



등록특허 10-2812405



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년05월23일
(11) 등록번호 10-2812405
(24) 등록일자 2025년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2025.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0638 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2019-7035686
(22) 출원일자(국제) 2018년05월03일
심사청구일자 2021년04월28일
(85) 번역문제출일자 2019년12월02일
(65) 공개번호 10-2020-0024770
(43) 공개일자 2020년03월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/061413
(87) 국제공개번호 WO 2018/202808
국제공개일자 2018년11월08일
(30) 우선권주장
1707048.3 2017년05월03일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
W02015189356 A1
W02016198480 A1
Woolf Richard et al., The LANCET (2016)
387:108
Ching-Liang Chu et al., The Journal of
Immunology (1999) 1896-1903

(73) 특허권자
킹즈 컬리지 런던
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드
감마델타 테라퓨틱스 엘티디
영국 런던 킹덤 스트리트 1 (우: 더블유2 6비디)
(72) 발명자
빗슨, 리차드
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈
컬리지 런던 내
헤이데이, 아드리안
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈
컬리지 런던 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 17 항

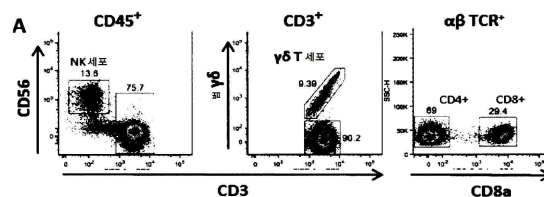
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 $\gamma\delta$ T 세포의 증식, 조성물 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 비-조혈 조직 공급원으로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 제공한다. 추가로 제공된 것은 증식된 $\gamma\delta$ T 세포의 조성물 및 증식된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 입양 T 세포 치료요법의 일부)를 사용하는 방법이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 2500/99 (2013.01)
C12N 2501/2301 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2304 (2013.01)
C12N 2501/2309 (2013.01)
C12N 2501/2312 (2013.01)
C12N 2501/2312 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/2318 (2013.01)

(72) 발명자

누스바우머, 올리버

영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈
컬리지 런던 내

울프, 리차드

영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈
컬리지 런던 내

이아니토, 마리아 루이자

영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드, 킹즈
컬리지 런던 내

마운트, 나탈리에

영국, 런던 더블유12 7에프큐, 화이트 시티 플레이
스, 우드 레인 195, 웨스트웍스, 감마텔다 테라퓨
틱스 리미티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

$\gamma\delta$ T 세포를 증식(expanding)시키는 방법으로서, 상기 방법은

- (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단을 제공하는 단계;
- (ii) 상기 $\gamma\delta$ T 세포를, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 유효량으로 적어도 5일 동안
 - (a) IL-2 또는 IL-9;
 - (b) IL-15; 및
 - (c) IL-21의 존재하에 배양하는 단계

를 포함하고,

상기 방법은 단계(i) 후, 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하고;

단계(ii)는 기질 세포 접촉의 부재 하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함하며; 그리고

단계(ii)는 외인성 TCR 경로 효능제의 부재 하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계(ii)는 IL-4의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계(ii)는

$\gamma\delta$ T 세포를

- (a) IL-2,
- (b) IL-15, 및
- (c) IL-21, 기질 세포-유래된 인자(SDF), IL-1 β , IL-12, IL-18, 및 IL-33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자

의 존재하에 배양하는 단계를 추가로 포함하며; 그리고

상기 세포는 적어도 5일 동안 배양되어 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계(ii)는 무혈청 배지에서 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 방법은 단계(i) 후, 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 그리고 단계(ii)는

- (a) 실질적인 종양 세포 접촉의 부재 하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계; 및/또는
- (b) 실질적인 피더 세포 접촉의 부재 하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 단계(ii)는 무혈청 배지에서 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하는 단계는 비-조혈 조직으로부터 세포 이탈을 촉진시키도록 구성된 합성 스캐폴드 상에서 $\gamma \delta$ T 세포 및 비-조혈 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하는 단계는 IL-2 및/또는 IL-15의 존재하에 $\gamma \delta$ T 세포 및 비-조혈 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 림프구의 분리된 집단은 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 포함하고, 그리고 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단이 V δ 1 T 세포의 분리된 집단을 포함하는, 방법.

청구항 10

제5항에 있어서, (a) $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 적어도 80%는 증식 전 V δ 1 T 세포이고/이거나, (b) $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 10% 미만은 증식 전 V δ 2 T 세포인, 방법.

청구항 11

제5항에 있어서, $\alpha \beta$ T 세포 및/또는 NK 세포는 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단으로부터 제거되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 배양 14일 이내에, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배 수의 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 배양 21일 이내에, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 50배 수의 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 증식된 집단을 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 배양 14일 이내에, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 증식 전 V δ 1 T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배 수의 V δ 1 T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 배양 21일 이내에, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 증식 전 V δ 1 T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 50배 수의 V δ 1 T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 비-조혈 조직이 피부인, 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

발명의 설명

배경 기술

[0001] 암에 대한 T 세포 면역치료요법에 대한 증가하는 관심은, 특히 PD-1, CTLA-4 및 기타 수용체에 의해 발휘되는 억제 경로의 임상적으로 매개된 길항작용에 의해 탈억제되는 경우, 암 세포를 인지하고 숙주-보호 기능적 잠재력을 매개하는 $CD8^+$ 및 $CD4^+ \alpha \beta$ T 세포의 서브세트의 명백한 용량에 초점을 맞추고 있다. 그럼에도 불구하고, 많은 의문이 남아 있다. 예를 들어, 그러한 치료의 효능이 불량한 것으로 보이는 많은 주요 임상 시나리오가 있는 것으로 보인다. 종종 극심한 부작용이 있으며, 효능 또는 부작용을 예측하는 능력은 매우 제한적이며, 숙주가 통상적인 항원-특이적 $CD8^+$ 및 $CD4^+ \alpha \beta$ T 세포 반응의 활성화에 앞서 종양 세포("면역원성")를 감지할 수 있도록 하는 상호작용에 대한 설명은 거의 없다.

[0002] 감마 델타 T 세포($\gamma \delta$ T 세포)는 이들의 표면 상에 특유의 한정된 $\gamma \delta$ T-세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포 서브세트를 나타낸다. 이 TCR은 하나의 감마(γ) 및 하나의 델타(δ) 쇄로 구성된다. 인간 $\gamma \delta$ T 세포는 말초 혈액-거주 $\gamma \delta$ T 세포 및 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 하나 또는 두 가지 유형으로 광범위하게 분류될 수 있다. 대부분의 혈액-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 V δ 2 TCR을 발현하는 반면, 이는 V δ 1 및/또는 다른 V δ 쇄를 더 자주 사용하는 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포 중에서 덜 통상적이다. 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 많은 수로 용이하게 수득될 수 없고 어떠한 통상적인 단리 또는 증식(expansion) 프로토콜도 존재하지 않기 때문에, 이들은 치료학적 적용을 위해 잘 특징 분석되지 않거나 연구되지 않았다. 따라서, 치료요법으로서, 예를 들어, 임상 T 세포 치료요법으로서 연구하고 잠재적으로 적응시키기 위해 충분한 양으로 비-조혈 조직 거주 $\gamma \delta$ T 세포를 단리하고 증식시키기 위한 방법에 대한 필요가 당해 분야에서는 충족되지 않고 있다.

발명의 내용

- [0003] 본 발명은 비-조혈 조직 공급원(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 V δ 1 T 세포)으로부터 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 증식시키는 방법을 제공한다. 증식 방법은 상당한 TCR 자극의 부재하에 및/또는 IL-4, IL-15, IL-21, 및/또는 IL-2의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 비-조혈 조직의 기질 세포로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포)를 배양하는 것을 포함한다. 증식된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 V δ 1 T 세포)의 조성물 및 증식된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 암 치료를 위한 입양 T 세포 치료요법의 일부)를 사용하는 방법이 추가로 제공된다.
- [0004] 하나의 양상에서, 본 발명은 (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2, IL-15, 및 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , 인간 혈소판 용해물(HPL), 및 기질 세포-유래된 인자-1(SDF-1)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 인자의 존재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계에 의해 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 한다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포는 IL-2, IL-15, 및 IL-4; IL-2, IL-15, 및 IL-21; 또는 IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21의 존재하에 배양될 수 있다.
- [0005] 또 다른 양상에서, 본 발명은 (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma\delta$ T 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21의 존재하에 유효량으로 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계에 의해 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 제공한다.
- [0006] 이전의 양상 중 어느 하나의 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포는 적어도 5일 동안 동시에 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21에 노출된다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 추가로 단계(i) 후, 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 생성하는 단계를 포함하며, 단계(ii)는: (a) 실질적인(substantial) 기질 세포 접촉의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계; (b) 실질적인 종양 세포 접촉의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계 및/또는; (c) 실질적인 피더(feeder) 세포 접촉의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0007] 또 다른 양상에서, $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법은 하기의 단계를 포함한다: (i) 비-조혈 조직은 제공하는 단계로서, 조직이 비-조혈 세포 및 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는 것인 단계; (ii) 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 수득하는 단계; 및 (iii) $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2, IL-15, 및 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL, 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자의 존재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 IL-2, IL-15, IL-4, 및/또는 IL-21(예를 들어, IL-2, IL-15, 및 IL-4; IL-2, IL-15, 및 IL-21; 또는 IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21)의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포는 IL-2, IL-15, IL-4, 및/또는 IL-21에 동시에 노출된다. 일부 구현예에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포와의 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)은 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0008] 또 다른 양상에서, 본 발명은 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 하고, 방법은 하기의 단계를 포함한다: (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma\delta$ T 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21의 존재하에 유효량으로 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. $\gamma\delta$ T 세포를 예를 들어, 적어도 5일 동안 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21에 동시에 노출시킬 수 있거나, 다른 것들에 노출 전에 하나 이상의 인자들에 노출시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma\delta$ T 세포를 인간 재조합 IL-2, 인간 재조합 IL-4, 인간 재조합 IL-15, 및 인간 재조합 IL-21의 존재하에 유효량으로 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma\delta$ T 세포를 외인성 TCR 경로 효능제(예를 들어, 항-CD3)의 부재하에, 예를 들어, 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma\delta$ T 세포를 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 약 10 ng/mL 또는 약 100 ng/mL)의 농도에서 IL-21의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 단계(ii)는 또한 $\gamma\delta$ T 세포를 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , 인간 혈소판 용해물(HPL), 및 기질 세포-유래된 인자-1(SDF-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0009] 또 다른 양상에서, 하기의 단계에 의해 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법이 본원에 제공된다: (i) 비-조혈 조직으

로부터 수득된 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 유효량으로 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 이 양상의 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 동시에 IL-2 및 IL-15에 노출된다. 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 또는 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-4, 및/또는 IL-21의 존재하에 배양한다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. IL-21은 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)의 농도일 수 있다.

[0010] 여전히 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기의 단계에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 한다: (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma \delta$ T 세포를 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 경우에, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-4 및 IL-15에 동시에 노출된다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-4, IL-21 또는 둘 다의 존재하에 배양할 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양한다. IL-21은 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)의 농도일 수 있다.

[0011] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, 방법은 추가로 단계(i) 후, 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 생성하는 단계; 및 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에, 실질적인 종양 세포 접촉의 부재하에 및/또는 실질적인 피더 세포 접촉(예를 들어, 조사된 피더 세포, B 세포, 또는 항원-제시 세포)의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다.

[0012] 또 다른 양상에서, 하기의 단계에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법이 본원에 특징화 된다: (i) 비-조혈 세포 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 비-조혈 조직을 제공하는 단계; (ii) 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 수득하는 단계; 및 (iii) $\gamma \delta$ T 세포를 $\gamma \delta$ T 세포와 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 및/또는 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2 및 IL-15에 동시에 노출될 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-4, IL-21 또는 둘 다의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. IL-21은 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)의 농도일 수 있다.

[0013] 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기의 단계에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 제공한다: (i) 비-조혈 세포 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 비-조혈 조직을 제공하는 단계; (ii) 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 수득하는 단계; 및 (iii) $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포와의 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 또는 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2 및 IL-15에 동시에 노출될 수 있다. 일부 경우에, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 IL-4 및/또는 IL-21의 존재하에 배양할 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(iii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. IL-21은 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)의 농도일 수 있다.

[0014] 또 다른 양상에서, 하기의 단계에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법이 본원에 특징화 된다: (i) 비-조혈 조직을 제공하는 단계로서, 조직이 비-조혈 세포 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 것인 단계; (ii) 비-조혈 세포로부터

$\gamma\delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 수득하는 단계; 및 (iii) $\gamma\delta$ T 세포를 실질적인 TCR 경로 활성화의 부재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. 일부 경우에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포를 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 및/또는 $\gamma\delta$ T 세포와의 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2 및 IL-15의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포는 IL-2 및 IL-15에 동시에 노출될 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포를 IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포는 IL-2 및/또는 IL-21의 존재하에 배양할 수 있다. 일부 구현예에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포를 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양하는 단계를 포함한다. IL-21은 1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL(예를 들어, 10 ng/mL 또는 100 ng/mL)의 농도일 수 있다.

[0015] 임의의 이전 방법의 일부 구현예에서, 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하는 단계는 비-조혈 조직으로부터 세포 이탈(egress)을 촉진하도록 구성된 스캐폴드 상에서 $\gamma\delta$ T 세포 및 비-조혈 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-조혈 세포로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 분리하는 단계는 IL-2, IL-15 또는 둘 다의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포 및 비-조혈 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구의 분리된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단을 포함하고, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단은 V δ 1 T 세포 및/또는 이중 음성(DN 세포)의 분리된 집단을 포함한다. 일부 경우에, 증식 단계 전에, 림프구의 분리된 집단의 1 내지 10%는 $\gamma\delta$ T 세포이다. 일부 구현예에서, 증식 단계 전에, 림프구의 분리된 집단의 1 내지 10%는 V δ 1 T 세포이다. 증식 단계 전에, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단의 적어도 80%는 V δ 1 T 세포 및/또는 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단의 10% 미만은 V δ 2 T 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, $\alpha\beta$ T 세포 및/또는 NK 세포는 (예를 들어, 증식 단계 전에) $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단으로부터 제거된다.

[0016] 일부 구현예에서, 증식 단계 전에, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단은 적어도 10%의 CCR3⁺ 세포, 적어도 10%의 CCR4⁺ 세포, 적어도 10%의 CCR7⁺ 세포, 적어도 10%의 CCR8⁺ 세포 또는 적어도 10%의 CD103⁺ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 증식 단계 전에, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단은 참조 집단(예를 들어, 혈액-거주 V δ 2 T 세포의 참조 집단)에 비해 보다 높은 빈도의 CCR3⁺ 세포, CCR4⁺ 세포, CCR7⁺ 세포 및/또는 CCR8⁺ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 증식 단계 전에, V δ 1 T 세포의 분리된 집단은 참조 집단(예를 들어, 혈액-거주 V δ 2 T 세포의 참조 집단)에 비해 보다 높은 빈도의 NKG2D⁺ 세포, CD56⁺ 세포, CD69⁺ 세포 및/또는 TIM3⁺ 세포를 포함한다.

[0017] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, 증식 단계 동안에 배양 14일 이내에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 단계 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배 수의 $\gamma\delta$ T 세포를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 증식 단계 동안에 배양 21일 이내에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 50배 수의 $\gamma\delta$ T 세포를 포함할 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 증식된 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식 단계 동안에 배양 14일 이내에, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 증식 전 V δ 1 T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배 수의 V δ 1 T 세포를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 증식 단계 동안에 배양 21일 이내에, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 증식 전 V δ 1 T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 50배 수의 V δ 1 T 세포를 포함한다.

[0018] 임의의 이전 양상의 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 CD27을 발현한다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단 보다, CD27의 메디안 표면 발현이 보다 큰 것일 수 있다. 일부 경우에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 CD27의 메디안 표면 발현이 적어도 2배로 나타난다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 CD27⁺ 세포의 빈도가 보다 높게 나타날 수 있다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ 세포의 빈도가 적어도 5% 높은 것일 수 있다. 일부 구현예에서, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 CD27을 발현한다. 일부 구현예에서, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단보다, 보다 큰 메디안 표면 발현을 나타낸다. 예를 들어, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27의 메디안 표면 발현이 적어도 2배인 것일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단에 비해 보다 CD27⁺ 세포의 빈도가 높게 나타날 수 있다. 예를 들어, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ 세포의 빈도가 적어도 5% 높은 것일 수 있다.

- [0019] 임의의 이전 양상의 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단보다, TIGIT의 메디안 표면 발현이 보다 낮게 나타난다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단보다, TIGIT의 메디안 표면 발현이 적어도 50% 적은 것일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단보다 TIGIT⁺ 세포의 빈도가 낮은 것일 수 있다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단보다 TIGIT⁺ 세포의 빈도가 적어도 20% 낮은 것일 수 있다. 일부 구현예에서, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단보다 TIGIT의 메디안 표면 발현이 낮게 나타난다. 예를 들어, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단의 것 보다, TIGIT의 메디안 표면 발현이 적어도 50% 낮은 것일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단보다 TIGIT⁺ 세포의 빈도가 낮은 것일 수 있다. 예를 들어, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 V δ 1 T 세포의 분리된 집단보다 TIGIT⁺ 세포의 빈도가 적어도 20% 낮은 것일 수 있다.
- [0020] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 표면 발현이 보다 크게 나타난다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 빈도가 보다 큰 것일 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 표면 발현이 보다 낮게 나타난다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 빈도가 보다 낮은 것일 수 있다.
- [0021] 일부 구현예에서, V δ 1 T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 표면 발현이 보다 크게 나타난다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 빈도가 보다 높게 나타난다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 표면 발현이 보다 낮게 나타난다. 다른 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해, 예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해) NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 빈도가 보다 낮게 나타난다.
- [0022] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, 단계(iii)은 $\gamma\delta$ T 세포를 실질적인 기질 세포 접촉의 부재하에, 실질적인 피더 세포 접촉의 부재하에 및/또는 실질적인 종양 세포 접촉의 부재하에 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-조혈 조직은 종양 조직이 아니다.
- [0023] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, 비-조혈 조직은 피부(예를 들어, 인간 피부, 예를 들어, 펀치 생검에 의해 수득된 피부)이다. 다른 구현예에서, 비-조혈 조직은 소화관(gut) 조직이다.
- [0024] 임의의 이전의 양상 및 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법은 시험관내(in vitro) 수행될 수 있다.
- [0025] 임의의 이전의 양상 및 구현예에서, 비-조혈 조직을 제공하는 단계는 대상체, 예를 들어, 인간 또는 비-인간 동물 대상체로부터 수득된 비-조혈 조직을 제공하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0026] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임의의 이전의 양상들 중 하나의 방법에 의해 수득된 증식된 $\gamma \delta$ T 세포를 특징으로 한다.
- [0027] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이전 양상의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다: 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 면역치료학적 제제, 세포독성 제제, 성장 억제제, 방사선 치료제, 항-혈관형성 제제, 또는 이들의 2개 이상의 제제의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 추가의 치료학적 제제를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 추가의 치료학적 제제는 면역치료학적 제제(예를 들어, IL-2, 예를 들어, 저용량의 IL-2, 예를 들어, 하루당 0.3×10^6 내지 3.0×10^6 IU IL-2, 예를 들어, 하루당 1.0×10^6 IU IL-2)이다.
- [0028] 또 다른 양상에서, 본 발명은 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 이전의 양상의 약제학적 조성물을 특징으로 한다.
- [0029] 또 다른 양상에서, 본 발명은 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 임의의 이전의 양상의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포를 특징으로 한다.
- [0030] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 암(예를 들어, 고형 종양), 감염(예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV) 감염), 또는 면역치료요법의 치료를 위한 약물의 제조에서 임의의 이전의 양상의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 또는 이의 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0031] 또 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 암(예를 들어, 고형 종양), 감염(예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV) 감염), 또는 면역치료요법의 치료를 위한 방법에 사용하기 위한 임의의 이전의 양상의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 또는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임의의 이전의 구현예의 방법에 의해 수득되는 장된 $\gamma \delta$ T 세포의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 치료학적 유효량은 치료 과정 동안에 용량당 10×10^{12} 세포 미만, 또는 10×10^{12} 세포 미만이다. 일부 구현예에서, 방법은 하나 이상의 추가의 치료학적 제제를 이를 필요로 하는 대상체에게 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 치료학적 제제는 면역치료학적 제제, 세포독성 제제, 성장 억제제, 방사선 치료제, 항-혈관형성 제제, 또는 이들의 2개 이상의 제제의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추가의 치료학적 제제는 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 투여와 동시에, 투여 이전에 또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 추가의 치료학적 제제는 면역치료학적 제제이다. 하나의 구현예에서, 면역치료학적 제제는 IL-2(예를 들어, 저용량 IL-2, 예를 들어, 하루당 0.3×10^6 내지 3.0×10^6 IU IL-2, 예를 들어, 하루당 1.0×10^6 IU IL-2)이다. 이들 구현예는 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법에서 본원에 개시된 방법에 의해 수득된 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 (또는 이들 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 약제학적 조성물)의 용도에 관한 임의의 이전 또는 하기 양상에 적용된다.
- [0033] 또 다른 양상에서, 본 발명은 임의의 이전의 양상의 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법을 특징으로 한다.
- [0034] 임의의 이전의 양상의 일부 구현예에서, 대상체는 인간(예를 들어, 인간 암 환자(예를 들어, 고형 종양에 대해 치료받은 인간 암 환자), 또는 감염(예를 들어, 바이러스, 예를 들어, CMV의 감염)에 대해 치료받은 인간 암 환자이다.
- [0035] 또 다른 양상에서, 본 발명은 (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma \delta$ T 세포를 (a) IL-2 또는 IL-9; (b) IL-15; 및 (c) IL-21의 존재하에 유효량으로 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계를 포함하는 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 또한 단계(ii)에서 IL-4의 존재하에 배양한다.
- [0036] 또 다른 양상에서, 본 발명은 (i) 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma \delta$ T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2, IL-15 및 IL-21, 기질 세포-유래된 인자(SDF, 예를 들어, SDF-1), IL-1 β , IL-12, IL-18, 및 IL-33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자의 존재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 외인성 TCR 경로 효능제의 부재하에 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(ii)는 $\gamma \delta$ T 세포를 무혈형 배지에서 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계(i) 후, $\gamma \delta$ T 세포를 비-조혈 세포로부터 분리하여 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 생성한다. 추가로, 단계(ii)는 실질적인 기질 세포 접촉의

부재하에 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하는 단계; 실질적인 종양 세포 접촉의 부재하에 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하는 단계; 및 /또는 실질적인 피더 세포 접촉의 부재하에 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0037] 또 다른 양상에서, 본 발명은 하기의 단계를 통해 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 특징으로 한다: (i) 비-조혈 조직을 제공하는 단계로서, 조직은 비-조혈 세포 및 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 것인 단계; (ii) 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 분리하여 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단을 수득하는 단계; 및 (iii) $\gamma \delta$ T 세포를 IL-2, IL-15, 및 IL-21, SDF, IL-1 β , IL-12, IL-18, 및 IL-33으로 이루어진 군으로부터 선택되는 인자의 존재하에 적어도 5일 동안 배양하여 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계. $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2, IL-15 및 IL-21의 존재하에 배양할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma \delta$ T 세포는 무혈청 배지에서 배양할 수 있다.

[0038] 또 다른 양상에서, 본 발명은 $\gamma \delta$ T 세포의 임의의 상기 언급된 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 표현형을 나타내는 단리된 집단을 특징으로 한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 단리된 집단의 $\gamma \delta$ T 세포의 적어도 50%는 CD27을 발현하고 실질적으로 TIGIT를 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 단리된 집단의 $\gamma \delta$ T 세포의 적어도 50%는 V δ 1을 발현한다.

[0039] 또 다른 양상에서, 본 발명은 이전 양상의 단리된 $\gamma \delta$ T 세포의 약제학적 조성물을 포함한다.

[0040] 또 다른 양상에서, 본원에서는 본원에 기재된 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

[0041] 또 다른 양상에서, 본 발명은 상기 기술된 증식된 $\gamma \delta$ T 세포, 상기 기술된 단리된 집단 또는 상기 기술된 약제학적 조성물의 치료학적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 입양 T 세포 치료요법에 의해 대상체를 치료하는 방법을 특징으로 한다.

[0042] 본원에 개시된 임의의 구현예는 본 발명의 각각의 양상 내에서 임의의 다른 개시된 구현예와 조합될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a 내지 1d는 인간 피부가 거주 $\gamma \delta$ T 세포의 주지할 만한 집단을 포함한다는 것을 보여준다. 도 1a: 피부 거주 림프구를 문헌(참조: Clark, et al (Clark, et al., *Journal of Investigational Dermatology*. 2006.126(5):1059-70; "the Clark protocol"))에 공개된 기관형(organotypic) 세포 배양물을 사용하여 단리하였다. CD45⁺ 세포 내에서, 항-CD3을 사용하여 T 세포를 염색시키고 항-CD56 항체를 사용하여 NK 세포, CD3⁻CD56⁺을 각각 동정하였다. CD3⁺ 세포 내에서, 범 $\gamma \delta$ T 세포 수용체에 대한 항체를 사용하여 피부-거주 $\gamma \delta$ T 세포를 동정하고, 항-CD8 α 를 사용하여 CD3⁺, 범 $\gamma \delta$ TCR 게이트 내 통상적인 CD4 및 CD8 양성 $\alpha \beta$ T 세포의 비율을 동정하였다. 도 1b는 클락(Clark) 프로토콜을 사용하여 7 내지 10명의 공여자에 대한 이들 실험의 개요를 보여준다. 이 프로토콜을 사용하여, 인간 피부 내 림프구는 여전히 피부 섬유아세포와 접촉해 있고, 사이토킨이 보충되지 않거나 인터류킨-2(IL-2), 인터류킨-15(IL-15), 또는 IL-2 및 IL-15가 보충되었으며, 이는 사이토킨의 사용이 피부-거주 림프구 조성물을 변화시키지 않음을 나타내는데, 단, IL-15 또는 IL-2 및 IL-15가 배양물에 보충되는 경우 약간 더 큰 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 제외하고는 클락 프로토콜을 입증한다. 3주 기관형 피부 배양 후 림프구 조성물은 4명의 공여자에 대한 개요로서 나타난 사이토킨을 사용하여 나타난다. 도 1c: 피부-거주 $\gamma \delta$ 세포는 대부분 V δ 1-발현 $\gamma \delta$ T 세포(76.24% $\pm$ 17.3), V δ 2 T 세포의 소집단(3.06% $\pm$ 6.1) 및 본원에서 이중 음성(DN) $\gamma \delta$ T 세포(20.7% $\pm$ 13.97)로도 지칭되는 V δ 1 또는 V δ 2에 대해 음성으로 염색된 범- $\gamma \delta$ TCR 양성 세포의 집단을 포함한다. 건강한 지원자의 혈액의 대조군 염색은 혈액 내에서 $\gamma \delta$ T 세포의 우성 집단이 V δ 2 TCR 쇄를 발현함에 따라 인간 $\gamma \delta$ T 세포의 강한 구획화를 보여준다. 도 1d: 피부-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 만성적으로 활성화된 T 세포와 이전에 연관된 마커를 보여주지만 이들 마커는 필수적으로 만성 활성화를 반영하기 보다는 조직 거주 시그니처 지표이다. 히스토그램은 $\gamma \delta$ T 세포(채워진 히스토그램) 상에 나타난 마커 대 각각의 항체에 대해 적절한 이소형 대조군(속빈 히스토그램)의 염색을 보여준다.

도 2a 내지 2d는 클락 프로토콜을 통해 인간 피부로부터 직접 유래된 피부-거주 $\gamma \delta$ T 세포가 T 세포를 활성화시키기 위한 통상적인 수단에 의한 활성화시 Th1-기반 반응을 나타내고 마찬가지로 NKG2D 리간드 단독에 의한 활성화시 Th1-기반 반응을 나타냄을 보여준다. 도 2a: 피부-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 활성화제 및 NK 세포-연관된 수용체 NKG2D(속빈 히스토그램으로 나타난 이소형에 대한 채워진 히스토그램)의 강한 발현을 보여준다. NKG2D 수용체에 대해 공지된 리간드 중 하나인 플레이트-결합된 재조합 MICA를 사용한 활성화시, 피부 $\gamma \delta$ T 세포는 반응이 차단 NKG2D 항체의 존재하에 소멸되기 때문에 임의의 다른 자극 없이 그리고 TCR 연결과는 무관하게 반응한다. 세포를 브레펠린 A 및 100 유닛의 IL-2/mL의 존재하에 6시간 동안 자극하였고 후속적으로 CD107a에 대한 염색에 의해 탈과립화에 대해 분석하였다. TNF α 및 INF- γ 의 생성을 표면 염색 및 세포내 사이토킨에 대한 후

속적 염색 후 투과화에 의해 분석하였다. 이오노마이신(I)과 조합된 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(P)를 T 세포를 활성화시키기 위한 양성 대조군으로서 사용하였다. 도 2b: 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 TH1-기반 반응을 보여준다. $\gamma\delta$ T 세포를 클락 프로토콜을 사용하여 구제하였고 브레펠딘 A의 존재하에 6시간 동안 PMA 및 이오노마이신으로 자극하였고 세포내 사이토킨에 대해 염색하였다. 인간 피부로부터 새롭게 분리된 $\gamma\delta$ T 세포는 자극시 TNF α 및 IFN- γ 를 생성하지만 Th2 또는 Th-17 세포와 연합된 사이토킨, 예를 들어, IL-4, IL-17A, IL-13, IL-22는 소량으로 검출되거나 검출되지 않는 반면, 통상적인 CD4+ $\alpha\beta$ T 세포는 매우 광범위하게 다양한 사이토킨 생성을 보여준다. 도 2c: 인간 피부로부터 직접 유래된 림프구 중에서, 다양한 수준의 NKG2D 수용체가 $\gamma\delta$ T 세포, CD8a+ 통상적인 $\alpha\beta$ T 세포 및 NK 세포에 의해 발현된다. 이들 세포 중에서, NK 세포는 NKG2D 리간드 단독으로의 노출에 응답하지만 T 세포들 내에서 $\gamma\delta$ T 세포 집단만이 임의의 TCR 자극의 부재하에 NKG2D 리간드로 자극시 사이토킨 반응을 보여준다(유동 세포측정 도트 플롯의 상부 열 참조). 반응은 가용성 차단 항-NKG2D 항체를 사용하여 차단될 수 있으며, 이는 반응이 전적으로 NKG2D 수용체를 통해 매개됨을 나타낸다. 도 2d: 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포 중에서, V δ 1 및 DN $\gamma\delta$ T 세포만이 재조합 MICA 단독에 의해 활성화될 선천적-유사 잠재력을 보여준다(*로 나타냄). 피부 내 소수에서 발견되는 V δ 2-발현 T 세포는 어떠한 그러한 반응도 보여주지 않는다.

도 3a 내지 3d는 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포가 배타적으로 강한 활성화 및 증식과 함께 피부 기질로부터의 분리에 반응함을 보여준다. 도 3a: 피부-거주 림프구를 클락 프로토콜을 사용하여 분리하였다. 3주 기관형 배양 후, 피부 림프구를 수거하고 섬유아세포를 포함하는 임의의 잔류 피부 세포로부터 분리하고 100만 림프구/mL의 밀도로 조직 배양 웰에 부가하고 100 U/mL의 IL-2를 보충한다. 추가로 3주 후, 거주 $\gamma\delta$ T 세포를 강하게 증식하였고 피부 림프구 배양물 내에 집적하였다. 이러한 강한 증식 현상은 3주 이내에 평균 127.18배 증식하는 대다수의 V δ 1 T 세포로 대표되는 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포에 배타적인 반면, 통상의 $\alpha\beta$ T 세포는 단지 평균 5.21배 증식했을 뿐인데, 즉 20배 이상 훨씬 적다. 도 3b: 피부-거주 V δ 1 T 세포는 14일 초과 동안 마커 Ki-67을 강하게 상향조절함으로써(세포 사이클링을 나타내는) 조직의 상실에 반응한다(점선으로 경계를 나타낸 속빈 히스토그램으로 나타낸 이소형 대조군; 속빈 히스토그램에 의해 나타낸 0일 켜 Ki-67 발현; 담회색 히스토그램에 의해 나타낸 7일 켜 Ki-67 발현; 암회색 히스토그램에 의해 나타낸 14일 켜 염색에서 Ki-67 발현). 추가로, 피부 기질과 접촉하는 경우, IL-2 수용체 알파(CD25)에 대해 대부분 음성인 피부-거주 V δ 1 T 세포는 조직으로부터 분리 후 CD25를 상향조절한다(이소형 대조군: 점선 히스토그램, 0일 켜 염색; 담회색 히스토그램, 7일 켜 염색; 암회색 히스토그램). 도 3c: Ki-67의 메디안 형광 강도(MFI)에 의해 나타낸 바와 같은 고속의 세포 사이클링은 단지 V δ 1 T 세포에 의해 대표되는 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포에서만 나타나고, 통상적인 $\alpha\beta$ T 세포에서 또는 14일 초과로 MFI가 실제로 감소하는 NK 세포에서 나타나지 않는다. 도 3d: 기질 세포로부터 분리된 피부 림프구는 3주 배양 후 강하게 집적된 거주 $\gamma\delta$ T 세포 집단을 보여준다. 이러한 $\gamma\delta$ T 세포 집단은 다수의 V δ 1 양성 세포($77.49\% \pm 17.04$) 및 범 $\gamma\delta$ TCR 양성 DN T 세포($21.46\% \pm 16.92$)를 함유한다. 클락 프로토콜을 사용하여 새롭게 수거된 피부 림프구에서 나타낸 초기의 작은 V δ 2 T 세포 집단은 감소하고 조직 $\gamma\delta$ T 세포의 3주 증식 후 거의 상실($0.6\% \pm 1.204$)된다.

도 4a 및 4b는 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포가 조직의 상실에 반응하고 피부 기질 세포, 특히 섬유아세포에 의한 접촉-의존성 기전을 통해 확인된 상태로 유지되는 것을 보여준다. 도 4a: 혼합된 피부 림프구를 3주 후 클락 프로토콜에서와 같이 기관형 배양 후 수거하였다. 이어서, 혼합된 림프구를 자가 피부 섬유아세포의 컨플루언트 층의 상부 및 섬유아세포에 의해 생성된 가용성 억제제 존재의 대조를 위한 트랜스웰에 씨딩하였다. 14일 후, 존재하는 절대 세포수를 통해 계산된 배수식(fold-wise) 증식은 $\gamma\delta$ T 세포 및 통상의 $\alpha\beta$ T 세포에 대해 측정되었다. 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 조직으로부터 분리될 때 그리고 섬유아세포의 존재하에, 그러나 자가 섬유아세포와 직접 세포 접촉하지 않을 때에만 강한 증식 반응을 보여주었다. 통상적인 $\alpha\beta$ T 세포는 시험된 임의의 조건하에 그러한 반응을 보여주지 않았다. 도 4b: 기관형 배양물로부터 수득된 혼합 림프구를 자가 섬유아세포의 단일층 상으로 씨딩하거나(담회색 히스토그램) IL-2가 보충된 속빈 웰 상에 씨딩하고(암회색 히스토그램) 7일 동안 배양하였다. 범 $\gamma\delta$ TCR+, DN T 세포(우측 패널)뿐만 아니라 피부-거주 V δ 1 T 세포(좌측 패널)는 섬유아세포의 직접적인 존재하에 정지 상태로 남아있지만, 피부 기관형 배양물로부터 분리된 경우 강한 활성화를 보여주었고 CD25, Th-1 연합된 전사 인자 T-bet, 및 세포 사이클링 마커 Ki-67의 상향 조절된 발현(MFI)에 의해 나타낸 바와 같이 섬유아세포는 존재하지 않는다(점선, 속빈 히스토그램은 일치하는 이소형 대조군을 나타낸다).

도 5a 및 5b는 증식 피부 $\gamma\delta$ T 세포가 탈억제의 징후 및 강한 세포독성 잠재력의 획득을 나타냄을 보여준다. 도 5a: 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포를 기관형 세포 배양물로부터 분리 후 14일 동안 증식하도록 하였다. 이어서 $\gamma\delta$ T 세포는 범 $\alpha\beta$ TCR 모노클로날 항체로 염색된, 모든 통상적인 T 세포를 배제함으로써 유동 세포측정을 사용하여 음성으로 분류하였다. 이어서, 150,000개의 분류된 $\gamma\delta$ T 세포를 96 편평한 웰 배양 플레이트에 이중으로

씨딩하고, 사이토킨 보충 또는 임의의 활성화 리간드의 보충이 없이 배양물에서 24시간 동안 잔류시켰다. 상등액을 수거하고 Affymetrix LUMINEX®-기반 사이토킨 어레이를 사용하여 생성된 사이토킨에 대해 분석하였다. 도 5b: 음성으로 분류된 $\gamma \delta$ T 세포를 또한 웰당 10,000개 세포의 농도로 1일 전에 씨딩된 암 세포주 상으로 씨딩하였다. 대조군으로서, 음성으로 분류된 통상적인 피부 $\alpha \beta$ T 세포를 사용하였다. T 세포는 이펙터로 씨딩하였고: 표적 비율은 100 U/mL에서 IL-2의 존재하에 차단 NKG2D 항체의 존재 및 부재하에 나타난다. 피부-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 통상의 $\alpha \beta$ T 세포 상에서 악성 세포 주의 ELISA를 통해 측정된 카스파제 절단된 상피 특이적 사이토 케라틴 18(CK18) 방출에 의해 나타난 바와 같이, 율동한 사멸을 보여주었다. 세포 독성은 NKG2D 수용체를 차단 하는 항체를 함유하는 배양물 중에 이의 감소에 의해 나타난 바와 같이, NKG2D 수용체를 통해 적어도 부분적으로 매개되었다.

