



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0102264
(43) 공개일자 2021년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) A61K 31/7056 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7018488
- (22) 출원일자(국제) 2019년11월15일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년06월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/061818
- (87) 국제공개번호 WO 2020/102731
국제공개일자 2020년05월22일
- (30) 우선권주장
62/768,176 2018년11월16일 미국(US)
62/927,075 2019년10월28일 미국(US)
- (71) 출원인
라파 세라퓨틱스 엘엘씨
미국 메릴랜드주 20852 락빌 락 크릭 밀 로드
12712 스위트 5비
- (72) 발명자
파올러 대니얼 하딩
미국 메릴랜드주 20814 베테스다 엘스미어 애비뉴
5219
- (74) 대리인
장훈

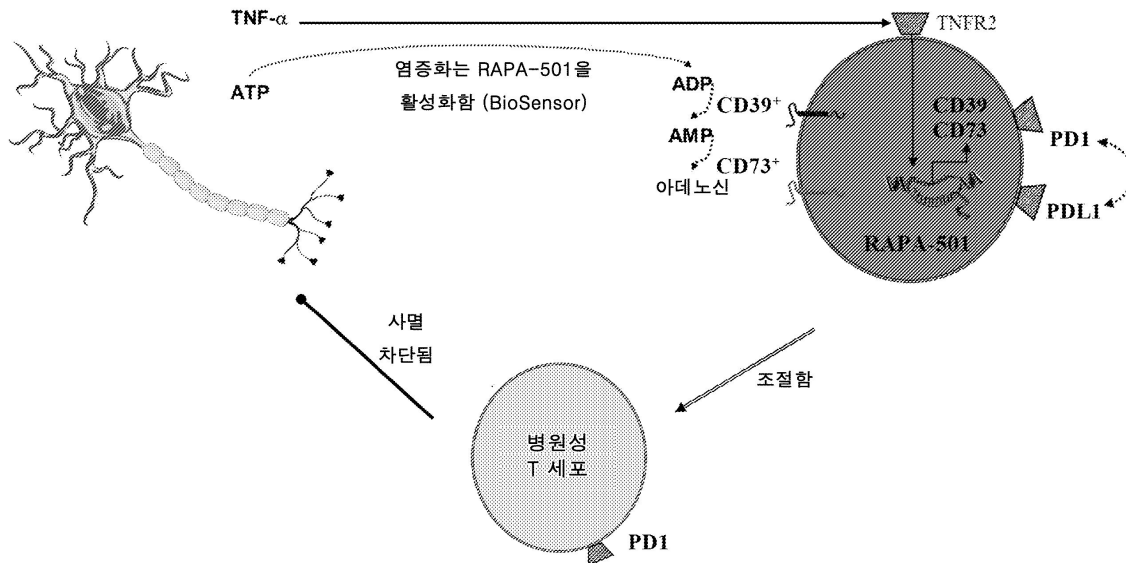
전체 청구항 수 : 총 164 항

(54) 발명의 명칭 유도된 조절 T (iTREG) 세포를 사용한 ALS 치료

(57) 요약

본 개시내용은 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드 처리에 이어 탈-분화된 T 세포로부터 T_{REG} 및/또는 T_{REG}/Th2 하이브리드 세포를 사용하여 ALS를 치료하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 탈-분화된 T 세포로부터 T_{REG} 및 T_{REG}/Th2 하이브리드 세포를 생산하는 방법, 상기 T_{REG} 및 T_{REG}/Th2 하이브리드 세포, 이의 모집단 및 이의 조성물을 추가로 제공한다. 탈-분화된 T 세포를 생산하는 방법, 상기 탈-분화된 T 세포, 이의 모집단 및 이의 조성물이 또한 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/675 (2013.01)

A61K 31/7056 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 5/0637 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2304 (2013.01)

C12N 2501/50 (2013.01)

C12N 2506/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

근위축성 측삭 경화증 치료를 필요로하는 대상체에서 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은:

상기 대상체에게 하나 이상의 일차 치료 주기를 적용하는 단계로서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각은:

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하는, 단계; 및

상기 대상체를 다음 단계를 포함하는 하나 이상의 면역 요법 치료 주기에 적용하는 단계를 포함하는, 방법:

상기 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 제조된 T_{REG} 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 NLRP3 염증소체의 억제제인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각은 2주 내지 5주 길이인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 18주 길이인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 펜토스타틴은 0.5 mg/m² 내지 4 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각의 1일차 또는 1 및 4일차에 투여되는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드의 용량은 50 mg 내지 400 mg인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드는 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각의 1, 2, 3일차 또는 1, 2, 3, 4 및 5일차에 투여되는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 방법은 2개 이상의 일차 치료 주기를 포함하고, 상기 2개 이상의 일차 치료 주기의 각각은 0 내지 2주만큼 분리되는, 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기 중 첫 번째와 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 중 마지막은 0 내지 2주만큼 분리되는, 방법.

청구항 14

제4항에 있어서, 상기 라미부딘은 1일 150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드는 단일 조성물로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 대상체에게 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 포함하는 제1 조성물을 투여하는 단계; 및 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 단일 조성물은 상기 대상체에게 정맥내로 투여되는, 방법.

청구항 18

제6항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 1 및 4일차에 수행되는, 방법.

청구항 19

제6항 또는 제18항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 1, 2, 3, 4 및 5일차에 수행되는, 방법.

청구항 20

제6항 및 제18항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 1 mg/m² 내지 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 22

제6항 및 제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로포스파미드는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 100 mg 내지 200 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 사이클로포스파미드는 100 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 8일차에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 2개 이상의 면역 요법 치료 주기를 포함하고, 상기 2개 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 0 내지 4주만큼 분리되는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 2개 이상의 면역 요법 치료 주기를 포함하고, 상기 2개 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 적어도 4주만큼 분리되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 대상체 체중 kg당 1×10^6 세포 내지 대상체 체중 kg당 5×10^6 세포 사이의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 1:1, 3:1, 10:1, 1:3 및 1:10에서 선택되는 중앙 기억 대 효과기 기억 세포의 비율을 포함하는, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제조된 T_{REG} 세포를 포함하는 상기 조성물은 천연 흉선-유래된 T_{REG} 세포를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 이전에 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후:
상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 후:
상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 후 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후에,
상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각 후에,
상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하고, 만약 $ALC < \mu\text{l당 } 750$ 이면 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 진행하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 35

근위축성 측삭 경화증 치료를 필요로하는 대상체에서 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

제1 치료 주기, 제2 치료 주기, 선택적으로 하나 이상의 추가 치료 주기, 및 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 포함하고,

상기 제1 치료 주기는

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고;

상기 제2 치료 주기는

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고;

상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각은

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고

상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계, 및

상기 대상체에게 제조된 T_{REG} 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기의 1일차에 수행되는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 펜토스타틴은 상기 제1 치료 주기 동안 1 mg/m^2 의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기 동안 반복되는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기의 1, 2 및 3일차에 수행되는 방법.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로포스파미드는 상기 제1 치료 주기 동안 100 mg 의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 41

제35항에 있어서, 상기 제1 치료 주기는 14일 기간인, 방법.

청구항 42

제35항에 있어서, 상기 제2 치료 주기는 14일 기간인, 방법.

청구항 43

제35항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각은 각각 14일 기간인, 방법.

청구항 44

제35항에 있어서, 상기 제1 치료 주기, 상기 제2 치료 주기 및 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각은 0 내지 2주만큼 분리되는, 방법.

청구항 45

제35항에 있어서, 상기 제1 치료 주기에서 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 이전에,

상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하고 CrCl을 기준으로 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 펜토스타틴은 $CrCl \geq 60\text{mL/분}/1.73\text{m}^2$ 일때 1 mg/m^2 으로 투여되고, 펜토스타틴은 $60\text{mL/분}/1.73\text{m}^2 > CrCl \geq 30\text{mL/분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 0.5 mg/m^2 으로 투여되고, 펜토스타틴은 $CrCl < 30\text{mL/분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 46

제35항에 있어서, 상기 제1 치료 주기에서 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 이전에,

절대 호중구 수 (ANC)를 측정하고 ALC 및 ANC를 기준으로 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 사이클로포스파미드는 $ANC > 1000$ 인 경우 100 mg의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 ANC 가 500-999인 경우 50 mg의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 $ANC < 500$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 47

제35항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기의 1일차에 수행되는, 방법.

청구항 48

제35항에 있어서, 펜토스타틴은 상기 제2 치료 주기 동안 2 mg/m^2 의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 49

제35항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기 동안 반복되는, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기의 1, 2 및/또는 3일차에 수행되는, 방법.

청구항 51

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로포스파미드는 상기 제2 치료 주기 동안 100 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 52

제35항에 있어서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 이전에,

상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하고 CrCl을 기준으로 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용

량을 조정하는 단계로서, 여기서 펜토스타틴은 $\text{CrCl} \geq 60\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 $2\text{ mg}/\text{m}^2$ 으로 투여되고, 펜토스타틴은 $60\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2 > \text{CrCl} \geq 30\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 $1\text{ mg}/\text{m}^2$ 으로 투여되고, 펜토스타틴은 $\text{CrCl} < 30\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 53

제35항에 있어서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 이전에,

절대 호중구 수 (ANC)를 측정하고 ANC를 기준으로 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 사이클로포스파미드는 $\text{ANC} > 1000$ 인 경우 100 mg 의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 ANC 가 $500\text{--}999$ 인 경우 50 mg 의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 $\text{ANC} < 500$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 54

제35항에 있어서, 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 이전에,

상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하고 ALC를 기준으로 상기 대상체의 치료를 조정하는 단계로서, 여기서 $\text{ALC} < 750$ 인 경우, 상기 환자에게 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 적용하는 것을 포함하는 유지 치료 주기를 상기 대상체에게 투여하고, $\text{ALC} > 750$ 인 경우 환자에게 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 적용하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 18주 길이인, 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, $\text{ALC} < 750$ 이고, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 주기 동안 대상체의 체중 kg 당 1×10^6 세포 내지 대상체의 체중 kg 당 5×10^6 세포 사이의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 8일차에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 58

제35항에 있어서, 펜토스타틴은 $2\text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 1 및 4일차에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 59

제35항에 있어서, 사이클로포스파미드는 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 100 mg 의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 60

제35항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기는

상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 라미부딘은 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 1일

150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 63

제35항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 대상이 되는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 1 및/또는 4일차에 수행되는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 펜토스타틴은 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 반복되는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 수행되는, 방법.

청구항 68

제63항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 사이클로포스파미드는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 동안 100 mg 내지 200 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 69

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 이전에,

상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하고 CrCl을 기준으로 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 펜토스타틴은 CrCl ≥ 60mL/분/1.73m²인 경우 2 mg/m²으로 투여되고, 펜토스타틴은 60mL/분/1.73m² > CrCl ≥ 30mL/분/1.73m²인 경우 1 mg/m²으로 투여되고, 펜토스타틴은 CrCl < 30mL/분/1.73m²인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 70

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 이전에,

절대 호중구 수 (ANC)를 측정하고 ANC를 기준으로 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 사이클로포스파미드는 ANC > 1000인 경우 100 mg의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 ANC가 500-999인 경우 50 mg의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 ALC < 50 또는 ANC < 500인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 71

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 적어도 2개의 추가 치료 주기를 포함하고, 상기 적어도 2개의 추가 치료 주기의 마지막은 상기 적어도 2개의 치료 주기의 상기 마지막 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 이전에,

절대 림프구 수 (ALC) 및 절대 호중구 수 (ANC)를 측정하고 ALC 및 ANC를 기준으로 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 사이클로포스파미드는 ALC ≥ 1250인 경우 200 mg의 용

량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 $ANC > 1000$ 및 $750 < ALC < 1250$ 인 경우 100 mg의 용량으로 투여되고, 사이클로포스파미드는 ANC 가 500-999인 경우 50 mg의 용량으로 투여되고, 그리고 사이클로포스파미드는 $ANC < 500$ 및/또는 $ALC \leq 750$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 72

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각은 0 내지 2주만큼 분리되는, 방법.

청구항 73

제63항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각 이전에,

상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하고 ALC를 기준으로 상기 대상체의 치료를 조정하는 단계로서, 여기서 $ALC \leq 750$ 인 경우, 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 포함하는 유지 치료 주기를 상기 대상체에게 투여하고 상기 유지 치료 주기 이전에 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 더 포함하지 않고, $ALC > 750$ 인 경우 대상체 환자에게 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 지속하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 4주 길이인, 방법.

청구항 75

제60항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안에

상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하고 CrCl을 기준으로 상기 대상체에게 투여될 라미부딘의 용량을 조정하는 단계로서, 여기서 라미부딘은 $CrCl \geq 50\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 1일 2회 150 mg으로 투여되고, 라미부딘은 $50\text{mL}/\text{분} > CrCl \geq 30\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 1일 150 mg으로 투여되고, 라미부딘은 $CrCl < 30\text{mL}/\text{분}/1.73\text{m}^2$ 인 경우 투여되지 않는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 76

근위축성 측삭 경화증 치료를 필요로하는 대상체에서 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

상기 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 제조된 T_{REG} 세포를 투여하는 것을 포함하는 하나 이상의 치료 주기를 포함하는, 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 대상체의 체중 kg당 1×10^6 세포 및 대상체의 체중 kg당 5×10^6 세포의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 78

제76항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 1:1, 3:1, 10:1, 1:3 및 1:10으로부터 선택된 중앙 기억 대 효과기 기억 세포의 비율을 포함하는, 방법.

청구항 79

제76항에 있어서, 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각은

상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는

상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 펜토스타틴은 $1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $2 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 81

제79항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드의 용량은 100 mg 내지 200 mg인, 방법.

청구항 82

제79항에 있어서, 상기 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각의 1 및 4일차에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 83

제79항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드는 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 84

제79항에 있어서, 상기 대상체는 이전에 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드로 치료받은, 방법.

청구항 85

제76항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 NLRP3 염증소체의 억제제인, 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘인, 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 라미부딘은 1일 150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 89

제76항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포와 동시에 상기 대상체에게 정상 T_{REG} 세포를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 90

제76항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각은 4주 간격인, 방법.

청구항 91

제76항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 치료 주기 이전에, 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후:
상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 93

근위축성 측삭 경화증 치료를 필요로하는 대상체에서 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은

상기 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 제조된 T_{REG} 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 대상체의 체중 kg당 1×10^6 세포 및 대상체의 체중 kg당 5×10^6 세포의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 95

제93항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 1:1, 3:1, 10:1, 1:3 및 1:10에서 선택된 중앙 기억 대 효과기 기억 세포의 비율을 포함하는, 방법.

청구항 96

제93항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포를 상기 대상체에게 투여하기 이전에, 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 펜토스타틴은 0.5 mg/m² 내지 4 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 98

제96항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드의 용량은 50 mg 내지 400 mg인, 방법.

청구항 99

제93항에 있어서, 상기 대상체는 이전에 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드로 치료받은, 방법.

청구항 100

제93항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 NLRP3 염증소체의 억제제인, 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘인, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 상기 라미부딘은 1일 150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 104

제93항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포와 동시에 상기 대상체에게 정상 T_{REG} 세포를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 105

제93항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제조된 T_{REG} 세포를 상기 대상체에게 투여하기 이전에, 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계; 및

상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 106

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 항-TNF- α 요법을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 107

탈-분화된 T 세포를 T_{REG}/Th2 세포로 분화하는 방법으로서, 상기 방법은

IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계;

항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;

T_{REG}/Th2 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 109

제107항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 110

제107항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 111

제107항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 112

제108항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 113

제108항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 114

제112항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 115

제112항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 116

제112항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 117

탈-분화된 T 세포를 T_{REG}/Th2 세포로 분화하는 방법으로서, 상기 방법은

탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계로서, 상기 탈-분화된 T 세포는 IL-2, IL-4 및 TGF-β를 포함하는 배양 배지에서 대조군 T 세포 대비 적어도 10% 감소된 수준으로 RAPTOR 및 RICTOR를 발현하는, 단계;

항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;

T_{REG}/Th2 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 119

제117항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 120

제117항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 121

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF-β는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 122

제118항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 123

제118항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 124

제122항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 125

제122항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 126

제122항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF-β는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 127

제107항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 배지는 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20인, 방법.

청구항 128

제107항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일정 시간은 3일 내지 40일인, 방법.

청구항 129

제107항 내지 제128항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 130

탈-분화된 T 세포를 T_{REG} 세포로 분화하는 방법으로서, 상기 방법은

IL-2 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 및 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계;

항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;

T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 탈-분화된 T 세포를 일정 시간 동안 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 132

제130항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 133

제130항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 134

제131항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 135

제131항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 136

제134항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 137

제134항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 138

탈-분화된 T 세포를 T_{REG} 세포로 분화하는 방법으로서, 상기 방법은

탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계로서, 여기서 상기 탈-분화된 T 세포는 IL-2 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 대조군 T 세포 대비 적어도 10% 감소된 수준으로 RAPTOR 및 RICTOR를 발현하는, 단계;

항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;

T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 탈-분화된 T 세포를 일정 시간 동안 인큐베이션하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 140

제138항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 141

제138항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 142

제139항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 143

제139항에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 144

제142항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 145

제142항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는, 방법.

청구항 146

제130항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양 배지는 5% AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배지인, 방법.

청구항 147

제130항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일정 시간은 3일 내지 40일인, 방법.

청구항 148

제107항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포는 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 및 RICTOR의 감소된 발현을 갖는, 방법.

청구항 149

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포.

청구항 150

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포로서, 여기서 후속 T 세포 배양을 위해 혈장교환에 의해 수집된 림프구는 정상 상태에서 또는 혈청, 무-세포 형태의 TNF- α , 가장 현저하기로는 재조합 수용체 분자 에타너셉트 또는 단일클론 항체 아달리무맙을 중화하는 관점에서 상대적으로 선택적인 항-TNF- α 치료제로 대상체 치료 후 획득되는, T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 151

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포로서, 여기서 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포 또는 그 모집단은 대조군 Th1/Tc1 세포에 대한 다음의 분자: CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1, OX40 및 이들의 조합 중 적어도

하나의 유세포분석법에 의해 증가된 발현을 갖는, T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 152

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포로서, 여기서 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포 또는 이의 모집단은 IFN- γ 및 TNF- α 를 포함한 대조군 Th1/Tc1 세포에 비하여 염증성 사이토카인의 감소된 분비를 갖는, T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 153

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포로서, 여기서 상기 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포 또는 그의 모집단은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 T 세포 운명 전사 인자의 변경된 발현, 가장 현저하게는 TBET의 감소 및 FOXP3의 증가를 갖는, T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 154

제107항 내지 제128항 및 제130항 내지 제148항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포로서, 여기서 상기 T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포 또는 그의 모집단은, Th2 사이토카인 IL-4의 증가된 분비; 및 Th2 전사 인자 GATA3의 증가된 발현을 포함하여, 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 추가적인 표현형 형질을 갖는, T_{REG} 세포 또는 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포.

청구항 155

GATA3를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 적어도 5%를 갖는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 156

FoxP3를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 적어도 5%를 갖는 TREG 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 157

CD73을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 적어도 10%를 갖는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 158

CD103을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 적어도 10%를 갖는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 159

CD150을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 적어도 20%를 갖는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 160

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 5pg/mL의 IL-4를 발현하는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 161

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 100pg/mL의 IL-2를 발현하는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 162

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100pg/mL 미만의 IFN- γ 또는 GM-CSF를 발현하는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 163

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100pg/mL 미만의 TNF- α 또는 IL-17F를 발현하는 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단.

청구항 164

제1항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 제조된 T_{REG} 세포는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는, 방법:

대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 측정된 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1, OX40 및 이들의 조합 중 하나 이상의 적어도 10% 증가된 발현;

대조군 Th1/Tc1 세포 대비 IFN- γ 의 적어도 10% 감소된 분비;

대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TNF- α 의 적어도 10% 감소된 분비;

대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TBET의 적어도 10% 감소된 발현;

대조군 Th1/Tc1 세포 대비 FOXP3의 적어도 10% 증가된 발현;

유세포분석법에 의해 측정된 GATA3를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 적어도 5%;

유세포분석법에 의해 측정된 FOXP3를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 적어도 5%;

유세포분석법에 의해 측정된 CD73을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 적어도 5%;

유세포분석법에 의해 측정된 CD103을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 적어도 5%;

유세포분석법에 의해 측정된 FOXP3 및 GATA3 둘 모두를 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ 세포 적어도 5%;

유세포분석법에 의해 측정된 CD150을 발현하는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포 적어도 20%;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 5pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-4의 발현;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-2의 발현;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IFN- γ 의 발현;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 GM-CSF의 발현;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 TNF- α 의 발현;

3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IL-17의 발현; 및 이들의 조합.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참고

[0002] 본 출원은 2018년 11월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 62/768,176 및 2019년 10월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 62/927,075에 대한 우선권을 주장하며, 그 각각의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 입양 T 세포 요법은 암 및 감염성 질환, 자가-면역 및 신경-퇴행성 질환의 효과적인 치료를 위해 부상하고 있는 인터벤션 치료이다. 더 높은 증식 잠재력과 기타 주요 속성으로 변환되는 보다 원시적인 분화 상태를 가진 T 세포의 전이는 적응 전이 후 향상된 생체내 효과와 연관된다는 것이 점점 분명해진다. 그러나, 입양 T 세포 요법의 대부분 형태는 생체의 제조 단계를 필요로 하며, 이는 전형적으로 추가 세포 분화를 초래한다; 이것은 성인 인간으로부터의 T 세포가 이미 주로 진보한 분화의 상태 (효과기 기억 세포로 명명됨)에 있고 체크포인트 억제성 분자의 제어하에있는 노화 상태에 종종 존재하기 때문에 특히 문제가 된다. 배양 시작시에서 보다 나이브 T 세포 하위 세트의 단리 (정제)를 포함하여 이 제한을 완화하기 위한 접근법이 취할 수 있다; 그러나, 이 접근법은 성인 인간 말초 혈액에 존재하는 소수의 나이브 T 세포에 의해 부분적으로 제한된다. 따라서, 원시 분화 상태에서 단리된 T 세포에 대한 매우 큰 필요성이 존재한다.

[0004] 고도로 분화된 세포조차도 보다 원시 상태로 탈-분화하는 고유한 능력을 보유하는 것이 잘 알려져 있다. 실제로, 가장 극단적인 예에서 분화된 세포는 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 상태를 얻기 위해 조작될 수 있으며, 이에 의해 이러한 iPSC 세포는 배아 줄기 세포와 주요 특성을 공유하고 그 다음 분기하는 조직 운명으로서 재-분화를 향해 추가로 조절될 수 있다; 이러한 iPSC 방법론을 사용하는 세포 요법은 수많은 잠재적인 임상적 적용을 가진다. 분화된 체세포로부터 iPSC 세포의 생성은 Sox2, Oct3/4, KLF4 및 c-myc 또는 Sox2, Oct3/4, Nanog, 및 Lin28을 포함한 바이러스 또는 비-바이러스 매개된 접근법을 통한 주요 전사 인자의 전달에 의해 처음에 입증되었다.

[0005] 그러나, 체세포를 iPSC 세포로 전환하는 능력은 비효율적이고 체세포 분화의 정도에 부분적으로 의존한다. 하나의 예로서, 성숙한 뮤어라인 면역 T 세포를 iPSC 세포로 전환하는 능력은 iPSC 세포로 뮤어라인 조혈 줄기 세포의 전환 대비 300-배 덜 효율적이다. 그럼에도 불구하고, 유전자 전달 방법을 사용하여 성숙한 인간 말초 혈액 T 세포가 iPSC 세포 상태로 전환하는 능력을 유지한다는 것이 입증되었다. 지난 10년에 걸쳐, 연구자들은 또한 T 세포 분화의 초기 단계와 연관된 전사 인자를 특성규명했다. 그러나, 다양한 유형의 줄기 세포 전구체로부터 T 세포의 재-분화는 전형적으로 1 내지 2 개월이 걸리는 비교적 비효율적인 과정이다.

[0006] 탈-분화의 생물학이 점점 더 특성규명되고 있지만, 탈-분화와 관련된 특정 전사 인자 및 전사 인자 동역학의 관점에서 많은 부분이 알려지지 않았다. 탈-분화를 달성하는 유전자 전달 방법은 힘들고 세포 운명 자살 유전자 프로그래밍과 같은 추가 유전적 개입을 통해 해결되어야 하는 기형종 생성과 같은 합병증과 관련이 있음을 인식하는 것이 또한 중요하다. 잠재적인 대안으로, 다양한 약리학적 개입이 어느 정도의 탈-분화를 달성하기 위해 이용될 수 있다. 하나의 예로서, 면역 억제제인 주기로스포르린의 사용에 의해 세포 배양 동안 칼시뉴린-억제는 뮤어라인 iPSC 세포의 축진을 위한 Sox2 전사 인자의 유전자 배달에 대한 필요성을 대체하는 분자 변경을 초래했다. 부가하여, 라파마이신의 포유류 표적 (mTOR)을 억제하는 면역 억제 약물인 라파마이신은 전사 인자 KLF2의 기아-유발 상황-조절을 통해 말단-단계 효과기 T 세포에 대한 탈-분화 효과를 초래할 수 있으며, 이는 차례로 T 중심-기억 분자 CD62L 및 CCR7을 증가시킨다. 부가하여, 라파마이신과 그에 따른 mTOR 시그널링의 억제는 분화의 상태가 감소된 나이브 T 세포에서 세포 정지를 유지하는 데 중요하다. mTOR 경로는 mTORC1 복합체 (Raptor 하위-단위를 포함함)와 mTORC2 복합체 (Rictor 하위-단위를 포함함)로 구성된다는 것을 인지하는 것이 중요하다. mTORC1 및 mTORC2 둘 모두의 억제는 기억 T 세포 축진의 증가 및 유지와 관련이 있다. 참고로, 라파마이신은 mTORC1을 단지 직접적으로 억제할 수 있다; 그러나, mTORC1의 라파마이신-매개된 억제가 연장되면, mTORC2의 하류 억제가 발생할 수 있다. mTOR 억제 또는 다른 경로 억제를 통한 T 세포 성장 인자 시그널링에서 감소는 또한 보다 원시적인 분화 상태의 T 세포, 즉 IL-7 수용체 알파 (CD127)와 관련된 또 다른 주요 분자 상향-조절하는 것으로 알려져 있다. 추가 연구에서, 약리학적 제제인 라파마이신 또는 Wnt-β-카테닌 시그널링 활성화제 TWS11을 통한 T 세포 mTOR 경로의 억제는 뮤어라인 및 인간 T 세포에서 이전에 동정되고 특성규명되었던 탈-분화된 T 줄기 세포 기억 모집단으로 인간 나이브 T 세포의 탈-분화를 촉진했다. 추가 실험 모델 연구에서, AKT 시그널링 경로의 약리학적 억제 또는 PI3 키나아제 및 혈관작용 장 펩티드 시그널링 경로의 조합된 억제는 적응 전달시 감소된 분화 상태 및 증가된 T 세포 기능을 갖는 T 세포의 생성을 초래했다.

[0007] 라파마이신에서 인간 T 세포의 생체의 배양을 통한 mTOR의 차단은 사이토카인 분비 분자 및 세포용해 효과기 분

자와 같은 효과기 분화와 관련된 분자의 T 세포 발현을 감소시키는 것이 입증되었다.

- [0008] 부가하여, 1, 25-하이드록실화된 형태의 비타민 D (본원에서 사용되는 "비타민 D")는 인간 T 세포 효과기 기능을 억제할 수 있다. 인간 T 세포 증식에 대한 비타민 D의 억제성 효과는 주기로스포린 A 또는 라파마이신과 같은 제제를 사용하는 면역 억제성 약물 노출과 시너지 효과를 낼 수 있다. 그러나, 이전 연구는 T 세포 효과기에 대한 비타민 D의 억제성 효과는 Th2-유형 분자보다 Th1-유형 분자에 대해 상대적으로 특이적이었다는 것을 나타냈다. 더욱이, 비타민 D는 면역 억제 조절성 T (T_{REG}) 세포 모집단을 촉진하는 것으로 나타났다.
- [0009] 다소 모순적인 발견에서, 인간 CD8⁺ T 세포는 높은 수준의 비타민 D 수용체를 발현하고, 가장 높은 수치를 가진 개체는 높은 수준의 T 세포 효과기 기능과 면역 노화를 갖는 경향이 있는 것으로 확인되었다.
- [0010] 최근 연구에서 결핵균 감염의 뮤어라인 모델을 사용하여, 비타민 D가 IFN- γ 생산 및 자가포식을 포함한 메커니즘을 통해 세포내 병원체의 대식세포 제거에 중요하다는 것이 입증되었다. 부가하여, 인간 비소세포 암 세포주에서 비타민 D 시그널링은 방사선과 조합될 때 항-종양 효과에 기여하는 자가포식의 세포독성 형태를 촉진할 수 있다. 마지막으로, 비타민 D 수용체 시그널링은 정상적인 인간 유방 조직에서 자가포식을 촉진한다; 이러한 비타민 D 수용체 시그널링의 손실은 유방암을 전개하는 증가된 위험과 관련되었다. 선천성 면역 (대식세포 맥락)에서 비타민 D를 자가포식과 연결하는 이 증거에도 불구하고, 적응 면역 동안 T 세포에서 자가포식에 대한 비타민 D 효과와, 이 맥락에서, T 세포자가 포식에 대한 비타민 D 및 라파마이신의 잠재적 효과가 중복되는지 여부에 관련된 데이터의 부족이 존재한다.
- [0011] T 세포 생물학에서 비타민 D의 잠재적인 역할에 관해 이들 다소 상충되는 결과는 최근 발견된, 비타민 D가 mRNA 수준과 microRNA 수준 둘 모두에서 전체 게놈에 미치는 광범위한 영향과 관련이 있을 가능성이 높다. 이와 같이, 면역에 대한 비타민 D의 영향은 상황-의존성 틀에서 평가되어야 할 필요가 있다.
- [0012] 조절성 T (T_{REG}) 세포는 면역 내성의 유지에 필수적이다. T_{REG} 세포의 양이나 질에서 감소는 몇가지만 말하면, 제 1형 당뇨병 (T1DM), 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 전신성 홍반성 루푸스를 포함한 다중의 일차 자가-면역 질환의 근본적인 원인이다. 부가하여, T_{REG}-결핍은 원발성 신경퇴행성 질환의 자연사에서 가속화와 관련되어 있다. 마지막으로, T_{REG}-결핍은 고형 장기 및 조혈 세포 이식 환경에서의 심각한 합병증, 특히 이식 거부 및 이식편대숙주 질환 (GVHD)의 증가된 비율과 관련된다. 면역 항상성 유지에서 T_{REG} 세포의 이 중요한 역할을 고려할 때, 질환의 치료를 위해 T_{REG} 세포를 촉진하기 위해 많은 실험적 접근법이 개발되었다. 이러한 유망한 접근법 중 하나는 T_{REG} 세포의 적응 전달이며, 이는 다음 두 가지 주요 하위-유형으로 존재한다: (1) 천연 (n) T_{REG} 세포로, 이는 흉선으로부터 유래되고 ("nT_{REG}" 또는 "천연 T_{REG}"), 나이가 들어감에 따라 적응 전달에 이용할 수 있는 nT_{REG} 세포의 수를 감소시킴; 및 (2) 유도성 (i) T_{REG} 세포로, 이는 보다 풍부한 효과기 T 세포의 풀로부터 주변 부에서 전환된다. nT_{REG} 세포는 수에서 제한되기 때문에, 임상 T 세포 요법을 위한 nT_{REG} 세포를 사용하는 시도는 nT_{REG} 세포의 단리 및 후속 팽창을 위한 생체의 제조 방법에 의존해왔다. 적응 세포 요법을 위한 nT_{REG} 세포의 임상 시험은 주로 GVHD의 예방 및 T1DM의 치료를 위한 페이스 I/페이스 II 임상 시험에서 시행 초기 단계에 있다. 대조적으로, 적응 세포 요법에서 iT_{REG} 세포 (본 개시내용의 T_{REG} 및 T_{REG}/Th2 세포를 포함하는 생체의 생산된 T_{REG} 세포)를 사용할 가능성에 대한 다른 도전이 존재하는데, 즉: (1) 말초 효과기 T 세포가 비교적 풍부하지만, 이들은 주로 복제 및 치료 잠재력이 제한된 효과기 기억 성숙의 상태로 존재하고; (2) 이러한 말초 효과기 T 세포는 질환 발병학에 기여하는 T 세포 서브세트, 즉 Th1- 및 Th17-유형 서브세트에 대해 높은 정도의 기존 효과기 분화를 갖는다. 이와 같이, iT_{REG} 세포 요법이 고도로 실현 가능성인 것으로 된다면, (1) T_{REG} 세포 요법적 잠재력에서 증가된 증식 잠재력 및 입증 가능한 개선을 갖는 덜-분화된 기억 표현형으로 효과기 T 세포의 탈-분화를 유발하고; (2) T_{REG} 표현형에 대한 T 세포 분화를 촉진하면서 병원성 Th1- 및 Th17-유형 경로를 소멸시키는 것 둘 모두를 하는 생체의 제조 방법을 개발하는 것이 필요할 것이다.
- [0013] iT_{REG} 세포의 제조는 치료되는 대상체 (자가조직 요법의 경우) 또는 정상 공여체 (동종이계 요법의 경우)로부터 림프구-함유 말초 혈액 단핵 세포의 수집에 의해 시작된다. 전형적으로, 이 수집은 정상-상태, 즉 임의의 성장 인자 투여 없이 수행된다; 그러나, 동종이계 맥락에서는 수집은 때때로 DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, 등. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. Blood. 2009;113(23):5720-

5726에 기술된 바와 같이 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF) 또는 플렉시포르 (plerixifor)와 같은 분자의 투여의 맥락에서 수행된다. 이 개시내용에서, 본 발명자들은 항-TNF- α 치료제가 T_{REG} 표현형에 대한 배양 투입 T 세포를 풍부화할 목적으로 iT_{REG} 제조를 위한 림프구의 수집 이전에 투여될 수 있음을 기술한다. 즉, 본 발명자들은 TNF- α 의 막-결합 형태인, 세포 표면의 상대적 보존과 함께 혈청, 무-세포 TNF- α 를 우선적으로 억제하는 제조용 수용체인 항-TNF- α 제제 엔브렐 주사가 RNA 시퀀싱으로 측정했을 때 T 세포 수용체 (TCR) 레퍼토리에서 전체적인 변화를 유도한다는 것을 입증한다. 막-결합 TNF- α 는 TNFR2 수용체를 통해 T_{REG} 세포에 양성 신호를 제공하기 때문에, 본 발명자들의 방법은 iT_{REG} 세포 제조 이전에 T_{REG} 세포를 풍부하게 하는 강력한 개입을 제공한다. 항-TNF- α 단일클론 항체인, 아달리무맙을 포함하되 이에 제한되지 않는 혈청, 무-세포 TNF- α 를 우선적으로 억제하는 다른 치료제가 또한 이 개입에 사용될 수 있다.

[0014] 근위축성 측삭 경화증 (ALS)은 대뇌 피질, 뇌간 및 척수를 포함하는 일차 신경퇴행성 질환으로 이는 진행성 장애를 초래하고 또한 전형적으로 호흡 부전에 기인한 사망을 초래한다. ALS는 다양한 유전적 사건에 기인한 환자의 10%에서 가족성 질환이다; 나머지 환자는 그 병인이 알려지지 않았지만 환경 요인을 포함할 수 있는 산발성 ALS를 갖는다. 가장 최근의 기록 데이터 (2013)는 미국에서 ALS의 유병률은 대략 16, 000건이었다는 것을 나타낸다; 이들 데이터는 또한 ALS가 60 내지 69세 군에서 백인, 남성 및 개인에게 불균형적으로 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 군 참전 용사들과 잠재적으로 프로 미식 축구 선수들은 ALS를 전개할 위험이 증가하는 것으로 보이며, 이에 의해 화학물질 노출이나 외상성 뇌 손상이 질환을 전개할 위험을 증가시킬 수 있음을 시사한다. ALS는 다양한 임상 양상과 진행을 가진 이질적인 질환이다. ALS 환자의 평균 생존기간은 진단 후 2 내지 4년이지만, 생존기간은 수개월로 짧을 수 있거나 또는 10년 이상일 수 있다. 환자-보고 ALSFRS-R 점수 (ALS Functional Rating Score, Revised)와 같은 질환 점수 시스템은 질환 진행의 선형 및 비-선형 측면을 설명하지 않기 때문에 ALS 환자에서 예후를 추정하는 것은 어렵다. 질환 진행의 속도를 추정하는 데 있어 이 어려움은 ALS에서 임상 시험에 대한 한계를 나타내고 본 발명자들이 개발한 면역학적 모니터링을 포함한 잠재적 질환 바이오마커가 프로토콜 요법의 구성요소로 강조되어야 함을 나타낸다. ALS의 임상적 발병은 방심할 수 없으며, 대부분의 환자에게 상지 또는 하지의 약화 또는 말하기 또는 삼키기 어려움 (구근-발병)을 나타낸다. ALS는 결정적인 혈액, 척수액 또는 방사선 검사가 없기 때문에 배제의 진단으로 남아 있다; 결과적으로, ALS는 전형적으로 다른 질환이 배제되어진 후 배제의 진단이다. 다른 질환을 배제하는 이 과정은 전형적으로 최대 1년이 소요될 수 있으므로 치료적 시도와 임상적 시험 발생이 지연된다; 이 의뢰 지연은 최종 ALS 진단시 최대 50%의 운동 뉴런이 더 이상 기능하지 않을 수 있기 때문에 중요성을 가지기 쉽다. 이 상황을 감안할 때, 전형적으로 진단 후 비교적 이른 시점에 ALS 환자를 조사 시험하는 것이 권장된다.

[0015] ALS는 신경-염증이 2차 전파 인자로 작용하는 일차 신경퇴행성 질환이다. 이 결론에 대한 증거는 부분적으로 TAR DNA-결합 단백질 43 (TDP-43)에서 기능적 이상이 대다수의 가족성 및 산발성 ALS 환자에서 발생한다는 관찰에서 유래된다. 건강한 상태에서 핵으로 제한되는 TDP-43은 응집되기 쉬운 RNA와 DNA 결합 단백질로, 이에 의해 ALS 환자의 뉴런에서 보이는 세포질 봉입체를 설명한다. TDP-43 경로의 변경을 초래하는 정확한 메커니즘은 완전히 밝혀진 상태로 남아 있지만 RNA 중간체를 통해 스스로 복제하는 다양한 세포 스트레스 사건 또는 게놈 요소 (다시치환가능한 요소, RTE)의 증폭을 포함하는 것으로 보인다. 궁극적으로, 이러한 사건은 프로그램된 괴사를 포함하여 뉴런에서 다면적인 프로그램된 세포사로 이어진다. 주목할 점은, ALS 환자에서 발생하는 괴사 세포사 패턴은 보다 질서있는 세포자살 세포사 대비 특히 면역원성이 있는 것으로 나타났다; 실제로, ALS에서 운동 뉴런사의 알려진 분자 매개체인 TNF- α 는 괴사 형태의 세포사를 생성할 수 있다. 괴사성 세포사는 자가면역 유도를 위해 그 다음 적응 면역계에 제시될 수 있는 자가-항원의 방출로 이어질 수 있다; 부가하여, 단백질 응집체 자체가 면역원성일 수 있기 때문에, ALS 환자에서 발생하는 단백질 응집체(TDP-43; SOD-1; p62를 포함하되 이에 제한되지 않음)가 신경변성 후 발산되는 자가면역 반응의 표적이 될 수 있다는 것이 가능하다. 실제로, ALS 환자로부터의 단백질이 TDP-43을 함유하는 엑소좀으로 펄스되었을 때 염증 표현형이 전개하는 것이 최근 밝혀졌다.

[0016] 일차 신경변성에 대한 반응에서, 선천적 염증소체와 적응성 말초 면역계가 문제의 추가 ALS 질환 진행에 조합한다는 광범위한 증거가 있다. ALS의 슈퍼옥사이드 디스뮤타제-1 (SOD1) 트랜스제닉 마우스 모델에서, CD3⁺ T 세포 척수 침윤 및 소교 세포 활성화가 질환 진행에 기여하는 전-염증성 인자로 인식되었다. 더욱이, ALS의 PU.1 녹아웃 마우스 모델에서 숙주 소교 세포 대비 감소된 염증성 성향을 갖는 야생형 소교 세포의 전달은 신경 퇴화를 감소시키고 생존을 향상시켰다. 부가하여, CD4⁺ T 세포에 대한 보호 역할은 ALS의 SOD1 뮌어라인 모델에서 처음으로 기술되었으며, 이에 의해 ALS에서 말초 면역 T 세포 풀의 양날 검 특성 (증식 또는 보호 인자 중 어느

하나로 작용)을 나타낸다. ALS 환자에서 말초 적응 면역계 T 세포의 유해한 역할에 대한 직접적인 증거는 척수에 침투하는 T 세포가 올리고글론성 T 세포 수용체 (TCR) 레퍼토리를 발현한다는 입증에 의해 확인될 수 있다. 더욱이, 말초 면역계에서 나오는 전문적인 항원-제시-세포 (수지상 세포)는 염증성 말초-유래 단핵구 및 상주 CNS 소교 세포와 밀접하게 연관된 ALS 환자 척수 조직에서 단리될 수 있다. 부가적으로, ALS 환자에서 정제된 단핵구는 선천성 염증성 분자 IL-1-β에서 증가를 포함하여 전-염증성 RNA 발현 프로파일을 발현하며, 이는 그 다음 CD4⁺T-헬퍼-1(Th1), CD8⁺T-세포독성-1 (Tc1) 및 CD4⁺Th17-매개된 신경퇴행성 면역을 촉진하는 IL-23 경로를 구동할 수 있다. 후속 연구에서, ALS의 SOD1 뮐어라인 모델에서 보호 CD4⁺T 세포 서브세트의 표현형은 반-조절성 Th2-유형 사이토카인 IL-4 및 IL-10을 통해 부분적으로 매개되는 메커니즘을 통해 염증을 감소시키는 조절성 T (T_{REG}) 세포 모집단으로 특성규명되었다.

[0017] 이 생물학은 다음을 나타내는 신경-염증 연구에서의 풍부한 데이터와 일치한다: 소교 세포는 신경퇴화를 유도하는 뇌에서의 주요 세포 구성요소이고; 그리고 소교 세포와 CNS-침투 말초 CD4⁺T 세포는 상호작용하고 질병 병인에 영향을 미친다. 뮐어라인 모델링 결과와 일치하여, FoxP3⁺T_{REG} 세포 및 Th2-유형 T 세포에 대해 풍부한 말초 면역계를 가진 환자는 주로 전-염증성 Th1-유형 면역 프로파일을 가진 환자 대비 감소된 ALS의 진행률을 보였다. 더욱이, ALS 환자 T_{REG} 세포가 기능장애를 일으키는 것이 최근 밝혀졌으며, 이러한 기능장애는 질환 진행률 및 중증도와 상호관련이 있다. 현행 임상 시험은 ALS의 요법을 위해 nT_{REG} 세포의 다중 주입 플러스 저용량 IL-2 투여의 사용을 평가하고 (ClinicalTrials.gov; NCT03241784); IL-2는 STAT5 시그널링 경로를 자극하고 이에 의해 nT_{REG} 세포의 생체내 팽창을 촉진할 수 있는 사이토카인이다.

[0018] 유도된 (i) T_{REG} 세포는 nT_{REG} 세포 모집단에서처럼 흉선에서 유래하지 않는다; 오히려, iT_{REG}는 달리 Th1 세포와 같은 병원성 흉선-후 T 세포 서브세트로부터 전환된 모집단이다. nT_{REG} 및 iT_{REG} 둘 모두는 염증 반응을 완화시키는 데 중요하고 비-중복하는 역할을 하지만, iT_{REG} 요법의 개발은 조절성 T 세포 효능과 제조 용이성의 관점에서 상대적으로 유리하다. 더욱이, ALS의 적응 iT_{REG} 요법은 본 발명자들이 여기에서 설명하는 면역 모니터링 기술 및 숙주 치료 요양법 (펜토스타틴, 사이클로포스파미드, 라미부딘)과 조합하여 사용하면 특히 효과적일 것이다.

[0019] 1995년 ALS 치료를 위해 최초로 승인된 약물인 릴루졸 (Rilutek®)은 단지 ALS의 이환율과 사망률을 줄이는 데 약간 효과적이다. 60개 초과 분자가 ALS 요법을 위해 조사된 중요한 임상 연구에도 불구하고, 적당한 임상적 성공을 보인 단지 2개의 추가 분자, 즉 항-산화제 에다라본과 티로신 키나제 억제제 마시티닙 만이 있었다. ALS의 요법에 대해 최근 FDA-승인된 에다라본 (Radicava®)은 최소한의 임상적 이점을 제공하고, 비싸고, 매일 2-주 지속하고 2-주 쉬는 지속적인 i.v. 주입 요법을 요하고; 마시티닙은 FDA-승인을 받지 않았다. ALS의 요법을 위한 라파마이신의 페이스 II 시험이 현재 막 시작되고 있다 (ClinicalTrials.gov Identifier:NCT03359538). 라파마이신은 또한 T_{REG} 세포 재구성을 촉진하는 이 체계의 경향으로 인해 ALS에서 사용하기에 유리한 약학적 체제를 나타낼 수 있다. 그러나, 라파마이신으로 장기간의 요법은 상당한 독성을 가지고 있고, 약리학적 모니터링이 필요하고, 일부 모델에서 실제로 ALS를 악화시키는 관점에서 역설적 효과를 가질 수 있고, 적응성으로 전이된 T 세포 모집단의 팽창을 제한할 수 있다.

[0020] 이와 같이, 현재 매우 제한된 치료적 옵션의 상태를 감안할 때, ALS의 요법에 대한 새로운 전략을 평가할 큰 필요성이 있다. 이 출원에서, 본 발명자들은 유도성 (i) 조절성 T (T_{REG}) 세포 요법을 중심으로 하는 ALS의 새로운 치료 접근법을 기술한다.

발명의 내용

[0021] **개요**

[0022] 본 개시내용은 T 세포의 탈-분화 및 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포로 이러한 세포의 분화에 대한 방법에 대한 것이다.

[0023] 일부 실시형태에서, 초기 탈-분화 방법은 (약물 투여 없이) 정상-상태에서 수확된 입력 세포 모집단으로 배양을 개시하는 것을 포함할 수 있다.

[0024] 일부 실시형태에서, 방법은 막-결합 TNF-α의 상대적 보존으로 혈청, 무-세포 형태의 TNF-α의 억제에 우선적으로 선택적인 항-TNF-α 치료제로 치료되었거나 치료되고 있는 대상체 (자가조직 맥락에서) 또는 정상 공여체

(동종이계 맥락에서)로부터 수확된 입력 세포 모집단으로 탈-분화 배양을 개시하는 것을 포함한다. 이러한 치료제는 피하 주사에 의해 주당 25 또는 50 mg의 통상적인 용량으로 투여될 수 있는 재조합 수용체 에타너셉트, 또는 정맥 주사에 의해 주당 40 mg 또는 격주로 40 mg의 통상적인 용량으로 투여될 수 있는 단일클론 항체 아달리무맙을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 모든 경우에서, 항-TNF- α 치료제의 복용량은 원하는 바이오마커 변경에 따라 조정될 수 있으며, 여기에는 RNA 시퀀싱 분석에 의한 TCR 레퍼토리의 변경 및 유세포분석법에 의한 유형 2 TNF 수용체 (TNFR2)로의 이동과 유형 1 TNF 수용체 (TNFR1)로부터 멀어지는 이동이 포함될 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.

- [0025] 일부 실시형태에서, 방법은 비타민 D, 텀시롤리무스 및 IL-2 시그널링 억제제를 포함하는 배양 배지 내 세포 밀도로 대상체로부터의 T 세포를 포함하는 세포의 배양 투입 모집단을 접종하는 단계; 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 상기 T 세포 및 배양 배지에 1:1 이하의 비드:T 세포 비율로 첨가하여 상기 T 세포를 자극하거나, 또는 가장 극단적인 예에서, 항-CD3/항-CD28 공-자극의 무 첨가 단계; 일정 시간 동안 상기 세포의 배양 투입 모집단 및 배양 배지를 배양하여 탈-분화된 T 세포를 생성하는 단계를 포함한다. 임의의 비드 공-자극이 없는 상태에서 이 탈-분화 절차를 수행하는 것이 또한 가능하다.
- [0026] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 탈-분화된 T 세포를 수확하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 탈-분화된 T 세포를 수확하는 단계 후에 패키지에 상기 탈-분화된 T 세포의 적어도 일부를 포장하는 단계; 및 상기 탈-분화된 T 세포의 상기 일부를 함유하는 상기 패키지를 동결시키는 단계를 포함한다.
- [0028] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 배양 배지 안으로 상기 세포의 배양 투입 모집단을 접종하는 단계 전에 상기 대상체로부터 상기 세포의 배양 투입 모집단을 수확하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0029] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 일정 시간은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소될 때까지 지속하고, 여기서 상기 T 세포의 대조군 모집단은 텀시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된다.
- [0030] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR 및 하우스키핑 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 일정 시간은 제조된 T 세포에서 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 텀시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단에서 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된, 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준보다 적어도 50%이고, 보다 바람직하게는 90% 낮을 때까지 지속한다.
- [0031] 본 개시내용은 또한 임의의 전술한 실시형태의 방법에 의해 생성된 탈-분화된 T 세포에 대한 것이다.
- [0032] 본 개시내용은 또한 탈-분화 세포의 모집단을 포함하는 조성물에 대한 것이며, 여기서 상기 탈-분화 세포의 상기 모집단의 적어도 일부는 텀시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단과 비교하여 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 90% 미만의 RAPTOR 또는 RICTOR를 발현한다.
- [0033] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 그들이 T 세포의 대조군 모집단 대비 다음 분자의 RNA 발현에서 적어도 10%, 그리고 더욱 바람직하게는 50% 변화를 나타내는 상기 탈-분화된 세포의 상기 모집단의 적어도 일부를 측정하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 즉: 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포 효과기 분자에서 감소; Nanog, KLF4 및 KLF10을 포함하지만 이에 제한되지 않는 감소된 분화 상태의 세포와 관련된 전사 인자에서 증가; CD127, IL-7 수용체 알파 사슬을 포함하지만 이에 제한되지 않는 나이브 T 세포 서브세트 상에서 우선적으로 발현되는 분자의 발현에서 증가; T-BET 및 STAT1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 Th1-유형 분화와 관련된 전사 인자에서 감소; 및 HIF-1 알파를 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포 생존을 촉진하는 전사 인자의 상대적 보존이다.
- [0034] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 그들이 자가포식을 겪는 세포를 나타내는 분자의 발현에서 적어도 10% 그리고 보다 바람직하게는 50% 변화를 나타내는 상기 탈-분화된 세포의 상기 모집단의 적어도 일부를 측정하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 예로서, 상기 탈-분화된 세포는 대조군 T 세포 대비 웨스턴 블랏 분석에 의해 p62의 증가된 발현을 갖는다. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy.

International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(9):1865에 기재된 것과 같이, 자가포식을 측정하는 다른 표준 방법이 또한 사용될 수 있다.

- [0035] 본 개시내용은 또한 임의의 전술한 실시형태의 방법에 의해 생성된 탈-분화된 T 세포에 대한 것이다.
- [0036] 본 개시내용은 또한 탈-분화된 세포의 모집단을 포함하는 조성물에 대한 것이며, 여기서 상기 탈-분화된 세포의 상기 모집단의 적어도 일부는 T 세포의 대조군 모집단 대비 다음 분자의 RNA 발현에서 적어도 10% 그리고 더욱 바람직하게는 50% 변화를 나타내며, 즉: 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포 효과기 분자에서 감소; Nanog, KLF4 및 KLF10을 포함하지만 이에 제한되지 않는 감소된 분화 상태의 세포와 관련된 전사 인자에서 증가; CD127, IL-7 수용체 알파 사슬을 포함하지만 이에 제한되지 않는 나이브 T 세포 서브 세트 상에서 우선적으로 발현되는 분자의 발현에서 증가; T-BET 및 STAT1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 Th1-유형 분화와 관련된 전사 인자에서 감소; 및 HIF-1 알파를 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포 생존을 촉진하는 전사 인자의 상대적 보존이다.
- [0037] 본 개시내용은 또한 자가포식을 겪는 세포를 나타내는 분자의 발현에서 적어도 10% 그리고 보다 바람직하게는 50% 변화를 나타내는 상기 탈-분화된 세포에 의해 정의된 바와 같은 탈-분화된 세포의 모집단을 포함하는 조성물에 대한 것이다. 하나의 예로서, 상기 탈-분화된 세포는 대조군 T 세포 대비 웨스턴 블랏 분석에 의해 p62의 증가된 발현을 갖는다. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(9):1865에 기재된 것과 같이, 자가포식을 측정하는 다른 방법이 또한 적용될 수 있다.
- [0038] 본 개시내용은 또한 탈-분화된 세포의 모집단을 포함하는 조성물에 대한 것이며, 여기서 상기 탈-분화된 세포의 모집단의 적어도 일부는 T 세포의 대조군 모집단과 비교하여 RAPTOR 및 RICTOR 둘 모두의 50% 미만을 발현한다.
- [0039] 본 개시내용은 탈-분화된 T 세포를 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포로 분화시키는 방법에 대한 것이다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 방법은 IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서, 본 개시내용의 탈-분화된 T 세포 또는 다르게 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계; 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계; 및 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하여 T_{REG}/Th2 세포를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0041] 일부 실시형태에서, 방법은 IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D 없이 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50% 더 적은 RAPTOR 또는 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계; 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계; 및 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하여 T_{REG}/Th2 세포를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 방법은 IL-2 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D 없이 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 90% 더 적은 RAPTOR 또는 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계; 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계; 및 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하여 T_{REG} 세포를 생성하는 단계를 포함한다.
- [0043] 임의의 전술한 실시형태에서, 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 개시내용은 또한 임의의 전술한 방법에 의해 생성된 T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포에 대한 것이다.
- [0045] 본 개시내용은 또한 근위축성 측삭 경화증의 치료를 필요로하는 대상체에서 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법에 대한 것이다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 방법은 상기 대상체에게 하나 이상의 일차 치료 주기를 적용하는 단계를 포함하며, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고; 상기 대상체에게 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 적용하는 단계는 상기 대상체에게 치료적으로 유효한 양의 제조된 T_{REG} 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0047] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 치료 주기, 제2 치료 주기, 선택적으로 하나 이상의 추가 치료 주기 및 하나 이

상의 면역 요법 치료 주기를 포함하고, 상기 제1 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고; 상기 제2 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고; 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하고 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계 및 상기 대상체에게 제조된 T_{REG} 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0048] 일부 실시형태에서, 방법은 제조된 T_{REG} 세포의 치료적으로 유효한 양을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 하나 이상의 치료 주기를 포함한다.

[0049] 일부 실시형태에서, 방법은 제조된 T_{REG} 세포의 치료적으로 유효한 양을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0050] 도 1a는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 GAPDH mRNA 발현을 도시한다.
- 도 1b는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 그랜자임 B mRNA 발현을 도시한다.
- 도 1c는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 IL-10 mRNA 발현을 도시한다.
- 도 1d는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 IFN-β mRNA 발현을 도시한다.
- 도 1a-1d는 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합이 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 효과기 분자 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다.
- 도 2a는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 NANOG mRNA 발현을 도시한다.
- 도 2b는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 KLF4 mRNA 발현을 도시한다.
- 도 2c는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 KLF10 mRNA 발현을 도시한다.
- 도 2d는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 IL-7 수용체 mRNA 발현을 도시한다.
- 도 2a-2d는 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합이 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 줄기 세포-관련 전사 인자 및 원시 T 세포 분자 IL-7 수용체-알파의 발현을 증가시킨다는 것을 예시한다.
- 도 3a는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 T-BET mRNA 발현을 도시한다.
- 도 3b는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 STAT1 mRNA 발현을 도시한다.
- 도 3c는 대조군 세포 및 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 정규화된 HIF-1-α mRNA 발현을 도시한다.
- 도 3a-3c는 비타민 D와 템시롤리무스의 조합이 T 세포 생존과 관련된 전사 인자인 HIF-1-α의 발현을 감소시키지 않으면서 효과기 Th1/Tc1 세포와 관련된 전사 인자의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다.
- 도 4는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 액틴 발현에 의해 정규화된 p62 발현을 도시하고, 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 자가포식-관련된 분자인 p62의 발현을 유도한다는 것을 예시한다.
- 도 5는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 액틴 발현에 의해 정규화된 Raptor 발현을 도시하고, 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 mTORC1-관련된 분자인 Raptor의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다.
- 도 6은 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 GAPDH, p70S6K, SGK1, Raptor 및 Rictor 발현의 웨스턴 블랏을 도시하고, 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 mTORC1-관련된 분자인 Raptor 및 mTORC2-관련된 분자인 Rictor의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다.
- 도 7은 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 액틴 발현에 의해 정규화된 BIM 발현을 도시하고, 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 프로-세포자멸사 분자인 BIM의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다.
- 도 8은 탈-분화 간격 동안 후속 T 세포 수율 (배양의 13일차)에 대한 배양 성분의 효과를 예시한다.

