



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0013831  
 (43) 공개일자 2019년02월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/0783* (2010.01) *A61K 35/12* (2015.01)  
*A61K 35/17* (2014.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61K 39/12* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0638* (2013.01)  
*A61K 35/17* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7036135
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월25일  
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년12월12일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/075644
- (87) 국제공개번호 WO 2017/202478  
 국제공개일자 2017년11월30일
- (30) 우선권주장  
 62/340,605 2016년05월24일 미국(US)  
 15/290,230 2016년10월11일 미국(US)

- (71) 출원인  
 테사 테라퓨틱스 피티이. 엘티디.  
 싱가포르 038988, 선텍 타워 3, 8 테마섹 블러바드 #24-02
- (72) 별명자  
 왕 피터  
 싱가포르, 싱가포르 239351, 더 헤렌시아,  
 넘버01-14, 46 킴 암 로드, 테사 테라퓨틱스 피티이 엘티디. 내  
 우 춘시아오  
 싱가포르, 싱가포르 239351, 더 헤렌시아,  
 넘버01-14, 46 킴 암 로드, 테사 테라퓨틱스 피티이 엘티디. 내
- (74) 대리인  
 손민

전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 T 세포 증식

### (57) 요 약

T 세포를 바이러스의 웹티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성시키거나 또는 증대시키는 방법으로, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지이다. 또한, 바이러스-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화하는 방법, 및 상기 생성되거나 증식된 T 세포 집단을 사용하여 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 39/0011* (2018.08)  
*A61K 39/12* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C12N 2500/32* (2013.01)  
*C12N 2501/2302* (2013.01)  
*C12N 2502/11* (2013.01)  
*C12N 2502/1107* (2013.01)  
*C12N 2502/99* (2013.01)  
*C12N 2710/16034* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(antigen presenting cell; APC) 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법으로서, 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%가 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지(conditioned medium)인 방법.

#### 청구항 2

T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는, 바이러스-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화하는 방법으로, 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%가 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 3

바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법으로서,

- (i) T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;
- (ii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함

을 포함하며, 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%가 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 4

바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법으로서,

- (i) T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;
  - (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
  - (iii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함
- 을 포함하며, 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%가 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 5

바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법으로서,

- (i) T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;
  - (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
  - (iii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극하고;
  - (iv) 단계 (iii)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
  - (v) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함
- 을 포함하며, 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%가 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

적응용 배지가 단계 (iii)의 자극 배양물로부터 수득되는 방법.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

적응용 배지가 1 내지 8일의 배양기간 후에 T 세포 및 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

적응용 배지가 1:1 내지 10:1의 응답자:자극인자 비에서 T 세포 및 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

바이러스의 펩티드를 제시하는 APC가 EBV-형질전환된 립프모구양 세포주(LCL) 세포인 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

적응용 배지의 적어도 10%가 적응용 배지의 20 내지 40%인 방법.

**청구항 11**

(a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지(Click's medium), 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,

(b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 엡스타인-바 바이러스(EBV)-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및

(c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 T 세포를 자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법.

**청구항 12**

(a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,

(b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 엡스타인-바 바이러스(EBV)-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및

(c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 T 세포를 자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화시키는 방법.

**청구항 13**

엡스타인-바 바이러스(EBV)-특이적 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키는 방법으로서,

(i) 7 내지 14일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에서 10:1 내지 80:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 PBMC를 배양함으로써 T 세포를 자극하고;

(ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

(iii) 상기 T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 단계 (ii)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극하고;

(iv) 단계 (iii)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

(v) 상기 T 세포를 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (iii)의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 존재하에서 단계 (iv)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함

을 포함하는 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

(vi) 단계 (v)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

(vii) T 세포를 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (v)의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 단계 (vi)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함

을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

세포를 수집하고, T 세포를, (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 선행 자극 단계의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어, 조사된(irradiated), EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 상기 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극하는 추가의 단계들을 포함하는 방법.

#### 청구항 16

대상체(subject)에서 암을 치료하는 방법으로서,

(1) 대상체로부터 T 세포를 단리하고;

(2) T 세포를 바이러스의 웨티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 10 내지 25%가 T 세포 및 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지이고;

(3) 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 대상체에게 투여함

을 포함하는 방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서,

적응용 배지가 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 방법.

#### 청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서,

바이러스의 웨티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극이

- (a) 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,
- (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민, 및 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지 25%의 적응용 배지, 및
- (c) 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함하는 방법.

#### **청구항 19**

제16항 또는 제17항에 있어서,

바이러스의 웨티드를 제시하는 APC가 EBV-형질전환된 림프모구양 세포주(LCL) 세포인 방법.

#### **청구항 20**

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 EBV-양성 암인 방법.

#### **청구항 21**

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 EBV-양성 비인두암(NPC)인 방법.

#### **청구항 22**

제16항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

세포가 배양되는 배지의 약 15%가 적응용 배지인 방법.

#### **청구항 23**

제16항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (2)가, 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함하는 방법.

#### **청구항 24**

대상체에서 암을 치료하는 방법으로,

(1) 대상체로부터 T 세포를 단리하고;

(2) T 세포를 바이러스의 웨티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 10 내지 25%가 적응용 배지이고, 여기에서 상기 적응용 배지가 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되며;

(3) 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 대상체에게 투여함

을 포함하는 방법.

#### **청구항 25**

제24항에 있어서,

바이러스의 웨티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극이

- (a) 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,
- (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민, 및 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지 25%의 적응용 배지, 및
- (c) 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함하는 방법.

#### 청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서,

암이 EBV-양성 암인 방법.

#### 청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 EBV-양성 비인두암(NPC)인 방법.

#### 청구항 28

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

10% 내지 25%의 적응용 배지가 약 15%의 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 29

제24항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (2)가, 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 30

T 세포를 바이러스의 웨티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키는 방법으로, 상기 세포가 배양되는 배지의 10% 내지 25%가 T 세포 및 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지인 방법.

#### 청구항 31

제30항에 있어서,

적응용 배지가 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 방법.

#### 청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서,

바이러스의 웨티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극이

- (a) 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,
- (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40~50% RPMI-1640 배지, 40~50% 클릭 배지, 5~20% FBS, 및 1~5 mM L-글루타민, 및 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지

25%의 적응용 배지, 및

(c) 10~200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함하는 방법.

### 청구항 33

제30항 또는 제31항에 있어서,

바이러스의 웹티드를 제시하는 APC가 EBV-형질전환된 림프모구양 세포주(LCL) 세포인 방법.

### 청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

적응용 배지의 10% 내지 25%가 적응용 배지의 약 15%인 방법.

### 청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 36

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제와 혼합함을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 37

바이러스에 특이적인 T 세포의 집단으로, 상기 T 세포의 집단이 제1항 내지 제15항 및 제30항 내지 제36항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득되거나, 상기 방법에 의해 수득 가능하거나, 또는 상기 방법의 생성물인 집단.

### 청구항 38

제37항에 따른 T 세포의 집단, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

### 청구항 39

질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제37항에 따른 T 세포의 집단 또는 제38항에 따른 약학 조성물.

### 청구항 40

질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제 또는 백신의 제조에서의, 제37항에 따른 T 세포의 집단 또는 제38항에 따른 약학 조성물의 용도.

### 청구항 41

대상체에게 치료학적 또는 예방학적 유효량의 제37항에 따른 T 세포의 집단 또는 제38항에 따른 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법.

### 청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

질환 또는 장애가, T 세포가 특이적인 바이러스에 의한 감염에 의해 야기되거나 또는 악화되거나 또는 T 세포가 특이적인 바이러스에 의한 감염이 위험 인자인 질환 또는 장애인, T 세포의 집단 또는 약학 조성물, 용도, 또는

방법.

### 청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항 있어서,  
질환 또는 장애가 암인, T 세포의 집단 또는 약학 조성물, 용도, 또는 방법.

### 청구항 44

제43항에 있어서,  
암이 EBV-양성 암인, T 세포의 집단 또는 약학 조성물, 용도, 또는 방법.

### 청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서,  
암이 EBV-양성 비인두암(NPC)인, T 세포의 집단 또는 약학 조성물, 용도, 또는 방법.

### 청구항 46

소정량의 제37항에 따른 T 세포의 집단 또는 제38항의 약학 조성물을 포함하는 부분들의 키트(kit).

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 바이러스-특이적 T 세포 집단의 생성 및/또는 증식 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 바이러스-특이적 T 세포의 입양전이는 바이러스성 질환의 예방 및 치료에 유망한 전략이다.

[0003] 입양전이는 큰 수의 T 세포의 사용을 요한다. 예를 들어 문헌[Chia et al., Mol Ther (2014) 22(1): 132-139]은 중간값 총수  $9.6 \times 10^8$  EBV-CTL(6.3 내지  $10.3 \times 10^8$  CTL의 범위)의 입양 전이에 의한 EBV-양성 비인두암(NPC)의 치료를 기재한다.

[0004] 입양 T 세포 전이에 의한 치료법의 주요 문제는 투여에 충분히 큰수의 바이러스-특이적 T 세포를 생성시키는데 걸리는 기간이다. 키아(Chia) 등(상기)은 CTL의 첫 번째 용량을 생성시키는데 걸리는 중간 시간이 13주(8 내지 22주 범위)임을 보고하였다. 더욱이, 상기 연구에서 3명의 환자에 대해 CTL 생성의 지연으로 인해 예정된 치료법으로부터 편차가 존재함을 보고하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

### 과제의 해결 수단

#### 발명의 요약

[0006] 바이러스-특이적 T 세포의 집단을 생성 및/또는 증식시키는 방법은 전형적으로 관심 바이러스(즉 상기 T 세포가 특이적인 바이러스)의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)에 의한 수회 라운드의 T 세포 자극을 포함한다.

[0007] 본 발명은 바이러스-특이적 T 세포의 집단을 자극 단계로부터 수득된 적응용 배지(conditioned media)의 존재하에서 재-자극을 수행함으로써 보다 신속하게 증식시킬 수 있다는 발견을 기본으로 한다. 유리하게는, 이에 의해 큰 수의 바이러스-특이적 T 세포를 종래 기술 방법에 비해 보다 짧은 기간으로 수득할 수 있다. 따라서 본

발명은 연구 및/또는 치료학적 용도에 사용하기 위한 바이러스-특이적 T 세포의 집단을 생성/증식시키기에 유용하다.

[0008] 하나의 태양에서, 본 발명은 T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(antigen presenting cell; APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지이다.

[0009] 또 다른 태양에서, 본 발명은 바이러스-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지이다.

[0010] 또 다른 태양에서, 본 발명은

[0011] (i) T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;

[0012] (ii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함

[0013] 을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인, 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다.

[0014] 또 다른 태양에서, 본 발명은

[0015] (i) T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;

[0016] (ii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극하고;

[0017] (iii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함

[0018] 을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다. 상기 방법의 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 단계 (ii)의 자극 배양물로부터 수득된다.

[0019] 또 다른 태양에서, 본 발명은

[0020] (i) T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;

[0021] (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

[0022] (iii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함

[0023] 을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인, 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다.

[0024] 또 다른 태양에서, 본 발명은

[0025] (i) T 세포를 바이러스의 펩티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극하고;

[0026] (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

[0027] (iii) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극하고;

[0028] (iv) 단계 (iii)에 의해 수득된 세포를 수집하고;

[0029] (v) 상기 T 세포를 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 재-자극함

[0030] 을 포함하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득되는 적응용 배지인, 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다. 상기 방법의 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 단계 (iii)의 자극 배양물로부터 수득된다.

- [0031] 본 발명의 다양한 태양들과 관련하여, 일부 실시태양에서 상기 적응용 배지는 1 내지 8일의 배양기간 후에 T 세포 및 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC의 자극 배양물로부터 수득된다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 1:1 내지 10:1의 응답자:자극인자 비에서 T 세포 및 APC의 자극 배양물로부터 수득된다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC는 EBV-형질전환된 램프모구양 세포주(LCL) 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지의 적어도 10%는 상기 적응용 배지의 20 내지 40%이다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지의 적어도 10%는 상기 적응용 배지의 10 내지 25%, 바람직하게는 약 15%이다.
- [0032] 또 다른 태양에서, 본 발명은 T 세포를
- [0033] (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지(Click's medium), 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,
- [0034] (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 엡스타인-바 바이러스(EBV)-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및
- [0035] (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2
- [0036] 를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 T 세포를 자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다.
- [0037] 또 다른 태양에서, 본 발명은 T 세포를
- [0038] (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,
- [0039] (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 엡스타인-바 바이러스(EBV)-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및
- [0040] (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2
- [0041] 를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 배양에 의해 T 세포를 자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화시키는 방법을 제공한다.
- [0042] 또 다른 태양에서, 본 발명은 T 세포를
- [0043] (i) 7 내지 14일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에서 10:1 내지 80:1의 응답자:자극인자 비로 엡스타인-바 바이러스(EBV)-형질전환된 LCL의 존재하에서 PBMC를 배양함으로써 T 세포를 자극하고;
- [0044] (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0045] (iii) 상기 T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 단계 (ii)에서 수집된 세포를 배양함으로써 상기 T 세포를 재-자극하고;
- [0046] (iv) 단계 (iii)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0047] (v) 상기 T 세포를 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (iii)의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(IU/ml)의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 존재하에서 단계 (iv)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 추가로

- [0049] (vi) 단계 (v)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0050] (vii) T 세포를 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (v)의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서 단계 (vi)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함
- [0051] 을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 세포를 수집하고, 상기 T 세포를, (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 선행 자극 단계의 종점에서 수득된 적어도 10%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어, 조사된 (irradiated), EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 상기 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극하는 추가의 단계들을 포함한다.
- [0052] 또 다른 태양에서, 본 발명은 대상체(subject)에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0053] (1) 대상체로부터 T 세포를 단리하고;
- [0054] (2) T 세포를 바이러스의 웹티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 10 내지 25%는 T 세포 및 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지이고;
- [0055] (3) 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 대상체에게 투여함
- [0056] 을 포함한다.
- [0057] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극은 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지 25%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC는 EBV-형질전환된 림프모구양 세포주(LCL) 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 암이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 비인두암(NPC)이다. 일부 실시태양에서, 상기 세포가 배양되는 배지의 약 15%는 적응용 배지이다. 일부 실시태양에서, 단계 (2)는 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함한다.
- [0058] 또 다른 태양에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은
- [0059] (1) 대상체로부터 T 세포를 단리하고;
- [0060] (2) T 세포를 바이러스의 웹티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 10 내지 25%는 적응용 배지이고, 여기에서 상기 적응용 배지는 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득되며;
- [0061] (3) 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 대상체에게 투여함
- [0062] 을 포함한다.
- [0063] 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극은 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자

자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지 25%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 암이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 비인두암(NPC)이다. 일부 실시태양에서, 상기 세포가 배양되는 배지의 약 15%는 적응용 배지이다. 일부 실시태양에서, 단계 (2)는 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함한다.

