를 계속 배양하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법,

<33> (9) CD44 에 결합활성을 가진 물질이 CD44 리간드 및/또는 항 CD44 항체인 상기 (8) 에 기재된 방법,

<34> (10) CD44 리간드가 히알루론산인 상기 (9) 에 기재된 방법,

<35> (11) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질이 성장인자에 결합활성을 가진 물질인 상기 (8) 에 기재된 방법,

<36> (12) 성장인자에 결합활성을 가진 물질이 항 성장인자 항체인 상기 (11) 에 기재된 방법,

<37> (13) 성장인자가 간세포증식인자, 인슐린양 증식인자-1 및 인슐린양 증식인자-2 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 성장인자인 상기 (8), (11) 및 (12) 중 어느 한 항에 기재된 방법,

<38> (14) 피브로넥틴의 프래그먼트가,

<39> (a) VLA-4 결합 도메인,

<40> (b) VLA-5 결합 도메인 및

<41> (c) 헤파린 결합 도메인

<42> 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 도메인을 가진 프래그먼트인 상기 (8) 에 기재된 방법,

<43> (15) 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 확대배양하는 방법으로, 상기 (1) 에 기재된 (A) ~ (E) 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질의 존재하에 세포상해성 T 세포를 인큐베이트하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법,

<44> (16) 상기 공정에 있어서, 다시 항 CD3 항체의 존재하에 세포상해성 T 세포를 인큐베이트하는 상기 (15) 에 기재된 방법,

<45> (17) 상기 공정에 있어서, 세포상해성 T 세포를 피더 세포와 함께 인큐베이트하는 상기 (15) 또는 (16) 에 기재된 방법,

<46> (18) 피더 세포가 비바이러스 감염세포인 상기 (17) 에 기재된 방법,

<47> (19) CD44 에 결합활성을 가진 물질이 CD44 리간드 및/또는 항 CD44 항체인 상기 (15) ~ (18) 중 어느 한 항에 기재된 방법,

<48> (20) CD44 리간드가 히알루론산인 상기 (19) 에 기재된 방법,

<49> (21) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질이 성장인자에 결합활성을 가진 물질인 상기 (15) ~ (18) 중 어느 한 항에 기재된 방법,

<50> (22) 성장인자에 결합활성을 가진 물질이 항 성장인자 항체인 상기 (21) 에 기재된 방법,

<51> (23) 성장인자가 간세포증식인자, 인슐린양 증식인자-1 및 인슐린양 증식인자-2 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 성장인자인 상기 (15) ~ (18), (21) 및 (22) 중 어느 한 항에 기재된 방법,

<52> (22) 피브로넥틴의 프래그먼트가,

<53> (a) VLA-4 결합 도메인,

<54> (b) VLA-5 결합 도메인 및

<55> (c) 헤파린 결합 도메인

<56> 으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 도메인을 가진 프래그먼트인 상기 (15) 에 기재된 방법,

<57> (25) 상기 (1) ~ (24) 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 얻어진 세포상해성 T 세포함유 배양물로부터, 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 고함유하는 세포집단을 선택하는 공정을 포함하는 세포상해성 T 세포의 회수 방법,

<58> (26) 상기 (1) ~ (25) 중 어느 한 항에 기재된 방법으로 조제된 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포, 및

<59> (27) 상기 (26) 에 기재된 세포상해성 T 세포를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 치료제

<60> 에 관한 것이다.

<61> 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

<62> 본 발명은 하기 (A) ~ (E) 로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종의 물질 (본 발명에서는 당해물질을 유효성분으로서 사용함) 에 의해 의외로 CTL 의 항원특이적인 세포상해활성의 유지 또는 증강능 (이하 작용이라고

하는 경우가 있음) 이 발휘되는 것을 발견하여 완성하기에 이른 것이다.

<63> (A) CD44 에 결합활성을 가진 물질,

<64> (B) CD44 리간드가 CD44 에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질,

<65> (C) 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질,

<66> (D) 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질, 및

<67> (E) 피브로넥틴, 그 프래그먼트 또는 이들의 혼합물.

<68> 따라서 본 발명에 의해, 양자면역요법에 사용하기에 적합한 항원특이적인 세포상해활성을 높은 레벨로 유지한 CTL 을 유도, 유지 및 확대배양하는 방법이 제공된다.

<69> 이하 본 발명을 구체적으로 설명한다.

<70> (1) 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유도방법

<71> 통상 항원제시세포에 의해 유도된 CTL 은 유지, 증식시키는 동안에 그 항원특이적인 세포상해활성을 저하시켜 가는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 의해, 유도후의 세포를 장기간에 걸쳐 유지 혹은 이것을 증식시켜도, 종래 관찰된 것과 같은 항원특이적인 세포상해활성의 현저한 저하가 발생되지 않는 항원특이적인 CTL 의 유도방법이 제공된다.

<72> 본 발명의 CTL 의 유도방법은 상기 유효성분의 존재하에 CTL 을 유도하는 것을 하나의 큰 특징으로 한다. CTL 의 유도는 당해 유효성분의 존재하, 얻어지는 CTL 에 원하는 항원에 대한 인식능력을 부여하기 위해, 적절한 항원제시세포와 함께 CTL 로의 분화능을 가진 전구세포를 인큐베이트함으로써 실시된다. 전구세포는 CTL 이 되는 전단계에서, 게다가 CTL 로 분화되도록 운명지어져 있는 세포이면 특별히 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 말초혈단핵구 (PBMC), 나이브세포, 메모리세포 등을 들 수 있다. 항원제시세포는 T 세포에 대해 인식해야되는 항원을 제시하는 능력을 가진 세포이면 특별히 제한은 없다. 예를 들어 단구, B 세포, T 세포, 마크로파지, 수상세포, 선유아세포 등에 원하는 항원을 제시시켜 본 발명에 사용할 수 있다.

<73> 항원제시세포는 항원제시능을 가진 세포에 항원펩티드를 부가하고, 그 표면에 항원펩티드를 제시시킴으로써 조제할 수 있다 [예컨대, 베드나레크 M. A. 등 (Bednarek M. A. et al.), J. Immunol., 제 147 권, 제 12 호, 제 4047 ~ 4053 면 (1991) 을 참조]. 또 항원제시능을 가진 세포가 항원을 처리 (process) 하는 능력을 갖고 있는 경우에는, 당해 세포에 항원을 부가함으로써 항원이 세포내에 도입되어 프로세싱을 받아, 단편화된 항원펩티드가 세포 표면에 제시된다. 또한 항원 펩티드를 항원제시능을 가진 세포에 부가하는 경우, 사용되는 항원제시세포, 유도하고자 하는 CTL 의 HLA 구속성에 합치되는 항원 펩티드가 사용된다.

<74> 또한 본 발명에서 사용되는 항원은 특별히 제한되지는 않고, 예를 들어 세균, 바이러스 등의 외래성 항원이나 종양관련 항원 (암 항원) 등의 내재성 항원 등을 들 수 있다.

<75> 본 발명에서는 항원제시세포는 비증식성으로 하는 것이 바람직하다. 세포를 비증식성으로 하기 위해서는 예를 들어 X 선 등의 방사선조사 또는 마이토마이신 (mitomycin) 등의 약제에 의한 처리를 실행하면 된다.

<76> 본 발명의 CTL 의 유도방법에서 사용되는 배지에는 특별히 한정은 없고, CTL, 그 전구세포, 그리고 항원제시세포의 유지, 생육에 필요한 성분을 혼합하여 제작된 공지된 배지를 사용할 수 있고, 예를 들어 시판되는 배지이어도 된다. 이들 배지는 그 본래의 구성성분 이외에 적당한 단백질, 사이토카인류, 기타 성분을 함유할 수도 있다. 바람직하게는 인터로이킨-2 (IL-2) 를 함유하는 배지가 본 발명에 사용된다. 또 이들의 단백질, 사이토카인류, 기타 성분은 본 발명의 방법에 사용하는 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체 (基體) 에 고정화하여 사용해도 된다. 이들 성분은 원하는 효과를 얻을 수 있는 양으로 후술하는 바와 같은 공지된 고정화방법에 의해 배양기재 등에 고정화하면 된다.

<77> CD44 는 조혈계 세포, 선유아세포, 마크로파지 등에 널리 존재하고 있는 세포표면 리셉터로, 히알루론산, 헤파란황산, 콘드로이틴황산, 오스테오폰틴, 콜라겐타입1, 콜라겐타입4, 피브로넥틴, 셀글리신 등이 그 리간드로서 보고되어 있다. 그 기능으로서는 세포-세포간 및 세포-세포외 기질간의 접착을 통한 세포내로의 정보전달에 의해 다른 접착분자의 활성화, 사이토카인 산생 등의 기능을 발휘하는 것이 알려져 있다. CD44 는 CTL 에도 존재하고 있고, CD44 에 히알루론산이나 항 CD44 항체가 결합되면 CD44 의 세포내영역에 존재하는 티로신키나아제 도메인의 활성화, 이에 의한 세포내 기질 단백질의 티로신의 인산화가 일어나 세포내 정보전달이 실행되는

것으로 알려져 있다. 즉, CD44 에 그 리간드나 항 CD44 항체가 결합됨으로써 시그널이 발생되어 각종 기능으로 이어지는 것으로 알려져 있다.

<78> 본 발명에서 CD44 에 결합활성을 가진 물질로서는, CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능을 나타내는 한 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 CD44 리간드 및/또는 항 CD44 항체가 예시된다. CD44 리간드로서는 CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능을 나타내는 한 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 히알루론산, 헤파란황산, 콘드로이틴황산, 오스테오폰틴, 콜라겐타입1, 콜라겐타입4, 피브로넥틴, 셀글리신 등을 들 수 있고, 특히 바람직한 히알루론산이 예시된다. 또, 항 CD44 항체로서는 CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능을 나타내는 한 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 시판되는 항 CD44 항체를 사용할 수 있고, 유도체, 예를 들어 형광표지화유도체 등도 CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능을 나타내는 한 특별히 한정없이 사용할 수 있다.

<79> 또, 본 발명에서는 CD44 와 CD44 에 결합활성을 가진 물질과의 결합 유무에 관계없이, CD44 리간드가 CD44 에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어하는 것에 의해서도 원하는 효과를 얻을 수 있다. 즉, 본 발명은 CD44 에 결합활성을 가진 물질 대신에 CD44 리간드가 CD44 에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질을 유효성분으로서 사용해도 실시할 수 있다. 여기에서 CD44 리간드가 CD44 에 결합됨으로써 발생되는 시그널로서는 당해 시그널을 수취한 생체분자로부터 발생되는 시그널도 포함한다. 즉 당해 시그널로서는, 예를 들어 CD44 의 세포내영역에 존재하는 티로신키나아제 도메인의 활성화, 활성화된 상기 티로신키나아제에 의한 세포내 기질 단백질의 티로신의 인산화 등을 들 수 있고, 이들의 시그널을 제어하는 물질로서는 예를 들어 각종 인산화효소 등을 들 수 있다. 또한 본 명세서에서 제어란, 시그널 전달경로에서 활성화된 정보를 하류역으로 전달하는 것, 또는 활성화된 정보의 하류역으로의 전달을 저해하는 것을 말한다.

<80> 성장인자는 각종 세포의 분열이나 발달을 촉진하는 폴리펩티드의 총칭으로, 세포막상의 특이적 리셉터를 통해 표적세포에 작용하고, 그 리셉터의 대부분은 세포내 영역에 존재하는 티로신키나아제 도메인을 활성화하여 표적세포로의 정보전달이 실행되는 것으로 알려져 있다.

<81> 본 발명에서 성장인자로서는 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합이 저해되거나, 혹은 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합에 의해 발생되는 시그널이 제어됨으로써, CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능이 나타나는 것인 한 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 간세포 증식인자 (HGF), 인슐린양 증식인자-1 (IGF-1), 인슐린양 증식인자-2 (IGF-2), 신경성장인자 (NGF), 신경영양성인자, 상피성장인자, 밀크유래 성장인자, 염기성 선유아세포 증식인자 (bFGF), 뇌유래 선유아세포 성장인자, 산성 선유아세포 증식인자, 켈라티노사이트 증식인자, 혈소판유래 성장인자 (PDGF), 혈소판염기성 단백질, 혈소판 제 4 인자, 결합조직활성화펩티드, 콜로니형성자극인자, 에리트로포에틴, 트롬보포에틴, T 세포성장인자, B 세포성장인자, 연골유래인자, 연골유래성장인자, 골유래성장인자, 골격성장인자, 내피세포성장인자, 내피세포유래 성장인자, 안(眼)유래 성장인자, 정소유래 성장인자, 셀트리세포유래 성장인자, 유선자극인자, 척수유래 성장인자, 마크로파지유래 성장인자, 리사이클간엽성장인자, 형질전환증식인자-α, 형질전환증식인자-β, 헤파린 결합성 EGF 양 증식인자, 안피레그린, 평활근세포유래 성장인자 (SDGF), 베타셀루린, 에피레그린, 뉴레그린-1, -2 및 -3, 혈관내피증식인자, 뉴로트로핀, 뇌유래 신경영양인자 (BNDE), 뉴로트로핀 (NT)-3, -4, -5, -6 및 -7, 그리아세포주유래 신경영양성인자, 줄기세포인자, 미드카인, 플레이오트로핀, Ephrin, Angiopoietin, 액티빈, 종양괴사인자 등이 예시된다. 본 발명에 의하면 성장인자로서는 바람직하게 간세포증식인자, 인슐린양 증식인자-1, 인슐린양 증식인자-2 가 예시된다.

<82> HGF 는 간세포증식작용, 단백질합성촉진작용, 담즙울체개선작용, 나아가서는 약제에 의한 신장장해의 예방작용 등을 나타내는 성장인자이다. HGF 의 리셉터로서는 c-Met 가 알려져 있고, HGF 가 나타내는 다양한 생리작용은 전부 c-Met 를 통해 실행되고 있다. c-Met 는 그 세포내 도메인에 티로신키나아제 도메인을 갖고 있다.

<83> 인슐린양 증식인자 (IGF) 는 인슐린 항체로 중화할 수 없는 인슐린양의 활성물질이다. IGF 에는 IGF-1 과 IGF-2 의 2 종이 존재하는 것으로 알려져 있다. IGF 가 결합되는 리셉터에는 인슐린 리셉터, IGF-1 리셉터, IGF-2 리셉터가 있고, 특히 인슐린 리렙터 및 IGF-1 리셉터에는 그 세포내 도메인에 티로신키나아제 도메인을 갖고 있다.

<84> 본 발명에서 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질로서는 CTL 의 특이적인 세포상해활성의 유지 혹은 증강능을 나타내는 한 특별히 한정되지는 않지만, 성장인자에 결합활성을 갖고, 성장인자와 복합체를 형성함으로써 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합되는 것을 저해하는 물질, 혹은 성장인자 리셉터에 결합활성을 갖고, 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합되는 것을 저해하는 물질을 들 수 있다. 전자로서는 예를

들어 항 성장인자 항체, 바람직하게는 항 HGF 항체, 항 IGF-1 항체, 항 IGF-2 항체가 예시된다. 또 후자로서는 예를 들어 항 성장인자 리셉터 항체, 바람직하게는 c-Met 항체, 항 인슐린 리셉터 항체, 항 IGF-1 리셉터 항체, 항 IGF-2 리셉터 항체가 예시된다.

<85> 또 본 발명에서는 상장인자와 성장인자 리셉터의 결합 유무에 관계없이 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어하는 것에 의해서도 원하는 효과를 얻을 수 있다. 즉, 본 발명은 성장인자의 성장인자 리셉터로의 결합을 저해할 수 있는 물질 대신에, 성장인자가 성장인자 리셉터에 결합됨으로써 발생되는 시그널을 제어할 수 있는 물질을 유효성분으로서 사용해도 실시할 수 있다. 여기에서 성장인자가 성장인자에 결합됨으로써 발생되는 시그널로서는 당해 시그널을 수취한 생체분자로부터 발생되는 시그널도 포함한다.

당해 시그널로서는 예를 들어 성장인자의 세포내영역에 존재하는 티로신키나아제 도메인의 활성화, 이에 의한 세포내 기질 단백질의 티로신의 인산화 등을 들 수 있고, 이들 시그널을 제어하는 물질로서는 예를 들어 키나아제 인히비터 등을 들 수 있다.

<86> 본 명세서내에 기재된 피브로넥틴 및 그 프래그먼트는 천연에서 얻어진 것, 또는 관용의 유전자재조합기술 등을 이용하여 인위적으로 합성된 것 중 어느 것이어도 된다. 피브로넥틴 및 그 프래그먼트는 예를 들어 루오슬라티 E. 등 [Ruoslahti E., et al, 저널 오브 바이올로지컬 케미스트리 (J. Biol. Chem.), 제 256 권, 제 14 호, 제 7277 ~ 7281 면 (1981)] 의 개시에 의거하여, 천연기원의 물질로부터 실질적으로 순수한 형태로 제조할 수 있다. 여기에서 본 명세서에 기재된 실질적으로 순수한 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 프래그먼트는 이들이 천연에서 피브로넥틴과 함께 존재하는, 그 공급원에서 유래하는 다른 단백질 등을 본질적으로 함유하지 않는 것을 의미한다. 상기 피브로넥틴 및 그 프래그먼트는 각각 단독으로 또는 복수 종류의 것을 혼합하여 본 발명에 사용할 수 있다.