- 도 8은 탈-분화 간격 동안 후속 T 세포 수율 (배양의 13일차)에 대한 배양 성분의 효과를 제시한다.
- 도 9a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 CD45RA+인 CD4 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 9b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 CD62L+ 및 CCR7+인 CD4 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 9c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 CD62L+, CCR7+ 및 CD127+인 CD4 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 9a-9c는 탈-분화 간격 동안 기억 마커의 CD4+ T 세포 발현 (배양의 13일차)에 대한 배양 성분의 효과를 제시한다.
- 도 10a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 CD62L+ 및 CCR7+인 CD8 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 10b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 CD62L+, CCR7+ 및 CD127+인 CD8 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 10a-10b는 탈-분화 간격 동안 기억 마커의 CD8+ T 세포 발현에 대한 배양 성분의 효과를 제시한다.
- 도 11a-11d는 분극화-중성 배지에서 배양된 탈-분화된 T 세포의 염증성 Th1/Th17 사이토카인 분석을 도시한다.
- 도 11a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IFN- γ 분비를 도시한다.
- 도 11b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 GM-CSF 분비를 도시한다.
- 도 11c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 TNF- α 분비를 도시한다.
- 도 11d는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-17 분비를 도시한다.
- 도 12a-12d는 분극화-중성 배지에서 배양된 탈-분화된 T 세포의 IL-2 및 Th2-유형 사이토카인 분석을 도시한다.
- 도 12a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-2 분비를 도시한다.
- 도 12b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-4 분비를 도시한다.
- 도 12c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-5 분비를 도시한다.
- 도 12d는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-13 분비를 도시한다.
- 도 13은 Th1 분극화 조건 대비 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 유리한 팽창을 도시한다.
- 도 14a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 총 CD4+ 세포 중 CD4+CD45RA+ 세포의 백분율을 도시한다.
- 도 14b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 총 CD4+ 세포 중 CD4+CD62L+CCR7+ 세포의 백분율을 도시한다.
- 도 14c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 총 CD4+ 세포 중 CD4+CD62L+CCR7+CD127+ 세포의 백분율을 도시한다.
- 도 14-a14c는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 나이브 및 삼중-양성 T 중앙 기억 CD4+ T 세포의 생성을 초래함을 제시한다.
- 도 15a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 총 CD8 세포 중 CD8+CD62L+CCR7+ 세포의 백분율을 도시한다.
- 도 15a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 총 CD8 세포 중 CD8+CD62L+CCR7+CD127+ 세포의 백분율을 도시한다.
- 도 15a-15b는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 삼중-양성 T 중앙 기억 CD8+ T 세포의 생성을 초래함을 제시한다.
- 도 16a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-2 분비를 도시한다.
- 도 16b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-4 분비를 도시한다.
- 도 16c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-5 분비를 도시한다.
- 도 16a-16c는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형: IL-2, IL-4 및 IL-5 분비를 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 제시한다.
- 도 17a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-10 분비를 도시한다.

- 도 17b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-13 분비를 도시한다.
- 도 17c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IL-17 분비를 도시한다.
- 도 17a-17c는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형: IL-10, IL-13 및 IL-17 분비를 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 18a는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 IFN- γ 분비를 도시한다.
- 도 18b는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 TNF- α 분비를 도시한다.
- 도 18c는 다양한 조건하에서 처리된 세포에 대한 GM-CSF 분비를 도시한다.
- 도 18a-18c는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형: IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF 분비를 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 19a는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD4+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 19b는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD4+FOXP3+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 19c는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD4+Tbet+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 19d는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD4+GATA3+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 19a-19d는 페메트렉시드를 함유하는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 FOXP3 및 GATA3 전사 인자를 발현하는 CD4+ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 20a는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD8+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 20b는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD8+FOXP3+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 20c는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD8+Tbet+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 20d는 일별 배양 및 배양 억제제에서 CD8+GATA3+ T 세포의 퍼센트를 도시한다.
- 도 20a-20d는 페메트렉시드를 함유하는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 FOXP3 및 GATA3 전사 인자를 발현하는 CD8+ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 21a는 일별 배양 및 배양 억제제의 세포에 대한 IL-4 분비를 도시한다.
- 도 21b는 일별 배양 및 배양 억제제의 세포에 대한 IL-5 분비를 도시한다.
- 도 21c는 일별 배양 및 배양 억제제에서 세포에 대한 IL-13 분비를 도시한다.
- 도 21a-21c는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 우세한 Th2 사이토카인 표현형: IL-4, IL-5 및 IL-13 분비로 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 22a는 일별 배양 및 배양 억제제의 세포에 대한 IL-2 분비를 도시한다.
- 도 22b는 일별 배양 및 배양 억제제에서 세포에 대한 IFN- γ 분비를 도시한다.
- 도 22c는 일별 배양 및 배양 억제제에 대한 세포에 대한 GM-CSF 분비를 도시한다.
- 도 22a-22c는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 우세한 Th2 사이토카인 표현형: IL-2, IFN- γ 및 GM-CSF 분비로 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 23a 및 23b는 항-TNF- α 요법 에타너셉트 요법이 RNA 시퀀싱에 의해 측정될 때 TCR 레퍼토리의 현저한 변경을 초래하고, 이에 의해 혈장교환에 의한 림프구 수집 이전에 대상체 치료에 대한 새로운 접근법을 나타낸다는 것을 예시한다.
- 도 24는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 증가된 수준의 다음 분자: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA를 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 25는 하이브리드 Th2/TREG 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 증가된 수준의 다음 분자: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40을 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.
- 도 26a는 유세포분석법에 의해 측정된 배양 개시 및 배양 후 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 FOXP3 발현을 도시한다.

도 26b는 유세포분석법에 의해 측정된 배양 개시 및 배양 후 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서의 GATA3 발현을 도시한다.

도 27a는 유세포분석법에 의해 측정된 배양 개시 및 배양 후 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서의 CD73 발현을 도시한다.

도 27b는 유세포분석법에 의해 측정된 배양 개시 및 배양 후 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서의 CD103 발현을 도시한다.

도 28a는 유세포분석법에 의해 측정된, 배양 개시, 배양 후 및 mTOR 억제제에 노출되지 않은 대조군 T 세포에 대한, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 유세포분석법에 의해 측정된 CD150 빈도를 도시한다.

도 28b는 유세포분석법에 의해 측정된 배양 개시 및 배양 후 CD4⁺ T 세포에 대한 CD27 대 CD95 발현을 도시한다.

도 29는 상이하게 배양된 세포 및 대조군 세포에 대한 IL-4, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-17 및 GM-CSF를 도시한다.

도 30a는 RAPA-501 세포가 있거나 없는 Th1/Tc1 세포의 트랜스웰 검정에 대한 사이토카인 함량을 도시한다.

도 30b는 실시예 24에서 CD4 및 PD1의 검정에 대한 유세포분석법 결과를 도시한다.

도 31a는 RAPA-501 세포에 노출되거나 노출되지 않은 인간 소교 세포에 대한 IL-6, IP-10 및 IFN- γ 분비를 도시한다.

도 31b는 RAPA-501 세포에 노출되거나 노출되지 않은 인간 소교 세포에 대한 IL-6, IP-10 및 IFN- γ 분비를 도시한다.

도 32는 PC 요양법 및 전반적인 치료적 접근법을 개략적으로 도시한다.

도 33은 PC 요양법-전 및 -후 혈장교환에 의한 림프구 수집을 개략적으로 도시한다.

도 34는 iT_{REG} 세포의 각각의 반복적 용량 이전의 PC 요양법을 개략적으로 도시한다.

도 35는 iT_{REG} 세포로 처리된 환자의 모니터링을 개략적으로 도시한다.

도 36a-36b는 항-TNF- α 요법 에타너셉트 요법이 RNA 시퀀싱에 의해 측정될 때 TCR 레퍼토리의 현저한 변경을 초래하고, 이에 의해 혈장교환에 의한 림프구 수집 이전에 대상체 치료를 위한 새로운 접근법을 나타낸다는 것을 예시한다.

도 37은 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 증가된 수준의 다음 분자: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA를 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.

도 38은 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 증가된 수준의 다음 분자: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40을 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다.

도 39는 대안적인 프로토콜 설계를 도시한다.

도 40a는 CD4⁺ 세포에 대한 유세포분석법에 의해 측정된 RAPA-501 GATA3 및 FOXP3를 도시한다.

도 40b는 CD8⁺ 세포에 대한 유세포분석법에 의해 측정된 RAPA-501 GATA3 및 FOXP3를 도시한다.

도 41은 본 개시내용의 탈-분화 방법의 예시적인 작업흐름을 도시한다.

도 42는 본 개시내용의 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포에 대한 작용의 추정 메커니즘을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 본 개시내용은 T 세포 탈-분화에 대한 방법 및 생성된 세포, 탈-분화된 T 세포로부터 인간 하이브리드 조절성 T/Th2 세포 (하이브리드 T_{REG}/Th2 세포)를 제조하는 방법 및 유도된 조절성 T (iT_{REG}) 세포를 사용한 ALS 치료를 위한 방법을 제공한다.

[0052] 정의

- [0053] 본 명세서에 사용된 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명확하게 달리 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.
- [0054] 청구범위 및 본 개시내용에서 용어 "또는"의 사용은 대안만을 지칭하는 것으로 명시적으로 표시되지 않거나 대안이 상호 배타적인 경우가 아니면 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다.
- [0055] 수치와 함께 사용될 때, 용어 "약"의 사용은 +/- 10%를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 아미노산의 수가 약 200개로 동정되면, 이는 180 내지 220개 (플러스 또는 마이너스 10%)를 포함한다.
- [0056] 용어 "환자", "개체" 및 "대상체"는 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용되고, 치료되어 지는 포유류 대상체를 지칭하며, 인간 환자가 바람직하다. 일부 경우에, 본 발명의 방법은 실험 동물, 수의학 적용 및 마우스, 랫트 및 햄스터를 포함한 설치류 및 영장류를 포함하지만 이에 제한되지 않는 질환에 대한 동물 모델의 개발에서 용도를 발견한다.
- [0057] "샘플"은 본 명세서에서 가장 넓은 의미로 사용된다. 세포, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 펩티드, 항체 등을 포함하는 샘플은 체액; 세포 체계의 가용성 분획, 또는 세포가 성장한 배지; 염색체, 세포기관 또는 세포에서 단리되거나 추출된 막; 용액 내 또는 기질에 결합된 게놈 DNA, RNA 또는 cDNA, 폴리펩티드 또는 펩티드; 세포; 조직; 조직 프린트; 지문, 피부 또는 머리카락; 등을 포함할 수 있다.
- [0058] "치료"는 장애의 진개를 예방하거나 그의 병리 또는 증상을 변경하기 위한 목적으로 수행되는 개입이다. 따라서, "치료"는 치료적 치료 및 예방적 또는 방지적 조치 둘 모두를 지칭할 수 있다. 치료가 필요한 이들은 이미 장애가 있는 이들뿐만 아니라 장애가 예방되어야 하는 이들을 포함한다. 종양 (예를 들어, 암) 치료에서, 치료제는 종양 세포의 병리를 직접 감소시키거나 종양 세포를 다른 치료제, 예를 들어 방사선 및/또는 화학요법에 의한 치료에 더 민감하게 만들 수 있다.
- [0059] 본 명세서에 사용된 "치료 주기"는 일반적으로 일차 치료 주기, 제1 치료 주기, 제2 치료 주기 또는 하나 이상의 추가의 치료 주기를 지칭할 수 있다.
- [0060] 본 명세서에 사용된 "면역 세포"는 B 세포라고도 불리는 B 림프구, T 세포라고도 불리는 T 림프구, 자연 살해 (NK) 세포, 자연 살해 T (NKT) 세포, 림포카인-활성화 살해 (LAK) 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 과립구, 비만 세포, 혈소판, 랑게르한스 세포, 줄기 세포, 수지상 세포, 말초 혈액 단핵 세포, 종양-침윤 (TIL) 세포, 하이브리도마를 포함하는 유전자 변형 면역 세포, 약물 변형 면역 세포 및 상기 세포 유형의 유도체, 전구체 또는 전구세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 분석될 수 있는 면역계의 임의의 세포를 포함하는 것으로 의미된다.
- [0061] "T 세포" 또는 "T 림프구"는 흉선에서 유래하고 CD3 복합체의 단백질과 관련된 이중이량체 수용체를 갖는 림프구의 서브세트 (예를 들어, 재배열된 T 세포 수용체, 세포의 항원/MHC 특이성을 담당하는 T 세포 표면 상의 이중이량체 단백질)이다. T 세포 반응은 다른 세포에 대한 그의 영향 (예를 들어, 표적 세포 사멸, B-세포와 같은 다른 면역 세포의 활성화) 또는 그들이 생산하는 사이토카인에 대한 검정에 의해 검출될 수 있다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 용어 "탈-분화된 T 세포"는 본 개시내용의 임의의 방법에 의해 탈-분화된 T 세포를 지칭한다. 특정 양태에서, 탈-분화된 T 세포는 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D 없이 동일한 조건하에 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 또는 RICTOR의 감소된 발현을 갖는다. "탈-분화된 T 세포"는 환자로부터 수집된 T 세포, 즉 자연적으로 발생하는 T 세포는 포함하지 않는다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 용어 "항-CD3/항-CD28"은 항-CD3/항-CD28 항체를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, "항-CD3/항-CD28 자기 비드"는 그와 연관된 항-CD3/항-CD28 항체 모이어티를 갖는 자기 비드를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 항-CD3/항-CD28 자기 비드와 같은 특정한 형태에 의해서도 항-CD3/항-CD28 공-자극이 제공되지 않는 것이 밝혀진 경우에, 이는 또한 다른 형태의 항-CD3/항-CD28로 공-자극을 배제할 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0064] 본 개시내용에서, 항-CD3/항-CD28 항체에 의한 공-자극이 수행되는 경우, 이 공-자극은 임의의 형태의 항-CD3/항-CD28 항체로 제공될 수 있음이 또한 이해되어야 한다. 비제한적인 예로서, 공-자극이 항-CD3/항-CD28 비드를 사용하여 수행되는 것으로 표시되는 경우, 항-CD3/항-CD28 나노입자 또는 마이크로 입자가 사용될 수 있다. 항-CD3/항-CD28 자기 비드와 같은 특정한 형태에 의해서도 항-CD3/항-CD28 공-자극이 제공되지 않는 것이 밝혀진 경우에, 이는 또한 다른 형태의 항-CD3/항-CD28로 공-자극을 배제할 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0065] 본 명세서에 사용된 용어 "인간 하이브리드 TREG/Th2 세포", "iTREG" 및 "TREG/Th2 세포"는 달리 언급되지 않는

한 본 개시내용의 방법에 의해 분화된 세포를 지칭한다. 본 개시내용의 "인간 하이브리드 TREG/Th2 세포", "iTREG" 및 "TREG/Th2 세포"는 환자로부터 수집된 T 세포, 즉 자연적으로 발생하는 T 세포를 포함하지 않는다.

- [0066] 본 명세서에 사용된 용어 "제조된 TREG 세포"는 본 개시내용의 탈-분화 및 재-분화 방법에 의해 생성된 세포를 지칭하고, 달리 언급되지 않는한, TREG 세포 및 인간 하이브리드 TREG/Th2 세포를 포함하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0067] 본 명세서에서 사용된 "대조군 Th1/Tc1 세포"는, 달리 언급되지 않는 한, 비타민 D, 텀시롤리무스 또는 IL-2 시그널링 억제제로 처리되지 않았고, 오히려 20 IU/ml IL-2 및 20,000 IU/ml의 IFN- α 가 보충된 배지에서 3:1 (비드:T 세포)의 비율로 항-CD3/항-CD28 자기 코팅된 비드로 공-자극되었고 그렇지 않으면 그들이 비교되어 지는 세포와 동일하게 배양된 세포를 지칭한다. 세포의 대조군 모집단 (또는 대조군 T 세포)이 텀시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제를 포함하는 배양 첨가제 없이 또는 탈-분화된 세포의 맥락에서 처리된 것으로 언급된 경우, 이 모집단 (또는 T 세포)은 20 IU/ml IL-2 및 20,000 IU/ml의 IFN- α 가 보충된 배지에서 3:1 (비드:T 세포)의 비율로 항-CD3/항-CD28 자기 코팅된 비드로 추가로 공-자극되었고 그렇지 않으면 그들이 비교되어 지는, 즉, 그들이 "대조군 Th1/Tc1 세포"인 세포와 동일하게 배양되었다는 것이 또한 이해되어야 한다.
- [0068] 본 개시내용은 새로운 약리학적 조합과 정의된 T 세포 공-자극성 조건을 사용하여 덜 분화된 중앙-기억 유형 T 세포 안으로 분화된 효과기 기억 T 세포의 전환에 기초한 감소된 분화 상태의 T 세포의 생체의 생성을 위한 새로운 방법론을 제공한다.
- [0069] 도 41에 도시된 바와 같이, 본 개시내용의 탈-분화된 T 세포는 체크포인트 억제제 수용체 (예컨대 PD1, CTLA4, TIM3 및 LAG3), 기억 마커 (예컨대 CD45RO) 및 운명 분자 (예컨대 TBET, ROR γ , FOXP3 및 GATA3 등)의 발현이 낮거나 없는 정지 표현형을 가질 수 있다. 재-분화된 T 세포는 GATA3 및 FOXP3 발현을 특징으로 하는 하이브리드 운명뿐만 아니라 CD45RA 및 CD150 발현을 특징으로 하고 체크포인트 단백질 발현이 없는 줄기 세포 기억을 가질 수 있다.
- [0070] 도 42에 도시된 바와 같이, 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포가 CD39 또는 CD73 수용체를 통한 염증 및 TNF- α 에 의해 활성화될 수 있는 본 개시내용의 하이브리드 T_{REG}/Th2 세포의 작용의 추정 메커니즘으로, 이는 세포가 병원성 T 세포를 조절하여 사멸을 방지할 수 있다.
- [0071] *T 세포 탈-분화를 위한 방법 및 얻어진 세포*
- [0072] 본 발명자들은 새로운 약리학적 조합과 정의된 T 세포 공-자극성 조건을 사용하여 덜 분화된 중앙-기억 유형 T 세포 안으로 분화된 효과기 기억 T 세포의 전환에 기초한 감소된 분화 상태의 T 세포의 생체의 생성을 위한 새로운 방법론을 제시한다.
- [0073] 일 실시형태에서, 방법은 비타민 D, 텀시롤리무스 및 IL-2 시그널링 억제제를 포함하는 배양 배지 내에 세포 밀도에서 대상체로부터의 T 세포를 포함하는 세포의 배양 투입 모집단을 접종하는 단계; 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 1:1 이하의 비드:T 세포 비율로 상기 T 세포 및 배양 배지에 첨가하여 상기 T 세포를 자극하거나 임의의 공-자극 비드를 첨가하지 않는 단계; 일정 시간 동안 상기 세포의 배양 투입 모집단 및 배양 배지를 인큐베이션하여 탈-분화된 T 세포를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 세포의 배양 투입 모집단의 수집 이전에 항-TNF- α 요법으로 처리되었다. 일부 실시형태에서, 항-TNF- α 요법은 에타너셉트 또는 아달리무맙이다. 일부 실시형태에서, 항-CD3/항-CD28로 공-자극은 수행되지 않는다.
- [0074] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 배양 배지는 IL-2를 함유할 수 없고 IL-2가 상기 배양 배지에 첨가될 수 없다.
- [0075] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 세포 밀도는 mL 당 약 1.5 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 18 x 10⁶ T 세포일 수 있다. 비제한적인 예로서, mL 당 6 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 18 x 10⁶ T 세포, mL 당 12 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 18 x 10⁶ T 세포, mL 당 1.5 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 12 x 10⁶ T 세포, mL 당 1.5 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 6 x 10⁶ T 세포, mL 당 6 x 10⁶ T 세포 내지 mL 당 12 x 10⁶ T 세포, 또는 mL 당 1.5 x 10⁶ T 세포, mL 당 3 x 10⁶ T 세포, mL 당 6 x 10⁶ T 세포, mL 당 9 x 10⁶ T 세포, mL 당 12 x 10⁶ T 세포, mL 당 15 x 10⁶ T 세포 또는 mL 당 18 x 10⁶ T 세포. 일부 실시형태에서, 비제한적인 예로서, mL 당 9 x 10⁶ T 세포 또는 mL 당 18 x 10⁶ T 세포 같은 더 높은 밀도에서 세포 배양을 개시하는 것이 바람직할 수 있다고 예상된다.
- [0076] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 텀시롤리무스는 약 0.3 μ M 내지 약 10 μ M의 농도로 존재할 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 텀시롤리무스는 약 0.3 μ M 내지 약 1 μ M, 0.3 μ M 내지 약 0.75 μ M, 0.3 μ M 내지 약 0.5 μ M,

0.5 μM 내지 약 1 μM, 0.75 μM 내지 약 1 μM, 0.5 μM 내지 약 0.75 μM, 0.3 μM 내지 약 10 μM, 0.3 μM 내지 약 5 μM, 0.3 μM 내지 약 3.3 μM, 1 μM 내지 약 3.3 μM, 5 μM 내지 약 10 μM, 3.3 μM 내지 약 10 μM, 3.3 μM 내지 약 5 μM의 농도로, 또는 비제한적인 예로서, 약 0.3 μM, 0.4 μM, 0.5 μM, 0.6 μM, 0.7 μM, 0.8 μM, 0.9 μM, 또는 1 μM, 2 μM, 3 μM, 3.3 μM, 4 μM, 5 μM, 6 μM, 7 μM, 8 μM, 9 μM 또는 10 μM의 농도로 상기 배양 배지에 존재할 수 있다.

[0077] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 항-IL-2 수용체 항체 또는 이의 단편일 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 바실릭시맙 또는 다클리주맙일 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 5 내지 50 μg/mL, 5 내지 40 μg/mL, 5 내지 30 μg/mL, 5 내지 20 μg/mL, 5 내지 10 μg/mL, 10 내지 50 μg/mL, 20 내지 50 μg/mL, 30 내지 50 μg/mL, 40 내지 50 μg/mL, 30 내지 40 μg/mL, 20 내지 40 μg/mL, 10 내지 40 μg/mL, 5 내지 40 μg/mL, 5 내지 30 μg/mL, 5 내지 20 μg/mL, 5 내지 10 μg/mL, 10 내지 20 μg/mL, 10 내지 30 μg/mL, 20 내지 30 μg/mL의 농도로, 또는 비제한적인 예로서, 약 5 μg/mL, 10 μg/mL, 15 μg/mL, 20 μg/mL, 25 μg/mL, 30 μg/mL, 35 μg/mL, 40 μg/mL, 45 μg/mL 또는 50 μg/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재한다.

[0078] 임의의 전술한 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 상기 일정 시간은 약 1.5일 내지 약 5일, 1.5일 내지 약 3.5일, 1.5일 내지 약 2.5일, 2.5일 내지 약 3.5일, 2.5일 내지 약 5일, 3.5일 내지 약 5일, 또는 약 1.5일, 2일, 2.5일, 3일, 3.5일, 4일, 4.5일 또는 5일일 수 있다. 일부 실시형태에서, mTORC1 및 mTORC2 감소의 수준은 최적의 배양 간격을 결정하기 위한 가이드로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포 효과기 분자의 RNA 발현 (즉, 감소된 IFN-γ); 전사 인자의 RNA 발현 (즉, 증가된 KLF4); 자가포식 시그니처의 증거 (즉, 증가된 p62); 및 나이브 T 세포 서브세트 상에 존재하는 마커의 상향-조절 (즉, 증가된 CD127)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 최적의 배양 간격을 결정하기 위해 탈-분화된 세포의 다른 분자 시그니처가 사용될 수 있다.

[0079] 임의의 전술한 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 상기 비드:T 세포 비율은 1:3일 수 있거나, 공-자극이 수행되지 않을 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 비드:T 세포 비율은 1:1과 1:12, 1:1과 1:3, 1:3에서 1:12 사이일 수 있다. 비제한적인 추가의 예로서, 상기 비드:T 세포 비율은 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11 또는 1:12일 수 있다. 마지막으로, 가장 극단적인 예에서, 항-CD3/항-CD28 공-자극이 이용될 수 없으며, 즉 일부 실시형태에서, 초기 탈-분화 과정 동안 항-CD3/항-CD28 공-자극이 수행되지 않는다.

[0080] 임의의 전술한 실시형태에서, 세포의 배양 투입 모집단의 공-자극은 권장되는 것보다 감소된 농도에서 사용될 수 있는 나노입자를 함유하는 항-CD3/항-CD28을 사용하여 달성될 수 있다. 비제한적인 예로서, 이러한 나노입자는 약 0.01X 내지 약 0.1X, 약 0.025X 내지 약 0.1X, 약 0.05X 내지 약 0.1X, 약 0.075X 내지 약 0.1X, 약 0.01X 내지 약 0.075X, 약 0.01X 내지 약 0.05X, 약 0.01X 내지 약 0.025X, 약 0.025X 내지 약 0.075X, 약 0.025X 내지 약 0.05X, 약 0.05X 내지 약 0.075X, 또는 약 0.01X, 약 0.025X, 약 0.05X, 약 0.075X 또는 약 0.01X 권장된 용량으로 사용될 수 있다. 비제한적인 예로서, Miltenyi® T Cell TransAct™과 같은 시약은, 비제한적인 예로서, 1.1 μL (9-배 감소) 또는 약 0.11X와 같이 1 x 10⁶ T 세포당 10 μL의 권장 용량에 비교된 감소된 용량으로 사용될 수 있다. 마지막으로, 가장 극단적인 예에서, 항-CD3/항-CD28 공-자극이 이용될 수 없으며, 즉 일부 실시형태에서 초기 탈-분화 과정 동안 항-CD3/항-CD28 공-자극이 수행되지 않는다.

[0081] 대안적으로, 항-CD3/항-CD28 공-자극이 제조된 T 세포를 생산하기 위해 사용되어야 한다면, 공-자극의 공급원은 용해 가능한 항-CD3/항-CD28 마이크로입자에 의해 제공될 수 있다. 비제한적인 예로서, 용해 가능한 항-CD3/항-CD28 마이크로입자는 제조업체 (예를 들어, Cloudz®; Bio-Techne)에 의해 권장된 강도의 20%에서 사용될 수 있다. 추가 예로서, 용해 가능한 항-CD3-항-CD28 마이크로입자는 제조업체 권장된 강도의 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 30%에서 사용될 수 있다.

[0082] 임의의 전술한 실시형태에서, 항-CD3/항-CD28 자극이 수행되는 경우, 그것은 원하는 탈-분화된 세포 특성을 달성하기에 충분한 양으로 항-CD3/항-CD28을 사용하여 수행될 수 있다.

[0083] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 배양 배지는 5% 인간 혈청을 추가로 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서 상기 배양 배지는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20% 인간 혈청 및 그 사이의 값을 포함하는 임의의 범위를 포함할 수 있다.

[0084] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 배양 배지는 X-Vivo 20 배지를 포함할 수 있다. T 세포를 배양에 적합한 임의의 배양 배지가 사용될 수 있다.

[0085] 임의의 전술한 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 상기 비타민 D는 약 0.03 nM 내지 약 1 nM, 0.03 nM 내지 약

0.5 nM, 0.03 nM 내지 약 0.1 nM, 0.03 nM 내지 약 0.05 nM, 0.05 nM 내지 약 0.1 nM, 0.05 nM 내지 약 0.5 nM, 0.05 nM 내지 약 1 nM, 0.1 nM 내지 약 1 nM, 0.1 nM 내지 약 0.5 nM, 또는 0.5 nM 내지 약 1 nM로 상기 배양 배지에 존재할 수 있거나, 또는 비제한적인 예로서, 상기 비타민 D는 약 0.03 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM 또는 1 nM의 농도로 존재한다.

[0086] 임의의 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR 및 하우스키핑 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 일정 시간은 제조된 T 세포에서 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50% 감소될 때까지 지속되며, 여기서 상기 T 세포의 대조군 모집단은 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된다. 일부 실시형태에서, 일정 시간은 제조된 T 세포에서 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 50% 이상 감소될 때까지 지속된다. 비제한적인 예로서, 일정 시간은 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과로 감소될 때까지 지속될 수 있다.

[0087] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 하우스키핑 단백질은 액틴일 수 있다. 일부 실시형태에서, 하우스키핑 단백질은 GAPDH일 수 있다. 임의의 전술한 실시형태에서, 발현 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블랏 분석에 의해 수행될 수 있다.

[0088] 임의의 전술한 실시형태에서, 일정 시간은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%로 감소될 때까지 지속될 수 있다. 일부 실시형태에서, RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준의 감소는 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 또는 그 초과일 수 있다.

[0089] 임의의 전술한 실시형태에서, 초기 탈-분화 배양의 일정 시간은 RNA 발현 패턴이 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제가 없는 동일한 조건하에서 배양된 대조군 T 세포와 비교하여 적어도 10%, 보다 최적으로는 50% 상이할 때까지 지속될 수 있으며, 즉: 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포 효과기 분자에서 감소; Nanog, KLF4 및 KLF10을 포함하지만 이에 제한되지 않는 감소된 분화 상태의 세포와 관련된 전사 인자에서 증가; CD127, IL-7 수용체 알파 사슬을 포함하지만 이에 제한되지 않는 나이브 T 세포 서브세트 상에서 우선적으로 발현되는 분자의 발현에서 증가; T-BET 및 STAT1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 Th1-유형 분화와 관련된 전사 인자에서 감소; 및 HIF-1 알파를 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포 생존을 촉진하는 전사 인자의 상대적 보존을 할 때까지 지속될 수 있다.

[0090] 임의의 전술한 실시형태에서, 초기 탈-분화 배양의 일정 시간은 RNA 발현 패턴이 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제가 없는 동일한 조건하에서 배양된 대조군 T 세포와 비교하여 적어도 10%, 보다 최적으로는 50% 상이할 때까지 지속될 수 있으며, 즉: 이에 의해 자가포식을 겪은 세포를 나타내는 분자의 발현에 최소 10%, 보다 바람직하게는 50% 변화가 있을 때까지 지속될 수 있다. 하나의 예로서, 상기 탈-분화된 세포는 대조군 T 세포 대비 웨스턴 블랏 분석에 의해 p62의 증가된 발현을 갖는다; 비제한적인 예로서, Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. International Journal of Molecular Sciences. 2017;18(9):1865에 기재된 것인, 자가포식을 측정하는 다른 방법이 또한 이용될 수 있다.

[0091] 임의의 전술한 실시형태에서, 배양 배지는 배양 개시시에 배양 배지에 부재할 수 있는 인간 혈청, 템시롤리무스, 비타민 D, IL-2 시그널링 억제제 또는 이들의 임의의 조합을 함유하지 않을 수 있다. 이러한 실시형태에서, 인간 혈청, 템시롤리무스, 비타민 D 또는 IL-2 시그널링 억제제는 세포의 배양 투입 모집단의 접종과 거의 동시에 또는 후속하는 시간에 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0092] 비제한적인 예로서, 1,25-비타민 D ("칼시트리올")의 정맥내 제형이 사용될 수 있다. 이 제형은 배양 배지에 완전히 가용성이고 신장에서 자연적으로 생성되는 1, 25 하이드록실화를 갖기 때문에 바람직하고 따라서 배양에 비타민 D를 첨가할 때 존재해야 한다. 칼시트리올에 대한 상표명은 Rocaltrol, Calcijex 및 Decostriol을 포함한다. 다른 비타민 D 수용체 (VDR) 리간드는 Maestro 등; Vitamin D receptor 2016: novel ligands and structural insights; Expert Opinion on Therapeutic Patents; Volume 26, 2016, issue 11에 기술된 바와 같이 리토콜산을 포함하지만 이에 제한되지 않는 칼시트리올을 대체할 수 있다고 또한 여겨진다.

- [0093] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 임의의 방법에 의해 수득될 수 있는 탈-분화된 T 세포가 제공된다. 일부 실시형태에서, 탈-분화된 T 세포의 모집단을 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 탈-분화된 T 세포의 적어도 일부는 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 50% 미만의 RAPTOR 또는 RICTOR를 발현한다. 일부 실시형태에서, 탈-분화 T 세포는 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 50% 미만 RAPTOR 또는 RICTOR를 발현한다. 비제한적인 예로서, 상기 탈-분화된 T 세포 또는 탈-분화된 T 세포의 모집단은 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 집단과 동일한 조건하에서 제조된, 각각, 대조군 T 세포 또는 T 세포의 모집단 대비 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 또는 미만 RAPTOR 또는 RICTOR를 발현할 수 있다.
- [0094] 일부 실시형태에서, 탈-분화된 T 세포 모집단 또는 탈-분화된 T 세포는 템시롤리무스, 비타민 D 및 그랜자임 B를 포함하지만 이에 제한되지 않는 IL-2 시그널링 억제제가 없는 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 세포용해 분자에 대해, 및/또는 IFN- γ 를 포함하지만 이에 제한되지 않는 사이토카인 분자에 대해 RNA 발현에서 감소를 특징으로할 수 있다. 이러한 감소는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0095] 일부 실시형태에서 탈-분화된 T 세포 모집단 또는 탈-분화된 T 세포는 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제, 비제한적인 예로 Nanog, KLF4 및 KLF10없이 동일한 조건하에서 배양된 대조군 T 세포 모집단 대비 iPSC와 관련된 전사 인자에 대한 RNA 발현의 증가, 및/또는 나이브 T 세포와 관련된 분자, 비제한적인 예로 IL-7 수용체, CD127에 대한 RNA 발현의 증가를 특징으로할 수 있다. 이러한 증가는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 탈-분화된 T 세포 모집단 또는 탈-분화된 T 세포는 동등한 HIF-1- α 발현에 대한 수반되는 유지와 함께, 템시롤리무스, 비타민 D 및 T-Bet와 STAT1을 포함하지만 이에 제한되지 않는 IL-2 시그널링 억제제가 없는 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 Th1 효과기 T 세포와 관련된 전사 인자에 대한 RNA 발현에서 감소를 특징으로할 수 있다. 이러한 감소는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 초과일 수 있다. 비제한적인 예로서, HIF-1- α 발현은 약 20%, 15%, 10% 또는 5% 또는 대조군 T 세포 모집단 내일 수 있다.
- [0097] 일부 실시형태에서 탈-분화된 T 세포 모집단 또는 탈-분화된 T 세포는 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 T 세포의 대조군 모집단 대비 p62의 단백질 발현의 증가를 특징으로할 수 있다. 이러한 증가는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0098] *탈-분화된 T 세포로부터 인간 하이브리드 조절성 T/Th2 세포 (하이브리드 T_{REG}/Th2 세포) 및 T_{REG}의 제조 방법*
- [0099] 본 개시내용에서, 본 발명자들은 Th1- 및 Th17-유형 분극화의 고갈과 조합된 초기 분화 상태에 대해 강화된 iTREG 세포의 생성을 초래하는 생체의 제조 공정을 제공한다. 이 방법은 2-단계 공정을 필요로 하는데, 제1 단계는 T 세포 탈-분화로 구성되고 제2 단계는 iTREG 세포 제조이다. 이 탈-분화된 T 세포 기질로부터 인간 iTREG 세포의 제조는 사이토카인 (IL-2 및 TGF- β 사이토카인의 표준 iTREG 사용 플러스 Th2 분화와 고전적으로-관련된 사이토카인인, IL-4의 추가 사용)과, 선택적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같이 페메트렉시드인, 신규한 약학적 제제의 새로운 조합을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, iTREG 세포는 페메트렉시드없이 생성될 수 있다. 이러한 세포는 TREG와 Th2 분자 둘 모두의 발현을 갖기 때문에, 이 방법으로 생성된 세포는 '인간 하이브리드 TREG/Th2 세포'로 명명된다.
- [0100] 일부 실시형태에서, 방법은 IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 본 개시내용의 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계; 예컨대 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 첨가하는 단계; 및 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하여 TREG/Th2 세포를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 개시내용의 탈-분화된 T 세포 모집단을 배양하는 단계를 포함한다. 항-CD3/항-CD28 비드의 비율은 공-자극이 세포를 분화하기에 충분한 경우에 한해 다양할 수 있다.
- [0101] 일부 실시형태에서, 방법은 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D 없이 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 또는 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 탈-분화된 T 세포를 IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 단계; 예컨대 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 첨가하는 단계; 및 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하여 TREG/Th2 세포를 생성

하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 본 개시내용의 탈-분화된 T 세포의 모집단을 배양하는 단계를 포함한다. 항-CD3/항-CD28 비드의 비율은 공-자극이 세포를 분화하기에 충분한 경우에 한해 다양할 수 있다. 일부 실시형태에서, RAPTOR 또는 RICTOR의 발현은 하우스키핑 단백질 예컨대, 비제한적인 예로서 액틴 또는 GAPDH에 의해 정규화된다.

- [0102] 임의의 전술한 실시형태에서, IL-2는 약 100 IU/ml 내지 10,000 IU/ml, 100 IU/ml 내지 1,000 IU/ml, 1,000 IU/ml 내지 약 10,000 IU/ml, 또는 약 100 IU/ml, 1,000 IU/ml 또는 10,000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재할 수 있다.
- [0103] 임의의 전술한 실시형태에서 배양 배지는 IL-4를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 전술한 실시형태에서, IL-4는 약 100 IU/ml 내지 1000 IU/ml, 100 IU/ml 내지 1000 IU/ml, 100 IU/ml 내지 250 IU/ml, 100 IU/ml 내지 500 IU/ml, 250 IU/ml 내지 1000 IU/ml, 500 IU/ml 내지 1000 IU/ml, 250 IU/ml 내지 500 IU/ml 또는, 100 IU/ml, 200 IU/ml, 300 IU/ml, 400 IU/ml, 500 IU/ml, 600 IU/ml, 700 IU/ml, 800 IU/ml, 900 IU/ml 또는 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 감소된 Th2 분극화를 달성하는 것이 바람직한 경우 100 IU/ml와 같은 더 낮은 농도가 사용될 수 있다.
- [0104] 임의의 전술한 실시형태에서, TGF-β는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재할 수 있다. 비제한적인 예로서, TGF-β의 농도는 약 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL 또는 10 ng/mL일 수 있다.
- [0105] 분화를 위한 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 비드:T 세포 비율은 3:1일 수 있다. 일부 실시형태에서, 동일한 효과를 갖는 동등한 양의 항-CD3/항-CD28의 대안적인 형태가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공-자극의 양은 세포를 포화시키기에 충분하다. 임의의 전술한 실시형태에서, 공-자극의 양은 인간 하이브리드 TREG/Th2 세포에서 GATA3 및 FOXP3의 발현을 증가시키기에 충분할 수 있다.
- [0106] 임의의 전술한 실시형태에서 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 페메트렉시드는 약 1 nM 내지 100 nM, 5 nM 내지 100 nM, 10 nM 내지 100 nM, 25 nM 내지 100 nM, 50 nM 내지 100 nM, 75 nM 내지 100 nM, 50 nM 내지 75 nM, 25 nM 내지 75 nM, 10 nM 내지 50 nM, 10 nM 내지 25 nM, 또는 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 또는 100 nM과 같은 값의 농도로 상기 배양 배지에 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 배양 배지는 페메트렉시드를 포함하지 않고 페메트렉시드는 배양 배지에 첨가되지 않는다.
- [0107] 임의의 전술한 실시형태에서, 상기 탈-분화된 T 세포를 배양하기 위한 상기 일정 시간은 비제한적인 예로서 3일 내지 40일, 2일 내지 20일, 3일 내지 10일, 3일 내지 6일, 6일 내지 10일, 10일 내지 40일, 10일 내지 20일, 10일 내지 15일, 15일 내지 40일, 20일 내지 40일, 30일 내지 40일, 20일 내지 30일, 또는 15일 내지 30일 또는 15일 내지 20일일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 매우 제한된 분화 상태의 하이브리드 Th2/TREG 세포인 경우 3일 내지 10일과 같은 더 짧은 배양 간격이 고려될 수 있다.
- [0108] 본 개시내용은 또한 IL-4를 사용하지 않고 임의의 전술한 방법에 의해 생성된 TREG 세포와 방법에 대한 것이다.
- [0109] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법에 의해 생성된 TREG 또는 TREG/Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40 중 적어도 하나의 유세포분석법에 의한 증가된 발현을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 증가는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0110] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법에 의해 생성된 TREG 또는 TREG/Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 염증성 사이토카인의 감소된 분비를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, 이러한 사이토카인은 IFN-γ 및 TNF-α를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 감소는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0111] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 방법에 의해 생성된 TREG 또는 TREG/Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 감소된 TBET 및 증가된 FOXP3 발현 및/또는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 증가된 IL-4 분비 및 증가된 GATA3의 발현을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이 감소 또는 증가는 비제한적인 예로서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 초과일 수 있다.
- [0112] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 GATA3을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포를 적어도 5% 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 GATA3을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50% 또는 적어도 60% 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포가 GATA3을 발현하는지 여부는 유세포분석법에 의해 결정

된다. 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 대조군 T 세포 모집단 대비 GATA3을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증가된 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가된 빈도는 50% 이상의 증가일 수 있다. 비제한적인 예로서, 증가는 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 2000%, 3000% 이상일 수 있다.

[0113] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 5%의 FoxP3을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 45%의 FoxP3을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포가 FoxP3을 발현하는지 여부는 유세포분석법에 의해 결정된다. 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 대조군 T 세포 모집단 대비 FOXP3을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 증가된 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가된 빈도는 50% 이상의 증가일 수 있다. 비제한적인 예로서, 증가는 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 2000%, 3000% 이상일 수 있다.

[0114] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%의 CD73을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 또는 적어도 25%의 CD73을 발현하는 CD4+ T 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 추가의 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 또는 적어도 80%의 CD73을 발현하는 CD8+ T 세포를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포가 CD73을 발현하는지 여부는 유세포분석법에 의해 결정된다. 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 대조군 T 세포 모집단 대비 CD73을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증가된 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가된 빈도는 50% 이상의 증가일 수 있다. 비제한적인 예로서, 증가는 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 2000%, 3000% 이상일 수 있다.

[0115] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%의 CD103을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 CD103을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포가 CD103을 발현하는지 여부는 유세포분석법에 의해 결정된다. 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 대조군 T 세포 모집단 대비 CD103을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증가된 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가된 빈도는 50% 이상의 증가일 수 있다. 비제한적인 예로서, 증가는 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 2000%, 3000% 이상일 수 있다.

[0116] 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 유세포분석법에 의해 측정된 바와 같이 적어도 5%의 FOXP3 및 GATA3 둘 모두를 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50%의 FOXP3 및 GATA3 둘 모두를 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 세포를 가질 수 있다.

[0117] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 20%의 CD150을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 또는 적어도 50%의 CD150을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 mTOR 억제제에 대한 노출 없이 인큐베이션된 T 세포의 대조군 모집단 대비 CD150을 발현하는 세포의 증가된 빈도일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포가 CD150을 발현하는지 여부는 유세포분석법에 의해 결정된다. 일부 실시형태에서, T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단은 T_{REG} 또는 $T_{REG}/Th2$ 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 대조군 T 세포 모집단 대비 CD150을 발현하는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ T 세포의 증가된 빈도를 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 증가된 빈도는 50% 이상의 증

가일 수 있다. 비제한적인 예로서, 증가는 50%, 100%, 200%, 300%, 500%, 1000%, 2000%, 3000% 이상일 수 있다.

[0118] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 5pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-4를 발현할 수 있다. 비제한적인 예로서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 적어도 5, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90, 또는 적어도 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 IL-4를 발현할 수 있다.

[0119] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-2를 발현할 수 있다.

[0120] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IFN- γ 또는 GM-CSF를 발현할 수 있다.

[0121] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 TNF- α 또는 IL-17을 발현할 수 있다.

[0122] 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포는 GATA3 및 FOXP3 둘 모두를 발현할 수 있다. 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포는 GATA3, FOXP3, CD103 및 CD73을 발현할 수 있다. 일부 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단은 유세포분석법에 의해 측정된 적어도 5%의 GATA3를 발현하는 T 세포, 적어도 5%의 FOXP3를 발현하는 T 세포, 적어도 5%의 CD103을 발현하는 T 세포 및 적어도 5%의 CD73을 발현하는 T 세포에 의해 특징되어 질 수 있다.

[0123] 임의의 전술한 실시형태에서, TREG 또는 TREG/Th2 세포 또는 그의 모집단은 특성이 양립할 수 없는 범위까지 전술한 특성의 적어도 하나 또는 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0124] *유도된 조절성 T (iT_{REG}) 세포를 사용한 ALS 치료 방법*

[0125] 이 프로토콜에서 본 발명자들은 ALS의 iT_{REG} 세포 요법을 향상시킬 면역 고갈 및 면역 억제 방법으로 펜토스타틴과 사이클로포스파미드 요양법을 사용할 것이다. 이 PC 요양법은 ALS 병인과 관련된 Th1-유형 면역 세포를 고갈시키고 억제하는 그 능력에 기인하여 직접적인 유익한 효과를 가질 수 있다; 부가하여, PC 요양법은 보다 효과적인 iT_{REG} 세포 요법을 위해 면역학적 T 세포 공간을 증가시키는 숙주 컨디셔닝으로 역할을 할 것이다. 특히, 이 프로토콜의 경우, 본 발명자들은 새로운 ALS 환자 모집단에서 요양법의 임의의 잠재적인 부작용을 완화하는데 도움이 되도록 PC 요양법의 용량을 감소시켰다. 이 프로토콜의 경우 본 발명자들은 펜토스타틴의 시작 용량을 4 mg/m²에서 1 mg/m²로 감소시켰고; 주기당 4회 주입의 이전 값 대 주기당 1회 주입의 현재 프로토콜 값으로 펜토스타틴 주입의 횟수를 감소시켰고; 그리고 초기 사이클로포스파미드 용량을 1일당 200 mg에서 1일당 100 mg으로 감소시켰다. 둘째, 본 발명자들은 PC 요양법에 의해 부여되는 면역 고갈의 깊이에 관한 명시된 목표의 관점에서 PC 요양법의 강도를 감소시켰다. ALS 환자 모집단에서 보다 신중한 접근방식이 의무화되어 있기 때문에, 현재 프로토콜 PC 요양법은 ALC 계수를, 즉 마이크로리터당 750 세포 바로 아래의 값으로 보다 적당히 감소시키려고 한다. 이 수준의 면역 고갈은 일반적으로 높은 기회 감염물의 관점에서 심오하고 장기적인 면역 무능과 관련이 없다.

[0126] 이론에 얽매이지 않고, PC 요양법이 ALS 병인의 진행과 연루된 Th1/Tc1-유형 적응 면역 서브세트를 고갈시키고 억제할 것으로 예상된다. 그러나, 이 요법은 ALS에서 근본적인 일차 사건, 즉; 잘못-접힌 RNA 종, 유해한 RNA/DNA 생성물의 제거를 위한 불충분한 자가포식, 및 P2X7 수용체-구동 NLRP3 염증소체의 수준에서 선천적 염증의 후속 RNA/DNA 활성화를 다루지 않는다. ALS 모델에서 작동하는 것으로 밝혀진 이러한 염증소체 활성화는 Th1/Tc1 서브세트에 의해 주로 매개되는 적응 T 세포 염증을 그 다음 구동하는 가장 초기의 가장 강력한 전-염증성 신호 중 하나인 후속 IL-1- β 활성화를 구동한다. 실제로, NLRP3 억제가 널리 다양한 신경퇴행성 질환의 요법에 대한 새로운 접근방식을 나타내는 것이 최근에 제안되었다. 뉴클레오시드 역전사효소 억제제 (NRTI)는 ALS의 요법에서 또한 역할을 할 수 있는 HIV 질환의 요법에 대해 승인된 항-바이러스 제제이다. ALS 환자는 부분적으로는 ALS에서 주요 기계적 구성요소인 TDP-43 침착물에 의한 조절에 의해 모델 시스템에서 질환 발병을 구동하는 인간 내인성 레트로바이러스-K (HERV-K)의 증가된 수준을 가질 수 있다; 이 생물학의 임상적 번역을 향해, 다루나비어, 리토나비어, 탈테그라비어 및 지도부딘의 HIV 항-바이러스 각테일을 평가하는 임상적 시험이 개시되었다 (NCT02437110). NRTI 분자 라미부딘 (3TC)은 또한 ALS에서 발생하는 NLRP3 활성화를 구동하는 P2X7

수용체를 억제하는 것으로 기술되었다. 부분적으로 이들 관찰에 기반하여, 아이카디-구티에레스 증후군 (AGS) 환자에서 염증을 감소시키는 라미부딘, 지도부딘 및 아바카비르의 3가지-약물 요양법의 능력을 평가하기 위한 페이스 II 임상 시험 (NCT02363452)이 시작되었으며, 이는 ALS에서 선천적인 염증성 이벤트를 모방하는 질병, 즉: 세포내 RNA 종의 축적, 염증소체 경로의 활성화 및 전신 Th1-구동된 염증을 결과적인 생성이다. 라미부딘은 NLRP3 염증소체의 강력한 억제제로 특성규명되었고 ALS 환자 모집단에서 잘 견디는 치료 요양법을 생성하기 위한 욕구 때문에, 본 발명자들은 이 프로토콜에서 라미부딘으로 단일-제제 NRTI 요법을 추구하기로 선정했다.

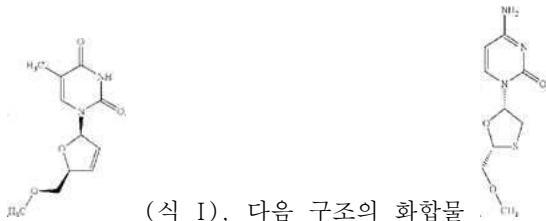
[0127] 따라서, 이론에 얽매이지 않고, (PC 요양법을 통해) Th1/Tc1 반응을 먼저 고갈시키고 억제한 다음 이차적으로 구동력 염증소체 활성화를 제어하는 순차적 전략이 ALS와 관련된 복잡한 신경-염증성 네트워크에 지속 가능한 조절을 제공하기 위한 새로운 접근법을 나타낼 것으로 예상된다. ALS 치료 플랫폼에서 라미부딘의 사용은 iT_{REG} 세포 요법을 플랫폼 안으로 추가로 통합하는 본 발명자들의 다음 단계의 관점에서도 유익할 수 있다. 즉, 3가지 치료 방식 (펜토스타틴/사이클로포스파미드; 라미부딘; 및 iT_{REG} 세포) 각각은 P2X7-구동되고, NLRP3-매개된 염증소체로부터 떨어지고 면역억제성 분자인 아데노신을 향하여 ATP의 트래피킹 (trafficking)을 차단함에 의해 적어도 부분적으로 작동한다. 첫째, 펜토스타틴은 아데노신 데아미나제를 억제함에 의해 아데노신을 증가시키고, 이에 의해 아데노신의 이노신으로의 전환을 방지한다; 둘째, 라미부딘은 P2X7의 알려진 억제제로, 이에 의해 염증소체를 직접적으로 억제한다; 셋째, iT_{REG} 세포는 아데노신으로 ATP를 처리하는 CD39- 및 CD73-매개된 엑토-뉴클레오티다제 활성을 제공한다. 이 마지막 과정과 관련하여, 소교 세포는 본질적으로 CD39 및 CD73을 이용하여 신경염증을 완화한다는 것에 유의하는 것이 중요하다.

[0128] 요약하면, 이들 데이터는 ALS에서 일차 신경퇴행 과정이 한편으로는 여전히 질환 진행을 구동할 수 있지만 다른 한편으로는 염증소체 활성화의 제어, Th1/Tc1-유형 서브세트의 고갈 및 억제, T_{REG} -유형 서브세트의 조장을 포함한 다중 단계에서 치료적 개입을 가리킬 수 있는 2차 염증성 반응을 유발한다는 증거를 제공한다. 이 정보를 감안할 때, ALS 환자에서 면역 조절 요법을 평가하는 데 큰 관심이 존재한다. ALS 환자에서 신경-염증의 최적의 제어는 상기-연급된 구성요소 각각을 다루는 세 가지의 요법: 즉, (1) 선천적 염증소체 활성화의 제어 (아래 기재된 바와 같이 라미부딘 투여를 포함); (2) 기존 Th1-유형 염증성 세포의 감소 (아래에 더 상세히 기재된 바와 같이 펜토스타틴/사이클로포스파미드 요양법을 포함); 및 (3) 적응 T 세포 전달을 통한 iT_{REG} 세포의 촉진이 필요할 것이라는 것이 본 발명자들의 가설이다. 이러한 조합 접근법이 필요할 수 있는 이유를 설명하는 데에는 몇 가지 이유가 있다. 첫째, 근본적인 염증소체 활성화가 유지 요법을 통해 해결되지 않으면, 숙주 컨디션닝 요법과 T_{REG} 세포 요법 동안 달성된 임의의 면역학적 및 치료적 이득은 주요한 기본 신경퇴행성 과정에 의해 침식될 가능성이 있을 것이다. 둘째, 더욱 최적화된 T_{REG} 세포 모집단을 제어되지 않은 Th1-구동 염증을 가진 숙주 안으로 단독으로 주입하는 것은 많은 이유로 어려운 면역학적 도전을 나타낸다: 기존 Th1-유형 세포는 적응성으로 전달된 T_{REG} 세포에 의한 분화 유연성을 나타낼 수 있으며, 이에 의해 보호 T_{REG} 모집단을 질병 발병에 기여할 수 있는 병원성 서브세트로 전환시킬 수 있다. 그리고 셋째, 적응성으로 전이된 T 세포 모집단의 효능은 면역학적 T 세포 공간의 정도와 복잡하게 연결되어 있으며, 이는 IL-7 및 IL-15와 같은 T 세포 성장 인자의 존재에 의해 대부분 정의될 수 있다; 이러한 면역학적 공간의 생성은 동종 조혈 줄기 세포 이식에 수십년 동안 이용되어 왔고 현재는 암 요법을 위한 적응 T 세포 전달을 사용하는 분야에서 이용되는 펜토스타틴 플러스 사이클로포스파미드 (PC) 요양법을 포함한 숙주 준비 요양법에 의해 생성된다. 참고로, 신경퇴행성 또는 자가면역 질환의 T_{REG} 세포 요법을 포함하는 이전의 임상 시험은 PC 요양법과 같은 숙주 준비 요양법을 통합하지 않았다.

[0129] 일부 실시형태에서, 방법은 상기 대상체에게 하나 이상의 일차 치료 주기를 적용하는 단계를 포함하며, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계; 및 상기 대상체에게 치료 유효량의 제조된 T_{REG} 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체를 하나 이상의 면역 요법 치료 주기에 적용시키는 단계를 포함한다. 당업자는 당업계에 공지되고 본 명세서에 개시된 방법에 의해 치료적 유효량을 결정할 수 있다.

[0130] 전술한 실시형태에서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 NLRP3 염증소체의 억제제일 수 있으며; 또는 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘일 수 있다. 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 상기 대

상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 1 및 4일차에 수행될 수 있다. 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 1, 2, 3, 4 및 5일차에 수행될 수 있다. 상기 방법은 2개 이상의 면역 요법 치료 주기를 포함할 수 있고, 상기 2개 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은, 비제한적인 예로서, 0 내지 4주, 0 내지 3주, 0 내지 2주, 0 내지 1주, 및 예컨대 비제한적인 예로서 0주, 1주, 2주, 3주 또는 4주 사이의 값으로 분리된다. 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 18주 길이일 수 있다. 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 아데노신 수용체 조절제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 번호 9,326,983호에 개시된 것들, 라미부딘, 지도부딘, 스타부딘, 코디세핀, 아지도티미딘, 아바카비르, 다음 구조의 화합물



[0131] (식 I), 다음 구조의 화합물 (식 II), 이의 화학적 유도체, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 이의 조합을 포함한 다른 뉴클레오시드 역전사효소 억제제가 사용될 수 있다.

[0132] 전술한 실시형태에서, 비제한적인 예로서, 상기 하나 이상의 일차 치료 주기는 2주 내지 5주, 2주 내지 4주, 2주 내지 3주, 3주 내지 4주, 또는 4주 내지 5주 사이, 및 예컨대 비제한적인 예로서, 2주, 3주, 4주 또는 5주 사이의 임의의 값일 수 있다. 상기 방법은 2개 이상의 일차 치료 주기를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 2개 이상의 일차 치료 주기의 각각은 0 내지 2주로 분리된다. 비제한적인 예로서, 상기 2개 이상의 일차 치료 주기의 각각은 0 내지 1주 또는 1 내지 2주, 및 예컨대 비제한적인 예로서, 1일, 1주, 또는 2주 사이의 임의의 값으로 분리된다.

[0133] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 이전에 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 방법은 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후: 상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 방법은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 후: 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 방법은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 후 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후: 상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 방법은 각각의 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 후: 상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하는 단계 및, 만약 ALC < 1μl당 750이면 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기로 진행되는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 그 표적 ALC 값은 다양할 수 있고 비제한적인 예로서, 마이크로리터당 0, 250, 500, 750, 1000, 1250 또는 1500 세포일 수 있다.

[0134] 전술한 실시형태에서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기 중 처음 및 상기 하나 이상의 일차 치료 주기 중 마지막은 0 내지 2주로 분리된다. 비제한적인 예로서, 상기 2개 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 0 내지 1주 또는 1 내지 2주, 및 예컨대 비제한적인 예로서, 0주, 1주 또는 2주 사이의 임의의 값으로 분리된다.

[0135] 전술한 실시형태에서, 비제한적으로 예로서, 펜토스타틴의 용량은 0.5 mg/m² 내지 4 mg/m², 1 mg/m² 내지 4 mg/m², 2 mg/m² 내지 4 mg/m² 및 예컨대 비제한적인 예로서 0.5 mg/m², 1 mg/m², 1.5 mg/m², 2 mg/m², 2.5 mg/m², 3 mg/m², 3.5 mg/m² 및 4 mg/m² 사이의 임의의 값의 용량일 수 있다. 상기 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각의 임의의 날자에 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 펜토스타틴은 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각의 1일차 또는 1 및 4일차에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0136] 전술한 실시형태에서, 사이클로포스파미드는 50 mg 내지 400 mg의 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 사이클로포스파미드의 용량은 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 또는 400 mg과 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 mg의 임의의 조합 사이 및 예컨대 비제한적인 예로서 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 또는 400 mg 사이의 임의의 값의 용량일 수 있다. 비제한적인 예로서, 사이클로포스파미드는 상기 하나 이상의 일차 치료 주기의 각각의 1, 2, 3일차 또는 1, 2, 3, 4 및 5일차에 투여될 수 있다.

[0137] 전술한 실시형태에서, 상기 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드는 단일 조성물로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 단일 조성물은 상기 대상체에게 정맥내로 투여될 수 있다. 상기 대상체에게 펜토스타틴 및 사이클로포

스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 포함하는 제1 조성물을 투여하는 단계; 및 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 전술한 실시형태에서, 상기 라미부딘은 1일 150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다.

