



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0041229
(43) 공개일자 2018년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/14 (2015.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7008284
(22) 출원일자(국제) 2016년08월25일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년03월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/048738
(87) 국제공개번호 WO 2017/035375
국제공개일자 2017년03월02일
(30) 우선권주장
62/209,721 2015년08월25일 미국(US)

(71) 출원인
유에이비 리서치 파운데이션
미국 35294-0111 알라바마주 버밍엄 사우쓰 트웬
티스 스트리트 701 어드미니스트레이션 빌딩
#1120지
(72) 발명자
램, 로렌스 에스.
미국 35242 알라바마주 버밍엄 이글 크레스트 로
드 5004
미네이쉬, 신
미국 35242 알라바마주 베스타비아 힐즈 파크 리
지 서클 717
새드, 아이만
미국 35216 알라바마주 후버 리버포드 드라이브
1236
(74) 대리인
양영준, 김영

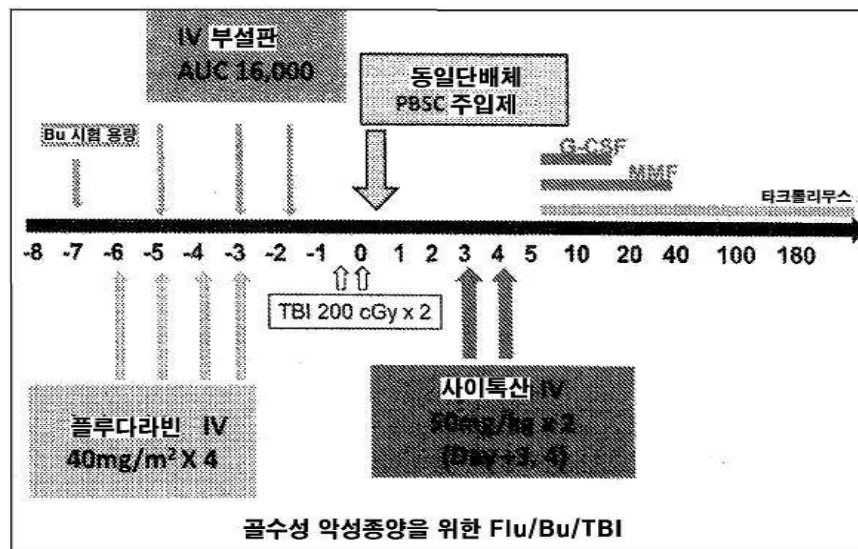
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 줄기 세포 이식을 위한 방법

(57) 요약

본 발명은 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)의 방법을 제공한다. 구체적으로 본 발명은, 생체 외 $\gamma \delta T$ 세포 증식 및 $\alpha \beta T$ 세포 고갈 방법과 생체 내 T 세포 고갈 방법의 병행이 이용되는, HSCT 방법을 제공한다. 본 생체 내 T 세포 고갈 방법은 GvHD 위험을 증가시키지 않을 동종반응성 T 세포를 (생체 내) 고갈시킨다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/193 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0087 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- i. 당일에 말초 혈액 줄기 세포(PBSC)를 포함하는, 최소한으로 조작된 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계;
 - ii. 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 상기 대상체에 투여하는 단계;
 - iii. 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및
 - iv. $\gamma \delta$ T 세포는 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 T 세포들을 포함하여 제2 이식편 주입제를 상기 대상체에 투여하는 단계
- 를 포함하는, 동종이계 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)을 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제2 이식편은 PBSC 주입 후 약 7일후 내지 약 25일후에 투여되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제2 이식편은 PBSC 주입 후 약 7일후 내지 약 9일후에 투여되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 당일 이전에 당 업계에 공지된 임의의 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 예비적 화학요법 치료계획은, 골수성 질병의 경우에는 플루다라빈/부설판/전신 방사선 조사; 연령이 40세 이하이고, 중대 동반질환이 발생하지 않은 환자에서, 급성 림프아구성 백혈병(ALL) 또는 공격성 비 호지킨 림프종(NHL) 또는 호지킨 림프종(HL) 경우에는 전신 방사선 조사/사이클로포스파미드(TBI/CY); 그리고 40세 보다 윗 연령대 중 임의의 연령대로서 중대 동반질환이 발생한 환자에서, 고선량/고농도 TBI/CY로 인해 비 재발 사망률(NRM) 상승의 전조를 보이는 ALL 또는 림프종의 경우에는 플루다라빈/전신 방사선 조사로부터 선택되는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 생체 내 T 세포 고갈은 당일 이후에 개시되고, 당 업계에 공지된 임의의 생체 내 T 세포 프로토콜의 사용을 포함하는 방법

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생체 내 T 세포 고갈 프로토콜은 당일에 최소한으로 조작된, PBSC 포함 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 것과 관련하여, 1일후와 10일후 사이에 수행되는 사이클로포스파미드 치료법; 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법; 3일후와 4일후에 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법으로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 당일 이후에 이식편 대 숙주병(GvHD) 예방적 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함하는 방법으로서, 상기 GvHD 치료계획은 당 업계에 공지된 임의의 치료계획인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 GvHD 예방적 치료계획은, 사용될 면역 억제제 하나 이상의 농도 감소 및/또는 이러한 제제들의 가짓 수 감소를 제공하는 것; 당일에 PBSC를 투여하는 것과 관련하여, 5일후를 시작으로 35일후까지 CELLCEPT[®](마이코페놀레이트 모페틸) 15 mg/kg씩 1일 3회 경구 투여(최대 1일 용량 = 3 gm)[신뢰할만한 경구 섭취가 확립될 때까지 CELLCEPT[®]의 정맥 내 투여용 제제의 투여가 이루어질 수 있고, 5일후를 시작으로 타크롤리무스를 1일 약 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입하다가(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음), 경구 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환하는 것을 추가로 포함하며, 타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여되고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 투여 용량은 점차 줄어든다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]; 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음) → 경구 섭취가 관용될 때, 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 투여 용량은 점차 줄어든다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]; 및 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 약 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음) → 경구 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 50일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 100일후까지 투여 용량은 점차 줄어든다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]으로부터 선택되는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 당일 이후 성장 인자를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 성장 인자 치료법의 치료계획은 당 업계에 공지된 임의의 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 성장 인자는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)이고, 이의 투여는 5일후부터 약 20일후까지; 그리고 5일후부터 약 15일후까지로부터 선택되는 시점에서 이루어지는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, G-CSF는 이식 후 5일에 호중구가 생착될 때까지 약 5 μ g/kg으로 투여되는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서,

- i. 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계;
- ii. 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는 단계;
- iii. 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계; 및
- iv. 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계

중 임의의 단계 2가지, 3가지 또는 4가지를 병행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 제2 이식편 주입제에 주입된 γ δ T 세포의 수는 약 5×10^8 개 γ δ T 세포/kg 미만, 약 1×10^7 개 γ δ T 세포/kg 미만, 또는 약 5×10^6 개 γ δ T 세포/kg 미만인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 제2 이식편 주입제는 γ δ T 세포를 60% 이상; γ δ T 세포를 60% 이상, 그리고 $\alpha\beta$ T 세포를 5% 이하; 또는 γ δ T 세포를 60% 이상, $\alpha\beta$ T 세포를 5% 이하, 그리고 NK 세포를 25% 이하 포함하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 HSCT는 HSCT가 사용되는 임의의 병태와 연계되어 수행되는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 병태는 동종이계 이식의 표시 징후를 보이는 혈액학적 신생물 질환; 위험 소견이 심각한 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 재발성 ALL; 호지킨 림프종(HL); 비호지킨 림프종(NHL); 완화 지속 기간이 1년 미만인 재발성 HL 또는 NHL; 앞서 자가조직 이식이 수행된 후의 재발성 HL 또는 NHL; 화학요법에 대해 완전 반응(CR)을 달성하지 못한 HL 또는 NHL; 골수성 악성종양; 위험 소견이 중간인/심각한 급성 골수성 백혈병(AML); 재발성 AML; 혈액학적 완화 상태 또는 만성기에 있는 만성 골수성 백혈병(CML); 골수성 질환; 위험 소견이 중간인/심각한 골수이형성 증후군(MSD); 난치성 MDS; 골수증식성 질환을 동반하는 MDS; 위험 소견이 심각한 원발성 또는 속발성 MDS; 난치성 MDS; 성상세포종; ATRT(비정형 유기형 간상 종양); 뇌간 신경교종; 맥락종 종양, 암종 및 유두종; 두개인두종; 영아의 결합조직형성 성상세포종; 생식 세포 종양; 수모세포종; 신경섬유종증; 피지교종; 시신경교종; 신경아세포종; 유잉 육종; 및 PNET(원시신경외배엽종양)로부터 선택되는 방법.

청구항 18

- v. 당일에 말초 혈액 줄기 세포(PBSC)를 포함하는 동일단배체 혈액 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계;
 - vi. 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 상기 대상체에 투여하는 단계;
 - vii. 선택적으로 γ δ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및
 - viii. γ δ T 세포가 농축되었고, α β T 세포가 고갈된 T 세포를 포함하는 제2 이식편 주입제를 상기 대상체에 투여하는 단계
- 를 포함하는, 동종이계 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)을 위한 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제2 이식편은 PBSC 주입후 약 7일후 내지 약 25일후에 투여되는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 이식편은 PBSC 주입후 약 7일후 내지 약 9일후에 투여되는 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 당일 이전에 당 업계에 공지된 임의의 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 예비적 화학요법 치료계획은, 골수성 질환의 경우에는 플루다라빈/부설판/전신 방사선 조사; 연령이 40세 이하이고, 중대 동반질환이 발생하지 않은 환자에서, 급성 림프아구성 백혈병(ALL) 또는 공격성 비 호지킨 림프종(NHL) 또는 호지킨 림프종(HL)의 경우에는 전신 방사선 조사/사이클로포스파미드(TBI/CY); 그리고 40세 보다 윗 연령대 중 임의의 연령대로서, 중대 동반질환이 발생한 환자에서, 고선량/고농도 TBI/CY로 인해 비 재발 사망률(NRM) 상승의 전조를 보이는 ALL 또는 림프종의 경우에는 플루다라빈/전신 방사선 조사로부터 선택되는 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 생체 내 T 세포 고갈은 당일 이후에 개시되고, 당 업계에 공지된 임의의 생체 내 T 세포 프로토콜의 사용을 포함하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 생체 내 T 세포 고갈 프로토콜은 당일에 최소한으로 조작된, PBSC 포함 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 것과 관련하여, 1일후와 10일후 사이에 수행되는 사이클로포스파미드 치료법; 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법; 3일후와 4일후에 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법으로부터 선택되는 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 당일 이후에 당 업계에 공지된 임의의 이식편 대 숙주병(GvHD) 예방적 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 GvHD 예방적 치료계획은, 사용될 면역 억제제 하나 이상의 농도 감소 및/또는 이러한 제제들의 가짓 수 감소를 제공하는 것; 당일에 PBSC를 투여하는 것과 관련하여, 5일후를 시작으로 35일후까지 CELLCEPT[®](마이코페놀레이트 모페틸) 15 mg/kg씩 1일 3회 경구 투여(최대 1일 용량 = 3 gm)[신뢰할만한 경구 섭취가 확립될 때까지 CELLCEPT[®]의 정맥 내 투여용 제제의 투여가 이루어질 수 있고, 5일후를 시작으로 타크롤리무스를 1일 약 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입하다가(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음), 경구 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환하는 것을 추가로 포함하며, 타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여되고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]; 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음) → 경구 섭취가 관용될 때, 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]; 및 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 약 0.03 mg/kg의 용량으로 정맥 내 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대해 조정될 수 있음) → 경구 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 50일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 100일후까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]으로부터 선택되는 방법.

청구항 27

제18항에 있어서, 당일 이후 성장 인자를 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 성장 인자 치료법의 치료계획은 당 업계에 공지된 임의의 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 성장 인자는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)이고, 이의 투여는 5일후부터 약 20일후까지; 그리고 5일후부터 약 15일후까지로부터 선택되는 시점에서 이루어지는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, G-CSF는 이식 후 5일에 호중구가 생착될 때까지 약 5 µg/kg으로 투여되는 방법.

청구항 30

제18항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서,

- v. 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계;
- vi. 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는 단계;
- vii. 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계; 및
- viii. 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계

중 임의의 단계 2가지, 3가지 또는 4가지를 병행하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제18항에 있어서, 상기 제2 이식편 주입제에 주입된 $\gamma \delta T$ 세포의 수는 약 5×10^8 개 $\gamma \delta T$ 세포/kg 미만, 약 1×10^7 개 $\gamma \delta T$ 세포/kg 미만, 또는 약 5×10^6 개 $\gamma \delta T$ 세포/kg 미만인 방법.

청구항 32

제18항에 있어서, 상기 제2 이식편 주입제는 $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상; $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상, 그리고 $\alpha \beta T$ 세

포를 5% 이하; 또는 $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상, $\alpha \beta T$ 세포를 5% 이하, 그리고 NK 세포를 25% 이하 포함하는 방법.

