



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030593

(43) 공개일자 2020년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 39/0011 (2018.08)

(21) 출원번호 10-2020-7005086

(22) 출원일자(국제) 2018년07월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년02월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/043146

(87) 국제공개번호 WO 2019/018801

국제공개일자 2019년01월24일

(30) 우선권주장

62/535,742 2017년07월21일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

버클리 라이트츠, 인크.

미국, 캘리포니아 94608, 에머리빌, 스위트 320,
호턴 스트리트 5858

(72) 발명자

비밀러 피터 제이

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
5858 스위트 320

마스트로안니 알렉산더 제이

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
5858 스위트 320

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

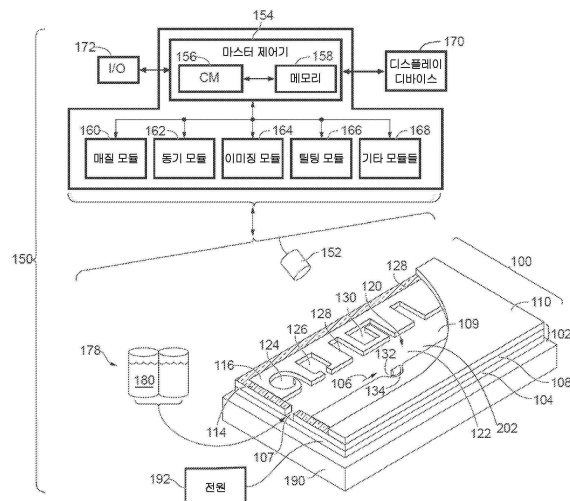
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 항원 제시 합성 표면, 공유결합으로 관능화된 표면, 활성화된 T 세포, 및 이들의 용도

(57) 요약

생체과학 및 관련된 분야에서, 생체분자 및 생물학적 미세객체와 같은 생체재료와 접촉하는 장치, 디바이스, 및 재료의 표면을 개질하는 것이 유용할 수 있다. 여기에 표면 개질화, 표면 관능화 시약, 이들의 제조, 및 T 림프구를 활성화하기 위해 표면을 개질하는 방법이 기재된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
B01L 3/502761 (2013.01)
B01L 3/502792 (2013.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
C07K 14/70539 (2013.01)
C07K 16/2806 (2013.01)
A61K 2039/625 (2013.01)
C07K 2317/74 (2013.01)
C07K 2317/75 (2013.01)

(72) 발명자

페이 샤오 닝

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

로우 주니어 랜덜 디

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

모시아로 안나마리아

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

라우터백 케빈 디

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

브로네베츠키 엘레나

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

슈타들러 귀도 케이

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

맥팔랜드 앤드류 더블유

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

채프먼 케빈 티

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

슈미스 듀안

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

마크스 나탈리 씨

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

굿셀 아만다 엘

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트
 5858 스위트 320

(30) 우선권주장

62/660,779 2018년04월20일 미국(US)
 62/664,279 2018년04월30일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면으로서,

a. 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들로서, 각각의 1 차 활성화 분자 리간드는 상기 T 세포의 T 세포 수용체 (TCR) 에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및

b. 각각 TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하고,

상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들 및 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드들 각각은 항원 제시 표면에 특이적으로 결합되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 20:1 내지 약 1:20 인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들은 상기 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 미크론 당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

복수의 표면 차단 분자 리간드들을 추가로 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 복수의 공 활성화 분자 리간드는 상기 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 미크론 당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자들 또는 제곱 미크론 당 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 항원 제시 표면 상에 존재하는 상기 1 차 활성화 분자 리간드 대 상기 공 활성화 분자 리간드의 비가 약 1:10 내지 약 2 : 1, 약 1 : 5 내지 약 2 : 1, 약 1 : 2 내지 약 2 : 1, 약 1:10 내지 약 1 : 1, 약 1 : 5 내지 약 1 : 1, 약 1 : 1 내지 약 2 : 1 또는 약 1 : 2 내지 약 1 : 1 인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

- (i) 상기 항원 제시 표면은 유리, 금속, 세라믹 및/또는 금속 산화물을 포함하거나; 또는
- (ii) 상기 항원 제시 표면은 폴리머 표면을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각이 결합 모이어티에 비공유적으로 결합되고, 추가로 상기 결합 모이어티는 (i) 상기 항원 제시 표면에 공유적으로 결합되거나 (ii) 상기 표면에 공유적으로 결합되는 제 2 결합 모이어티에 비공유적으로 결합되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 MHC 분자가 MHC 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 MHC 분자가 종양 연관 항원을 추가로 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 종양 연관 항원이 SLC45A2, TCL1, VCX3A, MART1 또는 NYESO1 인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

- (i) 상기 TCR 공 활성화 단백질 분자는 CD-28 결합 단백질 또는 CD28 과의 결합 능력을 보유하는 이의 단편을 포함하거나; 또는
- (ii) 상기 제 1 TCR 공 활성화 분자는 항-CD28 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 상기 단편은 CD28 과의 결합 활성을 보유하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

- (i) 상기 보조 자극 분자는 CD2 결합 단백질 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 단편은 CD2와의 결합 활성을 보유하거나; 또는 (ii) 상기 보조 자극 분자는 항-CD2 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 단편은 CD2 와의 결합 활성을 보유하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 14

제 4 항에 있어서,

복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 폴리에틸렌 (PEG) 모이어티, 카복실산 모이어티 또는 이들의 조합을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 15

제 1 항에 있어서,

상기 복수의 공 활성화 분자 리간드의 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 3:1 내지 약 1:3 인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 제시 표면이 비드의 표면인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.

청구항 17

T 세포 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법으로서,

각각 상기 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자를 공유적으로 관능화된 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계로서, 상기 제 1 복수의 결합 모이어티 각각은 상기 1 차 활성화 분자에 결합하도록 구성되는, 상기 제 1 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계;

상기 공 활성화 분자에 결합하도록 구성된 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티와 복수의 공 활성화 분자를 반응시키는 단계로서, 상기 복수의 공 활성화 분자는 각각

T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는

보조 TCR 활성화 분자를 포함하는, 상기 복수의 공 활성화 분자를 반응시켜,

상기 항원 제시 표면 상에 복수의 특이적으로 결합된 1 차 활성화 분자 리간드 및 복수의 특이적으로 결합된 공 활성화 분자 리간드를 제공하는 단계를 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 20:1 내지 약 1:20 인, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서,

복수의 표면 차단 분자를 공유결합으로 관능화된 표면의 제 3 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계를 더 포함하고, 여기서 제 3 복수의 결합 모이어티들의 결합 모이어티들 각각은 표면 차단 분자에 결합하도록 구성되는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

상기 MHC 분자가 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서,

MHC 분자를 포함하는 상기 복수의 1 차 활성화 분자 각각이 중양 연관 항원을 추가로 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 22

제 17 항에 있어서,

상기 중양 연관 항원이 SLC45A2, TCL1, VCX3A, MART1 또는 NYESO1 인, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 23

제 17 항에 있어서,

상기 공유 관능된 표면의 상기 제 1 복수의 결합 모이어티 각각이 스트렙타비딘 또는 비오틴 모이어티를 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 24

제 17 항에 있어서,

중간 반응성 표면의 반응 모이어티의 적어도 제 1 서브 세트를 각각 결합 모이어티를 포함하는 제 1 연결 시약과 반응시킴으로써 상기 제 1 복수의 결합 모이어티를 포함하는 상기 공유결합으로 관능화된 표면을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

상기 결합 모이어티가 스트렙타비딘 또는 비오틴이고, 임의로 상기 결합 모이어티가 비오틴인 경우, 상기 방법은 상기 비오틴을 스트렙타비딘과 비공유적으로 연관시키는 단계를 추가로 포함하는, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 26

제 17 항에 있어서,

상기 제 2 복수의 결합 모이어티가 적어도 제 1 복수의 결합 모이어티의 제 2 서브 세트인, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 27

제 19 항에 있어서,

상기 표면 차단 분자에 결합하도록 구성된 제 3 의 복수의 결합 모이어티가 중간 반응성 표면의 반응성 부분의 추가 서브 세트인, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 28

제 17 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 제시 표면이 비드의 표면인, T 세포를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법.

청구항 29

T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법으로서,

복수의 T 세포를 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계로서, 상기 항원 제시 합성 표면은:

각각 상기 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및

각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하는, 상기 복수의 T 세포를 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및

상기 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 상기 복수의 T 세포를 배양함으로써, 상기 복수의 T 세포의 적어도 일부를 활성화된 T 세포로 전환시키는 단계를 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 30

T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법으로서,

복수의 T 세포를 제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및

상기 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 상기 복수의 T 세포를 배양함으로써, 상기 복수의 T 세포의 적어도 일부를 활성화된 T 세포로 전환시키는 단계를 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 31

제 30 항에 있어서,

상기 T 세포는 CD8+ T 세포를 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 32

제 30 항에 있어서,

복수의 T 세포를 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서,

성장 자극 분자 리간드들 각각은 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 성장 인자 수용체 리간드는 IL-21 또는 이의 단편을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 35

제 30 항에 있어서,

상기 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 배양하는 단계는 약 4 일 내지 약 7 일의 기간 동안 수행되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 36

제 30 항에 있어서,

상기 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 제 1 활성화 기간을 완료하는 단계로서, 상기 항원 제시 합성 표면은 제 1 항원 제시 합성 표면인, 상기 제 1 활성화 기간을 완료하는 단계;

복수의 활성화된 T 세포를 각각 MHC 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드, 및 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함하는 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및

제 2 배양 기간 동안 상기 복수의 활성화된 T 세포를 상기 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 배양함으로써, 증식된 복수의 활성화된 T 세포를 제공하는 단계를 더 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 제 2 항원 제시 표면이 복수의 비드의 표면이고, 상기 방법이 제 2 복수의 항원 제시 비드를 복수의 활성화된 T 세포에 대해 1 : 1 비로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 38

제 30 항에 있어서,

상기 활성화된 T 세포는 CD45RO+ 인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 39

제 30 항에 있어서,

상기 활성화된 T 세포는 CD28 양성인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 40

제 30 항에 있어서,

상기 항원 제시 표면이 비드의 표면인, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서,

상기 복수의 T 세포가 항원 제시 비드와 약 1 : 1 의 항원 제시 비드 대 세포의 비율로 접촉되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법.

청구항 42

제 30 항의 방법에 의해 생성된 생성물 T 세포를 포함하는 활성화된 T 세포의 집단.

청구항 43

암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법으로서,

상기 대상체로부터 복수의 T 림프구 (T 세포) 를 얻는 단계;

복수의 T 세포를 상기 복수의 T 세포 각각의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계로서, 상기 MHC 분자는 대상체의 암에 대해 특이적인 항원을 포함하고, 상기 항원 제시 합성 표면은 제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 항원 제시 표면인, 상기 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계;

복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계로서, 활성화는 상기 대상체의 암에 대해 특이적하도록 구성되는, 상기 복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계;

복수의 특이적 활성화된 T 세포를 활성화되지 않은 세포로부터 분리하는 단계; 및

복수의 항원 특이적 활성화된 T 세포를 상기 대상체에게 도입하는 단계를 포함하는, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

상기 복수의 항원 특이적 활성화된 T 세포를 분리하는 단계는 상기 항원 특이적 활성화된 T 세포의 표면 바이오마커를 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 45

제 44 항에 있어서,

상기 표면 바이오마커는 CD45RO+ 또는 CD28+ 인, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 46

제 43 항에 있어서,

항원 특이적 활성화된 T 세포의 증식된 집단을 제공하기 위해 항원 특이적 활성화된 T 세포를 빠르게 증식시키는 단계를 추가로 포함하는, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

빠른 증식은 상기 특이적 활성화된 T 세포를 상기 활성화되지 않은 T 세포로부터 분리한 후 수행되는, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 48

제 43 항에 있어서,

대상체를 치료하는 상기 방법이 상기 대상체에서 암의 진행을 지연시키거나 중단시키는, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 49

제 43 항에 있어서, 상기 항원 제시 표면이 비드의 표면인, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법.

청구항 50

T 림프구 (T 세포) 의 항원 특이적 활성화를 위해 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트로서,

- a. 적어도 하나의 복수의 스트렙타비딘 작용기들 및 적어도 하나의 복수의 표면 차단 분자 리간드들을 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면으로서, 상기 복수의 표면 차단 분자 리간드들은 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유적으로 부착되고, 상기 스트렙타비딘 작용기는 (i) 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유적으로 부착되거나 (ii) 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유적으로 부착된 비오틴 모이어티를 통해 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 비공유적으로 부착된, 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면; 및
- b. T 세포의 T 세포 수용체와 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자를 포함하는 제 1 개질 시약으로서, 추가로 상기 MHC 분자가 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 스트렙타비딘 작용기들의 제 1 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된, 상기 제 1 개질 시약을 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

상기 복수의 MHC 분자들 각각은 적어도 하나의 비오틴 작용기를 추가로 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 52

제 50 항에 있어서,

공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 스트렙타비딘 작용기의 제 2 서브 세트 중 하나에 결합하도록 각각 구성된 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함하며, 상기 공 활성화 분자 각각은 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 53

제 48 항에 있어서,

상기 복수의 공 활성화 분자는 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자의 제 1 서브 세트 및 보조 TCR 활성화 분자의 제 2 서브 세트를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 54

제 49 항에 있어서,

복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약을 함유하는 컨테이너는 약 20:1 내지 약 1:20 의 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자를 함유하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 55

제 50 항에 있어서,

성장 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함하고, 각각의 성장 자극 분자는 성장 인자 수용체 리간드를 포함

하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 56

제 50 항에 있어서,

사이토카인은 IL-21 또는 이의 단편을 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 57

제 50 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 비드의 표면인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제조하기 위한 키트.

청구항 58

복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 의 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법으로서,

중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티의 적어도 제 1 서브 세트를 복수의 연결 시약과 반응시키는 단계로서, 상기 복수의 연결 시약의 각각은 스트렙타비딘 또는 비오틴을 포함하는, 상기 복수의 연결 시약과 반응시키는 단계; 및

상기 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티의 적어도 제 2 서브 세트를 복수의 표면 차단 분자와 반응시켜, 적어도 하나의 복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기와 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제공하는 단계를 포함하고, 상기 연결 시약이 비오틴을 포함하는 경우, 상기 방법은 스트렙타비딘을 비오틴 작용기와 비공유적으로 연관시키는 단계를 추가로 포함하는, 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법.

청구항 59

미세유체 디바이스 내에서 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법으로서,

상기 미세유체 디바이스는 제 1 액체 매질을 포함하는 흐름 영역; 및

격리 영역 및 연결 영역을 포함하는 격리 펜으로서, 상기 연결 영역은 상기 흐름 영역에 대한 근위 개구 및 상기 격리 영역에 대한 원위 개구를 가지며 상기 격리 영역은 상기 연결 영역에 대해 개방되고, 제 1 격리 펜의 격리 영역은 상기 흐름 영역의 스윕되지 않은 영역이며, 상기 방법은 :

상기 미세유체 디바이스의 격리 펜으로 하나 이상의 표적 세포들을 로딩하는 단계;

하나 이상의 T 세포가 하나 이상의 표적 세포와 접촉할 수 있도록 상기 격리 펜에 하나 이상의 T 세포를 로딩하는 단계;

상기 표적 세포를 세포자멸성 세포를 표지하는 검출 가능한 마커와 접촉시키는 단계; 및

상기 표적 세포가 세포 자멸되는지 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법.

청구항 60

항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트로서,

미세유체 디바이스; 및

세포자멸성 세포를 검출하기 위한 시약을 포함하는, 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트.

요약서

생명과학 및 관련 분야들에서, 생체분자들 및 생물학적 미세 객체들과 같은 생체물질들을 접촉하는 장치들, 디바이스들, 및 물질들의 표면들을 개질하는 것이 유용할 수 있다. 표면 개질 및 표면 관능화 시약들, 그 제조, 및 생체물질들을 이용하여 개선된 또는 변경된 성능을 제공하기 위해 표면들을 개질시키는 방법들이 본원에 설명된다.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 면역 요법은 암을 성공적으로 치료하는 잠재적으로 강력한 접근법을 제공한다. 항원 제시 수지상 세포에 의한 T 림프구 활성화는 면역 요법에서 사용하기 위한 중앙-표적화 세포 독성 T 림프구를 제조하는 한 양태이다. 수지상 세포에 의한 활성화는 보다 재현성 있고 더 우수한 특성화 기술을 사용함으로써 개선 될 수 있다. 본 발명의 일부 실시 예는 T 림프구를 활성화시키도록 구성된 개질된 표면, 이러한 개질된 표면을 사용하여 T 림프구를 활성화시키는 관련 방법, 및 이러한 활성화된 T 림프구를 함유하는 조성물을 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

- [0002] 제 1 양태에서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들로서, 각각의 1 차 활성화 분자 리간드는 T 세포의 T 세포 수용체 (TCR) 에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및 각각 TCR 공 활성화 분자 또는 보조 (adjunct) TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들로서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 공 활성화 분자 리간드들 각각은 항원 제시 표면에 특이적으로 결합되는, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면이 제공된다. 일부 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 보조 TCR 활성화 분자에 대한 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 10:1 내지 약 1:20 일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 일부 상에 제곱 미크론 당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치될 수 있다. 다른 실시형태들에서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 미크론 당 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치된다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 비드의 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 웨이퍼의 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 미세유체 디바이스의 적어도 하나의 내부 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 튜브의 내부 표면일 수 있다.
- [0003] 다른 양태에서, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법이 제공되며, 그 방법은 공유결합으로 관능화된 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계로서, 제 1 복수의 결합 모이어티들 각각은 1 차 활성화 분자에 결합하도록 구성되는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계; 및 공 활성화 분자에 결합하도록 구성된 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자들을 반응시켜, 항원 제시 표면 상에 복수의 특이적으로 결합된 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 특이적으로 결합된 공 활성화 분자 리간드들을 제공하는 단계를 포함한다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 비드의 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 웨이퍼의 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 미세유체 디바이스의 적어도 하나의 내부 표면일 수 있다. 이들 실시형태들 중 임의의 것에서, 항원 제시 표면은 튜브의 내부 표면일 수 있다.
- [0004] 다른 양태에서, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 합성 표면을 제조하기 위한 키트가 제공되며, 그 키트는 a. 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링체들을 포함하는, 본원에 기술된 임의의 공유결합으로 관능화된 합성 표면; 및 T 세포의 T 세포 수용체와 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자들을 포함하는 제 1 개질 시약을 포함하며, 또한 여기서 MHC 분자들은 공유결합으로

관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들의 제 1 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된다. 일부 실시형태들에서, 제 1 커플링제는 비오틴 결합제일 수 있다. 비오틴 결합제는 스트렙타비딘일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 복수의 MHC 분자들 각각은 적어도 하나의 비오틴 작용기를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 키트는 각각 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들의 제 2 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된 복수의 공 활성화 분자들을 포함하는 시약을 추가로 포함한다. 일부 실시형태들에서, 공 활성화 분자는 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 공 활성화 분자는 적어도 하나의 비오틴 작용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0005] 또 다른 양태에서, 복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은: 복수의 연결 시약들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계로서, 각각의 연결 시약은 스트렙타비딘 또는 비오틴을 포함하는, 상기 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계; 및 복수의 표면 차단 분자들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 2 서브 세트를 반응시켜, 적어도 하나의 복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 연결 시약들이 비오틴을 포함하는 경우, 방법은 선택적으로 스트렙타비딘을 비오틴 작용기들과 비공유적으로 연관시키는 단계를 더 포함한다.

[0006] 다른 양태에서, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법이 제공되며, 그 방법은 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 각각 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하는 항원 제시 합성 표면과 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계; 및 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 복수의 T 세포들을 배양함으로써, 복수의 T 세포들의 적어도 일부를 활성화된 T 세포들로 변환시키는 단계를 포함한다. 항원 제시 합성 표면은 본원에 기재된 임의의 항원 제시 합성 표면, 예를 들어, 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼, 항원 제시 튜브, 또는 본원에 기재된 항원 제시 미세 유체 디바이스 또는 본 명세서에 기재된 방법들 중 임의의 방법의 제품일 수도 있다. 일부 실시형태들에서, T 세포는 CD8+ T 세포들을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 방법은 복수의 T 세포를 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태들에서, 성장 자극 분자 리간드들 각각은 성장 인자 수용체 리간드를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 성장 인자 수용체 리간드는 IL-21 또는 이의 단편을 포함한다.

[0007] 다른 양태에서, 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법이 제공되는데, 상기 방법은: 미세 유체 디바이스의 격리 펜에 하나 이상의 표적 세포를 로딩하는 단계; 하나 이상의 T 세포가 하나 이상의 표적 세포와 접촉할 수 있도록 격리 펜에 하나 이상의 T 세포를 로딩하는 단계; 표적 세포를 사멸 세포를 라벨링하는 검출 가능한 마커와 접촉시키는 단계; 및 표적 세포가 세포 사멸 되는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태들에서, 미세유체 디바이스는 미세 유체 채널을 추가로 포함하고, 격리 펜은 미세 유체 채널에 유체적으로 연결되도록 미세 유체 채널에 대해 개방되는 개구를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 복수의 표적 세포들이 격리 펜 안으로 로딩된다. 다른 실시형태들에서, 단일의 표적 세포가 격리 펜 안으로 로딩된다. 특정의 실시형태들에서, 단일의 T 세포가 격리 펜 안으로 로딩된다. 다른 실시형태들에서, 복수의 T 세포들이 격리 펜 안으로 로딩된다. 특정 실시형태들에서, 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들)는 이들을 미세 유체 채널 내로 유동시킨 후 미세 유체 칩을 기울이고 중력이 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들) 을 격리 펜으로 끌어 당기는 것을 허용함으로써 격리 펜 안으로 로딩된다. 특정 실시형태들에서, 미세유체 디바이스는 DEP 구성을 포함하고 DEP 힘은 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들)를 격리 펜으로 로딩하는데 사용된다. 특정 실시형태들에서, DEP 힘은 구조화된 광에 의해 활성화된다. 특정 실시형태들에서, 검출 가능한 마커는 미세 유체 채널을 통해 유동되는 용액에 제공되며, 이때 검출 가능한 마커는 미세 유체 채널로부터 격리 펜으로 확산되어 표적 세포와 접촉할 수 있다. 특정 실시형태들에서, 검출 가능한 마커는 카스파제 3 기질과 같은 효소 기질이다. 다른 실시형태들에서, 검출 가능한 마커는 사멸 세포 및/또는 사멸체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체이다. 특정 실시형태들에서, 표적 세포가 세포 사멸되는지 여부를 검출하는 것은 표적 세포 (들)를 검출 가능한 마커와 접촉시킨 후 2 시간 이상 (예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7 시간 이상) 에 결정된다. 특정 실시형태들에서, 표적 세포 (들)는 암 세포, 예컨대 암 세포주로부터의 세포이다. 특정 실시형태들에서, 표적 세포 (들)는 암 연관 또는 암 특이적 항원을 발현하는 세포주로부터의 세포이다. 특정 실시형태들에서, 표적 세포 (들)은 흑색 종, 유방암 또는 폐암과 연관된 항원을 발현한다. 특정 실시형태들에서, T 세포는 키메릭 항원 수용체 (CAR) 를 발현한다. 예를 들어, T 세포는 CAR T 세포일 수 있다. 다른 실시형태들에서, T 세포는 키메릭 항원 수용체를 발현하지 않는다.

예를 들어, T 세포는 요법적 내생적 T 세포 (endogenous T cell: ETC) 일 수 있다.

[0008] 다른 양태에서, 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법이 제공되며; 대상체로부터 복수의 T 림프구 (T 세포)를 얻는 단계; 복수의 T 세포들 각각의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계로서, MHC 분자는 대상체의 암에 대해 특이적인 항원을 포함하고, 항원 제시 합성 표면은 본원에 기술된 항원 제시 표면이거나 본원에 기술된 방법에 따라 생성되는, 상기 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계; 복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계로서, 활성화는 대상체의 암에 대해 특이적이도록 구성되는, 상기 복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계; 복수의 특이적 활성화된 T 세포를 활성화되지 않은 세포로부터 분리하는 단계; 및 복수의 항원 특이적 활성화된 T 세포를 대상체에게 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 항원 제시 표면은 본원에 기술된 바와 같은 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼, 항원 제시 튜브 또는 항원 제시 미세유체 디바이스이다.

[0009] 다른 양태에서, 본원에 기재된 항원 제시 표면을 포함하는 T 림프구 (T 세포)를 활성화시키기 위한 키트가 제공된다. 일부 실시형태들에서, 항원 제시 표면은 본원에 기술된 바와 같은 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼, 항원 제시 튜브 또는 항원 제시 미세유체 디바이스이다.

[0010] 다른 양태에서, 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트가 제공되며, 이는 미세유체 디바이스 (예를 들어, 미세 유체 채널 및 격리 펜을 갖는 미세유체 디바이스); 및 세포 사멸을 검출하기 위한 시약을 포함한다. 특정 실시형태들에서, 미세유체 디바이스는 항원 제시 미세유체 디바이스이다. 미세유체 디바이스 또는 항원 제시 미세유체 디바이스는 본원에 기술된 임의의 미세유체 디바이스 또는 항원 제시 미세유체 디바이스일 수 있다. 특정 실시형태들에서, 세포 사멸을 검출하기 위한 시약은 카스파제 3 과 같은 카스파제 효소에 대한 기질이다. 특정 실시형태들에서, 세포 사멸을 검출하기 위한 시약은 세포 사멸 특이적 항체와 같은 사멸 세포에 특이적으로 결합한다.

[0011] 추가의 양태에서, 적어도 하나의 복수의 스트렙타비딘 작용기들 및 적어도 하나의 복수의 표면 차단 분자 리간드들을 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면이 제공되며, 여기서 복수의 표면 차단 분자 리간드들은 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유결합적으로 부착되고, 스트렙타비딘 작용기는 (i) 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유결합으로 부착되거나 (ii) 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유결합으로 부착된 비오틴 모이어티를 통해 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 비공결합으로 부착된다. 일부 실시형태들에서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 본원에 기재된 바와 같이 공유결합으로 관능화된 비드, 공유결합으로 관능화된 웨이퍼, 또는 공유결합으로 관능화된 미세유체 디바이스일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1a 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 미세유체 디바이스 및 연관된 제어 장비와의 이용을 위한 시스템의 예를 예시한다.

도 1b 및 도 1c 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 미세유체 디바이스를 예시한다.

도 2a 및 도 2b 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 격리 펜들을 예시한다.

도 2c 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 상세한 격리 펜을 예시한다.

도 2d 내지 도 2f 는 발명의 일부 다른 실시형태들에 따른 격리 펜들을 예시한다.

도 2g 는 본 개시의 실시형태에 따른 미세유체 디바이스를 예시한다.

도 2h 는 본 개시의 실시형태에 따른 미세유체 디바이스의 코팅된 표면을 예시한다.

도 3a 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 미세유체 디바이스 및 연관된 제어 장비와의 이용을 위한 시스템의 특정 예를 예시한다.

도 3b 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 이미징 디바이스를 예시한다.

도 4 는 본 개시의 일 실시형태에 따른 T 세포 활성화 통로들의 그래픽 표현이다.

도 5a 및 도 5b 는 본 개시의 여러 실시형태들에 따른 항원 제시 표면들의 제조의 개략적 표현들이다.

도 6 은 본 개시의 일 실시형태에 따른 항원 제시 표면을 제조하는 프로세스의 개략적 표현이다.

도 7a 및 도 7b 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 패턴화된 항원 제시 표면들의 주사 전자 현미경사진 표현

들이다.

도 8a 내지 도 8d 는 본 개시 일부 실시형태들에 따라 배양 7 일째에 T 림프구의 활성화를 위한 다양한 특성화 파라미터의 그래프 표현이다.

도 9 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 활성화된 T 림프구에 대한 특성들의 분포의 그래프 표현이다.

도 10 은 본 개시의 일 실시형태에 따라 항원 제시 비드 활성화의 사용을 수치상 세포 활성화와 비교하여, 자극 및 배양의 제 1 주기 후 활성화된 T 림프구의 분포의 그래프 표현이다.

도 11 은 본 개시의 일 실시형태에 따라 항원 제시 비드 활성화의 사용을 수치상 세포 활성화와 비교하여, 자극 및 배양의 제 2 주기 후 활성화된 T 림프구의 분포의 그래프 표현이다.

도 12 는 수치상 세포 활성화와 비교하여 7 일 및 14 일에 T 림프구의 활성화를 위한 다양한 특성화 파라미터의 그래프 표현이다.

도 13 은 관능화의 선택된 단계들에서 공유결합으로 관능화된 폴리스티렌 비드의 푸리에 변환 적외선 스펙트럼의 그래프 표현이다.

도 14a 내지 도 14d 는 본 개시 일 실시형태에 따라 T 세포들의 활성화를 위한 다양한 특성화 파라미터의 그래프 표현이다.

도 15a 내지 도 15e 는 본 개시의 일 실시형태에 따른 세포 생성물 특성화의 그래프 표현들이다.

도 16 은 본 개시의 일 실시형태에 따른 세포 생성물 특성화의 그래프 표현이다.

도 17 은 본 개시의 일 실시형태에 따른 세포독성 실험들의 그래프 표현이다.

도 18a 내지 도 18c 는 본 개시의 일 실시형태에 따른 세포 생성물 특성화의 그래프 표현들이다.

도 19a 내지 도 19f 는 본 개시 일부 실시형태들에 따른 항원 제시 표면을 사용하는 활성화의 특성화의 그래프 표현들이다.

도 20a 내지 도 20i 는 본 개시 일부 실시형태들에 따른 항원 제시 표면을 사용하는 활성화의 특성화의 그래프 표현들이다.

도 21a 내지 도 21f 는 본 개시 일부 실시형태들에 따른 항원 제시 표면을 사용하는 활성화의 특성화의 그래프 표현들이다.

도 22a 내지 도 22b 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 항원 특이적 세포독성 분석에서 T 림프구 및 카스파제 3 기질과 접촉된 후 선택된 시점들에서 취한 표적 세포의 이미지들이다.

도 22c 는 본 개시의 일부 실시형태들에 따른 항원 특이적 세포독성 분석의 과정의 그래프 표현이다.

도 23a 내지 도 23e 는 본 개시 일부 실시형태들에 따른 항원 제시 표면을 사용하여 획득된 세포 생성물의 특성화의 그래프 표현들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

이 명세서에는 본 개시의 예시적인 실시형태들 및 애플리케이션들을 설명한다. 그러나, 본 개시물은, 이들 예시적인 실시형태들 및 애플리케이션들에, 또는 예시적인 실시형태들 및 애플리케이션들이 동작하거나 또는 본원에서 설명되는 방법에 한정되지 않는다. 더욱이, 도면들은 단순화된 또는 부분 도들을 나타낼 수도 있으며, 도면들에서의 엘리먼트들의 치수들은 확대되거나 또는 아니면 비율대로 확대되지 않을 수도 있다. 또한, 용어들 "~ 상에 (on)", "~ 에 부착된 (attached to)", "~ 에 접속된 (connected to)", "~ 에 결합된 (coupled to)" 또는 유사한 단어들이 본원에서 사용되는 바와 같이, 하나의 엘리먼트가 다른 엘리먼트 바로 위에 있고, 그것에 부착되거나, 그것에 접속되고 또는 그것에 결합되는지, 또는 하나의 엘리먼트와 다른 엘리먼트 사이에 하나 이상의 중간 엘리먼트들이 있는지 여부에 관계 없이, 하나의 엘리먼트 (예를 들어, 재료, 층, 기관 등) 는 다른 엘리먼트 "상에" 있을 수 있고, 그것에 "부착될" 수 있고, 그것에 "접속될" 수 있고, 또는 그것에 "결합될" 수 있다. 또한, 콘텍스트가 다르게 기술하지 않으면, 방향들 (예를 들어, 상방 (above), 하방 (below), 상단 (top), 하단 (bottom), 측면 (side), 상 (up), 하 (down), 아래에 (under), 위에 (over), 상부 (upper), 하부 (lower), 수평, 수직, "x", "y", "z" 등) 은, 제공된다면, 상대적이고, 한정이 아니라, 전적으로 예로서 그리고 예시 및 논

의의 용이함을 위해 제공된다. 추가로, 엘리먼트들 (예를 들어, 엘리먼트들 a, b, c) 의 리스트에 대해 참조가 이루어지는 경우, 이러한 참조는 열거된 엘리먼트들 자체, 전부보다 적은 열거된 엘리먼트들의 임의의 조합, 및/또는 열거된 엘리먼트들의 전부의 조합 중의 임의의 하나를 포함하도록 의도된다. 용어 "또는" 은 콘텍스트가 다르게 기술하지 않는 한 포괄적 인 의미로, 즉 "및/또는" 과 등가로 사용된다. 본 명세서 및 첨부된 청구 범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the" 및 임의의 단어의 임의의 단수 사용은 하나의 지시 대상에 대해 명백하게 및 모호하지 않게 제한되지 않는 한 복수의 지시 대상들을 포함한다는 것에 유의한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다", "구비하다" 및 그것의 문법적 변형은 비제한적인 것으로 의도되며, 목록의 항목의 인용이 나열된 항목들에 대체되거나 추가될 수 있는 다른 유사한 항목들을 배제하지 않는다. 명세서에서의 섹션 분할들은 단지 리뷰의 용이함을 위한 것이고 논의된 엘리먼트들의 임의의 조합을 한정하지 않는다. 참조로 포함된 자료와 본원에 제공된 명시적으로 기술된 내용 사이의 임의의 모순 또는 충돌의 경우, 명시적으로 기술된 내용이 지배한다.

[0014] 미세유체 피쳐들의 치수들은 폭 또는 면적을 갖는 것으로 설명되는 경우, 치수는 일반적으로, 미세유체 디바이스의 기관 및/또는 커버에 평행한 평면 내에 놓인, x-축 및/또는 y-축 치수에 대해 설명된다. 미세유체 피쳐의 높이는 미세유체 디바이스의 기관 및/또는 커버에 평행한 평면에 수직한 z-축 방향에 대해 설명될 수도 있다. 일부의 경우, 채널 또는 통로와 같은, 미세유체 피쳐의 단면적은 x-축/z-축, y-축/z-축, 또는 x-축/y-축 영역을 기준으로 할 수도 있다.

[0015] 본 명세서 및 첨부된 청구 범위의 목적 상, 달리 표시되지 않는 한, 명세서 및 청구 범위에 사용된 수량, 백분율 또는 비율을 나타내는 모든 숫자 및 기타 수치는 그들이 아직 그렇게 변형되지 않은 정도로 용어 "약"에 의해 모든 경우에 변형되는 것으로 이해되어야 한다. "약"은 설명된 주제의 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는, 예를 들어 10 %, 5 %, 2 % 또는 1 % 내의 변동 정도를 나타낸다. 따라서, 반대로 지시되지 않는 한, 하기 명세서 및 첨부된 청구 범위에 제시된 수치 파라미터는 획득하고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 적어도, 청구 범위의 균등론의 적용을 제한하려는 시도로서가 아니라, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 자릿수의 수를 고려하고 일반적인 라운딩 기법을 적용하여 해석되어야 한다.

[0016] **정의들**

[0017] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 (substantially)" 는 의도된 목적을 위해 작동하기에 충분하다는 것을 의미한다. 용어 "실질적으로" 는 따라서, 당업자에 의해 예상될 것이지만, 전체 성능에 인식가능하게 영향을 주지 않는 바와 같은, 절대적인 또는 완전한 상태, 치수, 측정, 결과 등으로부터의 소수의 중요하지 않은 변화들을 허용한다. 수치 값들 또는 수치 값들로서 표현될 수 있는 파라미터들 또는 특징들에 대하여 사용될 때, "실질적으로" 는 10 퍼센트 이내를 의미한다.

[0018] 용어 "것들 (ones)" 은 하나보다 더 많은 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "복수" 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상일 수 있다.

[0019] 본원에 사용된 바와 같이, "알킬" 은 1 내지 6 개의 탄소 원자들 (예를 들어, C1-C6 알킬) 을 갖는, 불포화를 함유하지 않는, 탄소 및 수소 원자들 만으로 이루어진 직쇄 또는 분기형 탄화수소 체인 라디칼을 지칭한다. 이것이 본원에 나타날 때마다, "1 내지 6" 과 같은 수치 범위는 소정의 범위에서의 각각의 정수를 지칭한다; 예를 들어, "1 내지 6 개의 탄소 원자들" 은 알킬 기가 1 개의 탄소 원자들, 2 개의 탄소 원자들, 3 개의 탄소 원자들 등 그리고 최대 6 개의 탄소 원자들을 포함하는 것으로 이루어질 수도 있는 것을 의미하지만, 본 정의는 또한, 수치 범위가 지정되지 않은 용어 "알킬" 의 발생을 커버한다. 일부 실시형태들에서, 이것은 C1-C3 알킬 기이다. 통상적인 알킬 기들은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소-부틸, 이차-부틸 이소부틸, 삼차부틸, 펜틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 헥실, 등을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 알킬은 단일 본드에 의해 나머지 분자, 예를 들어, 메틸 (Me), 에틸 (Et), n-프로필, 1-메틸에틸 (이소-프로필), n-부틸, n-펜틸, 1,1-디메틸에틸 (t-부틸), 헥실 등에 부착된다.

[0020] 명세서에 달리 구체적으로 언급되지 않으면, 알킬 기는 독립적인 하나 이상의 치환기들: 아릴, 아릴알킬, 헤테로아릴, 헤테로아릴알킬, 하이드록시, 할로, 시아노, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 니트로, 트리메틸실라닐, $-OR'$, $-SR'$, $-OC(O)-R'$, $-N(R')_2$, $-C(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-OC(O)N(R')_2$, $-C(O)N(R')_2$, $-N(R')C(O)OR'$, $-N(R')C(O)R'$, $-N(R')C(O)N(R')_2$, $N(R')C(NR')N(R')_2$, $-N(R')S(O)_tR'$ (여기서, t 는 1 또는 2), $-S(O)_tOR'$ (여기서, t 는 1 또는 2), $-S(O)_tN(R')_2$ (여기서, t 는 1 또는 2), 또는 $PO_3(R')_2$ 에 의해 선택적으로 치환될 수도 있고, 여기서 각각의 R' 은 독립적으로 수소, 알킬, 플루오로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로시

클로알킬 또는 헤테로아릴이다.

- [0021] 본원에 지칭된 바와 같이, 플루오르화 알킬 모이어티는 플루오로 치환기에 의해 대체된 알킬 모이어티의 하나 이상의 수소들을 갖는 알킬 모이어티이다. 퍼플루오르화된 알킬 모이어티는 플루오로 치환기들에 의해 대체된 알킬 모이어티에 부착된 모든 수소들을 갖는다.
- [0022] 본원에 지칭된 바와 같이, "할로" 모이어티는 브로모, 클로로, 또는 플루오로 모이어티이다.
- [0023] 본원에 지칭된 바와 같이, "올레핀" 화합물은 "알켄" 모이어티를 함유하는 유기 분자이다. 알켄 모이어티는 적어도 2 개의 탄소 원자들 및 적어도 1 개의 탄소-탄소 이중 결합으로 이루어진 기를 지칭한다. 분자의 비-알켄 부분은 임의의 클래스의 유기 분자일 수도 있고, 일부 실시형태들에서 알킬 또는 (퍼플루오르화를 포함하지만 이에 제한되지는 않는) 플루오르화 알킬 모이어티들을 포함할 수도 있고, 이들 중 임의의 것은 추가로 치환될 수도 있다.
- [0024] 본원에 사용된 바와 같이, "공기" 는 지구의 대기에서 우세한 기체들의 조성을 지칭한다. 4 개의 가장 풍부한 기체들은 (통상적으로, 예를 들어 약 70-80% 의 범위에서, 체적 당 약 78% 의 농도로 존재하는) 질소, (통상적으로, 예를 들어 약 10% 내지 약 25% 의 범위에서, 해수면에서 체적 당 약 20.95% 의 농도로 존재하는) 산소, (통상적으로, 예를 들어 약 0.1% 내지 약 3% 의 범위에서, 체적 당 약 1.0% 로 존재하는) 아르곤, 및 (통상적으로, 예를 들어 약 0.01% 내지 약 0.07% 의 범위에서, 약 0.04% 로 존재하는) 이산화탄소이다. 공기는 메탄, 질소 산화물 또는 오존과 같은 다른 미량의 기체들, 미량의 오염물질 및 꽃가루, 디젤 미립자 등과 같은 유기 물질들을 가질 수도 있다. 공기는 (통상적으로, 약 0.25% 로 존재하거나, 또는 체적 당 약 10ppm 내지 약 5% 의 범위에 존재할 수도 있는) 수증기를 포함할 수도 있다. 공기는 필터링되고, 제어된 조성물로서 배양 실험들에서 사용하기 위해 제공될 수도 있고 본원에 설명된 바와 같이 컨디셔닝될 수도 있다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "복수" 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 이상일 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "배치된" 은 그 의미 내에 "위치된" 을 포함한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "미세유체 디바이스" 또는 "미세유체 장치" 는 유체를 보유하도록 구성된 하나 이상의 별개의 미세유체 회로들을 포함하는 디바이스이고, 각각의 미세유체 회로는, 영역(들), 흐름 경로(들), 채널(들), 챔버(들), 및/또는 펌프(들), 및 유체 (및, 옵션으로는, 유체에서 부유된 미세 객체들) 가 미세유체 디바이스의 안 및/또는 밖으로 흐르는 것을 허용하도록 구성된 적어도 하나의 포트를 포함하지만 이에 한정되지는 않는, 유체 상호연결된 회로 엘리먼트들로 구성된다. 통상적으로, 미세유체 디바이스의 미세유체 회로는 흐름 영역을 포함할 것이고, 이 흐름 영역은 미세유체 채널 및 적어도 하나의 챔버를 포함할 수도 있고, 그리고 약 1 mL 미만, 예를 들어 약 750, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2 μ L 미만의 유체의 볼륨을 보유할 것이다. 소정의 실시형태들에서, 미세유체 회로는 약 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 2-5, 2-8, 2-10, 2-12, 2-15, 2-20, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 10-50, 10-75, 10-100, 20-100, 20-150, 20-200, 50-200, 50-250, 또는 50-300 μ L 를 보유한다. 미세유체 회로는 미세유체 디바이스 내의 제 1 포트 (예를 들어, 인렛) 와 유체 연결된 제 1 단부 및 미세유체 디바이스 내의 제 2 포트 (예를 들어, 아웃렛) 와 유체 연결된 제 2 단부를 갖도록 구성될 수도 있다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "나노유체 디바이스" 또는 "나노유체 장치" 는 약 1 μ L 미만, 예를 들어 약 750, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 nL 미만, 또는 그 이하의 유체의 볼륨을 보유하도록 구성된 적어도 하나의 회로 엘리먼트를 포함하는 미세유체 회로를 갖는 미세유체 디바이스의 타입이다. 나노유체 디바이스는 복수의 회로 엘리먼트들 (예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10,000, 또는 그 이상) 을 포함할 수도 있다. 특정 실시형태들에서, 적어도 하나의 회로 엘리먼트들 중 하나 이상 (예를 들어, 전부) 은 약 100 pL 내지 1 nL, 100 pL 내지 2 nL, 100 pL 내지 5 nL, 250 pL 내지 2 nL, 250 pL 내지 5 nL, 250 pL 내지 10 nL, 500 pL 내지 5 nL, 500 pL 내지 10 nL, 500 pL 내지 15 nL, 750 pL 내지 10 nL, 750 pL 내지 15 nL, 750 pL 내지 20 nL, 1 내지 10 nL, 1 내지 15 nL, 1 내지 20 nL, 1 내지 25 nL, 또는 1 내지 50 nL 의 유체의 볼륨을 보유하도록 구성된다. 다른 실시형태들에서, 적어도 하나의 회로 엘리먼트들 중 하나 이상 (예컨대, 모두) 은 약 20 nL 내지 200nL, 100 내지 200 nL, 100 내지 300 nL, 100 내지 400 nL, 100 내지 500 nL, 200 내지 300 nL, 200 내지 400 nL, 200 내지 500 nL, 200 내지 600 nL, 200 내지 700 nL, 250 내지 400 nL, 250 내지 500 nL, 250 내지 600 nL, 또는 250 내지 750 nL 의 유체의 체적을 수용하도록 구성된다.

- [0029] 미세유체 디바이스 또는 나노유체 디바이스는 본원에서 "미세유체 칩" 또는 "칩"; 또는 "나노유체 칩" 또는 "칩"으로 지칭될 수 있다.
- [0030] 본원에서 이용된 바와 같은 "미세유체 채널" 또는 "유동 채널"은 양자의 수평 및 수직 치수들보다 상당히 더 긴 길이를 가지는 미세유체 디바이스의 유동 영역을 지칭한다. 예를 들어, 흐름 채널은 수평 또는 수직 치수 중 어느 하나의 길이의 적어도 5 배, 예를 들어 그 길이의 적어도 10 배, 그 길이의 적어도 25 배, 그 길이의 적어도 100 배, 그 길이의 적어도 200 배, 그 길이의 적어도 500 배, 그 길이의 적어도 1,000 배, 그 길이의 적어도 5,000 배, 또는 그 이상일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 유동 채널의 길이는 그 사이의 임의의 값을 포함하여, 약 100,000 마이크로미터 내지 약 500,000 마이크로미터이다. 일부 실시형태들에서, 수평 치수는 약 100 마이크로미터 내지 약 1000 마이크로미터 (예컨대, 약 150 마이크로미터 내지 약 500 마이크로미터)이며, 수직 치수는 약 25 마이크로미터 내지 약 200 마이크로미터 (예컨대, 약 40 마이크로미터 내지 약 150 마이크로미터)이다. 흐름 채널은 미세유체 디바이스에서 다양한 상이한 공간 구성들을 가질 수도 있고, 따라서 완벽히 선형 엘리먼트에 제한되지 않는다는 것에 주목한다. 예를 들어, 유동 채널은 다음 구성들: 곡선, 굴곡, 나선, 오름 경사, 내리막 경사, 포크 (예컨대, 다수의 상이한 유동 통로들), 및 이들의 임의의 조합을 가지는 하나 이상의 섹션들일 수도 있거나 또는 포함할 수도 있다. 게다가, 유동 채널은 그의 경로를 따라서 상이한 단면적들을 가질 수도 있으며, 그 내부에 원하는 유체 유동을 제공하기 위해 넓어지거나 수축될 수도 있다. 유동 채널은 밸브들을 포함할 수도 있으며, 밸브들은 마이크로 유체공학의 분야에 공지된 임의의 유형일 수도 있다. 밸브들을 포함하는 미세유체 채널들의 예들은 미국 특허들 제 6,408,878호 및 제 9,227,200호에 개시되어 있으며, 이들의 각각은 본원에서 전체적으로 참고로 포함된다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "장애물"은 일반적으로 미세유체 디바이스에서의 2 개의 상이한 영역들 또는 회로 엘리먼트들 사이의 타겟 미세 객체들의 이동을 부분적으로 (그러나 완전히는 아님) 방해하기에 충분히 큰 범프 또는 유사한 타입의 구조를 지칭한다. 2 개의 상이한 영역들/회로 엘리먼트들은, 예를 들어 미세유체 격리 펜 및 미세유체 채널, 또는 미세유체 격리 펜의 연결 영역 및 격리 영역일 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "수축 (constriction)"은 일반적으로 미세유체 디바이스에서 회로 엘리먼트 (또는 2 개의 회로 엘리먼트들 사이의 인터페이스)의 폭을 좁히는 것을 지칭한다. 수축은, 예를 들어 미세유체 격리 펜과 미세유체 채널 사이의 인터페이스에, 또는 미세유체 격리 펜의 격리 영역과 연결 영역 사이의 인터페이스에 위치될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "투명한"은 가시 광이 통과될 때 가시 광이 실질적으로 바뀌지 않고 통과하는 것을 허용하는 재료를 지칭한다.
- [0034] 여기에서 사용되는 바와 같이, 용어 "미세 객체"는 일반적으로 본 개시에 따라 격리 및/또는 조작될 수 있는 임의의 미시적 물체를 지칭한다. 미세 객체들의 비-한정적 예들은: 미세입자들; 미세비드들 (예를 들어, 폴리스티렌 비드들, Luminex™ 비드들 등); 자기 비드들; 미세로드들; 미세와이어들; 양자 점들 등과 같은 무생물의 미세 객체들; 세포들 등과 같은 생물학적 미세 객체들; 생물학적 세포기관들; 소낭들, 또는 착물들; 합성 소낭들; (예를 들어, 막 표면들로부터 유래된 또는 합성의) 리포솜들; 지질 나노래프트들 등; 또는 무생물의 미세 객체들 및 생물학적 미세 객체들의 조합 (예를 들어, 세포들에 부착된 미세비드들, 리포솜-코팅된 미세-비드들, 리포솜-코팅된 자기 비드들 등)을 포함한다. 비드들은 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 부착된 모이어티들/분자들, 이를 테면 형광 라벨들, 단백질들, 탄수화물들, 항원들, 소분자 시그널링 모이어티들, 또는 분석에서 사용 가능한 다른 화학적/생물학적 종들을 포함할 수도 있다. 지질 나노래프트들은 예를 들어 Ritchie 등 (2009) "Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs", Methods Enzymol., 464:211-231 에 기재되어 있다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포"는 용어 "생물학적 세포"와 상호 교환 가능하게 사용된다. 생물학적 세포의 비 제한적인 예로는 진핵 세포, 식물 세포, 포유 동물 세포, 파충류 세포, 조류 세포, 물고기 세포 등과 같은 동물 세포, 원핵 세포, 박테리아 세포, 진균 세포, 원충 세포 등이 포함된다 근육, 연골, 지방, 피부, 간, 폐, 신경 조직 등과 같은 조직으로부터 해리된 세포, T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 대 식세포 등의 면역 세포, 배아 (예를 들어 접합체), 난 모세포, 난자, 정자 세포, 하이 브리 도마, 배양된 세포, 세포주의 세포, 암 세포, 감염된 세포, 형질 전환된 세포 및/또는 형질 전환된 세포, 포유류 세포는 예를 들어 인간, 마우스, 래트, 말, 염소, 양, 소, 영장류 등일 수 있다.
- [0036] 콜로니에서 번식할 수 있는 모든 살아있는 세포들이 단일의 부모 세포에서 유래한 딸 세포라면, 생물학적 세포들의 콜로니는 "클론 (clonal)"이다. 어떤 실시형태들에서, 클론 콜로니에서의 모든 딸 세포들은 단일 부모 세

포로부터 10 번 이하의 분할들에 의해 유도된다. 다른 실시형태들에서, 클론 콜로니에서의 모든 딸 세포들은 단일 부모 세포로부터 14 번 이하의 분할들에 의해 유도된다. 다른 실시형태들에서, 클론성 군체에서의 모든 딸 세포들은 17 개를 초과하지 않는 분할들에 의해 단일의 부모 세포로부터 유도된다. 다른 실시형태들에서, 클론성 군체에서의 모든 딸 세포들은 20 개를 초과하지 않는 분할들에 의해 단일의 부모 세포로부터 유도된다. 용어 "클론 세포들" 은 동일한 클론 콜로니의 세포들을 지칭한다.

- [0037] 본원에서 이용된 바와 같이, 생물학적 세포들의 "군체" 는 2 개 이상의 세포들 (예컨대, 약 2 내 약 20, 약 4 내지 약 40, 약 6 내지 약 60, 약 8 내지 약 80, 약 10 내지 약 100, 약 20 내지 약 200, 약 40 내지 약 400, 약 60 내지 약 600, 약 80 내지 약 800, 약 100 내지 약 1000, 또는 1000 개 이상의 세포) 을 지칭한다.
- [0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포(들)를 유지하는 것" 은 세포들을 생존가능하게 유지하고 및/또는 증식시키는데 필요한 조건들을 제공하는, 유체 및 기체 성분들 양자 모두, 및 옵션으로는 표면을 포함하는 환경을 제공하는 것을 지칭한다.
- [0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 세포들을 언급할 때 용어 "증식하는"은 세포 수의 증가를 지칭한다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같이, "기체 투과성" 은, 물질 또는 구조물이 산소, 이산화탄소, 또는 질소 중 적어도 하나에 대해 투과성인 것을 의미한다. 일부 실시형태들에서, 기체 투과성 물질 또는 구조물은 산소, 이산화탄소, 또는 질소 중 1 보다 많은 것에 투과성이고, 또한 이들 기체들 3 개 모두에 대해 투과성일 수도 있다.
- [0041] 유체 매질의 "성분"은, 용매 분자들, 이온들, 소분자들, 향생물질들, 뉴클레오티드들 및 뉴클레오시드들, 핵산들, 아미노산들, 펩티드들, 단백질들, 설탕들, 탄수화물들, 지질들, 지방산들, 콜레스테롤, 대사물들 등을 포함하는, 매질에 존재하는 임의의 화학적 또는 생물학적 분자이다.
- [0042] 유체 매질에 관하여 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "확산하다" 및 "확산"은 농도 기울기 아래의 유체 매질 성분의 열역학 운동을 지칭한다.
- [0043] "매질의 흐름"이란 문구는 주로 확산 이외의 임의의 메커니즘으로 인한 유체 매질의 벌크 이동을 의미한다. 예를 들어, 매질의 흐름은 지점들 사이의 압력 차이로 인한 유체 매질의 한 지점에서 다른 지점으로의 이동을 수반할 수 있다. 이러한 흐름은 액체의 연속적, 펄스식, 주기적, 랜덤, 간헐적, 또는 왕복 흐름, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 하나의 유체 매질이 다른 유체 매질 안으로 흐를 때, 매질들의 터블런스 및 혼합이 초래될 수 있다.
- [0044] 문구 "실질적으로 흐르지 않음" 은, 시간 경과에 따라 평균화될 때, 유체 매질 안으로 또는 유체 매질 내에서 재료 (예를 들어, 관심 있는 분석물) 의 성분들의 확산 속도보다 작은 유체 매질의 흐름 속도를 지칭한다. 이러한 재료의 성분들의 확산의 레이트는, 예를 들어 온도, 성분들의 사이즈, 및 성분들과 유체 매질 사이의 상호작용들의 강도에 의존할 수 있다.
- [0045] 미세유체 디바이스 내의 상이한 영역들을 참조하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "유체 연결된" 은, 상이한 영역들이 유체 매질들과 같은 유체로 실질적으로 채워질 때, 영역들의 각각에서의 유체가 유체의 단일체를 형성하도록 연결된다는 것을 의미한다. 이것은, 상이한 영역들에서의 유체들 (또는 유체 매질들) 이 반드시 조성이 동일하다는 것을 의미하지 않는다. 오히려, 미세유체 디바이스의 상이한 유체 연결된 영역들에서의 유체들은, 용질들이 그들 개별의 농도 기울기들을 하강시키고 및/또는 유체들이 디바이스를 통해 흐를 때 유입되는 상이한 조성들 (예를 들어, 단백질들, 탄수화물들, 이온들, 또는 다른 분자들과 같은 용질들의 상이한 농도들) 을 가질 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "흐름 경로" 는 매질의 흐름의 궤적을 정의하고, 그것에 종속되는 하나 이상의 유체 연결된 회로 엘리먼트들 (예를 들어, 채널(들), 영역(들), 챔버(들) 등) 을 지칭한다. 흐름 경로는 따라서 미세유체 디바이스의 스윕된 영역의 예이다. 다른 회로 엘리먼트들 (예를 들어, 비스윕된 영역들) 은 흐름 경로에서의 매질의 흐름에 종속됨 없이 흐름 경로를 포함하는 회로 엘리먼트들과 유체 연결될 수도 있다.
- [0047] 본원에서 이용된 바와 같이, "미세 객체를 격리시키는 것" 은 미세 객체를 미세유체 디바이스 내의 정의된 에어리어에 한정시킨다.
- [0048] 미세유체 (또는 나노유체) 디바이스는 "스윕된 (swept)" 영역들과 "비스윕된 (unswept)" 영역들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "스윕된 (swept)" 영역은, 미세유체 회로를 통하여 유체가 흐르고 있을 때 각각이 매질의 흐름을 경험하는, 미세유체 회로의 하나 이상의 유체 상호연결된 회로 엘리먼트들로 구성된다. 스윕된 영역의 회로 엘리먼트들은 예를 들어 영역들, 채널들, 및 챔버들의 전부 또는 부분들을 포함

할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "비스weep된 (unswept)" 영역은, 미세유체 회로를 통하여 유체가 흐르고 있을 때 각각이 실질적으로 어떠한 유체의 플럭스도 경험하지 않는, 미세유체 회로의 하나 이상의 유체 상호연결된 회로 엘리먼트로 구성된다. 유체 연결들이 확산을 가능하게 하지만 실질적으로 sweep된 영역과 비sweep된 영역 사이에 어떠한 매질들의 흐름도 없도록 구조화되어 있다면, 비sweep된 영역은 sweep된 영역에 유체 연결될 수 있다. 따라서, 미세유체 디바이스는 sweep된 영역과 비sweep된 영역 사이에서 실질적으로 확산 유체 연통만을 가능하게 하면서, sweep된 영역에서의 매질의 흐름으로부터 비sweep된 영역을 실질적으로 고립시키도록 구조화될 수 있다. 예를 들어, 미세유체 디바이스의 흐름 채널은 sweep 영역의 일 예인 한편, 미세유체 디바이스의 격리 영역(이하에서 더 상세히 설명됨)은 비sweep 영역의 예이다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, 유체 매질 흐름의 "비-sweeping (non-sweeping)" 속도는, 격리 펜의 격리 영역 내의 제 2 유체 매질의 성분들이 유동 영역 내의 제 1 유체 매질로 확산하는 것 및/또는 제 1 유체 매질의 성분들이 격리 영역 내의 제 2 유체 매질로 확산하는 것을 허용하기에 충분한, 미세유체 채널과 같은, 흐름 영역 내의 흐름의 속도를 의미하고; 또한 제 1 매질은 격리 영역 안으로 실질적으로 유동하지 않는다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같이, "합성 표면"은 지지체 구조와 기체/액체 매질 사이의 계면을 말하며, 여기서 합성 표면은 비생물학적 공정에 의해 제조된다. 합성 표면은 생물학적 유기체에 의해 발현되지 않는 한, 항원 제시 합성 표면을 제공하기 위해 그것에 연결되는 생물학적으로 유도된 물질, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 1차 및 공 활성화 분자를 가질 수 있다. 전형적으로, 지지체 구조는 비 표면 노출된 부분들의 비드, 웨이퍼, 또는 미세유체 디바이스의 기관, 커버 또는 회로 물질과 같은 고체이며 생물학적 핵 또는 소기관을 둘러싸지 않는다.

[0051] 본원에 사용된 "공 활성화"는 T 세포의 활성화를 생성하는 생산적인 면역 반응을 강화하는, 생물학적 거대 분자, 이의 단편 또는 이의 합성 또는 개질된 버전과 1차 T 세포 수용체/항원 이외의 T 세포 사이의 결합 상호작용: MHC 결합 상호작용을 지칭한다. 공 활성화 상호 작용은 예를 들어 CD28, CD2, ICOS 등과 같은 세포 내 시그널링에 관여 할 수 있는 T-세포 표면 단백질과 그의 작용제 사이의 항원-비특이적 상호 작용이다. 본원에 사용된 "공 활성화 (co-activation)" 및 "공 활성화하는 (co-activating)" 는 각각 보조-자극 및 보조-자극하는 이라는 용어와 동일하다.

[0052] 본원에 사용된 "TCR 공 활성화 분자"는 TCR의 항원 특이적 결합에 의해 유발되는 반응을 증폭 및/또는 완료시키는 원위 시그널링 분자를 활성화시키는 T 세포상의 하나 이상의 공 수용체에 결합하는 생물학적 거대 분자, 이의 단편 또는 그의 합성 또는 개질된 버전이다. 일 예에서, 전사 인자들 핵 인자 카파 B (NF κB) 및 활성화된 T 세포의 핵 인자 (NFAT)와 같은 신호 전달 분자는 TCR 공 활성화 분자에 의해 활성화된다. TCR 공 활성화 분자는 예를 들어 포스포이노시티드 3 키나제 (PI3K)/Akt 경로를 통해 시그널링하는 CD28 수용체의 작용 제일 수 있다. 도 4 참조.

[0053] 본원에 사용된 "CD28^{high}"는 T 세포에서 높은 CD28 표면 발현의 표현형을 지칭한다. 당업자는 CD28^{high} 표현형 및 CD28^{high} T 세포를 식별하는 적절한 방법에 익숙하다. 달리 지시되지 않는 한, CD28^{high} T 세포는 하기 기준 중 어느 하나를 만족시키는 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태들에서, CD28^{high} T 세포는 휴지 CD8⁺ T 세포보다 더 높은 수준의 CD28을 발현하는 T 세포이다. CD28^{high} T 세포는 또한 관련이없는 비-항원 특이적 T 세포보다 더 높은 수준의 CD28을 발현할 수 있다. 일부 실시형태에서, CD28^{high} T 세포는 FACS에 의해 측정 될 수 있는 표면 CD28의 수준이 FACS에 의해 측정 될 수 있는 순환 기억 T 세포에 존재하는 표면 CD28의 수준 이상인 집단이다. 일부 실시형태에서, CD28^{high} T 세포는 동일한 샘플 또는 개인으로부터의 순환 기억 T 세포에 존재하는 표면 CD28의 수준 이상인 표면 CD28의 수준을 갖는다. 표면 CD28의 발현은 FACS에 의해 결정될 수 있고 순환 기억 T 세포 상에 존재하는 표면 CD28의 평균 (예를 들어, 기하학적 평균) 또는 중간 수준은 주어진 T 세포가 CD28^{high}인지를 결정하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, CD28^{high} T 세포는 동일한 샘플 또는 개체로부터의 나이브 CD8 T 세포의 전형적인 발현보다 유의하게 더 높은 수준, 예를 들어 나이브 T 세포의 75 %, 80 %, 85 %, 87.5 %, 90 %, 92.5 % 또는 95 % 보다 높은 수준에서 CD28을 발현하는 T 세포이다. 나이브 CD8 T 세포는 검출가능한 CD28을 발현하고 CD45RO를 최소로 또는 전혀 나타내지 않는 CD8⁺ 세포로서 공지된 방법, 예를 들어 유세포 분석에 의해 식별되고 특성화 될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 "TCR 공 활성화 분자"는 항원-특이적 TCR 상호 작용을 증폭시키고 TCR 공 활성화 분자와 구별되는 신호 전달 분자들의 클래스들을 자극한다. 예를 들어, TCR 근위 신호 전달 복합체의 인산화에 의한 TCR 근위 신호 전달은 TCR 공 활성화 분자가 작용할 수 있는 하나의 루트이다. TCR 공 활성화 분자는 예를 들어 CD2 수용체의 작용제일 수 있다. 도 4 참조.

[0055] 본원에 사용된 "활성화된 T 세포"는 항원 (또는 이의 후손)을 경험한 그리고 그 항원에 대한 항원-특이적 반응을 장작할 수 있는 T 세포이다. 활성화된 T 세포는 일반적으로 CD28, CD45RO, CD127 및 CD197 중 하나 이상에 대해 양성이다.

[0056] 개관

[0057] 암에 대한 면역 요법은 유망한 발달이지만, 치료의 대상과 양립하는 특이적으로 활성화된 T 림프구를 필요로 한다. 그러나, T 림프구를 활성화시키기 위해 항원 제시 수지상 세포의 현재 사용은 몇 가지 불리한 측면을 제시한다. 수지상 세포는 처리량을 제한하는 공여자 공급원으로부터 얻어야 한다. 수지상 세포는 T 림프구 활성화의 각각의 시퀀스에 대해 성숙되어야 하며, 약 7 일의 리드 타임이 필요하다. 수지상 세포의 조사도 필요하며, 이는 그러한 처리가 수행될 수 있는 곳을 제한한다.

[0058] 자가 항원 제시 수지상 세포의 사용을 T 림프구 활성화를 위한 항원 제시 합성 표면으로 대체하는 것은 치료적으로 관련된 집단에 대해 T 림프구를 자극하고 증식시키기 위해 더 큰 재현성을 제공할 수 있다. 항원 제시 합성 표면은 T 림프구의 항원-특이적 활성화를 위해 조작될 수 있으며, 암의 치료를 위해 바람직한 표현형을 갖는 활성화된 T 림프구 집단의 보다 제어 가능하고, 특성화 가능하고, 재현 가능하고 및/또는 보다 신속한 개발을 제공할 수 있다. 항원 제시 합성 표면은 또한 활성화 후 원하는 T 세포 표현형의 보다 정확한 표적화, 예를 들어 특정 형태의 기억 T 세포의 풍부화 (enrichment) 를 포함하여 T 세포 활성화에 대한보다 많은 제어 및 선택성을 허용 할 수 있다. 또한, 항원 제시 합성 표면은 또한 규모의 경제를 이용하고 및/또는 자가 항원 제시 수지상 세포를 사용하는 것보다 더 큰 정도로 재현성을 제공할 수 있다. 이와 같이, 이 기술은 세포 요법을 필요로 하는 환자에게 더 많은 수 및/또는 더 적은 시간에 이용할 수 있게 할 수 있다. 세포 요법에 유용한 T 세포를 보다 빠르게 제공하는 것은 진행성 질환이 있는 환자에게 특히 중요할 수 있다. 이러한 항원 제시 합성 표면의 구조 및 이들의 제조 및 사용 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시형태들에서, 항원 제시 합성 표면은 함께 T 세포를 활성화시키는 역할을 하는 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자와 함께 1 차 활성화 리간드를 포함한다. 이들 성분에 대한 표면 밀도 범위 및 효능을 추가로 개선시킬 수 있는 서로의 비율이 또한 본원에 개시된다. 일부 실시형태들에서, 항원 제시 합성 표면 및 이의 제조 및 사용 방법은 상기 이점 중 하나 이상을 제공하거나, 적어도 대중에게 유용한 선택을 제공한다.

[0059] T 세포 활성화를 위한 항원 제시 합성 표면.

[0060] T 림프구 (T 세포)를 활성화시키기위한 항원 제시 합성 표면이 본원에 제공되며: 그 표면은 복수의 1 차 활성화 분자 리간드; 및 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함하며, 여기서 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 및 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각은 항원 제시 합성 표면에 특이적으로 결합된다. 각각의 1 차 활성화 분자 리간드는 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자를 포함 할 수 있다. 일부 실시형태들에서, MHC 분자는 MHC 클래스 I 분자이다. 일부 다른 실시형태들에서, MHC 분자는 MHC 클래스 II 분자이다. 일부 실시형태들에서, 1 차 활성화 분자 리간드는 항원성 펩티드 (예를 들어, MHC 분자에 공유결합으로 또는 비공유결합으로 결합됨) 를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 복수의 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 및 복수의 보조 TCR 활성화 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자는 약 1:100 내지 약 100:1, 예를 들어, 약 20:1 내지 약 1:20 또는 약 10:1 내지 약 1:20 의 비로 존재한다. 일부 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 중 하나 이상은 전사 인자들 핵 인자 카파 B (NF κB) 및 활성화된 T 세포의 핵 인자 (NFAT) 와 같은 신호 전달 분자를 활성화 할 수 있는 TCR 공 활성화 분자이다. 일부 실시형태들에서, TCR 공 활성화 분자는 포스포이노시티드 3 키나제 (PI3K)/Akt 경로를 통해 시그널링하는 CD28 수용체의 작용제이다. 일부 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 중 하나 이상은 예를 들어 TCR 근위 시그널링 복합체의 인산화에 의해 TCR 근위 시그널링을 활성화시키는 TCR 부 활성화 분자이다. TCR 공 활성화 분자는 예를 들어 CD2 수용체의 작용제일 수 있다. CD28 및 CD2 수용체 (및 추가 세부 사항)를 통해 활성화 될 수 있는 예시적인 경로가 도 4 에 도시되어 있다. 이 항원 제시 합성 표면에 의해 활성화된 T 세포는 나이브 T 세포일 수 있다. 항원 제시 합성 표면은 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼, 튜브 (예를 들어, 유리 또는 폴리머 튜브)의 항원 제시 내부 표면, 또는 미세유체 디바이스의 항원 제시 내부 표면일 수 있다. 항원 제시 미세유체 디바이스는 본원에서 설명된 임의의 미세유체 디바이스일 수도 있고, 여기에 기술된 특징들의 임의의 조합을 가질 수도 있다.

[0061] 다양한 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 시험 관내에서 T 림프구를 활성화하도록 구성된다. 1 차 활성화 분자 리간드는 아미노산 서열을 갖는 MHC 분자를 포함할 수 있고 C-말단 연결을 통해 항원 제시 합성 표면의 표

면에 공유결합으로 연결될 수 있다. MHC 분자는 표면으로부터 멀어지도록 배향된 MHC 분자의 N-말단 부분을 제시함으로써, 표면 상에 배치된 T 림프구의 TCR과 MHC 분자의 특이적 결합을 용이하게 한다. MHC 분자는 MHC 펩티드를 포함할 수 있다. 표면이 수성 환경에 노출 될 때 MHC 테트라머가 형성 될 수 있도록, 항원 제시 합성 표면상의 위치에 적어도 4 개의 MHC 분자의 클러스터가 배치될 수 있다.

[0062] 일부 실시형태에서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각은 연결기를 통해 항원 제시 합성 표면에 공유결합으로 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 1 차 활성화 분자 리간드의 MHC 분자는 공유결합 연결을 통해 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 예를 들어, 클릭 화학 및 적절한 클릭 시약 쌍을 사용하여 공유 결합 연결을 형성 할 수 있다. 마찬가지로, 공 활성화 분자 리간드 (TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는), 성장 자극 분자 리간드, 및 추가 자극 분자 리간드와 같은 본원에 기술된 다른 리간드는 연결기를 통해 항원 제시 합성 표면의 표면에 공유결합으로 연결될 수 있고, 연결은 클릭 화학 및 적절한 클릭 시약 쌍을 사용하여 형성 될 수 있다.

[0063] 다른 실시형태에서, MHC 분자는 비오틴/스트렙타비딘 결합 쌍 상호 작용과 같은 커플링 그룹 (CG)을 통해 비공유결합으로 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 커플링 그룹의 하나의 구성원은 표면 (예를 들어, 스트렙타비딘) 과 공유결합으로 연관된다. 커플링 그룹의 추가의 예는 비오틴/아비딘, 비오틴/뉴트레아비딘, 및 디곡시게닌/안티-디곡시게닌이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 스트렙타비딘, 아비딘 및 뉴트레아비딘은 비오틴 결합체의 예를 나타낸다. 마찬가지로, 공 활성화 분자 리간드 (TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는), 성장 자극 분자 리간드, 및 추가 자극 분자 리간드와 같은 본원에 기술된 다른 리간드는 항원 제시 합성 표면에 비공유결합으로 커플링될 수 있고, 커플링 그룹은 비오틴 또는 디곡시게닌을 포함할 수도 있다.

[0064] 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍의 하나의 구성원은 그 자체가 예를 들어 하나 이상의 연결기를 통해 표면에 공유 결합 될 수 있다. 표면에 대한 공유결합 연결은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면에 공유결합으로 결합된 CG 결합 쌍의 구성원은 클릭 시약 쌍을 통해 결합될 수 있다. 이것은 또한 본원에 기술된 다른 리간드 (예를 들어, 공 활성화 분자 리간드, TCR 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 성장 자극 분자, 및 추가 자극 분자) 를 표면과 연관시키는 것과 관련된 CG 결합 쌍 구성원에 대해서도 사실일 수 있다. 또한, 스트렙타비딘과 같은 일부 결합 쌍 구성원은 다중 결합 부위 (예를 들어, 스트렙타비딘에서 4 개) 를 갖기 때문에, 1 차 활성화 분자 리간드는 비오틴/스트렙타비딘/비오틴 연결에 의해 항원 제시 합성 표면에 결합 될 수 있다. 다시, 이것은 또한 본원에 기술된 다른 리간드 (예를 들어, 공 활성화 분자 리간드, TCR 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 성장 자극 분자, 및 추가 자극 분자) 를 표면과 연관시키는 것과 관련된 CG 결합 쌍 구성원에 대해서도 사실일 수 있다.

[0065] 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍의 제 1 구성원은 1 차 활성화 분자 리간드와 공유적으로 연관되고 CG 결합 쌍의 제 2 구성원은 표면과 비공유적으로 연관된다. 예를 들어, CG 결합 쌍의 제 1 구성원은 1 차 활성화 분자 리간드와 공유적으로 연관된 비오틴일 수 있고; CG 결합 쌍의 제 2 구성원은 표면과 비공유적으로 연관된 스트렙타비딘일 수 있다 (예를 들어, 추가의 비오틴을 통해, 추가의 비오틴은 표면과 공유적으로 연관된다). 일부 실시형태에서, 표면과 공유결합으로 연관된 비오틴은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결된다. 예를 들어, 표면과 공유적으로 연관된 비오틴은 기술된 바와 같이 총 길이를 갖는 일련의 하나 이상의 연결기를 통해 표면에 연결될 수 있다. 다시, 이것은 또한 본원에 기술된 다른 리간드 (예를 들어, 공 활성화 분자 리간드, TCR 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 성장 자극 분자, 및 추가 자극 분자) 를 표면과 연관시키는 것과 관련된 CG 결합 쌍 구성원에 대해서도 사실일 수 있다. 스트렙타비딘과 같은 CG 결합 쌍의 제 2 구성원을 표면과 비공유적으로 연관시키는 것은 1 차 활성화 분자 리간드, 공 활성화 분자 리간드, TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자와 같은 리간드를 CG 결합 쌍의 제 2 구성원이 표면과 공유적으로 연관되는 경우보다 더 큰 밀도로 로딩하는 것을 용이하게 할 수 있다.

[0066] 1 차 활성화 분자 리간드 (예를 들어, MHC 분자를 포함)는 종양 연관 항원을 포함하는 항원성 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 종양 연관 항원은 1 차 활성화 분자 리간드 (예를 들어, MHC 분자)와 비공유적으로 연관 될 수 있다. 종양 연관 항원은 1 차 활성화 분자 리간드 (예를 들어, MHC 분자)에 의해 T 림프구의 활성화를 개시 할 수 있는 배향으로 제시될 수 있다. 종양 관련 항원은 펩티드 일 수 있다. 종양 관련 항원의 일부 비 제한적 예는 흑색 종 및 일부 암종, SLC45A2, TCL1 및 VCX3A 에 관여하는 흑색 종에 대한 MART1 (펩티드 서열 ELAIGIGITV), NYESO1 (펩티드 서열 SLLMWITQV)을 포함하지만, 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 종양 항원의 추

가의 예는 CD19, CD20, CLL-1, TRP-2, LAGE-1, HER2, EphA2, FOLR1, MAGE-A1, 메조텔린, SOX2, PSM, CA125, T 항원 등과 같은 종양 세포의 표면 상에 발현된 단백질로부터 아미노산 서열의 세그먼트를 포함하는 펩티드를 포함한다. 펩티드는 종양 관련 항원의 세포 외 도메인으로부터 유래 될 수 있다. 항원은 종양 세포가 유래된 유형의 건강한 세포보다 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발현되는 경우 종양 연관된 것으로 간주된다. 이 종양 관련 항원을 인식하는 T 세포는 항원 특이적 T 세포이다. 본원에 기재된 항원 제시 표면에 임의의 종양 관련 항원이 이용 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 종양 관련 항원은 예를 들어 종양 세포에서 돌연변이 유전자에 의해 인코딩된 신생 항원 펩티드이다. 신생 항원 펩티드에 대한 상세한 논의는 예를 들어 US 2011/0293637을 참조하라.

[0067] 항원 제시 합성 표면은 각각 TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 복수의 TCR 공 활성화 분자를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 복수의 부 TCE 활성화 분자를 포함한다. 다른 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 포함할 수도 있다. TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자는 100:1 내지 1:100, 10:1 내지 1:20, 5:1 내지 1:5, 3:1 내지 1:3, 2:1 내지 1:2 등과 같은 비율로 존재할 수 있으며, 여기서 상기 값 각각은 "약"에 의해 수정 될 수 있다. 다른 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 약 3:1 내지 약 1:3 의 비율로 포함할 수도 있다.

[0068] TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자는 단백질, 예를 들어 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, TCR 공 활성화 분자는 CD28 결합 분자 (예를 들어, CD80 분자를 포함) 또는 CD28 에 대한 결합 능력을 보유하는 이의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, TCR 공 활성화 분자는 CD28 결합 분자 (예를 들어, CD80 분자를 포함) 또는 CD28 에 특이적으로 결합하는 이의 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, TCR 공 활성화 분자는 CD28 결합 분자 (예를 들어, CD80 분자를 포함) 또는 이의 CD28-결합 단편일 수 있다. 일부 실시형태에서, TCR 공 활성화 분자는 항-CD28 항체 또는 이의 단편 (예를 들어, CD28-결합 단편)을 포함할 수 있다.

[0069] 일부 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각은 연결기를 통해 항원 제시 합성 표면에 공유결합으로 연결될 수 있다. 다른 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각은 항원 제시 합성 표면에 공유 결합된 연결기에 비공유적으로 결합 될 수 있다. TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자는 비오틴/스트렙타비딘 결합 쌍 상호 작용과 같은 CG를 통해 비공유적으로 공유결합으로 개질된 표면에 연결될 수 있다. 예를 들어, TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자는 스트렙타비딘과 상호 작용하는 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 추가로 포함할 수 있으며, 이는 본원에 기술된 바와 같이 표면과 공유적으로 또는 비공유적으로 연관 될 수 있다. 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티는 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어, BirA 효소와 같은 비오틴 리가제를 사용하여 TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자에 첨가 될 수 있다. 예를 들어, Fairhead et al., Methods Mol Biol 1266, 171-184, 2015 을 참조한다. 커플링 그룹의 추가의 예는 비오틴/아비딘, 비오틴/뉴트레아비딘, 및 디곡시게닌/안티-디곡시게닌을 포함한다. 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍 중 하나는 그 자체가 예를 들어 상술된 바와 같은, 연결기를 통해 표면에 공유 결합 될 수 있다. 예시적인 TCR 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자에 대한 예를 참조하라.

[0070] 일부 다른 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면의 공 활성화 분자 리간드는 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은 TCR 공 활성화 분자에 추가하여 또는 대신에 복수의 보조 TCR 활성화 분자를 포함할 수 있다. 일부 추가의 실시형태에서, 추가의 공 활성화 분자 리간드가 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 보조 TCR 활성화 분자 또는 추가의 공 활성화 분자 리간드는 하나 이상의 CD2 작용제, CD27 작용제 또는 CD137 작용제를 포함한다. 예를 들어, 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 결합 단백질 또는 이의 단편일 수 있으며, 여기서 단편은 CD2와의 결합 능력을 보유한다. 일부 실시형태에서, 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 와의 결합 능력을 보유하는 CD58 또는 이의 단편일 수 있다. 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 결합 단백질 (예를 들어, CD58) 또는 이의 단편일 수 있으며, 여기서 단편은 CD2 와 특이적으로 결합한다. 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 결합 단백질 (예를 들어, CD58) 또는 이의 CD2-결합 단편일 수도 있다. 보조 TCR 활성화 분자 또는 추가의 공동 활성화 분자 리간드는 각각 CD2, CD27 또는 CD137에 대한 항체일 수 있거나, 이러한 항체의 임의의 조합이 존재할 수 있다. 보조 TCR 활성화 분자 또는 추가의 공동 활성화 분자 리간드는 대안적으로 각각 CD2, CD27 또는 CD137 에 대한 항체의 단편, 또는 이들의 임의의 조합일 수도 있다. 발리루맵 (CDX-1127) 은 예시적인 항-CD27 항체이다. 유토밀루맵 (PF-05082566) 은 예시적인 항-CD137 항체이다. CD70 또는 이의 세포 외 부분은 또한 CD27 작용제로서 사용될 수 있다. CD137L 로서도 알려진 TNFSF9, 또는 이의 세포 외 부분은 또한 CD137 작용제로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서,

보조 TCR 활성화 분자는 CD2의 작용제, 예컨대 항-CD2 항체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 보조 TCR 활성화 분자들 각각은 연결기를 통해 표면에 공유결합으로 연결될 수 있다. 다른 실시형태에서, 보조 TCR 활성화 분자들 각각은 비오틴/스트렙타비딘 결합 쌍 상호 작용과 같이, 예를 들어 CG를 통해, 표면에 공유결합된 연결기에 비공유 결합될 수도 있다. 예를 들어, 보조 TCR 활성화 분자는 스트렙타비딘과 상호 작용하는 상술된 바와 같은 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 포함할 수 있으며, 이는 본원에 기술된 바와 같이 표면과 공유적으로 또는 비공유적으로 연관 될 수 있다. 커플링 그룹의 추가의 예는 비오틴/아비딘, 비오틴/뉴트레아비딘, 및 디곡시게닌/안티-디곡시게닌이 포함한다. 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍 중 하나는 그 자체가 예를 들어 연결기를 통해 표면에 공유 결합 될 수 있다.

[0071] 항원 제시 합성 표면은 적어도 하나의 성장 자극 분자 리간드를 추가로 포함할 수 있다. 성장 자극 분자 리간드는 단백질 또는 펩티드 일 수 있다. 성장 자극 단백질 또는 펩티드는 사이토카인 또는 이의 단편 일 수 있다. 성장 자극 단백질 또는 펩티드는 성장 인자 수용체 리간드일 수 있다. 성장 자극 분자 리간드는 IL-21 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 성장 자극 분자 리간드는 공유결합 연결기를 통해 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 다른 실시형태에서, 성장 자극 분자 리간드는 비오틴/스트렙타비딘 결합 쌍 상호 작용과 같은, CG 을 통해 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 커플링 그룹의 추가의 예는 비오틴/아비딘, 비오틴/뉴트레아비딘, 및 디곡시게닌/안티-디곡시게닌이 포함한다. 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍 중 하나는 그 자체가 예를 들어 연결기를 통해 표면에 공유 결합 될 수 있다. 다른 실시형태에서, 성장 자극 분자 리간드는 공유적으로 또는 비오틴/스트렙타비딘 결합 상호 작용을 통해 표면에 부착 될 수 있으며, 여기서 표면은 MHC 분자가 연결된 항원 제시 합성 표면과 동일하지 않다. 예를 들어, 성장 자극 분자 리간드가 부착되는 표면은 또한 제 1, 항원 제시 합성 표면을 포함하는 미세유체 디바이스의 제 2 표면일 수 있다.

