



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149454
(43) 공개일자 2024년10월14일

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 39/00 (2006.01) A61P 19/02 (2006.01)
 A61P 29/00 (2023.01) A61P 37/00 (2006.01)
 C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 5/0783 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 A61K 39/4611 (2023.05)
 A61K 39/4631 (2023.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7033230(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2015년04월23일
 심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2022-7032825
 원출원일자(국제) 2015년04월23일
 심사청구일자 2022년10월20일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년10월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2015/027401</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/164675
 국제공개일자 2015년10월29일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/983,415 2014년04월23일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 주노 세리퓨티크스 인코퍼레이티드
 미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400</p> <p>(72) 발명자
 램스보그, 크리스
 미국 워싱턴 98109 시애틀 웨스트레이크 애버뉴 노스 307 스위트 300
 보니하디, 마크, 엘.
 미국 워싱턴 98109 시애틀 웨스트레이크 애버뉴 노스 307 스위트 300
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 이귀동</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

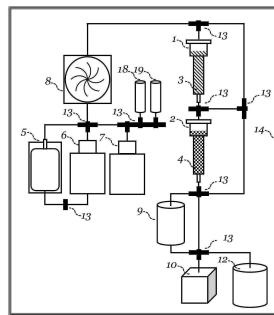
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **입양 치료용 면역 세포 집단의 단리, 배양 및 유전자 조작 방법**

(57) 요약

본 발명은 몇몇 측면에서 유전자 조작 및 세포 치료를 위한 세포 및 조성물을 제조하기 위한 방법, 세포 및 조성물에 관한 것이다. 몇몇 구체예에서, 예컨대 세포 또는 세포 집단들의 단리, 프로세싱, 인큐베이션, 및 유전자 조작을 위한, 능률화된 세포 제조방법이 제공된다. 또한 본 발명에 따라 이러한 방법 및 사용 방법에 의해 생산되는 세포 및 조성물이 제공된다. 이러한 세포에는 면역 세포, 예컨대 T 세포가 포함되고 일반적으로 복수개의 단리된 T 세포 집단들 또는 종류가 포함될 수 있다. 몇몇 측면에서, 이러한 방법을 이용할 경우 다른 방법에 비해 더 적은 단계 및/또는 공급원 및/또는 감소된 핸들링을 사용하여, 입양 치료를 위한 여러가지 상이한 복수개의 세포 집단을 만들 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/464412 (2023.05)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 2239/13 (2023.05)
A61K 2239/38 (2023.05)

(72) 발명자

첸, 켈빈

미국 워싱턴 98109 시애틀 웨스트레이크 애버뉴 노
스 307 스위트 300

보웬스, 파스칼

미국 워싱턴 98109 시애틀 웨스트레이크 애버뉴 노
스 307 스위트 300

명세서

청구범위

청구항 1

자가면역 질환 또는 염증 질환을 갖는 대상자에서 사용하기 위한 유전자 조작된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량을 포함하는 조성물이며, 여기서

$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포는 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 존재하고;

$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 약 1×10^6 내지 1×10^9 세포이며;

$CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포는 CD19를 인식하는 항원 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 5×10^6 내지 500×10^6 세포인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1×10^6 내지 25×10^6 세포인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 약 5×10^6 세포인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 약 10×10^6 세포인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 20×10^6 내지 60×10^6 세포인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 관절염, I형 당뇨병, 전신홍반루푸스(SLE), 염증성 장 질환, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질환, 그레이브스 병, 크론병, 다발성 경화증, 천식, 및 이식과 관련된 질환 또는 병태로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 SLE인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 경피증인 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 다발성 경화증인 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 관절염인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, CAR는 CD19에 결합하는 Fv, 막투과 도메인, 및 공동자극 신호 도메인 및 CD3 제타 신호 도메인을 포함하는 세포내 신호 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 공동자극 신호 도메인은 4-1BB 신호 도메인인 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 공동자극 신호 도메인은 CD28 신호 도메인인 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 대상자에 자가(autologous)인 조성물.

청구항 17

자가면역 질환 또는 염증 질환을 갖는 대상자를 치료하기 위한 약제의 제조에서 유전자 조작된 T 세포의 투여량을 포함하는 조성물의 용도이며, 여기서

CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 존재하고;

CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 약 1×10^6 내지 1×10^9 세포이며;

CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 CD19를 인식하는 항원 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 것인 용도.

청구항 18

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 5×10^6 내지 500×10^6 세포인 용도.

청구항 19

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 1×10^6 내지 25×10^6 세포인 용도.

청구항 20

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 약 5×10^6 세포인 용도.

청구항 21

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 약 10×10^6 세포인 용도.

청구항 22

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 20×10^6 내지 60×10^6 세포인 용도.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 관절염, I형 당뇨병, 전신홍반루프스(SLE), 염증성 장 질환, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질환, 그레이브스 병, 크론병, 다발성 경화증, 천식, 및 이식과 관련된 질환 또는 병태로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 용도.

청구항 24

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 SLE인 용도.

청구항 25

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 경피증인 용도.

청구항 26

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 다발성 경화증인 용도.

청구항 27

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환 또는 염증 질환은 관절염인 용도.

청구항 28

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 것인 용도.

청구항 29

제28항에 있어서, CAR는 CD19에 결합하는 Fv, 막투과 도메인, 및 공동자극 신호 도메인 및 CD3 제타 신호 도메인을 포함하는 세포내 신호 도메인을 포함하는 것인 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, 공동자극 신호 도메인은 4-1BB 신호 도메인인 용도.

청구항 31

제29항에 있어서, 공동자극 신호 도메인은 CD28 신호 도메인인 용도.

청구항 32

제17항에 있어서, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 대상자에 자가(autologous)인 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] [0001] 이 출원은 2014년 4월 23일 출원된 미국 가특허출원 No. 61/983,415에 기초한 우선권 주장 출원으로 상기 출원은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 통합되었다.

[0002] 서열목록의 참조 통합

[0003] [0002] 본 발명은 전자 파일 형태의 서열목록과 함께 출원되었다. 서열목록은 2015년 4월 22일, 13 킬로바이트의 크기로 생성되었으며 파일명은 735042000240seq1ist.txt이다. 서열목록의 전자 파일 정보는 본 발명에 그 내용 전체가 참조 통합된다.

[0004] 분야

[0005] [0003] 본 발명은 몇몇 측면에서 유전자 조작 및 세포 치료용 세포 및 조성물의 생산을 위한 방법, 세포, 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 몇몇 구체예에서 예컨대 세포 및 세포 집단의 단리, 가공, 인큐베이션, 및 유전자 조작 등의 능률화된(streamlined) 세포 생산방법이 제공된다. 또한 이러한 방법에 의해 생산된 세포 및 조성물과 이들의 사용 방법 역시도 제공된다. 이 세포들에는 면역 세포, 예컨대 T 세포가 포함되며, 및 일반적으로 복수개의 단리된 T 세포 집단 또는 T 세포 서브타입이 포함된다. 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법을 이용할 경우 다른 방법에 비해 더 적은 수의 단계 및/또는 자원 및/또는 감소된 핸들링을 이용하여 임상 치료를 위한 여러가지 복수종의 세포 집단을 생산할 수 있다.

배경 기술

[0006] 배경

[0007] [0004] 다양한 방법을 이용하여 치료 용도의 세포를 생산할 수 있다. 예컨대, T 세포 및 기타 면역 세포를 비롯한 세포들을 분리, 가공 및 조작하는 방법이 있다. 이러한 세포를 분리하고 고친화성 T 세포 수용체 (TCRs) 및 키메라 항원 수용체 (CARs)와 같은 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 방법이 이용가능하다. 이러한 세포를 대상자 내로 입양 전달(adoptively transfer)하는 방법이 있다. 그러나 세포 치료용 세포의 생산(예컨대, 분리, 가공, 배양, 및 조작)을 위한 개선된 방법이 요구되고 있다. 특히, 효능, 안전성, 다양성 및 자원 보존 측면이 개선된, 복수종의 분리된 세포 타입 또는 서브타입과 같은 세포의 생산 및 조작을 위한 개선된 방법이 요구되고 있다. 본 발명에 따라, 이러한 요구사항을 만족하는 세포, 조성물, 키트 및 시스템이 제공된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 발명의 개요

[0009] [0005] 세포 및 세포 집단의 생산 및 조작 방법 그리고 이러한 방법에 의해 생산된 세포 및 조성물이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 세포는 입양 면역치료법과 관련된 면역요법에 사용될 수 있다. 몇몇 측면에서, 본 발명에 의해 제공된 방법은 예를 들어 단일 성분채집술(apheresis) 샘플, 백혈구성분채집술(leukapheresis), 또는 말초혈액 단핵세포(PBMCs)를 포함하는 샘플과 같은 단일 세포로부터 CD4+ 및 CD8+ 세포, 또는 그의 하위집단(subpopulations)을 분리, 선택 또는 농축(enrichment)하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 단일 프로세싱 스트림으로, 예컨대 CD4+ 세포 집단 및 CD8+ 집단과 같은 적어도 2종의 세포 집단을 선택 또는 농축하는 방법으로서, 이 방법에서는 CD4+ 또는 CD8+ 중 어느 하나의 1차 선택 또는 농축으로부터의 어떠한 음성 분획 샘플도 CD4+ 또는 CD8+ 중 다른 하나에 대한 2차 선택이 수행되기 전에는 폐기되지 않는다. 몇몇 구체예에서, 1차 및 2차 선택은 동시에 또는 순차적으로 일어날 수 있다.

[0010] [0006] 몇몇 측면에서, CD4+ 및 CD8+ 세포와 같은 두 가지 세포 집단 모두의 선택, 농축 및/또는 분리는 예컨대 동일 용기 또는 동일 장치를 이용하여 동시에 수행되거나 또는 어떤 시스템이나 장치의 일부로서 순차적으로 수행되는데, 후자, 즉 순차 수행의 경우에는 예컨대 1차 및 2차 선택에 사용되는 예컨대 컬럼, 챔버와 같은 용기가 작동적으로 연결된다. 몇몇 구체예에서, 동시 및/또는 순차적인 농축 또는 선택은 1차 및/또는 2차 선택 또는 농축의 일부로서 제조된 양성 또는 음성 분획을 어느 것도 핸들링함이 없이 단일 프로세스 스트림으로서 일어날 수 있다. 몇몇 측면에서, 여러가지 상이한 집단의 분리, 배양, 및/또는 조작은 동일 샘플과 같이 동일한 출발 조성물 또는 재료로부터 수행된다.

[0011] [0007] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 일차 인간 T 세포(primary human T 세포)를 함유하는 샘플로부터 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 1종을 농축시킴으로써 1차 선택을 수행하여 1차 선택 집단 및 선택되지 않은 집단을 생성하고, 상기 선택되지 않은 집단으로부터 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포 중 다른 1종을 농축시킴으로써 2차 선택을 수행하는 것을 포함하는 것으로, 이 방법에 의해 CD4+ 세포가 농축된 세포 및 CD8+가 농축된 세포를 함유하는 조성물이 생산된다.

[0012] [0008] 몇몇 구체예에서, 2차 선택은 1차 선택에 의해 생성된 선택되지 않은 집단으로부터 나머지 T 세포 서브타입을 농축시킴으로써 수행된다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 1차 선택으로부터의 음성 분획이 폐기되지 않고 다른 세포 유형을 농축하기 위한 추가 선택을 위한 기초로서 사용된다는 점에서 여타의 선택 방법과 차별화된다. 일반적으로, 1차 선택에서 농축된 T 세포 서브세트가 CD4+ 서브세트인 경우 (또는 1차 선택이 CD4+ 세포를 농축하는 경우), 2차 선택에서 농축될 다른 서브타입의 세포가 1차 선택에서 농축되지 않도록 설계될 것이다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 1차 선택은 CD4+ 세포를 농축하고 CD8+ 세포는 농축하지 않으며 2차 선택은 1차 선택으로부터 회수된 음성 분획으로부터 CD8+ 세포를 농축한다. 마찬가지로, 일반적으로, 1차 선택에서 농축된 T 세포 서브세트가 CD8+ 서브세트인 경우 (또는 1차 선택이 CD8+ 세포를 농축하는 경우), 2차 선택에서 농축될 다른 서브타입의 세포가 1차 선택에서 농축되지 않도록 설계될 것이다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 1차 선택은 CD8+ 세포를 농축하고 CD4+ 세포는 농축하지 않으며 2차 선택은 1차 선택으로부터 회수된 음성 분획으로부터 CD4+ 세포를 농축한다.

[0013] [0009] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 이전의 선택 단계로부터 선택되지 않거나 및/또는 선택된 집단으로부터 세포를 농축할 수 있는 3차, 4차 및 그 이상의 추가 선택을 수행하는 것을 포함한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 어떤 주어진 단계 (예컨대 2차 선택 단계)로부터 선택된 집단 또는 선택되지 않은 집단으로부터의 세포들이 추가 농축된다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 선택된 CD8+ 세포들을 추가 농축하여 예컨대 휴지기 세포(resting

세포) 또는 중심 기억 세포(중심 기억 세포)와 같은 CD8+ 세포의 서브타입을 얻는다.

[0014] [0010] 몇몇 구체예에서, 본 발명에 따라 (a) 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플로부터 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 1종을 농축시켜 1차 선택 집단 및 선택되지 않은 집단을 생성하는 밀폐 시스템에서의 1차 선택의 수행 및, 상기 선택되지 않은 집단으로부터 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포 중 다른 1종을 농축시킴으로써 2차 선택 집단을 생성하는 것을 포함하는 상기 밀폐 시스템에서의 2차 선택의 수행에 의해 생산되는 배양-개시(culture-initiation) 조성물을 제공하는 단계; (b) 1차 선택 집단의 세포 및 2차 선택 집단의 세포를 포함하는 배양-개시 조성물을, 자극 조건 하에 배양 용기에서 인큐베이션함으로써 자극된 세포(stimulated 세포)를 생산하는 단계; 및 (d) 단계 (b)에서 생산된 자극된 세포에 유전자 조작된 항원 수용체를 도입하는 단계를 포함함으로써, 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 아웃풋 조성물을 생성하는, 유전자 조작된 T 세포의 제조 방법이 제공된다.

[0015] [0011] 또한, 몇몇 구체예에서, CD4+ 및 CD8+ 세포 집단과 같은 1차 및 2차 세포 집단의 동시적인 농축 또는 선택을 포함하는 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플의 세포들을 CD4에 특이적으로 결합하는 1차 면역친화성 시약 및 CD8에 특이적으로 결합하는 2차 면역친화성 시약과 접촉시키되, 샘플 내 세포 표면에서 상기 면역친화성 시약들이 CD4 및 CD8 분자들에 각각 특이적으로 결합하도록 하는 조건 하에서 접촉시킨 다음, 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약에 결합된 세포들을 회수함으로써, CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 포함하는 농축 조성물을 생산하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 인큐베이션 조성물 중의 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약을 최적화(sub-optimal) 수율 농도로 포함하도록, 즉 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 그 이하 또는 인큐베이션 조성물 중 CD8+ 세포의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 그 이하를 포함하도록 수행된다.

[0016] [0012] 몇몇 구체예에서, 본 발명에 따라 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 농축 방법이 제공되며, 이 방법은, 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플의 세포들을 CD4에 특이적으로 결합하는 1차 면역친화성 시약 및 CD8에 특이적으로 결합하는 2차 면역친화성 시약과 접촉시키되, 샘플 내 세포 표면에서 상기 면역친화성 시약들이 CD4 및 CD8 분자들에 각각 특이적으로 결합하도록 하는 조건 하에서 접촉시킨 다음; 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약에 결합된 세포들을 회수함으로써, CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 배양-개시 비율(culture-initiating 비율)로 포함하는 농축 조성물을 생산하는 것을 포함하되, 여기서: 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 상기 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 70% 미만 및/또는 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포의 70% 미만을 함유하도록 함으로써, CD4+ 및 CD8+ T 세포가 농축된 조성물을 얻는 것이다.

[0017] [0013] 이와 같이 제공된 구체예들의 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 예컨대 세포를 CD4, CD8 세포 표면 마커 또는 나이브, 휴지기 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 것과 같은 기타 세포 표면 마커에 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 것과 같은 면역친화성-기반 선택에 의해 수행된다. 몇몇 구체예에서, 고체 지지체는 비드, 예컨대 마이크로비드 또는 나노비드와 같은 구체이다. 몇몇 구체예에서, 비드는 자기(magnetic) 비드일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 고체 지지체는 컬럼이거나 또는 컬럼 크로마토그래피를 수행할 수 있는 기타 용기(vessel)일 수 있다.

[0018] [0014] 몇몇 구체예에서, 항체는 구체 또는 크로마토그래피 매트릭스와 같은 고체 표면에 고정된 결합 시약과 가역적인 결합을 형성할 수 있는 1종 이상의 결합 파트너를 함유하되, 여기서 상기 항체는 상기 고체 표면에 가역적으로 동원되는 것이다. 몇몇 구체예에서, 상기 고체 표면 상에서 항체에 의해 결합된 세포 표면 마커를 발현하는 세포들은 결합 시약과 결합 파트너 간의 비가역적 결합의 파괴에 의해 매트릭스로부터 회수될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 결합 시약은 스트렙타아비딘(strep아비딘)이거나 또는 스트렙타아비딘 유사체 또는 돌연변이체, 예컨대 SEQ ID NOS:11-16 중 어느 하나 또는 SEQ ID NOS: 11-16 중 어느 하나의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내고, 결합 파트너, 예컨대 바이오틴 또는 펩타이드와의 결합을 유지하는 아미노산 서열에 제시된 스트렙타아비딘, 유사체 또는 돌연변이체이다. 몇몇 구체예에서, 결합 파트너는 결합 시약, 예컨대 스트렙타아비딘 결합 펩타이드와 결합할 수 있는 펩타이드, 예컨대 SEQ ID NOS: 1-10 중 어느 하나에 제시된 서열을 함유하는 펩타이드이거나 이러한 펩타이드를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 1차 및/또는 2차 선택의 일부로서 샘플 중의 세포들을 항체가 고정된 고체 지지체와 접촉시킨 후, 경쟁 시약을 적용시켜 결합 파트너와 결합 시약 간의 결합을 파괴시킴으로써, 고체 표면으로부터 선택된 세포를 회수하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 경쟁 시약은 바이오틴 또

는 바이오틴 유사체이다.

- [0019] [0015] 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 선택 또는 농축된 CD4⁺ 세포와 CD8⁺ 세포 또는 이들의 하위집단을 배양-개시 비율로 함유하는 선택 또는 농축된 조성물을 생산한다. 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 약 10:1 내지 약 1:10, 약 5:1 내지 약 1:5이거나 또는 약 2:1 내지 약 1:2, 예컨대, 약 1:1이다. 이하의 설명에서 "약"이라는 표현은 약이라는 표현 뒤에 나오는 정확한 수치 자체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다 (번역자 주). 통상의 기술자라면 CD4, CD8 또는 그의 하위집단이 농축 또는 선택된 세포들을 함유하는 배양-개시 조성물과 같은 생성된 조성물에서 배양-개시 비율을 달성하거나 생성하기 위한, 면역친화성-기반 시약, 예컨대 항체-코팅된 비드 (예컨대 자기 비드) 또는 친화성 크로마토그래피 매트릭스 또는 매트릭스들의 충분한 양 또는 충분한 상대적 양을 선택할 수 있다. 이러한 방법의 예를 이하에 설명한다.
- [0020] [0016] 몇몇 구체예에서, 세포들은 림프구와 같은 면역계의 세포, 예컨대, T 세포 (예컨대, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 및 그의 단리된 하위집단들), 및 NK 세포를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포들은 복수개의 세포 집단 또는 세포 종류의 조합으로서 존재하는데, 이는 어떤 측면에서 세포 또는 세포 종류가 특정한 비율 또는 갯수로 조성물 중에 포함된 것이다. 또한 이러한 방법을 최적화하기 위한 방법, 예컨대 적절한 비율 및 갯수, 예컨대 이러한 방법과 연계 사용되기 위한 세포 종류 및 집단의 배양-개시 비율 및 소망되는 아웃풋 비율 및 투여량을 선택 또는 탐지함으로써 최적화시키는 방법이 제공된다.
- [0021] [0017] 또한 이러한 방법에 의해 생산되거나 사용되기 위한, 세포, 세포 집단, 및 그의 조성물도 제공된다. 또한 이러한 방법을 수행하기 위한 시스템, 기구, 장치, 시약, 화합물 및 키트도 제공된다. 뿐만 아니라, 이러한 방법에 의해 생산된 세포 및 조성물을 이용한 치료 방법 및 용도 예컨대 입양세포 치료 방법도 제공된다.
- [0022] [0018] 몇몇 구체예에서, 입양세포 치료용 세포의 생산 방법, 유전자 조작용 세포의 생산 방법, 및 유전자 조작된 세포의 생산 방법도 제공된다. 몇몇 측면에서, 세포는 T 세포, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 및/또는 그의 서브타입이다. 몇몇 측면에서, 세포 치료는 T 세포 치료법이다.
- [0023] [0019] 몇몇 구체예에서, 이러한 방법은 (a) 샘플로부터 세포 집단을 단리하고, 및 (b) 단리된 집단의 세포들을 함유하는 배양 용기에서 배양-개시 조성물을 인큐베이션함으로써 수행된다. 몇몇 측면에서, 이러한 방법은 예컨대 (c) 유전자 조작된 항원 수용체를 배양 용기 내로 도입하는 것과 같이, 인큐베이션된 세포 또는 세포들을 배양 용기에서 유전자 조작하는 것을 더 포함한다.
- [0024] [0020] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 특정 배양-개시 비율 또는 특정한 갯수의 세포로 복수개의 세포 집단을 함유하는 배양 용기에서 배양-개시 조성물을 인큐베이션하고; 및 (b) 예컨대 유전자 조작된 항원 수용체를 배양 용기 내의 세포 내로 도입하는 것에 의해 세포를 유전자 조작함으로써 수행된다.
- [0025] [0021] 몇몇 구체예에서, 유전자 조작된 항원 수용체는 배양 용기 내의 세포들, 예컨대 배양 용기 내의 상이한 세포 종류 또는 하위집단, 예컨대, 배양 용기 내의 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포들에 도입된다.
- [0026] [0022] 몇몇 측면에서, 이들 방법은 유전자 조작 또는 입양세포 치료용 아웃풋 조성물 또는 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 세포를 포함하는 아웃풋 조성물을 생산한다.
- [0027] [0023] 몇몇 구체예에서, 단리는 샘플로부터 CD4⁺ 일차 인간 T 세포 집단 및/또는 CD8⁺ 일차 인간 T 세포 집단을 단리하는 것을 포함하거나 단리하는 것에 의해 수행된다. 몇몇 측면에서, 이것은 CD4⁺ 세포의 하위집단을 고갈 (depleting) 또는 농축하는 것 및/또는 CD8⁺ 세포의 하위집단을 고갈 또는 농축하는 것을 포함한다. 따라서, 몇몇 측면에서, 배양-개시 조성물은 단리된 CD4⁺ 및 CD8⁺ 일차 인간 T 세포를 포함한다.
- [0028] [0024] 몇몇 측면에서, 농축 또는 고갈은 면역친화성-기반 선택에 의해, 예컨대 항체 또는 세포 상의 표면 마커를 인식하는 기타 결합 분자에 대한 결합에 의해 수행된다. 몇몇 측면에서, 항체 또는 기타 분자는 자기적으로 반응성이거나 자성을 띤 입자 예컨대 비드에 커플링된다. 몇몇 측면에서, 선택은 양성 및/또는 음성 선택 단계를 포함한다.
- [0029] [0025] 몇몇 구체예에서, CD8⁺ 일차 인간 T 세포 집단의 단리는 CD8⁺ 세포의 하위집단의 고갈 또는 농축을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 일차 인간 T 세포 집단의 단리는 CD4⁺ 세포의 하위집단의 고갈 또는 농축을 포함한다. 몇몇 측면에서, T 세포 집단의 단리는 T_{CM} 세포의 농축을 포함한다. 몇몇 측면에서, CD8⁺ 및/또는 CD4⁺ 일차

인간 T 세포 집단의 단리는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축을 포함한다. 몇몇 측면에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축은 CD45RA와 같이, 나이브 T 세포 상에 존재하는 표면 마커를 발현하는 세포의 음성 선택, 또는 CD45RO와 같이, 나이브 T 세포 상에 존재하지 않고 중심 기억 T 세포 상에 존재하는 표면 마커를 발현하는 세포의 양성 선택; 및/또는 CD62L, CCR7, CD27, CD127, 및/또는 CD44과 같이, 또 다른 메모리 T 세포 하위집단 상에 존재하지 않고 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 존재하는 표면 마커를 발현하는 세포의 양성 선택을 포함한다.

[0030] [0026] 몇몇 구체예에서, 단리는 (i) CD4의 표면 발현에 기초하여 샘플을 양성 선택함으로써 양성 및 1차 음성 분획을 야기하고 (여기서 양성 분획은 단리된 $CD4^+$ 집단임); 및 (ii) 비-T 세포 마커 및 나이브 T 세포 상에 존재하는 표면 마커의 표면 발현에 기초하여 상기 1차 음성 분획을 음성 선택함으로써, 2차 음성 분획을 생성하고; 및 (iii) 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 표면에 존재하지만 다른 기억 T 세포 하위집단의 표면에는 존재하지 않는 마커의 표면 발현에 기초하여 상기 2차 음성 분획을 양성 선택하는 것을 포함한다.

[0031] [0027] 몇몇 측면에서, 나이브 T 세포 상에 존재하는 마커는 CD45RA를 포함한다. 몇몇 측면에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 존재하지만 다른 기억 T 세포 하위집단 상에는 존재하지 않는 표면 마커에는 CD62L, CCR7, CD27, CD127, 및/또는 CD44가 포함된다.

[0032] [0028] 몇몇 측면에서, 단리 또는 선택은 동일한 분리 용기에서 수행된다. 몇몇 측면에서, 단리는 (i) 샘플을 1차 선택시킴으로써 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 일차 인간 T 세포 집단 중 1종과 선택되지 않은 샘플을 생성하고; (ii) 상기 선택되지 않은 샘플을 2차 선택시킴으로써, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 일차 인간 T 세포 집단의 다른 1종을 생성하는 것을 포함한다. 몇몇 측면에서, $CD4^+$ 일차 인간 T 세포 집단은 1차 선택에서 생성되고 $CD8^+$ 일차 인간 T 세포 집단은 2차 선택에서 생성된다. 몇몇 측면에서, 1차 및/또는 2차 선택은 복수개의 양성 또는 음성 선택 단계들을 포함한다.

[0033] [0029] 몇몇 측면에서, 일차 인간 T 세포 집단, 일차 인간 $CD4^+$ T 세포 집단, 또는 일차 인간 $CD8^+$ T 세포 집단과 같은 1종 이상의 집단들의 단리는, 표면 발현 CD62L, CCR7, CD44, 또는 CD27에 기초한 양성 선택을 포함한다. 몇몇 측면에서, 일차 인간 T 세포 집단, 일차 인간 $CD4^+$ T 세포 집단, 또는 일차 인간 $CD8^+$ T 세포 집단과 같은 1종 이상의 집단들의 단리는, CD45RA의 표면 발현에 기초한 음성 선택 또는 CD45RO의 표면 발현에 기초한 양성 선택을 포함한다.

[0034] [0030] 몇몇 구체예에서, 예컨대 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 집단과 같은 복수개의 세포 집단의 단리와 같은 다양한 단리는 동일한 분리 용기에서 수행된다. 몇몇 측면에서, 분리 용기는 튜브, 튜빙 세트, 챔버, 유닛, 웰, 배양 용기, 백, 및/또는 컬럼이거나 이들을 포함한다. 몇몇 측면에서, 분리 용기는 분리가 일어나는 동안 세포들을 한정된 또는 평균 환경에서 유지시켜준다.

[0035] [0031] 몇몇 구체예에서, 인큐베이션은 자극 조건 하에서 수행된다. 몇몇 측면에서, 배양-개시 조성물은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 일차 인간 T 세포 집단을 배양-개시 비율로 포함한다. 몇몇 측면에서, 배양-개시 비율은 상기 인큐베이션 후 또는 특정한 나중 시기, 예컨대 조작, 동결보존 후, 또는 투여 직전, 예컨대 병상 해동시 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 소망되는 아웃풋 비율(또는 T 세포 또는 몇몇 하위집단(들)의 소망되는 총 갯수)이 획득되도록 설계된다.

[0036] [0032] 몇몇 구체예에서, 소망되는 아웃풋 비율은 약 5:1 내지 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 5:1 미만), 예컨대 약 1:3 내지 약 3:1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예컨대 약 2:1 및 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만)이거나, 또는 약 2:1 내지 약 1:5의 범위이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 아웃풋 비율은 약 3:1, 2.9:1, 2.8:1, 2.7:1, 2.6:1, 2.5:1, 2.4:1, 2.3:1, 2.2:1, 2.1:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5이다.

[0037] [0033] 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 아웃풋 조성물 중 2가지 서로 다른 세포 종류 또는 집단의 비율, 예컨대 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 비율을 약 5:1 내지 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 약 5:1 미만), 예컨대 약 1:3 내지 약 3:1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예컨대 약 2:1 내지 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만), 또는 약 3:1, 2.9:1, 2.8:1, 2.7:1, 2.6:1, 2.5:1, 2.4:1, 2.3:1, 2.2:1, 2.1:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8,

1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5의 비율로 결과시킨다.

- [0038] [0034] 몇몇 측면에서, 소망되는 아웃풋 비율은 1:1 또는 약 1:1이다.
- [0039] [0035] 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 아웃풋 조성물에서 소망되는 아웃풋 비율 또는 세포 수(들)을 결과시키며, 아웃풋 조성물에서, 그러한 소망되는 아웃풋 비율 또는 갯수의 오차 범위 또는 특정한 허용차(tolerated difference) 내의 범위의 비율 또는 갯수를 결과시키거나 및/또는 그 방법이 수행되는 시간의 특정 백분율, 예컨대 그 시간의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 95% 이상에서 그러한 비율 또는 갯수를 결과시킨다.
- [0040] [0036] 몇몇 측면에서, 허용차는 소망되는 비율의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 이내이다. 몇몇 측면에서, 아웃풋 비율은 그 방법이 수행되는 기간의 적어도 80% 이내에서 소망되는 비율의 20% 이내이거나 및/또는 그 비율 이내이다.
- [0041] [0037] 몇몇 구체예에서, 허용차 및/또는 소망되는 아웃풋 비율 또는 수(들)은 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포와 같은 다양한 세포 종류를 한 명 이상의 대상자에게 복수 횟수의 테스트 비율 또는 수로 투여하여 하나 이상의 파라미터를 평가함으로써 구한다. 몇몇 측면에서, 소망되는 아웃풋 비율 또는 수 또는 허용차의 탐지는 대상자에게 투여 후 하나 이상의 결과를 평가하는 것을 포함한다. 몇몇 측면에서, 결과는 질병 증상의 완화 및 낮은 독성 또는 독성 부재 및/또는 안전성을 나타내는 결과로부터 선택되는 것들을 포함한다.
- [0042] [0038] 몇몇 구체예에서, 배양-개시 비율은 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 일차 인간 T 세포 집단과 같은 다양한 단리된 세포 종류의 증식 속도 또는 생존능에 기초하여 선택된다. 몇몇 구체예에서, 배양-개시 비율은 샘플의 공급원, 예컨대 샘플이 채취된 대상자에 기초하여 선택된다. 예컨대, 몇몇 측면에서, 샘플은 대상자로부터 유도되고 배양-개시 비율은 상기 대상자에게 영향을 미치는 질병 또는 병태(condition) 및/또는 상기 대상자가 처리받는 중이거나 처리받은 적이 있는, 또는 처리받을 치료법, 예컨대 입양세포 요법계 투여와의 공동-치료에 의해 선택된다. 몇몇 측면에서, 배양-개시 비율은 단리 또는 배양되는 1종 이상의 세포 또는 세포의 서브타입의 표현형, 예컨대 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포 집단의 표현형, 예컨대 세포 표면 마커의 발현 또는 예컨대 시토카인 또는 케모카인과 같은 1종 이상의 인자의 합성 또는 분비에 기초하여 선택된다.
- [0043] [0039] 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 인큐베이션 단계에 앞서 배양-개시 비율을 선택하는 것을 포함한다. 몇몇 측면에서, 선택은 예컨대 CD4⁺ 일차 인간 T 세포 및/또는 단리된 CD8⁺ 일차 인간 T 세포와 같이, 1종 이상의 단리된 세포 집단 또는 인큐베이션되는 세포 집단의 증식 속도 또는 생존능을 측정함으로써 수행된다. 몇몇 측면에서, 선택은 단리된 CD4⁺ 일차 인간 T 세포 및/또는 단리된 CD8⁺ 일차 인간 T 세포의 표현형을 평가함으로써 수행된다. 몇몇 측면에서, 표현형은 특히 표면 마커의 발현 및 시토카인이나 기타 인자의 분비로부터 선택된다. 몇몇 측면에서, 선택은 샘플의 공급원, 예컨대 그 샘플이 유래하는 대상자에게 영향을 미치는 질병 또는 병태에 기초하여 배양-개시 비율이 선택되는 샘플의 공급원을 평가함으로써 수행된다.
- [0044] [0040] 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 상기 인큐베이션 개시 후의 시점에서 배양 용기에 존재하는 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 중간 비율(intermediate ratio)과 같은 세포의 중간 비율 또는 수를 알아내는 것을 추가로 포함한다. 몇몇 측면에서, 이들 방법은 상기 중간 비율에 기초해서 하나 이상의 파라미터를 조정하고 및/또는 인큐베이션 및/또는 조작 단계를 수행하는 횟수를 증가 또는 감소시키는 것을 추가로 포함한다. 일 측면에서, 상기한 조정은 배양 용기에서 하나 이상의 세포 집단의 수를 증감시키거나 농축시키는 것, 예컨대 배양 용기에 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포를 농축시키거나 증가시키는 것, 온도 조정, 배양 용기에 자극제 첨가, 배양 용기 중의 1종 이상의 자극제의 농도 조정, 및/또는 배양 용기에 세포의 하위집단을 첨가하거나 및/또는 배양 용기로부터 세포의 하위 집단을 제거하는 것을 포함한다. 몇몇 측면에서, 탐지 및/또는 조정은 인큐베이션되는 조성물을 밀폐 또는 밀폐 환경(contained environment)으로 유지하면서 수행된다 몇몇 측면에서, 탐지 및/또는 조정은 자동화 방식, 예컨대 상기 단계들이 수행되는 기구에 부착된 컴퓨터에 의해 제어되는 방식으로 수행된다.
- [0045] [0041] 몇몇 측면에서, 단리, 인큐베이션, 및/또는 조작 단계는 밀폐 또는 밀폐 환경 및/또는 자동화 방식, 예컨대 상기 단계들이 수행되는 기구에 부착된 컴퓨터에 의해 제어되는 방식으로 수행된다.
- [0046] [0042] 몇몇 측면에서, 배양-개시 조성물 중 CD8⁺ 집단은 적어도 50% 중심 기억 T (T_{CM}) 세포를 포함하거나 또는

나이브 T(T_N) 세포를 20% 미만으로 포함한다.