청구항 33

제18항에 있어서, 상기 HSCT는 HSCT가 사용되는 임의의 병태와 연계되어 수행되는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 병태는 동종이계 이식의 표시 징후를 보이는 혈액학적 신생물 질환; 위험 소견이 심각한 급성 림프아구성 백혈병(ALL); 재발성 ALL; 호지킨 림프종(HL); 비호지킨 림프종(NHL); 완화 지속 기간이 1년 미만인 재발성 HL 또는 NHL; 앞서 자가조직 이식이 수행된 후의 재발성 HL 또는 NHL; 화학요법에 대해 완전 반응(CR)을 달성하지 못한 HL 또는 NHL; 골수성 악성종양; 위험 소견이 중간인/심각한 급성 골수성 백혈병(AML); 재발성 AML; 혈액학적 완화 상태 또는 만성기에 있는 만성 골수성 백혈병(CML); 골수성 질환; 위험 소견이 중간인/심각한 골수이형성 증후군(MSD); 난치성 MDS; 골수증식성 질환을 동반하는 MDS; 위험 소견이 심각한 원발성 또는 속발성 MDS; 난치성 MDS; 성상세포종; ATRT(비정형 유기형 간상 종양); 뇌간 신경교종; 맥락종 종양, 암종 및 유두종; 두개인두종; 영아의 결합조직형성 성상세포종; 생식 세포 종양; 수모세포종; 신경섬유종증; 피지교종; 시신경교종; 신경아세포종; 유잉 육종; 및 PNET(원시신경외배엽종양)로부터 선택되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

배경

동종이계 조혈 줄기 세포 이식(allo HSCT)은 혈액학적 악성종양이 발병한 다수의 환자에 있어서 잠재적 근치 치료법이다¹. 임상학적으로 바람직한 줄기 세포 공급원은 인간 백혈구 항원(Human Leucocyte Antigen; HLA) 매칭 혈연 공여자 또는 HLA 매칭 비혈연 공여자이다². 불행하게도 다수의 환자, 특히 소수 민족군에 속하는 환자는 HLA 매칭 혈연 공여자 또는 비혈연 공여자가 없다. 장기이식등록 검색 또한 몇몇 고위험 환자들에 있어서는 부적절하게 시간이 소요되는 과정일 수 있다. 그러므로 HSCT 이식편의 대안적 공급원이 임상학적으로 이용되어 왔다. 이에 대한 선택권으로서는 HLA 부분 매칭(동일단배체) 가족 구성원으로부터 유래하는 공여자 세포를 사용하는 것을 포함한다³.

동일단배체 HSCT는 동종이계 HSCT를 필요로 하되 HLA 매칭 공여자가 존재하지 않는 환자에서 장기 생존 및 치유를 달성하는 것으로 보였다³. 그러나 동일단배체 HSCT의 성공은 다중 합병증에 의해 좌절되었다. 공여자와 수여자 간 HLA의 불일치는 높은 이식편 거부 위험을 초래할 수 있고, 이식편 대 숙주병(GvHD)을 유발할 수 있으며, 후속 감염으로 인한 합병증 발생시 면역 재구성의 지연을 초래할 수 있다⁴. (GvHD를 예방하기 위하여) 강력한 면역억제 치료계획이 적용되면, 적어도 이론상으로는 이식편 대 종양(GvT) 효과가 억제되고, 이는 GvHD 재발 위험 증가의 전조가 된다. 동종 HSCT(allo HSCT) 이후 GvT 효과는 재발 위험 감소와 상관되는 것으로 보였다^{5,6}. 따라서 주입된 공여자의 T 세포는 유리한 효과(생착, 면역 재구성 및 GvT)를 보일 수 있음과 동시에, GvHD의 유해한(때로는 치사적인) 현상을 보일 수도 있다. 이러한 이유들로 인하여 연구자들은, GvHD를 유발할 수 있는 동종 반응성 T 세포를 최소화하면서, 생착을 유지하고 GvT 효과를 최적화하기에 충분한 수의 세포를 제공할 수 있는, T 세포 아집단들의 최적 비를 제공할 방법으로서 세포 치료 요법을 도모하기 위한 방법을 찾아왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

본 발명은 유해한 현상(예컨대 GvHD(이에 한정되는 것은 아님))을 최소화하면서, 주입된 공여자 T 세포의 유리한 효과(생착, 면역 재구성 및 GvT를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님)를 최대화하는, HSCT에 유용한 방법과

조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0005] 발명의 개요

[0006] 본 발명은 HSCT의 향상된 방법을 제공하기 위해, 최소한으로 조작된 말초 혈액 줄기 세포(PBSC)의 이식후 생체 내 T 세포 고갈 방법과, $\gamma \delta$ T 세포 농축 및/또는 증식 및/또는 $\alpha \beta$ T 세포 고갈의 생체 외 방법의 병행이 이용되는 HSCT 방법을 제공한다.

[0007] 제1 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포는 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 T 세포들을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0008] 제2 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 최소한으로 조작된 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포는 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 T 세포들을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0009] 제3 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계로서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 군집인 단계를 포함한다.

[0010] 제4 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 최소한으로 조작된 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계로서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 군집인 단계를 포함한다.

[0011] 제5 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하기 위한 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0012] 제6 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하도록 최소한으로 조작된 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0013] 제7 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하기 위한 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0014] 제8 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하도록 최소한으로 조작된 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여

하는 단계; v) $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, HSCT의 기술된 방법들은 주입된 공여자 T 세포의 유리한 효과(생착, 면역 재구성 및 GvT를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님)를 최대화할 것이다. 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, HSCT의 기술된 방법은 주입된 공여자 T 세포의 유해한 현상(예컨대 GvHD(이에 한정되는 것은 아님))을 최소화할 것이다. 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 상기한 바의 조합이 달성된다. 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, PBSC 이식편은 동일단배체 공여자로부터 수집되며, 세포 생성물은 (HSCT에서 표준인 바와 같이) 당일에 대상체에 투여될, 최소한으로 조작된 HSCT 생성물과, 당일 이후에 대상체에 투여될 $\gamma \delta$ T 세포 제품으로 나누어진다. 임의의 구현 예에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 당일 이후 25일 이내에 대상체에 투여된다. 임의의 구현 예들에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은, 생체 내 T 세포 고갈이 개시된 후 3일 이후에 대상체에 투여된다. 임의의 구현 예에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 생체 외에서 증식되고, 그 결과 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 수는 증가한다. 임의의 구현 예들에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축된다. 임의의 구현 예들에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 $\alpha \beta$ T 세포가 고갈된다. 임의의 구현 예들에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 생체 외에서 증식되고, 그 결과 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 수는 증가하고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된다. 임의의 구현 예에서, $\gamma \delta$ T 세포 제품은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축되고 $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된다.

[0016] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 본 발명의 방법들은 HSCT가 사용되는 임의의 병태와 연계되어 수행될 수 있다.

[0017] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 본 발명의 방법들은 예방적 화학요법 치료계획(regime)(다만 이러한 예방적 화학요법 치료계획은 바람직하게 당일 이전에 개시됨)과 연계되어 수행될 수 있다.

[0018] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 본 발명의 방법들은 당일 이후에 개시되는 생체 내 T 세포 고갈 프로토콜과 연계되어 수행된다. 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 생체 내 T 세포 고갈 프로토콜은 사이클로포스파미드(CY)의 이식 후 투여이다.

[0019] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 본 발명의 방법들은 GvHD 예방적 치료계획과 연계되어 수행될 수 있으며; 이러한 GvHD 예방적 치료계획은, 바람직하게 당일 이후에 개시된다.

[0020] 상기 양태들의 임의의 구현 예들에서, 본 발명의 방법들은 성장 인자 치료법과 연계되어 수행될 수 있는데; 이러한 성장 인자 치료법은, 바람직하게 당일 이후에 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은, 플루다라빈/부실판/TBI가 사용되는 골수병(myeloid disease)의 예비적 치료계획에 관한 일 구현 예를 보여주는 것이다.

도 2는, TBI/사이클로포스파미드가 사용되는 40세 이하 연령대의 림프종 환자 또는 ALL 환자의 예비적 치료계획에 관한 일 구현 예를 보여주는 것이다.

도 3은, 중대 동반질환들이 발병한, 40세 보다 윗 연령대 중 임의의 연령대의 림프종 환자 또는 ALL 환자의 예비적 치료계획에 관한 일 구현 예를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 상세한 설명

[0023] 정의

[0024] 본원에 사용된 바와 같이, "최소한으로 조작된"이란 용어는, 공여자(예컨대 동일단배체 공여자)로부터 분리된 PBSC 풀(PBSC pool)이, 세포의 관련 생물학적 특징들을 바꾸는 방법이나 절차의 대상이 되지 않은 경우를 의미한다. 시료채취는 세포의 특정 군집을 농축 및/또는 고갈시키는 것이 아니므로, 본원에 기술된 바와 같이 (예컨대 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제조하기 위해) 공여자로부터 분리된 PBSC 풀로부터 유래하는 PBSC 일부를 제거하는 작업, 또는 PBSC 풀의 제조, 처리 및/또는 보관시 진행되는 기타 통상의 단계들(예컨대 밀도 구배 분리, 세포 선별, 원심분리 및 동결보존(이에 한정되는 것은 아님))은, 여전히 "최소한으로 조작된" PBSC 풀을 만든다. 특정 양태에서, 공여자(예컨대 동일단배체 공여자)로부터 분리된 PBSC 풀은, 대상체에 투여되기 전 PBSC 풀로부터 유래하는 세포(예컨대 $\gamma \delta$ T 세포(이에 한정되는 것은 아님))의 특정 군집을 농축 및/또는 고갈하는 방법이나

절차의 대상이 되지 않는다.

- [0025] 본원에 사용된 바와 같이, "-이 고갈된"이란 용어는, 세포 군집 중 특정 유형의 세포 수나 농도가 (예를 들어 특정 조작 또는 절차의 결과로서) 처음의 원래 수준으로부터 감소하여, 더 낮은 제2의 수준이 된 경우를 의미한다. 상기 용어는 특정 유형의 세포가 세포 군집으로부터 완전히 제거되는 것을 요구하지 않는다. 일례로서, 만일 대상체에 투여된 조성물 중 $\alpha\beta$ T 세포의 수나 농도가 (예컨대 공여자로부터 수득된 PBSC의 풀 중에) 원래 존재하던 $\alpha\beta$ T 세포의 수나 농도에 비하여 감소하였다면, T 세포 군집은 $\alpha\beta$ T 세포가 "고갈된" 것이다.
- [0026] 본원에 사용된 바와 같이, "-이 농축된"이란 용어는, 세포 군집 중 특정 유형의 세포 수나 농도가 (예를 들어 특정 조작 또는 절차의 결과로서) 처음의 원래 수준으로부터 증가하여, 더 높은 제2의 수준이 된 경우를 의미한다. 일례로서, 만일 대상체에 투여된 조성물 중 $\gamma\delta$ T 세포의 수나 농도가 (예컨대 공여자로부터 수득된 PBSC의 풀 중에) 원래 존재하던 $\gamma\delta$ T 세포의 수나 농도에 비하여 증가하였다면, T 세포 군집은 $\gamma\delta$ T 세포가 "농축된" 것이다.
- [0027] 일반적 설명
- [0028] 주입된 공여자 림프구의 대부분(약 80%)은 T 세포이다(주입된 다른 세포는 B 세포 및 NK 세포임). T 세포는, 보조적인 역할들에 기여하는 것으로 예측되는 B 세포 및 NK 세포와 함께, 이식 후 면역 현상(줄기 세포 생착, GvHD, GVT 및 면역 재구성)에서 핵심 역할을 담당하는 세포인 것으로 보인다(1,7). T 세포의 대부분(약 95%)은 알파-베타 T 세포 수용체($\alpha\beta$ TCR)를 운반하며; 이러한 T 세포는 알파-베타 T 세포($\alpha\beta$ T 세포)라 지칭된다. 낮은 비율의 T 세포는 상이한 T 세포 수용체($\gamma\delta$ -TCR)를 운반하며; 이러한 T 세포는 감마-델타 T 세포($\gamma\delta$ T 세포)라 지칭된다.
- [0029] $\gamma\delta$ T 세포는 항 종양 활성을 가지는 것으로 보인다. 이 $\gamma\delta$ T 세포는 새로운 암이 발병하여 진행되는 것을 예방하고, 또한 면역 감시 기능을 통해 감염을 막아주는 선천적 면역 계의 일부인 것으로 간주된다(8). 일반적인 T 세포 아형인 $\alpha\beta$ T 세포와는 달리, $\gamma\delta$ T 세포는 악성 세포를 사멸하기 위해 항원을 인식할 것을 필요로 하지 않는다(9). 그러므로 이 $\gamma\delta$ T 세포는 암에 대비하여 사용될 후보물질이었다(9). 선천적 면역 세포의 또 다른 유형인 NK 세포는 또한 항 종양 효과를 가질 뿐만 아니라, GvHD 발병 위험을 높이지 않으면서 HCT 이후에 면역 재구성을 촉진하는 것으로 보인다(10, 11).
- [0030] $\gamma\delta$ T 세포는 부분적 미스매칭 이식에서 GvHD 발병 위험을 높이지 않고 항백혈병 효과를 발휘하는 것으로 보인다(12, 13). 회고 분석에 있어서, 백혈병 무병 환자의 5년 생존율(LFS) 및 전체 생존율(OS)은, $\gamma\delta$ T 세포 수가 보통이거나 감소한 환자에 비하여, $\gamma\delta$ T 세포 수 증가와 함께 회복이 된 환자에서 더 높았다[각각 19% vs 54%($P < 0.0003$) 및 20% vs 71%($P < 0.0001$)]. 이러한 두 군에 있어서 GvHD의 발병률에는 차이가 없었다($P = 0.96$)(14). Handgretenger와 다수는, $\gamma\delta$ T 세포를 보존하기 위해 동일단배체 HCT와 함께 $\alpha\beta$ T 세포 고갈을 이용하였다. 이러한 연구들은, 신속한 면역 재구성과 함께 신속한 생착을 보였다(8, 15).
- [0031] 현재 동일단배체 이식 환자를 대상으로, 환자에게 최소한으로 조작된 이식편을 투여한 후, 이식 후 사이클로포스파미드(CY) 투여를 실시하는 제I기 임상시험이 진행되고 있다. 동일한 공여자로부터 유래하는 제2 이식편은 선택적으로 $\alpha\beta$ T 세포가 고갈되어 있으며, HSCT 후 7일 경과시 주입된다. 이 시점에 이르기까지 GvHD의 증거(evidence)를 보이지 않는 3명의 환자들이 연구 참가자로서 등록되었다.
- [0032] 항원 제시 세포(APC)에 의해 MHC 분자상에 제시되는 특이적 가공 펩티드 항원들을 인식하는 $\alpha\beta$ T 세포와는 달리, $\gamma\delta$ T 세포는 악성 세포에 의해 발현되는 다수의 MHC 유사 스트레스 유도성 자기 항원을 직접 인식하고 이에 반응하는 것으로 보인다. 그러므로 $\gamma\delta$ T 세포는, 기타 선천적 면역 세포, 예컨대 대식세포 및 NK 세포에 의해 공유되는 기능인, 항원으로 인한 프라이밍(priming)과 항원에의 사전 노출을 필요로 하지 않는, 특이성이 낮은 기작을 통하여 악성 세포를 인식할 수 있다(8).
- [0033] 인간 동종이계 이식 연구로부터 얻어지는 간접 증거 및 동물 연구는, $\gamma\delta$ T 세포가 동종생착(alloengraftment)을 촉진할 수 있다고 제시하고 있다. Blazar(23)는, 마우스 동종이계 이식 모델에서 공여 개체 $\gamma\delta$ T 세포가 T 세포 고갈(TCD) 공여 개체 골수의 생착을 촉진하는 것을 발견하였다. TCD C.B-17^{scid/scid} 공여 개체 골수가 B6 수컷 개체에 주입되기 전 3×10^6 개 이하의 $\gamma\delta$ T 세포로 보충되었을 때, 공여 개체의 키메라 현상은 약 40%까지 증가하였다. Drobyski는, C57BL/6 [H-2^b]-B1.BR[H-2^k] 미스매칭 마우스에서의 유사한 발견에 주목하였으며(24), 이후에는 생착을 촉진하는데 필요한 $\gamma\delta$ T 세포의 용량은 치사 마우스 GvHD를 유발하지 않았음을 보여주었다(25). Niepp(26)은, 치사 선량으로 방사선 조사된 래트(Wistar FurthWF-RTIA)가 1×10^8 개의 $\alpha\beta$ TCD 골수로