[0072] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 이의 단편일 수 있는 추가 성장 자극 분자 리간드가 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-2 또는 IL-7을 포함하지만 이에 제한되지 않는 추가의 자극 분자 리간드는 항원 제시 합성 표면 또는 항원 제시 합성 표면이 아닌 다른 표면에 성장 자극 분자 리간드와 관련하여 상기 논의된 바와 같이 연결될 수 있다.

[0073] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 접착 자극 분자 리간드를 포함하며, 이는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드이다.

[0074] 추가의 자극 분자 리간드 및/또는 접착 자극 분자 리간드는 비오틴/스트렙타비딘 결합 쌍 상호 작용과 같은, CG 를 통해 표면에 공유적으로 연결되거나 표면에 비공유적으로 연결될 수 있다. 커플링 그룹의 추가의 예는 비오틴/아비딘, 비오틴/뉴트레아비딘, 및 디곡시게닌/안티-디곡시게닌이 포함한다. 일부 실시형태에서, CG 결합 쌍 중 하나는 그 자체가 예를 들어 비오틴/스트렙타비딘 결합 상호 작용을 통한 연결기를 통해 표면에 공유 결합 될 수 있다.

[0075] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 연결기 및 말단 표면-차단기를 포함할 수 있는 복수의 표면-차단 분자 리간드를 포함한다. 연결기는 6 개 이상의 원자 (예를 들어, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 또는 그 이상의 원자) 의 선형 사슬을 포함할 수 있다. 선택적으로, 연결기는 선형 구조를 갖는다. 말단 표면-차단기는 친수성 모이어티, 양친매성 모이어티, 양쪽이온성 모이어티 또는 음으로 하전된 모이어티일 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단 차단기는 말단 히드록시기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 차단기는 말단 카르복시기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 말단 차단기는 말단 양쪽이온성기를 포함한다. 복수의 표면-차단 분자 리간드는 모두 동일한 말단 표면-차단기를 가질 수 있거나 또는 말단 표면-차단기들의 혼합물을 가질 수 있다. 이론에 결부되지 않고, 표면 차단 분자 리간드의 친수성 연결기뿐만 아니라 말단 표면 차단기는 항원 제시 합성 표면을 둘러싸는 수성 매질에서 물 분자와 상호 작용하여 전체적으로 보다 친수성인 표면을 생성할 수 있다. 이러한 향상된 친수성 특성은 항원 제시 합성 표면과 세포 사이의 접촉이 생체 내에서 자연 세포 간 상호 작용 및/또는 세포-세포 외 유체 환경과 보다 양립 가능하고 보다 유사하게 만들 수 있다. 연결기는 예를 들어 폴리머를 포함할 수 있다. 폴리머는 알킬렌 에테르 모이어티들을 포함하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 매우 다양한 알킬렌 에테르 함유 폴리머들이 여기에 기술된 표면들상에서의 사용을 위해 적합할 수도 있다. 알킬렌 에테르 함유 폴리머의 하나의 클래스는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG M_w <100,000Da) 이고, 이는 당업계에 생체 적합성 인 것으로 알려져 있다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 88Da, 100Da, 132Da, 176Da, 200Da, 220Da, 264Da, 308Da, 352Da, 396Da, 440Da, 500Da, 600Da, 700Da, 800Da, 900Da, 1000Da, 1500Da, 2000Da, 5000Da, 10,000Da 또는 20,000Da 의 M_w 을 가질 수 있거나, 또는 상기 값 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위 내에 속하는 M_w 를 가질 수도 있다. 일부 실시형태에서, PEG 폴리머는 약 3, 4, 5, 10, 15,

25 단위, 또는 그 사이의 임의의 값의 폴리에틸렌 모이어티 반복을 갖는다. 일부 실시형태에서, PEG는 카르복시 치환된 PEG 모이어티이다. 일부 실시형태에서, PEG는 히드록시 치환된 PEG 모이어티이다. 일부 실시형태에서, 복수의 표면 차단 분자 리간드 각각은 복수의 표면 차단 분자 리간드 중 다른 리간드의 연결기와 동일한 길이를 갖는 연결기를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 복수의 표면 차단 분자 리간드의 연결기는 다양한 길이를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면-차단기 및 연결기의 길이는 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각에 대해 동일 할 수 있다. 대안 적으로, 표면 차단기 및 연결기의 길이는 복수의 표면 차단 분자 리간드 내에서 변할 수 있고 임의의 조합으로 선택된 2, 3 또는 4 개의 상이한 표면 차단기 및/또는 2, 3, 4 개, 또는 그 이상의 상이한 길이를 포함할 수 있다. 일반적으로, 표면-차단 분자 리간드는 1 차 활성화 분자 리간드 및 공 활성화 분자 리간드의 결합 및/또는 기능을 입체적으로 방해하지 않도록 충분히 짧은 길이 및/또는 구조를 갖는다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표면-차단 분자 리간드의 길이는 표면에 결합된 다른 연결기 (예를 들어, 커플링 그룹들을 연결하는 연결기, 1 차 활성화 분자 리간드, 보조-자극 분자 리간드 또는 다른 리간드) 의 길이와 같거나 적다. 일부 실시형태에서, 표면-차단 분자 리간드의 길이는 표면에 결합된 다른 연결기 (예를 들어, 커플링 그룹들을 연결하는 연결기, 1 차 활성화 분자 리간드, 보조-자극 분자 리간드 또는 다른 리간드) 의 길이보다 작은 약 1 이상의 옹스트롬 (예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 또는 그 이상의 옹스트롬) 이다. 일부 실시형태에서, 표면-차단 분자 리간드의 길이는 표면에 결합된 다른 연결기의 길이보다 작은 약 1 내지 약 100 옹스트롬 (예를 들어, 약 2 내지 약 75, 약 3 내지 약 50, 약 4 내지 약 40, 또는 약 5 내지 약 30 옹스트롬) 이다. 표면-차단 분자 리간드가 표면에 결합된 다른 연결기의 길이와 동일하거나 다소 작은 길이를 갖는 경우, 결과의 표면은 커플링 및/또는 세포와의 상호 작용에 용이하게 이용 가능한 방식으로 다른 연결기에 부착된 리간드를 효과적으로 제시한다. 항원 제시 비드와 관련하여, 친수성 폴리머, 예를 들어 PEG 또는 PEO 폴리머와 같은 표면-차단 분자 리간드 및/또는 말단 히드록시 또는 카르복시기를 포함하는 리간드를 포함하는 것은 유리하게는 소수성 상호 작용을 통한 비드의 응집을 감소시킬 수 있다. 표면-차단 분자 리간드는 상기 논의된 1 차 및 다른 (예를 들어, 공 활성화, 보조 등) 리간드 후에 표면에 부착 될 수 있거나, 임의의 활성화 또는 공 활성화 중이 본 명세서에 개시된 임의의 실시 예에 기재된 표면에 부착되기 전에 도입될 수 있다.

[0076] 항원 제시 합성 표면은 유리, 금속, 폴리머 또는 금속 산화물을 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 임의의 종류의 구성을 갖는 웨이퍼의 표면, 비드의 표면, 복수의 세포들을 포함하도록 구성된 유체 회로 함유 장치 (예를 들어, 미세유체 디바이스) 의 적어도 하나의 내부 표면, 또는 튜브 (예를 들어, 유리 또는 폴리머 튜브)의 내부 표면이다. 일부 실시형태에서, T 립프구를 활성화시키도록 구성된 항원 제시 합성 표면을 갖는 웨이퍼는 표준 48, 96 또는 384 웰플레이트의 웰 내에 맞게 크기가 정해질 수 있다. 다양한 실시형태에서, T 립프구를 활성화시키도록 구성된 항원 제시 합성 표면을 갖는 비드는 웰플레이트 내에 또는 유체 회로 함유 장치 내에서의 사용하기 위해 배치 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면 상의 (또는 그것이 부착되는 각 부분 또는 하위-영역에서의) 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 밀도는 제곱 마이크론 당 약 50 내지 약 500 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 4×10^2 내지 약 3×10^3 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 개의 분자; 또는 제곱 마이크론 당 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 개의 분자일 수도 있다.

[0077] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면 상의 (또는 그것이 부착되는 각 부분 또는 하위-영역에서의) 복수의 공 활성화 분자 리간드의 밀도는 제곱 마이크론 당 약 20 내지 약 250 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 2×10^2 내지 약 1×10^3 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 500 내지 약 5×10^3 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1×10^3 내지 약 1×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 5×10^2 내지 약 2×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 분자 약 5×10^2 내지 약 1.5×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1×10^4 내지 1.5×10^4 개의 분자; 제곱 마이크론 당 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 개의 분자; 또는 제곱 마이크론 당 약 1.25×10^4 내지 약 1.5×10^4 개의 분자이다.

[0078] 임의의 특정 이론에 구속되기를 원하지 않으면서, 특정 실험은 상대적으로 정의된 표면적 대 부피 비를 갖는 T 세포 활성화를 위한 비드를 제공하고 사용하는 것이 유리할 수 있음을 나타내었다. 이러한 비드는 활성화 동안 T 세포와 보다 효율적으로 상호 작용하도록 관련 리간드를 보다 접근 가능한 방식으로 제시할 수 있다. 이러한 비드는 표면적 대 부피 비가 더 높은 비드보다 필요한 리간드가 더 적은 원하는 정도의 T 세포 활성화를 제공할 수 있고/있거나 표면적 대 부피 비가 더 높은 비드보다 원하는 특징 (예 : 항원 특이성 및/또는 본원에 기재된 마커 표현형) 을 갖는 더 높은 정도의 T 세포 활성화 또는 더 많은 T 세포를 제공할 수 있다. 이상적인 구형 고체는 가장 낮은 가능한 표면적 대 부피 비율을 갖는다. 따라서, 일부 실시형태에서, 비드 표면적은 동일한 크기 (볼륨 또는 직경)의 구의 표면적의 10 % 내에 있으며, 본 명세서에서 "실질적으로 구형"으로 지칭된다. 예를 들어, 직경이 2.8 μm (반경 1.4 μm) 인 비드의 경우 해당하는 이상적인 구의 표면적은 $4\pi r^2 = 24.63 \mu\text{m}^2$ 일 것이다. 동일한 체적 또는 직경의 이상적인 구의 표면적의 10 % 이내의 표면적을 갖는 실질적으로 구형인 2.8 μm 직경의 비드는 $27.093 \mu\text{m}^2$ 이하의 표면적을 가질 것이다. 특정의 상업적으로 이용 가능한 비드가 더 높은 표면적을 갖는 것으로 보고되고; 예를 들어 다이아비즈 M-270 에폭시는 제품 문헌에 $2\text{-}5\text{m}^2/\text{g}$ 의 비표면적 및 2.8 μm 직경을 갖는 것으로 설명되어 있고 그 문헌은 또한 1 mg의 비드가 $6\text{-}7 \times 10^7$ 개의 비드들을 나타낸다. 비 표면적에 1 mg/ $6\text{-}7 \times 10^7$ 개의 비드들을 곱하는 것은 비드 당 28 내지 83 μm^2 의 비드당 표면적을 제공하며, 이것은 2.8 μm 직경을 갖는 이상적인 구의 표면적보다 10 % 이상 더 크다. 이상적인 구의 표면적보다 10 % 이상 더 큰 표면적을 갖는 폴리머 비드는 본원에서 "콘볼루트된 비드"로 지칭된다. 일부 실시형태에서, 폴리머 비드는 실질적으로 구형이거나 콘볼루트될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 폴리머 비드는 콘볼루트되지 않고, 실질적으로 구형이다.

[0079] **비패턴화 표면.** 다양한 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 그 위에 균일하게 분포된 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 갖는 비 패턴화 표면일 수 있다. 1 차 활성화 분자 리간드는 MHC 분자를 포함 할 수 있으며, 이들 각각은 종양 관련 항원을 포함 할 수 있다. 비패턴화 표면은 그 위에 균일하게 분포된 복수의 공동 활성화 분자 리간드 (예를 들어, TCR 공동 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자)를 추가로 포함할 수 있다. 공동 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면에 대해 임의의 조합으로 상기 기재된 바와 같을 수 있다. 1 차 활성화 분자 리간드 및 공동 활성화 분자 리간드의 밀도는 항원 제시 표면에 대해 전술 한 바와 동일한 범위일 수 있다. 비패턴화 항원 제시 합성 표면은 항원 제시 표면에 대해 전술 한 바와 같이 추가 성장 자극제, 접착제 및/또는 표면 차단 분자 리간드를 추가로 포함 할 수 있으며, 이들 각각은 (존재하는 경우) 비패턴화 표면 상에 균일하게 분포 될 수 있다. 예를 들어, 비패턴화 표면은 표면에 연결된 IL-21과 같은 부 자극 분자를 포함할 수 있다. 1 차 활성화 분자 리간드, 공동 활성화 분자 리간드 및/또는 추가 리간드는 항원 제시 표면에 대해 상기 기재된 바와 같이 표면에 연결될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 리간드가 "균일하게 분포된" 표면은 전체 표면적의 10 % 이상의 크기를 갖는 표면의 일부가 표면의 총 표면적의 평균 리간드 농도와 비교하여 통계적으로 유의미한 더 높은 농도의 리간드를 갖지 않는 것을 특징으로한다.

[0080] **패턴화 표면.** 다양한 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 패턴화 될 수 있고, 복수의 영역을 가질 수 있으며, 각각의 영역은 MHC 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 포함하며, 여기서 복수의 영역은 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 영역에 의해 분리된다. 항원 제시 합성 표면은 평면 표면일 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 포함하는 복수의 영역들 각각은 복수의 공동 활성화 분자 리간드, 예를 들어 TCR 공동 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 추가로 포함할 수 있다. 공동 활성화 분자 리간드는 상기 기재된 바와 같은 및 임의의 조합의 임의의 공동 활성화 분자 리간드일 수 있다. 1 차 활성화 분자 리간드 및/또는 공동 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면에 대해 상기 기재된 바와 같이 표면에 연결될 수 있다. 1차 활성화 분자 리간드 및/또는 공동 활성화 분자 리간드를 함유하는 각각의 영역에서 1차 활성화 분자 리간드 및/또는 공동 활성화 분자 리간드의 밀도는 항원 제시 표면에 대해 상기 기재된 밀도와 동일한 범위에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 포함하는 복수의 영역 각각은 약 0.10 제곱 마이크론 내지 약 4.0 제곱 마이크론의 면적을 갖는다. 다른 실시 예에서, 복수의 영역 각각의 면적은 약 0.20 제곱 마이크론 내지 약 0.8 제곱 마이크론 일 수 있다. 복수의 영역은 약 2 마이크론, 약 3 마이크론, 약 4 마이크론 또는 약 5 마이크론만큼 서로 분리 될 수 있다. 복수의 영역의 각각의 영역과 그 이웃 영역 사이의 피치는 약 2 마이크론, 약 3 마이크론, 약 4 마이크론, 약 5 마이크론, 또는 약 6 마이크론 일 수 있다. 패턴화 표면의 두 가지 실시형태를 도시한 도 7a 및 도 7b 를 참조하라.

[0081] 다양한 실시형태에서, MHC 분자를 포함하는 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 영역은

또한 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 실질적으로 배제하도록 구성 될 수 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, 1 차 활성화 분자 리간드 및 선택적으로 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 실질적으로 배제하도록 구성된 영역은 또한 표면-차단 분자 리간드, 성장 자극 분자, 추가 자극 분자, 및 접착 자극 분자 리간드 중 하나 이상을 포함하도록 구성될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 성장 자극 분자 및/또는 추가 자극 분자는 사이토카인 또는 이의 단편을 포함하고, IL-21 또는 이의 단편을 추가로 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 1 차 활성화 분자 리간드 및 선택적으로 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 실질적으로 배제하도록 구성된 영역은 또한 하나 이상의 지원 (supportive) 모이어티들을 포함하도록 구성될 수도 있다. 지원 모이어티는 T 림프구 성장을 지원하기 위한 접착 모티프를 제공할 수 있거나 세포 성장을 위한 일반적 지원 환경을 제공하는 친수성 모이어티를 제공할 수 있다. 접착적 지원을 제공하는 모이어티는 RGD 모티프를 포함하는 펩티드 서열을 포함 할 수 있다. 다른 실시형태에서, 접착적 지원을 제공하는 모이어티는 ICAM 서열 일 수 있다. 친수성을 제공하는 모이어티는 PEG 모이어티 또는 카르복시산 치환된 PEG 모이어티와 같은 모이어티일 수 있다.

[0083] **미세유체 디바이스** 일부 실시형태에서, 미세유체 디바이스는 임의의 상기 실시 형태에 따른 복수의 영역을 갖는 패턴화된 항원 제시 합성 표면을 포함한다. 미세유체 디바이스의 항원 제시 표면은 본원에 기술된 임의의 미세유체 (또는 나노 유체) 장치 일 수 있지만, 본 개시는 이에 제한되지 않는다. W02014/153651, W02016/115337 또는 W02017/124101에 기술된 바와 같은 마이크로 웰 또는 마이크로 챔버를 포함하는 미세유체 디바이스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 클래스들의 미세유체 디바이스는 이 섹션에 기술된 바와 같이 항원 제시 표면을 포함하도록 변형 될 수 있거나, 또는 본원에 기재된 방법에서 본원에 기재된 바와 같은 항원 제시 비드 또는 항원 제시 웨이퍼와 조합하여 사용될 수 있다.

[0084] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면은 하나 이상의 격리 펜 및 채널을 포함하는 미세유체 디바이스의 내부 표면이다. 하나 이상의 이러한 격리 펜 내의 표면의 적어도 일부는 예를 들어 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 및 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함 할 수 있다. 1 차 활성화 분자 리간드 및 공 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면에 대해 상기 기재된 임의의 것일 수 있고, 상기 기재된 임의의 농도 또는 조합으로 존재할 수 있다. 미세유체 디바이스의 표면에 대한 리간드 부착의 특성은 항원 제시 표면에 대해 상기 기재된 임의의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 이러한 격리 펜 내의 이러한 표면은 표면-차단 분자 리간드, 성장 자극 분자 리간드, 추가 자극 분자 리간드 및 접착 자극 분자 리간드 중 하나 이상을 추가로 포함 할 수 있다. 채널 표면의 적어도 일부는 표면-차단 분자 리간드, 예를 들어 본원에 기술된 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 임의의 영역을 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 채널의 표면은 표면-차단 분자 리간드 및 선택적으로 다른 비자극 리간드를 포함하지만, 격리 펜의 표면 상에 존재하는 다른 리간드, 예를 들어 1 차 활성화 분자 리간드 및 공 활성화 분자는 실질적으로 없다.

[0085] **세포 대 표면 접착의 변조.** 일부 실시형태들에서, 세포들이 미세유체 디바이스 내의 표면들에 부착하는 능력을 조절하는 것이 유용할 수 있다. 실질적으로 친수성 특징을 갖는 표면은 적절하게 성장 및 증식하기 위해 부착의 기계적 응력을 필요로 하는 세포들에 대해 고정 포인트들을 제공하지 않을 수도 있다. 과잉의 이러한 고정 모이어티들을 나타내는 표면은 성공적으로 성장하는 부착 세포들이 격리 펜 내로부터 그리고 미세유체 디바이스 밖으로 배출되는 것을 방지할 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 공유 결합된 개질은 부착 세포들을 고정하는 것을 돕기 위한 표면 접촉 모이어티들을 포함한다. 본원에 설명된 표면들의 구조들 및 그것들을 제조하는 방법들은 특정 사용을 위해 바람직할 수도 있는 고정 모이어티들의 양을 선택하기 위한 능력을 제공한다. 충분한 부착 강화 환경을 제공하기 위해 매우 작은 퍼센티지의 부착 유형 모티프들이 필요할 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 부착 강화 모이어티들은 미세유체 디바이스로 세포들이 도입되기 전에 제조된다. 대안으로, 부착 강화 개질된 표면은 세포들을 도입하기 전에 제공될 수도 있고, 다른 부착 강화 모이어티의 더 추가가 이루어질 수도 있어, 이것은 (예를 들어, 비오틴/스트렙타비딘 결합의 베이스에서와 같이) 공유 결합이나 비-공유 결합으로 제 1 개질된 표면에 어태치하도록 설계된다.

[0086] 일부 실시형태들에서, 부착 강화 표면 개질들은 표면 개질 리간드의 개별의 분자들의 랜덤한 패턴으로 표면을 개질할 수도 있다. 일부 다른 실시형태들에서, 부착 강화 표면 개질들의 더 농축된 패턴은, 친수성 표면 개질들을 가져 부착 강화를 조절할 수도 있는, 표면의 나머지에 의해 둘러싸인 표면 개질의 작은 영역들을 생성할 수 있는, 양으로 하전된 리신 측쇄들과 같은 다수의 부착 강화 모티프들을 함유하는 폴리머들을 사용함으로써 도입될 수도 있다. 이것은 다수의 부착 강화 리간드들을 갖는, 수지상 폴리머들의 사용에 의해 추가로 정교화될 수도 있다. 수지상 폴리머 유형 표면 개질 화합물 또는 시약은 단지 친수성 표면 접촉 모이어티들을 갖는

제 2 표면 개질에 대해 매우 작은 비율로 존재할 수도 있지만, 여전히 부착 강화를 제공한다. 또한, 수지상 폴리머 유형 표면 개질 화합물 또는 시약은 그 자체로 전체 표면의 거동을 추가적으로 조절할 수 있는 말단 작용기들의 혼합된 세트를 가질 수도 있다.

[0087] 일부 실시형태들에서, 표면들의 위치 선택적 도입을 제공하는 것이 바람직할 수도 있다. 예를 들어, 미세유체 채널 및 격리 펜들을 포함하는 미세유체 디바이스의 콘텍스트에서, 부착-유형 세포들을 성공적으로 배양할 뿐만 아니라 원하는 경우 (예를 들어, 유전영동 또는 다른 힘들을 사용하여) 쉽게 그들을 배출하기 위한 능력을 제공하는 채널을 개방하는 격리 펜들 내에 표면을 제공하면서 미세유체 채널 내에 제 1 유형의 표면을 제공하는 것이 바람직할 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 부착 강화 개질들은 절단 가능 모이어티들을 포함할 수도 있다. 절단 가능 모이어티들은 배양되고 있는 세포들과 양립 가능한 컨디션들 하에서 절단 가능할 수도 있어, 임의의 원하는 시점에서, 절단 가능 모이어티가 절단될 수도 있고 표면의 성질이 부착을 위해 덜 강화되도록 변경될 수도 있다. 밑에 있는 절단된 표면은 그 시간에 배출이 강화되도록 유용하게 비-오염될 수도 있다. 본원에 논의된 예들은 부착 및 이동성을 조절하는 것에 초점을 맞추지만, 이들 위치 선택적으로 개질된 표면들의 사용은 그렇게 제한되지 않는다. 배양되고 있는 세포들에 대한 임의의 종류의 이점에 대한 상이한 표면 개질들은 본 개시물에 따른 제 1 및 제 2 표면 개질을 갖는 표면에 통합될 수도 있다.

[0088] 사용될 수도 있는 예시적인 부착 모티프들은 폴리-L-리신, 아민 등, 및 비오틴화된 시약으로서 이용 가능하고 본원에 설명된 방법들에 쉽게 적용 가능한 트리펩티드 시퀀스 RGD 를 포함한다. 사용될 수도 있는 다른 대형 생체분자들은 다른 것들 중에서 피브로넥틴, 라미닌 또는 콜라겐을 포함한다. 폴리글루탐산 표면 접촉 모이어티를 포함하는, W02017/205830 에서 정의된 화학식 XXVI 의 구조를 갖는 표면 개질은 부착 세포들을 생존 가능하게 부착 및 성장하도록 유도할 수 있다. 부착 사이트를 제공하는 것을 도울 수도 있는 다른 모티프는, VPGXG 의 반복 시퀀스를 포함하는 엘라스틴 유사 펩티드 (Elastin Like Peptide; ELP) 이고, 여기서 X 는 모티프의 효과들을 조절할 수 있는 가변 아미노산이다.

[0089] 일부 실시형태들에서, 미세유체 채널 및 격리 펜들을 포함하는 미세유체 디바이스의 콘텍스트에서, 유동 영역 (예를 들어, 미세유체 채널) 의 표면은 제 1 공유 결합으로 바인딩된 표면 개질로 개질될 수도 있고 적어도 하나의 격리 펜의 표면은 제 2 공유 결합으로 바인딩된 표면 개질로 개질될 수도 있고, 여기서 제 1 및 제 2 공유 결합으로 바인딩된 표면 개질은 상이한 표면 접촉 모이어티들, 상이한 반응성 모이어티들, 또는 이들의 조합을 갖는다. 제 1 및 제 2 공유 결합으로 바인딩된 표면 개질들은 화학식 XXX, 화학식 V, 화학식 VII, 화학식 XXXI, 화학식 VIII, 및/또는 화학식 IX 중 어느 하나로부터 선택될 수도 있으며, 이들 모두는 W02017/205830 에 정의된 바와 같다. 제 1 및 제 2 공유 결합으로 바인딩된 표면 개질들 양자 모두가 W02017/205830 에 정의된 바와 같은 화학식 XXX, 화학식 V, 또는 화학식 VII 의 관능화된 표면을 포함하는 경우, 그러면 직교 반응 화합물질들은 제 1 반응성 모이어티 및 제 2 반응성 모이어티의 선택을 위해 선택된다. 다양한 실시형태들에서, 유동 영역의 표면들 모두는 제 1 공유 결합 표면 개질로 개질될 수도 있고 적어도 하나의 격리 펜의 표면들 모두는 제 2 공유 결합 개질로 개질될 수도 있다.

[0090] **항원 제시 합성 표면의 제조 방법; 공유결합으로 관능화된 표면**

[0091] 도 5a 및 도 5b 는 하나 이상의 단계에서 활성화, 공 활성화 및 표면-차단 분자 리간드를 첨가하여 비개질된 표면으로부터 구성되는 항원 제시 합성 표면의 구조를 나타낸다. 도 5a 는 단일 영역을 갖는 항원 제시 합성 표면에 대한 공정 및 구조를 도시한 반면; 도 5b는 2 개의 영역을 갖는 항원 제시 합성 표면에 대한 각각의 중간 및 최종 생성물의 공정 및 구조를 보여준다.

[0092] 도 5a 를 참조하면, 개략적 표현은 복수의 표면 노출 모이어티 (SEM)를 포함하는 합성 반응성 표면으로 시작하는 항원 제시 표면을 제조하기 위한 예시적인 절차를 도시한다. 반응 모이어티 (RM) 및 표면-차단 분자 리간드 SB 는, 제조시에 이 시점에서 첨가되는 경우, SEM 을 적절한 제조 시약 (들)과 반응시킴으로써 도입되어 중간 반응성 표면을 제공한다. 중간 반응성 표면에 도입된 반응성 모이어티 (RM)는 본원에 기술된 임의의 반응성 모이어티일 수 있고 본원에 기술된 임의의 연결기에 의해 중간 반응성 표면에 연결될 수 있다. 중간 반응성 표면은 적어도 반응성 모이어티 (RM)를 포함하고, 일부 실시형태에서, 본원에 기술된 임의의 표면-차단 분자 리간드 일 수도 있는 표면-차단 분자 리간드 (SB)를 포함할 수도 있다.

[0093] 이어서, 중간 반응성 표면은 결합 모이어티 (BM) 을 포함하는 관능화 시약으로 처리하고, 여기서 관능화 시약은 반응성 모이어티 (RM) 과 반응하여 결합 모이어티 BM 리간드를 도입한다. 이렇게 도입된 결합 모이어티는 본원에 기술된 임의의 결합 모이어티 BM 일 수 있다. 결합 모이어티 BM 은 스트랩타비딘 또는 비오틴 일 수 있다. 일부 구현 예에서, 결합 모이어티 BM 은 스트랩타비딘이며, 이는 연결기를 통해 반응성 모이어티 RM 과의 반응

을 통해 공유결합으로 관능화된 표면에 공유 결합으로 부착된다. 일부 다른 실시형태에서, 공유결합으로 관능화된 표면은 두 부분 구조로 스트랩타비딘 결합 모이어티를 비공유적으로 도입할 수 있다. 이 두 부분 구조는 중간 반응성 표면을 제 1 관능화 시약과 접촉시켜 반응성 모이어티 RM 과의 반응을 통해 연결기를 통해 공유결합으로 부착된 비오틴 모이어티를 도입함으로써 도입된다. 제 2 관능화 시약으로서의 스트랩타비딘의 후속 도입은 공유결합으로 관능화된 표면을 제공하며, 여기서 결합 모이어티 BM, 스트랩타비딘은 그 자체가 표면에 공유결합으로 부착되는 비오틴 모이어티에 비공유 결합으로 부착된다. 표면-차단 분자 리간드 SB' 는 결합 모이어티의 도입과 동시에 도입 될 수 있거나 또는 결합 모이어티의 도입에 후속하여 공유결합으로 관능화된 표면에 도입 될 수 있다. 표면-차단 분자 리간드 SB' 는 본원에 기술된 임의의 표면-차단 분자 리간드 일 수 있고, 표면-차단 분자 리간드 SB가 존재하는 경우, 표면-차단 분자 리간드 SB와 동일하거나 상이 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면 차단 분자 리간드 SB 가 존재할 수도 있고 표면 차단 분자 리간드 SB' 가 없을 수도 있다. 대안적으로, 표면-차단 분자 리간드 SB' 가 존재할 수 있지만 표면-차단 분자 리간드 SB 는 없을 수도 있다. 일부 실시형태에서, 표면-차단 분자 리간드 SB 및 SB '가 모두 존재한다. 이론에 구속되지 않으면서, 공유결합으로 관능화된 표면 상에 반응되지 않고 남은 일부 반응성 모이어티 RM 이 있을 수 있지만, 합성 표면을 제시하는 생성물 항원이 기능하는 것을 방지하기에는 불충분한 수의 반응성 모이어티 RM 이 존재한다. 1 차 활성화 리간드 MHC 및 공동 활성화 리간드 Co-A₁ 그리고 Co-A₂ 은 공유결합으로 관능화된 표면의 결합 모이어티 BM 을 적절한 활성화 리간드 시약과 반응시킴으로써 도입되어 항원 제시 합성 표면을 제공한다. Co-A₁ 및 Co-A₂ 는 동일 또는 상이한 공 활성화 리간드 일 수 있다. 예를 들어, Co-A₁ 그리고 Co-A₂ 는 TCR 공 활성화 분자 및 TCR 공 활성화 분자 중 하나, 다른 것 또는 집합 적으로 둘 다를 포함 할 수 있다. Co-A₁ 및/또는 Co-A₂ 는 본 명세서에 기재된 바와 같이, TCR 공 활성화 분자 및 TCR 공 활성화 분자의 임의의 조합 일 수 있다. 일부 실시형태에서, 1 차 활성화 리간드 MHC는 공유결합으로 관능화된 표면이 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및/또는 Co-A₂ 와 접촉하기 전에 공유결합으로 관능화된 표면에 도입 될 수 있다. 다른 실시형태에서, 1 차 활성화 리간드 MHC 는 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및/또는 Co-A₂ 의 도입과 동시에 또는 그 도입에 후속하여 공유결합으로 관능화된 표면에 도입 될 수 있다. 도 5a 에 도시되지 않은 일부 실시형태에서, 1차 활성화 리간드 MHC 및 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및/또는 Co-A₂ 의 도입 후, 표면-차단 분자 리간드 (SB) 는 표면-차단 분자를 항원 제시 합성 표면 상에 여전히 존재하는 잔류 반응성 모이어티 (RM) 와 반응시킴으로써 항원 제시 합성 표면에 도입 될 수 있다. 또한 하나 이상의 성장 자극 분자 리간드 및/또는 접착 자극 분자 리간드일 수도 있는 2차 리간드 SL 의 도입이 도 5a 에 포함되지만 도시되지는 않았다. 2차 리간드 SL 은 리간드들의 이들 클래스들 중 임의의 것일 수도 있다.

[0094]

도 5b 는 복수의 표면 노출 모이어티 (SEM) 를 포함하는 합성 반응성 표면으로 시작하는 제 1 및 제 2 영역들을 포함하는 항원 제시 표면을 제조하기 위한 예시적인 절차의 개략적 도시를 제공한다. 영역 1 내의 표면 노출 모이어티 SEM 은 도 6 에 도시된 바와 같이 영역 2 내의 표면 노출 모이어티 SEM₂ 와는 상이할 수도 있으며, 여기서 상이한 재료들은 합성 반응성 표면이 표면에 존재할 수도 있다. 반응성 모이어티 RM 은 영역 1 에 도입되고 영역 2 에는 실질적으로 도입되지 않는 반면, 반응성 모이어티 RM₂ 은 영역 2 에 도입되고 영역 1 에는 실질적으로 도입되지 않으며, 이는 SEM 및 SEM₂ 의 각각에 대해 직교 케미스트리의 사용에 기인한다. 예를 들어, 도 6 에 도시된 바와 같이, 영역 1 의 SEM 은 아지드 RM 을 포함하는 알콕시실록산 시약과 반응될 수도 있는 반면, 영역 2 의 SEM₂ 은 알킬닐 RM 을 포함하는 포스폰산 시약과 반응될 수도 있다. SEM 을 적절한 제조 시약 (예를 들어, 도 6 의 영역 1 과 같은 표면의 경우, 시약은 표면 차단기 SB 를 포함하는 알콕시실록산 시약일 것이다) 과 반응시킴으로써, 표면 차단 분자 리간드 SB₁ 은 영역 1 에 도입되고, 영역 2 에는 실질적으로 도입되지 않는다. 차별화된 반응성 모이어티를 갖는 중간 반응성 표면은 이러한 공정으로부터 야기된다. 차별화된 반응성 모이어티들 RM 및 RM₂ 에 기초하여, 추가의 직교 케미스트리들은 영역 1 에 결합 모이어티 BM 및 표면 차단 분자 리간드 SB₁' 를 도입할 수 있고 영역 2 에는 실질적으로 도입하지 않을 수 있고, 표면 차단 분자 리간드들 SB₂ 는 영역 2 에 도입되고 영역 1 에는 실질적으로 도입되지 않는다. 따라서, 2 개의 상이한 영역들을 갖는 공유결합으로 관능화된 표면이 제공된다. SB₁' 는 SB₁ 과 동일하거나 상이할 수도 있고; SB₁' 는 SB₂ 과 동일하거나 상이할 수도 있고; SB₂ 는 SB₁ 과 동일하거나 상이할 수도 있다. 1차 활성화 리간드 MHC 및 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및 Co-A₂ 는 결합 모이어티 BM 를 적절한 활성화 리간드 시약과 반응시킴으로써 영역 1 에 도입되고, 2차 리간드 SL 은 RM 을 적절한 시약과 반응시킴으로써 영역 2 에 형성되어, 항원 제시 합성 표면을 제공한다. 2차 리간드 SL 은 도 5a 에 대해 기술된 바와 같은 분자 리간드들의 클래스들 중 임의의 것일 수도 있다. 1차 활성화

화 리간드 MHC 는 도 5a 에 대해 기술된 프로세스와 유사하게 공 활성화 리간드를 도입하기 전에 도입될 수도 있다. Co-A₁ 및 Co-A₂ 는 동일 또는 상이한 공 활성화 리간드 일 수 있다. 예를 들어, Co-A₁ 그리고 Co-A₂ 는 TCR 공 활성화 분자 및 TCR 공 활성화 분자 중 하나, 다른 것 또는 집합 적으로 둘 다를 포함 할 수 있다. SEM, RM, SB, 1차 활성화 리간드 MHC, 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및 Co-A₂ 및 2차 리간드 SL 의 각각은 여기에 기술된 임의의 SEM, RM, SB, 1차 활성화 리간드 MHC, 공 활성화 리간드 Co-A₁ 및 Co-A₂ 및 2차 리간드 SL 일 수도 있다.

[0095] **항원 제시 합성 표면의 제조 방법**

[0096] T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 합성 표면을 제조하는 방법이 제공되며, 그 방법은 결합 모이어티 (예를 들어, 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제, 또는 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제와 비공유적으로 연관되는 비오틴 모이어티) 를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티들과 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계로서, 제 1 복수의 결합 모이어티들 각각은 1 차 활성화 분자에 결합하도록 구성되는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계; 및 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자들을 반응시키는 단계로서, 제 2 복수의 결합 모이어티들은 공 활성화 분자에 결합하도록 구성된, 상기 복수의 공 활성화 분자들을 반응시키는 단계를 포함하여, 항원 제시 합성 표면 상에 복수의 특이적으로 결합된 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 특이적으로 결합된 공 활성화 분자 리간드들을 제공한다.

[0097] 결합 모이어티 (예를 들어, 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제, 또는 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제와 비공유적으로 연관되는 비오틴 모이어티) 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면이 또한 제공된다. 다음의 논의가 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 특징들을 기술하는 정도로, 그것은 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 실시형태들 및 공유결합으로 관능화된 합성 표면이 사용되는 항원 제시 표면을 제조하는 방법의 실시형태들 양자 모두에 적용된다.

[0098] 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 여기에 기술된 임의의 표면 타입, 예를 들어, 비드, 웨이퍼, 미세유체 디바이스의 내부 표면, 또는 튜브 (예를 들어, 유리 또는 폴리머 튜브) 일 수도 있다. 표면 재료는 예를 들어, 금속, 유리, 세라믹, 폴리머, 또는 금속 산화물을 포함할 수도 있다. 미세유체 디바이스는 본원에 설명된 바와 같은 임의의 미세유체 디바이스일 수도 있고, 특징들의 임의의 조합을 가질 수도 있다. 비드는 항원 제시 합성 표면에 관한 섹션에서 논의된 바와 같이, 동일한 부피 및 직경의 구의 표면적의 10% 내인 표면적을 갖는 비드일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 비드는 항원 제시 표면에 관해 논의된 바와 같이, 동일한 부피 및 직경의 구의 표면적의 10% 를 초과하는 표면적을 갖는 비드일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 비드는 항원 제시 표면에 관해 논의된 바와 같이, 동일한 부피 및 직경의 구의 표면적의 10% 를 초과하는 표면적을 갖는 비드가 아니다.

[0099] 1차 활성화 분자 및 공 활성화 분자는 각각 여기에 기술된 임의의 그러한 분자일 수도 있으며, 그들의 임의의 조합이 사용될 수도 있다. 따라서, 1차 활성화 분자는 MHC 분자 및, 선택적으로 항원 펩티드를 포함할 수 있고; 공 활성화 분자는 여기에 기술된 임의의 TCR 공 활성화 분자 또는 여기에 기술된 임의의 보조 TCR 활성화 분자를 포함할 수 있다.

[0100] 일부 실시형태들에서, 결합 모이어티를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티들과 복수의 1차 활성화 분자들을 반응시키는 것은 1차 활성화 분자와 결합 모이어티 사이의 비공유결합 연관을 형성하는 것을 포함한다. 예를 들어, 1차 활성화 분자는 비오틴을 포함할 수 있고 결합 모이어티는 (예를 들어, 표면에 공유결합될 수도 있거나 그 자신이 표면에 공유결합되는 제 2 비오틴에 비공유 결합될 수도 있는) 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제는 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결된다. 예를 들어, 비오틴 결합제는 기술된 바와 같이 선택된 길이를 갖는 일련의 하나 이상의 연결기를 통해 표면에 연결될 수 있다. 다른 예에서, 결합 모이어티 및 1차 활성화 분자 양자 모두는 비오틴을 포함할 수 있고, 스트렙타비딘과 같은 자유, 다가 비오틴 결합제는 비공유 연결체로서 사용될 수 있다. 여기에 다른 곳에 기술된 것들과 같은 임의의 다른 적절한 비공유 결합 쌍이 또한 사용될 수 있다.

[0101] 대안적으로, 복수의 1 차 활성화 분자를 결합 모이어티를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 것은 공유결합을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, (여기의 다른 곳

에 기술된 것들 중 임의의 것과 같은) 아지드-알킨 반응은 공유 결합을 형성하는데 사용될 수 있으며, 여기서 1차 활성화 분자 및 결합 모이어티는 각각 아지드 및 알킨, 또는 알킨 및 아지드를 포함한다. 본 기술에서 알려진 바와 같이, 말레이미드 및 설폰아미드를 포함하지만 이들에 제한되지 않는 다른 반응 쌍이 사용될 수도 있다. 더욱 일반적으로, 공유 결합을 형성하는데 유용한 예시적인 작용기들은 아지드, 카르복시산 및 그의 활성화 에스테르, 숙신이미드 에스테르, 말레이미드, 케토, 술폰일 할라이드, 술폰산, 디벤조시클로옥틴, 알킨 등을 포함한다. 당업자는 그러한 모이어티를 사용하여 공유 결합을 형성하기 위한 적절한 조합 및 반응 조건에 익숙하다.

[0102] 공유결합으로 관능화된 합성 표면이 공유적으로 연관된 비오틴을 포함하는 경우, 표면은 비공유적으로 연관된 비오틴 결합제 (예를 들어, 스트렙타비딘) 를 더 포함할 수 있어, 표면이 비오틴 모이어티를 포함하는 공 활성화 분자 및 1 차 활성화 분자와 반응될 수 있도록 한다. 일부 실시형태들에서, 항원 제시 합성 표면의 제조 방법은 공유적으로 연관된 비오틴을 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 비오틴 결합제 (예를 들어, 스트렙타비딘) 와, 및 그 후 1차 활성화 분자 및 비오틴 모이어티를 포함하는 공 활성화 분자와 반응시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 공유결합으로 관능화된 표면의 비오틴은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결된다.

[0103] 일부 실시형태들에서, 반응은 표면상의 1 차 활성화 분자 리간드의 여기에 기술된 밀도들 중 임의의 것, 예를 들어, 제곱 마이크로당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 , 4×10^2 내지 약 2×10^3 , 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 , 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 , 또는 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 분자를 제공한다.

[0104] 일부 실시형태들에서, 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자들을, 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 것은 공 활성화 분자 및 결합 모이어티 사이의 비공유 연관을 형성하는 것을 포함한다. 스트렙타비딘과 같은 비오틴 결합제 및 비오틴과 같은 비공유 결합 쌍을 수반하는 1차 활성화 분자에 대해 여기에 개시된 임의의 실시형태들에서 진술되거나 상술된 실시형태들의 임의의 것이 사용될 수 도 있다.

[0105] 대안적으로, 복수의 공 활성화 분자를 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 것은 공유결합을 형성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, (여기의 다른 곳에 기술된 것들 중 임의의 것과 같은) 아지드-알킨 반응은 공유 결합을 형성하는데 사용될 수 있으며, 여기서 1차 활성화 분자 및 결합 모이어티는 각각 아지드 및 알킨, 또는 알킨 및 아지드를 포함한다.

[0106] 일부 실시형태들에서, 반응은 표면상의 공 활성화 분자 리간드의 여기에 기술된 밀도들 중 임의의 것, 예를 들어, 제곱 마이크로당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 , 4×10^2 내지 약 2×10^3 , 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 , 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 , 또는 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 분자를 제공한다.

[0107] 일부 실시형태들에서, 반응은 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 표면에 여기에 기술된 임의의 비율, 예를 들어 100:1 내지 1:100, 10:1 내지 1:20, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3 으로 제공하며, 여기서 상기 값 각각은 "약"에 의해 수정 될 수 있다.

[0108] 일부 실시형태들에서, 상술된 또는 여기에 개시된 임의의 실시형태들에 진술된 반응들은 1차 활성화 분자 리간드 및 공 활성화 분자 리간드를 표면에 여기에 기술된 임의의 비율, 예를 들어 약 1:1 내지 약 2:1; 약 1:1 또는 약 3:1 내지 약 1:3 으로 제공한다.

[0109] 일부 실시형태들에서, 항원 제시 표면을 제조하는 방법은 복수의 표면 차단 분자를 공유결합으로 관능화된 표면의 제 3 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계를 포함하고, 여기서 제 3 복수의 결합 모이어티들의 결합 모이어티들 각각은 표면 차단 분자에 결합하도록 구성된다. 여기의 다른 곳에 기술된 임의의 표면 차단 분자가 사용될 수도 있다. 비공유 연관 또는 공유 결합을 형성하기 위한 여기에 기술된 반응 접근법들 중 임의의 것이 사용될 수도 있다.

[0110] 일부 실시형태들에서, 항원 제시 표면을 제조하는 방법은 복수의 접착 자극 분자 리간드를, 공유결합으로 관능화된 비드의 제 4 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계를 더 포함하며, 여기서 각각의 접착 자극 분자 리간드는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함하고, 제 4 복수의 결합 모이어티의 결합 모이어티들 각각은 세포 접착 수용체 리간드 분자와 결합을 위해 구성된다. 비공유 연관 또는 공유 결합을 형성하기 위한 여기에 기술된 반응 접근법들 중 임의의 것이 사용될 수도 있다.

- [0111] 일부 실시형태들에서, 항원 제시 표면을 제조하는 방법은 중간 반응성 표면을 생성하는 단계를 더 포함한다. 이것은 예를 들어 합성 반응성 표면의 표면에 배치된 표면 노출 모이어티의 적어도 제 1 부분을 반응성 모이어티를 포함하는 복수의 중간 제조 분자와 반응시켜, 중간 반응성 표면을 생성하는 것을 포함할 수 있다. 중간 반응성 표면으로서 사용될 수 있는 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세하게 설명된다. 중간 반응성 표면을 생성하는 것은 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법에 대해 여기서 기술된 특징들 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0112] 일부 실시형태들에서, 그 방법은 예를 들어 적절하게 성장 및 증식시키기 위해 부착의 기계적 응력을 요구하는 세포들에 대해 고정 포인트들을 제공함으로써 세포들이 미세유체 디바이스 내의 표면들에 부착되는 능력을 조절하는 단계를 더 포함한다. 이것은 부착 세포들을 고정하는 것을 돕기 위한 표면 접촉 모이어티들을 포함하는 공유 결합된 표면 개질을 도입함으로써 달성될 수 있다. 여기의 다른 곳에 기술된 임의의 표면 접촉 모이어티가 사용될 수 있다.
- [0113] 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 여기에 기술된 반응들 중 임의의 것에서 사용을 위해 적합한 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0114] **공유 결합으로 관능화된 표면의 제조 방법**
- [0115] 복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은: 복수의 연결 시약들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계로서, 각각의 연결 시약은 스트렙타비딘 또는 비오틴을 포함하는, 상기 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계; 및 복수의 표면 차단 분자들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 2 서브 세트를 반응시켜, 적어도 하나의 복수의 스트렙타비딘 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제공하는 단계를 포함한다. 일반적으로 스트렙타비딘을 포함하는 연결 시약 또는 비오틴을 포함하는 연결 시약 중 단지 하나 또는 다른 것이 사용된다. 중간 반응성 합성 표면은 여기에 기술된 임의의 표면 타입, 예를 들어, 비드, 웨이퍼, 미세유체 디바이스의 내부 표면, 또는 튜브 (예를 들어, 유리 또는 폴리머 튜브) 일 수도 있다. 표면 재료는 예를 들어, 금속, 유리, 세라믹, 폴리머, 또는 금속 산화물을 포함할 수도 있다. 항원 제시 미세유체 디바이스는 본원에서 설명된 임의의 미세유체 디바이스일 수도 있고, 특징들의 임의의 조합을 가질 수도 있다. 비드는 항원 제시 합성 표면에 관한 섹션에서 논의된 바와 같이, 동일한 부피 및 직경의 구의 표면적의 10% 내인 표면적을 갖는 비드일 수 있다.
- [0116] 연결 시약들이 비오틴을 포함하는 실시형태들에서, 방법은 스트렙타비딘을 비오틴과 비공유적으로 연관시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 그러한 실시형태들에서, 도 5a 를 참조하면, 반응성 모이어티 RM 의 결합 모이어티 BM 으로의 변환은 RM 과의 반응을 통해 (상기의 설명에서 추가적인 비오틴에 대응하는) 비오틴을 공유적으로 부착시키는 것 및 그 후 공유적으로 부착된 비오틴과 비공유적으로 스트렙타비딘을 연관시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0117] 일부 실시형태에서, 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티는 일련의 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 또는, 일부 실시형태들에서, 더 큰 수의 결합들을 통해 표면에 연결된다. 예를 들어, 반응성 모이어티는 예를 들어 (11-(X)운데실)트리메톡시 실란을 사용하여 일련의 15 개의 결합들을 통해 연결될 수 있다. 비오틴을 포함하는 연결 시약에 대해, 비오틴은 그 후 일반 구조 DBCO-PEG4-비오틴 (브로드팜으로부터 상업적으로 이용가능함) 을 갖는 것과 같은 연결 시약을 사용하여 공유적으로 연관될 수 있다. 일부 실시형태에서, 비오틴은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결된다. 스트렙타비딘을 포함하는 연결 시약에 대해, 스트렙타비딘은 그 후 숙신이미드와 스트렙타비딘의 반응이 후속되는, 일반 구조 DBCO-PEG₁₃-숙신이미드를 갖는 것과 같은 연결 시약을 사용하여 공유적으로 연관될 수 있다. 일부 실시형태에서, 스트렙타비딘은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결된다. 모이어티가 표면에 연결되는 결합들의 수는 예를 들어 상술된 것들과 유사하지만 상이한 길이들의 알킬렌 및/또는 PEG 사슬들을 갖는 시약을 사용하여 변경될 수 있다.
- [0118] 일부 실시형태에서, 중간 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역의 반응성 모이어티는 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 공유 결합은 여기의 다른 곳에 기재된 임의의 아지드-알킨 반응과 같은 아지드-알킨 반응을 통해 형성된다.

- [0119] 일부 실시형태에서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 복수의 스트랩타비딘 작용기들이 배치되는 제 2 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드는 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 영역에 배치된다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 방법은 중간 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역에서 반응성 모이어티의 제 2 서브세트와 제 2 복수의 표면 차단 분자를 반응시키는 단계를 더 포함한다.
- [0121] 일부 실시형태에서, 복수의 스트랩타비딘 작용기들의 반응 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자의 반응은 반응성 모이어티를 포함하는 공유적으로 제조된 합성 표면의 적어도 제 1 영역의 복수의 서브 영역에서 수행된다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 반응성 합성 표면의 제 2 부분은 복수의 1 차 활성화 및 공 활성화 분자와 실질적으로 반응하지 않도록 구성된 표면 노출 모이어티를 포함한다.
- [0123] 일부 실시형태에서, 방법은 아지드 반응성 모이어티를 포함하는 적어도 제 1 표면 제조 시약을 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역에 배치된 표면 노출 모이어티와 반응시키는 것을 포함하는, 중간 반응성 합성 표면을 제조하는 단계를 더 포함한다.
- [0124] 일부 실시형태에서, 표면 노출 모이어티는 친핵성 모이어티이다. 일부 실시형태들에서, 표면의 친핵성 모이어티는 수산화물, 아미노 또는 티올이다. 일부 다른 실시형태들에서, 표면의 친핵성 모이어티는 수산화물일 수도 있다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 표면 노출 모이어티는 치환가능 모이어티이다.
- [0126] 2 개의 개질 시약들이 사용되는 일부 실시형태들에서, 표면과 제 1 개질 시약의 반응 및 제 2 개질 시약의 반응은 표면 위의 랜덤한 로케이션들에서 발생할 수도 있다. 다른 실시형태들에서, 제 1 개질 시약의 반응은 표면의 제 1 영역 내에서 발생할 수도 있고 제 2 개질 시약의 반응은 제 1 영역에 인접하는 표면의 제 2 영역 내에서 발생할 수도 있다. 예를 들어, 미세유체 디바이스의 채널 내의 표면들은 제 1 표면 개질로 선택적으로 개질될 수도 있고, 채널 내에서 표면들과 인접하는 격리 펜 내의 표면들은 제 2 의, 상이한 표면 개질로 선택적으로 개질될 수도 있다.
- [0127] 또 다른 실시형태들에서, 제 1 개질 시약의 반응은 적어도 하나의 표면 상에서 서로 분리된 복수의 제 1 영역들 내에서 발생할 수도 있고, 제 2 개질 시약의 반응은 서로 분리된 복수의 제 1 영역들을 둘러싸는 제 2 영역에서 발생할 수도 있다.
- [0128] 다양한 실시형태들에서, 제 1 표면 개질 및 제 2 표면 개질의 조합을 도입하기 위한 미세유체 디바이스의 하나 이상의 표면들의 개질은, 미세유체 디바이스가 어셈블링된 후에 수행될 수도 있다. 하나의 비제한적 예에 대해, 제 1 및 제 2 표면 개질은 미세유체 디바이스의 어셈블리 후에 화학적 기상 증착에 의해 도입될 수도 있다. 다른 비제한적 예에서, 제 1 반응성 모이어티를 갖는 제 1 표면 개질 및 제 2 의, 직교 반응성 모이어티를 갖는 제 2 표면 개질을 갖는 관능화된 표면이 도입될 수도 있다. 2 개의 상이한 표면 접촉 모이어티를 갖는 2 개의 상이한 표면 개질 리간드로의 차동 변환이 후속할 수 있다.
- [0129] 일부 실시형태들에서, 제 1 및 제 2 표면 개질의 조합의 적어도 하나는 미세유체 디바이스의 어셈블리 전에 수행될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 적어도 하나의 표면을 개질하는 것은 미세유체 디바이스의 어셈블리 후에 수행될 수도 있다.
- [0130] 일부 실시형태들에서, 공유결합으로 관능화된 표면은 결합제를 포함하여 제조된다. 일부 실시형태들에서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면상의 복수의 결합제 (예를 들어, 공유결합된 비오틴과 공유적으로 연관되거나 비공유적으로 연관될 수도 있는, 4가 결합제와 같은 복수의 다가 결합제, 예를 들어, 스트랩타비딘 작용기들)의 분포는 그것이 부착되는 각 영역에서 제곱 마이크론당 약 6×10^2 내지 약 5×10^3 분자이다. 일부 실시형태들에서, 복수의 결합제 (예를 들어, 3가 결합제와 같은 복수의 다가 결합제)의 분포는 그것이 부착되는 각 영역에서 제곱 마이크론당 약 1.5×10^3 내지 약 1×10^4 , 약 1.5×10^3 내지 약 7.5×10^3 , 또는 약 3×10^3 내지 약 7.5×10^3 분자들이다. 일부 실시형태들에서, 복수의 결합제 (예를 들어, 2가 결합제와 같은 복수의 다가 결합제)의 분포는 그것이 부착되는 각 영역에서 제곱 마이크론당 약 2.5×10^3 내지 약 1.5×10^4 , 약 2.5×10^3 내지 약 1×10^4 , 또는 약 5×10^3 내지 약 1×10^4 분자들이다. 일부 실시형태들에서, 복수의 결합제 (예를 들어, 복수의 1가 결합제)의 분포는 그것이 부착되는 각 영역에서 제곱 마이크론당 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 , 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 ,

또는 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 분자들이다.

- [0131] 일부 실시형태들에서, 공유결합으로 관능화된 표면은 결합제를 포함하여 제조되며, 여기서 복수의 결합제 (예를 들어, 공유결합된 비오틴과 공유적으로 연관되거나 비공유적으로 연관될 수도 있는 스트렙타비딘 작용기들) 의 분포는 그것이 부착되는 각 영역에서 제곱 마이크론당 약 1×10^4 내지 약 1×10^6 분자이다.
- [0132] 일부 실시형태들에서, 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 단계 및 그 후 항원 제시 합성 표면을 제조하는 단계를 포함하는 결합된 방법이 제공된다. 이와 같이, 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하기 위한 단계들 및 항원 제시 합성 표면을 제조하기 위한 단계들의 임의의 적합한 조합이 사용될 수도 있다.
- [0133] **표면 제조 및 공유결합으로 관능화된 표면의 추가의 양태들.**
- [0134] 항원 제시 합성 표면을 제조하는 방법 및 공유결합으로 관능화된 표면을 제조하는 방법을 포함하는 여기에 기술된 표면을 제조하는 임의의 방법은 다음의 양태들 중 하나 이상을 더 포함할 수도 있다. 공유결합으로 관능화된 표면은 반응기와 같은, 그러한 표면에 적용가능한 다음의 양태들 중 하나 이상을 더 포함할 수도 있다.
- [0135] **아지드-알킨 반응.** 일부 실시형태들에서, 공유 결합은 비고리형 알킨과 같은 알킨을 아지드와 반응시킴으로써 형성된다. 예를 들어, "클릭" 고리화 반응이 수행될 수도 있으며, 그것은 구리 (I) 염에 의해 촉진된다. 구리 (I) 염이 반응을 촉진시키는데 사용되는 경우, 반응 혼합물은 선택적으로, 반응의 속도 또는 범위를 강화시킬 수 있는 다른 시약들을 포함할 수도 있다. 표면 개질 기약 또는 관능화된 표면의 알킨이 시클로옥타인 경우, 대응하는 관능화된 표면 또는 표면 개질 시약의 아지드와의 "클릭" 고리화 반응은 구리가 없을 수도 있다. "클릭" 고리화 반응은 이에 의해, 표면 개질 리간드를 관능화된 표면에 커플링하여 공유 결합으로 개질된 표면을 형성하는데 사용될 수 있다.
- [0136] 구리 촉매제들. 임의의 적합한 구리(I) 촉매제가 사용될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 요오드화 구리(I), 염화 구리(I), 브롬화 구리(I) 또는 다른 구리(I) 염. 다른 실시형태들에서, 구리(II) 염은 인 시추 (in situ) 로 구리(I) 종들을 생성하기 위해 아스코르베이트와 같은 환원제와 결합하여 사용될 수도 있다. 황산구리 또는 아세트산 구리는 적합한 구리(II) 염의 비-제한적 예들이다. 다른 실시형태들에서, 아스코르베이트와 같은 환원제가 구리(I) 염과 결합하여 존재하여 반응의 과정 동안 충분한 구리(I) 종들을 보장할 수도 있다. 구리 금속은 또한, Cu(II) 종들을 생성하는 산화 환원 반응에서 Cu(I) 종들을 제공하는데 사용될 수도 있다. 구리의 배위 착물들, 예컨대 $[\text{CuBr}(\text{PPh}_3)_3]$, 구리, $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ 또는 $(\text{EtO})_3\text{P CuI}$ 의 규팅스텐산 착물들이 사용될 수도 있다. 또 다른 실시형태들에서, 실리카 지지된 구리 촉매제, 구리 나노클러스터들 또는 구리/산화제일구리 나노 입자들이 촉매제로서 이용될 수도 있다.
- [0137] **다른 반응 강화제들.** 전술된 바와 같이, 아스코르브산나트륨과 같은 환원제들은, 산소가 반응으로부터 엄격하게 배제되지 않더라도 구리(I) 종들이 반응 전반에 걸쳐 유지되는 것을 허용하도록 사용될 수도 있다. 구리(I) 종들을 안정화시키기 위해 다른 보조 리간드들이 반응 혼합물에 포함될 수도 있다. 트리스(벤질-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)메틸아민 (TBTA) 또는 3[트리스(3-하이드록시프로필트리아졸릴메틸)아민 (THPTA) 을 포함하지만 이에 제한되지 않는 트리아졸릴 함유 리간드들이 사용될 수 있다. 반응을 용이하게 하는데 사용될 수 있는 보조 리간드의 다른 부류는 술폰화된 바소페난트롤린이며, 이것은 또한 수용성이며, 산소가 배제될 수 있는 경우 사용될 수 있다. 당해 분야에 알려진 바와 같은 다른 화학적 커플링들이 관능화된 표면에 표면 개질 시약을 커플링하는데 사용될 수도 있다.
- [0138] **표면을 세정하는 단계.** 개질된 표면은, 표면 상의 친핵성 모이어티들이 반응을 위해 자유롭게 이용가능한 것, 예를 들어 오일들 또는 접착제들에 의해 커버되지 않는 것을 보장하도록 개질 전에 세정될 수도 있다. 세정은 알콜들 또는 아세톤을 포함하는 용매들로의 처리, 초음파 처리, 증기 세정 등을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 달성될 수도 있다. 대안으로, 또는 추가하여, 이러한 사전-세정은 다양한 불순물들을 제거할 수 있는 산소 플라즈마 세정기에서 (예를 들어, 미세유체 디바이스의 컴포넌트들의 콘텍스트에서 커버, 미세유체 회로 물질, 및/또는 기관의) 세정하면서, 동시에 산화된 표면 (예를 들어, 본원에 설명된 바와 같이 공유 결합으로 개질될 수도 있는, 표면에서의 산화물들) 을 도입하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 하이드로클로릭 애시드와 하이드로전 페록사이드의 혼합물 또는 설푸릭 애시드와 하이드로전 페록사이드의 혼합물 (예를 들어, 약 3:1 내지 약 7:1 의 설푸릭 애시드 대 하이드로전 페록사이드의 비를 가질 수도 있는 피라나 용액) 과 같은 액상 처리들은 산소 플라즈마 클리너 대신에 사용될 수도 있다. 이것은 유리하게 표면 상에 개질을 위한 더 많은 사이트들을 제공할 수 있고, 이에 의해 더 밀접하게 패킹된 개질된 표면 층을 제공한다.

- [0139] **미세유체 디바이스의 컴포넌트들.** 미세유체 디바이스의 컴포넌트로서 사용될 수도 있는 물질의 표면은 그것의 어셈블리 전에 개질될 수도 있다. 대안으로, 부분적으로 또는 완전히 구축된 미세유체 디바이스는, 생체분자들을 포함하는 생체물질들 및/또는 미세 객체들 (생물학적 미세 객체들을 포함할 수도 있음) 과 접촉할 모든 표면들이 동시에 개질되도록 개질될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 디바이스 및/또는 장치의 전체 내부는, 디바이스 및/또는 장치 내의 상이한 표면들에서 구별되는 물질들이 존재하더라도 개질될 수도 있다. 이러한 논의는 또한 여기에 기술된 항원 제시 합성 표면을 제조하는 방법에 적용된다.
- [0140] 미세유체 디바이스의 내부 표면이 표면 개질 시약과 반응한 경우, 반응은 미세유체 디바이스 안으로 그리고 이를 통해 표면 개질 시약의 용액을 유동시킴으로써 수행될 수도 있다.
- [0141] **표면 개질 시약 용액 및 반응 조건** 여러 실시형태들에서, 표면 개질 시약은 액상 표면 개질 반응에서 사용될 수도 있으며, 예를 들어, 여기서 표면 개질 시약은 수용액과 같은 용액에서 제공된다. 다른 유용한 용매들은 수성 디메틸 술폭시드 (DMSO), DMF, 아세토니트릴, 또는 알콜이 사용될 수도 있다. 반응은 실온 또는 상승된 온도들에서 수행될 수도 있다. 예를 들어, 토실기로 활성화되거나 에폭시기로 라벨링된 표면은 액상 반응에서 개질될 수 있다. 결합 모이어티에 항체, MHC, 또는 스트렙타비딘과 같은 비오틴 또는 단백질을 커플링하는 반응은 또한 액상 반응으로서 수행될 수 있다.
- [0142] 반응은 실온에서 또는 상승된 온도에서 수행될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 반응은 약 15 °C, 내지 약 60 °C; 약 15 °C 내지 55 °C; 약 15 °C 내지 50 °C; 약 20 °C 내지 약 45 °C 의 범위의 온도에서 수행된다.
- [0143] 일부 실시형태들에서, 미세유체 디바이스의 관화된 표면을 공유 결합으로 개질된 표면으로 변환하기 위한 반응은 약 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 또는 약 60 °C 의 온도에서 수행된다.
- [0144] 대안적으로, 표면 개질 시약은 기상 표면 개질 반응에서 사용될 수도 있다. 예를 들어, 실리카 표면 및 히드록시기를 포함하는 다른 표면들은 기상 반응에서 개질될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 표면 (예를 들어, 실리콘 표면) 은 (예를 들어 산소 플라스마 세정기를 사용하여; 예시의 처리 조건에 대한 예를 참조) 플라스마로 처리된다. 일부 실시형태들에서, 플라스마 처리된 및/또는 실리콘 표면과 같은 표면은 예를 들어 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란과 같은 메톡시실란 및 아지드를 포함하는, 제조 시약과 진공 하에서 반응된다. 제조 시약은 표면으로부터 분리된 용기에 액체 형태로 초기에 제공될 수 있고 그것이 표면과의 반응을 위해 이용가능하게 하기 위해 기화될 수 있다. 염수화물, 예를 들어 마그네슘 설페이트 헵타하이드레이트와 같은 수원이 또한 예를 들어 다른 분리된 용기에 제공될 수 있다. 예를 들어, 진공 반응기의 저부의 호일 보트(들) 이 분리된 용기(들) 로서 사용될 수 있다. 예시적인 반응 조건 및 절차는 진공 펌프를 사용하여 약 750 mTorr 까지 챔버를 펌핑하고 그 후 챔버를 밀봉하는 것을 포함한다. 진공 반응기는 그 후 예를 들어 그것을 110° C 에서 24 내지 48 시간 동안 가열된 오븐 내에 배치함으로써 적절한 길의 시간 동안 주위 보다 높은 온도에서 배양될 수 있다. 반응 주기에 후속하여, 챔버는 냉각되는 것이 허용될 수 있고, 아르곤과 같은 비활성 기체가 배기된 챔버에 도입될 수 있다. 표면은 아세톤 및/또는 이소프로판올과 같은 하나 이상의 적절한 액체로 린싱되고, 그 후 질소와 같은 비활성 기체의 스트림 하에서 건조될 수 있다. 개질된 표면의 도입의 확인은 편광 해석법 및 접촉각 각도측정법과 같은 기법을 사용하여 획득될 수 있다.
- [0145] 본 개시에 따라 채용될 수 있는 추가의 개질된 표면, 표면 개질 시약, 및 관련된 방법은 모든 목적을 위해 참조로 여기에 포함되는 2017년 11월 30일자로 공개된 W02017/205830 에 기술되어 있다.
- [0146] **T 림프구를 활성화하는 방법**
- [0147] T 림프구를 활성화시키는 방법이 제공되며, 그 방법은 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 각각 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하는 항원 제시 합성 표면과 복수의 T 림프구들을 접촉시키는 단계; 및 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 복수의 T 림프구들을 배양하여, 복수의 T 림프구들의 적어도 일부를 활성화된 T 림프구들로 변환시키는 단계를 포함한다. 항원 제시 표면은 본원에 설명된 바와 같은 임의의 항원 제시 표면일 수도 있다. 일부 실시형태들에서, MHC 분자는 MHC 클래스 1 분자이다. 여기에 기술된 임의의 항원 제시 합성 표면이 사용될 수 있다. 여러 실시형태들에서, 복수의 MHC 분자들은 각각 아미노산 서열을 포함할 수도 있고, 또한 아미노산 서열의 C-말단 연결을 통해 항원 제시 합성 표면에 연결될 수도 있다. 대안적으로, MHC 분자는 비공유 연관을 통해 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 임의의 비공유 연관, 예를 들어 MHC 의 비오틴화 및 표면상의 스트렙타비딘에 대한 그의 결합이 사용될

수 있다. 여러 실시형태들에서, MHC 분자는 종양 연관 항원, 예를 들어 여기에 기술된 종양 연관 항원 중 임의의 것과 같은 항원 분자를 더 포함할 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 항원 분자는 MART1, NYESO1, SLC45A2, TCL1, 또는 VCX3A 일 수도 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 공 활성화 분자는 여기에 기술된 바와 같이 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 복수의 공 활성화 분자의 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자는 여기에 기술된 바와 같은 임의의 TCR 공 활성화 분자 또는 임의의 보조 TCR 활성화 분자일 수도 있고 여기에 기술된 임의의 비율로 제공될 수도 있다.

[0149] 여러 실시형태들에서, 방법은 복수의 T 림프구를 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태들에서, 성장 자극 분자 리간드들 각각은 성장 인자 수용체 리간드를 포함할 수도 있다. 여러 실시형태들에서, 복수의 T 림프구를 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계는 적어도 하루의 배양의 제 1 주기 후에 수행될 수도 있다. 여러 실시형태들에서, 복수의 성장 자극 분자 리간드는 IL-21 또는 그의 단편을 포함할 수도 있다. 여러 실시형태에서, 복수의 성장 자극 분자 리간드는 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다. 여러 실시형태들에서, 복수의 성장 자극 분자 리간드는 MHC 분자를 포함하는 생체분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 상이한 표면인 (예를 들어, 비드의) 표면에 연결될 수도 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 성장 자극 분자 리간드는 MHC 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면에 연결될 수 있다.

[0150] 여러 실시형태들에서, 방법은 비드 상에 항원 제시 표면을 사용하는 단계를 포함할 수도 있다. 항원 제시 표면을 갖는 비드가 사용되는 경우, T 림프구에 대한 비드의 비는 약 1:1; 약 3:1; 약 5:1; 약 7:1 또는 약 10:1 일 수도 있다. 비드는 여기에 기술된 임의의 방법에서 항원 제시 MHC 분자 및 그것에 부착된 항-CD28 항체를 가질 수도 있다. 일부 실시형태에서, IL-21 은 또한 비드의 항원 제시 표면에 부착될 수도 있다. 다른 실시형태들에서, IL-21 은 활성화에 기여하는 유일한 생체분자로서 IL-21 을 갖는 제 2 비드에 부착될 수도 있다.

[0151] 다른 실시형태들에서, 방법은 패턴화되거나 패턴화되지 않을 수도 있는 평면 표면을 사용하여 수행될 수도 있다.

[0152] 여러 실시형태들에서, 배양의 제 1 주기는 4, 5, 6, 7, 또는 8 일 동안 수행될 수도 있다. 배양의 제 1 주기 동안, IL-21, IL-2, 및/또는 IL-7 과 같은 성장 자극 분자는 T 림프구를 공급하기 위해 용액중에 첨가되거나 비드 상에 첨가될 수도 있다.

[0153] 배양의 제 1 주기의 종단에서, 세포의 집단은 비활성화된 및 활성화된 T 림프구의 혼합물을 포함할 수도 있다. 다중 세포 표면 마커를 사용하는 유세포분석은 활성화의 정도 및 분석된 세포의 표현형을 결정하기 위해 수행될 수 있다.

[0154] 배양의 제 2 주기가 수행될 수 있다. 항원 제시 표면이 비드인 경우, 종양 연관 항원 및 공 활성화 분자 (예를 들어, 각각 항-CD28 항체 및/또는 항-CD2 항체와 같은 TCR 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자) 를 포함하는 MHC 분자를 포함하는 1차 활성화 분자 리간드를 함유하는 비드들의 제 2 부분표본이 예를 들어 여기에 기술된 웰플레이트, 유체 회로 함유 디바이스의 챔버, 또는 격리펜을 갖는 미세유체 디바이스에 첨가함으로써 T 림프구에 제공될 수도 있다. 항원 제시 비드는 그것에 연결된 추가의 성장 자극 분자, 예를 들어 IL-21 을 더 포함할 수 있다. 항원 제시 비드는 배양되는 세포에 세포에 대해 약 1:1; 약 3:1, 약 5:1; 또는 약 10:1 비율로 첨가된다. 일부 실시형태에서, IL-21 의 제 2 부분표본은 그것에 연결된 IL-21 을 갖는 비드들의 제 2 세트로서 첨가될 수도 있거나, 또한 용액으로서 첨가될 수도 있다. IL-2 및 IL-7 은 또한 추가의 수의 T 림프구를 활성화하기 위해 배양의 제 2 주기 동안 첨가될 수도 있다.

[0155] 패턴화 되거나 비패턴화된 웨이퍼, 유체 회로 함유 디바이스의 내부 표면, 튜브의 내부 표면, 또는 격리펜을 갖는 미세유체 디바이스의 내부 표면이 사용되는 경우, 배양의 제 2 주기는 동일한 항원 제시 표면과 접촉하여 배양을 계속함으로써 달성될 수도 있다. 대안적으로, 새로운 항원 제시 표면은 배양의 제 1 주기로부터 야기된 T 림프구와 접촉될 수도 있다. 다른 실시형태에서, 상기 설명되거나 본원에 개시된 임의의 실시형태에서 제시된 바와 같은 항원 제시 비드는 유체 회로 함유 장치의 웰 또는 내부 챔버 또는 미세유체 디바이스의 격리 펜에 첨가될 수 있다. IL-21, IL-2, IL-7 또는 이들의 조합과 같은 성장 자극 분자는 용액 또는 비드에 첨가될 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-2 및 IL-7 가 첨가된다.

[0156] 제 2 배양 기간이 끝나면, 유세포 분석을 수행하여 활성화 정도를 결정하고 그 시점에 존재하는 추가로 활성화된 T 림프구의 표현형을 결정할 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, 제 3 배양 기간이 포함될 수 있다. 제 3 기간은 제 2 기간과 관련하여 본 명세서에 기술된

임의의 특징을 가질 수 있다. 일부 실시 예에서, 제 3 기간은 제 2 기간과 동일한 방식으로 수행된다. 예를 들어, 배양 제 2 기간에 사용된 모든 작용은 웰 플레이트의 웰, 튜브, 또는 유체 회로 함유 장치 또는 격리펜을 갖는 미세유체 디바이스의 챔버에서 T 림프구를 추가로 활성화시키기 위해 반복 될 수 있다.

[0158] 일부 실시형태에서, 활성화되는 T 림프구는 나이브 CD8+ T 림프구와 같은 CD8+ T 림프구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화되는 T 림프구는 나이브 CD8+ T 림프구와 같은 CD8+ T 림프구에 대해 풍부화된다. 대안적으로, 일부 실시형태에서, 활성화되는 T 림프구는 나이브 CD4+ T 림프구와 같은 CD4+ T 림프구를 포함한다. 일부 실시형태에서, 활성화되는 T 림프구는 나이브 CD4+ T 림프구와 같은 CD4+ T 림프구에 대해 풍부화된다. 예를 들어, 클래스 II-제한 항원에 특이적인 T 세포가 요구되는 경우, CD4+ T 림프구가 사용될 수 있다.

[0159] 일부 실시형태에서, 방법은 CD45RO + 인 활성화된 T 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 방법은 CD28 + 인 활성화된 T 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 방법은 CD28+ CD45RO+ 인 활성화된 T 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 방법은 CD197 + 인 활성화된 T 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 방법은 CD127 + 인 활성화된 T 림프구를 생성한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 CD28, CD45RO, CD127 및 CD197에 대해 양성인 활성화된 T 림프구, 또는 상기 마커 중 3 가지 이상의 임의의 조합, 또는 상기 마커 2 개 이상의 임의의 조합을 생성한다. 임의의 상기 표현형을 갖는 활성화된 T 림프구는 추가로 CD8+ 일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD28+ 인 임의의 상기 표현형은 CD28high 표현형을 포함한다.

[0160] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 항원-특이적 T 세포를 포함하는 T 세포 집단을 생성하는데, 이때 적어도 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % 또는 98 % 의 항원-특이적 T 세포는 CD45RO+/CD28High 세포이며, 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 실시형태에서, 방법은 T 세포의 집단을 생성하며, 여기서 적어도 1 %, 1.5 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % 또는 10 %의 T 세포가 항원-특이적 T 세포이고; 또는 1 %-2 %, 2 %-3 %, 3 %-4 %, 4 %-5 %, 5 %-6 %, 6 %-7 %, 7 %-8 %, 8 %-9 %, 9 %-10 %, 10 %-11 %, 또는 11 %-12 % 의 T 세포는 항원-특이적 T 세포이며, 상기 각각의 값은 "약"에 의해 변형 될 수 있다. T 세포의 집단의 함량은 항원 제시 표면과의 접촉에 후속하여 그리고 선택적으로 추가의 증식 단계, 즉 특정 표현형을 갖는 생성물 T 세포를 농축 또는 분리하기 전/농축 또는 분리 없이 그 방법의 "크루드" 생성물에서 결정될 수 있다. 항원 특이성 및/또는 T 세포 마커 표현형의 결정은 죽은 세포를 배제 할 수 있다.

[0161] 일부 실시형태에서, 방법은 항원-특이적인 T 세포의 분율이 출발 집단에 비해 증가된 T 세포의 집단을 제공한다.

[0162] 세포와 조성.

[0163] 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생성된 활성화된 T 림프구가 제공된다.

[0164] 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD45RO + 이다. 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD28 + 이다. 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD28+ CD45RO+ 이다. 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD197 + 이다. 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD127 + 이다. 일부 실시형태에서, 활성화된 T 림프구는 CD28, CD45RO, CD127 및 CD197, 적어도 상기 마커 중 3 가지의 임의의 조합, 또는 적어도 상기 마커 2 개의 임의의 조합에 대해 양성이다. 임의의 상기 표현형을 갖는 활성화된 T 림프구는 추가로 CD8 + 일 수 있다. 일부 실시형태에서, CD28 + 인 임의의 상기 표현형은 CD28high 표현형을 포함한다.

[0165] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 방법에 의해 생성된 활성화된 T 세포를 포함하는 T 세포의 집단이 제공된다. 집단은 T 세포 집단에 대해 상기 기술된 임의의 특징을 가질 수 있다.

[0166] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 T 세포 집단을 포함하는 미세유체 디바이스가 제공된다. 미세유체 디바이스는 본원에 기재된 (예를 들어, 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한) 임의의 항원 제시 미세유체 디바이스 또는 다른 미세유체 디바이스 일 수 있다.

[0167] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 T 세포 집단을 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 약학 조성물은 예를 들어 식염수, 포도당 및/또는 인간 혈청 알부민을 추가로 포함 할 수 있다. 조성물은 수성 조성물 일 수 있으며 냉동 또는 액체 형태로 제공 될 수 있다. 약학 조성물은 단일 용량으로, 예를 들어 주사기 내에 제공 될 수 있으며, 천만, 1 억, 10 억 또는 100 억 개의 세포를 포함 할 수 있다. 투여된 세포의 수는 적응증 특정, 환자 특이적 (예를 들어, 환자의 크기) 이며, 또한 투여된 세포의 순도 및 표현형에 따라 달라질 것이다.

[0168] 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법.

- [0169] 본 발명은 다음을 포함하는 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법을 제공한다 :
- [0170] 미세 유체 디바이스의 격리 펜에 하나 이상의 표적 세포를 로딩하는 단계; 하나 이상의 T 세포가 하나 이상의 표적 세포와 접촉할 수 있도록 격리 펜에 하나 이상의 T 세포를 로딩하는 단계; 표적 세포를 사멸 세포를 라벨링하는 검출 가능한 마커와 접촉시키는 단계; 및 표적 세포가 세포 사멸 되는지 여부를 검출하는 단계.
- [0171] 미세유체 디바이스는 여기에 기술된 임의의 디바이스일 수 있다. 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트에 포함된 미세유체 디바이스는 항원 제시 합성 표면을 포함 할 필요는 없다. 하나 이상의 T 세포는 이러한 세포를 생성 또는 활성화시키기 위해 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 생성 또는 활성화 될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 유형의 CD8+ T 세포가 사용될 수 있다. 특정 실시형태들에서, 하나 이상의 T 세포는 키메릭 항원 수용체 (CAR) 를 발현한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 T 세포는 CAR을 발현하지 않는다.
- [0172] 표적 세포는 본원에 기재된 임의의 종양 항원과 같은 종양 항원을 발현 할 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포는 표적 세포에 의해 발현된 항원에 특이적이다. 일부 실시형태에서, 표적 세포는 불멸 세포주 유래이고 및/또는 흑색 종, 유방암 또는 폐암과 같은 암으로부터 유래된다.
- [0173] 다른 실시형태들에서, 단일의 표적 세포 및/또는 단일 T 세포가 격리 펜 안으로 로딩된다. 일부 실시형태들에서, 복수의 표적 세포들 및/또는 복수의 T 세포들이 격리 펜 안으로 로딩된다. 일부 실시형태에서, 복수의 T 세포는 클론 집단이다. 다른 실시형태들에서, 단일의 T 세포 및 복수의 표적 세포가 격리 펜 안으로 로딩된다.
- [0174] 격리 펜 내로의 셀 로딩은 중력을 사용하여, 예를 들어, 세포가 펜 내로 중력으로 당겨 지도록 미세유체 디바이스를 기울임으로써 수행 될 수 있다. 대안 적으로, 유전 영동 (DEP) 구성을 갖는 미세유체 디바이스에서, DEP 힘이 셀을 로딩하는데 사용될 수 있다. 일부 실시형태들에서, DEP 힘은 구조화된 광에 의해 활성화된다.
- [0175] 사멸 세포를 표지하는 임의의 적합한 마커가 사용될 수 있다. 사멸 세포를 표지하는 마커는 살아있는 세포와 구별되는 죽은 세포를 표지하는 것들, 예를 들어, 살아있는 세포막을 통과하지 않지만 손상된 죽은 세포막을 교차하는 염료 및 라벨링을 위한 세포사멸-연관 단백질 또는 효소 활성화에 의존하는 라벨 (예 : 세포 사멸 연관 프로테아제) 을 포함한다. 일부 실시형태에서, 마커는 핵산 결합 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 마커는 카스파제, 예를 들어 카스파제-3과 같은 세포사멸-연관 프로테아제와 같은 프로테아제에 의한 클리비지에 의해 활성화되는 형광성 또는 절단성 마커이다. 일부 실시형태에서, 마커는 사멸 세포 및/또는 세포 사멸체에 특이적으로 결합하는 결합제 (예를 들어, 항체) 를 포함하고; 결합제는 형광단과 같은 검출 가능한 모이어티를 추가로 포함 할 수 있다.
- [0176] 상기 방법은 표적 세포가 1 회 또는 주기적으로, 예를 들어 2 회, 3 회 또는 그 이상으로 세포 사멸되었는지 여부를 검출하는 단계를 포함 할 수 있다. 상기 방법은 세포를 마커 및/또는 T 세포 (들)와 접촉시킨 후 2 시간 이상에 표적 세포가 세포 사멸되었는지 여부를 검출하는 것을 포함 할 수 있다.
- [0177] **항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트.**
- [0178] 또한 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 키트는 미세유체 디바이스를 포함한다. 미세유체 디바이스는 본 명세서에 기재된 임의의 미세유체 디바이스들일 수 있다. 일부 실시형태에서, 미세유체 디바이스는 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법에 관한 섹션에서 상술되고 또는 본원에 개시된 임의의 실시형태에 기재된 바와 같다. 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트에 포함된 미세유체 디바이스는 항원 제시 합성 표면을 포함 할 필요는 없다. 일부 실시형태에서, 사멸 세포를 검출하기 위한 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사멸 세포를 검출하기 위한 시약은 항원-특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법에 관한 섹션에서 상술되고 또는 본원에 개시된 사멸 세포를 표지하는 검출가능한 마커이다.
- [0179] **치료의 방법**
- [0180] 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공되고; 대상체로부터 T 림프구를 포함하는 샘플을 얻는 단계; 샘플에서의 다른 세포로부터 T 림프구를 분리하는 단계; 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 MHC 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 T 림프구를 접촉시키는 단계, 여기서 MHC 분자는 대상체의 암에 특이적인 항원을 포함 함; 대상체의 암에 대해 특이적으로 활성화된 복수의 T 림프구를 생성하는 단계; 복수의 특이적 활성화된 T 림프구를 비활성화된 T 림프구로부터 분리하는 단계; 및 복수의 특정 활성화된 T 림프구를 대상체 내로 도입하는 단계를 포함한다. 암 치료에 사용하기 위한 복수의 특이적 활성화된 T 림프구가 또한 본원에 제공되며, 상기 복수의 특이적 활성화된 T 림프구는: 대상체로부터 T 림프구를 포함하는 샘플을 얻는 단계; 샘플에서

다른 세포로부터 T 림프구를 분리하는 단계; 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 MHC 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 T 림프구를 접촉시키는 단계, 여기서 MHC 분자는 대상체의 암에 특이적인 항원을 포함 함; 대상체의 암에 대해 특이적으로 활성화된 복수의 T 림프구를 생성하는 단계; 및 복수의 특이적 활성화된 T 림프구를 비활성화된 T 림프구로부터 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.. 또한, 암을 치료하기위한 의약의 제조를위한 복수의 특이적 활성화된 T 림프구의 용도가 제공되며, 여기서 복수의 특이적 활성화된 T 림프구는 피험자로부터 T 림프구를 포함하는 샘플을 얻는 단계; 샘플에서 다른 세포로부터 T 림프구를 분리하는 단계; 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 MHC 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 T 림프구를 접촉시키는 단계, 여기서 MHC 분자는 대상체의 암에 특이적인 항원을 포함 함; 대상체의 암에 대해 특이적으로 활성화된 복수의 T 림프구를 생성하는 단계; 및 복수의 특이적 활성화된 T 림프구를 비활성화된 T 림프구로부터 분리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된다.