<87> 본 발명에 사용할 수 있는 피브로넥틴 프래그먼트 및 이 프래그먼트의 조제에 관한 유용한 정보는, 키미즈카 F. 등 [Kimizuka F., et al., 저널 오브 바이오케미스트리 (J. Biochem.), 제 110 권, 제 2 호, 제 284 ~ 291 면 (1991)], 콘블리트 A. R. 등 [Kornblihtt A. R. et al., EMBO 저널 (EMBO J.), 제 4 권, 제 7 호, 1755 ~ 1759 (1985)] 및 세키구치 K. 등 [Sekiguchi K., et al, 바이오케미스트리 (Biochemistry), 제 25 권, 제 17 호, 제 4936 ~ 4941 면 (1986)] 등에서 얻을 수 있다.

<88> 피브로넥틴은 분자량 220 ~ 250 kD 의 거대한 당단백질로, 콜라겐, 헤파린, 피브린, 인테그린 패밀리의 VLA-4 및 VLA-5, 세포, 세균 등 많은 생체고분자와 결합한다. 또 피브로넥틴 분자는 그 기능적 영역으로서 약간의 도메인 구조로 나누어져 있다 (대사 Vol. 23, No. 11 (1986)). 도메인 1 은 분자량 약 30,000 으로, 헤파린, 피브린, 황색포도구균 등에 결합된다. 도메인 2 는 분자량 약 40,000 으로, 콜라겐에 결합된다. 도메인 3 은 분자량 약 20,000 으로, 피브린에 약하게 결합되는 것으로 생각된다. 도메인 4 는 분자량 약 75,000 으로, 세포결합 도메인이다. 도메인 5 (헤파린 결합 도메인) 는 분자량 약 35,000 으로, 헤파린에 강하게 결합된다. 도메인 6 은 분자량 약 30,000 으로, 피브린에 결합된다. 도메인 7 은 카르복실 말단의 분자량 약 3,000 의 도메인이다. 또한, 도메인 4 에는 VLA-5 결합 도메인이 포함되고, 도메인 5 와 6 사이에는 VLA-4 결합 도메인이 포함된다. 또, 피브로넥틴은 ED-A, ED-B, IIICS 와 같은 3 개의 모듈을 갖고 있고, 선택적 스플라이싱이 실행되는 것으로 알려져 있다. 또한 IIICS 에는 세포접착활성을 가진 CS-1 및 CS-5 를 갖고 있다 (FIBRONECTIN, Edited BY Deane F. Mosher, ACADEMIC PRESS, INC, (1989)).

<89> 본 발명에서는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 피브로넥틴 프래그먼트로서는 바람직하게는 이들의 도메인 1 ~ 7, VLA-4 결합 도메인, VLA-5 결합 도메인, ED-A, ED-B, IIICS, CS-1 및 CS-5 에서 선택되는 영역을 가진 프래그먼트가 예시된다. 또, 본 발명에 사용되는 피브로넥틴 프래그먼트의 분자량으로서는 특별히 한정되지는 않지만 바람직하게는 1 ~ 200 kD, 보다 바람직하게는 5 ~ 190 kD, 더욱 바람직하게는 10 ~ 180 kD 의 프래그먼트가 바람직하게 사용된다.

<90> 본 발명에서는 특히 바람직한 피브로넥틴 프래그먼트로서는 (a) 피브로넥틴유래의 세포결합 도메인인 인테그린 α5β1 (VLA-5) 결합 도메인, (b) 인테그린 α4β1 (VLA-4) 결합 도메인 및 (c) 헤파린 결합 도메인으로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 도메인을 가진 프래그먼트가 바람직하게 사용된다. VLA-5 결합 도메인을 함유하는 프래그먼트로서는 서열번호 : 1 에 기재된 아미노산서열을 가진 프래그먼트가, VLA-4 결합 도메인을 가진 프래그먼트로서는 서열번호 : 2 에 기재된 아미노산서열을 가진 프래그먼트가, 또한 헤파린 결합 도메인을 함유하는 프래그먼트로서는 서열번호 : 3 에 기재된 아미노산서열을 가진 프래그먼트가 각각 예시된다.

<91> 또한 본 발명에서 바람직하게 사용되는 프래그먼트로서는 상기 결합활성을 갖고 있는 범위에서 피브로넥틴유래의 아미노산 서열에 1 이상의 아미노산의 치환, 결실, 삽입, 부가를 가질 수도 있다. 예를 들어 2 개의 다

른 도메인 사이에 링커로서 1 이상의 아미노산이 삽입된 프래그먼트도 본 발명에 사용할 수 있다.

<92> 본 명세서중에 기재된 실질적으로 순수한 피브로넥틴 프래그먼트는, 예를 들어 미국특허 제 5,198,423 호의 기재에 의거하여 유전자 재조합체로부터 제조할 수도 있다. 특히 하기 실시예에서 H-271 (서열번호 : 3), H-296 (서열번호 : 4), CH-271 (서열번호 : 5) 및 CH-296 (서열번호 : 6) 으로서 기재되어 있는 재조합 프래그먼트 및 이들을 취득하는 방법은, 이 특허에 상세하게 기재되어 있다. 또 하기 실시예에서 사용한 C-274 프래그먼트 (서열번호 : 1) 는, 미국특허 제 5,102,988 호에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있다. 또한 C-CSI 프래그먼트 (서열번호 : 7) 는 일본특허 제 3104178 호에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있다.

<93> 상기의 CH-271, CH-296, C-274, C-CS1 의 각 프래그먼트는 VLA-5 에 결합되는 활성을 가진 세포결합 도메인을 가진 폴리펩티드이다. 또 C-CS1, H-296, CH-296 은 VLA-4 에 결합하는 활성을 가진 세포결합 도메인을 가진 폴리펩티드이다. 또한 H-271, H-296, CH-271 및 CH-296 은 헤파린 결합 도메인을 가진 폴리펩티드이다.

<94> 상기 각 도메인이 개변된 프래그먼트도 본 발명에 사용할 수 있다. 피브로넥틴의 헤파린 결합부위는 3 개의 III 형 유사서열 (III-12, III-13, III-14) 에 의해 구성되어 있다. 상기 III 형 유사서열 중의 하나 혹은 2 개를 결실한 헤파린 결합부위를 포함하는 프래그먼트도 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어 피브로넥틴의 세포결합부위 (VLA-5 결합 도메인, Pro1239 ~ Ser1515) 와 1 개의 III형 유사서열이 결합된 프래그먼트인 CHV-89 (서열번호 : 8), CHV-90 (서열번호 : 9), CHV-92 (서열번호 : 10), 혹은 2 개의 III 형 유사서열이 결합된 프래그먼트인 CHV-179 (서열번호 : 11), CHV-181 (서열번호 : 12) 이 예시된다. CHV-89, CHV-90, CHV-92 는 각각 III-13, III-14, III-12 를 함유하는 것으로, CHV-179 는 III-13 과 III-14 를, CHV-181 은 III-12 와 III-13 을 각각 함유한다. CHV-89, CHV-90, CHV-179 는 일본특허 제 2729712 호에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있다. 또 CHV-181 은 국제공개 제 97/18318 호 팜플렛에 기재된 방법에 의해 얻을 수 있다. 또한 CHV-92 는 상기 문헌에 기재된 플라스미드에 의거하여 정형적으로 플라스미드를 구축하고, 이 플라스미드를 사용하여 유전자공학적으로 취득할 수 있다.

<95> 또 하기 실시예에 사용된 H-275-Cys (서열번호 : 13) 는 피브로넥틴의 헤파린 결합 도메인을 갖고, 또한 C 말단에 시스테인 잔기를 가진 프래그먼트이다. 당해 프래그먼트도 본 발명에 사용할 수 있다.

<96> 이들 프래그먼트 또는 이들 프래그먼트로부터 정형적으로 유도할 수 있는 프래그먼트는 우편번호 305-8566 일본국 이바라기겡 쓰꾸바시 히가시 1 쵸메 1 번지 1 중앙 제 6 독립행정법인 산업기술종합연구소 특허미생물기탁센터 (구 통상산업성 공업기술원 미생물공업기술연구소) 에 하기 수탁번호하에 기탁된 미생물을 사용하여 제조하거나, 혹은 각 미생물이 보유하는 플라스미드를 공지된 방법 (예를 들어 부위특이적 변이유발 등) 에 의해 개변함으로써 제조할 수 있다 ;

<97> FERM BP-2799 (H-271 을 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<98> 국제기탁일 : 1989 년 5 월 12 일

<99> FERM BP-2800 (CH-296 을 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<100> 국제기탁일 : 1989 년 5 월 12 일

<101> FERM BP-5723 (C-CS1 을 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<102> 원기탁일 : 1990 년 3 월 5 일

<103> 국제기탁으로의 이관청구일 : 1996 년 10 월 23 일

<104> FERM P-10721 (H-296 을 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<105> 일본국내기탁일 : 1989 년 5 월 12 일

<106> FERM P-12182 (CHV-89 를 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<107> 일본국내기탁일 : 1991 년 4 월 8 일

<108> FERM P-12183 (CHV-179 를 코드하는 플라스미드를 보유하는 대장균),

<109> 일본국내기탁일 : 1991 년 4 월 8 일

<110> 본 발명에서 사용되는 프래그먼트의 세포결합 도메인과 세포의 결합은 관용 방법을 사용하여 행할 수 있다. 예를 들어 이와 같은 방법에는, 윌리엄즈 D. A. 등의 방법 [Williams D. A. et al., Nature, 제 352 권, 제

6334 호, 제 438 ~ 441 면 (1991)] 이 포함된다. 당해 방법은 배양 플레이트에 고정화한 프래그먼트에 대한 세포의 결합을 측정하는 방법이다.

<111> 또 상기 방법에 있어서, 세포 대신에 헤파린, 예를 들어 표지 헤파린을 사용함으로써, 동일한 방법으로 프래그먼트의 헤파린 결합 도메인의 평가를 실행할 수 있다.

<112> 상기 서술한 바와 같이 피브로넥틴은 거대분자이기 때문에, 그 편리성 면에서 본 발명에서 사용되기에는 피브로넥틴 프래그먼트가 바람직하게 사용된다. 또 본 발명에 사용되는 피브로넥틴 또는 그 프래그먼트는 동물유래의 혈장이나 장기로부터 얻어지는 것을 사용한 경우, 동물에서 유래하는 바이러스 (HCV, HIV 등) 의 콘터미네이션, 순도, 균일성에 대해 주의할 필요가 있는 점에서, 특히 바람직하게는 상기와 같이 유전자공학적으로 얻어진 피브로넥틴 또는 그 프래그먼트를 사용하는 것이 바람직하다.

<113> 본 발명에서 사용하는 유효성분은 단독으로 혹은 2 종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.

<114> 본 발명에서는 CTL 로의 분화능을 가진 전구세포를 항원제시세포와 함께 인큐베이트 (공배양) 하여 CTL 을 유도하기 위한 일반적인 조건은 공지된 조건 [예컨대 베드나레크 M. A. (Bednarek M. A.) 등, J. Immunol., 제 147 권, 제 12 호, 제 4047 ~ 4053 면 (1991) 을 참조] 에 따르면 된다. 공배양 조건에는 특별히 한정은 없고, 통상의 세포배양에 사용되는 조건을 사용할 수 있고, 예를 들어 37℃, 5% CO_2 와 같은 조건에서 배양할 수 있다. 이 공배양은 통상 2 ~ 15 일 정도 실시되는데, 그 동안에 항원제시세포를 새로 조제한 것으로 교체하여 재자극을 실행해도 된다. 또 적당한 시간간격으로 배지를 신선한 것으로 교환할 수 있다.

<115> 공배양을 실행하는 배지중에서의, 본 발명의 유효성분의 함유량은 원하는 효과가 얻어지면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 바람직하게는 0.001 ~ 1000 ㎍/㎖, 보다 바람직하게는 0.01 ~ 100 ㎍/㎖ 이다. 또한 본 명세서에서 유효성분 등의 성분을 배지중에 함유한다는 것은 세포배양시에 배지를 넣어 사용하는 배양기재나, 배지에 넣어 사용하는 마이크로 비즈 등의 기체에 당해 성분을 고정화해 놓고, 이들 기체와 배지를 접촉시켜, 당해 성분 (배지와의 접촉후, 기체에 고정화되어 있는지 여부를 불문하고) 을 배지에 함유한다는 태양도 포함한다. 또한 유효성분은 배지중에 용해 혹은 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체에 고정화하여 존재시키는 것이 바람직하다. 또 상기 유효성분으로서는 히알루론산, 항 CD44 항체, 항 HGF 항체, 항 IGF-1 항체, 항 IGF-2 항체 및 피브로넥틴 프래그먼트로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종이 바람직하다.

<116> 이렇게 하여 유도된 CTL 은 원하는 항원을 특이적으로 인식하는 능력을 갖고 있고, 예를 들어 이 항원을 가진 세포를 그 세포상해활성에 의해 특이적으로 파괴한다. 이 CTL 의 세포상해활성은 공지된 방법에 의해 평가할 수 있다. 예를 들어 항원제시세포에 의해 제시된 펩티드와 방사성물질, 형광물질 등으로 표지한 표적세포에 대한 상해성, 방사능의 도입에 의해 측정할 수 있는 CTL 증식의 항원특이적인 증가 혹은 CTL 이나 표적세포로부터 항원특이적으로 유리되는 GM-CSF, INF-γ 등의 사이토카인량을 측정함으로써 평가할 수 있다 (후술하는 실시예 1-1-(3) 참조). 그 외 형광색소 등에 의해 표지된 항원 펩티드나 복합체의 사용에 의해 직접 확인할 수도 있다. 이 경우, 예를 들어 CTL을 CTL 특이성 항체와 커플링시킨 제 1 형광마커와 접촉시킨 후 제 2 형광마커와 커플링시킨 항원 펩티드-MHC 복합체를 접촉시키고, 그리고 이중표지세포의 존재를 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 분석함으로써 평가할 수 있다.

<117> 본 발명의 방법에 의해 유도된 CTL 은 유도후의 세포를 장기간에 걸쳐 유지, 혹은 이것을 급속하게 증식시켜도, 종래 관찰된 바와 같은 항원특이적인 세포상해활성의 현저한 저하가 없다는 우수한 성질을 갖고 있다. 따라서 유도된 CTL 을 클론화함으로써 안정된 세포상해활성을 가진 림프구로서 유지할 수도 있다. 예를 들어 유도된 CTL 에 항원, 각종 사이토카인, 항 CD3 항체 자극을 부여함으로써 증식시켜 확대배양할 수 있다. 이 CTL 의 유지, 확대배양에는 특별히 한정은 없고 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어 후술하는 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유지방법, 확대배양방법의 사용이 적합하다.

<118> (2) 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유지방법

<119> 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유지방법은 CTL 을 항원특이적인 세포상해활성을 유지한 상태로 유지하는 방법이다. 이 방법은 본 발명의 유효성분을 함유하는 배지중에서 CTL 을 계속 배양하는 것을 하나의 큰 특징으로 하고, 이 세포가 가진 항원특이적인 세포상해활성을 계속적으로 유지시킬 수 있다.

<120> 상기 방법을 적용가능한 CTL 에는 한정은 없고, 공지된 방법으로 얻어진 CTL 을 그 항원특이적인 세포상해활성을 유지시킨 상태에서 본 발명의 방법으로 유지할 수 있다. 또 상기 (1) 에 기재된 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유도방법에 의해 얻어진 CTL 의 유지에도 바람직하게 사용된다.

<121> 본 발명에서는 CTL 의 계속배양의 일반적인 조건은 공지된 조건 [예를 들면 커터 J. 등 (Carter J. et al.), 이뮤놀로지 (Immunology), 제 57 권, 제 1 호, 제 123 ~ 129 면 (1986) 을 참조] 에 따르면 된다. 본 발명의 세포상해성 T 세포의 유지방법에 사용되는 배지에도 특별히 한정은 없고, 예를 들어 상기 CTL 의 유도방법에 사용되는 배지를 사용할 수 있다.

<122> 본 발명의 방법은 상기 유효성분을 함유하는 배지에 의해 실시된다. 배양을 실행하는 배지중에서의, 본 발명의 유효성분의 함유량은 원하는 효과가 얻어지면 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 0.001 ~ 1000 ㎍/㎖, 보다 바람직하게는 0.01 ~ 100 ㎍/㎖ 이다. 또한 유효성분은 배지중에 용해 혹은 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체에 고정화하여 존재시키는 것이 바람직하다. 또 상기 유효성분으로서는 히알루론산, 항 CD44 항체, 항 HGF 항체, 항 IGF-1 항체, 항 IGF-2 항체 및 피브로넥틴 프래그먼트로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종이 바람직하다. 또한 배지에는 사이토카인이나 그 외의 공지된 성분을 첨가할 수 있다. 본 발명에 바람직하게는 IL-2 를 함유하는 배지가 사용된다. 또 상기와 동일하게 이들의 사이토카인이나 그 외의 공지된 성분은 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체에 고정화하여 사용해도 된다. 배양조건에는 특별히 한정은 없고, 통상의 세포배양에 사용되는 조건을 사용할 수 있으며, 예를 들어 37℃, 5% CO_2 등의 조건에서 배양할 수 있다. 또 적당한 시간간격으로 배지를 신선한 것으로 교환할 수 있다.