재구성되었던 래트 모델에서 유사한 발견을 보여주었다. 모든 동물들에서는 평균 $92 \pm 4\%$ 의 공여 개체 세포가 생착되었고, GvHD의 임상 증거는 보이지 않았다. $\alpha\beta$ TCD 이식편을 수여받은 환자와 pan-TCD 이식편을 수여받은 환자들을 비교하는 연구는 또한, 생착 시간이 더 짧은 이식편 중 클로닝가능한(clonable) $\gamma\delta$ T 세포들의 수 사이의 양의 연관성을 보여준다(27, 28).

[0034] $\gamma\delta$ T 세포는 GvHD를 발생시키지 않음

[0035] 마우스 대상 연구 및 인간 대상 연구 둘 다는, $\gamma\delta$ T 세포가 GvHD의 1차적 개시제가 아니고, 사실은 $\alpha\beta$ T 세포의 GvHD 활성을 조정할 수 있음을 제시하고 있다. Drobyski(25)는, 많은 용량만큼의 IL-2 증식 $\gamma\delta$ T 세포가, GvHD를 유발하지 않고, 치사 선량만큼 방사선 조사된 MHC-이질 마우스(C57BL/6 [H-2^b] a BIO.BR [H-2k] 및 C57BL/6 [H-2^b] a B6D2F1 [H-2^{b/d}])에 주입될 수 있었음을 보여주었다. Ellison(29)은, $\gamma\delta$ T 세포가 GvHD 반응에서 활성화되었음에 주목하였지만, GvHD가 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 개시되었다는 증거는 없었음을 발견하였다. 이 연구는 훗날, 활성화된 $\gamma\delta$ T 세포 및 처녀 $\alpha\beta$ T 세포가 함께 주입될 때에는 GvHD를 악화하였지만, $\alpha\beta$ T 세포 주입이 2주일까지 늦추어졌을 때에는 생존율 향상을 초래하였음을 보여주었던 훗날의 Drobyski(25)에 의한 연구와 일치하는 것이다. 인간 대상 연구에 있어서, Schilbach(30) 및 Lamb(31)은, 시험관 내 동종이계 혼합 림프구 배양 중 $\gamma\delta$ T 세포가 실질적으로 활성화되지 않았음을 발견하였다. 몇몇 BMT 후 연구들은 $\gamma\delta$ T 세포가 일시적으로 증가하는 것을 보여주었지만(32-34), 이러한 발견은 GvHD와 연관되어 있지 않으며, Tsuji(35)는, $\gamma\delta$ T 세포가 병변에 새로 공급되어 CD4+ $\alpha\beta$ T 세포에 의해 활성화될 수 있었음을 발견하였다. $\alpha\beta$ TCD 이식편을 수여받은 환자들의 결과들과, pan-TCD 이식편을 수여받은 환자들의 결과들을 비교하는 몇몇 연구들은 모두, $\alpha\beta$ TCD 수여 군에 있어서 GvHD 발병율이 더 낮았음을 보여주고 있는데, 이는 이식편에 $\gamma\delta$ T 세포가 주입되면 환자의 GvHD 발생 위험은 증가하지 않음을 암시하는 것이다(36, 37). 그러나 $\gamma\delta$ T 세포가 실제로 GvHD 진행에 기여할 가능성이 더 낮은지 여부는 아직 시험되지 않았다.

[0036] ALL 또는 AML에 대한 BMT 이후 첫 해에 $\gamma\delta$ T 세포의 자발적 증가가 진행된 환자 25명으로부터 구한 6년간의 생존율 데이터는, 유사 위험군 환자의 생존율에 비한 무병 생존율(DFS)의 유의미한 향상을 보여준다(ALL 환자에 대해서는 $p = 0.009$ 이고, AML 환자에 대해서는 $p = 0.045$ 임)(12, 38). 본 연구로부터 얻은 발견은, 생존 환자에 있어서 종종 수년 동안 $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ T 세포 수의 지속적 증가였다. $\alpha\beta$ T 세포 고갈 이식편을 수여받은 환자들은, OKT3, 즉 pan T 세포 모노클로날 항체가 고갈된 이식편을 수여받은 환자들보다 $\gamma\delta$ T 세포 수가 증가할 가능성과, 이처럼 증가한 상태가 지속될 가능성이 더 컸기 때문에, 세포의 지속성은 T 세포 고갈 방법에 의존적이다($p = 0.05$)(38).

[0037] T 세포 포만 HCT의 주입 후 수 일 이내에 CY가 투여되면, 공여자와 숙주 둘 다의 동종반응성 T 세포는 고갈되므로, GvHD와 이식편 거부 둘다가 각각 억제된다(17 ~ 21). 고 용량 CY는 증식성 동종반응성 T 세포를 고갈시켜, 비 증식성(비활성) T 세포를 야길 수 있다는 가설이 세워져있다(21). 동일단배체 HCT를 수행한 후에 행하여진, 이식 후 사이클로포스파미드의 사용은 존스 홉킨스 대학교(Johns Hopkins University) 및 프레드 허친슨 암 연구 센터(Fred Hutchinson Cancer Research Center)에서 연구자들에 의해 고무적인 결과들을 보여주었다(22). 이 접근법에 있어서 가장 불행한 결과는, 1년 내 재발율이 51%로 여전히 높았다는 점이었다(23). 골수 이식 임상 시험 네트워크(Bone Marrow Transplant Clinical Trials Network; BMT-CTN)는, 동일단배체 HCT의 동일한 접근법을 사용하여 임상 시험(CNT 0603)을 수행하였는데, 이 경우 보고된 재발율은 45%였다(24). 그러므로 동일단배체 HCT에서 이 접근법이 사용되었을 때 GvHD는 감소되었지만, 여전히 높은 재발율(45% ~ 51%)을 보였고, 이는 여전히 해결되어야 할 과제로서 남아있다. 증가한 재발 위험은 효과적인 이식편 대 종양 효과의 부재로 말미암을 수 있다. 이식편 대 백혈병(GVL) 효과는 이러한 상태에서 오로지 항 종양 효과만에 해당하므로, 비 골수 파괴 치료계획이 사용될 때 특히 확실한 결과가 도출된다.

[0038] HSCT의 방법

[0039] 본 발명은 HSCT의 방법들을 제공한다. 하나의 구현 예에서, 본 발명은 생체 내 T 세포 고갈 방법(예컨대 이식후 사이클로포스파미드 투여)과, $\alpha\beta$ T 세포 고갈 및 $\gamma\delta$ T 세포 증식의 생체 외 방법(예컨대 CLINIMACS[®] System 사용)의 병행이 이용되는 HSCT의 방법을 제공한다. 생체 내 T 세포 고갈(예컨대 최소한으로 조작된 줄기 세포 이식편의 주입 후 CY 주입)은 (생체 내) 동종 반응성 T 세포를 고갈시키는데, 그렇지 않을 경우 GvHD 위험이 높아질 것이다. 생체 외 증식/활성화된 $\gamma\delta$ T 세포 제품은 선택적으로 $\alpha\beta$ T 세포가 고갈될 것이지만, 또한 NK 세포의 2차 군집을 포함하기도 할 것이다.

[0040] 하나의 구현 예에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를

대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포는 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 T 세포들을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0041] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 최소한으로 조작된 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포는 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 T 세포들을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계로서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 군집인 단계를 포함한다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 당일에 PBSC를 포함하는, 최소한으로 조작된 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; ii) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; iii) $\gamma \delta$ T 세포 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 및 iv) $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계로서, $\gamma \delta$ T 세포의 증식된 군집은 $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 군집인 단계를 포함한다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하기 위한 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하도록 최소한으로 조작된 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) 선택적으로 $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하기 위한 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 HSCT 방법은 i) 동일단배체 공여자로부터 PBSC 풀을 수득하는 단계; ii) PBSC 풀을, PBSC 생성물을 제공하도록 최소한으로 조작된 PBSC의 제1 부와, $\gamma \delta$ T 세포가 농축되었고, $\alpha \beta$ T 세포는 고갈된 $\gamma \delta$ T 세포 제품을 제공하도록 조작된 PBSC의 제2 부로 나누는 단계; iii) 당일에 PBSC 생성물을 포함하여 조혈 줄기 세포 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계; iv) 생체 내 T 세포 고갈을 초래하는 제제를 대상체에 투여하는 단계; v) $\gamma \delta$ T 세포 제품 중 $\gamma \delta$ T 세포의 군집을 생체 외에서 증식시키는 단계; 그리고 vi) $\gamma \delta$ T 세포 제품을 포함하여 제2 이식편 주입제를 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0048] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 당일에 동일단배체 PBSC 주입을 대상체에 실시한 다음, 7일후 내지 25일후에 $\gamma \delta$ T 세포 주입을 실시하는 단계를 포함한다.

[0049] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함한다.

[0050] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는

단계를 추가로 포함한다.

- [0051] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0052] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0053] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 (i) 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계; (ii) 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는 단계; (iii) 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계; 및 (iv) 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계 중 적어도 2가지의 병행을 추가로 포함한다.
- [0054] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 (i) 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계; (ii) 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는 단계; (iii) 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계; 및 (iv) 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계 중 적어도 3가지의 병행을 추가로 포함한다.
- [0055] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 방법은 (i) 당일 이전에 예비적 화학요법 치료계획을 진행하는 단계; (ii) 당일 이후에 T 세포 고갈 프로토콜을 진행하는 단계; (iii) 당일 이후에 GvHD 예방적 치료계획을 진행하는 단계; 및 (iv) 당일 이후에 성장 인자를 투여하는 단계 각각의 병행을 추가로 포함한다.
- [0056] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, HSCT의 전술된 방법은 주입된 공여자 T 세포의 유리한 효과 (생착, 면역재구성 및 GvT를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아님)를 최대화할 것이다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 또 다른 구현 예에서, HSCT의 전술된 방법은 주입된 T 세포의 유해한 현상(예컨대 GvHD(이에 한정되는 것은 아님))을 최소화할 것이다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 또 다른 구현 예에서, 상기한 바의 조합이 본 방법에 의해 달성된다.
- [0057] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, PBSC 이식편은 동일단배체 공여자로부터 수집되고, 세포 생성물은, (HSCT에서 표준적인 바와 같이) 이식 당일에 제공될 최소한으로 조작된 HCT 생성물과, 이식 후 25일 이내, 예를 들어 하나의 구현 예에서는 이식 후 3일 이후에 제공될 $\gamma \delta T$ 세포 제품으로 나누어진다. 본 발명의 방법들이 사용되면, 급속한 면역 억제 경감을 동반하며 GvHD를 유발하는 동종 반응성 T 세포의 이식 후 감소가 일어난 후 (주입을 통한) $\gamma \delta T$ 세포의 면역 증강(boosting)은, 동일단배체 HCT 이후 혈액학적 악성종양의 재발 위험을 감소시킬 것이다.
- [0058] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 동일단배체 조혈 줄기 세포 이식편 주입에 주입되는 PBSC의 수는 당 업계에 공지된 바와 같다. 주입될 세포 수의 선택은 당 업계에 공지된 바와 같은 다수의 요인들, 예컨대 치료될 질병이나 병태, 그리고 대상체의 상태(이에 한정되는 것은 아님)에 의존적일 수 있다.
- [0059] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 5×10^8 개 이하의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 1×10^7 개의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 5×10^6 개 이하의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 1 kg당 5×10^8 개 이하의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 1 kg당 1×10^7 개의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 1 kg당 5×10^6 개 이하의 $\gamma \delta T$ 세포가 제2 이식편 주입제에 주입된다. 주입될 세포 수의 선택은, 당 업계에 공지된 바와 같은 다수의 요인들, 예컨대 치료될 질병이나 병태, 그리고 대상체의 상태(이에 한정되는 것은 아님)에 의존적일 수 있다.
- [0060] 하나의 구현 예에서, 제2 이식편 주입제 또는 $\gamma \delta T$ 세포 제품은 $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상 함유한다. 하나의 구현 예에서, 제2 이식편 주입제 또는 $\gamma \delta T$ 세포 제품은 $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상, 그리고 $\alpha \beta T$ 세포를 5% 이하 함유한다. 하나의 구현 예에서, 제2 이식편 주입제 또는 $\gamma \delta T$ 세포 제품은 $\gamma \delta T$ 세포를 60% 이상, $\alpha \beta T$ 세포를 5% 이하, 그리고 NK 세포를 25% 이하 함유한다.
- [0061] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 발명의 방법은 HSCT가 사용되는 임의의 병태와 연계되어

수행될 수 있다. 상기된 양태들 중 임의의 것의 또 다른 구현 예에서, 병태는 (i) 전국 종합 암 네트워크(National Comprehensive Cancer Network; NCCN) 또는 기타 표준 가이드라인에 따라서 동종이계 이식의 표시 징후를 보이는 환자로서, 다음과 같은 혈액학적 신생물 질환, 즉 (a) 위험 소견(risk feature)이 심각한 급성 림프아구성 백혈병[ALL]²⁵, 즉 재발성 질병(재발성 ALL); (b) 호지킨 림프종²⁶ 또는 비호지킨 림프종²⁷[HL 또는 NHL]: 완화 지속 기간이 1년 미만이거나, 앞서 자가조직 이식이 수행된 후 재발되거나, 화학요법에 대해 완전 반응(CR)을 달성하지 못한 재발성 질병; 그리고 (c) 골수성 악성종양(예컨대 (NCCN 기준에 따른) 위험 소견이 중간인/심각한 급성 골수성 백혈병[AML]²⁸, 즉 재발성 질병이거나, 또는 혈액학적 완화 상태 또는 만성기에 있는 만성 골수성 백혈병[CML]²⁹)이 발병한 환자, (ii) 골수성 질환(예컨대 위험 소견이 중간인/심각한 골수이형성 증후군[MSD]³⁰ 또는 난치성 질병 또는 골수증식성 질환; 위험 소견이 심각하면 원발성 또는 속발성 질병, 또는 난치성 질병)³¹, 그리고 (iii) 기타 병태, 예컨대 성상세포종, ATRT(비정형 유기형 간상 종양; Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor), 뇌간 신경교종, 맥락종 종양, 암종 및 유두종, 두개인두종, 영아의 결합조직형성 성상세포종, 생식 세포 종양, 수모세포종, 신경섬유종증, 편지교종, 시신경교종, 신경아세포종, 유잉(Ewing) 육종 및 PNET(원시신경외배엽종양)(이에 한정되는 것은 아님) 중 하나로부터 선택된다.