- [0047] [0043] 몇몇 구체예에서, 샘플은 대상자로부터 획득된다. 몇몇 측면에서, 대상자는 상기 유전자 조작된 세포, 예컨대, T 세포, 또는 입양세포 치료용 세포가 투여될 대상자이거나 또는 이러한 투여를 필요로 하는 대상자이다. 다른 측면에서, 대상자는 유전자 조작된 세포, 예컨대, T 세포, 또는 입양세포 치료용 세포가 투여될 대상자가 아닌 대상자이거나 또는 이러한 투여를 필요로 하지 않는 대상자이다. 샘플은 특히 혈액 및 혈액-유래 샘플, 예컨대 백혈구 샘플, 성분채집술 샘플, 백혈구성분채집술 샘플, 말초혈액 단핵세포(PBMC) 샘플 또는 전혈이다.
- [0048] [0044] 몇몇 측면에서, 인큐베이션 또는 조작을 위한 자극 조건에는 배양-개시 조성물의 T 세포가 증식 또는 팽창하는 조건이 포함된다. 예컨대, 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 CD3 제타 사슬과 같이 TCR 복합체의 1 이상의 성분들의 1 이상의 세포내 신호 도메인을 활성화시킬 수 있거나, 또는 이러한 복합체 또는 성분을 통한 신호를 활성화시킬 수 있는 물질의 존재 하에 수행된다. 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 항-CD3 항체, 및 항-CD28 항체, 항-4-1BB 항체, 예컨대, 비드와 같은 고체 지지체 표면에 커플링되거나 표면에 존재하는 항체, 및/또는 IL-2, IL-15, IL-7, 및/또는 IL-21과 같은 시토카인의 존재 하에 수행된다.
- [0049] [0045] 몇몇 구체예에서, 유전자 조작된 항원 수용체는 T 세포 수용체 (TCR), 예컨대 고-친화성 TCR, 또는 기능성 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)이거나 이들을 포함한다. 몇몇 측면에서, 수용체는 치료하고자 하는 질병 또는 병태의 세포에 의해 발현되는 항체에 특이적으로 결합한다. 몇몇 측면에서, CAR은 세포의 항원-인식 도메인을 함유한다. 몇몇 측면에서, 이것은 ITAM-함유 서열을 포함하는 세포내 신호 도메인 및 T 세포 공동자극 분자의 세포내 신호 도메인을 추가로 함유한다.
- [0050] [0046] 또한 입양세포 치료를 위한 세포 및 유전자 조작된 세포를 비롯하여, 상기 방법 또는 구체예에 의해 생산된 세포 및 의약 조성물을 비롯한 조성물도 제공된다. 또한 대상자에게 이러한 세포 및 조성물을 투여하는 방법 및 이러한 방법에서 상기 세포 및 조성물의 용도도 제공된다. 예컨대, 상기 세포 생산 방법에 따라 세포를 생산하고 아웃풋 조성물 또는 그로부터 유래된 조성물의 세포를 대상자에게 투여함으로써 수행되는 치료 방법이 제공된다. 또한 대상자에게 상기 제공된 세포 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법도 제공된다. 몇몇 측면에서, 세포가 그로부터 단리되는 샘플은 그 세포가 투여되는 대상자로부터 유래된다. 몇몇 측면에서, 샘플은 상이한 대상자로부터 유래된다. 그러므로, 본 발명의 방법은 자가(autologous) 및 동종이계(allogeneic) 방법을 포괄한다. 몇몇 구체예에서, 이들 방법은 대상자에서 어떤 질병 또는 병태의 1 이상의 증상을 경감, 치료 또는 예방한다. 몇몇 측면에서, 질병 또는 병태는 암 또는 관련 증상이다. 몇몇 구체예에서, 암은 백혈병, 림프종, 예컨대, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), ALL, 비-호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 다발골수종, 난치성 소포 림프종, 외투세포 림프종, 무통형(indolent) B 세포 림프종, B 세포 종양, 결장, 폐, 간, 유방, 전립선, 난소, 피부(흑색종 포함)의 암, 골암 및 뇌암, 난소암, 상피암, 신세포 암종, 횡장 선암종, 호지킨 림프종, 경추 암종, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종, 유방 육종, 수모세포종, 골육종, 활막 육종, 및/또는 중피종을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0051] [0047] 도 1A는 본 발명에서 제공된 방법의 구체예에 사용되기 위한 폐쇄 시스템의 일 구체예를 개략적으로 나타낸 도면이다. 도시된 예시적인 시스템은 세포 샘플 5, 세척 완충제 저장소 6, 용리 완충제 저장소 7, 제1 Fab 저장소 18, 제2 Fab 저장소 19, 및 제2 매트릭스 4를 함유하는 제2 크로마토그래피 컬럼 2에 일련의 튜빙관을 통해 작동적으로 연결된 제1 매트릭스 3을 함유하는 제1 크로마토그래피 컬럼 1에 일련의 튜빙 및 밸브 13을 통해 연결되어 있는 펌프 8을 포함한다. 제2 크로마토그래피 컬럼 2는 제거 챔버 9에 작동적으로 연결되어 있다. 제거 챔버 9는 일련의 튜빙관을 경유하여 세포 및 유액을 폐기 용기 10 또는 배양 용기 12로 배향시키는 밸브 13에 작동적으로 연결되어 있다. 이 시스템은 인클로저(enclosure) 14에 의해 둘러싸여져 있다.
- [0048] 도 1B는 본 발명에서 제공된 방법의 구체예에 사용되기 위한 폐쇄 시스템의 일 구체예를 개략적으로 나타낸 도면이다. 도시된 예시적인 시스템은 세포 샘플 5, 세척 완충제 저장소 6, 용리 완충제 저장소 7, 제1 Fab 저장소 18, 제2 Fab 저장소 19, 제3 Fab 저장소 20, 및 제1 매트릭스 3을 함유하는 제1 크로마토그래피 컬럼 1에 일련의 튜빙을 통해 연결되어 있는 펌프 8을 포함한다. 일련의 튜빙에 작동적으로 연결된 밸브들 13은 일련의 튜빙을 통해 유액을 배향시킨다. 제 1크로마토그래피 컬럼 1에 작동적으로 연결된 밸브 13은 제거 챔버 9에 작동적으로 연결된 제2 매트릭스 4를 함유하는 제2 크로마토그래피 컬럼 2로 세포와 유액을 배향시킨다. 제1 크로마토그래피 컬럼 1에 작동적으로 연결된 밸브 13은 또한 제3 매트릭스 16을 함유하는 제3 크로마토그래피 컬

럼 15에 작동적으로 연결된, 제거 챔버 9에 세포 및 유액을 배향시킨다. 상기 제3 크로마토그래피 컬럼 15는 제거 챔버 9에 작동적으로 연결되어 있다. 제거 챔버 9는 일련의 튜빙관 및 밸브 13을 경유하여 배양 용기 12 또는 제1 폐기 용기 10에 작동적으로 연결되어 있다. 이 시스템은 인클로저(enclosure) 14에 의해 둘러싸여져 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 발명의 설명
- [0053] [0049] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 용어, 표기법 및 기타 기술 및 과학 용어 또는 전문용어들은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 기술자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 몇몇 경우, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어들에 대하여도 명확성을 기하고 및/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에서 정의하였으나 이러한 정의가 주어졌다 하여 이들 용어들이 반드시 기술분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실제로 다른 의미를 갖는 것으로 이해되어서는 아니된다.
- [0054] [0050] 특허 문헌, 과학 논문 및 데이터베이스를 비롯하여 이 출원에서 인용된 모든 간행물은 각각의 간행물이 개별적으로 참조 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적에서 그 내용 전체가 본 발명에 참조 통합된다. 만일 본 명세서에서 주어진 정의가 본 발명에 참조로 인용된 특허, 출원, 공개출원 및 기타 공개문헌에서 설정된 것과 반대되거나 불일치할 경우, 본 발명의 정의가 참조 통합된 인용문헌의 정의에 우선한다.
- [0055] [0051] 본 명세서에서 사용된 섹션 소제목들은 조직적 정리 목적을 위한 것일 뿐 본 발명이 어떠한 식으로든 그 에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] **I. 입양 치료용 세포의 단리, 배양 및 조작을 위한 방법 및 시스템**
- [0057] [0052] 본 발명에 따라 입양세포 치료와 같은 치료법 및 유전자 조작에 사용되기 위한 세포, 예컨대 T 세포의 제조 방법이 제공된다. 구체적으로, 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 단리된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 집단들 및 하위 집단들과 같은, 복수개의 상이한 세포 집단 또는 세포 종류를 함유하는 조성물을 이용하거나 생성한다. 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 1 이상의 세포 집단, 일반적으로 복수개의 세포 집단을 단리하는 단계를 포함한다. 세포들은 일반적으로 대상자로부터 유래된 샘플로부터 단리된다.
- [0058] [0053] 몇몇 측면에서, 이들 방법들은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플과 같은 샘플로부터, CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포와 같은 복수개의 상이한 세포 집단들을 선택, 농축 및/또는 단리하는, 동시적 또는 순차적인 선택 또는 농축을 이용함으로써 수행된다. 몇몇 구체예에서, 이러한 방법은 단일 프로세싱 스트림으로, 즉, CD4⁺ 세포 또는 CD8⁺ 세포와 같은 1차 세포 집단 및 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 중 다른 하나와 같은 2차 세포 집단을 선택, 농축 및/또는 단리하되 2차 세포 집단의 선택을 수행하기 전에는 1차 선택 집단으로부터의 어떠한 세포도 폐기하지 않는 것인 단일 프로세싱 스트림으로 수행된다. 몇몇 측면에서, 1차 및 2차 선택은 동시적으로 또는 순차적으로 수행될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 선택 방법은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플과 같은 샘플로부터 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 중 어느 하나와 같은 1차 세포 집단을 농축시키는 1차 선택을 수행하고, 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포들을 2차 선택을 위한, 예컨대 상기 샘플로부터 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 중 다른 하나에 대한 세포 공급원으로서 이용함으로써 단일 프로세스 스트림으로서 수행된다.
- [0059] [0054] 몇몇 구체예에서, 추가의 선택 또는 선택들은 1차 또는 2차 선택 세포에 대해 수행될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 추가 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상의 마커를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포의 하위집단을 농축하거나 및/또는 CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127, 또는 CD44를 발현하는 세포들의 하위집단을 농축하는 것이다.
- [0060] [0055] 몇몇 구체예에서, 선택 방법은 폐쇄 시스템 또는 장치에서 수행된다. 몇몇 구체예에서, 폐쇄 시스템 또는 장치에서, 동일한 조성물 중에 농축 또는 선택된 CD4⁺ 집단과 CD8⁺ 집단 두 가지 모두와 같은, 농축 또는 선택된 세포 집단을 함유하는 배양-개시 조성물과 같은 조성물이 생성된다.
- [0061] [0056] 예컨대, 몇몇 측면에서, 동일 조성물 내에 조합된 복수개의 세포 집단 또는 동일 용기, 예컨대, 동일한 폐쇄 시스템 또는 장치, 또는 동일한 용기, 유닛, 또는 챔버, 예컨대, 동일한 컬럼, 예컨대, 자성 분리 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 배양 챔버, 배양 용기, 프로세싱 유닛, 세포 분리 용기, 원심분리 챔버 중에 존재하는 복수개의 세포 집단에 대해, 또는 복수개의 세포 집단에 대해 동일한 분리 매트릭스, 배지, 및/또는 시약, 예컨대 동일한 자성 또는 자성 반응성 매트릭스, 입자, 또는 비드, 동일한 고체 지지체, 예컨대, 친화성-표지된 고체 지

지체, 및/또는 동일한 항체 및/또는 기타 결합 파트너, 예컨대 형광-표지된 항체 및 결합 파트너를 이용하여, 하나 이상의 단계가 수행된다. 몇몇 구체예에서, 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포 집단이 2차 선택을 위한 세포 공급원으로서 사용될 수 있는 단일 프로세스 스트림 방식으로 단리, 선택 및/또는 농축 방법들이 일어나도록, 하나 이상의 용기, 유닛 또는 챔버, 예컨대 컬럼이 동일한 폐쇄 시스템 또는 장치에서 작동적으로 연결된다.

[0062] [0057] 몇몇 구체예에서, 예컨대 배양될, 또는 입양 치료용으로 조작될 CD4+ 및 CD8+ T 세포와 같은 세포의 1 이상의 특별한 집단들 또는 하위집단들의 단리 또는 농축은 한 가지 이상의 장점을 제공한다, 예컨대, 단리된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 집단들 및 하위집단들과 같이, 복수개의 상이한 세포 집단 또는 세포 종류들이 농축된 세포들을 조작함으로써, 효율성을 증진시키거나 원치않는 효과를 감소 또는 회피할 수 있다. 몇몇 측면에서, 단리 또는 농축은 대상자에게 궁극적으로 투여되는 세포들의 인 비보 또는 대상자에게 투여시, 지속, 증식 활성화되는 능력을 증가시킨다. 몇몇 측면에서, 이것은 하나 이상의 이펙터 기능 또는 활성화 표현형을 개선 또는 증가시킨다. 예컨대, 몇몇 측면에서, T 세포 집단, 예컨대 CD8+ T 세포 집단을 중심 기억 (T_{CM}) 세포에 대해 농축시킴으로써 이러한 장점이 달성될 수 있다. 몇몇 측면에서, 2 이상의 단리된 집단들 또는 서브타입, 예컨대 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 단리된 집단들 또는 하위집단들, 예컨대 T_{CM}-농축된 CD8⁺ 집단 및 CD4⁺ 집단을 조합시킴으로써 이러한 장점들이 한 가지 이상 제공된다. 예컨대, CD8+ 집단을 단독으로 투여하는 경우에 비해 CD4+ 집단과 CD8+ 집단을 투여함으로써 어떤 측면에서 이러한 장점들이 달성될 수 있다.

[0063] [0058] 몇몇 구체예에서 이 방법들은 선택 또는 농축된 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포 집단과 같은, 복수개의 단리 또는 선택된 세포 집단들을 함유하는 생성 조성물의 프로세싱을 포함한다. 일 구체예에서, 생성된 조성물의 프로세싱은 세포들을 자극 조건 하에서, 예를 들어 몇몇 측면에서, 조작 또는 형질도입을 위해 세포를 활성화시키거나 또는 세포 증식을 위한 조건 하에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포와 같은 복수개의 세포 종류, 예컨대 인큐베이션된 조성물에서 단리 및 존재하는 것들, 예컨대 배양-개시 조성물을 조작하는 단계들을 포함한다. 몇몇 측면에서, 조작은 유전자 조작된 항원 수용체를 세포, 예컨대 TCR, 예컨대 고-친화성 TCR, 또는 기능적인 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 내로 도입하기 위해 수행된다. 몇몇 측면에서, 이 방법은 추가의 프로세싱, 예컨대 약 37°C ± 2°C의 온도에서의 추가 인큐베이션 및/또는 세포 및 이를 함유하는 조성물의 제형화를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 프로세싱에 의해 유전자 조작된 세포, 예컨대 유전자 조작된 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 함유하는 결과적인 아웃풋 조성물이 생산된다. 몇몇 구체예에서, 결과적으로 프로세싱된 아웃풋 조성물은 이들 방법으로 제조된 세포 및 조성물을 예컨대 입양세포 요법과 관련하여 환자에게 투여하는 방법에서 이용될 수 있다.

[0064] [0059] 특정 구체예에서, 단리(isolation) 또는 분리(separation)는 이들 방법의 1 이상의 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화를 수행하는 시스템, 기구 또는 장치를 이용하여 수행된다. 몇몇 측면에서, 예컨대 실수를 최소화하고, 사용자의 핸들링 및/또는 오염을 최소화하기 위해, 폐쇄 또는 멸균 환경에서 이들 단계들을 각각 수행하기 위해 시스템이 이용된다. 일례에서, 시스템은 국제특허출원, 공개번호 W02009/072003, 또는 US 20110003380 A1에 설명된 시스템이다. 몇몇 구체예에서, 시스템은 도 1A 또는 도 1B에 도시된 것과 같은 폐쇄 장치 또는 시스템이다. 몇몇 구체예에서, 시스템 또는 장치는 자동화된 것이거나 및/또는 자동화 방식으로 본 발명의 방법에 따라 세포들을 농축하기 위한 선택 단계들을 수행한다.

[0065] [0060] 몇몇 구체예에서, 시스템 또는 장치는 단리, 예컨대 선택 또는 농축 단계를 수행한다. 몇몇 구체예에서, 추가적인 시스템 또는 장치, 예컨대 폐쇄 시스템 또는 장치를 이용하여 이들 방법의 1 이상의 다른 단계 예컨대 세포 제조, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계들을 수행할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 시스템 또는 장치는 단리, 프로세싱, 조작 및 제형화 단계 중 하나 이상, 예컨대 이들 모두를 통합 시스템에서 또는 자족형(self-contained) 시스템에서 및/또는 자동화되거나 프로그래밍된 방식으로 수행한다. 몇몇 측면에서, 시스템 또는 장치는 시스템 또는 장치와 교통하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함함으로써 해서, 사용자로 하여금 프로세싱, 단리, 조작 및 제형화 단계들의 결과를 프로그램, 제어, 평가하거나 및/또는 이의 다양한 측면을 조정하도록 할 수 있다.

[0066] [0061] 몇몇 구체예에서, 배양 개시 조성물과 같은 농축된 조성물이 CD4+ 및 CD8+과 같은 상이한 세포집단을 함유하도록 본 발명의 방법에 의해 제조되므로, 이렇게 제조된 조성물은 동일한 조건 하에서 그리고 몇몇 측면에서 폐쇄 시스템에서 함께 및 동시에 프로세싱될 수 있다. 그러므로, 몇몇 측면에서, 이 방법은 단일 프로세스 스트림으로 CD4+ 및 CD8+ 세포와 같은 상이한 세포 집단을 함유하는 선택, 농축 또는 단리된 세포 집단을 생

산 및 프로세싱하는 방법이 제공된다. 몇몇 측면에서, 이것은 종래기술 방법, 예컨대 적어도 2개의 프로세스 스트림과 같이 각각 상이한 세포집단에 대해 별도의 프로세스 스트림을 전형적으로 포함하는, 종래의 입양세포 치료용 세포를 프로세싱하는 종래기술의 방법과 다르다. 예컨대, 기존 방법의 몇가지 측면에서, CD4+ T 세포는 유전자 조작을 위한 자극 조건 하에서 개별적으로 단리, 농축 및/또는 선택 및 프로세싱되며, CD8+ T 세포는 유전자 조작을 위한 자극 조건 하에서 개별적으로 단리, 농축 및/또는 선택되고 프로세싱되며, 별도로 프로세싱 및 조작된 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상자에게 투여되기 전에 재결합된다.

[0067] [0062] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 경비, 시간, 및/또는 자원 절약의 측면에서, 다른 제조, 단리, 인큐베이션 및 조작 방법에 비해 한 가지 이상의 장점을 제공한다. 이러한 장점들은 다른 방법에 비해 증가된 효율성 및/또는 감소된 복잡성, 시간, 경비 및/또는 자원 사용으로, 소망되는 비율 또는 그에 근사한 비율로 존재하는 복수 개의 세포 집단을 단리, 프로세싱, 예컨대 인큐베이션 및/또는 조작하는 것을 포함할 수 있다.

[0068] [0063] 몇몇 구체예에서, 이러한 장점은 하나 이상의 방법 단계들을 스트림라이닝함으로써 달성된다. 예컨대, 몇몇 측면에서, 상이한 집단의 단리, 배양, 및/또는 조작은 동일한 장치 또는 장비를 이용하여 및/또는 동시에 수행된다. 몇몇 측면에서, 상이한 집단의 단리, 배양, 및/또는 조작은 동일한 출발 조성물에 기초하여 수행된다. 몇몇 측면에서, 이 방법들의 이러한 특징은 별도의 장비를 이용하여 별도 용기에서 별도 시간으로 및/또는 상이한 출발 조성물을 이용하여 세포 집단을 단리, 인큐베이션, 및/또는 조작하는 방법에 비해, 시간, 방법 단계, 경비, 복잡성, 및/또는 자원 갯수를 감소시킬 수 있다.

[0069] [0064] 몇몇 측면에서, 세포의 단리, 인큐베이션 및 조작 방법에 의해 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포와 같은, 상이한 세포 집단 또는 세포 종류가 소망되는 비율로 존재하거나 소망되는 비율의 특정 정도의 허용 오차 범위 내에 존재하는 아웃풋 조성물이 결과된다. 이러한 비율에는 예컨대 입양세포 치료와 관련하여 환자에게 투여하는데 적절하거나 최적으로 여겨지는 아웃풋 비율과 같이, 치료 용도로 최적으로 여겨지는 비율들이 포함된다. 또한 예컨대 입양세포 치료와 관련하여 환자에게 본 발명의 방법으로 제조된 세포 및 조성물을 투여하는 방법도 제공된다.

[0070] [0065] 몇몇 구체예에서, 단리 또는 선택 방법은 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포 또는 그의 하위집단의 선택된 배양-개시 비율로 세포를 선택하도록 수행된다. 몇몇 측면에서, 이러한 비율에는 방법 종결시 또는 예컨대 배양, 인큐베이션 및/또는 조작 단계에 이어서와 같이 1 이상의 단계 종결시, 아웃풋 조성물에서 예컨대 소망되는 비율과 같은 최적 비율을 달성하기 위한 최적 출발점으로서 여겨지는 비율도 포함된다. 몇몇 구체예에서, CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 비율과 같은 배양-개시 비율로 세포를 제공하는 것은 아웃풋 조성물에서 소망되는 비율을 달성하기 위해 상이한 시약들로 자극 또는 활성화시 일어날 수 있는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 증폭의 상이점을 설명한다.

[0071] [0066] 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 유전자 조작된 세포 또는 조작을 위한 세포를 소망되는 아웃풋 비율의 특정 백분율로 생성하거나 또는 적어도 특정 백분율 시간 내에 생성한다. 소망되는 아웃풋 비율은 일반적으로 입양 전달을 통해 환자에게 투여되는데 최적인 것으로 결정된 비율이다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단들 또는 서브타입, 예컨대 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포는 예컨대 T 세포의 소망되는 투여량과 같이, 총 세포의 소망되는 투여량의 허용차 범위 내에서 투여된다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 예컨대 세포/kg과 같이, 세포가 투여되는 대상자의 체중 단위 당 소망되는 세포 갯수, 또는 소망되는 세포 갯수이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 체중 단위 당 세포의 최소 갯수 또는 세포의 최소 갯수 이상이다. 몇몇 측면에서, 총 세포 중, 소망되는 투여량으로 투여되는 개별적인 집단들 또는 서브타입은 소망되는 아웃풋 비율(예컨대 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비율)로 또는 그러한 비율 근사치, 예컨대, 그러한 비율의 특정한 허용차 이내 또는 오차 범위 내로 존재한다.

[0072] [0067] 몇몇 구체예에서, 세포들은 예컨대 소망되는 투여량의 CD4+ 세포 및/또는 소망되는 투여량의 CD8+ 세포와 같이, 하나 이상의 개별적인 세포 집단 또는 서브타입의 소망되는 투여량으로 또는 그러한 투여량의 허용차 이내의 양으로 투여된다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 예컨대 세포/kg과 같이, 세포가 투여될 대상자의 체중 단위 당 그러한 세포의 소망되는 갯수 또는 서브타입 또는 집단의 세포의 소망되는 갯수이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 체중 단위 당 집단 또는 서브타입의 세포의 최소 갯수 또는 집단 또는 서브타입의 세포의 최소 갯수 또는 최소 갯수 이상이다.

[0073] [0068] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 투여량은 하나 이상의, 예컨대 개별적인 각각의 서브타입 또는 하위집단의 소망되는 고정 투여량에 기초하거나 및/또는 소망되는 비율 및 총 세포의 소망되는 고정 투여량에 기초한다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 투여량은 T 세포의 소망되는 고정 또는 최소 투여량 및 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 소망되는

비율에 기초하거나, 및/또는 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포의 소망되는 고정 투여량 또는 최소 투여량에 기초한다.

- [0074] [0069] 몇몇 구체예에서, 허용될 소망되는 투여량 또는 소망되는 아웃풋 비율, 예컨대 허용차로부터 그러한 최적의 아웃풋 비율 및/또는 소망되는 투여량, 및/또는 분산 수준(level of variance)을 구하는 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 소망되는 아웃풋 비율 또는 투여량(들)을 달성하기 위해 (또는 특정한 허용차 범위 내 또는 특정 시간 백분율로 그러한 비율을 달성하기 위해), 입양 전달을 위한 소망되는 아웃풋 비율을 달성하도록 설계된 비율(예컨대, 배양-개시 비율)로 세포 집단들을 조합하거나 인큐베이션한다.
- [0075] [0070] 또한 특정한 허용차 범위 내 및/또는 특정한 시간 백분율 내에서 소망되는 아웃풋 비율을 달성하도록 설계된 배양-개시 비율 또는 그러기 위한 투여량을 구하는 방법도 제공된다. 또한 다양한 방법 단계의 경과에 걸쳐 한 가지 이상의 기간 예컨대 인큐베이션 동안의 세포 집단의 중간(interim) 비율 또는 갯수를 평가하기 위한 방법도 제공된다. 뿐만 아니라 이러한 평가에 기초하여 배양 조건과 같은 다양한 조건을 조정하는 방법도 제공된다. 몇몇 측면에서, 이러한 조정은 특정한 아웃풋 비율 또는 투여량이 달성되거나 허용차 범위 이내에서 달성되도록 하기 위해 수행된다.
- [0076] [0071] 특정 구체예에서, 입양세포 치료에 사용되기 위한 유전자 조작된 항원의 도입을 위해, CD4⁺ T 세포 집단 및 CD8⁺ T 세포 집단 (예컨대, 중심 기억 T 세포와 같은 T 세포의 서브타입에 대해 농축된 CD8⁺ 집단)을 소망되는 아웃풋 비율로 또는 소망되는 아웃풋 비율에 근사한 비율로, 및/또는 T 세포 및/또는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 소망되는 투여량(예컨대, 갯수 또는 체중 단위 당 갯수)로 갖는 조성물의 제조를 위한 능률화된 방법이 제공되며, 여기서 상기 세포 집단들은 조합적으로 단리, 인큐베이션 및/또는 조작됨으로 해서, 집단들이 개별적으로 단리, 인큐베이션, 및/또는 조작되는 방법에 비해, 효율은 증가되고 및/또는 복잡성, 시간, 경비 및/또는 자원 사용은 감소된다.
- [0077] [0072] 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포 및 조성물, 예컨대 의약 조성물 및 제형, 및 방법을 수행하기 위한 키트, 시스템, 및 기구도 제공된다. 또한, 입양세포 치료를 위한 방법과 같은 치료 방법을 비롯한 방법에 의해 제조된 세포 및 조성물의 사용 방법 및 대상자에게 투여되기 위한 의약 조성물도 제공된다.
- [0078] A. 단리, 단리된 세포, 및 기타 프로세싱 단계
- [0079] [0073] 본 발명의 구체예에 따라 샘플로부터 복수개의 세포 및 세포 집단을 단리하기 위한 방법, 및 이러한 방법에 의해 제조된 단리된, 예컨대 농축된 세포가 제공된다. 단리는 크기, 밀도, 민감성 또는 특정 시약에 대한 내성, 및/또는 친화성, 예컨대 항체나 기타 결합 파트너에 대한 면역 친화성과 같은 하나 이상의 특성에 기초한 분리를 비롯하여, 한 가지 이상의 다양한 세포 제조 및 분리 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 측면에서, 단리는 동일한 장치 또는 장비를 이용하여 단일 프로세스 스트림으로 순차적으로 및/또는 동시적으로 수행된다. 몇몇 측면에서, 상이한 집단들의 단리, 배양, 및/또는 조작은 동일한 출발 조성물 또는 재료, 예컨대 동일한 샘플로부터 수행된다.
- [0080] [0074] 몇몇 측면에서, 복수개의 세포 집단들이 동일한 폐쇄 시스템 또는 장치에서, 및/또는 동일한 용기 또는 용기 세트에서, 예컨대, 동일한 (또는 동일한 세트의) 유닛, 챔버, 컬럼, 예컨대, 자성 분리 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 배양 챔버, 배양 용기, 프로세싱 유닛, 세포 분리 용기, 원심분리 챔버에서 단리된다. 예컨대, 몇몇 경우, 복수개의 세포 집단의 단리는 예컨대 세포 집단, 조성물 또는 현탁액을 예컨대 튜빙 세트와 같은 하나의 용기로부터 다른 용기로 이동시킬 필요 없이, 예컨대 하나의 또는 동일한 단리 또는 분리 용기 또는 용기 세트, 예컨대 하나의 컬럼 또는 컬럼 세트 및/또는 동일한 튜브, 또는 튜빙 세트를 이용하는 시스템이나 장치에서 수행된다.
- [0081] [0075] 몇몇 측면에서, 이러한 방법은 예컨대 폐쇄 시스템에서 동시적 또는 순차적 선택을 이용하는 것과 같은 단일 프로세스 스트림에 의해 달성되는데, 이 방법에서는 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플과 같은 샘플로부터 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포와 같은 복수개의 상이한 세포 집단들이 선택, 농축 및/또는 단리된다. 일 구체예에서, CD4⁺ 집단과 CD8⁺ 집단 양자 모두를 동시 농축함으로써 세포를 함유하는 샘플을 선택시킨다. 몇몇 측면에서, 동일한 용기 또는 용기 세트, 예컨대 튜빙 세트에서 분리 또는 단리를 수행하는 것은 양성 선택 및 음성 선택 단계를 순차로 수행하고 후속 단계에서 이전 단계로부터의 음성 및/또는 양성 분획을 추가 선택하되 전체 프로세스를 동일한 튜브 또는 튜빙 세트에서 수행함으로써 달성된다. 일 구체예에서, 선택하고자 하는 세포를 함유하는 샘플을 순차 선택시키는데, 여기서 1차 선택은 CD4⁺ 집단 또는 CD8⁺ 집단 중 어느 하나를 농축시키는 1차 선택을 행하고 상기 1차 선택에서 선택되지 않은 세포들을 2차 선택의 세포 공급원으로서 이용하여 CD4⁺ 집단 또

는 CD8+ 집단 중 나머지 하나를 농축시킨다. 몇몇 구체예에서, 예컨대, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포와 같이 CD4+ 또는 CD8+ 집단의 일방 또는 양방의 하위집단을 농축하도록 추가 선택 또는 선택들을 수행할 수 있다.

[0082] [0076] 특정한 일 측면에서, 1차 선택 단계는 CD4-결합 분자, 예컨대 항체(또는 이러한 분자를 인식하는 2차 시약)에 의해 표지된 비드를 이용하여 수행되며, 1차 선택 단계로부터의 양성 및 음성 분획들을 유지하고, 이어서, 예컨대 CD8-결합 분자에 의해 표지된 비드를 이용함으로써 CD8+ 세포를 농축하기 위해, 음성 분획으로부터 추가로 양성 또는 음성 선택을 수행하고, 임의로 CD8+ 분획으로부터 CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127, 또는 CD44 마커들 중 1종 이상을 발현하는 세포 및/또는 중심 기억 CD8⁺ T 세포와 같은, 세포들의 하위 집단을 선택한다. 몇몇 구체예에서, 선택의 순서는 역전될 수도 있다. 몇몇 구체예에서는 CD4 선택이 항상 먼저 수행되고, 예컨대 CD45RA⁺ 및 CD14의 1종 이상에 대해 음성 선택하거나 및/또는 CD62L, CCR7 중 하나 이상, 및/또는 중심 기억 세포 상에서 발현되는 기타 마커에 대해 양성 선택함으로써, 음성 분획 (CD4-)으로부터 CD8+ 분획을 2차 선택에서 농축시킨다.

[0083] [0077] 몇몇 구체예에서는, 예컨대, CD4⁺ T 세포 집단 및 CD8⁺ T 세포 집단과 같은 복수개의 세포 집단을 단리하여, 예컨대 상기 복수개의 세포 집단을 함유하는 배양-개시 조성물을 생산한다. 이 배양-개시 조성물은 일반적으로, 하나 이상의 인큐베이션, 배양, 컬티베이션, 및/또는 조작 단계에 이어, 특정한 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비율과 같은 2 이상의 세포 종류의 특정한 소망되는 아웃풋 비율을 생산하도록 설계된 배양-개시 비율로 세포를 함유한다. 몇몇 구체예에서 소망되는 아웃풋 비율은 예컨대, 입양세포 치료에서 환자에 대한 세포 투여를 최적화시키도록 설계된 비율이다.

[0084] [0078] 몇몇 측면에서, 복수개의 집단들을 단일 또는 동일한 단리 또는 분리 용기 또는 용기 세트, 예컨대 단일 컬럼 또는 컬럼 세트, 및/또는 동일한 튜브, 또는 튜빙 세트에서 단리하거나 또는 동일한 분리 매트릭스 또는 배지 또는 시약, 예컨대 동일한 자성 매트릭스, 친화성-표지된 고체 지지체, 또는 항체 또는 기타 결합 파트너를 이용하여 분리하는 것은, 예컨대 경비, 시간, 복잡성, 샘플 핸들링 필요성, 자원, 시약 또는 장비의 사용 감소를 결과시키는 능률화된 단리 특징을 포함한다. 몇몇 측면에서, 이러한 특징은 이들이 방법과 관련된 경비, 시간 및/또는 복잡성을 최소화하고 및/또는 감염, 오염 및/또는 온도 변화에 기인하는 유해성과 같은, 세포 생성물의 잠재적인 유해성을 회피한다는 점에서 유리하다.

[0085] [0079] 몇몇 구체예에서 본 발명의 방법에 사용되기 위하여 수득된 단리된 세포 집단은 멸균된 것이다. 세포 단리 생성물의 미생물 오염은 몇몇 경우 수혜 대상자, 예컨대 감염에 대하여 싸울 수 없는 면역손상 환자에서 감염을 일으킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포, 세포 집단, 및 조성물들은 GMP (우수제조관리기준: good manufacturing practice) 조건 하에서 제조된다. 몇몇 구체예에서, GMP 조건은 엄격한 회분식 테스트를 포함한다. 특정 구체예에서, 인간 백혈구 항원(HLA) 미스매치를 회피하고 이식편-대-숙주 질환과 같은 문제를 방지하기 위해 이식에 앞서 조직 검사가 수행된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명에 따라 제공된 방법들은 개인 사용자에게 의한 핸들링을 감소시키고 여러가지 단계들을 자동화시키므로, 몇몇 측면에서 단리된 세포 집단 및 조성물들의 일관성을 증가시키고 오차를 감소시킬 수 있기 때문에 치료 및 안전성의 일관성 역시 향상시킬 수 있다.

[0086] **1. 세포 및 세포 집단**

[0087] [0080] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 일차 인간 세포 샘플과 같은 세포 샘플의 선택, 단리 및/또는 농축을 수행하는 것을 포함한다. 단리된 세포 집단은 일반적으로 복수개의 세포 집단, 일반적으로, 혈액 또는 혈액 유래 세포 집단, 예를 들어 조혈 세포, 백혈구(백혈구 세포), 말초혈액 단핵세포(PBMCs), 및/또는 면역계 세포, 예컨대 선천성 또는 후천성 면역세포 예컨대 골수성 또는 림프성 세포, 예컨대, 림프구, 일반적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 샘플은 성분채집술 또는 백혈구성분채집술 샘플이다. 몇몇 구체예에서, 선택, 단리 및/또는 농축은 샘플로부터의 세포의 양성 또는 음성 선택을 포함할 수 있다.

[0088] [0081] 몇몇 구체예에서, 샘플은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다. 특정 구체예에서, 샘플은 CD4⁺ 세포 집단 및 CD8⁺ T 세포 집단과 같은 복수개의 T 세포 집단들이 단리되어 있는 샘플이다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 단리는 CD4 발현 세포 또는 CD8 발현 세포에 대한 양성 선택 및/또는 골수 또는 B 세포 마커와 같은 비-T 세포 마커를 발현하는 세포의 음성 선택, 예컨대 CD14, CD19, CD56, CD20, CD11b, 및/또는 CD16를 발현하는 세포의 음성 선택을 포함한다.

[0089] [0082] 몇몇 구체예에서, 샘플은 T 세포 집단, 예컨대 온전한(whole) T 세포 또는 CD4+ 집단, 및 NK 세포 집단

을 포함하는 복수개의 집단을 함유하는 샘플이다. 농축, 단리 및/또는 선택될 수 있는 T 세포 집단들에는 비분획화(unfractionated) T 세포, 비분획화된 CD4+ 세포, 비분획화된 CD8+ 세포, 및 CD4+ 집단들 및/또는 CD8+ T 세포의 하위집단들, 예컨대 특정한 표면 마커 발현 프로파일에 기초하여 특정 서브타입의 세포를 농축 또는 고갈시킴으로써 생성되는 T 세포의 하위집단들이 포함된다.

[0090] [0083] 예컨대, 농축, 단리 및/또는 선택될 수 있는 T 세포의 서브타입 (예컨대, CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포)에는 기능, 활성 병태, 성숙도, 분화 잠재성, 증식, 재순환, 국소화, 및/또는 지속능, 항원-특이성, 항원 수용체의 종류, 특정 장기 또는 구획 내에서의 존재여부, 마커 또는 시토카인 분비 프로파일, 및/또는 분화도에 의해 정의되는 것들이 포함된다.

[0091] [0084] 농축, 단리 및/또는 선택될 수 있는 T 세포의 및/또는 CD4+의 및/또는 CD8+ T 세포의 서브타입 및 하위 집단들에는 나이브 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 그의 서브타입, 예컨대 줄기세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM), 또는 말단 분화된 이펙터 기억 T 세포, 종양-주입 림프구 (tumor-infiltrating lymphocyte: TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-관련 불변 T (MAIT) 세포, 자연발생적 및 후천조절적 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 소포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포가 포함된다.

[0092] [0085] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 샘플로부터 농축, 단리 및/또는 선택된 1 이상의 T 세포 집단들은 표면 마커와 같은 하나 이상의 특정 마커에 대해 양성(마커+) 또는 하나 이상의 특정 마커를 높은 수준으로 발현(마커^{하이}: markerhigh)하는 세포이거나 또는 하나 이상의 마커에 대해 음성(마커-) 또는 하나 이상의 마커를 상대적으로 낮은 수준으로 발현(마커^{로우}: markerlow)하는 세포이다. 몇몇 경우, 이러한 마커들은 특정한 T 세포 집단(예컨대 비-기억 세포)에서 상대적으로 낮은 수준으로 발현되거나 부재하지만 특정한 다른 T 세포 집단(예컨대 기억 세포)에서는 상대적으로 더 높게 발현되거나 존재하는 마커들이다. 일 구체예에서, 세포 (예컨대 CD8+ 세포 또는 T 세포, 예컨대, CD3+ 세포)를 CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127, 및/또는 CD62L에 대해 양성이거나 이들을 높은 표면 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축(즉 양성 선택)시키거나 및/또는 CD45RA에 대해 양성이거나 이를 높은 표면 수준으로 발현하는 세포를 고갈(예컨대, 음성 선택)시킨다. 몇몇 구체예에서, 세포를 CD122, CD95, CD25, CD27, 및/또는 IL7-R α (CD127)를 높은 수준으로 발현하거나 이들에 대해 양성인 세포에 대해 농축 또는 고갈시킨다. 몇 가지 예에서, CD8+ T 세포를 CD45RO에 대해 양성 (또는 CD45RA에 대해 음성)이고 CD62L에 대해 양성인 세포들로 농축시킨다.

[0093] [0086] 몇몇 구체예에서, CD4+ T 세포 집단 및 CD8+ T 세포 하위집단, 예컨대, 중심 기억 (TCM) 세포에 대해 농축된 하위집단.

[0094] [0087] 몇몇 구체예에서, 세포들은 내추럴 킬러(NK) 세포이다. 몇몇 구체예에서, 세포들은 단핵구, 또는 과립구, 예컨대, 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구, 및/또는 호염기구이다.

[0095] **2. 샘플**

[0096] [0088] 세포 및 세포 집단은 일반적으로 생물학적 샘플과 같은 샘플, 예컨대 특정 질병이나 병태를 갖거나 세포 치료법을 필요로 하는 또는 세포 치료법이 실시될 대상자로부터 획득 또는 유래된 샘플로부터 단리된다. 몇몇 측면에서, 대상자는 인간, 예컨대 특정 치료적 개체, 예컨대 세포가 단리, 프로세싱 및/또는 조작되는 입양세포 치료와 같은 치료적 개체를 필요로 하는 인간이다. 따라서, 몇몇 구체예에서 세포는 일차 세포, 예컨대 일차 인간 세포이다. 샘플에는 대상자로부터 직접 채취된 조직, 유액(fluid), 및 기타 세포 뿐만 아니라 분리, 원심분리, 유전자 조작 (예컨대 바이러스 벡터를 이용한 형질도입), 세척, 및/또는 인큐베이션과 같은 한 가지 이상의 프로세싱 단계의 결과 얻어지는 샘플이 포함된다. 생물학적 샘플은 프로세싱되는 샘플 또는 생물학적 공급원으로부터 직접 얻어지는 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플의 비제한적인 예로는 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 뇨 및 땀, 조직 및 장기 샘플 및 이들로부터 유래된 프로세싱된 샘플을 들 수 있다.

[0097] [0089] 몇몇 측면에서, 샘플은 혈액 또는 혈액-유래된 샘플이거나 또는 성분채집술 또는 백혈구성분채집술 생성물로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플로는 전혈, 말초혈액단핵 세포(PBMCs), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장연관 림프조직, 점막연관 림프조직, 비장, 기타 림프조직, 간, 폐, 위, 소장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도, 또는 기타 장기, 및/또는 이들로부터 유래된 세포를 들 수 있다. 예컨대, 입양세포 치료와 같은 세포 치료 맥락에서 샘플에는 예컨대 자가 공급원 및 동

종이계 공급원으로부터의 샘플이 포함된다.

[0098] [0090] 몇몇 구체예에서, 세포는 세포주, 예컨대, T 세포주로부터 유래된다. 몇몇 구체예에서 세포는 이종발생 (xenogeneic) 공급원, 예컨대 마우스, 래트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 취득된다.

[0099] **3. 세포 프로세싱, 제조 및 비-친화성-기반 분리**

[0100] [0091] 몇몇 구체예에서, 세포 또는 세포 집단들의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비-친화성 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 몇 가지 예에서, 세포들은 예컨대 원치 않는 성분들을 제거하고, 원하는 성분들을 농축시키거나, 특정 시약에 민감한 세포들을 용해 또는 제거하기 위한 1종 이상의 시약의 존재 하에, 세척, 원심분리, 및/또는 인큐베이션된다. 몇 가지 예에서, 세포들은 밀도, 흡착 특성, 크기, 민감성 및/또는 특정 성분에 대한 내성과 같은 하나 이상의 성질에 기반하여 분리된다.

[0101] [0092] 몇 가지 예에서, 대상자의 순환 혈액으로부터 예컨대 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 세포를 취득한다. 몇몇 측면에서 샘플은 림프구, 예컨대 T 세포, 단핵구, 과립구, B 그 밖에 유핵 백혈구 세포, 적혈구 세포, 및/또는 혈소판을 포함하며 몇몇 측면에서 적혈구 세포 및 혈소판 이외의 세포들을 함유한다.

[0102] [0093] 몇몇 구체예에서, 대상자로부터 수집된 혈액 세포들을 세척하여 예컨대 혈장 분획을 제거하고 후속 프로세싱 단계를 위하여 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣는다. 몇몇 구체예에서, 세포들을 인산완충염수(PBS)로 세척한다. 몇몇 구체예에서, 세척용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 다수의 또는 모든 2가 양이온을 결여한다. 몇몇 측면에서, 세척 단계는 제조사 지침에 따라 반자동화식 "병류(flow-through)" 원심분리 (예컨대, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)에 의해 달성된다. 몇몇 측면에서, 세척 단계는 제조사 지침에 따라 탄젠트 유동 여과(tangential flow filtration: TFF)에 의해 달성된다. 몇몇 구체예에서, 세포는 예컨대 Ca^{++}/Mg^{++} 가 없는 PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁된다. 특정 구체예에서, 혈액세포 샘플 성분들을 제거하고 세포들을 배양 배지에 직접 현탁시킨다

[0103] [0094] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 적혈구 세포의 용해 및 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통한 원심분리에 의해 말초혈액으로부터 백혈구 세포를 준비하는 것과 같은, 밀도-기반 세포 분리방법을 포함한다.

[0104] **4. 친화성 및/또는 마커 프로파일에 기초한 분리**

[0105] [0095] 몇몇 구체예에서, 분리 방법은 세포 내 하나 이상의 특이 분자, 예컨대 표면 마커, 예컨대 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 발현 또는 존재여부에 기초하여 상이한 세포 유형을 분리하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 마커에 기반한 공지의 분리 방법들이 이용될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 분리는 친화성- 또는 면역친화성-기반 분리이다. 예컨대, 몇몇 측면에서 단리는 세포 발현 또는 전형적으로 세포 표면 마커와 같은 하나 이상의 마커의 발현 수준에 기초하여 세포 및 세포 집단을 분리하는 것을 포함하며, 예컨대 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션한 다음, 일반적으로 세척 단계 및, 항체 또는 결합 파트너와 결합된 세포를 항체 또는 결합 파트너와 결합하지 않은 세포들로부터 분리함으로써 달성된다

[0106] [0096] 이러한 분리 단계는 시약과 결합한 세포가 추가 사용을 위해 유지되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포들이 유지되는 음성 선택에 기초할 수 있다. 몇 가지 예에서, 두 가지 분획 모두 추가 사용을 위해 유지된다. 몇몇 측면에서, 음성 선택은 소망되는 집단 이외의 세포에 의해 발현되는 마커에 기초하여 분리가 최선으로 수행되는 것인, 이종 집단 내의 세포 유형을 특이적으로 동정할 수 있는 항체가 없을 경우 특히 유용할 수 있다.

[0107] [0097] 분리에 의해 특정 마커를 발현하는 세포 특정 세포 집단 또는 세포가 반드시 100% 농축되거나 제거되는 것은 아니다. 예컨대, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 농축 또는 양성 선택은 그러한 세포의 갯수 또는 백분율을 증가시키는 것을 가리키는 것이지 그 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 반드시 결과시키는 것은 아니다. 마찬가지로, 예컨대 마커를 발현하는 것처럼 어떤 특정한 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의 갯수 또는 백분율을 감소시키는 것을 가리키는 것일 뿐 이러한 모든 세포의 완전한 제거를 반드시 결과시키는 것은 아니다. 예컨대, 몇몇 측면에서, CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 1종의 선택은 상기한 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 어느 하나를 농축시키는 것이지만 선택되지 않은 다른 세포를 소량 또는 적은 비율의 백분율로 함유할 수도 있으며, 몇몇 경우, 농축된 집단에는 CD4 또는 CD8 집단 중 선택되지 않은 다른 일방이 여전히 존재하기도 한다.