<123> 상기와 같이 본 발명의 유효성분을 함유하는 배지중에서 CTL 을 계속적으로 배양함으로써, 그 특이적인 세포상해활성의 저하를 억제하여 CTL 을 유지할 수 있다. 이와 같은 본 발명의 효과는 본 발명의 방법으로 유지된 CTL 이 가진 세포상해활성을 실시예 1-1-(3) 에 기재된 방법에 의해 측정하여 확인할 수 있다. 또 이 방법으로 유지된 CTL 은 공지된 확대배양법에 의해 증식시킬 수 있고, 이렇게 하여 증식된 CTL 도 특이적으로 세포상해활성을 유지하고 있다. 또한 CTL 의 확대배양방법으로서는 후술하는 본 발명의 CTL 의 확대배양방법을 바람직하게 사용할 수 있다.

<124> (3) 본 발명의 세포상해성 T 세포의 확대배양방법

<125> 세포상해성 T 세포는 적절한 조건하에서 배양을 실행함으로써, 세포수를 증가시킬 수 있다 (확대배양). 종래부터 약간의 CTL 확대배양방법이 개발되고 있으나, 단기간에 효율적으로 CTL 을 증식시키는 것이 가능한 것으로서 리델 (Riddell) 등이 개발한 상기 서술한 REM 법이 알려져 있다. 이 방법은 X 선 조사에 의해 비증식성으로 한 PBMC (피더 세포로서 사용) 과 EBV 로 형질전환된 B 세포 (EBV-B 세포) 를 사용하고, IL-2, 항 CD3 모노클로날 항체의 존재하에 CTL 을 배양하는 방법이다. 그러나 이 방법에서는 T 세포로의 EBV-B 세포의 혼입 위험성을 부정할 수 없는 점에서 문제가 되었다.

<126> 본 발명의 세포상해성 T 세포의 확대배양방법은 항원특이적인 세포상해활성을 유지한 상태에서 당해 세포수를 증가시킬 수 있는 방법이다. 이 방법은 본 발명의 상기 유효성분의 존재하에 세포를 인큐베이트 (배양) 하는 것을 특징으로 한다.

<127> 본 발명의 방법에 있어서, 적용가능한 CTL 에는 한정은 없고, 생체로부터 얻어진 세포상해활성을 가진 CTL, 공지된 방법으로 유도된 CTL, 상기 (1) 에 기재된 본 발명의 CTL 의 유도방법에 의해 얻어진 CTL, 상기 (2) 에 기재된 본 발명의 CTL 의 유지방법에 의해 유지된 CTL 을, 본 발명의 CTL 의 확대배양에 적합하게 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 있어서는, CTL 확대배양의 일반적인 조건은 공지된 조건 [예를 들어 우버티 J. P. 등 (Uberti J. P. et al.), 클리니컬 이뮤놀로지 앤드 이뮤노파솔로지 (Clin. Immunol. Immunopathol.), 제 70 권, 제 3 호, 제 234 ~ 240 면 (1994) 을 참조] 에 따르면 된다.

<128> 본 발명의 세포상해성 T 세포의 확대배양방법에 있어서는, 상기 유효성분에 더하여 항 CD3 항체, 바람직하게는 항 CD3 모노클로날 항체를 추가로 함유하는 배지중에서 CTL 을 공배양하는 것이 바람직하다. 또 추가로 바람직하게는 CTL 은 적절한 피더 세포와 공배양된다.

<129> 상기 방법에 사용되는 배지에는 특별히 한정은 없고, CTL 의 배양, 생육에 필요한 성분을 혼합하여 제작된 공지된 배지를 사용할 수 있고, 예를 들어 시판되는 배지이어도 된다. 또한 CTL 을 피더 세포와 공배양하는 경우에는, CTL, 피더 세포의 양자의 유지, 생육에 적합한 배지인 것이 바람직하다. 이들 배지는 그 본래의 구성성분 이외에 적당한 단백질, 사이토카인류, 그 외의 공지된 성분을 함유할 수도 있고, 예를 들어 IL-2 를 함유하는 배지가 본 발명에 적합하게 사용된다. 항 CD3 항체, 특히 항 CD3 모노클로날 항체는 CTL 상의 T 세포 리셉터를 활성화하는 목적에서 첨가할 수 있다. 또한 항 CD3 항체의 배지중에서의 함유량은 공지된 조건에 따라 결정하면 되고, 예를 들어 0.01 ~ 400 ㎍/㎖ 가 바람직하다. 또한 이들의 단백질, 사이토카인류, 그 외의 공지된 성분에 대해서는, 배지중에 용해하여 함유시켜도 되고, 또 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체

에 고정화하여 함유시켜도 된다.

<130> 본 발명의 CTL 의 확대배양방법은 상기 유효성분을 배지에 함유시켜 실시된다. 또한 상기 유효성분으로서는 히알루론산, 항 CD44 항체, 항 HGF 항체, 항 IGF-1 항체, 항 IGF-2 항체 및 피브로넥틴프래그먼트로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1 종이 바람직하다. 또 배양을 실행하는 배지중에서의, 본 발명의 유효성분의 함유량은 원하는 효과가 얻어지면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 0.001 ~ 1000 ㎍/㎖, 보다 바람직하게는 0.01 ~ 100 ㎍/㎖ 이다. 또한 유효성분은 배지중에 용해 혹은 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체에 고정화하여 존재시키는 것이 바람직하다.

<131> 본 발명의 방법에 사용되는 피더 세포는 항 CD3 항체, 특히 항 CD3 모노클로날 항체와 협동하여 CTL 을 자극하고, T 세포 리셉터 또는 부자극수용체 (costimulatory signal receptor) 를 활성화하는 것이면 특별히 한정은 없다. 본 발명에는 예를 들어 PBMC 나 EBV-B 세포가 사용된다. 통상 피더 세포는 방사선 조사와 같은 수단으로 증식능을 제거한 후에 사용된다. 또한 피더 세포의 배지중에서의 함유량은 공지된 방법에 따라 결정하면 되고, 예를 들어 1 $\times 10^5$ ~ 1 $\times 10^7$ cells/㎖ 가 바람직하다.

<132> 본 발명의 특히 바람직한 태양에 있어서는, 피더 세포로서 비바이러스 감염세포, 예를 들어 EBV-B 세포 이외의 것, 구체적으로는 자기(自己) 혹은 비자기 유래의 PBMC 등이 사용된다. 이에 의해 확대배양된 CTL 중에 EBV-B 세포가 혼재될 가능성을 배제할 수 있고, 양자면역요법과 같은 CTL 을 이용한 의료의 안전성을 높일 수 있게 된다.

<133> 본 발명의 CTL 확대배양방법에 있어서 그 배양조건에는 특별히 한정은 없고, 통상의 세포배양에 사용되는 조건을 사용할 수 있으며, 예를 들어 37℃, 5% CO_2 등의 조건에서 배양할 수 있다. 또 적당한 시간간격으로 배지를 신선한 것으로 교환할 수 있다.

<134> 또한 본 발명의 CTL 확대배양방법에 대해서는, 상기 유효성분을 사용하고 있는 배지에 함유시키고 있으면 특별히 한정은 없고, 상기 이외의 종래의 CTL 확대배양법에 있어서 본 발명의 유효성분을 배지에 함유시키는 태양도 본 발명에 포함된다.

<135> 본 발명의 확대배양방법에 의하면, 예를 들어 14 일간의 확대배양에 의해 10^2 ~ 10^3 배로 세포수가 증가된 CTL 을 얻을 수 있다. 또한 이렇게 하여 얻어진 CTL 은 종래의 CTL 확대배양법, 예를 들어 REM 법으로 얻어진 것에 비하여 보다 높은 항원특이적인 세포상해활성을 유지하고 있다.

<136> 이와 같은 본 발명의 효과는, 본 발명의 방법으로 확대배양된 CTL 이 가진 세포상해활성을, 실시예 1-1-(3) 에 기재된 방법에 의해 측정하여 확인할 수 있다.

<137> 또 본 발명에 사용되는 유효성분은 CTL 의 항원특이적인 세포상해활성의 유지 또는 증강에 작용하는, CTL 유도제, CTL 유지제 혹은 CTL 확대배양제 (이하 이들을 CTL 배양제라고 함) 로서 사용할 수 있다. 당해 CTL 배양제는 유효성분 그 자체, 또는 추가로 그 외의 임의의 성분, 예를 들어 CTL 의 유도방법에서 사용되는 배지, CTL 의 유지방법에서 사용되는 배지 또는 CTL 의 확대배양방법에서 사용되는 배지에 함유되는, CTL 이나 피더세포 등의 배양, 생육에 필요한 성분, 그리고 적당한 단백질, 사이토카인류 (바람직하게는 IL-2), 원하는 기타 성분으로 이루어진다. 또 CTL 배양제를 함유하는 배지는 CTL 유도용, 유지용, 혹은 확대배양용 배지 (CTL 용 배지) 로서 사용할 수 있다. 또 이들의 CTL 배양제는 배지에 혼합 (용해를 포함) 시켜 두어도 되고, 배양기재나 마이크로 비즈 등의 기체에 고정화시켜 두어도 된다. 이들 배지는 세포배양을 위한 기본적인 성분을 임의로 함유하는 것이다. 또한 상기 CTL 배양제 및 CTL 용 배지는 원하는 성분을 공지된 방법으로 적절하게 혼합함으로써 제조할 수 있다.

<138> 또한 본 발명에 의하면 예를 들어 배양 플레이트, 샬레, 플라스크, 백 등의 임의의 배양기재 (용기), 혹은 비즈, 멤브레인과 같은 지지담체 등의 기체 (상세하게는 세포배양시에 배지가 접촉하는 기체의 부분) 에 상기 유효성분을 고정화하여 이루어지는 CTL 유도용, 유지용 또는 확대배양용의, 이들 기체를 제공할 수도 있다. 기체에 대한 유효성분의 고정화량으로서는 본 발명의 원하는 효과가 얻어지면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 당해 기체를 사용하여 CTL 을 유도하는 등의 경우에, 유효성분이 본 발명의 CTL 유도방법, 유지방법 또는 확대배양방법의 설명에서 기재한 유효성분의 바람직한 배지함유량 범위에서, 기체에서 사용하는 임의의 배지중에 함유될 수 있게 되는 양인 것이 바람직하다. 또 상기 유효성분에 추가하여 임의로 상기 단백질, 사이토카인류, 기타 성분을 고정화해도 된다. 고정화 방법으로서는 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면 단백질 흡착, 비오틴과 아비딘 혹은 스트렙토아비딘의 결합, 화학적 고정화 등의 공지된 고정화방법을 사용할

수 있다. 당해 기재는 본 발명의 CTL 유도방법, 유지방법 또는 확대배양방법에서 바람직하게 사용된다.

<139> 상기 CTL 의 유도방법, 유지방법 그리고 확대배양방법을 사용함으로써 얻어진 CTL 함유 배양물 중에서는 통상 헬퍼 T 세포 등의 CTL 이외의 세포도 혼재되어 있다. 본 발명에서는 이 배양물로부터 원심분리 등에 의해 이 배양물 중의 세포를 회수하여, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 CTL 로서 그대로 사용할 수 있다.

<140> 또 다시 이 배양물로부터 공지된 방법에 의해, 항원특이적인 세포상해활성을 가진 CTL 을 고함유하는 세포집단(혹은 배양물) 을 분리하여, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 CTL 로서 사용할 수도 있다. 즉, 본 발명에서는 상기 CTL 함유 배양물 중의 CTL 이외의 세포 (예를 들어 헬퍼 T 세포 등) 와 CTL 의 분리조작을 실시함으로써 항원특이적인 세포상해활성에 관해 농축된 세포집단을 조제하여 사용할 수 있다. 이와 같은 상기 세포집단을 분리하는 것에 의한 항원특이적인 세포상해활성의 농축은 종래의 REM 법에서는 이룰 수 없었던 것이다. 따라서 본 발명의 한 가지 태양으로서 본 발명의 CTL 의 유도방법, 유지방법 그리고 확대배양방법 중 어느 하나에 의해 얻어진 CTL 함유배양물로부터 항원특이적인 세포상해활성을 가진 세포상해성 T 세포를 고함유하는 세포집단을 선택하는 공정을 포함하는 세포상해성 세포의 회수 방법이 제공된다. 또한 본 발명의 CTL 의 회수방법은, 첫째로는 높은 항원특이적인 세포상해활성을 가진 CTL 의 세포집단을 선택적으로 얻는 방법을 말하는데, 넓은 의미에서는 당해 CTL 의 세포집단를 생산 또는 획득하는 방법을 말한다. 이 세포집단의 선택방법에 대해서는 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들어 상기 CTL 의 유도방법, 유지방법 그리고 확대배양방법을 이용하여 얻어진 CTL 함유 배양물로부터 CTL 세포표면상에 발현되어 있는 세포표면항원에 대한 항체, 예를 들어 항 CD8 항체를 결합시킨 자기 (磁氣) 비즈 또는 컬럼을 사용하여 CTL 만을 선택적으로 회수하여, CTL 을 고함유하는 세포집단을 얻을 수 있다. 또 플로우 사이토 미터를 사용하여 CTL 을 선택적으로 분리할 수도 있다. 또 본 발명의 CTL 의 유도방법, 유지방법 그리고 확대배양방법에 의해 얻어진 CTL 함유 배양물 중에서 CTL 이외의 세포를 제거함으로써, CTL 을 고함유하는 세포집단을 얻을 수 있다. 예를 들어 당해 배양물로부터 헬퍼 T 세포를 제거하기 위해 헬퍼 T 세포 표면상에 발현되어 있는 세포표면 항원에 대한 항체, 예를 들어 항 CD4 항체를 결합시킨 자기 비즈 또는 컬럼을 사용하여 헬퍼 T 세포를 선택적으로 제거하고, CTL 을 고함유하는 세포집단을 얻을 수 있다. 또 헬퍼 T 세포의 제거에는 플로우 사이토 미터를 사용할 수도 있다. 이와 같이 하여 얻어진 CTL 을 고함유하는 세포집단은, CTL 함유 배양물로부터 비선택적으로 회수된 세포집단과 비교하여 보다 강한 세포상해활성을 갖고 있고, 본 발명의 방법에 의해 얻어진 CTL 로서 보다 적합하게 사용할 수 있다. 또 본 발명에서는 CTL 을 고함유하는 세포집단으로서 CTL 만의 세포집단도 포함한다.

<141> 또 본 발명의 CTL 의 유지방법 및 확대배양방법에 의해 얻어진 CTL 을 사용하여 다시 본 발명의 CTL 의 유지방법 그리고 확대배양방법을 실행함으로써 CTL 의 유지 또는 확대배양을 실행할 수도 있다. 예를 들어 본 발명의 확대배양방법에 의해 얻어진 CTL 로부터 상기 방법에 의해 CTL 을 고함유하는 획분을 얻고, 이 획분을 사용하여 다시 본 발명의 확대배양방법을 실행함으로써, 더욱 세포상해활성이 높은 CTL 을 얻을 수도 있다. 또 본 발명의 확대배양방법에 의해 얻어진 CTL 을 본 발명의 유지방법을 이용하여 그 세포상해활성을 유지시켜 둘 수도 있다.

<142> 또한 본 발명은 상기 본 발명의 CTL 의 유도방법, 유지방법 그리고 확대배양방법으로 얻어진 CTL (이들 방법으로 얻어진 CTL 함유 배양물로부터 상기 회수 방법에 의해 회수된 CTL 을 포함) 을 제공한다. 이와 같은 CTL 은 모두 항원특이적인 세포상해활성을 갖고 있고, 장기간에 걸친 계속배양이나 확대배양을 실행해도 세포상해활성의 저하가 적다는 성질을 가진다. 또 본 발명은 당해 CTL 을 유효성분으로서 함유하는 치료제를 제공한다. 당해 치료제는 특히 양자면역요법에 사용하기에 적합하다. 양자면역요법에 있어서는 환자의 치료에 적합한 항원특이적인 세포상해활성을 가진 CTL 이 예를 들어 정맥으로의 투여에 의해 환자에게 투여된다. 당해 치료제는 제약분야에서 공지된 방법에 따라, 예를 들어 본 발명의 방법에 의해 조제된 CTL 을 유효성분으로서, 예를 들어 공지된 비경구투여에 적합한 유기 또는 무기의 담체, 부형제, 안정제 등과 혼합함으로써 조제할 수 있다. 당해 CTL 로서는 특히 본 발명의 CTL 확대배양방법에 의해 EBV 감염세포를 사용하지 않고 조제된 CTL 이 이 목적에 적합하다. 또한 치료제에서의 CTL 의 함유량, 치료제의 투여량, 당해 치료제에 관한 모든 조건은 공지된 양자면역요법에 따라 적절하게 결정할 수 있다.