[0064] 또 다른 태양에서, 본 발명은 T 세포를 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 항원제시세포(APC)의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 10% 내지 25%는 T 세포 및 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지이다.

[0065] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 T 세포 및 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 자극은 (a) 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) T 세포를 1 내지 8일의 기간 동안 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 및 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 10% 내지 25%의 적응용 배지, 및 (c) 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일의 기간 동안 2:1 내지 7:1의 응답자 대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL의 존재하에서의 배양을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC는 EBV-형질전환된 림프모구양 세포주(LCL) 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지의 10% 내지 25%는 상기 적응용 배지의 약 15%이다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 수집함을 추가로 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제와 혼합함을 추가로 포함한다.

[0066] 또 다른 태양에서, 본 발명은 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 제공하며, 여기에서 상기 T 세포의 집단은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 상기 방법에 의해 수득 가능하거나, 또는 상기 방법의 생성물이다.

[0067] 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 발명에 따른 T 세포의 집단, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0068] 또 다른 태양에서, 본 발명은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 약학 조성물을 제공한다.

[0069] 또 다른 태양에서, 본 발명은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제(medicament) 또는 백신의 제조에서의 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 약학 조성물의 용도를 제공한다.

[0070] 또 다른 태양에서, 본 발명은 대상체에게 치료학적 또는 예방학적 유효량의 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0071] 일부 실시태양에서, 상기 질환 또는 장애는 T 세포가 특이적인 바이러스에 의한 감염에 의해 야기되거나 또는 악화되거나, 또는 T 세포가 특이적인 바이러스에 의한 감염이 위험 인자인 질환 또는 장애이다. 일부 실시태양에서, 상기 질환 또는 장애는 암이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 암이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 비인두암(NPC)이다.

[0072] 또 다른 태양에서, 본 발명은 소정량의 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 약학 조성물을 포함하는 부분들의 키트(kit)를 제공한다.

### **발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

#### **T 세포 및 항원제시세포**

[0073] 본 발명은 바이러스-특이적 T 세포 집단의 생성 및/또는 증식과 관련된다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 바이러스-특이적 T 세포는 바이러스에 감염되거나 또는 바이러스의 웨პ티드를 포함하는 세포에 반응성인 T 세포이다. 바이러스-특이적 T 세포는 상기 T 세포가 특이적인 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 MHC 분자에 결합할 수 있는 T 세포 수용체(TCR)를 포함한다.

- [0076] T 세포 수용체(TCR)는 전형적으로  $\alpha$ -쇄 및  $\beta$ -쇄를 포함하는 이종이량체성, 항원-결합 분자이다. 사실상,  $\alpha$ -쇄 및  $\beta$ -쇄는 불변 CD3 쇄와의 복합체로서 T 세포( $\alpha\beta$  T 세포)의 세포 표면에서 발현된다.  $\gamma$  및  $\delta$  쇄를 포함하는 대안의 TCR은 T 세포( $\gamma\delta$  T 세포)의 부분집합상에서 발현된다. TCR은 주 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 의해 제시되는 항원 웹티드를 인식한다(상기 웹티드에 결합한다). TCR 구조 및 상기 웹티드-MHC 복합체의 인식은 예를 들어 문헌[Immunobiology, 5<sup>th</sup> Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science (2001), Chapters 3 and 6](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다.
- [0077] T 세포를 하기 중 하나 이상의 표면 발현을 참조하여 특성화할 수 있다: TCR 폴리웹티드(예를 들어  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  또는  $\delta$  쇄), CD3 폴리웹티드(예를 들어  $\gamma$ ,  $\delta$  또는  $\epsilon$  쇄), CD8 및 CD4. 주어진 폴리웹티드의 표면 발현을 당해 분야에 주지된 다양한 방법, 예를 들어 항체-기반 방법, 예를 들어 면역조직화학, 면역세포화학, 및 유식 세포측정에 의해 측정할 수 있다.
- [0078] 본 발명의 방법에 따라 증식된 T 세포는 바이러스에 특이적인 TCR을 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 T 세포는 CD3+ CD8+ T 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 T 세포는 세포독성 T 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 T 세포는 CD3+ CD4+ T 세포이다. 일부 실시태양에서, 상기 T 세포는 헬퍼 T 세포이다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 방법은 바이러스-특이적 세포독성 T 림프구(CTL) 및 헬퍼 T 림프구의 집단을 생성 및/또는 증식시키기 위한 것이다.
- [0079] CTL은 퍼포린, 그랜자임, 그라눌리신을 포함한 세포독성 인자를 방출시키고/시키거나, T 세포상에서 발현된 FASL을 통해 바이러스로 감염된 세포상에 FAS를 결찰시킴으로써 상기 감염된 세포의 세포사멸을 유도함으로써 상기 감염된 세포에서 세포사를 실행할 수 있다(예를 들어 문헌[Chavez-Galan et al., Cellular and Molecular Immunology (2009) 6(1): 15-25](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 의해 기재된다). 세포독성을 예를 들어 문헌[Zaritskaya et al., Expert Rev Vaccines (2011), 9(6):601-616](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 리뷰된 방법들 중 어느 하나를 사용하여 조사할 수 있다. 표적 세포에 대한 T 세포의 세포독성에 대한 분석의 일례는  $^{51}\text{Cr}$  방출 분석으로, 상기 분석에서 표적 세포를  $^{51}\text{Cr}$ 로 처리하며, 상기는 내면화된다. T 세포에 의한 상기 표적 세포의 용해 결과 방사성  $^{51}\text{Cr}$ 이 세포 배양 상등액내로 방출되고, 이를 검출할 수 있다.
- [0080] APC에 의해 제시되는 바이러스의 웹티드는 바이러스 입자로부터 유래하거나, 또는 상기 바이러스의 핵산에 의해 암호화될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "웹티드"는 웹티드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 단량체들의 쇄를 지칭하며, 그 길이는 50 아미노산 이하이다.
- [0081] 상기 바이러스 웹티드는 MHC 부류 I 또는 부류 II 분자에 의해 제시된다. MHC 부류 I 분자는  $\alpha$ -쇄 및  $\beta$  2-미세글로불린의 이종이량체이다. 상기  $\alpha$ -쇄는  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  및  $\alpha 3$ 로 표시되는 3개의 도메인을 갖는다. 상기  $\alpha 1$  및  $\alpha 2$  도메인은 함께 상기 MHC 부류 I 분자에 의해 제시된 웹티드가 결합하는 흄을 형성하여 웹티드-MHC 복합체를 형성한다. MHC 부류 I  $\alpha$ -쇄는 다형성이며, 상이한  $\alpha$ -쇄들이 결합하여 상이한 웹티드들을 제시할 수 있다. MHC 부류 I 분자와 유사하게, MHC 부류 II 분자도 또한 이종이량체이며,  $\alpha$ -쇄 및  $\beta$  쇄로 이루어진다. 인간에서, MHC 부류 I  $\alpha$ -쇄 및 MHC 부류 II  $\alpha$  및  $\beta$ -쇄는 인간 백혈구 항원(HLA) 유전자에 의해 암호화된다.
- [0082] 본 명세에 따른 바이러스-특이적 T 세포는 MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 분자에 의해 제시되는, 상기 T 세포가 특이적인 바이러스의 웹티드에 결합할 수 있는 TCR을 포함한다.
- [0083] 상기 T 세포가 특이적인 바이러스는 dsDNA 바이러스(예를 들어 아데노바이러스, 헤르페스바이러스, 폭스바이러스), ssRNA 바이러스(예를 들어 파르보바이러스), dsRNA 바이러스(예를 들어 레오바이러스), (+)ssRNA 바이러스(예를 들어 피코르나바이러스, 토가바이러스), (-)ssRNA 바이러스(예를 들어 오쏘믹소바이러스, 라브도바이러스), ssRNA-RT 바이러스(예를 들어 레트로바이러스) 또는 dsDNA-RT 바이러스(예를 들어 헤파드나바이러스)일 수 있다. 본 명세는 아데노바리다에, 헤르페스바리다에, 파필로마바리다에, 폴리오마바리다에, 폭스바리다에, 헤파드나바리다에, 파르보바리다에, 아스트로바리다에, 칼리시바리다에, 피코르나바리다에, 코로나바리다에, 플라비바리다에, 토가바리다에, 헤페바리다에, 레트로바리다에, 오쏘믹소바리다에, 아레나바리다에, 분야바리다에, 필로바리다에, 파라믹소바리다에, 라브도바리다에 및 레오바리다에 과의 바이러스들을 고려한다.
- [0084] 질환 또는 장애와 관련된 바이러스가 특히 중요하다. 상응하게, 하기의 바이러스들이 고려된다: 아데노바이러스, 헤르페스 단순 1형 바이러스, 헤르페스 단순 2형 바이러스, 바리셀라-조스터 바이러스, 앱스타인-바 바이러스

스, 인간 거대세포바이러스, 인간 헤르페스바이러스 8형, 인간 파필로마바이러스, BK 바이러스, JC 바이러스, 스몰폭스, B형 간염 바이러스, 파르보바이러스 B19, 인간 아스트로바이러스, 노로 바이러스, 콕삭키바이러스, A형 간염 바이러스, 폴리오바이러스, 리노바이러스, 중증 급성 호흡기 세포융합 바이러스, C형 간염 바이러스, 황열 바이러스, 뎅기 바이러스, 웨스트 나일 바이러스, TBE 바이러스, 루벨라 바이러스, E형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 라싸 바이러스, 크립반도-콩고 출혈열 바이러스, 한탄 바이러스, 에볼라 바이러스, 말버그 바이러스, 홍역 바이러스, 이하선염 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스, 광견병 바이러스, D형 간염 바이러스, 로타바이러스, 오르비바이러스, 콜티바이러스, 및 반나 바이러스.