[0062] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 발명의 방법은 예비적 화학요법 치료계획과 연계되어 수행될 수 있다. 하나의 구현 예에서, 예비적 화학요법 치료계획은 당 업계에 공지된 임의의 치료계획이다. 다른 구현 예에서, 예비적 화학요법 치료계획은 다음과 같은 것들(각각은 본원의 방법 섹션에 기술되어 있음), 즉 (i) 골수성 질병에 대하여 수행될 수 있는, 플루다라빈/부설판/전신 방사선 조사 예비적 요법; (ii) 중대 동반 질환이 발병하지 않은 40세 이하 연령의 환자에 있어서 ALL 또는 공격성 NHL 또는 HL의 경우에 진행될 수 있는, 전신 방사선 조사/사이클로포스파미드(TBI/CY) 예비적 치료계획; 또는 (iii) 40세 보다 윗 연령대 중 임의의 연령대의 환자로서, 중대 동반질환이 발병한 환자있어서, 고농도/고선량 Cy/TBI로 인해 비 재발 사망률 상승의 전조를 보이는 ALL 또는 림프종의 경우 진행될 수 있는, 플루다라빈/TBI 예비적 치료계획 중 하나이다.

[0063] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 발명의 방법은 생체 내 T 세포 고갈 프로토콜과 함께 병행된다. 하나의 구현 예에서, 당 업계에 공지된 이러한 임의의 프로토콜이 이용될 수 있다. 하나의 구현 예에서, T 세포 고갈 프로토콜은 1일후와 10일후 사이에 수행되는 사이클로포스파미드 치료법이다. 하나의 구현 예에서, T 세포 고갈 프로토콜은 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법이다. 하나의 구현 예에서, T 세포 고갈 프로토콜은 3일후와 4일후에 30 mg/kg 내지 70 mg/kg 또는 50 mg/kg으로 수행되는 사이클로포스파미드 치료법이다.

[0064] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, GvHD 예방적 치료계획이 진행된다. 하나의 구현 예에서, GvHD 예방적 치료계획은 당 업계에 공지된 임의의 계획이다. 다른 구현 예에서, GvHD 예방적 치료계획은 사용될 제제들, 즉 면역 계 억제제를 초래하는 제제들 하나 이상의 농도 감소 및/또는 이러한 제제들의 가짓 수 감소를 제공한다. 다른 구현 예에서, GvHD 예방적 치료계획은 다음과 같은 치료계획들, 즉 (i) 5일후를 시작으로 35일 후까지 CELLCEPT[®](마이코페놀레이트 모페틸) 15 mg/kg씩 1일 3회 경구(PO) 투여(최대 1일 용량 = 3 gm)[환자의 신뢰할만한 PO 섭취가 확립될 때까지 전문의의 판단에 따라서 정맥 내 투여용 제제가 사용될 수 있음. 타크롤리무스는 5일후를 시작으로 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입되다가(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음), PO 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환될 것임. 타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여되며, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후에 이를 때까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단될 수 있음]; (ii) 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음) → PO 섭취가 관용될 때, 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단 될 수 있음]; 또는 (iii) 5일후를 시작으로 타크롤리무스 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입(다만 이 경우 용량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음) → PO 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환[타크롤리무스는 50일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 100일후까지 투여 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여 중단될 수 있음] 중 하나이다.

[0065] 상기된 양태들 중 임의의 것의 하나의 구현 예에서, 본 발명의 방법은 성장 인자 치료법과 연계하여 수행될 수 있다. 하나의 구현 예에서, 임의의 성장 인자 치료법의 치료계획이 진행될 수 있다. 다른 구현 예에서, 성장 인자는 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)이다. 다른 구현 예에서, G-CSF는 5일후부터 약 20일후까지, 또는 5일후부

터 약 15일후까지 투여된다. 다른 구현 예에서, G-CSF는 이식 후 5일 경과시 호중구가 생착될 때까지 5 mcg/kg 투여된다.

[0066] 실시 예

[0067] 실시 예 1 - $\alpha\beta$ T 세포 고갈

[0068] $\alpha\beta$ T 세포 고갈을 위한 방법들이 당 업계에 공지되어 있으며, 당 업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 하나의 구현 예에서, 다음과 같은 $\alpha\beta$ T 세포 고갈 방법이 사용된다. $\alpha\beta$ T 세포 고갈을 위해 CLINIMACS[®] 장치가 α/β TCR 시약 키트 및 기타 연관된 시약들과 함께 사용된다. CLINIMACS[®] α/β TCR 시약은 $\alpha\beta$ 세포에 특이적인 멸균 모노클로날 항체 시약이다. $\alpha\beta$ T 세포의 고갈은 제조자의 지침에 따라서 이미 기술된 바와 같이 수행될 것이다(16). 요약하면, 백혈구분리반출/생체 외 증식된 생성물은, 자성 입자와 접합된 적당한 항체와 함께 항온 처리된 다음, CLINIMACS[®] 장치(Miltenyi Biotec)가 사용되어 처리된다. CLINIMACS[®] 플러스 기구는 소프트웨어에 의해 제어되는, 혈액 시료(세포 생성물) 처리 기구이다. CLINIMACS[®] 튜빙 세트는 등록 상표가 붙은 세포 선별 컬럼을 가지는 것으로서, 한번 사용하고 폐기되는 1회용 멸균 튜빙 세트이다. CLINIMACS[®] PBS/EDTA 완충액은 멸균의 등장성인 인산염 완충 1 mM EDTA 식염수 용액으로서, 외부 세척용으로, 그리고 혈구의 시험관 내 제조를 위한 이송 유체로 사용된다.

[0069] 실시 예 2 - 생체 외 $\gamma\delta$ T 세포 증식

[0070] $\gamma\delta$ T 세포 증식을 위한 방법들이 당 업계에 공지되어 있으며, 당 업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 하나의 구현 예에서, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)가 말초 혈액 채혈 또는 백혈구분리반출술을 통해 수득된다. PBMC 생성물은 밀도 $1 \sim 2 \times 10^6$ 개/ml가 되도록 배양액에 첨가되며, 이때 2mM ZOMETA[®](Novartis, Inc.; 졸레드론산), 100u/ml 인터루킨-2(IL-2 Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, GERMANY), 단핵구의 부착을 허용하는 생물반응기 시스템(예컨대 조직 배양 플라스틱 시스템 또는 PRODIGY[®] 생물반응기 시스템(Miltenyi Biotec)) 또는 적당한 GMP-등급의 베이스 배지 배양액이 첨가된다. 배양 개시 후 14일 경과시 세포가 수집되고, 이로부터 $\alpha\beta$ T 세포가 고갈된다.

[0071] 바람직하게 다음과 같은 $\alpha\beta$ T 세포 고갈 방법이 사용된다. $\alpha\beta$ T 세포 고갈을 위해 PRODIGY[®] 또는 CLINIMACS[®] 장치가 α/β TCR 시약 키트 및 기타 연관된 시약들과 함께 사용된다. CLINIMACS[®] α/β TCR 시약은 $\alpha\beta$ 세포에 특이적인 멸균 모노클로날 항체 시약이다. $\alpha\beta$ T 세포의 고갈은 제조자의 지침에 따라서 이미 기술된 바와 같이 수행된다(16). 요약하면, 백혈구분리반출/생체 외 증식된 생성물은, 자성 입자와 접합된 적당한 항체와 함께 항온 처리된 다음, PRODIGY[®] 또는 CLINIMACS[®] 장치(Miltenyi Biotec)가 사용되어 처리된다. CLINIMACS[®] 플러스 기구는 소프트웨어에 의해 제어되는, 혈액 시료(세포 생성물) 처리 기구이다. PRODIGY[®] 또는 CLINIMACS[®] 튜빙 세트는 등록 상표가 붙은 세포 선별 컬럼을 가지는 것으로서, 한번 사용하고 폐기되는 1회용 멸균 튜빙 세트이다. CLINIMACS[®] PBS/EDTA 완충액은 멸균의 등장성인 인산염 완충 1 mM EDTA 식염수 용액으로서, 외부 세척용으로, 그리고 혈구의 시험관 내 제조를 위한 이송 유체로 사용된다.

[0072] 실시 예 3 - 임상 연구

[0073] 환자들이 본 연구에 등록되기 위해서는 모든 적격성 기준을 만족시켜야 하고, 배제 기준에 의해 배제되어서는 안된다.

[0074] 적격성 기준

[0075] 본 연구에 대한 적격성 기준은 다음과 같다:

[0076] (i) 전국 종합 암 네트워크(National Comprehensive Cancer Network; NCCN) 또는 기타 표준 가이드라인에 따라서 동종이계 이식의 표시 징후를 보이는 환자로서, 다음과 같은 혈액학적 신생물 질환, 즉 (a) 위험 소견이 심각한 급성 림프아구성 백혈병[ALL]²⁵, 즉 재발성 질병; (b) 호지킨 림프종²⁶ 또는 비호지킨 림프종²⁷ [HL 또는 NHL]: 완화 지속 기간이 1년 미만이거나, 앞서 자가조직 이식이 수행된 후 재발되거나, 화학요법에 대해 완전 반응(CR)을 달성하지 못한 재발성 질병; 그리고 (c) 골수성 악성종양(NCCN 기준에 따른) 위험 소견이 중간인/

심각한 급성 골수성 백혈병[AML]²⁸, 즉 재발성 질병이거나, 혈액학적 완화 상태 또는 만성기에 있는 만성 골수성 백혈병[CML]²⁹)이 발병한 환자;

[0077] (ii) 골수성 질환(위험 소견이 중간인/심각한 골수이형성 증후군[MSD]³⁰ 또는 난치성 질병 또는 골수증식성 질환; 위험 소견이 심각하면 원발성 또는 속발성 질병, 또는 난치성 질병)³¹;

[0078] (iii) 적합 HLA 매칭 공여자를 찾을 수 없음;

[0079] (iv) 연령 기준: 19세에서 65세

[0080] (v) 장기 기능 기준: 연구 등록 전 35일 이내에 하기와 같은 장기 기능 검사가 수행되어야 함: (a) 심장: MUGA 또는 심장초음파검사에 의하면 LVEF가 50% 이상이어야 하고; (b) 폐: FVC, FEV1 및 DLCO(교정치)는 예상치의 50% 이상이어야 하며; (c) 신장: 혈청 크레아티닌 수치 2 mg/dl 미만이거나, Cockcroft-Gault 식에 의해 산정된 바에 의하면 크레아티닌 청소율 산정치(CrCl)가 40 ml/min/1.73 m²이어야 하고; (d) 간: 혈청 빌리루빈 수치는 정상가의 상한치(ULN)×1.5 이하이고, 아스파르트산염 트랜스아미나제(AST)/알라닌 트랜스아미나제(ALT)는 ULN ×2.5 이하이며, 알칼리 포스파타제는 ULN×2.5 이하이어야 함;

[0081] (vi) 수행도: Karnofsky ≥ 70%; 및

[0082] (vii) 동의: 모든 환자들은 본 연구에 관한 연구 논문의 본질을 고지받아야 하고, 기관 및 연방정부의 가이드라인에 따라서 서면 사전동의서를 제공받아야 함.

[0083] 제외 기준

[0084] 이하 제외 기준이 적용될 수 있다:

[0085] (i) 투약에 대해 순응하지 않는 경우;

[0086] (ii) 적당한 관리인(caregiver)이 확인되지 않는 경우;

[0087] (iii) 환자가 임상 연구를 진행하는 것을 방해할 수 있는 불가항력적 질병 또는 정신 질환을 앓고있는 경우(임상 연구 참여 전문의의 판단에 의함);

[0088] (iv) 활성 중추신경계(CNS) 신생물이 관여되어 있는 경우;

[0089] (v) DMSO에 대해 공지된 알레르기 반응을 보이는 환자;

[0090] (vi) HIV1(인간 면역결핍 바이러스-1) 또는 HIV2 양성인 경우; 그리고

[0091] (vii) 임신중이거나 수유중인 경우.

