



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0098235  
(43) 공개일자 2018년09월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)  
A61P 31/18 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
G01N 33/50 (2017.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 5/0638 (2013.01)  
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7015244
- (22) 출원일자(국제) 2016년10월31일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2018년05월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/076264
- (87) 국제공개번호 WO 2017/072367  
국제공개일자 2017년05월04일
- (30) 우선권주장  
1519198.4 2015년10월30일 영국(GB)  
1612731.8 2016년07월22일 영국(GB)

- (71) 출원인  
캔서 리서치 테크놀로지 리미티드  
영국, 런던 이씨1브이 4에이디, 407 존 스트리트,  
엔젤빌딩  
더 프란시스 크릭 인스티튜트 리미티드  
영국, 그레이터 런던 엔더블유1 1에이티 런던 미  
드랜드 로드 1  
킹즈 컬리지 런던  
영국, 런던 더블유씨2알 2엘에스, 스트랜드
- (72) 발명자  
헤이데이, 아드리안  
영국, 그레이터 런던 에스이1 9알티, 런던, 버로  
우 윙 세컨드 플로어, 킹즈 컬리지 런던 스쿨 오  
브 메디슨  
누스바우머, 올리버  
영국, 그레이터 런던 에스이1 9알티, 런던, 버로  
우 윙 세컨드 플로어, 킹즈 컬리지 런던 스쿨 오  
브 메디슨  
울프, 리차드  
영국, 그레이터 런던 에스이1 9알티, 런던, 버로  
우 윙 세컨드 플로어, 킹즈 컬리지 런던 스쿨 오  
브 메디슨
- (74) 대리인  
안소영

전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식 및 이들 세포의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 기질세포 또는 상피세포와 임의의 직접적인 접촉 없이, 인터루킨-2(IL-2) 및/또는 인터루킨-15(IL-15)의 존재 및 TCR 활성화 또는 공동 자극 신호의 부재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하여 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 시험관 내에서 증식시키는 것에 관한 것이다. 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포 증식 방법뿐만 아니라, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 집단 및 이의 용도가 제공된다.

(52) CPC특허분류

*A61P 31/18* (2018.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*G01N 33/505* (2013.01)

*C12N 2501/2302* (2013.01)

*C12N 2501/2315* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

시험관 내에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 증식시키는 방법으로서,

인터루킨-2(IL-2) 및/또는 인터루킨-15(IL-15)의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함하며, 여기에서 림프구는 배양 중에 기질세포 또는 상피세포와 직접 접촉하지 않는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

림프구는 배양 중에 섬유아세포와 직접 접촉하지 않는 방법.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

IL-2의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

인터루킨-15(IL-15)의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

IL-2 및 IL-15의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

TCR 활성화 또는 공동 자극 신호의 부재하에 림프구를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

T 세포 수용체 경로 작용제의 부재하에 림프구를 배양하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

림프구는 기질세포 또는 상피세포의 부재하에 배양되는 것인 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

기질세포 또는 상피세포는 배양 전에 제거되는 것인 방법.

#### 청구항 10

제8항에 있어서,  
림프구는 섬유아세포의 부재하에 배양되는 것인 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서,  
섬유아세포는 배양 전에 제거되는 것인 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,  
림프구는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma \delta$  증식 배지에서 배양되는 것인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 T 세포 수용체를 활성화시키거나 공동 자극하지 않는 것인 방법.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외에 성장 인자가 없는 것인 방법.

**청구항 15**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어지는 것인 방법.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,  
림프구는 피부, 위장관(예를 들어, 결장), 유선 조직, 폐, 간, 췌장 또는 전립선으로부터 수득되는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  T 세포는 비 V $\delta$ 2 세포인 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  T 세포는 V $\delta$ 1 세포인 방법.

**청구항 19**

제17항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  T 세포는 이중 음성(double negative, DN)  $\gamma \delta$  T 세포인 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,  
인간 또는 비인간 동물 조직으로부터 림프구를 수득하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서,

림프구는 인간 또는 비인간 동물 비-조혈조직의 샘플로부터 수득되는 것인 방법.

**청구항 22**

제20항 또는 제21항에 있어서,

조직은 비-조혈세포 및 림프구를 포함하는 것인 방법.

**청구항 23**

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

인간 또는 비인간 동물 비-조혈조직의 샘플을 제공하는 단계 및 상기 샘플의 비-조혈세포로부터 림프구를 분리하여 기질세포를 실질적으로 포함하지 않는 림프구 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 24**

$\gamma \delta$  T 세포를 증식시키는 방법으로서,

(i) 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및

(ii)  $\gamma \delta$  T 세포와 기질세포 접촉이 실질적으로 없는 조건에서  $\gamma \delta$  T 세포를 배양하여  $\gamma \delta$  T 세포의 증식된 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서,

비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포의 집단은 실질적으로 순수한  $\gamma \delta$  T 세포의 집단인 방법.

**청구항 26**

제24항 또는 제25항에 있어서,

비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포의 집단은 비 V $\delta$ 2 세포인 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서,

비 V $\delta$ 2 세포의 집단은 V $\delta$ 1 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 28**

제26항 또는 제27항에 있어서,

비 V $\delta$ 2 세포의 집단은 DN  $\gamma \delta$  T 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 29**

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포의 집단은 V $\delta$ 1<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>CCR8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>  $\gamma \delta$  T 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 30**

제24항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의 배양은  $\gamma \delta$  T 세포와 기질세포 사이의 접촉 없이 수행되는 것인 방법.

