



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113767
(43) 공개일자 2023년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7021098
(22) 출원일자(국제) 2021년11월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/060650
(87) 국제공개번호 WO 2022/115492
국제공개일자 2022년06월02일
(30) 우선권주장
63/117,787 2020년11월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
라이엘 이뮤노파마, 인크.
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201
(72) 발명자
비즈카르도 사코다, 라울 이.
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
레스티포, 니콜라스
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

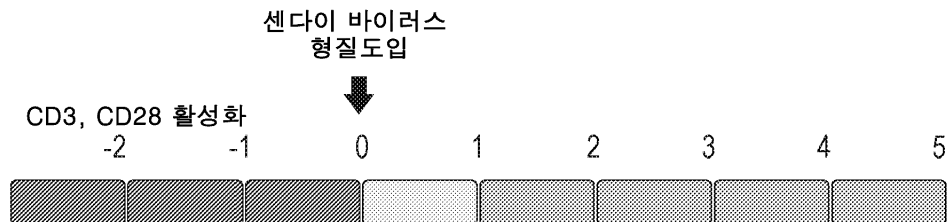
전체 청구항 수 : 총 112 항

(54) 발명의 명칭 **재생 T 세포의 제조 방법, 이를 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법**

(57) 요약

본 개시는 일반적으로 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키는 단계 및 접촉된 세포를 재활성화하는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법; 그리고 이 조성물 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 개시는 또한 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 세포 집단을 기재한다. 본 개시는 또한 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 세포 집단을 사용하여 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
C12N 2501/602 (2013.01)
C12N 2501/603 (2013.01)
C12N 2501/604 (2013.01)
C12N 2501/606 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

클라우스너, 리처드 디.

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스
킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

황, 인

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스
킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

마에다, 타쿠야

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스
킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

타마오키, 나리타카

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스
킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

야마자키, 야스히로

미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 헤스
킨스 웨이 201 라이엘 이뮤노파마, 인크. 내

(30) 우선권주장

63/153,881 2021년02월25일 미국(US)
63/165,093 2021년03월23일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법:

- a. T 세포를 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, T 세포 유래 부착성 세포를 형성하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는 단계; 및
- b. T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계.

청구항 2

다음 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법:

- a. 배양 용기 내의 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. 적어도 하나의 부착된 콜로니를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계.

청구항 3

다음 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법:

- a. 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과 적어도 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계;
- b. (a)의 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계.

청구항 4

다음 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법:

- a. T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과 T 세포가 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. (a)의 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, T 세포는 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 SSEA4 및 CD3을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 CD9, 또는 CD3 및 CD90, 또는 CD3, CD9

및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, SSEA4, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에, T 세포가 IL-2 및 상기 T 세포를 활성화할 수 있는 적어도 하나의 제제로 활성화되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 TCR $\alpha \beta$ 세포; TCR $\gamma \delta$ 세포; CD4+CD8 $\alpha \beta$ + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(예컨대 Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 활성화 T 세포가 CD137, PD1 또는 LAG3을 발현하는 세포에 대한 선택에 의해 농축된, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포가 포유동물로부터 유래된, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포가 인간으로부터 유래된, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, T 세포가 적어도 약 4일 내지 약 10일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, T 세포가 적어도 약 4일 내지 약 7일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, T 세포가 약 7일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 T 세포에서 발현되는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 비통합 바이러스 벡터를 사용하여 발현되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 센다이 바이러스를 사용하여 발현되는, 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 발현되고, 발현이 나중에 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현을 억제하는 화합물의 첨가에 의해 억제되는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 화합물이 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 발현 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 소분자 억제제인, 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현이 T 세포 유래 부착성 세포를 T 세포를 활성화하는 작용제와 접촉시켜 억제되는, 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 나노입자로 전달되는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포를 사이토카인과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T 세포 활성화제가 CD3에 결합하는 항체 또는 CD28에 결합하는 항체 또는 둘 모두를 포함하거나; 적어도 하나의 T 세포 활성화제가 종양 항원인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에 조작되는, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시킨 후에 조작되는, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체 또는 이의 하이브리드 수용체인, 방법.

청구항 30

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 표적 세포의 표면 상의 특정 항원을 인식하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 항원이 MHC 클래스 I 의존적인, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 항원이 MHC 클래스 I 비의존적인, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 T 세포가 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함하는, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령이 재프로그래밍 전의 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 젊은, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 부분적 재프로그래밍 T 세포가 대조군 T 세포보다 적어도 25배 더 많이 증식할 수 있는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포를 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 인자; 및 (ii) SV40과 접촉시키는 단계가 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는, 방법.

청구항 38

다음 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법:

- a. IL-2를 포함하는 제1 배양 중 T 세포를 배양하고 상기 T 세포를 CD3 또는 CD28 또는 둘 모두에 특이적인 적어도 하나의 항체; 또는 종양 항원, 종양 오가노이드 또는 종양 세포주로 활성화하는 단계;
- b. 상기 활성화 T 세포를 IL-2 또는 CD3 또는 CD28에 특이적인 항체; 또는 종양 항원, 종양 오가노이드 또는 종양 세포주를 포함하지 않는 제2 배양 배지 중 일정 기간 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 완전 재프로그래밍되지 않는, 단계;
- c. 상기 제2 배양 배지를 IL-2 및 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 제3 배양 배지로 대체하는 단계로서, 상기 접촉된 T 세포는 적어도 약 5일 동안 상기 제3 배양 배지 중 배양되는, 단계.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 접촉된 T 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 T 세포가 TCR $\alpha\beta$ 세포; TCR $\gamma\delta$ 세포; CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ 이중 양성 세포, CD4⁺ 단일 양성 세포(Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포인, 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접촉 단계가 활성화 T 세포를 SV40과 접촉시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 자가 종양 세포와의 공동 배양 후 활성화 마커를 발현하고, 활성화 마커는 CD137, PD1 또는 LAG3인, 방법.

청구항 43

후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은, T 세포 집단.

청구항 44

제43항에 있어서, 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 25% 더 젊은, T 세포 집단.

청구항 45

세포의 적어도 70%가 CD3 및 SSEA4를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.

청구항 46

제45항에 있어서, 세포의 적어도 30%가 CD9를 발현하는, 집단.

청구항 47

제45항에 있어서, 세포의 적어도 30%가 CD90을 발현하는, 집단.

청구항 48

제45항에 있어서, 세포의 적어도 30%가 CD9 및 CD90 둘 모두를 발현하는, 집단.

청구항 49

세포의 적어도 30%가 CD9 또는 CD90을 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.

청구항 50

세포의 적어도 30%가 CD9 및 CD90 둘 모두를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.

청구항 51

다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단:

- a. T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계.

청구항 52

다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단:

- a. 배양 용기 내의 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과 T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. 적어도 하나의 부착된 콜로니를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계.

청구항 53

다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단:

- a. 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과 적어도 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계;
- b. (a)의 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계.

청구항 54

다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단:

- a. T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과 T 세포가 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. (a)의 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계.

청구항 55

제54항에 있어서, T 세포는 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된

군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 56

제55항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 SSEA4 및 CD3을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 57

제55항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 58

제55항에 있어서, T 세포는 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, SSEA4, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 59

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에, 상기 T 세포가 이들을 사이토카인 및 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시켜 활성화되는, T 세포 집단.

청구항 60

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 TCR $\alpha\beta$ 세포; TCR $\gamma\delta$ 세포; CD4+CD8 $\alpha\beta$ + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(예컨대 Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포인, T 세포 집단.

청구항 61

제59항에 있어서, T 세포 활성화제가 자가 종양 세포인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 활성화 T 세포가 CD137, PD1 또는 LAG3을 발현하는 세포에 대한 선택에 의해 농축된, 방법.

청구항 63

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포가 포유동물로부터 유래된, T 세포 집단.

청구항 64

제51항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 65

제64항에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 적어도 약 4일 내지 약 11일 동안 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 66

제65항에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 적어도 약 4일 내지 약 7일 동안 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 67

제66항에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 약 7일 동안 접촉되는, T 세포 집단.

청구항 68

제51항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC이 T 세포에서 발현되는, T 세포 집단.

청구항 69

제68항에 있어서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC이 비통합 바이러스 벡터를 사용하여 발현되는, T 세포 집단.

청구항 70

제69항에 있어서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC이 센다이 바이러스를 사용하여 발현되는, T 세포 집단.

청구항 71

제69항에 있어서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC이 발현되고, 발현은 나중에 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC의 발현을 억제하는 화합물의 첨가에 의해 억제되는, T 세포 집단.

청구항 72

제69항에 있어서, 상기 화합물이 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 발현 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 소분자 억제제인, T 세포 집단.

청구항 73

제66항에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현이 T 세포 유래 부착성 세포를 T 세포 활성화제와 접촉시켜 억제되는, T 세포 집단.

청구항 74

제68항에 있어서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC이 나노입자에서 T 세포에 전달된 하나 이상의 발현 벡터로부터 발현되는, T 세포 집단.

청구항 75

제51항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, T 세포 집단.

청구항 76

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 T 세포 활성화제가 CD3에 결합하는 항체 또는 CD28에 결합하는 항체 또는 둘 모두를 포함하거나; 적어도 하나의 T 세포 활성화제가 종양 항원인, T 세포 집단.

청구항 77

제51항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에 조작되는, T 세포 집단.

청구항 78

제51항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시킨 후에 조작되는, T 세포 집단.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체 또는 이의 하 이브리드 수용체인, T 세포 집단.

청구항 80

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체가 표적 세포의 표면 상의 특정 항원을 인식하는, T 세포 집단.

청구항 81

제80항에 있어서, 항원이 MHC 클래스 I 의존적인, T 세포 집단.

청구항 82

제80항에 있어서, 항원이 MHC 클래스 I 비의존적인, T 세포 집단.

청구항 83

제51항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 T 세포가 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함하는, T 세포 집단.

청구항 84

제51항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 측정하는 단계를 추가로 포함하는, T 세포 집단.

청구항 85

제84항에 있어서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령이 재프로그래밍 전 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 젊은, T 세포 집단.

청구항 86

제51항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 부분적 재프로그래밍 T 세포가 대조군 T 세포보다 적어도 25배 더 많이 증식할 수 있는, T 세포 집단.

청구항 87

제51항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포를 klf4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 인자; 및 SV40과 접촉시키는 단계가 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는, T 세포 집단.

청구항 88

다음 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단:

- a. IL-2를 포함하는 제1 배양 중 T 세포를 배양하고 상기 T 세포를 CD3 또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체로 활성화하는 단계;
- b. 상기 활성화 T 세포를 IL-2 또는 CD3 또는 CD28에 특이적인 항체를 포함하지 않는 제2 배양 배지 중 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 완전 재프로그래밍되지 않는, 단계;
- c. 상기 제2 배양 배지를 IL-2 및 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 제3 배양 배지로 대체하는 단계로서, 상기 접촉된 T 세포는 적어도 약 5일 동안 상기 제3 배양 배지 중 배양되는, 단계.

청구항 89

제88항에 있어서, 상기 T 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함하는, T 세포 집단.

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 T 세포가 TCR $\alpha\beta$ 세포; TCR $\gamma\delta$ 세포; CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺ 이중 양성 세포, CD4⁺ 단일 양성 세포(Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포인, T 세포 집단.

청구항 91

치료를 필요로 하는 대상체를 제1항 내지 제42항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 T 세포 집단으로 치료하

는, 방법.

청구항 92

치료를 필요로 하는 환자를 제43항 내지 제50항 중 어느 한 항의 집단으로 치료하는, 방법.

청구항 93

치료를 필요로 하는 환자를 제51항 내지 제91항 중 어느 한 항의 T 세포 집단으로 치료하는, 방법.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 치료 방법이 암, 바이러스 병태 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법인, 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 암이 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 두경부암(예를 들어, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암), 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대망암, 및 장간막암, 인두암, 전립샘암, 직장암, 신암(예를 들어, 신세포 암종(RCC)), 육종, 소장암, 연조직 암, 위암, 고환암, 갑상샘암, 요관암 또는 방광암인, 방법.

청구항 96

다음 단계를 포함하는, 재생 종양 침윤 림프구(TIL)를 제조하는 방법:

- a. TIL 집단을 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 임의로 SV40과 접촉시키는 단계로서, TIL은 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및
- b. T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계.

청구항 97

제96항의 방법에 따라 제조된 TIL 집단.

청구항 98

다음 단계를 포함하는, 재생 종양 침윤 림프구(TIL)를 제조하는 방법:

- a. 활성화 TIL이 CD137을 발현하도록 TIL 집단을 제1 종양 항원으로 활성화하고; 임의로 CD137+ TIL을 농축하는 단계;
- b. 활성화 TIL 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 (ii) 임의로 SV40과 TIL 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 TIL은 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계.

청구항 99

제98항에 있어서, TIL-유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물이 제1 종양 항원인, 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 제1 종양 항원이 자가 종양 세포, 자가 종양 세포주, 종양 오가노이드 또는 이들 중 임의의 것으로부터 유래된 항원인, 방법.

청구항 102

제98항에 있어서, TIL 집단이 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, TIL 집단이 SV40과 접촉되는, 방법.

청구항 104

제98항에 있어서, TIL 집단이 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC 및 SV40과 접촉되는, 방법.

청구항 105

제98항 내지 제104항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된, 재생 TIL 집단.

청구항 106

제105항에 있어서, 재생 TIL의 적어도 50%가 CCR7 및 CD62L 둘 모두를 발현하는, 재생 TIL 집단.

청구항 107

제105항에 있어서, 재생 TIL의 적어도 50%가 CCR7 및 CD62L 둘 모두를 발현하는, 재생 TIL 집단.

청구항 108

제105항에 있어서, 재생 TIL의 적어도 50%가 CCR7 및 TCF7 둘 모두를 발현하는, 재생 TIL 집단.

청구항 109

제105항에 있어서, 재생 TIL의 적어도 50%가 CCR7 및 TCF7 둘 모두를 발현하는, 재생 TIL 집단.

청구항 110

치료를 필요로 하는 환자를 제98항 내지 제109항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 재생 TIL 집단으로 치료하는 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 암, 바이러스 병태 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법인, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 암이 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 두경부암(예를 들어, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암), 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대망암 및 장간막암, 인두암, 전립샘암, 직장암, 신암(예를 들어, 신세포 암종(RCC)), 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상샘암, 요관암 또는 방광암인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 특허 협력 조약("PCT")에 따라 출원된 이 국제 특허 출원은 2020년 11월 24일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/117,787, 2021년 2월 25일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/153,881, 및 2021년 3월 23일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 63/165,093에 대한 우선권을 주장하며, 각각의 내용 전체가 본원에 포함된다.

배경 기술

- [0003] 종양 침윤 림프구("TIL")는 암 세포를 인식하고 죽일 수 있는 종양 내에서 발견되는 면역 세포(예를 들어, T 세포)이다. 자가 TIL의 차용 전달이 광범위하게 연구되었지만 TIL 기반 치료법의 한 가지 단점은 이러한 세포가 종종 기능성 상실과 함께 광범위한 분화 및 노화의 세포 마커를 나타낸다는 것이다. 예를 들어, 문헌(Gurusamy, 등, 2020, Cancer Cell 37, 818-833; Jiang, 등, 2015, Cell Death Dis 6, e1792)을 참고한다. 전형적으로 TIL은 크게 TEM 또는 TEMRA 세포로 이루어지며 고갈되는 특성을 가지고 있다(Sakuishi 등, 2010, J Exp Med 207, 2187-2194). 또한, 전임상 증거는 종양 부위의 손상된 T 세포 기능이 T 세포 제품의 낮은 임상적 유효성을 유도할 수 있음을 강력하게 제시한다.
- [0004] T 세포(T 림프구라고도 함)는 골수에서 발견되는 줄기 세포에서 발생하는 독특한 특성을 가진 일종의 혈액 세포이다; T 세포는 감염으로부터 보호하고 암과 싸운다. T 세포는 섬유아세포와 같은 다른 세포 유형과 구조적 및 기능적으로 상이하며 가슴샘에서 양성 및 음성 선택을 필요로 하고 T 세포 수용체 유전자좌에서 체세포 유전자 재배열이 관여하는 복잡한 발생을 겪는다(예를 들어, Kurd and Robey, Immunol Rev. 2016 May; 271(1): 114-126 참고). 섬유아세포도 신체의 면역 반응에 관여하지만, 섬유아세포는 세포외 기질 및 콜라겐을 합성하여 동물 조직의 구조적 틀을 생성하는 세포이다. 섬유아세포는 주로 상처 치유 과정에 관여한다.
- [0005] 종양 반응성 T 세포는 고갈 및 분화 증가의 특성을 나타내는 것 외에도 세포 노쇠 경로의 유도를 받는다. 노쇠는 노화 및 세포 분열의 반복 주기로 초래되는 효능 및 기능성의 점진적 상실 과정이다. 후생유전학적 변화(Vodnala 등, 2019, Cancer Cell 37, 818-833 e819), 텔로미어 길이 감소(Rosenberg 등, 2011, Clin Cancer Res 17, 4550-4557) 및 기능성, 증식 가능성 및 세포 생존력 상실(Im 등, 2016, Nature 537, 417-421)을 포함하는 세포 노쇠에 연관된 몇몇 특성은 불량한 T 세포 기능과 연관된다. TIL 기반 세포 치료법은 일부 환자에서 반응을 매개할 수 있지만 임상 증거에 따르면 CCR7 발현이 상승하고 텔로미어 길이가 증가한 TIL 제품이 치료 결과 개선과 연관됨이 실증되었다(Rosenberg 등, 2011, Clin Cancer Res 17, 4550-4557). 따라서 많은 그룹에서 T 세포 고갈, 분화 및 노쇠를 역전시키는 방법으로서 세포를 탈분화 또는 재프로그래밍하는 방법을 추구해 왔다.
- [0006] 세포 탈분화(재프로그래밍)는 과거에 iPS 세포 기술을 활용하여 체세포를 만능 줄기 세포로 되돌린 다음 원하는 세포 계통으로 재분화함으로써 달성되었다(Takahashi 등, 2007, Cell 131, 861-872). iPS 세포 기술은 시험관 내 T 계통 세포를 생성하는 능력을 가진 iPS 세포로 종양 항원 특이적 종양 침윤 림프구를 재프로그래밍할 수 있는 것으로 나타났다(Vizcardo 등, 2013, Cell Stem Cell 12, 31-36). 세포를 iPS 세포로 유도하는 것은 세포의 생물학적 및 후생유전학적 시계를 완전히 재설정하는 장점이 있다.
- [0007] 그러나 T 세포에서 유래된 iPS 세포는 종종 비정상적인 생물학 - 예를 들어, 미성숙 표현형, 비 MHC 의존적 사멸, 부적절한 CD8 α β 이량체화, 유전자 발현 조절장애 및 T 세포의 발생학적으로 동질적인 집단 생성 실패 - 을 갖는다(예를 들어, Vizcardo 등, 2018, Cell Rep 22, 3175-3190; Takada, K., Kondo, K., and Takahama, Y. 2017 J. Immunol. 198, 2215-2222.; Yamagata, T., 등, (2004). Nat. Immunol. 5, 597-605; Fink, P.J. (2013). Annu. Rev. Immunol. 31, 31-50; Kuderer, N.M., 등, 2006 Cancer 106, 2258-2266 참고). 이러한 제한은 3D 가슴샘 오가노이드 배양에서 iPS 세포를 분화함으로써 극복될 수 있지만(예를 들어, Vizcardo 등, 2018, Cell Rep 22, 3175-3190 참고), 이러한 방법은 시간 및 자원 집약적이다. T 세포 고갈, 분화 및 노쇠를 역전시키기 위한 더욱 확대 가능한 방법이 T 세포를 사용하여 상업적으로 타당한 차용 세포 치료법을 달성하기 위해 요망된다.

발명의 내용

- [0008] T 세포 항종양 기능의 개선이 세포 면역치료법의 모든 양식에 유익할 것임을 감안할 때, 본 개시는 치료 T 세포 제품 품질 및 항종양 가능성을 개선하는 방법, 이러한 개선된 T 세포를 포함하는 조성물 및 치료 방법 그리고 개선된 T 세포 조성물의 다른 용도에 관한 것이다. 결과적으로, 이 시스템은 종양 미세환경에서 T 세포의 기능 개선을 위해 항고갈 또는 친기능성 유전자로 유전적으로 변형된 세포와 함께 TCR 및 CAR 형질도입 T 세포와 같은 암에 대한 다른 많은 치료 과정에 적용 가능할 수 있다.
- [0009] 이 시스템은 또한 인공 신생단백질에 의해 고안된 매질 및 혁신의 향후 반복에서 T 세포 증식의 새로운 방법을 따를 것이다. 종합하면, 본 개시의 재생 T 세포는 향상된 증식 능력, 개선된 대사 품질 및 확립된 고품종양이 지속하고 제거하는 증대된 능력을 갖는 T 세포를 생성함으로써 세포 면역치료법의 모든 양식의 효율을 향상시킬

수 있다.

- [0010] 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 적어도 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0011] 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포를 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0012] 다양한 구현예에서, 본 개시는 배양 용기 내의 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 적어도 T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 적어도 하나의 부착된 콜로니를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0013] 다양한 구현예에서, 본 개시는 제1 배양 배지 중 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 SV40과 적어도 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 상기 접촉된 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0014] 다양한 구현예에서, 본 개시는 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 SV40과 적어도 T 세포가 SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 상기 접촉된 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는 적어도 하나의 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0015] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 다양한 구현예에서, T 세포는 적어도 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 SSEA4 및 CD3을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, T 세포는 적어도 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, T 세포는 적어도 상기 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, SSEA4, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉된다.
- [0016] 다양한 구현예에서, 상기 단리된 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에, 상기 일시적으로 접촉된 T 세포는 IL-2 및 상기 단리된 T 세포를 활성화할 수 있는 적어도 하나의 화합물과 접촉된다. 다양한 구현예에서, T 세포는 TCR $\alpha\beta$ T 세포; TCRgd T 세포; CD4+CD8 $\alpha\beta$ + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(예컨대 Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포이다. 다양한 구현예에서, T 세포는 TIL이다. 다양한 구현예에서, 상기 단리된 T 세포는 포유동물로부터 단리된다.
- [0017] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 적어도 약 4 내지 10일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다.
- [0018] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 적어도 약 4 내지 7일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 약 5일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉된다.
- [0019] 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 T 세포에서 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 비통합 바이러스 벡터를 사용하여 일시적으로 발현된다. 이와 관련하여, T 세포는 재프로그래밍 인자를 암호화하는 하나 이상의 바이러스 벡터로 형질도입될 수 있다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 센다이 바이러스를 사용하여 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 구성적으로 발현되며, 발현은 나중에 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC의 발현을 억제하는 화합물의 첨가에 의해 억제된다. 다양한 구현예에서, 상기 화합물은 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 발현 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 소분자 억제제이다. 다양한 구현예에서, 상기 화합물은 KLF4, OCT3/4,

SOX2 및 C-MYC 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 siRNA 또는 shRNA 분자이다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 나노입자를 사용한 전달 후 일시적으로 발현된다.

- [0020] 다양한 구현예에서, 본 개시는 접촉된 T 세포(즉, 부분적 재프로그래밍 T 세포)를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물, 및 임의로 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인과 추가로 접촉시키는 단계를 제공한다. 다양한 구현예에서 부분적 재프로그래밍 세포는 T 세포 유래 부착성 세포이다. 다양한 구현예에서, 상기 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물은 CD3에 결합하는 항체 또는 CD28에 결합하는 항체 또는 둘 모두를 포함하거나; 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물은 종양 항원이다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 추가로 조작하는 단계를 제공하며, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에 조작된다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 추가로 조작하는 단계를 제공하며, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉시킨 후에 조작된다.
- [0021] 다양한 구현예에서, 상기 세포 표면 수용체는 키메라 항원 수용체 또는 조작된 T 세포 수용체 또는 이의 하이브리드 수용체이다. 다양한 구현예에서, 상기 세포 표면 수용체는 표적 세포의 표면 상의 특정 항원 모이어티를 인식한다. 다양한 구현예에서, 항원 모이어티는 MHC 클래스 I 의존적이다. 다양한 구현예에서, 항원 모이어티는 MHC 클래스 I 비의존적이다.
- [0022] 다양한 구현예에서, 생성된 T 세포는 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 추가로 측정하는 단계를 제공한다. 다양한 구현예에서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령은 재프로그래밍 전의 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 젊다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 처음에 단리된 세포보다 적어도 25배 더 많이 증식할 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 상기 단리된 T 세포를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 인자; 및 SV40과 추가로 접촉시켜 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는 단계를 추가로 개시한다.
- [0023] 다양한 구현예에서, 본 개시는 공급원으로부터 복수의 단리된 T 세포를 수득하는 단계; 상기 단리된 T 세포를 IL-2를 포함하는 제1 배지 중 배양하고 상기 단리된 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물 또는 제제 및 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 항체와 같은 공동자극제로 활성화하는 단계; 상기 활성화 T 세포를 IL-2 또는 CD3 또는 CD28에 특이적인 항체를 포함하지 않는 제2 배양 배지 중 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 세포로 완전 재프로그래밍되지 않는, 단계; 상기 제2 배양 배지를 IL-2 및 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 제3 배양 배지로 대체하는 단계로서, 상기 일시적으로 접촉된 T 세포는 적어도 약 5일 동안 상기 제3 배양 배지 중 배양되는, 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0024] 다양한 구현예에서, 본 개시는 상기 부분적 재프로그래밍, 재활성화 T 세포를 추가로 증식시키는 단계를 제공한다. 다양한 구현예에서, 상기 T 세포는 TCR $\alpha \beta$ 세포; TCRgd 세포; CD4+CD8 $\alpha \beta$ + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포이다. 다양한 구현예에서, 상기 T 세포는 종양 침윤 림프구(TIL)이다.
- [0025] 다양한 구현예에서, 본 발명은 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은 T 세포 집단을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포 집단을 제공하며, 후생유전학적 연령은 그 연대순 연령보다 적어도 25% 더 젊다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포 유래 부착성 세포 집단을 제공하며, 세포의 적어도 70%는 CD3 및 SSEA4 둘 모두를 발현한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포 유래 부착성 세포 집단을 제공하며, 세포의 적어도 30%는 CD9 또는 CD90 또는 CD9 및 CD90 둘 모두를 발현한다.
- [0026] 다양한 양태에서, 본 발명은 종양 침윤 림프구 집단을 제공하며, 종양 침윤 림프구의 적어도 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 CCR7 및 CD62L 둘 모두를 발현한다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 종양 침윤 림프구 집단을 제공하며, 종양 침윤 림프구의 적어도 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%는 CCR7 및 TCF7 둘 모두를 발현한다.
- [0027] 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단을 제공한다.

- [0028] 다양한 구현예에서, 본 개시는 배양 용기 내의 제1 배양 배지 중 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 단리된 T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 적어도 하나의 부착된 콜로니를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단을 제공한다.
- [0029] 다양한 구현예에서, 본 개시는 제1 배양 배지 중 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 SV40과 적어도 약 5일 및 약 10일 이하의 기간 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 상기 일시적으로 접촉된 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단을 제공한다.
- [0030] 다양한 구현예에서, 본 개시는 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 SV40과, 단리된 T 세포가 SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 상기 일시적으로 접촉된 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단을 제공한다.
- [0031] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 단리된 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 상기 일시적으로 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 SSEA4 및 CD3을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 상기 일시적으로 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 상기 일시적으로 접촉된 T 세포의 적어도 일부가 CD3, SSEA4, CD9 및 CD90을 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다.
- [0032] 다양한 구현예에서, 상기 단리된 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에, 상기 일시적으로 접촉된 T 세포는 IL-2 및 상기 단리된 T 세포를 활성화할 수 있는 적어도 하나의 화합물과 접촉된다.
- [0033] 다양한 구현예에서, T 세포는 TCR α β 세포; TCR γ δ 세포; CD4+CD8 α β + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포 (예컨대 Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포이다. 다양한 구현예에서, T 세포는 TIL이다. 다양한 구현예에서, 상기 단리된 T 세포는 포유동물로부터 단리된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다.
- [0034] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 적어도 약 4 내지 10일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 적어도 약 4 내지 7일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다.
- [0035] 다양한 구현예에서, 단리된 T 세포는 약 5일 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 T 세포에서 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 비통합 바이러스 벡터를 사용하여 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 센다이 바이러스를 사용하여 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 구성적으로 발현되며, 발현은 나중에 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC의 발현을 억제하는 화합물의 첨가에 의해 억제된다. 다양한 구현예에서, 상기 화합물은 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 발현 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 소분자 억제제이다. 다양한 구현예에서, 상기 화합물은 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 중 하나 이상의 발현을 특이적으로 억제하는 siRNA 또는 shRNA 분자이다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC은 나노입자를 사용하여 일시적으로 발현된다.
- [0036] 다양한 구현예에서, 본 개시는 일시적으로 접촉된 T 세포(예를 들어, 부분적 재프로그래밍 T 세포)를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인; 및/또는 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물 및/또는 적어도 하나의 T 세포 공동자극제(예를 들어, 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체)와 추가로 접촉시키는 단계를 제공한다. 다양한 구현예에서, 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물은 CD3에 결합하는 항체 또는 CD28에 결합하는 항체 또는 둘 모두를 포함하거나; 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물은 증양 항원이다.
- [0037] 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 추가로 조작하는 단계를 제공하며, 상

기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉시키기 전에 조작된다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 추가로 조작하는 단계를 제공하며, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉시킨 후에 조작된다.

[0038] 다양한 구현예에서, 상기 세포 표면 수용체는 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 용체 또는 이의 하이브리드 수용체이다. 다양한 구현예에서, 상기 세포 표면 수용체는 표적 세포의 표면 상의 특정 항원 모이어티를 인식한다. 다양한 구현예에서, 항원 모이어티는 MHC 클래스 I 의존적이다. 다양한 구현예에서, 항원 모이어티는 MHC 클래스 I 비의존적이다. 다양한 구현예에서, 생성된 T 세포는 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 추가로 측정하는 단계를 제공한다. 다양한 구현예에서, 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령은 재프로그래밍 전 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 젊다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 처음에 단리된 세포보다 적어도 25배 더 많이 증식할 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 상기 단리된 T 세포를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 인자; 및 SV40과 추가로 접촉시켜 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는 단계를 제공한다.

[0039] 다양한 구현예에서, 본 개시는 공급원으로부터 복수의 단리된 T 세포를 수득하는 단계; 상기 단리된 T 세포를 IL-2를 포함하는 제1 배양 중 배양하고 상기 단리된 T 세포를 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체로 활성화하는 단계; 상기 활성화 T 세포를 IL-2 또는 CD3 및/또는 또는 CD28에 특이적인 항체를 포함하지 않는 제2 배양 배지 중 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 세포로 완전 재프로그래밍되지 않는, 단계; 상기 제2 배양 배지를 IL-2 및 CD3 및/또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 제3 배양 배지로 대체하는 단계로서, 상기 일시적으로 접촉된 T 세포는 적어도 약 5일 동안 상기 제3 배양 배지 중 배양되는, 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단에 관한 것이다.

[0040] 다양한 구현예에서, 본 개시는 상기 일시적으로 접촉된 T 세포를 추가로 증식시키는 단계에 관한 것이다. 다양한 구현예에서, 상기 T 세포는 TCR α β 세포; TCR γ δ 세포; CD4+CD8 α β + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포이다. 다양한 구현예에서, 상기 T 세포는 종양 침윤 림프구(TIL)이다.

[0041] 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 본원에 개시된 방법에 의해 또는 본원에 개시된 T 세포 집단에 의해 제조된 T 세포 집단으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 다양한 구현예에서, 치료 방법은 암, 바이러스 병태 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법이다.

[0042] 다양한 구현예에서, 암은 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 두경부암(예를 들어, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암), 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대장암 및 장간막암, 인두암, 전립샘암, 직장암, 신암(예를 들어, 신세포 암종(RCC)), 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상샘암, 요관암 또는 방광암이다.

[0043] 다양한 구현예에서, 본 발명은 a. 종양으로부터 T 세포를 단리하는 단계로서, T 세포는 종양 침윤 림프구이고, 종양 침윤 림프구는 CD137을 발현하는, 단계; b. 상기 종양 침윤 림프구를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물로 활성화하는 단계로서, T 세포 활성화 화합물은 종양 항원인, 단계; c. 단리된 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 d. T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0044] 다양한 구현예에서, 본 발명은 (a) TIL을 종양으로부터 단리하는 단계로서, TIL은 CD137을 발현하는, 단계, (b) 상기 TIL을 적어도 하나의 제1 종양 항원으로 활성화하는 단계, 및 (c) 단리된 TIL 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, TIL-유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 단리된 TIL은 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 종양 침윤 림프구(TIL)를 제조하는 방법에 관한 것이다.

- [0045] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, 접촉된 T 세포의 적어도 20%가 $\alpha 6\beta 1$ 인테그린을 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 적어도 상기 접촉된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 상기 접촉된 T 세포의 적어도 20%를 $\alpha 6\beta 1$ 인테그린에 특이적으로 결합하는 결합 분자로 단리하는 단계; (b)의 단리된 세포를 T 세포 활성화제 및/또는 T 세포 공동자극제와 접촉시켜 재생 T 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0046] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; $\alpha 6(\text{CD}49\text{f})$ 또는 $\text{b}1(\text{CD}29)$ 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 단리된 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; $\alpha 6$ 인테그린, $\text{b}1$ 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 재생 T 세포 집단에 관한 것이다.
- [0048] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 유래 부착성 세포 집단에 관한 것이며, 세포의 적어도 70%는 인테그린 $\alpha 6$ 또는 인테그린 $\beta 1$ 을 발현한다.
- [0049] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 유래 부착성 세포 집단에 관한 것이며, 세포의 적어도 50%는 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 모두를 발현한다.
- [0050] 다양한 구현예에서, 본 발명은 T 세포 유래 부착성 세포 집단에 관한 것이며, 세포의 적어도 70%는 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 둘 모두를 발현한다.
- [0051] 본 발명의 추가적인 특징 및 양태는 하기 개시 및 첨부된 청구범위 및 도면을 고려하여 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 센다이 바이러스 형질도입을 사용한 부분적 재프로그래밍을 위한 실험 설계를 나타낸다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터의 단리 후, T 세포를 IL2를 포함하는 CD3, CD28 활성화 배양 배지로 3일 동안 활성화하였다(제-2일 내지 제0일). 제0일에, 세포를 (i) 방해 없이 방치하거나(그룹 #1); (ii) IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지에 넣거나(그룹 #2); (iii) IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지에 넣고 2개의 센다이 바이러스 - 하나는 EmGFP를 발현하고, 하나는 SV40을 발현함 - 로 형질도입하거나(그룹 #3); (iv) IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지에 넣고 4개의 센다이 바이러스 - KOS(KLF4, OCT3/4, SOX2), KLF4, cMyc 및 SV40을 발현함 - 로 형질도입하였다(그룹 #4). 발현은 5일 동안 계속되었다.
- 도 2는 OSKM+SV40을 발현하는 센다이 바이러스로의 형질도입 후 제4일에 시작하여 제9일까지 그룹 #4에서의 콜로니 형성을 나타낸다.
- 도 3a-3f는 실시예 1에 기재된 바와 같이 상이한 조건에서 배양된 T 세포의 형태 차이를 나타낸다. 도 3a는 그룹 #4로부터의 부착 세포 콜로니 형성을 나타낸다. 도 3b는 부착 및 콜로니 형성을 나타내지 않는 그룹 #3의 T 세포를 나타내고; 도 3c는 도 3d와 비교하기 위해 도 3a와 동일한 패널을 도시한다. 도 3d는 항-CD3 항체(100 ng/ml) 및 항-CD28 항체(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 자극을 포함하는 표준 T 세포 배양 배지 중 3일 후 T 세포를 나타낸다; 도 3e는 도 3f와 비교하기 위한 도 3a와 동일한 패널이다. 도 3f는 정상적인 iPS 세포 콜로니를 나타낸다. 도 3a, 3c 및 3e에 나타난 부착 세포는 본원에서 T 세포 유래 부착성 세포로 지칭된다.
- 도 4는 부분적 재프로그래밍 제3일, 제4일 및 제5일의 CD3 발현을 나타낸다. 특히, 그룹 #4의 재프로그래밍 세포는 부분적 재프로그래밍 과정에 걸쳐 CD3의 상실을 실증하였다.
- 도 5는 그룹 #4의 부착 세포의 측면 산란/전방 산란(SSC/FSC) FACS 그래프를 나타내어 부착 세포가 그룹 1 및 3

에서의 세포에 비해 더 크고 더 복잡한 구조를 가짐을 시사한다.

도 6은 제5일 부착 세포가 복잡한 구조를 가지고 더 커짐을 나타내는 SSC/FSC FACS 등고선 그래프이다.

도 7은 그룹 #4의 부착 세포가 2일 동안 T 세포 활성화 후 5일 더 T 세포 배양 배지 중 배양한 후 CD3 및 CD8 발현을 재획득함을 나타낸다. T 세포는 96웰 플레이트에서 2일 동안 T 세포 배양 배지 중 1 대 100 희석된 (1:100) T 세포 TRANSACTM(Miltenyi Biotec)를 사용하여 제5일에 활성화하였다. 그룹 #4 조건의 세포를 제5일에 2개의 웰로 나누었고, 부유 세포 및 부착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 모든 세포는 활성화 후 5일 더 T 세포 배양 배지 중 배양하였다.

도 8은 제12일 CD3 양성 세포의 표현형을 나타낸다. CCR7 및 CD62L은 나이브, 기억 줄기 세포 및 중추 기억 T 세포와 같은 특정 T 세포 유형을 검출하기 위한 마커이다. 세포는 제12일에 CD3 발현을 재획득하여 T 세포 표현형으로의 복귀를 시사하였다.

도 9는 제0일, 제5일 및 제12일에 세포 증식을 도시하는 막대 그래프이다. 세포 증식은 유세포측정을 사용하여 비드를 계수하여 측정하였다(123count eBeads Counting beads, Thermo). 그룹 #4의 부착 세포는 제5일 비정상적인 외관 및 CD3 발현 감소를 나타냈지만, 제5일부터 활성화 후 활성화에 반응하여 증식하였다. 제12일 대 제5일의 변화 비율은 특히 부착 세포에 대해 #1과 비교하여 #4의 증가된 증식을 시사하였다. 이는 본원에 사용된 부분적 재생 방법이 특히 부착 세포에서 T 세포 증식 가능성을 증가시킴을 시사한다.

도 10은 부분적 재프로그래밍 T 세포에서 SSEA4 및 CD3 발현의 FACS 등고선 그래프 분석이다. 실시예 2에 기재된 바와 같은 센다이 바이러스 감염 T 세포를 제1일에 iMatrix 코팅 접시로 옮기고 iPS 세포 배지 + 60 IU/ml IL2 중 3일 동안 배양한 다음 제4일부터 IL2를 포함하지 않는 iPS 세포 배지로 변경하였다. FACS 분석은 재프로그래밍 제8일에 수행하였다. 도면은 부분적 재프로그래밍 T 세포가 hiPS 세포 마커 SSEA4를 발현하고 CD3 T 세포 마커의 발현을 상실함을 나타낸다.

도 11은 PBMC-유래 CD8 T 세포의 부분적 재프로그래밍을 개략한 모식도이다(실시예 4, 표 4 참고).

도 12a~12b는 재활성화 전 표시된 일수 동안 부분적 재프로그래밍 세포에서 CD8a, CD8b, CD3을 측정된 유세포측정의 결과를 나타낸다. 도 12a는 제7일, 제9일 및 제10일 CD8a 및 CD8b의 발현에 대한 FACS 그래프를 나타내고 도 12b는 제6일~제10일에 CD8a 및 CD3CD8ab에 대해 양성인 세포의 백분율을 도시한 그래프이다. 실시예 4를 참고한다. CD4-CD8a+ 집단을 CD8B 및 CD3의 추가 분석을 위해 관문화하였다. 센다이 감염이 없다는 것은 CD8 T 세포가 제1 및 제2 자극을 받았지만 센다이 바이러스에 감염되지 않았음을 의미한다(재프로그래밍 인자 없음).

도 13은 NY-ESO-1+ T 세포의 부분적 재프로그래밍 및 재활성화를 개략한 모식도이다. 명확성을 위해 전체 과정의 상이한 상을 표지하였다.

도 14a~14d는 재생 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포의 사이토카인 생산 및 탈과립 검정의 결과를 나타내는 그래프이다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사랑체+ 세포를 NY-ESO-1 Tg T 세포에 대해 관문화하였고 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사랑체- 세포를 모의 대조군 T 세포에 대해 관문화하였다. IFNγ+(a), TNFα+(b), IL-2+(c) 및 CD107a+(d)의 빈도를 계산하여 나타낸 바와 같이 도시하였다.

도 15는 자극 T 세포 대 T 세포 유래 iPS 세포에서 세포 표면 마커 발현 수준의 비의 워터폴 그래프이다(또한 표 5 참고).

도 16은 비자극 T 세포 대 T 세포 유래 iPS 세포에서 세포 표면 마커 발현 수준의 비의 워터폴 그래프이다(또한 표 5 참고).

도 17은 CD9 및 CD90이 부분적 재프로그래밍 T 세포의 초기 상의 잠재적 세포 표면 마커 표시인자임을 나타낸다. 도면은 자극 T 세포, 비자극 T 세포 및 제5일 부착된 부분적 재프로그래밍 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)에서 CD9 및 CD90 발현의 유세포측정 분석을 나타낸다. 초기 iPS 세포 표면 마커 SSEA4의 발현은 CD9 및 CD90의 발현과 대조적으로 T 세포 유래 부착성 세포에서 제5일에 크게 변화하지 않는다.

도 18a~18d는 부분적 재프로그래밍 T 세포가 통상적 T 세포 마커 CD3 및 CD8a의 발현을 재획득하고 생존 및 증식하기 위해 자극 신호전달이 중추적임을 나타낸다. 도 18a는 제7일(탈착일)에 CD3 및 CD8a를 발현하는 부분적으로 재프로그래밍 세포의 백분율을 나타내는 FACS 등고선 그래프이다. 도 18b는 1:500 또는 1:1000 희석 TRANSACT로의 활성화 후 또는 T 세포 배양 배지(TCM + IL2 60 IU/ml) 중에서만 제20일에 CD3 및 CD8a를 발현하

는 세포의 백분율을 나타내는 FACS 등고선 그래프이다. 도 18c 및 18d는 상이한 그룹의 증식 및 생존력을 나타낸다.

도 19a~19b는 재생 T 세포가 극적으로 향상되고 지속된 시험관내 증식을 보임을 나타낸다. T 세포는 37세 여성, 42세 남성 및 52세 남성 공여자로부터 획득하였다.

도 20a~20c는 재생 T 세포에 대한 IL-2의 효과를 나타낸다. 재생 45일 후, 재생 T 세포를 IL-2 없이 TCM 중 공동 배양하였다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ 세포를 모든 세포 그룹에 대해 관문화하였다. 도 20b 및 도 20c에서 알 수 있는 바와 같이, IL-2 없이 공동 배양한 세포는 6일 내에 죽었다.

도 21은 재생 37yF, 42yM 및 52yM T 세포의 사이토카인 생산 검정 결과를 나타낸다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- 세포를 모든 세포 그룹에 대해 관문화하였다. IL2+ 및 IFN γ +의 빈도를 계산하고 나타낸 바와 같이 도시하였다.

도 22a~22c는 재생 T 세포가 장기 증식 후 효과기 표현형을 나타낸다는 것을 나타낸다. 센다이 바이러스 감염 T 세포를 제1일에 iMatrix 코팅 접시로 옮기고 T 세포 배지 + 60 IU/ml IL2 또는 iPS 세포 배지 + 60 IU/ml IL2 중 3일 동안 배양한 다음 제4일부터 IL2를 포함하지 않는 iPS 세포 배지로 변경하였다. 재프로그래밍 후 제7일 및 제26일에 FACS 분석을 수행하였다.

도 23은 T 세포의 분화 상태를 정의하기 위해 사용된 세포 마커(CD3, CD45RA, CD45RO, CD62L 및 CCR7)의 FACS 등고선 그래프 분석이다.

도 24는 TRANSACT로의 자극 후 2명의 상이한 공여자(#3 및 #4)로부터의 NY-ESO-1 재생 또는 대조군 세포의 증식 배율을 나타낸다. 재생 T 세포는 대조군보다 더 오래 증식했고 약 2~3주의 배양에서 대조군을 능가하였다.

도 25는 부분적으로 재프로그래밍 NY-ESO-1 T 세포에서 NY-ESO-1-CD3, CD4-CD8b, CCR7-CD62L 및 CD45RO-CD45RA 발현의 FACS 등고선 그래프 분석이다.

도 26a~26d는 재생 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포의 사이토카인 생산 및 탈과립 검정 결과를 나타내는 그래프이다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사랑체+ 세포를 NY-ESO-1 Tg T 세포에 대해 관문화하였고 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사랑체- 세포를 모의 대조군 T 세포에 대해 관문화하였다. IFN γ +(a), TNF α +(b), IL-2+(c) 및 CD107a+(d)의 빈도를 계산하고 나타낸 바와 같이 도시하였다. 표적 없음(대조군); T2P-: 펩티드가 없는 T2 표적 세포(- 대조군); T2P+: NYESO1 펩티드로 펠싱된 T2 표적 세포; Mel1624: 내인성 NYESO1을 발현하는 HLA-A2+ 종양 세포; PMA/I: PMA/이오노마이신으로 활성화된 세포(+ 대조군).

도 27a~27b는 종양 침윤 림프구(TIL)의 재생이 증식을 증대시키고 더욱 줄기 세포 유사 생성물을 생성함을 나타낸다. 도 27a는 세포 증식을 도시하고 재생 TIL의 변화 배율을 대조군 세포와 비교하는 그래프이다. 도 27b는 CCR7-CD62L 및 CCR7-TCF7의 발현에 대한 FACS 그래프를 나타내고, 재생 TIL이 줄기성 관련 마커의 높은 발현을 보였음을 나타낸다.

도 28은 아래 기재된 실시예 12에서 사용된 재생 프로토콜의 예시적이고 비제한적 방식을 도시한다.

도 29a 및 29b는 실시예 12의 재생 프로토콜과 관련하여 수행된 표현형 분석을 나타낸다. 도 29a는 공여자 1의 대표적 FACS 그래프를 나타내며, CD3+CD8b+의 빈도를 나타낸다(단일체, 사멸 세포 염색 음성, 및 림프구 SSC/FSC에 대해 관문화됨). 도 29b는 도 29a에서와 같이 관문화된 CD3+CD8b+ 빈도의 막대 그래프이다; 각 막대는 공여자 1~3의 평균을 나타낸다. 오차 막대는 +/-1SD를 표시한다.

도 30a~30c는 실시예 12의 공여자 1~3에서 Sev 형질도입 전 및 형질도입 후 제7일, 제13일, 제18일의 피부 및 혈액 시계 결과를 나타낸다. "Sev 형질도입 전"은 센다이 바이러스 형질도입을 위한 활성화 전 샘플을 표시한다. 오차 막대는 □1SD.FIG를 나타낸다.

도 31은 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포의 재생 결과를 예시한다. CD4 또는 CD8 T 세포는 재프로그래밍 전에 Transact에 의해 자극되고 NY-ESO-1 TCR로 형질도입되었다.

도 32a 및 32b는 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 덜 분화된 표현형을 나타낸 재생 결과를 예시한다.

도 33은 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 대조군 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포보다 더 많이 증식된 재생 결

과를 예시한다.

도 34a 및 34b는 2명의 공여자: 24세 남성(a) 및 35세 남성(b)의 eAge 값을 나타내는 막대 그래프이다. 이 도면은 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 대조군 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포의 후생유전학적 연령 분석 및 공여자의 연대순 연령에 의해 더 젊은 표현형을 나타냄을 예시한다. 그래프는 특정 CpG 부위의 메틸화 상태에서 분석된 연령 값의 평균 및 S.D.를 나타낸다.

도 35는 재생 및 대조군 NY-ESO-1 세포로부터의 세포내 사이토카인 염색을 나타내는 막대 그래프를 도시한다. 그래프는 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 T2 세포와 NY-ESO-1 펩티드의 공동 배양 시 더 많은 사이토카인(IFN γ (a), IL-2(b) 및 TNF α (c))을 생산하였음을 나타낸다. t-시험 p-값 통계적 유의성: * <0.05, ** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001.

도 36은 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포가 NY-ESO-1 발현 표적 세포(A375-NLR)와의 반복된 공동 배양 시 지속되고 이의 세포독성 활성을 더 오래 유지하였다는 재생 결과를 예시한다.

도 37은 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 T 세포의 첨가로 인한 재생 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포의 향상된 세포독성을 기재한다.

도 38a 및 38b는 표시된 시점에 2명의 상이한 공여자로부터의 재생 세포 및 대조군 세포의 적응 면역 관련 사이토카인의 발현 수준을 나타낸다. y축은 사이토카인 농도(pg/mL)를 표시한다.

도 39a 및 39b는 표시된 시간에 2명의 상이한 공여자로부터의 재생 세포 및 대조군 세포의 선천성 면역 관련 사이토카인의 발현 수준을 나타낸다. y축은 사이토카인 농도(pg/mL)를 표시한다.

도 40은 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포의 대표적 FACS 그래프를 사용하여 CD8 T 세포에서의 NY-ESO-1 TCR 형질도입 효율을 기재한다: (왼쪽) CD4 x CD8b, (오른쪽) CD3 x NY-ESO-1 TCR TE. 실시예 15를 참고한다.

도 41은 실시예 15의 절차를 도식적으로 제시한다.

도 42는 제0일과 비교하여 제7일에 각각의 조건으로부터 수집된 탈착 세포수의 변화 배율을 나타내는 막대 그래프를 제공한다. 실시예 15를 참고한다.

도 43은 부분적으로 재프로그래밍 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 재자극을 기재한다. 도 43은 제14일의 대표적 FACS 그래프를 제공한다. NY-ESO-1 TCR TE+ 세포의 빈도가 제공된다. 실시예 15를 참고한다.

도 44는 부분적으로 재프로그래밍 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 재자극을 기재한다. 도 44는 NY-ESO-1 TCR TE+ 세포의 제14일 빈도의 대표적 막대 그래프를 제공한다. 실시예 15를 참고한다.

도 45는 재생 NY-ESO-1 Tg T 세포가 비재생 대조군보다 높은 증식 능력을 가짐을 나타내는 증식 곡선이다(실시예 15 참고).

도 46은 CD8 T 세포에서의 CD19 CAR 형질도입 효율을 예시한다. 실시예 16을 참고한다. 세포를 림프구 > 단세포 > 살아있음/사멸-로 판분화하였고, CD3 x CD8a(오른쪽에서 두 번째), CAR 개별특이형 x EGFR(맨 오른쪽)로 도시하였다. tEGFR은 성공적 형질도입의 마커로 발현시켰다.

도 47은 재생 CD19 CAR T 세포가 덜 분화된 표현형을 나타냄을 예시한다. 제13일에 대조군 및 재생 CD19 CAR Tg T 세포를 FACS에 의해 표면 마커 및 Tcf1 발현에 대해 분석하였다. 세포를 림프구 > 단세포 > 살아있음/사멸- > CD19 CAR+로 판분화하였고, CD4 x CD8a(왼쪽에서 두 번째), CCR7 x CD62L(오른쪽에서 두 번째) 및 CCR7 x Tcf1(맨 오른쪽)로 도시하였다.

도 48은 재생 CD19 CAR T 세포가 대조군 CD19 CAR T 세포보다 더 증식했음을 나타낸다. 실시예 16을 참고한다. CD19 CAR Tg T 세포를 섹션 3에 기재된 바와 같이 재생 및 배양하고, 세포수를 3-4일마다 계수하였다. 그래프는 시간이 지남에 따른 2명의 건강한 공여자 및 이의 상응하는 대조군 세포에서의 재프로그래밍 인자의 형질도입 후 제7일과 비교한 변화 배율을 도시한다.

도 49는 재생 CD19 CAR T 세포가 CD19 발현 표적 세포와의 공동 배양 시 필적하는 수준의 사이토카인을 생산했음을 예시한다. 실시예 16을 참고한다. 제20일에 대조군 또는 재생 CD19 CAR Tg T 세포를 단독으로 또는 PMA/이오노마이신, Co1o205(CD19-) 또는 Nalm6(CD19+)과 함께 골지 수송체 억제제의 존재 하에 배양하였다. 표면 항원을 염색한 후, 세포를 고정, 투과화하고 세포내 Ab로 염색하였다. 각 사이토카인 양성 CAR+ 세포의 빈도를 도시하였다.

도 50a 및 50b는 재생 CD19 CAR T 세포가 CD19 발현 표적 세포와의 반복된 공동 배양 시 지속되고 이의 세포독성 활성을 더 오래 유지했음을 나타낸다. 실시예 16을 참고한다. 도 50a 및 50b는 대조군 또는 재생 CD19 CAR Tg T 세포와 Na1m6-NLR 세포주의 공동 배양한 결과를 나타낸다. 3~4일마다 이전 배양의 25%(4차 및 5차 공동 배양의 경우 10%)를 신선 표적을 포함하는 새 플레이트로 옮겼다. Incucyte® 살아있는-세포 분석 시스템을 사용하여 표적의 성장을 모니터링하고 기본 소프트웨어 분석 모듈로 분석하였다. 그래프는 공여자 #1(도 50a) 및 #2(도 50b)의 각 조건의 Na1m6-NLR 수/이미지를 나타낸다.

도 51은 예시 목적을 위해 실시예 17에 기재된 재생 프로토콜의 예시적이고 비제한적인 실험 설계이다.

도 52a 및 52b는 실시예 17에서 논의된 Sev 및 mSev 그룹 각각에서의 제11일에 탈착 세포(도 52a) 및 제17일에 동일한 세포(즉, 제11일에 탈착됨)(도 52b)의 표현형 분석 결과이다. 제공된 FACS 그래프는 CD3+CD8b+(단일체, 사멸 염색 음성 및 림프구 SSC/FSC에 대해 관문화됨)의 빈도를 나타낸다.

도 53a~53c는 탈착 후 다양한 일수 후의 변화 배율을 나타내는 증식 곡선이다(실시예 17 참고). 도 53a는 제7일에 발생한 탈착 후 세포수 변화 배율을 나타낸다. 도 53b는 제9일에 발생한 탈착 후 세포수 변화 배율을 나타낸다. 도 53c는 제11일에 발생한 탈착 후 세포수 변화 배율을 나타낸다. 각각의 도 53a~53c에서의 각 점은 2명의 공여자의 평균을 표시한다. 오차 막대는 ±1SD를 표시한다.

도 54a는 줄기성 표현형이 실시예 17의 재프로그래밍 T 세포의 탈착 6일 후에 나타났음을 나타낸다. 막대 그래프는 기술적 복제물에서의 평균 TCF1+CCR7+ 빈도(단일체, 사멸 염색 음성, 림프구 SSC/FSC 및 CD3+CD8b+에 대해 관문화됨)를 나타낸다. 오차 막대는 ±1SD를 표시한다.

도 54b는 실시예 17의 재프로그래밍 T 세포의 탈착 6일 후 줄기성 표현형을 나타낸다. 막대 그래프는 기술적 복제물에서의 평균 CCR7+CD62L+ 빈도(단일체, 사멸 염색 음성, 림프구 SSC/FSC 및 CD3+CD8b+에 대해 관문화됨)를 나타낸다. 오차 막대는 ±1SD를 표시한다.

도 55는 실시예 17에 기재된 바와 같이 Sev 또는 mSev로 일시적으로 재프로그래밍되고 제7일, 제9일 및 제11일에 탈착된 T 세포의 후생유전학적 연령을 나타낸다. 후생유전학적 연령은 호르바트(Horvath) 피부 혈액 시계를 사용하여 측정하였다.

도 56은 실시예 18의 재생 및 대조군 세포에 대한 증식 곡선을 나타낸다.

도 57a~57d는 실시예 18의 제7일 및 제13일에 대조군 및 재생 세포로부터의 건강한 공여자 CD8+ T-세포의 트랜스크립토프로파일분석을 나타낸다. 도 57a는 UMAP에 의해 시각화된 4명의 공여자 모두로부터의 대조군 및 재생 세포의 CD8+ T-세포의 단세포 RNA-seq 데이터를 나타낸다. 도 57b는 대조군 및 재생 세포로부터의 CD8+ T-세포의 단세포 RNA-seq 데이터에서 재생 세포의 야마나카(Yamanaka) 인자를 암호화하는 전사체의 발현 수준을 나타낸다. 도 57c는 대조군 및 재생 세포로부터의 CD8+ T-세포의 벌크 RNA-seq 데이터에서 야마나카 인자를 암호화하는 전사체의 발현 수준을 나타낸다. 도 57d는 제7일 및 제13일에 대조군 및 재생 세포로부터의 건강한 공여자 CD8+ T-세포에서 내인성 cMYC 유전자에 대해 정렬된 관독의 게놈 정렬 시각화를 나타낸다.

도 58a는 실시예 18의 벌크 RNA-seq 데이터의 3명의 공여자(즉, 공여자 번호 11347, 12254 및 26221)에서 제7일 및 제13일에 대조군 세포와 비교하여 재생 세포에서 대사 유전자 세트의 농축을 도시한다. x축 눈금의 차이는 제7일 및 제13일에 대한 조정된 p 값을 나타낸다. 회색 실선은 유의성의 임계값을 나타낸다(조정된 P 값 < 0.05).

도 58b는 도 59a에 나타난 동일한 UMAP 제시에 대한 해당작용 및 산화적 인산화 유전자 세트의 AddModule 점수를 나타낸다(실시예 18 참고).

도 59a는 재생 세포가 대조군 세포와 비교하여 제13일에 나이브 유전자 세트(가티노니(Gattinoni))가 농축됨을 예시하는 UMAP이다(실시예 18 참고).

도 59b는 재생 세포가 대조군 세포와 비교하여 제13일에 나이브 유전자 세트(가티노니)가 농축됨을 예시하는 막대 그래프이다(실시예 18 참고).

도 60a 및 60b는 재생 후 공여자 1 및 2의 증식 곡선을 나타내는 그래프이다. 모든 재생 세포는 대조군보다 훨씬 높은 증식 배율을 나타내었다. 한 공여자에서 TransAct 자극 그룹은 CD137+ 선택 그룹보다 높은 증식을 나타낸 반면 다른 공여자에서는 이것이 더 낮았다. 이는 자극에 대한 중앙 반응성 집단의 상이한 친화도를 제시하였다. 33일 후 증식은 감소를 나타냈으며, 이는 해당 배양의 시딩 세포 밀도가 배양 플레이트에 대해 최적이지 아니

어서 불충분한 영양분 및 산소 공급을 유발하였기 때문일 수 있다. 실시예 19를 참고한다.

도 61a 및 61b는 경시적인 재생 및 대조군 세포에서의 CD62L 및 CCR7의 발현을 나타내는 그래프이다. CD62L+CCR7+는 재생 초기 단계에서 보존되었다. 세포를 표시된 날짜에 수확하고 형광 표시된 항체로 염색한 다음 유세포측정으로 분석하였다. 결과는 재생 세포가 이 두 공여자에서 D14 및 D17에 CD62L+CCR7+를 높게 발현함을 나타내었다. 실시예 19를 참고한다.

도 62는 재생 후 공여자 3의 증식 곡선을 나타내는 그래프이다. TIL은 CD45+가 농축되었고, 그 다음 TransAct로 자극된 후 재생되었다. 세포를 지정된 날짜에 계수하였다. 재생 CD45+는 대조군 세포와 비교하여 훨씬 향상된 증식을 나타낸 반면, CD45- 그룹은 매우 제한된 증식을 나타내었다. 실시예 19를 참고한다.

도 63은 15일에 대조군 및 공여자 3에서 주기성과 연관된 마커의 발현을 측정하는 FACS 등고선 그래프를 나타낸다. CD45- 세포가 아닌 재생 CD45+ TIL은 CD62L+CCR7+ 및 TCF7+CCR7+의 훨씬 더 높은 발현을 나타냈다. 실시예 19를 참고한다.

도 64는 재생 후 대조군 및 공여자 4의 증식 곡선을 나타내는 그래프이다. 세포를 1:500(고) 또는 1:2000(저)의 TransAct로 자극하였다. 재생 세포(고 및 저 그룹 둘 모두)는 T 세포로의 재유도 후 대조군과 유사한 증식율을 나타내었다.

도 65는 재생 후 대조군 세포 및 공여자 4에서 제21일에 주기성과 연관된 마커의 발현을 측정하는 FACS 등고선 그래프를 나타낸다. 재생 세포(고 및 저 그룹 모두)는 대조군 세포보다 CD62L+CCR7+ 및 TCF7+CCR7+의 더 높은 발현을 나타내었다. 실시예 19를 참고한다.

도 66은 표시된 시간에 공여자 7로부터의 대조군 또는 재생 세포의 후생유전학적 연령(eAge)을 나타내는 그래프이다. 대조군 세포의 후생유전학적 연령은 공여자의 연대순 연령과 유사했지만, 재생 세포는 제15일에 훨씬 더 젊은 연령을 나타내었고, 이는 증식 시간과 함께 점차 증가하였다. 실시예 19를 참고한다.

도 67은 표시된 시간에 공여자 9로부터의 대조군 또는 재생 세포의 후생유전학적 연령(eAge)을 나타내는 그래프이다. 대조군의 후생유전학적 연령은 연대순 공여자 연령과 유사한 반면, 재생 세포는 제15일에 훨씬 더 젊은 후생유전학적 연령을 나타내었고, 이는 배양에서 증식 경시적으로 점차 대조군 수준으로 복귀하였다. 실시예 19를 참고한다.

도 68은 공여자 7 및 공여자 9로부터의 대조군 및 재생 세포의 증식을 나타내는 그래프이다. 재생 세포는 T 세포로의 재유도 후 대조군과 유사한 증식율을 나타냈다. 실시예 19를 참고한다.

도 69a는 실시예 20의 공여자 6으로부터의 제14일 및 제18일에 제11일 탈착 세포의 표현형 분석을 나타낸다. FACS 그래프는 CD3+(단일체, 사멸 염색 음성 및 CD3+ 세포에 대해 관문화됨)의 빈도를 나타낸다. 재생 세포는 제14일 및 제18일에 더 높은 TCF7+CCR7+를 나타냈다. 실시예 20 및 표 10을 참고한다.

도 69b는 실시예 20의 공여자 8로부터의 제14일 및 제18일에 제11일 탈착 세포의 표현형 분석을 나타낸다. FACS 그래프는 CD3+(단일체, 사멸 염색 음성 및 CD3+ 세포에 대해 관문화됨)의 빈도를 나타낸다. 재생 세포는 제14일 및 제18일에 더 높은 TCF7+CCR7+를 나타냈다. 실시예 20 및 표 10을 참고한다.

도 70은 부착 세포(약부착 세포, 부착 세포, 강부착 세포)가 제10일에 활성화 T 세포 대조군보다 높은 인테그린 a6 및 인테그린 b1 발현을 나타냄을 나타낸다. 강부착 세포는 약부착 세포 및 부착 세포보다 높은 인테그린 a6 및 인테그린 b1 발현을 나타낸다. 그래프는 단일체 및 살아있는 관문화 후 획득하였다.

도 71은 제10일에 T 세포 활성화 후 인테그린 a6 및 인테그린 b1 발현이 감소되었음을 나타낸다. 막대 그래프는 도 70의 그래프의 MFI(평균 형광 세기)를 나타낸다. 값은 각 시점의 활성화 T 세포 대조군의 MFI에 의해 정규화하였다. 대조군 값은 1이었다.

도 72는 부착 세포가 제10일에 CD3 발현을 상실했지만 제17일에 CD3 발현을 획득했음을 나타낸다.

도 73은 약부착 세포, 부착 세포 및 강부착 세포에서 나타나는 높은 증식이 나타남을 나타낸다. 강부착 세포는 늦은 세포 증식 시작을 나타내었다.

도 74a 및 74b는 부착 세포(특히 강부착 세포)가 제10일(도 74a) 및 제17일(도 74b)에 높은 TCF1 및 CCR7 발현을 보였음을 나타낸다. MFI는 단일체 및 살아있는 관문화 후 데이터에서 획득하였다.

도 75는 제7일 및 제13일에 대조군 및 재생 세포로부터의 단세포 TCR 서열의 심슨 클론성 분포를 나타낸다(실시

예 18 참고).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] 본원의 기재는 단지 예시적이고 설명을 위한 것이며 청구된 바와 같은 본 개시를 제한하지 않는다는 것이 이해될 것이다. 본 출원에서 단수의 사용은 특별히 달리 언급하지 않는 한 복수를 포함한다.
- [0054] 본원에 사용된 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0055] 본 개시에 걸쳐 다양한 특허, 특허 출원 및 간행물이 참조된다. 이들 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시는 이의 전체가 본 개시일 현재 당업자에게 알려진 최신 기술을 보다 완전하게 설명하기 위해 참고문헌으로 본 개시에 포함된다. 인용된 특허, 특허 출원 및 간행물과 본 개시 사이에 임의의 불일치가 있는 경우, 본 개시가 우선할 것이다.
- [0056] 편의를 위해, 본 명세서, 실시예 및 청구범위에 사용된 특정 용어가 여기에 수집된다. 달리 정의되지 않는 한, 본 개시에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시가 속하는 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 개시에 따라 활용된 바와 같이, 달리 표시되지 않는 한, 하기 용어는 하기 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다:
- [0057] 본 출원에서 "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, "포함하다" 및 "포함된"과 같은 다른 형태뿐만 아니라 용어 "포함하는"의 사용은 제한하는 것이 아니다. 또한, "요소" 또는 "성분"과 같은 용어는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 하나의 단위를 포함하는 요소 및 성분 그리고 하나 초과와 서브유닛을 포함하는 요소 및 성분 둘 모두를 포괄한다.
- [0058] 본 개시는 부분적으로 부분적 재프로그래밍 및 재활성화 과정에 의해 재생 T 세포를 생성하여 부분적으로 재프로그래밍 세포를 재생되고 기능하는 T 세포로 복귀시키는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 재프로그래밍 인자의 T 세포에서의 일시적 발현을 포함한다. 부분적 재프로그래밍 과정은 탈분화 세포의 하나 이상의 마커를 발현하지만 T 세포 계통의 표현형 마커를 보유하는 "T 세포 유래 부착성" 세포의 형성을 초래한다. 따라서, T 세포 유래 부착성 세포는 T 세포 활성화 화합물 제제와 접촉될 때 기능하는 T 세포로 복귀하는 부분적 탈분화 T 세포이다. 이 과정에 의해 생성된 T 세포는 본원에서 더 상세히 기재된 바와 같이 계통 안정성을 유지하고 항원-특이성을 유지하면서 세포 재생 특성을 나타낸다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "면역 세포(들)"는 예를 들어 T 세포, B 세포, 단핵구, 대식구, 수지상 세포 등을 포함하는 임의의 유형의 면역 세포를 표시한다. 특정 예시적 구현예에서, 본원에 개시된 면역 세포는 T 세포이다.
- [0060] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 단일 가닥 및 이중 가닥 뉴클레오티드 중합체 둘 모두를 포함한다. 폴리뉴클레오티드를 이루는 뉴클레오티드는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 둘 중 한 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태일 수 있다. 상기 변형은 브로모우리딘 및 이노신 유도체와 같은 염기 변형, 2',3'-디데옥시리보스와 같은 리보스 변형, 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로-디셀레노에이트, 포스포로-아닐로티오에이트, 포스포로아닐라테이트 및 포스포로아미데이트와 같은 뉴클레오티드간 결합 변형을 포함한다.
- [0061] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 200개 이하의 뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 돌연변이체 유전자의 작제에서 사용하기 위한 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 검출 검정을 위한 방사성 표지, 형광 표지, 합텐 또는 항원 표지를 포함하는 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 PCR 프라이머, 클로닝 프라이머 또는 혼성화 탐침으로 사용될 수 있다.
- [0062] 용어 "제어 서열"은 결합된 코딩 서열의 발현 및 가공에 영향을 미칠 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 제어 서열의 성질은 숙주 유기체에 의존할 수 있다. 특정 구현예에서, 원핵생물에 대한 제어 서열은 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 진핵생물에 대한 제어 서열은 전사 인자에 대한 하나 또는 복수의 인식 부위를 포함하는 프로모터, 전사 인핸서 서열 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. "제어 서열"은 리더 서열(신호 펩티드) 및/또는 융합 파트너 서열을 포함할 수 있다.
- [0063] 본원에 사용된 바와 같이, "작동 가능하게 연결된"은 이 용어가 적용되는 성분이 적절한 조건 하에 이의 내재적 기능을 수행할 수 있도록 하는 관계에 있음을 의미한다.
- [0064] 용어 "백터"는 단백질 코딩 정보를 숙주 세포로 전달하기 위해 사용되는 임의의 분자 또는 실체(예를 들어, 핵

산, 플라스미드, 박테리오파지 또는 바이러스)를 의미한다. 용어 "발현 벡터" 또는 "발현 작제물"은 숙주 세포의 형질전환에 적합하고 이에 작동적으로 연결된 하나 이상의 이중 코딩 영역의 발현을 유도 및/또는 제어하는 (숙주 세포와 함께) 핵산 서열을 함유하는 벡터를 지칭한다. 발현 작제물은 전사, 번역에 영향을 미치거나 제어하고, 인트론이 존재하는 경우 이에 작동 가능하게 연결된 코딩 영역의 RNA 스플라이싱에 영향을 미치는 서열을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0065] 용어 "숙주 세포"는 핵산 서열로 형질전환되었거나 형질전환될 수 있고 이에 따라 관심 유전자를 발현하는 세포를 지칭한다. 이 용어는 관심 유전자가 존재하는 한, 자손이 원래 모세포와 형태 또는 유전적 구성이 동일한지 여부에 관계없이 모세포의 자손을 포함한다.

[0066] 용어 "형질전환"은 세포의 유전적 특성의 변화를 지칭하며, 세포가 새로운 DNA 또는 RNA를 함유하도록 변형되었을 때 세포는 형질전환된다. 예를 들어, 형질감염, 형질도입, 나노입자(예를 들어, 지질 나노입자)를 사용한 전달 또는 다른 기술을 통해 새로운 유전 물질을 도입함으로써 그 천연 상태에서 유전적으로 변형된 경우 세포가 형질전환된다. 형질감염 또는 형질도입 후, 형질전환 DNA는 세포의 염색체에 물리적으로 통합되어 세포의 DNA와 재조합할 수 있거나, 복제되지 않고 에피솜 요소로 일시적으로 유지될 수 있거나, 플라스미드로서 독립적으로 복제할 수 있다. 형질전환 DNA가 세포 분열과 함께 복제될 때 세포는 "안정적으로 형질전환"된 것으로 간주된다.

