



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월23일

(11) 등록번호 10-2660362

(24) 등록일자 2024년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/74 (2024.01) C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2017-7016293

(22) 출원일자(국제) 2015년11월17일

심사청구일자 2020년11월17일

(85) 번역문제출일자 2017년06월14일

(65) 공개번호 10-2017-0101206

(43) 공개일자 2017년09월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/061189

(87) 국제공개번호 WO 2016/081518

국제공개일자 2016년05월26일

(30) 우선권주장

62/080,500 2014년11월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Clin Cancer Res. 2014 Nov 15,
20(22):5720-5732.*

Mol Ther. 2013, 21(3):638-647.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

아디셋 바이오, 인크.

미국 94025 캘리포니아주 덴로 파크 컨스티튜션
드라이브 200

(72) 발명자

자코비츠, 아야

미국 90210 캘리포니아주 비버리 힐즈 허튼 드라
이브 3135

폴드, 오릿

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 카이만 레
인 712

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 41 항

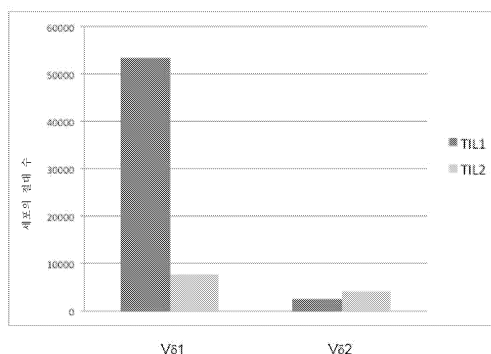
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 조작된 감마 델타 T 세포

(57) 요약

본 발명은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포(들) 및 선택의 항원을 표적화하는 강력하고 선택적인 능력을 가지는 치료제로서 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 다양한 암, 감염성 질환 및 면역 장애의 치료에 유용하다. 조작된 및 비조작된 $\gamma\delta$ T 세포(들) 집단을 치료학적으로 유용한 분량으로 증식시키는 방법이 또한 개시된다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 보편 공여자일 수 있고, 임의의 MHC 일배체형을 가지는 대상체에게 투여될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2024.01)

C07K 14/70503 (2013.01)

C07K 14/70539 (2013.01)

C07K 16/30 (2013.01)

C07K 2317/22 (2013.01)

C07K 2317/32 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

(72) 발명자

린, 앤디, 안-데

미국 94306 캘리포니아주 폴로 알토 둔칸 플레이스
3934

산타구이다, 마리안느, 테레사

미국 94002 캘리포니아주 벨몬트 파인 크놀 드라이
브 1706

명세서

청구범위

청구항 1

- a) $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 복합 샘플을 제공하는 단계, 및
- b) $\delta 1$ 또는 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키는 적어도 1종의 항체와 함께 상기 샘플의 세포를 배양함으로써 $\delta 1$ 또는 $\delta 2$ T 세포를 증식시키는 단계로서,

여기서 $\delta 1$ 또는 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키는 상기 적어도 1종의 항체는 각각

i. $\delta 1$ TCR 가변 영역의 아미노산 서열에 결합하여 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키고 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 생성하는 TS8.2 및 TS-1 항체, 또는

ii. $\delta 2$ TCR 가변 영역의 아미노산 서열에 결합하여 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키고 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 생성하는 B6 및 15D 항체

로부터 선택된 것인 단계

를 포함하는, 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단 또는 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 생성하는 생체의 또는 시험관내 방법으로서,

여기서 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단 내 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포의 백분율은 60% 초과이고, 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 1×10^7 개의 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 포함하거나; 또는

여기서 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단 내 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포의 백분율은 60% 초과이고, 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 1×10^7 개의 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 것인

방법.

청구항 2

$\gamma \delta$ T 세포 집단을 $\delta 1$ 또는 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포의 선택적 증식을 자극하는 활성화제와 접촉시키는 것을 포함하는, $\gamma \delta$ T 세포 집단의 시험관내 증식을 위한 방법으로서,

a. 활성화제는 TS8.2 및 TS-1로부터 선택된 항체이고, 항체는 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키며, 여기서 방법은 $\delta 1$ T 세포의 백분율을 포함하는 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 생성하고, 여기서 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단 내의 $\delta 1$ T 세포의 백분율은 60% 초과이고, 증식된 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 1×10^7 개의 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 포함하거나; 또는

b. 활성화제는 B6 및 15D로부터 선택된 항체이고, 항체는 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키며, 여기서 방법은 $\delta 2$ T 세포의 백분율을 포함하는 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 생성하고, 여기서 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단 내의 $\delta 2$ T 세포의 백분율은 60% 초과이고, 증식된 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포 집단은 적어도 1×10^7 개의 $\delta 2$ $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 것인,

방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 표면에 부동화된 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키는 항체가 항체 TS-1 및 항체 TS 8.2로부터 선택된 것이며, 여기서 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 증식시키는 항체가 또 다른 $\gamma \delta$ T 세포 집단에 비해 $\delta 1$ $\gamma \delta$ T 세포 집단의 성장을 10배 초과로 자극하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, $\delta 2 \gamma \delta T$ 세포를 선택적으로 활성화 및 증식시키는 항체가 항체 B6 및 항체 15D로부터 선택된 것이며, 여기서 $\delta 2 \gamma \delta T$ 세포를 선택적으로 증식시키는 항체가 또 다른 $\gamma \delta T$ 세포 집단에 비해 $\delta 2 \gamma \delta T$ 세포 집단의 성장을 10배 초과로 자극하는 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 증식 단계가 IL-2, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 및 IL-33으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 존재 하에 $\gamma \delta T$ 세포를 배양하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 사이토카인이 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-18로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 사이토카인이 IL-2, IL-7 및 IL-15로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 배양 조건이 IL-4를 포함하지 않고, 세포가 증식 전에 IL-4에 노출된 적이 없는 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 항원 제시 세포, 아미노포스페이트, 또는 질소 함유 비스포스포네이트에 의해 $\gamma \delta T$ 세포 집단을 증식시키는 것을 포함하지 않는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, $\gamma \delta T$ 세포가 대상체의 복합 샘플로부터 단리된 $\gamma \delta T$ 세포로부터 유래되며, 여기서 복합 샘플이 혈액 샘플, 제대혈 샘플, 종양, 줄기 세포 전구체, 종양 생검, 조직, 림프, 또는 외부 환경과 직접 접촉하는 대상체의 상피 부위인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 증식된 $\delta 1$ 또는 증식된 $\delta 2 \gamma \delta T$ 세포 집단의 $\gamma \delta T$ 세포가 T 세포 수용체 (TCR), 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작된 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 증식된 $\delta 1$ 또는 증식된 $\delta 2 \gamma \delta T$ 세포 집단의 $\gamma \delta T$ 세포가 2개 이상의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작된 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 2개 이상의 종양 인식 모이어티가 상이하고, 여기서 각각의 상이한 종양 인식 모이어티가 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하거나 또는 상이한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 조작된 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

- a) 조작된 $\gamma \delta T$ 세포가 인간 HLA 유전자좌위를 결여했거나,
- b) 조작된 $\gamma \delta T$ 세포가 보편 공여자 세포이거나, 또는
- c) 조작된 $\gamma \delta T$ 세포가 종양 특이적 동종이계 $\gamma \delta T$ 세포 인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

- a) 종양 인식 모이어티가 종양 침윤 림프구로부터 유래되거나,
- b) 종양 인식 모이어티가 T 세포로부터 클로닝되거나,
- c) 종양 인식 모이어티가 조작된 T 세포 수용체이거나,
- d) 종양 인식 모이어티가 종양 항원을 인식하는 $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, 키메라 항원 수용체(CAR), 항체, 단쇄 가변 단편(scFv), 단일 도메인 항체(sdAb), 항체 단편, Fab, 또는 F(ab)₂이거나,
- e) 종양 항원이 펩타이드-MHC 복합체이고, 종양 인식 모이어티가 펩타이드-MHC 복합체를 인식하거나, 또는
- f) 종양 인식 모이어티가 MHC 클래스 분자와의 복합체로, 종양 세포 표면 상에 발현된 외인성 항원 또는 세포 표면 상에 디스플레이된 유래된 펩타이드를 인식하는 것인

방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 종양 인식 모이어티가 종양 항원을 인식하는 $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, 키메라 항원 수용체(CAR), 항체, 단쇄 가변 단편(scFv), 단일 도메인 항체(sdAb), 항체 단편, Fab, 또는 F(ab)₂이며, 여기서 종양 인식 모이어티가 인간 B 세포, 낙타 B 세포, 라마 B 세포, 랫트 B 세포, 또는 마우스 B 세포로부터 유래된 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

- i. 조작된 T 세포 수용체가 인간 또는 마우스 T 세포 수용체로부터 유래되거나,
- ii. 조작된 T 세포 수용체가 조작된 $\alpha\beta$ TCR이거나, 또는
- iii. 조작된 T 세포 수용체가 조작된 $\gamma\delta$ TCR인

방법.

청구항 19

제12항에 있어서, 종양 인식 모이어티가 MICA, MICB, Her2Neu, EGFR, 메소텔린, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD22, CD37, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아단백질, 암배아 항원, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, PLIF, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질F77, 섬유모세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 플레이트 결합 단백질, 플레이트 수용체, SLC44A4, CTAG1B, AXL, IL-13R, SLTRK6, gp100, MART1, 티로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원, MAGEA 패밀리 단백질, KKL1, 돌연변이된 ras, β raf, 또는 p53에 결합하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 증식된 $\delta 1 \gamma\delta$ T 세포 집단 또는 증식된 $\delta 2 \gamma\delta$ T 세포 집단의 $\gamma\delta$ T 세포가 T 세포 수용체 (TCR), 항체, 또는 그의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 항원 인식 모이어티가 자가면역 질환과 연관된 항원을 인식하거나, 또는 항원 인식 모이어티가 병원균성 항원을 인식하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

- a) 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 각각의 항원 인식 모이어티는 동일하거나 상이한 자가면역 항원을 인식하거나,
- b) 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 각각의 항원 인식 모

이어티는 동일한 자가면역 항원 또는 상이한 자가면역 항원의 상이한 에피토프를 인식하거나,

c) 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 항원 인식 모이어티는 병원균성 항원을 인식하거나,

d) 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 각각의 항원 인식 모이어티는 동일한 병원균성 항원의 상이한 에피토프를 인식하거나, 또는

e) 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되며, 여기서 각각의 항원 인식 모이어티는 상이한 병원균성 항원을 인식하는 것인

방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포가 병원균성 항원을 인식하는 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 때, 병원균성 항원이 박테리아 항원이거나, 또는 병원균성 항원이 바이러스 항원인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포가 각각 상이한 병원균성 항원을 인식하는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 때, 병원균성 항원이 박테리아 항원이거나, 또는 병원균성 항원이 바이러스 항원인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 항원 인식 모이어티가 자가면역 질환과 연관된 항원 또는 병원균성 항원을 인식하는 $\alpha \beta$ TCR, $\gamma \delta$ TCR, 키메라 항원 수용체(CAR), 항체, 단쇄 가변 단편(scFv), 단일 도메인 항체(sdAb), 항체 단편, Fab, 또는 F(ab)₂인 방법.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 복합 샘플이 단핵구, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포 및 NK 세포의 사전 결실이 없는 전체 PBMC 집단을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 또는 제2항에 있어서, 증식된 $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포 집단 내 $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포의 백분율이 80% 초과 또는 90% 초과인 방법.

청구항 27

제1항 또는 제2항에 있어서, 증식된 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포 집단 내 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포의 백분율이 80% 초과 또는 90% 초과인 방법.

청구항 28

제1항 또는 제2항에 있어서, $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포 또는 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 증식시키기 전에 $\gamma \delta$ T 세포를 농후화하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 농후화가 적혈구, NK 세포, $\alpha \beta$ 세포, B 세포, 단핵구, 및 대식 세포 중 하나 이상을 제거하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 30

증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단 및 TS8.2 또는 TS-1 항체로부터 선택된 항체를 포함하는 조성물로서, 여기서 항체는 $\delta 1$ TCR 가변 영역의 아미노산 서열에 결합하고 $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 증식시켜, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단이 60% 초과인 $\delta 1$ T 세포의 백분율을 포함하고, 증식된 $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포 집단이 적어도 1×10^7 개의 $\delta 1 \gamma \delta$ T 세포를 포함하도록 하거나; 또는

증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단 및 B6 또는 15D 항체로부터 선택된 항체를 포함하는 조성물로서, 여기서 항체는 $\delta 2$ TCR 가변 영역의 아미노산 서열에 결합하고 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포를 선택적으로 증식시켜, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단이 60% 초과인 $\delta 2$ T 세포의 백분율을 포함하고, 증식된 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포 집단이 적어도 1×10^7 개의 $\delta 2 \gamma \delta$ T 세포를 포함하도록 하는 것인,

조성물.

청구항 31

제30항에 있어서,

- a) 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단이 $\delta 1$ T 세포의 백분율을 포함하며, 여기서 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단에서의 $\delta 1$ T 세포의 백분율은 80% 또는 90% 초과이거나, 또는
- b) 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단이 $\delta 2$ T 세포의 백분율을 포함하며, 여기서 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단에서의 $\delta 2$ T 세포의 백분율은 80% 또는 90% 초과인

조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 항체가 표면 상에 부동화된 것인 조성물.

청구항 33

제30항에 있어서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포가 대상체의 복합 샘플로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포로부터 유래된 것인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 복합 샘플이 대상체의 혈액 샘플, 체대혈 샘플, 종양, 줄기 세포 전구체, 종양 생검, 조직, 림프, 또는 외부 환경과 직접 접촉하는 상피 부위인 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 복합 샘플이 단핵구, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포 및 NK 세포의 사전 결실이 없는 전체 PBMC 집단을 포함하는 것인 조성물.

청구항 36

제30항에 있어서, IL-2, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 및 IL-33으로부터 선택된 사이토카인을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 사이토카인이 IL-2, IL-7 및 IL-15로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

청구항 38

제30항에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포 집단이 농후화된 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 포함하는 것인 조성물.

청구항 39

제36항에 있어서, IL-4를 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 40

제30항에 있어서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 $\gamma \delta$ T 세포가 T 세포 수용체 (TCR), 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작된 것인 조성물.

청구항 41

제30항에 있어서, 증식된 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 $\gamma \delta$ T 세포가 자가면역 질환과 연관된 1종 이상의 항원 또는 1종 이상의 병원성 항원을 인식하는 T 세포 수용체 (TCR), 항체 또는 그의 항원 결합 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작된 것인 조성물.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] T 림프구에 의한 항원 인식은 T 세포 수용체(T-cell receptor; TCR)인 매우 다양한 이종이합체 수용체에 의해 달성될 수 있다. 혈액 및 림프구성 장기에서의 대략 95%의 인간 T 세포는 이종이합체 $\alpha\beta$ TCR 수용체($\alpha\beta$ T 세포 계열)를 발현한다. 혈액 및 림프구성 장기에서의 대략 5%의 인간 T 세포는 이종이합체 $\gamma\delta$ TCR 수용체($\gamma\delta$ T 세포 계열)를 발현한다. 이 T 세포 하위세트는 각각 ' $\alpha\beta$ ' 및 ' $\gamma\delta$ ' T 세포라 칭해질 수 있고, $\alpha\beta$ 및 $\gamma\delta$ T 세포는 기능이 다르다. $\alpha\beta$ T 세포는 MHC 제한 양자 면역을 추진시키고, $\gamma\delta$ T 세포는 선천성 및 MHC 비제한 양자 면역을 브릿징한다. 항원 제시 세포(antigen presenting cell; APC)가 클래스 I/II MHC의 상황에

서 항원을 제시할 때 $\alpha\beta$ T 세포의 활성화가 이후 발생한다. 수지상 세포는 미경험 T 세포의 가장 강한 공지된 활성제이다. a) MHC-펩타이드와 TCR-CD3 복합체의 상호작용에 의해 생성된 신호; 및 b) T 세포 상의 CD28과 APC 상의 B7 패밀리의 구성원의 상호작용에 의해 생성된 신호(동시자극 신호)의 2개의 신호는 전체 $\alpha\beta$ T 세포 활성화에 필요하다. $\alpha\beta$ T 세포와 반대로, $\gamma\delta$ T 세포는 항원을 직접적으로 인식할 수 있고, MHC-펩타이드와 TCR-CD3 복합체의 상호작용을 요하지 않는다. 그러므로, $\gamma\delta$ T 세포가 MHC 제한되지 않는다고 말해진다. 내인성 T 세포에서, 동시자극 신호의 결여는 클론 무반응을 발생시킨다.

[0002]

항원을 직접적으로 인식하는 내인성 $\gamma\delta$ T 세포의 능력은 $\gamma\delta$ T 세포가 매력적인 치료학적 도구가 되게 한다. 그러나, 내인성 $\gamma\delta$ T 세포의 조작 및 지향의 어려움은 클리닉에서 환자 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 치료학적 유용성을 제한한다.

발명의 내용

[0003]

몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 제공하고, 여기서 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 1개, 2개, 또는 이것 초과 상이한 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작되고, 각각의 종양 인식 모이어티는 종양 항원을 인식한다. 종양 인식 모이어티는 동일한 종양 항원, 구별되는 종양의 항원, 종양 항원 및 활성화 또는 불활성화 동시자극/면역 조절 수용체, MHC 분자와 복합체 형성된 항원 또는 호밍 수용체의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 암을 치료하는 방법을 제공한다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 대상체에 동종이게이도록 설계될 수 있고, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 종양 특이적 동종이게 $\gamma\delta$ T 세포일 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 인간 HLA 유전좌위를 결여시킨다. HLA 유전좌위는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포가 설계될 수 있으므로 2개 이상의 HLA 유전좌위로부터의 유전자 발현을 결여시키도록 조작될 수 있다. 몇몇 경우에, 적어도 하나의 조작된 종양 인식 모이어티는 조작된 T 세포 수용체이다. T 세포 수용체는 인간 T 세포 수용체, 마우스 T 세포 수용체, 랫트 T 세포 수용체 또는 키메라 T 세포 수용체일 수 있다. 조작된 T 세포 수용체는 조작된 $\alpha\beta$ TCR일 수 있고, 2개의 상이한 조작된 $\alpha\beta$ TCR은 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 다른 경우에, 조작된 T 세포 수용체는 조작된 $\gamma\delta$ TCR이다. 몇몇 실시형태에서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 고형 종양을 침윤시키도록 설계된다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 종양 세포 내에 세포내 또는 세포외 발현된 종양 항원을 인식하도록 설계될 수 있다. 세포외 발현된 종양 항원의 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 MHC 분자와 복합체 형성된 펩타이드인 항원을 인식하도록 구성될 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 항원은 림프종 항원, 백혈병 항원, 다발성 골수종 항원, 유방암 항원, 전립선암 항원, 방광암 항원, 결장암 및 직장암 항원, 뇌암 항원, 위암 항원, 두경부암 항원, 신장암 항원, 폐암 항원, 췌장암 항원, 육종 항원, 중피종 항원, 난소암 항원 또는 흑색종 항원이다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 $V\delta 1^+$ T 세포, $V\delta 2^+$ T 세포 또는 $V\delta 3^+$ T 세포, 또는 $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$ 또는 $V\delta 3^+$ T 세포의 혼합물로부터 유래된다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 $CD3^+$ T 세포 또는 $CD3^-$ T 세포로부터 유래할 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다.

[0004]

몇몇 경우에, 2개 이상의 상이한 종양 인식 모이어티는 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고, 각각의 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열은 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 조작된다. 몇몇 경우에, 적어도 하나의 종양 인식 모이어티는 종양 세포로부터 클로닝된다. 다른 경우에, 적어도 하나의 종양 인식 모이어티는 합성으로 조작된다. 몇몇 경우에, 적어도 하나의 종양 인식 모이어티는, 종양 항원을 인식하는, 항체 단편, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 종양 인식 모이어티는 조작된 면역글로불린 경쇄, 조작된 면역글로불린 중쇄, 또는 임의의 이의 단편일 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 또한 이동 및 호밍 수용체(homing receptor)를 발현한다. 호밍 분자는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 고형 종양에 부착시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 적어도 하나의 면역 관문 유전자를 결여시키도록 추가로 조작되고, 면역 관문 유전자는 CTLA-4 유전자, PD-1 유전자, LAG3 유전자, CEACAM-1 유전자 또는 또 다른 유전자일 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 항원은 CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아 단백질(alphafetoprotein; AFP), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen; CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, 메소텔린, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 폴레이트 결합 단백질/수용체, SLC44A4, 크립토(Cripto), CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MARTI, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원(epithelial tumor antigen; ETA), MAGEA 패밀리의 유전자(예컨대, MAGE3A, MAGE4A), KKL1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A(MICA), MHC 클래스 I 사슬 관련

분자 B(MICB), HPV 또는 CMV로부터 선택된다. 다른 경우에, 적어도 하나의 종양 인식 모이어티는 항원, 본 명세서에 기재된 임의의 항원의 일부 또는 단편을 인식하도록 설계된 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)이다.

[0005] 다른 실시형태에서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되고, 여기서 항원 인식 모이어티는 자가면역 질환과 연관된 항원을 인식한다. 이러한 세포는 1개, 2개, 또는 이것 초과와 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 수 있고, 여기서 각각의 항원 인식 모이어티는 동일한 자가면역 항원의 상이한 에피토프를 인식한다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 구별되는 항원, 항원 및 활성화 또는 불활성화 동시자극/면역 조절 수용체, MHC 분자와 복합체 형성된 항원 또는 자가면역 질환과 연관된 호밍 수용체를 인식한다.

[0006] 대안적인 실시형태에서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작되고, 여기서 항원 인식 모이어티는 병원균성 항원을 인식한다. 이러한 세포는 2개 이상의 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 수 있고, 여기서 각각의 항원 인식 모이어티는 동일한 병원균성 항원의 상이한 에피토프를 인식한다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 구별되는 항원, 항원 및 활성화 또는 불활성화 동시자극/면역 조절 수용체, MHC 분자와 복합체 형성된 항원 또는 병원균성 항원과 연관된 호밍 수용체를 인식한다.

[0007] 병원균성 항원은 박테리아 분자 또는 바이러스 분자, 예컨대 박테리아 단백질 또는 바이러스 단백질일 수 있다.

[0008] 다른 경우에, 본 개시내용은 $\gamma\delta$ T 세포 집단을 제공하고, 여기서 $\gamma\delta$ T 세포 집단의 증식은 24시간 미만에 약 1의 세포 분열의 평균 속도로 $\gamma\delta$ T 세포 집단의 증식을 자극하는 물질에 의해 활성화된다. 몇몇 경우에, 증식된 $\gamma\delta$ T 세포 집단은 $\delta 1$ T 세포, $\delta 2$ T 세포 또는 $\delta 3$ T 세포의 백분율을 포함하고, 상기 언급된 증식된 $\gamma\delta$ T 세포 중 임의의 하나의 백분율은 5% 초과일 수 있다. 몇몇 경우에, $\gamma\delta$ T 세포 집단에서의 $\delta 1$, $\delta 2$ 또는 $\delta 3$ T 세포의 백분율은 24시간 미만에 약 1의 세포 분열의 평균 속도로 시험관내 또는 생체내 증식한다. 몇몇 경우에, $\gamma\delta$ T 세포 집단은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 양을 추가로 포함하고, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 항원 인식 모이어티를 발현하도록 조작된다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 인간 HLA 유전자위를 또한 결여시키도록 설계될 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포 집단의 증식을 자극하는 물질은 항체일 수 있고, 항체는 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, $\gamma 3.20$, 7A5, IMMU510, R9.12 및 11F2 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 경우에, 항체는 표면에 부동화된다.

[0009] 몇몇 경우에, 본 개시내용은 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 에피토프에 관한 것이다. 몇몇 경우에, 활성화 에피토프는 24시간 미만에, 또는 $\gamma\delta$ T 세포의 집단의 신속한 증식을 지지하기에 또 다른 적합한 시간 기간에 1 세포 분열의 평균 속도로 $\gamma\delta$ T 세포 집단의 증식을 자극한다. 몇몇 경우에, 활성화 에피토프는 δ TCR, 예컨대 $\delta 1$, $\delta 2$ 또는 $\delta 3$ TCR의 아미노산 서열이다. 몇몇 경우에, 활성화 에피토프는 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, $\gamma 3.20$, 7A5, IMMU510, R9.12 및 11F2 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 중 임의의 하나가 결합한 에피토프이다. 활성화 에피토프는 V $\delta 1$ 유전자 분절 및 a J $\delta 1$, J $\delta 2$, J $\delta 3$ 또는 J $\delta 4$ 유전자 분절로부터의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에 활성화 에피토프는 구성적 에피토프이고, 다른 경우에 활성화 에피토프는 선형 에피토프이다.

[0010] 몇몇 경우에, 본 개시내용은 $\gamma\delta$ T 세포 수용체의 에피토프를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) $\gamma\delta$ T 세포 수용체로부터의 에피토프의 라이브러리를 제조하는 단계; (b) 에피토프의 라이브러리를 항체와 접촉시키는 단계; 및 (c) 항체가 결합한 에피토프의 라이브러리에서의 적어도 하나의 에피토프의 아미노산 서열을 확인하는 단계를 포함한다. 항체는 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, $\gamma 3.20$, 7A5, IMMU510, R9.12, 11F2 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 경우에, 항체는 고체 지지체에 부착된다. T 세포 수용체의 에피토프는 T 세포 수용체에서의 아미노산의 연속 또는 불연속 서열에 상응할 수 있다. 에피토프의 라이브러리는 약 10개의 아미노산 내지 약 30개의 아미노산 길이, 약 10개의 아미노산 내지 약 20개의 아미노산 길이, 약 5개의 아미노산 내지 약 12개의 아미노산 길이의 범위의 단편을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 항체는 표지된다. 라벨은 방사성 분자, 발광성 분자, 형광성 분자, 효소 또는 바이오틴일 수 있다. 몇몇 경우에, 에피토프의 라이브러리는 합성으로 설계된 cDNA로부터 번역된 펩타이드를 포함하고, 합성으로 설계된 cDNA는 복수의 합성으로 설계된 γ TCR 및 복수의 합성으로 설계된 δ TCR의 분절을 포함한다. 다른 경우에, 에피토프의 라이브러리는 인간 PBMC, 또는 인간 악성 또는 정상 상피 조직으로부터 단리된 림프구로부터 유래된, 인간 $\gamma\delta$ T 세포로부터 추출된 전체 RNA로부터 증폭된 펩타이드를 포함한다. 합성으로 설계된 cDNA의 라이브러리는 J δ 영역이 다른 복수의 V $\delta 1$, V $\delta 2$ 및 V $\delta 3$ 유전자 분절을 포함할 수 있고, 상기 라이브러리는 복수의 V $\gamma 2$, V $\gamma 3$, V $\gamma 4$, V $\gamma 5$, V $\gamma 8$, V $\gamma 9$, V $\gamma 10$, $\delta 1$, $\delta 2$ 및 $\delta 3$ 유전자 분절을 포함할 수 있다.

[0011] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 명

세서에 기재된 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용의 추가적인 양태 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 당해 분야의 당업자에게 용이하게 명확해질 것이고, 본 개시내용의 오직 예시적인 실시형태가 도시되고 기재되어 있다. 실현될 수 있는 것처럼, 모두 본 개시내용으로부터 벗어나지 않으면서, 본 개시내용은 다른 및 상이한 실시형태일 수 있고, 이의 몇몇 상세내용은 변형될 수 있다. 따라서, 도면 및 설명은 성질상 제한이 아니라 예시적으로 생각되어야 한다.

[0012]

참고문헌에 의한 포함

[0013]

본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별 공보, 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고문헌으로 포함된 것으로 표시된 것과 동일한 정도로, 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0014]

본 발명의 새로운 특징은 첨부된 청구항에서 특별히 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점의 더 우수한 이해는 본 발명의 원칙이 이용되는 예시적인 실시형태를 기재한 하기 상세한 설명, 및 수반된 도면(또한 본 명세서에서 "도" 및 "도면")을 참조하여 얻어질 수 있을 것이고, 도면에서,

도 1은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 도식적으로 예시한다. 패널 A는 1개의 종양 인식 모이어티를 발현하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 예시한다. 패널 B는 2개의 종양 인식 모이어티를 발현하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 예시한다.

도 2는 대상체를 치료하는 방법을 도식적으로 예시한다.

도 3은 대상체에게 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단을 투여하는 방법을 도식적으로 예시한다.

도 4는 간(TIL 1) 및 신장 종양(TIL 2)으로의 결장 전암 전이로부터 단리된 $\gamma\delta 1$ 및 $\gamma\delta 2$ 림프구의 성장을 예시하는 그래프를 도시하고, CCR4 및 CCR7을 발현하는 것으로 나타났다.

도 5는 혈청 함유 배지 및 혈청 비함유 배지에서의 $\gamma\delta$ T 세포 성장을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 6은 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, $\gamma 3.20$, IMMU510 또는 11F2에 의한 항- $\gamma\delta$ TCR 항체 차단 실험을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 7은 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, $\gamma 3.20$, IMMU510 또는 11F2에 의한 항- $\gamma\delta$ TCR 항체 차단 실험을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 8은 항-TCR $\gamma\delta 1$ TS-1 항체와의 경쟁 실험을 도시한다.

도 9는 항-TCR $\gamma\delta 1$ TS8-2 항체와의 경쟁 실험을 도시한다.

도 10은 PBMC로부터의 $\delta 1$ T 세포의 활성화 및 증식을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 11은 PBMC로부터의 $\delta 2$ T 세포의 활성화 및 증식을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 12는 PBMC로부터의 $\delta 1$ T 세포의 배수 증식을 예시하는 그래프를 도시한다.

도 13은 PBMC로부터의 $\delta 2$ T 세포의 배수 증식을 예시하는 그래프를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 발명의 다양한 실시형태가 본 명세서에 도시되고 기재되어 있지만, 이러한 실시형태가 오직 예로 제공된다는 것이 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 본 발명으로부터 벗어나지 않으면서 당해 분야의 당업자에게 다수의 변형, 변경 및 치환이 이제 일어날 수 있다. 본 명세서에 기재된 발명의 실시형태에 대한 다양한 대안이 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0016]

개관

[0017]

인간에서, $\gamma\delta$ T 세포(들)는 선천성 면역 반응과 후천성 면역 반응 사이의 연결을 제공하는 T 세포의 하위집단이다. 이 세포는 V-(D)-J 분절 재배열을 겪어서 항원 특이적 $\gamma\delta$ T 세포 수용체($\gamma\delta$ TCR) 및 $\gamma\delta$ T 세포(들)를 생성하고, $\gamma\delta$ T 세포 이펙터 기능을 활성화하도록 독립적으로 또는 함께 작용하는, $\gamma\delta$ TCR 또는 다른, 비-TCR 단백질에 의해, 항원의 인식을 통해 직접 활성화될 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포는 말초 혈액 및 림프구성 장기에서 T 세포의 대략 1-5%인 포유류에서의 전체 T 세포 집단의 적은 비율을 나타내고, 피부, 간, 소화관, 호흡기 및 생식기와 같은 상피 세포 농후 구획에 주로 있는 것으로 보인다. 주요 조직적합 복합체 분자(major

histocompatibility complex; MHC)에 결합한 항원을 인식하는 $\alpha\beta$ TCR과 달리, $\gamma\delta$ TCR은 박테리아 항원, 바이러스 항원, 이환된 세포에 의해 발현된 스트레스 항원, 및 온전한 단백질 또는 펩타이드 화합물의 형태의 종양 항원을 직접 인식할 수 있다.

