(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0133442
(43) 공개일자 2018년12월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 39/0011 (2018.08)
(21) 출원번호 10-2018-7031631
(22) 출원일자(국제) 2017년04월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년10월31일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/058891
(87) 국제공개번호 WO 2017/178572
국제공개일자 2017년10월19일
(30) 우선권주장
62/321,964 2016년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
비비아 바이오테크 에스.엘.
스페인 마드리드 트레스 칸토스 28760 엔. 2 (피씨엠) 그리솔리아 씨/산티아고
(72) 발명자
발레스테로스 노벨, 장 안토니오
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
베넷, 테레사 앤
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영환

전체 청구항 수 : 총 67 항

(54) 발명의 명칭 **생체외 BITE 활성화된 T 세포**

(57) 요 약

표적 세포 살상(killing) 활성의 측면에서 매우 효과적인 면역 작동세포의 생성 및 식별은 표적 세포와 면역 작동세포 간 근접성을 최적화함으로써 향상될 수 있다. 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 다양한 암 종류, 예를 들어 고형암, 혈액 암 및 이의 전이 형태에 대해 매우 효과적인 치료제를 제공할 수 있다. 암 살상 T 세포를 생성하는 생체외 방법, 상기 면역 세포를 함유하는 조성물; 상기 세포를 이용하는 방법, 상기 표적 세포 살상 활성을 증진시키는 최적의 약제(agent)를 선택하는 방법, 최적화된 면역 세포를 선택하는 방법 및 다른 암 치료제에 대한 환자의 반응성을 평가하기 위해 상기 접근법을 이용하는 방법을 포함한다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0637 (2013.01)
C12N 5/0638 (2013.01)
G01N 33/5011 (2013.01)
(72) 발명자
헤르난데즈 캄포 필라
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
고메즈 곤잘레스, 크리스티나
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
골로차테기 기옌 줄리앙
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
마르티네스 로페즈, 호아킨
스페인 마드리드 28005 칼레 멜리야6 6° 비
로블레스 마케오 앨리시아
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.
프리모 라모스, 다니엘
스페인 마드리드 28760 스위트 205 칼레 산티아고 그리솔리아 1 마드리드 과학공원, 비비아 바이오테크 에스. 엘.

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 암을 가진 피검체로부터 적어도 하나의 T 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

(b) 적어도 하나의 암 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

(c) 적어도 하나의 T 세포, 적어도 하나의 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(proximity immuno-coaching factor: pICF)를 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 적어도 하나의 T 세포가 적어도 하나의 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한 조건 및 충분한 시간 동안 형성시켜, 적어도 하나의 암 살상 T 세포를 생산하는 단계; 및

(d) 다음과 같은 시험관내 단계들 중 하나, 둘, 셋 또는 모든 단계들:

i) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 팽창시키는 단계;

ii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 선택하는 단계;

iii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계;

iv) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 정제하는 단계를 포함하여, 암 살상 T 세포 또는 암 살상 T 세포 제조물을 생산하는 시험관내 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, pICF가 제조물에 0.005 내지 10 중량%의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, pICF가 T 세포에 친화성을 제공하는 제1 구성요소 및 암 세포에 친화성을 가진 제2 구성요소를 보유하고, 상기 제1 구성요소는 T 세포에 결합하고 암 세포의 실질적인 수에 결합하지 않으며, 제2 구성요소는 암 세포에 결합하고 T 세포의 실질적인 수에 결합하지 않는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, T 세포에 결합하는 제1 구성요소가 다음과 같은 세포 수용체: CD8, CD3, CD4, α/β T 세포 수용체(TCR), CD45RO 및/또는 CD45RA 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 제2 구성요소가 CD20, CD30, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신, TAG-72, 탄산 탈수효소(carbonic anhydrase) IX, PSMA, 엽산(folate) 결합 단백질, 다음 GD2, GD3, 또는 GM2 중에서 선택되는 강글리오사이드, Lewis-Y2, VEGF, VEGFR, αVβ3, α5β1, ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ERbB3, c-MET, IGF1 R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신, CD123, CD19, 또는 BCMA 중 하나 이상에 결합하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, pICF가 이중특이적 면역글로불린(BsIgG), 추가 항원 결합 분자에 작동적으로 결합된 면역글로불린, 이중 친화성 재표적화(DART) 항체 단편 또는 이중특이적 T 세포 이용자(BiTE) 중에서 선택되는 링커에 의해 작동적으로 연결된 2 이상의 scFv 단편을 함유하는 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질 또는 BsAb 접합체 중에서 선택되는 이중특이적 항체 분자를 함유하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, pICF가 BsMAb CD123/CD3, BsMAb CD19/CD3 및 EpCAM/CD3으로 이루어진 목록 중에서 선택되는 이중특이적 항체인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포의 팽창이 암 살상 T 세포 수를 2배 내지 10^6 배 이상 증가시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 선택이 암 세포 살상 활성의 증가, 독성 감소, 비표적 효과 감소, 생육성 증가, 증식 증가 또는 유효 E:T 비 중 하나 이상으로부터 선택된 파라미터를 기반으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 선택 및/또는 농축 단계(d)가 i) 하나 이상의 암 항원에 결합하거나, 암 세포 막 내로 확산하는 형광 표지된 화합물, 또는 ii) 활성화된 T 세포의 하나 이상의 마커, 또는 i)과 ii) 모두를 사용하거나; 또는 i) 하나 이상의 암 항원 또는 ii) 활성화된 T 세포의 하나 이상의 마커, 또는 i)과 ii) 모두에 결합하는 항체 또는 이의 단편으로 코팅된 비드를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 암 살상 T 세포 제조물이 삼투적립성(trogocytotic) 암 살상 T 세포를 제조물 중의 총 세포수의 적어도 50%의 농도로 포함하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 하나 이상의 CD8+ T 세포 및/또는 하나 이상의 CD25+ T 세포, 및/또는 하나 이상의 CD8+/CD25+ T 세포 및/또는 하나 이상의 CD4+/CD25+ T 세포, 및/또는 하나 이상의 세포독성 T 림프구(CTL) 또는 하나 이상의 종양 침윤 림프구(TIL) 및/또는 하나 이상의 삼투적립성 T 세포를 함유하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포 제조물이 조절성 T 세포(Treg)를 제조물 중의 총 세포수의 10% 미만의 농도로 포함하고; 및/또는 미분화 T 세포를 제조물 중의 총 세포수의 10% 미만의 농도로 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 암 살상 T 세포 제조물로부터 개별 클론을 분리하되, 이 분리 단계가

(i) 암 살상 T 세포의 제조물을 단세포로 분리하고,

(ii) 상기 단세포를 팽창하여 암 살상 T 세포의 하나 이상의 제조물을 생성하여, 단세포의 클론적 팽창을 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 샘플 및 단계 (b)의 샘플이 동일한 피검체에서 유래되는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a) 및 단계 (b)가 암 세포 및 T 세포를 둘다 함유하는 하나의 샘플을 제공하는 것을 포함하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 (a)가 미세환경을 가진 조직에서 유래하되, 전혈액, 말초혈액, 골수, 림프절, 원발성 종양의 생검 또는 전이의 생검 또는 비장 중에서 선택되는 샘플로부터 제거되거나 분리된 성분이 실질적으로 없는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 피검체가 성인 또는 소아 피검체인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 (b)의 암이 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(B 세포 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 외투 세포 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포 림프종, 모상세포 백혈병), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 다발성 골수종 또는 급성 림프구성 백혈병 중에서 선택되는 혈액 암인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 난소암, 직장암, 위암, 고환암, 항문 부위 암, 자궁암, 결장암, 직장암, 신장 세포 암종, 간암, 비-소세포 폐암, 소장 암, 식도암, 흑색종, 카포시 육종, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선 암, 부신암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌하수체 선암, 표피모양 암, 자궁경부 편평세포 암의 암종, 난관 암종, 자궁내막 암종, 질 암종, 연조직 육종, 요도암, 외음부 암종, 음경암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 척추 종양, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 상기 암들의 전이 병변, 또는 상기 암의 조합 중에서 선택되는 고형암인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 흑색종이 아닌 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 (a) 및/또는 샘플 (b)를 제공하는 피검체가

(a) 암의 사전 치료를 받은 적이 없는 피검체;

(b) 1회 이상의 암 사전 치료를 받은 피검체; 또는

(c) 미세잔존질병(MRD)이 있는 피검체인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 이전 단계 (a) 내지 (d)에 사용된 샘플과 다른 샘플의 T 세포 및 암 세포를 사용하여 단계 (a) 내지 (d)를 반복하는 것을 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 각 반복 단계 (a) 내지 (d)로부터 생산된 암 살상 T 세포가 수집되어 암 살상 T 세포의 혼합물을 형성하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 암 살상 T 세포 또는 암 살상 T 세포 제조물의 암 살상 활성을 평가하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 평가가

(a) 제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 따라 수득할 수 있는암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 제공하는 단계;

(b) 동일한 피검체 유래의 암 세포를 제공하는 단계;

(c) 상기 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 상기 암 세포와, 상기 암 살상 T 세포가 상기 암 세포를 살상하기에 충분한 시간 기간 동안 접촉시키는 단계;

(d) 단계 (c) 이후에 암 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 이후에 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계; 및 경우에 따라

(e) 단계 (d)로부터 암 세포 대 T 세포의 비, 또는 T 세포 대 암 세포의 비를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 단계 (c)가 추가로 pICF를 증가하는 투여량으로 첨가하는 것을 포함하는 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포의 활성이 EC50, Emax, 유효 E:T 비, 또는 동역학 파라미터 중에서 선택되는, 암 살상 T 세포와 암 세포의 약동학적 파라미터 및/또는 용량 반응에 의해 결정되는 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 수준 대비 암 세포의 수준 또는 양의 감소가 암 세포 살상 증가를 나타내거나, 또는 기준 수준 대비 암 세포의 수준 또는 양의 변화 감소 또는 실질적인 무변화가 암 세포 살상의 저하를 나타내는 방법.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 높은 유효 E:T 비가 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 암 세포의 효과적인 킬러임을 나타내고, 암 세포 대 T 세포의 낮은 비로써 정의되는 T 세포 대비 암 세포의 낮은 수준이 불량한 T 세포 살상 활성을 나타내는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 1:10 이상의 유효 E:T 비가 강력한 T 세포 살상 활성을 나타내고 1:1, 1:3 또는 1:5의 비가 불량한 T 세포 살상 활성을 나타내는 방법.

청구항 32

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 암 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준이 단계 (c) 이후 0 내지 72 시간째 또는 수 일 후에 결정되는 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 자동 형광 기반 플랫폼을 사용하여 수행되는 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 수득할 수 있는 삼투적립성 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 함유하는 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 삼투적립성 암 살상 세포가 (i) 암 세포에 대해 세포독성 활성이 있고, (ii) 적어도 100 카피의 암 세포 표면 마커를 함유하고; 검출가능한 양의 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유하는, 조성물.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 암 살상 세포가 CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포 중에서 선택되는 헬퍼 T 세포 또는 세포독성 T 림프구인 조성물.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 암 세포를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 30% 미만의 농도로 함유하고, Treg를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 30% 미만의 농도로 함유하며, 미분화 T 세포를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 30% 미만의 농도로 함유하고, 적혈구

세포를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 30% 미만의 농도로 함유하며, 및/또는 비면역 세포를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 30% 미만의 농도로 함유하는, 조성물.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 삼투적립성 T 세포를 이 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포수의 적어도 30%의 농도로 함유하는 조성물.

청구항 39

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 기재된 조성물 및 약학적 허용성 운반체를 함유하는 약학 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 피검체를 치료하기 위한 입양 암 치료에 사용하기 위한 것으로, 상기 피검체는 단계 (a)의 피검체와 동일한 피검체이고, 및/또는 상기 피검체는 단계 (b)의 피검체와 동일한 피검체이고, 및/또는 상기 피검체는 단계 (a) 또는 (b)의 피검체와 다른 피검체인 약학 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 비호지킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군 또는 다발성 골수종 중에서 선택되는 혈액 암을 겪고 있는 피검체를 치료하기 위한 입양 암 치료에 사용되는 약학 조성물.

청구항 42

(a) 암을 가진 피검체로부터 T 세포 함유 샘플을 제공하는 단계;

(b) 상기 피검체로부터, 암 세포 함유 샘플을 제공하는 단계;

(c) T 세포, 암 세포, 근접성 면역 코칭 인자(pICF), 및 치료제를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성시키는 단계;

(d) 다음과 같은 시험관내 단계들 중 하나, 둘, 세 단계 또는 모든 단계들:

i) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 팽창시키는 단계;

ii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 선택하는 단계;

iii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계;

iv) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 정제하는 단계; 및

(e) 단계 (c)의 반응 혼합물의 세포 살상 활성을 결정하는 단계를 함유하되,상기 치료제의 존재하에 상기 반응 혼합물의 세포 살상 활성의 기준값(치료제 부재) 대비 증가는 상기 치료제에 대한 더 높은 반응성을 나타내는 것인, 치료제에 대한 피검체의 반응성을 평가하는 시험관내 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 단계 (d)가 추가로 단계 (c) 이후 암 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 이후 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계를 함유하는, 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 반응 혼합물의 살상 활성이 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성, 암 살상 T 세포의 생육성, 암 살상 T 세포의 증식, 암 살상 T 세포에서 세포 표면 마커의 발현, 유효 E:T 비, 삼투적립성 세포의 수준, 및/또는 EC50, Emax, 기본 E:T 비, 유효 E:T 비, 및/또는 동역학 중에서 선택되는, 암 살상 T 세포와 암 세포의 용량 반응 곡선을 피팅시켜 수득한 약동학적 파라미터 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터에 의해 결정되는, 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 암 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준이 단계 (c) 이후 1 이상의 시간 간격에서 결정되는 방법.

청구항 46

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 암 세포 대 T 세포의 비 또는 T 세포 대 암 세포의 비를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 47

제42항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, pICF가 이중특이적 면역글로불린(BsIgG), 추가 항원 결합 분자에 작동적으로 연결된 면역글로불린, 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질 또는 BsAb 접합체 중에서 선택되는 이중특이적 항체 분자인 방법.

청구항 48

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제가 면역 체크포인트 억제제의 억제제, T 세포의 작용물질, 또는 MDSC 및/또는 Treg 세포의 억제제, 레날리도마이드, 또는 백신, 또는 사이토킨, 또는 자가 T 세포, 또는 아미노산 이화작용, 종양 유래 세포외 ATP의 신호전달, 아데노신 신호전달, 아데노신 생산, 케모킨 및 케모킨 수용체, 이종 유기체의 인식 또는 키나제 신호전달 활성과 관련된 성분의 조절제 또는 IDO, COX2, ARG1, ArG2, iNOS 또는 포스포디에스터라제의 억제제; 또는 TLR 작용물질, 또는 케모킨 길항물질 중에서 선택되는 면역조절제인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 수득할 수 있는 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물, 또는 제34항 내지 제39항 중 어느 한 항의 조성물을 제공하는 단계, 및 상기 세포, 제조물 또는 조성물의 유효량을 피검체에게 투여하는 단계를 포함하여, 암을 가진 피검체를 치료하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서,

(a) 피검체로부터 T 세포 및 암 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

(b) 상기 샘플을 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와 일정 시간 동안 생체외에서 접촉시키는 단계;

(c) 다음과 같은 시험관내 단계들 중 하나, 둘, 세 단계 또는 모든 단계:

i) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 팽창시키는 단계;

ii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 선택하는 단계;

iii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계; 또는

iv) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 정제하는 단계; 및

(d) 상기 암 살상 T 세포의 유효량을 상기 피검체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 추가로 제2 치료제 또는 제2 치료 절차를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 제2 치료제 또는 제2 치료 절차가 화학요법, 표적화된 항암 요법, 항암 약물, 세포독성제, 면역 기반 치료제, 사이토킨, 수술 절차, 방사선 절차, T 세포의 작용물질(작용성 항체 또는 이의 단편, 공동자극 분자의 활성인자), 억제성 분자의 억제제(면역 체크포인트 억제제), 면역조절제, 백신 또는 세포 면역치료 중 하나 이상으로부터 선택되는, 방법.

청구항 53

(a) 암을 가진 피검체로부터 T 세포 함유 샘플을 제공하는 단계;

(b) 상기 피검체로부터 암 세포 함유 샘플을 제공하는 단계;

(c) 단계 (a)의 T 세포, 단계 (b)의 암 세포 및 pICF를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성시키되, 이 생체외 반응 혼합물이 상기 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록 하는 조건하에 형성되어 암 살상 T 세포를 형성시키는 단계;

(d) 경우에 따라, 상기 암 살상 T 세포를 생체외 반응 혼합물에서 식별하는 단계; 및

(e) 상기 생체외 반응 혼합물에서 상기 암 살상 T 세포의 수준을 정량하는 단계를 포함하되,

상기 생체외 반응 혼합물에서 기준 수준 대비 암 살상 T 세포의 상승된 수준은 상기 피검체가 암 살상 T 세포를 생성할 수 있고, 제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 반응할 가능성이 있는 것으로써 식별되고, 상기 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포의 낮은 수준은 피검체가 암 살상 T 세포를 덜 생성할 수 있고, 이 피검체는 제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 반응할 가능성이 적은 것으로써 식별되는, 암 살상 T 세포를 생성하는 피검체의 능력을 평가하는 시험관내 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 암 세포가 혈액 암, 고형암 또는 전이암, 순환 종양 세포 또는 이의 조합 중에서 선택된 세포인 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, T 세포가 말초혈액 샘플, 골수 샘플, 림프절 샘플, CTL 및/또는 TIL을 함유하는 종양 샘플, 또는 이의 조합 중에서 선택되는 세포인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, T 세포가 CD8 및/또는 CD25를 발현하고, 및/또는 T 세포가 CD4 및/또는 CD25를 발현하는 방법.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (e)가 자동 형광 기반 플랫폼을 사용하여 수행되고, 형광 표지된 암 살상 T 세포의 수준이 평가되는 방법.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 암 살상 T 세포에서 종양 항원의 존재가 검출되는 방법.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포(삼투적립성 T 세포)의 상승된 수준이 피검체가 암 살상 T 세포를 생성할 수 있음을 나타내는 방법.

청구항 60

제53항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 생체외 반응 혼합물의 존재 하에 암 세포 살상의 상승된 수준은 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포의 활성을 나타내는 방법.

청구항 61

(a) 암 세포에 특이적인 암 살상 T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및

(b) 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성, 암 살상 T 세포의 생육성, 암 살상 T 세포의 증식, 암 살상 T 세포에서 세포 표면 마커의 발현, 그리고 EC50, Emax, 기본 E:T 비, 유효 E:T 비, 및 동역학 중에서 선택되는, 암 살상 T 세포와 암 세포의 용량 반응 곡선을 피팅시켜 수득한 약동학적 파라미터 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터를 결정하는 단계를 포함하여, 생체내에서 암 세포를 살상하는데 효과적일 것 같은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 유효성을 식별하는 시험관내 방법.

청구항 62

(a) 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 제공하는 단계;

(b) 피검체 유래의 암 세포를 제공하는 단계;

(c) 상기 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 상기 암 세포와, 상기 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건하에 접촉시키는 단계;

(d) 단계 (c) 이후 암 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 이후 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계(구체예들에서, 암 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 1회 이상의 시간 간격에서 결정된다); 및 경우에 따라

(e) 단계 (d)로부터 암 세포 대 T 세포의 유효 비 또는 T 세포 대 암 세포의 유효 비를 결정하는 단계를 포함하되,

상기 암 세포의 수준 또는 양의 저하는 암 세포 살상 증가를 나타내고, 암 세포의 수준 또는 양의 변화 감소 또는 실질적인 무변화는 암 세포 살상의 저하를 나타내는, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 효능을 평가하는 시험관내 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 접촉시키는 단계가 추가로 용량 반응 곡선을 생성하기 위한 증가 투여량의 pICF의 첨가를 포함하는 방법.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 1:10 또는 그 이상의 유효 E:T 비가 강력한 T 세포 살상 활성을 나타내는 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 강력한 세포 활성을 갖고 있다면, 피검체는 pICF에 대한 강한 반응자인 것으로써 식별되는 방법.

청구항 66

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 암 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준이 단계 (c) 이후 0 내지 72 시간째 또는 수일 후에 결정되는 방법.

청구항 67

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 자동 형광 기반의 플랫폼을 사용하여 수행되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 입양 세포 치료법(Adoptive cell therapy, ACT)은 환자의 면역 세포 수집, 세포의 팽창, 및 동일 환자 또는 다른 환자에게 상기 세포의 재도입을 수반하는 방법이다. 예를 들어, 공여체(donor) 유래의 생체외 팽창된 인간 세포독성 T 림프구(CTL)의 ACT는 암을 치료하기 위한 유망한 접근법으로 등장했다. ACT의 예는 배양된 종양 침윤 림프구(TIL), 분리 및 팽창된 T 세포 클론 및 통상적인 T 세포 수용체 또는 키메라(chimeric) 항원 수용체를 발현하는 유전자적으로 조작된 림프구(예: T 세포)를 포함한다. 유전자적으로 조작된 림프구는 특정 항원(들)을 발현하는 암세포를 제거하기 위해 디자인되고 팽창되어 환자에게 전달된다. ACT의 다른 예는 암 백신 투여 후 환자의 혈액에서 T 세포를 분리하여 사용하는 것이다. ACT는 환자의 종양 세포를 감소시키는 종양 특이적 림프구(예: T 세포)를 제공할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0002] 그러나 ACT의 한계는 예를 들어 T 세포의 비표적(off-target) 활성화 및/또는 비암 조직을 표적화할 가능성이 가장 적은 항원을 선택하는 것에 관한 문제를 포함할 수 있다. 부작용을 최소화하면서 효과적인 치료법을 제공하기 위해 T 세포 의 적절한 하위세트(예 : CTL)를 선택하는 방법에 대한 필요성은 여전히 남아있다.

과제의 해결 수단

[0003] 본 발명은 적어도 부분적으로, 병든 조직(예를 들어, 암)을 선택적 및 효과적으로 표적화하는 활성화된 면역 작동세포(예를 들어, 활성화된 T 세포)를 생성하는 최적화된 접근법을 특징으로 한다.

[0004] 일 구체예에서, 활성화된 면역 세포(예를 들어, 활성화된 T 세포)는 표적 세포, 예를 들어, 암세포의 살상(killing)을 유도한다. 활성화된 T 세포는 일반적으로 본원에서 "암 살상 T 세포"로 지칭되며, 이 용어는 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대, 비제한적으로 작동체(effector) 기억 T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 헬퍼 T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL) 및 삼투적립(trogocytotic) T 세포를 포함한다. 본 발명은 적어도 부분적으로, 표적 세포 살상 활성의 측면에서 매우 효과적인 면역 작동세포(예를 들어, T 세포)의 생성 및 식별이, 예컨대 표적(예 : 암) 세포 및 면역 작동세포 간 근접성을 최적화함으로써, 향상될 수 있다는 놀라운 발견을 기초로 한다.

[0005] 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 다양한 암 종류, 예를 들어 고형암, 혈액 암 및 이의 전이 형태에 대해 매우 효과적인 치료법을 제공할 수 있다. 본원에 개시된 암 살상 T 세포를 사용하는 치료법은 또한 피검체에서 일반적으로 강한 면역 반응을 유도하지 않는 암, 예를 들어 흑색종 이외의 암을 치료하는 데에도 적합하다. 구체예들에서, 본원에 개시된 암 치료법은 예를 들어, 피검체의 암을 선택적 및 효과적으로 표적화하는 암 살상 T 세포(예: 자가 암 살상 T 세포)를 생성시킴으로써 주어진 피검체에게 맞춤화되거나 개인화될 수 있다.

[0006] 따라서, 증진된 표적 세포 살상 활성을 갖는 면역 작동세포(예를 들어, 암 살상 T 세포)를 생성시키는 방법; 그러한 면역 세포를 함유하는 조성물; 상기 세포를 사용하는 방법(예를 들어, 치료 방법); 예를 들어 T 세포와 같은 면역 세포와 표적 세포 간의 근접성, 예컨대 공간적 근접성을 증진시킴으로써 표적 세포 살상 활성을 증진시키는 최적의 제제를 선택하는 방법; 최적화된(예를 들어, 가장 높은 활성 분획/클론) 면역 세포, 예를 들어, T 세포를 선택하는 방법; 및 이 접근법을 사용하여 다른 암 치료법에 대한 환자의 반응성을 평가하는 방법이 제공된다.

[0007] ***암 살상 T 세포의 생산 방법***

[0008] 한 관점에서, 본 발명은 암 살상 T 세포를 생산(예, 제조/제공)하는 방법을 제공한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0009] (a) 암(예를 들어, 혈액암, 고형암, 전이암, 또는 이들의 조합)을 갖는 피 검체로부터 T 세포를 제공하는 단계;

[0010] (b) 암 세포를, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계;

[0011] (c) T 세포, 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 예를 들어, T 세포를 활성화시키기에 충분한 조건(예를 들어, 일정 시간 동안) 하에, 예컨대 T 세포가 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하도록 형성시키는 단계를 포함한다. 몇몇 구체예에서, 활성화된 T 세포는 암세포로부터 세포 표면 마커를 확득하고, 예를 들어 삼투적립성 T 세포가 된다.

[0012] 몇몇 구체예들에서, 암세포 및 T 세포는 샘플, 예를 들어 암을 가진 피검체의 샘플에 존재한다. 한 구체예에서, 암 세포 및 T 세포는 동일 샘플, 예컨대 단일 샘플(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 샘플)에 존재한다. 다른 구체예들에서, 암 세포 및 T 세포는 상이한 샘플, 예를 들어 하나 이상의 샘플, 예를 들어 암을 가진 피검체 유래의 샘플(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 샘플)에 존재한다.

[0013] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 단계 (a) 및 단계 (b)는 암세포 및 T 세포를 모두 함유하는 하나의 샘플을 제공하는 것을 포함한다.

[0014] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 단계 (a) 및 단계 (b)는 하나의 샘플이 암세포를 함유하고 다른 샘플이 T 세포를 함유하는 두가지 샘플을 제공하는 것을 포함한다.

[0015] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 다음 중 한가지, 두가지, 세가지 또는 전부를 포함한다:

[0016] i) 단계 (c)로부터 암 살상 T 세포를 팽창시키는 단계;

[0017] ii) 단계 (c)로부터 암 살상 T 세포를 선택하는 단계;

[0018] iii) 단계 (c)로부터 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계;

[0019] iv) 단계 (c)로부터 암 살상 T 세포를 정제하는 단계.

[0020] 다른 관점에서, 본 발명은 또한 암 살상 T 세포를 생산(예컨대, 제조/제공)하는 방법도 제공한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0021] (a) 암세포와 T 세포를 함유하는 샘플("암 및 T 세포 샘플")을, 예컨대 암(예, 혈액암, 고형암, 전이암 또는 이의 조합)을 가진 피검체로부터 제공하는 단계;

[0022] (b) 상기 샘플을 근접성 면역 코칭 인자(proximity immune-coaching factor)(pICF)와, 예컨대 T 세포가 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록(구체예들에서, 암 살상 T 세포를 생산하는 생체외 반응 혼합물을 형성시켜), 예컨대 T 세포를 활성화시키기에 충분한 조건 하에(예컨대 일정 시간 동안) 접촉시키는 단계;

[0023] (c) 암 살상 T 세포, 예컨대 활성화된 T 세포(예컨대, 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 T 세포)를 농축시키는 단계.

[0024] 또 다른 관점에서, 본 발명은 암 살상 T 세포를 생산(예, 제조/제공)하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0025] (a) 암 샘플, 예컨대 암 세포(예, 혈액암, 고형암, 전이암(예, 순환성 종양 세포(CTC), 또는 이의 조합 중의 암 세포)를 함유하는 샘플을, 예컨대 암을 가진 피검체로부터 제공하는 단계;

[0026] (b) T 세포 샘플, 예컨대 T 세포 함유 샘플(예, 혈액 샘플(예, 말초혈액 샘플, 골수 샘플, 림프절 샘플, 비장 샘플, 세포독성 T 림프구(CTL) 및/또는 종양침윤림프구(TIL)를 함유하는 종양 샘플, 또는 이의 조합)을, 예컨대 암을 가진 피검체로부터 제공하는 단계;

[0027] (c) 단계 (a)의 샘플을 단계 (b)의 샘플 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와, 예컨대 T 세포가 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득하게 하는(구체예들에서, 암 살상 T 세포를 생산하는 생체외 반응 혼합물을 형성시켜), 예컨대 T 세포를 활성화시키기에 충분한 조건 하에(예컨대 일정 시간 동안) 접촉시키는 단계; 및

[0028] (d) 암 살상 T 세포, 예컨대 활성화된 T 세포(예, 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 T 세포)를 농축시키는 단계.

[0029] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물 중 몇몇 구체예들에서, 샘플은 혈액암, 고형암, 전이암(예, CTC, 1차, 2차 또는 추가 전이 암), 또는 이의 조합 중에서 선택되는 암 샘플이다.

[0030] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 다른 구체예에서, 샘플은 혈액 샘플(예, 말초혈액 샘플), 골수 샘플, 림프절 샘플, 비장 샘플, CTL, TIL 또는 이의 조합을 함유하는 종양 샘플 중에서 선택되는 T 세포 샘플이다.

[0031] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 구체예들에서, 샘플로부터 제거되거나 분리된 성분(예, 세포)은 실질적으로 없다.

[0032] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 구체예들에서, 샘플은 기원이 되는 조직의 미세환경을 실질적으로 유지하고, 예컨대 종양 또는 면역 미세환경의 구조를 실질적으로 유지한다.

[0033] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 구체예들에서, 샘플은 종양 항원 특이적 T 세포(예, CTL 또는 TIL)를 함유한다. 이론적으로 국한됨이 없이, 종양 항원 특이적 T 세포는 예컨대 종양 미세환경에 존재할 때 면역억제될 수 있다. 한 구체예에서, 면역억제된 종양 항원 특이적 T 세포는 본원에 기술된 조건하에, 예컨대 암세포 및 pICF와 접촉 시에 활성화된다.

[0034] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 몇몇 구체예들에서, 샘플 또는 샘플들은 암세포와 T 세포를 함유한다. 예를 들어, 샘플은 T 세포(예, 종양 항원 특이적 CTL)를 포함하는 혈액암(예, 골수, 림프절 유래의 암)에서 유래할 수 있다. 또한, 혈액학적 샘플은 암세포, 예컨대 백혈병 또는 림프종 아세포(CD19, CD123, CD20 등에서 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 아세포)도 함유할 수 있다. 구체예들에서, 샘플에 pICF의 첨가는 T 세포를 활성화시키는(예, 종양 항원 특이적 CTL을 활성화시키는) 암세포와 T 세포간의 상호작용을 촉진시킨다. 몇몇 구

체예들에서, 활성화된 T 세포는 암세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하고, 예컨대 삼투적립성 T 세포가 된다.

[0035] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물의 다른 구체예들에서, 암은 고형암이다. 샘플은 본원에 기술된 바와 같은 종양 항원 특이적 T 세포(예, CTL 또는 TIL) 및 암세포를 함유할 수 있다. 구체예들에서, 샘플에 pICF의 첨가는 T 세포를 활성화시키는(예, 종양 항원 특이적 CTL 또는 TIL을 활성화시키는) 암세포와 T 세포간의 상호작용을 촉진시킨다. 몇몇 구체예들에서, 활성화된 T 세포는 암세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하고, 예컨대 삼투적립성 T 세포가 된다.

[0036] 본원에 개시된 임의의 방법 및 조성물 중 다른 구체예들에서, 샘플은 전이 샘플, 예컨대 전이암을 가진 피검체에서 유래된 샘플을 함유할 수 있다. 한 구체예에서, 전이 샘플은 CTC를 함유한다. 구체예들에서, CTC는 암, 예컨대 고형암을 가진 피검체의 말초혈액에서 발견되는 종양 세포이다. 생체외 반응 혼합물은 전이암세포와 T 세포를 함유하는 것으로 형성될 수 있다. 구체예들에서, T 세포는 전이암 샘플(예, 1차 종양 샘플 또는 2차 종양 샘플, 또는 이의 조합)로부터 수득할 수 있다. 몇몇 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물은 전이 샘플을 표적으로 하는(예컨대, CTC, 1차 종양 샘플 또는 2차 종양 샘플, 또는 이의 조합을 표적으로 하는) 종양 항원 특이적 T 세포(예, CTL 또는 TIL)를 함유한다. 구체예들에서, 종양 항원 특이적 T 세포는 pICF 및 전이 샘플(예, CTC, 1차 종양 샘플 또는 2차 종양 샘플, 또는 이의 조합)의 존재하에 활성화된다. 예컨대, 전이암에서, 종양 성장은 1차 종양 부위와 다른 조직(예컨대, 본원에서 2차 종양이라고 지칭됨)에서 일어날 수 있다. 1차 종양의 암세포는 2차 또는 다른 전이 부위와 상이할 수 있다. 예컨대, 골수 종양 침윤은 고형암에서 일어날 수 있다. 다른 예로써, 골수에서 성장하는 고형암, 예컨대 췌장 또는 유방 암 유래의 전이 종양 세포는 1차 종양에서의 종양 세포와 생물학적으로 상이할 수 있다. 이러한 구체예들에서, pICF의 존재하에 T 세포의 활성화는 피검체에서 종양 세포의 영향을 받은 모든 조직에서 반복될 수 있다. 이러한 구체예들에서, 활성화된 T 세포(예, 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포)는 피검체에 존재하는 1차 종양 및 2차 종양에 대하여 선택적일 수 있다.

[0037] 하나의 구체예에서, 샘플은 CTC를 함유한다. 생체외 반응 혼합물은 피검체에 존재하는 1차 및 2차 종양 유래의 샘플과 CTC 함유 샘플에 의해 형성될 수 있고, 이로써 CTC, 피검체에 존재하는 1차 및 2차 종양에 대하여 선택적인 활성화된 T 세포(예컨대, 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포)를 생산한다.

[0038] ***조성물 및 반응 혼합물***

[0039] 본 명세서의 목적을 위해, "조성물"이란 용어는 암 살상 T 세포를 포함하고, 이 용어는 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 비제한적으로 작동체 기억 T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 헬퍼(helper) T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL) 및 삼투적립성 T 세포, 및 이의 약학 조성물을 포함한다.

[0040] 한 관점에서, 본 발명은 T 세포, 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 특징으로 하고, 여기서 T 세포 및 암세포는 샘플, 예컨대 혈액 샘플(예, 전혈액, 말초혈액); 혈액암 유래의 샘플; 골수 유래의 샘플, 림프절 유래의 샘플; 또는 비장 유래의 샘플, 고형암 유래의 샘플; 전이암(예, CTC) 유래의 샘플에 존재하고, 이 샘플로부터 제거되거나 분리된 성분(예, 세포)은 실질적으로 없다.

[0041] 구체예들에서, 샘플은 암, 예컨대 혈액암, 고형암 또는 전이암을 가진 피검체에서 유래한다.

[0042] 구체예들에서, 샘플은 미세환경을 실질적으로 유지하고, 예컨대 종양 미세환경의 구조를 실질적으로 유지한다.

[0043] 구체예들에서, 샘플은 종양 항원 특이적 T 세포(예, CTL 또는 TIL)를 함유한다. 이론적으로 국한됨이 없이, 종양 항원 특이적 T 세포는 예컨대 종양 미세환경에 존재할 때, 면역억제될 수 있다. 한 구체예에서, 면역억제된 종양 항원 특이적 T 세포는 본원에 기술된 조건하에, 예컨대 암세포 및 pICF와 접촉 시에 활성화될 수 있다.

[0044] 다른 관점에서, 본 발명은 조성물, 예컨대 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 암 살상 세포 및 약학적 허용성 운반체, 예컨대 GMP 허용성 운반체를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

[0045] 또 다른 관점에서, 본 발명은 조성물(예컨대, 정제된 제제)을 특징으로 한다. 이 조성물은 다음을 포함한다:

[0046] (1) 암 살상 세포로써, (i) 암세포에 대해 세포독성 활성을 나타내고, (ii) 암세포에서 유래된 세포 표면 마커를, 예컨대 하나 이상의 암세포 표면 마커 중 하나의 세포 표면 마커의 90 내지 500 카피(예컨대, 적어도 90, 100, 200, 300, 400 또는 500 카피)의 양으로 함유하는 세포; 및

[0047] (경우에 따라) (2) 근접성 면역 코칭 인자(pICF), 예컨대 검출가능한(예, 미량) 양의 pICF.

[0048] 구체예들에서, 조성물은 추가로 약학적 허용성 운반체, 예컨대 GMP 허용성 운반체를 함유한다.

[0049] 한 구체예에서, 반응 혼합물에 있는 총 T 세포의 약 2 내지 75%(예, 약 2 내지 70%, 2 내지 60%, 2 내지 50% 또는 2 내지 40%)는 하나 이상의 암 세포 표면 마커(예, 하나 이상의 백혈병 세포 암)를 발현한다.

[0050] 구체예들에서, 암 살상 세포는 농축되거나 정제된다. 몇몇 구체예들에서, 농축 또는 정제된 암 살상 세포 집단은 적어도 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 암 살상 세포를 함유하고, 이때 암 살상 세포는 하나 이상의 암세포 표면 마커를 함유한다.

[0051] ***치료 방법***

[0052] 다른 관점에서, 본 발명은 암(예, 본원에 기술된 바와 같은 혈액암, 고형암, 또는 전이암)을 가진 피검체를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 이 방법은 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 암 살상 T 세포를 함유하는 제조물을 제공하는 단계; 및 이 제조물을 피검체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0053] 또 다른 관점에서, 본 발명은 암(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 혈액암, 고형암 또는 전이암)을 가진 피검체를 치료하는 방법을 제공한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0054] (a) T 세포와 암세포를 함유하는 샘플(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 샘플)을 피검체로부터 제공하는 단계;

[0055] (b) 상기 샘플을 암 살상 T 세포가 생산되도록 하는 조건하에(예컨대, 일정 시간 동안) 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와 접촉시키는 단계;

[0056] (c) (경우에 따라) 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키거나 또는 팽창시키는 단계;

[0057] (d) 상기 암 살상 T 세포를 피검체에게 투여하여 피검체를 치료하는 단계.

[0058] 또 다른 관점에서, 본 발명은

[0059] (a) 본원에 기술된 바와 같은 암 샘플을, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계;

[0060] (b) 본원에 기술된 바와 같은 T 세포 샘플을, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계;

[0061] (c) 상기 암 샘플을 암 살상 T 세포가 생산되도록 하는 조건하에(예컨대, 일정 시간 동안) T 세포 샘플 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와 접촉시키는 단계;

[0062] (d) (경우에 따라) 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키거나, 또는 팽창시키는 단계;

[0063] (e) 상기 암 살상 T 세포를 피검체에게 투여하여 피검체를 치료하는 단계를 포함하여, 암(예컨대, 혈액암, 고형암 또는 전이암)을 가진 피검체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0064] 몇몇 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 실질적인 팽창 없이 투여된다. 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 세포 팽창 후, 예컨대 각 세포들의 팽창 후 투여된다.

[0065] 전술한 임의의 방법 중 몇몇 구체예에서, 피검체에게 투여된, 예컨대 샘플에 존재하는, 활성화된(예컨대, 암 살상) T 세포의 수는 적어도 5 내지 10,000개(예컨대, 5개, 10개, 100개, 1000개, 10,000개 이상)이다.

[0066] ***피검체를 평가하는 분석법 및 방법***

[0067] 다른 관점에서, 본 발명은 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포를 비롯한 활성화된 T 세포)를 생성하는 피검체의 능력을 평가하는 방법 또는 분석법을 제공한다. 이 방법 또는 분석법은 다음을 포함한다:

[0068] (a) 암을 가진 피검체 유래의 T 세포(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 T 세포)를 제공하는 단계;

[0069] (b) 피검체 유래의 암 세포(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 암 세포)를 제공하는 단계;

[0070] (c) T 세포, 암 세포 및 pICF를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성시키고, 예컨대 상기 생체외 반응 혼합물은 T 세포를 활성화시키기에 충분한 조건하에, 예컨대 일정 시간 동안 형성시켜, T 세포가 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록 하여, 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포)를 형성시키는 단계;

[0071] (d) 경우에 따라, 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포)를 식별하는 단계; 및

[0072] (e) 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포)의 수준 또는 활성을 측정하고, 예컨대 정량하는 단계.

[0073] 다른 관점에서, 본 발명은 피검체를 평가하는, 예컨대 치료제, 예컨대 면역조절제 및/또는 암치료제에 반응성인 피검체를 식별 또는 선택하는 방법으로써,

[0074] (a) 암을 가진 피검체 유래의 T 세포(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 T 세포 또는 T 세포 샘플)를 제공하는 단계;

[0075] (b) 암세포를, 예컨대 상기 피검체로부터 제공하는 단계(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 암 세포 또는 암 세포 샘플);

[0076] (c) T 세포, 암 세포 및 면역조절제 및/또는 암 치료제를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성시키는 단계;

[0077] (d) 단계 (c)의 반응 혼합물의 세포 살상 활성을 결정하는 단계를 포함하고,

[0078] 상기 치료제의 존재하에 상기 반응 혼합물의 세포 살상 활성의 증가가 기준값(예컨대, 치료제의 부재) 대비, 상기 치료제에 대해 더 높은 반응성을 나타내는 것인, 방법을 특징으로 한다.

[0079] 구체예들에서, 단계 (c)는 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물과 표적 세포, 예컨대 암 세포의 생체외 혼합물을 형성시키는 것을 포함한다. 구체예들에서, 암 세포는 혈액암, 고형암, 전이암, CTC 또는 이의 조합 중에서 선택되는 세포이다. 구체예들에서, 암 세포는 백혈병 또는 림프종 아세포(예컨대, CD19, CD123, CD20 등에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 아세포)이다. 구체예에서, T 세포는 혈액 샘플(예컨대, 말초혈액 샘플), 골수 샘플, 림프절 샘플, CTL 및/또는 TIL을 함유하는 종양 샘플 또는 이의 조합 중에서 선택되는 세포이다. 구체예들에서, T 세포는 CD8 및/또는 CD25를 발현한다(예컨대, 이것은 CD8+CD25+ T 세포이다). 구체예들에서, T 세포는 CD4 및/또는 CD25를 발현한다(예컨대, 이것은 CD4+CD25+ T 세포이다).

[0080] 구체예들에서, 단계 (e)는 자동 플랫폼(platform), 예컨대 자동 유세포분석 형광 기반 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 ExviTech 플랫폼을 사용하여 수행한다. 이러한 구체예들에서, 검출가능하게(형광) 표지된 암 살상 T 세포의 수준이 평가된다.

[0081] 하나의 구체예에서, 암 살상 T 세포에 존재하는 종양 항원의 수준 및/또는 존재가 검출된다(예컨대, 삼투적립성 T 세포의 수 또는 활성이 검출된다).

[0082] 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 수준은 CTL 또는 TIL의 수 또는 활성을 검출하여 측정한다. 다른 구체예들에서, CD8 및/또는 CD25를 발현하는 T 세포(예컨대, CD8+CD25+ T 세포)의 수 또는 활성이 검출된다. 다른 구체예들에서, CD4 및/또는 CD25를 발현하는 T 세포(예, CD4+CD25+ T 세포)의 수 또는 활성이 검출된다.

[0083] 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)의 상승된 수준(예컨대, 기준 수준 대비)은 피검체가 암 살상 T 세포를 생성할 수 있음(예컨대, 높은 생산자임)을 시사한다. 구체예들에서, 상기 피검체는 본원에 개시된 방법 및 조성물에 반응할 가능성이 있는 것으로 식별된다.

[0084] 다른 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물에서 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)의 낮은 수준(예컨대, 각 샘플에 존재하는 특이적인 작동체 대 표적 비에 의존적인 기준 수준 대비)은 피검체가 암 살상 T 세포를 덜 생성할 수 있다는 것을 시사한다. 구체예들에서, 상기 피검체는 본원에 개시된 방법 및 조성물에 반응할 가능성이 적은 것으로써 식별된다.

[0085] 구체예들에서, 상기 방법 또는 분석법은 추가로 암 살상 T 세포를 생성하는 능력을 기반으로 피검체를 식별 또는 선택하는 단계, 예컨대 암 살상 T 세포의 높은 또는 낮은 생산자인 피검체를 식별하는 단계를 함유한다.

[0086] 구체예들에서, 기준 수준은 하나 이상의 T 세포, 암세포 또는 pICF 및/또는 면역조절제의 부재하에 유사한 생체외 반응 혼합물에서 생성된 활성화된 T 세포(예, 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포))의 수 또는 활성을 함유한다. 한 구체예에서, 기준 수준은 암 살상 T 세포에 존재하는 종양 항원의 수준 및/또는 존재를 검출하여 결정한다. 다른 구체예들에서, 기준 수준은 CTL 또는 TIL의 수 또는 활성을 검출하여 결정한다. 한 구체예에서, 기준 수준은 CD8 및/또는 CD25를 발현하는 T 세포(예, CD8+CD25+ T 세포)의 수 또는 활성을 함유한다. 한 구체예에서, 기준 수준은 CD4 및/또는 CD25를 발현하는 T 세포(예, CD4+CD25+ T 세포)의 수 또는 활성을 함유한다.

[0087] 다른 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물에서 생산된 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)의 활성이 평가된다. 몇몇 구체예들에서, 단계 (c) 유래의 생체외 반응 혼합물은 암 세포(예, CD19, CD123, CD20 등에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 아세포)의 존재 중에서 암세포 살상이 일어나도록 하는 조건하에 항온처리된다. 생체외 반응 혼합물의 존재하에 암세포 살상의 수준 또는 양의 검출은 반응 혼합물 중 암 살상 T 세포의 활성을 시사한다. 구체예들에서, 암 세포의 수준 또는 양의 감소는, 예컨대 기준 수준에 대비하여, 증가된

암세포 살상을 시사한다. 다른 구체예들에서, 암세포의 수준 또는 양의 작은 변화 또는 실질적인 무변화는, 예컨대 기준 수준에 대비하여, 저하된 암세포 살상을 시사한다.

[0088] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 피검체, 예컨대 본원에 기술된 암을 가진 피검체에게 암 살상 T 세포를 투여하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 피검체는 본원에 개시된 방법 및 조성물에 반응성일 가능성이 있는 것으로 식별되고, 예컨대 반응 혼합물에 더 많은 수(예컨대, 기준 수준 대비)의 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)를 나타낸다.

[0089] ***E:T 비를 평가하는 분석법 및 방법***

[0090] 다른 관점에서, 본 발명은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 효능(potency)을 평가하는 방법 또는 분석법을 제공한다. 이 방법 또는 분석법은 다음을 포함한다:

[0091] (a) 예컨대 본원에 기술된 방법에 따라 생산된, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을, 예컨대 피검체(예, 본원에 기술된 바와 같은 암을 가진 피검체)로부터 제공하는 단계;

[0092] (b) 표적 세포(예컨대, 암 세포), 예컨대 피검체 유래인 암세포를 제공하는 단계;

[0093] (c) 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 이 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건하에(예, 일정 시간 동안) 표적 세포(예, 암세포)와 접촉시키는 단계(구체예들에서, 접촉 단계는 추가로 본원에 기술된 바와 같은 면역조절제 및/또는 pICF를, 예컨대 다른 용량들(예컨대, 증가 투여량들)로 첨가하는 것을 포함한다);

[0094] (d) 단계 (c) 후에 제거된 표적 세포의 수준, 예컨대 수(예컨대, pICF 또는 면역조절제를 첨가하지 않은 샘플, 예컨대 pICF를 첨가하지 않은 동일한 피검체 유래의 샘플 대비)를 측정하는 단계, 및 (경우에 따라) 단계(c) 후에 생산된 암 살상 T 세포(예컨대, 갓 생성된 세포)의 수준, 예컨대 수(예컨대, pICF를 첨가하지 않은 샘플, 예컨대 pICF 또는 면역조절제를 첨가하지 않은 동일한 피검체 유래의 샘플 대비)를 결정하는 단계(구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준, 예컨대 수는 단계 (c) 후에 1회 이상의 시간 간격에서 결정된다); 및

[0095] (경우에 따라) (e) 단계 (d)로부터 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 비 또는 암 살상 T 세포 대 표적 세포의 비를 결정하는 단계.

[0096] 또 다른 관점에서, 본 발명은 후보 pICF 및/또는 면역조절제를 평가하는 방법 또는 분석법을 제공한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0097] (a) 예컨대 본원에 기술된 방법에 따라 생산된, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을, 예컨대 피검체(예, 본원에 기술된 바와 같은 암을 가진 피검체)로부터 제공하는 단계;

[0098] (b) 표적 세포(예컨대, 암 세포), 예컨대 피검체 유래인 암세포를 제공하는 단계;

[0099] (c) 후보 pICF 및/또는 면역조절제(예컨대, 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제)를 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물 및 표적세포(예, 암 세포)와 상기 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건하에(예, 일정 시간 동안 및/또는 소정 농도의 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 존재하에) 접촉시키는 단계;

[0100] (d) 단계 (c) 후에 제거된 표적 세포의 수준, 예컨대 수(예컨대, pICF 및/또는 면역조절제를 첨가하지 않은 다른 샘플 대비)를 결정하고, 경우에 따라 단계(c) 후에 갓 생성된 암 살상 T 세포의 수준, 예컨대 수(예컨대, pICF 및/또는 면역조절제를 첨가하지 않은 다른 샘플 대비)를 결정하는 단계(구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수는 단계 (c) 후에 1회 이상의 시간 간격 및/또는 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 하나 이상의 농도에서 결정된다); 및

[0101] (경우에 따라) (e) 단계 (d)로부터 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 비 또는 암 살상 T 세포 대 표적 세포의 비를 결정하는 단계.

[0102] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예들에 따르면, 기본 E:T 비가 수득된다. 기본 E:T 비는 pICF 및/또는 면역좇러제 노출 전에 세포독성 T 세포와 암 세포 간의 비이다. 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예들에서, 유효 E:T 비가 수득된다. 하나의 구체예에서, 유효 E:T 비는 pICF 및/또는 면역조절제 노출 후에 생성된 암 살상 T 세포와 살상된 암세포 간의 비이다.

[0103] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예들에서, 유효 E:T 비는 pICF의 하나 이상의 소정의 농도에서 계산될 수 있다. 하나의 구체예에서, pICF의 소정의 농도는 유효 E:T 비를 계산하기 위해 최적화된다. 하나의 구체예에서, E:T 비는 최대 농도의 pICF에 노출되었을 때의 활성화된 T 세포와 종양의 수를 사용하여 계산한다.

다른 구체예에서, E:T 비는 활성화된 T 세포 수의 최대 피크를 발생시키는 pICF의 농도에 노출되었을 때의 활성화된 T 세포와 종양의 수를 사용하여 계산한다. 또 다른 구체예에서, E:T 비는 각 용량 반응 곡선의 EC50 농도에 대응하는 활성화된 T 세포 및 종양의 수를 사용하여 계산한다.

[0104] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예에서, 유효 E:T 비는 또한 유효 T:E 비(예컨대, 암 세포 대 암 살상 T 세포 간의 비)로 나타낼 수도 있다.

[0105] 몇몇 구체예들에 따르면, 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 암 살상 T 세포가 제공된다. 몇몇 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 삼투적립성 T 세포이다. 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 CD8+CD25+ T 세포이다. 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 CD4+CD25+ T 세포이다. 세포독성 T 세포, 예컨대 CD8+ T 세포 및 활성화된 CD4+ T 세포도 암 세포 살상 활성이 있지만, 삼투적립성 T 세포가 더욱 효과적인 암 세포 킬러(killer)인 것으로 생각된다. 따라서, 모든 활성화된 T 세포 종류가 유효 E:T 비에 포함될 수 있다.

[0106] 몇몇 구체예들에 따르면, 상기 방법 또는 분석법은 갓 생성된 암 살상 세포독성 T 세포의 수, 및 동일한 조건하에, 예컨대 동일한 웰에서 살상된 표적 세포의 수를 검출, 예컨대 계수하는 것을 포함한다. 이러한 값들의 비가 유효 E:T 비이다.

[0107] 몇몇 구체예들에서, 이 비는 두 빨셈값 간의 비로써, 하나의 빨셈은 항온처리 전 대비 항온처리 후의 표적의 수(즉, 이러한 조건에서 살상된 표적 세포의 수를 측정하는 것)이고, 다른 빨셈값은 항온처리 전 대비 항온처리 후의 암 살상 T 세포의 수(즉, 이러한 조건에서 표적 세포를 살상하는 세포독성 T 세포의 수를 측정하는 것)이다. 몇몇 구체예들에서, pICF가 없다면 암 살상 T 세포는 0(또는 검출불가능)이고, 따라서 빨셈값은 암 살상 T 세포의 총 수(예컨대, CD8+CD25+ T 세포의 총 수 또는 CD4+CD25+ T 세포의 총 수)와 같다.

[0108] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 예컨대 pICF 및/또는 면역조절제를 첨가하지 않은 기준 수준에 대비하여, 암 세포의 수준 또는 양의 감소는 암 세포 살상의 증가를 나타낸다. 다른 구체예들에서, 예컨대 기준 수준 대비, 암 세포 수준 또는 양의 변화 감소 또는 실질적인 무변화는 암 세포 살상의 저하를 나타낸다.

[0109] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제에 의해 유도된 갓 생성된 표적 살상 T 세포에 대비하여 높은 수준의 표적 세포 살상(예컨대, 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 높은 유효 비)은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 암세포의 효과적인 킬러인 것을 나타낸다. 한 구체예에서, 표적 대 T 세포 비는 기준 비와 비교된다. 예를 들어, 1(T 세포) 대 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 500 또는 그 이상(표적 세포)의 비는 강력한 T 세포 살상 활성을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, T 세포: 표적 세포의 비는 1:500, 또는 그 이상의 범위이다. 강력한 세포 살상 활성이 있는 T 세포를 가진 피검체는 pICF 및/또는 면역조절제에 강한 반응자인 것으로 식별될 수 있다.