도 6a 내지 6d는 인간 소화관에서 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 분석을 보여준다. 도 6a: 클락 프로토콜의 채택은 소화관-거주 림프구의 단리를 가능하게 하였다. 혼합 소화관 림프구는 일반적으로 대부분 V δ 1 T 세포를 포함하는 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 대형 집단을 함유하지만 또한 V δ 2 및 이중 음성 $\gamma \delta$ T 세포를 함유한다. 도 6b: 소화관 기관형 배양물로부터 단리된 $\gamma \delta$ T 세포는 이들이 소화관 기질로부터 분리되면 시간 경과에 따라 Ki-67을 상향조절함으로써 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포에 대해 유사한 반응을 보여준다. 도 6c: 소화관-유래된 $\gamma \delta$ T 세포는 CD107a 상향 조절에 의해 측정된 바와 같이 IFN- γ 를 생성함에 의해 그리고 탈과립화함에 의해 제조합 MICA와 같은 선천적-유사 자극에 반응한다. 도 6d: 소화관 기관형 배양물로부터 단리된 $\gamma \delta$ T 세포는 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포와 유사한 반응을 보여주고 소화관 기질과의 접촉이 부재인 림프구 배양물 중에 전체 집적에 의해 나타난 바와 같이 세포 배양물에서 시간 경과에 따라 증식한다.

도 7a 및 7b는 증식된 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포의 조직 표현형을 보여준다. 도 7a: 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포는 피부 호밍 케모킨 수용체 CCR4 및 CCR8에 대해 양성으로 염색된다. 도 7b: 발현 수준은 각각 피부 또는 혈액으로부터 유래된 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 상에서 상이하다.

도 8은 TCR의 임의의 자극 없이 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포의 탈-억제가 자발적 Th1 사이토킨 생성을 유도하고 흥미롭게도 이는 아토피 사이토킨 IL-13의 생성에서 새로운, TCR 활성화된 $\gamma \delta$ T 세포와는 대조적임을 보여준다. 새롭게 유래된 $\gamma \delta$ T 세포와 일치하게, 탈억제되고 증식 $\gamma \delta$ T 세포는 무시할만한 양의 Th-2-연합된 사이토킨, 예를 들어, IL-4 및 IL-5를 생성한다. 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포를 14일 동안 증식시켰고 통상적인 $\alpha \beta$ T 세포를 배제함으로써 음성으로 분류하였다. 150,000개 혼합된 $\gamma \delta$ T 세포를 임의의 자극 또는 사이토킨 보충 없이 4명의 공여자에 대해 96 플레이트 편평한 웰에서 이중으로 100만 세포/mL의 밀도로 배양하였다. 상등액을 24시간 후 수거하고 Affymetrix에 의해 LUMINEX® 기반 사이토킨 어레이를 사용하여 분석하였다.

도 9는 증식되고 음성으로 분류된 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포가 ELISA를 사용하여, 표적 세포에 의해 카스파제-절단된 사이토케라틴 18의 방출에 의해 측정된 바와 같이, 이들이 공-배양된 다양한 인간 종양 세포주에 대해 강한 세포독성을 나타냄을 보여준다.

도 10a 및 10b는 새로운 비-증식된 피부-유래된 V δ 1 T 세포가 이전 T 세포 활성화의 마커를 나타냄을 보여준다. 도 10a: 피부-유래된 V δ 1 T 세포는 고수준의 CD69, 및 TIM3, 및 저수준의 CD28를 발현한다. 추가로, 이들은 활성화 마커 NKG2D의 고발현을 보여준다. 이 표현형은 시험관내 증식 동안에 피부-유래된 V δ 1 T 세포에 의해 지속된다. 대조적으로, 인간 혈액으로부터 유래된 V δ 1 T 세포는 이들 활성화 징후가 없고, CD69 또는 TIM3을 발현하지 않는다. 피부-유래된 V δ 1 T 세포와 비교하여, 혈액-유래된 V δ 1 T 세포 상에서 NKG2D 발현은 보다 매우 낮은 반면 혈액-유래된 V δ 1 T 세포는 동시 자극 분자 CD28을 발현한다. 도 10b: 단지 피부 유래된 V δ 1 T 세포는 T 세포 수용체에 대한 리간드와 같은 임의의 다른 자극의 부재 하에 제조합 MICA와 같은 NKG2D 리간와 반응한다. 혈액-유래된 V δ 1 또는 V δ 2 T 세포는 선천적-유사 자극에 대한 그러한 반응성을 보여주지 않았다. 세포를 나타낸 바와 같이 제조합 MICA 또는 항-CD3 항체 또는 둘 다와 함께 96 웰 플레이트에 씨딩하였다. 세포를 마지막 4시간 동안 IL-2 100 U/mL에서 6시간에 걸쳐 배양한 후, IFN- γ 에 대한 표면 항원 염색, 투과 및 세포내 염색을 수행한다.

도 11은 피부-유래된 V δ 1 T 세포가 CD16을 최소 수준으로 발현하는 것을 보여주지만 고친화성 IgG 수용체 CD64의 상당한 표면 발현을 보여준다. 따라서, 직접적인 세포독성 활성화에 추가로, 조직-유래된 V δ 1 T 세포는 또한 이들이 악성 종양 및 전이 부위로 항체를 가이드하여 옹소닌화된 종양 세포를 인지하고 이들을 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 통해 이들을 사멸시킴으로써 CD20 또는 Her2 치료요법과 같은 모노클로날 항체 치료요법의 효능을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 나타낸 결과는 (4개 중) 하나의 대표적인 공여자로부터 기원한다.

도 12는 IL-2(좌측 패널), IL-15(중앙 패널), 및 IL-2 + IL-15(우측 패널)에서 Vδ1 T 세포의 증식을 보여준다. 새롭게 단리된 피부 유래된 림프구를 10% FCS 및 1% Pen/Strep을 함유하는 RPMI 배지에서 96웰 평저 플레이트에서 배양하고 7일 동안 각각 IL-2, IL-15, 또는 IL-2 + IL-15을 보충하였다. 사이토킨 모두의 조합뿐만 아니라 IL-2 및 IL-15 모두는 임의의 기질 세포의 부재하에 이소형(진정한 음성) 염색과 비교하여 Ki-67 염색에서 전환에 의해 나타난 바와 같이 Vδ1 T 세포의 증식을 유도하였다. Ki-67은 특이적으로 세포 사이클의 G0에 잔류하는 세포를 염색하고 증식과 통상적으로 연관된다.

도 13은 21일째에 증식된 Vδ1 T 세포의 표면 상에 CD9, CCR3, 및 CD39의 발현을 나타내는 유동 세포측정 결과를 보여준다. 증식된 피부 유래된 Vδ1 T 세포는 균등한 이소형 염색(진정한 음성, 개방 히스토그램)에 비해(검은 히스토그램)으로 나타난 바와 같이 고수준의 세포 표면 마커, CCR3, CD39, 및 CD9을 유지하였다.

도 14는 피부 유래된 Vδ1 T 세포(검은 막대) 및 혈액 유래된 Vδ1 T 세포(밝은 막대)에서 CCR3 및 CD9의 mRNA 발현을 보여준다. 피부 유래된 Vδ1 T 세포를 본원에 기재된 바와 같이 증식시켰고 혈액 유래된 Vδ1 T 세포는 Vδ T 세포 수용체(20 μg/mL)에 대해 플레이트 결합된 항체를 사용하여 증식시켰다. 증식 후, Vδ1 T 세포를 형광성 활성화된 세포 분류(FACS)를 사용하여 단리하였고 RNA를 그룹 모두(혈액=회색 대 피부=검정)에 대해 3명의 공여자로부터 단리하였다. 전체 mRNA를 서열 분석하고 나타난 mRNA의 발현 수준을 정규화하고 로그 2 전환하였다. 모든 발현 수준은 대부분의 인간 세포에서 고수준으로 발현되는 통상의 하우스키핑 유전자인 GAPDH에 대한 비율과 직접 비교하여 나타낸다.

도 15는 피부 유래된 Vδ1 T 세포(검은 막대) 및 혈액 유래된 Vδ1 T 세포(밝은 막대)에서 IL-13의 mRNA 발현을 보여준다. 피부 유래된 Vδ1 T 세포는 본원에 기재된 바와 같이 증식시켰고 혈액 유래된 Vδ1 T 세포는 Vδ T 세포 수용체(20 μg/mL)에 대해 플레이트 결합된 고용량 항체를 사용하여 증식시켰다. 증식 후, Vδ1 T 세포는 FACS를 사용하여 단리하였고 RNA는 그룹 모두(혈액=회색 대 피부=검정)에 대해 3명의 공여자로부터 단리하였다. 전체 mRNA를 서열 분석하고 IL-13에 대한 mRNA의 발현 수준을 정규화하고 로그 2 전환하였다. 발현 수준은 직접 비교에서 및 GAPDH에 대한 비율로 나타낸다.

도 16a 및 16b는 PMA/로노마이신(도 16a) 또는 항-CD3(도 16b)을 사용한 TCR 자극 후 피부 유래된 Vδ1 T 세포에서 사이토킨의 생성을 보여준다. 단리 및 증식 후, 피부 유래된 Vδ1 T 세포를 형광성 활성화된 세포 분류(FACS)를 사용하여 정제하였다. 150,000 Vδ1 T 세포를 3명의 공여자에 대해 이중으로 96 웰 평저 플레이트로 씨딩하고 24시간 동안 플레이트 결합된 항 CD3(5 μg/mL) 또는 PMA/로노마이신으로 자극하였다. LUMINEX® 플랫폼을 사용하여 나타난 사이토킨의 절대량에 대해 상등액을 분석하였다.

도 17a 내지 17h는 증식 조건의 결과를 보여준다. 도 17a 및 17b는 분리된 림프구(분리 배양 21일 후; 도 17a) 및 20일 동안 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21의 존재하에 증식된 림프구(도 17b)에 대한 대표적인 유동 세포측정 플롯 및 게이팅 도식을 보여준다. 도 17c는 IL-2(100 U/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 결과로서 Vδ1 T 세포 증식으로 정규화된, 다양한 조건하에 Vδ1 T 세포의 배수 증식을 보여준다. 도 17d는 IL-2+IL-15, IL2+IL-15+IL-4, IL-2+IL-15+IL-21, 및 IL-2+IL-15+IL-4+IL-21을 처리한 결과로서 분리된 집단에 대한 배수 증식을 보여준다.

도 17e는 21일째(증식 전) 및 42일째(증식 후) 절대 Vδ1⁺ T 세포 수를 보여준다. 증식은 나타난 바와 같이 100 U/ml IL-2, 100 U/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-15, 또는 100 U/ml IL-2 + 5 ng/ml IL-4 + 10 ng/ml IL-15 + 100 ng/ml IL-21에서 수행하였다. (n=8-17). 도 17f는 2개의 시점에서 각각의 조건에 대한 평균(+ SEM) Vδ1⁺ T 세포 수를 보여준다. ** p=0.001. 스튜던트 쌍을 이루지 않은 t-시험. (n=8-17). 도 17g는 단독의 100 U/mL IL-2, 5 ng/ml IL-4 및 10 ng/ml IL-15을 사용한 증식으로 정규화된, 상이한 농도의 IL-21을 사용한 Vδ1⁺ T 세포 증식을 보여준다(n=3). 도 17h는 단독의 IL-2를 사용한 증식으로 정규화된, 100 U/ml IL-2 + 5 ng/ml IL-4 + 10 ng/ml IL-15 + 10 ng/ml IL-21을 사용한 Vδ1⁺ T 증식을 보여준다.

도 18a 내지 18d는 증식된 Vδ1 T 세포에 의한 CD27의 발현을 특징화한다. 도 18a는 IL-2(100 U/mL) 및 IL-15(10 ng/mL)의 결과로서 CD27 발현으로 정규화된, 다양한 조건하에서 CD27(MFI에 의한)의 배수 발현을 보여준다. 도 18b는 IL-2+IL-15, IL2+IL-15+IL-4, IL-2+IL-15+IL-21, 및 IL-2+IL-15+IL-4+IL-21을 처리한 결과로서 분리된 집단에 대한 CD27 MFI를 보여준다. 도 18c는 유동 세포측정에 의해 평가된 바와 같이, 단독의 100 U/mL IL-2, 5 ng/ml IL-4, 및 10 ng/ml IL-15을 사용한 증식으로 정규화된, IL-21의 상이한 농도를 사용한 Vδ1⁺ CD27 발현을 보여준다(n=3). 도 18d는 유동 세포측정에 의해 평가된 바와 같이, 단독의 IL-2를 사용한 증식으로 정규화된, 100 U/ml IL-2 + 5 ng/ml IL-4 + 10 ng/ml IL-15 + 10 ng/ml IL-21을 사용한 Vδ1⁺ CD27 발현을 보

여준다. (n=4).

도 19는 증식된 $V\delta 1$ T 세포에 의한 TIGIT의 표면 발현을 특징화한다. 도 19는 IL-2 및 IL-15 처리로부터 비롯된 TIGIT 발현으로 정규화된, 다양한 조건하에서 TIGIT(MFI에 의한)의 배수 발현을 보여준다.

도 20은 CD27 발현의 함수로서 개별 세포의 표면 TIGIT 발현을 보여주는 플롯이다.

도 21은 혈액-유래된 혈청 또는 혈장 분획물의 존재 또는 부재하에 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식 및 집적을 지지하기 위한 사이토킨의 용도를 보여주는 그래프이다. 2% $\gamma\delta$ T 세포를 함유하는 조직 샘플로부터 단리된 혼합 림프구 집단은 10% 인간 AB 혈청의 존재 또는 부재하에 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21을 함유하는 배지에서 증식하였다. 데이터는 혈청을 사용한 것(295배 증식, 2% 내지 75% 집적)에 비해 인간 혈청 부재하에 성공적이고 균등한 증식(432배) 및 집적(2% 내지 77%)을 강조한다.

도 22a 내지 22d는 단리된 혼합 림프구 집단으로부터 조직-유래된 $\gamma\delta$ 세포의 예시적 집적을 보여주는 그래프이다. 세포는 단일 인간 조직 샘플 및 복제물로부터 단리되었고 이어서 10% 혈청(좌측 컬럼) 또는 5% 세포 치료 요법 시스템 혈청(CTSTM) (우측 컬럼)을 함유하는 TexMACS 배지 + IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-21에서 증식시켰다. 단리되고 증식된 세포 배양물의 프로파일은 나타낸 바와 같이 제공한다. 도 22a는 초기 단리된 배양물이 비교적 낮은 수(<10%)의 원하는 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포를 함유한다는 것을 보여준다. 대조적으로, 도 22b 내지 22d는 증식 후, 생성된 세포 집단이 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포에 대해 상당히 집적되어 있다는 것을 보여준다.

도 23은 소화관 거주 $V\delta 1$ 세포 상에서 구성적(constitutive) TIGIT 발현을 보여주는 그래프이다. 데이터는 결장 내-상피 림프구의 방출을 위해 표준 단리 프로토콜을 사용하는 소화관 상피로부터 단리된 $V\delta 1$ 세포를 사용하여 생성하였다.

도 24a 및 24b는 폴리오바이러스 수용체(PVR)가 IFN γ (도 24a) 및 TNF α (도 24b) 발현에 의해 측정된 바와 같이 TCR 신호전달을 특이적으로 억제함을 보여주는 그래프이다. 세포는 IL-2 및 IL-15로 항온처리하고 항-CD3 항체로 활성화시켰다.

도 25a 및 25b는 PVR 억제 효과가 IFN γ (도 25a) 또는 TNF α (도 25b)에 의해 측정된 바와 같이 TIGIT-음성 $V\delta 1$ +/ $V\delta 3$ + 세포에 대해 상실됨을 보여주는 그래프이다. 세포는 IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21로 항온처리하고 항-CD3 항체로 활성화시켰다.

도 26a 및 26b는 IL-9가 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식에서 IL-2의 기능을 대체할 수 있음을 보여주는 그래프이다. 3명의 공여자(TS052, TS056, 및 SK073)로부터의 피부 조직을 9 mm 격자판에 위치시키고 IL-2 및 IL-15가 보충된 배지에서 3주 동안 배양하였다. 이어서, 단리된 림프구는 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21(좌측 막대) 또는 IL-4, IL-9, IL-15 및 IL-21(우측 막대)이 보충된 배지에서 증식시켰다. $\gamma\delta$ T 세포/격자판(도 26a) 및 $V\delta 1$ 세포/격자판(도 26b)의 최종 수율은 증식 3주 후 계산하였다. 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식에서 IL-2의 IL-9로의 대체는 균등한 증식 효율을 유도한다. 히스토그램은 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다.

도 27a 내지 27c는 IL-9가 배수 변화(도 27a), $\gamma\delta$ TCR+ T 세포의 %(도 27b), 및 $V\delta 1$ + T 세포의 %(도 27c)에 의해 측정된 바와 같은 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식에서 IL-2의 기능을 대체할 수 있음을 보여주는 그래프이다. 피부 조직은 6명의 공여자(SK073, SK075, SK077, TS052, TS053, 및 TS056)로부터 기원하였다. 2CK = 2 사이토킨(IL-2 + IL-15) 및 4CK = 4 사이토킨(IL-2 + IL-15 + IL-21 + IL-4).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 서론

본원에 제공된 것은 비-조혈 조직 공급원(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $V\delta 1$ T 세포)으로부터 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비- $V\delta 2$ T 세포, 예를 들어, $V\delta 1$ T 세포 및/또는 이중 음성 T 세포)를 증식시키는 방법이다. 증식 방법은 상당한 TCR 자극의 부재하에 및/또는 인터류킨-4(IL-4), 인터류킨-15(IL-15), 인터류킨-21(IL-21) 및/또는 인터류킨-2(IL-2)의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 비-조혈 조직의 기질 세포로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포)를 배양하는 단계를 포함한다. 증식된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비- $V\delta 2$ T 세포, 예를 들어, $V\delta 1$ T 세포 및/또는 DN T 세포)의 조성물 및 증식된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 암의 치료를 위한 입양 T 세포 치료요법의 일부)를 사용하는 방법이 추가로 제공된다.

[0046] II. 정의

[0047] 본원에 기재된 발명의 양상 및 구현에는 "포함하는", "로 이루어진" 및 "필수적으로 이루어진" 양상 및 구현예를 포함하는 것으로 이해되어야만 한다. 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 달리 지적되지 않는 경우 복수 개념을 포함한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약"은 이 기술 분야의 당업자에게 용이하게 공지된 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 언급한다. 본원에서 값 또는 파라미터의 "약"에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 지시된 구현예를 포함하고(기재한다). 일부 경우에, "약"은 특정된 값으로부터 +20%, 일부 경우에 +10%, 일부 경우에 +5%, 일부 경우에 +1%, 또는 일부 경우에 +0.1%의 변동을 포함하고, 그러한 변동은 기재된 방법을 수행하기 위해 적당하다.

[0049] 본원에 사용된 용어 "실질적인" 및 "실질적으로"는 관심 특징 또는 성질의 전체 또는 거의 전체 범위 또는 정도를 나타내는 정성적 조건을 언급한다. 생물학적 분야의 당업자는 생물학적 및 화학적 현상이 거의 완료되지 않거나 완전성을 달성하거나 및/또는 절대적인 결과를 달성 또는 회피하는 경우가 거의 없다는 것을 이해할 것이다. 따라서 "실질적으로"라는 용어는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완전성의 잠재적 부재를 포착하기 위해 본원에 사용된다. 수용체/리간드 상호 작용 또는 세포/세포 접촉과 같은 물리적 시나리오를 기술 할 때, 방법을 수행하는 사람이 이용할 수 있는 통상적인 수단에 의해 기능적 결과가 검출될 수 있다면 시나리오는 실질적이다. 예를 들어, "상당한 TCR 활성화"는 세포 집단 중에서 TCR 활성화의 검출가능한 수준(예를 들어, TCR 활성화의 통계학적으로 유의적인 정도)을 언급한다. 일부 구현예에서, TCR은 각각의 세포 집단에 대한 TCR 경로 효능제(예를 들어, 항체, 예를 들어, 항-CD3, 또는 렉틴)의 EC₅₀의 최대 0.1%, 최대 0.5%, 최대 1%, 최대 5%, 최대 10%, 최대 20%, 최대 30%, 또는 최대 40%로 노출시 실질적으로 활성화된다. 또한, "상당한 세포 접촉"(예를 들어, 실질적인 피더 세포 접촉, 실질적인 기질 세포 접촉, 또는 실질적인 종양 세포 접촉)은 증식 세포에서 검출가능한 변화(예를 들어, 증식을 감소시키는)를 유도할 수 있는 세포-대-세포 접촉 정도를 언급한다. 일부 경우에, 상당한 세포 접촉은 오염 세포 유형(예를 들어, 피더 세포, 기질 세포, 또는 종양 세포)이 증식 세포 집단에 비해 수에 의해 최대 0.1%, 최대 0.5%, 최대 1%, 최대 5%, 최대 10%, 또는 최대 20%의 농도로 배양물 격실에 존재하는 경우 일어난다. 세포의 "상당한 수" 또는 제제의 "상당한 양"은 또한 상기 정의된 바와 같이 상당한 효과를 유도하기 위해 요구되는 수 또는 양을 언급한다.

[0050] 본원에 사용된 바와 같은 "비-조혈 세포"는 기질 세포 및 상피 세포를 포함한다. 기질 세포는 임의의 기관의 비-조혈 연결 조직 세포이고 그 기관의 조직질실 세포의 기능을 지지한다. 기질 세포의 예는 섬유아세포, 주피세포, 간엽 세포, 각질세포, 내피 세포, 및 비-조혈 종양 세포를 포함한다. 상피 세포는 몸 전체의 혈관 및 기관의 공동 및 표면에 정렬된 비-조혈 세포이다. 이들은 정상적으로 편평하거나, 주상 또는 입방형이며 세포의 단일층 또는 2개 이상의 세포층으로 정렬될 수 있다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 "비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포", "비-조혈 조직-유래된", 및 "비-조혈 조직-고유 $\gamma \delta$ T 세포"는 조직이 외식되는 시점에 비-조혈 조직에 존재하는 $\gamma \delta$ T 세포를 언급한다. 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 임의의 적합한 인간 또는 비-인간 동물 비-조혈 조직으로부터 획득될 수 있다. 비-조혈 조직은 혈액 또는 골수 이외의 조직이다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 혈액 또는 활액과 같은 생물학적 유체의 특정 유형의 샘플로부터 획득되지 않는다. 그러한 적합한 인간 또는 비-인간 동물 비-조혈 조직의 예는 피부 또는 이의 일부(예를 들어, 진피 또는 표피), 위장관(예를 들어, 위장 상피, 결장, 소장, 위, 맹장, 맹관 또는 직장), 유선 조직, 폐(바람직하게 여기서, 조직은 기관지폐포 세척액으로부터 획득되지 않는다), 전립선, 간 및 췌장을 포함한다. 일부 구현예에서, 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 흉선, 비장 또는 편도와 같은 림프구 조직으로부터 유래할 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 또한 인간 암 조직, 예를 들어, 유방 및 전립선에 거주할 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 인간 암 조직으로부터 획득되지 않는다. 비-조혈 조직 샘플은 표준 기술, 예를 들어, 외식(예를 들어, 생검)에 의해 획득될 수 있다. 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포, 이중 음성(DN) T 세포, V δ 3 T 세포, 및 V δ 5 T 세포를 포함한다.

[0052] 본원에 사용된 바와 같은 "IL-2"는 하나 이상의 IL-2 수용체(IL-2R) 서브유닛(예를 들어, 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 수용체 복합체, 단편, 이소형, 및 이의 펩티도모사체)에 대한 효능제로서 작용하는 고유 또는 재조합 IL-2 또는 이의 변이체를 언급한다. 그러한 제제는 IL-2-의존성 세포주, CTLL-2(33; 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection (ATCC®) TIB 214)의 증식을 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-2는 문헌(참조: Fujita, et al. *CeIl* 1986. 46.3:401-407)에 기재된 바와 같이 133개 아미노산 서열(추가 20 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩타이드가 적은)로서 존재한다. IL-2 뮤테인은 폴리펩타이드이고, 여기

서, 인터류킨-2 단백질에 대한 특정 치환이 만들어지고 미국 제2014/0046026호에 기재된 것들과 같이 IL-2R β 에 결합하는 능력을 보유한다. IL-2 뮤테인은 고유 IL-2 폴리펩타이드 쇄의 다른 잔기 내에서 또는 잔기에서의 하나 이상의 부위에 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형을 특징으로 할 수 있다. 본원의 개시내용에 따라, 임의의 그러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-2R β 결합 활성을 보유하는 IL-2 뮤테인을 유도한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0053] 인간 IL-2를 암호화하는 핵산은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 과정에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-2(Gene ID 3558)의 아미노산 서열은 승인 로케이터 NP_000577.2 GI: 28178861 하에 기관(Genbank)에서 발견된다. 뮤린(무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)) IL-2 아미노산 서열(Gene ID 16183)은 승인 로케이터 NP_032392.1 GI: 7110653하에 기관(Genbank)에서 발견된다.

[0054] IL-2는 또한 예를 들어, 인간, 시미안, 소, 돼지, 말, 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-2를 언급할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있고, 이는 소정의 아미노산 잔기가 유사한 생리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 하나의 지방족 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, 서로에 대해 Ile, Val, Leu, 또는 Ala의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 간의 치환을 포함한다. 다른 그러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 천연적으로 존재하는 IL-2 변이체는 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 그러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱 이벤트로부터 비롯되거나 IL-2 단백질의 단백질용해 절단으로부터 비롯된 단백질이고, 여기서, IL-2 결합 성질은 보유된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-2 단백질을 생성할 수 있다. 단백질용해에 기인할 수 있는 변이는 예를 들어, IL-2 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산(일반적으로 1 내지 10개 아미노산으로부터 기원하는)의 단백질용해 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현시 N- 또는 C-말단에서의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학적 그룹을 사용하여 이의 물리적 성질을 변경하기 위해 변형될 수 있다(참조: Yang, et al. *Cancer* 1995, 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가의 아미노산으로 변형될 수 있다(참조: Clark-Lewis, et al. *PNAS* 1993, 90:3574-3577).

[0055] 본원에 사용된 바와 같은 "IL-15"는 하나 이상의 IL-15 수용체(IL-15R) 서브유닛(예를 들어, 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 수용체 복합체, 단편, 이소형, 및 이의 펩티도모사체)에 대한 효능제로서 작용하는 고유 또는 재조합 IL-15 또는 이의 변이체를 언급한다. IL-2와 같이 IL-15는 IL-2-의존성 세포주, CTLL-2의 증식을 지지할 수 있는 공지된 T-세포 성장 인자이다. IL-15는 처음으로 114 아미노산 성숙한 단백질로서 문헌(참조: Grabstein, et al. (Grabstein, et al. *Science* 1994, 264.5161: 965-969)에 의해 보고되었다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "IL-15"는 고유 또는 재조합 IL-15 및 뮤테인, 이의 유사체, 서브유닛, 또는 이의 복합체(예를 들어, 수용체 복합체, 예를 들어, 수시(sushi) 펩타이드, WO 2007/046006에 기재된 바와 같이)를 의미하고, 이의 각각은 CTLL-2 세포의 증식을 자극할 수 있다. CTLL-2 증식 검정에서, 재조합적으로 발현된 전구체 및 IL-15의 성숙한 형태의 인-프레임 융합체로 형질감염된 세포의 상등액은 CTLL-2 세포 증식을 유도할 수 있다.

[0056] 인간 IL-15는 문헌(참조: Grabstein, et al. (Grabstein, et al. *Science* 1994, 264.5161: 965-969)에 의해 기재된 과정에 따라 또는 폴리머라제 연쇄반응(PCR)과 같은 통상적인 과정에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-15 cDNA는 1993년 2월 19일자로 ATCC® 로 기탁되었고 수탁 번호 69245가 할당되었다.

[0057] 인간 IL-15(유전자 ID 3600)의 아미노산 서열은 승인 로케이터 NP000576.1. GI: 10835153(이소형 1) 및 NP_751915.1 GI: 26787986(이소형 2) 하에 기관(Genbank)에서 발견된다. 뮤린(무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)) IL-15 아미노산 서열(유전자 ID 16168)은 승인 로케이터 NP_001241676.1 GI: 363000984하에 기관(Genbank)에서 발견된다.

[0058] IL-15는 또한 예를 들어, 인간, 시미안, 소, 돼지, 말, 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물로부터 유래된 IL-15를 언급할 수 있다. 본원에 언급된 바와 같이 IL-15 "뮤테인" 또는 "변이체"는 고유 포유동물 IL-15의 서열에 실질적으로 상동성이지만 아미노산 결실, 삽입 또는 치환 때문에 고유 포유동물 IL-15 폴리펩타이드와는 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드이다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있고, 이는 소정의 아미노산 잔기가 유사한 생리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 하나의 지방족 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, 서로에 대해 Ile, Val, Leu, 또는 Ala의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 간의 치환을 포함한다. 다른 그러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 천연적으로 존재하는

IL-15 변이체는 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 그러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱 이벤트로부터 비롯되거나 IL-15 단백질의 단백질용해 절단으로부터 비롯된 단백질이고, 여기서, IL-15 결합 성질은 보유된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-15 단백질을 생성할 수 있다. 단백질용해에 기인할 수 있는 변이는 예를 들어, IL-15 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산(일반적으로 1 내지 10개 아미노산으로부터 기원하는)의 단백질용해 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현시 N- 또는 C-말단에서의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학적 그룹을 사용하여 이의 물리적 성질을 변경하기 위해 변형될 수 있다(참조: Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가의 아미노산으로 변형될 수 있다(참조: Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

[0059] 본원에 사용된 바와 같은 "IL-4"는 하나 이상의 IL-4 수용체(IL-4R) 서브유닛(예를 들어, 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 수용체 복합체, 단편, 이소형, 및 이의 펩티도모사체)에 대한 효능제로서 작용하는 고유 또는 재조합 IL-4 또는 이의 변이체를 언급한다. 그러한 제제는 순수(naive) 헬퍼 T 세포(Th0 세포)의 Th2 세포로의 분화를 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-4는 129개 아미노산 서열(추가 24 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩타이드가 적은)로서 존재한다. IL-4 뮤테인은 폴리펩타이드이고, 여기서, 인터류킨-4 단백질에 대한 특정 치환이 만들어지고 미국 특허 제6,313,272호에 기재된 것들과 같이 IL-4R α 에 결합하는 능력을 보유한다. IL-4 뮤테인은 고유 IL-4 폴리펩타이드 쇄의 다른 잔기 내에서 또는 잔기에서의 하나 이상의 부위에 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형을 특징으로 할 수 있다. 본원의 개시내용에 따라, 임의의 그러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-2R α 결합 활성을 보유하는 IL-4 뮤테인을 유도한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0060] 인간 IL-4를 암호화하는 핵산은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 과정에 의해 취득될 수 있다. 인간 IL-4(유전자 ID 3565)의 아미노산 서열은 승인 로케이터 NG_023252하에 기관(Genbank)에서 발견된다. 뮤린(무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)) IL-4 아미노산 서열(유전자 ID 16189)은 승인 로케이터 NC_000077.6하에 기관(Genbank)에서 발견된다.

[0061] IL-4는 또한 예를 들어, 인간, 시미안, 소, 돼지, 말, 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물로부터 유래된 IL-4를 언급할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있고, 이는 소정의 아미노산 잔기가 유사한 생리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 하나의 지방족 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, 서로에 대해 Ile, Val, Leu, 또는 Ala의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 간의 치환을 포함한다. 다른 그러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 천연적으로 존재하는 IL-4 변이체는 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 그러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱 이벤트로부터 비롯되거나 IL-4 단백질의 단백질용해 절단으로부터 비롯된 단백질이고, 여기서, IL-4 결합 성질은 보유된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-4 단백질을 생성할 수 있다. 단백질용해에 기인할 수 있는 변이는 예를 들어, IL-4 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산(일반적으로 1 내지 10개 아미노산으로부터 기원하는)의 단백질용해 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현시 N- 또는 C-말단에서의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학적 그룹을 사용하여 이의 물리적 성질을 변경하기 위해 변형될 수 있다(참조: Yang, et al. Cancer 1995. 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가의 아미노산으로 변형될 수 있다(참조: Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 "IL-21"는 하나 이상의 IL-21 수용체(IL-21R) 서브유닛(예를 들어, 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 수용체 복합체, 단편, 이소형, 및 이의 펩티도모사체)에 대한 효능제로서 작용하는 고유 또는 재조합 IL-21 또는 이의 변이체를 언급한다. 그러한 제제는 천연 킬러(NK) 및 세포독성(CD8⁺) T 세포의 증식을 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-21은 133개 아미노산 서열(추가 22 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩타이드가 적은)로서 존재한다. IL-21 뮤테인은 폴리펩타이드이고, 여기서, 인터류킨-21 단백질에 대한 특정 치환이 만들어지고 미국 제 9,388,241호에 기재된 것들과 같이 IL-21R α 에 결합하는 능력을 보유한다. IL-21 뮤테인은 고유 IL-21 폴리펩타이드 쇄의 다른 잔기 내에서 또는 잔기에서의 하나 이상의 부위에 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형을 특징으로 할 수 있다. 본원의 개시내용에 따라, 임의의 그러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-21R 결합 활성을 보유하는 IL-21 뮤테인을 유도한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

- [0063] 인간 IL-21을 암호화하는 핵산은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 과정에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-21(유전자 ID 59067)의 아미노산 서열은 승인 로케이터 NC_000004.12하에 기관(Genbank)에서 발견된다. 뮤린(무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)) IL-21 아미노산 서열(유전자 ID 60505)은 승인 로케이터 NC_000069.6하에 기관(Genbank)에서 발견된다.
- [0064] IL-21은 또한 예를 들어, 인간, 시미안, 소, 돼지, 말, 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물로부터 유래된 IL-21을 언급할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있고, 이는 소정의 아미노산 잔기가 유사한 생리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 하나의 지방족 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, 서로에 대해 Ile, Val, Leu, 또는 Ala의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 간의 치환을 포함한다. 다른 그러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 천연적으로 존재하는 IL-21 변이체는 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 그러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱 이벤트로부터 비롯되거나 IL-21 단백질의 단백질용해 절단으로부터 비롯된 단백질이고, 여기서, IL-21 결합 성질은 보유된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-21 단백질을 생성할 수 있다. 단백질용해에 기인할 수 있는 변이는 예를 들어, IL-21 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산(일반적으로 1 내지 10개 아미노산으로부터 기원하는)의 단백질용해 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현시 N- 또는 C-말단에서의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학적 그룹을 사용하여 이의 물리적 성질을 변경하기 위해 변형될 수 있다(참조: Yang, et al. Cancer 1995, 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가의 아미노산으로 변형될 수 있다(참조: Clark-Lewis, et al. PNAS 1993, 90:3574-3577).
- [0065] 본원에 사용된 바와 같은 "IL-9"는 하나 이상의 IL-9 수용체(IL-9R) 서브유닛(예를 들어, 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 수용체 복합체, 단편, 이소형, 및 이의 펩티도모사체)에 대한 효능제로서 작용하는 고유 또는 재조합 IL-9 또는 이의 변이체를 언급한다. 성숙한 인간 IL-9는 144 아미노산 서열로서 존재한다. IL-9 뮤테인은 폴리펩타이드이고, 여기서, 인터류킨-9 단백질에 대한 특정 치환이 만들어지고 IL-9R에 결합하는 능력을 보유한다. IL-9 뮤테인은 고유 IL-9 폴리펩타이드 쇄의 다른 잔기 내에서 또는 잔기에서의 하나 이상의 부위에 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형을 특징으로 할 수 있다. 본원의 개시내용에 따라, 임의의 그러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-9R 결합 활성을 보유하는 IL-9 뮤테인을 유도한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.
- [0066] 인간 IL-9를 암호화하는 핵산은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 과정에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-9의 아미노산 서열은 UniProtKB P15248로 나타낸다.
- [0067] IL-9는 또한 예를 들어, 인간, 시미안, 소, 돼지, 말, 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물로부터 유래된 IL-9를 언급할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있고, 이는 소정의 아미노산 잔기가 유사한 생리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 하나의 지방족 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, 서로에 대해 Ile, Val, Leu, 또는 Ala의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 잔기, 예를 들어, Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 간의 치환을 포함한다. 다른 그러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 천연적으로 존재하는 IL-9 변이체는 또한 본 발명에 의해 포괄된다. 그러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱 이벤트로부터 비롯되거나 IL-9 단백질의 단백질용해 절단으로부터 비롯된 단백질이고, 여기서, IL-9 결합 성질은 보유된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-9 단백질을 생성할 수 있다. 단백질용해에 기인할 수 있는 변이는 예를 들어, IL-9 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산(일반적으로 1 내지 10개 아미노산으로부터 기원하는)의 단백질용해 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현시 N- 또는 C-말단에서의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학적 그룹을 사용하여 이의 물리적 성질을 변경하기 위해 변형될 수 있다(참조: Yang, et al. Cancer 1995, 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가의 아미노산으로 변형될 수 있다(참조: Clark-Lewis, et al. PNAS 1993, 90:3574-3577).
- [0068] 상기 인자들 중 임의의 하나 이상은 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 유효량으로 증식 프로토콜에 포함될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량으로"는 검출가능한 결과를 유도하는 양(예를 들어, 이의 출발 집단에 비해, 예를 들어, $p < 0.05$ 에서 통계학적으로 유의적인 증가된 수를 갖는 세포의 수)를 언급한다. 다수의 인자들이 한때 존재하는 경우에, 유효량은 모든 인자들의 혼성 효과(예를 들어, IL-2 및 IL-15의 혼

성 효과, 또는 IL-2 또는 IL-9, IL-4, IL-15, 및 IL-21의 혼성 효과)를 언급한다.