효 과

<143> 본 발명에 의해 항원특이적인 세포상해활성을 고활성으로 유지한 상태에서 유지 및/또는 확대배양할 수 있는 CTL 의 유도방법, 유지방법 및 확대배양방법이 제공된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<144> 이하 실시예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이들의 기재에 조금도 한정되지 않는다.

<145> [실시예]

<146> 실시예 1 히알루론산을 사용한 특이적 세포상해활성 유지 CTL 의 확대배양

<147> 실시예 1-1

<148> (1) PBMC 분리 및 보존

<149> HLA-A2.1 을 보유한 건강인 제공자로부터 성분을 채혈한 후, 채혈액을 PBS(-) 로 2 배 희석하고, Ficoll-paque [파르마시아 (Pharmacia) 사 제조] 상에 층을 겹친 후, 500 g ×20 분간 원심하였다. 원심후, 중간층의 말초혈단핵세포 (PBMC) 를 피펫으로 회수, 세정하였다. 채취한 PBMC 는 90% FBS [바이오 휘태커 (Bio Whittaker) 사 제조] / 10% DMSO [시그마 (SIGMA) 사 제조] 로 이루어지는 보존액에 현탁하여 액체질소 중에서 보존하였다. CTL 유도시에는 이들 보존 PBMC 를 37℃ 수욕중에서 급속융해시켜 10 ㎍/㎖ DNase [카르비오켐 (Calbiochem) 사 제조] 를 함유하는 RPMI1640 배지 (Bio Whittaker 사 제조) 에서 세정후, 트리판블루 염색법으로 생세포수를 산출하여 각 실험에 제공하였다.

<150> (2) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<151> 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도는 베드나레크 (Bednarek) 등의 방법 [Bednarek M. A. et al., J. Immunology., 제 147 권, 제 4047 ~ 4053 면 (1991)] 을 일부 개변하여 실시하였다. 즉 5% 인간 AB 형 혈청, 0.1 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루빈산나트륨, 2 mM L-글루타민 (전부 Bio Whittaker 사 제조), 10 mM HEPES (나카라이테스크사 제조), 1% 스트렙토마이신-페니실린 [기브코 비알엘 (Gibco BRL) 사 제조] 을 함유하는 RPMI1640 배지 (Bio Whittaker 사 제조) (이하 5HRPMI 라고 함) 에 1 ~ 4 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 실시예 1-1-(1) 에서 조제한 PBMC 를 현탁한 후, 24 구멍 세포배양 플레이트 [팔콘 (Falcon) 사 제조] 에 1 ㎖/웰씩 뿌려, 5% CO_2 습식 인큐베이터내에서 37℃ 에서 1.5 시간 인큐베이트하고, 플라스틱 접착성의 단구를 분리하였다. 그 후, 비접착성 세포를 RPMI1640 배지를 사용하여 회수하고, 리스폰더 세포로 하여 빙상 보존하였다.

분리한 단구에는 항원 펩티드로서 5 ㎍/㎖ 의 인플루엔자바이러스 단백질유래 에피토프 펩티드 (서열표의 서열번호 : 18 에 기재된 매트릭스 프로테인 유래-HLA-A2.1 결합성 펩티드) 및 1 ㎍/㎖ 의 β2 마이크로글로불린 [스크립스 (Scrips) 사 제조] 을 함유하는 5HRPMI 를 0.5 ㎖ 씩 첨가하여, 2 시간 실온에서 인큐베이트한 후, X 선 조사 (5500R) 하여 항원제시세포로 하였다. 각 웰로부터 펩티드액을 흡인제거하고, 웰을 RPMI1640 배지를 사용하여 세정한 후, 빙상보존해 둔 리스폰더 세포를 0.5 ~ 2 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 5HRPMI 에 현탁하고, 1 ㎖/웰씩 항원제시세포상에 첨가하였다. 이 때 히알루론산 (Calbiochem 사 제조) 을 종농도 10 ㎍/㎖ 로 되도록 첨가하였다. 대조군으로서 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다. 플레이트를 5% CO_2 중, 37℃ 에서 배양하였다. 배양개시후 2 일째에 60 U/㎖ 의 IL-2 (시오노기제약사 제조) 와 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 5HRPMI 1 ㎖ (대조군은 IL-2 만 함유) 를 각 웰에 첨가, 또 5 일째에는 배양상청을 절반 제거한 후, 동일한 IL-2 및 히알루론산 함유 배지 (대조군은 IL-2 만을 함유) 를 1 ㎖ 씩 첨가하였다. 7 일째에 상기와 동일하게 하여 항원제시세포를 조제한 후, 1 주간 배양한 리스폰더 세포를 0.5 ~ 2 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 되도록 5HRPMI 에 현탁하고, 조제한 항원제시세포상에 1 ㎖/웰씩 첨가하여 재자극하였다. 이 때, 히알루론산을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다 (대조군은 무첨가). 재자극후 2 일째에 60 U/㎖ 의 IL-2 및 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 (대조군은 IL-2만 함유) 5HRPMI 1 ㎖ 를 각 웰에 첨가, 또 5 일째에는 배양상청을 절반 제거한 후, 제거전과 동일한 내용의 배지를 1 ㎖ 씩 첨가하여, 다시 배양을 2 일간 계속하여 CTL 을 유도하였다.

<152> (3) CTL 세포상해활성의 측정

<153> 실시예 1-1-(2) 에서 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, Calcein-AM 을 사용한 세포상해활성 측정법 [리히텐펠즈 R. 등 (Lichtenfels R. et al.), J. Immunol. Methods, 제 172 권, 제 2 호, 제 227 ~ 239 면 (1994)] 으로 평가하였다. 하룻밤 에피토프 펩티드와 공배양, 혹은 에피토프 펩티드 비존재하에서 배양한 HLA-A2.1 유지 EBV 트랜스폼 B 세포 (세포명 221A2.1) 를 1 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 5% FBS (fetal bovine serum, 소태아혈청, Bio Whittaker 사 제조) 를 함유하는 RPMI1640 배지에 현탁한 후, 종농도 25 μM 이 되도록 Calcein-AM [도타이트 (Dotite) 사 제조] 을 첨가하고, 37℃ 에서 1 시간 배양하였다. 세포를 Calcein-AM 을 함유하지 않은 배지에서 세정한 후, 20 배량의 K562 세포 (ATCC CCL-243) 와 혼합하여, Calcein

표지 표적세포로 하였다. 또한 K562 세포는 리스폰더 세포중에 혼입하는 NK 세포에 의한 비특이적 상해활성을 배제하기 위해 사용하였다.

<154> 실시예 1-1-(2) 에서 조제한 메모리 CTL 을 이펙터 세포로서 1 $\times 10^5$ ~ 9 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 5HRPMI 로 단계희석후, 96 구멍 세포배양 플레이트의 각 웰에 100 ㎕/웰씩 나누어 부어 놓고, 이들에 1 $\times 10^5$/㎖ 로 조제한 Calcein 표지 표적세포를 100 ㎕/웰씩 첨가하였다. 상기 세포현탁액이 들어간 플레이트를 400 g 으로 1분간 원심한 후, 37℃ 의 습식 CO_2 인큐베이터내에서 4 시간 인큐베이트하였다. 4 시간 후 각 웰로부터 배양상청 100 ㎕ 를 채취하고, 형광 플레이트 리더 (485 ㎚/538 ㎚) 에 의해 배양상청중에 방출된 Calcein 량을 측정하였다. 「특이적 세포상해활성 (%)」은 이하의 식 1 에 따라 산출하였다.

<155> 식 1 : 특이적 세포상해활성 (%) =

<156> {(각 웰의 측정치 - 최소방출량)/(최대방출량 - 최소방출량)} ×100

<157> 상기 식에서 최소방출량은 표적세포 및 K562 세포만 함유하는 웰의 Calcein 방출량으로, 표적세포로부터의 Calcein 자연방출량을 나타낸다. 또 최대방출량은 표적세포에 0.1% 계면활성제 Triton X-100 (나카라이테스크사 제조) 을 첨가하여 세포를 완전 파괴했을 때의 Calcein 방출량을 표시하고 있다. 그 결과 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 히알루론산의 첨가 유무에 따른 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<158> (4) CTL 의 확대배양

<159> 실시예 1-1-(2) 에서 조제한 CTL 을 5HRPMI 로 세정한 후, 3 $\times 10^4$ cells/㎖ 로 조제하였다. 한편 실시예 1-1-(1) 과 동일한 방법에 의해 채취한 HLA-A2.1 비유지 allogenic PBMC 를 X 선 조사 (3300R) 하고, 배지에서 세정한 후, 2 ~ 5 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 조제하였다. 이들 3 $\times 10^4$ cells 의 CTL 및 4 ~ 10 $\times 10^6$ cells 의 allogenic PBMC 를 10 ㎖ 의 5HRPMI 에 현탁하고, 다시 종농도 50 ng/㎖ 의 항 CD3 항체 [얀센교와 (Janssen Kyowa) 사 제조] 를 첨가하여 12.5 ㎠ 의 플라스크 (Falcon 사 제조) 에 넣고, 37℃ 습식 CO_2 인큐베이터내에서 14 일간 배양하였다. 이 때, 실시예 1-1-(2) 의 CTL 유도시에 첨가한 히알루론산을 첨가하는 군 (종농도 10 ㎍/㎖) 과 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 이 사이 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 이 때, 히알루론산 첨가군의 배지에는 동 농도의 샘플을 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 1 에 나타낸다. 또한 표 중에서 E/T 비는 표적세포수 (T) 에 대한 이펙터 세포수 (E) 의 비를, 펩티드 부가는 표적세포에 대한 펩티드 부가의 유무를 의미한다. 또 확대증식률은 확대배양개시시의 세포수에 대한 확대배양종료시점의 세포수의 비를 증식률로서 구하였다.

표 1

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대 배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	–	–	547	–	7.3	8.4	9.1	12.7
	–	–	547	+	8.1	11.2	21.5	45.9
히알루론산	+	+	493	–	7.3	8.6	13.1	17.0
	+	+	493	+	31.1	49.8	90.8	105.6

*: +; 샘플을 첨가, –; 샘플 첨가하지 않음

<160> ¶: +; 펩티드 부가 있음, –; 펩티드 부가 없음

<161> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 히알루론산을 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 중 어느 것에서나 샘플을 첨

가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 히알루론산을 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서 CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<162> 실시예 1-2

<163> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<164> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로, 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 히알루론산을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<165> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 히알루론산 첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<166> (2) CTL 의 확대배양

<167> 실시예 1-2-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때, 실시예 1-2-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 히알루론산은 전혀 첨가하지 않았다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 2 에 나타낸다.

표 2

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	확대 배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	-	-	480	-	0	0	0.4	6.8
	-	-	480	+	4	11.2	29.3	59.7
히알루론산	+	+	423	-	0	0	1.9	14.3
	+	+	423	+	7.2	23.3	59.6	85.1
	+	-	393	-	3.0	1.4	4.7	9.3
	+	-	393	+	9.9	22.1	47.7	78.0

* : + ; 샘플을 첨가, -; 샘플 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, -; 펩티드 부가 없음

<168>

<169> 그 결과, CTL 유도시에만 히알루론산을 첨가한 군에 있어서는, 확대배양시에 이들의 샘플을 첨가하지 않아도 14 일간의 확대배양후에 있어서 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 샘플을 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, CTL 유도시에만 히알루론산을 첨가하더라도 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서 CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<170> 실시예 1-3

<171> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL의 유도

<172> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때, 히알루론산 (표 3 중에서는 HA 라고 함) 을 첨가하는 군 (종농도 10 ㎍/㎖) 과 전혀 샘플을 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 히알루론산 첨가군에 관해서는, 동시에 종농도 0.2 ㎍/㎖ 의 항 CD44 항체 (히알루론산 결합 차단 항체 ; 표 중에서는 HA 차단 항 CD44 항체라고 함) 혹은 항 CD44 항체 (히알루론산 결합 비-차단 항체 ; 표 중에서는 HA 비-차단 항 CD44 항체라고 함) (각각 안셀 (Ancell) 사 제조, 모노클로날 항체) 를 공첨가하는 군도 설정하여 항체에 의한 저해효과를 검토하였다.

<173> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<174> (2) CTL 의 확대배양

<175> 실시예 1-3-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때, 실시예 1-3-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 히알루론산을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 히알루론산을 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 또 유도시에 히알루론산과 항 CD44 항체를 공첨가한 군에 관해서는, 확대배양시도 동일한 샘플 및 항체를 첨가하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다.
확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 3 에 나타낸다.

표 3

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대 배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가 ¶	세포 상해 활성(%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	-	-	330	-	2.4	6.2	7.4	9.6
	-	-	330	+	3.9	5.8	7.2	10.9
HA	+	+	350	-	0	0	1.9	5.3
	+	+	350	+	4.8	15.3	35.3	70.2
HA+HA 차단 항CD44 항체	+	+	357	-	5.9	4.7	15.0	14.9
	+	+	357	+	10.9	11.8	19.5	17.5
HA+HA 비-차단 항CD44 항체	+	+	413	-	6	4.7	5	7.6
	+	+	413	+	12.2	17.5	34.9	69.9

* : + ; 샘플을 첨가, - ; 샘플 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, - ; 펩티드 부가 없음

<176>

<177> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 히알루론산을 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 샘플을 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 히알루론산과 항 CD44 항체 (히알루론산 결합 차단 항체) 를 공첨가한 군에서는, 히알루론산에 의한 CTL 활성유지효과는 완전히 저해되었다. 한편 히알루론산과 항 CD44 항체 (히알루론산 결합 비-차단 항체) 를 공첨가한 군에서는, 히알루론산에 의한 CTL 활성유지효과는 저해되지 않았다. 즉 히알루론산에 의한 세포상해활성유지의 효과는 세포표면상의 CD44 항원에 히알루론산이 결합됨으로써 발휘되는 것이 밝혀졌다.

<178> 실시예 2 항 인간 CD44 항체를 사용한 특이적 세포상해활성유지 CTL 의 확대배양

<179> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<180> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 정제 마우스 IgG1 [젠자임/테크네 (Genzyme/Techne) 사 제조] 혹은 실시예 1-3-(1) 에서 사용한 2 종류의 항 인간 CD44 항체를 종농도 0.2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 다시 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<181> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<182> (2) CTL 의 확대배양

<183> 실시예 2-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이때, 실시예 2-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 마우스 IgG1 혹은 상기 2 종류의 항 인간 CD44 항체를 각각 종농도 0.2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 항체를 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가하고, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 0.2 ㎍/㎖ 의 마우스 IgG1 혹은 상기 2 종류의 항 인간 CD44 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 항체를 첨가하지 않은 군에 있어서는 배지교환시에도 항체는 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 4 에 나타낸다.

표 4

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 3	10	30
대조군	−	−	413	−	5.9	10.5	12.8
	−	−	413	+	4.0	14.8	46.9
마우스 IgG1	+	+	357	−	5.6	0	2
	+	+	357	+	6.2	6.8	13.3
HA 비-차단 항CD44 항체	+	+	357	−	10.3	14.2	21.2
	+	+	357	+	32.4	60.1	104.8
HA 차단 항CD44 항체	+	+	420	−	1.6	1.3	3.5
	+	+	420	+	9.5	9.8	17.7

*: +; 샘플을 첨가, -; 샘플을 첨가하지 않음

¶: +; 펩티드 부가 있음, -; 펩티드 부가 없음

<184>

<185> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 항 인간 CD44 항체 (히알루론산 결합 비-차단 항체) 를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군 및 항 인간 CD44 항체 (히알루론산 결합 차단 항체) 첨가군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 항 인간 CD44 항체 중에서도 히알루론산의 결합을 저해하지 않는 항체를 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<186> 실시예 3 히알루론산 및 항 인간 CD44 항체와 가용성 혹은 세포표면상 CD44 항원의 결합성

<187> CD44 에는 배양상청중에 가용성 상태에서 존재하는 것 (이하 가용성 CD44 라고 함), 세포의 막표면상에 존재하는 것 (이하 세포표면상 CD44 라고 함) 의 2 종류의 존재양식이 있다. CD44 는 히알루론산의 리셉터이고, 히알루론산은 CTL 의 확대배양시에 첨가함으로써 세포상해활성유지효과가 있기 때문에, 이 활성유지효과가 어느 CD44 항원에 의존하는 것인지를 검토하였다.