[0092] 이하 공여자 적격성 기준도 또한 충족되어야 할 것이다:

[0093] (i) HLA 형별 검사(고 해상 형별 분류에 따라 A, B, C 및 DRB1으로 분류됨)

[0094] (ii) 적합 공여자 - 즉 공여 가능성이 의학적으로 명백히 확인된 공여자; 그리고

[0095] (iii) 적격 공여자 - 감염성 질병의 전염과 관련된, 공여자 스크리닝 및 시험 조건을 모두 충족하는 공여자.

[0096] 연구 치료법

[0097] 예비적 화학요법 치료계획

[0098] 개시된 방법은 다양한 병태를 치료하기 위해 수행될 것이다. 치료될 병태에 따라서 하기 예비적 치료계획들 중 하나가 진행될 것이다.

[0099] 골수 질환의 경우, 플루다라빈/부설판/전신 방사선 조사 예비적 요법이 적용된다. 이 치료계획은 변형된 플루다라빈 + 부설판 예비적 치료계획이다. 골수 파괴 플루다라빈 + 부설판 치료계획이 진행될 때, 부설판의 총 용량은 일반적으로 AUC(농도 곡선 하 면적) 20,000을 달성하는 것을 목표로 한다. 프로토콜은 이식후 CY를 첨가하는 것이므로, 치료계획 관련 독성이 최소화되기 위해서 부설판의 목표 용량은 16,000 AUC로 감소할 것이다. 기관의 가이드라인에 따라서 부설판에 의한 발작 예방 약물이 투여될 것이다. 생착이 허용되도록 적당한 면역 억제가 달성되기 위해서는 TBI 400 cGy(200 cGy×2)이 실시될 것이다. 3일후 및 4일후에 이식 후 CY 투여도 또한 50 mg/kg씩 이루어질 것이다. 기관의 가이드라인에 따라서 환자들에게는 출혈성 방광염 예방을 위해 수화 및 MESNA

(신장 보호를 위해 사이클로포스파미드 및 이포스파미드가 사용되는 암 화학요법에서 보조제로 사용되는 유기 황 화합물)가 적용/투여될 것이다. 치료계획은 이하에 추가로 기술되었으며, 도 1에 도시되어 있다.

- [0100] 7일전: 부설관 60 mg IV(AUC에 대한 PK 16,000인 시험 용량)
- [0101] 6일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0102] 5일전: 부설관 PK 유도 IV 투여(확증적 PK), 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0103] 4일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0104] 3일전: 부설관 PK 유도 IV 투여, 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0105] 2일전: 부설관 PK 유도 IV 투여
- [0106] 1일전: 부설관 PK 유도 IV 투여(첨언: 현재의 프로토콜과 상이할 경우, 본 발명자들은 이하 그래프를 다시 작성할 것임)
- [0107] 당일: TBI 200 cGy 2회 실시(총 선량 400 cGy) → 이식
- [0108] 3일후: CY 50 mg/kg IV
- [0109] 4일후: CY 50 mg/kg IV
- [0110] 전신 방사선 조사/사이클로포스파미드(TBI/CY) 예비적 치료계획이 ALL 또는 공격성 NHL 또는 HL 환자들(연령 40세 이하, 중대 동반질환 무)을 대상으로 진행될 것이다. 이러한 환자들에 대한 표준적 골수 파괴 치료계획은 TBI 1,200 cGy 및 CY 60 mg/kg(2일)이다. 본 연구에서, TBI 선량은 동일하게 적용될 것이지만, 이식전 CY 용량은 2일전에 20 mg/kg으로 감소할 것이고, 이식 후 CY 용량은 3일후와 4일후에 50 mg/kg으로 감소할 것이다. 그러므로 본 치료계획에서 CY의 전신 투여 용량은 바뀌지 않는다. 기관의 가이드라인에 따라서 환자들에게는 출혈성 방광염 예방을 위해 수화 및 MESNA가 적용/투여될 것이다. 본 치료계획은 이하에 추가로 기술되었으며, 도 2에 도시되어 있다.
- [0111] 5일전: 회차당 TBI 200 cGy(총 2회차 실시)
- [0112] 4일전: 회차당 TBI 200 cGy(총 2회차 실시)
- [0113] 3일전: 회차당 TBI 200 cGy(총 2회차 실시)
- [0114] 2일전: CY 20 mg/kg IV
- [0115] 1일전: 휴식
- [0116] 당일: 이식
- [0117] 3일후: CY 50 mg/kg IV
- [0118] 4일후: CY 50 mg/kg IV
- [0119] 플루다라빈/TBI 예비적 치료계획이 고농도/고선량 Cy/TBI로 인해 비 재발 사망률(NRM) 상승의 전조를 보이는 ALL 또는 림프종을 대상으로, 환자들(40세 보다 윗 연령대 중 임의의 연령대의 환자로서, 중대 동반질환이 발생하지 않은 환자)에서 진행될 것이다. 이 환자들에게 보통의 1,200 cGy가 조사되는 대신, 플루다라빈 40 mg/m²(4일) 및 TBI 800 cGy가 투여/적용될 것이다. 3일후와 4일후에 이식 후 CY 투여가 50 mg/kg으로 이루어질 것이다. 기관의 가이드라인에 따라서 환자들에게는 출혈성 방광염 예방을 위해 수화 및 MESNA가 적용/투여될 것이다. 본 치료계획은 이하에 추가로 기술되었으며, 도 3에 도시되어 있다
- [0120] 6일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0121] 5일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0122] 4일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0123] 3일전: 플루다라빈 40 mg/m² IV
- [0124] 2일전: 회차당 TBI 200 cGy(총 2회차 실시)
- [0125] 1일전: 회차당 TBI 200 cGy(총 2회차 실시)

- [0126] 당일: 이식
- [0127] 3일후: CY 50 mg/kg IV
- [0128] 4일후: CY 50 mg/kg IV
- [0129] 화학요법 용량 조정
- [0130] 화학요법의 약물 투여량은, 실제 체중이 표준 체중(IBW)에 못미치지 않는 한 조정 체중을 기반으로 결정될 것이다(이 경우, 본 발명자들은 실제 체중을 이용할 것임). 체중은 하기와 같이 산정된다:
- [0131] * 표준 체중(IBW):
- [0132] 남성: $IBW = 50 + ([(\text{신장(cm)} \times 0.39) - 60] \times 2.3)$
- [0133] 여성: $IBW = 45.5 + ([(\text{신장(cm)} \times 0.39) - 60] \times 2.3)$
- [0134] * 조정 체중 = $IBW + (\text{실제 체중} - IBW) \times 0.4$
- [0135] 공여자 선별, 동원 및 모집
- [0136] 알파/베타 고갈 공여자 백혈구 주입이 실시되는 환자를 위하여, 공여자는 기관의 절차에 따라서 동종이계 조혈 줄기 세포 공여에 대한 적격성과 적합성에 대해 스크리닝된다. 이식 전날 줄기 세포 수집(목표로 하는 CD34+ 세포 용량 = 수여자 체중 1kg당 5×10^6 개 초과 세포(4×10^6 개 세포/kg 초과))을 위하여, 적합하고 적격한 동일 단배체 공여자를 대상으로 말초혈액 분리반출법이 수행될 것이다. 알파/베타 T 세포 고갈을 위해 $\gamma \delta T$ 세포를 적어도 1×10^5 개/kg 함유하는 생성물의 일부는 제거될 것이며, 이때 이식 생성물 중 CD34 용량은 4×10^6 개 CD34+ 세포/kg 이하로 감소하지 않는다. 조각된 분획은 호중구 생착이 확인될 때까지 동결보존되어 보관될 것이다. 만일 CD34 용량이 4×10^6 개 세포/kg 이하로 감소하지 않으면서 $\gamma \delta T$ 세포 필요 용량이 얻어질 수 없으며/없거나 수집된 줄기 세포의 총 수가 5×10^6 개 세포/kg 미만이면, 해당 생성물은 추가 처리를 위하여 나누어 지지 않을 것이고, 환자는 본 연구에서 제외될 것이다. 만일 참가자가 생성물을 투여받기 전에 연구에서 제외된다면, 해당 참가자는 자신에게 배정된 예비적 치료계획에 따라서 이식 후 사이토산을 투여받을 것이고, 재발여부에 대해 지속적으로 추적 검사가 이루어질 것이다.
- [0137] 생체 외 증식된/활성화된 감마/델타 T 세포를 투여받은 환자를 위하여, 공여자는 기관의 절차에 따라서 동종이계 조혈 줄기 세포 공여에 대한 적격성과 적합성에 대해 스크리닝될 것이다. 이식하기 8 ± 1 일 전 줄기 세포 수집을 위하여, 적합하고 적격한 동일단배체 공여자를 대상으로 말초혈액 분리반출법이 수행될 것이다. 이 생성물은 세포 요법 생성물용으로서 디자인될 것이다. 이와 같이 수집한 후 공여자는 수집을 위해 동원될 것이다(목표 CD34+ 세포 용량 = 4×10^6 개 세포/kg 이상).
- [0138] 세포 제작
- [0139] $\gamma \delta T$ 세포 증식 프로토콜을 위하여, cGMP/cGMP 제작 프로토콜 하에 분류된 ISO 7 공간에 있는 표준적인 생물 안전 작업대 안에서 제작이 수행될 것이다. 공여자 분리반출 생성물은 $2 \mu M$ 졸레드로네이트(Novartis Oncology; East Hanover, NJ) 및 50 u/ml GMP 등급 IL-2(Miltenyi Biotec)와, 자기유래 혈청을 포함하거나 포함하지 않는 상업적 GMP등급 T 세포 증식 매질 중에 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ /ml로 재현탁될 것이다. 이 배양액은 14일 동안 원래 밀도로 유지되는데, 이때 배양후 2일, 6일 및 10일 경과시에는 IL-2 50 u/ml가 첨가되고, pH와 세포 밀도에 의해 측정되는 바에 따라 완전한 것으로 확인되는 배지가 첨가된다. 조성, 순도 및 생존도는 배양 개시 당일, 배양 개시 후 7일 및 14일 경과시 유동 세포계측법으로 측정된다. $\alpha \beta T$ 세포는 전술된 바와 같이, CLINIMACS[®], PRODIGY[®](Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 또는 기타 적합한 생물반응기/세포 분리 시스템이 사용되어 14일 \pm 3 일 경과시에 고갈된다. 최종 생존도 측정치는 To Pro 요오드 혼입 또는 기타 세포 생존도 염색 후 유동 세포계측법에 의해 구하여진다. 최종 생성물 주입에 허용 가능할 본 발명자들의 공개 기준은, $\gamma \delta T$ 세포 60% 이상, $\alpha \beta T$ 세포 5% 이하, 그리고 NK 세포 25% 이하이다. 주입용 생성물을 방출하기 위한 생존도는 70% 이상인 것으로 확인되어야 한다. 생존도가 70% 미만인 생성물은 예외적 방출을 필요로 할 것이다. 세포 생성물의 효능은 K562 세포에 대한 시험관 내 세포독성 검정이 사용되어 측정된다.
- [0140] 줄기 세포 주입

- [0141] 별도로 제공될 세포 생성물의 일부는 동결보존되므로, 연구 참가자들은 최소한으로 조작된 분획이 주입되는 동안 디메틸설폭사이드(DMSO)에 노출될 것이다. DMSO 독성은 동결보존된 생성물 투여시 일어날 수 있는 합병증이다. 부작용과 증상들은 일반적으로 히스타민 방출과 연관되어 있다. 징후들 및 증상들로서는 기침, 홍조, 발진, 흉부 압박감, 천명, 오심, 구토 및 심혈관 불안정성을 포함한다. DMSO에 대한 반응 위험을 줄이기 위해 표준 줄기 세포 주입시 예방대책이 취하여진다. 이러한 예방대책으로서 주입 속도 늦추기, 항히스타민제 사전 복용 및 투여시 지속적인 모니터링을 포함한다.
- [0142] 이식 후 CY 처리
- [0143] 이식 후 CY(50 mg/kg) 주입은 3일후 및 4일후에 이루어질 것이다. 기관의 가이드라인에 따라서 출혈성 방광염 예방을 위해 MESNA가 투여될 것이다.
- [0144] γ δ T 세포 주입
- [0145] γ δ T 세포 주입은 이식 후 7일 경과하였을 때로부터 호중구 생착이 확인된 후 3일 경과하였을 때 임의의 시점에 진행될 것이다. 이러한 타이밍은 완전히 CY가 씻겨 나간 후 γ δ T 세포 주입을 허용할 것이다. CY의 제거 반감기는 3시간 ~ 12시간이므로(LexiComp 단행본 논문), 5 반감기(60 시간) 이후에 예상 완전 청소(expected complete clearance)가 일어날 것이고, 그 다음에는 7일 경과시 γ δ T 세포 이식편의 기대 주입(anticipated infusion)이 이루어질 것이다. 생착은 통상 약14일 내지 약18일 후에 일어날 것으로 예상된다. 생성물 주입은 공여자 세포의 이식 후 주입을 위해 계획된 본 프로그램의 표준 순서에 따라서 수행될 것이다. 만일 7일 경과시 환자의 상태가 좋지 않으면(예를 들어 고열, 불안정한 혈압 또는 심각한 혈액량 과부하를 보이면), 연구 참여 전문의의 판단에 따라서 γ δ T 세포 주입은 2일 동안(즉 9일 경과시까지) 보류될 수 있다. 또한 만일 이식 후 CY 투여시 환자에서 신부전이 발생하면, 주입은 9일 경과시(즉 γ δ T 세포 주입전 CY가 청소되었음이 확인될 때)까지 늦추어질 수 있다.
- [0146] 주입 전략은 하기와 같을 것이다. 표준 3+3 제I기 증량 계획(escalation scheme)이 적용되면, 환자에는 고정 용량, 즉 1×10^7 개 γ δ T 세포/kg만큼이 투여될 것이다. 처음 3명의 환자를 대상으로는 전술된 바와 같이 완전 HSCT 후 면역억제 치료계획이 진행될 것이다. 각 군의 처음 환자를 대상으로는 90일 동안 관찰이 이루어질 것이며, 이후에는 다음 환자들이 차례로 프로토콜에 투입될 것이다.
- [0147] 예방법
- [0148] GvHD 예방법은 이식 후 CY 투여(이식 후 3일 및 4일 경과시 50 mg/kg IV)로 이루어질 것이다. 기타 GvHD 예방법은 필요에 따라서 마이코페놀레이트 모페틸(MMF, CELLCEPT[®]) 및 칼시뉴린 억제제, 예컨대 타크롤리무스를 포함할 것이다. 하나의 구현 예에서, 본 발명의 방법은 단축된 GvHD 예방적 치료계획을 허용한다.
- [0149] 하나의 구현 예에서, GvHD 치료계획은 하기와 같다. 5일후를 시작으로 35일후까지 CELLCEPT[®]가 15 mg/kg씩 1일 3회 PO 투여될 것이다(1일 최대 용량 = 3 gm). 전문의의 판단에 따라서 환자의 신뢰할만한 PO 섭취가 확립될 때까지 정맥 내 투여용 제제가 사용될 수 있다. 타크롤리무스는 5일후를 시작으로 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입되다가(다만 이 경우 투여량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음), 이후 PO 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환될 것이다. 타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 그 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여가 중단될 수 있다.
- [0150] 다른 구현 예에서, GvHD 치료계획은 하기와 같다. 타크롤리무스는 5일후를 시작으로 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입되다가(다만 이 경우 투여량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음), 이후 PO 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환될 것이다. 타크롤리무스는 100일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 180일후까지 그 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투여가 중단될 수 있다. 본 구현 예에 관한 하나의 양태에서, 상기 치료계획은, 만일 용량 제한 독성이 관찰되지 않는다면 앞선 문단에 기술된 치료계획과 함께 진행된다.
- [0151] 또 다른 구현 예에서, GvHD 치료계획은 하기와 같다. 타크롤리무스는 5일후를 시작으로 1일 0.03 mg/kg씩 IV 주입되다가(다만 이 경우 투여량은 동시에 섭취되는 의약품들과의 약물 상호작용에 대한 기준과 같이 조정될 수 있음), 이후 PO 섭취가 관용될 때 타크롤리무스 경구 투여로 전환될 것이다. 타크롤리무스는 50일후까지 계속 투여될 것이고, 이후 만일 활성 GvHD에 관한 증거가 없으면 100일후까지 그 용량은 점차 줄어들다가 중국엔 투