[0181] 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하는 방법이 또한 제공되며; 복수의 특이적 활성화된 T 림프구를 대상체 내로 도입하는 단계를 포함하고, 여기서 복수의 특이적 활성화된 T 림프구는 본원에 기재된 방법에 의해 생성되었다. 본원에 기재된 특이적 활성화된 T 림프구 집단을 대상체에게 도입하는 것을 포함하는, 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하는 방법이 또한 제공된다. 이러한 방법은 활성화된 T 림프구를 비활성화된 T 림프구로부터 분리하는 단계를 추가로 포함 할 수 있다. 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하는데 사용하기위한 복수의 특이적 활성화된 T 림프구가 또한 제공되며, 여기서 복수의 특이적 활성화된 T 림프구는 본원에 기재된 방법에 의해 제조된다. 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하는데 사용하기위한 본원에 기술된 특이적 활성화된 T 림프구 집단이 또한 제공된다. 또한 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하기위한 의약의 제조를위한 복수의 특이적 활성화된 T 림프구의 용도가 제공되며, 여기서 복수의 특이적 활성화된 T 림프구는 본원에 기재된 방법에 의해 제조된다. 암을 치료할 필요가있는 대상체를 치료하기위한 의약의 제조를위한 본원에 기재된 특정 활성화된 T 림프구 집단의 용도가 또한 제공된다. 이러한 특이적 활성화된 T 림프구의 복수 또는 집단은 활성화된 T 림프구를 비활성화된 T 림프구로부터 분리함으로써 추가로 제조 될 수 있다.

[0182] 일부 실시형태에서, 복수의 특이적 활성화된 T 림프구를 분리하는 단계는 특이적 활성화된 T 림프구의 표면 바이오 마커를 검출하는 것을 추가로 포함 할 수 있다.

[0183] 일부 실시형태에서, 특이적 활성화된 T 림프구는 자가성 (즉, 이들이 투여 될 대상으로부터 유래 됨)이다.

[0184] 다양한 실시형태에서, 복수의 특이적 활성화된 T 림프구 집단의 방법 또는 제조는 활성화된 T 림프구의 증식된 집단을 제공하기 위해 활성화된 T 림프구를 빠르게 증식시키는 것을 추가로 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 급속 증식은 비활성화된 T 림프구로부터 특이적 활성화된 T 림프구를 분리 한 후에 수행 될 수 있다. 충분한 수준의 T 림프구의 생성은 본원에 기술되거나 당 업계에 공지된 빠른 증식 방법을 사용하여 달성 될 수 있다. 예를 들어, 아래 실시 예를 참조하라; Riddell, US 5,827,642; Riddell et al., 미국 특허 번호 6,040,177, 및 Yee and Li, PCT 특허 출원 공보 W02009/045308 A2 참조

[0185] 인간 대상체의 치료 (예를 들어, 입양 세포 요법을 위한) 에서 T 세포의 용도는 당 업계에 공지되어있다. 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 T 세포는 이러한 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, MART-1 항원 특이적 T 세포를 포함하는 종양 침윤 림프구를 사용한 입양 세포 요법이 클리닉에서 시험되었다 (Powell et al., Blood 105 : 241-250, 2005). 또한, 항-CD3 모노클로날 항체 및 IL-2와 공 활성화된 T 세포의 투여는 Chang et al., J. Clinical Oncology 21 : 884-890, 2003에 기재되어있다. 암 치료를위한 T 세포 투여에 대한 추가 예 및 / 또는 논의는 Dudley et al., Science 298 : 850-854, 2002; Roszkowski 등, Cancer Res 65 (4) : 1570-76, 2005; 쿠퍼 등, Blood 101 : 1637-44, 2003; Yee, 미국 특허 출원 공보 2006/0269973; Yee and Li, PCT 특허 출원 공보 W02009 / 045308 A2; Gruenberg 등, 미국 특허 출원. 공보 2003/0170238; Rosenberg, 미국 특허 번호 4,690,915; 및 Alajez et al., Blood 105 : 4583-89, 2005 에서 제공된다.

[0186] 일부 실시형태에서, 세포는 먼저 그들의 배양 매질로부터 세포를 수확 한 다음, 치료 유효량으로 투여하기에 적합한 매질 및 용기 시스템 ("제약 상 허용되는"담체)에서 세포를 세척 및 농축함으로써 제형 화된다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장성 매질 제형 일 수 있으며, 전형적으로 생리 식염수, Normosol R (Abbott) 또는 Plasma-Lyte A (Baxter) 일 수 있지만, 또한 수중 5 % 텍스트로스 또는 링거의 락테이트가 사용될 수 있다. 주입 매질은 인간 혈청 알부민이 보충 될 수 있다.

[0187] 일부 실시형태에서, 조성물 중 세포의 수는 적어도 109 또는 1010 개의 세포들이다. 일부 실시형태에서, 단일 용량은 적어도 1 천만, 1 억, 10 억 또는 100 억 개 이상의 세포를 포함 할 수 있다. 투여된 세포의 수는 적응 증 특정, 환자 특이적 (예를 들어, 환자의 크기) 이며, 또한 투여된 세포의 순도 및 표현형에 따라 달라질 것이

다. 세포의 수는 조성물에 포함된 세포의 유형과 같이 조성물이 의도된 최종 용도에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 특정 항원에 특이적인 세포가 바람직하다면, 집단은 그러한 세포의 70 % 이상, 일반적으로 80 % 이상, 85 % 이상 및 90-95 % 이상을 함유 할 것이다. 본원에 제공된 용도의 경우, 세포는 일반적으로 1 리터 이하의 부피이고, 500ml 이하, 심지어 250ml 또는 100ml 이하일 수 있다. 따라서 원하는 세포의 밀도는 10^6 세포/ml, 10^7 세포/ml 또는 10^8 세포/ml 보다 클 수 있다. 임상 적으로 관련된 수의 면역 세포는 누적 적으로 10^9 , 10^{10} 또는 10^{11} 개 세포 이상인 다중 주입으로 분류 될 수 있다.

[0188] 일부 실시형태에서, 본원에 기술되거나 본 발명의 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 T 림프구는 종양 또는 암 세포에 대한 개체에 면역성을 부여하는데 사용될 수 있다. "면역"은 림프구가 활성화된 항원에 대한 암 세포 또는 종양과 관련된 하나 이상의 물리적 증상의 감소를 의미한다. 세포는 주입에 의해 투여 될 수 있으며, 각각의 주입은 적어도 $10^6 \sim 10^{10}$ 세포 / m2 의 범위로, 예를 들어, 적어도 $10^7 \sim 10^9$ 세포 / m2 의 범위에서 이다. 클론은 단일 주입 또는 일정 시간에 걸친 다중 주입에 의해 투여 될 수 있다. 그러나 상이한 개체가 반응성에 차이가 있을 것으로 예상되므로, 주입된 세포의 유형 및 양 뿐만 아니라 주입 횟수 및 다수의 주입이 주어지는 시간 범위는 주치의가 결정하며 검사로 결정될 수 있다.

[0189] 세포를 환자에게 다시 전달한 후, IL-21 및 IL-2 를 포함 할 수있는 사이토카인으로 환자를 치료함으로써 생존력을 유지하기 위한 방법이 사용될 수 있다 (Bear et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 50 : 269-74, 2001; 및 Schultze et al., *Br. J. Haematol.* 113:455-60, 2001) 참조). 다른 실시형태에서, 세포는 환자에게 투여 하기 전에 IL-21의 존재 하에서 배양된다. Yee, US 특허 출원 공보 No. 20060269973 참조. IL-21은 활성화된 T 세포를 포함하는 집단에서 추가의 항원-특이적 T 세포 농축없이 증식 및 입양 전달에 충분히 높은 수준으로 T 세포 빈도를 증가시킬 수 있다. 따라서, 이러한 단계는 치료 시간을 추가로 감소시키고 및 / 또는 추가 선택 및 / 또는 클로닝에 대한 필요성을 제거 할 수 있다.

[0190] **항원 제시 합성 표면의 제조를 위한 키트.**

[0191] T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 합성 표면을 제조하기 위한 키트가 또한 제공되며, 그 키트는 a. 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들을 포함하는, 본원에 기술된 임의의 공유결합으로 관능화된 합성 표면; 및 T 세포의 T 세포 수용체와 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자들을 포함하는 제 1 개질 시약을 포함하며, 또한 여기서 MHC 분자들은 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들의 제 1 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된다. 일부 실시형태들에서, 제 1 커플링제는 비오틴 결합제일 수 있다. 비오틴 결합제는 스트렙타비딘 일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 복수의 MHC 분자들 각각은 적어도 하나의 비오틴 작용기를 추가로 포함할 수 있다. 당 업계에 알려진 바와 같이 다른 커플 링 화학이 사용될 수 있으며, 다른 부위 특이적 단백질 태그가 MHC 단백질에 부착 될 수 있으며, 이는 비드에 부착된 인식 단백질 기반 중에 공유적으로 부착되도록 구성된다. 이들 커플 링 전략은 MHC 분자의 C- 말단 비오틴화에 의해 제공되는 바와 같은 MHC 분자의 등가 부위 특이적이고 구체적으로 배향된 부착을 제공 할 수 있다. 공유 기능화된 합성 표면은 웨이퍼, 비드, 미세유체 디바이스의 적어도 하나의 내부 표면, 또는 튜브 일 수 있다.

[0192] 키트는 각각 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 비오틴 결합제들의 제 2 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된 복수의 공 활성화 분자들을 포함하는 시약을 추가로 포함한다. 일부 실시형태들에서, 복수의 공 활성화 분자들 각각은 비오틴 작용기를 포함할 수 있다. 공 활성화 분자들 각각은 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 및/또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 개개의 컨테이너에 시약이 제공된다. 대안 적으로, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약은 약 100:1 내지 1:100 의 비로 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 및 / 또는 보조 TCR 활성화 분자를 함유하는 하나의 용기에 제공 될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약은 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자의 혼합물을 포함하고, 여기서 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자 대 TCR 공 활성화 분자의 비는 100 : 1 내지 90 : 1, 90 : 1 내지 80 : 1, 80 : 1 내지 70 : 1, 70 : 1 내지 60 : 1, 60 : 1 내지 50 : 1, 50 : 1 내지 40 : 1, 40 : 1 내지 30 : 1, 30 : 1 내지 20 : 1, 20 : 1 내지 10 : 1, 10 : 1 내지 1 : 1, 1 : 1 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1 : 20 내지 1:30, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90 또는 1:90 내지 1:100 이며, 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약은 약 20 : 1 내

지 약 1:20의 비율로 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 함유한다.

[0193] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면을 제조하기위한 키트는 접착 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함 할 수 있고, 여기서 각각의 접착 자극 분자는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 관련된 비오틴 결합제 작용기들의 제 3 서브 세트와 반응하도록 구성된 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함한다. 일부 실시형태들에서, 접착 자극 분자는 비오틴 작용기를 포함할 수 있다.

[0194] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면을 제조하기위한 키트는 성장 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함 할 수 있고, 각각의 성장 자극 분자는 성장 인자 수용체 리간드를 포함 할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 성장 인자 수용체 리간드는 사이토카인 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 사이토카인은 IL-21 또는 그것의 단편을 포함할 수도 있다. 일부 실시형태에서, 성장 자극 분자는 공유적으로 개질된 비드에 부착 될 수 있다.

[0195] 일부 실시형태에서, 항원 제시 합성 표면을 제조하기위한 키트는 하나 이상의 추가의 성장 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가의 성장 자극 분자는 IL2 및 / 또는 IL7 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 성장 자극 분자는 공유적으로 개질된 비드에 부착 될 수 있다.

[0196] **T 림프구 활성화를 위한 키트.**

[0197] 본원에 기재된 바와 같은 항원 제시 합성 표면을 포함하여 T 림프구를 활성화시키기위한 키트가 또한 제공된다. 키트는 성장 자극 분자를 추가로 포함 할 수있으며, 여기서 각각의 성장 자극 분자는 성장 인자 수용체 리간드를 포함 할 수 있다. 성장 자극 분자는 유리 분자로서 제공 될 수 있고, 항원 제시 합성 표면 (일차 활성화 분자 리간드와 동일 또는 상이한 영역에) 에 부착되거나, 또는 상이한 공유적으로 개질된 합성 표면에 부착 될 수 있다. 예를 들어, 키트는 부가 자극 분자를 포함하는 복수의 공유적으로 개질된 비드를 추가로 포함 할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 성장 인자 수용체 리간드 분자는 사이토카인 또는 이의 단편을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 성장 인자 수용체 리간드는 IL-21 을 포함한다. 다른 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 추가 (예를 들어, 제 2 또는 제 2 및 제 3) 성장 자극 분자를 포함 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 추가의 성장 자극 분자는 IL-2 및 / 또는 IL-7 또는 이의 단편을 포함한다. 추가의 성장 자극 분자는 유리 분자로서 제공 될 수 있고, 항원 제시 합성 표면 (일차 활성화 분자 리간드와 동일 또는 상이한 영역에) 에 부착되거나, 또는 비드와 같은 상이한 공유적으로 개질된 합성 표면에 부착 될 수 있다.

[0198] **미세유체 디바이스 구조, 로딩 및 작동의 추가 양태들; 관련 시스템**

[0199] 본원에 기술된 미세유체 디바이스 및 이의 용도는 하기 특징 중 임의의 것을 가질 수 있으며, 하기 기술된 시스템과 함께 사용될 수 있다.

[0200] **로딩의 방법들.** 생물학적 미세 객체들 또는 미세 객체들, 이를 테면, 비드들 (그러나 이에 한정되지 않음) 의 로딩은, 본 명세서에서 설명된 바와 같이 유체 흐름, 중력, 유전영동 (DEP) 힘, 전기습윤 (electrowetting), 자기력, 또는 이들의 임의의 조합의 사용을 수반할 수 있다. DEP 힘은 광학적으로, 예컨대 광전자 트위저들 (OET) 구성에 의해 및/또는 전기적으로, 예컨대 시간적/공간적 패턴으로 전극들/전극 영역들의 활성화에 의해 생성될 수 있다. 유사하게, 전기습윤 힘은 광학적으로, 예컨대 광-전자 습윤 (OEWE) 구성에 의해 및/또는 전기적으로, 예컨대 시간적 공간적 패턴으로 전극들/전극 영역들의 활성화에 의해 제공될 수도 있다.

[0201] **이러한 디바이스를 조작하고 관찰하기 위한 미세유체 디바이스 및 시스템.** 도 1a 는 생리학적 미세 객체를 유지, 고립, 검증 또는 배양하는데 사용될 수 있는 미세유체 디바이스 (100) 및 시스템 (150) 의 예를 예시한다. 미세유체 디바이스 (100) 의 사시도는 미세유체 디바이스 (100) 안의 부분 뷰를 제공하도록 그 커버 (110) 의 부분 컷-어웨이를 갖고 도시된다. 미세유체 디바이스 (100) 는 일반적으로, 흐름 경로 (106) 를 포함하는 미세유체 회로 (120) 를 포함하고, 이 흐름 경로를 통해 유체 매질 (180) 이 흘러, 옵션으로 하나 이상의 미세 객체들 (미도시) 을 미세유체 회로 (120) 안으로 및/또는 미세유체 회로 (120) 를 통과하여 운반할 수 있다. 단일 미세유체 회로 (120) 가 도 1a 에 예시되지만, 적합한 미세유체 디바이스들은 복수 (예를 들어, 2 또는 3) 의 이러한 미세유체 회로들을 포함할 수 있다. 그것과는 관계없이, 미세유체 디바이스 (100) 는 나노유체 디바이스이도록 구성될 수 있다. 도 1a 에 예시된 바와 같이, 미세유체 회로 (120) 는 복수의 미세유체 격리 펜들 (124, 126, 128, 및 130) 을 포함할 수도 있고, 여기서 각각의 격리 펜들은 유동 경로 (106) 와 유체 연통하는

하나 이상의 개구들을 가질 수도 있다. 도 1a의 디바이스의 일부 실시형태들에서, 격리 펜들은 유동 경로 (106)와 유체 연통하는 단지 단일의 개구만을 가질 수도 있다. 이하에 추가로 논의된 바와 같이, 미세유체 격리 펜들은, 매질 (180)이 흐름 경로 (106)를 통하여 흐르고 있더라도, 미세유체 디바이스 (100)와 같은 미세유체 디바이스에 미세 객체들을 유지하기 위해 최적화된 다양한 피처들 및 구조들을 포함한다. 그러나, 전술한 것으로 돌아가기 전에, 미세유체 디바이스 (100) 및 시스템 (150)의 간단한 설명이 제공된다.

[0202] 일반적으로 도 1a에 예시된 바와 같이, 미세유체 회로 (120)는 인클로저 (102)에 의해 정의된다. 인클로저 (102)는 상이한 구성들로 물리적으로 구조화될 수 있지만, 도 1a에 도시된 예에서 인클로저 (102)는 지지 구조 (104)(예를 들어, 베이스), 미세유체 회로 구조 (108), 및 커버 (110)를 포함하는 것으로 도시된다. 지지 구조 (104), 미세유체 회로 구조 (108), 및 커버 (110)는 서로 부착될 수 있다. 예를 들어, 미세유체 회로 구조 (108)는 지지 구조 (104)의 내측면 (109)상에 배치될 수 있고, 커버 (110)는 미세유체 회로 구조 (108)위에 배치될 수 있다. 지지 구조 (104) 및 커버 (110)와 함께, 미세유체 회로 구조 (108)는 미세유체 회로 (120)의 엘리먼트들을 정의할 수 있다.

[0203] 지지 구조 (104)는 도 1a에 예시된 바와 같이 미세유체 회로 (120)의 하단에 있고 커버 (110)는 상단에 있을 수 있다. 대안으로, 지지 구조 (104) 및 커버 (110)는 다른 배향들에서 구성될 수 있다. 예를 들어, 지지 구조 (104)는 미세유체 회로 (120)의 상단에 있을 수 있고 커버 (110)는 하단에 있을 수 있다. 관계없이, 인클로저 (102)안 또는 밖으로의 통로를 각각 포함하는 하나 이상의 포트들 (107)이 존재할 수 있다. 통로의 예들은 밸브, 게이트, 관통 홀 (pass-through hole) 등을 포함한다. 예시된 바와 같이, 포트 (107)는 미세유체 회로 구조 (108)에 갭으로 생성된 관통 홀이다. 그러나, 포트 (107)는 커버 (110)와 같은, 인클로저 (102)의 다른 컴포넌트들에 놓일 수 있다. 단지 하나의 포트 (107)가 도 1a에 예시되지만, 미세유체 회로 (120)는 2개 이상의 포트들 (107)을 가질 수 있다. 예를 들어, 미세유체 회로 (120)에 들어가는 유체에 대한 인렛으로서 기능하는 제 1 포트 (107)가 존재할 수 있고, 미세유체 회로 (120)에서 나가는 유체에 대한 아웃렛으로서 기능하는 제 2 포트 (107)가 존재할 수 있다. 포트 (107)가 인렛으로서 기능하는지 또는 아웃렛으로서 기능하는지는 유체가 흐름 경로 (106)를 통해 흐르는 방향에 의존할 수 있다.

[0204] 지지 구조 (104)는 하나 이상의 전극들 (미도시) 및 기관 또는 복수의 상호연결된 기관들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 지지 구조 (104)는 하나 이상의 반도체 기관들을 포함할 수 있고, 이 기관들 각각은 전극에 전기적으로 연결된다 (예를 들어, 반도체 기관들의 전부 또는 서브세트는 단일 전극에 전기적으로 연결될 수 있다). 지지 구조 (104)는 인쇄 회로 기관 어셈블리 ("PCBA")를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 반도체 기관(들)은 PCBA 상에 장착될 수 있다.

[0205] 미세유체 회로 구조 (108)는 미세유체 회로 (120)의 회로 엘리먼트들을 정의할 수 있다. 이러한 회로 엘리먼트들은, 미세유체 회로 (120)가 유체로 채워질 때 유체 상호연결될 수 있는 공간들 또는 영역들, 이를 테면 (하나 이상의 흐름 채널들을 포함하거나 또는 하나 이상의 흐름 채널들일 수도 있는) 흐름 영역들, 챔버들, 펜들, 트랩들 등을 포함할 수 있다. 도 1a에 예시된 미세유체 회로 (120)에서, 미세유체 회로 구조 (108)는 프레임 (114) 및 미세유체 회로 재료 (116)를 포함한다. 프레임 (114)은 미세유체 회로 재료 (116)를 부분적으로 또는 완전히 인클로징할 수 있다. 프레임 (114)은, 예를 들어 미세유체 회로 재료 (116)를 실질적으로 에워싸는 상대적으로 강성 구조일 수 있다. 예를 들어, 프레임 (114)은 금속 재료를 포함할 수 있다.

[0206] 미세유체 회로 재료 (116)는 미세유체 회로 (120)의 상호연결들 및 회로 엘리먼트들을 정의하도록 캐비티들 등으로 패턴닝될 수 있다. 미세유체 회로 재료 (116)는, 기체 투과성일 수 있는 유연성 재료, 예컨대 유연성 폴리머 (예를 들어, 고무, 플라스틱, 엘라스토머, 실리콘, 폴리디메틸실록산 ("PDMS"), 등)을 포함할 수 있다. 미세유체 회로 재료 (116)를 구성할 수 있는 재료들의 다른 예들은 몰딩된 유리, 실리콘 (예를 들어, 포토-패턴 가능 실리콘 또는 "PPS")과 같은 식각 가능 재료, 포토-레지스트 (예를 들어, SU8) 등을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 이러한 재료들- 및 이에 따른 미세유체 회로 재료 (116)-은 강성 및/또는 실질적으로 기체에 대해 불투과성일 수 있다. 관계없이, 미세유체 회로 재료 (116)는 지지 구조 (104)상에 그리고 프레임 (114)안에 배치될 수 있다.

[0207] 커버 (110)는 미세유체 회로 재료 (116) 및/또는 프레임 (114)의 일체형 부품일 수 있다. 대안으로, 커버 (110)는 도 1a에 예시된 바와 같이 구조적으로 별개의 엘리먼트일 수 있다. 커버 (110)는 미세유체 회로 재료 (116) 및/또는 프레임 (114)과 동일한 또는 상이한 재료들을 포함할 수 있다. 유사하게, 지지 구조 (104)는 예시된 바와 같이 프레임 (114) 또는 미세유체 회로 재료 (116)로부터 별개의 구조이거나, 또는 프레임 (114) 또는 미세유체 회로 재료 (116)의 일체형 부품일 수 있다. 마찬가지로, 프레임 (114) 및 미세유체 회로

재료 (116) 는 도 1a 에 도시된 바와 같이 별개의 구조들이거나 또는 동일한 구조의 일체형 부분들일 수 있다.

- [0208] 일부 실시형태들에서, 커버 (110) 는 강성 재료를 포함할 수 있다. 강성 재료는 유리 또는 유사한 속성들을 가진 재료일 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 커버 (110) 는 가요성 재료를 포함할 수 있다. 가요성 재료는 폴리머, 이를 테면 PDMS 일 수 있다. 일부 실시형태들에서, 커버 (110) 는 강성 및 가요성 재료들 양자 모두를 포함할 수 있다. 예를 들어, 커버 (110) 의 하나 이상의 부분들 (예를 들어, 격리 펜들 (124, 126, 128, 130) 위에 포지셔닝된 하나 이상의 부분들) 은 커버 (110) 의 강성 재료들과 인터페이스하는 가요성 재료를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 커버 (110) 는 하나 이상의 전극들을 더 포함할 수 있다. 하나 이상의 전극들은 유리 또는 유사한 절연 재료 상에 코팅될 수도 있는, 전도성 산화물, 이를 테면 인듐-주석-산화물 (ITO) 을 포함할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 전극들은, 가요성 재료, 이를 테면 폴리머 (예를 들어, PDMS) 에 임베딩된, 가요성 전극들, 이를 테면 단일-벽 나노튜브들, 멀티-벽 나노튜브들, 나노와이어들, 전기 전도성 나노입자들의 클러스터들, 또는 이들의 조합들일 수 있다. 미세유체 디바이스들에서 사용될 수 있는 가요성 전극들은, 예를 들어, 미국 2012/0325665 (Chiou 등) 에 기재되어 있고, 그 내용들은 참조로 본 명세서에 통합된다. 일부 실시형태들에서, 커버 (110) 는 세포 부착, 생존능력 및/또는 성장을 지원하도록 (예를 들어, 미세유체 회로 (120) 를 향해 내측으로 대면하는 표면의 전부 또는 일부를 컨디셔닝함으로써) 변경될 수 있다. 이 변경은 합성 또는 천연 폴리머의 코팅을 포함할 수도 있다. 일부 실시형태에서, 커버 (110) 및/또는 지지 구조 (104) 는 광에 대해 투명할 수 있다. 커버 (110) 는 또한 기체 투과성인 적어도 하나의 재료 (예를 들어, PDMS 또는 PPS) 를 포함할 수도 있다.
- [0209] 도 1a 는 또한, 미세유체 디바이스들, 이를 테면 미세유체 디바이스 (100) 를 동작 및 제어하기 위한 시스템 (150) 을 도시한다. 시스템 (150) 은 전기 전원 (192), 이미징 디바이스 (이미징 모듈 (164) 내에 통합되며, 그리고 도 1a 에는 명확히 도시되지 않음), 및 틸팅 디바이스 (틸팅 모듈 (166) 의 부분이며, 도 1a 에 명확히 도시되지 않음) 를 포함한다.
- [0210] 전원 (192) 은, 미세유체 디바이스 (100) 및/또는 틸팅 디바이스 (190) 에 전력을 제공하여, 필요에 따라 바이어싱 전압들 또는 전류들을 제공할 수 있다. 전원 (192) 은, 예를 들어, 하나 이상의 교류 (AC) 및/또는 직류 (DC) 전압 또는 전류 소스들을 포함할 수 있다. 이미징 디바이스 (194) (이하에 논의되는 이미징 모듈 (164) 의 일부) 는 미세유체 회로 (120) 내측의 이미지들을 캡처하기 위한 디바이스, 이를 테면 디지털 카메라를 포함할 수 있다. 일부 인스턴스들에서, 이미징 디바이스는 (194) 는 (예를 들어, 낮은 광 애플리케이션들에 대해) 빠른 프레임 레이트 및/또는 고 감도를 갖는 검출기를 더 포함한다. 이미징 디바이스 (194) 는 또한, 시뮬레이팅 방사선 및/또는 광 빔들을 미세유체 회로 (120) 로 지향시키고 미세유체 회로 (120) (또는 그 안에 포함된 미세 객체들) 로부터 반사 또는 방사된 방사선 및/또는 광 빔들을 수집하기 위한 메커니즘을 포함할 수 있다. 방사된 광 빔들은 가시 스펙트럼에 있을 수도 있고, 예를 들어, 형광 방출들을 포함할 수도 있다. 반사된 광 빔들은 LED 또는 광역 스펙트럼 램프, 이를 테면 수은 램프 (예를 들어, 고 압력 수은 램프) 또는 크세논 아크 램프에서 비롯되는 반사된 방출들을 포함할 수도 있다. 도 3b 에 대하여 논의된 바와 같이, 촬상 디바이스 (194) 는 아이피스를 포함하거나 포함하지 않을 수도 있는 현미경 (또는 광학 트레인) 을 더 포함할 수도 있다.
- [0211] 시스템 (150) 은 하나 이상의 회전 축들을 중심으로 미세유체 디바이스 (100) 를 회전시키도록 구성된 틸팅 디바이스 (190) (이하에 논의되는 틸팅 모듈 (166) 의 부분) 를 더 포함한다. 일부 실시형태들에서, 틸팅 디바이스 (190) 는, 미세유체 디바이스 (100)(및 이에 따른 미세유체 회로 (120)) 가 수평 배향 (즉, x 및 y 축에 대해 0°), 수직 배향 (즉, x 축 및/또는 y 축에 대해 90°), 또는 그 사이의 임의의 배향에서 홀딩될 수 있도록 적어도 하나의 축을 중심으로 미세유체 회로 (120) 를 포함하는 인클로저 (102) 를 지지 및/또는 홀딩하도록 구성된다. 축에 대한 미세유체 디바이스 (100)(및 미세유체 회로 (120)) 의 배향은 미세유체 디바이스 (100)(및 미세유체 회로 (120)) 의 "틸트" 로서 본원에서 지칭된다. 예를 들어, 틸팅 디바이스 (190) 는 미세유체 디바이스 (100) 를 x 축에 대하여 0.1°, 0.2°, 0.3°, 0.4°, 0.5°, 0.6°, 0.7°, 0.8°, 0.9°, 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65°, 70°, 75°, 80°, 90° 또는 그 사이의 임의의 각도로 틸팅할 수 있다. 레벨 배향 (및 따라서 x- 및 y-축들) 은 중력에 의해 정의된 수직 축에 대한 법선으로서 정의된다. 틸팅 디바이스는 또한 x-축 및/또는 y-축에 대해 90° 초과 임의의 각도로 미세유체 디바이스 (100) (및 미세유체 회로 (120)) 를 틸팅하거나, 또는 x-축 또는 y-축에 대해 180° 로 미세유체 디바이스 (100) (및 미세유체 회로 (120)) 를 틸팅하여 미세유체 디바이스 (100) (및 미세유체 회로 (120)) 를 완전히 뒤집을 수 있다. 유사하게, 일부 실시형태에서, 틸팅 디바이스 (190) 는 흐름 경로 (106) 또는 미세유체 회로 (120) 의 일부 다른 부분에 의해 정의된 회전 축을 중심으로 미세유체 디바이스

(100) (및 미세유체 회로 (120)) 를 틸팅한다.

[0212] 일부 인스턴스들에서, 미세유체 디바이스 (100) 는 흐름 경로 (106) 가 하나 이상의 격리 펜들 상방 또는 하방에 포지셔닝되도록 수직 배향으로 틸팅된다. 미세유체 디바이스의 콘텍스트에서 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "상방 (above)" 은 흐름 경로 (106) 가 중력에 의해 정의된 수직 축 상에 하나 이상의 격리 펜들보다 더 높게 포지셔닝된다 (즉, 흐름 경로 (106) 상방의 격리 펜에서의 객체는 흐름 경로에서의 객체보다 더 높은 중력 위치 에너지를 가질 것이다) 는 것을 나타낸다. 미세유체 디바이스의 콘텍스트에서 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "하방 (below)" 은 흐름 경로 (106) 가 중력에 의해 정의된 수직 축 상에 하나 이상의 격리 펜들보다 더 낮게 포지셔닝된다 (즉, 흐름 경로 (106) 하방의 격리 펜에서의 객체는 흐름 경로에서의 객체보다 더 낮은 중력 위치 에너지를 가질 것이다) 는 것을 나타낸다.

[0213] 일부 인스턴스들에서, 틸팅 디바이스 (190) 는 흐름 경로 (106) 에 평행한 축을 중심으로 미세유체 디바이스 (100) 를 틸팅한다. 또한, 미세유체 디바이스 (100) 는 흐름 경로 (106) 가 격리 펜의 바로 위 또는 아래에 위치하지 않고 하나 이상의 격리 펜의 위 또는 아래에 위치하도록 90 ° 미만의 각도로 기울어 질 수 있다. 다른 인스턴스들에서, 틸팅 디바이스 (190) 는 흐름 경로 (106) 에 수직인 축을 중심으로 미세유체 디바이스 (100) 를 틸팅한다. 또 다른 인스턴스들에서, 틸팅 디바이스 (190) 는 흐름 경로 (106) 에 평행하지도 수직이지도 않은 축을 중심으로 미세유체 디바이스 (100) 를 틸팅한다.

[0214] 시스템 (150) 은 매질 소스 (178) 를 더 포함할 수 있다. 매질 소스 (178) (예를 들어, 컨테이너, 저장소 등) 는, 상이한 유체 매질 (180) 을 각각 보유하기 위한, 다수의 섹션들 또는 컨테이너들을 포함할 수 있다. 따라서, 매질 소스 (178) 는 도 1a 에 예시된 바와 같이, 미세유체 디바이스 (100) 밖에 있고 그와는 별개인 디바이스일 수 있다. 대안으로, 매질 소스 (178) 은 미세유체 디바이스 (100) 의 인클로저 (102) 내에 전체적으로 또는 부분적으로 위치될 수 있다. 예를 들어, 매질 소스 (178) 은 미세유체 디바이스 (100) 의 부분인 저장고들을 포함할 수 있다.

[0215] 도 1a 는 또한, 시스템 (150) 의 부분을 구성하고 미세유체 디바이스 (100) 와 함께 이용될 수 있는 제어 및 모니터링 장비 (152) 의 예들의 단순화된 블록도 도시들을 예시한다. 도시된 바와 같이, 이러한 제어 및 모니터링 장비(152)의 예들은 매질 소스(178)를 제어하기 위한 매질 모듈(160), 미세유체 회로(120) 내의 미세 물체들(미도시) 및/또는 매질(예컨대, 매질의 액적들)의 이동 및/또는 선택을 제어하기 위한 동기 모듈(162), 이미지들(예컨대, 디지털 이미지들)을 캡처하는 이미징 디바이스(194)(예컨대, 카메라, 현미경, 광원 또는 이들의 임의의 조합)를 제어하기 위한 이미징 모듈(164), 및 틸팅 디바이스(190)를 제어하기 위한 틸팅 모듈(166)을 포함하는 마스터 제어기(154)를 포함한다. 제어 장비(152)는 미세유체 디바이스(100)에 대하여 제어, 모니터링, 또는 다른 기능들을 수행하기 위한 다른 모듈들(168)을 또한 포함할 수 있다. 도시된 바와 같이, 장비(152)는 디스플레이 디바이스(170) 및 입/출력 디바이스(172)를 더 포함할 수 있다.

[0216] 마스터 제어기(154)는 제어 모듈(156) 및 디지털 메모리(158)를 포함할 수 있다. 제어 모듈 (156) 은, 예를 들어 메모리 (158) 내에 비-일시적 데이터 또는 신호들로서 저장된 머신 실행가능 명령들 (예를 들어, 소프트웨어, 펌웨어, 소스 코드, 등) 에 따라 동작하도록 구성된 디지털 프로세서를 포함할 수 있다. 대안으로, 또는 추가적으로, 제어 모듈 (156) 은 하드와이어 디지털 회로부 및/또는 아날로그 회로부를 포함할 수 있다. 매질 모듈 (160), 동기 모듈 (162), 이미징 모듈 (164), 틸팅 모듈 (166), 및/또는 다른 모듈들 (168) 은 유사하게 구성될 수 있다. 따라서, 미세유체 디바이스 (100) 또는 임의의 다른 미세유체 장치에 대하여 수행되는 것으로서 본원에 설명된 기능들, 프로세스들, 액트들, 액션들, 또는 프로세스의 단계들은 위에서 논의된 바와 같이 구성된 마스터 제어기 (154), 매질 모듈 (160), 동기 모듈 (162), 이미징 모듈 (164), 틸팅 모듈 (166), 및/또는 다른 모듈들 (168) 중 임의의 하나 이상에 의해 수행될 수 있다. 유사하게, 마스터 제어기 (154), 매질 모듈 (160), 동기 모듈 (162), 이미징 모듈 (164), 틸팅 모듈 (166), 및/또는 다른 모듈들 (168) 은 본원에 논의된 임의의 기능, 프로세스, 액트, 액션 또는 단계에서 사용된 데이터를 송신 및 수신하도록 통신 가능하게 커플링될 수도 있다.

[0217] 매질 모듈 (160) 은 매질 소스 (178) 을 제어한다. 예를 들어, 매질 모듈 (160) 은 선택된 유체 매질 (180) 를 (예를 들어, 인렛 포트 (107) 를 통해) 인클로저 (102) 안으로 입력하도록 매질 소스 (178) 을 제어할 수 있다. 또한, 매질 모듈 (160) 은 (예를 들어, 아웃렛 포트 (미도시) 를 통해) 인클로저 (102) 로부터 매질의 제거를 제어할 수 있다. 따라서, 하나 이상의 매질은 선택적으로 미세유체 회로 (120) 안으로 입력되고 이로부터 제거될 수 있다. 또한, 매질 모듈 (160) 은 미세유체 회로 (120) 내의 흐름 경로 (106) 에서의 유체 매질 (180) 의 흐름을 제어할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태들에서 매질 모듈(160)은 틸팅 모듈(166)이 틸팅 디바이스

(190)로 하여금 원하는 각도의 기울기로 미세유체 디바이스(100)를 틸팅하게 하기 전에 인클로저(102)를 통해 그리고 흐름 경로(106)에서의 매질(180)의 흐름을 정지시킨다.

[0218] 동기 모듈(162)은 미세유체 회로(120)에서 미세 물체들(미도시)의 선택, 트랩핑, 및 이동을 제어하도록 구성될 수 있다. 도 1b 및 도 1c 를 참조하여 이하에 논의된 바와 같이, 인클로저 (102) 는 유전영동 (DEP), 광전자 트위저들 (OET) 및/또는 광-전기습윤 (OEWS) 구성 (도 1a 에 미도시) 을 포함할 수 있고, 동기 모듈 (162) 은 흐름 경로 (106) 및/또는 격리 펜들 (124, 126, 128, 130) 에서 매질 (미도시)의 액적 (droplet) 들 및/또는 마이크로-객체들 (미도시) 을 선택 및 이동시키도록 전극들 및/또는 트랜지스터들 (예를 들어, 포토트랜지스터들) 의 활성화를 제어할 수 있다.

[0219] 이미징 모듈 (164) 은 이미징 디바이스 (194) 를 제어할 수 있다. 예를 들어, 이미징 모듈 (164) 은 이미징 디바이스 (194) 로부터 이미지 데이터를 수신 및 프로세싱할 수 있다. 이미징 디바이스 (194) 로부터의 이미지 데이터는 이미징 디바이스 (194) 에 의해 캡처된 임의의 타입의 정보 (예를 들어, 미세 객체들의 존재 또는 부재, 매질의 액적들, 라벨, 이를 테면 형광 라벨의 축적 등) 를 포함할 수 있다. 이미징 디바이스 (194) 에 의해 캡처된 정보를 사용하여, 이미징 모듈 (164) 은 객체들 (예를 들어, 미세 객체들, 매질의 액적들) 의 포지션 및/또는 미세유체 디바이스 (100) 내에서의 이러한 객체들의 모션의 레이트를 추가로 계산할 수 있다.

[0220] 틸팅 모듈 (166) 은 틸팅 디바이스 (190) 의 틸팅 모션들을 제어할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 틸팅 모듈 (166) 은 틸팅 속도 및 타이밍을 제어하여, 중력들을 통해 하나 이상의 격리 펜들로의 마이크로-객체들의 트랜스퍼를 최적화할 수 있다. 틸팅 모듈 (166) 은 미세유체 회로 (120) 에서 매질의 액적들 및/또는 마이크로-객체들의 모션을 설명하는 데이터를 수신하도록 이미징 모듈 (164) 과 통신 가능하게 커플링된다. 이 데이터를 사용하여, 틸팅 모듈 (166) 은, 마이크로-객체들 및/또는 매질의 액적들이 미세유체 회로 (120) 에서 이동하는 속도를 조정하기 위해 미세유체 회로 (120) 의 틸트를 조정할 수도 있다. 틸팅 모듈 (166) 은 또한, 이 데이터를 사용하여 미세유체 회로 (120) 에서 마이크로-객체 및/또는 매질의 액적의 포지션을 반복적으로 조정할 수도 있다.

[0221] 도 1a 에 도시된 예들에서, 미세유체 회로 (120) 는 미세유체 채널 (122) 및 격리 펜들 (124, 126, 128, 130) 을 포함하는 것으로서 예시된다. 각각의 펜은 채널(122)에 대한 개구를 포함하지만, 다르게는 펜들이 펜 내부의 미세 물체들을 채널(122)의 흐름 경로(106) 내 또는 다른 펜들 내의 미세 물체들 및/또는 유체 매질(180)로부터 실질적으로 격리할 수 있도록 인클로저된다. 격리 펜의 벽들은 베이스의 내부 표면 (109) 으로부터 커버 (110) 의 내측 표면까지 연장되어 인클로저를 제공한다. 미세유체 채널 (122) 로의 펜의 개구는 유동 (106) 이 펜들로 지향되지 않도록, 유체 매질 (180) 의 유동 (106) 에 대한 각도로 배향된다. 그 흐름은 펜의 개구의 평면에 접하거나 또는 직교할 수도 있다. 일부 인스턴스들에서, 펜들 (124, 126, 128, 130) 은 미세유체 회로 (120) 내에 하나 이상의 미세 객체들을 물리적으로 몰아넣도록 구성된다. 본 발명에 따른 격리 펜들은, 이하에서 상세히 논의 및 도시되는 바와 같이, DEP, OET, OEWS, 유체 흐름, 및/또는 중력들과의 사용을 위해 최적화되는 다양한 형상들, 표면들 및 피쳐들을 포함할 수 있다.

[0222] 미세유체 회로 (120) 는 임의의 수의 미세유체 격리 펜들을 포함할 수도 있다. 5 개의 격리 펜들이 도시되어 있지만, 미세유체 회로 (120) 는 더 적거나 또는 더 많은 격리 펜들을 가질 수도 있다. 도시된 바와 같이, 미세유체 회로 (120) 의 미세유체 격리 펜들 (124, 126, 128, 및 130) 은 각각 생리학적인 미세 객체를 유지, 고립, 검증 또는 배양하는데 있어서 유용한 하나 이상의 이익들을 제공할 수도 있는 상이한 특징들 및 형상들을 포함한다. 일부 실시형태들에서, 미세유체 회로 (120) 는 복수의 동일한 미세유체 격리 펜들을 포함한다.

[0223] 도 1a 에 예시된 실시형태에서, 단일 채널 (122) 및 흐름 경로 (106) 가 도시된다. 그러나, 다른 실시형태들은 다수의 채널들 (122) 을 포함할 수도 있고, 채널들 각각은 흐름 경로 (106) 를 포함하도록 구성된다. 미세유체 회로 (120) 는 흐름 경로 (106) 및 유체 매질 (180) 과 유체 연통하는 인렛 밸브 또는 포트 (107) 를 더 포함하고, 그것에 의하여 유체 매질 (180) 은 인렛 포트 (107) 를 통해 채널 (122) 에 액세스할 수 있다. 일부 인스턴스들에서, 흐름 경로 (106) 는 단일 경로를 포함한다. 일부 인스턴스들에서, 그 단일 경로는 지그재그 패턴으로 배열되고, 그것에 의하여 흐름 경로 (106) 는 교번하는 방향으로 2 회 이상 미세유체 디바이스 (100) 를 가로질러 이동한다.

[0224] 일부 인스턴스들에서, 미세유체 회로 (120) 는 복수의 병렬 채널들 (122) 및 흐름 경로들 (106) 을 포함하며, 각각의 흐름 경로 (106) 내의 유체 매질 (180) 은 동일한 방향으로 흐른다. 일부 인스턴스들에서, 각각의 흐름 경로 (106) 내의 유체 매질은 순방향 또는 역방향 중 적어도 하나의 방향으로 흐른다. 일부 경우들에서, 복수의 격리 펜들은, 격리 펜들이 타겟 마이크로-객체들과 병렬로 로딩될 수 있도록 (예를 들어, 채널 (122) 에 대

해) 구성된다.

[0225] 일부 실시형태들에서, 미세유체 회로 (120) 는 하나 이상의 마이크로-객체 트랩들 (132) 을 더 포함한다. 트랩들 (132) 은 일반적으로, 채널 (122) 의 경계를 형성하는 벽에 형성되고, 미세유체 격리 펜들 (124, 126, 128, 130) 중 하나 이상의 개구 반대편에 위치될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 트랩들 (132) 은 흐름 경로 (106) 로부터 단일의 마이크로-객체를 수신 또는 캡처하도록 구성된다. 일부 실시형태들에서, 트랩들 (132) 은 흐름 경로 (106) 로부터 복수의 마이크로-객체들을 수신 또는 캡처하도록 구성된다. 일부 경우들에서, 트랩들 (132) 은 단일의 타겟 마이크로-객체의 체적과 거의 동일한 체적을 포함한다.

[0226] 트랩들 (132) 은 타겟이 되는 마이크로-객체들의 트랩들 (132) 안으로의 흐름을 돕도록 구성되는 개구를 더 포함할 수도 있다. 일부 경우들에서, 트랩들 (132) 은 단일의 타겟 마이크로-객체의 치수들과 대략 동일한 높이 및 폭을 갖는 개구를 포함하고, 이에 의해 더 큰 마이크로-객체들이 마이크로-객체 트랩 안으로 진입하는 것이 방지된다. 트랩들 (132) 은 트랩 (132) 내에 타겟이되는 마이크로-객체들의 보유를 돕도록 구성된 다른 피처들을 더 포함할 수도 있다. 일부 경우들에서, 트랩 (132) 은, 채널 (122) 에 평행한 축을 중심으로 미세유체 디바이스 (100) 를틸팅할 때, 트랩된 마이크로-객체가, 마이크로-객체로 하여금 격리 펜의 개구 안으로 들어가게 하는 궤적에서 트랩 (132) 을 나가도록, 미세유체 격리 펜의 개구에 대해 채널 (122) 의 반대 측에 놓이고 이와 정렬된다. 일부 인스턴스들에서, 트랩 (132) 은, 트랩 (132) 을 통한 흐름을 용이하게 하고 그것에 의하여 트랩 (132) 에서의 미세 객체를 캡처할 가능성을 증가시키기 위하여 타겟 미세 객체보다 더 작은 사이드 통로 (134) 를 포함한다.

[0227] 일부 실시형태들에서, 유전영동 (DEP) 힘들이 하나 이상의 전극들 (미도시) 을 통해 (예를 들어, 흐름 경로에서 및/또는 격리 펜들에서) 유체 매질 (180) 을 가로질러 인가되어 그 안에 위치한 미세 객체들을 조작, 이송, 분리 및 소팅한다. 예를 들어, 일부 실시형태들에서, 단일 미세 객체를 흐름 경로 (106) 로부터 원하는 미세유체 격리 펜 안으로 트랜스퍼하기 위하여 미세유체 회로 (120) 의 하나 이상의 부분들에 DEP 힘들이 인가된다. 일부 실시형태들에서, DEP 힘들은 격리 펜 (예를 들어, 격리 펜 (124, 126, 128, 또는 130)) 내의 미세 객체가 변위되는 것을 방지하는데 사용된다. 또한, 일부 실시형태들에서, DEP 힘들은 본 개시의 실시형태들에 따라 이전에 수집되었던 미세 객체를 격리 펜으로부터 선택적으로 제거하는데 사용된다. 일부 실시형태들에서, DEP 힘들은 광전자 트위저 (OET) 힘들을 포함한다.

[0228] 다른 실시형태들에서, 광전기습윤 (OEW) 힘들은 미세유체 회로 (120) 내에 위치한 액적들을 조작, 이송, 분리 및 소팅하기 위해 하나 이상의 전극들 (미도시) 을 통해 미세유체 디바이스 (100) 의 지지 구조 (104) (및/또는 커버 (110)) 에서의 하나 이상의 포지션들 (예를 들어, 흐름 경로 및/또는 격리 펜들을 정의하는 것을 돕는 포지션들) 에 인가된다. 예를 들어, 일부 실시형태들에서, OEW 힘들은 흐름 경로 (106) 로부터 원하는 미세유체 격리 펜 내로 단일 액적을 트랜스퍼하기 위하여 지지 구조 (104) (및/또는 커버 (110)) 에서의 하나 이상의 포지션들에 인가된다. 일부 실시형태들에서, OEW 힘들은 격리 펜 (예를 들어, 격리 펜 (124, 126, 128, 또는 130)) 내의 액적이 변위되는 것을 방지하는데 사용된다. 추가로, 일부 실시형태들에서, OEW 힘들은 현재 개시의 실시형태들에 따라 이전에 수집되었던 액적을 격리 펜으로부터 제거하기 위하여 이용된다.

[0229] 일부 실시형태들에서, DEP 및/또는 OEW 힘들은 미세유체 회로 (120) 내의 액적들 및/또는 미세 객체들을 조작, 이송, 분리 및 소팅하도록, 다른 힘들, 이를 테면 흐름 및/또는 중력과 결합된다. 예를 들어, 인클로저 (102) 는 흐름 경로 (106) 및 그 안에 위치한 미세 객체들을 미세유체 격리 펜들 상방에 포지셔닝하도록 (예를 들어,틸팅 디바이스 (190) 에 의해)틸팅될 수 있고, 중력은 미세 객체들 및/또는 액적들을 펜들 안으로 이송할 수 있다. 일부 실시형태들에서, DEP 및/또는 OEW 힘들은 다른 힘들 이전에 인가될 수 있다. 다른 실시형태들에서, DEP 및/또는 OEW 힘들은 다른 힘들 이후에 인가될 수 있다. 또 다른 인스턴스들에서, DEP 및/또는 OEW 힘들은 다른 힘들과 동시에 또는 다른 힘들과 교번하는 방식으로 인가될 수 있다.

[0230] 도 1b, 도 1c, 및 도 2a 내지 도 2h 는 본 개시의 실시형태들에서 이용될 수 있는 미세유체 디바이스들의 다양한 실시형태들을 예시한다. 도 1b 는 미세유체 디바이스 (200) 가 광학적으로 작동된 동전기적 디바이스로서 구성되는 실시형태를 묘사한다. 광전자 트위저 (OET) 구성을 갖는 디바이스들 및 광전기습윤 (OEW) 구성을 갖는 디바이스들을 포함하는 다양한 광학적으로 작동된 동전기적 디바이스들이 당업계에 알려져 있다. 적합한 OET 구성들의 예들은 각각이 전부 참조로 본 명세서에 통합되는, 다음의 미국 특허 문헌들에 예시된다: 미국 특허 번호 RE 44,711 (Wu 등) (US 특허 제 7,612,355 호로서 특허됨); 및 US 특허 제 7,956,339 호 (Ohta 등). OEW 구성들의 예들은 미국 특허 제 6,958,132 (Chiou 등) 및 미국 특허 출원 공개 제 2012/0024708호 (Chiou 등) 에 예시되어 있으며, 이들 둘 다는 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다. 광학적으로 작동되는 동전기적 디바

이스의 또 다른 예는 결합된 OET/OEW 구성을 포함하며, 이것의 예들은 미국 특허 공개 제 20150306598 호 (Khandros 등) 및 제20150306599호(Khandros 등)와 그것들의 대응하는 PCT 공개들 W02015/164846호 및 W02015/164847호에서 보여지며, 이들 모두는 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0231] 생물학적 마이크로-객체들이 배치, 배양, 및/또는 모니터링될 수 있는 펜들을 갖는 미세유체 디바이스들의 예들은 예를 들어 US 2014/0116881 (2013년 10월 22일자로 출원된 출원 번호 제 14/060,117 호), US 2015/0151298 (2014년 10월 22일자로 출원된 출원 번호 제 14/520,568 호), 및 US 2015/0165436 (2014년 10월 22일자로 출원된 출원 번호 제 14/521,447 호) 에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조에 의해 여기에 포함된다. 미국 출원 번호들 제 14/520,568 호 및 제 14/521,447 호는 또한 미세유체 디바이스에서 배양된 세포들의 분비물들을 분석하는 예시적인 방법들을 기술한다. 전술한 출원들의 각각은 광전자 트위저들 (OET) 과 같은 유전영동 (DEP) 힘들을 생성하도록 구성되거나 또는 광-전기습윤 (OEW) 을 제공하도록 구성된 미세유체 디바이스들을 추가로 기재하고 있다. 예를 들어, US 2014/0116881 의 도 2 에 도시된 광전 트위저 디바이스는 개개의 생물학적 미세 객체 또는 생물학적 미세 객체들의 그룹을 선택하고 이동시키기 위해 본 개시의 실시형태들에서 이용될 수 있는 디바이스의 예이다.

[0232] **미세유체 디바이스 동기 구성들.** 상기 설명된 바와 같이, 시스템의 제어 및 모니터링 장비는 미세유체 디바이스의 미세유체 회로에서, 미세 객체들 또는 액적들과 같은 객체들을 선택 및 이동시키기 위한 동기 모듈을 포함할 수 있다. 미세유체 디바이스는, 이동되고 있는 객체의 타입 및 다른 고려사항들에 의존하여, 다양한 동기 구성들을 가질 수 있다. 예를 들어, 유전영동 (DEP) 구성은 미세유체 회로에서 미세 객체들을 선택 및 이동시키기 위해 활용될 수 있다. 따라서, 미세유체 디바이스 (100) 의 지지 구조 (104) 및/또는 커버 (110) 는 미세유체 회로 (120) 에서 유체 매질 (180) 내의 미세 객체들 상에 DEP 힘들을 선택적으로 유도하기 위한 DEP 구성을 포함하고 그것에 의하여 개개의 미세 객체들 또는 미세 객체들의 그룹들을 선택, 캡처, 및/또는 이동시킬 수 있다. 대안적으로, 미세유체 디바이스 (100) 의 지지 구조 (104) 및/또는 커버 (110) 는 미세유체 회로 (120) 에서 유체 매질 (180) 내의 액적들 상에 EW 힘들을 선택적으로 유도하기 위한 전기습윤 (EW) 구성을 포함하고, 그것에 의하여 개개의 액적들 또는 액적들의 그룹들을 선택, 캡처, 및/또는 이동시킬 수 있다.

[0233] DEP 구성을 포함하는 미세유체 디바이스 (200) 의 하나의 예가 도 1b 및 도 1c 에 예시된다. 간단성의 목적으로, 도 1b 및 도 1c 는 영역/챔버 (202) 를 갖는 미세유체 디바이스 (200) 의 인클로저 (102) 의 부분의, 각각, 측면면도 및 평면 단면도를 도시하지만, 그 영역/챔버 (202) 는 성장 챔버, 격리 펜, 흐름 영역, 또는 흐름 채널과 같은 더 상세한 구조를 갖는 유체 회로 엘리먼트의 부분일 수도 있다는 것이 이해되어야 한다. 더욱이, 미세유체 디바이스 (200) 는 다른 유체 회로 엘리먼트들을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 미세유체 디바이스 (200) 는, 미세유체 디바이스 (100) 에 대하여 본 명세서에서 설명된 것들과 같은 복수의 성장 챔버들 또는 격리 펜들 및/또는 하나 이상의 흐름 영역들 또는 흐름 채널들을 포함할 수 있다. DEP 구성은 미세유체 디바이스 (200) 의 임의의 이러한 유체 회로 엘리먼트들, 또는 그 선택 부분들에 통합될 수도 있다. 위 또는 아래에 설명된 미세유체 디바이스 컴포넌트들 및 시스템 컴포넌트들 중 임의의 것은 미세유체 디바이스 (200) 에 통합되고 및/또는 그와 결합하여 사용될 수도 있다는 것이 추가로 인식되어야 한다. 예를 들어, 상기 설명된 제어 및 모니터링 장비 (152) 를 포함하는 시스템 (150) 은, 매질 모듈 (160), 동기 모듈 (162), 이미징 모듈 (164), 틸팅 모듈 (166), 및 다른 모듈들 (168) 중 하나 이상을 포함하는 미세유체 디바이스 (200) 와 함께 사용될 수도 있다.

[0234] 도 1b 에서 알 수 있는 바와 같이, 미세유체 디바이스 (200) 는 하단 전극 (204) 및 하단 전극 (204) 위에 있는 전극 활성화 기관 (206) 을 갖는 지지 구조 (104), 및 하단 전극 (204) 으로부터 이격된 상단 전극 (210) 을 갖는 커버 (110) 를 포함한다. 상단 전극 (210) 및 전극 활성화 기관 (206) 은 영역/챔버 (202) 의 대향 표면들을 정의한다. 영역/챔버 (202) 에 포함된 매질 (180) 는 따라서, 상단 전극 (210) 과 전극 활성화 기관 (206) 간의 저항성 접촉을 제공한다. 하단 전극 (204) 및 상단 전극 (210) 에 접촉되고 영역/챔버 (202) 에서 DEP 힘들의 생성에 필요한 바와 같은 전극들 간의 바이어싱 전압을 생성하도록 구성된 전원 (212) 이 또한 도시된다. 전원 (212) 은, 예를 들어 교류 (AC) 전원일 수 있다.

[0235] 특정 실시형태들에서, 도 1b 및 도 1c 에 예시된 미세유체 디바이스 (200) 는 광학적으로-작동된 DEP 구성을 가질 수 있다. 따라서, 동기 모듈 (162) 에 의해 제어될 수도 있는 광원 (216) 으로부터의 광 (218) 의 패턴들을 변경하는 것은 전극 활성화 기관 (206) 의 내측 면 (208) 의 영역들 (214) 에서 DEP 전극들의 패턴들을 변경하는 것을 선택적으로 활성화 및 비활성화할 수 있다. (이하에서, DEP 구성을 갖는 미세유체 디바이스의 영역들 (214) 은 "DEP 전극 영역들" 로서 지칭된다). 도 1c 에 예시된 바와 같이, 전극 활성화 기관 (206) 의 내측 면 (208) 위로 지향된 광 패턴 (218) 은 정사각형과 같은 패턴으로 DEP 전극 영역들 (214a)(화이트로 도시됨) 을

선택적으로 조명할 수 있다. 비-조명된 DEP 전극 영역들 (214)(십자-해칭됨)은 "어두운" DEP 전극 영역들 (214)로서 이하에서 지칭된다. DEP 전극 활성화 기관 (206)을 통한 (즉, 하부 전극 (204)으로부터 흐름 영역 (106)에서 매질 (180)와 인터페이스하는 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)까지의) 상대적인 전기적 임피던스는 각각의 어두운 DEP 전극 영역 (214)에서 영역/챔버 (202)내의 매질 (180)를 통한 (즉, 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)으로부터 커버 (110)의 상단 전극 (210)까지의) 상대적 전기적 임피던스보다 더 크다. 그러나, 조명된 DEP 전극 영역 (214a)은, 각각의 조명된 DEP 전극 영역 (214a)에서 영역/챔버 (202)내의 매질 (180)를 통한 상대적 임피던스보다 작은 전극 활성화 기관 (206)을 통한 감소된 상대적 임피던스를 보인다.

[0236] 전원 (212)이 활성화됨에 따라, 상기 DEP 구성은 조명된 DEP 전극 영역들 (214a)과 인접한 어두운 DEP 전극 영역들 (214)사이의 유체 매질 (180)에서 전계 구배를 생성하고, 이것은 이어서 유체 매질 (180)에서 부근의 마이크로-객체들 (미도시)을 끌어당기거나 밀어내는 로컬 DEP 힘들을 생성한다. 유체 매질 (180)내의 마이크로-객체들을 끌어당기거나 밀어내는 DEP 전극들은 따라서, 광원 (216)으로부터 미세유체 디바이스 (200)로 프로젝팅된 광 패턴들 (218)을 변경함으로써 영역/챔버 (202)의 내측면 (208)에서 많은 상이한 이러한 DEP 전극 영역들 (214)에서 선택적으로 활성화 및 비활성화될 수 있다. DEP 힘들이 부근의 마이크로-객체들을 끌어당기거나 밀어내는지 여부는, 매질 (180) 및/또는 마이크로-객체들 (미도시)의 유전 특성들 및 전원 (212)의 주파수와 같은 이러한 파라미터들에 의존할 수 있다.

[0237] 도 1c에 예시된 조명된 DEP 전극 영역들 (214a)의 정사각형 패턴 (220)은 단지 일 예이다. DEP 전극 영역들 (214)의 임의의 패턴이 미세유체 디바이스 (200)로 프로젝팅된 광의 패턴 (218)에 의해 조명 (및 이에 의해 활성화)될 수 있고, 조명된/활성화된 DEP 전극 영역들 (214)의 패턴은 광 패턴 (218)을 변경 또는 이동시킴으로써 반복적으로 변경될 수 있다.

[0238] 일부 실시형태들에서, 전극 활성화 기관 (206)은 광전도성 재료를 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 이러한 실시형태들에서, 전극 활성화 기관 (206)의 내부 표면 (208)은 피처리스 (featureless)일 수 있다. 예를 들어, 전극 활성화 기관 (206)은 수소화된 비정질 실리콘 (a-Si:H)의 층을 포함하거나 또는 이로 이루어질 수 있다. a-Si:H는, 예를 들어 약 8% 내지 40% 수소 ($100 \times$ 수소 원자들의 수 / 수소 및 실리콘 원자들의 총 수로서 계산됨)를 포함할 수 있다. a-Si:H의 층은 약 500 nm 내지 약 2.0 μ m의 두께를 가질 수 있다. 이러한 실시형태들에서, DEP 전극 영역들 (214)은 광 패턴 (218)에 따라, 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)상에 임의의 패턴으로 그리고 어디든 생성될 수 있다. 따라서, DEP 전극 영역들 (214)의 패턴 및 수는 고정될 필요가 없고, 광 패턴 (218)에 대응할 수 있다. 상기 논의된 바와 같은 광전도성 층을 포함하는 DEP 구성을 갖는 미세유체 디바이스들의 예들은, 예를 들어, 미국 특허 RE 44,711 (Wu 등) (미국 특허 제 7,612,355 호로서 최초 발행됨)에 기재되어 있고, 그 출원들의 전체 내용들은 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0239] 다른 실시형태들에서, 전극 활성화 기관 (206)은 복수의 도핑된 층들, 전기 절연 층들 (또는 영역들), 및 반도체 분야들에서 알려진 바와 같은 반도체 집적 회로들을 형성하는 전기 전도성 층들을 포함하는 기관을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전극 활성화 기관 (206)은 예를 들어, 측방향 바이폴라 포토트랜지스터들을 포함하는 복수의 포토트랜지스터들을 포함할 수 있고, 각각의 포토트랜지스터는 DEP 전극 영역 (214)에 대응한다. 대안으로, 전극 활성화 기관 (206)은 포토레지스터 스위치들에 의해 제어된 전극들 (예를 들어, 전도성 금속 전극들)을 포함할 수 있고, 각각의 이러한 전극은 DEP 전극 영역 (214)에 대응한다. 전극 활성화 기관 (206)은 이러한 포토레지스터들 또는 포토레지스터-제어된 전극들의 패턴을 포함할 수 있다. 패턴은, 예를 들어 도 2b에 도시된 바와 같이 행들 및 열들로 배열된 실질적으로 정사각형의 포토레지스터들 또는 포토레지스터-제어된 전극들의 어레이일 수 있다. 대안으로, 패턴은 육각형 격자를 형성하는 실질적으로 육각의 포토레지스터들 또는 포토레지스터-제어된 전극들의 어레이일 수 있다. 패턴에 관계없이, 전기 회로 엘리먼트들은 하단 전극 (210)과 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)에서의 DEP 전극 영역들 (214)간의 전기적 접촉들을 형성할 수 있고, 이들 전기적 접촉들 (즉, 포토레지스터들 또는 전극들)은 광 패턴 (218)에 의해 선택적으로 활성화 및 비활성화될 수 있다. 활성화되지 않은 경우, 각각의 전기적 접촉은, 전극 활성화 기관 (206)을 통한 (즉, 하단 전극 (204)으로부터 영역/챔버 (202)에서 매질 (180)와 인터페이스하는 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)까지의) 상대적 임피던스가 대응하는 DEP 전극 영역 (214)에서 매질 (180)를 통한 (즉, 전극 활성화 기관 (206)의 내측면 (208)으로부터 커버 (110)의 상단 전극 (210)까지의) 상대적 임피던스보다 더 크도록 높은 임피던스를 가질 수 있다. 그러나 광 패턴 (218)에서 광에 의해 활성화되는 경우, 전극 활성화 기관 (206)을 통한 상대적 임피던스는 각각의 조명된 DEP 전극 영역 (214)에서 매질 (180)를 통한 상대적 임피던스보다 더 작고, 이에 의해 위에서 논의된 바와 같이 대응하는 DEP 전극 영역 (214)에서 DEP 전극을 활성화시

킨다. 따라서, 매질 (180) 내의 마이크로-객체들 (미도시) 을 끌어당기거나 밀어내는 DEP 전극들은 광 패턴 (218) 에 의해 결정된 방식으로 영역/챔버 (202) 의 전극 활성화 기관 (206) 의 내측 면 (208) 에서 많은 상이한 DEP 전극 영역들 (214) 에서 선택적으로 활성화 및 비활성화될 수 있다.

[0240] 포토트랜지스터들을 포함하는 전극 활성화 기관들을 갖는 미세유체 디바이스들의 예들은, 예를 들어 미국 특허 제7,956,339 (Ohta 등) (예를 들어, 도 21 및 도 22 에 예시된 디바이스 (300), 및 그 설명들을 참조) 에 기재되어 있고, 그 전체 내용들은 참조로 본 명세서에 통합된다. 포토레지스터 스위치들에 의해 제어된 전극들을 포함하는 전극 활성화 기관들을 갖는 미세유체 디바이스들의 예들은, 예를 들어 미국 특허공개 제 2014/0124370 (Short 등) (예를 들어, 도면들 전체에 예시된 디바이스들 (200, 400, 500, 600, 및 900) 및 그 설명들을 참조) 에서 설명되어 있고, 그 전체 내용들은 참조로서 본원에 포함된다.

[0241] DEP 구성된 미세유체 디바이스의 일부 실시형태들에서, 상단 전극 (210) 은 인클로저 (102) 의 제 1 벽 (또는 커버 (110)) 의 부분이고, 전극 활성화 기관 (206) 및 하단 전극 (204) 은 인클로저 (102) 의 제 2 벽 (또는 지지 구조 (104)) 의 부분이다. 영역/챔버 (202) 는 제 1 벽과 제 2 벽 사이에 있을 수 있다. 다른 실시형태들에서, 전극 (210) 은 제 2 벽 (또는 지지 구조 (104)) 의 일부이고, 전극 활성화 기관 (206) 및/또는 전극 (210) 중 하나 또는 양자 모두는 제 1 벽 (또는 커버 (110)) 의 일부이다. 더욱이, 광원 (216) 은 대안적으로 아래로부터 인클로저 (102) 를 조명하는데 사용될 수 있다.

[0242] DEP 구성을 갖는 도 1b 및 도 1c 의 미세유체 디바이스 (200) 로, 동기 모듈 (162) 은, 마이크로-객체를 둘러싸고 캡처하는 패턴 (예를 들어, 정사각형 패턴 (220)) 에서 전극 활성화 기관 (206) 의 내측 면 (208) 의 DEP 전극 영역들 (214a) 에서 하나 이상의 DEP 전극들의 제 1 세트를 활성화시키도록 광 패턴 (218) 을 미세유체 디바이스 (200) 로 프로젝팅함으로써 영역/챔버 (202) 내의 매질 (180) 에서 마이크로-객체 (미도시) 를 선택할 수 있다. 동기 모듈 (162) 은 그 후, DEP 전극 영역들 (214) 에서 하나 이상의 DEP 전극들의 제 2 세트를 활성화시키도록 미세유체 디바이스 (200) 에 대해 광 패턴 (218) 을 이동시킴으로써 인 시츄 생성된 캡처된 미세 객체를 이동시킬 수 있다. 대안적으로, 미세유체 디바이스 (200) 는 광 패턴 (218) 에 대해 이동될 수 있다.

[0243] 다른 실시형태들에서, 미세유체 디바이스(200)는 전극 활성화 기관(206)의 내부 표면(208)에서 DEP 전극들의 광 활성화에 의존하지 않는 DEP 구성을 가질 수 있다. 예를 들어, 전극 활성화 기관 (206) 은 적어도 하나의 전극을 포함하는 표면 (예를 들어, 커버 (110)) 의 반대편에 위치한 선택적으로 어드레싱 가능 및 에너지אי징 가능한 전극들을 포함할 수 있다. 스위치들 (예를 들어, 반도체 기관에서의 트랜지스터 스위치들) 은 DEP 전극 영역들 (214) 에서 DEP 전극들을 활성화 또는 비활성화시키도록 선택적으로 개방 및 폐쇄될 수도 있고, 이에 의해 활성화된 DEP 전극들 근처에서 영역/챔버 (202) 내의 마이크로-객체 (미도시) 상에 순 (net) DEP 힘을 생성한다. 영역/챔버 (202) 에서 마이크로-객체들 및/또는 매질 (미도시) 의 유전 특성들 및 전원 (212) 의 주파수와 같은 이러한 특징들에 따라, DEP 힘은 부근의 마이크로-객체를 끌어당기거나 밀어낼 수 있다. (예를 들어, 정사각형 패턴 (220) 을 형성하는 DEP 전극 영역들 (214) 의 세트에서) DEP 전극들의 세트를 선택적으로 활성화 및 비활성화시킴으로써, 영역/챔버 (202) 내의 하나 이상의 마이크로-객체들은 영역/챔버 (202) 내에서 트랩 및 이동될 수 있다. 도 1a 에서의 동기 모듈 (162) 은 이러한 스위치들을 제어하고, 따라서 영역/챔버 (202) 주변의 특정한 마이크로-객체들 (미도시) 을 선택, 트랩, 및 이동시키도록 DEP 전극들 중 개별의 전극들을 활성화 및 비활성화시킬 수 있다. 선택적으로 어드레싱 가능 및 에너지אי징 가능한 전극들을 포함하는 DEP 구성을 갖는 미세유체 디바이스들은 당해 분야에서 알려져 있고, 예를 들어 미국특허 제6,294,063호(Becker 등) 및 제6,942,776호(Medoro)에서 설명되어 있고, 그 전체 내용들은 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0244] 또 다른 예로서, 미세유체 디바이스(200)는 전기습윤(EW) 구성을 가질 수 있으며, 이것은 DEP 구성 대신일 수 있거나 또는 DEP 구성을 갖는 부분으로부터 분리된 미세유체 디바이스(200)의 부분에 위치될 수 있다. EW 구성은 광-전기습윤 구성 또는 유전체 상 전기습윤(electrowetting on dielectric, EWOD)구성일 수도 있으며, 이들 둘 다는 본 기술분야에서 알려져 있다. 일부 EW 구성들에서, 지지 구조(104)는 유전체층(미도시)과 하부 전극 (204) 사이에 샌드위치된 전극 활성화 기관(206)을 갖는다. 유전체 층은 이하에서 설명된 바와 같이, 소수성 재료 (hydrophobic material) 를 포함할 수 있고 및/또는 소수성 재료로 코팅될 수 있다. EW 구성을 갖는 미세유체 디바이스들(200)의 경우, 지지 구조(104)의 내부 표면(208)은 유전체층의 내부 표면 또는 그것의 소수성 코팅이다.

[0245] 유전체층(미도시)은 하나 이상의 산화물 층들을 포함할 수 있고, 약 50 nm 내지 약 250 nm(예컨대, 약 125 nm 내지 약 175 nm)의 두께를 가질 수 있다. 특정 실시형태들에서, 유전체층은 금속 산화물 (예를 들어, 알루미늄 산화물 또는 하프늄 산화물) 과 같은 산화물의 층을 포함할 수도 있다. 특정 실시형태들에서, 유전체층은 실리

콘 산화물 또는 질화물과 같은, 금속 산화물 이외의 유전체 재료를 포함할 수 있다. 정확한 조성 및 두께에 관계 없이, 유전체층은 약 10 kOhms 내지 약 50 kOhms의 임피던스를 가질 수 있다.

[0246] 일부 실시형태들에서, 영역/채널 (202)를 향해 내부로 마주하는 유전체층의 표면은 소수성 재료로 코팅된다. 소수성 재료는 예를 들어 플루오리네이티드 카본 분자들을 포함할 수 있다. 플루오리네이티드 카본 분자들의 예들은 폴리테트라플루오로에틸렌 (예를 들어, TEFLON® 또는 폴리(2,3-디플루오로메틸렌일-퍼플루오로테트라하이드로퓨란) (예를 들어, CYTOP™)과 같은 퍼플루오로-폴리머들을 포함한다. 소수성 재료를 구성하는 분자들은 유전체층의 표면에 공유결합될 수 있다. 예를 들어, 소수성 재료의 분자들은 실록산 기, 포스포산 기, 또는 티올 기와 같은 연결자에 의해 유전체층의 표면에 공유결합될 수 있다. 따라서, 일부 실시형태들에서, 소수성 재료는 알킬-말단 실록산, 알킬-말단 포스포산, 또는 알킬-말단 티올을 포함할 수 있다. 알킬 기는 (예컨대, 적어도 10개의 탄소들, 또는 적어도 16, 18, 20, 22개 또는 그 이상의 탄소들의 사슬을 갖는) 긴-사슬 탄화수소들일 수 있다. 대안적으로, 플루오리네이티드 (또는, 퍼플루오리네이티드) 카본 사슬들이 알킬 기들을 대신하여 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 소수성 재료는 플루오로알킬-말단 실록산, 플루오로알킬-말단 포스포산, 또는 플루오로알킬-말단 티올을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 소수성 코팅은 약 10 nm 내지 약 50 nm의 두께를 갖는다. 다른 실시형태들에서, 소수성 코팅은 10 nm 미만 (예를 들어, 5 nm 미만, 또는 약 1.5 내지 3.0 nm)의 두께를 갖는다.

[0247] 일부 실시형태들에서, 전기습윤 구성을 갖는 미세유체 디바이스 (200)의 커버 (110)는 마찬가지로 소수성 재료 (미도시)로 코팅된다. 소수성 재료는 지지 구조 (104)의 유전체층을 코팅하기 위해 사용되는 동일한 소수성 재료일 수 있고, 소수성 코팅은 지지 구조 (104)의 유전체층상의 소수성 코팅의 두께와 실질적으로 동일한 두께를 가질 수 있다. 게다가, 커버 (110)는 지지 구조 (104)의 방식으로, 유전체층과 상부 전극 (210) 사이에 샌드위치된 전극 활성화 기관 (206)을 포함할 수 있다. 커버 (110)의 전극 활성화 기관 (206) 및 유전체층은 지지 구조 (104)의 전극 활성화 기관 (206) 및 유전체층과 동일한 조성 및/또는 치수들을 가질 수 있다. 따라서, 미세유체 디바이스 (200)는 2개의 전기습윤 표면들을 가질 수 있다.

[0248] 일부 실시형태들에서, 전극 활성화 기관 (206)은 상술된 바와 같은 광도전 재료를 포함할 수 있다. 이에 따라, 특정 실시형태들에서, 전극 활성화 기관 (206)은 수소화 비정질 실리콘 (a-Si:H)의 층을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. a-Si:H는, 예를 들어 (100 * 수소 원자들의 수/수소 및 실리콘 원자들의 총 수로서 계산된) 약 8% 내지 40% 수소를 포함할 수 있다. a-Si:H의 층은 약 500 nm 내지 약 2.0 μm의 두께를 가질 수 있다. 대안적으로, 전극 활성화 기관 (206)은 상술된 바와 같이 포토트랜지스터 스위치들에 의해 제어되는 전극들 (예를 들어, 도전성 금속 전극들)을 포함할 수 있다. 광-전기습윤 구성을 갖는 미세유체 디바이스들은 본 기술에서 알려져 있고 및/또는 본 기술에서 알려져 있는 전극 활성화 기관들로 구성될 수 있다. 예를 들어, 그 전체 내용들이 참조로 본 명세서에 포함되는 미국 특허 제6,958,132호(Chiou 등)는 a-Si:H와 같은 광도전성 재료를 갖는 광-전기습윤 구성들을 개시하는 반면, 위에서 참조된 미국 특허 공개 제2014/0124370호(Short 등)는 포토트랜지스터 스위치들에 의해 제어되는 전극들을 갖는 전극 활성화 기관들을 개시한다.

[0249] 따라서, 미세유체 디바이스 (200)는 광-전기습윤 구성을 가질 수 있고, 광 패턴들 (218)은 전극 활성화 기관 (206)에서의 광도전성 EW 영역들 또는 광응답성 EW 전극들을 활성화하기 위해 사용될 수 있다. 전극 활성화 기관 (206)의 그러한 활성화된 EW 영역들 또는 EW 전극들은 지지 구조 (104)의 내부 표면 (208) (즉, 오버레이잉 유전체층 또는 그것의 소수성 코팅의 내부 표면)에서 전기습윤력을 생성할 수 있다. 전극 활성화 기관 (206)상에 입사하는 광 패턴들 (218)을 변경함으로써 (또는 광원 (216)에 대해 미세유체 디바이스 (200)를 이동시킴으로써), 지지 구조 (104)의 내부 표면 (208)과 접촉하는 (예를 들어, 수성 매질, 용액, 또는 용매를 포함하는) 액적들이 영역/채널 (202)에 존재하는 비혼성 유체 (예를 들어, 오일 매질)를 통해 이동될 수 있다.

[0250] 다른 실시형태들에서, 미세유체 디바이스들 (200)은 EWOD 구성을 가질 수 있고, 전극 활성화 기관 (206)은 활성화를 위해 광에 의존하지 않는 선택적으로 어드레싱가능한 및 에너지이징가능한 전극들을 포함할 수 있다. 전극 활성화 기관 (206)은 따라서 그러한 전기습윤 (EW) 전극들의 패턴을 포함할 수 있다. 그 패턴은 예를 들어 도 2b에 도시된 바와 같은 열들 및 행들로 배열된 실질적으로 정사각형 EW 전극들의 어레이일 수 있다. 대안적으로, 패턴은 육각형 격자를 형성하는 실질적으로 육각형 EW 전극들의 어레이일 수 있다. 패턴에 관계없이, EW 전극들은 전기 스위치들(예컨대, 반도체 기관 내의 트랜지스터 스위치들)에 의해 선택적으로 활성화(또는 비활성화)될 수 있다. 전극 활성화 기관 (206)내의 EW 전극들을 선택적으로 활성화 및 활성화해제함으로써, 오버레이잉 유전체층 또는 그것의 소수성 코팅의 내부 표면 (208)과 접촉하는 액적들 (미도시)은 영

역/챔버 (202) 내에서 이동될 수 있다. 도 1a 에서의 동기 모듈 (162) 은 그러한 스위치들을 제어할 수 있고 따라서 영역/챔버 (202) 주위의 특성의 액적들을 선택하고 이동시키기 위해 개개의 EW 전극들을 활성화 및 비활성화할 수 있다. 선택적으로 어드레싱가능한 및 에너지이징가능한 전극들을 갖는 EWOD 구성을 갖는 미세유체 디바이스들은 본 기술분야에서 알려져 있고 예를 들어 미국 특허 제 8,685,344 호(Sundarsan 등)에 기술되었으며, 이것의 전체 내용들은 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0251] 미세유체 디바이스(200)의 구성에 관계없이, 전원(212)은 미세유체 디바이스(200)의 전기 회로들에 전력을 공급하는 전위(예컨대, AC 전압 전위)를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 전원(212)은 도 1에서 참조되는 전원(192)과 동일하거나, 그 전원의 컴포넌트일 수 있다. 전원(212)은 상부 전극(210)및 하부 전극(204)에 AC 전압 및/또는 전류를 제공하도록 구성될 수 있다. AC 전압의 경우, 전원(212)은 위에서 논의된 바와 같이 영역/챔버 (202) 내에서 개개의 미세 물체들(미도시)을 트랩하고 이동시키며, 및/또는 또한 위에서 논의된 바와 같이 영역/챔버(202)에서 지지 구조(104)(예컨대, 유전체층 및/또는 유전체층상의 소수성 코팅)의 내부 표면(208)의 습윤 특성들을 변경하기에 충분히 강한 네트 DEP 힘들(또는 습윤력들)을 발생시키기에 충분한 주파수 범위 및 평균 또는 피크 전력(예컨대, 전압 또는 전류) 범위를 제공할 수 있다. 그러한 주파수 범위들 및 평균 또는 피크 전력 범위들은 본 기술분야에서 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,958,132 (Chiou 등), 미국 특허 번호 RE44,711 (Wu 등) 참조 예를 들어, 미국 특허 제 6,958,132 호 (Chiou et al.), 미국 특허 제 RE44,711 호 (Wu et al.) (미국특허 제 7,612,355 호로서 이슈됨), 및 미국 특허 출원 공개 US2014/0124370 호 (Short 등), US2015/0306598 호 (Khandros 등) 및 US2015/0306599 호 (Khandros 등) 를 참조한다.

[0252] **격리 펜들.** 일반적인 격리 펜들 (224, 226, 및 228) 의 비-한정적 예들은 도 2a 내지 도 2c 에 묘사된 미세유체 디바이스 (230) 내에 도시된다. 각각의 격리 펜 (224, 226, 및 228) 는 격리 영역 (240) 및 격리 영역 (240) 을 채널 (122) 에 유체적으로 접속시키는 접속 영역 (236) 을 정의하는 고립 구조 (232) 를 포함할 수 있다. 접속 영역 (236) 은 미세유체 채널 (122) 로의 근위 개구 (234) 및 격리 영역 (240) 으로의 원위 개구 (238) 를 포함할 수 있다. 접속 영역 (236) 은, 미세유체 채널 (122) 로부터 격리 펜 (224, 226, 228) 안으로 흐르는 유체 매질 (미도시) 의 흐름의 최대 침투 깊이가 격리 영역 (240) 안으로 확장하지 않도록 구성될 수 있다. 따라서, 접속 영역 (236) 으로 인해, 격리 펜 (224, 226, 228) 의 격리 영역 (240) 에 배치된 마이크로-객체 (미도시) 또는 다른 재료 (미도시) 는 미세유체 채널 (122) 에서의 매질 (180) 의 흐름으로부터 고립될 수 있고, 실질적으로 이에 의해 영향을 받지 않는다.