<188> 실시예 3-1

<189> (1) 가용성 CD44 와 히알루론산의 결합성 평가

<190> 가용성 CD44 와 히알루론산의 결합성은 이하의 방법으로 평가하였다. 즉 5 ㎍/㎖ 의 항 인간 CD44 항체 (가용성 CD44 인식항체, Ancell 사 제조) 를 함유하는 PBS (닛스이사 제조) 100 ㎕/웰을 넣고, 실온에서 하룻밤 프리인큐베이트한 Nunc-Immuno 플레이트 [눈크 (Nunc) 사 제조] 를 0.025% Tween20 (SIGMA 사 제조)/PBS 로 3 회 세정한 후, 블록에이스 (다이닛뽕제약사 제조) 를 300 ㎕/웰 첨가하고, 실온에서 1 시간 이상 인큐베이트하였다. 한편 가용성 CD44 (15 ng/㎖) 함유 RPMI 배지중에 히알루론산을 종농도 0, 0.25, 0.5, 1 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하고, 37℃ 에서 1 시간 프리인큐베이트하였다. 블로킹후의 플레이트의 각 웰을 다시 0.025% Tween20/PBS 로 3 회 세정한 후, 프리인큐베이트해 둔 히알루론산 함유 혹은 히알루론산을 함유하지 않은 가용성 CD44 함유 (15 ng/㎖) RPMI 배지를 100 ㎕/웰씩 첨가하였다. 다시 각 웰에 HRP 표지

Conjugate [벤다메드 (BenderMed) 사 제조 가용성 CD44 측정용 ELISA 시스템 부속시약] 를 50 ㎕/웰씩 첨가하여 실온에서 3 시간 인큐베이트하였다. 인큐베이트한 후, 각 웰을 0.025% Tween20/PBS 로 3 회 세정하고, TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘) 용액 (SIGMA 사 제조) 을 100 ㎕/웰씩 첨가, 실온에서 15 분간 인큐베이트한 후, 2N 황산을 50 ㎕/웰씩 첨가하고, 반응을 정지하였다. 각각의 흡광도는 플레이트리더 (450 ㎚) 를 사용하여 측정하였다. 측정결과를 도 1 에 나타낸다.

<191> 그 결과 가용성 CD44 함유 배지중에 히알루론산을 첨가해도 가용성 CD44 인식항체에 의한 인식을 전혀 저해하지 않았다. 즉, 히알루론산은 배지중에 존재하는 가용성 CD44 와는 전혀 결합되지 않았다. 이에 의해 히알루론산에 의한 CTL 특이적 세포상해활성 유지효과에 배지중의 가용성 CD44 는 전혀 관여하지 않은 것이 밝혀졌다.

<192> (2) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<193> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다.

<194> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었다.

<195> (3) CTL 의 확대배양

<196> 실시예 3-1-(2) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가하고, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하고, 이들의 CTL 이 특이적세포상해활성을 가진 것을 확인하였다.

<197> (4) 히알루론산과 세포표면상의 CD44 의 결합성 평가

<198> 실시예 3-1-(3) 에서 조제한 2 $\times 10^5$ cells 의 CTL 을 1% 파라포름알데히드 (나카라이사 제조) 를 함유하는 PBS (닛스이사 제조) 를 사용하여 고정한 후, PBS 로 세정하였다. 고정세포를 10 ㎍/㎖ 의 FL 표지 히알루론산 [모레큘러 프로브스 (Molecular Probes) 사 제조] 을 함유하는 PBS 중에 현탁하고, 37℃ 에서 30 분간 인큐베이트하였다. 음성 대조군으로서 FL 표지 히알루론산 (FL-HA) 을 함유하지 않은 PBS 중에서 인큐베이트하는 군도 설정하였다. 인큐베이트한 후, PBS 로 세정하고, 다시 1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS 중에 현탁하였다. 조제한 CTL 을 FACS Vantage [벡톤·디킨슨 (Becton, Dickinson) 사 제조] 에 넣어 CTL 세포표면상의 형광강도를 측정하였다. 결과를 도 2 에 나타낸다.

<199> 그 결과, FL 표지 히알루론산은 CTL 의 세포표면상에 결합되었다. 즉, 히알루론산에 의한 CTL 특이적 세포상해활성 유지효과는 CTL 의 세포표면상에 존재하는 CD44 에 히알루론산이 결합됨으로써 발휘되는 것이 밝혀졌다.

<200> 실시예 3-2

<201> (1) 항 인간 CD44 항체 (HA 비-차단 항 CD44 항체) 와 가용성 CD44 의 결합성 평가

<202> HA 비-차단 항 CD44 항체와 가용성의 CD44 의 결합성은 이하의 방법으로 평가하였다. 즉, 1차 항체로서 5 ㎍/㎖ 의 HA 비-차단 항 CD44 항체 혹은 항 인간 CD44 항체 (가용성 CD44 인식항체) (Ancell 사 제조) 를 함유하는 (닛스이사 제조) 100 ㎕/웰을 넣고, 실온에서 하룻밤 인큐베이트한 Nunc-Immuno 플레이트 (Nunc 사 제조) 를 0.025% Tween20 (SIGMA 사 제조)/PBS 로 3 회 세정한 후, 블록에이스 (다이닛뽕제약사 제조) 를 300 ㎕/웰 첨가하여 실온에서 1 시간 이상 인큐베이트하였다. 블로킹후의 플레이트의 각 웰을 다시 0.025% Tween20/PBS 로 3 회 세정한 후, 가용성 CD44 (15 ng/㎖) 함유 RPMI 배지를 100 ㎕/웰씩 첨가하였다. 다시 각 웰에 HRP 표지 Conjugate (벤더메드사 제조 가용성 CD44 측정용 ELISA 시스템 부속 시약) 를 50 ㎕/웰씩 첨가하여 실온에서 3 시간 인큐베이트하였다. 인큐베이트후 각 웰을 0.025% Tween20/PBS 로 3 회 세정하고, TMB 용액 (SIGMA 사 제조) 을 100 ㎕/웰씩 첨가, 실온에서 15 분 인큐베이트한 후, 2N 황산을 50 ㎕/웰씩 첨가하여 반응을 정지하였다. 각각의 흡광도는 플레이트리더 (450 ㎚) 를 사용하여 측정하였다. 실험은 2 번 연속하여 실행하고 그 평균값을 채용하였다. 그 결과를 도 3, 도 4 에 나타낸다. 그 결과 1차 항체로서 사용한 가용성 CD44 인식항체는 배지중의 가용성 CD44 를 항체농도의존적으로 인식하였다. 한편 HA 비

-차단 항 CD44 항체는 배지중의 가용성 CD44 를 전혀 인식하지 않았다. 즉, HA 비-차단 항 CD44 항체는 배지중에 존재하는 가용성 CD44 와는 결합되지 않았다. 이에 의해 HA 비-차단 항 CD44 항체에 의한 CTL 특이적 세포상해활성유지효과에 배지중의 가용성 CD44 는 전혀 관여하지 않는 것이 밝혀졌다.

<203> (2) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<204> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다.

<205> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었다.

<206> (3) CTL 의 확대배양

<207> 실시예 3-2-(2) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하고, 이들의 CTL 이 특이적세포상해활성을 가진 것을 확인하였다.

<208> (4) 항 인간 CD44 항체 (HA 비-차단 항 CD44 항체) 와 세포표면상 CD44 의 결합성 평가

<209> 실시예 3-2-(3) 에서 조제한 2 $\times 10^5$ cells의 CTL 을 1% 파라포름알데히드 (나카라이사 제조) 를 함유하는 PBS (닛스이사 제조) 를 사용하여 고정한 후, PBS 로 세정하였다. 고정세포를 1 ㎍/㎖ 의 항-CD44/FITC (FITC 표지 비-차단 항 CD44 항체 (CD44-FITC), Ancell 사 제조) 를 함유하는 1% BSA (SIGMA 사 제조) PBS 중에 현탁하고, 빙상 30 분 인큐베이트하였다. 대조군으로서 1 ㎍/㎖ 마우스 IgG1/FITC (FITC 표지 마우스 IgG 항체 (IgG1-FITC), 다코 (DAKO) 사 제조) 를 함유하는 PBS 중에서 인큐베이트하는 군도 설정하였다. 인큐베이트한 후, PBS 로 세정하여 다시 1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS 중에 현탁하였다. 조제한 CTL 을 FACS Vantage 에 넣어 CTL 세포표면상의 형광강도를 측정하였다. 결과를 도 5 에 나타낸다.

<210> 그 결과 FITC 표지 HA 비-차단 항 CD44 항체는 CTL 의 세포표면상에 결합되어 있었다. 즉, 항 인간 HA 비-차단 항 CD44 항체에 의한 CTL 특이적 세포상해활성유지효과는, CTL 의 세포표면상에 존재하는 CD44 에 히알루론산이 결합됨으로써 발휘될 가능성이 시사되었다.

<211> 실시예 3-3

<212> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<213> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 HA 비-차단 항 CD44 항체를 종농도 0.2 ㎍/㎖가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<214> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차는 거의 없었다.

<215> (3) CTL 의 확대배양

<216> 실시예 3-3-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 3-3-(1) 에서 CTL 유도시에 첨가한 HA 비-차단 항 CD44 항체를 각각 종농도 0.2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또 유도시에 항체를 첨가하지 않은 군에 대해서는 여기에서도 항체는 첨가하지 않았다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 0.2 ㎍/㎖ 의 HA 비-차단 항 CD44 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 항체를 첨가하지 않은 군에 있어서는, 배지교환시에도 항체는 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 그 결과 CTL 유도시 및 확대배양시에 HA 비-차단 항 CD44 항체를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하는 것을 확인하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는

그 활성은 명확하게 저하되어 있는 것을 확인하였다.

<217> (3) HA 비-차단 항 CD44 항체 첨가 확대배양후 CTL 의 세포표면상에서의 항체 결합성 평가

<218> 실시예 3-3-(1) 에서 조제한 2 $\times 10^5$ cells 의 CTL (HA 비-차단 항 CD44 항체 첨가조건에서 배양한 CTL) 을 1% 파라포름알데히드 (나카라이사 제조) 를 함유하는 PBS (닛스이사 제조) 를 사용하여 고정한 후, PBS 로 세정하였다. 고정세포를 1 ㎍/㎖ 의 FITC 표지 마우스 IgG 또는 FIFC 표지 항 마우스 IgG 항체를 함유하는 1% BSA (SIGMA 사 제조) PBS 중에 현탁하고, 빙상에서 30 분 인큐베이트하였다. 인큐베이트한 후, PBS 로 세정하여 다시 1% 파라포름알데히드를 함유하는 PBS 중에 현탁하였다. 조제한 CTL 을 FACS Vantage 에 넣어 CTL 세포 표면상의 형광강도를 측정하였다. 결과를 도 6 에 나타낸다.

<219> 그 결과 HA 비-차단 항 CD44 항체첨가 조건하에서 확대배양한 CTL 의 세포표면상에 있어서 이 항체의 결합이 확인되었다. 즉, HA 비-차단 항 CD44 항체에 의한 CTL 특이적 세포상해활성유지효과는, CTL 의 세포표면상에 존재하는 CD44에 이 항체가 결합됨으로써 발휘될 가능성이 밝혀졌다.

<220> 실시예 4 항 인간 HGF 항체를 사용한 특이적 세포상해활성유지 CTL 의 확대배양

<221> 실시예 4-1

<222> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<223> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 정제 마우스 IgG1 (Genzyme/Techne 사 제조) 혹은 항 인간 HGF 항체 (마우스 모노클로날 항체 ; Genzyme/Techne 사 제조) 를 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<224> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<225> (2) CTL 의 확대배양

<226> 실시예 4-1-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 4-1-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 마우스 IgG1 혹은 항 인간 HGF 항체와 동일한 항체를 각각 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 항체를 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 2 ㎍/㎖ 의 마우스 IgG1 혹은 항 인간 HGF 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 항체를 첨가하지 않은 군에 있어서는, 배지교환시에도 항체는 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 5 에 나타낸다.

표 5

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	-	-	340	-	0.6	0.6	1.5	19.4
	-	-	340	+	0	3.2	6.8	21.3
마우스IgG1	+	+	207	-	0	0	0.1	3.9
	+	+	207	+	0	4.1	9.3	30.3
항HGF 항체	+	+	435	-	1.2	3.1	0	4.0
	+	+	435	+	7.2	19.5	39.6	74.5

* : + ; 샘플을 첨가, - ; 샘플을 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, - ; 펩티드 부가 없음

<227>

<228> 그 결과 CTL 유도시 및 확대배양시에 항 인간 HGF 항체를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 항 인간 HGF 항체를 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<229> 실시예 4-2

<230> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<231> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 항 인간 HGF 항체 (마우스 모노클로날 항체 ; Genzyme/Techne 사 제조) 를 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<232> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<233> (2) CTL 의 확대배양

<234> 실시예 4-2-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 4-2-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 항 인간 HGF 항체는 전혀 첨가하지 않았다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 6 에 나타낸다.

표 6

샘플	샘플 첨가 CTL 유도시 *	샘플 첨가 확대배양시 *	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	–	–	547	–	7.3	8.4	9.1	12.7
	–	–	547	+	8.1	11.2	21.5	45.9
항HGF 항체	+	+	540	–	6.8	7.3	8.5	10.2
	+	+	540	+	23.3	40.8	72.4	103.4
	+	–	463	–	7.4	7.9	10.5	14.4
	+	–	463	+	22.2	38.1	70.4	94.5

*; + ; 샘플을 첨가, -; 샘플 첨가하지 않음

¶ ; + ; 펩티드 부가 있음, -; 펩티드 부가 없음

<235>

<236> 그 결과 CTL 유도시에만 항 인간 HGF 항체를 첨가한 군에 있어서는, 확대배양시에 이들 항체를 첨가하지 않아도, 14 일간의 확대배양후에서 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, CTL 유도시에만 항 인간 HGF 항체를 첨가하더라도, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<237> 실시예 5 항 인간 IGF-1 항체를 사용한 특이적 세포상해활성 유지 CTL 의 확대배양

<238> 실시예 5-1

<239> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<240> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인

플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 정제 염소 IgG [케미콘 인터내셔널 (CHEMICON International) 사 제조] 혹은 항 인간 IGF-1 항체 (염소 폴리클로날 항체 ; Genzyme/Techne 사 제조) 를 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<241> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<242> (2) CTL 의 확대배양

<243> 실시예 5-1-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 5-1-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 염소 IgG 혹은 항 인간 IGF-1 항체를 각각 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 2 ㎍/㎖ 의 염소 IgG 혹은 항 인간 IGF-1 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 항체를 첨가하지 않은 군에 있어서는 배지교환시에도 항체는 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 7 에 나타낸다.

표 7

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대 배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	–	–	340	–	0.8	0.6	1.5	19.4
	–	–	340	+	0	3.2	6.8	21.3
염소 IgG	+	+	463	–	0	0	1.6	5.6
	+	+	463	+	0.7	2.1	6.6	18.9
항IGF-1 항체	+	+	368	–	0	0	0.4	3.4
	+	+	368	+	13.0	40.2	80.4	90.9

* : + ; 샘플을 첨가, –; 샘플을 첨가하지 않음

<244> ¶ : + ; 펩티드 부가 있음, –; 펩티드 부가 없음

<245> 그 결과 CTL 유도시 및 확대배양시에 항 인간 IGF-1 항체를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양 후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 항 인간 IGF-1 항체를 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<246> 실시예 5-2

<247> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<248> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 항 인간 IGF-1 항체 (염소 폴리클로날 항체 ; Genzyme/Techne 사 제조) 를 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<249> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<250> (2) CTL 의 확대배양

<251> 실시예 5-2-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 5-2-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 항 인간 IGF-1 항체는 전혀 첨가하지 않았다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 8 에 나타낸다.

표 8

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10
대조군	-	-	547	-	7.3	8.4	9.1
	-	-	547	+	8.1	11.2	21.5
항IGF-1 항체	+	+	637	-	3.8	3.2	7.5
	+	+	637	+	20.8	47.4	69.0
	+	-	553	-	9.4	11.6	15.0
	+	-	553	+	49.6	82.6	111.0

* : + ; 샘플을 첨가, -; 샘플을 첨가하지 않음

<252> ¶ : + ; 펩티드 부가 있음, -; 펩티드 부가 없음

<253> 그 결과 CTL 유도시에 항 인간 IGF-1 항체를 첨가한 군에 있어서는, 확대배양시에 항체를 첨가하지 않아도 14 일간의 확대배양후에서 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, CTL 유도시에만 항 인간 IGF-1 항체를 첨가하더라도 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<254> 실시예 6 항 인간 IGF-2 항체를 사용한 특이적 세포상해활성 유지 CTL 의 확대배양

<255> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<256> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 정제 마우스 IgG1 (Genzyme/Techne 사 제조) 혹은 항 인간 IGF-2 항체 (마우스 모노클로날 항체 ; Genzyme/Techne 사 제조) 를 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 항체를 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<257> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 항체첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<258> (2) CTL 의 확대배양

<259> 실시예 6-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 6-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 마우스 IgG1 혹은 항 인간 IGF-2 항체와 동일한 항체를 각각 종농도 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 2 ㎍/㎖ 의 염소 IgG 혹은 항 인간 IGF-2 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 항체를 첨가하지 않은 군에 있어서는 배지교환시에도 항체는 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 9 에 나타낸다.