**청구항 31**

제24항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의  $\gamma\delta$  T 세포는 TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호가 실질적으로 없는 조건에서 배양되는 것인 방법.

**청구항 32**

제24항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의 배양은 TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호의 부재하에 수행되는 것인 방법.

**청구항 33**

제24항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의 배양은 기질세포 조정 배지에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 34**

제24항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의  $\gamma\delta$  T 세포 배양은 IL-2, IL-15 또는 이들의 조합의 존재하에 수행되는 것인 방법.

**청구항 35**

제24항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$  T 세포의 집단은 인간 또는 비인간 동물 비-조혈조직의 샘플로부터 수득되는 것인 방법.

**청구항 36**

제24항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

비-조혈조직은 비-조혈세포 및  $\gamma\delta$  T 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 37**

제24항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

비 조혈세포로부터  $\gamma\delta$  T 세포를 분리하여, 기질세포를 실질적으로 포함하지 않는  $\gamma\delta$  T 세포를 포함하는 분리된 림프구 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 38**

제24항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$  T 세포는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma\delta$  증식 배지에서 배양되는 것인 방법.

**청구항 39**

제24항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$  증식 배지는 T 세포 수용체를 활성화시키거나 공동 자극하지 않는 것인 방법.

**청구항 40**

제24항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외의 성장 인자가 없는 배지인 방법.

**청구항 41**

제24항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어지는 배지인 방법.

**청구항 42**

$\gamma \delta$  T 세포를 증식시키는 방법으로서,

(i) 비-조혈조직을 제공하는 단계;

(ii) 비-조혈세포로부터  $\gamma \delta$  T 세포를 분리하여 기질세포를 실질적으로 포함하지 않는  $\gamma \delta$  T 세포를 포함하는 분리된 집단을 생성하는 단계; 및

(iii) TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호의 부재하에 단계 (ii)의 분리된 집단을 배양하여  $\gamma \delta$  세포의 증식된 집단을 생성하는 단계를 포함하고,

여기에서 상기 조직은 비-조혈세포 및  $\gamma \delta$  T 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서,

단계 (ii)의 분리는  $\alpha \beta$  T 세포로부터  $\gamma \delta$  T 세포를 분리하는 단계를 더 포함하는 방법.

**청구항 44**

제42항 또는 제43항에 있어서,

단계 (ii)의 분리된 집단은 실질적으로 순수한  $\gamma \delta$  T 세포 집단인 방법.

**청구항 45**

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의 분리된 집단은 비 V $\delta$ 2 세포인 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서,

비 V $\delta$ 2 세포의 집단은 V $\delta$ 1 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 47**

제45항 또는 제46항에 있어서,

비 V $\delta$ 2 세포의 집단은 DN  $\gamma \delta$  T 세포를 포함하는 것인 방법.

**청구항 48**

제42항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (ii)의 분리된 집단은 V $\delta$ 1<sup>+</sup>CLA<sup>+</sup>CCR8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>  $\gamma \delta$  T 세포의 집단을 포함하는 것인 방법.

**청구항 49**

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (iii)의 배양은 실질적으로 기질세포 접촉 없이 수행되는 것인 방법.

**청구항 50**

제42항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (iii)의 배양은  $\gamma \delta$  T 세포와 기질세포 사이의 접촉 없이 수행되는 것인 방법.

**청구항 51**

제42항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

단계 (iii)의 배양은 TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호가 실질적으로 없는 것인 방법.

**청구항 52**

제42항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 (iii)의 배양은 TCR 활성화 신호 및 공동 자극 신호의 부재하에 수행되는 것인 방법.

**청구항 53**

제42항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 (iii)의 배양은 기질세포 조정 배지에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 54**

제42항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,  
단계 (iii)의 배양은 IL-2, IL-15 또는 이들의 조합의 존재하에 수행되는 것인 방법.

**청구항 55**

제54항에 있어서,  
분리된 집단은 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma \delta$  증식 배지에서 배양되는 것인 방법.

**청구항 56**

제55항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 T 세포 수용체를 활성화시키거나 공동 자극하지 않는 것인 방법.

**청구항 57**

제55항 또는 제56항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외의 성장 인자가 없는 것인 방법.

**청구항 58**

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,  
 $\gamma \delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어지는 것인 방법.

**청구항 59**

제24항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서,  
증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 배양 14일 이내에 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포로서 적어도 20배의  $\gamma \delta$  T 세포 수를 포함하는 것인 방법.

**청구항 60**

제59항에 있어서,  
증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 배양 7일 이내에 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma \delta$  T 세포로서 적어도 2배의  $\gamma \delta$  T 세포 수를 포함하는 것인 방법.

**청구항 61**

제24항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서,  
증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 적어도 50%  $V\delta 1^+$  세포인 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서,

증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 적어도 70%  $V\delta 1^+$  세포인 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서,

증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 적어도 90%  $V\delta 1^+$  세포인 방법.

**청구항 64**

제24항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서,

증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 CCR4, CCR8 및 CD103에 대해 적어도 10% 양성인 방법.

**청구항 65**

제63항에 있어서,

증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 CCR4 및 CCR8에 대해 적어도 30% 양성인 방법.

**청구항 66**

제65항에 있어서,

증식된  $\gamma \delta$  T 세포 집단은 CCR8에 대해 적어도 60% 양성인 방법.

**청구항 67**

제24항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma \delta$  T 세포는  $V\delta 2^-$  세포인 방법.