[0253] 도 2a 내지 도 2c 의 격리 펜들 (224, 226, 및 228) 은 각각 미세유체 채널 (122) 로 직접적으로 개방되는 단일의 개구를 가진다. 격리 펜의 개구는 미세유체 채널 (122) 로부터 횡방향으로 개방된다. 전극 활성화 기관 (206) 은 양자의 미세유체 채널 (122) 및 격리 펜들 (224, 226, 및 228) 의 아래에 놓인다. 격리 펜의 바닥을 형성하는, 격리 펜의 인클로저 내의 전극 활성화 기관 (206) 의 상부 표면은 미세유체 디바이스의 흐름 채널 (또는 각각, 흐름 영역) 의 바닥을 형성하는, 미세유체 채널 (122) (또는 채널이 존재하지 않는 경우 흐름 영역) 내의 전극 활성화 기관 (206) 의 상부 표면의 동일한 레벨 또는 실질적으로 동일한 레벨에 배치된다. 전극 활성화 기관 (206) 은 특징부가 없을 수도 있거나, 약 3 마이크로, 2.5 마이크로, 2 마이크로, 1.5 마이크로, 1 마이크로, 0.9 마이크로, 0.5 마이크로, 0.4 마이크로, 0.2 마이크로, 0.1 마이크로, 또는 그 미만의 것보다 더 작은 것만큼 그 최고 상승부 (elevation) 로부터 그 최저 침하 (depression) 까지 변동되는 불규칙적인 또는 패터화된 표면을 가질 수도 있다. 미세유체 채널 (122) (또는 흐름 영역) 과 격리 펜들 양자 모두에 걸친 기관의 상부 표면에서의 상승부의 변화는 격리 펜의 벽들 또는 미세유체 디바이스의 벽들의 높이의 약 3%, 2%, 1%, 0.9%, 0.8%, 0.5%, 0.3% 또는 0.1% 미만일 수도 있다. 미세유체 디바이스 (200) 에 대해 상세히 설명되지만, 이것은 또한 여기에 기술된 미세유체 디바이스들 (100, 230, 250, 280, 290) 중 임의의 것에 적용된다.

[0254] 미세유체 채널 (122) 은 이에 따라, 스윕된 영역의 예일 수 있고, 격리 펜들 (224, 226, 228) 의 격리 영역들 (240) 은 스윕되지 않은 영역들의 예들일 수 있다. 언급된 바와 같이, 미세유체 채널 (122) 및 격리 펜들 (224, 226, 228) 은 하나 이상의 유체 매질들 (180) 을 함유하도록 구성될 수 있다. 도 2a 내지 도 2b 에서 도시된 예에서, 포트들 (222) 은 미세유체 채널 (122) 에 접속되고, 유체 매질 (180) 이 미세유체 디바이스 (230) 로 도입되거나 미세유체 디바이스 (230) 로부터 제거되는 것을 허용한다. 유체 매질 (180) 의 도입 전에, 미세유체 디바이스는 이산화탄소 기체와 같은 기체로 프라이밍될 수도 있다. 일단 미세유체 디바이스 (230) 가 유체 매질 (180) 을 함유하면, 미세유체 채널 (122) 에서의 유체 매질 (180) 의 유동 (242) 은 선택적으로 생성될 수 있고 정지될 수 있다. 예를 들어, 도시된 바와 같이 포트들 (222) 은 미세유체 채널 (122) 의 상이한 로케이션들 (예를 들어, 반대편 단부들) 에 배치될 수 있고, 매질의 흐름 (242) 은 인렛로서 기능하는 하나의 포트

(222)로부터 아웃렛으로서 기능하는 다른 포트 (222)로 생성될 수 있다.

[0255] 도 2c는 본 개시에 따른 격리 챔 (224)의 일 예의 상세 뷰를 예시한다. 미세 객체들 (246)의 예들이 또한 도시된다.

[0256] 알려진 바와 같이, 격리 챔 (224)의 근위 개구 (234)를 지나 미세유체 채널 (122)에서의 유체 매질 (180)의 흐름 (242)은 격리 챔 (224)의 안 및/또는 밖으로의 매질 (180)의 이차적 흐름 (244)을 야기할 수 있다. 격리 챔 (224)의 격리 영역 (240)에서 마이크로-객체들 (246)을 이차적 흐름 (244)으로부터 고립시키기 위해, (즉, 근위 개구 (234)로부터 원위 개구 (238)로의) 격리 챔버 (224)의 접속 영역 (236)의 길이 (L_{con})는 이차적 흐름 (244)의 접속 영역 (236) 안으로의 침투 깊이 (D_p)보다 커야 한다. 이차적인 유동 (244)의 침투 깊이 D_p 는 미세유체 채널 (122)에서 유동하는 유체 매질 (180)의 속도 (velocity)와, 미세유체 채널 (122) 및 미세유체 채널 (122)로의 접속 영역 (236)의 근위 개구 (234)의 구성에 관련되는 다양한 파라미터들에 종속된다. 소정의 미세유체 디바이스에 대하여, 미세유체 채널 (122) 및 개구 (234)의 구성들은 고정될 것인데 반해, 미세유체 채널 (122)에서의 유체 매질 (180)의 유동 (242)의 레이트는 가변적일 것이다. 이에 따라서, 각각의 격리 챔버 (224)에 대해, 채널 (122)에서 유체 매질 (180)의 흐름 (242)에 대한 최대 속도 (V_{max})는, 세컨더리 흐름 (244)의 침투 깊이 (D_p)가 접속 영역 (236)의 길이 (L_{con})를 초과하지 않는 것을 보장하도록 식별될 수 있다. 미세유체 채널 (122)에서의 유체 매질 (180)의 유동 (242)의 레이트가 최대 속도 V_{max} 를 초과하지 않는 한, 결과적인 이차적인 유동 (244)은 미세유체 채널 (122) 및 접속 영역 (236)으로 제한될 수 있고, 격리 영역 (240)의 외부에서 유지될 수 있다. 미세유체 채널 (122)에서 매질 (180)의 흐름 (242)은 따라서, 미세 객체들 (246)을 격리 영역 (240) 밖으로 인출하지 않을 것이다. 차라리, 격리 영역 (240)에 위치한 미세 객체들 (246)은 미세유체 채널 (122)에서 유체 매질 (180)의 흐름 (242)에 관계없이 격리 영역 (240)에 머무를 것이다.

[0257] 또한, 미세유체 채널 (122)에서의 매질 (180)의 유동 (242)의 레이트가 V_{max} 를 초과하지 않는 한, 미세유체 채널 (122)에서의 유체 매질 (180)의 유동 (242)은 미세유체 채널 (122)로부터 격리 챔 (224)의 격리 영역 (240)으로 잡다한 입자들 (예컨대, 미세입자들 및/또는 나노입자들)을 이동시키지 않을 것이다. 따라서, 접속 영역 (236)의 길이 (L_{con})가 세컨더리 흐름 (244)의 최대 침투 깊이 (D_p)보다 더 큰 것은 미세유체 채널 (122) 또는 다른 격리 챔버 (예를 들어, 도 2d에서 격리 챔들 (226, 228))로부터의 잡다한 입자들로 하나의 격리 챔 (224)의 오염을 방지할 수 있다.

[0258] 미세유체 채널 (122) 및 격리 챔들 (224, 226, 228)의 접속 영역들 (236)이 미세유체 채널 (122)에서의 매질 (180)의 유동 (242)에 의해 영향을 받을 수 있으므로, 미세유체 채널 (122) 및 접속 영역들 (236)은 미세유체 디바이스 (230)의 스위칭된 (또는 유동) 영역들로 간주될 수 있다. 한편, 격리 챔들 (224, 226, 228)의 격리 영역들 (240)은, 비스위칭된 (또는 비-흐름) 영역들로 간주될 수 있다. 예를 들어, 미세유체 채널 (122)에서의 제 1 유체 매질 (180)에서의 컴포넌트들 (도시되지 않음)은 미세유체 채널 (122)로부터 접속 영역 (236)을 통해 그리고 격리 영역 (240)에서의 제 2 유체 매질 (248)로의 제 1 매질 (180)의 컴포넌트들의 확산에 의해서만 실질적으로, 격리 영역 (240)에서의 제 2 유체 매질 (248)과 혼합할 수 있다. 유사하게, 격리 영역 (240)에서의 제 2 매질 (248)의 컴포넌트들 (도시되지 않음)은 격리 영역 (240)으로부터 접속 영역 (236)을 통해 그리고 미세유체 채널 (122)에서의 제 1 매질 (180)로의 제 2 매질 (248)의 컴포넌트들의 확산에 의해서만 실질적으로, 미세유체 채널 (122)에서의 제 1 매질 (180)과 혼합할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 확산에 의한 격리 챔의 단리 영역과 유동 영역 사이의 유체 매질 교환의 정도는 유체 교환의 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%보다 더 크거나 약 99%보다 더 크다. 제 1 매질 (180)은 제 2 매질 (248)과 동일한 매질이거나 또는 상이한 매질일 수 있다. 또한, 제 1 매질 (180) 및 제 2 매질 (248)는 동일하게 시작하고, 그 후 (예를 들어, 격리 영역 (240)에서 하나 이상의 세포들에 의해 제 2 매질 (248)의 컨디셔닝을 통해, 또는 미세유체 채널 (122)을 통해 흐르는 매질 (180)를 변경함으로써) 상이하게 될 수 있다.

[0259] 미세유체 채널 (122)에서의 유체 매질 (180)의 유동 (242)에 의해 야기된 이차적인 유동 (244)의 최대 침투 깊이 D_p 는 위에서 언급된 바와 같이, 다수의 파라미터들에 종속될 수 있다. 이러한 파라미터들의 예들은: 미세유체 채널 (122)의 형상 (예를 들어, 미세유체 채널은 접속 영역 (236) 안으로 매질을 지향시키고, 접속 영역 (236)으로부터 멀리 매질을 전환시키고, 또는 접속 영역 (236)의 근위 개구 (234)에 실질적으로 수직한 방향에서 매질을 미세유체 채널 (122)로 지향시킬 수 있음); 근위 개구 (234)에서 미세유체 채널 (122)의 폭

(Wch)(또는 단면적); 및 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon)(또는 단면적); 미세유체 채널 (122) 에서 유체 매질 (180) 의 흐름 (242) 의 속도 (V); 제 1 매질 (180) 및/또는 제 2 매질 (248) 의 속도 등을 포함한다.

[0260] 일부 실시형태들에서, 미세유체 채널 (122) 및 격리 펜들 (224, 226, 228) 의 치수들은 미세유체 채널 (122) 에서 유체 매질 (180) 의 흐름 (242) 의 벡터에 대하여 다음과 같이 배향될 수 있다: 미세유체 채널 폭 (Wch)(또는 미세유체 채널 (122) 의 단면적) 은 매질 (180) 의 흐름 (242) 에 실질적으로 수직할 수 있다; 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon)(또는 단면적) 은 미세유체 채널 (122) 에서의 매질 (180) 의 흐름 (242) 에 실질적으로 평행할 수 있다; 및/또는 접속 영역의 길이 (Lcon) 는 미세유체 채널 (122) 에서 매질 (180) 의 흐름 (242) 에 실질적으로 수직할 수 있다. 상기한 것은 오직 예들이고, 미세유체 채널 (122) 및 격리 펜들 (224, 226, 228) 의 상대적인 위치는 서로에 대하여 다른 배향들로 되어 있을 수 있다.

[0261] 도 2c 에 예시된 바와 같이, 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 은 근위 개구 (234) 로부터 원위 개구 (238) 까지 균일할 수 있다. 따라서, 원위 개구 (238) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 은 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 에 대해 본원에 식별된 값들 중 어느 하나일 수 있다. 대안으로, 원위 개구 (238) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 은 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 보다 더 클 수 있다.

[0262] 도 2c에 예시된 바와 같이, 원위 개구(238)에서의 격리 영역(240)의 폭은 근위 개구(234)에서 연결 영역(236)의 폭(Wcon)과 실질적으로 동일할 수 있다. 원위 개구 (238) 에서 격리 영역 (240) 의 폭은 따라서, 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 에 대해 본원에 식별된 값들 중 어느 하나일 수 있다. 대안적으로, 원위 개구(238)에서의 격리 영역(240)의 폭은 근위 개구(234)에서의 연결 영역(236)의 폭(Wcon)보다 더 크거나 또는 더 작을 수 있다. 또한, 원위 개구 (238) 는 근위 개구 (234) 보다 더 작을 수도 있고, 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 은 근위 개구 (234) 와 원위 개구 (238) 사이에서 좁아질 수도 있다. 예를 들어, 접속 영역 (236) 은 다양한 상이한 지오메트리들을 사용하여 (예를 들어, 접속 영역을 챔퍼링, 접속 영역을 베벨링), 근위 개구와 원위 개구 사이에서 좁아질 수도 있다. 또한, 접속 영역 (236) 의 임의의 부분 또는 하위부분 (예를 들어, 근위 개구 (234) 에 인접한 접속 영역의 부분) 이 좁아질 수도 있다.

[0263] 도 2d 내지 도 2f 는 도 1a 의 각각의 미세유체 디바이스 (100), 회로 (132) 및 채널 (134) 의 변형들인, 미세유체 회로 (262) 및 흐름 채널들 (264) 을 포함하는 미세유체 디바이스 (250) 의 다른 예시적인 실시형태를 도시한다. 미세유체 디바이스 (250) 는 또한, 상기 설명된 격리 펜들 (124, 126, 128, 130, 224, 226 또는 228) 의 추가적인 변화들인 복수의 격리 펜들 (266) 을 갖는다. 특히, 도 2d 내지 도 2f 에 도시된 디바이스 (250) 의 격리 펜들 (266) 은 전술된 디바이스들 (100, 200, 230, 280, 290) 내의 격리 펜들 (124, 126, 128, 130, 224, 226 또는 228) 중 어느 하나를 대체할 수 있다. 마찬가지로, 미세유체 디바이스 (250) 는 미세유체 디바이스 (100) 의 다른 변형이고, 또한 전술된 미세유체 디바이스 (100, 200, 230, 280, 290), 뿐만 아니라 본원에 설명된 다른 미세유체 시스템 컴포넌트들 중 어느 하나와 동일한 또는 상이한 DEP 구성을 가질 수도 있다.

[0264] 도 2d 내지 도 2f 의 미세유체 디바이스 (250) 는 지지 구조 (도 2d 내지 도 2f 에서는 보이지 않고, 도 1a 에 묘사된 디바이스 (100) 의 지지 구조 (104) 와 동일하거나 또는 일반적으로 유사할 수 있음), 미세유체 회로 구조 (256), 및 커버 (도 2d 내지 도 2f 에서는 보이지 않고, 도 1a 에 묘사된 디바이스 (100) 의 커버 (122) 와 동일하거나 또는 일반적으로 유사할 수 있음) 를 포함한다. 미세유체 회로 구조 (256) 는, 도 1a 에 도시된 디바이스 (100) 의 프레임 (114) 및 미세유체 회로 재료 (116) 와 동일하거나 또는 일반적으로 유사할 수 있는 프레임 (252) 및 미세유체 회로 재료 (260) 를 포함한다. 도 2d 에 도시된 바와 같이, 미세유체 회로 재료 (260) 에 의해 정의된 미세유체 회로 (262) 는 다수의 격리 펜들 (266) 이 유체 연결되는 다수의 채널들 (264) (2 개가 도시되지만 더 많이 있을 수 있음) 을 포함할 수 있다.

[0265] 각각의 격리 펜 (266) 은 격리 구조 (272), 격리 구조 (272) 내의 격리 영역 (270), 및 연결 영역 (268) 을 포함할 수 있다. 미세유체 채널 (264) 에서의 근위 개구 (274) 로부터 격리 구조 (272) 에서의 원위 개구 (276) 까지, 접속 영역 (268) 은 미세유체 채널 (264) 을 격리 영역 (270) 에 유체적으로 접속시킨다. 일반적으로, 도 2b 및 도 2c 의 상기 논의에 따르면, 미세유체 채널 (264) 에서 제 1 유체 매질 (254) 의 흐름 (278) 은 미세유체 채널 (264) 로부터 격리 펜들 (266) 의 각각의 접속 영역들 (268) 안으로 및/또는 밖으로 제 1 매질 (254) 의 세컨더리 흐름들 (282) 을 생성할 수 있다.

[0266] 도 2e 에 예시된 바와 같이, 각각의 격리 펜 (266) 의 연결 영역 (268) 은 일반적으로, 채널 (264) 로의 근위 개구 (274) 와 격리 구조 (272) 로의 원위 개구 (276) 사이에서 확장하는 영역을 포함한다. 접속 영역 (268)

의 길이 (Lcon) 는 세컨더리 흐름 (282) 의 최대 침투 깊이 (Dp) 보다 더 클 수 있고, 이 경우에서 세컨더리 흐름 (282) 은 (도 2d 에 도시된 바와 같이) 격리 영역 (270) 을 향해 재지향되지 않고 접속 영역 (268) 으로 확장할 것이다. 대안으로, 도 2f 에 예시된 바와 같이, 접속 영역 (268) 은 최대 침투 깊이 (Dp) 보다 작은 길이 (Lcon) 를 가질 수 있고, 이 경우에서 세컨더리 흐름 (282) 은 접속 영역 (268) 을 통해 확장하고 격리 영역 (270) 을 향해 재지향될 것이다. 이 후자의 상황에서, 접속 영역 (268) 의 길이들 (LC1 및 LC2) 의 합은 최대 침투 깊이 (Dp) 보다 커서, 세컨더리 흐름 (282) 이 격리 영역 (270) 안으로 확장하지 않을 것이다. 접속 영역 (268) 의 길이 (Lcon) 가 침투 깊이 (Dp) 보다 크든 아니든, 또는 접속 영역 (268) 의 길이들 (LC1 및 LC2) 의 합이 최대 침투 깊이 (Dp) 보다 크든 아니든, 최대 속도 (Vmax) 를 초과하지 않는 미세유체 채널 (264) 에서의 제 1 매질 (254) 의 흐름 (278) 은 침투 깊이 (Dp) 를 갖는 세컨더리 흐름을 생성할 것이고, 격리 펜 (266) 의 격리 영역 (270) 에서 마이크로-객체들 (도시되지 않지만, 도 2e 에 도시된 마이크로-객체들 (246) 과 동일하거나 또는 일반적으로 유사할 수 있음) 은 미세유체 채널 (264) 에서 제 1 매질 (254) 의 흐름 (278) 에 의해 격리 영역 (270) 밖으로 인출되지 않을 것이다. 또한, 미세유체 채널 (264) 에서의 흐름 (278) 은 미세유체 채널 (264)로부터 격리 펜 (266) 의 격리 영역 (270) 안으로 잡다한 재료들 (미도시) 을 인출하지도 않을 것이다. 이와 같이, 확산은 미세유체 채널 (264) 에서의 제 1 매질 (254) 에서의 컴포넌트들이 미세유체 채널 (264)로부터 격리 펜 (266) 의 격리 영역 (270)에서의 제 2 매질 (258)로 이동할 수 있게 하는 유일한 메커니즘이다. 마찬가지로, 확산은, 격리 펜 (266) 의 격리 영역 (270)에서의 제 2 매질 (258) 내의 성분들이 격리 영역 (270)으로부터 채널 (264) 내의 제 1 매질 (254)로 이동할 수 있는 유일한 메커니즘이다. 제 1 매질 (254)은 제 2 매질 (258)과 동일한 매질일 수 있거나, 또는 제 1 매질 (254)은 제 2 매질 (258)과는 상이한 매질일 수 있다. 대안으로, 제 1 매질 (254) 및 제 2 매질 (258)는 동일하게 시작할 수 있고, 그 후 예를 들어 격리 영역 (270) 내의 하나 이상의 세포들에 의한 제 2 매질의 컨디셔닝을 통해, 또는 미세유체 채널 (264)을 통해 흐르는 매질을 변경함으로써 상이하게 될 수 있다.

[0267] 도 2e 에서 예시된 바와 같이, 미세유체 채널 (264)에서의 (즉, 도 2d 에서 화살표들 (278)에 의해 표시된 미세유체 채널을 통한 유체 매질 유동의 방향을 횡단하여 취해진) 미세유체 채널들 (264)의 폭 Wch 은 근위 개구 (274)의 폭 Wcon1에 대해 실질적으로 수직일 수 있고, 이에 따라, 원위 개구 (276)의 폭 Wcon2에 대해 실질적으로 평행할 수 있다. 근위 개구 (274)의 폭 (Wcon1) 및 원위 개구 (276)의 폭 (Wcon2)은 그러나, 서로 실질적으로 수직할 필요는 없다. 예를 들어, 근위 개구 (274)의 폭 (Wcon1)이 배향되는 축 (미도시)과 원위 개구 (276)의 폭 (Wcon2)이 배향되는 다른 축 간의 각도는 수직 외 및 따라서 90° 이외일 수 있다. 대안적으로 배향된 각도의 예는 다음의 각도를 포함한다: 약 30° 내지 약 90°, 약 45° 내지 약 90°, 약 60° 내지 약 90° 등.

[0268] 격리 펜들 (예를 들어, 124, 126, 128, 130, 224, 226, 228, 또는 266)의 다양한 실시형태들에서, 격리 영역 (예를 들어, 240 또는 270)은 복수의 미세 객체들을 포함하도록 구성된다. 다른 실시형태들에서, 격리 영역은 단지 1, 2, 3, 4, 5, 또는 유사한 상대적으로 작은 수의 미세 객체들만을 포함하도록 구성될 수 있다. 따라서, 격리 영역의 체적은 예를 들어, 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 세제곱 마이크로, 또는 그 초과일 수 있다.

[0269] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234)에서 미세유체 채널 (예를 들어, 122)의 폭 (Wch)은 약 50-1000 마이크로, 50-500 마이크로, 50-400 마이크로, 50-300 마이크로, 50-250 마이크로, 50-200 마이크로, 50-150 마이크로, 50-100 마이크로, 70-500 마이크로, 70-400 마이크로, 70-300 마이크로, 70-250 마이크로, 70-200 마이크로, 70-150 마이크로, 90-400 마이크로, 90-300 마이크로, 90-250 마이크로, 90-200 마이크로, 90-150 마이크로, 100-300 마이크로, 100-250 마이크로, 100-200 마이크로, 100-150 마이크로, 또는 100-120 마이크로일 수 있다. 일부 다른 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234)에서 미세유체 채널 (예를 들어, 122)의 폭 (Wch)은 약 200-800 마이크로, 200-700 마이크로, 또는 200-600 마이크로일 수 있다. 상기의 것은 단지 예들이며, 미세유체 채널 (122)의 폭 (Wch)은 위에 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나 이내의 임의의 폭일 수 있다. 또한, 미세유체 채널 (122)의 폭 (Wch)은 격리 펜의 근위 개구 외의 미세유체 채널의 영역들에서 이들 폭들 중 어느 하나에 있도록 선택될 수 있다.

[0270] 일부 실시형태들에서, 격리 펜은 약 30 내지 약 200 마이크로, 또는 약 50 내지 약 150 마이크로 높이를 갖는다. 일부 실시형태들에서, 격리 펜은 약 $1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$ 제곱 마이크로, $2 \times 10^4 - 2 \times 10^6$ 제곱 마이크로, $4 \times 10^4 - 1 \times 10^6$ 제곱 마이크로, $2 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ 제곱 마이크로, $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ 제곱 마이크로 또는 약 $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ 제곱 마이크로 단면적을 갖는다.

- [0271] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 미세유체 채널 (예를 들어, 122) 의 높이 (Hch) 는 다음의 높이들 중 임의의 것 내의 높이 일 수 있다: 20-100 마이크로, 20-90 마이크로, 20-80 마이크로, 20-70 마이크로, 20-60 마이크로, 20-50 마이크로, 30-100 마이크로, 30-90 마이크로, 30-80 마이크로, 30-70 마이크로, 30-60 마이크로, 30-50 마이크로, 40-100 마이크로, 40-90 마이크로, 40-80 마이크로, 40-70 마이크로, 40-60 마이크로, 또는 40-50 마이크로. 상기의 것은 단지 예들이며, 미세유체 채널 (예를 들어, 122) 의 높이 (Hch) 는 위에서 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나 이내의 높이일 수 있다. 미세유체 채널 (122) 의 높이 (Hch) 는 격리 펜의 근위 개구 이외의 미세유체 채널의 영역들에서 이들 높이들 중 어느 하나에 있도록 선택될 수 있다.
- [0272] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 미세유체 채널 (예를 들어, 122) 의 단면적은 약 500-50,000 제곱 마이크로, 500-40,000 제곱 마이크로, 500-30,000 제곱 마이크로, 500-25,000 제곱 마이크로, 500-20,000 제곱 마이크로, 500-15,000 제곱 마이크로, 500-10,000 제곱 마이크로, 500-7,500 제곱 마이크로, 500-5,000 제곱 마이크로, 1,000-25,000 제곱 마이크로, 1,000-20,000 제곱 마이크로, 1,000-15,000 제곱 마이크로, 1,000-10,000 제곱 마이크로, 1,000-7,500 제곱 마이크로, 1,000-5,000 제곱 마이크로, 2,000-20,000 제곱 마이크로, 2,000-15,000 제곱 마이크로, 2,000-10,000 제곱 마이크로, 2,000-7,500 제곱 마이크로, 2,000-6,000 제곱 마이크로, 3,000-20,000 제곱 마이크로, 3,000-15,000 제곱 마이크로, 3,000-10,000 제곱 마이크로, 3,000-7,500 제곱 마이크로, 또는 3,000 내지 6,000 제곱 마이크로일 수 있다. 상기의 것은 단지 예들이며, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 미세유체 채널 (예를 들어, 122) 의 단면적은 위에서 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나 이내의 임의의 면적일 수 있다.
- [0273] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 길이 (Lcon) 는 약 1-600 마이크로, 5-550 마이크로, 10-500 마이크로, 15-400 마이크로, 20-300 마이크로, 20-500 마이크로, 40-400 마이크로, 60-300 마이크로, 80-200 마이크로, 또는 약 100-150 마이크로일 수 있다. 상기의 것은 단지 예들이며, 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 길이 (Lcon) 는 위에서 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나의 길이에 있을 수 있다.
- [0274] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 폭 (Wcon) 은 약 20-500 마이크로, 20-400 마이크로, 20-300 마이크로, 20-200 마이크로, 20-150 마이크로, 20-100 마이크로, 20-80 마이크로, 20-60 마이크로, 30-400 마이크로, 30-300 마이크로, 30-200 마이크로, 30-150 마이크로, 30-100 마이크로, 30-80 마이크로, 30-60 마이크로, 40-300 마이크로, 40-200 마이크로, 40-150 마이크로, 40-100 마이크로, 40-80 마이크로, 40-60 마이크로, 50-250 마이크로, 50-200 마이크로, 50-150 마이크로, 50-100 마이크로, 50-80 마이크로, 60-200 마이크로, 60-150 마이크로, 60-100 마이크로, 60-80 마이크로, 70-150 마이크로, 70-100 마이크로, 또는 80-100 마이크로일 수 있다. 상기의 것은 단지 예들이며, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 폭 (Wcon) 은 상기 예들과 상이할 수 있다 (예를 들어, 위에서 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나 이내의 임의의 값일 수 있다).
- [0275] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 폭 (Wcon) 은 격리 펜이 그에 대해 의도되는 미세 객체 (예를 들어, T 세포 또는 B 세포일 수 있는 생리학적 세포) 의 최대 치수만큼 적어도 클 수 있다. 상기의 것은 단지 예들이며, 근위 개구 (예를 들어, 234) 에서 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 폭 (Wcon) 은 상기 예들과 상이할 수 있다 (예를 들어, 위에서 열거된 엔드포인트들 중 어느 하나 이내의 폭일 수 있다).
- [0276] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 접속 영역의 근위 개구의 폭 (Wpr) 은 적어도 격리 펜이 그에 대해 의도되는 미세 객체 (예를 들어, 세포와 같은 생물학적 미세 객체) 의 최대 치수만큼 클 수도 있다. 예를 들어, 폭 (Wpr) 은 약 50 마이크로, 약 60 마이크로, 약 100 마이크로, 약 200 마이크로, 약 300 마이크로일 수도 있거나, 약 50-300 마이크로, 약 50-200 마이크로, 약 50-100 마이크로, 약 75-150 마이크로, 약 75-100 마이크로, 또는 약 200-300 마이크로일 수도 있다.
- [0277] 격리 펜들의 다양한 실시형태들에서, 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 길이 (Lcon) 대 접속 영역 (예를 들어, 236) 의 폭 (Wcon) 의 비율은 다음의 비율들 중 어느 하나 이상일 수 있다: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 또는 그 이상. 상기의 것은 단지 예들이며, 근위 개구 (234) 에서 접속 영역 (236) 의 길이 (Lcon) 대 접속 영역 (236) 의 폭 (Wcon) 의 비율은 상기 예들과 상이할 수 있다.
- [0278] 미세유체 디바이스들 (100, 200, 230, 250, 280, 290) 의 다양한 실시형태들에서, Vmax 는 대략 0.2, 0.5, 0.7, 1.0, 1.3, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10, 11,

12, 13, 14, 또는 1.5 마이크로리터/초로 설정될 수 있다.

[0279] 격리 펜들을 갖는 미세유체 디바이스들의 다양한 실시형태들에서, 격리 펜의 단리 영역 (예를 들어, 240) 의 체적은, 예를 들어 적어도 5×10^5 , 8×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 또는 8×10^8 세제곱 마이크로론, 또는 그 이상일 수 있다. 격리 펜들을 가지는 미세유체 디바이스들의 다양한 실시형태들에서, 격리 펜의 체적은 약 5×10^5 , 6×10^5 , 8×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 , 1×10^7 , 3×10^7 , 5×10^7 , 또는 약 8×10^7 세제곱 마이크로론, 또는 그 초과일 수도 있다. 일부 다른 실시형태들에서, 격리 펜의 체적은 약 1 나노리터 내지 약 50 나노리터, 2 나노리터 내지 약 25 나노리터, 2 나노리터 내지 약 20 나노리터, 약 2 나노리터 내지 약 15 나노리터, 또는 약 2 나노리터 내지 약 10 나노리터일 수도 있다.

[0280] 다양한 실시형태에서, 미세유체 디바이스는, 본원에 논의된 실시형태들 중 어느 하나로서 구성된 격리 펜들을 갖고, 여기서 미세유체 디바이스는 약 5 내지 약 10 개의 격리 펜들, 약 10 내지 약 50 개의 격리 펜들, 약 100 내지 약 500 개의 격리 펜들; 약 200 내지 약 1000 개의 격리 펜들, 약 500 내지 약 1500 개의 격리 펜들, 약 1000 내지 약 2000 개의 격리 펜들, 약 1000 내지 약 3500 개의 격리 펜들, 약 3000 내지 약 7000 개의 격리 펜들, 약 5000 내지 약 10,000 개의 격리 펜들, 약 9,000 내지 약 15,000 개의 격리 펜들, 또는 약 12,000 내지 약 20,000 개의 격리 펜들을 갖는다. 격리 펜은 모두 동일한 크기일 필요는 없으며 다양한 구성들 (예를 들어, 다양한 폭들, 격리 펜 내의 다른 특징들) 을 포함할 수 있다.

[0281] 도 2g 는 일 실시형태에 따른 미세유체 디바이스 (280) 를 예시한다. 도 2g 에서 예시된 미세유체 디바이스 (280) 는 미세유체 디바이스 (100) 의 양식화된 다이어그램이다. 실제로, 미세유체 디바이스 (280) 및 그 구성 회로 엘리먼트들 (예를 들어, 채널들 (122) 및 격리 펜들 (128)) 은 본원에 논의된 치수들을 가질 것이다. 도 2g 에 예시된 미세유체 회로 (120) 는 2 개의 포트들 (107), 4 개의 별개의 채널들 (122) 및 4 개의 별개의 흐름 영역들 (106) 을 갖는다. 미세유체 디바이스 (280) 는 각각의 미세유체 채널 (122) 에서 개방된 복수의 격리 펜들을 더 포함한다. 도 2g 에 예시된 미세유체 디바이스에서, 격리 펜들은 도 2c 에 예시된 펜들과 유사한 지오메트리를 갖고, 따라서 양자의 접촉 영역들 및 격리 영역들을 갖는다. 따라서, 미세유체 회로 (120) 는 스위칭 영역들 (예를 들어, 세컨더리 흐름 (244) 의 최대 침투 깊이 (Dp) 내의 접촉 영역들 (236) 의 부분들 및 채널들 (122)) 및 비-스위칭 영역들 (예를 들어, 세컨더리 흐름 (244) 의 최대 침투 깊이 (Dp) 내에 있지 않은 접촉 영역들 (236) 의 부분들 및 격리 영역들 (240)) 양자 모두를 포함한다.

[0282] 도 3a 및 도 3b 는 본 개시에 따른 미세유체 디바이스들 (예를 들어, 100, 200, 230, 250, 280, 290) 을 동작 및 관측하는데 사용될 수 있는 시스템 (150) 의 다양한 실시형태들을 나타낸다. 도 3a 에 예시된 바와 같이, 시스템 (150) 은 미세유체 디바이스 (100)(미도시), 또는 본원에 설명된 임의의 다른 미세유체 디바이스를 홀딩 하도록 구성된 구조 ("네스트 (nest)") (300) 를 포함할 수 있다. 네스트 (300) 는 미세유체 디바이스 (320) (예를 들어, 광학적으로-작동된 동전기 디바이스 (100)) 와 인터페이스하고 전원 (192) 으로부터 미세유체 디바이스 (320) 로 전기적 접속들을 제공할 수 있는 소켓 (302) 을 포함할 수 있다. 네스트 (300) 는 집적된 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 을 더 포함할 수 있다. 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 은, 바이어싱 전압이, 미세유체 디바이스가 소켓 (302) 에 의해 홀딩되는 경우 미세유체 디바이스 (320) 내의 전극들의 쌍 양단에 인가되도록 바이어싱 전압을 소켓 (302) 에 공급하도록 구성될 수 있다. 따라서, 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 은 전원 (192) 의 부분일 수 있다. 미세유체 디바이스 (320) 에 바이어싱 전압을 인가하는 능력은, 바이어싱 전압이, 미세유체 디바이스 (320) 가 소켓 (302) 에 의해 홀딩되는 경우 항상 인가될 것이라는 것을 의미하지는 않는다. 차라리, 대부분의 경우들에서, 바이어싱 전압은 간헐적으로, 예를 들어 미세유체 디바이스 (320) 에서 유전영동 또는 전기습윤과 같은 동전기적 힘들의 생성을 용이하게 하도록 필요할 때에만, 인가될 것이다.

[0283] 도 3a 에 예시된 바와 같이, 네스트 (300) 는 인쇄 회로 기판 어셈블리 (PCBA) (322) 를 포함할 수 있다. 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 은 PCBA (322) 상에 장착되고 이 안에 전기적으로 집적될 수 있다. 예시적인 지지체는 PCBA (322) 상에 또한 장착된 소켓 (302) 을 포함한다.

[0284] 통상적으로, 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 은 파형 생성기 (미도시) 를 포함할 것이다. 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 은 파형 생성기로부터 수신된 파형을 증폭시키도록 구성된 파형 증폭 회로 (미도시) 및/또는 오실로스코프 (미도시) 를 더 포함할 수 있다. 오실로스코프는, 존재하는 경우, 소켓 (302) 에 의해 홀딩된 미세유체 디바이스 (320) 에 인가된 파형을 측정하도록 구성될 수 있다. 특정 실시형태들에서, 오실로스코프는 미세유체 디바이스 (320) 에 근접한 (및 파형 생성기에 대해 먼) 로케이션에서 파형을 측정하고, 따라서 디바이

스에 실제로 인가된 파형을 측정하는데 있어서 더 큰 정확도를 보장한다. 오실로스코프 측정으로부터 획득된 데이터는, 예를 들어 파형 생성기에 피드백으로서 제공될 수 있고, 파형 생성기는 이러한 피드백에 기초하여 그 출력을 조정하도록 구성될 수 있다. 적합한 결합형 파형 생성기 및 오실로스코프의 예는 Red Pitaya™ 이다.

[0285] 특정 실시형태들에서, 네스트 (300) 는 제어기 (308), 예컨대 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 을 감지 및/또는 제어하는데 사용된 마이크로프로세서를 더 포함한다. 적합한 마이크로프로세서들의 예들은 Arduino™ 마이크로프로세서들, 예컨대 Arduino Nano™ 을 포함한다. 제어기 (308) 는 기능들 및 분석을 수행하는데 사용될 수도 있고, 또는 기능들 및 분석을 수행하도록 (도 1a 에 도시된) 외부 마스터 제어기 (154) 와 통신할 수도 있다. 도 3a 에 예시된 실시형태에서, 제어기 (308) 는 인터페이스 (310) (예를 들어, 플러그 또는 커넥터) 를 통해 마스터 제어기 (154) 와 통신한다.

[0286] 일부 실시형태들에서, 네스트 (300) 는 Red Pitaya™ 파형 생성기/오실로스코프 유닛 ("Red Pitaya 유닛") 및 Red Pitaya 유닛에 의해 생성된 파형을 증폭시키고 증폭된 전압을 미세유체 디바이스 (100) 로 전달하는 파형 증폭 회로를 포함하는 전기 신호 생성 서브시스템 (304) 을 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, Red Pitaya 유닛은 미세유체 디바이스 (320) 에서 증폭된 전압을 측정하고, 그 후, 미세유체 디바이스 (320) 에서의 측정된 전압이 원하는 값이도록 필요에 따라 그 자신의 출력 전압을 조정하도록 구성된다. 일부 실시형태들에서, 파형 증폭 회로는 PCBA (322) 상에 장착된 DC-DC 컨버터들의 쌍에 의해 생성된 +6.5V 내지 -6.5V 전력 공급을 가져, 미세유체 디바이스 (100) 에서 최대 13 Vpp 의 신호를 초래할 수 있다.

[0287] 도 3a 에서 예시된 바와 같이, 지지 구조체 (300) (예컨대, 네스트) 는 열 제어 서브시스템 (306) 을 더 포함할 수 있다. 열 제어 서브시스템 (306) 은 지지 구조 (300) 에 의해 보유된 미세유체 디바이스 (320) 의 온도를 조절하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 열 제어 서브시스템 (306) 은 펠티어 열전기 디바이스 (미도시) 및 냉각 유닛 (미도시) 을 포함할 수 있다. 펠티어 열전기 디바이스는 미세유체 디바이스 (320) 의 적어도 하나의 표면과 인터페이스하도록 구성된 제 1 표면을 가질 수 있다. 냉각 유닛은, 예를 들어 냉각 블록 (미도시), 이를 테면 액냉식 (liquid-cooled) 알루미늄 블록일 수 있다. 펠티어 열전기 디바이스의 제 2 표면 (예를 들어, 제 1 표면의 반대 표면) 은 이러한 냉각 블록의 표면과 인터페이스하도록 구성될 수 있다. 냉각 블록은 냉각 블록을 통해 냉각된 유체를 순환시키도록 구성된 유체 경로 (314) 에 연결될 수 있다. 도 3a 에 예시된 실시형태에서, 지지 구조 (300) 는 인렛 (316) 및 아웃렛 (318) 을 포함하여, 외부 저장소 (미도시) 로부터 냉각된 유체를 수신하고, 냉각된 유체를 유체 경로 (314) 안으로 그리고 냉각 블록을 통해 도입하며, 그 후 냉각된 유체를 외부 저장소로 리턴한다. 일부 실시형태들에서, 펠티어 열전기 디바이스, 냉각 유닛, 및/또는 유체 경로 (314) 는 지지 구조 (300) 의 케이싱 (312) 상에 장착될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 열 제어 서브시스템 (306) 은 미세유체 디바이스 (320) 에 대한 타겟 온도를 달성하도록 펠티어 열전기 디바이스의 온도를 조절하도록 구성된다. 펠티어 열전기 디바이스의 온도 조절은, 예를 들어 Pololu™ 열전기 전력 공급기 (Pololu Robotics and Electronics Corp.) 와 같은 열전기 전력 공급기에 의해 달성될 수 있다. 열 제어 서브시스템 (306) 은 아날로그 회로에 의해 제공된 온도 값과 같은 피드백 회로를 포함할 수 있다. 대안적으로, 피드백 회로는 디지털 회로에 의해 제공될 수 있다.

[0288] 일부 실시형태들에서, 네스트 (300) 는 (예를 들어, 저항 1 kOhm+/-0.1 %, 온도 계수 +/-0.02 ppm/CO 를 갖는) 저항기 및 (예를 들어, 공칭 저항 1 kOhm+/-0.01 % 를 갖는) NTC 서미스터를 포함하는 아날로그 분압기 회로 (미도시) 인 피드백 회로를 갖는 열 제어 서브시스템 (306) 을 포함할 수 있다. 일부 경우들에서, 열 제어 서브시스템 (306) 은 피드백 회로로부터의 전압을 측정하고, 그 후 온-보드 PID 제어 루프 알고리즘에 대한 입력으로서 계산된 온도 값을 사용한다. PID 제어 루프 알고리즘으로부터의 출력은, 예를 들어 Pololu™ 모터 드라이버 (미도시) 상에서 방향성 및 펄스-폭-변조 신호 핀 양자 모두를 구동하여 열전기 전력 공급기를 작동시키고, 이에 의해 펠티어 열전기 디바이스를 제어할 수 있다.

[0289] 네스트 (300) 는, 제어기 (308) 의 마이크로프로세서가 인터페이스 (310) (도시되지 않음) 를 통해 외부 마스터 제어기 (154) 와 통신하는 것을 허용하는 직렬 포트 (324) 를 포함할 수 있다. 또한, 제어기 (308) 의 마이크로프로세서는 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 및 열 제어 서브시스템 (306) 과 (예를 들어, Plink 톨 (미도시)) 을 통해 통신할 수 있다. 따라서, 제어기 (308), 인터페이스 (310), 및 직렬 포트 (324) 의 조합을 통해, 전기적 신호 생성 서브시스템 (304) 및 열 제어 서브시스템 (306) 은 외부 마스터 제어기 (154) 와 통신할 수 있다. 이 방식으로, 마스터 제어기 (154) 는, 다른 것들 중에서, 출력 전압 조정들을 위한 스케일링 계산들을 수행함으로써 전기 신호 생성 서브시스템 (304) 을 도울 수 있다. 외부 마스터 제어기 (154) 에 커플링된 디스플레이 디바이스 (170) 를 통해 제공된 그래픽 사용자 인터페이스 (GUI) (미도시) 는 열 제어 서브시스템 (306) 및 전기 신호 생성 서브시스템 (304) 각각으로부터 얻어진 온도 및 파형 데이터를 플롯 (plot) 하도록 구성될

수 있다. 대안적으로, 또는 추가로, GUI 는 제어기 (308), 열 제어 서브시스템 (306), 및 전기 신호 생성 서브시스템 (304) 에 대한 업데이트들을 허용할 수 있다.

[0290] 위에서 논의된 바와 같이, 시스템 (150) 은 촬상 디바이스 (194) 를 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 촬상 디바이스 (194) 는 광 조절 서브시스템 (330) (도 3b 참조) 을 포함한다. 광 조절 서브시스템 (330) 은 디지털 미러 디바이스 (DMD) 또는 마이크로셔터 어레이 시스템 (MSA) 을 포함할 수 있고, 이들 중 어느 하나는 광원 (332) 으로부터 광을 수신하고 수신된 광의 서브세트를 현미경 (450) 의 광학 트레인으로 송신하도록 구성될 수 있다. 대안으로, 광 조절 서브시스템 (330) 은 그 자신의 광을 생산하고 (따라서 광원 (332) 에 대한 필요성을 없애는) 디바이스, 예컨대 유기 발광 다이오드 디스플레이 (OLED), 액정 온 실리콘 (LCOS) 디바이스, 강유전성 액정 온 실리콘 디바이스 (FLCOS), 또는 투과형 액정 디스플레이 (LCD) 를 포함할 수 있다. 광 조절 서브시스템 (330) 은, 예를 들어 프로젝터일 수 있다. 따라서, 광 조절 서브시스템 (330) 은 구조화된 및 구조화되지 않은 광 양자 모두를 방출할 수 있다. 특정 실시형태들에서, 시스템 (150) 의 이미징 모듈 (164) 및/또는 동기 모듈 (162) 은 광 조절 서브시스템 (330) 을 제어할 수 있다.

[0291] 특정 실시형태들에서, 촬상 디바이스 (194) 는 현미경 (350) 을 더 포함한다. 이러한 실시형태들에서, 네스트 (300) 및 광 조절 서브시스템 (330) 은 현미경 (350) 상에 장착되도록 개별적으로 구성될 수 있다. 현미경 (350) 은, 예를 들어 표준 연구-등급 광 현미경 또는 형광 현미경일 수 있다. 따라서, 네스트(300)는 현미경 (350)의 스테이지(344) 상에 장착되도록 구성될 수도 있고/있거나 광 변조 서브시스템(330)은 현미경(350)의 포트 상에 장착하도록 구성될 수 있다. 다른 실시형태들에서, 본원에 설명된 네스트 (300) 및 광 변조 서브시스템 (330) 은 현미경 (350) 의 일체형 컴포넌트들일 수 있다.

[0292] 특정 실시형태들에서, 현미경 (450) 은 하나 이상의 검출기들 (348) 을 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태들에서, 검출기 (348) 는 이미징 모듈 (164) 에 의해 제어된다. 검출기 (348) 는 아이 피스 (eye piece), 전하-결합 디바이스 (CCD), 카메라 (예를 들어, 디지털 카메라), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 적어도 2 개의 검출기들 (348) 이 존재하면, 하나의 검출기는 예를 들어, 고속-프레임율 (fast-frame-rate) 카메라일 수 있는 한편, 다른 검출기는 고 감도 카메라일 수 있다. 또한, 현미경 (350) 은 미세유체 디바이스 (320) 로부터 반사 및/또는 방출된 광을 수신하고, 반사 및/또는 방출된 광의 적어도 일부분을 하나 이상의 검출기들 (348) 상에 포커싱하도록 구성된 광학 트레인을 포함할 수 있다. 현미경의 광학 트레인은 또한, 각각의 검출기 상의 최종 배율이 상이할 수 있도록, 상이한 검출기들에 대한 상이한 튜브 렌즈들 (미도시) 을 포함할 수 있다.

[0293] 특정 실시형태들에서, 촬상 디바이스 (194) 는 적어도 2 개의 광원들을 사용하도록 구성된다. 예를 들어, 제 1 광원 (332) 은 (예를 들어, 광 조절 서브시스템 (330) 을 통해) 구조화된 광을 생산하도록 사용될 수 있고, 제 2 광원 (334) 은 비구조화된 광을 제공하도록 사용될 수 있다. 제 1 광원 (332) 은 광학적으로-작동된 전기역학 및/또는 형광성 여기를 위해 구조화된 광을 생산할 수 있고, 제 2 광원 (334) 은 밝은 필드 조명을 제공하도록 사용될 수 있다. 이들 실시형태들에서, 동기 모듈 (164) 은 제 1 광원 (332) 을 제어하도록 사용될 수 있고, 이미징 모듈 (164) 은 제 2 광원 (334) 을 제어하도록 사용될 수 있다. 현미경 (350) 의 광학 트레인은 (1) 디바이스가 네스트 (300) 에 의해 홀딩되는 경우, 광 조절 서브시스템 (330) 으로부터 구조화된 광을 수신하고, 이 구조화된 광을 광학적으로-작동된 전기역학 디바이스와 같은 미세유체 디바이스에서의 적어도 제 1 영역에 포커싱하고, (2) 미세유체 디바이스로부터 반사 및/또는 방출된 광을 수신하고 이러한 반사 및/또는 방출된 광의 적어도 일부를 검출기 (348) 로 포커싱하도록 구성될 수 있다. 광학 트레인은 또한, 디바이스가 네스트 (300) 에 의해 홀딩되는 경우, 제 2 광원으로부터 비구조화된 광을 수신하고, 이 비구조화된 광을 미세유체 디바이스의 적어도 제 2 영역 상에 포커싱하도록 구성될 수 있다. 특정 실시형태들에서, 미세유체 디바이스의 제 1 및 제 2 영역들은 오버랩하는 영역들일 수 있다. 예를 들어, 제 1 영역은 제 2 영역의 서브세트일 수 있다. 다른 실시형태들에서, 제 2 광원 (334) 은 추가적으로 또는 대안적으로, 임의의 적합한 파장의 광을 가질 수 있는 레이저를 포함할 수 있다. 도 3b에 도시된 광학 시스템의 도시는 단지 개략적인 도시이며, 광학 시스템은 추가 필터들, 노치 필터들, 렌즈들 등을 포함할 수 있다. 제 2 광원 (334) 이 레이저 조명 이외에 브라이트필드 및/또는 형광성 여기를 위한 하나 이상의 광원(들)을 포함하는 경우, 광원(들)의 물리적 배열은 도 3b에 도시된 것과 달라질 수 있고, 그리고 광학 시스템 내의 임의의 적합한 물리적 위치에 레이저 조명이 도입될 수 있다. 광원 (334) 및 광원 (332)/광 변조 서브시스템 (330) 의 개략적인 위치가 인터체인징될 수 있음은 물론이다.

[0294] 도 3b 에서, 제 1 광원 (332) 은, 시스템 (355)(미도시) 의 현미경 (350) 의 광학 트레인에 구조화된 광을 제공하는, 광 변조 서브시스템 (330) 에 광을 공급하는 것으로 도시된다. 제 2 광원 (334) 은 비구조화된 광을 빔 스플리터 (336) 를 통해 광학 트레인에 제공하는 것으로 도시된다. 광 조절 서브시스템 (330) 으로부터의 구조

화된 광 및 제 2 광원 (334) 으로부터의 비구조화된 광은 빔 스플리터 (336) 로부터 광학 트레인을 통해 함께 이동하여 제 2 빔 스플리터 (또는 광 조절 서브시스템 (330) 에 의해 제공된 광에 따라, 이색성 필터 (338)) 에 도달하며, 여기서 광은 대물렌즈 (336) 를 통해 샘플 평면 (342) 으로 아래로 반사된다. 샘플 평면 (342) 으로부터 반사 및/또는 방출된 광은 그 후, 대물렌즈 (340) 를 통해, 빔 스플리터 및/또는 이색성 필터 (338) 를 통해, 이색성 필터 (346) 로 위로 다시 이동한다. 이색성 필터 (346) 에 도달하는 광의 일부만이 통과하여 검출기 (348) 에 도달한다.

[0295] 일부 실시형태들에서, 제 2 광원 (334) 은 청색 광을 방사한다. 적합한 이색성 필터 (346) 로, 샘플 평면 (342) 으로부터 반사된 청색 광은 이색성 필터 (346) 를 통과하고 검출기 (348) 에 도달할 수 있다. 반대로, 광 조절 서브시스템 (330) 으로부터 오는 구조화된 광은 샘플 평면 (342) 으로부터 반사되지만, 이색성 필터 (346) 를 통과하지 않는다. 이 예에서, 이색성 필터 (346) 는 495 nm 보다 긴 파장을 갖는 가시 광을 필터링한다. 광 조절 서브시스템 (330) 으로부터의 광의 이러한 필터링은 단지, 광 조절 서브시스템으로부터 방출된 광이 495 nm 보다 짧은 임의의 파장을 포함하지 않는다면 (도시된 바와 같이) 완료될 것이다. 실제로, 광 조절 서브시스템 (330) 으로부터 오는 광이 495 nm 보다 짧은 파장들 (예를 들어, 블루 파장들) 을 포함하면, 광 조절 서브시스템으로부터의 광의 일부는 필터 (346) 를 통과하여 검출기 (348) 에 도달한다. 이러한 실시형태에서, 필터 (346) 는 제 1 광원 (332) 및 제 2 광원 (334) 으로부터 검출기 (348) 에 도달하는 광의 양 간의 균형을 변화시키도록 작용한다. 이것은, 제 1 광원 (332) 이 제 2 광원 (334) 보다 상당히 더 강한 경우 유리할 수 있다. 다른 실시형태들에서, 제 2 광원 (334) 은 레드 광을 방출할 수 있고, 이색성 필터 (346) 는 레드 광 외의 가시 광 (예를 들어, 650 nm 보다 짧은 파장을 갖는 가시 광) 을 필터링할 수 있다.

[0296] **코팅 용액들 및 코팅제들.** 이론에 의해 제한되도록 의도하지 않고, 미세유체 디바이스 (예를 들어, DEP-구성된 및/또는 EW-구성된 미세유체 디바이스) 내에서의 생물학적 미세 객체 (예를 들어, 생물학적 세포) 의 유지보수는, 미세유체 디바이스와 그 안에 유지되는 생물학적 미세 객체(들) 사이의 일차 인터페이스를 제공하는 생체 분자 및/또는 친수성 분자의 층을 제공하도록 미세유체 디바이스의 적어도 하나 이상의 내부 표면들이 컨디셔닝 또는 코팅된 경우, 용이하게 될 수도 있다 (즉, 생물학적 미세 객체는 미세유체 디바이스 내에서 증가된 생존 능력, 더 큰 증식 및/또는 더 큰 운반가능성을 나타낸다). 일부 실시형태들에서, 미세유체 디바이스의 내부 표면들 (예컨대, DEP-구성된 미세유체 디바이스의 전극 활성화 기관의 내부 표면, 미세유체 디바이스의 커버, 및/또는 회로 재료의 표면들) 중의 하나 이상은 유기 및/또는 친수성 분자들의 희박된 층을 생성하기 위하여 코팅 용액 및/또는 코팅제로 처리될 수도 있거나 코팅 용액 및/또는 코팅제에 의해 개질될 수도 있다.

[0297] 코팅은 생물학적 미세 객체(들) 의 도입 전 또는 후에 도포될 수도 있거나, 생물학적 미세 객체(들) 과 동시에 도입될 수도 있다. 일부 실시형태들에서, 생물학적 미세 객체(들) 은 하나 이상의 코팅제들을 포함하는 유체 매질에서 미세유체 디바이스 내로 들어와 질 수도 있다. 다른 실시형태들에서, 미세유체 디바이스 (예를 들어, DEP-구성된 미세유체 디바이스) 의 내부 표면(들) 은 미세유체 디바이스 내로 생물학적 미세 객체(들) 의 도입 이전에 코팅제를 포함하는 코팅 용액으로 처리 또는 "프라이밍"된다.

[0298] 일부 실시형태들에서, 미세유체 디바이스의 적어도 하나의 표면은 생물학적 미세 객체(들) 의 유지 및/또는 증식에 적합한 생체 분자 및/또는 친수성 분자들의 층을 제공하는 (예를 들어, 이하에 기술된 바와 같이 컨디셔닝된 표면을 제공하는) 코팅 재료를 포함한다. 일부 실시형태에서, 미세유체 디바이스의 실질적으로 모든 내부 표면은 코팅 재료를 포함한다. 코팅된 내부 표면(들)은 흐름 영역 (예를 들어, 채널), 챔버 또는 격리 펜의 표면, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 격리 펜 각각은 코팅 재료로 코팅된 적어도 하나의 내부 표면을 갖는다. 다른 실시형태에서, 복수의 흐름 영역 또는 채널의 각각은 코팅 재료로 코팅된 적어도 하나의 내부 표면을 갖는다. 일부 실시형태에서, 복수의 격리 펜 각각 및 다수의 채널 각각의 적어도 하나의 내부 표면은 코팅 재료로 코팅된다. (여기)

[0299] **코팅제/용액.** 혈청 또는 혈청 인자들, 소 혈청 알부민(BSA), 폴리머들, 계면활성제들, 효소들, 및 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이들에 제한되지 않는 임의의 편리한 코팅제/코팅 용액이 사용될 수 있다.

[0300] **폴리머 계 코팅 재료.** 적어도 하나의 내부 표면은 폴리머를 포함하는 코팅 재료를 포함할 수 있다. 폴리머는 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 적어도 하나의 표면에 바인딩될 수도 있다 (또는 비-구체적으로 유착 (adhere) 될 수도 있음). 폴리머는 블록 폴리머들(및 코폴리머들), 성형 폴리머들(성형 코폴리머들), 및 그래프트 또는 빗살모양 폴리머들(그래프트 코폴리머들)에서 발견되는 바와 같은 다양한 구조성 모티프들을 가질 수도 있으며, 이들 모두는 본 명세서에서 개시된 방법들에 적합할 수도 있다.

[0301] 폴리머는 알킬렌 에테르 모이어티들을 포함하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 매우 다양한 알킬렌 에테르 함유

폴리머들이 본 명세서에서 기술되는 미세유체 디바이스들에서의 사용을 위해 적합할 수도 있다. 알킬렌 에테르 함유 폴리머들의 하나의 비제한적인 예시의 클래스는 폴리머 사슬 내에 상이한 비율들로 및 상이한 위치들에서 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO) 및 폴리프로필렌 옥사이드 (PPO) 서브유닛들의 블록들을 포함하는 양쪽 친매성 비이온 블록 코폴리머들이다. Pluronic® 폴리머들 (BASF) 은 이러한 타입의 블록 코폴리머들이고, 살아있는 세포들과 접촉할 때 사용하기에 적합한 것으로 본 기술에서 알려져 있다. 폴리머들은 평균 분자 질량 (M_w) 에서 약 2000Da 로부터 약 20KDa 까지의 범위에 있을 수도 있다. 일부 실시형태에서, PEO-PPO 블록 코폴리머는 약 10 보다 큰 (예를 들어, 12-18) 친수성-친유성 균형 (HLB) 을 가질 수 있다. 코팅된 표면을 만드는데 유용한 Pluronic® 폴리머는 Pluronic® L44, L64, P85 및 F127 (F127NF 포함) 을 포함한다. 알킬렌 에테르 함유 폴리머들의 다른 클래스는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG $M_w < 100,000$ Da) 또는 대안적으로 폴리에틸렌 옥사이드 (PEO, $M_w > 100,000$)이다. 일부 실시형태에서, PEG는 약 88Da, 100Da, 132Da, 176Da, 200Da, 220Da, 264Da, 308Da, 352Da, 396Da, 440Da, 500Da, 600Da, 700Da, 800Da, 900Da, 1000Da, 1500Da, 2000Da, 5000Da, 10,000Da 또는 20,000Da 의 M_w 을 가질 수 있거나, 또는 상기 값 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위 내에 속하는 M_w 를 가질 수도 있다.

[0302] 다른 실시형태들에서, 코팅 재료는 카르복실릭 애시드 모이어티들을 포함하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 카르복실릭 애시드 서브유닛은 알킬, 알케닐 또는 방향족 모이어티 포함 서브유닛일 수도 있다. 하나의 비제한적인 예는 폴리락틱 애시드 (PLA)이다. 다른 실시형태에서, 코팅 재료는 폴리머 백본의 말단 또는 폴리머 백본으로부터의 펜던트 중 어느 하나에서 인산염 모이어티를 함유하는 폴리머를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태들에서, 코팅 재료는 술폰산 모이어티들을 함유하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 술폰산 애시드 서브유닛은 알킬, 알케닐 또는 방향족 모이어티 포함 서브유닛일 수도 있다. 하나의 비제한적인 예는 폴리스티렌 술폰산 애시드 (PSSA) 또는 폴리아네톨 술폰산 애시드이다. 추가 실시형태에서, 코팅 재료는 아민 모이어티를 포함하는 폴리머를 포함할 수 있다. 폴리아민 폴리머는 천연 폴리아민 폴리머 또는 합성 폴리아민 폴리머를 포함할 수 있다. 천연 폴리아민의 예에는 스페르민, 스페르미딘 및 푸트레신을 포함한다.

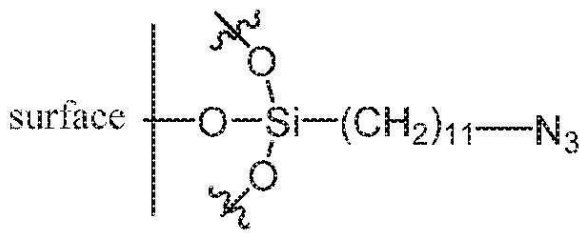
[0303] 다른 실시형태들에서, 코팅 재료는 당류 모이어티를 포함하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 비-제한적인 예에서, 잔탄검 또는 텍스트란과 같은 폴리사카라이드들은 미세유체 디바이스에서의 세포 스틱킹 (cell sticking) 을 감소시킬 수도 있거나 방지할 수도 있는 재료를 형성하기 위하여 적당할 수도 있다. 예를 들어, 약 3kDa 크기를 갖는 텍스트란 폴리머가 미세유체 디바이스 내의 표면을 위한 코팅 재료를 제공하는데 사용될 수 있다.

[0304] 다른 실시형태들에서, 코팅 재료는 폴리전해질 표면을 제공하는, 리보뉴클레오타이드 모이어티들 또는 디옥시리보뉴클레오타이드 모이어티들을 가질 수도 있는 뉴클레오타이드 모이어티들, 즉, 핵산을 함유하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 핵산은 천연 뉴클레오타이드 모이어티들만을 포함할 수도 있거나 제한 없이 7-디아자아데닌, 펜토오스, 메틸 포스포네이트 또는 포스포로티오에이트 모이어티들과 같은 핵염기, 리보오스 또는 포스페이트 모이어티 유사체들을 포함하는 비천연 뉴클레오타이드 모이어티들을 포함할 수도 있다.

[0305] 또 다른 실시형태들에서, 코팅 재료는 아미노산 모이어티들을 포함하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 아미노산 모이어티들을 포함하는 폴리머는 천연 아미노산 포함 폴리머 또는 비천연 아미노산 포함 폴리머를 포함할 수도 있으며, 이들 중 어느 것은 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 포함할 수도 있다. 하나의 비-제한적인 예에서, 단백질은 알부민 및/또는 하나 이상의 다른 유사한 단백질들을 코팅제로서 포함하는 소혈청 알부민 (BSA) 및/또는 혈청 (또는 다수의 상이한 혈청들의 조합) 일 수도 있다. 혈청은 태아 송아지 혈청, 양 혈청, 염소 혈청, 말 혈청 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 편리한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 소정의 실시형태들에서, 코팅 용액 내의 BSA 는 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 또는 그 이상 또는 이들 사이의 임의의 값을 포함하는 약 1 mg/mL 로부터 약 100 mg/mL 까지의 농도일 수 있다. 소정의 실시형태들에서, 코팅 용액 내의 혈청은 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 그 이상 또는 이들 사이의 임의의 값을 포함하는 약 20% (v/v) 로부터 약 50% v/v 까지의 농도에서 존재할 수도 있다. 일부 실시형태들에서는, BSA 가 5 mg/mL 에서의 코팅 용액에서의 코팅제로서 존재할 수도 있는 반면, 다른 실시형태에서는, BSA 가 70 mg/mL 에서의 코팅 용액에서의 코팅제로서 존재할 수도 있다. 특정 실시형태에서, 혈청은 코팅 용액 중의 코팅제로서 30%로 존재한다. 일부 실시형태들에서, 세포외 기질 (ECM) 단백질은 세포 성장을 조성하기 위해 최적화된 세포 부착을 위해 코팅 재료 내에 제공될 수도 있다. 코팅 재료에 포함될 수도 있는 세포 기질 단백질은 콜라겐, 엘라스틴, RGD-함유 펩티드 (예를 들어, 피브로넥틴), 또는 라미닌을 포함할 수 있지만, 이들에 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태들에서, 성장 인자들, 사이토킨들, 호르몬들 또는 다른 세포 시그널링 종이 미세유체 디바이스의 코팅 재료 내에 제공될 수도 있다.

- [0306] 일부 실시형태들에서, 코팅 재료는 알킬렌 옥사이드 모이어티들, 카르복실릭 애시드 모이어티들, 술폰릭 애시드 모이어티들, 포스페이트 모이어티들, 당류 모이어티들, 뉴클레오타이드 모이어티들, 또는 아미노 애시드 모이어티들 중 2 이상을 함유하는 폴리머를 포함할 수도 있다. 다른 실시형태들에서, 폴리머 컨디셔닝된 표면은 각각 알킬렌 옥사이드 모이어티들, 카르복실릭 애시드 모이어티들, 술폰릭 애시드 모이어티들, 포스페이트 모이어티들, 당류 모이어티들, 뉴클레오타이드 모이어티들, 및/또는 아미노 애시드 모이어티들을 갖는 2 이상의 폴리머의 혼합물을 포함할 수도 있으며, 그것은 코팅 재료 내로 독립적으로 또는 동시에 통합될 수도 있다.
- [0307] 또한, 공유 개질된 표면이 코팅제들과 함께 사용되는 실시형태들에서, 공유 개질된 표면의 음이온들, 양이온들, 및/또는 양쪽성 이온들은 인클로저 내의 유체 매질 (예를 들어, 코팅 용액) 에 존재하는 비공유결합 코팅제들 (예를 들어, 용액 내의 단백질들) 의 대전된 부분들과 이온성 결합들을 형성할 수 있다.
- [0308] 적절한 코팅 처리들 및 개질들의 추가의 세부사항들은 2016 년 4 월 22 일자로 출원된 미국 출원 제 15/135,707 호에서 발견될 수도 있고, 그 전체적으로 참조로 편입된다.
- [0309] 미세유체 디바이스의 격리 펜들 내의 세포들의 생존력의 유지보수를 위한 추가적인 시스템 컴포넌트들. 세포 개체군들의 성장 및/또는 확장을 촉진하기 위하여, 기능적인 세포들을 유지하기 위하여 도움이 되는 환경 조건들은 시스템의 추가적인 컴포넌트들에 의해 제공될 수도 있다. 예를 들어, 이러한 추가적인 컴포넌트들은 영양분들, 세포 성장 시그널링 종들, pH 조절, 기체 교환, 온도 제어, 및 세포들로부터의 노폐물들의 제거를 제공할 수 있다.
- [0310] 실시형태
- [0311] **일반적 재료 및 방법**
- [0312] **시스템 및 미세유체 디바이스:** Berkeley Lights, Inc.에 의해 제조되고 Berkeley Lights, Inc에 의해 제조된 광학 기기에 의해 제어되는 미세 유체 (또는 나노 유체) 장치 인 OptoSelect 칩. 그 기구는 온도 제어기에 연결된 칩의 장착 스테이지; 펌프 및 유체 매체 컨디셔닝 구성 요소; 및 칩 내에서 포토 트랜지스터를 활성화시키는 데 적합한 카메라 및 구조화된 광원을 포함하는 광학 트레인을 포함한다. OptoSelect™ 칩은 포토트랜지스터 활성화된 OET 힘을 제공하는, OptoElectroPositioning (OEP™) 기술로 구성된 기판을 포함한다. 칩은 또한 복수의 미세유체 채널들을 포함하며, 각각의 미세유체 채널들은 그에 유체 연결된 복수의 나노펜™ 챔버들 (또는, 격리 펜들) 을 갖는다. 각각의 격리 펜의 체적은 대략 1x106 입방 마이크로론이었다.
- [0313] **프라이밍 용액:** 0.1 % Pluronic® F127 (Life Technologies® Cat# P6866) 을 함유하는 완전한 배양 매질.
- [0314] **배양 제조 :** 표면 개질된 미세유체 디바이스를 시스템 상에 로딩하고 5 분 동안 15psi에서 100 % 이산화탄소로 퍼지 하였다. 이산화탄소 퍼지 직후, 프라이밍 용액을 8 분 동안 5 마이크로 리터/초로 미세유체 디바이스를 통해 관류시켰다. 이어서 배양 매질을 5 분 동안 5 마이크로리터/초로 미세유체 디바이스를 통해 유동시켰다.
- [0315] **프라이밍 체제.** 100 % 이산화탄소의 250 마이크로리터가 12 마이크로리터/초의 레이트에서 내부로 유동되었다. 이것 다음에, 12 마이크로리터/초로 유동된, 0.1 % Pluronic® F27 (Life Technologies® Cat# P6866) 을 함유하는 250 마이크로리터의 PBS 가 이어졌다. 프라이밍의 최종 단계는 12 마이크로리터/초로 유동된, 250 마이크로리터의 PBS 를 포함하였다. 배양 매질의 도입은 다음과 같다.
- [0316] **관류 체제.** 관류 방법은 다음의 2 개의 방법들 중 어느 하나였다:
- [0317] 1. 2시간 동안 0.01 마이크로리터들/초로 관류시키고; 64 초 동안 2 마이크로리터들/초로 관류시키고; 그리고 반복시킨다.
- [0318] 2. 100 초 동안 0.02 마이크로리터들/초로 관류시키고; 유동을 500 초 중지시키고; 64 초 동안 2 마이크로리터들/초로 관류시키고; 그리고 반복시킨다.
- [0319] **예 1. 비패턴화된 실리콘 웨이퍼의 관능화된 표면의 제조.** 실리콘 웨이퍼 (780 마이크로론 두께, 1cm × 1cm) 가 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여 5 분 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리되었다. 플라즈마 처리된 실리콘 웨이퍼는, 진공 반응기의 하단의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황산 마그네슘 헥사하이드레이트 (0.5 g, Acros Cat# 10034-99-8) 의 존재 시에 진공 반응기의 하단의 호일 보트에서 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란 (300 마이크로리터) 으로 진공 반응기에서 처리되었다. 챔버는 그 후, 진공 펌프를 사용하여 750 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 진공 반응기를 110 °C 에서 24-48 시간 동안 가열된 오븐 내에 두었다. 이것은 개질된 표면을 웨이퍼에 도입하였고, 여기서 개질된 표

면은 화학식 I 의 구조를 가졌다 :

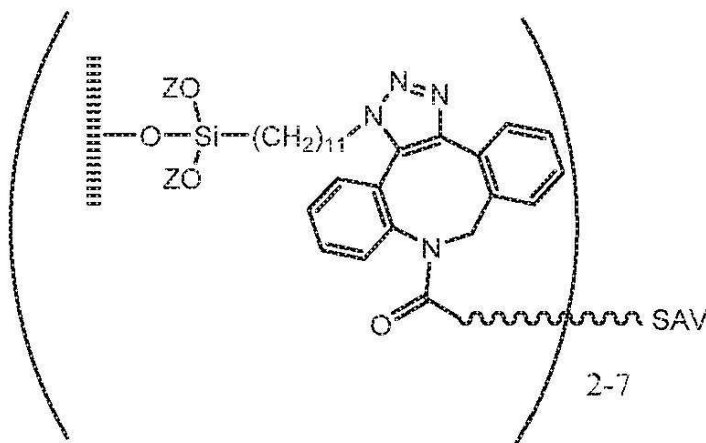


식 I

실온으로 냉각시키고 배기된 챔버로 아르곤을 주입한 후에, 웨이퍼는 반응기로부터 제거되었다. 웨이퍼는 아세톤, 이소프로판올로 린스되고, 질소 스트림 하에서 건조되었다. 개질된 표면의 도입의 확인은 엘립소메트리 및 접촉각 측정법에 의해 이루어졌다.

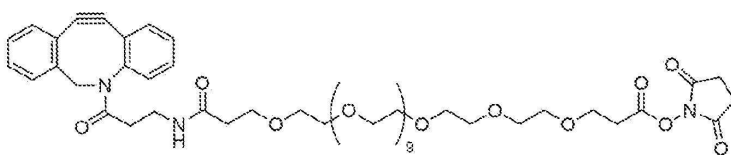
대안 적으로, 규소 웨이퍼를 평평한 바닥 웰 플레이트의 바닥 내에 맞게 크기로 절단하여 화학식 I 의 관능화된 표면을 그 위에 도입하고, 복수의 포매팅된 규소 웨이퍼가 동시에 관능화되었다.

예 2. 스트렙타비딘 관능화된 표면을 갖는 평면 비 패턴 화 실리콘 웨이퍼의 제조. 전술된 바와 같은 화학식 I 의 표면을 갖는, 실시형태 1 로부터의 제품 실리콘 웨이퍼는 디벤질시클로옥티닐 (DBCO) 스트렙타비딘 (SAV), Nanocs, 카탈로그 # SV1-DB-1 로 처리되었고, 여기서 실리콘 웨이퍼를 상업적으로 이용가능한 DBCO-SAV 의 2 마이크로몰 용액을 포함하는 수용액과 접촉시킴으로써 SAV 의 각각의 분자에 대해 2-7 DBCO 가 존재한다. 반응을 실온에서 1 시간 이상 동안 진행시켰다. 이어서, 화학식 II 의 개질된 표면을 갖는 비 패턴 화된 실리콘 웨이퍼를 1xPBS로 헹구었다.



식 2

예 3. DBCO-표지된 스트렙타비딘 (SAV) 화합물 1의 합성: 5 mg 의 동결 건조된 SAV (ThermoFisher PN # S888) 를 1X PBS 에서 1 mL의 1X PBS (Gibco) 및 1 mL의 2 mM Na2CO3 (Acros) 에 용해시켰다. 10Mg 의 깔끔한 DBCO-PEG13-NHS (화합물 2, 클릭 화학 도구 PN # 1015-10) 을 0.4 mL 의 건조 DMSO에 용해시켰다. 16 uL 의 DBCO-PEG13-NHS 용액을 SAV 용액에 첨가하고 25 °C 에서 400 RPM으로 Eppendorf ThermoMixer에서 4 시간 동안 혼합 하였다. 표지된 SAV (화합물 1) 를 반응 혼합물을 Zeba 크기 배제 크로마토 그래피 스핀 컬럼 (ThermoFisher PN #89882)을 통해 통과시킴으로써 DBCO-PEG13-NHS로부터 정제하고, 추가 정제없이 사용되었다.



화합물 2

예 4. 스트렙타비딘 관능화된 표면을 갖는 평면 비 패턴 화 실리콘 웨이퍼의 제조. 상기 기술된 바와 같은 화학식 I 의 표면을 갖는 예 1의 생성물 실리콘 웨이퍼를 실리콘 웨이퍼를 2 마이크로몰 화합물 1을 함유하는 수용액과 접촉시킴으로써 화합물 1 (PEG 13 연결기를 갖는 예 3의 생성물 인 DBCO 연결된 스트렙타비딘 (SAV), 여기서 SAV 의 각 분자에 대해 2-7 DBCO 가 존재함) 으로 처리 하였다. 반응을 실온에서 1 시간 이상 동안 진

행시켰다. 이어서 PEG 13 연결기를 포함하는 스트렙타비딘 공유결합으로 관능화된 표면을 갖는 비패턴화된 실리콘 웨이퍼를 1xPBS로 행구었다.

[0328] **예 5. 화합물 1 을 사용한 관능화와 비교하여 시판되는 DBCO 연결 SAV를 사용한 실리콘 웨이퍼의 관능화의 비교**
SAV 개질된 표면의 비교는 반응성 아지드 모이어티의 도입의 각 단계 후 엘립 소메트리 및 접촉각 고니오메트리 (실시 예 1)에 의해 이루어졌다; 각각의 SAV 층의 도입; 이어서, 시약 농도 및 반응 조건이 동일한 비오틴화된 항-CD28을 도입 하였다. PEG13 모이어티를 포함하는 연결기를 갖는 DBCO SAV 시약을 사용하는 샘플 2 는 샘플 1의 것보다 더 강력한 SAV의 관능화를 제공하였고, 이어서 SAV 결합 부위에 비오틴화된 항-CD2 결합에 의한 보다 강력한 관능화를 제공 하였다.

표 1

샘플	아지드 층의 두께 (옹스트롬)	DBCO SAV 커플링 후 전체 두께 (옹스트롬)	항-CD 28 결합 후의 전체 두께 (옹스트롬)	도입된 SAV 층의 두께 (옹스트롬)	도입된 항-CD28 층의 두께 (옹스트롬)
Ex. 2 로부터의 웨이퍼 1	13.31	25.22	28.54	11.91	3.32
Ex. 4 로부터의 웨이퍼 2	13.43	45.08	62.37	31.65	17.29

[0330] 이론에 구속되지 않고, 적어도 5 개의 PEG 반복 단위, 최대 약 20 개의 PEG 반복 단위의 길이를 갖는 연결기 (대안적으로, 약 20 Å 내지 약 100 Å 길이를 갖는 연결기) 가 실리콘 웨이퍼의 이 반응성 표면상의 반응성 모이어티에 우수한 수준의 커플링을 제공 할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 더 많은 SAV 결합 부위가 이용 가능하므로 샘플 웨이퍼 2에 도입된 항-CD28 층의 추가 두께에 의해 추가로 입증된다.

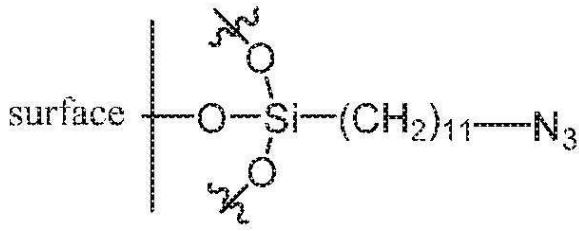
[0331] **예 6. 평면 패턴화된 표면의 제조, 및 활성화 작용화를 갖지 않는 상이한 영역에 의해 분리된 복수의 영역 내에 항원 제시 표면을 제공하기 위한 추가의 구체화.** 인듐 주석 산화물 (ITO) 웨이퍼가 그 ITO 상에 비정질 실리콘의 패턴화된 복수의 영역을 갖도록 제조되었다. 영역들은 a) 서로 3 미크론만큼 분리된 1 미크론 직경의 원형 비정질 실리콘 영역 또는 b) 서로 2 미크론만큼 분리된 2 미크론 사각형 비정질 실리콘 영역이었다. 도 6a 및 도 6b 는 각 유형의 패턴화된 표면의 부분들의 SEM 이미지를 도시한다.

[0332] 패턴화된 웨이퍼를 아세톤에서 10 분 동안 초음파 처리하여 기능화하기 전에 세정하고, 탈 이온수로 린싱하고 건조시켰다 (도 6 의 단계 1). 패턴화된 웨이퍼는 그 후 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여, 5 분 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리되었다.

[0333] 관능화 처리의 개략적인 표현이 도 6 에 도시되어 있다. ITO 표면의 초기 공유결합 개질. 웨이퍼의 인듐 주석 산화물베이스 층을 50 % N-메틸피롤리딘 (NMP) / 수용액에서 40mM 운데시닐 포스포산 (Sikemia Catalog # SIK7110-10)과의 반응에 의해 관능화했다 (도 6의 단계 2). 웨이퍼의 세정된 표면을 바이알 내 용액에 침지시키고 밀봉 하였다. 바이알을 50 °C 수조에서 밤새 유지시켰다. 다음날, 웨이퍼를 제거하고 50 % 이소프로필 알코올 / 물로 세척한 다음 이소 프로필 알코올로 세척 하였다.

[0334] **A. 패턴화된 표면의 ITO 영역의 비오틴화.** 알킨 작용기화된 ITO 영역은 아지도 반응성 모이어티 (azide-SS-biotin, Broadpharm Catalog # BP-2877), 0.5 mM 아스코르브산 나트륨; 및 수중의 1mM Cu (II) SO₄ / THPTA (도 6의 단계 3)에 연결된 1.5 mM 비오틴과의 반응에 의해 추가로 공유결합 개질되었다. 디설파이드 함유 비오틴 시약과 접촉하기 전에 구리 리간드 및 나트륨 아스코르베이트를 예비 혼합하도록 주의를 기울였다. 표면을 1 시간 동안 비오틴 시약 용액과 접촉된 상태로 유지시켰다. 이어서 웨이퍼의 표면을 물로 세척하고, 다음 단계를 위해 제조하여 건조시켰다.

[0335] **B. 패턴화된 웨이퍼의 복수의 비정질 실리콘 영역의 표면의 공유 결합 개질.** 웨이퍼의 ITO 영역 내의 비오틴화된 표면을 갖는 패턴화된 웨이퍼들은 진공 반응기의 하단의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황산 마그네슘 헵타하이드레이트 (0.5 g, Acros Cat# 10034-99-8) 의 존재 시에 진공 반응기의 하단의 호일 보트에서 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란 (화합물 3, 300 마이크로리터) 으로 진공 반응기에서 처리되었다 (도 6의 단계 4). 챔버는 그 후, 진공 펌프를 사용하여 750 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 진공 반응기는 밤새도록 110 °C 에서 가열된 오븐 내에 배치되었다. 이것은 개질된 표면을 웨이퍼상의 복수의 비정질 실리콘 영역에 도입하였고, 여기서 개질된 표면은 화학식 I 의 구조를 갖는다:



식 I

[0336]

[0337]

실온으로 냉각시키고 배기된 챔버로 아르곤을 주입한 후에, 웨이퍼는 반응기로부터 제거되었다. 웨이퍼는 아세톤, 이소프로판올로 린스되고, 질소 스트림 하에서 건조되었다. 계측은 패터닝된 웨이퍼의 비오틴화된 ITO 영역이 화학식 I의 작용기 리간드의 실질적인 양의 오염을 갖지 않았으며; 10 % 이하의 오염 물질이 발견되었다.

[0338]

C. 지지 모이어티를 제공하기 위해 패터닝된 웨이퍼의 비오틴-개질된 ITO 영역의 공유결합 개질. 비오틴 개질된 ITO 영역에 의해 분리된 복수의 운데실 아지도 개질된 비정질 실리콘 영역을 갖는 패턴화된 웨이퍼를 0.02 % 아지드화 나트륨을 함유하는 PBS 중의 스트렙타비딘 (SAV, 3.84 마이크로 몰)의 용액과 반응시키고 30 분 동안 인큐베이션시켰다 (도 6 의 단계 5). 고체를 PBS 로 세척하고, 건조시킨다.

[0339]

이어서, 패턴화된 웨이퍼의 ITO 영역의 스트렙타비딘 개질된 표면은 0.02 % 나트륨 아지드를 함유하는 PBS 중 200 마이크로 몰의 비오틴-RGD 용액 (Anaspec Catalog # AS-62347)과의 반응에 의해 개질되어, 이들 표면상에서 배양될 때 T 림프구의 생존력에서의 일반적인 개선을 위한 접착제 모이어티를 제공한다 (도 6의 단계 6). 45 분 동안 인큐베이션 한 후, 웨이퍼를 PBS로 행구고 건조시켰다.