[0108] [0098] 몇 가지 예에서, 분리 단계를 복수 라운드로 수행하는데, 이 경우 어떤 한 단계로부터 양성 또는 음성 선택된 분획을 후속적인 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계로 처리한다. 몇 가지 예에서, 음성 선

택에 표적화된 마커에 대해 각각 특이적인 복수개의 항체 또는 결합 하트너와 세포를 함께 인큐베이션시킴으로써, 단일 분리 단계에 의해 복수개의 마커를 동시에 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다양한 세포 종류에서 발현되는 복수개의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 함께 인큐베이션시킴으로써 복수개의 세포 종류들을 동시에 양성 선택할 수 있다.

- [0109] [0099] 예컨대, 몇몇 측면에서, 예컨대, $CD28^+$, $CD62L^+$, $CCR7^+$, $CD27^+$, $CD127^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD45RA^+$, 및/또는 $CD45RO^+$ T 세포와 같은, 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 이에 대해 양성인 세포와 같은 T 세포의 특별한 하위집단이 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 단리된다.
- [0110] [0100] 예컨대, $CD3^+$, $CD28^+$ T 세포는 CD3/CD28 컨주게이트된 자기 비드 (예컨대, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)를 이용하여 양성 선택될 수 있다.
- [0111] [0101] 몇몇 구체예에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정 세포 집단에 대한 농축 또는 음성 선택에 의한 특정 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 몇몇 구체예에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 비교적 고수준 (마커^{하이})으로 또는 발현되는 (마커⁺) 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체 또는 기타 결합제와 세포를 함께 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0112] [0102] 몇몇 구체예에서, T 세포는 비-T 세포, 예컨대 B 세포, 단핵구 또는 기타 백혈구 세포, 예컨대 CD14 상에서 발현되는 마커들의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포의 단리, 선택 및/또는 농축을 포함한다. 일례에서, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포를 농축하기 위한 모노클로날 항체 각테일인 일반적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16 및 HLA-DR에 대한 항체들을 포함한다. 일례에서, 음성 선택에 의해 $CD8^+$ 집단을 농축하기 위해 CD14 및/또는 $CD45RA$ 를 발현하는 세포를 고갈시킨다. 몇몇 측면에서, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 선택 단계, 예컨대 $CD4$ 에 대한 양성 선택 및 $CD8$ 에 대한 양성 선택을 이용하여 $CD4^+$ 헬퍼 및 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 분리한다. 몇몇 측면에서 이러한 선택은 동시에 수행되며 또 다른 측면에서는 순차적으로(순서는 무방) 수행된다.
- [0113] [0103] 몇몇 측면에서, 이들 방법은 $CD4^+$ 세포에 대한 1차 양성 선택을 포함하며 여기서 상기 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포들($CD4^-$ 세포)은 $CD8^+$ 농축을 위한 2차 양성 선택에서 세포 공급원으로서 사용된다. 몇몇 측면에서, 이들 방법은 $CD8^+$ 세포에 대한 1차 양성 선택을 포함하며 여기서 상기 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포들($CD8^-$ 세포)은 $CD4^+$ 농축을 위한 2차 양성 선택에서 세포 공급원으로서 사용된다. 이러한 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 집단들은 1종 이상의 나이브, 메모리 및/또는 이펙터 T 세포 하위집단들에서 발현되거나 또는 비교적 고도로 발현되는 마커들을 양성 또는 음성 선택함으로써 하위집단으로 추가 소팅될 수 있다.
- [0114] [0104] 몇몇 구체예에서, $CD4^+$ 세포를 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해, 예컨대 이들 각각의 집단과 연계된 표면 항원에 기반한 양성 또는 음성 선택에 의해 추가로 농축 또는 고갈시킨다. $CD4^+$ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단의 동정에 의해 나이브, 중심 기억, 및 이펙터 세포로 소팅된다. $CD4^+$ 림프구는 표준방법에 의해 수득가능하다. 몇몇 구체예에서, 나이브 $CD4^+$ T 림프구는 $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ T 세포이다. 몇몇 구체예에서, 중심 기억 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^+$ 및 $CD45RO^+$ 이다. 몇몇 구체예에서, 이펙터 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^-$ 및 $CD45RO^+$ 이다.
- [0115] [0105] 몇몇 구체예에서, $CD8^+$ 세포를 나이브 중심 기억, 이펙터 기억, 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해, 예컨대 이들 각각의 하위집단과 연계된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해, 추가로 농축 또는 고갈시킨다. 몇몇 구체예에서, 효능 증가를 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 증식 및/또는 이식을 위해 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축이 수행되는데, 이는 몇몇 측면에서 이러한 하위집단들에서 특히 원기왕성하다. 참조 [Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82; Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]. 몇몇 구체예에서, T_{CM} -농축된 $CD8^+$ T 세포와 $CD4^+$ T 세포의 조합에 의해 효능이 추가로 향상된다.
- [0116] [0106] 몇몇 구체예에서, 기억 T 세포는 $CD8^+$ 말초 혈액 림프구의 $CD62L^+$ 및 $CD62L^-$ 서브세트 양쪽 모두에 존재한다. PBMC는 예컨대 항- $CD8$ 및 항- $CD62L$ 항체를 이용함으로써, $CD62L-CD8^+$ 및/또는 $CD62L^+CD8^+$ 분획을 농축 또

는 고갈시킬 수 있다.

- [0117] [0107] 몇몇 구체예에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 및/또는 CD127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초한다; 몇몇 측면에서, 이것은 CD45RA 및/또는 그랜자임(granzyme) B를 발현 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기반한다.
- [0118] [0108] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 예컨대 CD8의 표면 발현에 기초한 양성 선택에 의해 샘플로부터 CD8+ 세포의 단리, 선택 및/또는 농축을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이들 방법들은 추가로 중심 기억 T (T_{CM}) 세포를 농축하는 것을 더 포함할 수 있다. 일 측면에서, 농축된 CD8+ 세포는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 예컨대 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 및/또는 CD127 중 하나 이상에서 발현되는 마커를 1개 이상 선택함으로써 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대해 추가 농축될 수 있다. 선택은 CD4+ 세포의 단리, 선택 및/또는 농축 전 또는 농축 후에 수행될 수 있다. 몇가지 측면에서 이러한 선택은 동시에 수행되며 다른 측면에서는 순서와 관계없이 순차적으로 수행된다.
- [0119] [0109] 몇몇 측면에서, 이 방법들은 CD4+ 세포에 대해 1차 양성 선택하고 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포 (CD4- 세포)를 CD8+ 세포의 농축을 위한 2차 선택에서 세포 공급원으로서 사용하며, 농축 또는 선택된 CD8+ 세포를 3차 선택에 사용하여, 예컨대 CD45RO+, CD62L+, CCR7+, CD28+, CD3+, CD27+ 및/또는 CD127+ 세포를 농축하는 것과 같은 3차 선택에 의해, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에서 발현되는 1개 이상의 마커를 발현하는 세포를 추가 농축한다. 몇몇 측면에서, 이들 방법들은 CD8+ 세포에 대해 1차 양성 선택하고 1차 선택으로부터 선택되지 않은 세포 (CD8- 세포)를 CD4+ 세포의 농축을 위한 2차 선택에서 세포 공급원으로서 사용하며, 1차 선택으로부터 농축 또는 선택된 CD8+ 세포를 3차 선택에 사용하여, 예컨대 CD45RO+, CD62L+, CCR7+, CD28+, CD3+, CD27+ 및/또는 CD127+ 세포를 농축하는 제3 선택에 의해 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 발현되는 마커를 한 개 이상 발현하는 세포를 추가 농축한다.
- [0120] [0110] 몇몇 측면에서, T_{CM} 세포가 농축된 $CD8^+$ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈 및 CD62L를 발현하는 세포의 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축은 CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택 처리되는 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포들의 음성 분획으로부터 출발하여 수행된다. 몇몇 측면에서 이러한 선택은 동시적으로 수행되며 또 다른 측면에서는 순서와 상관없이 순차적으로 수행된다. 몇몇 측면에서, $CD8^+$ 세포 집단 또는 하위집단을 준비하는데 사용된 것과 동일한 CD4 발현-기반 선택 단계를, $CD4^+$ 세포 집단 또는 하위집단을 생성하는데도 이용함으로써, CD4-기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 양방 모두를 유지하여 후속 단계에서 이용할 수 있으며, 한 가지 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계를 임의로 더 실시할 수 있다.
- [0121] [0111] 특정 예에서, PBMCs 샘플 또는 기타 백혈구 세포 샘플을 $CD4^+$ 세포 선택 처리하여, 음성 분획과 양성 분획 양자 모두를 유지시킨다. 이어서 음성 분획을 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기반하여 음성 선택하고, 중심 기억 T 세포, 예컨대 CD62L 또는 CCR7에 특징적인 마커에 기초하여 양성 선택하되, 이 때 양성 선택과 음성 선택을 순서와 관계없이 수행한다.
- [0122] [0112] 몇몇 구체예에서, 전술한 방법에 의해, 세포 표면 마커 또는 마커들의 발현에 기반한 양성 또는 음성 선택에 의해서와 같이, 세포를 단리, 선택 및/또는 농축하는 방법에는 면역친화성-기반 선택이 포함될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 면역친화성-기반 선택은 CD4+ 및 CD8+ 세포를 함유하는 일차 인간 T 세포와 같은 세포를 함유하는 샘플을 세포 표면 마커 또는 마커들과 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항체 또는 결합 파트너는 아가로스, 자성 비드 또는 상자성 비드를 비롯하여, 예컨대 구체 또는 비드, 예컨대 마이크로비드, 나노비드와 같은 고체 지지체 또는 매트릭스에 결합되어 세포를 양성 및/또는 음성 선택으로 분리시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 구체 또는 비드를 컬럼에 충전하여 면역친화성 크로마토그래피를 실시할 수 있는데, 여기서 CD4+ 및 CD8+ 세포를 함유하는 일차 인간 T 세포와 같은 세포를 함유하는 샘플은 컬럼의 매트릭스와 접촉되고 이어서 그로부터 용리 또는 방출된다.
- [0123] **a. 면역친화성 비드(Immunoaffinity Beads)**
- [0124] [0113] 예컨대, 몇몇 구체예에서, 세포 및 세포 집단은 면역자성(또는 친화자성) 분리 기술에 의해 분리 또는 단리된다 (문헌 Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell

Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks 및 U. Schumacher " Humana Press Inc., Totowa, NJ에서 검토됨).

- [0125] [0114] 몇몇 측면에서, 분리하고자 하는 세포의 샘플 또는 조성물은 자성 반응성 입자 또는 마이크로입자, 예컨대 상자성 비드와 같이 자화가능하거나 또는 자성적으로 반응성인 소형 물질과 함께 인큐베이션된다. 자성적으로 반응성인 물질, 예컨대, 입자는 일반적으로 분리하고자 하는, 예컨대 양성 또는 음성 선택이 요구되는 세포 또는 세포 집단 상에 존재하는 예컨대 표면 마커와 같은 분자에 특이적으로 결합하는 항체와 같은 결합 파트너에 일반적으로 직접 또는 간접적으로 결합된다. 이러한 비드는 공지이며 다양한 공급원으로부터 상업적으로 구득가능하며, 이러한 공급원은 몇몇 측면에서, Dynabeads® (Life Technologies, Carlsbad, CA), MACS® beads (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) 또는 Streptamer® 비드 시약 (IBA, Germany)이다.
- [0126] [0115] 몇몇 구체예에서, 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 기타 결합 파트너와 같은 특이적인 결합 멤버에 결합된 자성적으로 반응성인 물질을 포함한다. 이 분야에는 자성 분리방법에 사용되는 자성적으로 반응성인 많은 물질들이 알려져 있다. 적절한 자성 입자에는 Molday의 미국특허 No. 4,452,773, 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B에 설명된 것들이 포함되며, 이들 문헌은 본 발명에 참조 통합되었다. 그 밖의 예로는 예컨대 Owen의 미국특허 No. 4,795,698, 및 Liberti 등의 미국특허 No. 5,200,084에 설명된 콜로이드 크기의 입자를 들 수 있다.
- [0127] [0116] 인큐베이션은 일반적으로 항체 또는 결합 파트너 또는 분자, 이러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하고 자성 입자 또는 비드에 결합된 예컨대 2차 항체 또는 기타 시약이 샘플 내 세포 상에 존재할 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 그러한 조건 하에서 수행된다.
- [0128] [0117] 몇몇 측면에서, 샘플은 자기장에 놓이며, 자성적으로 반응성인 세포 또는 그에 결합된 자화가능한 입자들이 자석에 이끌려 비표지 세포로부터 분리된다. 양성 선택의 경우, 자석에 유인되는 세포들이 유지된다; 음성 선택의 경우, 유인되지 않는 세포(비표지 세포)가 유지된다. 몇몇 측면에서, 동일한 선택 단계 동안 양성 및 음성 선택의 조합을 수행하여, 양성 및 음성 분획을 유지하여 추가 분리 단계로 처리하거나 또는 추가 프로세싱한다.
- [0129] [0118] 특정 구체예에서, 자성적으로 반응성인 입자들은 일차 항체 또는 기타 결합 파트너, 이차 항체, 렉틴, 효소, 또는 스트렙타아비딘에서 코팅된다. 특정 구체예에서, 자성 입자들은 하나 이상의 마커에 특이적인 일차 항체의 코팅을 통해 세포에 결합된다. 특정 구체예에서는 비드가 아닌 세포가 일차 항체 또는 결합 파트너로 표지된 다음, 세포-유형 특이적인 이차 항체- 또는 기타 결합 파트너(예컨대, 스트렙타아비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구체예에서, 스트렙타아비딘-코팅된 자성 입자들은 바이오티닐화된 일차 또는 이차 항체와 연계적으로 사용된다.
- [0130] [0119] 몇몇 구체예에서, 자성적으로 반응성인 입자들은 후속적으로 인큐베이션, 배양 및/또는 조작될 세포에 부착된 채로 방치된다; 몇몇 측면에서, 이들 입자들은 환자에 대한 투여를 위해 세포에 부착된 채로 방치된다. 몇몇 구체예에서, 자화가능한 또는 자성적으로 반응성인 입자들이 세포로부터 제거된다. 세포로부터 자화가능한 입자를 제거하는 방법은 공지이며 여기에는 예컨대 경쟁적 비-표지 항체의 사용, 자화가능한 입자 또는 절단가능한 링커에 컨주게이션된 항체의 사용, 등이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 자화가능한 입자들은 생분해성이다.
- [0131] [0120] 몇몇 구체예에서, 친화성-기반 선택은 자기-활성화 세포 소팅(MACS) (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 경유한다. 자기 활성화 세포 소팅(MACS) 시스템은 그에 결합된 자화된 입자들을 갖는 세포의 고순도 선택이 가능하다. 특정 구체예에서, MACS은 비표적 종 또는 표적 종이 외부 자기장 인가 후에 순차적으로 용리되는 방식으로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포들은 그 자리에 유지되는 반면 부착되지 않은 종들은 용리된다. 이어서, 이 1차 용리 단계가 종결된 후, 자기장에 포획된 종들 및 용리되지 않은 종들이 용리 및 회수가능한 몇몇 방식으로 방출된다. 특정 구체예에서, 비-표적 세포가 표지되어 이질적인 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0132] [0121] 몇몇 구체예에서, 친화성-기반 선택은 Streptamers®을 이용하는데 이것은 예컨대 1-2 μm의 마이크로비드 또는 나노비드와 같은 자기 비드로서, 예컨대 Strep-Tactin® 또는 Strep-Tactin XT®와 같은 스트렙타아비딘 돌연변이체를 경유하여 항체와 같은 결합 파트너 면역친화성 시약에 컨주게이션된다 (예컨대 미국특허 No. 6,103,493, 국제공개 PCT 출원 Nos. WO/2013011011, WO 2014/076277 참조). 몇몇 구체예에서, 스트렙타아비딘 돌연변이체는 관능화되어 비드 상에 코팅 및/또는 고정화된다.
- [0133] [0122] 몇몇 구체예에서, 스트렙타아비딘 돌연변이체는 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO:14에 제시된 비변형 또는 야생형 스트렙타아비딘과 같은 비변형 또는 야생형 스트렙타아비딘보다, 예컨대 SEQ ID NO:5 및/또는 SEQ ID

NO:6 (예컨대 Strep-tag II®)과 같은 SEQ ID NOS:1-6 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 펩타이드 리간드에 대해 더 높은 결합 친화성을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 돌연변이체는 동일한 펩타이드에 대한 야생형 스트렙트아비딘의 결합 친화성보다 친화성이 5배, 10배, 50배, 100배, 200배 또는 그 이상 더 큰 펩타이드에 대한 친화성 상수와 같은 결합 친화성을 나타낸다.

[0134] [0123] 스트렙트아비딘 뮤테인은 야생형 스트렙트아비딘 또는 그의 단편과 같은 비변형 스트렙트아비딘과 비교하여 1개 이상의 아미노산 차이를 함유한다. 용어 "비변형 스트렙트아비딘"은 1개 이상의 변형이 가해진 출발 폴리펩타이드를 가리킨다. 몇몇 구체예에서, 출발 또는 비변형 폴리펩타이드는 SEQ ID NO:11에 제시된 야생형 폴리펩타이드일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 비변형 스트렙트아비딘은 N- 및/또는 C-말단에서 단축된 야생형 스트렙트아비딘의 단편이다. 이러한 최소(minimal) 스트렙트아비딘에는 SEQ ID NO:117의 아미노산 위치 10 내지 16의 영역에서 N-말단적으로 시작되어 SEQ ID NO:11의 아미노산 위치 133 내지 142의 영역에서 C-말단적으로 종결되는 것들이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 비변형 스트렙트아비딘은 SEQ ID NO:14에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 구체예에서, SEQ ID NO:14에 제시된 것과 같은 비변형 스트렙트아비딘은 SEQ ID NO:11에 제시된 넘버링에 따를 때 Ala13에 상응하는 위치에서 N-말단 메티오닌을 추가로 함유할 수 있다. 본 명세서에서 제공되는 스트렙트아비딘 중의 잔기 번호는 SEQ ID NO:11의 잔기 번호를 참조한 것이다.

[0135] [0124] "스트렙트아비딘 뮤테인," "스트렙트아비딘 돌연변이체" 또는 이들의 변이체라는 용어는 예컨대 SEQ ID NO: 11 또는 SEQ ID NO:14에 제시된 스트렙트아비딘과 같은 비변형 또는 야생형 스트렙트아비딘과 비교하여 1개 이상의 아미노산 차이를 함유하는 스트렙트아비딘 단백질을 가리킨다. 이러한 1개 이상의 아미노산 차이는 아미노산 돌연변이, 예컨대 1개 이상의 아미노산 대체(치환), 삽입 또는 결실일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 야생형 또는 비변형 스트렙트아비딘에 비해 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 아미노산 차이를 가질 수 있다. 몇몇 구체예에서, 아미노산 대체(치환)은 보존적 또는 비보존적 돌연변이이다. 1개 이상의 아미노산 차이를 함유하는 스트렙트아비딘 뮤테인은 펩타이드 리간드 (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag®라고도 칭해지며, SEQ ID NO:5에 제시됨)에 대해 $2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 를 초과하는 친화성 상수로서의 결합 친화성을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 돌연변이체는 펩타이드 리간드 (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag® II라고도 칭해지며, SEQ ID NO:6에 제시됨)에 대해 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 보다 더 큰 친화성 상수로서의 결합 친화성을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 결합 친화성은 예컨대 후술하는, 기술분야에 알려진 공지 기술에 의해 구할 수 있다.

[0136] [0125] 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 하나 이상의 잔기 44, 45, 46, 및/또는 47에서 돌연변이를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 돌연변이체는 잔기, 예컨대 SEQ ID NO: 12 또는 SEQ ID NO:15에 제시된 예시적인 스트렙트아비딘 뮤테인에 제시되는 것과 같은 잔기 Val44-Thr45-Ala46-Arg47을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 SEQ ID NO: 13 또는 16에 제시된 것과 같은 예시적인 스트렙트아비딘 뮤테인에 제시된 것과 같은 잔기 Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 SEQ ID NO: 12, 13, 15 또는 16에 제시된 아미노산 세트의 서열, 또는 SEQ ID NO:12, 13, 15 또는 16에 제시된 아미노산 세트의 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내며, 펩타이드 리간드 (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag®라고도 칭하며, SEQ ID NO:5에 제시됨)에 대해 $2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 을 초과하는 결합 친화성을 나타내거나 및/또는 펩타이드 리간드 (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag® II라고도 칭하며, SEQ ID NO:6에 제시됨)에 대해 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 을 초과하는 결합 친화성을 나타내는 서열을 나타낸다.

[0137] [0126] 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 국제공개 PCT 출원 Nos. WO 2014/076277에 설명된 돌연변이체이다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 SEQ ID NO:11에 제시된 아미노산 위치를 참조할 때 아미노산 위치 44 내지 53의 영역에 적어도 2개의 시스테인 잔기를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 상기 시스테인 잔기는 위치 45 및 52에 존재하여 이들 아미노산들을 연결하는 다이설파이드 브릿지를 만든다. 이러한 구체예에서, 아미노산 44는 일반적으로 글리신 또는 알라닌이고 아미노산 46은 일반적으로 알라닌 또는 글리신이며 아미노산 47은 전형적으로는 아르기닌이다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 SEQ ID NO:11에 제시된 아미노산 위치를 참조할 때 아미노산 잔기 115 내지 121의 영역에서 적어도 1개의 돌연변이 또는 아미노산 차이를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 아미노산 위치 117, 120 및 121에서 적어도 1개의 돌연변이 및/또는 아미노산 118 및 119의 결실 및 적어도 아미노산 위치 121에서의 치환을 함유한다.

[0138] [0127] 몇몇 구체예에서, 스트렙트아비딘 뮤테인은 결과적인 스트렙트아비딘 뮤테인이 펩타이드 리간드 (Trp

Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag®라고도 칭해지며, SEQ ID NO:5에 제시됨)에 대해 $2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 를 초과하는 결합 친화성을 나타내거나 및/또는 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the 펩타이드 리간드 (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag®II라고도 칭해지며, SEQ ID NO:6에 제시됨)에 대해 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 를 초과하는 결합 친화성을 나타내는 한, 전술한 돌연변이들을 어떠한 조합으로든 함유할 수 있다.

[0139] [0128] 몇몇 구체예에서, 펩타이드 리간드 결합 시약에 대한 스트렙타비딘 돌연변이체의 결합 친화성은 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 또는 $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 를 초과하지만, 일반적으로는 $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 또는 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 미만이다.

[0140] [0129] 몇몇 구체예에서, 스트렙타비딘 돌연변이체는 비제한적인 예로서 바이오틴, 이미노바이오틴, 리포산, 테스티오바이오틴, 디아미노바이오틴, HABA (히드록시아조벤젠-벤조산) 또는/및 디메틸-HABA와 같은 다른 스트렙타비딘 리간드에 대한 결합 역시도 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 바이오틴 또는 테스티오바이오틴과 같은 또 다른 스트렙타비딘 리간드에 대해, 펩타이드 리간드 (Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly; Strep-tag®라고도 칭해지며, SEQ ID NO:5에 제시됨) 또는 펩타이드 리간드 (Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys; Strep-tag® II라고도 칭해지며, SEQ ID NO:6에 제시됨)에 대한 스트렙타비딘 뮤테인의 결합 친화성보다 더 큰 친화성을 나타낸다.

[0141] [0130] 몇몇 구체예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 멀티머이다. 멀티머는 미국특허 출원 No. US2004/0082012에 공개된 내용과 같이 종래기술분야에 공지인 여하한 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 뮤테인의 올리고머 또는 폴리머는 예컨대 텍스트란과 같은 다당류에 카르복실 잔기를 도입함으로써 제조될 수 있다. 그 다음 몇몇 측면에서, 스트렙타비딘 뮤테인을 내부 라이신 잔기의 일차 아미노기를 통해 커플링시키거나 및/또는 제2 단계에서 통상적인 카르보디이미드 화학을 이용하여 텍스트란 백본 중의 카르복실기에 유리 N-말단을 커플링시킨다. 몇몇 구체예에서, 상기 커플링 반응은 텍스트란 1몰 당 약 60몰의 스트렙타비딘 돌연변이체의 몰 비율로 수행한다. 몇몇 구체예에서, 올리고머 또는 폴리머는 글루타르디알데하이드와 같은 이관능성 링커를 경유한 가교에 의해 또는 기타 공지 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0142] [0131] 몇몇 측면에서, 면역친화성 비드, 예컨대 Streptamer® 또는 기타 면역친화성 비드는, 다음과 같은 하이브리도마로부터 유래되거나 생산된 항체를 함유할 수 있다: OKT3 ("CD3), 13B8.2 ("CD4), OKT8 ("CD8), FRT5 ("CD25), DREG56 ("CD62L), MEM56 ("CD45RA). 몇몇 구체예에서, 이들 항체들은 어느 것이든 고도로 가변적인 CDR 영역을 표적화함이 없이 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 골격 내에서 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 몇몇 측면에서 이러한 항체의 예로는 미국특허 No. 7,482,000 및 *Bes et al.* (2003) *J. Biol. Chem.*, 278:14265-14273에 설명된 것과 같은 항-CD4 항체를 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, Fab 단편과 같은 항원-결합 단편을, 예컨대 중쇄 및 경쇄의 고가변성(hypervariable) 서열의 증폭 및 적절한 불변 도메인을 코딩하는 서열과 조합되도록 클로닝시키는 등의 공지 방법을 이용하여 항체로부터 만들어낼 수 있다. 몇몇 구체예에서, 불변 도메인은 인간 서브클래스 IgG1/ κ 이다. 이러한 항체들은 예컨대 SEQ ID NO:10에 제시된 것과 같은 펩타이드 스트렙타비딘 결합 분자와 카르복시-말단적으로 융합될 수 있다. 이러한 항체의 예는 Stemberget et al. (2102) *PLoS One*, 7:35798 및 국제 PCT출원 No. W02013/011011에 설명되어 있다.

[0143] [0132] 몇몇 구체예에서, 비드 또는 기타 표면에 회합 또는 코팅된 세포 표면 마커에 특이적으로 결합하는 항체는 전장 항체이거나 또는 그의 항원-결합 단편으로서, 여기에는 (Fab) 단편, F(ab')₂ 단편s, Fab' 단편, Fv 단편, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 가변 중쇄(V_H) 영역, 단쇄 항체 단편, 예컨대 단쇄 가변 단편 (scFv), 및 단일 도메인 항체 (예컨대, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 항체는 Fab 단편이다. 몇몇 구체예에서, 항체는 1가, 2가 또는 다가이다. 몇몇 구체예에서, 항체, 예컨대 Fab는 멀티머이다. 몇몇 구체예에서, Fab 멀티머와 같은 항체는, 세포 표면 마커와 다가 복합체를 형성한다.

[0144] [0133] 몇몇 구체예에서, 스트렙타머와 연계된 Fab와 같은 항체는 결합 친화성의 특정한 키네틱 척도(예컨대 해리 상수, K_D, 결합 상수 K_A, 오프-비율(off-rate) 또는 결합 친화성의 기타 키네틱 파라미터)를 나타낸다. 이러한 척도는 통상의 기술자에게 알려진 결합 분석법을 이용하여 구할 수 있다. 특정 예에서, 친화성-기반 바이오센서 기술이 결합 친화성의 척도로서 이용된다. 예시적인 바이오센서 기술로는, 예컨대, Biacore technologies, BioRad ProteOn, Reichert, GWC Technologies, IBIS SPIR Imaging, Nomadics SensiQ, Akubio RAPid, ForteBio Octet, IAsys, Nanofilm 등을 들 수 있다(예컨대 Rich et al. (2009) *Analytical Biochemistry*, 386:194-216

참조). 몇몇 구체예에서, 결합 친화성은 형광 적정 또는 적정 열량측정법에 의해 구해진다.

[0145] [0134] 몇몇 구체예에서, Fab와 같은 항체는, 세포 상의 세포 표면 마커에 대한 결합에 대해 약 $0.5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $1 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $2 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $3 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$, 약 $1 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $1.5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $2 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $3 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $4 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$, 약 $1 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$, 또는 약 $5 \times 10^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 또는 그 이상을 초과하는 k_{off} 비율 (해리 비율 상수라고도 칭함)을 나타낸다. 특정한 k_{off} 비율로 당해 항체 시약이 세포 표면 마커에 대한 그의 결합을 통해 세포와의 상호작용으로부터 해리할 수 있는 비율을 알아낼 수 있다 (예컨대 국제공개 PCT 출원 No. WO/2013011011 참조). 예컨대, 몇몇 측면에서, k_{off} 범위는 특정 적용 또는 선택 또는 농축된 세포의 용도에 따라, 예컨대, 세포 표면으로부터 결합된 항체를 제거하기 위한 요구, 세포의 배양 또는 인큐베이션 시간, 세포 및 기타 인자에 대한 민감성과 같은 인자에 따라 선택될 수 있다. 일 구체예에서, 항체가 예컨대 $4.0 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 를 초과하는 높은 k_{off} 비율을 가질 경우, 다가 결합 복합체의 파괴 후, 대부분의 항체가 1 시간 이내에 제거될 수 있는데, 이는 몇몇 측면에서, 복합체의 반감기 $T_{1/2}$ 를 고려할 때 56분 이내에 복합체 농도가 원래 농도의 25%까지 감소되기 때문으로, 충분한 희석으로 인해 재결합 효과는 무시해도 된다). 또 다른 구체예에서, k_{off} 비율이 예컨대 $1.0 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 로 낮은 항체의 경우, 표면으로부터 항체의 75%를 제거하는데 예를 들어 약 또는 대략 212분 또는 3시간 반이 소요 됨으로 해서 해리가 더 길어질 수 있다.

[0146] [0135] 몇몇 구체예에서, Fab와 같은 항체는, 세포 상의 세포 표면 마커에 대한 결합에 대한 해리 상수(K_a)가 약 10^{-2} M 내지 약 10^{-8} M , 또는 약 10^{-2} M 내지 약 10^{-9} M , 또는 약 10^{-2} M 내지 약 $0.8 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-2} M 내지 약 $0.6 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-2} M 내지 약 $0.4 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-2} M 내지 약 $0.3 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-2} M 내지 약 0.2×10^{-9} , 또는 약 10^{-2} M 내지 약 $0.15 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-2} 내지 약 10^{-10} 의 범위 일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 어떤 세포 상의 세포 표면 마커에 대한 결합 해리 상수(K_a)는 약 10^{-7} M 내지 약 10^{-10} M , 또는 약 10^{-7} M 내지 약 $0.8 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 10^{-7} M 내지 약 $0.6 \times 10^{-9} \text{ M}$, 약 10^{-7} M 내지 약 $0.3 \times 10^{-9} \text{ M}$, $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 내지 약 10^{-10} M , 또는 약 $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 내지 약 $0.15 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 내지 약 $0.3 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 내지 약 $0.6 \times 10^{-9} \text{ M}$, 또는 약 $1.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 내지 약 $0.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ 의 범위일 수 있다.

[0147] [0136] 몇몇 구체예에서, 면역친화성 시약 예컨대 Fab와 같은 항체는 스트렙트아비딘 돌연변이체에 결합할 수 있는 펩타이드 리간드와 같은 펩타이드 리간드에 직접 또는 간접적으로 링크된다 (예컨대 미국특허 No. 5,506,121 참조). 몇몇 구체예에서, 이러한 펩타이드는 SEQ ID NOS:1-6 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 면역친화성 시약, 예컨대 Fab와 같은 항체는, SEQ ID NO:6에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 펩타이드 리간드에 직접 또는 간접적으로 링크된다.

[0148] [0137] 몇몇 구체예에서, 면역친화성 시약, 예컨대 Fab와 같은 항체는, 적어도 2개의 스트렙트아비딘-결합 분자의 순차 배치를 함유하는 펩타이드 서열과 직접 또는 간접적으로 융합되는데, 여기서 상기 2개의 모듈 간의 거리는 적어도 0 및 50 이하의 아미노산이며, 이 때 하나의 결합 모듈은 3 내지 8 아미노산을 함유하고 적어도 서열 His-Pro-Xaa (SEQ ID NO:1)을 함유하며, 여기서 Xaa는 글루타민, 아스파리긴, 또는 메티오닌이고, 다른 결합 모듈은 SEQ ID NO:3에 제시된 것과 같은 동일 또는 상이한 스트렙트아비딘 펩타이드 리간드의 서열을 갖는다 (예컨대 국제공개 PCT 출원 No. W002/077018; 미국특허 No. 7,981,632 참조). 몇몇 구체예에서, 예컨대 Fab와 같은 항체와 같은 면역친화성 시약에 직접 또는 간접적으로 융합된 펩타이드 리간드는, SEQ ID NO: 7 또는 8 중 어느 하나에 제시된 포물러를 갖는 서열을 함유한다. 몇몇 구체예에서, 이 펩타이드 리간드는 SEQ ID NOS: 9, 10 또는 17-19 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 갖는다.

[0149] [0138] 별법으로, 예컨대 Wilson et al. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98 (2001), 3750-3755)에 설명된 것과 같은 기술분야에 공지인 스트렙트아비딘-결합 펩타이드를 사용할 수도 있다. 몇몇 구체예에서는, 펩타이드가 단백질의 N- 및/또는 C-말단에 융합된다.

[0150] [0139] 몇몇 구체예에서는, 스트렙트아비딘 돌연변이체에 결합할 수 있는 펩타이드 리간드에 융합된 Fab와 같은

항체를 스트렙트아비딘-돌연변이체 함유 비드와 접촉시켜 비드를 항체로 코팅한다. 몇몇 구체예에서는, 농축 또는 선택하고자 하는 세포를 함유하는 샘플과 이러한 비드를 접촉시킴으로써 상기 코팅된 비드를 설명된 바와 같은 농축 및 선택 방법에 사용할 수 있다.

[0151] [0140] 몇몇 구체예에서, 펩타이드 리간드 결합 파트너와 스트렙트아비딘 뮤테인 결합 시약 간의 결합은 가역적이다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드 리간드 결합 파트너와 스트렙트아비딘 뮤테인 결합 시약 간의 결합은 예컨대 전술한 바와 같이 높지만, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체에 대한 스트렙트아비딘 결합 시약의 결합 친화성보다는 낮다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 바이오틴 (비타민 H) 또는 바이오틴 유사체를 첨가하여 비드 상의 스트렙트아비딘 뮤테인 결합 시약과 표면 상의 세포 표면 마커에 특이적으로 결합된 항체와 연계된 펩타이드 리간드 결합 파트너 간의 결합 상호작용을 파괴하는 결합을 두고 경쟁시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 상호반응은 저농도의 바이오틴 또는 유사체, 예컨대 0.1 mM 내지 10 mM, 0.5 mM 내지 5 mM 또는 1 mM 내지 3 mM, 예컨대 일반적으로 적어도 또는 약 적어도 1 mM 또는 적어도 2 mM, 예를 들어 약 2.5 mM의 바이오틴 또는 유사체의 존재하에 역전될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 예컨대 바이오틴 또는 바이오틴 유사체와 같은 경쟁 물질의 존재하에서 인큐베이션할 경우 선택된 세포로부터 비드가 방출된다.

[0152] **b. 면역친화성 크로마토그래피**

[0153] [0141] 몇몇 구체예에서, 친화성-기반 선택은 면역친화성 크로마토그래피를 이용한다. 면역친화성 크로마토그래피 방법은 몇몇 측면에서, 미국 특허출원 No. US2015/0024411에 설명된 1종 이상의 크로마토그래피 매트릭스를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 방법은 유체 크로마토그래피, 일반적으로 액체 크로마토그래피이다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피는 병류 방식(flow through mode)으로, 즉 단리하고자 하는 세포를 함유하는 유체 샘플을 예컨대 중력 유동 또는 크로마토그래피 매트릭스를 함유하는 컬럼의 한쪽 말단에서 펌프에 의해 적용하는 방식으로 수행되며, 이 때 유체 샘플은 컬럼의 반대쪽 말단에 존재하는 것이다. 이에 더해, 몇몇 측면에서, 크로마토그래피는 "상향 및 하향" 방식으로도 수행될 수 있는데 여기서는 단리하고자 하는 세포를 함유하는 유체 샘플이, 예컨대 피펫 선단에 충전된 크로마토그래피 매트릭스를 함유하는 컬럼의 한쪽 말단에서 피펫에 의해 적용되고, 컬럼의 반대쪽 말단 크로마토그래피 매트릭스/피펫 선단에서는 유체 샘플이 유입되어 존재한다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피는 또한 회분식 모드로 수행될 수도 있는데, 여기서는 예컨대 진탕, 회전 또는 반복적인 접촉 하에 크로마토그래피 재료(정지상)가 세포를 함유하는 샘플과 인큐베이션되며 예컨대 피펫 수단에 의해 유체 샘플이 제거된다.

[0154] [0142] 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 정지상이다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피는 컬럼 크로마토그래피이다. 몇몇 구체예에서, 적절한 크로마토그래피 재료는 어느 것이든 이용가능하다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 고체 또는 반 고체상의 형태를 갖는다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 폴리머 수지 또는 금속 산화물 또는 메탈로이드 산화물을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 비자성 재료 또는 비자화성 재료이다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 유도된 실리카 또는 가교된 겔, 예컨대 다당류와 같은 천연 폴리머 형태이다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 아가로스 겔이다. 크로마토그래피 매트릭스에 사용하기 위한 아가로스 겔은 기술분야에 공지이며 몇몇 측면에서 이의 예로는, SuperflowTM 아가로스 또는 Sepharose 재료 예컨대 SuperflowTM Sepharose®를 들 수 있는데 이들은 다양한 비드 및 포어 크기로 상업적으로 구득가능하다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 텍스트라이 공유 결합된 특정한 가교 아가로스 매트릭스로서, 예컨대 몇몇 측면에서, 기술분야에 알려진 Sephadex®, Superdex® 또는 Sephacryl®이 다양한 비드 및 포어 크기로 구득가능하다.

[0155] [0143] 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 합성 폴리머, 예컨대 폴리아크릴아미드, 스티렌-디비닐벤젠 겔, 아크릴레이트와 디올과의 코폴리머 또는 아크릴아미드와 디올의 코폴리머, 다당류 및 아가로스와의 코폴리머, 예컨대 폴리아크릴아미드/아가로스 복합체, 다당류 및 N, N'-메틸렌비스카릴아미드, 또는 합성 또는 천연 폴리머에 커플링된 유도화 실리카를 들 수 있다.

[0156] [0144] 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스, 예컨대 아가로스 비드 또는 기타 매트릭스는 크기가 적어도 또는 약 적어도 50 μm, 60 μm, 70 μm, 80 μm, 90 μm, 100 μm, 120 μm 또는 150 μm 또는 그 이상이다. 크기 배제 크로마토그래피 매트릭스의 크기 제한은 샘플 중의 표적 세포 예컨대 T 세포의 최대 폭 미만이 되도록 선택된다. 몇몇 구체예에서, 매트릭스의 부피는 적어도 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL 또는 그 이상이다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스는 컬럼 내로 충전된다.

[0157] [0145] 몇몇 구체예에서, 면역친화성 크로마토그래피 매트릭스인 크로마토그래피 매트릭스에는 예컨대 항체 또는 항체 또는 Fab와 같은 항원-결합 단편은 친화성 시약이 고정되어 있다. 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대

Fab는 전술한 것이면 어느 것이든 무방하며 몇몇 측면에서 기술분야에 공지인 항체, 특별한 k_{off} 비율을 갖는 항체 및/또는 특정 해리상수(K_a)를 갖는 항체일 수 있다.