[0069] "T 세포 수용체(TCR) 경로 효능제" 또는 "TCR 경로를 활성화시키는 제제"는 TCR 신호 전달을 통한 $\alpha\beta$ T 세포 및/또는 혈액-거주 $\gamma\delta$ T 세포와 같은 T 세포의 활성화의 증식 또는 다른 결과를 유도하는 화합물을 언급한다. T 세포 신호 전달 조절인자는 Src-관련된 단백질 티로신 키나제(PTKs), Lck 및 Fyn, 및 70kDa의 제타-쇄(TCR) 연합된 단백질 키나제(ZAP70)의 순차적 활성화에 의해 기능한다. 이들 PTK는 T 세포에 대한 링커 활성화제(LA T)를 포함하는 폴리펩타이드의 인산화를 유도하고, 이는 세포의 신호 조절된 키나제(ERK), c-Jun N-말단 키나제(JNK), 및 활성화된 T-세포의 핵 인자(NFAT)를 통한 다운스트림 자극을 유도한다. 예를 들어, CD28 및 CD45를 통한 동시-자극은 인산화를 증진시킬 수 있고 TCR 신호전달 경로를 증진시킬 수 있다. 따라서, TCR 또는 동시-자극 경로의 일부를 표적화하는 임의의 제제는 T 세포 신호전달을 활성화시킬 수 있다. TCR 경로 효능제는 항체(예를 들어, 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-TCR V δ 1, 항-TCR δ TCS-1, 항-TCR PAN $\gamma\delta$, 및 항-CD3), 렉틴(예를 들어, 식물 렉틴, 예를 들어, 콘카나발린 A, 파세올루스 불가리스(*Phaseolus vulgaris*) (PHA-P), 피토라카 아메리카나(*Phytolacca Americana*), 트리티쿰 불가리스(*Triticum vulgaris*), 렌스 콜리나리스(*Lens culinaris*), 글라이신 맥스(*Glycine max*), 맥키아 아무렌시스(*Maackia amurensis*), 피숨 사티븀(*Pisum sativum*), 및 삼부쿠스 니그라(*Sambucus nigra*)로부터 기원하는 렉틴, 합성 포스포항원(예를 들어, BrHPP(브로모하이드린 피로포스페이트), 2M3B1PP(2-메틸-3-부테닐-1-피로포스페이트), HMBPP((E)-4-하이드록시-3-메틸-부트-2-에닐 피로포스페이트), 또는 IPP(이소펜테닐 피로포스페이트)), 및 N-비스포스포네이트(예를 들어, 졸레드로네이트)를 포함한다. TCR 경로 효능제는 공동-수용체 효능제를 포함하고, 이는 항체(예를 들어, 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-CD2, 항-CD6, 항-CD9, 항-CD28, 항-CD43, 항-CD94, 항-CD160, 항-SLAM, 항-NKGD2, 항-2B4, 항-HLA-A, 항-HLA-b, 항-HLA-C, 및 항-ICAM-3) 및 단백질(예를 들어, 제조합 단백질, 예를 들어, 제조합 인간 단백질, 예를 들어, CD7L, CD26, CD27L, CD30L, CD40L, OX40L, 4-1BBL, ICAM-1, 피브로넥틴, 하이드로코르티손, 및 이의 변이체, 예를 들어, Fc-융합 단백질, 예를 들어, CD27L-Fc)를 포함한다. TCR 경로 효능제는 가용성이거나 막 결합된 것일 수 있고 예를 들어, MHC 또는 HLA 복합체에 대한 경우에서와 같이 인공 항원 제공 세포(aAPC)와 같은 세포 상에 제공될 수 있다. T 세포 신호전달을 활성화시키기 위해 적합한 aAPC는 당업계에 공지되어 있다. TCR 경로 효능제를 외인성으로 첨가하는 것에 의해 T 세포를 활성화시키는 적합한 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고 문헌(참조: Deniger, et al. (Deniger, et al. *Frontiers in Immunology*. 2014. 5(636):1-10)의 도 1에 요약되어 있다.

[0070] "외인성 TCR 경로 효능제"는 비-조혈 조직 또는 이의 공여자로부터 기원하지 않는 TCR 경로 효능제를 언급한다(즉, 이들은 외인성으로 첨가된다). 따라서, 발명의 일부 구현예에서, TCR 경로 효능제는 비-조혈 조직으로부터의 잔류물(예를 들어, 가용성 피브로넥틴 또는 세포-결합된 ICAM-1)로서 배양물 중에 존재할 수 있는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 잔류 TCR 경로 효능제는 무시할만한 농도를 갖고 있고 실질적으로 T 세포를 활성화시키지 않는다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같은 "합성 스캐폴드", "스캐폴드", 및 "격자판"은 상호교환적으로 사용되고 세포 성장을 지지하기 위해 적합한 비-고유 3차원 구조물을 언급한다. 외식편은 합성 스캐폴드에 부착되어, 외식편으로부터 스캐폴드 상으로의 림프구 이동을 촉진시킬 수 있다. 합성 스캐폴드는 천연 및/또는 합성 물질 예를 들어, 중합체(예를 들어, 천연 또는 합성 중합체, 예를 들어, 폴리 비닐 피롤리돈, 폴리메틸메타크릴레이트, 메틸 셀룰로스, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄), 세라믹(예를 들어, 인산삼칼슘, 칼슘 알루미늄하이드록시옥사이드, 또는 금속(탄탈륨, 티타늄, 백금, 및 백금, 니오븀, 하프늄, 텅스텐 및 이들의 합금 조합과 동일한 원소 그룹 내 금속)으로부터 작제될 수 있다. 생물학적 인자들(예를 들어, 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 I 또는 콜라겐 II), 피브로넥틴, 라미닌, 인테그린, 혈관형성 인자, 항-염증 인자, 글리코사미노글리칸, 비트로젠, 항체 및 이의 단편, 사이토킨(예를 들어, IL-2 또는 IL-15, 및 이들의 조합체)은 당업계에 공지된 방법에 따라, 스캐폴드 표면 상에 코팅될 수 있거나 스캐폴드 물질 내에 캡슐화되어 세포 접착, 이동, 생존 또는 증식을 증진시킬 수 있다. 이러한 방법 및 다른 방법을 사용하여 다수의 다른 비-조혈 조직 유형, 예를 들어, 소화관, 전립선 및 유방으로부터 림프구를 분리할 수 있다. 본 발명의 일부로서 사용하기 위해 고려된 예시적 합성 스캐폴드는 클락 프로토콜에 사용된 것을 포함한다.

[0072] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "분리", "분리된", 또는 "분리한다"는 특유의 세포 집단 간의 물리적 접촉을 절단하거나 방지하는 작용(예를 들어, 비-조혈 세포로부터 조혈 세포(예를 들어, 림프구)의 분리)을 언급한다. 분리는 예를 들어, 강압적으로 세포의 혼합 집단을 피펫팅하여 막 간 연합을 절단함에 의해, 또는 예를 들어, 조직 매트릭스로부터 세포 집단의 "크롤-아웃(crawl-out)"을 유도함에 의해, 예를 들어, 문헌(참조: Carrasco A. et al *Journal of Immunological Methods* 2013. 389(1-2):29-37)에 기재된 바와 같이 케모킨 또는 사이토킨과

함께 배양함에 의해 수행될 수 있다. 분리는 트랜스웰 배양 시스템을 사용하거나 특유의 세포 집단 간의 물리적 접촉을 방지하는 유사 배양 방법에 의해 배양 동안에 유지될 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 바와 같은 "γ δ 세포의 분리된 집단"은 고유한 이의 비-조혈 조직으로부터 분리되어 비-조혈 세포와 실질적으로 접촉되지 않는 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 분리 프로토콜에 따라) γ δ 세포를 포함하는 조혈 세포의 집단을 언급한다. 또한, "Vδ 1 세포의 분리된 집단"은 고유한 이의 비-조혈 조직으로부터 분리되어 비-조혈 세포와 실질적으로 접촉되지 않는 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 분리 프로토콜에 따라) Vδ 1 세포를 포함하는 조혈 세포의 집단을 언급한다. 따라서, 이들 경우에, 분리는 비-조혈 세포(예를 들어, 기질 세포 및/또는 상피 세포)로부터 조혈 세포(예를 들어, 림프구)의 분리를 언급한다.

[0074] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고 구체적으로 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체를 포함하는), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체), 및 이들이 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같은, "증식 단계"는 특정 γ δ T 세포의 수가 세포 분열에 의해 증가하는 분리 후 일어나는 배양 단계를 언급한다. 세포 분열은 분리 단계 동안에 일어날 수 있고, γ δ T 세포는 기질 세포와 접촉되어 있지만 증식 단계는 분리가 완전해질때까지 개시하지 않는 것으로 이해된다. 따라서, 분리된 세포 집단이 "증식 단계 전" 시점에서 특징 분석되는 경우, 분리 배양 후 및 증식 배양 전 시점을 의미한다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같은, "γ δ 세포의 증식된 집단"은 γ δ 세포의 증식, 즉, 증가된 γ δ 세포 수를 유도하는 조건 및 기간 동안에 배양된 γ δ T 세포를 포함하는 조혈 세포의 집단을 언급한다. 또한, 본원에 사용된 바와 같은 "Vδ 1 T 세포의 증식된 집단"은 Vδ 1 세포의 증식, 즉, 증가된 Vδ 1 세포 수를 유도하는 조건 및 기간 동안에 배양된 Vδ 1 T 세포를 포함하는 조혈 세포의 집단을 언급한다.

[0077] 본원에 사용된 바와 같은, "피더 세포"는 비-조혈 조직-유래된 세포로의 세포-대-세포 표면 접촉을 제공하기 위해 부가되는 임의의 외인성 세포를 언급한다. 피더 세포는 1차 세포(예를 들어, 조직으로부터 유래된)일 수 있거나 세포주로부터 유래될 수 있다. 피더 세포는 생존하거나 조사될 수 있고 종양 세포, 섬유아세포, B 세포, 및 다른 항원 제공 세포를 포함할 수 있다.

[0078] 본원에서의 용어 "마커"는 환자의 샘플 중에 이의 발현 또는 존재가 표준 방법 (또는 본원에 기재된 방법)에 의해 검출될 수 있는 DNA, RNA, 단백질, 탄수화물, 당지질, 또는 세포-기반 분자 마커를 언급한다.

[0079] 관심 대상의 마커를 "발현하는" 세포 또는 세포 집단은 단백질, 또는 이의 단편을 포함하는 단백질 자체를 암호화하는 mRNA가 세포 또는 집단 중에 존재하는 것으로 결정된 것이다. 마커의 발현은 다양한 수단에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 마커의 발현은 세포 상의 마커의 표면 밀도를 언급한다. 예를 들어, 유동 세포측정의 관독으로서 사용된 바와 같은 평균 형광성 강도(MFI)는 세포 집단 상의 마커의 밀도를 나타낸다. 당업자는 MFI 값이 염색 파라미터(예를 들어, 농도, 지속 시간 및 온도) 및 형광색소 조성물에 의존함을 이해할 것이다. 그러나, MFI는 적당한 제어와 관련하여 고려되는 경우 정량적일 수 있다. 예를 들어, 세포 집단은 그 마커에 대한 항체의 MFI가 균등한 조건하에서 염색되는, 세포의 동일한 세포 집단 상에서 적합한 이소형 대조군 항체의 MFI 보다 상당히 높은 경우, 마커를 발현하는 것으로 일컬어질 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 세포 집단은 통상적인 유동 세포측정 분석학적 방법에 따라(예를 들어, 게이트를 이소형 또는 "형광성-마이너스-원"("fluorescence-minus-one") (FMO) 대조군에 따라 게이트를 세팅함에 의해) 양성 및 음성 게이트를 사용한 세포 별 기반으로 마커를 발현하는 것으로 일컬어질 수 있다. 이러한 측정에 의해, 집단은 마커에 대해 양성인 것으로 검출된 세포가 배경 보다 상당히 높은 경우(예를 들어, 이소형 대조군에 대해 게이팅함에 의해) 마커를 "발현하는" 것으로 일컬어질 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 바와 같이, 집단의 발현이 양성 세포의 퍼센트로서 기재되고 그 퍼센트가 참조 집단의 양성 세포의 상응하는 퍼센트와 비교되는 경우, 퍼센트 차이는 각각의 집단의 모 집단의 퍼센트이다. 예를 들어, 마커가 집단 A의 세포의 10% 상에서 발현되고, 동일한 마커가 집단 B의 세포의 1% 상에서 발현되는 경우, 집단 A는 집단 B 보다 마커-양성 세포의 9% 초과 빈도(즉, 10%-1%, 10%÷1%가 아님)를 갖는 것으로 일컬어진다. 빈도를 모 집단 중 세포의 수와 곱하는 경우, 세포의 절대 수에서의 차이가 계산된다. 상기 소정의 예에서, 집단 A 중 100개 세포가 있고 집단 B 중에 10개 세포가 있는 경우, 집단 A는 집단 B에 비해 100배의 세포의 수를 갖고, 즉, (10% x 100) ÷ (1% x 10)이다.

[0081] 마커의 발현 수준은 핵산 발현 수준(예를 들어, DNA 발현 수준 또는 RNA 발현 수준, 예를 들어, mRNA 발현 수준)일 수 있다. 핵산 발현 수준을 결정하는 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 발

현 수준은 qPCR, rtPCR, RNA-seq, 멀티플렉스 qPCR 또는 RT-qPCR, 마이크로어레이 분석, 유전자 발현의 연속 분석(SAGE), MassARRAY 기술, 동일계 하이브리드화(예를 들어, FISH), 또는 이들의 조합을 사용하여 결정된다.

- [0082] 본원에 사용된 바와 같이, 세포의 "참조 집단"은 관심 세포의 표현형이 측정되는 것에 반하여 관심 세포에 상응하는 세포 집단을 언급한다. 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ 세포의 분리된 집단 상의 마커의 발현 수준은 상이한 조건(예를 들어, 상당한 TCR 활성화의 존재함, 외인성 TCR 활성화제(예를 들어, 항-CD3)의 존재하에 또는 기질 세포(예를 들어, 섬유아세포)와의 상당한 접촉에서) 하에서 증식된 조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 혈액-거주 $\gamma \delta$ 세포, 예를 들어, 동일한 공여자 또는 상이한 공여자로부터 유래된 혈액-거주 $\gamma \delta$ 세포) 또는 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 상에서 동일한 마커의 발현 수준과 비교할 수 있다. 집단은 또한 보다 초기 상태에서 그 자체와 비교될 수 있다. 예를 들어, 참조 집단은 이의 증식 전에 분리된 세포 집단일 수 있다. 이 경우에, 증식된 집단은 증식 단계 전에 이 자신의 조성물, 즉, 과거 조성물과 비교되고, 이 경우에 참조 집단과 비교한다.
- [0083] "암"은 악성 암 세포의 비정상적 증식을 언급하고 백혈병, 예를 들어, 급성 골수 백혈병(AML), 만성 골수 백혈병(CML), 급성 림프아구성 백혈병(ALL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL), 림프종, 예를 들어, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 다발성 골수종, 및 고형 암, 예를 들어, 육종, 피부암, 흑색종, 방광암, 뇌암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 폐암, 결장직장암, 경부암, 간암, 두경부암, 식도암, 췌장암, 신장암, 부신암, 위암, 고환암, 담낭암 및 담도암, 갑상선암, 흉선암, 골암 및 뇌암을 포함한다.
- [0084] 암 환자 내 암 세포는 개체 내 정상 체세포와는 면역학적으로 구분할 수 있다(예를 들어, 암 종양은 면역원성일 수 있다). 예를 들어, 암 세포는 암 세포에 의해 발현되는 하나 이상의 항원에 대항하여 암 환자에서 전신 면역 반응을 유발할 수 있다. 면역 반응을 유발하는 항원은 종양 항원일 수 있거나 정상 세포에 의해 공유될 수 있다. 암을 갖는 환자는 적어도 하나의 동정가능한 징후, 증상 또는 당업계에 공지된 임상 표준물에 따라 암 진단을 하기에 충분한 검사 결과를 나타낼 수 있다. 그러한 임상 표준물의 예는 의학 텍스트북, 예를 들어, 문헌(참조: Harrison's Principles of Internal Medicine (Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. 18e. New York, NY: McGraw-Hill; 2012))에서 발견될 수 있다. 일부 경우에, 개체에서 암의 진단은 개체로부터 획득된 체액 또는 조직의 샘플 중에서 특정 세포 유형(예를 들어, 암 세포)의 동정을 포함할 수 있다.
- [0085] 본원에 사용된 바와 같은 "고형 종양"은 혈액, 골수 또는 림프계 이외의 신체 조직의 임의의 암이다. 고형 종양은 상피 세포 기원의 것들 및 비-상피 세포 기원의 것들로 추가로 나누어 질 수 있다. 상피 세포 또는 고형 종양의 예는 위장관, 결장, 유방, 전립선, 폐, 콩팥, 간, 췌장, 난소, 두경부, 구강, 위, 십이지장, 소장, 대장, 항문, 담낭, 음순, 비인두, 피부, 자궁, 수컷 생식 기관, 뇨 기관, 방광 및 피부의 종양을 포함한다. 비-상피 기원의 고형 종양은 육종, 뇌 종양, 및 골 종양을 포함한다.
- [0086] 상기된 바와 같은 치료를 위해 적합한 환자, 대상체 또는 개체는 포유동물, 예를 들어, 설치류(예를 들어, 기니아 피그, 햄스터, 래트, 마우스), 무린(예를 들어, 마우스), 개과(예를 들어, 개), 고양이과(예를 들어, 고양이), 말과(예를 들어, 말), 영장류, 시미안(예를 들어, 몽키 또는 에이프(ape)), 몽키(예를 들어, 마모셋 또는 비비(baboon)), 에이프(예를 들어, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄 또는 긴팔원숭이) 또는 인간일 수 있다.
- [0087] 일부 구현예에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다. 다른 바람직한 구현예에서, 비-인간 포유동물, 특히, 인간에서 치료학적 효능을 입증하기 위한 모델로서 통상적으로 사용되는 포유동물(예를 들어, 무린, 영장류, 돼지, 개과, 또는 토끼)이 사용될 수 있다.
- [0088] 본원에 사용된 바와 같은 "치료" (및 "치료한다" 또는 "치료하는"과 같은 문법적 변형어구)는 인간 또는 동물(예를 들어, 수의학적 응용에서)에서든 상관 없이 임상적 증세를 언급하고, 여기서, 일부 목적하는 치료학적 효과가 성취되고, 예를 들어, 병태의 진행 억제 또는 지연이 성취되고, 진행율에서의 감소, 진행율의 중지, 병태의 개선, 병태의 치유 또는 차도(부분적이거나 전체이든 상관 없이), 병태의 하나 이상의 증상 및/또는 징후의 예방, 지연, 약화 또는 정지 또는 치료의 부재하에 예상된 것을 초과하여 대상체 또는 환자의 생존율을 지연시킴을 포함한다.
- [0089] 예방학적 수단(즉, 예방)으로서의 치료가 또한 포함된다. 예를 들어, 암의 존재 또는 재발에 민감하거나 이의 위험에 처한 환자, 대상체 또는 개체는 본원에 기재된 바와 같이 치료될 수 있다. 그러한 치료는 환자, 대상체 또는 개체에서 암의 존재 또는 재발을 예방하거나 지연시킬 수 있다.

- [0090] 특히, 치료는 완전한 암 차단 및/또는 암 전이의 억제를 포함하는, 암 성장을 억제함을 포함할 수 있다. 암 성장은 일반적으로 보다 발육된 형태로 암 내 변화를 지적하는 다수의 지수 중 임의의 하나를 언급한다. 따라서, 암 성장의 억제를 측정하기 위한 지수는 암 세포 생존율에서의 감소, 종양 용적 또는 형태에서의 감소(예를 들어, 컴퓨터 단층촬영술(CT), 초음파 촬영술 또는 다른 이미지화 방법을 사용하여 결정된 바와 같은), 지연된 종양 성장, 종양 혈관계의 파괴, 지연된 과민성 피부 시험에서의 개선된 수행능, 세포용해 T-림프구 활성의 증가 및 종양 특이적 항원 수준에서의 감소를 포함한다. 개체에서 암성 종양 내 면역 억제를 감소시키는 것은 개체가 암 성장, 특히, 대상체에 이미 존재하는 암의 성장에 저항하고/하거나 개체에서 암 성장에 대한 경향을 감소시키는 능력을 개선시킬 수 있다.
- [0091] 일부 구현예에서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 V δ 1 T 세포)는 질환의 발병을 지연시키거나 질환 또는 장애의 진행을 서행시키기 위해 투여된다.
- [0092] 본원에 사용된 바와 같은 "투여하는"은 치료요법(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 입양 T 세포 치료요법) 또는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물, 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 약제학적 조성물)의 용량을 환자에게 투여하는 방법을 의미한다. 본원에 기재된 방법에 사용되는 조성물은 예를 들어, 근육내, 정맥내, 피내로, 경피적으로, 동맥내로, 복막내, 병변내로, 두개내, 관절내, 전립선내로, 흉막내로, 기관내로, 척수내로, 비강내로, 질내로, 직장내로, 국소적으로, 종양내로, 복막으로, 피하로, 결막하로, 소포내로, 점막으로, 심막내로, 제대혈내로, 안내로, 환상내로, 유리체내로(예를 들어, 유리체 내 주사), 점안에 의해, 경구적으로, 국소적으로, 경피적으로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 이식에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 직접적으로 국소화된 관류 입욕 표적 세포에 의해, 카테터에 의해, 세척에 의해, 크랩 내로 또는 지질 조성물로 투여될 수 있다. 본원에 기재된 방법에 사용되는 조성물은 또한 전신으로 또는 국소적으로 투여될 수 있다. 투여 방법은 다양한 인자(예를 들어, 투여되는 치료학적 제제 또는 조성물 및 치료 중인 병태, 질환 또는 장애의 중증도)에 의존하여 다양할 수 있다.
- [0093] "치료학적 유효량"은 포유동물 내 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하기 위한 치료제의 양을 언급한다. 암의 경우에, 치료학적 유효량의 치료학적 제제(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T)는 암 세포의 수를 감소시킬 수 있고; 1차 종양 크기를 감소시키고; 암 세포의 말초 기관으로의 암세포 침윤을 억제(예를 들어, 어느 정도로 서행 및 바람직하게 중지)하고; 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도로 성행 및 바람직하게 중지)하고; 종양 성장을 어느 정도로 억제하고/하거나 장애와 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도로 경감시킬 수 있다. 약물이 기존의 암 세포의 성장을 예방하고/하거나 사멸시킬 수 있는 정도로, 이것은 세포억제 및/또는 세포독성일 수 있다. 암 치료요법을 위해, 생체내(in vivo) 효능은 예를 들어, 생존 지속 기간, 질환 진행 시간(TTP), 반응율(예를 들어, 완전한 반응(CR) 및 부분 반응(PR)), 반응의 지속 기간 및/또는 삶의 질을 평가함에 의해 측정될 수 있다.
- [0094] 용어 "동시에"는 투여의 적어도 일부가 시간 내 중복하는, 2개의 이상의 치료학적 제제의 투여를 언급하기 위해 사용된다. 따라서, 동시 투여는 하나 이상의 제제(들)의 투여가 하나 이상의 다른 제제(들)의 투여를 중단시킨 후 계속되는 경우의 투여 용법을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및 IL-2는 동시 투여될 수 있다.
- [0095] 용어 "약제학적 조성물"은 여기에 함유된 하나 이상의 활성 성분들의 생물학적 활성이 유효하도록 하기 위한 형태로 있고 제형이 투여되는 환자에게 허용가능하지 않게 독성인 추가의 성분들을 함유하지 않는 제제를 언급한다.
- [0096] **III. $\gamma \delta$ T 세포를 분리하고 증식시키는 방법**
- [0097] 본 발명은 환자로부터 기원할 수 있거나 이로부터 제거된 임의의 인간 또는 비-인간 동물 비-조혈 조직으로부터 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 분리하고 증식시키는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 이로부터 $\gamma \delta$ T 세포가 유래하고 증식되는 비-조혈 조직은 당업계에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있는 피부(예를 들어, 인간 피부)이다. 일부 구현예에서, 피부는 펀치 생검에 의해 수득된다. 대안적으로, 본원에 제공된 $\gamma \delta$ T 세포의 분리 및 증식 방법은 위장관(예를 들어, 결장), 유선, 폐, 전립선, 간, 비장 및 췌장에 적용될 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 또한 인간 암 조직, 예를 들어, 유방 및 전립선의 종양에 거주할 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 인간 암 조직(예를 들어, 고형 종양 조직)으로부터 기원할 수 있다. 다른 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 인간 암 조직 이외의 비-조혈 조직(예를 들어, 상당수의 종양 세포가 부재인 조직)으로부터 기원할 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 인간

또는 인접한 암 조직으로부터 분리된 피부(예를 들어, 건강한 피부) 영역으로부터 기원할 수 있다.

[0098] 혈액 내 우성인 $\gamma \delta$ T 세포는 주로 V δ 2 T 세포이고, 비-조혈 조직 내 우성인 $\gamma \delta$ T 세포는 주로 V δ 1 T 세포여서 V δ 1 T 세포는 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 약 70 내지 80%를 차지한다. 그러나, 일부 V δ 2 T 세포는 또한 비-조혈 조직, 예를 들어, 소화관에서 발견되고, 여기서, 이들은 $\gamma \delta$ T 세포의 약 10 내지 20%를 차지할 수 있다(도 6). 비-조혈 조직에 거주하는 일부 $\gamma \delta$ T 세포는 V δ 1 또는 V δ 2 TCR을 발현하지 않고 본원 발명자는 이들을 이중 음성(DN) $\gamma \delta$ T 세포로 명명하였다. 이들 DN $\gamma \delta$ T 세포는 V δ 5-발현하는 T 세포는 소수이고 대부분 V δ 3-발현할 가능성이 있다. 따라서, 비-조혈 조직에 통상적으로 거주하고 본 발명의 방법에 의해 증식되는 $\gamma \delta$ T 세포는 바람직하게 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포이고, 보다 작은 양의 DN $\gamma \delta$ T 세포를 포함한다.

[0099] 당업자는 특정 비-조혈 조직이 고도로 혈관화될 수 있고 실제로 비-조혈 조직 샘플은 주변 혈액 거주 세포로의 오염에 취약할 수 있음을 인지할 것이다. 그러한 오염을 회피하거나 최소화하기 위해, 당업계에 공지된 방법에 따라, 예를 들어, 혈액-거주 세포를 제거하기 위해 적합한 완충액 중에서 조직을 완전히 세척함을 통해, 단리 및 증식 배양물로부터 말초 혈액이 확실히 제거되도록 주의할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 폐 조직으로부터 단리된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 기관지폐포 세척에 의해 획득되지 않는다.

[0100] 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 비-조혈 조직으로부터의 분리

[0101] 일부 구현예에서, 임계적 단계는 예를 들어, 수일 또는 수주 배양 후 T 세포가 획득된 조직의 비-조혈 세포(예를 들어, 기질 세포, 특히 섬유아세포)로부터 비-조혈 조직-거주 T 세포(예를 들어, $\alpha \beta$ 세포, 천연 킬러(NK) 세포, B 세포, 및 $\gamma \delta$ 2 및 비- $\gamma \delta$ 2 T 세포를 포함할 수 있는 혼합 림프구 집단 내)를 의도적으로 분리하는 단계이다. 이것은 비-조혈 조직-유래된 V δ 1 T 세포 및 DN $\gamma \delta$ T 세포의 후속 수일 및 수주 간에 우선적이고 신속한 증식을 가능하게 한다.

[0102] 본 발명은 비-조혈 조직(예를 들어, 피부, 예를 들어, 펀치 생검에 의해 획득된 피부)으로부터 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 분리를 포함하는 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 비-조혈 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포의 분리는 비-조혈 조직으로부터 세포 이탈을 촉진시키도록 구성된 합성 스캐폴드 상에서 $\gamma \delta$ T 세포 및 비-조혈 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 고정 조직으로부터 림프구 분리를 위해 적합한 임의의 스캐폴드가 사용될 수 있다. 합성 스캐폴드는 천연 및/또는 합성 물질 예를 들어, 중합체(예를 들어, 천연 또는 합성 중합체, 예를 들어, 폴리 비닐 피롤리돈, 폴리메틸메타크릴레이트, 메틸 셀룰로스, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄), 세라믹(예를 들어, 인산삼칼슘, 칼슘 알루미늄하이드록시옥사이드), 또는 금속(탄탈륨, 티타늄, 백금, 및 백금, 니오븀, 하프늄, 텅스텐 및 이들의 합금 조합과 동일한 원소 그룹 내 금속)으로부터 작제될 수 있다. 생물학적 인자들(예를 들어, 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 I 또는 콜라겐 II), 피브로넥틴, 라미닌, 인테그린, 혈관형성 인자, 항-염증 인자, 글리코사미노글리칸, 비트로젠, 항체 및 이의 단편, 사이토킨(예를 들어, IL-2 또는 IL-15, 및 이들의 조합체), 케모킨 및/또는 화학 유인제(chemoattractant)는 당업계에 공지된 방법에 따라, 스캐폴드 표면 상에 코팅될 수 있거나 스캐폴드 물질 내에 캡슐화되어 세포 접착, 이동, 생존 또는 증식을 증진시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 합성 스캐폴드는 클락 프로토콜에 기재된 바와 같이 셀폼(Cellfoam) 스캐폴드이다. 대안적으로, 다른 방법을 사용하여 다수의 다른 비-조혈 조직 유형으로부터, 예를 들어, 세포의 매트릭스 성분(예를 들어, 콜라게나제)의 효소 기반 분해에 의해 림프구를 단리할 수 있다.

[0103] 분리 배양은 1시간(예를 들어, 단순한 분해의 경우에) 내지 최대 42일(스캐폴드 배양의 경우에)의 임의의 지속 기간 동안 수행될 수 있다. 분리 단계가 스캐폴드 상에서 수행되는 경우에, 배양은 적어도 5일(예를 들어, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 12일, 적어도 14일, 적어도 16일, 적어도 18일, 적어도 20일, 적어도 21일, 적어도 24일, 적어도 28일, 적어도 30일, 적어도 35일, 또는 적어도 40일, 예를 들어, 7 내지 14일, 14 내지 21일 또는 21일 내지 35일, 예를 들어, 약 14일 또는 약 21일) 동안 수행될 수 있다.

[0104] $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 분리 동안에, 이로부터 유래된 비-조혈 조직 및 세포는 생물학적 인자들의 존재하에 조직으로부터의 이탈을 증진시키거나 하나 이상의 세포의 서브집단의 생존능을 촉진시키기 위해 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리 배양물은 IL-2, 예를 들어, 적어도 10 IU/mL의 농도(예를 들어, 10 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 20 IU/mL 내지 800 IU/mL, 25 IU/mL 내지 750 IU/mL, 30 IU/mL 내지 700 IU/mL, 40 IU/mL 내지 600 IU/mL, 50 IU/mL 내지 500 IU/mL, 75 IU/mL 내지 250 IU/mL, 또는 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 예를 들어, 10 IU/mL 내지

20 IU/mL, 20 IU/mL 내지 30 IU/mL, 30 IU/mL 내지 40 IU/mL, 40 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 75 IU/mL, 75 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 150 IU/mL, 150 IU/mL 내지 200 IU/mL, 200 IU/mL 내지 500 IU/mL, 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL)의 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 분리 배양물은 약 100 IU/mL의 농도에서 IL-2를 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 분리 배양은 IL-15, 예를 들어, 적어도 0.1 ng/mL의 농도(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 5 ng/mL 내지 800 ng/mL, 10 ng/mL 내지 750 ng/mL, 20 ng/mL 내지 500 ng/mL, 50 ng/mL 내지 400 ng/mL, 또는 100 ng/mL 내지 250 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5.0 ng/mL, 5.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 50 ng/mL, 50 ng/mL 내지 100 ng/mL, 100 ng/mL 내지 200 ng/mL, 200 ng/mL 내지 500 ng/mL, 또는 500 ng/mL 내지 1,000 ng/mL)의 IL-15를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 분리 배양물은 약 20 ng/mL의 농도에서 IL-15를 포함한다.

[0105] 일부 구현예에서, 비-조혈 조직으로부터 $\gamma \delta$ T 세포의 분리는 각각 상기 열거된 임의의 농도에서 IL-2 및 IL-15 둘 다 존재하의 배양물을 포함한다. 일부 경우에, IL-2의 농도는 약 100 IU/mL이고, IL-15의 농도는 20 ng/mL이다.

[0106] $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)는 IL-6, IL-23, 및 IL-1 β 의 부재하에, 또는 이들 사이토킨의 낮은 농도(예를 들어, 20 ng/mL 미만)의 존재하에 배양될 수 있고, 사이토킨의 이러한 조합의 첨가는 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식을 감소시키는 작용할 수 있다.

[0107] 비-조혈 조직(예를 들어, 피부)로부터의 분리 시, $\gamma \delta$ T 세포는 일반적으로 예를 들어, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포 및 천연 킬러(NK) 세포를 함유하는 림프구의 보다 큰 집단의 일부이다. 일부 구현예에서, 림프구의 분리된 집단 1%-10%는 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포이다(예를 들어, 피부-유래된 림프구의 분리된 집단의 1-10%는 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포이다). 대부분의 경우에, $\gamma \delta$ T 세포 집단(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 집단)은 V δ 1 T 세포의 대형 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구(예를 들어, 피부-유래된 림프구)의 분리된 림프구의 1-10%는 증식 전 V δ 1 T 세포이다(예를 들어, V δ 1 T 세포는 증식 전 분리된 집단 $\gamma \delta$ T 세포의 집단의 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과를 나타낼 수 있다). 일부 경우에, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 10% 미만은 증식 전 V δ 2 T 세포이다(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 10% 미만은 증식 전 V δ 2 T 세포이다).

[0108] 비-V δ 1 T 세포 또는 비-DN T 세포, 예를 들어, V δ 2 T 세포, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포, 또는 NK 세포는 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된(예를 들어, 증식 전, 동안에 또는 이후) 집단으로부터 제거될 수 있다.

[0109] 증식 전, 분리된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 피부로부터 분리된 V δ 1 T 세포)는 상응하는 조혈 조직-유래된 세포(예를 들어, 혈액-유래된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 혈액-유래된 V δ 2 T 세포)으로부터 특유의 표현형을 갖는다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단은 참조 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단 또는 조혈 조직-유래된 세포(예를 들어, 혈액-유래된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 혈액-유래된 V δ 2 T 세포)의 상응하는 집단 보다 높은 수준의 CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, 또는 CD103을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CCR3⁺ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CCR4⁺ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CCR7⁺ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CCR8⁺ 세포; 및/또는 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CD103⁺ 세포를 포함한다. $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단은 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상 또는 모든 6개의 CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, 또는 CD103을 발현할 수 있다.

[0110] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 피부-유래된 V δ 1 T 세포)의 분리된 집단은 참조 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단 또는 조혈 조직-유래된 세포(예를 들어, 혈액-유래된 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 혈액-유래된 V δ 2 T 세포)의 상응하는 집단 보다 높은 수준의 NKG2D, CD56, CD69, 및/또는 TIM3을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 NKG2D⁺ 세포; 적어도 5%, 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CD56⁺ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 CD69⁺ 세포; 및/또는 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 TIM3⁺ 세포를 포함한다. $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단은 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 모든 5개의 NKGD2, CD56, CD69, 및/또는 TIM3을 발현할 수 있다.