[0340]

추가적 일반화. 패터닝된 웨이퍼의 ITO 영역의 스트렙타비딘 개질된 표면은 대안 적으로 패턴화된 표면의 -활성화 영역 내에서 친수성 모이어티를 제공하기 위해 200 마이크로 몰의 비오틴-PEG-5K (Jenkem Catalog # M-BIOTIN-5000) 용액과의 반응에 의해 개질 될 수 있다. . 추가로, 스트렙타비딘 표면은 스트렙타비딘 표면을 비오틴화된 모이어티의 200 마이크로 몰 스톡 용액의 혼합물과 임의의 비, 예를 들어 1:1:1:10; 10 : 1 또는 그 사이의 임의의 비율로 반응시킴으로써 접착성 및 친수성 모이어티의 혼합물에 의해 개질될 수 있다.

[0341]

D. 패터닝된 웨이퍼의 복수의 아지도 관능화된 비정질 실리콘 영역에 2 차 관능화된 표면을 제공하는 단계. 0.02 % 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중의 DBCO-SAV (Nanocs Catalog # SV1-DB-1, 2 micromolar)의 용액을 그 위에 공유적으로 부착된 지지 모이어티 (예를 들어, RGD와 같은 접착성 모티프 또는 PEG-5K와 같은 친수성 모이어티)를 갖는 ITO 의 영역에 의해 분리된 복수의 아지도 작용화 비정질 실리콘 영역을 갖는 패턴화된 웨이퍼와 30 분의 인큐베이션 기간 동안 접촉시켜 지지 개질된 ITO 영역에 의해 분리된 스트렙타비딘 관능화된 표면을 갖는 복수의 비정질 영역을 제공한다. (도 6의 단계 7). 항원 활성화 리간드의 최종 도입까지 패턴화된 웨이퍼를 PBS / 0.02 % 아 지드화 나트륨으로 유지시켰다.

[0342]

E. 패터닝된 웨이퍼의 비정질 실리콘 영역의 스트렙타비딘 개질된 표면의 기능화 (도 6의 단계 8). 단계적 관능화는 실시 예 12 에서와 유사하게 수행되고, 먼저 패턴화된 표면을 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 MART-1 (MBL International Corp., 카탈로그 번호 MR01008, ELAGIGILTV)에 용액중에 노출시키고 45 분 동안 배양에 노출시켰다. 위시 버퍼로 복수의 MHC 개질된 비정질 실리콘 영역을 갖는 패터닝된 웨이퍼를 린싱한 후, 패터닝된 웨이퍼를 비오틴화된 항-CD28 용액 (Miltenyi Biotec, 카탈로그 번호 130-100-144)과 접촉시키고 30-45 분 동안 인큐베이션하여 패턴화된 웨이퍼의 지지 개질된 ITO 영역에 의해 분리된 복수의 pMHC / 항-CD28 영역을 제공한다.

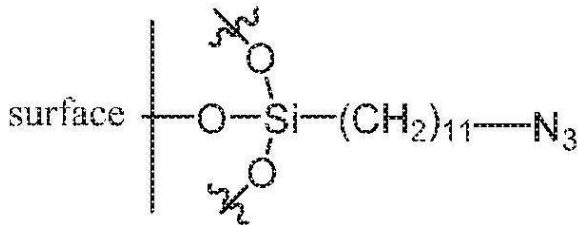
[0343]

예 7. pMHC 및 항-CD28이 연결된 복수의 영역을 포함하고, 패턴화되지 않은 표면에 비해 지지 모이어티가 연결된 영역에 의해 분리된 패턴화된 표면을 사용하여 CD8+ T 림프구의 활성화. 실시 예 6의 생성물 패턴화된 웨이퍼는 48- 웰 플레이트의 웰의 바닥 내에 배치하기 위해 크기가 정해졌다. 2 개의 상이한 패턴화된 표면이 사용되었고, 첫 번째는 도 7a 에 도시된 바와 같이 직경이 1 미크론 인 원형 영역을 갖고 두 번째는 도 7b 에 도시된 바와 같이 각변이 2 미크론의 정사각형 영역을 갖는다. 동일한 수준의 MHC 펩티드 변형 및 항-CD28의 무작위 분포를 갖는 비 패턴화된 평면 제 3 표면을 제 3 48 웰 플레이트의 제 3 웰에 사용 하였다. 평면 표면에 로딩되는 한 수준의 항-CD28 항체 만이 사용되었다. 실시 예 12에 기재된 바와 같이 수득된 나이브 T- 림프구 (하기)를 웰 플레이트의 웰 내에 배치하고 패턴화되거나 패턴화되지 않은 웨이퍼와 접촉시켰다. 자극 프로토콜 및 배양 프로토콜은 각각 1 내지 7 일 동안 실시 예 12에서와 같이 수행되었다. 유세포 분석은 나이브 T 림프구의 활성화를 보여 주었다. 유세포 분석 결과는 도 8a 내지 도 8d 에 도시된 바와 같이 3 가지 종류의 표

면 각각이 T 림프구를 활성화시킬 수 있음을 보여준다. 이들 3 가지 활성화 조건에 대한 도 8a 내지 도 8d 에 도시된 그래프 특성은 표현형 특이성이 수득됨을 보여준다. 도 8a는 1 마이크로 활성화 아일랜드 패턴, 2 마이크로 활성화 아일랜드 패턴 및 비패턴 웨이퍼 표면 각각에 대해 생성물 세포 집단에서 발견된 항원 특이적 (MART1) T 세포의 백분율을 나타낸다. 도 8b는 각각의 표면 유형에 대한 각각의 생성된 세포 집단에서 발견된 MART 1 항원 특이적 T 세포의 총 수를 나타낸다. 도 8c는 각각의 표면 유형에 대한 MART 1 항원 특이적 T 세포의 배가 확장을 보여준다. 도 8d 는 각각의 표면 유형에 대한 항원 특이적 T 세포 집단 내에서 항원 특이적 T 세포를 발현시키는 CD28^{high} 의 백분율을 보여준다. 패턴화된 표면은 보다 재현 가능하고 제어 가능한 양의 증식, 표현형 및 실제 세포 수를 나타낸다. 더 작은 1 마이크로 영역은 제시된 항원, MHC 분자 및 항-CD 28의 자연적인 바람직한 배열을 보다 효과적으로 모방 할 수 있다. 도 9 참조.

[0344] 자극의 제 1 기간이 완료된 후, 생성된 T 세포를 웰플레이트의 동일한 웰 내에서 7-14 일 동안, 및 임의로 14-21 일 동안 재 자극하여 상기와 같은 사이토카인 첨가물을 첨가한다. 대안 적으로, 7 일 및 / 또는 14 일에, 생성된 T 림프구를 새로운 패턴화된 웨이퍼를 갖는 새로운 웰로 이동시킬 수 있고, 실시 예 12의 프로토콜은 계속되었다. 원하는 자극 반복이 끝나면, 세포의 일부가 염색되고 활성화 정도를 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 검사 될 수 있다. 패턴화된 표면 웨이퍼는 비드-기반 활성화 또는 항원 제시 수지상 세포에 의한 활성화만큼 쉽게 T 세포 활성화를 자극 할 것으로 예상된다.

[0345] **예 8.** 식 I 의 개질된 내부 표면을 갖는 미세유체 디바이스의 제조. 제 1 실리콘 전극 활성화 기관 및 반덕벽에 제 2 ITO 기관, 및 2 개의 기관을 분리하는 광패턴화된 실리콘 미세유체 회로 재료를 갖는 상기 일반적 실험 섹션에서 기술된 미세유체 디바이스 (Berkeley Lights, Inc.) 는 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여, 1 분 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리되었다. 플라즈마 처리된 미세유체 디바이스는, 진공 반응기의 하단의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황산 마그네슘 헵타하이드레이트 (0.5g, Acros) 의 존재 시에 진공 반응기의 하단의 호일 보트에서 3-아지도운데실) 트리메톡시실란 (300 마이크로리터) 으로 진공 반응기에서 처리되었다. 챔버는 그 후, 진공 펌프를 사용하여 750 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 진공 반응기를 110 °C에서 2448 시간 동안 가열된 오븐 내에 두었다. 이것은 개질된 표면을 미세유체 디바이스에 도입하였고, 여기서 개질된 표면은 화학식 I 의 구조를 가졌다 :



[0346] 식 I

[0347] 실온으로 냉각시키고 배기된 챔버로 아르곤을 주입한 후에, 미세유체 디바이스는 반응기로부터 제거되었다. 기능화된 표면을 갖는 미세유체 디바이스를 250 마이크로 리터 이상의 탈 이온수로 행구고, 추가로 사용할 제조가 되었다.

[0348] **예 9. 미세유체 디바이스 내의 T-세포 활성화 표면의 도입**

[0349] A. OptoSelect 미세유체 디바이스의 내부 표면은 실시 예 8 (화학식 I)에서와 같이 아지도 모이어티를 포함하도록 공유 변형되었다. 스트렙타비딘으로 표면을 기능화하기 위해, OptoSelect 미세 유체 디바이스를 먼저 100 % 이산화탄소로 반복적으로 플러싱 한 다음, 실시 예 4에서 생성된 바와 같이 약 0.5 내지 약 2 마이크로 물의 농도를 갖는 DBCO- 스트렙타비딘 용액으로 로딩 하였다. DBCO 및 아지도 기들이 커플링했던 15-30 분 동안의 인큐베이션 후에, OptoSelect 미세유체 디바이스는 비결합된 DBCO-개질된 스트렙타비딘을 플러싱하기 위해 1X PBS 로 반복적으로 세척되었다.

[0350] 이어서, 이 스트렙타비딘 표면을 비오틴화 pMHC, 및 비오틴화 항 CD28, 비오틴화 항 CD2 또는 이들의 임의의 조합 중의 선택으로 추가로 변형시킨다. 이들 분자는 약 2:1 내지 약 1:2의 pMHC 분자 대 항 CD28 / 항 CD2의 비로 약 1 내지 10 마이크로 그램 / mL의 농도로 2 % 소 혈청 알부민과 함께 PBS에 현탁된다. 이 용액은 스트렙타비딘 관능화된 표면을 갖는 OptoSelect 미세유체 디바이스를 통해 관류되어 표면과의 공액을 촉진시킨다. 1 시간의 배양 후, 세포를 로딩하기 전에 OptoSelect 미세유체 디바이스를 PBS 또는 매질로 플러싱한다.

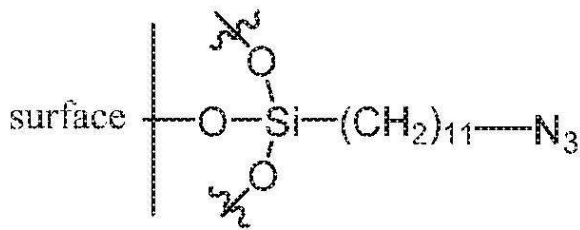
[0351] B. 대안 적으로, 관심있는 생체 분자는 OptoSelect 미세유체 디바이스의 아지도-개질된 표면과의 반응 전에 생

체 분자의 스트렙타비딘으로의 비오틴 변형을 통해 접합된다. DBCO-스트렙타비딘 및 비오틴닐레이티드 생체분자는 이하에 기술된 바와 같이, 0.5 - 2 마이크로몰의 범위에서의 농도들에서 PBS 용액에서 별개로 제조되고, 그 후 임의의 원하는 비율로 혼합될 수 있다. 비오틴닐레이티드 생체분자들이 적어도 15 분 동안 스트렙타비딘 대해 컨쥬게이트하는 것을 허용한 후, 결과의 착체들은 상술된 바와 같이 아지도-개질된 OptoSelect 미세유체 디바이스의 표면을 개질하기 위해 사용될 수 있다.

[0352] 세포는 하나 이상의 항원 제시 내부 표면을 갖는 미세유체 디바이스 내로 수입 될 수 있고, 실시 예 19의 항원 제시 비드에 의한 T 세포의 활성화에 대해 기술된 것과 유사하게 배양 기간 동안 활성화 될 수 있다.

[0353] **예 10. 실리카 비드의 공유 변형 및 기능화.**

[0354] 10A 스트렙타비딘에 연결된 공유 PEG 3 이황화 비오틴을 갖는 실리카 비드. 구형 실리카 비드 (2.5 미크론, G 바이오 사이언스 카탈로그 번호 786-915, 실질적으로 단순한 구형 부피를 갖는 것, 예를 들어 비드의 표면적은 관계식 $4\pi r^2 \pm 10\%$ 이하에 의해 예측된 범위 내에있는 것)를 이소프로판올에 분산시킨 다음 건조시켰다. 건조된 비드들은 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여, 5 분 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리되었다. 세정된 비드들은 진공 반응기의 하단의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황산 마그네슘 헵타하이드레이트 (0.5 g, Acros Cat# 10034-99-8) 의 존재 시에 진공 반응기의 하단의 호일 보트에서 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란 (300 마이크로리터) 으로 진공 반응기에서 처리되었다. 챔버는 그 후, 진공 펌프를 사용하여 750 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 진공 반응기를 110 °C에서 24-48 시간 동안 가열된 오븐 내에 두었다. 이것은 공유결합으로 개질된 표면을 비드들에 도입하였고, 여기서 개질된 표면은 화학식 I 의 아지드 관능화된 구조를 가졌다 :



[0355] 식 I

[0356] 실온으로 냉각하고 배기된 챔버에 아르곤을 도입한 후, 공유결합으로 개질된 비드들이 반응기로부터 제거되었다. 아지드 반응성 모이어티들로 관능화된 공유결합으로 개질된 표면을 갖는 비드들은 아세톤, 이소프로판올로 린싱되고, 질소의 스트림 하에서 건조되었다. 공유결합으로 개질된 아지드 관능화된 비드들은 디벤질 시클로옥티닐 (DBCO) S-S 비오틴 개질된-PEG3 (브로드팜, Cat. #BP-22453) 의 5.7 mM DMSO 용액 중에 1 mg/20 마이크로리터의 농도로 분산되고, 그 후 18 시간 동안 열혼합기 (thermomixer) 에서 90°C/2000 RPM 으로 배양되었다. 비오틴 개질된 비드들은 초과 DMSO 에서 각각 3 번 세척되었고, 그 후 PBS 로 린싱되었다. PBS 에서의 비오틴 개질된 비드들은 대략 30 마이크로몰/700 마이크로리터 농도 스트렙타비딘을 함유하는 PBS 용액 중에 분산되었다. 반응 혼합물은 30 분 동안 열혼합기에서 30°C/2000 RPM 으로 웨이킹 (shaking) 되었다. 반응 주기의 완료 시에, 공유결합으로 개질된 비드 제시 스트렙타비딘은 초과 PBS 에서 3 번 세척되었다. FTIR 분석은 SAV 가 표면에 첨가되었다고 결정했다 (데이터 미도시). 디숄파이드 함유 링커는 표면으로부터의 균열이 바람직할 수도 있다면 특히 유용할 수도 있다. 디숄파이드 링커는 T 림프구 생존 능력과 양립가능한 것으로 발견된 농도들에서의 디티오프레이터를 갖는 균열에 민감하다 (데이터 미도시).

[0357] 10B. PEG5-카복시산 표면-차단 분자 리간드들로 희석된 스트렙타비딘에 연결된 공유결합 PEG4 비오틴을 갖는 실리카 비드들. 예 10A 에서 상술된 바와 같이 준비된, 식 1 의 아지드 반응성 모이어티들로 관능화된 공유결합으로 개질된 표면을 갖는 비드들은 아세톤, 이소프로판올로 린싱되었고, 질소의 스트림 하에서 건조되었다. 공유결합으로 개질된 아지드 관능화된 비드들은 0.6 mM 디벤질시클로옥티닐 (DBCO)-개질된-PEG4-비오틴 (브로드팜, Cat. #BP-22295), 5.4 mM 디벤질시클로옥티닐 (DBCO)-개질된-PEG5-카복시산 (브로드팜, Cat. #BP-22449), 및 100 mM 요오드화나트륨의 DMSO 용액 중에 1 mg/10 마이크로리터의 농도로 분산되었고 그 후 18 시간 동안 열혼합기에서 30°C/1000 RPM 으로 배양되었다. 비오틴 개질된 비드들은 초과 DMSO 에서 각각 3 번 세척되었고, 그 후 PBS 로 린싱되었다. PBS 내의 비오틴 개질된 비드들은 대략 10 나노몰/1 밀리리터 농도 스트렙타비딘을 함유하는 PBS 용액에 분산되었다. 반응 혼합물은 30 분 동안 열혼합기에서 30°C/1000 RPM 으로 웨이킹되었다. 반응 주기의 완료 시에, 공유결합으로 개질된 비드 제시 스트렙타비딘은 초과 PBS 에서 3 번 세척

되었다. FTIR 분석은 SAV 가 표면에 첨가되었다고 결정했다 (데이터 미도시).

[0358] **예 11. 폴리머 비드의 항원 제시 표면의 준비.** 스트렙타비딘 관능화된 (공유결합으로 커플링된) 콘볼루트된 구형 폴리머 비드들 (예를 들어, 비드의 실제 표면적은 관계 표면적 = $4\pi r^2$ +/- 10% 이하보다 큼, DynaBeadsTM (서모피셔 카탈로그 # 11205D, 6.67e8/mL 의 비드 스톡)) 은 워시 버퍼 (Wash Buffer) (DPBS (마그네슘¹² 없음, 칼슘¹² 없음, 244 mL); EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5% 의 5mL, 최종 농도 0.1%) 의 1 mL 를 갖는 1.5 mL 마이크로원심분리 튜브로 전달되었고 (15 마이크로리터; 1e7 비드들), 자기 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL 의 워시 버퍼를 갖는 세척/분리는 반복되었고, 추가의 200 마이크로리터의 워시 버퍼가 후속 펄스 원심분리로 첨가되었다. 상청액 워시 버퍼는 제거되었다.

[0359] 1.5 마이크로그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A* 02:01 MART-1 (MBL 인터네셔널 코퍼레이션, 카탈로그 번호 MR01008, ELAGIGILTIV) 를 함유하는 워시 버퍼 (600 마이크로리터) 는 마이크로원심분리 튜브 내로 분산되었고, 비드들은 위 아래로 피펫팅함으로써 다시 부유되었다. 단량체는 4℃ 에서 30 분 동안 결합이 허용되었다. 15 분 후에, 혼합물은 다시 위 아래로 피펫팅되었다. 튜브는 펄스 원심분리되었고 상청액은 제거되었으며, 튜브는 비드들을 제거하지 않고 더 많은 상청액을 제거하기 위해 자기 랙 내에 배치되었다.

[0360] 600 마이크로리터 워시 버퍼 내의 비오틴화된 안티-CD28 (Miltenyi Biotec, 카탈로그 # 130-100-144, 22.5 마이크로리터) 의 용액이 마이크로원심분리 튜브에 첨가되었다. 비드들은 위 아래로 피펫팅함으로써 다시 부유되었다. 비드들은 4℃ 에서 30 분 동안 배양되어, 또 다른 위 아래 피펫팅에 의해 15 분 후에 다시 부유하였다. 배양 주기의 중단에서, 튜브는 간단하게 펄스 원심분리되었다. 자기 랙에 다시 배치하고 1 분 동안 분리를 허용한 후, 버퍼 용액은 관능화된 비드들로부터 흡입되었다. MHC 단량체/안티-CD28 항원 제시 비드들은 100 마이크로리터 버퍼 워시에서 다시 부유되고, 4℃ 에서 저장되고, 추가의 조작 없이 사용되었다. 1e7 2.80 마이크론 직경 관능화된 DynaBeads 은 T 림프구 세포와 접촉을 위해 이용가능한 약 24e6 제곱 마이크론의 공칭 (구의 이상적 예측된 표면적) 표면적을 갖는다. 그러나, T 림프구 세포들에 의해 반드시 액세스가능하지는 않는 이러한 클래스의 폴리머 비드의 콘볼루션들이 또한 이러한 방법으로 관능화된다. 총 리간드 카운트는 T 림프구 세포들과 접촉하고 그들을 활성화하는데 이용가능한 것을 반영하지 않을 수도 있다.

[0361] MHC 단량체/안티-CD28 항원 제시 비드들은 Alexa Fluor 488-컨쥬게이트드 Rabbit 안티 Mouse IgG (H+L) 크로스-흡착된 2차 항체 (Invitrogen 카탈로그 # A-11059) 및 APC-컨쥬게이트드 안티-HLA-A2 항체 (Biolegend 카탈로그 # 343307) 로 스테이닝 (staining) 하는 것에 의해 특성화되었고, 유세포 분석에 의해 특성화되었다.

[0362] **예 12. 수지상 세포들에 의한 CD8+ T 림프구들의 활성화에 비교한 항원 제시 비드들에 의한 CD8+ T 림프구들의 활성화.**

[0363] 세포들: CD8+ T 림프구들은 네거티브 선택에 의해 EasySepTM Human CD8 Positive Selection Kit II, 즉 StemCell Technologies Canada Inc. 로부터의 상업적으로 이용가능한 키트 (카탈로그 # 17953) 에 대한 제조자의 지시들에 따라 상업적으로 이용가능한 PBMC 들로부터의 RPMI 플러스 10% 소태아혈청 (FBS) 을 포함하는 매질에서 풍부화 되었다.

[0364] 수지상 세포들은: 오토로고스 PBMC 들로부터 생성되었다. 오토로고스 PBMC 들 (10-50 e6) 은 10% FBS 를 포함하는 10 mL 의 예열된 RPMI 매질들내로 해동되었다. 세포들은 400xg 에서 5 분 동안 원심분리함으로써 펠릿화되었다. 세포들은 RPMI 에서 다시 부유되고 카운트되었다.

[0365] 세포들은 제조자의 지시들에 따라 네거티브 비드 격리 (EasySepTM Human Monocyte Isolation Kit, StemCell Technologies, 카탈로그 # 19359) 를 사용하여 단핵구들에 대해 풍부화 되었다. 결과의 모노사이트가 카운트되어 약 5% 수율을 제공하고, 그 후 17 ng/mL IL-4 및 53 ng/mL Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Fact (GM-CSF, ThermoFisher 카탈로그 # PHC2013) 을 함유하는 AIM-V® 매질 (ThermoFisher 카탈로그 # 12055091) 내의 웰 당 3mL 당 1.5- 3e6 세포들로 플레이팅되었다. 세포들은 37℃ 에서 총 6일 동안 배양되었다. 2일 및 4일째에 100 마이크로리터의 공급 매질 (AIM-V® 매질 플러스 IL-4 (167 U/mL) 및 GM-CSF (540 ng/mL)) 이 각 웰에 첨가되었고, 배양이 계속되었다.

[0366] 6 일째에, 0.5 mL 의 숙성 각테일이 각 웰에 첨가되었다. 숙성 각테일은 AIM-V® 매질에 10 ng/mL TNF-알파; 2 ng/mL IL-1B; 1000 U/mL IL-6, 1000 ng/mL PGE2; 167 U/mL IL-4 및 267 U/mL GM-CSF 를 포함했다. 세포들은 37℃ 에서 추가의 24 시간 동안 배양되었다. 숙성된 DC 들이 그 후 숙성 매질로부터 수집되고, 카운트되고, 추

가의 사용을 위해 준비되었다. DC 들은 CD3 (BD 카탈로그 # 344828), DC-SIGN (CD209, 바이오레전드 카탈로그 # 330104), CD14 (바이오레전드 카탈로그 # 325608), CD86 (BD 카탈로그 # 560359), Fc Block (바이오레전드 카탈로그 # 422302), 및 생존능력 (BD 카탈로그 # 565388) 에 대한 스테이닝을 특징으로하였고; FACS 버퍼에서 부유되었고; 및 FACS 유세포분석에 의해 검사되었다.

[0367] 항원을 제시하는 수지상 세포는 1% HSA 에서 2e6/mL 의 농도로 플레이팅하고 항원 (MART1 펩티드, Anaspec, 커스텀 합성, 40 마이크로그램/mL) 및 베타2-마이크로글로불린 (시그마 알드리치 카탈로그 # M4890, 3 마이크로그램/mL) 으로 펄싱하고, 그 후 4 시간 동안 교반과 함께 배양함으로써 제조되었다. 펄싱된 DC 들은 50 그레이의 목표 도즈로, 사용전에 30 분 동안 Faxitron CellRad® x-레이 셀 조사기에서 조사되었다.

[0368] 시약 첨가를 위한 배양 매질 및 희석제 : 고급 RPMI (ThermoFisher 카탈로그 번호 12633020, 500mL); 1x GlutaMAX (ThermoFisher 카탈로그 번호 35050079, 5mL); 10 % 인간 AB 혈청 (zen-bio, Catalog # HSER-ABP 100mL, 50mL); 및 50nM 베타-메르 캅토 에탄올 (ThermoFisher 카탈로그 번호 31350010, 50nm 스톱, 0.5mL, 최종 conc 50 마이크로 몰).

[0369] 실험 설정 : 각 활성화 중에 대해, 단일 96-웰 조직 배양 처리 플레이트 (VWR 카탈로그 번호 10062-902)를 사용 하였다 (웰 플레이트 1 (DC); 웰 플레이트 2 (항원 제시 비드)). CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 각각의 개별 웰에 첨가 하였다.

[0370] 펄싱된 DC를 웰 플레이트 1에서 각 웰에 대해 5e3로 첨가하고, 1:40 비율의 DC:CD8 + T 림프구를 수득 하였다 :

[0371] MART1 및 항-CD28 항체를 포함하는 pMHC를 제공하는 실시 예 11에서와 같이 제조된 항원 제시 표면 폴리머 비드 (2e5)를 웰 플레이트 2의 각 웰에 첨가 하였다. pMHC를 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 항-CD 28 항체를 3 가지 상이한 수준으로 비드 상에 로딩 하였다 : 0.25 마이크로 그램 / 1e7 비드; 0.75 마이크로 그램 / 1e7 비드; 및 2.25 마이크로 그램 / 1e7 비드.

[0372] 각 웰 플레이트를 37 °C에서 배양 하였다. 0 일에, CTL 매질 중의 IL-21 (150ng / 밀리리터)을 웰 플레이트 1 및 2 의 각 웰에 첨가하여, 각 웰에서 30 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 2 일에, IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양은 7 일까지 계속되었다.

[0373] 7일. 각 웰 플레이트로부터의 웰의 서브 세트를 MHC 테트라머 (Tetramer PE, MBL 카탈로그 번호 T02000, 1 마이크로 리터 / 웰), CD4 (Biolegend 카탈로그 번호 300530, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD8 (Biolegend Catalog # 301048, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD28 (Biolegend 카탈로그 번호 302906, 0.31 마이크로 리터 / 웰); CD45RO (Biolegend Catalog # 304210, 0.63 마이크로 리터 / 웰); CCR7 (CD197, Biolegend 카탈로그 번호 353208, 0.5 마이크로 리터 / 웰); 및 생존력 (BD 카탈로그 번호 565388, 0.125 마이크로 리터 / 웰)에 대해 개별적으로 염색하였다. 각 웰을 150 마이크로 리터 FACS 완충액 및 10 마이크로 리터의 카운트 브라이트™ 비즈 (ThermoFisher 카탈로그 번호 C36950)로 재현탁시켰다. FACS 분석은 FACSCelesta™ 유세포 분석기 (BD Biosciences)에서 수행되었다. 도 10은 CD8 / MART1 표현형에 대한 유세포 분석에 대한 제브라 플롯을 보여준다. 제브라 플롯의 각 행 (1010, 1020, 1030 및 1040) 에 대해, 왼쪽 플롯은 대표적인 음성 웰이고 오른쪽 플롯은 대표적인 양성 웰이다. 1010 행은 DC 자극 웰 플레이트로부터의 웰이다. 1020, 1030 및 1040 행은 항원 제시 비드 자극 웰 플레이트로부터의 결과를 보여준다. 1020 행은 항-CD28 항체 로딩의 0.25 마이크로 그램 / 1e7 비드 및 pMHC의 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드에 대한 결과를 보여준다. 1030 행은 0.75 마이크로 그램 / 1e7 비드 항 CD28 항체 로딩 및 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드 pMHC에 대한 결과를 보여준다. 1040 행은 2.25 마이크로 그램 / 1e7 비드 항 CD28 항체 로딩 및 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드 pMHC에 대한 결과를 보여준다. 항원 제시 비드는 항-CD28 항체의 수준을 변화시킬 때 용량 / 반응 방식으로 활성화를 개시하고, MART1이 로딩된 MHC 펩티드는 항-CD28 로딩과 조합하여 T 림프구를 DC의 그것과 유사하게 활성화시키는데 충분하다는 것을 알 수 있다.

[0374] 7일. 제 자극. 펄스 DC 또는 항원 제시 비드의 제 2 분취량을 각각 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 각각 점유된 웰에 전달 하였다. IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양이 계속되었습니다.

[0375] 8일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 각각의 웰에 50 마이크로 리터의 IL-2 (50 IU / mL) 및 IL-7 (25ng / mL)을 첨가하여 각각 10 IU / mL 및 5 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.

[0376] 9일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2 의 각각의 점유된 웰에 50 마이크로 리터의 IL-21 (150ng / mL)을 첨가하

여 30ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.

[0377] 14일. 각 웰 플레이트로부터의 웰의 제 2 서브 세트를 개별적으로 염색하고 7 일차 분석에 대해 기재된 바와 같이 FACS 분류 하였다. 유세포 분석 결과는 도 11 에 도시되어 있다. 각 행 (1110, 1120, 1130, 1140)에 대해 대표적 덜 포지티브 웰 (각 행의 왼손 그래프) 및 높게 포지티브 웰 (각 행의 오른손 그래프)을 갖는다. 행 1110은 DC 활성화로 인한 활성화 양을 보여준다. 행 1120, 1130 및 1140은 7 일 결과에 대해 논의된 바와 같이 증가된 양의 항-CD 28에 대한 결과를 나타낸다. 1120 행은 항-CD28 항체 로딩의 0.25 마이크로 그램 / 1e7 비드 및 pMHC의 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드에 대한 결과를 보여준다. 1130 행은 0.75 마이크로 그램 / 1e7 비드 항 CD28 항체 로딩 및 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드 pMHC에 대한 결과를 보여준다. 1140 행은 2.25 마이크로 그램 / 1e7 비드 항 CD28 항체 로딩 및 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드 pMHC에 대한 결과를 보여준다. 공 자극 리간드의 양이 증가하는 항원 제시 비드의 경우, 항원 특이적 T 세포가 없는 웰이 없다는 것이 주목할 만하다. 특히 0.75 마이크로 그램 및 2.25 마이크로 그램 CD28 항체 로딩 수준 (1130 및 1140)에서, DC 펄스드 웰보다 많은 유의한 수의 항원 특이적 T 세포가 존재한다 (1110 행).

[0378] 도 12는 이들 실험으로부터의 표화된 결과를 도시한다. 1210 행은 7 일차에 T 세포 활성화 특성화의 그래픽 표현을 보여준다. 1220 행은 14 일차에 T 세포 활성화 특성화의 그래픽 표현을 보여준다. 각 행에서 왼쪽에서 오른쪽으로, y 축은 항원 특이적 T 세포의 백분율; 항원 특이적 T 세포의 총수; 항원 특이적 T 세포 배가 확장; 및 항원-특이적 T 세포 집단 내 CD28 고 발현 세포의 % 를 나타낸다. 각 그래프의 x- 축은 DC, 0.25 마이크로 그램 CD28 로딩된 비드, 0.75 마이크로 그램 CD28 비드 및 2.25 마이크로 그램 CD28 로딩된 비드 각각의 데이터 세트를 보여준다. 항원 제시 비드 자극 활성화는 DC 자극보다 초기에 느린 것으로 보이지만, 제 2 배양 기간이 끝날 때까지 생산은 동일한 수준에 도달 하였다. 표현형 결과는 항원 제시 비드를 사용한 활성화의 우수한 특이성을 보여준다. 도 12는 DC 자극 실시 예와 비교하여 항원 제시 비드 개시 실시 예에서 동등한 수준의 MART 1 활성화 T 림프구를 나타낸다. 그러나, 수지상 세포를 활성화 종으로서 사용하면, 14 일 후에 활성화된 T 림프구가 없는 웰이 존재한다. 따라서, 항원 제시 비드 활성화는 수지상 세포보다 더 제어 가능하고 재현 가능한 활성화를 제공한다.

[0379] **배양의 세 번째 기간.** 다른 실험에서, 비드상의 항원 제시 표면이 바로 앞 단락에 기술된 바와 같이 사용되었지만, DC와 비교되지 않은 경우, 세 번째 자극 및 배양 기간이 수행되었다. 14 일부터 21 일까지. 배양 조건을 21 일까지 계속하는 동안 7 일 내지 14 일에 대해 상기와 같이 재 자극 및 공급을 수행 하였다. 21일에, 각 웰 플레이트로부터의 웰의 마지막 서브 세트를 개별적으로 염색하고 7 일차 분석에 대해 기재된 바와 같이 FACS 분류 하였다. 연장된 제 3 자극 서열에 대해 추가의 활성화가 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

[0380] **예 13. 공유 관능화된 유리 비드의 제조.** 실리카 비즈 (2.5 미크론, G 바이오 사이언스 카탈로그 번호 786-915, 실질적으로 단순한 구형 표면을 갖는 것, 예를 들어 비드의 표면적은 관계식 $4\pi r^2 \pm 10\%$ 이하에 의해 예측된 범위 내에있는 것)를 이소프로판올에 분산시킨 다음 건조시켰다. 건조된 비드들은 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여, 5 분 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리 되었다. 세정된 비드들은 진공 반응기의 하단의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황산 마그네슘 헥사하이드레이트 (0.5 g, Acros Cat# 10034-99-8) 의 존재 시에 진공 반응기의 하단의 호일 보트에서 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란 (300 마이크로리터) 으로 진공 반응기에서 처리되었다. 챔버는 그 후, 진공 펌프를 사용하여 750 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 진공 반응기를 110 °C에서 24-48 시간 동안 가열된 오븐 내에 두었다. 이것은 공유결합으로 연결된 표면 제시 반응성 아지드 모이어티를 비드에 도입하였고, 여기서 개질된 표면은 화학식 I 의 구조를 가졌다 :

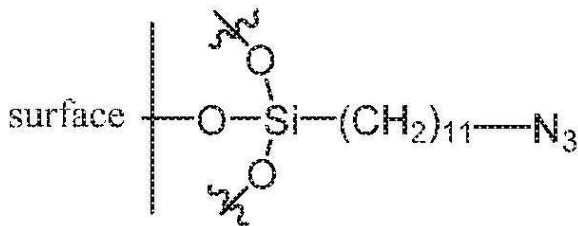
[0381] 실온으로 냉각하고 아르곤을 진공 챔버로 도입 한 후, 중간 반응성 아지드 제시 비드를 반응기로부터 제거하고 아세톤, 이소프로판올로 세정하고 질소 스트림 하에서 건조시켰다. 아지드 제시 반응성 비드 (50 mg)를 격렬한 볼텍싱/간편 초음파 처리와 함께 500 마이크로 리터 DMSO에 분산시켰다. 비드를 펠릿 화하고, 450 마이크로 리터의 DMSO를 비드로부터 흡인시켰다. 나머지 50 마이크로 리터의 DMSO에서 펠릿을 활발하게 볼텍싱하여 분산시켰다. PEG13 연결기를 갖는 실시 예 3에서 합성된 DBCO-SAV (10 마이크로 몰 농도의 52 마이크로 리터, 화합물 1)를 첨가 하였다. 비드를 덩 혼합에 의해 분산시킨 후, 볼 텍싱 하였다. 0.02 % 아지드화 나트륨 용액을 포함하는 398 마이크로 리터의 PBS를 첨가 한 후, 추가로 볼 텍싱 하였다. 반응 혼합물을 30 °C, 1000 RPM에서 열 혼합기에서 밤새 인큐베이션 하였다.

[0382] 16 시간 후, 10 마이크로 리터의 83.7 mM DBCO-PEG5-산을 각 샘플에 첨가하고 30 °C / 1,000 RPM에서 추가로 30 분 동안 배양 하였다. 비드를 PBS / 아 지드에서 3X 세척 한 후, 500 마이크로 리터의 현탁액에

현탁시켰다.

[0383] 이들 공유 관능화된 비드는 하기 실시 예 18에 기재된 바와 같이 1 차 활성화 분자 및 공 활성화 분자를 도입하도록 개질된다.

[0384] **예 14. 공유 관능화된 폴리스티렌 비드의 제조.** 디비닐벤젠 가교 폴리스티렌 비드 (14-20 미크론, Cospheric Catalog # 786-915)를 이소프로판올에 분산시킨 다음, 유리 페트리 접시에서 건조시켰다. 건조된 비드들은 100 W 전력, 240 mTorr 압력 및 440 sccm 산소 유량을 사용하여, 40 초 동안 산소 플라즈마 세정기 (Nordson Asymtek) 에서 처리되었다. 세정된 비드들은 오븐의 동일한 선반의 별개의 호일 보트에서 물 반응원으로서, 황 산 마그네슘 헵타하이드레이트 (1 g, Acros Cat# 10034-99-8) 의 존재 시에 오븐의 선반 상의 호일 보트에서 (11-아지도운데실) 트리메톡시 실란 (화합물 5, 900 마이크로리터) 으로 진공 오븐에서 처리되었다. 오븐은 그 후, 진공 펌프를 사용하여 250 mTorr 로 펌핑되었고 그 후 실링되었다. 오븐을 110 °C에서 18-24 시간 동안 가열하였다. 이것은 공유결합으로 개질된 표면을 비드들에 도입하였고, 여기서 개질된 표면은 화학식 I 의 구조를 가졌다 :



[0385] 식 I

[0386] 오븐을 3 회 펌프 퍼지 한 후, 공유 개질된 비드를 오븐에서 제거하고 냉각시켰다. 공유적으로 개질된 아지도 관능화된 비드를 DMSO에 15 mg / 50 마이크로 리터의 농도로 분산시켰다. 여기에, 9.9 마이크로 물 농도의 DBCO- 표지된 스트렙타비딘 (SAV) (화합물 1)의 450 마이크로 리터 용액을 첨가 하였다. 이어서, 그 용액을 열 혼합기에서 30° C / 1000 RPM에서 18 시간 동안 인큐베이션 하였다. SAV 개질된 비드는 PBS에서 3 회 세척되었다. FTIR 분석에 의해 SAV가 도 13 에 도시된 바와 같이 표면에 첨가된 것으로 확인되었다.

[0387] 도 13은 공유결합으로 관능화된 표면이 구축 될 때 관능화된 비드의 중첩된 FTIR 트레이스를 도시한다. 트레이스 1310은 폴리스티렌 비드의 원래 비 관능화된 표면을 보여 주었다. 트레이스 1320은 아 지드 관능화된 표면의 도입 후 표면의 FTIR을 보여 주었다 (화학식 I의 구조를 가짐). 트레이스 1330은 폴리스티렌 비드에 공유 결합된 PEG13- 스트렙타비딘 표면의 도입 후 표면의 FTIR을 보여 주었다. 트레이스들 1320 및 1330은 단계적 합성에서 각 화학 종 세트의 도입과 일치하는 FTIR 흡수 밴드의 도입을 보여 주었다.

[0388] **예 15. 항-CD28 및 항-CD2를 갖는 비드의 항원 제시 표면의 제조.** 스트렙타비딘 기능화 (공유 결합) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D), 6.67e8 / mL의 비드 스톱, 콘볼루트된 (위에 설명된대로) 폴리머 비드) 가 1mL의 세척 버퍼 (DPBS (마그네슘+2 없음, 칼슘+2 없음, 244 mL 없음)를 사용하여 1.5mL 마이크로 원심 분리 튜브에 15 µL; EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5mL의 5 %, 최종 농도 0.1 %) 에 전달되고, 및 자성 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL의 세척 완충제로 세척 / 분리를 반복하고, 추가의 펄스 원심 분리로 추가 200 마이크로 리터의 세척 완충제를 첨가 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.

[0389] 0.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 MART-1 (MBL International Corp., Catalog No. MR01008, ELAGIGILTV)를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 마이크로 원심 분리 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 펄스 원심 분리하고 상청액을 제거하고, 튜브를 자기 랙 내에 배치하여 비드를 제거하지 않고 더 많은 상청액을 제거 하였다.

[0390] 600 마이크로 리터 세척 완충액 중의 비오틴화 항-CD28 (Biolegend, 카탈로그 번호 302904) 및 비오틴화 항-CD2 (Biolegend, 카탈로그 번호 300204)의 용액을 마이크로 원심 분리 튜브에 첨가 하였다. 용액은 총 3 마이크로 그램의 항체를 함유 하였다. 용액에는 다음이 포함된다: 3 마이크로 그램의 항-CD28 및 0 마이크로 그램의 항-CD2, 2.25 마이크로 그램의 항-CD28 및 0.75 마이크로 그램의 항-CD2, 1.5 마이크로 그램의 항-CD28 및 1.5 마이크로 그램의 항-CD2, 0.75 마이크로 그램의 항-CD28 및 2.25 마이크로그램의 항-CD2, 또는 0 마이크로 그램의 항-CD28 및 3 마이크로 그램의 항-CD2. 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 비드를 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션 한 다음, 15 분 후에 또 다른 상하 피펫팅으로 재현탁시켰다. 인큐베이션 기간의 말기에, 튜브

를 간단히 펄스 원심 분리 하였다. 자기 랙에 다시 넣고 1 분 동안 분리 한 후, 완충 용액을 기능화된 비드로부터 흡인시켰다. MHC 단량체 / 항 CD28 항원 제시 비드를 100 마이크로 리터 완충액 세척에 재현탁시키고, 4 °C 에서 보관하고, 추가 조작없이 사용 하였다. 1e7 2.80 미크론 직경의 기능화된 DynaBeads는 T 림프구 세포와의 접촉에 이용 가능한 공칭 표면적이 약 24e6 제곱 미크론이지만, 전술 한 바와 같이, 이러한 콘볼루트된 구형 비드는 공칭 표면적보다 10 % 이상 더 많은 실제 표면적을 갖는다.

[0391] **예 16. 공유 관능화된 폴리머 비드의 제조. 중간 반응성 합성 표면의 제조.** 제조 공정의 첫 번째 단계에서 M-450 에폭시 기능화된 상자성 콘볼루트된 폴리머 비드 (DynaBeads™, ThermoFisher Cat. # 14011 (상기와 동일한 의미를 갖는 콘볼루트된)) 를 테트라 부틸 암모늄 아 지드와 반응시켜 클릭 화학 상용 성 반응성기를 갖는 작용 기화 시약과 반응 할 수있는 아 지드 반응성 모이어티를 제시하는 폴리머 비드를 제조 하였다.

[0392] **예 17. 비드의 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제조.** 이어서 실시 예 16으로부터의 아 지드-제조된 복잡한 비드를 디 벤조 사이클로 옥틸 (DBCO)-결합된 스트렙타비딘과 반응시켜 스트렙타비딘을 폴리머 비드에 공유적으로 부착시켰다. DBCO- 스트렙타비딘 시약은 Streptavidin을 아민 반응성 DBCO- 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 13-NHS 에스테르와 반응시켜 Streptavidin 단위당 하나 이상의 부착 부위를 제공함으로써 생성되었습니다.

[0393] **표면 차단 분자와의 추가 반응.** 실시 예 17로부터의 스트렙타비딘 작용기를 나타내는 생성된 공유결합으로 관능화된 폴리머 비드는 이어서 폴리머 비드 상에 임의의 남아있는 아 지드 반응성 모이어티와 반응하도록 DBCO 관능화된 표면-차단 분자로 처리 될 수 있다. 일부 경우에, DBCO 관능화된 표면-차단 분자는 PEG 분자를 포함 할 수 있다. 일부 경우에, DBCO PEG 분자는 DBCO PEG5- 카르복실 산일 수 있다. 추가적인 PEG 또는 PEG- 카르복실 산 표면-차단 분자를 포함하는 스트렙타비딘 관능화된 폴리머 비드는 우수한 물리적 거동을 제공하여 수성 환경에서 개선된 분산을 나타낸다. 추가로, 잔류 아 지드 모이어티의 표면-차단은 이 단계 또는 이후의 제조 단계 또는 활성화 단계에 존재하는 다른 관련되지 않은 / 불량 성분이 또한 폴리머 비드에 공유 결합하는 것을 방지한다. 마지막으로, 표면 차단 분자 리간드의 도입은 T 림프구 상에 존재하는 표면 분자가 반응성 아 지드 작용기와 접촉하는 것을 방지 할 수 있다.

[0394] **추가적 일반화.** DBCO 함유 리간드 분자의 혼합물로 실시 예 16의 아 지드 작용 기화된 표면을 변형시키는 것이 바람직 할 수 있다. 예를 들어, DBCO- 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 13- 스트렙타비딘 (실시 예 3에서와 같이 제조된 화합물 1)을 다양한 비율로 DBCO-PEG5-COOH (표면-차단 분자)와 혼합 한 후 아지드 기능화된 비드와 접촉시킬 수 있다. 일부 경우에, DBCO- 스트렙타비딘 분자 대 DBCO-PEG5-COOH의 비는 약 1 : 9 ; 약 1 : 6, 약 1 : 4 또는 약 1 : 3일 수도 있다. 이론에 구속되지 않고, 표면-차단 분자 리간드는 비드의 표면에 스트렙타비딘 분자의 과도한 로딩을 방지하고, 추가적인 친수성을 제공함으로써 향상된 물리 화학적 거동을 추가로 제공한다. 표면 차단 분자는 PEG5-COOH로 제한되지 않고 본원에 기재된 임의의 적합한 표면 차단 분자 일 수 있다.

[0395] **예 18. 공유 개질된 항원 제시 비드의 제조. 펩티드-HLA 및 단일 클론 항체 공 활성화 분자의 건주 게이션.**

[0396] **재료 A. 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자를 보유하는 항원. 비오틴화 펩티드-인간 백혈구 항원 복합체 (pMHC)는 MBL, 이뮤니트랙 (Immunitrack) 또는 바이오레간드 (Biolegend)로부터 상업적으로 입수 가능 하였다.** 비오틴화된 펩타이드-HLA 복합체는 클래스 I HLA 분자의 펩타이드-결합 그루브에 비공유적으로 결합된 항원 성 펩타이드를 포함하였고, 이는 제조되어 제조업 자에서 HLA 복합체로 폴딩되었다. 비오틴화된 펩티드-HLA 복합체는 또한 베타 2- 마이크로 글로불린에 비공유적으로 결합되었다. 이 복합체는 제조업체에 의해 수행된 HLA의 C- 말단 펩티드 서열상의 인식된 위치에서 BirA 효소에 의해 도입된 리신 잔기의 측쇄 아민에서 공유적으로 비오틴화되었다.

[0397] **B. 공 활성화 분자.** 비오틴화된 항체를 비용 측정에 사용하였고 무린 하이브리도마 배양물의 상청액으로부터 생성 하였다. 항체는 리신의 측쇄의 다수의 아민 작용기를 통해 비오틴에 접합되었으며, 항체의 표면에서 무작위로 이용 가능하다. 비오틴화된 항체는 상업적으로 입수 가능 하였다 (Biolegend, Miltenyi 또는 Thermo Fisher).

[0398] 이들 실험에 유용한 비오틴화된 항-CD28은 클론 CD28.2, 15e8 또는 9.3으로부터 생성되었다.

[0399] 이들 실험에 유용한 비오틴화된 항-CD2는 클론 LT2 또는 RPA-2.10으로부터 생성되었다. 다른 클론이 또한 이들 폴리머 비드와 같은 공유 개질된 항원 제시 합성 표면의 구축에 사용될 수 있다.

[0400] **1 차 활성화 및 공 활성화 분자의 비드의 공유결합으로 관능화된 표면으로의 접합.** MHC 분자 (항원 성 분자 함유) 및 공 활성화 분자를 2 단계 공정으로 생성된 비드에 접합시켰다. 다양한 실험에서, 공 활성화 분자-이 경우 비오틴화 항-CD28 및 비오틴화 항-CD2 - 의 비는 약 100 : 1 내지 약 1 : 100; 또는 약 20 : 1 내지 약

1:20의 범위에서 변할 수 있다. 다른 실험에서, 공 활성화 분자의 비는 약 3 : 1 내지 약 1 : 3 또는 약 1 : 1이었다. 도 14a 내지 도 14d 참조.

- [0401] **pMHC 로딩.** 스트렙타비딘 기능화 (공유 결합) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D), 6.67e8 / mL의 비드 스톡, 콘볼루트된 (상기 설명된대로) 폴리머 비드)는 세척 완충액 (칼슘 또는 마그네슘이없는 둘베코 인산염 완충 식염수; 0.1 % 소 혈청 알부민; 2mM 에틸렌 디아민 테트라 아세트산) 으로 세척 됨. 세척 완충액을 튜브에 피펫팅하고, 여기에 스트렙타비딘 비드를 첨가 하였다. 전형적으로, ~ 1e7 비드를 1 mL의 세척 완충액에 피펫팅 하였다. 자석 (예를 들어, DYNAL DynaMag-2, ThermoFisher Cat. #12-321-D) 을 사용하여 비드를 튜브의 벽에 대해 수집 하였다. 비드가 튜브의 벽으로 이동 한 후, 비드가 유지된 벽을 피하면서 완충액을 흡인을 통해 제거 하였다. 이러한 작업을 2 회 더 반복하였다. 세 번째 세척 후, 비드를 세척 완충액에서 1.67e7 비드 / mL로 재현탁시켰다.
- [0402] [00363] 이어서 비드를 pMHC와 혼합 하였다. pMHC를 0.83 마이크로 그램의 pMHC / mL의 최종 농도로 세척 완충제 중의 비드에 첨가 하였다. 비드 및 pMHC를 볼 텍싱에 의해 완전히 혼합 한 후, 4 °C에서 15 분 동안 인큐베이션 하였다. 비드를 다시 볼 텍싱 한 다음, 추가 15 분 동안 4 °C에서 인큐베이션 하였다.
- [0403] **공 활성화 분자 로딩.** pMHC 관능화된 비드를 다시 자석을 통해 포획하고, pMHC 시약 혼합물을 흡인에 의해 제거 하였다. 이어서 비드를 세척 완충액에서 1.67e7 / mL로 만들었다. 이어서, 비오틴화 항-CD28 및 비오틴화 항-CD2 (사용되는 경우)를 총 항체의 총 농도 5 마이크로 그램 / mL 에서 비드에 첨가 하였다. 항-CD28 및 항-CD2 가 모두 사용된 경우, 각각의 항체를 2.5 마이크로 그램 / mL로 첨가 하였다.
- [0404] 비드 및 pMHC를 볼 텍싱에 의해 완전히 혼합 한 후, 4 °C에서 15 분 동안 인큐베이션 하였다. 비드를 다시 볼 텍싱 한 다음, 추가 15 분 동안 4 °C에서 인큐베이션 하였다.
- [0405] 비오틴화된 항체에 의한 변형 후, 비드를 자석을 통해 포획하고, 항체 혼합물을 흡인에 의해 제거 하였다. 비드는 1e8 비드 / mL의 최종 밀도로 워시 버퍼에 재현탁되었다. 추가 세척없이 비드를 직접 사용 하였다.
- [0406] **특성화.** 생성된 항원 제시 비드의 로딩 정도 및 균질성을 평가하기 위해, 비드를 pMHC에 결합하고 비드에 공 활성화 CD28 / CD2 (존재하는 경우) 항체로 염색 하였다. 이어서, 생성된 양의 염색 항체를 유세포 분석에 의해 정량화 하였다. 이어서, 비드상의 pMHC 및 공동 자극 항체의 수를 제조사의 지시에 따라 분자 정량 키트 (Quantum Simply Cellular, Bangs Labs)를 사용하여 결정하였다.
- [0407] 비드를 분석하기 위해, 2e5 비드를 1 mL의 세척 완충제와 함께 2 개의 미세 원심 분리 튜브 각각에 첨가 하였다. pMHC 정량 및 보조자극 항체 정량을 별도의 튜브에서 수행 하였다. 각각의 개별 실험에서, 비드를 자석을 사용하여 튜브의 벽에 대해 수집하고 세척 완충액을 제거 하였다. 비드를 0.1 mL의 세척 완충제 중 각 튜브에 재현탁시키고, 각 튜브를 간단히 볼 텍싱하여 튜브의 벽으로부터 비드를 분리시켰다. pMHC를 검출하기 위해, APC (클론 BB7.2, Biolegend) 에 접합된 0.5 마이크로 리터의 항-HLA-A 를 제 1 튜브에 첨가 하였다. 제 1 튜브를 다시 간단히 볼 텍싱하여 비드 및 검출 항체를 혼합 하였다. 보조자극 항체를 검출하기 위해, APC 에 접합된 0.5 마이크로 리터의 항-마우스 IgG를 제 2 튜브에 첨가 하였다. 사용된 보조 자극 항체 클론에 따라, 상이한 항-마우스 항체가 사용되었고, 예를 들어, CD28.2 (항-CD28) 및 RPA-2.10 (항-CD2)을 검출하기 위해 RMG1-1 (Biolegend)이 사용되었다. 검출 항체를 각 튜브에 대해 실온에서 어두운 곳에서 30 분 동안 비드와 함께 배양 하였다.
- [0408] 각각의 튜브에 대해, 비드는 자석을 통해 튜브의 벽에 붙잡히고, 염색 용액은 흡인에 의해 제거되었다. 1 mL의 세척 완충제를 각 튜브에 첨가 한 후, 흡인하여 잔류 염색 항체를 제거 하였다. 각 튜브의 비드를 0.2 mL의 세척 완충액에 재현탁시킨 후, 각 튜브의 비드를 5 mL 폴리스티렌 튜브로 옮기고, 두 세트의 비드를 분리시켰다.
- [0409] 상이한 종의 로딩을 정량하기 위해, 비드를 유세포 분석기 (FACS Aria 또는 FACS Celesta, BD Biosciences)에서 분석 하였다. 먼저, 염색되지 않은 산물 항원 함유 비드의 샘플이 수집된다. 단일 및 이중 비드 주위에 게이트가 그려진다. 이중 비드는 더 높은 전방 및 측면 산란 진폭에 기초하여 단일 비드와 구별된다. 일반적으로 약 10,000 개의 비드 이벤트가 기록되었다. 이어서 pMHC 및 보조 자극 항체에 대해 염색된 비드를 별도의 실험에서 분석한다. 또한, 각각의 샘플에 대해 대략 10,000 개의 비드 이벤트가 수집되었고, 단일 비드 이벤트의 APC MFI (median fluorescence intensity) 및 APC MFI (100 * [MFI의 표준 편차] / [MFI])의 변동 계수가 기록되었다.
- [0410] 비드 당 pMHC 및 보조 자극 항체의 수를 결정하기 위해 분자 정량 키트가 사용된다. 키트 (Quantum Simply Cellular (Bangs Laboratories))는 특정 항체 결합 용량 (제조업체에 의해 결정됨)을 갖는 비드 세트를 포함 하

였다. 이들 비드는 검출 항체를 포획하는데 사용된다. 간략하게, 정량화 비드를 포화량의 검출 결합과 함께 인큐베이션 한 다음 철저히 세척하여 과량의 항체를 제거한다. 상이한 결합 용량을 갖는 비드를 음성 대조군 비드와 함께 혼합하고 세척 완충액에 재현탁시켰다. 이어서 혼합 비드를 유세포 분석법에 의해 분석한다. 지정된 결합 능력을 갖는 각 비드의 APC MFI 가 기록되고, 결합 능력에 대한 MFI의 선형 적합이 생성된다. 이어서, aAPC의 MFI를 사용하여 aAPC 당 결합된 검출 항체의 수를 결정한다. 이 수는 비드의 (pMHC 또는 보조 자극) 항체 수와 같다. 다음 표는 다음에 대한 결과를 보여줍니다:

[0411] A. 실시 예 16-17에서 생산되고 본 실험에서 상기 기능화된 항원 제시 콘볼루트된 폴리머 비드.

[0412] B. 실시 예 10B 에서 생성된 항원 제시 실질적 구형 실리카 비드

표 2

조건	라벨링	리간드 / 비드	리간드 / sq um	표적 항체 (ug) / mg 비드
A. 폴리머 비드	HLA	487209	19781	8.1
A. 폴리머 비드	Costim	426992	17336	7.1
B. 4 마이크로 단 분산 실리카 (10B)	HLA	604471	12026	2.35
B. 4 마이크로 단 분산 실리카 (10B)	Costim	760489	15129	2.96

[0414] 예 19. 항원 제시 비드에 의한 자극.

[0415] **입력 세포 집단.** 웰 당 플레이팅된 항원-특이적, CD8+ T 세포의 수를 증가시키기 위해, CD8+ T 세포는 시판되는 시약을 사용하여 말초 혈액 단핵 세포로부터 먼저 분리되었다. 세포는 음성 선택, 예를 들어 EasySep™ Human CD8 + T 세포 분리 키트 (StemCell Technologies)를 사용하거나 양성 선택, 예를 들어 CliniMACS CD8 시약 (Milenyi Biotec)을 사용하여 분리 될 수 있다. CD8+ T 세포를 제조사 권장 프로토콜에 따라 분리 하였다. 대안 적으로, T 세포의 상이한 서브 세트, 예를 들어 나이브 CD8+ T 세포 만을 분리할 수있거나 또는 덜 엄격한 정제, 예를 들어 CliniMACS CD14 시약 (Milenyi Biotec)에 의한 단핵구의 고갈이 수행 될 수 있다. 대안 적으로, 클래스 II- 제한 항원에 특이적인 T 세포가 필요한 경우, CD4+ T 세포는 상응하는 방법에 의해 분리 될 수 있다.

[0416] **첫 번째 T 세포 자극 기간.** 농축된 CD8 + T 세포를 30 나노그램 / mL에서 IL-21과 함께 매질에서 1e6 / mL로 재현탁시켰다 (R & D Systems). T 세포에 사용된 매질은 10 % 인간 AB 혈청 (Corning CellGro) + GlutaMax (Thermo Fisher) 및 50 마이크로 몰 Beta-MercaptoEthanol (Thermo Fisher) 또는 ImmunoCult™ -XF T 세포 확장 매질(StemCell Technologies)가 보충된 Advanced RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher) 이었다..

[0417] 항원 제시 비드는 실시 예 18에 기술된 바와 같이 제조되었고, 여기에서 복잡한 폴리머 비드는 0.83 마이크로 그램의 pMHC / mL의 최종 농도로 로딩되었다. 생성된 많은 비드를 5 개의 부분으로 나누고, 다음 비율로 보조 자극 리간드를 로딩 하였다 :

[0418] 세트 1 : 3.00 마이크로 그램 / mL의 CD28 및 제로 농도의 CD2.

[0419] 세트 2 : 2.25 마이크로 그램 / mL의 CD28 및 0.75 마이크로 그램 / mL의 CD2.

[0420] 세트 3 : 1.50 마이크로 그램 / mL의 CD28 및 2.25 마이크로 그램 / mL의 CD2.

[0421] 세트 4 : 0.75 마이크로 그램 / mL의 CD28 및 2.25 마이크로 그램 / mL의 CD2.

[0422] 세트 5 : 0.00 마이크로 그램 / mL의 CD28 및 3.00 마이크로 그램 / mL의 CD2.

[0423] 매질 내의 T 세포에, 각 세트의 항원 제시 비드의 분취 액을 첨가하여 세포 당 1 개의 항원 제시 비드의 최종 농도로 웰을 분리시켰다. 세포 및 항원 제시 비드를 혼합하고 조직 배양 처리된 둥근 바닥의 96- 웰 마이크로 플레이트에 시딩 하였다. 0.2 mL (2e5 세포)를 플레이트의 각 웰에 첨가 한 후, 표준 5 % CO2 , 37 °C 인큐베이션

터에 넣었다. 전형적으로, 플레이트 당 48-96 개의 웰이 사용되었다. 이를 후, IL-21을 매질에서 150 나노 그램 / mL로 희석 하였다. 매질에 희석된 50 마이크로 리터의 IL-21을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 인큐베이터로 되 돌렸다.

[0424] 추가 5 일 (총 7 일) 동안 세포를 배양 한 후, 항원-특이적 T 세포 확장에 대해 세포를 분석 하였다. 대안 적 으로, 항원 특이적 T 세포의 확장을 계속하기 위해 하기 단락에 기재된 바와 같이 제 2 자극 기간에 세포를 자극 하였다.

[0425] **제 2 T 세포 자극 기간.** 첫 번째 자극 기간이 끝날 때 상기 웰 플레이트의 각 웰로부터, 웰의 바닥에서 세포 펠렛을 방해하지 않도록 주의하면서 50 마이크로 리터의 매질을 제거 하였다. 신선한 매질에서 IL-21을 150 ng / mL로 희석하고, 상기에서 생성된 항원 제시 비드를 4e6 항원 제시 비드 / mL의 최종 밀도로 IL-21 / 매질 혼합물에 첨가 하였다. 이 IL-21 / 항원 제시 비드 / 매질 혼합물 50 마이크로 리터를 각 웰에 첨가하여, 추가의 2e5 항원 제시 비드가 각 웰에 첨가되게 하였다. 임의로, 웰 플레이트를 400xg에서 5 분 동안 원심 분리하여 항원 제시 비드를 세포 상에 펠렛화할 수 있다. 웰 플레이트를 인큐베이터로 돌려 보냈다.

[0426] 다음날 (자극 실험 시작 후 8 일), 웰 플레이트를 인큐베이터에서 제거하고, 각 웰에서 50 마이크로 리터의 매질을 제거 하였다. IL-2 (R & D Systems)를 새로운 매질로 50 Units / mL로 희석 하였다. 여기에, IL-2, IL-7 (R & D Systems)을 함유하는 매질을 25ng / mL의 최종 농도로 첨가 하였다. 50 마이크로리터의 이러한 IL-21/IL-7/매질을 각 웰에 첨가하고, 웰플레이트를 인큐베이터로 되 돌렸다.

[0427] 다음날 (자극 실험 시작 후 9 일), 웰 플레이트를 인큐베이터에서 제거하고, 각 웰에서 50 마이크로 리터의 매질을 제거 하였다. IL-21 를 새로운 매질로 150 나노그램 / mL로 희석 하였다. 50 마이크로리터의 이러한 IL-21/매질을 각 웰에 첨가하고, 웰플레이트를 인큐베이터로 되 돌렸다.

[0428] 추가 5 일 (자극 실험 시작 후 14 일) 동안 세포를 배양 한 후, 항원-특이적 T 세포 확장에 대해 세포를 분석 하였다. 그러나, 항원 특이적 T 세포의 확장을 계속하기 위해 상기와 같이 다른 배양 기간 동안 세포를 보다 많은 항원 제시 비드로 재 자극 할 수 있다.

[0429] **항원 특이적 T 세포 자극 및 확장의 분석.** 원하는 수의 T 세포 자극이 수행되면, 항원 제시 비드를 제조하는데 사용된 pMHC 복합체에 특이적인 T 세포의 확장에 대해 세포를 분석 하였다. 항원-특이적 T 세포는 4 pMHC 복합체에 결합된 피코에리트린 (PE) 접합된 스트렙타비딘을 사용하여 검출된다. 이러한 착물을 사량 체라고한다. 일반적으로, 항원 제시 비드의 pMHC에 사용된 동일한 펩티드로 제조된 사량 체를 사용하여 항원-특이적 T 세포를 검출 하였다.

[0430] 항원-특이적 T 세포를 검출하고 특성화하기 위해, PE- 사량 체 (MBL, Int1) 및 다양한 형광단, 예를 들어, FITC- 접합된 항-CD28, PerCP-Cy5.5- 접합된 항-CD8을 갖는 다양한 세포 표면 마커에 특이적인 항체의 혼합물은 FACS 완충제 (칼슘 또는 마그네슘이 없는 둘베코 인산염 완충 식염수; 2 % 소 태아 혈청; 5 mM 에틸렌 디아민 테트라 아세트산, 10 mM HEPES) 에서 제조 하였다. 사용된 항체의 양은 표준 세포 샘플에 대한 적정에 의해 결정되었다. 특성화를 위해 일반적으로 사용되는 표면 마커는 다음과 같다: CD4, CD8, CD28, CD45RO, CD127 및 CD197. 또한, 살아있는 세포를 구별하고 각각 배양 물에서 세포를 발현하는 임의의 Fc-수용체의 비특이적 항체 염색을 방지하기 위해 살아있는/사멸 세포 구별 염료, 예를 들어, 줌비 Near-IR (Biolegend) 및 Fc 수용체 차단제, 예를 들어 인간 TruStain FcX TM (Biolegend)를 첨가 하였다.

[0431] 전형적으로, 웰을 다중-채널 마이크로-피펫 터를 사용하여 혼합하고, 각각의 웰로부터의 50 마이크로 리터의 세포를 신선한 비 처리된 둥근 바닥 96- 웰 마이크로 플레이트로 옮겼다. 세포를 0.2 mL의 FACS 완충제를 각 웰에 첨가하여 세척 하였다. 세포를 실온에서 5 분 동안 400xg에서 원심 분리하고 세척을 제거 하였다. 각 웰에, 25 마이크로 리터의 테트라 머, 항체, 라이브 / 데드, Fc 차단 시약 혼합물을 첨가 하였다. 세포를 실온에서 호일 하에서 30분 동안 염색하였다. 이어서 세포를 다시 세척하고, 마지막으로 CountBright Absolute Counting Beads (Thermo Fisher)를 사용하여 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 이어서 세포를 유세포 분석 (FACS Aria 또는 FACS Celesta, BD Biosciences)에 의해 분석 하였다. 항원-특이적 T 세포의 빈도는 단일 / 생성 세포에서 먼저 게이팅 한 다음 CD8+ / Tetramer+ 세포에서 게이팅하여 결정 하였다.. 적절한 게이팅 조건은 알려진 특이성 (MBL, Int1) 이 없는 음성 대조군 테트라머 또는 항체 이소 타입 대조군과 같은 대조군 염색으로부터 결정되었다. 항원-특이적 T 세포 집단 내에서, CD127을 발현하는 세포의 수뿐만 아니라, CD45RO + / CD28^{High} 세포의 빈도를 결정 하였다. 높은 수준의 CD28 및 CD127을 계속 발현하는 CD45RO를 발현하는 활성화된 T 세포는 메모리 전구체 효과기 세포를 포함하는 것으로 나타났다. 메모리 전구체 세포는 이들 마커를 발현하지 않는 활성화된 T

세포보다 덜 분화되고 높은 복제 가능성을 갖는 것으로 나타났다.

- [0432] 도 14a: 표시된 양 (마이크로 그램)의 항-CD28 및 / 또는 항-CD2로 제조된 항원 제시 비드로 자극 한 후 7 일 후에 MART1-특이적 T 세포 (생 세포 백분율)의 빈도. 각 점은 96 웰 마이크로 플레이트의 웰을 나타낸다. 데이터는 2 가지 독립적인 실험으로부터 나온 것이다.
- [0433] 도 14b: 표시된 양 (마이크로 그램)의 항-CD28 및 / 또는 항-CD2로 제조된 항원 제시 비드로 자극 한 후 7 일 후에 MART1-특이적 T 세포의 총수. 각 점은 96 웰 마이크로 플레이트의 웰을 나타낸다. 데이터는 2 가지 독립적인 실험으로부터 나온 것이다.
- [0434] 도 14c: 표시된 양 (마이크로 그램)의 항-CD28 및 / 또는 항-CD2로 제조된 aAPC 들로 자극 한 후 7 일 후에 MART1-특이적 T 세포의 배가 증식. 각 점은 96 웰 마이크로 플레이트의 웰을 나타낸다. 데이터는 2 가지 독립적인 실험으로부터 나온 것이다. 배가 확장은 7 일에 각 웰의 MART1 T 세포의 빈도를 0 일에 샘플의 MART1 T 세포의 빈도로 나눔으로써 계산된다.
- [0435] 도 14d: 표시된 양 (마이크로 그램)의 항-CD28 및 / 또는 항-CD2로 제조된 aAPC 들로 자극 한 후 7 일 후에 CD45RO 에 대해 양성이고 CD28 의 높은 수준을 발현하는 MART1-특이적 T 세포의 단편. 각 점은 96 웰 마이크로 플레이트의 웰을 나타낸다. 데이터는 2 가지 독립적인 실험으로부터 나온 것이다. 배가 확장은 7 일에 각 웰의 MART1 T 세포의 빈도를 0 일에 샘플의 MART1 T 세포의 빈도로 나눔으로써 계산된다.
- [0436] 광범위한 비율의 보조 자극 리간드인 항-CD28 및 항-CD2로 항원 특이적 T 세포의 생성이 가능하다는 것이 관찰되었다. 2 개의 보조 자극 리간드 중 하나만 사용하여 생산이 가능 하였다. 그러나, 약 3 : 1 내지 약 1 : 3 의 항-CD28 : 항-CD2의 비를 포함하는 항-CD28 및 항-CD2의 조합은 상기 특성 각각의 증가된 측정을 제공 하였다.
- [0437] 도 15A-도 15E: 상기 한 바와 같이 자극된 T 세포에 대해, 상기 한 바와 같이 생성된 항원 제시 비드에서 SLC45A2 항원을 사용하여, 예시적인 유세포 분석 그래프가 도시된다. 도 15A 는 자극 ("입력") 전에 T 세포의 결과를 보여 주었다. 대표적인 자극된 웰이 하부 패널에 나타난다 : 음의 성장 웰 (도 15B); 중간 성장 웰 (도 15C); 높은 성장 웰 (도 15D); 및 관련없는 테트라머 염색 (도 15E).
- [0438] 도 16: 상술 한 바와 같이 자극된 T 세포의 경우, NYES01 항원을 사용하여, CD45RO에 대해 양성이고 높은 수준의 CD28을 발현하는 T 세포의 빈도는 위에서 설명한 단일 자극 기간 (7 일, 좌측 칼럼) 후 및 2 개의 자극 기간 후에 (14 일, 오른쪽 열) 각각 도시된다.. 항원 특이적 활성화된 T 세포의 증가된 빈도가 관찰되었다.
- [0439] **세포 독성 :** 상기와 같이 생성된 SLC45A2 항원 (DCs, 블랙 바) 또는 항원 제시 비드 (SLC45A2 항원 제시)로 펄스된 수지상 세포를 사용하여 확장된 SLC45A2 특이적 T 세포에 의한 표적 종양 세포 및 비 표적 종양 세포의 사멸 (회색 빗금 바) . 도 17 참조. 표적 세포에서 카스파제-3 의 활성화에 의해 사멸을 측정 하였다. MEL526 종양 세포는 SLC45A2를 발현하고 DC 및 항원 제시 비드 둘 다를 사용하여 확장된 T 세포에 의해 사멸되었다. A375 세포는 SLC45A2를 발현하지 않으며 DC 또는 항원 제시 비드를 사용하여 확장된 T 세포에 의해 사멸되지 않았다. 항원 제시 비드 및 수지상 세포가 수행되었다.
- [0440] 도 18A-18C는 수지상 세포 자극의 세포 생성물과 항원 제시 비드 자극된 세포 생성물의 비교를 보여준다. 도 18A는 항원 제시 비드 자극 실험에서 항원 특이적 (AS) 활성화된 T 세포의 백분율이 더 높다는 것을 보여 주었다. 도 18b는 항원 제시 비드 자극 실험의 세포 생성물이 수지상 세포 자극된 세포 생성물의 것에 비해 원하는 CD45RO 양성/매우 CD28 양성 표현형의 백분율이 더 높은 것을 보여 주었다. 도 18C는 항원 제시 비드 자극 실험에 의해 생성된 세포 생성물에서 항원-특이적 T 세포의 실제 수가 더 높다는 것을 보여 주었다. 전반적으로, 항원 제시 비드 자극은 보다 바람직한 세포 생성물을 제공하고, 수지상 세포 활성화의 사용보다 T 세포를 활성화시키는 보다 제어 가능하고 비용 효과적인 방법이다.
- [0441] 예 20. **단백질 단편 공 활성화 리간드를 갖는 항원 제시 비드의 제조.**
- [0442] **20A. 리신-비오틴화된 CD80 및 CD58 을 갖는 비드의 항원 제시 표면의 제조.** 스트렙타비딘 기능화된 (공유 결합된, 콘볼루트된 (위에 설명된대로) 폴리머) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D, 6.67e8/mL의 비드 스톱) 가 1mL의 세척 버퍼 (DPBS (마그네슘+2 없음, 칼슘+2 없음, 244 mL)를 사용하여 1.5mL 마이크로 원심 분리 튜브에 에 전달되고 (15 μ L; 1e7 비드들), EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5mL의 5 %, 최종 농도 0.1 %) , 및 자성 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL의 세척 완충제로 세척 / 분리를 반복하고, 추가의 펄스 원심 분리로 추가 200 마이크로 리터의 세척 완충제를 첨가 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.

- [0443] 0.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 SLC45A2 (Biolegend, Custom Product, SLYSYFQKV)를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 마이크로 원심 분리 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 펄스 원심 분리하고 상청액을 제거하고, 튜브를 자기 랙 내에 배치하여 비드를 제거하지 않고 더 많은 상청액을 제거 하였다.
- [0444] 600 마이크로 리터 세척 완충액 중의 비오틴화 제조합 CD80 단백질 (R & D 시스템, 맞춤형 제품) 및 비오틴화 제조합 CD58 (R & D 시스템, 맞춤형 제품)의 용액을 마이크로 원심 분리 튜브에 첨가 하였다. CD80을 인간 IgG1 Fc 도메인에 대한 N-말단 융합으로서 제조하고, 제조자에 의해 랜덤 리신 잔기상에서 비오틴화시켰다. CD58을 동일한 방식으로 비오틴화시켰다. 용액은 총 4.5 마이크로 그램의 CD80 및 1.5 마이크로 그램의 CD58을 함유 하였다. 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 비드를 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션 한 다음, 15 분 후에 또 다른 상하 피펫팅으로 재현탁시켰다. 인큐베이션 기간의 말기에, 튜브를 간단히 펄스 원심 분리하였다. 자기 랙에 다시 넣고 1 분 동안 분리 한 후, 완충 용액을 기능화된 비드로부터 흡인시켰다. MHC 단량체/CD80/CD58 항원 제시 비드를 100 마이크로 리터 세척 완충액에 재현탁시키고, 4 °C에서 보관하고, 추가 조작 없이 사용 하였다. 1e7 2.80 미크론 직경의 기능화된 DynaBead는 T 림프구 세포와의 접촉에 이용 가능한 약 24e6 제곱 미크론의 공칭 표면적을 가지며, 이는 본원에 기술된 바와 같이 pMHC 및 보조 자극 분자 리간드가 차지하는 총 표면을 반영하지 않는다.
- [0445] **20B. BirA 비오틴화된 CD80 및 CD58 을 갖는 비드의 항원 제시 표면의 제조.** 스트렙타비딘 기능화된 (공유 결합된, 콘볼루트된 (위에 설명된대로) 폴리머) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D, 6.67e8/mL의 비드 스톱)가 1mL의 세척 버퍼 (DPBS (마그네슘+2 없음, 칼슘+2 없음, 244 mL)를 사용하여 1.5mL 마이크로 원심 분리 튜브에 에 전달되고 (15 µL; 1e7 비드들), EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5mL의 5 %, 최종 농도 0.1 %) , 및 자성 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL의 세척 완충제로 세척 / 분리를 반복하고, 추가의 펄스 원심 분리로 추가 200 마이크로 리터의 세척 완충제를 첨가 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.
- [0446] 0.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 MART1 (Biolegend, Custom Product, ELAGIGILT))를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 마이크로 원심 분리 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 펄스 원심 분리하고 상청액을 제거하고, 튜브를 자기 랙 내에 배치하여 비드를 제거하지 않고 더 많은 상청액을 제거 하였다.
- [0447] 600 마이크로 리터 세척 완충액 중의 비오틴화 제조합 CD80 단백질 (BPS Biosciences, Catalog Number 71114) 및 비오틴화 제조합 CD58 (BPS Biosciences, Catalog Number 71269)의 용액을 마이크로 원심 분리 튜브에 첨가 하였다. 제조합 단백질은 최종 C- 말단 BirA 비오틴화 부위를 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인에 대한 N- 말단 융합으로서 제조되고, 제조자에 의해 비오틴화되었다. 용액은 총 1.5 마이크로 그램의 제조합 CD80 및 1.5 마이크로 그램의 제조합 CD58 단백질을 함유 하였다. 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 비드를 4 °C에서 30 분 동안 인큐베이션 한 다음, 15 분 후에 또 다른 상하 피펫팅으로 재현탁시켰다. 인큐베이션 기간의 말기에, 튜브를 간단히 펄스 원심 분리 하였다. 자기 랙에 다시 넣고 1 분 동안 분리 한 후, 완충 용액을 기능화된 비드로부터 흡인시켰다. MHC 단량체/CD80/CD58 항원 제시 비드를 100 마이크로 리터 세척 완충액에 재현탁시키고, 4 °C에서 보관하고, 추가 조작없이 사용 하였다. 1e7 2.80 미크론 직경의 기능화된 DynaBead는 T 림프구 세포와의 접촉에 이용 가능한 약 24e6 제곱 미크론의 공칭 표면적을 가지며, 이는 본원에 기술된 바와 같이 pMHC 및 보조 자극 분자 리간드가 차지하는 총 표면을 반영하지 않는다.
- [0448] **예 21. 제조합 단백질 보조 자극과 비교하여 항체 보조 자극으로 항원 제시 비드에 의한 CD8+ T 림프구의 활성화.**
- [0449] 세포 : CD8 + T 림프구는 EasySep™ 인간 CD8 + T 세포 분리 키트, 음성 선택에 의해 StemCell Technologies Canada Inc. (카탈로그 # 17953)로부터 시판되는 키트에 대한 제조업체의 지시에 따라 상업적으로 이용 가능한 PBMC로부터의 RPMI 플러스 10 % 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 매질에서 농축되었다.
- [0450] 시약 첨가를 위한 배양 매질 및 희석제 : 고급 RPMI (ThermoFisher 카탈로그 번호 12633020, 500mL); 1x GlutaMAX (ThermoFisher 카탈로그 번호 35050079, 5mL); 10 % 인간 AB 혈청 (zen-bio, Catalog # HSER-ABP 100mL, 50mL); 및 50nM 베타-메르 캅토 에탄올 (ThermoFisher 카탈로그 번호 31350010, 50nm 스톱, 0.5mL, 최종 conc 50 마이크로 몰).

- [0451] 실험 설정 : 각 활성화 중에 대해, 단일 96-웰 조직 배양 처리 플레이트 (VWR 카탈로그 번호 10062-902)를 사용 하였다.
- [0452] 웰 플레이트 1. 항체 보조 자극을 가진 항원 제시 비드).
- [0453] 웰 플레이트 2. 무작위 비오틴화 재조합 단백질 공 활성화를 갖는 항원 제시 비드.
- [0454] 웰 플레이트 3. BirA 비오틴화된 재조합 단백질 공 활성화를 갖는 항원 제시 비드.
- [0455] CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 각각의 개별 웰에 첨가 하였다.
- [0456] MART1, 항-CD28 항체 및 항-CD2 항체를 포함하는 pMHC를 제시하는 실시 예 15에서 기술된 유사한 제조에 의해 제조된 항원 제시 표면 비드 (2e5)를 웰 플레이트 1의 각 웰에 첨가 하였다. pMHC를 0.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 항-CD28 항체를 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 항-CD2 항체를 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다.
- [0457] MART1, 재조합 CD80 및 재조합 CD58 을 포함하는 pMHC를 제시하는 실시 예 20A에서와 같이 제조된 항원 제시 표면 폴리머 비드 (2e5)를 웰 플레이트 2의 각 웰에 첨가 하였다. pMHC를 0.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 재조합 CD80 을 4.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 재조합 CD58 을 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다.
- [0458] MART1, BirA 비오틴화된 재조합 CD80 및 재조합 CD58 을 포함하는 pMHC를 제시하는 실시 예 20B에서와 같이 제조된 항원 제시 표면 폴리머 비드 (2e5)를 웰 플레이트 3의 각 웰에 첨가 하였다. pMHC를 0.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 재조합 CD80 을 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다. 재조합 CD58 을 1.5 마이크로 그램 / 1e7 비드로 로딩 하였다.
- [0459] 각 웰 플레이트를 37 °C에서 배양 하였다. 0 일에, CTL 매질 중의 IL-21 (150ng / 밀리리터)을 웰 플레이트 1 및 2 의 각 웰에 첨가하여, 각 웰에서 30 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 2 일에, IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양은 7 일까지 계속되었다.
- [0460] 7일. 재 자극. 항체 보조 자극 또는 재조합 단백질 보조 자극을 갖는 항원 제시 비드의 제 2 분취량을 각각 웰 플레이트 1, 웰 플레이트 2 및 웰 플레이트 3에서 각각 점유된 웰에 전달 하였다. IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양이 계속되었다.
- [0461] 8일. 각각의 웰 플레이트에서 각각의 웰에 50 마이크로 리터의 IL-2 (50 IU / mL) 및 IL-7 (25ng / mL)을 첨가 하여 각각 10 IU / mL 및 5 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 배양이 계속되었다.
- [0462] 9일. 각각의 웰 플레이트의 각각의 점유된 웰에 50 마이크로 리터의 IL-21 (150ng / mL)을 첨가하여 30ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 배양이 계속되었다.
- [0463] 14일. 각 웰 플레이트로부터의 웰을 MHC 테트라머 (Tetramer PE, MBL 카탈로그 번호 T02000, 1 마이크로 리터 / 웰), CD4 (Biolegend 카탈로그 번호 300530, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD8 (Biolegend Catalog # 301048, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD28 (Biolegend 카탈로그 번호 302906, 0.31 마이크로 리터 / 웰); CD45RO (Biolegend Catalog # 304210, 0.63 마이크로 리터 / 웰); CCR7 (CD197, Biolegend 카탈로그 번호 353208, 0.5 마이크로 리터 / 웰); 및 생존력 (BD 카탈로그 번호 565388, 0.125 마이크로 리터 / 웰)에 대해 개별적으로 염색하였다. 각 웰을 150 마이크로 리터 FACS 완충액 및 10 마이크로 리터의 카운트 브라이트™ 비즈 (ThermoFisher 카탈로그 번호 C36950)로 재현탁시켰다. FACS 분석은 FACSCelesta™ 유세포 분석기 (BD Biosciences)에서 수행되었다.
- [0464] 도 19A는 항체 또는 무작위로 비오틴화된 재조합 단백질 리간드를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1- 특이적 T 세포 (모든 생 세포 중의 %)의 빈도를 나타낸다. 도 19B는 항체 또는 무작위로 비오틴화된 재조합 단백질 리간드를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1- 특이적 T 세포의 수를 나타낸다. 도 19C는 높은 수준의 CD28을 발현하는 MART1 T 세포의 빈도, 항체 자극 또는 무작위 비오틴화된 재조합 단백질 리간드를 비교하는 기억 전구체 표현형의 지표를 나타낸다.
- [0465] 도 19D는 항체 또는 재조합 단백질 BirA 리간드를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1- 특이적 T 세포 (모든 생 세포 중의 %)의 빈도를 나타낸다. 도 19E는 항체 또는 재조합 단백질 BirA 리간드를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1- 특이적 T 세포의 수를 나타낸다. 도 19F는 높은 수준의 CD28을 발현하는 MART1 T 세포의 빈도, 기억 전구체 표현형의 지표를 나타낸다. BirA에 의해 비

오티화된 재조합 단백질 리간드를 갖는 항원 제시 비드는 항원-특이적 CD8 + T 세포를 효과적으로 확장시키고, 확장된 세포 중 다수가 기억 전구체 표현형을 취한다는 것을 알 수 있다. 대조적으로, 무작위 비오티화된 단백질 리간드의 사용은 상당한 항원 특이적 T 세포 집단을 초래하지 않았고 또한 세포에 기억 전구체 표현형을 제공하지 않았다.