- [0158] [0146] 몇몇 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab와 같은 친화성 시약은 고정된다. 몇몇 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab와 같은 친화성 시약은 매트릭스 상에 고정된 결합 시약과 상호반응하는 결합 파트너와 융합되거나 이에 링크된다. 몇몇 구체예에서, 크로마토그래피 매트릭스의 결합 능력은 적어도 1×10^7 세포/mL, 5×10^7 세포/mL, 1×10^8 세포/mL, 5×10^8 세포/mL, 1×10^9 cells/ml 또는 그 이상을 흡수 또는 흡착하기에 충분하며, 이 때 상기 세포는 항체 또는 Fab와 같은 친화성 시약에 의해 특이적으로 인식되는 세포 표면 마커를 발현하는 세포이다.
- [0159] [0147] 몇몇 구체예에서, 결합 시약과 결합 파트너 간의 상호반응은 가역적 결합을 형성함으로써, 매트릭스에 대한 항체의 결합 역시 가역적이다. 몇몇 구체예에서, 가역적 결합은 스트렙타아비딘 돌연변이체 결합 파트너와 매트릭스 상에 고정된 결합 시약에 의해 매개될 수 있는데, 상기 결합 파트너는 스트렙타아비딘, 스트렙타아비딘 유사체 또는 뮤테인, 아비딘 또는 아비딘 유사체 또는 뮤테인이다
- [0160] [0148] 몇몇 구체예에서, 친화성 시약, 예컨대 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab의 가역적 결합은 면역친화성 비드와 관련하여 전술한 바와 같이, 펩타이드 리간드 결합 시약 및 스트렙타아비딘 뮤테인 상호반응을 경유한다. 크로마토그래피 매트릭스 맥락에서, 아가로스 비드 또는 기타 매트릭스와 같은 매트릭스는 상기에서 예컨대 SEQ ID NOS: 12, 13, 15 또는 16에 제시된 것과 같은, 스트렙타아비딘 뮤테인과 컨주게이션되거나 관능화된다. 몇몇 구체예에서, 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab는 전술한 바와 같이, 스트렙타아비딘 돌연변이체에 결합할 수 있는 펩타이드 리간드에 직접 또는 간접적으로 융합 또는 링크된다. 몇몇 구체예에서, 펩타이드 리간드는 SEQ ID NOS:1-10 또는 17-19 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 펩타이드와 같은 것이다. 몇몇 구체예에서는, 크로마토그래피 매트릭스 컬럼을 친화성 시약, 예컨대 항체 또는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab와 접촉시켜 친화성 시약을 컬럼에 가역적으로 결합시키거나 고정시킨다.
- [0161] [0149] 몇몇 구체예에서, 면역친화성 크로마토그래피 매트릭스는 농축 또는 선택하고자 하는 세포를 함유하는 샘플과 상기 매트릭스를 접촉시키는 전술한 바와 같은 농축 및 선택 방법에 이용가능하다. 몇몇 구체예에서, 선택된 세포는 결합 파트너/결합 시약의 상호반응 파괴에 의해 매트릭스로부터 용리 또는 방출된다. 몇몇 구체예에서, 결합 파트너/결합 시약은 펩타이드 리간드 및 스트렙타아비딘 돌연변이체 상호반응에 의해 매개되며, 방출 또는 선택된 세포는 가역적 결합의 존재로 인해 실시가능하다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 펩타이드 리간드 결합 파트너와 스트렙타아비딘 뮤테인 결합 시약 간의 결합은 전술한 바와 같이 강하지만, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체에 대한 스트렙타아비딘 결합 시약의 결합 친화성 보다는 낮다. 그러므로, 몇몇 구체예에서는, 매트릭스 상의 스트렙타아비딘 뮤테인 결합 시약과 표면 상의 세포 마커에 특이적으로 결합된 항체와 연계된 펩타이드 리간드 결합 파트너 간의 결합 상호반응의 파괴를 위한 결합을 두고 경쟁하도록 바이오틴 (비타민 H) 또는 바이오틴 유사체를 첨가할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 이러한 상호반응은 저농도의 바이오틴 또는 유사체의 존재, 예컨대 0.1 mM 내지 10 mM, 0.5 mM 내지 5 mM 또는 1 mM 내지 3 mM, 예컨대 일반적으로 적어도 또는 약 적어도 1 mM 또는 적어도 2 mM, 예를 들어 또는 약 2.5 mM의 양으로 존재에 의해 역전될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체와 같은 경쟁 물질의 존재 하에서 용리시키면 매트릭스로부터 선택된 세포가 방출된다.
- [0162] [0150] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 따라 면역친화성 크로마토그래피는 작동적으로 연결된 적어도 2개의 크로마토그래피 매트릭스 컬럼을 이용하여 수행됨으로써, 예컨대 Fab와 같은 항체와 같은 CD4 또는 CD8 중 어느 하나에 대한 친화성 물질 또는 결합제가 1차 선택 컬럼의 1차 크로마토그래피 매트릭스에 커플링되고, 예컨대 Fab와 같은 항체와 같은 CD4 또는 CD8 중 다른 하나에 대한 친화성 물질 또는 결합제가 1차 선택 컬럼의 1차 크로마토그래피 매트릭스에 커플링된다. 몇몇 구체예에서, 이러한 적어도 2개의 크로마토그래피 매트릭스 컬럼은 멸균된 폐쇄 시스템 또는 장치와 같은 폐쇄 시스템 또는 장치에 존재한다.
- [0163] [0151] 몇몇 구체예에서, 작동적으로 연결된 적어도 2개의 크로마토그래피 매트릭스 컬럼을 함유하는 폐쇄 시스템 또는 장치가 제공되며 이에 따라, 예컨대 Fab와 같은 항체와 같은 CD4 또는 CD8 중 어느 하나에 대한 친화성 물질 또는 결합제가 1차 선택 컬럼의 1차 크로마토그래피 매트릭스에 커플링되고, 예컨대 Fab와 같은 항체와 같은 CD4 또는 CD8 중 다른 하나에 대한 친화성 물질 또는 결합제가 1차 선택 컬럼의 1차 크로마토그래피 매트릭스에 커플링된다. 이러한 시스템 및 방법의 예는 도 1A 및 도 1B, 그리고 실시예에 설명되어 있다.
- [0164] [0152] 몇몇 구체예에서, 폐쇄 시스템은 자동화된 것이다. 몇몇 구체예에서, 시스템과 연계된 부품에는 시스템

의 다양한 부분들 간의 유체 흐름을 제어하기 위한 일체형 마이크로컴퓨터, 연동 펌프, 다양한 밸브, 예컨대 핀치 밸브 또는 스톱콕이 포함될 수 있다. 몇몇 측면에서 일체형 컴퓨터는 장비의 모든 부품들을 제어하여 시스템으로 하여금 표준화된 시퀀스로 공정을 반복 수행하게 할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 연동 펌프는 튜빙 세트를 통해 유속을 조절하고 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 흐름을 통제한다.

[0165] [0153] 도 1A 및 도 1B를 참조하면, 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1 중에 제1 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 1차 친화성 매트릭스 3은 i) 튜빙 또는 밸브 13을 통해 2차 선택 컬럼 2 중에 제2 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 2차 친화성 매트릭스 4에 작동적으로 커플링됨으로 해서, 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통과하였으나 제1 친화성 물질 또는 결합제와는 결합되지 않은 세포들이 2차 친화성 매트릭스 내로 통과할 수 있고 및 ii) 배양 용기 12와 같은 아웃풋 용기에 작동적으로 커플링되어, 예컨대 1차 친화성 매트릭스로부터 이러한 세포의 용리 및 방출 후, 제1 친화성 물질 또는 결합제에 결합된 1차 친화성 매트릭스로부터 선택된 세포를 선택한다. 몇몇 구체예에서, 2차 선택 컬럼 2 중에 제2 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 2차 친화성 매트릭스 4는 예컨대 배양 용기 12와 같은 아웃풋 용기에 작동적으로 커플링되어, 예컨대 2차 친화성 매트릭스로부터 이러한 세포의 용리 및 방출 후, 제2 친화성 물질 또는 결합제에 결합된 2차 친화성 매트릭스로부터 선택된 세포를 수집한다. 몇몇 구체예에서, 2차 선택 컬럼 2는 바이오틴과 같은 용리 시약에 예컨대 10^{-10} M^{-1} 을 초과하는 높은 친화성으로 결합가능한, 스트렙타비딘 돌연변이체와 같은 결합 시약을 함유하는 제거 챔버 9를 통해, 예컨대 배양 용기 12와 같은 아웃풋 용기에 작동적으로 연결된다.

[0166] [0154] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1 및 2차 선택 컬럼 2의 크기, 예컨대 길이 및/또는 직경은 같거나 다를 수 있다. 몇몇 구체예에서, 1차 컬럼 1 또는 2차 컬럼 2 중 어느 하나의 크기, 예컨대 길이 및/또는 직경은 다른 한 컬럼의 크기에 비해 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 5배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 이상 더 크다.

[0167] [0155] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1 중에 제1 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 1차 친화성 매트릭스 3은 또한 튜빙 및 밸브 13을 통해 3차 선택 컬럼 15 중 제3 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 3차 친화성 매트릭스 17에 작동적으로 연결됨으로 해서, 제1 친화성 물질 또는 결합제 상에 결합된 1차 친화성 매트릭스로부터 선택된 세포들이 예컨대 1차 친화성 매트릭스로부터 그러한 세포의 용리 및 방출 후, 3차 친화성 매트릭스 내로 통과할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1은 바이오틴과 같은 용리 시약에 예컨대 10^{-10} M^{-1} 을 초과하는 높은 친화성으로 결합가능한, 스트렙타비딘 돌연변이체와 같은 결합 시약을 함유하는 제거 챔버 9를 통해, 3차 선택 컬럼 15에 작동적으로 연결된다. 몇몇 구체예에서, 3차 선택 컬럼 15 중에 제3 친화성 물질 또는 결합제를 함유하는 3차 친화성 매트릭스 17은 또한 예컨대 배양 용기 12와 같은 아웃풋 용기와도 작동적으로 커플링되어, 예컨대 3차 친화성 매트릭스로부터 (및 이전의 1차 친화성 매트릭스로부터) 이러한 세포의 용리 및 방출 후, 제3 친화성 물질 또는 결합제에 결합된 (및 이전의 제1 친화성 물질 또는 결합제에 결합된) 3차 친화성 매트릭스로부터 선택된 세포를 수집한다. 몇몇 구체예에서, 3차 선택 컬럼 15는 바이오틴과 같은 용리 시약에 예컨대 10^{-10} M^{-1} 을 초과하는 높은 친화성으로 결합가능한, 스트렙타비딘 돌연변이체와 같은 결합 시약을 함유하는 제거 챔버 9를 통해, 배양 용기 12와 같은 아웃풋 용기에 작동적으로 연결된다.

[0168] [0156] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1 및 3차 선택 컬럼 15의 크기, 예컨대 길이 및/또는 직경은 같거나 다를 수 있다. 몇몇 구체예에서, 1차 컬럼 1 또는 3차 컬럼 15 중 어느 하나의 크기, 예컨대 길이 및/또는 직경은 다른 한 컬럼의 크기보다 적어도 1.2배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 5배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 이상 더 크다.

[0169] [0157] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1은 세포 샘플을 1차 선택 컬럼 내를 통해 제공하도록, 예컨대 튜빙, 밸브 및 펌프 8을 경유하여, 세포 샘플 5를 함유하는 저장소에 작동적으로 커플링된다.

[0170] [0158] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1은 또한 1차 선택 컬럼 내의 1차 크로마토그래피 매트릭스 내로 세척 완충액 또는 용리 완충액을 각각 통과시킬 수 있도록, 예컨대 튜빙 및 밸브를 통해, 세척 완충액을 함유하는 세척 저장소 6 및/또는 용리액을 함유하는 용리 저장소 7과도 작동적으로 커플링된다. 몇몇 구체예에서, 1차 및 2차 선택 컬럼 간의 작동가능한 연결로 인해, 세척 완충액 및/또는 용리 완충액은 2차 컬럼을 통해 작동적으로 통과할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 1차 3차 선택 컬럼 간의 작동적 연결로 인해, 세척 완충액 및/또는 용리 완충액은 3차 선택 컬럼을 통해 작동적으로 통과할 수 있다.

[0171] [0159] 몇몇 구체예에서, 2차 선택 컬럼 2는 또한 1차 선택 컬럼 내의 1차 크로마토그래피 매트릭스 내로 세척 완충액 또는 용리 완충액을 각각 통과시킬 수 있도록, 예컨대 튜빙 및 밸브를 통해, 세척 완충액을 함유하는 세

척 저장소 6 및/또는 용리액을 함유하는 용리 저장소 7과도 작동적으로 커플링된다.

[0172] [0160] 세척 완충액은 인산완충염수와 같이, 세포와 공존가능한 생리완충액이면 어느 것이든 무방하다. 몇몇 구체예에서, 세척 완충액은 소혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 또는 재조합 인간 혈청 알부민을, 예컨대 0.1% 내지 5% 또는 0.2% 내지 1%, 예컨대 약 0.5%의 농도로 함유한다. 몇몇 구체예에서, 용리액은 바이오틴 또는 바이오틴 유사체, 예컨대 테스바이오틴이며, 그 양은 예를 들어 적어도 약 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM, 4 mM, 또는 5 mM이다.

[0173] [0161] 몇몇 구체예에서, 1차 선택 컬럼 1 중의 1차 친화성 매트릭스 3은 예컨대 1차 친화성 매트릭스 상의 고정을 위해, 제1 친화성 물질 또는 결합제, 예컨대 항체, 예컨대 Fab를 함유하는 제1 친화성 시약 저장소 (예컨대 Fab 저장소) 18에 튜빙 및 밸브를 통해 작동적으로 연결되어 있다. 몇몇 구체예에서, 2차 컬럼 2 중의 2차 친화성 매트릭스 4는 예컨대 2차 친화성 매트릭스 상의 고정을 위해, 제2 친화성 물질 또는 결합제, 예컨대 항체, 예컨대 Fab를 함유하는 제2 친화성 물질 또는 결합제 저장소 (예컨대 Fab 저장소) 19에 튜빙 및 밸브를 통해 작동적으로 연결되어 있다. 몇몇 구체예에서, 3차 선택 컬럼 15 중의 3차 친화성 매트릭스 17은 예컨대 2차 친화성 매트릭스 상의 고정을 위해, 제3 친화성 물질 또는 결합제, 예컨대 항체, 예컨대 Fab를 함유하는 제3 친화성 물질 또는 결합제 저장소 (예컨대 Fab 저장소) 20에 튜빙 및 밸브를 통해 작동적으로 연결되어 있다.

[0174] [0162] 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 친화성 시약은 CD4 또는 CD8에 특이적으로 결합되되, 여기서 1차 및 2차 친화성 시약은 동일하지 않다. 몇몇 구체예에서, 3차 친화성 시약은 나이브, 휴지 또는 중심 기억 T 세포 상의 마커에 특이적으로 결합하거나 또는 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD27 및/또는 CD127 마커에 특이적으로 결합한다.

[0175] **5. 생성된 조성물의 농축 및 비율**

[0176] [0163] 몇몇 구체예에서, 전술한 방법을 이용하여 1차 및 2차 선택을 수행하면 1차 세포 표면 마커를 발현하는 1차 세포 집단과 2차 세포 표면 마커를 발현하는 2차 세포 집단이 각각 샘플로부터 농축된다. 특정 예에서, 농축된 세포의 1차 및/또는 2차 집단은 CD4+ 세포에 대해 농축된 세포 집단일 수 있고, 다른 농축 집단, 즉 1차 또는 2차 세포 집단 중 다른 하나는 CD4+에 대해 농축된 집단일 수 있다. 전술한 바와 같이, 몇몇 구체예에서, 3차, 4차 또는 그 이상의 후속 선택을 실시하여 1차, 2차 또는 후속 농축에서 앞서 농축된 세포 집단으로부터 추가적인 세포의 하위집단, 예컨대 CD4+ 세포의 하위집단 및/또는 CD8+ 세포의 하위집단을 더 농축할 수 있다.

[0177] [0164] 몇몇 구체예에서, 이 방법에 의해 예컨대 CD4+ 세포가 농축된 세포 집단 및 CD8+ 세포가 농축된 세포 집단과 같이, 농축된 세포의 1차 및 2차 집단을 함유하는 세포의 농축 조성물이 생산된다. 몇몇 구체예에서, 세포의 농축 조성물은 배양 개시 조성물로 지정되어 예컨대 농축된 세포의 인큐베이션, 자극, 활성화, 조작 및/또는 제형화를 포함하는 후속적인 프로세싱 단계와 같은 후속 프로세싱 단계에 사용된다. 몇몇 구체예에서, 인큐베이션, 자극, 활성화, 조작 및/또는 제형화를 포함하는 후속적인 프로세싱 단계와 같은 추가적인 후속 프로세싱 단계에 이어, 몇몇 측면에서 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 함유하는 유전자 조작된 세포를 함유할 수 있는 아웃풋 조성물이 생성된다.

[0178] [0165] 몇몇 구체예에서, 세포의 농축 조성물은 전술한 바와 같이 출발 샘플로부터 농축된 세포로서, 출발 샘플 중의 세포 갯수는 배양-개시 조성물과 같은, 농축된 조성물 중의 소망되는 세포 갯수보다 적어도 더 많은 것이다. 몇몇 구체예에서, 출발 샘플 중의 세포 갯수는 농축된 조성물 중의 세포의 소망되는 갯수보다 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 500%, 1000%, 5000% 또는 그 이상 더 많은 것이다. 몇 가지 예에서, 농축된 CD4+ 세포, CD8+ 세포 또는 그의 하위집단을 포함하여 농축된 집단 중의 세포의 소망되는 갯수는 적어도, 1×10^6 세포, 2×10^6 세포, 4×10^6 세포, 6×10^6 세포, 8×10^6 세포, 1×10^7 세포, 2×10^7 세포, 4×10^7 세포, 6×10^7 세포, 8×10^7 세포, 1×10^8 세포, 2×10^8 세포, 4×10^8 세포, 6×10^8 세포, 8×10^8 세포, 1×10^9 세포 또는 그 이상이다. 몇몇 구체예에서, 출발 샘플 중의 세포 갯수는 적어도 1×10^8 세포, 5×10^8 세포, 1×10^9 세포, 2×10^9 세포, 3×10^9 세포, 4×10^9 세포, 5×10^9 세포, 6×10^9 세포, 7×10^9 세포, 8×10^9 세포, 9×10^9 세포, 1×10^{10} 세포 또는 그 이상이다.

[0179] [0166] 몇몇 구체예에서, 농축된 조성물 중의 1차 및/또는 2차 집단 또는 그의 하위집단의 수율(yield), 즉 출발 샘플 중의 동일한 세포 집단 또는 세포 하위집단의 갯수와 비교한 집단 또는 하위집단 중의 농축된 세포의 갯수는, 10% 내지 100%, 예컨대 20% 내지 80%, 20% 내지 60%, 20% 내지 40%, 40% 내지 80%, 40% 내지 60%, 또는 60%, 내지 80%이다. 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 세포 집단 또는 그의 하위집단의 수율은 70% 미만,

60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만 또는 20% 미만이다.

- [0180] [0167] 몇몇 구체예에서, 농축된 조성물 중 1차 및/또는 2차 세포 집단 또는 그 세포의 하위집단의 순도, 즉 농축된 세포의 집단 중의 총 세포에 대한, 선택된 세포 표면 마커에 대해 양성인 세포 백분율은 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%이고, 일반적으로 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이다.
- [0181] [0168] 몇몇 구체예에서, 세포의 농축 조성물, 예컨대 배양-개시 조성물은 CD4⁺ 세포 대 CD8⁺ 세포의 비율을 배양-개시 비율로서 함유한다. 배양-개시 비율은 소망되는 아웃풋 비율 또는 투여량이 결과되도록, 비율 또는 투여량이 예컨대 환자에게 투여하는데 적합하도록, 또는 인큐베이션 및/또는 조작 단계 종결시 또는 기타 프로세싱 단계 및/또는 해동 및/또는 대상자에게 투여 직전에 허용 오차 범위 또는 허용차 범위 이내에 들도록 설계된 것으로, 그 세포의 비율 또는 갯수로 2 종류의 세포 또는 분리된 세포 집단이 배양-개시 조성물에 포함되는 그러한 세포의 비율 또는 갯수이다. 본 발명에 따른 방법의 구체예에서, 1차 및/또는 2차 선택, 그의 하위집단들에 대한 선택은, 선택된 배양-개시 비율을 결과시키는 방식으로 수행된다. 이러한 방법의 예를 이하에 실시예를 통해 설명한다.
- [0182] **a. 배양-개시 비율 및 갯수**
- [0183] [0169] 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 또는 그의 하위집단 대 CD8⁺ 세포 또는 그의 하위집단의 배양-개시 비율은 약 10:1 내지 약 1:10, 또는 약 5:1 내지 약 1:5, 또는 약 2:1 내지 약 1:2이다. 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 또는 그의 하위집단 대 CD8⁺ 세포 또는 그의 하위집단의 배양-개시 비율은 약 1:1이다.
- [0184] [0170] 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포, 또는 그의 하위집단에 대한 배양-개시 비율은 대상자로부터의 샘플 중의 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포 또는 그의 하위집단들의 비율과는 다르다. 몇몇 구체예에서, 대상자로부터의 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 비율은 1:1 내지 14:1 CD4⁺:CD8⁺ 세포이고, 일반적으로 약 1.5:1 내지 약 2.5:1 CD4⁺:CD8⁺ 세포인 것으로 보고되었다. 몇몇 구체예에서, 예컨대 혈액 샘플과 같은 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 비율은 약 2:1 CD4⁺:CD8⁺ 세포이다. 몇몇 구체예에서, 혈액 샘플과 같은 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 비율은 약 1:1이다. (예컨대 Amadori, A et al., *Nature Med.* 1: 1279-1283, 1995; Chakravarti, A., *Nature Med.* 1: 1240-1241, 1995; Clementi, M., et al., *Hum. Genet.* 105: 337-342, 1999 참조.) 몇몇 구체예에서, subject 비율은 1:1 CD4⁺:CD8⁺ 세포이다. (예컨대 Muhonen, T. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1994 Jan;15(1):67-73 참조.). 몇몇 구체예에서, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 125%, 적어도 150, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 또는 적어도 500% 이상이거나 또는 대상자로부터의 샘플 중의 CD4⁺ to CD8⁺ 세포의 비율보다 적은 것이다.
- [0185] [0171] 몇몇 구체예에서는, 1차 및/또는 2차 선택 수행 전에, 대상자로부터의 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 비율을 구한다. 대상자에 따라 다를 수 있는 대상자에 있어서의 특정한 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포 비율에 기초하여, 대상자에 맞게 특정한 선택 방식을 개별적으로 맞춰서, 예컨대 면역친화성시약의 양이나 농도를 선택하거나 크로마토그래피 컬럼의 크기를 택하여 소망되는 또는 선택된 배양-개시 비율을 달성할 수 있다. 대상자에 있어서 다양한 세포집단의 상대적인 수준 또는 빈도는 이러한 집단들 또는 하위집단 상에 존재하는 마커 또는 마커들의 표면 발현 평가에 기초하여 알아낼 수 있다. 표면 마커 또는 단백질의 발현 수준을 평가하기 위한 몇 가지 공지 방법을 이용할 수 있으며 이에 친화성-기반 방법, 예컨대 유세포 분석법과 같은, 세포표면 단백질 맥락에서 면역친화성-기반 방법을 들 수 있다.
- [0186] [0172] 어떤 맥락에서, 특정 세포 유형에 대한 적절한 배양-개시 비율은 예를 들어 특정 질병, 병태, 또는 세포가 유래된 대상자가 종전에 받은 치료, 및/또는 세포의 특정한 항원-특이성, 다양한 하위집단들의 특정 유형(예컨대, CD8⁺ T 세포)간의 상대적인 표시, 예컨대 이펙터 세포 대 기억 세포 대 나이브 세포, 및/또는 세포가 인큐베이션되는 하나 이상의 조건, 예컨대 배지, 자극제, 배양시간, 완충제, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 항원, 시토키인, 항체 및 기타 성분들에 따라 달라질 수 있다. 그러므로, 일반적으로 또는 전형적으로 다른 세포에 비해 더 급속하게 증식 또는 성장하는 것으로 알려진 세포 유형이 모든 관점에서 항상 그러한 특성을 나타내리라고 할 수는 없다. 따라서, 몇몇 측면에서, 일반적 또는 전형적인 관점에서 세포 종류의 공지 능력, 그 세포의 표현형 또는 병태를 평가와 함께 세포가 유래된 대상자 및/또는 실험 증거를 모두 함께 고려하여 배양-개시 비율을 구한다.
- [0187] [0173] 몇몇 구체예에서, 배양-개시 비율은 그 농도로 존재하는 것으로 알려지거나 구해진 특정한 세포 종류에

대해 이들 공지의 한 가지 이상의 특성에 기초한다. 몇몇 구체예에서, 배양-개시 조성물 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율은 CD4⁺ 대 CD8⁺의 소망되는 아웃풋 비율에 대해 각각 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 초과이거나 미만이다.

[0188] [0174] 몇몇 구체예에서, 예컨대, 몇몇 맥락에서 CD4⁺ 세포는 특정한 자극 조건 하에서 인큐베이션될 경우 CD8⁺ 세포에 비해 증식 또는 성장이 덜하거나 그 속도가 덜한 것으로 알려져 있다. 예컨대 문헌[Foulds et al. (2002) *J Immunol.* 168(4): 1528-1532; Caggiari et al. (2001) *Cytometry.* 46(4) 233-237; Hoffman, et al. (2002) *Transplantation.* 74(6): 836-845; 및 Rabenstein et al. (2014) *J Immunol.* 2014년 3월 17일 인쇄 전 온라인 배포, doi: 10.4049/jimmunol.1302725] 참조. 따라서, 몇몇 예에서, 배양-개시 조성물 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율은 소망되는 아웃풋 비율의 10배 또는 100배이다. 예컨대, 만일 1:1 (또는 50%/50%) CD4/CD8 아웃풋 비율이 소망되는 경우, 특정한 기간에 걸쳐 성장 비율의 차이를 상쇄하기 위해 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단들은 일례로 배양-개시 조성물 중에 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 또는 100:1의 비율로 포함될 수 있다. CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 중 하나 또는 그의 하위집단과 다른 하나의 속도 또는 성장 차이에 기초하여, 통상의 기술자는 특정한 자극 또는 활성화 조건을 따라 소망되는 아웃풋 비율을 달성하기 위해 배양-개시 비율을 실험적으로 결정할 수 있다.

[0189] [0175] 배양-개시 비율은 소망되는 아웃풋 비율과 반드시 동일하거나 근사하지 않아도 된다. 예컨대, 만일 조작된 CD4⁺ 및 CD8⁺ (예컨대, CAR-발현) T 세포를 1:1 비율 또는 특정 오차 범위 이내로 투여하고자 할 경우, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 1:1이 아닌 경우가 흔하다. 몇몇 구체예에서, 소망되는 아웃풋 비율을 야기하는 배양 개시 비율은 예컨대 세포 공급원, 배양하고자 하는 세포 종류, 세포를 투여하고자 하는 환자, 세포가 단리 또는 유래된 대상자 또는 대상자들, 예컨대 그 대상자가 걸린 질병이나 병태, 치료하고자 하는 질병, 배양 조건 및 기타 파라미터에 따라 달라진다.

[0190] [0176] 몇몇 구체예에서, 배양 개시 비율은 세포들의 각 하위집단의 조성에 기초한다. 특정 구체예에서, 배양 개시 비율은 당해 집단이 유전자 조작되기 전에 걸린 배양 기간에 기초한다. 몇몇 구체예에서, 배양 개시 비율은 세포의 각 집단의 증식 속도에 기초한다.

[0191] [0177] 또 다른 측면으로서, 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 배양-개시 비율 또는 갯수를 구하는 것을 더 포함한다. 몇몇 구체예에서는, 세포, 세포 종류 및 세포 집단들의 적절한 비율, 투여량, 및 갯수를 알아내기 위한 단계 및 방법들이 제공된다. 예컨대, CD4⁺/CD8⁺ 세포, 집단들, 및/또는 하위집단들의 비율을 구하고 이러한 세포 및 서브타입의 적절한 투여량을 알아내는 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서는, 소망되는 결과를 달성하기 위해, 배양-개시 조성물과 같은 조성물에 포함될 세포 종류 또는 세포 집단의 적절한 비율이나 갯수를 알아내기 위한 방법이 제공된다. 몇몇 측면에서, 이러한 비율 또는 갯수는 소망되는 아웃풋 비율 또는 투여량을 달성하기 위한 인큐베이션 또는 조작 단계에서 이용되도록 설계된다. 몇몇 구체예에서, 대상자 또는 환자에게 투여하기 위한 세포, 세포 종류 또는 집단들의 비율, 및/또는 그의 세포 갯수를 구하는 방법이 제공된다.

[0192] [0178] 몇몇 구체예에서, 선택된 배양 개시 비율은 배양 조건 하 인큐베이션시 배양 중 세포 또는 세포 종류의 각 집단의 생존 및/또는 증식 또는 성장을 위한 여러가지 상이한 세포 종류 또는 집단들의 상대적인 능력(예컨대 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포)에 기초한다. 따라서, 몇몇 측면에서는, 배양 개시를 위한 최적 비율을 구하기 위하여, 테스트 인큐베이션에 이어, 예컨대 인큐베이션 및/또는 냉동보존 또는 냉동 단계 및/또는 그러한 절차 후 해동 단계에 후속되는 특정 시점 또는 시점들, 예컨대 투여 직전, 예컨대 병상 현장에서 투여 직전에 측정 또는 평가된다. 시험관내(*in vitro*) 또는 생체외(*ex vivo*) 세포 증식 속도 또는 생존률을 구하는 공지의 방법들은 유세포분석법 예컨대 인큐베이션에 앞서 카르복실플루오레신 디아세테이트 숙신이미딜 에스테르(CFSE) 또는 유사한 형광 염료로 표지한 다음, 유세포 분석에 의해 형광강도를 평가하거나, 및/또는 Annexin V 또는 세포자멸사(apoptotic) 세포 상의 마커를 인식하는 다른 화합물에 대한 세포 결합 및/또는 프로피디움 요오다이드 또는 7AAD와 같은 DNA 인터칼레이팅 제제의 흡수의 평가 및/또는 유세포분석에 의한 증식 또는 세포자멸사의 척도로서의 세포 주기 단계의 평가를 포함한다.

[0193] [0179] 몇몇 구체예에서, 배양-개시 비율은 특정 테스트 조건 하에서 테스트 조성물 중 2가지 분리된 세포 집단 예컨대 하위집단을 상이한 비율로 인큐베이션하고, 일정 기간 후 달성된 아웃풋 비율과 같은 한 가지 이상의 결과를 평가함으로써 구한다. 몇몇 측면에서, 상기 조건은 자극 조건, 예컨대 배양 및/또는 조작 단계에서 배양-

개시 조성물이 인큐베이션될 조건에 근사한 조건이다. 예컨대, 몇몇 측면에서 테스트 조성물은 투여를 위하여 조작되는 조성물과 같은, 궁극적인 조성물의 제조 또는 생산에 이용될 인큐베이션 및/또는 조작 단계에서 사용될 파라미터들과 동일한 자극 물질, 배지, 완충제, 가스 함량 중 하나 이상 예컨대 각각의 존재 하에, 및/또는 동일한 종류의 용기에, 및/또는 기간 동안 투여된다.

[0194] [0180] 테스트 배양-개시 조성물에 대한 예시적인 테스트 비율은 약 90%/10%, 80%/20%, 70%/30%, 60/40%, 50/50%, 40/60%, 30/70%, 20%/80%, 및 10%/90%, 또는 0.1:1, 0.5:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2., 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 또는 약 1:1.5, 또는 약 1:0.1, 1:0.4, 1:0.7, 1:0.8, 1:0.8, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 또는 1.5:1, 또는 그 이상이다.

[0195] [0181] 어떤 맥락에서, 생산 말기에 소망되는 CD4:CD8 비율을 달성하기 위한 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 적절한 배양-개시 비율은 특정한 단리된 세포 생성물 중의 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 분획의 하위 집단에 기초하여 결정되며, 예컨대 나이브, 이펙터, 및 다양한 기억 구획(compartments)의 존부 및/또는 백분율이 특정한 단리된 조성물에 나타난다. 이러한 평가는 세포 상의 다양한 표면 마커의 존부 또는 수준을 예컨대 유세포 분석법에 의해 탐지함으로써 구할 수 있다.

[0196] [0182] 몇몇 구체예에서, 배양 개시 비율은 각 세포 집단의 표현형에 기초한다. 특정 구체예에서, 배양 개시 비율은 배양 조건(예컨대 배지 조성, 성장인자, 자극물질, 및/또는 기타 물질의 존재 및/또는 부재, 온도, 환기 조건 등)에 기초한다.

[0197] [0183] 본 명세서에 설명된 방법들의 몇몇 구체예에서, 배양 개시 비율에 의해 CD4⁺ : CD8⁺ 세포 비율 또는 이러한 서브타입의 갯수 또는 총 세포 갯수가 소망되는 비율 또는 투여량의 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30% 약 35%, 약 40%, 약 45% 또는 약 50% 이내에 드는 아웃풋 조성물이 생산되며, 상기 수치는 상기 수치값 사이의 범위도 포괄하는 것이다. 본 발명의 몇몇 구체예 방법에서, 배양 개시 비율에 의해 CD4⁺:CD8⁺ 세포의 소망되는 비율 또는 이러한 세포의 투여량은 시간의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 이상 이내에 달성되며, 상기 수치는 상기 수치값 사이의 범위도 포괄하는 것이다. 본 발명의 방법의 특정 구체예에서, 배양 개시 비율에 의해 적어도 80% 이내의 시간에서 소망되는 아웃풋 비율의 20% 이내로 아웃풋 조성물 중의 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포 비율이 달성된다. 본 발명에 설명된 방법들 중 몇몇 구체예에서, 아웃풋 조성물은 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포 비율을 소망되는 아웃풋 비율의 허용차 이내로 포함하되, 상기 허용차는 전술한 바와 같이, 예컨대 복수개 비율로 1명 이상의 대상자에게 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포를 투여함으로써 구한다.

[0198] **b. 아웃풋 비율 및 투여량**

[0199] [0184] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 세포의 인큐베이션, 자극, 활성화, 조작 및/또는 제형화와 같은, 배양-개시 조성물의 1가지 이상의 프로세싱 단계에 이어 아웃풋 조성물이 얻어진다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포, 또는 그의 하위집단을 소망되는 비율로, 즉 약 2:1 내지 약 1:5, 약 2:1 내지 약 1:2, 약 1.5:1 내지 약 1:5, 약 1.5:1 내지 약 1:2, 또는 약 1:1 및 내지 약 1:2의 비율로 달성하거나 결과시키기 위해 수행된다. 몇몇 구체예에서, 아웃풋 조성물 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 소망되는 아웃풋 비율은 1:1 또는 약 1:1이다.

[0200] [0185] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 아웃풋 조성물, 예컨대 유전자 조작된 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 또는 그의 하위집단을 함유하는 조성물로서, 조성물 또는 그의 하위집단 중의 CD4+ 대 CD8+ 세포의 아웃풋 비율이 약 2:1 및 내지 약 1:5, 약 2:1 내지 약 1:2, 약 1.5:1 내지 약 1:5, 약 1.5:1 내지 약 1:2, 또는 약 1:1 내지 약 1:2인 아웃풋 조성물을 생산 또는 생성한다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포를 1:1 또는 약 1:1의 아웃풋 비율로 함유하는 아웃풋 조성물을 생산 또는 생성한다.

[0201] [0186] 몇몇 구체예에서, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 아웃풋 비율은 예컨대 임상 면역요법과 연관되는 것과 같이, 면역요법용 T 세포의 투여량의 일부로서 소망되는 비율이다.

[0202] [0187] 몇몇 구체예에서, 세포 종류 또는 집단들의 소망되는 투여량, 예컨대 소망되는 세포 갯수 및/또는 소망되는 아웃풋 비율 (예컨대, 환자에게 치료 투여하는데 최적인 비율)이 탐지된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은

소망되는 아웃풋 또는 투여 비율 또는 투여량으로부터의 허용 오차 또는 허용차, 예컨대 조작된 조성물과 같은 주어진 조성물 중 그 비율이 소망되는 아웃풋 비율로부터 변동가능하지만 여전히 소망되는 결과, 예컨대 대상자나 환자에 있어서 허용가능가능한 안전성 정도, 특정 질병 또는 병태의 치료 효능 또는 기타 치료 효과를 나타내는 오차 한계를 구하는 단계를 포함한다.

[0203] [0188] 몇몇 구체예에서, 소망되는 투여량, 비율 및/또는 허용 오차는 치료하고자 하는 질병이나 병태, 대상자, 세포 공급원, 예컨대 그 세포가 특정 병태 또는 질병에 걸린 대상자로부터 유래한 것인지 및 그 세포가 자가 또는 동종이계 이식을 위한 것인지, 예컨대 그 세포들이 입양세포 치료에서 당해 세포를 제공받을 대상자로부터 단리된 것인지 및/또는 그 대상자가 그러한 종류의 치료이지만 다른 치료 대상자의 세포를 제공받는 것인지 등에 따라 달라진다. 몇몇 구체예에서, 비율, 갯수, 및/또는 허용차 또는 허용 오차는 당해 세포의 하나 이상의 기타 특성, 예컨대 증식속도, 생존능, 특정 마커의 발현 또는 시토키인과 같은 인자의 분비, 또는 인큐베이션 및 조작 단계에 앞서 분리된 특정 하위집단들에 따라 달라진다. 몇 가지 예에서, 소망되는 비율 및/또는 허용 오차 또는 허용차는 대상자의 연령, 성별, 건강 및/또는 체중, 질병 소질의 지표로서의 바이오마커, 대상자에게 공동 투여되거나 이전에 투여된 치료법에 따라 달라질 수 있다.

[0204] [0189] 몇몇 구체예에서, 소망되는 비율, 투여량, 및/또는 허용 오차는 관심 대상 세포 종류 또는 집단들을 상이한 비율 또는 상이한 갯수로 각기 함유하는 다양한 테스트 조성물들을 테스트 대상자에게 투여한 다음, 안전성, 치료 효능, 생체내(in vivo) 세포 농도 또는 국소화, 및/또는 기타 소망되는 결과를 나타내는 파라미터와 같은 하나 이상의 결과 또는 파라미터를 평가함으로써 구하여진다.

[0205] [0190] 몇몇 구체예에서 테스트 대상자는 비인간 동물, 예컨대, 일반적인 동물이거나 또는 질병, 예컨대 그 세포 투여에 의해 치료하고자 하는 질병 또는 병태의 동물 모델이다. 몇몇 구체예에서, 테스트 대상자에게 투여하기 위한 다양한 테스트 비율은 하나의 세포 종류 또는 서브타입(예컨대, CD4⁺ T 세포 또는 그의 서브타입) 및 다른 세포 종류(예컨대, CD8⁺ T 세포 또는 NK 세포 또는 그의 서브타입)의 백분율로서 표시할 경우, 약 90%/10%, 80%/20%, 70%/30%, 60%/40%, 50%/50%, 40%/60%, 30%/70%, 20%/80%, 및 10%/90%이며, 상기 수치 사이의 수치 값들도 포함된다. 상기 비율들은 상대적 백분율 또는 그 밖의 다른 포맷, 예컨대 약 0.1:1, 0.5:1, 0.7:1, 0.8:1, 0.9:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2., 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 또는 그 이상, 또는 약 1:1.5, 또는 약 1:0.1, 1:0.4, 1:0.7, 1:0.8, 1:0.8, 1.1:1, 1.2:1, 1.3:1, 1.4:1, 또는 1.5:1, 또는 그 이상으로 나타낼 수도 있으며 이들 수치 사이의 수치 범위도 포함된다. 몇몇 구체예에서, 테스트 대상자는 인간이다. 몇몇 구체예에서, 소망되는 비율은 특정한 최적 효과를 갖는 테스트 대상자들에서의 평균(average), 평균(mean), 또는 중앙(median) 비율이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 비율은 안전성 대 효능의 최적 균형을 달성하게 하는 비율이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 비율 또는 투여량은 모든 테스트 비율 또는 투여량에서 최고 효능을 달성하면서 안전성 역치를 유지하는 비율 또는 투여량이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 비율 또는 투여량은 최고의 안전성을 달성하면서 효능 역치 또는 효능 범위를 유지하는 비율 또는 투여량이다. 몇몇 경우에서, 최적 비율 또는 투여량은 범위로서, 예컨대 한 세포 종류 대 다른 세포 종류의 1:1 내지 1:2 범위 비율 또는 kg 체중 당 10⁴ 내지 10⁹ 또는 10⁵ 내지 10⁶ 세포로 표시된다.

[0206] [0191] 몇몇 구체예에서, 허용 오차는 각 백분율 조합의 치료 효능 및/또는 안전성 평가를 위해 모니터링된 소망되는 평균 테스트 대상자로부터의 편차에 기초하여 구해진다. 몇몇 구체예에서, 허용 오차는 소망되는 비율의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 이내이며, 상기 수치들 사이의 수치 범위도 포함된다.

[0207] **6. 세포를 선택 또는 농축하는 예시적인 방법들**

[0208] **a. 면역자기 비드를 이용하는 단일 프로세스 스트림 및/또는 동시적인 선택**

[0209] [0192] 몇몇 구체예에서, 분리 및/또는 단계를 면역자기 비드를 이용하여 수행한다. 몇몇 구체예에서, 일차 인간 T 세포 샘플과 같은, CD4+ 및 CD8+ 세포를 함유하는 세포 샘플을 CD4 또는 CD8에 결합하는 1차 면역친화성 시약을 함유하는 자기 비드 및 CD4 또는 CD8 중 다른 하나에 결합하는 2차 면역친화성 시약을 함유하는 자기 비드와 접촉시킨다. 분리 및/또는 단계들은 동시에 및/또는 순차적으로 수행가능하다.