**청구항 68**

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포.

**청구항 69**

다음 중 하나 이상을 갖는 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포:

- (i) 표현형  $CD69^{high}$ ,  $ICOS^{high}$ ,  $TIM3^{high}$  및  $CD28^{low/absent}$  을 나타내고,
- (ii) CCR3, CD39, CD11b, 및 CD9 중 하나 이상을 상향 조절하고,
- (iii) TCR 작용제의 부재하에 NKG2D 리간드에 반응하여 IFN- $\gamma$  를 생성하고,
- (iv) TCR 작용제의 부재하에 IL-13을 생성하고,
- (v) TCR 활성화에 반응하여 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 GM-CSF 중 하나 이상을 생성하고,
- (vi) TCR 활성화에 반응하여 IL-17을 전혀 또는 실질적으로 생성하지 않고,
- (vii) 추가적인 성장 인자 없이 IL-2를 함유하는 배양 배지에서 성장하고,
- (viii) TCR 작용제의 부재하에 세포독성 T 세포 반응을 나타내고, 및/또는
- (ix) 정상 세포보다 종양 세포에 대해 선택적인 세포독성을 나타낸다.

**청구항 70**

체크포인트 억제제에 대한 스크리닝 방법으로서,

- (i) 시험 화합물의 존재 및 부재하에 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 직접적으로 접촉시켜 시험관 내(*in vitro*)에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 배양하거나,  $\gamma \delta$  T 세포 내 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)에서의 시험 유전자의 발현이 변경된 기질세포 또는 상피세포(예를 들어,

섬유아세포)와 직접적으로 접촉시켜 시험관 내에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 배양하는 단계; 및

(ii) 시험 화합물의 존재 및 부재하에 또는 섬유아세포 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재 및 부재하에 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식 또는 활성화 속도를 결정하거나, 시험 화합물의 존재 및 부재하에 또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재 및 부재하에 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)의 살해 속도를 결정하는 단계를 포함하며,

여기에서, T 세포의 증식 또는 활성화 속도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시험 화합물의 존재하에서 더 높거나 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 변경의 부재하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높은 경우, 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)의 살해 속도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시험 화합물의 존재하에서 더 높거나 섬유아세포 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 변경의 부재 하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높은 경우, 시험 화합물은 체크포인트 조절인자이거나 시험 유전자가 체크포인트 유전자 후보일 가능성이 있는 방법.

**청구항 71**

입양 T 세포(adoptive T cell) 치료법에 의한 인간 또는 비인간 동물의 치료 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포.

**청구항 72**

제71항에 있어서,

인간은 인간 암 환자 또는 CMV 감염 환자 또는 HIV 감염 환자와 같은 바이러스 감염 환자인 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포.

**청구항 73**

입양 T 세포 치료법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 있어서,

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 74**

제73항에 있어서,

대상체는 인간 암 환자 또는 CMV35 감염 환자 또는 HIV 감염 환자와 같은 바이러스 감염 환자인 방법.

**청구항 75**

키메라 항원 수용체 치료법에 의한 인간 또는 비인간 동물의 치료 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포.

**청구항 76**

제75항에 있어서,

인간은 인간 암 환자인 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포.

**청구항 77**

키메라 항원 수용체 치료법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 있어서,

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 78**

제77항에 있어서,  
대상체는 인간 암 환자인 방법.

**청구항 79**

입양 T 세포 치료법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 있어서,  
제69항의 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 80**

제79항에 있어서,  
대상체는 인간 암 환자 또는 CMV35 감염 환자 또는 HIV 감염 환자와 같은 바이러스 감염 환자인 방법.

**청구항 81**

키메라 항원 수용체 치료법에 의해 대상체를 치료하는 방법에 있어서,  
제69항의 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 세포는 키메라 항원 수용체를 발현하는 세포인 방법.

**청구항 82**

제81항에 있어서,  
대상체는 인간 암 환자인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 생체 외(ex vivo)에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 증식시키는 방법에 관한 것이다. 용어 "비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포(non-haematopoietic tissue-resident  $\gamma \delta$  T cell)"는 림프기관 및 혈액 내가 아니라 비-조혈조직 내에 상재하는 T 림프구의 서브셋을 지칭한다. 이러한 세포는 비 V $\delta$ 2 세포, 예를 들어 V $\delta$ 1, V $\delta$ 3 및 V $\delta$ 5 세포를 포함한다. 또한, 본 발명은 입양(adoptive) T 세포 치료법 및 키메라 항원 수용체 치료법에서의 이들 세포의 용도뿐만 아니라, 체크포인트 조절인자(checkpoint modulator)의 스크리닝 방법에서의 이의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 생체 외 증식의 결과로 생성된 세포에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암에 대한 T 세포 면역요법에 대한 늘어가는 관심은 특히, PD1(7, 8), CTLA4(9, 10) 및 기타 수용체(11)에 의해 발휘되는 억제성 경로의 임상적으로 매개된 길항작용에 의해 탈 억제될(de-repressed) 때, 암세포를 인식하고 숙주를 보호하는 기능적인 잠재력을 매개하는 CD8+(1-4) 및 CD4+ $\alpha \beta$  (5, 6) T 세포 서브셋의 명백한 능력에 집중되어 있었다. 그럼에도 불구하고, 많은 의문점이 남아 있다. 예를 들어, 이러한 치료의 효능이 좋지 못해 보이는 여러 주요한 임상적 시나리오가 있는 것으로 보인다(11); 종종 극심한 부작용(adverse event, AE)이 있고(12); 효능이나 극심한 부작용을 예측하는 능력이 극도로 한정되어 있으며(13); 통상적인, 항원 특이적인 CD8+ 및 CD4+  $\alpha \beta$  T 세포 반응의 활성화에 반드시 선행되어야 하는, 숙주가 종양 세포를 감지할 수 있게 하는 상호작용(소위 "면역원성")에 대한 설명이 거의 없다.