[0111]

비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 피부-유래된 V δ 1 T 세포)의 분리된 집단은 또한 기능을 특징으로 할 수 있다. 당업계에서 공지되고 실시예 3에서 설명된 기능적 검정은 본 발명의 임의의 비-조혈 조직-유래된 세포(예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 피부-유래된 V δ 1 T 세포의 분리된 집단, 또는 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 피부-유래된 V δ 1 T 세포의 증식된 집단) 및 참조 세포(예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단 또는 조혈 조직-유래된 세포, 예를 들어, 혈액-유래된 $\gamma\delta$ T 세포, 예를 들어, 혈액-유래된 V δ 2 T 세포의 상응하는 집단) 간의 기능적 차이를 결정하기 위해 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단(예를 들어, 상당한 TCR 경로 활성화와 접촉되지 않는 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단)은 참조 집단(예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 항-CD3 활성화된 집단)보다 높은 수준의 IL-13을 분비한다. 예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 분리된 집단은 세포의 참조 집단(예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 항-CD3 활성화된 집단)에 비해 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 이상의 농도의 IL-13을 분비할 수 있다. 유사하게, IL-13을 분비하는 분리된 집단에서 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 수 또는 빈도는 세포의 참조 집단(예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 항-CD3 활성화된 집단)에 비해 보다 높을 수 있다. 예를 들어, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단 내 IL-13 분비 세포의 빈도(예를 들어, V δ 1 T 세포의 분리된 집단 내 IL-13 분비 세포의 빈도)는 세포의 참조 집단(비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 항-CD3 활성화된 집단) 보다 클 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단 내 IL-13 분비 세포의 빈도(예를 들어, 본 발명의 DN T 세포 또는 V δ 1 T 세포의 분리된 집단 내 IL-13 분비 세포의 빈도)는 세포의 참조 집단(비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 TCR 활성화된 집단, 예를 들어, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 항-CD3 활성화된 집단) 보다 적어도 1% 초과, 적어도 2% 초과, 적어도 3% 초과, 적어도 4% 초과, 적어도 5% 초과, 적어도 6% 초과, 적어도 7% 초과, 적어도 8% 초과, 적어도 9% 초과, 적어도 10% 초과, 적어도 20% 초과, 적어도 30% 초과, 적어도 40% 초과, 적어도 50% 초과, 적어도 60% 초과, 적어도 70% 초과, 적어도 80% 초과, 적어도 90% 초과 또는 최대 100% 초과한다.

[0112]

비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 증식

[0113]

본 발명은 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 증식시키는 방법을 특징으로 한다. 이들 방법은 시험관내 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 상기 기술된 방법에 따라 비-조혈 조직으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포 집단으로부터 증식된다. 일반적으로, 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 기질 세포(예를 들어, 피부 섬유아세포)와의 물리적 접촉의 제거시 자발적으로 증식할 수 있다. 따라서, 상기 기술된 스캐폴드-기반 배양 방법을 사용하여 그러한 분리를 유도하여 증식을 유발하기 위한 $\gamma\delta$ T 세포의 탈-억제를 유도한다. 따라서, 일부 구현예에서, 증식 단계 동안에 어떠한 상당한 TCR 경로 활성화도 존재하지 않는다(예를 들어, 어떠한 외인성 TCR 경로 활성화제가 배양물에 포함되어 있지 않다). 추가로, 본 발명은 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 제공하고, 여기서, 방법은 피더 세포, 종양 세포 및/또는 항원-제공 세포와의 접촉을 포함하지 않는다.

[0114]

본원 발명자들은 효율적인 $\gamma\delta$ T 세포 증식을 지지하기 위한 생물학적 인자의 유효 콕테일의 존재하에 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포를 배양하는 것을 포함하는 증식 프로토콜을 개발하였다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 비-조혈 조직으로부터 수득된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단(예를 들어, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단, 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 분리된 집단)을 제공하고 IL-2, IL-4, IL-15, 및/또는 IL-21의 존재하에 $\gamma\delta$ T 세포를 배양함에 의해 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키는 방법을 제공한다. 이들 사이토킨 또는 이의 유사체는 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 유효량으로 일정 지속 기간(예를 들어, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적

어도 21일, 적어도 28일 또는 그 이상, 예를 들어, 5일 내지 40일, 7일 내지 35일, 4일 내지 28일, 또는 약 21일) 동안 세포와 함께 배양될 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-2 유효량은 1 IU/mL 내지 2,000 IU/mL(예를 들어, 5 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 10 IU/mL 내지 500 IU/mL, 20 IU/mL 내지 400 IU/mL, 50 IU/mL 내지 250 IU/mL, 또는 약 100 IU/mL, 예를 들어, 5 IU/mL 내지 10 IU/mL, 10 IU/mL 내지 20 IU/mL, 20 IU/mL 내지 30 IU/mL, 30 IU/mL 내지 40 IU/mL, 40 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 60 IU/mL, 60 IU/mL 내지 70 IU/mL, 70 IU/mL 내지 80 IU/mL, 80 IU/mL 내지 90 IU/mL, 90 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 120 IU/mL, 120 IU/mL 내지 140 IU/mL, 140 IU/mL 내지 150 IU/mL, 150 IU/mL 내지 175 IU/mL, 175 IU/mL 내지 200 IU/mL, 200 IU/mL 내지 300 IU/mL, 300 IU/mL 내지 400 IU/mL, 400 IU/mL 내지 500 IU/mL, 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 1,000 IU/mL 내지 1,500 IU/mL, 1,500 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 또는 그 초과)이다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-2의 유효량은 약 100 IU/mL이다.

[0116] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-4의 유효량은 적어도 0.1 ng/mL(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 5 ng/mL 내지 800 ng/mL, 10 ng/mL 내지 750 ng/mL, 20 ng/mL 내지 500 ng/mL, 50 ng/mL 내지 400 ng/mL, 또는 100 ng/mL 내지 250 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5.0 ng/mL, 5.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 50 ng/mL, 50 ng/mL 내지 100 ng/mL, 100 ng/mL 내지 200 ng/mL, 200 ng/mL 내지 500 ng/mL, 또는 500 ng/mL 내지 1,000 ng/mL)이다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-4의 유효량은 약 5 ng/mL이다.

[0117] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-15의 유효량은 적어도 0.1 ng/mL(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 5 ng/mL 내지 800 ng/mL, 10 ng/mL 내지 750 ng/mL, 20 ng/mL 내지 500 ng/mL, 50 ng/mL 내지 400 ng/mL, 또는 100 ng/mL 내지 250 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5.0 ng/mL, 5.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 50 ng/mL, 50 ng/mL 내지 100 ng/mL, 100 ng/mL 내지 200 ng/mL, 200 ng/mL 내지 500 ng/mL, 또는 500 ng/mL 내지 1,000 ng/mL)이다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-15의 유효량은 약 10 ng/mL이다.

[0118] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-21의 유효량은 적어도 0.1 ng/mL(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 5 ng/mL 내지 800 ng/mL, 10 ng/mL 내지 750 ng/mL, 20 ng/mL 내지 500 ng/mL, 50 ng/mL 내지 400 ng/mL, 또는 100 ng/mL 내지 250 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5.0 ng/mL, 5.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 50 ng/mL, 50 ng/mL 내지 100 ng/mL, 100 ng/mL 내지 200 ng/mL, 200 ng/mL 내지 500 ng/mL, 또는 500 ng/mL 내지 1,000 ng/mL)이다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-21의 유효량은 약 10 ng/mL이다. 다른 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위한 IL-21의 유효량은 약 10 ng/mL이다.

[0119] 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 증식 배양에서 다른 인자의 치환 또는 부가가 또한 본원에 제공된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , 인간 혈소판 용해물(HPL), 및 기질 세포-유래된 인자-1(SDF-1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 임의의 하나 이상의 인자들은 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21 중 임의의 하나에 추가로 또는 이를 대신하여 포함된다. 이들 인자들 각각에 대해 적합한 농도는 실시예 3의 표 2에서 제공된다.

[0120] $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 생성하기 위해 요구되는 상기 사이토킨 각각의 양이 하나 이상의 다른 사이토킨의 농도에 의존할 것으로 이해된다. 예를 들어, IL-2의 농도가 증가되거나 감소되는 경우, 이에 따라서 IL-15의 농도는 각각 감소되거나 증가될 수 있다. 상기 주지된 바와 같이, 증식된 집단을 생성하기 위한 유효량은 본원에서 세포 증식에 대한 모든 인자들의 혼성 효과를 언급한다.

[0121] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포는 인자들 각각에 동시에 노출된다(예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 적어도 5일 동안 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21에 동시에 노출된다). 다른 경우에, $\gamma \delta$ T 세포는 다른 인자와의 배양 전에 특정 인자들에 노출된다. 예를 들어, 증식 배양물에 증식 기간에 걸쳐 추가의 인자들이 점진적으로 공급될 수

있거나, 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포는 하나의 인자 또는 인자들 그룹의 배양물로부터 또 다른 배양물로 전달될 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포는 수시간의 기간(예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 또는 21 시간) 내지 약 35일(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 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, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35일) 동안 배양 중에서 증식된다. 하나의 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포는 14 내지 21일의 기간 동안 증식된다. 따라서, 분리 배양 기간(예를 들어, 1 내지 40일, 예를 들어, 14 내지 21일)을 포함하여, 일부 구현예에서 분리 및 증식 단계는 28 내지 56일, 또는 약 41일 동안 지속할 수 있다.

[0123] 증식 방법은 참조 집단 보다 수적으로 보다 큰 $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 단계 전의 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단 보다 수적으로 보다 크다(예를 들어, 증식 단계 전에 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 수적으로 적어도 2배, 수적으로 적어도 3배, 수적으로 적어도 4배, 수적으로 적어도 5배, 수적으로 적어도 6배, 수적으로 적어도 7배, 수적으로 적어도 8배, 수적으로 적어도 9배, 수적으로 적어도 10배, 수적으로 적어도 15배, 수적으로 적어도 20배, 수적으로 적어도 25배, 수적으로 적어도 30배, 수적으로 적어도 35배, 수적으로 적어도 40배, 수적으로 적어도 50배, 수적으로 적어도 60배, 수적으로 적어도 70배, 수적으로 적어도 80배, 수적으로 적어도 90배, 수적으로 적어도 100배, 수적으로 적어도 200배, 수적으로 적어도 300배, 수적으로 적어도 400배, 수적으로 적어도 500배, 수적으로 적어도 600배, 수적으로 적어도 700배, 수적으로 적어도 800배, 수적으로 적어도 900배, 수적으로 적어도 1,000배, 수적으로 적어도 5,000배, 수적으로 적어도 10,000배, 또는 그 이상).

[0124] 따라서, 본 발명은 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 대형 집단을 고속으로(예를 들어, 기질 세포 접촉 및/또는 TCR 자극을 제거함에 의해 또는 유효량의 인자들의 존재하에 배양함에 의해) 생성하는 수단을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 증식 단계는 하기의 수학적식에 의해 주어지는 낮은 집단 배가 시간에서 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시킨다:

$$\text{배가 시간} = \frac{\text{지속 기간} \cdot \log(2)}{\log(\text{최종 농도}) - \log(\text{초기 농도})}$$

[0125]

[0126] 본원에서, 예를 들어, 하기 실시예 3에 제공된 정보에 따라, 당업자는 본 발명이 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 5일 미만(예를 들어, 4.5일 미만, 4.0일 미만, 3.9일 미만, 3.8일 미만, 3.7일 미만, 3.6일 미만, 3.5일 미만, 3.4일 미만, 3.3일 미만, 3.2일 미만, 3.1일 미만, 3.0일 미만, 2.9일 미만, 2.8일 미만, 2.7일 미만, 2.6일 미만, 2.5일 미만, 2.4일 미만, 2.3일 미만, 2.2일 미만, 2.1일 미만, 2.0일 미만, 46시간 미만, 42시간 미만, 38시간 미만, 35시간 미만, 32 시간 미만)의 집단 배가 시간에서 증식시키는 방법을 제공할 수 있다.

[0127] 일부 구현예에서, 배양 7일 이내에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단(예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 증식된 집단)은 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 10배의 $\gamma\delta$ T 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 또는 적어도 8,000배의 $\gamma\delta$ T 세포의 수)를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 14일 이내에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단(예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 증식된 집단)은 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 20배의 $\gamma\delta$ T 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배 또는 적어도 10,000배의 $\gamma\delta$ T 세포 수)를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 21일 이내에, $\gamma\delta$ T 세포의 증식된 집단(예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 증식된 집단)은 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 50배의 $\gamma\delta$ T 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비

해 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 또는 적어도 10,000배의 $\gamma \delta$ T 세포의 수)를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 28일 이내에, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단(예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 증식된 집단)은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 100배의 $\gamma \delta$ T 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 110배, 적어도 120배, 적어도 130배, 적어도 140배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 적어도 10,000배, 적어도 12,000배, 또는 적어도 15,000배의 $\gamma \delta$ T 세포의 수)를 포함한다.

[0128] 본원에 제공된 방법에 의해 증식된 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)는 항-종양 효능을 위해 매우 적합한 표현형을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 V δ 1 T 세포)의 증식된 집단은 참조 집단(예를 들어, 증식 단계 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단) 보다 CD27의 보다 큰 평균 발현을 갖는다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 2배인 CD27의 평균 발현(예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 5,000배, 적어도 10,000배, 적어도 20,000배 또는 그 이상)을 갖는다.

[0129] $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단의 특유의 부분은 CD27을 상향조절할 수 있고, 또 다른 부분은 CD27^{낮은} 또는 CD27⁻이다. 이 경우에, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단 내 CD27⁺ 세포의 빈도는 보다 클 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ 세포의 적어도 5% 큰 빈도(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ 세포보다 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 큰 빈도)를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단 내 CD27⁺ 세포의 수는 증가될 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 2배의 CD27⁺ 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 큰 CD27⁺ 빈도)를 가질 수 있다.

[0130] 본원에 제공된 바와 같은 증식 방법은 일부 구현예에서 참조 집단(예를 들어, 증식 단계 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단)에 비해 TIGIT이 낮은 발현을 갖는 비-조혈 조직-유래된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단을 생성한다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단(예를 들어, 증식 단계 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단)보다, TIGIT의 보다 낮은 평균 발현을 갖는다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단 보다 적어도 10% 적은(예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단 보다 적어도 20% 적은, 적어도 30% 적은, 적어도 40% 적은, 적어도 50% 적은, 적어도 60% 적은, 적어도 70% 적은, 적어도 80% 적은, 적어도 90% 적은 또는 최대 100% 적은) TIGIT의 평균 발현을 갖는다.

[0131] $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단의 특유의 부분은 TIGIT, 예를 들어, 고수준의 TIGIT를 발현할 수 있고, 또 다른 부분은 TIGIT^{낮은} 또는 TIGIT⁻이다. 이 경우에, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단 내 TIGIT⁺ 세포의 빈도는 보다 낮을 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 TIGIT⁺ 세포의 적어도 5% 낮은 빈도(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 TIGIT⁺ 세포

보다 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 낮은 빈도)를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단 내 TIGIT⁺ 세포의 수는 보다 적을 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에서 TIGIT⁺ 세포의 수에 비해 적어도 10% 적은 TIGIT⁺ 세포(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에서 TIGIT⁺ 세포의 수에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 적은 TIGIT⁺ 세포)를 가질 수 있다.

[0132] 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단은 CD27⁺ 세포의 높은 수 또는 빈도 및 TIGIT⁺ 세포의 낮은 빈도를 나타낸다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단에 비해 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포의 높은 빈도(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해)를 나타낸다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포의 적어도 5% 큰 빈도(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포의 큰 빈도)를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단에서 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포의 수가 증가될 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 2배의 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포 수(예를 들어, 증식 전 $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 큰 CD27⁺ TIGIT⁻ 세포의 빈도)를 가질 수 있다.

[0133] 일부 경우에, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단에서 CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 집단에 대한 TIGIT의 평균 발현은 참조 집단에 비해 낮다. 일부 구현예에서, CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 참조 집단(예를 들어, 증식 단계 전 CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단)보다, TIGIT의 보다 낮은 평균 발현을 나타낸다. 일부 구현예에서, CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단 보다 적어도 10% 적은(예를 들어, CD27⁺ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단 보다 적어도 20% 적은, 적어도 30% 적은, 적어도 40% 적은, 적어도 50% 적은, 적어도 60% 적은, 적어도 70% 적은, 적어도 80% 적은, 적어도 90% 적은 또는 최대 100% 적은) TIGIT의 평균 발현을 나타낸다.

[0134] 추가로 또는 대안적으로, $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단에서 TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 집단에 대한 CD27의 메디안 발현은 참조 집단에 비해 높다. 예를 들어, TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 CD27⁺ 세포의 적어도 5% 큰 빈도(예를 들어, 증식 전 TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 CD27⁺ 세포의 큰 빈도)를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 증식된 집단 내 CD27⁺ 세포의 수는 증가될 수 있다. 예를 들어, TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단은 증식 전 TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 적어도 2배의 CD27⁺ 세포 수(예를 들어, 증식 전 TIGIT⁻ $\gamma \delta$ T 세포의 분리된 집단의 것에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100%의 큰 CD27⁺ 세포의 빈도)를 가질 수 있다.

[0135] 다른 마커의 발현에서 증가 또는 감소는 추가로 또는 대안적으로 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28,

CD103, Nkp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64를 포함하는, 비-조혈 조직-유래된 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 하나 이상의 증식된 집단을 특징 분석하기 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에, $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단은 예를 들어, 증식 전 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 보다 큰 평균 발현을 나타낸다. 추가로 또는 대안적으로, $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 보다 큰 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 증식된 집단은 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 Nkp44, Nkp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, Nkp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커의 보다 낮은 평균 발현을 나타낸다. 증식된 집단은 유사하게 $\gamma\delta$ T 세포의 분리된 집단에 비해 Nkp44, Nkp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, Nkp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 보다 낮은 빈도의 세포를 가질 수 있다.

[0136] 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 따라서 하나 이상의 하기의 성질을 가질 수 있다: (i) 표현형 CD69^{높은}, TIM3^{높은} 및 CD28^{낮은/부재}을 나타냄; (ii) CCR3, CD39, CD11b, 및 CD9의 하나 이상의 상향조절; (iii) TCR 효능제의 부재하에 NKG2D 리간드에 응답한 IFN- γ 의 생성; (iv) TCR 효능제의 부재하에 IL-13의 생성; (v) TCR 활성화에 응답하여 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF 중 하나 이상의 생성; (vi) TCR 활성화에 응답하여 IL-17의 생성 부재, 실질적으로 생성 부재; (vii) 추가의 성장 인자 없이 IL-2를 함유하는 배양 배지에서서의 성장; (viii) TCR 효능제의 부재하에 세포독성 T 세포 반응을 나타냄; 및/또는 (ix) 정상 세포 보다 종양 세포에 대한 선택적 세포독성을 나타냄.

[0137] 일부 경우에, 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 TCR 효능제의 부재하에 IL-13을 생성하고/하거나 TCR 효능제의 부재하에 NKG2D 리간드에 응답하여 IFN- γ 를 생성한다.

[0138] $\gamma\delta$ T 세포의 증식에 사용하기 위해 적합한 수많은 기본 배양 배지가 가용하고, 특히, 완전 배지, 예를 들어, AIM-V, 이스코브(Iscoves) 배지 및 RPMI-1640(Life Technologies)이 있다. 배지에는 다른 배지 인자들, 예를 들어, 혈청, 혈청 단백질 및 선택적 제제, 예를 들어, 항생제가 보충될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, RPMI-1640 배지는 2 mM 글루타민, 10% FBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 나트륨 피루베이트(1 mM; Life Technologies), 비-필수 아미노산(예를 들어, 100 μ M Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro 및 Ser; 1X MEM 비-필수 아미노산 Life Technologies), 및 10 μ l/L β -머캅토에탄올을 함유한다. 간편하게, 세포는 적합한 배양 배지에서 5% CO₂를 함유하는 습한 대기에서 37°C에서 배양한다.

[0139] $\gamma\delta$ T 세포를 교반된 탱크 발효기, 에어리프트 발효기, 플러병, 배양 백 또는 접시, 및 다른 생물반응기, 특히 중공 섬유 생물반응기를 포함하는 임의의 적합한 시스템에서 본원에 기재된 바와 같이 배양할 수 있다. 그러한 시스템의 용도는 당업계에 널리 공지되어 있다. 림프구의 배양을 위한 일반적인 방법 및 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0140] 본원에 기재된 방법은 하나 초과와 선택 단계, 예를 들어, 하나 초과와 고갈 단계를 포함할 수 있다. 음성 선택에 의한 T 세포 집단의 집적은 예를 들어, 음성으로 선택된 세포에 고유한 표면 마커로 지시된 항체의 조합을 사용하여 성취될 수 있다. 하나의 방법은 음성으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커에 지시된 모노클로날 항체 카테일을 사용하는 음성 자기 면역접착 또는 유동 세포측정을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다.

[0141] IV. 약제학적 조성물 및 치료 방법

[0142] 본 발명의 방법에 의해 수득된 $\gamma\delta$ T 세포는 예를 들어, 입양 T 세포 치료요법을 위한 의약으로서 사용될 수 있다. 이것은 본 발명의 방법에 의해 수득된 $\gamma\delta$ T 세포의 환자로의 전달을 포함한다. 치료요법은 자가일 수 있고, 즉, $\gamma\delta$ T 세포는 이들이 수득된 동일한 환자에게 다시 전달할 수 있거나 치료요법은 동종이계일 수 있고, 즉, 하나의 사람으로부터 $\gamma\delta$ T 세포는 상이한 환자에게 전달될 수 있다. 동종이계 전달을 포함하는 경우에, $\gamma\delta$ T 세포는 실질적으로 $\alpha\beta$ T 세포가 부재일 수 있다. 예를 들어, $\alpha\beta$ T 세포는 예를 들어, 증식 후 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단을 사용하여(예를 들어, 음성 삼입에 의해, 예를 들어, 자기 비드를 사용하

여) $\gamma \delta$ T 세포 집단으로부터 고갈될 수 있다. 치료 방법은 공여자 개체로부터 수득된 비-조혈 조직 샘플을 제공하는 단계; 상기된 바와 같이 샘플로부터 기원하는 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하여 증식된 집단을 생성하는 단계; 및 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 수용자 개체로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0143] 치료될 환자 또는 대상체는 바람직하게 인간 암 환자(예를 들어, 고형 종양에 대해 치료받는 인간 암 환자) 또는 바이러스-감염된 환자(예를 들어, CMV-감염된 또는 HIV 감염된 환자)이다. 일부 경우에, 환자는 고형 종양을 갖고/갖거나 이에 대해 치료받고 있는 중이다.

[0144] 이들은 정상적으로 비-조혈 조직에 거주하기 때문에, 조직-거주 V δ 1 T 및 DN $\gamma \delta$ T 세포는 또한 이들의 전신 혈액-거주 대응물 보다 귀소하고 종양 매쓰내 보유될 가능성이 높고 이들 세포의 입양 전달은 고형 종양 및 잠재적으로 다른 비-조혈 조직-연합된 면역병리를 표적화하는데 보다 효과적일 가능성이 높다.

[0145] $\gamma \delta$ T 세포는 비-MHC 제한되기 때문에, 이들은 이들이 외래 물질로서 전달되는 숙주를 인지하지 못하고 이는 이들이 이식편 대 숙주 질환을 유발할 가능성이 적음을 의미한다. 이는 이들이 "오프 더 쉘프(off the shelf)"로 사용될 수 있고, 예를 들어 동종이계 입양 T 세포 치료요법을 위한 임의의 수용자에게 전달 될 수 있음을 의미한다.

[0146] 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 NKG2D를 발현하고, 악성 종양과 강하게 연관된 NKG2D 리간드(예를 들어, MICA)에 응답한다. 이들은 또한 임의의 활성화의 부재하에 세포독성 프로필을 발현하고 따라서 종양 세포를 사멸시키는데 효과적일 가능성이 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 수득된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 임의의 활성화의 부재하에 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, 그라눌라이신(Granulysin), 그랜자임 A 및 B, 및 퍼포린 중 하나 이상, 바람직하게는 모두를 발현할 수 있다. IL-17A는 발현될 수 없다.

[0147] 따라서, 본원에서 보고된 결과는 "오프 더 쉘프" 면역치료학적 시약으로서 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 임상 적용에 대한 실용성과 적합성에 대한 강력한 증거를 제공한다. 이들 세포는 선천적-유사 사멸을 보유하고, MHC 제한이 부재이며, 다른 T 세포보다 종양 내 개선된 귀소 및/또는 보유를 나타낸다.

[0148] 일부 구현예에서, 비-조혈 조직 내 종양을 갖는 개체의 치료 방법은 공여자 개체로부터 수득된 상기 비-조혈 조직의 샘플을 제공하는 단계; 상기된 바와 같이 샘플로부터 기원하는 $\gamma \delta$ T 세포를 배양하여 증식된 집단을 생성하는 단계; 및 $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 집단을 종양을 갖는 개체로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0149] 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합된, 본원에 기재된 같은 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포를 포함할 수 있다. 그러한 조성물은 완충액, 예를 들어, 천연 완충 식염수, 인산 완충 식염수 등; 탄수화물, 예를 들어, 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산, 예를 들어, 글라이신; 항산화제; 킬레이팅제, 예를 들어, EDTA 또는 글루타민; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 사용될 수 있는 냉동보존 용액은 예를 들어, DMSO를 포함한다. 조성물은 예를 들어, 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다.

[0150] 하나의 구현예에서, 약제학적 조성물은 실질적으로 부재이고, 예를 들어, 내독소 또는 마이코플라스마와 같은 검출가능한 수준의 오염물이 없다.

[0151] 일부 경우에, 상기된 임의의 방법에 의해 수득된 치료학적 유효량의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포는 치료학적 유효량으로 대상체에 투여(예를 들어, 암의 치료를 위해, 예를 들어, 고형 종양의 치료를 위해)될 수 있다. 일부 경우에, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 치료학적 유효량은 용량당 10×10^{12} 세포 미만(예를 들어, 용량당 9×10^{12} 세포 미만, 용량당 8×10^{12} 세포 미만, 용량당 7×10^{12} 세포 미만, 용량당 6×10^{12} 세포 미만, 용량당 5×10^{12} 세포 미만, 용량당 4×10^{12} 세포 미만, 용량당 3×10^{12} 세포 미만, 용량당 2×10^{12} 세포 미만, 용량당 1×10^{12} 세포 미만, 용량당 9×10^{11} 세포 미만, 용량당 8×10^{11} 세포 미만, 용량당 7×10^{11} 세포 미만, 용량당 6×10^{11} 세포 미만, 용량당 5×10^{11} 세포 미만, 용량당 4×10^{11} 세포 미만, 용량당 3×10^{11} 세포 미만, 용량당 2×10^{11} 세포 미만, 용량당 1×10^{11} 세포 미만, 용량당 9×10^{10} 세포 미만, 용량당 7.5×10^{10} 세포 미만, 용량당 $5 \times$

10^{10} 세포 미만, 용량당 2.5×10^{10} 세포 미만, 용량당 1×10^{10} 세포 미만, 용량당 7.5×10^9 세포 미만, 용량당 5×10^9 세포 미만, 용량당 2.5×10^9 세포 미만, 용량당 1×10^9 세포 미만, 용량당 7.5×10^8 세포 미만, 용량당 5×10^8 세포 미만, 용량당 2.5×10^8 세포 미만, 용량당 1×10^8 세포 미만, 용량당 7.5×10^7 세포 미만, 용량당 5×10^7 세포 미만, 용량당 2.5×10^7 세포 미만, 용량당 1×10^7 세포 미만, 용량당 7.5×10^6 세포 미만, 용량당 5×10^6 세포 미만, 용량당 2.5×10^6 세포 미만, 용량당 1×10^6 세포 미만, 용량당 7.5×10^5 세포 미만, 용량당 5×10^5 세포 미만, 용량당 2.5×10^5 세포 미만, 또는 용량당 1×10^5 세포 미만)이다.

[0152] 일부 구현예에서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 치료학적 유효량은 치료 과정에 동안 10×10^{12} 세포 미만(예를 들어, 치료 과정 동안 9×10^{12} 세포 미만, 8×10^{12} 세포 미만, 7×10^{12} 세포 미만, 6×10^{12} 세포 미만, 5×10^{12} 세포 미만, 4×10^{12} 세포 미만, 3×10^{12} 세포 미만, 2×10^{12} 세포 미만, 1×10^{12} 세포 미만, 9×10^{11} 세포 미만, 8×10^{11} 세포 미만, 7×10^{11} 세포 미만, 6×10^{11} 세포 미만, 5×10^{11} 세포 미만, 4×10^{11} 세포 미만, 3×10^{11} 세포 미만, 2×10^{11} 세포 미만, 1×10^{11} 세포 미만, 9×10^{10} 세포 미만, 7.5×10^{10} 세포 미만, 5×10^{10} 세포 미만, 2.5×10^{10} 세포 미만, 1×10^{10} 세포 미만, 7.5×10^9 세포 미만, 5×10^9 세포 미만, 2.5×10^9 세포 미만, 1×10^9 세포 미만, 7.5×10^8 세포 미만, 5×10^8 세포 미만, 2.5×10^8 세포 미만, 1×10^8 세포 미만, 7.5×10^7 세포 미만, 5×10^7 세포 미만, 2.5×10^7 세포 미만, 1×10^7 세포 미만, 7.5×10^6 세포 미만, 5×10^6 세포 미만, 2.5×10^6 세포 미만, 1×10^6 세포 미만, 7.5×10^5 세포 미만, 5×10^5 세포 미만, 2.5×10^5 세포 미만, 또는 1×10^5 세포 미만)이다.

[0153] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 용량은 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 적어도 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 최대 약 1×10^6 , 1.1×10^6 , 2×10^6 , 3.6×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.8×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 또는 5×10^8 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 약 1.1×10^6 - 1.8×10^7 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 적어도 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 최대 약 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 또는 5×10^9 세포/kg을 포함한다.

[0154] 하나의 구현예에서, 대상체에는 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^6 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포(예를 들어, 피부-유래된 $\gamma \delta$ T 세포 및/또는 비-V δ 2 T 세포, 예를 들어, V δ 1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 투여한다. 하나의 구현예에서, 대상체는 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 초기 투여(예를 들어, 대상체의 체중

kg당 10^4 내지 10^6 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 $\gamma \delta$ T 세포의 초기 투여), 및 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 1회 이상(예를 들어, 2, 3, 4 또는 5)의 후속적 투여(예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^6 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포, 예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 증식된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 1회 이상의 후속적 투여)를 투여받는다. 하나의 구현예에서, 1회 이상의 후속적 투여는 이전 투여 후 15일 미만, 예를 들어, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일째, 예를 들어, 이전 투여 후 4, 3 또는 2일째 미만에 수행된다. 하나의 구현예에서, 대상체는 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 적어도 3회 투여 과정 동안에 대상체의 kg 체중당 총 약 10^6 $\gamma \delta$ T 세포를 투여받고, 예를 들어, 대상체는 1×10^5 $\gamma \delta$ T 세포의 초기 용량, 3×10^5 $\gamma \delta$ T 세포의 제2 투여 및 6×10^5 $\gamma \delta$ T 세포의 제3 투여를 받고, 예를 들어, 각각의 투여는 이전의 투여 후 4, 3 또는 2일 미만으로 수행된다.

[0155] 본 발명의 방법에 의해 획득된 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 또한 CAR-T 치료요법을 위해 사용될 수 있다. 이것은 새로운 특이성, 예를 들어, 모노클로날 항체의 특이성을 갖는 T 세포를 재프로그래밍하기 위해 가공된 T 세포 수용체(TCR)의 생성을 포함한다. 가공된 TCR은 T 세포가 악성 종양 세포에 대해 특이적이게 할 수 있고 따라서 암 면역치료요법에 유용할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 종양 항원, 예를 들어, 대상체 조직 기원의 정상 체세포에 의해 발현되지 않는 종양 연합된 항원을 발현하는 암 세포를 인지할 수 있다. 따라서, CAR-변형된 T 세포는 예를 들어, 암 환자의 입양 T 세포 치료요법을 위해 사용될 수 있다.

[0156] CAR에 대한 혈액-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 사용은 기재되었다. 그러나, 본 발명의 방법에 의해 획득되는 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포는 이들이 형질전환된 세포를 인지하는 선천적-유사 능력을 보유하면서, 키메라 항원 특이적 TCR로 형질도입됨으로써 CAR-T 접근법에 대해 특히 양호한 비히클릴 가능성이 있고 혈액-거주 $\gamma \delta$ T 세포 또는 통상적인, 전신 $\alpha \beta$ T 세포 보다 양호한 종양 침투 및 보유 능력을 가질 가능성이 있다. 추가로, 이들의 MHC 의존성 항원 제공의 부재는 이식편 대 숙주 질환에 대한 잠재력을 감소시키고 이들이 저수준의 MHC를 발현하는 종양을 표적화하도록 할 수 있다. 또한, 예를 들어, CD28의 개입을 통한 통상적인 동시-자극에 대한 비-의존성은 동시 자극 수용체를 위한 저수준의 리간드를 발현하는 종양의 표적화를 증진시킨다.

[0157] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가의 치료학적 제제는 대상체에게 투여될 수 있다. 추가의 치료학적 제제는 면역치료학적 제제, 세포독성 제제, 성장 억제제, 방사선 치료제, 항-혈관형성 제제, 또는 이의 2개 이상의 제제의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 추가의 치료학적 제제는 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 투여와 동시에, 투여 이전에 또는 투여 이후에 투여될 수 있다. 추가의 치료학적 제제는 면역치료학적 제제일 수 있고, 이는 대상체의 신체 내 표적(예를 들어, 대상체 자신의 면역계) 및/또는 전달된 $\gamma \delta$ T 세포에 대해 작용할 수 있다.

[0158] 조성물의 투여는 임의의 통상적인 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 경동맥으로, 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 골수내로, 근육내로, 정맥내 주사에 의해 또는 복막내로, 예를 들어, 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위로 직접 주사될 수 있다.

[0159] 실시예

[0160] 대부분의 성인에서, V δ 2 세포는 안정적인 상태로 단지 혈액 T 세포의 단지 소수 및 고도로 가변적인 성분(0.01-5%)을 포함하지만, 세포는 수많은 세균 및 기생충을 포함하는 광범위한 제제에 의한 챌린지 후 신속하게 증식하여 일시적으로 ~25%의 CD3⁺ 세포에 도달한다. 이러한 반응을 위한 주요 기반은 예를 들어, 게라닐화 또는 파르네실화에 의해 단백질을 변형시키기 위해 사용되는 콜레스테롤 및 다른 지질의 합성의 중요한 미생물 경로에서 중간체인 하이드록실-메틸 부트-2-에닐 피로포스페이트(HMBPP)를 포함하는 저분자량의 "포스포-모이어티"의 V δ 2 TCR-매개된 인지이다. 영양류에서, 이러한 합성은 메발로네이트 경로를 통해 일어나고, 이러한 경로 중 하나의 중간체인 이소펜테닐 피로포스페이트(IPP)는 바이러스 감염되고 형질전환된 세포에서 매우 높은 수준으로 발현되고 또한 V δ 2 TCR-매개된 인지의 표적이다.

[0161] 추가로, 대부분의 V δ 2 T 세포는 NKG2D 리간드, 예를 들어, MICA, MICB, 및 ULBP의 개입 시 세포의 세포용해 잠재력을 활성화시키거나 동시-자극(T 세포 수용체(TCR)와 함께)할 수 있는 고수준의 NKG2D 수용체를 발현한다. 이들 리간드는 세포가 제제, 예를 들어, 산화성 또는 삼투압성 스트레스 또는 자외선 광에 노출된 경우 상향조절되는 숙주 단백질이다. 이들 제제는 또한 인간 고형 종양에서 통상적으로 조절불능인 상피 성장 인자 수용체

(EGFR) 경로의 과-활성 신호전달을 촉진시킨다.