[0018] 넓은 스펙트럼의 항원을 인식하는 $\gamma\delta$ T 세포의 능력은 $\gamma\delta$ T 세포의 유전 조작에 의해 증대될 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포(들)는 생체내 선택의 항원을 인식하는 보편 동종이계 치료를 제공하도록 조작될 수 있다. 막관통 도메인 및/또는 세포내 T 세포 활성화 도메인에 커플링된, $\alpha\beta$ TCR 또는 $\gamma\delta$ TCR과 같은, 적어도 하나의 종양 인식 모이어티를 포함하는 발현 카세트를 발현하도록 조작된 $\gamma\delta$ T 세포(들)가 본 명세서에 기재되어 있다. 활성화 도메인은 T 세포의 $\alpha\beta$ TCR 또는 $\gamma\delta$ TCR 기계로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 활성화 도메인은 CD28, CD2, CTLA-4, ICOS, JAMAL, PD-1, 41-BB, CD27, CD30, OX40, NKG2D, HVEM 또는 CD46 분자로부터 유래할 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포는 2개 이상의 구별되는 TCR, 구별되는 항체, 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 항원 결합 단편을 발현하도록 조작될 수 있다. 대상체에게 투여될 때, 항원에 의한 조작된 $\alpha\beta$ TCR, $\gamma\delta$ TCR, 항체 또는 키메라 항원 수용체 CAR의 동원은 생체내 상당한 세포독성을 가지는 $\gamma\delta$ T 세포를 효과적으로 제공한다. TCR은 인간 T 세포, 마우스 T 세포, 랫트 T 세포, 인간화된 마우스, 인간화된 랫트, 면역화 포유류, 또는 파지 또는 효모 라이브러리로부터 유래할 수 있다. 항체, CAR, 또는 임의의 항원 결합 단편은 인간 B 세포, 마우스 B 세포, 랫트 B 세포, 낙타 B 세포, 라마 B 세포, 면역화 포유류, 또는 파지 또는 효모 라이브러리로부터 유래할 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 발현된 종양 인식 모이어티는 이환된 세포에 의해 세포내 또는 세포외 발현된 항원을 인식할 수 있다. 예를 들어, 세포는 암 유발 바이러스, 예컨대 인간 유두종 바이러스(human papilloma virus; HPV)에 의해 감염될 수 있고, 이환된 세포는 세포내 하나 이상의 HPV 항원을 발현할 수 있다. 이환된 세포는 세포내 발현된 HPV 항원을 더 작은 단편으로 처리할 수 있어서, 항원 펩타이드가 MHC 클래스 I 분자에 커플링되고 세포 표면으로 수송되게 한다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 종양 인식 모이어티는, MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자와 복합체로, 다양한 항원 단편, 또는 이환된 세포에 의해 세포내 발현되고 세포 표면 상에 제시된 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 대안적으로, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 종양 인식 모이어티는, MHC 클래스 분자와 복합체로, 종양 세포 표면 상에 발현된 외인성 항원 또는 세포 표면 상에 디스플레이된 유래된 펩타이드를 인식하도록 설계될 수 있다.

[0019] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포(들) 및 이환된 세포 상의 선택의 항원을 표적화하는 강력하고 선택적인 능력을 가지는 치료학적 생성물로서 이를 사용하는 방법이 본 명세서에 제공된다. $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ TCR의 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질 서열은 종양 항원(들), 박테리아 항원(들), 바이러스 항원(들), 또는 스트레스 항원(들)에 의해 동원된 1개 또는 복수의 $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ T 세포(들)로부터 표준 기법에 의해 클로닝될 수 있다. 대안적으로, $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ TCR의 폴리뉴클레오타이드 서열은 컴퓨터 프로그램 제품에서 인실리코 설계될 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ TCR을 포함하는 발현 카세트는 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 합성 기법에 의해 합성될 수 있다. 종양 항원에 대한 조작된 TCR의 결합을 규명하기 위해 고속 스크리닝 기법을 이용할 수 있다. $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ TCR, 막관통 도메인 및 활성화 도메인을 포함하는 발현 카세트의 조작은 $\gamma\delta$ T 세포의 활성 및 세포독성 특성을 증가시키고, 이로써 강력한 세포독성을 가지는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 제공한다.

[0020] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 혈액, 제대혈, 줄기 세포, 종양, 또는 종양 침윤 림프구(tumor infiltrating lymphocyte; TIL)로부터 단리된 비조작된 T 세포로부터 유래할 수 있다. 단리된 T 세포는 포유류, 예를 들어 인간으로부터 유래할 수 있다. 단리된 T 세포 집단에서의 하나 이상의 세포는 T 세포 활성화 또는 불활성화 도메인과 커플링된 예를 들어 종양 인식 모이어티를 포함하는 발현 카세트로부터 폴리뉴클레오타이드(들)를 발현하도록 조작될 수 있다. 종양 인식 모이어티는 표적 종양 항원, 종양 세포 불활성화 또는 T 세포 불활성화 도메인을 인식하도록 설계된다. 종양 인식 모이어티는 표적 종양 항원, 활성화 또는 불활성화 동시자극/면역 조절 수용체, 또는 호밍 수용체를 인식하도록 설계된다. 종양 항원은 주요 조직적합 복합체(MHC)와 복합체로 예를 들어 세포 표면 상에 발현된 세포내 또는 세포외 단백질로부터 유래된 펩타이드일 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 $\alpha\beta$ TCR이고, 항원은 MHC와 복합체로 종양 세포에 의해 제시된 펩타이드이다. 항원은 고난의 세포, 예컨대 암성 세포로부터, 또는 병원균, 예컨대 바이러스 또는 세포 내 복제하는 세포내 박테리아로부터, 또는 병원균 또는 세포가 세포의 유체로부터 세포 이물 흡수에 의해 내재화한 이의 생성물로부터 유래된 분자일 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 2개 이상의 상이한 종양 인식 모이어티를 발현하도록 설계되고, 각각의 종양 인식 모이어티는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계된다. 보편 조작된 $\gamma\delta$ T 세포(들)는 상이한 MHC 일배체형을 가지는 항원을 인식할 수 있는 종양 인식 모이어티를 발현할 수 있다. 종양 인식 모이어티는 TCR($\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ TCR) 또는 항체 인식 펩타이드-MHC 복합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 소정의 항원, 상이한 종양 인식 모이어티의 경우, TCR 또는 항체 중 어느 하나는 상이한 HLA 일배체형과 복합체화된

동일한 또는 상이한 항원 유래 펩타이드를 인식할 수 있다.

[0021] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는, 대상체에게 투여될 때, 표적 항원을 발현하는 세포를 약하게 하거나 사멸할 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 질환의 치료를 필요로 하는 인간으로 도입될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 세포는 암을 가지는 사람에게 투여되고, 이러한 경우에 세포는 종양 항원 또는 다른 질환 관련 항원을 인식하도록 조작된다. 도 1은 $\gamma \delta$ T 세포를 도식적으로 예시한다. 패널 A는 1개의 종양 인식 모이어티를 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 예시한다. 패널 B는 2개의 종양 인식 모이어티를 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 예시한다.

[0022] 발현 카세트, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)에 의해 코딩된 인식 모이어티는 전체 항체, 항체 단편, 단쇄 가변 단편(scFv), 단일 도메인 항체, (sdAb), Fab, F(ab)₂, Fc, 항체 상의 경쇄 또는 중쇄, 항체의 가변 또는 불변 영역, 또는 세포 표면 종양 항원에 결합하는 임의의 이들의 조합, MHC와의 복합체로 세포 표면 상에 발현된 종양 항원으로부터 유래된 펩타이드(펩타이드-MHC 복합체), 또는 2개의 상이한 항원에 지향된 2개의 상이한 항체를 포함하는 이중특이적 작제물, 동일한 항원의 상이한 에피토프, 또는 종양 항원 및 동시자극/활성화 분자, 면역 조절 분자(들), 또는 호밍 수용체(들)일 수 있다. 항체는 예를 들어 인간 B 세포, 마우스 B 세포, 랫트 B 세포 또는 하이브리도마 세포주로부터 유래할 수 있다. 마우스 하이브리도마 세포주는 면역화된 야생형 또는 인간화된 마우스, 랫트 B 세포, 면역화된 야생형 또는 인간화 랫트로부터 단리된 랫트 하이브리도마 세포로부터, 또는 인간, 마우스, 랫트, 낙타 또는 라마로부터 유래된 항체 라이브러리로부터 유래할 수 있다. 조작된 종양 인식 모이어티는 세포 표면 항원 또는 펩타이드 MHC-항원 복합체를 인식하는 CAR일 수 있다. 조작된 종양 인식 모이어티는 MHC 클래스 I 또는 II와 복합체화된 종양 특이적 항원을 인식하는 조작된 $\alpha \beta$ TCR일 수 있다. 인식 모이어티는 또한 MHC 비제한 방식으로 종양 특이적 항원을 인식하는 $\gamma \delta$ TCR일 수 있다. 종양 인식 모이어티는 세포 표면 항원, 펩타이드-MHC 복합체, 탄수화물 또는 지질을 인식하는 조작된 TCR 또는 CAR일 수 있다.

[0023] 1개, 2개, 또는 이것 초과인 종양 인식 모이어티는 동일한 또는 상이한 항원을 인식하도록 설계될 수 있다. 1개, 2개, 또는 이것 초과인 종양 인식 모이어티는 동일한 또는 상이한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 조작된 발현 카세트에 의해 발현된 $\alpha \beta$ TCR 수용체이다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 발현된 조작된 $\alpha \beta$ TCR은, 종양 세포 또는 또 다른 이환된 세포에 의해 세포내 또는 세포외 또는 세포 표면 상에 발현된 항원으로부터 유래된, 펩타이드, 또는 펩타이드 합체(예컨대, 9합체)를 인식하도록 설계된다. 세포내 항원은 예를 들어 감염된 세포 내 복제하는 바이러스 및 박테리아에 의해 또는 대상체 자체의 단백질에 의해 생성될 수 있다. 대상체의 세포는 항원을 펩타이드로 처리하고 MHC 클래스 I 또는 II 분자와 복합체로 펩타이드를 제시할 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 다양한 상이한 세포내 항원의 다양한 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 세포외, 또는 외인성 항원, 예컨대 박테리아, 기생충, 바이러스 또는 심지어 암성 세포는 항원 제시 세포에 의해 식균작용되고, 더 작은 단편으로 처리되고, MHC 클래스 II 분자와 복합체로 제시될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 다양한 상이한 세포외 항원의 다양한 상이한 에피토프를 인식하도록 설계될 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 새로운 항원 인식을 가지는 세포를 제공하는 $\gamma \delta$ TCR 수용체이다. 발현 카세트는 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 통합되고 이에 의해 발현된 예를 들어 항체 또는 리간드를 발현하는 CAR을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 예를 들어 본 명세서에 기재된 항체, TCR, 항원 결합 단편, 또는 임의의 이들의 조합을 포함하는 이중특이적 작제물일 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 종양 침윤 림프구(TIL)로부터 조작될 수 있고/있거나, 발현 카세트에 의해 코딩된 종양 인식 모이어티는 TIL로부터 단리될 수 있다. TIL로부터 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 효과적으로 이동하고 호밍하고 종양 미세환경과 상호작용하는 종양 특이적 동종이계 세포일 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 특정한 종양, 예컨대 유방암, 전립선암, 방광암, 결장암 및 직장암, 뇌암, 위암, 두경부암, 신장암, 폐암, 췌장암, 육종, 중피종, 난소암 항원 또는 흑색종으로부터 단리된 TIL로부터 조작될 수 있다. 종양 인식 모이어티는 합성 라이브러리로부터 유래할 수 있거나, 종양 인식 모이어티는 예를 들어 림프종, 백혈병, 다발성 골수종, 유방암, 전립선암, 방광암, 결장암 및 직장암, 뇌암, 위암, 두경부암, 신장암, 폐암, 췌장암, 육종, 중피종, 난소암 항원 또는 흑색종으로부터 단리된 T 세포, B 세포로부터 유래할 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 암으로부터 단리된 종양 침윤 림프구로부터 유래된다.

[0024] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 T 세포 동시자극/활성화 도메인을 추가로 포함할 수 있다. T 세포 활성화 도메인은 $\alpha \beta$ T 세포 및/또는 $\gamma \delta$ T 세포로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 조작된 $\alpha \beta$ TCR은 $\gamma \delta$ 동시자극/활성화 도메인 또는 $\alpha \beta$ 동시자극/활성화 도메인에 연결되도록 설계될 수 있다. $\alpha \beta$ 동시자극/활성화 도메인의 비제한적 예는 CD28, CD2, CTLA4, ICOS, PD-1, 4-1 BB(CD 137), OX40, CD27, HVEM을 포함한다. $\gamma \delta$ 동시자극/활성화 도메인의 비제한적 예는 CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD46을 포함한다. 종양 인식 모이어티는 T 세포 활성화 도메인 또는 임의의 다른 적합한 활성화 도메인에 연결될 수 있다. T 세포 활성화 도메인은

CD3 ξ 도메인, CD28 도메인, 또는 CD2, ICOS, 4-1 BB(CD 137), OX40(CD 134), CD27, CD30, CD46, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, CTLA4, CD152, PD-1, JAMAL, NKG2D, CD314, 및/또는 Fc ϵ R1을 포함하는 또 다른 적합한 활성화 도메인일 수 있다. 막관통 도메인은 예를 들어 CD28, CD4, CD3e, CD 16, 및 면역글로불린의 관련 도메인을 포함할 수 있다.

[0025] 본 명세서에 개시된 발명은 바람직하게는 인식 분자를 코딩하는 발현 카세트를 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공한다. 몇몇 경우에, 발현 카세트에 상응하는 핵산 서열은 클로닝되고 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 안정하게 도입된다. 종양 인식 모이어티 및 관련 활성화 도메인을 포함할 수 있는 발현 카세트를 포함하는 핵산 서열은 합성으로 조작되고 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 안정하게 도입될 수 있다. 2개 이상의 상이한 종양 인식 모이어티는 동일한 또는 상이한 발현 카세트로부터 발현될 수 있다.

[0026] 이러한 세포를 조작하도록 다양한 기법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 클로닝된 또는 합성으로 조작된 DNA는 조작된 뉴클레아제, 예컨대 a) CRISPR/Cas 시스템; b) 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription Activator-Like Effector Nuclease; TALEN); c) 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease; ZFN); 및 d) 조작된 메가뉴클레아제 호밍 엔도뉴클레아제에 의한 게놈 편집 방법에 의해 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 생성하도록 삽입되거나 대체되거나 제거될 수 있다. 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty) 전이인자 시스템은 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 생성하도록 종양 인식 모이어티에 대한 코드를 포함하는 핵산을 수송하도록 또한 사용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 다른 폴리뉴클레오타이드 전달 방법, 예컨대 형질감염, 전기천공, 형질도입, 리포펙션, 나노조작된 물질, 예컨대 오르모실(Ormosil), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노 연관 바이러스를 포함하는 바이러스 전달 방법, 또는 또 다른 적합한 방법은 $\gamma \delta$ T 세포의 조작에 적합할 수 있다.

[0027] 몇몇 경우에, 인식 모이어티는 단일 또는 다수의 종으로부터 유래되고, 예를 들어 인식 모이어티의 폴리뉴클레오타이드 서열은 예를 들어 인간(호모 사피엔스(*Homo sapiens*)), 마우스(예를 들어, 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)), 랫트(예를 들어, 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*) 또는 라투스 라투스(*Rattus rattus*)), 낙타(예를 들어, 카멜루스 드로메다리우스(*Camelus dromedarius*) 또는 카멜루스 박트리아누스(*Camelus bactrianus*)), 또는 라마(라마 비쿠그나(*Lama vicugna*))로부터 유래할 수 있거나, 인식 모이어티의 폴리뉴클레오타이드 서열은 둘 다의 키메라 조합일 수 있다. 종양 인식 모이어티는 바람직하게는 인간으로부터 유래되지만, 몇몇 경우에 이것은 마우스 또는 다른 종, 바람직하게는 포유류로부터 유래할 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 키메라 TCR 수용체 또는 키메라 CAR이다. 몇몇 경우에, 비인간 종으로부터 유래된 종양 인식 모이어티의 폴리뉴클레오타이드 서열은 인간 종으로부터의 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 이의 유사성을 증가시키도록 조작되고, 이로써 종양 인식 모이어티를 "인간화"한다. 몇몇 경우에, 종, 예컨대 마우스 및 랫트는 예를 들어 인간화 항체 및 TCR을 제공하도록 "인간화"된다.

[0028] 종양 인식 모이어티는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서 발현 카세트로부터 바람직하게는 구성적으로 발현된다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 유도성 발현 시스템, 예컨대 테트라사이클린 조절 T-REx(상표명) 포유류 발현 시스템, 적합한 Tet-온/Tet-오프 발현 시스템 또는 또 다른 적합한 시스템의 발현 하에 있다. 구체적인 일 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 인간 V δ 1⁺ T 세포, 인간 V δ 2⁺ T 세포, 인간 V δ 3⁺ T 세포, 인간 CD3⁺ T 세포, 또는 인간 CD3⁻ T 세포로부터 유래된다.

[0029] 본 개시내용은, 생체내 대상체에서 특이적 항원을 검출하고 표적화할 수 있는 발현 카세트로부터 종양 인식 모이어티를 발현하는, 방법 및 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)를 제공한다. 대상체는 효과적이고 선택적인 방식으로 특이적 항원을 발현하는 세포(들)를 인식하고 사멸하거나 약하게 할 수 있는 치료제에 의한 치료를 필요로 하는 대상체일 수 있다. 바람직한 경우에, 항원은 암과 연관된다. 항원은 계열 특이적 종양 항원일 수 있다. 일 실시형태에서, 항원은 종양 항원, 예컨대 CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, 메소텔린, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 플레이트 결합 단백질/수용체, SLC44A4, 크립토, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원(ETA), MAGEA 패밀리 유전자(예컨대, MAGE3A, MAGE4A), KKL1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A(MICA), MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 B(MICB), HPV 또는 CMV이다.

[0030] 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 대상체의 MHC 유전좌위와 관련하여 자가유래 또는 동종이계일 수 있다. 예를 들어, 자가유래 및 동종이계 골수 이식(bone marrow transplantation; BMT)은 몇몇 분야, 특히 혈액학적 악성종양에 대한 치료로서 이용된다. 그러나, 급성 이식편 대 숙주 질환(graft-versus-host disease; GVHD) 및

숙주 대 이식편 질환(host-versus-graft disease; HVGD)은 동종이계 BMT에 대한 BMT의 가장 중요한 합병증으로 남아있다.

[0031] 공여자 T 세포 및 숙주 항원 제시 세포(APC)는 GVHD의 유도에 중요하다. $\gamma \delta$ T 세포가 숙주로부터 MHC 분자를 인식하지 않으므로, 본 발명의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의한 항원 인식은 GVHD를 촉발하지 않을 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 이식편 대 숙주 질환을 촉발하지 않으면서 비자가유래 대상체에게 투여되도록 설계될 수 있다. 또한, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 MHC 유전자좌위로부터의 유전자 발현을 결여시키도록 설계될 수 있다. 대안적으로, $\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 MHC 유전자좌위(유전자좌위들)를 결여시키도록 조작될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서의 MHC 유전자좌위의 결실 또는 유전자 발현의 파괴는 유전자 편집 기술, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), CRISPR 및 조작된 메가뉴클레아제에 의해 또는 $\beta 2m$ 결실에 의해 달성될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 다수의 MHC 유전자좌위의 유전자 발현을 결여시키거나 파괴시키도록 조작된다. 다른 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 적어도 하나의 MHC 클래스 I 유전자좌위, 적어도 하나의 MHC 클래스 II 유전자좌위, 또는 둘 다에서 유전자 발현을 결여시키거나 파괴시키도록 조작된다. 하나 이상의 MHC 유전자좌위의 결실은 숙주 대 이식편 질환을 촉발하지 않으면서 임의의 MHC 일배체형을 가지는 임의의 대상체에 대한 보편 공여자인 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공할 수 있어서, 숙주의 면역계에 의해 표적화되지 않으면서 숙주 내에 번창하고 지속하고 증식하고 작용할 수 있는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공한다.

[0032] 본 명세서에 기재된 교시내용 및 조성물은 전체의 다양한 분야에서 사용될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 종양 항원은 유방암 항원, 전립선암 항원, 방광암 항원, 결장암 및 직장암 항원, 뇌암 항원, 위암 항원, 두경부암 항원, 신장암 항원, 폐암 항원, 췌장암 항원, 육종 항원, 중피종 항원, 난소암 항원 또는 흑색종 항원이다. 이러한 경우에, 종양 인식 모이어티는, 클래스 I 또는 클래스 II MHC와의 복합체에서, 종양 세포 표면에 제시된, 세포내 또는 세포의 종양 항원으로부터 유래된 에피토프를 인식하도록 설계된, 조작된 $\alpha \beta$ TCR 또는 항체일 수 있다. 조작된 $\alpha \beta$ TCR은, 예를 들어 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 복합체의 상황에서, 또는 HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO 또는 다른 HLA 분자의 상황에서 종양 또는 APC에 의해 제시된, 세포내 종양 항원을 인식할 수 있다.

[0033] 몇몇 경우에, 항원은 자가 항원이다. 자가 항원은 예를 들어 면역글로불린, T 세포 수용체, 세포내 종양 항원, 세포의 종양 항원, MHC 분자 또는 병태와 연관된 세포의 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 인간 HLA DR2의 세포 발현은 전신 루푸스 및 다발성 경화증과 연관되고, 인간 HLA DR4의 세포 발현은 류마티스성 관절염 및 진성 당뇨병과 연관된다.

[0034] 다른 경우에, 항원은 외래 항원이다. 외래 항원은 예를 들어 바이러스, 박테리아, 원생동물 또는 알레르겐, 예컨대 화분 또는 식품일 수 있다. 외래 항원은 예를 들어 감염성 질환, 자가면역 장애 또는 조직 손상과 연관될 수 있다.

[0035] 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 대상체의 신체에서 특정한 신체 위치로 호밍하고 그러므로 특정한 조직, 장기 또는 신체 부위에서 항원을 표적화하도록 설계될 수 있다. 내인성 T 세포는 통행 리간드 및 이의 이동 패턴에 영향을 미치는 수용체의 구별되는 레퍼토리를 가진다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 종양 인식 모이어티를 포함하는 발현 카세트로부터 또는 별개의 발현 카세트로부터, 하나 이상의 통행 리간드(들), 또는 특정한 조직, 장기, 또는 신체 부위로의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 이동을 안내하는 수용체(들)를 발현하도록 설계될 수 있다.

[0036] 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 종양 특이적 동종이계 세포일 수 있다. 예를 들어, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 종양으로부터 단리된 종양 침윤 림프구(TIL)인 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포로부터 유래할 수 있다. 상이한 TIL은 상이한 종양 유형으로부터 단리될 수 있다. 종양 인식 모이어티, 및 활성화 도메인을 코딩하는 발현 카세트, 또는 또 다른 조작된 특징은 다양한 종양으로부터 단리된 TIL의 계통으로 삽입될 수 있다. 이러한 $\gamma \delta$ T 세포는 고형 종양을 침윤시키고, 하나 이상의 표적 항원을 발현하는 종양 세포를 약하게 하고 사멸시킬 수 있고, 이들은 다양한 악성종양에 대한 효과적인 치료를 제공할 수 있다. 종양 특이적 동종이계 $\gamma \delta$ T 세포는 선택의 에피토프를 인식하는 적어도 하나의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 수 있다. 몇몇 경우에, 종양 특이적 동종이계 $\gamma \delta$ T 세포는 적어도 2개의 상이한 종양 인식 모이어티를 발현하도록 설계되고, 각각의 상이한 종양 인식 모이어티는 동일한 항원, 구별되는 항원, 항원 및 활성화 또는 불활성화 동시 자극/면역 조절 수용체(들), MHC 분자와 복합체 형성한 항원, 또는 호밍 수용체의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계된다.

[0037] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 TCR δ 및 TCR γ 수용체 사슬의 특이적 대립유전자를 발현

하도록 설계된다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 TCR δ 및 TCR γ 수용체 사슬의 특이적 대립유전자는 대상체의 몸에서의 하나 이상의 신체 위치로의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 이동 또는 호밍을 지시할 수 있다. 예를 들어, 인간에서, $V\delta 1^+$ TCR을 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포는 피부의 상피 또는 상피 연관/점막 조직, 기도, 소화관 및 비노생식기 및 몇몇 내부 장기로 주로 제한되거나 이들로 호밍한다. $V\delta 3^+$ TCR을 발현하는 인간 $\gamma \delta$ T 세포는 간에서 농후화된다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 구성적으로 활성화될 수 있다. 야생형 T 세포에서, TCR은 몇몇 단백질의 복합체로서 존재하고, 이것은 CD3 단백질, 예컨대 $CD3\epsilon \gamma$, $CD3\epsilon \delta$ 및 ξ 사슬($CD3\xi$ 동종이합체)을 포함한다. ξ 사슬 상의 다수의 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)는 T 림프구 상의 활성화 신호를 생성하도록 인산화될 수 있다. 각각 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자와 연관된 특이적 항원을 인식할 때 활성화되는 α/β TCR CD8 및 CD4 세포와 달리, $\gamma \delta$ T 세포는 MHC 비제한 방식으로 항원을 직접적으로 인식함으로써 활성화된다. 이러한 항원은 종양 세포에 의해 발현된 항원, 예컨대 MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A 및 B(MICA 및 MICB), CD1, NKG2A, ULBP1-3, 지질 및 포스포항원을 포함한다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 구성적으로 활성이도록 조작될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 종양 인식 모이어티 및 활성화 모이어티를 포함하도록 조작된다. 활성화 모이어티는 TCR-CD3 복합체 중의 단백질일 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 유전적으로 변형된 $CD3\xi$ 유전자를 구성적으로 발현하고, $CD3\xi$ 유전자의 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프는 YxxL/I 모티프에서 타이로신 유전자의 포스포도방체를 포함하도록 변형된다. 다양한 T 세포 활성화 도메인 및 막관통 도메인, 예컨대 $CD3\xi$, CD28, CD2, ICOS, 4-1 BB(CD 137), OX40(CD134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, Fc ϵ R1g, CD4, CD3e, JAMAL, NKG2D 또는 CD 16은 예를 들어 포스포도방체 또는 또 다른 핵산 돌연변이를 포함하도록 조작될 수 있다.

[0038] 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 시험관내(생체외) 증식을 위한 방법이 본 명세서에 추가로 개시되어 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 항원 제시 세포 또는 아미노포스페이트(들)에 의한 자극 없이 생체외 증식될 수 있다. 본 개시내용의 항원 반응성 조작된 T 세포는 생체외 및 생체내 증식될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 집단은 소정의 항체, 사이토카인, 유사분열물질, 또는 융합 단백질, 예컨대 IL-17 Fc 융합, MICA Fc 융합 및 CD70 Fc 융합을 이용하여 항원 제시 세포, 항원 펩타이드, 비펩타이드 분자 또는 소분자 화합물, 예컨대 아미노포스페이트(들)에 의한 항원 자극 없이 생체외 증식될 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포 집단의 증식에 사용될 수 있는 항체의 예는 항-CD3, 항-CD27, 항-CD30, 항-CD70, 항-OX40, 항-NKG2D 또는 항-CD2 항체를 포함하고, 사이토카인의 예는 IL-2, IL-15, IL-12, 또는 IL-21, IL-18, IL-9, IL-7, IL-33을 포함하고, 유사분열물질의 예는 CD70, 인간 CD27에 대한 리간드, 피토헤마글루티닌(phytohaemagglutinin; PHA), 콘카나발린 A(concavalin A; ConA), 미국자리공 유사분열물질(pokeweed mitogen; PWM), 단백질 땅콩 응집소(protein peanut agglutinin; PNA), 대두 응집소(soybean agglutinin; SBA), 렌즈콩 응집소(les culinaris agglutinin; LCA), 완두 응집소(pisum sativum agglutinin; PSA), 헬릭스 포마티아 응집소(Helix pomatia agglutinin; HPA), 비시아 그라미네아 렉틴(Vicia graminea Lectin; VGA) 또는 T 세포 증식을 자극할 수 있는 또 다른 적합한 유사분열물질을 포함한다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 집단은 60일 미만, 48일 미만, 36일 미만, 24일 미만, 12일 미만 또는 6일 미만에 증식될 수 있다.

[0039] 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)에 의해 다양한 병태를 치료하는 방법이 본 명세서에 추가로 개시되어 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 병태에 대한 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 병태는 암, 예컨대 방광암, 유방암, 폐암, 전립선암, 간암, 피부암, 결장암 및 직장암, 림프종, 백혈병, 다발성 골수종, 난소암, 육종, 두경부암, 중피종, 뇌암, 육종 또는 또 다른 암일 수 있다. 병태는 감염성 질환, 자가면역 장애, 장기이식 또는 패혈증일 수 있다. 대상체에게 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공하는 방법이 본 명세서에 또한 개시되어 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 병태로 고통받는 대상체에게 투여될 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 수술, 예컨대 골수 이식 동안 대상체에게 투여될 수 있다. 본 개시내용은 조절 사이토카인, 예컨대 IL-2의 동시투여 없이 대상체에게 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 방법을 추가로 제공한다. 몇몇 경우에, $\gamma \delta$ T 세포는 생체외 증식되고 생체내 투여될 때 증식, 생존 및 기능을 증대시킬 수 있는 하나 이상의 사이토카인 또는 호르몬, 예컨대 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9를 발현하도록 조작된다. $\gamma \delta$ T 세포는 인식 모이어티를 포함하는 동일한 또는 상이한 발현 카세트로부터 하나 이상의 사이토카인 또는 호르몬을 발현하도록 조작될 수 있다. 사이토카인은 케모카인, 인터페론, 인터류킨 및 종양 괴사 인자를 포함한다. 사이토카인의 비제한적 예는 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, IL-12, IL-18, IL-9, 에리트로포이에틴(erythropoietin; EPO), G-CSF, GM-CSF, 트롬보포이에틴(thrombopoietin; TPO), 및 인터페론(interferon; IFN) 하위패밀리의 구성원을 포함한다.

[0040] 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 병용 치료로서 대상체에게 투여될 수 있다. 몇몇 경우에, 병용 치료는 a) 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포; 및 b) 면역-관문 치료를 포함한다.

[0041] **조작된 $\gamma \delta$ T 세포**

[0042] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 다양한 방법 당해 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 생성될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 특정한 종양 인식 모이어티를 안정하게 발현하도록 설계될 수 있다. 종양 인식, 또는 또 다른 유형의 인식 모이어티를 포함하는 발현 카세트를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 전이인자/트랜스포사제 시스템 또는 바이러스 기반 유전자 수송 시스템, 예컨대 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템, 또는 또 다른 적합한 방법, 예컨대 형질감염, 전기천공, 형질도입, 리포펙션, 인산칼슘(CaPO_4), 나노조작된 물질, 예컨대 오르모실, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노 연관 바이러스를 포함하는 바이러스 전달 방법, 또는 또 다른 적합한 방법에 의해 $\gamma \delta$ T 세포로 안정하게 도입될 수 있다. $\alpha \beta$ 또는 $\gamma \delta$ 중 어느 하나인, 항원 특이적 TCR은 항원 특이적 TCR에 대한 유전자 코드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 안정하게 삽입함으로써 조작된 $\gamma \delta$ T 세포로 도입될 수 있다. 종양 인식 모이어티에 의해 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드를 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 안정하게 삽입함으로써 조작된 $\gamma \delta$ T 세포로 도입될 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 종양 인식 모이어티는 조작된 T 세포 수용체이고, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 도입된 발현 카세트는 조작된 TCR α (TCR 알파) 유전자, 조작된 TCR β (TCR 베타) 유전자, TCR δ (TCR 델타) 유전자, 또는 조작된 TCR γ (TCR 감마) 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 도입된 발현 카세트는 항체 단편 또는 이의 항원 결합 부분을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 경우에, 항체 단편 또는 이의 항원 결합 단편은 전체 항체, 항체 단편, 단쇄 가변 단편(scFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Fab, F(ab)₂, Fc, 항체 상의 경쇄 또는 중쇄, 항체의 가변 또는 불변 영역, 또는 키메라 항원 수용체(CAR) 작제물의 일부로서 세포 표면 종양 항원에 결합하는 임의의 이들의 조합, 또는 상이한 항원에 지향된 항체와 CAR 및 T 세포 수용체(TCR) 또는 CAR을 포함하는 이중특이적 작제물을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드이다. 몇몇 경우에, 폴리뉴클레오타이드는 인간 또는 또 다른 종으로부터 유래된다. 비인간 종으로부터 유래된 항체 단편 또는 항원 결합 단편 폴리뉴클레오타이드는 인간에서 자연에서 생성된 항체 변이체에 대한 이의 유사성을 증가시키도록 변형될 수 있고, 항체 단편 또는 항원 결합 단편은 부분적으로 또는 완전히 인간화될 수 있다. 항체 단편 또는 항원 결합 단편 폴리뉴클레오타이드는 또한 키메라, 예를 들어 마우스-인간 항체 키메라일 수 있다. CAR을 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 종양 인식 모이어티에 의해 인식된 항원에 리간드를 발현하도록 또한 조작될 수 있다.