[0067] 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외래 또는 외인성 유전 물질(DNA 또는 RNA)의 흡수를 지칭한다. 다수의 형질감염 기술이 당분야에 잘 알려져 있고 본원에 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌(Graham 등, 1973, *Virology*, 1973, 52:456; Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2001, 상기 문헌; Davis 등, *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986, Elsevier; Chu 등, 1981, *Gene*, 13:197)을 참고한다.

[0068] 용어 "형질도입"은 외래 DNA 또는 RNA가 바이러스 벡터를 통해 세포로 도입되는 과정을 지칭한다. 예를 들어, 문헌(Jones 등, *Genetics: Principles and Analysis*, 1998, Boston: Jones & Bartlett Publ)을 참고한다.

[0069] 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 천연 서열의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 포함하는 단백질의 아미노산 서열을 갖는 거대분자를 지칭한다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 특히 항원 결합 단백질의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 항원 결합 분자, 항체 또는 서열을 포괄한다. 용어 "폴리펩티드 단편"은 전장 천연 단백질과 비교하여 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 단편은 천연 단백질과 비교하여 변형된 아미노산을 또한 함유할 수 있다. 유용한 폴리펩티드 단편은 항원-결합 분자의 면역학적으로 기능적인 단편을 포함한다.

[0070] 용어 "단리된"은 (i) 일반적으로 발견되는 적어도 일부 다른 단백질이 없거나, (ii) 동일한 공급원, 예를 들어 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 본질적으로 없거나, (iii) 자연에서 연관된 적어도 약 50%의 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물, 또는 다른 물질로부터 분리되거나, (iv) 자연에서 연관되지 않은 폴리펩티드와 (공유 또는 비공유 상호작용에 의해) 작동 가능하게 연관되거나, (v) 자연 발생하지 않음을 의미한다.

[0071] 폴리펩티드(예를 들어, 항원 결합 분자)의 "변이체"는 하나 이상의 아미노산 잔기가 또 다른 폴리펩티드 서열에 비해 아미노산 서열로 삽입, 결실 및/또는 치환된 아미노산 서열을 포함한다. 변이체는 융합 단백질을 포함한다.

[0072] 용어 "동일성"은 서열을 정렬하고 비교함으로써 결정되는, 2개 이상의 폴리펩티드 분자 또는 2개 이상의 핵산 분자의 서열 사이의 관계를 지칭한다. "동일성 백분율"은 비교되는 분자의 아미노산 또는 뉴클레오티드 사이의 동일한 잔기%를 의미하며 비교되는 가장 작은 분자의 크기에 기반하여 계산된다. 이러한 계산을 위해 정렬의 겹(있는 경우)은 바람직하게는 특정 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘")에 의해 처리된다.

[0073] 동일성%를 계산하기 위해 비교되는 서열은 전형적으로 서열 간에 가장 큰 매치를 제공하는 방식으로 정렬된다. 동일성%를 결정하기 위해 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램의 한 예는 GCG 프로그램 패키지이며, 이는 GAP(Devereux 등, *Nucl. Acid Res.*, 1984, 12, 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)을 포함한다. 컴퓨터 알고리즘 GAP은 서열 동일성%가 결정될 2개의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 정렬하기 위해 사용된다. 서열은 이의 각각의 아미노산 또는 뉴클레오티드의 최적 매칭(알고리즘에 의해 결정되는 "매칭 구간")을 위해 정렬된다. 특정 구현예에서, 표준 비교 매트릭스(예를 들어, PAM 250 비교 매트릭스에 대해 Dayhoff 등, 1978, *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5:345-352; BLO-SUM 62 비교 매트릭스에 대해 Henikoff 등, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 10915-10919 참고)가 또한 알고리즘에 의해 사용된다.

- [0074] 본원에 사용된 바와 같이, 20개의 통상적인(예를 들어, 자연 발생) 아미노산 및 이의 약어는 통상적 용법을 따른다. 예를 들어 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함되는, 문헌(Immunology A Synthesis (2nd Edition, Golub and Green, Eds., Sinauer Assoc., Sunderland, Mass. (1991))을 참고한다. 20개의 통상적 아미노산, 알파-, 알파-2치환 아미노산, N-알킬 아미노산, 락트산과 같은 비천연 아미노산 및 다른 비통상적 아미노산의 입체이성질체(예를 들어, D-아미노산)도 본 개시의 폴리펩티드를 위해 적합한 성분일 수 있다. 비통상적 아미노산의 예는 4-하이드록시프롤린, γ 카복시-글루타메이트, 엡실론-N,N,N-트리메틸라이신, e-N-아세틸라이신, 0-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, .시그마-N-메틸아르기닌 및 다른 유사한 아미노산 및 이미노산(예를 들어, 4-하이드록시프롤린)을 포함한다. 본원에 사용된 폴리펩티드 표기법에서, 표준 용법 및 관례에 따라 왼쪽 방향은 아미노 말단 방향이고 오른쪽 방향은 카복시-말단 방향이다.
- [0075] 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 생물학적 시스템에서의 합성보다는 화학적 펩티드 합성에 의해 포함되는 비-자연 발생 아미노산 잔기를 포괄할 수 있다. 이들은 펩티드모사체 및 다른 반전되거나 전위된 형태의 아미노산 모이어티를 포함한다. 자연 발생 잔기는 공통 측쇄 특성에 기반하여 클래스로 구분될 수 있다:
- [0076] a) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0077] b) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [0078] c) 산성: Asp, Glu;
- [0079] d) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0080] e) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및
- [0081] f) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0082] 예를 들어, 비보존적 치환은 이러한 클래스 중 하나의 구성원을 또 다른 클래스의 구성원으로 교환하는 것이 관여할 수 있다.
- [0083] 특정 구현예에 따르면, 조작된 T 세포의 항원-결합 분자, 공동자극 또는 활성화 도메인을 변경함에 있어서, 아미노산의 수치(hydrophobic) 지수가 고려될 수 있다. 각 아미노산에는 그 소수성 및 전하 특성을 기준으로 수치 지수가 지정되었다. 이들은 다음과 같다: 이소류신(+4.5); 발린(+4.2); 류신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스틴(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글리신(-0.4); 트레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 티로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5). 예를 들어, 문헌(Kyte 등, 1982, J. Mol. Biol., 157, 105-131)을 참고한다. 특정 아미노산은 유사한 수치 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있고 여전히 유사한 생물학적 활성을 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 이에 의해 생성된 생물학적 기능성 단백질 또는 펩티드가 본 경우에서와 같이 면역학적 구현예에서 사용되도록 의도되는 경우에, 유사 아미노산의 치환이 친수성을 기준으로 효과적으로 이루어질 수 있음이 또한 이해된다. 예시적인 아미노산 치환이 표 1에 제시된다.

표 1

원래 잔기	예시적 치환	바람직한 치환
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르류신	Leu
Leu	노르류신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 디아미노- 부티르산, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르류신	Leu

[0084]

[0085]

용어 "유도체"는 아미노산(또는 핵산)의 삽입, 결실 또는 치환 이외의 화학적 변형을 포함하는 분자를 지칭한다. 특정 구현예에서, 유도체는 중합체, 지질, 또는 다른 유기 또는 무기 모이어티와의 화학적 결합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 공유 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 화학적으로 변형된 항원 결합 분자는 화학적으로 변형되지 않은 항원 결합 분자보다 큰 순환 반감기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 유도체 항원-결합 분자는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 수용성 중합체 부착을 포함하도록 공유적으로 변형된다.

[0086]

펩티드 유사체는 주형 펩티드와 유사한 특성을 가진 비펩티드 약물로서 약학 산업에서 일반적으로 사용된다. 이러한 유형의 비펩티드 화합물을 "펩티드 모사체" 또는 "펩티드모사체"라고 한다(모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함되는, Fauchere, J. L., 1986, Adv. Drug Res., 1986, 15, 29; Veber, D. F. & Freidinger, R. M., 1985, Trends in Neuroscience, 8, 392-396; 및 Evans, B. E., 등, 1987, J. Med. Chem., 30, 1229-1239).

[0087]

용어 "치료 유효량"은 포유동물에서 치료 반응을 일으키는 것으로 결정된 면역 세포(예를 들어, T 세포) 또는 다른 치료제의 양을 지칭한다. 이러한 치료 유효량은 당업자에 의해 쉽게 확인된다.

[0088]

용어 "환자" 및 "대상체"는 상호교환적으로 사용되며 인간 및 비인간 동물 대상체뿐만 아니라 공식적으로 진단된 장애가 있는 사람, 공식적으로 인식된 장애가 없는 사람, 의학적 주의를 받는 사람, 장애가 발생할 위험이

있는 사람 등을 포함한다.

- [0089] 용어 "치료한다" 및 "치료"는 치료적 치료, 예방적 치료, 및 대상체에서 장애가 발생할 위험 또는 다른 위험 요인을 감소시키는 적용을 포함한다. 치료는 장애의 완전 치유를 필요로 하지 않으며 증상 또는 기저 위험 요인을 감소시키는 구현예를 포괄한다. 용어 "방지한다"는 이벤트 가능성의 100% 제거를 필요로 하지 않는다. 오히려 화합물 또는 방법이 존재하는 경우 이벤트 가능성이 감소했을 확률을 표시한다.
- [0090] 제조합 DNA, 올리고뉴클레오티드 합성, 조직 배양 및 형질전환(예를 들어, 전기천공, 리포펙션)을 위해 표준 기술을 사용할 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조업체의 사양에 따라 또는 당분야에서 일반적으로 달성되거나 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 전술한 기술 및 절차는 일반적으로 당분야에 잘 알려진 통상적 방법에 따라 그리고 본 명세서에 걸쳐 인용되고 논의되는 다양한 일반적인 및 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함되는, 문헌(Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)))을 참고한다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "실질적으로" 또는 "본질적으로"는 참조 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이와 비교하여 약 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 더 높은 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이를 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "본질적으로 동일한" 또는 "실질적으로 동일한"은 참조 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이와 대략 동일한 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이의 범위를 지칭한다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 "~가 실질적으로 없는" 및 "~가 본질적으로 없는"은 상호교환적으로 사용되며, 세포 집단 또는 배양 배지와 같은 조성물을 설명하기 위해 사용될 때 특정 물질이 95% 없는, 96% 없는, 97% 없는, 98% 없는, 99% 없는 것과 같이 특정 물질이 없거나, 통상적 방법으로 측정될 때 검출 불가능한 조성물을 지칭한다. 조성물의 특정 물질 또는 성분의 부재를 지칭하는 경우, 용어 "~의 부재"도 유사한 의미가 적용될 수 있다.
- [0093] 본원에 사용된 용어 "인지 가능한"은 하나 이상의 표준 방법에 의해 쉽게 검출 가능한 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이의 범위 또는 이벤트를 지칭한다. 용어 "인지 불가능한" 및 "인지 가능하지 않은" 그리고 이에 상응하는 용어는 표준 방법으로 쉽게 검출 가능하지 않거나 검출 불가능한 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이의 범위 또는 이벤트를 지칭한다. 특정 구현예에서, 이벤트는 시간의 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.1%, 0.001% 이하로 발생하는 경우 인지 가능하지 않다.
- [0094] 본 명세서에 걸쳐, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함한다", "포함하다" 및 "포함하는"은 언급된 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하는 것을 시사할 수 있지만, 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하는 것을 시사하지 않음이 이해될 것이다. 특정 구현예에서, 용어 "포함한다", "갖는다", "함유한다" 및 "포함하다"는 동의어로 사용된다.
- [0095] 본원에 사용된 바와 같이, "~로 구성된"은 어구 "~로 구성된"을 따르는 것이 무엇이든 이를 포함하고 이에 제한됨을 의미한다. 따라서 어구 "~로 구성된"은 나열된 요소가 요구되거나 필수이며 다른 요소는 존재할 수 없음을 표시한다.
- [0096] "~로 본질적으로 구성된"은 어구 뒤에 나열된 모든 요소를 포함하고 나열된 요소에 대해 본 개시에 명시된 활성 또는 작용을 방해하거나 이에 기여하지 않는 다른 요소로 제한됨을 의미한다. 따라서 어구 "~로 본질적으로 구성된"은 나열된 요소가 요구되거나 필수이지만 다른 요소는 선택 사항이 아니며 나열된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 여부에 따라 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있음을 표시한다.
- [0097] 범위에 따라 또는 임의의 유사한 방식으로 청구될 수 있는 그룹 내 임의의 하위 범위 또는 하위 범위의 조합을 포함하여 임의의 이러한 그룹의 임의의 개별 구성원을 조건을 달고 제외하거나 배제할 권리를 보유함으로써, 어떠한 이유로든 본 개시의 전체 척도보다 적게 청구될 수 있다. 또한, 임의의 개별 치환기, 유사체, 화합물, 리간드, 구조 또는 이의 그룹 또는 청구된 그룹의 임의의 구성원을 조건을 달고 제외하거나 배제할 권리를 보유함으로써, 어떠한 이유로든 본 개시의 전체 척도보다 적게 청구될 수 있다.
- [0098] 본 명세서에 걸쳐 "한 구현예", "일 구현예", "특정 구현예", "관련 구현예", "소정 구현예", "추가적 구현예" 또는 "추가 구현예" 또는 이의 조합에 대한 언급은 구현예와 관련하여 기재된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 개시의 적어도 하나의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서에 걸쳐 다양한 곳에서 전술한 어구의 출현이 반드시 모두 동일한 구현예를 언급하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 구

현에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

- [0099] 본원에 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 참조 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이 대비 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1%만큼 변하는 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 무게 또는 길이를 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 수치 값 앞에 있을 때 그 값에 플러스 또는 마이너스 15%, 10%, 5% 또는 1%의 범위, 또는 이의 임의의 개재 범위를 표시한다.
- [0100] 본원에 사용된 바와 같이, "~와 연관된"은 2개의 이벤트, 실제 및/또는 현상 사이의 관계를 표시한다. 하나의 존재, 수준 및/또는 형태가 다른 하나에서와 상관있는 경우, 2개의 이벤트, 실제 및/또는 현상은 서로 "연관된"다.
- [0101] 본원에 사용된 용어 "기억" T 세포는 이전에 이의 인지체 항원에 접하고 반응하거나(예를 들어, 생체내, 시험관내 또는 생체외) 예를 들어 항-CD3 항체로 자극된(예를 들어, 시험관내 또는 생체외) T 세포를 지칭한다. 2차 노출 시 "기억 유사" 표현형을 갖는 면역 세포, 이러한 기억 T 세포는 1차 노출 동안보다 더 빠르고 더 강한 면역 반응을 일으키기 위해 번식될 수 있다. 일부 측면에서, 기억 T 세포는 중추 기억 T 세포(TCM 세포), 효과기 기억 T 세포(TEM 세포), 조직 상주 기억 T 세포(TRM 세포), 줄기 세포 유사 기억 T 세포(TSCM 세포), 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.
- [0102] 본원에 사용된 용어 "줄기 세포 유사 기억 T 세포", "T 기억 줄기 세포" 또는 "TSCM 세포"는 CD95, CD45RA, CCR7 및 CD62L을 발현하고 자가 재생하는 줄기 세포-유사 능력 그리고 기억 및 효과기 T 세포 하위세트의 전체 스펙트럼을 재구성하는 다능성 능력이 부여된 기억 T 세포를 지칭한다.
- [0103] 본원에 사용된 용어 "중추 기억 T 세포" 또는 "TCM 세포"는 CD45RO, CCR7 및 CD62L을 발현하는 기억 T 세포를 지칭한다. 중추 기억 T 세포는 일반적으로 림프절내 및 말초 순환계에서 발견된다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "효과기 기억 T 세포" 또는 "TEM 세포"는 CD45RO를 발현하지만 CCR7 및 CD62L은 발현은 부재하는 기억 T 세포를 지칭한다. 효과기 기억 T 세포에는 림프절 귀소 수용체(예를 들어, CCR7 및 CD62L)가 부재하므로, 이러한 세포는 전형적으로 말초 순환 및 비림프 조직에서 발견된다.
- [0105] 본원에 사용된 용어 "조직 상주 기억 T 세포" 또는 "TRM 세포"는 순환하지 않고 피부, 폐 및 위장관과 같은 말초 조직에 상주하는 기억 T 세포를 지칭한다. 일부 측면에서, 조직 상주 기억 T 세포는 또한 효과기 기억 T 세포이다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "나이브 T 세포" 또는 "TN 세포"는 CD45RA, CCR7 및 CD62L을 발현하지만 CD95는 발현하지 않는 T 세포를 지칭한다. TN 세포는 T 세포 계통에서 가장 미분화된 세포를 제시한다. TN 세포와 항원 제시 세포(APC) 사이의 상호작용은 TN 세포의 활성화와 TEFF 세포로의 분화 및 면역 반응을 유도한다.
- [0107] 본원에 사용된 용어 "줄기성", "줄기 세포 유사", "줄기 유사" 또는 "덜 분화된"은 나이브 표현형과 일치하는 마커를 발현하는 면역 세포(예를 들어, T 세포 또는 TIL)를 지칭한다. 예를 들어, 덜 분화된 T 세포는 TN 또는 TSCM 세포에 특징적인 하나 이상의 마커를 발현할 수 있다. 일부 측면에서, "덜 분화된" 또는 "줄기 유사" T 세포는 CD45RA, CCR7 및 CD62L을 발현한다. 일부 측면에서, "덜 분화된" 또는 "줄기 유사" T 세포는 CD45RA, CCR7, CD62L 및 TCF7을 발현한다. 일부 측면에서, "덜 분화된" 또는 "줄기 유사" T 세포는 CD45RO를 발현하지 않거나 CD45RO저발현이다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 덜 분화된 표현형을 갖는 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 촉진한다. 임의의 특정 메카니즘에 구애됨이 없이, 일부 측면에서, 본원에 개시된 방법은 덜 분화된 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 분화를 차단, 억제 또는 제한하여, 배양에서 줄기-유사 세포의 수를 증가시킨다. 예를 들어, 일반적으로 종양을 효과적으로 제어하기 위해서는 덜 분화된 면역 세포, 예를 들어 줄기 세포 유사 기억 또는 중추 기억 표현형을 갖는 T 세포의 차용 전달이 바람직하다고 생각된다. 문헌(Gattinoni, L., 등, J. Clin. Invest. 115:1616-1626 (2005), Gattinoni, L., 등 Nat Med 15(7):808-814 (2009), Lynn, R.C., 등, Nature 576(7786): 293-300 (2019); Gattinoni, L., 등 Nat Rev 12:671-684 (2012), Klebanoff, C., 등, J. Immunother 35(9):651-670 (2012) 및 Gattinoni, L., 등, Nat Med 17(10): 1290-1297 (2011))을 참고한다.
- [0108] 줄기성은 자가 재생 능력, 다능성 및 증식 가능성의 지속을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 줄기성은 특정 유전자 특징부, 예를 들어 다수의 유전자에 걸친 조합된 발현 패턴을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 줄기-유사 세포는 예를 들어 본원에 개시된 줄기성 유전자 특징부를 사용하여 트랜스크립톰 분석에 의해 확인될 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 특징부는 ACTN1, DSC1, TSHZ2, MYB, LEF1, TIMD4, MAL, KRT73, SESN3, CDCA7L, LOC283174, TCF7, SLC16A10, LASS6, UBE2E2, IL7R, GCNT4, TAF4B, SULT1B1, SELP, KRT72, STXBP1, TCEA3,

FCGBP, CXCR5, GPA33, NELL2, APBA2, SELL, VIPR1, FAM153B, PPFIBP2, FCER1G, GJB6, OCM2, GCET2, LRRN1, IL6ST, LRRC16A, IGSF9B, EFHA2, LOC129293, APP, PKIA, ZC3H12D, CHMP7, KIAA0748, SLC22A17, FLJ13197, NRCAM, C5orf13, GIPC3, WNT7A, FAM117B, BEND5, LGMN, FAM63A, FAM153B, ARHGEF11, RBM11, RIC3, LDLRAP1, PELI1, PTK2, KCTD12, LMO7, CEP68, SDK2, MCOLN3, ZNF238, EDAR, FAM153C, FAAH2, BCL9, C17orf48, MAP1D, ZSWIM1, SORBS3, IL4R, SERPINF1, C16orf45, SPTBN1, KCNQ1, LDHB, BZW2, NBEA, GAL3ST4, CRT3, MAP3K1, HLA-DOA, RAB43, SGTB, CNN3, CWH43, KLHL3, PIM2, RGMB, C16orf74, AEBP1, SNORD115-11, SNORD115-11, GRAP로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 및 이의 임의의 조합을 포함한다(예를 들어, Gattinoni 등, Nature Medicine 17(10):1290-97 (2011) 참고). 일부 측면에서, 유전자 특징부는 NOG, TIMD4, MYB, UBE2E2, FCER1G, HAVCR1, FCGBP, PPFIBP2, TPST1, ACTN1, IGF1R, KRT72, SLC16A10, GJB6, LRRN1, PRAGMIN, GIPC3, FLNB, ARRB1, SLC7A8, NUCB2, LRRC7, MYO15B, MAL, AEBP1, SDK2, BZW2, GAL3ST4, PITPNM2, ZNF496, FAM117B, C16orf74, TDRD6, TSPAN32, C18orf22, C3orf44, LOC129293, ZC3H12D, MLXIP, C7orf10, STXPB1, KCNQ1, FLJ13197, LDLRAP1, RAB43, RIN3, SLC22A17, AGLB3, TCEA3, NCRNA00185, FAM153B, FAM153C, VIPR1, MMP19, HBS1L, EEF2K, SNORA5C, UBASH3A, FLJ43390, RP6-213H19.1, INPP5A, PIM2, TNFRSF10D, SNRK, LOC100128288, PIGV, LOC100129858, SPTBN1, PROS1, MMP28, HES1, CACHD1, NSUN5C, LEF1, TTTY14, SNORA54, HSF2, C16orf67, NSUN5B, KIAA1257, NRG2, CAD, TARBP1, STRADB, MT1F, TMEM41B, PDHX, KDM6B, LOC100288322, UXS1, LGMN, NANOS2, PYGB, RASGRP2, C14orf80, XPO6, SLC24A6, FAM113A, MRM1, FBXW8, NDUFS2, KCTD12로부터 선택된 하나 이상의 유전자, 및 이의 임의의 조합을 포함한다(예를 들어, Gattinoni, L., 등, Nat Med 17(10): 1290-1297 (2011) 참고).

- [0109] 본원에 사용된 용어 "단핵 세포"는 하나의 둥근 핵을 갖는, 혈액에서 발견되는 세포를 지칭한다.
- [0110] 본원에 사용된 용어 "전능"은 배아 뿐만 아니라 배아의(태반) 세포에서 발견되는 임의의 세포 유형을 발생시키는 세포의 능력을 지칭한다.
- [0111] 본원에 사용된 용어 "만능"은 신체 또는 체세포의 모든 계통(즉, 고유배이지만 태반은 아님)을 형성하는 세포의 능력을 지칭한다. 예를 들어, 배아 줄기 세포는 외배엽, 중배엽 및 내배엽의 세 배엽층 각각으로부터의 세포를 형성하기 위해 이용 가능한 만능 줄기 세포의 한 유형이다. 만능성은 부분적으로 세포의 만능성 특성을 평가함으로써 결정될 수 있다. 만능성 특성은 (i) 만능 줄기 세포 형태; (ii) 무제한적인 자가 재생 가능성; (iii) 세 가지 체세포 계통(외배엽, 중배엽 및 내배엽) 모두로 분화하는 능력; (iv) 세 가지 체세포 계통으로 구성된 기형종 형성; 및 (v) 세 가지 체세포 계통의 세포로 구성된 배아체의 형성; (vi) SSEA1(마우스만 해당), SSEA3/4, SSEA5, TRA1-60/81, TRA2-54(ALP), TRA1-85, GCTM-2, TG343, TRA2-49, CD340, CD326, 포도플라닌(Podoplanin), 및 TG30(CD9)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 만능 줄기 세포 마커의 발현; (vii) 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, CD29, CD133/프로미닌, CD140a, CD56, CD73, CD90, CD105, CD30 및/또는 LD50을 포함하지만 이에 제한되지 않는 신체 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포로부터의 조기 분화 세포와 연관된 특정한 다른 마커의 발현; (viii) OCT4, NANOG, SOX2를 포함하는 특정 만능 유전자의 발현을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0112] 본원에 사용된 용어 "다능성"은 특정 계통에서 제한된 수의 세포 유형으로 발생하는 세포의 능력을 지칭한다.
- [0113] 본원에 사용된 용어 "비-만능 세포"는 불완전하거나 부분적으로 만능인 줄기 세포, 다능성 세포, 올리고능 세포, 단능 세포(예를 들어, 전구 세포) 및 말단 분화 세포와 같이 완전한 만능성을 보유하지 않는 임의의 세포를 지칭한다.
- [0114] 본원에 사용된 용어 "도입하는"은 세포를 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 소분자와 접촉시키는 단계를 포함하는 과정을 지칭한다. 도입 단계는 또한 세포 내로 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 미세주입, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 세포 내로 전달하기 위한 리포솜의 사용, 또는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 세포 내로 도입하기 위해 세포 투과성 모이어티에 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [0115] 본 개시의 일 구현예는 시험관내 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 단리된 또는 정제된 집단을 제조하는 방법을 제공한다. 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 단리된 또는 정제된 집단은 본원에 기재된 바와 같은 다양한 상이한 병태의 치료 또는 방지에 유용한 약학 조성물에 포함될 수 있다.
- [0116] "분화"는 세포가 그 효능 및 자가 재생 능력을 상실하고 궁극적으로 별개의 계통 내에서 성숙한 별개의 세포 유형이 되는 과정이다(예를 들어, Crompton 2014, Trends in Immunol. 35:178-185 참고).
- [0117] "탈분화"는 세포가 덜 특화되는 과정을 지칭한다. 특정 구현예에서, 탈분화는 정상 발생 경로 내에 있거나 동일

한 세포 계통 내에 있는 특화 특성의 상실이다. 특정 구현예에서, 탈분화는 동일한 세포 계통 내에서의 탈분화 (계층적 탈분화)이다. 그러나, 본원에 기재된 바와 같이, 또 다른 구현예에서, 탈분화는 동일한 세포 계통 내에 있지 않을 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 T 세포의 부분적 재프로그래밍은 CD9 및/또는 CD90 및/또는 SSEA4, 인간의 통상적 T 세포 계통과 일반적으로 연관되지 않은 마커의 발현을 얻음으로써 탈분화하는 세포를 생성하며, 이 세포는 T 세포 마커 CD3 및/또는 CD4 및/또는 CD8의 발현을 상실하기 시작한다. 이러한 탈분화는 표준 T 세포 계층적 혈통을 따르지 않는다. 이러한 세포는 T 세포 활성화제로의 자극 후 통상적 T 세포로 복귀할 수 있다. CD90 발현은 피질 가슴샘세포 및 Th17의 하위세트와 같은 인간 T 세포의 희귀 집단과만 연관된다.

[0118] 재생은 세포 노화로 인해 상실된 세포 기능이 회복되는 과정이다. 세포 연령은 공여자의 연대순 연령과 세포 미세 환경에서 스트레스를 유도하는 여러 요인의 조합에 의해 결정되는 알파 요인을 더한 합으로 설명될 수 있다. 이러한 요인은 생체내 관찰될 수 있으며(예를 들어, 과도한 흡연, 자가면역 질환을 포함한 만성 질병, 감염, 비만, 대사 문제 및 가능하게는 우울증) 시험관내 인공적으로 유도될 수 있다(예를 들어, 종양 항원 또는 다른 자극에 대한 장기 노출, 높은 수준의 사이토카인, 저산소증 등). 실제 연령으로 인해 또는 지속적으로 강한 스트레스 자극의 산물로 더 노화되는 세포가 노쇠 세포로 알려져 있다. 몇몇 세포 과정은 연대순 연령, 종양 항원 특이성, 킬러 세포 특성, 증식 능력, 대사, DNA 보수 시스템 폐기, 텔로미어 길이 및 줄기성 가능성의 상실과 같은 세포 연령에 의해 손상된 것으로 확인되었다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같은 "재생 T 세포"는 T 세포가 배양 용기 표면에 부착하기 시작하여 T 세포 활성화제 및 임의로 면역조절 분자로의 자극 후 기능하는 T 세포로 복귀하는 T 세포 유래 부착성 세포를 형성하기 충분한 시기 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된 T 세포를 지칭한다.

[0120] 예를 들어, 본원에 기재된 방법은 최종 분화 T 세포와 비교하여 증가된 생체내 증식, 생존, 지속성 및/또는 세포독성, 후생유전학적 연령 감소, 텔로미어 길이 증가, 대사 개선, 아포토시스 및 세포 노쇠와 연관된 다른 마커 감소 및 항종양 활성 개선 중 임의의 하나 이상을 제공하는 재생 T 세포를 제조한다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 폴리클로날 TCR 레퍼토리 및 장기 생체내 생착 능력을 나타낸다. 재생 T 세포는 후생유전학적 특징부, 텔로미어 길이, 대사 활성 및 기능성 측면에서 더 젊은 T 세포의 생물학적 및 표현형 특성을 나타낼 수 있다. 다양한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 부분적 재프로그래밍 과정은 T 세포가 부분적으로 탈분화되도록, 예를 들어 TCR 신호전달을 통한 T 세포 활성화 및/또는 적절한 배지 중 배양을 통해 재획득되는 T 세포 표현형의 특정 측면을 상실하도록 유발할 수 있다.

[0121] 다양한 구현예에서, 재생 T 세포는 암, 바이러스 또는 자가면역 질환을 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 전체 차용 면역계를 재구성하거나 면역약화된 환자를 완화시키기 위해 사용될 수 있다.

[0122] 특정 구현예에서, T 세포는 재프로그래밍 인자의 일시적 발현을 통해 부분적으로 재프로그래밍되고 재생된다. 다양한 구현예에서, T 세포의 형태 및 세포 표면 발현 프로파일이 변화하기 시작한다. 특히, 특정 구현예에서, 세포는 특정 세포 표면 마커를 발현하기 시작하고 T 세포 마커의 발현은 감소한다. 특정 구현예에서, 세포는 특정 세포 표면 마커를 발현하기 시작하고 T 세포 마커의 발현은 부분적 재프로그래밍의 약 제5일부터 감소하여, 탈분화 과정이 개시되었음을 시사한다. 다양한 구현예에서, 탈분화 T 세포(본원에서 "T 세포 유래 부착성" 세포로도 지칭됨)는 항-CD3 항체 또는 다른 CD3 작용제와 같은 하나 이상의 T 세포 활성화 분자로 자극되고 T 세포 조건에서 배양된다. 특정 구현예에서, 본원에서 "재활성화"로도 지칭되는 이러한 T 세포 자극은 탈분화 세포가 T 계통 세포로 복귀하는 것을 유도할 수 있다. 놀랍게도, 재활성화 T 세포는 후생유전학적 시계 분석에 기반하여 훨씬 더 젊은 세포의 특성을 가지고, 더 줄기 유사 표현형을 가지며 높은 증식 가능성을 획득하였다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, "일시적"은 하나 이상의 T 세포의 부분적 재프로그래밍을 달성하기 충분한 시기(예를 들어, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분하지만 하나 이상의 T 세포가 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질 전환되기에는 충분히 길지 않은 시기) 동안을 의미한다.

[0124] 예를 들어, 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 "일시적으로 접촉시키는"은 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되거나 하나 이상의 T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기, 그러나 하나 이상의 T 세포가 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되기에는 충분히 길지 않은 시기 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와의 접촉을 의미한다. 다양한 구현예에서, "일시적 접촉"은 최대 1일, 또는 최대 2일, 또는 최대 3일, 또는 최대 4일, 또는 최대 5일, 또는 최대 6일, 또는 최대 7일 또는 최대 8일 또는 최대 9일 또는 최대 10일 또는 최대 11일 또는 최대 12일 또는 최대 13일 또는 최대 14일의 기간 동안의 접촉을 의미할 수 있다.

- [0125] 예를 들어, "일시적으로 발현하는" 또는 "일시적 발현" 등은 하나 이상의 T 세포의 부분적 재프로그래밍을 달성하기 위한(즉, iPS 세포 또는 전능 세포로의 형질전환이 달성되지 않는 경우) 하나 이상의 야마나카 인자의 발현 또는 발현의 유발을 의미한다.
- [0126] 본원에 사용된 바와 같이, "후생유전학적 연령"(또는 "eAge")은 알려진 후생유전학적 시계, 예를 들어 호르바트 시계, 한님 시계 또는 르바인(Levine) 시계를 사용하여 결정된 세포의 연령을 의미한다(예를 들어, Horvath 등, 2018, *Aging* 10, 1758-1775; Hannum 등, 2013, *Mol. Cell.* 49(2), 359-367; Levine 등, 2018, *Aging*, 10(4):573-592 참고). 특정 구현예에서, eAge는 353 CpG에서의 메틸화 상태를 측정하는 호르바트 시계 방법을 사용하여 결정된 세포의 연령이다(Horvath and Raj, 2018 *Nature Reviews Genetics*, 19:371-385). 이러한 결과는 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 및 재활성화 방법이 시간 소모적이고 복잡한 분화 단계를 필요로 하는 iPS 세포 단계를 거치지 않고 재생 T 세포를 생성할 수 있음을 시사하였다. 또한, iPS 세포로부터의 분화 T 세포는 자가 가슴샘 교육이 없으면 진정한 T 세포 기능이 부재하고 미성숙 표현형, 비 MHC 의존적 사멸, 부적절한 CD8 α β 이량체화, 유전자 발현 조절장애 및 T 세포의 발생학적으로 균질한 집단의 제조 실패를 포함하는 이상을 보유한다(Vizcardo 등, 2018, *Cell Rep* 22, 3175-3190). 따라서, 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 방법을 사용하여 생성된 재생 T 세포는 당분야에 알려진 방법을 사용하여 생성된 T 세포에 비해 예상치 못한 유리한 특성을 제공한다.
- [0127] **I. 재생 T 세포를 제조하는 방법**
- [0128] 본 발명의 비제한적인 예시적 구현예가 아래에 기재된다. 본 발명의 조성물 및 방법의 추가 측면은 본원에 제공된 개시에 기반하여 당업자에게 명백해질 것이다.
- [0129] 다양한 구현예에서, 본 개시는 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 다양한 구현예에서, 방법은 (i) T 세포 집단을 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 부분적 재프로그래밍을 달성하기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (ii) 부분적 재프로그래밍 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물 또는 제제, 및 임의로 하나 이상의 면역조절제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0130] 다양한 구현예에서, 본 개시는 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 다양한 구현예에서, 방법은 (i) T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, NANOG, LIN28, L-MYC 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 부분적 재프로그래밍을 달성하기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (ii) 부분적 재프로그래밍 T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물 또는 제제 및 임의로 하나 이상의 면역조절제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0131] 다양한 구현예에서, 본 개시는 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 다양한 구현예에서, 방법은 (i) T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, NANOG, LIN28, L-MYC 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자; 및 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포의 형성에 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (ii) T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물 또는 제제 및/또는 T 세포 공동자극제, 및 임의로 하나 이상의 면역조절제와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0132] 본원에 사용된 바와 같이, "재프로그래밍"은 포유동물 세포 발생 동안 또는 세포 배양에서 획득된 후생유전학적 변형을 지우고/지우거나 재구축하는 과정을 지칭한다. 예를 들어, 근육 세포는 뉴런으로 재프로그래밍될 수 있다. 재프로그래밍은 내재적으로 노화 및 재생과 관련되지 않는다(예를 들어, Takahashi 등, *Cell* (2007) 131, 861-872 참고).
- [0133] "완전 재프로그래밍"은 체세포의 만능 줄기(iPS) 세포 또는 전능 줄기 세포로의 재프로그래밍을 지칭한다.
- [0134] "부분적 재프로그래밍"은 전능 줄기 세포 상태 또는 만능 줄기 세포 상태(iPS 세포)에 도달하지 않고 재프로그래밍하는 과정을 지칭한다. 따라서 부분적 사전프로그래밍은 완전 재프로그래밍이 아닌 모든 재프로그래밍이다. "부분적" 또는 "불완전" 또는 "일시적" 재프로그래밍은 예를 들어 iPS 세포로 완전 재프로그래밍 세포와 비교될 때, 완전 재프로그래밍이 아닌 재프로그래밍이다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 약 1일 내지 약 20일 수행되는 재프로그래밍이다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 약 25일 동안 수행되는 재프로그래밍이다.
- [0135] 특정 구현예에서, 부분적 T 세포 재프로그래밍은 T 세포 재활성화가 개시될 때까지 수행되는 재프로그래밍 과정

이다. 또 다른 구현예에서, 부분적 T 세포 재프로그래밍은 적어도 T 세포가 하나 이상의 T 세포 마커의 발현을 상실하기 시작하고/하거나 비-T 세포 계통과 연관된 마커를 발현하기 시작할 때까지 수행되는 재프로그래밍 과정이다. 특정 구현예에서, 부분적 T 세포 재프로그래밍은 T 세포가 T 세포 활성화제에 의해 CD3, CD4 및/또는 CD8을 발현하는 세포로 더 이상 복귀될 수 없는 시간까지의 시기 동안 수행되는 재프로그래밍 과정이다.

[0136] "부분적 재프로그래밍 T 세포"는 전능 줄기 세포 상태 또는 만능 줄기 세포 상태(iPS 세포)에 도달하지 않고 재프로그래밍 T 세포를 지칭한다. 추가 구현예에서, T 세포의 부분적 재프로그래밍은 iPS 세포에 비해 불완전하고/하거나 부분적이고/이거나 일시적인 재프로그래밍이다. 부분적 재프로그래밍 T 세포는 T 세포가 T 세포 유래 부착성 세포를 형성하도록 일정 시기 동안 T 세포를 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 재프로그래밍 T 세포를 지칭한다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 배양 용기 표면에 약하게 부착된다. 본원에 기재된 바와 같은 T 세포 유래 부착성 세포는 계통 안정성을 유지하며, 예를 들어 T 세포 활성화제 및 임의로 면역조절 분자(예를 들어 사이토카인)로의 자극(재활성화) 후 T 세포 계통으로 복귀한다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 반부착성, 약부착성, 부착성 또는 강부착성(강하게 부착됨)이다.

[0137] **1. T 세포의 공급원 및 단리**

[0138] 일부 구현예에서 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 방법에 유용한 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포로부터 유래된다. 샘플은 대상체로부터 직접 채취한 조직, 유체 및 다른 샘플뿐만 아니라 분리, 원심분리, 유전공학(예를 들어, 바이러스 벡터를 사용한 형질도입), 세척 및/또는 인큐베이션과 같은 하나 이상의 처리 단계에서 생성된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원에서 직접 수득된 샘플 또는 처리된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀과 같은 체액, 조직 및 이로부터 유래된 처리된 샘플을 포함하는 기관 샘플을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0139] 일부 측면에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 산물이거나 이로부터 유래된다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 백혈구, 골수, 가슴샘, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 연관 림프 조직, 점막 연관 림프 조직, 비장, 다른 림프 조직, 간, 폐, 위, 내장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립샘, 자궁경부, 고환, 난소, 편도선 또는 다른 기관 및/또는 이로부터 유래된 세포를 포함한다. 샘플은 세포 치료법, 예를 들어 차용 세포 치료법과 관련하여, 자가 및 동종이계 공급원의 샘플을 포함한다.

[0140] 일부 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 방법에서 사용하기 위한 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 구현예에서 세포는 이종 공급원, 예를 들어 마우스, 래트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다.

[0141] 다양한 구현예에서, 본 개시는 공급원으로부터 T 세포를 단리하고 상기 T 세포를 부분적으로 재프로그래밍하여 노화를 호전시키고 T 세포의 기능을 개선하는 것에 관한 것이다. 적합한 공급원 세포의 예는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본원의 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 배양된 T 세포, 예를 들어 1차 T 세포 또는 배양된 T 세포주, 예를 들어 Jurkat, SupT1 등으로부터의 T 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 T 세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 포유동물로부터 수득되는 경우, 공급원 세포는 혈액, 골수, 림프절, 종양, 가슴샘, 비장 또는 다른 조직 또는 유체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 공급원에서 수득될 수 있다. 공급원 세포는 또한 농축되거나 정제될 수 있다. T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있고 CD4+CD8 α β+ 이중 양성 T 세포, CD4+ 헬퍼 T 세포, 예를 들어 Th1 및 Th2 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 말초 혈액 백혈구(PBL), 종양 침윤 세포(TIL), 기억 T 세포, 나이브 T 세포 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 발생 단계일 수 있다.

[0142] 다양한 구현예에서, T 세포는 종양으로부터 단리되며, 특히 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 TIL이다. 본원에 사용된 바와 같이, "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"은 대상체의 혈류를 떠나 종양으로 이동한 세포로 원래 수득된 세포 집단을 의미한다. TIL은 CD8+ 세포독성 T 세포(림프구), Th1 및 Th17 CD4+ T 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포 및 M1 대식구를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. TIL은 1차 및 2차 TIL 둘 모두를 포함한다. "1차 TIL"은 본원에 개략된 바와 같이 환자 조직 샘플로부터 수득된 것들이다(때때로 "신선 수확된"으로 지칭됨). 일부 구현예에서, TIL은 하기 바이오마커: CD4, CD8, TCR α β, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 및 CD25 중 하나 이상을 발현함으로써 분류될 수 있다.

[0143] 본 개시의 다양한 구현예에서, 공급원 세포는 나이브 T 세포((TN) 표현형, 중추 기억 T 세포(TCM) 표현형, 또는 효과기 기억 T 세포(TEM) 표현형, 줄기 유사 T 세포(Tscm)를 가질 수 있다. TN, TCM 및 TEM 세포의 표현형은 당

분야에 알려져 있으며 본원의 다른 곳에서 기재된다. 예를 들어, CCR7 및 CD62L은 TN 및 TCM 세포에 의해 발현되지만 TEM 세포에 의해서는 발현되지 않는다. 전사 인자 LEF1, FOXP1 및 KLF7은 TN 및 TCM 세포에 의해 발현되지만 TEM 세포에 의해서는 발현되지 않는다. CD45RO 및 KLRG1은 TN 세포에 의해서는 발현되지 않지만 TEM 세포에 의해 발현된다(Gattinoni 등, 2012, Nat. Rev. Cancer, 12:671-84). 대안적으로 또는 추가적으로, TN 및 TCM 세포는 TEM 세포에 비해 더 긴 텔로미어를 특징으로 할 수 있다.

[0144] CD3+, CD45+, CD137+, CD25+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, GITR+ 및/또는 CD45RO+ T 세포와 같은 T 세포의 특정 하위집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해(예를 들어, 형광 기반 또는 자기 기반 세포 분류를 사용하여) 분리될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 원하는 T 세포의 양성 선택 또는 원하지 않는 세포의 제거를 위한 음성 선택에 충분한 시기 동안 Dynabeads®, CELLlection™, DETACHaBEAD™(Thermo Fisher) 또는 MACS® 세포 분리 제품(Miltenyi Biotec)과 같은 임의의 다양한 상업적으로 이용 가능한 항체 접합 비드와의 인큐베이션에 의해 분리될 수 있다.

[0145] 본원의 다양한 구현예에서, 단리, 사전활성화상, 재활성화상 또는 증식상을 위해 T 세포는 적절한 배양 배지 중 배양된다. T 세포 배양 조건은 당분야에 알려져 있다. 특정 구현예에서 본원에서 T 세포를 배양하기 위한 배지는 "기본" 배지로 지칭되는 출발 배지로부터 수행될 수 있다. 기본 배지는 본원에 개시된 하나 이상의 추가 요소, 예를 들어 글루코스, 다양한 염 중 하나, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, 또는 이의 조합과 같은 하나 이상의 사이토카인으로 보충된 임의의 출발 배지를 지칭한다. 기본 배지는 면역 세포, 예를 들어 T 세포를 배양하기 위한 임의의 배지일 수 있다. 일부 측면에서, 기본 배지는 균형 잡힌 염 용액(예를 들어, PBS, DPBS, HBSS, EBSS), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 클릭(Click's) 배지, 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(BME), F-10, F-12, RPMI 1640, 글래스고 최소 필수 배지(GMEM), 알파 최소 필수 배지(알파 MEM), 이소코브 변형 둘베코 배지(IMDM), M199, OPTIMIZERTM Pro, OPTIMIZER™ CTS™ T-세포 증식 기본 배지(ThermoFisher), OPTIMIZERTM, 완전 OPTIMIZER™, IMMUNOCULT™ XF(STEMCELL™ Technologies), AIM V™, TEXMACS™ 배지, PRIME-XV® T 세포 CDM, X-VIVOTM 15(Lonza), TRANSACT™ TIL 증식 배지, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 측면에서, 기본 배지는 무혈청이다. 일부 측면에서, 기본 배지는 PRIME-XV® T 세포 CDM을 포함한다. 일부 측면에서, 기본 배지는 OPTIMIZERTM을 포함한다. 일부 측면에서 기본 배지는 OPTIMIZERTM Pro를 포함한다. 일부 측면에서, 기본 배지는 면역 세포 혈청 대체물(ICSR)을 추가로 포함한다.

[0146] 본원에 사용된 용어 "사이토카인"은 세포 사이의 상호작용 및 소통에 특정 효과를 갖는 세포에 의해 방출되는 작은 분비 단백질을 지칭한다. 사이토카인의 비제한적 예는 인터류킨(예를 들어, 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-10, IL-20, IL-14, IL-16, IL-17, IL-21 및 IL-23), 인터페론(IFN; 예를 들어, IFN- α , IFN- β , 및 IFN- γ), 종양 괴사 인자(TNF) 패밀리 구성원 및 전환 성장 인자(TGF) 패밀리를 포함한다. 본 개시의 일부 측면은 면역 세포, 예를 들어 T 세포 또는 본원에 개시된 하나 이상의 조작된 면역 세포를 사이토카인을 포함하는 배지 중 배양하는 및/또는 증식시키는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 사이토카인은 인터류킨이다. 일부 측면에서, 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0147] 본 개시의 다양한 구현예에서, 본원의 부분적 재프로그래밍 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 TCR $\alpha\beta$ 세포이다. 이와 관련하여, TCR $\alpha\beta$ 세포는 알파(α) 사슬과 베타(β) 사슬 둘 모두를 포함하는 기능적, 항원 특이적 T 세포 수용체(TCR)를 발현할 수 있다. TCR 알파 및 베타 사슬은 당분야에 알려져 있다. TCR은 TCR이 항원에 특이적으로 결합하고 이를 면역학적으로 인식할 수 있는 한, 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. TCR은 임의의 원하는 항원에 대한 항원 특이성을 가질 수 있다. 본원에 사용된 어구 "항원-특이적" 및 "항원 특이성"은 항원 또는 이의 에피토프에 대한 TCR의 결합이 면역 반응을 촉발하도록 TCR이 항원, 예를 들어 조건-특이적 항원 또는 이의 에피토프에 특이적으로 결합하고 이를 면역학적으로 인식할 수 있음을 의미한다.

[0148] 다양한 구현예에서, T 세포가 단리된 포유동물은 병태의 항원 또는 이에 특이적인 항원으로 면역화된다. 바람직하게는, 포유동물은 포유동물로부터 T 세포를 수득하기 전에 면역화된다. 이러한 방식으로, 단리된 T 세포는 치료될 병태에 대해 특이성을 갖도록 유도된 T 세포를 포함하거나, 병태에 특이적인 세포를 더 높은 비율로 포함할 수 있다.

[0149] 대안적으로, 내인성 항원 특이적 TCR을 포함하는 T 세포는 포유동물로부터 단리된 혼합 세포 집단 내의 T 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 혼합 집단은 시험관내 배양되는 동안 내인성 TCR에 의해 인식되는 항원에 노출될 수 있다. 이러한 방식으로 조건 특이적 항원을 인식하는 TCR을 포함하는 T 세포는 시험관내 증식 또는 증대하여 내인성 항원 특이적 수용체를 갖는 T 세포의 수를 증가시킨다.

- [0150] 항원 특이적 TCR은 외인성 TCR, 즉 T 세포에 고유하지 않은(자연 발생이 아닌) 항원 특이적 TCR일 수 있다. 재조합 TCR은 하나 이상의 외인성 TCR α -, β -, γ - 및/또는 δ -사슬 암호화 유전자의 재조합 발현을 통해 생성된 TCR이다. 재조합 TCR은 전적으로 단일 포유동물 종으로부터 유래된 폴리펩티드 사슬을 포함할 수 있거나, 항원-특이적 TCR은 2개의 상이한 포유동물 종으로부터의 TCR로부터 유래된 아미노산 서열로 이루어진 키메라 또는 하이브리드 TCR일 수 있다. 예를 들어, 항원 특이적 TCR은 TCR이 "인간화"되도록 첫과 TCR로부터 유래된 가변 영역 및 인간 TCR의 불변 영역을 포함할 수 있다. 재조합 TCR을 만드는 방법은 당분야에 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,820,174; 8,785,601; 8,216,565; 및 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0274203을 참고한다.
- [0151] 내인성 항원 특이적 TCR을 포함하는 T 세포는 또한 외인성(예를 들어, 재조합) TCR 또는 다른 재조합 키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산으로 형질전환, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염될 수 있다. 이러한 외인성 키메라 수용체, 예를 들어 키메라 CR은 내인성 TCR이 자연적으로 특이적인 항원을 넘어 형질전환된 T 세포에 대한 추가 항원에 대한 특이성을 부여할 수 있다. 이는 이중 항원 특이성을 갖는 T 세포의 제조를 초래할 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다.
- [0152] 내인성 항원-특이적 TCR을 포함하는 T 세포는 또한 "키메라 항원 수용체"(CAR)를 암호화하는 하나 이상의 핵산으로 형질전환, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염될 수 있다. 전형적으로, CAR은 항체의 항원 결합 도메인, 예를 들어 TCR의 막횡단 및 세포내 도메인에 융합된 단일쇄 가변 단편(scFv); 및 일부 구현예에서, T 세포 공동자극 분자의 세포내 신호전달 영역과 같은 하나 이상의 공동자극 도메인을 포함한다. 따라서, TCR의 항원 특이성은 항원 또는 이의 에피토프에 특이적으로 결합하는 scFv에 의해 암호화될 수 있다. 이러한 CAR을 만드는 방법은 당분야에 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,465,743, 10,533,055, 10,603,380 및 미국 특허 출원 공개 번호 2014/0037628 및 2014/0274909를 참고한다.
- [0153] CAR, 조작된 TCR, 또는 TCR-유사 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 임의의 적합한 핵산이 사용될 수 있다. 이들 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 과정은 아래 추가 논의된 바와 같이 CAR, 조작된 TCR 또는 TCR-유사 단백질 또는 폴리펩티드를 사용한 T 세포의 유전적 변형 전, 후 또는 이와 동시에 일어날 수 있다. 핵산에 의해 암호화된 CAR 또는 조작된 TCR은 예를 들어 단일쇄 CAR 또는 TCR 또는 다른 단백질 또는 폴리펩티드(예를 들어 비제한적으로 공동자극 분자)와의 융합을 포함하는 임의의 적합한 형태일 수 있다.
- [0154] 내인성 항원 특이적 TCR, 조작된 TCR 또는 CAR에 의해서인지와 무관하게, 본원에서 T 세포에 의해 인식되는 항원은 조건과 연관된 임의의 항원일 수 있다. 예를 들어, 항원은 암 항원(종양 항원 또는 종양 연관 항원이라고도 함) 또는 감염 병태 항원(예를 들어, 바이러스 항원. 바이러스 항원은 당분야에 알려져 있으며 예를 들어, 임의의 바이러스 단백질, 예를 들어 env, gag, pol, gp120, 티미딘 키나제 등을 포함함)일 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [0155] 특정 구현예에서, 항원은 CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD70, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, 메조텔린, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-베타, SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파, ERBB2(Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, 에프린(Ephrin) B2, IGF-I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-abl, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 엽산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGA-A1, 레구마인, HPV E6,E7, MAGA A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT- 2, Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스타인, 서바빈, 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴(Galectin) 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 파단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로젠 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TE51, LCK, AKAP-4, SXX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 내장 카복실 에스터라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 부분, 또는 이의 임의의 조합이거나 이로부터 유도된다.
- [0156] 특정 구현예에서, CAR 또는 조작된 TCR은 AFP, CD19, TRAC, TCR β , BCMA, CLL-1, CS1, CD38, CD19, TSHR, CD123, CD22, CD30, CD171, CD33, EGFRvIII, GD2, GD3, Tn Ag, PSMA, ROR1, ROR2, GPC1, GPC2, FLT3, FAP, TAG72, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3, KIT, IL-13Ra2, 메조텔린, IL-11Ra, PSCA, PRSS21, VEGFR2, LewisY, CD24, PDGFR-베타, SSEA-4, CD20, 엽산 수용체 알파, ERBB2(Her2/neu), MUC1, MUC16, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP,

ELF2M, 에프린 B2, IGF-I 수용체, CAIX, LMP2, gp100, bcr-ab1, 티로시나제, EphA2, 푸코실 GM1, sLe, GM3, TGS5, HMWMAA, o-아세틸-GD2, 염산 수용체 베타, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, GPRC5D, CXORF61, CD97, CD179a, ALK, 폴리시알산, PLAC1, GloboH, NY-BR-1, UPK2, HAVCR1, ADRB3, PANX3, GPR20, LY6K, OR51E2, TARP, WT1, NY-ESO-1, LAGE-1a, MAGE-A1, 레구마인, HPV E6,E7, MAGE A1, ETV6-AML, 정자 단백질 17, XAGE1, Tie 2, MAD-CT-1, MAD-CT-2, Fos-관련 항원 1, p53, p53 돌연변이체, 프로스타틴, 서바빈, 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 과단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 내장 카복실 에스터라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ε, CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 부분, 또는 이의 임의의 조합을 표적화한다.

[0157] 본원에 사용된 용어 "암 항원" 또는 "종양-연관 항원"은 항원이 종양 또는 암과 연관되도록 종양 세포 또는 암 세포에 의해 단독으로 또는 우세하게 발현되거나 과발현되는 임의의 분자(예를 들어, 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 지질, 탄수화물 등)를 지칭한다. 암 항원은 예를 들어 돌연변이된 종양 항원 또는 신생항원일 수 있다. 암 항원은 정상, 비종양 또는 비암성 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 그러나, 이러한 경우 정상, 비종양 또는 비암성 세포에 의한 암 항원의 발현은 종양 또는 암 세포에 의한 발현만큼 강력하지 않다. 이와 관련하여, 종양 또는 암 세포는 정상, 비-종양 또는 비-암 세포에 의한 항원의 발현과 비교하여 항원을 과발현하거나 항원을 유의하게 높은 수준으로 발현할 수 있다. 또한, 암 항원은 상이한 발생 또는 성숙 상태의 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 예를 들어, 암 항원은 일반적으로 성인 포유동물에서 발견되지 않는 배아 또는 태아 단계의 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 대안적으로, 암 항원은 줄기 세포 또는 전구체 세포에 의해 추가로 발현될 수 있으며, 이러한 세포는 일반적으로 성인 포유동물에서 발견되지 않는다. 암 항원은 당분야에 알려져 있고, 예를 들어 상기 열거된 암 항원, 공유되는 종양 항원, 예컨대 예를 들어 메조텔린, CD19, CD22, CD276(B7H3), gp100, MART-1, 표피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRVIII), TRP-1, KRAS, TRP-2, 티로시나제, NY-ESO-1(CAG-3으로도 알려짐), MAGE-1, MAGE-3 등을 포함한다. 본 개시의 일 구현예에서, 암 항원은 환자 특이적 신생항원이다. 종양 특이적 돌연변이의 결과로 환자 특이적 신생항원이 발생할 수 있다.

[0158] 암 항원은 본원에 기재된 암 및 종양을 포함하는 임의의 암 또는 종양의 임의의 세포에 의해 발현되는 항원일 수 있다. 암 항원이 단지 한 유형의 암 또는 종양과 연관되거나 이에 특징적이라도, 암 항원은 단지 한 유형의 암 또는 종양의 암 항원일 수 있다. 대안적으로, 암 항원은 하나 초과와 유형의 암 또는 종양의 암 항원일 수 있다(예를 들어, 이에 특징적일 수 있음). 예를 들어, 암 항원은 유방암 및 전립샘암 세포 둘 모두에서 발현되고 정상, 비종양 또는 비암성 세포에서는 전혀 발현되지 않을 수 있다.

[0159] TCR 또는 CAR에 의해 인식되는 항원과 연관되거나 이에 특징적인 병태는 임의의 병태일 수 있다. 예를 들어, 병태는 본원에 논의된 바와 같이 암 또는 감염성 병태, 예를 들어 바이러스 병태일 수 있다.

[0160] 암은 육종, 암종, 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 두경부암(예를 들어, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암), 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대장암 및 장간막암, 인두암, 전립샘암, 직장암, 신암(예를 들어, 신세포암종(RCC)), 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상샘암, 요관암 및 방광암 중 임의의 것을 포함하는, 임의의 암일 수 있다.

[0161] 본원의 목적을 위해, "바이러스 병태"는 사람에서 사람으로 또는 유기체에서 유기체로 전파될 수 있는 병태를 의미하며 바이러스에 의해 유발된다. 본 개시의 일 구현예에서, 바이러스 병태는 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 헤파드나바이러스, 유두종 바이러스, 아테노바이러스, 코로나바이러스, 오르토믹소바이러스, 파라믹소바이러스, 플라비바이러스 및 칼리시바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 바이러스에 의해 유발된다. 예를 들어, 바이러스 병태는 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인플루엔자 바이러스, 단순 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바 바이러스, 수두 바이러스, 사이토메갈로바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프친화성 바이러스, 칼리시바이러스, 아테노바이러스 및 아레나 바이러스로 구성된 군으로부터 선택된 바이러스에 의해 유발될 수 있다.

[0162] 바이러스 병태는 예를 들어 인플루엔자, 폐렴, 헤르페스, 간염, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 만성 피로 증후군, 돌연 급성 호흡기 증후군(SARS), 위장염, 장염, 심장염, 뇌염, 세기관지염, 호흡기 유두종증, 수막염,

HIV/AIDS 및 단핵구증일 수 있다.

[0163] 본 개시의 부분적 재프로그래밍 방법에서 사용하기 위한 T 세포는 당분야에 알려진 임의의 적합한 기술을 사용하여 공급원으로부터 단리 또는 정제될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 대상체로부터 수득될 수 있다. 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 가슴샘 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 포함하는 여러 공급원으로부터 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 FICOLL™ 분리와 같은 당업자에게 알려진 임의의 수의 기술을 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 수득될 수 있다. 세포는 바람직하게는 성분채집술에 의해 개인의 순환 혈액으로부터 수득될 수 있다. 성분채집 산물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는 림프구를 함유한다. 특정 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하기 위해 세척될 수 있고 후속 처리를 위해 적절한 완충액 또는 배지에 배치될 수 있다. 세포는 PBS로 세척될 수 있다. 이해질 바와 같이, 예를 들어 Cobe™ 2991 세포 프로세서, Baxter Cyto-Mate™ 등과 같은 반자동 관류식 원심분리기를 사용하는 것과 같은 세척 단계가 사용될 수 있다. 세척 후, 세포는 다양한 생체적합성 완충액 또는 완충액을 포함하거나 포함하지 않는 다른 식염수 용액에 재현탁될 수 있다. 특정 구현예에서, 성분채집술 샘플의 요망되지 않는 성분은 제거될 수 있다.

[0164] **2. T 세포의 부분적 재프로그래밍**

[0165] 본 개시는 부분적으로 T 세포를 부분적으로 재프로그래밍하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, T 세포는 T 세포 중 하나 이상이 배양 용기 표면에 부착된(또는 부분적으로 부착된) 콜로니를 형성하도록(T 세포 유래 부착성 세포 콜로니를 형성하도록) T 세포를 수 일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉시켜 부분적으로 재프로그래밍되며, 이러한 부착성 세포는 T 세포 활성화제 및 임의로 면역조절 분자(예를 들어, 사이토카인)로의 자극(재활성화) 후 기능하는 T 세포로 복귀한다.

[0166] 본원에 사용된 용어 "재프로그래밍 인자"는 포유동물 세포 발생 동안 또는 세포 배양에서 획득된 후생유전학적 변형을 지우고/지우거나 재확립할 수 있는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 아미노산, mRNA, DNA 또는 소분자를 지칭한다. 재프로그래밍 인자는 세포의 분화 상태를 변경할 수 있다. 이러한 재프로그래밍 인자는 야마나카 및 동료들에 의해 발견되었고(예를 들어, Takahashi and Yamanaka, 2006, Cell, 136, 364-377 참고), 본원에서 "OSKM" 또는 "야마나카 인자"로 지칭되는, 전사 인자, OCT4(또는 OCT3/4), SOX3, KLF4 및 C-MYC을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 재프로그래밍 인자는 세포의 분화 상태를 변경할 수 있거나 세포 재프로그래밍의 효율을 향상시키거나 변경할 수 있는 다른 인자를 지칭한다. 이러한 인자는 당분야에 알려져 있다. 예시적인 재프로그래밍 인자는 문헌(Feng 등 2009, Cell Stem Cell Review, 4:301-313)에 기재되어 있다.

[0167] 다양한 구현예에서, 재프로그래밍 인자는 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC 및 SV40으로 구성된 군 중 적어도 하나이다. 다양한 구현예에서, 4개의 야마나카 인자 모두가 엄격하게 필요한 것은 아니다(예를 들어, Genome Biol. 2012; 13(10): 251; Cell Stem Cell, 2019, 25(6):737-753; Nature Communications (2018) 9:2865 참고). 다양한 구현예에서, 단리된 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 OCT3/4 및 SOX2와 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉된다. 다양한 구현예에서, 단리된 세포는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 OCT3/4, SOX2 및 KLF4, 및 C-MYC 또는 SV40과 접촉된다.

[0168] 추가적 재프로그래밍 인자가 다양한 구현예에서 단리된 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 부분적으로 재프로그래밍하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 인자는 LIN28, NANOG, Esrrb, Pax5 shRNA, C/EBPa, p53 siRNA, UTF1, DNMT shRNA, Wnt3a, GLIS1, DLX4, CDH1, SV40 LT(T) 및 hTERT를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다양한 구현예에서, 재프로그래밍 인자는 재프로그래밍에 관여된 특정 miRNA를 상향조절하거나 하향조절할 수 있다. 특정 구현예에서, 재프로그래밍 인자는 하나 이상의 야마나카 인자의 상류 또는 하류 유전자 중 하나 이상의 발현을 상향조절하거나 하향조절할 수 있다. 다양한 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자는 히스톤 메틸트랜스퍼라제 억제제, L-유형 칼슘 채널 작용제, G9a 메틸트랜스퍼라제 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, MEK 억제제, GSK3 억제제 또는 TGF-β 억제제를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 재프로그래밍 전사 인자의 상류 또는 하류 분자 경로를 조절하는 임의의 인자가 본원의 부분적 재프로그래밍 방법에서 사용하기 위해 고려된다. 예시적인 억제제는 BIX01294, BayK 8644, CHIR 99021, 폴스콜린(Forskolin) 및 RepSox를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-Raf(BRAF) 억제제, 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제, 혈관 내피 성장 인자 1(VEGFR1) 억제제, 및/또는 섬유아세포 성장 인자 수용체 1(FGFR1) 억제제가 본원의 재프로그래밍 방법에서 사용될 수 있다(예를 들어, US2017114323 참고).

- [0169] 다양한 구현예에서, 본 개시는 재생 T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이며, T 세포는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로부터 선택된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 본 개시의 다양한 구현예에서, 단리된 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 및 임의로 SV40과 일시적으로 접촉된다.
- [0170] 재프로그래밍 인자를 세포에 전달하기 위한 당분야에 알려진 많은 전략이 있다. 이러한 전략은 단일 가닥 음성 센스 RNA 바이러스(Vizcardo 등, 2013), 예를 들어 문헌(Nat. Methods 2011, 8(5):409-412)에 기재된 것과 같은 에피솜 플라스미드 시스템, 나노입자에 의한 mRNA 형질감염(Moffett 등, 2017), 및 만능성을 부여하는 인자의 유전자 발현을 유도하는 것으로 알려진 소분자의 사용(Feng 등, 2009; Hou 등, 2013)을 포함한다.
- [0171] 다양한 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자는 단리된 면역 세포(예를 들어, T 세포)에서 일시적으로 발현된다. 다양한 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC 중 하나 이상 또는 모두를 포함할 수 있거나; 하나 이상의 다른 재프로그래밍 인자를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 재프로그래밍 인자는 당분야에 알려진 유전자 편집 기술(예를 들어, TALENS, CRISPR/cas)을 사용하여 단리된 T 세포에서 발현될 수 있다. 다양한 구현예에서, 유전자 편집 기술은 단리된 T 세포에서 발현될 유도 가능한 재프로그래밍 인자 세트를 전달한다. 다양한 구현예에서, 줄기 세포 연관 유전자(들)를 암호화하는 핵산(들)은 하나 이상의 재조합 발현 벡터에서 운반된다. 재조합 발현 벡터(들)는 단일 가닥 또는 이중 가닥의, 합성되거나 부분적으로 천연 공급원으로부터 획득될 수 있고, 천연, 비천연 또는 변경된 뉴클레오티드를 함유할 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유형의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터(들)는 자연 발생 또는 비자연 발생 뉴클레오티드간 결합, 또는 두 유형의 결합을 포함할 수 있다. 벡터(들)는 줄기 세포 연관 유전자의 발현을 제공하는 조절 핵산 서열을 함유할 수 있다.
- [0172] 일부 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 센다이 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 알파바이러스, 백시니아, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 가금류 수두 바이러스 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않으며, 바람직하게는 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 형질전환하는 천연 또는 조작된 능력을 갖는다. 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 이중 바이러스 외피 단백질로 위유형화된다. 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 적합한 외피, 예를 들어, 바이러스 외피로 위유형화된 렌티바이러스 또는 센다이 바이러스 벡터이다(예를 들어, Blood Adv 2017 Oct 24;1(23):2088-2104; Mol Ther 2012 Sep;20(9):1699-712 참고). 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 통합 결핍 렌티바이러스 벡터이다. 적합한 바이러스 벡터는 당분야에 알려져 있고, 예를 들어 문헌(J. Biol. Chem. (2011) 286:4760-4771; Stem Cell Research & Therapy (2019) 10:185)에 기재되어 있다.
- [0173] 다양한 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 나노입자로 전달된다. 다양한 구현예에서, 재프로그래밍 인자는 나노입자를 사용하여 전달된다. 이러한 나노입자는 특정 mRNA 또는 다른 거대분자를 일시적이고 용량 제어 방식으로 리프구에 전달하도록 설계될 수 있다. 이러한 나노입자는 특정 세포 서브타입을 표적화하고 이에 결합 시, 수용체 매개 세포내이입을 자극하여 세포가 이제 발현할 수 있는 나노입자가 운반하는 합성 mRNA를 도입하도록 설계될 수 있다. 트랜스유전자의 핵 수송 및 전사가 필요하지 않기 때문에 이 과정은 빠르고 효율적이다.
- [0174] 다양한 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 벡터는 별도의 벡터로 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 전달된다. 다양한 구현예에서, KLF4, OCT3/4, SOX2(KOS)는 단일 벡터로 전달된다. 다양한 구현예에서, KOS를 발현하는 벡터는 바이러스 벡터이고 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 또는 30 MOI(감염 다중도)의 역가로 전달된다. 다양한 구현예에서, KLF4는 바이러스 벡터에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 또는 30 MOI의 역가로 전달된다. 다양한 구현예에서, cMyc은 바이러스 벡터로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 또는 30 MOI의 역가로 전달된다. 다양한 구현예에서 SV40을 발현하는 벡터가 세포에 추가로 전달되고 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 또는 30 MOI의 역가로 전달되는 바이러스 벡터이다. 다양한 구현예에서, 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 10 MOI로 KOS를 발현하는 센다이 벡터, 10 MOI로 KLF4를 발현하는 센다이 벡터, 3 MOI로 C-MYC을 발현하는 센다이 벡터, 및 5 MOI로 SV40을 발현하는 센다이 벡터와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 KOSM을 발현하는 렌티바이러스 벡터, 센다이 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터와 같은 멀티시스템 벡터와 접촉된다.
- [0175] 특정 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉되기 전에 T 세포는 T 세포 활성화제 및 임의로 하나 이상의 면역조절 분자로 T 세포를 자극하고 활성화하기 충분한 시간 동안 자극된다. 특정 구현예에서, T 세포는 종양 항원 또는 자가 종양 세포 또는 종양 세포주로 자극된다. 일부 구현예에서, T 세포는 TIL이고 TIL은 암 환자로부터의 종양 표적 세포 또는 이로부터 유래된 종양 항원, 또는 하나 이상의 종양 연관 항원으로 자극된다.