- [0085] 일부 실시태양에서, 상기 바이러스는 앱스타인-바 바이러스(EBV)이다. 상응하게, 일부 실시태양에서 상기 방법은 EBV-특이적 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키기 위한 것이다.
- [0086] 일부 실시태양에서, 상기 EBV는 균주 B95-8, P3HR-1, 또는 그의 유도체이다.
- [0087] 본 발명에서, 상기 바이러스 웨პ티드는 항원제시세포(APC)에 의해 제시된다. APC는 분자 기구에 의해 폴리펩티드를 웨პ티드로 가공하고 이어서 상기 웨პ티드는 MHC 분자와 결합하게 되고 세포 표면에서 웨პ티드-MHC 복합체로서 제시된다. 상이한 TCR은 상이한 웨პ티드-MHC 복합체에 결합하는 상이한 능력을 나타내며, 따라서 상기 복합체에 대해 상이한 반응성을 나타낸다.
- [0088] 바이러스 웨პ티드/폴리웨პ티드는 MHC 분자와의 복합체로 가공되고 제시된다. MHC상의 항원 가공, 로딩 및 제공은 예를 들어 문헌[*Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science (2001), Chapter 5](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다.
- [0089] 상이한 종류의 T 세포들이 MHC-웨პ티드 복합체의 인식에 의해 그들의 TCR을 통해 활성화된다. CD8+ T 세포는 웨პ티드-MHC 부류 I 복합체를 인식하는 반면, CD4+ T 세포는 웨პ티드-MHC 부류 II 복합체를 인식한다. T 세포 활성화는, 상기 T 세포의 TCR이 APC로부터 양의 보조자극 신호의 상황에서 높은 친화성을 갖는 MHC-웨პ티드 복합체 결합을 요한다. 상기 T 세포 활성화의 프로세스는 숙련가에게 주지되어 있으며 예를 들어 문헌[*Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Edn. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. New York: Garland Science (2001), Chapter 8](내용 전체가 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다.
- [0090] 본 발명에 따른 APC는 전문 APC일 수 있다. 전문 APC는 T 세포에 항원을 제시하는데 특화되어 있으며; 상기는 세포 표면에서 MHC-웨პ티드 복합체의 가공 및 제시에 효율적이고, 높은 수준의 보조자극 분자를 발현한다. 전문 APC는 수지상 세포(DC), 대식세포, 및 B 세포를 포함한다. 비-전문 APC는 T 세포에 MHC-웨პ티드 복합체, 특히 CD8+ T 세포에 MHC 부류 I-웨პ티드 복합체를 제시할 수 있는 다른 세포이다.
- [0091] 본 발명과 관련하여, 상기 APC는 상기 T 세포가 특정한 TCR을 포함하는 바이러스로 감염되거나 또는 상기 바이러스의 웨პ티드를 포함하거나 발현하는 임의의 세포일 수 있다. 상기 바이러스로 감염되거나 또는 상기 바이러스의 웨პ티드를 포함하거나 발현하는 세포는 세포 표면에서 MHC 분자의 상황에서 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시 할 수 있다.
- [0092] 본 명세서에서 "웨პ티드"에 대한 언급은 복수의 웨პ티드를 포함함을 알 것이다. 예를 들어, 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC는 상기 바이러스의 복수의 웨პ티드를 제시할 수 있다.
- [0093] 상기 APC는 상기 T 세포의 TCR이 특이적인 바이러스의 웨პ티드를 제시할 수 있는 MHC 부류 I 또는 부류 II 분자를 암호화하는 HLA 대립유전자를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서 상기 APC는 상기 T 세포의 TCR에 의해 인식되는 바이러스 웨პ티드에 합치되는 HLA일 수 있다.
- [0094] 일부 실시태양에서 상기 APC는 상기 바이러스로 감염된 결과로서 상기 바이러스의 웨პ티드를 발현하거나 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서 상기 APC는 상기 바이러스의 웨პ티드를 포함하거나 발현하도록 변형될 수도 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서 상기 세포는 상기 바이러스의 웨პ티드를 암호화하는 핵산을 포함하도록 변형되거나, 또는 상기 바이러스의 웨პ티드로 펠스화될 수도 있다.
- [0095] 일부 실시태양에서, 바이러스 웨პ티드(들)를 웨პ티드 혼합물의 라이브러리로 APC에 제공할 수 있으며, 이를 웨믹스(pepmix)라 칭할 수 있다. 일부 실시태양에서, APC에의 노출을 위한 다양한 웨믹스들의 풀링(pooling)이 존재한다. 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC를 특정 조건하에서 말초 혈액 T-세포에 노출시켜 상기 특정 바이러스 웨პ티드(들)에 특이적인 T-세포의 자극을 생성시킬 수 있다.

- [0096] 일부 실시태양에서, 상기 APC는 B 세포이거나 또는 B 세포로부터 유래될 수 있다. 특정한 실시태양에서, 상기 APC는 램프모구양 세포주(LCL)의 세포일 수 있다.
- [0097] LCL을 B 세포의 바이러스 형질전환에 의해 제조할 수 있다. LCL을 전형적으로는 엡스타인-바 바이러스에 의한 B 세포의 형질전환에 의해 생성시킨다. LCL의 생성 및 특성화가 예를 들어 문헌[Hui-Yuen et al., J Vis Exp (2011) 57: 3321], 및 문헌[Hussain and Mulherkar, Int J Mol Cell Med (2012) 1(2): 75-87](이들은 모두 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 상세히 기재되어 있다. 간단히, LCL을 사이클로스포린 A의 존재하에서 PBMC를 EBV를 생산하는 세포, 예를 들어 B95-8 세포의 농축된 세포 배양 상등액과 배양하여 생성시킬 수 있다.
- [0098] 일부 실시태양에서, 상기 APC는 상기 T 세포의 집단이 생성되거나 증식되는 대상체와 동일한 대상체로부터 수득되거나, 또는 상기 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래한다. 즉, 일부 실시태양에서 상기 APC 및 T 세포는 자기유래 기원의 것이다. 일부 실시태양에서, 상기 APC는 상기 T 세포의 집단이 생성되거나 증식되는 대상체와 상이한 대상체로부터 수득되거나, 또는 상기 대상체로부터 수득된 세포로부터 유래한다. 즉, 일부 실시태양에서 상기 APC 및 T 세포는 이종 기원의 것이다.
- [0099] 본 발명에 따른 일부 실시태양에서, 상기 APC는 EBV에 의한 B 세포의 형질전환에 의해 제조된 LCL이며, 여기에서 상기 B 세포는 본 발명의 방법에 사용된 T 세포와 동일한 대상체로부터 수득된다. 일부 실시태양에서 상기 LCL은 상기 T 세포가 수득되는 대상체와 상이한 대상체로부터 수득된 B 세포의 형질전환에 의해 제조된다.
- [0100] 일부 실시태양에서, 상기 LCL의 제조에 사용되는 B 세포는 본 발명에 따른 바이러스-특이적 T 세포의 집단이 생성되고/되거나 증식되는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)의 집단과 동일한 개인으로부터 수득되는 PBMC의 집단으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 LCL의 제조에 사용되는 B 세포는 본 발명에 따른 바이러스-특이적 T 세포의 집단이 생성되고/되거나 증식되는 PBMC의 동일 집단으로부터 수득된다.
- [0101] 일부 실시태양에서, 상기 APC(예를 들어 LCL)는 상기 T 세포의 존재하에서 배양 전에, 그의 증식을 방지하기 위해 하나의 물질(예를 들어 미토마이신 C)로 처리되거나 조사된다. 본 발명의 방법에 따른 LCL의 방사선 조사는 전형적으로 6000 내지 12000 rad이다.
- [0102] 본 발명의 방법은 바이러스-특이적 T 세포의 생성/증식을 위한 종래 기술 방법에 비해 보다 짧은 기간으로 큰 수의 바이러스-특이적 T 세포를 생성시키는데 유용하다. 특히, 상기 방법은 상기 바이러스에 의해 야기되거나 악화되는, 또는 상기 바이러스에 의한 감염이 원인 인자인 질환의 치료 또는 예방을 위한 상기 바이러스-특이적 T 세포의 입양전이를 위해 큰 수의 바이러스-특이적 T 세포를 생성시키는데 유용하다.
- [0103] 예를 들어, 상기 방법이 EBV-특이적 T 세포의 집단을 생성 및/또는 증식시키기 위한 것일 때, 상기 세포는 예를 들어 문헌[Chia WK et al., Molecular Therapy (2014), 22(1): 132-139](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같이, 입양전이에 의한 EBV 관련 장애, 예를 들어 비인두암(NPC)의 치료에 유용하다.
- [0104] T 세포의 입양전이는 T 세포를 전형적으로는 혈액 샘플을 채혈함으로써 대상체로부터 수득하는 과정을 지칭한다. 이어서 상기 T 세포를 전형적으로 처리하거나 또는 일부 방식으로 변경시키고, 동일한 대상체에게 복귀시키거나 또는 상이한 대상체내에 도입시킨다. 상기 처리는 전형적으로 대상체에게 일부 목적하는 특성을 갖는 T 세포 집단을 제공하거나, 또는 상기 대상체에서 상기와 같은 특성을 갖는 T 세포의 빈도를 증가시키는 것이 목적이다. 바이러스 특이적 T 세포의 입양전이는 예를 들어 문헌[Cobbold et al., (2005) J. Exp. Med. 202: 379-386] 및 문헌[Rooney et al., (1998), Blood 92:1549-1555](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재되어 있다.
- [0105] 본 명세서에서 대상체는 인간일 수 있다. 일부 실시태양에서, 대상체는 비-인간 포유동물(예를 들어 토끼, 기니 피그, 래트, 마우스 또는 다른 설치류(쥐목의 임의의 동물 포함), 고양이, 개, 돼지, 양, 염소, 소(암소, 예를 들어 젖소, 또는 Bos 목의 임의의 동물 포함), 말(기체목의 임의의 동물 포함), 당나귀 및 비-인간 영장류)일 수 있다.
- [0106] T 세포 자극
- [0107] 본 발명에서, T 세포의 집단을 생성시키고/증식시킨다. 상기 방법은 일반적으로 T 세포를 자극하여 그의 세포 분열 및 따라서 그의 수의 증가를 생성시키는 단계들을 포함한다.
- [0108] T 세포의 집단을, 자극 및 결과적인 세포분열에 의해 단일의 T 세포로부터 생성시킬 수 있다. T 세포의 기존

집단을 상기 T 세포 집단의 세포의 자극 및 결과적인 세포분열에 의해 증식시킬 수 있다.

[0109] 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC는 상기 바이러스에 특이적인 T 세포(즉 상기 APC에 의해 제시된 바이러스 웨პ티드를 인식할 수 있는 TCR을 갖는 T 세포)를 우선적으로 자극하며, 따라서 자극은 예를 들어 상기 바이러스에 특이적인 TCR을 포함/발현하지 않는 다른 T 세포에 비해 상기 세포의 세포분열 및 증식을 야기한다. 따라서 자극의 끝에서 상기 세포의 집단은 자극전 세포의 집단에 비해 상기 바이러스에 특이적인 T 세포가 풍부하다; 즉 상기 바이러스-특이적 T 세포는 자극에 이어서 상기 세포 집단 중에서 증가된 빈도로 존재한다. 이렇게 하여, 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단은 상이한 특이성을 갖는 T 세포의 이종 집단으로부터 증식/생성된다.

[0110] T 세포를 활성화에 이은 세포분열에 의해 증식되도록 자극한다. 본 명세서에서 상기에 기재한 바와 같이, T 세포 활성화는 상기 T 세포의 TCR이 APC로부터의 양의 보조자극 신호의 상황에서 높은 친화성을 갖는 MHC-웨პ티드 복합체의 결합을 통해 발생한다. 활성화는 T-세포를, IL-2를 생산하도록 유도하며, 이는 세포분열을 촉진한다. T 세포 활성화는 또한 상기 IL-2에 대한 수용체의 발현을 상향조절하며, 따라서 활성화된 T 세포의 증식이 자가 분비 방식으로 촉진된다.

[0111] 본 발명의 방법은 T 세포가 특이적인 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC를 사용하여 T 세포를 자극 및 재-자극하는 단계들을 수반한다. 상기 자극성 APC는 상기 T 세포가 특이적 TCR을 포함하고 MHC 분자의 상황에서 바이러스 웨პ티드를 제시하는 바이러스로 감염되거나, 또는 상기 바이러스의 웨პ티드를 포함하거나 발현한다. 자극은 세포분열을 촉진하여(즉 상기 T 세포(들)가 증식되게 하여) 상기 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 및 /또는 증식시킨다.

[0112] 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 T 세포를 "자극" 및/또는 "재-자극"함을 포함하는 방법 단계를 본 명세서에서 "자극 단계"라 칭할 수 있다. 본 발명에 따른 자극 단계의 상황에서 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC 및 T 세포의 배양물을 본 명세서에서 "자극 배양물"이라 칭할 수 있다. 본 명세로부터 명백한 바와 같이, 자극 단계의 자극 배양물은 세포 배양 배지, 및 다수의 경우에 적응용 배지를 또한 포함하는 배지 중의 배양물 중에 세포를 포함한다.

[0113] 본 발명의 방법에 따른 T 세포 자극은 APC의 존재하에서의 T 세포의 배양; 즉 상기 T 세포 및 APC의 공-배양을 수반한다. 공-배양을 전형적으로는 시험관내 또는 생체외에서 수행한다.

[0114] 본 발명의 방법에서, 바이러스-특이적 T 세포의 집단은 전형적으로는 PBMC의 집단으로부터 생성되거나 또는 증식된다. 상응하게, 본 발명의 방법의 일부 실시태양에서, APC의 존재하에서의 배양에 의해 자극된 T 세포는 다른 PBMC, 예를 들어 B 세포, NK 세포 및/또는 단핵세포와 함께 상기 배양물 중에 존재한다. 일부 실시태양에서, 상기 T 세포의 집단은 백혈구의 집단으로부터 생성되거나 증식될 수 있으며, 따라서 T 세포 이외의 백혈구, 예를 들어 B 세포, NK 세포, 단핵세포, 호중구, 호산구, 및/또는 호염기구와 함께 배양물 중에 존재할 수 있다.

[0115] 바이러스-특이적 T 세포의 집단이 생성되거나 증식되는 세포의 집단을 본 명세서에서 "응답자"라 칭할 수 있으며, 상기 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC를 본 명세서에서 "자극인자"로서 칭할 수 있다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 방법의 자극 단계는 "응답자" 및 "자극인자"를 특정한 비로 제공하며, 이를 본 명세서에서 "응답자 대 자극인자 비"라 칭한다. 상기로부터 명백한 바와 같이, 일부 실시태양에서, 본 명세서에 사용된 바와 같은 "응답자"는 PBMC의 집단을 지칭한다. 일부 실시태양에서, "응답자"는 T 세포, 또는 백혈구의 집단을 지칭한다.

[0116] 초기 자극 단계에서, 상기 "응답자"는 바이러스-특이적 T 세포의 집단을 생성 및/또는 증식시키고자 하는 T 세포를 포함하는 세포의 집단이다. 초기 자극의 "응답자"는 예를 들어 T 세포의 집단, 림프구의 집단, 백혈구의 집단, 또는 PBMC의 집단일 수 있다. 특정한 실시태양에서, 초기 자극의 "응답자"는 PBMC의 집단이다.