여가 중단될 수 있다. 본 구현 예에 관한 하나의 양태에서, 상기 치료계획은, 만일 용량 제한 독성이 관찰되지 않는다면 앞선 문단에 기술된 치료계획과 함께 진행된다.

[0152] 그러므로, 본 발명의 방법들이 사용될 때 최소한의 제제 및/또는 농도가 이용/적용되는 GvHD 예방법이 유리한 것으로 확인될 수 있으며, 이 GvHD 예방법은 본 발명의 방법들과 병행될 수 있다.

[0153] 기관의 가이드라인에 따라서 항진균, 항박테리아, PCP 및 항바이러스 요법에 의해 감염 예방법이 수행될 것이다. 약 20일후를 시작으로 환자에 면역억제가 일어날 때까지 계속해서 1주일마다 CMV 항원 스크리닝 또는 PCR 모니터링이 수행되면서 거대세포바이러스 예방 요법이 실시될 것이다. 약 20일후를 시작으로 환자에 면역억제가 일어날 때까지 계속해서 최소한 2주 간격으로 HHV6, EBV 및 아데노바이러스 PCR이 모니터링될 것이다.

[0154] 용량 증가에 관한 계획이 하기에 제공되어 있다.

코호트	대상체 수 (n; 명)	용량 제한 독성(DLT) 을 경험한 대상체 수 (명)	계획 진행 방식
-1 (코호트가 최대 내약 용량 (MTD) 초과를 보이면 등록만 하였을) $\gamma \delta$ T세포: 5×10^6 개 세포/kg MMF: 5일후 내지 35일후 45 mg/kg 타크롤리무스: 5일후를 시작으로 0.03 mg/kg/일 IV 투여 → 180 일후까지 경구 투여(다만, 100일후 부터 용량을 점점 줄여나감)	3	0 또는 1 2	계속 증량 최대 용량 초과, 시험을 중단하고, 전략을 재평가함
-1	6	1 또는 2 3 이상	코호트-1의 대상체 수를 총 10명으로 늘림 (코호트1이 MTD 초과를 보이면 등록만 함) 최대 용량 초과; 시험을 중단하고, 전략을 재평가함
1(개시 코호트) $\gamma \delta$ T세포: 1×10^7 개 세포/kg MMF: 5일후 내지 35일후 45 mg/kg 타크롤리무스: 5일후를 시작으로 0.03 mg/kg/일 IV 투여 → 180 일후까지 경구 투여(다만, 100일후 부터 용량을 점점 줄여나감)	3	0 1 2	다음 코호트까지 면역억제가 점점 약해짐. 계속 증량 최대 용량 초과; 코호트-1까지 용량 감소

[0155]

1	6	1 또는 2 3 이상	다음 코호트까지 진행 최대 용량 초과; 코호트-1까지 용량 감소
2 γ δ T세포: 1 x 10 ⁷ 개 세포/kg 타크롤리무스: 5일후를 시작으로 0.03 mg/kg/일 IV 투여 → 180일후까지 경구 투여(다만, 100일후부터 용량을 점점 줄여 나감)	3	0 1 2	다음 코호트까지 면역억제가 점점 약해짐. 계속 증량 최대 용량 초과; MTD는 코호트1에 대한 용량으로 서, 코호트1의 대상체 총10명에 대해 증량
2	6	1 또는 2 3 이상	다음 코호트까지 진행 최대 용량 초과; MTD는 코호트1에 대한 용량으로 서, 코호트1의 대상체 총10명에 대해 증량
3 γ δ T세포: 1 x 10 ⁷ 개 세포/kg 타크롤리무스: 5일후를 시작으로 0.03 mg/kg/일 IV 투여 → 100일후까지 경구 투여(다만, 50 일후부터 용량을 점점 줄여나감)	3	0 또는 1 2	계속 증량 최대 용량 초과; MTD는 코호트2에 대한 용량으로 서, 코호트 2의 대상체 총10명에 대해 증량
3	6	1 또는 2 3 이상	10명의 대상체에 대해 계속 증량 최대 용량 초과; MTD는 코호트2에 대한 용량으로 서, 코호트 2의 대상체 총10명에 대해 증량

[0156]

[0157] 관리 기준의 일환으로서 이식 후 5일 경과시부터 호중구 생착이 일어날 때까지 동일단배체 이식 환자들에 G-CSF가 5 mcg/kg씩 투여될 것이다.

[0158] 관찰

[0159] 하기 관찰이 모니터링될 것이다.

[0160] 이식 전 필요한 관찰: (연구 등록 전 35일 이내/이식 최종 평가일)

[0161] 1. 병력 및 신체 검사(Karnofsky 수행도 스코어 포함).

[0162] 2. CBC, BUN, 크레아티닌, AST, ALT, 총 빌리루빈.

[0163] 3. 심장초음파검사 또는 MUGA.

[0164] 4. 폐 기능 검사: FVC, FEV1, DLCO(헤모글로빈에 대해 교정).

[0165] 5. 일측성 골수 흡인 및 생검(급성 백혈병 환자), 형태학 및 세포유전학적 관찰.

[0166] 6. 병상 평가에 적당하다면 CT 스캔 또는 전신 CT/PET 스캔.

[0167] 7. ALL 환자를 대상으로는 요추 천자가 실시될 것이다. 연구 참여 전문의의 판단에 따라서 이식 전 초 내 치료법(들)이 수행될 수 있다.

[0168] 전술된 필요 관찰 이외에, 동종이계 이식 수여자들을 대상으로 이식 전 병력 기록을 위해 적당한 바와 같이 하기 절차의 수행이 권장된다: 감염성 질환 마커 검정(Hep A, Hep B, Hep C, HTLV, HIV, RPR, 웨스트 나일 바이러스(West Nile Virus), VZV, CMV, HSV, 톡소플라즈마 IgG, GM 검정); 임신 여부 확인; 신 기능 및 간 기능 실험실 패널링(paneling); 연령 40세 이상의 여성 환자를 대상으로 하는 유방조영술 검사; 연령 50세 이상의 환자를 대상으로 하는 대장내시경 또는 기타 적당한 GI 스크리닝 결과 검토; 연령 50세 이상의 남성 환자를 대상으로 하는 PSA 수치 검사; 치아 상태 검사; 그리고 비 악성종양 관련 동반질환 병태에 관한 검사 및 평가.

- [0169] 이식 후 필요한 관찰 및 후속 계획:
- [0170] 병상: 질병의 유형과 발병 위치에 의해 나타나는 바와 같이, 이식 후 병상 평가를 위해 적당한 시험이 수행될 것이다.
- [0171] 백혈병 환자: 형태학적 및 세포유전학적 검사를 위해 이식 후 30일(±7일), 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시, 임상적으로 안정하고, 해당 시점까지 질병의 진행을 보이지 않는 환자 모두를 대상으로 골수 흡인 및 생검 표본이 수집될 것이다. 또한, 재발이 의심되는 때라면 언제든지 일측성 골수 흡인물 표본이 수집될 것이다.
- [0172] 골수 관련 병력이 알려지지 않은 림프종 환자: 이식 후 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시, 임상적으로 안정하고, 해당 시점까지 질병의 진행을 보이지 않는 환자 모두를 대상으로 CT 스캔 또는 전신 CT/PET 스캔이 수행될 것이다.
- [0173] 골수 관련 병력이 있는 림프종 환자: 형태학적 및 세포유전학적 검사를 위해 임상적으로 안정하고, 해당 시점까지 질병의 진행을 보이지 않는 환자 모두를 대상으로 이식 후 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시, 적당하다면 CT 스캔 또는 전신 CT/PET 스캔이 수행될 것이고/수행될 것이거나, 이식 후 30일(±7일), 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시에는 골수 흡인물 표본 및 생검 표본이 수집될 것이다.
- [0174] 본 연구를 위하여, 재발은 질병(백혈병)의 형태학적 또는 세포유전학적 증거, 또는 진행성 림프종의 방사선학적 증거(PET 스캔에서 확인되는 플루오로데옥시글루코스[FDG]-아비드 병변의 재발 포함) 중 어느 하나에 의해 규정된다.
- [0175] BMT 표준 및/또는 임상학적으로 확인되는 바에 따라서 면역 재구성이 진행될 것이다. 본 실험의 권장 타이밍은 이식 후 30일(±7일), 60일(±7일), 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시이다. 이 패널은 CD3+, CD4+, CD8+, CD56+, CD 19+, Treg(CD4+/CD25+) 효과기/기억, 및 GD T 세포의 백분율과 절대 수의 측정을 포함할 것이다.
- [0176] 자연 생착 여부를 평가하기 위해 BMT 표준에 따라서 키메라 현상 연구가 수행될 것이다. 본 실험의 권장 타이밍은 이식 후 30일(±7일), 60일(±7일), 100일(±14일), 180일(±21일) 및 1년(±45일) 경과시이다.
- [0177] (공통 기준³²을 적용하여) 급성 GvHD를 확인하는 신체 검사를 받기 위해 환자들은 1주일에 적어도 한 번 이식 후 100일 경과시까지 클리닉을 방문하게 될 것이다. 그 다음, 만성 GvHD, 재발 또는 진행 징후 및 증상을 확인하는 신체 검사를 받기 위해 환자들은 1개월에 적어도 한 번 이식 후 1년 경과시까지 클리닉을 방문하게 될 것이다. 각 방문일에는 부작용 및 독성 모니터링이 수행될 것이다.
- [0178] 환자들은 이식 후 1년 경과시 심장 기능 검사(심장초음파 또는 MUGA 스캔), 폐 기능 검사(FVC, FEV1, DLCO), 그리고 내분비기관 기능 검사(TSH 및 유리 T4, 그리고 무작위 코르티솔 수치(random cortisol level)를 비롯한 갑상선 기능 검사)를 수행할 것이다. 이후에도 PFT는 매년 반복 수행될 것이다.
- [0179] 본 연구 기간은 조건화(conditioning) 개시시부터 이식 후 100일 경과시까지이다. 이식 후 적어도 2년 동안 환자를 대상으로 생존 여부 및 재발 여부에 대하여 추적 검사가 이루어질 것이다. 이후 추적 검사 간격 1년은 임상학적 필요에 따라서 결정된다. 이식 후 재발된 환자는 오로지 생존 여부에 대해서만 추적 검사가 이루어질 것이다.
- [0180] 화학요법 약물
- [0181] 시타라빈. 시타라빈(1-β-D-아라비노푸라노실시토신)은 정맥 내, 초 내 또는 피하 투여용 멸균 용액으로 사용되는 화학식 C₉H₁₃N₃O₅(M.W. 243.22)의 항신생물 약물이다. 기타 승인된 항암 약물과 함께 시타라빈이 주사되면, 성인 및 소아 환자에 있어서 급성 비 림프구성 백혈병 완화를 유도하는 것으로 보인다. 이 약물은 또한 급성 비 림프구성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 그리고 만성 골수구성 백혈병의 급성기 치료에 유용한 것으로 확인되었다. 시타라빈(보존제를 함유하지 않는 순수 제제)의 초 내 투여(주사)는 수막 백혈병의 예방 및 치료에 보인다. 시타라빈은 세포 기 특이성을 보이는데, 주로 DNA 합성이 진행중인 세포(S기 세포)와, G1기로부터 S기로의 세포주기 진행이 차단되는 임의의 병태가 발생한 세포를 사멸한다. 시타라빈의 작용 기작은 완전히 이해되어 있지는 않지만, DNA 중합효소를 억제함으로써 작용을 하는 것으로 보인다.
- [0182] 사이클로포스파미드(사이토산, CY). 사이클로포스파미드는 화학적으로 2-[비스(2-클로로에틸)아미노]테트라하이드로-2H-1,3,2-옥사자포스포린 2-옥사이드 일수화물로 인식되는 합성 항 신생물 약물이다. CY의 분자식은

$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2 \cdot H_2O$ (분자량 279.1)이다. 비경구 투여용 CY는, 직접 주사될 경우에는 0.9% 염화나트륨 용액에 첨가되어 제제화되어야 하고, 주입될 경우에는 멸균수에 첨가되어 제제화되어야 한다. 물로 구성될 경우 CY는 저장성이 되므로; CY는 직접 주사되어서는 안된다. 염화나트륨 용액과 CY의 용액은 정맥 내, 근육 내, 복막 내 또는 흉막 내 주사될 수 있다. 구성된 사이클로포스파미드는 24 시간 동안 실온에서, 또는 6일간 냉장 보관시 물리적 및 화학적으로 안정하다. 제제화된 용액은 어떠한 미생물 보존제도 함유하지 않으므로; 용액의 멸균성은 모니터링되어야 한다.