- [0176] 종양 연관 항원의 비제한적 예는 AFP(알파-태아단백질), $\alpha v \beta 6$ 또는 또 다른 인테그린, BCMA, BRAF, B7-H3, B7-H6, CA9(탄산 무수화효소 9), (암배아 항원), 클라우딘(Claudin) 18.2, 클라우딘 6, c-MET, DLL3(델타 유사 단백질 3), DLL4, ENPP3(엑토뉴클레오티드 피로포스파타제/포스포디에스터라제 패밀리 구성원 3), EpCAM, EPG-2(상피 당단백질 2), EPG-40, ephrinB2, EPHA2(에프린 수용체 A2), ERBB 이량체, 에스트로겐 수용체, ETBR(엔도텔린 B 수용체), FAP- α (섬유아세포 활성화 단백질 α), 태아 AchR(태아 아세틸콜린 수용체), FBP(엽산 결합 단백질), FCRL5, FR- α (엽산 수용체 알파), GCC(구아닐 사이클라제 C), GD2, GD3, GPC2(글리피칸-2), GPC3, gp100(당단백질 100), GPNMB(당단백질 NMB), GPRC5D(G 단백질 커플링 수용체 5D), HER2, HER3, HER4, B형 간염 표면 항원, 흑색종 연관 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1(멜란 A), 메조텔린, 뮤신 1(MUC1), MUC16, MHC/펩티드 복합체(예를 들어, AFP, KRAS, NY-ESO, MAGE-A 및 WT1로부터 유래된 펩티드와 복합체화된 HLA-A), NCAM(신경 세포 부착 분자), 넥틴(Nectin)-4, NY-ESO, 암배아 항원, PRAME(흑색종의 우선 발현 항원), 프로게스테론 수용체, PSA(전립샘 특이적 항원), PSCA(전립샘 줄기 세포 항원), PSMA(전립샘 특이적 막 항원), ROR1, ROR2, SIRP α (신호 조절 단백질 알파), SLIT, SLITRK6(NTRK 유사 단백질 6), 서바빈, TAG72(종양 연관 당단백질 72), TPBG(영양막 당단백질), Trop-2, VEGFR1(혈관 내피 성장 인자 수용체 1), p53, p53 돌연변이체, 프로스테인, 서바빈, 텔로머라제, PCTA-1/갈렉틴 8, MelanA/MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 과단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SSX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 내장 카복실 에스터라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포의 부분, 신생항원, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.
- [0177] 이러한 방식으로 암 환자로부터의 폴리클로날 항원 특이적(예를 들어, 종양 특이적) T 세포가 부분적으로 재프로그래밍되고 재생될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 종양 항원, 종양 오가노이드, 자가 종양 세포 또는 종양 세포주와 같은 항원으로서의 자극 후 선택, 분류 또는 달리 농축된다. 특정 구현예에서, T 세포는 4-1BB(CD137), PD1, LAG3, CD45, CD39, TIGIT, TIM3, CD69, OX40, CD28, CD25, CD49d 및 CTLA4와 같은 하나 이상의 세포 표면 마커를 발현하는 세포를 선택함으로써 농축, 선택 또는 분류된다. 특정 구현예에서, T 세포는 본원에 기재된 임의의 T 세포 활성화제로의 활성화 전에 농축되거나, 선택되거나, 분류된다. 특정 구현예에서, CD45+ T 세포는 본원에 기재된 임의의 활성화제로의 활성화 전에 선택되거나 농축된다.
- [0178] 일부 구현예에서, 방법은 세포와 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션 전, 동안 및/또는 후에 세포를 활성화하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 TCR 복합체의 구성원, 예를 들어 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 제제 및 비드(예를 들어, TRANSACT, Miltenyi)와 같은, 고체 지지체 표면 상에 존재하는 것들과 같은 항체를 포함하는 T 세포 공동자극 분자, 예를 들어 CD28, CD27, CD137(4-1BB), OX40 또는 ICOS에 특이적으로 결합하는 2차 제제와 같은, TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화할 수 있는 제제의 존재 하에 세포의 인큐베이션을 포함할 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 방식으로 T 세포를 자극하는 것(사전활성화상)은 바이러스 형질도입의 효율 및 재프로그래밍 인자의 전달을 증가시킨다. 유사하게, 핵산의 형질감염이 재프로그래밍 인자의 전달을 위해 사용되는 경우, T 세포의 사전자극은 유전자 전달의 효율을 증가시킨다.
- [0179] 특정 구현예에서, T 세포는 하나 이상의 T 세포 활성화 및/또는 공동자극 및/또는 면역조절 화합물로 사전활성화, 재활성화 및/또는 증식된다.
- [0180] 특정 구현예에서, T 세포는 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 약 21일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 7일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 8일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 9일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 10일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 11일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 12일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 13일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 14일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다.
- [0181] 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 5일 내지 약 10일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 5일 내지 약 11일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 5일 내지 약 12일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프

로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 5일 내지 약 12일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5일 이상 약 13일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다.

[0182] 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 6일 내지 약 10일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 6일 내지 약 11일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 6일 내지 약 12일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 6일 내지 약 12일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 적어도 약 6일 내지 약 13일 이하의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다.

[0183] T 세포가 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉되는 기간은 재프로그래밍 인자의 발현 양 또는 수준에 따라 다를 수 있다. 예를 들어, T 세포가 높은 수준의 하나 이상의 재프로그래밍 인자를 발현하는 바이러스 벡터로 형질도입되는 일 구현예에서, 원하는 부분적 재프로그래밍(T 세포 유래 부착성 세포의 형성)을 달성하는 데 더 짧은 기간이 필요할 수 있다. 또 다른 구현예에서, T 세포는 낮은 수준의 하나 이상의 재프로그래밍 인자를 발현하는 바이러스 벡터로 형질도입되며 원하는 부분적 재프로그래밍(T 세포 유래 부착성 세포의 형성)을 달성하기 위해 더 긴 시기가 필요할 수 있다. 이와 관련하여, 특정 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자를 암호화하는 바이러스 벡터와 같은 발현 벡터는 부분적 재프로그래밍 인자의 발현이 원하는 발현 수준으로 조정될 수 있는 유도성 프로모터를 포함할 수 있다.

[0184] 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 30일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 25일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 20일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 15일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 13일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 5 내지 12일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 6 내지 12일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 6 내지 13일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 7 내지 12일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 7 내지 13일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 7 내지 14일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 6 내지 20, 7 내지 20, 8 내지 20, 9 내지 20, 10 내지 20, 5 내지 18, 6 내지 18, 7 내지 18, 8 내지 18, 9 내지 18 또는 10 내지 18일의 기간 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉된다.

[0185] 전능 또는 만능 줄기 세포(TSC 또는 PSC)로의 체세포 재프로그래밍 동안 체세포는 이들이 또한 PSC 표현형을 획득하기 시작하면서 탈분화를 시작하고 이의 계통 특이적 후생유전학적 상태를 상실할 것이다. 이러한 변화는 점진적으로 진행되므로 체세포가 재프로그래밍 과정에 오래 머무를수록 이들은 더 많은 PSC 표현형을 획득할 것이다. 본 개시의 다양한 구현예에서, 재프로그래밍 과정은 체세포가 이의 공급원 세포 기능을 상실하는 것을 방지할 만큼 탈분화되기 전에 중단된다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 면역 세포(예를 들어, T 세포)가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 세포를 형성하고 본원에서 "T 세포 유래 부착성 세포"로 지칭되는 중간 세포 유형으로 형질전환하기 충분할 것이다.

[0186] 본원에 사용된 "T 세포 유래 부착성 세포"는 T 세포 부분적 재프로그래밍 과정에서 중간 세포를 지칭한다. T 세포 유래 부착성 세포는 (적어도 부분적으로) 배양 용기 표면에 부착하고 부분적 재프로그래밍 과정 동안 콜로니를 형성한다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 배양 용기 표면에 약하게 부착된다. T 세포 유래 부착성 세포는 이들이 완전 재프로그래밍되지 않았다는 점에서 iPSC 세포(및 iTSC)와 상이하다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포 콜로니는 배양 용기 표면에 약하게 부착된다. 본원에 기재된 바와 같은 T 세포 유래 부착성 세포는 계통 안정성을 유지하며, 예를 들어, 본 개시의 T 세포 유래 부착성 세포는 T 세포 활성화/자극 조건(예를 들어, 항-CD3, 항-CD28, 항-CD27 항체와 같은 활성화 및/또는 면역조절 분자 및 IL2, IL7, IL15와 같은 사이토카인 등의 존재 하에 T 세포 배양 배지와 함께)에서 배양 후 T 세포 계통으로 복귀하는 능력을 유지한다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 다능성이 아니다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 T 세포 또는 활성화 T 세포보다 크다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 FACS 분석에 의해 측정된 바와 같이 더 크고 더 복잡한 구조를 갖는다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 SSEA4+CD3+이다. 또 다른 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 유세포측정 또는 트랜스

크립토펙 분석을 사용하여 결정된 바와 같이 하기 세포 표면 마커 중 하나 이상을 발현한다: CD50, CD352, CD31, 인테그린 $\beta 7$, CD49e, CD122, CD314, HLA-DR, CD134, CD245, CD105(엔도글린(Endoglin)), CD366, CD39, 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, 인테그린 $\beta 5$, CD71, CD164, CD10, CD63, XCR1, CD298, CD201, CD151, CD325, CD324, CD147, SSEA-3, TRA-1-81, TRA-2-54, 포도플라닌, CD9, CD340, CD24, CD90, CD326, SSEA-5, SSEA4, TRA-1-60-R.

[0187] 당업자에 의해 쉽게 이해될 바와 같이, iPS 세포는 형태에 의해 T 세포 유래 부착성 세포와 구별될 수 있다. 특히, 도 3f에 나타난 바와 같이, iPS 세포 콜로니는 훨씬 더 크고 더 명확한 콜로니 구조를 가지고 있다. iPS 세포는 당분야에 잘 알려져 있으며 예를 들어 문헌(Nishimura 2013, Cell Stem Cell 12, 114-126; Vizcardo 등, 2013, Cell Stem Cell 12, 31-36)에 기재되어 있다.

[0188] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 10%는 유세포측정 또는 트랜스크립토펙 분석을 사용하여 결정된 바와 같이 하기 세포 표면 마커 중 하나 이상을 발현한다: CD50, CD352, CD31, 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, 인테그린 $\beta 7$, CD49e, CD122, CD314, HLA-DR, CD134, CD245, CD105(엔도글린), CD366, CD39, 인테그린 $\beta 5$, CD71, CD164, CD10, CD63, XCR1, CD298, CD201, CD151, CD325, CD324, CD147, SSEA-3, TRA-1-81, TRA-2-54, 포도플라닌, CD9, CD340, CD24, CD90, CD326, SSEA-5, SSEA4, TRA-1-60-R.

[0189] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 약 10% 내지 약 80%는 유세포측정 또는 트랜스크립토펙 분석을 사용하여 결정된 바와 같이 하기 세포 표면 마커 중 하나 이상을 발현한다: CD50, CD352, CD31, 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, 인테그린 $\beta 7$, CD49e, CD122, CD314, HLA-DR, CD134, CD245, CD105(엔도글린), CD366, CD39, 인테그린 $\beta 5$, CD71, CD164, CD10, CD63, XCR1, CD298, CD201, CD151, CD325, CD324, CD147, SSEA-3, TRA-1-81, TRA-2-54, 포도플라닌, CD9, CD340, CD24, CD90, CD326, SSEA-5, SSEA4, TRA-1-60-R. 또 다른 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 약 15% 내지 약 80%, 적어도 약 20% 내지 약 75%, 적어도 약 25% 내지 약 75%, 적어도 약 30% 내지 약 50%, 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 또는 약 80%는 유세포측정, 유전자 발현 또는 트랜스크립토펙 분석과 같은 당분야에 알려진 검정을 사용하여 결정된 바와 같이 전술한 세포 표면 마커 중 하나 이상을 발현한다. 이러한 마커의 발현 수준 및 양성 세포%는 부분적 재프로그래밍 일수에 따라 다를 것이다.

[0190] 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 면역 세포(예를 들어, T 세포) 동일성의 특정 마커의 부분적 상실을 초래할 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, T 세포의 부분적 재프로그래밍은 CD3, CD4, CD8(예를 들어, CD8 $\alpha\alpha$ 및/또는 CD8 $\alpha\beta$) 중 임의의 하나 이상의 발현의 상실 또는 감소를 초래할 수 있다. 특정 구현예에서, 발현의 감소는 유세포측정에 의해 측정된 바와 같이 마커 발현의 약 10% 내지 약 95% 감소를 의미할 수 있다. 특정 구현예에서, 발현의 감소는 T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 일부에서 약 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75 또는 2 log의 평균 형광 세기(MFI)의 감소이다.

[0191] 특정 구현예에서, T 세포는 T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉된다. 특정 구현예에서, T 세포는 부착 세포 콜로니가 형성되기 충분한 시기 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉되며, 부착 세포의 적어도 일부는 하기 세포 표면 마커 중 하나 이상을 발현한다: CD50, CD352, CD31, 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, 인테그린 $\beta 7$, CD49e, CD122, CD314, HLA-DR, CD134, CD245, CD105(엔도글린), CD366, CD39, 인테그린 $\beta 5$, CD71, CD164, CD10, CD63, XCR1, CD298, CD201, CD151, CD325, CD324, CD147, SSEA-3, TRA-1-81, TRA-2-54, 포도플라닌, CD9, CD340, CD24, CD90, CD326, SSEA-5, SSEA4, TRA-1-60-R. 이러한 마커의 발현은 유세포측정, 유전자 발현 분석, RNAseq 또는 당분야에 알려진 다른 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0192] 특정 구현예에서, T 세포는 부착 세포 콜로니가 형성되기 충분한 시기 동안 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉되며, 부착 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, CD9, CD90 및/또는 SSEA4를 발현한다.

[0193] 특정 구현예에서, T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, CD9, CD90, 또는 SSEA4, 또는 이의 조합을 발현한다. 특정 구현예에서, T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$ 을 발현하거나; T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$ 및 SSEA4를 발현하고, T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4 및 CD9를 발현하거나; T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90을 발현한다. 특정 구현예에서, T 세포 부착성 세포의 적어도 일부는 SSEA4; SSEA4 및 CD9; 또는 SSEA4, CD9 및 CD90을 발현한다.

[0194] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 일부는 부분적 재프로그래밍 과정에 대한 초기 마커인 CD9 및/또는 CD90을 발현한다. CD9는 테트라스파닌-29로도 알려져 있으며 4개의 막형단 도메인을 가지고 있다. 이는

세포 부착, 신호전달 및 세포 분화에 관여된다. CD90은 THY-1이라고도 한다. 이는 면역글로불린 슈퍼패밀리 표면 당단백질이며 중간엽 줄기 세포와 연관된 마커이다. 이는 또한 세포 부착 및 소통에 관여된다. Thy-1은 쥐와 T 세포에서 일반적으로 발견되는 반면, 인간 T 세포 계통에서 T 세포 Thy-1 발현은 가슴샘 피질 및 CD4 Th17 T 세포의 하위세트에 있는 특화된 집단으로 제한된다.

- [0195] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 이상은 CD9 및/또는 CD90을 발현한다.
- [0196] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 특정 구현예에서 자극 및 비자극 T 세포와 비교하여 인테그린 $\alpha 6 \beta 1$, CD164, CD9, CD63, CD90, CD71, CD326, TRA-1-81 및 TRA-1-60-R 중 하나 이상을 발현한다. 또 다른 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 자극 또는 비자극 T 세포와 비교하여 CD352 및 CD31의 감소된 발현을 갖는다.
- [0197] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 이상은 CD164, CD9, CD63, CD90, CD71, CD326, TRA-1-81 및 TRA-1-60-R 중 하나 이상을 발현한다.
- [0198] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 관련 대조군 T 세포 또는 단리된 출발 T 세포 집단의 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은 T 세포 유래 부착성 세포 집단을 제공한다. 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 단리된 공급원 T 세포(즉, 재프로그래밍 인자와 접촉된 단리된 T 세포)의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 유래 부착성 세포 집단을 제공한다.
- [0199] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포가 T 세포 활성화제(예를 들어, 항-CD3, 항-CD28, IL2, IL7, IL15와 같은 하나 이상의 사이토카인)와 접촉될 때, 세포는 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 증식 가능성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 대조군 T 세포보다 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500, 100, 1500 또는 2000배 더 많이 증식한다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 대조군 T 세포보다 적어도 약 50~2000배, 적어도 약 50~1000배, 적어도 50~900배, 적어도 50~800배, 적어도 50~700배, 적어도 50~600배, 적어도 50~500배, 적어도 100~400배, 적어도 150~500배, 적어도 200~500배 또는 적어도 300~500배 더 많이 증식한다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 T 세포보다 더 빨리 증식한다. 본 개시의 특정 구현예에서 부분적 재프로그래밍 방법은 단리된 T 세포 및/또는 부분적 재프로그래밍 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)의 유지에 적절한 조건 하에 수행된다. 특정 세포 유형의 유지 및 증식에 적절한 조건은 당업자에게 명백할 것이다. 특화된 배양 배지는 상업적 공급원으로부터 취득될 수 있거나, 증식을 향상시키기 위해 필요하거나 요망되는 인자가 표준 배양 배지에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 상기 세포에서 유도성 요소의 발현을 유도하거나 특정 체제에 민감한 세포의 성장을 억제하기 위해 추가 인자 및 체제가 또한 배양 배지에 첨가될 수 있다.
- [0200] 특정 구현예에서, 단리된 T 세포는 TexMACS 배지 또는 OpTmizer 기본 배지와 같은 T 세포의 배양에 최적화된 상업적으로 이용 가능한 배지를 포함하는 T 세포 배양 배지(TCM) 중에, OpTmizer 세포 보충물과 같은 하나 이상의 보충물을 첨가하여, 특정 구현예에서 면역 세포 혈청 대체물(예를 들어, T 세포 혈청 대체물) 및/또는 L-글루타민; 글루타맥스(GlutaMAX); 및/또는 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15와 같은 사이토카인과 같은 다른 보충물을 첨가하여 배양된다.
- [0201] 특정 구현예에서, 본원의 방법의 부분적 재프로그래밍상은 STEMFIT 배지(Amsbio, Abington, UK), mTESR2(Stem Cell Technologies) 및 ESSENTIAL 6 또는 8(Life Technologies); STEMPRO hESC SFM(Gibco); TESR, clone-R, dMEM F12, KSR과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 세포 재프로그래밍에 최적화된 배지를 사용하여 수행된다.
- [0202] 또 다른 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 50% T 세포 배지 및 50% 줄기 세포 배지(예를 들어, STEMFIT 또는 Essential 8, mTESR, TESR, clone-R, dMEM F12, KSR)로 구성된 배지 중, 임의로 IL2, IL7 및/또는 IL15와 같은 하나 이상의 사이토카인을 첨가하여 수행된다. 특정 구현예에서, 부분적 재프로그래밍은 제1 배지 중 제1 시기 동안, 이어서 제2 배지 중 제2 시기 동안 수행된다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 제1 배지는 1, 2, 3, 4, 5, 6 일 이상의 기간 동안 임의로 하나 이상의 사이토카인이 첨가된, 주지된 바와 같은 50/50 배지이고, 이어서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9일 이상 동안 줄기 세포 배지(예를 들어, Essential 8의 STEMFIT) 배지인 제2 배지 중 세포를 배양한다. 특정 구현예에서, 제1 배지는 50/50이고 1, 2 또는 3일 동안 사용되며, 제2 배지는 줄기 세포

배지(예를 들어, STEMFIT 또는 Essential 8)이고 제2일, 제3일 또는 4일에 시작하여 T 세포 유래 부착성 세포의 형성 및 본원에 추가로 기재된 바와 같은 재활성화 전까지 사용된다. 부분적 재프로그래밍 방법의 특정 구현예에서, T 세포는 제1 배지 중 제1 시기 동안 배양된 후 제2 배지 중 제2 시기 동안 배양된다. 본원의 방법의 부분적 재프로그래밍상의 특정 구현예에서, 하나 이상의 재프로그래밍 인자(예를 들어, KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC 및 SV40 중 하나 이상)와 접촉된 T 세포는 iMatrix와 같은 재조합 인간 라미닌511-E8 단편으로 코팅된 배양 용기 내에서 적절한 배지 중 배양된다.

[0203] **3. 부분적 재프로그래밍 T 세포 유래 부착성 세포의 재활성화**

[0204] 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍 T 세포 유래 부착성 세포는 재프로그래밍면역 세포(예를 들어, T 세포)가 T 세포 정체성 및 기능성을 재획득할 수 있게 하는 활성화 배지 중 재활성화된다.

[0205] 본 개시의 다양한 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 적절한 T 세포 배양 배지 중 하나 이상의 T 세포 자극제 또는 활성화제 및/또는 공동자극제를 사용하여 부분적 재프로그래밍 직후에 재활성화된다.

[0206] 본 개시의 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 하나 이상의 T 세포 활성화제 및/또는 하나 이상의 공동자극제를 포함하거나 포함하지 않는, IL2, IL7, IL15, IL21과 같은 하나 이상의 사이토카인으로 보충된 T 세포 배양 배지 중 부분적 재프로그래밍 직후에 재활성화된다.

[0207] 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 TexMACS 배지 또는 OpTmizer 기본 배지와 같은 T 세포 배양에 최적화된 상업적으로 이용 가능한 배지를 포함하는 OpTmizer 세포 보충물과 같은 하나 이상의 보충물을 첨가한, T 세포 배양 배지(TCM)와 같은 T 세포 배양을 위한 적절한 배지 중 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 하나 이상의 T 세포 활성화제 및/또는 공동자극제 및/또는 면역조절제로 재활성화된다. 특정 구현예에서는 면역 세포 혈청 대체물(예를 들어, T 세포 혈청 대체물) 및 L-글루타민; 글루타맥스; IL-2, IL7 및/또는 IL15와 같은 사이토카인과 같은 다른 보충물을 첨가한다.

[0208] 일부 구현예에서, 본원에 사용된 자극 또는 활성화 조건 또는 제제는 본원의 방법의 사전활성화, 재활성화 및/또는 증식상을 위해 사용될 수 있다. T 세포는 예를 들어 미국 특허 5,858,358; 5,883,223; 6,352,694; 6,534,055; 6,797,514; 6,867,041; 6,692,964; 6,887,466; 6,905,680; 6,905,681; 6,905,874; 7,067,318; 7,144,575; 7,172,869; 7,175,843; 7,232,566; 7,572,631; 및 10,786,533에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 일반적으로 활성화되고 증식될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 T 세포 활성화제, 및/또는 1차 활성화 신호를 제공하는 공동자극제 및 공동자극 신호를 제공하는 제제와 접촉된다. 1차 활성화 신호를 제공하는 제제는 당 분야에 알려져 있고, 예를 들어 T 세포 상에서 발현된 CD3 세포 표면 수용체에 결합하는 항체(예를 들어, 항-CD3 항체) 또는 이의 항원 결합 단편 또는 리간드 또는 이의 표적 결합 단편을 포함한다. 공동자극 신호를 제공하는 제제는 당 분야에 알려져 있고, CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40 등에 결합하는 항체 또는 리간드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 활성화제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화할 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 예를 들어 ITAM 유도 신호의 활성화를 개시하기 위해 1차 신호를 전달하기 적합한 제제, 예컨대 TCR 성분에 특이적인 것들과 같이, 제제는 T 세포에서 1차 TCR/CD3 세포내 신호 전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 또 다른 구현예에서, 활성화제는 공동자극 신호를 촉진하는 제제와 조합하여 또는 동시에 제공된다. 공동자극 신호를 촉진하는 적합한 제제는 당 분야에 알려져 있고 CD28, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, 유도성 T 세포 공동자극제(ICOS), 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1(CD11a/CD18), CD247, CD276(B7-H3), Ig 알파(CD79a), DAP-10, Fc 감마 수용체 또는 이의 임의의 조합의 신호전달을 촉진하는 항체 또는 리간드를 포함한다. 특정 구현예에서, 방법의 활성화 단계를 위한 자극제 및 공동자극제는 예를 들어 비드와 같은 고체 지지체에 결합된 항-CD3, 항-CD28, 항-41-BB 또는 항-CD27 항체 및/또는 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 특정 구현예에서, 제제는 활성화 수용체 또는 공동자극 수용체, 예를 들어 펩티드/MHC 복합체 및/또는 CD27 리간드(예를 들어, CD70 또는 이의 삼량체화 버전), CD80, CD86 등에 대한 리간드를 포함한다. 자극제 및 공동자극제 중에는 항-CD3/항-CD28 비드(예를 들어, DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T 세포 증식제 및/또는 ExpACT 비드)가 있다. 임의로, 자극 및/또는 활성화는 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15를 포함한다.

[0209] 다양한 구현예에서, 활성화제는 중양 항원, 특히 본원에 개시된 바와 같은 중양 항원이다.

[0210] 일부 구현예에서, 본원의 활성화제 및/또는 공동자극제는 하나 이상의 표면 상에 코팅되거나 흡착될 수 있다. 이러한 표면은 예를 들어 고체 표면, 다공성 표면, 반다공성 표면, 구형 표면, 비구형 표면, 막대 유사 표면 및

중합체 표면을 포함한다.

[0211]

특정 구현예에서, T 세포는 TRANSACT(Miltenyi Biotec)와 같은 상업적으로 이용 가능한 시약을 사용하여 활성화된다(예를 들어, 본원의 방법의 사전활성화, 재활성화 또는 증식상에서). 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그램 T 세포는 T 세포 유래 부착성 세포가 그 T 세포 정체성을 재획득할 수 있도록 하는 비로 TRANSACT를 사용하여 활성화된다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그램 T 세포는 1:10, 1:50 1:100, 1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450, 1:500, 1:550, 1:600, 1:650, 1:700, 1:750, 1:800, 1:850, 1:900, 1:1,000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 또는 1:10,000으로 TRANSACT로 활성화된다. 다양한 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 적절한 T 세포 활성화 배지 중 활성화되고 T 세포 유래 부착성 세포가 그 정체성을 재획득할 수 있도록 하는 충분한 시간 동안 배양된다. 다양한 구현예에서, 부분적으로 재프로그램 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 이상의 기간 동안 T 세포 활성화 배지 중 활성화되고 배양된다. 특정 구현예에서, 부분적으로 재프로그램 세포는 약 1~20일 동안, 약 2~20일 동안, 약 3~20일 동안, 약 4~20일 동안, 약 5~20일 동안, 약 6~20일 동안, 약 7~20일 동안, 8~20일 동안, 약 9~20일 동안, 또는 약 10~20일 동안 활성화되고 배양된다. 특정 구현예에서, 부분적으로 재프로그램 세포는 약 1~15일 동안, 약 2~15일 동안, 약 3~15일 동안, 약 4~15일 동안, 약 5~15일 동안, 약 6~15일 동안, 약 7~15일 동안, 약 8~15일 동안, 약 9~15일 동안 또는 약 10~15일 동안 활성화된 후 배양된다.

[0212]

특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 종양 항원 발현 자가 세포 또는 종양 항원과 같은 항원 또는 항원 발현 세포로 재유도되거나 재활성화된다. 특정 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포는 APC 발현 일렬 미니유전자와의 공동 배양에 의해 재활성화된다(즉, 종양은 APC에 의해 발현 및 제시된 일렬 미니유전자로부터 재발현된 단편으로 시퀀싱될 수 있음). 암과 연관된 것으로 알려진 임의의 종양 항원이 본원에서 사용을 위해 고려된다. 항원의 비제한적 예는 AFP(알파-태아단백질), $\alpha\beta6$ 또는 또 다른 인테그린, BCMA, BRAF, B7-H3, B7-H6, CA9 (탄산 무수화효소 9), (암배아 항원), 클라우딘 18.2, 클라우딘 6, c-MET, DLL3(델타 유사 단백질 3), DLL4, ENPP3(엑토뉴클레오티드 피로포스파타제/포스포디에스터라제 패밀리 구성원 3), EpCAM, EPG-2(상피 당단백질 2), EPG-40, ephrinB2, EPHA2(에프린 수용체 A2), ERBB 이량체, 에스트로겐 수용체, ETBR(엔도텔린 B 수용체), FAP- α (섬유아세포 활성화 단백질 α), 태아 AchR(태아 아세틸콜린 수용체), FBP(엽산 결합 단백질), FCRL5, FR- α (엽산 수용체 알파), GCC(구아닐 사이클라제 C), GD2, GD3, GPC2(글리피칸-2), GPC3, gp100(당단백질 100), GPNMB(당단백질 NMB), GPRC5D(G 단백질-커플링 수용체 5D), HER2, HER3, HER4, B형 간염 표면 항원, 흑색종 연관 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1(멜란 A), 메조텔린, 뮤신 1(MUC1), MUC16, MHC/펩티드 복합체(예를 들어, AFP, KRAS, NY-ESO, MAGE-A 및 WT1로부터 유래된 펩티드와 복합체화된 HLA-A), NCAM(신경 세포 부착 분자), 넥틴-4, NY-ESO, 암배아 항원, PRAME(흑색종의 우선 발현 항원), 프로게스테론 수용체, PSA(전립샘 특이적 항원), PSCA(전립샘 줄기 세포 항원), PSMA(전립샘 특이적 막 항원), ROR1, ROR2, SIRP α (신호 조절 단백질 알파), SLIT, SLITRK6(NTRK 유사 단백질 6), 서바빈, TAG72(종양 연관 당단백질 72), TPBG(영양막 당단백질), Trop-2, VEGFR1(혈관 내피 성장 인자 수용체 1), p53, p53 돌연변이체, 프로스테인, 서바빈, 텔로머라제, PCTA-1/갈락틴 8, MelanA/ MART1, Ras 돌연변이체, hTERT, 육종 전위 과단점, ML-IAP, ERG(TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, 안드로젠 수용체, 사이클린 B1, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, SART3, PAX5, OY-TES1, LCK, AKAP-4, SXX2, RAGE-1, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2, 내장 카복실 에스터라제, mut hsp70-2, CD79a, CD79b, CD72, LAIR1, FCAR, LILRA2, CD300LF, CLEC12A, BST2, EMR2, LY75, GPC3, FCRL5, IGLL1, CD2, CD3 ϵ , CD4, CD5, CD7, APRIL 단백질의 세포외 부분, 신생항원, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0213]

다양한 구현예에서, T 세포 유래 부착성 세포의 재활성화를 위한 활성화 매질은 사이토카인과 같은 면역조절 분자를 추가로 포함할 수 있다. 면역조절 분자의 예는 림포카인, 모노카인 및 전통적 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토카인 중에는 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬; 부갑상샘 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 릴렉신; 프로릴렉신; 난포 자극 호르몬(FSH), 갑상샘 자극 호르몬(TSH), 황체 형성 호르몬(LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자(HGF); 섬유아세포 성장 인자(FGF); 프로락틴; 태반 락토겐; 물리리안 억제 물질; 마우스 성선자극호르몬 연관 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); NGF-베타와 같은 신경 성장 인자(NGF); 혈소판 성장 인자; TGF-알파 및 TGF-베타와 같은 전환 성장 인자(TGF); 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리스로포이에틴(EPO); 글루코코르티코이드; 인터페론-알파, 베타 및 -감마와 같은 인터페론; 대식구-CSF(M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자(CSF); 과립구-대식구-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); IL-1, IL-1 알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15와 같은 인터류킨(IL); TNF-알파 또는 TNF-베타와 같은 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 kit 리간드(KL)를 포함하는 다른 폴리펩티드 인자가 있다. 본원에 사용된 용어 사이토카인은 자연적 공급원

또는 재조합 세포 배양으로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 동등물을 포함한다.

- [0214] 특정 구현예에서, 본원의 부분적으로 재프로그래밍되고 재활성화된 T 세포는 본원에 기재된 바와 동일한 재활성화 방법을 사용하여 추가로 자극 및 증식될 수 있다. 이러한 T 세포 활성화 및 증식 방법은 당분야에 알려져 있다.
- [0215] 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍에 이어 재활성화 및 임의로 추가 증식을 포함하는 본원의 방법은 재생 T 세포가 하기 특징 중 임의의 하나 이상을 획득하기 충분할 것이다:
- [0216] 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 높은 후생유전학적 가소성을 포함하는 하나 이상의 줄기성 특성을 갖는다. 재생 세포가 획득할 수 있는 다른 유리한 표현형 마커는 L-셀렉틴(CD62L), L-7Ra, CD132, CCR7, CD45RA, CD45RO, CD27, CD28, CD95, CXCR3, TCF7 및 LFA-1의 발현을 포함한다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 T 기억 줄기 세포 발현 마커를 획득하며, 예를 들어 CD95, CD45RA, CCR7 및 CD62L을 발현하고 줄기 세포 유사 자가 재생 능력 그리고 기억 및 효과기 T 세포 하위세트의 전체 스펙트럼을 재구성하는 다능성 능력을 부여받은 기억 T 세포이다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 CD45RO, CCR7 및 CD62L을 발현하는 기억 T 세포인 "중추 기억 T 세포" 또는 "TCM 세포"이다. 또 다른 구현예에서, 재생 T 세포는 효과기 기억 T 세포 마커, 예컨대 CD45RO의 발현을 갖지만 CCR7 및 CD62L의 발현은 없다. 특정 구현예에서, 본원의 재생 T 세포는 줄기 유사 표현형을 갖고 개선된 증식 능력을 갖는다.
- [0217] 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 CD45RA, CCR7 및 CD62L을 발현하지만 CD95는 발현하지 않는 T 세포인 나이브 T 세포, "TN 세포"의 특성을 갖는다.
- [0218] 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 후생유전학적 특징부, 텔로미어 길이 및 기능성 측면에서 더 젊은 T 세포의 생물학적 및 표현형 특성을 나타낼 수 있다.
- [0219] 다양한 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 부분적 재프로그래밍 및 재활성화는 세포의 DNA에서 다양한 CpG 부위의 메틸화 상태를 평가하여 측정될 수 있는 바와 같이 재생 T 세포를 생성한다. 이러한 기술은 당분야에 알려져 있다. 예를 들어 문헌(Horvath and Raj, 2018, Nature Reviews Genetics, 19:371-375)을 참고한다. 다양한 그룹이 계놈에서 특정 CpG의 메틸화 상태에 지정된 값을 사용하는 수학적 알고리즘을 사용하여 해당 세포 또는 조직 "생물학적 연령"의 추정치를 제공하기 위해 세포의 메틸화 상태를 사용하는 모델 또는 "후생유전학적 시계"를 확립하였다. 다양한 구현예에서, 부분적 재프로그래밍이 발생했는지 여부를 결정하기 위해 다양한 CpG 부위의 메틸화 상태가 사용된다. 다양한 구현예에서, 고갈된 CD8 T 세포의 수를 예측하기 위해 다양한 CpG 부위의 메틸화 상태가 사용된다. 다양한 구현예에서, 면역 세포(예를 들어, T 세포) 집단이 환자에 투여하기 적합한지 여부를 결정하기 위해 다양한 CpG 부위의 메틸화 상태가 사용된다.
- [0220] 다양한 구현예에서 재생 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 포함하는 본원에 기재된 세포의 후생유전학적 연령을 결정하기 위해 문헌(Horvath 및 Raj (2018, Nature Reviews Genetics, 19:371-375))에 기재된 바와 같은 "호르바트 시계"가 사용된다. 다양한 구현예에서 부분적 재프로그래밍이 일어났는지 여부를 결정하기 위해 호르바트 시계가 사용된다. 다양한 구현예에서, 고갈된 CD8 T 세포수를 예측하기 위해 호르바트 시계가 사용된다. 다양한 구현예에서, imm 면역 세포(예를 들어, T 세포) 집단이 환자의 투여에 적합한지 여부를 결정하기 위해 호르바트 시계가 사용된다. 다양한 구현예에서, 다른 후생유전학적 시계 또는 알고리즘(예를 들어, 한넬 시계 또는 르바인 시계)이 사용된다. 예를 들어 문헌(Hannum 등, 2013, Mol. Cell., 49:359-369; Levine 등, 2018, Aging, 10(4):573-591)을 참고한다.
- [0221] 특정 구현예에서, 재생 T 세포(본원에 기재된 바와 같이 부분적으로 재프로그래밍되고 재활성화된 T 세포)는 대조군 T 세포(예를 들어, 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉 없이 배양된 T 세포)와 비교하여 감소된 후생유전적 연령(eAge)을 나타낸다. eAge는 본원의 다른 곳에서 기재된 호르바트 시계와 같은 알려진 후생유전적 시계 결정 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 재생 T 세포의 eAge는 적절한 대조군 T 세포(예를 들어, 부분적 재프로그래밍 및 재활성화 전의 원래 공여자 샘플로부터의 T 세포 또는 연대순으로 연령 매칭된 T 세포)의 eAge와 비교하여 약 5%~75%, 10%~75%, 10%~50%, 15%~75%, 15%~50%, 20%~75% 또는 20%~50% 감소된다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 재생 T 세포의 eAge는 적절한 대조군 T 세포(예를 들어, 부분적 재프로그래밍 전의 원래 공여자 샘플의 T 세포 또는 연대순으로 연령 매칭된 T 세포)와 비교하여 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 이상만큼 감소된다.
- [0222] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하는

다. 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20년 이상 더 젊은 T 세포 집단을 제공한다. 이와 관련하여, 후생유전학적 연령은 호르바트 후생유전학적 시계를 측정하는 것과 같이 당분야에 알려진 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

- [0223] 특정 구현예에서, 재생 T 세포(본원에 기재된 바와 같이 부분적으로 재프로그래밍되고 재활성화된 T 세포)는 약 7-16세인 후생유전학적 연령(eAge)을 나타낸다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 대조군 T 세포와 비교하여(예를 들어, 하나 이상의 재프로그래밍 인자와 접촉 없이 배양된 T 세포; 예를 들어, 출발 세포의 연대순 연령과 비교하여) 사춘기 동등 연령 근처로 감소된 후생유전학적 연령(eAge)을 나타낸다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 텔로미어 길이를 갖는다. 텔로미어 길이는 당분야에 알려진 방법(예를 들어, Rosenberg 등, 2011, Clin Cancer Res 17, 4550-4557 참고) 및 상업적으로 이용 가능한 키트(예를 들어, TELOTAGGG, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 텔로미어 길이는 약 0.1-3kb 연장된다. 특정 구현예에서, 텔로미어 길이는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 약 1 kb 연장된다. 또 다른 구현예에서, 텔로미어는 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2 kb 연장된다.
- [0224] 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 증가된 증식 가능성을 나타낸다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않았거나 연대순으로 연령 매칭된 T 세포인 대조군 T 세포보다 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50배 더 많이 증식한다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 연대순으로 연령 매칭된 대조군 T 세포 또는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 대조군 T 세포보다 25-1000배 더 많이 증식한다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 연대순으로 연령 매칭된 대조군 T 세포 또는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 대조군 T 세포보다 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500배 더 많이 증식한다. 특정 구현예에서, 재생 T 세포는 부분적으로 재프로그래밍되지 않은 T 세포보다 더 빨리 증식한다.
- [0225] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하며, T 세포는 비정상적 NK, T 또는 B 세포 마커를 발현하지 않는다.
- [0226] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포 또는 적절한 대조군 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 비정상적인 NK, T 또는 B 세포 마커를 발현하지 않는다.
- [0227] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포 또는 적절한 대조군 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 줄기와 같은 표현형을 갖는다.
- [0228] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포 또는 적절한 대조군 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 CCR7, CD62L 및 TCF7을 발현한다.
- [0229] 또 다른 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포 또는 적절한 대조군 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 CCR7, CD62L 및 TCF7을 발현하고; 적절한 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 사멸 능력을 갖는다. 사멸 능력은 본원의 실시예에 기재된 것과 같은 당분야에 알려진 검정을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0230] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하며, T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않는다.
- [0231] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않는다.
- [0232] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령(또는 적절한 대조군 T 세포)보다 적어도 5%,

6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 산화적 인산화, 지방산 대사, 해당작용 및 저산소증 유전자 세트가 농축된다.

- [0233] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령(또는 적절한 대조군 T 세포)보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 또는 이러한 T 세포 집단을 제공하고, T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 대조군 T 세포와 비교하여 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두가 농축된다.
- [0234] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 적절한 대조군 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포를 제공하고, T 세포는 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 TCR 레퍼토리 다양성을 갖는다.
- [0235] 다양한 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고 T 세포는 T 세포 수용체 유전자의 V, D, 및 J 절편의 불완전 세트를 포함한다.
- [0236] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고; T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않으며; T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 산화적 인산화, 지방산 대사, 해당작용 및 저산소증 유전자 세트가 농축된다.
- [0237] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고; T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않으며; T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 대조군 T 세포와 비교하여 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두가 농축된다.
- [0238] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고; T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않으며; T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 대조군 T 세포와 비교하여 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두가 농축되고; T 세포는 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 TCR 레퍼토리 다양성을 갖는다.
- [0239] 특정 구현예에서, 본 개시는 후생유전학적 연령이 공급원 T 세포의 연대순 연령보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊은 T 세포 집단을 제공하고; T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않으며; T 세포는 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 대조군 T 세포와 비교하여 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두가 농축되고; T 세포는 대조군 T 세포와 비교하여 증가된 TCR 레퍼토리 다양성을 갖고; T 세포는 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함한다.
- [0240] 당업자에게 인식될 바와 같이, T 세포 수용체 V, D 및 J 유전자 절편은 T 세포 발생 동안 재배열되어 완전한 가변 도메인 엑손을 형성한다. 이러한 유전자 재배열은 가슴샘에서 발생한다. 본원에서 제조된 재생 T 세포는 재배열된 TCR 유전자좌를 갖고 TCR을 발현하는 단리된 T 세포로부터 제조된다. 따라서, 특정 구현예에서, 본원에서 제조된 재생 T 세포는 단리된 공급원 T 세포보다 후생유전학적으로 더 젊지만 이들을 단리된 T 세포와 구별하는 기능성 TCR(즉, T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트)을 갖는다.
- [0241] 특정 구현예에서, 재생 T 세포의 대사 상태는 개선된다(예를 들어, Cell Metabolism 14, 264-271 참고). 특정 구현예에서, 적절한 대조군과 비교하여 본원에 기재된 재생 T 세포에서 산화적 인산화, 지방산 대사, 해당작용 및 저산소증에 상응하는 대사 유전자 세트가 농축된다(예를 들어, Nishimura 2019 Int. J. Mol. Sci. 20:2254 참고). 특정 구현예에서, 본원에 기재된 재생 T 세포는 상향조절된 해당작용 효소 및 하향조절된 전자 수송 사슬 서브유닛을 갖는다. 특정 구현예에서, 본원의 재생 T 세포는 하기 특성: 체세포 산화 대사를 해당작용 플럭스-의존적 미토콘드리아 비의존적 상태로 전환시키는 대사 스위치; p16INK4a, p21CIP1, Atf3 및 Gadd45B를 포함하는 p53 종양 억제인자 경로에서 연령 관련 스트레스 반응 유전자의 하향조절된 발현; 노쇠 연관 메탈로프로테아제 MMP13 및 인터유킨-6의 하향조절; 감소된 노쇠 연관 β-갈락토시다제 활성; 감소된 미토콘드리아 반응성

산소중(ROS)의 생산; H3K9me3 및 H4K20me3(뭉친 염색질의 유지에 관련된 후생유전학적 변형)의 수준 회복(예를 들어, Ocampo, Cell. 2016, 167(7): 1719-1733; Benayoun BA, Nat Rev Mol Cell Biol. 2015; 16:593-610; Liu B, Nat Commun. 2013, 4:1868; Database, Volume 2016, baw100; doi.org/10.1093/database/baw100 참고) 중 하나 이상을 실증한다.

[0242] 특정 구현예에서, 본원의 재생 T 세포는 비재생 대조군 T 세포와 비교하여 줄기성 유전자 특징부가 농축된다(예를 들어, Gattinoni 등, 2011 Nature Medicine 17(10):1290-1297 참고).

[0243] **II. 치료 방법**

[0244] 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 본원에 개시된 부분적 재프로그래밍 및 재활성화 방법에 의해 제조된 재생 T 세포 집단으로 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 재생 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계에 의해 암을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 (a) T 세포를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 임의로 SV40과 T 세포 유래 부착성 세포 콜로니를 형성하기 충분한 시간 동안 일시적으로 접촉시키는 단계; 및 (c) 상기 T 세포 유래 부착성 세포를 항-CD3, 항-CD28, 및/또는 IL-2와 같은 하나 이상의 사이토카인과 같은 T 세포 활성화제 및/또는 공동자극제를 포함하는 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 T 세포 집단으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, T 세포는 표적 세포의 표면 상의 특정 항원 모이어티를 인식하는 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작된다. 본 개시의 다양한 구현예에서, 표적 세포는 암 세포이다.

[0245] 특정 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 본원에 기재된 바와 같은 재생 T 세포 집단으로 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0246] 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 본원에 개시된 방법에 의해 제조된 재생 면역 세포(예를 들어, T 세포) 집단으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 암, 감염성 질환 또는 자가면역 질환을 포함하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 치료를 필요로 하는 환자를 (a) 복수의 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 공급원으로부터 단리하는 단계; (b) 상기 복수의 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 일시적으로 접촉시키는 단계; 및 (c) 상기 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 IL-2를 포함하는 배양 배지와 접촉시키는 단계로서, 상기 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 적어도 약 4일의 기간 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 면역 세포(예를 들어, T 세포) 집단으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 복수의 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 표적 세포의 표면 상의 특정 항원을 인식하는 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작된다. 본 개시의 다양한 구현예에서, 표적 세포는 암 세포이다.

[0247] 다양한 구현예에서, 본 개시는 본원의 방법에 의해 제조된 복수의 재생 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 (a) 복수의 T 세포를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 부분적으로 재프로그래밍 세포가 배양 용기 표면에 부착하기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 부착된 재프로그래밍 T 세포를 T 세포 활성화제를 포함하는 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 재생 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 추가적 활성화제를 추가로 포함한다.

[0248] 일부 측면에서, 본 개시는 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 재생 T 세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 추가적 활성화제를 추가로 포함한다.

[0249] 재생 T 세포에 대한 표적 용량은 약 1×10^6 내지 약 2×10^{10} 개 세포/kg, 바람직하게는 2×10^6 개 세포/kg의 범위일 수 있음이 이해될 것이다. 이 범위 초과 및 미만의 용량이 특정 대상체에게 적절할 수 있으며 적절한 용량 수준은 필요에 따라 의료 제공자에 의해 결정될 수 있음이 이해될 것이다. 다양한 구현예에서 표적 용량은 1×10^5 이다. 다양한 구현예에서 표적 용량은 1×10^6 이다. 다양한 구현예에서 표적 투여량은 1×10^7 이다. 다양한 구현예에서 표적 투여량은 1×10^8 이다. 다양한 구현예에서 표적 용량은 1×10^9 이다. 다양한 구현예에서 표적 용량은 1×10^{10} 이다. 다양한 구현예에서 표적 용량은 2×10^{10} 이다. 추가로, 본 개시에 따라 다중 용량의 세포가 제공될 수 있다. 다양한 구현예에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 용량의 세포가 투여를 필요로 하는 환자에 투여된다.

[0250] 또한 대상체에 본 개시의 재생 T 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 종양 크기를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 대상체는 고형 종양, 또는 림프종 또는 백혈병과 같은 혈액 악성종양을 갖는다. 일

부 구현예에서, 재생 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 종양층으로 전달된다. 일부 구현예에서, 암은 대상체의 골수에 존재한다.

[0251] 본원에 사용된 용어 "대상" 또는 "환자"는 개체를 의미한다. 일부 측면에서, 대상체는 인간과 같은 포유동물이다. 일부 측면에서, 대상체는 비인간 영장류일 수 있다. 비인간 영장류는 마모셋, 원숭이, 침팬지, 고릴라, 오랑우탄, 긴팔원숭이 등을 포함한다. 용어 "대상체"는 또한 고양이, 개 등과 같은 길들인 동물, 가축(예를 들어, 라마, 말, 소), 야생 동물(예를 들어, 사슴, 엘크, 무스 등), 실험실 동물(예를 들어, 마우스, 토끼, 쥐, 게르빌투스쥐, 기니피그 등) 및 조류 종(예를 들어, 닭, 칠면조, 오리 등)을 포함한다. 바람직하게는 대상체는 인간 대상체이다. 보다 바람직하게는 대상체는 인간 환자이다.

[0252] 방법은 하나 이상의 화학치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 화학치료제는 림프구고갈(사전컨디셔닝) 화학치료제이다. 상관관계가 있는 유익한 바이오마커와 함께 유익한 사전컨디셔닝 치료 요법이 미국 특허 가출원 62/262,143 및 62/167,750에 기재되어 있다. 이들은 예를 들어, 환자에 특정된 유익한 용량의 사이클로포스파미드(200 mg/m²/일 내지 2000 mg/m²/일) 및 특정된 용량의 플루다라빈(20 mg/m²/일 내지 900 mg/m²/일)을 투여하는 단계를 포함하는, T 세포 치료법을 필요로 하는 환자를 컨디셔닝하는 방법을 기재한다. 바람직한 용량 요법은 환자에 치료 유효량의 재생 T 세포를 투여하기 전에 3일 동안 매일 환자에 약 500 mg/m²/일의 사이클로포스파미드 및 약 60 mg/m²/일의 플루다라빈을 투여하는 단계를 포함하는 환자의 치료가 관여된다.

[0253] 다른 구현예에서, 재생 T 세포 및 화학치료제는 각각 대상체에서 질환 또는 병태를 치료하는 데 효과적인 양으로 투여된다.

[0254] 특정 구현예에서, 본원에 개시된 재생 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 포함하는 조성물은 임의의 수의 화학치료제와 함께 투여될 수 있다. 화학치료제의 예는 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXANTM)와 같은 알킬화제; 부설판, 임프로설판 및 피포설판과 같은 알킬 설포네이트; 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리에틸렌올로멜라민 재개를 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴과 같은 니트로소우레아; 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 탁티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 퀘-라마이신, 로도루비신, 스트랩토니그린, 스트랩토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신과 같은 항생제; 메토티렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항대사물질; 데놉테린, 메토티렉세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU와 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스타판과 같은 항부신제; 프롤린산 등의 엽산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리ethyl아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀(Taxol®, Bristol-Myers Squibb) 및 독세탁셀(Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer); 클로람부실; 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 시스플라틴 및 카보플라틴과 같은 백금 유사체; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS2000; 디플루오로메틸로미틴(DMF0); TargretinTM(백사로텐), PanretinTM(알리트레티노인)과 같은 레티노산 유도체; OntakTM(데니류킨 디프티톡스); 에스페라미신; 카페시타빈; 및 임의의 상기의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한 이 정의는 예를 들어 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케

옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)을 포함하는 항에스트로겐; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비갈루타미드, 류프로라이드 및 고세렐린과 같은 항안드로겐과 같은 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항호르몬제; 및 임의의 상기의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 적절한 경우 CHOP, 즉 사이클로포스파미드(Cytosan®) 독소루비신(하이드록시독소루비신), 플루다라빈, 빈크리스틴(Oncovin®) 및 프레드니손을 포함하지만 이에 제한되지 않는 화학치료제의 조합이 또한 투여된다.

[0255] 일부 구현예에서, 화학치료제는 조작된 세포 또는 핵산의 투여와 동시에 또는 1주 내에 투여된다. 다른 구현예에서, 화학치료제는 조작된 세포 또는 핵산 투여 1주 내지 4주 또는 1주 내지 1개월, 1주 내지 2개월, 1주 내지 3개월, 1주 내지 6개월, 1주 내지 9개월, 또는 1주 내지 12개월 후에 투여된다. 다른 구현예에서, 화학치료제는 세포 또는 핵산의 투여 적어도 1개월 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 방법은 2개 이상의 화학치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0256] 다양한 추가적 치료제가 본원에 기재된 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 잠재적으로 유용한 추가적 치료제는 니볼루맵(Opdivo®), 켈브롤리주맵(Keytruda®), 켈브롤리주맵, 피딜리주맵 및 아테졸리주맵(Tecentriq®)과 같은 PD-1(또는 PD-L1) 억제제를 포함한다.

[0257] 본 개시과 조합하여 사용하기 적합한 추가적 치료제는 이브루티닙(Imbruvica®), 오파투무맵(Arzerra®), 리툽시맵(Rituxan®), 베바시주맵(Avastin®), 트라스투주맵(Herceptin®), 트라스투주맵 엠탄신(KADCYLA®), 이마티닙(Gleevec®), 세톡시맵(Erbix®), 파니투무맵(Vectibix®), 카투막소맵, 이브리투모맵, 오파투무맵, 토시투모맵, 브렌톡시맵, 알렘투주맵, 쟈투주맵, 예를로티닙, 게피티닙, 반데타닙, 아파티닙, 라파티닙, 네라티닙, 악시티닙, 마시티닙, 파조파닙, 수니티닙, 소라페닙, 토세라닙, 레스타우르티닙, 악시티닙, 세디라닙, 렌마티닙, 닌테다닙, 파조파닙, 레고라페닙, 세막사닙, 소라페닙, 수니티닙, 티보자닙, 토세라닙, 반데타닙, 엔트렉티닙, 카보잔티닙, 이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 라도티닙, 보수티닙, 레스타우르티닙, 록솔리티닙, 파크리티닙, 코비메티닙, 세포루메티닙, 트라메티닙, 비니메티닙, 알렉티닙, 세리티닙, 크리조티닙, 애플리베르셉트, 아디포티드, 데니류킨 디프티톡스, 에버롤리무스 및 템시롤리무스와 같은 mTOR 억제제, 소니데길 및 비스모데길과 같은 헤지호그 억제제, CDK 억제제(팔보시클립)와 같은 CDK 억제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0258] 추가 구현예에서, 재생 T 세포를 포함하는 조성물은 항염증제와 함께 투여될 수 있다. 항염증제 또는 약물은 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부데소니드, 텍사메타손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론 포함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센을 포함하는 비스테로이드성 항염증 약물(NSAIDs), 메토티렉세이트, 설파살라진, 레플루노미드, 항-TNF 약제, 사이클로포스파미드 및 미코페놀레이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 억제제 및 시알레이트를 포함한다. 예시적인 진통제는 아세트아미노펜, 옥시코돈, 프로포락시펜 하이드로클로라이드의 트라마돌을 포함한다. 예시적인 글루코코르티코이드는 코르티손, 텍사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론 또는 프레드니손을 포함한다. 예시적인 생물학적 반응 변형체는 세포 표면 마커(예를 들어, CD4, CD5 등)에 대해 유도된 분자, TNF 길항제와 같은 사이토카인 억제제(예를 들어, 에타네르셉트(ENBREL®), 아달리우맵(HUMIRA®) 및 인플릭시맵(REMICADE®), 케모카인 억제제 및 부착 분자 억제제를 포함한다. 생물학적 반응 변형체는 모노클로날 항체뿐만 아니라 재조합 형태를 포함한다. 예시적인 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 메토티렉세이트, 페니실라민, 레플루노미드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 금(경구(아우라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0259] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 조성물은 사이토카인과 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 천연 공급원으로부터의 또는 재조합 세포 배양으로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 동등물을 포함할 수 있다.

[0260] **III. 제형물 및 약학 조제물**

[0261] 본 개시에 따른 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 벡터, 항원 결합 분자, 면역 세포(예를 들어, T 세포), 조성물 등을 제조하기 위해 다양한 알려진 기술이 활용될 수 있다.

[0262] 단리된 T 세포는 알려진 방법을 사용하여 단리 후 유전적으로 변형될 수 있거나, T 세포는 유전적으로 변형되기 전에 시험관내에서 부분적으로 재프로그래밍, 활성화 및 증식될 수 있다. 또 다른 구현예에서, T 세포는 재조합 TCR 또는 CAR로 유전적으로 변형된 후 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 및 재활성화 방법을 사용하여 재생된

다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 재생 세포는 시험관내에서 추가로 활성화 및/또는 증식된다. 면역 세포(예를 들어, T 세포)를 활성화 및 증식시키는 방법은 당분야에 알려져 있고, 예를 들어 미국 특허 6,905,874; 6,867,041; 6,797,514; 및 WO2012/079000에 기재되어 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 T 세포를 자극제(예를 들어, 활성화제)(특정 구현예에서 T 세포 활성화 화합물로 지칭됨)(예를 들어, CD3/TCR 복합체를 자극하는 제제(예를 들어, 항-CD3 항체 또는 CD3 작용제) 및 공동자극제(CD28, ICOS, CD27, HVEM, LIGHT, CD40, 4-1BB, OX40, DR3, GITR, CD30, TIM1, CD2, CD226 또는 이의 임의의 조합을 자극하는 항체 또는 리간드와 같은 제제)와 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 자극제 및 공동자극제는 IL-2와 같은 적절한 사이토카인을 포함하는 배양 배지 중 비드 또는 다른 표면에 부착된다.

[0263] 다른 구현예에서, 재생 T 세포는 미국 특허 6,040,177; 5,827,642; 및 WO/2012129514에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 영양공급 세포 및 적절한 항체 및 사이토카인으로 증식하도록 활성화되고 자극될 수 있다.

[0264] 본 개시의 작제물 및 조작된 T 세포를 제조하기 위한 특정 방법은 PCT 출원 PCT/US2015/14520에 기재되어 있다.

[0265] 특정 구현예에서, 본 개시는 본원에 기재된 재생 T 세포를 보관하는 방법을 제공한다. 이는 T 세포가 해동 시 생존력으로 유지되도록 T 세포를 동결보존하는 단계가 관여된다. T 세포 분획은 악성종양에 걸린 환자의 향후 치료를 위한 이러한 세포의 영구 공급원을 제공하기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 동결보존될 수 있다. 필요한 경우 동결보존된 T 세포는 더 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 증식될 수 있다.

[0266] 본원에 사용된 바와 같이 "동결보존한다"는 (전형적으로) 77 켈빈 또는 196°C(액체 질소의 끓는점)와 같은 영하의 온도로 냉각함으로써 세포를 보존함을 지칭한다. 동결보호제는 저온에서의 동결 또는 실온으로의 가온으로 인해 세포가 손상되는 것을 방지하기 위해 종종 영하의 온도에서 사용된다. 동결보존제 및 최적 냉각 속도는 세포 손상을 보호할 수 있다. 본 개시에 따라 사용될 수 있는 동결보호제는 디메틸 설펝시드(DMSO)(Lovelock & Bishop, Nature, 1959, 183, 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961, 190, 1204-1205), 글리세롤, 폴리비닐 피롤리딘(Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 85, 576) 및 폴리에틸렌 글리콜(Sloviter & Ravdin, Nature, 1962, 196, 48)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직한 냉각 속도는 1°C~3°C/분이다.

[0267] 용어 "실질적으로 순수한"은 주어진 성분이 높은 수준으로 존재함을 시사하기 위해 사용된다. 성분은 바람직하게는 조성물에 존재하는 주요 성분이다. 바람직하게는 30% 초과, 50% 초과, 75% 초과, 90% 초과 또는 심지어 95% 초과 수준으로 존재하며, 상기 수준은 고려 하의 총 조성물에 대해 건조 중량/건조 중량 기준으로 결정된다. 매우 높은 수준(예를 들어, 90% 초과, 95% 초과 또는 99% 초과)에서 성분은 "순수한 형태"인 것으로 간주될 수 있다. 본 개시의 생물학적 활성 물질(폴리펩티드, 핵산 분자, 항원 결합 분자, 모이어티 포함)은 물질에 달리 연관될 수 있는 하나 이상의 오염물질이 실질적으로 없는 형태로 제공될 수 있다. 조성물에 주어진 오염물질이 실질적으로 없는 경우, 오염물질은 낮은 수준(예를 들어, 위에 제시된 건조 중량/건조 중량 기준으로 10% 미만, 5% 미만 또는 1% 미만 수준)일 것이다.

[0268] 일부 구현예에서, 본원의 세포는 먼저 이의 배양 배지로부터 세포를 수확한 다음, 치료 유효량으로 투여하기 적합한 배지 및 용기 시스템("약학적으로 허용 가능한" 담체)에서 세포를 세척하고 농축하여 제형화된다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장 매질 제형물일 수 있으며, 전형적으로 일반 식염수, Normosol™ R(Abbott) 또는 Plasma-Lyte™ A(Baxter)이지만, 수중 5% 텍스트로스 또는 링거 락테이트도 활용할 수 있다. 주입 매질은 인간 혈청 알부민으로 보충될 수 있다.

[0269] 조성물에서 세포의 요망되는 치료 양은 일반적으로 적어도 2개 세포이거나 보다 전형적으로 102개 세포 초과이고, 최대 106개, 최대 108개 또는 109개 세포이고, 1010개 초과 세포일 수 있다. 세포의 수는 조성물이 의도되는 원하는 용도 및 그 안에 포함된 세포의 유형에 의존할 것이다. 원하는 세포의 밀도는 전형적으로 106개 세포/ml 초과이고 일반적으로 107개 세포/ml 초과, 일반적으로 108개 세포/ml 초과이다. 임상적으로 관련된 수의 면역 세포(예를 들어, T 세포)는 누적해서 105, 106, 107, 108, 109, 1010, 1011 또는 1012개 세포와 같거나 이를 초과하는 다회 주입으로 할당될 수 있다. 본 개시의 일부 측면에서, 특히 모든 주입된 세포가 특정 표적 항원으로 채유될 것이기 때문에, 106/킬로그램(환자당 106~1011) 범위의 더 적은 수의 세포가 투여될 수 있다. 재생 T 세포 치료는 이러한 범위 내의 용량으로 다회 투여될 수 있다. 세포는 치료법을 받는 환자에게 자가, 동종이계 또는 이종일 수 있다.

[0270] 본 개시의 재생 T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 IL-2 또는 다른 사이토카인 또는 세포 집단과 같은 다른 성분과 조합된 약학 조성물로 투여될 수 있다. 본 개시의 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 본원에 기재된 바와 같은 재생 T 세포 집단을 포함할

수 있다. 이러한 조성물은 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등과 같은 완충액; 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 항산화제; EDTA 또는 글루타치온과 같은 킬레이트제; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 개시의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형화된다. 치료는 또한 텍사메타손 및/또는 메틸프레드니솔론과 같은 하나 이상의 코르티코스테로이드 치료를 포함할 수 있다.

[0271] 본 출원의 조성물은 개시된 성분을 포함하거나, 이로 본질적으로 구성되거나, 이로 구성될 수 있다.

[0272] 본 개시의 약학 조성물(용액, 현탁액 등)은 하기: 무균 희석제, 예를 들어 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리 식염수, 링거 용액, 등장성 염화나트륨, 용매 또는 현탁 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드와 같은 신전유; 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매와 같은 무균 희석제; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 향균제; 아스코르브산 또는 중황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌-디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트와 같은 완충제 및 염화나트륨 또는 텍스트로스과 같은 긴장성 조정제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 비경구 조제물은 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다회 용량 바이알에 봉입될 수 있다. 주사 가능 약학 조성물은 바람직하게는 무균이다.

[0273] 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 자살 유전자를 형질도입하여 유해 사례가 최소화될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 적합한 "사멸 스위치"는 예를 들어 WO2021/189008에 기재되어 있다. 또한 유도성 "온" 또는 "가속화제" 스위치를 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 포함시키는 것이 요망될 수 있다. 이들 기술은 이량체화 도메인 및 이러한 도메인 이량체화의 선택적 활성화제의 사용을 이용할 수 있다. 이러한 기술은 예를 들어 특정 세포에서 FKBP/라파로그 이량체화 시스템을 활용하는 문헌(Wu 등, Science 2014, 350(6258))에 기재된 것들을 포함한다. 추가적 이량체화 기술은 예를 들어 문헌(Fegan 등 Chem. Rev. 2010, 110, 3315-3336 뿐만 아니라 미국 특허 번호 5,830,462; 5,834,266; 5,869,337; 및 6,165,787)에 기재되어 있다. 추가적 이량체화 쌍은 사이클로스포린-A/사이클로필린, 수용체, 에스트로젠/에스트로젠 수용체(임의로 타목시펜 사용), 글루코코르티코이드/글루코코르티코이드 수용체, 테트라사이클린/테트라사이클린 수용체, 비타민 D/비타민 D 수용체를 포함할 수 있다. 이량체화 기술의 추가 예는 예를 들어 WO 2014/127261, WO 2015/090229, US 2014/0286987, US 2015/0266973, US 2016/0046700, 미국 특허 번호 8,486,693, US 2014/0171649, 및 US 2012/0130076에서 확인될 수 있다.

[0274] 본원의 재생 세포의 유전적 변형에 적합한 기술은 세포가 유전적으로 변형되어 CAR 또는 다른 조작된 TCR을 발현하기 전, 후 또는 동시에 유도성 카스파제-9(미국 출원 공개 번호 2011/0286980) 또는 티미딘 키나제의 사용을 포함한다. 자살 유전자 및/또는 "온" 스위치를 도입하는 추가적 방법은 CRISPR, TALENS, MEGATALEN, 징크 핑거, RNAi, siRNA, shRNA, 안티센스 기술 및 당분야에 알려진 다른 기술을 포함한다.

[0275] **IV. 키트**

[0276] 또한 시험관내 하나 이상의 T 세포와 접촉하기 위한 적어도 하나의 재프로그래밍 인자를 포함하는 키트, 예를 들어 약학 키트가 본 개시의 범위 내에 포함된다. 키트는 전형적으로 키트 내용물의 의도된 용도 및 사용 지침을 표시하는 표지를 포함한다. 용어 "표지"는 키트 상에 또는 이와 함께 제공되거나 달리 키트에 동반되는 임의의 서면 또는 녹음 자료를 포함한다.

[0277] 다양하게, 본 개시는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 임의로 SV40을 포함하는, T 세포 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포를 제조하기 위한 키트를 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자를 발현할 수 있는 적어도 하나의 발현 벡터를 포함하는, T 세포 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포를 제조하기 위한 키트를 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 개시는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자를 발현할 수 있는 적어도 하나의 센다이 바이러스 벡터를 포함하는, T 세포 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포를 제조하기 위한 키트를 제공한다. 다양한 구현예에서, 키트는 SV40을 발현할 수 있는 센다이 바이러스 벡터를 추가로 포함한다.

[0278] 다양한 구현예에서, 본 개시는 다음을 포함하는, 벡터 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포 벡터를 제조하기 위한 키트를 제공한다:

[0279] KLF4, OCT3/4 및 SOX2를 암호화하는 발현 벡터;

- [0280] KLF4를 암호화하는 발현 벡터;
- [0281] C-MYC을 암호화하는 발현 벡터; 및
- [0282] SV40을 암호화하는 발현 벡터.
- [0283] 다양한 구현예에서, 본 개시는 다음을 포함하는, 벡터 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포 벡터를 제조하기 위한 키트를 제공한다:
- [0284] KLF4, OCT3/4 및 SOX2를 암호화하는 센다이 바이러스;
- [0285] KLF4를 암호화하는 센다이 바이러스;
- [0286] C-MYC을 암호화하는 센다이 바이러스; 및
- [0287] SV40을 암호화하는 센다이 바이러스.
- [0288] 다양한 구현예에서, 본 개시는 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC 및 임의로 SV40을 암호화하는 멀티시스트론 센다이 바이러스 벡터를 포함하는, 벡터 제조를 필요로 하는 대상체에 대한 T 세포 치료법을 위해 하나 이상의 T 세포 벡터를 제조하기 위한 키트를 제공한다.
- [0289] 다양한 구현예에서, 키트는 T-세포 활성화 화합물 또는 제제를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서 T 세포 활성화 화합물 또는 제제는 항-CD3 항체이다. 다양한 구현예에서 키트는 항-CD28 항체와 같은 공동자극제를 포함한다. 다양한 구현예에서, 키트는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 둘 모두를 포함한다. 다양한 구현예에서, 키트는 T 세포를 배양 및/또는 부분적으로 재프로그래밍하기 위한 하나 이상의 적절한 배양 배지를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 키트는 하나 이상의 사이토카인을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 사이토카인은 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-12를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0290] **V. 추가 구현예**
- [0291] 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 다양한 구현예를 정의하는 다음 조항 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다.
- [0292] 제1 구현예에서, 본 발명은 [1]에 관한 것이다:
- [0293] [1] 하나 이상의 재생 T 세포를 제조하는 시험관내 방법은 (a) T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (b) T 세포 유래 부착성 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0294] 제2 구현예에서, 본 발명은 [2]에 관한 것이다:
- [0295] [2] (a) 배양 용기 내 제1 배양 배지 내의 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 SV40과, T 세포가 배양 용기 표면에 부착된 적어도 하나의 콜로니를 형성하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (b) 적어도 하나의 부착된 콜로니를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 시험관내 방법.
- [0296] 제3 구현예에서, 본 발명은 [3]에 관한 것이다:
- [0297] [3] (a) 제1 배양 배지 중 T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 SV40과 적어도 약 5일 및 약 10일 이하의 기간 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (b) T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 시험관내 방법.
- [0298] 제4 구현예에서, 본 발명은 [4]에 관한 것이다:
- [0299] [4] (a) T 세포 집단을 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자 및 SV40과, T 세포가 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 세포 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 및 (b) T 세포를 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 시험관내 방법.

- [0300] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0301] [5] [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 T 세포의 적어도 일부가 CD3 및 인테그린 $\alpha 6\beta 1$, SSEA4, CD9 및 CD90, 바람직하게는 SSEA4 및 CD3, 보다 바람직하게는 CD3, CD9 및 CD90, 더욱 더 바람직하게는 CD3, SSEA4, CD9 및 CD90으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하기 충분한 시기 동안 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉되는, 방법.
- [0302] [6] [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포를 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉시키기 전에, T 세포가 IL-2 및/또는 상기 T 세포를 활성화할 수 있는 적어도 하나의 제제와 접촉되고, 바람직하게는 상기 T 세포를 활성화할 수 있는 제제는 종양 항원인, 방법.
- [0303] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 TCR $\alpha + TCR\beta +$ 세포; TCRg(감마)+TCRd(델타) 세포; CD4+CD8 $\alpha \beta +$ 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(예컨대 Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포이거나, T 세포가 자가 종양 세포와의 공동 배양 후 활성화 마커를 발현하고, 활성화 마커는 4-1BB(CD137), PD1, LAG3, CD45, CD39, TIGIT, TIM3, CD69, OX40, CD28, CD25, CD49d 및 CTLA4인, 방법.
- [0304] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포가 포유동물, 바람직하게는 인간으로부터 단리되는, 방법.
- [0305] [9] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 접촉되는, 방법.
- [0306] [10] [1] 내지 [9] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 바람직하게는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 적어도 약 4 내지 10일, 바람직하게는 적어도 약 4 내지 7일, 보다 바람직하게는 약 5 일 동안 접촉되는, 방법.
- [0307] [11] [1] 내지 [10] 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 T 세포에서 발현되고, 바람직하게는 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 비통합 바이러스 벡터 또는 나노입자로 세포에 전달되는 핵산을 사용하여 발현되고, 보다 바람직하게는 벡터가 센다이 바이러스이고, 더욱 더 바람직하게는 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC인, 방법.
- [0308] [11a] [1] 내지 [11] 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 T 세포에서 a) T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 발현되고, 상기 단리된 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않거나; b) 약 4일 내지 약 10일; c) 약 4일 내지 약 11일; d) 약 4일 내지 약 12일; e) 약 4일 내지 약 13일; 또는 f) 약 4일 내지 약 14일 동안 발현되는, 방법.
- [0309] [12] [1] 내지 [11a] 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 재프로그래밍 인자가 구성적으로 발현되고, 발현은 나중에 T 세포 활성화제 또는 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현을 억제하는 화합물의 첨가에 의해 억제되고, 바람직하게는 상기 화합물은 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현을 특이적으로 억제하는 소분자 억제제이고, 더욱 바람직하게는 상기 화합물은 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 발현을 특이적으로 억제하는 siRNA 또는 shRNA 분자, 더욱 더 바람직하게는 적어도 하나의 재프로그래밍 인자는 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC인, 방법.
- [0310] [13] [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 있어서, T 세포를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-12로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0311] [14] [1] 내지 [13] 중 어느 하나에 있어서, 상기 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물이 CD3에 결합하는 항체 또는 CD28에 결합하는 항체 또는 둘 모두를 포함하고; 및/또는 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물이 종양 항원인, 방법.
- [0312] [15] [1] 내지 [14] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 세포 표면 수용체를 발현하도록 조작하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 T 세포는 상기 T 세포를 상기 적어도 하나의 재프로그래밍과 접촉시키기 전 또는 후에 조작되고, 바람직하게는 상기 세포 표면 수용체는 키메라 항원 수용체 또는 T 세포 수용체 또는 이들의 하이브리드 수용체이고, 더 바람직하게는 상기 세포 표면 수용체는 표적 세포 표면 상의 특정 항원 모이어티를 인식하는, 방법.
- [0313] [16] [15]에 있어서, 항원 모이어티가 MHC 클래스 I 의존적이거나 MHC 클래스 I 비의존적인, 방법.
- [0314] [17] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서, 생성된 T 세포가 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전

세트를 포함하고/하거나 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 측정하는 단계를 추가로 포함하고, 바람직하게는 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령은 재프로그래밍 전 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 짧은, 방법. [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서, 생성된 T 세포가 T 세포 수용체 유전자의 V, D 및 J 절편의 불완전 세트를 포함하고/하거나 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령을 측정하는 단계를 추가로 포함하고, 바람직하게는 생성된 T 세포의 후생유전학적 연령은 재프로그래밍 전 T 세포 집단보다 적어도 5% 더 짧고, T 세포는 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4를 발현하지 않는, 방법.