[0117] 상기 초기 자극 단계에 후속적인 자극 단계(즉 상기 T 세포의 재-자극 단계)에서, 상기 "응답자"는 선행 자극 단계의 끝에서의 세포, 예를 들어 선행 자극 단계의 끝에서 수집된 세포이다. 후속적인 자극 단계의 "응답자"는 자극되어 분열된 세포를 포함하여, 선행 자극 단계의 끝에서 배양물 중의 생육성 세포를 포함할 것이다.

[0118] 예를 들어, 하기의 단계들:

(i) 바이러스의 웨პ티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포 자극;

- [0120] (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포의 수집; 및
- [0121] (iii) 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의한 T 세포의 재-자극(여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 상기 바이러스의 펩티드를 제시하는 APC 및 T 세포의 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지이다)
- [0122] 을 포함하는 방법에서, 단계 (iii)의 자극에 대한 "응답자"는 단계 (ii)에서 수집된 세포이다.
- [0123] 상기 "응답자 대 자극인자 비"는 주어진 자극 단계의 시작에서 상대적인 세포의 수, 즉 상기 자극 단계의 출발 시 배양물에 제공되는 세포의 비를 지칭함을 알 것이다.
- [0124] 일부 실시태양에서, 재-자극 단계의 "응답자"는 T 세포 이외의 세포; 예를 들어 상술한 바와 같은 다른 PBMC 또는 백혈구를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 방법의 초기 자극 단계의 응답자가 PBMC인 실시태양에서, 상기 초기 자극 단계의 끝에서 수집된 세포는 T 세포 외에 PBMC 또는 백혈구를 포함할 수 있다.
- [0125] 다중 자극 단계를 포함하는 바이러스-특이적 T 세포의 증식 방법은 숙련가에게 주지되어 있다. 전형적인 배양 조건(즉 세포 배양 배지, 첨가제, 온도, 기상 분위기), 응답자 대 자극인자의 비, 자극 단계를 위한 배양 기간 등을 예를 들어 문헌[Bollard et al., J Exp Med (2004), 200(12): 1623-1633] 및 문헌[Straathof et al., Blood (2005), 105(5): 1898-1904](둘 다 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)을 참조하여 쉽게 측정할 수 있다.
- [0126] 본 발명에 따른 자극 단계에서 T 세포 및 APC의 공-배양을 세포 배양 배지에서 수행한다. 상기 세포 배양 배지는, 본 발명에 따른 T 세포 및 APC를 시험관내/생체외에서 배양물 중에서 유지시킬 수 있는 임의의 배지일 수 있다. 림프구의 배양에 사용하기에 적합한 배양 배지는 숙련가에게 주지되어 있으며, 예를 들어 AIM-V 배지, 아이스코베 배지 및 RPMI-1640 배지를 포함한다.
- [0127] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "세포 배양 배지"는 "적응용 배지"와 뚜렷이 다르다. 본 명세 전체로부터 명백한 바와 같이, 본 발명에 따른 T 세포 및 APC를 포함하는 배양물을 실질적으로 단지 세포 배양 배지만을 사용하여 확립시키거나(예를 들어 초기 자극 단계에서), 또는 상기 배양물을 세포 배양 배지와 적응용 배지를 모두 포함할 수도 있다(예를 들어 후속적인 자극 단계에서).
- [0128] 일부 실시태양에서, 세포 배양 배지는 RPMI-1640 배지 및/또는 클릭 배지(또한 이글스 햄스 아미노산(EHAA) 배지로서 공지됨)를 포함할 수 있다. 이를 배지의 조성은 숙련가에게 주지되어 있다. RPMI-1640 배지의 제형화는 예를 들어 문헌[Moore et al., JAMA (1967) 199:519-524]에 기재되어 있고, 클릭 배지의 제형화는 문헌[Click et al., Cell Immunol (1972) 3:264-276]에 기재되어 있다. RPMI-1640 배지를 예를 들어 써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)으로부터 수득할 수 있고, 클릭 배지는 예를 들어 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich)(카탈로그 No. C5572)로부터 수득할 수 있다.
- [0129] 일부 실시태양에서, 상기 세포 배양 배지는 RPMI-1640 배지 및 클릭 배지를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 (부피 기준으로) 25-65% RPMI-1640 배지, 및 25-65% 클릭 배지를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 30-60% RPMI-1640 배지, 및 30-60% 클릭 배지를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 35-55% RPMI-1640 배지, 및 35-55% 클릭 배지를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 40-50% RPMI-1640 배지, 및 40-50% 클릭 배지를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 45% RPMI-1640 배지, 및 45% 클릭 배지를 포함한다.
- [0130] 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 하나 이상의 세포 배양 배지 첨가제를 포함할 수 있다. 세포 배양 배지 첨가제는 숙련가에게 주지되어 있으며, 항생제(예를 들어 페니실린, 스트렙토마이신), 혈청(예를 들어 소태아 혈청(FBS), 소 혈청 알부민(BSA)), L-글루타민, 사이토kin/성장 인자 등을 포함한다.
- [0131] 일부 실시태양에서, 상기 세포 배양 배지는 (부피 기준으로) 5-20% FBS, 7.5-15% FBS, 또는 10% FBS를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 세포 배양 배지는 1-5 mM L-글루타민, 1.5-3 mM L-글루타민 또는 2 mM 글루타민을 포함한다.
- [0132] 일부 실시태양에서, 자극 단계용 세포 배양 배지는 IL-2를 포함할 수도 있다. 일부 실시태양에서 IL-2를 첨가할 수 있다(본 명세서에서 "첨가된 IL-2"라 지칭된다). 일부 실시태양에서 상기 IL-2는 외인성, 즉 배양물의 세포에 의해 생성되지 않는 IL-2일 수 있다. 일부 실시태양에서 상기 IL-2는 재조합 IL-2일 수 있다.
- [0133] 일부 실시태양에서 본 발명에 따른 자극 단계의 세포 배양 배지는 10-200 IU/ml, 15-175 IU/ml, 20-150 IU/ml,

30-125 IU/ml, 또는 40-100 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함한다. 상기 최종 농도는 상기 자극 단계의 배양물 중의 배지(세포 배양 배지 및 임의의 적응용 배지 포함)의 전체 부피 중의 농도이다.

[0134] 일부 특정 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 40-50% RPMI-1640 배지, 40-50% 클릭 배지, 5-20% FBS, 1-5 mM L-글루타민, 및 10-200 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 42.5-47.5% RPMI-1640 배지, 42.5-47.5% 클릭 배지, 7.5-15% FBS, 1.5-3 mM L-글루타민, 및 20-150 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함한다. 일부 실시태양에서 상기 세포 배양 배지는 45% RPMI-1640 배지, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 및 40-100 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함한다.

[0135] 본 발명에 따른 자극 단계는 전형적으로 한정된 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 공-배양을 수반한다. 적합하게, 상기 기간은 적어도 상기 APC가 상기 T 세포를 자극하여 세포분열을 겪게하기에 충분히 길다. 일부 실시태양에서 상기 기간은 자극 및 자극된 T 세포의 적어도 단일 세포 분열에 충분히 길다.

[0136] 일부 실시태양에서, 본 발명의 방법에 따른 자극 단계는 적어도 1시간, 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 36시간, 적어도 72시간, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 또는 적어도 14일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 자극 단계는 20일 이하, 14일 이하, 13일 이하, 12일 이하, 11일 이하, 10일 이하, 9일 이하, 8일 이하, 7일 이하, 6일 이하, 5일 이하, 4일 이하, 또는 72시간 이하 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다.

[0137] 일부 실시태양에서, 본 발명의 방법에 따른 자극 단계는 24시간 내지 20일, 48시간 내지 14일, 및 3 내지 12일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 자극 단계는 7 내지 14일, 8 일 내지 13일, 및 9 내지 12일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 자극 단계는 1 내지 8일, 2일 내지 6일 및 3 내지 4일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다.

[0138] 자극 단계는 전형적으로 세포가 배양된 배지로부터의 배양물 중에서 상기 세포를 분리시킴으로써 종료된다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 상기 세포를 상기 자극 단계의 끝에서 수집하는(즉 선행 자극 단계의 끝에서 수득된 세포를 수집하는) 단계를 포함한다. 자극 단계의 끝은 상기 단계의 배양 기간에 의해 측정된다; 예를 들어 7일의 기간 동안 바이러스의 웨터드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 T 세포를 자극함을 포함하는 방법 단계는 상기 7일 배양 기간의 끝에서 상기 세포를 수집함으로써 종료된다.

[0139] 본 발명에 따른 방법의 일부 실시태양에서 자극 단계는 예를 들어 세포 배양 배지의 첨가에 의해 상기 배양물을 회석함으로써 종료된다. 상기와 같은 실시태양에서, 세포의 수집은 필요하지 않으며, 본 발명에 따른 재-자극 단계를, 상기 재-자극 단계를 위한 세포 배양 배지, 적응용 배지(및 임의의 첨가제)의 목적하는 백분율/농도를 성취하기에 적합한 양으로 세포 배양 배지(및 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 다른 첨가제)를 첨가함으로써 확립시킬 수 있다.

[0140] 상기 자극 단계의 배양 기간의 끝에서, 상기 세포를 수집하고 세포 배양 상등액으로부터 분리시킬 수 있다. 혼탁 배양액 중에서 증식된 세포(예를 들어 림프구)의 경우, 상기 세포를 원심분리에 의해 수집할 수 있으며, 상기 세포 배양 상등액을 세포 펠릿으로부터 분리시킬 수 있다. 이어서 상기 세포 펠릿을, 예를 들어 추가의 자극 단계를 위해 세포 배양 배지에 재-혼탁시킬 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 세포는 수집후 세척 단계를 겪을 수 있다. 세척 단계는 상기 세포 펠릿을 등장성 완충제, 예를 들어 포스페이트-완충된 염수(PBS)에 재-혼탁시키고, 원심분리에 의해 상기 세포를 수집하고, 상등액을 버림을 포함할 수 있다.

[0141] 본 발명에 따른 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 및/또는 증식하는 방법은 전형적으로 단일 초파의 자극 단계를 수반한다. 본 발명에 따른 방법에서 수행될 수 있는 자극 단계의 수에 대한 상한은 없다. 일부 실시태양에서 상기 방법은 2, 3, 4 또는 5개 초파의 자극 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 자극 단계 중 하나를 포함한다.

[0142] 본 발명에 따른 방법에서 상기 자극 단계는 서로 상이할 수도 있다.

[0143] 증식시키고자 하는 상기 바이러스-특이적 T 세포의 빈도는 초기 응답자 집단(예를 들어 대상체로부터 수득된 PBMC의 샘플)에서 매우 낮을 수 있으며, 후속 단계에서 상기 응답자 집단 중 바이러스-특이적 T 세포의 빈도는 선행 자극(들)의 결과로서 더 크다. 상응하게, 일부 실시태양에서 상기 방법은 후속(즉 재-자극) 단계의 경우 보다 초기 자극 단계에 대해 더 높은 응답자 대 자극인자 비를 제공한다.