[0043] 당해 분야에 공지된 다양한 기법은 클로닝된, 또는 합성으로 조작된, 종양 인식 모이어티에 대한 유전자 코드를 포함하는 핵산을 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈 내에 특정한 위치로 도입하기 위해 이용될 수 있다. 각각 WO201409370, WO2003087341, WO2014134412 및 WO2011090804(이의 각각은 본 명세서에 그 전문이 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 바와 같은 미생물 주기적으로 반복되는 짧은 회문구조 반복서열(clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CRISPR) 시스템으로부터의 RNA 가이드 Cas9 뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 메가뉴클레아제 기술은 $\gamma \delta$ T 세포(들)에서의 효율적인 게놈 조작을 제공하도록 이용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 기술은 1개의 유전자의 녹아웃 및 또 다른 유전자의 녹인을 동시에 제공하는 게놈 위치로 발현 카세트를 삽입하기 위해 또한 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 발현 카세트를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 MHC 유전자를 코딩하는 게놈 영역으로 삽입될 수 있다. 이러한 조작은 하나 이상의 유전자, 예를 들어 발현 카세트에 포함된 유전자의 녹인, 및 또 다른 유전자, 예를 들어 MHC 유전자좌위의 녹아웃을 동시에 제공할 수 있다.

[0044] 일 경우에, 종양 인식 모이어티를 코딩하는 핵산을 포함하는 슬리핑 뷰티 전이인자는 조작되는 세포 $\gamma \delta$ T 세포로 도입된다. 야생형 슬리핑 뷰티, 예컨대 US 7,985,739(본 명세서에 그 전문이 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 트랜스포사제와 비교하여 증대된 통합을 제공하는 돌연변이체 슬리핑 뷰티 트랜스포사제는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서 폴리뉴클레오타이드를 도입하도록 사용될 수 있다.

[0045] 몇몇 경우에, 바이러스 방법은 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈으로 종양 인식 모이어티를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 도입하도록 이용된다. 다수의 바이러스 방법은 인간 유전자 치료, 예컨대 WO 1993020221(본 명세서에 그 전문이 포함됨)에 기재된 방법에 이용된다. $\gamma \delta$ T 세포를 조작하도록 이용될 수 있는 바이러스 방법의 비제한적 예는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 백시니아 바이러스, 폭스 바이러스 또는 아데노-바이러스 연관 바이러스 방법을 포함한다.

[0046] 종양 인식 모이어티에 대한 유전자 코드를 함유하는 폴리뉴클레오타이드는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 성장, 증식,

활성화 상태에 영향을 미치는 돌연변이 또는 다른 전이유전자, 또는 종양 세포에 특이적인 항원, 예컨대 교환 특이적 암 항원을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 $\gamma \delta$ T 세포는, 항원 인식 모이어티, 예컨대 TCR-CD3 복합체에서의 분자 또는 동시자극 인자에 연결된, 활성화 도메인을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 발현하도록 조작될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 T 림프구 활성화 도메인인 세포내 신호전달 도메인을 발현할 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 세포내 활성화 도메인 유전자 또는 세포내 신호전달 도메인을 발현하도록 조작될 수 있다. 세포내 신호전달 도메인 유전자는 예를 들어 CD3 ξ , CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, NKG2D, CD4, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ RI γ , ILRB/CD 122, IL-2RG/CD132, DAP 분자, CD70, 사이토카인 수용체, CD40, 또는 임의의 이들의 조합일 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 사이토카인, 항원, 세포내 수용체 또는 다른 면역 조절 분자를 발현하도록 또한 조작된다.

[0047] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 발현하고자 하는 적절한 종양 인식 모이어티는 치료하고자 하는 질환에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 TCR이다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 암 세포 상에 발현된 리간드에 대한 수용체이다. 적합한 수용체의 비제한적 예는 NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKR1, Nkp30, Nkp44, Nkp46, CD244(2B4), DNAM-1 및 Nkp80을 포함한다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 리간드, 예를 들어 IL-13 리간드, 또는 종양 항원에 대한 리간드 모방체, 예컨대 IL13R에 대한 IL-13 모방체를 포함할 수 있다.

[0048] $\gamma \delta$ T 세포는 NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKR1, Nkp30, Nkp44, Nkp46, CD244(2B4), DNAM-1 및 Nkp80으로부터 유래된 리간드 결합 도메인, 또는 항종양 항체, 예컨대 항-Her2neu 또는 항-EGFR, 및 CD3 ξ , Dap 10, CD28, 4 IBB 및 CD40L로부터 얻어진 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 수 있다. 몇몇 예에서, 키메라 수용체는 MICA, MICB, Her2neu, EGFR, 메소텔린, CD38, CD20, CD 19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 플레이트 결합 단백질/수용체, SLC44A4, 크립토, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원(ETA), MAGEA 패밀리를 유전자(예컨대, MAGE3A, MAGE4A), KKL1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A(MICA), 또는 MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 B(MICB), HPV, CMV에 결합한다.

[0049] 2개 이상의 종양 인식 모이어티는 $\gamma \delta$ T 세포에서, 유전적으로 상이한, 실질적으로 상이한, 또는 실질적으로 동일한, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포로부터 안정하게 발현된 $\alpha \beta$ TCR 폴리뉴클레오타이드로부터 또는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서 안정하게 혼입된 유전적으로 구별되는 $\alpha \beta$ TCR 폴리뉴클레오타이드로부터 발현될 수 있다. 유전적으로 구별되는 $\alpha \beta$ TCR(들)의 경우에, 동일한 병태와 연관된 상이한 항원을 인식하는 $\alpha \beta$ TCR(들)을 사용할 수 있다. 바람직한 일 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포는, 상이한 MHC 일배체형의 상황에서 동일한 항원을 인식하는 하나 이상의 발현 카세트로부터, 인간 또는 마우스 기원으로부터, 상이한 TCR을 발현하도록 조작된다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포는 상이한 MHC 일배체형과 복합체 형성한 소정의 항원으로부터 동일한 또는 상이한 펩타이드에 지향된 1개의 TCR 및 2개 이상의 항체를 발현하도록 조작된다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의한 단일 TCR의 발현은 적절한 TCR 쌍 짓기를 수월하게 한다. 상이한 TCR을 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 보편 동종이게 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공할 수 있다. 제2 바람직한 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포는 펩타이드-MHC 복합체에 지향된 하나 이상의 상이한 항체를 발현하도록 조작되고, 각각은 동일한 또는 상이한 MHC 일배체형과 복합체 형성한 동일한 또는 상이한 펩타이드에 지향된다. 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 항체일 수 있다.

[0050] $\gamma \delta$ T 세포는 상이한 MHC 일배체형의 상황에서 동일한 항원을 인식하는 하나 이상의 발현 카세트로부터 TCR을 발현하도록 조작될 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 조작된 세포 내에 TCR 미스페어링의 가능성을 최소화하도록 단일 TCR 또는 CAR과 조합된 TCR을 발현하도록 설계된다. 2개 이상의 발현 카세트로부터 발현된 종양 인식 모이어티는 바람직하게는 상이한 폴리뉴클레오타이드 서열을 가지고, 동일한 표적의 상이한 에피토프를 인식하는 종양 인식 모이어티를 코딩한다. 이러한 상이한 TCR 또는 CAR을 발현하는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 보편 동종이게 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공할 수 있다.

[0051] 몇몇 경우에, $\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작된다. 2개 이상의 종양 인식 모이어티는 $\gamma \delta$ T 세포에서 조작된 유전적으로 동일한, 또는 실질적으로 동일한, 항원 특이적 키메라(CAR) 폴리뉴클레오타이드로부터 발현될 수 있다. 2개 이상의 종양 인식 모이어티는 $\gamma \delta$ T 세포에서 조작된 유전적으로 구별되는 CAR 폴리뉴클레오타이드로부터 발현될 수 있다. 유전적으로 구별되는 CAR(들)은 동일한 병태와 연관된

상이한 항원을 인식하도록 설계될 수 있다.

[0052] $\gamma \delta$ T 세포는 대안적으로 이중특이적일 수 있다. 이중특이적 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 2개 이상의 종양 인식 모이어티를 발현할 수 있다. 이중특이적 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 TCR 및 CAR 종양 인식 모이어티 둘 다를 발현할 수 있다. 이중특이적 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 동일한 병태와 연관된 상이한 항원을 인식하도록 설계될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 동일한 또는 실질적으로 동일한 항원을 인식하는 2개 이상의 CAR/TCR(들) 이중특이적 폴리뉴클레오타이드를 발현할 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 구별되는 항원을 인식하는 2개 이상의 CAR/TCR(들) 이중특이적 작제물을 발현할 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 이중특이적 작제물은 표적 세포의 활성화 및 불활성화 도메인에 결합하고, 이로써 표적 특이성 증가를 제공한다. $\gamma \delta$ T 세포는 적어도 1개의 종양 인식 모이어티, 적어도 2개의 종양 인식 모이어티, 적어도 3개의 종양 인식 모이어티, 적어도 4개의 종양 인식 모이어티, 적어도 5개의 종양 인식 모이어티, 적어도 6개의 종양 인식 모이어티, 적어도 7개의 종양 인식 모이어티, 적어도 8개의 종양 인식 모이어티, 적어도 9개의 종양 인식 모이어티, 적어도 10개의 종양 인식 모이어티, 적어도 11개의 종양 인식 모이어티, 적어도 12개의 종양 인식 모이어티, 또는 또 다른 적합한 수의 종양 인식 모이어티를 발현하도록 조작될 수 있다.

[0053] 적절한 TCR 기능은 ITAM 모티프를 포함하는 2개의 기능성 ζ (제타) 단백질에 의해 증대될 수 있다. 적절한 TCR 기능은 $\alpha \beta$ 또는 $\gamma \delta$ 활성화 도메인, 예컨대 CD28, CD2, CTLA4, ICOS, JAMAL, PD-1, CD27, CD30, 41-BB, OX40, NKG2D, HVEM 또는 CD46의 발현에 의해 또한 증대될 수 있다. 발현된 폴리뉴클레오타이드는 종양 인식 모이어티, 링커 모이어티 및 활성화 도메인에 대한 유전자 코드를 포함할 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의한 폴리뉴클레오타이드의 번역은 단백질 링커에 의해 연결된 종양 인식 모이어티 및 활성화 도메인을 제공할 수 있다. 대개, 링커는 종양 인식 모이어티 및 활성화 도메인의 폴딩을 막지 않는 아미노산을 포함한다. 링커 분자는 적어도 약 5개의 아미노산, 약 6개의 아미노산, 약 7개의 아미노산, 약 8개의 아미노산, 약 9개의 아미노산, 약 10개의 아미노산, 약 11개의 아미노산, 약 12개의 아미노산, 약 13개의 아미노산, 약 14개의 아미노산, 약 15개의 아미노산, 약 16개의 아미노산, 약 17개의 아미노산, 약 18개의 아미노산, 약 19개의 아미노산, 또는 약 20개의 아미노산 길이일 수 있다. 몇몇 경우에, 링커에서의 적어도 50%, 적어도 70% 또는 적어도 90%의 아미노산은 세린 또는 글라이신이다.

[0054] 몇몇 경우에, 활성화 도메인은 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 적합한 돌연변이는 예를 들어 활성화 도메인이 구성적으로 활성이게 하는 돌연변이일 수 있다. 하나 이상의 핵산의 정체성의 변경은 번역된 아미노산의 아미노산 서열을 변경한다. 핵산 돌연변이는 코딩된 아미노산이 극성, 비극성, 염기성 또는 산성 아미노산으로 변형되도록 만들어질 수 있다. 핵산 돌연변이는 종양 인식 모이어티가 종양으로부터 에피토프를 인식하도록 최적화되도록 만들어질 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포의 조작된 종양 인식 모이어티, 조작된 활성화 도메인, 또는 또 다른 조작된 성분은 1개 초과, 2개의 아미노산 돌연변이, 3개의 아미노산 돌연변이, 4개의 아미노산 돌연변이, 5개의 아미노산 돌연변이, 6개의 아미노산 돌연변이, 7개의 아미노산 돌연변이, 8개의 아미노산 돌연변이, 9개의 아미노산 돌연변이, 10개의 아미노산 돌연변이, 11개의 아미노산 돌연변이, 12개의 아미노산 돌연변이, 13개의 아미노산 돌연변이, 14개의 아미노산 돌연변이, 15개의 아미노산 돌연변이, 16개의 아미노산 돌연변이, 17개의 아미노산 돌연변이, 18개의 아미노산 돌연변이, 19개의 아미노산 돌연변이, 20개의 아미노산 돌연변이, 21개의 아미노산 돌연변이, 22개의 아미노산 돌연변이, 23개의 아미노산 돌연변이, 24개의 아미노산 돌연변이, 25개의 아미노산 돌연변이, 26개의 아미노산 돌연변이, 27개의 아미노산 돌연변이, 28개의 아미노산 돌연변이, 29개의 아미노산 돌연변이, 30개의 아미노산 돌연변이, 31개의 아미노산 돌연변이, 32개의 아미노산 돌연변이, 33개의 아미노산 돌연변이, 34개의 아미노산 돌연변이, 35개의 아미노산 돌연변이, 36개의 아미노산 돌연변이, 37개의 아미노산 돌연변이, 38개의 아미노산 돌연변이, 39개의 아미노산 돌연변이, 40개의 아미노산 돌연변이, 41개의 아미노산 돌연변이, 42개의 아미노산 돌연변이, 43개의 아미노산 돌연변이, 44개의 아미노산 돌연변이, 45개의 아미노산 돌연변이, 46개의 아미노산 돌연변이, 47개의 아미노산 돌연변이, 48개의 아미노산 돌연변이, 49개의 아미노산 돌연변이, 또는 50개의 아미노산 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0055] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 $\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 MHC 분자를 발현하지 않는다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서의 하나 이상의 MHC 유전자좌의 결실은 조작된 $\gamma \delta$ T 세포가 숙주 면역계에 의해 인식될 가능성을 감소시킬 수 있다. 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen; HLA) 시스템으로 공지된 인간 주요 조직적합 복합체(MHC) 유전자좌는 항원 제시 세포, 예컨대 $\gamma \delta$ T 세포에서 발현된 큰 유전자 패밀리를 포함한다. HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 분자는 항원 제시 세포에 대한 항원으로서 세포내 펩타이드를 제시하도록 작용한다. HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR 분자는 항원 제시 세포에 대한 항원으로서 세포의 펩타이드를 제시하도록 작용한다. HLA 유전자의 몇몇 대립유전자는 GVHD, 자가면역 장애 및 암과 연관된다. 본 명세서에 기재된 조작된

$\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 HLA 유전자의 유전자 발현을 결여시키거나 파괴하도록 추가로 조작될 수 있다. 본 명세서에 기재된 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 MHC 복합체의 하나 이상의 성분의 유전자 발현을 결여시키거나 파괴하도록, 예컨대 완전한 하나 이상의 MHC 유전자의 결실, 특이적 엑손의 결실, 또는 β_2 마이크로글로불린(B2m)의 결실이 되도록 추가로 조작될 수 있다. 적어도 하나의 HLA 유전자의 유전자 절제 또는 유전자 파괴는 숙주 대 이식편 질환을 발생시키지 않으면서 임의의 HLA 일배체형을 가지는 대상체에게 투여될 수 있는 임상적으로 치료학적인 $\gamma \delta$ T 세포를 제공할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 임의의 HLA 일배체형을 가지는 인간 대상체에 대한 보편 공여자일 수 있다.

[0056] $\gamma \delta$ T 세포는 1개의 또는 다양한 HLA 유전좌위(유전좌위들)를 결여시키도록 조작될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 HLA-A 대립유전자, HLA-B 대립유전자, HLA-C 대립유전자, HLA-DR 대립유전자, HLA-DQ 대립유전자 또는 HLA-DP 대립유전자를 결여시키도록 조작될 수 있다. 몇몇 경우에, HLA 대립유전자는 인간 병태, 예컨대 자가면역 병태와 연관된다. 예를 들어, HLA-B27 대립유전자는 관절염 및 포도막염과 연관되고, HLA-DR2 대립유전자는 전신 홍반성 낭창과 연관되고, HLA-DR3 대립유전자는 21-하이드록실라제 결핍과 연관되고, HLA-DR4는 류마티스성 관절염 및 1형 당뇨병과 연관된다. 예를 들어, HLA-B27 대립유전자를 결여시키는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 대상체의 면역계를 용이하게 인식하지 않으면서 관절염으로 고통받는 대상체에게 투여될 수 있다. 몇몇 경우에, 하나 이상의 HLA 유전좌위의 결실은 임의의 HLA 일배체형을 가지는 임의의 대상체에 대한 보편 공여자인 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 제공한다.

[0057] 몇몇 경우에, $\gamma \delta$ T 세포의 조작은 $\gamma \delta$ T 세포 게놈의 일부의 결실을 요한다. 몇몇 경우에, 게놈의 결실된 부분은 MHC 유전좌위(유전좌위들)의 일부를 포함한다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 야생형 인간 $\gamma \delta$ T 세포로부터 유래되고, MHC 유전좌위는 HLA 유전좌위이다. 몇몇 경우에, 게놈의 결실된 부분은 MHC 복합체에서 단백질에 상응하는 유전자의 일부를 포함한다. 몇몇 경우에, 게놈의 결실된 부분은 β_2 마이크로글로불린 유전자를 포함한다. 몇몇 경우에, 게놈의 결실된 부분은 면역 관련 유전자, 예컨대 PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, B7-H3, B7-H4 및 CECAM-1을 포함한다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 T 세포 활성화 및 세포독성을 증대시키는 활성화 도메인을 발현하도록 설계될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 발현될 수 있는 활성화 도메인의 비제한적 예는 CD2, ICOS, 4-1 BB(CD 137), OX40(CD 134), CD27, CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, FcεRIg를 포함한다.

[0058] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈의 임의의 일부는 내인성 $\gamma \delta$ T 세포 유전자의 발현을 파괴시키도록 결실될 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포의 게놈에서 결실되거나 파괴될 수 있는 게놈 영역의 비제한적 예는 프로모터, 활성화제, 인핸서, 엑손, 인트론, 비코딩 RNA, 마이크로-RNA, 소형 핵 RNA, 가변 수 연쇄 반복(variable number tandem repeat; VNTR), 짧은 연쇄 반복(short tandem repeat; STR), SNP 패턴, 초가변 영역, 소위성(minisatellite), 다이뉴클레오타이드 반복, 트라이뉴클레오타이드 반복, 테트라뉴클레오타이드 반복 또는 단순 서열 반복을 포함한다. 몇몇 경우에, 게놈의 결실된 부분은 1개의 핵산 내지 약 10개의 핵산, 1개의 핵산 내지 약 100개의 핵산, 1개의 핵산 내지 약 1,000개의 핵산, 1개의 핵산 내지 약 10,000개의 핵산, 1개의 핵산 내지 약 100,000개의 핵산, 1개의 핵산 내지 약 1,000,000개의 핵산의 범위, 또는 다른 적합한 범위이다.

[0059] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서의 HLA 유전자 발현은 당해 분야에 공지된 다양한 기법에 의해 또한 파괴될 수 있다. 몇몇 경우에, 큰 유전좌위 유전자 편집 기술은 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에서 조작된 $\gamma \delta$ T 세포 게놈으로부터 유전자를 삭제시키거나, 적어도 하나의 HLA 유전좌위의 유전자 발현을 파괴시키도록 이용된다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈에서 원하는 유전좌위를 편집하도록 이용될 수 있는 유전자 편집 기술의 비제한적 예는 각각 WO201409370, WO2003087341, WO2014134412 및 WO 2011090804(이의 각각은 본 명세서에 그 전문이 참고문헌으로 포함됨)에 기재된 바대로 주기적으로 반복되는 짧은 회문구조 반복서열(CRISPR)-Cas, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 메가뉴클레아제 기술을 포함한다.

[0060] $\gamma \delta$ T 세포는 종양 인식 모이어티를 이미 발현한 단리된 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포로부터 조작될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 단리된 야생형 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 내인성으로 발현된 종양 세포 인식 모이어티를 보유할 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포 종양 세포 인식 모이어티는 야생형 $\gamma \delta$ TCR을 대체한다.

[0061] $\gamma \delta$ T 세포는 하나 이상의 호밍 분자, 예컨대 림프구 호밍 분자를 발현하도록 조작될 수 있다. 호밍 분자는 예를 들어 림프구 호밍 수용체 또는 세포 부착 분자일 수 있다. 호밍 분자는 대상체에 대한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 투여 시 표적화된 조작된 $\gamma \delta$ T 세포가 고형 종양을 포함하는 고형 종양을 이동시키고 침윤시키도록 도울 수 있다. 호밍 수용체의 비제한적 예는 CCR 패밀리의 구성원, 예를 들어 CCR2, CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CLA, CD44, CD103, CD62L, E-선택틴, P-선택틴, L-선택틴, 인테그린, 예컨대 VLA-4 및 LFA-1을 포함한다. 세포

부착 분자의 비제한적 예는 ICAM, N-CAM, VCAM, PE-CAM, LI-CAM, 넥틴(PVRL1, PVRL2, PVRL3), LFA-1, 인테그린 알파X베타2, 알파v베타7, 대식세포-1 항원, CLA-4, 당단백질 IIb/IIIa를 포함한다. 세포 부착 분자의 추가적인 예는 칼슘 의존적 분자, 예컨대 T-카데린, 및 기질 금속단백분해효소(MMP), 예컨대 MMP9 또는 MMP2에 대한 항체를 포함한다.

[0062] T 세포 성숙, 활성화, 증식 및 기능에 관여한 단계는 면역 관문 단백질을 통해 동시자극 및 저해 신호를 통해 조절될 수 있다. 면역 관문은 면역계에 고유한 동시자극 및 저해 요소이다. 면역 관문은, 면역계 질환 상태, 예컨대 세포 형질전환 또는 감염에 반응할 때 조직에 대한 손상을 예방하도록, 생리학적 면역 반응의 기간 및 양을 조절하고 자체 내성을 유지시키는 것을 돕는다. $\gamma\delta$ 및 $\alpha\beta$ T 세포로부터의 면역 반응을 제어하기 위해 이용되는 동시자극과 저해 신호 사이의 평형은 면역 관문 단백질에 의해 조절될 수 있다. 면역 관문 단백질, 예컨대 PD1 및 CTLA4는 T 세포의 표면에 제시되고, 면역 반응 "온" 또는 "오프"를 키도록 사용될 수 있다. 종양은 특히 종양 항원에 특이적인 T 세포에 대한 면역 내성 기전으로서 관문 단백질 기능을 이상조절할 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 하나 이상의 면역 관문 유전자(유전자좌위들), 예컨대 PD-1, CTLA-4, LAG3, ICOS, BTLA, KIR, TIM3, A2aR, CEACAM1, B7-H3 및 B7-H4를 결여시키도록 추가로 조작될 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서의 내인성 면역 관문 유전자의 발현은 유전자 편집 기술에서 파괴될 수 있다.

[0063] 면역학적 관문은 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서 (CTLA4, PD1 및 LAG3으로 예시된) 저해 신호전달 경로를 조절하는 분자 또는 (ICOS로 예시된) 자극 신호전달 경로를 조절하는 분자일 수 있다. 연장된 면역글로불린 슈퍼패밀리에서의 몇몇 단백질은 면역학적 관문에 대한 리간드일 수 있다. 면역 관문 리간드 단백질의 비제한적 예는 B7-H4, ICOSL, PD-L1, PD-L2, 메가CD40L, 메가OX40L 및 CD137L을 포함한다. 몇몇 경우에, 면역 관문 리간드 단백질은 종양에 의해 발현된 항원이다. 몇몇 경우에, 면역 관문 유전자는 CTLA-4 유전자이다. 몇몇 경우에, 면역 관문 유전자는 PD-1 유전자이다.

[0064] PD1은 CD28/CTLA4 패밀리에 속하는 저해 수용체이고, 활성화 T 림프구, B 세포, 단핵구, DC 및 T-reg에서 발현된다. 자가 반응성 림프구를 억제하고 TAA 특이적 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte; CTL)의 이펙터 기능을 저해하도록 T 세포, APC 및 악성 세포 기능에서 발현된, PD1, PD-L1 및 PD-L2에 대한 2개의 공지된 리간드가 존재한다. 따라서, PD1을 결여시키는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 종양 세포에 의한 PD-L1 및 PD-L2의 발현과 관계 없이 이의 세포독성 활성을 보유할 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 PD-1 유전자에 대한 유전자 유전자좌위를 결여시킨다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서의 PD-1 유전자의 발현은 유전자 편집 기술에 의해 파괴된다.

[0065] CTLA4(세포독성 T 림프구 항원 4)는 CD 152(분화 152의 클러스터)로서 또한 공지되어 있다. CTLA4는 동시자극 분자 CD28과 서열 동종성 및 리간드(CD80/B7-1 및 CD86/B7-2)를 공유하지만, 수용체로서 T 세포 발현 CTLA4에 저해 신호를 전달함으로써 다르다. CTLA4는 리간드 둘 다에 대한 훨씬 더 높은 전체 친화도를 가지고, 리간드 밀도가 제한될 때 결합에 대해 CD28보다 경쟁력이 있을 수 있다. CTLA4는 대개 $CD8^+$ 이펙터 T 세포의 표면에서 발현되고, 미경험 및 기억 T 세포 둘 다의 초기 활성화 단계에서 기능적 역할을 한다. CTLA4는 T 세포 활성화의 초기 단계 동안 CD80 및 CD86에 대한 친화도 증가를 통해 CD28의 활성화에 대응한다. CTLA4의 주요 기능은 헬퍼 T 세포의 하향조절 및 조절 T 세포 면역억제 활성의 증대를 포함한다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 CTLA4 유전자를 결여시킨다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서의 CTLA4 유전자의 발현은 유전자 편집 기술에 의해 파괴된다.

[0066] LAG3(림프구-활성화 유전자 3)은 활성화 항원 특이적 세포독성 T 세포에서 발현되고, 조절 T 세포의 기능을 증대시키고 독립적으로 $CD8^+$ 이펙터 T 세포 활성을 저해할 수 있다. LAG3은, 몇몇 상피 암에서 상향조절되어, T 세포 증식 및 항상성의 반응을 발생시키는, MHC 클래스 II 단백질에 결합하는 높은 친화도를 가지는 CD-4 유사 음성 조절 단백질이다. LAG-3-IG 융합 단백질을 사용한 LAG-3/클래스 II 상호작용의 감소는 항종양 면역 반응을 증대시킬 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 LAG3 유전자에 대한 유전자 유전자좌위를 결여시킨다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서의 LAG3 유전자의 발현은 유전자 편집 기술에 의해 파괴된다.

[0067] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 표현형

[0068] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 대상체의 신체에서 특이적 신체 위치로 호밍할 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 이동 및 호밍은 특이적 케모카인 및/또는 부착 분자의 조합된 발현 및 작용에 따라 달라질 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 호밍은 케모카인과 이의 수용체 사이의 상호작용에 의해 제어될 수 있다. 예를 들어, CXCR3(이의 리간드는

IP-10/CXCL10 및 6Ckine/SLC/CCL21로 표시됨) CCR4+ CXCR5+(RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β 에 대한 수용체) CCR6+ 및 CCR7(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 사이토카인은 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 호밍에 영향을 미칠 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 염증 및 손상의 부위로, 및 이환된 세포로 호밍하여 복구 기능을 수행할 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 암으로 호밍할 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 흉선, 골수, 피부, 후두, 기관, 흉막, 폐, 식도, 복부, 위, 소장, 대장, 간, 췌장, 신장, 요도, 방광, 고환, 전립선, 정관, 난소, 자궁, 유선, 부갑상선, 비장 또는 대상체의 신체의 또 다른 부위로 호밍할 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 하나 이상의 호밍 모이어티, 예컨대 특정한 TCR 대립유전자 및/또는 림프구 호밍 분자를 발현할 수 있다.

[0069] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 특정한 표현형을 가질 수 있고, 표현형은 세포 표면 마커 발현의 면에서 기재될 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포의 다양한 유형은 본 명세서에 기재된 바대로 조작될 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 인간으로부터 유래되지만, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 또한 상이한 공급원, 예컨대 포유류 또는 합성 세포로부터 유래할 수 있다.

[0070] **항원**

[0071] 본 명세서에 개시된 발명은 항원 인식 모이어티를 발현하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 제공하고, 여기서 항원 인식 모이어티는 질환 특이적 에피토프를 인식한다. 항원은 면역 반응을 촉발하는 분자일 수 있다. 이 면역 반응은 항체 생성, 특이적 면역학적 능력 세포의 활성화, 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 항원은 예를 들어 펩타이드, 단백질, 합텐, 지질, 탄수화물, 박테리아, 병원균 또는 바이러스일 수 있다. 항원은 종양 항원일 수 있다. 종양 에피토프는 종양 세포의 표면 상에 MHC I 또는 MHC II 복합체에 의해 제시될 수 있다. 에피토프는 세포 표면 상에 발현되고 종양 인식 모이어티에 의해 인식된 항원의 일부일 수 있다.

[0072] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 인식된 항원의 비제한적 예는 CD-19, CD-30, CD-22, CD37, CD38, CD-33, CD-138, CD-123, CD-79b, CD-70, CD-75, CA6, GD2, 알파태아단백질, 암배아 항원, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, 메소텔린, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 폴레이트 결합 단백질 수용체, SLC44A4, 크립토, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원, MAGEA, KKLC1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MICA 및 MICB, 또는 병태와 연관된 또 다른 항원을 포함한다. 개정한 리스트를 참조한다 - CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), RON, CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, 메소텔린, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 폴레이트 결합 단백질/수용체, SLC44A4, 크립토, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원(ETA), MAGEA 패밀리의 유전자(예컨대, MAGE3A, MAGE4A), KKLC1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A(MICA), 또는 MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 B(MICB), HPV, CMV.

[0073] 항원은 세포의 세포내 또는 세포외 구획에서 발현될 수 있고, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 세포내 또는 세포외 종양 항원을 인식할 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포에서의 $\alpha\beta$ TCR은 세포내 또는 세포외 종양 항원으로부터 유래된 펩타이드를 인식한다. 예를 들어, 항원은 바이러스에 의해 감염된 세포에 의해 세포내 또는 세포외 생성된 단백질, 예컨대 HIV, EBV, CMV 또는 HPV 단백질일 수 있다. 항원은 또한 암성 세포에 의해 세포내 또는 세포외 발현된 단백질일 수 있다.

[0074] 항원 인식 모이어티는 고난의 세포, 예컨대 암성 세포 또는 바이러스에 의해 감염된 세포로부터 항원을 인식할 수 있다. 예를 들어, 인간 MHC 클래스 I 사슬 관련 유전자(MICA 및 MICB)는 염색체 6의 HLA 클래스 I 영역 내에 위치한다. MICA 및 MICB 단백질은 인간 상피에서 "스트레스"의 마커인 것으로 생각되고, 일반 자연 살해 세포 수용체(NKG2D)를 발현하는 세포에 대한 리간드로서 작용한다. 스트레스 마커로서, MICA 및 MICB는 암성 세포로부터 고도로 발현될 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 MICA 또는 MICB 종양 에피토프를 인식할 수 있다.

[0075] 종양 인식 모이어티는 소정의 결합도로 항원을 인식하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, TCR 또는 CAR 작제물에 의해 코딩된 종양 인식 모이어티는 적어도 적어도 10fM, 적어도 100fM, 적어도 1피코몰(pM), 적어도 10pM, 적어도 20pM, 적어도 30pM, 적어도 40pM, 적어도 50pM, 적어도 60pM, 적어도 7pM, 적어도 80pM, 적어도 90pM, 적어도 100pM, 적어도 200pM, 적어도 300pM, 적어도 400pM, 적어도 500pM, 적어도 600pM, 적어도 700pM, 적어도 800pM, 적어도 900pM, 적어도 1나노몰(nM), 적어도 2nM, 적어도 3nM, 적어도 4nM, 적어도 5nM, 적어도 6nM, 적어도 7nM, 적어도 8nM, 적어도 9nM, 적어도 10nM, 적어도 20nM, 적어도 30nM, 적어도 40nM, 적어도 50nM, 적어

도 60nM, 적어도 70nM, 적어도 80nM, 적어도 90nM, 적어도 100nM, 적어도 200nM, 적어도 300nM, 적어도 400nM, 적어도 500nM, 적어도 600nM, 적어도 700nM, 적어도 800nM, 적어도 900nM, 적어도 1 μ M, 적어도 2 μ M, 적어도 3 μ M, 적어도 4 μ M, 적어도 5 μ M, 적어도 6 μ M, 적어도 7 μ M, 적어도 8 μ M, 적어도 9 μ M, 적어도 10 μ M, 적어도 20 μ M, 적어도 30 μ M, 적어도 40 μ M, 적어도 50 μ M, 적어도 60 μ M, 적어도 70 μ M, 적어도 80 μ M, 적어도 90 μ M, 또는 적어도 100 μ M의 해리 상수로 항원을 인식할 수 있다.