[0315] [18] [1] 내지 [17] 중 어느 하나에 있어서, 부분적 재프로그래밍 T 세포가 적어도 하나의 재프로그래밍 인자와 접촉하기 전 T 세포보다 적어도 25배 더 많이 증식할 수 있는, 방법.

[0316] [19] [1] 내지 [18] 중 어느 하나에 있어서, 상기 단리된 T 세포와 적어도 하나의 재프로그래밍 인자의 접촉이 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는 방법.

[0317] 추가 구현예에서, 본 발명은 [20]에 관한 것이다:

[0318] [20] T 세포를 IL-2를 포함하는 제1 배양 중 배양하고 상기 T 세포를 CD3 또는 CD28 또는 둘 모두에 특이적인 적어도 하나의 항체로 활성화하는 단계; 상기 활성화 T 세포를 KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC과 약 5일 내지 약 10일의 기간 동안 IL-2, 또는 CD3 또는 CD28에 특이적인 항체를 포함하지 않는 제2 배양 배지 중 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPSC 세포로 완전 재프로그래밍되지 않는, 단계; 상기 제2 배양 배지를 IL -2 및 CD3 및 /또는 CD28에 특이적인 적어도 하나의 항체를 포함하는 제3 배양 배지로 대체하는 단계로서, T 세포는 적어도 약 5일 동안 상기 제3 배양 배지 중 배양되는, 단계를 포함하는, T 세포를 제조하는 시험관내 방법.

[0319] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음 중 하나 이상에 관한 것이다:

[0320] [21] [20]에 있어서, T 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0321] [22] [20] 또는 [21]에 있어서, 상기 T 세포가 TCR α +TCR β + 세포; TCR γ (감마)+TCR δ (델타) 세포; CD4+CD8 $\alpha\beta$ + 이중 양성 세포, CD4+ 단일 양성 세포(Th1, Th2, Th17, Treg), 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포인, 방법.

[0322] [23] [20] 내지 [22] 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉시키는 단계가 활성화 T 세포와 SV40을 접촉시키는 것을 추가로 포함하는, 방법.

[0323] [24] [20] 내지 [23] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 자가 종양 세포와 공동 배양 후 활성화 마커를 발현하고, 활성화 마커는 4-1BB(CD137), PD1, LAG3, CD45, CD39, TIGIT, TIM3, CD69, OX40, CD28, CD25, CD49d 및 CTLA4인, 방법.

[0324] [25] [1] 내지 [24] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 종양으로부터 획득된 종양 침윤 림프구(TIL)인, 방법.

[0325] 추가 구현예에서, 본 발명은 [26]에 관한 것이다:

[0326] [26] 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령보다 적어도 5% 더 짧은, 바람직하게는 그 연대순 연령보다 적어도 25% 더 짧은, T 세포 집단.

[0327] 추가 구현예에서, 본 발명은 [27]에 관한 것이다:

[0328] [27] 세포의 적어도 70%가 CD3 및 SSEA4 둘 모두를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.

[0329] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:

[0330] [28] [27]에 있어서, 세포의 적어도 30%가 CD9를 발현하고/하거나 세포의 적어도 30%가 CD90을 발현하고, 바람직하게는 세포의 적어도 30%가 CD9 및 CD90 둘 모두를 발현하는, 집단.

[0331] [29] [1] 내지 [25]에 따른 방법 중 어느 하나에 의해 제조된 T 세포 집단.

[0332] [30] [26] 내지 [29] 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포와 KLF4, OCT3/4, SOX2, C-MYC 및 SV40으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 인자의 접촉이 CD3 및 CD8 발현 감소를 초래하는, T 세포 집단.

[0333] [31] [26] 내지 [30] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 TIL이고, TIL의 적어도 50%는 CCR7 및 CD62L 둘 모두를 발현하거나 TIL의 적어도 50%는 CCR7 및 TCF7 둘 모두를 발현하는, 집단.

[0334] [32] [26] 내지 [31] 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 재생 TIL인, 집단.

- [0335] [33] [26] 내지 [32] 중 어느 하나에 있어서, 치료법에서 사용하기 위한 T 세포 집단.
- [0336] [34] [26] 내지 [32] 중 어느 하나에 있어서, 암, 바이러스 병태 또는 자가면역 장애를 치료하는 방법에서 사용하기 위한 T 세포 집단.
- [0337] [35] [34]에 있어서, 암이 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암 또는 항문직장암, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 목암, 담낭암 또는 흉막암, 두경부암(예를 들어, 코암, 비강암 또는 중이암, 구강암), 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장관 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막암, 대망암 및 장간막암, 인두암, 전립샘암, 직장암, 신암(예를 들어, 신세포 암종(RCC)), 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상샘암, 요관암 또는 방광암인, 사용하기 위한 T 세포 집단.
- [0338] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0339] [37] T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과 접촉된 T 세포의 적어도 20%가 $\alpha 6\beta 1$ 인테그린을 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 접촉된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; 접촉된 T 세포의 적어도 20%를 $\alpha 6\beta 1$ 인테그린에 특이적으로 결합하는 결합 분자로 단리하는 단계; (b)의 단리된 세포를 T 세포 활성화제 및/또는 T 세포 공동자극제와 접촉시켜 재생 T 세포를 제조하는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법.
- [0340] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0341] [38] T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; $\alpha 6$ (CD49f) 또는 b1(CD29) 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 단리된 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 적어도 하나의 재생 T 세포를 제조하는 방법.
- [0342] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0343] [39] T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; $\alpha 6$ 인테그린, b1 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 재생 T 세포 집단.
- [0344] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0345] [40] 세포의 적어도 70%가 인테그린 $\alpha 6$ 또는 인테그린 $\beta 1$ 을 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단, 또는
- [0346] [41] 세포의 적어도 50%가 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 둘 모두를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.
- [0347] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0348] [42] 세포의 적어도 70%가 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 둘 모두를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.
- [0349] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:
- [0350] [43] 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령(또는 적절한 대조군 T 세포)보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 적어도 80% 더 젊고, 트랜스크립톰 분석에 의해 결정된 바와 같이 산화적 인산화, 지방산 대사, 해당작용 및 저산소증 유전자 세트가 농축된, T 세포.
- [0351] [44] 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령(또는 적절한 대조군 T 세포)보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 적어도 80% 더 젊고, 전사체 분석에 의해 결정된 바와 같이 대조군 T 세포와 비교하여 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두가 농축된, T 세포.
- [0352] [45] 후생유전학적 연령이 그 연대순 연령(또는 적절한 대조군 T 세포)보다 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%,

15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 또는 적어도 80% 더 짧고, 비정상적, NK, T 또는 B 세포 마커(예를 들어, NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4 또는 KIR2DS4)를 발현하지 않는 T 세포.

[0353] 추가 구현예에서, 본 발명은 다음에 관한 것이다:

[0354] [46] a) T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과 접촉된 T 세포의 적어도 20%가 α6β1 인테그린을 발현하기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 접촉된 T 세포는 iPS 세포로 형질전환되지 않는, 단계; b) 상기 접촉된 T 세포의 적어도 20%를 α6β1 인테그린에 특이적으로 결합하는 결합 분자로 단리하는 단계; c) (b)의 세포를 T 세포 활성화제 및/또는 T 세포 공동자극제와 접촉시켜 재생 T 세포를 제조하는 단계를 포함하고; [47] α6β1 인테그린에 특이적으로 결합하는 결합 분자는 라미닌-511, 라미닌-511E8, 항-CD29 항체 및 항-Cd49f 항체로부터 선택되는, 재생 T 세포를 제조하는 방법.

[0355] 추가 구현예에서, 본 개시는 다음에 관한 것이다:

[0356] [48] a) T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) 임의로 SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 일시적으로 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; b) α6(CD49f) 또는 b1(CD29) 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 c) 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 재생 T 세포를 제조하는 방법.

[0357] 추가 구현예에서, 본 개시는 다음에 관한 것이다:

[0358] [48] T 세포 집단을 (i) KLF4, OCT3/4, SOX2 및 C-MYC로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 재프로그래밍 인자, 및 (ii) SV40과, T 세포 유래 부착성 세포가 형성되기 충분한 시기 동안 접촉시키는 단계로서, 상기 T 세포는 iPS 또는 전능 세포로 형질전환되지 않는, 단계; b) α6 인테그린, b1 인테그린 또는 둘 모두를 발현하는 T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 단리하는 단계; 및 c) T 세포 유래 부착성 세포의 하위집단을 적어도 하나의 T 세포 활성화 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조된 재생 T 세포 집단.

[0359] [49] [46] 내지 [48] 중 어느 하나에 있어서, 하위집단에서 세포의 적어도 20%가 인테그린 α6 또는 인테그린 β1을 발현하거나; [50] 하위집단에서 세포의 적어도 50%가 인테그린 α6 또는 인테그린 β1을 발현하거나; [51] 하위집단에서 세포의 적어도 20%가 인테그린 α6 및 인테그린 β1 둘 모두를 발현하거나, [52] 하위집단에서 세포의 적어도 50%가 인테그린 α6 및 인테그린 β1 둘 모두를 발현하는, 재생 T 세포 집단.

[0360] [50] 세포의 적어도 70%가 인테그린 α6 또는 인테그린 β1을 발현하거나; [51] 세포의 적어도 50%가 인테그린 α6 및 인테그린 β1 둘 모두를 발현하거나; [52] 세포의 적어도 70%가 인테그린 α6 및 인테그린 β1 둘 모두를 발현하는, T 세포 유래 부착성 세포 집단.

[0361] [53] 치료를 필요로 하는 환자를 [1]~[52]의 구현예 중 어느 하나의 T 세포 집단으로 치료하는 방법.

[0362] **실시예**

[0363] 하기 실시예는 제한하려는 것이 아니라 본 발명에 대한 추가 정보 및 지원을 제공하기 위해 제시된다. 아래 실시예는 T 세포의 세포 재프로그래밍 조건(이 경우 4개의 야마나카 인자를 운반하는 센다이 바이러스를 사용함)으로의 일시적 노출이 높은 증식 능력을 갖고 항원 특이성을 유지하는 감소된 후생유전학적 연령을 갖는 부분적 재프로그래밍 T 세포를 생성함을 실증한다. 처리된 T 세포는 탈분화하기 시작하고, 줄기 세포에서 더 전형적으로 나타나는 마커(예를 들어, SSEA4)를 발현하며, 배양 용기 표면에 부착하여 상피 유형 콜로니를 형성한다. 동시에 처리된 세포는 T 세포 정체성을 상실하기 시작한다(CD3 및 CD8 발현 손실). 후속 활성화는 이러한 "T 세포 유래 부착성 세포"가 이의 T 세포 정체성을 회복하고 놀랍게 증가된 증식 가능성을 나타내도록 도울 수 있다(6 일 동안 250배).

[0364] **실시예 1: T 세포에 대한 부분적 재프로그래밍 조건**

[0365] 이 실험에서는 T 세포의 생물학적 특성을 재생시키고 개선하기 위한 재프로그래밍 조건을 조사하였다. 21세 남성의 PBMC로부터 MACS 자기 비드(Miltenyi Biotec)로 단리된 CD8 양성 T 세포(공여자 11360; AllCells, Alameda, CA에서 구입한 세포)를 60 IU/ml IL2가 포함된 T 세포 배양 배지(TCM) 중 3일 동안 가용성 CD3(Cat. No. 317325, BioLegend) 및 CD28로 자극하였다(TCM: OpTmizer 기본 배지(1000 mL 병); OpTmizer 세포 보충물(보충물 #02); 면역 세포 혈청 대체물(CTS SR); L-글루타민 200 mM(100x), GlutaMAX 200 mM(100x), IL-2(1

ug=2.1x10⁴ IU) **RS 50 ug/105 ul, (1 ug=4.5x10⁵ IU) **RS 25 ug/1125 ul). 이 실험에 기재된 모든 T 세포 배양 배지는 60 IU/ml의 IL2를 함유한다. 이 활성화 과정은 센다이 바이러스의 형질도입 효율을 증가시키기 위해 수행하였다. 센다이 바이러스(Cytotune iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트, ThermoFisher)는 3개의 벡터로 이루어졌다: 1) KLF4-OCT3/4-SOX2(KOS) 암호화, 2) KLF4 암호화; 3) C-MYC 암호화. 총체적으로 이들은 "야마나카 인자"로 알려져 있으며 도면에서 "4인자" 또는 "4F"로 도시한다. 또한 SV40을 암호화하는 센다이 바이러스 벡터를 사용하여 재프로그래밍 효율을 증가시켰다.

[0366] 활성화 CD8 T 세포를 4개의 그룹으로 나누었다. 그룹 #1은 T 세포가 전체 과정 동안 T 세포 배양 배지 중 배양된 대조군이다. 그룹 #2는 센다이 바이러스로 형질도입되지 않았으며 제1일부터 IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배지(SCM)(bFGF 포함 StemFit Basic02, Ajinomoto) 중 배양하였다. 그룹 #1 및 #2의 세포를 3개씩 96웰 플레이트의 웰당 50,000개의 세포를 시딩하였다. 그룹 #3은 EmGFP 센다이 바이러스(Cytotune EmGFP 센다이 형광 리포터, Thermo)의 23 다중 감염도(MOI) 및 SV40 센다이 바이러스의 5 MOI로 형질도입하였다. 그룹 #3 세포를 제조업체 프로토콜에 따라 3개씩 재조합 인간 라미닌511-E8 단편(iMatrix-511, Cat. No. T304, Takara)으로 코팅된 24웰 플레이트에 웰당 50,000개의 밀도로 플레이팅하였다. 그룹 #4는 10 MOI KOS 센다이 벡터, 10 MOI KLF4 벡터, 3 MOI cMyc 벡터 및 5 MOI SV40 벡터로 형질도입하였다. 세포를 제1일부터 IL2를 포함하지 않는 SCM 중 배양하고 4개씩 iMatrix-511로 코팅된 24-웰 플레이트에 웰당 80,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 전체 실험 설계에 대해서는 도 1 및 표 2를 참고한다.

표 2

표 2: T 세포 재생 실험 조건		
조건	센다이 바이러스 형질도입	제 1 일부터의 배양 배지
#1	아니오	60 IU/ml IL2를 포함하는 T 세포 배양 배지
#2	아니오	IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지
#3	23 MOI EmGFP, 5 MOI SV40	IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지
#4	10 MOI KOS, 10 MOI KLF4, 3 MOI cMyc, 5 MOI SV40	IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배양 배지

[0367]

[0368] 그룹 #4의 T 세포는 제3일 또는 제4일부터 콜로니 형성을 시작하였다. 도 2를 참고한다. 콜로니를 형성하는 코팅된 플레이트의 바닥에 부착된 세포는 정상적인 T 세포 배양에서는 나타나지 않는다. 다른 조건의 T 세포는 어떠한 콜로니 형성도 나타내지 않았고 배양 플레이트의 바닥에 부착하지 않았다. 도 3은 그룹 #4의 부착 세포(4개의 야마나카 인자를 발현함)를 그룹 #3의 T 세포(야마나카 인자를 발현하지 않음; 대신 GFP를 발현함)의 외관과 비교한다. 부착 세포는 콜로니 형성을 나타내었고 그룹 #3의 T 세포보다 컸다. 이는 T 세포 유래 부착성 세포가 T 세포 정체성을 상실하고 있음을 제시한다. 그룹 #4의 T 세포 유래 부착성 세포도 표준 활성화 T 세포보다 크다(도 3d). 도 3a~3f 패널은 하기와 같은 다양한 조건에서 배양된 T 세포를 나타낸다: 3a, 3c, 3e: 그룹 #4의 부착된 콜로니; 3b: 그룹 #3의 세포; 3d: 표준 T 세포 활성화 조건 하에서 배양한 T 세포; 3f: 표준 iPS 세포 콜로니. 도 3에서 자명한 바와 같이, 부분적으로 재프로그래밍 세포는 구별되는 형태를 나타낸다. 더욱이, 유세포측정 분석은 그룹 #2, #3 및 #4 세포에서 감소된 CD3 마커 발현을 나타내었고 이들 모두는 제1일부터 IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배지 중에 있었다. 예를 들어, 도 4를 참고한다. CD3는 림프구 사이에서 T 세포 정체성의 중요한 마커이다. 감소는 그룹 #4의 T 세포 유래 부착성 세포에서 두드러졌다. 이것은 또한 그룹 #4의 부착 세포가 T 세포 정체성을 상실하고 있음을 제시한다. 특히 이것은 야마나카 인자의 일시적인 발현이 세포 운명을 방해하지 않지만 여전히 노화를 역전시키고 특정 세포 유형의 유효성을 향상시킬 수 있음을 나타낸 다른 그룹의 작업에서 벗어난다. 예를 들어, 문헌(Sarkar 등, 2020, Nat Commun 11, 1545)을 참고한다. Sarkar와 동료들은 근원성 마커인 MyoD 발현이 일시적 재프로그래밍 후 변화하지 않았다는 결과에 기반하여 "일시적 재프로그래밍이 근원성 운명을 방해하지 않지만 근원성 가능성을 향상시킬 수 있음"을 실증하였다. 여기서 T 세포 정체성은 적어도 부분적으로 형질전환되었다. 또한, 그룹 #4의 부착 세포는 FSC/SSC FACS 분석(도 5 및 도 6

참고)에 의해 표시된 바와 같이 보다 복잡한 구조를 갖고 약간 더 컸다.

[0369] 실시예 2: 부분적 재프로그래밍 T 세포의 재활성화

[0370] 다음으로, 부분적으로 재프로그래밍된 T 세포를 96웰 플레이트에서 2일 동안 T 세포 배양 배지 중 1:1 내지 100 희석된 T 세포 TRANSACT™(Miltenyi Biotec)를 사용하여 제5일에 재활성화하였다. 그룹 #4 조건의 세포를 제5일에 2개의 웰로 나누었다 - 부유 세포를 한 웰로 옮기고 재프로그래밍 조건에 노출된 후 부착 세포를 용기 표면에서 탈착시켜 세척하고 또 다른 웰로 옮겼다. 센다이 바이러스의 독성으로 인해 그룹 #3의 다수의 세포가 사멸하였다. 그룹 #4에서 발현된 야마나카 인자가 센다이 바이러스 독성으로부터 세포를 구제할 수 있었다고 가정한다. 활성화 후 추가 5일 동안 모든 세포를 T 세포 배양 배지 중 배양하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 재프로그래밍 제5일에 CD3 및 CD8 발현을 상실한 세포는 제12일에 이들 유전자의 발현을 재획득하였다. 예를 들어, 도 7을 참고한다.

[0371] 제12일에 CD3 발현을 재획득한 것 외에도, 재활성화 T 세포는 나이브 T 세포 집단을 제시하는 T 세포 귀소 마커, CCR7 및 CD62L의 발현을 실증하였다. 예를 들어, 도 8을 참고한다.

[0372] T 세포 증식을 평가하기 위해 유세포측정을 사용하여 비드(123count eBeads Counting beads, Thermo)를 계수하여 제0일, 제5일 및 제12일에 세포를 계수하였다. 그룹 #4의 부착 세포는 제5일 비정상적 외관을 나타내고 CD3 발현이 감소했지만, 활성화 후 강력한 세포 증식을 나타내었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 제12일 대 제5일 세포수 변화 비율은 그룹 #1과 비교하여 그룹 #4로부터 세포의 증가된 증식을 실증하였다. 이는 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 방법이 특히 부착 세포에서 T 세포 증식 가능성을 증가시킴을 시사한다.

[0373] 유사한 실험에서, PBMC 유래 CD8 T 세포를 상기 기재된 바와 같이 1일 동안 TRANSACT로 자극하였다. 다음날, 재프로그래밍 인자(야마나카 인자 + SV40)를 또한 상기 기재된 바와 같이 센다이 바이러스 형질도입에 의해 T 세포로 도입하였다. 감염된 T 세포를 제1일에 iMatrix 코팅 접시 상으로 옮기고 (a) T 세포 배지 + 60 IU/ml IL2 또는 (b) iPS 세포 배지 60 IU/ml IL2 중 3일 동안 배양한 다음 제4일부터 IL2를 포함하지 않는 iPS 세포 배지로 변경하였다. 제8일에, 부유 세포 및 부착 세포를 유세포측정 분석을 위해 수확하였다. 특히, T 세포 재프로그래밍을 보다 정확하게 모니터링하기 위해 SSEA4 및 CD3 발현을 분석하였다. SSEA4는 부분적으로 재프로그래밍된 체세포에서 만능 줄기 세포에 이르기까지 발현되는 광범위한 줄기 세포 마커로 간주되는 탄수화물 에피토프이다. 놀랍게도, 부착된 콜로니는 조건 (a)에서 검출되지 않아, 배양 조건이 T 세포 재프로그래밍에 영향을 미칠 수 있음을 제시하였다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 제8일에 FACS 분석은 부착 세포의 71.9%가 CD3 및 SSEA4 양성임을 나타내어, 부착 세포가 줄기 세포 마커뿐만 아니라 T 세포 계통 마커 둘 모두를 발현함을 시사하였다. SSEA4가 높고 CD3 음성인 세포 집단이 관찰되었다. 부착 세포와 비교할 때, 조건 (b)에서 매우 소수의 부유 세포가 SSEA4를 발현하였고, SSEA4가 높은 CD3- 집단은 관찰되지 않았다. 예상된 바와 같이, 배양 조건 (a)(표준 T 세포 배양 조건) 후 SSEA4+ 세포는 발견되지 않았다. 이 데이터는 부착된 콜로니를 형성하는 부분적 재프로그래밍 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)가 탈분화(즉, 부분적 탈분화)되고 SSEA4를 발현함을 강력하게 제시한다. 본 발명자들의 관찰은 iPS 세포로 재프로그래밍하기 위해 섬유아세포를 사용하는 이전 보고와 일치하였다(예를 들어, Biol Open. 2017 Jan 15;6(1):100-108 참고).

[0374] 실시예 3: 후생유전학적 연령 측정

[0375] Horvath와 동료들은 세포 계놈의 다양한 DNA CpG 부위에서 메틸화 상태를 분석하는 방법을 사용하여 세포의 "후생유전학적 연령"(eAge)을 추정할 수 있음을 실증하였다(Horvath 등, Aging, 10(7):1758-1775). 이 실시예에서 부분적 재프로그래밍 전후 T 세포의 eAge를 호르바트와 동료들이 기재한 기술을 사용하여 계산하였다. 부분적 재프로그래밍 전에, 실시예 1 및 2에 기재되고 표 1에 개략된 모든 실험 그룹에 대한 eAge는 공여자의 실제(연대순) 연령과 호환되는 21.5세로 추정되었다. 재프로그래밍 및 후속 T 세포 활성화 후, 그룹 #1 세포의 계산된 eAge는 20.8세인 반면, 그룹 #4의 부착 세포는 계산된 eAge가 10.0세였다(부분적 재프로그래밍 과정 동안 혈관 표면에 부착된 세포가 활성화 시 또는 활성화 직후 표면에서 탈착됨을 주지한다. 이러한 세포를 부유 세포와 구별하기 위해 이들은 "탈착" 세포로 지칭한다). 이는 부분적 재프로그래밍 과정이 측정된 eAge 21.5세에서 약 10세로 세포의 재생을 초래했음을 시사한다. 4개의 야마나카 인자로 형질도입되지 않았음에도 불구하고 그룹 #4의 부유 세포는 계산된 eAge가 14.5세였고 그룹 #2의 T 세포도 계산된 eAge가 14.6세였다. 이는 줄기 세포 배지 자체(StemFit, Ajinomoto)가 그 내용물이 공개적으로 알려지지 않았지만 세포를 재생시키는 일부 가능성을 제공하는 성분을 함유함을 제시한다. 결과를 아래 표 3에 요약한다.

표 3

표 3: 부분적으로 재프로그래밍된 T 세포의 후생유전학적 연령

조건	연령	
	호르바트 후생유전학적 연령	고갈된 CD8 T 세포의 예측된 수
원래 세포	21.2	6.5
#1	20.8	10.4
#2	14.6	7.9
#3 부유	14.5	-1.6
#3 부착>탈착	10.0	-2.8

[0376]

실시예 4: 제10일 이후의 부분적 재프로그래밍이 비정상적 T 세포의 생성을 초래함

[0378]

이 실시예에서는 2차 자극(재활성화) 시점의 범위를 조사하였다. 실험을 아래 표 4에 개략한다. 센다이 바이러스 형질도입은 하기: KOS 10MOI, KLF4 10MOI, cMyc 3MOI, SV40 5MOI와 같았고, 60 IU/ml IL2를 포함하는 TCM 중 수행하였다. 재프로그래밍 배양 조건은 3일 동안 60 IU/ml IL2를 포함하는 50/50 TCM/iPS 배지(Stemfit)에 이어 2차 활성화까지 IL2를 포함하지 않는 Stemfit 중 배양하였다. 표시된 시기 동안 재프로그래밍한 후 부유 세포 및 부착 세포를 수확하였다. 그런 다음 세포를 TCM + 60 IU/ml IL2 중 TRANSACT로 1:100으로 활성화하였다. 이어서, 세포를 하기 마커: CD3, CD4, CD8 α , CD8 β 의 발현에 대해 유세포측정에 의한 2차 자극 7일 후 분석하였다. 도 11은 PBMC-유래 CD8 T 세포에 대한 과정을 요약한 모식도이다(또한 표 4 참고).

표 4

표 4			
xpt. No.	사건-센다이 활성화 조건	T 세포	2차 활성화 시점
	CD3 100 ng/ml CD28 4 ug/ml 3일 동안	PBMC로부터의 CD8+ T 세포	제 6일~제 10일 및 제 13일

[0379]

[0380]

일반적으로 통상적 세포독성 T 세포는 CD8 α -CD8 β 이중이량체를 발현한다. 비정상적 T 세포, 예를 들어 상피내 림프구(IEL) 및 감마 델트 T 세포는 CD8 $\alpha\alpha$ 동종이량체를 발현한다. 이와 같이, 이 실험에서 FACS를 사용하여 부분적 재생 과정을 사용하여 생성된 T 세포가 정규 CD8 T 세포 마커를 발현할 수 있는지 여부를 결정하였다. 자극 후 CD8 $\alpha\beta$ 발현의 부재는 부분적 재생 T 세포가 통상적 세포독성 T 세포가 아님을 시사할 수 있다.

[0381]

도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, 제6일~제10일부터 TCM으로 재활성화 T 세포 유래 부착성 세포 콜로니는 정상적 CD8 T 세포 표현형으로의 복귀를 시사하는 CD8 α 및 CD8 β 를 발현한다. 탈분화 T 세포를 T 세포 표현형으로 복귀시키기 위한 현재의 재프로그래밍 방법의 제10일 이후 재활성화 지연은 CD4-CD8- 집단의 증가를 초래하였다(도 12a, CD8 α 발현이 왼쪽으로 이동하는(하부 MF1) 제10일의 상부 및 하부 패널 참고. 위에서 주지된 바와 같이, CD8 α 음성 세포는 성숙 T 세포가 아니다. 제10일 이후, CD8 α 양성 집단에 대해 관문화할 때, 더 많은 CD8 β 음성 세포(CD8 $\alpha\alpha$ + 비-통상적 T 세포)가 관찰되었다(도 12b 제13일 FACS 그래프 참고).

[0382]

실시예 5: 재생 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포의 사이토카인 생산 검정 및 탈과립화 검정이 T 세포 기능을 실증함

[0383]

부분적 재프로그래밍 T 세포가 항원 특이성을 유지하는지 여부를 시험하기 위해 NY-ESO-1 특이적 TCR을 발현하도록 유전적으로 변형된 CD8+ T 세포를 부분적으로 재프로그래밍하고 T 세포 활성화 분자로 자극하고 NY-ESO-1 펩티드로 표적 세포에 대한 반응을 측정하였다.

- [0384] 42세 남성의 말초 혈액 유래 CD8+ T 세포를 Allcells(Alameda, CA)에서 구입하였다. 세포를 해동하고 실시예 4에 기재된 바와 같이 IL-2(60 IU/ml)를 포함하는 TCM 중 TRANSACT(1/100)로 자극하였다. 다음날, T 세포를 하기와 같이 렌티바이러스 벡터 형질도입에 의해 NY-ESO-1 TCR로 형질도입하였다:
- [0385] 렌티바이러스 형질도입을 위해, T 세포를 T 세포 TRANSACT(Miltenyi)의 1:100 희석으로 30시간 동안 자극하였다. 그런 다음 바이러스를 24시간 동안 T 세포에 첨가하였다. 이어서 TRANSACT를 포함하지 않는 7부피의 신선 배지를 첨가하여 자극 및 바이러스 감염을 종료하고, 세포를 3 x 10⁷/ml 세포로 CryoStor CS10(STEMCELL Technologies) 중 동결보존 전에 Grex-24 플레이트(Wilson Wolf)에서 추가 7일 동안 배양하였다 (또한 Robbins 2008 J Immunol, 180(9) 6116-6131 참고). 대조군 T 세포는 형질도입하지 않았고 유사하게 자극하였다.
- [0386] 부분적 재프로그래밍 및 재활성화를 위해, NY-ESO-1 특이적 T 세포를 해동하고 IL-2(60 IU/ml)를 포함하는 TCM 중 TRANSACT(1/100)로 자극하였다. 제2일에, T 세포를 4개의 야마나카 인자(KOSM MOI = 10) 및 SV40 대형 T 항원(MOI = 3)을 함유하는 센다이 바이러스로 감염시켰다. 이어서 세포를 TRANSACT로 제9일에 자극하여 상기 기재된 바와 같이 재생 NY-ESO-1 특이적 T 세포(2차 자극)를 수득하였다. 기능 검정을 위해, 재생 NY-ESO-1-특이적 T 세포를 제16일(3차 자극)에 다시 TRANSACT로 재자극하여 증식시켰다(도 13 참고).
- [0387] 사이토카인 생산 및 탈과립화 검정을 하기와 같이 제26일에 수행하였다. 대조군 비-형질도입 T 세포 및 NY-ESO-1 특이적 TCR 형질도입 T 세포를 해동하고 IL-2(60 IU/ml)를 포함하는 TCM 중 TRANSACT(1/500)로 1주일 동안 자극하여 증식시켰다. 비형질도입 T 세포, NY-ESO-1 특이적 TCR 형질도입 T 세포 및 재생 NY-ESO-1 특이적 TCR T 세포를 효과기 세포와 비교하였다. 표적 세포, T2를 T2 배지(RPMI, 20% FCS 및 P/SM) 중 배양하였다. T2 세포를 1시간 동안 NY-ESO-1 펩티드(SLLMWITQC)(10 nM)를 포함하고 또는 포함하지 않고 사전배양하고, 세척하고 계수하였다. 하나의 웰은 5x10⁴ 효과기 세포 및 1x10⁵ 표적 세포(E:T 비 2:1)를 함유하였다. 양성 대조군으로 PMA/이오노마이신(세포 활성화 카테일, Biolegend)을 제조업체 지침에 따라 첨가하였다. GolgiPlug 및 GolgiStop(BD Biosciences)을 제조업체 지침에 따라 첨가하였다. 또한 항-CD107a Ab-BV421을 배양 배지(1 ul/웰)에 첨가하였다. 세포를 사이토카인을 포함하지 않는 TCM 중 6시간 동안 배양하였다. 이어서 공동 배양된 세포를 표면 항원(PE-NY-ESO-1 사량체, BUV395-CD8, BUV496-CD4 및 BUV805-CD3)에 대해 염색하였다. 살아있음/사멸 eFluor 780을 또한 첨가하여 사멸 세포를 제외하였다. 20분 후 세포를 세척하였다. 제조업체의 지시에 따라 BD cytofix/cytoperm 키트를 사용하여 세포를 고정하고 투과화하였다. 이어서, 세포를 세포내 사이토카인 발현(FITC-IFN γ , APC-IL-2 및 BV785-TNF α)에 대해 염색하였다. 30분 인큐베이션 후, 세포를 2회 세척하고 ZE5 기기를 사용하여 유세포측정으로 분석하였다. FACS 결과를 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사량체+ 세포를 NY-ESO-1 Tg T 세포에 대해 관문화하고, 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사량체- 세포를 모의 대조군 T 세포에 대해 관문화하였다. IFN γ +, TNF α +, IL-2+, CD107a+의 빈도를 도 14에 나타낸 바와 같이 계산하였다. 결과는 재생 NY-ESO-1+ 형질도입 T 세포가 기능성을 유지하고 항원 특이적임을 나타내었다.
- [0388] **실시예 6: T 세포, iPS 및 부분적 재프로그래밍 T 세포의 표면 단백질 프로파일분석**
- [0389] 이 실시예에서, 활성화 T 세포, 비자극 T 세포, iPS 세포 및 제5일 부착된 부분적 재프로그래밍 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)에서 세포 표면 단백질을 프로파일분석하였다. 스크리닝의 목적은 중간 세포를 확인하고 부분적 재프로그래밍 과정 및 방법을 사용하여 제조된 세포를 특성규명하기 위해 사용할 수 있는 부분적으로 재프로그래밍 세포에서 발현되는 마커를 확인하는 것이었다.
- [0390] 이전에 기재된 바와 같이 T 세포 배양 배지(TCM)를 제조하였다. 최초 스크리닝을 위해 CD4+ 및 CD8+ T 세포(세포 ID 30460871&K, Allcells)를 해동하였다. T 세포를 100 ng/ml 항-CD3 및 2 ug/ml 항-CD28(항-인간 CD3 OKT3 및 CD28 CD28.2 항체, BioLegend, San Diego, CA) + 60 IU IL-2로 3일 동안 자극하였다. 제대혈 유래 iPS 세포주인 NL5GFP 및 종양 침윤 림프구(TIL) 유래 iPS 세포주인 hi4095 #8을 Stemfit 중 배양하여 수확하였다. T 세포 및 iPS 세포를 BioLegend LEGENDScreen(BioLegend, San Diego, CA)과 항-CD8, CD4, CD3, SSEA4, 살아있음/사멸 로 염색하고 371개 마커의 발현 수준을 유세포측정을 사용하여 결정하였다.
- [0391] 최초 스크리닝 결과 T 세포 및 iPS 세포에서의 발현 수준에 따라 선택된 아래 나열된 39개 후보 마커를 확인하였다. iPS 세포에 비해 자극 또는 비자극 T 세포에서 유의하게 더 높은 수준을 나타내거나 iPS 세포와 T-iPS 세포 간에 상이한 발현 패턴을 나타내는 마커를 선택하였다. iPS 세포에 대한 자극 또는 비자극 T 세포에서의 이들 마커 및 이의 상대적 발현 수준의 순위를 아래 표 5에 요약한다. 데이터는 또한 도 15(자극 T 세포 대

NL5iPS 세포) 및 도 16(비자극 T 세포 대 T-iPS 세포)의 워터폴 그래프에서 도식적으로 나타낸다.

표 5

표 5: 부분적으로 재프로그래밍된 T 세포에서의 후보 세포 표면 마커						
		T 세포 대 iPS 에서의 높은 발현부터 낮은 발현까지의 순위				
		자극 T 세포		비자극 T 세포		
이름	CD	CD4/iPS	CD8/iPS	CD4/T-iPS	CD8/T-iPS	평균
ICAM-3	CD50	10	11	8	7	9
	CD352	32	29	28	28	29.25
	CD31	65	27	45	26	40.75
인테그린 β7	인테그린 β7	53	47	43	36	44.75
	CD49e	72	85	90	101	87
인테그린 a5	CD122	43	35	272	136	121.5
	NKG2D	CD314	122	63	283	50
HLA-DR	HLA-DR	55	38	320	130	135.75
	CD134	45	167	148	246	151.5
	CD245	110	123	259	238	182.5
엔도글린	CD105	96	65	310	264	183.75
	Tim-3	CD366	114	62	280	281
CD39	CD39	101	57	303	297	189.5
	인테그린 β5	336	332	54	54	194
	CD71	97	43	335	343	204.5
CD164	CD164	88	74	326	349	209.25
	CD10	81	64	352	355	213
CD63	CD63	219	84	353	340	249
	XCR1	150	178	344	339	252.75
CD298	CD298	293	94	336	326	262.25
	CD201	206	226	343	330	276.25
CD151	CD151	334	110	347	321	278
	N-카드헤린	CD325	304	309	325	323
E-카드헤린	CD324	347	348	361	364	355
	CD147	356	343	364	363	356.5

[0392]

SSEA-3	353	359	357	359	357
TRA-2-49	358	357	356	358	357.25
TNAP	359	358	358	360	358.75
TRA-1-81	364	364	355	356	359.75
TRA-2-54	360	360	359	361	360
포도플라닌	367	367	362	357	363.25
CD9	363	363	363	365	363.5
CD340	365	365	366	366	365.5
CD24	368	368	367	367	367.5
CD90	369	369	368	368	368.5
EpCAM	CD326	370	370	369	369.5
SSEA-5	371	371	372	372	371.5
SSEA-4	372	372	371	371	371.5
TRA-1-60-R	373	373	370	370	371.5

[0393]

- [0394] 두 번째 스크리닝에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포(세포 ID 30460871&K, Allcells)를 해동하고 100 ng/ml 항-CD3 및 2 ug/ml 항-CD28과 60 IU IL-2로 자극하였다. 3일 후, 이전 실시예에 기재된 바와 같이 T 세포를 10 MOI KOS 센다이 벡터, 10 MOI KLF4 벡터, 3 MOI cMyc 벡터 및 5 MOI SV40 벡터로 형질도입하였다. 5일 후, 부착 세포를 수확하고 1차 스크리닝에서 확인된 마커의 표면 발현에 대해 상기 기재된 바와 같이 스크리닝하였다. 비자극 T 세포, 자극 T 세포, NL5 iPS 세포 및 hi4095 iPS 세포를 대조군으로 사용하였다.
- [0395] CD164, CD9, CD63, CD90, CD71, CD326, TRA-1-81 및 TRA-1-60-R 발현의 발현은 자극 및 비자극 T 세포와 비교하여 제5일 부분적 재프로그래밍 부착 세포에서 증가하는 것으로 밝혀진 반면, CD352 및 CD31은 하향조절되었다. 도 17에 나타난 바와 같이, 이 두 번째 스크리닝은 CD9 및 CD90을 부분적 재프로그래밍 동안 초기 전이의 잠재적 표지자로 확인한 반면, 제5일에는 알려진 iPS 세포 마커 SSEA3 및 SSEA4의 발현 수준이 크게 변화하지 않았다. CD9는 테트라스파닌-29로도 알려져 있으며 4개의 막횡단 도메인을 가지고 있다. 이는 세포 부착, 신호 전달 및 세포 분화에 관여된다. CD90은 THY-1로도 알려져 있다. 이는 면역글로불린 슈퍼패밀리 표면 당단백질이며 중간엽 줄기 세포와 연관된 마커이다. 이는 또한 세포 부착 및 소통에도 관여된다. 따라서, 이 두 마커의 발현은 탈분화 T 세포에서 획득된 부착 특성을 설명할 수 있다. 이들 2개의 마커의 발현은 또한 부분적 재프로그래밍 T 세포가 미지의 유형의 세포로 역분화되고 있으며, 이는 본 발명자들이 아는 한 T 세포 계통 계층에 상응하는 분화 세포 단계로 확인되지 않음을 제시한다.
- [0396] **실시예 7: 자극 신호전달이 재생 T 세포가 생존하고 증식하는 데 중추적임**
- [0397] 자극 신호전달이 향상된 생존 및 증식에 중추적인지 여부를 결정하기 위해 T 세포 부착성 세포로 다양한 농도에 서 TRANSACTM(Miltenyi Biotec) 활성화를 거쳤다.
- [0398] 먼저, T 세포를 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 부분적으로 재프로그래밍하였다. 간략하게, CD8 양성 T 세포를 60 IU/ml IL2를 포함하는 T 세포 배양 배지 중 3일 동안 가용성 CD3 및 CD28 TRANSACTM(Miltenyi Biotec)로 자극하였다. 3일 후, T 세포를 10 MOI KOS 센다이 벡터, 10 MOI KLF4 벡터, 3 MOI cMyc 벡터 및 5 MOI SV40 벡터로 형질도입하였다. 세포를 제1일부터 IL2를 포함하지 않는 SCM 중 배양하고 iMatrix-511로 코팅된 24-웰 플레이트에서 웰당 80,000개 세포 밀도로 4개씩 플레이팅하였다.
- [0399] 1제7일에 부착성 세포를 용기 표면에서 탈착시키고 세척하여 또 다른 웰로 옮겼다. 그런 다음 T 세포 유래 부착성 세포를 1:500 또는 1:1000의 농도로 희석된 T 세포 TRANSACTM(Miltenyi Biotec)로 재활성화하거나 비자극 배지 중 인큐베이션하였다. 활성화 후 추가 9일 동안 모든 세포를 T 세포 배양 배지(TCM + 60 IU/ml IL2) 중 배양하였다. 도 18a에 나타난 바와 같이, T 세포 유래 부착성 세포는 CD3 및 CD8a의 발현을 크게 상실하였다. 그러나 제22일까지 어느 한 농도의 TRANSACT로 활성화 세포의 93%~94%가 통상적 T 세포 마커인 CD3 및 CD8a의 발현을 재획득한 반면, TRANSACT를 포함하지 않는 TCM 중에서만 배양된 세포의 8.4%만이 CD3 및 CD8a를 발현하였다. 또한, 도 18c 및 18d에 나타난 바와 같이, 활성화 T 세포는 TRANSACTM를 포함하지 않는 T 세포 배지 중 배양된 부분적 재프로그래밍 T 세포와 비교할 때 유의하게 더 큰 생존 및 증식 능력을 나타내었다.
- [0400] **실시예 8: 재생 T 세포가 IL-2의 존재 하에서 장기 증식 후 효과기 표현형을 나타냄**
- [0401] 이 실시예에서는 상이한 공여자로부터의 재생 T 세포가 경시적으로 생존하고 증식하는 능력을 검사하였다. 3명의 공여자(42세 남성, 37세 여성 및 52세 남성)의 말초 혈액 유래 CD8+ T 세포는 Allcells, Alameda, CA에서 구입하였다. 세포를 해동하고 IL-2(60 IU/ml)를 포함하는 TCM 중 1:500 농도로 TRANSACTM(Miltenyi Biotec)로 자극하였다.
- [0402] 제2일에, T 세포를 4개의 야마나카 인자(KOSM MOI = 10) 및 SV40 대형 T 항원(MOI = 3)을 함유하는 센다이 바이러스로 감염시켰다. 그런 다음 세포를 TRANSACTM(1:500)로 제9일에 자극하였다. 각 공여자로부터 얻은 CD8+ T 세포의 추가 분취물을 해동하고 제9일에 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 TRANSACTM(1:500)로 자극하거나 ("대조군 1"), 제0일에 해동하고 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TRANSACTM로 자극하고(1:500) IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 배양하였다("대조군 2"). 제9일에 대조군 2 세포를 TRANSACTM(1:500)로 자극하였다. 재생 T 세포는 42일 동안 시험관내 증식하도록 두었다. 비재생 T 세포의 증식은 시험관내 증식 대략 3주 후 정체되었다. 도 19a를 참고한다. 재생 T 세포는 배양에서 최대 42일 동안 계속해서 유의한 증식을 나타내었다. 도 19b를 참고한다. 이러한 증식은 사이토카인 의존적이며 재생 T 세포는 IL-2 철회 6일 내에 사멸하기 시작하였다. 도 20b 및 20c를 참고한다.
- [0403] 사이토카인 생산 및 탈과립 검정을 제36일에 하기와 같이 수행하였다. PMA/이오노마이신(세포 활성화 카테일, Biologend)을 포함하거나 포함하지 않고 사이토카인 없이 TCM 중 세포를 배양하였다. GolgiPlug 및

GolgiStop(BD Biosciences)도 제조업체 지침에 따라 첨가하였다. 이어서 공동 배양된 세포를 표면 항원(BUV395-CD8, BUV496-CD4 및 BUV805-CD3)에 대해 염색하였다. 살아있음/사멸 eFluor 780도 사멸 세포를 제외하기 위해 첨가하였다. 20분 후 세포를 세척하였다. 제조업체의 지침에 따라 BD cytofix/cytoperm 키트를 사용하여 세포를 고정하고 투과화하였다. 이어서 세포를 세포내 사이토카인 발현(FITC-IFN γ 및 APC-IL-2)에 대해 염색하였다. 30분 인큐베이션 후, 세포를 2회 세척하고 ZE5 기기를 사용하여 유세포측정으로 분석하였다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- 세포를 모든 세포에 대해 관문화하였다. IFN γ + 및 IL-2+의 빈도를 도 21에 나타낸 바와 같이 계산하였다. 결과는 재생 T 세포가 기능을 유지함을 나타내었다. 일반적으로 효과기 T 세포는 IFN γ 를 발현하지만 다량의 IL2를 발현하지는 않는다. 따라서, 이러한 결과는 배양 36일 후 재생 세포가 여전히 완전한 효과기 표현형에 도달하지 않았음을 제시한다.

[0404] CD3, CD8b, CD45RA, CCR7 및 CD62L의 세포 표면 발현을 제7일 및 제26일에 유세포측정으로 측정하였다. 도 22 및 23을 참고한다. 제프로그래밍을 거친 탈착 T 세포는 감소된 CD3+CD8b+ 발현을, 그러나 상승된 CD45RA 및 CCR7+CD62L+ 발현을 실증한다. 제26일까지, 재생 T 세포는 정상 수준의 CD3+CD8b+ 발현 및 감소된 수준의 CD45RA+ 세포 및 CCR7+CD62L+ 세포를 나타낸다. 도 22 및 23을 참고한다.

[0405] 종합하면, 이들 데이터는(도 19~23) 장기 시험관내 배양 후, 재생 세포가 높은 증식 능력을 갖고 다기능적임을 제시한다. 재생 세포는 줄기성의 표시인 IL2를 계속 발현하지만 세포 표면 마커에 의해 나타나는 효과기 표현형을 갖는다. 따라서, 장기 배양 및 증식에도 불구하고, 재생 세포는 여전히 줄기성 특성을 갖는 것으로 보인다.

[0406] **실시예 9: 재생 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포가 NY-ESO-1 발현 종양 세포를 인식함**

[0407] 재생 T 세포가 종양 세포에 대한 항원 특이성을 유지하는지 여부를 시험하기 위해, NY-ESO-1-특이적 TCR을 발현하도록 유전적으로 변형된 CD8+ T 세포를 부분적으로 제프로그래밍하고, T 세포 활성화 분자로 자극하고, NY-ESO-1 펩티드로 펠싱한 표적 세포에 대한 반응을 측정하였다.

[0408] 2명의 상이한 공여자(#3 42세 남성 및 #4 37세 여성)의 말초 혈액 유래 CD8+ T 세포는 Allcells(Alameda, CA)에서 구입하였다. 2x10⁶ 세포를 해동하고 실시예 4에 기재된 바와 같이 각 공여자에 대해 24웰 플레이트의 1개 웰에서 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 TRANSACT™(1:100)로 자극하였다. 다음날 T 세포를 하기와 같이 렌티바이러스 벡터 형질도입에 의해 NY-ESO-1 TCR로 형질도입하였다: 먼저, T 세포를 T 세포 TRANSACT(Miltenyi)의 1:100 희석으로 30시간 동안 자극하였다. 이어서 바이러스(MOI: 5) 및 LentiBOOST™ A & B(Sirion Biotech)를 24시간 동안 T 세포에 첨가하였다. 그런 다음 IL-2(60 IU/L)를 포함하는 7 ml TCM을 첨가하여 자극 및 바이러스 감염을 종료하였다. 제2일에 T 세포를 4개의 야마나카 인자(KOS 10 MOI, KLF 10 MOI, cMyc 3 MOI, SV40 5 MOI) 및 SV40 대형 T 항원(MOI = 3)을 함유하는 센다이 바이러스로 감염시켰다. 대조군 세포는 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 배양을 유지하였다.

[0409] 16시간 후, 감염된 T 세포를 세척하고 제1일에 iMatrix 코팅 접시 상으로 옮기고 배지를 IL-2를 포함하지 않는 Stemfit(2 mL/웰)으로 변경하였다. 3개씩, 샘플 #3 밀도는 2.6x10⁵개 세포/웰이었고 #4 밀도는 1.76x10⁵개 세포/웰이었다. 제3일에 Stemfit을 첨가하였다(2 mL/웰, 총 4 mL).

[0410] 제5일에 부유 세포를 제거하고 부착 세포를 하기 프로토콜에 따라 수확하였다. 배지를 흡인하고 웰당 2 mL PBS로 2회 세척하였다. 1 ml EDTA를 첨가하고 혼합물을 37°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다. #3의 경우 3개 웰에서 6.1x10⁵ 및 #4의 경우 1개 웰에서 1.9x10⁶의 최종 밀도로 P1000 피펫팅으로 세포를 수집하였다. 이는 96-웰 U형 바닥 마이크로플레이트에서 약 2x10⁵개 세포/웰을 생성하였다. 그런 다음 세포를 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 1:500으로 TRANSACT로 활성화하였다. 대조군 비-센다이 감염 NY-ESO-1 Tg 세포를 동일한 방식으로 재 자극하였다.

[0411] 제6일에 세포 밀도가 너무 높아서 이들을 96-웰 마이크로플레이트에서 두 개의 웰로 분할하였다. IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM을 첨가하였다. 제8일에, 96-웰 마이크로플레이트의 2개 웰에 있는 세포를 48-웰 플레이트의 1개 웰로 조합하고 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM을 첨가하였다. 제12일에 세포 밀도가 2x10⁶ 세포/웰이 되도록 세포를 24-웰 플레이트로 옮겼다. IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM을 각 웰에 첨가하였다. 3~4일마다 세포를 계수하고 변화 배율을 계산하였다. 도 24를 참고한다. 세포수를 약 2x10⁶개 세포/웰로 조정하고 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM을 첨가하여 부피가 2 mL/웰이 되도록 하였다.

[0412] 제19일(2차 자극 14일 후)에, 표적 세포인 내인성 NYESO1을 발현하는 T2 및 Me1624 HLA-A *02:01 양성 종양 세포를 T2 배지(RPMI, 20% FCS 및 P/SM) 중 배양하였다. T2 세포를 1시간 동안 NY-ESO-1 펩티드(SLLMWITOC)(10 nM)를 포함하고 또는 포함하지 않고 사전배양하고, 세척하고, 계수하였다. 하나의 웰은 5x10⁴개 효과기 세포 및

1x10⁵개 표적 세포(E:T 비 1:2)를 함유하였다. 양성 대조군으로 PMA/이오노마이신(세포 활성화 카테일, Biolegend)을 제조업체 지침에 따라 첨가하였다. GolgiPlug 및 GolgiStop(BD Biosciences)을 제조업체 지침에 따라 첨가하였다. 또한 항-CD107a Ab-BV421을 배양 배지에 첨가하였다(1 µL/웰). 세포를 사이토카인을 포함하지 않는 TCM 중 6시간 동안 배양하였다. 이어서 공동 배양된 세포를 표면 항원(PE-NY-ESO-1 사량체, BUV395-CD8, BUV496-CD4 및 BUV805-CD3)에 대해 염색하였다. 살아있음/사멸 eFluor 780도 사멸 세포를 제외하기 위해 첨가하였다. 20분 후, 세포를 세척하였다. 제조업체 지침에 따라 BD cytofix/cytoperm 키트를 사용하여 세포를 고정하고 투과화하였다. 이어서, 세포를 세포내 사이토카인 발현(FITC-IFN γ , APC-IL-2 및 BV785-TNF α)에 대해 염색하였다. 30분 인큐베이션 후, 세포를 2회 세척하고 ZE5 기기를 사용하여 유세포측정으로 CD45RA, CD45RO, CCR7 및 CD62L의 세포 표면 마커 발현에 대해 분석하였다. FACS 결과는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사량체+ 세포를 NY-ESO-1 Tg T 세포에 대해 판문화하고 단세포 > 살아있는 세포 > CD3+ > CD8+ CD4- > NY-ESO-1 사량체- 세포를 모의 대조군 T 세포에 대해 판문화하였다. 도 25. IFN γ +, TNF α +, IL-2+ 및 CD107a+의 빈도를 도 26a-26d에 나타난 바와 같이 계산하였다. 이 실험은 재생 NYESO1 T 세포가 항원 특이적이며 NYESO1 양성 T2 및 Me1624 표적 세포를 인식함을 확인시켜준다(도 24~26)(또한 도 14 참고). 이들 데이터는 또한 재생 세포가 줄기성의 표시인 IL2를 계속 발현하지만 세포 표면 마커에 의해 나타난 바와 같은 효과기 표현형을 가짐을 확인시켜준다.

[0413] 실시예 10: NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포가 항원-특이적 자극으로 재생됨

[0414] 항원 특이적 T 세포가 항원 특이적 자극을 사용하여 재생될 수 있는지 여부를 시험하기 위해 NY-ESO-1 특이적 TCR을 발현하도록 유전적으로 변형된 한 명 이상의 공여자로부터 CD8+ T 세포를 단리하였다. 공여자 세포를 해당하고 각 공여자에 대해 24웰 플레이트의 1개 웰에서 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 TRANSACTTM로 자극한다. 하루 후, T 세포를 NY-ESO-1 T 세포 수용체를 발현하는 렌티바이러스로 형질도입한다. 그런 다음 NY-ESO-1 특이적 T 세포를 NY-ESO-1 펩티드로 펄싱한 T2 세포(T2+NY-ESO-1 세포)와 공동 배양한다. 다음으로, 세포를 NY-ESO-1 특이적 T 세포로 농축하거나(그룹 1) NY-ESO-1 특이적 T 세포 및 비형질도입 T 세포의 이중 혼합으로 유지한다(그룹 2). 세포는 재프로그래밍 동안 다시 T2+NY-ESO-1 세포와 공동 배양한다. 그런 다음 세포를 4개의 야마나카 인자(KOS 10 MOI, KLF 10 MOI, cMyc 3 MOI, SV40 5 MOI) 및 SV40 대형 T 항원(MOI = 3)을 함유하는 센다이 바이러스로 감염시킨다. 대조군 세포는 T2+NY-ESO-1 세포와의 공동 배양에서 IL-2(60 IU/mL)를 포함하는 TCM 중 배양을 유지한다.

[0415] NY-ESO-1 특이적 T 세포는 임의의 추가 자극 없이 T2+NY-ESO-1 세포의 존재 하에 T 세포 유래 부착성 세포를 형성할 수 있다. 부착 세포를 실시예 9에 기재된 프로토콜에 따라 수확한 다음, T2+NY-ESO-1 세포와의 공동 배양에 의해 다시 활성화한다.

[0416] 실시예 11: 재생이 종양 침윤 림프구에서 T 세포 줄기성 특성을 향상시킴

[0417] 이 실시예에서는 종양 침윤 림프구(TIL)를 66세 공여자로부터 단리하여 하기와 같이 재생시켰다. 2주 동안 T 세포 배양 배지 중 종양 단편을 배양하여 TIL을 농축하였다. T 세포는 종양에서 유래된 자가 항원 제시 세포와의 밤새 공동 배양을 통해 활성화하였다. 그런 다음 T 세포를 FACS 분류하고 CD137(4-1BB) 양성 세포를 단리하였다. 1일 후(제0일), 세포를 그대로 두거나 이전에 기재된 바와 같이KOS(KLF4, OCT3/4, SOX2), KLF4, cMyc 및 SV40을 발현하는 4개의 센다이 바이러스로 형질도입하였다. 그런 다음 세포를 줄기 세포 배지(StemFit)로 옮기고 7일 동안 배양하였다. T 세포 유래 부착성 세포를 제7일에 수확하고 추가 2일 동안 T 세포 배양 배지 중 TransAct(1:500)로 재활성화하였다. 제9일부터 세포를 정상 T 세포 배양 배지 중 배양하였다. 제21일에, 재생 세포 또는 대조군 세포(세포가 4개의 센다이 바이러스로 형질도입되지 않은 것을 제외하고는 동일한 절차를 거침)를 유세포측정을 사용하여 CD62L, CCR7 및 TCF7의 발현에 대해 평가하였다. 재생 TIL은 비재생 대조군에 비해 향상된 증식(도 27a) 및 줄기성 표현형 마커의 향상된 발현(도 27b)을 나타냈다. 이 실험에서, 재생 TIL의 73.0%가 CCR7 및 CD62L을 공동 발현하고 재생 TIL의 64.5%가 CCR7 및 TCF7을 공동 발현했는데, CCR7 및 CD62L의 2.94% 공동 발현 그리고 CCR7 및 TCF7의 3.07% 공동 발현만 나타난 비재생 TIL 집단보다 유의하게 더 높다. 이러한 데이터는 전형적으로 낮은 증식 능력 및 고갈의 표현형 마커를 특징으로 하는 TIL이 성공적으로 재생되어 향상된 증식 및 줄기성을 허용할 수 있음을 제시한다.

[0418] 실시예 12: T 세포 재생 동안 후생유전학적 시계의 동적 분석

[0419] 이 실시예에서는 53세 남성, 55세 남성 및 50세 남성으로부터의 CD8+ T 세포를 백만개 세포/ml의 세포 밀도로 60 IU/ml의 IL-2를 포함하는 T 세포 배양 배지(TCM) 중 1:500 희석으로 인간, T 세포 TransAct®(Miltenyi Biotec,)로 48-웰 플레이트에서 자극하였다. 이하 기재된 모든 TCM은 60 IU/ml IL-2를 함유한다. 26.5시간 활성

화 후, 세포를 두 그룹으로 나누었다. 한 그룹은 재생 프로토콜을 거쳤다; 다른 그룹은 임의의 바이러스 조작 없이 대조군으로 사용하였고 전체 과정 동안 TCM 중 배양하였다.

- [0420] 야마나카 인자 및 SV40 함유 센다이 바이러스(SeV)를 KLF4-OCT3/4-SOX2 10 MOI, KLF4 10 MOI, cMyc 3 MOI 및 SV40 5 MOI로 재생 샘플에 형질도입한 다음(제0일), 37°C에서 배양하였다. 16.5시간 후, 세포를 세척하고 줄기 세포 배지로 현탁하였다. 세포를 iMatrix-511 코팅된 24-웰 플레이트 상에 50,000개 세포/웰(제0일 계수 50,000에 상응함)로 플레이팅하고 37°C에서 배양하였다(제1일). 500 µl의 SCM을 제3일 및 제5일에 첨가하였다.
- [0421] 제7일에 부착성 세포를 탈착시키기 위해 1 ml의 TrypLE Express(Thermo cat# 12604013)를 첨가하고 세포를 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서 탈착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 상청액 중 부유 세포도 보관하여 탈착 세포와 혼합하였다. eAge를 결정하기 위해 일부 세포를 DNA를 위해 보관하였다. 48-웰 플레이트에서 백만개 세포/ml의 밀도로 500 µl TCM 중 1:500 희석된 인간, T 세포 TransAct로 50만개 세포의 대조군 및 재생 샘플 둘 모두를 활성화하였다. 제9일에 세포를 12-웰 플레이트로 옮기고 각 웰에 1 ml의 TCM을 첨가하였다. 제11일에 세포를 6-웰 플레이트로 옮겼다. 그런 다음 세포를 6-웰 플레이트에서 배양하였다.
- [0422] 세포 샘플은 SeV 형질도입을 위한 사전활성화 단계 전 및 제7, 제13 및 제18일에 후생유전학적 시계 분석을 위해 수집하였다. 각 시점의 세포를 펠릿화하고 DNA 추출 전까지 -20°C에서 보관하였다. PureLink Genomic DNA 미니 키트(Invitrogen, K182002)를 사용하여 동결 세포 펠릿에서 DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA는 메틸롬 분석의 기술적 복제를 위해 3개 튜브로 분할하였다. DNA가 충분하지 않기 때문에 제18일에 공여자 1 그리고 제7일 및 제18일 공여자 3의 대조군 조건은 2개의 기술 복제로만 구성된다. Illumina Infinium 어레이에 의한 후생유전학적 분석을 위해 샘플을 제조하였다. CpG 메틸화 상태 데이터를 피부 및 혈액 시계 값을 얻기 위해 문헌(Horvath 등, 2018, Aging 10, 1758-1775; Horvath and Raj, 2018, Nature Reviews Genetics, 19:371-375)에 기재된 호르바트 방법을 사용하여 분석하였다.
- [0423] 세포를 형광 접합 항체로 염색하고 생존력 염료 및 세포 표현형을 Cytex Aurora에서 유세포측정으로 획득하였다.
- [0424] 3명의 남성 공여자(53세, 55세 및 50세)의 CD8 양성 T 세포를 도 28에 도시된 재생 프로토콜에 따라 야마나카 인자 및 SV40으로 형질도입하고 각 시점에서 비형질도입 조건의 대조군과 비교하였다. 재생 세포는 제7일에 감소된 CD3 및 CD8b 발현을 나타내었다. 이들을 탈착 및 자극 후, T 세포 통상적 마커 발현이 제13일 및 제18일에 재생 세포에서 완전히 회복되었다(도 29a 및 29b). 따라서, 부분적으로 재프로그래밍 세포는 재활성화 후 6일 만에 통상적 T 세포 마커의 발현을 재획득하였다.
- [0425] 재생 프로토콜의 4개 시점에서 후생유전학적 연령(eAGE)을 확인하기 위해 3명의 남성 공여자의 DNA 샘플에서 피부 및 혈액 후생유전학적 시계(매우 정확한 연령 추정기)를 수행하고 분석하였다(도 30a-30c).
- [0426] 연대순 연령이 53세(y/o)인 공여자 1의 eAge는 Sev 형질도입을 위한 활성화 전 45.1세를 나타내었다. TransAct 활성화 후 비재생 대조군 세포의 eAge는 변동을 나타내지 않았지만[43.3 내지 45.7세 범위(2.4년 변동)], 제7일 센다이 바이러스로 형질도입된 세포(재생 세포)의 eAge는 가장 젊은 연령인 30.9세를 나타내었고, 점차 증가하여 제18일에 46.2세에 도달하였다. 제7일 대조군과 재생 eAGE 간 차이는 12.9년이었다. 이것은 호르바트 시계 분석에 의해 측정된 연령의 약 24.3% 감소이다.
- [0427] 연대순 연령이 55세인 공여자 2의 대조군 세포에서의 eAge는 55세로, 43.8 내지 50.0세(6.2년 변동) 범위였다. 다시, 가장 젊은 연령은 제7일 재생에 의해 달성된, 34.4세(제7일 대조군 eAGE보다 12.9년 더 젊음)였다. 공여자 1의 결과와 일치하게 eAge는 점차 증가하였다.
- [0428] 공여자 3의 연대순 연령은 50세였다. 비재생 대조군 세포의 eAge는 46.0 내지 51.4(5.4년 변동)로 변했으며, 가장 젊은 연령은 제7일 재생 세포에서 31.5세로 제7일 대조군 eAge보다 19.9년 더 젊었다. 요약하면, 3명의 공여자 모두에서 재생 세포가 제7일에 가장 젊은 eAge를 나타낸 다음 eAge가 점차 증가하였다. 공여자 1 재생 세포의 eAge는 제18일에 대조군 수준에 도달한 반면, 다른 두 공여자의 경우 재생 세포는 계속 대조군보다 더 젊었다.
- [0429] 상기 기재된 결과에 의해 실증된 바와 같이, 부분적 재프로그래밍 T 세포는 탈착일(즉, 7일)에 측정된 바와 같이 공통 T 세포 마커(예를 들어, CD3 및 CD8b)를 상실한다. 그러나 제7일에 재자극하고 T 세포 배지 중 배양한 후, T 세포 부착성 세포는 제13일까지 또는 제13일에 T 세포 마커를 완전히 재획득하였다. 후생유전학적 시계는 시험한 3명의 공여자(각각 50세, 53세, 및 55세)에서 제7일에 가장 젊은 후생유전학적 연령을 나타내었다. 이 실시예의 결과는 점진적인 eAge 증가가 제7일 후 관찰되었지만, 재생 세포는 재생 세포가 완전한 T 세포 표현형

을 나타낸 제13일에 대조군보다 더 짧게 유지됨을 실증한다.

[0430] 실시예 13: NY-ESO-1 형질도입 T 세포의 재생

[0431] 이 실시예는 T 세포가 원하는 표적(예를 들어, NYESO1)에 특이적인 TCR을 발현하도록 유전자 조작될 수 있고 본원의 방법을 사용하여 재생될 수 있음을 실증한다.

[0432] 건강한 공여자 CD4/CD8 T 세포 활성화: 제1일에 2명의 남성 공여자(24세 및 35세)로부터의 건강한 인간 공여자 CD4 및 CD8 T 세포를 해동하고 한 번 세척한 다음 예열된 완전 TCM + IL-2(60 IU/ml) 중 재현탁하였다(제-3일). 세포를 2e6개 세포/ml로 희석하였다. CD4 및 CD8 T 세포를 자극하기 위해 Transact를 10 uI/ml(1/100 희석)로 첨가하였다(도 31 참조). 제2일에, 자극 CD8+ 및 CD4+ T 세포를 계수하고 7.5e+5개 세포를 0.75 ml의 TCM + IL-2 중 현탁하였다. NYESO1 특정 TCR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 표준 프로토콜을 사용하여 만들었다. NYESO1-암호화 렌티바이러스 상청액(7.5 uI, MOI; 10) 및 LentiBoost A&B(각각 7.5 uI)를 첨가하였다. 다음날 새로운 5.25 ml의 TCM + IL-2를 첨가하였다(총 6 ml).

[0433] NY-ESO-1 트랜스제닉(Tg) T 세포의 재프로그래밍 및 이의 수집: 제0일에, 4e+5개 세포를 수집하고, 48-웰 플레이트에서 TCM + IL-2 중 재현탁하였다. Cytotune® 센다이 재프로그래밍 키트를 재프로그래밍을 위해 사용하였다(KOS: MOI=10, KLF4: MOI=10, C-MYC: MOI=3 및 SV40: MOI=5). 다음 날(즉, 제1일), 세포를 수집하고, 줄기 세포 배양 배지 중 재현탁하고, iMatrix-코팅 6-웰 플레이트에 시딩하였다(조건당 2개 웰). 제3일에 새로운 줄기 세포 배양 배지를 첨가하고 제5일에 배지의 절반을 새로운 줄기 세포 배양 배지로 교체하였다. 대조군 세포는 TCM + IL-2 중 배양을 유지하였다. 제7일에 부유 세포를 수집하고 웰을 PBS로 세척하고 TrypLE를 첨가하고 부착 세포를 탈착시켰다. 수집된 모든 세포(즉, 부유 세포 + 탈착 세포)의 세포수를 계수하였다. 탈착 세포를 500 uI의 TCM + IL2 중 Transact(1/500 희석)로 재자극하였다(48-웰 플레이트에서). 제11일에 세포를 수집하고 1 ml의 새로운 TCM + IL-2 중 재현탁하고 6웰 플레이트로 옮겼다. 세포 계수 및 배지 교환을 3~4일마다 수행하였다. 제13일에 세포의 1/20을 CD3, CD62L, CD45RO, HLA-A02:01 NYESO1 MHC 사량체, Cd197, CD4, CD8a, CD45RA에 대한 항체로 표면 발현 및 TCF1에 대한 세포내 염색을 위해 염색하고, 제조업체의 프로토콜에 따라 기재된 바와 같이 Foxp3 염색 키트를 사용하여 고정 및 투과화하고, Tcf7 항체로 염색하고 FACS로 분석하였다. 예를 들어, 도 32a 및 32b를 참고한다. 지침에 따라 PureLink Genomic DNA 미니 키트를 사용하여 조건당 1e+6개 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였다. DNA를 RNase로 처리하고 이전에 기재된 바와 같이 후생유전학적 연령 분석을 위해 평가하였다.

[0434] T2 세포의 스톱 바이알을 해동하고 1회 세척하고 완전 RP10 배지 중 1주 동안 배양하였다. 5e+6개 세포를 5% CO2 인큐베이터에서 2시간 동안 10 nM NY-ESO1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않는 완전 RP10 중 재현탁하였다. 2시간 후, 세포를 세척하고 TCM 중 재현탁하였다.

[0435] 제19일에 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포를 표적 세포와의 공동 배양 시 사이토카인을 생성하는 능력에 대해 분석하였다. 5e+4개 T 세포를 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않고 1e+5개 T2 세포와 공동 배양하였다. 표적 세포를 포함하는 웰 및 PMA/이오노마이신(세포 활성화 각테일)을 포함하는 웰을 각각 음성 및 양성 대조군으로 첨가하였다. CD107a 항체를 배양 배지에 첨가하였다. 6시간 후 공동 배양 세포를 표면 Ab 혼합물로 염색하고, 제조업체의 프로토콜에 기재된 바와 같이 BD 키트를 사용하여 고정 및 투과화하고 세포내 Ab 혼합물로 염색하고 FACS(Cytek Aurora)로 분석하였다. 데이터는 Flowjo 소프트웨어로 분석하였다. 관문화 전략은 하기와 같았다: 림프구 > 단세포 > 살아있음/사멸- > CD3+ NY-ESO-1 사량체+.

[0436] 제19일에 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포를 순차적 자극을 사용하여 표적 세포를 사멸시키는 능력에 대해 분석하였다. 구체적으로, 대조군 및 재생 T 세포를 계수하였다. 50,000개 NY-ESO-1 사량체+ T 세포를 20,000개 NY-ESO-1+ HLA A02:01+ 표적 세포(A375-Nuclight Red(NLR) 또는 H1703-NLR)와 1:4 E:T로 24웰 플레이트에서 공동 배양하였다. 3~4일마다 배양의 25%를 초기 시딩 밀도로 플레이팅된 신선 표적 세포를 포함하는 새로운 플레이트로 옮겼다. 표적 제거율을 Incucyte를 사용하여 정량하였다.