- [0144] 일부 실시태양에서, 초기 자극 단계에 대한 응답자 대 자극인자의 비는 10:1 내지 80:1, 15:1 내지 70:1, 20:1 내지 65:1, 25:1 내지 60:1, 30:1 내지 50:1, 35:1 내지 45:1, 또는 40:1 중 하나의 범위이다. 일부 실시태양에서, 재-자극 단계에 대한 응답자 대 자극인자의 비는 1:1 내지 10:1, 1.5:1 내지 8:1, 2:1 내지 7:1, 2.5:1 내지 6:1, 3:1 내지 5:1, 3.5:1 내지 4.5:1, 또는 4:1 중 하나의 범위이다.
- [0145] 초기 자극 단계(즉 상기 방법의 첫 번째 자극 단계)는 전형적으로 후속 자극 단계에 대한 배양 기간보다 더 긴 기간인 기간 동안의 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 상기 더 긴 기간은 바이러스-특이적 T 세포 수의, 상기 초기 자극의 응답자 집단에서 일반적으로 낮은 빈도로부터의 인지할 만한 증가를 허용한다.
- [0146] 일부 실시태양에서, 초기 자극 단계는 7 내지 14일, 8일 내지 13일, 및 9 내지 12일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 후속 자극 단계는 1 내지 8일, 2일 내지 5일 및 3 내지 4일 중 하나의 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다.
- [0147] 일부 실시태양에서, 초기 자극 단계의 배양은 첨가된 IL-2를 포함하지 않을 수도 있는 반면, 후속 자극 단계의 배양은 첨가된 IL-2를 포함할 수 있다.
- [0148] 일부 실시태양에서, 상기 방법은 초기 자극 단계에 이어서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 후속 자극 단계를 포함한다. 일부 실시태양에서, 각각의 상기 후속 자극 단계는 동일하거나 유사한 기간 동안 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 각각의 상기 후속 자극 단계는 동일하거나 유사한 응답자 대 자극인자의 비에서 상기 T 세포 및 APC의 배양을 수반한다. 일부 실시태양에서, 각각의 상기 후속 자극 단계의 배양은 동일하거나 유사한 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함한다.
- [0149] 편의상, 본 명세에 따른 세포 배양물을 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 가습 분위기하에 37 °C에서 유지시킨다. 배양을 상기 배양 부피에 적합한 임의의 용기에서, 예를 들어 세포 배양 플레이트의 웰, 세포 배양 플라스크, 생물반응기 등에서 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 세포 배양물의 세포를 숙련가에 의해 쉽게 측정될 수 있는 바와 같이, 임의의 적합한 밀도로 확립 및/또는 유지시킬 수 있다. 예를 들어, 배양물을  $\sim 0.5 \times 10^6$  내지  $\sim 5 \times 10^6$  세포/ml의 배양물의 초기 밀도(예를 들어  $\sim 1 \times 10^6$  세포/ml)로 확립시킬 수 있다.
- [0150] 세포를 임의의 적합한 세포 배양 용기에서 배양시킬 수 있다. 본 발명의 다양한 태양에 따른 방법의 일부 실시태양에서, 세포를 생물반응기에서 배양시킨다. 일부 실시태양에서, 세포를 문헌[Somerville and Dudley, Oncoimmunology (2012) 1(8):1435-1437](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 생물반응기에서 배양시킨다. 일부 실시태양에서 세포를 GReX 세포 배양 용기, 예를 들어 GReX 플라스크 또는 GReX 100 생물반응기에서 배양시킨다.
- [0151] 적응용 배지
- [0152] 본 발명은 적응용 배지에서의 세포의 배양을 수반한다. "적응용 배지"는 세포 배양 배지에서 세포의 배양에 의해 수득된 배지를 지칭한다. 적응용 배지는 상기 배양된 세포로부터 분비/방출된 인자들(예를 들어 사이토킨, 케모킨, 생육 인자 등)을 함유한다. 적응용 배지는 세포를, 상기 배지를 적응시키기에 충분한 시간 동안 배양 배지에서 배양시키고, 이어서 상기 적응용 배지(conditioned medium)를 수집함으로써 생성된다.
- [0153] 본 발명에 따른 자극 단계의 배양물은 세포 배양 배지 및 적응용 배지의 혼합물을 포함할 수 있다. 즉, 자극 배양물의(예를 들어 자극 단계의) 세포가 확립되고 배양되는 배지는 세포 배양 배지 및 적응용 배지를 모두 포함할 수 있다. 적응용 배지 및 신선한 배지의 혼합물의 사용은 배양물 중의 세포에 이로운 보다 복합적인 영양 배지를 제공할 수 있다.
- [0154] 상기 적응용 배지의 조성은 세포, 기간, 배양 조건, 임의의 첨가제의 사용, 및 상기 적응용 배지가 수득되는 배양에 사용된 세포 배양 배지의 조성에 따라 변할 것이다.
- [0155] 본 발명에서, 상기 적응용 배지를 T 세포 및 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득한다.
- [0156] 일부 실시태양에서 본 발명의 방법에 따른 자극 배양물의 세포 배양 배지 및 적응용 배지는 상기 적응용 배지가 적응된 것을 제외하고 동일할 수 있다.
- [0157] 본 발명의 방법에 따른 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지를 본 명세서에 기재된 임의의 실시태양에 따른 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있다.
- [0158] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지를 자극 단계의 종점에서 수집한다. 편의상, 상기 적응용 배지를 상기 세

포 수집 시기에 자극 단계의 종점에서 수집할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 적응용 배지를 원심분리에 의해 수득된 상등액으로부터 수득하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 자극 단계의 끝에서 세포를 수집할 수 있다.

[0159] 일부 실시태양에서, 본 발명에 따른 자극 단계의 배양물(즉 자극 배양물) 중에 포함된 적응용 배지를 본 명세서에 기재된 자극 단계의 배양물로부터 수득한다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 초기 자극 단계(즉 본 발명에 따른 방법의 첫 번째 자극 단계)의 배양물로부터 수득되지 않는다.

[0160] 배지의 적응에 적합한 배양 기간은 공지된 방법들에 근거하여 숙련가에 의해 결정될 수 있다. 전형적으로, 배지를 약 1시간 내지 약 8일, 예를 들어 약 1일 내지 8일, 2일 내지 5일, 또는 3 내지 4일 동안 컨디셔닝할 것이다.

[0161] 특정한 실시태양에서, 본 발명에 따른 적응용 배지는 하기로부터 수득된다:

[0162] (1) 상기 T 세포가 특이적인 바이러스의 웹티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 바이러스-특이적 T 세포의 자극 배양;

[0163] (2) 1 내지 8일, 2일 내지 6일, 및 3 내지 4일 중 하나의 배양 기간 후, (1)에 따른 자극 배양;

[0164] (3) 1:1 내지 10:1, 1.5:1 내지 8:1, 2:1 내지 7:1, 2.5:1 내지 6:1, 3:1 내지 5:1, 3.5:1 내지 4.5:1, 또는 4:1 중 하나의 응답자:자극인자 비에서, (1) 또는 (2)에 따른 자극 배양;

[0165] (4) (1) 내지 (3) 중 어느 하나에 따른 자극 배양, 여기에서 상기 자극 배양에 사용된 세포 배양 배지는 30-60% RPMI-1640 배지 및/또는 30-60% 클릭 배지 및/또는 5-20% FBS 및/또는 1-5 mM L-글루타민을 포함한다;

[0166] (5) 10-200 IU/ml, 15-175 IU/ml, 20-150 IU/ml, 30-125 IU/ml, 또는 40-100 IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는, (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 따른 자극 배양;

[0167] (6) (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 자극 배양으로부터 수득된 적어도 10%의 적응용 배지를 추가로 포함하는, (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 따른 자극 배양;

[0168] (7) (1) 내지 (6) 중 어느 하나에 따른 자극 배양, 여기에서 APC는 LCL, 예를 들어 EBV-형질전환된 LCL이다.

[0169] 일부 실시태양에서, 주어진 자극 단계의 배양물 중에 포함된 적응용 배지를 동일한 방법의 또 다른, 상이한 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있다. 예를 들어 본 발명에 따른 방법의 세 번째 자극 단계의 배양물 중에 포함된 적응용 배지를 두 번째 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있다.

[0170] 일부 실시태양에서, 자극 단계의 배양물 중에 포함된 적응용 배지를 상기 방법의 선행 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 세 번째 자극 단계의 배양물 중에 포함된 적응용 배지를 두 번째 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있고, 네 번째 자극 단계의 배양물 중에 포함된 적응용 배지를 세 번째 자극 단계의 배양물로부터 수득할 수 있는 등이다.

[0171] 본 발명에 따른 방법의 실시태양에서, 모든 자극 단계가 적응용 배지를 포함하는 배지 중의 배양을 포함하는 것은 아니다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 상기 방법에 따른 초기 자극 단계의 배양물은 적응용 배지를 포함하지 않는다.

[0172] 적응용 배지를 포함하는 자극 단계의 배양물은 상기 자극 단계의 배양물 중의 배지의 전체 부피의 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 7.5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 중 하나의 양(부피 기준으로)의 적응용 배지를 함유할 수 있다. 나머지 부피는 상기 배지에 첨가되는 임의의 첨가제를 포함하여, 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포 배양 배지에 의해 구성될 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중의 배지의 전체 부피의 적어도 10%를 차지할 수 있다.

[0173] 적응용 배지에 생육 인자 및 사이토킨이 풍부하지만, 상기 배지는 전형적으로, 예를 들어 상기 배지 중에서 배양된 세포에 의한 소비로 인해, 적응되지 않은 필적하는 세포 배양 배지에 비해 보다 낮은 농도의, 예를 들어 아미노산 및 글루코스를 포함한다. 적응용 배지는 또한 배지의 적응에 사용된 세포의 노폐물을 또한 포함할 수 있다. 상기와 같은 인자는 세포 성장 및 분열에 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 따라서 본 발명에 따른 자극 단계의 자극 배양물 중 상기 배지의 100%가 적응용 배지가 아닌 것이 중요할 수 있다. 일부 실시태양에서, 적

응용 배지를 포함하는 자극 단계의 배양물은 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 100% 미만, 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 또는 15% 미만 중 어느 하나의 양(부피 기준)의 적응용 배지를 함유할 수 있다.

[0174] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 30% 이하, 25% 이하, 20% 이하 또는 15% 이하를 차지할 수 있다.

[0175] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 5 내지 70%, 7.5 내지 70%, 10 내지 70%, 10 내지 65% 10 내지 60%, 12.5 내지 55%, 15 내지 50%, 15 내지 45%, 15 내지 40%, 17.5% 내지 45%, 20-40%, 20-35%, 또는 20-30% 중 하나를 차지할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 20-30%를 차지할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 10 내지 25%, 바람직하게는 약 15%를 차지할 수 있다.

[0176] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 5 내지 30%, 5 내지 27.5%, 5 내지 25%, 5 내지 22.5%, 5 내지 20%, 또는 5 내지 17.5% 중 하나를 차지할 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 7.5 내지 30%, 10 내지 30% 또는 12.5 내지 30% 중 하나를 차지할 수 있다.

[0177] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 5 내지 30%, 10 내지 25%, 10 내지 20%, 12.5 내지 17.5% 또는 약 15% 중 하나를 차지할 수 있다.

[0178] 일부 실시태양에서, 상기 적응용 배지는 상기 자극 단계의 배양물 중 배지의 전체 부피의 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29% 또는 30% 중 하나를 차지할 수 있다.

[0179] 배양 배지는 1x 제형 또는 농축된 제형, 예를 들어 2x 내지 250x 농축된 배지 제형일 수 있다. 1x 제형에서 상기 배지 중의 각 성분은 세포 배양을 위해 의도된 농도로 있다. 농축된 제형에서 상기 성분들 중 하나 이상은 세포 배양을 위해 의도된 것보다 더 높은 농도로 존재한다. 농축된 배양 배지는 당해 분야에 주지되어 있다. 배양 배지를 공지된 방법, 예를 들어 염 침전 또는 선택적인 여과를 사용하여 농축시킬 수 있다. 농축된 배지를 물(바람직하게는 탈이온수 및 증류수) 또는 임의의 적합한 용액, 예를 들어 수성 염수 용액, 수성 완충제 또는 배양 배지로 사용을 위해 희석할 수 있다.

[0180] 상기 지시된 백분율은 적응용 배지의 1x 제형을 참조하여 만들어짐을 알 것이다. 숙련가는 적응용 배지의 1x 제형의 10%를 포함하는 배양물이 적응용 배지의 10x 농축된 제형의 1%를 포함하는 배양물과 같음을 이해한다.

[0181] 일부 실시태양에서, 적응용 배지를 자극 단계의 배양물로부터 수집하고 예를 들어 -80 °C에서 보관할 수 있다. 이어서 상기 보관된 적응용 배지를 해동시켜 본 발명에 따른 방법에 사용할 수 있다. 일부 실시태양에서 상기 적응용 배지를 예를 들어 여과에 의해 세포 또는 찌꺼기 제거를 위해 처리할 수 있다.

#### 방법의 구체적인 예시적인 실시태양

[0183] 본 발명에 따라, 상기 방법들의 다수의 구체적인 예시적인 실시태양들을 제공한다. 하기의 구체적인 실시태양들은 순전히 예시를 목적으로 하며, 본 명세서에서 상기에 기재된 다양한 특징들을 어떻게 결합하는가를 나타내고, 본 발명을 어떠한 식으로도 제한하고자 하지 않는다.

[0184] (a) 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지,

[0185] (b) T 세포(예를 들어 PBMC의 집단내)를 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민, 및 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL) 존재하에서의 배양에 의해 자극함을 포함하는 방법에 의해 수득된 적어도 10%(예를 들어 10% 내지 70%)의 적응용 배지, 및

[0186] (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2

[0187] 를 포함하는 배지에서, 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자

대 자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL) 존재하에서의 배양에 의해 T 세포(예를 들어 PBMC의 집단내)를 자극함을 포함하는, EBV-특이적 T 세포(예를 들어 CTL) 집단의 생성 또는 증식 방법, 또는 상기 집단의 증식 속도를 가속화시키는 방법.