- [0162] 이들의 강력한 세포용해 능력 및 항원을 $CD8^+$ T 세포에 제공하는 명백한 잠재력과 함께 이들의 TCR 및/또는 NKG2D를 사용하여 형질전환된 세포를 검출하는 V δ 2 T 세포의 능력은 총체적으로 V δ 2 T 세포가 암 면역치료요법을 전달하기 위해 임상적으로 활용될 수 있다는 관점을 유발하였다. 이것은 세포의 입양 전달에 의해 성취될 수 있고, 이와 관련하여, $\gamma\delta$ T 세포가 MHC에 의해 제한되지 않는 것은 이식편 대 숙주 질환(GvHD)에 대한 잠재력을 상당히 및 이롭게 제한한다. 이를 성취하기 위해, 혈액-거주 V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T 세포는 외인성 TCR-활성화제, 예를 들어, 포스포-모이어티(예를 들어, BrHPP)와 함께, 또는 임상적으로-승인된 비스포스포네이트(예를 들어, 졸레드론산)와 함께 인터류킨-2(IL-2)과 같은 사이토킨을 첨가하여, 메탈로네이트 경로에서 파르네실 피로포스페이트 신타제를 억제하여 TCR-활성화 모이어티, IPP의 축적을 유도함에 의해 생체외에서 증식될 수 있다. 그러나, BrHPP와 같은 제제를 통한 V γ 9V δ 2 세포의 만성 활성화는 점진적으로 세포 소모, 및 세포독성에 대해 감소된 잠재력으로 유도할 수 있다.
- [0163] 대안적으로, 환자 자신의 $\gamma\delta$ T 세포는 약리학적으로 변형된 형태의 HMBPP, 또는 임상적으로-승인된 아미노비스포스포네이트를 사용하여 동일계에서 활성화될 수 있다. 이들 접근법에 의해, 250명 초과와 암 환자들은 겉보기로 안전하게 치료되었지만 완전한 차도는 단지 드물게 발생하였다. 세포의 제한된 임상적 효능에 관한 하나의 주요 걱정은 만성 항원 노출에 의해 돌이킬 수 없이 소모되는 이들의 경향이다. 두번째 주요 걱정은 고형 종양 및 이들 종양 함유 조직으로의 귀소에 있어서 이들의 겉보기 비효율이다.
- [0164] 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 치료요법은 B 세포 악성종양을 위한 클리닉에서의 전망을 보여준다. 그러나, 고형 종양의 치료와 관련하여, CAR-T 세포의 수행능은 지금까지 기대 이하였고, 완전한 종양 반응 및 종양 제거 세포독성의 높은 발생율을 유도하는데 있어서 적은 효과를 보여준다. 말초 혈액 $\gamma\delta$ T 세포와 관련하여, 고형 종양에 대한 CAR-T 접근법의 성공에 대한 주요 장벽은 악성 종양 부위로 이동하고 기능적으로 효과적인 상태로 거기에 잔류하는 전신 CAR-T 세포의 가능한 비효율이다. 추가로, 통상적인 $\alpha\beta$ T 세포를 기준으로, CAR-T 세포는 종양 미세환경에서 면역억제 신호, 예를 들어, PD1 수용체를 통해 전송되는 것들을 극복해야만 한다.
- [0165] CAR-T 접근법에 대해 $\gamma\delta$ T 세포를 사용하는 것과 연관된 이점이 있을 수 있는데, 그 이유는 NKG2D와 같은 수용체를 사용하여 형질전환된 세포를 인지하는 이들의 선천적 능력을 보유하면서 종양-반응성 키메라 항원 특이적 TCR이 이들에게 형질도입될 수 있기 때문이다. 따라서 이들은 동시에 종양 입양(TCR) 및 선천적(NKG2D)-매개 효과를 견딜 수 있다. 그러나, 고형 조직 내 종양으로 귀소하고 거기에서 활성 형태로 유지되는 인간 혈액 $\gamma\delta$ T 세포의 겉보기 비효율의 문제는 여전하다. 이러한 고려 사항은 통상적으로 비-조혈 조직에서 거주하는 $\gamma\delta$ T 세포의 보다 세부적인 고려사항을 유발하였다.
- [0166] 그러한 T 세포는 이들의 발육의 일부로서 비-조혈 조직으로 이동하고 이와 같이 전신 프라이밍 후 조직에 침윤하는 이들 T 세포, 예를 들어, 조직-거주 TCR $\alpha\beta$ 기억 T 세포(TRM 세포)와는 구분된다. 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 마우스에서 가장 잘 연구되고, 여기서, 이들은 다른 부위 중에, 피부, 소화관 및 생식 조직 내에서 만연되어 있는 것으로 나타났다. 많은 그러한 세포는 선천적-유사 기능성 잠재력을 함유하는 것으로 나타났고 이들은 NKG2D 수용체의 활성화를 통한 켈린지에 응답할 수 있다. 본원 발명자들은 최근에 인간 피부 및 장이 또한 선천적-유사 활성을 갖는 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포의 큰 격실을 함유함을 입증하는 데이터를 취득하였다. 악성 종양, 염증, 아토피, 알레르기 및 비-조혈 조직 내 형성되는 다른 병리학의 연구는 대부분 병리학적 병변이 존재하는 조직 내 거주하는 이들 천연적-유사 인간 T 세포의 잠재적 영향을 고려하는데 실패하였다.
- [0167] 비-조혈 조직 내 거주하는 인간 $\gamma\delta$ T 세포는 훨씬 덜 연구되었는데 그 이유는 이들의 국소화가, 세포의 샘플링을 더 어렵게 하고 이들을 배양하는 수단이 확립되어 있지 않기 때문이다. 이러한 서브타입은 비-MHC-제한된 세포용해 잠재력을 갖는 다양한 세포를 포함하고, 이것은 이들이 V δ 2-함유 TCR을 발현하지 않기 때문에 전반적으로 저분자량의 포스포-모이어티에 반응하지 않는다. 정확한 TCR-특이성이 그러한 세포에 대해 거의 공지되어 있지 않지만, 가용한 데이터는 그러한 세포가 사이토메갈로바이러스(CMV)-감염된 세포에 의해 그리고 많은 고형 종양에 의해 과발현되는, 내피 단백질 C 수용체(EPCR)와 같은 자가-항원에 반응함을 시사한다. 비-조혈 조직-연합된 $\gamma\delta$ T 세포는 또한 통상적으로 NKG2D를 발현한다. 이들 성질, 및 피부 및 소화관과 같은 비-조혈 조직 내 세포의 생리학적 거주를 고려하면, 그러한 세포의 암 환자의 입양 전달이 고형 종양 및 잠재적으로 다른 면역 병리학을 표적화하는데 상당히 보다 효과적일 수 있다.
- [0168] 면역치료요법을 위해 비-V δ 2 세포를 활용하기 위해서는 세포를 동일계에서 증식시키거나 이들을 수확하고 재주입 전에 이들을 생체의 증식시키는 수단을 요구한다. 후자 접근법은 채택하였는데, 그 이유는 동일계에서 다수의 비-V δ 2 T 세포를 증식시키는 입증된 능력을 갖는 어떠한 TCR-활성화제가 공지되어 있지 않기 때문이다. 비-

조혈 조직의 제한된 가용성의 과제를 극복하기 위해, 일부 연구자들은 V δ 2-발현 세포가 주요 서브세트인 혈액으로부터 매우 소수의 비-V δ 2 T 세포를 증식시켜 이들 세포가 조직-거주 비-V δ 2 T 세포와 균등하다는 추정하기 위한 시도를 하였다. 혈액 중에서 발견되는 소수의 비-V δ 2 T 세포는 활성 CMV 감염 동안에 실질적으로 증식하고, V δ 2 T 세포와 비교하여 CMV에 대해 월등한 반응성을 보여주고 자궁 내 CMV 감염의 경우에 사람 태아를 보호할 수 있는 것으로 보인다. 추가로, CMV-반응성 비-V δ 2 $\gamma\delta$ T 세포는 걸보기에 면역억제 동안에 이식 환자를 CMV 재-활성화로부터 보호하고 형질전환된 세포에 대한 교차 반응성을 통해 2차 악성 종양의 위험을 감소시킨다. 유사하게, $\gamma\delta$ T 세포가 HIV 감염을 제어하는데 이로운 역할을 수행함을 시사하는 데이터가 있고, 이 경우에, 비-V δ 2 $\gamma\delta$ T 세포는 V δ 2 T 세포에 비해 혈액 중에서 증식된다.

[0169] 혈액 거주 비-V δ 2 세포는 TCR 신호 전달을 직접적으로 활성화시키는 외인성 제제의 첨가에 의해, 예를 들어, 항-CD3 항체, 범 $\gamma\delta$ -TCR-특이적 항체 또는 피토헤마글루티닌(PHA)과 같은 제제를 사용함에 의해, 또는 자극된 비-V δ 2 T 세포를 인조 항원 제공 세포(aAPC)와 동시 배양함에 의해 생체의 증식시켰고, 여기서, $\gamma\delta$ T 세포와 aAPC 간의 직접적인 접촉은 생체의 비-V δ 2 T 세포 증식을 위해 요구된다. 대안적으로, 세포는 예를 들어, 상피암-침윤 림프구(TIL)로부터 생체의 $\gamma\delta$ T 세포 배양물의 증식을 지지하기 위해 사용된 바와 같은, 고정화된 재조합 MICA(NKG2D 리간드)를 사용함에 의한 NKG2D 수용체 신호 전달을 촉진시킴에 의해 증식시켰다. 요약하면, V δ 2-발현 혈액 $\gamma\delta$ T 세포의 또는 비-V δ 2 혈액 $\gamma\delta$ T 세포의 생체의 증식의 현재 방법은 IL-2와 같은 보충 사이토킨과 함께 영구적으로 TCR 및/또는 NKG2D 수용체의 활성화를 촉진시키는 제제의 첨가를 요구한다. 수용체-활성화 신호 및 사이토킨의 이 조합은 공통체에 의해 광범위하게 채택되는, T 세포를 배양하고 증식하기 위한 표준 접근법을 반영한다. 지금까지, 비-조혈 조직에 거주하는 $\gamma\delta$ T 세포를 실질적으로 증식시키기 위한 방법이 보고되지 않았다. 그러한 방법은 본원에 기재된다.

[0170] 인간 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포(예를 들어, 피부 $\gamma\delta$ T 세포)의 표현형 및 기능적 특징 분석의 일부로서, 본원 발명자들은 통상적으로 비-조혈 조직 내에 거주하고 $\alpha\beta$ T 세포 및 혈액-거주 $\gamma\delta$ T 세포에 비해 고유 성질을 갖는 특유하며 $\gamma\delta$ T 세포의 대형 집단을 단리하였다. 본원 발명자들은 세포가 NGK2D-리간드 및 사이토킨에 대해 강한, TCR-독립적, 선천적-유사 반응을 보여줌을 밝혔다. 반면, 1차 $\alpha\beta$ T 세포의 증식에서의 노력은 통상적으로 이로운 성장 인자들의 공급원으로서 다른 지지 세포와 동시 배양함을 사용한 반면, 본 발명자들은 예상치 않게 피부 및 다른 비-조혈 조직에 거주한 $\gamma\delta$ T 세포가 심오하게 및 특이적으로, 접촉된 이들 세포를 자가 피부 섬유아세포 및 잠재적으로 다른 기질 성분들, 예를 들어, 각질세포 및 내피 세포와 동시 배양함에 의해 억제됨을 보여주었다. 그러한 상호 작용의 완화는 잠재적인 임상적 적용을 위해 세포가 대량으로 신속하게 증식 될 수 있게 한다.

[0171] 추가로, 지금까지 혈액 및 종양 유래된 $\gamma\delta$ T 세포를 증식시키기 위한 노력과 대조적으로, 본원 발명자들은 그러한 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포가 이들의 TCR 또는 NKG2D 신호전달 경로를 활성화시키는 임의의 외인성 제제의 의도적 첨가 없이 증식될 수 있음을 보여주었다.

[0172] 본원에 기재된 것은 인간 또는 비-인간 동물 비-조혈 조직, 예를 들어, 피부 및 장으로부터 $\gamma\delta$ T 세포를 효과적으로 및 재현적으로 단리하고 증식시키기 위한 신규 수단이다. 증식은 비-조혈 조직-유래된 비-V δ 2 T 세포와 자가 섬유아세포 및 잠재적으로 다른 기질 성분들의 접촉을 중단시킴에 의해 촉진되고 IL-2, IL-15, IL-4, 및/또는 IL-21와의 배양에 의해 지속된다.

[0173] 하기의 실시예는 본원에 청구된 방법 및 화합물이 어떻게 수행되는지, 만들어지는지 그리고 평가되는지에 대한 완전한 기재내용 및 기술을 당업자에게 제공하기 위해 제시되고, 순수하게 본 발명의 예시인 것으로 의도되고 본원 발명자들이 이들의 발명과 관련되는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0174] 실시예 1. 분석학적 방법

[0175] 달리 기재되지 않는 경우, 하기의 방법을 사용하여 후속 실시예의 결과를 생성하였다.

[0176] 유동 세포측정

[0177] 유동 세포측정은 하기의 항체-형광색소 접합체를 사용하여 수행하였다: Ki-67-BV421, CD3-BV510, V δ 1-PeVio770, TIM-3-PE, CD9-PE, CCR3-BV421, 및 CD39-BV421. 샘플은 또한 eFluor770 NIR를 사용하여 생존능을 위해 염색하였다. 시판되는 항체는 제조원(Biolegend 또는 Miltenyi)으로부터 구입하였다. 생존능 염료(IR 근처)는 제조원(eBioscience)으로부터 구입하였다. Ki-67 염색은 Foxp3 염색 완충액 세트(eBioscience)를 사용하여 고정되고 고정화된 세포에 대해 수행하였다. 일단 각각의 실험이 종료되면, 세포 집단은 PBS 중에서 세척하고 절반으로 분리하였다. 세포는 생존능에 대해 eFluor770 NIR로 염색하고 세척함에 이어서 TrueStain(제조원:

Biolegend)으로 염색하여 염색 항체의 비특이적 결합을 회피하였다. 샘플의 절반을 지정된 표면 마커에 대해 염색하고, 다른 절반은 단지 계통 마커(CD3, V δ 1)에 대해 염색하였고 표면 마커에 대한 균등한 이소형 대조군을 사용하였다. 동일한 형광색소에 접합된 매칭된 마우스 이소형 항체는 동일한 농도로 사용하였다. 이소형 대조군은 어떠한 공지된 사람 항원에 결합하지 않고 따라서 비특이적 결합 또는 가양성(false positives)을 나타낸다. 히스토그램은 이의 상응하는 이소형 대조군 또는 나타내는 경우, FMO와 비교하여 보여준다(도 1d, 2a, 3b, 4b, 6b, 7a, 및 11-13). 데이터 요약은 비교되는 지정된 마커에 양성인 것으로 염색되고 따라서 이소형 보다 높은 수준에서의 세포의 퍼센트를 나타낸다. 유동 세포측정 데이터 분석은 FlowJo(버전 10.1) 상에서 수행하였다.

[0178] RNA 서열분석

[0179] 인간 피부로부터의 V δ 1 T 세포 및 인간 혈액 V δ 1 T 세포(T 세포 수용체가 증식을 개시한 후)는 분류하고 (FACS), 원심분리하고 세포 펠렛은 RLT 완충액 중에서 재현탁시켰다. RNA는 RNA-마이크로-플러스 키트(QIAGEN)를 사용하여 제조하였다. RNA 라이브러리는 리보에라제(HMR) (KAPA BIOSYSTEMS)와 함께 KAPA 가닥 RNA-seq 키트를 사용하여 생성하였다. 신속한 전개 화학(판독 길이: 100bp)을 사용한 HiSeq 2500(Illumina) 상에서 쌍을 이룬 말단 서열 분석. 101개 염기 쌍을 이룬 말단 판독값을 정렬하고 Bowtie 2와 함께 RSEM(v1.2.11)을 사용하여 정량하였다. 판독값은 인간 전사체에 정렬시키고 계수 값은 log2 전환되었고 분위 정규화되었다.

[0180] 사이토킨 정량

[0181] 인간 피부로부터의 V δ 1 T 세포는 24시간 동안 PMA 및 이오노마이신 또는 플레이트 결합된 항-CD3 mAb(OKT3, 5 μ g/ml)를 사용하여 자극하였다. 상등액은 이후 채취하고 ProcartaPlex 인간 사이토킨 & 케모킨 패널 1A(34 플렉스) (제조원: eBioscience)을 사용하여 분석하였다. 검정은 Luminex FlexMap3D(Luminex Corp)를 사용하여 분석하였다. 데이터는 마이크로소프트 엑셀에서 분석하고 3명의 공여자의 평균(이중 수행)을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

[0182] 섬유아세포와의 공-배양

[0183] 각각의 분리 배양을 위해, 2개의 평판 접시(100 x 25mm, Corning)은 스칼펠을 사용하여 여러 위치에서 스크래칭하였다. 잘게 썬 피부 조각을 스크래치 상에 위치시켰다. 공기 중에 건조 5 내지 10분 후, 피부 조각들을 정상적으로 접시에 부착시키고 10 mL의 피부-T 배지를 첨가하였다. 배지를 1주 1회 교환하고 1차 섬유아세포를 성장 3주 후 ACCUTASE®(Life Technologies)를 처리한 후 수확하였다. 섬유아세포는 1×10^4 로 48웰에 또는 트랜스웰 실험의 경우에 2×10^4 로 24웰 플레이트의 바닥 챔버로 씨딩하였다. 2 내지 3일 후, 섬유아세포는 컨플루언스에 도달하였고 공-배양 실험은 RPMI를 사용하여 개시하였고 사이토카인은 48웰 플레이트의 경우에 2×10^5 혼합 피부 림프구, 또는 24웰 플레이트, 바닥 웰 및 트랜스웰의 경우에 3×10^5 림프구의 첨가를 나타냈다.

[0184] 혈액 유래된 $\gamma \delta$ T 세포의 증식

[0185] PBMC 내 혈액 유래된 $\gamma \delta$ T 세포는 단지 TCR 리간드(V δ 2, 예를 들어, IPP, HMBPP, 비스포스포네이트의 경우에) 또는 TCR 수용체(mAb) 또는 TCR 연합 키나제 CD3을 가교결합시키기 위한 항체 보충으로 자극된 경우 증식될 수 있다. TCR 가교결합의 동일한 효과는 또한 PHA와 같은 렉틴을 사용하여 성취될 수 있다. 그러한 TCR 자극 제제의 첨가 부재하에, PBMC 내 $\gamma \delta$ T 세포는 수일 동안 생존하지만 최소 변화와 함께 T 세포 서브세트의 초기 조성물에서 증식하고 잔류하는데 실패한다.

[0186] 건강한 지원자로부터 혈액을 사용하여 전체 혈액을 Ficoll 상으로 적층시킴에 이어서 20분 동안 400 g에서 원심 분리하여 적혈구 세포, 혈액 혈장 및 백색 림프구/단핵구를 분리하기 위해 PBMC를 단리시켰다. 백혈구 세포는 스트리팻을 통해 조심스럽게 수확하였고 냉 PBS 중에서 4회 세척하였다. 세포는 10% 열-불활성화된 태아 소 혈청(Life Technologies), L-글루타민(292 μ g/ml; Life Technologies), 페니실린(100 유닛/ml; Life Technologies), 스트렙토마이신(100 μ g/ml; Life Technologies), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설펜산(HEPES; 0.01 M; Life Technologies), 나트륨 피루베이트(1 mM; Life Technologies), 최소 필수 배지(MEM) 비-필수 아미노산(1X; Life Technologies)과 함께 mL당 1×10^6 의 밀도로 RPMI-1640 배지(Life Technologies)에 재현탁시키고 IL-2(100 IU/ml)를 보충하였다. 세포를 세포 전달 전 90분에 범 $\gamma \delta$ TCR 모노클로날 항체(20 μ g/ml, clone B1, Biolegend)로 코팅된 24 웰 플레이트에 전달하였다. 세포를 14일 동안 성장시키고 배지를 2 내지 3일 마다 교환하고 새로운 사이토킨을 첨가하였다. 컨플루언스에 도달한 즉시 세포를 1:1로 분할하였다. 이들 조건하에서, 14일 후, $\gamma \delta$ T 세포의 본래의 최소 집단을 통상적으로 이들의 TCR을 통해 고도로 활성화되

고(CD69 및 CD25의 경우 상향조절에 의해 나타낸 바와 같이) 주로 V δ 2 T 세포뿐만 아니라 V δ 1 T 세포(모든 γ δ T 세포의 30%까지)로 이루어져 대부분 집적된다. V δ 1 T 세포는 후속적으로 기능성 또는 표현형(예를 들어, 유전학적) 분석을 위해 FACS를 사용하여 분리될 수 있다.

[0187] 실시예 2. 피부 및 소화관으로부터 비-조혈 조직-거주 γ δ T 세포의 분리

[0188] 3차원 피부 외식편 프로토콜은 클락 프로토콜을 사용하여 확립하였다. 셀폼 매트릭스(Cellfoam Matrices) (Cytomatrix Pty Ltd, Victoria, Australia) 또는 9 mm x 9 mm x 1.5 mm의 차원을 갖는 등가물은 오토클레이빙 하고 실온에서 30분 동안 PBS 중, 100 mg/ml 래트 꼬리 콜라겐 I(BD Biosciences)의 용액 중에서 항온처리함에 이어서 PBS 중 1회 세정한다. 성인 인간 피부의 샘플은 피부 수술의 3 내지 6시간 내에 수득하였다. 피하 지방을 제거하고 나머지 피부 조직을 대략적으로 1 mm x 1 mm을 측정하는 단편으로 잘게 썬다. 대략적으로 5개 피부 단편/외식편을 각각의 매트릭스의 표면상으로 위치시키고 압착시켰다. 각각의 매트릭스는 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청(Life Technologies), L-글루타민(292 μ g/ml; Life Technologies), 페니실린(100 유닛/ml; Life Technologies), 스트렙토마이신(100 μ g/ml; Life Technologies), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설펜산(HEPES; 0.01 M; Life Technologies), 나트륨 피루베이트(1 mM; Life Technologies), 최소 필수 배지(MEM) 비-필수 아미노산(1x; Life Technologies) 및 3.5 μ l/L 2-머캅토에탄올(Life Technologies)과 함께 2 ml의 피부-T 배지(이스코브 변형된 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM; Life Technologies)를 함유하는 24-웰 플레이트(Corning)의 분리된 웰에 위치시켰다. 처음 배양 7일 동안, 암포테리신(2.5 μ g/ml; Life Technologies)을 배지에 첨가하였다. 배지는 각각의 웰로부터 상부 1 mL의 배지를 흡인 제거하고 1 mL의 새로운 배지를 첨가함에 의해 주당 3회 새롭게 하였다. 인간 재조합 IL-2(100 IU/mL; PROLEUKIN[®]; Novartis Pharmaceutical UK Ltd) 및 인간 재조합 IL-15(20 ng/ml; Biolegend)는 배양 개시에서 첨가하고 각각에 대해 배지를 21 내지 35일 후 림프구의 분리때까지 표 1에 나타낸 바와 같이 새롭게 한다. 각각의 공여자에 대해 배양물에 96개 까지의 웰(4개의 24-웰 플레이트)을 설정하였다.

[0189] 림프구를 분리하기 위해, 매트릭스 및 배지를 0.01 mM HEPES(최대 12 매트릭스/튜브)와 함께 10ml 헝크스 균염 용액(Hanks Balanced Salt Solution) (HBSS; Life Technologies)을 함유하는 50ml 원심분리 튜브(Corning)에 옮겼다. 매트릭스는 10 ml 피펫을 사용하여 세포 현탁액으로 세정하고 세포 현탁액을 70 μ m 필터(BD Biosciences)를 통해 새로운 50 ml 원심분리 튜브에 통과시켰다. 매트릭스의 세정은 2회 추가로 반복하였다. 배양물로부터 배지를 또한 흡인 제거하고 70 μ m 필터를 통해 새로운 50 ml 원심분리 튜브에 통과시켰다. 웰은 2회 추가로 1 ml의 0.01 mM HEPES/HBSS로 세척하였고 70 μ m 필터를 통해 통과시켰다. 이어서, 세포를 원심분리 (15분 동안 1600 rpm)에 의해 분리하였다. 펠렛은 피부-T 배지에 재현탁시켰다. 최종 세포 펠렛은 후속적 유동 세포측정 분석 또는 기능적 연구를 위해 피부-T 배지에 재현탁시켰다. 세포 계수가 요구되는 경우, 림프구는 하기 중 어느 하나에 의해 이 단계에서 계수하였다; (1) 트리판 블루 염색(0.4%) (Life Technologies) 및 혈구측정기, 또는 (2) CASY[®] 모델 TT 세포 계수기 및 분석기(Roche). 예시적인 연구로부터의 결과는 하기 표 1에 나타난다.

표 1

공여자당 단리된 림프구 수율.

배양 지속 기간	총 림프구	스캐폴드 수	림프구/스캐폴드
35일	23.5×10^6	72	3.26×10^5
32일	38.87×10^6	96	4.04×10^5
21일	29.9×10^6	96	3.11×10^5
21일	18.0×10^6	72	2.50×10^5
23일	16.0×10^6	72	2.22×10^5
28일	10.7×10^6	23	4.65×10^5
25일	88.0×10^6	120	7.33×10^5
22일	20.0×10^6	39	5.12×10^5
21일	4.1×10^6	42	0.97×10^5
23일	31.4×10^6	96	3.27×10^5
23일	15.21×10^6	72	2.11×10^5
26일	43.0×10^6	144	2.99×10^5
32일	44.5×10^6	96	4.64×10^5
24일	72.4×10^6	96	7.54×10^5
22일	46.0×10^6	96	4.79×10^5
평균:			
25일	33.4×10^6	82	3.91×10^5

[0190]

[0191]

1차 소화관 샘플은 보다 오염되는 경향이 있기 때문에, 획득한 생검은 잘게 썰기 전에 먼저 10% FCS, 페니실린 (500 U/mL), 스트렙토마이신 (500 μ g/mL), 겐타마이신 (100 μ g/mL), 암포테리신 B (12.5 μ g/mL), 및 메트로니다졸 (5 μ g/mL)을 함유하는 IMDM 중에서 2회 세척하고 스캐폴드 상에 위치시켰다. 소화관 스캐폴드 배양물을 소화관-T 배지(IMDM, 10% FCS, 페니실린 100 U/mL, 스트렙토마이신 100 μ g/mL, 겐타마이신 20 μ g/mL, 메트로니다졸 1 μ g/mL)에서 성장시켰다. 성장 제1 주 동안, 본원 발명자들은 또한 피부와 유사하게, 암포테리신 B 2.5 μ g/mL를 사용하였다. 배지는 IL-2 (100 IU/mL) 및 IL-15 (20 ng/mL)를 함유하였고 주당 3회 갈아주었다. 소화관 구조물은 피부 보다 더 느슨하기 때문에, 림프구는 1주 후 수거하였다.

[0192]

실시예 3. 비-조혈 조직-거주 $\gamma \delta$ T 세포의 특징 분석

[0193]

인간 $\gamma \delta$ T 세포는 주로 V δ 2⁺의 피부에서 풍부하고, 인간 림프구 스트레스 감시 반응에 관여한다.

[0194]

도 1a 내지 1d는 인간 피부가 거주 $\gamma \delta$ T 세포의 주지할만한 집단을 포함한다는 것을 보여준다. 클락 프로토콜을 사용하여, 본원 발명자들은 IL-2 및 IL-15이 보충된 인간 잔류 피부 샘플을 사용하여 3주 과정에 걸쳐 조직 거주 림프구의 과성장을 가능하게 할 수 있다. 평균 수율은 스캐폴드당 240,000개 림프구이다. 이전의 보고와 일치하여, 특유의 피부-거주 림프구 서브셋을 동정하였고 대다수의 세포는 대부분 조직 거주 "TRM" 유형의 통상적인 $\alpha \beta$ TCR을 발현하였다. 전체적으로, 59.9% ($\pm$ 8.6%)의 CD45⁺ 세포는 CD4⁺이고, 18.3% ($\pm$ 2.8%)은 CD8⁺ $\alpha \beta$ T 세포이고, NK 세포 분획은 8.7% ($\pm$ 3.6%)였다. 추가로, 본원 발명자는 본 발명의 공여자에서 $\gamma \delta$ T 세포의 상당한 집단(CD45⁺ 세포의 평균 8.513%, $\pm$ 6.564%)을 발견하였다(도 1a 및 3d). 이 림프구 프로파일은 기관형 배양 후 대략 100명의 공여자에서 매우 재현가능하였고, 새롭게 분해된 피부 샘플에 상응하였고, 단지 약하게 증가된 $\gamma \delta$ 집단에서는 상이하였지만 실제 용도에 있어서 표준 조직 분해 프로토콜과 비교하여 보다 크고 순수한 림프구 집단을 제공하였다. 이들의 TCR 델타 채를 기반으로 하는 인간 $\gamma \delta$ T 세포의 조직 구획화에 관한 문헌에 따르면, 대부분의 인간 피부 $\gamma \delta$ T 세포는 유동 세포측정에 의해 동정된 다양한 γ 채와 쌍을 이루는 V δ

1 TCR쇄를 발현하였다. 이것은 $V\gamma 9$ 와 연결된 $V\delta 2$ 쇄의 단일 특이적 TCR이종이량체를 보여주고 실제로 인간 피부 샘플에서는 부재인, 다수의 말초 혈액 $\gamma\delta$ T 세포와는 대조적이다. 그러나, 서브세트가 본원에서 이중 음성 $\gamma\delta$ T 세포(DN $\gamma\delta$ T 세포; 도 1c)로서 언급되는, $V\delta 1$ TCR 또는 $V\delta 2$ TCR을 발현하지 않는다는 것을 주지하는 것은 중요하다.

[0195] 이러한 양상으로 성장한 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 CD45RA의 발현 부재 및 동시-자극 분자 CCR7의 다양한 발현 수준인 비-말단으로 분화된 기억 표현형을 보여주었다. 통상적인 전신 T 세포에 비해, 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 프로그램화된 사멸 수용체 1(PD-1)의 발현과 함께 표면 마커 CD69의 고발현, 낮거나 부재 수준의 IL-2 수용체 α (CD25) 및 동시-자극 분자 CD28의 부재를 나타냈고 이는 이전의 또는 만성 활성화를 시사한다(도 1d). 이들의 조직 국소화와 일치하여, $V\delta 1$ 및 DN 세포는 CCR4, CCR8 및 인테그린 αE 와 같은 피부 및 조직 귀소 마커의 발현을 보여준다(CD103; 도 7). 이 조직-귀소 마커-세트는 면역치료요법 세팅에서 이로움을 입증할 수 있다. 추가로, 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 활성화 수용체 NKG2D에 대해 고수준의 발현을 보여주고(도 2a), 이는 림프구 스트레스 감시 반응에서 이들의 세포의 가능한 역할을 의미한다. 각각 MICA, MICB, 및 ULBP와 같은 NKG2D 리간드는 각각 DNA 손상, EGF-수용체 활성화 및 산화 스트레스에 응답하여 세포에 의해 상향 조절되고 따라서 NKG2D를 발현하는 T 세포가 스트레스받거나 형질전환된 세포를 동정하고 박멸시켜 조직 항상성을 유지할 수 있게 해준다. 이 원리와 일치하여, 본원 발명자는 본 발명의 방법에 의해 증식된 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포가 NKG2D 수용체에 대한 재조합 리간드(MICA, ULBP2)에 노출시 활성화됨을 밝혔고, 이는 리소솜-연합된 막 단백질 CD107a의 상향 조절에 의해 측정된 바와 같은 탈파립화를 입증한다(도 2a). 이러한 선천적-유사 특성은 다른 조직-거주 T 세포(도 2c) 및 전신 $\gamma\delta$ T 세포에는 이 반응이 없기 때문에 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포에 유일하였다(도 10b).

[0196] 전체적으로, 활성화된 피부-거주 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포가 PMA/요노마이신에 의해 또는 NKG2D 리간드, 예를 들어, 재조합 MICA 단백질에 의해 활성화되는 경우 전-염증성 Th1 편향된 사이토킨 프로그램(IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF에 대해 양성인 염색)을 실행하여(도 2a 및 2b), 세포의 선천적-유사 반응을 주장한다. 실제로, MICA에 대한 반응은 항체에 의해 NKG2D 수용체를 차단시킴으로써 거의 완전히 차단되었다(도 2b 및 2c).

[0197] $\gamma\delta$ T 세포는 건선과 같은 특정 질환 세팅 하에 및 종양의 일부 유형 내에서 IL-17을 분비하는 것으로 공지되어 있다. 본 발명의 방법에 의해 증식된 $\gamma\delta$ T 세포는 광범위 활성화시에도 낮은 수준의 IL-17을 생성하거나 IL-17을 전혀 생성하지 않는다(도 2b 및 8). 역으로, 조직-거주 CD4-발현 $\alpha\beta$ T 세포는 TCR 활성화시 IL-17을 생성하였다(도 2b). 일반적으로, $\alpha\beta$ T 세포는 숙주-보호와 연합된 Th1 편향된 프로그램으로 제한된, $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포와 비교하여, PMA/요노마이신에 응답하는 보다 더 광범위한 사이토킨 레퍼토리를 보여주었다.

[0198] 조직으로부터의 분리는 인간 조직 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 및 막대한 증식을 유발한다

[0199] 인간 조직 $\gamma\delta$ T 세포를 추가로 연구하기 위해, 혼합 피부 림프구를 세포 배양 웰에 옮기고 시간 경과에 따라 생존능을 유지하기 위해 IL-2를 보충하였다. 흥미롭게도, 기관형 배양물에 존재하는 기질 및 상피 세포로부터의 분리에 의해, $V\delta 1$ T 세포는 유일하게 임의의 추가의 자극 없이 활성화 및 증식의 징후를 보여주었다. 7일 이내에, $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 특유하게 및 막대하게 핵 인자 Ki-67을 상향조절하였고 IL-2 수용체 α 의 표면 발현을 증가시켰다(CD25; 도 3b 및 4b). 현저하게, 3주 과정에 걸쳐 및 IL-2의 존재하에 유일하게, 조직-유래된 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 모든 다른 T 세포 서브세트 보다 과성장하여 모든 피부 림프구의 최대 65%를 차지하고, 수에 있어서 평균 127.18배 증가하고, $\alpha\beta$ T 세포는 단지 절대 세포 수에 의해 측정된 바와 같이 5.21배($p=0.0124$) 증가하였다(도 3a). 세포 사이클링-연관된 핵 인자 KI-67의 MFI는 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포에서 14일 후 $2,664.5(\pm 1,876.1)$ 로부터 $8,457.7(\pm 4,574.2)$ 로 증가하는 반면 $\alpha\beta$ T 세포에서, MFI는 동일한 시간 과정 동안에 $592.8(\pm 390.5)$ 로부터 $284.7(\pm 140.1)$ 로 감소하였다(도 3c). 선택적, 피부-거주 $\gamma\delta$ T 세포 과성장의 이 현상은 추가로 림프구의 생존능 및 총수를 증가시키는, 추가의 재조합 IL-15을 사용하여 추가로 지지될 수 있다.

[0200] 피부 $\gamma\delta$ T 세포는 접촉 의존성 방식으로 섬유아세포에 의해 활성적으로 억제된다

[0201] 상기 기재된 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포의 현저한 증식은 광범위 섬유아세포 과성장장이 있는 기관형 배양 시스템에 결코 존재하지 않았다. 자가 섬유아세포는 과성장시켜 직접적으로 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포와의 공-배양이 T 세포 증식을 억제하는지를 시험하였다. 3주 스캐폴드 배양 후, 혼합 피부 림프구는 비워있거나 이전에 확립된 섬유아세포의 컨플루언트 단일층을 함유한 웰에 씨딩하였고, 각각의 경우에 배지를 외인성 IL-2에 보충하여 T 세포

포 성장을 지지하였다. 추가로, 트랜스웰을 사용하여 T 세포가 이들이 섬유아세포에 의해 분비되는 가용성 인자들에 의해 영향받을 수 있게 하면서 동일한 웰 내에서 섬유아세포와 직접 접촉하는 것을 방지하였다. 공-배양 14일에, $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 어떠한 섬유아세포가 존재하지 않는 웰에서 및 T 세포가 직접적으로 섬유아세포와 직접 접촉되는 것이 방지된 웰에서 증식을 개시하였다. 이전과 같이, $\alpha\beta$ T 세포 증식은 모든 조건하에서 낮았다. T 세포가 섬유아세포와 직접 접촉하도록 허용되는 경우, 2주에 걸쳐 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포의 성장 속도는 섬유아세포 접촉이 없는 웰에서의 $22.6(\pm 8.07)$ 배로부터 $3.3(\pm 0.17)$ 배로 상당히 감소하였다(도 4a). 이러한 접촉-매개된 억제는 단독으로 성장한 림프구와 비교하여, 7일의 경과에 따라 $V\delta 1$ T 세포 내에서 CD25, Ki-67 및 전사 인자 T-bet의 상향 조절의 부재에 의해 추가로 확인되었다(도 4b). 면역계의 조직-매개된 제어의 일부 형태는 이것 없이 지속적인 염증에 대한 가능성이 있기 때문에, 조직 항상성을 유지하는데 기본적인 것으로 나타난다. 기질 섬유아세포에 의한 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포의 억제성 조절은 그러한 제어의 예인 것으로 보인다.

[0202] 요약하면, 피부-거주 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포의 표현형 및 이들의 현저한 기능적 잠재력은 접촉-의존성 기전을 통해 이들의 이웃하는 피부 섬유아세포에 의해 통상적으로 억제된 상태로 있는 이전-활성화된 T 세포를 반영한다. 섬유아세포와의 접촉으로부터 T 세포를 방출시킴에 의해 그 기전을 불활성화시키는 것은 선택적으로 $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포의 증식을 가능하게 하는 반면, 피부 내 다른 T 세포는 영향을 받지 않는다.