[0437] 결과는 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포가 덜 분화된 표현형을 가짐을 나타내었다. 특히, 제13일에 재생 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포 - NY-ESO-1 사량체의 결합에 의해 검출됨 - 는 더 높은 백분율의 CCR7+ CD62L+ 집단 및 Tcf1+ 집단을 함유하여, 덜 분화된 표현형을 시사하였다. 예를 들어, 도 32a 및 32b를 참고한다. 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포는 연장된 시간 동안 TCM + IL-2 중 배양을 유지하였다. 배지는 3~4일마다 교체하였고 세포는 1~2e+6개/ml의 농도로 유지하였다. 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포는 증식을 시작하는 데 더 오랜 시간이 필요했으며, 이는 재프로그래밍 과정으로부터의 회복 때문일 수 있다. 그러나 경시적으로 이들은 비재생 대

대조군 세포보다 100배 이상 더 증식하였다. 예를 들어, 도 33을 참고한다. 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 후생유전학적 연령을 도 34에 도시된 바와 같이 분석하였다. 대조군 T 세포와 비교하여 19일에 재생 세포는 약 8~18년 더 젊은 표현형을 나타내었다. 보다 구체적으로, 제1 공여자(도 34a)의 경우, 제7일에 재생 CD4 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)의 후생유전학적 연령은 대조군 세포의 eAge(제19일 eAge)와 비교하여 연령의 68% 감소를 나타내었다. 제19일에, 재생 CD4+ T 세포는 대조군 세포와 비교하여 연령의 33% 감소를 나타내었다. 제7일 재생 CD8 T 세포의 후생유전학적 연령은 대조군 세포와 비교하여 연령의 70% 감소를 나타내었다. 제19일에, 재생 CD8 T 세포는 대조군 세포와 비교하여 연령의 45% 감소를 나타내었다. 두 번째 공여자(도 34b)에서, 제7일에 재생 CD4 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)의 후생유전학적 연령은 대조군 세포와 비교하여 연령의 62% 감소를 나타내었다. 제19일에, 재생 CD4+ T 세포는 대조군 세포와 비교하여 연령의 27% 감소를 나타내었다. 제7일 재생 CD8 T 세포(T 세포 유래 부착성 세포)의 후생유전학적 연령은 대조군 세포 27% 연령의 68% 감소를 나타내었다. 제19일에, 재생 CD8 T 세포는 대조군 세포와 비교하여 연령의 67% 감소를 나타내었다.

[0438] 또한, 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포는 표적 세포와 NY-ESO-1 펩티드의 공동 배양 시 더 많은 사이토카인(IL-2, IFN γ 및 TNF α)을 생산하는 것으로 관찰되었다(도 35). 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 사이토카인(IL-2, TNF α , IFN γ) 생산을 위해서 기재된 바와 같이 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않고 T2 세포(HLA A02:01+)와 공동 배양하여 분석하였다. 대조군 및 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포는 둘 모두 펩티드를 포함하지 않고 T2 세포와 공동 배양 시 사이토카인을 생산하지 않았다. 더 높은 백분율의 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포가 NY-ESO-1 펩티드를 포함하고 T2 세포와 공동 배양 시 IL-2, IFN γ 및 TNF α 를 생산하였다. 예를 들어, 도 35를 참고한다.

[0439] 일반적으로, 도 31~37을 참고한다. 도 31은 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포의 재생 실험의 도표이다. CD4 또는 CD8 T 세포는 재프로그래밍 전에 Transact에 의해 자극하고 NY-ESO-1 TCR로 형질도입하였다. 세포는 제1일부터 제7일까지 iPS 세포 배양 조건에서 배양하였다. 제7일에 세포를 수집하고, 계수하고, Transact에 의해 재자극하고 TCM + IL-2 중 배양에서 유지하였다. 제19일에, 대조군 및 재생 세포를 사이토카인 생산 및 세포독성 활성화에 대해 분석하였다. 순차적 사멸 검정 조건에서 재생 CD4 및 CD8 T 세포를 혼합하여 이의 시너지 효과를 확인하였다.

[0440] 도 32a 및 32b는 재생 NY-ESO-1 Tg CD4(도 32a) 및 CD8 T 세포(도 32b)가 덜 분화된 표현형을 나타내었음을 예시한다. 제13일에 대조군 및 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포를 FACS에 의해 표면 마커 및 Tcf1 세포내 발현에 대해 분석하였다. 세포를 림프구 > 단세포 > 살아있음/사멸- > NY-ESO-1 사랑체+로 관문화하였고 CD4 x CD8a, CCR7 x CD62L 및 CCR7 x Tcf1로 도식화하였다.

[0441] 도 33은 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 대조군 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포보다 더 많이 증식하였음을 예시한다. NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포를 재생시키고 기재된 바와 같이 배양하고 세포수를 3~4일마다 계수하였다. 그래프는 경시적인 재프로그래밍 인자 및 이의 상응하는 대조군 세포의 형질도입 7일 후와 비교하여 변화 배율을 도시한다. 4명의 상이한 공여자의 대표적 데이터.

[0442] 도 34는 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 대조군 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포 및 공여자의 연대순 연령보다 후생유전적 연령 분석에 의해 더 젊은 표현형을 나타내었음을 예시한다. 그래프는 특정 CpG 부위의 메틸화 상태에서부터 분석된 연령 값의 평균 및 SD를 나타낸다.

[0443] 도 35는 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포가 NY-ESO-1 펩티드를 포함하고 T2 세포와 공동 배양 시 더 많은 사이토카인(IFN γ , IL-2 및 TNF α)을 생산하였음을 예시한다. 제19일에 대조군 또는 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포를 단독으로 또는 PMA/이오노마이신과, 골지 수송체 억제제의 존재 하에 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않고 T2 세포와 함께 배양하였다. 표면 항원을 염색한 후, 세포를 고정, 투과화하고 세포내 Ab로 염색하였다. 각 사이토카인 양성 NY-ESO-1 사랑체+ 세포의 빈도를 도시하였다.

[0444] 도 36은 재생 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포가 NY-ESO-1 발현 표적 세포(A375-NLR)와의 반복된 공동 배양 시 대조군 세포보다 더 오래 이의 세포독성 활성을 지속하고 유지하였음을 예시한다. 대조군 또는 재생 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포를 A375-NLR 세포주와 공동 배양하였다. 3~4일마다 이전 배양의 25%를 신선 표적을 포함하는 새 플레이트로 옮겼다. 표적의 성장을 Incucyte® 살아있는 세포 분석 시스템을 사용하여 모니터링하고 기본 소프트웨어 분석 모듈로 분석하였다. 그래프는 각 조건의 A375-NLR/이미지 수를 나타낸다. 2명의 상이한 공여자의 대표적 데이터. NLR: 누클라이트 레드(Nuclight Red)

[0445] 도 37은 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 T 세포의 첨가로 초래된 재생 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포의 향상된 세포독성을 기

재한다. 재생 NY-ESO-1 Tg CD4 및 CD8 T 세포를 E:T=1:4로 A375-NLR 세포주와 공동 배양하였다. 한 조건에서는 외인성 IL-2(10 IU/ml)를 첨가하였다. 또 다른 조건에서는, 재생 CD4 및 CD8 T 세포를 1:1 비로 혼합하고 E:T=1:2로 A375-NLR 세포주와 공동 배양하였다. 3~4일마다 이전 배양의 25%를 신선 표적을 포함하는 새 플레이트로 옮겼다. 표적 세포의 성장을 Incucyte® 살아있는 세포 분석 시스템을 사용하여 모니터링하고 기본 소프트웨어 분석 모듈로 분석하였다. 그래프는 각 조건의 A375-NLR/이미지 수를 나타낸다. 대표적 데이터는 2명의 상이한 공여자로부터 유래된다.

[0446] 이 실시예에서, 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포가 대조군 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포보다 덜 분화된 표현형을 나타내었고 더 많이 증식했다는 결론을 내릴 수 있다. 또한, 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 후생유전학적 연령은 대조군 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포에서보다 낮았다. 재생 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포는 또한 관련 NYESO1 펩티드로 펠싱한 표적 세포와의 공동 배양 시 더 많은 사이토카인(IL-2, IFN γ 및 TNF α)을 생산하였다. 또한, 재생 NYESO1 TCR+ 세포는 비재생 대조군 세포보다 표적 항원 세포에 또한 반복적 노출 후 더 오랜 시기 동안 세포독성 활성을 유지하였다. 또한, 재생 NY-ESO-1 TCR Tg CD8 T 세포 활성은 IL-2 또는 재생 NY-ESO-1 TCR Tg CD4 T 세포의 첨가에 의해 향상되었다.

[0447] **실시예 14: 사이토카인 확인**

[0448] 이 실시예는 재생 T 세포의 사이토카인 생산을 평가하기 위해 수행하였다.

[0449] PBMC의 재생. 제-2일에, 1x10⁶개 공여자 세포를 해동하고 24시간 동안 24-웰-플레이트에서 웰당 1 mL TCM + IL-2(60 IU/ml)에서 인큐베이션하였다. 다음날(즉, -1일) 세포를 계수하고 T 세포를 인간 T 세포 TransAct(Miltenyi) REA107 1:500으로 활성화한 다음 24시간 동안 인큐베이션하였다. 제0일에 섀다이 백터 형질 도입(MOI: KOS 10, KLF4 10, c-MYC 3, SV40 5)을 수행하였고, iMatrix 511을 희석하여(57.6 μ l iMatrix+9 ml PBS) 기질 코팅(iMatrix 511) 플레이트를 제조하였다. 24웰 플레이트의 웰당 희석한 iMatrix 500 μ l를 첨가하고 37°C에서 >1시간 동안 유지하였다. 제1일에, 세포를 펠릿화하고 웰당 500 μ l 줄기 세포 배양 배지 + bFGF를 포함하는 iMatrix 코팅 플레이트로 분배하였다. 제3일에, 500 μ l 신선 줄기 세포 배양 배지 및 bFGF를 24-웰 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 제7일에, 모든 부유 세포를 현탁 없이 수확하고, 1 mL TrypLE Express를 첨가하여 세포를 탈착시켰다. 세포를 37°C에서 10분 동안 인큐베이션한 다음 500 μ l PBS를 각 웰에 첨가하여 희석하였다. 세포를 수확하고 여기에 1 ml PBS를 첨가하였다. 세포를 현탁 및 수확하고 부유 세포를 탈착 세포와 조합했다. 세포를 계수하고, 펠릿화하고, TCM + IL-2(60 IU/ml)로 재현탁하고, 인간 T 세포 TransAct(Miltenyi)(1:500)로 재활성화하였다. 상청액을 수확하여 동결시켰다. 제11일, 제14일 및 제18일에 세포를 펠릿화하고 수확하고 신선 TCM + IL-2(60 IU/ml)로 재현탁하였다.

[0450] 적응 면역 관련 사이토카인의 정량적 분석. 제7일, 제11일, 제14일 및 제18일에 대조군 및 재생 세포 둘 모두로부터의 상청액을 Isoplexis Codeplex 적응 면역 세크레툼 칩으로 분석하였다. 결과를 도 38a 및 도 38b에 도시한다. 두 공여자 모두에서 D7 T 세포 유래 부착성 세포는 GM-CSF, IFN-g, IL-5, IL-13, MIP-1a 및 MIP-1b의 상대적으로 낮은 발현 수준을 나타내었다. 이러한 사이토카인의 발현은 D18에 대조군 세포와 필적하는 수준까지 점차 증가하였다. T 세포 유래 부착성 세포(D7 세포)에서 IL-6, IL-8 및 TNF-b의 발현 패턴은 대조군 세포와 구별된다. 이러한 결과는 T 세포 유래 부착성 세포가 대조군 세포와 상이한 세포 유형임을 시사하였다.

[0451] 선천성 면역 관련 사이토카인의 정량적 분석. 제7일, 제11일, 제14일 및 제18일에 대조군 및 재생 세포 모두로부터의 상청액을 Isoplexis Codeplex 선천성 면역 세크레툼 칩으로 분석하였다. 결과를 도 39a 및 도 39b에 도시한다. 두 공여자 모두에서 T 세포 유래 부착성 세포(D7 세포)는 IFN-g, MIP-1a의 상대적으로 낮은 발현 수준을 나타내었다.

[0452] **실시예 15: 항원-특이적 T 세포의 선택적 재생**

[0453] 이 실시예는 특정 T 세포의 항원 자극이 해당 세포의 선택적 재생을 초래하는지를 조사하기 위해 수행하였다.

[0454] 자가 LCL의 확립. 건강한 인간 공여자 CD4 및 CD8 고갈 PBMC를 해동하고 한 번 세척한 후 예열된 완전 RP10 배지 중 재현탁하였다. 1e+6개 세포를 24웰 플레이트에서 1 ml의 완전 RP10 배지 중 배양하였다. 인간 감마 헤르페스바이러스 4(HHV-4)(ATCC)의 상청액을 해동하고 250 μ l를 배양에 첨가하였다. 4일 후, 500 μ l의 기존 배지를 흡인하고 새로운 완전 RP10(500 μ l)을 첨가하였다. 세포가 증식하기 시작할 때까지 3~4일마다 배지를 교체하였다. 3주 후 세포가 증식하기 시작하여 배양 플라스크로 옮겼다. 바이알당 2e+6개 LCL을 동결시켰다.

[0455] 단계 A: 건강한 공여자 CD8 T 세포 활성화. 건강한 인간 공여자 CD8 T 세포를 해동하고 한 번 세척하여 예열된 완전 TCM + IL-2(60 IU/ml) 중 재현탁하였다. 세포를 2e6개 세포/ml로 희석하였다. CD8 T 세포를 자극하기 위해

Transact를 10 ul/ml(1/100 희석) 첨가하였다.

[0456] 단계 B: NY-ESO-1 TCR의 형질도입. 다음날, 자극 CD8 T 세포를 계수하고 1e+6개 세포를 1 ml의 TCM + IL-2 중 현탁하였다. NYESO1-TCR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터의 상청액(10 ul, MOI; 9.7) 및 LentiBoost A&B(각각 12.5 ul)를 현탁된 세포에 첨가하였다. 다음날 FACS에 의해 형질도입 효율을 결정하였다. 특히 7 ml의 TCM + IL-2를 첨가하여 바이러스를 희석하였다. 제7일에, 아래 표 6에 기재된 항체 혼합물을 사용하여 세포를 염색하고, 세포를 NY-ESO-1 TCR의 발현에 대해 분석하였다. 도 40을 참고한다.

표 6

NY-ESO-1 TCR 형질도입된 재생 T 세포에 대한 항체 혼합물 염색

물질	ul/시험
CD3-BUV805 (SK7)	0.5
CD4-PECy7 (RPA-T4)	0.5
CD8b-BV421 (2ST8.5H7)	0.5
PE-iTAg MHC 사탕채 HLA-A02:01 NY-ESO-1 고정형 생활성 염료 eFluor 780	1
BD 호라이즌 브릴리언트(Horizon Brilliant) 염색 완충액 플러스	5

[0457]

[0458] 단계 C: 재프로그래밍.

[0459] 자가 LCL의 미토마이신 C(MMC) 처리 및 NY-ESO-1 펩티드로의 펠싱. 자가 LCL을 해동하고, 1회 세척하고, 완전 RP10 배지 중 1주일 동안 배양하였다. 1e+7개 세포를 MMC(최종 농도 50 ug/ml)가 첨가된 2 ml의 예열된 완전 RP10 배지 중 재현탁하고 5% CO2 인큐베이터에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 후, 10 mL의 PBS를 첨가한 코니컬 튜브에 세포를 수집하였다. 세포를 회전 침강시키고 상청액을 흡인하였다. 그런 다음 세포를 완전 RP10 중 현탁하였다. 세포를 5% CO2 인큐베이터에서 2시간 동안 10 nM NY-ESO1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않고 완전 RP10 중 배양하였다. 2시간 후, 세포를 세척하고 TCM + IL-2 중 재현탁하였다.

[0460] Transact에 의한 NY-ESO-1 TCR 형질도입 T 세포 또는 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않고 펠싱한 자가 LCL의 활성화. 제2일에 단계 B(NY-ESO-1 TCR의 형질도입)로부터의 NY-ESO-1 TCR Tg CD8 T 세포를 계수하고, TCM + IL-2 중 재현탁하고 5e+5개 세포/웰을 24웰 플레이트에 시딩하였다. 4개의 상이한 조건을 시험하였다: 자극 없음, Transact(1/500 희석), NY-ESO-1 펩티드를 포함하지 않는 자가 LCL(1e+6개 세포(T 세포:LCL=1:2)) 및 NY-ESO-1 펩티드로 펠싱한 자가 LCL(1e+6개 세포(T 세포:LCL=1:2)). 다음날(제1일) Transact 활성화 T 세포를 수집하고, 10 mL PBS로 세척하고, 1 ml의 TCM + IL-2 중 재현탁하고, 배양에서 유지하였다. 자가 LCL과 공동 배양된 T 세포를 수집하고 T 세포를 EasySep™ 인간 T 세포 분리 키트를 사용하여 농축하고 TCM + IL-2 중 재현탁하고 배양에서 유지하였다. 도 41을 참고한다.

[0461] Cytotune 재프로그래밍 키트를 사용한 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 재프로그래밍. 제0일에, 각 조건으로부터 2.4e+5개 세포를 수집하고, 96 U형-바닥 플레이트에서 TCM + IL-2 중 재현탁하였다. 재프로그래밍을 위해 Cytotune 센다이 재프로그래밍 키트를 사용하였다(KOS: MOI=10, KLF4: MOI=10, c-myc: MOI=3 및 SV40: MOI=5). 다음날(제1일), 세포를 수집하고 줄기 세포 배양 배지 중 재현탁하고 iMatrix 코팅 6웰 플레이트에 시딩하였다(조건당 2개 웰). 제3일에 새로운 줄기 세포 배양 배지를 첨가하고 제5일에 배지의 절반을 새로운 줄기 세포 배지로 교체하였다(도 3a).

[0462] 단계 D: 부분적으로 재프로그래밍 NY-ESO-1 TCR Tg T 세포의 탈착 및 재자극.

[0463] 부분적으로 재프로그래밍 세포의 수집. 제7일에 부유 세포를 수집하고 웰을 PBS로 세척하고 TrypLE를 첨가하고 부착 세포를 탈착시켰다. 수집한 모든 세포(부유 세포 + 탈착 세포)의 세포수를 계수하였다. 그런 다음 모든 세포를 재활성화에 사용하였다.

[0464] 부분적으로 재프로그래밍 세포의 재자극. 이전에 Transact 또는 NY-ESO-1 펩티드를 포함하는 자가 LCL로 자극된

세포를 Transact 또는 NY-ESO-1 펩티드를 포함하는 자가 LCL로 재자극하였다. 자가 LCL은 이전에 기재된 바와 같이 MMC로 처리하고 NY-ESO-1 펩티드로 펠싱하였다. 비자극에 의한 1e+5개 세포/웰 Transact(1/500)/LCL P-/200 ul의 TCM + IL2 중 LCL P+(E:T=1:1)(96 U-형 바닥 플레이트). 제10일에 배지의 절반을 새로운 TCM + IL-2로 교체하였다. 제14일에 세포를 수집하고 1 ml의 새로운 TCM + IL-2 중 재현탁하고 24웰 플레이트로 옮겼다. 세포 계수 및 배지 교체는 제18일 및 제21일에 수행하였다.

[0465] 재생 T 세포의 표면 표현형 분석. 제14일에, 세포의 1/20을 표 6에 기재된 항체로 염색한 다음, FACS로 NY-ESO-1 TCR 사랑체 양성(TE+) 세포의 빈도에 대해 분석하였다.

[0466] 결과는 재프로그래밍 전 자가 LCL + NY-ESO-1 펩티드에 의한 TCR 자극이 제7일에 더 많은 부분적 재프로그래밍 세포를 생성함을 나타내었다. 약 60% NY-ESO-1 TCR 양성 세포를 함유하는 NY-ESO-1 TCR 형질도입 CD8 T 세포(도 40에 나타낸 바와 같음)를 상기 기재된 바와 같이 Transact 또는 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않는 자가 LCL에 의해 자극하였다. 제7일에, 세포를 수집하고(부유 세포 및 부착 세포 둘 모두) 계수하였다(도 41 및 42 참고). 제0일(센다이 바이러스 감염일)의 세포수와 비교하여 Transact 및 NY-ESO-1 펩티드를 포함하는 자가 LCL 자극 조건은 각각 5.5배 및 8.7배 세포수 증가를 나타낸 반면, 비자극 및 펩티드를 포함하지 않는 자가 LCL 조건에서 관찰된 변화 배율은 각각 0.62 및 1.6이었다. 자가 LCL은 EB 바이러스 항원을 발현하므로 EB 바이러스 특이적 T 세포는 펩티드를 포함하지 않고 자가 LCL과 공동 배양될 때 TCR 자극을 받을 수 있다.

[0467] 부분적 재프로그래밍 NY-ESO-1 Tg T 세포의 재자극은 NY-ESO-1 TCR+ 세포의 우선적 재생을 초래하였다. 제7일에, 부착 세포 및 부유 세포를 포함하는 부분적 재프로그래밍 세포를 수집하고 기재된 바와 같이 Transact® 또는 NY-ESO-1 펩티드를 포함하거나 포함하지 않는 자가 LCL로 재자극하였다. 제14일에, 세포의 1/20을 수확하고 상기 기재된 바와 같이 NY-ESO-1 사랑체를 사용하여 NY-ESO-1 TCR의 발현에 대해 분석하였다.

[0468] 사전활성화 및 재활성화 단계(즉, 제-2일 및 제7일) 둘 모두에서 TRANSACT로 비특이적으로 자극된 세포와 비교될 때, 어느 단계에서든 항원(LCL + NYESO1 펩티드)으로 자극된 T 세포는 1차 자극이 비특이적인지(TRANSACT 사용) 또는 항원 특이적인지(LCL+펩티드 사용) 여부와 무관하게(도 43 참고) NY-ESO-1 사랑체+ 세포 빈도가 더 높았다(도 43 및 도 44 참고, 78.6% 대 97% 또는 97.1%).

[0469] 재생 NY-ESO-1 Tg T 세포가 증식함. Transact 또는 펩티드를 포함하는 자가 LCL(Transact에 의해 1차 자극)에 의해 재자극된 부분적 재프로그래밍 T 세포를 제21일까지 기재된 바와 같이 배양하였다. 증식 곡선을 도 45에 나타낸다. NY-ESO-1 펩티드를 포함하는 자가 LCL로 재자극된 재생 T 세포뿐만 아니라 Transact로 재자극된 T 세포가 증식하였다.

[0470] **실시예 16: CD19-CAR T 세포의 재생**

[0471] 이 실시예는 CD19 CAR-T 세포를 제조하고 부분적 재프로그래밍 과정을 거친 후 증식 및 세포독성을 평가하였다. 재생 CD19 CAR T 세포는 이전에 NY-ESO-1 Tg CD8 T 세포로 나타낸 바와 같이 대조군에 비해 더 높은 증식을 나타내었다. 재생 CD19 CAR T 세포의 세포독성을 CD19를 발현하는 표적 세포(Nalm6)와의 반복적인 공동 배양에 의해 시험하였다. 반복된 공동 배양 후, 재생 CAR T 세포는 더 높은 지속성 및 세포독성을 나타내었다.

[0472] **물질 및 방법**

[0473] 단계 A: 건강한 공여자 CD8 T 세포 활성화. 건강한 인간 공여자 CD8 T 세포를 해동하고 한 번 세척하여 예열된 완전 TCM + IL-2(60 IU/ml) 중 재현탁하였다(제-3일). 세포를 2e6개 세포/ml로 희석하였다. CD8 T 세포를 자극하기 위해 Transact를 10 ul/ml(1/100 희석) 첨가하였다.

[0474] 단계 B: CD19-CAR의 형질도입: TRANSACT로 시뮬레이션한 다음날(제-2일), 자극 CD8 T 세포를 계수하고 3e+5개 세포를 1 ml의 TCM + IL-2 중 현탁하였다. CD19 CAR 및 절단된 EGFR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 통상적 방법을 사용하여 제조하였다. 바이러스 상청액(6 ul, MOI;) 및 LentiBoost A&B(각각 10 ul)를 활성화 세포에 첨가하였다. 다음날, 바이러스를 함유하는 0.7 ml의 배지를 제거하고 1.8 ml의 새로운 TCM + IL-2를 첨가하였다. CAR 형질도입 후 제5일에 아래 표 7의 항체 혼합물을 사용하여 세포를 염색하고, 개별특이형 항체 및 EGFR 항체에 의해 CAR의 발현을 분석하였다(도 46).

표 7

CD19 CAR 형질도입된 재생 T 세포에 대한 항체 혼합물 표면 염색

물질	ul/시험
CD62L-BUV395(DREG-56)	0.5
CD3-BUV805(SK7)	0.5
CD45RO-BV785(UCHL1)	0.5
CD8a-PE(HIT8a)	0.5
CD197(CCR7)-PE-CF594(150503)	0.5
CD4-PECy7(RPA-T4)	0.5
개별특이형-AF647()	1
CD45RA-AF700(HI100)	0.5
고정형 생활성 염료 eFluor 780	
BD 호라이즌 브릴리언트 염색 완충액 플러스	5

[0475]

[0476]

Cytotune 재프로그래밍 키트를 사용한 CD19 CAR Tg T 세포의 재프로그래밍. 제0일에 3e+5개 세포(공여자 #1) 또는 4e+5개 세포(공여자 #2)를 수집하고, 48웰 플레이트에서 TCM + IL-2 중 재현탁하였다. 재프로그래밍을 위해 Cytotune 센다이 재프로그래밍 키트를 사용하였다(KOS: MOI=10, KLF4: MOI=10, c-myc: MOI=3 및 SV40: MOI=5). 다음날 세포를 수집하고 줄기 세포 배지(StemFit) 중 재현탁하고 iMatrix 코팅 6웰 플레이트(2개 웰/조건)에 시딩하였다. 제3일에 신선 줄기 세포 배지를 첨가하고 제5일에 배지의 절반을 교체하였다. 대조군 세포를 TCM + IL-2 중 배양에서 유지하였다.

[0477]

단계 D: 부분적 재프로그래밍 CD19 CAR Tg T 세포의 재자극. 제7일에 부유 세포를 수집하고 웰을 PBS로 세척하고 TrypLE 효소를 첨가하고 부착 세포를 탈착시켰다. 수집한 세포(부유 세포 + 탈착 세포)를 계수하였다. 도 47을 참고한다. 5e+5개 세포를 DNA 연령 검사를 위해 -80C에서 보존하였다. 수확한 세포(공여자 #1 및 #2에 대해 각각 1.7e+6개 및 2.3e+6개)를 TCM + IL-2 중 Transact(1/500 희석)로 재자극하였다. 1e+6개 대조군 세포를 동일한 방식으로 자극하였다. 제10일에 배지의 절반을 새로운 TCM + IL-2로 교체하였다. 제13일 이후에는 3~4일마다 세포수 및 배지 교환을 수행하였다. 세포를 ml당 1~2e+6개 세포의 농도로 배양하였다.

[0478]

재생 T 세포의 FACS 분석. 제13일에 세포의 1/20을 표면 항체(TCF7-PB(C63D9), Cell Signaling Technology에서 상업적으로 이용 가능함)로 염색하고, 제조업체의 프로토콜에 기재된 바와 같이 Foxp3 염색 키트를 사용하여 고정 및 투과화하고, Tcf7 항체로 염색하고 FACS에 의해 분석하였다.

[0479]

재생 CD19 CAR Tg T 세포의 세포내 사이토카인 생산 검정. 제20일에 대조군 및 재생 CD19 CAR Tg T 세포를 CD19 항원 특이적 표적 세포와의 공동 배양 시 사이토카인을 생성하는 이의 능력에 대해 분석하였다. 5e+4개 T 세포를 1e+5개 Colo205(CD19-) 또는 Nalm6(CD19+) 세포와 1:2 E:T 비로 공동 배양하였다(도 49 참고). 표적 세포를 포함하지 않는 웰 및 PMA/이오노마이신(세포 활성화 각테일)을 포함하는 웰을 각각 음성 및 양성 대조군으로 첨가하였다. 5시간 후 공동 배양 세포를 표면 항체로 염색하고, 제조업체의 프로토콜에 기재된 바와 같이 BD 키트를 사용하여 고정 및 투과화하고 세포내 항체 혼합물로 염색하고(표 7) FACS(Cytek Aurora)로 분석하였다. 데이터는 Flowjo 소프트웨어로 분석하였다. 사용한 관문화 전략은 하기와 같다. 림프구 > 단세포 > 살아있음/사멸- > CD3+ EGFR+.

[0480]

단계 F: 순차적 자극을 사용하여 CAR-T 세포가 반복적으로 표적 세포를 제거하는 능력 검정.

[0481]

재생 CD19 CAR Tg T 세포의 순차적 사멸 검정. 제20일에 대조군 및 재생 CD19 CAR Tg T 세포를 순차적 자극을 사용하여 표적 세포를 사멸시키는 이의 능력에 대해 분석하였다. 대조군 및 재생 T 세포를 계수하였다. 50,000개 EGFR+ CAR T 세포를 폴리-D-라이신으로 코팅된 24-웰 플레이트에서 1:4 E:T로 20,000개 CD19+ 표적(Nalm6-NLR)과 공동 배양하였다. 3~4일마다 이전 배양의 25%(4차 및 5차 공동 배양의 경우 10%)를 초기 시딩 밀도로 플레이트링된 신선 표적 세포를 포함하는 새로운 플레이트로 옮겼다. 표적 제거는 Incucyte® 살아있는 세포 분석 시스템을 사용하여 정량하고 기본 소프트웨어 분석 모듈로 분석하였다.

[0482]

결과

[0483]

재생 CD19 CAR T 세포는 덜 분화된 표현형을 나타내었다. 상기 기재된 바와 같이 건강한 공여자 CD8+ T 세포를

활성화하고 CD19 CAR로 형질도입하고 7일 동안 재프로그래밍하고 탈착시키고 Transact에 의해 재자극하였다. 제 13일에 EGFRt의 발현에 의해 구별되는 재생 CD19 CAR 형질도입 T 세포는 더 높은 백분율의 CCR7+ CD62L+ 집단 및 Tcf1+ 집단을 가져서, 재생 CAR-T 세포가 덜 분화되고 더 줄기 유사 표현형을 가짐을 시사하였다(도 47 참고).

[0484] 재생 CD19 CAR T 세포는 대조군 CD19 CAR T 세포보다 더 많이 증식하였다. 대조군 및 재생 CD19 CAR Tg T 세포를 TCM + IL-2 중 배양하고 세포수를 정기적으로 모니터링하였다. 배지를 3~4일마다 교체하고, 세포 농도를 1~2e+6개/ml로 유지되도록 조정하였다. 재생 CD19 CAR Tg T 세포는 초기에 지연된 증식 속도를 나타내었으나, 제25일에 변곡점을 표시하였고, 그 후 제55일까지 재생 세포는 대조군에 비해 100배 이상 더 많은 증식을 나타냈다(도 48 참고).

[0485] 재생 CD19 CAR T 세포는 CD19 발현 표적 세포와의 공동 배양 시 필적하는 수준의 사이토카인을 생산하였다. 대조군 및 재생 CD19 CAR T 세포의 사이토카인(IL-2, TNF α , IFN γ)의 생산은 상기 기재된 바와 같이 이를 CD19를 발현하는 표적 세포(Nalm6) 또는 CD19를 발현하지 않는 표적 세포(Colo205)와 공동 배양하여 분석하였다. 대조군 또는 재생 CD19 CAR Tg T 세포는 대조군 Colo205 세포와의 공동 배양 시 사이토카인을 생산하지 않았다. 그러나 두 그룹 모두 Nalm6과의 공동 배양 시 IFN γ 를 제외하고 필적하는 수준으로 사이토카인을 생산하였다(도 49 참고). 특히, IFN γ 생산은 대조군에 비해 재생 세포에서 더 높았다.

[0486] 재생 CD19 CAR T 세포는 CD19 발현 표적 세포와의 반복된 자극(공동 배양) 시 대조군 세포보다 더 오래 표적 세포를 사멸시키는 이의 능력을 지속하고 유지하였다. 두 공여자 모두에서 재생 및 대조군 CAR T 세포는 4차 또는 5차 주기의 공동 배양까지 표적 세포를 효과적으로 사멸시키고 제거하였다. 그러나, 재자극 주기 6 및 7에서, 재생 세포는 더 우수한 세포독성 및 지속성을 유지한 반면 대조군 세포는 그렇지 않았다(도 50a 및 50b 참고). 종합적으로, 이들 연구는 부분적 재프로그래밍을 활용하는 재생 과정이 대조군 세포와 비교하여 더 줄기 유사 표현형, 더 높은 증식 능력, 더 높은 지속성 및 세포독성을 갖는 CD19 CAR T 세포를 생성하였음을 제시한다.

[0487] **실시예 17: mSev 대 Sev**

[0488] 이 실시예에서, 단일 멀티시스트론(즉, "mSev") 벡터로부터 4개의 야마나카 인자를 발현하도록 변형된 센다이 바이러스 벡터를 T 세포를 재생시키기 위해 사용하였고 이전 구현예에서 기재된 바와 같이 Cytotune 키트를 사용한 재생과 비교하였다.

[0489] 이전에 기재된 바와 같이, Cytotune-iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트(즉, "Sev")는 3개의 별도 바이러스 벡터를 함유한다: (Klf4, OCT4 및 SOX2를 암호화하는 KOS; cMyc; 재프로그래밍을 위한 Klf4. 일반적으로 SV40을 발현하는 추가적 센다이 바이러스(Sev)를 또한 아토포시스를 억제하고 재프로그래밍 효율을 증가시키기 위해 사용한다. Cytotune 키트를 사용하여 4개의 별도 벡터를 T 세포로 형질도입해야 한다. 아래에서 더 자세히 논의된 바와 같이 4개의 별도 바이러스로 형질도입하면 고르지 않은 공동 형질도입, 비효율적인 재프로그래밍을 초래하여 이후 제품에서 상당한 변형을 초래할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0490] 따라서, T 세포는 (a) 4개의 야마나카 인자를 발현하는(그러나 SV40은 발현하지 않음) 멀티시스트론 센다이 벡터 또는 (b) Cytotune Sev(+SV40)를 사용하여 본원에 기재된 재생 과정을 거쳤다.

[0491] 두 실험 그룹 모두 탈착 후 23일 동안 유사한 증식 곡선을 나타내었다. 멀티시스트론 센다이 그룹은 약간 더 높은 줄기성 T 세포 표현형(TCF1+CCR7+)을 나타내었다. 이러한 데이터는 재프로그래밍 효율을 증가시키는 SV40 없이도 멀티시스트론 센다이 벡터가 T 세포의 부분적 재프로그래밍 및 재생을 위해 사용될 수 있음을 시사한다.

[0492] 단계 A: T 세포 재생. 53세 남성(공여자 1) 및 55세 남성(공여자 2)으로부터의 CD8+ T 세포를 인간, T 세포 TransAct(Miltenyi Biotec, cat# 130-111-160)로 48-웰 플레이트에서 백만개 세포/mL의 세포 밀도로 60 IU/ml의 IL-2를 포함하는 T 세포 배양 배지 중 1:500으로 자극하였다. 이 실시예에서, 본 발명자들은 24시간의 활성화가 멀티시스트론 센다이 바이러스 벡터(mSev)를 사용하여 가장 효율적인 형질도입을 초래함을 발견하였다. TransAct로 26시간 동안 자극 후, 세포를 두 그룹으로 나누었다(즉, 제0일). 세포의 한 그룹은 Cytotune 키트(Sev 또는 "비교예 17")로부터의 센다이 바이러스 벡터를 사용하여 재생 과정을 거친 반면, 다른 그룹은 멀티시스트론 센다이 바이러스 벡터(mSev)로 재생시켰다. Sev 재생 그룹은 10 MOI의 Klf4-Oct3/4-Sox2, 10 MOI의 Klf4, 3 MOI의 cMyc(Cytotune iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트, Thermo) 및 5 MOI의 SV40으로 형질도입한 반면, MSev 그룹은 SV40을 포함하지 않고 야마나카 인자 4개를 모두 발현하는 5 MOI의 mSev로 형질도입하였다. 그런 다음 세포를 37°C에서 배양하였다. 16.5시간 후, 세포를 세척하고 줄기 세포 배지(SCM; bFGF를 포함하는 Stemfit Basic 04) 중 현탁하였다. 세포를 iMatrix-511(PEPROTEC cat# RL511S) 코팅 24-웰 플레이트에 50,000

개 세포/웰(제0일 계수에 상응함)로 플레이팅하고 37°C에서 배양하였다(즉, 제1일). 500 u1의 SCM을 제3일, 제5일, 제7일, 제9일에 첨가하였다. 1 ml의 SCM을 제7일에 흡입하였다. 재자극을 위해 두 그룹을 제7일, 제9일, 제11일에 1 ml의 TrypLE Express(Thermo cat # 12604013)를 사용하여 탈착시키고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 탈착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 1x10⁵개 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 5x10⁵개 세포/ml의 밀도로 200 uL의 T 세포 배양 배지 중 1:500 희석된 인간, T 세포 TransAct로 활성화하였다. 탈착 2일 후, 세포를 12-웰 플레이트로 옮기고 각 웰에 1 ml의 T 세포 배양 배지를 첨가하였다. 탈착 4일 후, 세포를 6-웰 플레이트로 옮겼다. 그 후, 세포를 6-웰 플레이트에서 IL2 60 IU/ml을 포함하는 T 세포 배양 배지로 배양하였다.

[0493] 단계 B: 유세포측정 분석. 세포를 형광 접합 항체 및 생존력 염료로 염색하였다(아래 표 8 참고). 세포 표현형은 Cytex Aurora에서 유세포측정으로 획득하였다.

표 8

염색을 위한 항체 및 생활성 염료

	형광	희석 인수	공급업체	Cat#
고정형 생활성 염료	eFluor 780	5:10000	Thermo	50-169-66
CCR7	PE CF594	3:100	BD	562381
CD3	BUV805	2.5:100	Thermo	612893
CD45RA	Alexa 700	2.5:100	BD	560673
CD45RO	BV786	1.25:100	BD	564290
CD8b(CD8 베타)	BV421	1:100	BD	742390
CD4	BUV496	1:100	BD	612937
CD62L	BUV395	0.3:100	BD	740301
TCF1/7	PE	1:100	Cell Signaling Technology	14456

[0494]

단계 C: DNA 추출 및 후생유전학적 분석

[0495]

PureLink Genomic DNA 미니 키트(Invitrogen, K182002)를 사용하여 동결 세포 펠릿에서 DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA를 메틸롬 분석의 기술적 복제를 위해 3개 튜브로 분할하였다. 샘플을 Illumina Infinium 어레이에 의한 후생유전학적 분석을 위해 AKES0gen, Inc로 보냈다. 피부 및 혈액 시계 값에 대해 문헌(AGING 2018, Vol. 10, No. 7, 1758-1774)에 기재된 바와 같이 호르바트 방법을 사용하여 CpG 메틸화 상태 데이터를 분석하였다.

[0496]

단계 D: 분석

[0497]

53세 및 55세의 2명의 남성 공여자로부터의 CD8+ T 세포를 Sev 또는 mSev로 형질도입하고, 탈착시키고, 제7일, 제9일 및 제11일에 재자극하였다(도 51 참고). 탈착 및 재자극 후, 통상적 T 세포 마커 CD3 및 CD8b는 탈착 및 재활성화 6일 후 재생 세포의 두 그룹 모두에서 완전히 회복되었다(도 52a 및 52b 참고).

[0498]

세포는 탈착 후 23일 동안 배양하였다.

[0499]

제7일(도 53a) 및 제9일(도 53b)에 탈착 세포의 경우, Sev 및 mSev 형질도입 그룹 모두 유사한 증식 곡선을 나타냈다. 제11일에 탈착 세포의 경우(도 53c), mSev 그룹이 더 높은 증식을 나타내었다. Sev 재프로그래밍이 탈착 시 더 큰 콜로니를 생성하고 mSev 그룹에서 측정된 수율보다 3~4배 더 높은 세포 수율을 초래함이 관찰되었다. mSev 그룹은 더 많은 콜로니를 가졌지만 콜로니가 더 작았다. 단일 이론에 얽매이지 않고, Sev 및 mSev 그룹 간 세포수 차이는 mSev 벡터로부터의 재프로그래밍 인자의 낮은 발현 수준 및 재프로그래밍 효율을 증가시키는 SV40의 부재에 의해 유발될 수 있는 것으로 여겨진다. 전반적으로, Sev 및 mSev 그룹의 증식 곡선이 유사하여, mSev 재프로그래밍 세포가 증식에 대해 유사하게 재생 능력을 획득했음을 시사한다.

[0500]

Sev와 mSev는 상이한 재프로그래밍 속도를 갖는 것으로 나타났다. 특히, 제11일 탈착 시(도 52a 및 52b 참고), Sev 그룹의 세포는 mSev 그룹보다 더 많은 CD3 및 CD8b 세포 표면 발현을 상실하였다(도 52a 참고). 이는 mSev 그룹에서보다 Sev 그룹에서 더 많은 세포가 복귀 불능 지점까지 재프로그래밍되어 Sev 그룹에서 TranAct에 반응하고 증식하는 세포를 더 적게 생성하였음을 제시한다. 이러한 데이터는 또한 mSev 벡터를 사용한 재프로그래밍이 Sev를 사용한 재프로그래밍보다 느리고 mSev 재프로그래밍이 충분한 T 세포 유래 부착성 세포의 형성 및 부분적 재프로그래밍 세포의 재생에 더 많은 시간을 필요로 함을 제시한다. 하나의 이론에 얽매이지 않고, 관찰된

[0501]

차이는 상기 논의된 바와 같이 멀티시스트론 벡터의 재프로그래밍 인자의 발현 수준 및/또는 SV40의 부재로 인해 유발될 수 있다. 재프로그래밍 인자의 발현을 증가시키기 위해 벡터를 변형하고/하거나 SV40을 첨가하면 원하는 재프로그래밍에 도달하는 데 필요한 일수를 감소시킬 수 있다.

[0502] 세포 표현형 측면에서, mSev는 CD3+CD8b+ 집단 중에서 더 많은 TCF1+CCR7+ 및 더 많은 CCR7+CD62L+ 집단을 나타냈고, 이는 mSev 그룹에서 더 줄기 유사 집단을 제시한다(도 54a 및 54ba 참고).

[0503] 호르바트 시계 분석에 의한 후생유전학적 연령 결정은 mSev로 일시적으로 재프로그래밍 T 세포가 탈착 제7일, 탈착 제9일 및 탈착 제11일에 대조군 세포에 비해 후생유전학적 연령이 감소됨을 나타내었다(도 55 참고). 도 55에 그래프로 나타낸 각 그룹에 대한 eAge 감소를 아래 하기 표 9에 요약한다:

표 9

탈착일	eAge 감소%		eAge 감소%	
	53 세 공여자		55 세 공여자	
	Sev	mSev	Sev	mSev
7	9%	0.89%	014%	9.7%
9	17%	7%	26%	7.79%
11	13%	6%	25%	8%

[0504] 표 9에 나타낸 바와 같이 mSev 그룹의 eAge 감소는 Sev 그룹에서 관찰된 감소보다 낮았다. 이러한 결과는 mSev 벡터가 재프로그래밍을 위해 더 오랜 시간을 필요로 한다는 점을 감안할 때 놀라운 일이 아니다. 위에서 논의된 바와 같이, 재프로그래밍 인자의 발현을 증가시키기 위해 벡터를 변형하면 일시적으로 재프로그래밍 T 세포의 eAge의 추가 감소를 초래할 수 있다.

[0505] 따라서, 이 실시예 및 수반되는 데이터는 멀티시스트론 센다이 벡터가 T 세포의 재생을 위해 사용될 수 있음을 제시한다.

[0506] **실시예 18: 재생 CD8+ T-세포의 트랜스크립톰 특성규명**

[0507] 이 구현예에서 단세포 및 벌크 RNAseq의 고차원 전사 분석을 사용하여 대조군 T 세포와 비교하여 재생 T 세포를 특성규명하였다. 요약하면, 클러스터링된 단세포 RNA-seq 데이터의 분석은 재프로그래밍 7일 후, 재생 T-세포가 대조군 T 세포와 매우 상이한 전반적 표현형을 가짐을 나타내었다. 부분적 재프로그래밍 세포의 대부분은 제7일에 4개의 야마나카 인자를 발현했지만, 제13일까지 형질도입된 야마나카 인자의 발현은 배경 수준이었다. 야마나카 인자 중 하나인 C-MYC의 발현이 제13일에 관찰되었으나, 이것이 내인성(즉, 형질도입되지 않은) C-MYC임이 확인되었다. 제13일까지 재생 세포는 전통적 T 세포 마커를 발현하지만 iPSC 유래 T 세포에서 전통적으로 보이는 림프구/골수 계통 마커는 발현하지 않는 T 세포로 되돌아갔다(Maeda 등 2016). 단세포 RNA-seq 결과는 벌크 RNA-seq 분석으로 확인되었다. 재생 세포에서 제7일과 제13일에 모두 여러 대사 유전자 세트의 농축이 나타났다. 요약하면, 전사 분석은 야마나카 인자 형질도입 후 제7일에 T 세포 부착성 세포가 상응하는 대조군 T 세포와 매우 상이함을 강조하였다. D13 후, 재활성화 후, 재생 세포는 야마나카 인자 발현을 상실하면서 T 세포 마커 및 대사 유전자 세트가 농축된 유전자를 발현한다.

[0508] T 세포 재생

[0509] 이 실시예에서, 4명의 공여자를 사용하여 2개의 독립적 실험을 수행하였다.

[0510] 첫 번째 실험에서는 54세 남성 공여자(공여자 번호 18698)의 CD8 양성 T 세포로 아래와 같은 재생 과정을 거쳤다. 세포를 두 그룹으로 나누었는데, 하나는 아래 기재된 바와 같이 재생시켰고 다른 하나는 대조군으로 사용하였다.

[0511] 두 번째 실험에서는 53세 남성 공여자, 55세 남성 공여자 및 50세 남성 공여자(각각 공여자 번호 11347, 12254 및 26221)로부터의 CD8 양성 T 세포로 같은 프로토콜을 거쳤다.

- [0513] 두 실험 모두에 대해 각 공여자의 CD8 양성 T 세포를 48웰 플레이트에서 백만개 세포/mL의 세포 밀도로 60 IU/ml의 IL-2를 함유하는 T 세포 배양 배지 중 1:500 희석으로 인간, T 세포 TransAct(Miltenyi Biotec,)로 자극하였다. TransAct로 24시간 활성화 후, 각 공여자의 세포를 2개 그룹으로 나누고, 한 그룹은 본원에 기재된 바와 같이 재생 과정을 거치고 다른 그룹은 대조군(센다이 벡터로 형질도입하지 않음)으로 사용하고 T 세포 배양 배지 중 배양하였다. 대조군은 사전활성화 단계에서 TRANSACT로 활성화하였고, IL2를 포함하는 TCM 중 배양한 후 부분적 재프로그래밍 세포를 재활성화하는 것과 동시에 TRANSACT로 재활성화하였다(제7일 탈착 후).
- [0514] 재생된 그룹에서, 4개의 야마나카 인자 및 SV40 함유 센다이 바이러스(SeV)를 Klf4-Oct3/4-Sox2 10 MOI, Klf4 10 MOI, cMyc 3 MOI(Cytotune iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트, Thermo) 및 SV40 5 MOI(ID Pharma, Tsukuba, Japan)로 형질도입하고(즉, 제0일), 이어서 37°C에서 배양하였다. 16시간 후, 세포를 세척하고 줄기 세포 배지(bFGF를 포함하는 Stemfit Basic 02, Ajinomoto Co., Tokyo, Japan)로 현탁하였다. 세포를 iMatrix-511(PEPROTEC) 코팅 24-웰 플레이트에 50,000개 세포/웰(0일 계수 50,000에 상응함)로 플레이팅하고 37°C에서 배양하였다(제1일). 제3일 및 제5일에 SCM 500 uI를 배양에 첨가하였다. 제7일에 T 세포 유래 부착성 세포를 0.5 ml의 TrypLE Express(Thermo)와 함께 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하여 세포를 배양 접시로부터 탈착시켰다. 이어서 탈착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 상청액 중 부유 세포도 수확하여 탈착 세포와 혼합하였다. 첫 번째 실험에서는 부유 세포는 세포수가 불충분하여 폐기하였다.
- [0515] 대조군 및 재생 샘플의 50만개 세포를 두 번째 실험에서 48-웰 플레이트에서 백만개 세포/ml의 밀도로 T 세포 배양 배지 500 uI 중 1:500 희석된 인간, T 세포 TransAct로 활성화하였다. 첫 번째 실험에서의 세포수는 낮은 세포수로 인해 48-웰 플레이트에서 364,050개/웰이었던 반면 대조군 및 재생 세포 둘 모두 동일한 밀도로 시딩하였다. 세포를 2개의 시점(제7일 및 제13일)에 획득한 샘플을 사용하여(제7일 탈착부터) 제13일까지 배양하고 트랜스크립톰 분석을 위해 아래 기재된 바와 같이 사멸 세포 제거를 거쳤다. 세포는 실험 1의 경우 제17일까지 및 실험 2의 경우 제29일까지 배양을 계속하도록 두었다. 첫 번째 및 두 번째 실험 모두에 대해 세포를 제7일 및 제13일에 계수하였다. 두 번째 실험을 위해 제18일, 제21일 및 제29일에 또한 세포를 계수하였다.
- [0516] 제조업체의 지침에 따라 EasySep 사멸 세포 제거(아넥신 V) 키트(STEMCELL technologies)를 사용하여 사멸 세포를 제거하였다. 샘플을 EasySep으로 2회 처리하여 생존력 세포 순도를 증가시켰다.
- [0517] 벌크 RNA-seq에 의한 T 세포의 전사 프로파일 분석
- [0518] 4명의 남성 공여자로부터의 재생 샘플 및 대조군 샘플 둘 모두로부터의 세포도 벌크 RNA-seq을 위해 제7일 및 제13일에 수집하였다.
- [0519] 각 수집 시점에서 세포로 사멸 세포 제거를 거치고(상기 기재된 바와 같이) 각 샘플로부터 대략 50,000개 세포를 MagMAX mirVana 총 RNA 단리 키트 프로토콜(Thermo Fisher Scientific)에 따라 제조한 용해 결합 혼합물 중 수집하고 처리 전까지 -80°C에서 보관하였다.
- [0520] Kingfisher Flex 시스템의 MagMAX mirVana RNA 키트를 사용하여 세포에서 총 RNA를 추출하고 -80°C에서 보관하였다. 2100 BioAnalyzer에서 Agilent RNA 6000 Pico 키트(Agilent)를 사용하여 RNA 품질 및 양을 평가하였다. Biomek i7 워크스테이션에서 자동화된 제조업체 프로토콜을 사용하여 SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA 키트(Takara Bio USA)를 사용하여 cDNA 생성을 위해 총 RNA 5 ng으로 mRNA 시퀀싱용 라이브러리를 제조하였다. 2100 BioAnalyzer에서 고감도 DNA 키트(Agilent)를 사용하여 cDNA 평가를 수행했으며, 150 pg의 전장 cDNA를 사용하여 Biomek i7 워크스테이션에서 자동화된 제조업체 프로토콜을 사용하여 Nextera XT DNA Library Prep 키트(Illumina)를 사용해서 시퀀싱용 바코드 라이브러리를 제조하였다. 품질 평가를 4200 TapeStation 시스템으로 DNA1000 ScreenTape 검정(Agilent)을 사용하여 수행하였다. 그런 다음 샘플에 걸쳐 바코드화 라이브러리를 등물풀에서 다중화하고 정제하여 NovaSeq 6000 시스템을 사용해서 시퀀싱하였다.
- [0521] 단세포 CITE-Seq 분석
- [0522] 단세포 CITE-Seq 데이터를 참조 게놈 및 디폴트 매개변수로 게놈 참조 컨소시움 인간 구축 38(GRCh38)을 사용하여 10X Cell Ranger 소프트웨어 버전 5.0.1(10X Genomics)을 사용해서 처리하였다. 참조 게놈에 형질도입된 야마나카 인자 서열 및 센다이 바이러스 골격으로부터의 제어 서열을 보충하였다. 세포-유전자 매트릭스를 R에서 Seurat 패키지(Hao 등 2021 참고)를 사용하여 추가 처리하였다. 세포 수준 품질 제어 및 이상값 제거는 미토콘드리아%, nCount_RNA, nFeature_RNA, nCount_ADT 및 해시태그 이중체에 대한 임계값을 시각적으로 선택하여 수행하였다. 4명의 남성 공여자로부터 수집한 재생 및 대조군 샘플 둘 모두로부터의 세포를 제7일 및 제13일 단세포 트랜스크립톰 분석을 위해 병합하였다. 필터링된 세포-유전자 매트릭스는 디폴트 10000으로 설정된

scale.factor 매개변수를 사용하여 'NormalizeData' 함수로 전반적으로 스케일링하였다. 각 공여자 샘플에 대해 세포 주기 이질성의 효과를 Seurat에서 'CellCycleScoring' 함수로 세포 주기 상 점수(G2M.Score, S.Score)를 계산한 후 함수에서 세포 주기 상 점수 및 미토콘드리아 판독%를 역행하여 교정하였다. 2개의 세포 주기 상 점수(0.25 초과)의 피어슨 상관 계수를 가진 중 어느 하나와 상관 관계가 있는 유전자는 세포 주기 이질성의 효과를 추가로 최소화하기 위해 선택된 속성에서 제외하였다. 미토콘드리아, 리보솜, TCR 및 IG 복합체 관련 유전자도 선택된 속성에서 제외하였다.

[0523] 가능한 배치 효과를 교정하고 공여자 이질성을 설명하기 위해 제7일 및 제13일에 각 공여자로부터의 데이터 세트를 처음 30개 정규 상관 분석 차원을 사용하여 'FindIntegrationAnchors' 및 'IntegrateData' 함수 호출과 조합하였다. 그런 다음 통합된 데이터를 스케일링하고 필터링된 속성을 사용하여 'RunPCA' 함수로 상위 30개 PC를 계산하였다. 그 후, Seurat의 'RunUMAP' 함수에 의한 균일 매니폴드 근사 및 투영(UMAP)을 사용하여 각 점이 세포를 표시하는 시각화를 위한 2차원 공간에 세포를 매핑하였다. Seurat의 'FindClusters' 함수를 사용하여 세포로 클러스터 분석을 거쳤다. CD8+ T 세포에서 단백질 발현 없이 RNA 발현을 사용하여 분석(UMAP, 클러스터링)을 수행했기 때문에 CITE-Seq 분석은 보고서에서 단세포 RNA-Seq 분석으로 지칭된이라고도 한다.

[0524] 단세포 표현형 평가

[0525] 단세포 클러스터링 분석 후 야마나카 인자를 코딩하는 마커 유전자의 발현 수준을 'FeaturePlots' 함수로 시각화하였다. 인간 유도 만능 줄기 세포 유래 세포에서 관찰된 통상적 및 비통상적 T 또는 B 세포 마커의 발현 (Themeli 등 2013, Maeda 등 2016)을 pheatmap 패키지(pheatmap CRAN)에서 구현된 히트맵 시각화로 평가하였다. 재생 세포에 대한 위(pseudo) 벌크 유전자 마커를 Seurat에서 'FindMarkers'를 사용하여 확인하였다. Seurat의 'AddModuleScore' 함수로 중요한 유전자 세트에 대해 양성인 세포를 시각화하였다.

[0526] 단세포 판독 정렬은 통합 게노믹스 브라우저(Integrative Genomics Browser)로 시각화하였다(예를 들어, Thorvaldsdóttir 등, 2013 참고).

[0527] 벌크 RNA-Seq 분석

[0528] 유전자 발현을 표준 처리 파이프라인을 사용하여 시퀀싱 데이터로부터 생성하였다. Trim_galore(Krueger-Github)를 어댑터 트리밍을 위해 사용하였고 STAR(예를 들어, Dobin 등 2013 참고)를 과발현된 야마나카 인자 서열 및 센다이 바이러스 골격으로부터의 제어 서열로 보충된 GRCh38 서열과 함께 컴파일링된 참조 게놈에 대한 정렬을 위해 사용하였다. 유전자 발현 정렬은 디폴트 매개변수를 사용하여 RSEM(예를 들어, Li and Dewey, 2011 참고)에 의해 수행하였다. 차등 분석은 DESeq2(Love 등 2014) 패키지를 사용하여 수행하였으며, 이로부터 발현의 log2 변화 배율(log2FC) 및 조정된 p 값(padj)과 같은 통계를 계산하였다. 대사 유전자 세트의 농축(MSigDB 버전 7, Subramanian 등 2005)을 clusterProfiler 패키지에서 구현된 'enricher' 함수로 수행하였다(예를 들어, Yu 등 2012 참고).

[0529] 재생 세포의 표현형 평가.

[0530] 4명의 남성 공여자로부터의 CD8 양성 T 세포를 재생 프로토콜에 따라 야마나카 인자 및 SV40로 형질도입하고(즉, 재생 세포) 각 시점에서 비형질도입 조건에 있는 상응하는 대조군과 비교하였다. 세포를 실험 1 및 2에서 각각 제17일 및 제29일까지 성장하게 두었다. 이전 실시예와 일치하는 도 56에 나타난 바와 같이, 재생 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 증식을 나타냈다.

[0531] 단세포 RNA-seq 분석은 4명의 공여자 모두(공여자 번호 18698, 11347, 12254 및 26221)로부터의 세포를 사용하여 제7일 및 제13일에 대조군 및 재생 세포로부터의 CD8+ T 세포에 대해 수행하였다. 벌크 RNA-seq은 상기 기재된 두 번째 실험에서 사용된 것과 동일한 샘플(즉, 두 번째 실험의 53세, 55세 및 50세 남성)로부터 수행하였다.

[0532] 7일의 부분적 재프로그래밍 종료 시 세포는 상응하는 대조군 T 세포와 상이한 표현형을 나타낸다. 단세포 RNA-seq UMAP 그래프는 재생 세포가 대조군 세포와 별도로 클러스터링됨을 나타내었다(도 57a 참고). 제7일에 2개의 재생 세포 클러스터가 존재하였고, 하나는 대부분의 세포가 야마나카 인자(OCT4, SOX2, KLF4 및 C-MYC)를 발현하고 또 다른 하나는 이들 인자에 대해 음성이었다(도 57a 참고). 제7일 후 외인성 재프로그래밍 인자의 하향조절이 단세포(도 57b 참고) 및 벌크(도 57c 참고) RNA-seq 데이터 둘 모두에서 관찰되었다. 주지할 것은 T-세포 상태로의 재유도 후 제13일에 cMYC을 발현하는 일부 단세포가 존재한다는 것이다(도 57b 참고, Myc로 표지된 패널). 본 발명자들은 재프로그래밍 후 C-MYC 발현이 형질도입된 C-MYC로부터가 아니라 주로 내인성임을 확인하였

다(도 57d). 제7일로부터의 단세포 RNA-seq 관독의 주요 정렬 피크는 엑손 1(데이터 범위, 0~66547)인 반면, 제 13일의 정렬 피크는 C-MYC의 5' UTR(데이터 범위 0~2596)로부터였다. 형질도입된 C-MYC은 엑손 1에서 시작하는 반면 내인성 cMYC은 5' UTR에서 시작할 것으로 예상되어 제7일에 나타난 C-MYC은 형질도입된 것인 반면 제13일에는 내인성임을 확인시켜준다. 이러한 데이터는 재생 T 세포가 탈착, 재현탁 및 활성화됨(제7일)까지 여전히 4개의 야마나카 인자를 발현하고 있음을 제시한다. 이들 인자의 외인성 발현은 제13일에 검출되지 않았다. 재생 T 세포가 여전히 C-MYC을 발현하고 있지만, 발현 기원은 내인성이다.

[0533] 그런 다음 재생 및 대조군 T 세포에서 계통 특이적 림프구/골수 마커 유전자의 발현을 단세포 및 벌크 RNA-seq 데이터 둘 모두에서 평가하였다(Themeli 등 2013, Maeda 등 2016). 제7일 탈착 재생 세포(예를 들어, T 세포 부작성 세포)는 CD3 및 CD8b의 감소된 발현을 나타내었다. 이들을 탈착시키고 자극한 후, T 세포 계통 마커는 제 13일에 재생 세포에서 완전히 회복되었다. 인간 iPSC 유래 T 세포 생성물에서 관찰된 것들(Themeli 등 2013, Maeda 등 2016)과 같이, 비정상적 NK, T 또는 B 세포 마커(예를 들어, NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4, KIR2DS4)의 비정상적 발현이 재생 T 세포에서는 관찰되지 않았다. 따라서, 본원에 기재된 부분적 재프로그래밍 방법을 사용하여 제조된 재생 T 세포는 비정상적 마커 NCAM1, NCR2, FCGR3A, KIR2DL4, KIR2DS4를 비정상적으로 발현하지 않았다.

[0534] 인간 iPSC의 통상적 성숙 T 세포로의 분화는 난제였으며 3D 오가노이드 배양을 사용하여 T 세포 분화에 필요한 질서 잡힌 수입 및 분화를 위해 적절한 환경의 제공이 관여하였다(Montel-Hagen 등, 2019). 또한 iPSC로부터의 T 세포의 분화는 비정상적 NK, T 또는 B 세포 마커를 발현하는 T 세포를 생성한다(Themeli 등 2013, Maeda 등 2016). 이 데이터는 부분적 T 세포 재프로그래밍 과정이 iPSC로의 시간 소모적 재프로그래밍 및 복잡한 T 세포 재분화 시스템의 사용을 피할 뿐만 아니라 놀랍게도 T 세포 활성화 후, 과정이 비정상적 마커를 발현하지 **않고**, 대조군 및 시작 T 세포와 비교하여 후생유전학적 연령이 감소하고 증식 능력이 증가한 T 세포를 발현함을 확인시켜주었다.

[0535] 그런 다음 재생 세포를 평가하여 이들이 제7일 및 제13일에 모두 상응하는 대조군 T 세포와 대사적으로 상이한 지 여부를 결정하였다. 산화적 인산화, 지방산 대사, 해당작용 및 저산소증에 해당하는 대사 유전자 세트가 제7일 및 제13일 재생 세포에서 유의하게 농축되었다(도 58a 참고). 이러한 대사 유전자 세트를 단세포 RNA-seq 데이터에 투영한 결과, 제7일에 재생 세포에서 해당작용 및 산화적 인산화 둘 모두가 농축됨을 시사하였다. 놀랍게도, 제13일까지 재생 세포는 높은 산화적 인산화 또는 높은 해당작용으로 이동하는 반면(도 58b 참고), 세포는 대조군 세포와 비교하여 전반적으로 이들 유전자 세트 모두가 여전히 유의하게 농축되었다.

[0536] 추가로, 재생 세포 및 상응하는 대조군 T 세포의 나이브 유전자 세트(Gattinoni 등, 2011 Nature Medicine 17(10):1290-1297)를 제13일에 평가하였다. 나이브 T 세포 표현형에 상응하는 유전자 세트가 제13일 재생 세포에서 농축되었다(도 59a 및 59b 참고). 또한, 상대적 T 세포 수용체 레퍼토리 다양성을 심슨 클론성에 의해 추정하였다(Wong 등 J. Immunology V:197. Pp 1642-1649). T-세포 레퍼토리 다양성을 0에서 1까지의 범위인 심슨 클론성 계측으로 추정하였으며, 여기서 0은 완전히 균일한 샘플을 나타내고 1은 모노클로날 샘플을 나타낸다. 증가된 TCR 레퍼토리 다양성을 시사하는 더 낮은 심슨 클론성이 대조군 T-세포와 비교하여 제7일 및 제13일에 재생 샘플에서 관찰되었다(도 75 참고).

[0537] 따라서, 이 실시예의 재생 T 세포는 대조군 세포와 비교하여 더 높은 대사 활성화와 연관된 유전자 발현이 농축되었다. 이 실시예의 데이터는 또한 재생 T 세포가 에너지를 사용하고 증식에 필요한 뉴클레오티드를 합성하는 데 더 적합함을 제시하고 대조군과 비교하여 재생 세포에서 관찰된 현저하게 증가된 증식 능력을 추가로 설명한다. 산화적 인산화 및 해당작용 유전자 세트 둘 모두의 농축은 체세포를 iPSC로 재프로그래밍하는 동안 대사 변화와 연관되며(예를 들어, Nishimura 2019 Int. J. Mol. Sci. 20:2254; doi:10.3390/ijms20092254 참고) 재생 세포가 완전히 만능 iPSC 단계로 재프로그래밍하지 않고 일부 줄기 세포 관련 품질을 획득했을 수 있음을 제시한다. 더욱이, 재생 T 세포는 나이브 T 세포 표현형에 상응하는 유전자 세트가 농축되고 증가된 폴리클론성을 갖는다. 종합하면, 데이터는 본원에 기재된 재생 과정이 차용 세포 치료법 치료에서 사용하기 위한 개선되고 유리한 특성을 갖는 T 세포를 생성함을 제시한다.

[0538] **실시예 19: 재생이 중앙 침윤 림프구에서 T 세포 줄기성 특성을 향상시킴**

[0539] 이 실시예에서, TIL을 표 10에서 아래 주지된 바와 같은 차이를 포함하여, 실시예 11에 기재된 바와 같은 과정을 사용하여 여러 상이한 중앙 유형(폐 샘암종, 결장직장암, 간암, 흑색종, 간으로의 결장직장 암종 전이)으로부터 재생시켰다.

- [0540] 종양 샘플을 협동 인간 조직 네트워크(CHTN)에서 조달하였다. TIL을 신선 단리하고 1) CD45+ 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 대한 자기 비드 분리에 의해 농축하여 직접 사용하거나; 2) CD45+ 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 대한 자기 비드 분리에 의해 농축한 후 1일 또는 2일 동안 TransAct(1:500)로 활성화하거나; 3) 6000 IU/ml IL-2를 포함하는 배지 중 5~17일 동안 단리 및 증식시켰다. 종양 샘플이 작았으므로, 재생 과정을 위한 충분한 세포를 생성하기 위해 농축 및/또는 증식이 필요하였다. 사전활성화 단계에서 TIL을 아래 표 10에 개략된 바와 같이 하기 중 하나에 의해 활성화하였다:
- [0541] 1) TransAct(달리 주지되지 않는 한 1:500 희석; 특정 실험에서는 1:2000 희석을 사용하였음. 두 희석 간에는 유의한 차이가 주지되지 않음);
- [0542] 2) 본질적으로 하기와 같이 제조한 자가 종양 오가노이드와의 공동 배양: 종양 단편을 얼음 위에서 잘게 다지고 PBS로 세척하고 얼음 상에서 매트릭겔(Matrigel)로 포매하여 동당 약 20 ul로 6웰 플레이트에서 동을 형성하였다. 37°C에서 20분 동안 고화한 후 동에 2 mL IntestiCult™ 오가노이드 성장 배지(인간)(Stemcell Technologies)를 오버레이하였다. 종양 절편을 잘게 다질 수 없는 경우 콜라게나제 IV(200 IU/mL; (Worthington Biochemical Corporation)를 사용하여 조직을 37°C에서 30분 동안 소화시킨 후 세척 및 포매하거나 자가 종양 세포주를 4-1BB+ 세포로 FACS 분류하였다.
- [0543] 그런 다음 TIL을 하기와 같이 재생시켰다. 사전활성화 단계로부터의 TIL을 Klf4-Oct3/4-Sox2 10 MOI, Klf4 10 MOI, cMyc 3 MOI(Cytotune iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트, Thermo) 및 SV40 5 MOI로 형질도입하였다. 그런 다음 세포를 37°C에서 배양하였다. 약 16시간 후, 세포를 세척하고 줄기 세포 배지(SCM; bFGF를 포함하는 Stemfit Basic 02)로 현탁하였다. 세포를 iMatrix-511(PEPROTEC) 코팅 24-웰 플레이트에 약 50,000개 세포/웰(제0일 세포수에 상응함)로 플레이팅하고 37°C에서 배양하였다(제1일). 제7일에 TIL을 효소(1 ml의 TrypLE Express(Thermo))로 탈착시키고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 탈착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 1E5개 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 5x105개 세포/ml의 밀도로 60 IU/mL IL2로 보충된 200 ul TCM 중 1:500 희석된 인간, T 세포 TransAct로 활성화하였다. 연관된 도면(도 60, 62, 64 및 68)에서 주지된 바와 같이 30일만 큼 오래 다양한 시점에서 세포수를 취하였다. 줄기성과 연관된 표면 마커(CD62L, CCR7, TCF7)의 발현을 도 61, 63 및 65에 주지된 날짜에 유세포측정에 의해 측정하였다. 이전 시점에서는 종종 표현형을 평가하기 위한 세포수가 충분하지 않았음을 주지한다.
- [0544] 실험 6의 경우, 후생유전학적 연령 결정을 하기와 같이 수행하였다: PureLink Genomic DNA 미니 키트(Invitrogen, K182002)를 사용하여 동결 세포 펠릿으로부터 DNA를 추출하였다. 추출된 각 DNA를 메틸롬 분석의 기술적 복제를 위해 3개 튜브로 분할하였다. 샘플을 Illumina Infinium 어레이에 의한 후생유전학적 분석을 위해 AKES0gen, Inc로 보냈다. CpG 메틸화 상태 데이터를 피부 및 혈액 후생유전학적 시계 값에 대해 문헌((1) Horvath Genome Biology 2013, 14:R115; (2) doi:10.1371/ journal.pone.0014821]에 기재된 바와 같이 호르바트 방법을 사용하여 분석하였다(도 66 및 도 67 참고).
- [0545] 도 60 내지 68에 나타낸 바와 같이, 이 실시예로부터의 데이터는 TIL을 본원의 방법을 사용하여 재생시킬 수 있다는 이전에 실시예 11에서 개략되고 도 27에 나타낸 결과 및 결론을 확인시켜주며 데이터는 폐 샘암종, 결장직장암, 간암, 흑색종 및 간으로의 결장직장암 전이를 포함하는 몇몇 상이한 종양 유형으로 연장할 수 있다. 결과는 재생 TIL이 향상된 증식 능력, 줄기성과 연관된 표현형 마커의 발현 증가 및 후생유전학적 연령 감소를 나타내었음을 나타낸다.
- [0546] 경시적으로 증식과 함께 줄기성 표현형 마커의 향상된 발현이 감소하고 후생유전학적 연령이 점차 증가하는 반면, TIL은 일반적으로 고갈되고 말단 분화되며 증식하기 어렵다. 향상된 증식 능력, 줄기성과 연관된 표현형 마커의 증가된 발현 및 재생 과정 후 후생유전학적 연령 감소를 획득하는 TIL의 능력은 재생 과정이 차용 세포 치료법 적용에서 TIL의 치료 가능성을 개선하기 위해 사용될 수 있음을 제시한다.