[0076] 몇몇 경우에, 종양 인식 모이어티는 기껏해야 10fM, 기껏해야 100fM, 기껏해야 1피코몰(pM), 기껏해야 10pM, 기껏해야 20pM, 기껏해야 30pM, 기껏해야 40pM, 기껏해야 50pM, 기껏해야 60pM, 기껏해야 7pM, 기껏해야 80pM, 기껏해야 90pM, 기껏해야 100pM, 기껏해야 200pM, 기껏해야 300pM, 기껏해야 400pM, 기껏해야 500pM, 기껏해야 600pM, 기껏해야 700pM, 기껏해야 800pM, 기껏해야 900pM, 기껏해야 1나노몰(nM), 기껏해야 2nM, 기껏해야 3nM, 기껏해야 4nM, 기껏해야 5nM, 기껏해야 6nM, 기껏해야 7nM, 기껏해야 8nM, 기껏해야 9nM, 기껏해야 10nM, 기껏해야 20nM, 기껏해야 30nM, 기껏해야 40nM, 기껏해야 50nM, 기껏해야 60nM, 기껏해야 70nM, 기껏해야 80nM, 기껏해야 90nM, 기껏해야 100nM, 기껏해야 200nM, 기껏해야 300nM, 기껏해야 400nM, 기껏해야 500nM, 기껏해야 600nM, 기껏해야 700nM, 기껏해야 800nM, 기껏해야 900nM, 기껏해야 1 μ M, 기껏해야 2 μ M, 기껏해야 3 μ M, 기껏해야 4 μ M, 기껏해야 5 μ M, 기껏해야 6 μ M, 기껏해야 7 μ M, 기껏해야 8 μ M, 기껏해야 9 μ M, 기껏해야 10 μ M, 기껏해야 20 μ M, 기껏해야 30 μ M, 기껏해야 40 μ M, 기껏해야 50 μ M, 기껏해야 60 μ M, 기껏해야 70 μ M, 기껏해야 80 μ M, 기껏해야 90 μ M, 또는 기껏해야 100 μ M의 해리 상수로 항원을 인식하도록 조작될 수 있다.

[0077] $\gamma \delta$ T 세포의 단리

[0078] 몇몇 양태에서, 본 개시내용은 대상체로부터 단리된 $\gamma \delta$ T 세포의 유전 조작을 위한 방법을 제공한다. $\gamma \delta$ T 세포는 대상체의 복잡한 샘플로부터 단리될 수 있다. 복잡한 샘플은 대상체의 말초 혈액 샘플, 제대혈 샘플, 종양, 줄기 세포 전구체, 종양 생검, 조직, 림프, 또는 외부 환경과 직접 접촉하는 상피 부위일 수 있거나, 줄기 전구체 세포로부터 유래할 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 예를 들어 유세포분석법 기법에 의해 하나 이상의 세포 표면 마커를 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포(들)를 분류함으로써 대상체의 복잡한 샘플로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 야생형 $\gamma \delta$ T 세포는, $\gamma \delta$ T 세포(들)와 연관될 수 있는, 많은 항원 인식, 항원 제시, 동시자극 및 부착 분자를 나타낸다. 하나 이상의 세포 표면 마커, 예컨대 특이적 $\gamma \delta$ TCR, 항원 인식, 항원 제시, 리간드, 부착 분자 또는 동시자극 분자는 복잡한 샘플로부터 야생형 $\gamma \delta$ T 세포를 단리시키도록 사용될 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포와 연관되거나 이에 의해 발현된 다양한 분자는 복잡한 샘플로부터 $\gamma \delta$ T 세포를 단리시키도록 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용은 $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$, $V\delta 3^+$ 세포의 혼합 집단 또는 임의의 이들의 조합의 단리 방법을 제공한다.

[0079] 말초 혈액 단핵 세포는 예를 들어 분리반출법 기계, 예컨대 피콜-파크(Ficoll-Paque)(상표명) 플러스(GE Healthcare) 시스템, 또는 또 다른 적합한 장치/시스템에 의해 대상체로부터 수집될 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포(들), 또는 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 원하는 하위집단은 예를 들어 유세포분석법 기법에 의해 수집된 샘플로부터 정제될 수 있다. 제대혈 세포는 대상체의 출생 동안 제대혈로부터 또한 얻어질 수 있다.

[0080] 수집된 $\gamma \delta$ T 세포(들)에서 발현된 세포 표면 마커의 양성 및/또는 음성 선택은, 대상체의 말초 혈액 샘플, 제대혈 샘플, 종양, 종양 생검, 조직, 림프로부터의 또는 상피 샘플로부터의 유사한 세포 표면 마커를 발현하는, $\gamma \delta$ T 세포, 또는 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 집단을 직접적으로 단리시키도록 이용될 수 있다. 예를 들어, $\gamma \delta$ T 세포는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, 키트, TCR α , TCR β , TCR γ , TCR δ , NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD 16, CD337(NKp30), CD336(NKp46), OX40, CD46, CCR7, 및 다른 적합한 세포 표면 마커의 양성 또는 음성 발현에 기초하여 복잡한 샘플로부터 단리될 수 있다.

[0081] $\gamma \delta$ T 세포는 시험관내 배양된 복잡한 샘플로부터 단리될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 특정한 세포 집단, 예컨대 단핵구, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포 및 NK 세포의 이전의 결실이 없는 전체 PBMC 집단은 활성화되고 증식될 수 있다. 다른 실시형태에서, 농후화된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 이의 특이적 활성화 및 증식 전에 생성될 수 있다. 몇몇 양태에서, $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 및 증식은 네이티브 또는 조작된 APC의 존재 없이 수행된다. 몇몇 양태에서, 종양 시편으로부터의 $\gamma \delta$ T 세포의 단리 및 증식은, 렉틴을 포함하는, $\gamma \delta$ TCR에 특이적인 항체 및 다른 $\gamma \delta$ TCR 활성화제를 포함하는, 부동화된 $\gamma \delta$ T 세포 유사분열물질을 사용하여 수행될 수 있다.

[0082] 몇몇 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포(들)는 하나 이상의 항원과의 접촉에 반응하여 신속히 증식할 수 있다. 몇몇 $\gamma \delta$ T 세포(들), 예컨대 $V\gamma 9V\delta 2^+$ $\gamma \delta$ T 세포(들)는 조직 배양 동안 프레닐-피로포스페이트, 알킬 아민, 및 대사물질 또는 미생물 추출물과 같은 몇몇 항원과의 접촉에 반응하여 시험관내 신속히 증식한다. 또한, 몇몇 야생

형 $\gamma\delta$ T 세포(들), 예컨대 $V\gamma 2V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T 세포(들)는 소정의 유형의 백신접종(들)에 반응하여 인간에서 생체내 신속히 증식한다. 자극된 $\gamma\delta$ T 세포는 다수의 항원 제시, 동시자극 및 복잡한 샘플로부터의 $\gamma\delta$ T 세포(들)의 단리를 수월하게 할 수 있는 부착 분자를 나타낼 수 있다. 복잡한 샘플 내의 $\gamma\delta$ T 세포(들)는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 또 다른 적합한 기간 동안 적어도 하나의 항원에 의해 시험관내 자극될 수 있다. 적합한 항원에 의한 $\gamma\delta$ T 세포의 자극은 시험관내 $\gamma\delta$ T 세포 집단을 증식시킬 수 있다.

[0083] 시험관내 복잡한 샘플로부터 $\gamma\delta$ T 세포(들)의 증식을 자극하기 위해 사용될 수 있는 항원의 비제한적 예는 프레닐-피로포스페이트, 예컨대 아이소펜테닐 피로포스페이트(IPP), 알킬-아민, 인간 미생물 병원균의 대사물질, 공생 박테리아의 대사물질, -메틸-3-뷰테닐-1-피로포스페이트(2M3B1PP), (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 피로포스페이트(HMB-PP), 에틸 피로포스페이트(EPP), 파르네실 피로포스페이트(FPP), 다이메틸알릴 포스페이트(DMAP), 다이메틸알릴 피로포스페이트(DMAPP), 에틸-아데노신 트라이포스페이트(EPPPA), 게라닐 피로포스페이트(GPP), 게라닐게라닐 피로포스페이트(GGPP), 아이소펜테닐-아데노신 트라이포스페이트(IPPPA), 모노에틸 포스페이트(MEP), 모노에틸 피로포스페이트(MEPP), 3-폴일-1-뷰틸-피로포스페이트(TUBAg 1), X-피로포스페이트(TUBAg 2), 3-폴일-1-뷰틸-유리딘 트라이포스페이트(TUBAg 3), 3-폴일-1-뷰틸-데옥시타이미딘 트라이포스페이트(TUBAg 4), 모노에틸 알킬아민, 알릴 피로포스페이트, 크로토일 피로포스페이트, 다이메틸알릴- γ -유리딘 트라이포스페이트, 크로토일- γ -유리딘 트라이포스페이트, 알릴- γ -유리딘 트라이포스페이트, 에틸아민, 아이소뷰틸 아민, sec-뷰틸아민, 아이소-아밀아민 및 질소 함유 비스포스포네이트를 포함한다.

[0084] $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 및 증식은 특이적 $\gamma\delta$ T 세포 증식 및 지속 집단을 촉발하도록 본 명세서에 기재된 활성화제 및 동시자극제를 사용하여 수행될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상이한 배양으로부터의 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 및 증식은 구별되는 클론 또는 혼합 다중클론 집단 하위집단을 달성할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상이한 작용제는 특이적 $\gamma\delta$ 활성화 신호를 제공하는 물질을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 일 양태에서, 특이적 $\gamma\delta$ 활성화 신호를 제공하는 물질은 $\gamma\delta$ TCR에 대한 상이한 단일클론 항체(MAb)일 수 있다. 일 양태에서, MAb는 γ TCR 및/또는 δ TCR의 불변 또는 가변 영역 상의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 일 양태에서, MAb는 $\gamma\delta$ TCR pan MAb를 포함할 수 있다. 일 양태에서, $\gamma\delta$ TCR pan MAb는, $\delta 1$ 및 $\delta 2$ 세포 집단을 포함하는, 둘 다 위의, 상이한 γ 및 δ TCR이 공유한 도메인을 인식할 수 있다. 일 양태에서, 항체는 5A6.E9(써모 사이언티픽(Thermo scientific)), B1(Biolegend), IMM510 및/또는 11F12(벡만 콜터(Beckman Coulter))일 수 있다. 일 양태에서, MAb는 γ 사슬의 가변 영역에 독특한 특이적 도메인(유사한 $V\gamma 9$ TCR(써모 사이언티픽 TCR1720호)에 대한, 7A5 Mab), 또는 $V\delta 1$ 가변 영역 상의 도메인(Mab TS8.2(써모 사이언티픽 TCR1730호; Mab TCI, Mab R9.12(벡만 콜터)), 또는 $V\delta 2$ 사슬(Mab 15D(써모 사이언티픽 TCR1732호))에 관한 것일 수 있다. 독특한 집단 $V\delta 1$ 또는 $V\delta 2$ 세포 하위세트를 특이적으로 활성화하고 증식시키는 이 MAb의 능력을 시험하였다(도 4). 도 4는 혈청 함유 배지(R2: RPMI+10%FBS) 및 혈청 비함유 배지(AIMV + 소 알부민; CTS 혈청 비함유 보충제를 가지는 CTS Optimizer 혈청 비함유 배지)에서의 $\delta 2$ T 세포 성장을 도시한다. 모든 배지는 100IU/ml의 IL-2, 2mM 글루타민 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유한다. 세포를 0일에 1, 5 및 20 μ M으로 졸레드론산에 의해 자극하였다. 배지를 추가의 졸레드론산의 첨가 없이 2-3일마다 보충하였다. 10^6 개의 PBMC로부터 증식되고 13일 후 배수 증식된 전체 $\delta 2$ T 세포는 각각의 조건에 대해 표시될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, $\gamma\delta$ TCR(pan 항체 및 하위 세트 집단 상의 특이적 가변 영역 에피토프를 인식하는 항체)의 상이한 도메인에 대한 항체는 $\gamma\delta$ T 세포의 증대된 활성화에 대한 이의 능력을 평가하기 위해 합해질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, $\gamma\delta$ T 세포 활성화제는 $\gamma\delta$ TCR 결합제, 예컨대 MICA, NKG2D에 대한 작용제 항체, MICA, ULBP1, ULBP3(알앤디 시스템즈(R&D systems), 미네소타주 미니애폴리스) ULBP2 또는 ULBP6(시노 바이올로지 베이징(Sino Biological Beijing), 중국)의 (Fc 태그) 융합 단백질을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 세포 무반응 및 아포토시스의 유도 없이 특이적 $\gamma\delta$ T 세포 증식을 촉발하는 것을 돕는 동안 동시자극제가 확인될 수 있다. 이 동시자극제는 $\gamma\delta$ 세포 상에 발현된 수용체에 대한 리간드, 예컨대 NKG2D, CD161, CD70, JAML, DNAX 보조 분자-1(DNAM-1) ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP 및 CD28-을 포함할 수 있다. 몇몇 양태에서, 동시자극제는 CD2 및 CD3 분자 상의 독특한 에피토프에 특이적인 항체일 수 있다. CD2 및 CD3은 $\alpha\beta$ 또는 $\gamma\delta$ T 세포(들) 상에 발현될 때 상이한 입체배좌 구조를 가질 수 있고, 몇몇 경우에, CD3 및 CD2에 특이적인 항체는 $\gamma\delta$ T 세포의 구별되는 활성화를 발생시킬 수 있다.

[0085] $\gamma\delta$ T 세포(들)의 집단은 $\gamma\delta$ T 세포(들)의 조작 전에 생체의 증식될 수 있다. 시험관내 $\gamma\delta$ T 세포 집단의 증식을 수월하게 하도록 사용될 수 있는 시약의 비제한적 예는 항-CD3 또는 항-CD2, 항-CD27, 항-CD30, 항-CD70, 항-OX40 항체, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18, 또는 IL-21, CD70(CD27 리간드), 피토HEMA글루티닌(PHA), 콘카나발린 A(ConA), 미국자리공(PWM), 단백질 땅콩 응집소(PNA), 대두 응집소(SBA), 렌즈콩 응집소

(LCA), 완두 응집소(PSA), 헬릭스 포마티아 응집소(HPA), 비시아 그라미네아 렉틴(VGA), 또는 T 세포 증식을 자극할 수 있는 또 다른 적합한 유사분열물질을 포함한다. $\gamma \delta$ T 세포(들)의 유전 조작은 생체외 및 생체내 T 세포 증식, 생존 및 기능을 증대시키도록 단리된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 게놈, 사이토카인(IL-15, IL-12, IL-2, IL-7, IL-21, IL-18, IL-19, IL-33, IL-4, IL-9, IL-23, IL1 β)으로의 중앙 인식 모이어티, 예컨대 $\alpha \beta$ TCR, $\gamma \delta$ TCR, CAR 암호화 항체, 이의 항원 결합 단편, 또는 림프구 활성화 도메인을 발현하는 작제물을 안정하게 통합시키는 것을 포함할 수 있다. 단리된 $\gamma \delta$ T 세포의 유전 조작은 단리된 $\gamma \delta$ T 세포의 게놈에서의 하나 이상의 내인성 유전자, 예컨대 MHC 유전자위(유전자위들)로부터의 유전자 발현을 결실시키거나 파괴시키는 것을 또한 포함할 수 있다.

[0086] **조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 생체외 증식**

[0087] 다른 양태에서, 본 개시내용은 입양 전달 치료를 위한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 집단의 생체외 증식을 위한 방법을 제공한다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 생체외 증식될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 APC에 의한 활성화 없이 또는 APC 및 아미노포스페이트와의 동시배양 없이 시험관내 증식될 수 있다.

[0088] 본 발명의 방법은 다양한 $\gamma \delta$ T 세포(들) 집단, 예컨대 $V\gamma 1^+$, $V\gamma 2^+$, $V\gamma 3^+$ $\gamma \delta$ T 세포 집단을 증식시킬 수 있다. 몇몇 경우에, $\gamma \delta$ T 세포 집단은 36일 미만, 35일 미만, 34일 미만, 33일 미만, 32일 미만, 31일 미만, 30일 미만, 29일 미만, 28일 미만, 27일 미만, 26일 미만, 25일 미만, 24일 미만, 23일 미만, 22일 미만, 21일 미만, 20일 미만, 19일 미만, 18일 미만, 17일 미만, 16일 미만, 15일 미만, 14일 미만, 13일 미만, 12일 미만, 11일 미만, 10일 미만, 9일 미만, 8일 미만, 7일 미만, 6일 미만, 5일 미만, 4일 미만, 3일 미만으로 시험관내 증식될 수 있다.

[0089] 몇몇 양태에서, $\gamma \delta$ T 세포를 활성화제와 접촉시킴으로써, 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는, 다양한 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시키는 방법이 제공된다. 몇몇 경우에, 활성화제는 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 표면 수용체 상의 특이적 에피토프에 결합한다. 활성화제는 항체, 예컨대 단일클론 항체일 수 있다. 활성화제는 $\delta 1$, $\delta 2$ 또는 $\delta 3$ 세포 집단과 같은 $\gamma \delta$ T 세포의 하나 이상의 유형의 성장을 특이적으로 활성화할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 활성화제는 $\delta 1$ 세포 집단의 성장을 특이적으로 활성화한다. 다른 경우에, 활성화제는 $\delta 2$ 세포 집단의 성장을 특이적으로 활성화한다.

[0090] 활성화제는 빠른 성장 속도로 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 증식을 자극할 수 있다. 예를 들어, 이 활성화제는 30시간 미만에 1 세포 분열, 29시간 미만에 1 세포 분열, 28시간 미만에 1 세포 분열, 27시간 미만에 1 세포 분열, 26시간 미만에 1 세포 분열, 25시간 미만에 1 세포 분열, 24시간 미만에 1 세포 분열, 23시간 미만에 1 세포 분열, 22시간 미만에 1 세포 분열, 21시간 미만에 1 세포 분열, 20시간 미만에 1 세포 분열, 19시간 미만에 1 세포 분열, 18시간 미만에 1 세포 분열, 17시간 미만에 1 세포 분열, 16시간 미만에 1 세포 분열, 15시간 미만에 1 세포 분열, 14시간 미만에 1 세포 분열, 13시간 미만에 1 세포 분열, 12시간 미만에 1 세포 분열, 11시간 미만에 1 세포 분열, 10시간 미만에 1 세포 분열, 9시간 미만에 1 세포 분열, 8시간 미만에 1 세포 분열, 7시간 미만에 1 세포 분열, 6시간 미만에 1 세포 분열, 5시간 미만에 1 세포 분열, 4시간 미만에 1 세포 분열, 3시간 미만에 1 세포 분열, 2시간 미만에 1 세포 분열의 평균 속도로 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 증식을 자극한다.

[0091] 몇몇 경우에, 활성화제는 약 4시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 5시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 6시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 7시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 8시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 9시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 10시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 11시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 12시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 13시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 14시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 15시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 16시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 17시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 18시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 19시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 20시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 21시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 22시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 23시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 24시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 25시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 26시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 27시간, 약 28시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 29시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 30시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 31시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 32시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 33시간, 약 34시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 35시간당 약 1 분열의 평균 속도, 약 36시간당 약 1 분열의 평균 속도로 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 증식을 자극할 수 있다.

[0092] 활성화제는 상이한 성장 속도로 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 하위집단의 증식을 자극할 수 있다. 예를 들어, 이 활성화제는 더 빠른 속도로 $\delta 1$ 세포 집단의 성장을 자극할 수 있어서, 배양의 1일 내지 90일의 기간에

결쳐 또 다른 $\gamma \delta$ T 세포 집단, 예컨대 $\delta 2$ 또는 $\delta 3$ 집단 또는 또 다른 $\gamma \delta$ 하위집단에 비해 10배 초과, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 10,000배, 100,000배 또는 1,000,000배 증식을 발생시킨다. 다른 경우에, 이 활성화제는 더 빠른 속도로 $\delta 2$ 또는 $\delta 3$ 집단의 성장을 자극할 수 있어서, 배양의 1일 내지 90일의 기간에 걸쳐 $\delta 1$ T 세포 집단 또는 또 다른 $\gamma \delta$ T 세포 하위집단에 비해 10배 초과, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 10,000배, 100,000배 또는 1,000,000배 증식을 발생시킨다. 다른 경우에, 이 활성화제는 더 빠른 속도로 $\delta 2$ 집단의 성장을 자극할 수 있어서, 배양의 1일 내지 90일의 기간에 걸쳐 $\delta 1$ T 세포 집단, $\delta 3$ T 세포 집단 또는 또 다른 $\gamma \delta$ T 세포 하위집단에 비해 10배 초과, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 10,000배, 100,000배 또는 1,000,000배 증식을 발생시킨다.

[0093] 몇몇 양태에서, 본 개시내용은 γ δ T 세포 집단을 제공하고, γ δ T 세포 집단의 증식은 신속한 속도로, 예컨대 1시간당 약 1개의 세포 분열 또는 초과로 γ δ T 세포 집단의 증식을 자극하는 물질에 의해 활성화된다. 몇몇 경우에, 이 물질은 δ 1, δ 2 또는 δ 3 T 세포의 증식을 선택적으로 자극한다. γ δ T 세포 집단은 비조작된 γ δ T 세포의 양 및 조작된 γ δ T 세포의 양을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, γ δ T 세포 집단은 δ 1, δ 2 및 δ 3 T 세포의 상이한 백분율을 포함한다. 조작된 또는 비조작된 γ δ T 세포 집단은 예를 들어 90% 미만의 δ 1 T 세포, 80% 미만의 δ 1 T 세포, 70% 미만의 δ 1 T 세포, 60% 미만의 δ 1 T 세포, 50% 미만의 δ 1 T 세포, 40% 미만의 δ 1 T 세포, 30% 미만의 δ 1 T 세포, 20% 미만의 δ 1 T 세포, 10% 미만의 δ 1 T 세포, 또는 5% 미만의 δ 1 T 세포를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조작된 또는 비조작된 γ δ T 세포 집단은 5% 초과, 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 90% 초과, 100% 초과, 또는 그 이상의 δ 1 T 세포를 포함할 수 있다.

[0094] 조작된 또는 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 예를 들어 90% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 80% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 70% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 60% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 50% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 40% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 30% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 20% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 10% 미만의 $\delta 2$ T 세포, 또는 5% 미만의 $\delta 2$ T 세포를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조작된 또는 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 5% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 10% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 20% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 30% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 40% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 50% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 60% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 70% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 80% 초과와 $\delta 2$ T 세포, 또는 90% 초과와 $\delta 2$ T 세포를 포함할 수 있다.

[0095] 조작된 또는 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 예를 들어 90% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 80% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 70% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 60% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 50% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 40% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 30% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 20% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 10% 미만의 $\delta 3$ T 세포, 또는 5% 미만의 $\delta 3$ T 세포를 포함할 수 있다. 대안적으로, 조작된 또는 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 5% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 10% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 20% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 30% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 40% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 50% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 60% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 70% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 80% 초과와 $\delta 3$ T 세포, 또는 90% 초과와 $\delta 3$ T 세포를 포함할 수 있다.

[0096] 하나 이상의 활성화체는 $\gamma \delta$ T 세포와 접촉할 수 있고, 이후 동시자극 분자는 $\gamma \delta$ T 세포와 접촉할 수 있어서, 추가의 자극을 제공하고 $\gamma \delta$ T 세포를 증식시킨다. 몇몇 실시형태에서, 활성화제 및/또는 동시자극제는 식물 및 비식물 기원의 렉틴, $\gamma \delta$ T 세포를 활성화하는 단일클론 항체, 및 다른 비렉틴/비항체 물질일 수 있다. 다른 경우에, 식물 렉틴은 콘카나발린 A(ConA)일 수 있지만, 다른 식물 렉틴, 예컨대 식물성혈구응집소(PHA)를 사용할 수 있다. 렉틴의 다른 예는 단백질 땅콩 응집소(PNA), 대두 응집소(SBA), 렌즈콩 응집소(LCA), 완두 응집소(PSA), 헬릭스 포마티아 응집소(HPA), 비시아 그라미네아 렉틴(VGA)을 포함한다.

[0097] 활성화제 및 동시자극 분자의 비제한적 예는 항체, 예컨대 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, 8.3.20, 7A5, IMM510, R9.12, 11F2, 또는 이들의 조합을 포함한다. 활성화제 및 동시자극 분자의 다른 예는 졸레드로네이트, 포르볼 12-미리스테이트-13-아세테이트(TP A), 메제레인(mezerein), 스타필로코커스 장독소 A(SEA), 스트렙토코커스 단백질 A, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0098] 다른 경우에, 활성화제 및/또는 동시자극제는 α TCR, β TCR, γ TCR, δ TCR, CD277, CD28, CD46, CTLA4, ICOS, PD-1, CD30, NKG2D, NKG2A, HVEM, 4-1 BB(CD137), OX40(CD134), CD70, CD80, CD86, DAP, CD122, GITR, FcεRIg, CD1, CD16, CD161, DNAX, 보조 분자-1(DNAM-1), SLAM, 콕사키 바이러스 및 아테노바이러스 수용체 또는 이들의 조합에 대한 항체 또는 리간드일 수 있다.

[0099] 에피토프 확인

- [0100] 일 양태에서, 본 개시내용은 신속한 성장 속도에서 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 증식을 자극하는 물질의 에피토프를 확인하는 방법을 제공한다. 에피토프는 독특한 공간 구성의 적어도 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 아미노산을 포함할 수 있다. 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산 둘 다를로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 변성 용매에 대한 노출에 통상적으로 보유될 수 있지만, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매에 의한 처리에서 통상적으로 소실될 수 있다.
- [0101] 에피토프 맵핑은, 선형 또는 비선형, 불연속 아미노산 서열(들), 즉 관심 있는 활성화제에 의해 인식되는 에피토프, 예컨대 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, 3.20, IMM510, R9.12, 11F2 및 7A5 항체를 확인하기 위해 수행될 수 있다. 에피토프 맵핑에 대한 일반적인 접근법은 일반적으로 비상동성 발현 시스템에서 관심 있는 항체 또는 리간드에 의해 인식된 전장 폴리펩타이드 서열, 및 다양한 단편, 즉 폴리펩타이드 서열의 절두 형태의 발현을 필요로 할 수 있다. 이 다양한 재조합 폴리펩타이드 서열 또는 이의 단편(예를 들어, N 말단 단백질(예를 들어, GFP)과 융합됨)은 이후 관심 있는 항체 또는 리간드가 폴리펩타이드 서열의 절두 형태 중 하나 이상에 결합할 수 있는지를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 중첩 아미노산 영역을 가지는 재조합 폴리펩타이드 서열의 반복적인 절두 및 생성의 이용을 통해, 관심 있는 항체에 의해 인식된 폴리펩타이드 서열의 영역을 확인할 수 있다(예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)] 참조). 상기 방법은 에피토프 라이브러리, 예컨대 막 지지체 상의 합성 펩타이드 어레이로부터 유래된 에피토프 라이브러리, 조합 파지 디스플레이 펩타이드 라이브러리로부터 되살린 서열에 결합하는 관심 있는 항체와 같은 물질의 능력에 따라 달라진다. 이후, 에피토프 라이브러리는 항체에 대해 스크리닝되는 가능성의 범위를 제공한다. 추가적으로, 부위 특이적 돌연변이발생, 또는 에피토프의 하나 이상의 잔기를 표적화하는 랜덤 Ala 스캔은 에피토프의 동일성을 확인하도록 추구될 수 있다.
- [0102] 에피토프의 라이브러리는 cDNA 작제물로서 $\gamma \delta$ T 세포 수용체($\gamma \delta$ TCR)의 다양한 가능한 재조합을 합성으로 설계하고 적합한 시스템에서 이를 발현함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, J δ 1, J δ 2 및 J δ 3 유전자 분절을 포함하는, J δ 영역이 다른 복수의 V δ 1 유전자 분절을 합성으로 설계할 수 있다. 대안적으로, V δ 2J δ 1 및 V δ 3J δ 1 사슬은 또한 합성 유전자로서 순서화되고 적합한 벡터로 클로닝될 수 있다. 복수의 합성으로 클로닝된 δ TCR 사슬, 예컨대 V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 1J δ 4, V δ 2 및 V δ 3 사슬은 합성으로 클로닝된 γ TCR 사슬, 예컨대 V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 및 V γ 10 합성으로 설계된 유전자 분절에 의해 숙주 시스템으로 동시형질감염될 수 있다. 다른 경우에 δ TCR 사슬, 예컨대 V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 1J δ 4, V δ 2 및 V δ 3 사슬은 인간 정상 및 악성 조직으로부터 분리된 인간 PBMC 또는 $\gamma \delta$ T 세포로부터 추출된 전체 RNA로부터 증폭될 수 있다.
- [0103] 숙주 시스템은 임의의 적합한 발현 시스템, 예컨대 293 세포, 곤충 세포, 또는 적합한 시험관내 번역 시스템일 수 있다. 숙주 시스템으로 형질감염된 합성으로 설계된 $\gamma \delta$ T 세포 분절의 복수의 다양한 가능한 재조합은 예를 들어 $\gamma \delta$ TCR의 25개 초과, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개 또는 90개의 가능한 쌍 짓기 조합을 제공할 수 있다. 이전에 기재된 라이브러리에서의 에피토프 중 하나에 대한 물질의 결합은 표지된 항체, 예컨대 TS-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, γ 3.20, R9.12, 7A5를 라이브러리의 에피토프와 접촉시키고 라벨로부터 신호를 검출함으로써 검출될 수 있다.
- [0104] 에피토프 맵핑의 경우, 구조적 불연속 에피토프를 맵핑하도록 나타난 컴퓨터 알고리즘을 또한 개발하였다. 예를 들어, x선 결정학 및 2차원 핵 자기 공명을 포함하는 방법에 의해 아미노산의 공간 입체배치를 결정함으로써 구조적 에피토프가 확인될 수 있다. 몇몇 에피토프 맵핑 방법, 예컨대 항원:항체 복합체의 결정의 x선 분석은 에피토프의 원자 해상을 제공할 수 있다. 다른 경우에, 에피토프 맵핑을 위한 컴퓨터 조합 방법은 TS-1 항체 또는 TS8.2 항체와 같은 항체의 서열에 기초한 가능한 에피토프를 모델링하도록 이용될 수 있다. 이러한 경우에, 항체의 항원 결합 부분은 서열분석되고, 컴퓨터화 모델은 항체의 가능한 결합 부위를 재구성하고 예측하도록 이용된다.
- [0105] 몇몇 경우에, 본 개시내용은 $\gamma \delta$ T 세포 수용체의 에피토프를 결정하는 방법을 제공하고, (a) $\gamma \delta$ T 세포 수용체로부터 에피토프의 라이브러리를 제조하는 단계; (b) 에피토프의 라이브러리를 항체와 접촉시키는 단계; 및 (b) 항체가 결합한 에피토프의 라이브러리에서 적어도 하나의 에피토프의 아미노산 서열을 확인하는 단계를 포함한다. 몇몇 경우에, 항체는 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, R9.12, 11F2 및 7A5 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 경우에, 항체는 고체 지지체에 부착된다. 에피토프의 라이브러리는 T 세포 수용체, 예컨대 γ TCR 또는 δ TCR의 연속 및 불연속 에피토프에 상응하는 서열을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에, 에피토프의 라이브러리는 약 10개의 아미노산 내지 약 30개의 아미노산 길이, 약 10개의 아미노산 내지 약 20개의 아미

노산 길이, 또는 약 5개의 아미노산 내지 약 12개의 아미노산 길이의 범위의 $\gamma\delta$ T 세포 수용체로부터의 단편을 포함한다. 몇몇 경우에, 항체는 표지되고, 라벨은 방사성 분자, 발광성 분자, 형광성 분자, 효소 또는 바이오틴이다.