표 9

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대 배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가 ¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 1	3	10	30
대조군	-	-	237	-	2.1	3.9	5.6	9.7
	-	-	237	+	0	4.1	6.9	12.4
마우스 IgG1	+	+	370	-	0	0	0	0
	+	+	370	+	0	0	0	3.1
항IGF-2 항체	+	+	225	-	3.9	5.0	5.8	10.2
	+	+	225	+	7.1	16.5	37.7	71.5

* : + ; 샘플을 첨가, -; 샘플 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, -; 펩티드 부가 없음

<260>

<261> 그 결과 CTL 유도시 및 확대배양시에 항 인간 IGF-2 항체를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양 후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 항체를 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, CTL 유도시에만 항 인간 IGF-2 항체를 첨가하더라도 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<262> 실시예 7 종양관련 항원성 특이적 세포상해활성을 유지하는 CTL 의 확대배양

<263> 실시예 7-1

<264> (1) 항 종양관련 항원 (MAGE3) 특이적 CTL 의 유도

<265> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 항 종양관련 항원 (melanoma-associated antigen 3, MAGE3) 특이적 CTL 의 유도를 실행하였다. 항 종양관련 항원 (MAGE3) 특이적 CTL 의 유도는 프레반스키 M. 등의 방법 [Plebanski M. et al., Eur. J, Immunol., 제 25 권, 제 6 호, 제 1783 ~ 1787 면 (1995)] 을 일부 개변하여 실시하였다. 즉 5HRPMI 에 2 ~ 4 $\times 10^7$ cells/㎖ 가 되도록 실시예 1-1-(1) 에서 조제한 PBMC 를 현탁한 후 양을 절반으로 나누었다. 그 중 절반은 리스폰더 세포로서 빙상 보존으로 하고, 나머지 절반은 항원제시세포로 사용하여 항원펩티드로서 80 ㎍/㎖ 의 멜라노머 항원 MAGE3 유래 에피토프 펩티드 (서열표의 서열번호 : 19 에 기재된 멜라노머 항원 MAGE3 유래-HLA-A2.1 결합성 펩티드) 및 6 ㎍/㎖ 의 β2 마이크로글로불린 (Scrips 사 제조) 을 함유하는 5HRPMI 를 등량 첨가하고, 5% CO_2 습식 인큐베이터내에서, 37℃ 에서 2 시간 인큐베이트하였다. 그 후, 5HRPMI 를 사용하여 세정하고, 빙상보존하였던 리스폰더 세포와 혼합한 후, 2 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 조제하였다. IL-7 및 KLH 를 각각 종농도 25 ng/㎖, 5 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하고, 24 구멍 세포배양 플레이트 (Falcon 사 제조) 에 2 ㎖/웰씩 넣었다. 이 때, 히알루론산 (Calbiochem 사 제조) 을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또 대조군으로서 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다. 플레이트를 5% CO_2 중, 37℃ 에서 배양하였다. 배양개시후 4 일째에 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 와 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 5HRPMI 1 ㎖ (대조군은 IL-2 만을 함유) 를 각 웰에 첨가하였다. 7 일째에 상기와 동일하게 하여 항원제시세포를 조제한 후, X 선 조사 (5500R) 하고, 4 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 조제하였다. 1 주간 배양한 리스폰더 세포를 2 $\times 10^6$ cells/㎖ 가 되도록 5HRPMI 에 현탁, 조제한 항원제시세포와 등량 혼합하고, 1 ㎖/웰씩 24 구멍 세포배양 플레이트에 첨가하고, 다시 종농도 25 ng/㎖ 의 IL-7 을 첨가하여 재자극하였다. 이 때 히알루론산을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다 (대조군은 무첨가). 재자극후 1 일째에 600 U/㎖ 의 IL-2 및 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 (대조군은 IL-2 만 함유) 5HRPMI 1 ㎖ 를 각 웰에 첨가, 또 3 일째에는 배양상청을 절반 제거한 후, 제거전과 동일한 내용의 배지를 1 ㎖ 씩 첨가하였다. 동일한 재자극을 1 주간에 1 번, 총 4 회 실시하여 CTL 을 유도하였다.

<266> (2) CTL 세포상해활성의 측정

<267> 실시예 7-1-(1) 에서 조제한 유도개시후 35 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 단, 이 때 표적세포로서 하룻밤 에피토프 펩티드와 공배양, 혹은 에피토프 펩티드 비존재하에서 배양한 HLA-A2.1 유지 EBV 트랜스폼 B 세포 (세포명 221A2.1) 를 사용하였다. 그 결과 유도직후에 있어서, 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 히알루론산의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<268> (2) CTL 의 확대배양

<269> 실시예 7-1-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 7-1-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 히알루론산을 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 샘플을 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 샘플을 첨가하지 않은 군에 있어서는 배지교환시에도 샘플은 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 10 에 나타낸다.

표 10

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가 ¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 2	E/T 비 6
대조군	−	−	237	−	0	0
	−	−	237	+	29.8	56.0
히알루론산	+	+	217	−	3.6	0
	+	+	217	+	50.3	67.7

* : + ; 샘플을 첨가, −; 샘플 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, −; 펩티드 부가 없음

<270>

<271> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 히알루론산을 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시의 어느 것에서나 이들 샘플을 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 항 종양관련 항원 (MAGE3) CTL 의 확대배양시에서도, 히알루론산을 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<272> 실시예 7-2

<273> (1) 항 종양관련 항원 (MART1) 특이적 CTL 의 유도

<274> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 7-1-(1) 과 동일한 방법으로 항 종양관련 항원 (T 세포에 의해 인식되는 멜라노마 항원 (Melanoma antigen recognized by T cell), MART1) 특이적 CTL 의 유도를 실행하였다. 항원 펩티드로서 멜라노머 항원 MART1 유래 에피토프 펩티드 (서열표의 서열번호 : 20 에 기재된 멜라노머 항원 MART1 유래-HLA-A2.1 결합성 펩티드) 를 사용하였다. 이 때 히알루론산 (Calbiochem 사 제조) 을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또 대조군으로서 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<275> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 35 일째의 CTL 의 세포상해활성은 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 단, 이 때 표적세포로서 하룻밤 에피토프 펩티드와 공배양, 혹은 에피토프 펩티드 비존재하에서 배양한 HLA-A2.1 유지 EBV 트랜스폼 B 세포 (세포명 221A2.1), 100 U/㎖ 의 IFN-γ 존재하에서 이틀밤 배양한 HLA-A2.1 유지 암세포주 (세포명 624mel; HLA-A2.1 유지 MART1 발현세포) 혹은 HLA-A2.1 비유지 암세포주 (세포명 888mel; HLA-A2.1 비유지 MART1 발현세포) 를 사용하였다.

<276> 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 샘플 첨가의 유무에 의한 세포상해활성

의 차이는 거의 없었다.

<277> (2) CTL 의 확대배양

<278> 실시예 7-2-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하여 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 을 확대배양하였다. 이 때 실시예 7-1-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 히알루론산을 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 샘플을 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 10 ㎍/㎖ 의 히알루론산을 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 샘플을 첨가하지 않은 군에 있어서는 배지교환시에도 샘플은 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 11 에 나타낸다.

표 11

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가 ¶	표적 세포	세포 상해 활성 (%) E/T 비 2	7	20
대조군	–	–	287	–	221A2.1	0	3.8	4.1
	–	–	287	+	221A2.1	8.1	27.5	43.5
	–	–	287	–	888mel	32.5	44.8	43.7
	–	–	287	–	624mel	27.4	55.8	81.6
						E/T 비 2	6	17
히알루론산	+	+	217	–	221A2.1	0	0	0
	+	+	217	+	221A2.1	9.1	52.8	74.4
	+	+	217	–	888mel	0	0	0
	+	+	217	–	624mel	29.6	73.8	90.6

* : + ; 샘플을 첨가, –; 샘플 첨가하지 않음

¶ : + ; 펩티드 부가 있음, –; 펩티드 부가 없음

<279>

<280> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 히알루론산을 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시의 어느 것에서나 이들 샘플을 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 종양세포주에 대한 특이적 세포상해활성에 대해서도 CTL 의 유도시 및 확대배양시에 히알루론산을 첨가한 군에서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에서도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 즉, 항 종양관련 항원 (MART1) CTL 의 확대배양시에도 히알루론산을 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<281> 실시예 8 REM 법과의 비교 및 REM 법과의 조합

<282> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<283> 실시예 1-1-(1) 에서 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 샘플로서 히알루론산을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또한 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<284> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일간의 CTL 의 세포상해활성은 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 항원 펩티드로서 5 ㎍/㎖ 의 실시예 1-(2) 에 기재된 인플루엔자 바이러스 단백유래 에피토프 펩티드를 사용하였다.

<285> (2) 특이적 활성 유지 CTL 의 항 CD3 항체에 의한 확대배양

<286> 실시예 8-(1) 에서 조제한 CTL 을 5HRPMI 로 세정한 후, 5 $\times 10^4$ cells/㎖ 로 조제하였다. 한편 실시예 1-1-(1) 과 동일하게 채취한 HLA-A24 및 A2.1 비유지 allogenic PBMC 를 X 선 조사 (3300R) 하고, 배지에서 세정한 후, 5 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 조제하였다. 이들 3.0 $\times 10^4$ cells 의 CTL 및 4 ~ 10 $\times 10^6$ cells 의 allogenic PBMC 를 10 ㎖ 의 5HRPMI 에 현탁하고, 다시 종농도 50 ng/㎖ 의 항 CD3 항체 (얀센교화사 제조) 를 첨가하여 12.5 ㎠ 의 플라스크 (Falcon 사 제조) 에 넣고, 37℃ 의 습식 CO_2 인큐베이터 내에서 14 일간 배양하였다. 이 때, 샘플로서 히알루론산을 첨가하는 군 (종농도 10 ㎍/㎖) 과 첨가하지 않은 군을 설정하였다.

그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 샘플 첨가군의 배지에는 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 히알루론산을 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 12 에 나타낸다.

<287> 한편 REM 법에 의한 확대배양은 이하와 같이 실시하였다. HLA-A24 및 A2.1 비유지 allogenic PBMC 를 X 선 조사 (3300R) 하고, 배지에서 세정한 후 5 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 조제하였다. 또 EBV-B 세포를 X 선 조사 (8000R) 하고, 배지에서 세정한 후 1 $\times 10^6$ cells/㎖ 로 조제하였다. 실시예 8-1-(1) 에서 조제한 3.0 $\times 10^4$ cells 의 CTL, 4 ~ 10 $\times 10^6$ cells 의 allogenic PBMC, 및 2.5 $\times 10^6$ cells 의 EBV-B 세포를 10 ㎖ 의 5HRPMI 에 현탁하고, 다시 종농도 50 ng/㎖ 의 항 CD3 항체 (얀센교와사 제조) 를 첨가하여 12.5 ㎠ 의 플라스크 (Falcon 사 제조) 에 넣고, 37℃ 의 습식 CO_2 인큐베이터 내에서 14 일간 배양하였다. 이 때 샘플로서 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 히알루론산을 첨가하는 군과 첨가하지 않는 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 샘플 첨가군의 배지에는 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 히알루론산을 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 12 에 나타낸다.

표 12

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대 배양시	EBV-B 세포 첨가†	확대 증식률 (배)	펩티드 부가¶	세포 상해 활성 (%) E/T 비 10
대조군	–	–	–	392	–	6.2
	–	–	–	392	+	10.6
히알루론산	+	+	–	335	–	2.3
	+	+	–	335	+	60.0
REM 법	–	–	+	427	–	11.5
	–	–	+	427	+	52.3
REM 법 +히알루론산	+	+	+	587	–	8.1
	+	+	+	587	+	95.5

*: +; 샘플을 첨가, –; 샘플을 첨가하지 않음

†: +; EMV-B 세포를 첨가, –; EMV-B 세포 첨가하지 않음

<288> ¶: +; 펩티드 부가 있음, –; 펩티드 부가 없음

<289> 그 결과 히알루론산을 첨가하지 않고 유도한 CTL (CTL 활성 유지물질 무첨가) 은, REM 법으로 확대배양한 경우에는 높은 세포상해활성을 유지하였다. 그러나 EBV-B 세포를 사용하지 않은 방법으로 확대배양한 경우에는 세포상해활성은 현저하게 저하되었다.

<290> 한편 히알루론산을 CTL 유도시와 확대배양시의 양방에 첨가하여 두면 EBV-B 세포를 첨가하지 않아도 14 일간의 대량 배양후에서의 CTL 세포상해활성을 충분히 높게 유지시켜 둘 수 있었다. 또한 본 발명에 의한 확대배양

후의 항원특이적 세포상해활성은 REM 법과 비교해도 높은 것이었다.

<291> 또 REM 법으로 확대배양하는 경우, 확대배양에 앞서 CTL 유도시부터 본 발명의 방법의 CTL 활성유지효과를 가진 물질의 하나인 히알루론산을 첨가해 두면, 종래기술에서 유도한 CTL 세포를 단순히 REM 법으로 확대배양하는 것보다, 세포상해활성을 높게 유지할 수 있었다.

<292> 즉, 본 발명의 CTL 의 확대배양방법에 있어서는, REM 법에서는 필수인 EBV-B 세포를 필요로 하지 않아, EBV-B 세포를 사용하는 위험성을 회피할 수 있었다. 또한 REM 법보다 높은 CTL 활성을 유지할 수 있었다. 이와 같은 점에서 본 발명의 CTL 세포의 확대배양방법은 REM 법보다 안전하고 우수한 방법이었다.

<293> 또한 히알루론산을 REM 법으로 도입하면 더욱 높은 활성을 유지할 수 있는 점에서, 히알루론산은 모든 CTL 세포의 확대배양방법으로의 적응이 가능하였다. 즉, 본 발명에서 사용되는 물질을 다양한 CTL 확대배양방법에 이용함으로써 특이적이고 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서 CTL 의 확대배양이 가능해졌다.

<294> 실시예 9 피브로넥틴 프래그먼트의 조제

<295> (1) 피브로넥틴 프래그먼트의 조제

<296> 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, H-271 은 Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP-2264) 로 미국특허 제 5,198,423 호 공보에 기재된 방법에 의해 조제하였다.

<297> 또 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, H-296, CH-271, CH-296 은 각각 Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM P-10721), Escherichia coli HB101/pCH101 (FERM BP-2799), Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) 를 사용하여 이것을 상기 공보에 기재된 방법으로 배양하여, 이 배양물로부터 조제하였다.

<298> 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, C-274 는 Escherichia coli JM109/pTF7221 (FERM BP-1915) 을 사용하고, 이것을 미국특허 제 5,102,988 호 공보에 기재된 방법으로 배양하여, 이 배양물로부터 조제하였다.

<299> 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, C-CS1 은 Escherichia coli HB101/pCS25 (FERM BP-5723) 를 사용하여 일본특허 3104178 호 공보에 기재된 방법으로 배양하여, 이 배양물로부터 조제하였다.

<300> 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, CHV-89, CHV-179 는, 각각 Escherichia coli HB101/pCHV89 (FERM P-12182), Escherichia coli HB101/pCHV179 (FERM P-12183) 를 사용하고, 일본특허 2729712 호에 기재된 방법으로 배양하고, 이 배양물로부터 조제하였다.

<301> 또 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, CHV-90 은 상기 공보에 기재된 방법으로 조제하였다. 즉, 당해 공보에 기재된 조작에 의해 플라스미드 pCHV90 을 구축한 후에, 이 플라스미드를 보유하는 형질전환체를 배양하고, 이 배양물로부터 CHV-90 을 조제하였다.

<302> 인간 피브로넥틴 유래의 프래그먼트, CHV-181 은 국제공개 제 97/18318 호 팜플렛에 기재된 방법으로 CHV-181 을 코드하는 DNA 를 함유하는 플라스미드 (pCHV181) 를 구축한 후, 이 플라스미드를 도입한 대장균 (Escherichia coli HB101/pCHV181) 을 배양하고, 이 배양물로부터 상기 CHV-179 와 동일한 방법으로 조제하였다.

<303> (2) CHV-92 의 조제

<304> 상기 폴리펩티드 CHV-181 을 발현시키기 위한 플라스미드, pCHV181 에 대해, CHV-181 을 코드하는 영역 중의 III-13 영역을 코드하는 영역을 결실한 플라스미드 CHV92 를 구축하였다. 결실조작은 일본특허 2729712 호 공보에 기재되어 있는, 플라스미드 pCHV179 로부터의 III-14 코드영역의 결실조작에 준하여 실행하였다.

<305> 상기 플라스미드 pCHV92 로 형질전환된 대장균 HB101 (Escherichia coli HB101/pCHV92) 을 배양하고, 이 배양물로부터 일본특허 제 2729712 호에 기재된 CHV-89 폴리펩티드의 정제방법에 준하여 정제조작을 하여 정제 CHV-92 표품 (標品) 을 얻었다.