[0139] 전술한 실시형태에서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 상기 대상체에게 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안, 비제한적인 예로서 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포 사이, 및 예컨대 비제한적인 예로서 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포 체중, 또는 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포 사이의 임의의 값의 용량으로 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 약 1 x 10⁶ 내지 약 200 x 10⁶ 세포/제조된 T_{REG} 세포의 주입이 투여될 수 있다. 추가 비제한적인 예로서 약 1 x 10⁶ 내지 약 200 x 10⁶, 10 x 10⁶ 내지 약 200 x 10⁶, 50 x 10⁶ 내지 약 200 x 10⁶, 100 x 10⁶ 내지 약 200 x 10⁶, 적어도 1 x 10⁶, 10 x 10⁶, 50 x 10⁶, 100 x 10⁶ 또는 200 x 10⁶ 세포/제조된 T_{REG} 세포의 주입이 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 약 40 x 10⁶ 세포/주입이 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 약 120 x 10⁶ 세포/주입이 투여될 수 있다. 상기 제조된 T_{REG} 세포는 1:1, 3:1, 10:1, 1:3 및 1:10에서 선택된 중앙 기억 대 효과기 기억 세포의 비율을 포함할 수 있다. 제조된 T_{REG} 세포를 포함하는 상기 조성물은 정상 T_{REG} 세포를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제조된 T_{REG} 세포는 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 8일차에 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, iT_{REG} 및 nT_{REG}는 조합하여 대상체에게 투여될 수 있다.

[0140] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 치료 주기, 제2 치료 주기, 선택적으로 하나 이상의 추가 치료 주기 및 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 포함할 수 있으며, 상기 제1 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계, 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하며; 상기 제2 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하며; 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 포함하며 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계, 및 상기 대상체에게 제조된 T_{REG} 세포를 투여하는 단계를 포함한다.

[0141] 전술한 실시형태에서, 상기 제1 치료 주기는 14일 기간일 수 있다. 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기의 1일차에 수행될 수 있다. 펜토스타틴은 상기 제1 치료 주기 동안 1 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 사이클로포스파미드는 상기 제1 치료 주기 동안 100 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기 동안 반복될 수 있으며, 비제한적인 예로서, 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제1 치료 주기의 1, 2 및 3일차에 수행될 수 있다.

[0142] 전술한 실시형태에서, 상기 제2 치료 주기는 14일 기간일 수 있다. 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기의 1일차에 수행될 수 있다. 펜토스타틴은 상기 제2 치료 주기 동안 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기 동안 반복될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 제2 치료 주기의 1, 2 및/또는 3일차에 수행될 수 있다. 사이클로포스파미드는 상기 제2 치료 주기 동안 100 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다.

- [0143] 전술한 실시형태에서, 상기 대상체는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 받을 수 있다. 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각은 각각 14일 기간일 수 있다. 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 0 내지 2주로 분리될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 2개 이상의 추가 치료 주기의 각각은 0 내지 1주 또는 1 내지 2주, 및 예컨대 비제한적인 예로서, 0주, 1주 또는 2주 사이의 임의의 값으로 분리될 수 있다. 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 1 및/또는 4일차에 수행될 수 있다. 펜토스타틴은 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 반복될 수 있다. 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 상기 단계는 상기 하나 이상의 추가 치료 주기의 각각의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 수행될 수 있다. 사이클로포스파미드는 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 100 mg 내지 200 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 추가 주기는 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 전에 상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하는 단계 및 CrCl에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 펜토스타틴은 CrCl > 60mL/분/1.73m²일 때 2 mg/m²로 투여되고, 펜토스타틴은 60mL/분/1.73 m² > CrCl > 30mL/분/1.73m²일 때 1 mg/m²로 투여되고, 그리고 펜토스타틴은 CrCl < 30mL/분/1.73m²일 때 투여되지 않는다. 상기 추가 주기는 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 전에 절대 호중구 수 (ANC)를 측정하는 단계 및 ANC를 기반으로 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 사이클로포스파미드는 ANC > 마이크로리터당 1000 일 때 100 mg의 용량으로 투여되고, ANC가 마이크로리터당 500-999일 때 사이클로포스파미드는 50 mg의 용량으로 투여되고, 그리고 ALC < 마이크로리터당 50 또는 ANC < 마이크로리터당 500일 때 사이클로포스파미드는 투여되지 않는다. 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 적어도 2개의 추가 치료 주기를 포함할 수 있으며, 상기 적어도 2개의 추가 치료 주기의 마지막은 상기 적어도 2개의 치료 주기의 상기 마지막 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 전: 절대 림프구 수 (ALC) 및 절대 호중구 수 (ANC)를 측정하는 단계 및 ALC와 ANC에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계를 포함하며, 여기서 사이클로포스파미드는 ALC > 마이크로리터당 1250일 때 200 mg의 용량으로 투여될 수 있으며, 사이클로포스파미드는 ANC > 마이크로리터당 1000 및 마이크로리터당 750 < ALC < 1250인 경우 100 mg의 용량으로 투여될 수 있고, 사이클로포스파미드는 ANC가 마이크로리터당 500-999일 때 50 mg의 용량으로 투여될 수 있고, 그리고 사이클로포스파미드는 ANC < 마이크로리터당 500 및/또는 ALC < 마이크로리터당 750일 때 투여되지 않을 수 있다.
- [0144] 전술한 실시형태에서, 상기 치료 주기, 상기 제2 치료 주기 및 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 0 내지 2주로 분리될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 치료 주기, 상기 제2 치료 주기 및 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기는 0 내지 1주 또는 1 내지 2주, 및 예컨대 비제한적인 예로서, 0주, 1주 또는 2주 사이의 임의의 값으로 분리될 수 있다.
- [0145] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 제1 치료 주기에서 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 전에 상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하는 단계 및 CrCl에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 펜토스타틴은 CrCl > 60mL/분/1.73m²일 때 1 mg/m²로 투여되고, 펜토스타틴은 60mL/분/1.73m² > CrCl > 30mL/분/1.73m²일 때 0.5 mg/m²로 투여되고, 그리고 펜토스타틴은 CrCl < 30mL/분/1.73m²일 때 투여되지 않는다.
- [0146] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 제1 치료 주기에서 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 전에 절대 호중구 수 (ANC)를 측정하는 단계 및 ALC와 ANC에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 사이클로포스파미드는 ANC > 마이크로리터당 1000일 때 100 mg의 용량으로 투여되고, ANC가 마이크로리터당 500-999일 때 사이클로포스파미드는 50 mg의 용량으로 투여되고, 그리고 ANC < 마이크로리터당 500일 때 사이클로포스파미드는 투여되지 않는다.
- [0147] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하기 이전에 상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하는 단계 및 CrCl에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 펜토스타틴의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 펜토스타틴은 CrCl > 60mL/분/1.73m²일 때 2 mg/m²로 투여되고, 펜토스타틴은 60mL/분/1.73m² > CrCl > 30mL/분/1.73m²일 때 1 mg/m²로 투여되고, 그리고 펜토스타틴은 CrCl < 30mL/분/1.73m²일 때 투여되지 않는다.
- [0148] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 제2 치료 주기 동안 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하기 이전에 절대 호중구 수 (ANC)를 측정하는 단계 및 ANC에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 사이클로포스파미드의 용량

을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 사이클로포스파미드는 ANC > 마이크로리터당 1000일 때 100 mg의 용량으로 투여될 수 있고, ANC가 마이크로리터당 500-999일 때 사이클로포스파미드는 50 mg의 용량으로 투여될 수 있고, 그리고 ANC < 마이크로리터당 500일 때 사이클로포스파미드는 투여되지 않을 수 있다.

[0149] 전술한 실시형태에서, 방법은 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 이전에 상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하는 단계 및 ALC에 기반하여 상기 대상체의 치료를 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 ALC < 마이크로리터당 750이면, 유지 치료 주기를 상기 대상체에게 투여하는 단계는 상기 환자에게 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기를 적용하는 단계를 포함하고, 여기서 ALC > 마이크로리터당 750이면, 환자에게 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 적용한다.

[0150] 전술한 실시형태에서, 방법은 각각의 상기 하나 이상의 추가 치료 주기 이전에 상기 대상체에서 절대 림프구 수 (ALC)를 측정하는 단계 및 ALC에 기반하여 상기 대상체의 치료를 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 ALC < 마이크로리터당 750이면, 유지 치료 주기를 상기 대상체에게 투여하는 단계는 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하고 상기 유지 치료 주기 이전에 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 더 이상 투여하지 않는 것을 포함하고, 여기서 ALC > 마이크로리터당 750이면, 대상체 환자에게 상기 하나 이상의 추가 치료 주기를 지속한다.

[0151] 전술한 실시형태에서, 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각은 비제한적인 예로서 18주 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 요법 치료 주기는 0 내지 4주까지 분리될 수 있다. 면역 요법 치료 주기는, 무제한을 포함하여 반복될 수 있다. 면역 요법 주기의 반복은 요양법에 따라 또는 재발시 반복할 수 있다. 비제한적인 예로서 면역 요법 주기는 1년에 1-4회 발생할 수 있다. 펜토스타틴은 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 1 및 4일차에 2 mg/m²의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 사이클로포스파미드는 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 100 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기는 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘일 수 있다. 상기 라미부딘은 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기 동안 매일 150 mg 내지 1일 2회 150 mg의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 각각의 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각 동안: 상기 대상체의 크레아티닌 청소율 (CrCl)을 측정하는 단계 및 CrCl에 기반하여 상기 대상체에게 투여될 라미부딘의 용량을 조정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 라미부딘은 CrCl > 50mL/분/1.73m²일 때 1일 2회 150 mg으로 투여되고, 라미부딘은 50mL/분 > CrCl > 30mL/분/1.73m²일 때 매일 150 mg으로 투여되고, 그리고 라미부딘은 CrCl < 30mL/분/1.73m²일 때 투여되지 않는다.

[0152] 전술한 실시형태에서, 방법은 제조된 T_{REG} 세포의 치료적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0153] 전술한 실시형태에서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 상기 하나 이상의 면역 요법 치료 주기의 각각의 8일차에 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 비제한적인 예로서, 제조된 T_{REG} 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15일차와 같은 상기 면역 요법 주기의 임의의 날에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0154] 전술한 실시형태에서, 상기 제조된 T_{REG} 세포는 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 비제한적인 예로서 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포 내지 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포 사이, 및 예컨대 비제한적인 예로서 대상체의 체중 kg당 1 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 2 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 3 x 10⁶ 세포, 대상체의 체중 kg당 4 x 10⁶ 세포 체중, 또는 대상체의 체중 kg당 5 x 10⁶ 세포 사이의 임의의 값의 용량으로 투여될 수 있다.

[0155] 각각의 상기 하나 이상의 치료 주기는 상기 대상체에게 펜토스타틴을 투여하는 단계; 및/또는 상기 대상체에게 사이클로포스파미드를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 펜토스타틴은 1 mg/m² 내지 2 mg/m² 사이, 및

예컨대 비제한적인 예로서 1 mg/m², 1.5 mg/m², 또는 2 mg/m² 사이 임의의 값의 용량으로 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 사이클로포스파미드의 용량은 100 mg 내지 200 mg 사이, 및 예컨대 비제한적인 예로서 100 mg, 150 mg 또는 200 mg 사이 임의의 값일 수 있다. 상기 펜토스타틴은 각각의 상기 하나 이상의 치료 주기의 1 및 4일차에 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 사이클로포스파미드는 각각의 상기 하나 이상의 치료 주기의 1, 2, 3, 4 및/또는 5일차에 상기 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 대상체는 이전에 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드로 치료를 받았을 수 있다. 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각은 상기 대상체에게 뉴클레오시드 역전사효소 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 NLRP3 염증소체의 억제제일 수 있다. 상기 뉴클레오시드 역전사효소 억제제는 라미부딘일 수 있다. 상기 하나 이상의 치료 주기의 각각은 4주 간격일 수 있다.

[0156] 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 제조된 T_{REG} 세포와 동시에 상기 대상체에게 정상 T_{REG} 세포를 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 하나 이상의 치료 주기 이전에 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 전술한 실시형태에서, 방법은 상기 대상체로부터 말초 림프구를 수확한 후에 상기 제조된 T_{REG} 세포를 산출하기 위해 상기 말초 림프구를 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0157] **실시예**

[0158] 다음 실시예는 본 개시내용의 방법 및 결과적인 탈-분화 및 iT_{REG} 또는 재-분화 T 세포를 더 잘 설명하기 위해 제공된다. 이들 실시예는 본 개시내용에 개시된 방법, 세포 및 조성물의 범주를 제한하거나 달리 변경하는 것으로 의도되지 않는다.

[0159] *실시예 1: 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합은 T 세포 효과기 분자를 감소시킨다*

[0160] 본 발명자들은 인간 T 세포 효과기 분자 발현에 대한 비타민 D, mTOR 억제 (비경구 형태의 라파마이신, 템시롤리무스 사용) 및 비타민 D 플러스 템시롤리무스의 조합의 개별 효과를 직접적으로 평가했다 (도 1 참조).

[0161] 도 1a-1d는 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합이 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 효과기 분자 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다. 컬럼 #2 내지 #5에 대해, T 세포는 낮은-수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율: 1:3); 고용량의 템시롤리무스 (1 μM); 비타민 D (0.1 또는 1.0 nM); 및 X-Vivo 20 배지에서 배양물을 포함하는 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 제1 컬럼은 대조 배양물 (템시롤리무스 없음, 비타민 D 없음, 3:1의 비드-대-T 세포 비율의 사용; 유형 I 분극화 사이토카인 IFN-α의 함유 (20,000 IU/ml, 달리 명시되지 않는한, 이 양은 대조군 배양에 대해 다음 실시예 1-11에서 사용됨))을 나타낸다. 제2 컬럼은 비드-대-T 세포 비율이 낮고 템시롤리무스가 비타민 D를 포함하지 않은 배양물을 나타낸다; 대조적으로, 제3 컬럼은 비타민 D (0.1 nM)는 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제4 컬럼은 고용량 ("HD") 비타민 D (1.0 nM)가 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제5 컬럼은 템시롤리무스와 조합된 고용량의 비타민 D (1.0 nM) 둘 모두를 가진 배양물을 나타낸다. 탈-분화 간격의 중단에서, 세포를 수확하고 RNA를 단리하고, 그리고 Luminex Quantigene 방법에 의해 RNA 발현 분석을 수행하였다. 표시된 모든 결과는 상대적 RNA 발현을 나타내며, Th1/Tc1 대조군 배양물에 대해 1.0의 값으로 정규화된 결과를 갖는다.

[0162] 낮은 수준의 T 세포 공-자극 (항-CD3/항-CD28 비드-대-T 세포 비율 1:3; 문헌에서 사용된 전형적인 비율은 역인, 3:1임), 템시롤리무스 (1 μM), 0.1 또는 1.0 nM의 용량에서 비타민 D, 또는 템시롤리무스와 고용량 비타민 D의 조합을 포함하는 3-일 배양 간격을 사용하였다. 배양 후에, RNA를 수확하고 효과기 분자 발현의 수준을 대조군 배양물에 비교하였다.

[0163] 도 1a가 보여주는 바와 같이, 다양한 배양물은 GAPDH를 포함하는 하우스키핑 제어 유전자의 유사한 RNA 발현을 가졌다. 현저하게 대조적으로, 비타민 D 또는 템시롤리무스를 수용하지 않은 대조군 Th1/Tc1 세포 배양물에 비해, 템시롤리무스, 비타민 D 또는 템시롤리무스 플러스 비타민 D의 조합의 배양물 부가는, 세포독성 분자 그랜자임 B (도 1b) 및 사이토카인 분자 IL-10 (Th2 사이토카인; 도 1c) 및 IFN-감마 (Th1 사이토카인; 도 1d)를 포함하는, T 세포 효과기 분자의 RNA 발현의 감소를 초래했다. 따라서, 탈-분화의 마커로서 그랜자임 B와 IFN-γ는 비타민 D가 0.1 내지 1.0 nM의 농도에서 효과적임을 나타낸다. 1 μM의 용량에서 템시롤리무스는 단독으로 탈-분화의 작용제로 유익하게 작용하고 (컬럼 2, 그랜자임 B 및 IFN-감마에서 감소) 조합하여 사용시 비타민 D의 효과를 없애지 않는다 (컬럼 5).

[0164] 따라서 낮은-수준의 공-자극 (항-CD3/항-CD28 비드 대 T 세포의 1:3 비율)과 짧은 3-일 배양 간격을 사용하여

템시롤리무스, 비타민 D 또는 템시롤리무스 플러스 비타민 D의 조합의 부가는 Th1 및 Th2 사이토카인 효과기와 세포독성 효과기 메커니즘 둘 모두를 감소시키기 위해 이용할 수 있다.

- [0165] 실시예 2: 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합은 탈-분화와 관련된 주요 전사 인자를 변경한다
- [0166] 본 발명자들은 또한 낮은-수준의 공-자극 후 주요 전사 인자의 발현에 대한 비타민 D, 템시롤리무스 또는 조합의 효과를 평가했다.
- [0167] 도 2a-2d는 비타민 D 및 템시롤리무스의 조합이 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 줄기 세포-관련 전사 인자 및 원시 T 세포 분자 IL-7 수용체-알파의 발현을 증가시킨다는 것을 예시한다. 비타민 D와 템시롤리무스의 조합은 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 효과기 분자 발현을 감소시킨다. 컬럼 #2 내지 #5에 대해, T 세포는 낮은-수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율; 1:3); 고용량의 템시롤리무스 (1 μM); 비타민 D (0.1 또는 1.0 nM); 및 X-Vivo 20 배지에서 배양물을 포함하는 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 제1 컬럼은 대조 배양물 (템시롤리무스 없음, 비타민 D 없음, 3:1의 비드-대-T 세포 비율의 사용; 유형 I 분극화 사이토카인 IFN-α의 함입)을 나타낸다. 제2 컬럼은 비드-대-T 세포 비율이 낮고 템시롤리무스가 비타민 D를 포함하지 않은 배양물을 나타낸다; 대조적으로, 제3 컬럼은 비타민 D (0.1 nM)는 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제4 컬럼은 고용량 ("HD") 비타민 D (1.0 nM)가 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제5 컬럼은 템시롤리무스와 조합된 고용량의 비타민 D (1.0 nM) 둘 모두를 가진 배양물을 나타낸다. 탈-분화 간격의 종단에서, 세포를 수확하고 RNA를 단리하고, 그리고 Luminex Quantigene 방법에 의해 RNA 발현 분석을 수행하였다. 표시된 모든 결과는 상대적 RNA 발현을 나타내며, Th1/Tc1 대조군 배양물에 대해 1.0의 값으로 정규화된 결과를 갖는다.
- [0168] 도 2a가 보여주는 바와 같이, 템시롤리무스 또는 템시롤리무스 플러스 비타민 D의 조합은 Nanog 전사 인자의 상향-조절을 초래하였으며, 이는 iPSC 상태로의 체세포 탈-분화에 필요한 몇 안되는 주요 인자 중 하나로 인식되고 있다. 이전에는 인간 섬유아세포에서, 라파마이신을 사용한 mTOR 억제가 Nanog 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다; 대조적으로, 비타민 D 수용체 시그널링은 iPSC 상태와 관련된 전사 인자의 발현을 감소시키는 것으로 밝혀졌다.
- [0169] 이와 같이, 낮은-수준의 공-자극을 사용하여 템시롤리무스는 iPSC 전사 인자 Nanog를 증가시킨다; 템시롤리무스의 이 촉진 효과는 0.1 내지 1.0 nM 범위인 농도에서 비타민 D에 의해 무효화되지 않는다.
- [0170] 이에 비해, 템시롤리무스나 비타민 D만으로는 또한 iPSC 상태와 관련된 고전적인 전사 인자 중 하나인 KLF4 분자의 RNA 발현을 증가시키지 않았다. 그러나, 템시롤리무스 플러스 비타민 D (1.0 nM)의 조합은 KLF4 RNA 발현을 증가시켰다. 이와 같이, T 세포 탈-분화 시도에 템시롤리무스와 비타민 D 둘 모두를 포함하는 것이 바람직하다. 도 2b가 보여주는 바와 같이, 템시롤리무스나 비타민 D 단독만으로 작용하여 탈-분화 분자 KLF4를 유익하게 상향-조절하지 않지만, 템시롤리무스 (1 μM)와 비타민 D (1.0 nM)의 조합은 상승적으로 KLF4를 상향-조절한다.
- [0171] 템시롤리무스 플러스 비타민 D (1.0 nM)의 조합을 이용했을 때 관련된 전사 인자인 KLF10도 또한 상향-조절되었다. 도 2c가 보여주는 바와 같이, 1 μM의 용량에서 템시롤리무스는 단독으로 작용하여 탈-분화 분자 KLF10, Nanog 및 IL-7 수용체 알파를 유익하게 상향-조절한다; 비타민 D는 이들 분자를 상향-조절하기 위해 단독으로 작용하지는 않지만, 조합하여 사용할 때 템시롤리무스의 효과를 무효화하지는 않는다 (컬럼 5).
- [0172] 마지막으로, 본 발명자들은 감소된 분화 상태를 갖는 T 세포에서 상향-조절되는 IL-7 수용체 알파의 RNA 발현에 대해 배양된 세포를 평가하였다. 중요하기로는, 비타민 D 단독이 아닌 템시롤리무스 단독은 IL-7 수용체 알파를 상향-조절할 수 있었다. 그럼에도 불구하고, 비타민 D (1.0 nM) 플러스 템시롤리무스의 조합은 도 2d에 나타난 바와 같이 IL-7 수용체 알파 상향-조절을 초래했다.
- [0173] 요약하면, 이들 데이터는 템시롤리무스와 조합된 낮은-수준의 공-자극이 T 세포 탈-분화를 강화하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다; 바람직하기로는, 더 완전한 탈-분화의 패턴을 위해 배양물은 템시롤리무스 플러스 비타민 D를 포함해야 했다.
- [0174] 실시예 3: 조합 비타민 D 및 템시롤리무스는 HIF-1-α 발현을 유지하면서 Th1 분화와 관련된 주요 전사 인자를 감소시킨다
- [0175] 본 발명자들은 또한 Th1-유형 분화와 관련된 주요 전사 인자, 즉 T-BET 및 STAT1의 발현에 대한 비타민 D, 템시롤리무스 또는 그 조합의 영향을 평가했다.
- [0176] 도 3a-3c는 비타민 D와 템시롤리무스의 조합이 T 세포 생존과 관련된 전사 인자인 HIF-1-α의 발현을 감소시키

지 않으면서 효과기 Th1/Tc1 세포와 관련된 전사 인자의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다. 비타민 D와 템시롤리무스의 조합은 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 효과기 분자 발현을 감소시킨다. 컬럼 #2 내지 #5에 대해, T 세포는 낮은 수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율; 1:3); 고용량의 템시롤리무스 (1 μ M); 비타민 D (0.1 또는 1.0 nM); 및 X-Vivo 20 배지에서 배양물을 포함하는 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 제1 컬럼은 대조 배양물 (템시롤리무스 없음, 비타민 D 없음, 3:1의 비드-대-T 세포 비율의 사용; 유형 I 분극화 사이토카인 IFN- α 의 함입)을 나타낸다. 제2 컬럼은 비드-대-T 세포 비율이 낮고 템시롤리무스가 비타민 D를 포함하지 않은 배양물을 나타낸다; 대조적으로, 제3 컬럼은 비타민 D (0.1 nM)는 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제4 컬럼은 고용량 ("HD") 비타민 D (1.0 nM)가 있지만 템시롤리무스는 없는 배양물을 나타낸다. 제5 컬럼은 템시롤리무스와 조합된 고용량의 비타민 D (1.0 nM) 둘 모두를 가진 배양물을 나타낸다. 탈-분화 간격의 종단에서, 세포를 수확하고 RNA를 단리하고, 그리고 Luminex Quantigene 방법에 의해 RNA 발현 분석을 수행하였다. 표시된 모든 결과는 상대적 RNA 발현을 나타내며, Th1/Tc1 대조군 배양물에 대해 1.0의 값으로 정규화된 결과를 갖는다.

[0177] 중요하게는 각각의 작용제 또는 작용제의 조합이 T-BET RNA (도 3a) 및 STAT1 RNA (도 3b) 둘 모두를 하향-조절하였다. 도 3a-3c에 나타낸 바와 같이, 0.1 내지 1.0 nM의 용량에서 비타민 D는 단독으로 작용하여 분화 분자 T-BET 및 STAT1을 유의하게 하향-조절한다. 1 μ M의 용량에서 템시롤리무스는 1.0 nM 비타민 D와 조합하더라도 친-생존 전사 인자인 HIF-1 알파를 유해하게 하향-조절하지 않는다. 그러나 1 μ M의 용량에서 템시롤리무스는 단독으로 작용하여 분화 분자 T-BET 및 STAT1을 유의하게 하향-조절한다; 비타민 D와의 조합은 유사한 결과를 산출한다 (이들 두 작용제는 길항적이지 않다).

[0178] 현저하게 대조적으로, 1 μ M의 용량에서 템시롤리무스, 0.1 내지 1.0 nM의 용량에서 비타민 D 또는 그 조합은 주요 전사 인자 HIF-1- α 를 하향-조절하지 않으며 (도 3c), 이는 항-종양 효과에 결정적인 T 세포 생존 인자로 중요하다.

[0179] 요약하면, 이들 데이터는 낮은 수준의 공-자극, 템시롤리무스 및 비타민 D의 조합이 전체 T 세포 생존에 필요한 주요 전사 인자인 HIF-1- α 를 억제하지 않고 Th1 생성에 필요한 전사 인자를 감소시키는 데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0180] *실시예 4: 조합 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체는자가포식 시그니처를 증가시킨다*

[0181] 본 발명자들은 또한 줄기-유사, 탈-분화 상태의 촉진에 결정적인 자가포식의 과정에 대한 비타민 D, 템시롤리무스 또는 그 조합의 영향을 평가했다. 자가포식의 수준은 웨스턴 블랏 분석에 의해 자가포식 기질인 p62의 후속 상향-조절에 의해 부분적으로 결정될 수 있다.

[0182] 도 4는 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 자가포식-관련 분자인 p62의 발현을 유도함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은 수준의 공-자극 (1:3 비드-대-T 세포 비율), 템시롤리무스 (도 4에 도시된 바와 같은 "TEM"; 1.0 또는 0.3 μ M의 농도), 비타민 D (표시된 바와 같은 "D"; 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 nM의 농도) 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μ g/ml; 표시된 바와 같은 "DAC")를 사용한 3-일 배양을 포함한 탈-분화 프로토콜을 거쳤다. 3-일 배양 간격 후, T 세포를 수확하고 단백질을 단리하고 자가포식-관련 유전자인 p62와 하우스킵핑 유전자인 액틴 (Actin)에 대해 웨스턴 블랏 분석을 거쳤다.

[0183] 도 4가 입증하는 바와 같이, T 세포 배양에 비타민 D의 함입은 상향-조절된 p62에 의해 측정된 바와 같이 자가포식을 증가시키는 데 중요했다. 0.01 내지 0.1 nM의 용량에서 비타민 D는 0.3 내지 1.0 μ M의 농도에서 템시롤리무스와 함께 작용하여 탈-분화 동안 자가포식 마커 p62를 유의하게 상향-조절한다. 즉, 도 4의 배양 #6 (제5 컬럼)에서, 웨스턴 블랏 분석에서 p62 발현이 거의 없었으며, 이는 낮은 수준의 자가포식과 일치한다; 도면 범례에서 나타난 바와 같이, 이 배양 조건은 낮은 수준의 공-자극, 템시롤리무스, 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙을 수용했지만 비타민 D는 수용하지 않았다.

[0184] 현저하게 대조적으로, 다른 배양 조건은 각각 비타민 D 보충을 수용했으며 각각 p62 발현을 증가시켰다 (비타민 D의 유효 용량 범위, 0.01 nM 내지 1.0 nM). 이 도 4는 또한 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 첨가가 없는 비타민 D 및 템시롤리무스 첨가가 없는 비타민 D가 T 세포 자가포식의 유도에 충분하였다는 것을 입증한다.

[0185] 요약하면, 이들 데이터는 낮은 수준의 공-자극과 함께 비타민 D의 함입이 단독으로 또는 다른 T 세포 억제제, 즉 항-IL-2 수용체 시약 또는 mTOR 억제제 템시롤리무스와 조합하여 T 세포 자가포식의 유도에 대해 효율적인 방법임을 나타낸다.

- [0186] 실시예 5: 조합 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체는 mTORC1 복합체의 최적의 파괴를 초래한다
- [0187] 본 발명자들은 또한 mTORC1 시그널링 복합체의 결정적인 구성요소인 Raptor의 발현에 대한 다양한 T 세포 배양 조건의 효과를 평가했다. 중요하기로는, mTORC1의 억제제 iPSC 상태로의 체세포 재프로그래밍에 결정적인 것으로 최근에 밝혀졌다.
- [0188] 도 5는 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 mTORC1-관련 분자인, Raptor의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은 수준의 공-자극 (1:3 비드-대-T 세포 비율), 템시롤리무스 (도 5에 도시된 바와 같은 "TEM"; 1.0 또는 0.3 μM의 농도), 비타민 D (표시된 바와 같은 "D"; 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 nM의 농도) 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 ng/mL; 표시된 바와 같은 "DAC")를 사용한 3-일 배양을 포함한, 탈-분화 프로토콜을 거쳤다. 3-일 배양 간격 후, T 세포를 수확하고 단백질을 단리하고 mTORC1 복합 단백질인, Raptor 및 하우스키핑 유전자인, 액틴에 대해 웨스턴 블랏 분석을 거쳤다.
- [0189] 도 5가 입증하는 바와 같이, Raptor 발현의 감소로 나타난 mTORC1 복합체의 최적의 억제제는 T 세포가 템시롤리무스 (1.0 μM), 비타민 D (0.1 nM), 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙 (50 μg/ml) (도시된 제1 컬럼; 배양 1)과 조합하여 낮은 비드-대-T 세포 비율 (1:3)로 공-자극되었을 때 발생했다.
- [0190] 도 5가 입증하는 바와 같이, 다클리주맙의 누락은 Raptor 발현에서 완만한 증가를 초래하였고, 이에 의해 최적의 mTORC1 억제를 위한 항-IL-2 수용체 시약에 대한 역할을 나타냈다. 따라서, 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙 (용량, 50 μg/ml)은 mTORC1 하위-단위 분자인, Raptor (컬럼 2)를 억제하는 데 유의한 역할을 한다.
- [0191] 도 5가 입증하는 바와 같이, 비타민 D에 의한 mTORC1 하위-단위 분자 Raptor의 최적 억제제는 0.03 내지 0.1 nM의 비타민 D 용량이다; 이 범위보다 낮거나 높은 농도는 Raptor의 더 낮은 최적 억제를 야기했다. 따라서, 0.03 nM 만큼 낮은 비타민 D의 수준은 Raptor의 최적의 억제에 충분하다; 그러나, 비타민 D 수준을 0.01 nM으로 줄이면 최적-이하의 Raptor 억제를 초래한다. 더욱이, 0.1 nM 농도를 넘어 비타민 D 수준을 증가시키는 것은 Raptor 발현의 수준이 더 높은 배양물 7 (0.3 nM 농도의 비타민 D)에서 나타난 바와 같이, 해로울 수 있다.
- [0192] 더욱이, 도 5가 입증하는 바와 같이, Raptor의 최적의 하향-조절은 비타민 D 플러스 템시롤리무스의 조합을 필요로 하며, 0.3 μM 농도에서 템시롤리무스를 보충한 배양물 9가 더 높은 수준의 Raptor 발현을 갖기 때문에 템시롤리무스 용량은 최적으로 1.0 μM이다.
- [0193] 실시예 6: 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 조합은 mTORC1 복합체와 mTORC2 복합체 둘 모두를 파괴한다
- [0194] 본 발명자들은 또한 라파마이신의 억제성 효과에 직접적으로 민감하지는 않지만 장기간 mTORC1 차단을 초래하는 조건에 영향을 받을 수 있는 mTORC2 복합체를 평가했다. 중요하기로는, mTORC2의 억제제는 줄기-유사 상태를 촉진할 수 있다.
- [0195] 도 6은 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 mTORC1-관련 분자인, Raptor 및 mTORC2-관련 분자인, Rictor의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은 수준의 공-자극 (1:3 비드-대-T 세포 비율), 템시롤리무스 (도 6에 도시된 바와 같은 "TEM"; 1.0 μM의 농도), 비타민 D (표시된 바와 같은 "D"; 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 nM의 농도) 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 ng/mL; 표시된 바와 같은 "DAC")를 사용한 3-일 배양을 포함한, 탈-분화 프로토콜을 거쳤다. 3-일 배양 간격 후, T 세포를 수확하고 단백질을 단리하고 mTORC1 복합 단백질인, Raptor; mTORC2 복합 단백질인, Rictor; 포스트-mTORC1 단백질 p70S6K; 포스트-mTORC2 단백질인, SGK1; 및 하우스키핑 유전자인, GAPDH에 대해 웨스턴 블랏 분석을 거쳤다.
- [0196] 도 6이 예시하는 바와 같이, 3가지 억제제 중 어느 것도 함유하지 않는 대조군 배양에 비해, 템시롤리무스, 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 항체 다클리주맙을 함유하는 배지에서 T 세포 배양물은 mTORC1 분자 Raptor 및 mTORC2 분자 Rictor 둘 모두에서 감소를 가졌다. 포스트-mTORC1 분자 p70S6K 및 포스트-mTORC2 분자 SGK1의 수준은 상대적으로 보존되었다. 따라서, 비타민 D (0.03 내지 1.0 nM 사이 농도)는 조합 작용제 탈-분화 동안 mTORC2 하위-단위인, Rictor의 하향-조절에 효과적이었다. 그리고, 1 μM 농도에서 템시롤리무스는 조합 작용제 탈-분화 동안 mTORC2 하위-단위인, Rictor의 하향-조절에 효과적이었다. 더욱이, 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙 (용량, 50 μg/ml)은 템시롤리무스와 비타민 D가 mTORC2 하위-단위 Rictor를 하향-조절하는 능력을

무효화하지 않았다.

- [0197] 이와 같이, 낮은 수준의 공-자극과 템시롤리무스, 비타민 D, 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 3-파트 억제성 요양법을 사용한 T 세포 배양은 Raptor와 Rictor 하위단위 둘 모두를 감소시키는 신규한 방법을 제시한다.
- [0198] *실시예 7: 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 조합은 항-세포자멸사 Bcl2-계열 구성원 유전자인 BIM의 발현을 감소시킨다*
- [0199] 미토콘드리아의 수준에서 자가포식 (미토파지(mitophagy))의 결과로, 미토콘드리아 단백질의 품질이 개질될 수 있다; 특히, 미토파지로, BIM과 같은 항-세포자멸사 계열 구성원으로부터 항-세포자멸사 계열 구성원 유전자로 bcl2-계열 구성원 유전자에 유리한 전이가 있을 수 있다. 부가하여, 세포자멸사 경향을 감소시키는 배양 방법은 탈-분화에 대한 증가된 능력과 관련되어 있다.
- [0200] 도 7은 비타민 D, 템시롤리무스 및 항-IL-2 수용체 차단제의 조합이 항-세포자멸사 분자인, BIM의 발현을 감소시킨다는 것을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은 수준의 공-자극 (1:3 비드-대-T 세포 비율), 템시롤리무스 (도 7에 도시된 바와 같은 "TEM"; 1.0 또는 0.3 μM의 농도), 비타민 D (표시된 바와 같은 "D"; 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 또는 1.0 nM의 농도) 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 ng/mL; 표시된 바와 같은 "DAC")를 사용한 3-일 배양을 포함한, 탈-분화 프로토콜을 거쳤다. 3-일 배양 간격 후, T 세포를 수확하고 단백질을 단리하고 항-세포자멸사-관련 유전자인, BIM 및 하우스키핑 유전자인, 액틴에 대해 웨스턴 블랏 분석을 거쳤다.
- [0201] 이를 평가하기 위해, 본 발명자들은 낮은-강도의 공-자극 (1:3 비드-대-T 세포 비율) 및 다양한 억제제의 존재로 배양된 T 세포에서 BIM 수준을 측정했다. 도 7이 예시하는 바와 같이, 템시롤리무스, 비타민 D (0.1 nM) 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙의 조합을 함유하는 T 세포 배양은 가장 낮은 수준의 BIM 발현을 가졌다. 그러나 여전히, 도 7은 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 다클리주맙 (용량, 50 μg/ml)이 항-세포자멸사 분자인, BIM (컬럼 2)을 억제하는 데 유의한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 임의의 단일 억제제의 부재가 BIM 수준을 증가시키기 때문에 3개 억제제 각각이 BIM 억제에서 역할을 하는 것으로 나타났다.
- [0202] 이와 같이, 본 발명자들은 조합 억제제 요양법이 세포자멸사 경향의 미토콘드리아 제어에서 유리한 전이를 유도하는 방법을 나타낸다고 결론지었다.
- [0203] *실시예 8: 3개 억제제 탈-분화 요양법은 억제제의 제거 후 후속 증식성 능력을 갖는 T 세포를 초래한다*
- [0204] 낮은-수준의 공-자극, 템시롤리무스, 비타민 D, 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체로 구성된 3-일 요양법이 재-분화 가능한 탈-분화의 상태를 초래함을 입증하기 위해, 본 발명자들은 배양에서 억제제의 제거 후 높은 수준의 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)을 사용하여 배양의 3일차에 세포를 재-자극하는 실험을 수행했다. 10일 (총 배양의 13일) 후, T 세포를 수확하고, 열거하고, 유세포분석법에 의해 평가했다.
- [0205] 도 8은 후속 T 세포 수율 (배양의 13일차)에 대한 탈-분화 간격 동안 배양 구성성분의 효과를 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은-수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율; 표시된 바와 같은 1:3 또는 1:1); 템시롤리무스 (1 μM; 또는 저용량 ["Lo"], 0.1 μM); 비타민 D (0.1 nM; 또는 1.0 nM의 고용량 ["HD"]; 또는 0.01 nM의 저용량); 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μg/ml) 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배지에서 배양을 포함한 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 제1 컬럼은 대조군 배양물 (템시롤리무스, 비타민 D 또는 항-IL-2R 항체 없음)을 나타낸다. 제2 컬럼은 항-IL-2R 항체가 없는 배양물을 나타낸다; 제4 컬럼은 혈청 보충이 없는 배양물을 나타낸다; 제5 컬럼은 저용량 비타민 D를 나타내는 반면 제6 컬럼은 고용량 비타민 D를 사용한 결과를 나타낸다; 제7 컬럼은 저용량 템시롤리무스를 사용한 결과를 나타낸다; 그리고 제8 컬럼은 템시롤리무스가 없는 배양물을 나타내고; 제9 컬럼은 더 높은 비율의 비드를 사용한 결과를 나타낸다. 3-일 간격 후, 배지를 억제제 없이 신선한 X-Vivo 20으로 교환하고, 높은-수준 공-자극을 제공하고 (3:1 비드-대-T 세포 비율), T 세포 성장 사이토카인 IL-2 (100 IU/ml) 및 IL-7 (10 ng/mL)을 첨가하였다. 배양의 13일차에, 생존 가능한 T 세포를 열거하고 전체 수율은 0일차 입력 수와 관련하여 도시되어 있다.
- [0206] 도 8은 재-분화 단계 후의 T 세포 수를 도시한다. 이들 데이터가 나타낸 바와 같이 (컬럼 #3), 낮은-수준의 공-자극, 템시롤리무스, 비타민 D, 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체를 사용하여 처음 3-일 탈-분화 간격에 대해 처음에 유지된 T 세포는 만족스러운 T 세포 수율 (배양 투입의 250% 초과)을 가졌다.
- [0207] 현저하게 대조적으로, 컬럼 #4에 나타난 배양물에서 매우 낮은 수율이 관찰되었으며, 이는 초기 3-일 배양 간격

동안 혈청 보충을 받지 않았다; 이와 같이, 이 데이터는 초기 3일차 배양 간격이 5% AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배양 배지를 포함해야한다는 것을 입증한다.

- [0208] 또한, 0.01 nM로 비타민 D 농도의 감소 또는 1.0 nM로 비타민 D 농도의 증가는 매우 낮은 수율을 초래했다 (각각 컬럼 #5 및 #6에 도시된 데이터). 이와 같이, 비타민 D의 바람직한 농도는 0.1 nM이다.
- [0209] 더욱이, 0.1 μM로 템시롤리무스 농도의 감소는 생성된 T 세포 수율을 감소시켰다 (컬럼 #7). 이와 같이, 템시롤리무스의 바람직한 농도는 1.0 μM이다.
- [0210] 마지막으로, 탈-분화 간격에서 공-자극 수준이 증가되면 (비드-대-T 세포 비율이 1:3에서 1:1로 변화; 결과는 마지막 컬럼인, 컬럼 #9에 도시됨), 결과적인 T 세포 수는 매우 낮았다. 도 8에서 도시된 바와 같이, 비율을 1:1로 증가시키면 탈-분화 상태로부터 T 세포를 제조하는 능력을 크게 감소시키므로 탈-분화 동안 낮은-수준의 공-자극 (1:3 공-자극 비드-대-T 세포 비율)을 사용하는 것이 필요하다 (마지막 컬럼). 이와 같이, 배양의 탈-분화 단계 동안에 바람직한 비드-대-T 세포 비율은 1:3이다.
- [0211] *실시예 9: 초기 3-구성성분 배양 간격은 감소된 분화와 일치하는 CD4⁺ T 세포 발현 세포 표면 분자의 생성을 초래한다*
- [0212] 배양의 재-분화 단계 동안 다양한 횡수에서, 생성된 CD4⁺ T 세포를 유세포분석법에 의해 기억 마커의 발현에 대해 평가하였다.
- [0213] 도 9a-9c는 기억 마커의 CD4⁺ T 세포 발현에 대한 탈-분화 간격 동안 (배양의 13일차에) 배양 구성성분의 효과를 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은-수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율; 1:3); 템시롤리무스 (1 μM 또는 0.1 μM [저용량; "Lo"]); 비타민 D (0.1 nM; 또는 0.01 nM [저용량; "Lo"]); 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μg/ml); 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배지에서 배양을 포함한 (상기 도 9a-9c에서 표시된 바와 같음) 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 3-일 간격 후, 배지를 억제제 없이 신선한 X-Vivo 20으로 교환하고, 높은-수준 공-자극을 제공하고 (3:1 비드-대-T 세포 비율), T 세포 성장 사이토카인 IL-2 (100 IU/ml) 및 IL-7 (10 ng/ml)을 첨가하였다. T 세포는 CD4⁺ 및 CD45RA⁺ 마커의 공-발현 (결과는 상단 패널에 도시됨; 배양의 13일차에 평가됨); CD4⁺, CD62L⁺ 및 CCR7⁺ 마커의 공-발현 (하단 왼쪽 패널, 배양의 3일차에 평가됨); 및 CD4⁺, CD62L⁺, CCR7⁺ 및 CD127⁺ 마커의 공-발현 (하단 오른쪽 패널; 배양의 10일차에 평가됨)의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다. 모든 결과는 배양 시작시 CD4⁺ T 세포의 값과 관련하여 도시되어 있다 (도 9a-9c의 마지막 컬럼; "0일차 입력 값").
- [0214] 도 9a에 도시된 바와 같이, 0일차 입력 T 세포로부터의 값에 비교하여, 초기에 템시롤리무스, 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 조합으로 증식된 T 세포는 나이브 T 세포 상에 발현된 CD45RA 마커의 발현을 비교적 보존하였다 (컬럼 #3). 현저하게 대조적으로, 초기 배양 간격 동안 이들 3개 분자의 부재는 나이브 T 세포 모집단의 고갈을 초래했다 (배양 #1). 더욱이, 초기 배양 간격 동안 템시롤리무스의 제거는 나이브 T 세포 모집단의 고갈을 초래했다 (배양 #6).
- [0215] 도 9b에 도시된 바와 같이, 낮은-수준의 공-자극을 포함하는 3-일 간격으로 초기에 증식된 각각의 T 세포 배양물은 중앙 기억 분자 CD62L 및 CCR7의 T 세포 발현의 증가를 가졌다.
- [0216] 마지막으로, 도 9c에 도시된 바와 같이, 템시롤리무스, 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 조합에서 초기에 증식된 T 세포는 CD62L, CCR7 및 IL-7 수용체 알파 (CD127)에 대해 삼중-양성인 T 세포의 크게 증가된 발현 (0일차 입력 세포에 비교함)을 가졌다. 초기 3-일 배양 (컬럼 #1) 동안 3가지 억제제의 제거는 이 삼중-양성 모집단의 팽창을 촉진하는 초기 배양 간격의 능력을 무효화했다. 부가하여, 초기 배양 간격에서 템시롤리무스만을 줄이거나 제거하면 또한 삼중-양성 T 세포의 빈도를 크게 감소시켰다 (컬럼 #5 및 6).
- [0217] 요약하면, 이들 데이터는 3-약물 초기 배양 간격이, 매우 제한된 T 세포 분화의 상태인, CD62L, CCR7 및 CD127의 공-발현을 포함하여 주로 말기, 효과기 기억 모집단에서 덜-분화된 T 세포 모집단으로의 CD4⁺ T 세포의 전환을 초래함을 예시한다.
- [0218] *실시예 10: 초기 3-구성성분 배양 간격은 감소된 분화와 일치하는 CD8⁺ T 세포 발현 세포 표면 분자의 생성을*

초래한다

- [0219] 배양의 재-분화 단계 동안 다양한 횃수에서, 생성된 CD8⁺ T 세포를 유세포분석법에 의해 기억 마커의 발현에 대해 평가하였다.
- [0220] 도 10a-10b는 기억 마커의 CD8⁺ T 세포 발현에 대한 탈-분화 간격 동안 배양 구성성분의 효과를 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 낮은-수준의 항-CD3/항-CD28 공-자극 (비드-대-T 세포 비율; 1:3); 템시롤리무스 (1 μM 또는 0.1 μM [저용량; "Lo"]); 비타민 D (0.1 nM; 또는 0.01 nM [저용량; "Lo"]); 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μg/ml); 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배지에서 배양을 포함한 (상기 도 10a-10b에서 표시된 바와 같음) 3-일 탈-분화 간격을 거쳤다. 3-일 간격 후, 배지를 억제제 없이 신선한 X-Vivo 20 으로 교환하고, 높은-수준 공-자극을 제공하고 (3:1 비드-대-T 세포 비율), T 세포 성장 사이토카인 IL-2 (100 IU/ml) 및 IL-7 (10 ng/mL)을 첨가하였다. T 세포는 CD8⁺, CD62L⁺ 및 CCR7⁺ 마커의 공-발현 (왼쪽 패널; 배양의 10일차에 평가됨); 및 CD8⁺, CD62L⁺, CCR7⁺ 및 CD127⁺ 마커의 공-발현 (오른쪽 패널; 배양의 10일차에 평가됨)의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다. 모든 결과는 배양 시작시 CD8⁺ T 세포의 값과 관련하여 도시되어 있다 (도 10a-10b의 마지막 컬럼; "0일차 입력 값").
- [0221] 도 10a에 도시된 바와 같이, 낮은-수준의 공-자극을 포함하는 3-일 간격으로 초기에 증식된 각각의 T 세포 배양은 중앙 기억 분자 CD62L 및 CCR7의 CD8⁺ T 세포 발현에서 증가를 가졌다.
- [0222] 마지막으로, 도 10b에 도시된 바와 같이, 템시롤리무스, 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 조합에서 초기에 증식된 T 세포는 CD62L, CCR7 및 IL-7 수용체 알파 (CD127)에 대해 삼중-양성인 CD8⁺ T 세포의 크게 증가된 발현을 가졌다 (0일차 입력 세포 대비). 초기 3-일 배양 (컬럼 #1) 동안 3가지 억제제의 제거는 이 삼중-양성 모집단의 팽창을 촉진하는 초기 배양 간격의 능력을 무효화했다. 부가하여, 초기 배양 간격에서 템시롤리무스만을 줄이거나 제거하는 것은 삼중-양성 T 세포의 빈도를 또한 크게 감소시켰다 (컬럼 #5 및 6).
- [0223] 요약하면, 이들 데이터는 3-약물 초기 배양 간격이, 매우 제한된 T 세포 분화의 상태인, CD62L, CCR7 및 CD127의 공-발현을 포함하여 주로 말기, 효과기 기억 모집단에서 탈-분화된 T 세포 모집단으로의 CD8⁺ T 세포의 전환을 초래함을 나타낸다.
- [0224] *실시예 11: 탈-분화된 T 세포는 낮은 사이토카인 잠재성에 대한 고유한 성향을 갖는다*
- [0225] 도 11a-11d는 낮은-수준의 공-자극 (1:3의 항-CD3/항-CD28 비드 대 T 세포 비율, Kalamasz D, Long SA, Taniguchi R, Buckner JH, Berenson RJ, Bonyhadi M. Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and Anti-CD28 antibodies) Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md: 1997). 2004;27(5):405-418.에 기재된 바와 같이 종래의 방법 대비 감소됨; mTOR 억제제 템시롤리무스; 비타민 D; 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 사용을 포함하는 탈-분화 과정의 구성요소를 강조한다.
- [0226] 도 11a-11d는 분극화-중성 배지에서 배양된 탈-분화 T 세포의 염증성 Th1/Th17 사이토카인 분석을 도시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는, 표시된 바와 같이, 다음과 같은 배양 구성성분을 포함하는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤다: 템시롤리무스 (Y는 1 μM의 농도를 나타냄; Y, Lo는 0.1 μM의 농도를 나타냄); 비타민 D (Y는 0.1 nM의 농도를 나타냄; Y, Lo는 0.01 nM의 농도를 나타냄); 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μg/ml); 낮은 비율 (비드-대-T 세포 비율, 1:3)에서 항-CD3/항-CD28 (3/28) 코팅된 자기 비드로 공-자극, 및 5% 인간 혈청 보충. 3-일 후, 탈-분화된 T 세포를, T 세포 분극화를 유도하는 관점에서 강력하지 않은, T 세포 성장 사이토카인 rhu IL-2 (100 IU/ml) 및 rhu IL-7 (10 ng/mL)이 보충된 배지에서 공-자극 (3:1의 전형적인 비드-대-T 세포 비율)했다. 배양에서 10일 후 (총, 배양의 13일차), T 세포를 수확하고 세정하고 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극하였다; 생성된 상청액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1 x 10⁶ 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다.
- [0227] 탈-분화된 T 세포 상태가 특정 사이토카인 분비 패턴에 대한 고유한 성향을 나타내는지 여부를 평가하기 위해, 본 발명자들은 높은-수준의 공-자극 (비드-대-T 세포 비율, 3:1) 및 어떤 억제제도 함유하지 않고 T 세포 성장 사이토카인 IL-2 및 IL-7만을 함유한 배지에서의 유지를 사용하여 탈-분화된 T 세포를 계산하였다.

- [0228] 도 11a-11d가 상세하게 설명하는 바와 같이, 각각의 탈-분화된 전구체 상태로부터 재-분화된 생성된 T 세포는 IFN- γ (대부분 1000pg/ml 미만의 값), TNF- α (대부분 100pg/ml 미만의 값) 및 IL-17 (모두 10pg/ml 미만의 값)을 포함하는 염증성 사이토카인의 분비 수준이 매우 낮았다. 참고로 GM-CSF는 일부 조건에서 훨씬 더 높은 수준, 일부 경우에 10,000pg/ml 초과로 분비되었다. GM-CSF 값은 더 높은 용량 템시롤리무스 (1.0 μ M) 및 더 높은 용량 비타민 D (0.1 nM)로 구성된 탈-분화 조건에서 조절되었다; 이와 같이, GM-CSF의 T 세포 사이토카인 분비의 결과적인 조절을 위해, 이들 더 높은 농도의 템시롤리무스 및 비타민 D를 포함하는 탈-분화 방법으로부터 T 세포를 팽창하는 것이 바람직하다.
- [0229] 특히, 탈-분화 간격 동안 저농도의 비타민 D (0.01 nM)의 함입은 더 높은 농도의 비타민 D (0.1 nM)를 사용하는 것 대비 다소 높은 수준의 IFN- γ 및 TNF- α 를 또한 초래했다. 이와 같이, 염증성 사이토카인 IFN- γ 의 생성된 T 세포 분비를 조절하기 위해서는, 대략 0.1 nM인 비타민 D의 농도를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0230] 더욱이, 도 12a-12d에 나타난 바와 같이, 각각의 탈-분화된 전구체 상태 T 세포로부터 재분화된 생성된 T 세포는 IL-2의 분비 수준이 매우 낮았지만, 그 수준은 더 높은 농도의 템시롤리무스 및 비타민 D를 포함하는 조건에서의 것이 더 낮은 농도의 이들 작용제를 사용한 조건에 비하여 다시 더 낮았다.
- [0231] 도 12a-12d는 분극화-중성 배지에서 배양된 탈-분화 T 세포의 IL-2 및 Th2-유형 사이토카인 분석을 도시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는, 표시된 바와 같이, 다음과 같은 배양 구성성분을 포함하는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤다: 템시롤리무스 (Y는 1 μ M의 농도를 나타냄; Y, Lo는 0.1 μ M의 농도를 나타냄); 비타민 D (Y는 0.1 nM의 농도를 나타냄; Y, Lo는 0.01 nM의 농도를 나타냄); 항-IL-2 수용체 단일클론 항체 (다클리주맙, 50 μ g/ml); 낮은 비율 (비드-대-T 세포 비율, 1:3)에서 항-CD3/항-CD28 (3/28) 코팅된 자기 비드로 공-자극, 및 5% 인간 혈청 보충. 3-일 후, 탈-분화된 T 세포를, T 세포 분극화를 유도하는 관점에서 강력하지 않은, T 세포 성장 사이토카인 rhu IL-2 (100 IU/ml) 및 rhu IL-7 (10 ng/mL)이 보충된 배지에서 공-자극 (3:1의 전형적인 비드-대-T 세포 비율)했다. 배양에서 10일 후 (총, 배양의 13일차), T 세포를 수확하고 세정하고 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극하였다; 생성된 상청액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1×10^6 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다.
- [0232] 생성된 T 세포는 또한 Th2-유형 사이토카인 IL-4 (20pg/ml 미만의 값) 및 Th2-유형 사이토카인 IL-5 (60pg/ml 미만의 값)의 분비 수준이 매우 낮았다. 그러나, IL-13의 수준은, 더 높은 농도의 템시롤리무스 및 비타민 D를 포함하는 조건에서 검출된 것이 더 낮은 농도의 이들 작용제를 사용한 조건에 비하여 더 낮은 사이토카인 분비로, 몇몇 T 세포 배양 조건에서 상승했다.
- [0233] 요약하면, 이들 데이터는 단계 1 탈-분화 과정 후 강력한 분극화 신호 없이 (IFN- α , IL-4 또는 TGF- β 의 추가 없음) T 세포 성장 사이토카인 (IL-2 및 IL-7)을 함유하는 배지에서 T 세포의 재-분화는 낮은 사이토카인 잠재력의 T 세포에 대한 고유한 성향을 갖는다는 것을 나타낸다; 특히, 본 발명자들은 유해한 사이토카인 IFN- γ , TNF- α 및 IL-17의 낮은 수준을 입증했다. 이 관찰은 특히 탈-분화 단계가 1.0 μ M 농도의 템시롤리무스, 0.1 nM 농도의 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체를 함유하는 배지에서 낮은 수준의 공-자극 및 증식을 통합하는 경우에 특히 강력하다.
- [0234] *실시예 12: 하이브리드 T_{REG}/Th2 분극화 조건 및 신규한 약학적 제제 페메트렉시드의 존재에서 탈-분화된 T 세포의 유리한 팽창*
- [0235] 본 발명자들은 T 세포 재-분화가 T_{REG} 분극성 사이토카인 IL-2와 TGF- β , 또는 Th1 분극성 사이토카인인, IFN- α 를 함체하였을 때 탈-분화 구성성분의 효과를 평가하였다.
- [0236] 실제로, TBET 또는 GATA3는 면역 내성을 유지하기 위해 T_{REG} 세포 용량을 유지하는 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고, T_{REG} 세포 기능에서 TBET 또는 GATA3의 역할에 대한 이 증거에도 불구하고, 본 발명자들은 TBET의 매우 강력한 연결과 그에 따른 자가면역에서 Th1-유형 경로 때문에 제조된 T_{REG} 세포에서 GATA3 발현을 우선선택하기로 선정했다. 이와 같이, 본 발명자들은 T_{REG} 분극화 신호 (IL-2, TGF- β)와 주 Th2 분극화 신호 (IL-4) 둘 모두를 포함하는 단계 1 탈-분화 과정에 이은 단계 2 재-분화 과정이 인간 "하이브리드" T_{REG}-Th2 세포를 생성할 수 있는지 평가하였다. 실험 무어라인 모델로부터의 문헌 결과는 이와 관련하여 혼합되어 있는데, 이는 생체의 배양 T_{REG} 세포에 IL-4를 의도적으로 첨가하는 것이 T_{REG} 표현형을 촉진하거나 억제하는 것으로 나타났기 때문이

다. T_{REG} 세포를 제조함에 있어 외인성 IL-4의 역할에 관한 이 상충하는 뮤어라인 문헌 외에도, 인간 T_{REG} 세포에 대한 IL-4의 생체의 역할에 관한 정보가 부족하지만, 일 연구는 IL-4가 인간 T_{REG} 세포 기능을 보존했다는 것을 밝혔다.

[0237] iT_{REG} 세포는 iT_{REG} 세포가 병원성 Th1-유형 또는 Th17-유형 서브세트로 전환할 수 있는 생체내 분화 유연성에 대한 경향을 갖는 것으로 특성규명되었기 때문에, 하이브리드 Th2 구성성분을 갖는 인간 iT_{REG} 세포는 입양 T 세포 요법에 유리할 수 있다. 반면에, Th2-유형 표현형에 대한 분화가 iT_{REG} 제조 내에서 인코딩되는 경우, Th2 성향은 Th1/Th17 표현형에 대한 유연성을 예측 가능하게 제한할 것이다.