[0106] **치료 방법**

[0107] 본 명세서에 기재된 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 함유하는 약제학적 조성물은 예방학적 및/또는 치료학적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료학적 분야에서, 이 조성물은 질환 또는 병태의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 정지 시키기에 충분한 양으로 질환 또는 병태를 이미 겪는 대상체에게 투여될 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 병태 발생, 병태 걸림 또는 병태 악화의 가능성을 낮추도록 또한 투여될 수 있다. 치료학적 용도를 위한 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단의 유효량은 질환 또는 병태의 중증도 및 과정, 이전의 치료, 대상체의 건강 상태, 체중, 및/또는 약물에 대한 반응, 및/또는 주치의의 판단에 기초하여 변할 수 있다.

[0108] 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 병태의 예는 암, 감염성 질환, 자가면역 장애 및 패혈증을 포함한다. 대상체는 인간, 비인간 영장류, 예컨대 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 중; 농장 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 가축 동물, 예컨대 토끼, 개 및 고양이; 실험실 동물, 예컨대 설치류, 예컨대 랫트, 마우스 및 기니아 피그 등일 수 있다. 대상체는 임의의 연령일 수 있다. 대상체는 예를 들어 노인, 성인, 사춘기, 예비사춘기, 어린이, 갓난아기, 돌배기일 수 있다.

[0109] $\gamma\delta$ T 세포에 의해 대상체에서 병태(예를 들어, 질병)를 치료하는 방법은 치료학적 유효량의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 $\gamma\delta$ T 세포는 다양한 섭생(예를 들어, 시기, 농도, 투약량, 치료 사이의 간격 및/또는 제제)으로 투여될 수 있다. 대상체는 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 받기 전에 예를 들어 화학치료, 방사선 또는 둘 다의 조합에 의해 또한 예비컨디셔닝될 수 있다. 치료의 일부로서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 제1 섭생에서 대상체에게 투여될 수 있고, 대상체는 제1 섭생에서의 치료가 치료학적 효능의 소정의 수준을 만족시키는지를 결정하도록 모니터링될 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포 또는 또 다른 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 제2 섭생에서 대상체에게 투여될 수 있다. **도 2**는 대상체를 치료하는 방법을 도식적으로 예시한다. 제1 조작(**201**)에서, 적어도 하나의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 소정의 병태(예를 들어, 암)를 가지거나 가지는 것으로 의심된 대상체에게 투여된다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 제1 섭생에서 투여될 수 있다. 제2 조작(**202**)에서, 예를 들어 건강관리 제공자(예를 들어, 주치의 또는 간호사)가 대상체를 모니터링할 수 있다. 몇몇 예에서, 대상체는 대상체의 병태의 치료에서의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 효능을 결정하거나 판단하도록 모니터링된다. 몇몇 상황에서, 대상체는 대상체에서 $\gamma\delta$ T 세포 집단의 생체내 증식을 결정하도록 또한 모니터링될 수 있다. 다음에, 제3 조작(**203**)에서, 적어도 하나의 다른 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 제2 섭생에서 대상체에게 투여된다. 제2 섭생은 제1 섭생과 동일하거나 제1 섭생과 다를 수 있다. 몇몇 상황에서, 예를 들어, 제1 조작(**201**)에서의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 투여가 효과적인 것으로 발견된 경우(예를 들어, 투여의 단일 회차는 병태를 치료하기에 충분할 수 있음), 제3 조작(**203**)은 수행되지 않는다. 이의 동종이계 및 보편 공여자 특징으로 인해, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 상이한 MHC 일배체형을 가지는 다양한 대상체에게 투여될 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 대상체에게 투여되기 전에 동결되거나 냉동보존될 수 있다.

[0110] 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 대상체에게 투여되기 전에 또한 동결되거나 냉동보존될 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 동일한, 상이한, 또는 동일한 및 상이한 종양 인식 모이어티의 조합을 발현하는 2개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 상이한 항원, 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하도록 설계된 몇몇 구별되는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 흑색종으로 고통받는 인간 세포는 NY-ESO-1 암유전자를 발현할 수 있다. 인간 내에 감염된 세포는 NY-ESO-1 단백질을 더 작은 단편으로 처리하고 항원 인식을 위해 NY-ESO-1 단백질의 다양한 부분을 제시할 수 있다. 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 NY-ESO-1 단백질의 상이한 부분을 인식하도록 설계된 상이한 종양 인식 모이어티를 발현하는 다양한 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 포함할 수 있다. **도 3**은 흑색종 항원 NY-ESO-1의 상이한 에피토프를 인식하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단에 의해 대상체를 치료하는 방법을 도식적으로 예시한다. 제1 조작(**301**)에서, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단을 선택한다. 예를 들어, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 NY-ESO-1 단백질의 상이한 부분을 인식하는 상이한 종양 인식 모이어티를 발현하는 2개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 제2 조작(**302**)에서, 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 집단은 제1 섭생에서 투여될 수 있다. 제2 조작(**303**)에서, 예를 들어 건강관리 제공자(예를 들어, 주치의 또는 간호사)가 대상체를 모니터링할 수 있다.

[0111] 본 개시내용의 $\gamma\delta$ T 세포는 다양한 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 암, 예컨대 고형 종양 및 혈액학적 악성종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 암의 비제한적

에는 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 신경아세포종, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 뇌암, 뇌종양, 예컨대 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각로 및 시상하부 신경교종, 유방암, 기관지 선종, 버킷 림프종, 미지의 1차 기원의 암종, 중추 신경계 림프종, 소뇌 성상세포종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 척수증식성 장애, 결장암, 경피 T 세포 림프종, 결체조직 작은 원형 세포 종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유잉 육종, 생식 세포 종양, 담낭암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양, 신경교종, 모발 세포 백혈병, 두경부암, 심장암, 간세포 (간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 소도 세포 암종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 입술 및 구강 암, 지방육종, 간암, 폐암, 예컨대 비소세포 및 소세포 폐암, 림프종, 백혈병, 매크로글로불린혈증, 골의 악성 섬유 조직구종/골육종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 잠복 원발을 가지는 전이성 편평 경부암, 구강암, 다발성 내분비 종양증 증후군, 골수이형성 증후군, 골수성 백혈병, 비강 및 부비동 암, 비인두 암종, 신경아세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 경구암, 입인두암, 골육종/의 악성 섬유 조직구종, 난소암, 난소 상피 암, 난소 생식 세포 종양, 췌장암, 췌장암 소도 세포, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 송과선 성상세포종, 송과선 배세포종, 뇌하수체 선종, 가슴막폐 모세포종, 혈장 세포 종양형성, 원발성 중추 신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신장 세포 암종, 신우 및 요관 이행성 세포 암, 망막아세포종, 횡문근육종, 침샘암, 육종, 피부암, 피부 암종 머털 세포, 소장암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 위암, T 세포 림프종, 경부암, 흉선종, 흉선 암종, 갑상선암, 영양막 종양(임신성), 미지의 원발성 부위의 암, 요도암, 자궁 육종, 질암, 음부암, 발덴스트롬 매크로글로불린혈증 및 월름스 종양을 포함한다.

[0112] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 감염성 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 감염성 질환은 예를 들어 병원균성 박테리아 또는 바이러스에 의해 야기될 수 있다. 다양한 병원균성 단백질, 핵산, 지질, 또는 이의 단편은 이화된 세포에 의해 발현될 수 있다. 항원 제시 세포는 예를 들어 식균작용 또는 수용체 매개 세포 이물 흡수에 이러한 병원균성 분자를 내재화하고, 적절한 MHC 분자에 결합한 항원의 단편을 디스플레이할 수 있다. 예를 들어, 병원균성 단백질의 다양한 9합체 단편은 APC에 의해 디스플레이될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 병원균성 박테리아 또는 바이러스의 다양한 항원 및 항원 단편을 인식하도록 설계될 수 있다. 병원균성 박테리아의 비제한적 예는 a) 보르데텔라(Bordetella) 속, 예컨대 보르데텔라 페르투스스 종; b) 보렐리아(Borrelia) 속, 예컨대 보렐리아 부르그도르페리 종; c) 브루셀라(Brucella) 속, 예컨대 브루셀라 아보르투스, 브루셀라 카니스, 브루셀라 멜리테리시스 및/또는 브루셀라 수이스 종; d) 캄필로박터(Campylobacter) 속, 예컨대 캄필로박터 제주니 종; e) 클라미디아(Chlamydia) 및 클라미도필라(Chlamydophila) 속, 예컨대 클라미디아 뉴모니아, 클라미디아 트라초마티스 및/또는 클라미도필라 프시타시 종; f) 크로스트리듐(Clostridium) 속, 예컨대 크로스트리듐 보툴리눔, 크로스트리듐 디피실, 크로스트리듐 페르프린젠스, 크로스트리듐 테타니 종; g) 코리네박테륨(Corynebacterium) 속, 예컨대 코리네박테륨 디프테리아 종; h) 엔테로코커스(Enterococcus) 속, 예컨대 엔테로코커스 파에칼리스 및/또는 엔테로코커스 파에숨 종; i) 에스체리치아(Escherichia) 속, 예컨대 에스체리치아 콜라이 종; j) 프란시셀라(Francisella) 속, 예컨대 프란시셀라 툴라렌시스 종; k) 하에모필루스(Haemophilus) 속, 예컨대 하에모필루스 인플루엔자 종; l) 헬리코박터(Helicobacter) 속, 예컨대 헬리코박터 파일로리 종; m) 레지오넬라(Legionella) 속, 예컨대 레지오넬라 뉴모필라 종; n) 렙토스피라(Leptospira) 속, 예컨대 렙토스피라 인테로간스 종; o) 리스테리아(Listeria) 속, 예컨대 리스테리아 모노사이토게네스 종; p) 마이코박테륨(Mycobacterium) 속, 예컨대 마이코박테륨 레프라에, 마이코박테륨 투베르쿨로시스 및/또는 마이코박테륨 울세란스 종; q) 마이코플라스마(Mycoplasma) 속, 예컨대 마이코플라스마 뉴모니아 종; r) 네이세리아(Neisseria) 속, 예컨대 네이세리아 고노르호에아에 및/또는 네이세리아 메닝기티디아 종; s) 슈도모나스(Pseudomonas) 속, 예컨대 슈도모나스 아에루기노사 종; t) 리켓치아(Rickettsia) 속, 예컨대 리켓치아 리케치 종; u) 살모넬라(Salmonella) 속, 예컨대 살모넬라 티피 및/또는 살모넬라 티피무리움 종; v) 쉬겔라(Shigella) 속, 예컨대 쉬겔라 소네이 종; w) 스티필로코커스(Staphylococcus) 속, 예컨대 스티필로코커스 아우레우스, 스티필로코커스 에피데르미디스 및/또는 스티필로코커스 사프로피티쿠스 종; x) 스트렙토코커스(Streptococcus) 속, 예컨대 스트렙토코커스 아갈락티아에, 스트렙토코커스 뉴모니아 및/또는 스트렙토코커스 피오게네스 종; y) 트레포네마(Treponema) 속, 예컨대 트레포네마 팔리둠 종; z) 비브리오(Vibrio) 속, 예컨대 비브리오 콜레라; 및/또는 aa) 예르시니아(Yersinia) 속, 예컨대 예르시니아 페스티스 종에서 발견될 수 있다.

[0113] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma\delta$ T 세포는 감염성 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있고, 감염성 질환은 바이러스에 의해 야기될 수 있다. 바이러스의 비제한적 예는 하기 바이러스의 패밀리에서 발견될 수 있고, 예시적인 종에 의해 예시된다: a) 아데노비리다에(Adenoviridae) 패밀리, 예컨대 아데노바이러스 종; b) 헤르페

스비리다에(Herpesviridae) 패밀리, 예컨대 단순 헤르페스 1형, 단순 헤르페스 2형, 바리셀라-조스터 바이러스, 엡스테인-바(Epstein-barr) 바이러스, 인간 사이토메갈로바이러스, 인간 헤르페스 바이러스 8형 중; c) 유두종 비리다에(Papillomaviridae) 패밀리, 예컨대 인간 유두종바이러스 중; d) 폴리오마비리다에(Polyomaviridae) 패밀리, 예컨대 BK 바이러스, JC 바이러스 중; e) 폭스비리다에(Poxviridae) 패밀리, 예컨대 두창 중; f) 헤파 드나비리다에(Hepadnaviridae) 패밀리, 예컨대 간염 B 바이러스 중; g) 파르보비리다에(Parvoviridae) 패밀리, 예컨대 인간 보카바이러스, 파르보바이러스 B19 중; h) 아스트로비리다에(Astroviridae) 패밀리, 예컨대 인간 아스트로바이러스 중; i) 칼리시비리다에(Caliciviridae) 패밀리, 예컨대 노르워크(Norwalk) 바이러스 중; j) 플라비비리다에(Flaviviridae) 패밀리, 예컨대 간염 C 바이러스(HCV), 황열 바이러스, 뎡기 바이러스, 웨스트 나일 바이러스 중; k) 토가비리다에(Togaviridae) 패밀리, 예컨대 루벨라(Rubella) 바이러스 중; l) 헤페비리다에(Hepeviridae) 패밀리, 예컨대 간염 E 바이러스 중; m) 레트로비리다에(Retroviridae) 패밀리, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 중; n) 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae) 패밀리, 예컨대 인플루엔자 바이러스 중; o) 아레나비리다에(Arenaviridae) 패밀리, 예컨대 구아나리토(Guanarito) 바이러스, 유닌(Junin) 바이러스, 라사(Lassa) 바이러스, 마추포(Machupo) 바이러스, 뢰/또는 사비아(Sabia) 바이러스 중; p) 부냐비리다에(Bunyaviridae) 패밀리, 예컨대 크림-콩고(Crimean-Congo) 출혈 열 바이러스 중; q) 필로비리다에(Filoviridae) 패밀리, 예컨대 에볼라 바이러스 뢰/또는 마르부르크 바이러스 중; 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae) 패밀리, 예컨대 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포융 합 바이러스, 인간 메타뉴모바이러스, 헨드라(Hendra) 바이러스 뢰/또는 니파(Nipah) 바이러스 중; r) 라브도비리다에(Rhabdoviridae) 속, 예컨대 광견병 바이러스 중; s) 레오비리다에(Reoviridae) 패밀리, 예컨대 로타바이러스, 오르비바이러스, 콜티바이러스 뢰/또는 마나 바이러스 중. 몇몇 예에서, 바이러스는 바이러스 패밀리, 예컨대 간염 D로 배정되지 않는다.

[0114] 몇몇 경우에, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 면역 질환, 예컨대 자가면역 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 염증성 질환, 예컨대 자가면역 질환은 또한 B- 세포 장애와 연관된 질환의 종류이다. 본 명세서에 개시된 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 치료될 수 있는 면역 질환 또는 병태, 예컨대 자가면역 병태의 예는 류마티스 성 관절염, 류마티스성 열, 다발성 경화증, 실험적 자가면역 뇌척수염, 건선, 포도막염, 진성 당뇨병, 전신 홍 방성 낭창(SLE), 낭창성 신염, 습진, 피부경화증, 다발근육염/피부경화증, 다발근육염/피부근염, 췌양성 직장염, 중증 복합 면역결핍(SCID), 디조지(DiGeorge) 증후군, 모세혈관확장성 운동실조증, 계절성 알레르기, 통년성 알레르기, 식품 알레르기, 아나필락시스, 비만세포증, 알레르기성 비염, 아토피성 피부염, 파키슨병, 알 츠하이머병, 비기능항진증, 백혈구 부착 결핍증, X-연관 림프증식성 질환, X연관성 무감마글로불린혈증, 선택적 면역글로불린 A 결핍증, 과 IgM 증후군, HIV, 자가면역 림프증식성 증후군, 비스코트-알드리히(Wiskott-Aldrich) 증후군, 만성 육아종성 질환, 공통 가변성 면역결핍(CVID), 과면역글로불린 E 증후군, 하시모토 갑상 선염, 급성 특발성 혈소판감소성 자반병, 만성 특발성 혈소판감소성 자반병, 피부근염, 시데남 무도병, 중증 근 무력증, 다선성 증후군, 수포성 유사천포창, 헤노호-스클레인(Henoch-Schonlein) 자반병, 슬알균감염후 신장염, 결절성 홍반, 다형 홍반, gA 신장병, 타카야수 동맥염, 에디슨병, 유육종증, 췌양성 결장염, 결절성 다발동맥염, 강직성 척추염, 굿파스튜어 증후군, 트롬보안지티서비테란스(thromboangitis obliterans), 쇼그렌 증 후군, 원발성 쓸개관 간경화증, 하시모토 갑상선염, 갑상선중독증, 만성 활성 간염, 다발 연골염, 심상성 천포 창, 베게너 육아종증, 막성 신장병, 근위축성 측색 경화증, 척수매독, 거대 세포 동맥염, 다발성 근육통, 악성 빈혈, 급속 진행 사구체신염, 건선, 섬유성 폐렴 뢰 암을 포함한다.

[0115] 본 개시내용의 $\gamma \delta$ T 세포에 의한 치료는 병태의 임상 발병 전에, 동안에 뢰 후에 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상 발병 후 1일, 1주, 6개월, 12개월 또는 2년 후에 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상 발병 후 1일 초과, 1주, 1개월, 6개월, 12개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년 초과 동안 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상 발병 후 1일 미만, 1주, 1개월, 6개월, 12개월 또는 2년 동안 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 임상 실험에서 인간을 치료하는 것을 또한 포함할 수 있다. 치료는 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0116] 몇몇 경우에, 대상체에 대한 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 투여는 대상체의 신체에서 내인성 림프구의 활성을 조절한다. 몇몇 경우에, 대상체에 대한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 투여는 내인성 T 세포에 항원을 제공 하고, 면역 반응을 부스팅할 수 있다. 몇몇 경우에, 기억 T 세포는 $CD4^+$ T 세포이다. 몇몇 경우에, 기억 T 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 몇몇 경우에, 대상체에 대한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 투여는 또 다른 면역 세포의 세포 독성을 활성화한다. 몇몇 경우에, 다른 면역 세포는 $CD8^+$ T 세포이다. 몇몇 경우에, 다른 면역 세포는 자연 살 해 T 세포이다. 몇몇 경우에, 대상체에 대한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 투여는 조절 T 세포를 억제한다. 몇몇

경우에, 조절 T 세포는 Fox3+ Treg 세포이다. 몇몇 경우에, 조절 T 세포는 Fox3- Treg 세포이다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 활성이 조절될 수 있는 세포의 비제한적 예는 조절 줄기 세포; B 세포; CD4; CD8; 적혈구; 백혈구; 수지상 세포, 예컨대 수지상 항원 제시 세포; 백혈구; 대식세포; 기억 B 세포; 기억 T 세포; 단핵구; 자연 살해 세포; 호중구 과립구; T-헬퍼 세포; 및 T 살해 세포를 포함한다.

[0117] 대부분의 골수 이식 동안, 사이클로포스파마이드와 전신 조사의 조합은 대상체의 면역계에 의한 이식에서의 조절 줄기 세포(HSC)의 거부를 예방하도록 종래에 사용된다. 몇몇 경우에, 공여자 골수와 인터류킨-2(IL-2)의 항온처리는 생체의 수행되어 공여자 골수에서의 살해 림프구의 생성을 증대시킨다. 인터류킨-2(IL-2)는 야생형 림프구의 성장, 증식 및 분화에 필요한 사이토카인이다. 인간으로의 $\gamma \delta$ T 세포의 입양 전달의 현재의 연구는 $\gamma \delta$ T 세포 및 인터류킨-2의 동시투여를 요할 수 있다. 그러나, IL-2의 낮은 및 높은 투약량 둘 다는 매우 독성인 부작용을 가질 수 있다. IL-2 독성은 복수의 장기/시스템, 가장 중요하게는 심장, 폐, 신장 및 중추 신경계에서 표출될 수 있다. 몇몇 경우에, 본 개시내용은 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-15, IL-12, IL-21의 동시투여 없이 대상체에게 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 방법을 제공한다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2와의 동시투여 없이 대상체에게 투여될 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 IL-2의 동시투여 없이 시술, 예컨대 골수 이식 동안 대상체에게 투여된다.

[0118] 투여 방법

[0119] 1 또는 다수의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 임의의 순서로 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다. 동시인 경우, 다수의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 단일 통합 형태로, 예컨대 정맥 주사로, 또는 다수의 형태로, 예를 들어, 다수의 정맥 점적주사, s.c, 주사 또는 환제로서 제공될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 단일 패키지 또는 복수의 패키지에서 함께 또는 별개로 패키징될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 1 또는 모두는 다수의 용량으로 제공될 수 있다. 동시가 아닌 경우, 복수의 용량 사이의 시기는 약 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 약 1년 만큼 변할 수 있다. 몇몇 경우에, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 대상체에 대한 투여 후에 생체 내 대상체의 몸 내에 증식할 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 동일한 세포 체제에 의해 다수의 치료에 대해 세포를 제공하도록 동결될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들), 및 이를 포함하는 약제학적 조성물은 키트로서 패키징될 수 있다. 키트는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들) 및 이를 포함하는 조성물의 사용에 관한 설명서(예를 들어, 서면 설명서)를 포함할 수 있다.

[0120] 몇몇 경우에, 암을 치료하는 방법은 치료학적 유효량의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 투여는 암을 치료한다. 몇몇 실시형태에서, 치료학적 유효량의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 적어도 약 10초, 30초, 1분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 또는 1년 동안 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 치료학적 유효량의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 적어도 1주 동안 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 치료학적 유효량의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 적어도 2주 동안 투여된다.

[0121] 본 명세서에 기재된 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 질환 또는 병태의 발병 전에, 동안에 또는 후에 투여될 수 있고, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 함유하는 약제학적 조성물의 투여의 시기는 변할 수 있다. 예를 들어, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 질환 또는 병태의 발병의 가능성을 낮추기 위해 예방적으로 사용될 수 있고, 병태 또는 질환에 대한 경향을 가지는 대상체에게 연속하여 투여될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 증상의 발병 동안에 또는 이후에 가능한 빨리 대상체에게 투여될 수 있다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)의 투여는 증상의 발생 내 즉시, 증상의 발생 처음 3시간 내에, 증상의 발생 처음 6시간 내에, 증상의 발생 처음 24시간 내에, 증상의 발생 처음 48시간 내에, 또는 증상의 발생으로부터 임의의 기간 내에 개시될 수 있다. 초기 투여는 본 명세서에 기재된 임의의 체제를 사용하여 예컨대 본 명세서에 기재된 임의의 경로에 의해 임의의 경로를 통해 실용적일 수 있다. 몇몇 예에서, 본 개시내용의 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 투여는 정맥 투여이다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 1 또는 복수의 투약량은 암, 감염성 질환, 면역 질환, 패혈증 또는 골수 이식의 발병 후에 실행 가능한 한 빨리 면역 질환의 치료에 필요한 시간의 기간, 예컨대 약 24시간 내지 약 48시간, 약 48시간 내지 약 1주, 약 1주 내지 약 2주, 약 2주 내지 약 1개월, 약 1개월 내지 약 3개월 등 동안 투여될 수 있다. 암의 치료를 위해, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 1 또는 복수의 투약량은 암의 발병 후에 및 다른 치료 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 몇몇 예에서, 조작된 $\gamma \delta$ T 세포(들)는 적어도 약 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 96시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년 또는 적어도 5년 동

안 투여될 수 있다. 치료의 길이는 각각의 대상체에 대해 변할 수 있다.

[0122] **투약량**

[0123] 본 명세서에 개시된 조작된 $\gamma\delta T$ 세포(들)는 정확한 투약량의 단일 투여에 적합한 단위 제형 중에 제제화될 수 있다. 몇몇 경우에, 단위 제형은 추가적인 림프구를 포함한다. 단위 제형에서, 제제는 하나 이상의 화합물의 적절한 분량을 함유하는 단위 용량으로 분할된다. 단위 투약량은 제제의 별개의 분량을 함유하는 패키지의 형태일 수 있다. 비제한적 예는 패키징된 정제 또는 캡슐, 및 바이알 또는 앰플 중의 분말이다. 수성 현탁액 조성물은 단일 용량 비재밀폐형 용기에 포장될 수 있다. 다용량 재밀폐형 용기를 예를 들어 보존제와 함께 또는 보존제 없이 사용할 수 있다. 몇몇 예에서, 약제학적 조성물은 보존제를 포함하지 않는다. 비경구 주사를 위한 제제는 단위 제형, 예를 들어 보존제를 가지는 앰플 또는 다용량 용기에 존재할 수 있다.

[0124] 본 명세서에 기재된 조작된 $\gamma\delta T$ 세포는 적어도 5개의 세포, 적어도 10개의 세포, 적어도 20개의 세포, 적어도 30개의 세포, 적어도 40개의 세포, 적어도 50개의 세포, 적어도 60개의 세포, 적어도 70개의 세포, 적어도 80개의 세포, 적어도 90개의 세포, 적어도 100개의 세포, 적어도 200개의 세포, 적어도 300개의 세포, 적어도 400개의 세포, 적어도 500개의 세포, 적어도 600개의 세포, 적어도 700개의 세포, 적어도 800개의 세포, 적어도 900개의 세포, 적어도 1×10^3 개의 세포, 적어도 2×10^3 개의 세포, 적어도 3×10^3 개의 세포, 적어도 4×10^3 개의 세포, 적어도 5×10^3 개의 세포, 적어도 6×10^3 개의 세포, 적어도 7×10^3 개의 세포, 적어도 8×10^3 개의 세포, 적어도 9×10^3 개의 세포, 적어도 1×10^4 개의 세포, 적어도 2×10^4 개의 세포, 적어도 3×10^4 개의 세포, 적어도 4×10^4 개의 세포, 적어도 5×10^4 개의 세포, 적어도 6×10^4 개의 세포, 적어도 7×10^4 개의 세포, 적어도 8×10^4 개의 세포, 적어도 9×10^4 개의 세포, 적어도 1×10^5 개의 세포, 적어도 2×10^5 개의 세포, 적어도 3×10^5 개의 세포, 적어도 4×10^5 개의 세포, 적어도 5×10^5 개의 세포, 적어도 6×10^5 개의 세포, 적어도 7×10^5 개의 세포, 적어도 8×10^5 개의 세포, 적어도 9×10^5 개의 세포, 적어도 1×10^6 개의 세포, 적어도 2×10^6 개의 세포, 적어도 3×10^6 개의 세포, 적어도 4×10^6 개의 세포, 적어도 5×10^6 개의 세포, 적어도 6×10^6 개의 세포, 적어도 7×10^6 개의 세포, 적어도 8×10^6 개의 세포, 적어도 9×10^6 개의 세포, 적어도 1×10^7 개의 세포, 적어도 2×10^7 개의 세포, 적어도 3×10^7 개의 세포, 적어도 4×10^7 개의 세포, 적어도 5×10^7 개의 세포, 적어도 6×10^7 개의 세포, 적어도 7×10^7 개의 세포, 적어도 8×10^7 개의 세포, 적어도 9×10^7 개의 세포, 적어도 1×10^8 개의 세포, 적어도 2×10^8 개의 세포, 적어도 3×10^8 개의 세포, 적어도 4×10^8 개의 세포, 적어도 5×10^8 개의 세포, 적어도 6×10^8 개의 세포, 적어도 7×10^8 개의 세포, 적어도 8×10^8 개의 세포, 적어도 9×10^8 개의 세포, 적어도 1×10^9 개의 세포, 또는 초과 양으로 조성물 중에 존재할 수 있다.

[0125] 본 발명의 조작된 $\gamma\delta T$ 세포의 치료학적 유효 용량은 약 1개의 세포 내지 약 10개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 100개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 10개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 20개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 30개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 40개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 50개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 60개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 70개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 80개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 90개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 100개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 5×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^3 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 5×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^4 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^5 개의 세포, 약 1개의

세포 내지 약 5×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^5 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 5×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^6 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 5×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^7 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 1×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 2×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 3×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 4×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 5×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 6×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 7×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 8×10^8 개의 세포, 약 1개의 세포 내지 약 9×10^8 개의 세포, 또는 약 1개의 세포 내지 약 1×10^9 개의 세포일 수 있다.

[illegible]

10^8 개의 세포, 또는 약 1×10^3 개의 세포 내지 약 1×10^9 개의 세포일 수 있다.

[0127] **보존**

[0128] 몇몇 실시형태에서, $\gamma \delta$ T 세포는 동결 배지 중에 제제화되고, 적어도 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 적어도 5년의 장기간 저장 동안 극저온 저장 유닛, 예컨대 액체 질소 동결장치(-195℃) 또는 초저온 동결장치(-65℃, -80℃ 또는 -120℃)에 위치할 수 있다. 동결 배지는 약 6.0 내지 약 6.5, 약 6.5 내지 약 7.0, 약 7.0 내지 약 7.5, 약 7.5 내지 약 8.0 또는 약 6.5 내지 약 7.5의 pH를 유지시키기 위해 생리학적 pH 완충제와 함께 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 및/또는 염화나트륨(NaCl), 및/또는 텍스트로스, 및/또는 황산텍스트란 및/또는 하이드록시에틸 전분(HES)을 함유할 수 있다. 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 해동되고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항체, 단백질, 펩타이드, 및/또는 사이토카인에 의한 자극에 의해 추가로 처리될 수 있다. 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 해동되고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터(레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터 포함) 또는 비바이러스 수단(RNA, DNA 및 단백질 포함)에 의해 유전적으로 변형될 수 있다. 변형된 $\gamma \delta$ T 세포는 냉동 배지 중에 1ml당 약 적어도 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 또는 적어도 약 10^{10} 개의 세포로 적어도 약 1개, 5개, 10개, 100개, 150개, 200개, 500개의 바이알의 분량으로 세포 은행을 생성하도록 추가로 냉동보존될 수 있다. 냉동보존된 세포 은행은 이의 기능을 보유할 수 있고, 해동되고 추가로 자극되고 증식될 수 있다. 몇몇 양태에서, 해동된 세포는 동종이계 세포 생성물로서 세포의 분량을 생성하도록 적합한 밀폐 용기, 예컨대 세포 배양 백 및/또는 생물반응기에서 자극되고 증식될 수 있다. 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 극저온 저장 조건 하에 적어도 약 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 15개월, 18개월, 20개월, 24개월, 30개월, 36개월, 40개월, 50개월, 또는 적어도 약 60개월 동안 이의 생물학적 기능을 유지시킬 수 있다. 몇몇 양태에서, 보존제가 제제에 사용되지 않는다. 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 해동되고 동종이계 선반 채고 세포 생성물로서 다수의 환자로 점적주사될 수 있다.

[0129] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더 잘 이해될 수 있고, 이것은 청구항의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0130] **실시예**

[0131] **실시예 1. 1차 세포 분리**

[0132] 분리반출법(apheresis) 기계를 사용하여 건강한 공여자로부터 1차 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 수집하였다. 피콜-파크(상표명) 플러스(GE Healthcare Bio-Sciences AB(스웨덴 옴살라)) 시스템 또는 유사한 시스템에 의해 PBMC를 정제하였다. 이후, 세포를 적절한 성장 배지 중에 재현탁시켰다.

[0133] 대안적으로, 말초 혈액, 제대혈, 골수, 건강한 조직, 또는 질환으로 고통받는 조직, 예컨대 암성 조직으로부터 1차 인간 세포를 수집하였다.

[0134] **실시예 2. 건강한 공여자로부터의 조직**

[0135] 건강한 공여자로부터의 새로운 조직을 협력 인간 조직 네트워크(Cooperative Human Tissue Network; CHTN)로부터 받고, 실험실에서 RPMI-1640 배지 중에 옮겼다. 메스에 의해 조직을 1-3mm³ 단편으로 슬라이싱하였다. 2-5개의 단편/웰을 24웰 플레이트(Costar)에서 GlutaMAX, 25mM HEPES(pH 7.2), 100U/ml의 페니실린, 100U/ml의 스트렙토마이신 및 10% 인간 AB 혈청 및 100IU/ml의 rhIL-2가 보충된 2ml의 RPMI-1640 중에 위치시키거나 하기 기재된 바대로 분해시켰다. 플레이트를 공기 중에 5% CO₂에 의해 37℃에서 습윤 항온처리기에서 항온처리하였다. 배양물을 격일로 검사하여 림프구의 증식을 모니터링하였다. 배지의 절반을 배양 개시 후 7일마다 모든 웰에서 대체하였다. 치밀한 림프구성 카펫이 단편의 주변을 덮거나 분해된 조직으로부터 유래된 림프구 집단이 하기 기재된 바대로 적절한 농도에 도달할 때 림프구를 수집하였다.