[0003] 이와 관련하여, 많은 과학자와 임상가의 모두  $\alpha \beta$  T 세포와 B 세포만큼 진화론적으로 확고히 보존되어 있는 체세포 생성 수용체(somatically-generated receptor)를 가진 제3 계통(a third lineage)의 림프구인  $\gamma \delta$  T 세포의 잠재력을 재평가하고 있다. 본질적으로는 인간  $\gamma \delta$  T 세포의 2개의 하위 그룹이 있다: 인간의 말초 혈액에서 우세하며, 주로 V $\delta$ 2 T 세포 수용체(T Cell Receptor, TCR)를 발현하는 하위 그룹; 그리고 비-조혈조직에서 우세하며, V $\delta$ 3 또는 V $\delta$ 5 사슬 또는 어떤 다른 비-V $\delta$ 2 사슬을 함유하는 TCR을 발현하는 소규모 집단과 함께 대다수가 V $\delta$ 1 TCR을 발현하는 하위 그룹이 있다(14).

[0004] 대부분의 성인에서, V $\delta$ 2 세포는 정상상태(steady-state)에서 단지 혈액 T 세포 중 작고 매우 가변적인 성분만

을 포함하지만(0.01-5%), 수많은 박테리아와 기생충을 포함하는 광역 스펙트럼의 약제에 의한 유발검사(challenge) 후에 세포는 CD3+ 세포의 ~25%까지 급격하고 일시적으로 증식한다(14). 이러한 반응에 대한 주요한 이유는 콜레스테롤 합성 및, 예를 들어 게라닐화(geranylation) 또는 파르네실화(farnesylation)에 의해 단백질을 개질시키는데 사용되는 기타 지질의 합성의 중요한 미생물 경로에서, 중간물질인 하이드록시-메틸 but-2-엔일 피로포스페이트(hydroxy-methyl but-2-enyl pyrophosphate, HMBPP)(15)를 포함하는, 저분자량 "포스포-모이어티(phospho-moieties)"의 V $\delta$ 2 TCR 매개성 인식이다. 영장류에서, 이 합성은 메발로네이트 경로를 통해 일어나는데, 이 경로의 한 중간물질인 이소펜테닐 피로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate, IPP)는 바이러스 감염 세포 및 바이러스 형질전환 세포에서 매우 높은 수준으로 발현되며, 또한 V $\delta$ 2 TCR 매개성 인식의 표적이기도 하다(16).

[0005] 또한, 대부분의 V $\delta$ 2 T 세포는 NKG2D 리간드, 예를 들어 MICA, MICB 및 ULBP에 결합시 세포의 세포 용해(cytolytic) 가능성을 활성화시키거나 (TCR과 함께) 공동 자극할 수 있는 NKG2D 수용체를 높은 수준으로 발현한다. 이들 리간드는 세포가 산화적 또는 삼투성 스트레스 또는 자외선과 같은 약제에 노출될 때 상향 조절되는 숙주 단백질이다. 이들 약제는 상피세포 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 경로의 과활성 신호전달(hyper-active signalling)을 촉진하며, 이는 또한 인간의 고형 종양에서 일반적으로 조절되지 않는다(17).

[0006] 강력한 세포 용해 능력과 함께, TCR 및/또는 NKG2D(18-20)를 이용하여 형질전환된 세포를 검출하는 V $\delta$ 2 T 세포의 능력, 그리고 CD8+ T 세포(21)에 대한 명백한 항원 제시 가능성은 총체적으로 암 면역요법을 전달하는 데 V $\delta$ 2 T 세포가 임상적으로 활용될 수 있을 것이라는 견해를 불러 일으켰다. 이는  $\gamma$   $\delta$  T 세포가 MHC에 의해 제한되는 것을 막고, 중요하고 유익하게는 이식편대숙주병(graft-versus-host disease, GvHD)(22)의 가능성을 제한한다는 점에서, 세포의 입양 전달(adoptive transfer)에 의해 달성될 수 있다. 이를 달성하기 위해, 포스포-모이어티(예를 들어, BrHPP)와 같은 외인성 TCR 활성화제와 함께 또는 메발로네이트 경로에서 파르네실 피로포스페이트 합성효소(farnesyl pyrophosphate synthase)를 억제하여 TCR 활성화 모이어티인 IPP의 축적을 유도하는, 임상적으로 승인된 비스포스포네이트(예를 들어, 졸레드론산)와 함께, 인터루킨 (IL)-2와 같은 사이토카인의 첨가에 의해, 혈액에 상재하는 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $\gamma$   $\delta$  T 세포를 생체 외(ex vivo)에서 증식시킬 수 있다. 그러나, BrHPP와 같은 약제를 통한 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 세포의 만성적인 활성화는 세포 고갈(exhaustion)로 점진적으로 진행되어 세포독성 가능성을 감소시킬 수 있다.