[0238] 부가하여, 본 발명자들은 약학적 제제 페메트렉시드가 iT_{REG} 세포 표현형을 촉진하는 데 유의할 수 있는지 여부를 평가하였다. 우선적인 iT_{REG} 세포 생성을 위한 약학적 제제의 사용에 대한 선례가 있다; 가장 현저하기로는, mTOR 억제제 라파마이신은 iT_{REG} 세포로의 전이와 관련되어 있다. 그러나, 페메트렉시드는 iT_{REG}-촉진 효과가 있는 것으로 특성규명되지 않았다. 페메트렉시드는 엽산 항-대사산물로서 복잡한 작용 메커니즘을 가지고 있다.

[0239] 도 13은 Th1 분극화 조건 대비 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 유리한 팽창을 도시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 3-일 탈-분화 절차 ("단계 1")를 거쳤다. 도 13에 나타낸 바와 같이, 이 단계 1 탈-분화 개입은 다양하게: 억제제 없음 ("아니오"); 템시롤리무스 단독 ("T"; 1.0 μM); 비타민 D 단독 ("D"; 0.1 nM); 항-IL-R 단일클론 항체 바실리시맙 단독 ("B"; 10 μg/ml); 또는 억제제의 다양한 조합 (T, D; 또는 T, D, B)을 포함했다 3-일 후, 탈-분화된 T 세포를: Th1 분극화 조건 (rhu IFN-α; 10,000 IU/ml); T_{REG} 분극화 (rhu IL-2, 100 IU/ml; rhu TGF-β, 10 ng/ml); 또는 하이브리드 Th2-T_{REG} 분극화 조건 (IL-2, TGF-β, 플러스 rhu IL-4의 첨가 [1000 IU/ml])으로 다양하게 보충된 배지에서 공-자극 (3:1의 전형적인 비드-대-T 세포 비율) 했다. 부가하여, 가변성 분극화 조건의 존재에서 T 세포 배양은 새로운 억제성 분자인, 페메트렉시드 없이 ("0") 또는 지시된 바와 같이 가변성 농도의 페메트렉시드의 존재에서 (10 nM ["10"]; 33 nM ["33"]; 또는 100 nM ["100"]) 수행하였다. 총 10일의 배양 후, n=24 배양물을 수확하고 살아있는 세포를 열거하고 위에 그래프로 표시했다 (y-축은 세포 수 x 10⁶을 나타내고; 입력 세포 수는 1.5 x 10⁶ 세포였다).

[0240] 도 13이 도시하는 바와 같이, 단계 1 탈-분화 후 T 세포를 재-분화하는 능력은 탈-분화 동안 추가된 특정 구성 성분; 재-분화 동안 추가된 특정 사이토카인; 및 재-분화 동안 페메트렉시드의 존재에 의존하였다.

[0241] 놀랍게도, 단계 1 탈-분화 후 충분한 수의 T 세포를 재-분화하려는 시도는 Th1-유형 분극화의 조건에서 성공하지 못했다 (도 13, 배양 #9 내지 #16 참조; 모든 T 세포는 T 세포 입력 수 미만을 생성함). 탈-분화 조건이 템시롤리무스 및 비타민 D 어느 하나의 단독으로 또는 항-IL-2 수용체 시약과 조합하여 포함하는 경우 Th1-유형 경로를 따라 재-분화하는 매우 제한된 능력이 관찰되었고, 페메트렉시드가 단계 2 배양 동안에 첨가되지 않거나 10 내지 100 nM 범위의 농도로 첨가되는 경우에도 또한 관찰되었다.

[0242] 현저하게 대조적으로, 단계 1 탈-분화 후 충분한 수의 T 세포를 재-분화하려는 시도는 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 성공적이었다 (도 13, 배양물 #2 및 #5 참조). 놀랍게도, 가장 엄격한 탈-분화 조건 (템시롤리무스, 비타민 D 및 항-IL-2 수용체 단일클론 항체의 합입)에서, 페메트렉시드가 10 nM의 농도에서 단계 2 배양에 첨가된 경우에만 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 충분한 T 세포가 관찰되었다.

[0243] 이 가장 엄격한 탈-분화 단계 1 조건을 사용하여, 순수한 T_{REG} 분극화 조건 (IL-4 없이 IL-2 플러스 TGF-β)에서 단계 2 동안 충분한 수의 T 세포를 재-분화하려는 시도는, 페메트렉시드의 존재에서도 성공하지 못했다 (배양물 #20 및 #21).

[0244] 요약하면, 수치적 관점에서 성공적인 T 세포 재-분화는 T_{REG}-Th2 하이브리드 분극화 조건 (IL-2, TGF-β 및 IL-4)을 사용하고 그리고 10 nM의 농도에서 약학적 제제 페메트렉시드를 사용하여 최적으로 수행된다.

[0245] 실시예 13: 하이브리드 T_{REG}-Th2 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양은 제한된 분화 상태의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 생성을 초래한다

[0246] 본 발명자들은 또한 T 세포 기억 상태에 대한 다양한 사이토카인 분극화 조건/다양한 페메트렉시드 조건에서 이

단계 1 탈-분화 과정에 이은 단계 2 재-분화의 효과를 평가했다. 즉, 연구는 제한된 분화 상태의 T 세포가 적응 세포 요법에 대한 치료적 유용성을 향상 시켰음을 보여준다; 따라서, 제한된 T 세포 분화는 단계 1/단계 2 T 세포 제조 방법의 유리한 특징이 될 것이다.

- [0247] 도 14a-14c는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 나이브 및 삼중-양성 T 중앙 기억 CD4⁺ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 도 13에 설명된 바와 같이 가변성 분극화 배양 조건 및 페메트렉시드의 가변성 존재를 함유하는 배지에서 3-일 탈-분화 절차 및 후속 배양을 거쳤다. 총 n=24 배양 조건 중에서, 유리한 세포 수율을 가진 배양물만 추가로 평가하였다; 페메트렉시드를 함유하는 모든 배양물 ("+")은 10 nM의 농도였다. 무엇보다도 T_{REG} 조건은 명시되지 않는한 ("TReg, No IL4") IL-2, TGF-β 및 IL-4를 함유했다 ("TReg"). 총 10일의 배양 후, 배양물을 수확하고 다음의 함량에 대해 유세포분석법에 의해 평가했다: 나이브 CD4⁺ T 세포 (CD45RA를 공-발현한 총 CD4⁺ T 세포의 %로 표현됨; 도 14a); 중앙 기억 CD4⁺ T 세포 (CD62L 및 CCR7 둘 모두를 공-발현한 총 CD4⁺ T 세포의 %로 표현됨; 도 14b); 및 삼중-양성 중앙-기억 CD4⁺ T 세포 (CD62L, CCR7 및 CD127을 공-발현한 총 CD4⁺ T 세포의 %로 표현됨; 도 14c).
- [0248] 도 14a에 도시된 바와 같이, 하이브리드 T_{REG}-Th2 조건 (10 nM 농도에서 페메트렉시드가 있거나 없음)에서 단계 2 재-분화는 입양 T 세포 요법의 실험적 뮤어라인 모델에 유리한 CD4⁺CD45RA⁺ 나이브 T 세포 서브세트의 높은 빈도를 초래했다.
- [0249] 부가하여, 도 14c에 도시된 바와 같이, 하이브리드 T_{REG}-Th2 조건 (10 nM 농도에서 페메트렉시드가 있거나 없음)에서 단계 2 재-분화는 기억 마커 CD62L, CCR7 및 CD127의 삼중 양성 공-발현을 갖는 CD4⁺ T 세포의 높은 빈도를 초래했다. 이 삼중-양성 기억 표현형은 매우 원시적인 분화 상태를 가진 T 세포의 마커이다.
- [0250] 도 14c에 나타난 바와 같이, CD62L, CCR7 및 CD127에 대해 삼중 양성인 CD4⁺ T 세포의 빈도는 순수한 T_{REG} 분극화 조건 대비 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 더 높았다.
- [0251] 또한, 도 14c에 나타난 바와 같이, 템시롤리무스 및 비타민 D뿐만 아니라 항-IL-2 수용체 단일클론 항체를 포함하는 보다 엄격한 단계 1 탈-분화 조건의 사용은 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건을 사용한 CD62L, CCR7 및 CD127에 대해 삼중 양성인 CD4 세포의 가장 높은 빈도를 산출했다.
- [0252] 도 15a-15b는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 삼중-양성 T 중앙 기억 CD8⁺ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 도 13에 설명된 바와 같이 가변성 분극화 배양 조건 및 페메트렉시드의 가변성 존재를 함유하는 배지에서 3-일 탈-분화 절차 및 후속 배양을 거쳤다. 총 n=24 배양 조건 중에서, 유리한 세포 수율을 가진 배양물만 추가로 평가하였다; 페메트렉시드를 함유하는 모든 배양물 ("+")은 10 nM의 농도였다. 무엇보다도 T_{REG} 조건은 명시되지 않는한 ("TReg, No IL4") IL-2, TGF-β 및 IL-4를 함유했다 ("TReg"). 총 10일의 배양 후, 배양물을 수확하고 다음의 함량에 대해 유세포분석법에 의해 평가했다: 중앙 기억 CD8⁺ T 세포 (CD62L 및 CCR7 둘 모두를 공-발현한 총 CD8⁺ T 세포의 %로 표현됨; 도 15a); 및 삼중-양성 중앙-기억 CD8⁺ T 세포 (CD62L, CCR7 및 CD127을 공-발현한 총 CD8⁺ T 세포의 %로 표현됨; 도 15b).
- [0253] 또한, 도 15b에 도시된 바와 같이, CD62L, CCR7, CD127에 대해 삼중 양성인 CD8 세포의 빈도는 순수한 T_{REG} 분극화 조건 대비 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 더 높았다. 더욱이, 도 15a-15b에 도시된 바와 같이, 템시롤리무스 및 비타민 D뿐만 아니라 항-IL-2 수용체 단일클론 항체를 포함하는 보다 엄격한 단계 1 탈-분화 조건의 사용은 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건을 사용한 CD62L, CCR7 및 CD127에 대해 삼중 양성인 CD8⁺ T 세포의 가장 높은 빈도를 산출하였다.
- [0254] 요약하면, 이들 데이터는 하이브리드 T_{REG}-Th2 사이토카인 분극화 (IL-2, TGF-β 및 IL-4)를 사용하고 그리고 단계 1 탈-분화 결과 후 페메트렉시드 (10 nM)를 사용한 T 세포 재-분화는 유리하고 제한된 분화 상태의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 초래한다는 것을 나타낸다.

- [0255] 실시예 14: 하이브리드 T_{REG}/Th2 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양은 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형을 갖는 T 세포를 초래한다
- [0256] 단계 1 탈-분화 후 단계 2 배양 조건에서 재-분화된 T 세포도 사이토카인 분비 패턴에 대해 또한 평가하였다. 사이토카인 분비는 T 세포 효과기 기능의 지표이고, 이와 같이, T_{REG} 세포가 특히 IL-17, IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 주요 염증성 사이토카인과 관련하여 감소된 사이토카인 분비 잠재력을 갖는다는 것이 일반적으로 바람직하다. 제안된 하이브리드 T_{REG}-Th2 세포 모집단의 경우, 그러한 세포는 또한 Th2 사이토카인의 일부 분포를 분비할 것으로 예상된다.
- [0257] 도 16a-16c는 하이브리드 Th2/TReg 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양은 높은 수준의 IL-2 및 IL-4 분비와 낮은 수준의 IL-5 분비에 의해 표시된 바와 같이, 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형을 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 도 13에 설명된 바와 같이 가변성 분극화 배양 조건 및 페메트렉시드의 가변성 존재를 함유하는 배지에서 3-일 탈-분화 절차 및 후속 배양을 거쳤다. 총 n=24 배양 조건 중에서, 유리한 세포 수율을 가진 배양물만 추가로 평가하였다; 페메트렉시드를 함유하는 도시된 모든 배양물 ("+")은 10 nM의 농도였다. 무엇보다도 T_{REG} 조건은 명시되지 않는한 ("TReg, No IL4") IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유했다 ("TReg"). 총 10일의 배양 후, T 세포를 수확하고 세정하고 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극하였다; 생성된 상청액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1 x 10⁶ 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다.
- [0258] 도 16a에 도시된 바와 같이, 배양에 페메트렉시드를 첨가하거나 첨가하지 않은 하이브리드 T_{REG}-Th2 사이토카인 분극화 조건 (IL-2, TGF- β , IL-4)에서 재-분화된 T 세포는 IL-2 분비에 대해 가장 높은 값을 가졌다. 이 결과는 T 세포에서 IL-2 분비가 하이브리드 배양 조건에서 재-분화된 T 세포가 갖는 초기 분화의 상태에서 T 세포의 특징이라는 이전의 이해와 일치한다.
- [0259] 도 17a-17c는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 낮은 수준의 IL-10, IL-13 및 IL-17 분비에 의해 표시된 바와 같이, 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형을 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 도 13에 설명된 바와 같이 가변성 분극화 배양 조건 및 페메트렉시드의 가변성 존재를 함유하는 배지에서 3-일 탈-분화 절차 및 후속 배양을 거쳤다. 총 n=24 배양 조건 중에서, 유리한 세포 수율을 가진 배양물만 추가로 평가하였다; 페메트렉시드를 함유하는 도시된 모든 배양물 ("+")은 10 nM의 농도였다. 무엇보다도 T_{REG} 조건은 명시되지 않는한 ("TReg, No IL4") IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유했다 ("TReg"). 총 10일의 배양 후, T 세포를 수확하고 세정하고 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극하였다; 생성된 상청액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1 x 10⁶ 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다.
- [0260] 도 18a-18c는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양이 낮은 수준의 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF 분비에 의해 표시된 바와 같이, 원시 Th2 세포 사이토카인 표현형을 갖는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 도 13에 설명된 바와 같이 가변성 분극화 배양 조건 및 페메트렉시드의 가변성 존재를 함유하는 배지에서 3-일 탈-분화 절차 및 후속 배양을 거쳤다. 총 n=24 배양 조건 중에서, 유리한 세포 수율을 가진 배양물만 추가로 평가하였다; 페메트렉시드를 함유하는 도시된 모든 배양물 ("+")은 10 nM의 농도였다. 무엇보다도 T_{REG} 조건은 명시되지 않는한 ("TReg, No IL4") IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유했다 ("TReg"). 총 10일의 배양 후, T 세포를 수확하고 세정하고 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극하였다; 생성된 상청액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1 x 10⁶ 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다.
- [0261] 더욱이, 도 16b에 도시된 바와 같이, 배양에 페메트렉시드를 첨가하거나 첨가하지 않은 하이브리드 T_{REG}-Th2 조건 (IL-2, TGF- β 및 IL-4)에서 재-분화된 T 세포는 IL-4 분비에 대해 가장 높은 값을 가졌다. IL-4가 Th2 분극화를 지시하는 주요 사이토카인이기 때문에, 하이브리드 조건에서 제조된 T 세포는 실제로 Th2 분극화된다. 반면, 그의 제한된 분화 상태와 일치하여, 하이브리드 조건에서 재-분화된 세포는 높은 수준의 효과기 Th2 사이토카인 (IL-5, 도 16c 참조; IL-10, 도 17a 참조; IL-13, 도 17b 참조) 또는 효과기 Th1/Th17 사이토카인

(IFN- γ , 도 18a 참조; TNF-알파, 도 18b 참조; GM-CSF, 도 18c 참조; IL-17, 도 17c 참조)을 분비하지 않았다.

- [0262] 중요하게도, T 세포 재-분화 과정에서 IL-4 함입의 기여는 더 높은 수준의 염증성 사이토카인 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF를 초래했다 (도 18a-18c 참조).
- [0263] 요약하면, 이들 데이터는 단계 1 탈-분화된 세포로부터 T_{REG} 표현형으로의 T 세포의 재-분화는 최적으로 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건을 활용해야하는데 이는 이 조건으로부터 나오는 T 세포는 염증성 질환과 관련된 사이토카인 분비에 대해 크게 감소된 용량을 갖기 때문이라는 것을 나타낸다.
- [0264] *실시예 15: 하이브리드 T_{REG}/Th2 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양은 향상된 하이브리드 T_{REG}/Th2 전사 인자 프로파일을 갖는 T 세포를 초래한다*
- [0265] T 세포 사이토카인 표현형은 주요 전사 인자에 의해 결정된다. 전사 인자와 T 세포 서브세트의 연관성은 다음과 같다: FOXP3는 T_{REG} 세포 발달을 지시한다; TBET는 Th1-유형 세포 발달을 지시한다; 그리고 GATA3는 Th2-유형 발달을 지시한다.
- [0266] 이들 전사 인자를 본 발명자들의 제조 방법에서 평가하기 위해, T 세포는 먼저 단계 1 탈-분화 과정을 거치고 그 다음 하이브리드 T_{REG}-Th2 배양 조건 (IL-2, TGF- β 및 IL-4)에서 재-분화하였다. 부가하여, 본 발명자들은 페메트렉시드와 고전적인 mTOR 억제제의 효과를 비교했다. 본 발명자들의 실험에서는 mTOR 억제제 (라파마이신; Sirolimus®)의 경구 제형을 사용하는 대신 수용성 모계 형태의 약물인 텀시롤리무스 (Toracel®)를 사용했다.
- [0267] iT_{REG} 표현형은 불안정한 것으로 간주된다; 이와 같이, 본 발명자들은 배양의 20 및 32일차를 포함하여 지연된 시점에서 하이브리드 T_{REG}-Th2 배양 조건을 사용하여 재-분화된 T 세포의 안정성을 평가하였다. 부가하여, 엄격한 방식으로 표현형 안정성을 테스트하기 위해, 배양의 24일차와 32일차 사이에 T 세포는 높은 수준의 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)을 수용하였고 사이토카인 또는 약리 작용제 없는 배지에서 증식되었다.
- [0268] 도 19a-19d는 페메트렉시드를 함유하는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 FOXP3 및 GATA3 전사 인자를 발현하는 CD4⁺ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤고 후속으로 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)되고 약리학적 억제제 텀시롤리무스 (1.0 μ M) 또는 페메트렉시드 (10 nM)가 있거나 없는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건 (IL-2; TGF- β ; IL-4)을 함유하는 배지에서 증식되었다. 배양의 14일차 및 24일차 둘 모두에서 3/28 비드로 배양물을 재자극하였다; 배양의 24일차에, 전사 인자 발현의 안정성을 평가하기 위해, 배양 배지는 외인성 사이토카인 또는 약리학적 억제제를 함유하지 않았다. 배양의 12, 20 및 32일차에, T 세포를 수확하고 다음 전사 인자인, FOXP3, Tbet 및 GATA3에 대해 표면 유세포분석법 (CD4 마커) 및 세포-내 염색을 수행했다. 위의 데이터는 전체 배양된 모집단에서 CD4 세포 퍼센트 (도 19a); T_{REG} 전사 인자 FOXP3를 발현한 CD4 세포의 퍼센트 (도 19b); Th1 전사 인자 Tbet을 발현한 CD4 세포의 퍼센트 (도 19c); 및 Th2 전사 인자 GATA3를 발현한 CD4 세포의 퍼센트 (도 19d)를 나타낸다.
- [0269] 도 19a-19d에서 상세하게 설명하는 바와 같이, T_{REG}-Th2 조건에서 재-분화된 T 세포는 배양에서 시간이 지남에 따라 CD4 세포 우세로 점진적으로 전이했다 (도 19a). 도 19b에 도시된 바와 같이, CD4 세포는 배양 내 텀시롤리무스 또는 페메트렉시드 존재와 무관하게 배양의 12일차부터 32일차까지 높은 빈도로 그리고 안정적인 방식으로 FOXP3를 발현하였다.
- [0270] 도 19c와 같이, 약리학적 억제제 존재 없이도 Th1 전사 인자 TBET에 의한 오염 빈도가 매우 낮았다. 그러나, 가장 지속적으로 감소된 TBET 값은 페메트렉시드를 또한 포함하는 하이브리드 분극화 조건에서 관찰되었다. 마지막으로, 도 19d에 도시된 바와 같이, 페메트렉시드가 보충된 하이브리드 T_{REG}-Th2 조건에서 제조된 T 세포에서 가장 높은 배양의 종료 Th2-관련 GATA3 발현이 관찰되었다.
- [0271] 도 20a-20d는 페메트렉시드를 함유하는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 FOXP3 및 GATA3 전사 인자를 발현하는 CD8⁺ T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤고 후속으로 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)되고 약리학적 억제제 텀시롤리무스

(1.0 μM) 또는 페메트렉시드 (10 nM)가 있거나 없는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건 (IL-2; TGF-β; IL-4)을 함유하는 배지에서 증식되었다. 배양의 14일차 및 24일차 둘 모두에서 3/28 비드로 배양물을 재자극하였다; 배양의 24일차에, 전사 인자 발현의 안정성을 평가하기 위해, 배양 배지는 외인성 사이토카인 또는 약리학적 억제제를 함유하지 않았다. 배양의 12, 20 및 32일차에, T 세포를 수확하고 다음 전사 인자인, FOXP3, Tbet 및 GATA3에 대해 표면 유세포분석법 (CD8 마커) 및 세포-내 염색을 수행했다. 위의 데이터는 전체 배양된 모집단에서 CD8 세포 퍼센트 (도 20a); T_{REG} 전사 인자 FOXP3를 발현한 CD8 세포의 퍼센트 (도 20b); Th1 전사 인자 Tbet을 발현한 CD8 세포의 퍼센트 (도 20c); 및 Th2 전사 인자 GATA3를 발현한 CD8 세포의 퍼센트 (도 20d)를 나타낸다.

[0272] 도 20a에 도시된 바와 같이, CD8 세포 함량은 배양에서 시간이 지남에 따라 점진적으로 그리고 완만하게 감소했다. T_{REG} 세포 기능은 일반적으로 CD4 세포 서브세트에 기인하지만 CD8⁺ T_{REG} 세포도 잘 설명되어 있다는 것을 인지해야 한다; CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 서브세트 둘 모두를 함유하는 T_{REG} 모집단의 사용은 항원-특이성의 다양화로 인해 유리할 수 있다는 것이 가능하다. 이와 같이, 본 발명자가 설명하는 방법은 CD4- 및 CD8-유형 T_{REG} 둘 모두를 생성하므로 부분적으로 잠재적으로 유리하다.

[0273] 도 20b가 도시하는 바와 같이 (오른쪽 상단 패널), 이 방법을 사용하여 제조된 CD8⁺ T 세포는 실제로 FOXP3 발현이 풍부했으며, 이는 배양에서 시간이 지남에 따라 안정하고 약리학적 억제제 존재와 무관하게 안정적이었다.

[0274] 도 20c가 도시하는 바와 같이 (왼쪽 하단 패널), 일반적으로 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서의 재-분화는 낮은 수준의 Th1 전사 인자 TBET의 CD8⁺ T 세포 발현을 유도했다; 그러나, 가장 낮은 수준은 페메트렉시드의 존재에서 가장 일관되게 관찰되었다.

[0275] 마지막으로, 도 20d가 도시하는 바와 같이 (오른쪽 하단 패널), T_{REG}-Th2 조건에서의 재-분화는 실제로 GATA3 전사 인자의 증가된 발현에 의해 표시되는 바와 같이 Th2-유형 분화쪽으로 또한 전이된 CD8⁺ T 세포를 초래했다.

[0276] 도 40a-40b는 또한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 서브세트 둘 모두에서 재-분화된 TREG-Th2 세포에 대한 GATA3 및 FOXP3의 유세포분석법을 도시한다.

[0277] 요약하면, 이들 전사 인자 분석은 하이브리드 T_{REG}-Th2 배양 조건 플러스 페메트렉시드 첨가에서 재-분화가 최적 이 될 수 있으며 이는 FOXP3 및 GATA3 둘 모두를 발현하는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 둘 모두를 TBET의 제한된 발현으로 보존할 수 있기 때문이다는 것을 나타낸다.

[0278] *실시예 16: 하이브리드 T_{REG}/Th2 조건에서 탈-분화된 T 세포의 배양은 향상된 Th2 사이토카인 분비 프로파일을 갖는 T 세포를 초래한다*

[0279] 전사 인자 측정에 부가하여, 본 발명자들은 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 재-분화된 T 세포의 사이토카인 분비 용량에 대해 평가하였다. 도 21a-21d에 도시된 바와 같이, T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 증식된 모든 재-분화 배양물은 IL-4 분비가 가능한 T 세포를 생성하며, 이에 의해 약리학적 억제제의 부재에서도 Th2 극성을 달성하는 이 방법의 고유한 능력을 입증한다.

[0280] 도 21a-21d는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 우세한 Th2 사이토카인 표현형: IL-4, IL-5 및 IL-13 분비를 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤고 후속으로 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)되고 약리학적 억제제 템시롤리무스 (1.0 μM) 또는 페메트렉시드 (10 nM)가 있거나 없는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건 (IL-2; TGF-β; IL-4)을 함유하는 배지에서 증식되었다. 배양의 14일차 및 24일차 둘 모두에서 3/28 비드로 배양물을 재자극하였다; 배양의 24일차에, 전사 인자 발현의 안정성을 평가하기 위해, 배양 배지는 외인성 사이토카인 또는 약리학적 억제제를 함유하지 않았다. 배양의 12, 20 및 32일차에, T 세포를 수확하고, 세정하고, 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극했다; 생성된 상층액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1 x 10⁶ 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로

표현된다. Th2 사이토카인 IL-10도 평가하였다: 모든 값은 1×10^6 세포/ml/24시간당 20pg/ml 미만이었다.

- [0281] 참고로, 템시롤리무스는 T_{REG}-Th2 조건에서 재-분화된 T 세포가 효과기 Th2 사이토카인 IL-5 (도 21b) 및 IL-13 (도 21c)을 분비하는 능력을 둔화시켰지만, 페메트렉시드의 사용은 IL-5 및 IL-13을 분비하는 T 세포의 능력을 완전히 보존했다. 이와 같이, 이들 데이터는 페메트렉시드가 T_{REG}-Th2 하이브리드 서브세트의 제조에 더 적합하기 때문에 페메트렉시드의 사용이 mTOR 억제제 템시롤리무스와 같은 통상적인 T_{REG}-촉진제의 사용 대비 유리하다는 추가의 증거를 제공한다.
- [0282] 더욱이, T_{REG}-Th2 분극화 조건에서 재-분화된 모든 T 세포는 상대적으로 낮은 수준의 IL-2 (도 22a), IFN- γ , (도 22b), IL-17 (모든 값이 20pg/ml 미만) 및 TNF- α (모든 값이 20pg/ml 미만) 발현을 가졌다.
- [0283] 도 22a-22d는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건에서 탈-분화된 T 세포의 연장된 배양이 우세한 Th2 사이토카인 표현형: IL-2, IFN- γ 및 GM-CSF 분비를 발현하는 T 세포의 생성을 초래함을 예시한다. 인간 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 3-일 탈-분화 절차를 거쳤고 후속으로 공-자극 (3:1 비드-대-T 세포 비율)되고 약리학적 억제제 템시롤리무스 (1.0 μ M) 또는 페메트렉시드 (10 nM)가 있거나 없는 하이브리드 Th2/T_{REG} 분극화 조건 (IL-2; TGF- β ; IL-4)을 함유하는 배지에서 증식되었다. 배양의 14일차 및 24일차 둘 모두에서 3/28 비드로 배양물을 재자극하였다; 배양의 24일차에, 전사 인자 발현의 안정성을 평가하기 위해, 배양 배지는 외인성 사이토카인 또는 약리학적 억제제를 함유하지 않았다. 배양의 12, 20 및 32일차에, T 세포를 수확하고, 세정하고, 24시간 동안 3/28 비드 (3:1 비율)로 재-자극했다; 생성된 상층액을 수확하고 Luminex 다중-분석물 방법에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 도시된 모든 결과는 1×10^6 세포/ml/24시간당 ml당 pg에서의 사이토카인 수준으로 표현된다. 염증성 사이토카인 IL-17 및 TNF- α 도 평가하였다: 모든 값은 1×10^6 세포/ml/24시간당 20pg/ml 미만이었다.
- [0284] 참고로, GM-CSF 분비는 페메트렉시드가 추가로 보충된 T_{REG}-Th2 하이브리드 배양 조건에서 재-분화된 T 세포에서 더 높은 수준으로 관찰되었다 (10 nM; 도 22c). 문헌에서의 실험적 연구에서 외삽하면, T_{REG}-Th2 하이브리드 모집단 내에서 향상된 GM-CSF에 대한 능력이 반드시 해로운지 유익한지 여부는 명확하지 않다.
- [0285] 요약하면, 이들 데이터는 T_{REG}-Th2 극성화 조건에서 T 세포 재-분화가 염증성 질환과 관련된 Th1- 및 Th17-유형 사이토카인의 분비에 대해 낮은 수준의 능력을 갖는 T 세포를 초래하기 때문에 유리하다는 것을 나타낸다. 하이브리드 T_{REG}-Th2 분극화 조건에 페메트렉시드의 함입은 Th2 사이토카인 생산에 대해 증가된 능력을 초래하여, Th1- 및 Th17-유형 서브세트에 대한 분화 유연성에 대한 방어를 추가로 제공할 것이기 때문에 유리한다.
- [0286] *실시예 17: 입력 T 세포 TCR 레퍼토리를 유익하게 변경하기 위해 혈장교환에 의한 림프구 수집 이전에 선별 항-TNF- α 시약의 사용*
- [0287] 도 23a 및 23b는 TNF- α 억제제인, 에타너셉트로의 요법 후 T 세포 TCR 특이성의 광범위한 상향- 및 하향-조절을 검출하기 위한 RNA-기반 T 세포 수용체 서열화의 사용을 도시한다. 도 23에서, RNA는 에타너셉트 요법으로 요법-전후의 ALS 환자로부터 말초 혈액 단핵 세포로부터 단리되었다. RNA는 이전에 Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. BMC Biotechnol. 2017;17(1):61에 의해 기술된 바와 같이, TCR 레퍼토리 프로파일링을 거쳤다.. 도 23a에서 TCR 특이성의 대략 25%가 요법-후 샘플에서 상향-조절되었음을 입증하였다 (빨간색으로 표시됨); 현저하게 대조적으로, TCR 특이성의 대략 25%는 요법-후 샘플에서 하향-조절되었다 (파란색으로 표시됨). 오른쪽 상단 도 (b)에 표시된 바와 같이, 여러 T 세포 클론이 0.01 프리-에타너셉트 (검정의 검출 한계 근처)의 빈도로부터 247에서 486의 범위인 치료-후 값으로 증가함에 따라 에타너셉트 요법은 현저한 T 세포 클론 팽창을 초래했으며, 이에 의해 4-로그 초과 T 세포 팽창과 일치한다. 도 23b 오른쪽 하단에 나타난 바와 같이, 여러 T 세포 클론이 259 내지 598 프리-에타너셉트의 빈도로부터 0.01의 치료-후 값으로 감소함에 따라 에타너셉트 요법은 현저한 T 세포 클론 수축을 초래했으며, 이에 의해 4-로그 초과 T 세포 수축과 일치한다.
- [0288] 도 23a-b는 TNFR1-발현 Th1-유형 세포를 촉진하는 TNF- α 의 무-세포 형태인, 혈청을 우선적으로 억제하는 에타너셉트로의 항-TNF- α 요법이 T 세포 수용체 상향- 및 하향-조절에서 광범위한 변화와 관련이 있음을 나타낸다. 이들 관찰은 TNF- α 의 무-세포 형태 (예컨대, 단일클론 항체, 아달리무맙)인, 혈청을 우선적으로 억제하는 에타

너셉트 또는 다른 항-TNF- α 치료제로 대상체의 사전-치료가 T 세포 수용체 레퍼토리를 항원-특이성 기준으로 Th1 유형-표현형의 T 세포로부터 떨어지도록 전이하여, 이에 의해 항원-특이적 기준으로 TREG 표현형의 T 세포를 풍부하게 하는데 이용할 수 있음을 나타낸다.

- [0289] 실시예 18: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 발현이 강화된 세포 생성물로서 TREG-Th2 하이브리드 모집단의 특성규명.
- [0290] 도 24는 제조된 iTREG/Th2 하이브리드 모집단은 대조군 Th1/Tc1 배양 대비 CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 증가된 발현을 가짐을 예시한다. 도 24에서, iTREG/Th2 하이브리드 모집단은 IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유하는 배지에서 T 세포 탈-분화의 초기 단계에 이어 재-분화를 사용하여 이전에 상세히 설명된 방법에 의해 생성되었다. iTREG/Th2 제조의 11일차에, 세포를 수확하고 관련 분자, 즉 CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 발현의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다; Th1/Tc1 분극화를 평가하는 3가지 별도 제어 조건에 대한 비교가 이루어졌다.
- [0291] 도 24는 기술된 조건에 따라 제조된 하이브리드 TREG-Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 다음 세포 표면 분자: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 증가된 발현을 가진다는 것을 나타낸다.
- [0292] 도 24가 예시하는 바와 같이, iTREG/Th2 하이브리드 세포 생성물은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 적어도 10%, 보다 바람직하게는 50% 더 높은 수준을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 갖는다.
- [0293] IL-2 수용체인 CD25는 TREG 세포가 자가면역, 특히 CD8+ T 세포 구동 반응을 제어하는 능력에 중요하다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CD25의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0294] TREG 세포 상에 증가된 발현을 갖는 공-자극성 분자인 CD27은 TREGS의 억제성 기능에 기여하는 것으로 나타났다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CD27의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0295] 2B4 (CD244)는 최근에 해당작용 및 세포 분열의 약화에 의해 CD8+ T 세포 반응을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 2B4의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0296] BTLA (CD272)는 공-억제성 수용체이고, BTLA와 헤르페스바이러스-진입 매개체 HVEM과의 결합은 TREG 세포 유도 및 효과기 면역 반응의 억제를 촉진한다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 BTLA의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0297] CTLA4는 말라리아의 감염에 대한 면역을 제한하는 그 능력으로 최근 입증된 바와 같이 TREG 세포의 중요한 효과기 분자이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CTLA4의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0298] 실시예 19: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 발현이 강화된 세포 생성물로서 TREG-Th2 하이브리드 모집단의 특성규명.
- [0299] 도 25는 제조된 iTREG/Th2 하이브리드 모집단은 대조군 Th1/Tc1 배양 대비 TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 증가된 발현을 가짐을 예시한다. 도 25에서, iTREG/Th2 하이브리드 모집단은 IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유하는 배지에서 T 세포 탈-분화의 초기 단계에 이어 재-분화를 사용하여 이전에 상세히 설명된 방법에 의해 생성되었다. iTREG/Th2 제조의 11일차에, 세포를 수확하고 관련 분자, 즉 TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 발현의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다; Th1/Tc1 분극화를 평가하는 3가지 별도 제어 조건에 대한 비교가 이루어졌다. 도 25는 기술된 조건에 따라 제조된 하이브리드 TREG-Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 다음 세포 표면 분자: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 증가된 발현을 가진다는 것을 나타낸다.
- [0300] 도 25가 예시하는 바와 같이, iTREG/Th2 하이브리드 세포 생성물은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 적어도 10%, 보다 바람직하게는 50% 더 높은 수준을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 갖는다.
- [0301] TIGIT는 조절성 T 세포 기능과 연관되는 세포 표면 공-억제성 수용체 분자이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 TIGIT의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0302] TIM3는 TREG 세포의 억제성 효과를 매개하는 공-억제성 수용체이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 TIM3의 발현은 바람직한 특성이다.

- [0303] ICOS는 중추 신경계에서 면역 반응성의 조절을 위한 조절성 T 세포에 의해 면역 억제를 유지하는 것을 돕는 것으로 최근 결정된 공-자극성 분자이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 ICOS의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0304] LAIR1 (CD305)은 활성화된 효과기 기억 T 세포의 억제를 포함하여, 다중 단계에서 염증화를 차단할 수 있는 다각적인 억제성 분자이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 LAIR1의 발현이 바람직한 특성이다.
- [0305] OX40은 공-자극성 분자이다. 따라서, iTREG/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 OX40의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0306] *실시예 20: TREG/Th2 하이브리드 모집단의 GATA3 및 FOXP3 발현의 특성규명*
- [0307] 정상-상태 혈장교환 샘플을 획득하고 피콜 (Ficoll) 구배에 의해 림프구를 농축한 다음 G-Rex 배양 용기에 도말하고 비타민 D (0.3 nM), 탬시롤리무스 (3.0 μM) 및 바실릭시막 (30 μg/mL)을 함유하는 완전한 배지에서 인큐베이션했다. 초기 탈-분화 간격 후, T 세포를 3:1 비드-대-T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28-코팅된 자기 비드와 함께 공-자극하고 사이토카인을 첨가했다 (IL-4 (1000 IU/ml), IL-2 (10,000 IU/ml) 및 TGF-β (100 ng/mL)). 6-일 배양 후, T 세포를 수확하고 표면 마커 (CD4 및 CD8) 및 세포내 분자 발현 (GATA3 및 FOXP3)에 대해 염색하고 유세포분석법에 의해 평가했다. 도 26a-b에서의 결과는 유세포분석법에 의해 측정된 배양의 시작 및 배양 후 (Th2/TREG)에 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 FOXP3 및 GATA3 발현을 도시한다. 제공된 백분율은 CD4+ 또는 CD8+ 및 세포내 마커 (상자에 표시됨)에 대해 양성으로 간주되는 세포의 양을 나타낸다.
- [0308] 도 26a-b에 나타난 결과는 제조된 Th2/TREG 세포 생성물의 표현형을 나타내는 결과를 도시한다. 유형 II 사이토카인 표현형의 T 세포는 부분적으로 전사 인자 GATA3의 그 발현에 의해 특성규명될 수 있는 반면, 조절성 T 세포 모집단은 FoxP3 전사 인자의 그 발현에 의해 부분적으로 동정될 수 있다. 배양 시작시에, 매우 낮은 빈도의 T 세포가 GATA3 또는 FoxP3를 발현했다. 현저하게 대조적으로, Th2/TREG 배양 조건에서 제조된 T 세포 생성물은 GATA3에 대해 단일-양성, FOXP3에 대해 단일-양성 또는 GATA3 및 FOXP3 둘 모두에 대해 이중-양성인 높은 빈도의 T 세포를 발현했다 (도시되지 않음); 중요하기로는, 도시된 바와 같이, 이 전사 인자 프로파일은 제조된 CD4+ (상단 패널) 및 CD8+ (하단 패널) T 세포 둘 모두에서 발현되었다. IL-4를 포함하지 않은 대조군 제조 배양은 GATA3-양성 T 세포의 빈도를 크게 감소 시켰으며, 이에 의해 Th2/TREG 하이브리드 모집단의 제조에서 IL-4의 중요한 역할을 입증했다 (도시되지 않음).
- [0309] 이 개시내용에 상세히 설명된 TREG/Th2 방법에 따라 제조된 T 세포 생성물의 표현형 특성규명의 대부분은 배양의 말기에서 확인될 수 있다. 그러나, T 세포 생성물은 동결보존될 수 있고, 이와 같이, 해동-후 상태에서 T 세포의 표현형 특성규명은 대상체에게 입양으로 전달될 실제 생성물을 반영한다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 해동-후 상태에서 TREG/Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 다음과 같은 특징을 가질 수 있다: (a) 유세포분석법에 의한 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 증가된 발현; (b) Luminex 사이토카인 분비 분석에 의해 감소된 IFN-g 및 TNF-a와 증가된 IL-4의 분비; 및 (c) T 세포 운명 전사 인자의 변경된 발현, 즉 감소된 TBET 및 증가된 FOXP3 및 GATA3.
- [0310] *실시예 21: TREG/Th2 하이브리드 모집단의 CD73 및 CD103 발현의 특성규명*
- [0311] 정상-상태 혈장교환 샘플을 획득하고 피콜 구배에 의해 림프구를 농축한 다음 G-Rex 배양 용기에 도말하고 비타민 D (0.3 nM), 탬시롤리무스 (3.0 μM) 및 바실릭시막 (30 μg/mL)을 함유하는 완전한 배지에서 인큐베이션했다. 초기 탈-분화 간격 후, T 세포를 3:1 비드-대-T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28-코팅된 자기 비드와 함께 공-자극하고 사이토카인을 첨가했다 (IL-4 (1000 IU/ml), IL-2 (10,000 IU/ml) 및 TGF-β (100 ng/mL)). 6-일 배양 후, T 세포를 수확하고 표면 마커 (CD4 및 CD8) 및 엑토뉴클레오타제 분자인, CD73 또는 인테그린 분자인, CD103에 대해 염색하고 유세포분석법에 의해 평가했다. 도 27a-b에서의 결과는 유세포분석법에 의해 측정된 배양의 시작 및 배양 후 (Th2/TREG)에 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 CD73 및 CD103 발현을 도시한다. 제공된 백분율은 각각 CD4+ 또는 CD8+ 및 엑토뉴클레오타제 분자 또는 인테그린 분자 (상자에 표시됨)에 대해 양성으로 간주되는 세포의 양을 나타낸다.
- [0312] 조절성 T 세포 모집단은 면역 억제성 아데노신 기질을 향해 전-염증성 ATP를 가수분해하는 역할을 하는 CD39 및 CD73 엑토뉴클레오타제 분자의 전반적 발현을 포함하는 여러 정의된 메커니즘에 의해 병원성 효과기 T 세포 모집단을 억제할 수 있다. 실제로, CD39를 발현하는 TREG 세포는 증가된 억제 기능을 보유하고 있으며 염증성 장 질환의 해결과 관련되어 있다. 더욱이, 인간 TREG 세포의 억제성 기능은 CD73에 의해 부분적으로 매개된다. 도 27a에서 아래 도시된 바와 같이, Th2/TREG 배양 조건에서 제조된 T 세포는 TREG-연관 효과기 분자인, CD73의 발

현을 증가시킬 수 있으며; CD39는 또한 TREG/Th2-제조된 T 세포에서 고도로 발현되었다 (도시되지 않음). CD39/CD73 엑토뉴클레오티다제에 부가하여, TREG 세포 기능은, 상피 림프구 국소화를 지시하는 인테그린인, CD103의 발현과도 관련되어 있다. 실제로, CD103과 IL-2 수용체 시그널링은 장 점막에서 면역 내성을 유지하기 위해 협력한다; 더욱이, CD103-발현 TREG 세포는 실험적 만성 GVHD의 개선에 중요하다. 도 27b에서 아래 도시된 바와 같이, Th2/TREG 배양 조건에서 제조된 T 세포는 TREG-연관 효과기 분자인, CD103의 발현을 증가시킬 수 있다.

[0313] 실시예 22: TREG/Th2 하이브리드 모집단의 CD150 및 CD27/CD95 발현의 특성규명

[0314] 정상-상태 혈장교환 샘플을 피콜 구배에 의해 림프구를 농축하고, G-Rex 배양 용기에 도말하고, 비타민 D (0.3 nM), 템시롤리무스 (3.0 μM) 및 바실릭시맙 (30 μg/mL)을 함유하는 완전한 배지에서 인큐베이션했다. 이 초기 탈-분화 간격 후, T 세포를 3:1 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28-코팅된 자기 비드와 함께 공-자극하고 사이토카인을 첨가했다 (IL-4 (1000 IU/ml), IL-2 (10,000 IU/ml) 및 TGF-β (100 ng/mL)). 6-일 키처 후, T 세포를 수확하고 표면 마커에 대해 염색하고 CD4, CD8, CD150, CD27, CD95, CD45RA, CD62L 및 CCR7에 대한 다중-색상 유세포분석법을 수행했다. 결과는 도 28a-b에 도시되어 있다.

[0315] TREG (RAPA-501) 조건에서 배양된 T 세포를 배양 투입 T 세포 ("0일차")와 비교하고 또한 mTOR 억제제 없이 증식된 대조군 배양 T 세포 ("대조군")와 비교했다. 도 28a에 도시된 바와 같이, RAPA-501 세포 생성물 내에 함유된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 서브세트 둘 모두는 배양 투입 T 세포에 비해, 그리고 대조군 배양된 T 세포 대비 줄기 세포 마커 CD150의 크게 증가된 발현을 가졌다. 도 28b에 도시된 바와 같이, RAPA-501 세포 생성물은 또한 배양 투입 세포 대비 T 줄기 세포 기억 (TSCM) 표현형을 농축했다; 이 조건에서 생성된 T 세포는 효과기 기억인, CD45RO+였기 때문에 대조군 배양에는 이 집단이 없었다 (도시되지 않음). 왼쪽 패널 (배양 투입 T 세포) 및 오른쪽 패널 (RAPA-501 세포)은 TSCM 마커 CD45RA, CD62L 및 CCR7에 게이팅 후 TSCM 마커 CD95 및 CD27의 발현을 도시한다; 이들 TSCM 마커의 발현에 있어서 유사한 차이가 CD8+ T 세포에 대해 관찰되었다 (도시되지 않음).

[0316] 실험 모델에서, 입양 T 세포 요법의 효능은 T 세포 모집단의 성공적인 생착과 생체내 지속성에 의존한다. 중요하기로는, T 세포 분화 상태가 생체내 지속성을 지시하는 데 도움이 되며, 덜 분화된 세포는 지속성이 증가한다. 본 발명자들의 초기 연구에서, T 중앙 기억 (TCM) 표현형을 발현하는 뮤어라인 라파마이신-내성 T 세포는 대조군 T 세포 대비 증가된 생체내 생착 잠재력을 가졌다; 부가하여, 인간 라파마이신-내성 T 세포는 이종 이식편대숙주 질환의 뮤어라인-안으로 인간 모델에서 증가된 생착을 가졌다. 다른 연구자들은 T 효과기 기억 (TEM) 모집단 대비 분화가 감소된 T 세포가 생체내 지속성을 증가시키고 TCM 서브세트, 나이브 T 세포 서브세트 및 더 최근에는 T 줄기 세포 기억 (TSCM) 서브세트를 포함한, 증가된 생체내 효과를 매개한다고 결정했다. (1) TCM 표현형의 TREG 세포는 TEM 표현형의 TREG 세포 대비 실험적 GVHD를 감소시키는 데 더 효과적이었고; (2) 줄기 세포 마커 CD150을 발현하는 TREG 세포는 줄기 세포 이식 거부 반응의 예방에 매우 효과적이었기 때문에, T 세포 분화 상태와 생체내 T 세포 기능 사이의 이 관계는 TREG 세포 대비 작동성이다. 도 28a에서 아래 도시된 바와 같이, Th2/TREG 배양 조건에서 제조된 T 세포는 세포에 CD150 마커의 발현을 포함한, T 줄기 세포 서브세트와 일치하는 감소된 분화 상태를 농축했다.

[0317] 실시예 23: TREG/Th2 하이브리드 모집단의 사이토카인 분비의 특성규명

[0318] 정상-상태 혈장교환 샘플을 피콜 구배에 의해 림프구를 농축하고, G-Rex 배양 용기에 도말하고, 비타민 D (0.3 nM), 템시롤리무스 (3.0 μM) 및 바실릭시맙 (30 μg/mL)을 함유하는 완전한 배지에서 인큐베이션했다. 초기 탈-분화 간격 후, T 세포를 3:1 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28-코팅된 자기 비드와 함께 공-자극하고 사이토카인을 첨가했다 (IL-4 (1000 IU/ml), IL-2 (10,000 IU/ml) 및 TGF-β (100 ng/mL)). 이 배양을 조건 "A"라고 한다. 조건 "B"는 동일한 배양 조건이지만 IL-4 첨가가 없다. 조건 "C"는 라파마이신 (1 μM), IL-2 (100 IU/ml) 및 TGF-β (10 ng/mL)의 표준 TREG 배양 조건을 반영한다. 조건 "D"는 mTOR 억제제 없이 IFN-α의 존재에서 제조된 Th1-유형 대조군 배양을 반영한다. 배양 후, T 세포를 수확하고, 항-CD3/항-CD28 비드로 자극하고, 생성된 상청액을 Luminex 검정에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트하였다.

[0319] 제조된 Th2/TREG 세포의 사이토카인 분비를 평가하는 것이 중요할 수 있다. 첫째, 세포 생성물이 후속 Th2 분화를 위한 드라이버 사이토카인인 IL-4를 분비할 수 있는 것이 중요하다. 둘째, 적응으로 진이된 T 세포 모집단은 IL-2를 분비할 수 있는 것이 바람직한데 이는 이 능력이 T 세포가 외인성 IL-2를 필요로 하지 않고 생체내에서 보다 쉽게 팽창하도록 허용하는 전구체 기능을 나타내기 때문이다. 마지막으로, Th2/TREG 세포 모집단이 Th1- 또는 Th17-유형 사이토카인 IFN-α, TNF-α, IL-17 및 GM-CSF의 감소된 분비를 갖는 것이 중요하다. 도 29가 예시하는 바와 같이, 제조된 Th2/TREG 세포 생성물은 Th1- 또는 Th17-유형 사이토카인의 최소 분비로 IL-4 및 IL-

2를 분비하였다.

[0320] 실시예 24: TREG/Th2 하이브리드 모집단에 의한 Th1/Tc1 억제의 특성규명

[0321] 정상-상태 혈장교환 샘플을 피콜 구배에 의해 림프구를 농축하고, G-Rex 배양 용기에 도말하고, 비타민 D (0.3 nM), 템시롤리무스 (3.0 μM) 및 바실락시맙 (30 μg/mL)을 함유하는 완전한 배지에서 인큐베이션했다. 초기 탈-분화 간격 후, T 세포를 3:1 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28-코팅된 자기 비드와 함께 공-자극하고 사이토카인을 Th2/TREG 세포의 생체의 제조를 위해 첨가했다 (IL-4 (1000 IU/ml), IL-2 (10,000 IU/ml) 및 TGF-β (100 ng/mL)). 동시에, T 세포를 유형 I 분극화 사이토카인 IFN-α의 존재에서 배양하여 효과기 Th1/Tc1 세포를 생성하였다; Th1/Tc1 배양은 RAPA-501 세포 배양과 동일한 기준자 (자가조직; "AUTO") 또는 관련없는 기준자 (동종이계; "ALLO")로부터 생성되었다. 생체의 배양 후, Th1/Tc1 효과기 T 세포를 트랜스웰 플레이트의 바닥 챔버에 도말하고 3:1의 비드-대-T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드로 공-자극하였다. Th1/Tc1 세포 공-자극의 24시간 후, RAPA-501 세포를 1:1의 Th1/Tc1-대-RAPA 501 비율에서 트랜스웰 플레이트의 상부 챔버에 첨가하였다. (A) 사이토카인 함량의 RAPA-501 조절. 24시간 (상부 챔버에 RAPA-501 세포의 첨가 이전) 및 48시간의 배양 (RAPA-501 세포를 첨가하거나 첨가하지 않음)에서, 배양 상청액을 수확하고 Luminex 검정에 의해 사이토카인 함량에 대해 테스트했다. 결과는 IL-2, IFN-γ, GM-CSF 및 TNF-α 함량에 대해 pg/ml/24시간/1 x 10⁶ 세포/ml로 표현된다. (B) PD1의 Th1/Tc1 세포 발현의 RAPA-501 세포 조절은 항원-독립적 방식으로 발생한다. 48 시간에서, 24-시간 시점에 RAPA-501 세포를 첨가하거나 첨가하지 않은 후에 자가이식 또는 동종이계 Th1/Tc1 세포를 수확하였다; Th1/Tc1 세포는 그 다음 PD1 발현의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다.

[0322] RAPA-501 세포 생성물의 발달 동안, 본 발명자들은 관찰된 T 세포 억제의 분자 메커니즘을 특성규명하기 위한 실험을 수행했다. 잠재적 메커니즘을 평가하는 한 가지 방법은 트랜스웰 검정으로, 이에 의해 효과기 T 세포와 RAPA-501 세포는 세포-대-세포 접촉을 방지하지만 사이토카인과 같은 작은 용해성 매개체에 의한 세포 통신을 허용하는 필터에 의해 분리된다. 도 30a-b는 RAPA-501 세포가 접촉-독립적 방식 (트랜스웰 용기에서 수행된 실험)으로 효과기 T 세포를 조절함을 예시한다. RAPA-501 세포는 T 세포 수용체 독립적인 방식으로 작용하여 효과기 T 세포의 사이토카인 분비 능력을 억제하였다; 즉, RAPA-501 세포를 함유하는 트랜스웰 챔버에 공-자극 비드가 추가되지 않았기 때문에, RAPA-501 세포는 IL-2, IFN-γ, GM-CSF 및 TNF-α를 포함한, 염증성 사이토카인 수준을 조절하기 위해 공-자극이 필요하지 않았다 (도 30a). TREG 세포가 IL-2를 소비하는 능력은 일반적으로 설명되는 현상이지만, 이전 연구에서 IL-2 소비를 위한 세포-대-세포 접촉의 요구사항을 동정하였다. 이와 같이, RAPA-501 세포는 접촉-독립적 방식으로 다중 염증성 사이토카인의 수준을 다소 독특하게 조절할 수 있는 것으로 보인다. 이들 결과는 RAPA-501 세포가 사이토카인의 중화에 적합한 후보를 나타낸다는 것을 시사한다. 둘째, 본 발명자들은 RAPA-501 세포가 접촉-독립적 방식 (트랜스웰 실험의 사용), 즉 효과기 T 세포 상에 프로그램된 사멸-1 (PD-1) 체크포인트 분자 발현의 촉진으로 효과기 T 세포 생물학의 추가 양태를 조절했음을 발견했다. 중요하게도, 도 30b에 도시된 바와 같이, RAPA-501 세포는 자가이식 및 동종이계 Th1/Tc1 세포 둘 모두 상에 PD1 발현을 상향-조절하여, 이에 의해 RAPA-501 세포 억제성 기능의 하나의 메커니즘이 가용성 매개체에 의해 TCR-독립적 방식으로 발생한다는 것을 추가로 분명하게 하였다.

[0323] 실시예 25: TREG/Th2 하이브리드 모집단에 의한 CNS 소교 세포 사이토카인 분비 억제의 특성규명

[0324] 인간 소교 세포 (HMC3 세포주)는 먼저 IFN-γ (10 ng/mL; 24시간)로 활성화된 다음 LPS (10 ng/mL; 3시간)로 활성화되었다; 처리된 HMC3 세포는 이전에 기술된 바와 같이 만들어진, RAPA-501 세포를 상부 챔버 안으로 (RAPA-501 대 HMC3 비율, 1:40) 첨가하지 않고 (왼쪽 패널) 또는 첨가하여 (오른쪽 패널) 트랜스웰의 하부 챔버 안으로 도말했다. RAPA-501 세포는 하이브리드 Th2/TREG 표현형의 T 세포를 생성하기 위해 특히 출원에 기술된 방법을 사용하여 생성되었다. 24시간 후, 무 세포 상청액을 수확하고 Luminex 검정에 의해 IL-6, IFN-γ 및 IP-10의 함량에 대해 평가했다 (ml/24시간당 pg/ml/1 x 10⁶ 세포로 측정된 사이토카인 분비). 결과는 도 31에 도시되어 있다.

[0325] 소교 세포는 ALS에서 전-염증성 인자로 발전할 수 있는 CNS-상주 항원-제시-세포이다. 인간 소교 세포 염증을 억제하는 제조된 인간 Th2/TREG 세포의 능력은 본 발명자의 지식으로는 이전에 보고되지 않았다. 이를 해결하기 위해, 본 발명자들은 IFN-γ에 이어 LPS 내독소에서 순차적 배양에 의해 인간 소교 세포주 HMC3를 전-염증성 상태로 유도했다. 도 31a-31b가 입증하는 바와 같이, 전-염증성 소교 세포에 RAPA-501 Th2/TREG 세포 생성물의 첨가는 전-염증성 사이토카인 IL-6, IP-10 및 IFN-γ의 배양 상청액 함량을 감소시켰다. 이 실험에서, 관찰된 면역 억제성 효과는 트랜스웰 용기에서 그리고 1-대-40의 매우 희석된 TREG 대 염증성 소교 세포 비율에서 발생하여, 이에 의해 RAPA-501 세포가 접촉 독립적 방식에서 (트랜스웰 디자인에 의해 표시된 바와 같음) 그리고 높은

정도의 효능으로 (1:40 TREG-대-소교 세포 비율에 의해 표시된 바와 같음) CNS 염증화를 감소시킬 수 있음을 나타냈다.

[0326] 실시예 26: 펜토스타틴, 사이클로포스파미드 및 라미부딘 숙주 컨디셔닝 플랫폼을 사용한 ALS의 iT_{REG} 세포 요법.

[0327] 도 32는 PC 요양법 및 전체 치료적 접근법을 자세히 설명한다. PC 요양법은 표시된 바와 같이 주기 1 내지 4에 걸쳐 펜토스타틴 또는 사이클로포스파미드의 용량을 증가시키면서 2-주 주기로 투여될 것이다 (PC 요양법의 총 기간 8주). 펜토스타틴은 14-일 주기의 1일차 또는 1 및 4일차에 투여된다; 사이클로포스파미드 (Cy)는 14-일 주기의 1, 2, 3일차 또는 1, 2, 3, 4 및 5일차에 투여된다. 주기 4의 경우, ALC가 마이크로리터당 < 1250 세포인 경우, Cy 용량은 1일당 200 mg으로 증가될 것이다. PC 요양법의 투여를 통해 면역 고갈과 면역 억제제가 실현된 후, 제1 iT_{REG} 세포 주입은 요법의 8주차에 발생할 것이다. 염증소체 억제제 라미부딘은 프로토콜 8주차부터 26주차까지 150 mg BID의 용량으로 지속적으로 투여될 것이다.

[0328] 도 33은 PC 요양법 전후 혈장교환에 의한 림프구 수집을 묘사하는, iT_{REG} 세포 제조에 관한 추가 세부사항을 제공한다. ALS 환자로부터 림프구는 PC 요양법 직전 또는 직후에 수행될 정상-상태 혈장교환에 의해 수집된다 (10- 내지 15-리터 수집). PC 요양법 이전의 수집은 T 세포가 더 많은 수에서 발견되고 면역 억제되지 않을 것이기 때문에 iT_{REG} 제조에 더 유리할 수 있다; 이에 비해, PC 요양법 후 수집은 iT_{REG} 배양을 오염시킬 염증성 Th1/Tc1 세포가 제조 이전에 생체내에서 고갈될 것이기 때문에 유리할 수 있다. iT_{REG} 제조 후, 생성물은 주입 #2, #3 및 #4에 의해 표시된 바와 같이, iT_{REG} 세포의 반복적인 투여를 허용하기 위해 치료적 용량으로 냉동보존될 것이다.