[0136] **실시예 3. 조직 효소 분해**

[0137] 건강한 공여자로부터의 새로운 조직 샘플을 협력 인간 조직 네트워크(CHTN)로부터 받고, 실험실에서 RPMI-1640 배지 중에 옮겼다. 2개의 효소 블렌드 리버라제(Liberase)(상표명) DL Research Grade(시그마 알드리치 코퍼레이션(Sigma Aldrich Co.)(미조리주 세인트 루이스)), 또는 리버라제(상표명) TM Research Grade(시그마 알드리치 코퍼레이션(미조리주 세인트 루이스))를 사용하여 효소 분해에 의해 림프구를 분리하였다. 조직을 2-3mm³ 단편으로 절단하고, 37℃ 및 5% CO₂에서 1시간 동안 분해시켰다. 분해된 세포 현탁액을 40마이크론 필터를 통해 통과시키고 스핀 다운하고 RPMI-1640 배지에 의해 세척하였다. 세포를 계수하고 10% 인간 AB 혈청(Coming) 및

100IU/ml의 rhIL-2가 보충된 RPMI 배지(GIBCO BRL) 중에 재현탁시켰다. 수집된 세포 집단을 24웰 조직 배양 플레이트에서 0.5 내지 1×10^6 개의 세포/ml로 시딩하였다. 세포가 1.5×10^6 개의 세포/ml의 농도를 초과할 때, 세포를 RPMI-IL2 함유 배지로 분할하였다.

[0138] 실시예 4. 종양 시편의 배양

[0139] 결장, 유방, 난소, 신장, 두경부, 구강, 췌장 및 간의 암을 포함하는, 원발성 및 전이성 암을 가지는 환자로부터의 새로운 종양 시편을 협력 인간 조직 네트워크(CHTN)로부터 받고, 실험실에서 RPMI 배지 중에 옮겼다. 메스에 의해 종양 시편을 1-3mm³ 단편으로 슬라이싱하였다. 2-5개의 단편/웰을 24웰 플레이트(Costar)에서 GlutaMAX, 25mM HEPES(pH 7.2), 100U/ml의 페니실린, 100U/ml의 스트렙토마이신 및 10% 인간 AB 혈청 및 100IU/ml의 rhIL-2가 보충된 2ml의 RPMI-1640 중에 위치시켰다. 플레이트를 공기 중에 5% CO₂에 의해 37°C에서 습윤 항온처리기에서 항온처리하였다. 배양물을 격일로 검사하여 림프구의 증식을 모니터링하였다. 배지의 절반을 배양 개시 후 7일마다 모든 웰에서 대체하였다. 치밀한 림프구성 카펫이 단편의 주변을 덮을 때 림프구를 수집하였다.

[0140] 실시예 5. 새로운 종양 시편 효소 분해

[0141] 결장, 유방, 난소, 신장, 두경부, 구강, 췌장 및 간의 암을 포함하는, 원발성 및 전이성 암을 가지는 환자로부터의 새로운 종양 시편을 협력 인간 조직 네트워크(CHTN)로부터 받고, 실험실에서 RPMI 배지 중에 옮겼다. 2개의 효소 블렌드 리버라제(Liberase)(상표명) DL Research Grade(시그마 알드리치 코퍼레이션(미조리주 세인트루이스)), 또는 리버라제(상표명) TM Research Grade(시그마 알드리치 코퍼레이션(미조리주 세인트루이스))를 사용하여 효소 분해에 의해 림프구를 분리하였다. 조직을 2-3mm³ 단편으로 절단하고, 공기 중에 37°C 및 5% CO₂에서 1시간 동안 분해시켰다. 분해된 세포 현탁액을 40마이크론 필터를 통해 통과시키고 스핀 다운하고 RPMI-1640 배지에 의해 세척하였다. 세포를 계수하고 10% 인간 AB 혈청(Corning) 및 100IU/ml의 rhIL-2가 보충된 RPMI 배지(GIBCO BRL) 중에 재현탁시켰다. 수집된 세포 집단을 24웰 조직 배양 플레이트에서 0.5 내지 1×10^6 개의 세포/ml로 시딩하였다. 세포가 1.5×10^6 개의 세포/ml의 농도를 초과할 때, 세포를 RPMI-IL2 함유 배지로 분할하였다.

[0142] 실시예 6. 예시적인 혈청 보충 배지 중의 1차 세포의 배양

[0143] 피콜-파크(상표명) 플러스(GE Healthcare Bio-Sciences PA(미국))를 사용하여 건강한 공여자로부터 유래된 버피코트로부터의 분리에 의해 PBMC 집단을 생성하였다. PBMC를 24웰 조직 배양 플레이트에서 10% 소 태아 혈청(Gibco), 2mmol/l의 L-글루타민, 100U/ml의 페니실린, 100U/ml의 스트렙토마이신 및 100U/ml의 rhIL-2가 보충된 RPMI-1640(Corning CellGro)에서 1×10^6 개의 세포/ml로 배양하였다. 말초 혈액, 제대혈, 골수, 건강한 조직, 또는 질환으로 고통받는 조직, 예컨대 이전에 기재된 암성 조직으로부터 1차 인간 세포를 성장시키도록 유사한 배양 조건을 이용할 수 있다.

[0144] 실시예 7. 예시적인 혈청 비함유 배지 중의 1차 세포의 배양

[0145] 피콜-파크(상표명) 플러스(GE Healthcare Bio-Sciences PA(미국))를 사용하여 건강한 공여자로부터 유래된 버피코트로부터의 분리에 의해 PBMC 집단을 생성하였다. PBMC를 24웰 조직 배양 플레이트에서 CTS-OpTmizer 보충제를 가지는 CTS 혈청 비함유 배지에서 1×10^6 개의 세포/ml로 배양하였다.

[0146] 말초 혈액, 제대혈, 골수, 건강한 조직, 또는 질환으로 고통받는 조직, 예컨대 이전에 기재된 암성 조직으로부터 1차 인간 세포를 성장시키도록 유사한 배양 조건을 이용할 수 있다.

[0147] 실시예 8. 부착성 단핵구 및 대식세포의 결핍

[0148] 이전에 기재된 바와 같은 분리반출법 방법에 의해 PMBC를 수집하고, 피콜 구배 원심분리를 이용하여 밀도 분리 또는 저장성 처리에 의해 적혈구를 제거하였다. 적혈구 비함유 PMBC를 대규모 조직 배양 용기, 예컨대 10-스택 또는 40-스택 셀 팩토리(Cell Factory)(Nunc), 롤러 병(Nunc)에서 항온처리하였다. 대식세포 및 단핵구를 포함하는 부착성 집단은 통상적으로 세포 배양 용기의 표면에 결합한 채 있다. 현탁액 집단에서 성장한 세포 집단을 $\gamma \delta$ T 세포에서 농후화시켰다. 대략 10^8 , 10^9 또는 10^{10} 개의 PMBC를 CD4 및 CD8 코팅된 철 함유 마이크로비드(예를 들어, Miltenyi Biotech 마이크로비드와 항온처리하였다. 항온처리된 세포 집단은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포가 보유된 자기장을 지나 흐른다. "통과" 세포 집단은 $\gamma \delta$ T 세포가 농후하다.

[0149] **실시예 9. 단핵구 및 대식세포의 결실**

[0150] 이전에 기재된 바와 같은 분리반출법 방법에 의해 PMBC를 수집하고, 피콜 구배 원심분리를 이용하여 밀도 분리 또는 저장성 처리에 의해 적혈구를 제거하였다. 적혈구 비함유 PMBC를 대규모 조직 배양 용기, 예컨대 10-스택 또는 40-스택 셀 팩토리(Nunc), 롤러 병(Nunc)에서 항온처리하였다. 패킹된 유리 울 칼럼 위로 적혈구 제거된 PMBC가 흐르게 함으로써 단핵구 및 대식세포를 제거하였다. "통과" 세포 집단은 추가의 가공에 $\gamma \delta$ T 세포가 농후하다.

[0151] **실시예 10. $\gamma \delta$ T 세포의 농후**

[0152] 이전에 기재된 바와 같은 분리반출법 방법에 의해 PMBC를 수집하고, 피콜 구배 원심분리를 이용하여 밀도 분리 또는 저장성 처리에 의해 적혈구를 제거하였다. 적혈구 비함유 PMBC를 대규모 조직 배양 용기, 예컨대 10-스택 또는 40-스택 셀 팩토리(Nunc), 롤러 병(Nunc)에서 항온처리하였다. 실시예 8 또는 in 실시예 9에 기재된 방법에 의해 단핵구 및 대식세포를 결실시켰다. 대략 10^8 , 10^9 또는 10^{10} 개의 PMBC를 CD4 및 CD8 코팅된 철 함유 마이크로비드(예를 들어, Miltenyi Biotech 마이크로비드와 항온처리하였다. 항온처리된 세포 집단은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포가 보유한 자기장을 지나 흐른다. "통과" 세포 집단은 $\gamma \delta$ T 세포가 농후하다. 원치 않는 세포 유형에 대항하여 지향된 항체의 각테일을 사용하여 면역자기 비드 분리(예를 들어, Miltenyi Biotech AutoMACS 시스템)에 의해 원치 않는 세포, 예컨대 NK, $\gamma \delta$ T 세포, B 세포, 단핵구 및 대식세포를 제거하였다.

[0153] 대안적으로, 4합체 항체 복합체 또는 NK, ab T 세포, B 세포, 단핵구 및 대식세포에서 표면 수용체에 대항하여 지향된 이중특이적 항체를 사용함으로써 원치않는 세포 유형을 제거하였다.

[0154] **실시예 11. 항체에 의한 1차 세포로부터의 $\gamma \delta$ T 세포의 단리**

[0155] 일 예에서, 세포 표면 마커의 양성(즉, $\gamma \delta$ TCR) 또는 음성(즉, $\alpha \beta$ TCR, CD4, CD8, CD56), 발현에 기초하여, 유세포분석법 분류에 의해 1차 배양물로부터 네이티브 $\gamma \delta$ T 세포를 단리하였다.

[0156] **실시예 12. 원발성 종양으로부터의 $\gamma \delta$ T 세포의 단리**

[0157] NCI 협력 인간 조직 네트워크(CHTN)로부터 새로 수확된 종양 시편을 얻었다. 간(TIL 1) 및 신장 종양(TIL 2)으로의 결장 선암 전이를 RPMI-1640 배지 중에 수송하였다. 종양 조직을 평평한 블레이드를 사용하여 크기 2mm의 작은 조각으로 저민 후, RPMI 및 기재된 바와 같은 3000단위의 DNase 중의 2ml의 리버라제 효소 각테일(시그마 케미칼 코포레이션(Sigma Chemical Co.)(미조리주 세인트 루이스))에 의해 분해하였다. 분해 후, 종양을 무균 게이지 40-마이크론 나일론 메쉬를 통해 여과시키고, RPMI-1640 중에 2회 세척하였다. 세포를 계수하고 24웰 플레이트에서 L-글루타민이 보충된 10% 인간 AB 혈청 및 100U/ml의 rhIL-2를 함유하는 RPMI-1640 중에 1×10^6 /ml로 플레이트하였다. 배양에서 6일 후 종양 침윤 림프구를 수집하였다. 유세포분석법 항- δ 1 TCR(FITC 접합 항-V δ 1TS8.2(Thermo Fisher)) 및 항-V δ 2 B6(Biolegend)에 의해 $\gamma \delta$ T 림프구의 존재를 분석하였다. FlowJo 소프트웨어에 의해 데이터를 분석하였다.

[0158] 도 4는 간(TIL 1) 및 신장 종양(TIL 2)으로의 결장 선암 전이로부터 단리된 $\gamma \delta$ 1 및 $\gamma \delta$ 2 림프구의 성장을 예시하는 그래프를 도시한다. 이 림프구는 CCR4 및 CCR7을 발현하는 것으로 나타났다. 도 4에 예시된 바대로, V δ 1 하위집단은 종양의 유형 둘 다로부터 단리된 우세 집단이었다.

[0159] **실시예 13. $\gamma \delta$ T 세포의 자극 및 증식**

[0160] $\gamma \delta$ T 세포를 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-7, IL-15, IL-12, IL-21, IL-23 또는 IL-33), 성장 인자(인슐린 및 트랜스페린, 인슐린 유사 성장 인자), 알부민, 지질(콜레스테롤, 지질 용액, 지질 전구체), 비타민, 구리, 철, 셀레늄, 단백질 가수분해물, 필수 아미노산, 비필수 아미노산 및 전단 보호제(Pluronic F-68)를 함유하는 혈청 비함유 배지, 예컨대 엑스-비보(Ex-Vivo) 10, 엑스-비보 15, 엑스-비보 20, AIMV 배지, Optimizer CTS 중에 자극하고 증식시켰다.

[0161] $\gamma \delta$ T 세포의 생물학적 기능을 유지시키면서 현탁 배양물(예를 들어, WAVE 바이오반응기) 중에 10^5 내지 2×10^7 개의 세포/ml의 높은 세포 밀도 $\gamma \delta$ T 세포 성장을 지지하도록 이 실시예에 기재된 혈청 비함유 배지를 첨가제에 의해 보충할 수 있다.

[0162] **실시예 14. 혈청 비함유 배지 중의 튼튼한 $\gamma \delta$ T 세포 성장을 제공하는 첨가제**

- [0163] 튼튼한 $\gamma \delta$ T 세포 성장을 제공하는 추가적인 첨가제는 염화칼슘, 무수물, 질산칼슘, 황산제이구리, 5수화물, 시트르산철, 질산철, 아황산철, 아황산아연 및/또는 푸트레신(Putrescine)을 포함하였다.
- [0164] 미량의 금속은, 파라몰리브덴산암모늄, 바나듐, 망간, 니켈, 아셀렌산나트륨, 메타규산나트륨, 9수화물, 염화제일주석, 염화알루미늄, 아스테산바륨, 염화카드뮴, 염화제이크롬, 코발트, 이산화게르마늄, 브롬화칼륨, 요오드화칼륨, 염화루비듐, 질산은, 불화나트륨 및/또는 염화지르코늄을 포함하는, 혈청을 대체하기 위한 낮은 수준의 원소 성분을 제공하기 위해 혈청 비함유 배지 중에 제공되었다.
- [0165] $\gamma \delta$ T 세포의 튼튼한 성장을 지지하기 위해 세포 배양 배지에 첨가된 다른 성분은 아데노신, 구아노신, 사이티딘, 유리딘, 베타인, 타우린, 폴린산, 에탄올아민, 리놀레산, 올레산 하이드로코티손, 피루베이트, 식물 가수분해물, 효모 가수분해물 및/또는 베타-머캅토에탄올이다.
- [0166] 튼튼한 $\gamma \delta$ T 세포 성장을 증대시키도록 첨가되는 비타민은 바이오틴(B7), D-칼슘 판토텐네이트(B5), 폴린 클로라이드, 사이아노코발라민(B12), 폴린산(B9), i-이노시톨(myo-이노시톨), 니아신아마이드(B3), 피리독살, 모노하이드로클로라이드, 피리독신, 모노하이드로클로라이드(B6), 리보플라빈(B2), 티아민 및/또는 모노하이드로클로라이드(B1)를 포함한다.
- [0167] **실시예 15. 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 규명: 면역표현형**
- [0168] 상이한 집단 사이를 구별하는 세포 표면 마커에 대한 FACS 염색에 의해 증식된 T 세포 집단을 규명하였다. 세포를 2% 소 태아 혈청을 함유하는 HEPES 완충 식염수 용액(HBSS) 중에 1회 세척하고, 적절한 양의 MAb와 4°C에서 30분 동안 항온처리하고 HBSS 중에 재세척하였다. 간단히 말하면, CD2, CD3(BioLegend, 클론 OKT3), CD4(BioLegend 클론 OKT4), CD7, CD8(BioLegend, 클론 RPAT8), CD11a, CD16, CD18, CD19, CD27, CD28, CD38, CD45RA, CD56, CD57, CD69, CD71, CD95, CD107, ICAM-1, MICA/B, NKG2D DR5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5 CCR6, CCR7, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR5, CXCR5, CXCR6, CXCR7, IL-2R, IL-7R, Ki67, L-선택틴, VLA-4, JAML, PD1, PDL1, CTLA-4, OX40, TCR V δ 1(ThermoFisher Scientific, 클론 TS8.2), 또는 TCR V δ 2(BioLegend, 클론 B6)에 대항하여 지향된 플루오로아이스티오사이아네이트(FITC) 또는 피코에리스틴(PE) 접합 MAb를 함유하는 100 μ l의 용적의 FACS 염색 배지(FSM; 2% 소 태아 혈청을 함유하는 HBSS) 중에 1x10⁶개의 세포를 염색하였다.
- [0169] 표면 마커 이외에, TNF- α IFN- γ , GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-17 또는 IL-21을 포함하는, 사이토카인 분비, 세포내 사이토카인 및/또는 막 연관 사이토카인을 규명하였다.
- [0170] 줌비 바이올렛(BioLegend) 아민 염료의 적은 혼입 또는 이것의 부재에 의해 생 세포를 결정하였다. 각각의 항원의 표면 발현의 양성 및 음성 게이트 경계를 확정하도록 플루오레센스 마이너스 원(Fluorescence Minus One; FMO) 대조군을 사용하였다. 염색된 세포를 Sony SH800 세포계산기에서 수집하고, FlowJo v10.1을 이용하여 데이터를 분석하였다. 유세포분석법 데이터를 도트 곡선으로 가시화하였다.
- [0171] **실시예 16. 혈청 함유 및 혈청 비함유 배지 중의 $\delta 2$ T 세포 증식**
- [0172] 상이한 $\delta 2$ T 세포의 성장 및 증식의 속도를 혈청 함유 배지(R2:RPMI + 10% FBS) 및 혈청 비함유 배지(AIMV + 소 알부민; CTS 혈청 비함유 보충제) 중에 평가하였다. 도 5는 $\delta 2$ T 세포의 성장을 예시하는 그래프를 도시한다. 현재의 실험에 사용된 모든 배지는 100IU/ml의 IL-2, 2mM 글루타민 및 1x 페니실린/스트렙토마이신을 함유하였다. 또한, 세포를 0일에 1, 5 및 20 μ M으로 졸레드론산에 의해 자극하였다. 배지를 추가의 졸레드론산의 첨가 없이 2-3일마다 보충하였다. 10⁶개의 PBMC로부터 증식된 $\delta 2$ T 세포의 전체 수 및 13일의 시간 기간 후 각각의 처리의 배수 증식이 도 5에 도시되어 있다.
- [0173] **실시예 17. 항- $\gamma \delta$ TCR 항체 차단 및 경쟁 검정**
- [0174] 도 6 및 도 7은 항- $\gamma \delta$ TCR 항체 차단 실험을 예시하는 그래프를 도시하고, 도 8 및 도 9는 항체 경쟁 검정을 도시한다. 도 6 및 도 7은 차단 실험의 결과를 예시하고, PBMC를 다양한 항체, 즉 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B3, B6, TS-1, γ 3.20, IMMU510 또는 11F2와 예비항온처리하였다. 후속하여, 세포를 세척하고 2차 TS8.2-FITC($\delta 1$ 특이적) 또는 B6-PE($\delta 2$ 특이적) 항체에 의해 염색하였다. PBMC 샘플을 유세포분석법에 의해 분석하였다. 기하 평균 형광 강도(gMFI)의 감소를 이용하여 차단의 정도를 평가하였다. 저해의 수준은 TS8.2-FITC(도 6) 및 B6-PE(도 7)에 대해 예시되어 있다.
- [0175] 30분 동안 얼음에서 동시에 1x10⁵개의 세포를 1, 2 또는 10 μ g의 비표지된 경쟁 항체(IgG1, 5A6.E9, B1, TS8.2,

TS-1, R9.12, IMMU510 또는 11F2) 및 0.2 μ g의 FITC 접합 항-V δ 1 TCR 클론 TS8.2(도 8) 또는 항-V δ 1 TCR 클론 TS-1(도 9)과 항온처리함으로써 γ δ 1TCR 발현 세포주 BE13에서 결합에 대한 MAbs TS-1 및 TS8.2와 항체 5A6.E9, B1, IMMU510, R9.12-2 또는 11F2 사이의 경쟁 연구를 수행하였다. 경쟁(%)은 기하 평균 형광의 최대 변화로 나눈 기하 평균 형광의 변화로 계산된다. 도 9에 도시된 바대로, TS-1 항체는 TS8.2 항체 자체만큼 효과적으로 세포에 대해 TS8.2 결합과 경쟁하였다. 다른 항체 중 어느 것도 TS8.2 결합과 경쟁할 수 없었다. TS8.2 항체는 세포에 대해 TS-1 결합과 경쟁하였지만, TS-1 자체만큼 효과적이지 않았다. TS-1 결합에 의한 경쟁의 약간의 수준은 11F2 항체에 의해 또한 관찰되었다. 이 결과는 TS-1 및 TS8.2 항체가 γ δ 1 둘 다에 결합하지만, 아마 동일한 에피토프에서는 아니라는 것을 나타낸다.

[0176] **실시예 18. 중앙 시편의 효소 분해 및 특이적 γ δ 에피토프에 대한 항체에 의한 γ δ T 세포 증식**

[0177] 24웰 플레이트를 0.5 내지 1 μ g의 항- γ δ TCR 항체에 의해 코팅하였다. 실시예 10에 기재된 바대로 분해된 중앙 조직으로부터 단리된 세포를 계수하고, 항체 코팅된 웰에 10% 인간 AB 혈청 및 rhIL-2(100IU/ml)가 보충된 RPMI 1640 배지에서 0.5-1x10⁶개의 세포/ml로 시딩하였다. 배양물을 74 내지 21일 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 항온처리하였다.

[0178] **실시예 19. 중앙 시편의 효소 분해 및 특이적 γ δ 에피토프에 대한 항체에 의한 γ δ T 세포 증식**

[0179] 실시예 5에 기재된 바대로 분해된 중앙 조직으로부터 단리된 세포를 계수하고, 3D 세포 배양 플레이트(Coming (등록상표) Costar(등록상표) Ultra-Low 부착 멀티 웰 플레이트)의 항체 코팅된 웰에 10% 인간 AB 혈청 및 rhIL-2(100IU/ml)가 보충된 RPMI 1640 배지에서 0.5-1x10⁶개의 세포/ml로 시딩하였다. 배양물을 74 내지 21일 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 항온처리하였다.

[0180] **실시예 20. PBMC로부터의 γ δ T 세포의 활성화 및 증식**

[0181] 활성화제를 가용성 물질 또는 배양 웰에 부동화된 물질로서 시험하였다. 가용성 항원 및 항체를 24웰 플레이트에서 배양된 인간 PBMC에 1x10⁶개의 세포/ml의 세포 밀도로 0.1 내지 5 μ g/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 대안적으로, 24웰 배양 플레이트의 웰을 코팅함으로써 동일한 항- γ δ TCR 항체를 부동화하였다. 항- γ δ TCR 항체를 0.1 내지 10 μ g/ml 농도로 첨가하였다. 웰을 PBS에 의해 2회 세척한 후, PBMC를 플레이트로 옮기고, 상기 기재된 바대로 RPMI-1640, AIM-V 또는 CTS-OpTmizer 배지 중에 배양하였다. 배양된 배지를 100IU/ml의 rhIL-2에 의해 보충하였다.

[0182] **실시예 21. PBMC로부터의 γ δ T 세포의 활성화 및 증식**

[0183] 공여자 B3으로부터의 1000000개의 PBMC/ml를 0일에 24웰 플레이트에서 웰당 0.5, 1 및 2 μ g으로 부동화된 다양한 항체에 의해 자극하였다. 시험된 항체는 마우스 IgG1 아이소타입 대조군 클론 MG1-45(Bio Legend), UCHT-1, 5A6.E9, B1, TS8.2, 15D, B6, B3, TS-1, γ 3.20, 7A5 및 졸레드로네이트였다. 도 10 및 도 11은 각각 PBMC로부터의 δ 1 및 δ 2 T 세포의 활성화 및 증식을 예시하는 그래프를 도시한다. 세포를 10% FBS, 100IU/ml의 rhIL-2, 글루타민 및 1x 페니실린 스트렙토마이신을 가지는 RPMI를 함유하는 배지 중에 활성화하고 증식시켰다. 초기 자극 후 7일에, 세포를 새로운 배지 중에 계대배양하고, 동일한 농도로 동일한 항체를 가지는 새로 코팅된 24웰 플레이트 중에 위치시켰다. 재자극된 배양물 중의 배지를 13일까지 2-3일마다 보충하고, 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0184] 도 12는 δ 1 T 세포의 전체 수를 예시하고, 도 13은 성장 및 증식의 13일 후 δ 2 T 세포의 전체 수를 예시한다. (각각 TS8.2-FITC 및 B6-PE를 사용하여 유세포분석법에 의해 결정된 바대로) δ 1 및 δ 2 T 세포 백분율에 전체 생존 가능 세포 수를 곱하고 비특이적 마우스 IgG MG 1-45에 의해 활성화된 δ 1 및 δ 2 T 세포로부터의 음성 대조군 값을 공제함으로써 γ δ T 세포의 전체 수를 계산하였다.

[0185] 항체가 배양 플레이트에 부동화될 때에만 세포 증식의 활성화가 얻어졌고, 이 항체가 전체 PBMC 세포 집단을 포함하여 가용성 형태의 배양물에 첨가될 때 검출된 증식이 없었다(데이터 비도시). Pan γ δ TCR MAbs 5A6.E9 및 B1은 δ 1 및 δ 2 세포 집단 둘 다의 성장을 활성화하였다. MAbs 15D 및 B6은 δ 2 세포 집단의 선택적 성장을 유도하였다. MAbs TS8.2 및 TS-1은 δ 1 세포 집단의 선택적 성장을 유도하였다. 흥미로운 것은, MAbs TS-1 및 TS8.2가 세포 표면 TCR에 대한 결합에서 서로 경쟁하지만, TS-1 유도된 증식이 3배 더 높다는 것이다. 유사하게, 항체 B1, 5A6.E9, 15D, B6 및 B3 사이에 δ 2 세포 집단 증식 유도의 상이한 정도가 검출되었다. 이 데이터는 독특한 에피토프가 γ δ 세포 집단의 특이적 및 튼튼한 증식을 촉발하는 데 필요하다는 것을 나타낸다.

[0186] **실시예 22. 활성화 $\gamma\delta$ TCR MAb의 에피토프 맵핑**

[0187] TS-1 MAb에 대해 하기 기재된 바대로 $\gamma\delta$ TCR에서의 특이적 활성화 에피토프를 확인하였다. 본 명세서에 기재된 다른 $\gamma\delta$ 활성화 항체의 활성화 에피토프를 확인하기 위해 유사한 단계를 수행하였다.

[0188] 처음에, TS-1에 의해 인식된 특이적 $\gamma\delta$ 재조합을 확인하였다. 인간 T 세포 급성 림프아구성 백혈병 $\gamma\delta$ 세포주 MOLT-13에 의한 마우스의 면역화에 의해 TS-1 항체(Thermo Fisher Scientific)를 생성하였다(Brenner et al., US005260223A). 본 발명자들은 MOLT-13 $\gamma\delta$ TCR 사슬을 서열분석하고 V δ 1D δ 3J δ 1 유전자 분절로 이루어지도록 특이적 δ 사슬 재배열을 확인하였다. TS-1 결합 특이성이 V δ 1의 가변 영역에 대한 것인지 또는 결합 부위가 V δ 1-J δ 1 연결부를 포함하는 TCR CDR3 영역에 이르는지를 확인하기 위해, 그리고 에피토프 인식에서의 γ 사슬의 역할을 평가하기 위해, γ 및 δ 사슬의 광범위한 세트를 pCI 발현 벡터(Promega)에서 클로닝하였다. 상이하게 설계된 γ 및 δ TCR 사슬을 IDT로부터의 합성 gBlock으로서 순서화하였다. NheI-NotI에 의해 분해된 합성 유전자를 pCI-neo 벡터로 클로닝하였다. 개별 박테리아 콜로니로부터의 플라스미드 DNA의 서열을 서열분석에 의해 확인하였다.

[0189] J δ 영역이 다른 3개의 V δ 1 유전자 분절(J δ 1, J δ 2 및 J δ 3)을 설계하였다. 또한, V δ 2J δ 1 및 V δ 3J δ 1 사슬을 합성 유전자로서 순서화하고 유사하게 클로닝하였다. V γ 2, V γ 3, V γ 4, V γ 5, V γ 8, V γ 9 및 V γ 10 유전자 분절을 사용하여 5개의 δ TCR 사슬(V δ 1J δ 1, V δ 1J δ 2, V δ 1J δ 3, V δ 2 및 V δ 3)을 γ TCR 사슬과 동시형질감염시켰다. $\gamma\delta$ TCR의 35개의 가능한 쌍 짓기 조합을 형질감염시키고 293개의 형질감염된 세포의 표면에 발현시켰다. 리포펙타민(Lipofectamine) 2000(인비트로젠(Invitrogen))을 사용하여 $\gamma\delta$ 사슬을 코딩하는 pCI 벡터에 의한 293개의 세포의 일시적 형질감염을 수행하였다. 상이한 특이성의 일련의 항- $\gamma\delta$ TCR 항체를 사용하여 유세포분석법에 의해 $\gamma\delta$ TCR의 발현에 대해 형질감염된 293개의 세포를 규명하였다. FACSCanto 유세포계산기(BD Biosciences)에서 FACS 분석을 수행하고, FlowJo 소프트웨어(Tree Star)를 이용하여 분석하였다. TS-1 mAb에 의해 인식된 특이적 $\gamma\delta$ TCR 사슬 쌍 짓기가 확인되면, 특이적 결합 에피토프는 선형으로서 또는 구조적 결정성으로 규명되었다.

[0190] 웨스턴 블롯 분석에 의해 변성 또는 네이티브 TCR에 결합하는 항체의 능력을 확인하였다. 프로테아제 저해제(시그마)의 각테일에 의해 매우 차가운 변형 RIPA 용해 완충제 중에 균질화함으로써 TCR을 발현하는 세포의 세포 용해물을 제조하였다. 브래드포드(Bradford) 검정(바이오-라드(Bio-Rad) 단백질 검정, 마이크로플레이트 표준 검정)에 의해 단백질 농도를 결정하였다. 세포 용해물을 5% b-머캅토에탄올을 함유하는 1 x SDS 로딩 완충제(50mM 트리스-HCl(pH 6.8), 12.5% 글라이세롤, 1% 황산 나트륨 도데실, 0.01% 브로모페놀 블루) 중에 5분 동안 비등시키고, 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(PAGE)에서 수행하였다. 전기영동 후, 분리된 분자를 PVDF 막으로 옮겼다. 다음에, 막을 차단하고 항체와 항온처리하였다. 형광 영상화 시스템에 의해 2차 형광성 태그 항체를 검출에 사용하였다.

[0191] 웨스턴 블롯 분석에 의해 δ 사슬에 대한 결합을 검출하는 경우에, 반응성 사슬의 폴리펩타이드 서열로부터 유래된 일련의 합성-막-결합 중첩 펩타이드를 사용하였다. (JPT peptide technology GmbH Germany). 펩타이드 어레이는 중첩 12합체 펩타이드로 이루어지고, V δ 1 전체 서열을 다루는 단일 잔기 오프셋에 의해 SPOT스캔 분석은 하기와 같이 수행된다. 막을 TBS 중에 3회 세척하고, 차단 완충제(TBST 중의 5% 저지방 밀크(TBS 중의 0.05% Tween 20) 중에 밤새 차단하였다. 막을 TBS 중에 세척하고, 실온에서 3시간 동안 1 μ g/ml로 차단 완충제 중에 희석된 TCS-1 MAb와 항온처리하였다.

[0192] TBS 중에 막을 3회 세척한 후, 실온에서 2시간 동안 차단 완충제 중에 희석된 HRP 접합 염소 항 마우스 IgG(Jackson immunResearch)에 의해 결합 MAb를 검출하였다. 막을 마지막으로 TBS 중에 3회 세척하고 신호 전개 용액과 항온처리하였다. 색상 반응이 실온에서 10 내지 40분 동안 전개되게 하였다. 결합 부위는 양성 펩타이드 스팟의 서열에 의해 표시된다.

[0193] **실시예 23. 구성적 에피토프의 에피토프 맵핑**

[0194] 항체의 결합 에피토프의 적절한 폴딩/어셈블리에 대해 이황화 결합의 형성을 요하는 에피토프는 구성적 에피토프로 공지되어 있다. 중요한 결합 잔기의 확인은 반응성 V 델타 사슬의 부위 지정 돌연변이유발에 의해 수행될 수 있다. 특이적 항체에 대한 반응성의 소실에 대해 돌연변이된 사슬을 시험하였다. 달리 비반응성 사슬에서 중요한 잔기의 돌연변이유발이 TS-1 항체의 결합의 복원을 발생시킬 때 결합 부위가 포함하는 잔기가 확인될 수 있다.