[0007] 대안적으로, 환자 자신의  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 약학적으로 개질된 형태의 HMBPP, 또는 임상적으로 승인된 아미노비스포스포네이트를 이용하여 현장(in situ)에서 활성화될 수 있다. 이들 접근법에 의해, 250명이 넘는 암 환자가 외견상으로 안전하게 치료를 받았으나, 완전 관해(complete remission)의 발생 빈도는 아주 드물었다. 이러한 세포의 제한된 임상적 효능과 관련된 한 가지 주요한 관심사는 만성적인 항원 노출에 의해 회복할 수 없을 정도로 고갈되는 세포의 성향이다. 두 번째 주요 관심사는 고형 종양 및 그 종양을 보유하고 있는 조직에 대한 표적 지향성(homing)에 있어서의 그것의 명백한 비효율성이다(23).

[0008] 키메라 항원 수용체 T 세포(Chimeric antigen receptor T cell, CAR-T) 치료법은 B 세포 악성 종양 클리닉에서 가능성을 보이고 있다. 그러나, 고형 종양 치료와 관련하여, CAR-T 세포의 성능은 지금까지 완전한 종양 반응을 유도할 때 효율성이 낮고, 높은 오프-종양 세포독성(off-tumour cytotoxicity)의 발생률을 보이는 것으로 기대 이하였다(24). 말초 혈액  $\gamma$   $\delta$  T 세포에 대해서는, 고형 종양에 대한 CAR-T 접근법의 성공을 가로막는 주요 장애물은 전신성 CAR-T 세포가 악성 종양 부위로 이동하여 기능적으로 유효한 상태로 머무는 비효율적 가능성이다(25). 추가적으로, 통상적인  $\alpha$   $\beta$  T 세포를 기반으로 하는 CAR-T 세포는 종양 미세환경에서 면역 억제성 신호, 예를 들어 PD1 수용체를 통해 전달되는 신호를 극복해야 한다.

[0009]  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 NKG2D와 같은 수용체를 이용하여 형질전환된 세포를 인식하는 선천적 능력은 유지하면서 종양 반응성 키메라 항원 특이적 TCR로 형질도입될 수 있기 때문에,  $\gamma$   $\delta$  T 세포를 CAR-T 접근법에 이용하는 것과 관련된 이점이 있을 수 있다. 따라서,  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 종양 적응성 (TCR) 및 선천적 (NKG2D)-매개 효과에 동시에 영향을 줄 수 있다. 그러나, 고형 조직 내의 종양에 대한 표적 지향에 있어서의 인간 혈액  $\gamma$   $\delta$  T 세포의 외견상 비효율성 및 거기에서 활성화형으로 유지된다는 문제가 남아 있다. 이러한 고려 사항은 정상적으로 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma$   $\delta$  T 세포에 대한 더욱 구체적인 고찰을 유발했다.

[0010] 이러한 T 세포는 발달의 일부로서 비-조혈조직으로 이동하며, 이는 전신성 촉발(systemic priming) 후 그 조직에 침투하는 T 세포, 예를 들어 조직에 상재하는 TCR  $\alpha$   $\beta$ + 기억 T 세포(소위 TRM 세포)와는 구별된다. 조직에 상재하는  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 마우스에서 가장 잘 연구되어 있으며, 이는 다른 부위 중에서도 피부, 소화관 및 생식

조직에 널리 퍼져있는 것으로 나타났다. 많은 그러한 세포가 NKG2D 수용체의 활성화를 통해 유발검사(challenge)에 반응할 수 있는 선천성(innate-like) 기능적 잠재력을 보유하고 있는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 최근에 인간 피부와 장 또한 선천성 활성을 가진 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 많은 구획을 보유하고 있다는 것을 입증하는 데이터를 획득하였다. 그럼에도 불구하고, 악성 종양, 염증, 아토피, 알레르기 및 비-조혈조직 내에서 형성되는 다른 병상(pathology)의 연구가 병리학적 병변이 발생하는 조직 내에 상재하는 이들 선천성 인간 T 세포의 잠재적인 영향을 대체로 고려하지 않았다는 사실은 놀랍다.

[0011] 비-조혈조직 내에 상재하는 인간  $\gamma\delta$  T 세포는 그 국재성(localisation)으로 인해 세포를 표본화하기 어렵고 이들 세포를 배양하는 확립된 수단이 없었기 때문에, 연구된 바가 거의 없다. 상대적으로 희박한 이용 가능한 정보 중에서, 이 아형은  $V\gamma 2$  함유 TCR을 발현하지 않기 때문에 저분자량 포스포-모이어티에 전혀 반응하지 않는, 비-MHC 제한성 세포 용해 잠재력을 가지는 다양한 세포를 포함한다. 이러한 세포에 대한 정확한 TCR 특이성은 거의 알려지지 않았지만, 이용 가능한 데이터는 세포가 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 감염 세포 및 많은 고형 종양에 의해 과발현되는 내피 단백질 C 수용체(Endothelial Protein C ReceptorEPCR)와 같은 자가 항원에 반응한다는 점을 시사한다(32). 비-조혈조직 관련  $\gamma\delta$  T 세포는 또한 일반적으로 NKG2D를 발현한다(14). 이러한 특성 및 피부와 소화관 같은 비-조혈조직 내에서의 세포의 생리학적 상재성을 고려하면, 이러한 세포의 암 환자로의 입양 전달은 고형 종양 및 잠재적으로 다른 면역병리를 표적화하는 데 있어서 상당히 더 효과적일 수 있다.