[0110] 한 구체예에서, 기준 비는 두 빨셈값 간의 비이다:

[0111] · pICF 없이 표적 세포 수 - pICF를 첨가한 표적 세포의 수($\triangle T^{pICF}$) (둘 다 동일한 실험 항온처리 조건을 공유함),

[0112] * 이 수는 최고의 표적 세포 살상을 유도하는 pICF 용량, 또는 대안적으로 pICF의 최고 용량에서의 표적 세포의 수를 빼서 계산함,

[0113] * 최댓값과 최솟값은 여러 용량의 pICF의 용량 반응 곡선에 실험 값을 수학적 피팅(fitting)시켜 유도함.

[0114] · pICF를 첨가한 작동체 암 살상 T 세포의 수 - pICF 없이 작동체 암 살상 T 세포의 수($\triangle E^{pICF}$), 둘 다 동일한 항온처리 조건을 공유함,

[0115] * 이 수는 최고 표적 세포 살상을 유도하는 pICF 용량에서의 표적 세포의 수, 또는 pICF의 최고 용량을 빼서 계산함,

[0116] * 최댓값과 최솟값은 여러 용량의 pICF의 용량 반응 곡선에 실험 값을 수학적 피팅(fitting)시켜 유도함.

[0117] · 이 두 변수 간의 비는 유효 E:T 비로써 정의되고 $\triangle T^{pICF}$ / $\triangle E^{pICF}$ 와 같다.

[0118] · 이 유효 E:T 비는 이러한 조건들에서 단일 암 살상 T 세포에 의해 살상된 표적 세포의 수를 측정한다. 이 비는 다른 항온처리 시간의 동일한 샘플과 pICF에서 유사할 수 있는데, 그 이유는 이 비가 다른 시간에 생성된 동일한 암 살상 T 세포의 활성을 나타내기 때문이다.

[0119] 몇몇 구체예들에서, 유효 E:T 비는 암 표적 세포를 살상하는데 있어서 생성된 암 살상 T 세포 활성의 추정값을 나타낸다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 암 살상 T 세포는 사실상 피검체, 예컨대 암 환자를 치료하기 위한 활성 약제이기 때문에 암 세포를 살상하는 약물의 활성과 동등하다. 유효 E:T 비는 여러 환자들로부터 암 살상 T 세포의 활성에 등급을 매겨 환자들을 계층화할 수 있다. 이러한 등급화 또는 계층화는 암 표적 세포의 살상 효능을 측정하는 표준 방법에서 유래된 등급화 또는 계층화와 매우 상이할 수 있다. 예를 들어, 암 살상 T 세포당 200개의 표적 세포를 제거하는 유효 E:T 비가 1:200인 매우 유효한 암 살상 T 세포는 환자가 매우 큰 암 표적 세포 밀도를 갖고 있다면 모든 암 세포를 살상할 수 없을 것이다. 살아있는 많은 암 세포의 잔존은 표준 화학요법 활성 측정에서 암 살상 T 세포의 낮은 활성의 표시로 간주될 것이다; 이 경우, pICF에 의해 생성된 진정한 높은 활성의 암 살상 T 세포를 놓칠 수 있고, 문제는 몇몇 암 세포가 면역억제되고, 그렇지 않다면 생성된 높은 활성의 암 살상 T 세포에 내성적인 것이다. 따라서, 유효 E:T 비는 최대 활성의 암 살상 T 세포, 예컨대 환자에게 투여하기에 더욱 적합한 암 살상 T 세포를 식별할 수 있다.

[0120] 대안적으로, 낮은 수준의 유효 E:T 비는 불량한 T 세포 살상 활성을 나타낸다. 한 구체예에서, 1:5(예컨대, 1, 3 또는 5)의 암 살상 T 세포 : 표적 세포의 비는 불량한 T 세포 살상 활성을 나타낸다. 세포 살상 활성이 저하된 T 세포를 가진 피검체는 pICF 및/또는 면역조절제에 대한 불량한 반응자인 것으로 식별될 수 있다.

[0121] 유효 E:T 비, 기본 E:T 비, EC50, Emax, 동역학 및 이 변수들의 관계외에도, 암 살상 T 세포의 활성을 추정하는 대안적 접근법들이 있다. 다른 약리학적 운영 모델을 이용하여 실험 데이터를 피팅하는 다른 방식 및 더욱 정교한 수학적 계산은 본원에서 제안된 유효 E:T 비에 대비하여 얼마나 많은 암세포가 암 살상 T 세포에 의해 살상되는지를 계산하는 다른 방식들을 제공할 수 있다. 이러한 대안적 접근법들은 암 살상 T 세포의 활성을 추정하기 위해 본질적으로 동일한 개념을 계산하는 바, 또한 유효 E:T 비의 정의에 포함되는 것으로 간주된다.

[0122] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 후에 1회 이상의 시간 간격에서 측정된다. 예시적 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 시간 0에서, 1 내지 168 시간(예컨대, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72, 96, 120, 144 또는 168 시간)째, 또는 수 일 또는 수 주째에 결정된다.

[0123] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 접촉 단계는 추가로 pICF 및/또는 면역조절제를, 예컨대 용량 반응 곡선을 생성하기 위해, 여러 용량(예컨대, 증가 투여량)의 pICF 및/또는 면역조절제로 첨가하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, 용량 0 또는 대조 수준(예컨대, 역치 용량)에서 및 포화 용량의 pICF 및/또는 면역조절제에서 T 세포 또는 암 세포의 수준 간의 차이가 결정된다. 구체예들에서, 포화 용량 vs. 역치 용량에서 T 세포 또는 암 세포의 수준 차이가 결정된다. 구체예들에서, 본원에 사용된 바와 같은 유효 E:T 비는 암 세포 수준 차이 대비 T 세포 수준 차이의 비이다. 구체예들에서, 본원에 사용된 바와 같은 유효 E:T 비는 각각 EC50 농도에서의 T 세포 및 표적 세포 수의 비이다.

[0124] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 이 방법은 자동 플랫폼, 예컨대 자동 형광 기반의 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 ExviTech 플랫폼을 이용하여 수행한다.

[0125] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제의 활성은 용량 반응 곡선을 측정하는 생체외/시험관내 분석을 이용하여 결정하며, 이의 수학적 피팅은 EC50, 유효 E:T 비, Emax 또는 동역학 중 적어도 하나로부터 선택되는 정량적 파라미터들이 활성을 추정할 수 있게 한다. 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 단계 (e)에 의해 평가된 pICF 및/또는 면역조절제의 활성은 예컨대, 표준 고갈 용량 반응 곡선에 비해, pICF 및/또는 면역조절제 활성의 용량 반응을 이용하는 활성 평가와 다르다.

[0126] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 기준 비는 소정의 비, 예컨대 약 1:3 내지 1:10, 예컨대 약 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10이다. 구체예들에서, 단계 (e)로부터의 T 세포 대 높은 표적 세포 비는 약 1:4 내지 1:500(예컨대, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100, 1:500 또는 그 이상)이다.

[0127] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 단계 (c)는 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물과 표적 세포, 예컨대 암 세포의 생체외 혼합물을 형성시키는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 암 세포는 혈액 암, 고형암, 전이 암(예컨대, CTC, 또는 이의 조합) 중에서 선택되는 세포이다. 구체예들에서, 암 세포는 백혈병 또는 림프종 아세포(예컨대, CD19, CD123, CD20 등에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 아세포)이다. 구체예들에서, T 세포는 혈액 샘플(예컨대, 말초혈액 샘플), 골수 샘플, 림프절 샘플, 비장 샘플, CTL 및/또는 TIL을 함유하는 종양 샘플, 또는 이의 조합 중에서 선택되는 세포이다. 구체예들에서, T 세포는 CD8 및/또는 CD25를 발현한다

(예컨대, 이것은 CD8+CD25+ T 세포이다). 다른 구체예들에서, T 세포는 CD4 및/또는 CD25를 발현한다(예컨대, 이것은 CD4+CD25+ T 세포이다).

[0128] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 pICF 및/또는 면역조절제, 예컨대 본원에 기술된 pICF 및/또는 면역조절제의 사용을 포함하는 방법에 의해 생산된다.

[0129] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 CD8+ 및 CD25+, 또는 CD4+ 및 CD25+, 또는 이 둘 다인, CTL과 같은 T 세포를 포함한다.

[0130] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 다른 투여량(예를 들어, 증가 투여량)으로 투여된다.

[0131] 전술한 임의의 방법 및 분석법의 구체예에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 존재하에 T 세포의 세포 살상 활성의 증가는 pICF 및/또는 면역조절제의 높은 효능을 나타낸다. 대안적으로, 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 존재하에 T 세포의 세포 살상 활성의 작은 변화 또는 실질적인 무변화는 pICF 및/또는 면역조절제의 낮은 효능을 나타낸다.

[0132] *선별 분석*

[0133] 다른 관점에서, 본 발명은 피검체로부터 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF를 식별하는 방법 또는 분석법을 제공한다. 이 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

[0134] (a) 후보 pICF(예, 하나 이상의 후보 pICF)를 제공하는 단계;

[0135] (b) 암세포 및 T 세포를 함유하는 샘플, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 샘플을 제공하는 단계; 및

[0136] (c) 후보 pICF(들) 및 샘플을 포함하는 생체외 반응 혼합물을, 예컨대 T 세포가 활성화(예컨대, T 세포가 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록) 하기에 충분한 조건(예를 들어, 일정 시간 동안)하에 형성시켜 암 살상 T 세포를 생성하는 단계.

[0137] 또 다른 관점에서, 본 발명은 피검체로부터 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 면역조절제를 식별하는 방법 또는 분석법을 제공한다. 이 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

[0138] (a) 후보 면역조절제(예를 들어, 본원에 기술된 하나 이상의 후보 면역조절제)를 제공하는 단계;

[0139] (b) 암세포 및 T 세포를 함유하는 샘플, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 샘플을 제공하는 단계; 및

[0140] (c) 후보 면역조절제(들) 및 샘플을 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 예컨대 T 세포가 활성화하기에 충분한 조건(예컨대, 소정 농도의 후보 면역조절제(들)의 존재하에 및/또는 일정 시간 동안) 하에(예컨대, T 세포가 암세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록 하는) 형성시켜, 암 살상 T 세포를 생산하는 단계.

[0141] 구체예들에서, 본 방법 또는 분석법은 추가로 다음을 포함한다:

[0142] (d) 암세포의 고갈, 활성화된, 예를 들어, 삼투적립성 T 세포의 수 또는 퍼센트, 및 활성화된, 예컨대 삼투적립성 T 세포의 증식 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터를, 예컨대 각 후보 pICF 또는 후보 면역조절제마다 결정하는 단계. 몇몇 구체예들에서, (i) 내지 (iv) 중 하나 이상은 후보 pICF 또는 면역조절제가 피검체로부터 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF 또는 면역조절제인 것을 나타낸다:

[0143] (i) pICF 또는 면역조절제는 기준 수준에 비해 생 암세포 수를 저하시키며, 이때 예컨대 기준 수준은 pICF 또는 면역조절제의 부재하에 단계 (c)에서 생산된 암 살상 T 세포와 항온처리한 후의 생 암세포의 수 또는 반응 혼합물 중의 생 암 세포의 수이다;

[0144] (ii) pICF 또는 면역조절제는 기준 수준 대비 활성화된 암 살상 T 세포의 수/퍼센트를 증가시키며, 예컨대 이때 기준 수준은 pICF 또는 면역조절제가 결여된 유사한 생체외 반응 혼합물 중의 활성화된 T 세포의 수/퍼센트이거나, 또는 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하도록 하기에 불충분한 시간 동안 형성된 생체외 반응 혼합물 중의 활성화된 T 세포의 수/퍼센트이다;

[0145] (iii) pICF 또는 면역조절제는 기준 수준 대비 활성화된 암 살상 T 세포의 증식을 증가시키며, 예컨대 이때 기준 수준은 암세포에 노출된 적이 없는 T 세포(예, CTL)(예, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 또는 생

체외에서 pICF 또는 면역조절제에 노출되지 않은 T 세포, 예컨대 CTL(예, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 증식이다; 및/또는

[0146] (iv) pICF 또는 면역조절제는 동일한 샘플 및 항온처리 조건에서 다른 pICF 대비 더 큰 유효 E:T 비를 야기한다.

[0147] 본원에 기술된 전술한 임의의 방법 또는 분석법에서, 상기 방법 또는 분석법은 추가로 면역조절제(예컨대, 면역 체크포인트 분자의 억제제, 면역 세포의 작용물질, 또는 다른 면역조절 약물 또는 세포 치료제 중 하나 이상, 예컨대 본원에 기술된 것)를 제공하는 것을 포함할 수 있다. 면역조절제는 후보 pICF(들), 면역조절제 및 샘플을 함유하는 생체외 반응 혼합물이 형성되도록 첨가될 수 있다. 생체외 반응 혼합물의 활성은 단계 (d)에 따라 측정될 수 있다.

[0148] 본원에 기술된 전술한 임의의 방법 또는 분석법에서, 상기 방법 또는 분석법은 추가로 억제 면역 세포, 예컨대 하나 이상의 골수 유래 억제 세포(MDSC) 또는 조절성 T(Treg) 세포의 수준 또는 활성을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예들에서, 억제 면역 세포의 표현형의 변화가 평가된다. 한 구체예에서, Treg 세포 마커, 예컨대 $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}CD127$ 발현 세포의 수준 또는 발현이 검출된다. 대안적으로, 또는 조합하면, MDSC 마커의 수준 또는 발현은 $CD33^{+}/CD11b^{+}/HLA\text{-}DR^{low/neg}$(예, AML에서), IDOhi$CD14^{+}$ $HLA\text{-}DR^{low}$(예, CLL에서) 또는 $CD11b^{+}/CD14^{-}/HLA\text{-}DR^{low/neg}/CD33^{+}CD15^{+}$(예, MM에서) 중 하나 이상을 검출함으로써 결정된다. 면역 억제세포의 마커는 예컨대 자동 형광 세포 분류(예, ExviTech 플랫폼을 사용하여)에 의해 검출될 수 있다.

[0149] 본원에 기술된 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예들에서, pICF, 예컨대 후보 pICF의 효과는 T 세포(예, 활성화된 T 세포), 삼투적립성 T 세포, Treg 또는 MDSC 중 하나, 둘, 셋 또는 전부의 수준 및/또는 활성의 함수로써 평가될 수 있다. 몇몇 구체예들에서, pICF의 존재 또는 부재하에 하나 이상의 전술한 세포들의 수 및/또는 비가 결정될 수 있다.

[0150] 본원에 기술된 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 몇몇 구체예들에서, 임의의 화합물(예컨대, 면역조절제, 예컨대 pICF)의 치료 효능은 암 살상 T 세포의 수준 또는 활성을 검출하고(또는) Treg 세포 또는 MDSC와 같은 억제 면역 세포의 활성 수준을 검출하여 평가할 수 있다. 한 구체예에서, 암 살상 T 세포의 수준 또는 활성의 증가 및/또는 억제 면역 세포의 활성 수준의 감소는 그 화합물의 치료 효능의 증가를 나타낸다. 대안적으로, 암 살상 T 세포의 수준 또는 활성의 감소 및/또는 억제 면역 세포의 활성 수준의 증가는 화합물의 치료 효능의 저하를 나타낸다.

[0151] 다른 관점에서, 본 발명은 생체내에서 암 세포의 살상에 효과적일 것 같은 암 살상 T 세포를 식별하는 방법 또는 분석법으로써,

[0152] (a) 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 것과 같은 암 세포에 특이적인 암 살상 T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및

[0153] (b) 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성, 암 살상 T 세포의 생육성, 암 살상 T 세포의 증식, 및 암 살상 T 세포 상에 세포 표면 마커의 발현 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터를 결정하는 단계를 함유하는 방법 또는 분석법을 특징으로 한다.

[0154] 몇몇 구체예들에서, 생체내 암 살상 T 세포의 유효성은 다음 중 하나 이상에 의해 평가된다:

[0155] (i) 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성을, 예컨대 기준 수준에 대비하여 검출하되, 이때 암 살상 T 세포의 더 높은 세포독성 활성은 생체내에서 증가된 유효성을 나타낸다(구체예들에서, 기준 수준은 다른 종류의 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성 또는 비-암성 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성에 의해 검출된다);

[0156] (ii) 암 살상 T 세포의 증식을, 예컨대 기준 수준과 비교하여 검출하되, 예컨대 이때 더 높은 증식은 생체내에서의 증가된 유효성을 나타낸다(구체예들에서, 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 또는 생체외에서 pICF에 노출되지 않았던 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 증식이다);

[0157] (iii) 암 살상 T 세포의 생육성을, 예컨대 기준 수준과 비교하여 검출하되, 이때 암 살상 T 세포의 증가된 생육성은 생체내에서 증가된 유효성을 나타낸다(구체예들에서, 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 또는 생체외에서 pICF에 노출되지 않았던 CTL과 같

은 T 세포(예컨대, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 생육성이다); 또는

[0158] (iv) 암 살상 T 세포 상에서 하나 이상의 암 항원, PD-1 또는 TIM-3의 발현 수준을, 예컨대 기준 수준과 비교하여 검출하되, 이때 더 높은 발현 수준은 생체내 증가된 유효성을 나타낸다(구체예들에서, 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 상에서 암 항원(들), PD-1 및/또는 TIM-3의 발현이다).

[0159] 또 다른 관점에서, 본 발명은 또한 생체내에서 암 세포를 살상하는데 효과적일 것 같은 암 살상 T 세포의 하나 이상의 클론을 식별하는(예컨대, 그리고 선택하는) 방법 또는 분석법으로써,

[0160] (a) 암 세포에 특이적인 암 살상 T 세포(예컨대, 본원에 기술된 방법에 의해 생산된)의 복수의 클론을 함유하는 집단을 제공하는 단계;

[0161] (b) 상기 집단을, 예컨대 개별 클론으로 분리하는 단계; 및

[0162] (c) 암 세포에 대한 암 살상 T 세포의 세포독성 활성, 암 살상 T 세포의 생육성, 암 살상 T 세포의 증식, 또는 암 살상 T 세포 상에 세포 표면 마커의 발현 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터를 결정하는 단계를 함유하는 방법 또는 분석법을 특징으로 한다. 구체예들에서, 클론은 개별적으로 평가된다.

[0163] 구체예들에서, (i) 내지 (v) 중 하나 이상은 클론이 생체내에서 효과적일 가능성이 있음을 시사한다:

[0164] (i) 암 세포에 대한 클론의 더 높은 세포독성 활성, 예컨대 유효 E:T 비를 사용하여, 예컨대 기준 수준과 비교하여 측정했을 때(예컨대, 이때 기준 수준은 다른 종류의 암세포에 대한 클론의 세포독성 활성 또는 비-암성 세포에 대한 클론의 세포독성 활성이다);

[0165] (ii) 클론의 더 높은 증식, 예컨대 기준 수준과 비교하여(예컨대, 이때 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포), 또는 생체외에서 pICF에 노출되지 않았던 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 증식이다);

[0166] (iii) 클론의 더 높은 생육성, 예컨대 기준 수준과 비교하여(예컨대, 이때 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 또는 생체외에서 pICF에 노출되지 않았던 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 생육성이다); 및/또는

[0167] (iv) 하나 이상의 암 항원, PD-1 또는 TIM-3의 더 높은 발현, 예컨대 기준 수준과 비교하여(예컨대, 이때 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 CTL과 같은 T 세포(예, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 상에서의 암 항원(들), PD-1 및/또는 TIM-3의 발현이다).

[0168] 구체예들에서, 분리 단계는 한계 희석(예컨대, 클론성 세포 집단을 수득하기 위해), 자성 비드계 농축, 또는 형광 세포 활성화된 분류법 중 하나 이상을 포함한다. 구체예들에서, 분리 단계는 추가로 개별 세포(예, 개별 클론)를 용기의 웰들에서 평판배양하는 것을 포함한다. 이 방법은 추가로 개별 세포를 각각 팽창시켜 각 클론의 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 몇몇 구체예들에서, 세포는 팽창없이 투여된다. 다른 구체예들에서, 세포는 세포 팽창 후, 예컨대 개별 세포의 팽창 후에 투여된다.

[0169] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 생체내에서 효과적일 것 같은 것으로써 식별된 클론을 팽창시키는 단계를 포함한다.

[0170] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 생체내에서 효과적일 것 같은 것으로써 식별된 2 이상의 클론을 배합하고, (경우에 따라) 클론의 혼합물을 팽창시키는 단계를 포함한다.

[0171] ***암 치료법에 반응성인 피검체를 식별하는 분석법 및 방법***

[0172] 다른 관점에서, 본 발명은 또한 피검체를 평가하는, 예컨대 치료제, 예컨대 면역조절 및/또는 암 치료제에 반응성인 피검체를 식별 또는 선택하는 방법 또는 분석법을 특징으로 한다. 이 방법은 다음을 포함한다:

[0173] (a) 암을 가진 피검체로부터 T 세포(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 T 세포 또는 T 세포 샘플)를 제공하는 단계;

[0174] (b) 암 세포를, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 암 세포 또는 암 세포 샘플);

[0175] (c) T 세포, 암 세포, 근접성 면역 코칭 인자(pICF) 및 치료제, 예컨대 암 치료제를 함유하는 생체외 반응 혼합

물을 형성시키는 단계;

[0176] (d) 단계 (c)의 반응 혼합물의 세포 살상 활성을 결정하는 단계.

[0177] 몇몇 구체예들에서, 기준 값 대비(예컨대, 치료제의 부재) 치료제의 존재하에 반응 혼합물의 세포 살상 활성의 증가는 치료제에 대한 더 높은 반응성을 나타낸다.

[0178] 몇몇 구체예들에서, 단계 (d)는 단계 (c) 이후 표적 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 이후 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계를 포함한다(구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 1회 이상의 시간 간격들에서 결정된다. 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 표적 세포 대 T 세포, 또는 T 세포 대 표적 세포 중 어느 하나의 유효 E:T 비, 예컨대 본원에 기술된 바와 같은 비를 결정하는 단계를 포함한다.

[0179] 구체예들에서, pICF는 이중특이적 항체 분자, 예컨대 이중특이적 면역글로불린(BsIgG), 추가 항원 결합 분자에 작동적으로 결합된 면역글로불린, 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질, 또는 BsAb 접합체이다.

[0180] 구체예들에서, pICF는 BsMAb CD123/CD3, BsMAb CD19/CD3 및 EpCAM/CD3으로 이루어진 목록 중에서 선택되는 이중특이적 항체이다.

[0181] 구체예들에서, 치료제는 면역조절제, 예컨대 본원에 기술된 바와 같은 면역조절제이다. 한 구체예에서, 면역조절제는 면역 체크포인트 분자의 억제제, 예컨대 본원에 기술된 면역 체크포인트 억제제, 예컨대 CTLA4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, TIM3, LAG3, BTLA, CD80, CD86 또는 HVEM 중 하나 이상의 억제제이다. 구체예들에서, 면역조절제는 T 세포의 작용물질, 예컨대 본원에 기술된 T 세포의 작용물질, 예컨대 작용성 항체, 예컨대 CD137, GITR 또는 CD40에 대한 작용성 항체 또는 이의 단편이다. 한 구체예에서, 면역조절제는 MDSC 및/또는 Treg 세포의 억제제이다.

[0182] 한 구체예에서, 면역조절제는 레날리도마이드(lenalidomide)이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 종양 특이적 항원에 대한 면역 반응을 활성화시키며, 예컨대 이것은 백신, 예컨대 gp100, MUC1 또는 MAGEA3과 같은 표적에 대한 백신이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 사이토킨, 예컨대 GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 또는 IL-21 중 하나 이상으로부터 선택되는 재조합 사이토킨이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 자가 T 세포, 예컨대 종양 표적화된 세포외 및 세포뇌 종양 특이적 항원(예, CAR T 세포 또는 TCR T 세포)이다. 또 다른 구체예들에서, 면역조절제는 아미노산 이화작용, 종양 유래 세포외 ATP의 신호전달, 아데노신 신호전달, 아데노신 생산, 케모킨 및 케모킨 수용체, 이종 유기체의 인식 또는 키나제 신호전달 활성과 관련이 있는 성분(예, 효소 또는 수용체)의 조절제이다. 예시적 제제로는 IDO, COX2, ARG1, ArG2, iNOS 또는 포스포디에스터라제(예, PDE5)의 억제제(예, 소분자 억제제); TLR 작용물질 또는 케모킨 길항물질을 포함한다. 면역조절제의 또 다른 예는 예컨대 문헌[Adams JL(2015) 및 Serafini(2008), 각 문헌은 본원에 참고 인용됨]에 상세히 설명되어 있다.

[0183] ***암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제를 식별하는 방법 또는 분석법***

[0184] 한 관점으로써, 본 발명은 피검체로부터 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제를 식별하는 방법 또는 분석법으로써,

[0185] (a) 후보 pICF 및/또는 면역조절제(예, 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제)를 제공하는 단계;

[0186] (b) 암 세포 및 T 세포를 함유하는 샘플, 예컨대 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 샘플을 제공하는 단계; 및

[0187] (c) 후보 pICF(들) 및/또는 면역조절제(들)와 상기 샘플을 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 예컨대 T 세포를 활성화시키기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안) 하에 형성시켜 암 살상 T 세포를 생산하는 단계를 포함하는 방법 또는 분석법을 특징으로 한다.

[0188] 구체예들에서, 상기 방법 또는 분석법은 추가로 다음을 포함한다:

[0189] (d) 암 세포의 고갈, 활성화된, 예컨대 삼투적립성 T 세포의 수 또는 퍼센트, 및 활성화된, 예컨대 삼투적립성 T 세포의 증식 중에서 선택되는 하나 이상의 파라미터를, 예컨대 각 후보 pICF 및/또는 면역조절제마다 결정하는 단계를 포함한다.

[0190] 구체예들에서, (i) 내지 (iii) 중 하나 이상은 후보 pICF 및/또는 면역조절제가 피검체로부터 암 살상 T 세포를

생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제임을 나타낸다:

[0191] (i) pICF 및/또는 면역조절제가 기준 수준에 비해 생 암 세포의 수를 감소시키고, 예컨대 이때 기준 수준은 반응 혼합물 중의 생(live) 암 세포의 수 또는 단계 (c)에 의해 생산된 암 살상 T 세포와 항온처리 후의 생 암 세포의 수이다;

[0192] (ii) pICF 및/또는 면역조절제가 기준 수준 대비 활성화된 T 세포의 수/퍼센트를 증가시키고, 예컨대 이때 기준 수준은 pICF 및/또는 면역조절제가 없는 유사한 생체외 반응 혼합물 중의 활성화된 T 세포의 수/퍼센트, 또는 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에 불충분한 시간의 기간 동안 형성된 생체외 반응 혼합물 중의 활성화된 T 세포의 수/퍼센트이다;

[0193] (iii) pICF 및/또는 면역조절제가 기준 수준 대비 활성화된 T 세포의 증식을 증가시키고, 예컨대 이때 기준 수준은 암 세포에 노출된 적이 없는 T 세포(예, CTL)(예컨대, 비-암성 피검체 유래의 CTL과 같은 T 세포) 또는 생체외에서 pICF 및/또는 면역조절제에 노출되지 않았던 CTL과 같은 T 세포(예컨대, 암성 또는 비-암성 피검체 유래)의 증식이다.

[0194] ***후보 pICF 및/또는 면역조절제를 평가(예컨대, 선별)하는 방법***

[0195] 몇몇 관점들에서, 선별 방법은 환자 유래의 제1 샘플을 pICF와 혼합하는 것과 같은 본원에 기술된 방법을 사용하여 암 살상 T 세포를 생성하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 선별 방법은 이어서 상기 환자 유래의 제2 샘플을 암 살상 T 세포 및 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제와 혼합하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 상이한 비의 T 세포 대 표적 세포(E:T 비)가 고정된 농도의 pICF(들) 및/또는 면역조절제(들)와 배합된다. 다른 구체예들에서는 고정된 비의 T 세포 대 표적 세포(E:T 비)가 다양한 농도의 pICF(들) 및/또는 면역조절제(들)와 배합되어, pICF/면역조절제가 활성에 따라 등급이 매겨진다.

[0196] 따라서, 한 관점에서 본 발명은 후보 pICF 및/또는 면역조절제를 평가하는 방법으로써,

[0197] (a) 예컨대, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을, 예컨대 피검체(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 암을 가진 피검체)로부터 제공하는 단계;

[0198] (b) 표적 세포(예, 암 세포)를 함유하는 샘플을, 예컨대 상기 피검체로부터 제공하는 단계;

[0199] (c) 후보 pICF 및/또는 면역조절제(예컨대, 하나 이상의 후보 pICF들 및/또는 면역조절제들)를 단계 (a)의 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물 및 단계 (b)의 제2 샘플과 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 기간 동안)하에 접촉시키는 단계;

[0200] (d) 단계 (c) 이후 표적 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 이후 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계(구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 하나 이상의 시간 간격에서 결정된다); 및

[0201] 경우에 따라, (e) 단계 (d) 유래의 표적 세포 대 T 세포, 또는 T 세포 대 표적 세포의 유효 비를 결정하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0202] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물 및 표적 세포(예, 암 세포)는 동일 샘플에서 유래되는 것이다.

[0203] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물 및 표적 세포(예, 암 세포)는 다른 샘플에서 유래되는 것이다.

[0204] 구체예들에서, 단계 (a), (b), 또는 단계 (a)와 (b) 모두가, 예컨대 하나 이상의 추가 샘플들, 예컨대 동일 피검체 유래의 샘플을 사용하여 반복된다.

[0205] 구체예들에서, 단계 (e)는 상이한 비의 T 세포 대 표적 세포를 고정된 양의 후보와 접촉시켜 유효 후보를 식별하는 단계를 포함한다.

[0206] 구체예들에서, 단계 (e)는 고정된 T 세포 대 표적 세포 비를 상이한 농도의 후보(들)와 접촉시켜, 후보(들)의 활성을 결정하고, 경우에 따라 활성을 기준으로 후보(들)의 등급을 매기는 단계를 포함한다.

[0207] 구체예들에서, 암 세포의 수준 또는 양의 감소(예컨대, 기준 수준 대비)는 암 세포 살상의 증가를 나타낸다.

[0208] 구체예들에서, 암 세포의 수준 또는 양의 변화 감소 또는 실질적인 무변화(예컨대, 기준 수준 대비)는 암 세포 살상의 감소를 나타낸다.

[0209] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 대비 표적 세포의 높은 수준(예컨대, 암 살상 T 세포 대비 표적 세포의 높은 유

효 비)은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 암 세포의 효과적인 킬러라는 것을 나타낸다.

[0210] 구체예들에서, 표적 대 암 살상 T 세포 비는 기준 비와 비교된다.

[0211] 구체예들에서, 1 대 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 또는 그 이상(표적 세포)의 유효 비는 강력한 T 세포 살상 활성을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, T 세포:표적 세포의 비는 1:100 또는 그 이상의 범위이다. 구체예들에서, 1:100 또는 그 이상의 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 유효 비는 암 살상 T 세포가 수퍼킬러 T 세포임을 결정한다.

[0212] 구체예들에서, 후보 pICF의 존재하에 T 세포의 세포 살상 활성의 증가 및/또는 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 높은 유효 비는 pICF의 높은 효능을 나타낸다.

[0213] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 대비 표적 세포의 낮은 수준(예컨대, 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 낮은 유효 비)은 불량한 T 세포 살상 활성을 나타낸다.

[0214] 구체예들에서, 표적 대 암 살상 T 세포 비는 기준 비와 비교된다.

[0215] 구체예들에서, 1(T 세포) 대 1, 3, 또는 5(표적 세포)의 유효 비는 불량한 T 세포 살상 활성을 나타낸다.

[0216] 구체예들에서, 후보 pICF의 존재하에 T 세포의 세포 살상 활성의 작은 변화 또는 실질적인 무변화 및/또는 표적 세포 대 T 세포의 낮은 유효 비는 pICF의 낮은 효능을 나타낸다.

[0217] 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 하나 이상의 시간 간격들에서 결정된다.

[0218] 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 이후 시간 0, 시간 1 내지 75 시간째(예컨대, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 또는 72시간), 또는 수 일째 결정된다.

[0219] 구체예들에서, 접촉 단계는 추가로 예컨대 용량 반응 곡선을 생성하기 위해, 상이한 용량(예컨대, 증가 투여량)의 pICF를 첨가하는 것을 포함한다.

[0220] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 용량 0 또는 대조 수준(예컨대, 역치 용량) 및 포화 용량의 pICF에서 T 세포 또는 암 세포 수준 간의 차이를 결정하는 것을 포함한다.

[0221] 구체예들에서, 상기 방법은 포화 용량 대 역치 용량에서 T 세포 또는 암 세포의 수준 차이를 결정하는 것을 포함한다.

[0222] 구체예들에서, 표적 세포(예, 암 세포) 대 암 살상 T 세포의 유효 비(예컨대, 단계 (e)에서)는 암 세포의 수준 차이 대비 암 살상 T 세포의 수준 차이의 비이다.

[0223] 구체예들에서, 상기 방법은 자동 플랫폼, 예컨대 자동 형광 기반 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 ExviTech 플랫폼을 사용하여 수행된다.

[0224] 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제의 활성은 용량 반응 곡선을 측정하는 생체외/시험관내 분석을 사용하여 결정되고, 이의 수학적 피팅이 EC50, 유효 E:T 비, Emax 또는 동역학 중 적어도 하나로부터 선택되는 정량적 파라미터로 하여금 활성을 평가할 수 있게 한다. 구체예들에서, 단계 (e)에 의해 평가된 pICF의 활성은 pICF 활성의 용량 반응을 이용한 활성 평가, 예컨대 표준 고갈 용량 반응 곡선과 비교 시와 다르다. 구체예들에서, 기준 비는 소정의 비, 예컨대 약 1:3 내지 1:10, 예컨대 약 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10이다.

[0225] 구체예들에서, 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 높은 유효 비는 약 1:4 내지 1:100(예, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100 또는 그 이상)이다. 구체예들에서, 1:100 이상의 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 유효 비는 암 살상 T 세포가 수퍼킬러 T 세포임을 결정한다.

[0226] 구체예들에서, 단계 (c)는 표적 세포, 예컨대 암 세포와 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 생체외 혼합물을 형성시키는 것을 포함한다.

[0227] 구체예들에서, 암 세포는 혈액암, 고형암, 전이암(예, CTC 또는 이의 조합) 중에서 선택되는 세포이다.

[0228] 구체예들에서, 암 세포는 백혈병 또는 림프종 아세포(예컨대, CD19, CD123, CD20 등에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 종양 세포)이다.

[0229] 구체예들에서, T 세포는 혈액 샘플(예컨대, 말초혈액 샘플), 골수 샘플, 림프절 샘플, CTL 및/또는 TIL을 함유하는 종양 샘플, 또는 이의 조합 중에서 선택되는 세포이다.

[0230] 구체예들에서, T 세포는 CD8 및/또는 CD25를 발현한다(예컨대, 이것은 CD8+CD25+ T 세포이다).

[0231] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 pICF, 예컨대 본원에 기술된 pICF의 사용을 포함하는 방법을 사용하여 생산된다.

[0232] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 CD8+ 및 CD25+인 CTL과 같은 T 세포이다.

[0233] 구체예들에서, 후보 pICF는 상이한 투여량(예컨대, 증가 투여량)으로 첨가된다.

[0234] 본원에 기술된 임의의 방법 및 조성물의 또 다른 특징 또는 구체예들은 다음 중 하나 이상을 포함한다:

[0235] 전술한 임의의 방법 또는 조성물의 구체예들에서, 암 살상 세포는 (i) 암 세포에 대한 세포독성 활성이 있고, (ii) 암 세포에서 유래된 세포 표면 마커, 예컨대 적어도 90 내지 500 카피의 세포 표면 마커(예컨대, 90, 100, 200, 300, 400 또는 500, 예컨대 하나 이상의 암 세포 표면 마커)를 함유한다; 및

[0236] 전술한 임의의 방법 또는 조성물의 구체예에서, 반응 혼합물 내의 총 T 세포의 약 2 내지 75%(예컨대, 약 2 내지 70%, 2 내지 60%, 2 내지 50% 또는 2 내지 40%)는 하나 이상의 암 세포 표면 마커(예컨대, 하나 이상의 백혈병 세포 암)를 발현한다.

[0237] 구체예들에서, 암 살상 세포는 농축되거나 정제된다. 몇몇 구체예들에서, 농도 또는 정제된 암 살상 세포 집단은 하나 이상의 암 세포 표면 마커를 함유하는 적어도 80%의 암 살상 T 세포(예컨대, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100%)를 함유한다.

[0238] 본원에 기술된 임의의 방법 및 조성물의 몇몇 구체예들에서, pICF는 T 세포에 대해 친화성(예컨대, 제1 결합 특이성)을 제공하는 제1 요소 및 암 세포에 대해 친화성(예컨대, 제2 결합 특이성)을 갖는 제2 요소를 보유한다. 구체예들에서, 제1 요소 및 제2 요소는 각각 1개, 2개 또는 3개, 4개, 5개 또는 6개의 CDR을 함유한다. 구체예들에서, 제1 요소 및 제2 요소는 각각 Fc 영역외에 다른 것이다.

[0239] 구체예들에서, 제1 요소 및 제2 요소는 각각 이의 표적에 대해 1μM 이하, 예컨대 약 1pM 이하의 해리 상수(Kd)를 나타낸다.

[0240] 구체예들에서, 제1 요소는 T 세포에 결합하고 상당한 수의 암 세포에 결합하지 않고(예컨대, 제1 요소는 암 세포보다 적어도 10 내지 10000배 더 높은 친화도로 T 세포에 결합한다(예컨대, 10, 100, 1000, 10000배 이상)); 제2 요소는 암 세포에 결합하고 상당한 수의 T 세포에 결합하지 않는다(예컨대 제2 요소는 T 세포보다 적어도 10 내지 10000배 더 높은 친화도로 암 세포에 결합한다(예컨대, 10, 100, 1000, 10000배(또는 그 이상)).

[0241] 구체예들에서, 제2 요소는 CD20, CD30, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, 뮤신, TAG-72, 탄산탈수효소 IX, PSMA, 엽산 결합 단백질, 강글리오사이드(예, GD2, GD3 또는 GM2), Lewis-Y2, VEGF, VEGFR, αVβ3, α5β1, ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ERbB3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, 테나신(tenascin), CD123, C19, CD19, BCMA 또는 다른 암 세포 항원 중 하나 이상에 결합(예컨대, 특이적으로 결합)한다.

[0242] 구체예들에서, 제1 요소는 T 세포, 예컨대 세포독성 T 세포, 예컨대 CD8, CD3, α/β T 세포 수용체(TCR), γδ TCR, CD45RO 및/또는 CD45RA 중 하나 이상을 함유하는 T 세포에 결합(예컨대, 특이적으로 결합)한다.

[0243] 구체예들에서, pICF는 이중특이적 항체 분자, 예컨대 이중특이적 면역글로불린(BsIgG), 추가 항원 결합 분자에 작동적으로 결합된 면역글로불린, 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질, 또는 BsAb 접합체, 예컨대 문헌[Spiess et al.(2015) Mol. Immunol. 67:95-106(예컨대, 도 1이 참고 인용됨)]에 기술된 바와 같은 것을 포함한다.

[0244] 구체예들에서, BsAb 단편은 2 이상의 scFv 단편, 예컨대 링커(예, 디아바디(diabody))에 의해 작동적으로 결합된 상기 단편, 예컨대 이중 친화성 재표적화(DART) 항체 단편 또는 이중특이적 T 세포 이용자(BiTE)를 포함한다. 구체예들에서, BsAb 단편은 2 이상의 단일 도메인 항체 단편(dAb), 예컨대 링커(linker)에 의해 작동적으로 결합된 상기 단편을 함유한다. 구체예들에서, BsAb 단편은 Fc 영역을 함유하지 않는다.

[0245] 구체예들에서, pICF는 BsMAb CD123/CD3, BsMAb CD19/CD3 및 EpCAM/CD3으로 이루어진 목록 중에서 선택되는 이중특이적 항체이다.

[0246] 구체예들에서, pICF는 CDR-접목된 스캐폴드 도메인, 예컨대 피브로넥틴 스캐폴드 도메인을 함유한다.

[0247] 다른 구체예들에서, 항체 분자는 고형 표면, 예컨대 비드 또는 중합체에 부착(예컨대, 접합)된다.

[0248] 본원에 기술된 임의의 전술한 방법 또는 분석법에서, 상기 방법 또는 분석법은 추가로 면역조절제(예를 들어, 면역 체크포인트 분자의 억제제, 면역 세포의 작용물질, 또는 다른 면역조절 약물, 예를 들어, 본 명세서에 기술된 것 중 하나 이상)를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 구체예들에서, 면역조절제는 본원에 기술된 바와 같은 생체외 반응 혼합물에 첨가되어 후보 pICF(들), 면역조절제 및 샘플을 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성할 수 있다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 피검체, 예컨대 본원에 기술된 바와 같은 암 살상 T 세포를 공급받은 피검체에게 복합 치료 프로토콜의 일부로써 투여된다.

[0249] 한 구체예에서, 면역조절제는 면역 체크포인트 분자의 억제제, 예를 들어 본원에 기재된 면역 체크포인트 억제제, 예를 들어 CTLA4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, TIM3, LAG3, BTLA, CD80, CD86 또는 HVEM 중 하나 이상의 억제제이다. 구체예들에서, 면역조절제는 T 세포의 작용물질, 예를 들어 본원에 기술된 T 세포의 작용물질, 예를 들어, 작용성 항체, 예컨대 CD137, GITR 또는 CD40에 대한 작용성 항체 또는 이의 단편이다. 한 구체예에서, 면역조절제는 MDSC 및/또는 Treg 세포의 억제제이다.

[0250] 한 구체예에서, 면역조절제는 레날리도마이드이다. 다른 구체예에서, 면역 조절제는 종양 특이적 항원에 대한 면역 반응을 활성화시키며, 예컨대 이것은 백신(예컨대, gp100, MUC1 또는 MAGEA3과 같은 표적에 대한 백신)이다. 다른 구체예에서 면역조절제는 사이토킨, 예컨대 GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 또는 IL-21 중 하나 이상으로부터 선택되는 재조합 사이토킨이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 자가 T 세포, 예컨대 종양 표적화된 세포외 및 세포내 종양 특이적 항원(예, CAR T 세포 또는 TCR T 세포)이다. 또 다른 구체예에서, 면역조절제는 아미노산 이화 작용, 종양 유래 세포외 ATP의 신호전달, 아데노신 신호전달, 아데노신 생산, 케모킨 및 케모킨 수용체, 이종 유기체의 인식, 또는 키나제 신호전달 활성과 관련된 성분(예를 들어, 효소 또는 수용체)의 조절제이다. 예시적인 제제는 IDO, COX2, ARG1, ArG2, iNOS 또는 포스포디에스터라제(예, PDE5)의 억제제(예, 소분자 억제제); TLR 작용물질 또는 케모킨 길항물질을 포함한다. 면역조절제의 추가 예는 예컨대 문헌[Adams JL (2015) 및 Serafini P(2008)]에 더 상세히 기재되어 있다.

[0251] ***암 살상 T 세포를 생산하는 방법의 추가 구체예***

[0252] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 암 살상 T 세포 제조물, 예컨대 약학적 제제를 생산하는 것을 추가로 포함한다.

[0253] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 암 살상 T 세포의 존재를 검출하는 것을 추가로 포함한다.

[0254] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 ICF로부터 암 살상 T 세포를 정제하는 것을 추가로 포함한다.

[0255] 구체예들에서, pICF는, 예컨대 제조물에, 10 중량% 미만, 예컨대 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005% 이하(예컨대, 0.001% 이상)의 농도로 존재한다. 바람직한 구체예에서, pICF는 제조물에 0.005 중량% 내지 10 중량%의 농도로 존재한다.

[0256] 구체예들에서, 반응 혼합물은 부피적으로 수 나노리터(예컨대, 10nl 미만, 약 1 내지 5 나노리터)의 pICF가 50 마이크로리터(예컨대, 약 60 마이크로리터) 이상의 세포 현탁액에 첨가된 것을 함유한다.

[0257] 구체예들에서, 제조물은 pICF, 예컨대 면역 분석법에 의해 검출가능한 pICF의 수준을 함유한다.

[0258] 구체예들에서, 선택 및/또는 농축 단계(예컨대, 상기 생산 방법의 단계 ii) 내지 iii) 또는 (d))는 암 세포 막내로 확산하거나, 또는 i) 하나 이상의 암 항원 또는 ii) 활성화된 T 세포의 하나 이상의 마커, 또는 i) 및 ii) 둘 모두에 결합하는 형광 표지된 분자(예, 세포 표면 표지, 예컨대 형광 표지된 항체 또는 이의 단편, 또는 세포 추적자 염료)를 사용하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 선택 및/또는 농축 단계는 형광 활성화된 세포 분류법(FACS)을 사용하는 것을 포함한다.

[0259] 구체예들에서, 선택 및/또는 농축 단계(예컨대, 상기 생산 방법의 단계 ii) 내지 iii) 또는 (d))는 i) 하나 이상의 암 항원 또는 ii) 활성화된 T 세포의 하나 이상의 마커, 또는 i) 및 ii) 둘 모두에 결합하는 항체 또는 이의 단편으로 코팅된 비드(예, 자성 비드)를 사용하는 것을 포함한다.

[0260] 구체예들에서, 선택 및/또는 농축 단계(예컨대, 상기 생산 방법의 단계 ii) 내지 iii) 또는 (d))는 소량, 예컨대 불충분한 수의 암 세포를 순차적으로 첨가하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 전술한 생산 방법은 세포독성 T 세포의 상이한 클론들을 발생시킬 수 있다. 구체예들에서, 암 세포 살상에 가장 효과적이거나 또는 가장 강력

한 세포독성 T 세포 클론의 선택은 소량, 예컨대 불충분한 양의 암 세포를 순차적으로 첨가하여 달성할 수 있다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포를 함유하는 반응물에 첨가될 수 있는 소량 또는 불충분한 수 또는 양의 암 세포는 활성화된 T 세포 수의 50% 이하, 예컨대 30%, 10%, 1%, 0.1% 또는 0.01% 이하이다. 한 구체예에서, 소량 또는 불충분한 수의 암 세포는 암 살상 T 세포(예컨대, 암세포, T 세포 및/또는 pICF를 함유하는 반응물)에 1회 이상, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 첨가될 수 있다. 한 구체예에서, 소량 또는 불충분한 수의 암 세포는 6시간, 12시간, 24시간, 36시간 또는 48시간마다 첨가된다. 한 구체예에서, 첨가되는 소량 또는 불충분한 수의 암 세포는 환자 유래의 암 세포이다. 한 구체예에서, 첨가되는 소량 또는 불충분한 수의 암 세포는 상기 환자 유래의 암 세포가 아니다. 한 구체예에서, 첨가되는 소량 또는 불충분한 수의 암 세포는 암 세포주 유래의 암세포이다.

[0261] 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 팽창된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 팽창은 암 살상 T 세포 수를, 예컨대 제조물에서, 예컨대 적어도 약 2배(예컨대, 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 1000, 10^4, 10^5, 10^6배 이상) 정도 증가시키는 것을 포함한다.

[0262] 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 실질적으로 팽창되지 않는다.

[0263] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 형광 표지된 분자(예, 세포 표면 표지, 예컨대 형광 표지된 항체 또는 이의 단편 또는 세포 추적자 염료) 및/또는 pICF를 포함하고, 예컨대 상기 형광 표지된 분자 및/또는 상기 pICF는 미량(예컨대, 5중량% 미만, 예컨대 중량 기준 5% 미만, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001% 또는 그 미만)으로 존재한다.

[0264] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물(정제 또는 팽창 전)은 암 살상 T 세포를 제조물 중의 총 세포 수의 5% 이하의 농도로 포함한다.

[0265] 구체예들에서, 정제 또는 농축된 암 살상 T 세포 제조물은 제조물에 존재하는 총 세포 수의 적어도 50%(예컨대, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상)의 농도로 암 살상 T 세포를 함유한다.

[0266] 구체예들에서, 정제 또는 농축된 암 살상 T 세포 제조물은 활성화된 암 살상 T 세포를, 예컨대 제조물에 존재하는 총 세포 수의 적어도 50%(예컨대, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상)의 농도로 함유한다.

[0267] 구체예들에서, 정제 또는 농축된 암 살상 T 세포 제조물은 삼투적립성 암 살상 T 세포를, 예컨대 제조물에 존재하는 총 세포 수의 적어도 50%(예컨대, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 그 이상)의 농도로 함유한다.

[0268] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 CD8+ T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 CD4+ T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 CD25+ T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 CD8+/CD25+ T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 CD4+/CD25+ T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 세포독성 T 림프구(CTL), 예컨대 암 항원 특이적 CTL을 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 하나 이상의 작동체 기억 T 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 실질적인 수의 조절성 T 세포(Treg)를 함유하지 않는다.

[0269] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 추가로 암 살상 T 세포 제조물에 존재하는 Treg의 수를 감소시키는 것을 포함한다. 한 구체예에서, pICF는 암 살상 T 세포를 선택적으로 팽창시키고, 이에 따라 암 살상 T 세포:Treg의 유효 E:T 비를 증가시킨다.

[0270] 다른 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 예컨대 Treg 세포 표면 마커에 부착된 비드(예컨대, 자성 비드)를 이용하여, 물리적 분리에 의해 Treg를 제거하는(예컨대, 고갈시키는) 단계를 포함한다.

[0271] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 제조물에 존재하는 총 세포 수의 10% 미만의 농도(예컨대, 9% 미만, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하)로 Treg를 함유한다.

[0272] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 실질적인 수의 미분화(naive) T 세포를 함유하지 않는다.

[0273] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 이 제조물에 존재하는 총 세포 수의 10% 미만의 농도(예컨대, 9% 미만, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하)로 미분화 T 세포를 함유한다.

[0274] 구체예들에서, 미분화 T 세포는 CD45RA, CD62L, CCR7, CD27, CD28 및/또는 CD57을 발현한다.

[0275] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 암 살상 T 세포의 하나보다 많은 클론을 함유한다.

[0276] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 추가로 암 살상 T 세포 제조물로부터 개별 클론을 분리하는 단계를 포함한다.

[0277] 구체예들에서, 분리 단계는 단세포의 클론 팽창을 포함한다(예컨대, (i) 암 살상 T 세포의 제조물을 단세포(예컨대, 웰 또는 용기당 단세포)로 분리하는 단계, 및 (ii) 이 단세포를 팽창시켜 각 제조물이 단일 클론을 함유하는 암 살상 T 세포의 하나 이상의 제조물을 생성시키는 단계를 함유한다.

[0278] 구체예들에서, 분리 단계는 유세포분석법 또는 한계희석을 포함한다.

[0279] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 추가로 암 살상 T 세포 제조물의 암 살상 활성을 결정하는 단계, 및 경우에 따라 증가된 암 세포 살상 활성, 감소된 독성, 저하된 비-표적 효과, 증가된 생육성, 증가된 증식 또는 암 세포 살상에 대한 유효 E:T 비 중 하나 이상으로부터 선택된 파라미터를 기반으로 하여 상기 제조물을 선택하는 단계를 함유한다.

[0280] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 높은 암 살상 활성 및/또는 낮은 독성을 가진 세포를 함유한다.

[0281] 독성이 낮은 암 살상 T 세포 제조물에 함유된 세포는 비-병리학적 세포를 훨씬 적게 살상하는 세포이고, 즉 더욱 선택적으로 살상한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 상청액 내로 및/또는 세포내로 사이토킨을 덜 생성시키기 때문에 독성이 낮은 세포를 함유한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 높은 암 살상 활성과 낮은 독성을 둘 다 동시에 보유하는 세포를 함유하고, 그 이유는 이 세포들이 암세포 살상의 단위당 더 적은 사이토킨을 상청액내 및/또는 세포내로 발생시키기 때문이며, 일단 방출된 사이토킨의 종류 및/또는 수준은 유효 E:T 비, EC50, Emax, 동역학 또는 이 인자들의 조합과 같은 암세포 살상 활성의 정량적 추정값에 의해 정규화된다.

[0282] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 암세포를 T 세포 당 높은 표적 세포로 효과적으로 살상하는 세포를 함유한다. 구체예들에서, T 세포 대 높은 표적 세포 비는 약 1:4 내지 1:100(예컨대, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100 또는 그 이상)이다.

[0283] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 암 살상 T 세포의 10개 미만의 클론으로 이루어지는 세포 집단을 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 클론이 제조물에 존재한다. 한 구체예에서, 2 내지 4개의 클론이 제조물에 존재한다. 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 단일 클론이 존재한다.

[0284] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 T 세포 또는 T 세포 샘플 및 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 암 세포 또는 암 세포 샘플은 동일 피검체에서 유래된 것이다.

[0285] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 T 세포 또는 T 세포 샘플 및 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 암 세포 또는 암 세포 샘플은 다른 피검체에서 유래된 것이다.

[0286] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 피검체에게 투여되고, 예컨대 상기 피검체는 T 세포(및/또는 암 세포)가 수득된 피검체와 다른 피검체이다. 예를 들어, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 자가유래인 것이다.

[0287] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 피검체에게 투여되고, 예컨대 상기 피검체는 T 세포(및/또는 암 세포)가 수득된 피검체와 동일한 피검체이다. 예컨대, 암 살상 T 세포 또는 제조물은 동종이계성이다.

[0288] 구체예들에서, 상기 방법(또는 생산 방법)은 T 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계를 함유한다. 구체예들에서, 방법(예컨대, 생산 방법)은 암 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계를 함유한다.

[0289] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 T 세포 및 암 세포는 동일 샘플에서 유래하는 것이다.

[0290] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 T 세포 및 암 세포는 상이한 샘플에서 유래하는 것이다.

[0291] 구체예들에서, 샘플은 골수, 림프절, 원발성 종양 또는 전이와 같이 미세환경을 가진 조직에서 유래된다.

[0292] 구체예들에서, 샘플은 피검체의 혈액(예컨대, 전혈액, 말초혈액 또는 골수), 고형암(예컨대, 원발성 종양 또는 전이로부터 절제된 샘플), 림프절 또는 비장을 포함한다. 구체예들에서, 샘플은 혈액 샘플, 예컨대 전혈액, 말초혈액 또는 골수이되, 이 혈액 샘플에서 제거되거나 분리된 성분(예컨대, 세포 또는 혈장)은 거의 없다. 구체

예들에서, 샘플은 예컨대 단계 (c) 전 및/또는 단계 (c) 동안, 예컨대 생리적 융화성 완충액 또는 배지 등에 의해 희석된다.