- [0188] (i) 7 내지 14일(예를 들어 9 내지 12일)의 기간 동안 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에서 10:1 내지 80:1(예를 들어 40:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL) 존재하에서의 배양에 의해 T 세포(예를 들어 PBMC의 집단내)를 자극하고;
- [0189] (ii) 단계 (i)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0190] (iii) T 세포를 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민, 및 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 단계 (ii)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극하고;
- [0191] (iv) 단계 (iii)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0192] (v) 상기 T 세포를 (a) 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (iii)의 종점에서 수득된 적어도 10%(예를 들어 10% 내지 70%)의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 단계 (iv)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함
- [0193] 을 포함하는, EBV-특이적 T 세포(예를 들어 CTL)의 집단을 생성 또는 증식하는 방법.
- [0194] 일부 실시태양에서, 상기 방법은 추가로
- [0195] (vi) 단계 (v)에 의해 수득된 세포를 수집하고;
- [0196] (vii) T 세포를 (a) 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 단계 (v)의 종점에서 수득된 적어도 10%(예를 들어 10% 내지 70%)의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 단계 (vi)에서 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극함
- [0197] 을 포함한다.
- [0198] 일부 실시태양에서, 상기 방법은 세포를 수집하고, 상기 T 세포를, (a) 40-50%(예를 들어 45%) RPMI-1640 배지, 40-50%(예를 들어 45%) 클릭 배지, 5-20%(예를 들어 10%) FBS, 및 1-5 mM(예를 들어 2 mM) L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지, (b) 선행 자극 단계의 종점에서 수득된 적어도 10%(예를 들어 10% 내지 70%)의 적응용 배지, 및 (c) 10-200(예를 들어 40-100) IU/ml의 최종 농도로 첨가된 IL-2를 포함하는 배지에서 1 내지 8일(예를 들어 3 내지 4일)의 기간 동안 2:1 내지 7:1(예를 들어 4:1)의 응답자:자극인자 비로 EBV-형질전환된 LCL(예를 들어 조사된, EBV-형질전환된 LCL)의 존재하에서 상기 수집된 세포를 배양함으로써 재-자극하는 추가의 단계들을 포함한다.
- [0199] 증식 속도
- [0200] 본 발명의 방법은 종래 기술 방법에 비해 바이러스-특이적 T 세포의 집단에 대한 개선된 증식 속도를 성취한다.
- [0201] T 세포 집단의 증식 속도를 숙련가에게 주지된 방법들에 의해 분석할 수 있다. 방법들은 T 세포의 수를 하나 이상의 시점에서 측정함을 포함한다.
- [0202] 예를 들어, 상기 T 세포의 수를 본 발명에 따른 방법을 수행한 후에 측정하고 상기 방법의 시작에서의 T 세포와 비교할 수 있으며; 이어서 상기 T 세포 수의 증식 배수를 계산할 수 있다.
- [0203] 증식 속도를 또한 일정 기간에 걸쳐 T 세포에 의한 세포분열을 분석함으로써 측정할 수 있다. 주어진 T 세포

집단에 대한 세포분열을 예를 들어  $^3\text{H}$ -티미딘 통합의 시험관내 분석에 의해 또는 CFSE 희석 분석에 의해, 예를 들어 문헌[Fulcher and Wong, Immunol Cell Biol (1999) 77(6): 559-564](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같이 분석할 수 있다.

[0204] 본 발명에 따른 방법에 의해 성취되는 증식 속도의 개선을, 본 발명에 따른 방법을 수행하고, 상기 방법에서 T 세포에 대한 증식을 적응용 배지 존재하에서의 자극 배양이 없는, 필적하는 대조용 방법과 비교함으로써 측정할 수 있다.

[0205] 예를 들어, 상기 증식 속도를 2가지 방법 사이에서 비교할 수 있다: (i) T 세포를 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC의 존재하에서의 배양에 의해 자극함(여기에서 상기 세포가 배양되는 배지의 적어도 10%는 T 세포 및 상기 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC를 포함하는 자극 배양물로부터 수득된 적응용 배지이다)을 포함하는 본 발명에 따른 방법; 및 (ii) 세포 배양 배지를 상기 적응용 배지 대신에 사용함을 제외하고 동일한 필적하는 대조용 방법.

[0206] 일부 실시태양에서, 본 발명에 따른 방법에서 T 세포의 집단에 대한 증식 속도는 세포 배양 배지가 적응용 배지 대신에 사용된 필적하는 대조용 방법에서의 증식 속도의 적어도 1.001 배, 1.002 배, 1.003 배, 1.004 배, 1.005 배, 1.006 배, 1.007 배, 1.008 배, 1.009 배, 1.01 배, 1.02 배, 1.03 배, 1.04 배, 1.05 배, 1.06 배, 1.07 배, 1.08 배, 1.09 배, 1.1 배, 1.2 배, 1.3 배, 1.4 배, 1.5 배, 1.6 배, 1.7 배, 1.8 배, 1.9 배, 또는 2 배 중 하나이다.

[0207] 상기 증식 속도는 바이러스-특이적 T 세포 집단, 또는 전체 T 세포 집단의 것일 수 있다.

#### 증식된 세포의 성질

[0209] 유리하게, 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포는 종래 기술 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포와 동일한 기능적 성질을 유지한다. 즉, 상기 가속화된 증식 속도는 상기 증식된 T 세포의 기능적 성질에 부정적인 영향을 미치지 않는다.

[0210] 예를 들어, 상기 방법이 바이러스-특이적 CTL의 집단을 생성/증식하는 실시태양에서, 상기 CTL은 바이러스의 웨티드로 감염되거나 또는 상기 웨티드를 포함/발현하는 세포에 대해 적응용 배지 존재하에서의 자극 배양이 없는 방법에 따라 증식된 바이러스-특이적 CTL과 유사한 세포독성을 나타낸다.

[0211] 증식된 CTL의 세포독성을, 예를 들어 상이한 효과기(즉 T 세포) 대 표적(즉 APC) 비에서 상기 증식된 T 세포 집단을 상기 T 세포가 특이적인 바이러스의 웨티드를 제시하는 APC와 배양하고, 상기 APC의 비용해(specific lysis)를 측정함으로써 분석할 수 있다. 예를 들어 EBV-특이적 CTL 집단의 세포독성을, 상이한 효과기 대 표적 비에서 EBV-형질전환된 LCL 세포의 비용해를 측정함으로써 분석할 수 있다.

#### 치료학적 및 예방학적 용도

[0213] 본 발명의 방법은 의학적 치료 방법에서 그 용도를 발견한다. 치료를 치료가 필요한 질환 또는 상태가 있는 대상체에게 제공할 수 있다.

[0214] 특히, 본 명세서에 기재된 바와 같은, 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성시키거나 증식하는 방법, 또는 바이러스-특이적 T 세포 집단의 증식 속도를 가속화시키는 방법을 포함하는, 질환 또는 장애(예를 들어 암)의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0215] 본 발명에 따른 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법은 T 세포의 입양전이를 포함할 수 있다.

[0216] 하나의 태양에서, 본 발명은

[0217] (1) 대상체로부터 T 세포를 단리하고;

[0218] (2) 본 명세서에 기재된 바와 같이 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고;

[0219] (3) 상기 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 대상체에게 투여함

[0220] 을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0221] 일부 실시태양에서, 상기 방법의 단계 (1)에서 T 세포가 수득되는 대상체는 상기 방법의 단계 (3)에서 본 명세서에 기재된 방법에 따라 생성되거나 증식된 T 세포의 집단이 투여된 대상체와 동일한 대상체이다(즉 입양전이는 자기유래 T 세포의 것이다). 일부 실시태양에서, 상기 방법의 단계 (1)에서 상기 T 세포가 수득되는 대상체

는 상기 방법의 단계 (3)에서 본 명세서에 기재된 방법에 따라 생성되거나 증식된 T 세포의 집단이 투여된 대상체와 상이한 대상체이다(즉 입양전이는 동종이계 T 세포의 것이다).

[0222] 상기 단계 (1)에 따라 대상체로부터 단리된 T 세포는 PBMC의 집단내에 있을 수 있음을 알 것이다.

[0223] 일부 실시태양에서, 상기 방법은 하기의 단계들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 대상체로부터 혈액을 채혈하고; 상기 혈액 샘플로부터 PBMC를 단리하고; 상기 혈액 샘플로부터 T 세포를 단리하고; 본 명세서에 기재된 방법에 따라 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고; 상기 T 세포를, 예를 들어 키메릭 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하도록 변형시키고; 상기 바이러스-특이적 T 세포의 생성/증식된 집단을 수집하고; 상기 바이러스-특이적 T 세포의 생성/증식된 집단을 보조제, 희석제 또는 담체와 혼합하고; 상기 바이러스-특이적 T 세포의 생성/증식된 집단을 대상체에게 투여한다.

[0224] 상기 방법은 일부 방식의 상기 T 세포의 변형 또는 치료를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 T 세포를 키메릭 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하거나 포함하도록 시험관내 또는 생체외에서 변형시킬 수 있다. T 세포를 숙련가에게 주지된 방법에 따라 변형시킬 수 있다. 상기 변형은 전이된 핵산의 영구적인 또는 일시적인 발현을 위한 핵산 전이를 포함할 수 있다. 임의의 적합한 유전공학 플랫폼을 상기와 같은 변형에 사용할 수도 있다. 적합한 방법은 예를 들어 문헌[Maus et al., Annu Rev Immunol (2014) 32:189-225](내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은, 유전공학 플랫폼, 예를 들어 감마레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, DNA 형질감염, 트랜스포손-기반 유전자 전달 및 RNA 형질감염을 포함한다.

[0225] 상기 치료는 질환/장애의 예방을 목적으로 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포 자체를 질환 상태의 발생에 대해 예방학적으로 사용할 수도 있다. 이는 상기 질환 상태의 증상의 개시 전에 발생하고/하거나, 상기 질환 또는 장애의 보다 큰 위험이 있는 것으로 간주되는 대상체에게 제공될 수 있다.

[0226] 본 발명에 따른 T 세포 집단의 투여, 또는 본 발명에 따른 T 세포의 집단을 포함하는 약학 조성물의 투여를 통해, 상기 질환 또는 장애를 치료하거나 예방한다.

[0227] 상기 질환 또는 상태는 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 T 세포가 특이적인 바이러스에 의한 감염에 의해 야기되거나 악화되는 것일 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 질환 또는 상태는 본 명세서에 기재된 바이러스에 의한 감염에 의해 야기되거나 악화되는 것일 수 있다.

[0228] 특히, 상기 질환 또는 상태는 앱스타인-바 바이러스(EBV), 인플루엔자 바이러스, 홍역 바이러스, B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV), 헤르페스 단순 바이러스(HSV) 또는 인유두종 바이러스(HPV)에 의해 야기되거나 악화되는 것일 수 있다.

[0229] 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포는 암의 치료 또는 예방 방법에 유용하다. 상응하게, 일부 실시태양에서 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법은 암의 치료 또는 예방을 위한 것이다.

[0230] 의학적 치료 방법은 인간 대상체에서 암 개선, 치료 또는 예방 방법에 의한 암 치료를 수반할 수 있으며, 여기에서 상기 방법의 단계들은 암성 세포의 근절에 있어서 면역계를 지원하거나 부양시킨다. 상기와 같은 방법은 암성 세포를 파괴하도록 능동(또는 수동) 면역 응답을 불러일으키는(성취하는) 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포의 투여를 포함할 수 있다. 치료 방법은 임의로, 통상적인 암 치료 요법, 예를 들어 화학요법, 방사선, 또는 수술과 함께 생물학적 항원보강제(예를 들어 인터류킨, 사이토킨, 바실러스 칼메트 계량, 모노포스포릴 지질 A 등)의 동시-투여를 포함할 수 있다. 치료 방법은 암세포 성장을 예방하거나 파괴하도록 면역계를 활성화시킴으로써 작용하는 백신으로서 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포를 투여함을 수반할 수 있다. 의학적 치료 방법은 자기유래 및/또는 이종 세포 또는 불멸화된 세포주를 사용하는 요법들을 포함하여, 생체내, 생체외 및 입양 면역요법을 수반할 수 있다.

[0231] 암은 임의의 원치않는 세포 증식(또는 원치않는 세포 증식에 의해 스스로 표출되는 임의의 질환), 신생물 또는 종양 또는 원치않는 세포 증식, 신생물 또는 종양의 증가된 위험성 또는 소인일 수 있다. 상기 암은 양성이거나 악성이 있으며 원발성 또는 2차성(전이성)일 수 있다. 신생물 또는 종양은 세포의 임의의 이상 성장 또는 증식일 수 있으며 임의의 조직 중에 위치할 수 있다. 조직의 예는 부신, 부신수질, 항문, 맹장, 방광, 혈액, 뼈, 골수, 뇌, 유방, 막창자, 중추신경계(뇌 포함 또는 제외) 소뇌, 자궁경부, 결장, 십이지장, 자궁내막, 상피세포(예를 들어 신장 상피), 담낭, 식도, 신경교 세포, 심장, 회장, 공장, 신장, 눈물샘, 후두, 간, 폐, 림프, 림프절, 림프아구, 상악골, 종격, 창자간막, 자궁근총, 비인두, 장막, 구강, 난소, 췌장,

턱밀샘, 말초 신경계, 복막, 흉막, 전립선, 침샘, S자 결장, 피부, 소장, 연조직, 비장, 위, 고환, 흉선, 갑상선, 혀, 편도, 기관, 자궁, 음문, 백혈구를 포함한다.

[0232] 치료하고자 하는 종양은 신경 또는 비-신경계 종양일 수 있다. 신경계 종양은 중추 또는 말초 신경계 중 어느 하나에서 기원할 수 있다, 예를 들어 신경교종(glioma), 수모세포종(medulloblastoma), 수막종(meningioma), 신경섬유종(neurofibroma), 상의세포종(ependymoma), 슈반종(Schwannoma), 신경섬유육종(neurofibrosarcoma), 성상세포종(astrocytoma) 및 펩지교종(oligodendrogloma). 비-신경계 암/종양은 임의의 다른 비-신경 조직에서 기원할 수 있으며, 예를 들어 흑색종(melanoma), 중피종(mesothelioma), 림프종(lymphoma), 골수종(myeloma), 백혈병(leukemia), 비-호지킨 림프종(Non-Hodgkin's lymphoma)(NHL), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma), 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia)(CML), 급성 골수양 백혈병(acute myeloid leukemia)(AML), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome)(MDS), 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma)(CTCL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia)(CLL), 간종양(hepatoma), 표피양 암종(epidermoid carcinoma), 전립선 암종(prostate carcinoma), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 결장암(colon cancer), 난소암(ovarian cancer), 훼장암(pancreatic cancer), 흉선 암종(thymic carcinoma), NSCLC, 혈액암(haematologic cancer) 및 육종(sarcoma)을 포함한다.