<306> (3) H-275-Cys 의 조제

<307> 폴리펩티드 H-275-Cys 를 발현시키기 위한 플라스미드는 이하에 나타내는 조작에 따라 구축하였다. 즉 Escherichia coli HB101/pCH102 (FERM BP-2800) 로부터 플라스미드 pCH102 를 조제하였다. 이 플라스미드를 주형으로 하고, 서열표의 서열번호 : 14 에 염기서열을 나타내는 프라이머 12S 와 서열표의 서열번호 : 15 에 염기서열을 나타내는 프라이머 14A 를 사용한 PCR 을 실행하여, 피브로넥틴의 헤파린 결합 폴리펩티드를 코드하는 약 0.8 kb 의 DNA 단편을 얻었다. 얻어진 DNA 단편을 NcoI, BamHI (모두 다까라슈죠사 제조) 로 소

화한 후, NcoI, BamHI 로 소화한 pTV118N (다까라슈죠사 제조) 와 라이게이션함으로써 플라스미드 pRH1 을 구축하였다.

<308> 플라스미드 벡터 pINIII-ompA$_1$ [구라이엡 J. 등 (Ghrayeb J. et al.), EMBO J., 제 3 권, 제 10 호, 제 2437 ~ 2442 면 (1984)] 을 BamHI 와 HincII (다까라슈죠사 제조) 로 소화하고, 리포프로테인 터미네이터 영역을 포함하는 약 0.9 kb 의 DNA 단편을 회수하였다. 이것을 BamHI 와 HincII 로 소화한 상기 플라스미드 pRH1 과 혼합하여 라이게이션을 실행하고, lac 프로모터, 헤파린 결합 폴리펩티드를 코드하는 DNA 단편 및 리포프로테인 터미네이터를 이 순서로 함유하는 플라스미드 pRH1-T 를 얻었다.

<309> 이 플라스미드 pRH1-T 를 주형으로 하고, 서열표의 서열번호 : 16 에 염기서열을 나타내는 프라이머 Cys-A 와 서열표의 서열번호 : 17 에 염기서열을 나타내는 프라이머 Cys-S 를 사용한 PCR 반응 후, 회수한 증폭 DNA 단편을 NotI (다까라슈죠사 제조) 로 소화하고, 다시 이 DNA 단편을 셀프라이게이션시켰다. 이렇게 하여 얻어진 환형상 DNA 를 SpeI 와 ScaI (다까라슈죠사 제조) 로 소화하여 얻어지는 2.3 kb 의 DNA 단편과, 플라스미드 pRH1-T 를 SepI 와 ScaI (다까라슈죠사 제조) 로 소화하여 얻어지는 2.5 kb 의 DNA 단편을 혼합하여 라이게이션을 실행하고, 플라스미드 pRH-Cys 를 얻었다. 이 플라스미드에는, 상기 H-271 의 N 말단측에 Met-Ala-Ala-Ser 의 4 아미노산이 부가되고, 다시 C 말단에 Cys 가 부가된 폴리펩티드 (H-275-Cys) 가 코드되었다.

<310> 폴리펩티드 H-275-Cys 는 이하의 방법에 의해 조제하였다. 상기 플라스미드 pRH-Cys 로 형질전화된 대장균 HB101 (Escherichia coli HB101/pRH-Cys) 을 120 ㎖ 의 LB 배지중, 37℃ 에서 하룻밤 배양하였다. 배양액으로부터 회수한 균체를 40 ㎖ 의 파쇄용 완충액 (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.5) 에 현탁, 초음파 처리를 하여 균체를 파쇄하였다. 원심분리를 하여 얻어진 상청을 정제용 완충액 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5) 으로 평형화된 하이트랩-헤파린컬럼 (Pharmacia 사 제조) 에 넣었다. 동 완충액으로 컬럼내의 비흡착 획분을 세정한 후, 0 ~ 1 M NaCl 농도 구배를 가진 정제용 완충액으로 용출을 실행하였다. 용출액을 SDS-PAGE 로 분석하고, H-275-Cys 의 분자량에 상당하는 획분을 모아 정제 H-275-Cys 표품을 얻었다.

<311> 실시예 10 피브로넥틴 프래그먼트 (FNfr) 를 사용한 특이적 세포상해활성 유지 CTL 의 확대배양

<312> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<313> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로, 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도를 실행하였다. 이 때, 실시예 9 에 기재된 각 피브로넥틴 프래그먼트 (이하 FNfr 이라고 기재함) 를 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 대조군으로서 FNfr 을 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<314> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 FNfr 첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<315> (2) CTL 의 확대배양

<316> 실시예 10-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하고, 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로 CTL 의 확대배양을 실행하였다. 이 때 CTL 유도시에 첨가한 것과 동일한 FNfr 을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또 FNfr 을 첨가하지 않고 유도한 대조군에는 FNfr 은 첨가하지 않았다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시후 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 를 함유하는 5HRPMI 혹은 10% Hyclone FBS, 0.1 mM 비필수아미노산, 1 mM 피루빈산나트륨, 2 mM L-글루타민 (전부 Bio Whittaker 사 제조), 10 mM HEPES (나카라이테스크사 제조), 1% 스트렙토마이신-페니실린 (Gibco BRL 사 제조) 을 함유하는 RPMI1640 배지 (Bio Whittaker 사 제조) (이하 10HycloneRPMI 라고 함) 를 5 ㎖ 각 플라스크에 첨가하였다. 이 때 FNfr 첨가군의 배지에는 동농도의 FNfr 을 첨가하였다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 확대배양전의 특이적 세포상해활성을 어느 정도 유지하는지를 「특이적 세포상해활성유지 (%)」로서 산출하였다. 「특이적 세포상해활성유지 (%)」는 이하의 식 2 에 따라 산출하였다.

<317> 식 2 : 특이적 세포상해활성유지 (%) = {확대배양후의 특이적 세포상해활성 (%)/확대배양전의 특이적 세포상해활성 (%)} ×100

<318> 측정결과를 표 13 에 나타낸다.

표 13

배지	피브로넥틴 프래그먼트	확대 증식률 (배)	세포 상해 활성 유지 (%) E/T 비 = 10
5HRPMI	대조군 (FNfr 무첨가)	417	17.3
	CH-271	397	53.5
	H-296	413	49.3
	C-CS1	393	49.3
	CHV-92	370	66.2
10HycloneRPMI	대조군 (FNfr 무첨가)	130	48.1
	CH-271	132	250.8
	H-296	75	162.3
	H-271	52	72.2
	C-CS1	130	100.2
	CHV-92	35	157.8
배지	피브로넥틴 프래그먼트	확대 증식률 (배)	세포 상해 활성 유지 (%) E/T 비 = 10
10HycloneRPMI	대조군 (FNfr 무첨가)	42	46.3
	CHV-89	35	69.0
	CHV-90	36	75.6

<319>

<320> 표 13 에 나타나는 바와 같이 유도시 그리고 확대배양시에 각종 피브로넥틴 프래그먼트를 첨가한 군의 CTL 은, 피브로넥틴 프래그먼트를 첨가하지 않은 대조군에 비하여, 14 일간의 확대배양 후에도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 즉, 피브로넥틴 프래그먼트의 공존하에 유도, 확대배양을 실행함으로써, 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서의 CTL 의 확대배양이 가능한 것이 밝혀졌다.

<321> 실시예 11 피브로넥틴 존재하에서의 CTL 유도, 확대배양

<322> (1) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<323> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때, FNfr 대신에 피브로넥틴 (Calbiochem 사 제조) 을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다 (대조군은 무첨가). 유도개시후 14 일째의 CTL 의 세포상해활성을, 실시예 1-1-(3) 에 기재된 방법으로 평가한 결과, 유도시의 FNfr 첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<324> (2) CTL 의 확대배양

<325> 실시예 11-(1) 에서 조제한 CTL 을 실시예 10-(2) 와 동일한 방법으로 확대배양하였다. 이 때 유도시에 피브로넥틴이 첨가되었던 것에는 피브로넥틴 (Calbiochem 사 제조) 을 종농도 10 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다 (대조군은 무첨가). 얻어진 CTL 의 세포상해활성을 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 측정하여, 확대배양전의 특이적 세포상해활성을 어느 정도 유지하는지를 「특이적 세포상해활성유지 (%)」로서 산출하였다. 「특이적 세포상해활성유지 (%)」는 상기의 식 2 에 따라 산출하였다.

<326> 측정결과를 표 14 에 나타낸다.

표 14

	확대 증식률 (배)	세포 상해 활성 유지 (%) E/T 비 = 10
대조군 (피브로넥틴 무첨가)	130	48.1
피브로넥틴	157	148.9

<327>

<328> 표 14 에 나타내는 바와 같이 피브로넥틴의 존재하에 CTL 유도 및 확대배양을 실행한 군에서는 높은 세포상해활성이 유지되었다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시의 어느 것에서나 피브로넥틴을 첨가하지 않은 대조군의 세포상해활성은 명확하게 저하되었다. 즉, 피브로넥틴을 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서의 CTL 의 확대배양이 가능한 것이 밝혀졌다.

<329> 실시예 12 고정화된 피브로넥틴 (FN) 프래그먼트 존재하에서의 CTL 확대배양

<330> (1) FN 프래그먼트 고정화

<331> 이하의 실험에서 사용하는 배양용 기재 (용기) 에 피브로넥틴 프래그먼트를 고정화하였다. 즉, 24 구멍 세포배양 플레이트, 12.5 ㎠ 플라스크에 각종 피브로넥틴 프래그먼트 (종농도 10 ㎍/㎖) 를 함유하는 PBS 를 1 ~ 2 ㎖ 씩 첨가하고, 실온에서 2 시간 인큐베이트한 후, 사용시까지 4℃ 에서 보존하였다. 또 상기 플레이트, 플라스크는 사용전에 PBS 로 2 회 세정하였다.

<332> (2) 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 의 유도

<333> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하고, 실시예 1-1-(2) 와 동일한 방법으로, 항 인플루엔자 바이러스 메모리 CTL 을 유도하였다. 이 때 배양기재로서 FNfr 을 고정화한 플레이트를 사용하였다 (대조군에는 고정화처리를 하지 않은 플레이트를 사용). 유도후의 CTL 의 세포상해활성을, 실시예 1-1-(3) 에 기재된 방법으로 평가한 결과, 유도시에 사용한 플레이트의 FNfr 고정화의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<334> (3) CTL 의 확대배양

<335> 실시예 12-(2) 에서 조제한 CTL 을 실시예 10-(2) 와 동일한 방법으로 확대배양하였다. 이 때, 배양기재로서 각종 FNfr 을 고정화한 플라스크를 사용하였다 (대조군에는 고정화처리를 하지 않은 플라스크를 사용). 또 배지에는 10Hyclone/RPMI 를 사용하였다.

<336> 이렇게 하여 확대배양된 CTL 의 세포상해활성이 확대배양전과 비교하여 어느 정도 유지되고 있는지를 「특이적 세포상해활성유지 (%)」로서 평가하였다. 「특이적 세포상해활성유지 (%)」는 상기의 식 2 에 따라 산출하였다.

<337> 측정결과를 표 15 에 나타낸다.

표 15

피브로넥틴 프래그먼트	확대 증식률 (배)	세포 상해 활성 유지 (%) E/T 비 = 3
대조군 (FNfr 비고정)	130	48.1
CH-271	128	95.4
H-296	27	95.0
H-271	40	133.9
C-CS1	130	73.8
H-275-Cys	87	137.7
CHV-92	122	92.7

<338>

<339> 표 15 에 나타나는 바와 같이 CTL 유도시 및 확대배양시에 피브로넥틴 프래그먼트를 고정화한 배양기재 (플레이트, 플라스크) 를 사용한 군의 CTL 은 확대배양후에도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시의 어느것에나 피브로넥틴 프래그먼트를 고정화하지 않은 기재를 사용한 대조군에서는, 세포상해활성은 명확하게 저하되었다. 즉 고정화된 피브로넥틴 프래그먼트를 사용함으로써, 배지중에 용해되어 있는 프래그먼트와 동일하게 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 CTL 을 확대배양하는 것이 가능한 것이 밝혀졌다.

<340> 실시예 13 종양관련항원특이적 세포상해활성을 유지하는 CTL 의 확대배양

<341> (1) 항 종양관련 항원 (MART1) 특이적 CTL 의 유도

<342> 실시예 1-1-(1) 에 기재된 방법으로 분리, 보존한 PBMC 를 사용하여 실시예 7-2-(1) 과 동일한 방법으로 항 종양관련 항원 (T 세포에 의해 인식되는 멜라노마 항원, MART1) 특이적 CTL 을 유도하였다. 이 때 항 HGF 항체를 종농도 2㎍/㎖ 가 되도록 첨가하였다. 또 대조군으로서 샘플을 첨가하지 않은 군도 설정하였다.

<343> 이렇게 하여 조제한 유도개시후 35 일째의 CTL 의 세포상해활성은, 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 평가하였다. 단 이 때, 표적세포로서 하룻밤 에피토프 펩티드와 공배양, 혹은 에피토프 펩티드 비존재하에서 배양한 HLA-A2.1 유지 EBV 트랜스폼 B 세포 (세포명 221A2.1), 100 U/㎖ 의 IFN-γ존재하에서 이틀밤 배양한 HLA-A2.1 유지 암세포주 (세포명 624mel; HLA-A2.1 유지 MART1 발현 세포) 혹은 HLA-A2.1 비유지 암세포주 (세포명 938mel; HLA-A2.1 비유지 MART1 발현세포) 를 사용하였다.

<344> 그 결과, 유도직후에서 특이적 세포상해활성은 유도되었으나, 유도시의 샘플첨가의 유무에 의한 세포상해활성의 차이는 거의 없었다.

<345> (2) CTL 의 확대배양

<346> 실시예 13-(1) 에서 조제한 CTL 을 사용하고, 실시예 1-1-(4) 와 동일한 방법으로, CTL 의 확대배양을 실행하였다. 이 때, 실시예 13-(1) 에서의 CTL 유도시에 첨가한 항 HGF 항체를 2 ㎍/㎖ 가 되도록 첨가하는 군과 유도시부터 샘플을 전혀 첨가하지 않은 군을 설정하였다. 그 동안 펩티드에 의한 자극은 전혀 부가하지 않고, 배양개시 1 일째에 종농도 120 U/㎖ 의 IL-2 를 첨가, 다시 배양개시후 4 일째 이후는 2 ~ 3 일마다 배양상청을 절반 제거한 후, 60 U/㎖ 의 IL-2 및 2 ㎍/㎖ 의 항 HGF 항체를 함유하는 5HRPMI 5 ㎖ 를 각 플라스크에 첨가하였다. 단, 샘플을 첨가하지 않은 군에 있어서는, 배지교환시에도 샘플은 첨가하지 않았다. 확대배양개시후, 14 일째에 실시예 1-1-(3) 과 동일한 방법으로 CTL 의 특이적 세포상해활성을 측정하였다. 측정결과를 표 16 에 나타낸다.

표 16

샘플	샘플 첨가 * CTL 유도시	샘플 첨가 * 확대배양시	확대 증식률 (배)	펩티드 부가 ¶	표적 세포	세포 상해 활성 (%) E/T 비 3
대조군	-	-	83	-	221A2.1	0
	-	-	83	+	221A2.1	31.7
	-	-	83	-	938mel	2.3
	-	-	83	-	624mel	60.0
						E/T 비 3
항HGF 항체	+	+	107	-	221A2.1	0
	+	+	107	+	221A2.1	59.1
	+	+	107	-	938mel	0
	+	+	107	-	624mel	81.2

* : + ; 샘플을 첨가, - ; 샘플 첨가하지 않음

<347> ¶ : + ; 펩티드 부가 있음, - ; 펩티드 부가 없음

<348> 그 결과, CTL 유도시 및 확대배양시에 항 HGF 항체를 첨가한 군에 있어서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 한편 CTL 유도시 및 확대배양시 어느 것에서나 이들 샘플을 첨가하지 않은 군에서는 그 활성은 명확하게 저하되었다. 또 종양세포주에 대한 특이적 세포상해활성에 대해서도 CTL 유도시 및 확대배양시에 항 HGF 항체를 첨가한 군에서는, CTL 은 14 일간의 확대배양후에도 특이적으로 높은 세포상해활성을 유지하였다. 즉 항 종양관련 항원 (MART1) CTL 의 확대배양시에서도 항 HGF 항체를 CTL 유도시 및 확대배양시에 첨가함으로써, 특이적으로 높은 세포상해활성을 장기적으로 유지한 상태에서, CTL 의 확대배양이 가능해지는 것이 밝혀졌다.

<349> 서열표 프리텍스트

<350> 서열번호 : 1 은 C-274 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산 서열이다.

<351> 서열번호 : 3 은 H-271 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<352> 서열번호 : 4 는 H-296 으로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<353> 서열번호 : 5 는 CH-271 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<354> 서열번호 : 6 은 CH-296 으로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<355> 서열번호 : 7 은 C-CS1 으로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<356> 서열번호 : 8 은 CHV-89 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<357> 서열번호 : 9 는 CHV-90 으로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<358> 서열번호 : 10 은 CHV-92 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<359> 서열번호 : 11 은 CHV-179 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<360> 서열번호 : 12 는 CHV-181 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<361> 서열번호 : 13 은 H-275-Cys 로 명명된 인간 피브로넥틴 유래의 펩티드 프래그먼트의 아미노산서열이다.