[0466] **예 22. 콘볼루트된 폴리머 비드와 실질적인 구형 실리카 비드의 로딩 및 그에 의한 활성화의 비교.**

[0467] **실시형태 22A: 폴리머 및 실리카 항원 제시 비드에 로딩하는 활성화 종의 비교.** 폴리머 및 실리카 비드 상에 침착될 수 있는 pMHC 및 보조자극 항체의 양을 측정 하였다.

[0468] 스트렙타비딘 기능화된 (공유 결합된) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D, 6.67e8/mL의 비드 스톡)가 1mL의 세척 버퍼 (DPBS (마그네슘+2 없음, 칼슘+2 없음, 244 mL)를 사용하여 1.5mL 마이크로 원심 분리 튜브에 에 전달되고 (15 µL; 1e7 비드들), EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5mL의 5 %, 최종 농도 0.1 %) , 및 자성 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL의 세척 완충제로 세척 / 분리를 반복하고, 추가의 펄스 원심 분리로 추가 200 마이크로 리터의 세척 완충제를 첨가 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.

[0469] 비오티인 관능화된 (공유 결합) 평활 실리카 비드를 먼저 100 마이크로 몰 스트렙타비딘에 저장함으로써 스트렙타비딘으로 코팅 하였다. 대략 5e6 비드를 마이크로 원심 분리 튜브에서 1 밀리리터의 세척 완충액으로 희석시킨 후, 1,000xg에서 1 분 동안 원심 분리하여 세척 하였다. 상청액을 흡인에 의해 조심스럽게 제거하고, 세척 과정을 2 회 더 반복 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.

[0470] 항원 제시 비드를 제조하기 위해, 0.5 마이크로 그램 비오티화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 SLC45A2 (Biolegend, Custom Product, SLYSYFQKV) 를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 DynaBeads 및 실리카 비드를 갖는 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다.

[0471] 1.5 마이크로 그램의 비오티화 항-CD28 및 1.5 마이크로 그램의 비오티화 항-CD2를 갖는 세척 완충제 (600 마이크로 리터)를 사용하여 각각의 비드 샘플을 재현탁시키고 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 항체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다. 마지막으로, 비드를 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시켰다.

[0472] 대략 2e5 폴리머 항원 제시 비드 또는 1e5 실리카 항원 제시 비드의 2 개의 샘플을 세척 완충제 (1 밀리리터)로 세척 하였다. 비드 샘플을 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시키고 1 마이크로 리터의 APC-접합된 항-HLA-A (Biolegend, 카탈로그 번호 343308) 또는 1 마이크로 리터의 APC- 접합된 단일 클론 항-마우스 -IgG1 (Biolegend, 카탈로그 번호 406610)의 첨가에 의해 염색하였다. 비드를 항체와 혼합하고 어둠 속에서 30 분 동안 염색시켰다. 염색 후, 비드를 세척하고 세척 완충액 (200 마이크로 리터)에 재현탁시키고 유세포 분석법에 의해 분석하기 위해 튜브로 옮겼다.

[0473] 이어서, 양자 단순 세포 형광 정량 비드 (Bangs Labs, 카탈로그 번호 815) 세트를 제조하여 각각의 항원 제시 비드 샘플에 결합된 항-HLA-A 항체 및 항-마우스 IgG1 항체의 수를 결정 하였다. 정량 비드는 제조사에 의해 결정된 항체 결합 능력을 갖는다. 미리 결정된 결합능력을 갖는 각각의 비드의 드롭을 50 마이크로 리터의 세척 완충액을 갖는 마이크로 원심 분리 튜브에 넣었다. 튜브에, 5 마이크로 리터의 APC-접합된 항-HLA-A 또는 APC-접합된 항-마우스 IgG1을 첨가하고 볼 텍싱에 의해 혼합 하였다. 상기 비드는 어둠 속에서 30 분 동안 염색되었고, 상기와 동일한 방법으로 세척되었다. 결합 용량이 다른 비드를 하나의 샘플에 모으고 단일 튜브로 옮겼다. 한 방울의 블랭크 비드 (항체 결합 능력 없음)를 첨가하고 비드를 유세포 분석법으로 분석 하였다.

[0474] 5,000 개 이벤트를 기록함으로써 유세포 분석법 (BD FACSCelesta, Becton Dickinson 및 Company)에 의해 정량 비드를 분석 하였다. 정량 비드는 포워드 스캐터 및 사이드 스캐터에 의해 식별되었고, 각 비드의 APC 채널에서 중간 강도가 기록되었다. 이 데이터는 APC 강도 대 항체 결합 용량의 표준 곡선을 계산하는 제조사 (Bangs)가 제공 한 독점 Excel 스프레드 시트에 기록되었습니다. 교정이 선형임을 확인한 후, 항원 제시 비드 샘플을 분석 하였다. 비드는 포워드 및 사이드 스캐터에 의해 식별되었고, APC 채널에서 중간 강도가 그 스프레드 시트상에 기록되었다. 스프레드 시트는 각 항원 제시 비드에서 APC 항-HLA-A 항체 또는 APC 항-마우스 IgG1의 수를 계산 한다. 1 개의 항-HLA-A 항체가 항원 제시 비드상의 하나의 pMHC에 결합한다고 가정하면, 이 값은 각 비드상의

pMHC 분자의 수를 나타낸다. 유사하게, 보조 자극 항체의 수를 결정할 수 있다.

[0475] 각각의 항원 제시 비드의 공칭 표면적으로부터, 각 종의 밀도 (분자 수 / 제곱 마이크로미터의 비드 표면)가 결정될 수 있다. 실리카 마이크로 스피어상의 pMHC의 총 수는 대략 800,000 pMHC / 항원 제시 비드인 것으로 결정되었다. 보조 자극 항체의 총 수는 약 850,000 개 항체 / 비드 인 것으로 결정되었다. 항원 제시 비드를 제조하는데 사용된 항-CD28 및 항-CD2 클론을 구별 할 방법이 없기 때문에 (그들은 동일한 이소 타입 임), 두 항체의 비는 1 : 1 인 것으로 가정된다. 실리카 비드 표면의 규칙 성으로 인해, 표면 영역을 구에서 합리적으로 모델링 할 수 있다. 4.08 마이크로 직경 마이크로스피어의 경우, 이는 약 52.3 제곱 마이크로미터의 표면적에 해당한다. 이로부터, 비드 표면의 제곱 마이크로미터 당 약 15,000 pMHC 및 15,000 보조 자극 항체가 표 1에 나타난 바와 같이 실리카 항원 제시 비드에 의해 제시되는 것으로 추정 될 수 있다. 각각의 리간드 클래스에 대한 각 비드 집단에 대한 분포는 도 20a 에 도시되어 있고, 여기서 각각의 행 2010, 2020 및 2030은 좌측 그래프에서 pMHC의 분포, 및 각 유형의 비드에 대한 우측 그래프에서의 보조 자극 항체의 분포를 보여준다. 2010 행은 2.8 마이크로 직경의 콘볼루트된 폴리머 비드 (Dynal)에 대한 리간드의 분포를 보여준다. 2020 행은 4.5 마이크로 직경의 콘볼루트된 폴리머 비드 (Dynal)에 대한 리간드의 분포를 보여준다. 2030 행은 실시 예 10B 에서 생성된 2.5 마이크로 직경의 실질적으로 구형 인 실리카 비드에 대한 리간드의 분포를 보여준다. 엄격하게 조절된 비드 집단이 생성되었고, 실질적으로 구형 인 실리카 비드는 전체 모집단에 걸쳐 리간드의 훨씬더 엄격하게 제어된 분포를 가지고, 중간 분포는 약간 더 높다. 따라서, 실질적으로 구형 인 실리카 비드의 사용은 이들 활성화 종의 보다 재현 가능하고 제어 가능한 생산을 초래할 수 있다. 또한, 모든 리간드가 콘볼루트된 폴리머 비드 리간드 분포와 달리 T 림프구에 접근 할 수 있기 때문에, 항체와 같은 귀중한 생물학적 리간드가 보다 효율적으로 사용된다.

[0476] 표 1. 콘볼루트된 폴리머 비드 및 실질적으로 구형 인 실리카 비드에 대한 리간드 정량 및 밀도.

표 3

비드	pMHC / 비드	pMHC 밀도 (분자 / 평방 마이크로미터)	동시 자극 항체 / 비드	동시 자극 항체 밀도 (분자 / 평방 마이크로미터)
M-280 폴리머	487,209	19,781	426,992	17,336
실리카,	807,180	14,847	845,388	15,550

[0478] 폴리머 비드의 경우, 콘볼루트된 표면은 비드 직경과 표면적 사이의 관계를 덜 간단하게 만든다. 정량으로부터, M-280 DynaBeads에 기초한 폴리머 항원 제시 비드는 표면에 약 480,000 개의 pMHC 분자 및 425,000 개의 보조 자극 항체가 있는 것으로 결정되었다. 반경 1.4 마이크로미터의 구 (M-280 DynaBeads의 공칭 반경과 동일)의 경우, 이는 표 1 에 표시된 바와 같이, 제곱 마이크로미터 당 약 20,000 pMHC 및 17,000 보조 자극 항체에 해당한다. 그러나, 폴리머 비드의 콘볼루트된 표면으로 인해, 실제 표면적이 더 클 수 있고, 따라서 실제 밀도는 더 낮아진다. 그러나, 도 20E, 도 20F 및 도 20G 로부터, 이들 비드가 다수의 항원-특이적 T 세포를 확장시키기 위해 항원 제시 비드 기질로서 사용될 수 있으며, 여기서 증식은 실시 예 22B와 유사한 방식으로 수행됨을 알 수 있다. 또한, 도 20H 로부터, 이들 항원 제시 비드는 기억 전구체 표현형을 나타내는 CD28의 높은 발현으로 다수의 항원-특이적 T 세포를 생성 하였다.[00438] 스트렙타비딘으로 개질된 M-450 에폭시 다이아 비드를 사용하여 동일한 방식으로 항원 제시 비드를 제조 하였다. 유세포 분석으로부터, M-450 비드로부터 제조된 항원 제시 비드는 M-280 DynaBeads로 제조된 항원 제시 비드와 대략 동일한 수의 pMHC 및 보조 자극 항체 분자를 가졌다. M-450 다이아 비드가 M-280 비드보다 크기 때문에, 이는 M-450 항원 제시 비드상의 활성화 종의 밀도가 M-280 항원 제시 비드보다 약 2-3 배 더 낮음을 의미한다. 그러나, 도 20f 에서 관찰할 수 있는 바와 같이, M-450 항원 제시 비드는 SLC45A2 T 세포를 증식시키는데 사용될 때 양성 웰 (SLC45A2- 특이적 T 세포가 웰에서 살아있는 세포의 0.5 % 이상을 나타내도록 증식된) 을 생성 하였다. 도 20G 및 도 20H 로부터, 이들 웰은 높은 빈도로 SLC45A2 T 세포를 생성하였고, SLC45A2 T 세포의 수는 M-280 항원 제시 비드로부터 수득된 수와 비교할 만 하였다. 또, 도 20I 로부터, 높은 수준의 CD28을 발현하는 SLC45A2 T 세포의 단편은 SLC45A2 T 세포를 확장시키기 위해 M-280 또는 M-450 항원 제시 비드를 사용할 때 필적 하였다.

[0479] 실시형태 22B: 폴리머 대 실리카 비드에 의한 항원-특이적 T 세포의 확장. 실리카 항원 제시 비드를 사용하여 항원-특이적 T 세포의 확장을 시험하고 콘볼루트된 폴리머 비드 (폴리스티렌)와 비교 하였다.

- [0480] 스트렙타비딘 기능화된 (공유 결합된, 콘볼루트된) DynaBeads™ (ThermoFisher Catalog # 11205D, 6.67e8/mL의 비드 스톱)가 1mL의 세척 버퍼 (DPBS (마그네슘+2 없음, 칼슘+2 없음, 244 mL)를 사용하여 1.5mL 마이크로 원심 분리 튜브에 에 전달되고 (15 μ L; 1e7 비드들), EDTA (1mL, 최종 농도 2mM); 및 BSA (5mL의 5 %, 최종 농도 0.1 %) , 및 자성 DynaBead 랙을 사용하여 분리되었다. 1 mL의 세척 완충제로 세척 / 분리를 반복하고, 추가의 펄스 원심 분리로 추가 200 마이크로 리터의 세척 완충제를 첨가 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.
- [0481] 실시형태 10B 에서와 같이 제조된 비오틴 관능화된 (공유 결합) 평활 실리카 비드를 먼저 100 마이크로 물 스트렙타비딘에 저장함으로써 스트렙타비딘으로 코팅 하였다. 대략 5e6 비드를 마이크로 원심 분리 튜브에서 1 밀리리터의 세척 완충액으로 희석시킨 후, 1,000xg에서 1 분 동안 원심 분리하여 세척 하였다. 상청액을 흡인에 의해 조심스럽게 제거하고, 세척 과정을 2 회 더 반복 하였다. 상청액 세척 완충제를 제거 하였다.
- [0482] 항원 제시 비드를 제조하기 위해, 0.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 SLC45A2 (Biolegend, Custom Product, SLYSYFQKV) 를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 DynaBeads 및 실리카 비드를 갖는 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다 . 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다.
- [0483] 1.5 마이크로 그램의 비오틴화 항-CD28 및 1.5 마이크로 그램의 비오틴화 항-CD2를 갖는 세척 완충제 (600 마이크로 리터)를 사용하여 각각의 비드 샘플을 재현탁시키고 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 항체들을 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다. 마지막으로, 비드를 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시켰다.
- [0484] 세포 : CD8 + T 림프구는 EasySep™ 인간 CD8 + T 세포 분리 키트, 음성 선택에 의해 StemCell Technologies Canada Inc. (카탈로그 # 17953)로부터 시판되는 키트에 대한 제조업체의 지시에 따라 상업적으로 이용 가능한 PBMC로부터의 RPMI 플러스 10 % 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 매질에서 농축되었다.
- [0485] 시약 첨가를 위한 배양 매질 및 희석제 : 고급 RPMI (ThermoFisher 카탈로그 번호 12633020, 500mL); 1x GlutaMAX (ThermoFisher 카탈로그 번호 35050079, 5mL); 10 % 인간 AB 혈청 (zen-bio, Catalog # HSER-ABP 100mL, 50mL); 및 50nM 베타-메르 캅토 에탄올 (ThermoFisher 카탈로그 번호 31350010, 50nm 스톱, 0.5mL, 최종 conc 50 마이크로 몰).
- [0486] 실험 설정 : 각 유형의 항원 제시 비드 (이 실시 예에서 위에서 제조된 실리카 또는 폴리머)에 대해, 단일 96 조각 배양 처리 웰 플레이트 (VWR 카탈로그 번호 10062-902)를 사용 하였다. 실리카 항원 제시 비드를 ~ 1 : 2 비드 : 세포에서 CD8 + T 림프구와 혼합 하였다. CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 대략 1e5 항원 제시 비드 (웰 플레이트 1)와 함께 각 웰에 첨가 하였다. 폴리머 항원 제시 비드는 ~ 1 : 1 비드 : 세포에서 CD8 + T 림프구와 혼합되었다. CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 대략 2e5 항원 제시 비드 (웰 플레이트 2)와 함께 각 웰에 첨가 하였다.
- [0487] 각 웰 플레이트를 37 °C에서 배양 하였다. 0 일에, CTL 매질 중의 IL-21 (150ng / 밀리리터)을 웰 플레이트 1 및 2 의 각 웰에 첨가하여, 각 웰에서 30 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 2 일에, IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양은 7 일까지 계속되었다.
- [0488] 7일. 재 자극. 항원 제시 비드의 제 2 분취량을 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 대응하는 웰에 첨가하였다. 실리카 비드의 경우, 대략 1e5 비드 (이 예에서 상기에서 제조된 실리카 비드)를 첨가 하였다. 폴리머 비드의 경우, 대략 2e5 비드 (이 실시 예에서 상기 제조된 바와 같은 콘볼루트된 폴리머 비드)를 첨가 하였다. IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양이 계속되었다.
- [0489] 8일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 각각의 웰에 50 마이크로 리터의 IL-2 (50 IU / mL) 및 IL-7 (25ng / mL)을 첨가하여 각각 10 IU / mL 및 5 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.
- [0490] 9일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2 의 각각의 점유된 웰에 50 마이크로 리터의 IL-21 (150ng / mL)을 첨가하여 30ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.
- [0491] 14일. 각 웰 플레이트로부터의 웰을 MHC 테트라머 (Tetramer PE, MBL 카탈로그 번호 T02000, 1 마이크로 리터 / 웰), CD4 (Biolegend 카탈로그 번호 300530, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD8 (Biolegend Catalog # 301048,

0.5 마이크로 리터 / 웰); CD28 (Biolegend 카탈로그 번호 302906, 0.31 마이크로 리터 / 웰); CD45RO (Biolegend Catalog # 304210, 0.63 마이크로 리터 / 웰); CCR7 (CD197, Biolegend 카탈로그 번호 353208, 0.5 마이크로 리터 / 웰); 및 생존력 (BD 카탈로그 번호 565388, 0.125 마이크로 리터 / 웰)에 대해 개별적으로 염색하였다. 각 웰을 150 마이크로 리터 FACS 완충액 및 10 마이크로 리터의 카운트 브라이트™ 비즈 (ThermoFisher 카탈로그 번호 C36950)로 재현탁시켰다. FACS 분석은 FACSCelesta™ 유세포 분석기 (BD Biosciences)에서 수행되었다.

[0492] 도 20B는 폴리머 또는 실리카 항원 제시 비드를 사용하는 증식 후에 (SLC45A2-특이적 T 세포가 웰에서 살아있는 세포의 0.5 % 이상을 나타내도록 증식된) 양성 웰의 퍼센트를 도시한다. 도 20C는 폴리머 또는 실리카 항원 제시 비드로 증식 한 후의 SLC45A2 T 세포 빈도 (각 웰에서의 생 세포의 %)를 나타낸다. 도 20D는 각 웰에서 SLC45A2 T 세포의 총 수를 나타낸다. 도 20E는 높은 수준의 CD28을 발현하는 웰에서 SLC45A2 T 세포의 백분율을 보여 주며, 이는 메모리 T 세포로의 분화 가능성을 나타낸다. 이들 플롯으로부터, 실리카 항원 제시 비드가 양성 웰을 생성하고, 실리카 항원 제시 비드가 폴리머 항원 제시 비드보다 SLC45A2 T 세포를 확장하거나 또는 더 우수함을 알 수 있다. 또한, 실리카 항원 제시 비드는 CD28의 높은 발현을 갖는 세포를 생성하여, 이들이 세포 생성물에 대한 원하는 표현형 인 메모리 전구체 T 세포의 형성을 지지 함을 나타낸다.

[0493] 폴리머 비드의 경우, 콘볼루트된 표면은 비드 직경과 표면적 사이의 관계를 덜 간단하게 만든다. 정량으로부터, M-280 DynaBeads에 기초한 폴리머 항원 제시 비드는 표면에 약 480,000 개의 pMHC 분자 및 425,000 개의 보조 자극 항체가 있는 것으로 결정되었다. 반경 1.4 미크론의 구 (M-280 DynaBeads의 공칭 반경과 동일)의 경우, 이는 제곱 미크론 당 약 20,000 pMHC 및 17,000 보조 자극 항체에 해당한다. 그러나, 폴리머 비드의 콘볼루트된 표면으로 인해, 실제 표면적이 더 클 수 있고, 따라서 실제 밀도는 더 낮아진다. 그러나, 도 20F, 도 20G 및 도 20H로부터, 이들 비드가 다수의 항원-특이적 T 세포를 확장시키기 위해 항원 제시 비드 기질로서 사용될 수 있다. 또한, 도 20I로부터, 이들 항원 제시 비드는 기억 전구체 표현형을 나타내는 CD28의 높은 발현으로 다수의 항원-특이적 T 세포를 생성 하였다.

[0494] **실시형태 23A: 한정된 리간드 밀도를 갖는 항원 제시 비드의 제조.**

[0495] **실시형태 23A.1 스트렙타비딘 제시 비드의 제조.** 세척 완충액 중 pMHC (HLA-A * 02:01 SLC45A2 (Biolegend, Custom Product, SLYSYFQKV))의 3 배 연속 희석 물을 제조 하였다. 20 μ l의 세척 완충제를 각각의 연속 희석이 수행되도록 마이크로 원심 분리기 튜브에 첨가 하였다. 제 1 연속 희석 튜브에, 10 마이크로 리터의 pMHC를 첨가 하였다. 희석된 pMHC를 볼 텍싱에 의해 혼합 하였다. 이어서, 10 μ l의 희석된 pMHC 혼합물을 사용하여 총 7 회 희석을 위한 후속 연속 희석을 제조 하였다.

[0496] 용액 중 pMHC의 농도와 비드에 증착된 밀도 (분자 / 단위 면적) 사이의 관계를 결정하려면, 실시형태 10B에서와 같이 제조된 비오틴 관능화된 (공유 결합) 평활 (예를 들어, 상기 기재된 바와 같이 실질적으로 구형) 4 미크론 단분산 실리카 비드 (Cat. # SiO2MS-1.8 4.08 μ m - 1g, Cospheric)을 먼저 100 마이크로 물 스트렙타비딘에 저장함으로써 스트렙타비딘으로 코팅 하였다. 대략 $1e7$ 비드를 마이크로 원심 분리 튜브에서 1 밀리리터의 세척 완충액으로 희석시킨 후, 1,000xg에서 1 분 동안 원심 분리하여 세척 하였다. 상청액을 흡인에 의해 조심스럽게 제거하고, 세척 과정을 2 회 더 반복 하였다. 세척 후, 대략 $1e6$ 비드를 8 개의 미세 원심 분리 튜브에 전달하고, 다시 원심 분리하고, 상청액을 조심스럽게 제거 하였다.

[0497] **실시형태 23A.2 MHC 농도 범위를 갖는 비드의 제조.** 4.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 SLC45A2 (Biolegend, Custom Product, SLYSYFQKV)를 함유하는 세척 완충액 (120 마이크로 리터)를 마이크로 원심 분리 튜브들 중 하나에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 희석되지 않은 pMHC 및 pMHC의 연속 희석 물을 추가로 세척 완충제 (120 마이크로 리터)로 희석하고 비드를 재현탁시키는 데 사용하여, $5e6$ 비드 당 4.5, 1.5, 0.5, 0.167, 0.056, 0.019, 0.006 또는 0.002 마이크로 그램의 pMHC 단량체를 갖는 용액에 비드를 현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 원심 분리하고, 상청액을 제거하고, 비드는 대략 $5e7$ / 밀리리터에서 재현탁시켰다.

[0498] 각 농도의 pMHC로 제조된 대략 $1e5$ 비드를 세척 완충제 (1 밀리리터)로 세척 하였다. 비드 샘플을 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시키고 1 마이크로 리터의 APC-접합된 항-HLA-A (Biolegend, 카탈로그 번호 343308)의 첨가에 의해 염색하였다. 비드를 항체와 혼합하고 어둠 속에서 30 분 동안 염색시켰다. 염색 후, 비드를 세척하고 세척 완충액 (200 마이크로 리터)에 재현탁시키고 유세포 분석법에 의해 분석하기 위해 튜브로 옮겼다.

- [0499] 이어서, 양자 단순 세포 형광 정량 비드 (Bangs Labs, 카탈로그 번호 815) 세트를 제조하여 각각의 항원 제시 비드 샘플에 결합된 항-HLA-A 항체의 수를 결정 하였다. 정량 비드는 제조사에 의해 결정된 항체 결합 능력을 갖는다. 미리 결정된 결합능력을 갖는 각각의 비드의 드롭을 50 마이크로 리터의 세척 완충액을 갖는 마이크로 원심 분리 튜브에 넣었다. 튜브에, 5 마이크로 리터의 APC-접합된 항-HLA-A 를 첨가하고 볼 텍싱에 의해 혼합 하였다. 상기 비드는 어둠 속에서 30 분 동안 염색되었고, 상기와 동일한 방법으로 세척되었다. 결합 용량이 다른 비드를 하나의 샘플에 모으고 단일 튜브로 옮겼다. 한 방울의 블랭크 비드 (항체 결합 능력 없음)를 첨가하고 비드를 유세포 분석법으로 분석 하였다.
- [0500] 5,000 개 이벤트를 기록함으로써 유세포 분석법 (BD FACSCelesta, Becton Dickinson 및 Company)에 의해 정량 비드를 분석 하였다. 정량 비드는 포워드 스캐터 및 사이드 스캐터에 의해 식별되었고, 각 비드의 APC 채널에서 중간 강도가 기록되었다. 정량은 정량 비드 제조업자가 제공 한 독점적 방법을 사용하여 실시 예 22A에 기술된 바와 같이 계산되었다. 도 21A 에 도시된 바와 같이, 항원 제시 비드 표준으로부터, 목표 밀도 pMHC 의 항원 제시 비드, 예를 들어 제곱 마이크론 당 대략 10,000, 1,000 또는 100 pMHC 분자를 갖는 비드를 생성하는 비드를 갖는 용액 중 pMHC의 농도를 결정할 수 있다.
- [0501] **실시형태 23A.3 공 자극 분자 농도 변화.** 위시 버퍼에서 비오틴화된 항-CD28 및 항-CD2의 3 배 연속 희석 물을 제조 하였다. 20 마이크로 리터의 항-CD28을 마이크로 원심 분리기 튜브에서 20 마이크로 리터의 항-CD2와 혼합 하였다. 이어서, 세척 완충액 (20 마이크로 리터)을 각각의 연속 희석을 위해 마이크로 원심 분리기 튜브에 첨가 하였다. 이어서, 항-CD28 / 항-CD2 혼합물 (10 마이크로 리터)을 제 1 연속 희석 튜브에 첨가 하였다. 용액은 보르텍서를 사용하여 혼합되었고, 이어서, 10 μ L 의 희석된 항-CD28 / 항-CD2 혼합물을 사용하여 총 7 회 희석을 위한 후속 연속 희석물을 제조 하였다.
- [0502] 용액 중의 보조 자극 항체와 비드 상에 침착된 밀도 (분자 / 단위 면적) 사이의 관계를 정량화하기 위해, 먼저 스트렙타빈 결합 모이어티를 갖는 실시 예 23A.1에서와 같이 제조된 대략 $1e7$ 실질적으로 구형 인 4 마이크론 실리카 비드를 마이크로 원심 분리 튜브에서 1 밀리리터의 세척 완충제에 넣고 희석에 의해 먼저 세척 하였고, 1 분 동안 1,000x에서 원심 분리 하였다. 상청액을 흡인에 의해 조심스럽게 제거하고, 세척 과정을 2 회 더 반복 하였다. 세척 후, 대략 $1e6$ 비드를 8 개의 미세 원심 분리 튜브에 전달하고, 다시 원심 분리하고, 상청액을 조심스럽게 제거 하였다.
- [0503] 비드는 먼저 세척 완충제 (1,200 마이크로 리터) 중 1.0 마이크로 그램의 pMHC로 관능 화되었다. 세척 후, 비드를 세척 완충제 (1,000 마이크로 리터)에 재현탁시켰다. 8 개의 마이크로 원심 분리 튜브에, 100 마이크로 리터의 pMHC 관능화된 비드를 분배하였다. 비드를 원심 분리하고, 상청액을 조심스럽게 제거 하였다.
- [0504] 희석되지 않은 혼합된 항-CD28 및 항-CD2 및 항-CD28/항-CD2 의 연속 희석 물을 추가로 세척 완충제 (120 마이크로 리터)로 희석하고 비드를 재현탁시키는 데 사용하여, $5e6$ 비드 당 4.5, 1.5, 0.5, 0.167, 0.056, 0.019, 0.006 또는 0.002 마이크로 그램의 혼합된 보조 자극 항체 단량체를 갖는 용액에 비드를 현탁시켰다. 단량체를 4 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫 텅 하였다. 튜브를 원심 분리하고, 상청액을 제거하고, 비드는 대략 $5e7$ / 밀리리터에서 재현탁시켰다.
- [0505] 각 농도의 보조 자극 항체로 제조된 대략 $1e5$ 비드를 세척 완충제 (1 밀리리터)로 세척 하였다. 비드 샘플을 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시키고 1 마이크로 리터의 APC-접합된 모노 클론 항-마우스-IgG1 (Biolegend, 카탈로그 번호 406610) 의 첨가에 의해 염색하였다. 비드를 항체와 혼합하고 어둠 속에서 30 분 동안 염색시켰다. 염색 후, 비드를 세척하고 세척 완충액 (200 마이크로 리터)에 재현탁시키고 유세포 분석법에 의해 분석하기 위해 튜브로 옮겼다.
- [0506] 이어서, 양자 단순 세포 형광 정량 비드 (Bangs Labs, 카탈로그 번호 815) 세트를 제조하여 각각의 항원 제시 비드 샘플에 결합된 APC 항-마우스 IgG1 항체의 수를 결정 하였다. 미리 결정된 결합능력을 갖는 각각의 비드의 드롭을 50 마이크로 리터의 세척 완충액을 갖는 마이크로 원심 분리 튜브에 넣었다. 튜브에, 5 마이크로 리터의 APC-접합된 항-마우스-IgG1 를 첨가하고 볼 텍싱에 의해 혼합 하였다. 상기 비드는 어둠 속에서 30 분 동안 염색되었고, 상기와 동일한 방법으로 세척되었다. 결합 용량이 다른 비드를 하나의 샘플에 모으고 단일 튜브로 옮겼다. 한 방울의 블랭크 비드 (항체 결합 능력 없음)를 첨가하고 비드를 유세포 분석법으로 분석 하였다.
- [0507] 5,000 개 이벤트를 기록함으로써 유세포 분석법 (BD FACSCelesta, Becton Dickinson 및 Company)에 의해 정량 비드를 분석 하였다. 정량 비드는 포워드 스캐터 및 사이드 스캐터에 의해 식별되었고, 각 비드의 APC 채널에서 중간 강도가 기록되었다. 정량은 정량 비드 제조업자가 제공 한 독점적 방법을 사용하여 실시 예 22A에 기술된

바와 같이 수행되었다. 이 정량 방법은 각 항원 제시 비드에서 APC 항-마우스 IgG1 항체의 수를 계산한다. 1 개의 항-마우스 IgG1 항체가 항원 제시 비드상의 하나의 보조 자극 항체에 결합한다고 가정하면, 이 값은 각 비드상의 보조 자극 항체의 수를 나타낸다. 도 21b 에 도시된 바와 같이, 항원 제시 비드 표준으로부터, 목표 밀도의 보조 자극 항체를 갖는 항원 제시 비드, 예를 들어 제곱 마이크론 당 대략 10,000, 1,000 또는 100 보조 자극 분자를 갖는 비드를 생성하는 비드를 갖는 용액 중 보조 자극 항체의 농도를 결정할 수 있다.

[0508] **실시형태 23B: 상이한 리간드 밀도를 갖는 항원 제시 비드에 의한 항원-특이적 T 세포의 확장.** 생성된 항원 제시 비드에 대한 pMHC 및 보조 자극 항체 농도 대 밀도의 플롯을 사용하여 (도 21A), 비드 표면의 제곱 마이크론 당 ~ 10,000, ~ 1,000 또는 ~ 100 pMHC를 갖는 항원 제시 비드를 제조하기 위해 각각의 pMHC의 얼마의 농도를 사용해야 하는지를 결정 하였다. 이 공정을 반복하여 비드 표면의 제곱 마이크론 당 ~ 10,000, ~ 1,000 또는 ~ 100 보조 자극 항체를 갖는 항원 제시 비드를 제조하는데 사용되는 항-CD28 및 항-CD2의 농도를 결정 하였다.

[0509] **실시형태 23B.1** 실시형태 23.A.1 같이 제조된 비오틴 관능화된 (공유 결합) 평활 실리카 비드를 먼저 100 마이크로 몰 스트렙타비딘에 저장함으로써 스트렙타비딘으로 코팅 하였다. 대략 5×10^7 비드를 마이크로 원심 분리 튜브에서 1 밀리리터의 세척 완충액으로 희석시킨 후, 1,000xg에서 1 분 동안 원심 분리하여 세척 하였다. 상청액을 흡인에 의해 조심스럽게 제거하고, 세척 과정을 2 회 더 반복 하였다. 세척 후, 대략 5×10^6 비드를 3 개의 미세 원심 분리 튜브에 전달하고, 다시 원심 분리하고, 상청액을 조심스럽게 제거 하였다.

[0510] **실시형태 23B.2** 적정된 pMHC 를 갖는 항원 제시 비드를 제조하기 위해, 0.5, 0.056, 또는 0.006 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 MART-1 (MBL International Corp., Catalog No. MR01008, ELAGIGILT V)를 함유하는 세척 완충액 (600 마이크로 리터)를 3 개의 마이크로 원심 분리 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다.

[0511] 1.0 마이크로 그램의 혼합된 비오틴화 항-CD28 및 비오틴화 항-CD2를 갖는 세척 완충제 (600 마이크로 리터)를 사용하여 각각의 비드 샘플을 재현탁시키고 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 항체들을 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다. 마지막으로, 비드를 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시켰다. 원하는 크기의 pMHC 및 항체를 갖는 비드의 로딩을 유세포 분석법 및 정량 비드와의 비교에 의해 확인 하였다.

[0512] 1.0 마이크로 그램의 항-CD28 및 항-CD2를 갖는 세척 완충제 (600 마이크로 리터)를 사용하여 각각의 비드 샘플을 재현탁시키고 비드를 위아래로 피펫팅하여 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다. 마지막으로, 비드를 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시켰다. 원하는 크기의 pMHC 를 갖는 비드의 로딩을 유세포 분석법 및 정량 비드와의 비교에 의해 확인 하였다.

[0513] **실시형태 23B.3** 적정된 보조 자극 항체를 갖는 항원 제시 비드를 제조하기 위해, 1.5 마이크로 그램 비오틴화된 단량체 MHC (HLA-A * 02:01 MART-1 (MBL International Corp., Catalog No. MR01008, ELAGIGILT V)를 함유하는 세척 완충액 (1,200 마이크로 리터)를 실시형태 23.B.1로부터의 1.5×10^7 세척된 비드를 함유하는 마이크로 원심 분리 튜브에 분배하고, 비드를 위아래로 피펫팅함으로써 재현탁시켰다. 단량체를 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다.

[0514] 이어서 비드를 세척 완충액 (900 마이크로 리터)에 재현탁시키고, 300 마이크로 리터의 비드를 3 개의 마이크로 원심 분리기 튜브로 옮겼다.

[0515] 1.0 마이크로 그램의 혼합된 항-CD28 및 항-CD2, 0.111 마이크로 그램의 혼합된 항-CD28 및 항-CD2, 또는 0.012 마이크로 그램의 혼합된 항-CD28 및 항-CD2를 갖는 세척 완충제 (300 마이크로 리터)를 3 개의 비드 샘플에 혼합하고, 비드를 위아래로 피펫팅하여 완전히 혼합 하였다. 항체들을 4 °C에서 30 분 동안 결합시켰다. 15 분 후, 혼합물을 다시 위아래로 피펫팅 하였다. 튜브를 1 분 동안 1,000xg에서 원심 분리하고 상청액을 제거 하였다. 마지막으로, 비드를 100 마이크로 리터의 세척 완충액에 재현탁시켰다. 원하는 크기의 보조 자극 항체들을 갖는 비드의 로딩을 유세포 분석법 및 정량 비드와의 비교에 의해 확인 하였다.

[0516] **실시형태 23B.4 자극. 세포 :** CD8 + T 림프구는 EasySep™ 인간 CD8 + T 세포 분리 키트, 음성 선택에 의해 StemCell Technologies Canada Inc. (카탈로그 # 17953)로부터 시판되는 키트에 대한 제조업체의 지시에 따라 상업적으로 이용 가능한 PBMC로부터의 RPMI 플러스 10 % 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 매질에서 농축되었다.

- [0517] 시약 첨가를 위한 배양 매질 및 희석제 : 고급 RPMI (ThermoFisher 카탈로그 번호 12633020, 500mL); 1x GlutaMAX (ThermoFisher 카탈로그 번호 35050079, 5mL); 10 % 인간 AB 혈청 (zen-bio, Catalog # HSER-ABP 100mL, 50mL); 및 50nM 베타-메르 캅토 에탄올 (ThermoFisher 카탈로그 번호 31350010, 50nm 스톡, 0.5mL, 최종 conc 50 마이크로 몰).
- [0518] 실험 설정 : 각 활성화 중 적정 (pMHC 또는 보조 자극 항체), 단일 96-조직 배양 처리 플레이트 (VWR 카탈로그 번호 10062-902)를 사용 하였다. 비드 표면의 제공 마이크론 당 ~ 10,000, ~ 1,000 또는 ~ 100 pMHC 및 비드 표면의 제공 마이크론 당 ~ 10,000의 보조 자극 항체를 갖는 항원 제시 비드 (실시 예 23.B.2로부터) 는 ~ 1:2 비드:세포에서 CD8 + T 림프구와 혼합되었다 CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 대략 1e5 항원 제시 비드 (웰 플레이트 1)와 함께 각 웰에 첨가 하였다. 비드 표면의 제공 마이크론 당 ~ 10,000 pMHC 및 비드 표면의 제공 마이크론 당 ~ 10,000, ~ 1,000 또는 ~ 100 보조 자극 항체 (실시 예 23.B.3)를 갖는 항원 제시 비드를 ~ 1:2 비드:세포에서 CD8 + T 림프구와 혼합 하였다. CD8 + T 림프구 (2e5) (80-90 % 순도)를 대략 1e5 항원 제시 비드 (웰 플레이트 2)와 함께 각 웰에 첨가 하였다.
- [0519] 각 웰 플레이트를 37 °C에서 배양 하였다. 0 일에, CTL 매질 중의 IL-21 (150ng / 밀리리터)을 웰 플레이트 1 및 2 의 각 웰에 첨가하여, 각 웰에서 30 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다. 2 일에, IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양은 7 일까지 계속되었다.
- [0520] 7일. 재 자극. 목표 밀도의 pMHC 또는 보조 자극 항체를 갖는 항원 제시 비드의 제 2 분취량을 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 대응하는 웰에 첨가하였다. IL21을 웰 플레이트의 각 웰에 최종 농도 30ng / mL로 첨가 하였다. 배양이 계속되었다.
- [0521] 8일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2에서 각각의 웰에 50 마이크로 리터의 IL-2 (50 IU / mL) 및 IL-7 (25ng / mL)을 첨가하여 각각 10 IU / mL 및 5 ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.
- [0522] 9일. 웰 플레이트 1 및 웰 플레이트 2 의 각각의 점유된 웰에 50 마이크로 리터의 IL-21 (150ng / mL)을 첨가하여 30ng / mL의 최종 농도를 제공 하였다 . 배양이 계속되었다.
- [0523] 14일. 각 웰 플레이트로부터의 웰을 MHC 테트라머 (Tetramer PE, MBL 카탈로그 번호 T02000, 1 마이크로 리터 / 웰), CD4 (Biolegend 카탈로그 번호 300530, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD8 (Biolegend Catalog # 301048, 0.5 마이크로 리터 / 웰); CD28 (Biolegend 카탈로그 번호 302906, 0.31 마이크로 리터 / 웰); CD45RO (Biolegend Catalog # 304210, 0.63 마이크로 리터 / 웰); CCR7 (CD197, Biolegend 카탈로그 번호 353208, 0.5 마이크로 리터 / 웰); 및 생존력 (BD 카탈로그 번호 565388, 0.125 마이크로 리터 / 웰)에 대해 개별적으로 염색하였다. 각 웰을 150 마이크로 리터 FACS 완충액 및 10 마이크로 리터의 카운트 브라이트™ 비즈 (ThermoFisher 카탈로그 번호 C36950)로 재현탁시켰다. FACS 분석은 FACSCelesta™ 유세포 분석기 (BD Biosciences)에서 수행되었다. 도 21c 는 pMHC/제공 마이크론의 여러 밀도를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1-특이적 T 세포의 수를 나타낸다. 도 21D 는 도 21C 의 MART1- 특이적 T 세포에서 메모리 전구체 T 세포의 마커 인 CD127의 발현 수준을 보여준다. 이들 플롯으로부터, 밀도가 ~ 100 pMHC / 제공 마이크론 이상일 때 MART1-특이적 T 세포의 수 및 이들 세포에서의 CD127의 발현이 pMHC 밀도에 둔감하다는 것을 알 수 있다.
- [0524] 도 21E 는 보조 자극 항체/제공 마이크론의 여러 밀도를 갖는 항원 제시 비드를 사용하여 증식된 각각의 웰에서 MART1-특이적 T 세포의 수를 나타낸다. 도 21F 는 도 21E 의 MART1- 특이적 T 세포에서 메모리 전구체 T 세포의 마커 인 CD127의 발현 수준을 보여준다. 이들 플롯으로부터, MART1-특이적 T 세포의 수 및 이들 세포에서의 CD127의 발현이 보조 자극 항체 밀도에 민감하다는 것을 알 수 있다. 비드의 비오틴 결합 부위를 거의 포화시키는 제공 마이크론 당 ~ 10,000 개의 보조 자극 항체로 제조된 비드 (도 21B 참조) 를 가장 많은 수의 항원-특이적 T 세포를 생성하였고, 이들 세포는 가장 높은 수준의 CD127을 발현 하였다. 보조 자극 리간드의 수가 로딩 체제의 하단으로 감소함에 따라, pMHC에 의한 1 차 자극은 효과적으로 보조-자극되지 않았으며, 세포 생성물의 표현형에 영향을 미쳤다.

[0525] **예 24. 미세유체 디바이스 내에서 항원-특이적 세포 독성 분석의 수행**

- [0526] **실험적 설계:** Mel 526 세포 및 A375 세포를 포함한 흑색 종 세포로부터 수득 된 종양 세포주를 온칩 T 세포 사멸 분석에서 시험 하였다. 각 세포주는 표준 절차에 따라 시험관 내에서 성장한 후, CellTrace™ Far Red dye (Cat. # C34572, ThermoFisher Scientific) 로 표지되었고, 이것은 안정적인 세포 내 라벨링을 제공한다. 표지 된 종양 세포의 각 집단을 T 세포 배지 (Adv. RPMI + 10 % 인간 AB 혈청 (Cat.# 35-060-CI, 코닝) + Gln +

50uM 2- 메 캅토 에탄올 (BME, Cat.# 31350-010, Gibco, ThermoFisher Scientific) 내의 개개의 미세 유체 칩 (Berkeley Lights, Inc.) 으로 유동시켰고 10uM 형광성 Caspase-3 기질 (DEVD, Green)(Nucview® 488, Cat.# 10403, 바이오티움) 이 보충되었다. 라벨링된 종양 세포들 (~ 2-10) 의 그룹은 미세유체 칩을 기울이고 중력이 종양 세포를 격리 펜으로 끌어 당김으로써 2 개의 미세유체 칩 (Me1 526 세포에 대한 하나 및 A375 세포에 대한 하나) 각각의 복수의 격리 펜 각각에 로딩되어, 각 미세 유체 칩에 대한 분석을 위해 Time = 0 에서 5uM에서 Caspase-3 기질의 최종 농도를 제공한다. Caspase-3 기질은 절단될 때까지 형광 신호를 제공하지 않으므로 Time = 0 에서 이 시약으로 인해 형광 신호가 없었다. 전술한 바와 같은 내인성 T 세포 (ETC) 프로토콜에 따라, SLC45A2 항원에 대해 확장된 T 세포를 각각의 2 개의 미세 유체 칩내로 흘렸고, 각각의 칩의 종양 세포의 상부에 중력이 로딩되었다. 전형적으로, 종양 세포 및 T 세포를 로딩 한 후, 각각의 격리 펜은 T 세포 당 0-5 개의 종양 세포를 함유 하였다. SLC45A2-특이적 T 세포 및 Me1526 종양 세포 (도 22a) 및 SLC45A2-특이적 T 세포 및 A375 세포 (도 22b) 를 함유하는 각각의 시점 및 각각의 미세 유체 칩에 대한 명시야 이미지 (BF)에 도 시 된 바와 같이, 세포의 집단이 각각 존재한다. 5uM Caspase-3 기질 (녹색) (Biotium의 Nucview 488)이 보충 된 T 세포 배지 (Adv. RPMI + 10 % Human AB 혈청 + Gln + 50uM BME) 를 각 미세 유체 칩의 미세 유체 채널 을 통해 관류시키고 격리 펜의 이미지를 (T 세포 로딩의 끝에서 시작하여) 7 시간 동안 30 분마다 촬영했다. CellTrace Far Red 레이블과 절단된, 이제 형광 Caspase-3 레이블을 다른 형광 큐브 (각각 Cy5, FITC)를 사용하여 시각화했다.

[0527] Me1526 흑색종 세포주는 SLC45A2 종양 관련 항원을 발현하고, SLC45A2- 특이 적 T 세포에 의해 표적화되고 사멸 될 것으로 예상되었다. A375 흑색종 세포주는 SLC45A2 종양 관련 항원을 발현하지 않으며, SLC45A2- 특이적 T 세포에 의해 표적화되거나 사멸될 것으로 예상되지 않았으므로, T 세포 세포 독성에 대한 음성 대조군으로서 사용되었다.

[0528] **결과:** Me1526 종양 세포 (도 22A) 및 A375 종양 세포 (도 22B) 는 1 시간 시점에서 CellTrace Far Red 신호 (Cy5 형광 큐브)를 나타내었지만 Caspase-3 기질 (녹색 형광 신호, FITC 형광 큐브)의 절단과 관련된 신호는 나타내지 않았다. 시간이 지남에 따라, Caspase-3 기질의 절단과 관련된 녹색 형광 신호는 Me1526 종양 세포에서 증가 하였지만 (도 22A, 최대 7 시간 시점에서 도시됨), A375 종양 세포에는 나타나지 않았다 (도 22B, 최대 7 시간 시점에서도 도시됨). 결과는 Me1526 종양 세포가 SLC45A2-특이 적 T 세포에 의해 효율적으로 사멸되었으며, 도 22A에서 Me1526 종양 세포를 함유하는 8 개의 격리 펜 중 6 개가 높은 수준의 카스파제-3 기질 절단을 보여주었다. 도 22C는 실험 과정 동안 항원-특이적 Me1526 종양 세포 사멸의 정도 대 A375 비 표적화 세포의 세포 사멸의 정도의 정량화를 보여 주었다. 매우 적은 양의 SLC45A2-특이적 T 세포 (분획) 사멸이 A375 비 표적화 세포에 대해 관찰 된 반면, SLC45A2-특이적 T 세포에 의한 Me1 526 종양 세포의 표적화 된 항원-특이적 세포 사멸은 같은 7 시간 시간 기간에 0.25 프랙셔널 사멸에 접근하였다. 각각의 형광 이미지에 대한 노출 시간은 각각의 미세 유체 칩 및 각 시점에 대해 동일 하였다. Cell Trace Far Red 염색에서 Cy5 신호의 시간이 지남에 따른 감소는 종종 모든 세포들의 임의의 세트에서 관찰된다; 각 세포 유형에 대한 이러한 감소의 관찰은 예상치 못한 것이 아니었다.

[0529] **예 25. 비드 자극 및 세포 생성물의 특성화 후 항원-특이적 T 림프구의 급속한 확장.** 전형적으로, 이전 실험에서 기술 된 바와 같이 항원 특이 적 T 림프구 활성화의 완료 후, 항원 특이 적 농축 T 세포를 항 -CD8-PerCPy5.5 (클론 RPA-T8, 301032, Biolegend, San Diego, CA), 항원에 특이적인 Tetramer-PE (MBL International, Woburn, MA) 및 줌비 NIR (Cat.# 423106, Biolegend, San Diego, CA) 를 갖는 FACS 완충제 (Ca^{2+} Mg^{2+} 이 없는 1XDPBS (Cat. # 4190250, ThermoFisher), 5mM EDTA (Cat. # AM9260G, ThermoFisher), 10mM HEPES (Cat. # 15630080, ThermoFisher), 2 % FBS)

[0530] 에서 30 분 RT를 염색 한 후 FACSria Fusion System (Becton Dickinson, San Jose, CA)에서 FACS로 분류하여 사멸 세포를 배제시켰다. 원하는 세포는 크기, 단일체, 생세포, CD8 양성 및 테트라머 양성을 CTL 배지 (고급 RPMI (Cat.# 12633020, ThermoFisher), 1x Glutamax (Cat. # 35050079, ThermoFisher), 10 % 인간 혈청 (Cat. # MT35060CI, ThermoFisher), 50uM b- 메 캅토 에탄올 (Cat. # 31350010, ThermoFisher), 2mM HEPES 내로 게이팅하여 순도 분류하였다.

[0531] 이어서, 분류된 항원-특이적 T 세포를 US 5,827,642의 Riddell에 기재된 바와 같이, 1 회 이상의 REP (Rapid Expansion Protocol)에서 확장시켰다. 림프 모세포 세포주 세포 (LCL, LCL 세포주는 Cassian Yee, MD Anderson Cancer Center의 선물이었다)에 100 Gy를 조사하고 3 개의 공여자로부터의 PBMC에 X- 선 조사기를 사용하여 50 Gy를 조사 하였다. 조사 된 세포를 10 % FBS를 함유하는 RPMI로 세척하고 1 : 5 (LCL : PBMC)의 비

율로 혼합 하였다. 이들 조사 된 세포를 FACS- 분류 된 T 세포 (REP의 제 1주기 동안) 또는 200 내지 500 배 과량으로 REP의 제 1주기의 생성물에 첨가 하였다. 배양물을 50 U / mL IL-2 (Cat. # 202-IL, R & D Systems) 및 30 ng / mL 항 -CD3 항체 (Cat. # 16-0037-85, ThermoFisher) 로 보충된 T 세포 배지에 설정하였다. 세포에 2 일, 5 일 및 10 일에 신선한 IL-2를 공급하였고, 그들의 성장 속도에 따라 확장되었다.

[0532] 확장은 일반적으로 첫 번째 REP주기 동안 1,000 배이다. REP1 동안의 확장은 매우 다양 하였다 (316 - 7,800 배, 데이터는 나타내지 않음). 낮은 입력 세포 수의 부정확 한 정량화가 이 변동에 기여했을 수 있다. 도 23A 는 제 1 사이클 (n = 20 실험, 11 공여자, 12 STIM) 후 제 2 REP 프로토콜로부터 얻은 배가-확장이다. 확장은 약 200 내지 최대 약 2000 배의 범위이다. 그러나, 이들 실험에서 특정 세포 집단에 대한 REP1 및 REP2의 확장 정도 사이에는 명확한 상관 관계가 없었다.

[0533] 도 23b 에서, REP 집단에서 항원-특이적 T 세포의 백분율이 REP 프로토콜의 20 회의 실험에 대해 제시되어있다. 관찰 된 것은 높은 백분율의 항원-특이 적 T 세포 (% Ag +), 전형적으로 ~ 90 %가 2 회 이상의 REP 사이클 동안 유지되었다는 것이다. 대조적으로, REP1 후 낮은 % Ag +는 REP2 후 낮은 % Ag +를 초래했다.

[0534] 도 23c 에서, REP2 의 완료 후 공동 자극 수용체 CD27 및 CD28을 발현하는 항원-특이 적 T 세포의 백분율이 제시되어있다. 도 23d 에서, REP2의 완료 후 생체 내 지속성을 유지시킬 수있는 중앙 기억 표현형에 대한 마커 인 CD127을 발현하는 항원-특이 적 T 세포의 백분율이 제시되어있다. 임의의 마커의 발현 분포가 밀접하게 클러스터되지 않았고, 개별 실험 중 일부가 원하는 마커를 발현하는 세포의 (예를 들어, 몇 퍼센트) 낮게 나타 냈지만, 이들 각각의 실험에서 수득 된 세포 생성물은 모든 카테고리에 걸쳐 충분히 양성인 표현형을 나타내어, 그들이 생체 내 도입을 위한 후보들이도록 했다. CD28의 발현과 같이 보여지는 디프레션된 값 중 일부는 활성화 사이클 동안 사용 된 CD28 리간드를 사용한 광범위한 자극에 기인하여, 이들 표면 마커의 디프레션된 발현을 초래할 수있다.

[0535] 도 23e 에서, 2 회의 REP 후 3 개의 개별 세포 집단 각각에 대한 항원-특이 적 세포 독성 분석 결과가 도시되어 있다. 표적 암 세포주로서 Me1526 세포 및 비 표적 세포주로서 A375 세포를 사용하여 실시 예 24에 기재된 바와 같이 검정을 수행하였으며, 여기서 항원 특이 적 T 세포는 SLC45A2- 특이 적 T 세포였다. 각각의 실험에서, 표적화 된 Me1526 세포의 50 % 초과가 카스파 제 3 트리거 된 형광 신호를 나타내었고, A375 비 표적화 된 세포의 소수가 카스파 제-3 기질의 형광성 절단 생성물에 의해 시그널링되는 바와 같은 세포 사멸 거동을 나타내거나 전혀 나타내지 않았다. 따라서, 활성화 된 T 세포는 모든 라운드의 활성화 및 확장 후에 여전히 항원-특이 적 세포 사멸 거동을 나타냈다.

[0536] 따라서, 본원에 기술 된 바와 같이 합성 표면상의 항원 제시를 통한 활성화 과정은 면역 요법에 사용하기에 적합하게 잘 제어되고, 재현 가능하며 특성화 될 수있는 세포 제품을 제공 할 수있다. 본원에 기재된 항원-제시 표면은 현재 이용 가능한 실험 공정과 비교하여 이들 개별 요법에 대해 제조 비용이 저렴하다.

[0537] 본 개시의 일부 실시형태들의 열거

[0538] 1. T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면으로서,

[0539] 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들로서, 각각의 1 차 활성화 분자 리간드는 T 세포의 T 세포 수용체 (TCR) 에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및 각각 TCR 보조 활성화 분자 또는 부 (adjunct) TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 보조 활성화 분자 리간드들로서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 보조 활성화 분자 리간드들 각각은 항원 제시 표면에 특이적으로 결합되는, 상기 복수의 보조 활성화 분자 리간드들을 포함한다.

[0540] 2. 실시형태 1 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 포함한다.

[0541] 3. 실시형태 1 또는 2 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비율은 약 100:1 내지 약 1:100 이다.

[0542] 4. 실시형태 1 또는 2 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비율은 100:1 내지 90:1, 90:1 내지 80:1, 80:1 내지 70:1, 70:1 내지 60:1, 60:1 내지 50:1, 50:1 내지 40:1, 40:1 내지 30:1, 30:1 내지 20:1, 20:1 내지 10:1, 10:1 내지 1:1, 1:1 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1:20 내지 1:30, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90, 또는 1:90 내지 1:100 이며, 상술된 값들 각각은 “약” 에 의해 수식된다.

- [0543] 5. 실시형태 1 또는 2 의 항원 제시 표면으로서, TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비율은 약 10:1 내지 약 1:20 이다.
- [0544] 6. 실시형태 1 또는 2 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비율은 약 10:1 내지 약 1:10 이다.
- [0545] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나의 항원 제시 표면으로서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 일부상에, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 분자의 밀도로 배치된다.
- [0546] 8. 실시형태 7 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 일부상에 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 분자의 밀도로 배치된다.
- [0547] 9. 실시형태 7 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 일부상에 제곱 마이크론당 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 분자의 밀도로 배치된다.
- [0548] 10. 실시형태 7 의 항원 제시 표면으로서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부상에 제곱 마이크론당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 분자, 제곱 마이크론당 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 분자, 또는 제곱 마이크론당 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 분자의 밀도로 배치된다.
- [0549] 11. 실시형태 7-10 중 어느 하나에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드가 제시된 밀도로 항원 제시 표면의 실질적으로 전체에 배치된다.
- [0550] 12. 실시형태 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 복수의 표면 차단 분자 리간드들을 추가로 포함하는, 항원 제시 표면.
- [0551] 13. 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 부 TCR 활성화 분자가 접착 자극을 제공하도록 구성된 항원 제시 표면.
- [0552] 14. 실시형태 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드는 상기 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 5×10^2 내지 약 2×10^4 개의 분자들 또는 제곱 마이크론 당 약 5×10^2 내지 약 1.5×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면.
- [0553] 15. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드가 항원 제시 표면의 적어도 일부 상에 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자의 밀도로 배치되는 항원 제시 표면.
- [0554] 16. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드들은 상기 항원 제시 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 항원 제시 표면.
- [0555] 17. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드들은 상기 항원 제시 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 5×10^2 내지 약 2×10^3 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 항원 제시 표면.
- [0556] 18. 실시형태 14-17 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드가 제시된 밀도로 항원 제시 표면의 실질적으로 전체에 배치된다.
- [0557] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 1 차 활성화 분자 리간드 대 상기 항원 제시 표면 상에 존재하는 상기 공 활성화 분자 리간드의 비가 약 1:10 내지 약 2 : 1, 약 1 : 5 내지 약 2 : 1, 약 1 : 2 내지 약 2 : 1, 약 1:10 내지 약 1 : 1, 약 1 : 5 내지 약 1 : 1, 약 1 : 1 내지 약 2 : 1 또는 약 1 : 2 내지 약 1 : 1 인, 항원 제시 표면.

- [0558] 20. 실시형태 1-19 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 표면은 유리, 금속, 세라믹 및 / 또는 금속 산화물 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항원 제시 표면.
- [0559] 21. 제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에있어서, 항원 제시 표면이 폴리머 표면을 포함하는, 항원 제시 표면.
- [0560] 22. 실시형태 20 또는 21에 있어서, 상기 표면은 자성 물질을 포함하는 항원-제시 표면.
- [0561] 23. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각이 결합 모이어 티에 비공유적으로 결합되고, 추가로 상기 결합 모이어티는 상기 항원 제시 표면에 공유적으로 결합되는, 항원 제시 표면.
- [0562] 24. 실시형태 23 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각이 비오틴을 포함하고 비오틴 결합체에 비공유적으로 결합되고, 추가로 비오틴 결합체가 항원 제시 표면에 공유 결합되는, 항원-제시 표면 .
- [0563] 25. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각이 결합 모이어 티에 비공유적으로 결합되고, 추가로 상기 결합 모이어티는 (i) 상기 항원 제시 표면에 비공유적으로 결합되는, 항원 제시 표면.
- [0564] 26. 실시형태 25 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 각각이 비오틴 모이어티를 포함하고, 결합 모이어티가 비오틴 결합체를 포함하고, 비오틴 결합체가 항원 제시 표면에공유적으로 부착된 제 2 비오틴 모이어티에 비공 유적으로 결합된, 항원-제시 표면 .
- [0565] 27. 실시형태 24 또는 26에 있어서, 비오틴 결합체는 스트렙티비딘인, 항원-제시 표면.
- [0566] 28. 실시형태 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 MHC 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, 항원 제시 표면.
- [0567] 29. 실시형태 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 종양 연관 항원을 추가로 포함하는, 항원 제시 표면.
- [0568] 30. 실시형태 29 에 있어서, 상기 종양 특이적 항원은 MHC 분자와 비공 유적으로 연관되는, 항원-제시 표면.
- [0569] 31. 실시형태 29 또는 30 에 있어서, 상기 항원이 SLC45A2, TCL1, VCX3A, MART1 또는 NYESO1 인, 항원 제시 표면.
- [0570] 32. 실시형태 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 TCR 공 활성화 분자가 단백질인, 항원 제시 표면.
- [0571] 33. 실시형태 32 에 있어서, TCR 공 활성화 단백질 분자는 CD28과의 결합 능력을 유지하는 CD-28 결합 단백질 또는 이의 단편을 포함하는, 항원-제시 표면.
- [0572] 34. 실시형태 32 또는 33 에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 부위-특이 적 C- 말단 바이오틴 모이어 티를 추가로 포함하는 항원-제시 표면.
- [0573] 35. 실시형태 33 또는 34 에 있어서, CD28 결합 단백질은 CD80 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 단편은 CD28에 대한 결합 능력을 보유하는 항원-제시 표면.
- [0574] 36. 실시형태 32-35 중 어느 하나에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 항 -CD28 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD28과의 결합 활성을 유지하는 항원-제시 표면.
- [0575] 37. 실시형태 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 부 TCR 활성화 분자 리간드는 CD2 결합 단백질 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD2과의 결합 능력을 유지하는하는, 항원-제시 표면.
- [0576] 38. 실시형태 37 에 있어서, CD2 결합 단백질은 부위-특이 적 C- 말단 바이오틴 모이어 티를 추가로 포함하는 항원-제시 표면.
- [0577] 39. 실시형태 37 또는 38 에 있어서, 부 TCR 활성화 분자 리간드는 CD58 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 단편은 CD2 에 대한 결합 능력을 보유하는 항원-제시 표면.
- [0578] 40. 실시형태 1-39 중 어느 하나에 있어서, 부 TCR 활성화 분자는 항 -CD2 항체 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD2 과의 결합 활성을 유지하는 항원-제시 표면.
- [0579] 41. 실시형태 1-40 중 어느 하나에있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각이 스트렙 타비 딘에 비공 유적으

로 부착되고, 스트랩 타비 딘이 스트랩 타비 딘 결합 분자에 비공 유적으로 부착되고, 추가로 스트랩 타비 딘 결합 분자는 링커를 통해 항원-제시 표면에 공유 적으로 부착되며, 임의로 스트랩 타비 딘 결합 분자는 비오틴 을 포함한다.

- [0580] 42. 실시형태 1-40 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각은 링커를 통해 표면에 공유적으 로 연결된다.
- [0581] 43. 실시형태 41 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 링커는 스트랩타비딘 결합 분자 및/또는 공 활성화 분자 리간 드를 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또 는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결한다.
- [0582] 44. 실시형태 1 내지 -40 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각이 스트랩타비딘 모 이어 티에 비공유적으로 부착되고, 상기 스트랩타비딘 모이어티는 상기 항원 제시 표면에 공유적으로 부착되는, 항원 제시 표면.
- [0583] 45. 실시예 42 에서, 스트랩타비딘 모이어티는 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 링커에 의해 연결된다.
- [0584] 46. 실시형태 5 내지 45 중 어느 하나에 있어서,
- [0585] (i) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 친수성 부분, 양친 매성 부분, 양쪽이 온성 부분 및 / 또는 음으로 하전 된 부분을 포함하고; (ii) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 링커 및 말단 표면-차단기를 포함하고, 임의로 복수의 표면-차단 분자 리간드의 링커는 길이가 동일하거나 길이가 상이하고; 또는 (iii) 복수의 표면- 차단 분자 리간드 각각은 링커 및 말단 표면-차단기를 포함하고, 여기서 말단 표면-차단기는 친수성 부분, 양친 매성 부분, 양쪽이 온성 부분 및 / 또는 음으로 하전 된 부분을 포함하고, 임의로, 복수의 표면-차단 분자 리간 드의 링커는 동일한 길이어거나 상이한 길이이다.
- [0586] 47. 실시형태 46 에 있어서,
- [0587] (i) 복수의 표면 차단 분자 리간드는 모두 동일한 말단 표면 차단기를 갖고; 또는 (ii) 복수의 표면 차단 분자 리간드는 말단 표면-차단 기의 혼합물을 갖고; 임의로, 다수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 폴리에틸렌 글리 콜 (PEG) 부분, 카복실산 부분 또는 이들의 조합을 포함하고, 추가로 임의로 표면-차단 분자 리간드 각각의 PEG 부분은 골격 선형을 갖는다 약 10 원자 내지 약 100 원자의 사슬 길이.
- [0588] 48. 실시형태 5 내지 47 중 어느 하나에 있어서,
- [0589] (i) 복수의 표면 차단 분자 리간드 각각은 항원 제시 표면에 공유적으로 연결되고; 및/또는
- [0590] (ii) 표면 차단기 및 링커의 길이는 복수의 표면 차단 분자 리간드 내에서 변할 수 있고 임의의 조합으로 선택 된 2, 3 또는 4 개의 상이한 표면 차단기 및/또는 2, 3, 4 개, 또는 그 이상의 상이한 길이의 링커들을 포함할 수있다.
- [0591] 49. 실시형태 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 다수의 접착 자극 분자 리간드를 추가로 포함하고, 임의로, 각 각의 접착제 분자 리간드는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함한다.
- [0592] 50. 실시형태 49 에 있어서, 접착 자극 분자 리간드는 링커를 통해 항원 제시 표면에 공유적으로 연결된다.
- [0593] 51. 실시형태 50 에 있어서, 접착 자극 분자 리간드는 스트랩타비딘 모이어티에 비공유적으로 부착되고, 상기 스트랩타비딘 모이어티는 상기 항원 제시 표면에 링커를 통해 공유적으로 부착되는, 항원 제시 표면.
- [0594] 52. 실시형태 50 에 있어서, 접착 자극 분자 리간드가 스트랩 타비 딘에 비공 유적으로 부착되고, 스트랩 타비 딘은 비오틴에 비공 유적으로 부착되고, 비오틴은 링커를 통해 항원 제시 표면에 공유 적으로 부착되는, 항원-제시 표면.
- [0595] 53. 실시형태 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 3:1 내지 약 1:3 인, 항원 제시 표면.
- [0596] 54. 실시형태 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 1:2 내지 약 2:1 인, 항원 제시 표면.

- [0597] 55. 실시형태 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 1:1 인, 항원 제시 표면.
- [0598] 56. 실시형태 1-55 중 어느 하나에 어서, 복수의 성장 자극 분자 리간드를 추가로 포함하고, 각각의 성장 자극 분자 리간드는 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는 항원-제시 표면.
- [0599] 57. 실시형태 56 있 있어서, 성장 인자 수용체 리간드는 사이토 카인 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 상기 단편은 수용체 결합 능력을 보유하며, 임의로 사이토 카인은 IL-21을 포함하는 항원-제시 표면.
- [0600] 58. 실시형태 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면이 비드인, 항원 제시 표면.
- [0601] 59. 실시형태 58 에 있어서, 비드가 동일한 부피 또는 직경을 갖는 구의 표면적의 10 % 이내의 표면적을 갖는, 항원-제시 표면.
- [0602] 60. 실시형태 58 에 있어서, 비드가 동일한 부피 또는 직경을 갖는 구의 표면적을 10 % 이상 초과하는 표면적을 갖는, 항원-제시 표면.
- [0603] 61. 실시형태 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면이 미세유체 디바이스, 웨이퍼, 또는 튜브인, 항원 제시 표면.
- [0604] 62. 실시형태 61 에 있어서, 제 1 부분 및 제 2 부분을 추가로 포함하며, 여기서 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 분포 및 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포는 항원-제시 표면의 제 1 부분에 위치되고, 제 2 부분은 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된다.
- [0605] 63. 실시형태 62에있어서, 하나 이상의 복수의 표면-차단 분자 리간드가 항원 제시 표면의 하나 이상의 내부 표면의 제 2 부분에 위치되는, 항원 제시 표면.
- [0606] 64. 실시형태 62 또는 63 에 있어서, 항원 제시 표면의 제 1 부분은 복수의 제 1 영역을 추가로 포함하고, 각각의 제 1 영역은 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브세트를 포함하며, 복수의 제 1 영역 각각은 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 제 2 부분에 의해 복수의 제 1 영역 중 다른 것으로부터 분리된다.
- [0607] 65. 실시형태 64 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브 세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각이 복수의 공 활성화 분자 리간드의 서브 세트를 추가로 포함하는 항원-제시 표면.
- [0608] 66. 실시형태 64 또는 65 에서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각은 약 0.10 제곱 마이크론 내지 약 4.0 제곱 마이크론의 면적을 갖는다.
- [0609] 67. 실시형태 64 내지 66 중 어느 하나에있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브 세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각의 면적이 약 4.0 제곱 마이크론 내지 약 0.8 제곱 마이크론 인 항원-제시 표면.
- [0610] 68. 실시형태 64 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 복수의 제 1 영역 각각은 복수의 접착 자극 분자 리간드의 적어도 서브세트를 추가로 포함하고, 임의로, 각각의 접착 자극 분자 리간드는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함한다.
- [0611] 69. 실시형태 63-68 중 어느 하나에 있어서, 상기 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 제 2 부분은 또한 공 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성되는, 항원-제시 표면.
- [0612] 70. 실시형태 62-69 중 어느 하나에 어서, 상기 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 제 2 부분은 복수의 성장 자극 분자 리간드를 포함하도록 추가로 구성되고, 각각의 성장 자극 분자 리간드는 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는 항원-제시 표면.
- [0613] 71. 실시형태 62 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 상기 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 제 2 부분은 복수의 접착 자극 분자 리간드를 포함하고, 각각의 접착 자극 분자 리간드는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함한다.
- [0614] 72. 실시형태 61 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면이 웨이퍼인, 항원 제시 표면.
- [0615] 73. 실시형태 61 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면이 튜브인, 항원 제시 표면.
- [0616] 74. 실시형태 61 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면이 미세유체 디바이스인, 항원 제시 표면.

- [0617] 75. 실시형태 74 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브 세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각이 항원 제시 미세유체 디바이스의 챔버 내의 적어도 하나의 표면에 배치되는, 항원 제시 미세유체 디바이스.
- [0618] 76. 실시형태 75 에 있어서, 챔버가 격리 펜인, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0619] 77. 실시형태 74-76 의 항원-제시 미세 유체 장치에 있어서, 미세 유체 장치는 제 1 유체 매질의 유동을 함유하기 위한 유동 영역으로서, 격리 펜은 제 2 유체 매질을 함유하기 위한 격리 영역을 포함하고, 격리 영역은 단일 개구를 가지며, 격리 펜의 격리 영역은 미세 유체 장치의 스윙되지 않은 영역인, 상기 유동 영역; 및 격리 영역을 유동 영역에 유체 연결하는 연결 영역을 더 포함하고; 선택적으로, 상기 미세 유체 장치는 상기 유동 영역의 적어도 일부를 포함하는 미세 유체 채널을 포함한다.
- [0620] 78. 실시형태 77 에 있어서, 미세 유체 장치는 유동 영역의 적어도 일부를 포함하는 미세 유체 채널을 포함하고, 연결 영역은 약 20 미크론 내지 약 100 미크론 범위의 폭 W_{con} 를 갖는 미세 유체 채널로의 근위 개구 및 격리 영역으로의 원위 개구를 포함하고, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 는 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 의 1.0 배 이상이다.
- [0621] 79. 실시형태 78 에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 의 1.5 배 이상이다.
- [0622] 80. 실시형태 78 에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 의 2.0 배 이상이다.
- [0623] 81. 실시형태 78-80 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 는 약 20 미크론 내지 약 60 미크론의 범위이다.
- [0624] 82. 실시형태 78-81 중 어느 하나에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 약 20 내지 약 500 미크론이다.
- [0625] 83. 구현 예 78-82 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구에서의 미세 유체 채널의 폭이 약 50 마이크로미터 내지 약 500 마이크로미터 인 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0626] 84. 실시형태 78-83 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구에서의 미세유체 채널의 높이는 약 20 미크론 내지 약 100 미크론의 범위이다.
- [0627] 85. 실시형태 77-84 중 어느 하나에 있어서, 격리 영역의 부피가 약 2×10^4 내지 약 2×10^6 입방 미크론 범위인, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0628] 86. 실시형태 77-85 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구는 유동 영역에서 제 1 매질의 유동 방향과 평행한, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0629] 87. 실시형태 77-86 중 어느 하나에 있어서, 마이크로유체 디바이스는 베이스, 베이스 상의 마이크로유체 회로 구조, 및 마이크로유체 회로를 함께 정의하는 커버를 포함하는 인클로저를 포함하고, 마이크로유체 회로는 흐름 영역, 미세유체 채널 및 격리 펜을 포함한다..
- [0630] 88. 실시형태 77-87 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 회로는 제 1 매체가 유동 영역으로 유입 될 수있는 하나 이상의 유입구 및 제 1 매체가 유동 영역으로부터 제거 될 수있는 하나 이상의 배출구를 추가로 포함하는, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0631] 89. 제 87 항에 있어서, 상기 커버는 상기 미세유체 회로 구조의 일체형 부분인, 항원 제시 미세유체 디바이스.
- [0632] 90. 실시형태 87 또는 88 에 있어서, 미세 유체 격리 펜을 한정하는 장벽이 미세 유체 장치의 베이스 표면으로부터 미세 유체 장치의 커버 표면으로 연장되는, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0633] 91. 실시형태 87-90 중 어느 하나에 있어서, 상기 커버 및 상기 베이스는 미세 물체에 DEP 힘을 선택적으로 유도하기 위한 유전 영동 (DEP) 메커니즘의 일부인, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0634] 92. 실시형태 87-91 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 장치는 제 1 전극, 전극 활성화 기관 및 제 2 전극을 추

가로 포함하고, 여기서 제 1 전극은 인클로저의 제 1 벽의 일부이고, 전극 활성화 기관 및 제 2 전극은 인클로저의 제 2 벽의 일부이며, 전극 활성화 기관은 광도전성 재료, 반도체 집적 회로 또는 광 트랜지스터를 포함한다.

- [0635] 93. 실시형태 92 에 있어서, 미세 유체 장치의 제 1 벽은 커버이고, 미세 유체 장치의 제 2 벽은 베이스인, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0636] 94. 실시형태 92 또는 93 에 있어서, 전극 활성화 기관은 광 트랜지스터를 포함하는, 항원-제시 미세 유체 장치.
- [0637] 95. 실시형태 87 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 커버 및/또는 상기 베이스는 광에 투명한, 항원 제시 미세 유체 디바이스.
- [0638] 96. 실시형태 61-95 중 어느 하나에 있어서, 제 2 부분은 항원 제시 미세 유체 장치의 미세 유체 채널의 적어도 하나의 표면에 배치되는, 항원 제시 미세 유체 장치.
- [0639] 97. 하나 이상의 복수의 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기와 하나 이상의 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면으로서, 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기 각각 및 복수의 표면 차단 분자 리간드 각각은 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 공유적으로 결합된다.
- [0640] 98. 실시형태 97 에 있어서, 표면이 복수의 비오틴 작용기를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0641] 99. 실시형태 98 에 있어서, 표면이 비오틴 작용기를 통해 표면에 비공 유적으로 부착 된 복수의 비오틴-결합제 작용기를 추가로 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0642] 100. 실시형태 97-99 중 어느 하나에 있어서, 복수의 비오틴 작용기 각각은 공유결합으로 관능화된 표면에 링커를 통해 부착된다.
- [0643] 101. 실시형태 97-100 중 어느 하나에 있어서, 비오틴 결합 제가 스트랩 타비 딘 인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0644] 102. 실시형태 97 또는 101 에 있어서, 복수의 비오틴 또는 비오틴 결합제 작용기 각각이 링커를 통해 공유결합으로 관능화된 합성 표면에 부착되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0645] 103. 실시형태 102 에 있어서, 비오틴 또는 비오틴-결합제 작용기를 연결하는 링커는 약 20 옹스트롬 내지 약 100 옹스트롬의 길이를 갖는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0646] 104. 실시형태 102 또는 103 에 있어서, 링커는 비오틴 결합제 작용기를 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결한다.
- [0647] 105. 실시예 102 또는 103 에서, 링커는 비오틴을 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결한다.
- [0648] 106. 실시형태 102-105 중 어느 하나에 있어서, 각각의 비오틴 또는 비오틴-결합제 작용기의 링커는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0649] 107. 실시형태 106 에 있어서, PEG 링커가 (PEG)₁₃ 반복 서열을 포함하고, 임의로, 표면은 복수의 비오틴-결합제 작용기를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0650] 108. 실시형태 106 에 있어서, PEG 링커가 (PEG)₄ 반복 서열을 포함하고, 임의로, 표면은 복수의 비오틴 작용기를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0651] 109. 실시형태 97 내지 108 중 어느 하나에 있어서,
- [0652] (i) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 친수성 모이어티, 양친매성 모이어티, 양쪽이온성 모이어티 및 / 또는 음으로 하전 된 모이어티를 포함하고; (ii) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 링커 및 말단 표면-차단기를 포함하고, 임의로 복수의 표면-차단 분자 리간드의 링커는 길이가 동일하거나 길이가 상이하고; 또는 (iii) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 링커 및 말단 표면-차단기를 포함하고, 여기서 말단 표면-차단기는 친수성 모이어티, 양친매성 모이어티, 양쪽이온성 모이어티 및 / 또는 음으로 하전 된 모이어티를 포함하고, 임의로, 복수의 표면-차단 분자 리간드의 링커는 동일한 길이가거나 상이한 길이며; (iv) 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 항원 제시 표면에 공유적으로 연결되며; 및/또는 (v) 복수의 표면-차단 분자 리간드는 임의

의 조합으로 선택된 2, 3, 또는 4 개의 상이한 표면 차단기 및/또는 2, 3, 4 개 또는 그 이상의 상이한 링커 길이를 포함할 수도 있다.

- [0653] 110. 실시형태 109 에 있어서,
- [0654] (i) 복수의 표면 차단 분자 리간드는 모두 동일한 말단 표면 차단기를 갖고; 또는 (ii) 복수의 표면 차단 분자 리간드는 말단 표면-차단 기의 혼합물을 갖고; 임의로, 복수의 표면-차단 분자 리간드 각각은 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 모이어티, 카복실산 모이어티 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0655] 111. 실시형태 108 에 있어서, 각각의 표면-차단 분자 리간드의 PEG 모이어티가 약 10 원자 내지 약 100 원자의 골격 선형 사슬 길이를 갖는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0656] 112. 실시형태 97-111 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 복수의 스트랩 타비 딘 모이어 티는 그것이 부착된 각 부분 또는 서브 영역에서공유결합으로 관능화된 합성 표면 상에 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 분자들의 밀도로 배치되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0657] 113. 실시형태 97-111 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 복수의 스트랩 타비 딘 모이어 티는 그것이 부착된 각 부분 또는 서브 영역에서 공유결합으로 관능화된 합성 표면 상에 제곱 마이크론당 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 분자들의 밀도로 배치되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0658] 114. 실시형태 97-111 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 복수의 스트랩 타비 딘 모이어 티는 그것이 부착된 각 부분 또는 서브 영역에서 공유결합으로 관능화된 합성 표면 상에 약 6×10^2 내지 약 5×10^3 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자로 배치되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0659] 115. 실시형태 97-114 중 어느 하나에 있어서, 상기 표면은 유리, 중합체, 금속, 세라믹 및 / 또는 금속 산화물을 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0660] 116. 실시형태 97-115 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 공유결합으로 관능화된 웨이퍼, 튜브의 공유결합으로 관능화된 내부 표면, 또는 미세 유체 장치의 공유결합으로 관능화된 내부 표면인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0661] 117. 실시형태 116 에 있어서, 튜브가 유리 또는 폴리머 튜브인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0662] 118. 실시형태 97 내지 115 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 공유결합으로 관능화된 비드인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0663] 119. 실시형태 118 에 있어서, 공유결합으로 관능화된 비드는 자기 재료를 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0664] 120. 실시형태 118 또는 119 에 있어서, 비드가 동일한 부피 또는 직경을 갖는 구의 표면적의 10 % 이내의 표면적을 갖는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0665] 121. 실시형태 118-120 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 복수의 스트랩 타비 딘 또는 비오틴 모이어티는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 실질적으로 전부 상에 배치되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0666] 122. 실시형태 97-117 중 어느 하나에 있어서, 제 1 부분 및 제 2 부분을 추가로 포함하고, 여기서 적어도 하나의 복수의 스트랩 타비 딘 또는 비오틴 관능기의 분포가 공유 적으로 개질된 합성 표면의 제 1 부분에 위치하고, 적어도 하나의 복수의 표면-차단 분자 리간드의 분포는 제 2 부분에 위치된다.
- [0667] 123. 실시형태 122 에 있어서, 제 2 복수의 표면-차단 분자 리간드가 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 1 부분에 배치되는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0668] 124. 실시형태 123 에 있어서, 제 2 복수의 표면-차단 분자 리간드가 공유결합으로 관능화된 합성 표면으로부터 형성된 항원-제시 합성 표면의 관능화 모이어티의 밀도를 제한하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0669] 125. 실시형태 123 또는 125 에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 1 부분은 복수의 제 1 영역을 추가로 포함하고, 각각의 제 1 영역은 복수의 스트랩티비딘 또는 비오틴 작용기의 적어도 서브세트를 포함하며, 복수의 제 1 영역 각각은 스트랩티비딘 또는 비오틴 작용기를 실질적으로 배제하도록 구성된 제 2 영역에 의해

복수의 제 1 영역 중 다른 것으로부터 분리된다.