[0293] 구체예들에서, 상기 방법(또는 생산 방법)은 피검체의 혈액 샘플로부터 T 세포를 제공하는 단계를 포함하고, 예컨대 이때 T 세포는 혈액 샘플에 존재하는 다른 성분들, 예컨대 세포 또는 혈장으로부터 정제되지 않는다. 구체예들에서, 혈액 샘플은 골수 샘플, 말초혈액 샘플 또는 전혈액 샘플이다.

[0294] 구체예들에서, 상기 방법(또는 생산 방법)은 피검체 유래의 혈액 샘플로부터 암 세포를 제공하는 단계를 함유하고, 예컨대 상기 암 세포는 혈액 샘플에 존재하는 다른 성분들, 예컨대 세포 또는 혈장으로부터 정제되지 않는다. 구체예들에서, 혈액 샘플은 골수 샘플, 전혈액 샘플 또는 말초혈액 샘플이다.

[0295] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)의 암세포는 피검체의 말초혈액 샘플과 같은 혈액 샘플 등에서 유래하는 순환 암 세포를 함유한다.

[0296] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 피검체 유래의 종양 또는 전이암 등의 생검과 같은 조직 샘플 유래의 암세포를 제공하는 단계를 포함한다.

[0297] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 T 세포 및 암세포를 둘 다 함유하는 혈액 샘플(예컨대, 골수, 말초혈액 또는 전혈액 샘플)과 같은 샘플을 제공하는 단계를 포함한다.

[0298] 구체예들에서, 피검체는 성인 또는 소아 피검체이다.

[0299] 구체예들에서, 암은 혈액암, 예컨대 B 세포 또는 T 세포 악성종양이다.

[0300] 구체예들에서, 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종(예, B 세포 림프종, 미만성 대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 외투 세포 림프종, 변연대 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포 림프종, 모상세포 백혈병), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 다발성 골수종 또는 급성 림프구성 백혈병이다.

[0301] 구체예들에서, 암은 고형암이고, 예컨대 이 고형암은 난소암, 직장암, 위암, 고환암, 항문 부위 암, 자궁암, 결장암, 직장암, 신장 세포 암종, 간암, 비-소세포 폐암, 소장 암, 식도암, 흑색종, 카포시 육종, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선 암, 부신암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌하수체 선암, 표피모양 암, 자궁경부 편평세포 암의 암종, 난관 암종, 자궁내막 암종, 질 암종, 연조직 육종, 요도암, 외음부 암종, 음경암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 척추 종양, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 상기 암들의 전이 병변, 또는 상기 암의 조합을 포함한다.

[0302] 구체예들에서, 암은 흑색종이 아니다.

[0303] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 샘플을 pICF와 접촉시키기 전에 형광 분자로 암세포(예, 암세포막)를 표지화하는 것을 포함하지 않는다.

[0304] 구체예들에서, 피검체는

[0305] (a) 암의 사전 치료를 받은 적이 없는 피검체;

[0306] (b) 1회 이상의 사전 암 치료를 받은 피검체; 또는

[0307] (c) 미세잔존질병(MRD)이 있는 피검체이다.

[0308] 구체예들에서, 시간 기간은 12 내지 120시간(예컨대, 12 내지 24시간, 24 내지 48시간, 48 내지 36시간, 36 내지 60시간, 60 내지 90시간, 또는 90 내지 120시간) 또는 1 내지 7일(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일)이다.

[0309] 구체예들에서, 전술한 방법은 추가로 T 세포 및 암 세포의 다른 샘플을 이용하여 샘플 또는 세포 제공 단계, 생체외 반응 형성 단계 및/또는 농축 단계(예컨대, 생산 방법의 단계 (a) 내지 (d))를 반복하는 것을 포함하고, 예컨대, 각 반복 단계는 T 세포 및 암 세포의 다른 샘플을 이용한다. 구체예들에서, T 세포 및 암 세포의 다른 샘플은 골수, 림프절, 원발성 종양 또는 전이와 같은 미세환경을 가진 조직에서 유래된 샘플을 포함한다.

[0310] 구체예들에서, 각 반복 단계들에서 생산된 암 살상 T 세포는 수집되어 암 살상 T 세포의 혼합물을 형성한다.

[0311] 구체예들에서, T 세포는 CTC를 포함하고, T 세포는 피검체의 샘플(예컨대, 혈액(예컨대, 전혈액, 말초혈액 또는

골수), 림프절, 원발성 종양 또는 전이암)에서 유래된다. 구체예들에서, T 세포는 CTC가 농축된 것이다. 구체예들에서, T 세포는 정제, 예컨대 피검체의 혈액 샘플(예컨대, 전혈액, 말초혈액 또는 골수)과 같은 다른 종류의 세포로부터 정제된다.

[0312] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 피검체 유래의 T 세포의 다른 샘플을 이용하여 샘플 또는 세포 제공 단계, 생체외 반응 형성 단계 및/또는 농축 단계(예컨대, 생산 방법의 단계 (a) 내지 (d))를 반복하는 것을 포함하고, 예컨대 각 반복 단계는 피검체 유래의 T 세포의 다른 샘플을 이용한다.

[0313] 구체예들에서, T 세포의 다른 샘플은 피검체 유래의 암 함유 조직에서 유래된 샘플, 예컨대 원발성 종양, 하나 이상의 전이암, 림프절, 림프 샘플 또는 혈액 샘플(예컨대, 전혈액, 말초혈액 또는 골수)을 포함한다.

[0314] 구체예들에서, 샘플 또는 세포 제공 단계, 생체외 반응 형성 단계 및/또는 농축 단계(예컨대, 생산 방법의 단계 (a) 내지 (d))의 반복마다 생산된 암 살상 T 세포는 수집되어 암 살상 T 세포의 혼합물을 형성한다.

[0315] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 생산 방법)은 추가로 암 살상 T 세포의 암 살상 활성을 평가하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 평가는 다음을 포함한다:

[0316] (a) 암 살상 T 세포를 암에서 유래된 표적 세포(예컨대, 이 표적 세포는 암에서 유래된 세포주를 포함하고, 예컨대 표적 세포는 피검체로부터 분리되지 않는다)와 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안) 하에 접촉시키는 단계;

[0317] (b) 단계 (a) 후에 표적 세포의 수를 결정하고, 경우에 따라 단계 (a) 후에 암 살상 T 세포의 수를 결정하는 단계;

[0318] 여기서, 접촉 단계 전의 표적 세포 수 대비 표적 세포 수의 감소는 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하는데 효과적인 것을 시사한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 수의 증가, 예컨대 접촉 단계 전의 암 살상 T 세포 수 대비 증가는 암 살상 T 세포가 암 세포의 살상에 효과적인 것을 시사한다.

[0319] 구체예들에서, 평가는 다음을 포함한다:

[0320] (a) 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물, 예컨대 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을, 예컨대 피검체(예컨대, 본원에 기술된 암을 가진 피검체)로부터 제공하는 단계;

[0321] (b) 표적 세포(예, 암 세포)를 제공하되, 예컨대 암 세포는 피검체에서 유래되는 것인 단계;

[0322] (c) 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 표적 세포(예컨대, 암 세포)와 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안) 하에 접촉시키는 단계(구체예들에서, 이 접촉 단계는 추가로 pICF를 예컨대 상이한 용량(예컨대, 증가 투여량)으로 첨가하는 것을 포함한다);

[0323] (d) 단계 (c) 후에 표적 세포의 수준을 결정하고, 경우에 따라 단계 (c) 후에 암 살상 T 세포의 수준을 결정하는 단계(구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 후에 1회 이상의 시간 간격에서 결정된다); 및

[0324] (경우에 따라) (e) 단계 (d)로부터 표적 세포 대 T 세포의 비 또는 T 세포 대 표적 세포의 비 중 어느 하나를 결정하는 단계(예컨대, 본원에 기술된 바와 같은 유효 E:T 비를 결정하는 단계).

[0325] 구체예들에서, 평가는 제1 환자 샘플, 예컨대 T 세포와 암 세포를 함유하는 샘플을 사용하여 암 살상 T 세포를, 예컨대 본원에 기술된 방법을 사용하여, 생성시키는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 정제, 분류, 농축, 팽창 및/또는 선택된다. 구체예들에서, 평가는 이어서 제1 환자 샘플을 사용하여 생성된 암 살상 T 세포와 동일 환자 유래의 제2 샘플을 혼합하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 다양한 농도는 제2 샘플과 혼합될 수 있고, 예컨대 여기서 제2 샘플은 예컨대 용량 반응 곡선을 생성하기 위한 고정 농도이다.

[0326] 따라서, 구체예들에서, 평가는 다음을 포함한다:

[0327] (a) 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을, 예컨대 환자 샘플에 T 세포와 암 세포가 존재하는 청구항 1의 방법에 따라, 생산하는 단계,

[0328] (b) 단계 (a) 유래의 암 살상 T 세포를 경우에 따라 팽창, 선택, 농축 및/또는 정제하는 단계,

[0329] (c) 단계 (a) 또는 (b) 유래의 암 살상 T 세포를 제2 샘플, 예컨대 동일 환자 유래의 제2 샘플과 접촉시키되,

상기 제2 샘플이 하나 이상의 암 세포를 함유하고, 상기 암 살상 T 세포가 암 세포와 접촉되는 단계,

[0330] (d) 본원에 기술된 바와 같은 용량 반응 및/또는 약동학적 파라미터를 결정하는 단계.

[0331] 한 구체예에서, 생체외 혼합물 중의 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 세포)의 활성 수준은 유효 E:T 비, EC50, Emax, 동역학 또는 이 인자들의 조합에 의해 측정된다.

[0332] 구체예들에서, 단계 (c)는 암 살상 T 세포와 암 세포를 복수의 비, 예컨대 유효 E:T 비로 접촉시키는 것을 포함한다.

[0333] 구체예들에서, 단계 (c)는 상이한 양의 암 살상 T 세포를 고정된 양의 암 세포와 혼합하는 것을 포함한다.

[0334] 전술한 임의의 방법들 중 몇몇 구체예에서, 유효 E:T 비가 수득된다. 한 구체예에서, 유효 E:T는 pICF 노출 후 암 세포와 암 살상 T 세포 간의 비이다.

[0335] 전술한 임의의 방법들의 구체예에서, 암 세포의 수준 또는 양의 감소, 예컨대 기준 수준 대비 감소는 암 세포 살상의 증가를 시사한다. 다른 구체예들에서, 암 세포의 수준 또는 양의 변화 저하 또는 실질적인 무변화는 암 세포 살상의 감소를 시사한다.

[0336] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, T 세포 대비 표적 세포의 높은 수준(예컨대, 암 살상 T 세포에 대한 표적 세포의 높은 유효 E:T 비)은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 암 세포의 효과적인 살상자임을 시사한다. 한 구체예에서, 표적 대 T 세포 비는 기준 비와 비교된다. 예를 들어, 1(암 살상 T 세포) 대 100(예컨대, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 또는 그 이상)(표적 세포)의 유효 E:T 비는 강력한 T 세포 살상 활성을 시사한다. 강력한 세포 살상 활성이 있는 T 세포를 가진 피검체는 pICF에 강력한 반응자인 것으로 식별될 수 있다.

[0337] 대안적으로, T 세포 대비 표적 세포의 낮은 수준(예컨대, 표적 세포 대 암 살상 T 세포의 낮은 유효 E:T 비)는 불량한 T 세포 살상 활성을 시사한다. 한 구체예에서, 표적 대 T 세포 비는 기준 비와 비교된다. 한 구체예에서, 1(암 살상 T 세포) 대 5(표적 세포)(예컨대, 1, 3 또는 5)의 유효 E:T 비는 불량한 T 세포 살상 활성을 시사한다. 세포 살상 활성이 저하된 T 세포를 가진 피검체는 pICF에 불량한 반응자인 것으로 식별될 수 있다.

[0338] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 T 세포의 수준은 단계 (c) 후에 1회 이상의 시간 간격에서 결정된다. 예시적 구체예들에서, 표적 세포 및/또는 암 살상 세포의 수준은 단계 (c) 후에 시간 0, 시간 1 내지 75시간(예컨대, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36 또는 72 시간) 또는 수 일째 결정된다.

[0339] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 접촉 단계는 추가로 pICF의 여러 용량(예컨대, 증가 투여량)으로 pICF를 첨가하여, 예컨대 용량 반응 곡선을 생선하는 것을 포함한다. 한 구체예에서, pICF의 용량 0 또는 대조 수준(예컨대, 역치 용량) 및 pICF의 포화 용량에서 암 살상 T 세포 또는 암 세포의 수준 간의 차이가 결정된다. 구체예들에서, 포화 용량 vs. 역치 용량에서 암 살상 T 세포 또는 암 세포의 수준 차이가 결정된다. 구체예들에서, 본원에 사용된 유효 E:T 비는 암 세포 수준 차이 대비 암 살상 T 세포 수준 차이의 비이다.

[0340] 전술한 임의의 방법의 구체예들에서, 방법은 자동 플랫폼, 예컨대 자동 형광 기반 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 ExviTech 플랫폼을 사용하여 수행된다.

[0341] 전술한 임의의 방법 또는 분석법의 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제의 활성은 용량 반응 곡선을 측정하는 생체외/시험관내 분석을 이용하여 결정되며, 상기 곡선의 수학적 피팅은 EC50, 유효 E:T 비, Emax 또는 동역학 중 적어도 하나로부터 선택되는 정량적 파라미터들이 활성을 추정할 수 있게 한다. 전술한 임의의 방법의 구체예들에서, 단계 (e)에 의해 평가된 pICF의 활성은 예컨대 표준 고갈 용량 반응 곡선과 비교하여, pICF 활성의 용량 반응을 이용하는 활성 평가와 다르다.

[0342] 전술한 임의의 방법들의 구체예에서, 기준 비는 소정의 비, 예컨대 약 1:3 내지 1:10, 예컨대, 약 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10이다. 구체예들에서, 단계 (e) 유래의 높은 표적 세포 대 T 세포 비는 약 1:4 내지 1:100(예컨대, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100 또는 그 이상)이다.

[0343] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 단계 (c)는 암 세포와 같은 표적 세포와 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물의 생체외 혼합물을 형성시키는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 암 세포는 혈액암, 고형암, 전이암(예컨대, CTC 또는 이의 조합) 중에서 선택된 세포이다. 구체예들에서, 암 세포는 백혈병 또는 림프종 아세포(예컨대, CD19, CD123, CD20 등에서 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하는 아세포)이다. 구체예에서, T 세포는 혈액 샘

플(예, 말초혈액 샘플), 골수 샘플, 림프절 샘플, CTL 및/또는 TIL을 함유하는 종양 샘플, 또는 이의 조합 중에서 선택된 세포이다. 구체예들에서, T 세포는 CD8 및/또는 CD25를 발현한다(예컨대, 이것은 CD8+CD25+ T 세포이다).

[0344] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 pICF, 예컨대 본원에 기술된 pICF의 사용을 포함하는 방법을 이용하여 생산된다.

[0345] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 CD8+ 및 CD25+인 T 세포, 예컨대 CTL을 함유한다. 몇몇 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 삼투적립성 T 세포이다. 다른 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 CD28+CD25+ T 세포이다.

[0346] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 암 살상 세포는 (i) 암 세포에 대해 세포독성 활성, 및 (ii) 암 세포 유래의 세포 표면 마커, 예컨대 적어도 90 내지 500 카피의 세포 표면 마커(예컨대, 90, 100, 200, 300, 400, 또는 500 카피, 예컨대 하나 이상의 암 세포 표면 마커)를 포함한다.

[0347] 전술한 임의의 방법들의 구체예들에서, 반응 혼합물 중의 총 T 세포의 약 2 내지 75%(예컨대, 약 2 내지 70%, 2 내지 60%, 2 내지 50%, 또는 2 내지 40%)는 하나 이상의 암 세포 표면 마커(예컨대, 하나 이상의 백혈병 세포 암)를 발현한다.

[0348] 구체예들에서, 암 살상 세포는 농축 또는 정제된다. 몇몇 구체예들에서, 농축 또는 정제된 암 살상 세포 집단은 적어도 80% 내지 100% 암 살상 T 세포(예컨대, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 100%)를 포함하되, 암 살상 세포는 하나 이상의 암 세포 표면 마커를 포함한다.

[0349] 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물은 우수의약품관리기준(Good Manufacturing Practice; GMP)에 따라 제조한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 팽창, 선택 및/또는 농축 중 하나 이상은 GMP에 따른다. 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 생산된 암 살상 T 세포를, 예컨대 병원, 의료인에게 전달하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 T 세포, 암세포 또는 이 둘 모두를, 예컨대 병원, 의료인으로부터 공급받는 것을 포함한다.

[0350] ***치료 방법의 추가 구체예***

[0351] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 치료 방법)은 추가로 제2 치료 제제 또는 절차를 투여하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 제2 치료 제제 또는 절차는 하나 이상의 화학요법, 표적화된 항암요법, 항암 약물, 세포독성제, 면역 기반 요법, 사이토킨, 수술 절차, 방사선 절차, T 세포의 작용물질(예컨대, 작용성 항체 또는 이의 단편 또는 공동자극 분자의 활성인자), 억제 분자의 억제제(예컨대, 면역 체크포인트 억제제), 면역조절제, 백신, 또는 세포 면역요법 중 하나 이상으로부터 선택된다.

[0352] 구체예들에서, 제2 치료제는 T 세포의 작용물질(예, 작용성 항체 또는 이의 단편 또는 공동자극 분자의 활성인자), 또는 면역 체크포인트 억제제이다.

[0353] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 CTLA4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, TIM3, LAG3, BTLA, CD80, CD86 또는 HVEM 중 하나 이상의 억제제이다.

[0354] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 이필리무마브, 트레멜리무마브, MDX-1106, MK3475, CT-011, AMP-224, MDX-1105, IMP321 또는 MGA271 중 하나 이상을 포함한다.

[0355] 구체예들에서, T 세포의 작용물질은 CD137, CD40 및/또는 글루코코르티코이드 유도된 TNF 수용체(GITR)에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함한다.

[0356] 한 구체예에서, 면역조절제는 MDSC 및/또는 Treg 세포의 억제제이다. 구체예들에서, 면역조절제는 레날리도마이드를 포함하거나, 레날리도마이드이다.

[0357] 구체예들에서, 제2 치료제는 T 세포의 면역적격을 상승시키고(상승시키거나) 복원시킨다.

[0358] 다른 구체예들에서, 면역조절제는 종양 특이적 항원에 대한 면역 반응을 활성화시키고, 예컨대 면역조절제는 백신(예, gp100, MUC1 또는 MAGEA3과 같은 표적에 대한 백신)이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 사이토킨, 예컨대 GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 또는 IL-21 중 하나 이상으로부터 선택된 재조합 사이토킨이다. 다른 구체예들에서, 면역조절제는 자가 T 세포, 종양 표적화된 세포외 및 세포내 종양 특이적 항원(예, CAR T 세포 또는 TCR T 세포)이다. 또 다른 구체예들에서, 면역조절제는 아미노산 이화작용, 종양 유래 세포외 ATP의 신호전달, 아데노신 신호전달, 아데노신 생산, 케모킨 및 케모킨 수용체, 이종 유기체의 인식 또는 키나제 신호전

달 활성과 관련된 성분(예, 효소 또는 수용체)의 조절제이다. 예시적 제제로는 IDO, COX2, ARG1, ArG2, iNOS, 또는 포스포디에스터라제(예, PDE5)의 억제제(예, 소분자 억제제); TLR 작용물질, 또는 케모킨 길항물질을 포함한다. 면역조절제의 추가 예는 본원에 기술되어 있다.

[0359] ***조성물 및 반응 혼합물의 추가 구체예들***

[0360] 구체예들에서, pICF는 항체 분자, 예컨대 이중특이적 항체 또는 이의 단편, 예컨대 이중특이적 면역글로불린(BsIgG), 추가 항원 결합 분자에 작동적으로 결합된 면역글로불린, 이중특이적 항체(BsAb) 단편, 이중특이적 융합 단백질 또는 BsAb 접합체를 포함한다.

[0361] 구체예들에서, pICF는 BsMAb CD123/CD3, BsMAb CD19/CD3 및 EpCAM/CD3으로 이루어진 목록 중에서 선택되는 이중특이적 항체이다.

[0362] 구체예들에서, pICF는 검출가능한 양, 예컨대 10중량% 미만, 예컨대 10% 미만, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.001% 또는 그 미만(하지만, 0.0001% 이상)의 농도로, 예컨대 본원에 기술된 조성물에 존재한다. 한 구체예에서, pICF는 1% 미만의 수준으로 존재한다. 바람직한 구체예에서, pICF는 0.005% 내지 10중량%의 농도로 제조물에 존재한다.

[0363] 구체예들에서, 암 살상 세포는 활성화된 T 세포를 포함한다.

[0364] 구체예들에서, 암 살상 세포는 삼투적립을 겪은 세포, 예컨대 암 세포 유래의 세포 표면 막의 일부를 포함하는 세포를 포함한다.

[0365] 구체예들에서, 암 살상 세포는 T 세포, 예컨대 세포독성 T 림프구, 예컨대 CD8+ T 세포이다.

[0366] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 실질적인 수의 암 세포를 포함하지 않으며, 예컨대 암 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 30% 미만(예컨대, 30% 미만, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 그 미만)의 농도로 포함한다.

[0367] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 실질적인 수의 조절성 T 세포(Treg)를 포함하지 않으며, 예컨대 Treg를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 30% 미만(예컨대, 30% 미만, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 그 미만)의 농도로 포함한다.

[0368] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 실질적인 수의 미분화 T 세포를 포함하지 않고, 예컨대 미분화 T 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 30% 미만(예컨대, 30% 미만, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 그 미만)의 농도로 포함한다.

[0369] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 실질적인 수의 적혈구 세포를 포함하지 않고, 예컨대 적혈구 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 30% 미만(예컨대, 30% 미만, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 그 미만)의 농도로 포함한다.

[0370] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 실질적인 수의 비-면역 세포를 포함하지 않고, 예컨대 비-면역 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 30% 미만(예컨대, 30% 미만, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 그 미만)의 농도로 포함한다.

[0371] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 활성화된 T 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 적어도 30%(예컨대, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상)의 농도로 포함한다.

[0372] 구체예들에서, 조성물 또는 제조물은 삼투적립성 T 세포를 조성물 또는 제조물에 존재하는 총 세포 수의 적어도 30%(예컨대, 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상)의 농도로 포함한다.

[0373] 또한, 본 발명은 피검체의 암(예, 혈액암, 고형암 또는 전이암)을 치료하는데 사용하기 위한(예컨대, 치료하는 약제의 제조에 사용하기 위한) 암 살상 T 세포(예컨대, 본원에 기술된 방법에 의해 제조)의 제법을 제공한다.

[0374] 또한, 본 발명은 피검체의 암(예, 혈액암, 고형암 또는 전이암)을 치료하는데 사용(예컨대, 치료하는 약제의 제조에 사용)하기 위한 암 살상 T 세포를 제공하고, 이 암 살상 T 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생산된다:

[0375] (a) T 세포 및 암 세포를 포함하는 피검체 유래의 샘플을 제공하는 단계;

[0376] (b) 상기 샘플을 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와, 예컨대 일정 시간 동안 접촉시키는 단계; 및

[0377] (c) 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계.

[0378] 또한, 본 발명은 피검체의 암(예, 혈액암 또는 고형암)을 치료하는데 사용(예컨대, 치료하는 약제의 제조에 사용)하기 위한 암 살상 T 세포로써, 상기 암 살상 T 세포가 다음을 포함하는 방법에 의해 생산되는 것을 특징으로 한다:

[0379] (a) 피검체로부터 종양 샘플을 제공하는 단계;

[0380] (b) 피검체로부터 T 세포를 함유하는 혈액 샘플(예, 말초혈액 샘플)을 제공하는 단계;

[0381] (c) 상기 종양 샘플을 상기 혈액 샘플 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와, 예컨대 일정 시간 동안 접촉시키는 단계; 및

[0382] (d) 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계.

[0383] 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 다르게 정의되지 않는 한, 본 발명이 속하는 당업계의 일상의 기술을 가진 자가 일반적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미인 것이다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료는 본 발명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적당한 방법 및 재료는 이하에 설명된다. 모든 공보, 특허출원, 특허 및 본원에 언급된 기타 문헌들은 그 전문이 참고인용된다. 혼동이 있는 경우, 정의를 비롯해서 본 명세서를 따를 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 제한하려는 것이 아니고 단지 예시하는 것이다.

[0384] 본 발명의 다른 특징 및 장점은 이하 상세한 설명 및 청구범위에서 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0385] 도 1: 샘플을 pICF와 항온처리하여 사전에 생성한 세포독성 T 세포에 낮은 수의 종양 세포를 연속 첨가함으로써 세포독성 T 세포를 선택하는 예시적 방법을 나타내는 개략도이다.

도 2: 삼투적립을 측정하는데 사용된 세포 표면 표지화의 기전을 보여주는 모식도. 상부 패널은 암 세포 상의 특이적 세포 표면 마커를 인식하는 형광 표지된 항체에 의한 세포 표면 표지화를 묘사한 것이다. 하부 패널은 세포 추적자 염료에 의한 암세포의 비특이적 세포 표면 표지화를 보여준다. 표지된 종양 세포와 T 세포간의 접촉은 표지된 종양 세포와 T 세포 간의 면역 시냅스의 형성, 및 T 세포가 종양 세포 막의 일부를 혼입하여, 표지된 항체 또는 세포 추적자 염료가 이제 T 세포 표면에 존재하는 삼투적립을 야기할 것이다.

도 3: 암 살상 T 세포(세포독성 T 세포)와 암 세포 간에 생성된 면역 시냅스를 보여주는 사진으로, T 세포가 자신의 촉수를 연장시켜 암 세포를 포착하고 있다. 이러한 접촉은 두 세포를 따라 막의 조각들을 수반하는 각 세포 막들의 깊은 중첩을 수반한다.

도 4: 세포 표면 상의 표적들에 특이적으로 결합하는 형광 표지된 항체를 이용하는 세포 표면 표지화(상부) 및 지질 막 이중층 내에 비특이적으로 분포하는 형광 친지성 분자인 세포 추적자 염료에 의한 삼투적립의 측정을 보여주는 모식도.

도 5: 암세포와 T 세포를 모두 함유하는 샘플에서 세포 추적자 염료를 이용하여 삼투적립을 측정하기 위한 예시적 과정을 보여주는 모식도. 먼저, 암세포, T 세포 및 pICF는 함께 항온처리된다(예, 144시간 동안). pICF는 제거될 수 있고(예컨대, 세척 단계에 의해), 생성된 세포독성 T 세포는 암 세포를 살상하여 혼합물에는 높은 퍼센트의 세포독성 T 세포와 낮은 퍼센트의 암 세포가 존재할 것이다. 세포 추적자 염료에 의해 표지된 암세포의 제2 세트가 도입될 수 있고, 암세포의 제2 세트로부터 표지된 세포막을 혼입시킨 T 세포를 식별하여 삼투적립을 측정할 수 있다.

도 6: 다양한 농도의 종양 표적 CD3 T 세포 이중특이적 항체와 항온처리한 후, 다발성 골수종 환자의 골수 샘플에 존재하는 T 림프구 세포 수(CD8+CD25+) 및 형질세포 수를 보여주는 그래프.

도 7: 다양한 농도의 CD19(종양 표적)/CD3(T 세포 표적) 이중특이적 항체와 항온처리한 후, 만성 림프성 백혈병 환자의 말초혈액 샘플에 존재하는 악성 B 림프구 세포 수 및 T 림프성 세포 수(CD8+CD25+)를 보여주는 그래프.

도 8: 다양한 농도의 CD123(종양 표적)/CD3(T 세포 표적) 이중특이적 항체와 항온처리한 후, 3명의 급성 골수성 백혈병 환자의 골수 샘플들(샘플 1, 2 및 3) 유래의 아세포수 및 T 림프성 세포수(CD8+CD25+)를 보여주는 그래프 세트.

도 9: 약물(이중특이적 단일클론 항체)와 항온처리하기 전(도 9 A 및 B) 및 후(도 9 C)의 AML 환자 골수 샘플에 존재하는 다양한 종류의 세포 집단을 보여주는 그래프. 도 9C의 원은 삼투적립성 집단 CD117+/CD3+의 출현을 보

여준다.

도 10: CD123/CD3 BsMAb에 144시간 동안 노출 후 갓 생성된 CTL 집단(삼투적립성 세포)의 살상 능력을 보여주는 실험의 유세포분석 점 플롯(CD117 vs CD3). 도 10 A는 갓 생성된 T 세포(CD3+/CD117-)만을 남긴채 AML 아세포(CD117+/CD3-)가 제거된, 144시간 BsMAb 노출 후의 제1 AML 샘플의 점 플롯을 보여준다. 도 10 B는 아세포(CD117+/CD3-) 및 낮은 수준의 잔존 T 세포(CD117-/CD3+)가 존재하는 동일 환자 유래의 새로 동결보존된 바이엘의 점 플롯을 보여준다. 도 10 C는 도 10 A와 도 10 B 샘플들의 혼합물의 0 시점에서의 점 플롯을 보여주며, 여기서 T 세포(CD3+/CD117-) 및 새로운 AML 아세포(CD117+/CD3-)의 존재를 관찰할 수 있다. 도 10 D는 24시간 배양 후의 점 플롯으로써, 여기서 AML 아세포(CD117+/CD3-)는 이전에 생성된 T 세포 집단의 존재하에 고갈되었음을 분명하게 보여준다. 이는 CD123/CD3 BsMAb의 부재하에 수행되었다.

도 11: 약물(이중특이적 항체)의 재도입 및 재도입 없이 AML 아세포를 살상하는 갓 생성된 삼투적립성 T 세포의 능력을 경시적으로 나타낸 결과를 도시한 그래프.

도 12: AML 샘플 유래의 아세포에 대한 분류된 활성화된 T 림프구(CD4+CD25+, CD8+CD25+ 및 CD4+CD25+/CD8+CD25+의 혼합물)에 의한 표적 세포 용해를 E:T 비(도 12 A), 또는 T 세포 수(도 12 B)를 통해 나타낸 대표적인 플롯 세트. 개별 데이터 점들은 모델 피팅없이 선으로 연결했다.

도 13: 활성화된 암 살상 T 세포에 의한 종양 세포 살상 %(도 13 A: CD8+CD25+, 도 13 B: CD4+CD25+ 및 도 13 C: CD4+CD25+/CD8+CD25+의 혼합물)를 AML 샘플의 쌍곡선 리간드-수용체 모델에 피팅시킨 그래프 세트. 종양 세포 생존율 %는 무약물 대조군과 비교하여 추정했다. 대시선(dashed line)은 IC50 값에 해당한다.

도 14: CTL 세포수가 AML 환자 유래의 2개의 BM 샘플에서 얼마나 농축될 수 있는지를 보여주는 유세포분석 점 플롯(CD5 vs. CD25). 도 14 A는 인수 시(CD5-CD25-)의 샘플 상태를 나타낸다. 도 14 B는 CD123/CD3 BsMAb(CD5+CD25+)와 항온처리한 후의 샘플을 나타낸다. 도 14 C는 CD5+CD25+ 집단의 형광 활성화된 세포 분류 후의 샘플을 나타낸다. 표는 각 공정 단계 동안 존재하는 CTL의 퍼센트를 나타낸다.

도 15: CTL이 삼투적립(CD5+CD123+) 및 비-삼투적립(CD5+CD123-) CTL 집단으로 분류될 수 있는 방식을 보여주는 유세포분석 점 블롯(CD5 vs. CD123). 도 15 A는 CD3+CD25+CD123- 세포 집단을 나타낸다. 도 15 B는 CD3+CD25+CD123+ 세포 집단을 나타낸다. 도 15C는 AML 아세포를 고갈시키는 CD123+ 및 CD123- 집단의 능력을 나타낸다.

도 16: AML 환자 샘플에서 아세포 수(도 16 A) 및 T 세포 수(도 16 B)에 미치는 CD123CD3 BsMAb의 효과를 나타내는 그래프 세트. 여기에는 아세포 수의 시간및 농도 의존적인 감소와 이에 대응하는 절대 T 세포 수의 시간 및 농도 의존적인 증가가 존재한다.

도 17: MRD AML을 가진 환자 유래의 샘플에서 CD123CD3 BsMAb의 효과. 여기에는 샘플의 단핵구 집단이 5% 미만의 아세포를 함유할지라도 아세포 수의 시간 의존적인 감소(도 17 A)와 이에 대응하는 절대 T 세포 수의 시간 의존적인 증가(도 17 B)가 존재한다. 대시 선은 BsMAb가 없는 대조 샘플을 나타내고, 실선은 CD123/CD3 BsMAb 데이터를 나타낸다.

도 18: AML 환자 유래의 BM 샘플을 CD123/CD3 BsMAb와 120시간 동안 항온처리하기 전 및 후에 발현된 마커의 수준을 나타내는 유세포분석 점 플롯. 도 18 A 내지 18 D는 BsMAb 전에 기준 시점에서의 세포를 나타내고, 도 18 E 내지 18 H는 항온처리한 후 샘플의 상태를 나타낸다. 도 18 A 및 18 E는 활성화 마커 CD25의 발현 수준을 나타내다. 도 18 B 및 18 F는 표현형으로 표시된 아집단의 분포를 나타낸다: 미분화 T 세포(미분화, $CD45RA^{+}/CCR7^{+}/CD27^{+}$), 중추기억 T 세포(CM, $CD45RA^{-}/CCR7^{+}/CD27^{+}$), 작동체 기억 T 세포(EM, $CD45RA^{-}/CCR7^{-}/CD27^{+/-}$), 및 말단 작동체 기억 T 세포(E, $CD45RA^{+}/CCR7^{-}/CD27^{-}$). 도 18 C 및 18 G는 마커 CCR7 및 CD62L의 발현 수준을 나타내고, 도 18 D 및 18 H는 마커 CD28 및 CD57을 나타낸다. 데이터는 시험된 4개의 AML 샘플들 중 대표적인 하나의 AML 샘플에서 유래하는 것이다.

도 19: AML BM 샘플을 CD123/CD3 BsMAb와 두 시점, 72시간 및 120시간째 항온처리한 결과. 도 19 A는 72시간 항온처리 동안의 아세포 고갈을 나타내고, 도 19 B는 120시간 항온처리 동안의 아세포 고갈을 나타낸다. 활성화된 CTL의 수준은 동시에 측정하고 72h 항온처리에 대해서는 도 19 C에, 120h 항온처리에 대해서는 도 19 D에 나타냈다.

도 20: 대조 세포 및 종양 세포에서 EpCAM/CD3 이중특이적 항체의 효과. 도 20 A는 용량 의존적 방식의 종양 세

포 살상을 나타낸다. 도 20 B는 종양 고갈의 증가가 T 세포 상의 CD25 활성화 마커의 증가와 관련이 있음을 보여준다.

도 21: T 세포의 삼투적립 능력을 예시하는 유세포분석 점 플롯(CD5 vs. PKH67). 도 21 A는 항온처리 전 기준 시점에서의 아세포(PKH67++/CD5-) 및 T 세포(PKH67-/CD5++)의 점 플롯을 나타낸다. 도 21 B는 BsMab의 부재 및 항온처리 후의 아세포(PKH67++/CD5-) 및 T 세포(PKH67-/CD5++)의 점 플롯을 나타낸다. 도 21 C는 CD123/CD3 BsMAb의 존재 및 항온처리 후의 아세포(PKH67++/CD5-) 및 T 세포(PKH67-/CD5++)의 점 플롯을 나타낸다.

도 22: CD123/CD3 BsMAb는 AML 환자 유래의 BM 샘플에서 반응을 유도한다. 도 22 A는 CTL 집단에서의 용량 반응 증가를 나타내고, 이는 아(종양) 세포의 용량 반응 고갈(도 22B)에 대응한다. 절대 수의 변화(△)는 1:100의 유효 E:T 비를 결정하는데 사용된다.

도 23: 다른 시점(72-96-120시간)에서 13가지 AML 골수 샘플의 CD8+CD25+ CTL(흰 원) 및 종양 세포(검은 원) 중의 CD123/CD3 BsMAb의 EC50을 나타내는 그래프 세트. 도 23 A는 샘플의 EC50 값의 분포를 나타내고, 도 23 B는 각 시점에 각 세포 집단의 중간값을 나타낸다. CD8+CD25+ CTL 및 종양 세포의 EC50은 집단 및 시점간에 비교적 유사하다.

도 24: BsMAb CD123/CD3과 항온처리된 5가지 AML 샘플(도 23에 제시된 것 중에서 선택됨, 샘플 ID 001-005)의 다른 항온처리 시점에서의 유효 T:E 비. y축은 각 시점에서 각 작동 세포(CTL)에 대한 표적 세포(종양 세포)의 수를 나타낸다.

도 25: 쌍을 이룬 BM(상부 패널) 및 PB(하부 패널) 샘플을 이용한 5 AML 환자(1 내지 5)에 미치는 CD123CD3 BsMAb의 효과를 나타내는 그래프 세트. 대응하는 그래프에서 각 샘플마다 유효 E:T 비가 표시되고 BM 샘플에서의 더 높은 세포독성을 나타낸다.

도 26: 건강한 과립구를 포함한 다른 세포 집단에서 두 MM 환자(A 및 B)에 미치는 BsMAb의 결과를 보여주는 그래프. BsMAb는 CTL(CD8+CD25+)의 증가와 종양 세포의 감소를 나타내지만, 건강한 과립구를 살상하지 않는다.

도 27: 건강한 B 세포를 포함한 다른 세포 집단에서 두 AML 환자(A 및 B)에 미치는 BsMAb의 결과를 보여주는 그래프. BsMAb는 CTL(CD4+CD25+ 및 CD8+CD25+)의 증가와 종양 세포의 감소를 나타내고, 건강한 B 세포의 최소 살상을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0386] 본 발명은 적어도 부분적으로 바람직하지 않은 표적 세포, 예컨대 암 세포에 대한 향상된 세포독성 활성을 가진 면역 작동 세포를 생성 및/또는 선택하는 개인화된 의약 접근법에 관한 것이다. 본원에서 특징으로 하는 것은 예컨대 표적, 예컨대 암 세포에 대하여 향상된 세포독성 활성을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포, 예를 들면 CTL)를 생산하는 방법이다. 구체예들에서, 이 방법은 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 세포독성 T 림프구(CTL))를 표적 세포, 예컨대 암 세포와 공간적으로 근접하게 하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 이 방법은 공간적 근접성을 유도하기 위해 제제, 예컨대 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 이용하는 것을 포함한다.

[0387] 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 암 세포와 같은 표적 세포와 면역 작동 세포의 공간적 근접성은 면역 세포 활성화를 겪고 이 중 일부가 삼투적립이라 불리는 공정을 겪은 면역 작동 세포의 수를, 예컨대 pICF의 부재하에 삼투적립을 겪은 세포 수에 비해 증가시키는 것으로 생각된다. 또한, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 삼투적립을 겪은 T 세포(예컨대, CTL)(또한, 삼투적립성 T 세포라고도 지칭됨)는 암 세포와 같은 표적 세포에 대하여 향상된 세포독성 활성을 나타내는 것으로 생각된다. 삼투적립성 T 세포는 본원에 기술된 방법동안 노출되는 특정 표적 세포(예, 암 세포)를 살상하도록 위치를 잡고 고도로 민감화되는 다수의 기억 T 세포를 포함할 수 있다.

[0388] 또한, 고형암 및 혈액학적 악성종양에 존재하는 T 세포의 퍼센트는 종양 침윤 림프구(TIL) 및/또는 암 항원 특이적 CTL(즉, 암 세포에 특이적인 항원을 인식하는 CTL)이 농축된 것으로 생각된다. 고형암 덩어리 내부에 존재하는 T 세포는 전부는 아니지만 대부분이 TIL(종양 침윤 림프구)이라는 면역억제된 종양 특이적 항원 T 세포인 것으로 생각된다. 또한, 고형암에 존재하는 TIL의 %는 면역요법 치료에 대한 임상 반응의 중요한 예측인자인 것으로 생각된다. 이러한 개념은 핵심 면역종양학 변수로써, 고형암에 존재하는 표적 세포에 대한 작동체의 기본 비인 "기본 E:T 비"의 사용을 확대시켰다. 그러나, 혈액, 골수, 비장, 림프절과 같이 고형암의 혈액학적 조직 또는 혈액학적 악성종양 유래의 암 세포를 가진 혈액학적 조직에는 항상 많은 T 세포가 존재한다. 따라서, 이러한 혈액학적 조직에서의 기본 E:T 비는 고형암에서보다 매우 다른 의미를 갖는다. 사실, 암 세포를 가진 상기

혈액학적 조직에 존재하는 면역억제된 종양 특이적 항원(Tumor-Specific Antigen, TSA) T 세포의 집단은 매우 소량인 것으로 생각된다. 따라서, 기본 E:T 비가 고형암에서와 같은 접근법에 따라 계산되고 총 T 세포 대 암 세포의 비 및 TSA T 세포의 %가 매우 낮다면, 이러한 기본 E:T 비는 암 세포(TSA)를 효과적으로 살상하는 선천적인 능력을 갖되 면역억제된 T 세포의 수를 지나치게 과대평가할 수 있다. 본 발명에서 발견된 "유효 E:T 비"는 암 세포를 효과적으로 살상하는 능력을 가진 작동체 T 세포의 수를 암 세포의 수로 나눈 비와 같은 개념을 포착하고; 이는 pICF의 존재 하에 갓 생성된 활성화된 암 살상 T 세포의 수(유일하게 암 세포를 살상할 수 있는 것) 및 살상된 암 세포의 수를 둘 다 대조 조건에 대비하여 측정하는 객관적 측정값이다. 혈액학적 악성종양의 샘플과 항온처리된 이중특이적 항체의 공보들에서 핵심 변수로써 기본 E:T 비의 압도적인 사용은 혈액학적 악성종양 조직의 T 세포들의 불균일성의 이해 부족을 나타낸다.

[0389] 고형암, 골수 및 림프절과 같이 3차원 구조를 가진 미세환경에는 상기 CTL이 더 높은 퍼센트로 존재하는 반면, 더욱 유동적인 환경, 예컨대 말초혈액에서는 상기 CTL이 더 낮은 퍼센트로 존재하는 것으로 생각된다. CTL, 예컨대 암 항원 특이적 CTL은 예컨대 샘플(암 세포 및 상기 CTL을 함유하는 샘플)을 pICF와 함께 항온처리함으로써 향상된 암 살상 활성을 가진 CTL을 생성하기에 바람직한 출발 물질일 수 있다. 몇몇 예들에서, 샘플은 고형암, 골수 또는 림프절과 같은 3차원 구조를 가진 미세환경일 수 있다. 다른 예들에서, 샘플은 말초혈액과 같은 더욱 유동적인 미세환경일 수 있다.

[0390] 또한, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 몇몇 CTL, 예컨대 암 항원 특이적 CTL은 이들의 미세환경, 예컨대 골수 또는 고형암에 의해 면역억제되는 것으로 생각된다. 또한, CTL(예컨대, 암 항원 특이적 CTL)은 생체외에서 암 세포와 직접 접촉시키면, pICF가 CTL(예, 암 항원 특이적 CTL)의 활성화 및/또는 증식을 촉진시킬 수 있는 것으로 생각된다. CTL(예컨대, 암 항원 특이적 CTL)의 활성화는 CTL을 이의 면역억제된 상태로부터 방출시킬 수 있고 이의 강한 증식을 유도할 수 있다. 이는 혼합물에 암 항원을 특이적으로 인식하고 그 특정 항원을 가진 암 세포를 높은 효능으로 살상하는 다수의 CTL을 초래할 수 있다. 암 세포를 CTL과 함께 두면, pICF는 또한 CTL의 삼투적립을 촉진할 수 있다. 따라서, 혼합물 내 삼투적립성 T 세포는 특정 암 세포를 살상하는 높은 효능을 가진 CTL이 되는 경향이 있는 것으로 생각된다. 특정 암 세포를 살상하는 높은 효능을 가진 CTL 집단도 역시 본원에서는 삼투적립성 T 세포로 지칭된다. 유리하게도, pICF의 생체외 사용은 암 항원 특이적 CTL을 거의 함유하지 않는 샘플로부터도 그러한 높은 살상 효능의 CTL을 생성시킬 수 있다.

[0391] 따라서, pICF는 종래 이용가능한 기술, 예컨대 종래 이용가능한 ACT보다 향상된 표적 세포 살상 활성을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포)를 생성하는 더욱 효과적인 방법(및 상기 세포의 더 많은 수를 생성하는 방법)을 제공한다. pICF 및 삼투적립 및 이들의 활성을 측정하고 높은 효능의 암 살상 T 세포를 인식하는 방법은 이하에 더 상세하게 설명된다.

[0392] 이러한 세포를 생성하는 방법외에도, 본 발명은 암 세포에 대하여 향상된 세포독성 활성을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)(예를 들어, 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포)를 함유하는 조성물, 예컨대 약학 조성물도 제공한다.

[0393] 또한, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 본원에 기술된 면역 작동 세포(예, 암 살상 T 세포)를 함유하는 치료제는 놀랍게도 고형암부터 혈액암까지 다양한 암을 살상하는데 효과적인 것으로 여겨진다. 이는 주로 매우 면역원성인 암, 예컨대 흑색종에만 효과적인 경향이 있는, 분리/팽창된 종양 침윤 림프구와 같은 종래 이용가능한 많은 ACT와는 다르다. 따라서, 암 세포에 대한 면역 반응이 일반적으로 낮은/최소인 암(예컨대, 다른 암 종류보다 변이율이 더 높아서 더욱 면역원성일 수 있는 것으로 생각되는 흑색종과 달리)을 살상하고 치료하는 본원에 기술된 면역 작동 세포(예컨대, 암 살상 T 세포)의 능력은 특히 놀랍다.

[0394] 구체예들에서, 본원에 기술된 면역 작동 세포, 예컨대 암 살상 T 세포, 예를 들면 삼투적립성 T 세포, 이를 생산하는 방법 및 사용하는 방법(예컨대, 치료로써)은 다음과 같은 하나 이상의 장점이 있을 수 있다. 몇몇 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 여러 종류의 암 세포를 표적화(및 제거/감소)할 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 환자 세포의 유전자 변형없이 생산될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 T 세포를 유도하는 특정 항원을 식별할 필요없이 생산될 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 암 세포의 예비표지화(pre-labelling) 없이, 예컨대 암 세포 막을 검출가능한 마커로 예비표지화하거나 암 세포를 특정 항원으로 예비표지화함이 없이 생산될 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 암 세포에 노출/암세포와 항온처리하기 전에 항원으로 T 세포를 예비활성화함이 없이 생산될 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 혈액 샘플로부터 임의의 세포를 분리할 필요없이 피검체로부터 혈액 샘플(예, 골수, 전혈액 또는 말초혈액)과 pICF를 항온처리하여 생산할 수 있다. 예를 들어, 혈액

샘플은 표적 세포(예, 암 세포) 및 이 표적 세포에 표적화되어야 하는 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL) 출발 물질을 모두 함유할 수 있어, 암 세포와 출발 면역 작동 세포의 별도의 제조물이 필요하지 않다.

[0395] 본원에서 상기 방법 및 조성물의 추가 장점은 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포의 안전성의 장점을 포함한다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 본원에 기술된 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산한 상기 T 세포는 주로 특정 암 항원을 발현하는 암 세포를 인식하고 상기 특정 암 항원을 발현하지 않는 다른 세포, 예컨대 정상 세포에 대한 반응성이 저하된 것으로 생각된다. 이는 상기 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포가 주로 암 세포를 살상할 것이므로, 상기 T 세포에 안전성 장점을 부여할 수 있다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 상기 특이성은 암 항원(들)에 이미 특이적인 CTL로부터 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포의 pICF를 이용한 생체외 분석에서 우선적인 및/또는 선택적인 활성화 및 증식때문인 것으로 생각된다.

[0396] 또한, 본 발명은 피검체, 예컨대 환자에게 적당한 면역요법을 선택하는 방법도 제공한다. 예컨대, 본 발명은 pICF, 예컨대 암 세포에 대해 향상된 세포독성 활성을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL) (예컨대 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포)를 생성하는데 최적의 활성을 가진 pICF를 선별하는 방법도 제공한다. 구체예들에서, 후보 pICF는 종래 기술된 적이 없는 신규 화합물/분자이며, 상기 방법들은 약물 발견에 사용된다.

[0397] 또한, 본 발명은 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포를 이용한 치료에 반응성일 가능성이 더 큰 피검체를 식별하는 방법을 제공한다. 또한, 본 명세서에는 최고의 암 살상 활성을 가진 암 살상 T 세포의 집단(예컨대, 단일 클론 또는 복수의 클론)을 선택하는 방법도 기술된다.

[0398] 또한, 본 발명은 암 치료법, 예컨대 종래 기술된 암 치료법에, 예컨대 단독요법으로써 또는 본원에 기술된 암 살상 T 세포 치료법과의 병용 요법으로써 반응할 가능성이 더 큰 환자를 식별하는 방법도 개시한다. 이 방법은 pICF(본원에 기술된 것)를 이용하여 높은 세포독성 암 살상 T 세포를 생산하는 능력을 이용하고 이 세포를 생체외 분석에 적용한다. 예컨대, 이 방법은 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포(향상된 표적 세포 살상 활성을 가진)를 함유하고, 환자 유래의 성분들로부터 생성되는 생체외 반응 혼합물을 생성시키는 단계를 수반한다. 이 방법은 유효 E:T 비를 계산하는 단계를 수반할 수 있고, 높은 유효 E:T 비는 강한 T 세포 살상 활성을 시사하고, 낮은 유효 E:T 비는 불량한 T 세포 살상 활성을 시사한다. 이 방법은 반응 혼합물에 후보 암 치료제를 첨가하여 반응, 예컨대 암 살상 활성을 검출하는 단계를 수반할 수 있다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 반응 혼합물에 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포의 존재는 분석법의 민감성을 증가시켜, 종래 기술된 생체외 분석법에서 암 살상 활성이 있는 것으로 관찰될 수 없었던 암 치료제가 이러한 더욱 민감한 분석에서 암 살상 활성을 나타낼 수 있게 하는 것으로 생각된다. 이처럼 개인화된 의약 분석은 또한 특정 환자에서 표적화된 치료제를 식별하고 특정 환자에게 덜 효과적일 것 같은 치료제의 투여를 피하기 위해 다수의 암 치료제 패널을 각각의 잠재 효능에 대해 시험하는 방법이다. 이 접근법은 아마도 특정 환자에게 효과적이고 유용할 수 있는 암 치료제를 종래 기술된 생체외 분석법에 의해 식별될 수 있는 것보다 더 많이 식별할 수 있다.

[0399] **정의**

[0400] 본원에 사용된, 물품의 단수 표현은 이 물품의 하나 또는 하나보다 많은, 예컨대 적어도 하나의 문법적 대상을 의미한다. 본원에서 "함유하는"이란 용어와 함께 사용된 단수 용어의 사용은 "하나"를 의미할 수 있지만, "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 하나보다 많은"의 의미와도 일치한다.

[0401] 본원에 사용된, "약" 및 "대략"은 일반적으로 측정의 본질 또는 정확성이 주어진다면 측정된 양의 허용되는 오차 정도를 의미한다. 예시적인 오차 정도는 주어진 범위 값의 20% 이내, 일반적으로 10% 이내, 더욱 일반적으로 5% 이내이다.

[0402] "자가"란 용어는 개체에게 이후에 재도입되는, 동일 개체 유래의 임의의 물질을 의미한다.

[0403] "동종이계"란 용어는 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 다른 동물에서 유래된 임의의 물질을 의미한다.

[0404] 본 명세서의 목적을 위한 "조성물"이란 용어는 "암 살상 T 세포"를 포함하고, 이 용어는 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포, 예컨대 비제한적으로 작동체 기억 T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 헬퍼 T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL) 및 삼투적립성 T 세포 및 이의 약학적 조성물을 포함한다.

[0405] 당해의 화합물은 "유효량"이 치료에 이용된다. 본 발명에 따라 사용된 화합물의 투여량은 화합물 및 치료받는

상태, 예컨대 연령, 체중 및 수용체 환자의 임상 상태에 따라 달라진다. 다른 요인으로는 투여 경로, 환자, 환자의 의료 기록, 질병 과정의 중증도, 및 특정 화합물의 효능을 포함한다. 상기 용량은 환자에게 허용될 수 없는 독성을 생산함이 없이 치료되는 질환의 증상 또는 징후를 경감시키기에 충분해야 한다. 일반적으로, 화합물의 유효량은 증상의 주관적인 경감 또는 임상의 또는 다른 의료 관찰자가 인지하는 객관적으로 식별가능한 향상을 제공하는 양이다.

[0406] 본원에 사용된 "근접성 ICF" 또는 "pICF"는 면역 작동 세포, 예컨대 T 세포를 표적 세포, 예컨대 암 세포와 근접하게 하여, 면역 작동 세포, 예컨대 T 세포(예, CTL)의 삼투적립을 향상시키는 제제를 의미한다. 한 구체예에서, 근접성 ICF는 면역 작동 세포 및 표적 세포에 각각 결합(예컨대, 직접 결합)한다. 몇몇 구체예들에서, 근접성 ICF는 항체 분자, 예컨대 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)에 대해 제1 결합 특이성 및 표적 세포에 대해 제2 결합 특이성을 가진 이중특이적 항체 분자이다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, pICF는 세포독성 T 세포(CTL)의 민감화 및/또는 활성화에 도움을 줄 수 있고, 즉 종양 세포를 인식하고(하거나) 제거할 수 있다. 몇몇 구체예들에서, pICF는 삼투적립 면역 작동 세포(예, T 세포)의 집단을, 예컨대 pICF의 부재하에 면역 작동 세포와 암 세포의 혼합물로부터 생성된 삼투적립 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)의 집단 대비, 적어도 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 30% 또는 그 이상 증가시킨다.