[0012] 면역요법을 위해 비- $V\delta 2$  세포를 이용하기 위해서는, 재주입(re-infusion) 전 세포를 현장(*in situ*)에서 증식시키거나 세포를 수확하여 생체 외(*ex vivo*)에서 증식시키는 방법이 필요하다. 많은 양의 비- $V\delta 2$  세포를 현장에서 증식시키는 것에 대하여 입증된 능력을 가진 공지된 TCR 활성화제가 없기 때문에 후자의 방법이 채택되었다. 비-조혈조직의 한정된 이용 가능성에 대한 도전을 극복하기 위해, 일부 연구자들이 혈액으로부터 매우 적은 수의 비- $V\delta 2$  세포를 증식시키기 위한 시도를 하였으며, 여기에서  $V\delta 2$ 를 발현하는 세포는 우세한 서브셋이고, 이들 세포가 조직에 상재하는 비- $V\delta 2$  세포와 동등하다고 가정하였다. 혈액에서 발견되는 소수의 비- $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T 세포는 활성 CMV 감염 중에 실질적으로 증식하고,  $V\delta 2$  T 세포와 비교하여 CMV에 대한 우수한 반응성을 나타내며, 자궁 내 CMV 감염의 경우 인간 태아를 보호할 수 있을 것으로 보인다. 또한, CMV 반응성 비- $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T 세포는 표면상으로는 면역억제 중에 CMV 재활성화로부터 이식 환자를 보호하고, 형질전환된 세포에 대한 교차 반응을 통해 2차 악성 종양의 위험을 감소시킨다(26). 유사하게는,  $\gamma\delta$  T 세포가  $V\delta 2$  T 세포와 비교하여 비- $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T 세포가 혈액에서 증식하는 HIV 감염을 제어하는 데 있어서 유익한 역할을 한다는 점을 시사하는 데이터가 있다(24).

[0013] 혈액에 상재하는 비- $V\delta 2$  세포는 TCR 신호전달을 직접적으로 활성화시키는 외인성 약제의 첨가에 의해, 예를 들어 항-CD3 항체, pan  $\gamma\delta$ -TCR 특이적 항체 또는 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin, PHA)과 같은 약제를 이용함으로써, 또는 자극된 비- $V\delta 2$  T 세포를 인공 항원 제시 세포(artificial Antigen Presenting cells, aAPC)와 공동 배양함으로써 생체 외에서 증식되었고, 여기에서  $\gamma\delta$  T 세포와 aAPC 사이의 직접적인 접촉은 생체 외에서의 비- $V\delta 2$  T 세포 증식에 필요하다(41-44). 대안적으로, 세포는 예를 들어, 상피암 침윤 림프구(TILs)로부터 생체 외에서  $\gamma\delta$  T 세포 배양물의 증식을 지속시키는 데 사용되었던 것처럼, 고정화된 재조합 MICA(NKG2D 리간드)의 사용에 의해 NKG2D 수용체 신호전달을 촉진하여 증식되었다(28). 요약하면, 현재의  $V\delta 2$ 를 발현하는 혈액  $\gamma\delta$  T 세포 또는 비- $V\delta 2$  혈액  $\gamma\delta$  T 세포의 생체 외 증식의 현재 방법은 인터루킨-2(IL-2)와 같은 보충적 사이토카인과 함께 TCR 및/또는 NKG2D 수용체의 활성화를 반드시 촉진하는 약제의 첨가를 필요로 한다(41-44). 수용체 활성화 신호와 사이토카인의 이러한 조합은 공동체가 광범위하게 채택한 T 세포 배양 및 증식에 대한 표준적인 접근법을 반영한다. 지금까지, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 실질적으로 증식시키는 방법은 기술된 적이 없었다. 이러한 방법은 본 설명에 기술된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

**과제의 해결 수단**

[0014] **발명의 요약**

[0015] 인간 피부 T 세포의 표현형 및 기능적 특성화의 일부로서, 본 발명자들은 비-조혈조직 내에 정상적으로 상재하

며,  $\alpha\beta$  T 세포 및 혈액에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포와 비교하여 독특한 성질을 가지는, 별개의 큰  $\gamma\delta$  T 세포 집단을 분리했다. 본 발명자들은 세포가 NKG2D 리간드 및 그리고 사이토카인에 대하여, 강하고, TCR 독립적이며, 선천성 반응을 보임을 발견했다. 1차  $\alpha\beta$  T 세포 증식을 위한 노력들이 유익한 성장 인자의 공급원으로서 다른 지지 세포와의 공동 배양을 일반적으로 사용하는 반면(29), 본 발명자들은 뜻밖에도 피부 및 다른 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 이들 세포를 자가 피부 섬유아세포(autologous dermal fibroblast) 및 가능한 다른 기질 성분(stromal component), 예컨대 각질형성세포(keratinocyte) 및 내피세포(endothelial cell)와 접촉하여 공동 배양하는 것에 의하여 완전히 그리고 특이적으로 억제된다는 점을 보여주었다. 이러한 상호 작용의 완화(relief)는 잠재적인 임상적 적용을 위해 세포를 대량으로 신속하게 증식시킬 수 있게 한다.

[0016] 나아가, 지금까지의 혈액 유래 및 종양 유래  $\gamma\delta$  T 세포를 증식시키기 위한 노력과는 달리, 본 발명자들은 이러한 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 이들의 TCR 또는 NKG2D 신호전달 경로를 활성화시키는 임의의 외인성 약제의 의도적인 첨가 없이도 증식될 수 있음을 보여주었다.