[0329] 도 34는 iT_{REG} 세포의 각각의 반복적 용량 이전에 PC 요양법의 시퀀싱을 묘사하는, 다중 iT_{REG} 세포 주입의 전략을 추가로 상세히 설명한다. PC 요양법은 각 iT_{REG} 주입 이전에 (1) 질환 발병에 기여하는 염증성 Th1/Tc1 세포를 고갈시키고 억제하고; (2) IL-7 및 IL-15와 같은 항상성 사이토카인의 생체내 수준을 증가시켜, 적응성으로 전달된 iT_{REG} 모집단의 생체내 팽창을 허용하기 위해 투여될 것이다. PC 요양법은 1일차 내지 5일차에 1일당 100 mg의 균일 용량의 사이클로포스파미드와 조합된 1 및 4일차에 2 mg/m²의 용량에서 펜토스타틴으로 구성될 것이다. 2일의 휴식 후, iT_{REG} 세포가 투여될 것이다 (요양법의 8일차). 염증소체 억제제 라미부딘은 iT_{REG} 세포 요법 동안 염증 유발을 제한하기 위해 8주차부터 향후 지속적으로 투여될 것이다.

[0330] 도 35는 ALS의 모니터링은 지시된 바와 같이 환자-보고된 ALSFRS-R 및 임상-보고된 Appel 점수 둘 모두에 의해 이루어질 것임을 예시하는, iT_{REG} 세포로 치료된 환자의 모니터링에 관한 추가 세부사항을 제공한다. ALS 환자 염증성 상태를 모니터링하기 위한 면역 실험실은 표시된 바와 같이 대략 매월 평가될 것이다.

[0331] 실시예 27: 입력 T 세포 TCR 레퍼토리를 유일하게 변경하기 위해 혈장교환에 의한 림프구 수집 이전에 선별 항-TNF- α 시약의 사용

[0332] 도 36a-36b는 TNFR1-발현 Th1-유형 세포를 촉진하는 TNF- α 의 무-세포 형태인, 혈청을 우선적으로 억제하는 에타너셉트로 항-TNF- α 요법이 T 세포 수용체 상향- 및 하향-조절에서 광범위한 변화와 관련이 있음을 나타낸다. 도 36a-36b는 TNF- α 억제제인, 에타너셉트로의 요법 후 T 세포 TCR 특이성의 광범위한 상향- 및 하향-조절을 검출하기 위한 RNA-기반 T 세포 수용체 서열화의 사용을 도시한다. 도 36a-36b에서, RNA는 에타너셉트 요법으로 요법-전후의 ALS 환자로부터 말초 혈액 단핵 세포로부터 단리되었다. RNA는 이전에 Rosati E, Dowds CM, Liaskou E, Henriksen EKK, Karlsen TH, Franke A. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis. BMC Biotechnol. 2017;17(1):61에 의해 기술된 바와 같이 TCR 레퍼토리 프로파일링을 거쳤다. 도 36a에서 도시된 바와 같이, TCR 특이성의 대략 25%가 요법-후 샘플에서 상향-조절되었음을 입증하였다 (빨간색으로 표시됨); 현저하게 대조적으로, TCR 특이성의 대략 25%는 요법-후 샘플에서 하향-조절되었다 (파란색으로 표시됨). 도 36b에 도시된 바와 같이, 여러 T 세포 클론이 0.01 프리-에타너셉트 (검정의 검출 한계 근처)의 빈도로부터 247에서 486의 범위인 치료-후 값으로 증가함에 따라, 에타너셉트 요법은 현저한 T 세포 클론 팽창을 초래했으며, 이에 의해 4-로그 초과 T 세포 팽창과 일치한다. 도 36b에 나타난 바와 같이, 여러 T 세포 클론이 259 내지 598 프리-에타너셉트의 빈도로부터 0.01의 치료-후 값으로 감소함에 따라 에타너셉트 요법은 현저한 T 세포 클론 수축을 초래했으며, 이에 의해 4-로그 초과 T 세포 수축과 일치한다 이들 관찰은 TNF- α 의 무-세포 형태 (예컨대, 단일클론 항체, 아달리무맙)인, 혈청을 우선적으로 억제하는 에타너셉트 또는 다른

항-TNF- α 치료제로 대상체의 사전-치료가 T 세포 수용체 레퍼토리를 항원-특이성 기준으로 Th1 유형-표현형의 T 세포로부터 떨어지도록 전이하어, 이에 의해 항원-특이적 기준으로 T_{REG} 표현형의 T 세포를 풍부하게 하는데 이용할 수 있음을 나타낸다.

- [0333] 실시예 28: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 발현이 강화된 세포 생성물로서 T_{REG}-Th2 하이브리드 모집단의 특성규명.
- [0334] 도 37은 기술된 조건에 따라 제조된 하이브리드 T_{REG}-Th2 세포가 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 다음 세포 표면 분자의 발현을 증가했음을 나타낸다: CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4. 도 37에서, iT_{REG}/Th2 하이브리드 모집단은 IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유하는 하이브리드 T_{REG}/Th2 배지에서 T 세포 탈-분화에 이은 재-분화의 초기 단계를 사용하여 이전에 상세히 설명된 방법에 의해 생성되었다; 세포를 수확하고 관련 분자, 즉 CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 발현을 평가하기 위해 유세포분석법을 거쳤다; Th1/Tc1 분극화를 평가하는 3가지 별도 제어 조건에 대한 비교가 이루어졌다.
- [0335] 도 37이 예시하는 바와 같이, iT_{REG}/Th2 하이브리드 세포 생성물은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 CD25, CD27, 2B4, BTLA 및 CTLA4의 적어도 10%, 보다 바람직하게는 50% 더 높은 수준을 발현하는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 갖는다.
- [0336] IL-2 수용체인 CD25는 T_{REG} 세포가 자가면역, 특히 CD8⁺ T 세포 구동 반응을 제어하는 능력에 중요하다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CD25의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0337] T_{REG} 세포 상에 증가된 발현을 갖는 공-자극성 분자인 CD27은 T_{REG}의 억제성 기능에 기여하는 것으로 나타났다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CD27의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0338] 2B4 (CD244)는 최근에 해당작용 및 세포 분열의 약화에 의해 CD8⁺ T 세포 반응을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 2B4의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0339] BTLA (CD272)는 공-억제성 수용체이고, BTLA와 헤르페스바이러스-진입 매개체 HVEM과의 결합은 T_{REG} 세포 유도 및 효과기 면역 반응의 억제를 촉진한다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 BTLA의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0340] CTLA4는 말라리아의 감염에 대한 면역을 제한하는 그 능력으로 최근 입증된 바와 같이 T_{REG} 세포의 중요한 효과기 분자이다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 CTLA4의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0341] 실시예 29: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 발현이 강화된 세포 생성물로서 T_{REG}-Th2 하이브리드 모집단의 특성규명.
- [0342] 도 38은 기술된 조건에 따라 제조된 하이브리드 T_{REG}-Th2 세포가 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 다음 세포 표면 분자의 발현을 증가했음을 나타낸다: TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40. 도 38에서, iT_{REG}/Th2 하이브리드 모집단은 IL-2, TGF- β 및 IL-4를 함유하는 배지에서 T 세포 탈-분화에 이은 재-분화의 초기 단계를 사용하여 이전에 상세히 설명된 방법에 의해 생성되었다. iT_{REG}/Th2 제조의 11일차에, 세포를 수확하고 관련 분자, 즉 TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 발현의 평가를 위해 유세포분석법을 거쳤다; Th1/Tc1 분극화를 평가하는 3가지 별도 제어 조건에 대한 비교가 이루어졌다.
- [0343] 도 38이 예시하는 바와 같이, iT_{REG}/Th2 하이브리드 세포 생성물은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 적어도 10%, 보다 바람직하게는 50% 더 높은 수준을 발현하는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 갖는다.
- [0344] TIGIT는 예를 들어 B 세포 비-호지킨 림프종에서 면역억제성 환경에 대한 기여를 포함하는 조절성 T 세포 기능과 연관되는 세포 표면 공-억제성 수용체 분자이다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 TIGIT의 발현은 바람직한 특성이다.

- [0345] TIM3는 예를 들어 두경부 편평 세포 암종에 침투하는 T 세포의 억제를 포함하여 T_{REG} 세포의 억제성 효과를 매개하는 공-억제성 수용체이다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 TIM3의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0346] ICOS는 중추 신경계에서 면역 반응성의 조절을 위한 조절성 T 세포에 의해 면역 억제를 유지하는 것을 돕는 것으로 최근 결정된 공-자극성 분자이다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 ICOS의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0347] LAIR1 (CD305)은 활성화된 효과기 기억 T 세포의 억제를 포함하여 다중 단계에서 염증화를 차단할 수 있는 다각적인 억제성 분자이다. 따라서 iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 LAIR1의 발현이 바람직한 특성이다.
- [0348] OX40은 공-자극성 분자이다. 따라서, iT_{REG}/Th2로 제조된 세포 생성물에 대한 OX40의 발현은 바람직한 특성이다.
- [0349] 이 개시내용에 상세히 기술된 T_{REG}/Th2 방법에 따라 제조된 T 세포 생성물의 표현형 특성규명의 대부분은 배양의 말기에 확인될 수 있다. 그러나, T 세포 생성물은 동결보존될 수 있고, 이와 같이 해동-후 상태에서 T 세포의 표현형 특성규명은 대상체에게 입양으로 전달될 실제 생성물을 반영한다는 것을 유의하는 것이 중요하다. 해동-후 상태에서 T_{REG}/Th2 세포는 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 다음과 같이 특징될 수 있다: (a) 유세포분석법에 의한 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1 및 OX40의 증가된 발현; (b) Luminex 사이토카인 분비 분석에 의해 감소된 IFN-g 및 TNF-a와 증가된 IL-4의 분비; 및 (c) T 세포 운명 전사 인자의 변경된 발현, 즉 감소된 TBET 및 증가된 FOXP3 및 GATA3.
- [0350] *iT_{REG} 생성을 위한 혈장교환.*
- [0351] 펜토스타틴/사이클로포스파미드 요양법으로의 요법 이전에, 대상체는 림프구 혈장교환 절차를 받을 것이다. 이 말초 림프구 수집의 목적은 입양 T 세포 요법을 위한 iT_{REG} 세포를 제조하기 위한 것일 것이다.
- [0352] 혈장교환은 CS-3000 또는 이와 동등한 기계에서 10- 내지 15-리터 수집으로 구성된다. 혈장교환 생성물은 프로토콜 후원자인, Rapa Therapeutics로 보내지며 iT_{REG} 세포는 특수 배양 조건을 사용하여 생체의 배양에 의해 제조될 것이다.
- [0353] 연구 목표
- [0354] 일차 목표. ALS 환자의 염증성 서브세트에서 PC 요양법 및 유지 라미부딘 요법의 맥락에서 iT_{REG} 세포 주입의 안전성을 결정한다.
- [0355] 이차 목표. ALS 환자에서 염증성 마커를 억제하는 iT_{REG} 요법의 능력을 결정한다. 예비 방식으로, 환자-보고된 및 임상-보고된 ALS 점수에 대한 iT_{REG} 요법의 영향을 결정한다.
- [0356] 자격 기준.
- [0357] 세계 신경과 연맹 (World Federation of Neurology) El Escorial Criteria에 따라 실험실-지원된 의심, 가능성 또는 확정으로 진단된 산발성 또는 가족성 ALS가 있는 대상체. 연령 ≥ 18세 및 75세 이하. 70% 이상의 카르노프스키 (Karnofsky) 수행성 상태. 기관 정상 한계 내에서 MUGA 또는 2-D 초음파심전도에 의한 박출 계수. 2.0 mg/dl 이하의 혈청 크레아티닌. 정상 상한 3배 이하의 AST 및 ALT. 1.5 이하의 빌리루빈 (길버트 병으로 인한 경우 제외). 폐 기능 검사에서 50% 이상의 보정된 DLCO.
- [0358] 2차 연구 종료점을 평가하기 위해, 환자는 스크리닝 간격 동안 적어도 2개의 별도 혈액 샘플의 평가 후 말초 혈액 세포 모집단에서 염증성 마커의 증거가 있어야 한다. 잠재적인 환자의 염증성 상태를 평가하기 위해 사용된 검정에는 다음이 포함될 것이다: 유세포분석법; 사이토카인 분비 분석; 및 웨스턴 블랏 분석에 의한 세포 시그널링 이벤트. 다른 검사는 T 세포 수용체 레퍼토리 또는 운동 뉴런 단백질 또는 ALS-관련 단백질 응집체와 같은 잠재적 자가-항원에 대한 시험관내 감각의 검사를 포함할 수 있다. 사이토카인 분비는 항-CD3/항-CD28 공-자극; LPS 내독소 노출; CD40 리간드 노출; 아데노신 A2_A 및 A3 수용체 작용 및 길항; T 세포 (PD1, TIM-3) 및 단핵구 (CD47, CD200) 체크포인트 억제; 및 RNA 시퀀싱에 의한 T 세포 수용체 클론성의 평가를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 양식으로부터의 자극 없이 (자율적 사이토카인 분비) 및 자극으로 평가될 것이다. 잠재적인 대상체가 연구에 포함되어야 하는 충분한 염증이 있는 것으로 간주되는지 여부에 대한 결정은 이들 모든 테스트의

매트릭스 분석을 기반으로 할 것이며, 면역 검정이 수행되는 Rapa Therapeutics Lab의 의료 책임자와 협의하여 연구 PI 또는 수석 부연구원에 의해 결정이 된다.

- [0359] 제외 기준은 릴루졸 (Rilutek®) 또는 에다라본 (Radicava®) 요법을 적극적으로 복용한 환자를 포함한다 (1개월 초과 동안 안정된 용량으로 되는 경우 제외). 다음은 또한 제외 기준을 나타낼 것이다: 프로토콜의 30일 이내에 임의의 조사 개입의 수령; 폐 활력 측정 < 60% 예측; 통제되지 않은 활성 감염; 3가지 이하의 약물로 적절하게 조절되지 않는 고혈압; 등록 6개월 이내에 뇌-혈관 사고의 이력; 등록 6개월 이내에 문서화된 폐색전의 이력; 또는 임상적으로 유의한 심장 병리 (등록 이전 6개월 이내에 심근 경색으로 정의됨; NYHY에 따른 부류 III 또는 IV 심부전; 통제되지 않은 협심증, 통제되지 않은 심각한 심실 부정맥; 또는 급성 허혈 또는 활성 흥분전도계 이상의 심전도 증거). 관상 동맥 우회술 또는 혈관성형술의 이력이 있는 환자는 심장학 평가를 받고 사례별로 고려될 것이다. HIV, B형 간염 또는 C형 간염에 대한 혈청양성인 환자는 제외될 것이다. 피임 시술을 원하지 않는 가임기의 환자와 마찬가지로 임신한 것으로 알려지거나 발견된 환자는 제외될 것이다. 환자는 PI의 재량에 따라 또는 참여를 허용하는 것이 허용되지 않는 의학적 또는 정신적 위험을 나타내는 것으로 간주되는 경우 제외될 수 있다.
- [0360] PC 요법으로 ALS 환자 치료.
- [0361] 8-주 PC 요양법의 목적은 부분 고갈을 야기하고 ALS 질환 발병에 기여하는 Th1/Tc1 세포를 억제하는 것이다. 부가하여, PC 요양법이 바로 iT_{REG} 세포 주입이 뒤 따르는 8주차 및 이후 시점에서, PC 요양법은 또한 T 세포 항상성 사이토카인, 특히 IL-7 및 IL-15에서 실제로 증가를 유발하는 것으로 의도된다.
- [0362] PC 요양법은 14-일 주기로 투여될 것이다; 그러나, 물류 장애가 발생하거나 임의의 부작용을 평가 및/또는 치료하는 데 추가 시간이 필요한 경우 주기 사이에 최대 2-주까지 추가 지연이 허용될 수 있다. 주기 #1의 경우, 펜토스타틴 (1일차에 1 mg/m² i.v.)이 사이클로포스파미드 (1, 2 및 3일차에 매일 100 mg p.o.)와 함께 투여될 것이다. 용량 제한 독성이 발생하지 않는 한 투여되는 주기 #2는 동일한 용량의 사이클로포스파미드 (1, 2 및 3일차에 매일 100 mg p.o.)와 조합하여 증가된 용량의 펜토스타틴 (1일차에 2 mg/m² i.v.)으로 구성될 것이다. 용량 제한 독성이 발생하지 않고 그리고 절대 림프구 수가 마이크로리터당 750 초과의 세포인 한 투여되는 주기 #3 및 #4는 5일간의 사이클로포스파미드 (1, 2, 3, 4 및 5일차에 매일 100 mg p.o.)와 조합하여 2회 용량의 펜토스타틴 (1일차 및 4일차에 2 mg/m² i.v.)으로 구성될 것이다.
- [0363] 주기 #3 또는 주기 #4 이전에 ALC 수가 마이크로리터당 750개 이하이면, 더 이상의 주기가 투여되지 않고 환자는 라미부딘으로 유지 요법을 진행할 것이다. 주기 #4 이전에 절대 림프구 수가 마이크로리터당 1250 초과 세포인 경우, 사이클로포스파미드의 용량은 두 배가 될 것이다 (1, 2, 3, 4 및 5일차에 매일 200 mg p.o.).
- [0364] 펜토스타틴 투여와 관련된 세부사항: (a) 준비: 펜토스타틴은 약병 지침에 따라 2 mg/ml의 농도로 약국 부서에서 재구성할 것이다. 적절한 환자 특정 용량을 0.9% 염화나트륨에 첨가하여 총 부피 50mL를 구성할 것이다; (b) 용량 및 투여: 펜토스타틴 용량은 신장 기능장애에 대해 조정될 것이다 (아래 참조); 펜토스타틴의 각 용량은 30-60분에 걸쳐 정맥내로 투여될 것이다; (c) 사전투약 및 구토-방지 요법: 주입 이전에 30-60분에 걸쳐 0.9% 염화나트륨 1 리터를 주입한다. 펜토스타틴은 구토를 유발할 수 있다. 구토-방지 요양법 지침은 다음과 같다 (PI의 재량에 따라 변동이 허용됨): (1) 각 펜토스타틴의 용량 60분 이전에 IV 주입으로 텍사메타손 12mg; (2) 부가하여, 구토 제어를 위해 필요한 경우, 각 주기의 처음 5일에서 경구 텍사메타손이 투여될 수 있다; (3) 각 펜토스타틴의 용량 60분 이전에 IV 주입에 의해 8mg의 용량으로 온단세트론이 투여될 수 있다; (4) 남은 치료 기간 동안, 온단세트론은 1 내지 14일차에서 주기 동안 필요한 기간 동안 12시간마다 8mg (정제)의 경구 용량으로 투여될 수 있다; 그리고 (5) 조절되지 않는 메스꺼움 및 구토가 있는 환자에서의 구토-방지 요양법에 필요에 따라 아프레피탄트 (Aprepitant)가 추가될 수 있다.
- [0365] 펜토스타틴 용량 감소와 관련된 세부사항: 혈청 크레아티닌 수준은 계산된 펜토스타틴 및 CrCl의 각각의 예정된 용량 이전에 얻어질 것이다. CrCl은 24시간 소변으로 얻거나 Cockcroft-Gault 공식에 의해 계산될 것이다. 대상체가 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드 요법 동안 크레아티닌 수준에서 증가를 경험하는 경우, 후속 투여는 다음과 같이 수정될 것이다: CrCl ≥ 60 (mL/분/1.73m²)인 경우: 100%의 의도된 펜토스타틴 용량 투여 (주기 #1, #2에 대해 1 mg/m²의 펜토스타틴; 주기 #3, #4에 대해 2 mg/m²); CrCl < 60이지만 ≥ 30인 경우: 50%의 의도된 펜토스타틴 용량 투여 (주기 #1, #2에 대해 0.5 mg/m²의 펜토스타틴; 주기 #3, #4에 대해 1 mg/m²); CrCl < 30인 경우: 펜토스타틴 유지.
- [0366] 펜토스타틴은 신경학적 독성 (발작, 혼수)과 거의 관련이 없기 때문에, CNS 독성 평가에 특별한 주의를 기울여

야 한다. PC 요양법이 등급 2 이상 중증의 새로운 신경 독성 또는 기존 신경 독성의 악화와 관련이 있는 경우, 기관 PI에 연락하여 추가 펜토스타틴 요법 및 추가 프로토콜 요법이 보장되는지 여부를 논의해야 한다.

[0367] 사이클로포스파미드 투여의 특정한 양태: 수화. 사이클로포스파미드는 방광염을 유발할 수 있기 때문에, 환자가 충분한 수분을 유지하는 것이 중요하다. 최소한, 환자는 소변에 깨끗한 색을 유지하기 위해 하루에 적어도 2 내지 4리터의 액체를 마셔야 한다. 수면 전에 방광을 비우는 것도 특히 중요하다. 경구 사이클로포스파미드는 1, 2 및 3일차 (주기 #1 및 #2) 또는 1, 2, 3, 4 및 5일차 (주기 #3 및 #4)에 1일당 100 mg의 고정된 용량으로 주어질 것이다. 그러나, 주기 #4 이전에 ALC에서 실질적으로 감소를 갖지 않는 환자의 경우 (마이크로리터당 1250 개 세포보다 큰 ALC로 정의된 바와 같음), 주기 #4에 대한 사이클로포스파미드 용량은 1, 2, 3, 4 및 5일차 동안 1일당 200 mg으로 증가될 것이다. 환자가 경구 요법을 견딜 수 없는 경우 사이클로포스파미드의 IV 주입이 허용될 것이다; IV 용량은 의도된 경구 용량과 동일할 것이다. IV 주입의 경우, 사이클로포스파미드는 HUMC 약국 부서에 의해 약병 지침에 따라 20 mg/ml의 농도로 재구성될 것이다. 적절한 용량 (100 mg 또는 200 mg)을 그 다음 100ml의 D5W 또는 0.9% 염화나트륨에 희석하고 30분에 걸쳐 정맥내로 주입할 것이다.

[0368] PC 주기가 절대 호중구 수에서 실질적인 감소를 초래할 것으로 예상되지는 않는다. 그러나, 다음 주기 직전 결정에서 ANC가 특정 값 미만인 경우, 사이클로포스파미드의 용량은 다음과 같이 조정될 것이다: (1) 마이크로리터당 1000 이상의 ANC 값인 경우, 의도된 용량의 100%가 투여될 것이다; (2) 마이크로리터당 500 내지 999 세포의 ANC 값인 경우, 의도된 용량의 50%가 투여될 것이다; 그리고 (3) ANC 값이 마이크로리터당 500 세포 미만이면, 사이클로포스파미드는 투여되지 않을 것이다. 부가하여, ANC 값이 마이크로리터당 500 세포 미만인 경우, PI에 의해 G-CSF 요법을 시작하는 결정이 고려될 수 있다.

[0369] 8-주 PC 요양법의 정량적 목표는 ALC 값을 마이크로리터당 대략 750 세포로 줄이는 것이다. 질환 발병에 기여하는 T 세포의 이 정도의 고갈 및 억제가 iT_{REG} 세포의 성공적인 생착 및 생물학적 활성을 허용하여 신경-염증성 과정을 제어할 것이라는 것이 본 발명자들의 가설이다. 그러나, iT_{REG} 세포가 그의 완전한 억제 기능을 발휘할 수 있도록 하기 위해 숙주 Th1/Tc1 세포에서 보다 엄격한 감소가 필요할 수 있다는 것이 가능하다; 이러한 경우, PC 요양법은 iT_{REG} 세포 요법 이전에 더 낮은 ALC 값, 예컨대 마이크로리터당 500, 250 또는 0 ALC를 표적으로 하기 위해 강화되거나 연장될 수 있다. 다른 한편으로, iT_{REG} 세포 요법은 매우 효과적일 수 있어 마이크로리터당 750 세포의 ALC 값조차도 너무 엄격하다고 간주될 수 있다는 것이 가능하다; 이러한 경우, PC 요양법은 마이크로리터당 1000, 1250 또는 1500 세포와 같은 더 높은 ALC 값을 표적으로 하기 위해 지속기간에서 비-강화되거나 또는 단축될 수 있다.

[0370] 라미부딘 유지 요법과 관련된 시행.

[0371] PC 요양법이 완료되면, 환자는 라미부딘으로 유지 요법을 진행할 것이며, 이는 프로토콜의 6-개월에서 연구의 종료일까지 계속될 것이다. 라미부딘 (경구 정제)은 150 mg p.o BID의 용량으로 투여될 것이다. 추정된 크레아티닌 청소율이 50ml/분 미만으로 감소되는 경우, 라미부딘은 매일 한 번 150 mg p.o의 용량으로 감소될 것이다; 라미부딘은 30ml/분 미만인 추정된 크레아티닌 청소율 값인 경우 중단될 것이다.

[0372] 이전에 언급된 바와 같이, 라미부딘의 명시된 목적은 ALS 병인에서 근위 사건을 나타내는 NLRP3 염증소체를 하향-조절하는 것이다. 이와 같이, 본 발명자들은 다른 염증소체 억제제가 본 발명자들의 프로토콜 플랫폼에서 사용하기에 적합하거나 아마도 바람직할 것이라고 생각한다; 예를 들어, 잠재적으로 개선된 위험:이익 비율을 가진 염증소체 억제제가 개발되었다.

[0373] 라미부딘은 실제로 그들의 작용 메커니즘이 상호보완적이기 때문에 iT_{REG} 세포 요법에 길항적일 것으로 예측되지 않는다는 점에 유의하는 것이 중요하다. 이는 라파마이신 (다양한 T 세포 반응을 억제할 수 있음) 및 IL-2 (생체내 T_{REG} 팽창을 촉진하는 관점에서 좁은 치료 범위를 가지고 염증성 T 세포 모집단을 촉진할 수 있음)와 같은 T_{REG} 세포 요법을 위해 제안된 다른 개입과 대조된다.

[0374] 지지적 케어 요법.

[0375] 환자는 호중구감소증 경우 체계적인 항생제 예방조치를 받을 필요가 없을 것이다. 항생제를 개시하기 위한 결정은 프로토콜 PI에 있을 것이다.

[0376] 모든 환자는 연구의 종료를 통해 프로토콜 요법의 개시시에 Acyclovir (또는 그것의 전구-약물 Valacyclovir)와

함께 HSV 또는 VZV에 대한 경구 항-바이러스 예방조치를 받게될 것이다.

- [0377] 모든 환자는 연구의 종료 방문을 통해 프로토콜 요법의 개시시에 경구 항-진균 예방조치 (제1 라인: 플루코나졸)을 받게될 것이다. 프로토콜 PI 승인에 따라 대체가 허용된다.
- [0378] 모든 환자는 연구 진입시 뉴모시스티스 PJP 예방조치를 개시할 것이다 (연구의 종료 방문까지 계속됨). 환자는 경구 코트리모キサ졸 (Cotrimoxazole) (Trimethoprim 160 mg/Sulfamethoxazole 800 mg)을 받게될 것이다: 월요일, 수요일 및 금요일에 1정씩 po; 프로토콜 PI 승인에 따라 대체 일정 또는 대체가 허용된다.
- [0379] *iT_{REG} 세포로 ALS 환자의 치료: 생성물의 제조 및 표현형.*
- [0380] 이전에 상세히 설명한 바와 같이, iT_{REG} 세포 생성물은 PC 요양법 이전에 연구 진입시 또는 8-주 PC 요양법 완료 시 혈장교환에 의해 수집된 자가 T 세포로부터 제조될 것이다. 각 혈장교환 수집은 고유한 장점을 가질 수 있다: 초기 수집은 더 높은 T 세포 수율을 갖는 반면 PC-후 수집은 상대적으로 Th1/Tc1 세포가 고갈된 T 세포 모집단으로 구성될 것이다.
- [0381] iT_{REG} 세포는 염증성 표현형으로부터 항-염증성 T_{REG} 표현형으로 효과기 T 세포 전환의 원리에 기반하여 제조되기 때문에, CD4⁺, CD25⁺ 및 CD127의 낮은 발현으로 전형적으로 특징지어 지는 비교적 드문 nT_{REG} 모집단을 얻기 위한 단일클론 항체/컬럼 선별 방법 또는 유세포분석법을 필요로 하는 비싸고 힘든 천연 T_{REG} 정제 단계가 필요하지 않을 것이다. 부가하여, CD8⁺ T_{REG} 세포가 면역 억제를 매개하는 것으로 나타났고 iT_{REG} 세포 요법에 증가된 다양성을 제공하는 관점에서 유익할 수 있기 때문에 iT_{REG} 세포 모집단에서 CD8⁺ T 세포를 제거할 필요가 없을 것이다.
- [0382] CD62L 및 CCR7과 같은 세포 표면 마커의 발현에 기반한 중심 기억 유형으로 정의될 수 있는 제한된 분화 상태의 T_{REG} 세포는 생체내 조절성 기능이 증가하는 것으로 나타났다. 다른 한편으로, 보다 분화된 효과기 기억 상태의 T_{REG} 세포 획득은 IL-10; CTLA-4; 엑토-뉴클레오티다제 분자 CD39 및 CD73; 및 세포용해 분자 예컨대 퍼포린 및 fas 리간드와 같은 억제성 기능을 매개하는 분자의 상향-조절을 허용한다는 것이 또한 알려져 있다. 이들 데이터는 중앙 및 효과기 기억 서브세트 둘 모두의 모집단을 함유하는 iT_{REG} 세포 생성물을 주입하는 것이 유익할 것이고, 이와 같이 본 발명자들이 활용할 iT_{REG} 세포 생성물은 두 서브세트로부터 표현을 가질 것임을 나타낸다.
- [0383] 부가하여, iT_{REG} 세포는 조절성 T 세포 분화 프로그램을 지시하는 전사 인자인 FoxP3를 발현하는 것이 필요하다. 더욱이, FoxP3 발현 및 그에 따른 조절성 기능이 시간이 지남에 따라 약화될 수 있음이 나타났기 때문에, iT_{REG} 세포 생성물은 배양에서 장기간에 걸쳐 안정된 FoxP3 발현을 가져야 한다.
- [0384] 더욱이, FoxP3 단독은 진정한 염증성 T 세포 서브세트에 의해 일시적으로 발현될 수 있기 때문에 조절성 T 세포 표현형의 동정에 충분하지 않다는 것이 인간에서 밝혀졌다. 이와 같이, FoxP3을 발현하지만 Th1/Tc1-유형 전사 인자 TBET 또는 Th1-유형 사이토카인 IL-2 또는 IFN- γ 와 같은 염증성 T 세포 서브세트와 관련된 분자의 공-발현이 또한 상대적으로 없는 iT_{REG} 세포 생성물을 제조하는 것이 중요하다.
- [0385] 마지막으로, iT_{REG} 세포 생성물이 조절성 표현형으로부터 염증성 표현형으로의 분화 유연성에 대해 감소된 능력을 갖는 것이 중요하다. 즉, T_{REG} 세포는 그 억제성 표현형에서 상대적으로 불안정할 수 있으며, 이는 실제로 신경-퇴행성 질환의 매개에 기여할 수 있는 염증성 T 세포 서브세트로의 변환을 초래할 수 있다는 것이 잘 문서화되었다. 이와 같이, iT_{REG} 세포 생성물은 FoxP3를 안정적으로 발현해야 하며 Th1/Tc1 서브세트로의 전환에 대해 감소된 경향을 나타내야 한다. Th1-유형 서브세트로의 T_{REG} 세포 분화 유연성에 대한 추가 보호장치로서, 본 발명자들은 IL-4를 iT_{REG} 세포 제조 공정에 의도적으로 통합하여 임의의 이러한 분화가 Th2-유형 계통으로 향하도록 할 것이며, 이는 T_{REG} 세포 유지 및 T_{REG} 세포 억제체 기능에 중요한 것으로 보이고; T_{REG} 세포에 대한 기본 경로로 기술되었고; ALS의 설정에서 항-염증성 효과를 매개할 수 있다. 조절성 T 세포의 Th2-유사 상태의 잠재적으로 유익한 역할에 대한 이 증거에도 불구하고, T_{REG} 세포 요법을 위한 제조 방법은 배양 동안 외인성 IL-4의 의도적 추가를 포함하지 않았다 (최근 T_{REG} 제조의 예에서 예시된 바와 같음).

- [0386] 제조의 종료시, iT_{REG} 세포 생성물은 치료적 세포 용량 (1 내지 5×10^6 세포/kg)으로 적어도 4개 단일-사용 분취량으로 동결보존될 것이다.
- [0387] iT_{REG} 세포로 ALS 환자의 치료: T_{REG} 세포 모집단의 조합.
- [0388] iT_{REG} 세포 모집단은 수령체 체중 kg당 1 내지 5×10^6 세포의 용량으로 주입될 것이다. 이전 연구 대비 상대적으로 낮은 T_{REG} 세포 요법의 이 복용량은 여러 요인에 의해 촉진된다: PC 요양법은 iT_{REG} 세포의 생착을 위한 충분한 면역학적 공간을 제공할 것이다; iT_{REG} 세포는 적응 전달 후 세포의 지속성과 관련된 기억 프로파일을 표현할 것이다; 그리고 iT_{REG} 세포 생성물은 적어도 4개의 임상적으로-관련된 치료적 용량으로 냉동보존될 것이며, 이에 의해 다중 주기의 요법이 가능하다.
- [0389] 이전에 상세히 설명된 바와 같이, iT_{REG} 세포 생성물은 다양한 기억 분화 상태 (중양 기억 [CM] 플러스 효과기 기억 [EM])를 함유할 것이며, 이에 의해 각각 신경-염증화의 장기적 및 즉각적인 제어 둘 모두를 허용한다. 임상 상황에 따라 최적의 결과를 위해 이러한 중양 및 효과기 메모리 모집단의 비율을 제어하는 것이 가능할 것이다; 즉, 임상적 매개변수에 기반하여, CM:EM 세포의 iT_{REG} 분포는 1:1, 3:1, 10:1, 1:3 또는 1:10일 수 있다.
- [0390] 유사한 방식으로, 임상적 상황에 따라, 개선된 치료적 효과를 위해 $CD4^+iT_{REG}$ 세포 대 $CD8^+iT_{REG}$ 세포의 비율을 조절하는 것이 가능할 것이다.
- [0391] 마지막으로, iT_{REG} 및 nT_{REG} 세포는 상이한 T 세포 수용체 레퍼토리를 발현하고 따라서 면역 억제를 매개하는 관점에서 보완적일 수 있기 때문에, 본 발명자들은 iT_{REG} 세포를 사용한 최적의 요법이 nT_{REG} 세포의 공-투여에 의해 달성될 수 있다고 생각한다.
- [0392] iT_{REG} 세포로 ALS 환자의 치료: 약학적 제제와의 조합
- [0393] iT_{REG} 세포 요법은 PC 요양법의 면역 조절 효과와 라미부딘의 염증소체 억제성 효과를 포함하는 플랫폼과 조합될 때 신경-염증화를 조절하기에 충분할 수 있다는 것이 가능하다.
- [0394] 그러나, 본 발명자들은 iT_{REG} 세포 요법이 플랫폼의 변경에 의해 최적화될 수 있다고 생각한다. 비제한적인 예로서, 요법은 PC 요양법의 강도 변경; 펜토스타틴과 시너지 효과로 작용하도록 다른 제제로 사이클로포스파미드의 치환; 또는 PC 요양법에 제3 구성성분, 예를 들어, 항-TNF 요법 후 저용량 IL-2 요법의 추가에 의해 최적화될 수 있으며, 이는 생체내에서 T_{REG} 세포를 예측 가능하게 증가시킬 것이라고 추론한다. 비제한적인 예로서, Pham MN, von Herrath MG, Vela JL. Antigen-Specific Regulatory T Cells and Low Dose of IL-2 in Treatment of Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*. 2015;6:651에 기술된 저용량 IL-2 요법.
- [0395] 더욱이, 본 발명자들은 라미부딘이 최근 합성된 분자와 유사한 보다 강력하거나 보다 특이적인 염증소체 억제제로 대체될 수 있다고 생각한다.
- [0396] 궁극적으로, ALS에서 염증화에 대한 추진은 잘못-접힌 RNA 요소의 축적 및 불충분한 자가포식과 같은 보다 근접한 사건에 의해 개시된다. 이 정도까지, 자가포식을 촉진할 수 있는 ALS 요법에서 약물, 특히 라파마이신을 이용하는 근거가 존재한다. 그러나, ALS의 요법을 위한 라파마이신의 임상적 시험은 현재 단지 시작되고 있다 (ClinicalTrials.gov 식별자: NCT03359538); 더욱이, 이 프로토콜은 연속적 요법의 라파마이신 (실질적인 독성과 연관될 수 있음), 고정 용량의 라파마이신 (큰 정도의 환자-간 약물 변동성을 초래할 수 있음) 및 상대적으로 낮은 용량의 라파마이신 (mTOR 경로의 강력한 억제 및 결과적인 자가포식의 촉진에 필요한 높은 약물 수준을 보장하지 않을 것임)을 평가하고 있다. 이들 한계를 피하기 위해, 본 발명자들은 다음 매개변수를 사용하여 자가포식의 촉진을 위해 iT_{REG} 세포 요법을 라파마이신과 조합할 것이다: 약물 독성을 제한하고 iT_{REG} 세포의 라파마이신 억제 가능성을 제한하기 위한 간헐적 라파마이신 요법의 사용 (비제한적인 예로서, mTOR 억제 요법에 대해 1 주 플러스 mTOR 요법의 회복 3 주); mTOR 경로의 보다 일관된 억제를 위해 균질한 약물 수준을 보장하기 위해 라파마이신 수준의 조합 혈청 테스트에서 라파마이신의 장입 용량을 포함하는, 라파마이신의 다양한 복용량의 사용; 및 ~ 5 내지 12 ng/mL의 전형적인 표적에 우선하여 30 ng/mL의 혈청 라파마이신 수준을 달성하기 위한 고용량 라파마이신 요법의 사용. Mossoba ME, Halverson DC, Kurlander R, 등. High-Dose Sirolimus And

Immune Selective Pentostatin Plus Cyclophosphamide Conditioning Yields Stable Mixed Chimerism and Insufficient Graft-Versus-Tumor Responses. *Clinical cancer research*. 2015;21(19):4312-4320을 참고한다.

- [0397] 더욱이, 라파마이신 요법은 중추 신경계 안으로 약물의 불충분한 침투에 기인하여 신경퇴행성에서 자가포식의 촉진에 대한 차선책일 수 있기 쉽다; 이 시점까지, 라파마이신 유사체 템시롤리무스로의 정맥내 요법조차도 뇌척수액에서 상당한 수준의 약물을 초래하지 않았다. 이 한계를 극복하기 위해, 본 발명자들은 리소좀 저장 질환의 요법에 이용되는 것과 유사한 방식으로 내재 오마야 저장소를 통해 템시롤리무스를 투여하여 신경퇴행성 질환의 환경에서 자가포식의 최적의 촉진을 위한 mTOR 억제제의 일관된 CSF 약물 수준을 달성할 것으로 예상된다.
- [0398] *iT_{REG} 세포로 ALS 환자의 치료: 면역 모니터링.*
- [0399] ALS의 iT_{REG} 세포 요법의 맥락에서, 질환과 관련된 신경-염증성 경로를 조절하는 그 능력의 관점에서 세포 요법의 성공을 정량화하는 것이 중요할 것이다. 즉, 신경퇴행성 질환의 임상적 경과의 모니터링은 환자 코호트에 걸친 질환 진행의 넓은 정도의 가변성을 고려할 때 불충분하다. 신경-염증화를 최적으로 치료하는 능력은 다양한 약리학적 작용제와의 조합을 포함하여 iT_{REG} 세포의 다중 주입을 필요로 할 것이다; 이와 같이, 치료적 결정의 지침을 돕기 위해 면역 바이오마커를 이용하는 것이 중요할 것이다.
- [0400] iT_{REG} 세포 주입 및 관련 약리학적 작용제의 반복적 복용에 관련된 치료적 결정은 본 발명자들이 개발한 말초 혈액 단핵 세포의 전문적인 검사를 기반으로 할 것이다. 이들 검사는 자발적 사이토카인 측정; 사이토카인 측정에서 T 세포 및 단핵구 협력성; 사이토카인 분비의 비 마스크에서 제조합 인간 CD40 리간드, T 세포 체크포인트 억제제 경로 및 단핵구 체크포인트 경로의 역할; 웨스턴 블랏에 의한 단백질 정량화와 같은 다양한 기술에 의한 염증소체 활성화의 평가; 염증성 사건에 대한 지표로서 말초 T 세포의 아데노신 수용체 생화학의 평가; Th1-관련 분자 TBET, IL-2 또는 IFN- γ 와 FoxP3 전사 인자 공-발현을 평가하기 위한 유세포분석법의 사용; RNA 서열화에 의한 T 세포 수용체 레퍼토리의 특성규명; 및 질환 발병 동안 전개하는 단백질 응집체와 같은 잠재적인 신경학적 자가-항원에 대한 항원-특이적 T 세포 반응의 검출을 포함하여 염증성 모니터링에 관련된 몇 가지 주요 문제를 다룬다.
- [0401] *프로토콜 평가.*
- [0402] 의사 또는 중간-수준 제공자에 의한 임상 평가는 14-일 주기인 것으로 의도된 PC 요양법의 각 주기의 1일차에 수행될 것이다. 환자는 또한 14-일 PC 주기 동안 (이상적으로는, 주기의 대략 8일차) 해당 지역의 제공자에게 보여질 것이다. 이들 방문에서, 차등 및 완전 대사 패널 (완전 대사 패널은 전형적으로 전해질, 크레아티닌, 간트랜스아미나제 및 빌리루빈을 포함하여 대략 14개의 검사를 포함하고; 사용되는 특정 패널은 프로토콜-의무화되지 않음)이 있는 CBC를 획득할 것이고 실험 결과는 프로토콜 조사관에게 보내질 것이다.
- [0403] PC 요양법을 포괄하는 간격이 끝나면 (대략 2개월차), 환자는 3, 4, 5, 및 6개월차에서 매월 진료를 받을 것이다; 6개월차 방문은 연구의 종료 방문을 나타낼 것이다. 이들 임상 평가시 수행되는 검사는 다음을 포함할 것이다: (1) 중간 이력 및 신체 검사; (2) 차등 및 혈소판 수를 갖는 CBC; (3) 완전 대사 패널; 및 (4) 면역 서브세트 열거 (TBNK 패널).
- [0404] 연구 면역 매개변수를 모니터링하기 위해, 말초 혈액 샘플이 Rapa Therapeutics로 보내져 중앙 집중식 모니터링과 보다 심층적인 분석을 가능하게 할 것이다. 혈액 샘플은 녹색 상단 헤파린화된 튜브 (세포 검정용)에 30ml 및 빨간색 상단 튜브 (혈청 검정용)에 5ml로 구성되어 Rapa Therapeutics로 보내질 것이다.
- [0405] Rapa Therapeutics로 보낸 동일한 샘플을 사용하여, 본 발명자들은 RNA 발현, 상청액/Luminex 검정, 유세포분석법, 및 웨스턴 블랏에 의한 인산화 분석에 의한 세포 시그널링 이벤트에 의해 측정된 전-염증성 또는 항-염증성 사이토카인 또는 세포 서브세트에 대한 PC 요양법 및 라미부딘 유지 요법의 효과를 조사할 것이다.
- [0406] 혈청은 ALS의 잠재적인 바이오-마커에 대해 평가될 것이다. 비제한적인 예로서, 예컨대 Beach TG. A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley? *Neurology and Therapy*. 2017;6(Suppl 1):5-13에 기재된 이들 바이오마커.
- [0407] 본 발명자들은 환자의 TCR 레퍼토리를 특성규명하고 치료적 개입이 레퍼토리에 영향을 미치는지 여부를 평가할 것이다.
- [0408] 시험관내 연구는 "면역 특성 연구"의 일반 범주에 속할 것이다. 그들은 다중-매개변수 FACS 분석에 의한 별개의 세포 서브세트의 분리 또는 후속 특성규명과 함께 자기 비드에 의한 분리에 초점을 맞출 것이다. 구체적으로,

말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 조혈 계통, 면역 기능 서브세트, 사이토카인 생산 및 활성화 상태를 나타내는 마커의 발현에 대해 유세포분석법으로 분석될 것이다. 세포 서브세트는 T 세포 수용체 레퍼토리 다양성에 대해 분석될 것이다. 세포는 T 림프구 또는 단핵구 기능의 뚜렷한 경로를 활성화하는 것으로 알려진 특정 항원 및 미토겐을 포함하는 다수의 상이한 자극으로 시험관내에서 활성화될 수 있다. 검정은 T 세포 증식, 사이토카인 생산 및 유전자 발현을 포함할 수 있다. 진행중인 데이터 분석에 사용되는 특정한 검정은 연구 목적에서 변경을 구성하지 않는 연구의 과정 동안 해당 분야의 기술과 지식이 진화함에 따라 수정, 삭제 또는 대체되는 대상이 된다.

- [0409] 응답 기준.
- [0410] 환자-보고된 ALSFS-R 점수 및 임상-보고된 Appel 점수는 이전에 표시된 바와 같이 다양한 시점에서 측정될 것이다.
- [0411] 독성 기준
- [0412] 독성은 NCI의 이상사례 공통 용어기준 (Common Terminology Criteria for Adverse Events; CTCAE)에 따라 등급이 매겨질 것이다 (<http://ctep.info.nih.gov>에서 이용 가능). CTCAE 버전 4.0의 사본은 CTEP 홈페이지에서 다운로드할 수 있다. 연구에 관련된 모든 치료 영역과 직원은 CTCAE 버전 4.0의 사본에 접속해야 한다.
- [0413] 연구 약물 (펜토스타틴, 사이클로포스파미드, 라미부딘)과 관련이 있을 가능성이 있거나 분명한 속성이 있는 임의의 등급 4 또는 5 독성 (CTCAE 버전 4.0)은 용량 제한 독성 (DLT)으로 간주될 것이다. 다음 독성은 DLT로 간주되지 않을 것이다: 생화학적 4 등급 독성 (신장 및 간 수치 제외); 4 등급 구토; 4 등급 발열; 7일 이내에 해결되는 감염과 관련된 4 등급 독성.
- [0414] 통계적 고려 사항.
- [0415] 연구 설계는 펜토스타틴 및 사이클로포스파미드 요양법 및 유지 라미부딘 요법 (플랫폼)의 안전성을 평가하기 위한 표준 3+3 방법을 통합한다. 처음 3명의 환자에서, 펜토스타틴/사이클로포스파미드 요법의 완료를 통해 DLT를 전개하는 환자가 없는 경우, 요양법은 코호트를 총 n=10 환자로 팽창하기에 안전한 것으로 결정될 것이다. 반면, 처음 환자 3명 중 1명이 DLT를 전개하는 경우, 증가부분은 총 n=6 환자로 증가할 것이다. 이러한 경우, 처음 6명의 환자 중 1명 이하가 DLT를 전개하면 코호트에서 n=10 수에 대한 증가부분이 진행할 수 있다.
- [0416] 이 플랫폼이 성공적으로 전개되면, 본 발명자들은 iT_{REG} 세포 주입의 안전성과 잠재적 효능을 평가할 것이다. 처음에는, 질환과 관련된 신경-염증성 경로를 억제하는 iT_{REG} 세포의 다중 주입 능력을 평가하기 위한 파일럿 연구가 수행될 것이다.
- [0417] 신경퇴행과 관련된 바이오마커를 효과적으로 조절하는 능력이 문서화되면, 본 발명자들은 iT_{REG} 세포 요법이 ALS 환자에서 임상 결과를 개선할 수 있는지 여부를 평가하기 위해 II 상 임상 시험 (이력 대조 데이터 또는 무작위화된 코호트 설계를 사용함)을 수행할 것이다.
- [0418] 위험/이익 분석.
- [0419] 이 연구에서 발생한 환자의 예상 생존 기간은 연구 진입으로부터 대략 2 내지 4년이 될 것으로 예상된다.
- [0420] 제1 프로토콜 구성성분은 펜토스타틴과 사이클로포스파미드 (PC 요양법)로 구성된 면역 고갈 및 면역 억제 요양법의 4 주기로 구성된다. 본 발명자들은 PC 요양법이 ALS 진행에 기여하는 병원성 면역 세포를 제거하고 억제할 것이라고 가정한다; 이와 같이, 환자는 향상된 삶의 질 또는 궁극적으로 감소된 질환의 진행의 형태에서 이 효과로부터 이점이 있을 수 있다는 것이 가능하다. 그러나, 중추 신경계의 관점에서 PC 요양법의 예상치 못한 독성이 있을 수 있다. PC 요양법이 이 신규한 ALS 환자 모집단에서 상대적으로 안전할 것이라는 것을 보장하기 위해 복용량 수정이 이루어지고 있지만, PC 요양법이 역설적 효과를 가질 수 있고 실제로 ALS 진행의 속도를 증가시키거나 일부 다른 신경학적 독성을 유발할 수 있다는 것이 가능하다. 펜토스타틴은 드물게 또한 심장이나 신장과 같은 다른 기관에도 독성을 유발할 수 있다. PC 요양법에서 예상되는 가장 일반적인 독성은 림프구 고갈일 것이지만, 이 효과는 치료적 근거의 일부이다; 반면에, PC 요양법은 골수 세포를 제거할 수 있으며, 이에 의해 박테리아 또는 곰팡이 감염의 기회를 증가시킬 수 있다. PC 요양법은 T 세포 면역 억제와 관련되는 것으로 예상되고, 이와 같이 기회적 바이러스 감염이 발생할 수 있다.
- [0421] 제2 프로토콜 구성성분은 항 바이러스 약물인, 라미부딘을 사용한 유지 요법으로 구성된다. 약물이 중추 신경계에서 발생하는 염증화를 줄이기 위해 가설된 바와 같이 작용한다면 환자는 이 요법으로부터 이익이 있을 수 있

다. 라미부딘은 일반적으로 주로 위장관 부작용과 헤장염 이외에 매우 잘 견디는 약물이다.

[0422] 제3 프로토콜 구성성분은 iT_{REG} 세포의 다중 주입으로 구성된다. 환자는 이 요법으로부터 이익이 있을 수 있는데 이는 염증화를 제어하는 세포 요법이 염증화가 시작되는 미세 환경에서 직접적으로 발생하기 때문이고, 세포 요법이 약물 요법으로 쉽게 복제될 수 없는 다중 분자의 작용 메커니즘을 통해 작동하기 때문이고, 그리고 세포 요법의 효과는 기억 세포 효과로 인해 오래 지속할 수 있기 때문이다.

[0423] 대체 프로토콜 설계

[0424] 도 39는 대체 프로토콜 설계를 제공한다. 림프구는 정상-상태 혈장교환에 의해 수집된다; 혈장교환 생성물은 Rapa Therapeutics (메릴랜드주 록빌 소재)로 배송될 것이다. RAPA-501 세포 제조 후, n=4 용량의 RAPA-501 세포는 임상적으로 표시된 세포 용량으로 단일-사용 주입 백에 냉동보존될 것이다. 치료 간격은 6-개월이고, 이어서 6-개월 관찰 간격이 따를 것이다. 코호트 #1은 40×10^6 세포/주입의 용량으로 4 주기에 걸쳐 투여되는 RAPA-501 세포를 받게될 것이다. 코호트 #1은 안전 코호트를 나타내고 표준 3+3 디자인을 이용할 것이다; 0/3 또는 1/6 이하의 환자가 용량-제한 독성 (DLT)을 경험하면 코호트 #2로의 진행이 일어날 것이다. 코호트 #2는 T 세포 용량이 120×10^6 세포/주입으로 증가될 것이라는 점을 제외하고는 이전에 논의된 연구 프로토콜에서와 동일한 4 주기의 RAPA-501 세포를 받게될 것이다. 코호트 #3은 단일-제제 (코호트 #1 또는 #2에 따라, 각각 40 또는 120×10^6 세포/주입) 플러스 각각의 4개 RAPA-501 세포 주입 이전 PC 요양법으로 숙주 컨디셔닝으로 안전하게 투여될 수 있는 RAPA-501 세포의 최고 용량을 평가할 것이다. PC 요양법은 헤파스타틴 (1 및 4일차에 2 mg/m²), 사이클로포스파미드 (1일당 100 mg, 1 내지 5일차), 6 및 7일차에는 무 요법, 8일차에는 RAPA-501 세포 주입으로 구성될 것이다.

[0425] 탈-분화 실시형태;

[0426] 1. 다음을 포함하는 T 세포의 탈-분화를 위한 방법:

[0427] 대상체로부터의 T 세포를 포함하는 세포의 배양 투입 집단을 비타민 D, 텀시롤리무스 및 IL-2 시그널링 억제제를 포함하는 배양 배지에 세포 밀도로 접종하는 단계;

[0428] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 1:1 내지 1:12의 비드:T 세포 비율로 상기 T 세포 및 배양 배지에 첨가하는 단계;

[0429] 탈-분화된 T 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 세포의 배양 투입 모집단 및 배양 배지를 인큐베이션하는 단계.

[0430] 2. 실시형태 1에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포를 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0431] 3. 실시형태 2에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포를 수확한 후에,

[0432] 상기 탈-분화된 T 세포의 적어도 일부를 패키지에 포장하는 단계; 및

[0433] 상기 탈-분화된 T 세포의 상기 일부를 함유하는 상기 패키지를 동결시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0434] 4. 실시형태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지에 상기 세포의 배양 투입 모집단을 접종하기 전에,

[0435] 상기 대상체로부터 상기 세포의 배양 투입 모집단을 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0436] 5. 실시형태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 IL-2를 함유하지 않고 IL-2는 상기 배양 배지에 첨가되지 않는 방법.

[0437] 6. 실시형태 1-5 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 밀도는 mL당 적어도 1.5×10^6 T 세포인 방법.

[0438] 7. 실시형태 1-6 중 어느 하나에 있어서, 상기 텀시롤리무스는 약 $0.3 \mu\text{M}$ 내지 약 $1 \mu\text{M}$ 의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.

[0439] 8. 실시형태 1-6 중 어느 하나에 있어서, 상기 텀시롤리무스는 약 $1 \mu\text{M}$ 의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.

[0440] 9. 실시형태 1-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 항-IL-2 수용체 항체 또는 이의 단편인 방법.

- [0441] 10. 실시형태 9에 있어서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 바실릭시맙 또는 다클리주맙인 방법.
- [0442] 11. 실시형태 1-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2 시그널링 억제제는 5 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0443] 12. 실시형태 1-11 중 어느 하나에 있어서, 상기 일정 시간은 약 3일인 방법.
- [0444] 13. 실시형태 1-12 중 어느 하나에 있어서, 상기 비드:T 세포 비율은 1:3인 방법.
- [0445] 14. 실시형태 1-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 5% 인간 혈청을 추가로 포함하는 방법.
- [0446] 15. 실시형태 1-14 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 X-Vivo 20 배지를 포함하는 방법.
- [0447] 16. 실시형태 1-15 중 어느 하나에 있어서, 상기 비타민 D는 약 0.03 nM 내지 약 1 nM으로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0448] 17. 실시형태 1-15 중 어느 하나에 있어서, 상기 비타민 D는 약 0.1 nM로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0449] 18. 실시형태 1-11 및 13-17 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0451] 여기서 상기 일정 시간은 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소될 때까지 지속되는, 단계.
- [0452] 19. 실시형태 1-11 및 13-17 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR 및 하우스키퍼 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0454] 여기서 상기 일정 시간은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서, 각각 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 하우스키퍼 단백질의 발현 수준에 대해 정상화한 후, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50% 감소될 때까지 지속되는, 단계.
- [0455] 20. 실시형태 19에 있어서, 상기 하우스키퍼 단백질은 액틴 또는 GAPDH인 방법.
- [0456] 21. 실시형태 18-20 중 어느 하나에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블랏 분석에 의해 수행되는 방법.
- [0457] 22. 실시형태 1-11 및 13-17 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0459] 여기서 상기 일정 시간은 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90%로 감소될 때까지 지속되는, 단계.
- [0460] 23. 실시형태 1-22 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 탈-분화 T 세포.
- [0461] 24. 탈-분화된 T 세포의 모집단을 포함하는 조성물로서, 여기서 상기 탈-분화된 T 세포의 상기 모집단의 적어도 일부는 T 세포의 대조군 모집단과 비교하여 RAPTOR 또는 RICTOR 둘 모두의 50% 미만을 발현하며, T 세포의 대조군 집단은 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조되는, 조성물.
- [0462] 25. 다음 단계를 포함하는 T 세포의 탈-분화를 위한 방법:
대상체로부터의 T 세포를 포함하는 세포의 배양 투입 집단을 비타민 D 및 템시롤리무스를 포함하는 배양 배지에 세포 밀도로 접종하는 단계;
- [0464] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 1:1 이하의 비드:T 세포 비율로 상기 T 세포 및 배양 배지에 첨가하여 상기 T 세포를 자극하는 단계;
- [0465] 탈-분화된 T 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 세포의 배양 투입 모집단 및 배양 배지를 인큐베이션하

는 단계.