[0407] 본원에 사용된 "삼투적립"은 표적 세포(예, 항원 제시 세포, 예컨대, 암 세포)의 세포막 일부가 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)로 전달되어, 표적 세포 유래의 일부 세포막을 함유하는 "삼투적립성" 면역 작동 세포를 형성하는 과정을 의미한다. 몇몇 구체예들에서, 표적 세포의 일부 세포막은 하나 이상의 표적 세포 항원을 함유한다. 즉, 삼투적립 면역 작동 세포는 이 세포의 표면에 하나 이상의 표적 세포 항원을 함유할 수 있다. 다른 구체예들에서, 표적 세포의 일부 세포막은 막 형광 염료를 대신한다. 따라서, 삼투적립 면역 작동 세포는 종래 암 세포를 염색하는데 사용된 막 염료 또는 암 세포 표면 마커를 이례적으로 발현한다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 삼투적립을 겪은, 예컨대 포획한 하나 이상의 표적 세포 항원을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)는 삼투적립을 겪지 않은 면역 작동 세포에 비해, 표적 세포에 대항한(예컨대, 살생하는) 면역 반응의 형성에 더욱 효과적인 것으로 생각된다.

[0408] "면역 작동 세포"는 이 용어가 본원에 사용될 때, 면역 반응에 관여하는, 예컨대 면역 작동체 반응의 촉진에 관여하는 세포를 의미한다. 면역 작동 세포의 예는 비제한적으로 T 세포, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ T 세포, 알파/베타 T 세포 및 감마/델타 T 세포, B 세포, 자연 살생(NK) 세포, 자연 살생 T(NKT) 세포, 및 비만 세포를 포함한다.

[0409] 본원에 사용된 "미분화 T 세포"는 예컨대 기억 세포의 전구체인, 항원-미경험 세포를 함유하는 T 세포를 의미한다. 몇몇 구체예들에서, 미분화 T 세포는 더 어린 T 세포, 즉 덜 분화된 표현형을 함유하는 T 세포이다. 몇몇 구체예들에서, 미분화 T 세포는 CD62L, CD27, CCR7, CD45RA, CD28 및 CS127의 발현, 및 CD57, CD95, CD122, KLRG-1 또는 CD45RO의 발현 부재를 특징으로 한다. 구체예들에서, 미분화 T 세포는 긴 텔로미어 길이를 특징으로 한다. 예컨대, 미분화 T 세포와 관련된 표현형 마커는 예컨대, 본원에 참고인용된 문헌[Maus M(2014)]에 기술되어 있다.

[0410] 본원에 사용된 "세포독성 T 림프구"(CTL)는 표적 세포를 살상하는 능력을 가진 T 세포를 의미한다. 구체예들에서, CTL은 이의 세포 표면에 CD8을 발현한다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, CD8+ T 세포는 일단 표적 세포 상의 항원을 인식하여 활성화되면 CTL이 되는 것으로 생각된다. 예컨대, CTL 활성화는 두 단계가 일어날 때, 즉 1) 표적 세포 상의 항원 결합된 MHC 분자와 CTL 상의 T 세포 수용체 간에 상호작용이 이루어지고; 2) T 세포와 표적 세포 상의 공동자극 분자의 체결에 의해 공동자극 신호가 만들어지면 발생한다. CTL은 그 다음 표적 세포 상의 특정 항원을 인식하고 이 표적 세포의 파괴를, 예컨대 세포 용해에 의해 유도한다. 구체예들에서, CTL은 암 세포 및 바이러스 등에 의해 감염되거나, 또는 다른 방식으로 손상된 세포를 표적화하여 살상한다. 구체예들에서, CD4+ T 세포도 표적 세포를 살상할 수 있고, 따라서 본원에 사용된 "CTL"은 CD4+ T 세포를 의미할 수도 있다.

[0411] 본원에 사용된 "종양 침윤 림프구"(TIL)는 종양 내로 이동한 림프구를 의미한다. 구체예들에서, TIL은 다른 성숙 또는 분화 단계에 있는 세포일 수 있고, 예컨대 TIL은 림프구의 다른 종류 중에서 CTL, Treg, 및/또는 작동체 기억 T 세포를 포함할 수 있다. 구체예들에서, TIL은 암 항원 특이적인 CTL을 포함하고, 즉 특정한 암 항원을 인식한다. 구체예들에서, TIL은 종양 살상 활성을 갖고 있다. 구체예들에서, TIL은 종양 외 다른 샘플에서 분리된 림프구에 비해 다른 세포 조성 또는 다른 세포 집단을 포함할 수 있다.

[0412] 본원에 사용된 "작동체 기억 T 세포"는 예컨대 작동체 사이토킨을 빠르게 생산하여, 항원의 존재에 대해 빠른 시간척도로 반응하는 T 세포를 의미한다. 예컨대, 항원과 접촉 시, 작동체 기억 T 세포는 다량의 염증 사이토킨

을 분비한다. 구체예들에서, 작동체 기억 T 세포는 다음과 같은 세포 표면 표현형을 지닌다: $CD62L^{low}$, CD44, TCR, CD3, IL-7R(CD127), IL-15R 및 $CCR7^{low}$.

[0413] 본원에 사용된 "유효 비" 또는 "유효 E:T 비"는 pICF 및/또는 면역조절제에 노출 후 암 살상 T 세포와 표적 암 세포 간의 비를 의미한다. 유효 E:T 비는 pICF 및/또는 면역조절제에 노출 후 암 살상 T 세포(E)의 수와 표적 암 세포(T)의 수를 사용하여 계산한다. 다른 구체예들에서, 유효 E:T 비는 pICF의 다른 농도마다, 예컨대 pICF의 최대 농도에서, 활성화되거나 세포독성인 암 살상 T 세포 수의 최대 피크를 생성하는 pICF의 농도에서, 또는 각 용량 반응 곡선의 EC50 농도에서 계산할 수 있다. 구체예들에서, 유효 E:T 비는 유효 T:E 비로도 표현될 수 있다. 본원에 사용된 "기본 E:T 비"는 구체적인 아형에 상관없이 작동체 T 세포의 총 수 vs. 표적 세포의 총 수 간의 비로써 정의된다. 따라서, 기본 E:T 비는 pICF 및/또는 면역조절제의 부재 또는 노출 전에 T 세포의 총 수와 표적 암 세포 간의 비를 의미하기 때문에 "유효 E:T 비"와 다르다.

[0414] 본원에 사용된 "조절성 T 세포"(Treg)는 면역억제 및 면역관용성 반응을, 예컨대 접촉 독립적 기전 및 접촉 의존적 기전을 통해 매개하는, 흉선에서 생성된 T 세포를 의미한다. 몇몇 Treg는 말초부에서 미분화 T 세포로부터 생성되는 유도성 Treg이다. 구체예들에서, Treg는 자가 항원에 대한 관용을 유지하고 자가면역의 감소를 돕는다. 구체예들에서, Treg는 작동체 T 세포의 증식 및 유도를 억제하고(하거나) 억제조절한다. 구체예들에서, Treg는 세포 표면에 다음과 같은 하나 이상의 마커를 발현한다: αβ T 세포 수용체(TCR), CD3, CD4, CD25, CTLA4, 및/또는 글루코코르티코이드 유도된 TNF 수용체(GITR). 구체예들에서, Treg는 다음과 같은 분자 중 하나 이상을 분비한다: IL-10, TGFβ, 및/또는 IL-35.

[0415] 본원에 사용된 "클론"은 동일한 선조 세포에서 유래되는 세포의 집단을 의미한다. 구체예들에서, 세포 클론 내의 세포는 동일한 표현형(들)과 유전자형(들)을 공유한다.

[0416] 본원에 사용된 "항체 분자"는 단백질, 예컨대 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 함유하는 면역글로불린 사슬 또는 이의 단편을 의미한다. 항체 분자는 항체(예컨대, 전 길이의 항체) 및 항체 단편을 포함한다. 예를 들어, 전 길이의 항체는 자연 발생하거나 정상 면역글로불린 유전자 단편 재조합 과정에 의해 형성된 면역글로불린(Ig) 분자(예, IgG 항체)이다. 구체예들에서, 항체 분자는 면역글로불린 분자의 면역학적 활성의 항원 결합 부위, 예컨대 항체 단편을 의미한다. 항체 단편, 예컨대 기능성 단편은 항체의 일부, 예컨대 Fab, Fab', $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, 가변 단편(Fv), 도메인 항체(dAb) 또는 일본쇄 가변 단편(scFv)이다. 기능성 항체 단편은 무손상(예, 전 길이) 항체가 인식하는 것과 동일한 항원에 결합한다. 또한, "항체 단편" 또는 "기능성 단편"이란 용어는 가변 영역으로 이루어진 분리된 단편, 예컨대 중쇄와 경쇄의 가변 영역 또는 경쇄와 중쇄 가변 영역이 펩타이드 링커에 의해 연결된 재조합 일본쇄 폴리펩타이드 분자("scFv 단백질")를 포함한다. 몇몇 구체예들에서, 항체 단편은 항원 결합 활성이 없는 항체 부위, 예컨대 Fc 단편 또는 단일 아미노산 잔기를 포함하지 않는다. 예시적인 항체 분자는 전 길이 항체 및 항체 단편, 예컨대 dAb(도메인 항체), 일본쇄, Fab, Fab', 및 $F(ab')_2$ 단편 및 일본쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다.

[0417] 구체예들에서, 항체 분자는 단일특이적이고, 예컨대 단일 에피토프에 대한 결합 특이성을 함유한다. 몇몇 구체예들에서, 항체 분자는 다중특이성이고, 예컨대 복수의 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하고, 여기서 제1 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제1 에피토프에 대해 결합 특이성이 있고, 제2 면역글로불린 가변 도메인 서열은 제2 에피토프에 대해 결합 특이성이 있다. 몇몇 구체예들에서, 항체 분자는 이중특이적 항체 분자이다. 본원에 사용된 "이중특이적 항체 분자"는 하나보다 많은(예컨대, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상) 에피토프 및/또는 항원에 대해 특이성이 있는 항체 분자를 의미한다. 이중특이적 항체 분자는 다양한 포맷을 포함할 수 있고, 본원의 이중특이적 항체 분자 단원에서 더 상세하게 설명된다.

[0418] 본원에 사용된 "항원"(Ag)은 면역 반응, 예컨대 특정 면역 세포 및/또는 항체 생성의 활성화를 수반하는 면역반응을 자극할 수 있는 분자를 의미한다. 거의 모든 단백질 또는 펩타이드를 포함하는 임의의 거대분자가 항원일 수 있다. 또한, 항원은 게놈 재조합체 또는 DNA에서 유래될 수도 있다. 예컨대, 면역 반응을 유도해낼 수 있는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 또는 부분 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 임의의 DNA는 "항원"을 암호화한다. 구체예들에서, 항원은 반드시 유전자의 전 길이 뉴클레오타이드 서열에 의해서만 암호화되거나, 또는 유전자 전체에 의해 암호화될 필요는 없다. 구체예들에서, 항원은 합성될 수도 있고, 또는 생물학적 샘플, 예컨대 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 다른 생물학적 성분을 가진 유체로부터 유래될 수도 있다.

[0419] 항체 분자의 "결합 부위" 또는 "항원 결합 부위"는 항원 결합에 참여하는 항체 분자의 일부, 예컨대 면역글로불린(Ig) 분자를 의미한다. 구체예들에서, 항원 결합 부위는 중쇄(H) 및 경쇄(L)의 가변(V) 영역의 아미노산 잔기

들에 의해 형성된다. 초가변 영역으로 지칭되는, 중쇄 및 경쇄의 가변 영역 내 3개의 고도로 상이한 스트레치(stretch)는 "프레임워크 영역"(FR)이라는 더욱 보존적인 인접 스트레치들 사이에 배치된다. FR은 면역글로불린의 초가변 영역 사이 및 인접에서 자연적으로 발견되는 아미노산 서열이다. 구체예들에서, 항체 분자에서 경쇄의 3개의 초가변 영역과 중쇄의 3개의 초가변 영역은 3차원 공간에서 서로에 대해 상대적으로 배치되어, 결합된 항원의 3차원 표면에 상보적인 항원 결합 표면을 형성한다. 각 중쇄 및 경쇄의 3개의 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"이라 불린다. 프레임워크 영역 및 CDR은 예컨대 문헌[Kabat EA(1991) 및 Chothia C(1987)]에 정의되고 설명되어 있다. 각 가변쇄(예컨대, 가변 중쇄 및 가변 경쇄)는 일반적으로 아미노산 말단부터 카르복시 말단까지 아미노산 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR로 이루어진다.

[0420] 본원에 사용된 "미세 잔존 질병(MRD)"은 치료 중 또는 치료 후에, 예컨대 환자가 회복 중일 때(즉, 질병의 징후 또는 증상이 없을 때) 환자에게 남아 있는 세포, 예컨대 질병 세포, 예컨대 암성 세포의 소집단을 의미한다. 구체예들에서, MRD는 환자 중에서 질병, 예컨대 암의 재발을 유발하는 세포의 근원일 수 있다. MRD는 환자 샘플, 예컨대 조직 샘플에서 질병에 걸린 세포의 작은 수를 측정할 수 있는 유세포분석, 단백질, DNA 또는 RNA 기반의 분석을 사용하여 검출할 수 있다.

[0421] 본원에 사용된 "암"은 모든 종류의 종양원성 과정 및/또는 암성 증식을 포함할 수 있다. 구체예들에서, 암은 원발성 종양 뿐만 아니라 전이 조직 또는 악성 변형 세포, 조직 또는 기관을 포함한다. 구체예들에서, 암은 암의 모든 조직병리 및 단계, 예컨대 침습/중증도 단계를 포함한다. 구체예들에서, 암은 재발 및/또는 내성 암을 포함한다. "암" 및 "종양"이란 용어는 호환적으로 사용될 수 있다.

[0422] "샘플" 또는 "조직 샘플"은 피검체 또는 환자의 조직 또는 체액으로부터 수득되는 생물학적 샘플을 의미한다. 조직 샘플의 급원은 갓 제조된, 동결된 및/또는 보존된 기관, 조직 샘플, 생검 또는 흡인물에서 유래되는 것과 같은 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성성분(예, 혈청, 혈장); 골수 또는 임의의 골수 구성성분; 소변, 뇌척수액, 전혈액, 혈장 및 혈청과 같은 체액일 수 있다. 샘플은 비-세포 분획(예, 소변, 혈장, 혈청 또는 다른 비세포 체액)을 포함할 수 있다. 다른 구체예들에서, 개체로부터 수득한 샘플의 체액은 혈액(예, 전혈액)을 포함한다. 한 구체예에서, 샘플은 피검체로부터 수득되는 전혈액 샘플, 전 골수 샘플, 전 말초혈액 샘플, 또는 전 종양 샘플이다. 구체예들에서, 예컨대 전 혈액 샘플, 전 골수 샘플 또는 전 말초혈액 샘플을 언급할 때, "전" 샘플은 이 샘플로부터 제거되거나 분리된 성분(예, 세포)이 실질적으로 없는 샘플이다. 한 구체예에서, 샘플, 예컨대 혈액 샘플은 이 방법의 나머지 단계들에 사용되기 전에 희석(예컨대, 생리적 융화성 완충액 또는 배지에 의해)된다. 다른 구체예들에서, "전" 샘플, 예컨대 전 조직 샘플 또는 전 종양 샘플은 기원 조직 유래의 미세환경을 실질적으로 유지하고, 예컨대 종양 또는 면역 미세환경의 구조를 실질적으로 유지한다. 다른 구체예에서, 샘플, 예컨대 종양 샘플은 더 작은 조각으로 가공(예, 마쇄, 다짐, 블렌딩, 분쇄 등)되고 희석(예컨대, 생리적 융화성 완충액 또는 배지에 의해)된다.

[0423] 본원에 사용된 "세포 표면 표지"는 세포 표면 성분, 예컨대 세포 표면 단백질, 글리칸, 세포막에, 예컨대 특이적으로 및/또는 비특이적으로, 상호작용하는 제제를 의미한다. 구체예들에서, 제제는 세포 표면 또는 세포 자체를 표지하는 기능을 하는 검출성 신호를 포함한다. 구체예들에서, 검출성 신호는 공지된 파장에서 형광을 방출하는 화학 분자, 예컨대 형광크롬이다. 한 구체예에서, 세포 표면 표지는 하나 이상의 세포 표면 표적을 선택적으로 인식하는 항체로써, 이 항체는 예컨대 본원에서 "형광 표지된 항체"라고도 지칭한, 형광단 분자에 부착, 예컨대 화학적으로 부착된다. 한 구체예에서, 세포 표면 표지는 하나 이상의 세포 표면 표적들을 인식할 수 있는 다른 거대분자, 예컨대 앱타머(aptamer)이다. 다른 구체예에서, 세포표면 표지는 세포 추적자 염료이다. 구체예들에서, 세포 추적자 염료는 형광 분자를 함유하는 분자, 예컨대 형광크롬이고, 이는 비특이적 방식으로 세포 표면 막을 통해 분포 또는 확산될 수 있다. 한 구체예에서, 세포 추적자 염료는 양친매성이어서, 예컨대 막-물 계면에 분포할 수 있고, 친지성 또는 소수성이어서, 예컨대 막 이중층에 존재하는 지질에 공유 부착될 수 있다.

[0424] **암 살상 T 세포의 생산**

[0425] 본 발명은 향상된 암 살상 활성을 가진 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)(예컨대, 암 살상 T 세포)를 생산(예컨대, 제조/제공)하는 방법을 제공한다.

[0426] 구체예들에서, 이 방법은 피검체(예컨대, T 세포와 암 세포 모두에 대해 동일한 피검체 또는 T 세포 대 암 세포에 대해 다른 피검체)로부터 T 세포와 암 세포를 제공하는 단계를 수반한다.

[0427] 구체예들에서, T 세포 및 암 세포는 피검체로부터 샘플 형태로 제공된다. 샘플은 혈액 샘플, 예컨대 전 혈액, 말초 혈액 또는 골수 샘플일 수 있다. 다른 구체예들에서, 샘플은 고형암(예컨대, 원발성 종양 또는 전이로부터 절제된 샘플), 림프절 또는 비장에서 유래된다.

[0428] 구체예들에서, 샘플에서 제거되거나 분리된 성분(예, 세포)은 실질적으로 없다. 예를 들어, 샘플, 예컨대 혈액 샘플은 이 방법의 나머지 단계에 사용하기 전에 희석(예컨대, 생리적 융화성 완충액 또는 배지에 의해)된다. 다른 예들에서, 샘플, 예컨대 종양 샘플은 이 방법의 나머지 단계들에 사용하기 전에 더 작은 조각으로 가공되고(예컨대, 마쇄, 다짐, 블렌딩, 분쇄 등), 희석(예컨대, 생리적 융화성 완충액 또는 배지에 의해)된다.

[0429] 다른 구체예들에서, T 세포 및 암세포는 피검체 유래의 다른 샘플들에 제공된다. 예컨대, T 세포는 혈액 샘플 형태, 예컨대 전혈액, 말초혈액 또는 골수 샘플로 제공된다. 다른 예들에서, T 세포는 예컨대 T 세포가 종양 침윤 T 세포를 포함하는 종양 샘플(예컨대, 원발성 종양 또는 전이암 중에서 절제된 샘플)의 형태로 제공된다. 예컨대, 암 세포는, 예컨대 이 암 세포가 순환성 종양 세포(CTC)를 포함하는, 혈액 샘플, 예컨대 전혈액, 말초 혈액 또는 골수 샘플의 형태로 제공된다. 다른 예들에서, 암 세포는 고형암 유래의 샘플(예컨대, 원발성 종양 또는 전이암에서 절제된 샘플), 림프절 또는 비장에서 제공된다.

[0430] 또한, 이 방법은 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와 함께 T 세포 및 암 세포로 생체외 반응 혼합물을 형성시키는 단계를 수반한다. 본원에 기술된 임의의 pICF는 이 방법에 사용될 수 있다. pICF는 본원의 "근접성 면역 코칭 인자(pICF)" 단원에 더 상세하게 설명되어 있다. 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물은 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에(예컨대, T 세포가 삼투적립을 겪기에) 충분한 조건 하에, 예컨대 일정 시간 동안 형성된다. 이로써, 이 방법은 암 살상 T 세포를 생산한다.

[0431] 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 혈액학적 종양 및 고형암에서 모두 피검체의 종양 세포는 다른 조직에 침범될 수 있다. 예컨대, 고형암의 경우, 전이는 원발성 종양 부위 내의 종양 세포와 다른 특성, 예컨대 발현 패턴(예, 다른 항원 발현 패턴)을 가진 종양 세포를 함유할 수 있다. 이처럼, 이 방법은 피검체의 체내에서 암 세포가 침범한 각 조직 내에서 암 특이적 CTL을 활성화시키는 pICF를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0432] 예를 들어, 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

[0433] (a) 암(예컨대, 혈액 암 또는 고형암)을 가진 피검체로부터 T 세포를 제공하는 단계;

[0434] (b) 암세포를, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계;

[0435] (c) 상기 T 세포, 상기 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 예컨대 상기 T 세포가 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안) 하에 형성시켜, 암 살상 T 세포를 생산하는 단계; 및

[0436] (d) 다음 중 하나, 둘, 셋 또는 전부를 수행하는 단계:

[0437] i) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 팽창시키는 단계;

[0438] ii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 선택하는 단계;

[0439] iii) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계; 또는

[0440] iv) 단계 (c) 유래의 암 살상 T 세포를 정제하는 단계,

[0441] 여기서, 암 세포는 피검체의 원발성 고형암에서 유래되고, 피검체의 전이암에서 유래되고, 및/또는 순환성 종양 세포(CTC), 예컨대 혈액(예컨대, 전 혈액, 골수, 또는 말초혈액) 유래의 순환성 종양 세포(CTC), 또는 피검체 유래의 림프 샘플이다.

[0442] 다른 예에서, 본원에 기술된 이 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

[0443] (a) 암(예, 혈액 암 또는 고형암)이 있는 피검체로부터 T 세포 및 암 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

[0444] (b) 상기 샘플을 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와, 예컨대 T 세포가 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한 조건 하에(예컨대, 일정 시간 동안) 접촉시키는 단계;

[0445] (c) 상기 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계,

[0446] 여기서, 상기 샘플은 피검체 유래의 원발성 고형암에서 유래되고, 피검체의 전이암에서 유래되고, 및/또는 피검

체의 혈액(예, 전 혈액, 골수 또는 말초 혈액) 또는 림프 샘플이다.

[0447] 또 다른 예에서, 본원에 기술된 방법은 다음과 같은 단계들을 포함한다:

[0448] (a) 암(예, 혈액 암 또는 고형암)을 가진 피검체로부터 암 세포를 함유하는 샘플을 제공하는 단계;

[0449] (b) 상기 피검체로부터, T 세포를 함유하는 샘플, 예컨대 혈액 샘플(예, 말초혈액 샘플)을 제공하는 단계;

[0450] (c) 상기 단계 (a)의 샘플을 상기 단계 (b)의 샘플 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)와, 예컨대 T 세포가 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한 조건 하에(예컨대, 일정 시간 동안) 접촉시키는 단계;

[0451] (d) 상기 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득한 암 살상 T 세포를 농축시키는 단계,

[0452] 여기서, 단계 (a)의 샘플은 피검체 유래의 원발성 고형암에서 유래되고, 피검체의 전이암에서 유래되고, 및/또는 피검체의 혈액(예, 전 혈액, 골수 또는 말초 혈액) 또는 림프 샘플이다.

[0453] 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)를 생산/생성하는 방법은 주어진 피검체 유래의 다른 샘플들을 사용하여 반복하고, 이때 각 반복은 암 세포의 다른 샘플, 예컨대 원발성 고형암, 전이, 혈액(예, 전 혈액, 골수 또는 말초혈액), 또는 림프를 이용하는 것을 포함한다.

[0454] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 상기 다른 암 세포 샘플을 각각 사용하여 생성한 삼투적립성 T 세포를 수집하는 단계를 포함한다.

[0455] 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 이러한 방법은 주어진 피검체의 다른 조직에 존재할 수 있는 다른 종류의 암 세포에 대하여 효과적인 삼투적립성 T 세포를 생성할 것으로 생각된다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 이러한 방법은 피검체 체내의 한 부위에 있는 암세포만을 살상하는 대신에, 피검체의 신체 전반에 존재하는 암 세포(예컨대, 원발성 종양 및 전이 모두, 그리고 아마도 혈액에서 순환하는 암세포도)를 유리하게 살상할 수 있는 것으로 생각된다.

[0456] 또한, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, CTC(암 환자, 일반적으로 고형암 환자의 말초혈액에서 발견되는 종양 세포)는 전이에 역할을 할 수 있고, 따라서 살상에 양호한 표적인 것으로 생각된다. 이처럼, 본원에 기술된 방법은 pICF를 생체외에서 말초 혈액 샘플(CTC 및 T 세포 함유)과 항온처리하여 CTC를 이의 동족 암 항원 특이적 T 세포와 근접시켜 삼투적립성 T 세포를 생성하는 것을 포함한다. 다른 구체예들에서, 예컨대 말초 혈액 샘플에서는 암 항원 특이적 T 세포가 충분히 농축되지 않아서, 아마도 암 항원 특이적 T 세포가 농축될 것 같은 3차원 미세환경(예, 골수, 종양, 전이) 유래의 샘플이 말초 혈액 샘플 대신에 사용된다. 이러한 경우, 예컨대 방법은 pICF와 분리된 CTC를 피검체 유래의 골수, 종양 또는 전이 샘플(암 항원 특이적 T 세포 함유)과 생체외에서 항온처리하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 생체외 혼합물은 pICF로 하여금 CTC를 이 CTC 상의 항원에 매치하는 암 항원 특이적 T 세포와 공간적으로 근접하게 하여, 적당한 T 세포를 활성화시켜 삼투적립성 T 세포를 생성시킬 수 있다. 구체예들에서, 이러한 방법은 암에 걸린 피검체의 각 조직을 사용하여 반복하여, 예컨대 적당한 암 항원 특이적 T 세포와 CTC의 매칭을 최대화할 수 있다.

[0457] **암 살상 T 세포의 추가 가공**

[0458] 본원에 기술된 방법에 따르면, 구체예들에서 암 살상 T 세포는 추가로 선택, 농축, 정제 및/또는 팽창될 수 있다.

[0459] 구체예들에서, 본원에 기술된, 예컨대 본원에 기술된 방법에 의해 생산된, 암 살상 T 세포는 예컨대 반응 혼합물로부터 선택된다. 예컨대, 반응 혼합물은 T 세포, 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 T 세포(들) 및/또는 pICF로부터 정제된다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 반응 혼합물 내의 세포 혼합물(예, 암 세포 및/또는 다양한 종류의 T 세포)로부터 농축된다.

[0460] 구체예들에서, 선택 단계, 정제 및/또는 농축 단계는 유세포분석(예, 형광 활성화된 세포 분류(FACS)) 또는 비드(예컨대, 자성 비드)와 같은 다른 분리 방법을 사용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 비드는 활성화된 T 세포(예, CTL)의 하나 이상의 마커 및/또는 하나 이상의 항원에 결합하는 항체 또는 이의 단편으로 코팅될 수 있다. 이러한 방식으로, 상기 비드에 결합한 세포는 하나 이상의 암 항원을 발현하는 활성화된 T 세포(예, CTL)일 것이다. 이러한 세포는 아마도 향상된 암 살상 활성을 가진 삼투적립성 T 세포일 것이다. 이와 마찬가지로, FACS에서 활성화된 T 세포(예, CTL)의 마커 및 암세포 마커를 둘 다 발현하는 세포(예컨대, 아마도 삼투적립성 T 세포)는 다른 세포 종류들로부터 분리될 수 있다. 선택 단계, 정제 및/또는 농축 단계에는 음성 또는 양성 선택

방법이 사용될 수 있다.

[0461] 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포, 예컨대 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 암 살상 T 세포는 팽창되어, 예컨대 피검체에 투여하기 위한 양의 암 살상 T 세포를 생성한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포의 제조물은 팽창된다. 구체예들에서, 팽창은 특정 T 세포 집단의 선택, 농축 또는 정제 전에 수행된다. 다른 구체예들에서, 팽창은 특정 T 세포 집단의 선택, 농축 또는 정제 후에 수행된다.

[0462] 세포, 예컨대 암 살상 T 세포를 팽창시키는 예시적 방법은 본원에 참고 인용된 US 8,034,334, US 2012/0244133 및 Montes M(2005)에 기술된 것을 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 팽창은 암 살상 T 세포 수를, 예컨대 제조물에서, 예컨대 적어도 약 2배(예컨대, 적어도 약 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 50배, 100배, 1000배, 10^4배, 10^5배, 10^6배 또는 그 이상)로 증가시키는 것을 포함한다. 구체예들에서, 팽창은 적어도 2일의 과정 동안, 예컨대 적어도 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일 이상 동안 수행된다. 몇몇 예에서, 세포는 IL-12 및/또는 IL-15와 같은 사이토킨의 존재 하에, 경우에 따라 T 세포 수용체를 자극하는 제제, 예컨대 항-CD3 항체 또는 이의 단편의 첨가 하에 세포를 배양하여 팽창시킨다.

[0463] 구체예들에서, 선택 단계, 정제 단계 및/또는 팽창 단계는 낮은, 예컨대 불충분한 수의 암 세포의 연속 첨가를 포함한다. 세포독성 T 세포를 생성하기 위해 암 세포, T 세포 및 pICF를 항온처리하는 것을 포함하는 본원에 기술된 방법은 세포독성 T 세포의 여러 클론들을 생성할 수 있다. 구체예들에서, 암세포를 살상하는데 가장 효과적이거나 가장 강력한 세포독성 T 세포 클론의 선택은 낮은, 예컨대 불충분한 양의 암 세포를 연속 첨가하여 달성할 수 있다. 한 구체예에서, 암 살상 T 세포를 함유하는 반응물에 첨가될 수 있는 낮은 또는 불충분한 수 또는 양의 암 세포는 활성화된 T 세포 수의 50% 이하, 예컨대 30%, 10%, 1%, 0.1% 또는 0.01% 이하이다. 한 구체예에서, 낮은 또는 불충분한 수의 암 세포는 혼합물(예컨대, 암세포, T 세포 및/또는 pICF 함유)에 적어도 1회 이상(예컨대, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회) 첨가될 수 있다. 한 구체예에서, 낮은 또는 불충분한 수의 암 세포는 6 내지 48 시간(예컨대, 6 시간, 12 시간, 24 시간, 36 시간 또는 48 시간)마다 첨가된다. 한 구체예에서, 첨가되는 낮은 또는 불충분한 수의 암 세포는 환자 유래의 암 세포이다. 한 구체예에서, 첨가되는 낮은 또는 불충분한 수의 암 세포는 환자 유래의 암 세포가 아니다. 한 구체예에서, 첨가되는 낮은 또는 불충분한 수의 암 세포는 암 세포주 유래의 암 세포이다.

[0464] 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, T 세포 및 pICF와의 혼합물에서 암 세포가 일단 예컨대 갓 생성된 암 살상 T 세포에 의해 제거되면, 상기 암 살상 T 세포는 고갈될 수 있고 수가 감소하는 것으로 여겨진다. 하지만, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 생성된 암 살상 T 세포에 낮은, 예컨대 불충분한 수의 암 세포가 첨가되면, 암 살상 T 세포의 서브세트는 새로 첨가된 암 세포를 인식하고 살상할 것이다. 암 세포의 인식은 예컨대 암 세포 표면에 발현된 암 항원에 대한 TCR의 선택적 인식 및 결합을 통해 일어날 수 있고; 암 항원에 대해 최고의 친화성 또는 가장 빠른 k_{on} 동역학 상수를 가진 T 세포 클론이 새로 첨가된 암 세포에 더 강하고 및/또는 더 빠르게 결합하여, 암 세포의 제거 및 암 살상 T 세포 클론의 증식 활성화를 초래할 수 있다. 암 살상 T 세포 간의 직접 경쟁으로 인해, 암 살상 T 세포는 더욱 효능적인 서브세트가 활성화되고 증식할 것이고, 반면 새로 첨가된 암 세포를 인식하지 못하는 나머지 암 살상 T 세포는 고갈 및 자가제거 과정을 지속하여 더욱 효능적인 암 살상 T 세포를 남길 것이다. 따라서, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 새로 첨가된 아 세포를 살상하는 암 살상 T 세포의 서브세트는 최고의 킬러, 예컨대 가장 활성적이거나 강력한 암 킬러 T 세포일 것으로 생각된다. 구체예들에서, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 낮은, 예컨대 불충분한 수의 암 세포를 첨가하는 상기 과정의 반복은 가장 활성적이고 더욱 효능적 또는 강력한 암 살상 T 세포가 우선적 또는 선택적으로 활성화하고 증식하도록 진화론적으로 선택적인 압박을 가하는 것으로 생각된다. 따라서, 낮은, 예컨대 불충분한 수의 암 세포의 연속 첨가는 가장 활성적이고 효능적인 암 살상 T 세포 클론을 선택 및 농축하는데 유용하다. 낮은 수의 암 세포의 연속 첨가를 포함하는 예시적인 과정은 도 1에 도시된다.

[0465] 구체예들에서, 선택된, 정제된, 농축된 및/또는 팽창된 세포는 암 살상 T 세포의 제조물을 형성할 수 있다.

[0466] **근접성 면역 코칭 인자(pICF)**

[0467] pICF는 예컨대 이중특이적 항체 분자, 또는 CDR-접목된 스캐폴드를 포함할 수 있다.

[0468] *이중특이적 항체 분자*

[0469] 구체예들에서, 이중특이적 항체 분자는 다른 부위들이 다른 항원들에 특이적인, 하나보다 많은 항원 결합 부위

를 함유할 수 있다. 구체예들에서, 이중특이적 항체 분자는 동일한 항원 상의 하나보다 많은(예컨대, 2 이상) 에피토프에 결합할 수 있다. 구체예들에서, 이중특이적 항체 분자는 표적 세포(예, 암 세포)에 특이적인 항원 결합 부위 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)에 특이적인 다른 항원 결합 부위를 함유한다. 이중특이적 항체 분자는 5개의 다른 구조 그룹으로 분류될 수 있다: (i) 이중특이적 면역글로불린 G(BsIgG); (ii) 추가 항원 결합 모이어티가 부가된 IgG; (iii) 이중특이적 항체 단편; (iv) 이중특이적 융합 단백질; 및 (v) 이중특이적 항체 접합체.

[0470] (i) BsIgG는 각 항원에 대해 1가인 포맷이다. 예시적인 BsIgG 포맷은 비제한적으로 crossMab, DAF(two-in-one), DAF(four-in-one), DutaMab, DT-IgG, knobs-in-holes 공통 LC, knobs-in-holes 어셈블리, 전하 쌍, Fab-암(arm) 교환, SEEDbody, 트리오마브, LUZ-Y, Facb, κλ-body, 직교성 Fab를 포함한다. Spiess(2015) 도 1 참조. 예시적인 BsIgG는 항-CD3 암 및 항-EpCAM 암을 함유하는 카투막소마브(catumaxomab)(Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm); 및 CD3 및 HER2를 표적으로 하는 에르투막소마브(ertumaxomab)(Neovii Biotech, Fresenius Biotech)를 포함한다. 몇몇 구체예들에서, BsIgG는 헤테로이량체화를 위해 조작되는 중쇄를 함유한다. 예를 들어, 중쇄는 헤테로이량체화를 위해 "knobs-in-holes" 전략, SEED 플랫폼, 공통 중쇄(예, κλ-bodies 중의), 및 헤테로이량체성 Fc 영역을 이용하여 조작될 수 있다[Spiess C(2015) 참조]. BsIgG에서 동종이량체의 중쇄 페어링(pairing)을 피하기 위해 사용된 전략은 knobs-in-holes, duobody, azymetric, 전하 쌍, HA-TF, SEEDbody 및 차등 단백질 A 친화성을 포함한다. 상기 동일 문헌 참조. BsIgG는 다른 숙주 세포에서 성분 항체들을 별도로 발현시키고, 이어서 정제/BsIgG로 어셈블리하여 생산할 수 있다. 또한, BsIgG는 단일 숙주 세포에서 성분 항체들의 발현에 의해 생산될 수도 있다. BsIgG는 친화성 크로마토그래피를 사용하여, 예컨대 단백질 A 및 연속 pH 용출을 사용하여 정제할 수 있다.

[0471] (ii) 추가 항원 결합 모이어티가 부가된 IgG는 이중특이적 항체 분자의 다른 포맷이다. 예컨대, 단일특이적 IgG는 이 단일특이적 IgG 위에, 예컨대 중쇄 또는 경쇄 중 어느 하나의 N 말단 또는 C 말단에 추가 항원 결합 단위를 부가하여 이중특이성을 갖도록 조작될 수 있다. 예시적인 추가 항원 결합 단위는 단일 도메인 항체(예, 가변 중쇄 또는 가변 경쇄), 조작된 단백질 스캐폴드, 및 쌍을 이룬 항체 가변 도메인(예, 단일 사슬 가변 단편 또는 가변 단편)을 포함한다. 상기 동일 문헌 참조. 부가된 IgG 포맷의 예는 이중 가변 도메인 IgG(DVD-Ig), IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L,H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KIH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, zybody, 및 DVI-IgG(four-in-one)를 포함한다. 문헌[Spiess C(2015), 도 1 참조]. IgG-scFv의 한 예는 IGF-1R 및 HER3에 결합하는 MM-141(Merrimack Pharmaceuticals)이다. DVD-Ig의 예는 IL-1α 및 IL-1β에 결합하는 ABT-981(AbbVie); TNF 및 IL-17A에 결합하는 ABT-122(AbbVie)를 포함한다.

[0472] (iii) 이중특이적 항체 단편(BsAb)은 항체 불변 도메인의 일부 또는 전부가 없는 이중특이적 항체 분자의 포맷이다. 예컨대, 몇몇 BsAb에는 Fc 영역이 없다. 구체예들에서, 이중특이적 항체 단편은 단일 숙주 세포에서 BsAb의 효과적인 발현을 가능하게 하는 펩타이드 링커에 의해 연결된 중쇄 및 경쇄 영역을 포함한다. 예시적인 이중특이적 항체 단편은 비제한적으로 나노바디, 나노바디-HAS, BiTE, 디아바디, DART, TandAb, scDiabody, scDiabody-CH3, Diabody-CH3, 트리플 바디, 미니항체, 미니바디, TriBi 미니바디, scFv-CH3 KIH, Fab-scFv, scFv-CH-CL-scFv, F(ab')2, F(ab')2-scFv2, scFv-KIH, Fab-scFv-Fc, 4가 HCAb, scDiabody-Fc, Dibody-Fc, 직렬 scFv-Fc, 및 인트라바디를 포함한다. 상기 동일 문헌 참조. 예컨대 BiTE 포맷은 직렬 scFv를 포함하고, 이때 성분 scFv는 T 세포 상의 CD3 및 암 세포 상의 표면 항원에 결합한다. 예시적인 BiTE는 CD3 및 CD19에 결합하는 블리나투모마브(blinatumomab)(Amgen); CD3 및 EpCAM에 결합하는 솔리토마브(solitomab)(Amgen); CD3 및 CEA에 결합하는 MEDI 565(MedImmune, Amgen); 및 CD3 및 PSMA에 결합하는 BAY2010112(Bayer, Amgen)를 포함한다. 예시적인 DART는 CD3 및 CD123에 결합하는 MGD006(Macrogenics); 및 CD3 및 gpA33에 결합하는 MGD007(Macrogenics)를 포함한다. 예시적인 TandAbs는 CD3 및 CD19에 결합하는 AFM11(Affimed Therapeutics); 및 CD30 및 CD16A에 결합하는 AFM13(Affimed Therapeutics)을 포함한다. 직렬 scFv의 한 예는 CD28 및 MAPG에 결합하는 rM28(University Hospital of Tubingen)이다. 예시적인 나노바디는 TNF 및 HSA에 결합하는 오조랄리주마브(Ablynx); IL-17A/F 및 HSA에 결합하는 ALX-0761(Merck Serono, Ablynx); IL-6R 및 HSA에 결합하는 ALX-0061(Abbvie, Ablynx); RANKL 및 HSA에 결합하는 ALX-0141(Ablynx, Eddingpharm)을 포함한다. BsAb의 성분 단편들은 파지 디스플레이를 사용하여 식별/선택할 수 있다. 몇몇 구체예들에서, pICF는 블리나투모마브를 포함하지 않는다.

[0473] (iv) 이중특이적 융합 단백질은 예컨대 추가 특이성 및/또는 기능성을 부가하기 위해, 다른 단백질에 결합된 항체 단편을 포함한다. 이중특이적 융합 단백질의 한 예는 HLA-제시 펩타이드를 인식하는 친화성-성숙된 T 세포

수용체에 결합된 항-CD3 scFv를 함유하는 immTAC이다. 구체예들에서, 더 높은 결합가를 가진 이중특이성 항체 분자를 생성하기 위해 dock-and-lock(DNL) 방법이 사용될 수 있다. 또한, 알부민 결합 단백질 또는 인간 혈청 알부민에 대한 융합체는 항체 단편의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다. 상기 동일 문헌 참조.

[0474] 구체예들에서, 화학적 접합, 예컨대 항체 및/또는 항체 단편의 화학적 접합은 BsAb 분자를 생성하는데 사용될 수 있다. 상기 동일 문헌 참조. 예시적인 이중특이적 항체 접합체는 저분자량 약물이 각 Fab 암(arm) 또는 항체 또는 이의 단편의 단일 반응성 리신에 부위 특이적으로 접합된 CovX-body 포맷을 포함한다. 구체예들에서, 접합은 저분자량 약물의 혈청 반감기를 증가시킨다. 예시적인 CovX-body는 VEGF 또는 Ang2를 억제하는 2개의 짧은 펩타이드에 접합된 항체를 함유하는 CVX-241(NCT01004822)이다. 상기 동일 문헌 참조.

[0475] (v) 이중특이적 항체 분자는 숙주계에서 예컨대 적어도 하나 이상의 성분의 재조합 발현에 의해 생산될 수 있다. 예시적인 숙주계는 진핵생물 세포(예, 포유동물 세포, 예, CHO 세포 또는 곤충 세포, 예컨대 SF9 또는 S2 세포) 및 원핵생물 세포(예, E.coli)를 포함한다. 이중특이적 항체 분자는 다른 숙주 세포에서 성분들을 별도로 발현시키고 이어서 정제/어셈블리하여 생산할 수 있다. 대안적으로, 이중특이적 항체 분자는 단일 숙주 세포에서 성분들을 발현시켜 생산할 수 있다. 이중특이적 항체 분자의 정제는 예컨대 단백질 A와 연속 pH 용출을 사용하는, 친화성 크로마토그래피와 같은 다양한 방법으로 수행할 수 있다. 다른 구체예에서, 친화성 태그(tag)는 정제를 위해 사용될 수 있고, 그 예로는 히스티딘 함유 태그, myc 태그 또는 스트렙타비딘 태그가 있다.

[0476] ***CDR 접목된 스캐폴드***

[0477] 구체예들에서, pICF는 CDR 접목된 스캐폴드 도메인이다. 구체예들에서, 이 스캐폴드 도메인은 피브로넥틴 도메인, 예컨대 피브로넥틴 III형 도메인을 기반으로 한다. 피브로넥틴 III형(Fn3) 도메인의 전체 접힘(overall fold)은 항체 중쇄의 가변 도메인인 최소 기능성 항체 단편의 전체 접힘과 밀접한 관련이 있다. Fn3의 말단에는 3개의 루프가 있고; BC, DE 및 FG 루프의 위치는 대략 항체의 VH 도메인의 CDR1, 2 및 3의 위치에 대응한다. Fn3은 이황화 결합을 보유하지 않고; 따라서 Fn3은 항체 및 이의 단편과 달리 환원 조건하에서 안정적이다(예컨대, WO 98/56915; WO 01/64942; WO 00/34784 참조). Fn3 도메인은 예컨대 본원에 기술된 항원/마커/세포에 결합하는 도메인을 선택하기 위해, 변형(예컨대, 본원에 기술된 초가변 루프 또는 CDR을 사용하여)되거나, 변형될 수 있다.

[0478] 구체예들에서, 스캐폴드 도메인, 예컨대 접힌 도메인은 단일클론 항체의 중쇄 가변 도메인으로부터 3개의 베타 가닥을 삭제하여 생성된 "미니바디" 스캐폴드와 같은 항체를 기반으로 한다(예컨대, Tramontano A(1994), Martin F(1994) 참조). "미니바디"는 2개의 초가변 루프를 제시하는데 사용될 수 있다. 구체예들에서, 스캐폴드 도메인은 V-유사 도메인(예, WO 99/45110 참조) 또는 2개의 이황화 결합에 의해 함께 유지되는 74 잔기의 6 가닥 베타 시트 샌드위치인 텐다미스타틴(tendamistatin)에서 유래되는 도메인(예컨대, McConnell SJ(1995) 참조)이다. 예컨대, 텐다미스타틴의 루프는, 예컨대 본원에 기술된 마커/항원/세포에 결합하는 도메인을 선택하도록 변형(예컨대, CDR 또는 초가변 루프를 이용하여)되거나 또는 변경될 수 있다. 다른 예시적인 스캐폴드 도메인은 CTLA-4의 세포외 도메인에서 유래되는 베타-샌드위치 구조이다(예컨대, WO 00/60070 참조).

[0479] 다른 예시적인 스캐폴드 도메인은 비제한적으로 T 세포 수용체; MHC 단백질; 세포외 도메인(예, 피브로넥틴 III형 반복체, EGF 반복체); 프로테아제 억제제(예, Kunitz 도메인, 에코틴, BPTI 등); TPR 반복체; 트리포일(trifoil) 구조; 아연 핑거 도메인; DNA 결합 단백질; 특히 단량체성 DNA 결합 단백질; RNA 결합 단백질; 효소, 예컨대 프로테아제(특히 불활성화된 프로테아제), RNase; 차페론, 예컨대 티오레독신, 및 열충격 단백질; 및 세포내 신호전달 도메인(예컨대, SH2 및 SH3 도메인)을 포함한다. 예컨대, 본원에 참고 인용된 US 2004/0009530 및 US 7,501,121 참조.

[0480] 구체예들에서, 스캐폴드 도메인은 예컨대 다음과 같은 기준 중 하나 이상에 의해 평가되고 선택된다: (1) 아미노산 서열, (2) 여러 상동성 도메인의 서열, (3) 3차원 구조, 및/또는 (4) 일정 범위의 pH, 온도, 염도, 유기용매, 산화제 농도에서의 안정성 데이터. 구체예들에서, 스캐폴드 도메인은 작고 안정한 단백질 도메인, 예컨대 100개 미만의 아미노산(예컨대, 100, 70, 50, 40 또는 30개 아미노산)의 단백질이다. 이 도메인은 하나 이상의 이황화 결합을 포함하거나 또는 아연과 같은 금속과 킬레이트화할 수 있다.

[0481] **T 세포 활성을 향상시키는 다른 조성물 및 방법**

[0482] 본원에 기술된 조성물 및 방법에 따라, 구체예들에서는 T 세포 활성, 예컨대 삼투적립을 향상시키기 위해 pICF 외에 다른 면역조절제가 사용될 수 있다. 이러한 면역조절제는 비제한적으로 면역 체크포인트 억제제, T 세포의 작용물질, 및 다른 면역조절 약물을 포함한다.

[0483] 대안적으로, T 세포 활성, 예컨대 삼투적립을 향상시키는 다른 제제(예컨대, 면역 체크포인트 억제제, T 세포의 작용물질 및 다른 면역조절 약물의 사용)는 pICF 대신 사용될 수 있다.

[0484] *면역 체크포인트 억제제*

[0485] 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 예컨대, 암 세포 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)와의 반응 혼합물에, 예컨대 pICF에 추가로 또는 pICF 대신에 첨가되는 면역 체크포인트 억제제의 사용을 포함한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 암 세포 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)를 면역 체크포인트 억제제와 접촉시키는 단계를 함유한다. 또한, 이 방법은 생체내 치료 프로토콜에도 사용될 수 있다.

[0486] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 체크포인트 분자를 억제한다. 체크포인트 분자는 몇몇 경우에 면역 작동체 반응을 상승시키기 위해 CAR 발현 세포의 능력을 저하시킬 수 있다. 예시적인 체크포인트 분자는 비제한적으로 CTLA4, PD1, PD-L1, PD-L2, TIM3, LAG3, CD160, 2B4, CD80, CD86, B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), HVEM(TNFRSF14 또는 CD270), BTLA, KIR, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II, GAL9, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1 및 A2aR을 포함한다. 예컨대, 본원에 참고 인용되는 문헌[Pardoll DM(2012)] 참조.

[0487] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, 예컨대 항-PD-1 항체, 예를 들면 니볼루마브(Nivolumab), 펨브롤리주마브(Pembrolizumab) 또는 피딜리주마브(Pidilizumab)이다. 니볼루마브(MDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538 또는 BMS-936558이라고도 지칭됨)는 PD1을 특이적으로 억제하는 완전 인간 IgG4 단일클론 항체이다. 예컨대, US 8,008,449 및 US 2006/121168 참조. 펨브롤리주마브(램브롤리주마브, MK-3475, MK03475, SCH-900475 또는 KEYTRUDA®(Merck)로도 지칭됨)는 PD-1에 결합하는 인간화된 IgG4 단일클론 항체이다. 예컨대 Hamid O(2013), US 8,354,509 및 WO 2009/114335 참조. 피딜리주마브(CT-011 또는 Cure Tech라고도 지칭)는 PD1에 결합하는 인간화된 IgG1k 단일클론 항체이다. 예컨대 WO 2009/101611 참조. 한 구체예에서, PD-1의 억제제는 니볼루마브, 펨브롤리주마브 또는 피딜리주마브의 서열에 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예컨대 적어도 85%, 90%, 95% 동일하거나 그 이상 동일한 서열을 가진 항체 분자이다. 또 다른 항-PD1 항체, 예컨대 AMP 514(Amplimmune)는 예컨대 US 8,609,089, US 2010/028330, 및/또는 US 2012/0114649에 기술되어 있다.

[0488] 몇몇 구체예들에서, PD-1 억제제는 면역부착소(immunoadhesin), 예컨대 불변 영역(예, 면역글로불린 Fc 영역)에 융합되는 PD-1 리간드(예, PD-L1 또는 PD-L2)의 세포외/PD-1 결합 부위를 함유하는 면역부착소이다. 구체예들에서, PD-1 억제제는 B7-H1과 PD-1 간의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 용해성 수용체인 AMP-224(B7-DCIg, 예컨대 WO 2011/066342 및 WO 2010/027827에 기술된 것)이다.

[0489] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 억제제, 예컨대 항체 분자이다. 몇몇 구체예들에서, PD-L1 억제제는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, 또는 MDX-1105이다. 몇몇 구체예들에서, 항-PD-L1 항체는 PD-L1에 결합하는 단일클론 항체인 MSB0010718C(A09-246-2라고도 지칭됨; Merck Serono)이다. 예시적인 인간화된 항-PD-L1 항체는 예컨대 WO 2013/079174에 기술되어 있다. 한 구체예에서, PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체, 예컨대 YW243.55.S70이다. YW243.55.S70 항체는 예컨대 WO 2010/077634에 기술되어 있다. 한 구체예에서, PD-L1 억제제는 예컨대 WO 2007/005874에 기술된 MDX-1105(BMS-936559라고도 지칭됨)이다. 한 구체예에서, PD-L1 억제제는 PD-L1에 대항하는 인간 Fc-최적화된 IgG1 단일클론 항체인 MDPL3280A(Genentech/Roche)이다. 예컨대, US 7,943,743 및 US 2012/0039906 참조. 한 구체예에서, PD-L1의 억제제는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, 또는 MDX-1105의 서열과 실질적으로 동일하거나 유사한 서열, 예컨대 상기 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 이상 동일한 서열을 가진 항체 분자이다.

[0490] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L2 억제제, 예컨대 AMP-224(PD1과 B7-H1 간의 상호작용을 차단하는 PD-L2 Fc 융합 용해성 수용체)이다. 예컨대, WO 2010/027827 및 WO 2011/066342 참조.

[0491] 한 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 LAG-3 억제제, 예컨대 항-LAG-3 항체 분자이다. 구체예들에서, 항-LAG-3 항체는 BMS-986016(BMS986016이라고도 지칭됨; Bristol-Myers Squibb)이다. BMS-986016 및 다른 인간화된 항-LAG-3 항체는 예컨대 US 2011/0150892, WO 2010/019570 및 WO 2014/008218에 기술되어 있다.

[0492] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 TIM-3 억제제, 예컨대 항-TIM3 항체 분자로써, 예컨대 US 8,552,156, WO 2011/155607, EP 2581113 및 US 2014/044728에 기술되어 있다.

[0493] 구체예들에서, 면역 체크포인트 억제제는 CTLA-4 억제제, 예컨대 항-CTLA-4 항체 분자이다. 예시적인 항-CTLA4 항체는 트리멜리무마브(IgG2 단일클론 항체, 파이자 제품, 구 티실리무마브로 알려진 것, CP-675,206); 및 이필리무마브(MDX-010으로도 지칭됨, CAS No. 477202-00-9)를 포함한다. 다른 예시적인 항-CTLA-4 항체는 예컨대

US 5,811,097에 기술되어 있다.

[0494] *T 세포의 작용물질(예, 작용성 항체)*

[0495] 구체예들에서, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 예컨대 암 세포와 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)와의 반응 혼합물에, 예컨대 pICF 외에 추가로 또는 pICF 대신에 사용되는, T 세포 작동체(예컨대, 작동성 항체)의 용도를 포함한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 T 세포의 작용물질(예, 작용성 항체)와 암 세포 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)를 접촉시키는 것을 포함한다.