[0183] 플루다라빈(FLUDARA[®]). 플루다라빈 포스페이트(플루다라빈)는 화학명 9H-퓨린-6-아민, 2-플루오로-9-(5-0-포스노-0-D-아라비노푸라노실)(2-플루오로-아라-AMP)인 대사길항물질이다. 분자식은 $C_{10}H_{13}FN_5O_7P$ (분자량 = 365.2)이다. IV 투여용 플루다라빈은, 백색의 고체 케이크에 멸균수를 첨가함으로써 제제화된다. 2 ml 멸균수 중에 재구성된 이 고체 케이크는 플루다라빈 포스페이트의 대략적인 농도가 25 mg/ml인 용액으로 제조된다. 플루다라빈의 추가 제조 및 투여 절차에 대한 기관의 가이드라인을 따른다. 재구성된 IV 투여용 플루다라빈은 항미생물 보존제를 함유하지 않으므로; 이는 재구성 후 8시간 이내에 사용되어야 한다. 양립 가능성이 알려지지 않은 기타 정맥 내 투여용 용액과 함께 주입되어서는 안된다.

[0184] 부설판(BUSULFEX[®]). 부설판은 화학적으로 1,4-부탄디올, 분자식 $CH_3SO_2O(CH_2)_4OSO_2CH_3$ 인 디메탄설포네이트(분자량 = 246 g/mole)로서 공지된 2작용성 알킬화제이다. IV 투여용 부설판은 사용 전에 NS 또는 D5W로 희석되어야 한다. 희석제의 양은 BUSULFEX[®] 부피의 10배이어야 하므로, 부설판의 최종 농도는 약 0.5 mg/ml이다. 희석된 부설판 용액이 투여되기 위해서는 주입 펌프가 사용되어야 한다. 양립 가능성이 알려지지 않은 기타 정맥 내 투여용 용액과 함께 주입되어서는 안된다. 경고: IV 투여용 부설판의 급속 주입은 시험되지 않았으며, 권장되고 있지 않다. 부설판은 기관의 가이드라인에 따라서 제조 및 투여된다.

[0185] 타크롤리무스(PROGRAF[®]). 타크롤리무스는 스트레토사이세스 츠쿠바엔시스(*Streptococcus Tsukubaensis*)에 의해 생산된 마크롤리드 계열 면역억제제이다. 타크롤리무스의 실험식은 $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ 이고 화학식량은 822.05이다. 타크롤리무스는 백색의 결정체 또는 결정질 분말인 것으로 보인다. 이는 실제로 물에 불용성이고, 에탄올에는 잘 용해되며, 메탄올과 클로로포름에는 아주 잘 녹는다. 타크롤리무스는 T 림프구 활성화를 억제하지만, 이의 정확한 작용 기작은 공지되어 있지 않다. 실험적 증거는, 타크롤리무스가 세포 내 단백질인 FKBP-12와 결합함을 암시하고 있다. 이후 타크롤리무스-FKBP-12, 칼슘, 칼모듈린 및 칼시뉴린의 복합체가 형성되고, 칼시뉴린의 포스포타제 활성이 억제된다. 이러한 효과는, 활성화된 T 세포의 핵내 인자(NF-AT)(림포카인(에컨대 인터루킨-2, 감마 인터페론)의 생성을 위한 유전자 전사를 개시하는 것으로 생각되는 핵 내 성분)의 탈인산화 및 위치변동을 막아줄 수 있다. 궁극적인 결과는 T 림프구 활성화의 억제(즉 면역억제)이다. 타크롤리무스(PROGRAF[®] 주사제)는 사용전 NS 또는 D5W로 희석되어야 한다. 타크롤리무스는 연속 주입으로서 투여된다. 경구 투여용 제제는 12시간마다 공복에 투여될 것이다.

[0186] 마이코페놀레이트 모페틸(MMF, CELLCEPT[®]). CELLCEPT[®](마이코페놀레이트 모페틸)는 면역억제제, 즉 이노신 모노포스페이트 탈수소효소(IMPDH) 억제제인 마이코페놀산(MPA)의 2-모폴리노에틸 에스테르이다. 마이코페놀레이트 모페틸(MMF)의 화학명은 2-모폴리노에틸 (E)-6-(1,3-디하이드로-4-하이드록시-6-메톡시-7-메틸-3-옥소-5-이소벤조푸라닐)-4-메틸-4-헥세노에이트이다. 이의 실험식은 $C_{23}H_{31}NO_7$ 이고, 분자량은 433.50이다. 마이코페놀레이트 모페틸은 백색 내지 회백색인 결정질 분말이다. 이는 물에 약간 녹는데(pH7.4에서 43 $\mu g/ml$); 산성 매질 중에서 용해도는 증가한다(pH 3.6에서 4.27 mg/ml). 이는 아세톤에 잘 녹으며, 메탄올에도 잘 녹지만, 에탄올에는 잘 녹지 않는다. 1-옥탄올/물(pH7.4) 완충 용액 중 겉보기 분배 계수는 238이다. 마이코페놀레이트 모페틸의 pKa 값은, 모폴리노기에 대해서는 5.6이고, 페놀기에 대해서는 8.5이다. 마이코페놀레이트 모페틸 하이드로클로라이드의 용해도는 D5W 중 65.8 mg/ml이다. 재구성된 용액의 pH는 2.4 내지 4.1이다. 경구 투여 제형(정제, 캡슐, 현탁액)은 MPA 흡수 변화를 방지하기 위해 공복에 투여되어야 한다. 경구 투여용 용액은 코위 영양관(최소 8 French, 내부 직경 1.7 mm)을 통해 투여될 수 있으며; 경구 투여용 현탁액은 다른 의약품과 혼합되어서는 안된다. 지연 방출형 정제는 으스러지거나, 절단되거나 또는 저작되어서는 안된다. 정맥 내 투여용 용액은 적어도 2 시간에 걸쳐 (말초 정맥 또는 중심 정맥) 투여되어야 하고; 이 정맥 내 투여용 용액은 급속 주사(rapid injection) 또는 볼루스 주사(bolus injection)에 의해 투여되지 않는다.

[0187] 필그라스티프(NEUPOGEN[®]). NEUPOGEN[®]은 재조합 메티오닐 인간 과립구-콜로니 자극 인자(r-methHuG-CSF)를 나타내

는 필그라스티프의 상표명이다. NEUPOGEN[®]은 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)(이.콜라이; *E.coli*)가 사용되는 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 175개 아미노산 단백질이다. NEUPOGEN[®]은 분자량이 18,800 달톤으로서, N-말단에 이.콜라이에서의 발현에 필요한 부가의 메티오닌이 있는 것을 제외하고 인간의 자연 상태 DNA의 아미노산 서열과 유사한 아미노산 서열을 가진다. NEUPOGEN[®]은 IV 또는 피하 주입으로서 투여될 수 있다. NEUPOGEN[®]은 골수 주입 후 적어도 24시간 경과시에 투여될 것이 권장되는데, 이 경우 용량 변경 여부는 호중구 반응에 의해 결정된다. 필요하다면 NEUPOGEN[®]은 5% 텍스트로스 중에 희석될 수 있으며, 이때 플라스틱 재료에의 흡수를 방지하기 위해 알부민(인간 것)이 첨가된다. 최종 농도 5 mcg/ml 미만으로의 희석은 어떠한 경우에도 권장되지 않는다. 생성물이 침전될 수 있으므로 식염수로 희석되어서는 안된다. 바이알이나 미리 충전된 시린지 중 어느 하나가 사용될 때, 미사용 약물은 후속 투여를 위해 아껴두어서는 안된다. 미사용 분취액들은 모두 폐기되어야 한다.

[0188] 전신 방사선 조사(TBI). TBI는 방사선 종양학에 의해 시행되는 바와 같은 관리 절차 기준에 따라서 적용될 것이다. 선량/회차수가 2 Gy/6차를 넘지 않는 청소년기 이후의 환자들에 있어서 TBI 단독 적용은, 5년내 심각한 후기 독성(late toxicity)(장기 부전 또는 중대한 기능 장애) 발생 위험이 5% 미만으로서 가장 정상인 장기의 관용성 안에서 허용된다. 주목할만한 예외적 경우는 백내장 진행, 골수 억제, 그리고 난소와 고환의 기능 장애 위험이 있을 때이다. 또한 제2의 악성종양 발생 위험은 작다. 가장 일반적인 급성 증상으로는 오심, 구토, 설사 및 이하선의 통증을 동반하는 부종을 포함한다. 이식이 이루어진 상태에서 TBI가 다른 요법들과 병행될 때, 부작용(예컨대 식욕 상실, 구강 건조증, 연하 곤란 및 통증, 두통, 구내염(인두염/구강염), 피부 통합성 변화, 탈모, 부종, 감염 및/또는 출혈 위험 증가, 폐 부전 가능성, 마른 기침, 피로감, 불안증, 발열, 간부전 가능성, 폐 반흔, 시력 상실, 숨가쁨, 불임, 속쓰림, 방광염, 수면장애, 위장관 및 비뇨생식기 기능 변화, 신경병증, 누공, 내분비기관 기능 변화, 심낭염 및 제2 암 발병 위험 증가)의 추가 발생 위험이 있다. 상기 개략적으로 기술된 바와 같이, 방사선 조사가 다른 요법과 함께 수행될 때 가장 강력한 독성의 발생률은 전반적으로 여전히 낮으며, 드물지만 심각한 부작용이 발생할 수 있다.

[0189] 실시 예 4 - 임상 연구의 결과

[0190] ABD 연구에 대하여 예상되는 결과는, 급성 GvHD 발생은, 추가 ABD 이식편 없이도 이식 후 사이클로포스파미드를 투여받은 동일단배체 이식 환자들의 경우와 다르지 않을 것이라는 점이다. 이러한 결과는 또한 EAGD 환자들에서도 예상되는 바이며, 이에 더하여 본 발명자들은 이식 후 초기(100일 이내)에 감염으로 인한 합병증의 발생률은 더 낮을 것이고, (1년, 2년 및 5년 내) 재발되는 질병의 재발률도 감소할 것으로 기대하고 있다.

[0191]

참고문헌

- [1] Copelan EA: Hematopoietic stem-cell transplantation. The New England journal of medicine 2006, 354:1813-26.
- [2] Lee SJ, Klein J, Haagenson M, Baxter-Lowe LA, Confer DL, Eapen M, Fernandez-Vina M, Flomenberg N, Horowitz M, Hurley CK, Noreen H, Oudshoorn M, Petersdorf E, Setterholm M, Spellman S, Weisdorf D, Williams TM, Anasetti C: High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. Blood 2007, 110:4576-83.
- [3] Alshemmari S, Ameen R, Gaziev J: Haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation in adults. Bone marrow research 2011, 2011 :303487.
- [4] Aversa F, Terenzi A, Tabilio A, Falzetti F, Carotti A, Ballanti S, Felicini R, Falcinelli F, Velardi A, Ruggeri L, Aloisi T, Saab JP, Santucci A, Perruccio K, Martelli MP, Mecucci C, Reisner Y, Martelli MF: Full haplotype-mismatched hematopoietic stem-cell transplantation: a phase II study in patients with acute leukemia at high risk of relapse. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2005, 23:3447-54.
- [5] Gale RP, Horowitz MM: Graft-versus-leukemia in bone marrow transplantation. The Advisory Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. Bone marrow transplantation 1990, 6 Suppl 1 :94-7.
- [6] Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. Blood 1990, 75:555-62.

[0192]

- [7] Ferrara JL, Yanik G: Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O* 2005, 3:415-9, 28.
- [8] Oevermann L, Handgretinger R: New strategies for haploidentical transplantation. *Pediatric research* 2012, 71 :418-26.
- [9] Lamb LS, Jr., Lopez RD: gammadelta T cells: a new frontier for immunotherapy? *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2005, 11: 161-8.
- [10] Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC, Moretta A: Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2011, 117:764-71.
- [11] Palmer JM, Rajasekaran K, Thakar MS, Malarkannan S: Clinical relevance of natural killer cells following hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Cancer* 2013, 4:25-35.
- [12] Lamb LS, Jr., Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Godder K, Thompson J, Lee C, Gee AP: Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *Journal of Hematotherapy* 1996, 5:503-9.
- [13] Lamb LS, Jr., Gee AP, Hazlett LJ, Musk P, Parrish RS, O'Hanlon TP, Geier SS, Folk RS, Harris WO, McPherson K, Lee C, Henslee-Downey PJ: Influence of T cell depletion method on circulating gammadelta T cell reconstitution and potential role in the graft-versus-leukemia effect. *Cytotherapy* 1999, 1 :7-19.
- [14] Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang KY, Abhyankar S, Lamb LS: Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007, 3 9:7 51-7.
- [15] Handgretinger R: New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. *Seminars in oncology* 2012, 39:664-73.
- [16] Smetak M, Kimmel B, Birkmann J, Schaefer-Eckart K, Einsele H, Wilhelm M, Kunzmann V: Clinicalscale single-step CD4(+) and CDS(+) cell depletion for donor innate lymphocyte infusion (DILI). *Bone marrow transplantation* 2008, 41 :643-50.
- [17] Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC: Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 2001, 294:605-9.
- [18] Kaminski MJ, Cruz PD, Jr., Bergstresser PR, Takashima A: Killing of skin-derived tumor cells by mouse dendritic epidermal T-cells. *Cancer Research* 1993, 53:4014-9.