- [0466] 26. 실시형태 25에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포를 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0467] 27. 실시형태 26에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포를 수확한 후:
- [0468] 상기 탈-분화된 T 세포의 적어도 일부를 패키지에 포장하는 단계; 및
- [0469] 상기 탈-분화된 T 세포의 상기 일부를 함유하는 상기 패키지를 동결시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0470] 28. 실시형태 25-27 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지에 상기 세포의 배양 투입 모집단을 접종하기 전에,
- [0471] 상기 대상체로부터 상기 세포의 배양 투입 모집단을 수확하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0472] 29. 실시형태 25-28 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 IL-2를 함유하지 않고 IL-2는 상기 배양 배지에 첨가되지 않는 방법.
- [0473] 30. 실시형태 25-29 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 밀도는 mL당 1.5×10^6 T 세포인 방법.
- [0474] 31. 실시형태 25-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 템시롤리무스는 약 $0.3 \mu\text{M}$ 내지 약 $1 \mu\text{M}$ 의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0475] 32. 실시형태 25-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 템시롤리무스는 약 $1 \mu\text{M}$ 의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0476] 33. 실시형태 25-32 중 어느 하나에 있어서, 상기 일정 시간은 약 3일인 방법.
- [0477] 34. 실시형태 25-33 중 어느 하나에 있어서, 상기 비드:T 세포 비율은 1:3인 방법.
- [0478] 35. 실시형태 25-34 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 5% 인간 혈청을 추가로 포함하는 방법.
- [0479] 36. 실시형태 25-35 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 X-Vivo 20 배지를 포함하는 방법.
- [0480] 37. 실시형태 25-36 중 어느 하나에 있어서, 상기 비타민 D는 약 0.03 nM 내지 약 1 nM 로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0481] 38. 실시형태 25-37 중 어느 하나에 있어서, 상기 비타민 D는 약 0.1 nM 로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0482] 39. 실시형태 25-32 및 34-38 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
- [0483] 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0484] 여기서 상기 일정 시간은 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%로 감소될 때까지 지속되는, 단계.
- [0485] 40. 실시형태 25-32 및 34-38 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
- [0486] 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR, RICTOR 및 하우스키핑 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0487] 여기서 상기 일정 시간은 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이, 하우스키핑 단백질 발현에 대해 정상화한 후 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 50% 또는 바람직하게는 90%로 감소될 때까지 지속되는, 단계.
- [0488] 41. 실시형태 40에 있어서, 상기 하우스키핑 단백질은 액틴 또는 GAPDH인 방법.
- [0489] 42. 실시형태 39-41 중 어느 하나에 있어서, 상기 발현 수준을 측정하는 단계는 웨스턴 블랏 분석에 의해 수행되는 방법.
- [0490] 43. 실시형태 25-32 및 34-38 중 어느 하나에 있어서, 다음 단계를 추가로 포함하는 방법:
- [0491] 상기 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준을 측정하는 단계로서,
- [0492] 여기서 상기 일정 시간은 세포의 배양 투입 모집단에서 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준이 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모

집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소될 때까지 지속되는, 단계.

- [0493] 44. 실시형태 25-43 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 탈-분화된 T 세포.
- [0494] 45. 이들 방법에 명시된 배양 첨가제 없이 배양된 T 세포의 대조군 모집단 대비 T 세포 분화 분자, 예컨대 비제한적으로 그랜자임 B를 포함하는 세포용해 분자; 및 비제한적으로 IFN- γ 를 포함하는 사이토카인 분자에서 RNA 발현이 적어도 10% 감소하고 보다 바람직하게는 50% 감소하는 것을 특징으로하는 탈-분화된 T 세포 모집단.
- [0495] 46. 이들 방법에 명시된 배양 첨가제 없이 배양된 T 세포의 대조군 모집단 대비 T 세포 분화 분자, 예컨대 비제한적으로 Nanog, KLF4 및 KLF10을 포함하는 유도된 만능 줄기 세포와 관련된 전사 인자; 및 비제한적으로 IL-7 수용체, CD127을 포함하는 나이브 T 세포와 관련된 분자에서 RNA 발현이 적어도 10% 감소하고 보다 바람직하게는 50% 감소하는 것을 특징으로하는 탈-분화된 T 세포 모집단.
- [0496] 47. 이들 방법에 명시된 배양 첨가제 없이 배양된 T 세포의 대조군 모집단 대비 T 세포 분화 분자, 예컨대 비제한적으로 T-Bet 및 STAT1을 포함하는 Th1 효과기 T 세포와 관련된 전사 인자에서 RNA 발현이 적어도 10% 감소하고 보다 바람직하게는 50% 감소하는 것을 특징으로하고; 그러나 동시에, 제조된 T 세포는 비제한적으로 HIF-1-알파를 포함하는 세포 생존과 관련된 전사 인자의 동등한 발현을 가지는, 탈-분화된 T 세포 모집단.
- [0497] 48. 자가포식-관련 분자인, p62의 웨스턴 블랏 분석에 의한 단백질 수준에서 증가를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 이들 방법에 명시된 배양 첨가제 없이 배양된 T 세포의 대조군 모집단 대비 자가포식의 분자 마커의 발현이 적어도 10% 증가하고 보다 바람직하게는 50% 증가하는 것을 특징으로하는 탈-분화된 T 세포 모집단.
- [0498] 49. 실시형태 1-22 중 어느 하나에 있어서, 1:1 내지 1:12의 비드:T 세포 비율로 상기 T 세포 및 배양 배지에 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 첨가하는 상기 단계는 수행되지 않는 방법.
- [0499] 50. 실시형태 25-43 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포를 자극하기 위해 1:1 이하의 비드:T 세포의 비율로 상기 T 세포 및 배양 배지에 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 첨가하는 상기 단계가 수행되지 않는 방법.
- [0500] 51. 다음 특성 중 하나 이상을 특징으로하는 탈-분화된 T 세포의 모집단:
- [0501] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 중 하나 이상에서 mRNA의 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0502] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 Nanog, KLF4, KLF10 및 CD127 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0503] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 T-Bet 및 STAT1 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0504] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단의 약 20% 이내 HIF-1- α 발현;
- [0505] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 p62 발현에서, 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0506] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준;
- [0507] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준; 및
- [0508] 이들의 조합.
- [0509] 52. 다음 특성 중 하나 이상을 특징으로하는 탈-분화된 T 세포:
- [0510] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0511] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비

Nanog, KLF4, KLF10 및 CD127 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;

- [0512] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비 T-Bet 및 STAT1 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0513] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포의 약 20% 이내 HIF-1- α 발현;
- [0514] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 p62 발현에서, 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0515] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 대조군 T 세포 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준;
- [0516] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 대조군 T 세포 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준; 및
- [0517] 이들의 조합.
- [0518] 재-분화 실시형태:
- [0519] 1. 다음 단계를 포함하는 탈-분화된 T 세포를 TREG/Th2 세포로 분화하는 방법:
- [0520] IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계;
- [0521] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;
- [0522] TREG/Th2 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하는 단계.
- [0523] 2. 실시형태 1에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는 방법.
- [0524] 3. 실시형태 1-2 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0525] 4. 실시형태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0526] 5. 실시형태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0527] 6. 실시형태 2에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0528] 7. 실시형태 2에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0529] 8. 실시형태 6-7 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0530] 9. 실시형태 6-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0531] 10. 실시형태 6-9 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0532] 11. 다음 단계를 포함하는 탈-분화된 T 세포를 TREG/Th2 세포로 분화하는 방법:
- [0533] 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계로서, 상기 탈-분화된 T 세포는 IL-2, IL-4 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 대조군 T 세포 대비 적어도 10% 감소된 수준으로 RAPTOR 및 RICTOR를 발현하는, 단계;
- [0534] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;
- [0535] TREG/Th2 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하는 단계.
- [0536] 12. 실시형태 11에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는 방법.
- [0537] 13. 실시형태 11-12 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.

- [0538] 14. 실시형태 11-13 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0539] 15. 실시형태 11-14 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0540] 16. 실시형태 12에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0541] 17. 실시형태 12에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0542] 18. 실시형태 16-17 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0543] 19. 실시형태 16-18 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-4는 약 1000 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0544] 20. 실시형태 16-19 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0545] 21. 실시형태 1-20 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20인 방법.
- [0546] 22. 실시형태 1-21 중 어느 하나에 있어서, 상기 일정 시간은 3일 내지 40일인 방법.
- [0547] 23. 실시형태 1-22 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 TREG/Th2 세포.
- [0548] 24. 다음 단계를 포함하는 탈-분화된 T 세포를 TREG 세포로 분화하는 방법:
- [0549] IL-2 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 및 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계;
- [0550] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;
- [0551] TREG 세포를 산출하기 위해 일정 시간 동안 상기 탈-분화된 T 세포를 인큐베이션하는 단계.
- [0552] 25. 실시형태 24에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는 방법.
- [0553] 26. 실시형태 24-25 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0554] 27. 실시형태 24-26 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0555] 28. 실시형태 25에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0556] 29. 실시형태 25에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0557] 30. 실시형태 28-29 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0558] 31. 실시형태 28-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0559] 32. 다음 단계를 포함하는 탈-분화된 T 세포를 TREG 세포로 분화하는 방법:
- [0560] 탈-분화된 T 세포를 배양하는 단계로서, 여기서 상기 탈-분화된 T 세포는 IL-2 및 TGF- β 를 포함하는 배양 배지에서 대조군 T 세포 대비 적어도 10% 감소된 수준으로 RAPTOR 및 RICTOR를 발현하는, 단계;
- [0561] 항-CD3/항-CD28 코팅된 자기 비드를 3:1의 비율 (비드:T 세포 비율)로 첨가하는 단계;
- [0562] TREG 세포를 산출하기 위해 상기 탈-분화된 T 세포를 일정 시간 동안 인큐베이션하는 단계.
- [0563] 33. 실시형태 32에 있어서, 상기 배양 배지는 페메트렉시드를 추가로 포함하는 방법.
- [0564] 34. 실시형태 32-33 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.

- [0565] 35. 실시형태 32-34 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0566] 36. 실시형태 33에 있어서, 상기 페메트렉시드는 최대 100 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0567] 37. 실시형태 33에 있어서, 상기 페메트렉시드는 약 10 nM의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법
- [0568] 38. 실시형태 36-37 중 어느 하나에 있어서, 상기 IL-2는 약 100 IU/ml의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0569] 39. 실시형태 36-38 중 어느 하나에 있어서, 상기 TGF- β 는 약 10 ng/mL의 농도로 상기 배양 배지에 존재하는 방법.
- [0570] 40. 실시형태 24-39 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 배지는 5% AB 혈청이 보충된 X-Vivo 20 배지인 방법.
- [0571] 41. 실시형태 24-40 중 어느 하나에 있어서, 상기 일정 시간이 3일 내지 40일인 방법.
- [0572] 42. 실시형태 1-41 중 어느 하나에 있어서, 상기 탈-분화된 T 세포는 T 세포의 대조군 모집단 대비 RAPTOR 및 RICTOR의 감소된 발현을 갖는 방법.
- [0573] 43. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 TREG 세포.
- [0574] 44. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포로서, 여기서 후속 T 세포 배양을 위해 혈장교환에 의해 수집된 림프구는 정상 상태에서 또는 혈청, 무-세포 형태의 TNF- α , 가장 현저하기로는 재조합 수용체 분자 에타너셉트 또는 단일클론 항체 아달리무맙을 중화하는 관점에서 상대적으로 선택적인 항-TNF- α 치료제로 대상체 치료 후 획득되는, TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포.
- [0575] 45. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포로서, 여기서 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포 또는 그 집단은 대조군 Th1/Tc1 세포에 대한 다음 분자: CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1, OX40 및 이들의 조합 중 적어도 하나의 유세포분석법에 의해 증가된 발현을 갖는, TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포.
- [0576] 46. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포로서, 여기서 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포 또는 그의 모집단은 IFN- γ 및 TNF- α 를 포함한 대조군 Th1/Tc1 세포와 비교하여 염증성 사이토카인의 감소된 분비를 갖는, TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포.
- [0577] 47. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포로서, 여기서 상기 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포 또는 그의 모집단은 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 T 세포 운명 전사 인자의 변경된 발현, 가장 현저하게는 TBET의 감소 및 FOXP3의 증가를 갖는, TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포.
- [0578] 48. 실시형태 1-22 및 24-42 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포로서, 여기서 상기 TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포 또는 그의 모집단은, Th2 사이토카인 IL-4의 증가된 분비; 및 Th2 전사 인자 GATA3의 증가된 발현을 포함하여, 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 추가적인 표현형 형질을 갖는, TREG 세포 또는 하이브리드 TREG/Th2 세포.
- [0579] 49. GATA3를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 적어도 5%를 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0580] 50. FoxP3를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 적어도 5%를 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0581] 51. CD73을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 적어도 10%를 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0582] 52. CD103을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 적어도 10%를 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0583] 53. CD150을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포의 적어도 20%를 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0584] 54. 3:1의 비드:T 세포 비율로 항-CD3/항-CD28 비드와 공-자극 후 적어도 5 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-4를 발현하는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0585] 55. 3:1의 비드:T 세포 비율로 항-CD3/항-CD28 비드와 공-자극 후 적어도 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-2를

발현하는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.

- [0586] 56. 3:1의 비드:T 세포 비율로 항-CD3/항-CD28 비드와 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IFN- γ 또는 GM-CSF를 발현하는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0587] 57. 3:1의 비드:T 세포 비율로 항-CD3/항-CD28 비드와 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 TNF- α 또는 IL-17F를 발현하는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단.
- [0588] 58. 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포의 모집단:
- [0589] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 측정된 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1, OXO40 및 이들의 조합 중 하나 이상의 적어도 10% 증가된 발현;
- [0590] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 IFN- γ 의 적어도 10% 감소된 분비;
- [0591] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TNF- α 의 적어도 10% 감소된 분비;
- [0592] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TBET의 적어도 10% 감소된 발현;
- [0593] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 FOXP3의 적어도 10% 증가된 발현;
- [0594] 유세포분석법에 의해 측정된 GATA3를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 적어도 5%;
- [0595] 유세포분석법에 의해 측정된 FOXP3를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 적어도 5%;
- [0596] 유세포분석법에 의해 측정된 CD73을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 적어도 5%;
- [0597] 유세포분석법에 의해 측정된 CD103을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 적어도 5%;
- [0598] 유세포분석법에 의해 측정된 FOXP3 및 GATA3 둘 모두를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 세포 적어도 5%;
- [0599] 유세포분석법에 의해 측정된 CD150을 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포 적어도 20%;
- [0600] T_{REG} 또는 T_{REG}/Th2 세포의 모집단이 생성된 T 세포의 특징적인 T 세포의 모집단 대비 GATA3, FoxP3, CD73, CD103 및 CD150 중 하나 이상의 발현에서 적어도 50% 증가;
- [0601] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 5 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-4 분비;
- [0602] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-2 분비;
- [0603] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IFN- γ 분비;
- [0604] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 GM-CSF 분비;
- [0605] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 TNF- α 분비;
- [0606] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IL-17 분비; 및
- [0607] 이들의 조합.
- [0608] 59. 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 TREG 또는 TREG/Th2 세포:
- [0609] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 유세포분석법에 의해 측정된 CD25, CD27, 2B4, BTLA, CTLA4, TIGIT, TIM3, ICOS, LAIR1, OXO40 및 이들의 조합 중 하나 이상의 적어도 10% 증가된 발현;
- [0610] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 IFN- γ 의 적어도 10% 감소된 분비;
- [0611] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TNF- α 의 적어도 10% 감소된 분비;
- [0612] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 TBET의 적어도 10% 감소된 발현;

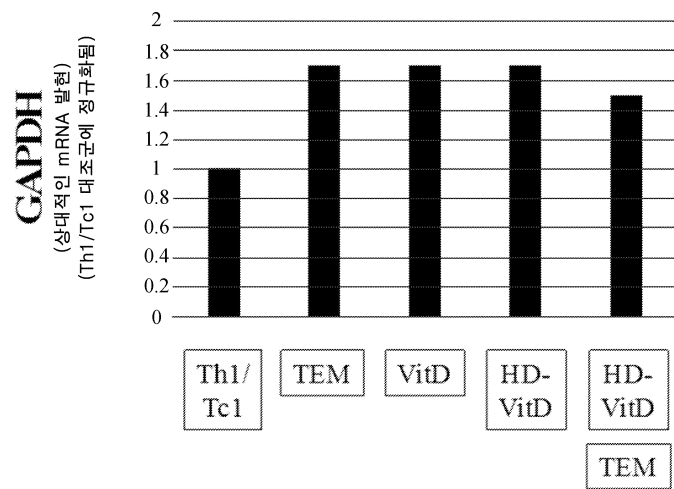
- [0613] 대조군 Th1/Tc1 세포 대비 FOXP3의 적어도 10% 증가된 발현;
- [0614] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 5 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-4 분비;
- [0615] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 적어도 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일의 IL-2 분비;
- [0616] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IFN- γ 분비;
- [0617] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 100 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 GM-CSF 분비;
- [0618] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 TNF- α 분비;
- [0619] 3:1의 비드:T 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 비드로 공-자극 후 10 pg/mL/1 x 10⁶ 세포/일 미만의 IL-17 분비;
- [0620] GATA3, FOXP3, CD73 및 CD103 발현; 및
- [0621] 이들의 조합.
- [0622] 60. 제1항 내지 제41항 중 어느 한항에 있어서, 탈-분화된 T 세포는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 방법:
- [0623] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0624] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 Nanog, KLF4, KLF10 및 CD127 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0625] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 T-Bet 및 STAT1 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0626] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단의 약 20% 이내 HIF-1- α 발현;
- [0627] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 p62 발현에서, 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0628] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준;
- [0629] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 T 세포의 대조군 모집단 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준; 및
- [0630] 이들의 조합.
- [0631] 61. 제1항 내지 제41항 중 어느한항에 있어서, 탈-분화된 T 세포가 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 방법:
- [0632] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비 그랜자임 B, IL-10 및 IFN- γ 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0633] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비 Nanog, KLF4, KLF10 및 CD127 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0634] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 대비 T-Bet 및 STAT1 중 하나 이상에서 mRNA 발현이 적어도 10% 감소, 보다 바람직하게는 50% 감소;
- [0635] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포의 약

20% 이내 HIF-1- α 발현;

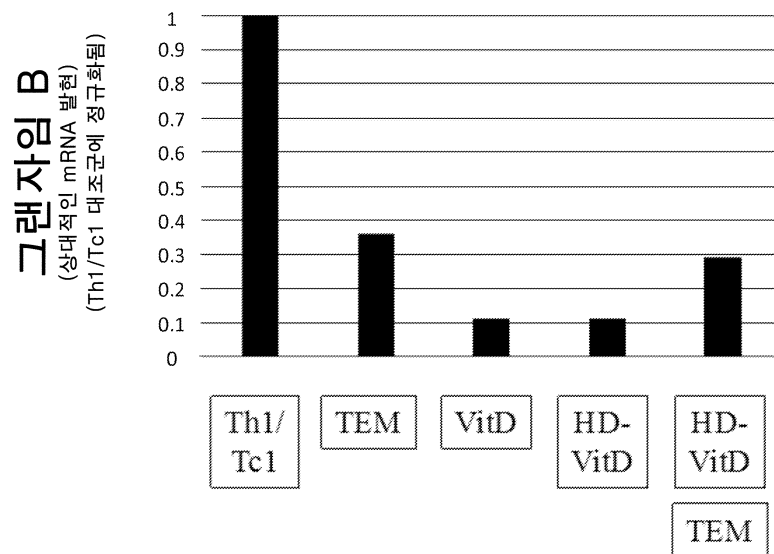
- [0636] 템시롤리무스, 비타민 D 및 IL-2 시그널링 억제제 없이 동일한 조건하에서 인큐베이션된 대조군 T 세포 모집단 대비 p62 발현에서, 적어도 10% 증가, 보다 바람직하게는 50% 증가;
- [0637] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 대조군 T 세포 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준;
- [0638] 템시롤리무스, IL-2 시그널링 억제제 및 비타민 D가 없는 세포의 배양 투입 모집단과 동일한 조건하에서 제조된 대조군 T 세포 대비 적어도 50%, 보다 바람직하게는 90% 감소된 하우스키핑 단백질에 의해 정규화된 RAPTOR 또는 RICTOR의 발현 수준; 및
- [0639] 이들의 조합.

도면

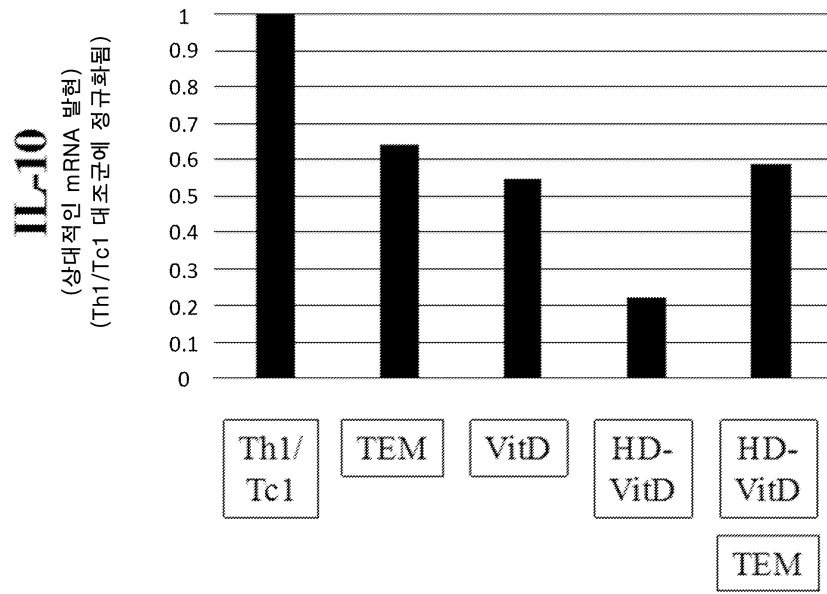
도면1a



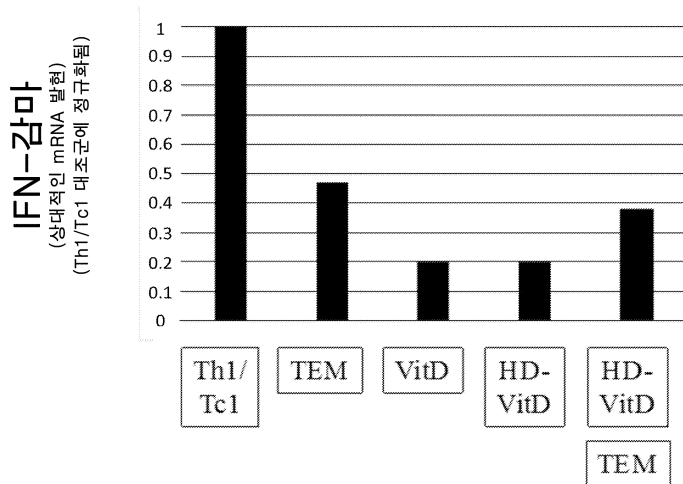
도면1b



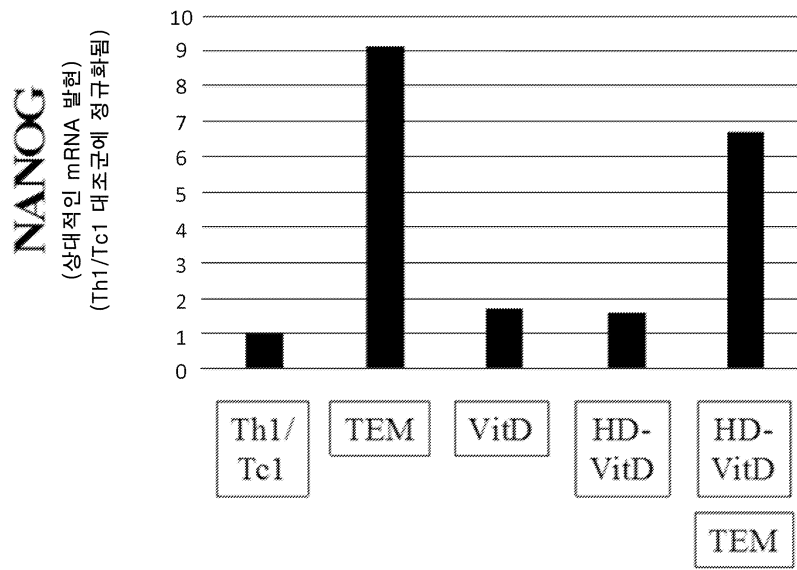
도면1c



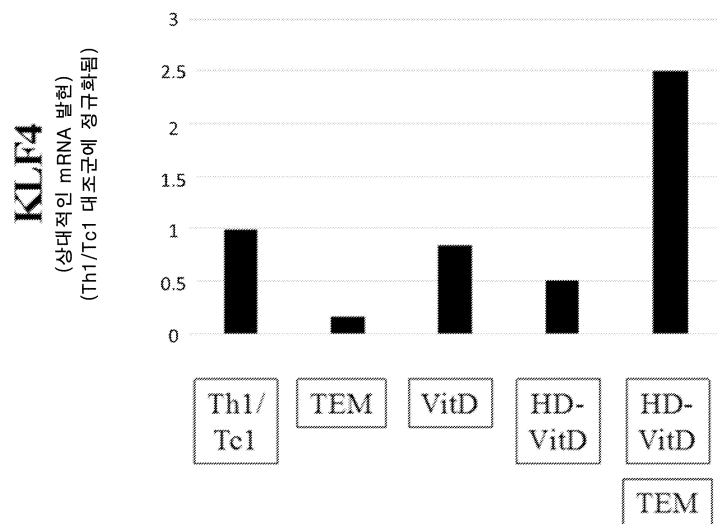
도면1d



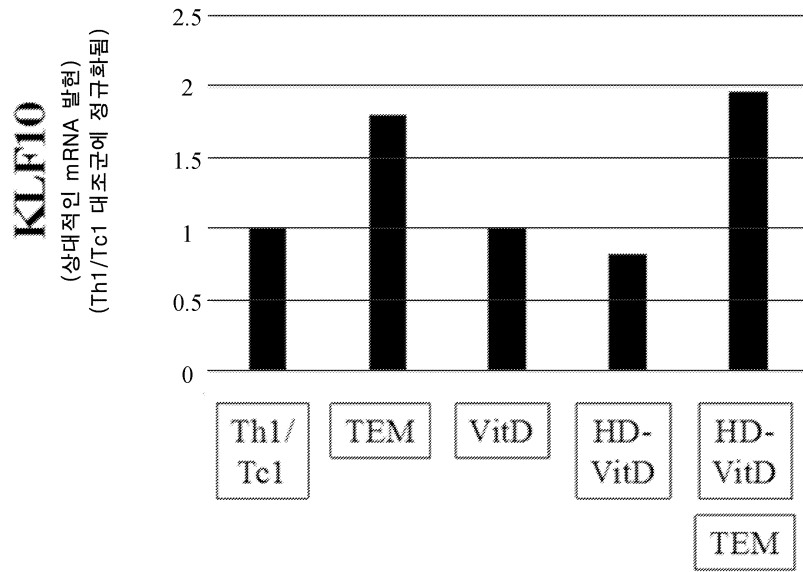
도면2a



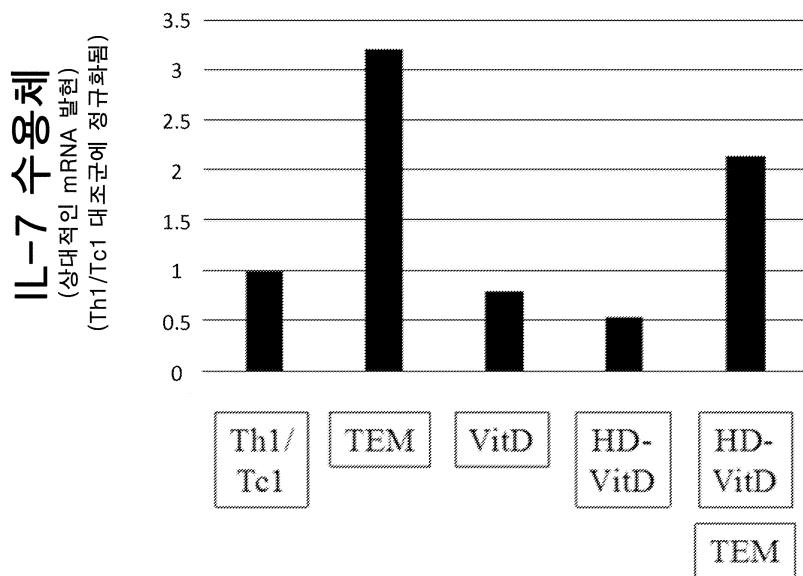
도면2b



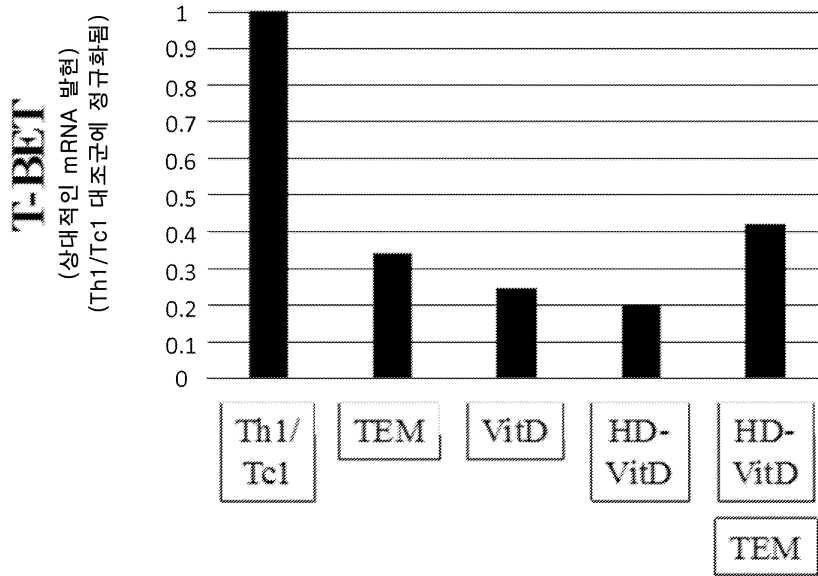
도면2c



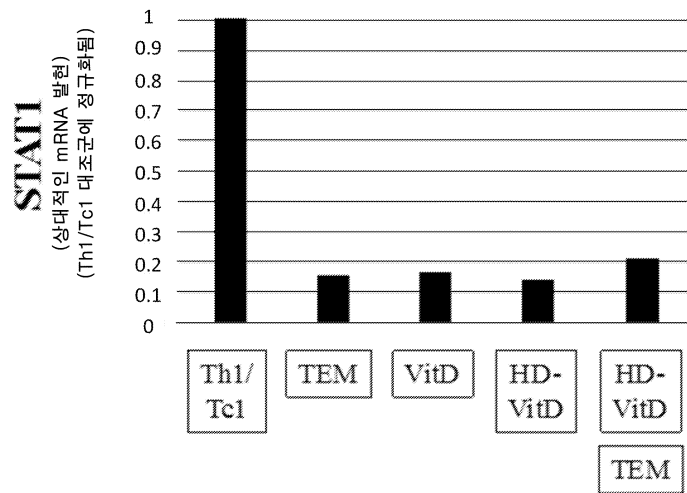
도면2d



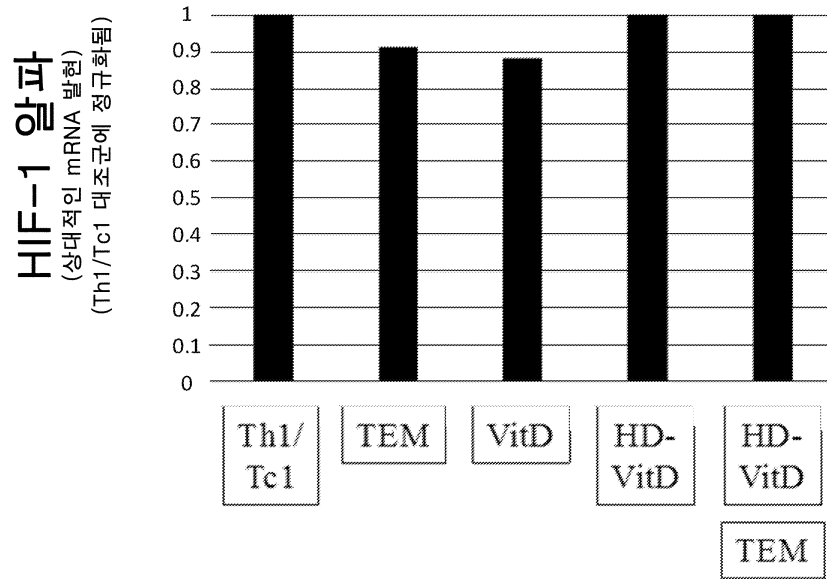
도면3a



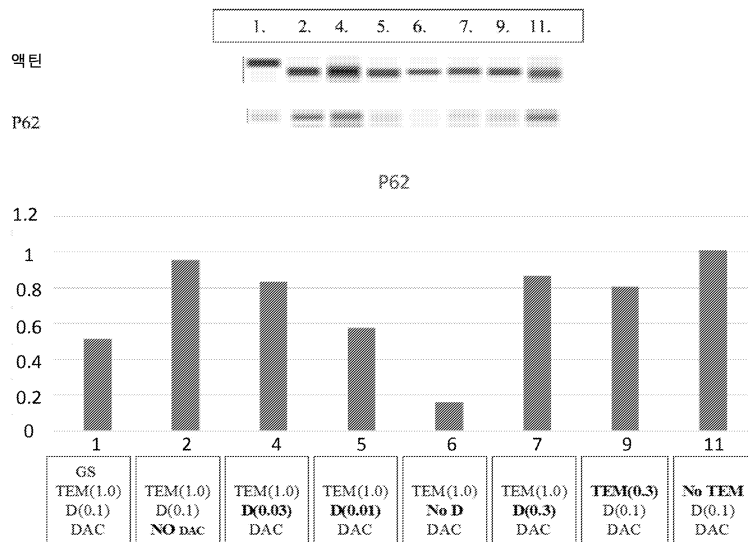
도면3b



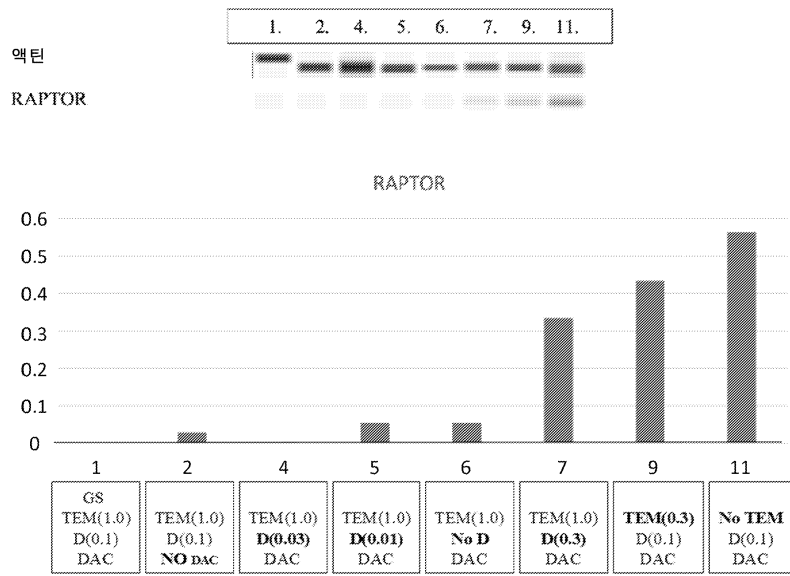
도면3c



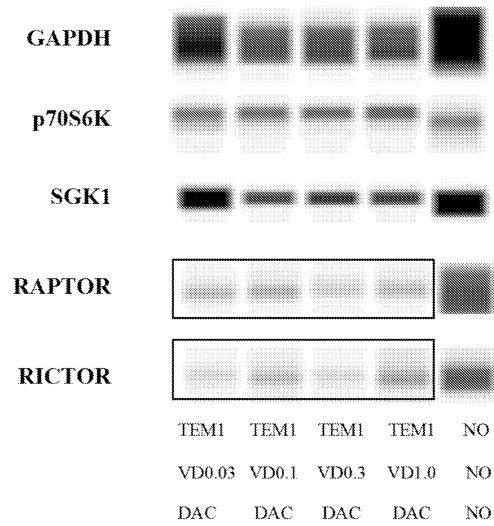
도면4



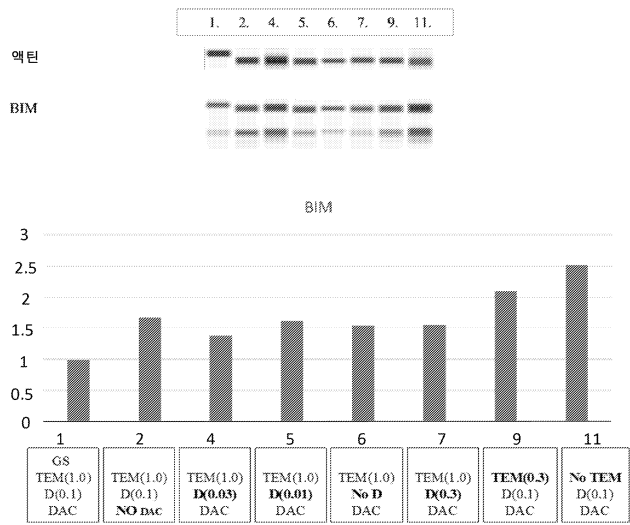
도면5



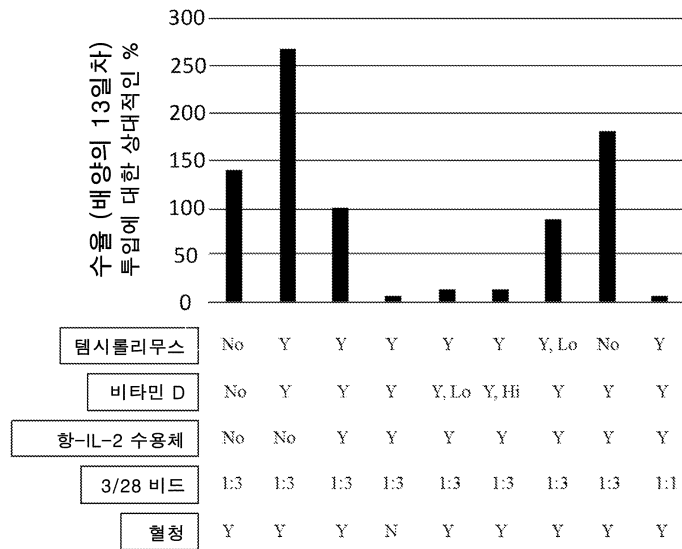
도면6



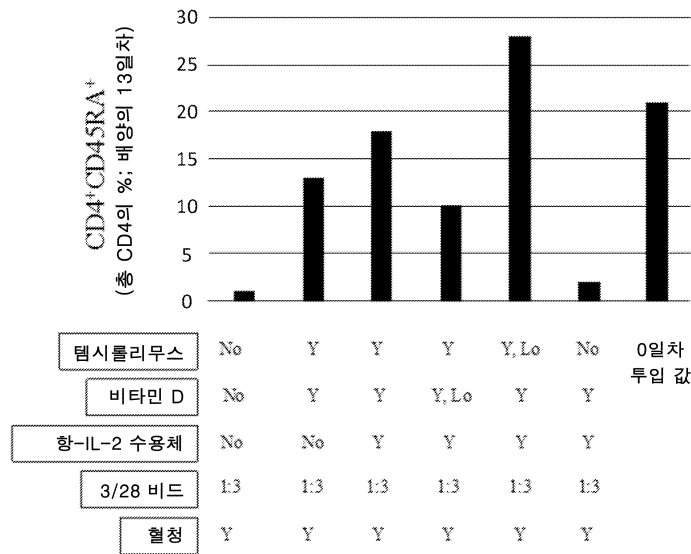
도면7



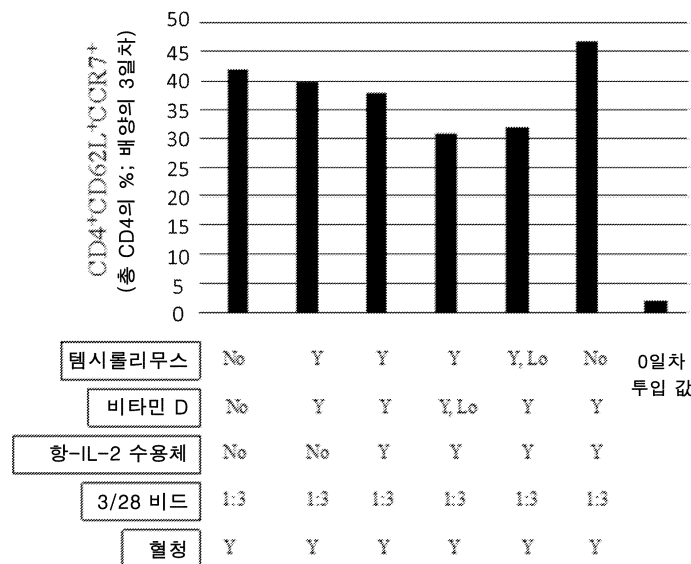
도면8



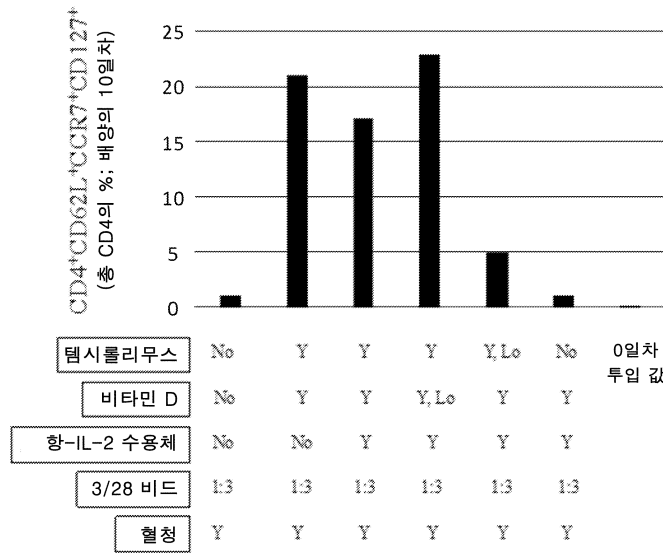
도면9a



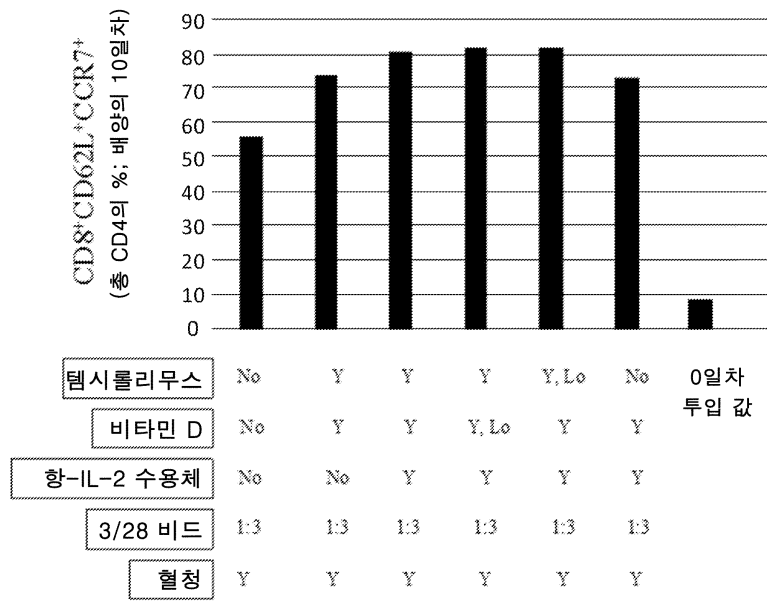
도면9b



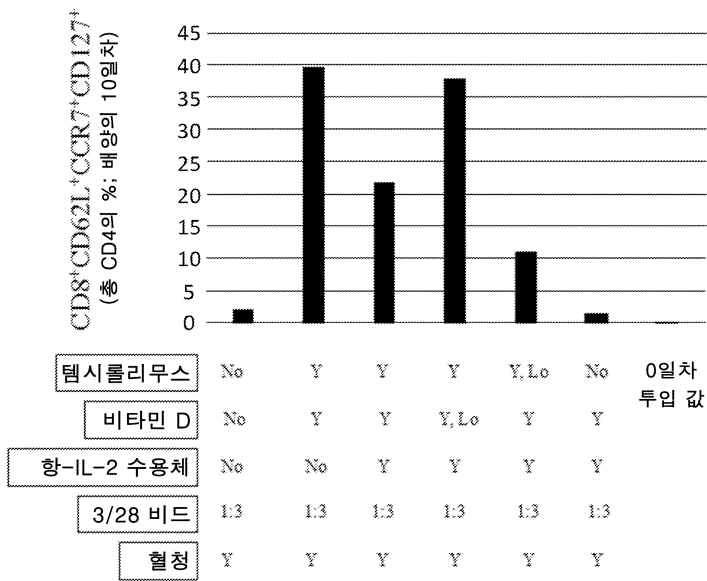
도면9c



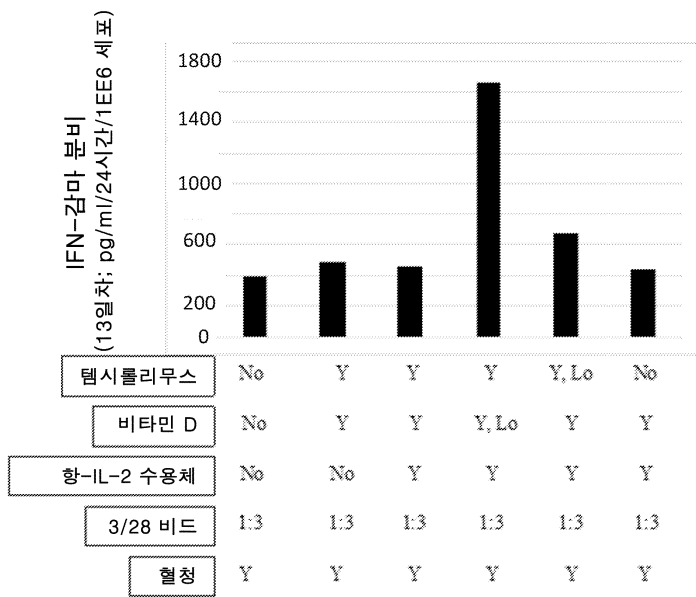
도면10a



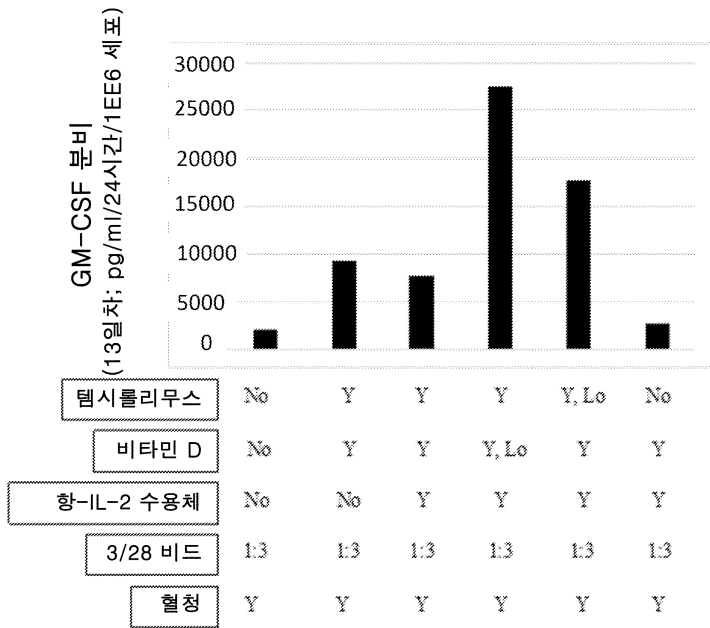
도면10b



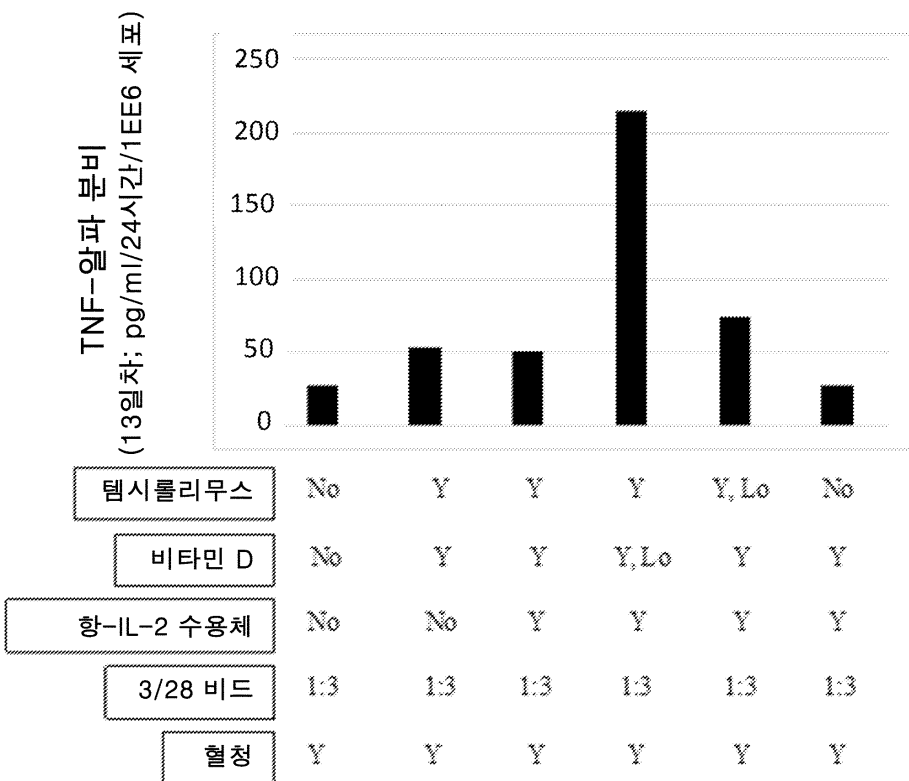
도면11a



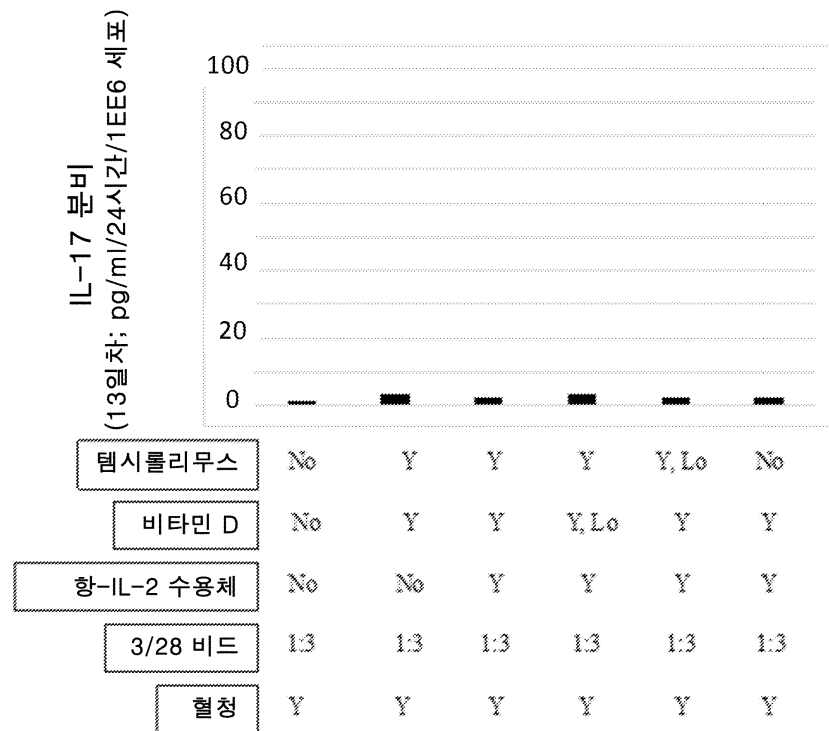
도면11b



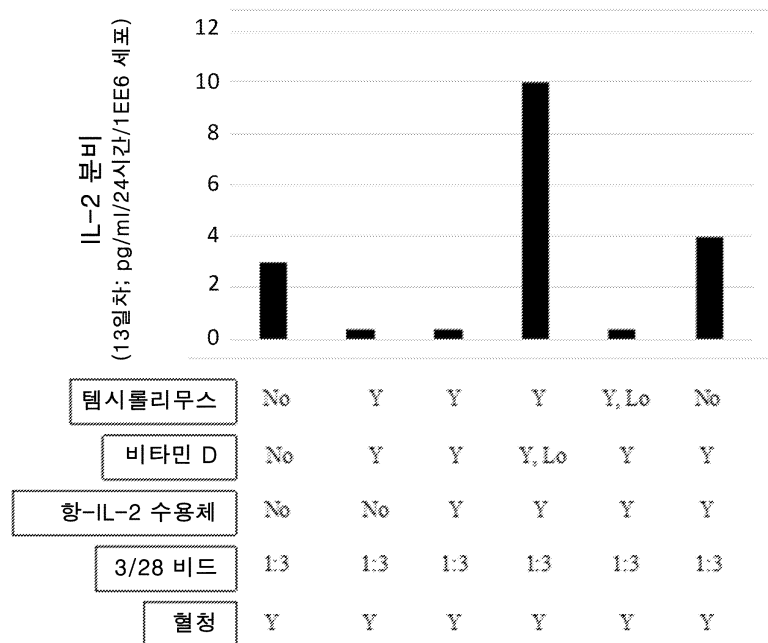
도면11c



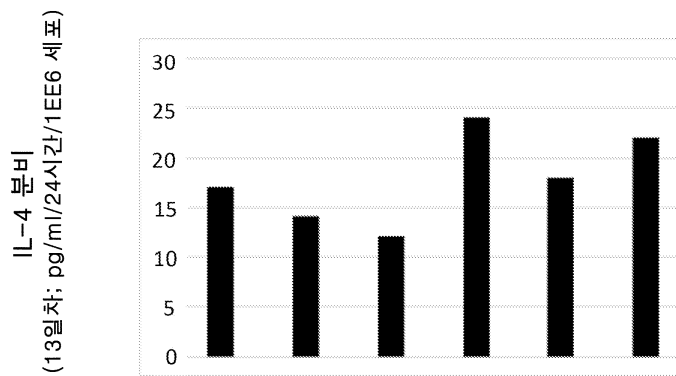
도면11d



도면12a

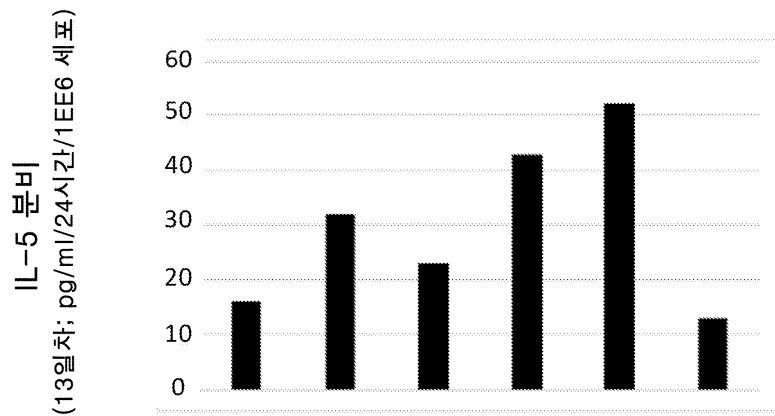


도면12b



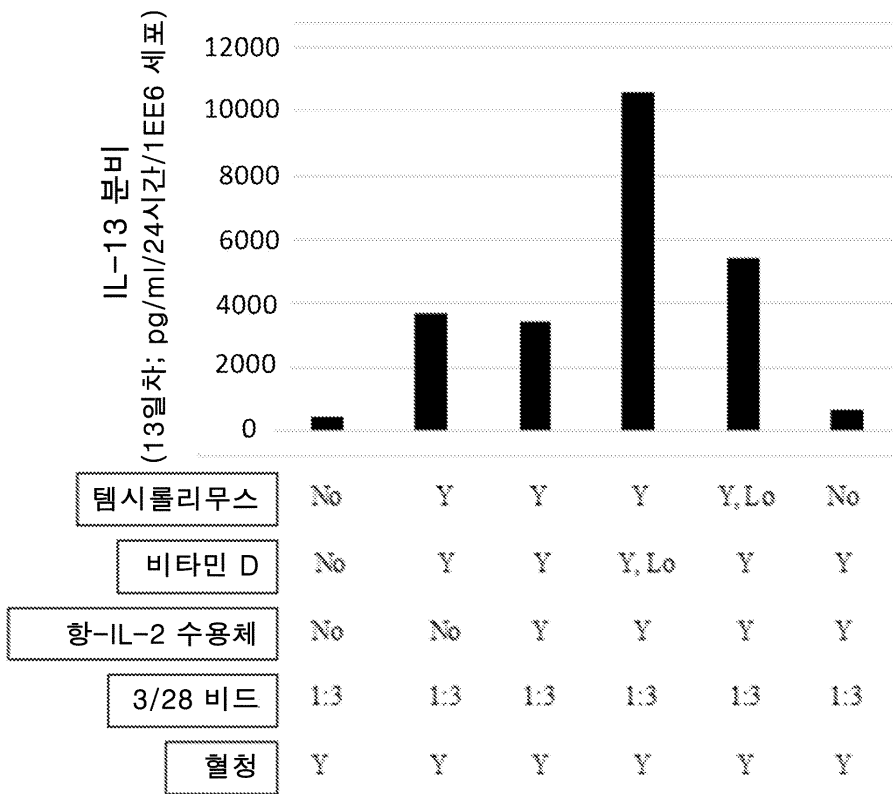
템시롤리무스	No	Y	Y	Y	Y,Lo	No
비타민 D	No	Y	Y	Y,Lo	Y	Y
항-IL-2 수용체	No	No	Y	Y	Y	Y
3/28 비드	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
혈청	Y	Y	Y	Y	Y	Y