<362> 서열번호 : 14 는 프라이머 12S 의 염기서열이다.

<363> 서열번호 : 15 는 프라이머 14A 의 염기서열이다.

<364> 서열번호 : 16 은 프라이머 Cys-A 의 염기서열이다.

<365> 서열번호 : 17 은 프라이머 Cys-S 의 염기서열이다.

<366> 서열번호 : 18 은 인플루엔자바이러스의 매트릭스 프로테인 유래 HLA-A2.1 결합성 펩티드에 의거하여 디자인된 펩티드의 아미노산서열이다.

<367> 서열번호 : 19 는 멜라노머 항원 MAGE3 유래 HLA-A2.1 결합성 펩티드에 의거하여 디자인된 펩티드의 아미노산서열이다.

<368> 서열번호 : 20 은 멜라노머 항원 MART1 유래 HLA-A2.1 결합성 펩티드에 의거하여 디자인된 펩티드의 아미노산서열이다.

산업이용 가능성

<369> 본 발명에 의해 항원특이적인 세포상해활성을 고활성으로 유지한 상태에서 유지 및/또는 확대배양할 수 있는 CTL 의 유도방법, 유지방법 및 확대배양방법이 제공된다.

<370> 당해 방법은 대량의 CTL 을 필요로 하는 양자면역요법 등의 세포의료의 분야에서 매우 유용하다. 또 당해 방법에 의해 조제된 CTL 은 안전한 방법으로 조제되는 점에서 매우 안전성이 높은 세포의약이 된다.

도면의 간단한 설명

<371> 도 1 은 히알루론산에 의한 가용성 CD44 와 가용성 CD44 인식항체의 결합저해활성을 나타내는 도면이다.

<372> 도 2 는 FL 표지 히알루론산과 CTL 세포표면상 CD44 의 결합활성을 나타내는 도면이다.

<373> 도 3 은 가용성 CD44 인식항체와 배지중의 가용성 CD44 의 결합활성을 나타내는 도면이다.

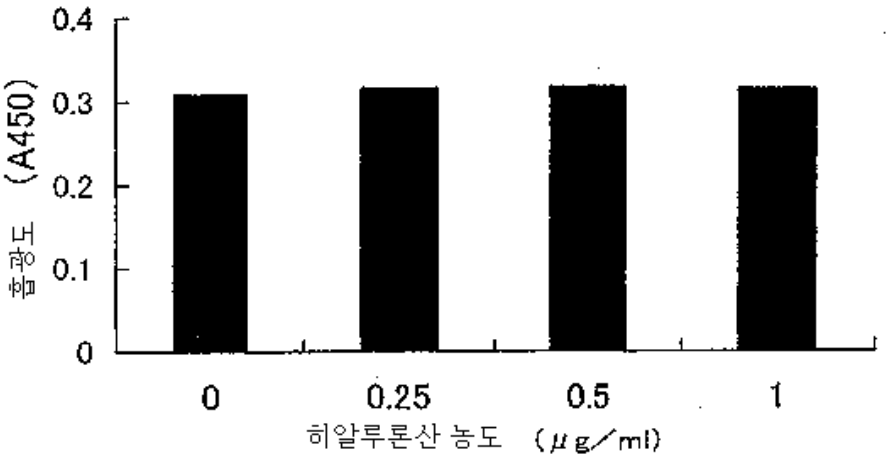
<374> 도 4 는 HA 비-차단 (Non-Blocking) 항 CD44 항체와 배지중의 가용성 CD44 의 결합활성을 나타내는 도면이다.

<375> 도 5 는 HA 비-차단 항 CD44 항체와 CTL 세포표면상 CD44 의 결합활성을 나타내는 도면이다.

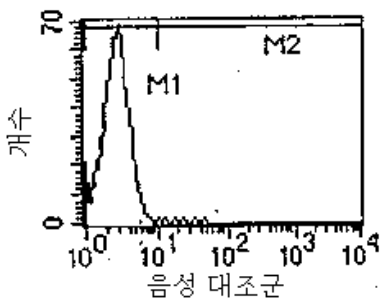
<376> 도 6 은 HA 비-차단 항 CD44 항체첨가 확대배양후 CTL 의 세포표면 상에서의 본 항체의 결합을 나타내는 도면이다.

도면

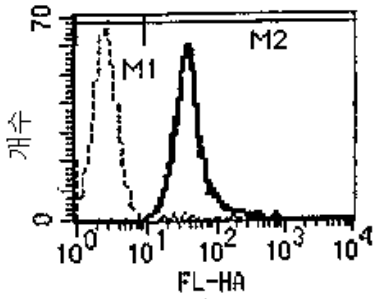
도면1



도면2

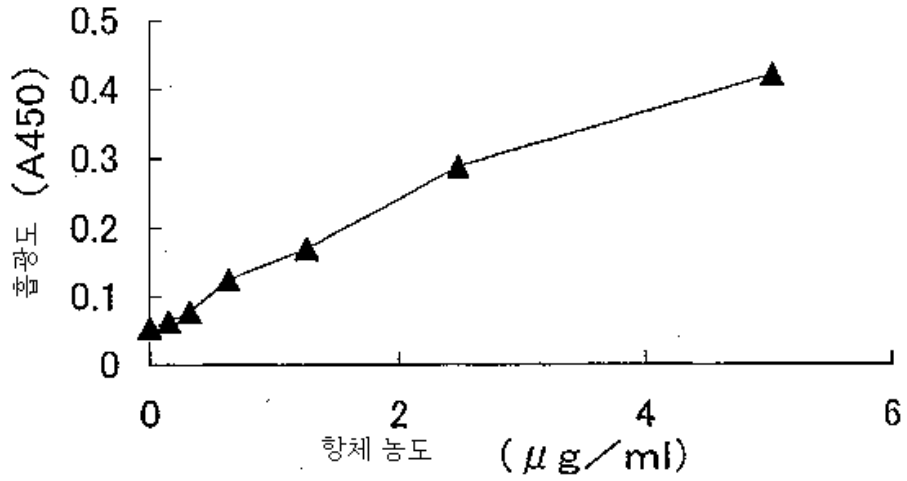


마커	% 게이트
총	100.00
M1	99.90
M2	0.10



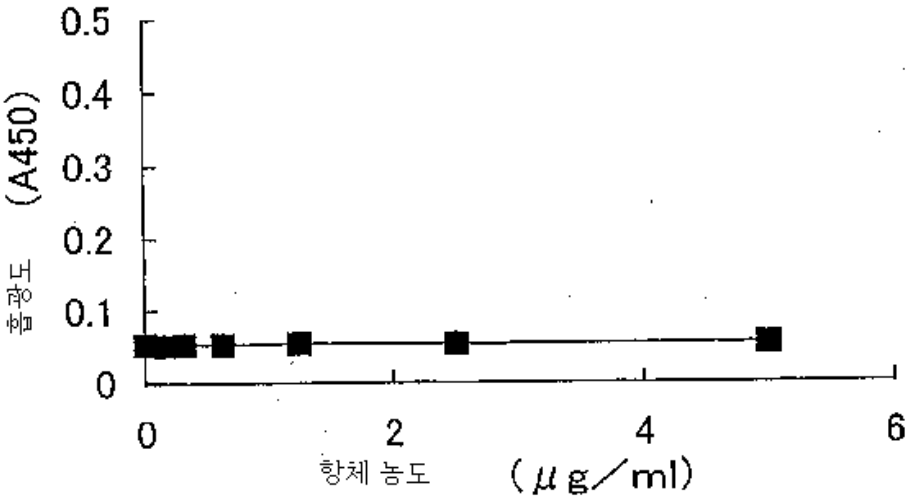
마커	% 게이트
총	100.00
M1	0.00
M2	100.00

도면3



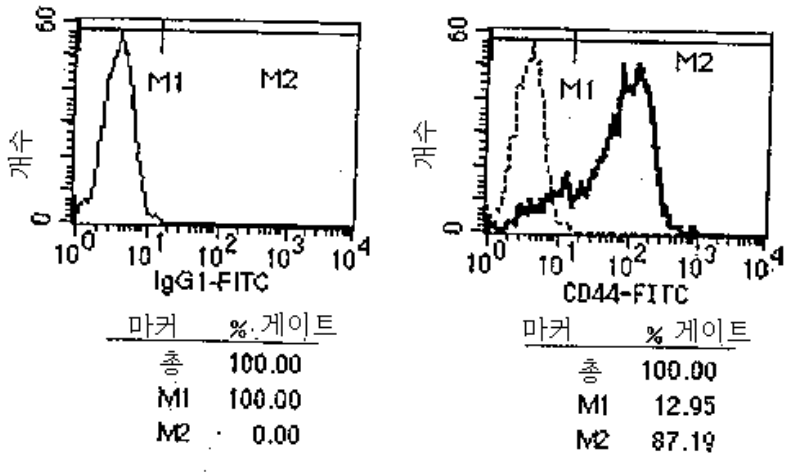
가용성 CD44 인식 항체

도면4

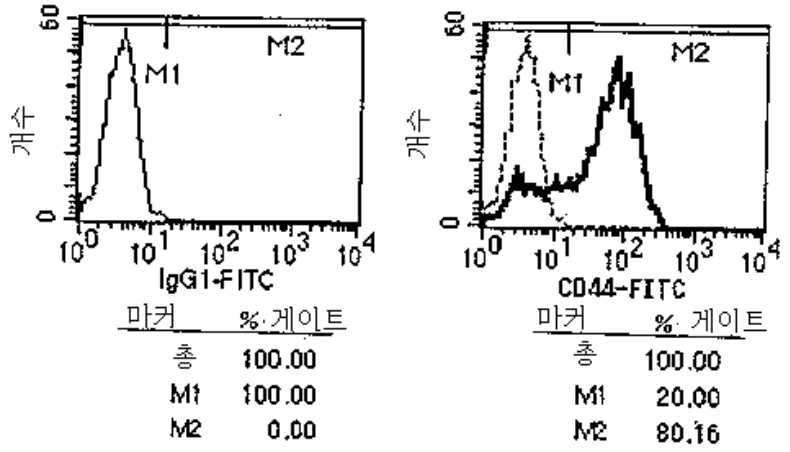


HA 비-차단 항CD44 항체

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> TAKARA BIO INC.
<120> Method for expansion of antigen specific cytotoxic T lymphocyte

<130> 02-050-PCT

<150> JP 2001-246747
<151> 2001-08-15

<150> JP 2001-376966
<151> 2001-12-11

<150> JP 2002-084428
<151> 2002-03-25

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 274
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named C-274

<400> 1

```
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
  1               5                  10                  15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
             20                  25                  30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
         35                  40                  45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140
```

```
Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp
```

<210> 2
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly
  1               5                  10                  15

Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
             20                  25
```

<210> 3
<211> 271
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named H-271

<400> 3

```
Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
  1               5                  10                  15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
             20                  25                  30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
         35                  40                  45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
     50                  55                  60

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
 65                  70                  75                  80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro
                 85                  90                  95

Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
            100                 105                 110

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
        115                 120                 125

Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
    130                 135                 140

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
145                 150                 155                 160

Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
                165                 170                 175

Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
            180                 185                 190
```

Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
195 200 205

Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro
210 215 220

Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
225 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
245 250 255

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
260 265 270

<210> 4
<211> 296
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named H-296

<400> 4
Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
35 40 45

Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
50 55 60

Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro

85 90 95

Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
100 105 110

Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
115 120 125

Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp
130 135 140

Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
145 150 155 160

Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
165 170 175

Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
180 185 190

Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
195 200 205

Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro
210 215 220

Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
225 230 235 240

Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
245 250 255

Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr Asp
260 265 270

Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro
275 280 285

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
290 295

<210> 5
<211> 549
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CH-271

<400> 5

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
180 185 190

```
Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
        275                 280                 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
    290                 295                 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
305                 310                 315                 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
                325                 330                 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
            340                 345                 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
        355                 360                 365

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
    370                 375                 380

Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
385                 390                 395                 400

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
                405                 410                 415

Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
            420                 425                 430
```

```
Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
        435                 440                 445

Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro
    450                 455                 460

Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
465                 470                 475                 480

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
                485                 490                 495

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
            500                 505                 510

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
        515                 520                 525

Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
    530                 535                 540

Gly Arg Lys Lys Thr
545
```

<210> 6
<211> 574
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CH-296

<400> 6

```
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
  1               5                  10                  15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
            20                  25                  30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
```

```
          35                  40                  45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270
```

```
Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
        275                 280                 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
    290                 295                 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
305                 310                 315                 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
                325                 330                 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
            340                 345                 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
        355                 360                 365

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
    370                 375                 380

Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
385                 390                 395                 400

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
                405                 410                 415

Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
            420                 425                 430

Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
        435                 440                 445

Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro
    450                 455                 460

Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser
465                 470                 475                 480

Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu
                485                 490                 495

Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly
            500                 505                 510
```

Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr
515 520 525

Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile
530 535 540

Gly Arg Lys Lys Thr Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His
545 550 555 560

Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
565 570

<210> 7
<211> 302
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named C-CS1

<400> 7
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro

```
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Pro Ser Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His
        275                 280                 285

Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr
    290                 295                 300
```

<210> 8
<211> 367
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CHV-89

<400> 8

```
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
  1               5                  10                  15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
             20                  25                  30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
         35                  40                  45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
```

```
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
        275                 280                 285

Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
    290                 295                 300

Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
305                 310                 315                 320

Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
                325                 330                 335

Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr
        355                 360                 365
```

<210> 9
<211> 368
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CHV-90

<400> 9

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
50 55 60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
65 70 75 80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
85 90 95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
100 105 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
115 120 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
130 135 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145 150 155 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
165 170 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
180 185 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
195 200 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
210 215 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys

225 230 235 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
245 250 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe
275 280 285

Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg
290 295 300

Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro
305 310 315 320

Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr
325 330 335

Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala
340 345 350

Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
355 360 365

<210> 10
<211> 370
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CHV-92

<400> 10
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

```
Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
         35                  40                  45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
```

260 265 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
275 280 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
290 295 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
305 310 315 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
325 330 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
340 345 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
355 360 365

Leu Glu
370

<210> 11
<211> 457
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CHV-179

<400> 11
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
1 5 10 15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
20 25 30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu

```
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240

Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
                245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
        275                 280                 285
```

```
Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
    290                 295                 300

Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln
305                 310                 315                 320

Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile
                325                 330                 335

Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
            340                 345                 350

Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala
        355                 360                 365

Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser
    370                 375                 380

Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile
385                 390                 395                 400

Ile Lys Tyr Glu Lys Pro Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg
                405                 410                 415

Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly
            420                 425                 430

Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser
        435                 440                 445

Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr
    450                 455
```

<210> 12
<211> 472
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named CHV-181

<400> 12

```
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro Asp Thr Met Arg Val
  1               5                  10                  15

Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu Val Arg
             20                  25                  30

Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser
         35                  40                  45

Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu Pro Gly Thr Glu
     50                  55                  60

Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 65                  70                  75                  80

Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp
                 85                  90                  95

Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro
            100                 105                 110

Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe
        115                 120                 125

Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile
    130                 135                 140

Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
145                 150                 155                 160

Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu Ile Gly Gln Gln Ser
                165                 170                 175

Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr
        195                 200                 205

Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu
    210                 215                 220

Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
225                 230                 235                 240
```

```
Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly
               245                 250                 255

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Glu
            260                 265                 270

Ile Asp Lys Pro Ser Met Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe
        275                 280                 285

Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn
    290                 295                 300

Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr
305                 310                 315                 320

Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val
               325                 330                 335

Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala
            340                 345                 350

Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr
        355                 360                 365

Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr
    370                 375                 380

Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr
385                 390                 395                 400

Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln
               405                 410                 415

Arg Thr Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
            420                 425                 430

Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala
        435                 440                 445

Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro
    450                 455                 460

Ser Asn Leu Arg Phe Leu Ala Thr
```

465 470

<210> 13
<211> 276
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Fibronectin fragment named H-275-Cys

<400> 13
Met Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln
1 5 10 15

Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln
20 25 30

Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro
35 40 45

Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser
50 55 60

Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys
65 70 75 80

Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu
85 90 95

Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr
100 105 110

Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe
115 120 125

Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr
130 135 140

Ile Lys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly
145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
180 185 190

Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln
195 200 205

Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Lys Pro
210 215 220

Gly Ser Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr
225 230 235 240

Glu Ala Thr Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr
245 250 255

Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg
260 265 270

Lys Lys Thr Cys
275

<210> 14
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer 12S

<400> 14
aaaccatggc agctagcgct attcctgcac caactgac 38

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer 14A

<400> 15
aaaggatccc taactagtct ttttccttcc aatcag 36

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer Cys-A

<400> 16
aaaagcggcc gctagcgcaa gccatggtct gtttcctgtg 40

<210> 17
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Primer Cys-S

<400> 17
aaaagcggcc gcactagtgc atagggatcc ggctgagcaa c 41

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Designed peptide based on
matrix-protein derived from influenza virus

<400> 18
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Designed peptide based on HLA A2.1 binding peptide derived from melanoma antigen MAGE3

<400> 19
Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Designed peptide based on HLA A2.1 binding peptide derived from melanoma antigen MART1

<400> 20
Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5