[0496] 구체예들에서, T 세포의 작용물질은 작용성 항체 또는 이의 단편, 또는 공동자극 분자의 활성인자/작용물질이다. 구체예들에서, T 세포의 작용물질은 공동자극 분자를 함유하거나 공동자극 분자이다. 공동자극 분자는 항원에 대한 T 세포와 같은 림프구의 효과적인 반응에 필요한 세포 표면 분자이다. 구체예들에서, 공동자극 분자는 항원 수용체 또는 이의 리간드외에 다른 분자이다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 공동자극은 T 세포의 팽창, 생존 및 작동체 기능을 향상(예컨대, T 세포 지속 및/또는 항암 활성 향상)시키는 것으로 여겨진다. 예컨대, Song DJ(2012) 참조. 예시적인 공동자극 분자는 비제한적으로 CD28, ICOS(CD278), BTLA, LIGHT, HVEM(LIGHTR), CD160(BY55), OX40, CD27, CD2, CD7, CD40, CD30, 4-1BB(CD137), ICAM-1, B7-1, 톨(toll) 유사 수용체, LFA-1(CD11a/CD18), GITR, BAFFR, B7-H3, 신호전달 림프구성 활성화 분자(SLAM 단백질), SLAMF7, SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), SLAMF4(CD244, 2B4), 인테그린, IL2R 베타, ITGA4, MHC 클래스 I 분자, TNF 수용체, CD49D, CD49f, LFA-1, CD29, CD18, TNFR2, CD84, RANKL, CD229, CD69, CD100(SEMA4D), 및 SLAMF6(NTB-A, Ly108)을 포함한다.

[0497] 몇몇 구체예들에서, T 세포의 작용물질은 CD137, GITR 또는 CD40에 대한 작용성 항체 또는 이의 단편이다.

[0498] 예시적인 작용성 항체는 예컨대, 본원에 참고인용된 Scott AM(2012)에 기술되어 있다.

[0499] *다른 면역조절 약물*

[0500] 구체예들에서, 본원에 기술된 조성물 및 방법은 예컨대, 암 세포 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)과의 반응 혼합물에, 예컨대 pICF 외에 추가로 또는 pICF 대신에 면역조절 약물, 예컨대 레날리도마이드를 포함한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 암 세포 및 면역 작동 세포(예, T 세포, 예컨대 CTL)를 T 세포의 작용물질(예, 작용성 항체)과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0501] 몇몇 구체예에서, ICF는 면역조절 약물, 예컨대 레날리도마이드이다.

[0502] 한 구체예에서, 면역조절제는 MDSC 및/또는 Treg 세포의 억제제이다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, MDSC 및 조절성 T(Treg) 세포는 면역 억제성 종양 미세환경의 중요한 성분이다. 실험적 증거는 MDSC가 Treg 세포의 발달 및 유도를 조절할 수 있다는 것을 밝혀냈다. 예컨대, MDSC는 T 세포 작동체 기능을 다양한 방식으로 억제할 수 있다. 여러 인자들은 l-아르기닌의 고갈, RNS 및 ROS의 방출(각각 ONOO- 및 H2O2가 가장 우세한 분자이다) 또는 높은 NO 수준의 무저항적 생산을 비롯한 미세환경에 대한 최종 효과와 함께 MDSC 서브세트에서 아르기닌, NADPH 산화효소 및 NOS의 발현 수준을 조절할 수 있다. 또한, l-시스테인은 MDSC에 의해 격리될 수 있다. 이러한 분자들은 모두 항원 자극 후 T 세포 증식을 조절하는 세포내 신호전달 경로에 영향을 미친다. 또한, MDSC 매개의 면역 억제는 Treg 세포 집단의 팽창, T 세포 증식의 억제 및 T 세포 아폽토시스의 촉진과 관련이 있을 수도 있다.

[0503] 한 구체예에서, 면역조절제는 레날리도마이드이다.

[0504] 다른 구체예들에서, 면역조절제는 종양 특이적 항원에 대한 면역 반응을 활성화시키고, 예컨대 이것은 백신(예컨대, gp100, MUC1 또는 MAGEA3과 같은 표적에 대한 백신)이다.

[0505] 다른 구체예들에서, 면역조절제는 사이토킨, 예컨대 GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 또는 IL-21 중 하나 이상으로부터 선택된 재조합 사이토킨이다.

[0506] 다른 구체예들에서, 면역조절제는 자가 T 세포, 예컨대 종양 표적화된 세포외 및 세포내 종양 특이적 항원(예, CAR T 세포 또는 TCR T 세포)이다.

[0507] 또 다른 구체예들에서, 면역조절제는 아미노산 이화작용, 종양 유래 세포외 ATP의 신호전달, 아데노신 신호전달, 아데노신 생산, 케모킨 및 케모킨 수용체, 이종 유기체의 인식 또는 키나제 신호전달 활성과 관련된 성분(예, 효소 또는 수용체)의 조절인자이다. 예시적 제제로는 IDO, COX2, ARG1, ArG2, iNOS 또는 포스포디에스터라제(예, PDE5)의 억제제(예컨대, 소분자 억제제); TLR 작용물질 또는 케모킨 길항물질을 포함한다. 예시적

IDO 억제제는 INCB24360, 1-메틸 트립토판 억제제 및 NLG919를 포함한다. 예시적 ARG1/ARG2 억제제는 화합물 9, NCX-4016, 및 AT38을 포함한다. 예시적 PDE5 억제제는 Tadalafil을 포함한다. 종양 세포외 ATP를 조절하는 예시적 제제로는 P2X7의 작용물질 또는 길항물질, 및 $P2Y_{11}$의 길항물질을 포함한다. 아데노신 신호전달을 조절하는 예시적 제제로는 A_{2A} 수용체의 길항물질(예, SCH58261 및 SCH420814), 및 A_{2B} 수용체의 길항물질(예, PSB1115)를 포함한다. 케모킨 및 케모킨 수용체의 조절인자, 예컨대 CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR2 및 CCR5는 비제한적으로 CXCR2 특이적 항체, Plerixafor, PF-4136309 및 Maraviroc을 포함한다. TLR의 조절인자, 예컨대 TLR4(예, OM-174, TLR4 작용물질), TLR7(예, Imiquimod, 852A, TLR7/8 작용물질), TLR8(예, VTX-2337, TLR8 작용물질) 및 TLR9(예, IMO-2055, TLR9 작용물질). 예시적인 키나제 억제제는 비제한적으로 ALK, BRAF, RON, CSF1, PI3K-델타 및 PI3K 감마의 억제제를 포함한다.

[0508] 면역조절제의 또 다른 예는 예컨대 본원에 참고인용된 Adams JL(2015) 및 Serafini P(2008)에 추가 설명되어 있다.

[0509] **암 살상 T 세포의 평가**

[0510] 본원에 기술된 방법에 따르면, 구체예들에서 암 살상 T 세포(예컨대, 암 살상 T 세포의 제조물, 예컨대 선택, 정제, 농축 및/또는 팽창된 세포)는 다수의 방식으로 특성화 또는 평가될 수 있다.

[0511] 예컨대, 암 살상 T 세포는 예컨대 단일클론 항체와 같은 항체의 패널을 이용하여, 다양한 암 세포 및/또는 작동체 T 세포 마커의 발현에 대해 특성화될 수 있다. 구체예들에서, 세포는 다른 면역 체크포인트 분자(예, 본원에 기술된 면역 체크포인트 분자) 중에서 PD-1 및 TIM-3과 같은 마커의 발현을 특징으로 한다. 구체예들에서, 세포 상에 PD-1 및/또는 TIM-3 발현의 존재는 암 살상 T 세포가 더욱 종양 면역반응성인 것을 나타낼 수 있다.

[0512] 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 예컨대 시험관내 또는 생체외에서, 암 세포에 대한 반응성에 대해 평가될 수 있다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 예컨대 시험관내 또는 생체외에서, 암 세포에 대한 반응성은 암 살상 T 세포가 생체내에서 암 세포를 살상하는데 얼마나 효과적인지의 척도인 것으로 생각된다. 구체예들에서, 암 세포에 대한 반응성은 암 살상 T 세포를 암 세포, 예컨대 암 유래 세포주 또는 원발성 암 샘플과 접촉시켜 평가할 수 있다.

[0513] 구체예들에서, 원발성 암 샘플은 피검체의 혈액학적 악성종양으로부터 분리된, 예컨대 혈액학적 악성종양을 가진 피검체의 혈액 샘플(예컨대, 말초혈액 또는 골수)로부터 분리된 세포를 포함한다. 예컨대, 암 살상 T 세포 및 암 세포는 예컨대 소정의 T 세포:암세포 비로 공동배양하여 접촉시킨다. 예시적인 T 세포:암세포 비는 약 1:4 내지 1:100(예컨대, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100 또는 그 이상)을 포함한다. 구체예들에서, 반응성은 공동배양 후 1 내지 36 시간의 시간 기간 동안 평가될 수 있다(예컨대, 1 내지 36시간, 1 내지 6시간, 6 내지 12시간, 12 내지 24시간 또는 24 내지 36시간). 반응성은 세포에 의해 방출된 인터페론-감마의 양 및/또는 4-1BB를 발현하는 T 세포의 퍼센트를 정량하여 평가할 수 있다. 구체예들에서, 대조 수준 대비 더 높은 수준의 인터페론-감마 및/또는 4-1BB는 암 살상 T 세포가 암 세포에 반응성인 것을 나타낸다. 대안적으로, 특정 종양 계열에 대한 마커, 예컨대 비제한적으로 CD107a, 그랜자임(granzyme) B, 퍼포린 및 다른 특정 계열의 종양 마커들이 평가될 수 있다.

[0514] 다른 구체예들에서, 반응성은 암 살상 T 세포와 공동배양하기 전에, 먼저 암 세포를 마커(예컨대, 방사능 마커, 예컨대 ^{51}Cr, 형광 마커 또는 다른 분자)로 표지화하여 평가한다. 표지화된 암 세포와 암 살상 T 세포의 공동배양 후, 배지로 방출된 마커(예컨대, 암 세포 용해 정도의 지표인자)의 양은 암 세포 사망 정도의 척도이다. 방사능 마커, 예컨대 ^{51}Cr의 양은 방사능을 검출 및 정량하는 임의의 방법을 사용하여 정량할 수 있다. 형광 마커의 양은 형광을 검출 및 정량하는 임의의 방법을 사용하여 정량할 수 있다. 또한, 마커, 예컨대 형광 마커 또는 다른 분자의 양은 항체 기반 분석법(예, ELISA)을 사용하여 정량할 수도 있다. 구체예들에서, 대조 수준 대비 암 세포로부터 방출 마커의 더 높은 수준은 암 살상 T 세포가 암 세포에 반응성인 것을 나타낸다.

[0515] 구체예들에서, 대조 수준은 암 살상 T 세포의 부재, 암 세포의 부재 또는 표지된 암 세포의 부재 하의 유사 분석법에서 생성된 마커 및/또는 인터페론 감마 및/또는 4-1BB의 수준일 수 있다.

[0516] 또한, 본 발명은 세포 표면 표지화를 이용하여 암 살상 T 세포의 삼투적립을 측정하는 방법도 제공한다. 암 살상 T 세포의 삼투적립의 측정은 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 생산된 암 살상 T 세포의 선택, 특성화 및 평가에 유용할 수 있다. 또한, 삼투적립을 측정하는 분석법은 선별 분석법에도 유용할 수 있다.

[0517] 구체예들에서, 삼투적립은 1) 암 세포를 세포 표면 표지, 예컨대 형광 표지화된 항체 또는 이의 단편, 또는 세포 추적자 염료와 접촉시켜 암 세포를 표지화하는 단계; 2) 표지화된 암 세포와 T 세포를 접촉시키는 단계; 및 3) 암 세포 유래의 세포 표면 표지가 혼입된 T 세포를 결정하여 삼투적립을 측정하는 단계에 의해 평가된다. 한 구체예에서, 세포 표면 표지는 표적 항원, 예컨대 암세포 표면 마커에 특이적으로 결합하는 형광 표지된 항체 또는 이의 단편이다. 한 구체예에서, 세포 표면 표지는 세포막 전반에 비특이적으로 확산하고(하거나) 세포막 내에 분포하는 세포 추적자 염료이다.

[0518] 형광 표지된 항체와 세포 추적자 염료 간의 차이는 도 2에 도시된다: 형광 표지된 항체는 세포 표면에서 발현된 특정 항원, 예컨대 세포 표면 마커에 결합하고, 반면 세포 추적자 염료는 세포의 표면막 전체를 훨씬 덜 선택적으로, 본질적으로 비특이적으로 표지화하여 세포막 전체에 분포한다.

[0519] 구체예들에서, 삼투적립이 일어날 때에는 T 세포가 이의 독성 인자를 암 내로 삽입하기 전에, 세포 간에 생성된 면역 시냅스에서 암 살상 T 세포와 표적 암 세포 간의 세포막 표면이 광범위하게 접촉한다. 도 3은 T 세포가 이의 촉수를 문어처럼 신장시켜 암 세포를 포획하는 상기 공정을 묘사한 도면이다. 이러한 접촉은 두 세포를 따라 막의 패치를 수반하는 각 세포 막의 깊은 중첩을 수반한다. 삼투적립에서, T 세포는 이러한 막 패치의 일부를, 이러한 막 패치에 존재하는, 예컨대 형광 표지된 항체 또는 세포 추적자 염료와 같은 임의의 세포 표면 표지와 함께 흡수한다.

[0520] 삼투적립 과정은 도 4에 개략적으로 묘사된다: 상부 패널은 암 세포 상의 특정한 세포 표면 마커를 인식, 예컨대 마커에 결합하는 형광 표지된 항체로의 표지화를 나타내고; 하부 패널은 세포 추적자 염료에 의한 암 세포막의 비특이적 표지화를 나타낸다. 면역 시냅스가 일어나면(도면의 중심), 세포 분리 후 세포독성 T 세포는 자신의 막 표면에서 면역 시냅스의 일부를 형성한 암세포 표면 막의 일부 패치를 갖게 된다.

[0521] 형광 표지된 항체 이용의 장점은 암 세포 유래의 특정 세포 표면 마커가 혼입되어 있는 삼투적립성 T 세포의 식별 및 추적을 포함한다. 하지만, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 몇몇 구체예들에서 형광 표지된 항체의 사용은 삼투적립을 검출할 수 없을 수 있다. 구체예들에서, T 세포에 흡수된 암 세포 형광 항체의 수는 면역 시냅스의 막 패치에 대한 상대적 수에 의존적일 수 있다. 예컨대, 몇몇 구체예들에서, 표적 세포에 존재하는 세포 표면 마커의 밀도 또는 수는 일어날 수 있는 임의의 삼투적립을 검출하기에는 너무 낮고, 예컨대 검출할 수 있는 신호에 대한 표적을 인식하는 표지화된 항체가 충분하지 않거나, 또는 검출될 삼투적립 사건 후 T 세포에 혼입된 표지화된 항체가 충분하지 않다. 다른 예에서, 한 구체예에 따르면, 항체에 결합된 형광크롬은 검출가능한 신호를 충분하게 방출하지 않아서 표지화된 항체 표적의 소량이 암 살상 T 세포에 의해 흡수된 삼투적립 사건에서는 검출될 수 없다. 다른 예에서, 한 구체예에 따르면 세포 표면 마커에 결합된 형광 표지된 항체는 내재화될 수 있어, 결과적으로 형광 신호를 검출가능한 한계 이하로 실질적으로 저하시킬 수 있다.

[0522] 세포 추적자 염료는 수성 매질에 머무르지 않고, 오히려 세포의 소수성 표면막을 통해 분포하는 친지성 또는 양친매성 형광크롬을 포함한다. 따라서, 형광 표지된 항체와 반대로, 세포 추적자 염료가 사용되는 구체예들에서 T 세포에 의해 흡수된 암 세포 막의 임의의 패치는 형광 분자를 운반할 것이고 검출될 수 있다. 고 용량의 세포 추적자 염료가 사용되는 구체예들에서 삼투적립에 의해 T 세포의 세포막에 혼입된 형광 분자의 수는, 특정 암 세포 표적에 대한 형광 표지된 항체의 수보다 더 높고, 예컨대 실질적으로 더 높을 수 있다.

[0523] 세포막을 표지화하는데 있어서 세포 추적자 염료의 비특이적 본성으로 인해, 암세포와 T 세포를 둘 다 함유하는 샘플(예컨대, 본원에 사용된 전체 샘플)에서 세포 추적자 염료의 사용은 암 세포 및 T 세포 모두의 표지화를 유발할 수 있고, 이에 따라 삼투적립 사건의 정확한 측정을 방해할 수 있다. 따라서, 이러한 구체예들에서, 세포 추적자 염료는 오로지 암 세포에, 예컨대 T 세포 또는 암 살상 T 세포의 부재 하의 암 세포에 선택적으로 첨가된다. 세포 추적자 염료가 사용되고 샘플이 암 세포와 T 세포를 함유하는 구체예들에서, 세포 추적자 염료는 샘플에 직접 첨가되지 않는다. 이러한 구체예들에서, 암 세포, T 세포 및 pICF는 암 살상 T 세포를 생성하기 위해 본원에 기술된 조건하에 제공된다. 한 구체예에서, pICF는 암 세포 및 T 세포, 예컨대 암 살상 T 세포로부터 세척될 수 있다. 한 구체예에서, 생성된 암 살상 T 세포가 모든 또는 거의 모든 암 세포를 살상한 후, 표지된 암 세포, 또는 표지된 암 세포의 집단이 갓 생성된 암 살상 T 세포에 첨가될 수 있다. 구체예들에서, 표지된 암 세포 또는 표지된 암 세포 집단은 환자 유래의 암 세포(예컨대, 환자 또는 동결보존 및 해동된 샘플에서 바로 유래되는), 또는 세포 추적자 염료로 표지된 암 세포주 유래의 암 세포일 수 있다. 구체예들에서, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 생성된 암 살상 T 세포와 함께 표지된 암 세포의 첨가는 암 살상 T 세포를 재활성화하고 증식을 유도할 수 있으며, 이에 따라 삼투적립은 세포 추적자 염료에서 방출된 신호를 검출하여 측정할 수 있다. 이 예시적 과정은 도 5에 도시된다.

[0524] 또한, 본 발명은 예컨대 특정 환자에 대해, 가장 효과적인 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포를 선택하는 방법을 제공한다.

[0525] 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물이 예컨대 입양 세포 치료제로써 생체내에서 효능성일 가능성에 대해 평가하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 이 방법은 다음과 같은 파라미터 중 하나 이상을 결정하는 단계를 포함한다: 암 세포 살상 활성의 증가, 독성 저하, 비-표적 효과 저하, 생육성 증가 또는 증식 증가. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 암 세포 살상 활성의 증가, 독성 저하, 비-표적 효과 저하, 생육성 증가, 및/또는 증식 증가를 나타내는 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)은 예컨대 입양 세포 치료제로써, 생체내에서 효능적일 가능성이 더 큰 것으로 생각된다.

[0526] 독성이 저하된 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 비병리학적 세포를 훨씬 적게 살상하는 세포이며, 즉 더욱 선택적으로 살상한다. 이는 비병리학적 세포를 표지화하고 기준과 비교할 때 더욱 선택적인 암 세포 살상을 나타내어 측정할 수 있고, 상기 기준은 동일한 암 종류에 대한 다른 환자 샘플이거나, 또는 동일한 환자 샘플(예컨대, 삼투적립성) 내의 다른 세포 서브세트(예컨대, 클론)일 수 있다.

[0527] 세포 치료제에서 관찰되는 가장 일반적인 독성은 사이토킨 캐스캐이드 및 사이토킨과분비증으로도 알려진 사이토킨 스톰(Cytokine Storm)이라 불린다. 이는 암 세포를 세포 용해에 의해 살상하는 과정에서 암 살상 T 세포에 의해 방출된 사이토킨이 세포 외부로 방출되어 다양한 사이토킨의 매우 상승된 수준을 초래할 때 일어나는 잠재적으로 치명적인 면역 반응이다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 사이토킨을 상청액 및/또는 세포내에 더 적게 생성하기 때문에 독성이 저하된 세포를 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 암 세포 살상 단위 당 상청액 및/또는 세포내에 더 적은 사이토킨을 생성하기 때문에, 저하된 독성과 더 높은 암 살상 활성을 둘 다 동시에 보유하는 세포를 포함하고, 즉 일단 방출된 사이토킨의 종류 및/또는 수준은 유효 E:T 비, EC50, Emax, 동역학 또는 이러한 인자들의 조합과 같은 암 세포 살상 활성의 정량적 평가에 의해 정규화된다.

[0528] 구체예들에서, 본 발명은 추가로 암 살상 T 세포(예컨대, 선택, 농축, 정제 및/또는 팽창된 암 살상 T 세포) 또는 이의 제조물의 암 살상 활성을 결정하는 단계를 포함한다. 암 살상 활성은 다음을 포함하는 것과 같은 방법들에 의해 결정될 수 있다:

[0529] (a) 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)를 암 살상 T 세포가 표적 세포를 살상하기에 충분한 조건(예, 일정 시간 동안) 하에 암에서 유래되는 표적 세포와 접촉시키는 단계; 및

[0530] (b) 단계 (a) 후에 표적 세포의 수를 결정하는 단계.

[0531] 구체예들에서, 접촉 단계 전 표적 세포의 수 대비 접촉 단계 후 표적 세포의 수의 감소는 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상하는데 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0532] 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 활성은 T 세포가 분리된 환자와 동일한 환자 유래의 암 세포에 대하여 시험한다. 다른 구체예에서, 암 살상 T 세포의 활성은 다른 환자(즉, T 세포가 분리된 환자 외에 다른 환자), 예컨대 T 세포가 분리된 환자와 같은 종류의 암을 가진 환자 유래의 암 세포에 대하여 시험한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 활성은 T 세포가 분리된 환자에서와 같은 암 종류에서 유래된 세포주에 대하여 시험한다.

[0533] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 단계 (a) 후에 암 살상 T 세포의 수를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 구체예들에서, 접촉 단계 전 암 살상 T 세포 수 대비 암 살상 T 세포 수의 증가는 이 암 살상 T 세포가 증가된 생육성 및/또는 증식을 갖고 암 세포의 살상에 더욱 효과적일 수 있다는 것을 나타낸다.

[0534] 구체예들에서, 평가 및/또는 결정 단계는 본원에 기술된 선택, 농축, 정제 또는 팽창 단계 전 및/또는 후에 수행될 수 있다. 구체예들에서, 생체내에서 더 효능적일 것 같은 것으로 결정된 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)가 팽창된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 추가 팽창은 암 살상 T 세포를 암 세포, 예컨대 암 유래 세포주 또는 원발성 암 샘플과 접촉시켜 달성할 수 있다. 한 구체예에 따르면, 암 세포의 낮은 또는 불충분한 수가 본원에 기술된 바와 같은 암 살상 T 세포에 첨가된다. 한 구체예에서, 암 세포는 암 살상 T 세포에 1회 이상, 예컨대 수회, 예컨대 연속적으로 첨가된다. 한 구체예에서, 암 세포, 예컨대 낮은 수의 암 세포의 각 첨가는 접촉 단계에 사용된 암 세포 전체 또는 일부가 제거될 때, 예컨대 살상될 때 수행한다. 구체예들에서, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 암 세포의 각 첨가는 암 살상 T 세포의 추가 팽창 및/또는 특별한 암 살상 T 세포 클론의 선택적 팽창을 유도한다.

[0535] 몇몇 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물), 예컨대 본원에 기술된 방법에 의해 생산

된 암 살상 T 세포는 하나보다 많은 T 세포 클론을 함유한다. 구체예들에서, 몇몇 클론은 다른 클론들보다 더 높은 암 살상 활성을 가질 수 있다.

[0536] 구체예들에서, 최대 활성(예컨대, 암 세포를 살상하는데 있어서)을 함유하는 암 살상 T 세포 클론이 선택된다. 구체예들에서, 클론은 예컨대 단세포를 서로 분리하기 위해, 한계 희석 또는 유세포분석 방법을 사용하여 분리할 수 있고, 예컨대 별도의 웰에 평판배양할 수 있다. 구체예들에서, 단세포는 각 클론의 집단을 생산하도록 팽창된다. 각 클론은 예컨대 암 살상 활성 및 경우에 따라 본원에 기술된 다른 파라미터를 결정함으로써, 생체내에서 효능적일 가능성에 대해 평가될 수 있다. 구체예들에서, 최고의 암 살상 활성을 나타내는 클론은 추가로 팽창 및/또는 저장된다. 구체예들에서, 가장 활성적인 암 살상 T 세포 클론은, 예컨대 동일한 환자 또는 암 세포주 유래의, 낮은, 예컨대 불충분한 수의 암 세포를, 연속적으로, 예컨대 매번 기존 암 세포가 제거될 때마다 첨가함으로써 선택된다. 구체예들에서, 가장 활성적인 T 세포 클론은 소수의 암 세포를 인식, 예컨대 결합하고 제거하는 최초의 T 세포들 중에 있어서, 가장 활성적인 T 세포 클론의 증식을 우선적으로 유도한다. 따라서, 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 전술한 방법은 T 세포 집단의 가장 활성적인 암 살상 T 세포를 경시적으로 농축시키는 것으로 생각된다. 경우에 따라, 높은 암 살상 활성을 나타내는 복수의 클론들이 함께 수집되어, 예컨대 추가로 팽창 및/또는 저장된다.

[0537] 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)는 T 세포의 단일 클론을 함유한다.

[0538] 구체예들에서, 본원에 기술된 암 살상 T 세포는 우수의약품관리기준(GMP)에 따라 제조된다. 예컨대 암 살상 T 세포의 생산에 사용된, 예컨대 본원에 기술된 생체외 반응 혼합물은 우수의약품관리기준(GMP)에 따라 제조된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 GMP 시스템 또는 시설에 내장되어 있는 자동 유세포분석 플랫폼을 사용하여 제조한다. 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물에 사용된 T 세포, 암 세포 또는 그 둘다는 병원 또는 의료인으로부터 수득된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 팽창, 선택, 정제 및/또는 농축은 우수의약품관리기준(GMP)에 따라 수행된다. 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 추가로 암 살상 T 세포(예컨대, GMP에 의해 생산된)를 병원 또는 의료인에게 전달하는 것을 포함한다.

[0539] **암 살상 T 세포 및 피검체의 반응성 평가**

[0540] 본 발명은 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포를 생산하는 피검체의 효율을 평가하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 암 살상 T 세포에 대한 피검체의 반응성을 평가하는 방법도 제공한다.

[0541] 구체예들에서, 상기 방법들은 (a) 암을 가진 피검체로부터 T 세포를 제공하는 단계; (b) 상기 피검체로부터 암 세포를 제공하는 단계; 및 (c) T 세포, 암 세포 및 pICF를 함유하는 생체외 반응 혼합물을 형성시키고, 예컨대 여기서 생체외 반응 혼합물은 T 세포가 암 세포 유래의 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한, 예컨대 암 세포에 대해 세포독성 활성을 가진 삼투적립성 T 세포를 생산하기에 충분한 조건, 예컨대 일정 시간 동안 형성되는 단계를 포함한다.

[0542] 구체예들에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제, 및 생성된 T 세포의 활성은 용량반응곡선을 측정하는 생체외/시험관내 분석을 사용하여 결정하고, 이의 수학적 피팅은 EC50, 유효 E:T 비, Emax 또는 동역학 중 적어도 하나로부터 선택되는 정량적 파라미터들이 활성을 추정할 수 있게 한다. 이러한 파라미터들은 암 살상 T 세포 및 개별 피검체의 반응성을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0543] - T 세포 증식의 EC50은 샘플에 50%의 활성화된 암 살상 T 세포를 발생시키는 pICF의 농도를 결정한다. T 세포 활성화의 EC50은 암 세포 고갈의 EC50과 유사하다.

[0544] - 유효 E:T 비는 암 세포(표적 세포)에 대한 생성된 암 살상 T 세포(유효 T 세포)의 활성을 나타낸다. 높은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료제로써 암 살상 T 세포에 민감한 환자를 예측하고, 낮은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료제로써 상기 암 살상 T 세포에 내성적인 환자를 예측한다.

[0545] - 암 세포의 용량 반응 곡선의 Emax는 주어진 항온처리 시간에 고용량의 pICF에서 살아 있는 암 세포의 퍼센트(%)를 결정한다. 항온처리가 길수록 암 살상 T 세포는 더 많은 암 세포를 살상한다. 활성화된 암 살상 T 세포는 이 T 세포가 환자에게 적당한 단독요법 치료가 되도록 100%의 암 세포를 살상해야 한다. 암 세포 살상이 100%보다 현저히 낮고, 더 긴 항온처리 시간에도 향상되지 않을 때, 살아 있는 암 세포는 내성적이고 치료를 결정하는데 임상적 정보가 될 수 있다. 내성적인 표현형을 퇴화시키기 위해 면역 체크포인트 억제제와 같은 추가 면역조절제의 첨가는 이러한 면역억제를 극복할 수 있고, 이에 따라 내성을 극복할 수 있다.

[0546] 암 살상 T 세포 활성의 시간 의존적 동역학. T 세포 활성화 및 암 세포 고갈의 효율은 각 피검체에서 동일한

pICF에 대해 다르다. 암 세포를 더 빠르게 살상하는 암 살상 T 세포가 세포 치료법에서 더욱 효능적일 가능성이 있다. 더 빠른 활성은 더 높은 민감성을 반영하는 양성 결과인, 환자의 암 세포에 대한 더 빠른 효과와 관련이 있다. 또한, 더 빠른 활성은 암 살상 T 세포가 MHC-I 기전을 통해 암 세포를 인식하는 CD8+ 종양 특이적 항원 T 세포일 때 암 세포에 대한 더 높은 친화성을 의미한다.

[0547] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 반응 혼합물에서 삼투적립성 T 세포를 식별하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 반응 혼합물에서 삼투적립성 T 세포를 정량하는 단계를 포함한다. 식별 및/또는 정량은 암 세포로부터 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 식별을 수반할 수 있다. 또한, 또는 대안적으로. 식별 및/또는 정량은 CTL, 예컨대 작동체 기억 CTL의 하나 이상의 마커를 발현하는 세포의 식별을 수반한다. CTL 마커의 식별 및/또는 정량은 표지된 항체 분자(예컨대, 형광 표지 또는 방사능 표지된 항체 분자)를 사용하여 수행할 수 있다. 구체예들에서, 삼투적립 마커의 식별 및/또는 정량은 또한 표적 세포 막 내에 또는 막 전반에 분포하는 형광 세포 추적자 염료와 같은 세포 표면 표지를 사용하여 수행할 수도 있다. 이러한 구체예들에서, 세포 표면 표지, 예컨대 세포 추적자 염료는 삼투적립성 T 세포를 생성하기 위한 반응물, 예컨대 암 세포, T 세포 및 pICF를 함유하는 반응물에서 암 살상 T 세포가 아닌 암 세포에 첨가된다. 몇몇 예에서, 반응 혼합물내 세포들에서 마커의 발현을 식별하는(그리고 경우에 따라 정량하는) 데에는 유세포분석이 사용될 수 있다. 구체예들에서, 유세포분석은 특별한 발현 패턴, 예컨대 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포)를 나타내는 발현 패턴을 가진 세포의 수를 정량하는데 사용될 수 있다. 구체예들에서, 피검체 유래의 성분들(예컨대, T 세포 및 암 세포)을 사용하여 생성된 삼투적립성 T 세포의 더 높은 수(예컨대, 기준 수준 대비)는 피검체가 암 살상 T 세포, 예컨대 삼투적립성 T 세포를 생산할 수 있다는 것을 나타낸다. 구체예들에서, 피검체 유래의 성분들(예, T 세포 및 암 세포)을 사용하여 생성한 삼투적립성 T 세포의 더 높은 수(예컨대, 기준 수준 대비)는 피검체가 암 살상 T 세포를 함유하는 치료, 예컨대 입양 세포 치료에 반응성이라는 것을 나타낸다. 구체예들에서, 기준 수준은 T 세포, 암 세포 또는 pICF 중 하나 이상의 부재하에 유사 반응 혼합물에서 생성된 암 살상 T 세포(예컨대, 삼투적립성 T 세포)의 수일 수 있다. 예컨대, 기준 수준은 pICF의 부재하에 유사 반응 혼합물에서 생성된 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)의 수일 수 있다. 다른 구체예들에서, 기준 수준은 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에 불충분한 시간 기간 후 생체외 반응 혼합물에서 생성된 암 살상 T 세포(예, 삼투적립성 T 세포)의 수이다.

[0548] 구체예들에서, 암 세포 사망을 초래하는 암 살상 T 세포 대 표적 세포(예, 암 세포)의 비는 암 살상 T 세포에 대한 피검체 반응성의 지표인자일 수 있다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 더 높은 표적 세포:암 살상 T 세포 비는 더 활성화된(예컨대, 삼투적립) T 세포가 생산(예컨대, 본원에 기술된 방법을 사용하여)된 것을 나타낼 수 있고, 결과적으로 피검체가 상기 암 살상 T 세포에 더 우수한 반응자(및 아마도 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용된 pICF에 대한 더 우수한 반응자)인 것을 나타낼 수 있는 것으로 생각된다.

[0549] **약학 조성물 및 치료 방법**

[0550] 본원에 개시된 약학 조성물은 암 살상 T 세포를 포함할 수 있고, 예컨대 비제한적으로 본원에 기술된 바와 같은 작동체 기억 T 세포, 세포독성 T 림프구(CTL), 헬퍼 T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL) 및 삼투적립성 T 세포 또는 이의 제조물을 비롯한 활성화된 종양 항원 특이적 T 세포를, 하나 이상의 생리학적 또는 약학적 허용성 운반체, 희석제 또는 부형제와 함께 함유할 수 있다. 예컨대, 약학 조성물은 완충액(예, 중성 완충화된 식염수, 인산염 완충화된 식염수; 폴리펩타이드/아미노산(예, 글리신); 항응고제(예, 헤파린); 단백질; 항산화제; 탄수화물(예, 글루코오스, 만노스, 수크로오스 또는 덱스트란, 만니톨); 보조제(예, 수산화알루미늄); 킬레이트화제(예, EDTA 또는 글루타치온); 및/또는 보존제를 포함할 수 있다. 구체예들에서, 약학 조성물은 오염물질, 예컨대 미코플라즈마, 내독소, 렌티바이러스 또는 이의 성분들, 자성 비드, 세균, 진균, 소혈청 알부민, 소혈청, 및/또는 플라스미드 또는 벡터 성분이 실질적으로 없다. 구체예들에서, 약학 조성물은 우수의약품관리기준(GMP)에 따라 제조된 암 살상 T 세포를 함유한다.

[0551] 구체예들에서, 약학 조성물은 정제된 제조물이다. 예컨대 약학 조성물은 오염물질이 실질적으로 없고, 예컨대 검출가능한 수준의 오염물질이 없다. 구체예들에서, 오염물질은 내독소, 미코플라즈마, p24, VSVG 핵산, HIV gag, 복제 컴피턴트 렌티바이러스(RCL), 잔존 pICF, 항체, 소혈청알부민, 소혈청, 저장된 인간 혈청, 배양 배지 성분, 벡터 패키징 세포 또는 플라스미드 성분, 세균 또는 진균을 포함한다. 한 구체예에서, 세균은 알칼리제네스 페컬리스(*Alcaligenes faecalis*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 에세리치아 콜리(*Escherichia coli*), 헤모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenza*), 나이제리아 메닝기티디스(*Neisseria meningiides*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumonia*), 및 스트렙토코커스 피오제게스(*Streptococcus pyogenes*) 그룹 A

로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 적어도 하나의 세균이다.

[0552] 특정 구체예들에서, 약학 조성물은 검출가능한(예, 미량) 양의 pICF, 예컨대 본원에 기술된 pICF를 함유한다. 구체예들에서, pICF는 10 중량% 미만, 예컨대 중량 기준으로 10% 미만, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01% 이하의 농도로 존재한다(예컨대, 하지만 0.0001 중량% 이상이다).

[0553] 특정 구체예들에서, 약학 조성물은 검출가능한(예, 미량)의 세포 표면 표지, 예컨대 형광 세포 표면 표지, 예컨대 항체 세포 표면 표지 또는 본원에 기술된 세포 추적자 염료를 포함한다. 구체예들에서, 세포 표면 표지, 예컨대 형광 세포 표면 표지는 10중량% 미만, 예컨대 중량 기준으로 10% 미만, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01% 이하(예컨대, 0.0001 중량% 이상이다)의 농도로 존재한다.

[0554] 구체예들에서, 약학 조성물은 본원에 기술된 방법을 사용하여 제조한 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)를 함유한다.

[0555] 본원에 기술된 방법은 본원에 기술된 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물)를 사용하여, 예컨대 본원에 기술된 약학 조성물을 사용하여 피검체의 암을 치료하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명은 암의 성장을 억제하는 방법 및/또는 하나 이상의 암 세포를 살상하는 방법뿐만 아니라 피검체의 암 증상을 감소 또는 경감시키는 방법도 제공한다. 구체예들에서, 본원에 기술된 방법은 본원에 기술된 암 살상 T 세포 또는 본원에 기술된 약학 조성물이 투여된 피검체에서 종양 크기를 감소시키고(감소시키거나) 암 세포 수를 감소시킨다.

[0556] 구체예들에서, 암은 혈액 암이다. 구체예들에서, 혈액 암은 백혈병 또는 림프종이다. 예시적인 혈액 암은 비제한적으로 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종(예컨대, B 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 외투세포 림프종, 변연구역 B 세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포 림프종, 모상 세포 백혈병), 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상 증후군, 다발성 골수종, 또는 급성 림프구성 백혈병을 포함한다. 구체예들에서, 암은 급성 골수성 백혈병(AML) 이외에 다른 것이다.

[0557] 구체예들에서, 암은 고형암이다. 예시적인 고형암은 비제한적으로 난소암, 직장암, 위암, 고환암, 항문 부위암, 자궁암, 결장암, 직장암, 신장 세포 암종, 간암, 폐의 비-소세포 암종, 소장 암, 식도암, 흑색종, 카포시 육종, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선 암, 부신암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 악성 흑색종, 자궁암, 뇌줄기 신경아교종, 뇌하수체 선암, 표피모양 암, 자궁경부 편평세포 암의 암종, 난관 암종, 자궁내막 암종, 질 암종, 연조직 육종, 요도암, 외음부 암종, 음경암, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우 암종, 척추 종양, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 상기 암들의 전이 병변, 또는 상기 암의 조합을 포함한다.

[0558] 구체예들에서, 암은 흑색종이 아니다.

[0559] 구체예들에서, 암 살상 T 세포에 의해 치료되는 피검체는 암 살상 T 세포의 생산을 위해 T 세포 및/또는 암 세포가 분리된 피검체와 동일하다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포에 의해 치료되는 피검체는 암 살상 T 세포의 생산을 위해 T 세포 및/또는 암 세포가 분리된 피검체와 다르다. 구체예들에서, 두 피검체는 동일한 종류의 암을 갖고 있거나 갖고 있었다.

[0560] 구체예들에서, 암 살상 T 세포(또는 약학 조성물)는 치료하거나 예방하려는 질병에 적당한 방식으로 투여된다. 투여 양 및 빈도는 환자의 상태 및 환자 질병의 종류 및 중증도와 같은 요인들에 의해 결정될 것이다. 적당한 투여량은 임상 시도들에 의해 결정될 수 있다. 예컨대, "유효량" 또는 "치료량"이 표시될 때, 투여되는 약학 조성물(또는 암 살상 T 세포)의 정확한 양은 피검체의 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 연령, 체중 및 상태의 개인적 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중, 예컨대 이 범위들 내의 모든 정수 값을 포함하는 투여량으로 투여될 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 상기 투여량들로 수회 투여될 수 있다. 구체예들에서, 본원에 기술된 약학 조성물은 면역요법(예컨대, Rosenberg SA(1988) 참조)에 기술된 주입 기술을 사용하여 투여할 수 있다.

[0561] 구체예들에서, 암 살상 T 세포(또는 이의 제조물) 또는 약학 조성물은 피검체에게 비경구적으로 투여된다. 구체예들에서, 세포는 피검체에게 정맥내, 피하, 종양내, 절내(intranodally), 근육내, 피내, 또는 복강내로 투여된다. 구체예들에서, 세포는 종양 또는 림프절에 직접 투여, 예컨대 주사된다. 구체예들에서, 세포는 주입(예컨대, Rosenberg SA(1988)에 기술됨) 또는 정맥내 푸시(push)로 투여된다. 구체예들에서, 세포는 주사가능한 데포(depot) 포뮬레이션으로써 투여된다.

[0562] 구체예들에서, 암 살상 T 세포(또는 약학 조성물)는 단일 용량이 피검체에게 투여된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포는 복수 용량이 피검체에게 투여된다. 구체예들에서, 각 용량 사이의 시간 기간은 적어도 12시간, 예컨대 적어도 12, 24, 36, 48, 72, 96h 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4주 이상이다.

[0563] 구체예들에서, 단일 용량은 10^3 내지 10^{11} 암 살상 T 세포(예컨대, 10^3 내지 10^4, 10^4 내지 10^5, 10^5 내지 10^6, 10^6 내지 10^7, 10^7 내지 10^8, 10^8 내지 10^9, 10^9 내지 10^{10}, 또는 10^{10} 내지 10^{11} 암 살상 T 세포)를 함유한다.

[0564] 구체예들에서, 복수 용량 처방의 각 용량은 10^3 내지 10^{11} 암 살상 T 세포(예컨대, 10^3 내지 10^4, 10^4 내지 10^5, 10^5 내지 10^6, 10^6 내지 10^7, 10^7 내지 10^8, 10^8 내지 10^9, 10^9 내지 10^{10}, 또는 10^{10} 내지 10^{11} 암 살상 T 세포)를 함유한다.

[0565] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물(또는 약학 조성물)은 피검체에 있는 암 세포의 수 또는 퍼센트를 감소시키고, 예컨대 음성 대조군 대비 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 감소시킨다.

[0566] 구체예들에서, 피검체는 포유동물이다. 구체예들에서, 피검체는 인간, 원숭이, 돼지, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 토끼, 래트 또는 마우스이다. 구체예들에서, 피검체는 인간이다. 구체예들에서, 피검체는 소아 피검체, 예컨대 18세 미만, 예컨대 17세 미만, 16세, 15세, 14세, 13세, 12세, 11세, 10세, 9세, 8세, 7세, 6세, 5세, 4세, 3세, 2세, 1세 이하이다. 구체예들에서, 피검체는 성인, 예컨대 18세 이상, 예컨대 적어도 19세, 20세, 21세, 22세, 23세, 24세, 25세, 25 내지 30세, 30 내지 35세, 35 내지 40세, 40 내지 50세, 50 내지 60세, 60 내지 70세, 70 내지 80세 또는 80 내지 90세이다.

[0567] **병용 치료**

[0568] 본원에 기술된 방법에 따라, 몇몇 구체예들에서, 본원에 기술된 작동체 T 세포, 예컨대 본원에 기술된 작동체 T 세포 집단(예컨대, 삼투적립성 T 세포)은 제2 치료제 또는 절차와 함께 사용될 수 있다.

[0569] 구체예들에서, 작동체 T 세포 및 제2 치료제 또는 제2 치료 절차는 피검체가 암 진단을 받은 후, 예컨대 피검체로부터 암이 제거되기 전에 투여되고/수행된다. 구체예들에서, 작동체 T 세포 및 제2 치료제 또는 제2 치료 절차는 동시에 또는 함께 투여/수행된다. 예컨대, 한가지 치료의 전달은 제2 치료 전달이 개시될 때에도 여전히 일어나고 있고, 예컨대 치료제 투여가 중복된다. 다른 구체예들에서, 작동체 T 세포 및 제2 치료제 또는 제2 치료 절차는 연속적으로 투여/수행된다. 예컨대, 하나의 치료 전달은 다른 치료 전달이 개시되기 전에 중단된다.

[0570] 구체예들에서, 병용 치료는 더욱 효과적인 치료, 예컨대 암 세포의 더욱 효과적인 살상을 초래한다. 구체예들에서, 제1 치료와 제2 치료의 병용은 제1 치료 또는 제2 치료 단독보다 더욱 효과적이다(예컨대, 증상 및/또는 암 세포의 더 큰 감소를 초래한다). 구체예들에서, 병용 치료는 보통 단독요법으로 투여되었을 때와 유사한 효과를 달성하는데 필요한 제1 또는 제2 치료의 용량에 비해 더 낮은 용량의 제1 또는 제2 치료를 사용할 수 있게 한다. 구체예들에서, 병용 치료는 부분적인 추가 효과, 완전한 추가 효과 또는 추가 효과 그 이상을 나타낸다.

[0571] 구체예들에서, 제2 치료제 또는 제2 치료 절차는 본원의 "T 세포 활성을 향상시키는 다른 방법" 단원에 기술된 치료를 포함한다. 구체예들에서, 제2 치료제는 면역 체크포인트 억제제(예, 본원에 기술된 면역 체크포인트 억제제), T 세포 작용물질(예, 본원에 기술된 T 세포의 작용물질), 및/또는 본원에 기술된 다른 면역조절 약물(예, 레날리도마이드)을 포함한다.

[0572] **신규 pICF 및 면역조절제에 대한 선별 분석**

[0573] 본 발명은 후보 pICF 및/또는 후보 면역조절제를 선별하는 방법을 제공한다. 예컨대, 상기 방법은 pICF의 효능, 예컨대 생체외 효능을 평가하는 단계를 수반한다. 본원에서 방법은 복수의 pICF 및/또는 면역조절제 후보 및 이의 조합을 선별하여 특정 환자의 특정 종양/암 종류에 대해 가장 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제의 세트를 식별하는 것을 포함한다.

[0574] 구체예들에서, 상기 방법들은 세포 기반 분석을 포함하고, 예컨대 ExviTech 플랫폼을 이용한, 예컨대 유세포분석에 의한 자동 샘플 제조 및 자동 평가를 수반할 수 있다. 예컨대, 본원에 참고인용된 US 8,703,491, US 2013/0109101A1, US 2010/0298255A1, US 8,313,948 및 Bennett TA(2014) 참조. 예컨대, 자동 플랫폼, 예컨대 자동 유세포분석 플랫폼의 사용은 수백개 또는 수천개의 다른 pICF 및/또는 면역조절제를 평가할 수 있게 하고,

이 평가는 생체외에서 이루어질 수 있다. 유세포분석 방법의 사용은 개별 세포의 평가 및 또한 특정 세포 집단의 분류를 가능하게 한다. 면역 세포는 세포 종류 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 항체로 염색될 수 있다. 표적 암 세포는 세포 표면 표지, 예컨대 세포 종류 특이적 세포 표면 마커에 결합하는 항체 또는 표적 세포 막에 분포하는 세포 추적자 염료로 염색될 수 있다. 또한, 세포는 세포 내부에 존재하는 분자에도 염색될 수 있어, 인터루킨 또는 인터페론과 같은 단백질의 생산에 의한 세포의 특성화가 가능해진다.

[0575] 구체예들에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 자동 유세포분석 플랫폼, 예컨대 ExviTech 플랫폼을 사용하여 선별할 수 있다. 예컨대, 상기 동일 문헌 참조. 이 플랫폼은 수백 또는 수천개의 pICF 및/또는 면역조절제의 암 살상(예컨대, 삼투적립) 효율을 결정할 수 있게 한다. 또한, pICF 및/또는 면역조절제의 암 살상 효율은 본원에 기술된 바와 같은 표적 암 세포 대 암 살상 T 세포의 비에 의해 측정될 수도 있다. 또한, 이 플랫폼은 pICF 및/또는 면역조절제의 많은 조합을 선별할 수 있게 한다.

[0576] 구체예들에서, 선별 방법은 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제를 암 세포 및 T 세포와 항온처리하는 것을 포함한다. 구체예들에서, 이 방법은 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제를 샘플, 예컨대 혈액 샘플과 항온처리하는 것을 포함하고, 여기서 혈액 샘플은 암 세포와 T 세포를 둘다 함유한다. 구체예들에서, 상기 방법은 하나 이상의 후보 pICF 및/또는 면역조절제를 종양 샘플과 항온처리하는 것을 포함하고, 이때 종양 샘플은 암 세포와 T 세포를 둘다 함유한다. 다른 구체예들에서, 암 세포 및 T 세포는 다른 샘플에서 유래하고, 예컨대 암 세포는 종양 샘플에서, T 세포는 혈액 샘플에서 유래하는 것이다.

[0577] 구체예들에서, 샘플은 혈액 샘플, 예컨대 전혈액 샘플, 말초혈액 또는 골수를 포함한다. 다른 구체예에서, 샘플은 림프절 또는 비장에서 수득된다. 구체예들에서, 샘플은 악성종양, 예컨대 혈액학적 악성종양 또는 고형암에 연루된 임의의 다른 조직에서 수득된다. 구체예들에서, 샘플은 이 샘플이 수득된 직후에 본원에 기술된 방법에 사용된다. 대안적으로, 샘플은 응고를 피하기 위해 화학물질로 처리될 수 있고, 나중에 분석될 수 있다. 한 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 헤파린으로 처리된다. 다른 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 EDTA로 처리된다. 다른 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 항응고제, 예컨대 비제한적으로 트롬빈 억제제로 처리된다. 구체예들에서, 샘플은 정제 또는 분리 단계 없이 사용되어, 예컨대 세포 환경이 생체내 환경에 더 유사하다.

[0578] 구체예들에서, 항온처리 시간은 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에, 예컨대 삼투적립을 겪어, 예컨대 암 세포를 살상하는, 삼투적립성 T 세포를 형성하기에 충분한 시간이다. 구체예들에서, 항온처리 시간은 pICF 및/또는 면역조절제가, 제거된 암 세포와 CD8 및/또는 CD4 활성화된 T 세포 간에 훨씬 높은 유효 E:T 비를 유도하기에 충분한 시간이다. 구체예들에서, 항온처리 시간은 적어도 12시간(예컨대, 적어도 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120h 또는 그 이상)이다. 구체예들에서, 암 세포, T 세포 및 pICF의 제1 반응 혼합물이 생체외에서 암 살상 T 세포를 생성한 후, 제2 세트 또는 후속 세트의 암 세포가 첨가되고, 이 경우 항온처리 시간은 더 짧아서, 예컨대 적어도 1시간(예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24h 또는 그 이상)이다.

[0579] 수백개 또는 수천개의 후보 pICF 및/또는 면역조절제가 평가 또는 선별될 수 있다. 본원에 기술된 방법은 다수의 후보 pICF 및/또는 면역조절제(예컨대, 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 조합)를 개별적 의약 처방(예컨대, 암 살상 T 세포의 개별적 생산 및 사용)을 위해 다수의 변수를 평가하기 위한 일정량의 형태로 다양한 농도에서 분석할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 방법은 약 5 내지 500개의 일정량(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 500 또는 그 이상)(경우에 따라 후보 pICF 및/또는 면역조절제마다), 또는 상기 값들 중 임의의 두 값에 의해 한정된 범위를 분석한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 약 96개 이상의 일정량을 분석한다. 또한, 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 수는 일정량의 수에 따라 달라질 수 있다. 한 구체예에서, 일정량의 수와 다른 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 수는 모두 각각 약 5개 초과(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40) 또는 상기 값들 중 임의의 두 값에 의해 한정된 범위이다. 다른 구체예에서, 일정량의 수 및 다른 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 수는 각각 약 50 초과이다. 다른 구체예에서, 일정량의 수 및 다른 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 수는 둘 다 각각 약 96 초과이다. 다른 구체예에서, 당업계에 공지된 승인된 약물의 활성 성분은 효율적인 pICF 및/또는 면역조절제를 식별하기 위한 본원에 기술된 분석법에서 선별될 수 있다. 이러한 승인된 약물은 사람에게 안전하고 환자에게 투여할 암 살상 T 세포를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0580] 구체예들에서, 선별 방법은 표적 세포(예, 암 세포) 집단을 식별(예컨대, 및 정량)하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가로 선별 방법은 작동 세포 집단(예컨대, 삼투적립성 T 세포 집단)을 식별하는 단계를 포함한다. 세포 집단은 형광 태그와 같은 검출 표지에 대한 접합체와 같은 특정 세포 표면 또는 세포내 마커에 대해

지향성인 항체, 예컨대 단일클론 항체를 사용하여 식별할 수 있다. 구체예들에서, 세포 표면 마커는 혈액학적 악성종양(예, 백혈병, 다발성 골수종, 림프종) 및 백혈구의 식별에 사용되는 분화 클러스(CD) 마커를 포함한다. 또한, CD 마커는 고형암을 식별 및 진단하는 데에도 사용된다. 유세포분석은 세포 집단의 검출 및 정량에 사용될 수 있다. 또한, 세포 표면 표지, 예컨대 세포 추적자 염료는 암 살상 T 세포에 의한 삼투적립을 측정하기 위해 암 세포 표면 막을 표지하는 데에도 사용될 수 있다. 또한, 특정 세포 마커를 검출하고, 예컨대 세포 집단을 식별하기 위해 면역조직화학을 이용할 수도 있다.

[0581] 구체예들에서, 작동 세포(예, T 세포)의 집단(들) 및 아집단(들)에 대한 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 효과가 결정된다. 예컨대, 샘플은 pICF 및/또는 면역조절제와 항온처리 전에 다양한 종류의 T 세포를 함유할 수 있고 pICF 및/또는 면역조절제와 항온처리 후 다양한 T 세포 종류의 다른 조합 또는 다른 수준을 함유할 수 있다. 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제와의 항온처리는 삼투적립성 T 세포의 형성 및/또는 삼투적립성 T 세포 수의 증가를 초래할 수 있다. 구체예들에서, pICF 및/또는 면역조절제와 항온처리 후 삼투적립성이 되는(그리고 작동체 T 세포 및 암 세포 모두의 마커를 발현하는) T 세포의 퍼센트가 측정된다.

[0582] 구체예들에서, 표적 세포(예, 암 세포) 집단에 대한 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 효과가 측정된다. 이 측정은 음성 대조군을 함유하는 웰(들)에 대하여 세포 고갈을 측정하는, 예컨대 pICF 또는 면역조절제를 함유하는 웰(들)의 세포 수를 정량하는 단계를 수반할 수 있다.

[0583] 구체예들에서, 작동 세포(예, 삼투적립성 T 세포) 집단에 대한 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 효과가 측정된다. 이 측정은 pICF 및/또는 면역조절제를 함유하는 웰(들)의 세포 수를 음성 대조군을 함유하는 웰(들)과 비교하는 것과 같은 세포 증식 분석을 수반할 수 있다.