[0210] [0193] 몇몇 구체예에서, 세포와 자기 비드의 접촉을 동시에 수행함으로써, 표면 마커인 CD4 및 CD8를 함유하는 세포의 농축도 동시에 수행할 수 있다. 이러한 몇몇 측면에서, 본 발명의 방법은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플의 세포를 인큐베이션 조성물 중 CD4에 특이적으로 결합하는 면역친화성 시약 및 CD8에 특이적으로 결합하

는 2차 면역친화성 시약과 접촉시키되, 샘플 중의 세포 표면에서 면역친화성 시약들이 CD4 및 CD8 분자에 각각 특이적으로 결합하는 조건 하에 접촉시키고 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약에 결합된 세포를 회수함으로써, 배양-개시 비율에서 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 포함하는 농축된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다

[0211] [0194] 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화(sub-optimal) 수율 농도로 존재하므로, 농축 조성물은 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포를 70% 미만으로 및/또는 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포를 70% 미만으로 함유하고, 이에 따라 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 농축된 조성물이 생성된다.

[0212] [0195] 몇몇 구체예에서, 친화성 시약의 최적화 수율 농도는 세포를 시약과 함께 인큐베이션하고 시약에 결합된 세포들을 회수 또는 분리하는 것을 포함하는 주어진 선택 또는 농축에서 결합된 세포의 최적 또는 최대 수율을 달성하는데 사용되거나 요구되는 농도보다 낮은 농도이다 ("수율"은 인큐베이션 중 총 세포 갯수 비해, 시약에 의해 표적화되는, 또는 시약이 그에 대해 특이적인, 또는 시약이 특이적이거나 결합할 수 있는 대상 마커를 갖는 회수 또는 선택된 세포의 갯수이다). 최적화 수율 농도는 일반적으로 그러한 방법 또는 단계에서 시약에 결합된 세포의 회수 시, 결합된 세포의 70% 수율 이하를 달성하는 시약의 농도 또는 양이다. 몇몇 구체예에서, 최적화 농도에 의해 약 50%, 45%, 40%, 30%, 또는 25% 수율 이상이 달성된다. 농도는 세포 당 입자 또는 표면의 갯수 또는 질량 및/또는 세포 당 물질 분자 (예컨대 항체, 항체 단편)의 갯수 또는 질량으로 표현할 수 있다.

[0213] [0196] 예컨대, 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $30 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다. 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $30 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $20 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $20 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $10 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $15 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $10 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $5 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $1 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $0.5 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 $0.2 \mu\text{M}$ 이하의 물질(예컨대, 항체)이다.

[0214] [0197] 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약

15 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 10 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 5 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 4 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 3 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 2 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 1 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다; 몇몇 구체예에서, 최적화 수율 농도는 인큐베이션 조성물 중 1×10^9 세포 당, 2×10^9 세포 당, 3×10^9 세포 당, 4×10^9 세포 당, 5×10^9 세포 당, 10×10^9 세포 당, 15×10^9 세포 당, 또는 20×10^9 세포 당 약 0.5 mg 이하의 비드, 입자, 표면, 또는 총 시약이다.

[0215] [0198] 몇몇 구체예에서, 예컨대, 2개 이상의 마커 또는 세포에 대해 친화성을 갖는 1종 이상 2종 이상의 선택 시약 또는 각각에 대한 최적화 수율 농도로 작업시, 이러한 시약 중 1종 이상은 다른 시약(들)에 의해 인식되는 세포 종류(들)에 비해 당해 시약에 의해 인식되는 세포 종류의 비율로 편향되도록, 이러한 시약들 중 1종 이상을 다른 시약(들) 중 1종 이상보다 높은 농도로 사용한다. 예컨대, 그것이 편향되도록 소망되는 마커에 특이적으로 결합하는 시약은 비율을 얼마나 증가시킬지의 정도에 따라 다른 것(들)의 절반, 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 또는 그 이상만큼 더 증가된 농도(예컨대 세포 당 물질 또는 질량)로 포함될 수 있다.

[0216] [0199] 몇몇 구체예에서, 세포의 일방 또는 양방 집단 모두를 편향시키기 위한 최적화 수율 농도를 사용함으로써 소망되는 또는 선택된 배양-개시 비율을 얻을 수 있다. 몇몇 구체예에서, CD4+ 및 CD8+ 세포를 많은 세포 수, 예컨대 적어도 1×10^9 세포, 2×10^9 세포, 3×10^9 세포, 4×10^9 세포, 5×10^9 세포, 6×10^9 세포, 7×10^9 세포, 8×10^9 세포, 1×10^{10} 세포, 2×10^{10} 세포, 3×10^{10} 세포, 4×10^{10} 세포, 5×10^{10} 세포 또는 그 이상 함유하는 샘플로부터 선택을 수행한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 다수의 세포는 샘플 중 면역친화성 시약을 그 시약이 특이적으로 결합하는 CD4 또는 CD8과 같은, 마커를 발현하는 세포로 포화시키는데 충분하다.

[0217] [0200] 몇몇 구체예에서, 최적화 범위 및/또는 시약의 포화를 달성하는데 충분한 세포를 이용하여 작업시, 면역친화성 시약의 양은 농축된 세포의 대략적인 수율에 비례한다. 일 구체예에서, CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 약 1:1의 배양-개시 비율을 달성하기 위해, CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를, CD4 및 CD8에 대한 각각의 면역친화성 시약과 동일한 또는 대략 동일한, 최적화 수율 농도로 이용하여, CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 선택할 수 있다. 또 다른 예시적인 구체예에서, CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 약 2:1의 배양-개시 비율을 달성하기 위해, CD8에 대한 면역친화성 시약의 최적화 수율 농도의 약 또는 대략 2배의 CD4에 대한 면역친화성 시약의 최적화 수율 농도로 CD4+ 세포를 선택할 수 있다. 통상의 기술자라면 전술한 설명을 참조로, 농축 또는 선택된 세포를 함유하는 생성된 조성물의 소망되거나 선택된 배양-개시 비율에 기초하여 면역친화성 시약의 적절한 양 또는 농도를 실험적으로 선택할 수 있을 것이다.

[0218] [0201] 몇몇 구체예에서는, 분리 및/또는 단계들이, 전술한 바와 같이 스트렙트아비딘 뮤테인과의 펩타이드 리간드 상호반응을 통해, 면역친화성 시약이 가역적으로 결합되어 있는 자기 비드를 이용하여 수행된다. 이러한 자기 비드의 예로는 Streptamers®를 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 분리 및/또는 단계는 예컨대 Miltenyi Biotec사로부터 상업적으로 구득가능한 자기 비드를 이용하여 수행된다.

- [0219] [0202] 몇몇 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계들은 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준으로 세포를 자동화 분리하기 위해 수행된다. 부품으로는 일체형 마이크로컴퓨터, 자성 분리 유닛, 연동 펌프, 다양한 핀치 밸브를 들 수 있다. 몇몇 측면에서 일체형 컴퓨터는 장비의 모든 부품들을 제어하여 시스템으로 하여금 표준화된 시퀀스로 공정을 반복 수행하게 할 수 있다. 몇몇 측면에서 자성 분리 유닛은 이동가능한 연구자석 및 선택 컬럼용 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 튜빙 세트를 통해 유속을 조절하고 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 흐름과 세포의 지속적인 현탁을 통제한다. 몇몇 측면에서, 분리 및/또는 기타 단계들은 CliniMACS 시스템(Miltenyi Biotec)을 이용하여 수행된다.
- [0220] [0203] 몇몇 구체예에서, 자동화 분리, 예컨대 몇몇 측면에서 CliniMACS 시스템을 이용한 분리는 멸균된 비발열성 용액에 공급되는 항체-커플링된 자화가능한 입자를 이용한다. 몇몇 구체예에서, 세포를 자성 입자로 표지한 후 세포들을 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서 세포 제조 백을 튜빙 세트에 연결한 다음 이것을 완충액을 함유하는 백과 세포 수집 백에 연결한다. 튜빙 세트는 예비-컬럼 및 분리 컬럼을 비롯하여, 미리-조립된 멸균 튜빙으로 구성되며, 1회 사용만을 염두에 둔 것이다. 분리 프로그램 개시 후, 시스템은 세포 샘플을 분리 컬럼에 자동적으로 적용한다. 표지된 세포들은 컬럼 내에 유지되는 한편, 비표지 세포들은 일련의 세척 단계로부터 제거된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 표지되지 않으며 컬럼에 유지되지 않는다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 표지되며 컬럼 내에 유지된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명에 설명된 방법에 사용되기 위한 세포 집단은 자기장 제거 후 컬럼으로부터 용리되어, 세포 수집 백에 수집된다.
- [0221] [0204] 특정 구체예에서, 분리 및/또는 기타 단계들은 자동화 세척 및 원심분리에 의한 세포 분획화를 가능하게 하는 세포 프로세싱 유닛이 장착된 시스템을 이용하여 수행된다. 몇몇 측면에서, 분리 및/또는 기타 단계들은 CliniMACS Prodigy 시스템(Miltenyi Biotec)을 이용하여 수행된다. 세포 프로세싱 유닛을 갖는 시스템은 또한 세포 생성물의 거시적인 층들을 포착함으로써 최적 세포 분획화 종말점을 결정하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어 공급원도 포함할 수 있다. 예컨대, 말초 혈액을 적혈구, 백혈구 세포 및 혈장 층으로 자동 분리한다. CliniMACS Prodigy 시스템과 같은 세포 프로세싱 시스템은 또한 예컨대 세포 분화 및 성장, 항원 로딩 및 장기간 세포 배양 등의 세포 배양 프로토콜을 달성하는 일체형 세포 배양 챔버를 포함할 수도 있다. 인풋 포트는 배지의 멸균 제거 및 재보충을 가능케하며 일체형 현미경을 이용하여 세포를 모니터링할 수 있다. 예컨대, Klebanoff et al.(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701 참조.
- [0222] [0205] 몇몇 구체예에서, 본 발명에 설명된 세포 집단은 유세포 분석법을 통해 수집 및 농축(또는 고갈)되는데, 이 방법에서는 복수개의 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포들이 유체 스트림을 통해 운반된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명에 설명된 세포 집단은 예비 규모(FACS)-소팅을 통하여 수집 및 농축(또는 고갈)된다. 특정 구체예에서, 본 발명에 설명된 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합적으로 미세전자기계 시스템(MEMS)를 사용함으로써 수집 및 농축(또는 고갈)된다. (예컨대, WO 2010/033140, Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 및 Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376 참조). 두 가지 경우 모두에서, 세포는 복수개의 마커로 표지되어, 잘-정의된 T 세포 서브세트들을 고순도로 분리할 수 있다.
- [0223] [0206] 몇몇 구체예에서는, 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이화하기 위해 항체 또는 결합 파트너를 하나 이상의 검출 가능한 마커로 표지한다. 예컨대, 분리는 형광 표지된 항체에 대한 결합에 기초할 수 있다. 몇 가지 예에서, 1개 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 기타 결합 파트너의 결합에 기초한 세포 분리를 유체 스트림에서, 예컨대, 예비 규모(FACS) 및/또는 미세전자기계 시스템(MEM) 칩을 비롯한, 형광-활성화 세포 소팅(FACS)에 의해, 유세포 검출 시스템과 조합하여 수행한다. 이러한 방법에 의해 복수 마커에 기초하여 양성 및 음성 선택을 동시에 수행할 수 있다.
- [0224] **b. 면역친화성 크로마토그래피를 이용한 단일 프로세스 스트림 및/또는 순차 선택**
- [0225] [0207] 몇몇 구체예에서, 세포 집단의 1차 선택 또는 농축 및 세포 집단의 2차 선택 및/또는 농축은 항체가 그 위에 각각 고정되어 있는 적어도 1차 및 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함하는 면역친화성-기반 시약을 이용하여 수행된다. 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 선택 중 일방 또는 양방은 복수개의 친화성 크로마토그래피 매트릭스 및/또는 항체를 사용할 수 있으므로, 동일한 선택, 즉 1차 선택 또는 2차 선택을 위해 사용되는 복수개의 매트릭스 및/또는 항체들은 직렬로 연결된다. 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 선택에서 사용되는 친화성 크로마토그래피 매트릭스 또는 매트릭스는 적어도 약 50×10^6 세포/mL, 100×10^6 세포/mL, $200 \times$

10^6 세포/mL 또는 400×10^6 세포/mL를 흡수하거나 또는 선택 또는 농축할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 흡착능은 컬럼의 직경 및/또는 길이에 기초하여 변형될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 선택 또는 농축된 조성물의 배양-개시 비율은 예컨대 세포 선택을 위한 컬럼 또는 컬럼들의 흡착능에 기초하여 충분한 양의 매트릭스 및/또는 배양-개시 비율을 달성하는데 상대적으로 충분한 양을 선택함으로써 달성된다.

[0226] [0208] 한 가지 예시적인 구체예에서, 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착능은 1차 및 2차 선택 간에, 예컨대 양방 모두 1×10^8 세포/mL 또는 약 1×10^8 세포/mL로 동일하며, 그에 따라 1차 선택 및 2차 선택에서의 세포 농축 또는 선택에 의해 CD4+ 세포 to CD8+ 세포를 약 1:1의 배양-개시 비율로 함유하는 조성물이 얻어진다. 또 다른 예시적인 구체예에서, 1차 선택 또는 2차 선택 중 어느 하나에 사용된 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착능은 1차 선택 또는 2차 선택 중 다른 하나에 사용된 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착능의 적어도 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 그 이상이며, 그에 따라, 예컨대 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포와 같이 보다 큰 흡착능으로 선택된 세포들이 다른 세포 집단의 적어도 1.5배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배, 10.0배 또는 그 이상의 양의 배양 개시 비율로 존재하는, 배양-개시 비율이 얻어진다. 통상의 기술자라면 농축 또는 선택된 세포를 함유하는 생성 조성물의 소망되거나 선택된 배양-개시 비율에 따라, 1차 및/또는 2차 선택을 위한 친화성 매트릭스 크로마토그래피 컬럼들의 적절한 부피, 직경 또는 갯수를 선택할 수 있을 것이다.

[0227] [0209] 제공된 방법에 의해 선택을 수행하기 위한 예시적인 방법이 실시예 2에 설명되어 있다. 몇몇 구체예에서, 이러한 방법에 의해 농축 또는 생성된 조성물에서 소망되는 배양-개시 비율이 달성된다.

[0228] [0210] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법에서의 1차 및/또는 2차 선택은 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 어느 한쪽을 먼저 농축한 다음 예컨대 휴지, 나이브 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 마커, 예컨대, CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커의 표면 발현에 기초하여 세포의 하위집단을 농축하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 1차 및/또는 2차 선택은 CD8+ 세포의 농축을 포함하며, 상기 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축을 추가로 포함하되, 여기서 1차 및/또는 2차 선택의 다른 하나는 CD4+ 세포의 농축이다. 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 CD4+ 세포의 농축 또는 선택을 위해 그리고 CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD127+ 또는 CD8+/CD27+인 세포의 하위집단을 농축 또는 선택하기 위해 수행된다. 몇몇 구체예에서, 1차 선택은 CD8+ 세포의 농축을, 2차 선택은 CD4+ 세포의 농축을 포함하며, 여기서, CD8+ 세포의 농축을 포함하는 1차 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축 또는 CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커를 발현하는 세포의 농축을 더 포함함으로써 해서, CD4+ 세포 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대해 농축되거나 CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된 CD8+ 세포를 함유하는 배양-개시 조성물과 같은 조성물이 생성된다. 몇몇 구체예에서, 1차 선택은 CD4+ 세포에 대한 농축을, 그리고 2차 선택은 CD8+ 세포에 대한 농축을 포함하되, 여기서 CD8+ 세포에 대하여 농축된 세포를 포함하는 2차 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축 또는 CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커를 발현하는 세포에 대한 농축을 더 포함함으로써 해서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대해 농축되거나 CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된 CD8+ 세포 및 CD4+ 세포를 함유하는 배양-개시 조성물과 같은 조성물이 생성된다.

[0229] [0211] CD4+ 세포 또는 그의 하위집단 대 CD8+ 세포 또는 그의 하위집단의 배양-개시 비율을 달성하기 위해, 세포의 하위집단의 추가 농축을 포함하는 이러한 몇 가지 구체예에서는, 대상자로부터의 출발 샘플 중 CD4+ 또는 CD8+ 모집단 세포 각각의 빈도와 비교한, 하위집단, 즉, 휴지, 나이브, 중심 기억 세포 또는 CD28, CD62L, CCR7, CD127 또는 CD27 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된 CD8+ 세포 또는 CD4+ 세포의 빈도의 차이를 보상하기 위해 컬럼 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착능이 조정된다. 대상자에 있어서 다양한 세포집단의 상대적인 수준 또는 빈도는 이러한 집단들 또는 하위집단들에 존재하는 마커 또는 마커들의 표면 발현 평가에 기초하여 탐지될 수 있다. 표면 마커 또는 단백질의 발현 수준을 평가하기 위한 몇몇 공지 방법, 예컨대 친화성-기반 방법, 예컨대 예컨대 유세포분석법과 같은 세포 표면 단백질 맥락의 면역친화성-기반 방법에 의한 검출 방법이 이용될 수 있다.

[0230] [0212] 예시적인 일 구체예에서, CD4+ 대 CD8+ 비율을 1:1로 얻기 위해 샘플을 CD4+ 및 CD8+/CD62L+ 세포로 농축한다. 이 예시적인 구체예에서, 1차 선택은 샘플에 존재하는 것으로 알려진 CD8+/CD62L+ 세포에 대한 CD4+ 세포의 상대 비율에 대해 조정된 흡착능을 갖는 컬럼을 이용하거나, 또는 그러한 샘플이 일반적으로 가질 것으로 평가되는 비율을 이용하여, CD8+ 세포를 농축하는 것을 포함할 수 있다. 예컨대, 인간 대상자로부터 수집된 CD8+ 세포의 CD62L+ 하위집단은 때로 총 CD8+ T 세포 분획의 약 25%일 수 있다. 예컨대 Maldonado, *Arthritis*

Res Ther. 2003; 5(2): R91-R96 참조. 이러한 구체예에서, CD62L+ 세포를 추가로 함유하는 CD8+ 하위집단과 CD4+ 세포를 1:1 배양 개시 비율로 생성하기 위해, CD4+ 세포에 비해 CD8+ 세포를 4배 더 많은 양으로 수집하도록 컬럼을 배치할 수 있다. 따라서, 각 선택 컬럼의 흡착능과 효율이 유사하다고 가정할 때, CD8+ 컬럼은 CD4 선택 컬럼 또는 CD62L 선택 컬럼보다 약 또는 대략 4배 더 클 수 있다. 컬럼의 크기 역시 예상 수율에 맞게 조정될 수 있다. 예를 들어, 만일 각각의 컬럼이 오직 80% 효율적일 경우, 각 후속 선택 효율을 보상하도록 각 컬럼의 크기를 조정할 수 있다.

[0231] [0213] 예컨대, 소망되는 또는 선택된 배양 개시 조성물은 200×10^6 CD4+ 세포 및 200×10^6 CD8+/CD62L+ 세포를 함유하는 것일 수 있다. 이 실시예에서, 상기 제시된 비율을 감안하면, 농축시키고자 하는 샘플은 적어도 또는 약 200×10^6 CD4+ 세포 및 적어도 또는 약 800×10^6 CD8+ 세포를 함유할 수 있고, 이의 25%(200×10^6)는 또한 CD62L+일 수 있다. 2 mL의 선택 매트릭스 각각으로 약 또는 대략 200×10^6 세포를 농축할 수 있다고 가정할 때, 8 mL의 선택 매트릭스를 갖는 CD8 선택 컬럼은 CD4 선택 컬럼으로 병류 통과(flow-through passes) 하면서 약 또는 대략 800×10^6 CD8+ 세포를 결합시킬 수 있다. 2 mL의 선택 매트릭스가 장착된 CD4 선택 컬럼은 약 또는 대략 200×10^6 CD4+ 세포와 결합할 수 있다. CD8+ 세포를 CD62L 선택 컬럼 내로 용리시킴으로써 CD8+ 세포를 CD62L에 대해 추가 농축할 수 있다. 이 예시적인 구체예에서, CD62L 선택 컬럼은 2 mL의 선택 매트릭스를 함유할 수 있으므로, 약 또는 대략 200×10^6 CD8+/CD62L+ 세포를 농축할 수 있다. CD4 및 CD8/CD62L 컬럼은 배양 용기 내로 용리되어, 약 또는 대략 1:1 배양-개시 비율을 갖는 조성물 또는 초기 배양 조성물이 수득된다.

[0232] [0214] 또 다른 예시적인 구체예에서는, 1:1의 CD4+ 대 CD8+ 비율이 얻어지도록 샘플을 CD4+ 및 CD8+/CCR7+ 세포에 대해 농축시킨다. 이 예시적인 구체예에서, 1차 선택은 샘플에 존재하는 것으로 알려진 CD8+/CCR7+ 세포에 대한 CD4+ 세포의 상대적 빈도로 조정된 흡착능을 갖는 컬럼을 이용하거나, 또는 그러한 샘플이 일반적일 것으로 평가되는 비율을 이용하여, CD8+ 세포에 대하여 농축하는 것을 포함할 수 있다. 예컨대, 인간 대상자로부터 수집된 CD8+ 세포의 CCR7+ 하위집단은 때로 총 CD8+ T 세포 분획의 약 60%일 수 있다. 예컨대 *Chen, Blood.* 2001 Jul 1;98(1):156-64 참조. 1:1 배양 개시 비율을 생성하기 위해 CD4+ 세포에 비해 CD8+ 세포를 3배 더 많이 수집하도록 컬럼들을 배치할 수 있다. 각각의 선택 컬럼에 대해 유사한 흡착능과 효율을 가정할 때, CD8+ 컬럼은 크기가 CD4 선택 컬럼 또는 CCR7 선택 컬럼에 비해 약 또는 대략 3배 더 클 수 있다. 컬럼의 크기 역시 예상된 수율로 조정할 수 있다. 예컨대, 만일 각각의 컬럼이 오직 80% 효율적일 경우, 각 후속 선택 효율을 보상하도록 각 컬럼의 크기를 조정할 수 있다.

[0233] [0215] 예컨대, 소망되는 개시 배양 조성물은 200×10^6 CD4+ 세포 및 200×10^6 CD8+/CCR7+ 세포를 함유하는 것일 수 있다. 이 실시예에서, 상기 제시된 비율을 감안하면, 농축시키고자 하는 샘플은 적어도 또는 약 200×10^6 CD4+ 세포 및 적어도 또는 약 6.6×10^6 CD8+ 세포를 함유할 수 있고, 이의 60%(200×10^6)는 또한 CCR7+일 수 있다. 2 mL의 선택 매트릭스 각각으로 약 또는 대략 200×10^6 세포를 농축할 수 있다고 가정할 때, 3 mL의 선택 매트릭스를 갖는 CD8 선택 컬럼은 CD4 선택 컬럼으로 병류 통과(flow-through passes) 하면서 약 또는 대략 6.6×10^6 CD8+ 세포를 결합시킬 수 있다. 2 mL의 선택 매트릭스가 장착된 CD4 선택 컬럼은 약 또는 대략 200×10^6 CD4+ 세포와 결합할 수 있다. CD8+ 세포를 CCR7 선택 컬럼 내로 용리시킴으로써 CD8+ 세포를 CD62L에 대해 추가 농축할 수 있다. 이 예시적인 구체예에서, CCR7 선택 컬럼은 1mL의 선택 매트릭스를 함유할 수 있으므로 해서, 약 또는 대략 200×10^6 CD8+/CCR7+ 세포를 농축할 수 있다. CD4 및 CCCR7 컬럼은 배양 용기 내로 용리되어, 약 또는 대략 200×10^6 CD4+ 세포 및 약 또는 대략 200×10^6 CD8+/CCR7+ 세포, 또는 약 또는 대략 1:1 배양-개시 비율을 초기 배양 조성물이 수득된다.

[0234] [0216] 통상의 기술자라면 농축 또는 선택된 세포를 함유하는 생성 조성물의 소망되거나 선택된 배양-개시 비율, 각 하위집단의 예상되는 빈도, 각 선택 컬럼의 다양한 효율, 및 전술한 설명과 통상의 기술자 수준 내의 기타 인자를 고려하여, 1차 및/또는 2차 및/또는 3차 선택을 위한 친화성 매트릭스 크로마토그래피 컬럼들의 적절한 부피, 직경 또는 갯수를 실험적으로 선택할 수 있을 것이다.

[0235] **B. 단리된 세포의 인큐베이션**

[0236] [0217] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 방법으로 단리된 집단과 같은 단리된 세포 및 세포 집단을 인큐베이션하는 1 이상의 다양한 단계, 예컨대 단리된 CD4+ T 세포 집단, 예컨대, 비분획화된 CD4+ T 세포

집단 또는 그의 하위집단(들) 및 단리된 CD8⁺ T 세포 집단, 예컨대, 단리된 비분획화된 CD8⁺ T 세포 집단 또는 그의 하위집단(들)을 인큐베이션하는 단계들을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 배양-개시 조성물에서 인큐베이션된다.

- [0237] [0218] 복수개의 단리된 세포 집단, 예컨대, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 집단 (예컨대, 비분획화된 또는 그의 하위집단)은 일반적으로, 예컨대 동일한 유닛, 챔버, 웰, 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 벨브, 바이알, 배양야 디쉬, 백 또는 세포 배양을 위한 기타 용기와 같은 동일한 배양 용기에서 배양-개시 조성물과 조합된 세포 집단과 함께 인큐베이션된다.
- [0238] [0219] 몇몇 측면에서, 인큐베이션 및/또는 조작 단계 후에 세포 집단 또는 세포 종류는 특정의 소망되는 아웃풋 비율, 또는 그러한 소망되는 아웃풋 비율의 특정한 허용 오차 범위 내를 달성하도록 설계되거나, 또는 특정한 시간 백분율 동안 그리 하도록 설계된, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 비율과 같은 배양-개시 비율로 배양-개시 조성물 중에 존재한다. 아웃풋 비율은, 예컨대, 입양세포 치료를 통해 환자에게 투여시 1 이상의 치료 효과를 달성하는데 최적인 비율일 수 있다. 몇몇 측면에서, 배양-개시 비율은 본 발명에 설명된 탐지 방법, 예컨대 특정 맥락에서 소망되는 아웃풋 비율을 달성하기 위한 최적의 배양-개시 비율을 탐지하는 방법을 이용하여 실험적으로 탐지된다.
- [0239] [0220] 인큐베이션 단계는 항원 노출을 모방하기 위해 및/또는 예컨대 유전자 조작된 항원 수용체의 도입을 위한 것과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 프라이밍시키기 위해, 자극 조건, 예컨대 집단 내 세포의 증식, 성장, 활성화, 및/또는 생존을 유도하도록 설계된 조건 의 존재 하에, 인큐베이션 의해 배양, 자극, 활성화, 증식하는 것을 포함할 수 있다.
- [0240] [0221] 이러한 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 물질, 예컨대 영양원, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 용합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포 활성화를 위해 고안된 기타 물질 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 일례로, 자극 조건은 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호 캐스캐이드를 촉발 또는 개시하는, 예컨대 리간드와 같은 1종 이상의 물질을 포함한다. 이러한 물질로는 항체, 예컨대 TCR 성분에 대해 특이적이거나 및/또는 공동자극적인 수용체, 예컨대, 비드와 같은 고체 지지체에 결합된 예컨대 항-CD3, 항-CD28, 항-4-1BB, 및/또는 1종 이상의 시토카인을 들 수 있다. 필요에 따라, 증식 방법은 또한 배양 배지에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 (예컨대, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로) 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 필요에 따라, 증식 방법은 배양 배지에 IL-2 및/또는 IL-15 및/또는 IL-7 및/또는 IL-21를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다 (이 경우 예컨대, IL-2의 농도는 적어도 약 10 유닛 /m l임).
- [0241] [0222] 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 Riddell 등의 미국특허 No. 6,040,177, Klebanoff et al.(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및/또는 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701에 설명된 기술에 따라 수행된다.
- [0242] [0223] 몇몇 구체예에서, 세포 집단, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단들 또는 하위집단들은 예컨대 비-분열성 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 같은 배양-개시 조성물 피더 세포를 첨가함하고 (예컨대 결과적인 세포 집단이 증식시키고자 하는 초기 집단 중의 각각의 T 림프구에 대해 PBMC 피더 세포를 적어도 5, 10, 20, 또는 40배 또는 그 이상 함유하도록); 배양체를 인큐베이션 (예컨대 몇몇 T 세포들이 증식하는데 충분한 기간 동안) 함으로써 증식된다. 몇몇 측면에서, 비분열 피더 세포들은 감마선이 조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rads 범위로 PBMC에 감마선을 조사한다. 몇몇 측면에서, T 세포 집단을 첨가하기에 앞서서, 배양 배지에 피더 세포를 첨가한다.
- [0243] [0224] 몇몇 구체예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도예컨대, 적어도 약 25°C, 일반적으로 적어도 약 30도, 및 일반적으로 약 37°C를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 배양 중, 예컨대 37°C에서 35°C로 온도 변화시키는 것과 같이 온도를 천이시킬 수 있다. 필요에 따라, 인큐베이션은 피더 세포로서 비분열 EBV-형질전환된 림프모구 세포(LCL)을 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. LCL에 약 6000 내지 10,000 rads 범위의 감마선을 조사할 수 있다. 몇몇 측면에서 LCL 피더 세포가 적절한 양, 예컨대 적어도 약 10:1의 초기 T 림프구에 대한 LCL 피더 세포 비율로서 제공된다.
- [0244] [0225] 몇몇 구체예에서, 나이브 또는 항원 특이적인 T 림프구를 항원으로 자극함으로써 항원 특이적인 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단을 수득할 수 있다. 예컨대, 감염된 대상자로부터 T 세포를 단리하고 시험관 내에서 상기 세포를 동일

한 항원으로 자극시킴으로써, 시토메갈로바이러스 항원에 대한 항원-특이적인 T 세포주 또는 클론을 생성할 수 있다. 나이브 T 세포 역시도 이용가능하다.

[0245] **중간 평가 및 조정**

[0226] 몇몇 구체예에서, 이 방법들은 인큐베이션 또는 배양 개시 후, 예컨대 인큐베이션 도중에, 세포 또는 세포를 함유하는 조성물을 평가 및/또는 조정하는 것을 포함한다. 이러한 평가는 증식 속도, 생존도, 표현형, 예컨대 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 1 이상의 표면 또는 세포내 마커의 발현에 대해 세포를 평가하거나, 및/또는 온도, 배지 성분(들), 산소 또는 이산화탄소 함량, 및/또는 1 이상의 인자, 물질, 성분의 존재여부 또는 양 또는 상대적인 양, 및/또는 서브타입을 비롯한 세포 종류에 대해 조성물 또는 용기를 평가하는 것과 같이, 세포를 함유하는 조성물 또는 용기에 대해 1 이상의 측정을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 평가는 인큐베이션되는 조성물이나 용기 중 복수개, 예컨대 2 가지 세포 종류, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 중간 비율을 탐지하는 것을 포함한다. 몇몇 측면에서, 평가는 자동화된 방식으로, 예컨대, 전술한 기기를 이용하여 수행되며 및/또는 인큐베이션 동안 특정 시점에서 수행되도록 설정된다. 몇몇 측면에서, 평가 결과, 예컨대 2종의 세포의 탐지된 중간 비율이 1종 이상의 세포 종류의 추가 또는 제거와 같은 조정 필요성을 나타낼 수 있다.

[0227] 조정은 여하한 세포 배양 인자 또는 파라미터, 예컨대 온도, 인큐베이션 또는 그의 단계가 수행되는 기간(시간) (인큐베이션의 기간), 인큐베이션되는 조성물 중 1가지 이상의 성분, 예컨대 배지 또는 완충제 또는 그의 성분, 물질, 예컨대 영양원, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 용합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 또는 세포, 또는 세포 종류 또는 세포 집단들의 재보충, 추가 및/또는 제거의 조정을 포함할 수 있다. 몇몇 측면에서, 다양한 성분의 제거 또는 첨가 또는 기타 조정을 자동화 방식으로, 예컨대 전술한 바와 같은 기기 또는 시스템을 이용하여 수행한다. 몇몇 구체예에서, 시스템은 중간 평가로부터 특정 관독값에 기초하여 조정이 자동적으로 개시되도록 프로그램된다. 예컨대, 몇 가지 경우에서, 시스템 또는 기기는 특정 시점에서 1가지 이상의 평가를 수행하도록 프로그램된다; 이 경우 시스템 또는 기기는 한 세포 종류에 대한 다른 세포 종류의 특정 비율과 같은 어떤 평가의 특정 결과가 특정 조정, 예컨대 1종 이상의 세포 종류의 부가를 개시하도록 추가로 프로그램될 수 있다.

[0228] 몇몇 측면에서, 세포 또는 조성물이 함유된 폐쇄 환경을 파괴하지 않는 방식으로, 예컨대 전술한 1종 이상의 기기 또는 시스템에서 멸균성을 유지하면서 성분들을 첨가 또는 제거하도록 설계된 인풋 및/또는 제거 밸브에 의해 조정을 수행한다.

[0229] 특정 구체예에서, CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 중간 비율을 인큐베이션 기간 동안에 평가한다. 몇몇 구체예에서, 평가는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 후, 예컨대 3 내지 5일 사이, 및/또는 모든 세포들이 세포 사이클에 존재하거나 존재하는 것으로 여겨지는 시점에서 수행된다. 몇몇 측면에서, 이렇게 구해진 중간 비율에 따라, CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포, 예컨대 CD4⁺ T 세포의 단리된 집단 또는 CD8⁺ T 세포의 단리된 집단의 세포 (예컨대, 하위집단, 예컨대 중심 기억 CD8⁺ T 세포)를, 인큐베이션되는 조성물이나 배양 용기에 추가로 첨가하거나 농축시킬 필요가 있다. 그러므로, 몇몇 측면에서, 평가 후에 이러한 부가 또는 제거, 일반적으로 부가가 수행된다. 몇몇 측면에서, 예컨대 반복 형식으로, 인큐베이션 기간 동안 복수회의 평가 및 가능한 조정이 수행된다.

[0230] 유전자 조작된 항원 수용체 도입을 위해 세포가 조작되는 몇몇 구체예에서는, 조작 페이즈 동안 하나 이상의 자극제 존재 하에 인큐베이션이 지속된다.

[0231] 몇몇 구체예에서, 세포는 조작 전 또는 조작 내내 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 동안 인큐베이션된다.

[0252] **C. 조작, 조작된 항원 수용체, 및 조작된 세포**

[0232] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 입양치료 맥락에서 유용한 예컨대 항원 수용체와 같은 수용체 등의 분자를 발현시키기 위해 재조합 유전자를 세포 내로 도입시키는 것과 같이, 단리 및/또는 인큐베이션된 세포를 유전자 조작하는 것을 포함한다.

[0233] 도입을 위한 유전자에는 예컨대 전달된 세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진함으로써 치료 효능을 증진하

기 위한 것들; 생체내 생존 또는 국소화를 평가하기 위한 것과 같이, 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 문헌 [Lupton S. D. et al., *Mol. 및 Cell Biol.*, 11:6 (1991); 및 Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)에 설명된 바와 같이 예컨대 세포를 생체내 음성 선택에 민감하게 만듦으로써, 안전성을 개선시키기 위한 유전자가 포함되며; 이와 관련하여 상세한 양성 선택성 마커를 음성 선택성 마커와 융합시킴으로써 유래된 이관능성 선택성 융합 유전자의 사용을 설명하는, PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 공개공보 역시도 참조할 수 있다. 이것은 공지 방법 (예컨대 Riddell et al., 미국특허 No. 6,040,177, 컬럼 14-17 참조) 또는 본 발명의 개시에 기초하여 통상의 기술자에게 자명한 변형법에 의해 수행될 수 있다.

[0256] [0234] 조각은 일반적으로 유전자 조각된 항원 수용체의 발현을 위해 유전자 또는 유전자들을 도입하는 것을 포함한다. 이러한 항원 수용체로는 유전자 조각된 T 세포 수용체 (TCRs) 및 그의 성분, 및 관능성 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)가 포함된다.

[0257] [0235] 몇몇 구체예에서 항원 수용체는 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 표적화되기 위한 것들을 비롯하여, 암 또는 기타 질병 또는 병태와 같이, 표적화시키고자 하는 질병 또는 세포 상의 리간드에 특이적으로 결합한다. 예시적인 항원에는 고아(orphan) 티로신 키나아제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 B형 간염 표면항원, 항-엽산염 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-alpha, IL-13R-알파2, kdr, 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 부착 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D Ligands, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양태아 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아 항원 (CEA), 전립선 특이 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3 및/또는 바이오티닐화된 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 기타 병원체에 의해 발현되는 분자가 포함된다.

[0258] **항원 수용체**

[0259] [0236] 일 구체예에서, 조각된 항원 수용체는 CARs이다. CARs는 일반적으로 1종 이상의 세포내 신호 성분에 링크된 세포의 리간드 결합 도메인을 포함하는 유전자 조각된 수용체를 포함한다. 이러한 분자들은 일반적으로 천연 항원 수용체를 통해 신호를 모방 또는 근사화하거나 및/또는 공동자극 수용체와 조합하여, 그러한 수용체를 통해 신호를 모방 또는 근사화한다.

[0260] [0237] 몇몇 구체예에서, CARs는 예컨대 암 마커와 같이 입양 치료에 의해 표적화될 특정 세포 종류에서 발현되는 마커와 같은 특정 마커에 대한 특이성을 갖도록 구축된다. 이것은 몇몇 측면에서 CARdml 세포의 부분에 하나 이상의 항원 결합 분자, 예컨대 하나 이상의 항원-결합 단편, 도메인 또는 일부분, 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인 및/또는 항체 분자를 포함시킴으로써 달성된다. 몇몇 구체예에서, CAR은 모노클로날 항체(mAb)의 가변부 중쇄(VH) 및 가변부 경쇄(VL)로부터 유래된 단쇄 항체 단편(scFv)과 같은 항체 분자의 일부 또는 항원-결합 단편을 포함한다.

[0261] [0238] 몇몇 구체예에서, CAR은 예컨대 본 명세서에 기재되거나 기술분야에 알려진 여하한 표적 항원, 예컨대 종양 세포 또는 암 세포와 같이, 표적화될 질병이나 세포의 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다.

[0262] [0239] 몇몇 구체예에서, 종양 항원 또는 세포 표면 분자는 폴리펩타이드이다. 몇몇 구체예에서, 종양 항원 또는 세포 표면 분자는 동일 조직의 비-종양 세포에 비해 종양 세포에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다.

[0263] [0240] 몇몇 구체예에서, CAR은 병원체-특이적인 항원에 결합한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 바이러스 항원(예컨대, HIV, HCV, HBV, 등), 박테리아 항원 및/또는 기생충 항원에 특이적이다.

[0264] [0241] 몇몇 측면에서, 항원-특이적 결합 또는 인식 성분은 하나 이상의 막투과 및 세포내 신호 도메인에 링크되어 있다. 몇몇 구체예에서, CAR은 CAR의 세포의 도메인에 융합된 막투과 도메인을 포함한다. 일 구체예에서, CAR 내 도메인들 중 하나와 자연적으로 관련된 막투과 도메인이 사용된다. 몇몇 경우, 수용체 복합체의 다른 멤버와의 상호작용을 최소화하기 위해 같거나 다른 표면 막 단백질의 막투과 도메인에 이러한 도메인이 결합하는 것을 회피하기 위해, 아미노산 치환에 의해 막투과 도메인을 선택 또는 변형시킨다.

[0265] [0242] 몇몇 구체예에서 막투과 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래한다. 공급원이 천연일 경우, 몇몇 측면에서 도메인은 어떠한 막-결합 또는 막투과 단백질로부터 유래되어도 무방하다. 막투과 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33,

CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD 154(의 막투과 영역(들)을 적어도 포함함)로부터 유래된 것들을 포함한다. 별법으로, 몇몇 구체예에서 막투과 도메인은 합성된 것이다. 몇몇 측면에서, 합성 막투과 도메인은 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함한다. 몇몇 측면에서, 합성 막투과 도메인의 각 말단에서는 페닐 알라닌, 트립토판 및 발린의 삼원체 발견된다.

[0266] [0243] 몇몇 구체예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 예컨대, 예컨대 글리신 및 세린을 함유하는 것과 같은 길이가 2 내지 10 아미노산인 링커, 예컨대 글리신-세린 이원체가 존재하며 CAR의 막투과 도메인과 세포질 신호 도메인 사이에 결합을 형성한다.

[0267] [0244] CAR은 일반적으로 세포내 신호 성분 또는 성분들을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 예컨대 CD3 제타 사슬과 같이, T-세포 활성화 및 세포독성을 매개하는 TCR CD3⁺ 사슬과 같은, TCR 복합체의 세포내 성분을 포함한다. 따라서 몇몇 측면에서, 항원 결합 분자는 하나 이상의 세포 신호 모듈에 링크된다. 몇몇 구체예에서, 세포 신호 모듈은 CD3 막투과 도메인, CD3 세포내 신호 도메인, 및/또는 기타 CD 막투과 도메인들을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 Fc 수용체 γ , CD8, CD4, CD25, 또는 CD16와 같은 하나 이상의 부가적인 분자의 일부를 추가로 포함한다. 예컨대, 몇몇 측면에서, CAR은 CD3-제타 (CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와 CD8, CD4, CD25 또는 CD16 간의 키메라 분자를 포함한다.