[0195] 결합 친화도의 변화, 인식 소실, 또는 TS-1 mAb에 의한 증가한 친화도를 평가하도록 반응성 TCR 사슬의 랜덤

Ala 스캔을 이용할 수 있다.

[0196] **실시예 24. $\gamma \delta$ T 세포 활성화 및 증식의 새로운 조절자의 에피토프 맵핑**

[0197] CD2 에피토프:

[0198] CD2 분자는 2개의 세포의 면역글로불린 슈퍼패밀리 도메인 Ig 유사 V형 도메인 및 Ig 유사 C형 도메인으로 이루어지고, 이것 위의 3개의 주요 면역원성 영역이 기재되어 있다(Davis et al., Immunol Today 1996; 17: 177-187). 영역 1 및 2는 제1 도메인에 위치하고, 영역 3은 제2 도메인에 위치한다. 영역 1을 인식하는 단일클론 항체(MAb)는 휴지 및 활성화 T 세포 둘 다에 결합하고, CD2에 대한 CD58의 결합을 강하게 저해할 수 있다. 영역 2를 인식하는 단일클론 항체는 유사한 결합 특성을 가지지만, CD58 결합을 차단하는 데 있어서 효과적이지 않다. 영역 3을 인식하는 단일클론 항체는 오직 활성화 T 세포 상의 CD2를 인식하고, CD58 결합을 차단하지 않는다.

[0199] CD2 작용제 MAb의 결합 에피토프의 맵핑은 CD2의 천연 리간드인 CD58에 대한 경쟁 검정 및 활성화 검정에 의해 수행된다. 또한, CD58의 결합의 소실을 발생시키는, 중요한 CD2 결합 잔기의 부위 지정 돌연변이유발을 MAb 결합에 대해 시험하였다. 돌연변이의 예는 67번 위치(R로의 K), 70번 위치(K로의 Q), 110번 위치(D로의 Y) 및 111번 위치(H로의 D)에서의 CD2 서열의 돌연변이유발을 포함한다. CD2의 결합 에피토프의 맵핑을 위한 작제물을 설계하기 위해, VectorNTI(Thermo Fisher)를 사용한 인간 및 마우스 CD2의 서열 정렬을 수행한다. 정렬은 인간과 마우스 CD2 사이의 50% 서열 동종성을 보여준다. 인간 CD2의 세포의 도메인에 결합하는 MAb는 마우스 CD2와 상호작용하는 것으로 예상되지 않았다. 결합 에피토프를 확인하기 위해, 본 발명자들은 마우스/인간 키메라 CD2 작제물의 도메인 교환(swapping)을 생성하였다. 이러한 작제물에서, 인간 N 말단 Ig 유사 V형 도메인(25-128번 잔기)은 CD2의 추가의 세포 도메인을 발현하는 발현 벡터에서 마우스 잔기(23-121)에 의해 대체되었다. 키메라 cDNA 종을 CHO 또는 293 세포로 일시적으로 형질감염시켰다. 인간 야생형 CD2 및 인간 마우스 키메라 작제물은 CHO 세포의 표면 상에 발현된다. FACScanto에 의해 키메라 CD2 세포 표면 발현을 분석하였다. 키메라 분자에 대한 결합 또는 결합의 소실을 유세포분석법에 의해 검출하고, 활성화 검정에 의해 검증하였다.

[0200] NKG2D 에피토프:

[0201] 리간드(MICA/MICB) 중 하나 이상과의 NKG2D 상호작용을 감소시키거나 차단하는 항-hNKG2D 항체의 능력에 의해 또는 hNKG2D 리간드 상호작용을 차단하는 것으로 공지된 항체와의 경쟁에 의해 NKG2D에 대한 활성화 MAb의 에피토프 맵핑을 시험하였다. NK 또는 T 세포의 NKG2D 매개 활성화를 감소시키는 능력에 의해 작용제 MAb를 확인하였다. 통상적인 세포독성 검정, 리간드-차단 항체의 첨가, 또는 용량 의존 방식으로 MICA 발현 종양 세포의 $\gamma \delta$ T 세포 매개 사멸을 차단함으로써 이것을 평가할 수 있다.

[0202] CD27 에피토프:

[0203] 기능 검정 및 인간 CD27과 이의 천연 리간드 인간 CD70 사이의 상호작용을 차단하는 능력에 의해 CD27에 대한 작용제 항체의 에피토프 맵핑을 행했다. CD27 발현 세포를 4°C에서 5 μ g의 MAb와 30분 동안 항온처리하고, 이후 1 μ g의 바이오티닐화 CD70을 관에 첨가하였다. 혼합물을 세척 전에 4°C에서 또 다른 15분 동안 항온처리하였다. 다음에, 세포를 (CD70 리간드 결합의 검출을 위해) 스트렙타비딘-PE의 혼합물과 30분 동안 항온처리한 후, 수회 세척 단계를 행하고 분석 FACS를 이용하여 분석하였다. CD70 결합의 봉쇄는 MAb 및 CD70이 동일한 에피토프를 공유한다는 것을 나타낸다.

[0204] **실시예 25: 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 집단의 TCR V δ 레퍼토리의 규명**

[0205] 개별 공여자로부터의 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 클론 다양성을 중합효소 사슬 반응(PCR)에 의해 평가하였다. 건강한 공여자로부터의 새로 분리된 PBMC의 클론 다양성을 항-TCR 특이적 항체, 리간드 및 렉틴을 포함하는 본 명세서에 기재된 상이한 활성화제에 의해 7 및 13일 동안 자극된 배양물의 클론 다양성과 비교하였다.

[0206] 상기 언급된 $\gamma \delta$ T 세포로부터의 RNA를 추출하고, cDNA로 역전사시키고, V δ 1, V δ 2 및 V δ 3 특이적 프라이머 쌍을 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. V δ 1 정방향 프라이머(5'ATGCTGTCTCCAGCCTGCTGTGTATTT 3'; 서열 번호 1) V δ 2 정방향 프라이머(5'ATGCAGAGGATCTCTCCCTCATCCATCT 3'; 서열 번호 2) 및 V δ 3 정방향 프라이머(5'ATGATTCTACTGTGGGCTTTAGCTTTTGG 3'; 서열 번호 3)을 A C δ 역방향 프라이머(5'CTTGGGGTAGAATTCCTTCACCAGACAAGC3'; 서열 번호 4)와 조합하여 사용하여 500bp DNA 단편을 증폭시켰다.

[0207] γ 사슬을 V γ 특이적 프라이머를 사용하여 분리된 RT-PCR 반응에서 증폭시켜 V γ 2, V γ 3, V γ 4를 증폭시키고, V γ 5(5'-GGTGCTTCTAGCTTTCCTGTCTCTGC-3'), V γ 8(5'-ATGCTGTGGCTCTAGCTCTGCTCTA-3') 및 V γ 9(5'-ATGCTGCTACTGCTCCACATCAACG-3') V γ 프라이머를 C γ 역방향 프라이머(5'-GGAAGAAAAATAGTGGGCTTGGGGGAA35)와

쌍 지었다. C_γ1 및 C_γ2의 공통 서열에 기초한 γ 역방향 프라이머. PCR 단편을 클로닝하고, 80개의 독립적 V_γ 삽입체의 뉴클레오타이드 서열을 얻었다. V_δ, D_δ 및 J_δ 연결 서열을 CDR3 서열 정렬에 의해 분석하였다.

[0208] **실시예 26: MAb 및 γ δ T 세포의 조작을 위한 관련 표적화 작제물**

[0209] cDNA 클론(Origene Technologies, Inc., 메릴랜드주 20850, 록빌, 스위트 100, 6 테프트 코트)으로부터 인간 CD20 유전자를 얻었다. CD20 유전자를 정방향 프라이머(5'-ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGG-3') 및 역방향 프라이머(5'-TCAAGGAGAGCTGTTCATTTCTATTGGTG-3')를 사용하여 증폭시키고, 증폭된 CD20 cDNA를 포유류 세포에 대한 높은 발현 벡터로서 pCDNA3.4(Thermo Fisher Scientific)로 도입하고, 숙주 세포로서 CHO 세포로 형질감염시켰다. FACS 분석에 의해 세포 표면에서 높은 수준으로 CD20 분자를 발현하는 재조합 CHO 세포(CD20/CHO 세포)를 확인하였다.

[0210] CD20/CHO 세포를 사용하여 Jakobovits 및 Bornstein이 기재한 바대로(Jakobovits Curr. Opin. Biotechnol. 1995 6:561-6; Bornstein et al., Invest New Drugs. 2010 28:561-74.) 완전 인간 항체를 생성하도록 조작된 BALB/C 마우스 또는 형질전환 마우스를 면역화하였다. FACS 검정에 의해 인간 CD20에 대해 높은 친화도 및 특이성을 가지는 항체를 스크리닝하였다. 마우스 항체를 CDR 그래프팅에 의해 인간화하였다(Kim and Hong Methods Mol Biol. 2012;907:237-45). 인간 중쇄 단일 도메인 항체를 생성하도록 조작된 마우스 또는 랫드로부터 인간 단일 도메인 CD20 항체를 또한 생성하였다(Janssens et al., PNAS 2006 vol. 103:15130).

[0211] 상기 기재된 높은 친화도/특이성 CD20 항체를 코딩하는 유전자를 MSGV1 레트로바이러스 벡터 골격 또는 pCAG 렌티바이러스 벡터로 클로닝하였다. 선택된 MAb를 발현하는 마우스 하이브리도마로부터, 또는 인간화된 항체 사슬로부터 VH 및 VL 도메인을 클로닝하였다. γ δ T 세포를 본 명세서에 기재된 CD20 MAb에 의해 조작하였다.

[0212] **실시예 27. γ δ T 세포의 조작을 위한 TCR 작제물**

[0213] 고도로 반응성인 α β TCR 사슬의 서열을 포함하는 TCR을 발현하는 작제물을 T 림프구 발현 NY-ESO-1-MHC 특이적 펩타이드 작제물로부터 단리시켰다. NY-ESO-1-MHC 특이적 펩타이드 작제물은 다양한 NYESO-1 발현 종양에 대해 강력한 시험관내 및 생체내 항-종양 활성을 유도한다.

[0214] 흑색종, 육종 환자 또는 인간 흑색종 또는 육종 종양으로부터 유래된 환자 유래 이종이식편을 보유하는 마우스로부터 고도로 반응성인 α β TCR 사슬을 단리시켰다. 대안적으로, TCR은 NY-ESO-1 펩타이드 또는 NYESO-1-펩타이드 복합체를 발현하는 인간화된 면역계를 가지도록 변경된 마우스로부터 유래된다(문헌[Gonzales et al., Immunol Res. 2013 57: 326-334; Boucherma et al., J Immuno. 2013. 191; 583-593; Liang-PingL. Et al., Nature Med. 2010, 16:1029-1035] 참조). 우세 클래스 I 대립유전자 HLA-A*02(예를 들어, 펩타이드 SLLMWITQC 157-167번 잔기) 및 우세 HLA-A*01 연관 펩타이드의 상황에서 NY-ESO-1의 에피토프를 인식하는 T 세포를 확인하였다.

[0215] 제조사의 제안에 따라 1단계 RT-PCR 키트(Qiagen Hilden Germany)를 사용하여 역전사 중합효소 사슬 반응(RT-PCR)에 의해 TCR α 및 TCR β 전사체의 서열을 생성하였다. 반응성 T 세포로부터 단리된 RNA로부터 제1 가닥 cDNA를 생성하였다. CTL 클론으로부터 트리플 전체 RNA 단리 시약(Invitrogen Life Technologies)에 전체 RNA를 의해 추출하였다. TCR α 및 β 사슬의 증폭을 아미노산 34번 및 35번 위치(카뎃 넘버링)에서 트립토판-타이로신 잔기 주위에 종양에 있는 TCR α 및 β 사슬 V 영역의 고도로 보존된 영역에 결합할 수 있는 일련의 축퇴성 프라이머에 의해 행하고, α 및 β 불변 영역 역방향 프라이머와 조합하여 사용하였다(Moonka and Loh Journal of Immunological Methods 169 (1994) 41-51). 증폭된 PCR 단편을 겔 정제하고 직접 서열분석하였다. 서열 정보를 이용하여 개별 전장 cDNA의 클로닝에 적합한 PCR 프라이머를 설계한다.

[0216] TCR 유전자를 클로닝하고, MSGV 기반 레트로바이러스 벡터 및 선택된 T 세포로부터 증폭된 전장 cDNA로 삽입하였다. MSGV1 골격을 이용하여 야생형 NY-ESO-1-반응성 인간 TCR의 α 및 β 사슬 둘 다를 코딩하는 레트로바이러스 벡터를 작제하였다. 일 작제물에서 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site; IRES) 구성요소를 통해, 또는 절단 가능한 피코코바이러스 펩타이드 서열을 사용한 분리에 의해 TCR α 및 TCR β 사슬의 연결을 행했다.

[0217] MMLV gag 및 pol 단백질을 안정하게 발현한 293개의 세포를 이전에 기재된 바대로 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 사용하여 각각 MSGV1 TCR 벡터 및 내인성 바이러스 레트로바이러스 봉입 단백질을 코딩하는 벡터에 의해 형질감염시킴으로써 또는 뉴클레오펙터(Nucleofector)(Lonza)를 사용한 전기천공에 의해 레트로바이러스 상청액을 생성하였다. 상청액을 형질감염 후 2일 및 3일에 수집하고, 10% FCS를 함유하는 새로운 DMEM에 의해 1:1 희석시켰다. 조작된 γ δ T 세포는 임의의 추가의 조작 없이 TCR α 및 β 사슬을 코딩하는 유전자를 적절히 발현

할 수 있다.

[0218] **실시예 28. $\alpha\beta$ TCR 작제물에 의한 $\gamma\delta$ T 세포의 조작**

[0219] 표준 기법을 이용하여 원하는 항원에 특이적으로 선택된 T 세포로부터 $\alpha\beta$ TCR(종양 인식 모이어티)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 클로닝하였다. 종양 인식 모이어티를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스에 의한 감염 전에 이전에 실시예에 기재된 방법에 의해 단리된 내인성 야생형 $\gamma\delta$ T 세포를 적어도 6×10^6 개의 세포로 성장시켰다. 바이러스 감염에 대한 표준 프로토콜을 이용하여 벡터 시스템을 야생형 $\gamma\delta$ T 세포로 도입할 수 있다. 성공적으로 형질감염된 세포를 선택하도록 선택 마커의 발현을 이용하였다.

[0220] 유세포분석법 및/또는 정량적 QRT-PCR 및 세포독성 및 사이토카인 분비에 대해 표적 세포에 의한 기능 검정에 의해 조작된 $\alpha\beta$ TCR의 발현을 평가할 수 있다. 유세포분석법 및/또는 정량적 qRT-PCR에 의해 조작된 활성화 도메인의 발현을 또한 평가할 수 있다. 유세포분석법에 의해 관심 있는 세포 표면 마커를 발현하는 조작된 $\gamma\delta$ T 세포의 수를 결정하였다. HLA 유전자 또는 $\beta 2M$ 유전자와 연관된 엑손을 결실시키기 위해 본 명세서에 기재된 적합한 방법론, 예컨대 CRISPR-Cas, talen, 메가뉴클레아제, 아연 핑거 또는 슬리핑 뷰티 전이인자 기술에 의해 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 추가로 조작하였다.

[0221] **실시예 29. CAR 및 TCR 작제물에 의한 $\gamma\delta$ T 세포의 조작**

[0222] $\gamma\delta$ T 세포를 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 기반 벡터에 의해 형질도입하여 표적화 모이어티를 발현시키고, 이 모이어티는 종양 세포를 특이적으로 인식하고 이를 사멸하도록 활성화되도록 조작된 $\gamma\delta$ T 세포를 지향시킬 수 있다. 형질도입된 표적화 모이어티는 종양 특이적 표면 단백질 또는 종양 특이적 세포내 펩타이드에 지향된 MAb를 포함한다. 펩타이드-MHC 복합체에 지향된 고친화도 TCR에 의해 $\gamma\delta$ T 세포를 또한 조작하였다.

[0223] 대안적으로, 비바이러스 벡터에 의한 형질도입을 통해 세포를 조작할 수 있다.

[0224] **실시예 30. 표적화 모이어티에 의한 단리된 $\gamma\delta$ T 세포의 조작**

[0225] CAR 작제물 설계는 상이한 주요 기능 도메인, 종양 세포에 디스플레이된 관심 있는 단백질 또는 MHC 연관 펩타이드를 인식하는, 표적 모이어티, 세포막을 횡단하고 세포내 활성화 신호전달 도메인에 연결하는, 막관통 도메인에 세포의 수용체 표적화 구성요소를 연결하는 짧은 스페이서를 포함한다.

[0226] $\gamma\delta$ T 세포의 표면 상에 발현된 표적 모이어티 수용체는 암 세포 상에 발현된 표적 단백질에 특이적으로 결합하도록 설계될 것이다. 종양 인식 모이어티는 CD19, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, 알파태아단백질(AFP), 암배아 항원(CEA), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, 당지질 F77, 섬유아세포 활성화 단백질, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, 메소텔린, c-met, CSPG4, 넥틴-4, VEGFR2, PSCA, 플레이트 결합 단백질/수용체, SLC44A4, 크립토, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, 및 SLTRK6을 포함하는 백혈병 표적에 대항하도록 설계될 것이다.

[0227] 표적 모이어티 수용체는 종양 세포의 표면 상에 발현된 종양 당단백질에 특이적인 항체의 일부로부터 유래할 수 있거나, 대안적으로 조작된 수용체는 공지된 특이성을 가지는 TCR 수용체 또는, gp100, MARTI, 타이로시나제, SSX2, SSX4, NYESO-1, 상피 종양 항원(ETA), MAGEA 패밀리에 유전자(예컨대, MAGE3A, MAGE4A), KKL1, 돌연변이된 ras, β raf, p53, MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 A(MICA), MHC 클래스 I 사슬 관련 분자 B(MICB), HPV 또는 CMV를 포함하는, MHC 복합체와 회합되어, 표면 상에 제시된 세포내 종양 특이적 항원으로부터 유래된 특이적 펩타이드 서열을 인식하는 항체로부터 유래할 수 있다. 이러한 고친화도 T 세포 수용체 유사 종양 인식 모이어티는 높은 정도의 특이성으로 펩타이드-MHC 복합체를 인식할 것이다.

[0228] **실시예 31. 스페이서 및 막관통 도메인을 가지는 표적화 모이어티 작제물**

[0229] 상이한 스페이서는 암 세포에 대한 조작된 T 세포의 효력을 최적화하기 위해 종양 인식 모이어티 작제물로 조작될 것이다. 각각의 스페이서의 크기는 표적 단백질의 크기, 수용체에 의해 인식된 에피토프, 조작된 종양 인식 모이어티의 크기 및 수용체의 친화도에 따라 변할 것이다. 스페이서는 인간 IgG, CD8a 및 CD4 힌지 영역의 서열을 포함하는 입체배좌 변화를 수용할 수 있다.

[0230] 시험된 스페이서는 개선된 결합 친화도 특성을 가지는 키메라 수용체를 제공하기 위해 상이한 길이(19개 내지 9개의 잔기)로 사용된 Gly, Ser 및 Thr 아미노산으로 이루어진다. 각각의 작제물의 힌지 및 막관통 부분은 CD8a

서열(인간 CD8a의 117번 내지 178번의 잔기) 또는 대안적으로 CD28 막관통 도메인(153-179번 잔기)을 가지는 인간 IgG1 힌지-Fc cDNA로부터 유래된다.

[0231] **실시예 32: 동시자극 도메인을 가지는 표적화 모이어티 작제물**

[0232] 상이한 동시자극 도메인은 종양 인식 모이어티를 포함하는 작제물로 조작될 것이다. CD28, 4-1BB, CD2, CD27, NKG2D, CD161, CD30, JAML, CD244 또는 CD 100 동시자극 신호전달 도메인을 포함하는 동시자극 도메인을 키메라 수용체를 통해 활성화를 증폭시키는 "제2 신호"를 모방하도록 $\gamma \delta$ T 세포로 조작하여서, 암 세포를 증식시키고 사멸시키는 더 강건한 신호를 발생시킨다.

[0233] 세포질 영역은 CD28(180-220번 잔기), CD137(214-255번 잔기), ICOS(165-199번 잔기) CD27(213-260번 잔기) NKG2D(잔류물 1-51), JAML(297-394번 잔기) CD2(236-351번 잔기), CD30(408-595번 잔기) OX40(1-23번 잔기), HVEM(224-283번 잔기), 또는 CD46 분자를 포함하는 $\alpha \beta$ 및/또는 $\gamma \delta$ T 세포 동시자극 분자의 엔도도메인으로부터 유래된다. 최적 작제물은 유도된 세포 세포독성에 대한 조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단의 활성화의 정도에 기초하여 및 시험관내 및 생체내 사이토카인 분비의 정도에 기초하여 선택된다.

[0234] **실시예 33: CD3 ξ 활성화 도메인을 포함하는 표적화 모이어티**

[0235] 3개의 ITAM 도메인(ITAM 1: APAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKR(서열 번호 5); ITAM 2: PQRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM(서열 번호 6); 및 ITAM3: ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ(서열 번호 7)를 함유하는 세포내 CD3 ξ (52-164번 잔기)를 클로닝하였다.

[0236] 프라이머 5' AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA-3'(서열 번호 8) 및 역방향 프라이머 5' CTCGAGTGGCTGTAGCCAGA-3'(서열 번호 9)을 사용하여 TCR ξ 의 세포내 도메인을 증폭시켰다.

[0237] 다단계 중첩 연장 PCR에 의해 CAR 작제물을 생성하였다. 중첩 연장 중합효소 사슬 반응 프로토콜을 이용하여 백금 Taq DNA 중합효소 하이 피델리티 키트(인비트로젠)에 테일링된(tailed) 프라이머에 의해 추진된 별개의 PCR 반응에서 생성물을 융합하였다. 전장 작제물을 코딩하는 DNA를 MSGV1 레트로바이러스 벡터로 결합하였다. 작제물은 CD3z 활성화 도메인을 포함하는 CAR 표적화 모이어티를 제공한다.

[0238] **실시예 34: 하나 초과인 인식 모이어티에 의한 $\gamma \delta$ T 세포의 조작**

[0239] 동일한 세포내 종양 특이적 단백질에 지향된 MAb 및 TCR을 포함하는, 종양 인식 모이어티를 포함하는 하나 초과인 작제물에 의해 $\gamma \delta$ T 세포를 형질도입하였다. 각각의 작제물은 상이한 MHC 일배체형, 예컨대 A2 및 A1, 동일한 종양 세포에서 발현된 상이한 표적에 지향된 항체 또는 동일한 표적에서 상이한 에피토프에 지향된 항체의 상황에서 특이적 펩타이드를 인식하도록 선택된다.

[0240] **실시예 35. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 시험관내 증식**

[0241] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 적절한 조직 배양 배지, 예컨대 이전의 실시예에 기재된 조직 배양 배지에 의해 성장시키고 증식시켰다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 외부 항원에 의한 자극과 함께 또는 이것 없이 및 APC 또는 아미노포스페이트와의 동시배양 없이 37°C에서 5% CO₂ 항온처리장치에서 약 1×10^6 개로 지수로 성장시켰다.

[0242] **실시예 36: 활성화된 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 방출된 사이토카인의 기능 규명**

[0243] IFN- γ , TNF- α (R&D Systems), IL-1 β , IL-2, (Biosource International), IL-12(Diaclone Research), 및 IL-18의 발현은 상업용 효소 연결 면역흡착 검정(ELISA) 키트를 사용하여 측정될 것이다. 효소 연결 면역흡착 검정은 제조사의 지시에 따라 수행될 것이다. 사이토카인의 양은 4°C에서 밤새 0.05M 중탄산나트륨 완충제 중에 1 μ g/ml의 농도로 인간 사이토카인에 대해 단일클론 마우스 IgG1에 의해 코팅된 폴리스타이렌 96웰 플레이트(Maxisorb, Nunc)에서 상이한 시점(24 내지 72시간)에 측정될 것이다. 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS에 의한 세척 후, 플레이트는 37°C에서 1시간 동안 PBST 중의 3% 소 혈청 알부민(BSA, wt/vol, 시그마)에 의해 차단될 것이다. 표준(제조업 인간 사이토카인(R&D 사제) 및 $\gamma \delta$ 배양물 샘플로부터의 상청액은 첨가될 것이고, 플레이트는 실온에서 2시간 동안 항온처리될 것이다. 제조업 인간 사이토카인 표준품과 관련하여 일치된 항체 쌍에 의해 검출된다.

[0244] **실시예 37. 동시자극제의 확인**

[0245] 전체 PBMC 또는 농후화된 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단에 동시자극제를 첨가함으로써 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화, 증식 및 생존능력을 지지하는 상이한 동시자극제의 능력을 시험하였다. 동시자극제를

가용성 또는 부동화 형태로 항- $\gamma \delta$ TCR 특이적 MAbs를 포함하는 상이한 활성화제에 첨가하였다. 이전의 실시예에 기재된 바와 같은 건강한 공여자의 버피 코트로부터 정제된 인간 PBMC 또는 조직으로부터 단리된 림프구를, CD2, CD27, CD28, CD30, CD 137, ICOS, CD161, CD122, CD244 및 NKG2D에 대한 가용성 또는 부동화 작용제 항체, 또는 CD70-FC(CD27에 대한 리간드) MICA, MICB 및 ULBP(NKG2D에 대한 리간드), 4-1BB(CD137에 대한 리간드), 및 Pilar 9(CD 161에 대한 리간드)를 포함하는, 자극 리간드의 존재 또는 부재 하에 2-10 μ g의 항- $\gamma \delta$ TCR 항체를 가지는 24웰 평평 바닥 조직에서 100IU/ml의 rhIL-2가 보충된 1ml의 완전 RPMI-1640 배지 중에 2 x 10⁶으로 플레이팅하였다.

[0246] 실시예 38. 사이토카인은 활성화를 지지한다

[0247] 전체 PBMC 또는 농후화된 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포 집단에 사이토카인을 첨가함으로써 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화, 증식 및 생존능력을 지지하는 상이한 사이토카인의 능력을 시험하였다. 사이토카인 활성화 지지를 시험하기 위해, 다양한 사이토카인을 3일마다 100IU/ml로 별개의 세포 배양물에 개별적으로 첨가하였다. 시험된 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-33, IL-21, IL-18, IL-19, IL-4, IL-9, IL-23 및 IL1 β 를 포함한다. 선택 시간 기간의 종료 후, 세포의 샘플을 수확하고, 세포 집단의 조성, 즉 $\gamma \delta$ T 세포, $\alpha \beta$ T 세포, B 세포, 및 NK 세포의 백분율을 유세포분석법에 의해 결정하였다.

[0248] 세포를 배양물 중에 유지시키고, 선택 집단의 증식을 14일 및 21일에 시험하였다.

[0249] 실시예 39. 시험관내 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 시험관내 세포독성 검정

[0250] 4개의 상이한 세포독성 검정에 의해 조작된 또는 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 시험관내 세포독성 검정을 결정하였다: 1) 종양 세포 용해; 2) 활성화 T 세포에 의한 사이토카인 방출; 3) LDH 검정; 및 4) CD 107a 발현의 활성화. 결장암, 유방암, 난소암, 신장암, 두경부암, 구강암, 췌장암 및 간암(이들로 제한되지는 않음)으로부터 유래된 다양한 인간 종양 세포주 또는 인간 종양 유래 세포(환자 유래 이종이식 종양 세포주)를 표적 세포로서 사용하였다. 정상 인간 유방 상피 세포(HMEC)를 양성 대조군으로서 사용하였다. 간단히 말하면, 96웰 플레이트에서 증식 표적 세포를 웰당 1 x 10⁴개의 세포로 시딩하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고, 활성화 $\gamma \delta$ T 세포를 20:1 또는 40:1의 이펙터 대 표적 비율로 RPMI 배지(RPMI-1640(Coming 사제), 10% 하이클론 소 태아 혈청, 2mmol/l의 L-글루타민, 100U/ml의 페니실린, 100U/ml의 스트렙토마이신) 중에 첨가하고, 습윤 대기에서 5% CO₂ 동안 37°C에서 5시간 동안 항온처리하였다. 동시배양 상청액을 수집하고 상업적으로 구입 가능한 ELISA 키트(BioLegend)를 사용하여 IFN- γ , IL2, TNF α , IL-6 및 IL1 β 를 포함하는, 사이토카인의 분비에 대해 정량화함으로써, 이 항온처리 후 조작된 및 비조작된 $\gamma \delta$ T 세포에 의해 방출된 사이토카인을 결정하였다. 제조사의 지시에 따라 LDH 세포독성 검출 키트(Roche)를 사용하여 LDH 검정을 수행하였다. 마지막으로, 세포를 표적화하기 위해 $\gamma \delta$ T 세포의 첨가 후 5 μ l의 Cy7PE에 접합된 CD 107a 항체(BioLegend)를 첨가함으로써 CD107a 발현을 결정하였다. 플레이트를 간단히 원심분리하고, 습윤 대기에서 5% CO₂ 동안 37°C에서 1시간 동안 항온처리하고, 이후 8.5 μ l의 골지 스탑(Golgi stop)(BD Biosciences; BD)의 1:50 희석액을 첨가하였다. 세포를 습윤 대기에서 5% CO₂ 동안 37°C에서 추가적인 2시간 동안 항온처리하였다. 이 항온처리 후, 세포를 얼음에서 수집하고, 차가운 HBSS에 의해 1회 세척하고, 1 μ l의 좀비 아쿠아(zombie aqua)(BioLegend) 아민 염료에 의해 염색하여 100 μ l의 HBSS 중의 생 세포 집단을 결정하였다. 세포를 FACS 염색 배지(FSM; 2% 소 태아 혈청을 함유하는 HBSS) 중에 세척하고, FITC에 접합된 V δ 1 항체(클론 TS8.2(ThermoFisher 사제)) 및 PE에 접합된 V δ 2 항체(클론 B6(BioLegend 사제))를 포함하는, 포화량의 항체를 함유하는 100 μ l의 FSM 중에 재현탁시켰다. 항체를 얼음에서 30분 동안 세포와 항온처리하고, 이후 과량의 HBSS에 의해 세척하였다. 염색된 집단을 BD FACSCanto II에서 수집하고, FlowJo v10.1 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0251] 실시예 40. 시험관내 증식된 $\gamma \delta$ T 세포의 항종양 활성

[0252] 다양한 종양 세포주 및 원발성 종양 세포에 대한 세포독성 활성을 1:1 내지 40:1의 이펙터 대 표적 비율로 시험하였다. 세포내 효소 락트산 탈수소효소의 방출을 검출함으로써 종양 세포주 및 원발성 종양 세포의 용해를 측정하였다. 유세포분석법, ELISA 및/또는 ELISPOT 검정에 의해 배양물에서 조작된 종양 인식 모이어티를 발현하는 $\gamma \delta$ T 세포의 백분율을 측정하였다.

[0253] 실시예 41. 생체내 항종양 활성

[0254] 인간 종양 이종이식편으로 그래프팅된 면역 결핍 마우스, 또는 huPBMC-NOG(Taconic) 마우스, 또는 상기 기재된

바와 같은 인간화된 면역계를 가지는 마우스의 코호트에 결장, 유방, 난소, 신장, 두경부, 전립선, 방광, 구강, 췌장 및 간의 암을 포함하는 환자 유래 종양으로부터 유래된 세포 또는 종양 세포주에 의해 피하로 또는 정위적으로 주사하고, 100mm³의 평균 크기에 도달하게 하였다. 미경험의 또는 조작된, 농후화 또는 단리된 $\gamma \delta$ T 세포를 마우스에 정맥내로 또는 용량의 범위로 종양으로 직접적으로 주사하였다. 종양 회귀는 $\gamma \delta$ T 세포 투약 후 종양 용적의 감소로 정의되고, 특정한 적응증에 대해 비치료 및 관리 표준과 비교된다. 몇몇 실험에서, 미경험의 또는 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 GFP 또는 루시페라제에 의해 표지하고, 종양 보유 마우스에 주사하여 이의 지속성 및 호밍을 따른다. 연구의 종료 시, 종양을 수확하고, GFP 양성 세포를 유세포분석법 및 면역조직화학에 의해 분석하였다.