[0584] 구체예들에서, (i) 표적(예, 암) 세포의 고갈; (ii) 삼투적립성 T 세포(예컨대, 암 세포의 마커와 작동체 T 세포, 예컨대 CTL의 마커를 함유하는 것)의 형성 또는 수준 증가, 및/또는 (iii) 작동체 T 세포(예, CTL)의 증식을 초래하는 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제로써, 예컨대 향상된 암 살상 활성을 가진 T 세포를 생성하는데 효과적인 것으로써 식별된다.

[0585] 구체예들에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 본원에 기술된 pICF 및/또는 면역조절제와 같은 기준과 비교하여 평가된다. 구체예들에서, 기준에 비해 표적(예, 암) 세포의 유사하거나 더 큰 고갈을 초래하는 후보 pICF는 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제로써 식별된다. 구체예들에서, 삼투적립성 T 세포(예컨대, 암 세포 유래의 마커 및 작동체 T 세포, 예컨대 CTL의 마커를 함유하는 것)의 유사하거나 또는 더 큰 형성 또는 수준 증가를 초래하는 후보 pICF는 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제로써 식별된다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포의 유사하거나 또는 더 큰 증식 정도를 초래하는 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제로써 식별된다.

[0586] 구체예들에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제, 및 생성된 T 세포의 활성은 수학적 피팅이 EC50, 유효 E:T 비, Emax 또는 동역학 중 적어도 하나로부터 선택되는 정량적 파라미터들로 하여금 활성을 추정할 수 있게 하는 용량반응곡선을 측정하기 위해 생체외/시험관내 분석을 사용하여 결정한다.

[0587] - T 세포 증식의 EC50은 샘플 내 활성화된 암 살상 T 세포의 50%를 발생시키는 pICF의 농도를 결정한다. T 세포 활성화의 EC50은 암 세포 고갈의 EC50과 유사하다.

[0588] - 유효 E:T 비는 암 세포(표적 세포)에 대한 생성된 암 살상 T 세포(유효 T 세포)의 활성을 나타낸다. 높은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료제로써 암 살상 T 세포에 대해 민감한 환자를 예측하고, 낮은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료제로써 상기 암 살상 T 세포에 대해 내성적인 환자를 예측한다.

[0589] - 암 세포의 용량반응곡선의 Emax는 주어진 항온처리 시간에 pICF의 고용량에서 생존하는 암 세포의 퍼센트(%)를 결정한다. 항온처리가 길수록 암 살상 T 세포는 더 많은 암 세포를 살상한다. 활성화된 암 살상 T 세포는 이러한 T 세포가 환자에게 적당한 단독요법 치료가 되도록 100%의 암 세포를 살상해야 한다. 암 세포 살상이 100%보다 현저히 낮고, 이것이 더 긴 항온처리 시간에서도 향상되지 않으면, 살아있는 암 세포는 내성적이고 치료를 결정하는데 임상적 정보가 될 수 있다. 내성 표현형을 퇴화시키기 위해, 면역 체크포인트 억제제와 같은 추가 면역조절제의 첨가는 면역억제를 극복할 수 있고, 이에 따라 상기 내성을 극복할 수 있다.

[0590] 1. 면역억제를 경감시키기 위한 생체외 추가 면역조절제의 첨가는 특히 후속 세포 치료를 위해 생성된 암 살상 T 세포에 의미있는 것이다. 그 이유는 이것이 다중 면역요법을 제한하는 독성 제한으로 인해 2 내지 3개의 면역요법 약물의 조합만이 동시에 피검체에게 생체내 투여될 수 있게 하는 종래 기술에 기술된 병용 치료와는 대조적으로, 복수의 작용 기전을 포함하는 복수의 면역요법제, 면역조절제를 최대 5개, 10개 또는 20개의 제제로 조

합할 수 있게 하기 때문이다. 암 살상 T 세포의 생체외/시험관내 독성을 단독적으로 측정하거나 또는 암세포 살상 활성에 의해 정규화하여 측정하는 본원에 제시된 바와 같은 선별 분석은 조합된 활성을 향상시키면서 조합된 독성을 제한하는, 생체외/시험관내에서 항온처리된 면역치료제의 최적의 조합을 식별하는데 적합할 수 있다. 따라서, 세포 치료를 위해 생체외에서 생성된 암 살상 T 세포는 다중 면역요법의 장점을 활용할 수 있다.

[0591] 2. 병용 치료를 초래하는 추가 면역요법적 치료로써 생체내 암 살상 T 세포에 면역조절제의 첨가. 암 살상 T 세포의 생체외/시험관내 독성을 단독적으로 측정하거나, 또는 암세포 살상 활성에 의해 정규화하여 측정하는 본원에 제시된 바와 같은 선별 분석은 조합된 활성을 향상시키면서 조합된 독성을 제한하여 환자를 치료하는 면역치료제의 최적의 조합을 예측하는데 적합할 수 있다.

[0592] - 암 살상 T 세포 활성의 시간 의존적 동역학. T 세포 활성화 및 암 세포 고갈의 효율은 동일한 pICF에 대해 각 피검체에서 다르다. 암 세포를 더 빠르게 살상하는 암 살상 T 세포는 세포 치료에 더욱 효능적일 가능성이 있다. 더 빠른 활성은 더 높은 민감성을 반영하는 양성 결과인, 환자의 암 세포에 대한 더 빠른 효과와 상관성이 있다. 더 빠른 활성은 암 살상 T 세포가 MHC-1 기전을 통해 암 세포를 인식하는 CD8+ 종양 특이적 항원 T 세포일 때 암 세포에 대한 더 높은 친화성을 의미하기도 한다.

[0593] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 비병리학적 세포를 훨씬 적게 살상, 즉 더욱 선택적으로 살상하기 때문에 생체외/시험관내에서 덜 독성인 세포를 함유한다. 이는 비병리학적 세포를 표지화하고, 동일한 암 종류의 다른 환자 샘플 또는 동일한 환자 샘플(예, 삼투적립성) 내의 다른 세포 서브세트(예, 클론)일 수 있는 기준과 비교했을 때 더욱 선택적인 암 세포 살상을 나타냄으로써 측정할 수 있다.

[0594] 세포 치료에서 관찰된 가장 일반적인 독성은 사이토킨 스톰(Cytokine Storm)이라 불리고, 사이토킨 캐스캐이드 및 사이토킨과분비증으로도 알려져 있다. 이는 암 세포를 세포 용해에 의해 살상하는 과정에서 암 살상 T 세포에 의해 방출된 사이토킨이 세포 외부로 방출되어 매우 상승된 수준의 다양한 사이토킨을 초래할 때 일어나는 잠재적으로 치명적인 면역 반응이다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 사이토킨을 상청액 내에서 및/또는 세포내로 덜 생성하기 때문에 생체외/시험관내에서 독성이 적은 세포를 포함한다. 구체예들에서, 암 살상 T 세포 제조물은 암 세포 살상 단위 당 상청액내에서 및/또는 세포내로 사이토킨을 덜 생성하기 때문에, 생체외/시험관내에서 더 높은 암 살상 활성 및 더 적은 독성을 동시에 둘 다 보유하는 세포를 포함하고, 즉 일단 방출된 사이토킨의 종류 및/또는 수준은 유효 E:T 비, EC50, Emax, 동역학 또는 이러한 인자들의 조합과 같은 암 세포 살상 활성의 정량적 평가에 의해 정규화된다.

[0595] 구체예들에서, 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 효능, 예컨대 효력, 활성은 다른 비율의 암 살상 T 세포 : 표적 세포를 사용한 생체외/시험관내 분석을 이용하여 결정하고, 예컨대 표적 세포는 암 세포일 수 있다. 몇몇 구체예들에서, 분석법은 예컨대, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 제공하는 단계를 수반한다. 구체예들에서, 이 분석법은 추가로 (a) 후보 pICF(들) 및/또는 면역조절제(들), 표적 세포(예, 암 세포), 및 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물을 함유하는 복수의 생체외 반응 혼합물을 암 살상 T 세포가 표적 세포를 살상하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안 및 후보 pICF 및/또는 면역조절제의 특정 농도에서) 하에 형성시키는 단계를 수반한다. 구체예들에서, 생체외 반응 혼합물은 복수의 표적 세포 대 T 세포 비를 함유한다. 이 분석법은 또한 (b) 각 표적 세포 대 T 세포 비마다 단계 (a) 이후 표적 세포의 수를 결정하고, 경우에 따라 단계 (a) 이후 암 살상 T 세포의 수를 결정하는 단계를 수반할 수 있다. 구체예들에서, 이 분석법은 또한 단계 (a) 유래의 표적 세포 대 T 세포 비를 단계 (b) 중의 표적 세포의 수와 상관짓는 단계 (c)를 수반할 수도 있다. 구체예들에서, 단계 (a) 이후 더 적은 표적 세포의 수를 초래하는 단계 (a) 유래의 높은 표적 세포 대 T 세포 비(예컨대, 기준 비보다 높은 비)는 후보 pICF 및/또는 면역조절제가 피검체로부터 암 살상 T 세포를 생산하는데 사용하기에 효과적인 pICF 및/또는 면역조절제(예컨대, 강력한 pICF 및/또는 면역조절제)라는 것을 나타낸다.

[0596] 구체예들에서, 기준 비는 소정의 비, 예컨대 약 1:3 내지 1:10, 예컨대 약 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10이다. 구체예들에서, 단계 (b) 유래의 높은 표적 세포 대 T 세포 비는 약 1:4 내지 1:100(예컨대, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:75, 1:100 또는 그 이상)이다.

[0597] 구체예들에서, 단계 (a) 이후 더 적은 표적 세포는 대조 값과 비교하여 단계 (b)에서의 더 낮은 표적 세포의 수에 의해 나타난다(예컨대, 적어도 1.5배, 예컨대 적어도 2배, 3배, 4배, 6배, 8배, 10배, 25배, 50배, 100배, 150배, 200배, 500배, 1000배 또는 그 이상 더 낮은). 구체예들에서, 대조 값은 생체외 혼합물의 형성 전에 표적 세포의 수 또는 암 살상 T 세포가 표적 세포를 살상하기에 불충분한 시간 기간 후 생체외 혼합물 내의 표적

세포의 수이다. 구체예들에서, 대조 값은 pICF 없이 또는 T 세포 상호작용 암(예, CD3)만을 함유하는 pICF의 널(null) 대조군과 함께 동일한 시간 기간 동안 항온처리된 생체외 혼합물 중의 표적 세포의 수이다.

[0598] 구체예들에서, 암 살상 T 세포 또는 이의 제조물은 CD8+ 및 CD25+인 T 세포, 예컨대 CTL, 및/또는 CD4+ 및 CD25+인 T 세포를 함유한다.

[0599] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, 상기 방법의 단계 (b))은 자동 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 자동 유세포분석 플랫폼, 예컨대 본원에 기술된 ExviTech 플랫폼에서 수행된다.

[0600] 구체예들에서, 유효 후보 pICF 및/또는 면역조절제는 본원에 기술된 방법, 예컨대 본원에 기술된 암 살상 T 세포를 생산하는 방법, 본원에 기술된 치료 방법, 본원에 기술된 암 치료를 평가하는 방법, 및/또는 본원에 기술된 암 살상 T 세포에 반응성인 환자를 식별하는 방법에 사용된다.

[0601] **암 치료들을 위한 평가 분석법**

[0602] 본 발명은 환자가 특정 암 치료에 반응하는지 또는 안하는지를 평가하는 방법을 제공한다. 구체예들에서, 이 평가 방법은 특정 환자에서 효과적일 가능성이 있는 암 치료를 선별하는 방법을 포함한다.

[0603] 구체예들에서, 많은 종류의 암 치료(예, 화학요법, 표적화된 항암 요법, 항암 약물, 세포독성제, 면역 기반 요법, 사이토킨, T 세포의 작용물질(예컨대, 작용물질성 항체 또는 이의 단편 또는 공동자극 분자의 활성인자), 억제 분자의 억제제(예컨대, 면역 체크포인트 억제제), 면역조절제, 백신 또는 세포 면역요법)가 평가될 수 있다. 구체예들에서, 평가되는 암 치료는 비제한적으로 면역 체크포인트 억제제, 예컨대 CTLA4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, TIM3, LAG3, BTLA, CD80, CD86 또는 HVEM 중 하나 이상의 억제제를 포함한다. 예시적인 면역 체크포인트 억제제는 이필리무마브, 트리멜리무마브, MDX-1106, MK3475, CT-011, AMP-224, MDX-1105, IMP321, 또는 MGA271을 포함한다. 구체예들에서, 평가될 암 치료는 T 세포의 작용물질, 예컨대 CD137, CD40 및/또는 글루코코르티코이드-유도 TNF 수용체(GITR)에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 구체예들에서, 평가될 암 치료는 레놀리도마이드와 같은 면역조절제를 포함한다. 본원에 기술된 임의의 면역조절제가 평가될 수 있다.

[0604] 구체예들에서, 평가 방법은 (a) 암(예컨대, 혈액학적 암 또는 고형암)을 가진 피검체로부터 T 세포를 제공하는 단계; (b) 암 세포를, 예컨대 피검체로부터 제공하는 단계; (c) T 세포, 암 세포 및 근접성 면역 코칭 인자(pICF)를 함유하는 생체외 반응 혼합물을, 예컨대 T 세포가 암 세포로부터 세포 표면 마커를 획득하기에 충분한 조건(예컨대, 일정 시간 동안) 하에 형성시키는 단계; 및 (d) 생체외 반응 혼합물을 후보 암 치료 또는 복합 암 치료와 접촉시키는 단계를 포함한다. 또한, 이 방법은 특정 환자의 암 세포를 살상하는데 있어서 후보 암 치료(들)의 효과를 나타내는 하나 이상의 파라미터를 결정하는 단계를 포함한다.

[0605] 예시적인 pICF는 본원의 "근접성 면역 코팅 인자(pICF)" 단원에 상세하게 설명되어 있다.

[0606] 구체예들에서, T 세포 및 암 세포는 동일 샘플에서 유래되고, 예컨대 평가되는(암 치료에 대한 반응성에 대해 평가되는) 환자에서 유래된다. 예컨대, 평가되는 환자 유래의 혈액 샘플(예컨대, 암 세포 및 T 세포 모두 함유)은 샘플로써 제공된다. 대안적으로, 평가되는 환자 유래의 종양 샘플(예컨대, 암 세포 및 T 세포, 예컨대 종양 침윤 T 세포를 모두 함유)이 제공된다. 구체예들에서, 상기 방법은 생체외 반응 혼합물을 형성하기 전에 혈액 샘플 또는 종양 샘플과 같은 샘플로부터 임의의 성분(예, 세포 성분)을 제거하는 단계를 포함하지 않는다. 구체예들에서, 혈액 샘플 또는 종양 샘플은 갓 분리된 샘플 또는 동결 및 해동된 샘플일 수 있다.

[0607] 구체예들에서, 샘플은 혈액 샘플, 예컨대 전혈액 샘플, 말초혈액 또는 골수를 포함한다. 다른 구체예에서, 샘플은 림프절 또는 비장에서 수득된다. 구체예들에서, 샘플은 악성종양, 예컨대 혈액학적 악성종양 또는 고형암에 연루된 임의의 다른 조직에서 수득된다. 구체예들에서, 샘플은 이 샘플이 수득된 직후 본원에 기술된 방법에 사용된다. 대안적으로, 샘플은 응고를 피하기 위해 화학물질로 처리될 수 있고, 나중에 분석될 수 있다. 한 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 헤파린으로 처리된다. 다른 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 EDTA로 처리된다. 다른 구체예에서, 혈액 샘플은 응고를 피하기 위해 항응고제, 예컨대 비제한적으로 트롬빈 억제제로 처리된다. 구체예들에서, 샘플은 정제 또는 분리 단계 없이 사용되어, 예컨대 세포 환경이 생체내 환경에 더욱 유사하다.

[0608] 구체예들에서, 반응 혼합물은 용기, 예컨대 다중웰 접시 또는 평판(예, 마이크로평판, 예컨대 6웰, 12웰, 24웰, 48웰 또는 96웰을 함유하는 것)의 웰, 또는 분석 튜브에서 수행된다.

[0609] 구체예들에서, 상기 방법(예컨대, pICF를 포함하여)은 향상된 암 살상 활성을 가진 삼투적립성 T 세포의 집단을 생성한다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 이러한 향상된 암 살상 T 세포의 집단을 생성함으로써, 이 분

석법은 이러한 암 살상 T 세포를 함유하지 않는 다른 종류의 분석법에서보다 암 치료 효과를 검출하는데 더욱 민감한 것으로 생각된다.

[0610] 구체예들에서, 평가 방법은 높은 처리량 상태에서 수행될 수 있고, 예컨대 특정 환자에 효과적일 가능성이 있는 암 치료들을 선별하는 단계를 수반할 수 있다. 구체예들에서, 선별 방법은 세포 기반 분석법을 포함하고, 자동 샘플 제조 및 예컨대 유세포분석에 의한, 예컨대 ExviTech 플랫폼을 사용한 자동 평가 단계를 수반할 수 있다. 예컨대, 자동 플랫폼, 예컨대 자동 유세포분석 플랫폼의 사용은 수백개 또는 수천개의 다른 암 치료를 평가할 수 있게 하고, 이 평가는 생체외에서 이루어질 수 있다. 구체예들에서, 후보 암 치료는 ExviTech 플랫폼과 같은 자동 유세포분석 플랫폼을 사용하여 선별할 수 있다. 또한, 이 플랫폼은 많은 암 치료 조합들의 선별을 가능하게 한다.

[0611] 수백개 또는 수천개의 후보 암 치료가 샘플화될 수 있다. 본원에 기술된 방법들은 다수의 후보 암 치료(예컨대, 후보 암 치료의 조합)를 다수의 변수를 평가하기 위한 일정량의 형태로 다양한 농도에서 분석할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 방법은 약 5 내지 500개의 일정량(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 500 또는 그 이상)(경우에 따라 암 치료마다), 또는 상기 값들 중 임의의 두 값에 의해 한정된 범위를 분석한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 약 96개 이상의 일정량을 분석한다. 또한, 암 치료의 수는 일정량의 수에 따라 달라질 수 있다. 한 구체예에서, 일정량의 수와 다른 후보 암 치료의 수는 모두 각각 약 5개 이상 내지 40개(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40) 또는 상기 값들 중 임의의 두 값에 의해 한정된 범위이다. 다른 구체예에서, 일정량의 수 및 다른 후보 암 치료의 수는 둘 다 각각 약 50 초과이다. 다른 구체예에서, 일정량의 수 및 다른 후보 암 치료의 수는 둘 다 각각 약 96 초과이다.

[0612] 평가될 환자 유래의 암 세포에 대한 후보 암 치료의 효과는 후보 치료의 부재 대비 후보 치료의 존재하에 일어나는 암 살상의 정도에 의해 결정될 수 있다. 암 살상의 정도는 본원에 기술된 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 구체예들에서, 암 살상 활성은 본원에 기술되고 유효 E:T 비라 지칭한, 제거된 표적 암 세포와 활성화된 T 세포(암 살상 T 세포)간의 유효 E:T 비를 측정하여 결정한다. 예컨대, 암 세포는 예컨대 유세포분석을 사용하여, 암 특이적 세포 마커를 검출하고, 그 다음 정량하여 식별할 수 있다.

[0613] 구체예들에서, 분석법에서 더 큰 암 살상 정도를 초래하는(예컨대, 이전보다 치료 후 더 낮은 암 세포 수 또는 음성 대조군 치료를 함유하는 샘플에 비해 더 낮은 암 세포 수) (예컨대, 적어도 10%(예컨대, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1.5배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 이상) 더 낮은 암 세포 수) 후보 암 치료는 환자가 암 치료에 민감하거나 반응성일 가능성이 있음을, 즉 상기 암 치료(들)가 환자의 암을 치료하는데 있어서 효과적일 가능성이 있음을 나타낸다.

[0614] 구체예들에서, 분석법에서 더 큰 암 살상 정도를 초래하는(예컨대, 이전보다 치료 후 더 낮은 암 세포 수 또는 음성 대조군 치료를 함유하는 샘플에 비해 더 낮은 암 세포 수) (예컨대, 적어도 10%(예컨대, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 1.5배, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 이상) 더 낮은 암 세포 수) 후보 암 치료는 상기 암 치료(들)가 환자의 암을 치료하는데 있어서 효과적일 가능성이 있음을 나타낸다.

[0615] 구체예들에서, 상기 방법은 추가로 다양한 후보 암 치료들에 대한 환자의 반응성의 기록을 제조하고 및/또는 제공하는 단계를 포함한다. 구체예들에서, 이 기록은 환자 또는 다른 사람 또는 실체, 예컨대 보호자, 예컨대 의사, 예컨대 종양학자, 병원, 의료인, 제3자 지불인, 보험 회사 또는 관공서에게 제공된다. 다른 구체예에서, 기록은 암 세포에 대한 후보 암 치료의 효과(예컨대, 암 살상 정도)를 해석 또는 결정하는데 책임이 있는 담당자에게 제공된다.

[0616] 구체예들에서, 기록은 전자 형태, 웹 기반 또는 종이 형태일 수 있다. 기록은 상기 방법, 예컨대 암 세포의 식별, 암 세포의 정량, 및 각 암 치료 또는 암 치료의 조합에 대응하는 암 세포 살상 정도에서 수득되는 결과를 포함할 수 있다.

[0617] 한 구체예에서, 기록은 암 세포 사망의 정도 및 이 효과를 초래하는 관련 암 치료가 밝혀져 있는 것으로, 예컨대 종이 또는 전자 형태로 생성된다.

[0618] 이러한 정보는 잠재적 또는 제안된 암 치료들에 대한 정보를 포함할 수 있다. 기록은 암 치료의 가능한 효과, 암 치료의 허용정도, 또는 환자에게 암 치료의 적용 타당성에 대한 정보를 포함할 수 있다. 예컨대, 기록은 환자에 대한 암 치료의 처방, 예컨대 소정 투여량, 또는 소정 치료 섭생의 처방, 예컨대 다른 약물과의 조합에 대한 정보 또는 추천을 포함할 수 있다. 구체예에서, 이 방법에서 시험된 모든 후보 암 치료가 상기 기록에서 확인되지는 않는다. 예컨대, 기록은 환자에게 효과적일 것 같은 암 치료에 제한될 수 있다. 다른 예들에서, 기록

은 환자에게 효과적일 것 같지 않은 암 치료를 생략할 수 있다. 이 기록은 예컨대 본원에 기술된 실체에게 상기 방법을 수행한 실체가 샘플을 수령한 날로부터 3 내지 21일 이내(예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 14 또는 21일)에 전달할 수 있다.

[0619] **실시예**

[0620] 실시예 1: 다발성 골수종(MM)에서 이중특이적 항체의 효과

[0621] 구체예들에서, 혈액학적 악성종양을 가진 환자로부터 수득한 샘플은 이러한 샘플이 표적(악성) 세포와 작동체(CTL) 세포를 모두 함유하기 때문에, 악성 세포 상의 특정 종양 표적 및 CTL 상의 T 세포 표적(CD3)에 대한 BsMAb의 효과를 시험하는데 유용하다. 골수(BM) 샘플은 다발성 골수종 진단을 받은 환자로부터 수득했다. 모든 샘플은 18세가 넘고 연구 참여에 대한 사전 동의서를 제공한 성인 환자로부터 수득했다.

[0622] 이중특이적 단일클론 항체(BsMAb) 및 대조 항체는 96웰 평판에 첨가했다. 각 BM 샘플은 전체를 배양 배지로 희석하고(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이), BsMAb, 대조 항체 중 어느 하나를 함유하거나 또는 둘 다 함유하지 않는 웰들로 구성된 96웰 평판에 평판배양하고, 모든 조건들은 2반복으로 시험했다. 샘플은 이 샘플에 존재하는 CTL의 증식을 촉진하기 위해 96시간 동안 항온처리했다. 분석 직전에 적혈구를 용해하고, 악성 세포 집단 및 CTL 집단을 정의하는 항체들을 평판에 첨가했다: CD138-PE(Cytognos, Ref: CYT-138PE4, 클론 B-A38)/CD38PerCP(Immnunostep, Ref: 38PP-100T, 클론 GR7A4)/CD45-PB(BD-Pharmingen, Ref: 560367, 클론 30-F11)/Annexin V-FITC(Immnostep, Ref: ANXVF)/CD56-APC(BD-Pharmingen, Ref: 341027, 클론 NCAM16,2)/CD3PE(Cytognos, Ref: CYT-3PE5, 클론 33-2A3)/CD4PB(IMMUNOSTEP, Ref: 4CFB-100T, 클론 HP2/6)/CD8 FITC(Cytognos, Ref: CYT-8F8, 클론 UCHT-4)/CD25 APC(Biolegend, Ref: 302610, 클론 BC96)/CD69 PerCP(Biolegend, Ref: 310928, 클론 FN50). Annexin V-FITC는 아폽토시스 수준을 모니터하기 위해 첨가했다. 평판은 ExviTech 유세포분석 기반의 플랫폼을 사용하여 분석했다. 세포는 전방 산란(FSC), 측방 산란(SSC) 및 CD38, CD138 및 CD56을 비롯한 다양한 표면 마커의 발현을 기반으로 하는 게이팅 전략을 사용하여 식별했다. 생세포의 퍼센트는 BsMAb가 없는 대조 웰 중의 생세포 수와 BsMAb가 있는 웰 중의 생 세포 수를 비교하여 결정했다.

[0623] 도 6은 x축에 나타낸 BsMab(약물)의 다양한 농도와 96시간 항온처리 후 악성 세포 및 CTL의 수를 모두 나타내는 대표 샘플의 그래프를 나타낸다. 악성세포 집단(점선, 사각형)의 감소에 대응하는 CTL(연속 선, 삼각형)의 증식 증가에 있어서 BsMAb 용량 반응 효과가 있었다. 악성 세포 집단의 감소는 아폽토시스와 별개의 기전을 통해 일어났고, 이는 T 세포 용해와 일치하는 비-아폽토시스성 세포사를 암시한다. 악성 세포 또는 T 세포 집단만을 표적으로 하는 대조 mAb는 어떠한 효과도 없었다. 이 샘플의 경우, 기본(BsMAb 없이) E:T 비는 1:2.7이고, 이는 1:6.1인 유효(BsMAb를 가진) E:T 비와 다르다. 이것은 BsMAb의 기능성이 생체외에서 평가될 수 있고, CTL의 증식이 전체 골수 샘플로부터 림프구를 사전 분리해야 할 필요 없이 BsMAb(하나의 암이 항 CD3이다)의 존재하에 전체 골수 샘플에서 촉진되었다는 것을 입증한다.

[0624] 실시예 2 - 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 표적 및 작동 세포에 미치는 BsMAb의 효과

[0625] 이 실시예에서는 표적 및 작동 세포에 대한 BsMAb의 효과를 실시예 1에서 시험된 것과 다른 샘플 종류 및 다른 항온처리 하에 시험했다. CLL 진단을 받은 환자 유래의 말초혈액(PB) 샘플을 사용했다. 모든 샘플은 연구 참여의 사전 동의서를 받은 18세 이상의 성인 환자에서 수득했다.

[0626] 악성 세포 상의 CD19 및 CTL 상의 CD3을 표적으로 하는 BsMAb 뿐만 아니라 대조 항체를 96웰 평판에 첨가했다. 각 PB 샘플은 전체를 배양 배지로 희석하고(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이), BsMAb, 대조 항체 중 어느 하나를 함유하거나 또는 둘 다 함유하지 않는 웰들로 구성된 96웰 평판에 평판배양하고, 모든 조건들은 2반복으로 시험했다. 샘플은 이 샘플에 존재하는 CTL의 증식을 촉진하기 위해 144시간 동안 항온처리했다. 분석 직전에 적혈구를 용해하고, 악성 세포 집단 및 CTL 집단을 정의하는 항체들을 평판에 첨가했다: 각 생세포 집단에 대한 CD3/CD19 BsMAb의 효과를 결정하기 위해 8색 패널을 사용했다: CD3PB(BD-Pharmingen, Ref:558117, 클론 UCHT1) / CD45-PO(Invitrogen, Ref: MHCD4530, 클론 HI30) / Annexin V-FITC(Immunostep, Ref: ANXVF) / CD19-PE (Ebioscience, Ref: 12-0199-42, 클론 HIB19) / CD4-PECY5 (Biolegend, Ref: 317412, 클론 OKT4) / CD5-PECY7 (Biolegend, Ref: 300622, 클론 UCHT2) / CD8 APC (BD, Ref: 555369, 클론 RPA-T8) /CD25 APCH7 (BD-Pharmingen, Ref: 560225, 클론 M-A251). Annexin V-FITC는 아폽토시스 수준을 모니터하고 생세포 수를 전부 정량하기 위해 첨가했다. 생 백혈병 B 세포(CD45+CD19+, 사각형)의 수 및 생 CTL(CD8+CD25+, 삼각형)의 수는 Y축에 나타냈다. X 축은 8개 농도의 CD3CD19 BsMAb(ng/ml)를 나타낸

다. 평판은 ExviTech 유세포분석 기반 플랫폼을 사용하여 분석했다. 세포는 전방 산란(FSC), 측방 산란(SSC) 및 다양한 표면 마커의 발현 또는 발현 결여를 기반으로 한 게이팅 전략을 사용하여 식별했다. 생세포의 퍼센트는 BsMAb가 없는 대조 웰 중의 생세포 수와 BsMAb가 있는 웰 중의 생 세포 수를 비교하여 결정했다.

[0627] 도 7은 BsMab(약물)의 다양한 농도와 144시간 항온처리 후 악성 B 세포 및 CTL의 수를 모두 나타내는 대표 샘플의 그래프를 나타낸다. 악성세포 집단(사각형)의 감소에 대응하는 CTL(삼각형)의 증식 증가에 있어서 용량 반응 효과가 있었다. 악성 세포 집단의 감소는 아폽토시스와 별개의 기전을 통해 일어났고, 이는 T 세포 용해와 일치하는 비-아폽토시스성 세포사를 암시한다. 악성 세포 또는 T 세포 집단만을 표적으로 하는 대조 mAb는 어떠한 효과도 없었다. 이 샘플의 경우, 기본(BsMAb 없이) E:T 비는 1:30.1로써, 1:5.7인 유효(BsMAb를 가진) E:T 비와 다르다. 이 결과는 BsMAb의 기능성이 전체 말초혈액 및 전체 골수를 이용하여 생체외에서 평가될 수 있다는 것을 입증한다. CTL의 증식은 PB 샘플로부터 림프구를 사전 분리해야 할 필요 없이 전체 PB 샘플에서 CD19/CD3 BsMAb의 존재 하에 촉진되었다.

[0628] 실시예 3 - 급성 골수성 백혈병(AML)에서 표적 및 작동 세포에 대한 BsMAb의 효과

[0629] 본 실시예에서는 표적 및 작동 세포에 대한 BsMAb의 효과를 실시예 1 및 2와 다른 증상에서 시험했다. 골수(BM) 샘플은 AML 진단을 받은 환자로부터 수득했다. 모든 샘플은 연구 참여에 대한 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다.

[0630] 악성 세포 상의 CD123 및 T 세포 집단 상의 CD3을 표적으로 하는 BsMAb, 뿐만 아니라 대조 항체를 96웰 평판에 첨가했다. 각 BM 샘플은 전체를 배양 배지로 희석하고(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이), BsMAb, 대조 항체 중 어느 하나를 함유하거나 또는 둘 다 함유하지 않는 웰들로 구성된 96웰 평판에 평판 배양하고, 모든 조건들은 2반복으로 시험했다. 샘플은 이 샘플에 존재하는 CTL의 증식을 촉진하기 위해 120시간 동안 항온처리했다. 분석 직전에 적혈구를 용해하고, 악성 세포 집단 및 CTL 집단을 정의하는 항체들을 평판에 첨가했다: CD3PB(BD-Pharmingen, Ref:558117, 클론 UCHT1) / CD45-PO(Invitrogen, Ref: MHCD4530, 클론 HI30) / Annexin V-FITC(Immunostep, Ref: ANXVF) / CD117-PE(Biolegend, Ref: 313204, 클론 104D2) 또는 CD33PE(BD-Pharmingen, Ref: 555450, 클론 WM53 / CD4-PECY5 (Biolegend, Ref: 317412, 클론 OKT4) / CD5-PECY7 (Biolegend, Ref: 300622, 클론 UCHT2) / CD8 APC (BD, Ref: 555369, 클론 RPA-T8) /CD25 APCH7 (BD-Pharmingen, Ref: 560225, 클론 M-A251). Annexin V-FITC는 아폽토시스 수준을 모니터하기 위해 첨가했다.

[0631] 평판은 ExviTech 유세포분석 기반 플랫폼을 사용하여 분석했다. 세포는 전방 산란(FSC), 측방 산란(SSC) 및 다양한 표면 마커의 발현 또는 발현 결여를 기반으로 한 게이팅 전략을 사용하여 식별했다. 생세포의 퍼센트는 BsMAb가 없는 대조 웰 중의 생세포 수와 BsMAb가 있는 웰 중의 생 세포 수를 비교하여 결정했다.

[0632] 도 8은 x축에 나타낸 바와 같은 BsMab(약물)의 다양한 농도와 120시간 항온처리 후 악성 세포(생 아세포) 및 CTL(CD8+CD25+)의 수를 모두 나타내는 3가지 대표 샘플의 그래프를 나타낸다. 각 샘플마다 악성 세포 집단(흑색 선, 사각형)의 감소에 대응하는 CTL(회색 선, 삼각형)의 증식 증가에 있어서 용량 반응 효과가 있었다. 악성 세포 집단의 감소는 아폽토시스와 별개의 기전을 통해 일어났고, 이는 T 세포 용해와 일치하는 비-아폽토시스성 세포사를 암시한다. 악성 세포 또는 T 세포 집단만을 표적으로 하는 대조 mAb는 어떠한 효과도 없었다. 이 예에서, 표적 세포(AML 아세포)의 감소 수준은 작동 세포(악성 아세포) 집단의 증가와 같이 샘플마다 상이했다. 또한, 유효 E:T 비도 다른 환자 샘플 간에 1:0.8부터 1:7.1까지 다양했고, 이는 한 샘플의 경우 각 활성화된 T 세포에 의해 1 미만의 암이 살상되고(1:0.8), 반면 다른 샘플의 경우 각 활성화된 T 세포에 의해 7 초과의 암 세포가 살상된 것(1:7.1)을 의미한다. 이것은 BsMAb와 항온처리 후의 비인 바람직한 유효 E:T 비를 가진 환자를 식별하는 방법을 입증한다. 구체예들에서, 바람직한 유효 E:T 비는 입양 세포 치료가 특히 효과적일 수 있는 환자에 대응할 수 있다. 이는 또한 BsMAb의 기능성이 생체외에서 평가될 수 있고 CTL의 증식이 전체 골수 샘플로부터 림프구를 사전 분리할 필요없이, BsMAb(하나의 암(arm)이 항 CD3인 것)의 존재 하에 전체 골수 샘플에서 촉진되었음을 입증한다.

[0633] 실시예 4 - ACT에 이상적인 삼투적립 작동 세포집단의 유세포분석 식별

[0634] 몇몇 구체예들에서, BsMAb 용량 의존적 증식을 나타낸 T 세포 집단은 잠재적으로 CTL 및 악성 형질세포 집단 모두에 대한 마커를 보유할 수 있었다. 이러한 구체예들에서, CTL의 이 집단은 능동적으로 체결된 악성 세포를 보유할 수 있고, 악성 세포를 용해할 때, 악성 세포의 몇몇 세포 표면 마커는 삼투적립 과정의 CTL 막에 매립될 수 있다. 이 집단은 본원에서 "삼투적립성 CTL"이라 지칭하고, 악성 세포와 상호작용하여 악성 세포를 제거할 가능성이 가장 큰 활성화된 T 세포의 서브세트이다. CTL이 악성 세포와 밀접한 접촉을 할 때, 몇몇 구체예에서

CTL은 악성 세포 상의 특정 항원에 노출되고, 이 항원에 특이적인 수용체를 생성하도록 준비될 것이다. 다른 구체예들에서, 이 CTL은 악성 세포에서 복수의 항원을 인식한다. 이론적으로 한정하려는 것은 아니지만, 삼투적립성 CTL의 이 집단은 팽창될 수 있고 숙주 내의 악성 세포의 인식(및 살상)에 사용될 수 있는 것으로 생각된다.

[0635] 이 효과를 입증하기 위해, AML 환자 유래의 BM 샘플을, 악성 세포를 묘사할 CD 마커 및 림프구성 세포 집단의 서브세트를 식별할 마커에 대한 항체의 풀 어레이(full array)로 분석했다. 웰은 AML 샘플에서 120 시간 CD123/CD3 BsMAb 노출 후 막 표면에 이상 아세포 마커(CD117+)를 발현하는 T 세포(CD3+)로써 정의된 삼투적립성 집단의 존재에 대해 평가했다.

[0636] 도 9A는 측방 산란(SSC) 및 CD3 발현을 사용하여 T 세포 집단(회색)을 정의하는 게이트(사각형)를 나타낸다. 도 9B는 BsMAb의 부재하에 T 세포(CD3+/CD117-) 집단(사각형 게이트, 회색) 및 AML 아세포(사각형 게이트, 흑색) 집단(CD117+/CD3-)을 120 시간 항온처리한 후의 점 플롯이다. BsMAb의 부재 하에서는 CD117+/CD3+ 집단을 나타내는 원형 게이트에서 찾아볼 수 있는 분명한 삼투적립성 세포가 없다. 도 9C는 도 9B와 동일한 게이트를 나타내지만, CD123/CD3 BsMAb의 존재하에 120시간 항온처리한 후인 것이다. 이 시점에 BsMAb를 >0.05 ㎍/ml의 농도로 함유하는 웰에서 악성 아세포(CD117+/CD3-)가 분명하게 제거되었고 T 세포(CD3+/CD117-) 수가 분명하게 증가했다. 또한, AML 아세포 마커 CD117을 발현하는 신규 T 세포 집단(CD117+/CD3+)의 출현이 관찰되었다. 이 집단은 삼투적립성 CTL 집단이라 정의된다.

[0637] 다양한 pICF, 예컨대 다양한 BsMAb의 효과는 생체외, 예컨대 이 실시예에 설명된 것과 같은 분석법에서 시험될 수 있다. 구체예들에서, 악성 세포를 표적화하는데 우수할 수 있는 CTL 집단의 존재가 검출될 수 있다. 구체예들에서, 이 집단은 팽창될 수 있고, CTL 세포 집단은 특히 혈액학적 악성종양과 같은 악성종양의 ACT 치료에, 약제로써 사용될 수 있다.

[0638] 실시예 5 - BsMAb 항체의 사용을 통해 생성된 CTL 집단의 살상능의 평가

[0639] 몇몇 구체예들에서, BsMAb의 사용을 통해 생성된 삼투적립성 CTL은 동일한 숙주로부터 악성 세포 집단을 제거하는 능력이 더 클 수 있다. 구체예들에서, 삼투적립성 집단은 예컨대 형광 활성화된 세포 분류(FACS)를 이용하여 나머지 샘플로부터 분리될 것이다. 이를 조사하기 위해, AML로 진단된 환자의 백혈구를 함유하는 동결보존된 샘플을 시험했다.

[0640] 도 10A, 10B 및 10C는 120시간 동안 CD123/CD3 BsMAb에 노출 후 갓 생성된 CTL 집단의 살상능을 입증하는 실험의 유세포분석 점 플롯(CD117 vs CD3)을 나타낸다. 먼저, AML 환자의 동결보존된 세포의 제1 튜브는 0.875㎍/ml 농도의 CD123CD3 BsMAb에 120시간 동안 노출시켰다. 수득되는 세포는 임의의 과량의 BsMAb를 제거하기 위해 세척했고, 세포를 5% CO_2와 가습 하에 37℃에서 하룻밤 동안 항온처리했다. 동일 환자의 동결보존된 세포의 제2 튜브는 해동하고, 이 샘플을 앞서 BsMAb에 노출시켜 생성한 샘플과 혼합했다.

[0641] 도 10A는 갓 생성된 T 세포(CD3+/CD117)만을 남기고 AML 아세포(CD117+/CD3-)는 제거된 제1 AML 샘플의 120시간 BsMAb 노출 후의 결과를 나타낸 점 플롯(CD117vsCD3)을 보여준다.

[0642] 도 10B는 아세포(CD117+/CD3-) 및 낮은 수준의 잔존 T 세포(CD117-/CD3+)의 존재를 가진 동일한 환자의 새 동결보존 바이엘의 점 플롯(CD117/CD3)을 보여준다. 도 10A에 도시된 세포 샘플은 BsMAb에 노출되기 전에 도 10B와 유사하게 보였다. 일단 샘플들이 혼합되면, 0.875 ㎍/ml의 CD123/CD3 BsMAb의 존재 및 부재하에 2시간, 4시간 및 24시간 동안 항온처리했다. 또한, 새로 해동된 세포도 전처리된(도 5A) 세포의 첨가 없이 단독으로 시험했다.

[0643] 도 10C는 T 세포(CD3+/CD117-) 및 새로운 AML 아세포(CD117+/CD3-)의 존재를 관찰할 수 있는, 0시간 시점에서의 도 10A 및 도 10B 세포 집단 혼합물의 점 플롯(CD117/CD3)을 도시한 것이다. 도 10D는 분명하게도 AML 아세포(CD117+/CD3-)가 앞서 생성된 T 세포 집단의 존재 하에서 고갈된, 24시간 항온처리 후의 점 플롯(CD117/CD3)이다. 이는 CD123/CD3 BsMAb의 부재하에서 수행되었다. 사전 생성된 T 세포 집단은 BsMAb의 보조없이 AML 아세포 집단을 살상할 수 있었다. 이는 BsMAb 및 악성 세포 모두에 대한 초기 노출에 의해 생성된 CTL이 BsMAb의 부재 하에 악성 집단을 살상하는 능력을 유지한다는 것을 입증한다.

[0644] 도 11의 그래프는 사전 생성된 CTL이 새로운 바이엘 유래의 AML 아세포를 고갈시키는 동역학적 효과를 경시적으로 도시한 것이다. 중간 회색 대시 선은 도 10A의 T 세포의 존재 없이 AML 아세포(도 10B 유래)의 대조 집단을 나타낸다. 결과는 아세포 집단의 약간 자발적인 고갈을 경시적으로 나타낸다. 검은 원은 도 10A의 T 세포와 혼합된 AML 아세포를 나타낸다. 사전 생성된 T 세포 집단에 의해 AML 아세포는 매우 빠르게 고갈되었고, 최초 2시

간 후 아세포의 거의 50%가 사라졌다. 24시간 시점에서는 거의 100%의 아세포 집단이 고갈되었다. CD123/CD3 BsMAb(밝은 회색 사각형)의 첨가는 효과가 없었다. 이러한 결과는 이것이 새로운 바이엘에 존재하는 T 세포 집단(도 10B의 세포)의 결과이기에는 너무 짧은 시간 기간 동안 일어났다.

[0645] 실시예 6 - 다른 E:T 비의 용량 반응에 의한 pICF에 의해 유도된 활성화된 T 세포의 활성 측정

[0646] 약물의 활성을 측정하는 방법은 다른 농도에서의 활성을 평가하고, 이 데이터를 활성을 설명하고 표준 파라미터들에 의해 정량을 가능하게 하는 운영중인 약동학적 수학적 모델에 피팅시켜 용량 반응 곡선을 생성하는 것이다.

[0647] pICF와 T 세포 및 종양 세포의 항온처리는 종양 세포를 살상하는 약제인 암 살상 T 세포의 활성화 및 증식을 유도한다.

[0648] 제1 단계에서, 활성화된 암 살상 T 세포는 환자 샘플(예, 혈액, 골수)을 pICF와 항온처리(예, 120시간 동안)하여 생성하고, 그 결과 암 살상 T 세포가 다수의 종양 세포를 제거하기 때문에 종양 세포의 수를 저하시킨다. 후속 단계에서, 몇몇 경우 pICF는 경우에 따라 세척되고, 암 살상 T 세포 그룹, CD4+CD25+ 및 CD8+CD25+는 경우에 따라 FACS(형광 활성화된 세포 분류기)에 의해 순수 집단들로 분류될 수 있다. 대안적으로, pICF의 세척 및/또는 FACS에 의한 분류없이 동일한 구도가 사용될 수 있다.

[0649] 제2 환자 샘플, 예컨대 동일한 환자 샘플의 일정량이 그 다음 암 살상 T 세포 그룹에 첨가될 수 있고, 분리되거나 또는 잔존 세포의 전체 배취에 첨가될 수 있다. 암 살상 T 세포는 약제를 나타내기 때문에, 제2 일정량(환자 샘플)에 다른 양, 특히 다른 E:T 비로의 첨가는 용량반응곡선의 측정 및 표준 약동학 모델링 접근법의 사용을 가능하게 한다. 몇몇 예에서, 종양 세포의 수는 고정되고 첨가되는 암 살상 T 세포의 수가 변동되어 다른 E:T 비에서의 용량반응곡선을 생성한다. 이는 약물 활성을 측정하는 약동학적 접근법이다.

[0650] 이 실시예는 또한 AML 샘플 유래의 아세포에 대한 pICF로써 이중특이적 항체, CD3xCD123의 사용을 설명한다. T 림프구는 CD123xCD3 BITE(Creative Biolabs)의 존재 및 5% CO_2를 함유하는 가습 공기 중에서 37℃ 하에 120시간 동안 항온처리 후 동결된 AML 샘플로부터 생성되었다. 이 기간 후, 활성화된(CD25+) T 세포(CD8+ 및 CD4+)는 FACS Aria III 유세포분석기(BD)를 사용하여 형광 활성화된 세포 분류(FACS 분류)에 의해 분류되었다. 분류된 세포 집단의 순도는 99%보다 높았다. 일단 작동체 T 세포가 정제되면, 분류된 집단의 세포독성을 평가하기 위해 동일 환자의 새 바이엘을 해동했다.

[0651] 작동체 T 세포(CD8+CD25+ 또는 CD4+CD25+ 또는 이 둘을 동시에 동일한 50/50 비율로)를 일정한 수의 아세포와 1:1에 가까운 비율로 시작해서 다른 작동체:표적(E:T) 비율들로 혼합했다. 두 세포 종류(작동체 및 표적)를 접종하여 CD123xCD3 BITE의 존재 없이 5% CO_2를 함유하는 가습 공기 중에서 37℃ 하에 추가 24h 항온배양했다.

[0652] 도 12는 CD123xCD3 BITE 노출 후 분류된 CD8+CD25+ 또는 CD4+CD25+ 세포의 살상능을 세포 용량 의존적 방식으로 입증하고, 최대 살상능은 1:1에 가까운 비율에서 도달했다. x 축은 E:T 비(도 12A) 또는 활성화된 T 세포 수(도 12B)를 나타낸다. 이 그래프는 일단 아세포의 수가 고정된다면 두 대표값들이 동일하고, y 축은 다른 비율 또는 T 세포 수에서 24시간 항온처리한 후의 생 아세포의 퍼센트를 나타낸다.

[0653] 다른 약동학 모델링 및 시뮬레이션 전략들은 면역조절 및 종양세포 고갈 활성을 특성화하는데 사용된다. 이 모델들은 전형적인 집단 파라미터들을 추정할 수 있게 할 뿐만 아니라 각 단일 개체마다 정확한 활성 평가를 가능하게 한다. 가장 간단한 모델은 T 세포의 활성화와 종양 세포의 고갈 간의 관계, 또는 약물 농도와 상기 임의의 변수들의 직접 관련성을 평가한다. 좀 더 복잡한 상황, 예컨대 기본 E:T 비(NK), 또는 활성화된 T 세포(CD8+CD25+ 또는 CD4+CD25+)의 최대수와 기초 아세포의 비, 또는 특별한 기준 약물 농도점에서 활성화된 T 세포와 고갈된 아세포의 비(예컨대, 본원에 기술된 유효 E:T 비)와 최종 반응의 관계가 모델링될 수 있다. 이 관련성은 다른 농도의 약물 및 다른 항온처리 시간에서의 효과를 설명한다. 측정들이 샘플마다 하나의 측정, 예컨대 달성되는 최초 E:T 비, 또는 활성화된 T 세포의 최대 수에만 제한된다면, 다른 모델링 접근법들이 사용될 수 있다. 예컨대, 각 샘플이 측정들이 모든 샘플들에 유효한 연속 모델 함수를 구축하는데 기여하는 집단 모델링 접근법이 사용될 수 있다. 또한, 한 모델에 의존적인 변수(예컨대, T 세포의 활성화 vs. 약물 농도 및 시간)가, 제2 변수가 분석되는 제2 모델(예, 종양 세포 고갈 vs 활성화된 T 세포)의 입력값으로써 사용되는 둥지형(nested) 모델이 적용될 수도 있다.

[0654] 표준 약동학 모델은 예컨대 본 실시예에서는 본원에 기술된 데이터 세트를 운영중인 모델에 피팅하여 각각의 활성을 정량하는데 적용될 수 있다. 암 세포 살상은 종양 표적 세포에 대한 활성화된 T 세포 중의 T 세포 수용체

의 결합으로부터 초래되기 때문에, 리간드-수용체 결합의 간단한 모델이 적용된다. 평형 모델은 리간드 농도의 함수(x, T 세포 수)로써 결합 데이터(y)를 피팅시키는데 사용된다. 최대 결합능(BL_{max}) 및 수용체의 결합 친화성(K_d)이 사용된다. 이 모델은 쌍곡 방정식을 따른다:

[0655] $$y = C + BL\max\left(1 - \left(\frac{x}{Kd + x}\right)\right)$$

[0656] 이 모델에 피팅된 암 살상 T 세포의 3 서브세트(CD8+CD25+, CD4+CD25+ 및 CD8+CD25+/CD8+CD25+) 각각의 데이터 점들은 도 13(A-C)에 제시된다. 도 13에 제시된 피팅된 그래프들은 이러한 3 서브세트들 간에 활성의 유의적인 차이를 나타낸다. 이 차이는 피팅 노력에 의해 가능해진 활성 정량 후 인식될 수 있다. 이하 표 1은 각 T 세포 서브세트의 표준 활성 값; 50% 종양 세포 살상을 유도하는 농도인 IC50 또는 효능, 피팅된 곡선이 X 축에서 0을 가로지르는 점, 즉 활성화된 T 세포가 첨가되지 않은 대조 웰과 유사하나 동일하지는 않은 T 세포의 부재하에서의 생존율 % 또는 E_0; 활성화된 T 세포의 최대 용량에서의 생존율 % 또는 E_{max}; 피팅된 곡선 아래의 면적을 적분한 AUC(곡선 아래 면적)(매우 큰 비현실적인 T 세포 수 또는 비율에서의 결과물을 피하기 위해 T 세포는 0 내지 1000개로 제한됨)를 나타낸다. AUC는 활성화된 모든 T 세포의 축적된 총 활성을 포착한다. CD8+CD25+의 효능은 CD4+CD8+ 대비 훨씬 높았다: 67 대 336, 또는 5배. 이는 동일한 수의 종양 세포를 살상하기 위해서 CD4 활성화된 T 세포에 비해 CD8에 대한 T 세포가 5배 적게 필요하다는 것을 의미한다. 하지만, CD8 서브세트는 13.7%의 생존 종양 세포를 남기는 반면, CD4 서브세트는 모든 종양 세포를 살상한다. CD8 유래의 AUC는 CD4 유래의 AUC보다 실질적으로 적다. 동일한 비율의 CD4/CD8의 혼합물은 중간 값을 나타낸다. 따라서, CD8+CD25+는 암 세포 살상에 더 우수한 것으로 나타나지만, CD4+CD25+ 서브세트는 상기 24h 시간틀에서 CD8+CD25+ 세포가 살상할 수 없는 일부(13.7%)를 포함해서, 모든 암 세포를 살상하는 측면에서 추가 활성을 부가한다.

표 1

[0657]

	IC50 (T 세포 #)	E0 (생존율 %)	Emax (생존율 %)	AUC (0 내지 1000)
CD8+CD25+	67	84.8	13.7	29392.1
CD4+CD25+	336	96.5	0.0	44769.0
(CD4+CD25+)+(CD8+CD25+)[1:1]	164	138.4	0.0	44499.9

[0658] 이 실시예는 면역종양학 생체외 분석에 드물게 사용되는 모델링 접근법들의 효력을 보여준다. 이 모델들에 의한 암 살상 활성의 정량은 생체외 분석이 더욱 정확하도록 향상시켜 ICF 및/또는 면역조절제의 신규 및 조합을 선별하는 더 우수한 분석법이 되게 하고, 면역종양학적 약물 치료를 단독적으로 또는 조합으로써 개인화하는데 더 우수한 분석법이 되게 하며, 자가 세포 치료에 적당한 암 살상 T 세포를 단독적으로 또는 조합으로써 식별하는데 더 우수한 분석법이 되게 한다. 약동학적 모델링 및 시뮬레이션은 약물 개발의 다른 단계들에 널리 적용되고 있다. 예컨대 Upton RN(2014) 및 Mould DR(2013) 참조.

[0659] 종양학 뿐만 아니라 다양한 이용예들은 소개된 바 있다. 예컨대, Buil-Bruna N(2016) 참조. 여기에는 면역 조절 및 종양 세포 고갈 활성을 특성화하는 약동학적 모델링 및 시뮬레이션 전략들이 개시된다. 구조 모델은 공변량 연구를 비롯하여 선형, S자형 또는 log 선형 모델을 통해 표준 반응 노출 한계를 커버할 수 있다. 예컨대 Unton RN(2014), Mould DR(2013) 및 The Guidance for Industry Population Pharmacokinetics(1999) 참조.

[0660] 예컨대, 전술한 모델들은 T 세포의 활성화와 종양 세포의 고갈 간의 관련성 및 이러한 임의의 변수들과 약물 농도의 직접 관련성을 평가한다. 추가 모델은 상기 사용된 것과 같은 활성화된 세포를 이용하는 상대적 E:T 비, 또는 활성화된 T 세포(CD8+CD25+ 또는 CD4+CD25+)의 최대 수와 기초 아세포의 비, 또는 특별한 기준 약물 농도점에서 활성화된 T 세포와 고갈된 아세포의 비(예컨대, 본원에 제시된 유효 E:T 비)와 최종 반응의 관련성을 연구한다. 모델은 다른 약물 노출 수준 또는 다른 항온처리 시간에서의 효과로써 여러 공변량을 고려해 개발될 것이다. 이 모델들은 전형적인 집단 파라미터의 추정 뿐만 아니라 각 단일 개체의 정확한 활성 추정을 가능하게 한다.