- [0670] 126. 실시형태 125 에서, 복수의 스트랩티비딘 또는 비오틴 작용기의 적어도 서브세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각은 약 0.10 제곱 마이크론 내지 약 4.0 제곱 마이크론의 면적을 갖는다.
- [0671] 127. 실시형태 125 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드의 적어도 서브 세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각의 면적이 약 4.0 제곱 마이크론 내지 약 0.8 제곱 마이크론 인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0672] 128. 실시형태 97 내지 116 또는 122 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 미세유체 디바이스의 적어도 하나의 내부 표면인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0673] 129. 실시형태 128 에 있어서, 복수의 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기의 적어도 서브 세트를 포함하는 복수의 제 1 영역 각각이 미세유체 디바이스의 챔버 내의 적어도 하나의 표면을 포함하는, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0674] 130. 실시형태 129 에 있어서, 챔버는 격리펜인, 공유결합으로 관능화된 합성 표면.
- [0675] 131. T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 합성 표면을 제조하는 키트로서,
- [0676] a. 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들을 포함하는, 실시형태 95 내지 128 중 어느 하나의 공유결합으로 관능화된 합성 표면; 및 b. T 세포의 T 세포 수용체와 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자들을 포함하는 제 1 개질 시약을 포함하며, 또한 여기서 MHC 분자들은 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들의 제 1 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된다.
- [0677] 임의로, 제 1 커플 링제는 비오틴 결합제이다.
- [0678] 132. 제 131 항에 있어서, 상기 복수의 MHC 분자들 각각은 적어도 하나의 비오틴 작용기를 추가로 포함하는, 키트.
- [0679] 133. 실시형태 131 또는 132 에서, 각각 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 복수의 비공유적으로 또는 공유적으로 연관된 제 1 커플링제들의 제 2 서브 세트 중 하나에 결합하도록 구성된 복수의 공 활성화 분자들을 포함하는 시약을 추가로 포함한다.
- [0680] 134. 실시형태 133 에서, 복수의 공 활성화 분자들 각각은 비오틴 작용기를 포함한다.
- [0681] 135. 실시형태 134 항에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자들 각각은 부위 특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 더 포함하는, 키트.
- [0682] 136. 실시형태 133 또는 135 에서, 공 활성화 분자들 각각은 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자, 보조 TCR 활성화 분자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0683] 137. 실시형태 136 에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 부 TCR 활성화 분자를 포함한다.
- [0684] 138. 실시형태 136 또는 137 에 있어서, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약을 함유하는 컨테이너는 약 100:1 내지 약 1:100 의 비율로 또는 약 3 : 1 내지 약 1:3 의 비율로 TCR 공 활성화 분자 및/또는 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자를 함유하는, 키트.
- [0685] 139. 실시형태 136 내지 138 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약을 함유하는 컨테이너는 약 10 : 1 내지 약 1:10 또는 약 10:1 내지 약 1:20 의 비율로 TCR 공 활성화 분자 및 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자를 함유하는, 키트.
- [0686] 140. 실시형태 136 내지 139 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자에 대한 TCR 공 활성화 분자의 비는 100 : 1 내지 90 : 1, 90 : 1 내지 80 : 1, 80 : 1 내지 70 : 1, 70 : 1 내지 60 : 1, 60 : 1 내지 50 : 1, 50 : 1 내지 40 : 1, 40 : 1 내지 30 : 1, 30 : 1 내지 20 : 1, 20 : 1 내지 10 : 1, 10 : 1 내지 1 : 1, 3:1 내지 1:3, 1 : 1 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1 : 20 내지 1:30, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90 또는 1:90 내지 1:100 이며, 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정된다.

- [0687] 141. 실시형태 136 내지 140 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약을 함유하는 컨테이너는 약 20 : 1 내지 약 1:20 의 비율로 TCR 공 활성화 분자 및 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자를 함유하는, 키트.
- [0688] 142. 제 136 항에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자를 포함하는 시약은 2 개의 컨테이너에 포함되고, 제 1 컨테이너는 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자를 함유하고, 제 2 컨테이너는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는, 키트.
- [0689] 143. 실시형태 136 내지 142 중 어느 하나에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 CD28과의 결합 능력을 유지하는 CD28 결합 단백질 또는 이의 단편인, 키트.
- [0690] 144. 구현 예 136-143 중 어느 하나에 있어서, 부 TCR 공 활성화 분자는 CD2 결합 단백질 또는 이의 단편인, 키트.
- [0691] 145. 실시형태 131 내지 144 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 합성 표면을 제조하기위한 키트는 접착 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함 할 수 있고, 여기서 각각의 접착 자극 분자는 공유 작용 화 된 합성 표면의 복수의 비공 유적으로 또는 공유 적으로 관련된 제 1 커플링제 작용기들의 제 3 서브 세트와 반응하도록 구성된 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함한다.
- [0692] 146. 실시형태 145 에서, 접착 자극 분자는 비오틴 작용기를 포함한다.
- [0693] 147. 실시형태 131 내지 146 중 어느 하나에 있어서, 성장 자극 분자를 포함하는 시약을 추가로 포함하고, 각각의 성장 자극 분자는 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는, 키트.
- [0694] 148. 실시형태 147 에 있어서, 상기 성장 인자 수용체 리간드는 사이토카인 또는 이의 단편을 포함하는, 키트.
- [0695] 149. 실시형태 148 항에 있어서, 사이토카인은 IL-21 또는 이의 단편을 포함하는, 키트.
- [0696] 150. 제 147 항 내지 제 149 항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 성장 자극 분자를 추가로 포함하는, 키트.
- [0697] 151. 실시형태 150 에서, 하나 이상의 추가의 성장 자극 분자는 IL2 및 / 또는 IL7 또는 이의 단편들을 포함한다.
- [0698] 152. 실시형태들 148 내지 151 에 있어서, 성장 자극 분자는 공유결합으로 개질된 비드에 부착되는, 키트.
- [0699] 153. 실시형태 131 내지 152 중 어느 하나에 있어서, 제 1 커플링제는 스트렙티비딘인, 키트.
- [0700] 154. 복수의 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 표면을 준비하는 방법이 또한 제공되며, 상기 방법은: 복수의 연결 시약들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계로서, 각각의 연결 시약은 비오틴 결합제 또는 비오틴을 포함하는, 상기 반응성 모이어티들의 적어도 제 1 서브 세트를 반응시키는 단계; 및 복수의 표면 차단 분자들과 중간 반응성 합성 표면의 반응성 모이어티들의 적어도 제 2 서브 세트를 반응시켜, 적어도 하나의 복수의 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드를 포함하는 공유결합으로 관능화된 합성 표면을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0701] 155. 실시형태 154 에 있어서, 연결 시약이 비오틴을 포함하고, 방법은 비오틴 결합제를 비오틴 작용기와 비공 유적으로 연관시키는 단계를 더 포함하는, 공유결합으로 관능화된 표면을 준비하는 방법.
- [0702] 156. 실시형태 154 또는 155 에서, 중간 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역의 반응성 모이어티는 아지드 모이어티를 포함한다.
- [0703] 157. 실시형태 154-156 중 어느 하나에있어서, 표면-차단 분자의 반응은 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기를 포함하는 연결 시약의 반응 후에 수행되는, 방법.
- [0704] 158. 실시형태 154-156 중 어느 하나에있어서, 표면-차단 분자의 반응은 복수의 연결 시약의 반응과 동시에 수행되는 방법.
- [0705] 159. 실시형태 154-158 중 어느 하나에있어서, 복수의 비오틴-결합제 또는 비오틴 작용기 및 적어도 제 1 복수의 표면-차단 분자 리간드는 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 적어도 제 1 영역에 배치되는, 방법.
- [0706] 160. 실시예 159 에서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면은 복수의 비오틴 결합제 또는 비오틴 작용기들이 배제

되는 제 2 영역을 포함한다.

- [0707] 161. 실시예 160 에서, 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자 리간드는 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 영역에 배치된다.
- [0708] 162. 실시형태 161 에 있어서, 중간 반응성 합성 표면의 제 2 영역에서 표면-차단 분자를 포함하는 시약의 반응이 중간 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역에서 바이오틴-결합제 또는 바이오틴 작용기를 포함하는 연결 시약의 반응 전에 수행되는, 방법.
- [0709] 163. 실시예 162 에서, 중간 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역에서 반응성 모이어티의 제 2 서브세트와 제 2 복수의 표면 차단 분자를 반응시키는 단계를 더 포함한다.
- [0710] 164. 실시형태 159 내지 163 중 어느 하나에서, 복수의 바이오틴 결합제 또는 바이오틴 작용기들의 반응 및 적어도 제 1 복수의 표면 차단 분자의 반응은 반응성 모이어티를 포함하는 공유적으로 제조된 합성 표면의 적어도 제 1 영역의 복수의 서브 영역에서 수행된다.
- [0711] 165. 실시형태 159 내지 163 중 어느 하나에서, 아지드 반응성 모이어티를 포함하는 적어도 제 1 표면 제조 시약을 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역에 배치된 표면 노출 모이어티와 반응시키는 것을 포함하는, 중간 반응성 합성 표면을 제조하는 단계를 더 포함한다.
- [0712] 166. 실시형태 165에있어서, 반응성 합성 표면의 제 2 영역에 배치 된 표면-노출 모이어 티의 제 2 부분을 복수의 표면-차단 분자와 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0713] 167. 실시형태 165 또는 166 에 있어서, 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 영역의 표면 노출 모이어티들과 반응성 합성 표면의 제 2 영역의 표면 노출 모이어티들은 동일한 표면 노출 모이어티들이 아닌, 방법.
- [0714] 168. 실시형태 166 내지 167 중 어느 하나에서, 반응성 합성 표면의 제 2 부분은 복수의 1 차 활성화 및 보조 활성화 분자와 실질적으로 반응하지 않도록 구성된 표면 노출 모이어티를 포함한다.
- [0715] 169. 실시형태 166-168 중 어느 하나에있어서, 반응성 합성 표면의 제 2 부분의 표면-노출 모이어 티를 복수의 표면-차단 분자와 반응시키는 단계는 합성 표면의 제 1 부분의 표면 노출 된 모이어 티를 적어도 제 1 표면 제조 시약과 응시키기 전에 수행되어, 표면의 제 1 부분에 공유 적으로 제조 된 표면을 제공하는, 방법.
- [0716] 170. 실시형태 165 내지 169 중 어느 하나의 방법으로서, 표면 노출 모이어티들은 친핵성 모이어티들인, 방법.
- [0717] 171. 실시형태 165 내지 170 중 어느 하나의 방법으로서, 표면 노출 모이어티는 치환가능한 모이어티인, 방법.
- [0718] 172. 실시형태 154-171 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면상의 복수의 바이오틴 결합제 또는 바이오틴 작용기의 분포는, 그것이 부착되는 각 영역에서, 제곱 마이크론당 약 6×10^2 내지 약 5×10^3 분자들인, 방법.
- [0719] 173. 실시형태 154-171 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면상의 복수의 바이오틴 결합제 또는 바이오틴 작용기의 분포는, 그것이 부착되는 각 영역에서, 제곱 마이크론당 약 5×10^3 내지 약 1×10^4 분자들인, 방법.
- [0720] 174. 실시형태 154-171 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면상의 복수의 바이오틴 결합제 또는 바이오틴 작용기의 분포는, 그것이 부착되는 각 영역에서, 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 3×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자인, 방법.
- [0721] 175. 실시형태 154-174 중 어느 하나에 있어서, 상기 표면은 금속, 유리, 세라믹, 폴리머, 또는 금속 산화물인, 방법.
- [0722] 176. 실시형태 154-175 중 어느 하나에있어서, 상기 표면은 비드의 표면, 임의의 구성의 웨이퍼의 표면, 튜브의 내부 표면, 또는 미세 유체 장치의 하나 이상의 내부 표면 인, 방법.
- [0723] 177. 실시형태 176 에 있어서, 비드가 동일한 부피 또는 직경을 갖는 구의 표면적의 10 % 이내의 표면적을 갖는, 방법.

- [0724] 178. 실시형태 176 에 있어서, 튜브가 유리 또는 폴리머 튜브인, 방법.
- [0725] 179. 실시형태 154 또는 156-178 중 어느 하나에있어서, 연결 시약은 비오틴-결합제를 포함하는, 방법.
- [0726] 180. 실시형태 154-179 중 어느 하나에있어서, T 림프구 (T 세포)를 활성화시키기위한 항원-제시 표면을 제조하는 단계를 추가로 포함하는 방법 :
- [0727] 공유결합으로 관능화된 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계로서, 제 1 복수의 결합 모이어티들 각각은 1 차 활성화 분자에 결합하도록 구성되는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계; 및 공 활성화 분자에 결합하도록 구성된 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 보조 활성화 분자들을 반응시켜, 항원 제시 표면 상에 복수의 특이적으로 결합된 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 특이적으로 결합된 공 활성화 분자 리간드들을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0728] 181. T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 항원 제시 표면을 제조하는 방법으로서,
- [0729] 공유결합으로 관능화된 표면의 제 1 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계로서, 제 1 복수의 결합 모이어티들 각각은 1 차 활성화 분자에 결합하도록 구성되는, 상기 복수의 1 차 활성화 분자들을 반응시키는 단계; 및 공 활성화 분자에 결합하도록 구성된 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티들과, 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자; 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 보조 활성화 분자들을 반응시켜, 항원 제시 표면 상에 복수의 특이적으로 결합된 1 차 활성화 분자 리간드들 및 복수의 특이적으로 결합된 공 활성화 분자 리간드들을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0730] 182. 실시형태 181 에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 부 TCR 활성화 분자를 포함한다.
- [0731] 183. 실시형태 181 내지 182 중 어느 하나에서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 100:1 내지 약 1:100 인, 방법.
- [0732] 184. 실시형태 181 내지 183 중 어느 하나에 있어서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 1:1 내지 약 2:1 인, 방법.
- [0733] 185. 실시형태 181 내지 139 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자에 대한 TCR 공 활성화 분자의 비는 100 : 1 내지 90 : 1, 90 : 1 내지 80 : 1, 80 : 1 내지 70 : 1, 70 : 1 내지 60 : 1, 60 : 1 내지 50 : 1, 50 : 1 내지 40 : 1 , 40 : 1 내지 30 : 1, 30 : 1 내지 20 : 1, 20 : 1 내지 10 : 1, 10 : 1 내지 1 : 1, 3:1 내지 1:3, 1 : 1 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1 : 20 내지 1:30, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90 또는 1:90 내지 1:100 이며, 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정된다.
- [0734] 186. 실시형태 181 내지 185 중 어느 하나에서, 상기 보조 TCR 활성화 분자에 대한 상기 TCR 공 활성화 분자의 비는 약 20:1 내지 약 1:20 또는 약 3:1 내지 약 1:3 인, 방법.
- [0735] 187. 실시형태 181 내지 186 중 어느 하나에서, 복수의 표면 차단 분자를 공유결합으로 관능화된 표면의 제 3 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계를 더 포함하고, 여기서 제 3 복수의 결합 모이어티들의 결합 모이어티들 각각은 표면 차단 분자에 결합하도록 구성되는, 방법.
- [0736] 188. 실시형태 181 내지 187 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, 방법.
- [0737] 189. 실시형태 181 내지 188 중 어느 하나에서, MHC 분자를 포함하는 상기 복수의 1 차 활성화 분자 각각이 종양 특이적 항원을 추가로 포함하는, 방법.
- [0738] 190. 실시형태 189 에 있어서, 상기 종양 특이적 항원이 SLC45A2, TCL1, VCX3A, MART1 또는 NYESO1 인, 방법.
- [0739] 191. 실시형태 181-190 에 있어서, 복수의 접착 자극 분자 리간드를 공유결합으로 관능화된 표면의 제 4 복수의 결합 모이어티와 반응시키는 단계를 포함하며, 여기서 각각의 접착 자극 분자 리간드는 ICAM 단백질 서열을 포함하는 세포 접착 수용체에 대한 리간드를 포함하고, 제 4 복수의 결합 모이어티의 결합 모이어티들 각각은 세

포 접착 수용체 리간드 분자와 결합을 위해 구성된다.

- [0740] 192. 실시형태 181-190 에 있어서, 상기 공유결합으로 관능된 표면의 상기 제 1 복수의 결합 모이어티 각각이 비오틴 결합제 또는 비오틴 모이어티를 포함하는, 방법.
- [0741] 193. 실시형태 181-192 중 어느 하나에 있어서, 제 1 복수의 결합 모이어티 및 제 2 복수의 결합 모이어티는 동일한 결합 모이어티를 포함하는, 방법.
- [0742] 194. 실시형태 181-193 중 어느 하나에 있어서, 표면-차단 분자에 결합하도록 구성된 제 2 복수의 결합 모이어티 및 제 3 복수의 결합 모이어티가 동일한 결합 모이어티를 포함하는, 방법.
- [0743] 195. 실시형태 181-194 에 있어서, 중간 반응성 표면의 반응 모이어티의 적어도 제 1 서브 세트를 각각 결합 모이어티를 포함하는 제 1 연결 시약과 반응시킴으로써 상기 제 1 복수의 결합 모이어티를 포함하는 상기 공유결합으로 관능화된 표면을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0744] 196. 실시형태 195 의 방법으로서, 결합 모이어티는 비오틴 결합제인, 방법.
- [0745] 197. 실시형태 193-196 에 있어서, 상기 제 2 복수의 결합 모이어티가 적어도 제 1 복수의 결합 모이어티의 제 2 서브 세트인, 방법.
- [0746] 198. 실시형태 195-197 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 합성 표면의 제 2 복수의 결합 모이어티는 중간 반응성 표면의 반응성 모이어티들의 제 2 서브 세트인, 방법.
- [0747] 199. 실시형태 187-198 에 있어서, 상기 표면 차단 분자에 결합하도록 구성된 제 3 의 복수의 결합 모이어티가 적어도 제 1 복수의 결합 모이어티의 제 3 서브 세트인, 방법.
- [0748] 200. 실시형태 195-198 에 있어서, 상기 표면 차단 분자에 결합하도록 구성된 제 3 의 복수의 결합 모이어티가 중간 반응성 비드의 반응성 모이어티의 추가 서브 세트인, 방법.
- [0749] 201. 실시형태 181-200 에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 표면은 금속, 유리, 세라믹, 폴리머, 금속 산화물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.
- [0750] 202. 실시형태 181 내지 201 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 MHC 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, 방법.
- [0751] 203. 실시형태 202 에 있어서, MHC 분자가 MHC 단백질 서열의 C- 말단 연결을 통해 공유결합으로 개질된 표면에 연결되는, 방법.
- [0752] 204. 실시형태 181 내지 203 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 항원 특이적 펩티드 서열을 포함하는, 방법.
- [0753] 205. 실시형태 181-204 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 밀도는, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크로당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 분자들인, 방법.
- [0754] 206. 실시형태 181-204 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 밀도는, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크로당 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 분자들인, 방법.
- [0755] 207. 실시형태 181-204 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 밀도는, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 제곱 마이크로 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크로 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크로 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크로 당 분자인, 방법.
- [0756] 208. 구현 예 181-207 중 어느 하나에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 CD28 결합 단백질 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0757] 209. 실시형태 209 에 있어서, CD28 결합 단백질 또는 그의 단편은 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.
- [0758] 210. 실시형태 181-209 중 어느 하나에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 CD28 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD28 과의 결합 활성을 유지하는, 방법.

- [0759] 211. 구현 예 181-209 중 어느 하나에 있어서, TCR 공 활성화 분자는 항-CD28 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0760] 212. 구현 예 181-211 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 결합 단백질을 포함하는, 방법.
- [0761] 213. 실시형태 212 에 있어서, CD2 결합 단백질 또는 그의 단편은 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.
- [0762] 214. 실시형태 181-213 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 CD58 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD2 과의 결합 활성을 유지하는, 방법.
- [0763] 215. 구현 예 181-214 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 항-CD2 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0764] 216. 실시형태 181 내지 215 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 표면 상에 존재하는 상기 1 차 활성화 분자 리간드 대 상기 공 활성화 분자 리간드의 비가 약 1:10 내지 약 2 : 1, 약 1 : 5 내지 약 2 : 1, 약 1 : 2 내지 약 2 : 1, 약 1:10 내지 약 1 : 1, 약 1 : 5 내지 약 1 : 1, 약 1 : 1 내지 약 2 : 1 또는 약 1 : 2 내지 약 1 : 1 인, 방법.
- [0765] 217. 실시형태 181-216 중 어느 하나에 있어서, 항원 활성화 표면상의 1 차 활성화 분자 리간드 대 공 활성화 분자 리간드의 비가 약 1 : 1 인, 방법.
- [0766] 218. 실시형태 181 내지 217 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 실시형태 1 내지 96 중 어느 하나에 기재된 항원 제시 표면을 생성하는, 방법.
- [0767] 219. 제 181 항 내지 제 218 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 표면은 비드의 표면인, 방법.
- [0768] 220. 제 181 항 내지 제 218 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 제시 표면이 항원 제시 비드인, 방법.
- [0769] 221. 실시형태 219 내지 220 중 어느 하나에 있어서, 비드가 동일한 부피 또는 직경을 갖는 구의 표면적의 10 % 이내의 표면적을 갖는, 방법.
- [0770] 222. 실시형태 219 내지 221 중 어느 하나에 있어서, 비드는 유리를 포함하는, 방법.
- [0771] 223. 실시형태 219 내지 222 중 어느 하나에 있어서, 상기 비드는 폴리머를 포함하는, 방법.
- [0772] 224. 실시형태 219 내지 223 중 어느 하나의 방법으로서, 비드는 자기 재료를 포함하는, 방법.
- [0773] 225. 실시형태 181 내지 224 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 3:1 내지 약 1:3 인, 방법.
- [0774] 226. 실시형태 181 내지 225 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1차 활성화 분자 리간드들은 상기 항원 제시 비드의 표면 상에 제곱 마이크론 당 약 4×10^2 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0775] 227. 실시형태 181-226 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 비드 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 분포는 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 분자들인, 방법.
- [0776] 228. 실시형태 181 내지 226 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1차 활성화 분자 리간드들은 상기 항원 제시 비드의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 2×10^3 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0777] 229. 실시형태 181 내지 226 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 상기 항원 제시 비드의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자들 또는 제곱 마이크론 당 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 개의 분자들, 또는 제곱 마이크론 당 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0778] 230. 실시형태 219-229 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포는 항원 제시 비드 상에 제곱 마이크론당 약 2×10^2 내지 약 1×10^3 분자들인, 방법.

- [0779] 231. 실시형태 219 내지 230 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 비드 상의 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포가 약 1×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자인, 방법.
- [0780] 232. 실시형태 181 내지 218 또는 225 내지 231 중 어느 하나에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 표면은 미세유체 디바이스의 내부 표면인, 방법.
- [0781] 233. 실시형태 181 내지 218 또는 225 내지 229 또는 232 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 표면이 미세유체 디바이스의 항원 제시 내부 표면인, 방법.
- [0782] 234. 실시형태 233 에 있어서, 항원 제시 내부 표면을 포함하는 상기 미세유체 디바이스는 실시형태 61-96 중 어느 하나의 미세유체 디바이스인, 방법.
- [0783] 235. 실시형태 181 내지 218 또는 224 내지 229 중 어느 하나에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 표면은 웨이퍼의 표면인, 방법.
- [0784] 236. 실시형태 181 내지 218 또는 224 내지 229 또는 235 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 표면이 항원 제시 웨이퍼인, 방법.
- [0785] 237. 실시형태 181 내지 218 또는 224 내지 231 중 어느 하나에 있어서, 상기 공유결합으로 관능화된 표면은 튜브의 내부 표면인, 방법.
- [0786] 238. 실시형태 181 내지 218 또는 224 내지 229 또는 237 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 표면이 튜브의 항원 제시 내부 표면인, 방법.
- [0787] 239. 실시형태 237 또는 238 에 있어서, 튜브가 (i) 유리 튜브 또는 (ii) 폴리머 튜브인, 방법.
- [0788] 240. 실시형태 181-239 중 어느 하나에있어서, 복수의 1 차 활성화 분자가 복수의 공 활성화 분자가 제 2 복수의 결합 모이어티와 반응하기 전에 제 1 복수의 결합 모이어티와 반응하는, 방법.
- [0789] 241. 실시형태 154-240 중 어느 하나에 있어서, 합성 반응성 표면의 적어도 제 1 부분에 배치된 적어도 제 1 복수의 표면-노출 모이어티를 복수의 중간 제조 분자와 반응시시켜, 복수의 반응성 모이어티를 포함하는 중간 반응성 표면을 생성하는 것을 포함하는, 중간 반응성 표면을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0790] 242. 실시형태 241에 있어서, 중간 반응성 표면을 생성하는 단계는 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 부분에 배치된 적어도 제 2 복수의 표면 노출 모이어티를 복수의 표면 차단 분자와 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0791] 243. 실시형태 241 또는 242 에 있어서, 합성 반응성 표면의 제 2 부분에 배치 된 제 2 복수의 표면 노출 모이어티를 복수의 표면-차단 분자와 반응시켜, 중간 반응성 표면의 제 2 부분에서 복수의 표면-차단 분자 리간드를 제공하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0792] 244. 실시형태 243 에 있어서, 각각의 표면 차단 분자 리간드는 MHC 분자를 포함하는 1 차 활성화 분자 리간드를 배제하도록 구성되는, 방법.
- [0793] 245. 실시형태 241 내지 244 중 어느 하나의 방법으로서, 표면 노출 모이어티들은 친핵성 모이어티들인, 방법.
- [0794] 246. 실시형태 241 내지 244 중 어느 하나의 방법으로서, 표면 노출 모이어티는 치환가능한 모이어티인, 방법.
- [0795] 247. 실시형태 241 내지 246 중 어느 하나에 있어서, 반응성 합성 표면의 적어도 제 1 부분의 표면 노출 모이어티들과 반응성 합성 표면의 제 2 부분의 표면 노출 모이어티들은 동일한 표면 노출 모이어티들이 아닌, 방법.
- [0796] 248. 실시형태 241 내지 247 중 어느 하나에있어서, 복수의 1 차 활성화 분자의 반응 및 복수의 공 활성화 분자의 반응은 공유결합으로 관능화된 표면의 적어도 제 1 부분의 복수의 서브 영역에서 수행되고, 각각의 서브 영역은 각각의 제 1 결합 모이어티 및 제 2 결합 모이어티를 포함한다.
- [0797] 249. 실시형태 248 에 있어서, 결합 모이어티를 포함하는 공유결합으로 관능화된 표면의 적어도 제 1 부분의 복

수의 서브-영역에서 복수의 표면 차단 분자를 반응시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

- [0798] 250. 실시형태 249 에 있어서, 공유결합으로 관능화된 표면의 적어도 제 1 부분의 복수의 서브-영역에서 복수의 표면-차단 분자를 반응시키는 단계가 복수의 1 차 활성화 분자의 반응 및 복수의 공 활성화 분자의 반응 전에 수행되는, 방법.
- [0799] 251. 실시형태 248 에 있어서, 공유결합으로 관능화된 표면의 적어도 제 1 부분의 복수의 서브-영역에서 복수의 표면 차단 분자의 반응이 복수의 1 차 활성화 분자의 반응 및 복수의 공 활성화 분자의 반응이 복수의 하위 영역에서 수행된 후에 수행되는, 방법.
- [0800] 252. 실시형태 241-250 중 어느 하나에 있어서, 공유결합으로 관능화된 표면의 복수의 제 1 서브-영역 각각은 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 부분에 의해 복수의 제 1 서브-영역 중 다른 것으로부터 분리되는 방법.
- [0801] 253. 실시형태 252 에 있어서, 공유결합으로 관능화된 표면의 제 2 부분에 위치한 각각의 복수의 결합 모이어티들과 복수의 표면 차단 분자를 반응시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0802] 254. 실시형태 252 에서, 중간 반응성 표면의 제 2 부분은 복수의 1 차 활성화 및 공 활성화 분자와 실질적으로 반응하지 않도록 구성된 표면 노출 모이어티를 포함하는, 방법.
- [0803] 255. 실시형태 253 또는 254 에 있어서, 합성 반응성 표면의 제 2 부분의 표면-노출 모이어티를 복수의 표면-차단 분자와 반응시키는 단계는 합성 반응성 표면의 제 1 부분의 표면 노출 모이어티를 하나 이상의 표면 제조 시약과 반응시키기 전에 수행되어, 중간 반응성 표면을 제공하는, 방법.
- [0804] 256. 실시형태 181-255 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자의 반응은 MHC 분자를 포함하는 제 1 복수의 분자의 반응 후에 수행되는, 방법.
- [0805] 257. 실시형태 227-256 중 어느 하나에 있어서, MHC 분자가 MHC 단백질 서열의 C- 말단 연결을 통해 항원 제시 표면에 연결되는, 방법.
- [0806] 258. 실시형태 181-257 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 분포는, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 분자들인, 방법.
- [0807] 259. 실시형태 181-258 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 분포는, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크론당 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 분자들인, 방법.
- [0808] 260. 실시형태 181-258 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 웨이퍼 상의 복수의 1차 활성화 분자 리간드의 분포는, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자인, 방법.
- [0809] 261. 실시형태 181-260 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포는, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 항원 제시 표면 상에서 제곱 마이크론당 약 2×10^2 내지 약 1×10^3 분자들인, 방법.
- [0810] 262. 실시형태 181-260 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포는, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 항원 제시 표면 상에서 제곱 마이크론당 약 1×10^3 내지 약 5×10^3 분자들인, 방법.
- [0811] 263. 실시형태 181 내지 260 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 표면 상의 복수의 공 활성화 분자 리간드의 분포가, 공 활성화 분자 리간드가 존재하는 항원 제시 표면의 각 부분 또는 서브 영역에서, 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론

당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자인, 방법.

- [0812] 264. 실시형태 154 내지 263 중 어느 하나에 있어서, 비오틴 결합제는 스트렙타비딘인, 방법.
- [0813] 265. T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키는 방법은 각각 T 세포의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드들; 및 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 각각 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드들을 포함하는 항원 제시 합성 표면과 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계; 및 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 복수의 T 세포들을 배양함으로써, 복수의 T 세포들의 적어도 일부를 활성화된 T 세포들로 변환시키는 단계를 포함한다.
- [0814] 266. T 림프구 (T 세포)를 활성화시키는 방법은 복수의 T 세포를 실시형태 1-96 중 어느 하나의 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 복수의 T 세포를 배양함으로써, 복수의 T 세포의 적어도 일부를 활성화 된 T 세포로 전환시키는 단계를 포함한다.
- [0815] 267. 실시형태 265 또는 266 에 있어서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포를 포함하는, 방법.
- [0816] 268. 실시형태 265-267 에서, 복수의 공 활성화 분자 리간드는 TCR 공 활성화 분자 및 보조 TCR 활성화 분자를 포함한다.
- [0817] 269. 실시형태 265 내지 268 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 100:1 내지 약 1:100 인, 방법.
- [0818] 270. 실시형태 265 내지 269 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 보조 TCR 활성화 분자에 대한 TCR 공 활성화 분자의 비는 100 : 1 내지 90 : 1, 90 : 1 내지 80 : 1, 80 : 1 내지 70 : 1, 70 : 1 내지 60 : 1, 60 : 1 내지 50 : 1, 50 : 1 내지 40 : 1, 40 : 1 내지 30 : 1, 30 : 1 내지 20 : 1, 20 : 1 내지 10 : 1, 10 : 1 내지 1 : 1, 3:1 내지 1:3, 1 : 1 내지 1:10, 1:10 내지 1:20, 1 : 20 내지 1:30, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90 또는 1:90 내지 1:100 이며, 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정된다.
- [0819] 271. 실시형태 265 내지 270 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 20:1 내지 약 1:20 또는 약 3:1 내지 약 1:3 인, 방법.
- [0820] 272. 실시형태 265 내지 271 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 MHC 분자가 각각 MHC 단백질 서열 및 베타 마이크로 글로불린을 포함하는, 방법.
- [0821] 273. 실시형태 272 에 있어서, MHC 분자의 단백질 서열이 단백질 서열의 C-말단 연결을 통해 항원 제시 합성 표면에 연결되는, 방법.
- [0822] 274. 실시형태 265-273 중 어느 하나에 있어서, MHC 분자가 비오틴 모이어티를 포함하고 비오틴 결합제와의 비 공유적 상호 작용을 통해 항원 제시 합성 표면에 부착되는, 방법.
- [0823] 275. 실시형태 274 에 있어서, 비오틴 결합제가 그 자체가 항원 제시 합성 표면에 공유 결합되는, 방법.
- [0824] 276. 실시형태 275 에 있어서, 비오틴 결합제는 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 결합되는, 방법.
- [0825] 277. 실시형태 274 에 있어서, 비오틴 결합제가 항원 제시 합성 표면에 비공유적으로 연관되는, 방법.
- [0826] 278. 실시형태 274 에 있어서, 비오틴 결합제가 비오틴과 비공유적으로 연관되고, 비오틴은 항원 제시 합성 표면에 공유 결합되는, 방법.
- [0827] 279. 실시형태 278 에 있어서, 비오틴은 일련의 약 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 100, 200 결합 길이들, 또는 그 사이의 임의의 수의 결합 길이들을 통해 표면에 연결기에 의해 연결되는, 방법.
- [0828] 280. 실시형태 274 내지 279 중 어느 하나에 있어서, 비오틴 결합제는 스트렙타비딘인, 방법.
- [0829] 281. 실시형태 265 내지 280 중 어느 하나에 있어서, 상기 MHC 분자가 항원 분자를 더 포함하는, 방법.
- [0830] 282. 실시형태 281 에 있어서, 상기 항원 분자는 SLC45A2, TCL1, VCX3A, MART1 또는 NYESO1 인, 방법.

- [0831] 283. 실시형태 265-282 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드 각각은 항원 제시 합성 표면에 연결된다.
- [0832] 284. 실시형태 265 내지 282 중 어느 하나에 있어서, T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자는 CD28 과의 결합 능력을 유지하는 CD28 결합 단백질 또는 이의 단편인, 방법.
- [0833] 285. 실시형태 284 에 있어서, CD28 결합 단백질 또는 그의 단편은 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.
- [0834] 286. 실시형태 265-285 중 어느 하나에 있어서, T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자는 CD28 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD28 과의 결합 활성을 유지하는, 방법.
- [0835] 287. 구현 예 265-286 중 어느 하나에 있어서, T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자는 항-CD28 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0836] 288. 구현 예 265-287 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 CD2 결합 단백질을 포함하는, 방법.
- [0837] 289. 실시형태 288 에 있어서, CD2 결합 단백질 또는 그의 단편은 부위-특이적 C-말단 비오틴 모이어티를 추가로 포함하는, 방법.
- [0838] 290. 실시형태 265-289 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 CD58 분자 또는 이의 단편을 포함하고, 여기서 그 단편은 CD2 과의 결합 활성을 유지하는, 방법.
- [0839] 291. 구현 예 265-290 중 어느 하나에 있어서, 보조 TCR 활성화 분자는 항-CD2 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0840] 292. 실시형태 265-291 중 어느 하나에 있어서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 하나의 영역상에, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크론당 약 4×10^2 내지 약 2×10^3 분자들의 밀도로 존재하는, 방법.
- [0841] 293. 실시형태 265 내지 292 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드들은, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 상기 항원 제시 합성 표면 상에서 제곱 마이크론 당 약 2×10^2 내지 약 1×10^3 개의 분자들의 밀도로 상기 항원 제시 표면의 적어도 일부 상에 배치되는, 방법.
- [0842] 294. 실시형태 265 내지 292 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 1차 활성화 분자 리간드들은, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 상기 항원 제시 합성 표면의 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 3×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0843] 295. 실시형태 265 내지 292 또는 294 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 공 활성화 분자 리간드는, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 상기 항원 제시 합성 표면의 적어도 일부 상에 제곱 마이크론 당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 개의 분자들 또는 제곱 마이크론 당 약 5×10^2 내지 약 1.5×10^4 개의 분자들의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0844] 296. 실시형태 265-295 중 어느 하나에 있어서, 복수의 1차 활성화 분자 리간드는 항원 제시 표면의 적어도 하나의 영역상에, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 제곱 마이크론당 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 , 약 2×10^3 내지 약 5×10^3 , 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 , 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 분자들의 밀도로 존재하는, 방법.
- [0845] 297. 실시형태 265 내지 296 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드가, 그것이 부착되는 각 부분 또는 서브 영역에서, 항원 제시 표면의 적어도 일부 상에 약 5×10^3 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 5×10^3 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 2×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 약 1.25×10^4 내지 약 1.75×10^4 제곱 마이크론 당 분자, 또는 약 1.25×10^4 내지 약 1.5×10^4 제곱 마이크론 당 분자의 밀도로 배치되는, 방법.
- [0846] 298. 실시형태 265 내지 297 중 어느 하나에 있어서, 상기 공유결합으로 개질된 표면상의 상기 1 차 활성화 분

자 리간드 대 상기 공 활성화 분자 리간드의 비가 약 1:10 내지 약 2 : 1, 약 1 : 5 내지 약 2 : 1, 약 1 : 2 내지 약 2 : 1, 약 1:10 내지 약 1 : 1, 약 1 : 5 내지 약 1 : 1, 약 1 : 1 내지 약 2 : 1 또는 약 1 : 2 내지 약 1 : 1 인, 방법.

- [0847] 299. 실시형태 265 내지 298 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 3:1 내지 약 1:3 인, 방법.
- [0848] 300. 실시형태 265 내지 299 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 2:1 내지 약 1:2 인, 방법.
- [0849] 301. 실시형태 265 내지 300 중 어느 하나에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드의 TCR 공 활성화 분자 대 보조 TCR 활성화 분자의 비는 약 1:1 인, 방법.
- [0850] 302. 실시형태 265-301 중 어느 하나에 있어서, 복수의 T 세포를 ICAM 분자를 포함하는 복수의 접착 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 복수의 접착 자극 분자 리간드 각각은 항원 제시 합성 표면에 부착되는, 방법.
- [0851] 303. 실시형태 302 에 있어서, 복수의 접착 자극 분자 리간드가 항원 제시 합성 표면에 공유적으로 부착되는, 방법.
- [0852] 304. 실시형태 265 내지 303 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 합성 표면은 복수의 표면 차단 분자 리간드들을 추가로 포함하는, 방법.
- [0853] 305. 실시형태 304 에 있어서, 복수의 표면 차단 분자 리간드가 1 차 활성화 분자 리간드의 밀도 및/또는 공 활성화 분자 리간드의 밀도를 제한하는, 방법.
- [0854] 306. 실시형태 304 또는 305 에 있어서, 복수의 표면 차단 분자 리간드가 공유 적으로 개질된 합성 표면의 선택 된 영역으로부터 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하는, 방법.
- [0855] 307. 실시형태 306 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 실질적으로 배제하도록 구성된 항원 제시 합성 표면의 선택된 영역이 미세 유체 장치의 미세 유체 채널을 포함하는, 방법.
- [0856] 308. 실시형태 306 에 있어서, 복수의 1 차 활성화 분자 리간드가 항원-제시 합성 표면의 제 1 부분의 복수의 서브 영역에 배치되고 복수의 표면-차단 분자 리간드가 제 2 영역에 배치되며, 추가로, 항원-제시 합성 표면의 제 1 부분의 복수의 서브 영역 각각은 항원-제시 합성 표면의 제 2 영역에 의해 제 1 부분의 복수의 서브 영역의 다른 영역과 분리된다.
- [0857] 309. 실시형태 308 에 있어서, 항원 제시 합성 표면의 제 1 부분의 복수의 서브 영역이 제 2 복수의 표면-차단 분자 리간드를 추가로 포함하는, 방법.
- [0858] 310. 실시형태 308 또는 309 에 있어서, 복수의 공 활성화 분자 리간드가 항원-제시 합성 표면의 제 1 부분의 복수의 서브 영역에 배치되는, 방법.
- [0859] 311. 실시형태 265-310 중 하나에 있어서, 복수의 T 세포를 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0860] 312. 실시형태 311 에 있어서, 성장 자극 분자 리간드들 각각은 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는, 방법.
- [0861] 313. 실시형태 312 에 있어서, 상기 성장 인자 수용체 리간드는 IL-21 또는 이의 단편을 포함하는, 방법.
- [0862] 314. 실시형태 265-313 중 어느 하나에 있어서, 복수의 성장 자극 분자 리간드와 접촉시키는 단계는 1 일 이상의 제 1 배양 기간 후에 수행되는, 방법.
- [0863] 315. 실시형태 311-314 중 어느 하나에 있어서, 성장 인자 수용체 리간드는 항원 제시 합성 표면에 연결된다.
- [0864] 316. 실시형태 311-315 중 어느 하나에 있어서, 복수의 성장 인자 수용체 리간드는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 상이한 표면인 항원 제시 합성 표면에 연결되는, 방법.
- [0865] 317. 실시형태 265 내지 316 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 합성 표면은 실시형태 181 내지 264 중 어느 하나에 기재된 임의의 것의 생성물인, 방법.
- [0866] 318. 실시형태 265 내지 317 중 어느 하나에 있어서, 상기 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 배양하는 단계는 약

4 일 내지 약 7 일의 기간 동안 수행되는, 방법.

- [0867] 319. 실시형태 265 내지 318 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 합성 표면이 비드 인 경우, 항원 제시 비드 대 세포의 비가 약 1 : 1 인 방법.
- [0868] 320. 실시형태 265 내지 319 중 어느 하나에 있어서, 항원-제시 합성 표면이 비드 일 때, 항원-제시 비드 대 세포의 비가 배양 시작시 약 1 : 1 인 방법.
- [0869] 321. 실시형태 265 내지 320 중 어느 하나에 있어서, 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 제 1 활성화 기간을 완료하는 단계로서, 여기서 항원 제시 합성 표면은 제 1 항원 제시 합성 표면인, 상기 제 1 활성화 기간을 완료하는 단계; 복수의 활성화된 T 세포를 각각 MHC 분자를 포함하는 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 및 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함하는 제 2 항원-제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및 상기 제 2 배양 기간 동안 상기 복수의 활성화된 T 세포를 상기 제 2 항원-제시 합성 표면과 접촉하여 배양함으로써, 확장된 복수의 활성화된 T 세포를 제공하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0870] 322. 실시형태 321 에 있어서, 제 2 항원 제시 합성 표면이 실시형태 1-96 중 어느 하나의 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼 또는 항원 제시 미세 유체 장치이거나 실시형태 181- 264 중 어느 하나의 생물인, 방법.
- [0871] 323. 실시형태 321 또는 322 에 있어서, 제 1 항원 제시 합성 표면이 제 1 복수의 항원 제시 비드를 포함하는 경우, 복수의 활성화된 T 세포를 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계는 제 2 복수의 항원 제시 비드를 복수의 활성화된 T 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0872] 324. 실시형태 323 에 있어서, 제 2 복수의 항원-제시 비드를 복수의 활성화된 T 세포에 1 : 1 비로 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0873] 325. 실시형태 323 또는 324 에 있어서, 제 1 항원 제시 합성 표면이 항원 제시 웨이퍼 또는 항원 제시 미세 유체 장치를 포함하는 경우, 복수의 활성화된 T 세포를 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉시키는 단계는 복수의 항원-제시 비드를 복수의 활성화된 T 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0874] 326. 실시형태 321 내지 325 중 어느 하나에 있어서, 제 2 배양 기간 동안 제 2 복수의 성장 자극 분자 리간드를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0875] 327. 실시형태 326 에 있어서, 제 2 복수의 성장 자극 분자 리간드가 항원 제시 비드와 상이한 비드인 비드의 표면에 연결되는, 방법.
- [0876] 328. 실시형태 321-327 중 어느 한 실시형태에 있어서, 복수의 IL-2 분자 및 복수의 IL-7 분자가 첨가되어 제 2 배양 기간의 나머지 동안 활성화된 T 세포와 접촉하는, 방법.
- [0877] 329. 실시형태 321-328 중 어느 하나에 있어서, 상기 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 배양하는 단계는 약 4 일 내지 약 7 일의 기간 동안 수행되는, 방법.
- [0878] 330. 실시형태 321-329 중 어느 하나에 있어서, 제 2 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 제 2 활성화 기간을 완료하는 단계; 증식된 복수의 활성화된 T 세포를 복수의 1 차 활성화 분자 리간드 및 각각 T 세포 수용체 (TCR) 공 활성화 분자 또는 보조 TCR 활성화 분자를 포함하는 복수의 공 활성화 분자 리간드를 포함하는 제 3 항원-제시 합성 표면과 접촉시키는 단계; 및 상기 제 3 배양 기간 동안 상기 증식된 복수의 활성화된 T 세포를 상기 제 3 항원-제시 합성 표면과 접촉하여 배양함으로써, 복수의 고도로 활성화된 T 세포를 제공하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0879] 331. 실시형태 330 에 있어서, 제 3 항원 제시 합성 표면이 실시형태 1-96 중 어느 하나의 항원 제시 비드, 항원 제시 웨이퍼 또는 항원 제시 미세 유체 장치이거나 실시형태 181- 264 중 어느 하나의 생물인, 방법.
- [0880] 332. 실시형태 330 내지 331 중 어느 하나에 있어서, 제 3 배양 기간 동안 제 3 복수의 성장 자극 분자 리간드를 첨가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0881] 333. 실시형태 332 에 있어서, 제 3 복수의 성장 자극 분자 리간드가 항원 제시 비드와 상이한 비드인 비드의 표면에 연결되는, 방법.
- [0882] 334. 실시형태 330-333 중 어느 한 실시형태에 있어서, 복수의 IL-2 분자 및 복수의 IL-7 분자가 첨가되어 제 3 배양 기간의 나머지 동안 활성화된 T 세포와 접촉하는, 방법.

- [0883] 335. 실시형태 330-334 중 어느 하나에 있어서, 상기 제 3 항원 제시 합성 표면과 접촉하여 배양하는 단계는 약 4 일 내지 약 7 일의 기간 동안 수행되는, 방법.
- [0884] 336. 실시형태 265 내지 335 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 T 세포는 CD45RO+ 인, 방법.
- [0885] 337. 실시형태 265 내지 336 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화된 T 세포는 CD28 양성인, 방법.
- [0886] 338. 실시형태 1-96 중 어느 하나의 항원-제시 합성 표면을 포함하는, T 림프구 (T 세포) 를 활성화시키기 위한 키트.
- [0887] 339. 실시형태 338 에서, 항원 제시 합성 표면은 항원-제시 비드, 항원-제시 웨이퍼, 항원-제시 튜브 또는 항원-제시 미세 유체 장치이다.
- [0888] 340. 실시형태 338 또는 339 중 어느 하나에 있어서, 복수의 성장 자극 분자 리간드를 포함하는 복수의 공유결합으로 개질된 비드를 더 포함하고, 각각의 성장 자극 분자 리간드는 성장 인자 수용체 리간드를 포함하는, 키트.
- [0889] 341. 실시형태 340 에 있어서, 상기 성장 인자 수용체 리간드는 사이토카인 또는 이의 단편을 포함하는, 키트.
- [0890] 342. 실시형태 341 항에 있어서, 사이토카인은 IL-21 또는 이의 단편을 포함하는, 키트.
- [0891] 343. 실시형태 340-342 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 성장 자극 분자를 추가로 포함하는, 키트.
- [0892] 344. 실시형태 343 에서, 추가의 성장 자극 분자(들) 은 IL2 및/또는 IL7 또는 이의 단편들을 포함한다.
- [0893] 345. 실시형태 344 에 있어서, 제 2 이상의 성장 자극 분자는 공유결합으로 개질된 비드에 부착되는, 키트.
- [0894] 346. 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 방법으로서,
- [0895] 미세유체 디바이스의 격리 펜으로 하나 이상의 표적 세포들을 로딩하는 단계;
- [0896] 하나 이상의 T 세포가 하나 이상의 표적 세포와 접촉할 수 있도록 상기 격리 펜에 하나 이상의 T 세포를 로딩하는 단계;
- [0897] 상기 표적 세포를 사멸 세포를 표지하는 검출 가능한 마커와 접촉시키는 단계; 및
- [0898] 상기 표적 세포가 세포 사멸되는지 여부를 검출하는 단계를 포함하는, 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하는 방법.
- [0899] 347. 실시형태 346 에서, 미세 유체 장치는 미세 유체 채널을 추가로 포함하고, 격리 펜은 미세 유체 채널에 유체적으로 연결되도록 미세 유체 채널에 대해 개방되는 개구를 포함한다.
- [0900] 348. 실시형태 346 에 있어서, 미세 유체 장치는 제 1 유체 매질의 유동을 함유하기 위한 유동 영역으로서, 격리 펜은 제 2 유체 매질을 함유하기 위한 격리 영역을 포함하고, 격리 영역은 단일 개구를 가지며, 격리 펜의 격리 영역은 미세 유체 장치의 스윕되지 않은 영역인, 상기 유동 영역; 및 격리 영역을 유동 영역에 유체 연결하는 연결 영역을 더 포함하고; 선택적으로, 흐름 영역은 미세유체 채널이다.
- [0901] 349. 실시형태들 346 내지 348 에 있어서, 복수의 표적 세포들은 격리 펜 안으로 로딩되는, 방법.
- [0902] 350. 실시형태들 346 내지 348 중 어느 하나에 있어서, 단일의 표적 세포가 격리 펜으로 로딩되는, 방법.
- [0903] 351. 실시형태들 346 내지 350 중 어느 하나에서, 단일의 T 세포가 격리 펜 안으로 로딩되는, 방법.
- [0904] 352. 실시형태들 346 내지 350 중 어느 하나에 있어서, 복수의 T 세포들은 격리 펜 안으로 로딩되는, 방법.
- [0905] 353. 실시형태 346 내지 352 중 어느 하나에 있어서, 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들)를 격리 펜으로 로딩하는 단계는:
- [0906] 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들)를 미세 유체 채널 내로 유동시키는 단계; 및
- [0907] 미세 유체 장치를 중력이 표적 세포 (들) 및/또는 T 세포 (들)를 격리 펜으로 끌어 당기도록 기울이는 단계를 포함한다.
- [0908] 354. 실시형태 346 내지 353 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 장치는 DEP 구성을 포함하고 DEP 힘은 표적 세

포 (들) 및/또는 T 세포 (들)를 격리 펜으로 로딩하는데 사용된다.

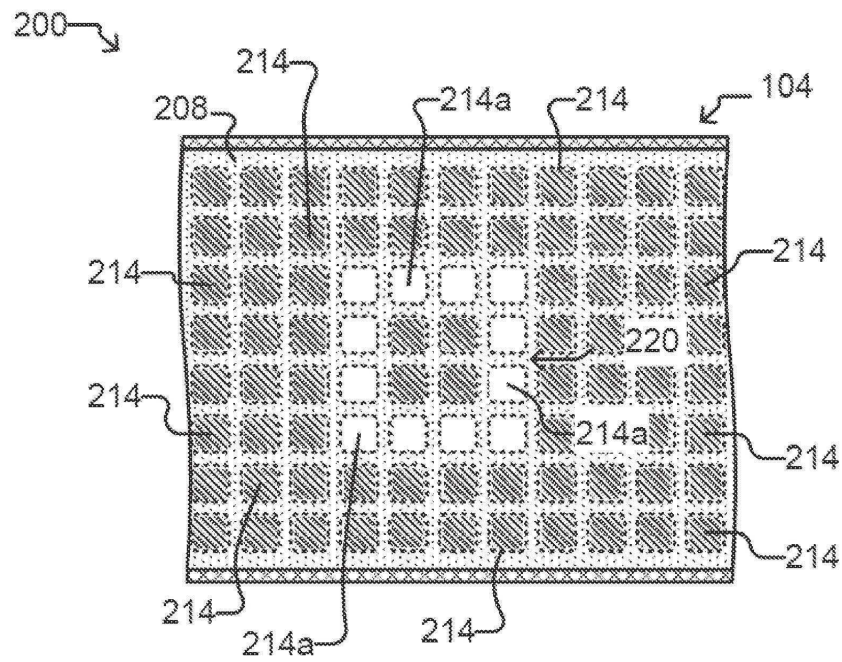
- [0909] 355. 실시형태 354 의 방법에 있어서, DEP 힘은 구조화된 광에 의해 활성화된다.
- [0910] 356. 실시형태 346 내지 355 중 어느 하나에 있어서, 검출 가능한 마커는 미세 유체 채널을 통해 유동되는 용액에 제공되며, 이때 검출 가능한 마커는 미세 유체 채널로부터 격리 펜으로 확산되어 표적 세포와 접촉할 수 있다.
- [0911] 357. 실시형태들 346 내지 356 중 어느 하나의 방법에 있어서, 검출가능한 마커는 효소 기질인, 방법.
- [0912] 358. 실시형태들 346 내지 357 중 어느 하나의 방법에 있어서, 검출가능한 마커는 카스파제 3 기질인, 방법.
- [0913] 359. 실시형태 346 내지 356 중 어느 하나에 있어서, 검출 가능한 마커는 세포 자멸성 세포 및/또는 세포자멸체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체이다.
- [0914] 360. 실시형태들 346 내지 359 에 있어서, 표적 세포들이 세포 자멸되는지 여부를 검출하는 것은 주기적으로 수행되는, 방법.
- [0915] 361. 실시형태 346 내지 360 중 어느 하나에 있어서, 표적 세포가 세포 자멸되는지 여부를 검출하는 것은 표적 세포 (들)를 검출 가능한 마커와 접촉시킨 후 2 시간 이상 후에 수행되는, 방법.
- [0916] 362. 실시형태 346 내지 실시형태 361 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 표적 세포(들) 는 암 세포이다.
- [0917] 363. 실시형태 346 내지 362 중 어느 하나에 있어서, 표적 세포 (들)는 암 연관 또는 암 특이적 항원을 발현하는 세포주로부터의 세포이다.
- [0918] 364. 실시형태 346 내지 363 중 어느 하나에 있어서, 표적 세포 (들)은 흑색 종, 유방암 또는 폐암과 연관된 항원을 발현한다.
- [0919] 365. 실시형태 346 내지 364 중 어느 하나의 방법으로서, T 세포는 키메릭 항원 수용체 (CAR) 를 발현한다.
- [0920] 366. 실시형태들 346 내지 365 중 어느 하나의 방법에 있어서, T 세포는 키메릭 항원 수용체를 발현하지 않는다.
- [0921] 367. 항원 특이적 세포 독성 분석을 수행하기 위한 키트로서,
- [0922] 미세유체 디바이스: 및
- [0923] 세포 자멸적 세포를 검출하기 위한 시약을 포함하는, 키트.
- [0924] 368. 실시형태 367 에 있어서, 상기 미세유체 디바이스는 실시형태 61 내지 96 중 어느 한 항에 기재된 항원 제시 미세유체 디바이스인, 키트.
- [0925] 369. 실시형태 367 또는 368 에 있어서, 세포 자멸성 세포를 검출하기 위한 시약은 효소 기질인, 키트.
- [0926] 370. 실시형태 369 에 있어서, 효소 기질은 카스파제 3 기질인, 키트.
- [0927] 371. 실시형태 367 내지 368 중 어느 하나에 있어서, 세포 자멸성 세포를 검출하기 위한 시약은 세포 자멸성 세포 및/또는 세포자멸체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체이다.
- [0928] 372. 전술한 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 상기 표면은 미세 유체 장치의 내부 표면이고 상기 내부 표면의 적어도 일부는 미세 유체 장치의 격리 펜 내에 있는, 표면, 키트 또는 방법.
- [0929] 373. 실시형태 372 의 표면, 키트 또는 방법, 또는 실시형태 346-371 중 어느 하나의 키트 또는 방법에 있어서, 미세 유체 장치는 제 1 유체 매질의 유동을 함유하기 위한 유동 영역으로서, 격리 펜은 제 2 유체 매질을 함유하기 위한 격리 영역을 포함하고, 격리 영역은 단일 개구를 가지며, 격리 펜의 격리 영역은 미세 유체 장치의 스윕되지 않은 영역인, 상기 유동 영역; 및 격리 영역을 유동 영역에 유체 연결하는 연결 영역을 더 포함하고; 선택적으로, 상기 미세 유체 장치는 상기 유동 영역의 적어도 일부를 포함하는 미세 유체 채널을 포함한다.
- [0930] 374. 실시형태 373 에 있어서, 미세 유체 장치는 유동 영역의 적어도 일부를 포함하는 미세 유체 채널을 포함하고, 연결 영역은 약 20 미크론 내지 약 100 미크론 범위의 폭 W_{con} 를 갖는 미세 유체 채널로의 근위 개구 및 격리 영역으로의 원위 개구를 포함하고, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 는 연결 영역의

근위 개구의 폭 W_{con} 의 1.0 배 이상이다.

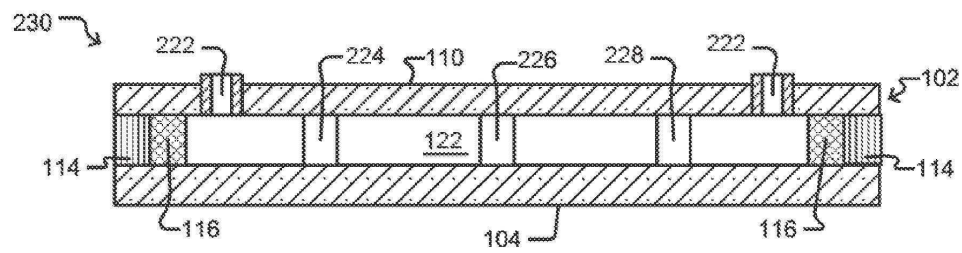
- [0931] 375. 실시형태 373 에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 의 1.5 배 이상이다.
- [0932] 376. 실시형태 373 에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 의 2.0 배 이상이다.
- [0933] 377. 실시형태 373-376 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구의 폭 W_{con} 는 약 20 미크론 내지 약 60 미크론의 범위이다.
- [0934] 378. 실시형태 373-376 중 어느 하나에 있어서, 근위 개구로부터 원위 개구까지의 연결 영역의 길이 L_{con} 은 약 20 내지 약 500 미크론이다.
- [0935] 379. 구현 예 373-378 중 어느 하나에있어서, 연결 영역의 근위 개구에서의 미세 유체 채널의 폭이 약 50 마이크로 내지 약 500 마이크로톤이다.
- [0936] 380. 실시형태 373-379 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구에서의 미세유체 채널의 높이는 약 20 마이크로 내지 약 100 미크론의 범위이다.
- [0937] 381. 실시형태 373-380 중 어느 하나에 있어서, 격리 영역의 부피가 약 2×10^4 내지 약 2×10^6 입방 미크론 범위이다.
- [0938] 382. 실시형태 373-381 중 어느 하나에 있어서, 연결 영역의 근위 개구는 유동 영역에서 제 1 매질의 유동 방향과 평행하다.
- [0939] 383. 실시형태 363-382 중 어느 하나에 있어서, 마이크로유체 디바이스는 베이스, 베이스 상의 마이크로유체 회로 구조, 및 마이크로유체 회로를 함께 정의하는 커버를 포함하는 인클로저를 포함하고, 마이크로유체 회로는 흐름 영역, 미세유체 채널 및 격리 펜을 포함한다..
- [0940] 384. 실시형태 383 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 회로는 제 1 매체가 유동 영역으로 유입 될 수있는 하나 이상의 유입구 및 제 1 매체가 유동 영역으로부터 제거 될 수있는 하나 이상의 배출구를 추가로 포함하는, 항원-체시 미세 유체 장치.
- [0941] 385. 실시형태 383 또는 384 항에 있어서, 상기 커버는 상기 미세유체 회로 구조의 일체형 부분이다.
- [0942] 386. 실시형태 383 -385 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 격리 펜을 한정하는 장벽이 미세 유체 장치의 베이스 표면으로부터 미세 유체 장치의 커버 표면으로 연장된다.
- [0943] 387. 실시형태 383-386 중 어느 하나에 있어서, 상기 커버 및 상기 베이스는 미세 물체에 DEP 힘을 선택적으로 유도하기 위한 유전 영동 (DEP) 메커니즘의 일부이다.
- [0944] 388. 실시형태 383-387 중 어느 하나에 있어서, 미세 유체 장치는 제 1 전극, 전극 활성화 기관 및 제 2 전극을 추가로 포함하고, 여기서 제 1 전극은 인클로저의 제 1 벽의 일부이고, 전극 활성화 기관 및 제 2 전극은 인클로저의 제 2 벽의 일부이며, 전극 활성화 기관은 광도전성 재료, 반도체 집적 회로 또는 광 트랜지스터를 포함한다.
- [0945] 389. 실시형태 388 에 있어서, 미세 유체 장치의 제 1 벽은 커버이고, 미세 유체 장치의 제 2 벽은 베이스이다.
- [0946] 390. 실시형태 388 또는 389 에 있어서, 전극 활성화 기관은 광트랜지스터를 포함한다.
- [0947] 391. 실시형태 383 내지 390 중 어느 하나에 있어서, 상기 커버 및/또는 상기 베이스는 광에 투명하다.
- [0948] 392. 실시형태 265-337 중 어느 하나의 방법에 의해 생성되는 하나 이상의 활성화된 T 세포.
- [0949] 393. 실시형태 265-337 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 활성화된 T 세포를 포함하는T 세포의 집단.
- [0950] 394. 실시형태 392 또는 393 의 세포 또는 집단에 있어서, 상기 활성화된 T 세포는 CD45R0+ 이다.
- [0951] 395. 실시형태 392 내지 394 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 T 세포는 CD28+ 이다.
- [0952] 396. 실시형태 265-337 또는 392-395 중 어느 하나에 있어서, 상기 활성화된 T 세포는 $Cd28^{high}$ 이다.

- [0953] 397. 실시형태 265-337 또는 392-396 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 T 세포는 CD127+ 이다.
- [0954] 398. 실시형태 265-337 또는 392-397 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 T 세포는 CD197+ 이다.
- [0955] 399. 실시형태 265-337 또는 392-398 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 T 세포는 CD8+ 이다.
- [0956] 400. 실시형태 392-399 중 어느 한 항에 기재된 세포 또는 집단을 포함하는 미세유체 디바이스.
- [0957] 401. 실시형태 61-96 중 어느 하나에 있어서, 실시형태 392-399 중 어느 하나의 세포 또는 집단을 포함하는, 미세 유체 장치.
- [0958] 402. 실시형태 392 내지 399 중 어느 하나의 세포 또는 집단을 포함하는, 약학 조성물.
- [0959] 403. 구현 예 257-327, 362-381 또는 382-389 중 어느 하나의 방법으로서, 여기서 상기 방법은 T 세포의 집단을 생성하는데, 여기서 T 세포의 집단의 적어도 1 %, 1.5 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % 또는 10 % 는 항원-특이적 T 세포이고, 여기서 상기 값 각각은 "약"에 의해 개질된다.
- [0960] 404. 실시형태 403 에 있어서, T 세포의 1 % -2 %, 2 % -3 %, 3 % -4 %, 4 % -5 %, 5 % -6 %, 6 % -7 %, 7 % -8 %, 8 % -9 %, 9 % -10 %, 10 % -11 % 또는 11 % -12 % 는 항원-특이적 T 세포이고, 여기서 상기 값들 각각은 "약"에 의해 수정된다.
- [0961] 405. 실시형태 403 또는 404 에서, 항원-특이 적 T 세포의 적어도 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % 또는 98 % 는 CD45RO+/CD28High 세포이며, 상기 값들 각각은 " 약" 에 의해 수정될 수 있다.
- [0962] 406. 암 치료가 필요한 대상체를 치료하는 방법은 대상체로부터 복수의 T 림프구 (T 세포) 를 얻는 단계; 복수의 T 세포들 각각의 T 세포 수용체에 결합하도록 구성된 복수의 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) I 분자를 포함하는 항원 제시 합성 표면과 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계로서, MHC 분자는 대상체의 암에 대해 특이적인 항원을 포함하고, 항원 제시 합성 표면은 본원에 기술 된 항원 제시 표면이거나 본원에 기술 된 방법에 따라 생성되는, 상기 복수의 T 세포들을 접촉시키는 단계; 복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계로서, 활성화는 대상체의 암에 대해 특이적이도록 구성되는, 상기 복수의 활성화된 T 세포를 생성하는 단계; 복수의 특이적 활성화된 T 세포를 활성화되지 않은 세포로부터 분리하는 단계; 및 복수의 항원 특이적 활성화된 T 세포를 대상체에 게 도입하는 단계를 포함한다.
- [0963] 407. 실시형태 406 에 있어서, T 세포는 실시형태 365-337 중 어느 하나의 방법을 사용하여 활성화된다.
- [0964] 408. 실시형태 406 또는 407 에 있어서, T 림프구를 공유적으로 개질된 합성 표면과 접촉시키기 전에 T 림프구를 포함하는 샘플을 농축하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0965] 409. 실시형태 406-408 중 어느 하나에 있어서, 상기 복수의 항원 특이적 활성화된 T 세포를 분리하는 단계는 상기 항원 특이적 활성화된 T 세포의 복수의 표면 바이오마커를 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0966] 410. 실시형태 409 에 있어서, 상기 복수의 표면 바이오마커는 CD45RO+ 를 포함한다.
- [0967] 411. 실시형태 409 또는 410 에 있어서, 복수의 표면 바이오마커는 CD28+ 를 포함한다.
- [0968] 412. 실시형태 409 내지 411 중 어느 하나에 있어서, 복수의 표면 바이오마커는 CD28^{high} 을 포함하는, 방법.
- [0969] 413. 실시형태 409 내지 412 중 어느 하나에 있어서, 복수의 표면 바이오마커는 CD8 인, 방법.
- [0970] 414. 실시형태 409 내지 413 중 어느 하나에 있어서, 복수의 표면 바이오마커는 CD127 인, 방법.
- [0971] 415. 실시형태 409 내지 414 중 어느 하나에 있어서, 복수의 표면 바이오마커는 CD197 을 포함하는, 방법.
- [0972] 416. 실시형태 406-415 중 어느 하나에 있어서, 항원 특이적 활성화된 T 세포의 증식된 집단을 제공하기 위해 항원 특이적 활성화된 T 세포를 빠르게 증식시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0973] 417. 실시형태 416 에 있어서, 빠른 증식은 상기 특이적 활성화된 T 세포를 활성화되지 않은 T 세포로부터 분리한 후 수행되는, 방법.
- [0974] 418. 실시형태 406-417 중 어느 하나에 있어서, 대상체를 치료하는 방법이 대상체에서 암의 진행을 지연시키거나 중단시키는, 방법.