[0268] [0245] 몇몇 구체예에서, CAR의 접합(ligation)에 의해, CAR의 세포질 도메인 또는 세포내 신호 도메인이 예컨대 당해 세포를 발현하도록 조작된 T 세포와 같은 면역 세포의 정상적인 이펙터 기능 중 적어도 한가지르르 활성화시킨다. 예컨대, 어떤 맥락에서, CAR은 T 세포의 기능 예컨대 세포용해 활성 또는 T-헬퍼 활성 예컨대 시토카인 또는 기타 인자의 분비를 유도한다. 몇몇 구체예에서, 항원 수용체 성분 또는 공동자극 분자의 세포내 신호 도메인의 절단된(truncated) 부분. 몇몇 측면에서는 예컨대 절단된 부분이 이펙터 기능 신호를 형질도입할 경우, 온전한 면역자극 사슬 대신 이러한 절단 부분이 사용된다. 몇몇 구체예에서, 세포내 신호 도메인 또는 도메인들은 T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열을 포함하고, 몇몇 경우 자연적인 맥락에서 그러한 수용체와 협동적으로 항원 수용체 인게이지먼트에 이어 신호 형질도입을 개시하는 공동-수용체, 및/또는 이러한 분자들의 여하한 유도체 또는 변이체, 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 합성 서열을 포함한다.

[0269] [0246] 천연 TCR의 맥락에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호 뿐만 아니라 공동자극 신호도 요구한다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공동-자극 시그널에 대한 성분 역시도 CAR에 포함된다. T 세포 활성화는 몇몇 측면에서 세포질 신호 서열의 2 부류에 의해 매개되는데; TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것들 (1차 세포질 신호 서열), 및 2차 또는 공동-자극 신호 제공을 위해 항원-비의존성 방식으로 작용하는 것들(2차 세포질 신호 서열)이 그러한 부류들이다. 몇몇 측면에서, CAR은 이러한 신호 성분의 하나 또는 두 가지 모두를 포함한다.

[0270] [0247] 일차 세포질 신호 서열은 몇몇 측면에서 자극 방식 또는 억제 방식으로, TCR 복합체의 일차 활성화를 제어한다. 자극적 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAMs 이라 알려진 신호 모티프를 함유할 수 있다. 일차 세포질 신호 서열을 함유하는 ITAM의 예로는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CDS, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것들을 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, CAR 중의 세포질 신호 분자(들)은 세포질 신호 도메인, 그의 일부 또는 CD3 제타로부터 유래된 서열을 함유한다.

[0271] [0248] 몇몇 구체예에서, CAR은 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10, 및 ICOS와 같은 공동자극 수용체의 막투과 부분 및 /또는 신호 도메인을 포함한다.

[0272] [0249] 특정 구체예에서, 세포내 신호 도메인은 CD3 세포내 도메인에 링크된 CD28 막투과 및 신호 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포내 신호 도메인은 CD3 세포내 도메인에 링크된 키메라 CD28 및 CD137 공동-자극 도메인을 포함한다. 몇몇 구체예에서, CAR은 형질도입 마커(예컨대, tEGFR)를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예에서, CD8⁺ 세포독성 T 세포의 세포내 신호 도메인은 CD4⁺ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호 도메인과 동일하다. 몇몇 구체예에서, CD8⁺ 세포독성 T 세포의 세포내 신호 도메인은 CD4⁺ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호 도메인과 다르다.

[0273] [0250] 몇몇 구체예에서, CAR은 세포질 부분에 예컨대 일차 활성화 도메인과 같은 활성화 도메인과 조합된 공동자극 도메인을 2개 이상 포함한다. 그 하나의 예는 CD3-제타, CD28, 및 4-1BB의 세포내 성분을 포함하는 수용체이다.

- [0274] [0251] CARs 및 이의 제조 및 도입에 관하여는 예컨대, 공개특허문헌인 W0200014257, US6451995, US2002131960, US7446190, US8252592, EP2537416, US2013287748, 및 W02013126726, 및/또는 문헌 [Sadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75]에 설명되어 있는 것을 참조할 수 있다.
- [0275] [0252] 몇몇 구체예에서는, T 세포가 재조합 T 세포 수용체에 의해 변형된다. 몇몇 구체예에서, 재조합 TCR은 항원, 일반적으로는 종양-특이 항원, 자가면역질환 또는 염증 질환과 연관된 특정 세포 종류상에서 발현되는 항원, 또는 바이러스 병원균 또는 박테리아 병원균으로부터 유래된 항원과 같은 항원에 특이적이다.
- [0276] [0253] 몇몇 구체예에서, T 세포는 자연발생적인 T 세포로부터 클로닝된 T-세포 수용체 (TCRs)를 발현하도록 조작된다. 몇몇 구체예에서는 환자로부터 표적 항원(예컨대 암 항원)에 대한 고-친화성 T 세포 클론이 동정, 분리되어 세포 내로 도입된다. 몇몇 구체예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 인간 면역계 유전자(예컨대 인간 백혈구 항원 시스템 또는 HLA)에 의해 조작된 유전자조작 마우스에서 생산된 것이다. 예컨대, 종양 항원 (예컨대, Parkhurst et al. (2009) *Clin Cancer Res.* 15:169-180 및 Cohen et al. (2005) *J Immunol.* 175:5799-5808 참조. 몇몇 구체예에서, 파지 디스플레이가 표적 항원에 대해 TCR을 분리하는데 이용된다 (예컨대, Varela-Rohena et al. (2008) *Nat Med.* 14:1390-1395 및 Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349-354 참조).
- [0277] [0254] 몇몇 구체예에서, T-세포 클론 수득 후, TCR 알파 및 베타 사슬을 분리하여 유전자 발현 벡터에 클로닝시킨다. 몇몇 구체예에서, TCR 알파 및 베타 유전자를 피코르나바이러스 2A 리보솜 스킵 펩타이드를 통해 링크시켜 두 사슬 모두 공동발현되도록 한다. 몇몇 구체예에서, TCR의 유전자 전달은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 통해, 또는 트랜스포존을 통해 달성된다 (예컨대, Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 18:1748-1757; an Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy.* 18:674-683 참조).
- [0278] [0255] 몇몇 구체예에서, 유전자 전달은 먼저 T 세포 성장을 자극하고 이어서 활성화된 세포를 배양체에서 형질 도입하고 임상 용도에 충분한 숫자가 되도록 및 증식시킴으로써 달성된다.
- [0279] [0256] 어떤 맥락에서, 공동자극 인자(예컨대, 림포카인 또는 시토카인)의 과발현은 대상자에게 독성적일 수 있다. 그러므로, 어떤 맥락에서, 조작된 세포는 임상 면역요법에서 투여시, 생체내 음성 선택에 민감성으로 만드는 유전자 세그먼트를 포함한다. 예컨대 몇몇 측면에서, 세포는 이들이 투여되는 환자의 생체내 조건의 변화 결과 이들이 제거될 수 있도록 조작된다. 음성 선택가능한 표현형은 투여된 물질 예컨대 화합물에 민감성을 부여하는 유전자의 삽입으로부터 야기될 수 있다. 음성 선택가능한 유전자에는 간시클로비어 민감성을 부여하는 I형 단순포진 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-I TK) 유전자 (Wigler et al., *Cell* 11:223, 1977); 세포성 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT) 유전자, 세포성 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (APRT) 유전자, 박테리아 시토신 데아미나제 (Mullen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:33 (1992))가 포함된다.
- [0280] [0257] 몇몇 측면에서, 세포는 전염증성 시토카인, 예컨대 IL-2, IL-12, IL-7, IL-15, IL-21와 같은 시토카인의 발현을 촉진하기 위해 추가로 조작된다.
- [0281] **유전자 조작된 성분들의 도입**
- [0282] [0258] 예컨대, 항원 수용체, 예컨대, CARs과 같이 유전자 조작된 성분들을 도입하는 다양한 방법이 공지이며 본 발명의 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예시적인 방법으로는 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스, 형질도입, 트랜스포존 및 전기영동과 같이, 바이러스를 통하여, 수용체를 인코딩하는 핵산의 전달을 위한 것들이 포함된다.
- [0283] [0259] 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 재조합 감염성 바이러스 입자, 예컨대 시미안 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스(AAV)로부터 유래된 벡터를 이용하여 세포 내로 전달된다. 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 이용하여 T 세포 내로 전달된다 (예컨대, Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November; 29(11): 550-557 참조).
- [0284] [0260] 몇몇 구체예에서, 레트로바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스 벡터 derived from the 쥐의 멀로니 백

혈병 바이러스 (MoMLV), 골수증식 육종 바이러스 (MPSV), 쥐의 배아줄기세포 바이러스 (MESV), 쥐의 줄기세포 바이러스(MSCV), 골수 포커스 형성 바이러스(SFFV), 또는 아데노-관련 바이러스 (AAV)로부터 유래한 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열(LTR)을 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 쥐의 레트로바이러스로부터 유래한다. 몇몇 구체예에서, 레트로바이러스는 조류 또는 포유동물 세포 공급원으로부터 유래된 것을 포함한다. 레트로바이러스는 일반적으로 양생(amphotropic) 바이러스인데 이는, 이들이 인간을 비롯한 여러 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 일 구체예에서, 발현시키고자 하는 유전자는 레트로바이러스의 gag, pol 및 /또는 env 서열을 대체한다. 몇 가지 예시적인 레트로바이러스가 설명된 바 있다 (예컨대, 미국특허 Nos. 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller 및 Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie 및 Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109 참조).

[0285] [0261] 렌티바이러스 형질도입 방법이 알려져 있다. 이의 예시는 예컨대 문헌 [Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505]에서 찾아볼 수 있다.

[0286] [0262] 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 전기영동을 통해 T 세포에 전달된다 (예컨대, Chicaybam et al, (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 및 Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437 참조). 몇몇 구체예에서, 재조합 핵산은 전위(transposition)을 통해 T 세포 내로 전달된다 (예컨대, Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; 및 Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126 참조). 면역 세포에 유전자 물질을 도입 및 발현시키기 위한 기타 방법으로는 칼슘 포스페이트 형질도입(예컨대, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.에 설명됨), 원형질 융합, 양이온성 리포좀-매개된 형질도입; 텅스텐 입자-보조된 마이크로 입자 충격법 (Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공침전법(Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987)을 들 수 있다.

[0287] [0263] 몇몇 구체예에서는, 동일한 CAR이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 림프구 각각에 도입된다. 몇몇 구체예에서는, 상이한 CAR이 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 림프구 각각에 도입된다. 몇몇 구체예에서, 이들 집단 각각에서 CAR은 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 갖는다. 몇몇 구체예에서, 이들 각 집단 중의 CAR은 상이한 분자에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 이들 각 집단 중의 CAR은 상이한 세포성 신호 모듈을 갖는다. 몇몇 구체예에서 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 림프구는 형질도입에 앞서 각각 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 또는 이펙터 세포로 소팅된 것이다.

[0288] [0264] 또 다른 구체예에서, 세포, 예컨대, T 세포는 재조합 수용체를 발현하기 위해 조작되는 것이 아니라, 특정 항원 특이성을 갖는 세포의 증식을 촉진하기 위해, 예컨대 인큐베이션 단계(들) 동안, 시험관내 또는 생체외에서 배양된 종양-주입 림프구 및/또는 T 세포와 같은, 소망되는 항원에 특이적인 자연발생적인 항원 수용체를 포함한다. 예컨대, 몇몇 구체예에서는 예컨대 자가 종양 주입 림프구(TIL)과 같은 종양-특이 T 세포의 단리에 의해 입양세포를 위한 세포가 생산된다. 자가 종양 주입 림프구를 이용한 인간 종양의 직접 표적화는 몇몇 경우 종양 퇴행을 매개한다 (Rosenberg SA, et al.(1988) *N Engl J Med.* 319:1676-1680 참조). 몇몇 구체예에서, 림프구는 절제된 종양으로부터 추출된다. 몇몇 구체예에서, 이러한 림프구는 시험관내에서 증폭된다. 몇몇 구체예에서, 이러한 림프구는 림포카인(예컨대, IL-2)과 함께 배양된다. 몇몇 구체예에서, 이러한 림프구는 자가 종양 세포의 특이한 용해를 매개하지만 동종이계 종양 또는 자가 정상 세포의 용해는 매개하지 않는다.

[0289] [0265] 몇몇 측면에서, 인큐베이션 및/또는 조작 단계 및/또는 방법은 일반적으로 소망되는 아웃풋 비율 (또는 그러한 비율의 허용 오차 또는 허용차 이내의 비율)을 결과시키거나, 또는 방법이 수행되는 기간의 특정 백분율 내에서 그러하다.

[0290] **D. 냉동보존 (Cryopreservation)**

[0291] [0266] 몇몇 구체예에서, 제공된 방법은 단리, 인큐베이션, 및/또는 조작 전 또는 후에 세포를 냉동, 예컨대 냉동보존하는 단계를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 냉동 및 후속적인 해동 단계는 세포 집단 내의 과립구 및, 어느 정도로 단핵구를 제거한다. 몇몇 구체예에서는 예컨대 혈장 및 혈소판 제거를 위해 세척 단계 후에 냉동 용액에 세포들을 현탁시킨다. 몇몇 측면에서 공지의 다양한 여하한 냉동 용액 및 파라미터가 모두 사용가능하다. 그 한 가지 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민 (HSA)를 함유하는 PBS 또는 그 밖의 적절한 세포 동결 배지의 사용

을 포함한다. 이어서 배지로 1:1 희석하여 DMSO 및 HSA_{dm1} 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 한다. 이어서 세포를 분 당 1℃의 속도로 -80℃까지 냉동시키고 액체질소 저장 탱크의 증기상에 보관한다.

[0292] **II. 키트 및 시스템**

[0267] 또한 본 발명의 방법을 수행하는데 유용한 시스템, 장치, 및 키트가 제공된다. 일례에서, 당해 방법의 단리, 세포 제조, 분리, 예컨대 밀도, 친화성, 1종 이상의 성분에 대한 민감성, 또는 기타 특성에 기초한 분리, 세척, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 이상을 수행하는 단일 시스템이 제공된다. 몇몇 측면에서, 시스템은 예컨대 실수, 사용자 핸들링 및/또는 오염을 최소화하기 위해, 폐쇄 또는 멸균 환경에서 이들 단계들을 각각 수행하도록 이용된다. 일례에서, 시스템은 국제특허출원, 공개번호 W02009/072003, 또는 US 20110003380 A1에 설명된 시스템이다.

[0268] 몇몇 구체예에서, 시스템 또는 장치는 단리, 프로세싱, 조작, 및 제형화 단계 중 하나 이상 또는 예컨대 모두를 일체형 또는 자족형 시스템, 및/또는 자동화 또는 프로그램가능한 방식으로 수행한다. 몇몇 측면에서, 시스템 또는 장치는 상기 시스템 또는 장치와 통신하여, 사용자로 하여금 프로세싱, 단리, 조작, 및 제형화 단계의 다양한 측면을 프로그램, 제어, 결과 평가 및/또는 조정하도록 하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.

[0269] 또한 제공된 방법을 수행하기 위한 키트도 제공된다. 몇몇 구체예에서, 키트는 방법의 단리, 예컨대 면역친화성-기반 분리 단계를 위해, 일반적으로 고체 지지체에 커플링된 항체 또는 기타 결합 파트너를 포함한다.

[0270] 몇몇 구체예에서, 키트는 자기 비드에 결합된 양성 및 음성 선택을 위한 항체를 포함한다. 일 구체예에서, 키트는 PBMC 샘플과 같은 샘플로부터 출발하여, 키트에 제공된 하나 이상의 항체에 의해 인식되는 1차 표면 마커의 발현에 기초하여 선택하고, 양성 및 음성 분획 두 가지 모두를 유지하여 선택을 수행하도록 하는 지시사항을 포함한다. 몇몇 측면에서, 지시사항은 예컨대 조성물을 폐쇄 환경 및/또는 동일한 분리 용기 중에 유지시킴으로써, 그로부터 유래된 양성 및/또는 음성 분획으로부터 출발하는, 부가적인 선택 단계를 1개 이상 수행하도록 하는 지시사항을 추가로 포함한다.

[0271] 일 구체예에서, 키트는 자기 비드에 결합된 항-CD4, 항-CD14, 항-CD45RA, 항-CD14, 및 항-CD62L 항체를 포함한다. 일 구체예에서, 키트는 PBMC 샘플과 같은 샘플로부터 출발하여, CD4 발현에 기초한 선택에 의해 양성 및 음성 분획 두가지를 모두 유지하고, 음성 분획에 대해, 항-CD14, 항-CD45RA 항체를 이용하여 상기 분획을 추가로 음성 선택시키고, 항-CD62L 항체를 이용하여 추가로 양성 선택 (순서는 무방함)시킴으로써 선택을 수행하는 지시사항을 포함한다. 별법으로 성분 및 지시사항을 본 발명에 설명된 분리 구체예에 따라 조정한다.

[0272] 몇몇 구체예에서, 키트는 선택 단계에 의해 단리된 집단의 세포들을 배양, 또는 프로세싱 용기로 전달하는 한편, 자족형 시스템으로 세포를 유지하는 지시사항을 추가로 포함한다. 몇몇 구체예에서, 키트는 여러가지 상이한 단리된 세포들을 특정 비율로 전달하기 위한 지시사항을 추가로 포함한다.

[0299] **III. 세포, 조성물, 및 투여 방법**

[0273] 또한, 세포, 세포 집단 및 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포 및 집단들을 함유하는 조성물(의약 조성물 및 치료 조성물을 포함한다)도 제공된다. 또한 이러한 세포 및 조성물을 예컨대 환자와 같은 대상자에게 투여하기 위한 치료방법과 같은 방법도 제공된다.

[0274] 세포, 집단들, 및 조성물의 투여 방법 및 암을 비롯한 질병, 병태, 장애를 치료 또는 예방하기 위한 이러한 세포, 집단들, 및 조성물의 용도도 제공된다. 몇몇 구체예에서, 세포, 집단들, 및 조성물은 예컨대 입양 T 세포 요법과 같은 입양세포 치료를 통해, 치료하고자 하는 특정 질환 또는 병태에 걸린 대상자 또는 환자에게 투여된다. 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해 제공된 세포 및 조성물, 예컨대 조작된 조성물 및 인큐베이션 및/또는 기타 프로세싱 단계에 이은 최종 생성 조성물이 질병 또는 병태에 걸리거나 걸릴 위험이 있는 대상자와 같은 대상자에게 투여된다. 그에 따라 몇몇 측면에서, 이들 방법은 조작된 T 세포에 의해 인식되는 항원을 발현하는 암에서 종양 부담을 감소시키는 것과 같이, 질병 또는 병태의 한 가지 이상의 증상을 치료, 예컨대 완화시킨다.

[0275] 입양세포 치료를 위한 세포의 투여 방법은 공지이며 제공된 방법 및 조성물과 연계하여 이용될 수 있다. 예컨대, 입양 T 세포 치료방법은 Gruenberg 등의 미국 특허출원 공개 No. 2003/0170238; Rosenberg의 미국특허 No. 4,690,915; Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85)에 설명되어 있다. 예컨대, Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol*. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1):

84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338 참조.

- [0303] [0276] 몇몇 구체예에서, 예컨대, 입양 T 세포 치료와 같은 세포 치료는 자가 전달에 의해 수행되는데, 이 방식에서는 세포가 세포 치료를 받을 대상자로부터 단리 및/또는 달리 제조되거나, 또는 샘플이 유래하는 대상자로부터 제조된다. 따라서, 몇몇 측면에서, 치료를 필요로 하는 예컨대 환자와 같은 대상자로부터 세포가 유래되고 상기 세포는 단리 및 프로세싱 후에 동일한 대상자에게 투여된다.
- [0304] [0277] 몇몇 구체예에서, 세포 치료, 예컨대, 입양 T 세포 치료는 동종이계 전달에 의해 수행되는데, 이 방식에서는 세포가 세포 치료를 받거나 궁극적으로 받게될 대상자가 아닌 다른 대상자, 예컨대 1차 대상자로부터 단리 및/또는 제조된다. 이러한 구체예에서, 세포는 상이한 대상자, 예컨대 동일한 종의 2차 대상자에게 투여된다. 몇몇 구체예에서, 1차 및 2차 대상자들은 유전적으로 동일하다. 몇몇 구체예에서, 1차 및 2차 대상자는 유전적으로 유사하다. 몇몇 구체예에서, 2차 대상자는 1차 대상자와 동일한 HLA 클래스 또는 수퍼타입을 발현한다.
- [0305] [0278] 몇몇 구체예에서, 세포, 세포 집단, 또는 조성물이 투여되는 대상자 예컨대 환자는 포유동물, 전형적으로는 인간과 같은 영장류이다. 몇몇 구체예에서, 영장류는 원숭이 또는 유인원이다. 대상자는 남성 또는 여성일 수 있고 유아, 소아, 청소년, 성인 및 노인 대상자를 비롯하여 연령 불문일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 설치류와 같은 비영장류 포유동물이다.
- [0306] [0279] 또한 이러한 방법에 사용되기 위한 의약 조성물도 제공된다.
- [0307] [0280] 본 발명에 따른 조성물, 세포, 방법 및 용도에 의해 치료될 질병, 병태, 및 장애로는 종양, 예컨대 고체 종양, 혈액학적 종양 및 흑색종, 및 감염성 질환, 예컨대 바이러스 또는 기타 병원체, 예컨대 HIV, HCV, HBV, CMV 감염, 및 기생충 질환을 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 질환 또는 병태는 종양, 암, 악성 종양, 신생물 또는 그 밖의 증식성 질환이다. 이러한 질환의 비제한적인 예로는 백혈병, 림프종, 예컨대, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), ALL, 비-호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 다발골수종, 난치성 소포 림프종, 외투세포 림프종, 무통형(indolent) B 세포 림프종, B 세포 종양, 결장, 폐, 간, 유방, 전립선, 난소, 피부(흑색종 포함)의 암, 골암 및 뇌암, 난소암, 상피암, 신세포 암종, 췌장 선암종, 호지킨 림프종, 경추 암종, 결장직장암, 교모세포종, 신경모세포종, 유잉 육종, 수모세포종, 골육종, 활막 육종, 및/또는 중피종을 들 수 있다.
- [0308] [0281] 몇몇 구체예에서, 질환 또는 병태는 감염성 질환 또는 병태이며, 예컨대 비제한적인 예로서 바이러스 레트로바이러스, 박테리아 및 원생동물 감염, 면역결핍증, 시톰에갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스를 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 질환 또는 병태는 자가면역 또는 염증성 질환 또는 병태, 예컨대 관절염, 예컨대 류마티스성 관절염(RA), I형 당뇨병, 진신흡반루프스 (SLE), 염증성 장 질환, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질환, 그레이브스 병, 크론 병, 다발성 경화증, 천식, 및/또는 이식과 관련된 질환 또는 병태이다.
- [0309] [0282] 몇몇 구체예에서, 질환 또는 장애와 연관된 항원은 고아 티로신 키나아제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 B형 간염 표면항원, 항-엽산염 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R- α , IL-13R- α 2, kdr, 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 부착 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D Ligands, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양태아 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암 배아 항원 (CEA), 전립선 특이 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3 및/또는 바이오티닐화된 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현되는 분자로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0310] [0283] 몇몇 구체예에서, 세포 및 조성물은 의약 조성물의 형태, 예컨대 상기 세포 또는 세포 집단 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물로서 투여된다. 몇몇 구체예에서 의약 조성물은 부가적으로 다른 약학적 활성물질 또는 약물, 예컨대 화학요법제, 예컨대 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐티타민, 히드록시우레아, 메토틱세이트, 파클리탁셀, 리투시맙, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등을 부가적으로 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 물질은 염, 예컨대 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여된다. 약학적으로 허용가능한 적절한 산 부가염에는 무기산, 예컨대 염산, 히드로브롬산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산, 그리고 유기산, 예컨대 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴설폰산, 예컨대 *p*-톨루엔설폰산이 포함된다.
- [0311] [0284] 의약 조성물 중의 담체의 선택은 부분적으로는 특정 조작된 CAR 또는 TCR, 벡터, 또는 CAR 또는 TCR을 발현하는 세포, 그리고 CAR을 발현하는 숙주 세포 또는 벡터를 투여하는데 사용되는 특정 방법에 따라

결정된다. 따라서, 적당한 제형이 다양하게 존재한다. 예컨대, 의약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제로는 예컨대, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 염화벤잘코늄을 들 수 있다. 몇몇 측면에서는 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 이의 혼합물은 일반적으로 총 조성물 중량의 약 0.0001% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다.

[0312] [0285] 이에 더해, 몇몇 측면에서는 완충제가 조성물에 포함된다. 적절한 완충제의 예로는 구연산, 구연산나트륨, 인산, 인산칼륨 및 기타 다양한 산 및 염으로 들 수 있다. 몇몇 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 일반적으로 총 조성물의 약 0.001% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여가능한 의약 조성물의 제조 방법은 공지이다. 예시적인 방법이 예컨대 문헌[Remington: The Science 및 Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 상세히 설명되어 있다.

[0313] [0286] 특정 구체예에서, 의약 조성물은 시클로덱스트린 봉입 복합체(inclusion complex)와 같은 봉입 복합체 또는 리포솜으로서 제형화된다. 리포솜은 숙주 세포(예컨대, T-세포 또는 NK 세포)를 특정 조직에 표적화시키는 기능을 할 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법이 다수 알려져 있으며, 예컨대 문헌 [Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), 및 미국특허 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, 및 5,019,369]에 설명되어 있다.

[0314] [0287] 몇몇 구체예에서, 의약 조성물은 시간-방출형, 지연 방출 및/또는 서방형 전달 시스템을 이용함으로써, 치료하고자 하는 부위의 감작화가 충분한 시간을 두고, 및 사전에 일어나도록 조성물이 전달된다. 이러한 시스템은 몇몇 측면에서 조성물의 반복 투여를 회피시킬 수 있으므로, 대상자와 의사의 편의성을 제고해준다.

[0315] [0288] 몇몇 구체예에서, 의약 조성물은 세포 또는 세포 집단을 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하는데 효과적인 양, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량으로 포함한다. 그러므로, 몇몇 구체예에서, 투여 방법은 세포 및 세포 집단을 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서 치료 또는 예방적 효능은 치료 대상자에 대한 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라 수일 또는 그 이상 반복 투여를 위해, 질병 증상의 소망되는 억제가 일어날 때까지 치료를 반복한다. 그러나, 다른 투여법도 유용할 수 있으며 찾아볼 수 있다. 소망되는 투여량은 조성물의 단일 볼러스(bolus) 투여, 조성물의 복수회 볼러스 투여 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0316] [0289] 몇몇 구체예에서, 세포는 소망되는 투여량으로 투여되는데 몇몇 측면에서, 이 투여량은 세포 또는 세포 종류(들)의 소망되는 투여량 또는 갯수 및/또는 세포 종류의 소망되는 비율을 포함한다. 그러므로, 몇몇 구체예에서 세포의 투여량은 세포의 총 갯수 (또는 kg 체중 당 갯수) 및 CD4+ 대 CD8+ 비율과 같은, 개별적인 집단들 또는 서브타입의 비율에 기초한다. 몇몇 구체예에서, 세포의 투여량은 개별적인 집단들 또는 개별적인 세포 종류 중의 세포의 소망되는 총 갯수 (또는 kg 체중 당 갯수)에 기초한다. 몇몇 구체예에서, 투여량은 이러한 특징의 조합, 예컨대 개별적인 집단들 내의 세포의 소망되는 총 갯수, 소망되는 비율 및 소망되는 총 세포 갯수의 조합에 기초한다.

[0317] [0290] 몇몇 구체예에서는, 예컨대 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포와 같은 세포의 집단들 또는 서브타입이 소망되는 총 세포 투여량, 예컨대 소망되는 T 세포 투여량으로 또는 이의 허용차 이내의 양으로 투여된다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 그 세포가 투여되는 대상자의 체중 단위 당 세포의 소망되는 갯수 예컨대, 세포/kg, 또는 세포의 소망되는 갯수이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 세포의 최소 갯수 또는 그 이상이거나 체중 단위 당 세포의 최소 갯수 또는 그 이상이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량으로 투여되는 총 세포, 개별적인 집단들 또는 서브타입은 소망되는 아웃풋 비율(예컨대 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비율)로 또는 소망되는 아웃풋 비율과 유사한 비율로, 예컨대, 그러한 비율의 특정한 허용차 또는 허용 오차 이내의 비율로 존재한다.

[0318] [0291] 몇몇 구체예에서, 세포는 CD4+ 세포의 소망되는 투여량 및/또는 CD8+ 세포의 소망되는 투여량과 같이 세포의 하나 이상의 개별적인 집단들 또는 서브타입의 소망되는 투여량 또는 그의 허용차 이내로 투여된다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 그 세포가 투여되는 대상자의 체중 단위 당 그 세포의 소망되는 갯수 예컨대 세포/kg 또는 서브타입 또는 집단의 세포의 소망되는 갯수이다. 몇몇 측면에서, 소망되는 투여량은 집단 또는 서브타입의 세포의 최소 갯수 이상이거나 또는 체중 단위 당 집단 또는 서브타입의 세포의 최소 갯수 이상이다.

[0319] [0292] 그러므로, 몇몇 구체예에서, 투여량은 총 세포의 소망되는 고정 투여량 및 소망되는 비율에 기초하거나, 및/또는 1종 이상 예컨대 각각의 개별적인 서브타입 또는 하위집단들의 소망되는 고정 투여량에 기초한다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 투여량은 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 소망되는 비율 및 T 세포의 소망되는 고정 또는 최소 투여

량에 기초하거나 및/또는 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포의 소망되는 고정 또는 최소 투여량에 기초한다.

- [0320] [0293] 특정 구체예에서, 세포, 세포의 서브타입의 개별적인 집단들은 대상자에게 약 100만 내지 1천억 세포, 예컨대, 백만 내지 500억 세포 (예컨대 약 5백만 세포, 약 2천5백만 세포, 약 5억 세포, 약 10억 세포, 약 50억 세포, 약 200억 세포, 약 300억 세포, 약 400억 세포, 또는 전술한 수치들 간의 여하한 범위), 예컨대 약 천만 내지 약 1천억 세포 (예컨대, 약 2천만 세포, 약 3천만 세포, 약 4천만 세포, 약 6천만 세포, 약 7천만 세포, 약 8천만 세포, 약 9천만 세포, 약 100억 세포, 약 250억 세포, 약 500억 세포, 약 750억 세포, 약 900억 세포 또는 또는 전술한 수치들 간의 여하한 범위), 및 몇몇 경우 약 1억 세포 내지 약 500억 세포 (예컨대 약 1억 2천만 세포, 약 2억 5천만 세포, 약 3억 5천만 세포, 약 4억 5천만 세포, 약 6억 5천만 세포, 약 8억 세포, 약 9억 세포, 약 30억 세포, 약 300억 세포, 약 450억 세포) 또는 전술한 수치 범위 사이의 모든 값의 범위로 투여된다.
- [0321] [0294] 몇몇 구체예에서, 총 세포의 투여량 및/또는 세포의 개별적인 하위집단들의 투여량은 약 10⁴ 및 내지 약 10⁹ 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10⁵ 내지 10⁶ 세포/ kg 체중 범위, 예컨대, 약 1 x 10⁵ 세포 /kg, 1.5 x 10⁵ 세포/kg, 2 x 10⁵ 세포/kg, 또는 1 x 10⁶ 세포/kg 체중으로 투여된다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 세포들은 약 10⁴ 내지 약 10⁹ T 세포/킬로그램 (kg) 체중 또는 이의 특정 오차 범위 내의 범위, 예컨대 10⁵ 내지 10⁶ T 세포 / kg 체중, 예컨대, 약 1 x 10⁵ T 세포/kg, 1.5 x 10⁵ T 세포/kg, 2 x 10⁵ T 세포/kg, 또는 1 x 10⁶ T 세포 /kg 체중으로 투여된다.
- [0322] [0295] 몇몇 구체예에서, 세포들은 약 10⁴ 내지 약 10⁹ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/킬로그램 (kg) 체중 또는 특정 오차 범위 내, 예컨대 10⁵ 내지 10⁶ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/ kg 체중 범위, 예컨대, 약 1 x 10⁵ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 1.5 x 10⁵ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 2 x 10⁵ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 또는 1 x 10⁶ CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg 체중으로 투여된다.
- [0323] [0296] 몇몇 구체예에서, 세포들은 약 1 x 10⁶, 약 2.5 x 10⁶, 약 5 x 10⁶, 약 7.5 x 10⁶, 또는 약 9 x 10⁶ CD4⁺ 세포, 및/또는 적어도 약 1 x 10⁶, 약 2.5 x 10⁶, 약 5 x 10⁶, 약 7.5 x 10⁶, 또는 약 9 x 10⁶ CD8+ 세포, 및/또는 적어도 약 1 x 10⁶, 약 2.5 x 10⁶, 약 5 x 10⁶, 약 7.5 x 10⁶, 또는 약 9 x 10⁶ T 세포 초과, 및/또는 그 이상의 양 또는 상기 값의 특정한 오차 범위 내의 양으로 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포들은 약 10⁸ 내지 10¹² 또는 약 10¹⁰ 내지 10¹¹ T 세포, 약 10⁸ 내지 10¹² 또는 약 10¹⁰ 내지 10¹¹ CD4⁺ 세포, 및/또는 약 10⁸ 내지 10¹² 또는 약 10¹⁰ 내지 10¹¹ CD8⁺ 세포의 양 또는 그의 특정 오차 범위 내의 양으로 투여된다.
- [0324] [0297] 몇몇 구체예에서, 세포들은 CD4+ 및 CD8+ 세포 또는 서브타입과 같은 복수 세포 집단 또는 서브타입의 소망되는 아웃풋 비율로 또는 그의 허용 범위 내로 투여된다. 몇몇 측면에서, 소망되는 비율은 특정 비율이거나 또는 비율 범위일 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 소망되는 비율 (예컨대, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율)은 약 5:1 내지 약 5:1 (또는 약 1:5 초과 및 약 5:1 미만), 또는 약 1:3 내지 약 3:1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예컨대 약 2:1 내지 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만, 예컨대 약 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5이다. 몇몇 측면에서, 허용차는 소망되는 비율의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 이내이며, 이들 범위 사이의 모든 값도 포함된다.
- [0325] [0298] 몇몇 구체예에서 세포 집단 및 조성물은 표준 투여 기술, 예컨대 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협강내(buccal), 설하 또는 좌제 투여 경로로 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 비경구 투여된다. 본 발명에서 "비경구"라는 용어는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질내 및 복강내 투여를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 이용하여 대상자에게 투여된다.
- [0326] [0299] 본 발명의 방법을 이용하여 수득된 세포 집단은 몇몇 구체예에서 1종 이상의 부가적인 치료제와 함께 또는 다른 치료적 개재와 함께 동시에 또는 순서 무관하게 순차적으로 공동 투여된다. 어떤 맥락에서, 세포는 그

세포 집단이 1종 이상의 부가적인 치료제의 효과를 증강시키도록 또는 부가적인 치료제가 세포 집단의 치료 효과를 증강시키도록, 상기 부가적인 치료와 시기적으로 충분히 가까운 시간 내에 공동 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 1종 이상의 부가적인 치료제의 투여 전에 투여된다. 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 1종 이상의 부가적인 치료제의 투여 후에 투여된다.

[0327] [0300] 세포 투여 후, 몇몇 구체예에서 조작된 세포 집단의 생물학적 활성을 예컨대 몇 가지 공지 방법에 의해 측정한다. 평가 파라미터에는 조작되거나 천연의 T 세포 또는 기타 면역 세포의 항원에 대한 특이적 결합이 포함된다 (영상화에 의해 생체내에서 또는 ELISA 또는 유세포분석법에 의해 생체외에서). 특정 구체예에서, 표적 세포를 파괴하는 조작된 세포의 능력은 기술분야의 적절한 공지 방법, 예컨대 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), 및 Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 설명된 세포독성 분석법을 이용하여 측정할 수 있다. 특정 구체예에서, 세포의 생물학적 활성은 1종 이상의 시토카인, 예컨대 CD 107a, IFN γ , IL-2, 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정된다. 몇몇 측면에서 생물학적 활성은 임상 결과, 예컨대 종양 부담 또는 로드의 감소를 평가함으로써 측정된다.

[0328] [0301] 특정 구체예에서, 조작된 세포는 그의 치료 또는 예방적 효능이 증가되도록, 여러 방식으로 추가 변형된다. 예컨대, 집단에 의해 발현된 조작된 CAR 또는 TCR은 직접 또는 링커를 통해 간접적으로 표적화 부분에 컨주게이션될 수 있다. 화합물, 예컨대 CAR 또는 TCR을 표적화 부분에 컨주게이션시키는 것은 기술 분야에 공지이다. 예컨대, Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995), 및 미국특허 5,087,616 참조.

[0329] **IV. 정의**

[0330] [0302] 본 발명에서, 단수 형태인 "a," "an," 및 "the"는 문맥상 달리 명시되지 않는 한 복수 개념을 포함한다. 예컨대, "a" 또는 "an"은 "적어도 1개" 또는 "1개 이상"을 의미한다.

[0331] [0303] 본 명세서 전반에 걸쳐, 청구 대상 발명의 다양한 측면이 범위 포맷으로서 표현되었다. 이러한 범위 포맷의 설명은 단지 편의성 및 간결성을 위한 것일 뿐 청구대상 발명의 범위를 경직적으로 한정하려는 것은 아니다. 따라서, 범위 설명은 가능한 모든 하위 범위 뿐만 아니라 그 범위 내에 속하는 개별적인 수치 값도 구체적으로 기재한 것으로 이해되어야 한다. 예컨대, 어떤 값의 범위가 제공된 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이에 개재된 각각의 값들 및 명시된 범위 내의 달리 명시 또는 개재된 모든 값들 역시 청구대상발명에 포괄되는 것으로 이해되어야 한다. 이러한 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 그 작은 범위에 독립적으로 포함되는 것일 수 있고, 또한 청구대상발명의 범위 내에 포괄되는 것이다. 명시된 범위가 이러한 한계의 일방 또는 양방 모두를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계의 일방 또는 양방 모두를 제외한 범위 역시도 본 발명에 포괄된다. 이것은 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

[0332] [0304] 본 명세서에서 "약"이라는 용어는 이 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 알려진 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 가리키는 것이다. 어떤 값 또는 파라미터에 대해 "약"이라는 표현이 사용될 경우 바로 그 값 또는 파라미터 자체에 지향된 구체예 역시도 포함(및 설명)하는 것이다.

[0333] [0305] 본 명세서에서, 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 그 문맥상 명백히 다른 의미를 갖는 것이 아닌 한 복수 개념을 포함한다. 예컨대, "a" 또는 "an"은 "적어도 1개" 또는 "1개 이상"을 의미한다.

[0334] [0306] 본 명세서의 전 기재에 걸쳐, 청구대상 발명의 다양한 측면이 범위 포맷으로 제시된다. 범위 포맷의 설명은 단지 편의와 간결을 위한 것으로 청구대상 발명의 범위를 경직적으로 제한하고자 함이 아니다. 따라서, 범위 설명은 가능한 모든 하위 범위 뿐만 아니라 이들 범위 사이의 개별적인 수치 값도 구체적으로 기재한 것으로 간주되어야 한다. 예컨대, 어떤 값의 범위가 제공된 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이에 개재된 각각의 값 및 명시된 범위 내에서 달리 명시되거나 개재하는 값 역시도 청구대상 발명에 포괄되는 것이다. 이러한 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 그 작은 범위에 독립적으로 포함되는 것일 수 있고, 또한 청구대상발명의 범위 내에 포괄되는 것이다. 명시된 범위가 이러한 한계의 일방 또는 양방 모두를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계의 일방 또는 양방 모두를 제외한 범위 역시도 본 발명에 포괄된다. 이것은 범위의 폭과 무관하게 적용된다.

[0335] [0307] 본 명세서에서 "퍼센트(%) 아미노산 서열 동일성" 및 "퍼센트 동일성"이라는 표현은 아미노산 서열과 관련하여 사용될 경우 (레퍼런스 폴리펩타이드 서열) 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 서열 정렬 및 필요시 갭 도입 후, 레퍼런스 폴리펩타이드 서열 중의 아미노산 잔기들과 동일한 후보 서열 (예컨대 스트렙타비딘 뮤테인) 중의 아미노산 잔기 백분율로서 정의되며, 서열 동일성의 일부로서 보존 치환은 고려되지 않는다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 탐지할 목적의 정렬은 통상의 기술자의 지식 수준 내의 다양한 방법으로 달성될 수 있으며 예컨대, 공개 구독가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign

(DNASTAR) 소프트웨어가 이에 이용될 수 있다. 통상의 기술자는 비교되는 서열들의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 모든 알고리즘을 포함하여, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터들을 결정할 수 있다.