[0203] 접촉 매개된 억제의 방출은 피부 $V\delta 1$ T 세포에 의해 세포독성 TH1 편향된 사이토킨 반응을 촉진시킨다

[0204] 혼합 피부-유래된 림프구는 14일 동안 증식시키고 형광성 연관된 세포 분류를 사용하여 $\gamma\delta$ T 세포로부터 $\alpha\beta$ T 세포를 제거함으로써 순도가 최대 90%까지 되게 할 수 있다. 이들과 같이 고도로 집적된 세포들은 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지에서 150,000 세포/웰의 농도로 세포 배양 웰에 침적시켰다. 상등액은 24시간 이후 수거하고 LUMINEX®-기반 어레이를 사용하여 광범위한 이펙터 사이토킨에 대해 평가하였다. 전반적으로 예상치 않게, $\gamma\delta$ T 세포의 증식(섬유아세포로부터의 이들의 분리에 의해서만 유발되는)은 자발적으로 대량의 TH1 연합된 사이토킨, 예를 들어, IFN- γ ($12,383.46 \pm 16,618.90$ pg/ml), GM-CSF ($4,316.73 \pm 4,534.96$ pg/ml) 및 염증촉진 케모킨 CCL4 ($14,877.34 \pm 10,935.64$ pg/ml) 및 CCL3 ($1,303.07 \pm 757.23$ pg/ml; 도 5a)을 생성하였다.

[0205] 추가로, 세포는 증식 동안에 아토피 반응과 연관된 대량의 자발적 IL-13을 생성하고 이는 새롭게 단리된 피부-유래된 TCR-활성화된 $\gamma\delta$ T 세포와는 대조적이다. IL-17A와 같은 다른 사이토킨은 보다 낮은 수준으로 생성되거나 전혀 생성되지 않았다(도 8). 세포의 높은 이펙터 잠재력은 제조함 MICA(NKG2D 리간드), 항-CD3, 또는 PMA/요노마이신으로 자극된 후 추가로 증가될 수 있다. 악성 종양 표적 세포에 대한 증식된 $\gamma\delta$ T 세포의 세포독성 잠재력을 평가하기 위해, 본원 발명자는 24시간 공-배양 실험에서 확립된 형질전환된 세포주를 사용하였다. $V\delta 1^+$ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 통상적인 조직 $\alpha\beta$ T 세포 보다 월등한 용량-의존성 방식으로 Hela 세포(자궁경부) 및 Caco2(결장)를 향한 매우 높은 세포독성 활성을 보여주었다(도 5b). 추가로, $\gamma\delta$ -세포 매개된 세포독성은 가용성 모노클로날 항체를 사용하여 NKG2D 수용체를 차단시킴에 의해 강력하게 억제될 수 있고 이는 이 수용체가 적어도 부분적으로 탈-억제된 인간 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포에 의한 종양 감시에 관여함을 나타낸다. 이들 세포의 세포독성 잠재력은 다른 표적을 사용하여 추가로 확인되었다: HCT1954(유방 암종), MDAMB231(유방 암종), 및 HCT116(결장) (도 9).

[0206] 본 발명의 방법에 의해 생성되는 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 추가로 이들이 예를 들어, TNF α , IFN γ , 및 CD107a의 증가된 생성에 의해 임의의 T 세포 수용체 자극 리간드의 부재하에, 악성 종양과 강하게 연관된, NKG2D 리간드(MICA)에 응답한다는 점에서 다른 혈액-유래된 $\gamma\delta$ T 세포와는 구분될 수 있다(도 2 및 도 10). 이들은 또한 T 세포 수용체의 임의의 외인성 약리학적 또는 리간드 매개된 활성화를 진행하는 것 없이 세포 독성 T 세포 반응을 이행하고 따라서 이들의 자극의 부재하에 세포 독성이다(도 3 및 도 5). 이것은 다른 $\gamma\delta$ T 세포, $\alpha\beta$ T 세포 또는 NK 세포와 비교하여, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포가 T 세포 수용체 신호전달을 활성화시키는 임의의 외인성 체계의 첨가의 부재하에 반응하고 증식하는 이들의 능력에 고유함을 의미한다(도 3). 본 발명의 방법에 의해 생성되는 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포는 또한 CD69 및 PD-1에 대해 양성인 것으로 염색되었고, CD28의 발현이 부재이고 단지 저수준의 CD25를 발현하였다(도 1d 참조). 이러한 마커의 조합은 혈액-유래된 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 발현되지 않는다. 추가로, 이들은 혈액 유래된, 증식된 $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T 세포와 비교하여 CCR4 및 CCR8과 같은 조직 귀소 수용체의 보다 높은 발현을 보여주었다(도 7b).

[0207] 인간 소화관에서 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포

[0208] V δ 1 T 세포 수용체를 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포의 비-조혈 조직-거주 집단의 인간 결장-유래된 집단이 또한 동정되었다(도 6). 3개의 공여자에서, 이들 세포는 4 내지 5주의 시간 과정에 걸쳐 피부 세포에 대해 이용된 바와 같이 동일한 방법을 사용하여 증식시켰다. 증식 동안에, 결장-유래된 V δ 1⁺ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 섬유아세포-풍부 기관형 세포 배양물로부터 이들의 분리 후 Ki-67 상향 조절의 유사한 패턴을 보여주었다. 또한, 결장-거주 V δ 1⁺ 및 DN $\gamma\delta$ T 세포는 NKG2D 수용체에 대한 리간드를 제공함에 의해 강하게 자극되었다. 혈액-유래된 $\gamma\delta$ T 세포는 CD16 발현을 통해 항체 의존성 세포-매개된 세포독성을 이행하도록 잘 구비되어 있고, 림프시막과 조합되는 경우 CD20-양성 B 계통 림프종에 대하여 표적화된 증진된 세포독성을 입증하였다. 유사하게, 만성 림프구 백혈병(CLL) 및 HER2-양성 유방 암 세포는 모노클로날 항체를 사용하여 표적화된 경우 보다 효과적으로 사멸될 수 있다. 항체 오폐소닌화된 표적 세포를 표적화하기 위한 피부 유래된 V δ 1 T 세포의 잠재력을 평가하기 위해, 3개의 IgG1 연관된 Fc 수용체, CD16, CD32 및 CD64의 발현 수준을 정량하였다. 피부 유래된 V δ 1 T 세포는 소수 준의 Fc 수용체 CD16을 발현하지만 고 친화성의 IgG 수용체 CD64에 대해 양호한 발현 수준을 보여준다(도 11). 따라서, 조직-유래된 V δ 1 T 세포는 오폐소닌화된 종양 세포를 인지하고 ADCC를 통한 표적을 사멸시키는, 악성 종양 및 전이 부위로 항체를 가이드함에 의해 CD20 또는 Her2 치료요법과 같은 모노클로날 항체 치료요법에 대한 보조제로서 사용되도록 잘 구비될 수 있다.

[0209] 실시예 4. 비-조혈 조직-거주 $\gamma\delta$ T 세포 증식 조건의 최적화

[0210] 피부 -유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식

[0211] 혼합 림프구는 스캐폴드 배양 3주 내지 4주 후 수거하고, PBS 중에 세척하고, 회전 하강시키고 여과된 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청(Life Technologies), L-글루타민(292 μ g/ml; Life Technologies), 페니실린(100 유닛/ml; Life Technologies), 스트렙토마이신(100 μ g/ml; Life Technologies), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설포산(HEPES; 0.01 M; Life Technologies), 나트륨 피루베이트(1 mM; Life Technologies), 최소 필수 배지(MEM) 비-필수 아미노산(1X; Life Technologies) 및 50 μ M 2-머캅토에탄올(Life Technologies) 1 x 10⁶ 세포/ml의 농도로 Roswell Park Memorial Institute 1640 배지(RPMI-1640; Life Technologies) 중에 재현탁시켰다. V δ 1⁺ 세포의 초기 집단은 림프구의 1.12%였다. 세포는 2 x 10⁵ 세포/웰로 96 웰 평저 플레이트(Corning)에 또는 2 x 10⁶ 세포/웰로 24 웰 플레이트(Corning)에 증식을 위해 씨앗하였고 표 2에 제공된 농도로 지적된 바와 같은 인자를 보충하였다.

표 2

확장 배양물 중에 포함된 각각의 인자의 농도

인자	농도
IL-1β	10 ng/ml
IL-2	100 U/mL
IL-4	5 ng/ml
IL-6	10 ng/ml
IL-7	25 ng/ml
IL-8	5 ng/ml
IL-9	10 ng/ml
IL-12	2.5 ng/ml
IL-15	10 ng/ml
IL-18	50 ng/ml
IL-21	10 ng/ml
IL-23	10 ng/ml
IL-33	500 ng/ml
SDF1α	10 ng/ml
IGF-1	100 ng/ml

[0212]

[0213]

세포는 매일 현미경으로 모니터링하고 주당 3회 새로운 배지 및 사이토킨을 제공하였다. 완전한 컨플루언시 및 세포 응집 시, 세포를 요구되는 바와 같이 추가의 웰 및 플레이트에 1:1로 분할하였다. 21일 후, 세포는 ACCUTASE®(eBioscience)를 사용하여 수거하고, 계수하고 유동 세포측정기를 사용하여 분석하였다. 도 17a 및 도 17b는 증식 전 및 후에 대표적인 유동 세포측정 플롯을 보여준다. 표 3은 각각의 처리 그룹의 증식된 세포 상에서 상대적 CD27 및 TIGIT 발현에 추가로 도 17c에 상응하는 배수-증식 값을 보여준다. 최종 Vδ1 배수 증식은 증식 전 및 후 Vδ1 총 수(%CD3⁺ 범 γδ⁺ Vδ1⁺ 세포 ÷ 100) x (총 세포 수)를 사용하여 계산하였다.

표 3

다양한 인자의 존재하에 피부-거주 Vδ1 T 세포의 확장.

확장 인자 (IL-2 + IL-15) +	IL-2 + IL-15 로 정규화된 Vδ1의 확장	IL-2 + IL-15 로 정규화된 Vδ1에 대한 CD27 MFI	IL-2 + IL-15 로 정규화된 Vδ1에 대한 TIGIT MFI
IL-4	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.5	NT
IL-6	1.9 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.1
IL-7	1.6 ± 0.3	0.5 ± 0.7	1.1 ± 0.2
IL-8	1.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3	NT
IL-21	2.9 ± 1.6	2.8 ± 0.8	NT
IL-23	1.3 ± 0.5	0.7 ± 0.5	NT
SDF-1	3.9 ± 1.9	0.9 ± 0.4	NT
IL-4 + IL-21	7.4 ± 5.0	7.3 ± 2.5	0.4 ± 0.1
IL1b	3.0 ± 1.4	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.3
IL-12	6.8 ± 4.3	0.7 ± 0.8	NT
IL-18	3.3 ± 1.0	0.8 ± 0.5	0.9 ± 0.2
IL-33	2.5 ± 1.3	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.2
IL-33 + IL-4 + IL-21	2.0 ± 1.3	0.7 ± 3.5	0.4 ± 0.2
IGF-1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
IL-9	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2
IL-9 + IL-4 + IL-21	1.8 ± 1.3	7.4 ± 3.9	0.3 ± 0.1
IL-4 + IL-21 + 1% HPL	5.3 ± 0.5	5.4 ± 1.0	0.3 ± 0.1
IL-4 + IL-21 + 5% HPL	4.7 ± 0.9	4.8 ± 2.9	0.4 ± 0.1

[0214]

[0215]

단독의 IL-2 및 IL-15에서 증식과는 대조적으로, 다른 인자들의 첨가는 도 17c에 나타난 바와 같이 Vδ1 T 세포의 증식을 증가시켰다. IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21에 응답하여 Vδ1 T 세포의 고수율에 따라, 이들 인자들의 조합을 도 17d-17h에 나타난 바와 같이 추가로 조사하였다.

[0216]

CD27 및 TIGIT의 발현을 포함하는, 각각의 Vδ1⁺ T 세포 집단의 초기 및 최종 표현형은 평균 형광성 강도(MFI)를 사용하여 결정하였고, 각각의 그룹 내 샘플은 메디안 MFI를 취하여 평균화하였다. 각각의 증식 조건 하에 Vδ1⁺ T 세포에 의한 CD27 및 TIGIT의 발현은 표 4에 나타낸다.

표 4

다양한 인자의 존재하에 확장된 피부-거주 Vδ1 T 세포의 표현형.

확장 인자	CD27 MFI	TIGIT MFI
IL-2	113 ± 5	7919 ± 179
IL-2, IL-15	226 ± 33	4788 ± 679
IL-2, IL-15, IL-6	140 ± 91	6663 ± 767
IL-2, IL-15, IL-7	128 ± 115	6083 ± 1813
IL-1, IL-15, IL-4, IL-21	1284 ± 1048	1721 ± 308
IL-2, IL-15, IL1β	-136 ± 3.5	9453 ± 390
IL-2, IL-15, IL-18	121 ± 75	4396 ± 2782
IL-2, IL-15, IL-9	260 ± 21	5247 ± 2333
IL-2, IL-15, IGF-1	193 ± 94	6584 ± 1127
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, IL-9	790 ± 61	1389 ± 803
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 1% HPL	990 ± 258	1203 ± 222
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 5% HPL	421 ± 76	1045 ± 798

[0217]

[0218]

단독의 IL-2 및 IL-15에 비해, 다른 인자들의 첨가는 도 18a에 나타난 바와 같이 평균 형광성 강도에 의해 측정된 바와 같이 CD27의 발현을 증가시켰다. 주지할 것은, IL-4 및 IL-21의 첨가가 CD27 MFI를 단독의 IL-2 및 IL-15에 비해 약 8배로 상승시킨다는 것이다. 다시, IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21의 4가지 방식의 조합은 이의 다른 조합에 비해 CD27의 최고 발현을 생성시켰다(도 18b 및 18d). 주지할 것은, T 세포 상의 CD27의 낮은 발현이 흔히 추가의 장기 증식을 위한 잠재력이 거의 없는 소모된 최종 분화된 표현형과 연관된다는 것이다.

[0219]

상이한 경향은 증식된 Vδ1⁺ T 세포에 의한 TIGIT 발현과 관련하여 관찰되었다(도 19). 특히, TIGIT 발현은 IL-2 및 IL-15과 연계하여 IL-4 및 IL-21에 반응하여 감소하였다. 이러한 경향을 추가로 탐구하기 위해, TIGIT 발현을 CD27 발현의 함수로서 플롯팅하였다(도 20). TIGIT와 CD27 간의 음성 상호관계가 관찰되었다. 높은 TIGIT 발현은 T 세포가 이의 리간드 폴리오바이러스 수용체(PVR; CD155)의 발현이 높을 수 있는 종양 미세환경에 의한 억제에 민감할 수 있게 한다.

[0220]

실시예 5. 4개의 사이토킨 배양물은 세포 배양 혈청을 대체하기 위해 충분하다

[0221]

현재, 조직 또는 종양 거주 유래된 T 세포를 제조하는 경우 복합 혈액-유래된 혈청 및 혈장의 배지로의 첨가는 통상적이다. 그러나, 이들 혈청 또는 혈장 성분들의 사용은 그러한 성분들의 고유 배치별 변화, 그러한 성분들의 고비용, 진보된 치료요법 약품(ATMP) 산업에 걸친 고수요에 따른 제한된 공급, 및 그러한 성분들로부터 우발적 제제 교차-오염의 증가된 위험 때문에 바람직하지 않을 수 있다. 결과적으로, 본원에 기재된 바와 같은 목적하는 γδ T 세포의 증식 및 집적을 지지하는 사이토킨을 성공적으로 동정한 후, 그러한 사이토킨의 사용이 조직-유래된 γδ T 세포를 증식시키기 위해 전형적으로 사용되는 복합 혈청/혈장 성분들의 임의의 요건을 제거할 수 있는지를 시험하였다. 이를 추가로 시험하기 위해, 면역 세포를 피부 샘플로부터 방출시키고 혈장/혈청이 γδ T 세포 +/- 혈청의 증식 및 집적을 지지하기 위해 여전히 요구되는지에 대해 시험하였다. 따라서, 방출된 세포는 이어서 수거하고 "0일" 켄에 2개의 배지에 씨앗하였다. 제1 배지는 10% 인간 유래된 혈청 및 사이토킨과 함께 동물 유래 성분 부재(ADCF) 배지(TexMACS, Miltenyi)를 포함하였다. 제2 배지는 동일한 ADCF 배지/사이토킨 혼합물, 표준 한정된 보충물(정제된 인간 혈청 알부민, 재조합 인슐린 및 트랜스페린을 함유하는 CTSTM)을 포함하지만 임의의 혈청 부가물은 없다. 이러한 연구 결과는 도 21에 나타낸다. 놀랍게도, 균등한 집적 및 균등한 배수 발현은 인간 혈청의 존재 또는 부재하에 관찰되었다. 이것은 임의의 동물 유래된 성분 또는 인간 혈청의 부재하에 조직-유래된 γδ T 세포를 증식시키고 집적시킬 수 있음을 보여준다.

[0222]

이어서, 이 접근법은 표준 기관형 배양물로부터 수거된 출발 혼합 림프구 집단으로부터 γδ T 세포의 우선적 증식에 대해 평가하였다. 성취될 수 있는 경우, 특히, 프로토콜이 > 50% γδ T 세포를 포함하는 최종 증식된

림프구 집단을 유도하는 경우 그러한 우선적 증식은 고도로 요구될 수 있다. 실제로, 지금까지, 통상적인 집적 프로토콜은 소수의 $\gamma \delta$ 세포를 물리적으로 분리하거나 다수의 $\alpha \beta$ 세포를 물리적으로 고갈시키기 위해서는 자기 면역고갈 기술(예를 들어, 제조원(Miltenyi 또는 Dynal)) 또는 유동 세포측정 분류 기술(예를 들어, 제조원(BD Biosciences))과 같은 고갈 또는 집적 기술의 사용을 필요로 한다. 대신, 본원의 연구는 본 발명의 방법이 그러한 물리적 분리 또는 고갈 프로토콜에 대한 필요 없이 임의의 소정의 출발 혼합된 림프구 집단에 존재하는 $\gamma \delta$ 세포를 집적시킬 수 있는지를 평가하였다. 놀랍게도, 출발 집단에 또한 존재하는 다른 세포 유형 이상 또는 초과로 $\gamma \delta$ 세포의 증식을 위한 프로토콜의 선택성으로 인해, 그러한 집적은 이들 증식 방법을 사용하여 성취되었다. 이것은 배양물에 존재하는 모든 세포의 50% 초과를 차지하는 보다 집적된 보다 순수한 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 유도하였다. 이 집적은 혈청의 존재 및/또는 부재하에 성취되었고 도 21 및 도 22a 내지 22d에 추가로 나타내고, 여기서, $\gamma \delta$ T 세포는 >100 배 증식하였고, 이 조직 샘플에 대한 모든 경우에 대해 $\gamma \delta$ T 세포의 순도를 < 50%에서 > 50%로 증진시킨다.

[0223] 단리 및 증식 방법

[0224] 혼합된 림프구는 실시예 2에서 뿐만 아니라 클락 프로토콜에 의해 이전에 기재된 바와 같은 균등한 접근법을 사용한 스캐폴드 배양의 3주 후 조직으로부터 수거하였다. 수거된 세포의 결과 프로파일은 실시예 3에 기재된 것들과 유사하였다. 이들 수거된 세포는 HBSS + HEPES에서 세척하고, 회전 하강시키고 (i) iIL-2(100 IU/L), IL4(Biolegend, 5 ng/ml), IL-15(Biolegend, 20 ng/ml), 및 IL-21(Biolegend, 5 ng/ml)에 추가로 10% 인간 AB 혈청(Life Science Production) 또는 (ii) IL-2(100 IU/L), IL-4(Biolegend, 5 ng/ml), IL-15(Biolegend, 20 ng/ml), 및 IL-21(Biolegend, 5 ng/ml)에 추가로 5% CTSTM(Thermo Fisher Scientific)를 함유하는 TexMACS 배지(Miltenyi)에 재현탁시켰다. 혈청 함유 및 무혈청 배지 모두는 또한 pen/strep 항생제(각각 100 유닛/ml, 100 ug/ml, Life Technologies)를 함유하였다. 이어서, 세포는 24웰 플레이트(Corning)에 200만 세포/웰로 씨딩하였다. 일단 세포가 컨플루언트 하게 되면, 이들은 이어서 1-인-2(1-in-2) 내지 1-인-4(1-in-4)를 동일한 배지를 함유하는 새로운 웰에 분할함에 의해 증식시키고/계대하였다. 21일 쯤에, 세포는 ACCUTASE® 세포 탈착 용액(Thermo-Fisher)의 사용으로 수거하고 유동 세포 측정에 의해 분석하여 도 21 및 도 22a-22d에서 표시된 바와 같은 최종 세포 프로파일을 결정하였다.

[0225] 실시예 6. TIGIT 발현의 기능적 관련성

[0226] TIGIT는 도 23에 나타낸 바와 같이 소화관 거주 V δ 1 세포 상에서 구성적으로 발현되었다. 데이터는 통상적인 조직 분해에 의해 소화관으로부터 단리된 V δ 1 세포를 사용하여 생성하였다. 조직 거주 $\gamma \delta$ T 세포의 구성적 TIGIT 발현은 피부-유래된 V δ 1 세포와 관련될 뿐만 아니라 TIGIT 발현은 클락 프로토콜(격자판-기반 단리 과정)의 인공물이 아니다.

[0227] 추가로, 단지 IL-2 및 IL-15로 항온처리된 세포에서, 폴리오바이러스 수용체(PVR)는 IFN γ 발현(도 24a) 및 TNF α (도 24b)에 의해 측정된 바와 같이 TCR 신호 전달을 특이적으로 억제하였다. IL-2, IL-15, IL-4, 및 IL-21로 항온처리된 세포에서, PVR 억제성 효과는 IFN γ (도 25a) 또는 TNF α (도 25b)에 의해 측정된 바와 같이, TIGIT-음성 V δ 1+/V δ 3+, 세포 상에서 상실하였고, 4개의 사이토킨 혼합물로부터 비롯된 TIGIT-음성은 우선적으로 V δ 1+/V δ 3+ T 세포의 TIGIT-매개된 활성화의 억제를 방지함을 나타낸다.

[0228] 실시예 7. 증식 배양물 중에 IL-2의 IL-9로의 치환

[0229] 3명의 공여자(TS052, TS056, 및 SK073)로부터의 피부 조직을 9 mm 격자판에 위치시키고 IL-2 및 IL-15가 보충된 배지에서 3주 동안 배양하였다. 단리된 림프구는 IL-2, IL-4, IL-15, 및 IL-21(도 26a 및 26b 좌측 막대) 또는 IL-4, IL-9, IL-15 및 IL-21(도 26a 및 26b 우측 막대)가 보충된 배지에서 항온처리하였다. $\gamma \delta$ T 세포/격자판(도 26a) 및 V δ 1 세포/격자판(도 26b)의 최종 수율을 증식 3주 후 계산하였다.

[0230] 도 27a 내지 27c에 나타낸 바와 같이, IL-9는 배수 변화(도 27a), $\gamma \delta$ TCR+ T 세포 %(도 27b) 및 V δ 1+ T 세포 % (도 27c)에 의해 측정된 바와 같이 피부 $\gamma \delta$ T 세포의 증식에 있어서 IL-2의 기능을 대체하기에 충분하다. 피부 조직은 6명의 공여자(SK073, SK075, SK077, TS052, TS053, 및 TS056)로부터 기원하였다. 2개-사이토킨 각테일은 IL-2 및 IL-15를 포함하였고, 4개-사이토킨 각테일은 IL-2, IL-15, IL-21, 및 IL-4를 포함하였다.

[0231] 도 28a 및 28b에 나타낸 바와 같이, IL-9는 V δ 1+ T 세포 상에서 CD27 발현의 평균 형광 강도(MFI) (도 28a)에 의해 그리고 V δ 1+ T 세포 상에서 CD27 발현의 정규화된 MFI(도 28b)에 의해 측정된 바와 같이 피부 $\gamma \delta$ T 세포의 증식에 있어서 IL-2의 기능을 대체하기에 충분하다. 표준 배양 조건과 비교하여 CD27 발현에서 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 피부 조직은 4명의 공여자(SK073, TS052, TS053, 및 TS056)로부터 기원한다. IL-2 및

IL-15로 이루어진 2개-사이토킨 콕테일, 및 IL-2, IL-15, IL-21, 및 IL-4로 이루어진 4개-사이토킨 콕테일.

[0232] 피부-유래된 $\gamma\delta$ T 세포의 증식

[0233] 혼합 림프구는 스캐폴드 배양 3주 후 수거하고, 인산-완충 식염수(PBS) 중에서 세척하고, 회전 하강시키고 여과된 10% 열-불활성화된 FBS(Life Technologies), L-글루타민(292 μ g/ml; Life Technologies), 페니실린(100 유닛/ml; Life Technologies), 스트렙토마이신(100 μ g/ml; Life Technologies), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설펜산(HEPES; 0.01 M; Life Technologies), 나트륨 피루베이트(1 mM; Life Technologies), 최소 필수 배지(MEM) 비-필수 아미노산(1X; Life Technologies) 및 50 mM 2-머캅토에탄올(Life Technologies) 1×10^6 세포/ml의 농도로 RPMI-1640 중에 재현탁시켰다. 세포를 증식을 위해 2×10^6 세포/웰로 하기의 최종 농도로 나타낸 바와 같이 사이토킨이 보충된 배지로 24-웰 플레이트(Corning)에 씨딩하였다: IL-2: 100 U/mL, IL-4: 5 ng/mL, IL-9: 10 ng/mL, IL-15: 20 ng/mL, 및 IL-21: 10 ng/mL.

[0234] 세포는 현미경에 의해 매일 모니터링하고 이중 강도에서 사이토킨을 함유하는 새로운 배양 배지로 1 mL 배양 배지를 대체함으로써 의해 주당 3회 새로운 배지 및 사이토킨을 제공하였다: 즉, IL-2: 200 U/mL, IL-4: 10 ng/mL, IL-9: 20 ng/mL, IL-15: 40 ng/mL, 및 IL-21: 20 ng/mL.

[0235] 완전한 컨플루언시 및 세포 응집 시, 세포는 요구되는 바와 같이 추가의 웰 및 플레이트에 1:1로 분할하였다. 21일 후, 세포는 ACCUTASE®(eBioscience)를 사용하여 수거하고, 계수하고 유동 세포측정기를 사용하여 분석하였다. 최종 $\gamma\delta$ T 세포 및 $\gamma\delta$ 1 세포 수는 증식 전 및 증식 후 수를 사용하여 계산하였고 데이터는 증식 후 격자판 당 최종 세포 수율을 보여준다.

[0236] 다른 구현예

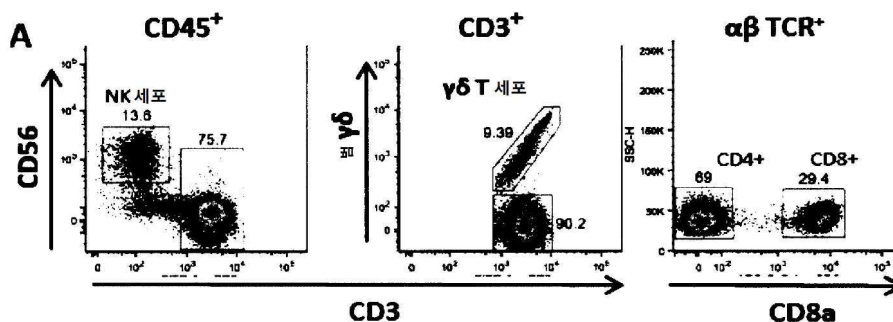
[0237] 본원에 언급된 모든 공개문헌, 특허 및 특허 출원은 본원에 각각의 개별 공개문헌 또는 모 출원이 특이적으로 및 개별적으로 참조로 인용된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 인용된다.

[0238] 본 발명은 이의 특정 구현예와 관련하여 기재되었지만, 추가로 변형될 수 있고 본 출원이 일반적으로 본원 발명의 원리에 따라 및 본 발명이 속하는 기술 분야 내 공지되거나 통상적인 수행에 있는 본원 개시내용으로부터의 그러한 출발을 포함하는 본 발명의 임의의 변화, 용도 또는 적응을 포함하는 것으로 의도되고 이전에 제시된 필수 특성에 적용될 수 있고 청구항의 범위에 따르는 것으로 의도된다.

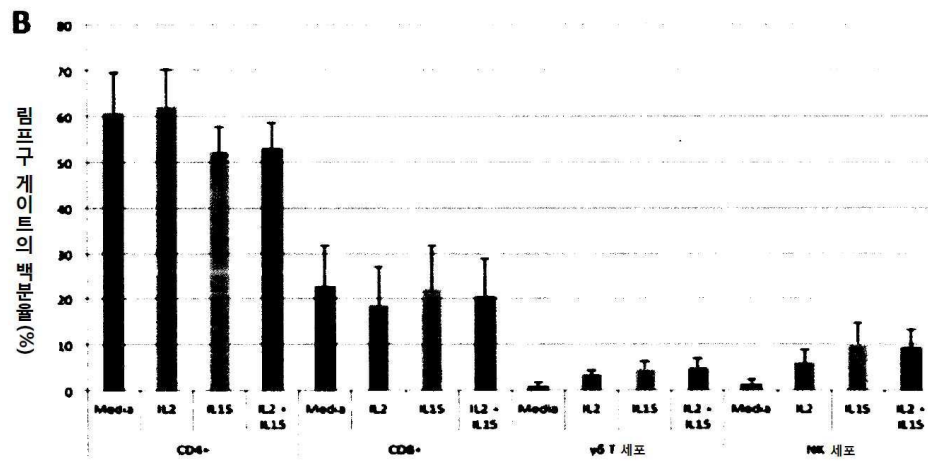
[0239] 다른 구현예는 청구항의 범위내에 있다.