도면12c

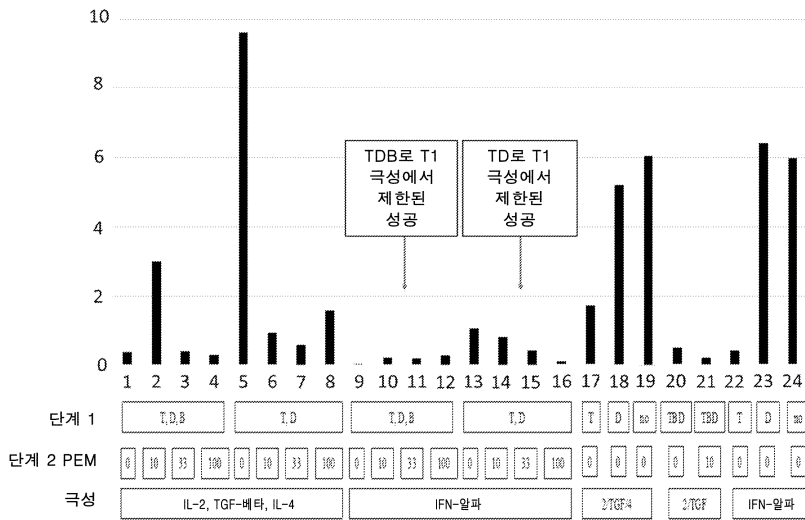


템시롤리무스	No	Y	Y	Y	Y,Lo	No
비타민 D	No	Y	Y	Y,Lo	Y	Y
항-IL-2 수용체	No	No	Y	Y	Y	Y
3/28 비드	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3	1:3
혈청	Y	Y	Y	Y	Y	Y

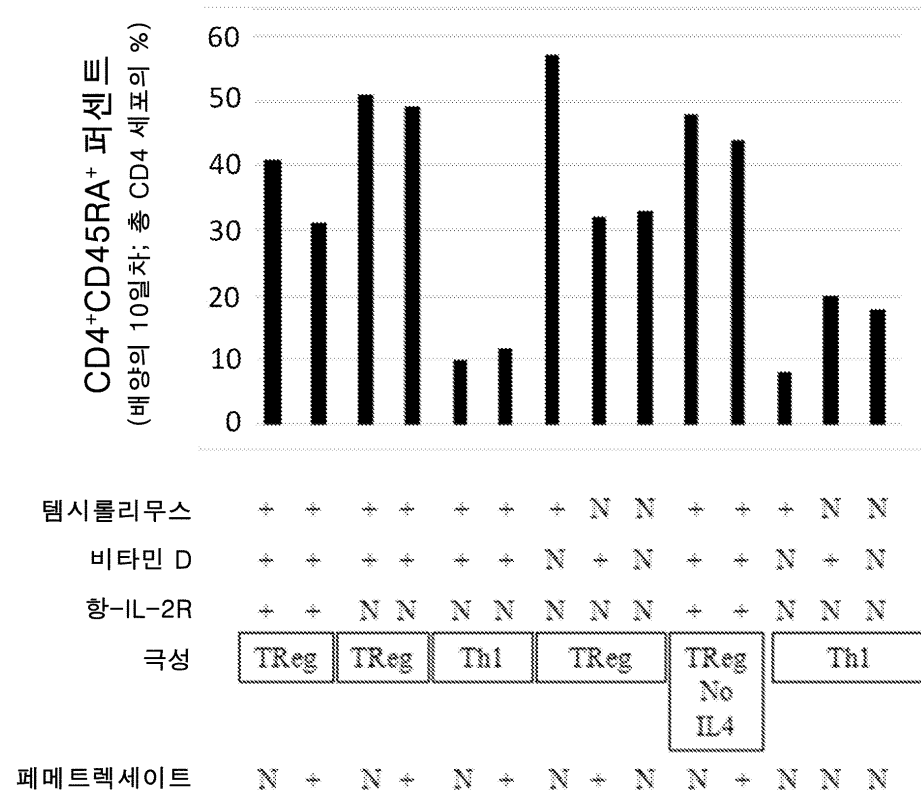
도면12d



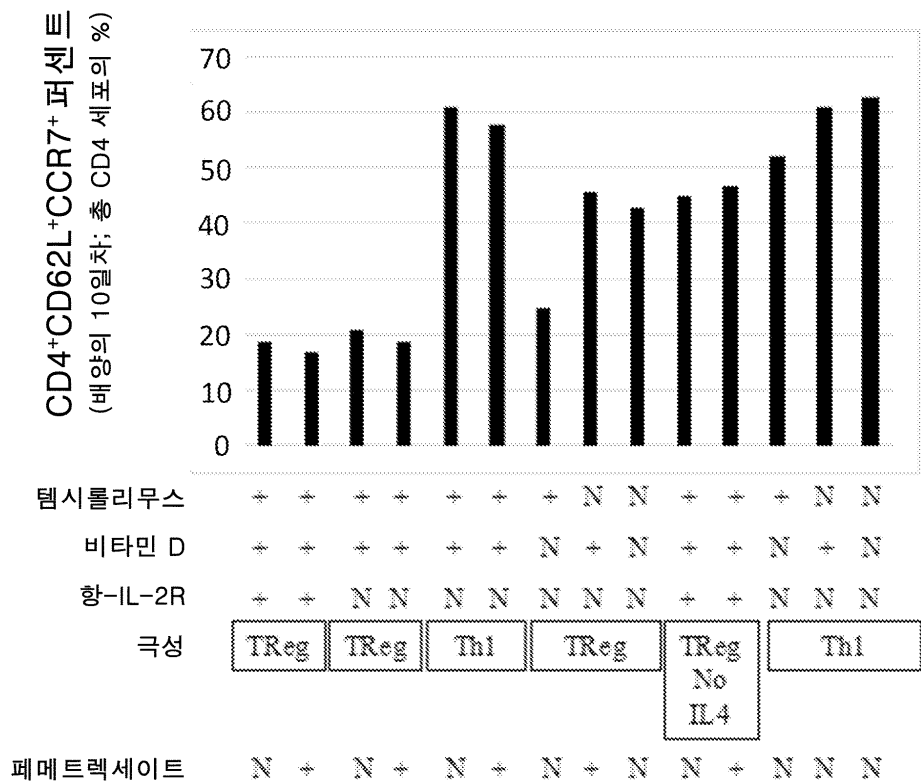
도면13



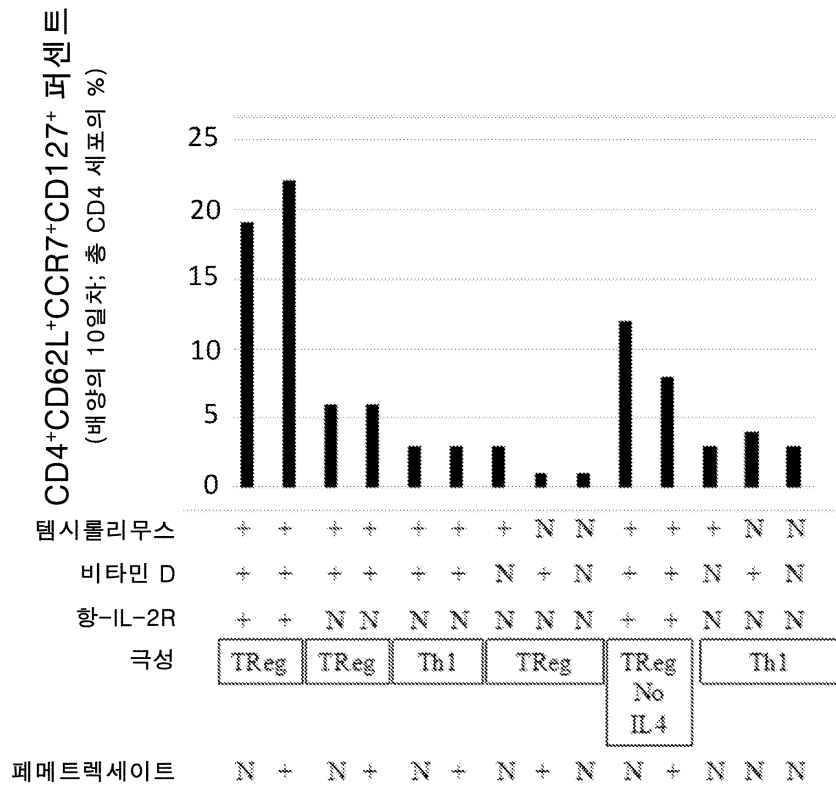
도면14a



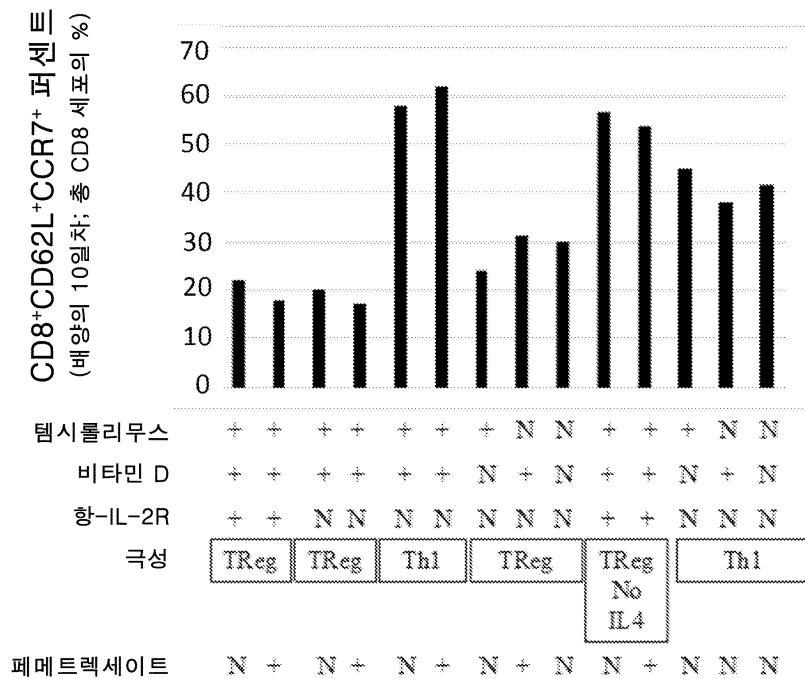
도면14b



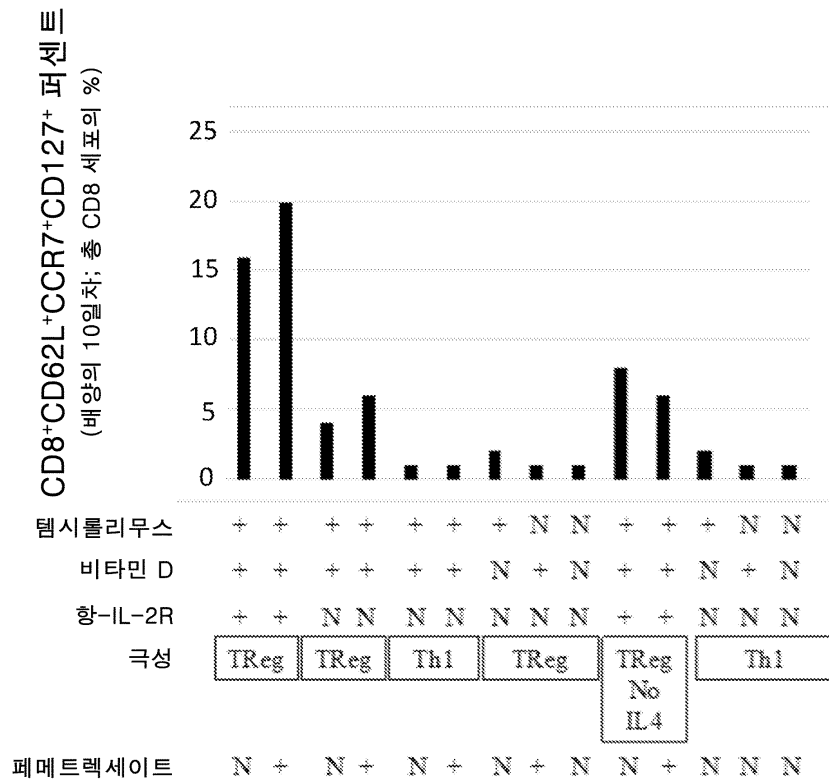
도면14c



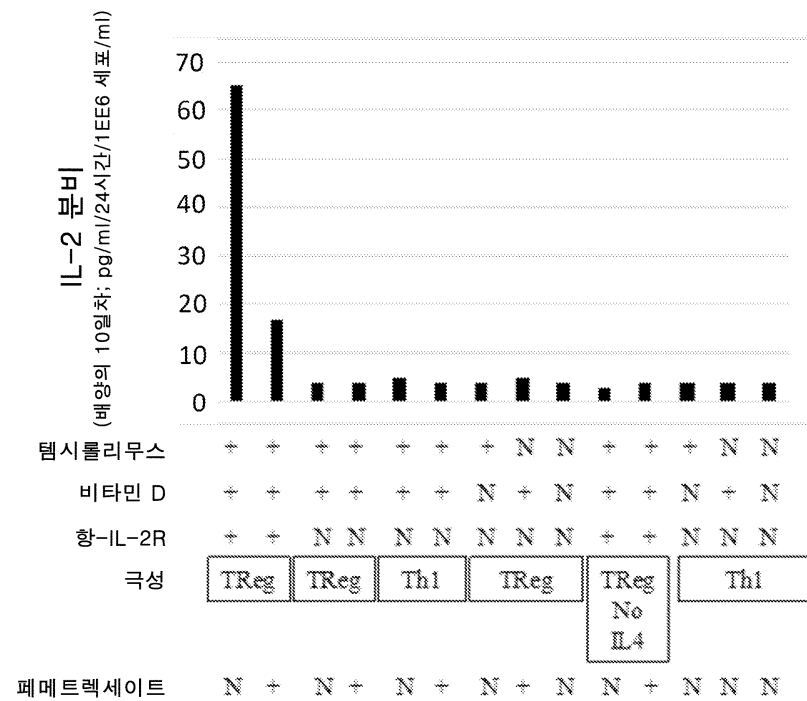
도면15a



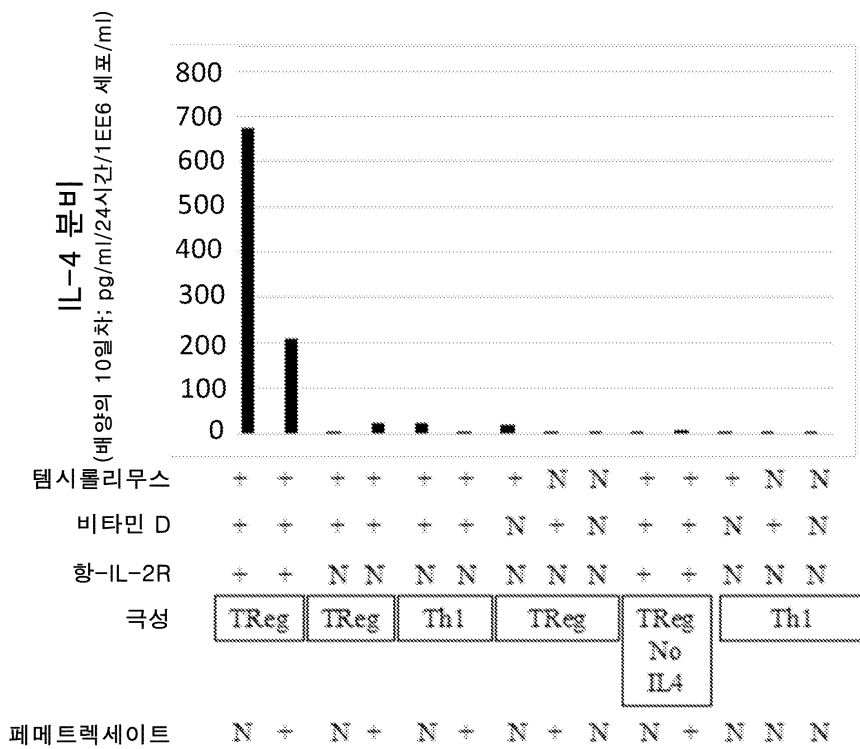
도면15b



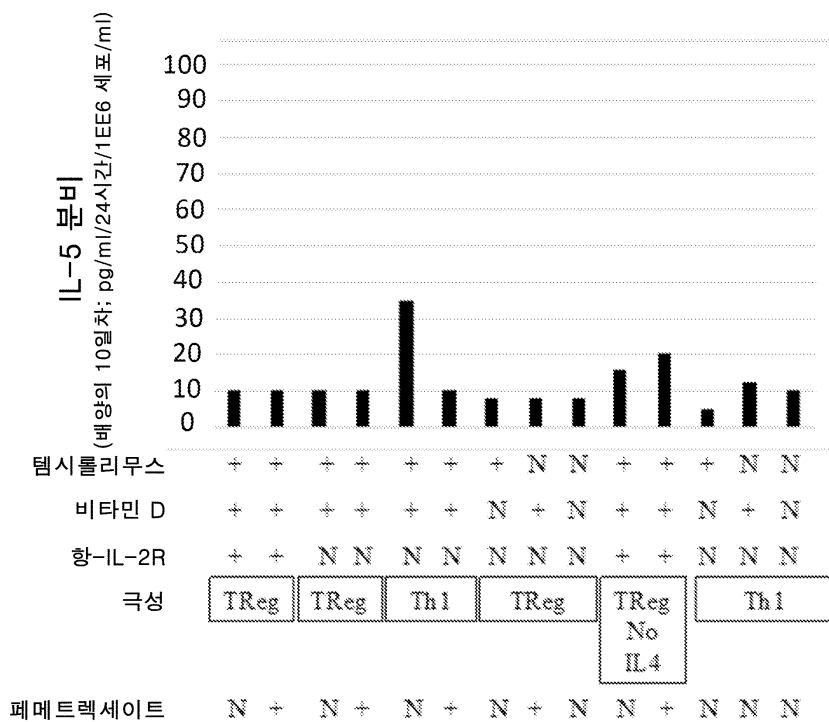
도면16a



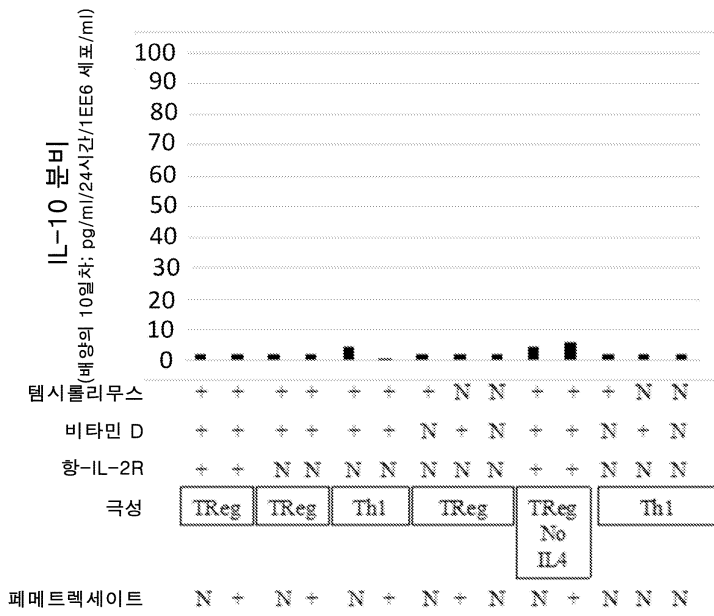
도면16b



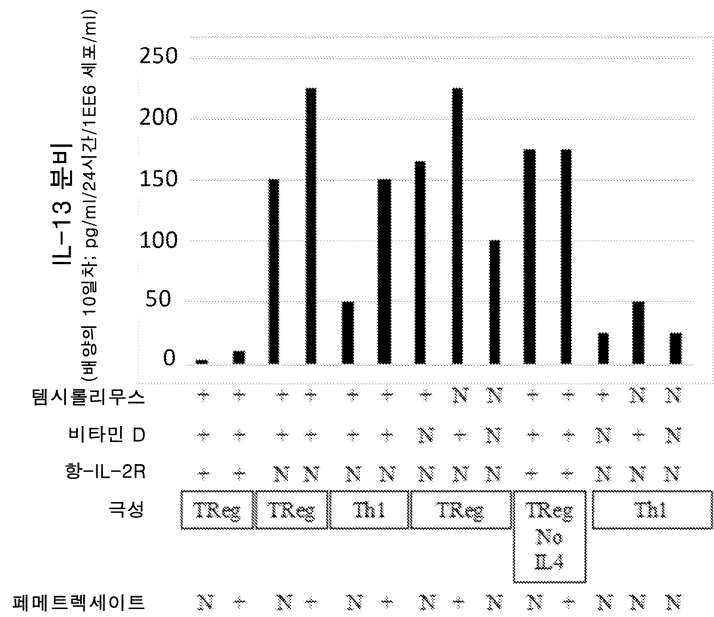
도면16c



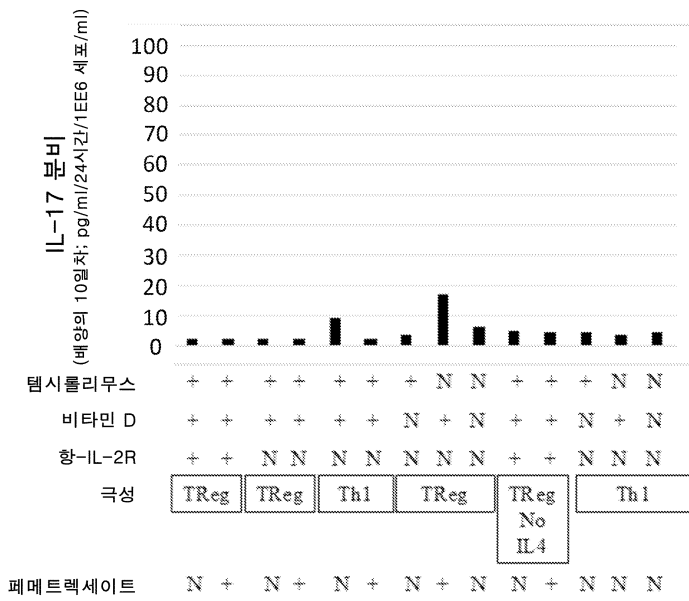
도면17a



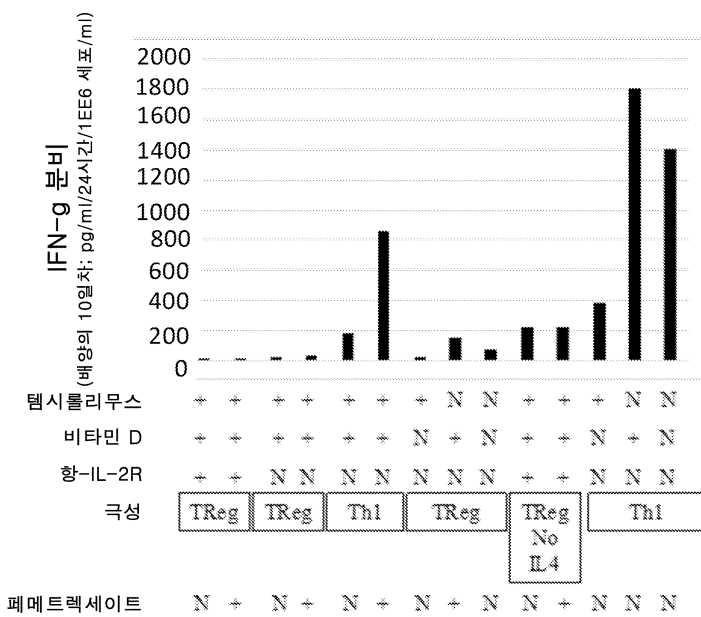
도면17b



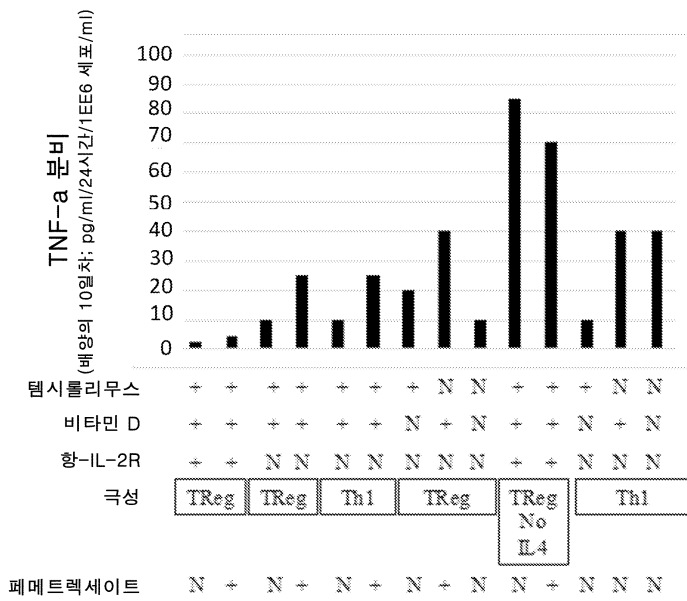
도면17c



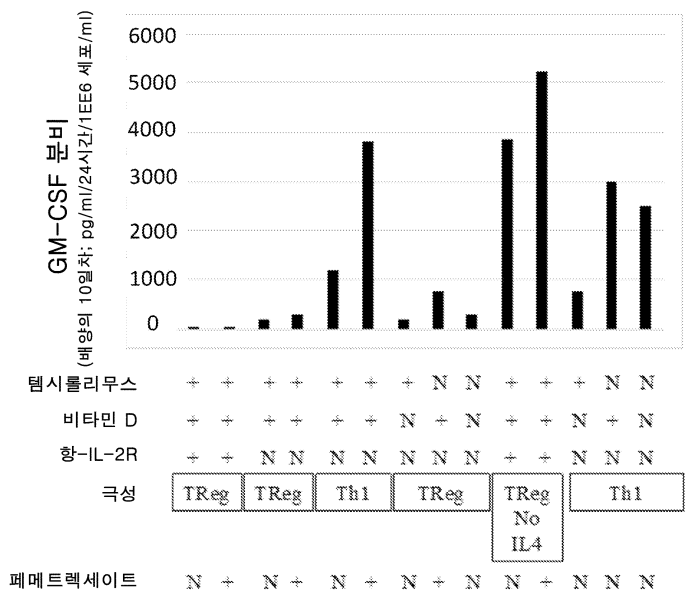
도면18a



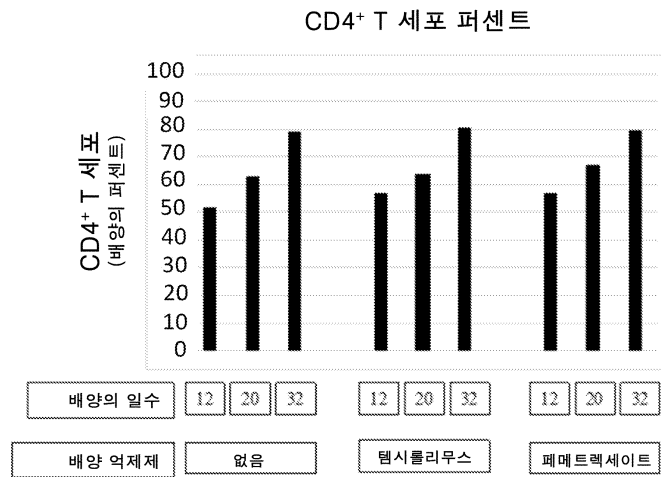
도면18b



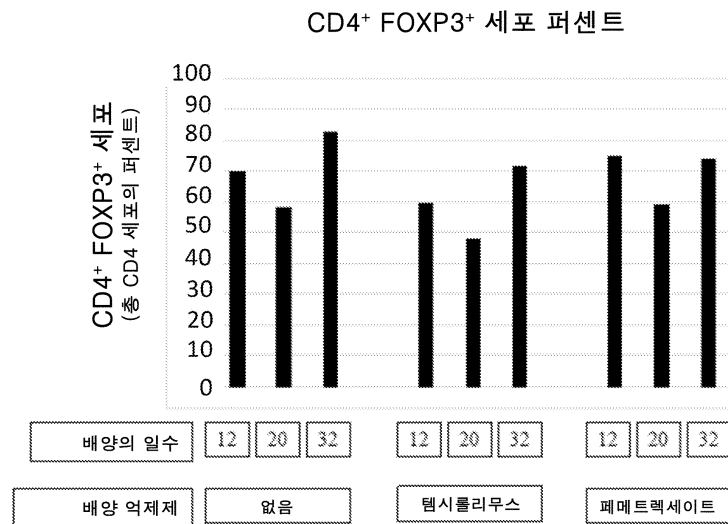
도면18c



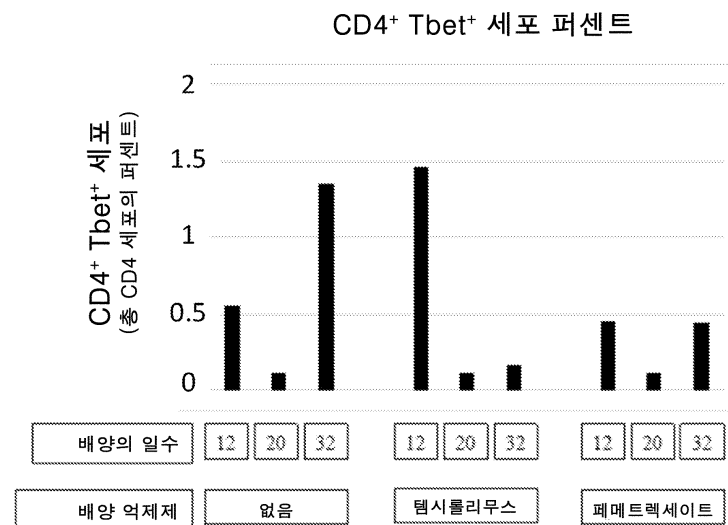
도면19a



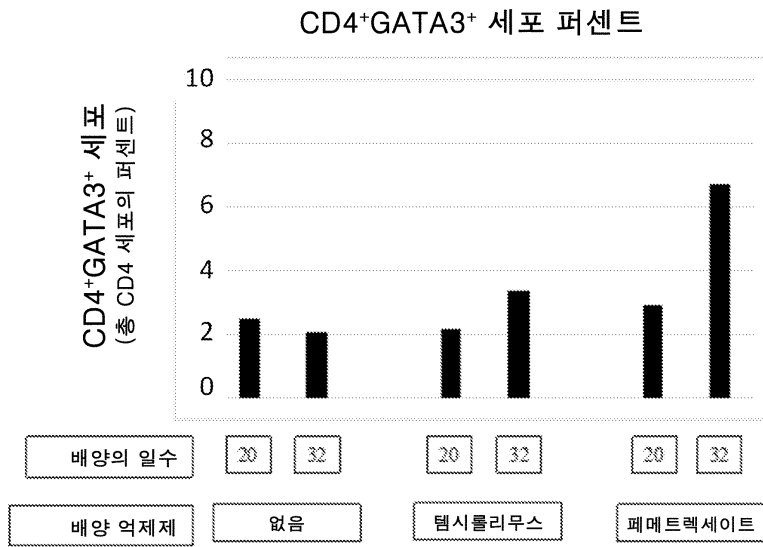
도면19b



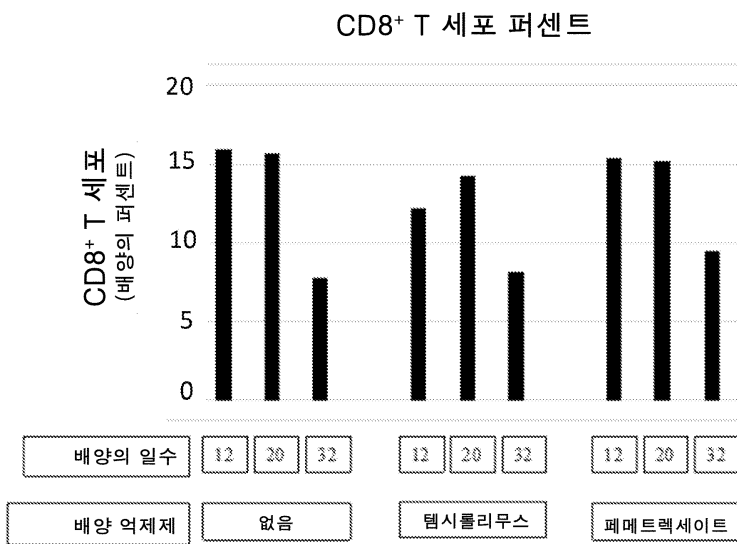
도면19c



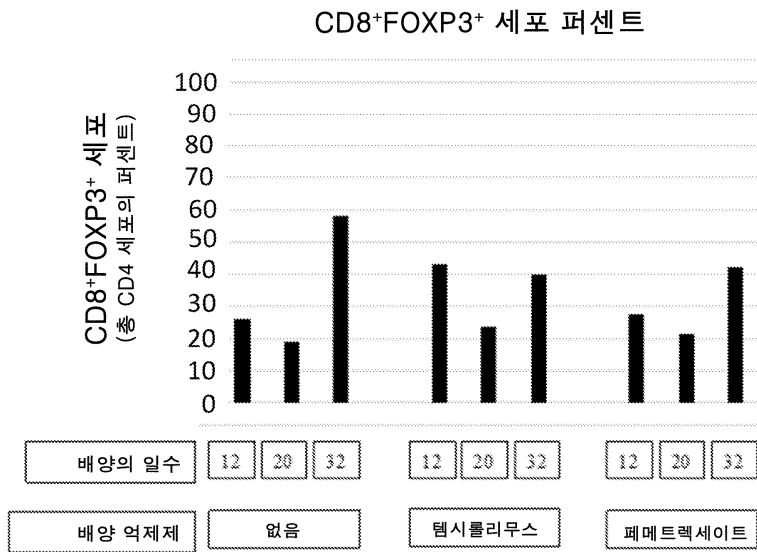
도면19d



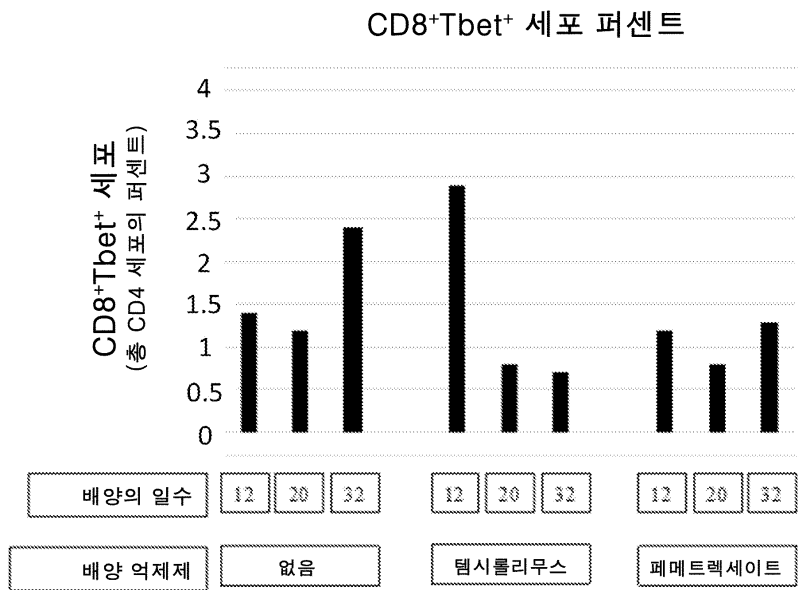
도면20a



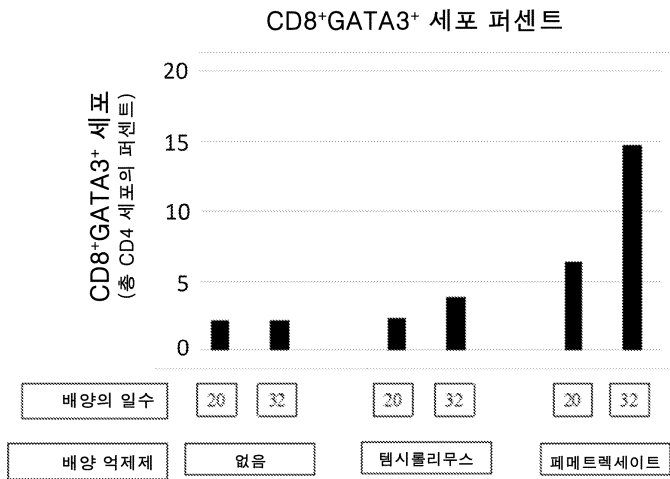
도면20b



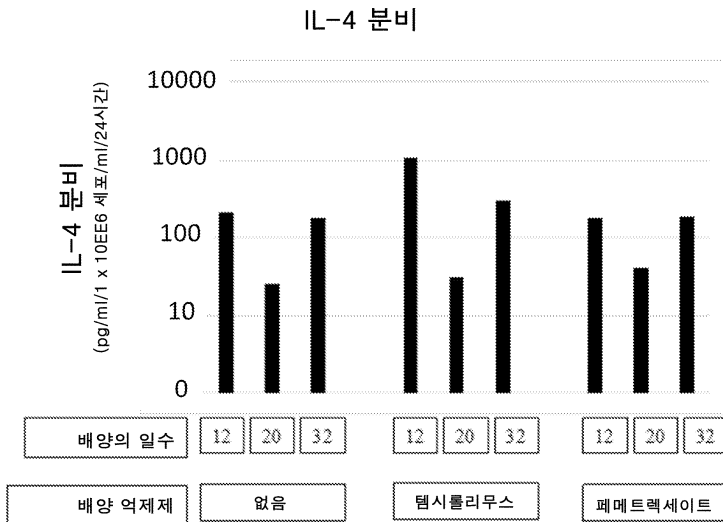
도면20c



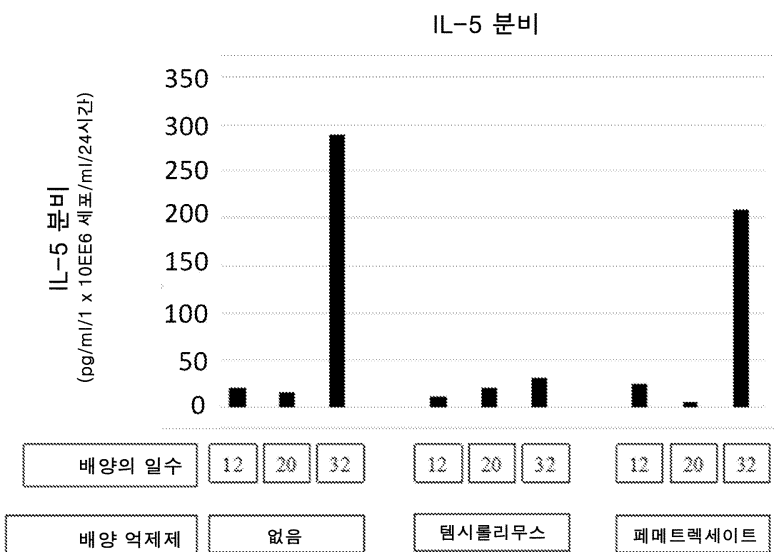
도면20d



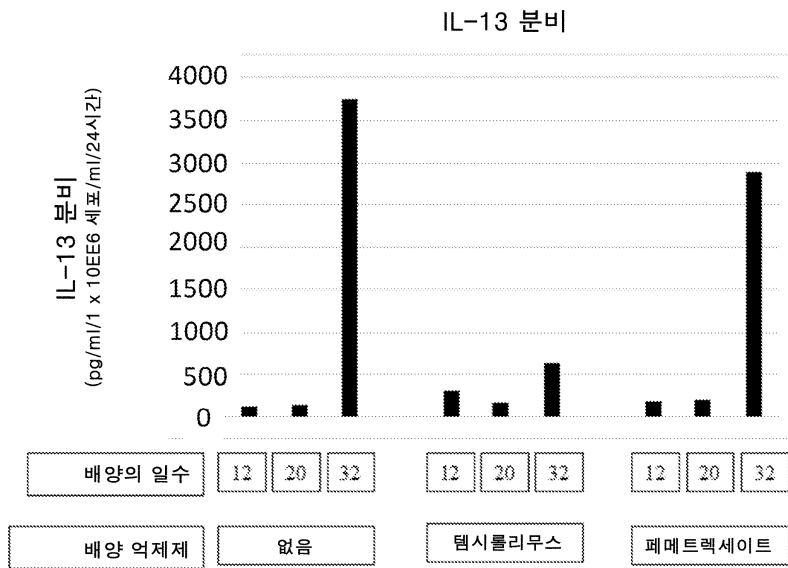
도면21a



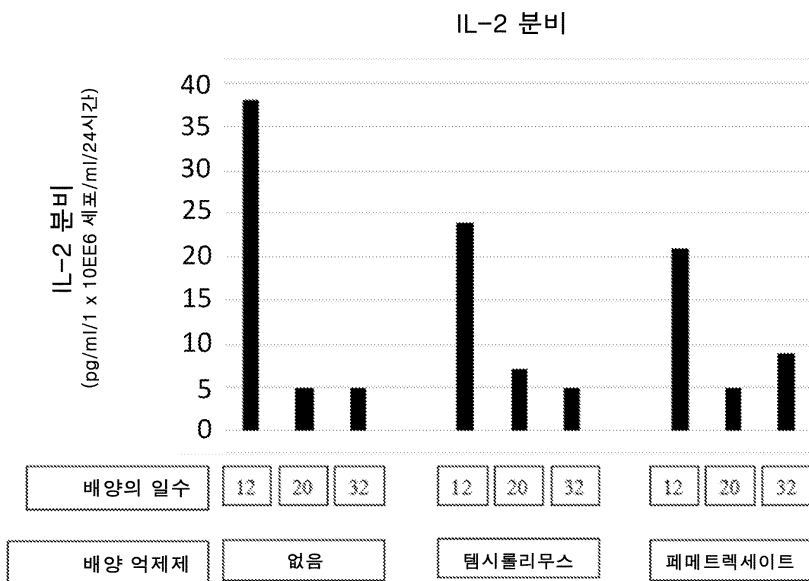
도면21b



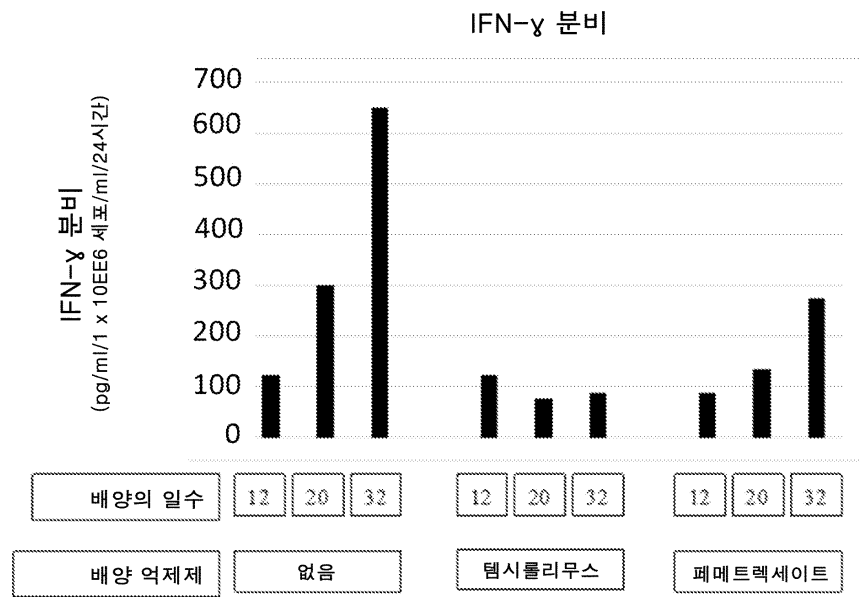
도면21c



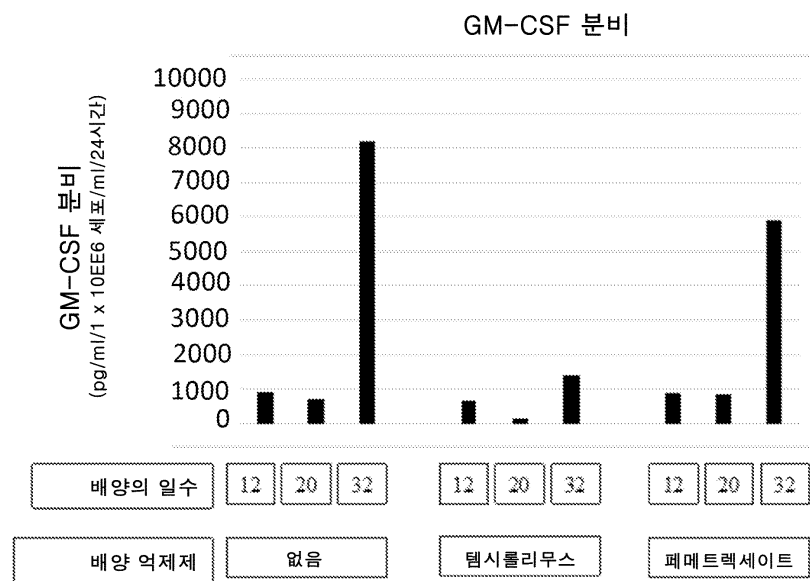
도면22a



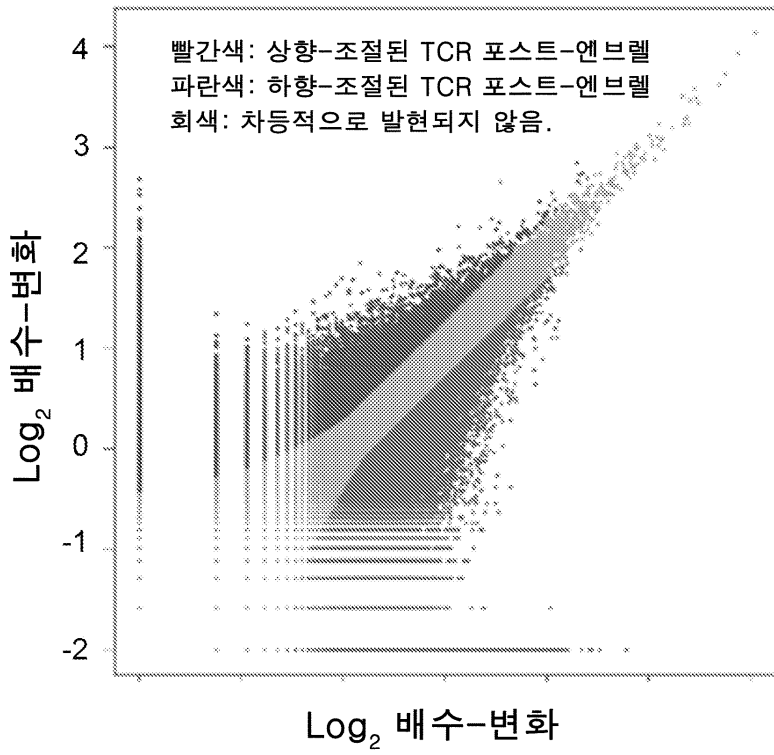
도면22b



도면22c



도면23a

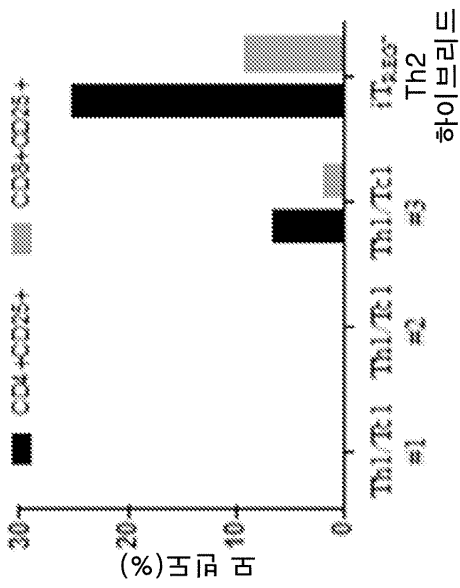
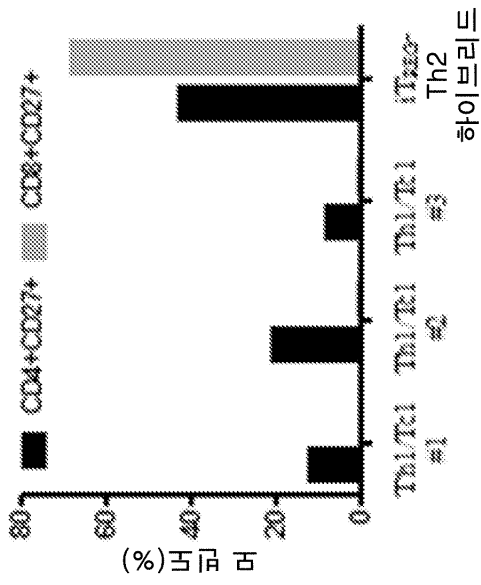


도면23b

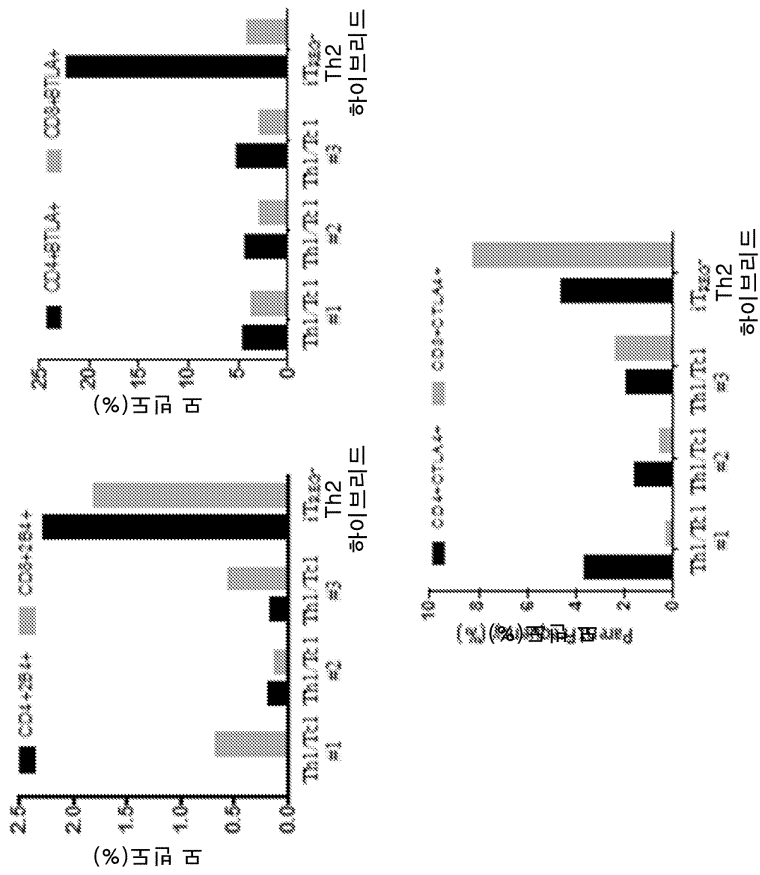
발현	발현	발현
TCR 유전자 I.D.: 상향-조절된 포스트-엔브렐	프리-엔브렐 포스트-엔브렐	프리-엔브렐 포스트-엔브렐
CASSTGDSYQYFTRBV12-3.TRB01.TRB01-2.12.18.25.26	0.01	486.910395
CASSTGDSYQYFTRBV12-3.TRB01.TRB01-1.10.14.19.20	0.01	382.293829
CASSTYEQYFTRBV12-4.TRB02-1.2.1.1.16	0.01	336.233749
CASVDLGGQPFQSTQYFTRBV12-4.TRB02.TRB02-3.11.24.34.45	0.01	247.235897

발현	발현	발현
TCR 유전자 I.D.: 하향-조절된 포스트-엔브렐	프리-엔브렐 포스트-엔브렐	프리-엔브렐 포스트-엔브렐
CASSTGDSYQYFTRBV12-4.TRB01.TRB01-2.12.18.25.26	598.697014	0.01
CASSTYEQYFTRBV12-3.TRB02-1.2.1.1.16	327.829849	0.01
CASSTGDSYQYFTRBV12-4.TRB01.TRB01-1.10.14.19.20	273.227753	0.01
CASVDLGGQPFQSTQYFTRBV12-4.TRB02.TRB02-1.10.14.19.20	259.258441	0.01

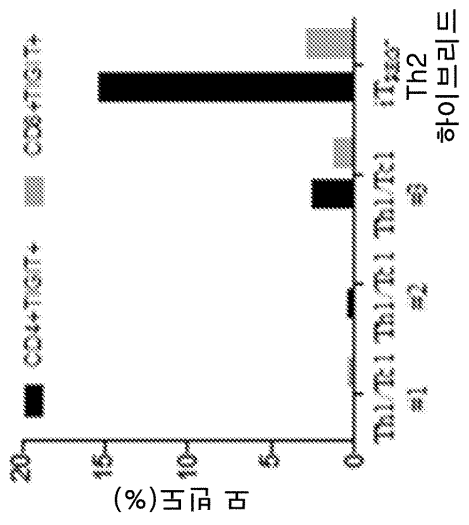
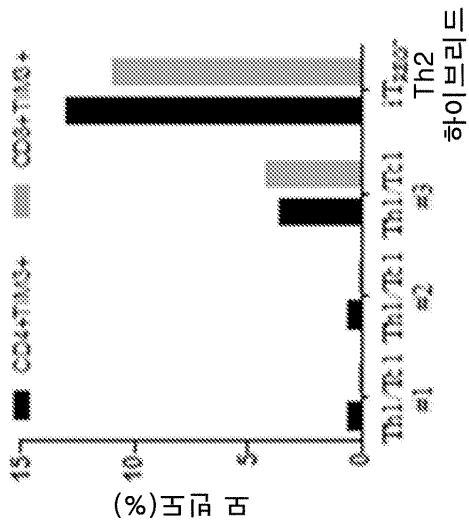
도면24a