[0661] 또한, 상기 제시된 실시예에서와 같은 복수의 E:T 비를 측정하지 않는 모델링 접근법도 있다. 예를 들어, 샘플 변동 조건의 제2 파트를 추가함이 없이 오로지 pICF와의 초기 항온처리로부터 초래되는 데이터를 사용하는 경우. 이러한 경우에, 유효 E:T 비와 같이 여러 파라미터들 중 하나의 값만이 이용가능하다. 하지만, 이 데이터

는 샘플의 제2 파트에 다른 E:T 비를 혼합하는 것보다 조작이 적어서, 역시 고찰된다. 샘플당 하나의 비만이 유용하다는 가능한 제한은 각 샘플의 단일 데이터 점이 모든 샘플에 유용한 연속 모델 함수를 구축하는데 기여하는 단일 처리 샘플 디자인을 통해 극복될 수 있다.

[0662] 실시예 7 - pICF에 의해 유도된 활성화된 T 세포에 대한 효과를 용량 반응 곡선으로 측정한 ICF 및/또는 면역조절제의 활성 측정

[0663] 예시적인 면역조절제는 예컨대 본원에 기술되며, 면역 체크포인트 억제제(PD1 또는 CTL4), Treg 억제제 및 MDSC 억제제를 포함한다.

[0664] pICF와의 항온처리가 활성화된 암 살상 T 세포를 생성한 후 제2 환자 샘플, 예컨대 동일한 환자 샘플의 제2 일정량을 첨가하는 전술한 바와 유사한 구도가 면역종양학 반응의 다른 성분들을 평가하는데 사용된다. 본원에 기술된 E:T 비가 첨가될 수 있고, 또한 잠재적 ICF 또는 면역조절제를 포함할 수도 있다.

[0665] 이 구도는 분자 자체가 암 살상 활성을 향상시키는 활성이 있든지 또는 없든지 간에 적용할 수 있다. 이러한 활성은 일단 활성화된 T 세포가 pICF에 의해 생성되면 더 잘 관찰될 수 있다. 예컨대, PD1 또는 CTL4와 같은 면역체크포인트 분자는 pICF와 수 일간 항온처리한 후에만 T 세포의 세포 표면에서 발현되기 시작한다. 따라서, 적합한 분석법은 T 세포 표면 상에 표적들이 발현된 후 항-PD1 항체와 같은 면역 체크포인트 억제제를 첨가하는 것이다. 예를 들어, 항-PD1 항체와 같은 면역 체크포인트 억제제의 용량 또는 이 용량 없이 용량 반응 곡선이 측정될 수 있다. 이러한 항-PD1 항체의 첨가가 CD4 및/또는 CD8 활성화된 세포 수 증가 및/또는 E:T 비 증가 및/또는 상기 T 세포들의 살상 활성 향상에 의해 종양 세포에 대한 면역 반응을 향상시킨다면, 항-PD1 항체와 같은 면역 체크포인트 억제제는 ICF로 간주된다. 활성의 향상은 실시예 6에 제시된 바와 같은 약동학 모델의 특정 파라미터들, 예컨대 EC50, Emax 및 AUC에 의해 측정될 수 있다. 항-PD1 항체와 같은 분자가 암 살상 T 세포의 활성을 향상시킨다면, 그 분자는 ICF로 간주된다.

[0666] 다른 ICF 또는 면역조절제는 전술한 바와 같이 활성화된 T 세포 또는 종양 세포외에 다른 세포 종류에 작용한다. 그 예는 Treg라는 불리는 면역억제 조절성 T 세포 및 골수 유래 억제 세포(MDSC)이다. ICF 또는 면역조절제로써 이 화합물들의 활성을 측정하기 위해, 동일한 분석법, 즉 활성화된 T 세포의 용량 반응에 상기 화합물들의 고정된 용량을 첨가하는 분석법을 사용할 수 있다. 때로, 이러한 생체외 샘플에서 Treg 및 MDSC의 수는 이러한 측정들에 불충분하거나 적은 수일 수 있다. 이러한 경우에는 샘플의 제2 분량에 고정된 양의 Treg 또는 MDSC 또는 이 둘 모두를 첨가하여 상기 구도를 더욱 연장시킬 수 있고, 이는 상기 ICF 및 면역조절제 화합물의 효과를 적당히 측정하기에 충분한 것이다.

[0667] 몇몇 예에서, 분류 및/또는 정제된 Treg 및/또는 MDSC(T 세포의 세포독성 효과 또는 세포 팽창을 음성 조절한다)는 공배양물에 첨가될 수 있다. 일단 다른 집단(BITE 노출 후 활성화된 T 세포, Treg 또는 MDSC)이 FACS 분류되면, 분류된 세포는 공배양물 실험에 각각(T 세포:Treg:아세포 또는 T 세포:MDSC:아세포) 다른 비율로 혼합될 수 있고, 예컨대 이러한 억제 세포들의 존재 하에 동결된 바이엘에서, T 세포의 용해 능력을 평가할 수 있다.

[0668] 또한, 면역 체크포인트 억제제(예컨대, 본원에 기술된 것, 예컨대 PD-1 및/또는 CTL-4의 억제제)는 효과를 평가하기 위해 다른 공배양물 모델에 첨가될 수 있고, 예컨대 아세포 용해 또는 T 세포 팽창을 향상시키는 능력이 평가될 수 있다.

[0669] 본원에 기술된 방법들은 신규 ICF 및/또는 면역조절제를 선별하고 이를 서로 또는 다양한 조합(예컨대, 그들 중에서 및/또는 치료 기준과 같은 다른 종류의 분자와의 조합)에 대해 직접 비교하는데 효과적인 분석법이다.

[0670] 실시예 8 - 활성화된 CTL의 선택 및/또는 농축

[0671] 이 실시예에서는 활성화된 CTL의 집단을 선택하고 농축시키는 능력이 입증된다. 2가지 BM 샘플은 AML 진단 환자로부터 수득했다. 샘플은 연구 참여 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자에서 수득했다.

[0672] 각 샘플의 일부는 존재하는 활성화된 CTL의 기본 수를 결정하기 위해 제조하고 시험했다. 분석 전에 RBC는 용해하고 활성 CTL 집단을 한정하는 항체를 평판에 첨가했다(CD138-PE (Cytognos, Ref: CYT-138PE4, 클론 B-A38) / CD38PerCP (Immunostep, Ref: 38PP-100T, 클론 GR7A4) / CD45-PB (BD-Pharmingen, Ref: 560367, 클론 30-F11) / CD56-APC (BD-Pharmingen, Ref:341027, 클론 NCAM16,2) / CD3PE (Cytognos, Ref: CYT-3PE5, 클론 33-2A3) / CD4PB (IMMUNOSTEP, Ref: 4CFB-100T, 클론 HP2/6) / CD8 FITC(Cytognos, Ref: CYT-8F8, 클론 UCHT-4) / CD25 APC (Biolegend, Ref: 302610, 클론 BC96) / CD69 PerCP (Biolegend, Ref: 310928, 클론 FN50)), 아폽토시스

의 수준을 모니터하기 위해, Annexin V-FITC(Immnunostep, Ref: ANXVF)도 첨가했다. 평판은 ExviTech 유세포분석 기반 플랫폼을 사용하여 분석했다. 본원에 참고인용된 US 8,703,491, US 8,313,948 및 Bennett TA(2014) 참조.

[0673] 골수 샘플은 전체를(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분들을 분리함이 없이) 배양 배지로 희석하고, CD123/CD3 BsMAb(Creative Biolabs, Shirley, NY) 또는 대조 항체 중 어느 하나를 함유하거나, 또는 이들 모두를 함유하지 않는 웰들로 구성된 96웰 평판에 평판배양했고, 모든 조건은 2반복으로 시험했다. 샘플은 이 샘플 내 CTL의 증식을 촉진하기 위해 120시간 동안 항온처리했다. 항온처리 기간 마지막에 평판은 앞서 개략된 바와 같이 처리하고 ExviTech를 사용하여 분석했다. 또한, 각 샘플의 일부는 FACS Aria III 유세포분석기(BD, San Jose, CA)를 이용하여 형광 활성화 세포 분류법(FACS 분류법)으로 분류하여 활성화된 CTL 집단을 농축시켰다. CD5 및 CD25 모두 양성인 세포를 분류하는 게이트가 설정되었다.

[0674] 결과는 도 14에 도시했고, 여기서 샘플 1의 점 플롯은 X 축에 CD5 강도, Y 축에 CD25 강도를 나타낸다. 도 14A는 매우 낮은 수준의 CD5+CD25+ 세포를 나타내는 기본 점이다(상부 오른쪽 사분면). 도 14B는 CD123/CD3 BsMAb와 항온처리된 후의 샘플을 나타내고, 여기서 세포들의 많은 퍼센트가 활성화된 CTL이지만, 다른 세포 서브타입도 존재한다. 이 집단이 분류된 후(도 14C), 세포의 99% 이상이 활성화된 CTL이다. 각 샘플 및 각 조건마다 CD5+ 및 CD25+ 세포의 퍼센트는 도 14D에 제시된다. 이는 활성화된 CTL이 얼마나 생성될 수 있고 선택적 분류에 의해 농축될 수 있는지를 입증한다.

[0675] 실시예 9 - 삼투적립성 암 살상 T 세포의 효과

[0676] 이 실시예는 AML 샘플 유래의 아세포에 대한 pICF로써 BsMAb의 사용을 설명한다. 활성화된 T 림프구는 악성 및 정상 세포를 모두 함유하는 백혈구 집단을 사전에 분리하여 동결보존시킨 AML 샘플로부터 생성되었다. 이 샘플은 연구 참여의 사전동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다.

[0677] 샘플은 해동하고 CD123/CD3 BsMAb(Creative Biolabs, Shirley, NY)를 함유하는 배양 배지와 혼합했다. 이 샘플은 5% CO_2를 함유하는 가습 공기 중에서 37℃ 하에 120 시간 동안 항온처리했다. CD3 암(arm)은 결합하여 T 세포의 활성화를 돕는 반면, CD123 암(arm)은 악성 AML 세포에 결합하여 방금 활성화된 CTL과 근접해지게 한다.

[0678] 항온처리 후, 샘플은 세척한 뒤, 항체 패널에 노출시켜 삼투적립을 겪은 활성화된 CTL을 그렇지 않은 CTL에 대비하여 식별했다. 사용된 항체 칵테일은 CD3PB (BD-Pharmingen, Ref:5581 17, 클론 UCHT1), CD25 APC (Biolegend, Ref: 302610, 클론 BC96), 및 Annexin V-FITC (Immunostep, Ref: ANXVF)와 함께 CD123 (ref)이었다. CD3 및 CD25는 CTL을 식별할 것이고, CD123은 CTL에 존재한다면 삼투적립성 CTL을 나타낼 것인 악성 AML 세포의 마커이다. 이 샘플은 FACS Aria III 유세포분석기(BD)를 이용한 형광 활성화된 세포 분류법(FACS 분류법)에 의해 두 집단, 즉 CD3+CD25+CD123-(도 15A) 및 삼투적립성 CD3+CD25+CD123+(도 15B)로 분류되었다. 분류된 세포 집단의 순도는 99%보다 높았다. 일단 작동체 T 세포가 정제되면, 동일한 환자 유래의 새로 동결보존된 바이엘을 해동하여 분류된 집단의 세포독성을 평가했다.

[0679] 두 집단(CD123+ 및 CD123-) 유래의 작동체 T 세포의 동일한 수를 악성 아세포를 함유하는 새로 해동된 샘플의 세포와 혼합했다. 두 세포 종류(작동체 및 표적)를 접종하여 CD123/CD3 BsMAb의 존재 없이 5% CO_2를 함유하는 가습 공기 중에서 37℃ 하에 추가 24h 항온처리했다. 도 15C에서 확인할 수 있는 것처럼, 삼투적립성 CTL(CD123+) 집단은 CD123- 세포 집단보다 약 10% 더 많은 악성 아세포를 살상했다(61% vs 72% 생존). 이러한 간단한 제조물조차도 약간의 이점을 부여하는 것처럼, 본 실험의 여러 파라미터들의 최적화는 더욱 특별한 이점을 나타낼 수 있다.

[0680] 실시예 10 - BsMAb의 환자간 변동성은 CTL의 생성 및 AML 아세포 고갈을 유도했다

[0681] 본 실시예는 AML 환자 유래의 17개 BM 샘플에 대한 CD123/CD3 BsMAb(Creative Biolabs, Shirley, NY)의 생체외 효과를 평가한다. 모든 샘플은 연구 참여의 사전동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자에서 수득했다.

[0682] 샘플은 수집 후 24 내지 48시간 내에 공급받았다. BM 샘플은 그 전체(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이)를 배양 배지로 희석하고, CD123/CD3 BsMAb 또는 대조 항체 중 어느 하나를 함유하거나, 또는 이들 모두를 함유하지 않는 웰들로 구성된 96웰 평판에 평판배양했고, 모든 조건은 2반복으로 시험했다. 샘플은 72시간, 96시간 또는 120시간 동안 항온처리했다. 분석 전에, RBC를 용해하고, 활성 CTL 집단을 정의하는 항체(CD3PB(BD-Pharmingen, Ref:558117, 클론 UCHT1) / CD4-PECY5(Biolegend, Ref: 317412, 클론 OKT4) / CD5-PECY7 (Biolegend, Ref: 300622, 클론 UCHT2) CD8 APC(BD, Ref: 555369, 클론 RPA-T8) /CD25 APCH7(BD-

Pharmingen, Ref: 560225, 클론 M-A251) / CD45-PO(Invitrogen, Ref: MHCD4530, 클론 HI30)) 및 AML 아세포 집단(CD33PE(BD Pharmingen, Ref: 555450, 클론 WM53) 또는 CD117-PE(Biolegend, Ref: 313204, 클론 104D2))를 평판에 첨가했고, 아폽토시스 수준을 모니터하기 위해 Annexin V-FITC(Immunostep, Ref: ANXVF)도 첨가했다. 평판은 ExviTech 유세포분석 기반 플랫폼을 사용하여 분석했다. 예컨대, 본원에 참고 인용된 US 8,703,491 B2, US 8,313,948 B2, 및 Bennett et al. Clin. Lymphoma, Myeloma, and Leukemia. 14.4(2014):305-18 참조.

[0683] CD123/CD3 BsMAb는 악성 AML 아세포를 비롯한 골수 세포 상의 CD123에 결합하고 T 세포 상의 CD3을 인식한다. CD3의 결합 및 AML 아세포의 근접성은 CTL을 활성화시켜 AML 아세포의 용해를 초래한다. AML 환자 유래의 BM 샘플이 AML 아세포와 T 세포를 둘다 함유하므로, BsMAb의 효과는 각 샘플에서 두 집단에 대해 동시에 측정될 수 있다. CD123/CD3 BsMAb는 시간 및 용량 의존적 방식의 AML 아세포 살상을 입증했다(도 16A). 이와 마찬가지로, 시간 및 용량 의존적인 T 세포 활성화 및 CTL의 증식도 있다(도 16B). 그래프들의 각 선은 개별 환자를 나타낸다. 이 결과들로부터 동역학 및 아세포 고갈 효율(A) 및 CTL 집단의 증식(B) 모두에서 환자간 변동성의 수준이 매우 높다는 것을 관찰할 수 있다. 약리학적 데이터가 수 시간 기간 동안 용량 반응 데이터(예, EC50 및 Emax)로부터 결정될 수 있는 이러한 종류의 동역학 분석은 BsMAb 또는 다른 ICF 효과의 다른 정량적 평가로써 유용할 수 있다. 이러한 결과들과 환자의 임상 반응 간에 상관성이 있는지를 입증하기 위해서는 추가 연구가 수행되어야 할 필요가 있지만, 이러한 종류의 데이터는 머지않아 특정 BsMAb가 특정 환자에게 적합할 수 있는지를 결정하는데 사용될 수 있을 것이다.

[0684] 실시예 11 - 미세잔존질병(MRD) 샘플에서 BsMAb 활성의 측정

[0685] 골수(BM) 샘플은 MRD가 있는 AML 환자로부터 수득했다. 샘플은 연구 참여 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다.

[0686] 샘플은 공급받자마자 시험했고, AML 아세포 집단은 단핵구 집단의 5% 미만인 것으로 발견되었다. BM 샘플은 그 전체(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이)를 배양 배지로 희석하고, CD123/CD3 BsMAb, 대조 항체 중 어느하나를 함유하거나, 또는 둘 다 함유하지 않는 웰로 구성된 96웰 평판에 평판배양했다. 샘플의 양이 적어서, CD123/CD3 BsMAb의 1회 용량, 3㎍/ml만이 3회의 시점, 즉 72시간, 96시간 및 120시간에 시험되었다. 모든 조건은 3반복으로 시험되었다.

[0687] 분석 직전 각 시점에서 적혈구를 용해하고, 악성 세포 집단 및 CTL 집단을 정의하는 항체를 평판에 첨가했다: CD3PB(BD-Pharmingen, Ref:558117, 클론 UCHT1) / CD45-PO(Invitrogen, Ref: MHCD4530, 클론 HI30) / Annexin V-FITC(Immunostep, Ref: ANXVF) / CD117-PE(Biolegend, Ref: 313204, 클론 104D2) 또는 CD33PE(BD-Pharmingen, Ref: 555450, 클론 WM53 / CD4-PECY5(Biolegend, Ref: 317412, 클론 OKT4) / CD5-PECY7(Biolegend, Ref: 300622, 클론 UCHT2) / CD8 APC(BD, Ref: 555369, 클론 RPA-T8) / CD25 APCH7(BD-Pharmingen, Ref: 560225, 클론 M-A251). Annexin V-FITC는 아폽토시스의 수준을 모니터하기 위해 첨가했다.

[0688] 평판은 ExviTech 유세포분석 기반 플랫폼을 사용하여 분석했다. 예컨대 본원에 참고 인용된 US 8,703,491, US 8,313,948, 및 Bennett TA(2014) 참조. 세포는 전방 산란기(FSC), 측방산란기(SSC) 및 다양한 표면 마커의 발현 또는 발현 결여를 기반으로 하는 게이팅 전략을 사용하여 식별했다.

[0689] 도 17은 Y 축에 AML 아세포(도 17A) 또는 활성화된 CTL 세포(CD25+, 도 17B)의 절대 세포수를 경시적으로(X 축) 나타낸다. 대시 선은 BsMAb가 없는 대조 샘플을 나타내고, 실선은 CD123/CD3 BsMAb 데이터를 나타낸다. 도 17에서 관찰할 수 있듯이, 종양 세포의 퍼센트가 전체 샘플에서 최소로 발현될 때에도 활성화된 CTL은 시간 의존적 방식으로 여전히 생성된다(도 17B). 또한, 존재하는 몇몇 아세포도 시간 의존적 방식으로 고갈된다(도 17A).

[0690] 실시예 12. BsMAb에 노출 전 및 후에 인간 T 림프구 집단의 특성화

[0691] 이 실시예는 BsMAb 노출 후 인간 T 림프구의 표현형을 평가한다. 골수(BM) 샘플은 AML 진단을 받은 4명의 환자로부터 추출했다. 샘플은 연구 참여 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다.

[0692] 샘플은 배양 배지(20%(vol/vol) FBS(Thermo Scientific, Waltham, MA), 2% Hepes, 1% 항생제(Zell Shield, Labclinics, Barcelona, Spain) 및 1% L-글루타민 200mM(Lonzon, Hopkinton, MA)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640(Sigma, St Louis, MO) 배지)에 희석하고, CD123/CD3 BsMAb(Creative Biolabs)를 0.21875 ㎍/ml의 농도로 첨가했다. 샘플은 이 샘플 내 CTL의 증식을 촉진하기 위해 120시간 동안 항온처리했다.

[0693] T 세포 표현형을 특성화하기 위해, 다음과 같은 표지 항체를 사용했다: CD4 (Immunostep, Salamanca, Spain), CD27(BD Pharmingen), CD8(Cytognos, Salamanca, Spain), CD62L(BD Pharmingen), CD45RA(QuantoBio, Beijing, China), CD5 (Biolegend, San Diego, CA), CD25(Biolegend, San Diego, CA), CCR7(Biolegend, San Diego, CA), CD28(BD Pharmingen) 및 CD57(BD Biosciences). 도 18은 BsMAb 노출 전 및 후의 암 살상 T 세포 제조물을 나타낸다. 이 도면은 시험된 샘플들 간의 차이가 약간뿐이었으므로, 시험된 샘플 중 하나로써 모든 샘플들의 대표이다. 유세포분석 점 플롯으로 나타냈고, 각각 축 위에 다른 CD 마커들의 강도를 나타낸다. BsMAb 첨가 전(도 18 A-D)인 기본 시간에서는 CD25+ 세포가 거의 관찰되지 않았다(도 18A). CD25는 활성화 마커여서, 이러한 낮은 발현이 예상된다. 도 18B는 다음과 같은 샘플에 존재하는 다른 T 세포 집단 표현형의 분포를 나타낸다: 46% 미분화(naive) T 세포(Naive, $CD45RA^{+}/CCR7^{+}/CD27^{+}$), 43% 중추 기억 T 세포(CM, $CD45RA^{-}/CCR7^{+}/CD27^{+}$), 9% 작동체 기억 T 세포(EM, $CD45RA^{-}/CCR7^{-}/CD27^{+/-}$), 및 2% 말단 작동체 기억 T 세포(E, $CD45RA^{+}/CCR7^{-}/CD27^{-}$)[문헌 Larbi A 2014에도 설명되어 있음]. 도 18C 및 18D는 비활성화된 T 세포 집단에서 예상되는 것에 대응하는 마커 CCR7, CD62L, CD28 및 CD57의 발현을 나타낸다. CD123/CD3 BsMAb와 120시간 항온처리 후 상기와 같은 마커들의 발현은 도 18E 내지 H에 제시된다. 도 18E에 도시된 것처럼, 세포의 97%가 이제 활성화 마커 CD25를 발현한다. 또한, 세포의 90%가 이제 중추 기억 T 세포 집단(CM, $CD45RA^{-}/CCR7^{+}/CD27^{+}$)에 속하는 각종 아집단의 분포에도 주요한 이동이 있었다(도 18F). 이 분포는 모든 샘플에서 유사하여, 항온처리 후 CM 집단이 90% 이상이었다. 도 18G는 CCR7 발현이 높게 유지되고 CD62L 발현이 혼합된 상태를 유지하지만, 떨어지기 시작한다는 것을 보여준다. 도 18H에서, CD28은 약간 증가하고 CD57 발현은 매우 증가하여, 이 또한 활성화된 기억 세포 집단으로의 이동을 보여준다.

[0694] 실시예 13. 생리학적 융화성 배지를 이용한 BsMAb 활성의 측정(자가 혈장의 사용).

[0695] pICF(BsMAb) 활성에 미치는 생리적 관련성이 더 큰 배지의 영향을 평가하기 위해, AML 피검체 유래의 골수 BM 샘플 하나를 다음과 같은 조건으로 2반복으로 시험했다:

[0696] i) 20%(vol/vol) FBS(Thermo Scientific, Waltham, MA), 2% Hepes, 1% 항생제(Zell Shield, Labclinics, Barcelona, Spain) 및 1% L-글루타민 200mM(Lonzo, Hopkinton, MA)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640(Sigma, St Louis, MO)을 함유하는 배지.

[0697] ii) 원심분리 후 수득한 20%(vol/vol) 자가 혈청, 2% Hepes, 1% 항생제 및 1% L-글루타민 200mM이 보충된 RPMI 1640을 함유하는 배지.

[0698] BM 샘플은 연구 참여 사전동의서를 제공한 18세 이상의 AML을 겪고 있는 성인 환자로부터 수득했다. 두 조건에서, 8가지 농도의 CD123/CD3 BsMAb(Creative Biolabs)를 5% CO_2를 함유하는 가습 공기 중에서 37℃ 하에 72시간 또는 120시간 동안 항온처리했다.

[0699] 항온처리 후, Annexin-V PB(Immunostep, Salamanca, Spain), CD45PO(Invitrogen, Carlsbad, CA), CD8-FITC(Cytognos, Salamanca, Spain), CD117-PE(Becton Dickinson, San Jose, CA), CD4PerCP(Biolegend, San Diego, CA), CD5-PE-Cya7(Biolegend, San Diego, CA) 및 CD25-APC(Biolegend, San Diego, CA)를 이용한 다색 유동 패널을 아세포 고갈 및 T 세포 활성화를 동시에 평가하기 위해 수행했다.

[0700] 도 19에 도시된 바와 같이, 정상 배지(회색 선) 또는 20% 자가 혈장이 보충된 배지(검은 선)에서 72h 또는 120h 째 두 분석 조건에서 아세포 고갈은 유사했다(각각 도 19A 및 19B 참조). 하지만, 정상 배지의 경우 72h째 더 높은 T 세포 활성화(CTL) 및/또는 팽창이 관찰되지만(도 19C), 120h째 두 조건은 유사한 결과를 나타낸다(도 19D).

[0701] 표 2는 72h 시점에서 정상 배지(1:8) vs 자가 혈장 배지(1:21)에 의한 더 낮은 유효 E:T 비를 나타내는 정량적 접근법을 나타낸다. 자가 혈장에 의해 생성된 CTL의 수는 더 낮지만, 정상 배지에 의해 생성된 CTL의 더 큰 수만큼 동일한 수의 종양 세포를 살상하는데 효과적이었다. 이는 혈장내 무언가가 생성된 CTL의 수를 감소시키는 한편 더욱 효과적인 CTL을 생산한다는 것도 암시한다.

[0702] 하지만, 더 긴 항온처리는 이러한 효과적인 살상능의 차이를 감소시킨다. 아마도, 자가 혈장 CTL 집단 팽창은 더 느리게 시작했지만, 만회할 시간이 있다. 이는 생리학적으로 더 유사한 배지의 사용이 종양 세포를 더 효과적으로 제거하는 CTL을 생성하고 환자가 치료에 어떻게 반응할 것인지에 관한 더욱 가치있는 정보를 제공할 수 있다는 것을 설명한다.

표 2

[0703]

배지	시간	아세포 #	CD25+ T 세포 #	△백혈병	유효 E:T
대조군	72h	11162	4		
정상	72h	4191	845	6971	1:8
자가 혈장	72h	4367	529	6795	1:21
대조군	120h	7052	27		
정상	120h	1233	16270	5819	0.35
자가 혈장	120h	902	13749	6150	0.44

[0704] 실시예 14. 고형암 샘플의 BsMAb 활성 측정

[0705] 이 실시예는 암 세포 및 자가 T 세포의 동시 존재 하에, Tumor BioBank(Molecular Response, San Diego, CA)에서 획득한 흑색종 샘플에 대한 EpCAM/CD3 BsMAb(G&P Biosciences, Santa Clara, CA)의 생체외 효과를 평가한다.

[0706] 샘플은 해동하고 3가지 다른 농도의 EpCAM/CD3 BsMAb(3, 2, 1㎍/ml) 및 대조 항체를 함유하는 웰로 구성된 96웰 평판에 평판배양했다. 샘플은 배양 배지(20%(vol/vol) FBS(Thermo Scientific, Waltham, MA), 2% Hepes, 1% 항생제(Zell Shield, Labclinics, Barcelona, Spain) 및 1% L-글루타민 200mM(Lonzo, Hopkinton, MA)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640(Sigma, St Louis, MO) 배지)와 항온처리했다. 144h 항온처리 후, 모든 세포는 0.05% 트립신/EDTA로 수확하고 원심분리로 침전시켰다. 분석 전에, 다중색 유세포분석 패널을 종양 및 T 세포 집단을 한정하기 위해 첨가했다: Annexin V(Immunostep), CD45 PO(Invitrogen), CD8(Cytognos), Tag72(Bionova), CD4(Biolegend), CD5(Biolegend), EpCAM(BD, Biosciences) 및 CD25(Biolegend).

[0707] 도 20에 도시된 바와 같이, EpCAM/CD3(회색 히스토그램)의 존재 하에서는 대조 웰과 달리 종양 세포가 용량 의존적 방식으로 살상되었다(도 20A). 또한, 종양 세포 고갈의 증가는 T 세포 상의 CD25 활성화 마커의 증가와 관련이 있다(도 20B).

[0708] 실시예 15. AML 샘플에서 삼투적립성 암 살상 T 세포의 효과

[0709] 이 실시예는 삼투적립을 겪은 활성화된 CTL이 높은 살상능이 있다는 것을 입증한다.

[0710] 동결보존된 AML 샘플은 Annexin V(Immunostep), CD45(Invitrogen), CD33(BD, Biosciences) 및 CD5(Biolegend)로 염색했다. 생 아세포(Annexin-/CD45+/CD33++) 및 생 T 세포(Annexin-/CD45++/CD5+) 집단은 FACS Aria III 유세포분석기(BD, San Jose, CA)를 이용하여 형광 활성화된 세포 분류법(FACS 분류법)으로 >99%의 순도로 분류했다. 샘플은 연구 참여 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 AML 질단을 받은 성인 환자로부터 수득했다.

[0711] 아세포는 세포 표면 염료 PKH67(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)로 염색하고, CD123-CD3 BsMAb의 존재 또는 부재하에, 자가 T 세포와 다른 작동체:표적 비율에서 3반복으로 144h 동안 항온처리했다. PKH67은 세포막 표지 염료이다. 이 특별한 분석에서, 상기 염료는 T 세포가 아닌 아세포만을 염색했다. BsMAb 노출 후, T 세포는 BsAMb에 의해 유도된 세포 대 세포 상호작용 동안 아세포로부터 상기 마커를 획득할 것으로 예측했고, 이는 삼투적립이 일어났음을 나타낼 것이다.

[0712] 세포는 배양 배지(20% (vol/vol) FBS (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2% Hepes, 1% 항생제(Zell Shield, Labclinics, Barcelona, Spain) 및 1% L-글루타민 200mM(Lonzo, Hopkinton, MA)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640(Sigma, St Louis, MO))와 항온처리했다. 분석 전에, 종양 및 T 세포 집단을 한정하기 위해 다중색 유세포분석 패널을 첨가했다: Annexin V(Immunostep), CD45(Invitrogen), CD8(Cytognos), CD33(BD, Biosciences), CD4(Biolegend), CD5(Biolegend), 및 CD25(Biolegend).

[0713] 도 21A, 21B 및 21C는 T 세포의 삼투적립능을 예시하는 실험의 유세포분석 점 플롯(CD5/PKH67)을 나타낸다. 생 아세포 및 T 세포가 동시에 표시된다. 도 21A는 항온처리 전 기본 시간에서의 아세포(PKH67++/CD5-, 상부 왼쪽 사분면) 및 몇몇 T 세포(PKH67-/CD5++, 하부 오른쪽 사분면)의 점 플롯을 나타낸다. 이 시점에서는 이중 양성 T 세포(PKH67++/CD5++)는 관찰되지 않았다. 도 21B는 항온처리 후 BsMAb의 부재하에 아세포(PKH67++/CD5-) 및 T 세포(PKH67-/CD5++)의 점 플롯을 나타낸다. 이 시점에서 BsMAb의 부재 하에, 이중 양성 T 세포(PKH67++/CD5++, 상부 오른쪽 사분면)는 관찰되지 않았다. 도 21C는 항온처리 후 BsMAb의 존재하에 아세포(PKH67++/CD5-) 및 T

세포(CD5++)의 점 플롯을 나타낸다. 관찰할 수 있듯이, 상부 오른쪽 사분면에서는 대부분의 활성화된 T 세포(CTL)가 나타나고, 이는 종양 세포와의 상호작용에서 추적자 염료를 획득했음을 나타낸다. BsMAb의 존재하에 이 샘플에서 생성된 삼투적립성 CTL은 CD5++ 집단이 78%인데 비해 대조군은 단지 9%이다.

[0714] 동일한 AML 환자 유래의 제2 동결보존된 튜브는 아세포 고갈 및 T 세포 활성화를 용량 반응 방식으로 정량하는데 사용했다. 이 샘플은 상기 사용된 동일한 배양 배지로 희석하고, 8가지 다른 농도의 CD123/CD3 BsMAb(0.5, 1, 10, 50, 100, 250, 500 및 1000 ng/ml)를 함유하는 평판에 첨가했다. 평판은 144시간 동안 항온처리했다. 분석 전에 상기에 사용된 마커의 동일한 다중색 유세포분석 패널을 평판에 첨가하여 종양 세포와 CTL 집단을 식별했다. 도 22A는 CD123/CD3 BsMAb가 용량 반응 방식으로 CTL 집단의 증가를 유도하는 방식을 나타내며, 이는 아세포(종양) 세포의 용량 반응 고갈에 상응한다. 이 샘플의 유효 E:T 비는 60:6000 또는 1:100이고, 이는 생성된 CTL이 종양 세포 살상에 매우 효과적인 것을 입증한다. 유효 E:T 비는 각 환자마다 특이적으로 BsMAb 또는 다른 ICF 활성의 강건함을 결정하는데 사용된 추가 도구인 것으로 입증될 수 있다.

[0715] 실시예 16. 암 살상 T 세포의 약리학적 활성의 생체외 측정

[0716] 환자 샘플에서 pICF에 의해 생성된 암 살상 T 세포의 활성을 정량적으로 측정하고 세포 치료에 사용될 암 살상 T 세포의 약리학적 활성을 결정하는 4가지 파라미터가 있다.

[0717] T 세포 증식의 EC50은 활성화된 암 살상 T 세포의 50%를 생성하는 pICF의 농도에 해당한다. 도 16B는 pICF BsMAb CD3xCD123 용량의 함수로써 여러 독립적 피검체 유래의 활성화된 T 세포의 중첩된 용량 반응 곡선을 나타낸다. T 세포 활성화의 EC50은 암 세포 고갈의 EC50과 유사한데(도 16A), 그 이유는 이들이 동일한 과정, 즉 pICF가 활성화된 T 세포를 암 세포를 고갈시키는 암 살상 세포로의 변환을 유도하는 방식을 나타내기 때문이다. 이러한 T 세포 활성화 및 암세포 고갈의 EC50 간의 동등성은 본 명세서의 도 6, 7 및 8에서도 관찰될 수 있다.

[0718] 이러한 T 세포 활성화의 EC50은 동일 질환의 진단을 받은 환자들의 여러 샘플들에서 매우 유사하다(도 16A 및 도 16B). 따라서, 이 파라미터는 EC50이 대부분의 샘플과 현저히 다른 몇몇 경우에만 환자 민감성의 정보를 제공한다. EC50이 현저히 낮으면, 상기 특정 환자에서 T 세포는 낮은 용량의 pICF에서 활성화될 것으로 해석되어야 한다. 이에 반해, EC50 값이 현저히 높으면, 상기 특정 환자에서 T 세포가 높은 용량의 pICF에서 활성화될 것이어서 암 살상 T 세포를 생성하는 항온처리 동안 높은 용량의 pICF가 사용되어야 하는 것으로 해석된다.

[0719] 유효 E:T 비는 pICF에 의해 생성된 암 살상 T 세포의 활성을 나타낸다. 따라서, 유효 E:T 비는 본원에 개시된 방법에 의해 수득된 활성화된 T 세포로 환자의 치료 여부를 결정하는 핵심 파라미터이다. 이 파라미터는 도 12 및 13에 제시된 바와 같은 FACS 분류법에 의해 사전 분리된, pICF와의 항온처리 후 생성된 활성화된 암 살상 T 세포의 정확한 수를 첨가하는 용량 반응을 측정하여 유효성이 입증될 수 있다.

[0720] 높은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료로써 상기 암 살상 T 세포에 민감한 환자를 예측하고, 낮은 유효 E:T 비는 자가 세포 치료로써 상기 암 살상 T 세포에 내성인 환자를 예측한다.

[0721] Emax 또는 효능은 높은 용량의 pICF에서 생존한 암 세포 %를 측정한다. 이 파라미터는 항온처리 시간에 의존적이고, T 세포 치료에 관한 임상 결정을 위해 긴 항온처리 시간이 필수적이고, 이때 활성화된 T 세포는 대부분의 샘플에서 모든 암 세포를 살상하고; 이 항온처리 시간에서 내성적인 암 세포 서브세트를 나타내는 샘플의 소량의 서브세트는 임상적 정보를 제공한다. 활성화된 암 살상 T 세포는 이러한 암 살상 T 세포가 환자에게 적당한 단독요법 치료이기 위해서는 100%의 암 세포를 살상해야 한다. 이에 반해, 활성화된 T 세포가 모든 암 세포를 살상할 수 없고(도 16A), 내성적인 암 세포의 서브세트가 있다면, 단독요법으로써의 암 살상 T 세포는 이러한 암 세포를 생존 상태로 남길 것으로 예측할 수 있으며, 이에 따라 적당한 치료로 간주되지 않을 것이다. 암세포의 내성 표현형을 퇴화시킬 치료에는 추가 약물 또는 다른 ICF의 조합이 가능하다.

[0722] 이러한 서브세트의 암세포가 암 살상 T 세포에 내성적인 것으로 식별되면, 이 내성 암 세포는 활성화된 자가 T 세포 치료에 내성적이기 때문에 면역억제성이다. 따라서, 면역 체크포인트 억제제와 같은 추가 면역조절제의 첨가가 이러한 면역억제를 극복할 수 있고, 결과적으로 치료에 내성인 암 세포를 극복할 수 있다. 이러한 추가 면역조절제는 2가지 다른 방식으로 첨가될 수 있다:

[0723] a) 면역억제를 경감시키고 완전 세포독성 암 살상 T 세포의 생성을 가능하게 하는 생체외 첨가. 이 방식은 특히 후속 세포 치료를 위해 생성된 암 살상 T 세포에 의미있는 것이다. 이 T 세포는 pICF와 항온처리 중인 동일한 웰에 첨가되거나, 또는 pICF와 항온처리 후 제2 단계에서 첨가될 수 있다. 면역조절제의 생체외 첨가는 다수의 작용 기전을 가진 제제를 비롯해서 다수의 제제의 조합을 가능하게 하고, 이것은 최대 5개, 10개 또는 20개 제제이다. 이러한 수는 독성 제약이 다중면역요법을 제한하는 임상 환자에게 생체내 동시 투여될 수 있는 보통 2

내지 3가지의 면역요법 약물보다 훨씬 많은 수이다. 따라서, 세포 치료를 위한 암 살상 T 세포의 생체외 생성은 직접적인 환자 임상 약물 치료보다 우수한 다중 면역요법을 활용할 수 있다.

[0724] b) 세포 치료와 함께 환자에게 투여하여 환자 체내에서 면역억제를 경감시킬 수 있다. 이것은 특히 환자에게 세포 치료로써 투여되는 암 살상 T 세포에 암 세포가 내성적이게 만드는 암 세포 상의 표적들에 의미있는 것이다.

[0725] 암 살상 T 세포의 활성을 측정하는 상기 언급한 임의의 3가지 파라미터는 항온처리 시간의 함수로써 변할 수 있어서, 반응의 동역학이 또한 의미있는 정보를 제공할 수 있다. 시간 의존적 파라미터는 이러한 과정의 동역학을 반영한다. 의미있는 해석의 몇몇 예는 이하에 설명된다.

[0726] 도 16은 AML 샘플들을 따라 동일한 BsAb CD3xCD123에 대한 T 세포 활성화 및 암세포 고갈의 동역학 및 효율의 환자간 변동성이 매우 높은 수준인 것을 보여준다.

[0727] 암 세포를 더욱 빠르게 살상하는 암 살상 T 세포는 더욱 효율적인 세포 치료제일 가능성이 있다. 더 빠른 활성은 더 높은 민감성을 반영하는 양성 결과인, 환자 암에 대한 더 빠른 효과를 의미할 수 있다. 또한, 더 빠른 활성은 암 살상 T 세포가 MHC-I 기전을 통해 암 세포를 인식하는 CD8+ 종양 특이적 항원 T 세포라면 암 세포에 대한 더 높은 친화성을 의미할 수도 있다. 도 11은 주어진 샘플 유래의 암 살상 T 세포의 암 세포 살상의 동역학을 나타낸다.

[0728] T 세포가 pICF에 의해 더 빠른 시점에서 활성화되기 시작하면, 살상 효능을 최대화하기 위해 몇몇 분할 사이클을 필요로 할 수 있다. 한편, 암 살상 T 세포가 암 세포를 살상한 후 암 세포가 더 이상 남아있지 않으면, 이 T 세포는 소모되기 시작하여, 수, 활성화 상태 및 살상능이 급감한다. 때로, 항온처리 시간을 증가시켜도 살상할 수 없는 암 내성 세포의 서브세트가 있지만, 암 살상 T 세포는 이를 인식하고 그 증식을 유도하여, 암 세포의 수를 변화시킴이 없이 암 살상 T 세포의 수를 증가시켜 이러한 더 긴 항온처리 시간에서 유효 E:T 비를 변화시킨다. 따라서, 암 살상 T 세포의 활성을 측정하기 위해서는 활성화 후의 시간, 즉 증식이 암 세포 살상과 관련이 있을 때, 그리고 소모에 도달하거나 또는 T 세포 내성 암 세포의 서브세트가 발견되기 전의 시간에 초점을 맞추는 것이 중요하다.

[0729] 이러한 개념을 입증하기 위해, 13가지 AML 골수 샘플을 연구 참여의 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다. 샘플은 72시간, 96시간 또는 120시간 동안 배양 배지와 항온처리하고, 8가지 다른 농도의 CD123/CD3 BsMAb를 함유하는 평판에 첨가했다. 매번 모든 환자들이 분석되지는 않는다는 점에 유의한다. 항온처리 후, Annexin-V (Immunostep, Salamanca, Spain), CD45 (Invitrogen, Carlsbad, CA), CD8 (Cytognos, Salamanca, Spain), CD117 (Becton Dickinson, San Jose, CA), CD64 (Biolegend, San Diego, CA), CD34 (Becton Dickinson, San Jose, CA), CD33 (Becton Dickinson, San Jose, CA), HLA-DR (Immunostep, Salamanca, Spain) CD4PerCP (Biolegend, San Diego, CA), CD5-PE-Cya7 (Biolegend, San Diego, CA) 및 CD25-APC (Biolegend, San Diego, CA)를 이용하는 다중색 유동 패널이 아세포 고갈과 T 세포 활성화를 동시에 평가하기 위해 수행되었다. 각각 특별한 샘플마다 적당한 아세포 마커들이 사용되었다.

[0730] 표 3은 CD8+ CTL 및 종양 세포 모두에 대해 EC50, Emax(BsMAb의 최고 농도에서의 절대 세포 수) 및 E0(BsMAb의 부재 하에서의 절대 세포 수)의 통계학적 파라미터를 나타낸다. 표 3 및 도 23에서 관찰할 수 있듯이, CTL과 종양 세포 집단의 EC50은 유사하다. 도 23A는 각 샘플마다 CTL 및 종양 세포 집단의 EC50을 각 시점에서 나타내며, 이 EC50은 약간의 일관성을 나타내지만, 모든 시점마다 변동을 관찰할 수 있다. 개체 변동이 예상되지만, 도 23B는 평균 EC50 값이 각 집단 및 각 시점마다 매우 유사하다는 것을 보여준다.

[0731] 유효 E:T 비는 작동 세포의 절대 수의 변화 및 표적 세포의 절대 수의 변화를 계산하여 결정한다. 이를 정량하기 위해 Emax 및 E0 값이 사용된다. 여기서, 작동 세포는 CTL 집단이고 표적은 종양 세포이다. 유효 E:T 비는 ICF(예, BsMAb)에 의해 유도된 값의 변화를 나타낸다.

[0732] 도 24는 상기의 대표적인 5가지 AML 샘플의 T:E 비 버전을 나타낸다. y축은 각 작동 세포당 존재하는 표적 세포의 수(T/E)를 각 시점(72, 96 또는 120시간)마다 나타낸다. CD8+ CTL은 경시적으로 증가하므로, 일반적으로 항온처리 시간이 길어지면 유효 T:E 비는 감소한다.

[0733] 이 실시예는 종양 고갈 및 T 세포 팽창이 일어날 수 있는 세포 배양 모델에서 암 살상 T 세포 활성의 정량적 측정의 관련성을 입증한다. EC50, Emax, 및 유효 E:T 비를 비롯한 복수의 주요 파라미터들의 동역학적 방식의 분석은 종양 및 CTL 집단 모두에 가치있는 정보를 제공한다. 생성된 데이터는 ICF의 활성 및 효과를 정량하는 강건한 도구를 제공한다.

표 3

[0734]

	집단	시간(h)	N	중간값	평균	Min	Max	StdDev
EC50 (μGr/mL)	생 T 림프세포 CD8+CD25+	72	13	0.16	0.19	0.11	0.43	0.09
		96	11	0.17	0.29	0.11	1.19	0.32
		120	9	0.15	0.2	0	0.51	0.15
	생 종양 세포	72	11	0.19	2.05	0	21.08	6.31
		96	9	0.21	0.16	0	0.36	0.12
		120	6	0.1	0.12	0	0.3	0.12
Emax 세포 #	생 T 림프세포 CD8+CD25+	72	13	114	438.62	40	1970	637.55
		96	11	263	600.55	71	2267	725.49
		120	9	829	1254.67	53	2857	1056.41
	생 종양 세포	72	11	1362.4	2567.24	0	11859.22	3749.35
		96	9	1630.63	3034.86	20.09	12892.9	4324.83
		120	6	1445.47	3414.7	0	10844.15	4349.72
E0 세포 #	생 T 림프세포 CD8+CD25+	72	13	0	10.62	0	100	27.55
		96	11	0	12.45	0	100	30.86
		120	9	0	3.67	0	28	9.27
	생 종양 세포	72	11	12118.5	11110.04	218.7	25749.3	7565.65
		96	9	11271.6	11149.57	628.2	22341.6	8020.15
		120	6	10475.2	12626.18	1476.3	30064.5	10024

[0735] 실시예 17: 골수 대 말초혈액 샘플에서 암 살상 T 세포의 생체외 활성

[0736] 이 실시예는 10쌍의 BM 및 PB AML 샘플(5쌍의 BM 및 PB)에서 CTL의 세포독성능을 평가한다. 샘플은 연구 참여 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다. 샘플은 수집 후 24 내지 48시간 내에 수령했다. BM 샘플은 그 전체(즉, 먼저 BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이)를 배양 배지로 희석하고, 8가지 농도의 BsMAb 및 대조 항체를 함유하는 웰로 구성된 96웰 평판에서 72시간 동안 평판배양했다.

[0737] 항온처리 후, Annexin-V (Immunostep), CD45 (Invitrogen), CD8 (Cytognos), CD117 (Becton Dickinson), CD64 (Biolegend), CD34 (Becton Dickinson), CD33 (Becton Dickinson), HLA-DR (Immunostep), CD4 (Biolegend), CD5 (Biolegend), CD25 (Biolegend), CD138 (Cytognos), CD38 (Immunostep), CD45 (BD-Pharmingen), CD56 (BD-Pharmingen), CD19 (Biolegend) 및 CD3 (Cytognos)을 이용한 다중색 유동 패널이 종양 고갈 및 T 세포 활성화를 동시에 평가하기 위해 수행되었다. 각각 특별한 샘플마다 적당한 종양 마커가 사용되었다.

[0738] 본 발명자들은 pICF가 면역억제된 종양 특이적 항원(TSA) T 세포를 활성화시킬 수 있고, 이와 같이 활성화된 T 세포는 역시 pICF에 의해 활성화된 다른 정상 T 세포보다 높은 암 세포 살상을 나타낸다는 가설을 세웠다. 또한, 본 발명자들은 말초혈액과 달리 골수와 같은 3차원 구조를 가진 조직에 존재하는 면역억제성 미세환경을 설명했다. 그 다음, 이 가설이 맞다면, 골수 샘플에 존재하는 암 살상 T 세포의 활성은 동일한 암 환자의 말초혈액 샘플에서보다 높아야 한다.

[0739] 5명의 AML 환자 유래의 골수와 말초혈액(동일 환자의)으로부터 수득한 샘플 쌍을 CD3xCD123과 항온배양했다. 도 25는 각 환자마다 샘플 쌍(S1 - S5, 상부 패널 vs 하부 패널)에서 T 세포 활성화 및 암 세포 고갈의 용량 반응 곡선을 도시한 것이다. 동일한 환자의 각 혈액 및 골수 샘플마다 EC50 및 Emax 측면에서 유사한 패턴이 관찰된다. 다른 샘플들은 특히 Emax 측면에서 다른 거동을 나타낸다.

[0740] 암 살상 T 세포의 활성은 도 25 및 이하 표 4의 각 그래프에 포함된 유효 E:T 비로 계산한다. 골수 샘플은 샘플 1, 4 및 5에서 상응하는 혈액 대응물보다 더 높은 유효 E:T 비를 나타낸다. 샘플 2 및 3의 골수 샘플은 골수 및 혈액에서 동일한 유효 E:T 비를 나타낸다. 따라서, 골수 암 살상 T 세포가 이의 혈액 대응물보다 낮지 않은, 더 높거나 유사한 암 살상 활성을 나타낸다는 예상된 결과가 확인된다. 이 패턴은 pICF에 의해 활성화될 수 있는 면역억제된 TSA T 세포의 존재를 반영할 수 있고, 이는 골수 vs 혈액 샘플 쌍에서 유효 E:T 비가 더 높은 골수 샘플에서 상기 T 세포의 더 많은 존재를 암시한다. 이것은 면역요법 반응의 공지된 임상 예측인자로써 고형암 샘플 중의 TIL%의 측정과 유사할 수 있다.

표 4

[0741]

	샘플 1	샘플 2	샘플 3	샘플 4	샘플 5
골수	25	5	8	7	9
말초혈액	5	5	8	3	2
차이	5배	동일	동일	2.3배	4.5배

[0742] 실시예 18: 암 살상 T 세포의 생체외 선택적 살상

[0743] 이 실시예는 2명의 MM 및 2명의 AML 환자 유래의 잔존 정상 세포에 대한 CTL의 선택적 능력을 평가한다. 샘플은 연구 참여의 사전 동의서를 제공한 18세 이상의 성인 환자로부터 수득했다. 샘플은 수집 후 24 내지 48 시간 내에 수령했다. BM 샘플은 그 전체(즉, BM으로부터 세포 또는 다른 성분을 분리함이 없이)를 배양 배지로 희석했고, 8가지 농도의 BsMAb 및 대조 항체를 함유하는 웰로 구성된 96웰 평판에 72시간 동안 평판배양했다.

[0744] 항온처리 후, Annexin-V (Immunostep), CD45 (Invitrogen), CD8 (Cytognos), CD117 (Becton Dickinson), CD64 (Biolegend), CD34 (Becton Dickinson), CD33 (Becton Dickinson), HLA-DR (Immunostep) CD4 (Biolegend), CD5 (Biolegend), CD25 (Biolegend), CD138 (Cytognos), CD38 (Immunostep), CD45 (BD-Pharmingen), CD56 (BD-Pharmingen), CD19 (Biolegend) 및 CD3 (Cytognos)을 이용한 다중색 유동 패널을 종양 고갈, T 세포 활성화 및 잔존 정상 세포를 동시에 평가하도록 수행했다. 이 잔존 정상 세포 집단은 AML 환자의 B 세포(CD19+) 및 MM 환자의 과립구(CD45+/SSChigh/FSChigh)에 대응한다. 각 특별한 샘플마다 적당한 종양 마커가 사용되었다.

[0745] 본 발명자들은 이중특이적 항체가 항원 독립적 작용 기전으로 T 세포를 암 세포에 근접시켜 T 세포를 활성화시킨다는 일반적인 이해와는 반대로, pICF는 혈액학적 악성종양의 골수 샘플에서 면역억제된 종양 특이적 항원(TSA) T 세포를 활성화시킬 수 있다는 가설을 세웠다. 활성화된 T 세포가 TSA T 세포라면, 암 세포를 선택적으로 인식하여 살상해야 한다. 이에 반해, 활성화된 T 세포가 비선택적 항원 독립적 방식으로 살상한다면, 이 T 세포는 비병리학적 세포도 살상해야 한다. 이것은 MM(도 26) 및 AML(도 27)에서 pICF 이중특이적 항체와의 항온처리 실험에서 암 세포와 동시에 대응하는 비병리학적 세포를 분석하여 평가할 수 있다.

[0746] 도 26은 pICF가 T 세포 활성화(CD8+CD25+) 및 암 세포 살상(종양 세포의 감소)을 유도하는 2가지 MM 골수 샘플(A 및 B)을 나타낸다. 이 그래프들에 가장 많은 비병리학적 세포로 간주되는 과립구 집단이 첨가되면, 그 수는 pICF와의 항온처리 후에도 유의적인 살상 없이 꽤 유사하게 유지되는 반면 암 세포는 살상된다. 이러한 샘플의 각 웰에서 각각 약 22.000 및 11.500인 과립구의 많은 수는 상기 결과가 통계적으로 매우 유의적이라는 것을 나타낸다. 이 결과는 암 살상 T 세포가 암 세포를 선택적으로 살상한다는 것을 보여준다.

[0747] 도 27은 pICF가 T 세포 활성화 및 암 세포 살상을 유도하는 2가지 AML 골수 샘플(A 및 B)을 나타낸다. 가장 많은 비병리학적 세포로 간주되는 B 세포 집단이 이 그래프에 첨가되면, 그 수는 pICF와의 항온처리 후 실질적으로 감소하지 않는 반면, 암 세포는 살상된다. 각각 약 450 및 200인 B 세포의 적은 수는 MM 샘플 중의 과립구보다 통계적으로 덜 유의적이지만, 상기 MM 결과와 일치한다. 이 결과는 암 살상 T 세포가 암 세포를 선택적으로 살상한다는 것을 보여준다.