표 10

표 10: 여러 종양 유형으로부터의 TIL의 재생 요약

Expt	공여 자 번호	연령/ 성별	종양 유형	TIL 단리/증식	사전-활성화	증식*	도면(제공 되는 경우)
1	1	66/M	폐 샘암종	6000 IU/mL IL2	-TransAct -종양 오가노이드와 공동배양; 4- 1BB ^{hi} 분류	+++ ++	도 61a 도 27 도 61b [†]
1	2	58/M	간에 대한 CRC 충족	6000 IU/mL IL2	TransAct -종양 오가노이드와 공동배양; 4- 1BB ^{hi} 분류	- +++	도 60b 도 61b [†]
2	3	85/M	결장	-6000 IU/mL IL2 -신선 단리됨; CD45 농축됨	TransAct	+++ +++	도 62 도 63 [†]
3	4	61/M	흑색종	6000 IU/mL IL2	TransAct 1:500(고) TransAct 1:2000(저)	+	도 64 도 65 [†]
4	1	66/M	폐 샘암종	6000 IU/mL IL2	TransAct	+	나타내지 않음
4	2	58/M	간에 대한 CRC 충족	6000 IU/mL IL2	TransAct	+	나타내지 않음
4	5	71/M	간	6000 IU/mL IL2	TransAct	+	나타내지 않음

[0547]

표 10: 여러 종양 유형으로부터의 TIL의 재생 요약

Expt	공여자 번호	연령/성별	종양 유형	TIL 단리/증식	사전-활성화	증식 ^a	도면(제공되는 경우)
4	6	52/F	간에 대한 CRC 증착	신선 단리됨; CD45 농축됨	TransAct	+	나타내지 않음
4	4	61/M	흑색종	6000 IU/mL IL2	종양 세포주와 공동배양; 4-1BB ^b 분류	+	나타내지 않음
5	7	61/M	간에 대한 CRC 증착	신선 단리됨; CD45 농축됨	TransAct	+++	나타내지 않음
5	3	85/M	결장	6000 IU/mL IL2	TransAct	+++	나타내지 않음
5	8	83/F	결장	6000 IU/mL IL2	TransAct	++	나타내지 않음
6	7	61/M	간에 대한 CRC 증착	6000 IU/mL IL2	TransAct	+	도 66 ^c 도 68
6	9	73/M	결장	6000 IU/mL IL2	TransAct	+	도 67 ^c 도 68

^a+++ 대조군보다 유의하게 더 우수함; ++ 대조군보다 더 우수함; + 대조군에 필적함; -증식하지 않았음

^b줄기성 표현형 분석;

^c호르바트 시계 후생유전학적 연령(eAge) 분석

[0548]

[0549]

실시예 20: mSev를 사용한 종양 침윤 림프구 재생

[0550]

이 실시예에서, 실시예 17에 기재된 바와 같이 4개의 야마나카 인자(SV40 없음)를 암호화하는 멀티시스트론 센다이 벡터(mSev)를 사용하여 TIL을 재생시켰다.

[0551]

52세 및 83세 여성 공여자(공여자 6 및 8; 표 10 참고)로부터의 TIL을 얼음 위에서 기계적 해리에 이어 약 30 내지 약 90분 동안 효소적 소화에 의해 종양 샘플로부터 단리하고 직접 사용하거나(즉, "벌크") CD45+ 면역 세포(예를 들어, T 세포)에 대한 자기 비드 분리에 의해 농축한 후 TransAct로 증식시켰다.

[0552]

공여자 8(83세 여성)의 경우 TIL을 6000 IU/ml의 IL-2를 포함하는 T 세포 배양 배지 중 배양하여 증식시키고 1 개월 동안 증식시켰다. 형질도입 전 사전활성화 단계를 위해 TIL을 인간, T 세포 TransAct(Miltenyi Biotec)로 1일 동안 1:500 희석으로 활성화하였다. 이어서 사전활성화 TIL을 SV40 없이 4개의 야마나카 인자를 발현하는 5 MOI의 mSev로 형질도입하였다. 그런 다음 세포를 37°C에서 배양하였다.

[0553]

약 16시간 후, 세포를 세척하고 줄기 세포 배지(bFGF를 포함하는 Stemfit Basic 02)로 현탁하고 iMatrix-511(PEPROTEC) 코팅 24-웰 플레이트에 웰당 50,000개 세포(제0일 계수에 상응함)로 플레이팅하고 37°C에서 배양하였다(즉, 제1일).

[0554]

제11일에, 37°C에서 10분 동안 인큐베이션된 1 mL의 TrypLE Express(Thermo)를 사용하여 T 세포 유래 부착성 세포를 탈착시켰다. 이어서 탈착 세포를 피펫팅으로 수확하였다. 1x10⁵개 세포를 96-웰 둥근 바닥 플레이트에서 5x10⁵개 세포/mL의 밀도로 200 µl의 T 세포 배양 배지 중 1:500 희석된 인간, T 세포 TransAct로 활성화하였다. 탈착 2일 후, 세포를 12-웰 플레이트로 옮기고 각 웰에 1 mL의 T 세포 배양 배지를 첨가하였다. 탈착 4일 후, 세포를 6-웰 플레이트로 옮겼다. 그 후, 세포를 6-웰 플레이트에서 T 세포 배양 배지로 배양하였다. 제14일 및 제18일에 세포를 형광 집합 항체로 염색하고 생존력 염료 및 세포 표현형을 Cytex Aurora에서 유세포측정으로 획득하였다.

- [0555] 제14일 및 제18일에, mSev 재생 세포는 CD3+ 집단 중 더 높은 TCF7+CCR7+ 집단을 나타냈고, 이는 대조군보다 mSev 그룹에서 더 줄기 유사 집단을 제시한다(도 69a 및 69b 참고).
- [0556] 따라서 이 실시예는 mSev 벡터를 TIL의 재생을 위해 사용할 수 있음을 시사한다.
- [0557] **실시예 21: 재생 T 세포의 마커로서의 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$**
- [0558] 이 실시예에서 인테그린 $\alpha 6\beta 1$ 이 세포 부착 및 덜 분화된 표현형(들)에 기여할 수 있는 T 세포 부착성 세포에 대한 마커일 수 있는지 여부를 평가하였다.
- [0559] 인테그린은 세포 부착에 관여되는 가장 중요한 단백질 중 하나이다. 이중이량체 막형단 단백질은 액틴 세포골격을 세포의 기질에 결합시켜 세포를 세포의 기질과 연결한다. 이들은 세포 부착 분자뿐만 아니라 세포 증식 및 생존을 조절하는 세포내 신호전달을 전파하는 수용체로도 작용한다. 본원에 기재된 T 세포의 부분적 재프로그래밍의 중요한 특징은 초기 상에서 기질 코팅 플레이트에 대한 세포 부착이며, 이는 부분적 재프로그래밍 T 세포가 세포 부착 분자, 즉 인테그린을 발현함을 제시한다(예를 들어, www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26867/ 참고). iPS 세포에서 가장 우세한 인테그린 복합체는 인테그린 $\alpha 6\beta 1$ 이다(예를 들어, Nishiuchi 등, Matrix Biology 2006, 25(3):189-197 참고). 인테그린 $\alpha 6\beta 1$ 은 라미닌-511에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 이 실시예에서 세포의 기질로 사용하였고 인간 만능 줄기 세포의 배양을 위해 사용하였다(예를 들어, Miyazaki T. 등 Nat Commun (2012) 3, 1236 참고).
- [0560] 물질 및 방법
- [0561] 단계 A: T 세포 재생
- [0562] 49세 여성 공여자로부터의 CD8 양성 T 세포를 48-웰 플레이트에서 백만개 세포/1 ml로서 60 IU/ml의 IL2를 포함하는 T 세포 배양 배지(TCM) 중 1일 동안 인간, T 세포 TransAct(Miltenyi Biotec, cat# 130-111-160)로 자극하였다. 이 실시예에서 사용한 모든 TCM은 60 IU/ml IL2를 함유하였다. 24시간 활성화 후 형질도입을 수행하였다.
- [0563] 센다이 바이러스를 17시간 동안 Klf4-Oct3/4-Sox2 10 MOI, Klf4 10 MOI, cMyc 3 MOI 및 SV40 5 MOI(Cytotune iPS 2.0 센다이 재프로그래밍 키트, Thermo)로 형질도입한 다음, 세척하고 IL2를 포함하지 않는 줄기 세포 배지(SCM)(bFGF를 포함하는 StemFit Basic02, Ajinomoto) 중 현탁하였다.
- [0564] 세포를 iMatrix-511(PEPROTEC cat# RL511S) 코팅 24-웰 플레이트에 5만개 세포/웰로 플레이팅하였다(제0일 계수 5만에 상응함).
- [0565] 단계 B: 부분적 재프로그래밍 T 세포 탈착
- [0566] 제10일에, 부분적 재프로그래밍 T 세포를 3개 그룹으로 나누었다. SCM을 제거한 후 TCM 1 ml을 첨가하고 P1000 피펫으로 2회 재현탁한 다음 수확하여 약부착 세포로 지칭하였다. 1 ml TCM을 사용한 강력한 피펫팅에 의해 수확한 탈착 세포를 부착 세포로 지칭하였다. 강부착 세포는 재조합 효소인 TrypLE Express(Thermo cat# 12604013)와 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하여 탈착시켰다. 세포를 생존력에 대해 및 CCR7, CD3, CD45RA, CD45RO, CD8b, CD4, CD62L, CD49f, CD29, TCF1/7의 검출을 위해 형광 집합 항체로 염색하였다. 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 은 각각 CD49f 항체 및 CD29 항체로 검출하였다. TCF1의 세포내 염색을 위해 세포를 Foxp3 염색 완충액 세트(Thermo, 00-5523-00)로 고정하고 투과화하였다. 세포 표현형은 Cytex Aurora에서 획득하였다.
- [0567] 분석 및 결과
- [0568] 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 은 활성화 T 세포(즉, 대조군)보다 재생 세포에서 더 높게 발현된다. 제10일에, 탈착 세포를 제-1일에 활성화되고 10일 동안 TCM 중 배양한 활성화 T 세포와 비교하였다. 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 발현은 활성화 T 세포 대조군에서보다 T 세포 유래 부착성 세포에서 더 높았다(도 70). 탈착 세포 중 강부착 세포는 부착 세포, 특히 약부착 세포보다 더 높은 백분율의 인테그린 $\alpha 6$ (CD49f) 및 인테그린 $\beta 1$ (CD29) 이중 양성 세포를 나타내었고, 이는 인테그린 복합체 발현 수준이 부착 세기와 관련이 있음을 제시하였다.
- [0569] 제10일에 T 세포 활성화에 이어 TCM 중 배양 후, 인테그린 발현 수준은 활성화 대조군 세포에서의 발현 수준을 향해 감소하였다(도 71).
- [0570] T 세포 표현형 및 증식. CD3는 T 세포의 가장 일반적인 마커이고 CD8은 세포 독성 T 세포에 대한 마커이다. CD3+CD8+ 집단은 약부착 세포, 부착 세포 및 강부착 세포에서 제10일에 감소했지만, 이 집단은 제17일까지 증가

하였다(도 72). 강부착 세포가 제10일에 CD3+CD8+ 발현을 거의 완전히 상실한 것을 감안할 때, CD3+CD8+ 집단의 재출현을 나타내는 제17일 결과는 CD3- 또는 CD8- 집단(T 세포 유래 부착성 세포 집단)이 T 세포 배양 조건에서 T 세포 활성화 및 성장에 의해 T 세포 마커 발현을 재획득함을 확인시켜주었다. 강부착 세포에서 제10일에 관찰된 CD3+CD8- 집단(도 72 참고)이 CD8 발현을 재획득하는 집단에 상응하는지 여부는 이 실험으로부터 불명확하다. 약부착 세포, 부착 세포 및 강부착 세포는 제10일에 T 세포 활성화 후 더 많은 증식을 나타내었다(도 73). 강부착 세포는 탈착 직후 천천히 증식했지만, 결국 반응하여 대조군 세포보다 더 많이 증식하였다.

[0571] 덜 분화된 표현형. TCF1 및 CCR7은 덜 분화된 T 세포의 잘 알려진 마커이다. 강부착 세포는 제10일 및 제17일에 모두 활성화 대조군보다 TCF1 및 CCR7의 더 높은 발현을 나타낸 반면, 부착 세포 및 약부착 세포는 두 시점 모두에서 활성화 대조군에 대해 TCF1의 필적하는 발현 및 CCR7의 더 높은 발현을 나타냈다(도 74).

[0572] 요약: 제10일에 탈착된 T 세포 부착성(즉, 부분적으로 재프로그래밍된) 세포가 활성화 T 세포보다 높은 인테그린 $\alpha 6$ 및 인테그린 $\beta 1$ 의 더 큰 발현을 나타냄이 관찰되었다. 제10일에 활성화에 이어 T 세포 조건에서 배양한 후 발현 수준이 감소하였다. 플레이트에서 탈착시키기 위해 효소 소화가 필요했던 강부착 세포에서는 발현 수준이 더 높았다. 발현은 효소 없이 피펫팅에 의해 플레이트로부터 탈착될 수 있는 약부착 세포에서 더 낮았다. 이는 인테그린 발현 수준이 세포 부착 세기와 관련될 있음을 제시하였다. 모든 부착 세포 그룹(약부착 세포, 부착 세포 및 강부착 세포)은 제10일 활성화 후 높은 증식을 나타냈다(도 73 참고). 강부착 세포는 탈착 직후 천천히 증식했지만 결국 반응하여 강력한 증식을 실증하였다. 강부착 세포는 또한 제10일 및 제17일에 높은 TCF1 및 CCR7 발현을 나타내어 줄기 유사 표현형을 시사하였다. 높은 인테그린 $\beta 1$ 발현은 잠재적으로 재생 T 세포의 덜 분화된 표현형에 기여할 수 있는(예를 들어, Clin Cancer Res, 2010 Oct 1;16(19):4695-701 참고) 신호전달을 통한 β -카테닌 발현의 상향조절을 유발할 수 있었다(예를 들어, Yuzuriha 등, Stem Cell Res. 2021 May;53:102287 참고).

[0573] 인용된 참고문헌

[0574] Dobin 등 2013 Bioinformatics Vol. 29 P:15-21

[0575] Feng, B., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Heng, J.C., Chan, Y.S., Yaw, L.P., Zhang, W., Loh, Y.H., Han, J., 등 (2009). *Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb*. Nat Cell Biol 11, 197-203.

[0576] Gurusamy, D., Henning, A.N., Yamamoto, T.N., Yu, Z., Zacharakis, N., Krishna, S., Kishton, R.J., Vodnala, S.K., Eidizadeh, A., Jia, L., 등 (2020). *Multi-phenotype CRISPR-Cas9 Screen Identifies p38 Kinase as a Target for Adoptive Immunotherapies*. Cancer Cell 37, 818-833 e819.

[0577] Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada S., Klotzle, B. Bibikova, M., Fan, J., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, Tr., Zhang, K., 2013, *Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates*. Mol. Cell. 49, 359-369.

[0578] Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, Felton S, Matsuyama M, Lowe D, Kabacik S, Wilson JG, Reiner AP, Maierhofer A, Flunkert J, Aviv A, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Ferrucci L, Matsuyama S, Raj K. (2019) *Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies*. Aging, 10(7):1758-1775.

[0579] Hao 등 2021 Cell Vol. 184 P:3573-3587

[0580] Haynes 등 2012 Semin Immunol Vol. 24 P:350-355

[0581] Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., 등 (2013). *Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds*. Science 341, 651-654.

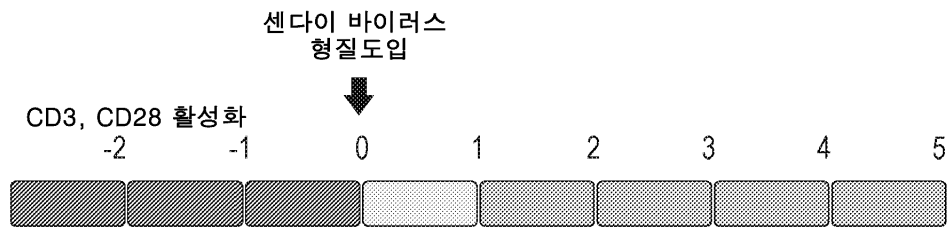
[0582] Im, S.J., Hashimoto, M., Gerner, M.Y., Lee, J., Kissick, H.T., Burger, M.C., Shan, Q., Hale, J.S., Lee, J., Nast, T.H., 등 (2016). *Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy*. Nature 537, 417-421.

[0583] Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015). *T-cell exhaustion in the tumor microenvironment*. Cell Death Dis 6, e1792.

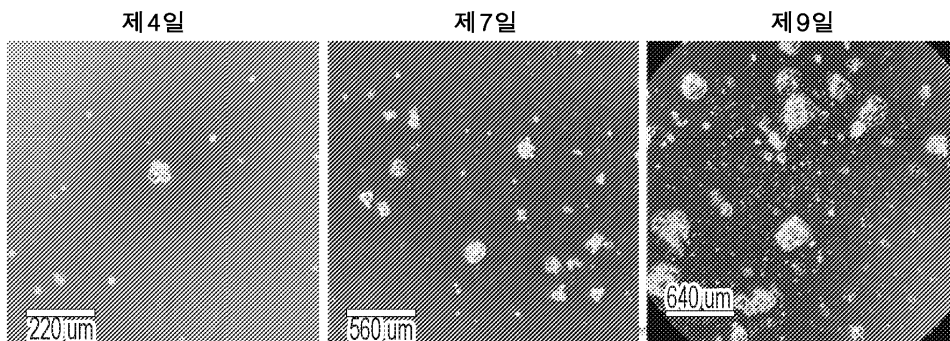
- [0584] Kochenderfer, J.N., Wilson, W.H., Janik, J.E., Dudley, M.E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S.A., Maric, I., Raffeld, M., Nathan, D.A., Lanier, B.J., 등 (2010). *Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19*. *Blood* 116, 4099-4102.
- [0585] Kruger 등 TrimGalore package obtained from github[dot]com/FelixKrueger/TrimGalore
- [0586] Levine M.E., Lu, A.T., Quach, A., Chen, B.H., Assimes, T.L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A.A., Stewart, J.D., Li, Y., Whitsel, E.A., Wilson, J.G., Reiner, A.P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., Horvath, S., 2018, *An epigenetic biomarker for aging for lifespan and healthspan*. *Aging*, 10(4):573-591.
- [0587] Li and Dewey 2011 BMC Bioinformatics Article No. 323
- [0588] Love 등 2014 Genome Biology Article No. 550
- [0589] Maeda 등 2016 Cancer Res Vol. 76 P:6839-6850
- [0590] Moffett, H.F., Coon, M.E., Radtke, S., Stephan, S.B., McKnight, L., Lambert, A., Stoddard, B.L., Kiem, H.P., and Stephan, M.T. (2017). *Hit-and-run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers*. *Nat Commun* 8, 389.
- [0591] Nikolich-Zugich 2008 Nat Rev Immunol Vol.8 P:512-22
- [0592] Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., 등 (2016). *In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming*. *Cell* 167, 1719-1733 e1712.
- [0593] Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., 등 (2011). *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. *Clin Cancer Res* 17, 4550-4557.
- [0594] Sarkar, T.J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C.M., Chu, C.R., Horvath, S., Qi, L.S., 등 (2020). *Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells*. *Nat Commun* 11, 1545.
- [0595] Subramanian 등 2005 PNAS Vol. 43 P:15545-15550
- [0596] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell* 131, 861-872.
- [0597] Themeli 등 2013 Nat Biotech Vol. 31 P: 928-933
- [0598] Thorvaldsdóttir 등 2013 Briefings in Bioinformatics Vol. 14 P:178-192
- [0599] Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S., Koseki, H., and Kawamoto, H. (2013). *Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells*. *Cell Stem Cell* 12, 31-36.
- [0600] Vizcardo, R., Klemen, N.D., Islam, S.M.R., Gurusamy, D., Tamaoki, N., Yamada, D., Koseki, H., Kidder, B.L., Yu, Z., Jia, L., 등 (2018). *Generation of Tumor Antigen-Specific iPSC-Derived Thymic Emigrants Using a 3D Thymic Culture System*. *Cell Rep* 22, 3175-3190.
- [0601] Vodnala, S.K., Eil, R., Kishton, R.J., Sukumar, M., Yamamoto, T.N., Ha, N.H., Lee, P.H., Shin, M., Patel, S.J., Yu, Z., 등 (2019). *T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism*. *Science* 363(6434):eaau0135.
- [0602] Yu 등 2012 OMICS Vol: 16 P: 284-287

도면

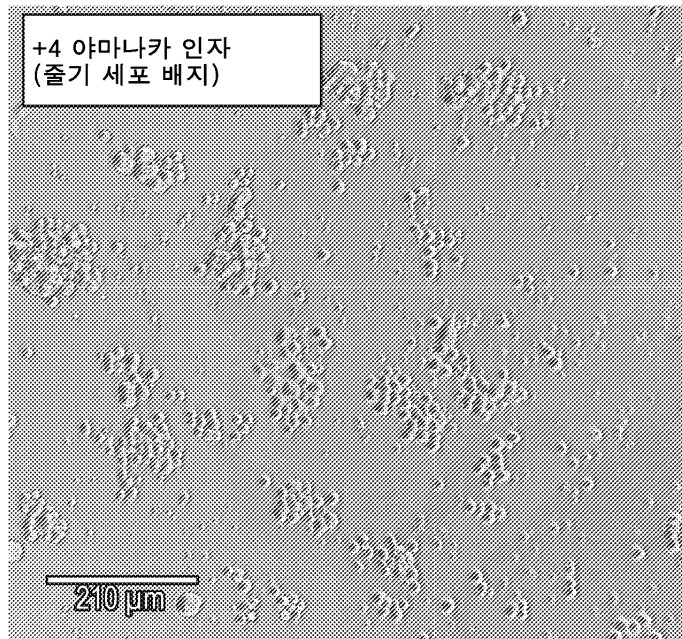
도면1



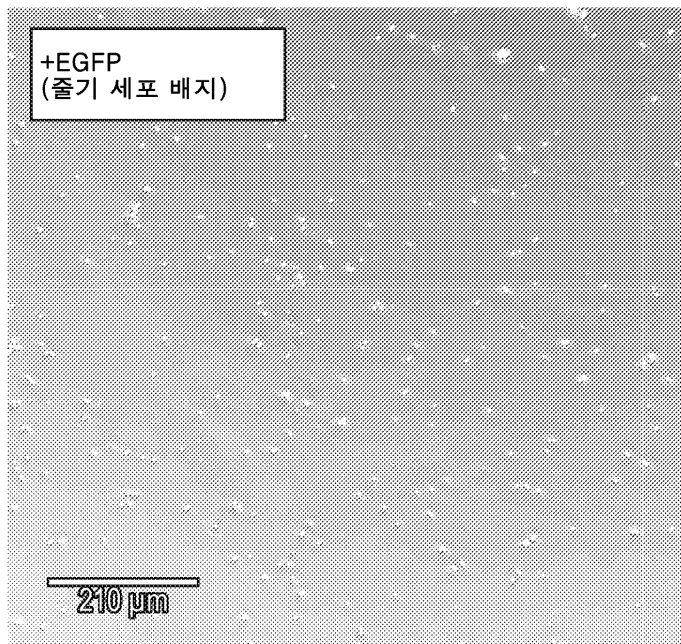
도면2



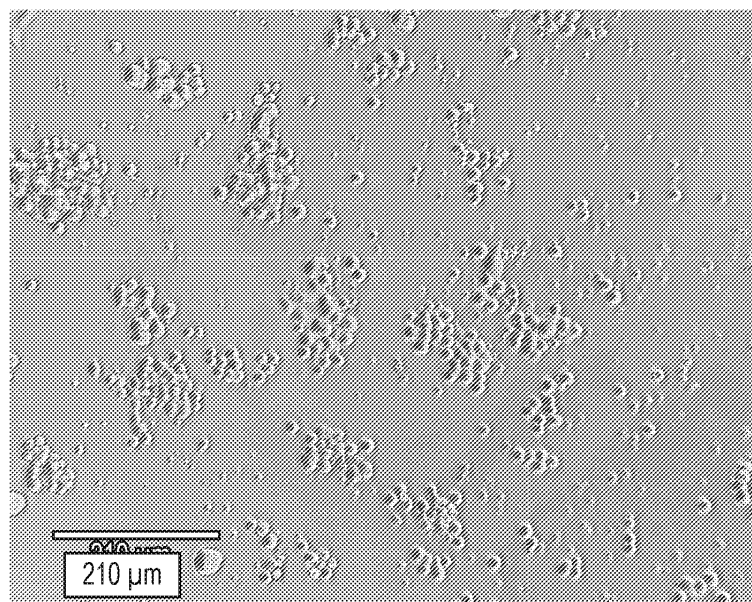
도면3a



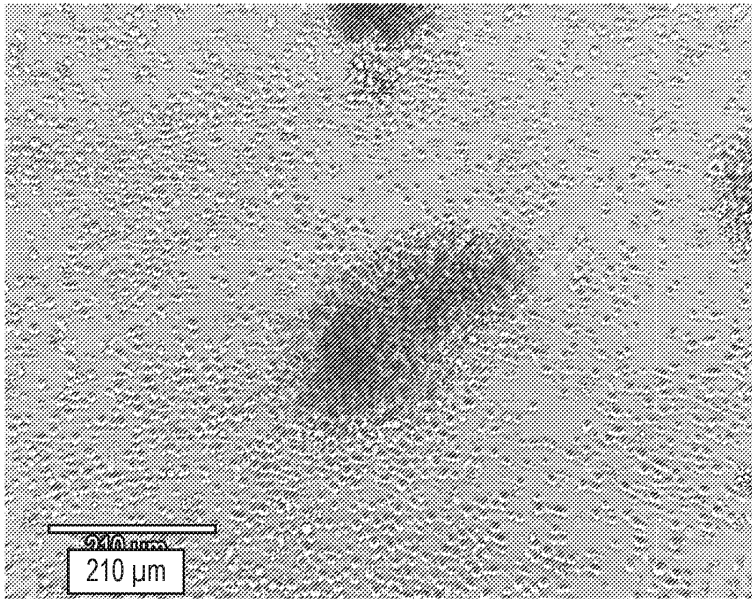
도면3b



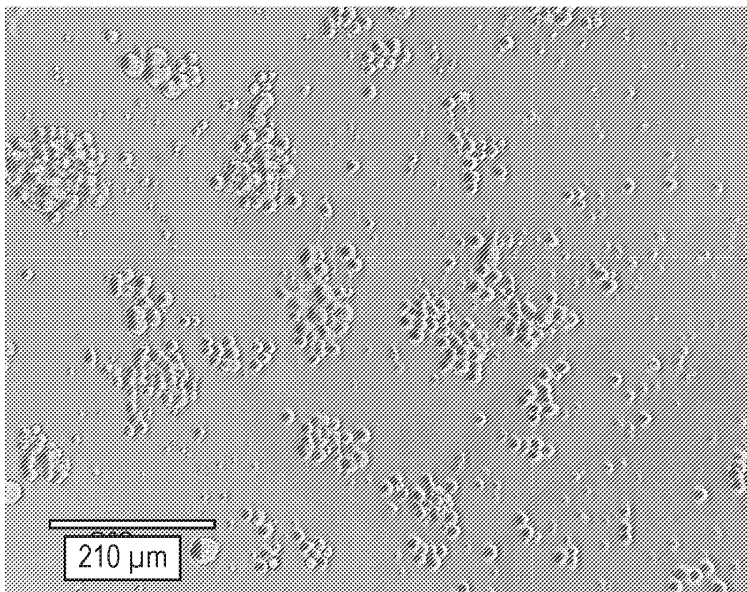
도면3c



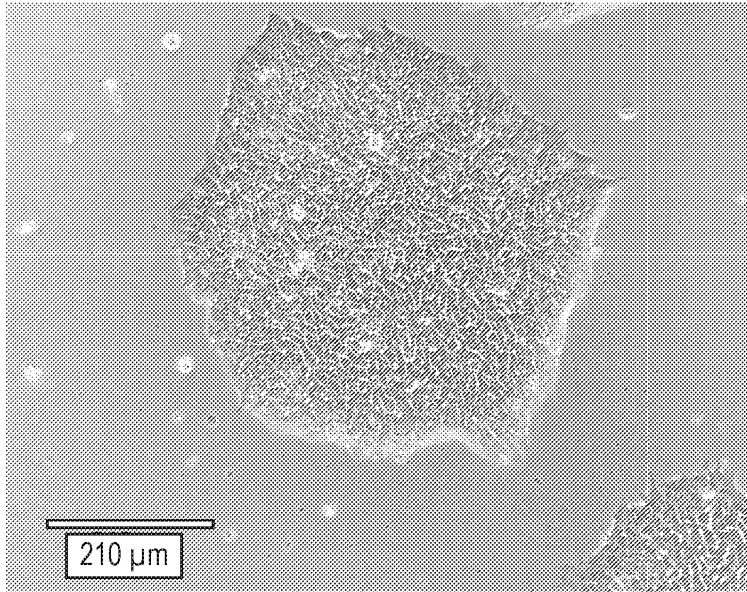
도면3d



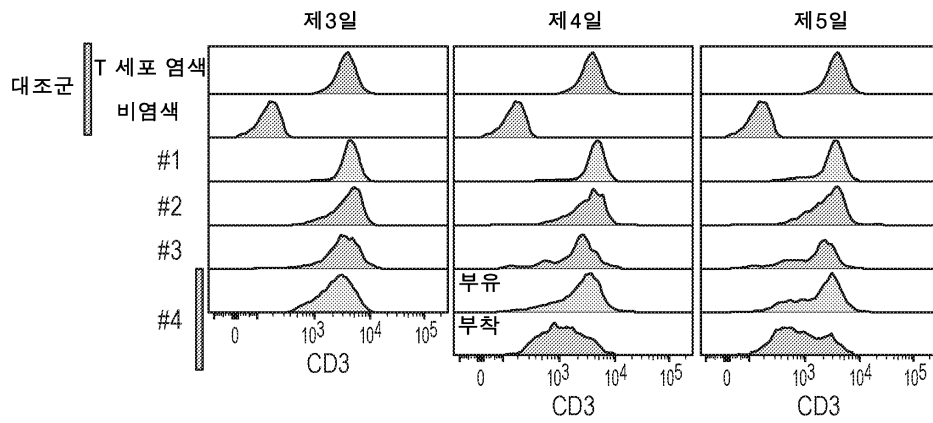
도면3e



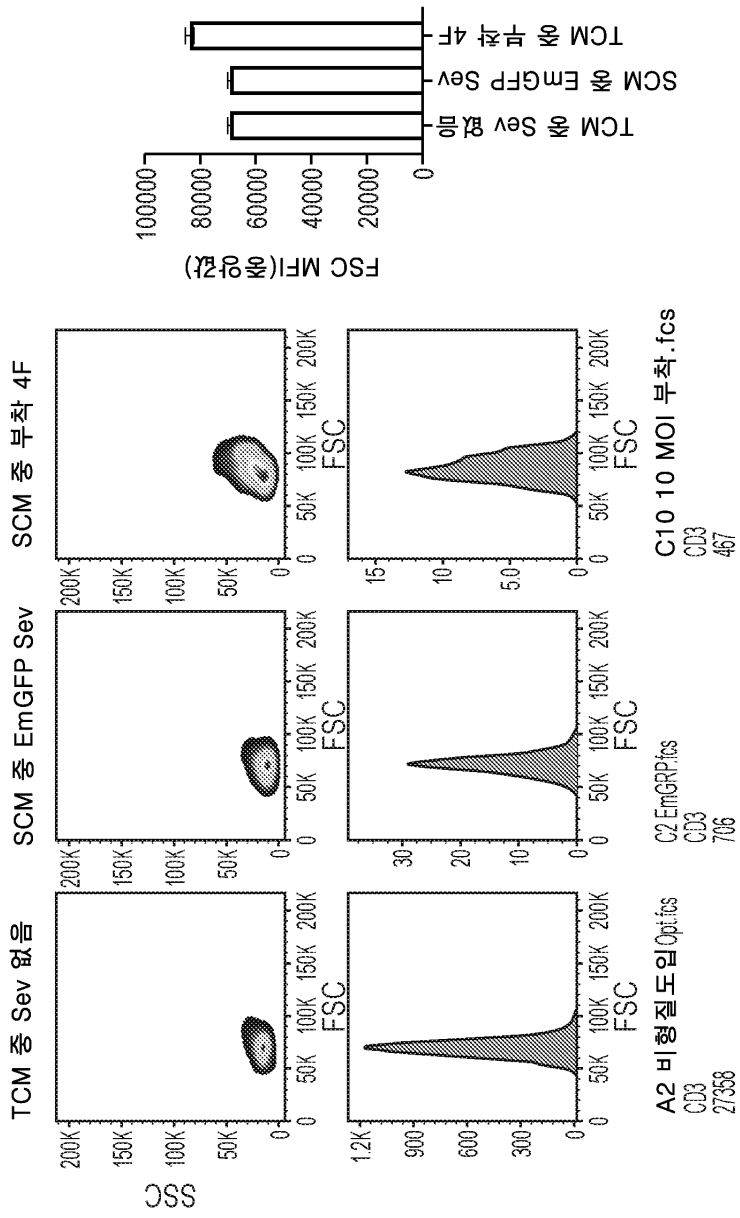
도면3f



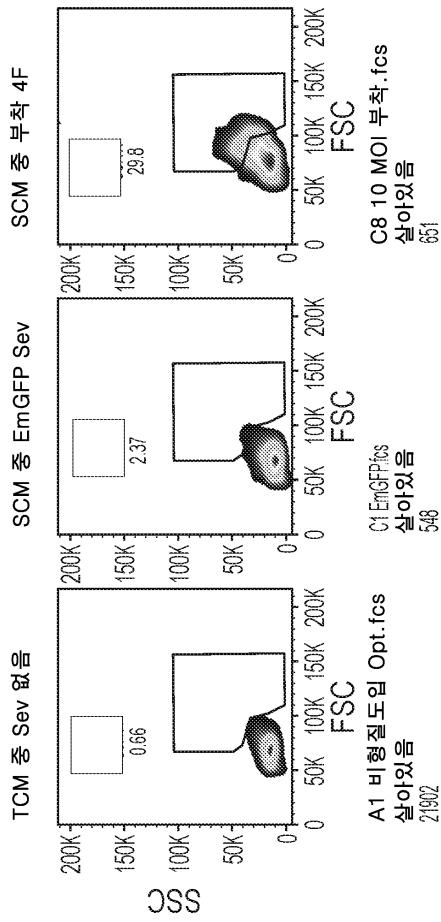
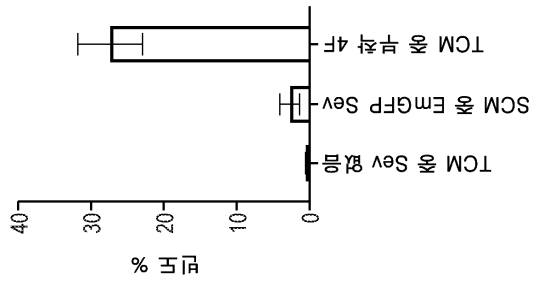
도면4



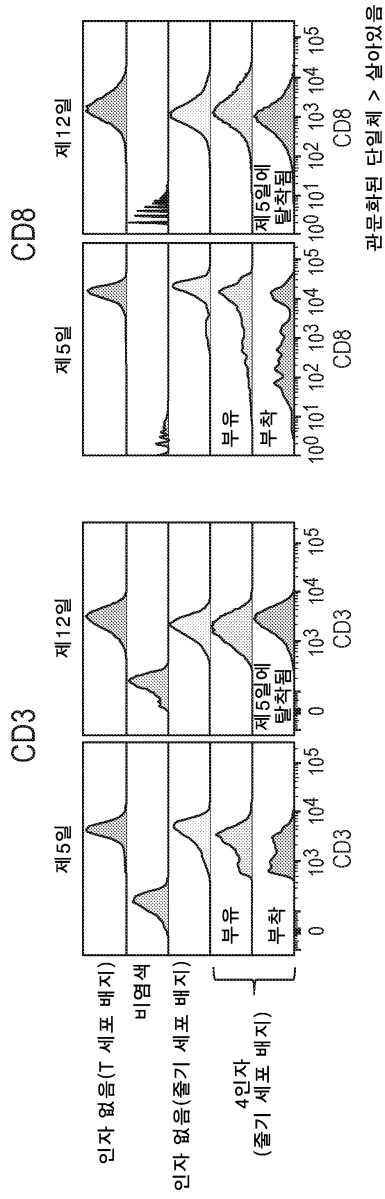
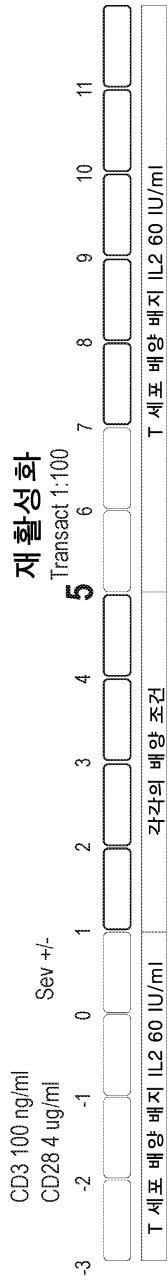
도면5



도면6

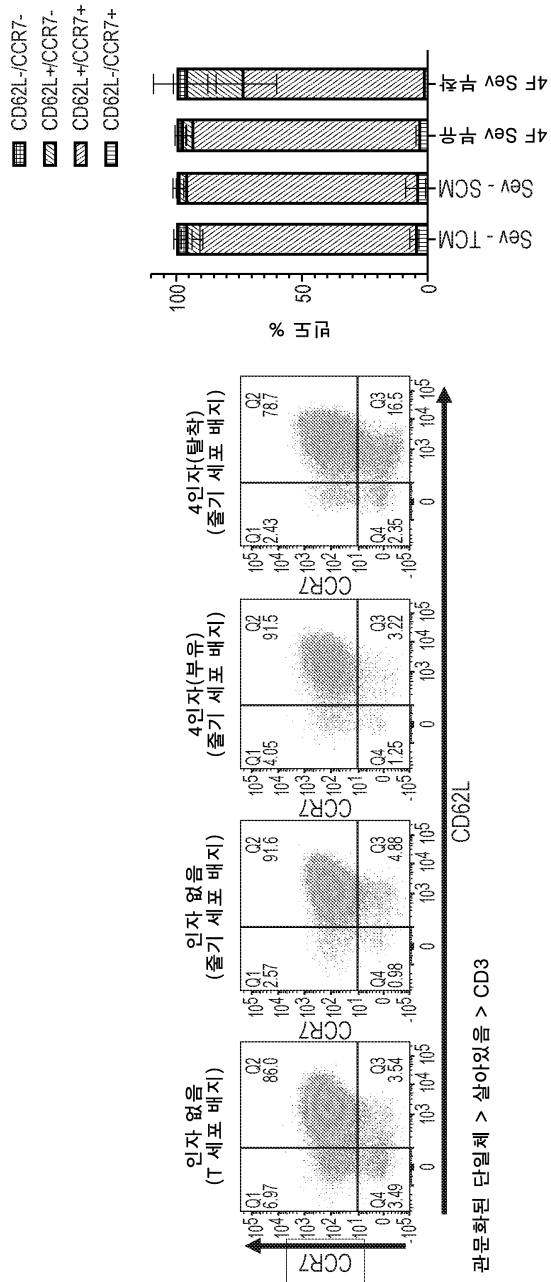


도면7

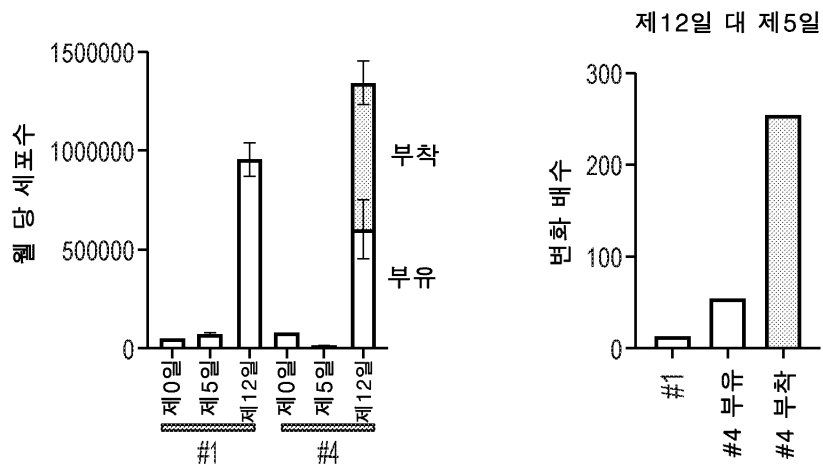


관문화된 단일체 > 살아있음

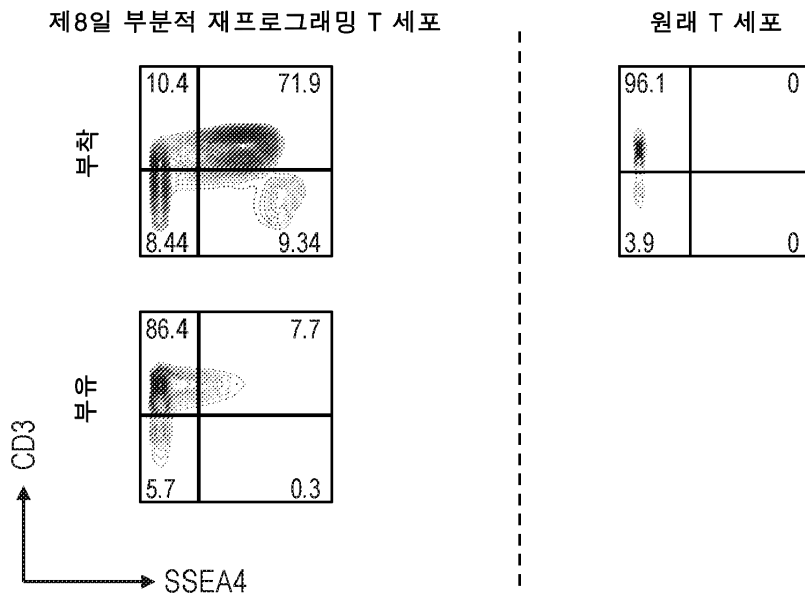
도면8



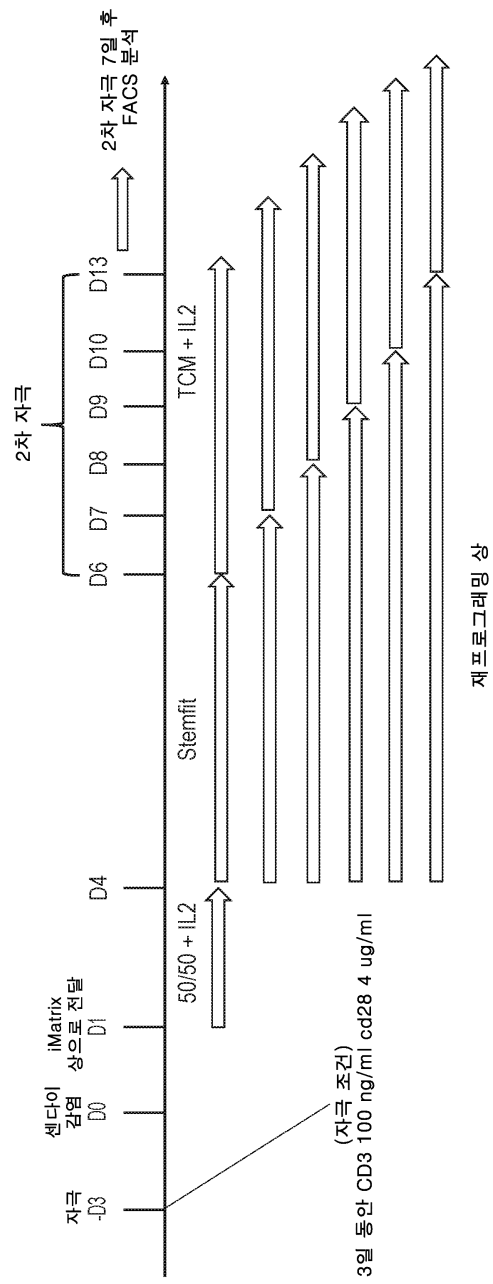
도면9



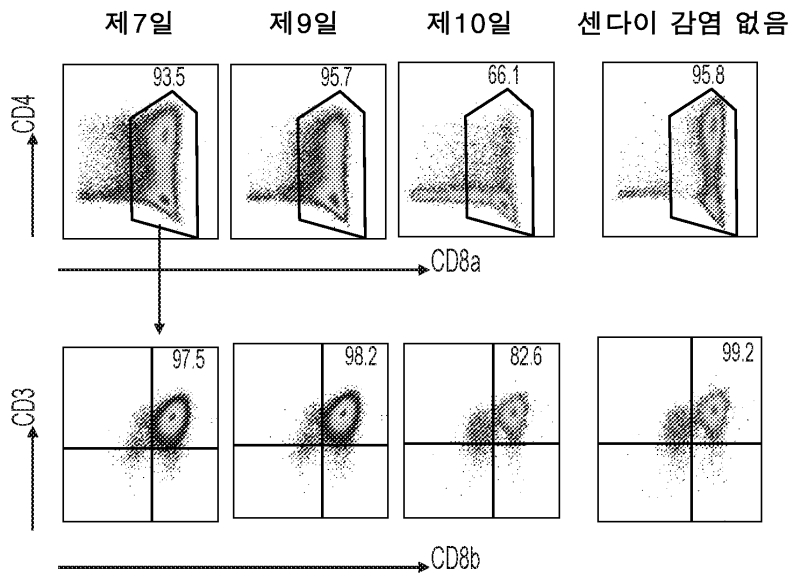
도면10



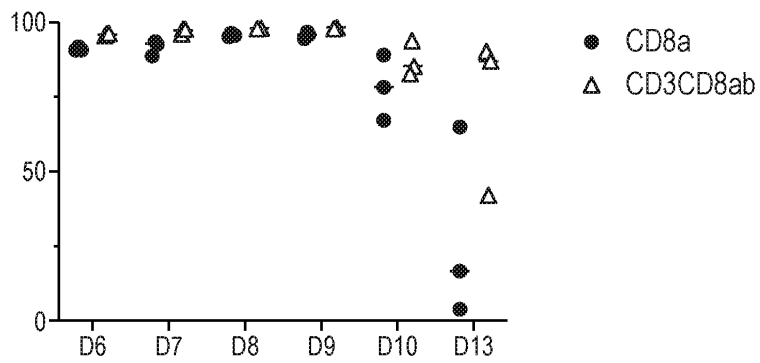
도면11



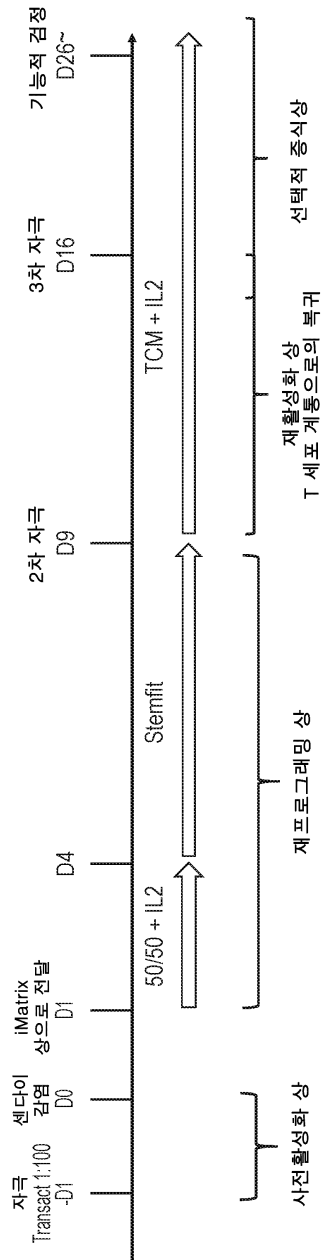
도면12a



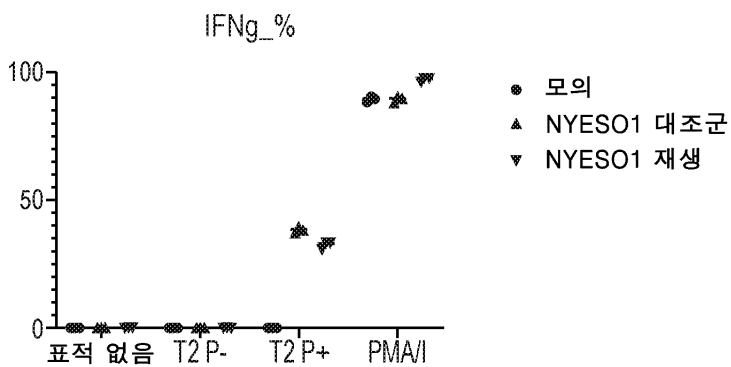
도면12b



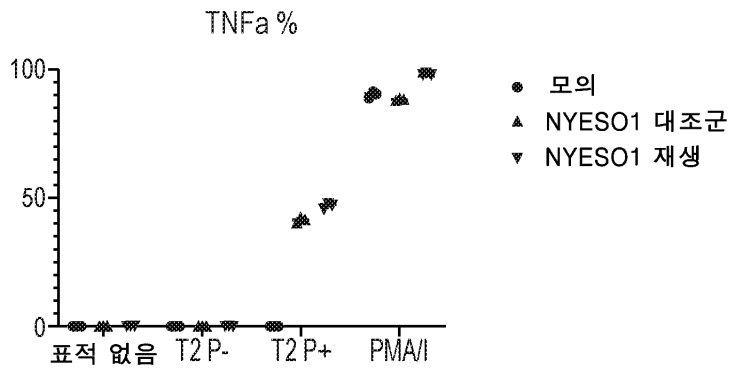
도면13



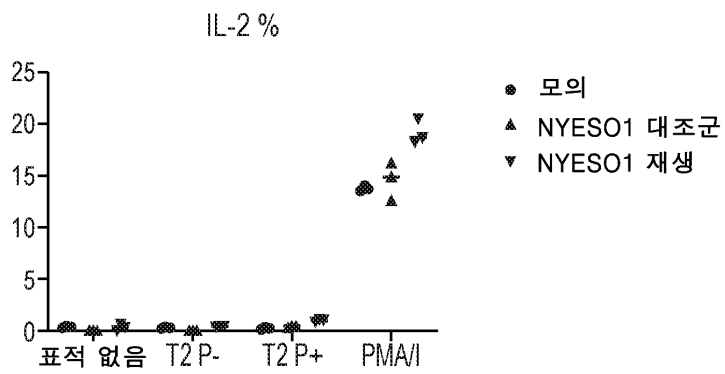
도면14a



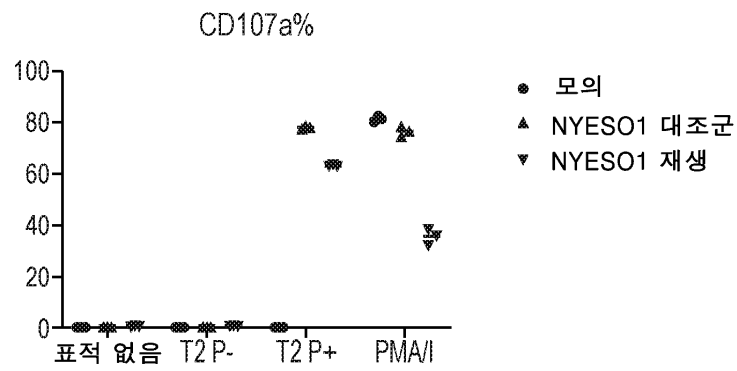
도면14b



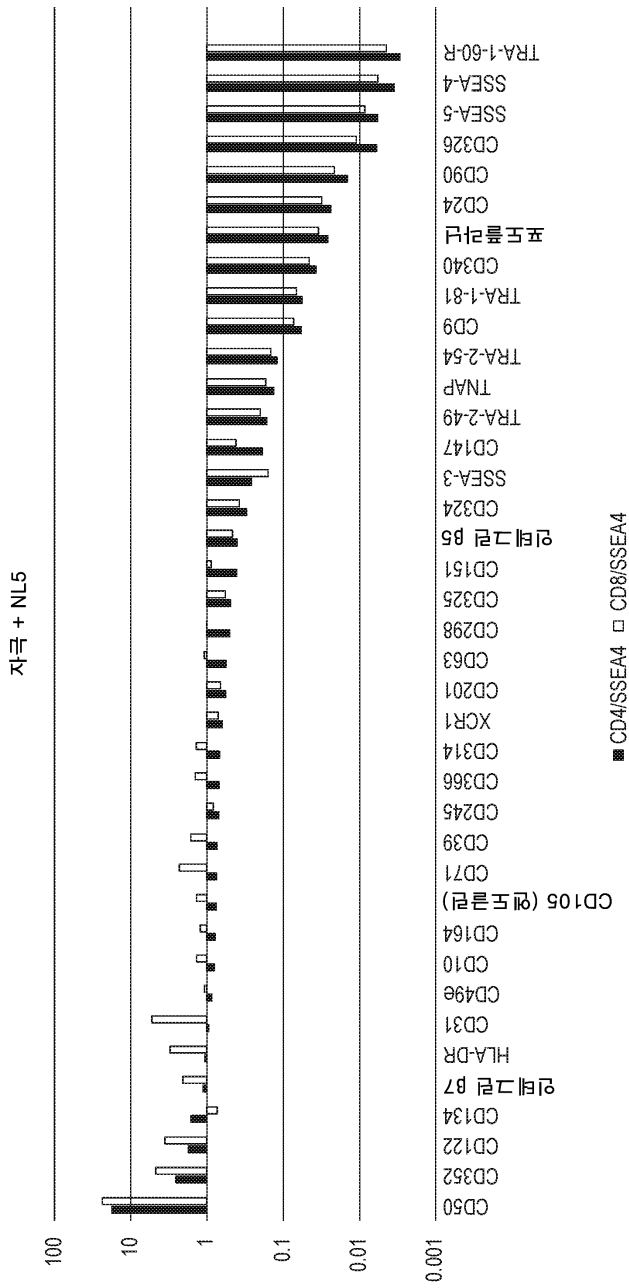
도면14c



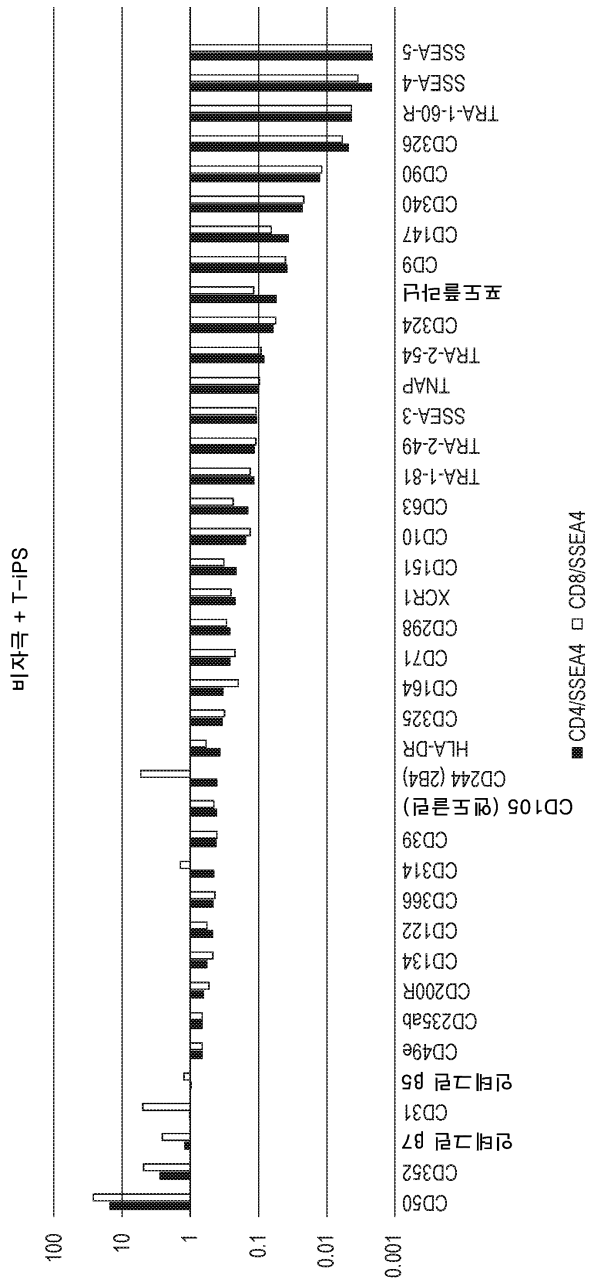
도면14d



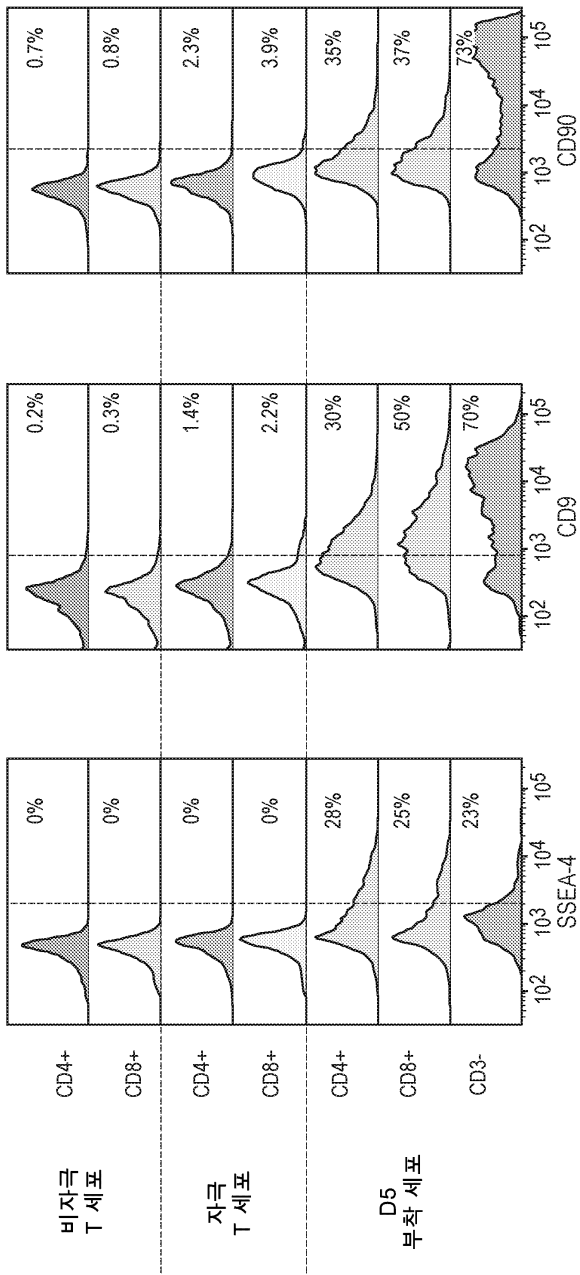
도면15



도면16

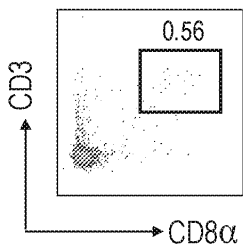


도면17

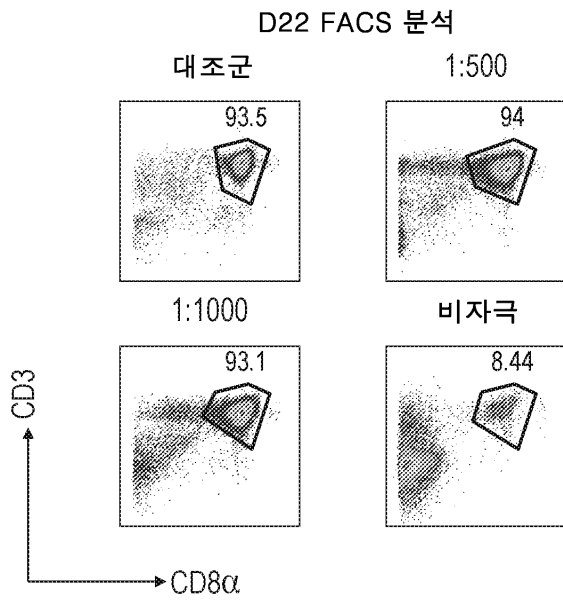


도면18a

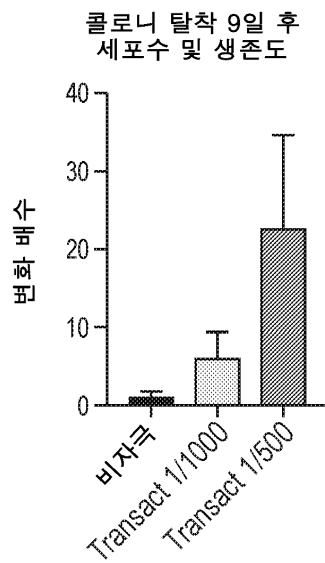
FACS 분석 D7(탈착일)



도면18b

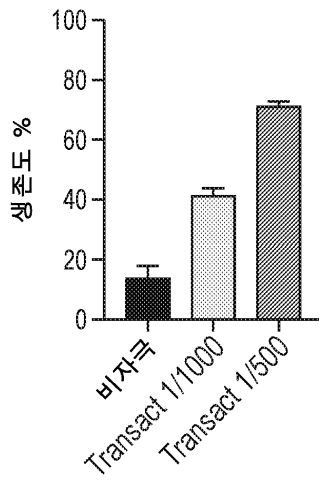


도면18c

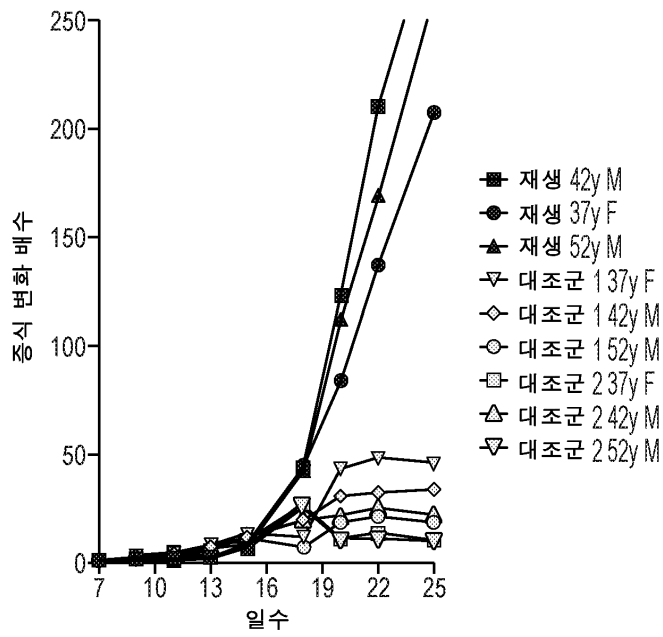


도면18d

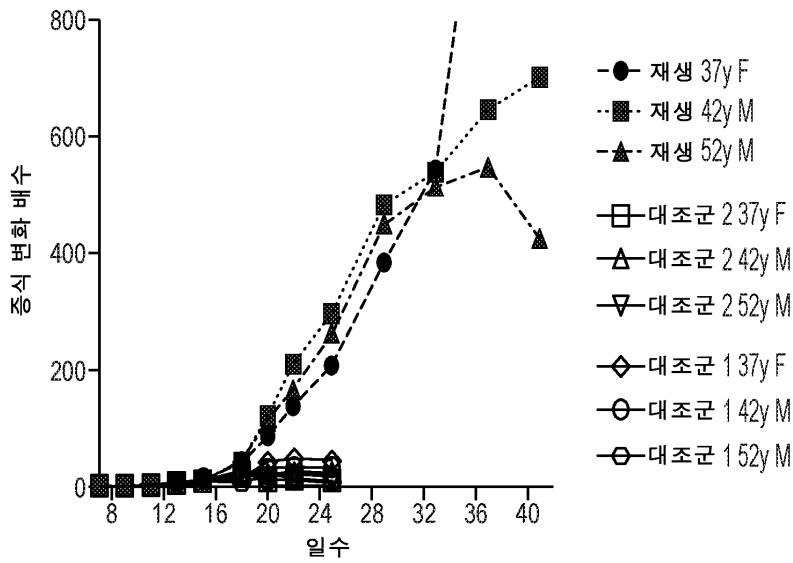
콜로니 탈착 9일 후
세포수 및 생존도



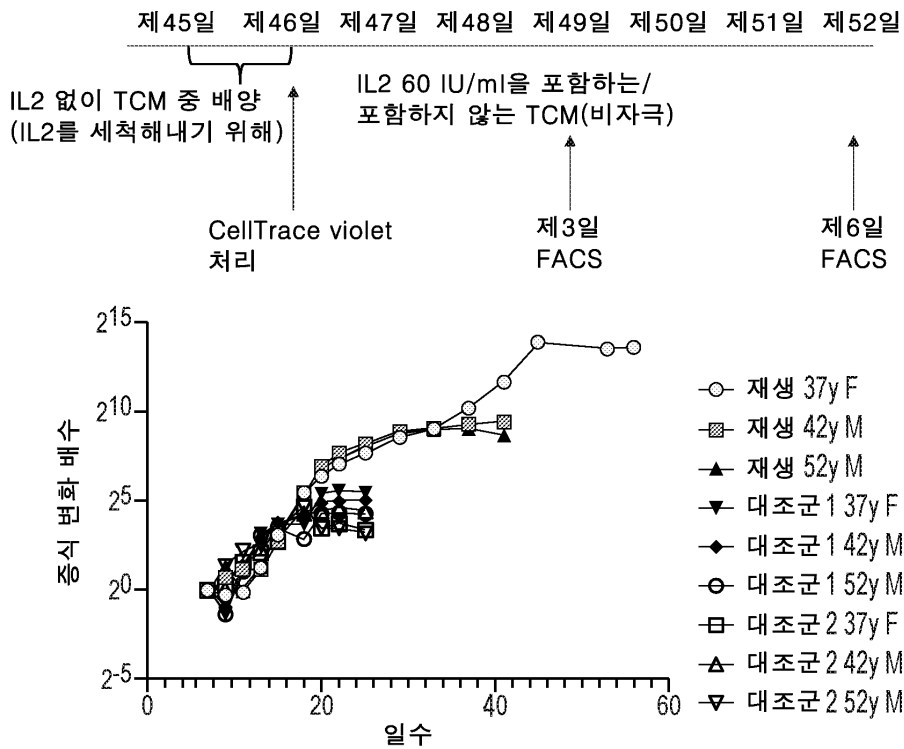
도면19a



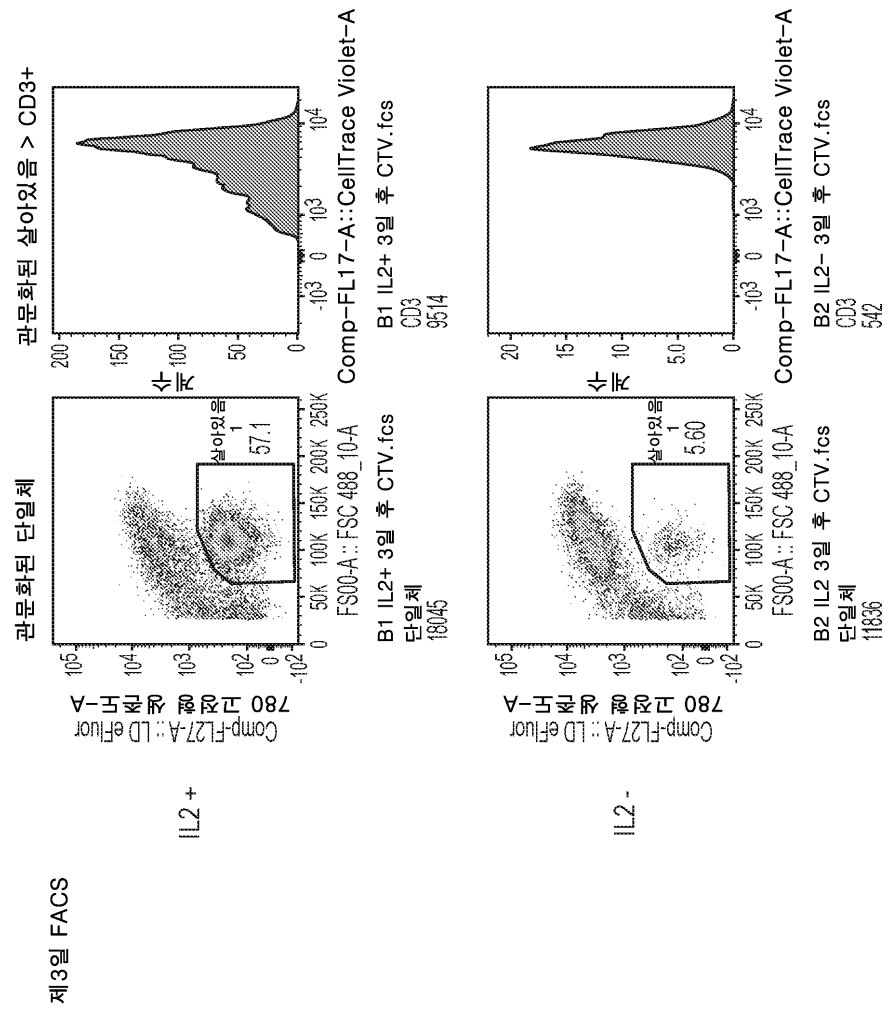
도면19b



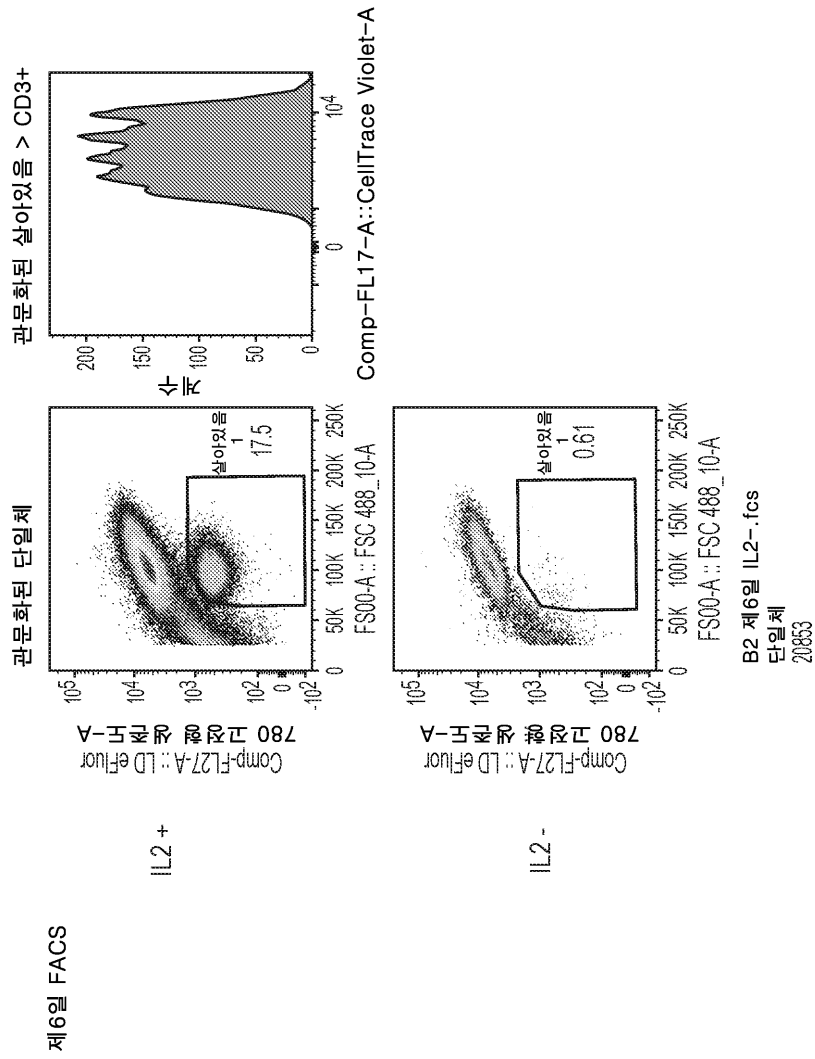
도면20a



도면20b

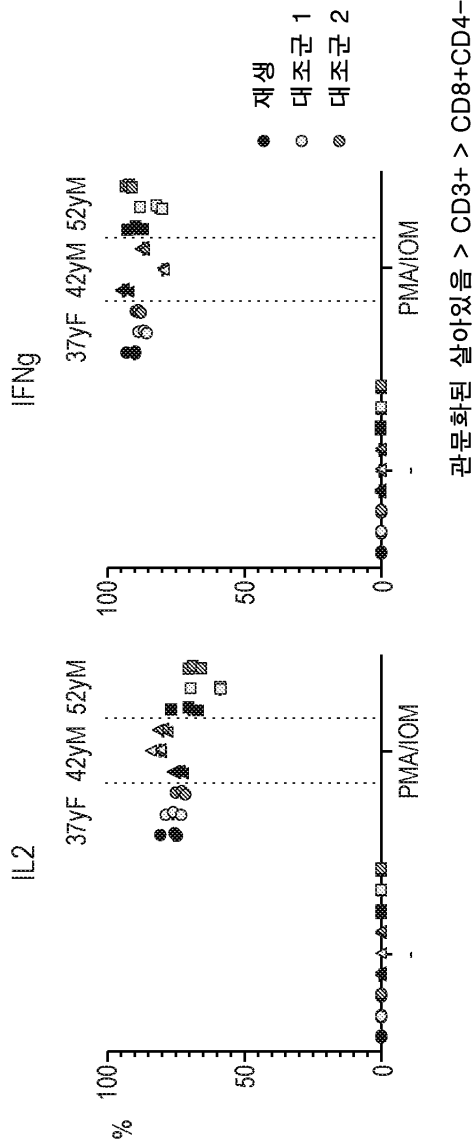


도면20c

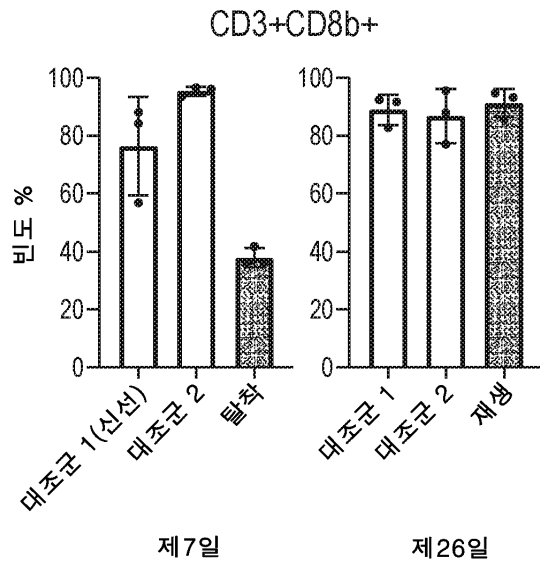


도면21

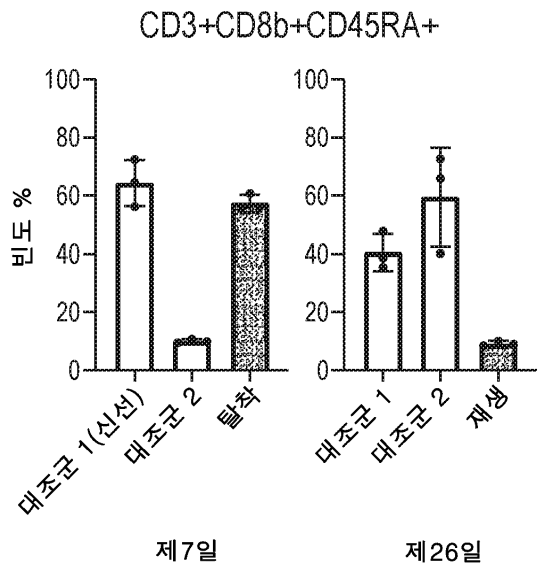
제36일



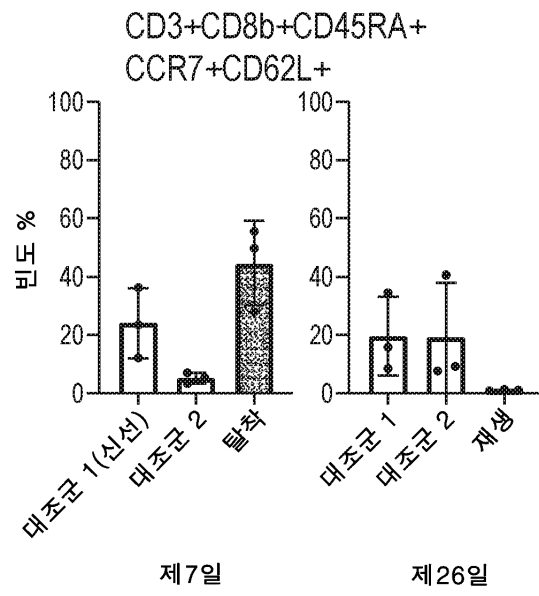
도면22a



도면22b

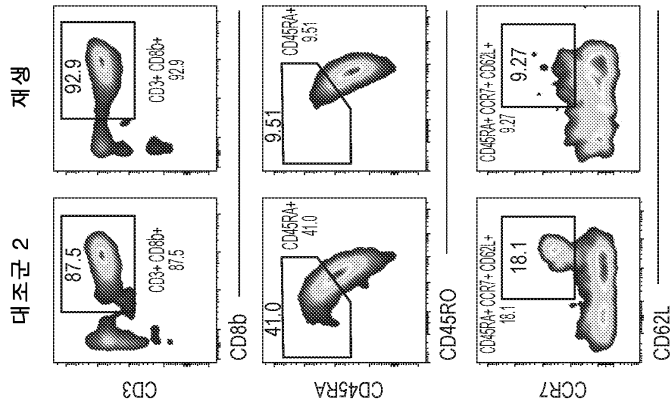


도면22c

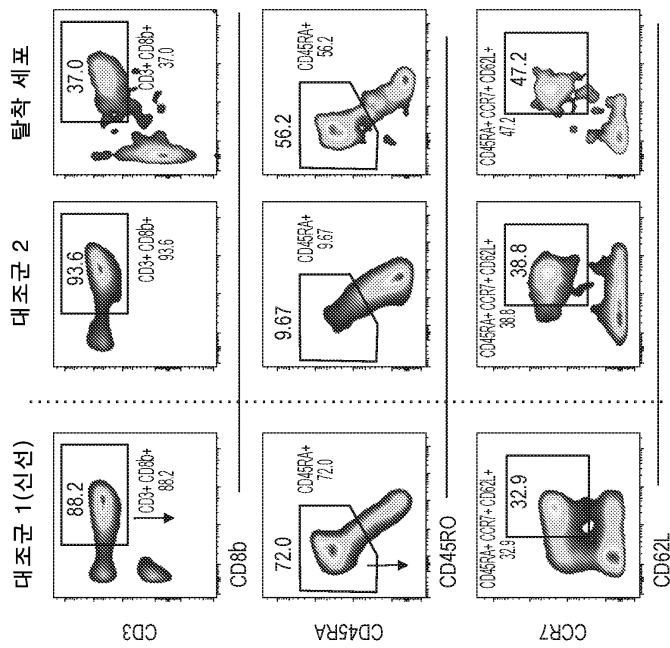


도면23

제26일



제7일 (탈착 콜로니)