- [0336] [0308] 아미노산 치환은 어떤 폴리펩타이드 중의 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 아미노산은 일반적으로 다음의 공통적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:
- [0337] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0338] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0339] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0340] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0341] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [0342] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0343] [0309] 비보존 아미노산 치환은 이들 클래스 중 하나의 멤버를 다른 클래스의 멤버로 교환하는 것을 포함한다.
- [0344] [0310] 본 발명에서, 대상자는 살아있는 생명체, 이를테면 인간 및 기타 포유동물을 포함한다. 포유동물의 비제한적인 예로는 인간, 및 비인간 동물, 예컨대 농장동물, 스포츠 동물, 설치류 및 애완동물을 들 수 있다.
- [0345] [0311] 본 발명에서, 조성물은 세포를 비롯하여 생성물, 물질 또는 화합물의 2 이상의 혼합물을 가리킨다. 이것은 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0347] [0312] 본 발명에서, 1종 이상의 특정 세포 종류 또는 세포 집단과 관련하여 "고갈(depleting)"이라는 용어가 사용될 경우, 이 용어는 고갈시키고자 하는 세포 집단 또는 세포 상에 존재하지 않는 마커에 기반한 양성 선택, 또는 집단 또는 세포에 의해 발현되는 마커에 기반한 음성 선택에 의해, 조성물의 부피 또는 조성물 중의 총 세포 갯수에 비교하여 또는 다른 세포 종류에 상대적으로, 세포 종류 또는 집단의 갯수나 백분율을 감소시키는 것을 가리킨다. 이 용어는 조성물로부터의 세포, 세포 종류 또는 집단의 완전한 제거를 요구하는 것은 아니다.
- [0348] [0313] 본 발명에서, 1종 이상의 특정 세포 종류 또는 세포 집단과 관련하여 "농축(enriching)"이라는 용어가 사용될 경우, 이 용어는 고갈시키고자 하는 세포 집단 또는 세포 상에 존재하지 않는 마커에 기반한 음성 선택, 또는 집단 또는 세포에 의해 발현되는 마커에 기반한 양성 선택에 의해, 조성물의 부피 또는 조성물 중의 총 세포 갯수에 비교하여 또는 다른 세포 종류에 상대적으로, 세포 종류 또는 집단의 갯수나 백분율을 증가시키는 것을 가리킨다. 이 용어는 조성물로부터의 세포, 세포 종류 또는 집단의 완전한 제거를 요구하는 것은 아니며 이렇게 농축된 세포가 농축된 조성물에 100%로 또는 거의 100%로 존재할 것을 요구하는 것이 아니다.
- [0349] [0314] 본 발명에서, "치료", "치료하다" 및 "치료하는"이라는 용어는 질병이나 병태 또는 장애 또는 그와 관련된 증상, 유해 효과 또는 결과 또는 표현형의 완전한 또는 부분적 경감 또는 감소를 가리킨다. 특정 구체에 있어서, 그 효과는 치료적이며 이에 따라 질병이나 병태 또는 그에 기인한 유해 증상이 부분적으로 또는 완전히 치유된다.
- [0350] [0315] 본 발명에서, 어떤 화합물 또는 조성물 또는 조합의 "치료적 유효량"이라 함은 이를테면 질병, 병태, 또는 장애의 치료와 같은 소망되는 치료적 결과를 달성하거나 및/또는 치료의 약동학적 또는 약력학적 효과를 달성하는 것을 가리키는데 효과적인 양을 가리킨다. 치료적 유효량은 대상자의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중, 그리고 투여되는 세포 집단들에 따라 달라질 수 있다.
- [0351] [0316] 본 발명에서, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "양성(positive)"라는 설명은 그 세포 상 또는 세포 내에 전형적으로는 표면 마커와 같은 특정 마커가 검출가능하게 존재함을 가리킨다. 표면 마커라는 용어는, 예컨대 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하여 상기 항체를 검색하는 것에 의한, 유세포분석법에 의해 검출되는 표면 발현의 존재를 가리키는 것으로, 여기서 상기 염색은 이소형-매칭된 대조군 또는 형관 마이너스 원(FMO: fluorescence minus one) 게이팅 대조군을 이용한 것을 제외하고는 동일 조건에서 동일한 공정 수행시 검출되는 염색 수준보다 실질적으로 더 높은 수준에서, 및/또는 그 마커에 대해 음성인 것으로 알려진 세포의 수준과 실질적으로 동일한 수준에서, 및/또는 그 마커에 대해 음성인 것으로 알려진 세포의 수준보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유세포분석법에 의해 검출가능하다.
- [0352] [0317] 본 발명에서, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "음성(negative)"라는 설명은 그 세포 상 또는

세포 내에 전형적으로는 표면 마커와 같은 특정 마커의 실질적으로 검출가능한 존재가 부재함을 가리킨다. 표면 마커라는 용어는, 예컨대 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하여 상기 항체를 검색하는 것에 의한, 유세포분석법에 의해 검출되는 표면 발현의 부재를 가리키는 것으로, 여기서 상기 염색은 이소형-맷칭된 대조군 또는 형광 마이너스 윈(FMO) 게이팅 대조군을 이용한 것을 제외하고는 동일 조건에서 동일한 공정 수행시 검출되는 염색 수준보다 실질적으로 더 높은 수준에서, 및/또는 그 마커에 대해 양성인 것으로 알려진 세포의 수준과 실질적으로 더 낮은 수준에서, 및/또는 그 마커에 대해 음성인 것으로 알려진 세포의 수준과 비교시 실질적으로 유사한 수준에서는 유세포분석법에 의해서 검출되지 아니한다.

[0353] [0318] 몇몇 구체예에서, 하나 또는 마커의 발현 감소는 평균 형광 강도의 $1 \log^{10}$ 손실을 가리키거나 및/또는 레퍼런스 세포 집단과 비교할 때 그 마커를 나타내는 세포의 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 100% 및 상기 20%와 100% 사이의 여하한 값 만큼의 세포 백분율 감소를 가리키는 것이다. 몇몇 구체예에서, 하나 또는 마커에 대해 양성인 세포 집단은 레퍼런스 세포 집단에 비해, 그 마커를 나타내는 세포의 적어도 약 50% 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100% 백분율 및 상기 50%와 100% 사이의 여하한 %을 가리키는 것이다.

[0354] **V. 예시적인 구체예**

[0355] [0319] 본 발명에 제공된 구체예는 다음과 같다:

[0356] 1. CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 농축시키는 방법으로서, 상기 방법은:

[0357] (a) 폐쇄 시스템에서 1차 선택을 수행하되, 상기 1차 선택은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플로부터 (i) CD4+ 세포 및 (ii) CD8+ 세포 중 어느 하나를 농축하는 것을 포함하여, 상기 농축에 의해 1차 선택된 집단 및 선택되지 않은 집단을 생성하는 것인 1차 선택을 수행하는 단계; 및

[0358] (b) 폐쇄 시스템에서 2차 선택을 수행하되, 상기 2차 선택은 선택되지 않은 집단으로부터 (i) CD4+ 세포 및 (ii) CD8+ 세포 중 다른 하나를 농축하는 것을 포함하여, 상기 농축에 의해 2차 선택된 집단을 생성하는 것인 1차 선택을 수행하는 단계

[0359] 를 포함하고, 상기 방법은 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포가 농축되고 1차 선택 집단의 세포와 2차 선택 집단의 세포를 포함하는 농축 조성물을 생산하는 것인 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 농축 방법.

[0360] 2. 구체예 1에 있어서, (c) 1차 선택 집단의 세포와 2차 선택 집단의 세포를 조합시킴으로써, 농축 조성물을 생산하거나 및/또는 농축 조성물 중 CD4+ 및 CD8+ 세포가 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 배양-개시 비율로 존재하는 조성물을 생산하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

[0361] 3. 구체예 2에 있어서, 상기 조합은 폐쇄 시스템에서 수행되는 것인 방법.

[0362] 4. 유전자 조작된 T 세포의 생산 방법으로서, 상기 방법은:

[0363] (a) 폐쇄 시스템에서 1차 선택을 수행하되, 상기 1차 선택은 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플로부터 (i) CD4+ 세포 및 (ii) CD8+ 세포 중 어느 하나를 농축하는 것을 포함하여, 상기 농축에 의해 1차 선택된 집단 및 선택되지 않은 집단을 생성하는 것인 1차 선택을 수행하는 단계;

[0364] (b) 폐쇄 시스템에서 2차 선택을 수행하되, 상기 2차 선택은 선택되지 않은 집단으로부터 (i) CD4+ 세포 및 (ii) CD8+ 세포 중 다른 하나를 농축하는 것을 포함하여, 상기 농축에 의해 2차 선택된 집단을 생성하는 것인 1차 선택을 수행하는 단계; 및

[0365] (c) 1차 선택 집단의 세포 및 2차 선택 집단의 세포를 함유하는 배양-개시 조성물을 자극 조건 하에 배양 용기에서 인큐베이션함으로써, 자극된 세포를 생성하는 단계; 및

[0366] (d) 유전자 조작된 항원 수용체를 단계 (c)에서 생성된 자극된 세포 내로 도입하는 단계

[0367] 를 포함함으로써 해서, 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 아웃풋 조성물을 생성하는 것인, 유전자 조작된 T 세포의 생산 방법.

[0368] 5. 구체예 4에 있어서, 단계 (c)에 앞서서, 1차 및 2차 선택된 세포 집단을 조합시켜 배양-개시 조성물을 생산

하거나 및/또는 상기 배양-개시 조성물 중 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포를 CD4⁺ 세포 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율로 존재하도록 하는 것을 더 포함하는 방법.

- [0369] 6. 구체예 5에 있어서, 상기 조합은 폐쇄 시스템에서 수행되는 것인 방법.
- [0370] 7. 구체예 1-6 중 어느 하나에 있어서, 상기 단계들 중 하나 이상은 자동화 방식으로 수행되고 및/또는 폐쇄 시스템이 자동화되는 것인 방법.
- [0371] 8. 구체예 2-7 중 어느 하나에 있어서, CD4⁺의 배양-개시 비율 대 CD8⁺의 배양-개시 비율은 약 10:1 내지 약 1:10, 약 5:1 내지 약 1:5, 또는 약 2:1 내지 약 1:2인 것인 방법.
- [0372] 9. 구체예 2-8 중 어느 하나에 있어서, CD4⁺ 세포 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 약 1:1인 것인 방법.
- [0373] 10. 구체예 2-6 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 인간 대상자로부터 획득되고 및;
- [0374] CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 대상자로부터의 샘플 중의 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율과 상이하며; 및/또는
- [0375] CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 대상자로부터의 샘플 중의 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율보다 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 더 크거나 미만인 것인 방법.
- [0376] 11. 구체예 1-10 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택에서 세포를 농축하는 것은 세포 표면 마커의 발현에 기초하여 양성 선택 또는 음성 선택을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0377] 12. 구체예 11에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택에서 세포를 농축하는 것은 비-T 세포 표면 마커를 발현하는 세포를 고갈시키는 것을 포함하는, 음성 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0378] 13. 구체예 12에 있어서, 비-T 세포 마커는 CD14를 포함하는 것인 방법.
- [0379] 14. 구체예 1-13 중 어느 하나에 있어서, 1차 또는 2차 선택에서 세포를 농축하는 것은 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포를 농축하기 위해 세포 표면 마커 또는 마커들의 발현에 기초하여 양성 또는 음성 선택 단계를 복수회 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0380] 15. 구체예 1-14 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택에서 세포를 농축하는 것은 면역친화성-기반 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0381] 16. 구체예 15에 있어서, 면역친화성-기반 선택은 세포를 세포 표면 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 접촉시키고 상기 항체에 결합된 세포를 회수하는 양성 선택, 또는, 항체와 결합되지 않은 세포를 회수하는 음성 선택에 의해 수행되고, 여기서 상기 회수된 세포들은 CD4⁺ 세포 또는 CD8⁺ 세포에 대해 농축된 것이고 자기 입자(magnetic particle) 상에 고정된 것인 방법.
- [0382] 17. 구체예 1-13 중 어느 하나에 있어서, 1차 선택 및 2차 선택은 작동적으로 연결된 분리된 분리 용기에서 수행되는 것인 방법.
- [0383] 18. 구체예 17에 있어서, 분리 용기들은 튜빙에 의해 작동적으로 연결된 것인 방법.
- [0384] 19. 구체예 15-18 중 어느 하나에 있어서, 면역친화성-기반 선택은 세포를, 친화성 크로마토그래피 매트릭스 상에 고정되거나 그에 부착된 항체와 접촉시킴으로써 수행되되, 상기 항체는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포의 양성 또는 음성 선택을 수행하기 위해 세포 표면 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 것인 방법.
- [0385] 20. 구체예 19에 있어서:
- [0386] 상기 항체는 매트릭스 상에 고정된 결합 시약과 가역적인 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 결합 파트너를 추가로 포함함으로써, 상기 항체는 상기 접촉 동안 상기 매트릭스에 가역적으로 결합되고; 및
- [0387] 상기 매트릭스 상에서 항체에 의해 특이적으로 결합된 세포 표면 마커를 발현하는 세포는 결합 시약과 결합 파트너 간의 가역적 결합의 파괴에 의해 매트릭스로부터 회수될 수 있는 것인 방법.
- [0388] 21. 구체예 17에 있어서:
- [0389] 결합 파트너는 바이오틴, 바이오틴 유사체, 및 결합 시약에 결합할 수 있는 펩타이드로부터 선택되고; 및
- [0390] 결합 시약은 스트렙트아비딘, 스트렙트아비딘 유사체 또는 뮤테인, 아비딘 및 아비딘 유사체 또는 뮤테인으로부

터 선택되는 것인 방법.

- [0391] 22. 구체예 21에 있어서:
- [0392] 결합 파트너는 SEQ ID NO:6에 제시된 아미노산 세트의 서열을 포함하거나; 및/또는
- [0393] 결합 시약은 SEQ ID NO: 12, 13, 15 또는 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인인 것인 방법.
- [0394] 23. 구체예 19-21 중 어느 하나에 있어서, 1차 선택 및/또는 2차 선택에서 샘플 중의 세포를 친화성 크로마토그래피 매트릭스와 접촉시킨 후, 결합 파트너와 결합 시약 간의 결합을 파괴하기 위해 경쟁 시약을 적용함으로써, 매트릭스로부터 선택된 세포를 회수하는 것을 더 포함하는 것인 방법.
- [0395] 24. 구체예 23에 있어서, 경쟁 시약은 바이오틴 또는 바이오틴 유사체인 것인 방법.
- [0396] 25. 구체예 20-24 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택 중 항체 또는 항체들은 세포 표면 마커 및 결합에 대한 해리 속도 상수(k_{off})가 약 $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 보다 큰 것인 방법.
- [0397] 26. 구체예 20-25 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택 중 항체 또는 항체들은 해리 상수(K_d)의 세포 표면 마커에 대한 친화성이 약 10^{-3} 내지 10^{-7} 이거나 또는 약 10^{-7} 내지 약 10^{-10} 의 범위인 것인 방법.
- [0398] 27. 구체예 20-26 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택의 크로마토그래피 매트릭스는 컬럼인 분리 용기에 충전된 것인 방법.
- [0399] 28. 구체예 19-27 중 어느 하나에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 적어도 또는 적어도 약 50×10^6 세포/mL, 100×10^6 세포/mL, 200×10^6 세포/mL 또는 400×10^6 세포/mL를 흡착하거나 및/또는 선택할 수 있는 것인 방법.
- [0400] 29. 구체예 19-28 중 어느 하나에 있어서, 1차 및 2차 선택 단계는 친화성 크로마토그래피 매트릭스의 사용을 포함하고 1차 및 2차 선택 단계에서 사용된 매트릭스의 양은 배양-개시 비율을 달성하는데 충분한 상대적 양인 것인 방법.
- [0401] 30. 구체예 1-29 중 어느 하나에 있어서, CD4+ 세포를 농축하는 것은 CD4의 표면 발현에 기초한 양성 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0402] 31. 구체예 1-29 중 어느 하나에 있어서, CD8+ 세포를 농축하는 것은 CD8의 표면 발현에 기초한 양성 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0403] 32. 구체예 1-29 중 어느 하나에 있어서, CD8+ 세포를 농축하는 것을 포함하는 1차 및 2차 선택 중 어느 하나는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축; 및/또는
- [0404] CD28, CD62L, CCR7, CD127 및 CD27로부터 선택된 마커를 발현하는 세포의 농축
- [0405] 을 더 포함하는 것인 방법.
- [0406] 33. 구체예 1-32 중 어느 하나에 있어서:
- [0407] 1차 선택은 CD8+ 세포에 대한 농축을 포함하고 2차 선택은 CD4+ 세포에 대한 농축을 포함하며; 및
- [0408] 1차 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축 및/또는 CD28, CD62L, CCR7, CD127 및 CD27로부터 선택된 마커를 발현하는 세포에 대한 농축을 더 포함하는 것인 방법.
- [0409] 34. 구체예 32 또는 구체예 33 또는 구체예 35에 있어서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축 및/또는 마커를 발현하는 세포에 대한 농축은:
- [0410] $CD8^+$ 세포가 농축된 1차 및/또는 2차 선택된 세포 집단으로부터, CD62L을 발현하는 세포를 선택하는 것; 및/또는
- [0411] $CD8^+$ 세포가 농축된 1차 및/또는 2차 선택된 세포 집단으로부터, CD27을 발현하는 세포를 선택하는 것; 및/또는

- [0412] CD8⁺ 세포가 농축된 1차 및/또는 2차 선택된 세포 집단으로부터, CCR7을 발현하는 세포를 선택하는 것; 및/또는
- [0413] CD8⁺ 세포가 농축된 1차 및/또는 2차 선택된 세포 집단으로부터, CD28을 발현하는 세포를 선택하는 것; 및/또는
- [0414] CD8⁺ 세포가 농축된 1차 및/또는 2차 선택된 세포 집단으로부터, CD127을 발현하는 세포를 선택하는 것
- [0415] 을 포함하는 것인 방법.
- [0416] 35. 구체에 1-32 중 어느 하나에 있어서:
- [0417] 1차 선택은 CD4⁺ 세포에 대한 농축을 포함하고 2차 선택은 CD8⁺ 세포에 대한 농축을 포함하며
- [0418] 2차 선택은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축을 더 포함하는 것인 방법.
- [0419] 36. 구체에 35에 있어서:
- [0420] (i) 1차 선택은 CD4의 표면 발현에 기초한 양성 선택에 의한 CD4 세포의 농축을 포함함으로써 CD4⁺ 일차 인간 T 세포가 농축된 1차 선택 집단 및 선택되지 않은 샘플을 생성하고;
- [0421] (ii) 2차 선택은 CD8⁺ 세포에 대한 농축을 포함하고, 2차 선택된 샘플을 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대해 농축시키는 것을 더 포함하되, 여기서 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축은:
- [0422] 나이브 T 세포 상에 존재하는 표면 마커를 발현하는 세포를 고갈시키기 위한 음성 선택 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커를 발현하는 세포에 대한 양성 선택; 또는
- [0423] 중심 기억 T 세포에는 존재하고 나이브 T 세포에는 존재하지 않는 표면 마커를 발현하는 세포에 대한 양성 선택 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에는 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커를 발현하는 세포에 대한 양성 선택;
- [0424] 을 포함함으로써 해서, T_{CM} 세포에 대해 농축된 CD8⁺ 일차 인간 T 세포를 생성하는 것인 방법.
- [0425] 37. 구체에 36에 있어서:
- [0426] 나이브 T 세포 상에 존재하는 마커는 CD45RA를 포함하고; 및
- [0427] 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축은 CD45RA를 발현하는 세포를 고갈시키는 음성 선택 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에는 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커를 발현하는 세포에 대한 양성 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0428] 38. 구체에 37에 있어서:
- [0429] 중심 기억 T 세포 상에 존재하고 나이브 T 세포 상에는 존재하지 않는 표면 마커는 CD45RO를 포함하고;
- [0430] 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 농축은 CD45RO를 발현하는 세포에 대한 양성 선택 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에는 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커를 발현하는 세포에 대한 양성 선택을 포함하는 것인 방법.
- [0431] 39. 구체에 36-38 중 어느 하나에 있어서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커는 CD62L, CCR7, CD27, CD127, 및 CD44로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0432] 40. 구체에 39에 있어서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 존재하고 다른 기억 T 세포 하위집단에는 존재하지 않는 표면 마커는 CD62L인 것인 방법.
- [0433] 41. 구체에 32-40 중 어느 하나에 있어서, 농축 조성물 또는 배양-개시 조성물 중 CD8⁺ 집단은 적어도 50% 중심 기억 T (T_{CM}) 세포를 포함하거나 또는 20% 미만의 나이브 T (T_N) 세포를 포함하거나 또는 적어도 80% CD62L⁺ 세포를 포함하는 것인 방법.
- [0434] 42. CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 농축 방법으로서, 상기 방법은 인큐베이션 조성물 중, 세포를 CD4에 특이적으로 결

합하는 1차 면역친화성 시약 및 CD8에 특이적으로 결합하는 2차 면역친화성 시약과 접촉시키되, 상기 면역친화성 시약들이 샘플의 세포 표면 상의 CD4 및 CD8 분자에 각각 특이적으로 결합하는 조건 하에서 접촉시키는 단계; 및

- [0435] 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약에 결합된 세포를 회수함으로써, 배양-개시 비율로 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 포함하는 농축 조성물을 생성하는 단계
- [0436] 를 포함하고, 여기서:
- [0437] 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 70% 미만 및/또는 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포의 70% 미만을 함유함으로써, CD4+ 및 CD8+ T 세포가 농축된 조성물을 생산하는 것인, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 농축 방법.
- [0438] 43. 유전자 조작된 T 세포의 제조 방법으로서, 상기 방법은:
- [0439] (a) 일차 인간 T 세포를 함유하는 샘플로부터 일차 인간 T 세포를 농축하는 단계로서, 상기 단계는:
- [0440] 상기 샘플의 세포를 인큐베이션 조성물 중 CD4에 특이적으로 결합하는 1차 면역친화성 시약 및 CD8에 특이적으로 결합하는 2차 면역친화성 시약과 접촉시키되, 상기 면역친화성 시약들이 샘플 중의 세포 표면 상의 CD4 및 CD8 분자들과 각각 결합하도록 하는 조건 하에서 접촉시키고; 및
- [0441] 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약에 결합된 세포를 회수함으로써, CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 배양-개시 비율로 포함하는 농축 조성물을 생성하는 단계를 포함하되, 여기서:
- [0442] 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 70% 미만 및/또는 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포의 70% 미만을 함유하는 것인 단계; 및
- [0443] (b) 배양-개시 조성물 중 농축 조성물의 세포를 배양 용기에서 자극 조건 하에 인큐베이션함으로써, 자극된 세포를 생성하되, 상기 세포는 배양-개시 비율로 또는 실제로 배양-개시 비율로 존재하는 것인 인큐베이션 단계; 및
- [0444] (c) 유전자 조작된 항원 수용체를 단계 (b)의 자극된 세포에 도입함으로써, 유전자 조작된 항원 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 아웃풋 조성물을 생성하는 단계
- [0445] 를 포함하는 것인, 유전자 조작된 T 세포의 제조 방법.
- [0446] 44. 구체에 42 또는 구체에 43에 있어서, 일차 인간 T 세포의 농축은 폐쇄 시스템에서 수행되는 것인 방법.
- [0447] 45. 구체에 42-44 중 어느 하나에 있어서, 1차 및 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 70% 미만 및 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포의 70% 미만을 함유하는 것인 방법.
- [0448] 46. 구체에 42-45 중 어느 하나에 있어서:
- [0449] 1차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD4+ 세포의 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만 또는 20% 미만 미만을 함유하고; 및/또는
- [0450] 2차 면역친화성 시약은 인큐베이션 조성물 중에 최적화 수율 농도로 존재함으로써, 농축 조성물이 인큐베이션 조성물 중 총 CD8+ 세포의 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만 또는 20% 미만 미만을 함유하는 것인 방법.
- [0451] 47. 구체에 42-46 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 적어도 1×10^9 CD3+ T 세포를 함유하는 것인 방법.
- [0452] 48. 구체에 42-47 중 어느 하나에 있어서, 인큐베이션 조성물 중 1차 및 2차 면역친화성 시약 중 어느 하나의 농도는 다른 하나의 농도보다 더 높음으로써, 이러한 더 큰 농도에 의해 농축 조성물 중 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포 각각을 CD4+ 세포 또는 CD8+ 세포의 다른 하나의 수율에 비해 더 높은 수율로 얻음으로써, 농축 조성물 중 배양-개시 비율을 얻는 것인 방법.
- [0453] 49. 구체에 48에 있어서:

- [0454] 1차 및 2차 면역친화성 시약들 중 하나의 농도는 1차 및 2차 면역친화성 시약들 중 다른 하나의 농도에 비해 적어도 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배 또는 10배 더 높고; 및/또는
- [0455] 농축 조성물 중 더 높은 수율은 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배, 2.0배, 3.0배, 4.0배, 5.0배, 6.0배, 7.0배, 8.0배, 9.0배 또는 10배 더 큰 것인 방법.
- [0456] 50. 구체에 42-49 중 어느 하나에 있어서, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 약 10:1 내지 약 1:10, 약 5:1 내지 약 1:5이거나 또는 약 2:1 내지 약 1:2인 것인 방법.
- [0457] 51. 구체에 42-50 중 어느 하나에 있어서, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 약 1:1인 것인 방법.
- [0458] 52. 구체에 42-51 중 어느 하나에 있어서:
- [0459] CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 대상자로부터의 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율보다 더 크고; 및/또는
- [0460] CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 배양-개시 비율은 대상자로부터의 샘플 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율보다 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 더 높거나 낮은 것인 방법.
- [0461] 53. 구체에 42-52 중 어느 하나에 있어서, 배양-개시 조성물 중 세포의 95% 초과 또는 98% 초과는 CD4⁺ 세포 및 CD8⁺ 세포인 것인 방법.
- [0462] 54. 구체에 42-53 중 어느 하나에 있어서, 각각의 면역친화성 시약은 항체를 함유하는 것인 방법.
- [0463] 55. 구체에 54에 있어서, 항체는 구체의 외부 표면 상에 고정된 것인 방법.
- [0464] 56. 구체에 55에 있어서, 구체는 자기 비드인 것인 방법.
- [0465] 57. 구체에 55 또는 구체에 56에 있어서:
- [0466] 항체는 구체 상에 고정된 결합 시약과 가역적인 결합을 형성할 수 있는 결합 파트너를 하나 이상 함유함으로써, 상기 항체가 상기 구체 상에 가역적으로 고정되고; 및
- [0467] 상기 방법은 1차 및 2차 면역친화성 시약에 샘플 중의 세포를 접촉시킨 후, 결합 파트너와 결합 시약 간의 결합을 파괴하기 위해 경쟁 시약을 적용함으로써, 선택된 세포를 구체로부터 회수하는 것을 더 포함하는 것인 방법.
- [0468] 58. 구체에 57에 있어서:
- [0469] 결합 파트너는 바이오틴, 바이오틴 유사체, 또는 결합 시약에 결합할 수 있는 펩타이드로부터 선택되고; 및
- [0470] 결합 시약은 스트렙트아비딘, 스트렙트아비딘 유사체 또는 뮤테인, 아비딘, 아비딘 유사체 또는 뮤테인으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0472] 59. 구체에 58에 있어서:
- [0473] 결합 파트너는 SEQ ID NO:6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 함유하거나; 및/또는
- [0474] 결합 시약은 SEQ ID NO: 12, 13, 15 또는 16에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 스트렙트아비딘 뮤테인인 것인 방법.
- [0475] 60. 구체에 58 또는 구체에 59에 있어서:
- [0476] 결합 시약은 스트렙트아비딘 또는 스트렙트아비딘 뮤테인의 하나 이상의 모노머를 포함하는 멀티머이거나; 및
- [0477] 결합 파트너는 각기 결합 시약의 적어도 1개의 모노머와 가역적으로 결합할 수 있는 적어도 2개의 모듈로 된 순차 어레인지먼트를 포함하는 것인 방법.
- [0478] 61. 구체에 60에 있어서, 결합 파트너는 SEQ ID NOS: 7-10 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열을 함유하는 것인 방법.
- [0479] 62. 구체에 57-61 중 어느 하나에 있어서, 경쟁 시약은 바이오틴 또는 바이오틴 유사체인 것인 방법.

- [0480] 63. 구체에 42-63 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택 중 항체 또는 항체들은 항체와 세포 표면 마커 사이의 결합에 대한 해리 속도 상수(k_{off})가 약 $3 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 을 초과하는 것인 방법.
- [0481] 64. 구체에 42-63 중 어느 하나에 있어서, 1차 및/또는 2차 선택 중 항체 또는 항체들은 약 10^{-3} 내지 10^{-7} 범위 또는 약 10^{-7} 내지 약 10^{-10} 범위의 해리 상수를 갖는 친화성을 갖는 것인 방법.
- [0482] 65. 구체에 42-63 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 단계는 자동화 방식으로 수행되거나 및/또는 폐쇄 시스템이 자동화된 것인 방법.
- [0483] 66. 구체에 2, 3 및 5-41 중 어느 하나에 있어서:
- [0484] 1차 선택 및/또는 2차 선택을 수행하기 전에, 샘플 중 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 탐지하고; 및
- [0485] 샘플 중 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율에 기초하여, 1차 및/또는 2차 선택을 조정하여 CD4+ 대 CD8+ T 세포가 배양-개시 비율로 포함된 조성물을 제조하는 것인 방법.
- [0486] 67. 구체에 66에 있어서:
- [0487] 1차 및/또는 2차 선택은 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함하는 면역친화성-기반 선택을 포함하고; 및
- [0488] 1차 및/또는 2차 선택의 조정은 1차 및/또는 2차 선택 중 친화성 크로마토그래피 매트릭스의 양을 배양-개시 비율을 달성하는데 충분하도록 선택하는 것인 방법.
- [0489] 68. 구체에 42-65 중 어느 하나에 있어서:
- [0490] 샘플의 세포를 1차 및 2차 면역친화성 시약과 접촉시키기 전에, 샘플 중 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 탐지하고; 및
- [0491] 샘플 중 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율에 기초하여, 1차 및/또는 2차 면역친화성 시약의 농도를 선택하여 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 배양-개시 비율로 포함하는 농축 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0492] 69. 구체에 1-68 중 어느 하나에 있어서, 아웃풋 조성물은 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율이 약 2:1 및 약 1:5인 것인 방법.
- [0493] 70. 구체에 69에 있어서, 아웃풋 조성물 중 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율은 1:1 또는 약 1:1인 것인 방법.
- [0494] 71. 구체에 1-70 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 대상자로부터 획득되는 것인 방법.
- [0495] 72. 구체에 71에 있어서, 대상자는 입양세포 치료를 위하여 상기 유전자 조작된 T 세포 또는 세포들이 투여될 대상자인 것인 방법.
- [0496] 73. 구체에 72에 있어서, 대상자는 입양세포 치료를 위하여 상기 유전자 조작된 T 세포 또는 세포들이 투여될 대상자가 아닌 것인 방법.
- [0497] 74. 구체에 1-73 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 혈액 또는 혈액-유래 샘플인 것인 방법.
- [0498] 75. 구체에 1-74 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 백혈구 세포 샘플인 것인 방법.
- [0499] 76. 구체에 1-75 중 어느 하나에 있어서, 샘플은 성분채집술, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 또는 백혈구성분채집술 샘플인 것인 방법.
- [0500] 77. 구체에 4-41 또는 43-76 중 어느 하나에 있어서, 자극 조건 하에 배양 용기에서 조성물을 인큐베이션하는 것은 유전자 조작된 항원 수용체의 도입 전, 도입 중 및/또는 도입 후에 수행되는 것인 방법.
- [0501] 78. 구체에 4-41 또는 43-76 중 어느 하나에 있어서, 자극 조건 하에 배양 용기에서 조성물을 인큐베이션하는 것은 유전자 조작된 항원 수용체의 도입 전, 도입 중 및 도입 후에 수행되는 것인 방법.
- [0502] 79. 구체에 4-41 또는 43-78 중 어느 하나에 있어서, 자극 조건은 조성물의 T 세포가 증식하도록 하는 조건을 포함하는 것인 방법.
- [0503] 80. 구체에 4-41 또는 43-79 중 어느 하나에 있어서, 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분들의 하나 이상의 세포내 신호 도메인을 활성화시킬 수 있는 물질을 포함하는 것인 방법.

- [0504] 81. 구체에 80에 있어서, TCR 복합체의 하나 이상의 성분들은 CD3 제타 사슬을 함유하는 것인 방법.
- [0505] 82. 구체에 4-41 또는 43-81 중 어느 하나에 있어서, 자극 조건은 항-CD3 항체, 및 항-CD28 항체, 항-4-1BB 항체, 및/또는 시토카인의 존재를 포함하는 것인 방법.
- [0506] 83. 구체에 82에 있어서, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체는 고체 지지체의 표면에 존재하는 것인 방법.
- [0507] 84. 구체에 83에 있어서, 시토카인은 IL-2, IL-15, IL-7, 및/또는 IL-21을 포함하는 것인 방법.
- [0508] 85. 구체에 4-41 또는 43-84 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 항원 수용체는 T 세포 수용체 (TCR) 또는 기능성 비-TCR 항원 수용체를 포함하는 것인 방법.
- [0509] 86. 구체에 85에 있어서, 수용체는 치료하고자 하는 질병 또는 병태의 세포에 의해 발현되는 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0510] 87. 구체에 85 또는 86에 있어서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR)인 것인 방법.
- [0511] 88. 구체에 87에 있어서, CAR은 세포의 항원-인식 도메인 및 ITAM-함유 서열을 포함하는 세포내 신호 도메인 및 T 세포 공동자극 분자의 세포내 시그널 도메인을 함유하는 것인 방법.
- [0512] 89. 치료 방법으로서, 상기 방법은:
- [0513] (a) 구체에 1-88 중 어느 하나에 기재된 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 아웃풋 조성물을 제조하는 단계; 및
- [0514] (b) 상기 아웃풋 조성물의 세포를 대상자에게 투여하는 단계
- [0515] 를 포함하는 것인 치료 방법.
- [0516] 90. 구체에 89에 있어서, 세포가 단리되는 샘플은 상기 세포가 투여될 대상자로부터 유래되는 것인 방법.
- [0517] 91. 구체에 1-88 중 어느 하나의 방법에 의해 제조된 세포의 조성물.
- [0518] 92. 구체에 91에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물.
- [0519] 93. 치료 방법으로서, 상기 방법은 구체에 91 또는 92의 세포들의 조성물을 대상자에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0520] 94. 구체에 93에 있어서, 유전자 조작된 항원 수용체는 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0521] 95. 구체에 94에 있어서, 질병 또는 병태는 암인 것인 방법.
- [0522] 96. 구체에 91 또는 구체에 92에 있어서, 대상자의 질병 또는 병태를 치료하기 위한 것인 조성물.
- [0523] 97. 대상자의 질병 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조를 위한, 구체에 91 또는 구체에 92의 조성물의 용도.
- [0524] 98. 구체에 96 또는 구체에 97에 있어서, 유전자 조작된 항원 수용체는 질병 또는 병태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인 조성물 또는 용도.
- [0525] 99. 구체에 96-98 중 어느 하나에 있어서, 질병 또는 병태는 암인 것인 조성물 또는 용도.
- [0526] 100. 표적 세포를 정제하기 위한 폐쇄 장치 시스템으로서 상기 시스템은:
- [0527] a) 1차 결합체가 고정되어 있는 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스로서, 여기서 상기 결합체는 1차 세포 상에 존재하는 1차 세포 표면 마커와 특이적으로 결합하는 것이고, 상기 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 1차 작동가능한 연결을 통해 세포 샘플을 포함하는 저장소에 작동적으로 연결되며, 상기 작동가능한 연결은 저장소로부터 세포를 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스로 통과시키는 것을 허용하는 것이고 상기 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 2차 작동가능한 연결을 통해 아웃풋 용기에 작동적으로 연결된 것인 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스; 및
- [0528] b) 2차 결합체가 고정되어 있는 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스로서, 여기서 상기 2차 결합체는 2차 세포 상에 존재하는 2차 세포 표면 마커와 특이적으로 결합하는 것이고, 상기 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는

3차 작동가능한 연결을 통해 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 작동적으로 연결되며, 상기 3차 작동가능한 연결은 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통해 통과하고 1차 결합제와는 결합되지 않은 세포를 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통해 통과하도록 허용할 수 있는 것이고, 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 4차 작동가능한 연결을 통해 아웃풋 용기에 작동적으로 연결되며, 4차 작동가능한 연결은 결합된 세포들을 1차 및/또는 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합 및 그로부터 용리하도록 통과시키는 것을 허용하며, 상기 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 5차 작동가능한 연결을 통해 폐기 용기에 작동적으로 연결되고, 상기 5차 작동가능한 연결은 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통해 통과하여 1차 결합제와 결합되지 않은 세포 및 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통해 통과하여 2차 결합제와 결합되지 않은 세포들을 통과시킬 수 있는 것인 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스;

[0529] c) 아웃풋 용기; 및

[0530] d) 폐기 용기를 포함하고,

[0531] 여기서 상기 시스템은 상기 폐쇄 시스템 내에서, 아웃풋 용기에 단일 조성물로서, (i) 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합되어 그로부터 회수된 세포 및 (ii) 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 통과하여 그에 결합되지 않고, 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 결합되어 그로부터 회수된 세포를 수집하도록 설정되는 것인, 표적 세포를 정제하기 위한 폐쇄 장치 시스템.

[0532] 101. 구체예 100에 있어서, 상기 작동가능한 연결의 하나 이상은 1차 저장소, 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스, 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스 및/또는 배양 용기를 연결하는 튜빙을 함유하는 것인 폐쇄 장치.

[0533] 102. 구체예 101에 있어서, 튜빙은 스톱콕, 밸브 또는 클램프에 연결된 것인 폐쇄 장치.

[0534] 103. 구체예 100-102 중 어느 하나에 있어서:

[0535] (a) 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 CD4+ 친화성 크로마토그래피 매트릭스 또는 CD8+ 친화성 크로마토그래피 매트릭스 중 어느 하나이고; 및

[0536] (b) 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 CD4+ 친화성 크로마토그래피 매트릭스 또는 CD8+ 친화성 크로마토그래피 매트릭스 중 다른 하나인 것인 폐쇄 장치 시스템.

[0537] 104. 구체예 100-103 중 어느 하나에 있어서:

[0538] d) 3차 결합제가 고정되어 있는 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 추가로 포함하되, 상기 결합제는 3차 세포 표면 마커에 특이적으로 결합하는 것이고, 상기 3차 결합제는 3차 세포 표면 마커를 발현하는 세포와 결합할 수 있는 것이며, 3차 작동가능한 연결이 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 1차 매트릭스에 추가로 작동적으로 연결하고, 6차 작동가능한 연결이 1차 매트릭스에 결합하여 그로부터 회수된 세포 및 3차 매트릭스에 결합하여 그로부터 회수된 세포들을 아웃풋 용기에 통과하도록 허용할 수 있으며, 및

[0539] 5차 작동가능한 연결이 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 폐기 용기에 추가로 작동적으로 연결시켜, 5차 작동가능한 연결이 3차 컬럼을 통해 통과하여 그에 결합하지 않은 세포들을 폐기 용기에 작동적으로 연결시킬 수 있는 것인 폐쇄 장치 시스템.

[0540] 105. 구체예 100-103 중 어느 하나에 있어서:

[0541] d) 3차 결합제가 고정되어 있는 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 추가로 포함하되, 상기 결합제는 3차 세포 표면 마커에 특이적으로 결합함으로써, 상기 3차 결합제가 3차 세포 표면 마커를 발현하는 세포와 결합할 수 있고, 여기서

[0542] 2차 작동가능한 연결은 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 1차 매트릭스 및 아웃풋 용기에 추가로 작동적으로 연결시켜, 2차 작동가능한 연결이 1차 매트릭스에 결합되어 그로부터 회수되고 3차 매트릭스에 결합되어 그로부터 회수된 세포들을 아웃풋 용기로 전달할 수 있는 것인 폐쇄 장치 시스템.

[0543] 106. 구체예 104 또는 105에 있어서:

[0544] 1차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 CD8에 특이적으로 결합하는 결합제를 포함하고;

[0545] 2차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 CD4에 특이적으로 결합하는 결합제를 포함하며; 및

[0546] 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에서 발현되는 마커에 특이적으로 결합하는 결

합제를 포함하는 것인 폐쇄 장치 시스템.