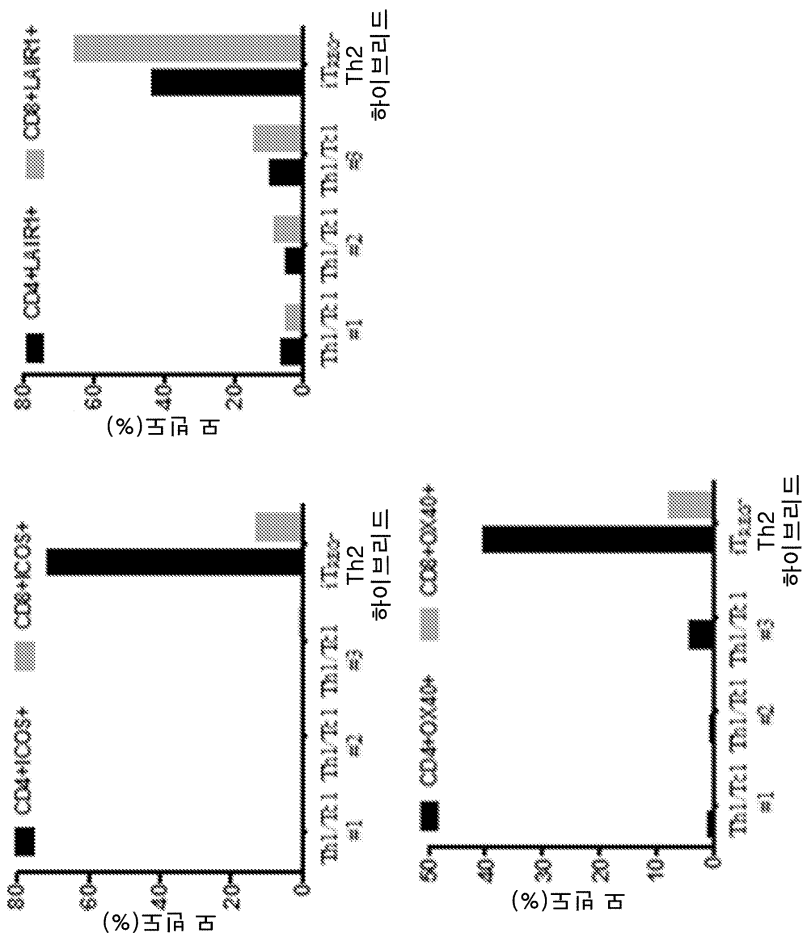
도면24b



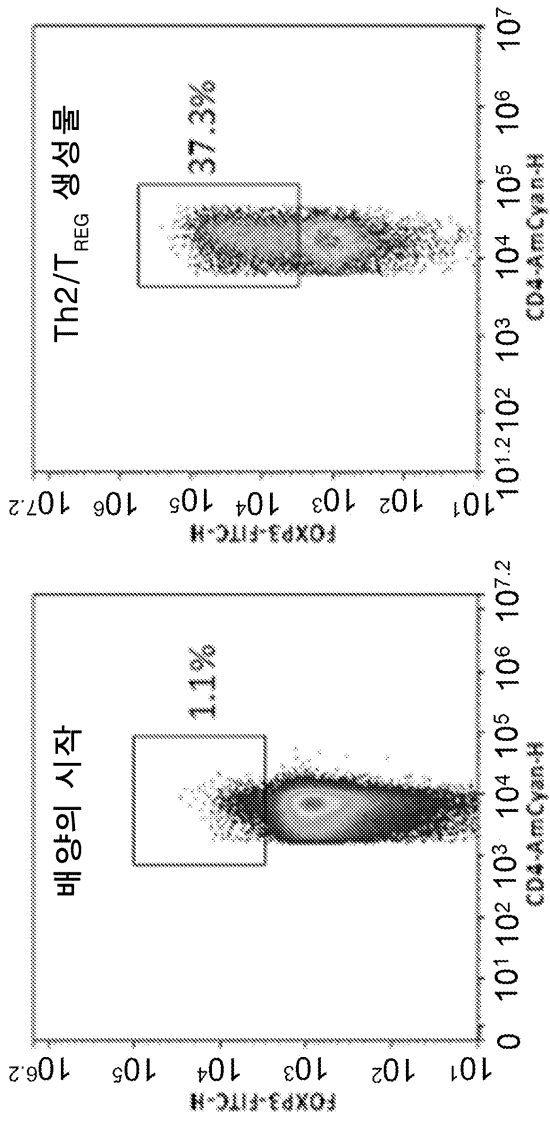
도면25a



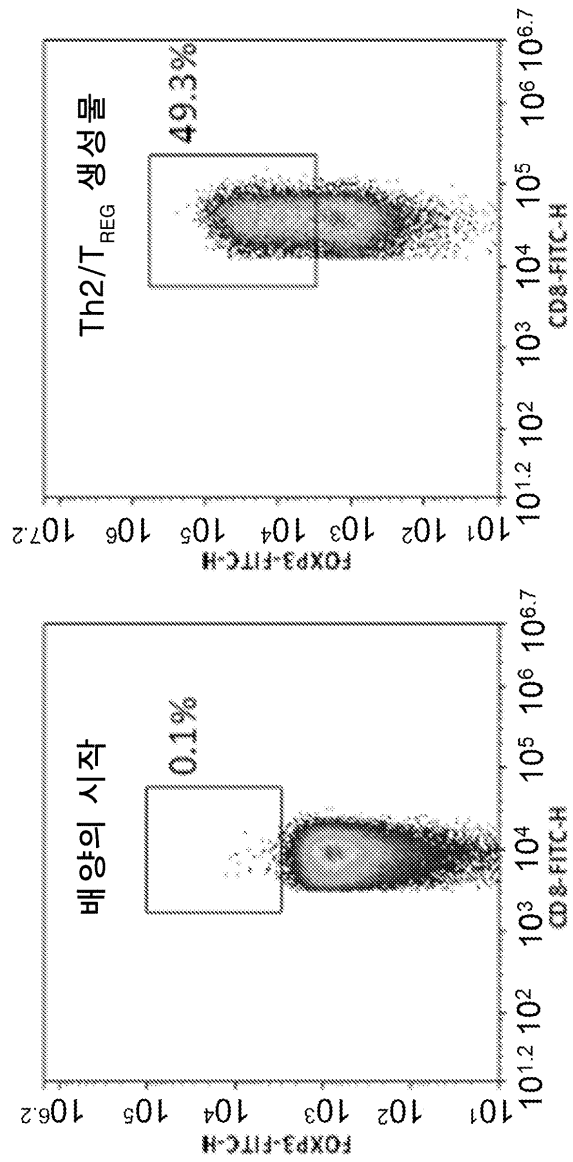
도면25b



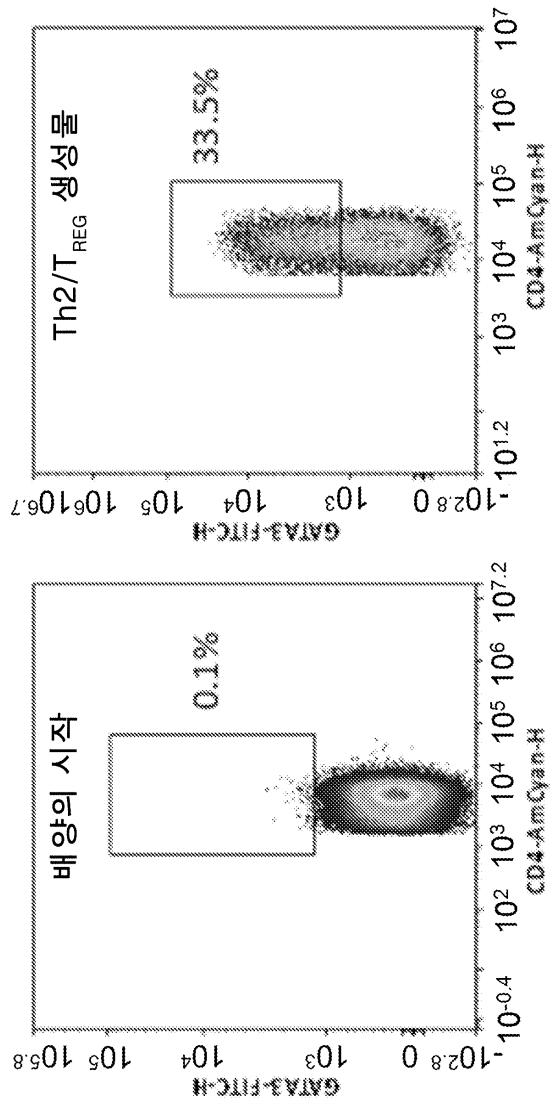
도면26aa



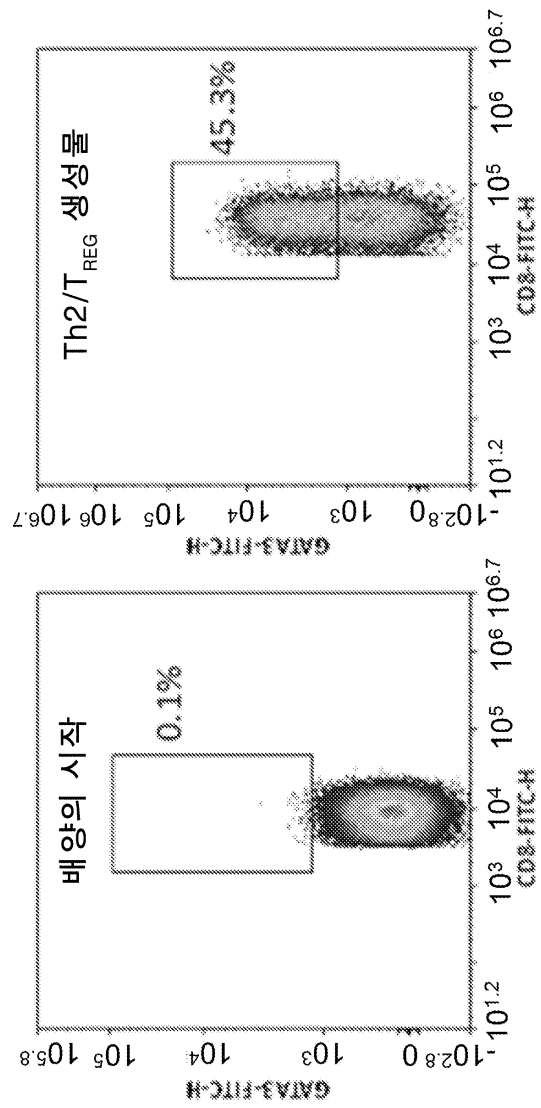
도면26ab



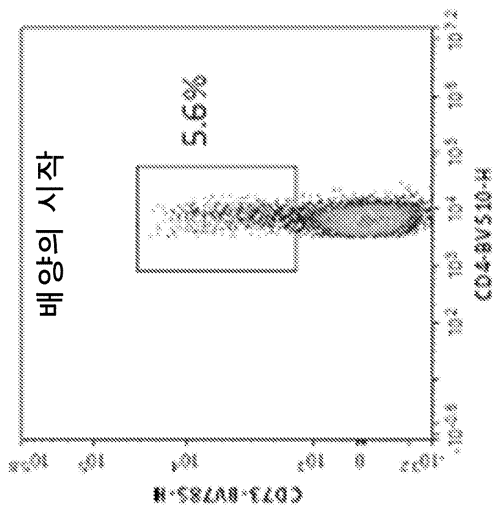
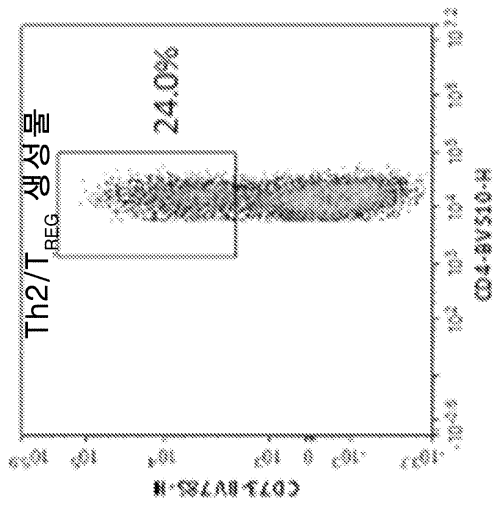
도면26ba



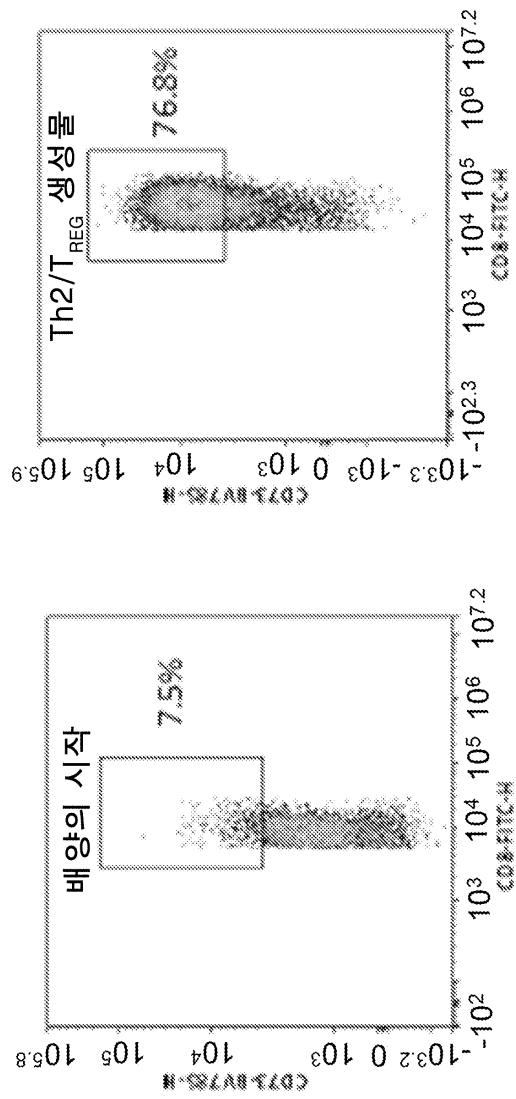
도면26bb



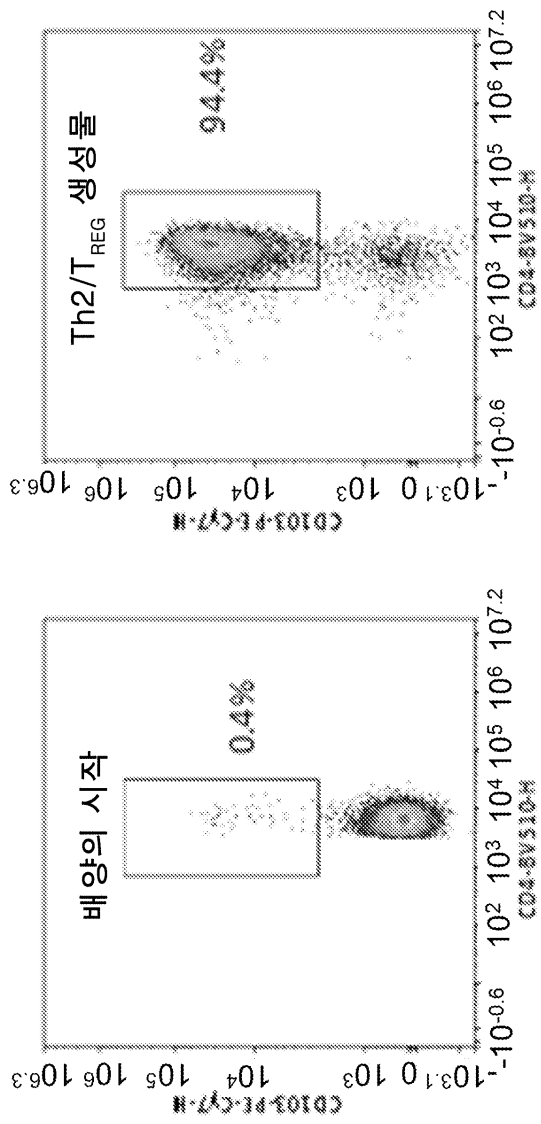
도면27aa



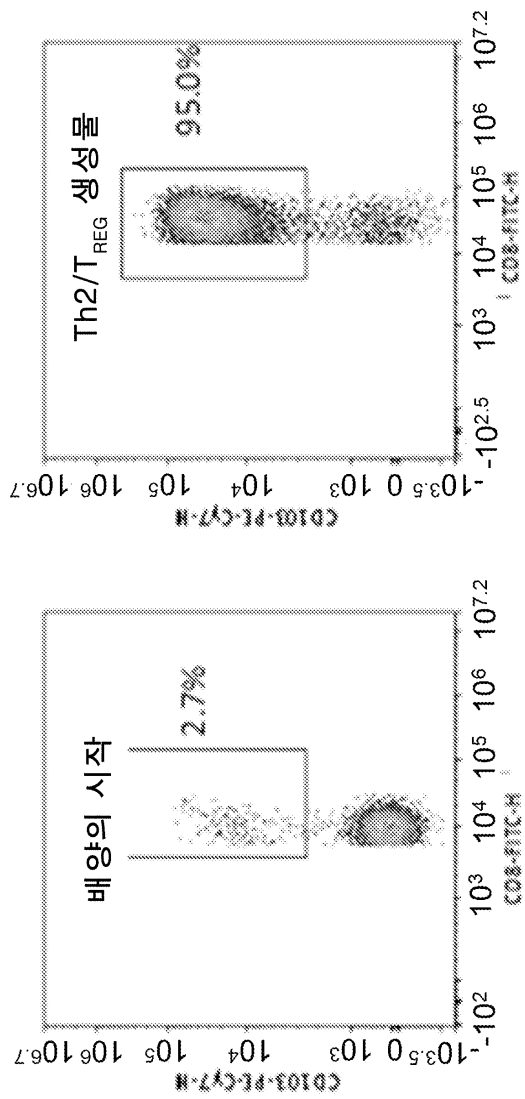
도면27ab



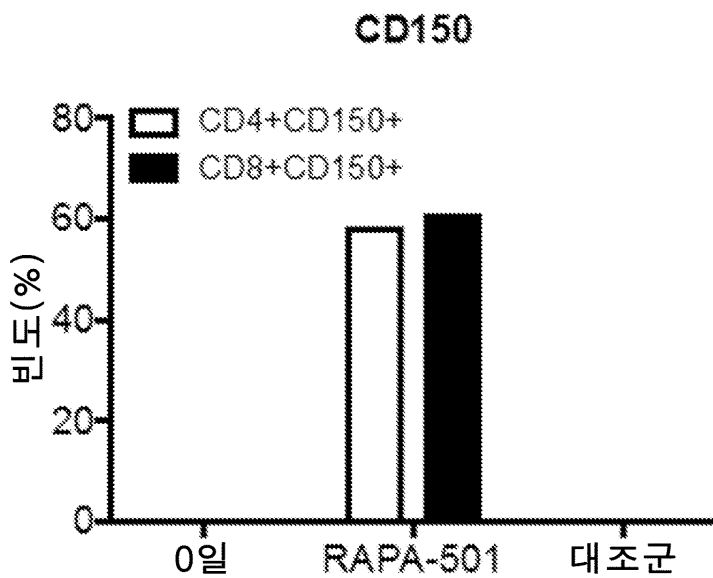
도면27ba



도면27bb

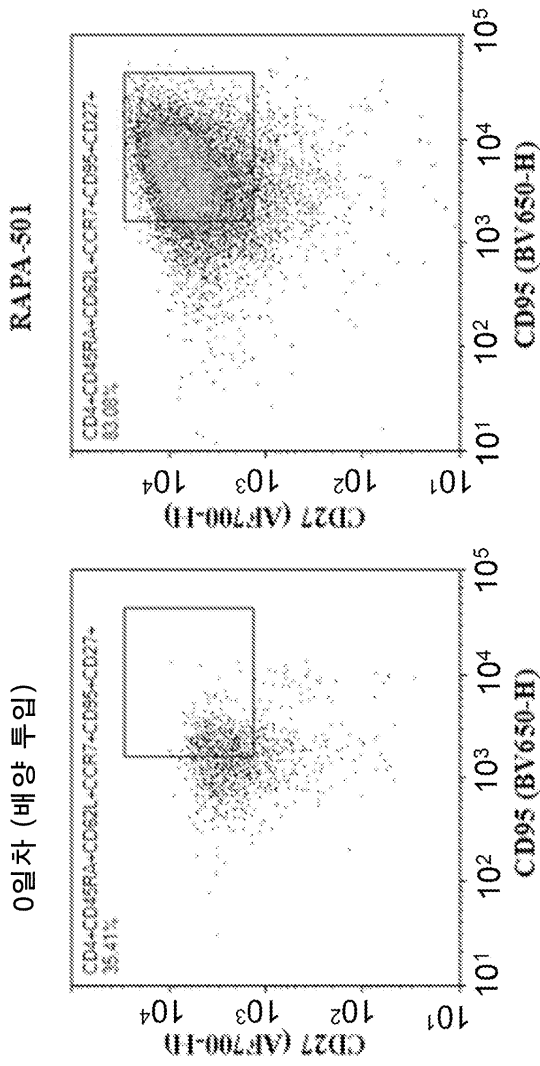


도면28a

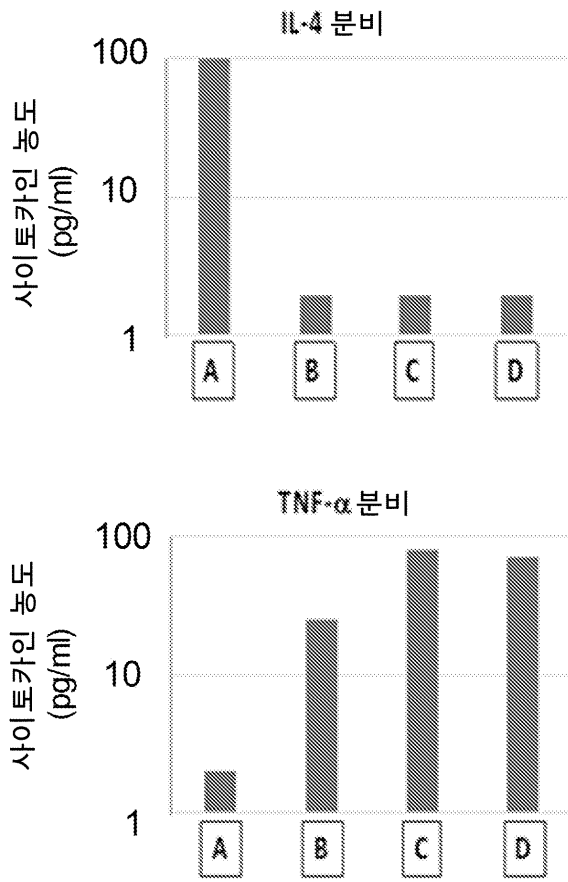


도면28b

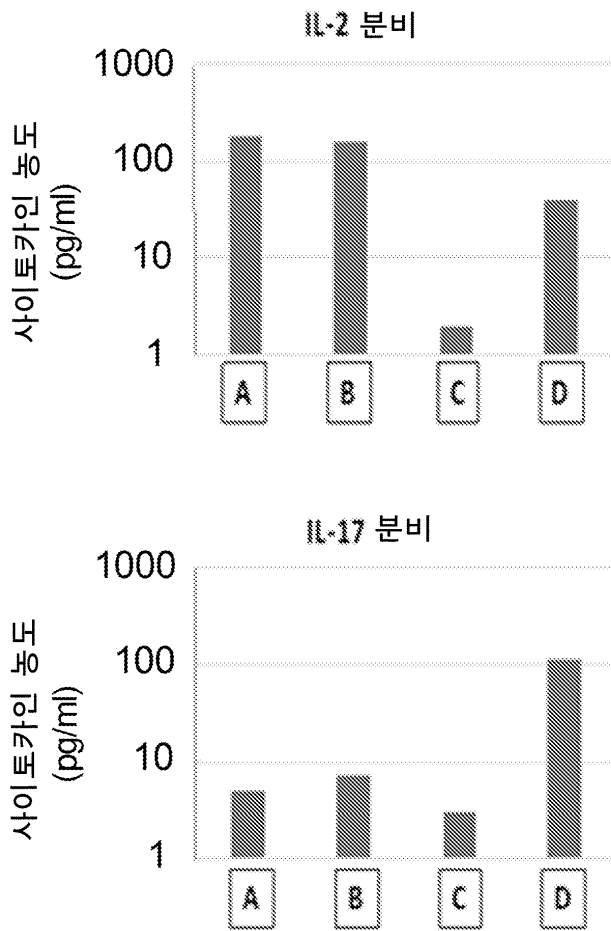
RAPA-501 세포는 T 줄기 기억 표현형에 대해 풍부함
(CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺CCR7⁺CD95⁺CD27⁺)



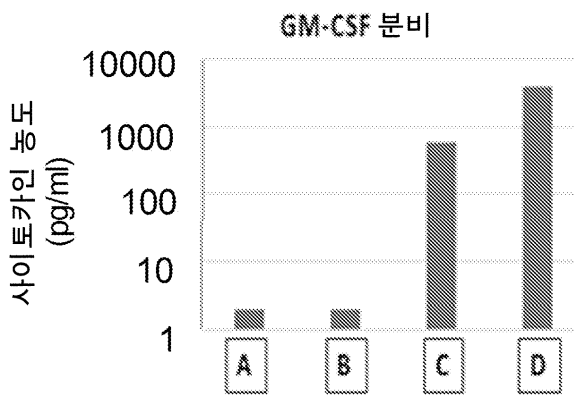
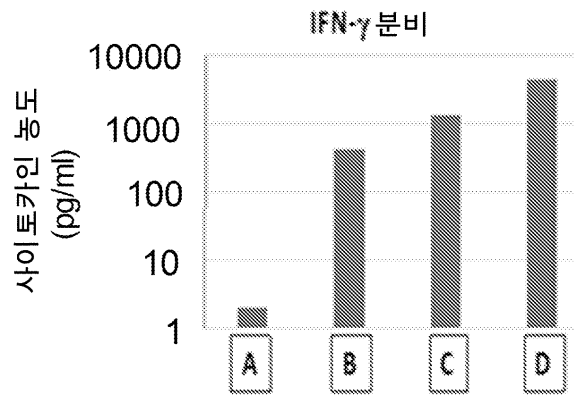
도면29a



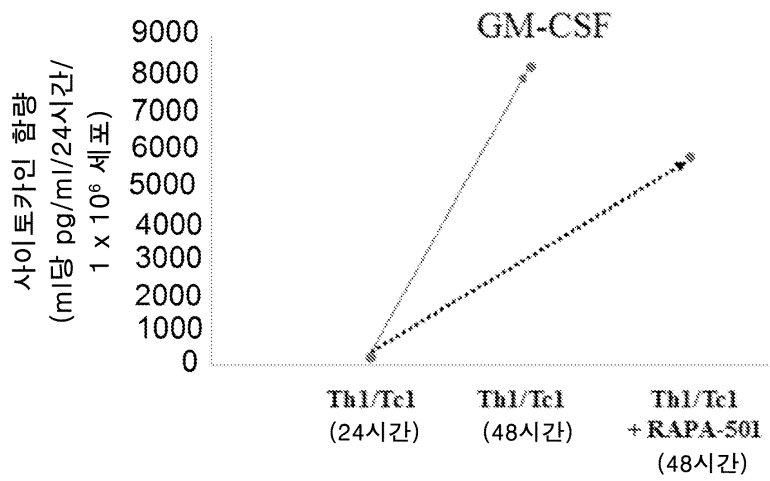
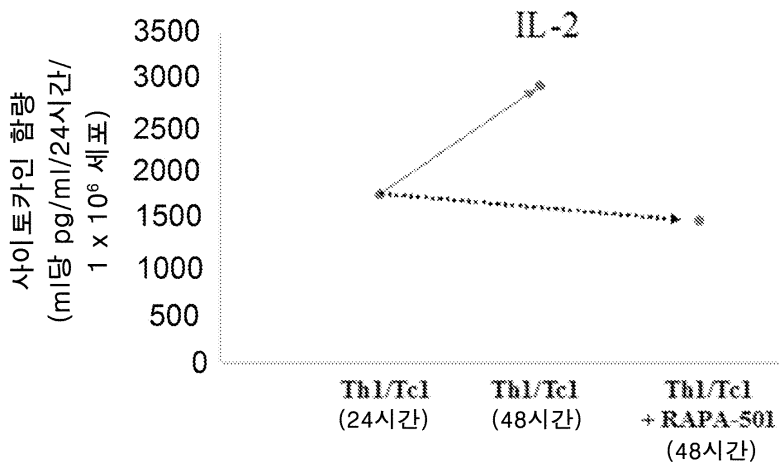
도면29b



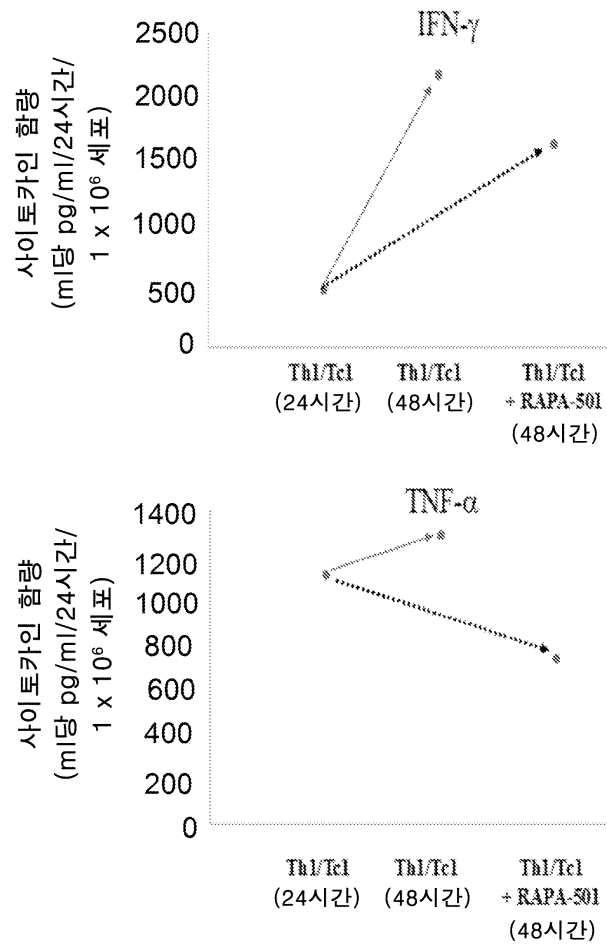
도면29c



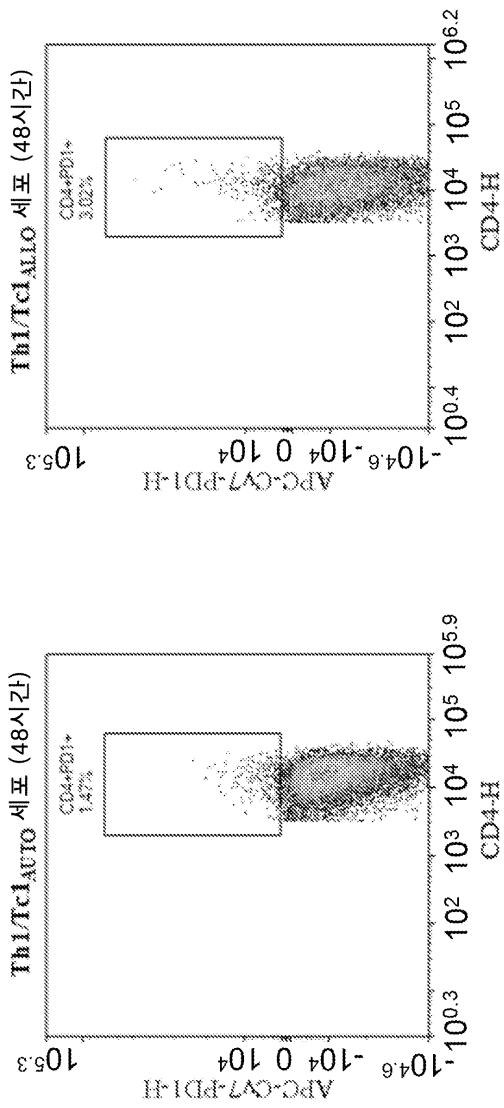
도면30aa



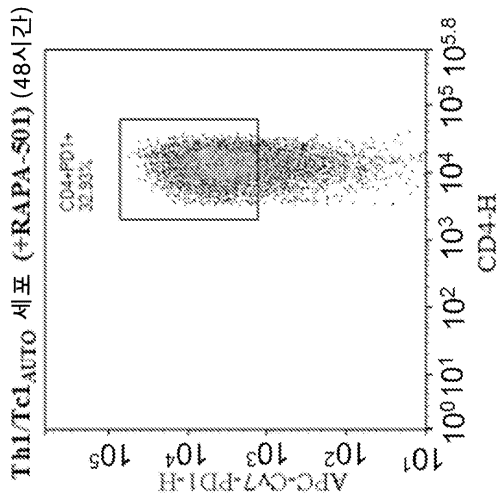
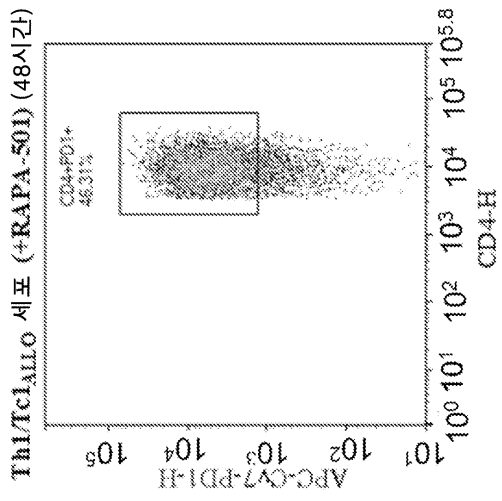
도면30ab



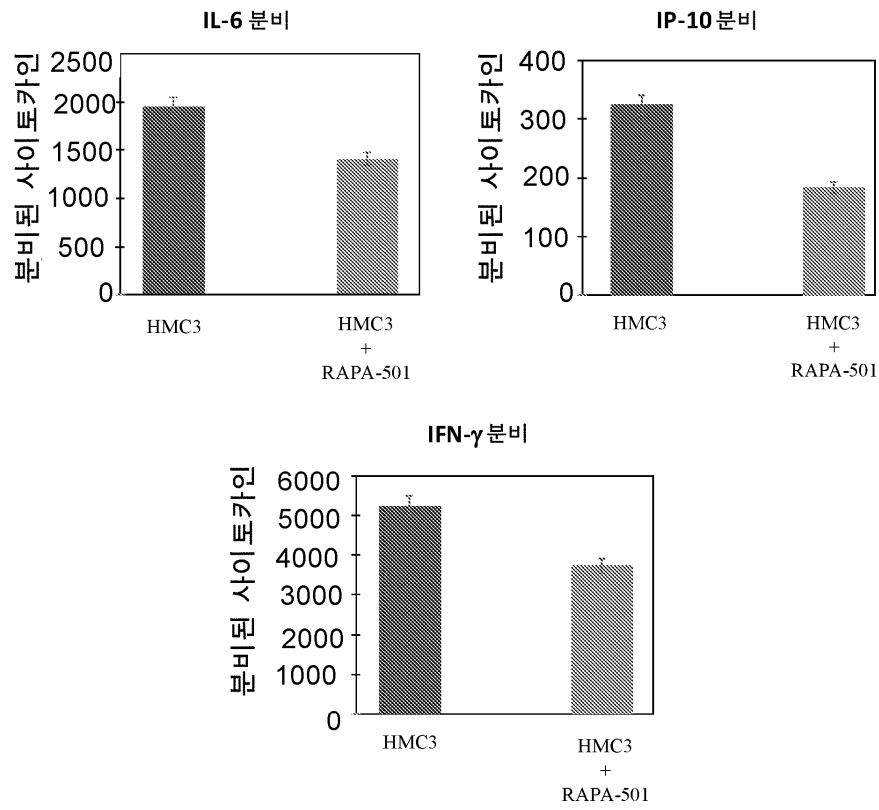
도면30ba



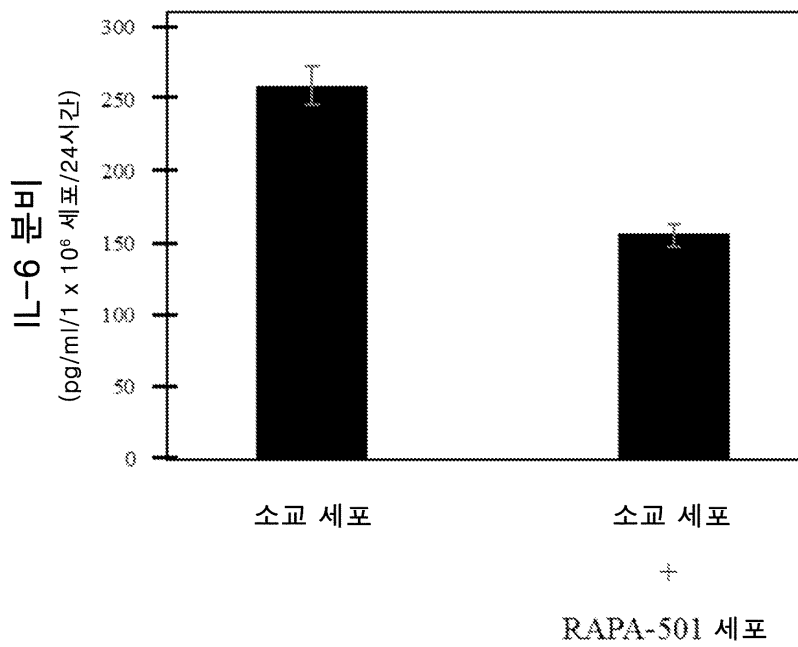
도면30bb



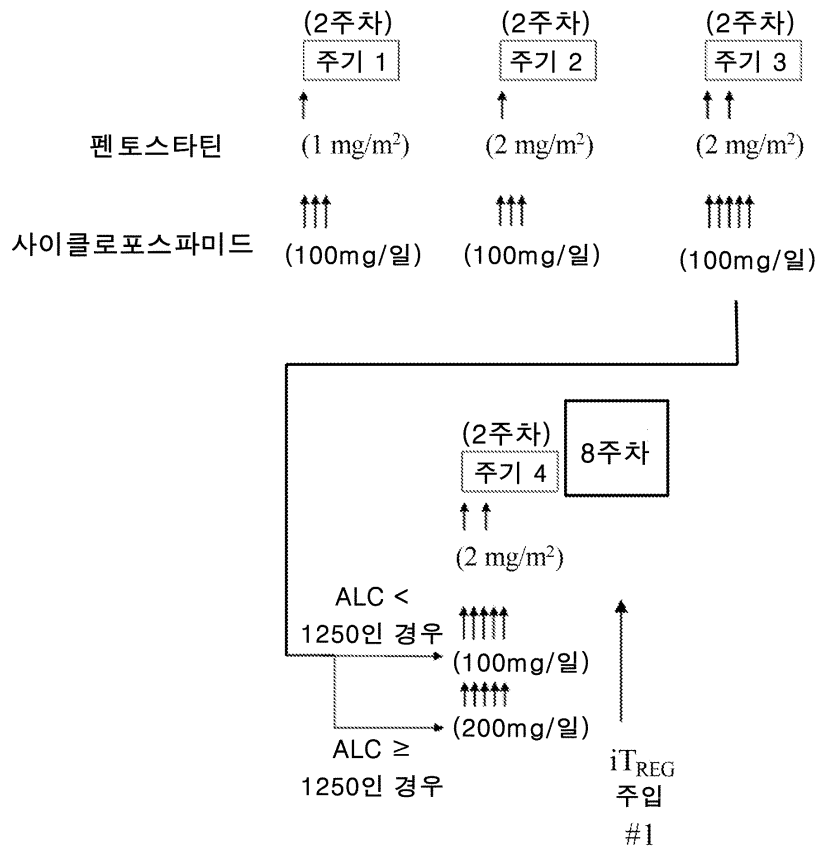
도면31a



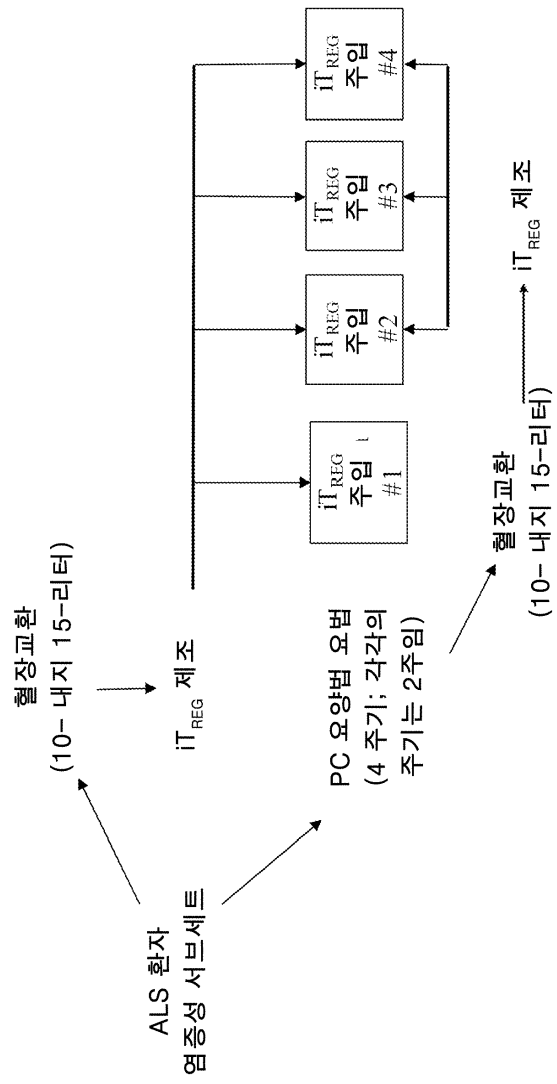
도면31b



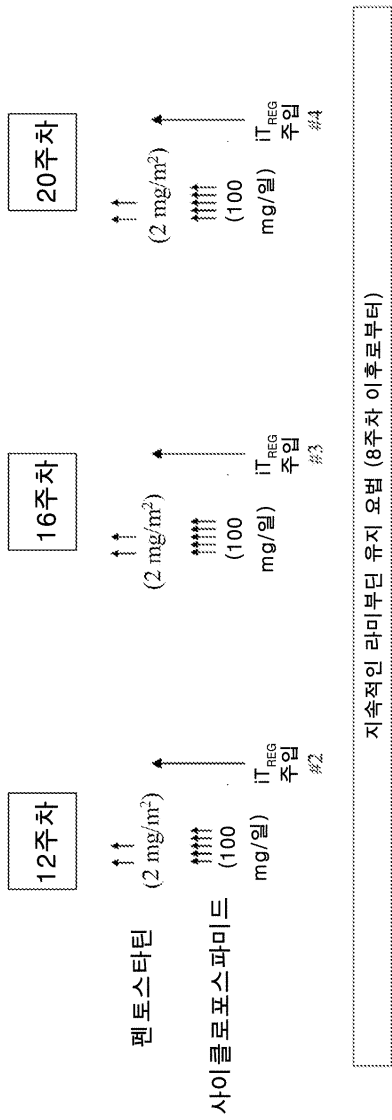
도면32



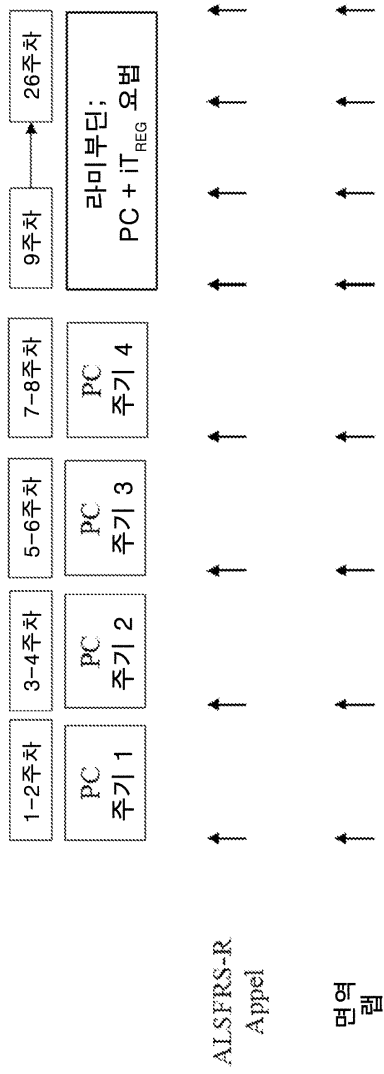
도면33



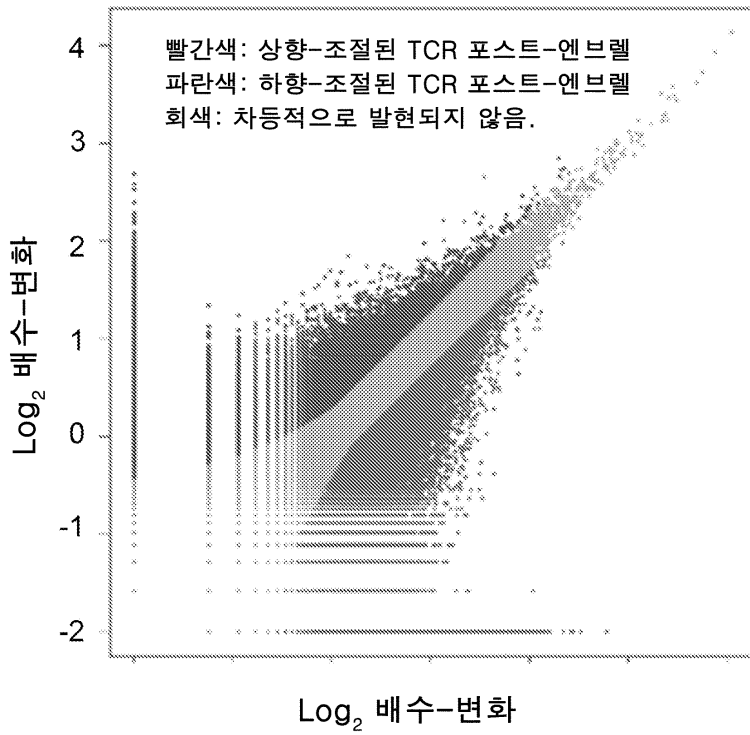
도면34



도면35



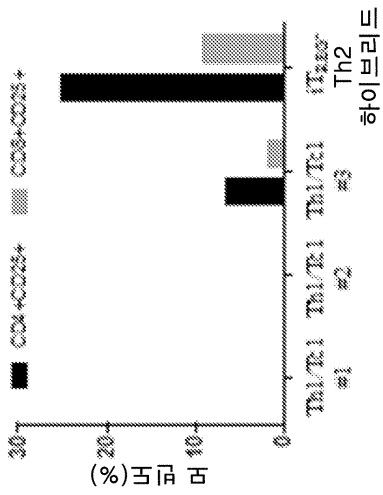
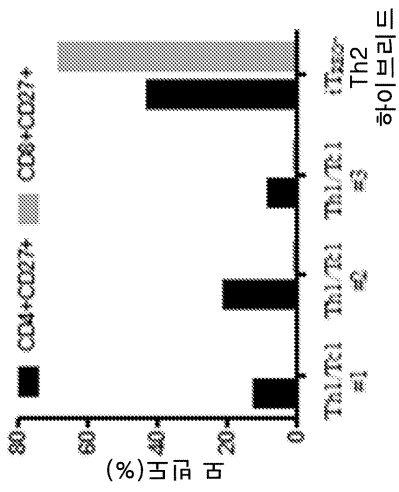
도면36a



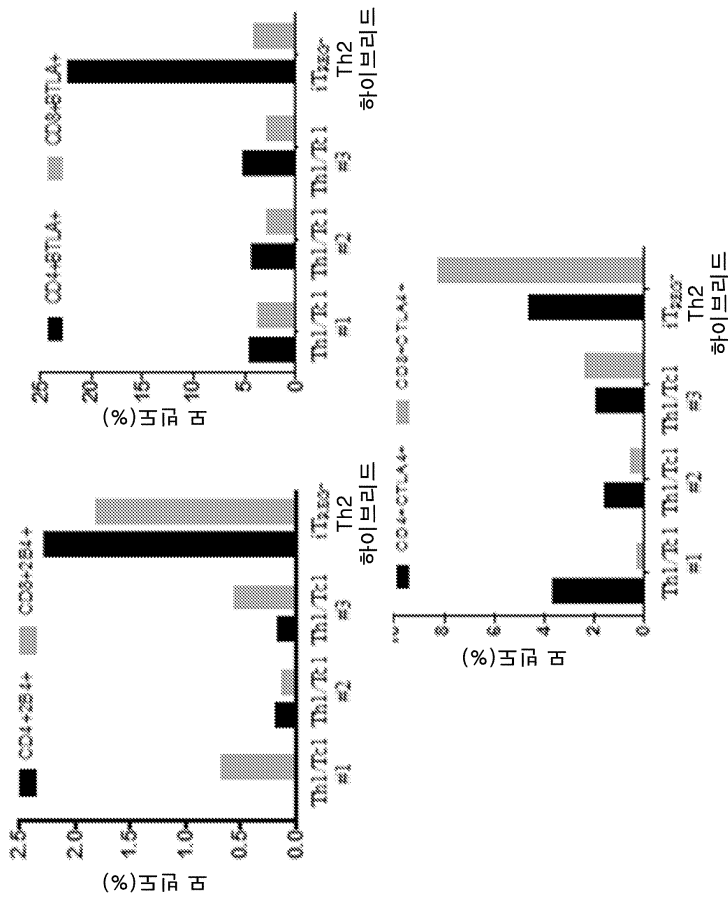
도면36b

발현	발현	발현
TCR 유전자 I.D.: 상향-조절된 포스트-엔브렐	TCR 유전자 I.D.: 하향-조절된 포스트-엔브렐	TCR 유전자 I.D.: 상향-조절된 포스트-엔브렐
CASS1GDSYGFTR8V12-3.TRBD1.TR8J1-2.12.16.25.26	CASS1GDSYGFTR8V12-4.TRBD1.TR8J1-2.12.16.25.26	486.91039
CASS1GDSYGFTR8V12-3.TRBD1.TR8J1-3.10.14.19.20	CASS1GDSYGFTR8V12-3.TRBD1.TR8J1-3.10.14.19.20	382.23383
CASS1GDSYGFTR8V12-4.TR8J1-2.12.13.15	CASS1GDSYGFTR8V12-4.TR8J1-2.12.13.15	336.23374
CASS1GDSYGFTR8V12-4.TRBD1.TR8J1-3.11.24.34.45	CASS1GDSYGFTR8V12-4.TRBD1.TR8J1-3.11.24.34.45	247.23367
		0.01
		0.01
		0.01
		0.01

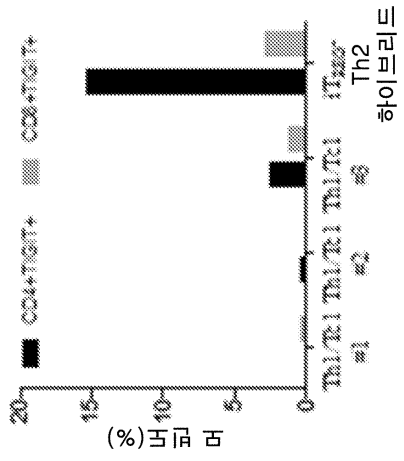
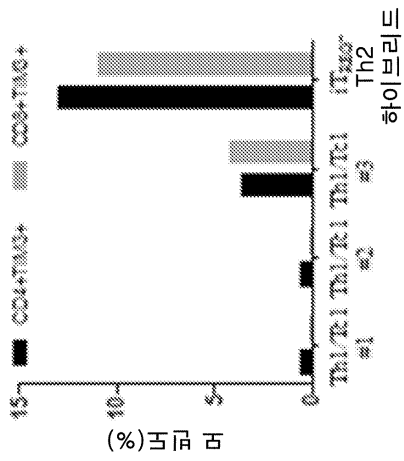
도면37a



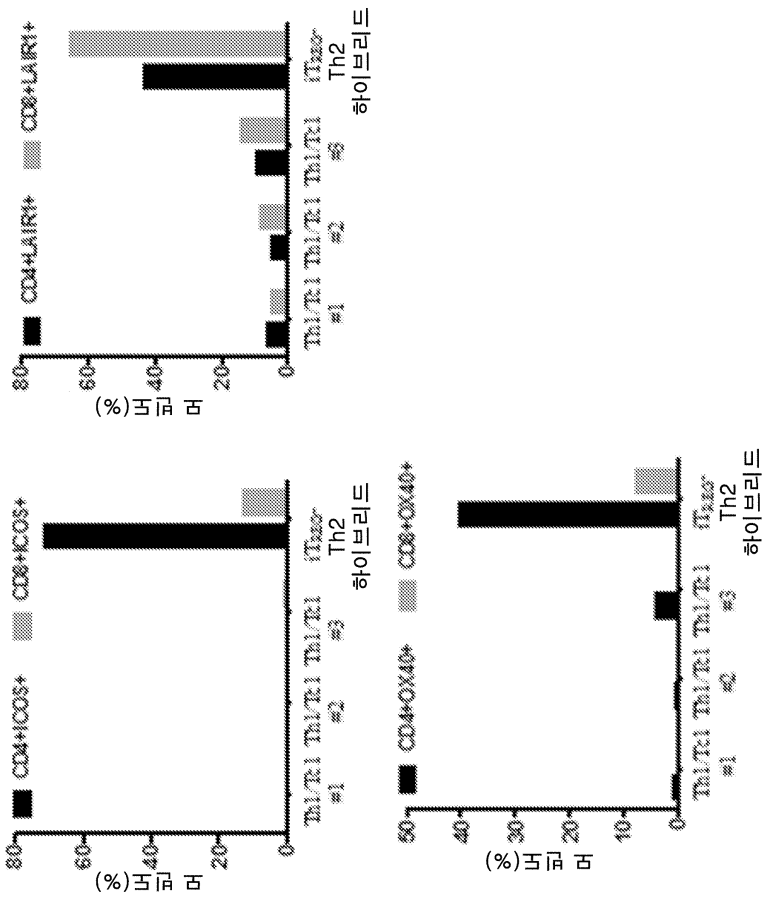
도면37b



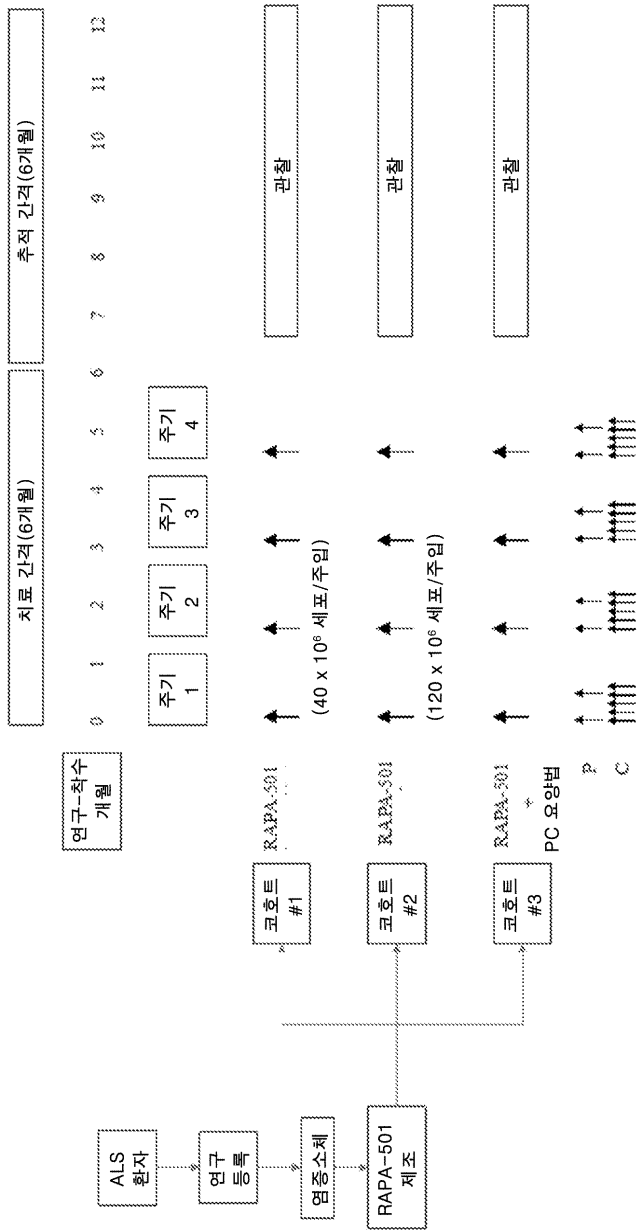
도면38a



도면38b

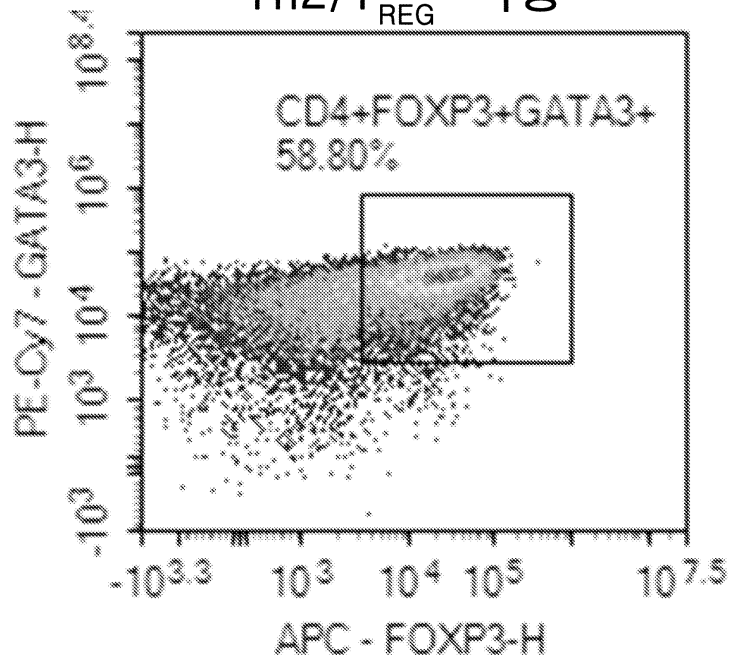


도면39



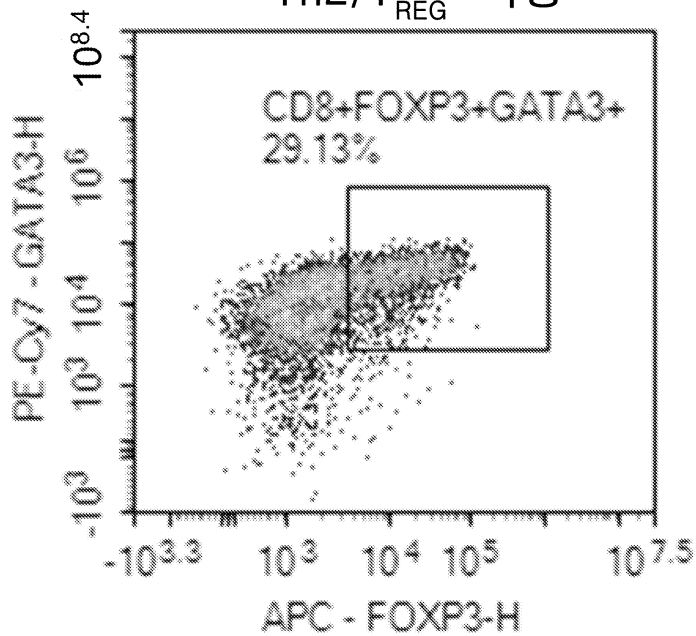
도면40a

RAPA-501 CD4⁺ 서브세트
Th2/T_{REG} 극성



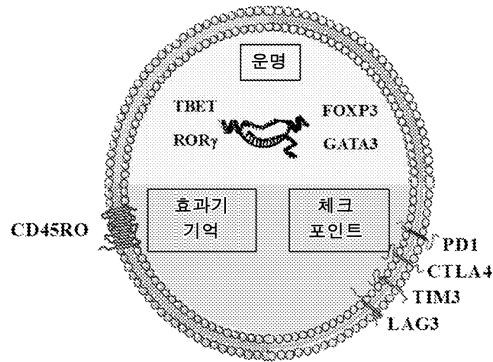
도면40b

RAPA-501 CD8⁺ 서브세트
Th2/T_{REG} 극성

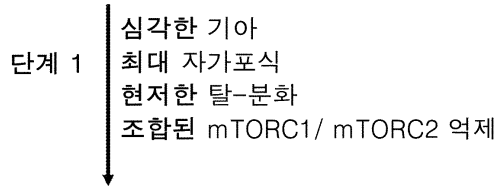


도면41a

배양 투입 T 세포

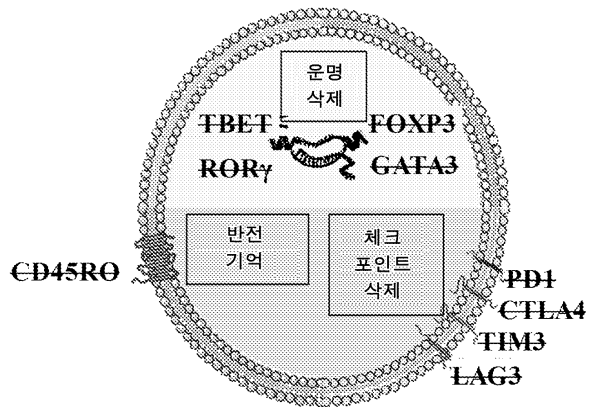


확산 운명
노화

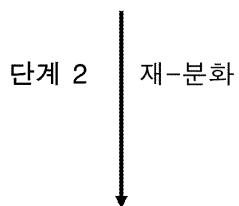


도면41b

배양 2일차

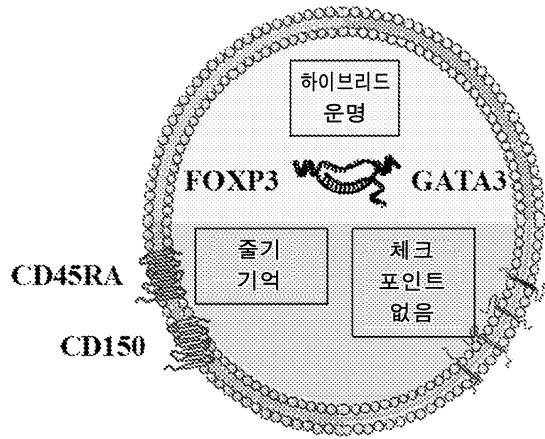


운명 정지
신진대사의 제거



도면41c

RAPA-501 생성물
(배양 6일차)



하이브리드 T_{REG}/Th2 운명
줄기-유사 기억

도면42