[0233] 특히, 두경부암(head and neck cancer), 비인두암(nasopharyngeal carcinoma)(NPC), 구강인두암(oropharyngeal cancer)(OPC), 경부암(cervical cancer)(CC), 위/위장암(gastric/stomach cancer) 또는 폐암(lung cancer)의 치료가 고려된다.

[0234] 일부 실시태양에서 상기 암은 EBV- 또는 HPV-양성 암이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 EBV-양성 NPC이다. 일부 실시태양에서, 상기 암은 HPV-양성 OPC 또는 HPV-양성 CC이다.

[0235] 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포의 투여는 바람직하게는 "치료학적 또는 예방학적 유효량"이며, 이는 개인에게 이점을 나타내기에 충분하다. 실제 투여량 및 투여속도 및 시간-경과는 치료되는 질환의 성질 및 중증도에 따라 변할 것이다. 치료의 처방, 예를 들어 투여량 등에 대한 결정은 일반의 및 다른 의사의 책임내에 있으며, 전형적으로 치료되는 장애, 개인 환자의 상태, 전달 부위, 투여 방법 및 의사에게 공지된 다른 인자를 고려한다. 상기에 언급된 기법 및 프로토콜의 예는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th Edition, 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins]에서 찾을 수 있다.

[0236] 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 생성되거나 증식된 T 세포의 집단을 제공한다. 상응하게, 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 수득가능하거나 또는 상기 방법의 생성물인, 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 제공한다.

[0237] 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에서 T 세포의 집단의 용도를 제공한다.

[0238] 즉, 본 발명은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 제공하며, 여기에서 상기 T 세포의 집단은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 수득가능하거나 또는 상기 방법의 생성물이다.

[0239] 또한, 대상체에게 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 여기에서 상기 T 세포의 집단은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 수득 가능하거나 또는 상기 방법의 생성물이다.

[0240] 또한, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제 또는 백신의 제조에서 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 약학 조성물의 용도를 제공하며, 여기에서 상기 T 세포의 집단은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 수득 가능하거나 또는 상기 방법의 생성물이다.

#### 약학적으로 유용한 조성물 및 약제

[0242] 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포를 임상용으로 제형화할 수 있으며 상기는 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 포함할 수 있다.

[0243] 본 발명의 방법에 따라 또한 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포를 포함하는 약학적으로 유용한 조성물의 생성을 제공하며, 상기와 같은 생성 방법은 하기 중에서 선택된 하나 이상의 단계를 포함할 수 있다: 본 발명의 방법에 따라 바이러스-특이적 T 세포의 집단을 생성/증식시키고; 및/또는 본 발명의 방법에 따라 생성/증식된 바이러스-특이적 T 세포를 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제와 혼합

한다.

[0244] 하나의 태양에서, 본 발명은 약학 조성물, 약제 또는 백신의 제조 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 방법에 따라 바이러스에 특이적인 T 세포의 집단을 생성 또는 증식시키고, 상기 수득된 세포를 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 희석제 또는 부형제와 혼합함을 포함한다.

[0245] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 T 세포의 집단, 및 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제, 부형제 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 T 세포의 집단은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되거나, 수득 가능하거나 또는 상기 방법의 생성물일 수 있다.

[0246] 본 발명은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에 사용하기 위한 본 발명에 따른 약학 조성물을 제공한다.

[0247] 대상체에게 본 발명에 따른 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 또한 제공한다.

[0248] 질환 또는 장애의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 약제 또는 백신의 제조에서 본 발명에 따른 약학 조성물의 용도를 또한 제공한다.

#### 대상체(subject)

[0250] 치료하고자 하는 대상체는 임의의 동물 또는 인간일 수 있다. 상기 대상체는 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간이다. 상기 대상체는 비-인간 포유동물일 수 있으나, 보다 바람직하게는 인간이다. 상기 대상체는 남성 또는 여성일 수 있다. 상기 대상체는 환자일 수 있다.

[0251] 대상체는 치료를 요하는 질환 또는 상태로 진단되었거나, 상기와 같은 질환 또는 상태가 있을 것으로 의심이 가거나, 또는 상기와 같은 질환 또는 상태를 나타낼 위험이 있을 수 있다.

#### 키트

[0253] 본 발명의 하나의 태양에서 부분들의 키트를 제공한다. 상기 부분들의 키트는 본 발명에 따른 T 세포의 집단 또는 본 발명에 따른 약학 조성물을 포함한다.

[0254] 일부 실시태양에서, 상기 키트는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 상기 T 세포의 집단 또는 약학 조성물의 사용 설명서를 포함할 수 있다.

[0255] 일부 실시태양에서, 키트는 바람직하게는 주입에 의해 대상체에게 투여하기 위해, 보다 바람직하게는 자기유래 입양 세포 면역요법의 방법에서 주입에 의해 투여하기 위해 제형화된(예를 들어 적합한 담체, 부형제, 희석제 또는 보조제와의 혼합에 의해) 본 발명의 방법에 의해 수득되는 일정량의 T 세포를 포함하는 용기를 포함할 수 있다. 상기 키트를 소정의 온도에서, 예를 들어 약 4 °C 미만, 약 -2 °C 미만 또는 약 -50 °C 미만에서 유지시킬 수 있다. 상기 키트는 상기 키트의 보관 및/또는 수송 및/또는 상기 T-세포의 투여를 위한 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

\*\*\*

[0257] 본 발명은 상기 기재된 태양 및 바람직한 특징들의 조합을, 상기 조합이 명백히 허용될 수 없거나 명백히 회피되는 경우를 제외하고 포함한다.

[0258] 본 명세서에 사용된 섹션 제목들은 단지 구성을 위한 것이며 기재된 발명의 요지를 제한하는 것으로서 해석해서는 안 된다.

[0259] 이제 본 발명의 태양 및 실시태양들을 첨부된 도면을 참조하여 실시예에 의해 예시할 것이다. 추가의 태양 및 실시태양들은 당해 분야의 숙련가들에게 자명할 것이다. 본문에 언급된 모든 문서들은 본 명세서에 참고로 인용된다.

[0260] 하기 특허청구범위를 포함하여 본 명세서 전체를 통해, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, "포함하다"란 단어 및 "포함하는"과 같은 변형은 서술된 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹을 포함함을 의미하지만 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수들 또는 단계들의 그룹을 배제함을 의미하는 것은 아닌 것으로 이해될 것이다.

[0261] 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형 "하나의" 및 "상기"는 문맥상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함함을 알아야 한다. 범위를 본 명세서에서는 "약" 하나의 특정

값으로부터, 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지로서 나타낼 수 있다. 상기와 같은 범위를 나타내는 경우, 또 다른 실시태양은 상기 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값들을 근사치로서 나타내는 경우, 선행사 "약"의 사용에 의해 상기 특정 값이 또 다른 실시태양을 형성함을 알 것이다.

## [0262] 도면의 간단한 설명

[0263] 이제 본 발명의 원리를 예시하는 실시태양 및 실험들을 첨부된 도면을 참조하여 논의할 것이며, 도면에서:

[0264] 도 1A 및 도 1B. (1A) 공여자 1 및 (1B) 공여자 2 및 3으로부터 수득한 세포로부터 EBV-특이적 T 세포 증식에 대한 적응용 배지의 영향을 도시하는 그래프. 증가하는 백분율의 적응용 배지를 배양 배지에 가한다. LCL과 1주일 공-배양 후, 증식된 T 세포의 수를 시딩된 T 세포의 원래 수와 비교한다.

[0265] 도 2. Grex-100 생물반응기에서, 3명의 공여자로부터 수득한 세포로부터 EBV-특이적 T 세포 증식에 대한 적응용 배지의 영향을 도시하는 그래프. 증가하는 백분율의 적응용 배지를 배양 배지에 가한다. LCL과 1주일 공-배양 후, 증식된 T 세포의 수를 시딩된 T 세포의 원래 수와 비교한다.

[0266] 도 3. EBV-특이적 T 세포에 의한 EBV-형질전환된 LCL 세포의 비사멸을 도시하는 그래프. 0% 및 30% 적응용 배지에서의 배양에 의해 증식된 T 세포를 상이한 효과기/표적 세포비에서 LCL과 공-배양하고, 상기 LCL 세포의 비용해를 4시간 후에 측정한다.

[0267] 도 4. Grex-100 생물반응기 배양 용기에서 배양된, EBV-특이적 CTL의 증식배수에 대한 상이한 백분율의 적응용 배지의 존재의 영향을 도시하는 그래프.

## [0268] 실시예

[0269] 하기의 실시예에서 발명자들은 적응용 배지 존재하에서의 배양을 포함하여 EBV-특이적 T 세포의 증식을 기재한다. 발명자들은 배양물 중에 포함되는 적응용 배지의 최적 백분율을 측정하고, 증식된 CTL의 세포독성을 확인하기 위한 실험들을 기재한다.

### [0270] 실시예 1. 적응용 배지의 최적 백분율

[0271] T 세포 증식을 위한 적응용 배지의 최적 백분율을 측정하기 위해서, 24 웰 플레이트 중에서 수행된 T 세포 증식에서, 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지를 T 세포와 LCL 세포와의 공-배양으로부터 수득한 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 및 60%의 적응용 배지와 혼합한다.

[0272] LCL 세포와 1주일 공-배양 후, T 세포의 수를 카운트하고 시딩된 세포의 수와 비교하여 증식배수를 측정한다.

[0273] 예상되는 증식 결과를 도 1A에 도시한다. T 세포는 적응용 배지 존재하에서의 배양을 포함하는 방법에 의해 더 빠른 속도로 증식한다. 가장 큰 증식배수에 대한 B에 따른 방법 단계에서 적응용 배지의 최적 백분율은 20-30% 적응용 배지인 것으로 예상된다.

[0274] 동일한 실험을 2명 더, 상이한 공여자(공여자 2 및 3)로부터 수득한 세포상에서 수행한다. 상기 결과는 공여자 1의 경우와 유사할 것이며, 이때 최대 T 세포 증식은 20-30% 적응용 배지에서 관찰될 것으로 예상된다(도 1B 참조).

[0275] T 세포의 대규모 증식을 생물반응기, 예를 들어 Grex-100 배양 용기에서 수행할 것이기 때문에, 적응용 배지의 최적화된 백분율을 생물반응기 배양에서 추가로 조사한다.

[0276] 예시를 목적으로: 세포를, 적응용 배지의 백분율이 변하는 200  $\mu\text{l}$ 의 배지에서  $1 \times 10^6$  세포/ $\text{ml}$ 의 세포 밀도로 배양한다:

45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지	적응용 배지	% 적응용 배지
160 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	20%
140 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	30%
120 $\mu\text{l}$	80 $\mu\text{l}$	40%
100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$	50%
80 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	60%

[0277] T 세포 증식에 대해 예상되는 결과를 도 2에 도시한다. 적응용 배지의 최적 백분율은 상이한 공여자들에 걸쳐 일관되게, 20-30%일 것으로 예상된다.

[0279] **실시예 2: EBV-형질전환된 LCL의 생성 및 EBV-특이적 CTL의 증식**

[0280] EBV-양성 NPC 환자로부터 수득한 말초 혈액(40-60 ml)을 사용하여 EBV-형질전환된 림프모구양 B-세포주(LCL) 및 EBV-특이적 T 세포를 모두 생성시킨다.

[0281] **EBV-형질전환된 LCL의 생성**

[0282] 간단히, LCL 생성을 위해서,  $15 \times 10^6$  말초 혈액 단핵세포(PBMC)를  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  사이클로스포린 A(산도즈(Sandoz), 오스트리아 빈 소재)의 존재하에서, B95-8 배양물의 농축된 상등액과 배양하여 LCL을 확립시킨다.

[0283] LCL을 자극에 사용하기 전에(자극일에) 60 Gy로 방사선 조사한다.

[0284] **EBV-특이적 T 세포의 증식**

[0285] 2개의 상이한 방법에 의한 EBV-특이적 T 세포의 증식을 비교한다.

[0286] 2개의 방법 모두에서, 첫 번째 자극을 하기와 같이 수행한다:

[0287] ·  $60 \times 10^6$  PBMC를 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에 재-현탁시키고, 생육성 세포 카운트를 수행한다.

[0288] · PBMC를 24 웨л 플레이트의 웨ل내로  $2 \times 10^6$  세포/웨л로 시팅한다.

[0289] · PBMC를 40:1의 응답자 대 자극인자 비로 조사된, 아사이클로비어(Acyclovir)-처리된 자기유래 LCL로 자극한다.

[0290] · 상기 세포를 5%  $\text{CO}_2$  분위기에서 37 °C에서 9-12일동안 배양한다.

[0291] 상기 두 방법 모두에서, 이어서 두 번째 자극을 하기와 같이 수행한다:

[0292] · 세포를 상기 첫 번째 자극의 끝에서 수집하고, 생육성 세포 카운트를 수행하고, 상기 세포를 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에  $1 \times 10^6$  세포/ml로 재-현탁시킨다.

[0293] · 1 ml의 세포를 24 웨л 플레이트의 웨л에 가하거나, 또는 상기 세포 현탁액을 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에  $15 \times 10^6$  세포/Grex10의 농도로 생물반응기에 가하고, 상기 세포를 4:1의 응답자 대 자극인자 비로 자기유래 조사된 LCL로 재-자극한다.