[0255] **실시예 42. 추가의 처리를 위한 세포 은행을 생성하기 위한 동결 배지에서의 $\gamma \delta$ T 세포의 냉동보존**

[0256] 비변형된 $\gamma \delta$ T 세포는 동결 배지 중에 제제화되고 장기간 저장을 위해 극저온 저장 유닛, 예컨대 액체 질소 동결장치(-195℃) 또는 초저온 동결장치(-65℃, -80℃ 또는 -120℃)에 위치할 것이다. 동결 배지는 6.5 내지 7.5의 범위의 생리학적 pH 완충제와 함께 다이메틸 설폭사이드(DMSO), 염화나트륨(NaCl), 텍스트로스, 황산텍스 트란 또는 하이드로시에틸 전분(HES)을 함유할 것이다.

[0257] 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 해동되고 항체, 단백질, 펩타이드 및 사이토카인에 의한 자극에 의해 추가로 처리될 것이다. 냉동보존된 $\gamma \delta$ T 세포는 해동되고 이 분야에 이전에 기재된 바대로 유전적으로 변형될 것이다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포는 동결 배지에서 1ml당 10^6 내지 10^8 개의 세포로 10, 100, 200개의 바이알의 분량으로 세포 은행을 생성하도록 추가로 냉동보존될 것이다.

[0258] **실시예 43. 추가의 처리를 위한 세포 은행을 생성하기 위한 동결 배지에서의 $\gamma \delta$ T 세포의 대안적인 냉동보존**

[0259] 동결 및 해동 공정 동안 용해에 대해 영양 보충 및 생물물리학 세포 보호를 제공하기 위해 이전의 실시예에 기재된 냉동보존 보충제에 다른 동결보호제를 첨가하였다. 이것은 D-글루코스, 만니톨, 수크로스, 아데닌, 구아노신, 제조함 인간 알부민, 시트레이트, 항응고제, 벤조나제, DNase, 프로필렌 글라이콜, 에틸렌 글라이콜, 2-메틸-2,4-펜탄다이올을 포함한다. 높은 세포 밀도 동결된 생성물에 대한 완충 능력을 제공하도록 설계된 추가적인 첨가제는 무기 포스페이트, 중탄산나트륨 및 HEPES를 포함한다.

[0260] **실시예 44. 추가의 처리를 위한 세포 은행을 생성하기 위한 동결 배지에서의 $\gamma \delta$ T 세포의 냉동보존**

[0261] 제어 속도 동결장치(예를 들어, CryoMed 제어 속도 동결장치) 또는 원하는 동결 속도를 전달하기 위해 적절하게 절연된 랙킹 시스템을 가지는 기계적 -70℃ 동결장치를 사용하여 분당 -0.1℃ 내지 -5℃의 동결 속도를 달성하도록 설계된 온도 제어 램프에서 $\gamma \delta$ T 세포의 초기 동결을 수행하였다. 동결된 세포를 30 내지 60일까지의 짧은 기간 동안 -70℃ 동결장치에 위치시켰다. 동결된 세포를 이전의 부분에 기재된 방법에 의해 측정된 바대로 저장 없이 $\gamma \delta$ T 세포 수 및 세포 기능을 유지시키면서 12, 24, 36 및 48개월까지의 더 장기간의 저장을 위해 액체 N₂ 저장 탱크에 위치시켰다.

[0262] 이 실시예에 기재된 냉동보존된 세포를 해동하고 추가로 자극하고 적합한 밀폐 용기, 예컨대 세포 배양 백 및/또는 생물반응기에서 증식시켜 대상체에 대한 투여를 위해 조작된 $\gamma \delta$ T 세포의 적합한 분량을 생성시킨다.

[0263] **실시예 45. 환자로의 직접 점적주사를 위한 $\gamma \delta$ T 세포의 제제**

[0264] 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 원심분리 및/또는 막 정용여과에 의해 저온보호 부형제를 함유하는 생리학적 완충제 중에 5×10^6 개의 세포/ml 내지 10^8 개의 세포/ml로 농축시키고, 장기간 저장을 위해 극저온 저장 유닛, 예컨대 액체 질소, 또는 초저온 동결장치에 위치시켰다.

[0265] **실시예 46. 암으로 고통받는 인간 대상체의 치료**

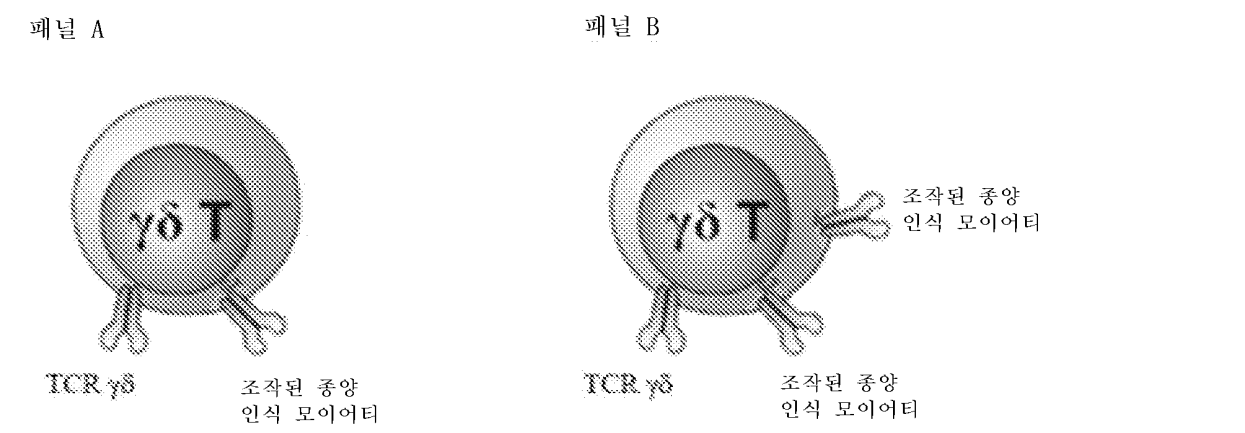
[0266] 새로운 또는 동결된 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 침대에서 해동하고 인간 대상체에 정맥내 점적주사하였다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포 1킬로그램당 약 1개의 세포 내지 1킬로그램당 약 1×10^{10} 개의 세포를 30-60분 기간에 걸쳐 인간 대상체에게 점적주사하였다. 조작된 $\gamma \delta$ T 세포를 동시자극 사이토카인 IL-2 또는 다른 사이토카인의 도움에 의해 또는 도움 없이 투여하였다. 임의로, 절차를 반복하였다. 유세포분석법에 의해 대상체에서의 $\gamma \delta$ T 세포의 생체내 증식을 측정하였다.

[0267] 본 발명의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 도시되고 기재되어 있지만, 이러한 실시형태가 오직 예로 제공된다. 본 발명의 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 본 발명으로부터 벗어나지 않으면서 당해 분야의 당업자에게

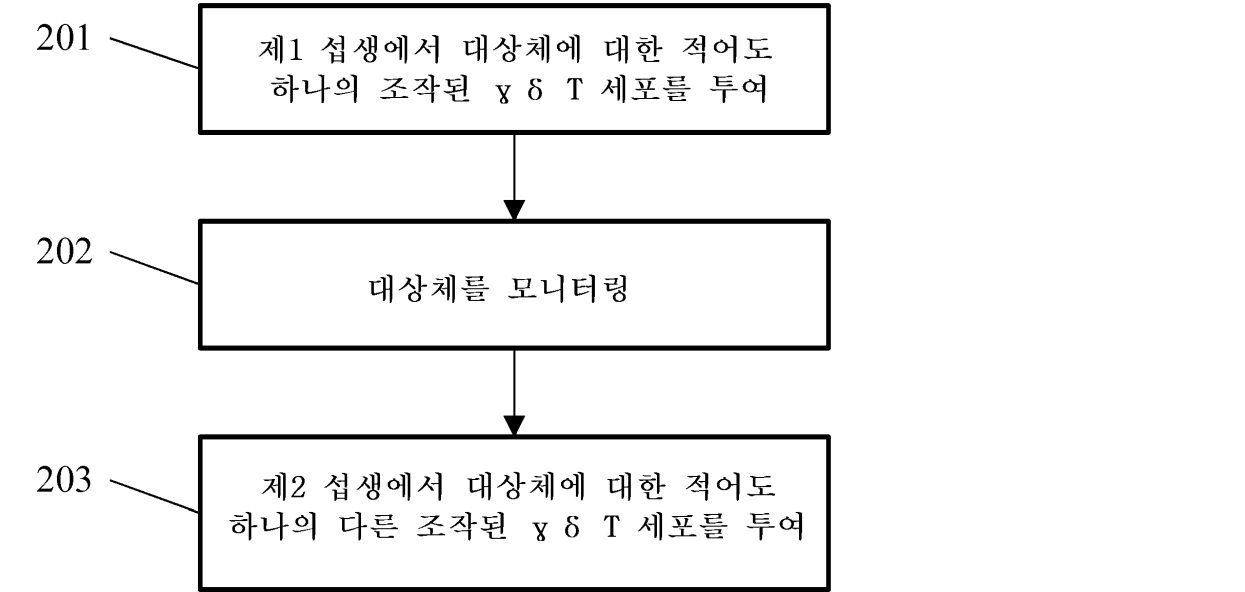
다수의 변형, 변경 및 치환이 이제 일어날 것이다. 본 발명을 실행 시 본 명세서에 기재된 발명의 실시형태에 대한 다양한 대안이 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 하기 청구항이 본 발명의 범위를 한정하고, 이 청구항의 범위 내의 방법 및 구조 및 이의 균등물이 이로써 취급되는 것으로 의도된다.

도면

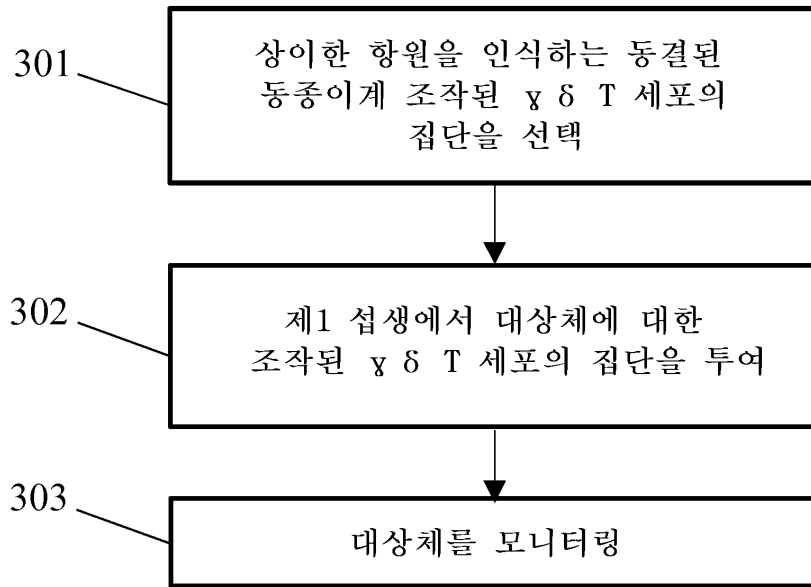
도면1



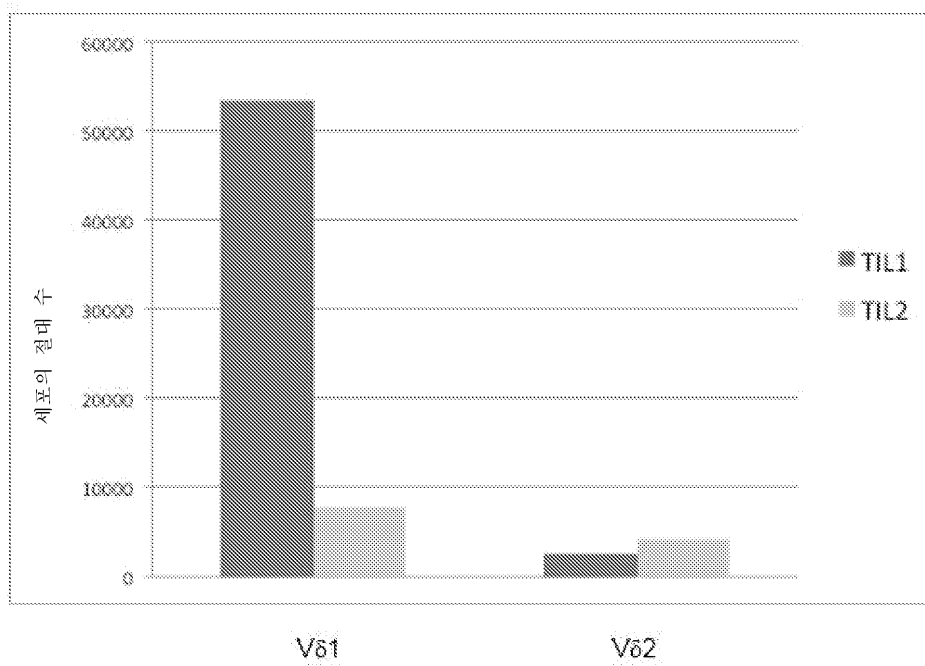
도면2



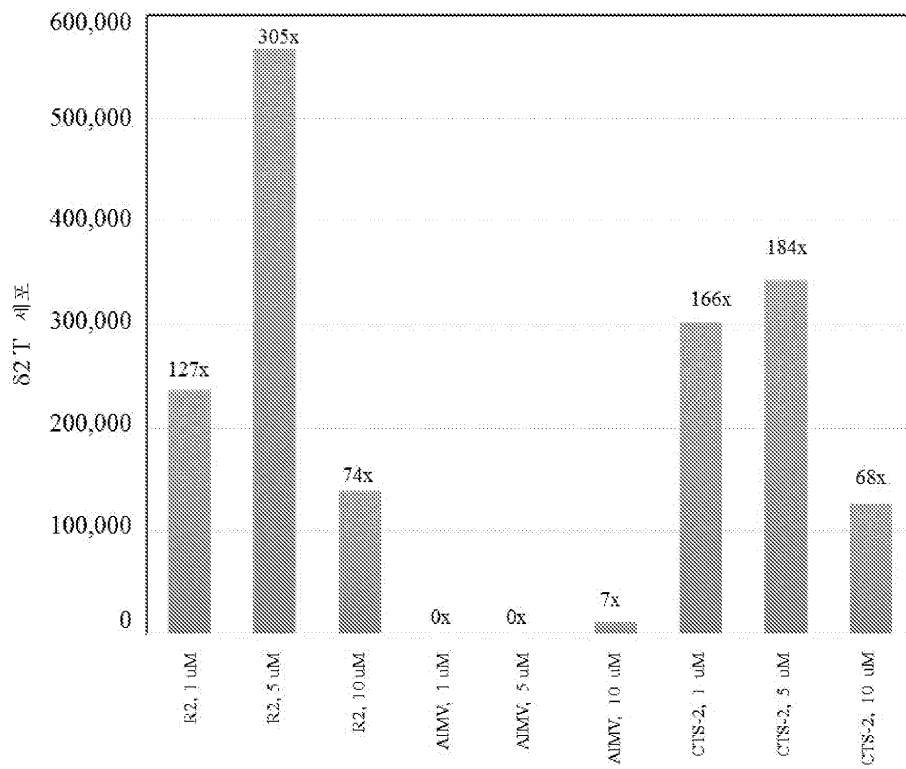
도면3



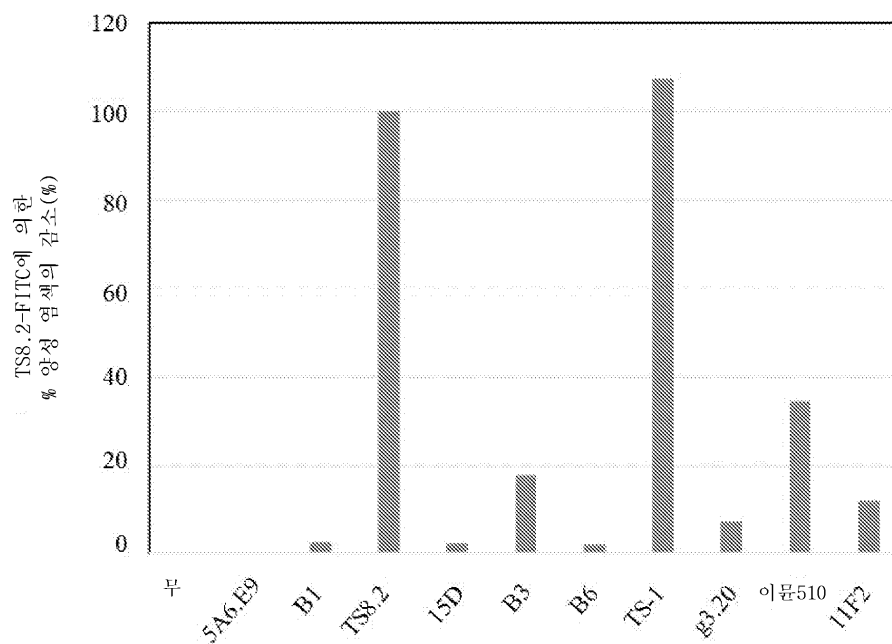
도면4



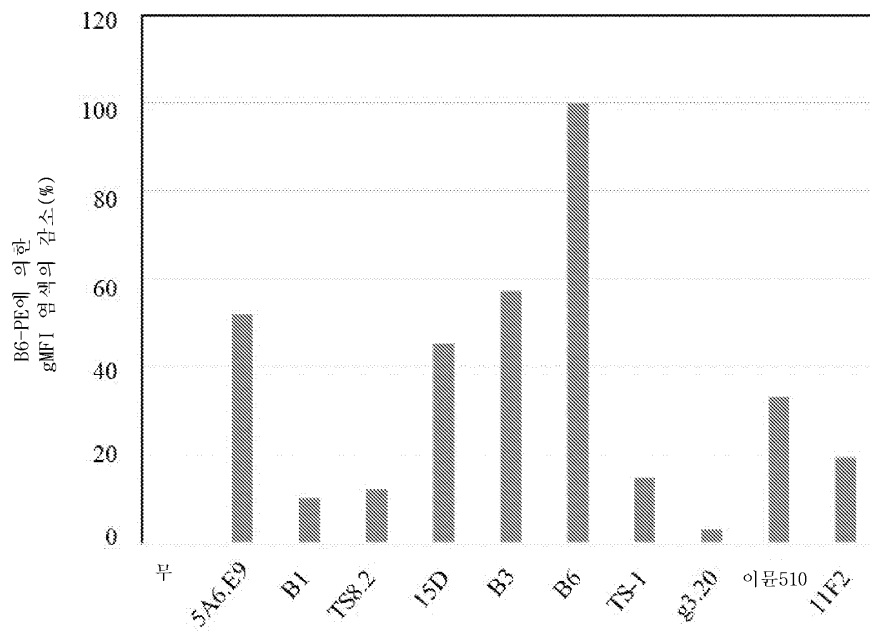
도면5



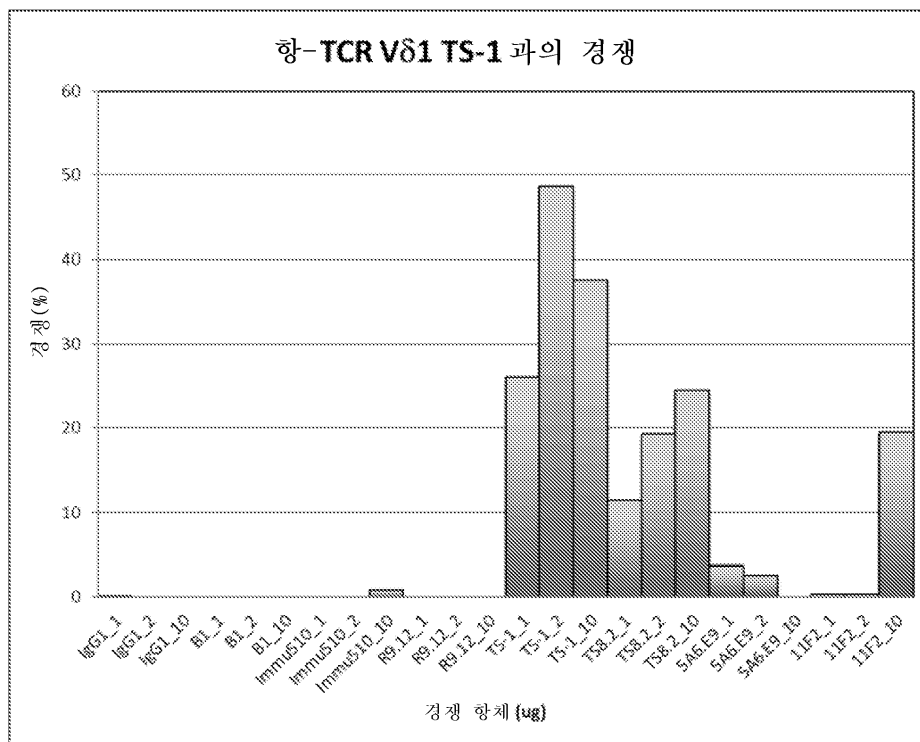
도면6



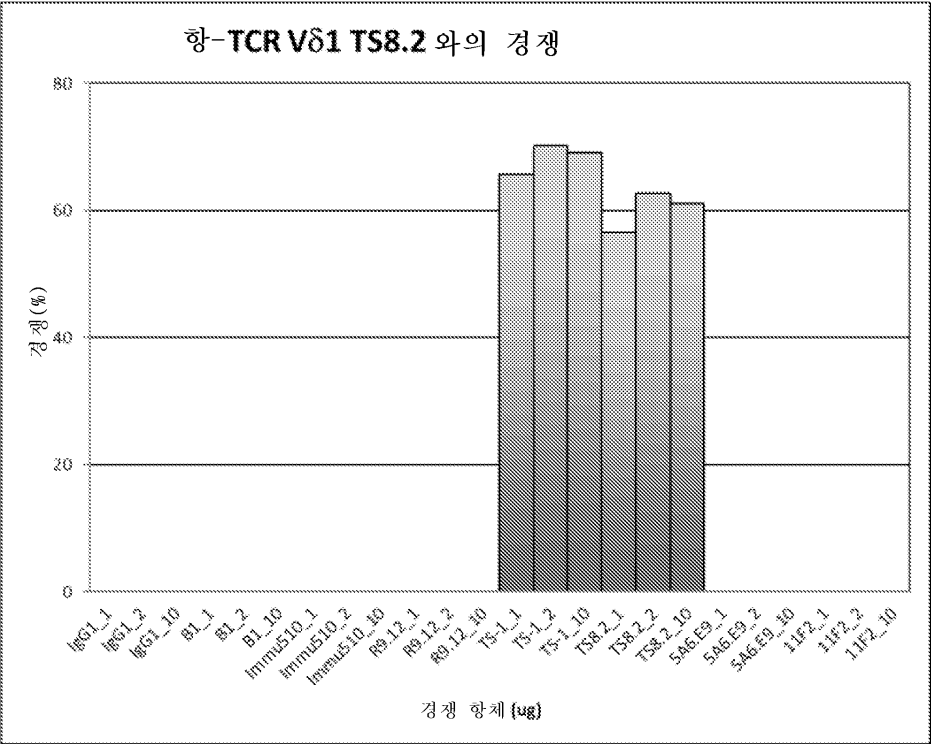
도면7



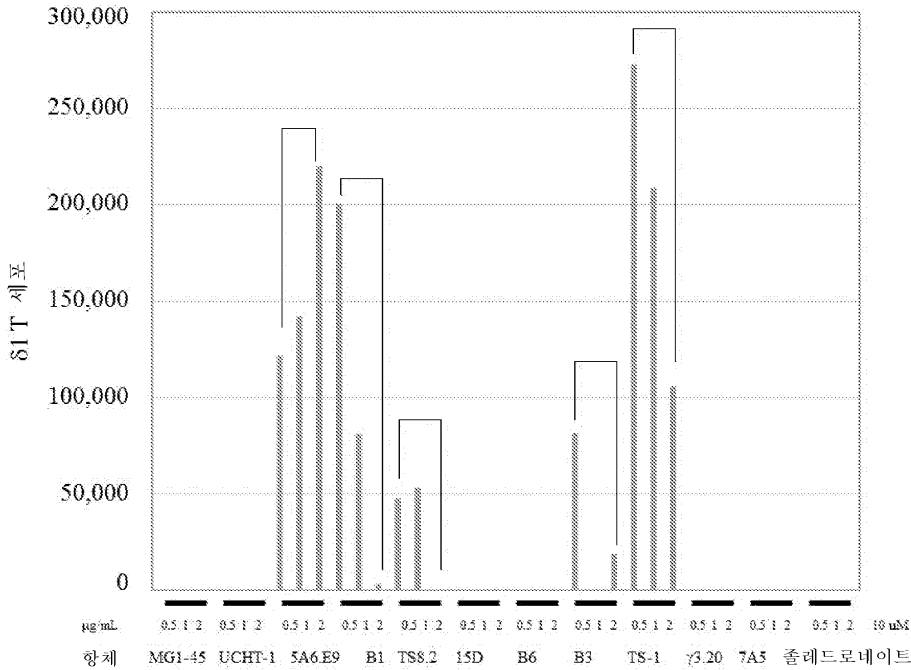
도면8



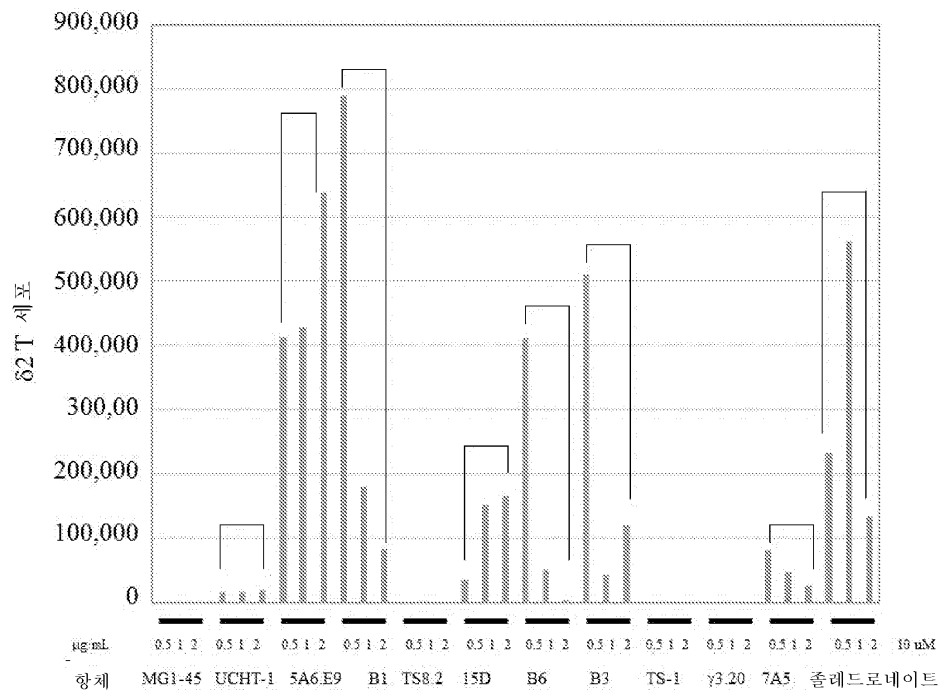
도면9



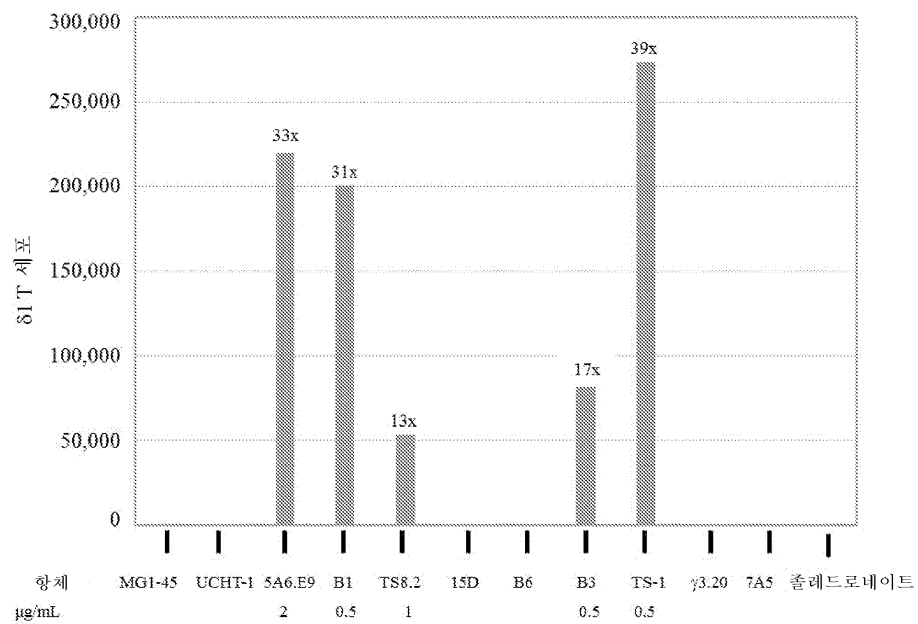
도면10



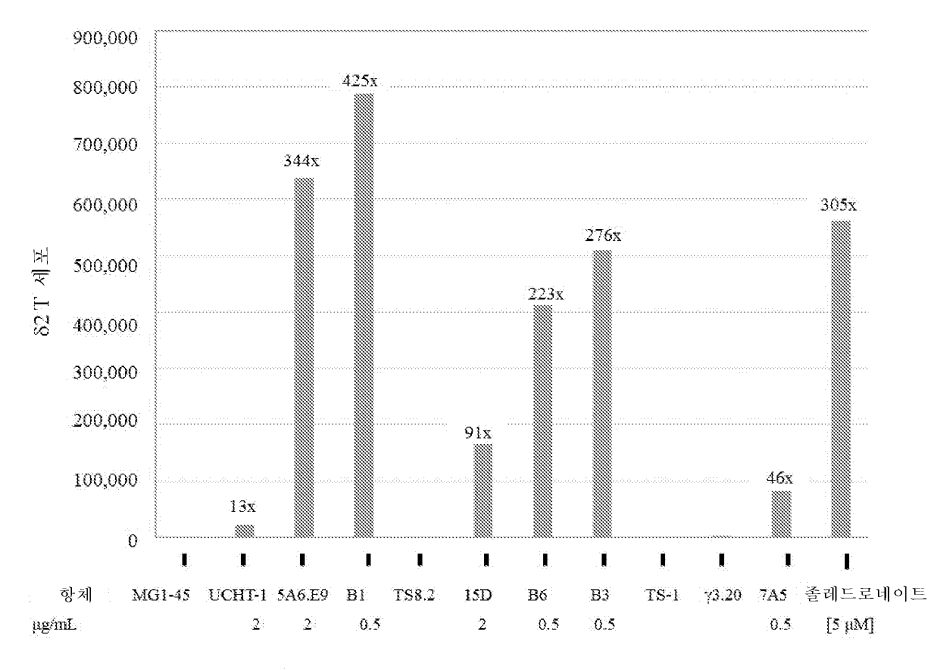
도면11



도면 12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ADICET BIO, INC.
- <120> ENGINEERED GAMMA DELTA T-CELLS
- <130> 47165-701.601
- <140> PCT/US15/61189
- <141> 2016-01-06
- <150> PCT/US2015/061189
- <151> 2015-11-17
- <150> 62/080,500
- <151> 2014-11-17
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer
- <400> 1

atgctgttct ccagcctgct gtgtgtattt 30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 2

atgcagagga tctctccct catccatct 29

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 3

atgattctta ctgtgggctt tagctttttg 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

cttggggtag aattccttca ccagacaagc 30

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn

1 5 10 15
Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg

20 25

<210> 6

<211> 29

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln

1 5 10 15

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

20 25

<210> 7

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 7

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser

1 5 10 15

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

20 25

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 8

agagtgaagt tcagcaggag cgca

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

ctcgagtggc tgtagccag a 21

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

ggtgcttcta gctttcctgt ctctgc 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

atgctgttgg ctctagctct gcttcta 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

atgctgtcac tgctccacac atcaacg 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 13

ggaagaaaaa tagtgggctt gggggaa 27

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 14

atgacaacac ccagaaattc agtaaattg 29

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 15

tcaaggagag ctgtcatttt ctattggtg 29

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 16

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5