도면

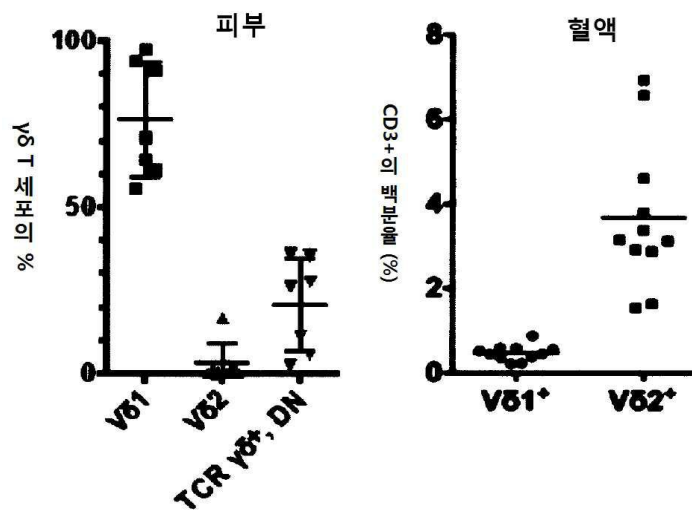
도면1a



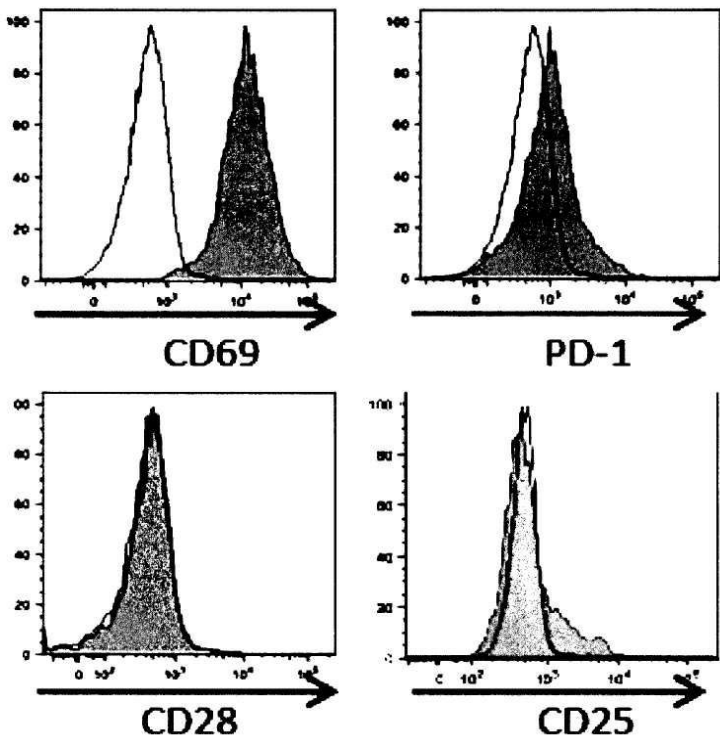
도면1b



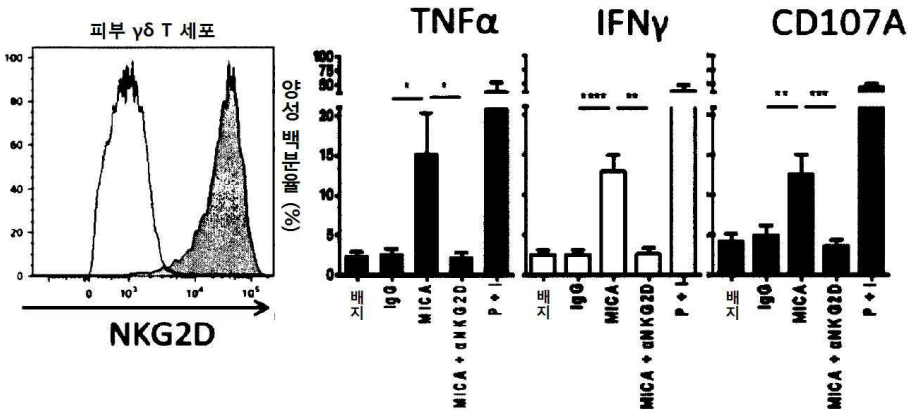
도면1c



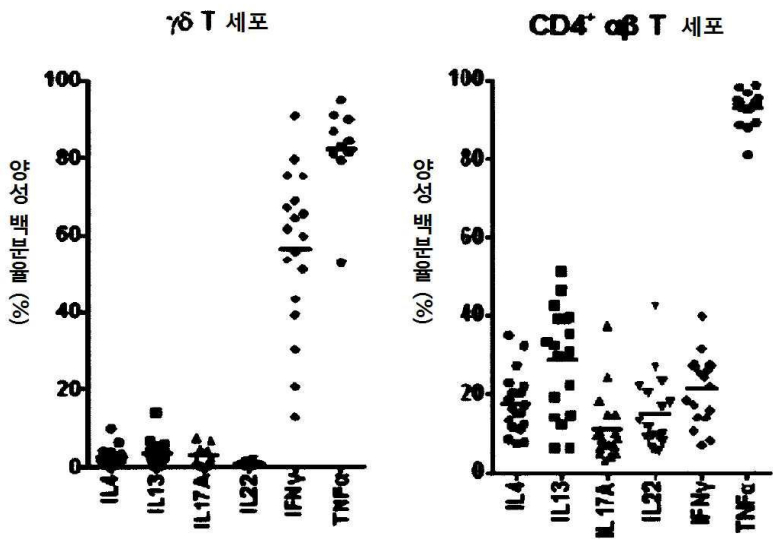
도면1d



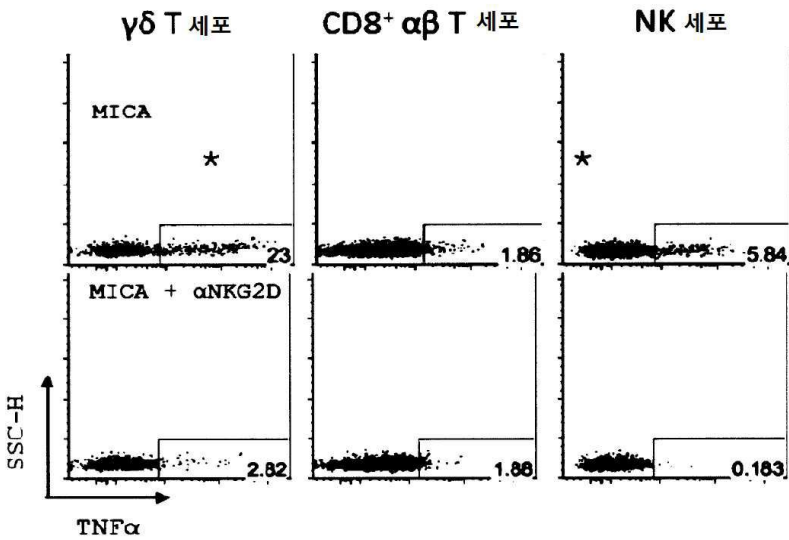
도면2a



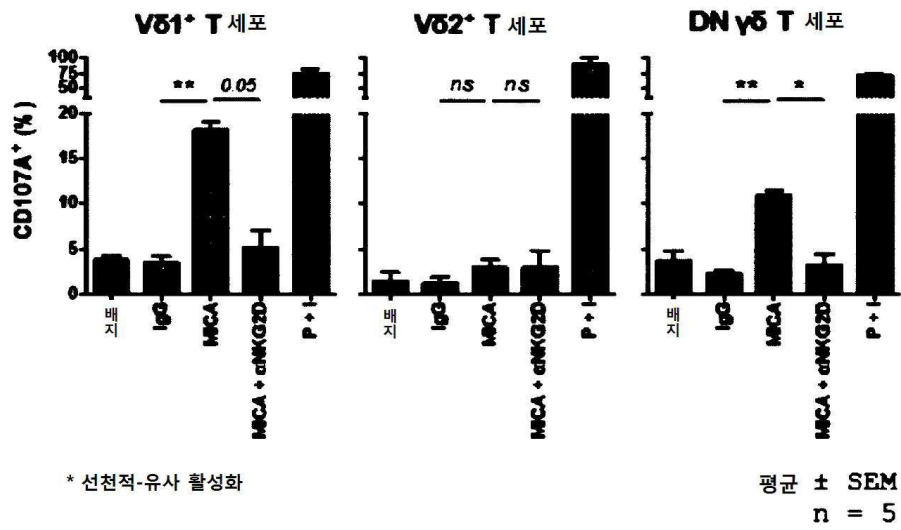
도면2b



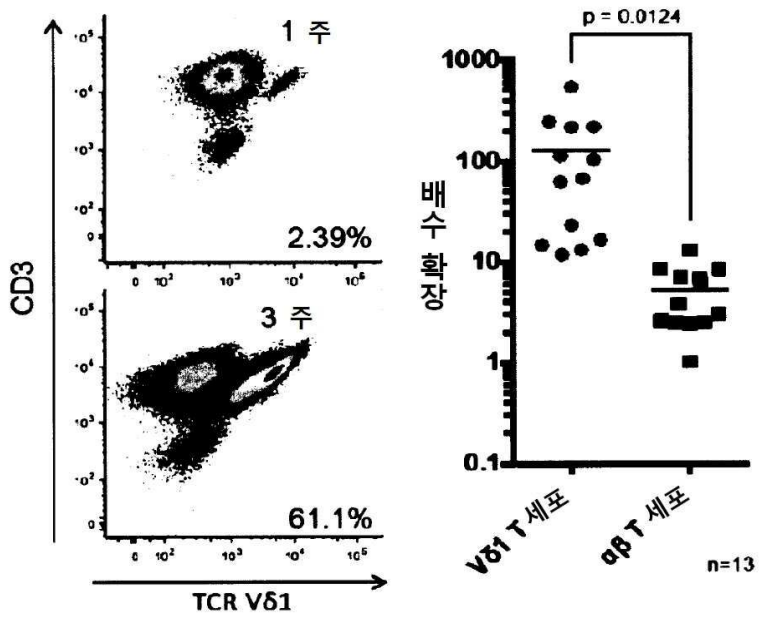
도면2c



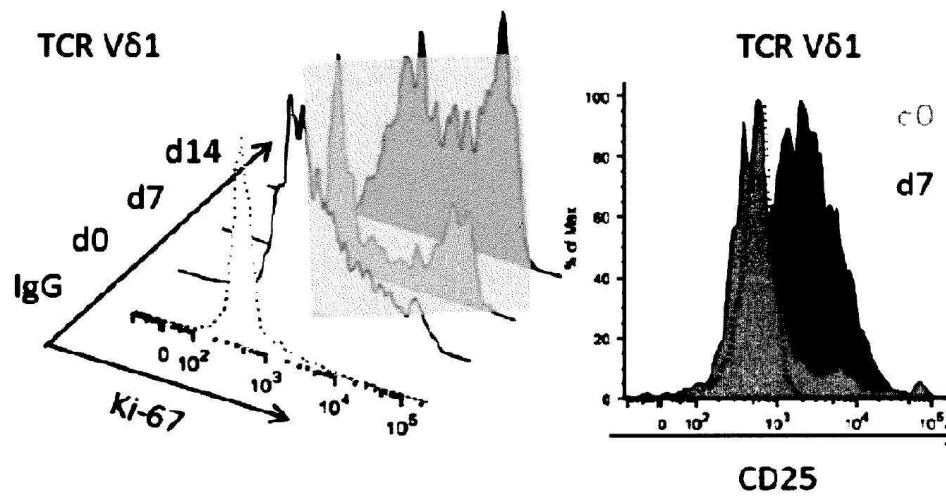
도면2d



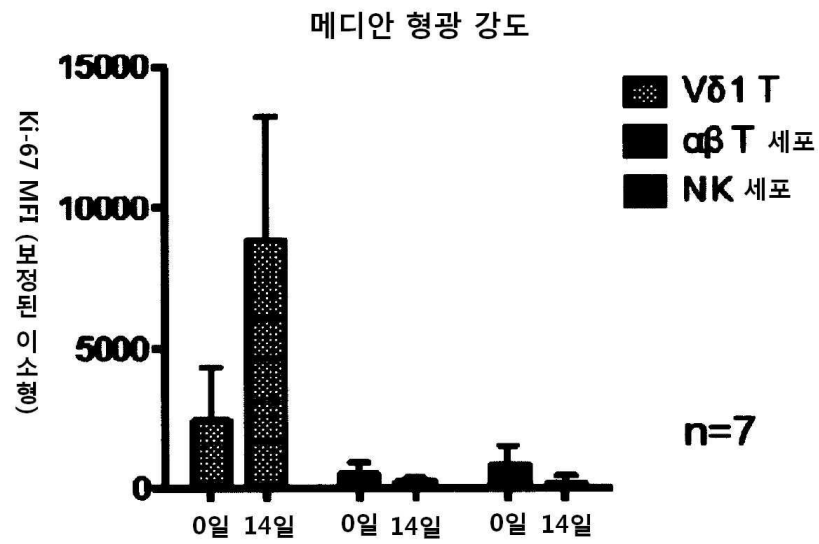
도면3a



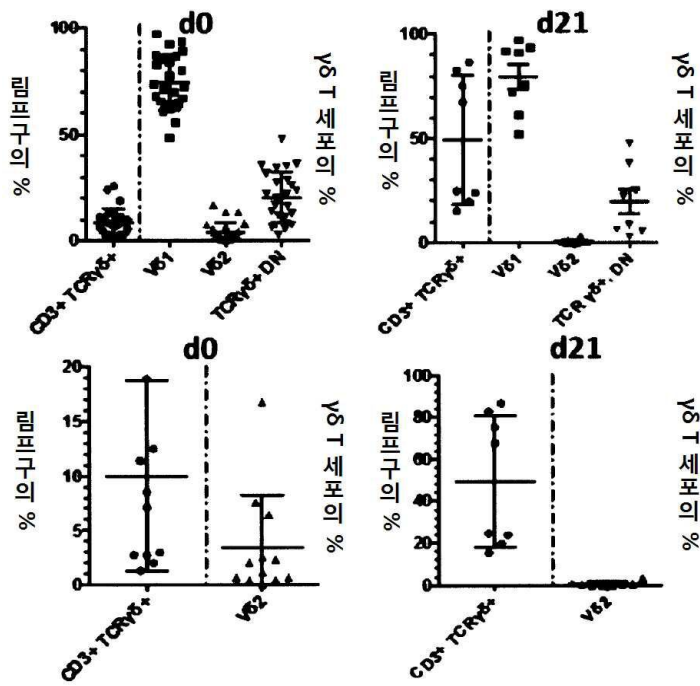
도면3b



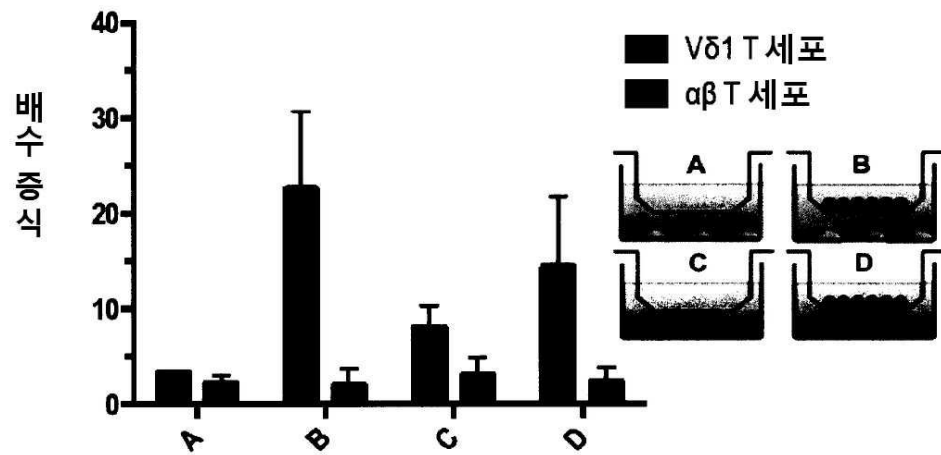
도면3c



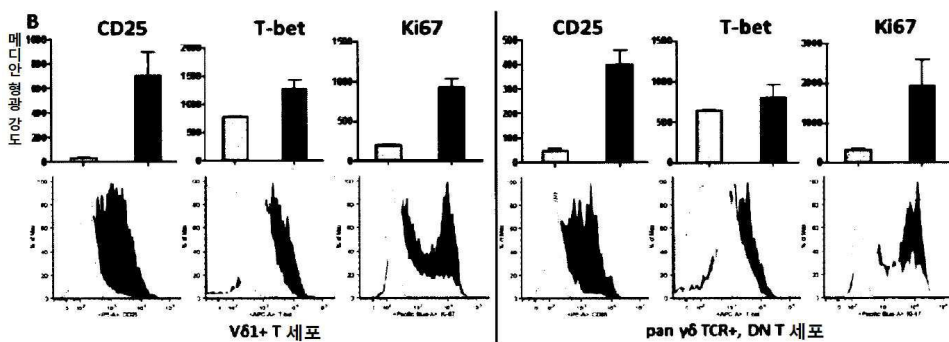
도면3d



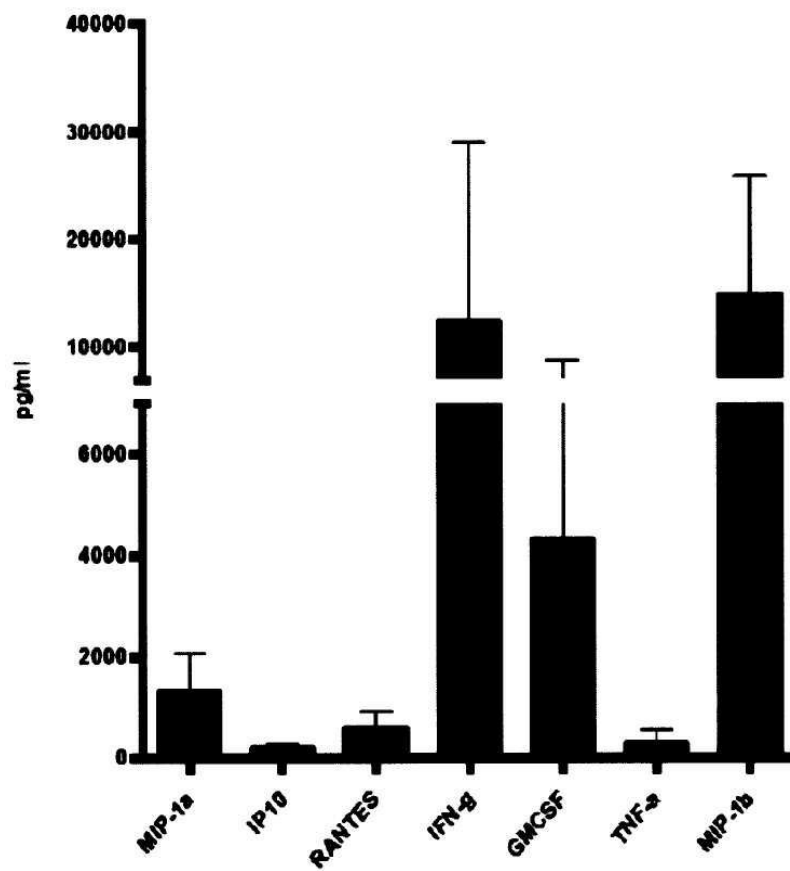
도면4a



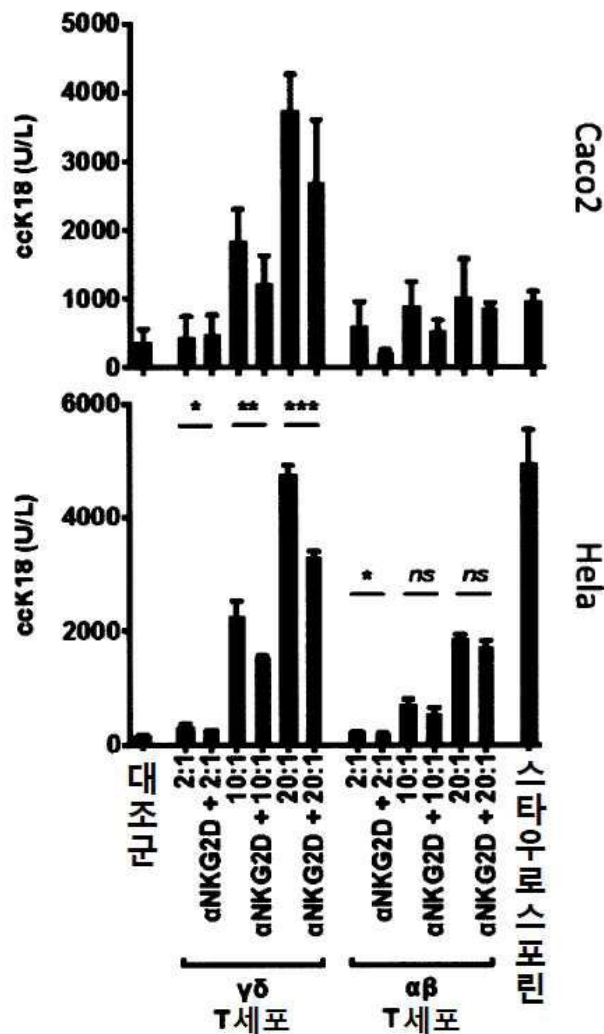
도면4b



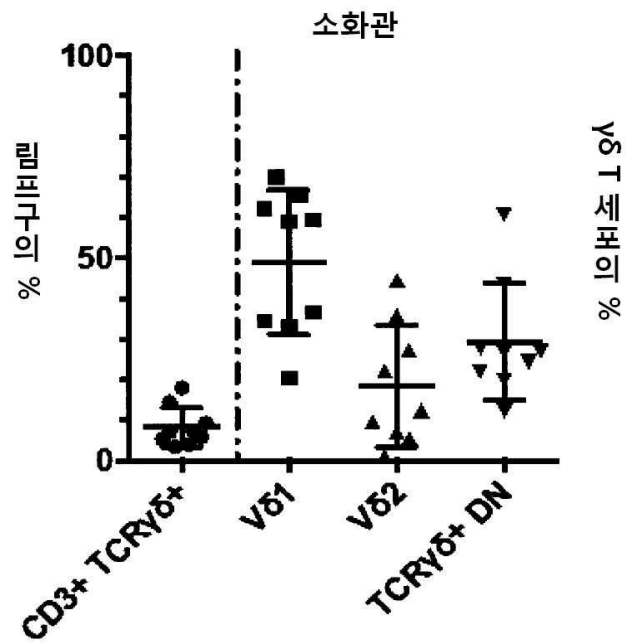
도면5a



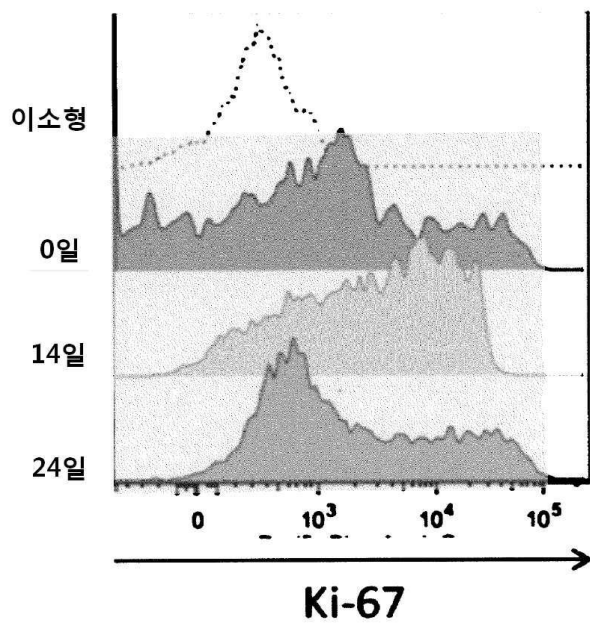
도면5b



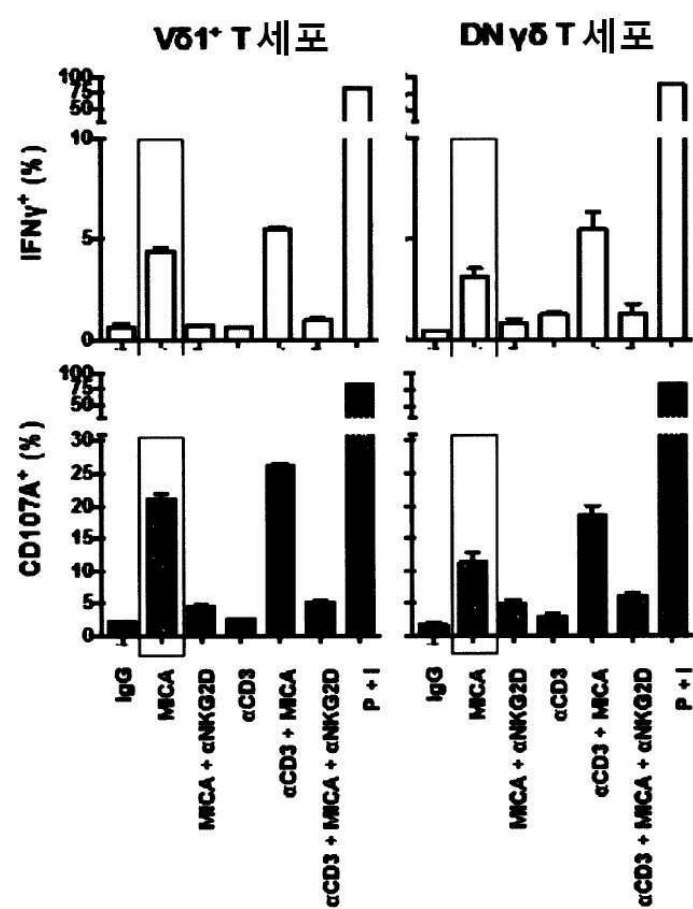
도면6a



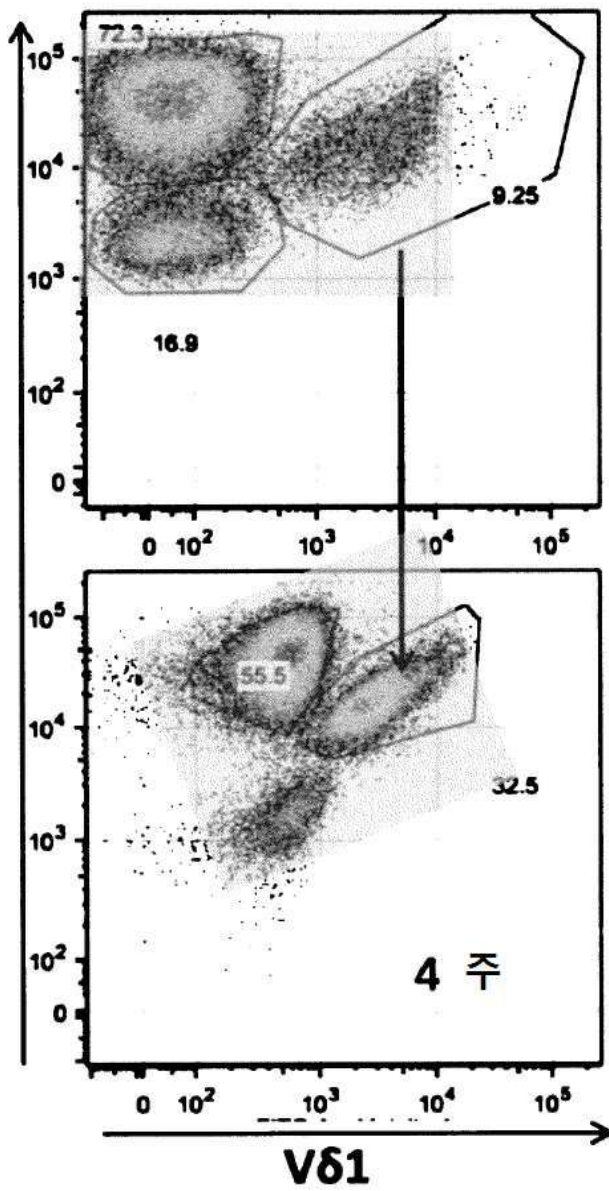
도면6b



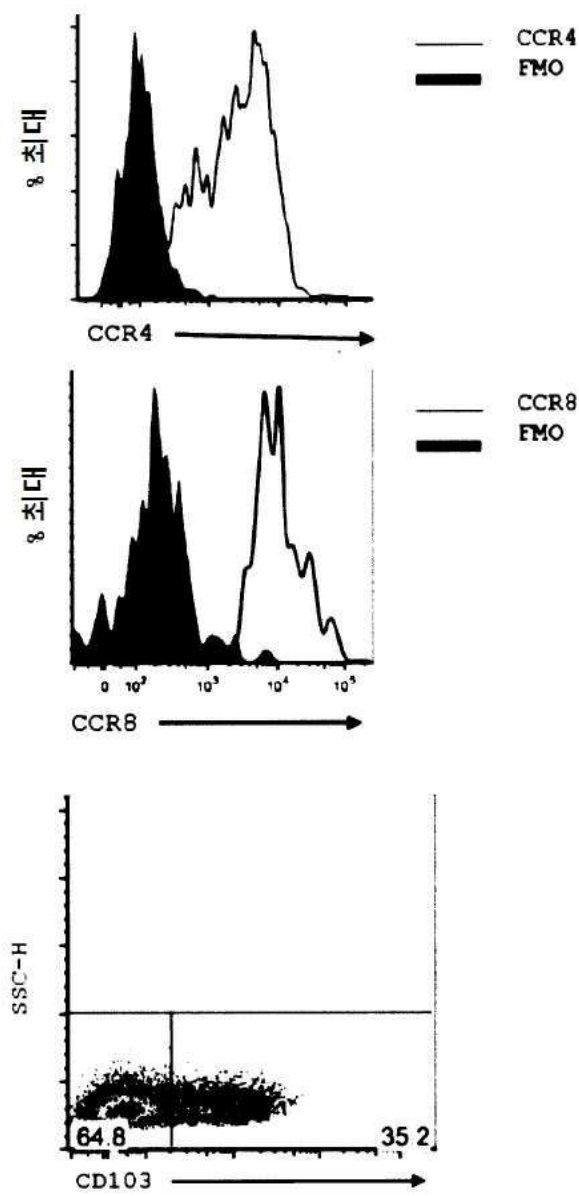
도면6c



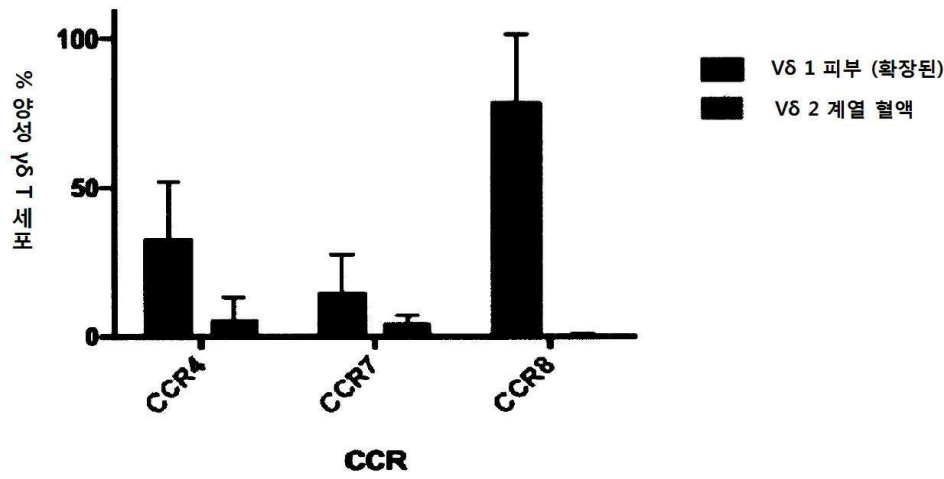
도면6d



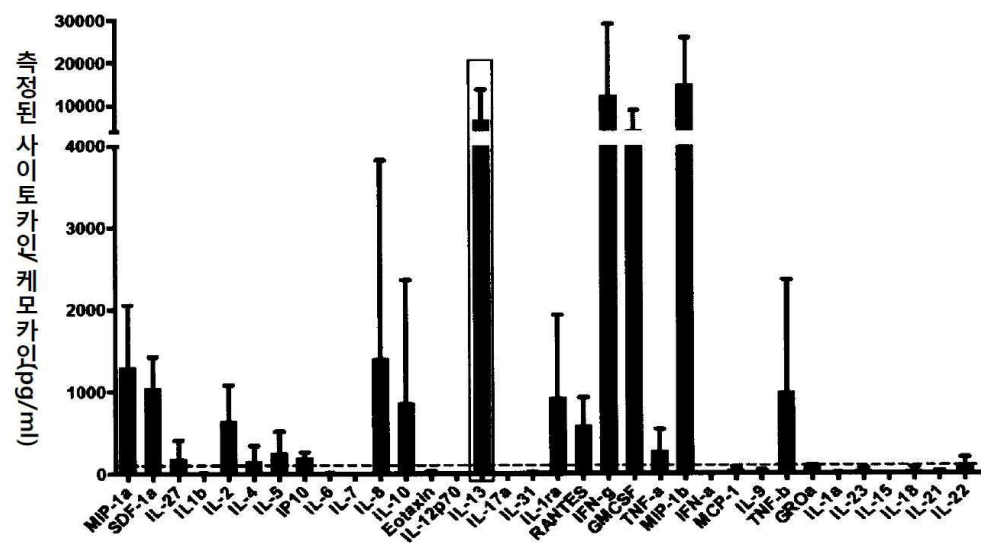
도면7a



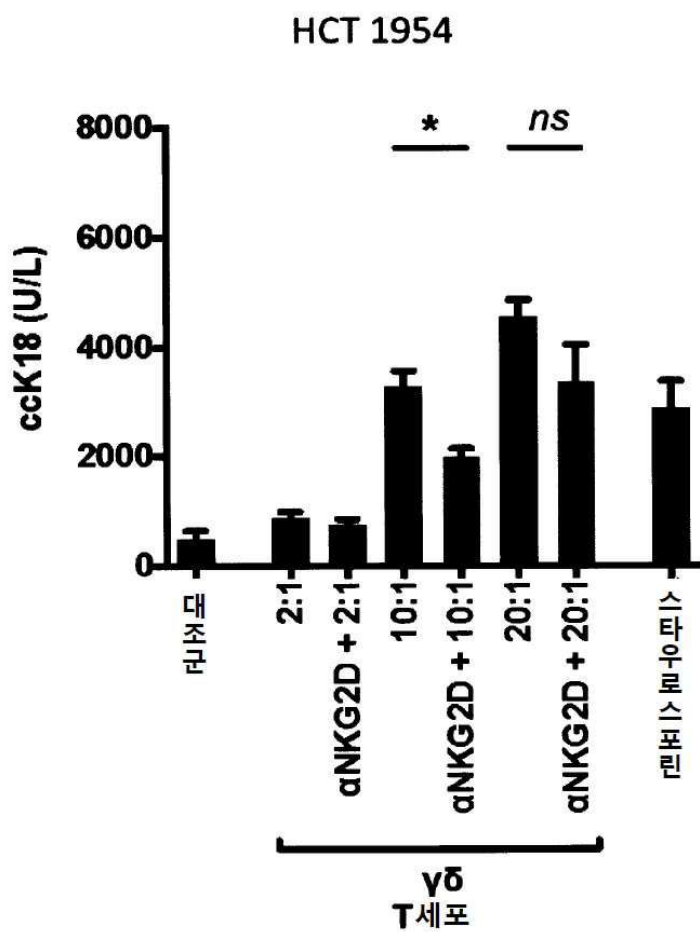
도면7b



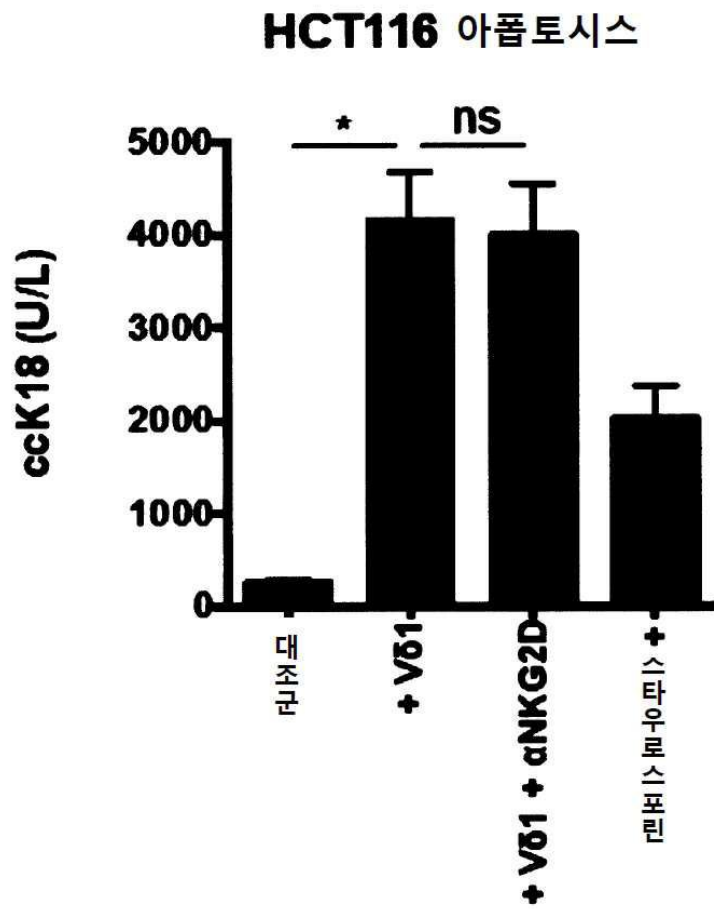
도면8



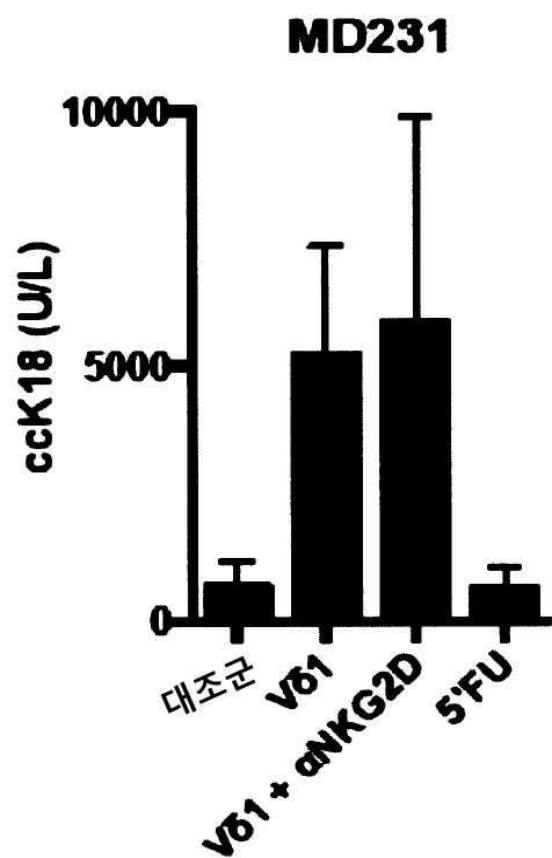
도면9a



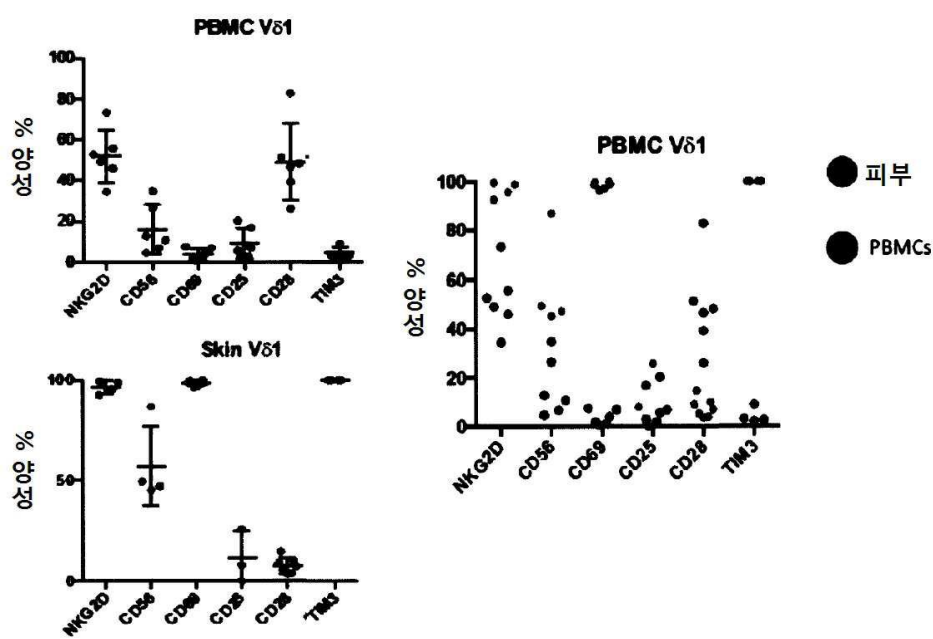
도면9b



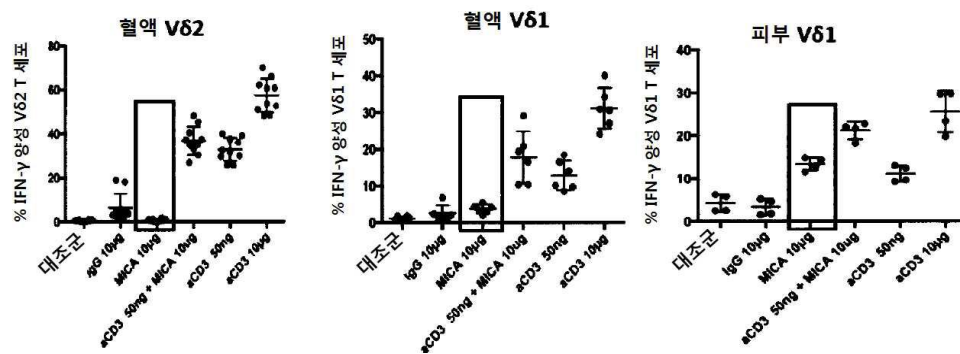
도면9c



도면10a



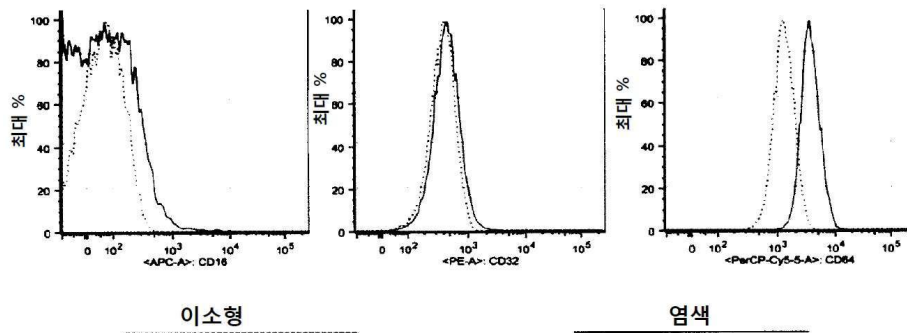
도면10b



도면11

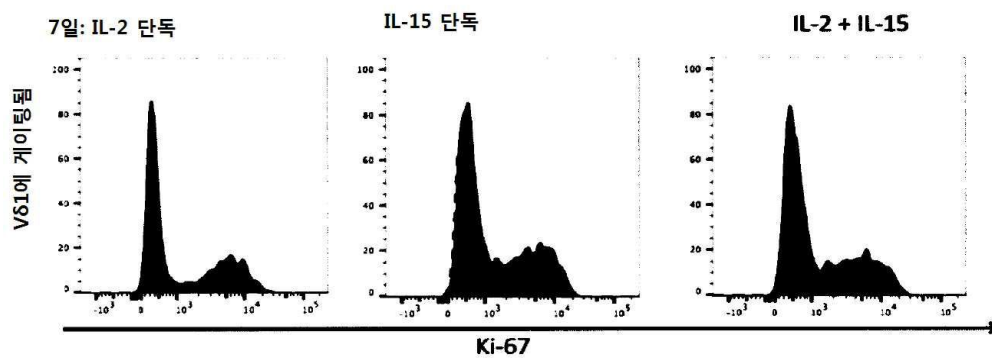
Fc 감마 수용체

IgG의 Fc 단편, 낮은 IIIa, 수용체 IgG의 Fc 단편, 낮은 IIa, 수용체 IgG의 Fc 단편, 낮은 Ia, 수용체 (CD16a) (CD32) (CD64)