공여자; 37y F

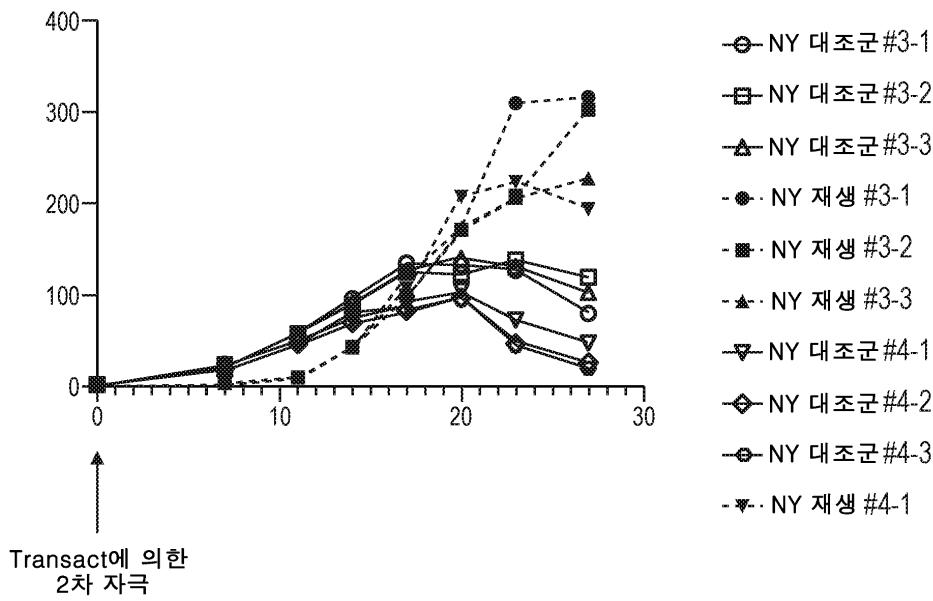
관문화된 살아있음

관문화된 살아있음 >
CD3+ CD8b+

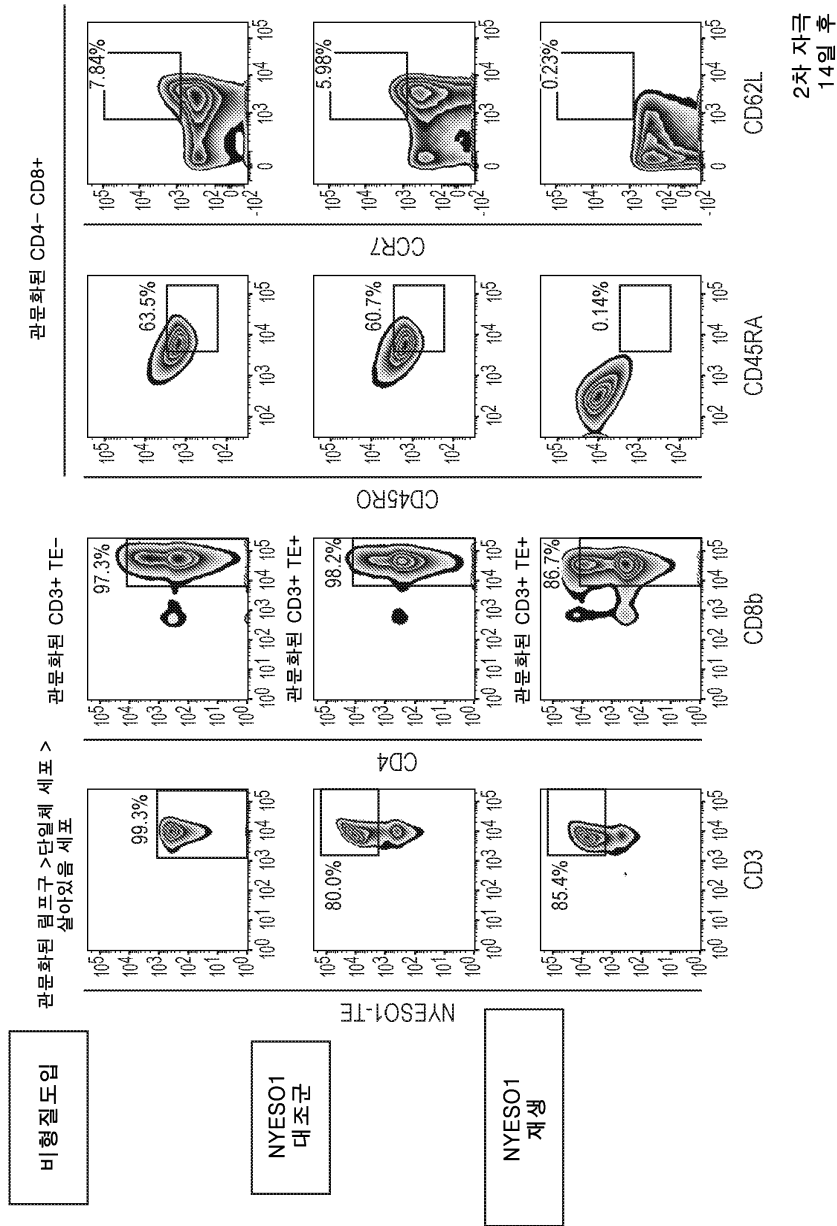
관문화된 살아있음 >
CD3+ CD8b+ >
CD45RA+

도면24

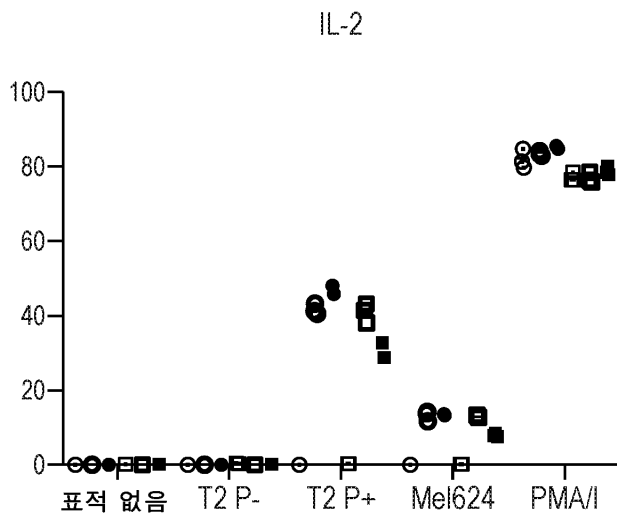
2차 자극 후 증식



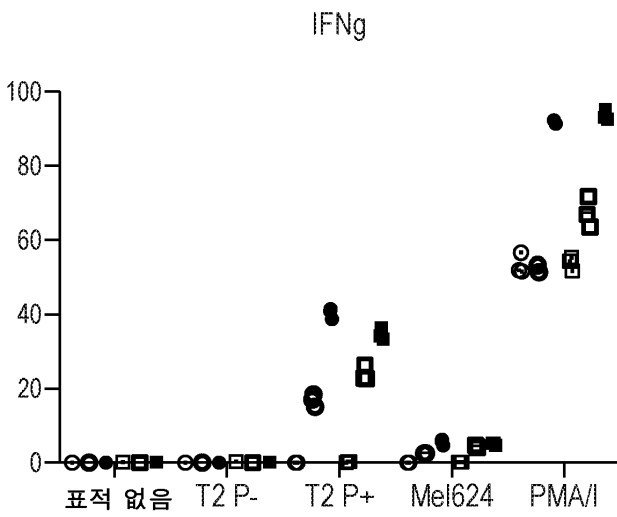
도면25



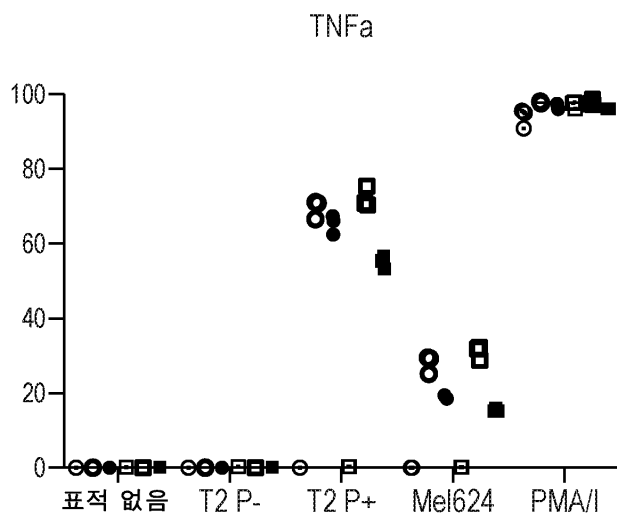
도면26a



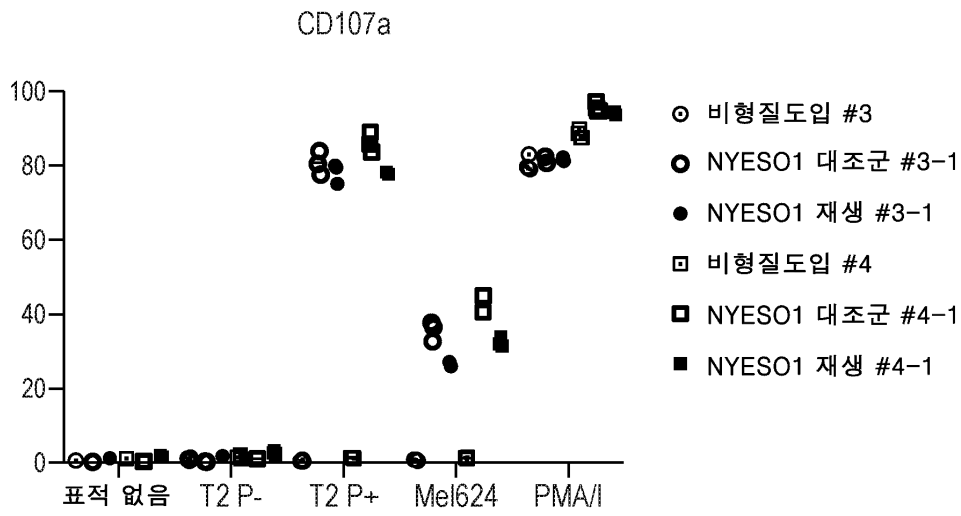
도면26b



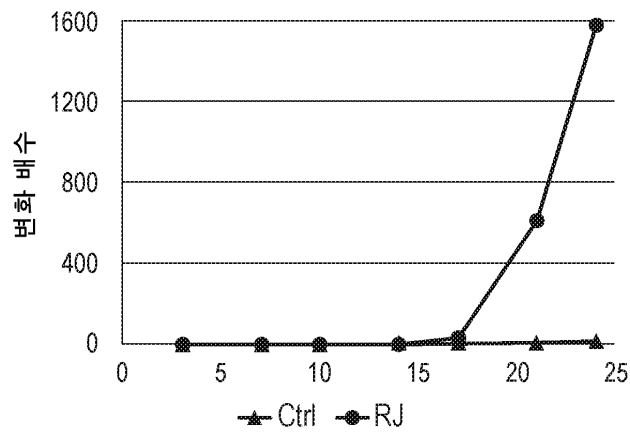
도면26c



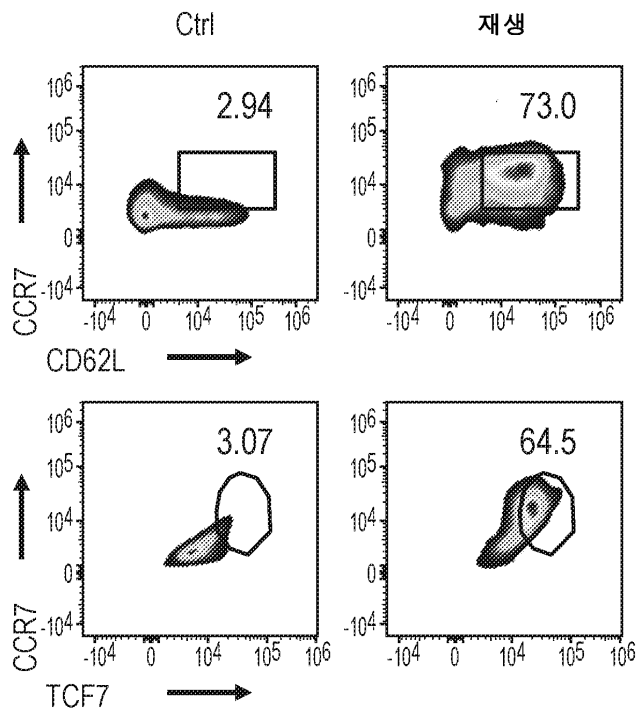
도면26d



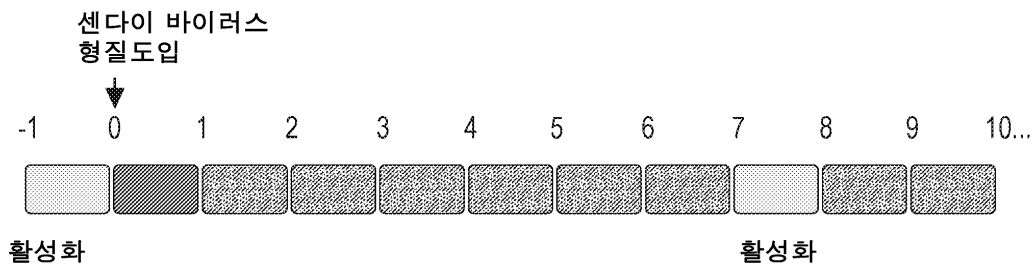
도면27a



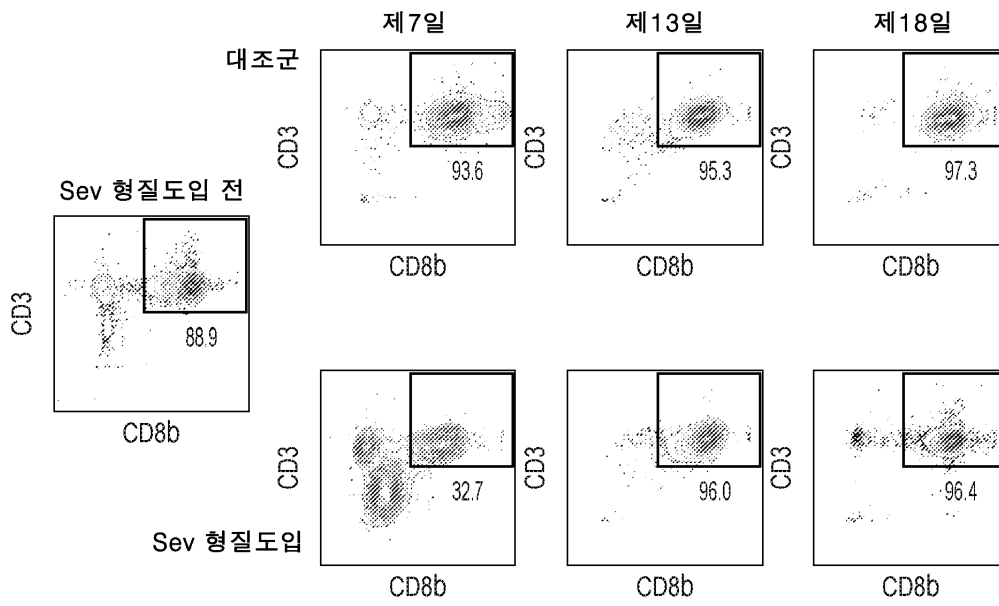
도면27b



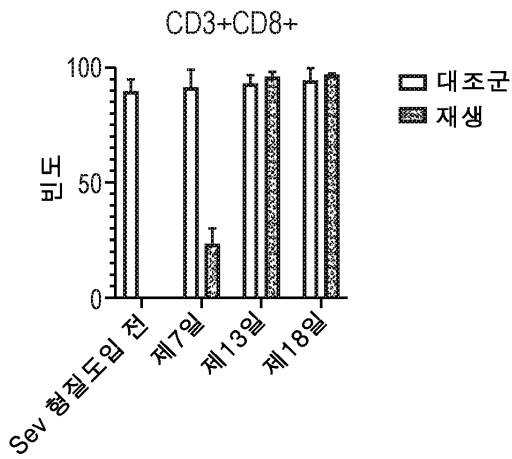
도면28



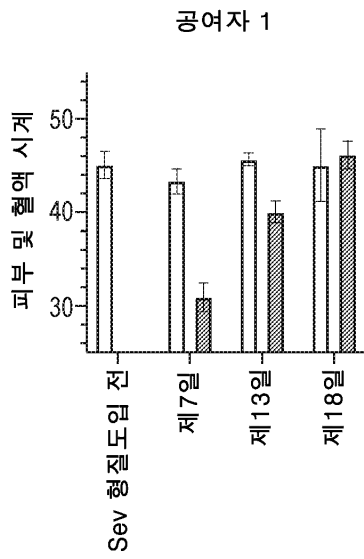
도면29a



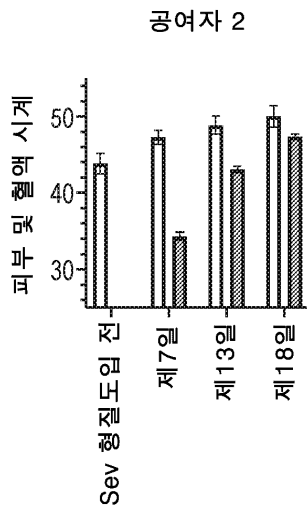
도면29b



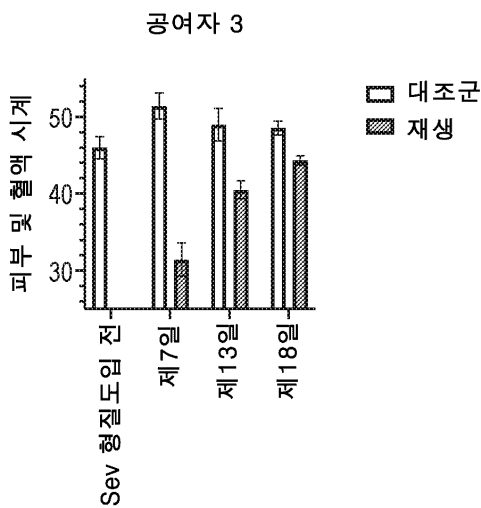
도면30a



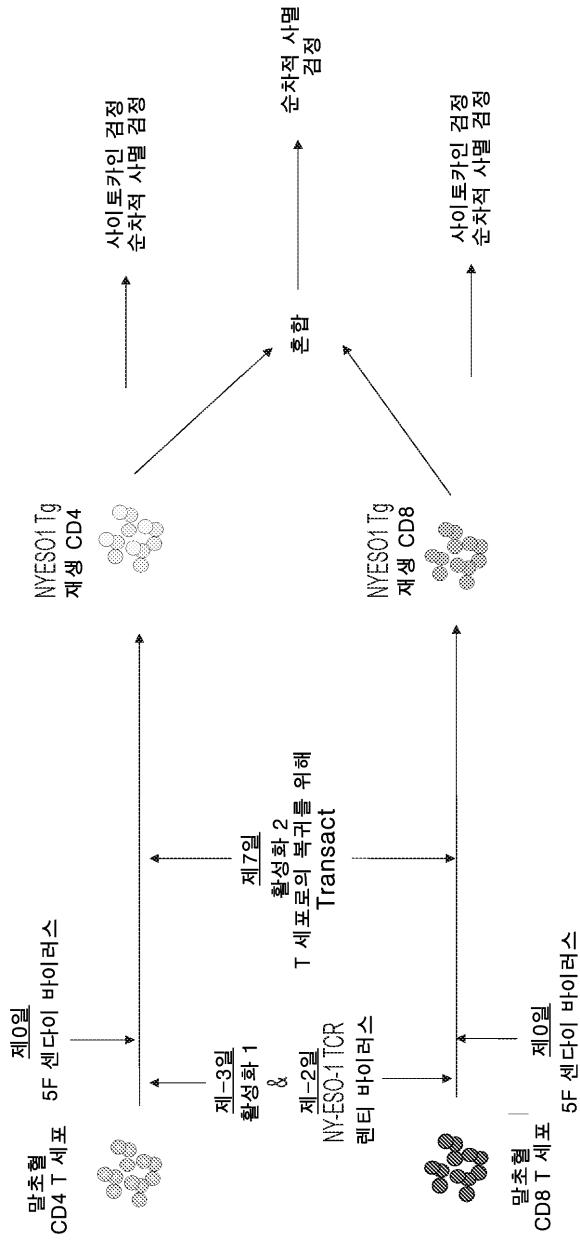
도면30b



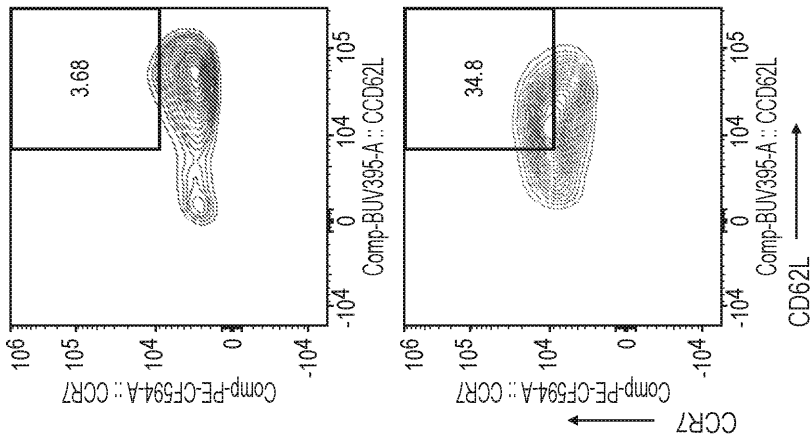
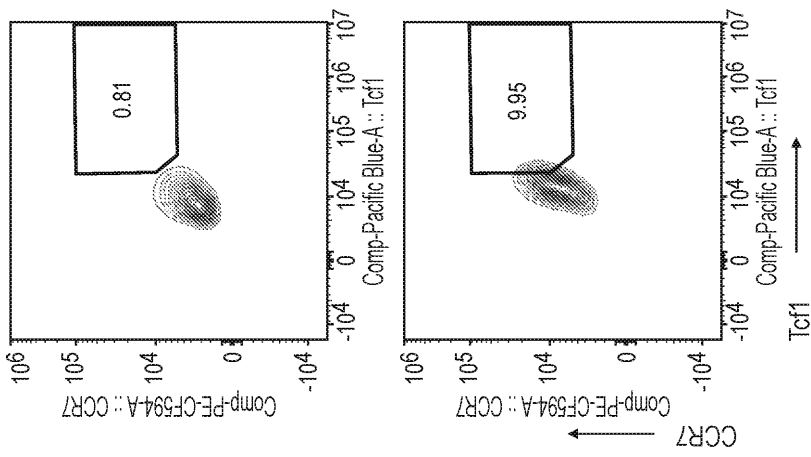
도면30c