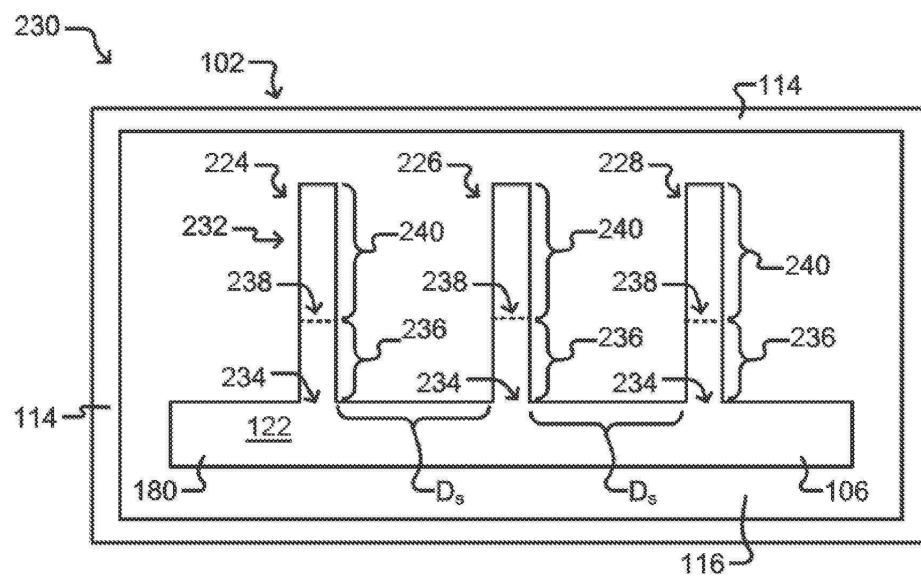
도면1c



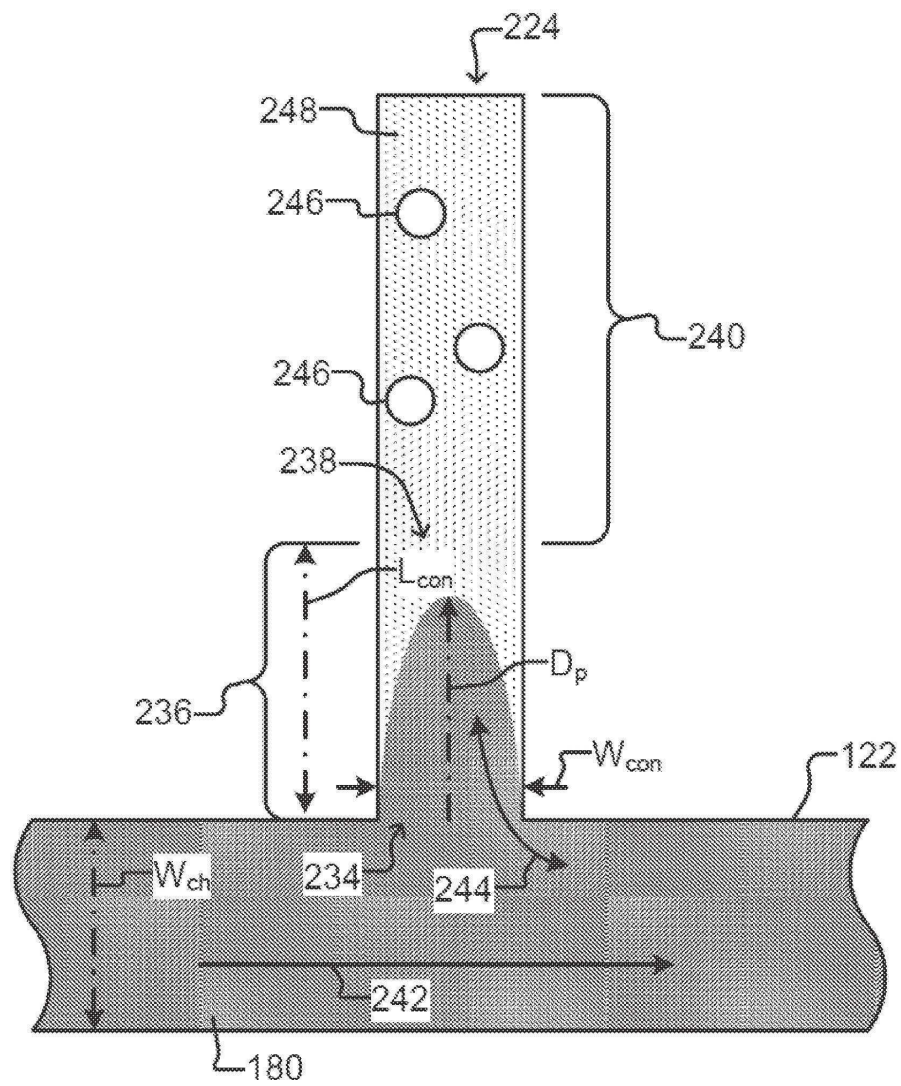
도면2a



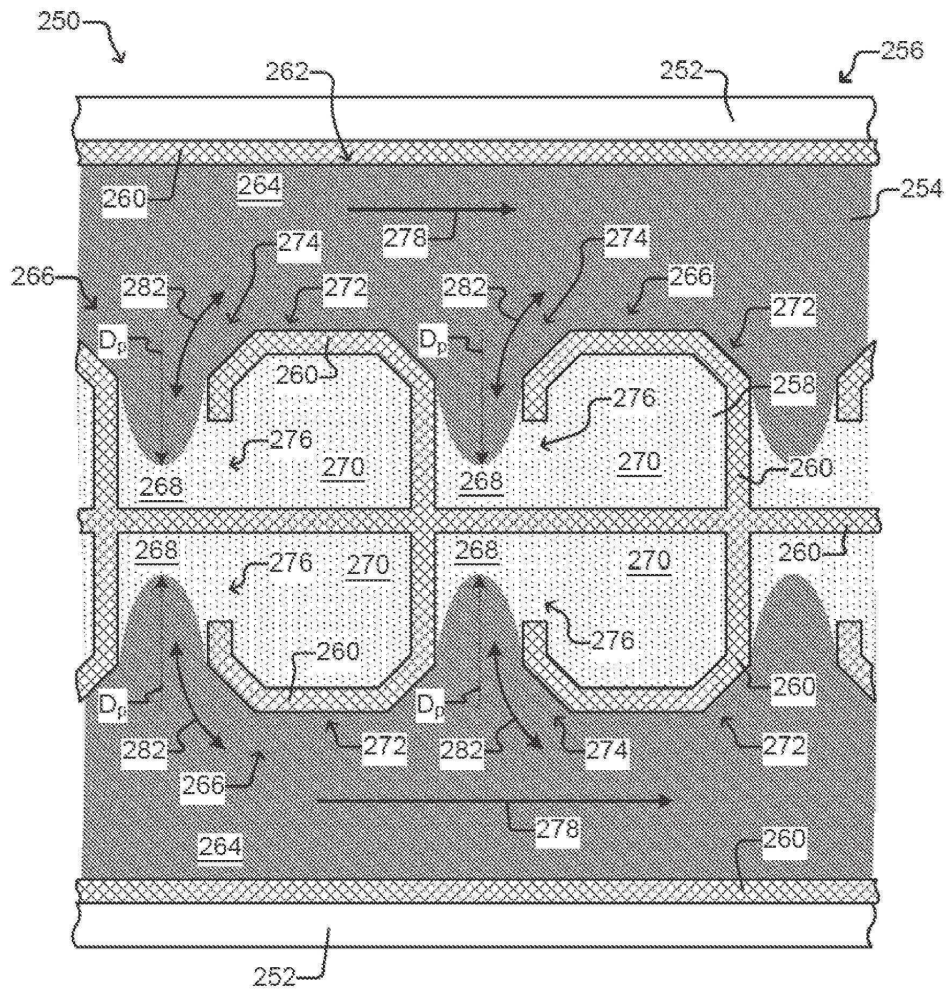
도면2b



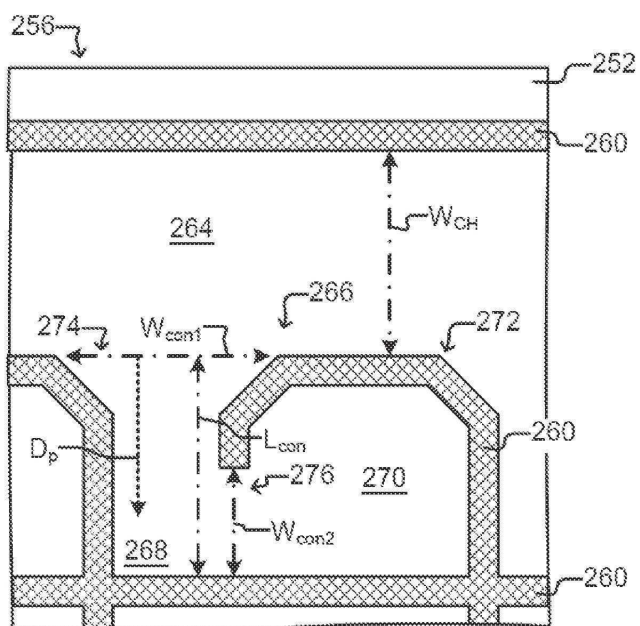
도면2c



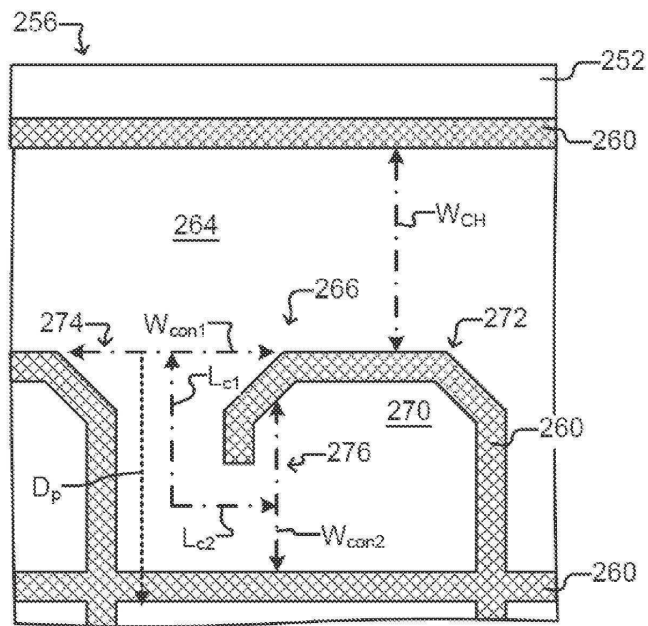
도면2d



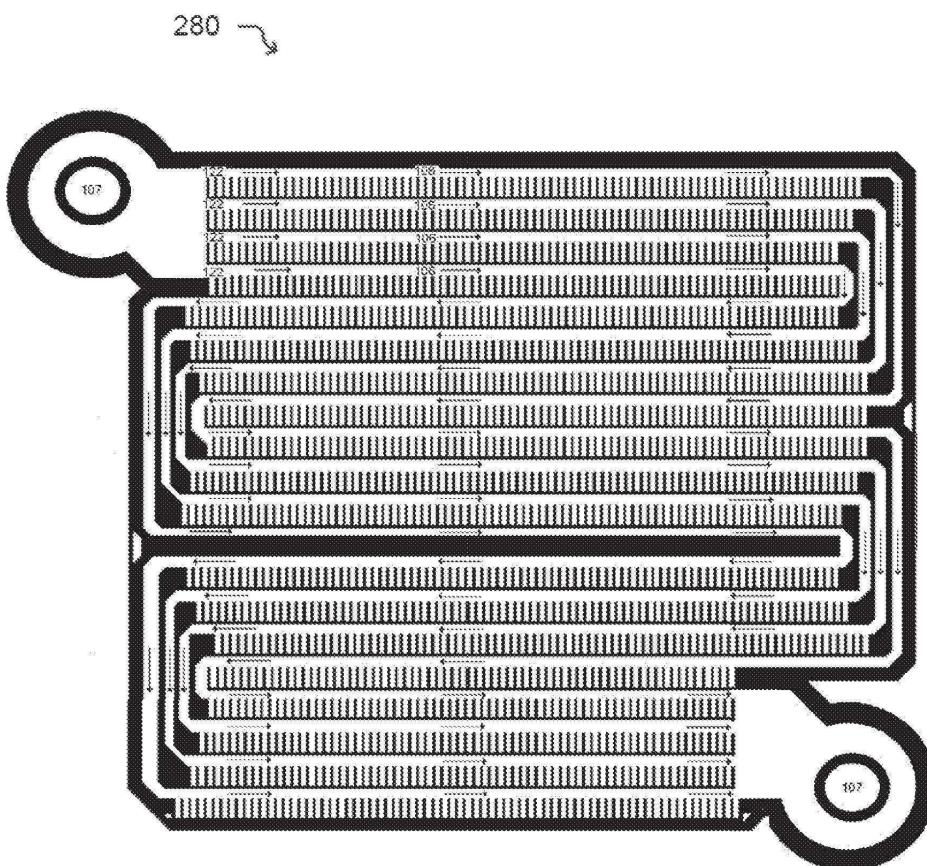
도면2e



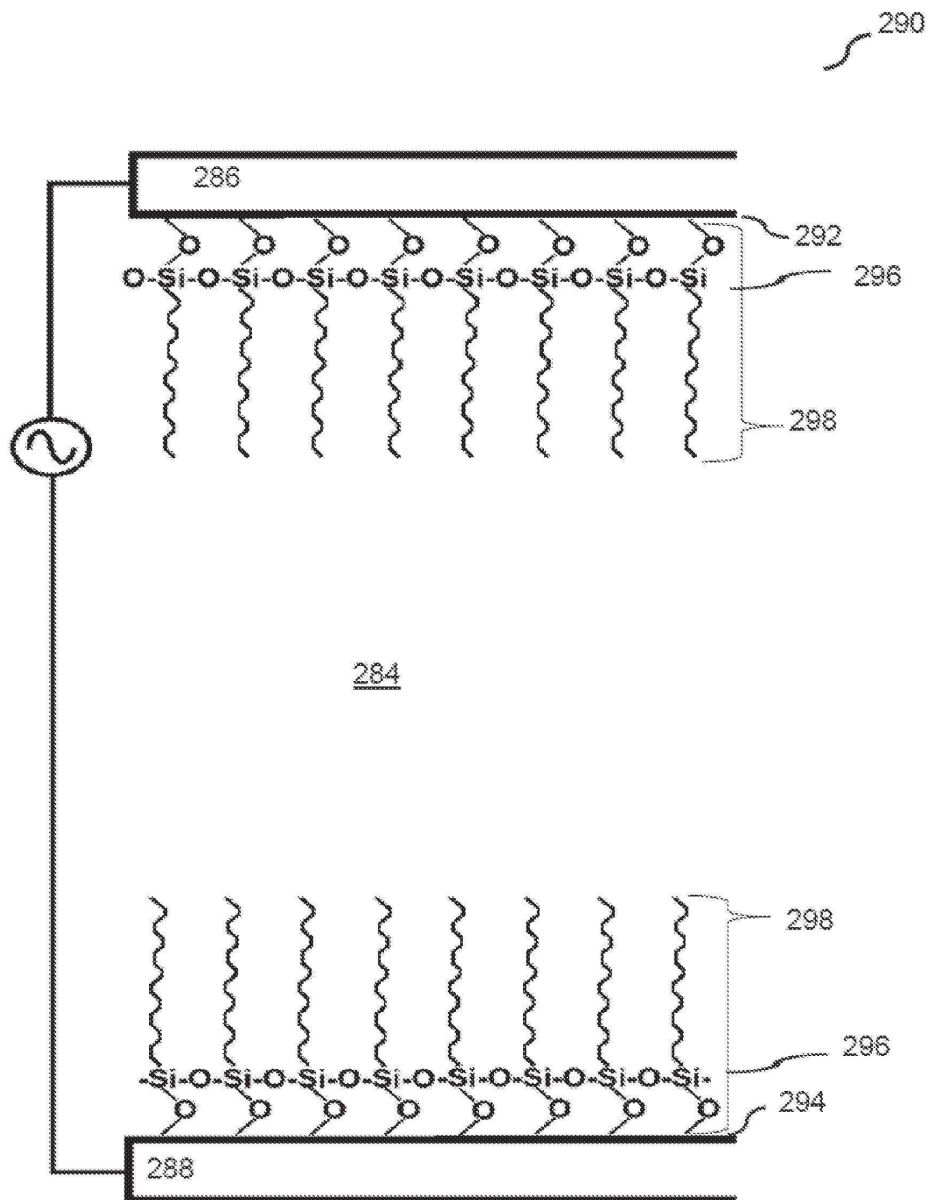
도면2f



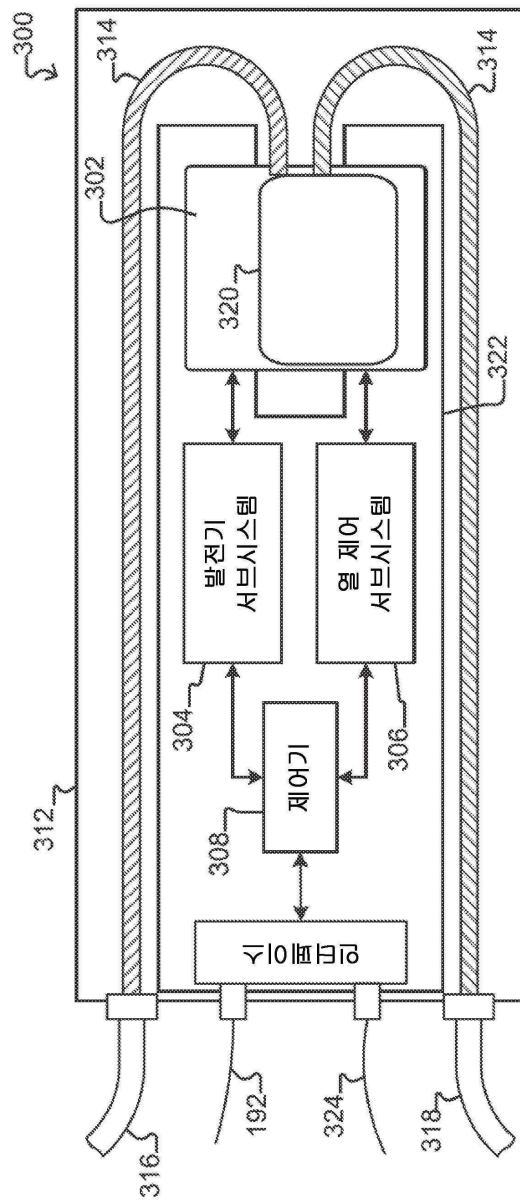
도면2g



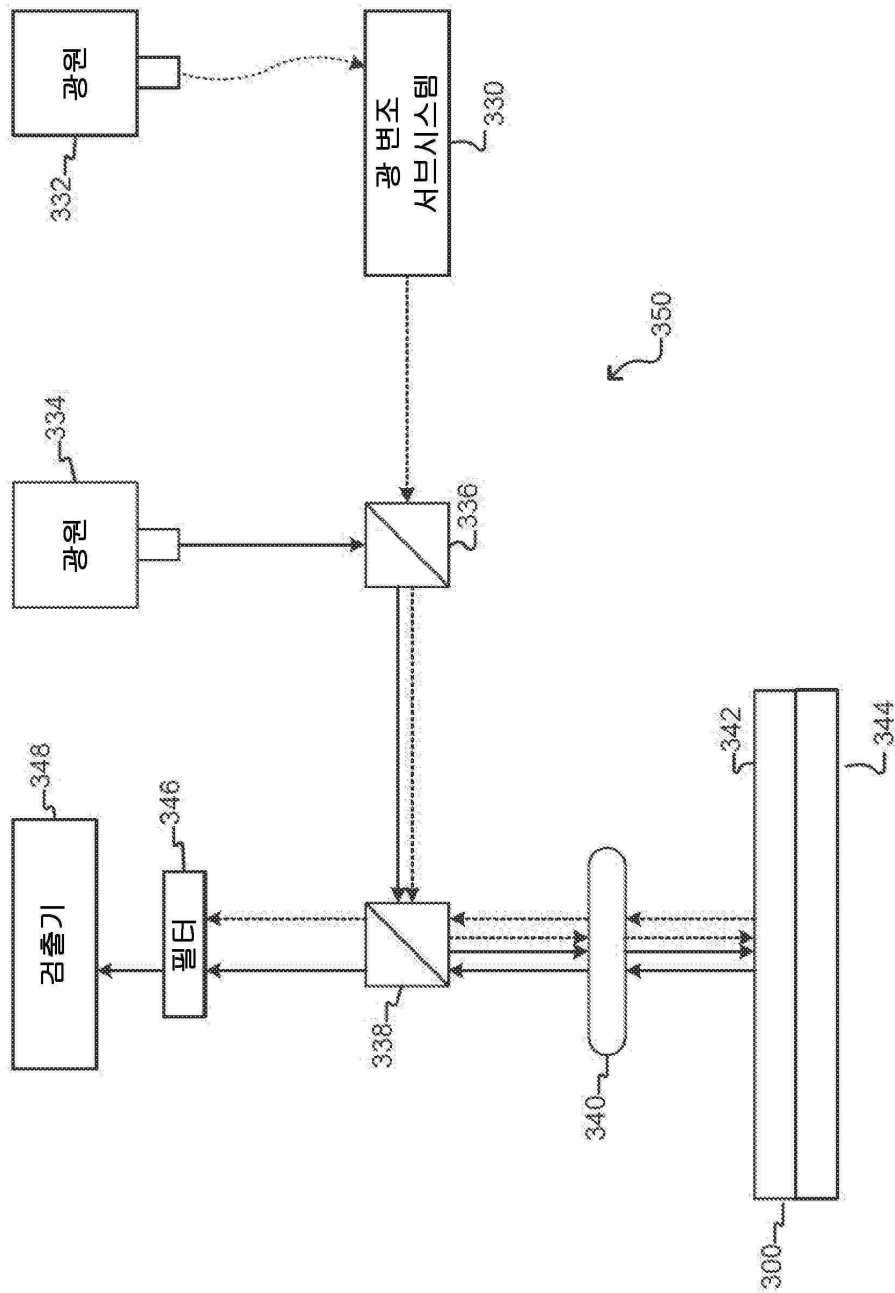
도면2h



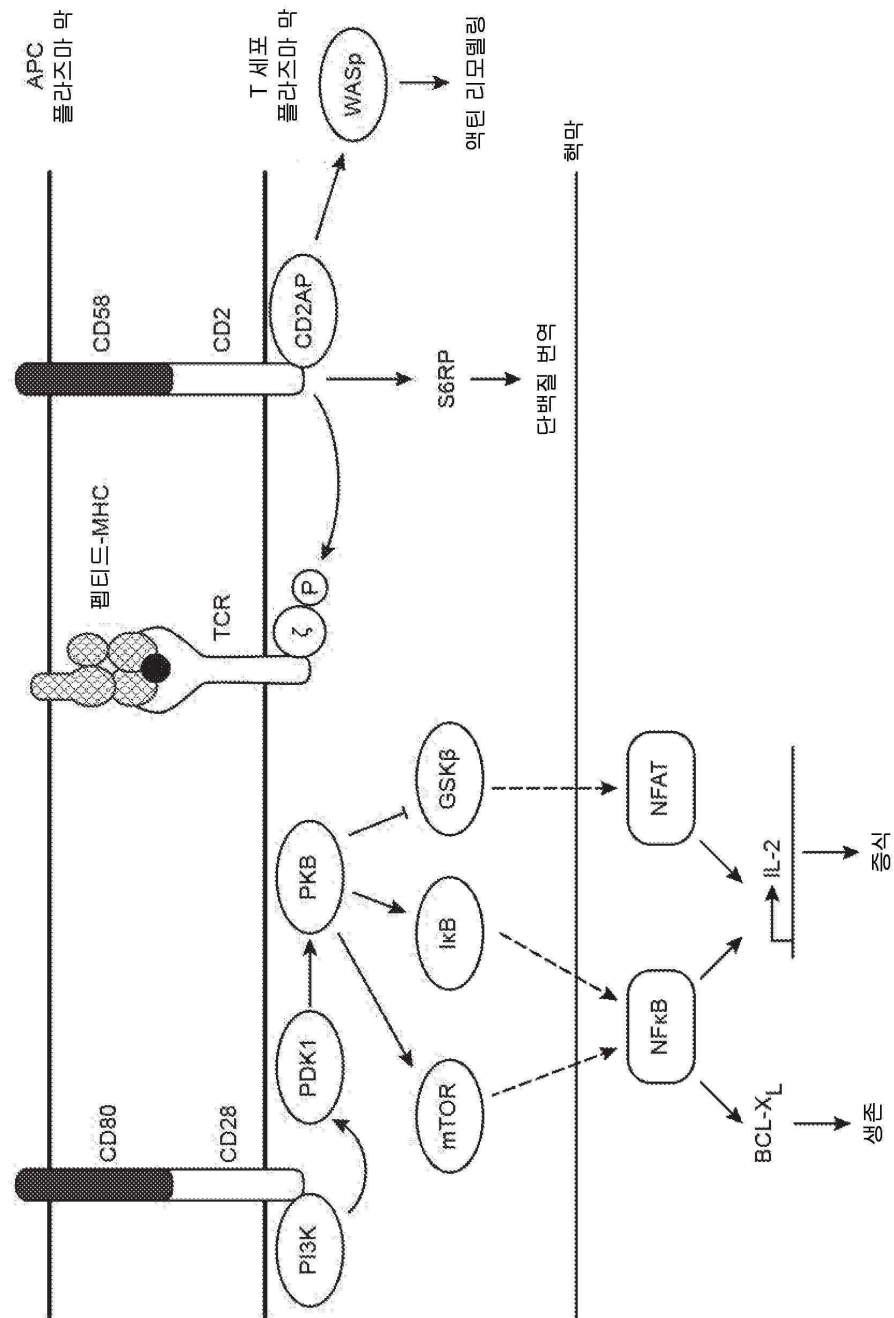
도면3a



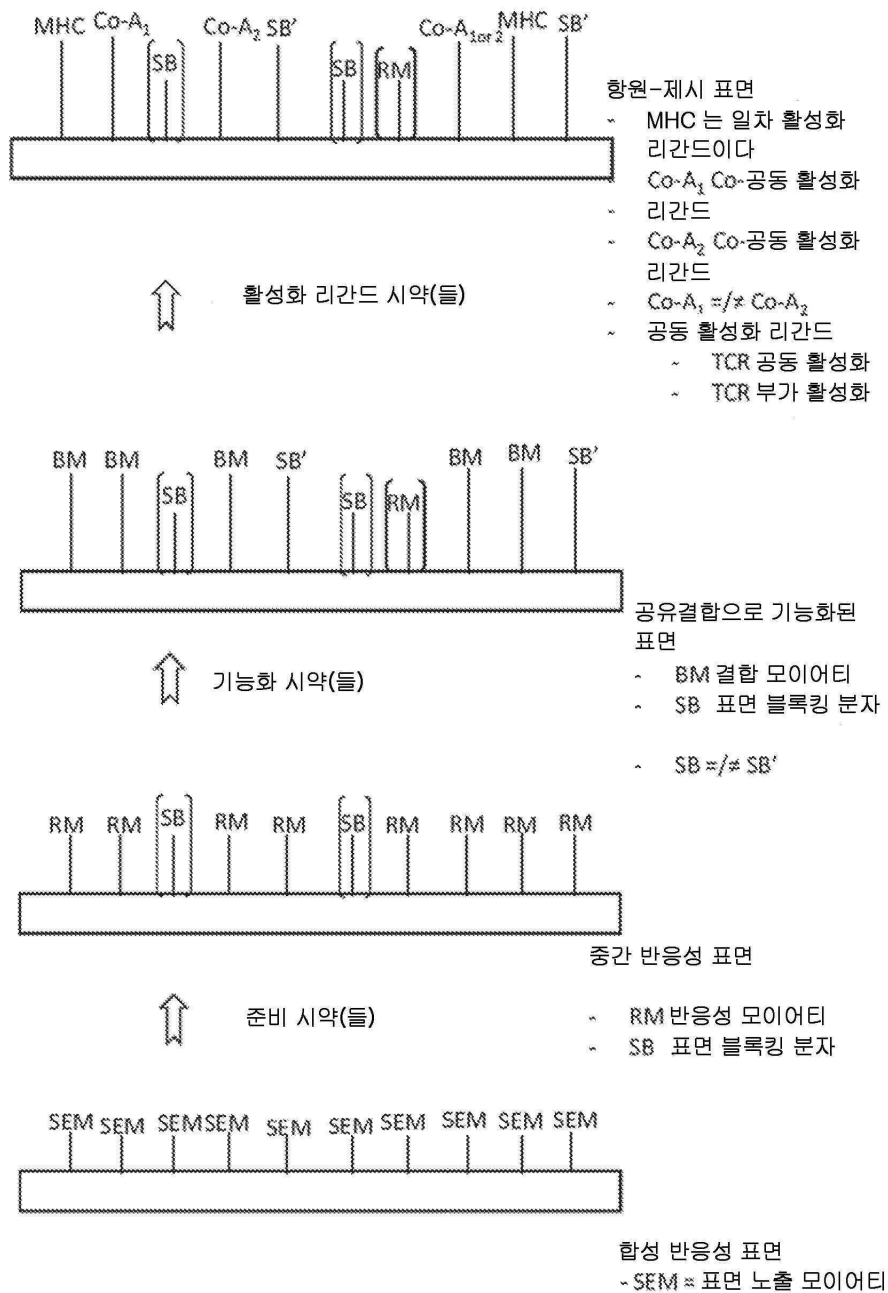
도면3b



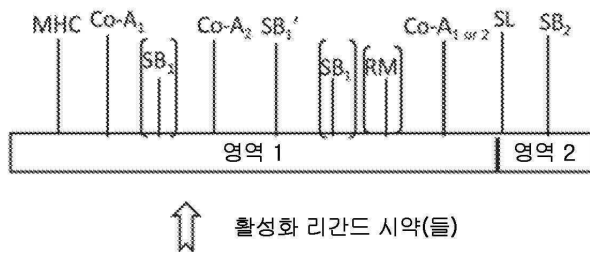
도면4



도면5a

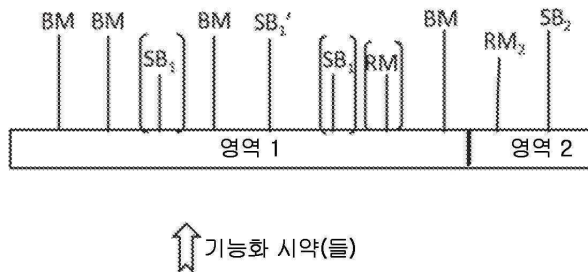


도면5b



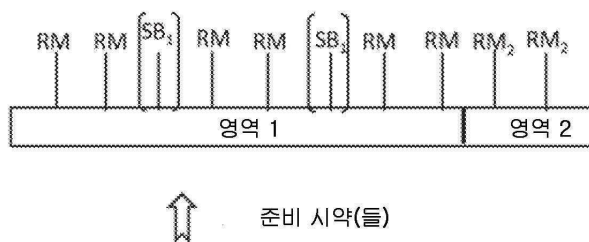
항원-제시 합성 표면

- × MHC 는 일차
활성화 리간드이다
- × Co-A_2 는 공동 활성화
리간드이다
- × Co-A_2 는 공동 활성화
리간드이다
- × $\text{Co-A}_2 \neq \text{Co-A}_3$
- × 공동 활성화 리간드
 - TCR 공동 활성화
 - TCR 부가 활성화
- × SL 는 이차 리간드이다
- × $\text{SB}_2 \neq \text{SB}_2' \neq \text{SB}_2$



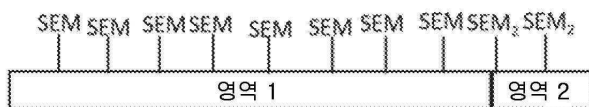
공유결합으로 기능화된
표면

- BM 결합 모이어티
- SB 표면 블록킹 분자
- $SB_1 \neq SB_2, SB_1' \neq SB_2'$



중간 반응성 표면

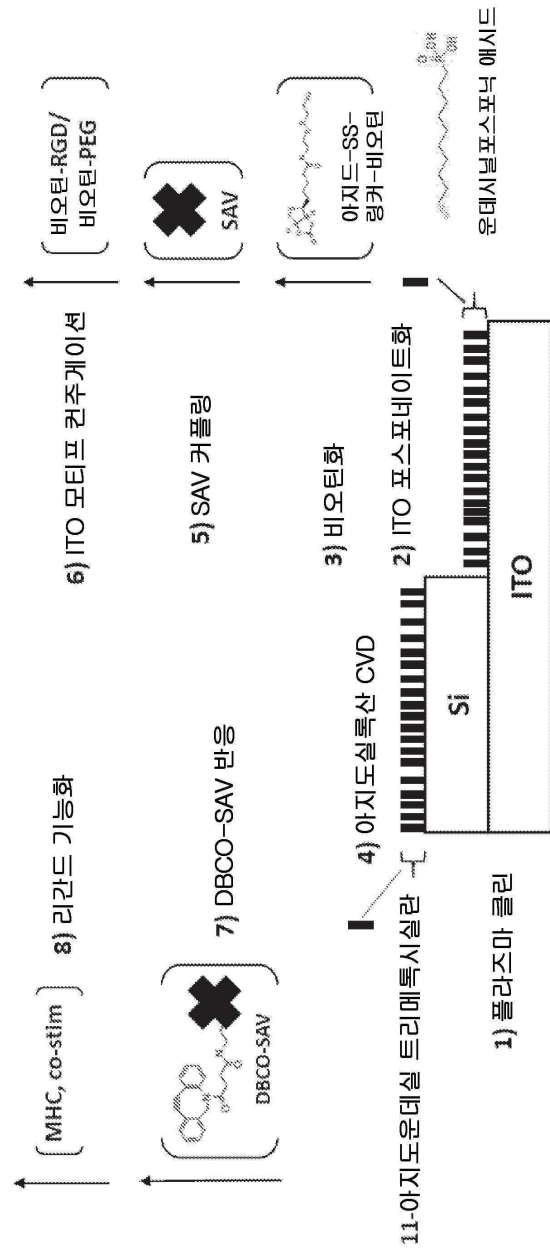
- RM 반응성 모이어티
- SB, 표면 블로킹 분자



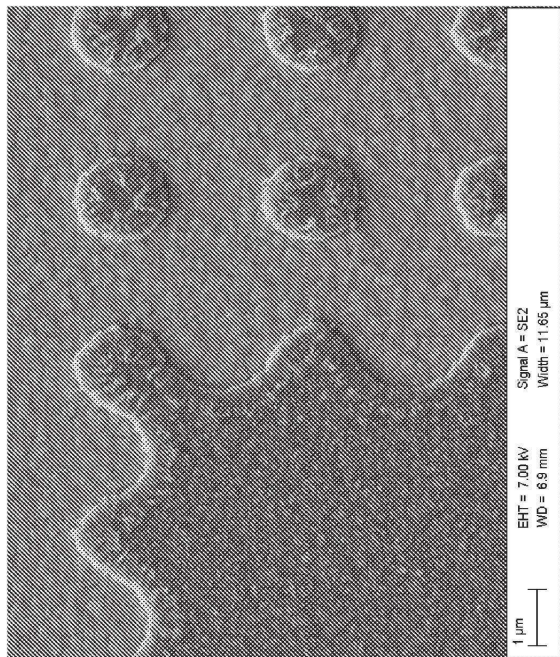
합성 반응성 표면

- SEM : 표면 노출 모이어티

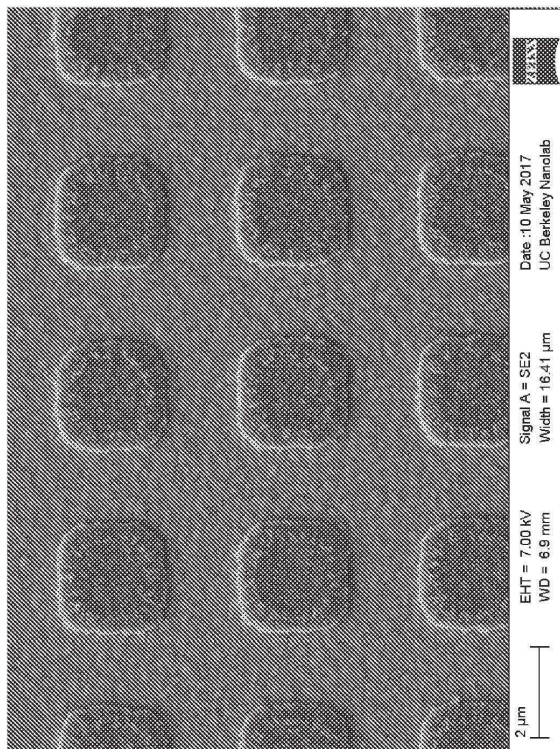
도면6



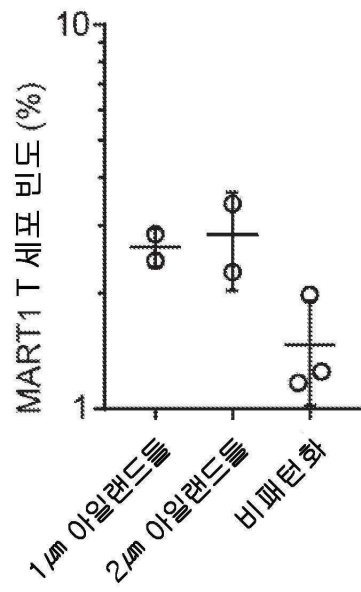
도면7a



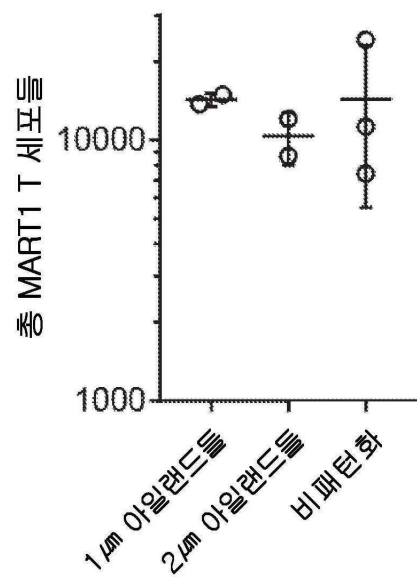
도면7b



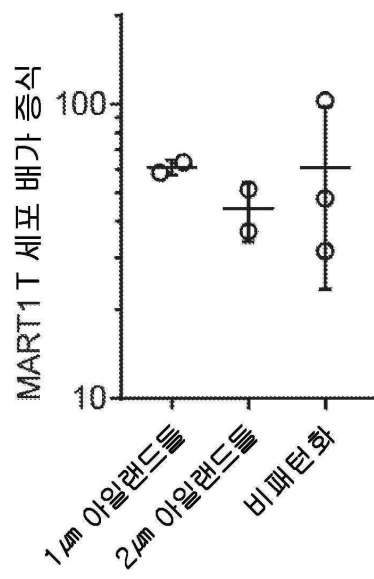
도면8a



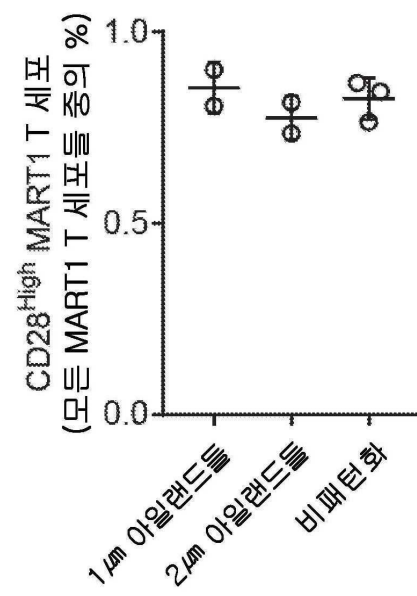
도면8b



도면8c

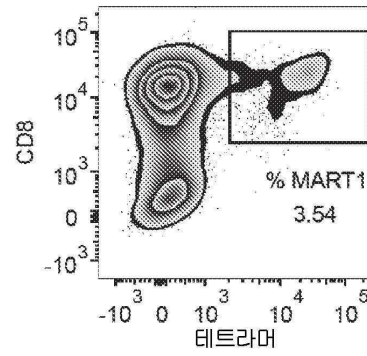
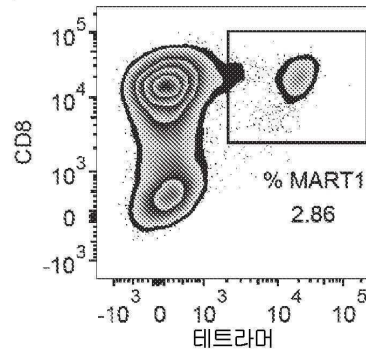


도면8d

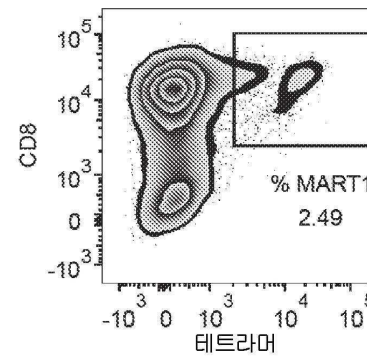
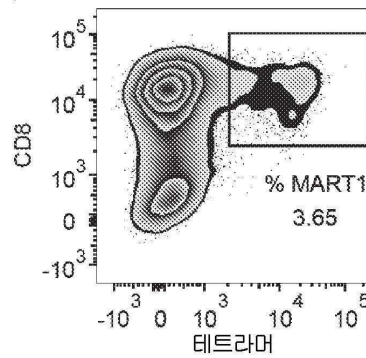


도면9

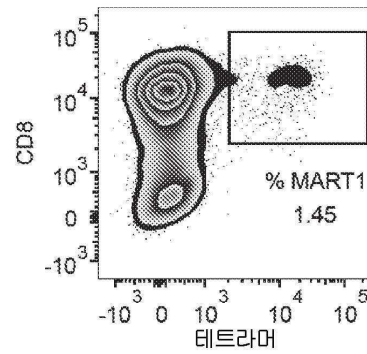
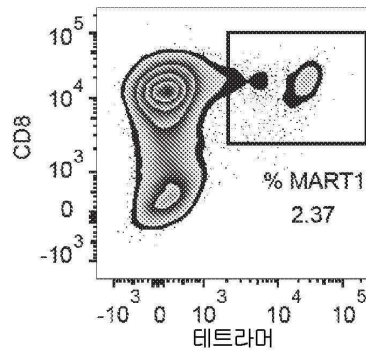
1 μ m 아일랜드들, 3 μ m 피치



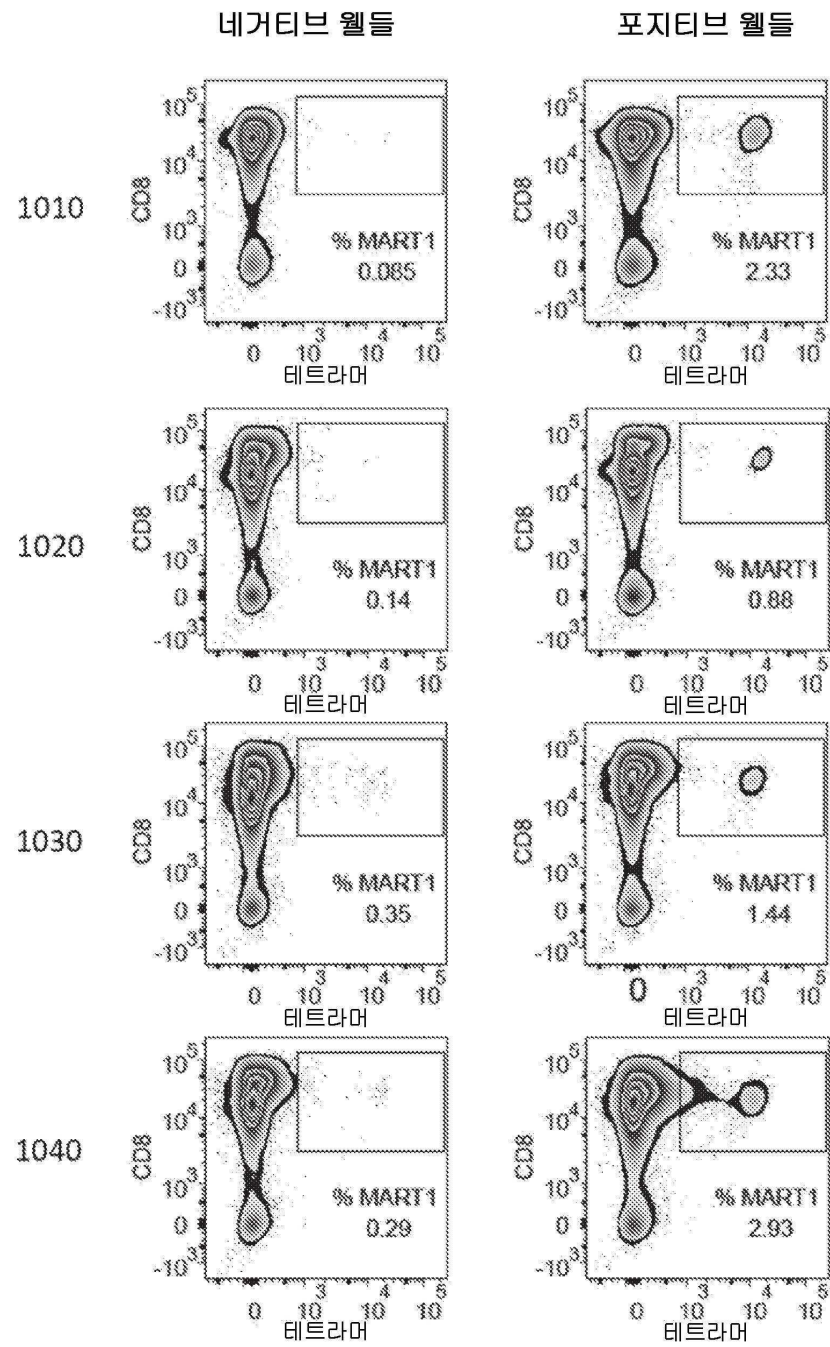
2 μ m 아일랜드들, 4 μ m 피치



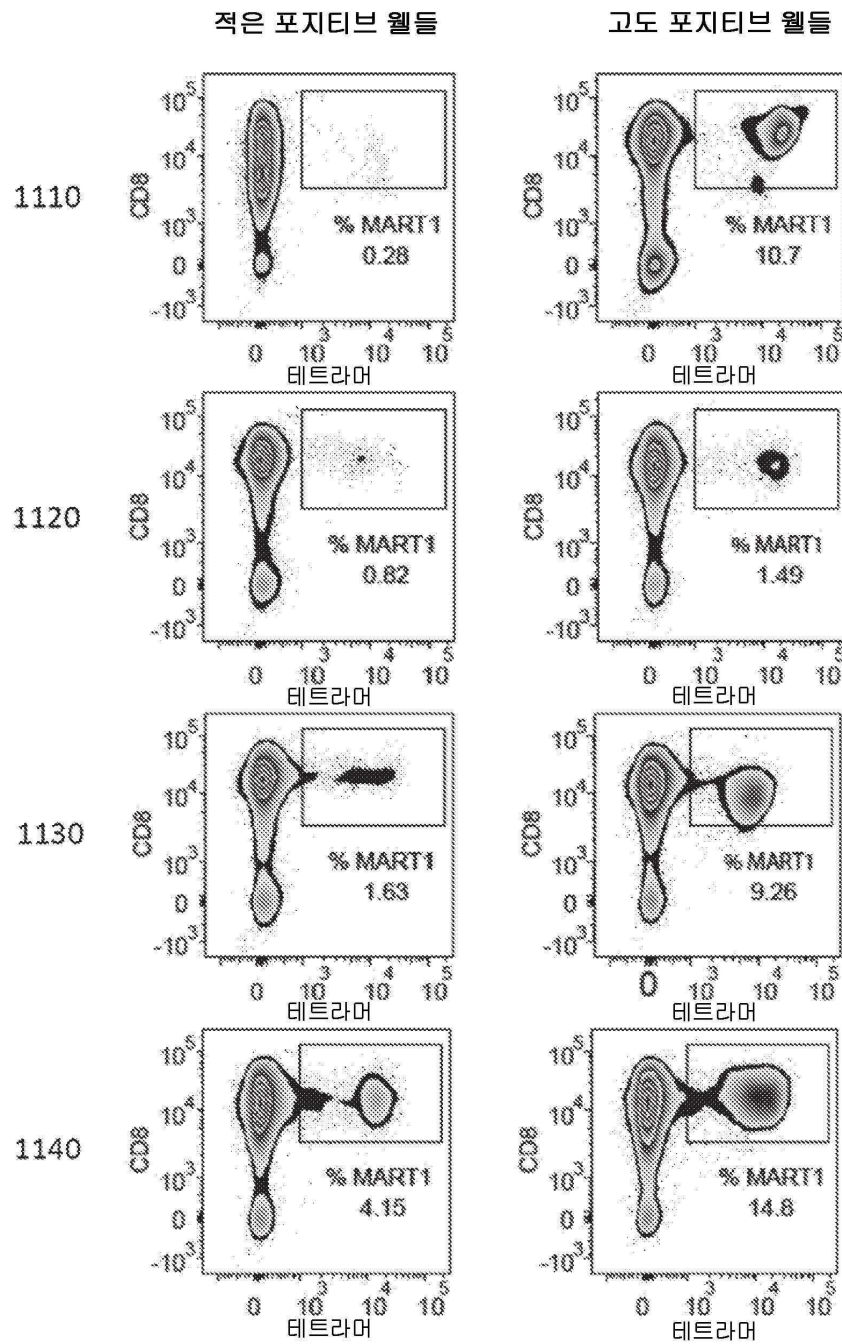
비패턴화



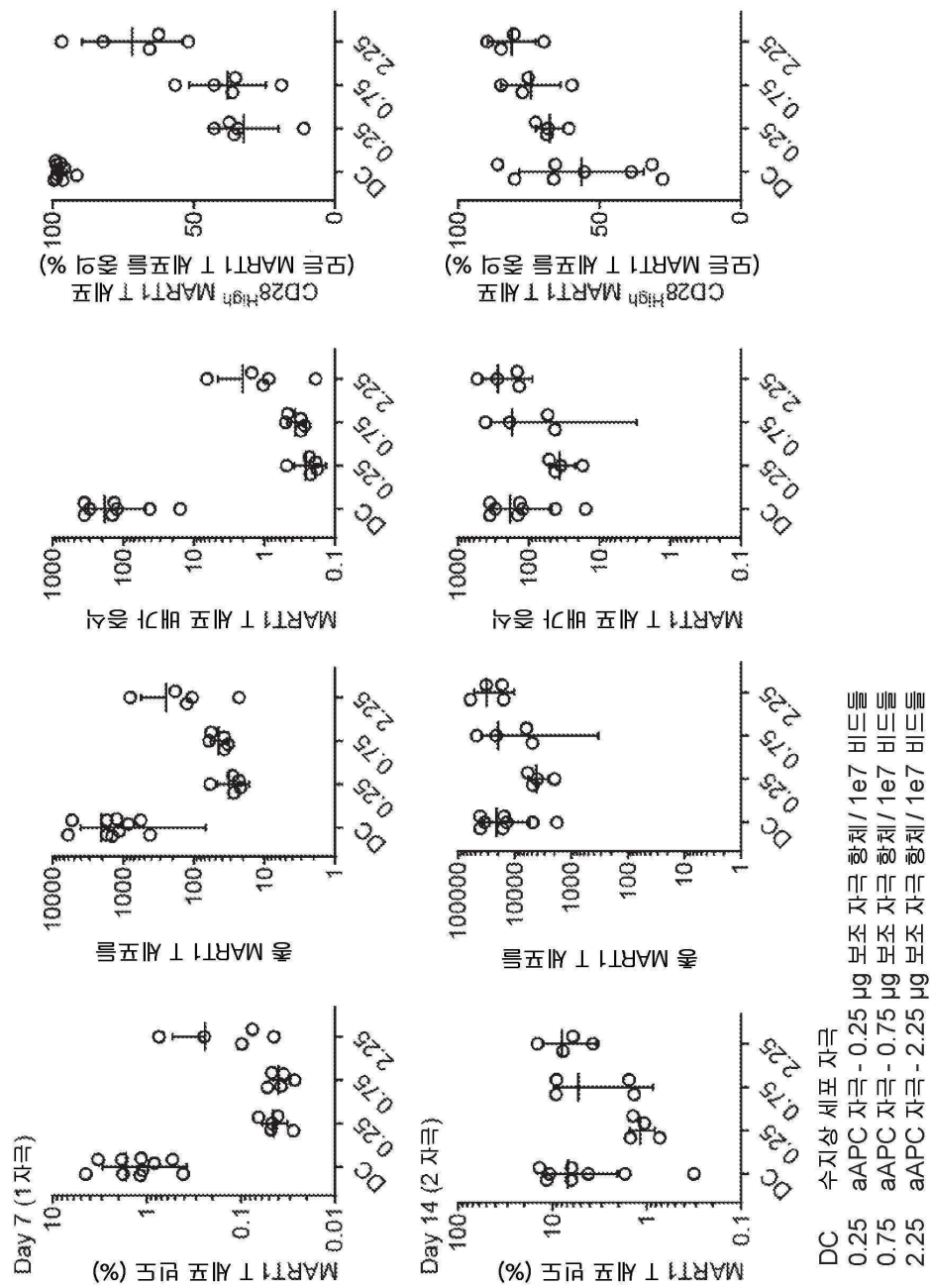
도면10



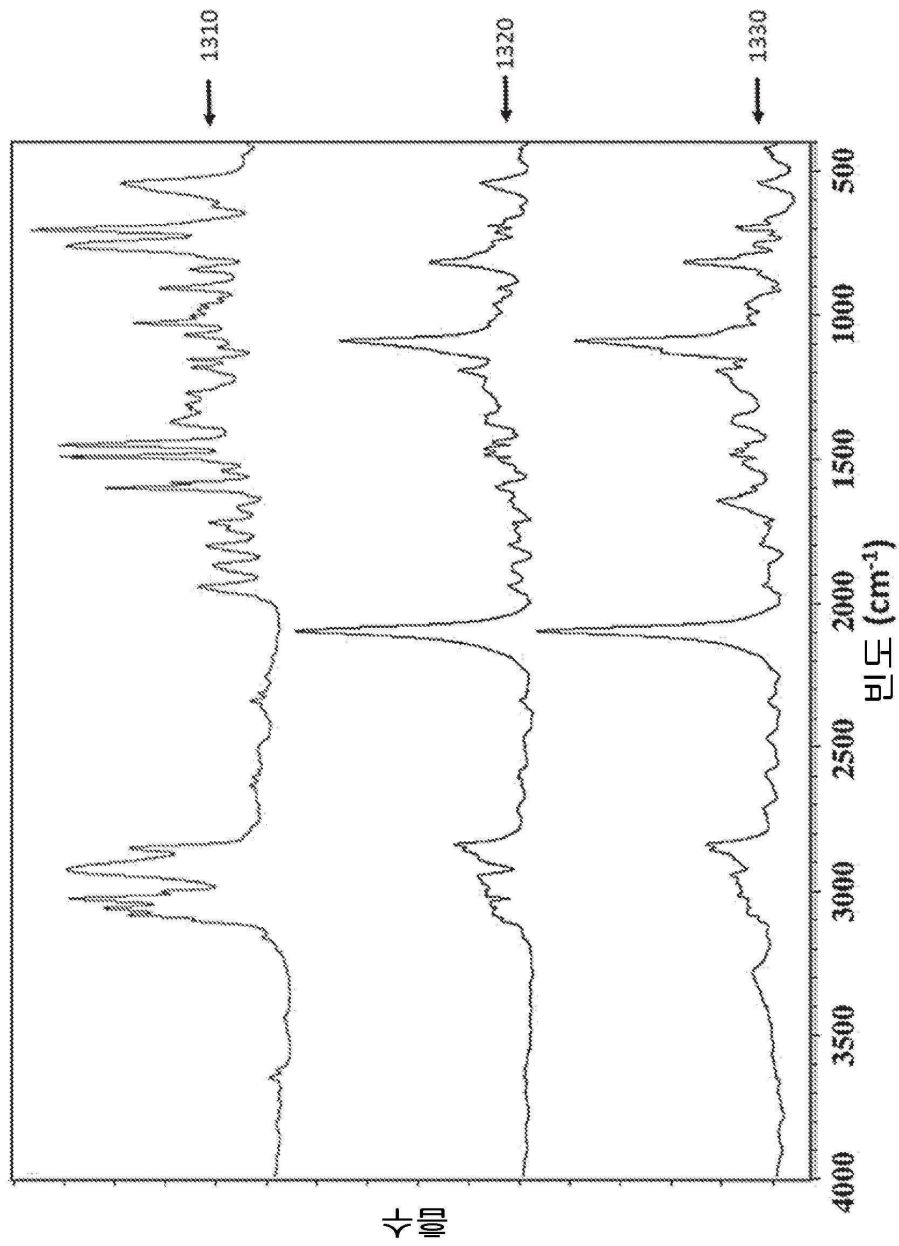
도면11



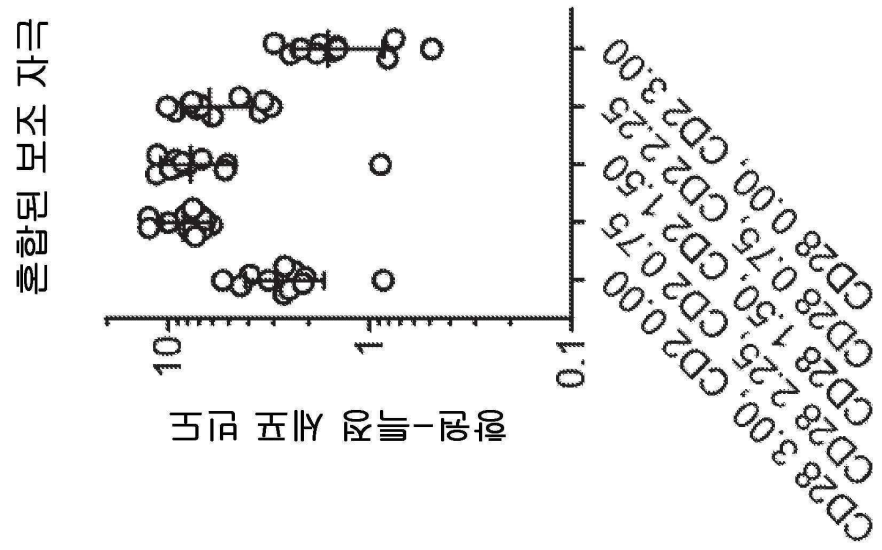
도면12



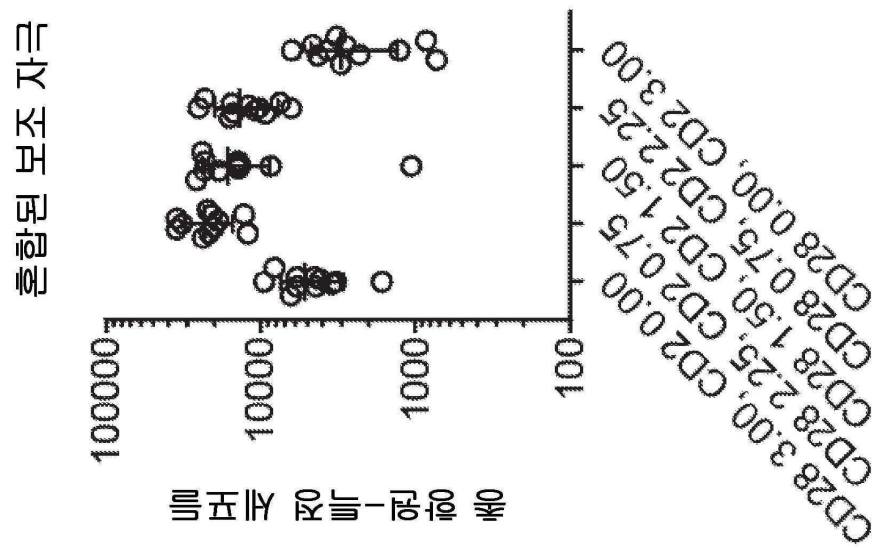
도면13



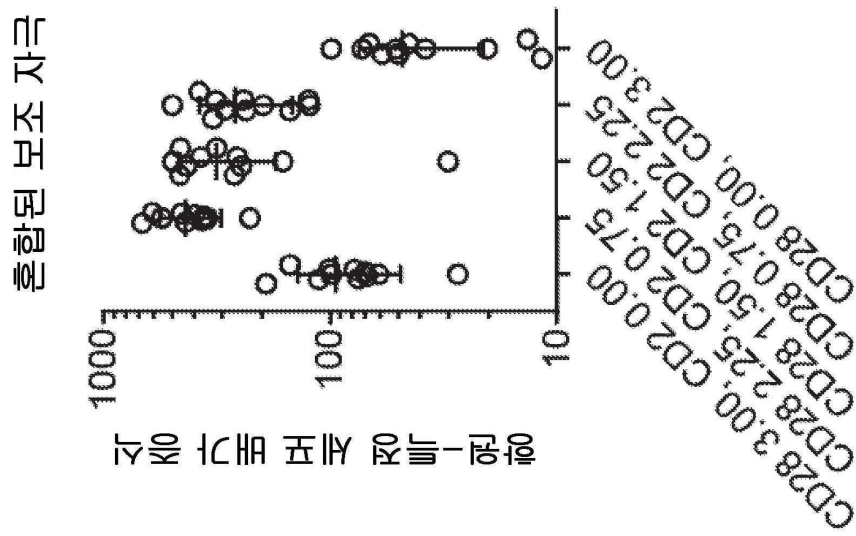
도면14a



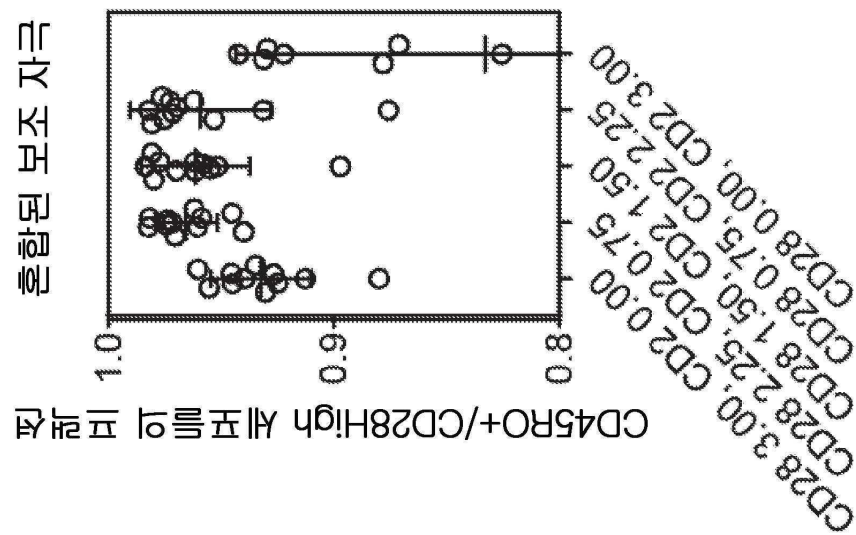
도면14b



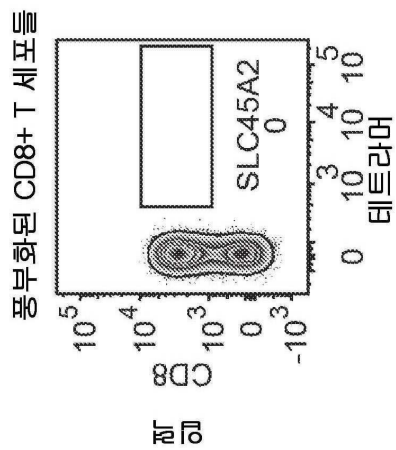
도면14c



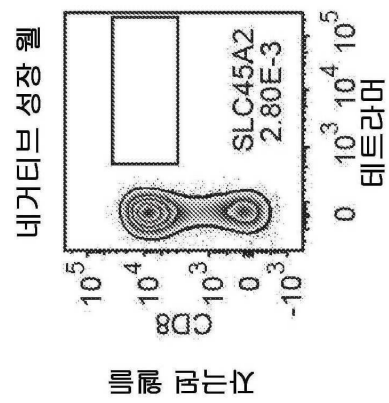
도면14d



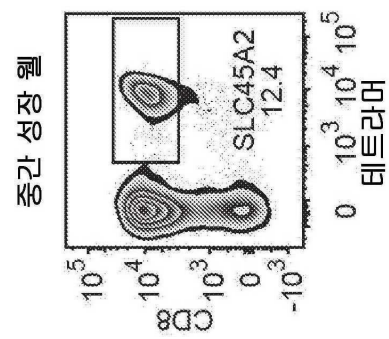
도면15a



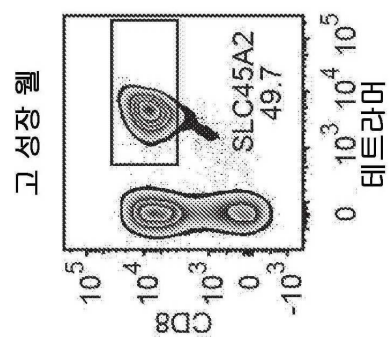
도면15b



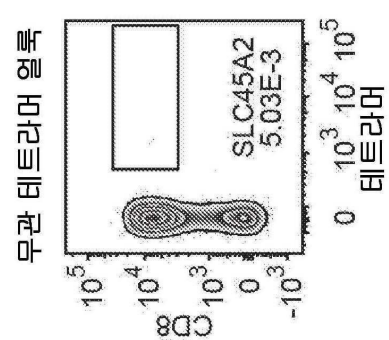
도면15c



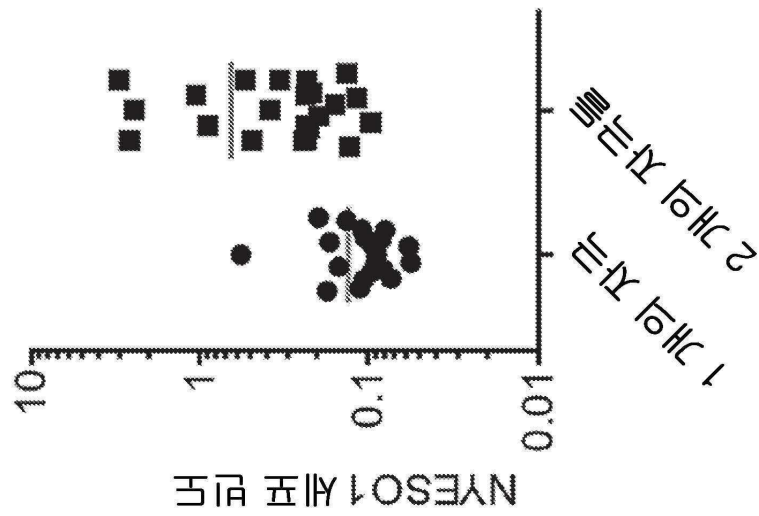
도면15d



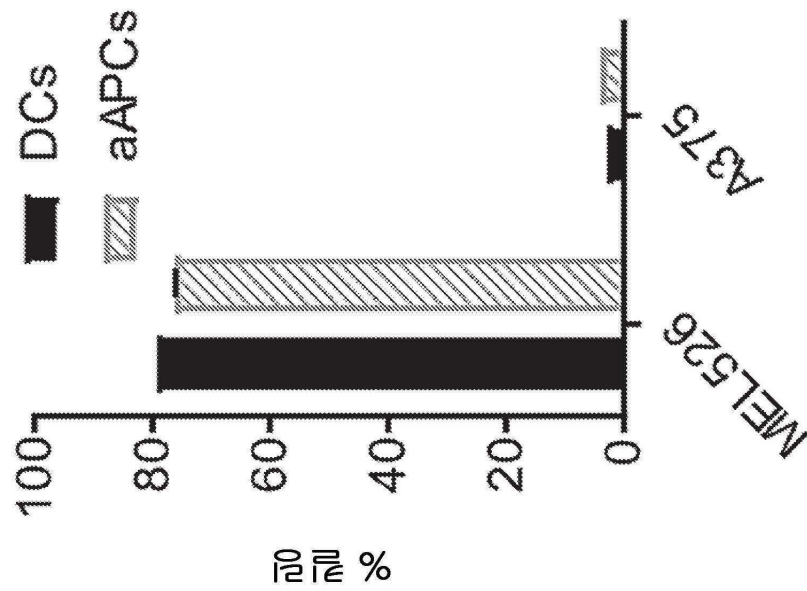
도면15e



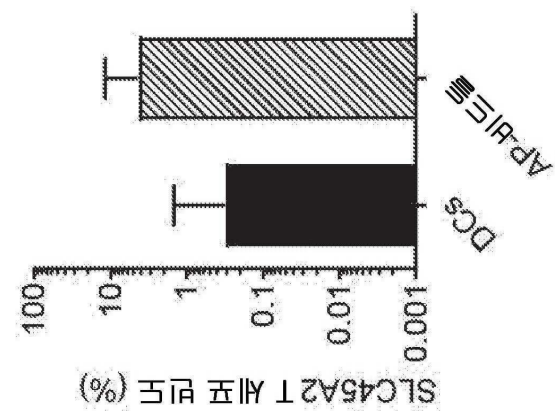
도면16



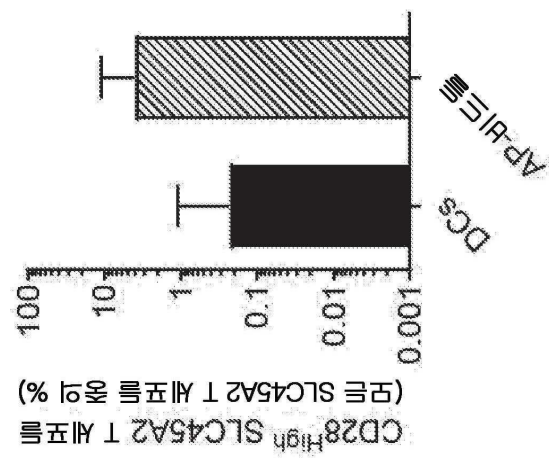
도면17



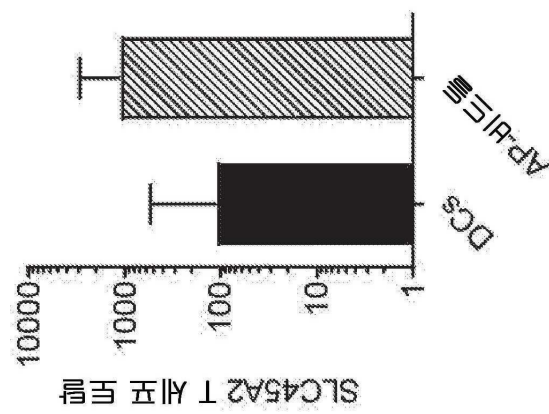
도면18a



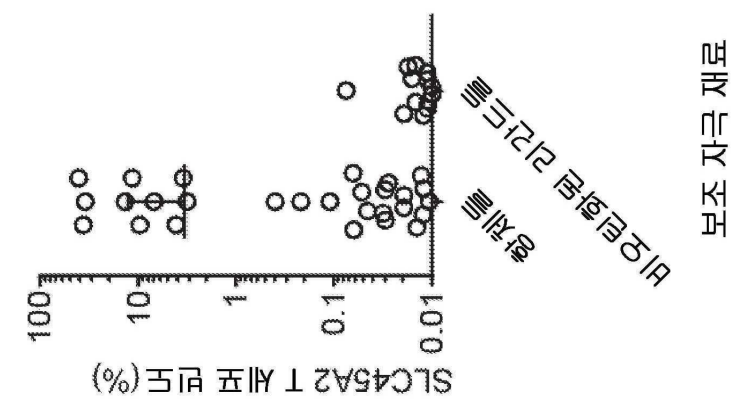
도면18b



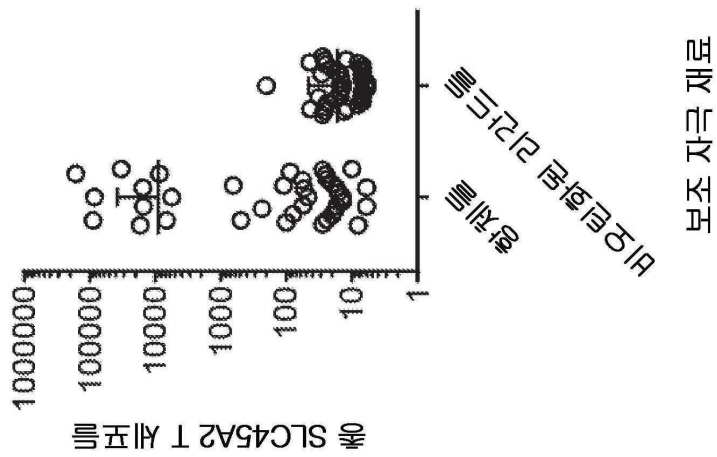
도면18c



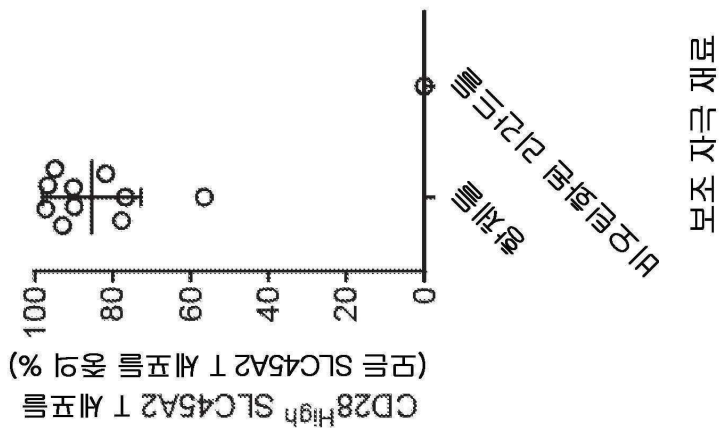
도면19a



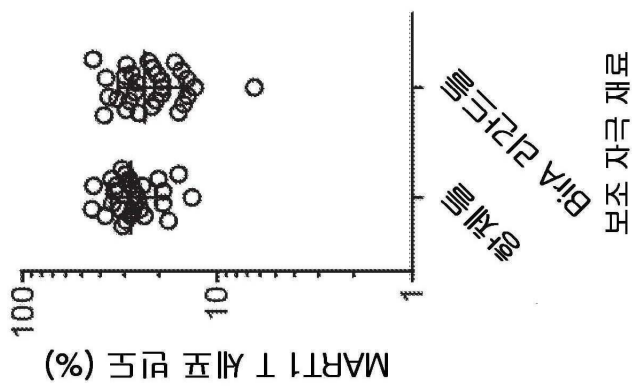
도면19b



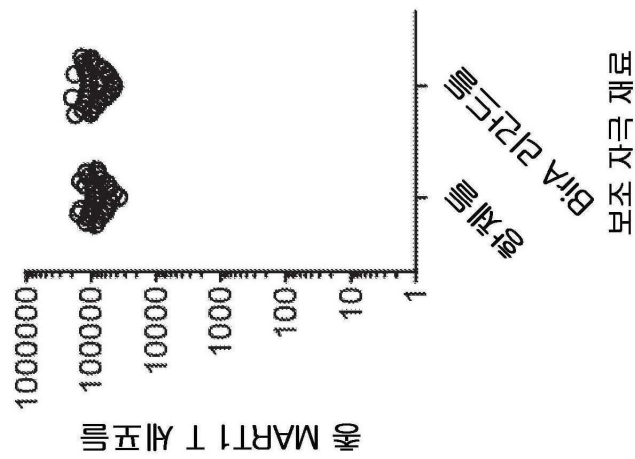
도면19c



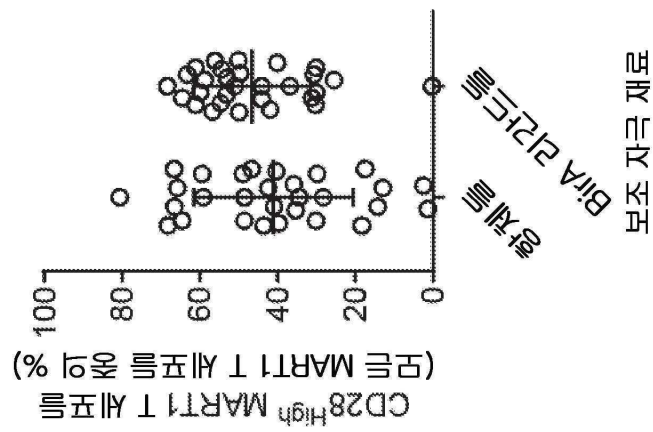
도면19d



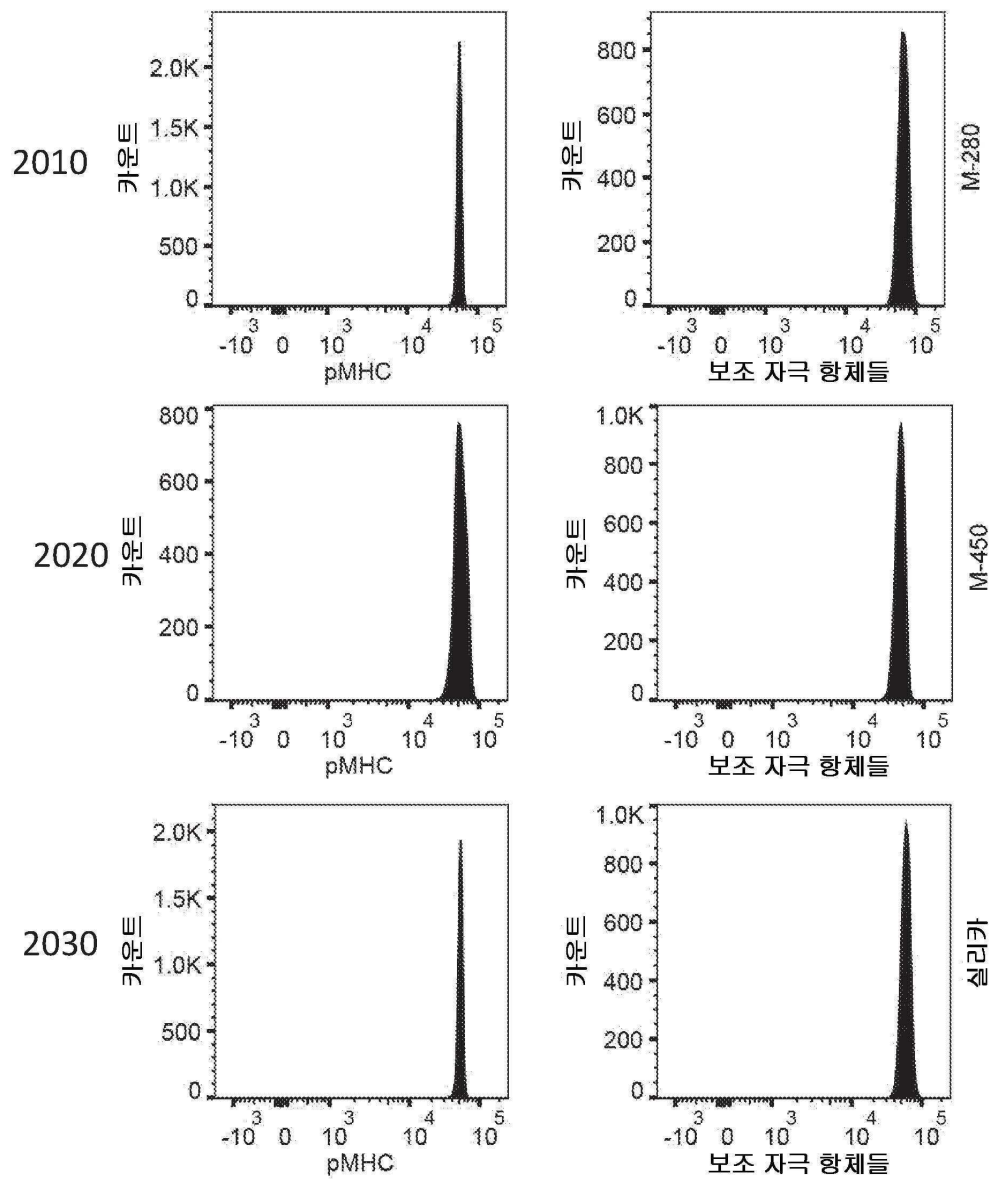
도면19e



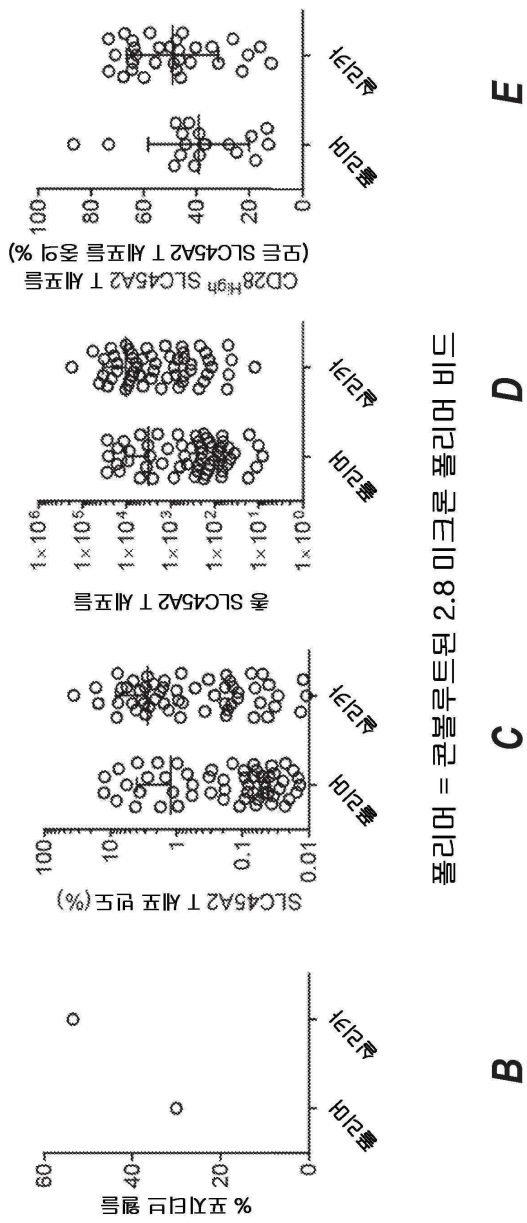
도면19f



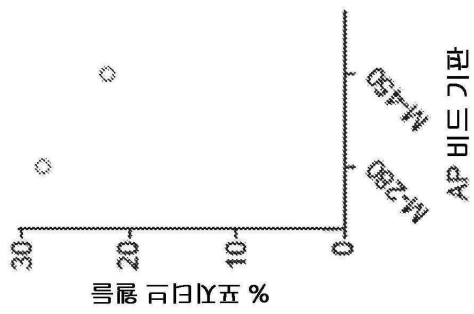
도면20a



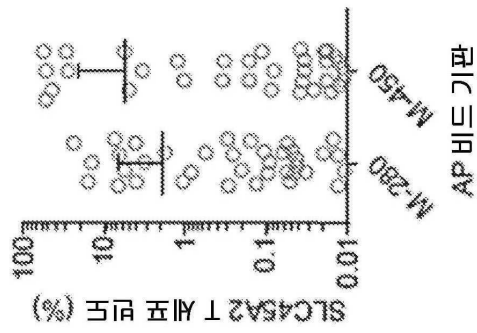
도면20



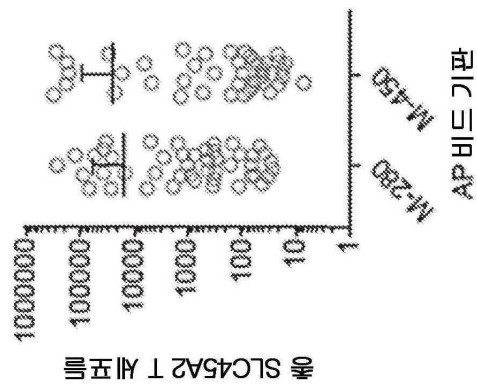
도면20f



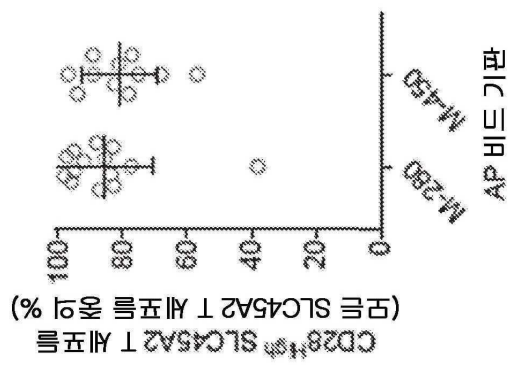
도면20g



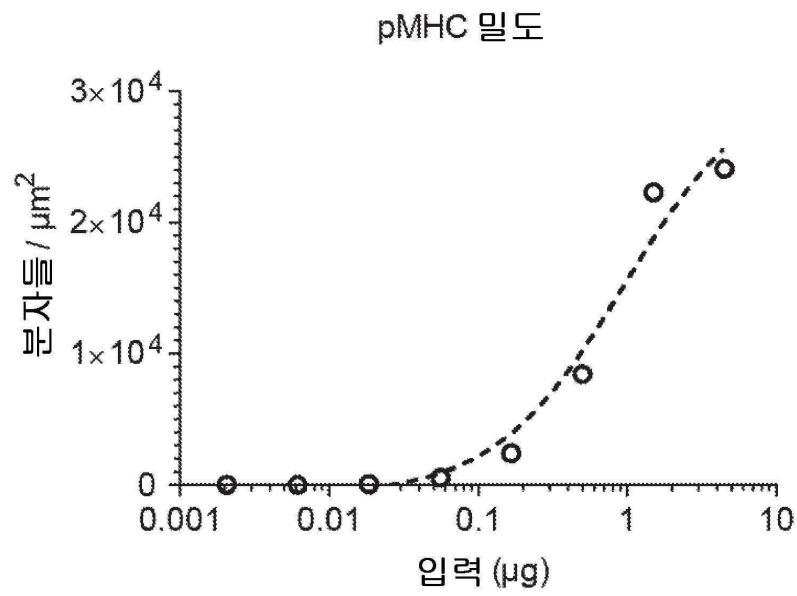
도면20h



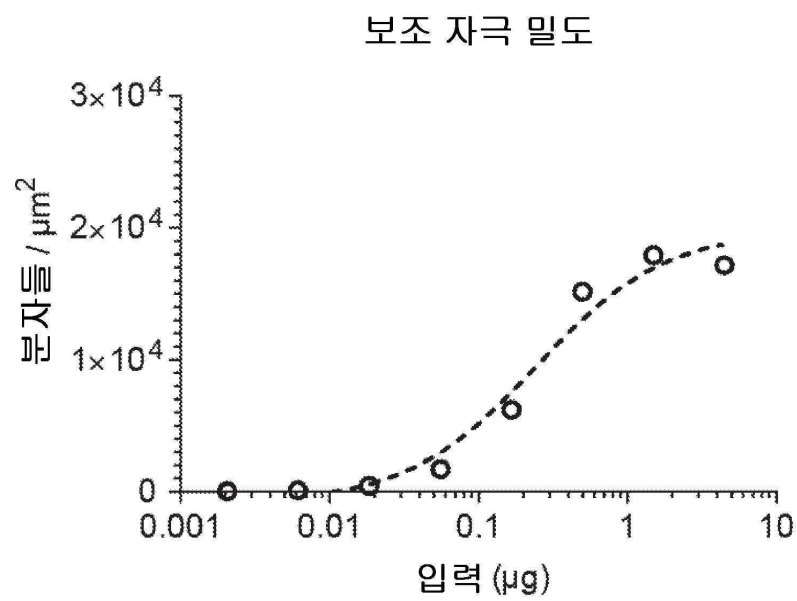
도면20i



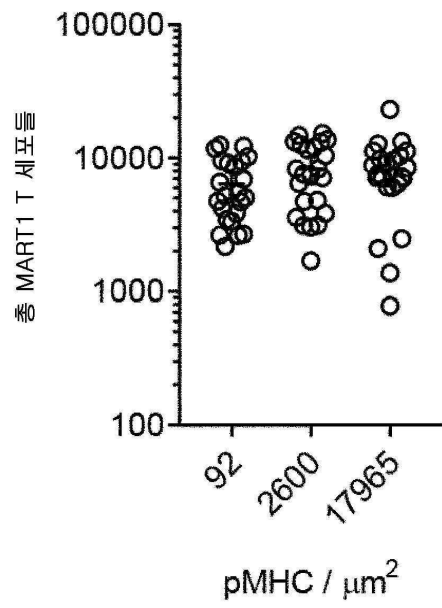
도면21a



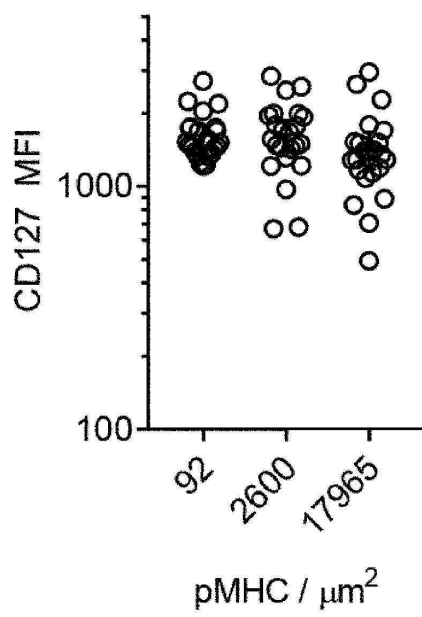
도면21b



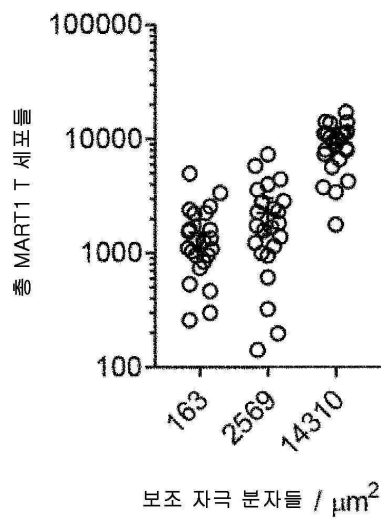
도면21c



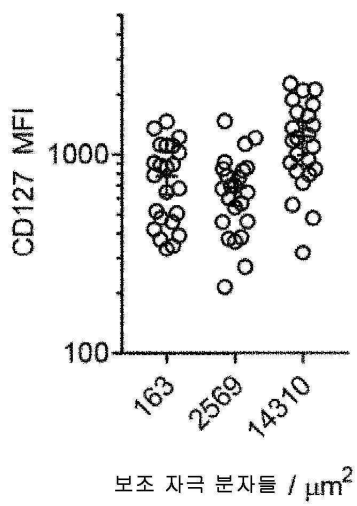
도면21d



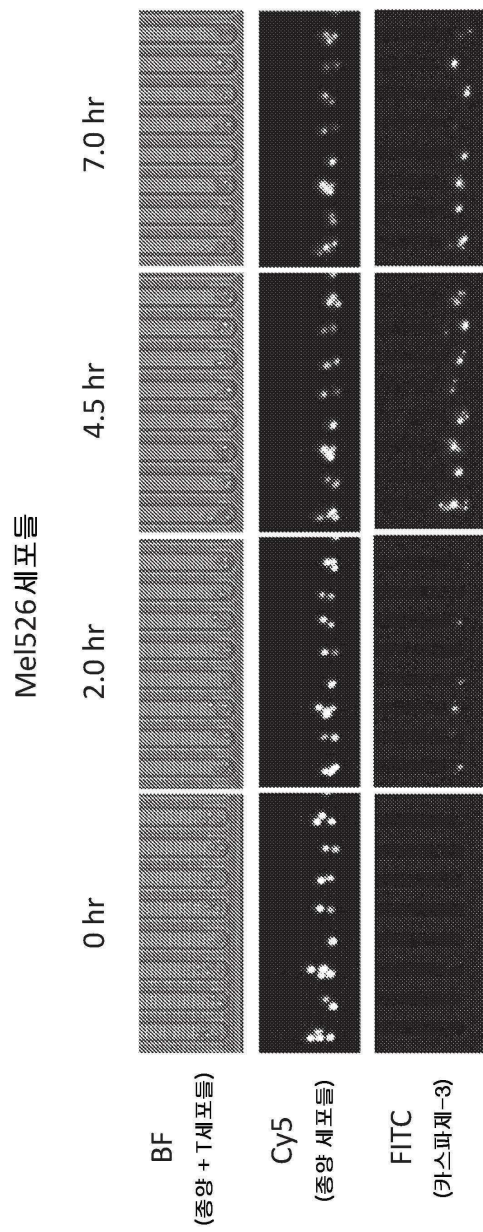
도면21e



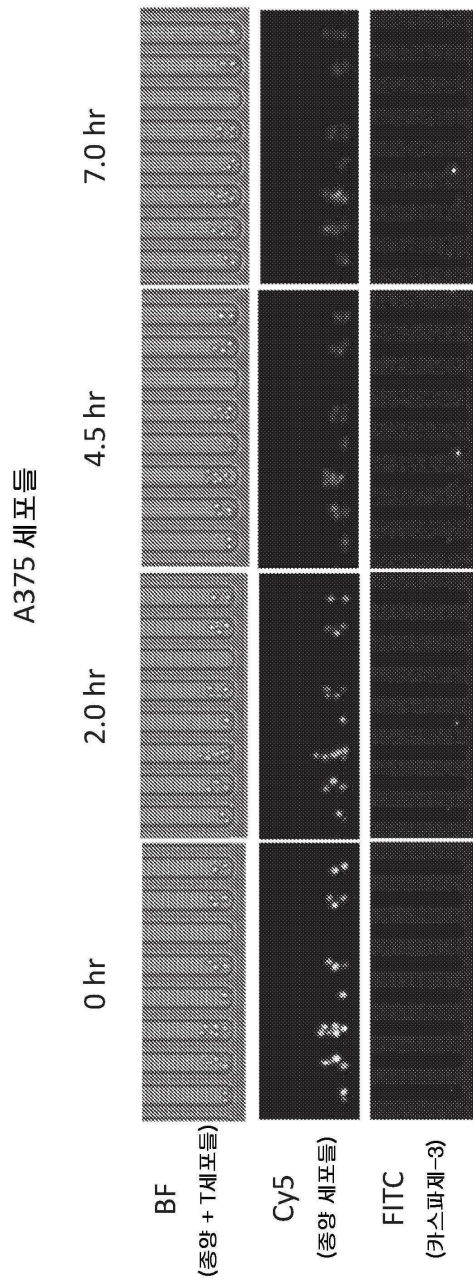
도면21f



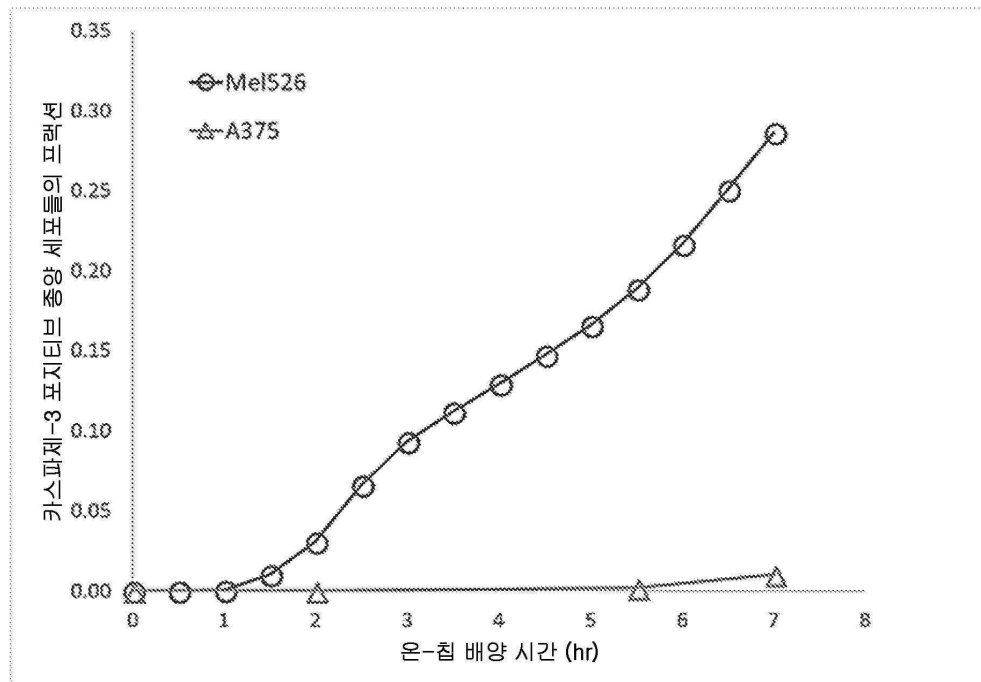
도면22a



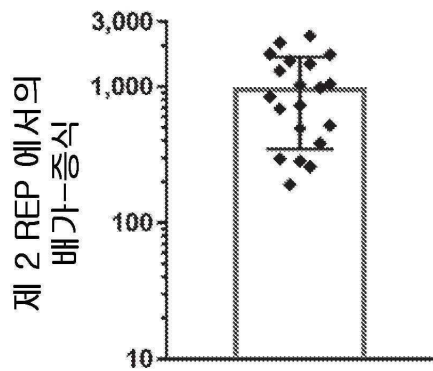
도면22b



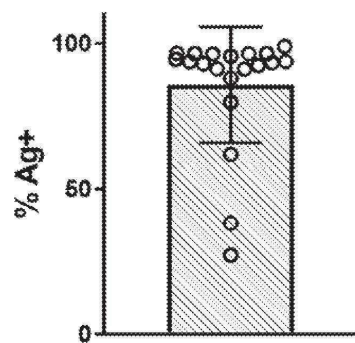
도면22c



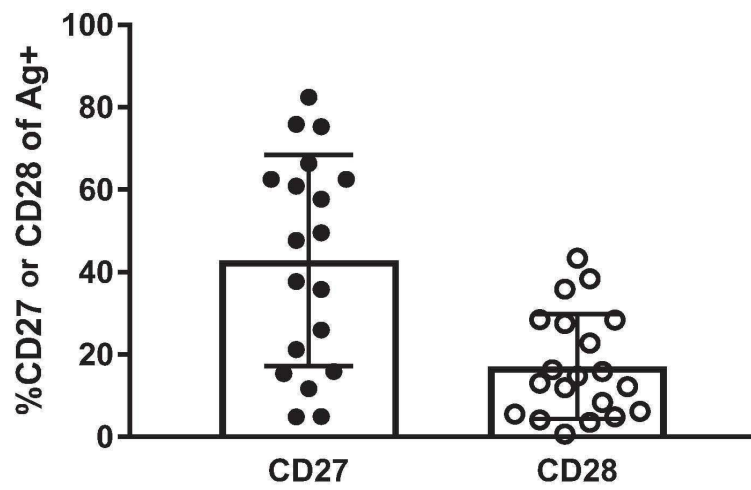
도면23a



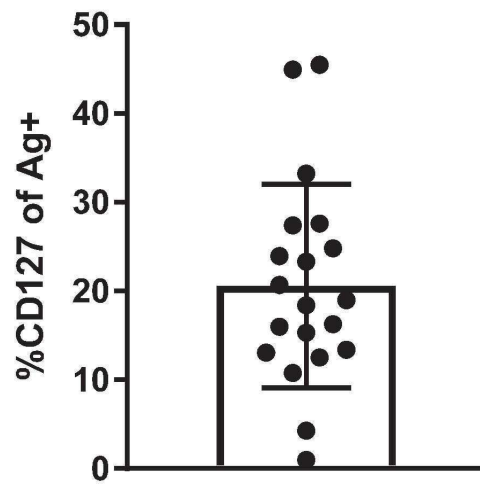
도면23b



도면23c



도면23d



도면23e