[0017] 피부 및 장과 같은 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 유래된  $\gamma\delta$  T 세포를 효과적으로 그리고 재현 가능하게 분리하고 증식시키는 신규한 방법이 본 설명에 개시된다. 증식은 비-조혈조직 유래 비-V $\delta$ 2 T 세포와 자가 섬유아세포 및 가능한 다른 기질 성분과의 접촉을 방해함으로써 촉진되며, 인터루킨-2(IL-2) 및/또는 인터루킨-15(IL-15) 중에서의 배양에 의해 지속된다.

[0018]  $\alpha\beta$  T 세포 또는 V $\delta$ 2를 발현하는 T 세포 또는 NK 세포의 증식은 자가 섬유아세포와 그것들의 접촉 방해에 의해서는 유도되지 않으므로 매우 선택적이다(도 3a, 도 3c 및 도 3d). 섬유아세포 매개성 체크포인트 조절로부터의 해방에 의한 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 이러한 증식은 또한 세포의 이펙터 잠재력의 "자발적(spontaneous)" 활성화를 야기하며(도 5a 및 도 5b), 이는 항-종양 활성의 맥락에서 매우 바람직하다. 이러한 발달은 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 배양물 중에서 증식되고, 환자에게 "기성품(off-the-shelf)" 세포 주입액으로서의 잠재적인 사용을 위해 활성화되도록 한다. 동시에, 항체의 개발 또는 섬유아세포(또는 기타 기질세포 또는 상피세포)에 의한 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 체크포인트 조절의 다른 형태의 억제제 개발은 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 체크포인트 차단을 통해 현장에서, 예를 들어 암 환자에서 활성화될 수 있게 할 것이다.

[0019] 비-조혈조직(예를 들어, 피부)로부터  $\gamma\delta$  T 세포를 수득하고 성장시키는 능력은 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포와의 명백한 차이점으로 확인되었다. 예를 들어, 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 CD69 발현, ICOS 및 TIM3 양성도(positive) 뿐만 아니라, 대표적인 공동자극 분자인 CD28의 발현이 거의 또는 전혀 없음과 같은 T 세포 활성화 이전의 마커를 보여준다(도 10a). 나아가, 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 높은 NKG2D 발현을 보여준다. 대조적으로, 인간 혈액으로부터 유래된 V $\delta$ 1 T 세포는 CD69 또는 TIM3을 발현하지 않고, 단지 낮은 수준의 ICOS만을 발현하며, 또한 CD28의 발현에 대해 어느 정도 양성이다. 더구나, 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포에 의한 NKG2D의 발현은 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포에 의한 그것의 발현과 비교하여 훨씬 낮고, 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 T 세포 수용체의 자극의 부재 하에서 재조합 MICA와 같은 NKG2D 리간드에 대해 선천성 반응성을 보여주는 반면, 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 그렇지 않다(도 10b). 또한, 본원에 기술된 바와 같은 비-조혈조직으로부터의  $\gamma\delta$  T 세포는 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포 및 다른 림프구 집단과 비교하여 CCR3, CD39, CD11b, IL-13 및/또는 CD9의 증가된 발현을 나타낼 수 있다.

[0020] 제1 양태에서, 본 발명은 시험관 내(*in vitro*)에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 증식시키는 방법을 제공하며, 방법은 IL-2 및/또는 인터루킨-15(IL-15)의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함하고, 여기에서 림프구는 배양 중에 기질세포 또는 상피세포와 직접적으로 접촉하지 않는다.

[0021] 바람직하게는, 림프구는 배양 중에 섬유아세포와 직접적으로 접촉하지 않는다.

[0022]  $\gamma\delta$  T 세포는 일반적으로 생체 내(*in vivo*)에서 비-조혈조직에 상재한다.

[0023] 바람직하게는, 방법은 IL-2 및 IL-15의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구를 배양하는 단계를 포함한다.

[0024] 일부 구현예에서, 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구는 TCR 활성화제 또는 T 세포 활성화를 유도하는 공동 자극제(co-stimulator)의 부재하에 배양될 수 있다. 예를 들어, 림프구는 CD28 활성화제의 존재 또는 부재하에, TCR 경로 작용제, 예를 들어 항-CD3 항체와 같은 CD3 활성화제의 부재 하에 배양될 수 있다.

[0025] TCR 신호전달의 이러한 외인성 활성화제의 첨가는 본 발명의 방법을 이용하는 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T

세포의 증식에 필요하지 않다. 이와 같이, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 적절한  $\gamma\delta$  증식 배지는 T 세포 활성화 활성, 예를 들어,  $\alpha\beta$  T 세포 또는 혈액  $\gamma\delta$  T 세포 활성화 활성이 없을 수 있고, TCR을 활성화시키거나 공동 자극하지 않을 수 있다.