도면31



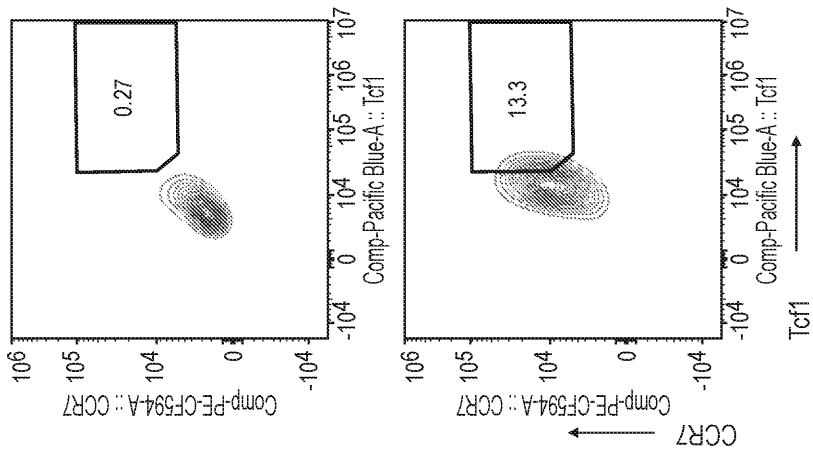
도면32a



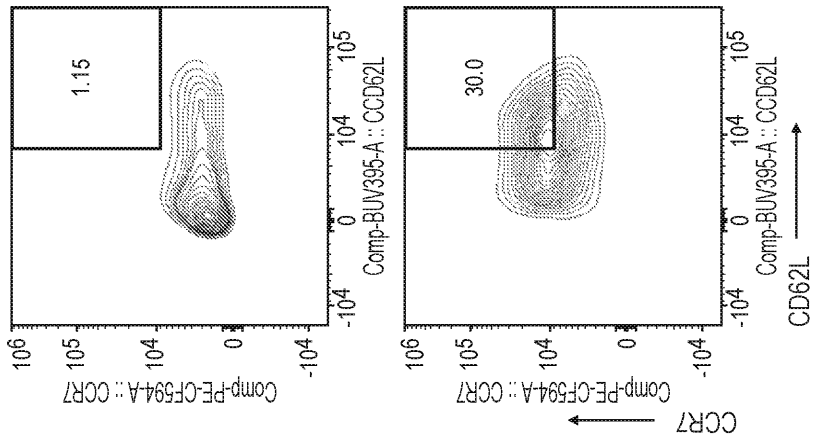
CD4 대조군

CD4 제형

도면32b

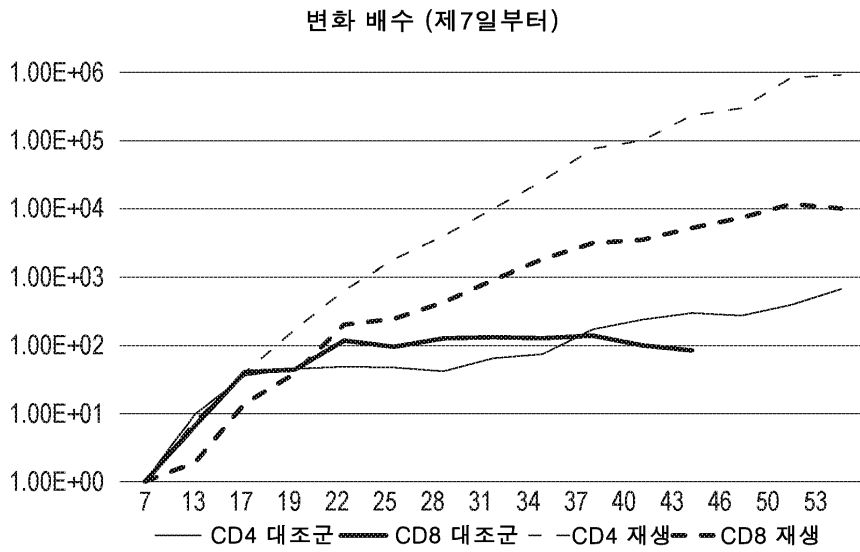


CD8 대조군

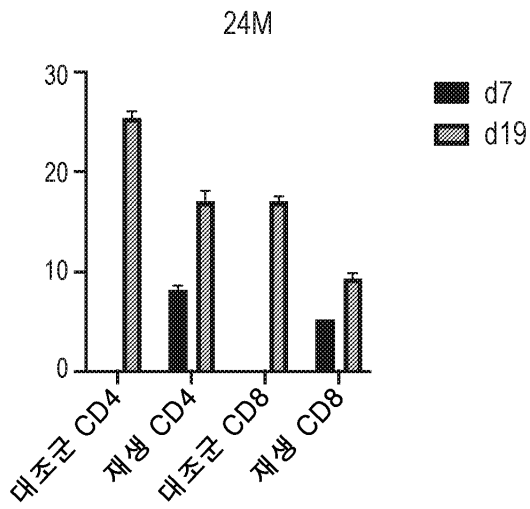


CD8 재생

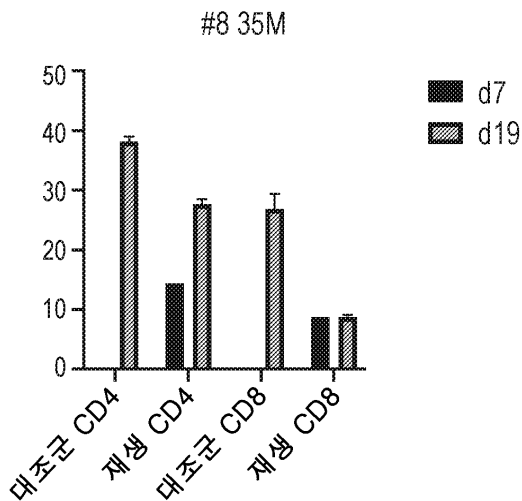
도면33



도면34a

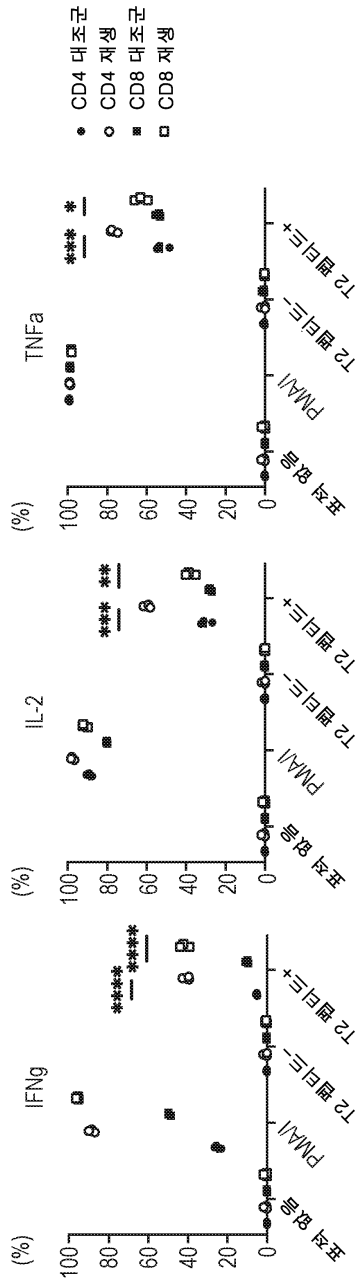


도면34b

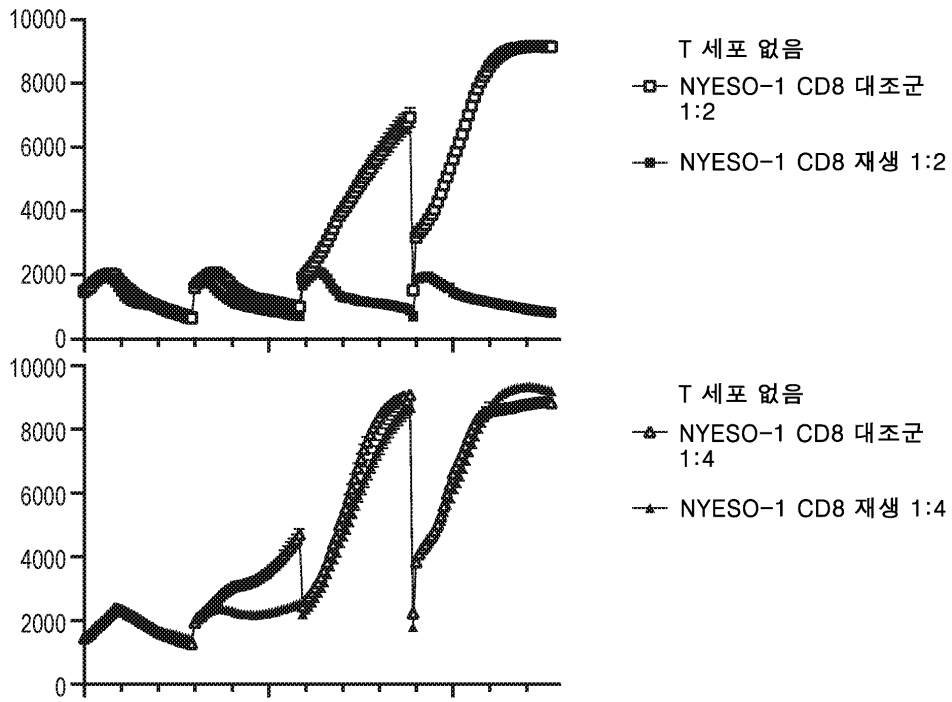


도면35

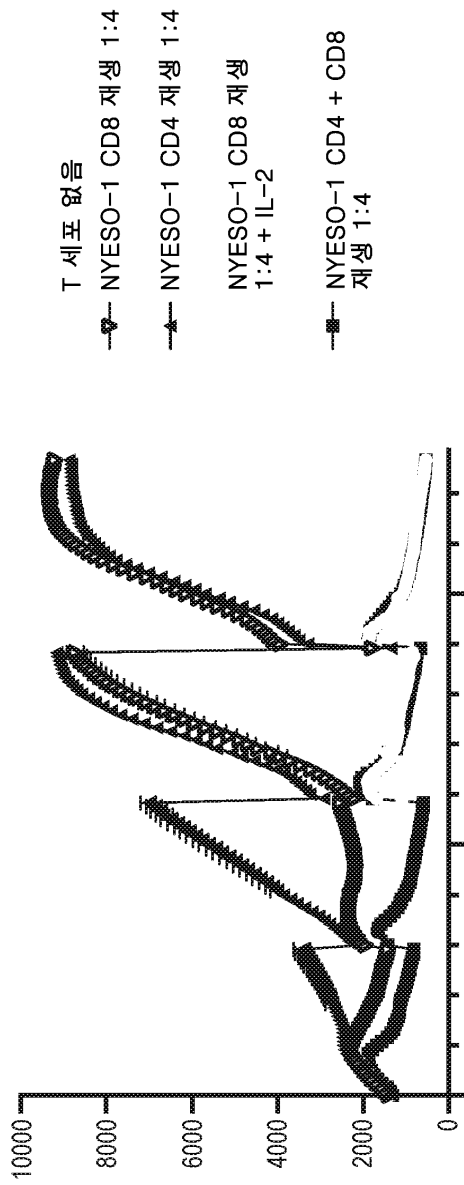
세포내 사이토카인 검정



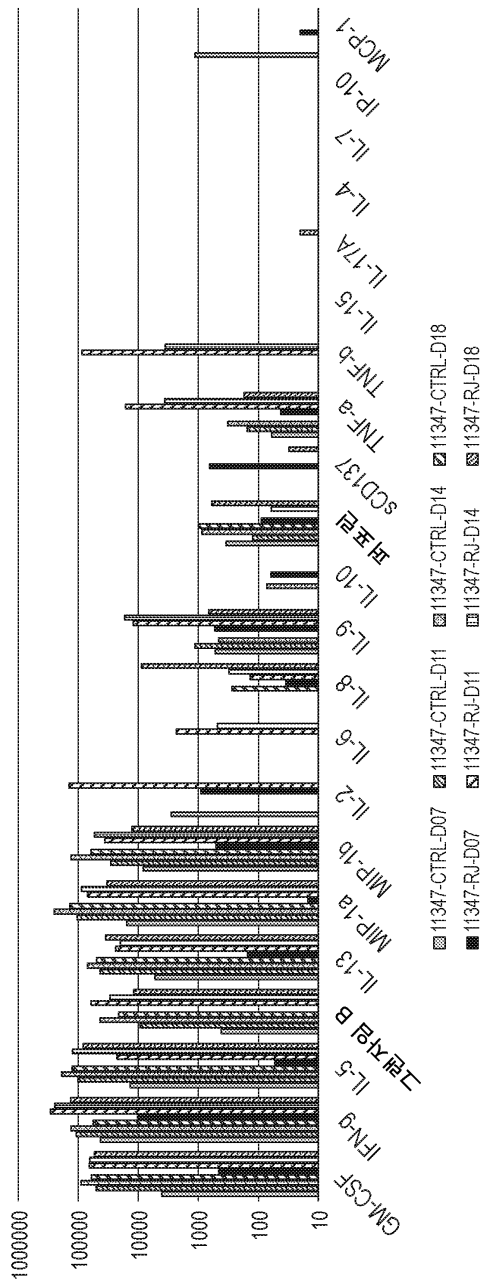
도면36



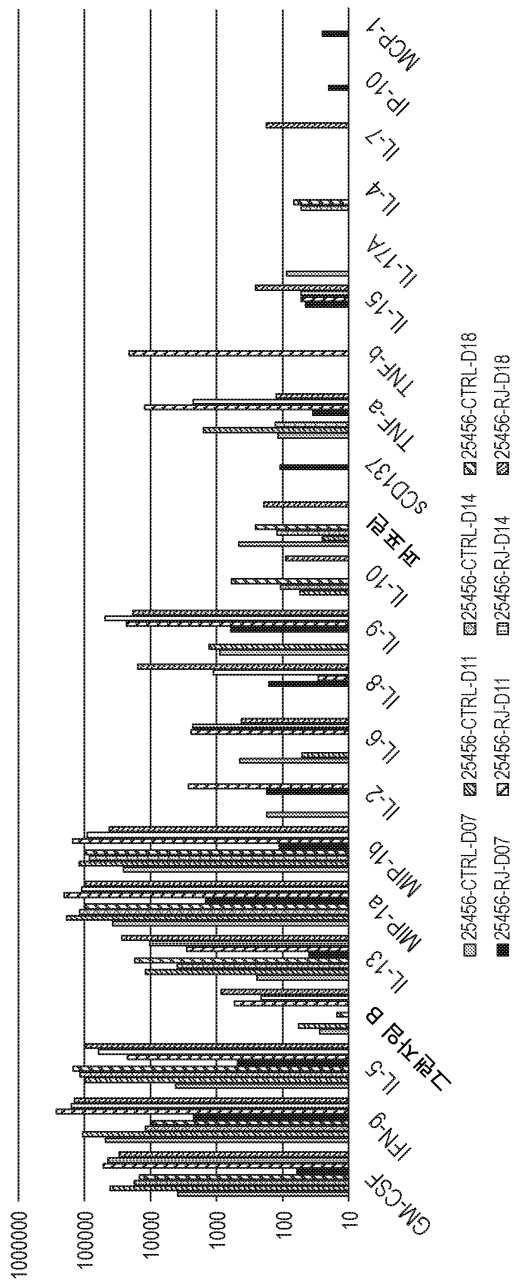
도면37



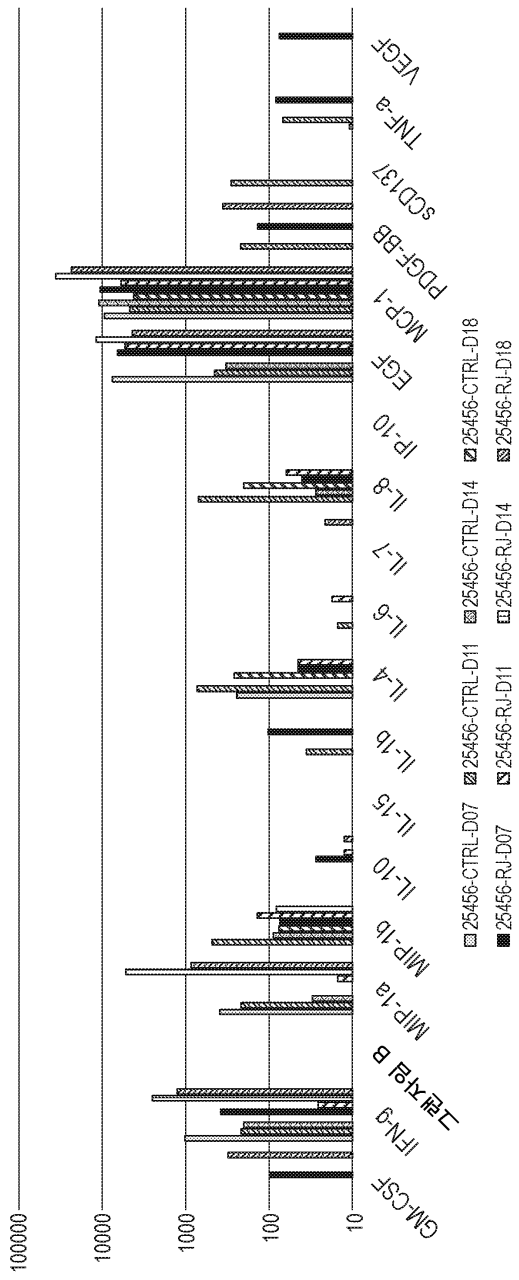
도면38a



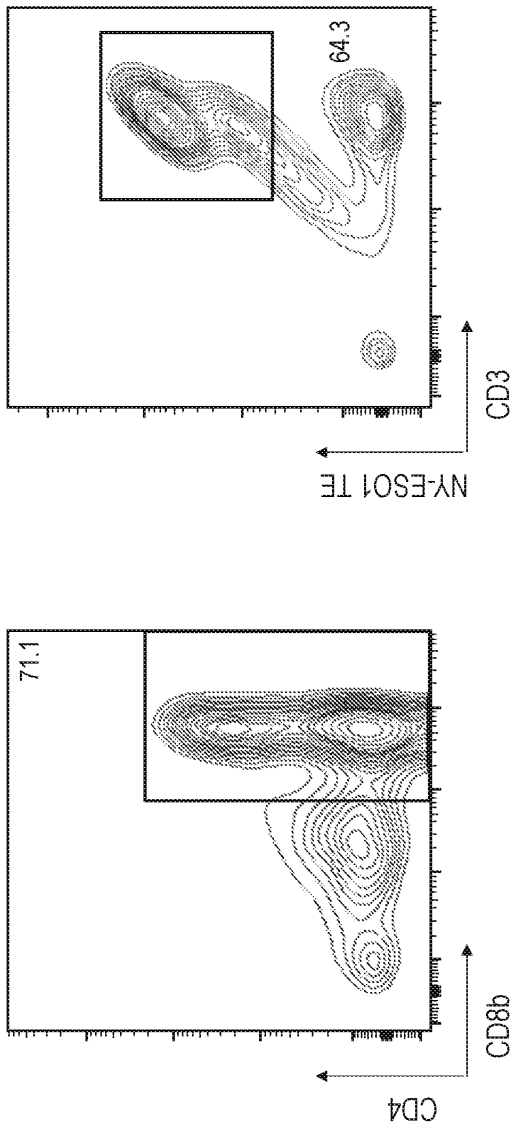
도면38b



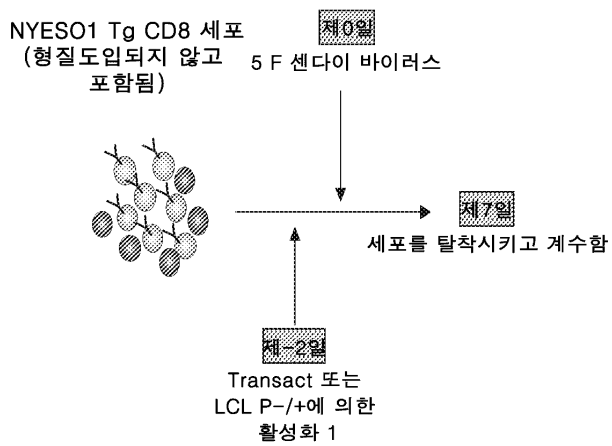
도면39b



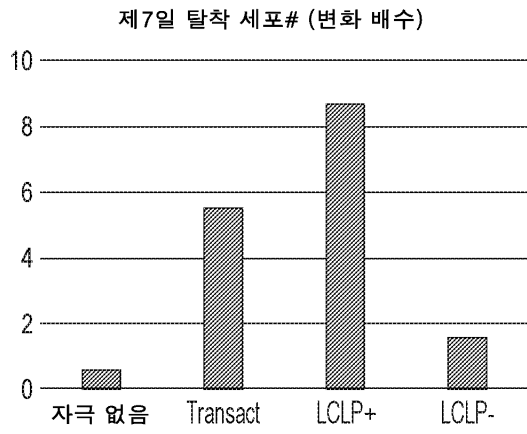
도면40



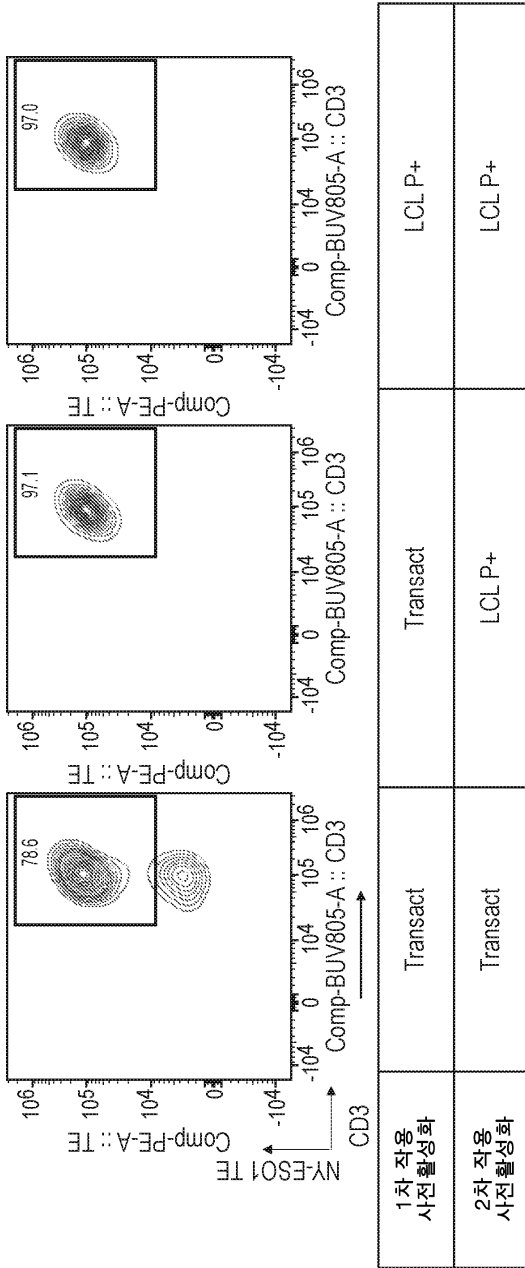
도면41



도면42

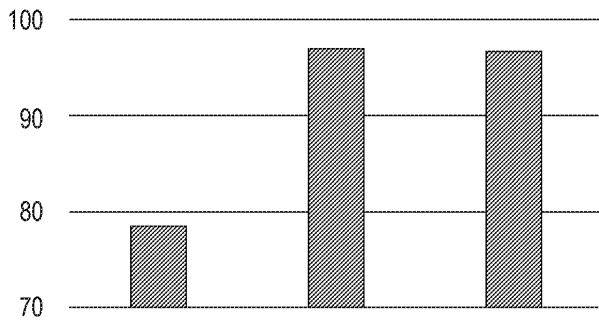


도면43



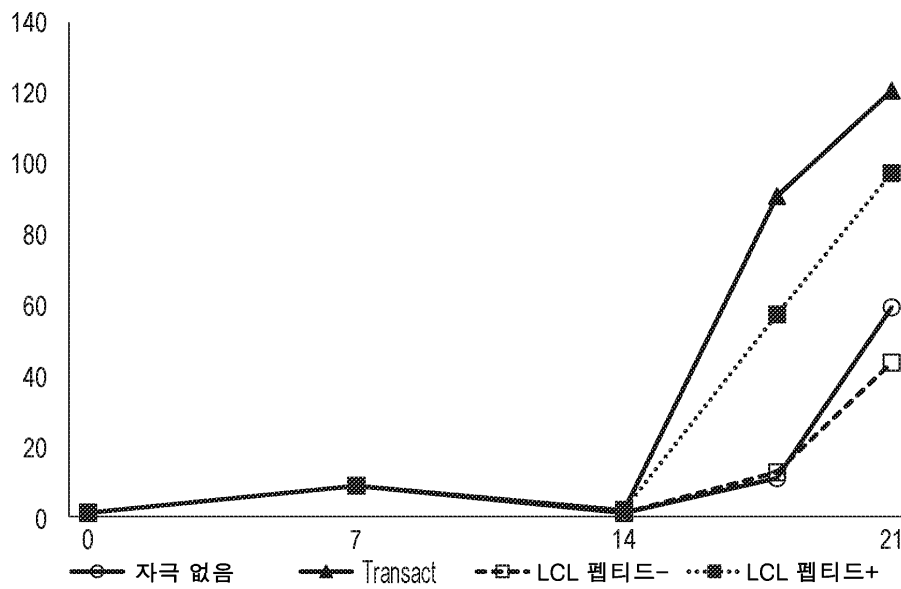
도면44

제14일 TE+%

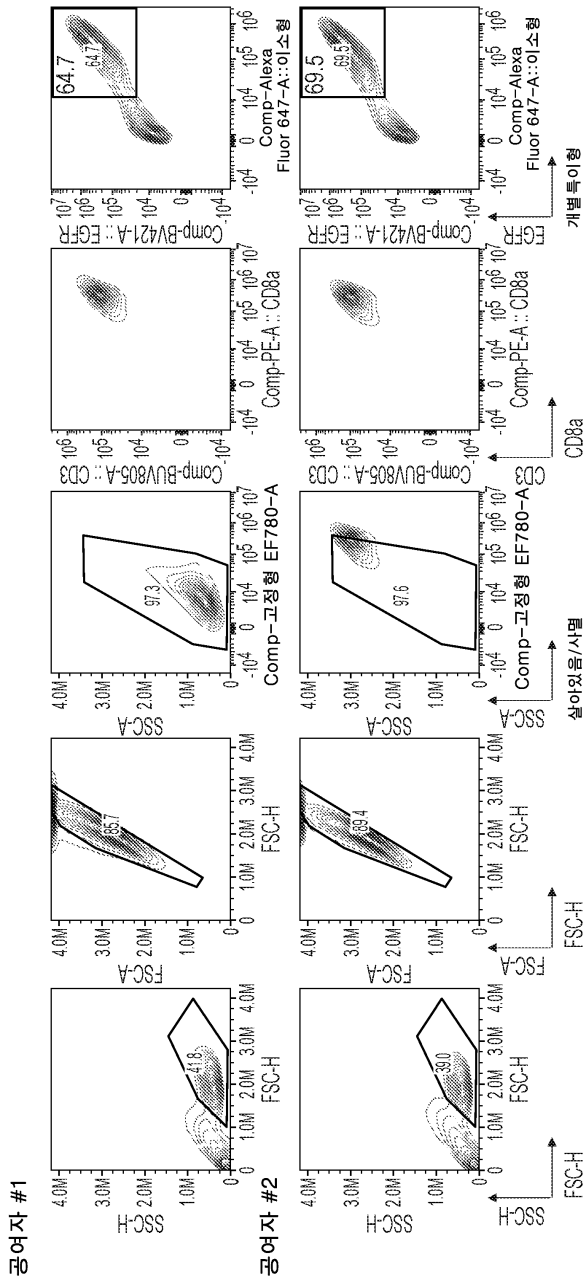


1차 작용	Transact	Transact	LCL P+
2차 작용	Transact	LCL P+	LCL P+

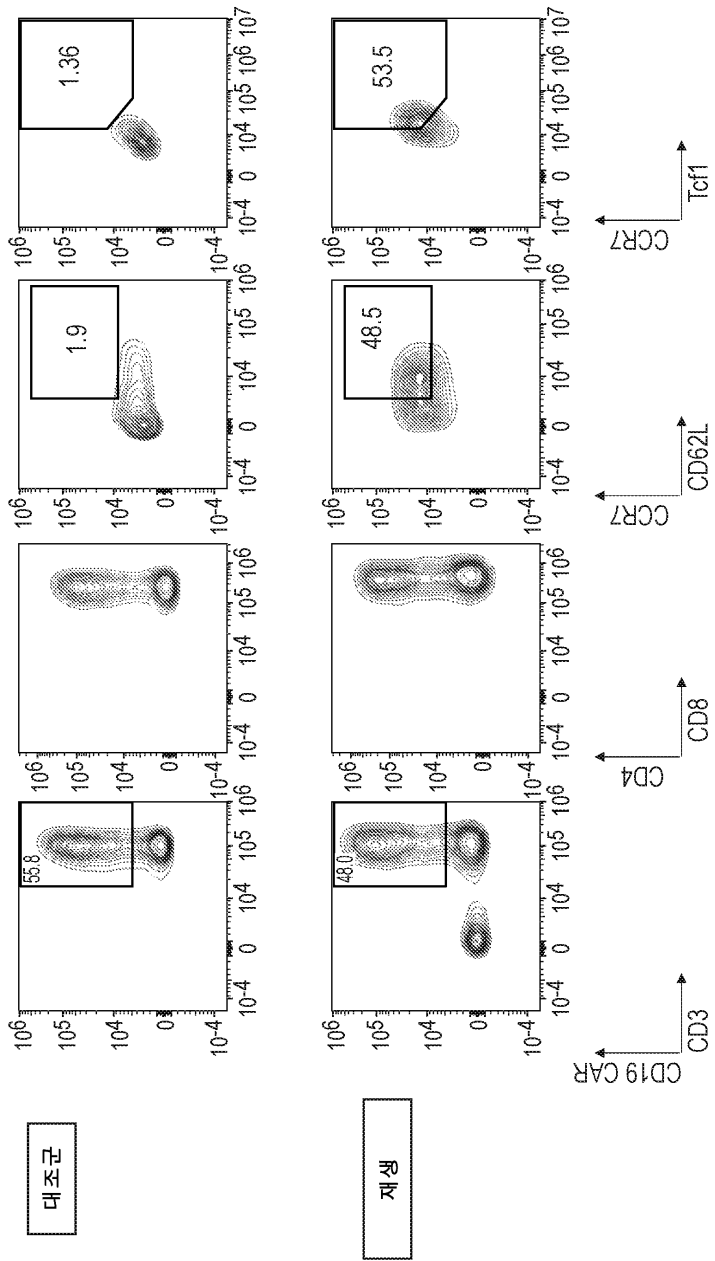
도면45



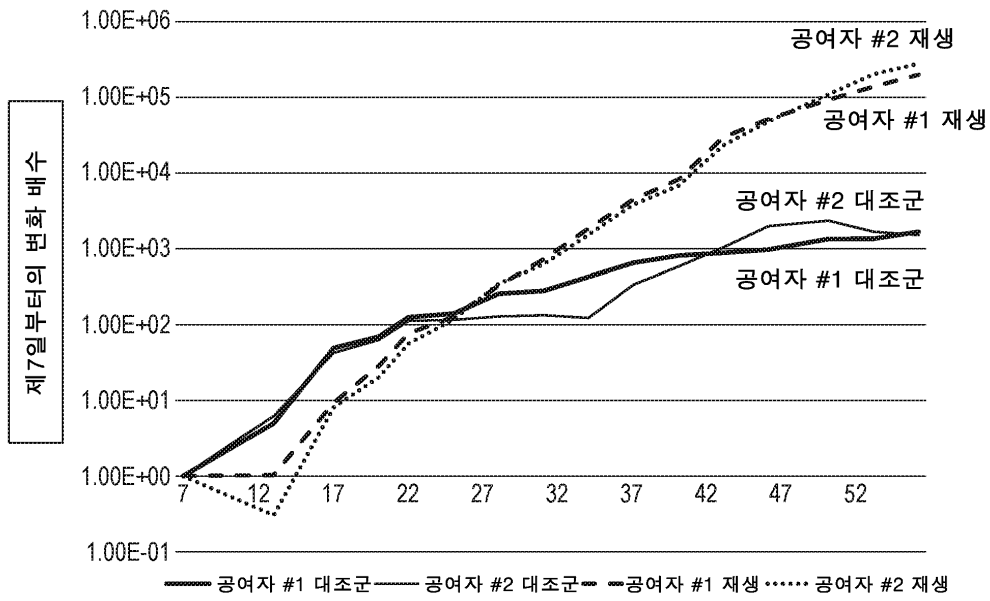
도면46



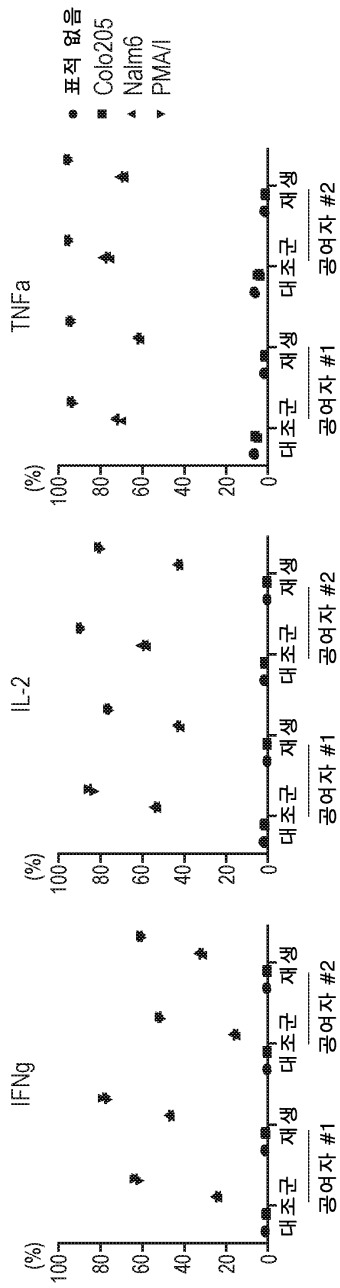
도면47



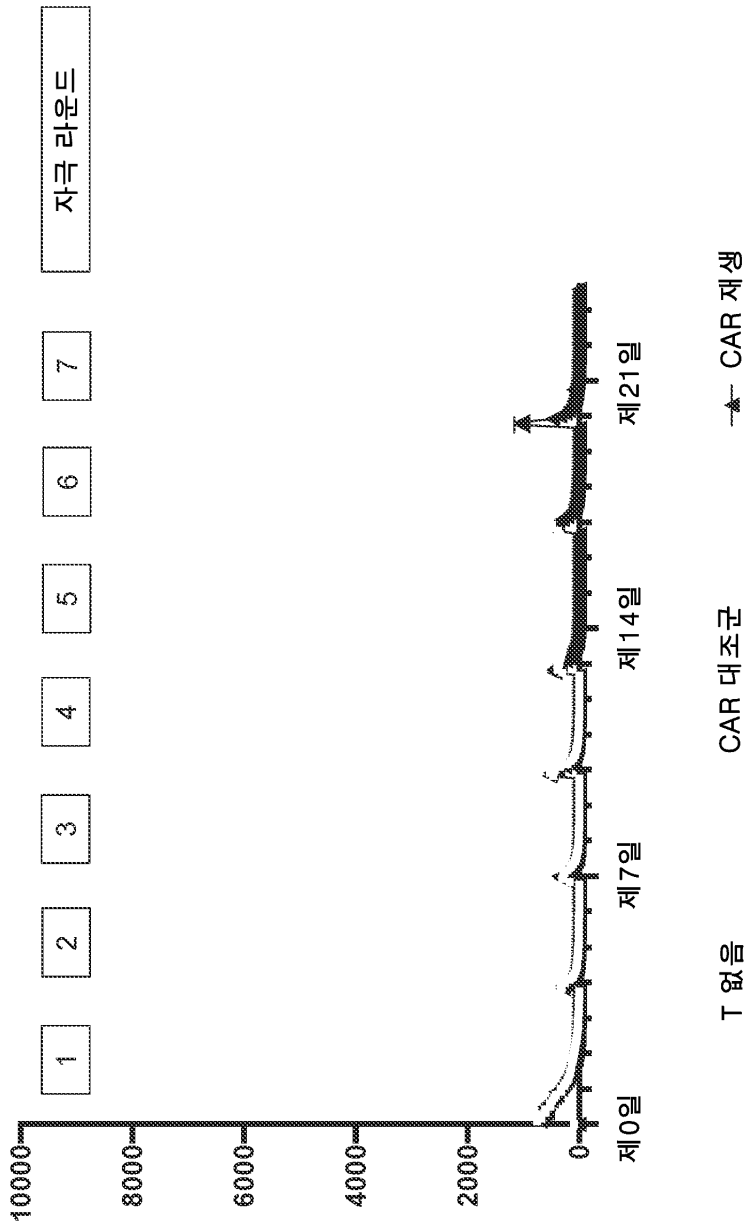
도면48



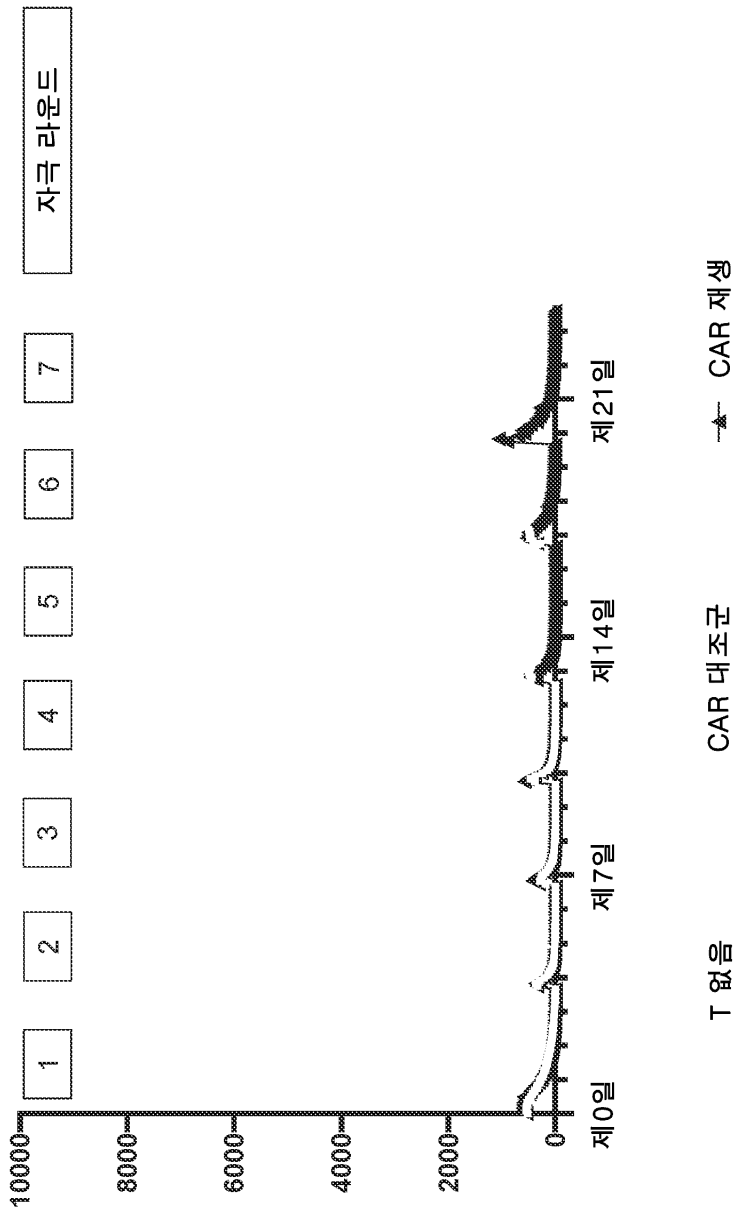
도면49



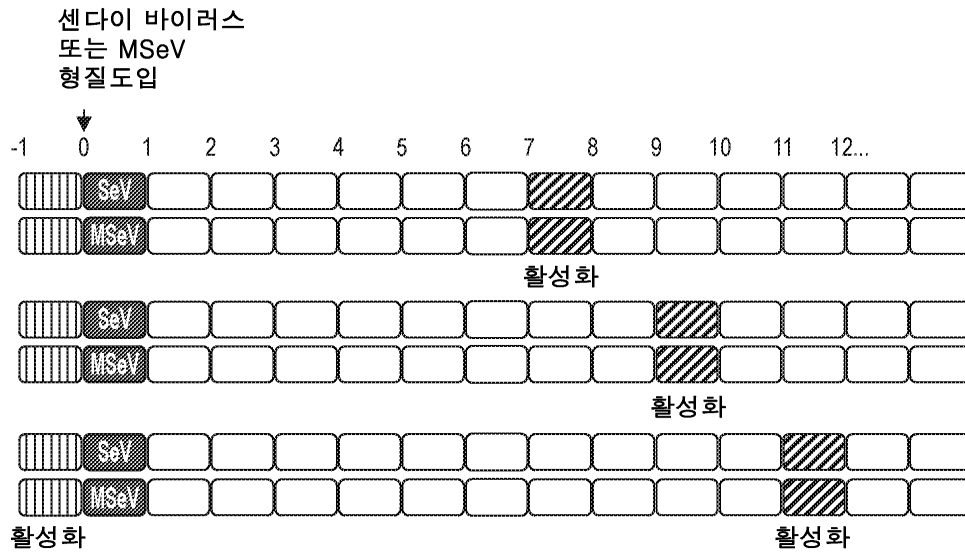
도면50a



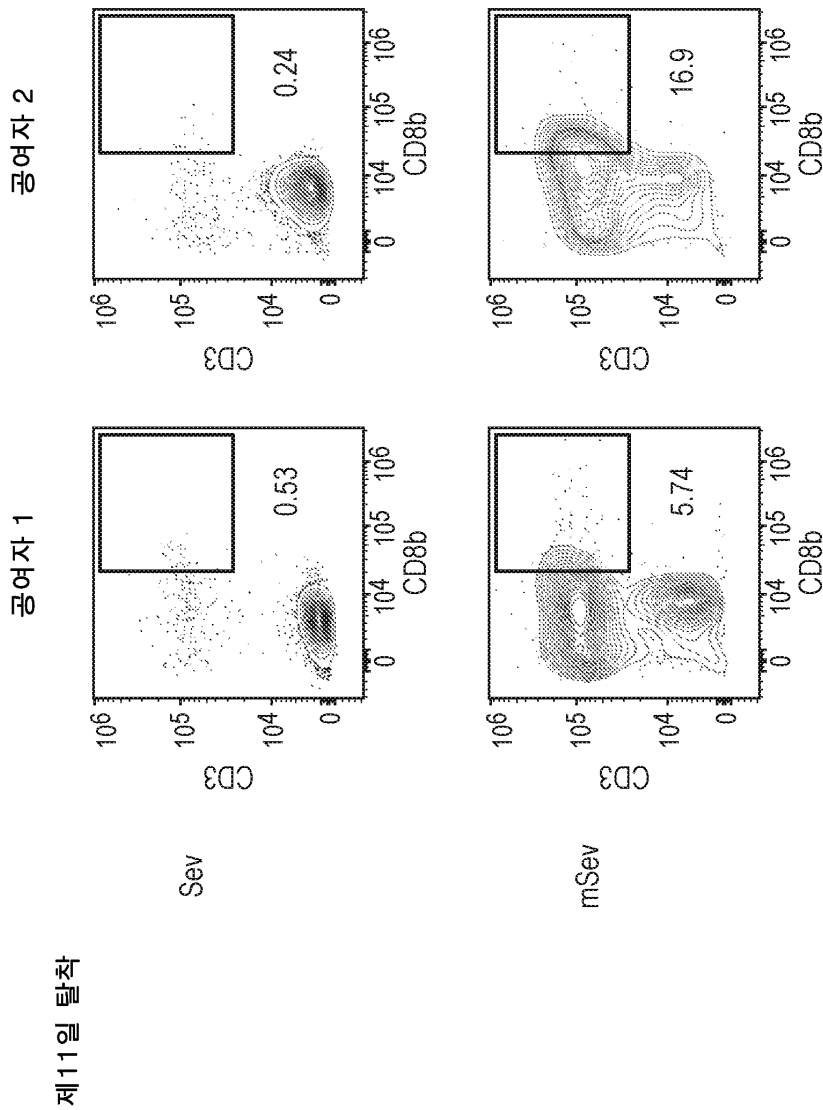
도면50b



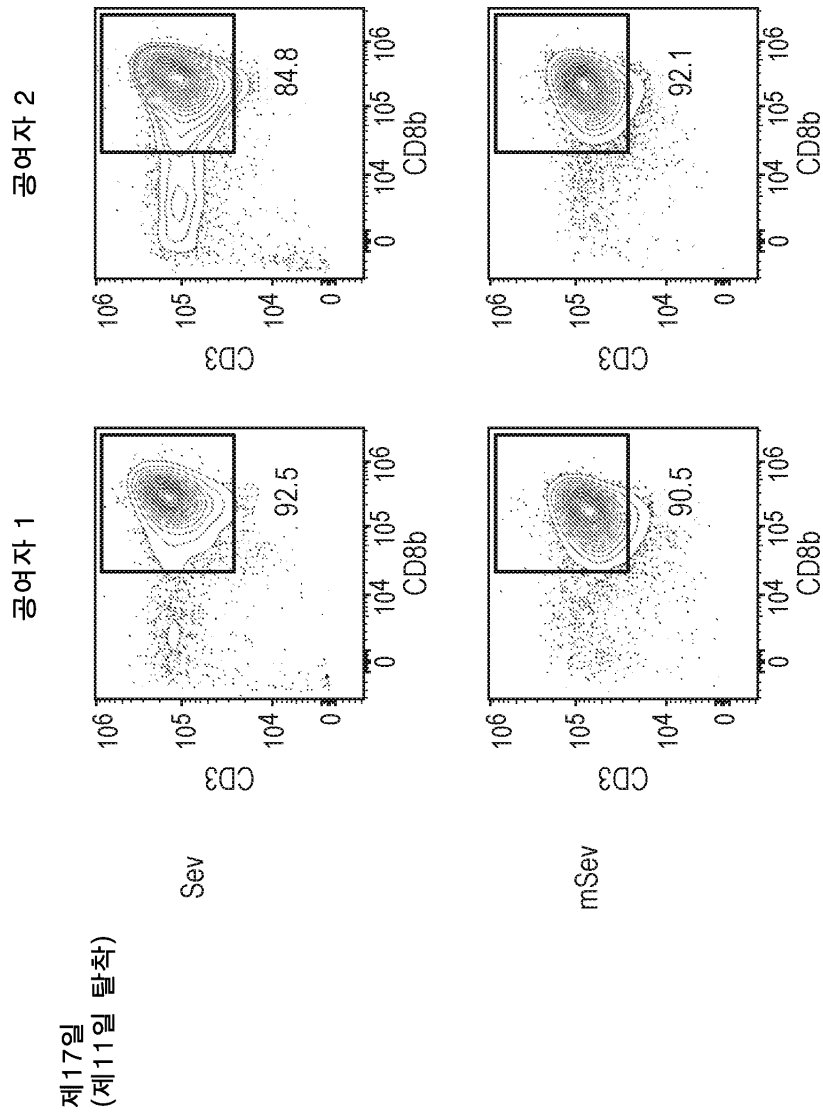
도면51



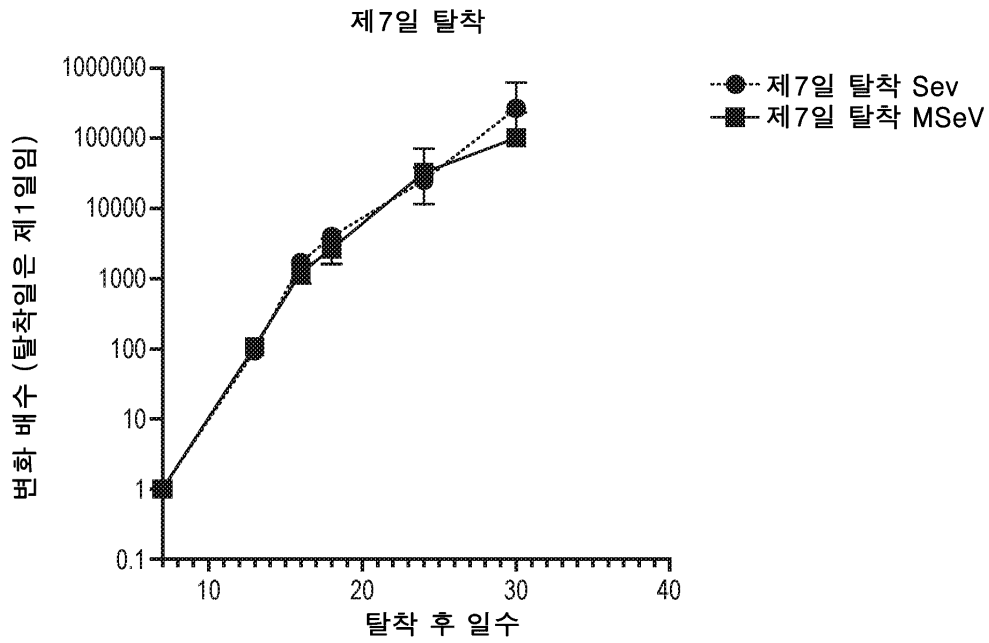
도면52a



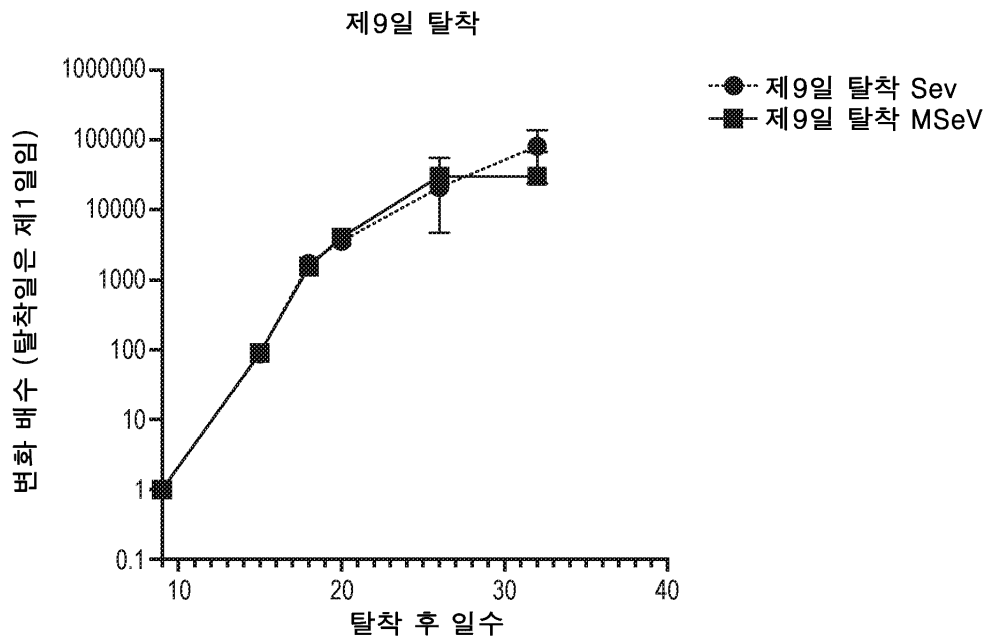
도면52b



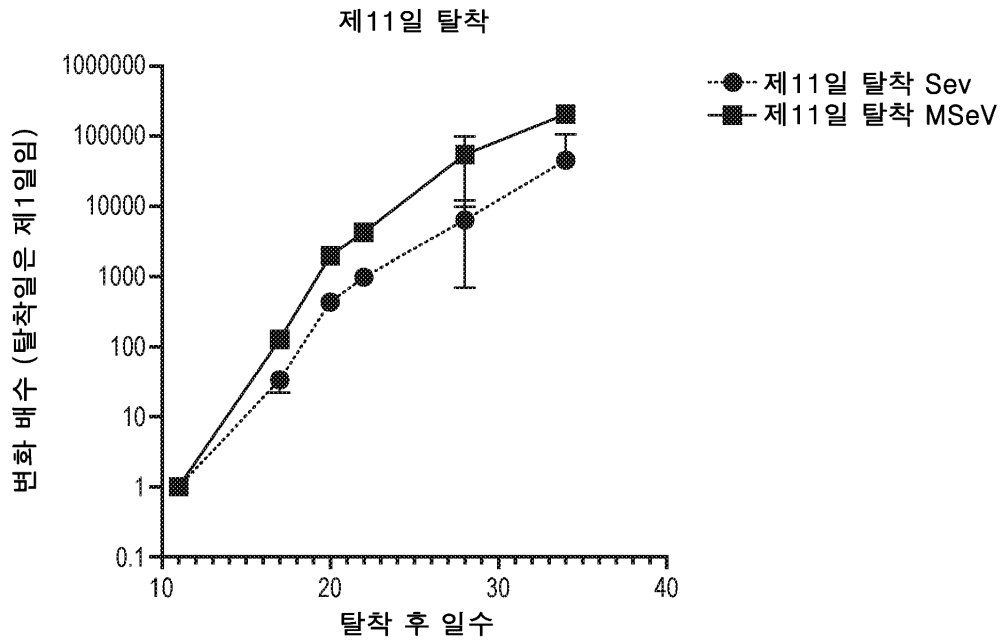
도면53a



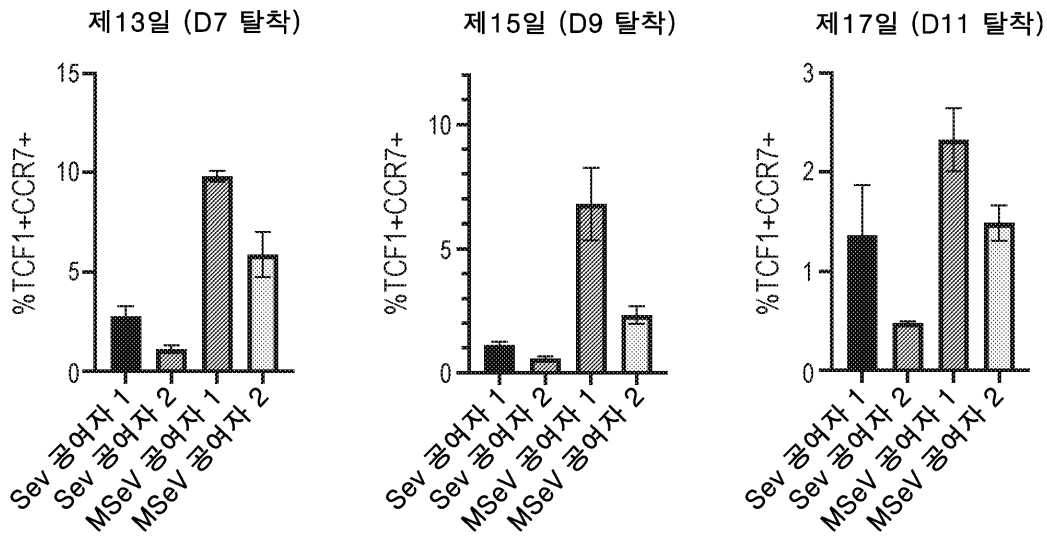
도면53b



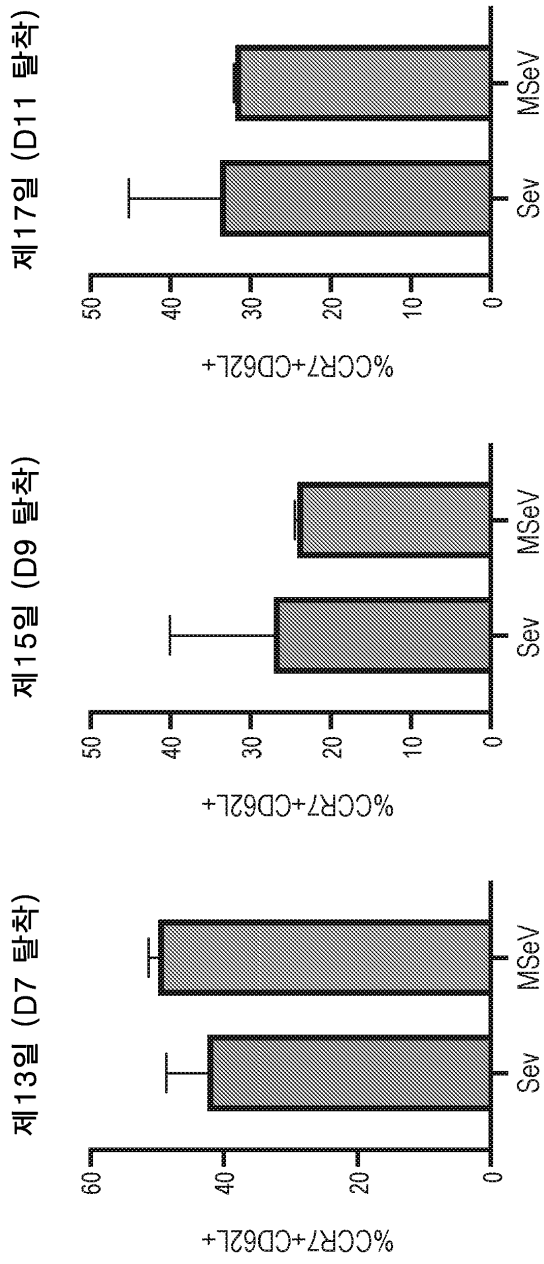
도면53c



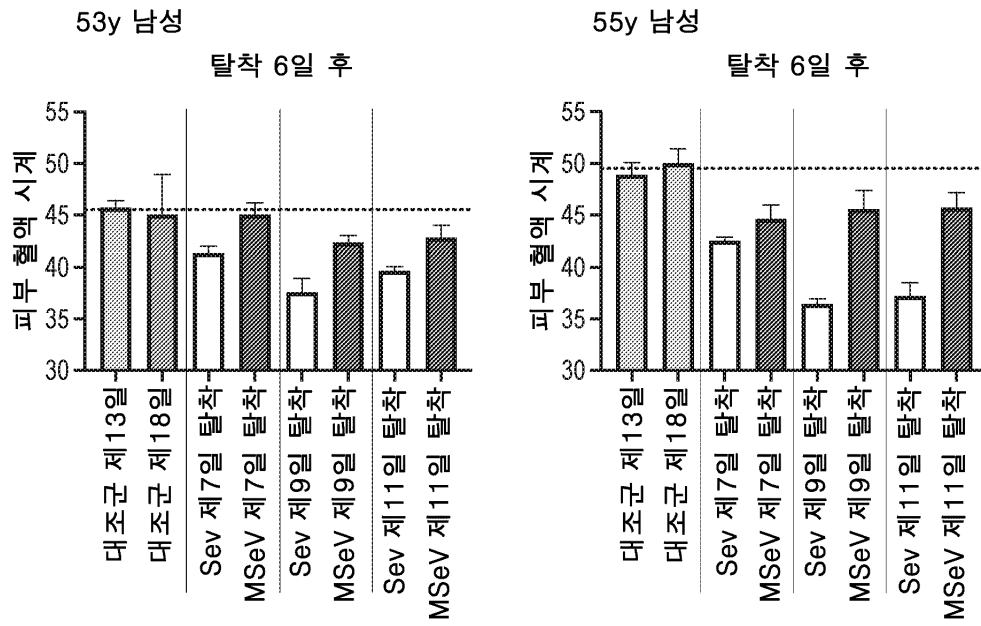
도면54a



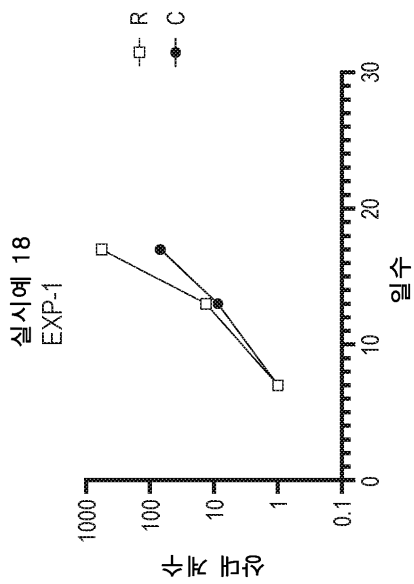
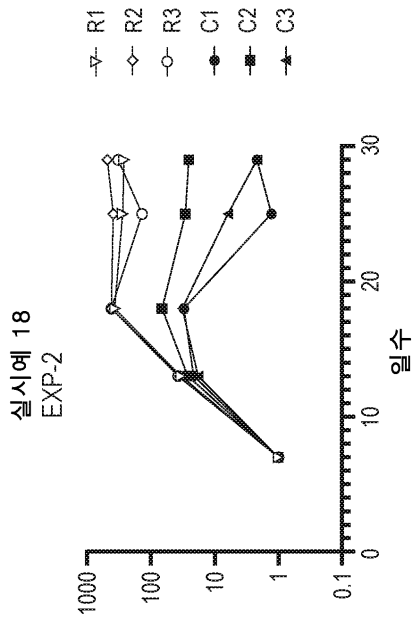
도면54b



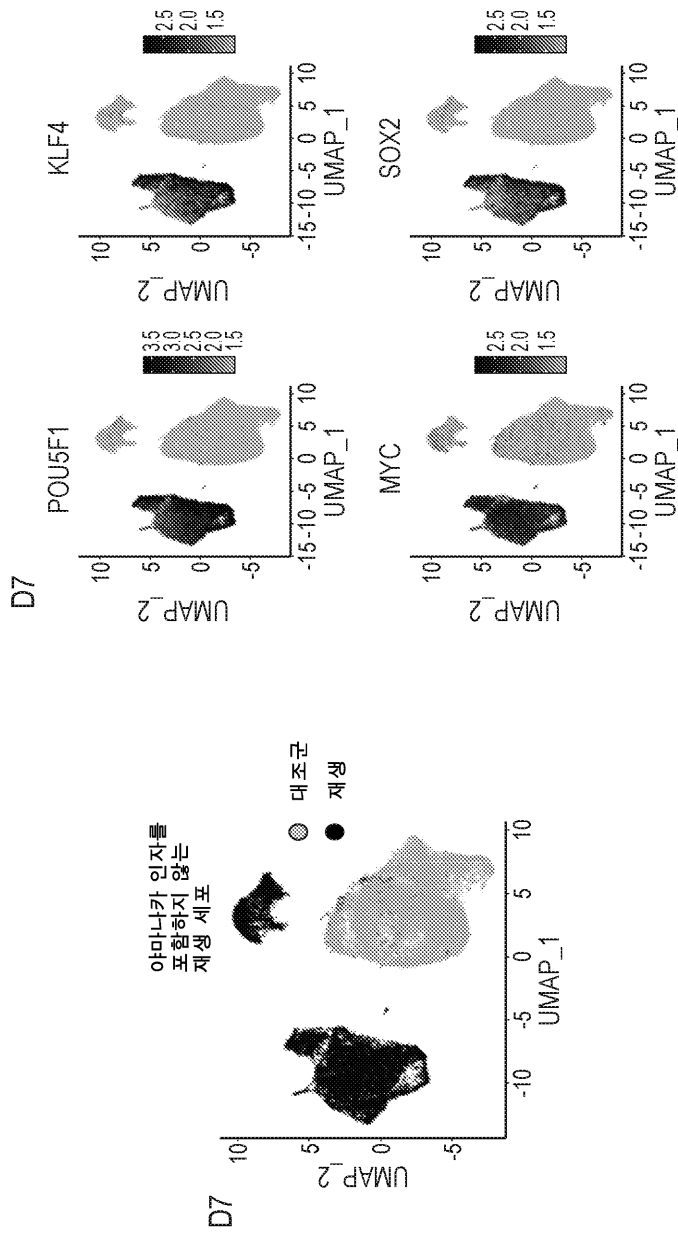
도면55



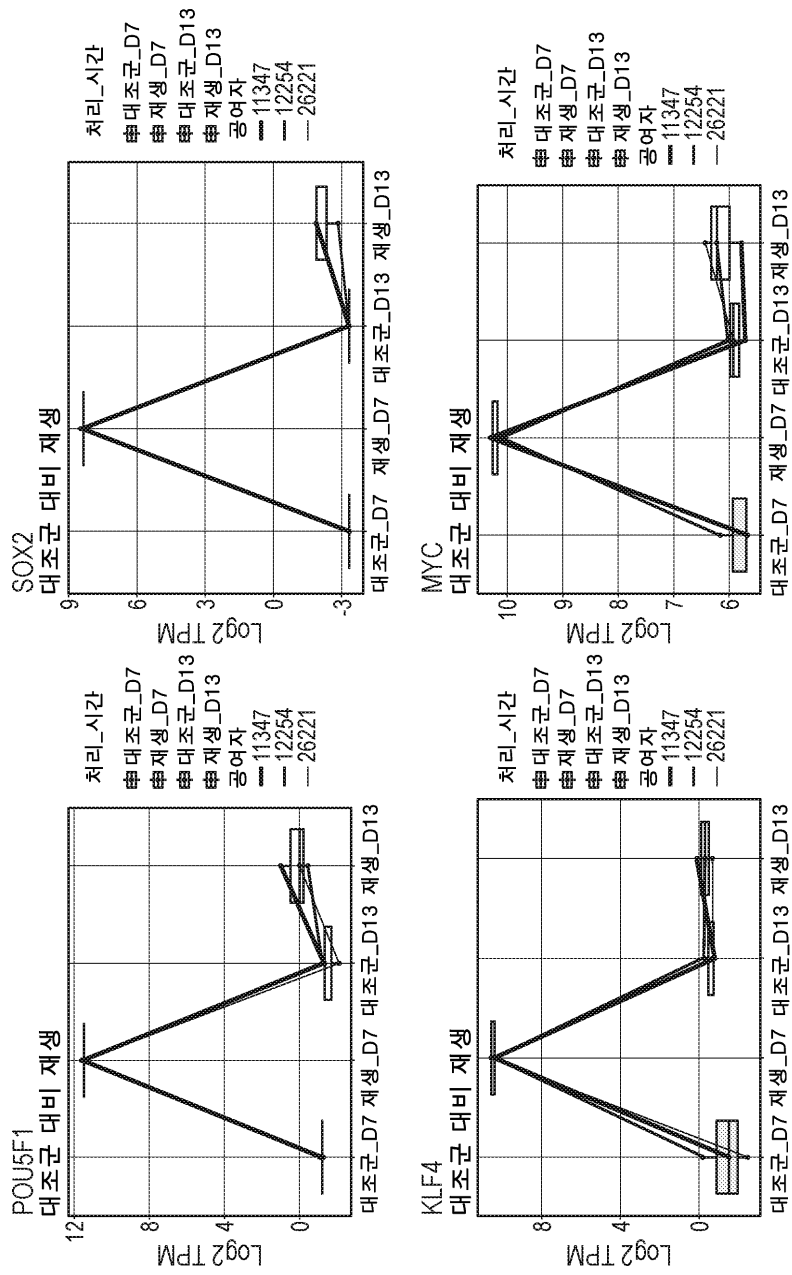
도면56



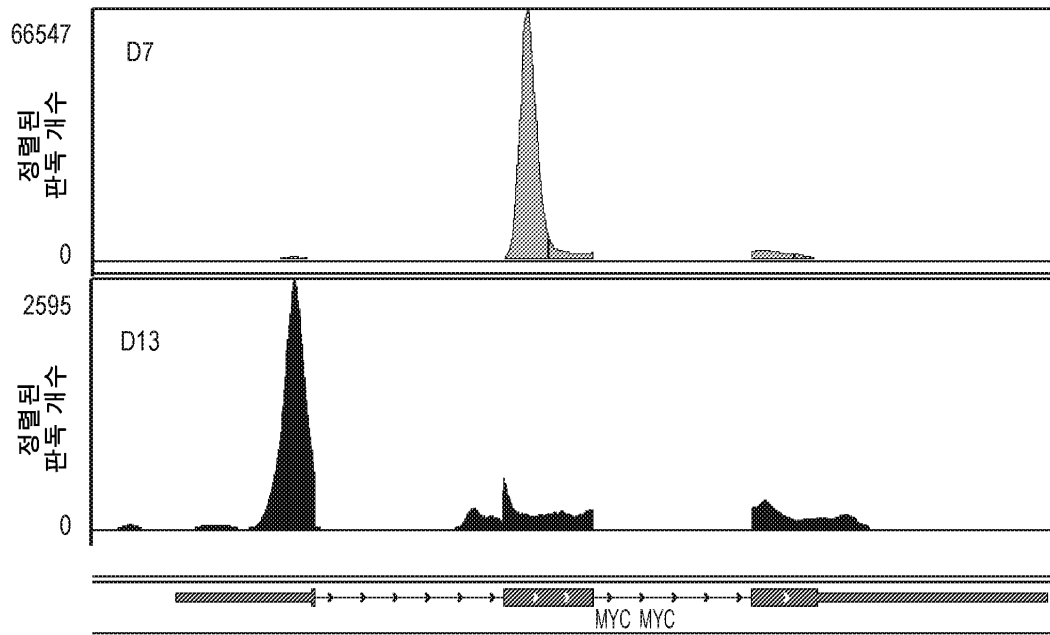
도면57a



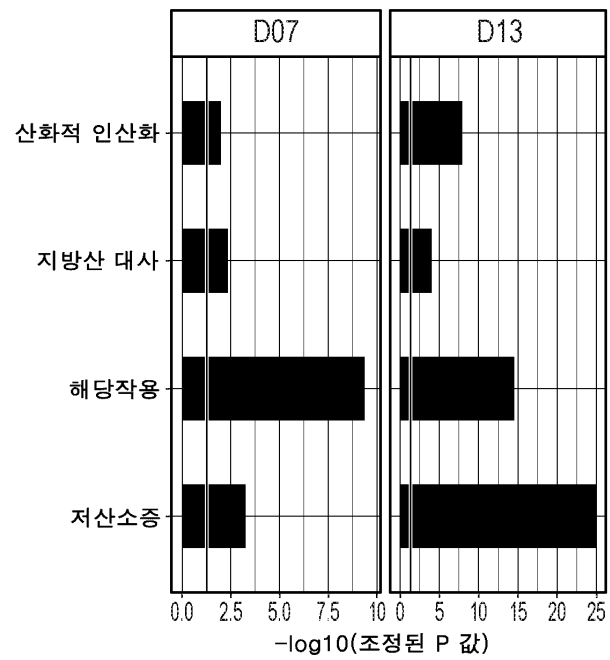
도면57c



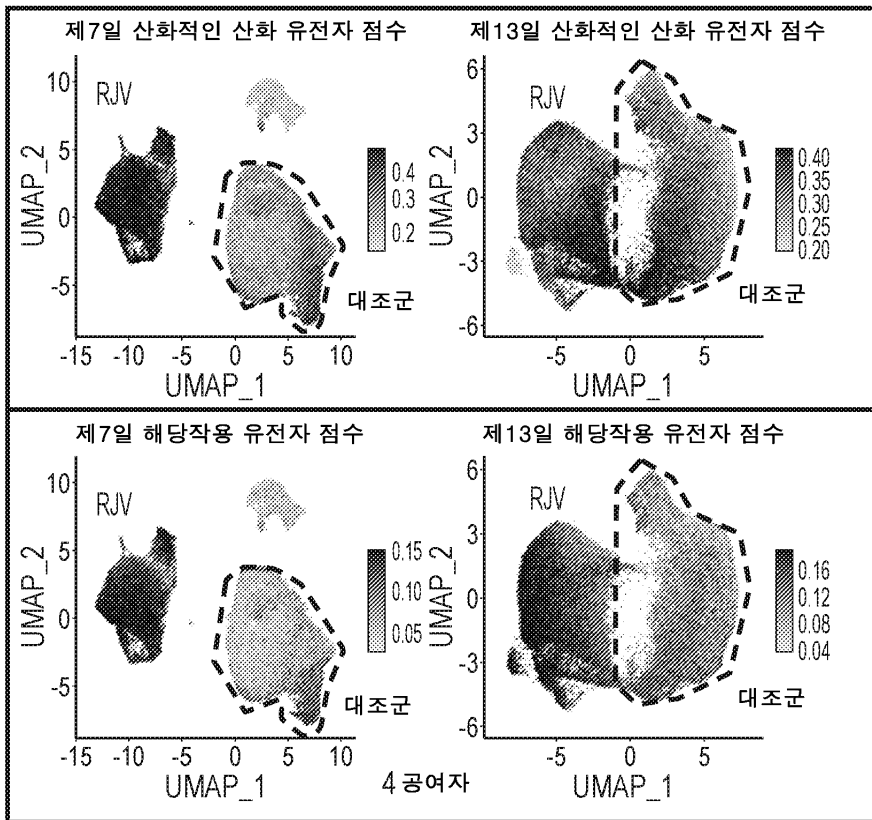
도면57d



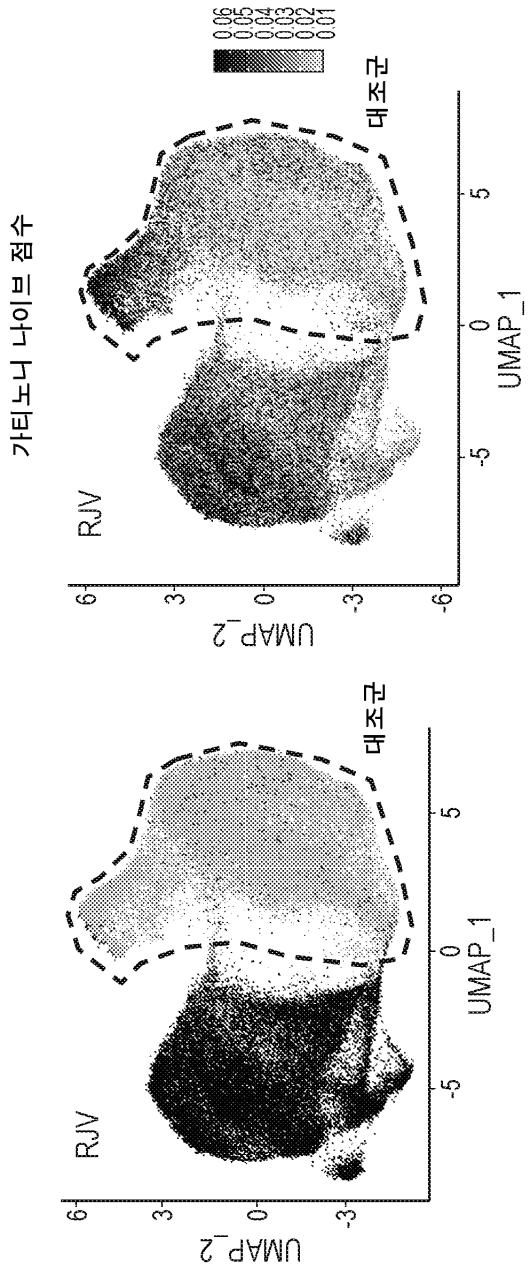
도면58a



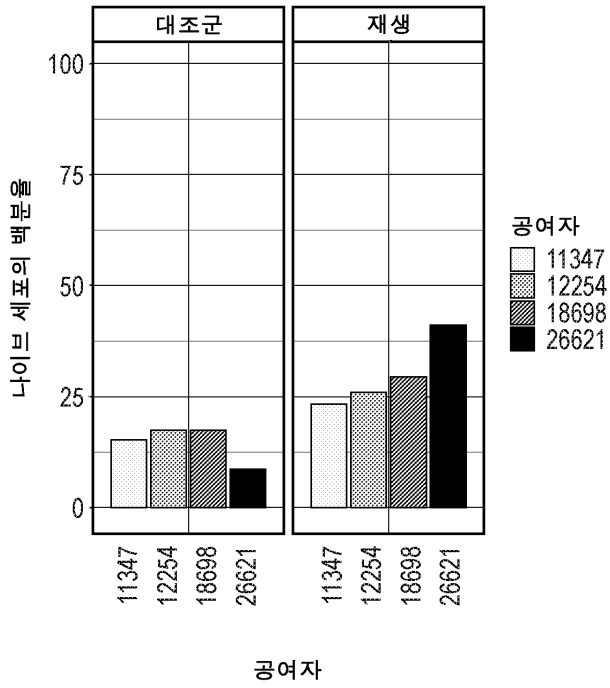
도면58b



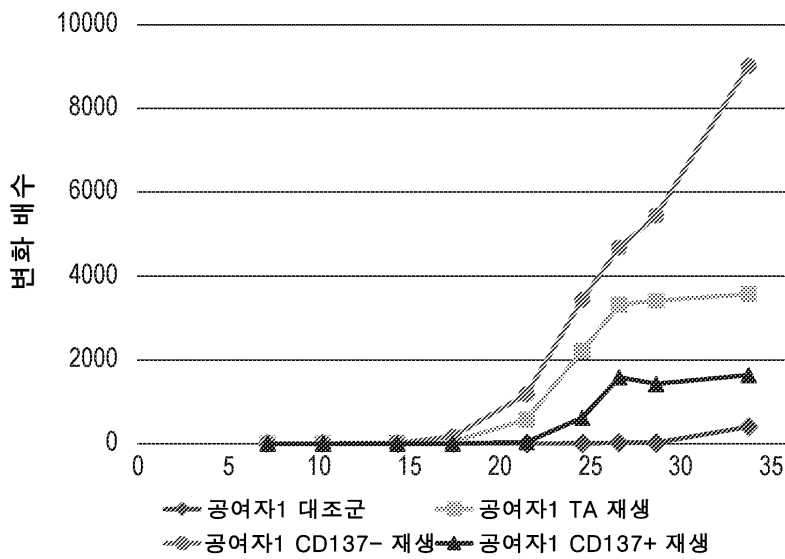
도면59a



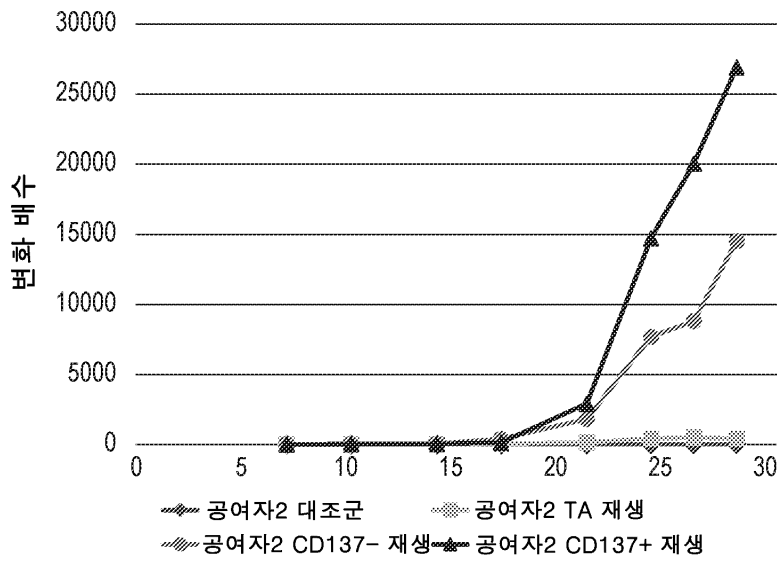
도면59b



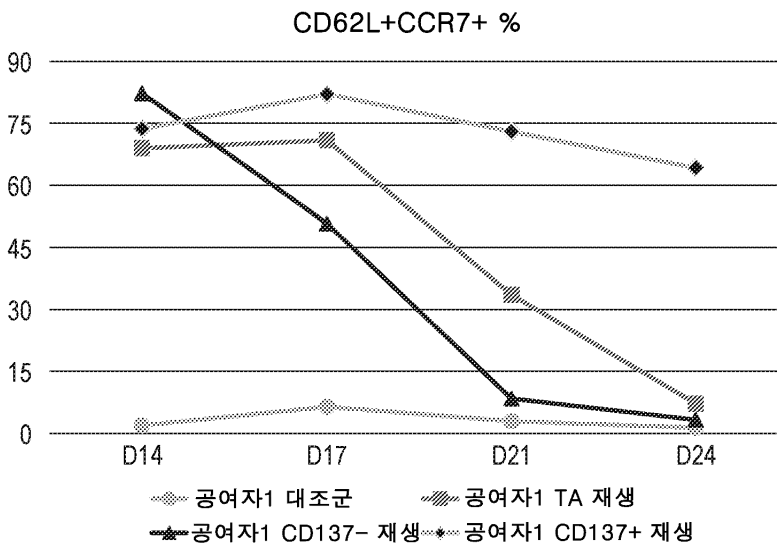
도면60a



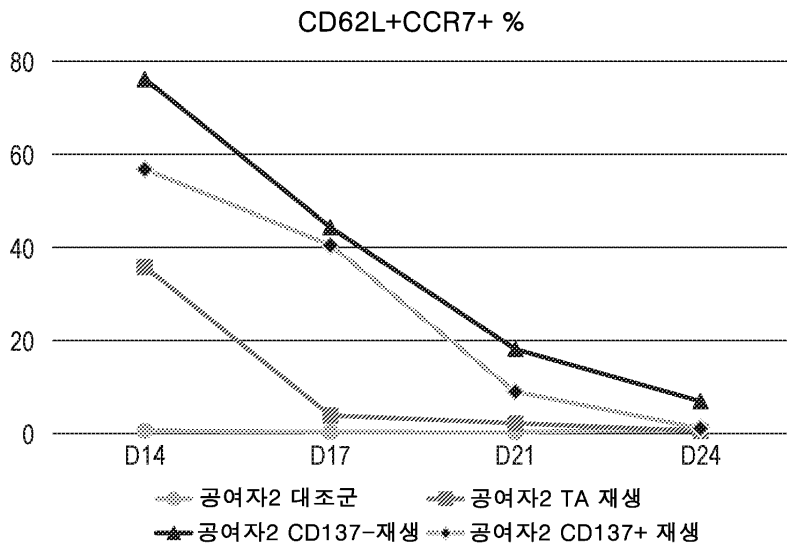
도면60b



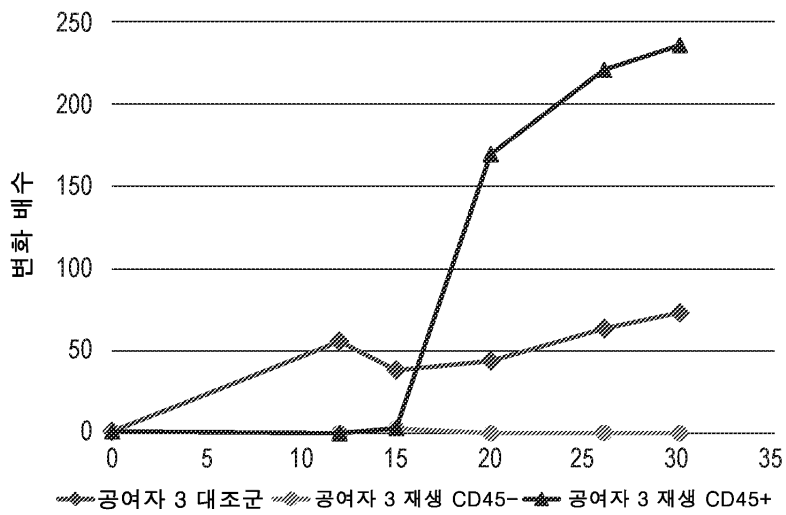
도면61a



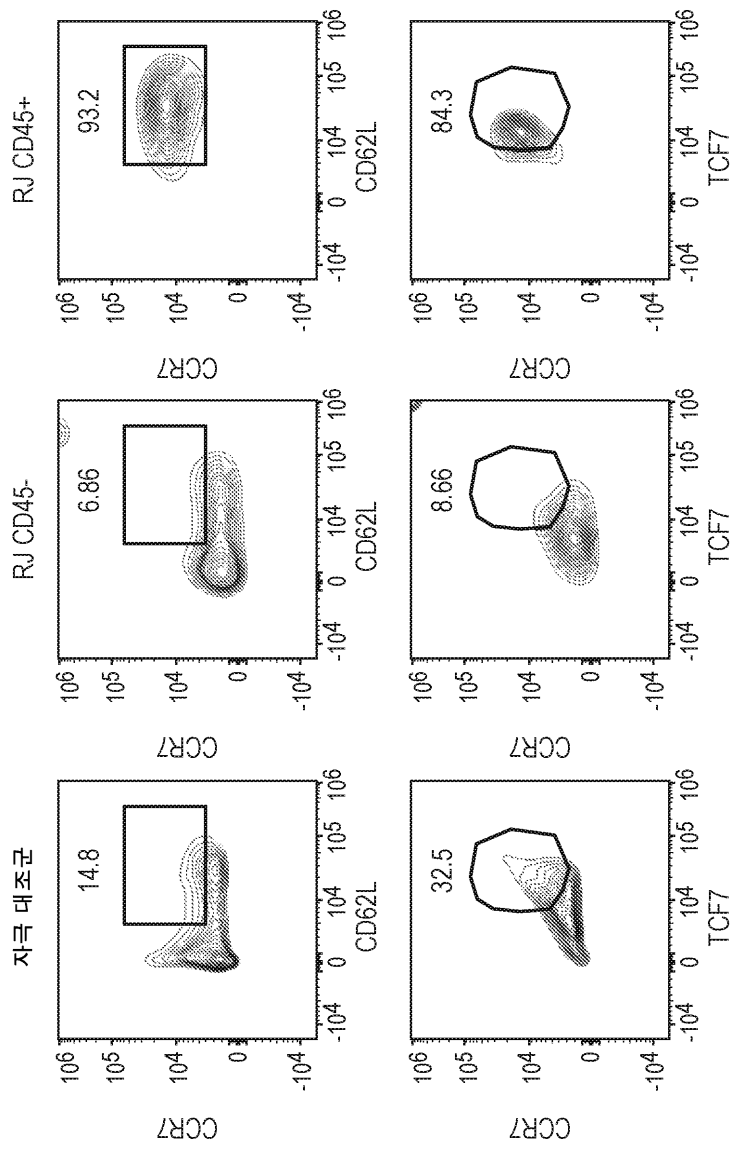
도면61b



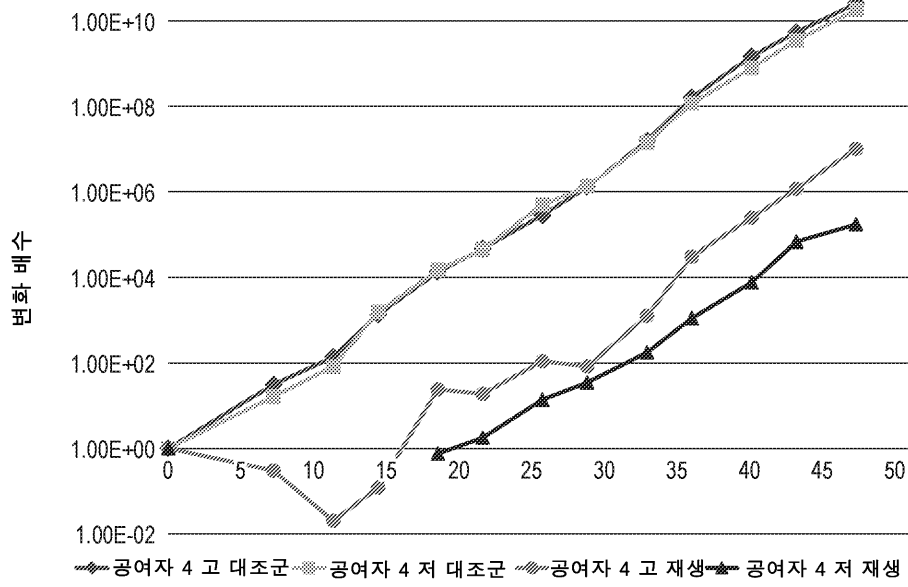
도면62



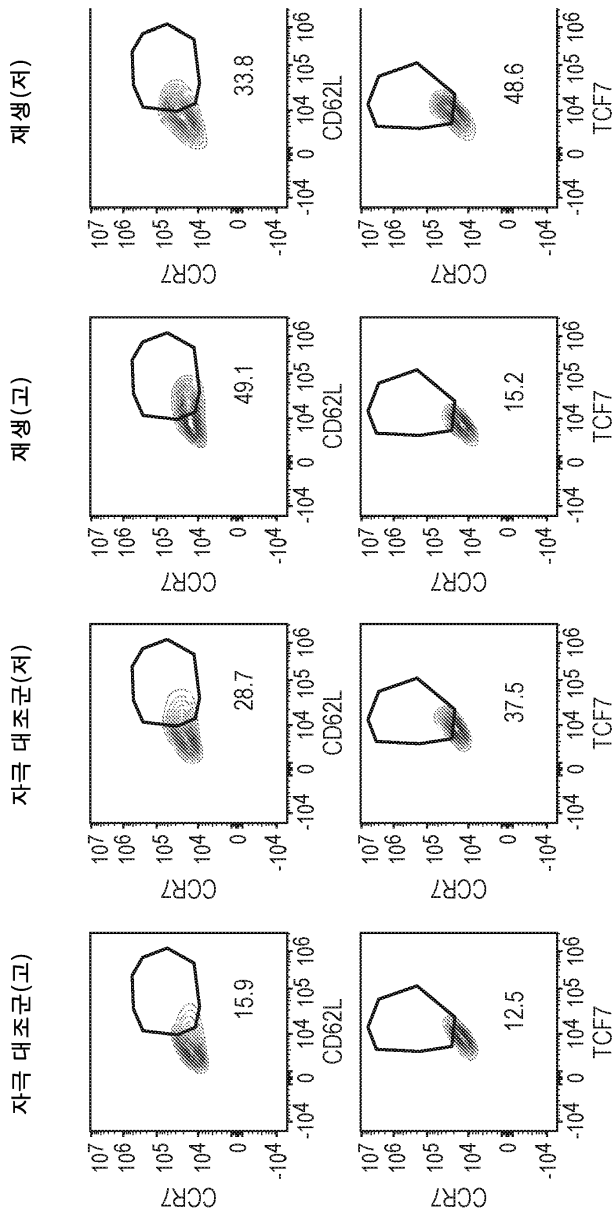
도면63



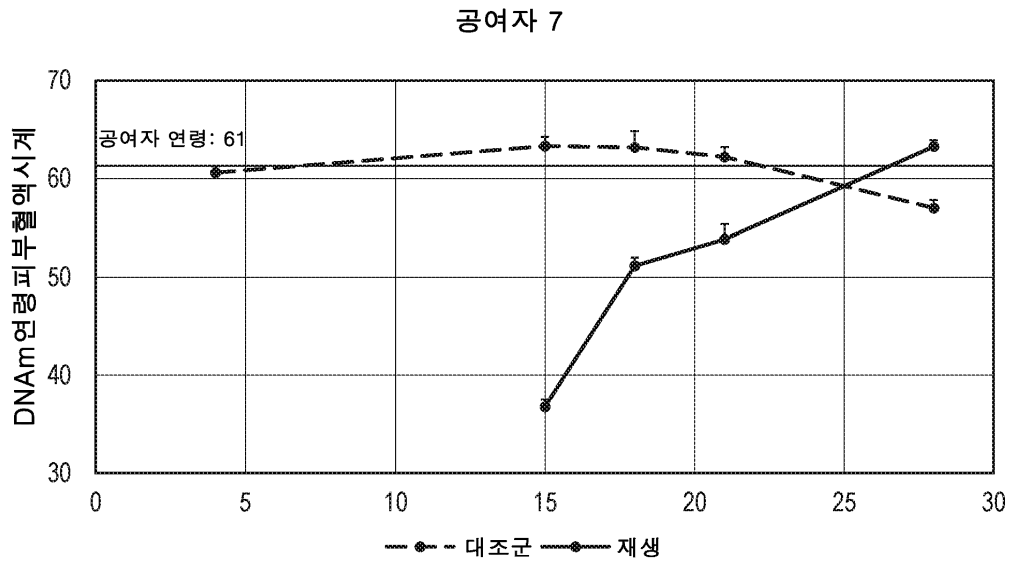
도면64



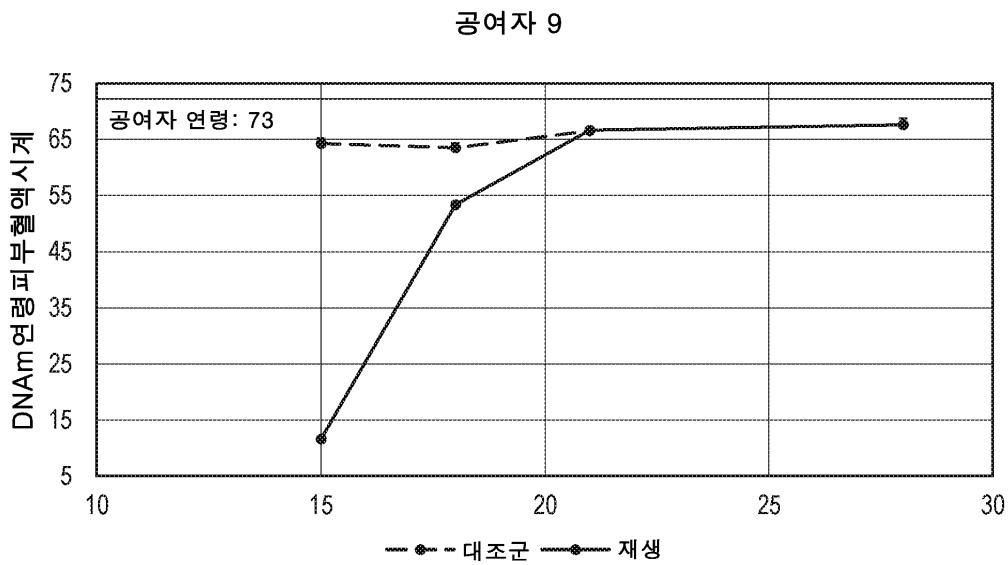
도면65



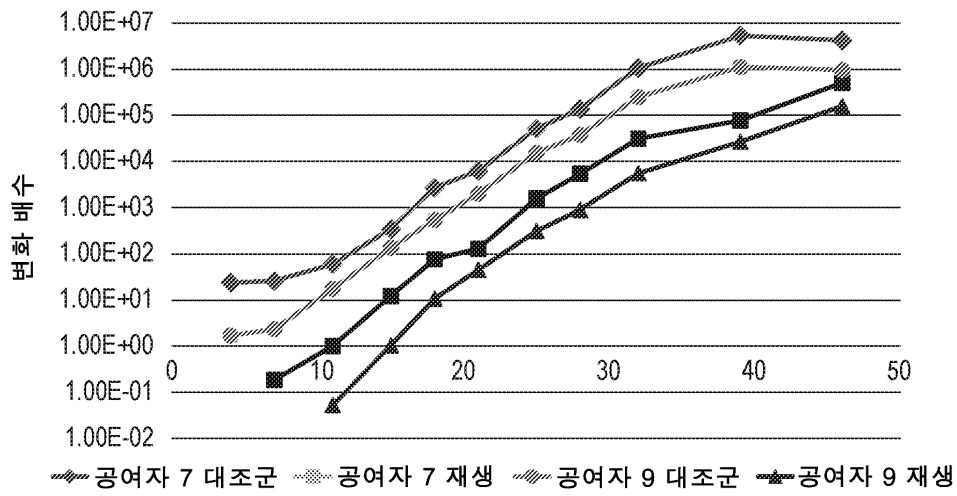
도면66



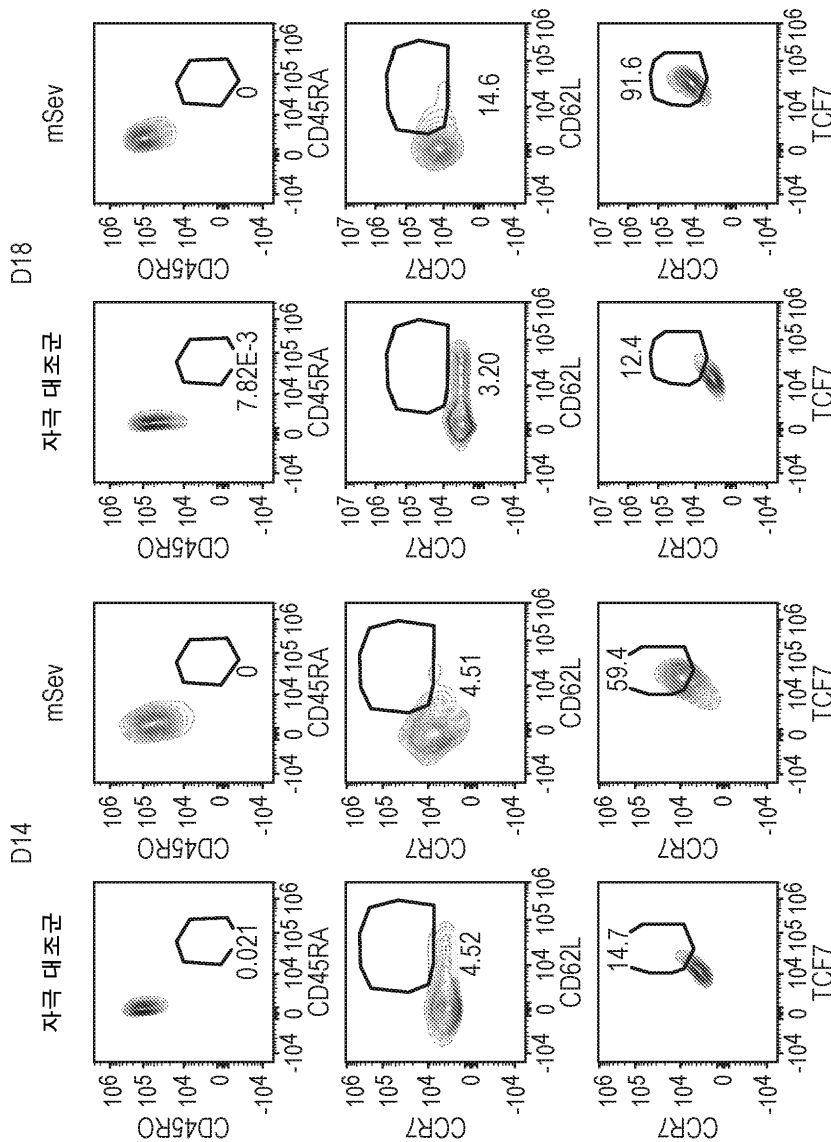
도면67



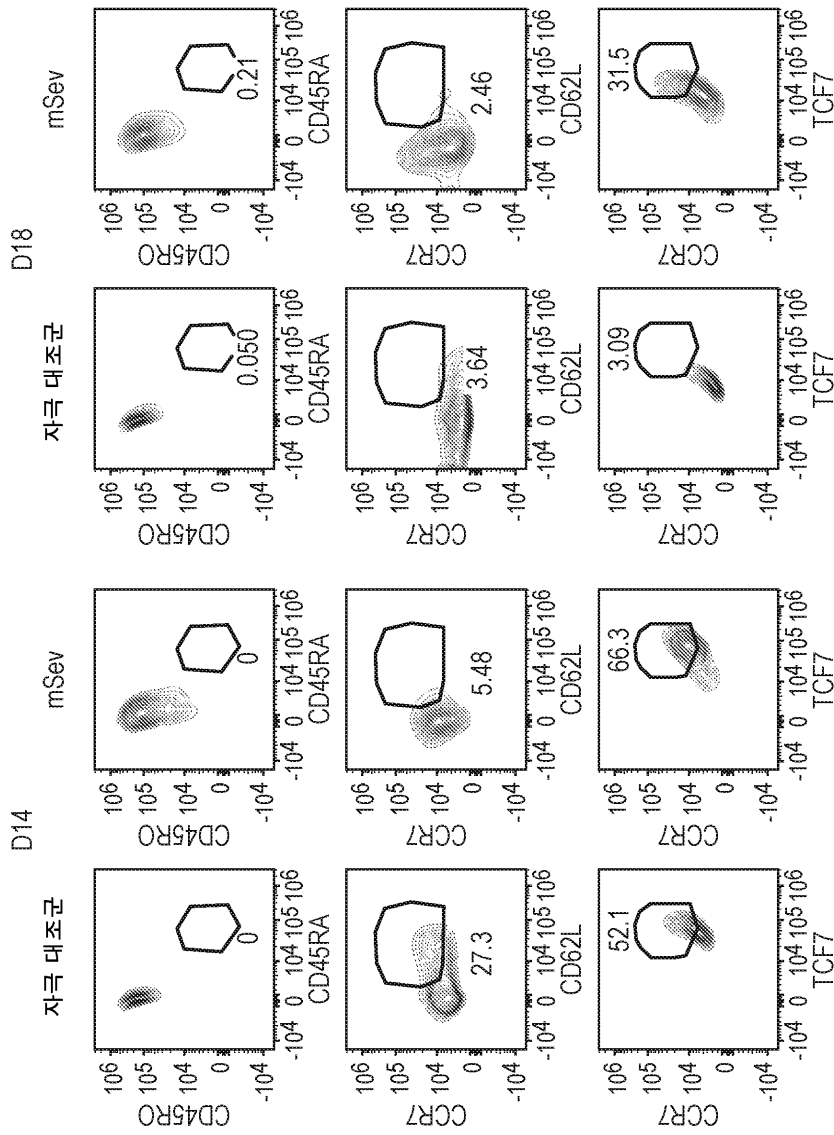
도면68



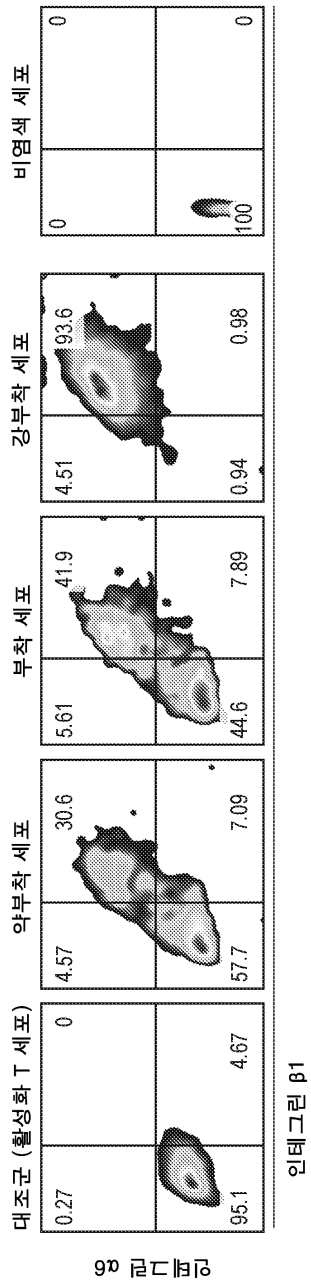
도면69a



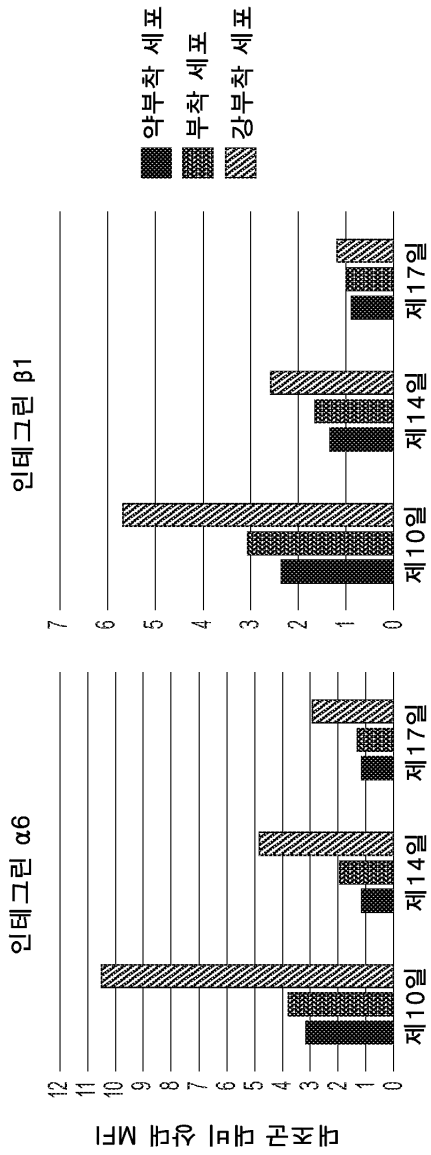
도면69b



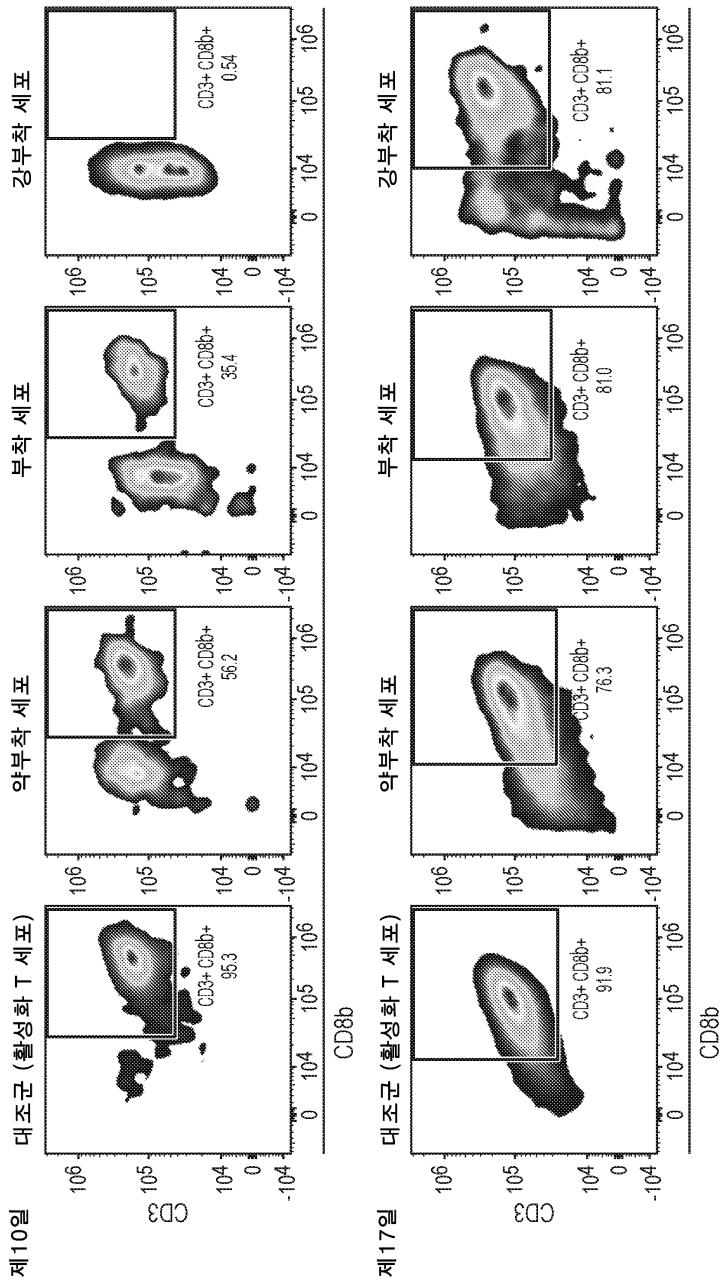
도면70



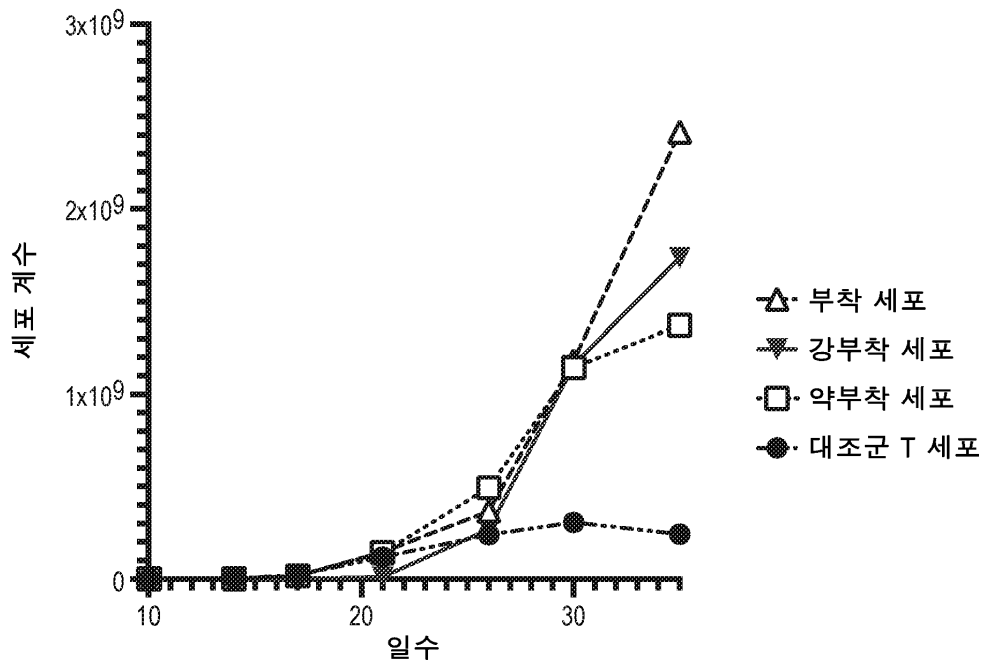
도면 71



도면72



도면73



도면74a