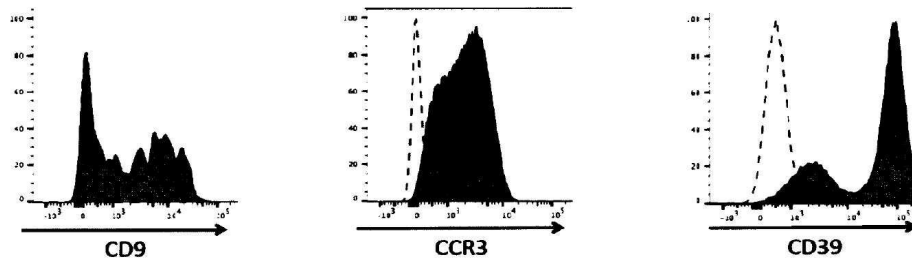


(4개 중) 하나의 대표적인 공여자

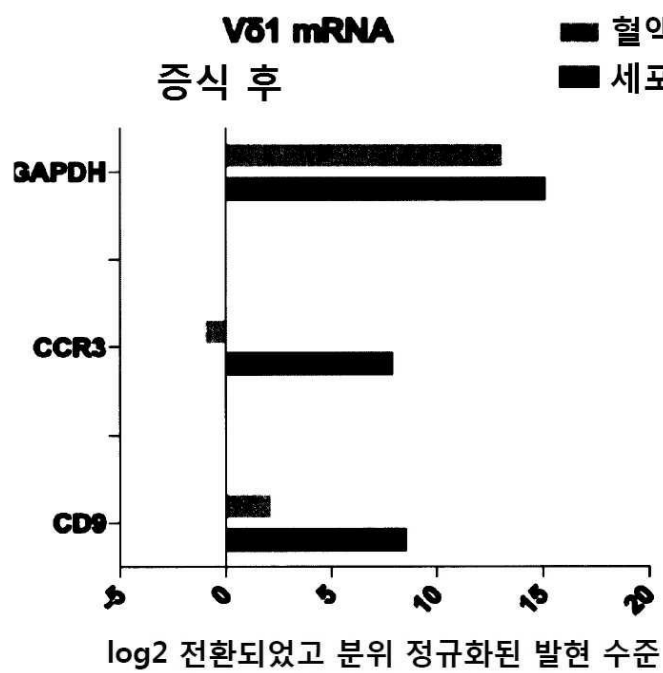
도면12



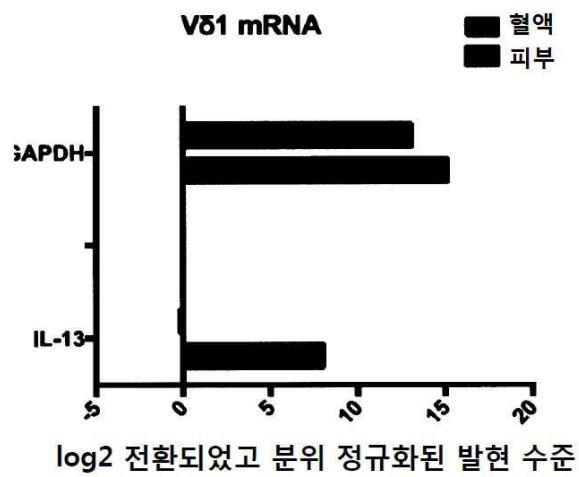
도면13



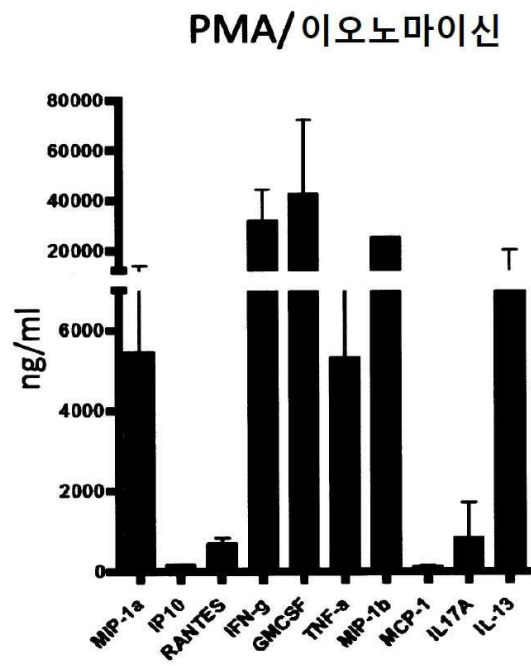
도면14



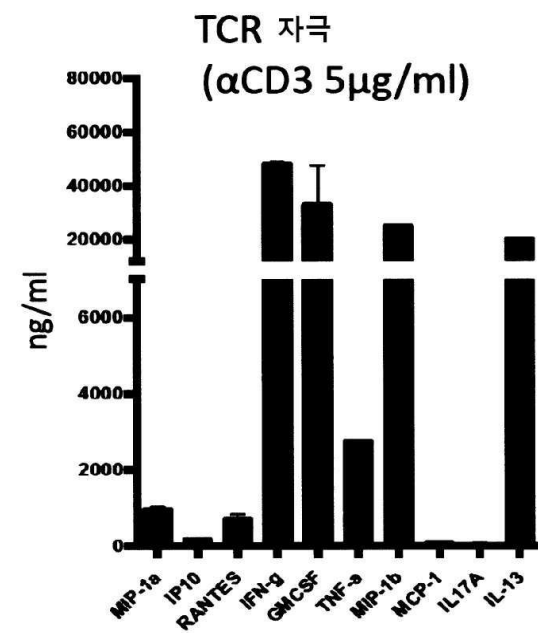
도면15



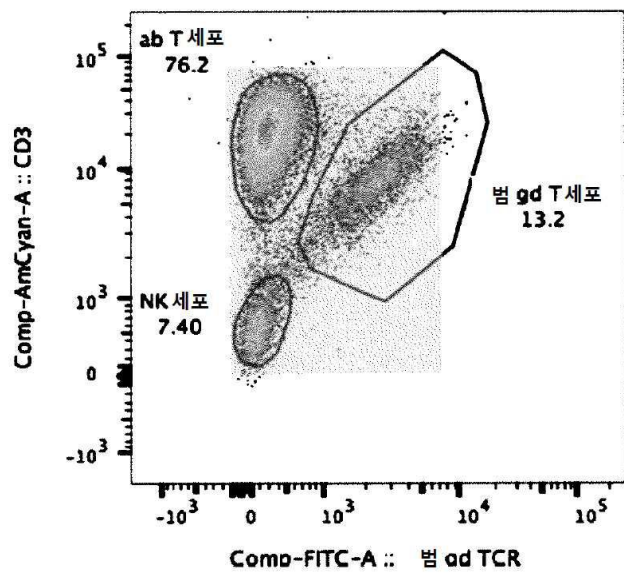
도면16a



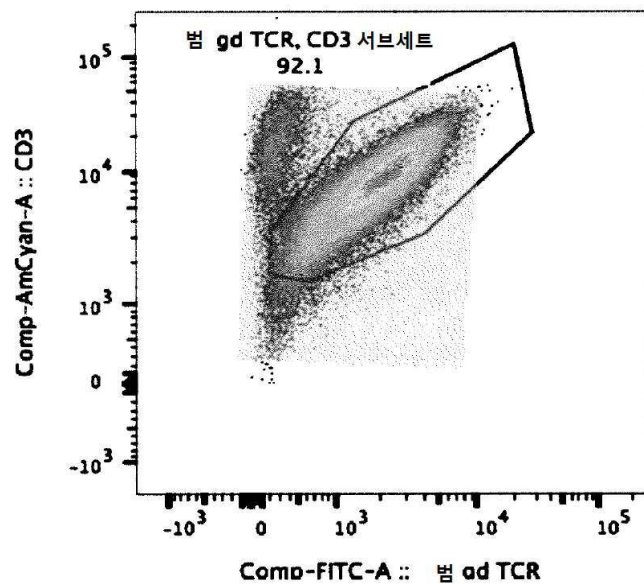
도면16b



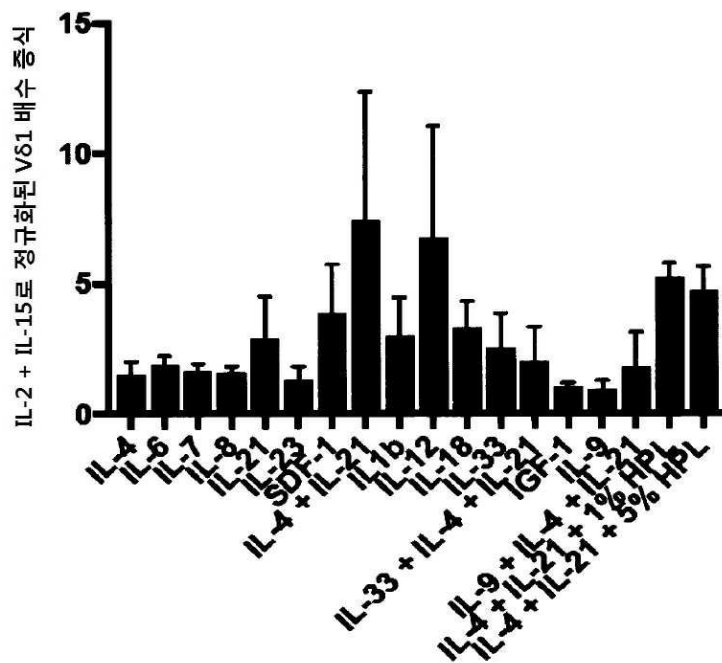
도면17a



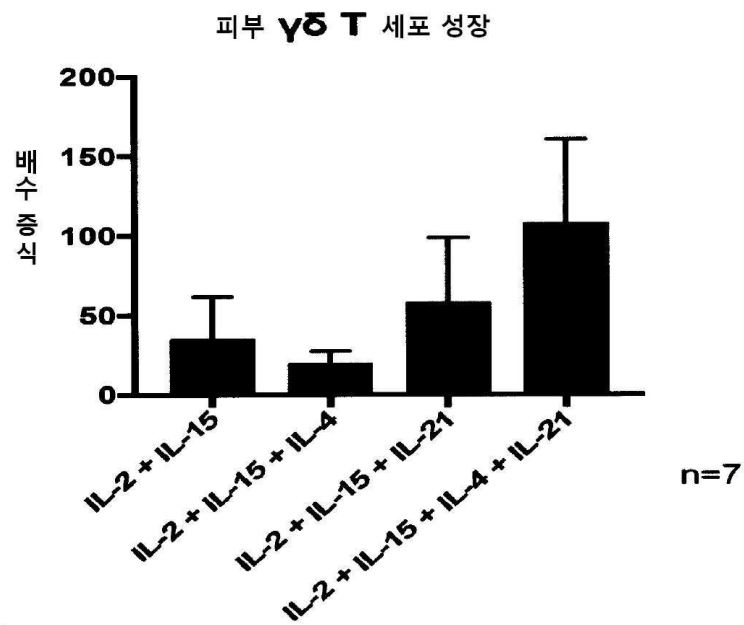
도면17b



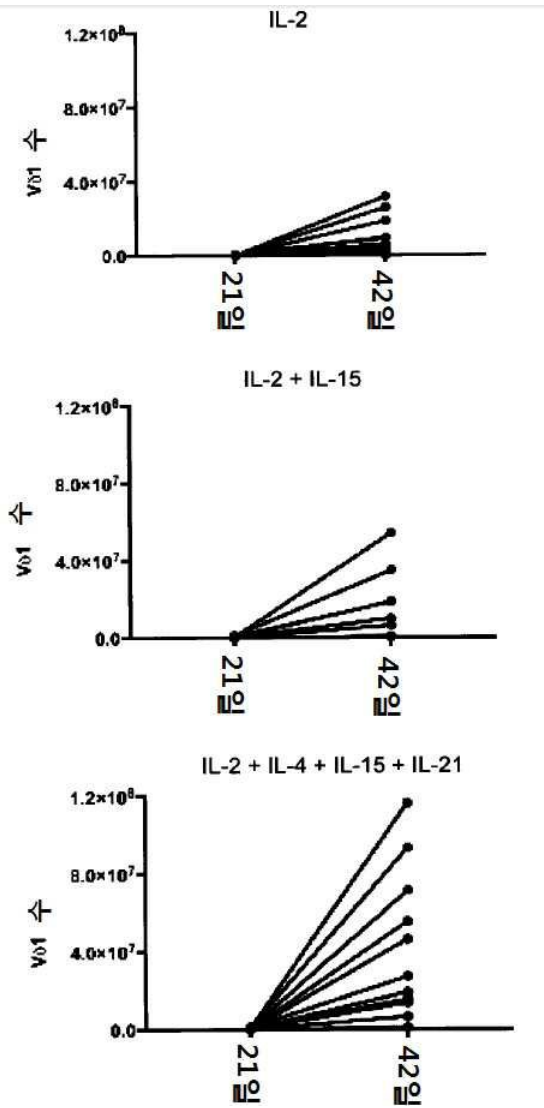
도면17c



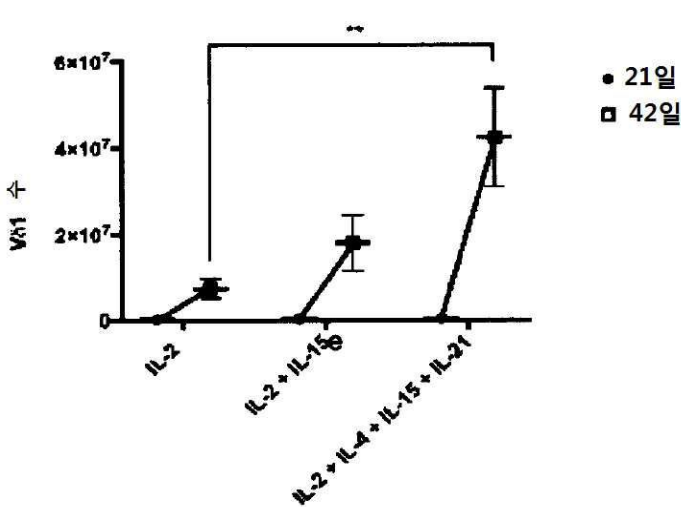
도면17d



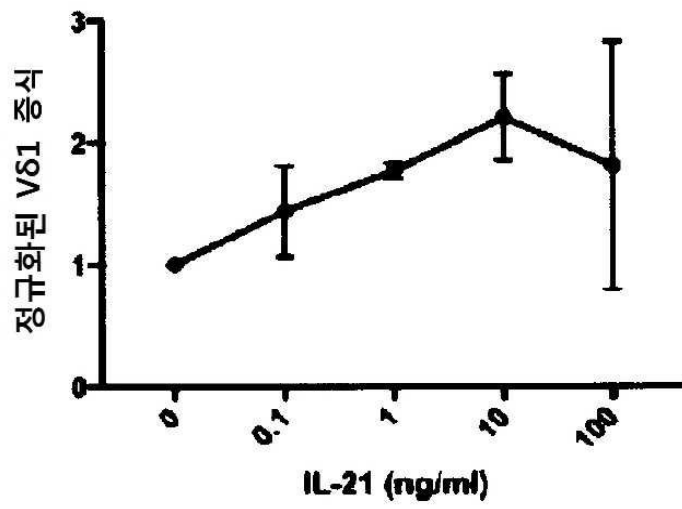
도면17e



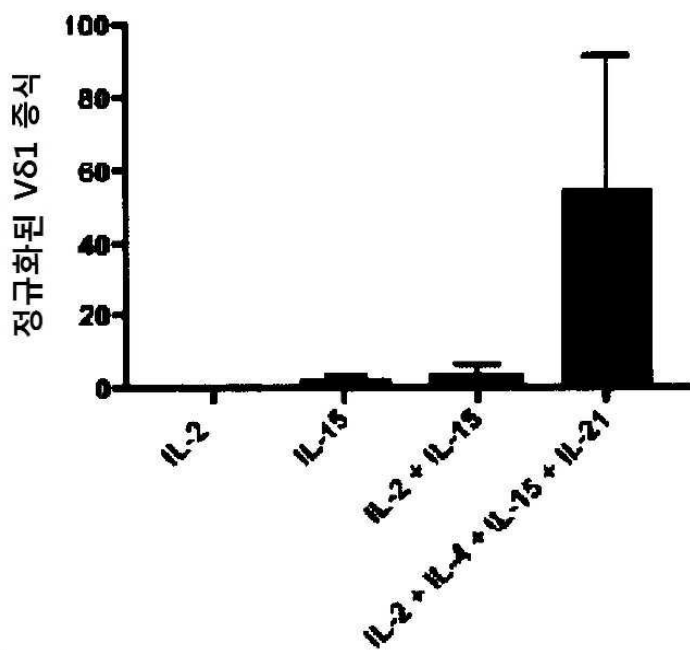
도면17f



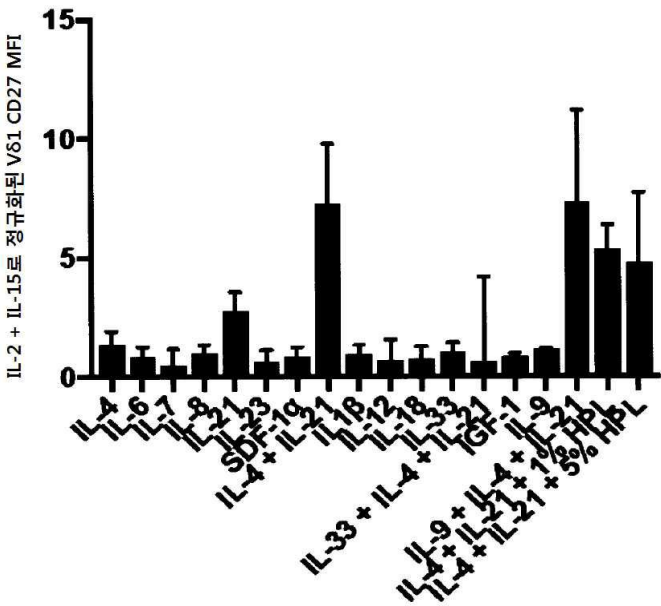
도면17g



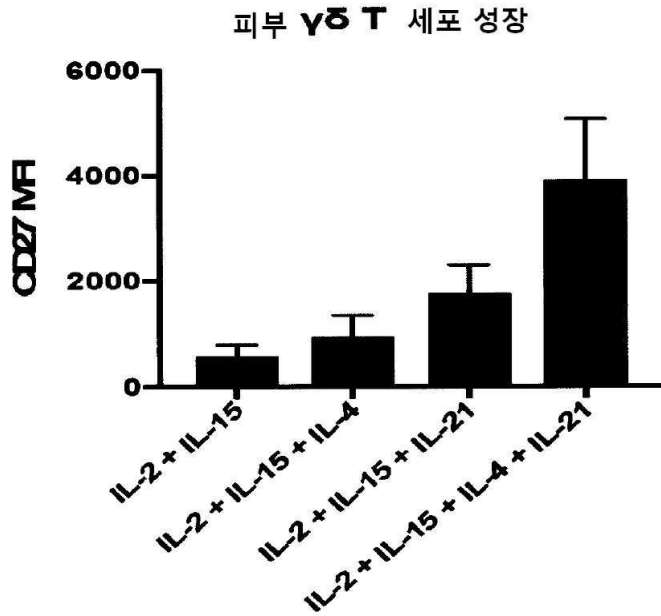
도면17h



도면18a

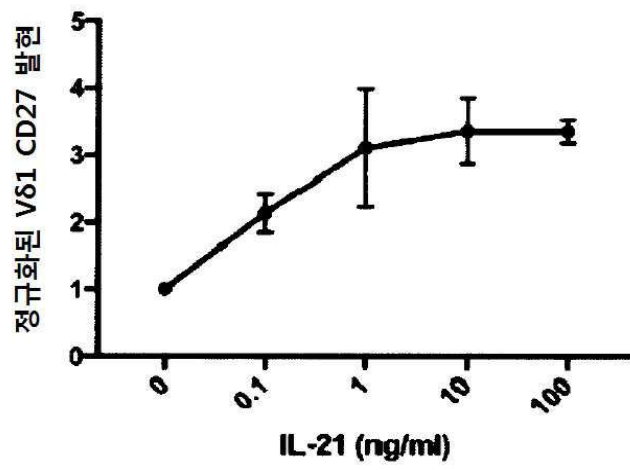


도면18b

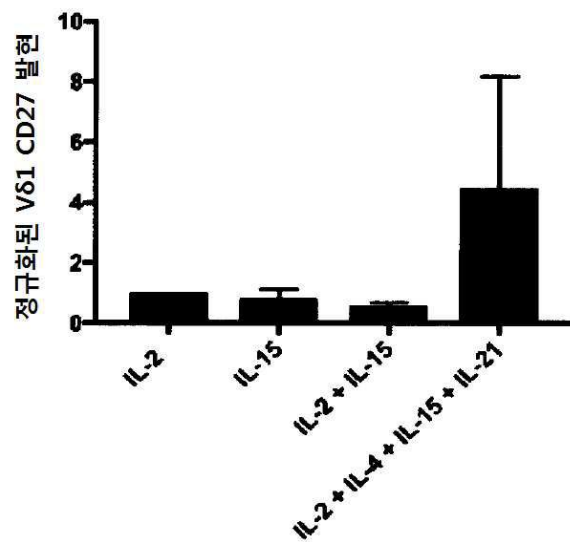


n=7

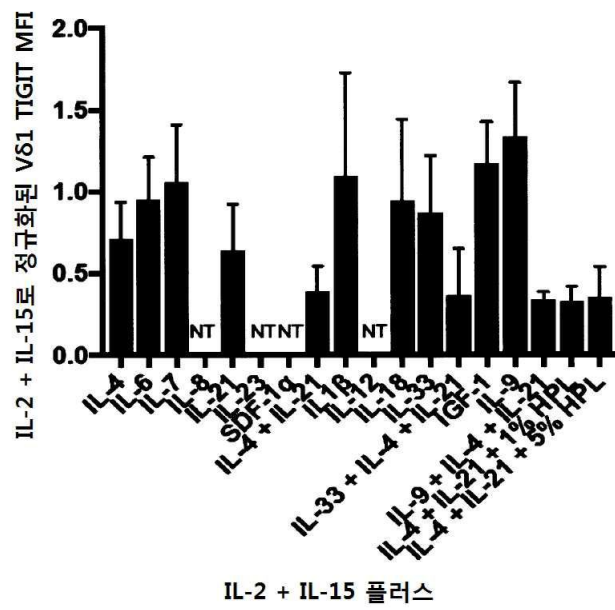
도면18c



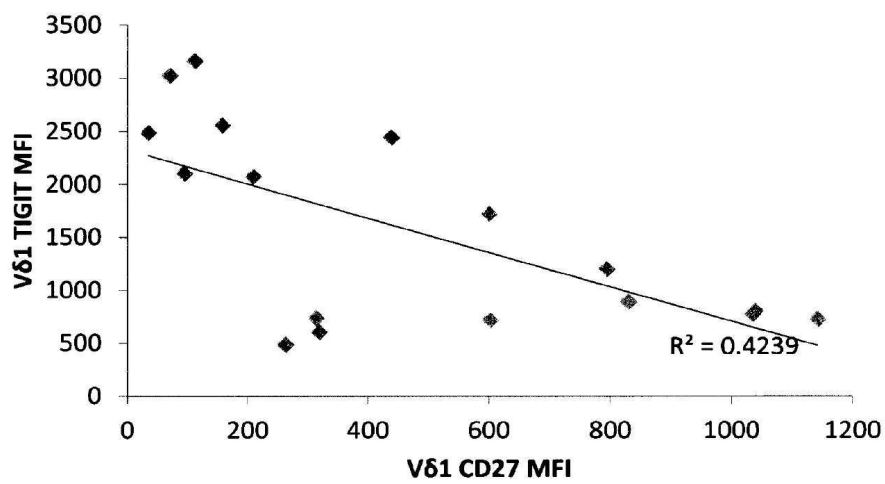
도면18d



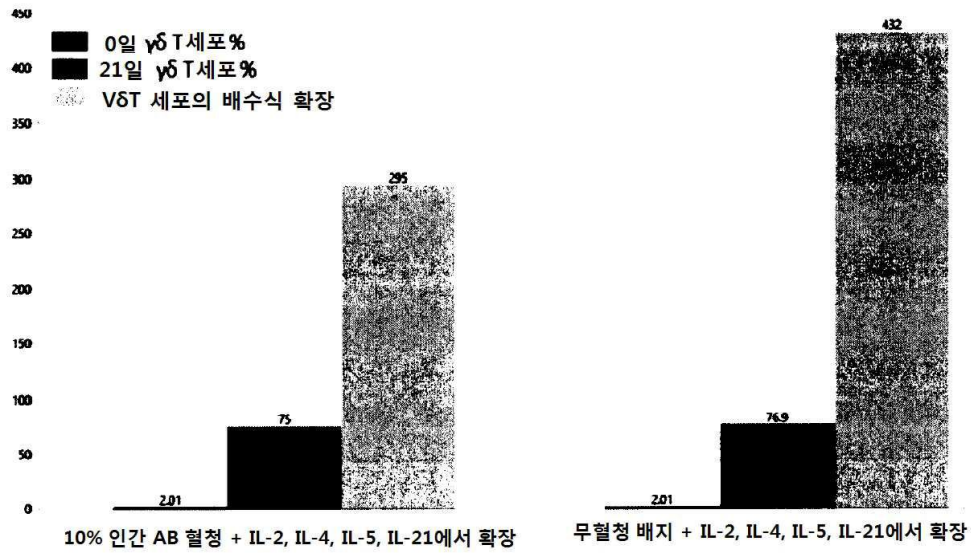
도면19



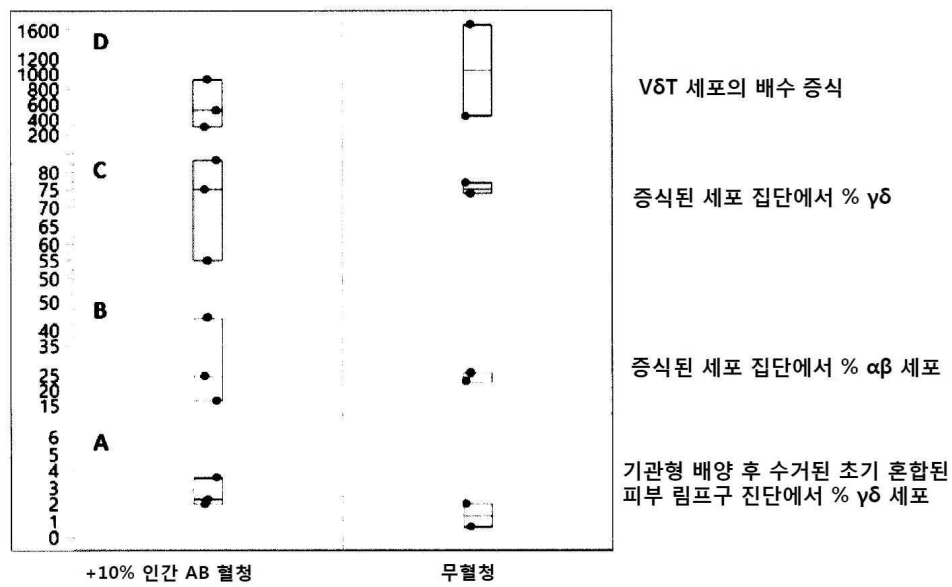
도면20



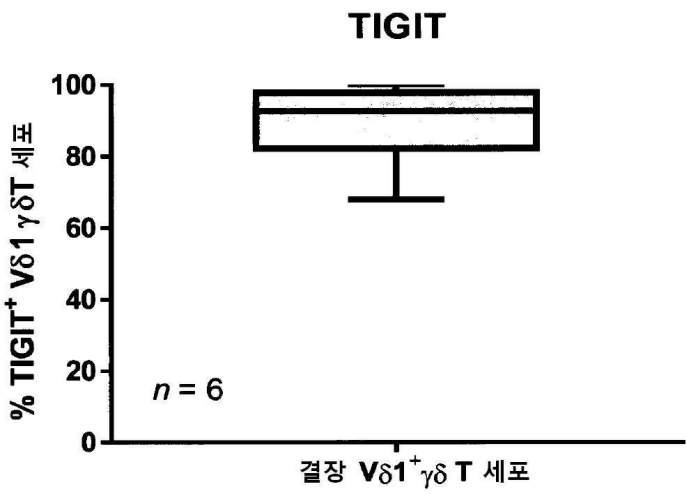
도면21



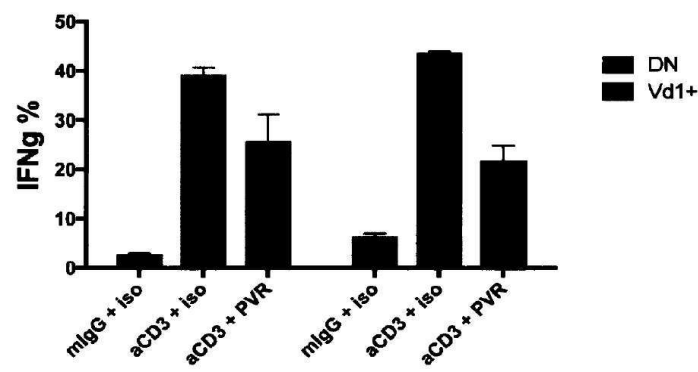
도면22



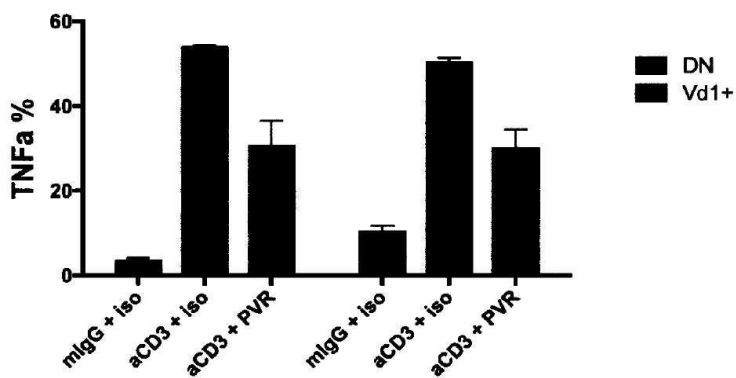
도면23



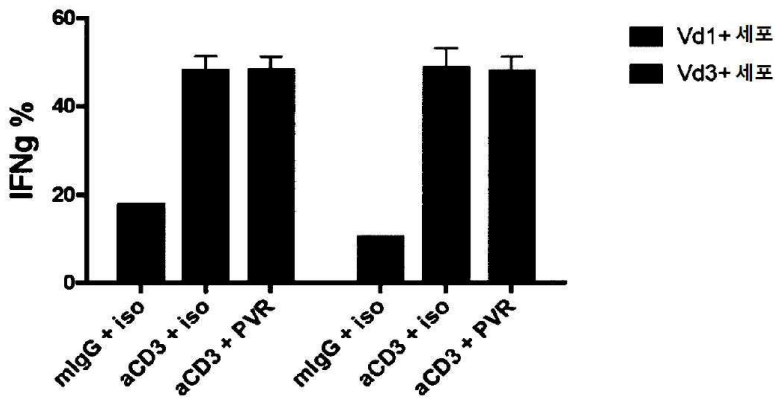
도면24a



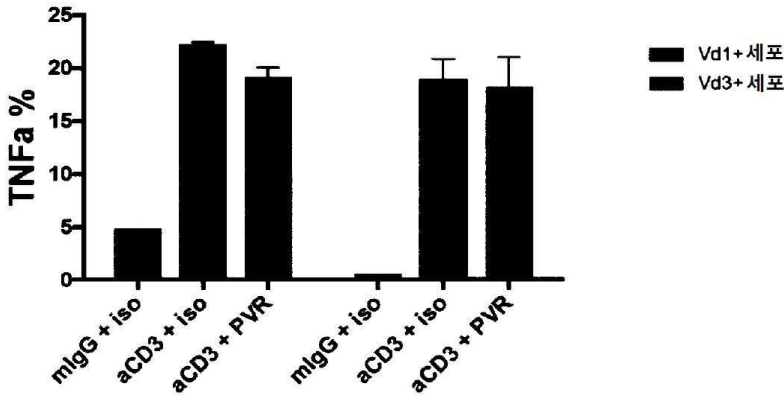
도면24b



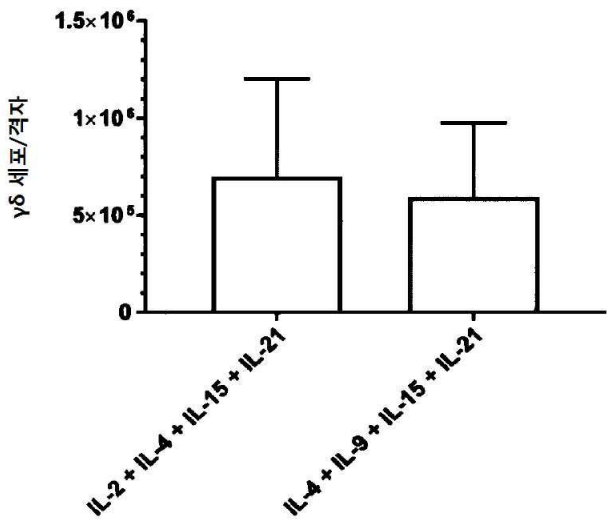
도면25a



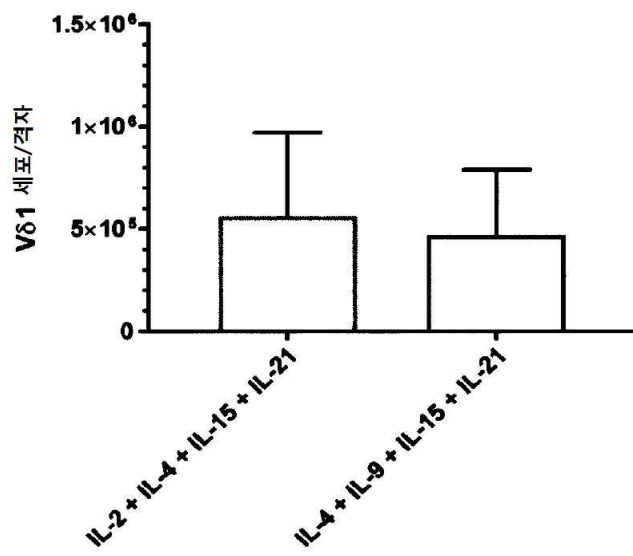
도면25b



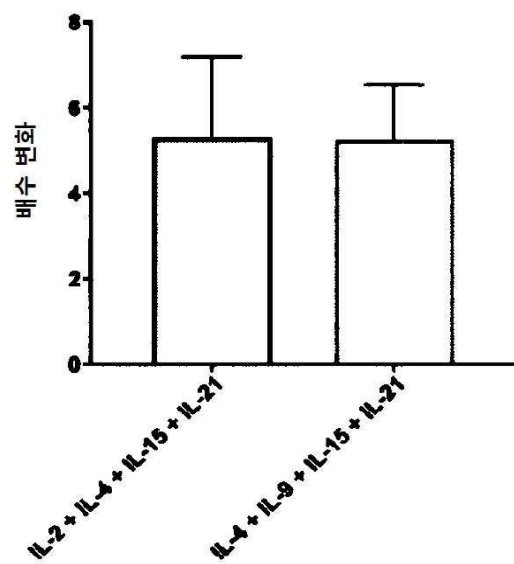
도면26a



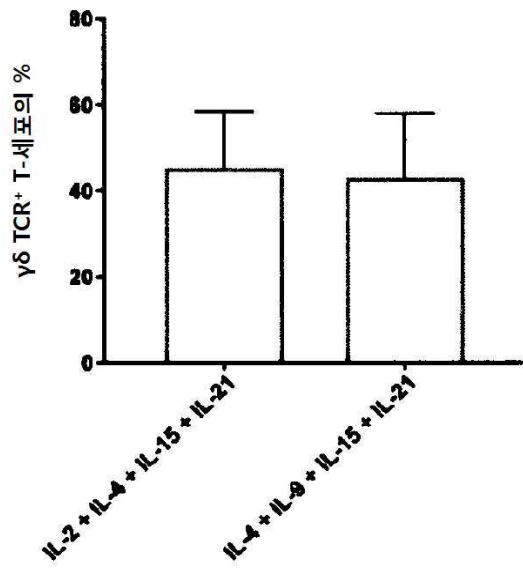
도면26b



도면27a



도면27b



도면27c