- [0547] 107. 구체예 106에 있어서, 3차 친화성 크로마토그래피 매트릭스의 결합제는 CD62L, CD45RA, CD45RO, CCR7, CD27, CD127, 및 CD44로부터 선택된 세포 표면 마커에 특이적으로 결합하는 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0548] 108. 구체예 100-107 중 어느 하나에 있어서, 친화성 크로마토그래피 매트릭스 중 하나 이상 또는 모두는 하나 이상의 경쟁 시약을 포함하는 용리 완충제 저장소에 추가로 작동적으로 연결된 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0549] 109. 구체예 100-107 중 어느 하나에 있어서, 경쟁 시약은 바이오틴, 바이오틴 유사체, 및 크로마토그래피 매트릭스에 결합할 수 있는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0550] 110. 구체예 100-107 중 어느 하나에 있어서, 3차, 4차 또는 6차 작동가능한 연결 중 하나 이상 또는 모두는 경쟁 물질 제거 챔버를 추가로 포함하는 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0551] 111. 구체예 110에 있어서, 경쟁 물질 제거 챔버는 결합 시약을 추가로 함유하는 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0552] 112. 구체예 111에 있어서, 결합 시약은 스트렙트아비딘, 스트렙트아비딘 유사체 또는 뮤테인, 아비딘 및 아비딘 유사체 또는 뮤테인으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0553] 113. 구체예 100-112 중 어느 하나에 있어서, 결합제들 중 하나 이상 또는 모두는 항체인 것인 폐쇄 장치 시스템.
- [0554] 114. 구체예 100-112 중 어느 하나에 있어서, 결합제들 중 하나 이상 또는 모두는 친화성 크로마토그래피 매트릭스에 가역적으로 결합된 것인 폐쇄 장치 시스템.

[0555] **VI. 실시예**

[0556] [0320] 다음의 실시예들은 설명 목적을 위한 것으로 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0557] **실시예 1: 유전자 조작 및 입양세포 치료를 위한 면역자기 분리에 의한 단일 프로세스 스트림을 이용한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물의 생성**

[0558] [0321] 예시적인 방법으로서, 중심 기억 T 세포가 농축된 CD4⁺ T 세포 집단 및 CD8⁺ T 세포 집단을 성분채집술 생산 샘플로부터 분리한 다음 이어서 인큐베이션 및 조작하고, 대상자에게 투여한다. CliniMACS® Prodigy 시스템을 이용하여 면역자기 분리에 의해 단일 프로세스 스트림을 이용하여 단리 공정을 수행한다. 이 프로세스는 CliniMACS® Prodigy 기기 및 3개의 개별적인 튜빙 세트를 이용하여 1차 성분채집술 분획으로부터 CD4⁺ 세포가 분리되고 2차 성분채집술 분획으로부터 CD8⁺ 세포가 분리 및 추가로 고갈/농축되는, 다른 방법에 비해 능률화 (streamlined)된다.

[0559] [0322] 이 능률화된 방법은 하나의 용기(예컨대, 튜빙 세트)로부터 다른 용기로 세포 집단을 이동시킴이 없이, CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 집단의 단리를 위한 하나의 튜빙 세트를 이용하여 수행된다.

[0560] [0323] CD4⁺ 세포 집단은 CliniMACS® CD4 시약을 이용하여 성분채집술 샘플을 인큐베이션함으로써 단리된다. 이어서 세포들을 농축 프로그램을 실시하도록 설정된 CliniMACS® Prodigy 기기에 의해 분리한 다음 2가지 세포 분획(즉, 면역자기적으로 선택된 농축된 CD4⁺ 세포 분획 및 병류(flow-through) 세포 분획) 모두를 유지시킨다. 농축된(양성) 분획은 단리된 CD4⁺ T 세포 집단이다. CD8⁺ T 세포의 집단은 CliniMACS® CD14 시약 및 CliniMACS® CD45RA 시약 또는 CD19 시약과 함께 병류하는(음성) 분획을 인큐베이션함으로써 단리된다. CliniMACS® Prodigy 기기는 고갈 프로그램을 실시하도록 설정된다. 이어서 세포/시약 혼합물을 1차 분리 단계에서 이용된 것과 동일한 튜빙 세트를 이용하여 CliniMACS® Prodigy 기기에 의해 분리한다. CD14⁺/CD45RA⁺ 또는 CD14⁺/CD19⁺ 세포가 고갈된 병류(음성) 분획을 CliniMACS® CD62L 시약과 함께 인큐베이션한다. 세포/시약 혼합물은 동일한 튜빙 세트를 이용하여 농축 프로그램을 실시하는 CliniMACS® Prodigy 기기를 이용하여 분리된다. 양성 분획은 중심 기억 세포에 대해 농축된 단리된 CD8⁺ 세포 집단이다.

[0562] [0324] 단리된 CD4+ 및 CD8+ 집단들을 동일한 배양 용기에서 배양-개시 조성물 중 배양 개시 비율로 조합시킨다. 이 배양-개시 비율은 인큐베이션 및/또는 조작 단계 후에 소망되는 특정 아웃풋 비율을 달성하도록

또는 그러한 소망되는 아웃풋 비율의 특정 허용 오차 범위 내에 들도록 설계되거나, 또는 특정 시간 백분을 내에 그렇게 되도록 설계된다. Prodigy 시스템에서, 37°C에서 72 시간 동안 IL-2 (100 IU/mL)의 존재 하에 항-CD3/항-CD28 비드를 이용하는 것과 같은 자극 조건 하에 세포들을 인큐베이션한다.

[0563] [0325] 세포 조성물은 인큐베이션 또는 배양 개시 후 하나 이상의 시점, 예컨대 인큐베이션 동안의 한 시점에서 임의로 주기적으로 평가 및/또는 조정된다. 평가는 증식 속도 측정, 생존률 측정, 표현형 탐지, 예컨대 단백질 또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 하나 이상의 표면 또는 세포내 마커의 발현, 및/또는 온도, 배지 성분(들), 산소 또는 이산화탄소 함량에 대한 조성물 또는 용기의 조정, 및/또는 하나 이상의 인자, 물질, 성분 및/또는 서브타입을 비롯한 세포 종류의 존부 여부 또는 양이나 상대적인 양을 측정하는 것을 포함한다.

[0564] [0326] 이렇게 인큐베이션된 세포는 키메라 항원 수용체 (CARs) 또는 재조합 TCRs와 같은 재조합 항원 수용체의 발현을 위한 재조합 유전자를 세포에 도입함으로써 유전자 조작된다. 이러한 도입은 동일한 조성물 및 용기에 존재하는 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포를 이용하여, CliniMACS® Prodigy 기기 내의 폐쇄 환경에서 수행된다. 이 방법에 의해 조작된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 갖는 아웃풋 조성물이 결과된다.

[0565] **실시예 2: 폐쇄 시스템에서 순차 정제에 의한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물의 생성**

[0566] [0327] 이 실시예는 대상자로부터 수득된 성분채집술 생성 샘플로부터 CD4+ T 세포 집단 및 CD8+ T 세포 집단을 조작 또는 선택하기 위한 예시적인 방법을 입증한다. 이 방법은 동일한 출발 샘플로부터 CD4+ 및 CD8+ T 세포 집단들의 순차적인 양성 선택을 위해 복수개의 크로마토그래피 컬럼이 구비된 폐쇄 시스템을 이용하여 수행된다.

[0567] **A. CD4+ T 세포 집단 및 CD8+ T 세포 집단의 농축**

[0568] [0328] 도 1A에 도시된 이 예시적인 방법에서는 폐쇄 장치 14 내에 액상 흐름 조절을 위한 밸브s 13 및 다양한 튜빙관을 통해 면역크로마토그래피 선택 컬럼 및 제거 컬럼이 상호 및 연동 펌프 8과 작동적으로 연결되어 있다.

[0569] [0329] 1차 선택 컬럼 1은 아가로스 수지, 예컨대 간행된 미국특허 출원 No. US2015/0024411에 설명된 바와 같은 T 세포의 단리를 위한 수지, 배제 한계가 예컨대 T 세포의 크기보다 더 크게 설정된 것, 예컨대 Agarose Beads Technologies (스페인, 마드리드)사로부터 구득한 아가로스 (6 x 10⁶ Daltons의 크기 배제를 갖는 Superflow™ Agarose에 비해 감소된 배제 크기를 가짐)와 같은 친화성 크로마토그래피 매트릭스 3을 선택된 부피로 함유한다. 1차 컬럼 중의 매트릭스는 Strep-Tactin®의 멀티머에 결합되어 있다 (예컨대 SEQ ID NO: 12, 13, 15 또는 16 중 어느 하나에 제시된 스트렙트아비딘 돌연변이체를 함유하거나, IBA GmbH, Germany 또는 국제공개 PCT 출원 Nos. WO 2014/076277에 설명됨). 2차 선택 컬럼 2는 상술한 바와 같고 Strep-Tactin®의 멀티머에도 결합되어 있는 아가로스 수지와 같은 친화성 크로마토그래피 매트릭스 4를 선택된 부피로 함유한다.

[0570] [0330] 항-CD8 Fab 단편 18을 함유하는 저장소(reservoir)가 항-CD8 Fab가 1차 선택 컬럼 1에 적용되도록 펌프 8, 튜빙, 및 밸브s 13을 통해 흐르도록 로딩됨으로써 해서, 항-CD8 Fab는 그의 중쇄의 카르복시-말단에 융합된, Fab 단편 중 Twin Strep-Tag®(예컨대 SEQ ID NO: 10에 제시됨; IBA GmbH)과 함께 친화성 매트릭스 3 상의 Strep-Tactin®에 고정되게 된다 (예컨대 간행된 미국특허 출원 No. US2015/0024411 참조). 몇몇 구체예에서, 세척 완충제 저장소 6으로부터의 세척 완충액, 이를테면 0.5% 소 혈청 알부민, 인간 혈청 알부민, 또는 재조합 인간 혈청 알부민을 함유하는 인산염 완충염수(PBS)를 작동적으로 커플링된 튜빙을 통해 1차 선택 컬럼에 통과 하도록 로딩한다. 병류는 1차 선택 컬럼과 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 통해 폐기 용기 10에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 복수회 반복된다.

[0571] [0331] 항-CD4 Fab 단편 19를 함유하는 저장소가 항-CD4 Fab가 2차 선택 컬럼 2에 적용되도록 펌프 8, 튜빙, 및 밸브 13을 통해 흐르도록 로딩됨으로써 해서, 항-CD8 Fab는 Twin Strep-Tag®(과 함께 친화성 매트릭스 4 상의 Strep-Tactin® 상에 고정되게 된다. 몇몇 구체예에서, 세척 완충제 저장소 6으로부터의 세척 완충액을 작동적으로 커플링된 튜빙을 통해 2차 선택 컬럼을 통해 통과시킨다. 병류는 2차 선택 컬럼과 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 통해 폐기 용기 10에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 복수회 반복된다.

[0572] [0332] 1차 선택 컬럼 및 2차 선택 컬럼에 함유된 친화성 매트릭스 시약의 부피는 같거나 다를 수 있고, 선택 후 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 소망되는 비율 및/또는 선택된 소망되는 수율에 기초하여 선택될 수 있다. 이렇게 선택된 부피는 충전된 컬럼 매 1 mL 부피 당 선택가능한 평균 수율이 1 x 10⁸ 세포라는 가정에 기반한다. 한 가

지 예시적인 방법에서, 컬럼 부피는 항-CD4 Fab 단편에 대한 2 mL 컬럼 및 항-CD8 Fab 단편에 대한 컬럼의 2 mL 부피를 이용하는 것처럼 동일하나. 컬럼 길이 및/또는 컬럼 직경은 예컨대 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 소망되는 배양-개시 비율을 달성하도록 소망되는 부피에 알맞게 선택할 수 있다. 몇몇 구체예에서, 친화성 매트릭스의 부피를 보상하기 위해, 동일한 Fab 시약이 고정된 복수개의 컬럼을 연속하여 직접 첨가해서 튜빙관을 통해 상호 작동적으로 연결시킨다.

[0573] [0333] 세포 선택을 위해, 성분채집술 샘플을 1차 선택 컬럼 1에 적용함으로써, CD8+ T 세포가 만일 샘플에 존재할 경우, 1차 컬럼의 수지 3에 결합된채 남아있고, 선택되지 않은 세포(CD8- 세포 함유)는 컬럼을 통해 통과한다. 몇몇 실시예에서 사용된 출발 샘플 중의 세포 갯수는 조합된 부피의 매트릭스에 기초하여, 예컨대 각각의 선택에 대한 컬럼의 능력 보다 큰 양으로 선택되는 세포의 수를 초과하도록 선택된다 (예컨대 2억개 초과 CD8+ 세포 및 2억개 초과 CD4+ 세포, 예컨대 적어도 10% 또는 20% 또는 그 이상 더 큰). 선택되지 않은 세포를 함유하는 병류 (음성 분획)를 작동적으로 연결된 튜빙을 경유하여 1차 컬럼으로부터 2차 선택컬럼 2에 통과시킨다. 병류는 플루이드를 함유하며 추가의 선택되지 않은 세포(음성 세포)는 2차 선택 컬럼 및 폐기 용기와 작동적으로 연결된 밸브 13을 통해 폐기 용기 10에 배향된다.

[0574] [0334] 몇몇 구체예에서, 별법으로 1차 선택 컬럼은 항-CD4 친화성 크로마토그래피 매트릭스이고 2차 선택 컬럼은 항-CD8 친화성 크로마토그래피 매트릭스일 수 있다.

[0575] [0335] 세척 완충제 저장소 6으로부터, 작동적으로 커플링된 튜빙을 경유하여 1차 컬럼 및 2차 컬럼을 통해 세척 완충액을 유동시킨다. 1차 및 2차 컬럼으로부터 세척된 세포들을 함유하는 병류는 2차 선택 컬럼과 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 폐기 용기 10에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 수회 반복된다.

[0576] [0336] 용리 완충제 저장소 7로부터, 작동적으로 커플링된 튜빙을 경유하여 1차 컬럼과 2차 컬럼을 통해 용리액 함유 완충제, 예컨대 저농도의 바이오틴 또는 그의 유사체, 예를 들어 2.5 mM 데스티오바이오틴을, 유동시키도록 로딩한다. 몇몇 구체예에서, 용리액은 세포 배양 배지를 함유한다. 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포 및 잔여 바이오틴 또는 유사체를 함유하는 병류는 바이오틴 또는 그의 유사체를 제거하기 위해 제거 챔버 9에 배향된다. 제거 챔버 9는 샘플로부터 바이오틴 또는 바이오틴 유사체르르 제거하는데 충분한 부피로 고정된 Strep-Tactin® 을 갖는 Superflow™ Sepharose® 비드의 컬럼, 예컨대 충전 부피 6 mL이고 결합능이 300 나노몰 바이오틴/mL인 컬럼이다. CD4+ 및 CD8+에 대해 양성 선택된 농축된 세포를 함유하는 병류는 제거 챔버 9와 배양 용기를 작동적으로 연결하는 밸브를 경유하여, 백과 같은 배양 용기 12에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 용리 단계는 반복된다.

[0577] [0337] 몇몇 구체예에서, 용리 단계 수행 후, T-세포 활성화 시약 (예컨대 항-CD3, 항-CD28, IL-2, IL-15, IL-7, 및/또는 IL-21)을 함유하는 활성화 완충제는 세척 완충제를 대체하여 제거 챔버를 통해 배향되고 병류는 배양 용기에 배향된다. 배양 용기에 수집된 양성 분획은 단리 및 조합된 CD4+ 및 CD8+ 세포 집단이다.

[0578] B. 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상의 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된, CD4+ T 세포 집단 및 CD8+ T 세포 집단의 농축

[0579] [0338] 도 1B에 도시된 예시적인 일 공정에서는 일련의 면역크로마토그래피 선택 컬럼 및 제거 컬럼들이 폐쇄 장치 14 내에서, 액상 흐름 조절을 위한 밸브 13 및 다양한 튜빙관으로 통해 상호 그리고 연동 펌프 8에 작동적으로 연결되어 있다.

[0580] [0339] 1차 선택 컬럼 1 및 2차 선택 컬럼 2는 실시예 2A와 관련하여 전술한 바와 동일하다. 이에 더해, 이 방법은 실시예 2A와 관련하여 전술한 바와 같이, T 세포의 단리를 위해, 간행된 미국특허 출원 No. US2015/0024411에 설명된 수지와 같은 아가로스 수지등의 친화성 매트릭스 17을 선택된 부피로 함유하는 3차 선택 컬럼 15를 추가로 포함한다.

[0581] [0340] 실시예 2A에 설명된 바와 같이, 항-CD8 Fab 및 항-CD4 Fab를 1차 컬럼 및 2차 컬럼에 각각 적용한다. CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127 중 어느 하나와 같이, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 20 상에 발현되는 마커에 대한 추가적인 Fab 단편을 함유하는 저장소를 펌프 8, 튜빙, 및 밸브 13을 통해 유동하도록 로딩하여, 상기 추가 Fab가 3차 선택 컬럼 15에 적용됨으로 해서, 추가적인 Fab가 실시예 2A에 설명된 바와 같이 그의 중쇄의 카르복시-말단과 융합된, Fab 단편에서 Twin Strep-Tag® (SEQ ID NO: 10; IBA GmbH)와 함께 친화성 매트릭스 17 상에서 Strep-Tactin®에 컨주게이션된다. 몇몇 구체예에서, 실시예 2A에 설명된 바와 같은 세척 완충액을 작동적으로 커플링된 튜빙을 경유하여 3차 선택 컬럼을 통해 로딩한다. 병류는 3차 선택 컬럼과 폐기 용기를 작동적

으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 폐기 용기에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 반복회 반복된다.

[0582]

[0341] 1차 선택, 2차 및/또는 3차 선택 컬럼에 함유된 친화성 매트릭스 시약의 부피는 같거나 다를 수 있고, 선택 후 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에서 발현되는 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 소망되는 비율 및/또는 선택의 소망되는 비율에 기초하여 선택된다. 이렇게 선택된 부피는 충전된 컬럼 매 1 mL 부피 당 1×10^8 세포가 선택가능한 평균 수율인 것이라는 가정에 기초한 것이다. 또한, 특정의 선택된 배양-개시 비율, 예컨대, CD4+ 세포 대 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 농축된 CD8+ 세포를 함유하는 집단 (예컨대 CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127 중 어느 하나에 대한 추가 선택에 기초하여 농축된 CD8+ 세포 집단)의 배양-개시 비율이 1:1인 경우, 예컨대 CD8+ 세포와 같은 농축 집단의 모집단 선택을 위한 매트릭스 부피는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 집단 중 다른 하나, 예컨대 CD4+ 집단을 선택하는데 사용되는 매트릭스에 비해 더 크다. 추가 농축 집단의 모집단을 선택하는데 사용되는 매트릭스, 예컨대 항-CD8 Fab 단편을 함유하는 매트릭스의 부피가 다른 매트릭스 또는 다른 매트릭스들의 부피보다 더 큰 정도 또는 양은 모집단, 예컨대 샘플 중의 CD8+ 세포의 분획 또는 백분율에 비교된, 샘플 중 추가 농축된 세포 집단(예컨대 CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD27+ 또는 CD8+/CD127+)의 분획 또는 백분율에 기초하여 선택된다. 이것은 환자 또는 건강한 공여자의 평균에 기초하여 평가될 수 있고 또는 사용할 컬럼 크기를 결정하기에 앞서 선택이 수행되는 주어진 환자에 대해 측정될 수 있다.

[0583]

[0342] 예시적인 한 가지 방법에서, 이 방법에 사용되는 컬럼 부피는, 예컨대, 항-CD4 Fab 단편의 경우 2 mL 컬럼, 항-CD8 Fab 단편의 경우 6 mL 컬럼, 및 항-CD62L Fab 단편의 경우 2 mL 컬럼이다. 컬럼 길이 및/또는 컬럼 직경은 소망되는 부피에 맞게 선택될 수 있으며, 예컨대 CD8+/CD28+, CD8+/CD62L+, CD8+/CCR7+, CD8+/CD27+ 또는 CD8+/CD127+ 세포와 같이, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에서 발현되는 마커를 발현하는 세포에 대해 농축된 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 소망되는 배양-개시 비율이 달성되도록 선택될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 친화성 매트릭스의 부피를 상쇄하기 위해, 동일한 Fab 시약이 고정된 복수개의 컬럼을 직접 직렬 부가하여 다른 튜빙관을 통해 상호 작동적으로 연결시킬 수 있다.

[0584]

[0343] 세포 선택을 위해, 성분채집술 샘플을 1차 선택 컬럼 1에 적용함으로써, CD8+ T 세포 (샘플 중에 존재할 경우)가 1차 컬럼의 수지에 선택되지 않은 세포로서 결합된 채로 유지되어 컬럼을 통과한다(CD8- 세포 함유). 몇몇 실시예에서 사용되는 출발 샘플 중 세포의 갯수는 각 선택에 대한 컬럼 능력보다 더 큰 양과 같이 매트릭스의 조합 부피에 기초하여 선택될 세포의 갯수를 초과하도록 선택된다 (예컨대 2억개 초과 CD8+/CD62L+ 세포 및 2억개 초과 CD4+ 세포를 갖는 양, 예컨대 적어도 약 10% 또는 20% 이상 더 많은 양). 선택되지 않은 세포 (음성 분획)를 함유하는 병류는 1차 컬럼과 2차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13을 통해 2차 컬럼 2를 통과하도록 배향된다. CD4+ T 세포는 2차 컬럼 중의 수지에 결합된 채 유지된다. 유액 및 추가로 선택되지 않은 세포(음성 세포)를 함유하는 병류는 2차 선택 컬럼과 음성 분획 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 통해 1차 폐기 용기 10에 배향된다.

[0585]

[0344] 세척 완충제 저장소 6으로부터 실시예 2A에 설명된 바와 같은 세척 완충액을 컬럼들을 작동적으로 연결하는 튜브 및 밸브를 경유하여 1차 컬럼 및 2차 컬럼을 통해 유동하도록 로딩된다. 1차 및 2차 컬럼으로부터 세척된 세포들을 함유하는 병류는 2차 선택 컬럼과 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 폐기 용기 10에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 반복회 반복된다.

[0586]

[0345] 용리 완충제 저장소 7로부터, 바이오틴 또는 그의 유사체와 같은 용리액, 예를 들어 2.5 mM 테스티오바이오틴을 함유하는 완충제가 용리 완충제 저장소와 2차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13 및 튜빙을 경유하여 2차 컬럼 2를 통해 로딩된다. 몇몇 구체예에서, 용리 완충액은 세포 배양 배지이다. 농축된 CD4+ 세포 및 잔여 바이오틴을 함유하는 병류는, 실시예 2A에 설명된 바와 같이, 밸브 13 및 튜빙을 통해 2차 컬럼에 작동적으로 연결된, 제거 챔버 9에 배향된다. CD4+에 대해 양성 선택된 농축 세포를 함유하는 병류는 제거 챔버 9와 배양 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여, 예컨대 백과 같은 배양 용기 12에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 용리 단계는 반복된다. 몇몇 구체예에서, 용리 단계 수행 후, T-세포 활성화 시약 (예컨대 항-CD3, 항-CD28, IL-2, IL-15, IL-7, 및/또는 IL-21)을 함유하는 활성화 완충액이 세척 완충액을 대체하고 밸브와 튜빙을 경유하여, 세척 완충제 저장소로부터 2차 컬럼, 제거 챔버 및 배양 용기로 배향된다. 배양 용기에서 수집된 양성 분획은 단리된 CD4+ 세포 집단이다.

[0587]

[0346] 용리 완충제 저장소 7로부터, 바이오틴과 같은 용리제를 함유하는 완충액을, 용리 완충제 저장소와 1차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13 및 튜빙을 경유하여 1차 컬럼 1을 통해 통과하도록 로딩한다. 몇몇 구체예

에서, 용리 완충액은 세포 배양 배지를 함유한다. 농축된 CD8+ 세포 및 잔여 바이오틴 또는 그의 유사체를 함유하는 병류는 밸브 13 및 튜빙을 경유하여 1차 컬럼에 작동적으로 연결된, 실시예 2A에 설명된 바와 같은, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 제거하기 위한 제거 챔버 9에 배향된다. CD8+에 대해 양성 선택된 농축 세포를 함유하는 병류는 제거 챔버 9와 3차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 3차 컬럼 15을 통과하도록 배향된다. CD8+ 세포의 CD62L+ 서브세트는 3차 컬럼의 수지에 결합된 채로 남아있다. 유액 및 추가의 선택되지 않은 세포(음성 세포)를 함유하는 병류는 3차 선택 컬럼과 2차 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 2차 폐기 용기 11에 배향된다.

[0588] [0347] 세척 완충제 저장소 6으로부터, 실시예 2A에 설명된 바와 같은 세척 완충액이 세척 완충제 저장소와 3차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 3차 컬럼 15을 통해 유동하도록 로딩된다. 3차 컬럼으로부터 세척된 세포들을 함유하는 병류는 3차 선택 컬럼과 2차 폐기 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 2차 폐기 용기 11에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 세척 단계는 복수회 반복된다.

[0589] [0348] 용리 완충제 저장소 7로부터 바이오틴 또는 그의 유사체, 예를 들어 2.5 mM 데스티오바이오틴과 같은 용리제 함유 완충제를, 용리 완충제 저장소와 3차 컬럼을 작동적으로 연결하는 밸브 13 및 튜빙을 경유하여 3차 컬럼 15을 통해 유동하도록 로딩한다. 몇몇 구체예에서, 용리 완충액은 세포 배양 배지를 함유한다. CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127 중 어느 하나를 발현하는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포에 대해 농축된 CD8+ 세포 및 잔여 바이오틴 또는 그의 유사체를 함유하는 병류는 실시예 2A에 설명된 바와 같이, 밸브 13 및 튜빙을 경유하여 3차 컬럼에 작동적으로 연결된 제거 챔버 9에 배향된다. CD8에 대해 양성 선택된 농축된 T 세포 기억 세포 및 CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127과 같은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상에 발현되는 마커를 함유하는 병류는 제거 챔버 9와 배양 용기를 작동적으로 연결하는 밸브 13을 경유하여 백과 같은 배양 용기 12에 배향된다. 몇몇 구체예에서, 배양 용기는 T-세포 활성화 시약, 세포 배양 배지 또는 양자 모두를 함유한다. 몇몇 구체예에서, 용리 단계는 반복된다. 몇몇 구체예에서, 용리 단계 수행 후, T-세포 활성화 시약 (예컨대 항-CD3, 항-CD28, IL-2, IL-15, IL-7, 및/또는 IL-21)을 함유하는 활성화 완충액은 세척 완충액을 대체하고 세척 완충제 저장소로부터의 밸브 및 튜빙을 경유하여 1차 및/또는 3차 컬럼, 제거 챔버 및 배양 용기로 배향된다. CD8+ 세포 및 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상의 마커, 예컨대 CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127 중 어느 하나에 대해 양성인 세포를 함유하는 양성 분획을 미리 수집한 CD4+ 양성 분획과 함께 배양 용기에 수집한다. 몇몇 구체예에서, 공정 단계들은 상이한 순서로도 수행가능하며, 예컨대 CD4+ 세포를 농축하기에 앞서, CD28, CD62L, CCR7, CD27 또는 CD127 중 어느 하나와 같은 중심 기억 T (T_{CM}) 세포 상의 마커에 대해 양성인 세포 및 CD8+ 세포를 함유하는 세포를 먼저 농축시킬 수 있다.

[0590] **실시예 3: 유전자 조작 및 입양세포 치료에서 사용하기 위한 폐쇄 시스템에서 순차 정제에 의한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물의 생성**

[0591] [0349] 이 실시예는 입양세포 치료와 관련하여 사용되기 위한 세포의 유전자 조작 관련 방법에서 인큐베이션/활성화 및 형질도입을 위해, CD4+ 및 CD8+ T 세포, 예컨대 배양-개시 비율로 존재하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 세포 조성물의 선택 및 생성 방법을 입증하는 것이다.

[0592] [0350] 실시예 2A (CD4+ 및 CD8+) 또는 실시예 2B (CD4+ 및 CD62L+에 대해 농축된 CD8+)에 설명된 바와 같이, CD4+ 및 CD8+ 세포의 선택에 의해 생성된 세포 조성물을 자극 조건, 예컨대 37°C에서 72 시간 동안, IL-2 (100 IU/mL)의 존재 하에 항-CD3/항-CD28을 이용하는 것과 같은 자극 조건 하에 인큐베이션한다. 이어서 예컨대 바이러스 형질도입에 의해, 키메라 항원 수용체 (CARs) 또는 재조합 TCR과 같은 재조합 항원 수용체의 발현을 위해 재조합 유전자를 세포 내로 도입하여 상기 자극된 세포를 유전자 조작한다. 몇몇 구체예에서, 도입 후, 세포를 일반적으로 예컨대 37도씨에서 추가 인큐베이션하여 세포를 증폭시킨다.

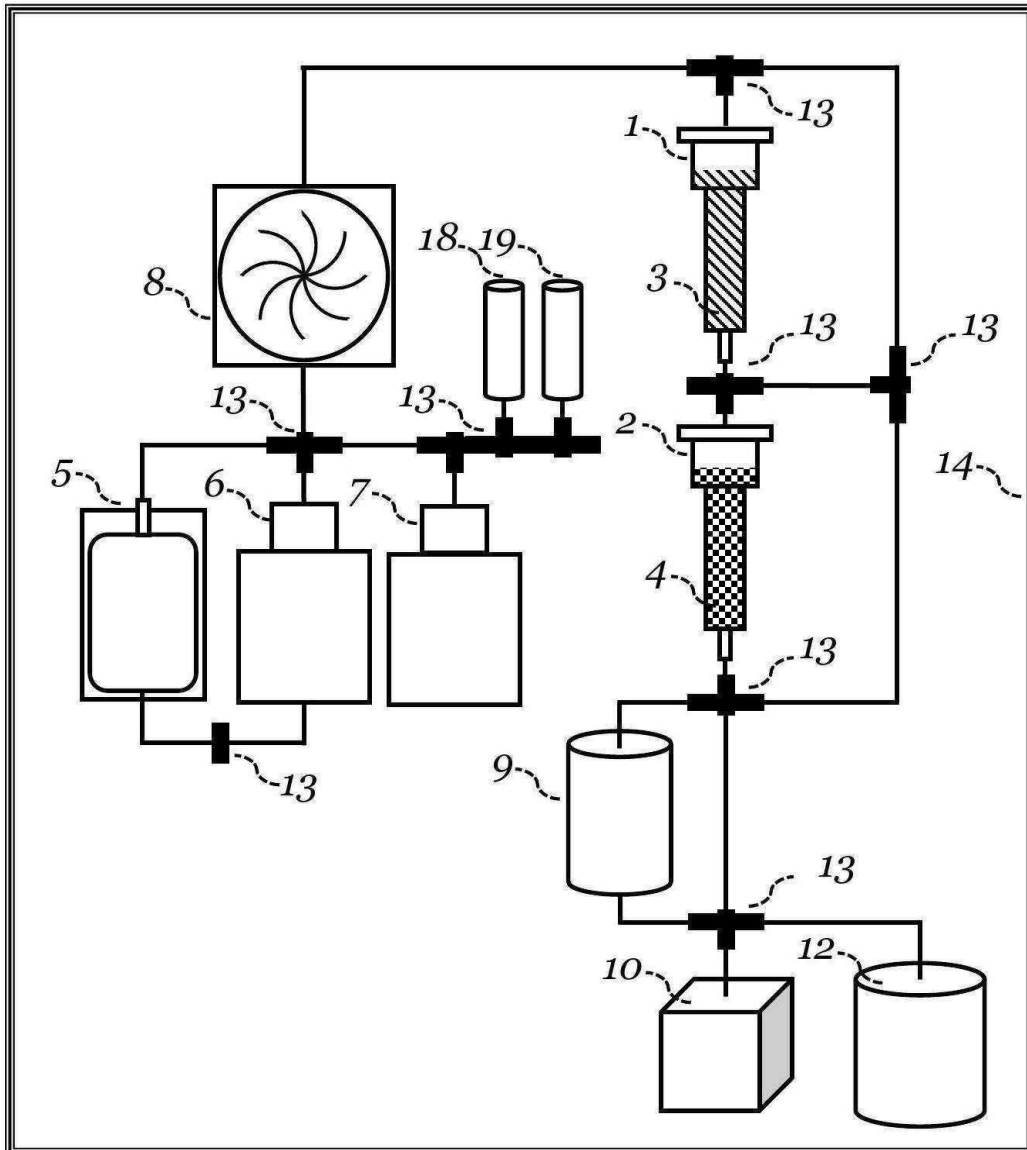
[0593] [0351] 이 방법은 조작된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포와 함께 아웃풋 조성물을 결과시킨다. 몇몇 구체예에서, 선택 컬럼의 선택된 부피에 기초하여, 조작에 앞서 자극 조건하에서 인큐베이션된 조성물 중 CD4+ 대 CD8+ 세포의 비율 (배양-개시 비율)은 인큐베이션, 자극 및/또는 조작 단계 후 CD4+ 대 CD8+ 세포의 소망되는 아웃풋 비율 또는 조작된 CD4+ 세포 대 조작된 CD8+ 세포의 소망되는 아웃풋 비율, 또는 그러한 소망되는 아웃풋 비율의 특정한 허용 오차 범위를 결과시킨다. 몇몇 구체예에서, 이러한 소망되는 아웃풋 비율 또는 허용오차 범위 내의 비율은 어떤 허용된 시간 백분율 내에 달성된다.

[0594] **실시예 4: Fab-코팅된 표면의 최적화 수율 농도를 이용한 세포 선택**

- [0595] [0352] 인간 성분채집술-유래된 PBPC 샘플을 상이한 세포수 범위로 하여 단일 조성물에서 항-CD4 Fabs에 퀴즈게이션된 자기 마이크로비드 및 항-CD8 Fabs에 퀴즈게이션된 자기 마이크로비드와 함께, 가볍게 혼합하면서 30분 간 인큐베이션하였다. 이 인큐베이션에 이어, 선택되지 않은 세포를 용리하고, 전술한 바와 같이 자기장을 이용하여 회수하였다. 세포 100만개 당 각 마이크로비드 시약 0.05 내지 1.5 mL를 이용하여 인큐베이션시키자 CD4+ 또는 CD8+ 세포가 각각 낮은 수율로 수득되었는데(인큐베이션 중 양성 세포와 비요한 각각의 선택에 대해 회수된 세포), 이는 이 연구에서 일반적으로 15-70%였다. 평균적으로, 이러한 최적화 수율 농도 이용시, 세포 당 시약의 농도가 높을수록 수율도 더 높게 관찰되었다.
- [0596] [0353] 따라서, 일례에서, PBMC를 CD4-결합제에 커플링된 비드 및 CD8-결합제에 커플링된 비드의 세포 수 당 최적화 농도로 인큐베이션하고, 자기장을 이용하여 세포를 회수한다. 세포 당 시약의 농도와 사용된 비드의 수율 간의 관계를 관찰한 것에 기초하여, CD4-결합 시약 또는 CD8-결합 시약 중 어느 하나 또는 다른 하나를 더 높은 농도로 포함시킴(예컨대 세포 당 CD4 또는 CD8 결합 분자를 더 높은 갯수로 포함시킴)으로써, 선택 후, CD8+:CD4+ 세포의 아웃풋 비율이 1을 상회 또는 하회, 예컨대 1.5:1 또는 2:1 또는 3:1 또는 1:1.5, 1:2, 또는 1:3이 되도록 한다. 아웃풋 비율은 활성화, 형질도입 및/또는 증폭과 같은 한 가지 이상의 부가적인 단계들 실시 후에 생산된 조작된 세포를 함유하는 조성물에서 CD8 대 CD4의 소망되는 비율에 기초하여 선택될 수 있다.

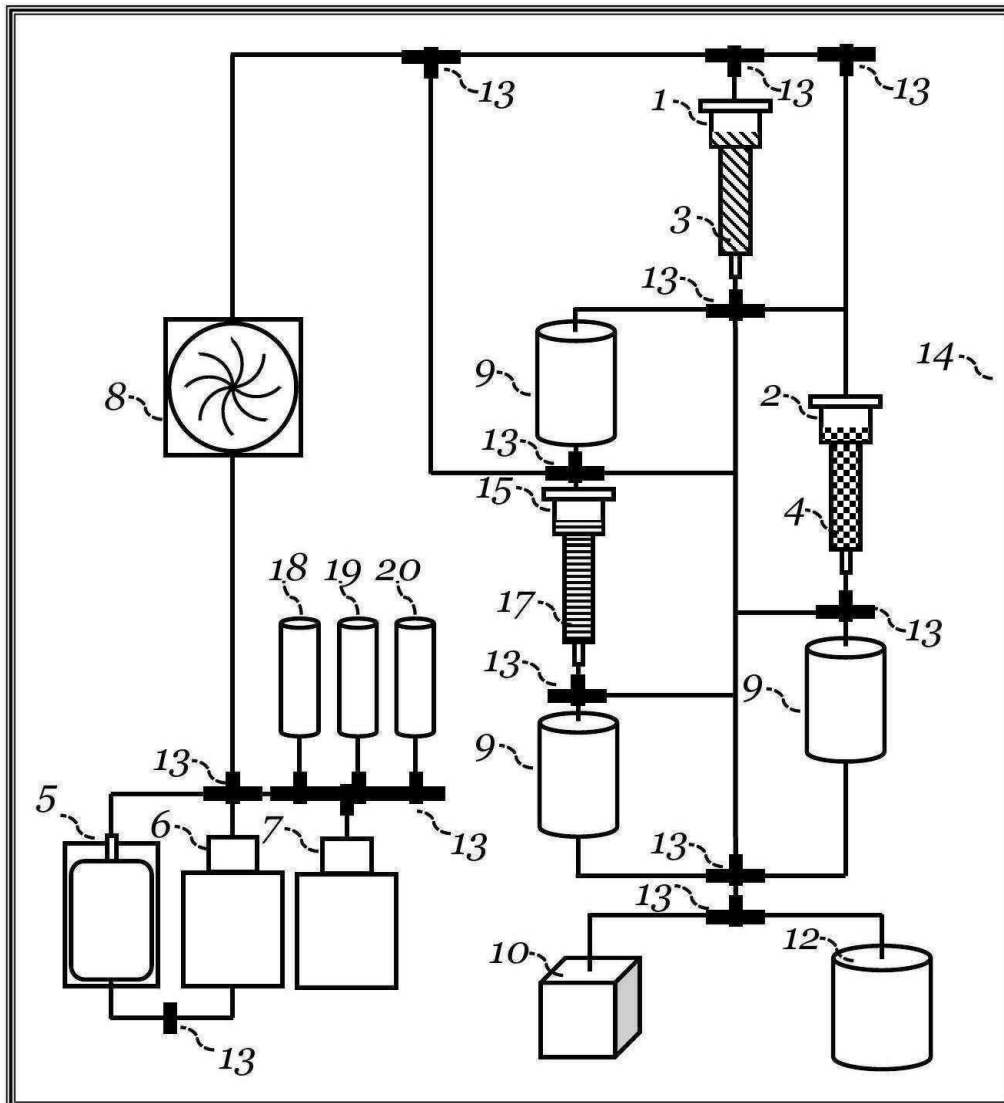
도면

도면1a



튜브 —————

도면1b



튜브 ———

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics, Inc.

RAMSBORG, Chris

BONYHADI, Mark

CHEN, Calvin

BEAUCHESNE, Pascal

<120> METHODS FOR ISOLATING, CULTURING, AND GENETICALLY ENGINEERING IMMUNE CELL POPULATIONS FOR ADOPTIVE

THERAPY

<130> 735042000240
<140> Not Yet Assigned
<141> Concurrently Herewith
<150> US 61/983,415
<151> 2014-04-23
<160> 19
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0
<210> 1
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic
<220>
<223> Streptavidin-binding peptide
<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa is selected from glutamine, asparagine and
methionine
<400> 1
His Pro Xaa
1
<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<220>
<223> Streptavidin-binding peptide
<400> 2
His Pro Gln Phe
1
<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Trp, Lys or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Gly, Lys or Arg

<400> 3

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1

5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Gly, Lys or Arg

<400> 4

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<400> 5

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Strep-tag (registered trademark) II

<400> 6

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(20)

<223> Xaa at positions 9-20 may be any amino acid and 4

of them may be absent

<400> 7

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(12)

<223> These amino acids may be absent

<400> 8

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

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Twin-Strep-Tag

<400> 9

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

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Twin-Strep-Tag

<400> 10

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

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25 30

<210> 11

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces Avidinii

<220>

<223> Streptavidin

<400> 11

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

<210> 12

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces Avidinii

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 12

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155
 <210> 13
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Streptomyces Avidinii
 <220>
 <223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 <400> 13

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly

35 40 45

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

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140

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

145 150 155

<210> 14

<211> 126

<212> PRT

<213> Streptomyces Avidinii

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 14

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser

20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

<211> 126

<212> PRT

<213> Streptomyces Avidinii

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 16

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Twin Strep-tag

<400> 17

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

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

20 25

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Twin Strep-tag

<400> 18

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 19

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<220>

<223> Twin Strep-tag

<400> 19

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25