[0193]

- [19] Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T: Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96:6879-84.
- [20] Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA [see comments]. *Science* 1999, 285:727-9.
- [21] Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998, 279:1737-40.
- [22] Boismenu R, Havran WL: An innate view of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 1997, 9:57-63.
- [23] Blazar BR, Taylor PA, Bluestone JA, Valleria DA: Murine gamma/delta-expressing T cells affect allograftment via the recognition of nonclassical major histocompatibility complex class Ib antigens. *Blood* 1996, 87:4463-72.
- [24] Drobyski WR, Majewski D: Donor gamma delta T lymphocytes promote allogeneic engraftment across the major histocompatibility barrier in mice. *Blood* 1997, 89:1100-9.
- [25] Drobyski WR, Hessner MJ, Klein JP, Kabler-Babbitt C, Vesole DH, Margolis DA, Keever-Taylor CA: Tcell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation.[erratum appears in *Blood* 2000 Feb 15;95(4):1137]. *Blood* 1999, 94:434-41.
- [26] Neipp M, Exner BG, Maru D, Haber M, Gammie JS, Pham SM, Ildstad ST: T-cell depletion of allogeneic bone marrow using anti-alphabetaTCR monoclonal antibody: prevention of graft-versus-host disease without affecting engraftment potential in rats. *Exp Hematol* 1999, 27:860-7.
- [27] Kawanishi Y, Passweg J, Drobyski WR, Rawlings P, Cook-Craig A, Casper J, Pietryga D, Garbrecht F, Camitta B, Horowitz M, Juckett M, Margolis D, Flomenberg N, Keever-Taylor CA: Effect of T cell subset dose on outcome of T cell-depleted bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 1997, 19:1069-77.
- [28] Henslee PJ, Thompson JS, Romond EH, Doukas MA, Metcalfe M, Marshall ME, MacDonald JS: T cell depletion of HLA and haploidentical marrow reduces graft-versus-host disease but it may impair a graft-versus leukemia effect. *Transplantation Proceedings* 1987, 19:2701-6.
- [29] Ellison CA, MacDonald GC, Rector ES, Gartner JG: Gamma delta T cells in the pathobiology of murine acute graft-versus-host disease. Evidence that gamma delta T cells

[0194]

mediate natural killer-like cytotoxicity in the host and that elimination of these cells from donors significantly reduces mortality. *J Immunol* 1995, 155:4189-98.

[30] Schilbach KE, Geiselhart A, Wessels JT, Niethammer D, Handgretinger R: Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J Immunother* 2000, 23:536-48.

[31] Lamb LS, Jr., Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, King KM, Henslee-Downey PJ: Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant* 2001, 27:601-6.

[32] Cela ME, Holladay MS, Rooney CM, Richardson S, Alexander B, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE: Gamma delta T lymphocyte regeneration after T lymphocyte-depleted bone marrow transplantation from mismatched family members or matched unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 1996, 17:243-7.

[33] Yabe M, Yabe H, Hattori K, Hinohara T, Morimoto T, Kato S, Kusunoki A: Transition of T cell receptor gamma/delta expressing double negative (CD4-/CD8-) lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994, 14:741-6.

[34] Viale M, Ferrini S, Bacigalupo A: TCR gamma/delta positive lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992, 10:249-53.

[35] Tsuji S, Char D, Bucy RP, Simonsen M, Chen CH, Cooper MD: Gamma delta T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+ alpha beta T cells. *European Journal of Immunology* 1996, 26:420-7.

[36] Keever-Taylor CA, Bredeson C, Loberiza FR, Casper JT, Lawton C, Rizzo D, Burns WH, Margolis DA, Vesole DH, Horowitz M, Zhang MJ, Juckett M, Drobyski WR: Analysis of risk factors for the development of GVHD after T cell-depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of Tcell depletion. *Biology of Blood & Marrow Transplantation* 2001, 7:620-30.

[37] Mehta J, Singhal S, Gee AP, Chiang KY, Godder K, Rhee Fv F, DeRienzo S, O'Neal W, Lamb L, Henslee-Downey PJ: Bone marrow transplantation from partially HLA-mismatched family donors for acute leukemia: single-center experience of 201 patients. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:389-96.

[38] Lamb LS HLMP, et al.: Influence of T cell depletion method on circulating gd+ T cell reconstitution and potential role in the graft-versus-leukemia effect. *Cytotherapy* 1999, 1:7-19.

[39] Eto M, Mayumi H, Tomita Y, Yoshikai Y, Nishimura Y, Maeda T, Ando T, Nomoto K: Specific destruction of host-reactive mature T cells of donor origin prevents graft-versus-host disease in cyclophosphamide-induced tolerant mice. *Journal of immunology* 1991, 146:1402-9.

[0195]

- [40] Strauss G, Osen W, Debatin KM: Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clinical and experimental immunology* 2002, 128:255-66.
- [41] Luznik L, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ: Posttransplantation cyclophosphamide facilitates engraftment of major histocompatibility complex-identical allogeneic marrow in mice conditioned with lowdose total body irradiation. *Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002, 8:131-8.
- [42] Luznik L, Jalla S, Engstrom LW, Iannone R, Fuchs EJ: Durable engraftment of major histocompatibility complex-incompatible cells after nonmyeloablative conditioning with fludarabine, low-dose total body irradiation, and posttransplantation cyclophosphamide. *Blood* 2001, 98:3456-64.
- [43] Mayumi H, Umesue M, Nomoto K: Cyclophosphamide-induced immunological tolerance: an overview. *Immunobiology* 1996, 195:129-39.
- [44] Burroughs LM, O'Donnell PV, Sandmaier BM, Storer BE, Luznik L, Symons HJ, Jones RJ, Ambinder RF, Maris MB, Blume KG, Niederwieser DW, Bruno B, Maziarz RT, Pulsipher MA, Petersen FB, Storb R, Fuchs EJ, Maloney DG: Comparison of outcomes of HLA-matched related, unrelated, or HLA-haploidentical related hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008, 14:1279-87.
- [45] Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, Chen AR, Leffell MS, Zahurak M, Gooley TA, Piantadosi S, Kaup M, Ambinder RF, Huff CA, Matsui W, Bolanos-Meade J, Borrello I, Powell JD, Harrington E, Warnock S, Flowers M, Brodsky RA, Sandmaier BM, Storb RF, Jones RJ, Fuchs EJ: HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2008, 14:641-50.
- [46] Bronstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, Karanes C, Costa LJ, Wu J, Devine SM, Wingard JR, Aljaitawi OS, Cutler CS, Jagasia MH, Ballen KK, Eapen M, O'Donnell PV, Blood, Marrow Transplant Clinical Trials N: Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011, 118:282-8.
- [47] Alvamas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Bellam N, Blum W, Boyer MW, Carraway HE, Coccia PF, Coutre SE, Cultrera J, Damon LE, DeAngelo DJ, Douer D, Frangoul H, Frankfurt O, Goorha S, Millenson MM, O'Brien S, Petersdorf SH, Rao AV, Terezakis S, Uy G, Wetzler M,

[0196]

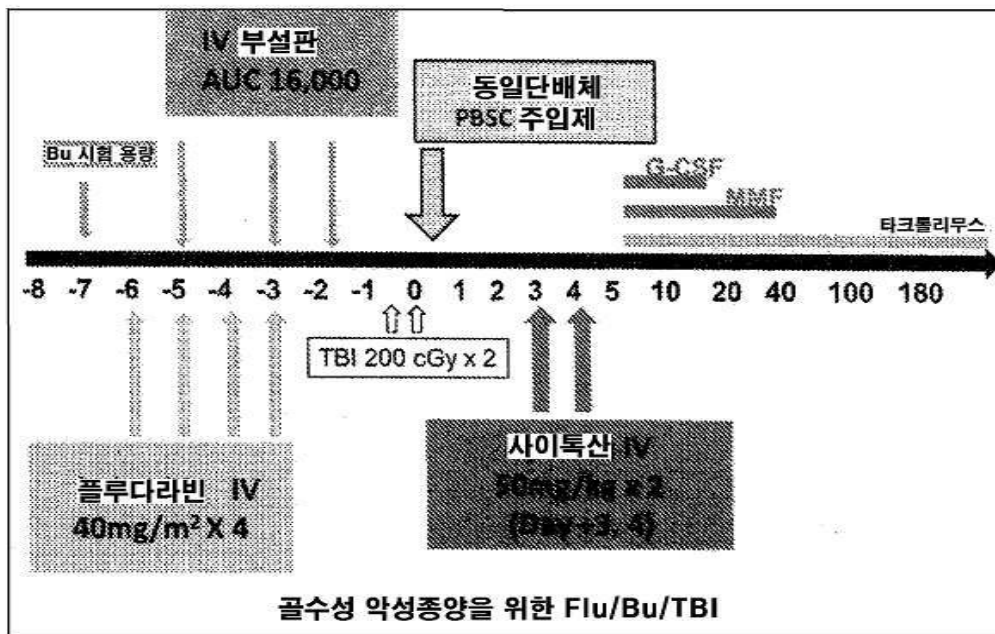
- Zelenetz AD, Naganuma M, Gregory KM, National Comprehensive Cancer N: Acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2012, 10:858-914.
- [48] Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, Ambinder RF, Bello CM, Bierman PJ, Blum KA, Dabaja B, Duron Y, Forero A, Gordon LI, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Hochberg EP, Maloney DG, Mansur D, Mauch PM, Metzger M, Moore JO, Morgan D, Moskowitz CH, Poppe M, Pro B, Weiss L, Winter JN, Yahalom J, Lymphoma NH: Hodgkin lymphoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2011, 9:1020-58.
- [49] Zelenetz AD, Wierda WG, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Bartlett N, Bellam N, Byrd JC, Czuczman MS, Fayad LE, Glenn MJ, Gockerman JP, Gordon LJ, Harris NL, Hoppe RT, Horwitz SM, Kelsey CR, Kim YH, Krivacic S, LaCasce AS, Nademanec A, Porcu P, Press O, Pro B, Reddy N, Sokol L, Swinnen L, Tsien C, Vose JM, Yahalom J, Zafar N, Dwyer MA, Naganuma M, National Comprehensive Cancer N: NonHodgkin's lymphomas, version 1.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11 :257-72; quiz 73.
- [50] O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, Borate U, Coutre SE, Damon LE, Lancet J, Maness LJ, Marcucci G, Martin MG, Millenson MM, Moore JO, Ravandi F, Shami PJ, Smith BD, Stone RM, Strickland SA, Wang ES, Gregory KM, Naganuma M: Acute myeloid leukemia, version 2.2013. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11:1047-55.
- [51] O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, Akhtari M, Altman JK, Berman E, DeAngelo DJ, Deininger M, Devine S, Fathi AT, Gotlib J, Jagasia M, Kropf P, Moore JO, Paller A, Pinilla-Ibarz J, Reddy VV, Shah NP, Smith BD, Snyder DS, Wetzler M, Gregory K, Sundar H: Chronic Myelogenous Leukemia, Version 1.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11:1327-40.
- [52] Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, Borate U, De Castro CM, Deeg HJ, Frankfurt O, Gaensler K, Garcia-Manero G, Gore SD, Head D, Komrokji R, Maness LJ, Millenson M, O'Donnell MR, Shami PJ, Stein BL, Stone RM, Thompson JE, Westervelt P, Wheeler B, Shad DA, Naganuma M: Myelodysplastic syndromes: clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 2013, 11:838-74.
- [53] Tefferi A: Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 2013, 88:141-50.

[0197]

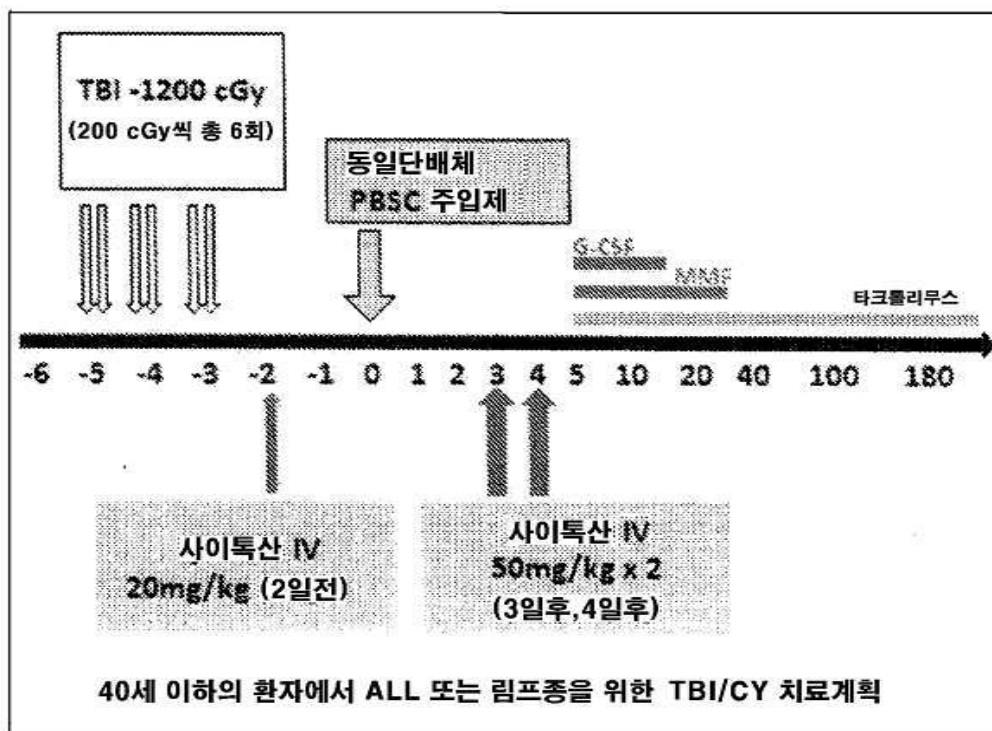
[0198]

도면

도면1



도면2



도면3