[0294] · 상기 세포를 3-4일동안 배양하고, 이어서 상기 세포를 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 신선한 세포 배양 배지에 재현탁시킨다. 재조합 인간 IL-2(rhIL-2, 프로류킨(Proleukin); 미국 캘리포니아주 치론 애머리빌 소재)를 상기 세포 배양물에 40-100 IU/ml의 최종 농도로 가한다.

[0295] **후속적인 자극**

[0296] 두 번째 자극에 이어서, 세포를 수집하고, 생육성 세포 카운트를 수행한다. 배양 배지(즉 적응용 배지)는 하기 방법 B에 사용하기 위해 유지된다. 이어서 상기 세포를 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에  $1 \times 10^6$  세포/ml(24 웨л 플레이트 중) 또는  $0.5 \times 10^6$  세포/ml(Grex10 중)로 재-현탁시키고 4:1의 응답자 대 자극인자 비로 자기유래 조사된 LCL로 재-자극한다.

[0297] 일단  $200 \times 10^6$  세포가 성취되면, 이어서 세포를 방법 단계 A 또는 방법 단계 B에 따라 자극한다:

방법 단계 A	방법 단계 B
<p><math>100 \times 10^6</math> 세포를 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 200 <math>\mu\text{l}</math> 세포 배양 배지에 재-현탁시키고, GRex 100으로 옮기고, 재-자극시키고, 상기 세포를 40-100 IU/<math>\text{ml}</math>의 최종 농도로 rhIL-2를 가하면서, 4:1의 응답자 대 자극인자비로 자기유래 조사된 LCL로 재-자극한다.</p> <p>상기 세포를 3-4일동안 5% CO<sub>2</sub> 분위기하에 37 °C에서 배양한다.</p>	<p><math>100 \times 10^6</math> 세포를</p> <p>(1) 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 180 <math>\mu\text{l}</math> 세포 배양 배지, 및</p> <p>(2) 두 번째 자극의 끝에서 배양물로부터 수득한 20 <math>\mu\text{l}</math> 적응용 배지(즉 10% 적응용 배지)에 재-현탁시키고, GRex 100으로 옮기고, 재-자극시키고, 상기 세포를 40-100 IU/<math>\text{ml}</math>의 최종 농도로 rhIL-2를 가하면서, 4:1의 응답자 대 자극인자비로 자기유래 조사된 LCL로 재-자극한다.</p> <p>상기 세포를 3-4일동안 5% CO<sub>2</sub> 분위기하에 37 °C에서 배양한다.</p>

[0298]

[0299] 방법 단계 A 또는 방법 단계 B에 따른 자극의 끝에서, 세포를 수집하고 동일한 방법 단계 A 또는 B에 따라 재-자극한다.

[0300] 방법 단계 B에 따른 재-자극을 위해서, 사용되는 적응용 배지는 B에 따른 선행 자극으로부터의 것이다.

### 실시예 3: 효능의 시험

[0302] 적응용 배지 존재하에서의 배양을 포함하는 방법에 의해 증식된 CTL의 세포독성 활성을 적응용 배지 존재하에서의 배양 없이 증식된 CTL의 세포독성 활성을 비교한다.

[0303] 0% 및 30% 적응용 배지로부터 증식된 T 세포를 LCL 세포에 상이한 효과기/표적 세포비(E/T 비)로 가하고, 4시간 후에, 상기 LCL 세포의 비용해를 측정한다. 0% 및 30% 적응용 배지에서의 배양에 의해 증식된 세포들에 대한 비용해간의 차이는 매우 적거나 없을 것으로 예상된다(도 3).

[0304] 증가된 속도로 증식된 CTL은 EBV-형질전환된 LCL 세포를 특이적으로 사멸시키는 능력을 유지하는 것으로 예상된다.

### 실시예 4: 적응용 배지를 사용하는 엘스타인-바 바이러스-특이적 T 세포(EB-VST) 성장의 최적화

[0306] 하기의 실시예는 최대 CTL 증식을 위해 재자극에 포함되는 적응용 배지의 최적 백분율의 조사를 기재한다.

[0307] 1주:

[0308] · 립프모구양 세포주(LCL) 샘플을 해동시키고 1주일동안 배양하였다

[0309] · 실험을 개시하기 위해서 최소한  $10 \times 10^6$  LCL이 요구된다

[0310] 2주:

[0311] · 상이한 환자들로부터의 동결된 EB-VST03 세포를 해동시키고, 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에 재-현탁시키고, 생육성 세포 카운트를 수행하였다

[0312] ○ EB-VST03 세포를 실시예 2에 따른 PBMC의 배양에 의해 수득하였으며, 여기에서 상기 PBMC는 첫 번째 및 두 번째 자극, 및 이어서 방법 단계 A에 따른 세 번째 자극(즉 적응용 배지의 부재하에서)을 겪었고, 상기 시점 후에 세포를 수확하고 동결시켰다

[0313] · EB-VST03 세포를 24-웰 플레이트의 웰당  $1 \times 10^6$  세포로 시딩하였다

[0314] · 세포 현탁액을 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에서 생물반응기에 가하고( $15 \times 10^6$  세포/G-Rex 10), 4:1의 응답자:자극인자 비로 자기유래 조사된 LCL로 재-자극하였다.

[0315] · 상기 세포를 3-4일 동안 배양하고, 이어서 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지에 재현탁시켰다.

[0316] · 이어서 IL-2를 40-100 IU/ $\text{ml}$ 의 최종 농도로 상기 세포 배양물에 가하였다.

[0317] 3주 이후:

[0318] · 세포를  $120 \times 10^6$  세포가 존재할 때까지 상기 2주기에 기재된 바와 같이 수확하고, 모으고, 카운트하고, 자극하였다.

[0319] · 이어서  $100 \times 10^6$  세포를 하기와 같이, 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민, 및 상이한 백분율의 적응용 배지(선행 자극 배양의 끝에서 배양물로부터 수득됨)를 포함하는 세포 배양 배지에서 G-Rex 100 플라스크에 시딩하였다:

45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지	적응용 배지	% 적응용 배지
200 mL	0 mL	0%
170 mL	30 mL	15%
140 mL	60 mL	30%
110 mL	90 mL	45%

[0320]

[0321] · 이어서 상기 세포를 3-4일 동안 5% CO<sub>2</sub> 분위기하에 37 °C에서 배양하였다.

[0322] · 이어서 IL-2를 40-100 IU/mL의 최종 농도로 상기 세포 배양물에 가하였다.

[0323] · 1주일 후에, 상기 세포를 수확하고 생육성 세포 카운트를 수행하였다.

[0324] 모든 생육성은 70%를 초과하는 것으로 관찰되었다. 결과를 도 4에 도시한다.

[0325] 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민 및 15% 이하의 적응용 배지를 포함하는 세포 배양 배지에서의 배양은 최고 수율의 EB-VST를 제공하며, 이는 45% RPMI 1640, 45% 클릭 배지, 10% FBS, 2 mM L-글루타민을 포함하는 세포 배양 배지를 100% 사용한 경우에 비해 EB-VST의 비율보다 ~20% 더 높은 것으로 밝혀졌다.

[0326] EB-VST의 증식배수는 보다 높은 백분율(즉 30%, 45%)의 적응용 배지를 사용한 경우 감소하였다.

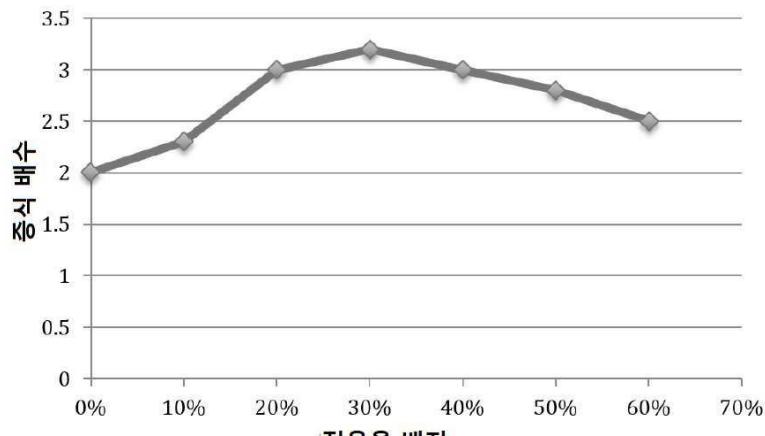
[0327] 샘플 3-EB-VST에 대해 관찰된 증식배수는 샘플 1 & 샘플 2에 대해 관찰된 만큼 현저하지 않았다. 이는 샘플 3 EB-VST가 추가적인 주기의 자극을 겪었고, 그 결과 세포 성장이 과부화되었기 때문일 수 있다.

[0328] 85%의 신선한 배양 배지(완전한 클릭 배지)와 15% 적응용 배지와의 조합은 최고의 EB-VST 수율, 즉 100% 신선한 배양 배지를 사용하는 경우에 비해 더 높은 EB-VST 증식 속도를 생성시켰다는 결론이 내려진다.

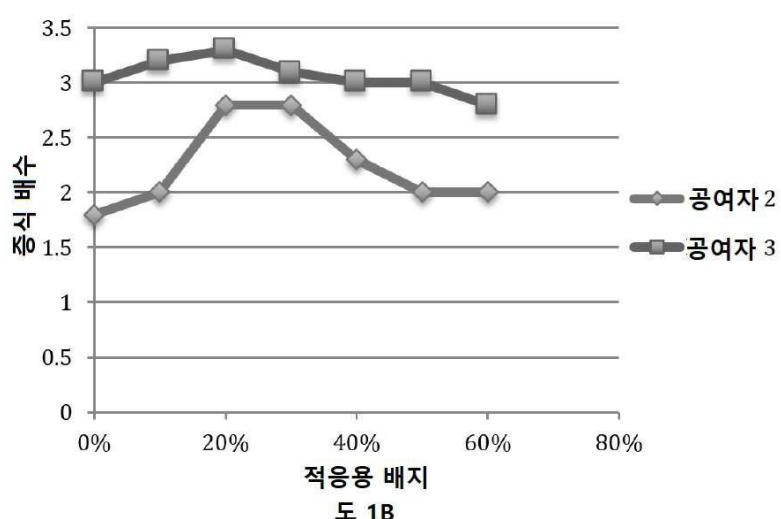
[0329] EB-VST 성장에 대한 적응용 배지의 영향은 상이한 개인간에 변하지만, 모든 경우에 15% 적응용 배지를 사용하는 것은 최상의 증식 속도를 제공하는 것으로 관찰되었다.

## 도면

### 도면1

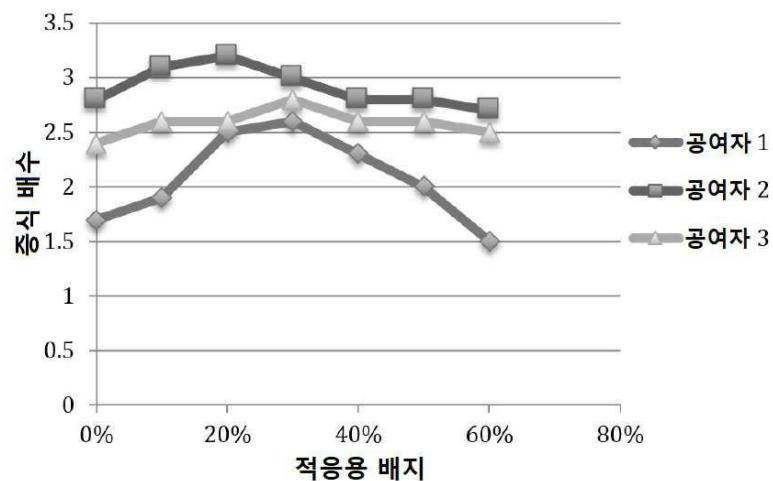


도 1A

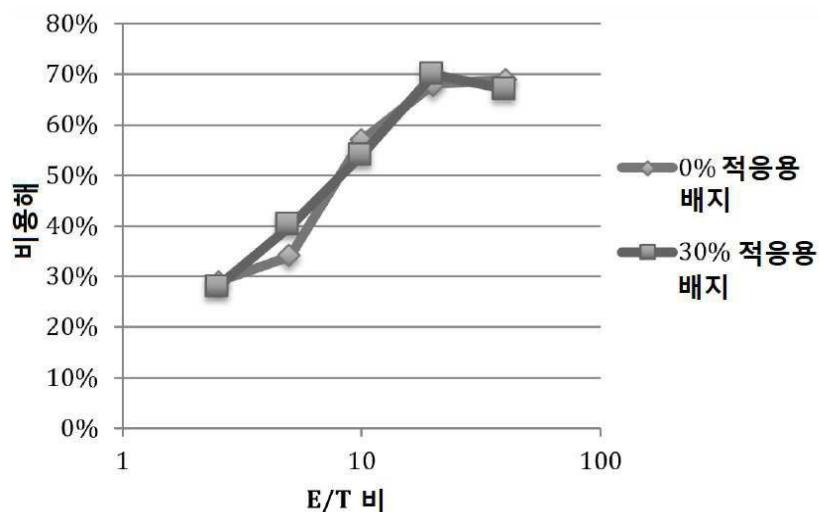


도 1B

### 도면2



도면3



도면4