[0748] 등가물

[0749] 청구범위에서, 단수적 표현은 상반적인 것으로 나타나지 않거나 또는 문장에서 명백하지 않는 한, 하나 이상을 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 멤버들 간에 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은 상반적인 것으로 나타나지 않거나 또는 문장에서 명백하지 않는 한, 그룹 멤버들의 하나, 하나보다 많은 또는 모든 멤버가 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나 또는 그렇지 않으면 관련이 있다면 만족스러운 것으로 생각한다. 본 발명은 정확히 그룹 중 하나의 멤버가 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나 또는 그렇지 않으면 관련이 있는 구체예들을 포함한다. 본 발명은 그룹 멤버들 중 하나보다 많은 멤버 또는 모든 멤버가 주어진 산물 또는 공정에 존재하거나, 이용되거나 또는 그렇지 않으면 관련이 있는 구체예들을 포함한다.

[0750] 또한, 본 발명은 나열된 청구항들 중 하나 이상의 청구항 유래의 하나 이상의 제한, 요소, 절 및 설명적 용어들이 다른 청구항에 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함한다. 예를 들어, 다른 청구항에 종속적인 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속적인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 구성요소들이 목록들처럼, 예컨대 마커시(Markush) 그룹 형식으로 제시되는 경우, 그 구성요소들의 각 서브그룹도 개시되고, 임의의 구성요소(들)는 그룹에서 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발

명의 관점들은 특별한 구성요소 및/또는 특징을 함유하는 것으로 언급되는 경우, 본 발명 또는 본 발명의 관점들의 특정 구체예들은 그러한 구성요소 및/또는 특징으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순함을 위해, 이러한 구체예들은 본원에 구체적으로 제시하지 않았다. 또한, "포함하는" 및 "함유하는"이란 용어들은 개방적인 것을 의미하며, 추가 구성요소 또는 단계들의 내포를 허용한다는 것을 유의한다. 범위가 주어지면 말단값도 포함된다. 또한, 다르게 나타나거나, 문맥상 다르게 분명하지 않은 한, 당업자가 이해하듯이, 범위로 표현된 값들은 본 발명의 다른 구체예들에서 제시된 범위 내의 임의의 특정 값 또는 하위범위를 문맥에서 분명하게 다른 것을 나타내지 않는 한 그 범위의 하한값 단위의 1/10로 추정할 수 있다.

[0751] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 논문 및 기타 간행물을 인용하며, 이들은 모두 참고 인용된다. 이러한 인용 문헌과 본 명세서 사이에 혼동이 있다면, 본 명세서를 따른다. 또한, 종래 기술에 속하는 본 발명의 임의의 특별한 구체예는 하나 이상의 임의의 청구항들에서 분명하게 배제될 수 있다. 이러한 구체예들은 당업자에게 공지된 것으로 간주되기 때문에, 이러한 구체예들은 본원에 분명하게 설명되지 않아도 배제될 수 있다. 본 발명의 임의의 특별한 구체예는 종래 기술의 존재와 관련이 있거나 없거나 간에 모든 청구항에서 어떠한 이유로든지 배제될 수 있다.

[0752] 당업자는 본원에 기술된 특정 구체예들에 대한 많은 등가물을 통상의 실험만을 사용하여 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기술된 본 발명의 구체예들의 범위는 상기 상세한 설명에 제한되기 보다는 이하 청구범위에 제시된 바와 같은 것이다. 당업자는 이하 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 범위에서 벗어나지 않는 본 명세서에 대한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0753] **참고문헌**

[0754] 비 특허 문헌

- Adams JL *et al.* (2015). Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. Nat Rev Drug Discov 14(9):603-22.
- Bennett TA *et al.* (2014). Pharmacological profiles of acute myeloid leukemia treatments in patient samples by automated flow cytometry: a bridge to individualized medicine. Clin. Lymphoma Myeloma Leuk. 14(4):305-18.
- Buil-Bruna N *et al.* (2016). Bringing Model-Based Prediction to Oncology Clinical Practice: A Review of Pharmacometrics Principles and Applications. The Oncologist 21(2):220-32.
- Chothia C *et al.* (1987). Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol 196(4):901-17.
- Hamid O *et al.* (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in mela
- noma. N Engl J Med 369(2):134–44.
- Kabat EA *et al.* (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. US Department of Health and Human Services Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242.
- Larbi A and Fulop T (2014). From "truly naïve" to "exhausted senescent" T cells: when markers predict functionality. Cytometry Part A 85(1): 25-35.
- Martin F *et al.* (1994). The affinity-selection of a minibody polypeptide inhibitor of human interleukin-6. EMBO J 13(22):5303-9.
- Maus MV *et al.* (2014). Adoptive immunotherapy for cancer or viruses. Annu Rev Immunol 32:189-225.

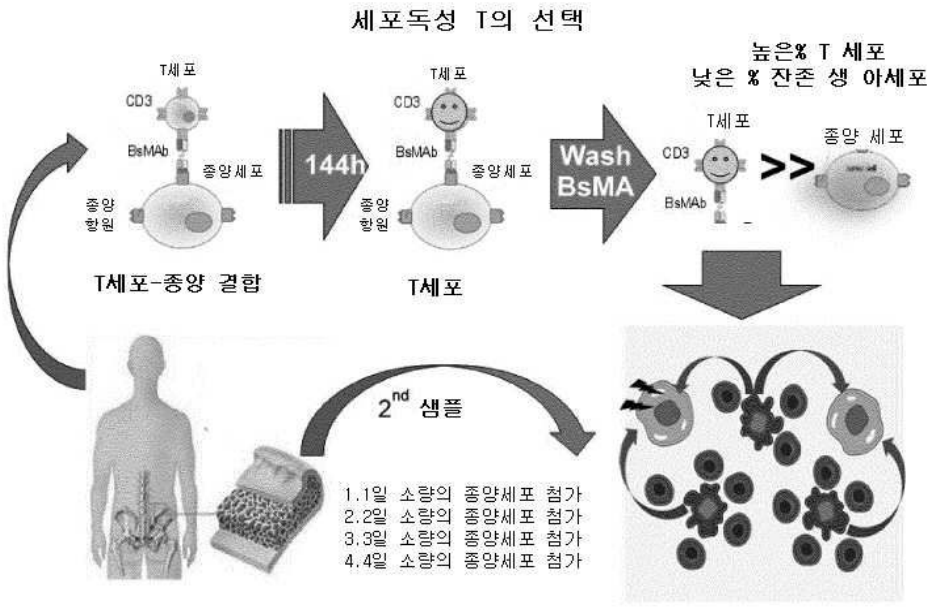
[0755]

- McConnell SJ *et al.* (1995). Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained peptide libraries. J Mol. Biol 250(4):460-70.
- Montes M *et al.* (2005). Optimum *in vitro* expansion of human antigen-specific CD8 T cells for adoptive transfer therapy. Clin Exp Immunol 142(2):292-302.
- Mould DR *et al.* (2013). Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development – Part 2: Introduction to Pharmacokinetics Modeling Methods. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 2(4):e38.
- Pardoll DM. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12(4):252-64.
- Rosenberg SA *et al.* (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. N Eng J Med 19(25):1676-80.
- Scott AM *et al.* (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. Cancer Immun 12:14.
- Serafini P *et al.* (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. Cancer Res 68(13):5439-49.
- Song DG *et al.* (2012). CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells *in vivo*. Blood 119(3):696-706.
- Spiess C *et al.* (2015). Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol Immunol 67:95-106.
- Tramontano A *et al.* (1994). The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. J Mol. Recognit 7(1):9-24.
- Upton RN *et al.* (2014). Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development: Part 3—Introduction to Pharmacodynamic Modeling Methods. CPT Pharmacometrics Syst Oharmacol 3(1): e88.
- Guidance for Industry Population Pharmacokinetics (1999). US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
- http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm072137.pdf).

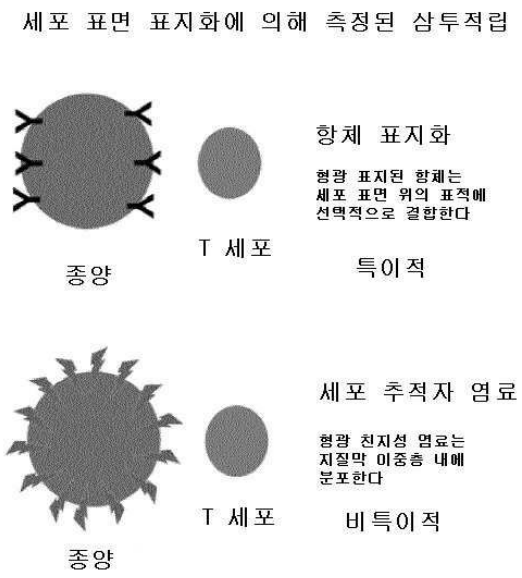
[0756]

도면

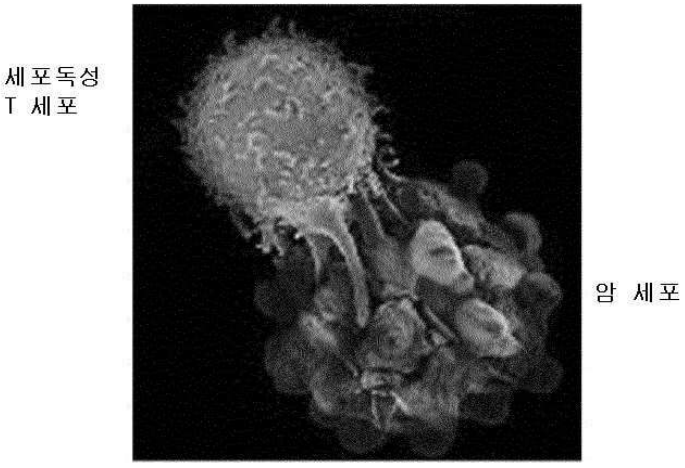
도면1



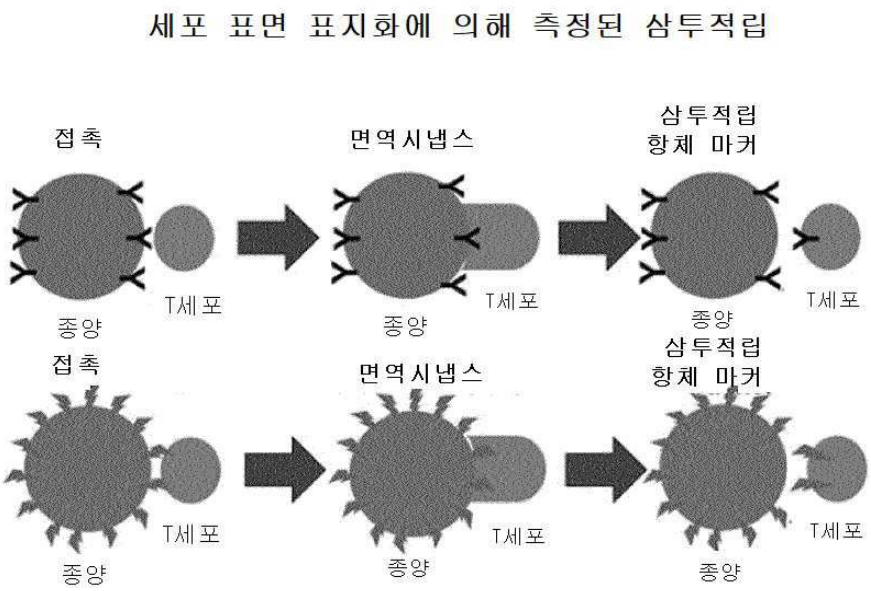
도면2


세포 표면 표지화에 의해 측정된 삼투적립
항체 표지화
형광 표지된 항체는
세포 표면 위의 표적에
선택적으로 결합한다
T 세포
종양
특이적
세포 추적자 염료
형광 친지성 염료는
지질막 이중층 내에
분포한다
T 세포
종양
비특이적

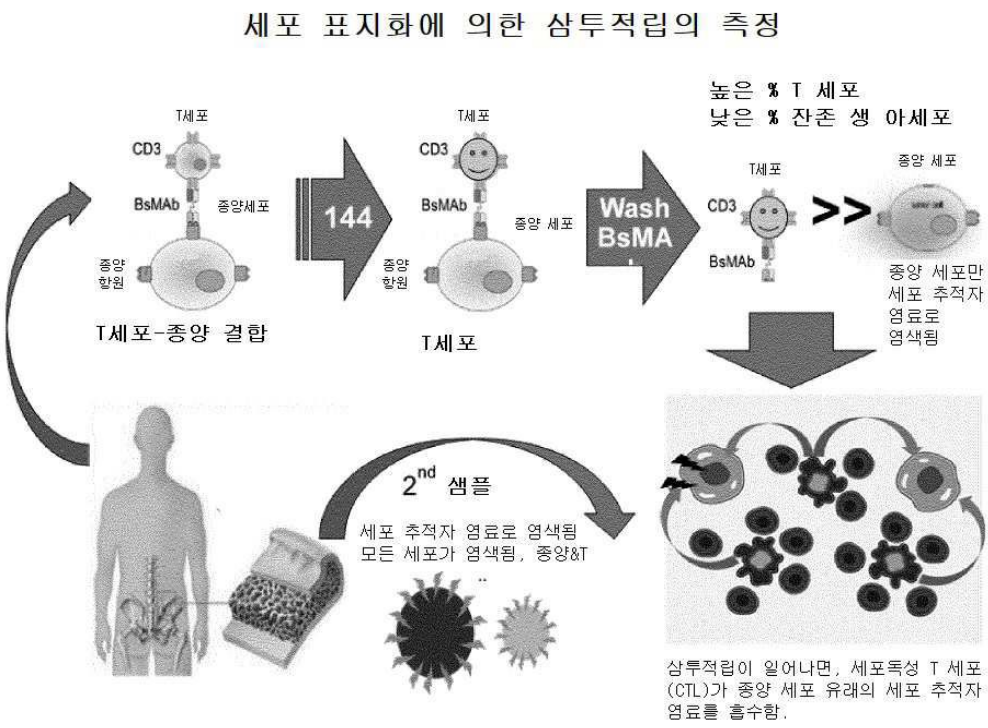
도면3


세포독성
T 세포
암 세포

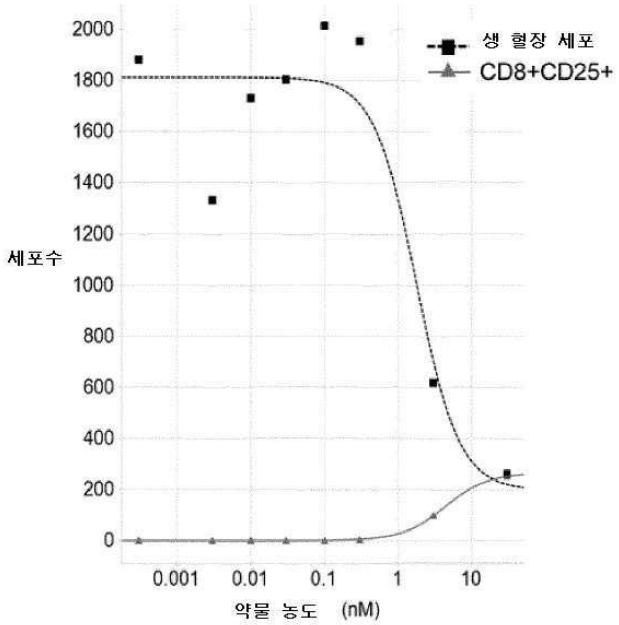
도면4


세포 표면 표지화에 의해 측정된 삼투적립
접촉
면역시냅스
삼투적립
항체 마커
T세포
종양
T세포
종양
T세포
종양
접촉
면역시냅스
삼투적립
항체 마커
T세포
종양
T세포
종양
T세포
종양

도면5


세포 표지화에 의한 삼투적립의 측정
T세포
CD3
BsMAb
종양세포
종양 항원
T세포-종양 결합
144
T세포
CD3
BsMAb
종양 세포
종양 항원
T세포
Wash BsMA
높은 % T 세포
낮은 % 잔존 생 아세포
T세포
CD3
BsMAb
>>
종양 세포
종양 세포만 세포 추적자 염료로 염색됨
2nd 샘플
세포 추적자 염료로 염색됨
모든 세포가 염색됨, 종양&T
삼투적립이 일어나면, 세포독성 T 세포 (CTL)가 종양 세포 유래의 세포 추적자 염료를 흡수함.

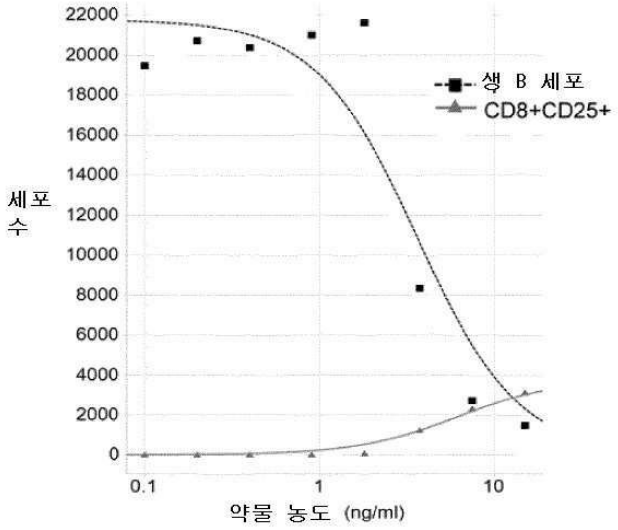
도면6



	T 세포	혈장 세포	기본 E:T 비
기준선에서 세포 #	2809	7679	1:2.7

	T 세포 CD8+CD25+	생 종양 세포	유효 E:T 비
약물 농도에 의한 변동 #	265	1616	1:6.1

도면7

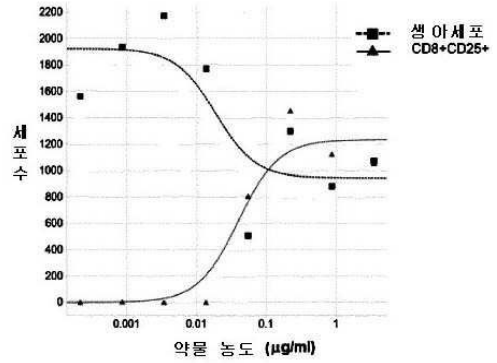


	T 세포	CD19+	기본 E:T 비
기준선에서 세포 #	1101	33166	1:30.1

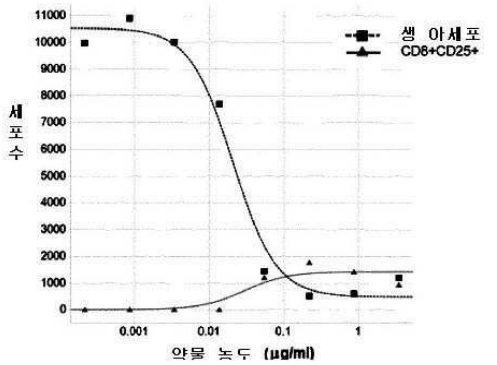
	T 세포 CD8+CD25+	생 종양 세포	유효 E:T 비
약물 농도에 의한 변동 #	3799	21761	1:5.7

도면8

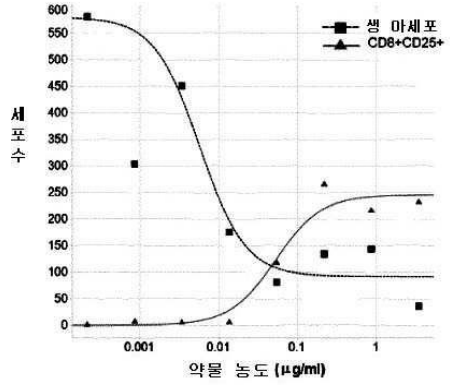
샘플 1



샘플 2

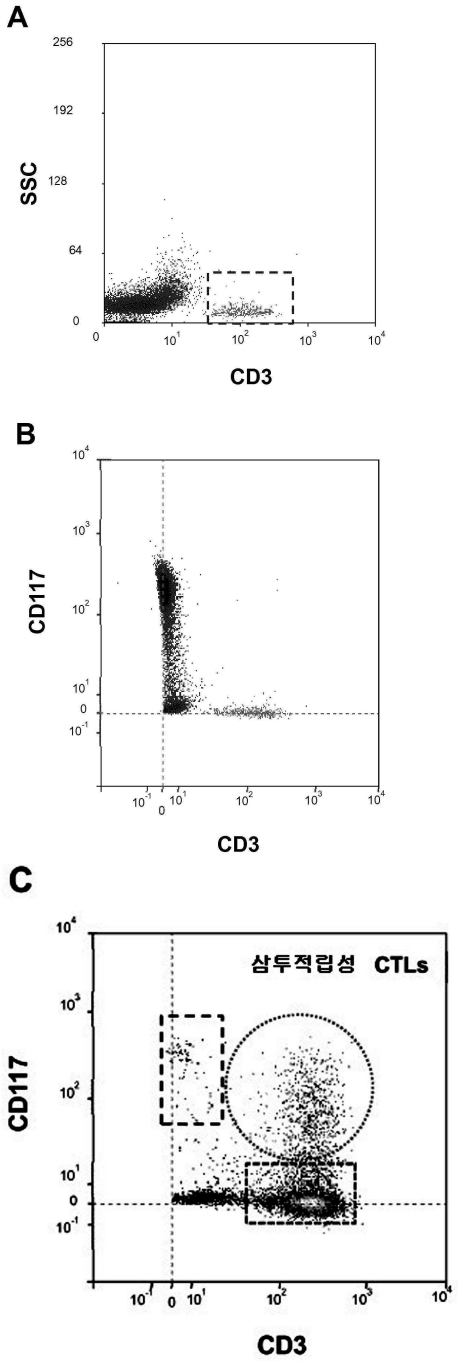


샘플 3

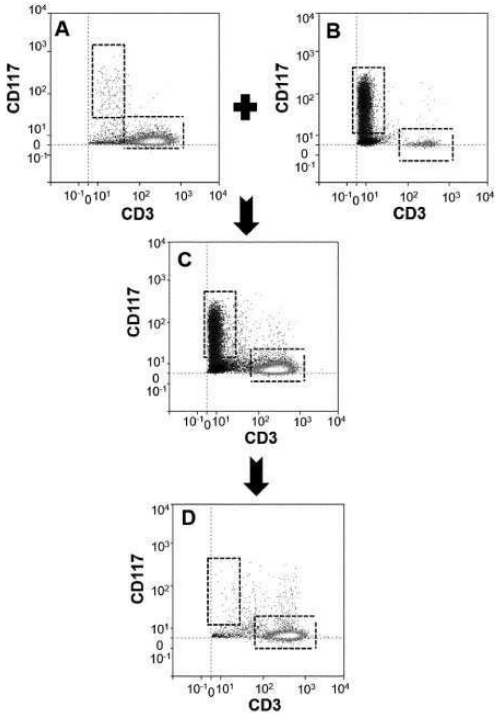


		T 세포 CD8+CD25+	생 아세포	유효E:T비
약물 농도에 의한 변동 #	샘플 1	1234	983	1:0.8
	샘플 2	1414	10057	1:7.1
	샘플 3	245	489	1:2

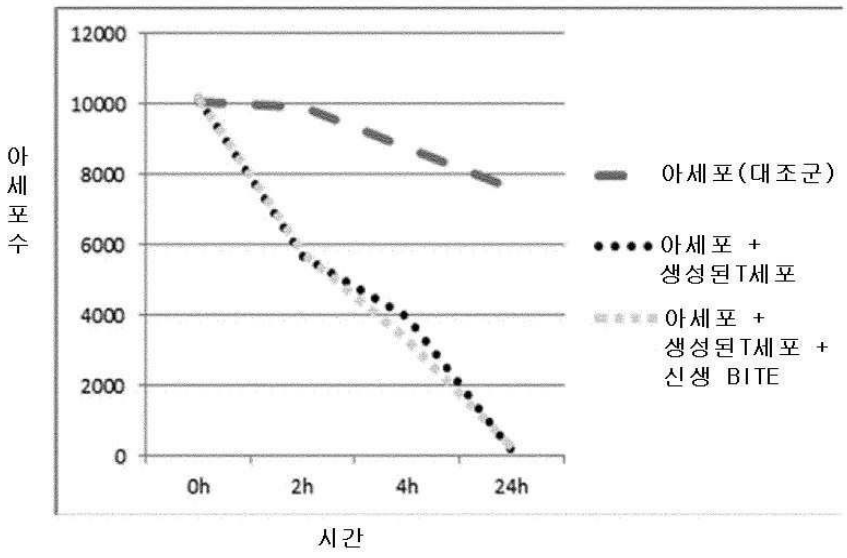
도면9



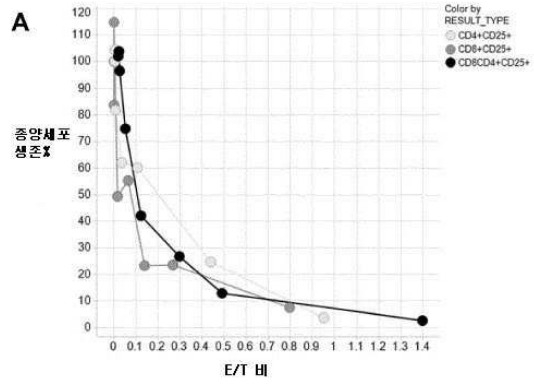
도면10

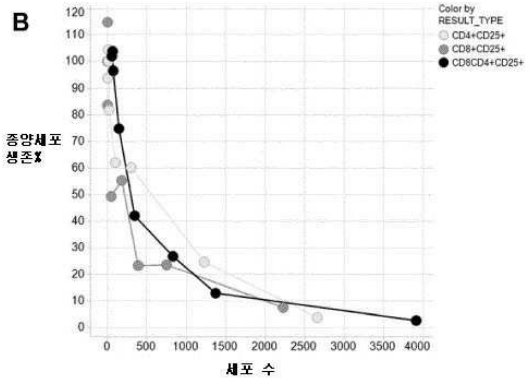

A
B
C
D
CD117
CD3

도면11

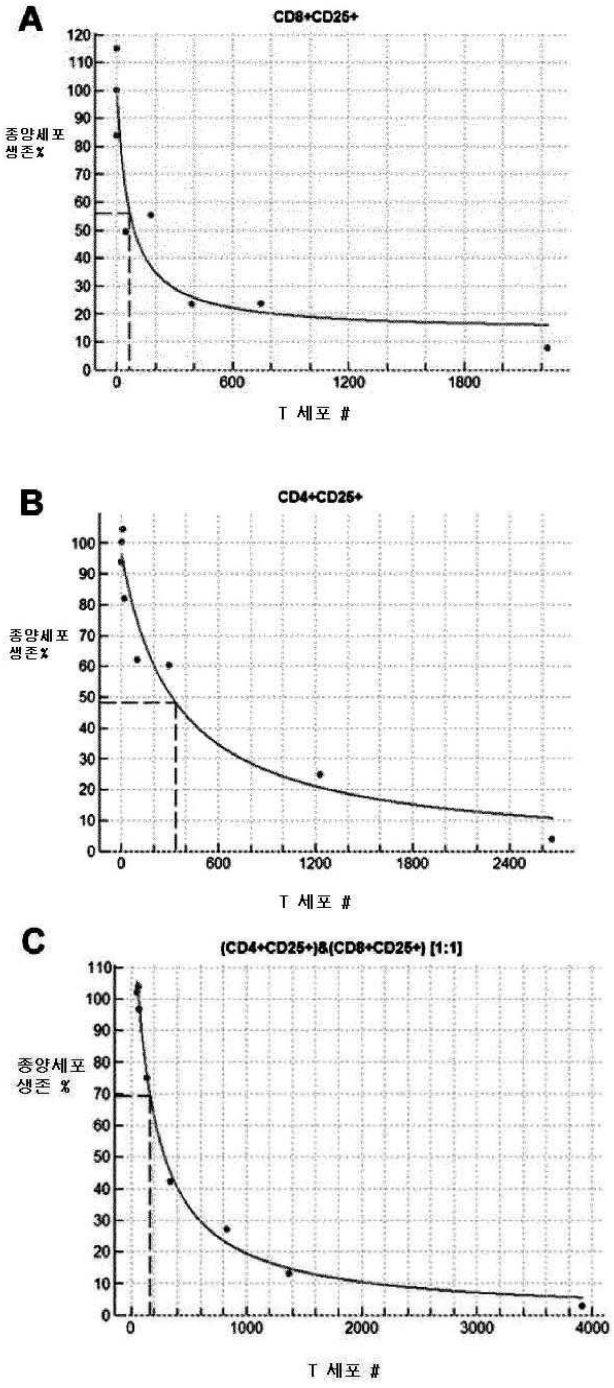

12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0h
2h
4h
24h
아세포 수
시간
아세포(대조군)
아세포 + 생성된T세포
아세포 + 생성된T세포 + 신생 BITE

도면12

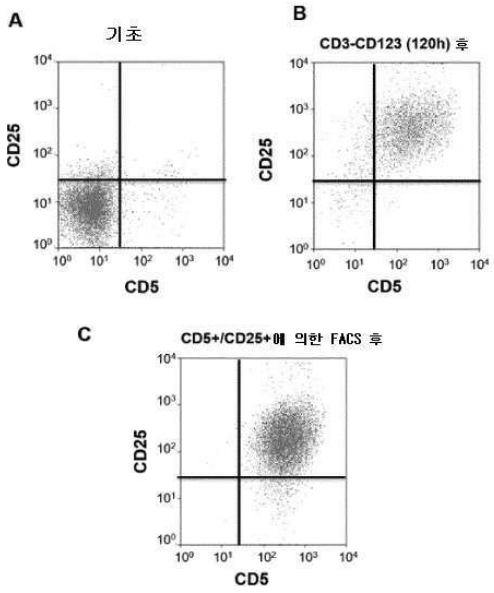

A
종양세포 생존%
E/T 비
Color by RESULT_TYPE
CD4+CD25+
CD8+CD25+
CD8CD4+CD25+


B
종양세포 생존%
세포 수
Color by RESULT_TYPE
CD4+CD25+
CD8+CD25+
CD8CD4+CD25+

도면13

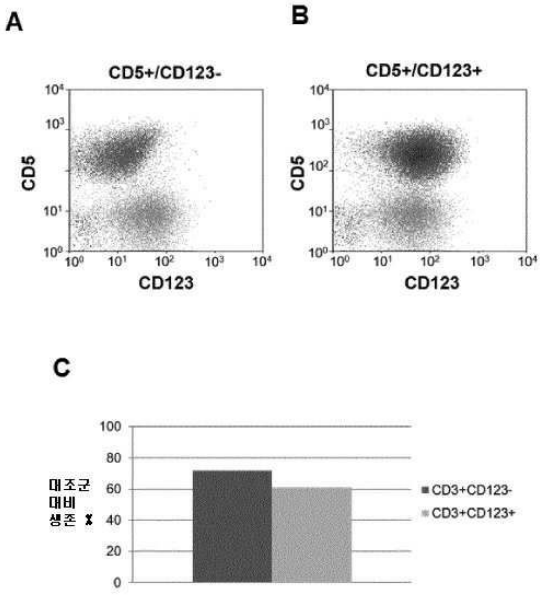

A
CD8+CD25+
종양세포 생존%
T 세포 #
B
CD4+CD25+
종양세포 생존%
T 세포 #
C
(CD4+CD25+)&(CD8+CD25+) [1:1]
종양세포 생존 %
T 세포 #

도면14

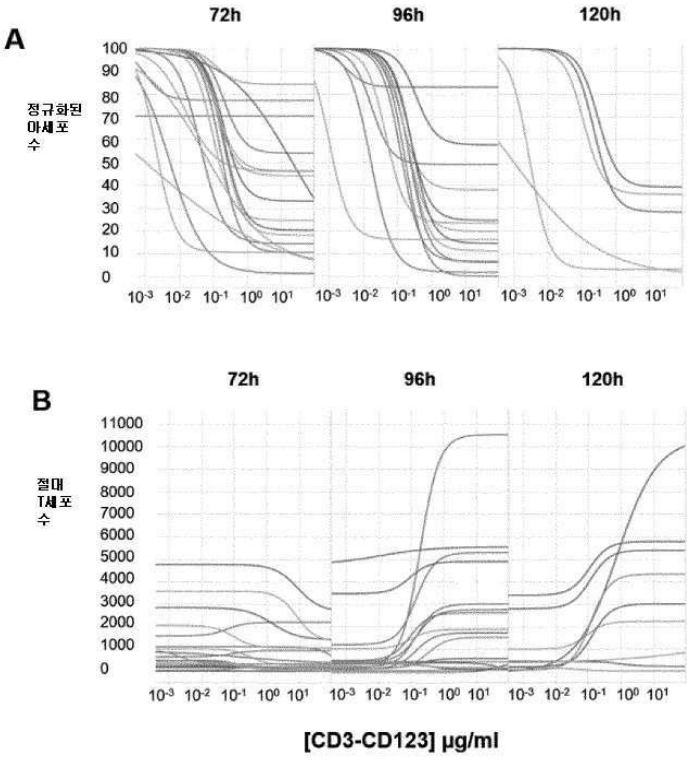


% CD5+CD25+	기초	120h CD3-CD123	FACS 후
샘플 1	0.25%	89.8%	99.1%
샘플 2	0.3%	75.2%	99.6%

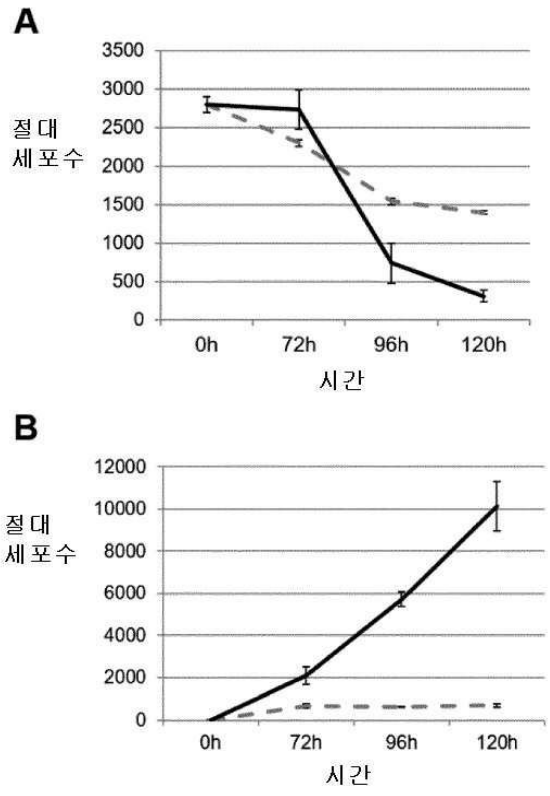
도면15



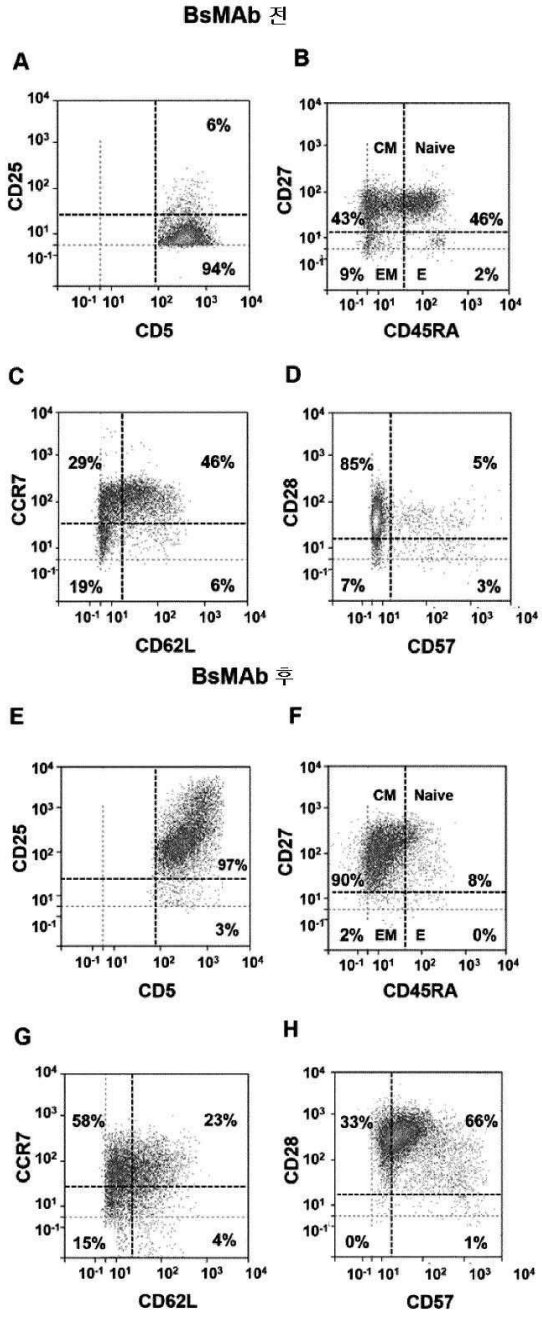
도면16


A
72h
96h
120h
정규화된 아세포 수
B
72h
96h
120h
절대 T세포 수
[CD3-CD123] μg/ml

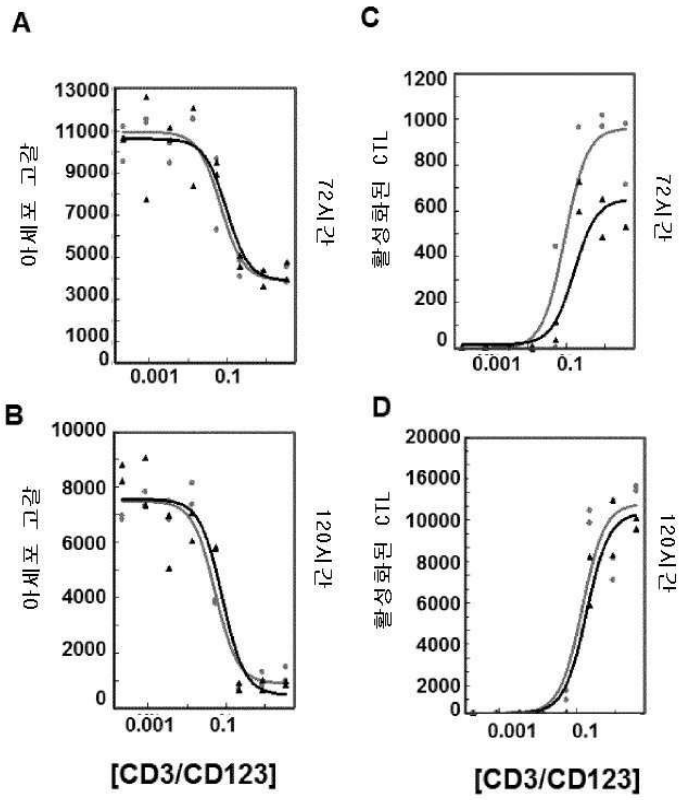
도면17


A
절대 세포수
0h
72h
96h
120h
시간
B
절대 세포수
0h
72h
96h
120h
시간

도면18

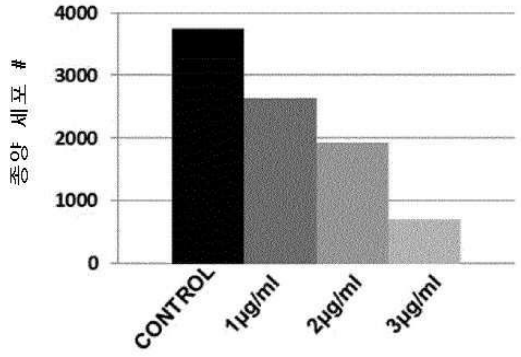

BsMAb 전
A
B
CD25
CD5
6%
94%
CD27
CD45RA
CM
Naive
43%
46%
9%
EM
E
2%
C
D
CCR7
CD62L
29%
46%
19%
6%
CD28
CD57
85%
5%
7%
3%
BsMAb 후
E
F
CD25
CD5
97%
3%
CD27
CD45RA
CM
Naive
90%
8%
2%
EM
E
0%
G
H
CCR7
CD62L
58%
23%
15%
4%
CD28
CD57
33%
66%
0%
1%

도면19

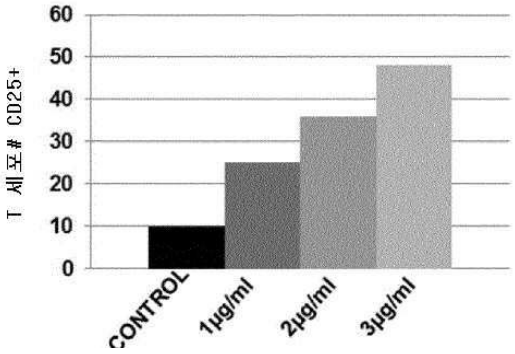


도면20

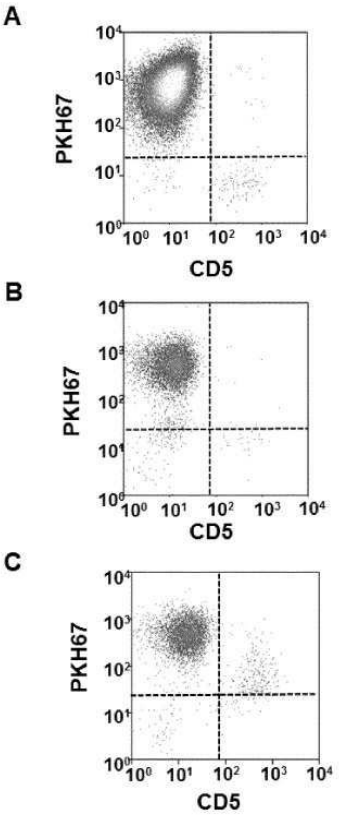
A


종양 세포 #
4000
3000
2000
1000
0
CONTROL
1μg/ml
2μg/ml
3μg/ml

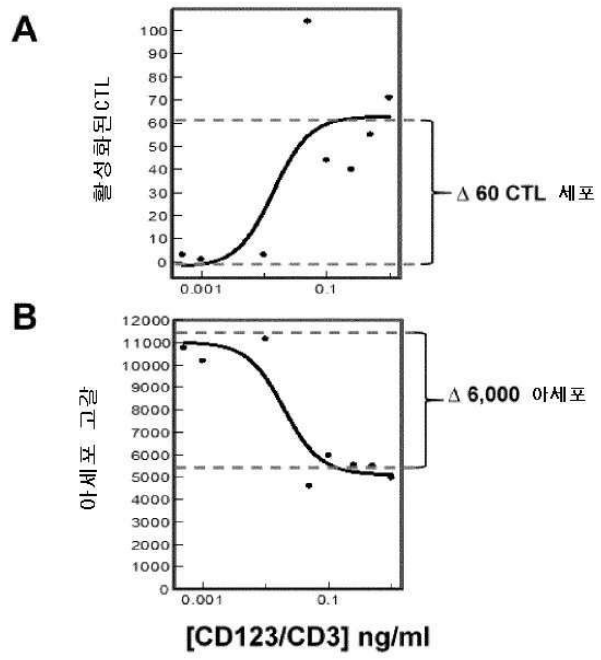
B


T 세포# CD25+
60
50
40
30
20
10
0
CONTROL
1μg/ml
2μg/ml
3μg/ml

도면21

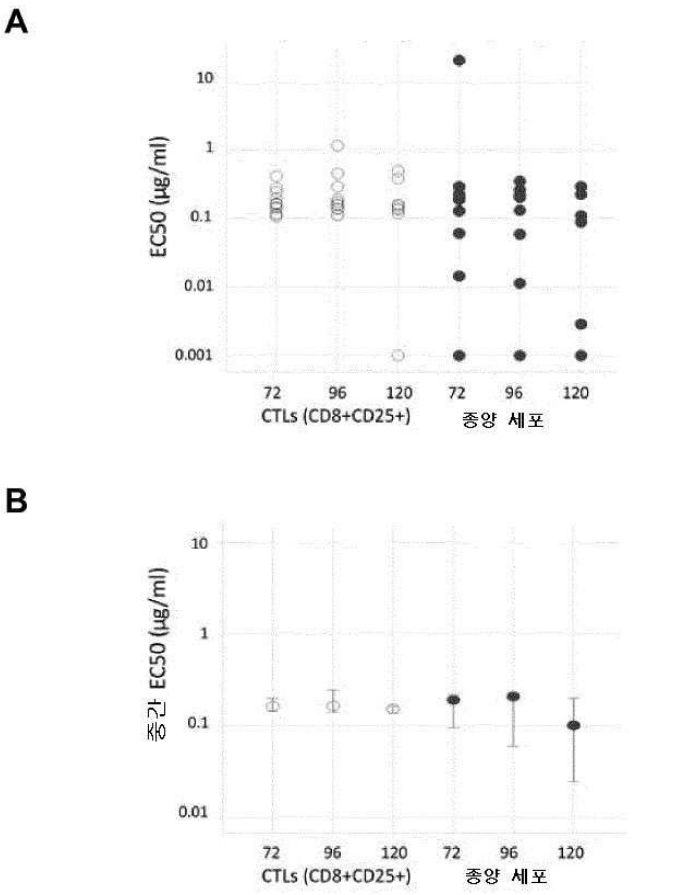


도면22

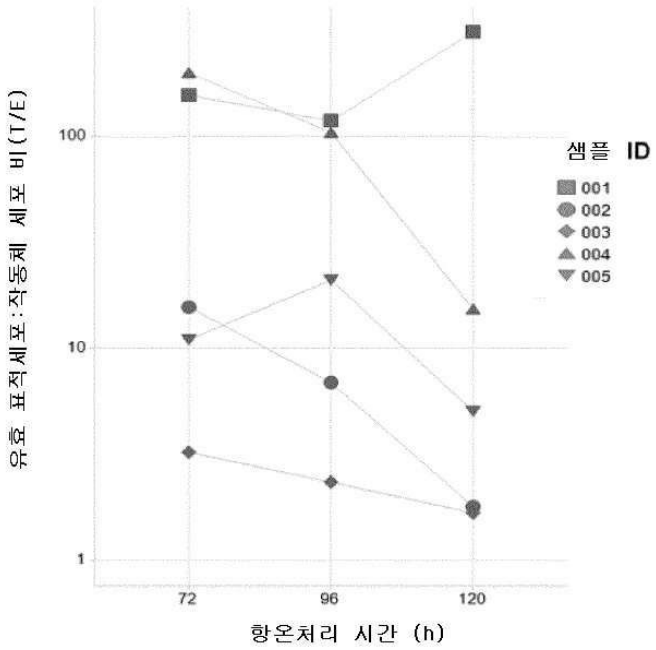


유효 E:T비 = ΔCTLs : Δ 아세포(종양)
= 60:6,000 = 1:100

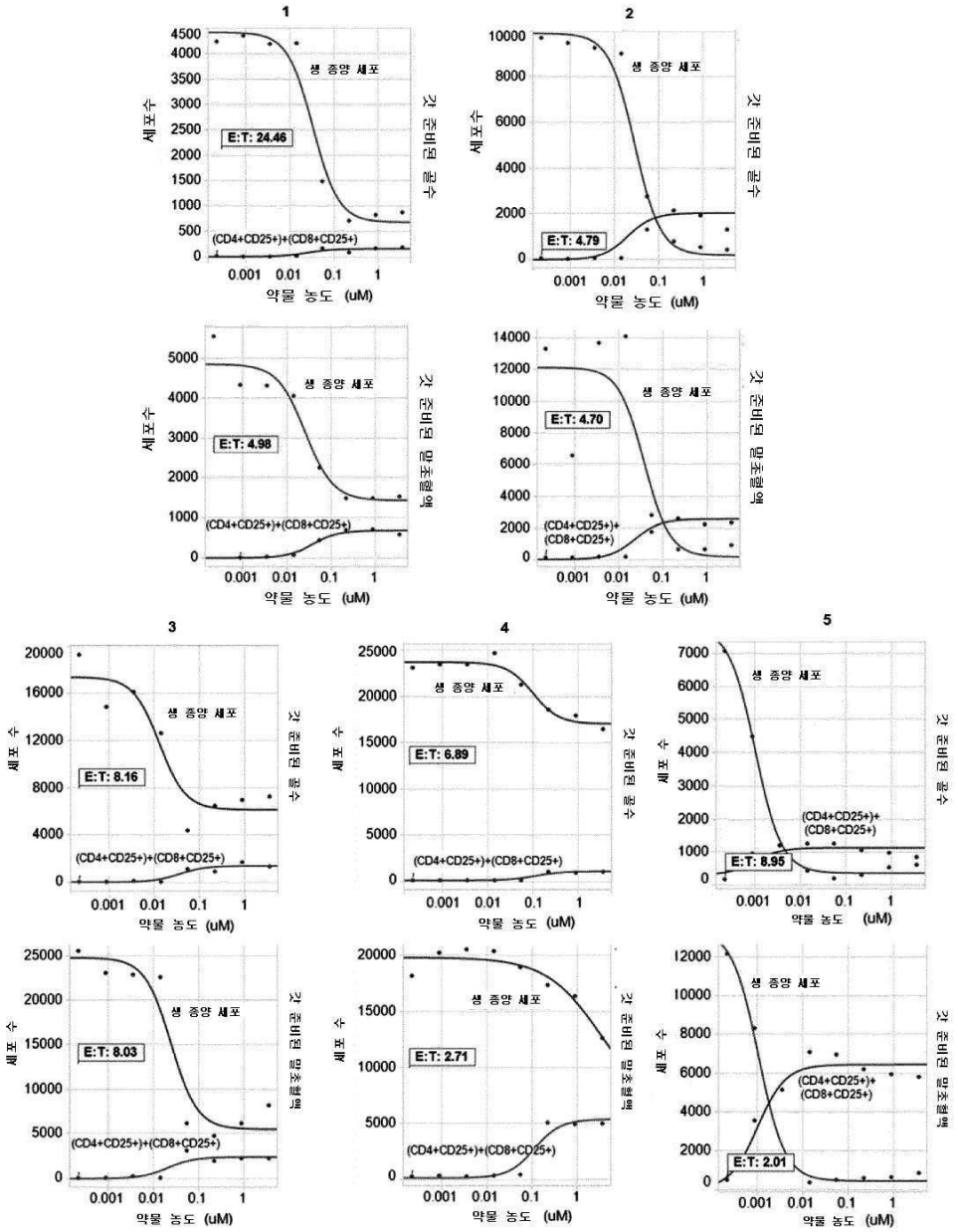
도면23


A
EC50 (μg/ml)
10
1
0.1
0.01
0.001
72
96
120
72
96
120
CTLs (CD8+CD25+)
종양 세포
B
중간 EC50 (μg/ml)
10
1
0.1
0.01
72
96
120
72
96
120
CTLs (CD8+CD25+)
종양 세포

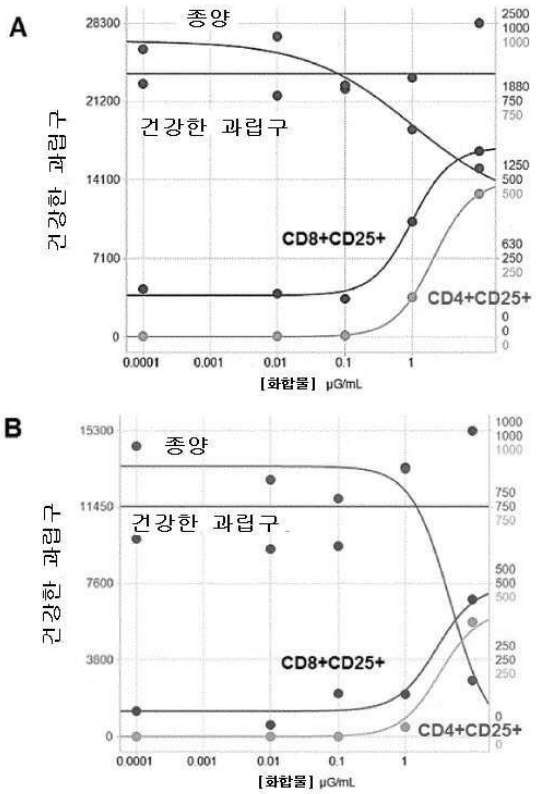
도면24


유효 표적세포:작동체 세포 비(T/E)
100
10
1
72
96
120
항온처리 시간 (h)
샘플 ID
001
002
003
004
005

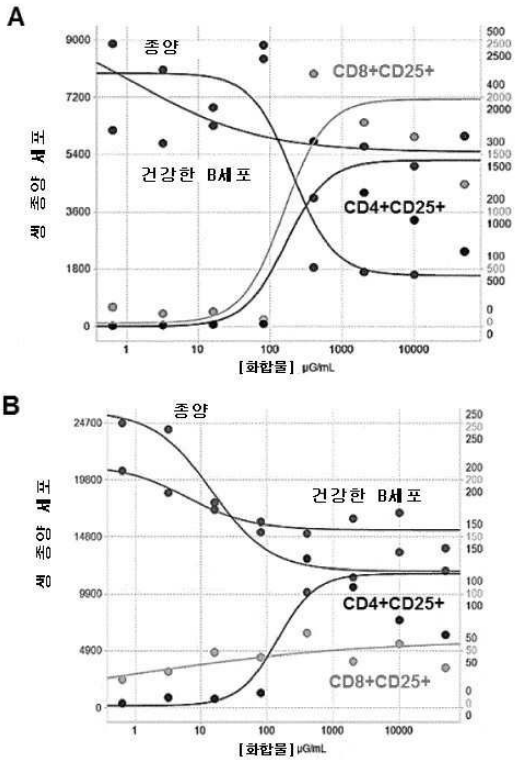
도면25


1
2
3
4
5
생 종양 세포
(CD4+CD25+)+(CD8+CD25+)
E:T: 24.46
E:T: 4.79
E:T: 4.98
E:T: 4.70
E:T: 8.16
E:T: 6.89
E:T: 8.95
E:T: 8.03
E:T: 2.71
E:T: 2.01
세포수
약물 농도 (uM)
0.001 0.01 0.1 1

도면26


A
종양
건강한 과립구
CD8+CD25+
CD4+CD25+
건강한 과립구
[화합물] μG/mL
B
종양
건강한 과립구
CD8+CD25+
CD4+CD25+
건강한 과립구
[화합물] μG/mL

도면27


A
종양
CD8+CD25+
건강한 B세포
CD4+CD25+
생 종양 세포
[화합물] μG/mL
B
종양
건강한 B세포
CD4+CD25+
CD8+CD25+
생 종양 세포
[화합물] μG/mL