- [0026] 예를 들어,  $\gamma\delta$  증식 배지는 외인성으로 첨가된 TCR 경로 작용제를 포함하여 TCR 활성화제 또는 공동 자극제와 같은 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제 또는 인자를 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외에, 사이토카인과 같은 1종 이상의 추가적인 성장 인자를 포함할 수 있다. 적절한 성장 인자는 T 세포 활성화 활성을 나타내지 않는다. 다른 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 외에 성장 인자가 없을 수 있고, 예를 들어  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어질 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구는 기질세포 또는 상피세포의 부재 하에 배양될 수 있다. 예를 들어, 기질세포 또는 상피세포는 배양 전에 제거될 수 있다. 바람직하게는, 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득된 림프구는 섬유아세포의 부재 하에 배양될 수 있다. 예를 들어, 섬유아세포는 배양 전에 제거될 수 있다.
- [0028] 림프구는 피부, 위장관(예를 들어, 결장 또는 회장), 유선 조직, 폐, 간, 췌장, 지방 조직 또는 전립선과 같은, 임의의 적절한 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 수득될 수 있다.
- [0029] 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 바람직하게는 가장 흔하게 V $\delta$ 1 사슬을 함유하는 TCR을 발현하는 비 V $\delta$ 2 세포, 즉, V $\delta$ 1 세포이다. 또한, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 V $\delta$ 1 사슬 및 V $\delta$ 2 사슬을 둘 다 함유하지 않는  $\gamma\delta$  TCR을 발현하는 것으로 정의되는, 소위 이중 음성(double negative, DN)  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다.
- [0030] 방법은 선택적으로 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 림프구를 수득하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 림프구는 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직의 샘플로부터 수득될 수 있다. 방법은 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직의 샘플을 제공하는 단계 및 상기 샘플의 비-조혈세포로부터 림프구를 분리하여 기질세포를 실질적으로 포함하지 않는 림프구의 집단을 생성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 제2의 양태에서, 본 발명은  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단을 제공하는 단계; 및 (ii) 기질세포 접촉이 실질적으로 없는  $\gamma\delta$  T 세포를 배양하여 증식된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함한다.
- [0032] 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단은 실질적으로 순수한  $\gamma\delta$  T 세포 집단일 수 있다.
- [0033] 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단은 바람직하게는 가장 흔하게 V $\delta$ 1 사슬을 함유하는 TCR을 발현하는 비 V $\delta$ 2 세포, 즉, V $\delta$ 1 세포이다.  $\gamma\delta$  T 세포의 집단은 또한 DN  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다.
- [0034] 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단은 CLA, IL13, CCL1, CD103 및 CCR8과 같은, 1종 이상의 추가적인 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 마커를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 비-조혈조직으로부터 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단은 V $\delta$ 1<sup>+</sup> CCR8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다.
- [0035]  $\gamma\delta$  T 세포는 증식된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단을 생성하기 위해 기질세포와의 접촉 부재하에서 배양될 수 있다(즉, 세포 배양에서  $\gamma\delta$  T 세포와 기질세포 사이에 어떠한 접촉도 없다).
- [0036]  $\gamma\delta$  T 세포는 TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호의 부재하에 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 단계는 기질세포 조정(stromal cell-conditioned) 배지에서, 또는 IL-2, IL-15 또는 이의 조합의 존재하에서 수행될 수 있다. 예를 들어,  $\gamma\delta$  T 세포는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma\delta$  증식 배지에서 배양될 수 있다. 적절한  $\gamma\delta$  증식 배지는 TCR을 활성화시키거나 공동 자극하지 않을 수 있다. 예를 들어,  $\gamma\delta$  증식 배지는 TCR 경로 작용제를 포함하여, TCR 활성화제 또는 공동 자극제와 같은 T 세포 신호전달을 활성화시키는 작용제 또는 인자를 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않을 수 있다.  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외에, 사이토카인과 같은 1종 이상의 추가적인 성장 인자를 포함할 수 있다. 적절한 성장 인자는 T 세포 활성화 활성을 나타내지 않는다. 다른 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외의 성장 인자가 없을 수 있고; 예를 들어,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어질 수 있다.
- [0037] 제3의 양태에서, 본 발명은 (i) 비-조혈조직을 제공하는 단계로서, 상기 조직은 비-조혈세포 및  $\gamma\delta$  T 세포를

포함하는, 단계; (ii)  $\gamma\delta$  T 세포를 비-조혈세포로부터 분리하여 기질세포를 실질적으로 포함하지 않는  $\gamma\delta$  T 세포를 포함하는 집단을 생성하는 단계; 및 (iii) TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호의 부재 하에 단계 (i)의 집단을 배양하여 증식된  $\gamma\delta$  T 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는,  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 방법을 제공한다.

- [0038]  $\gamma\delta$  T 세포는 예를 들어,  $\alpha\beta$  T 세포로부터 분리될 수 있다.
- [0039] 단계 (ii)의 집단은 실질적으로 순수한  $\gamma\delta$  T 세포의 집단일 수 있다.
- [0040] 단계 (ii)의 집단의  $\gamma\delta$  T 세포는 가장 흔하게 V $\delta$ 1 사슬을 함유하는 TCR을 발현하는 비-V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T 세포, 즉 V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다. 단계 (ii)의 집단에서  $\gamma\delta$  T 세포는 또한 DN  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다.
- [0041] 단계 (ii)의 집단에서  $\gamma\delta$  T 세포는 또한 CLA, CD103 및 CCR8과 같은, 1종 이상의 추가적인, 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 마커를 발현하는  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 단계 (ii)의 집단에서  $\gamma\delta$  T 세포는 V $\delta$ 1<sup>+</sup>CCR8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다.
- [0042] 단계 (iii)의 배양은 단계 (ii)의 집단과 기질세포 접촉이 실질적으로 없을 수 있고/있거나, TCR 활성화 신호 또는 공동 자극 신호의 부재 하에 있다. 예를 들어, 배양은  $\gamma\delta$  T 세포와 기질세포 사이의 접촉 없이 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 단계 (iii)의 배양은 기질세포 조정 배지에서, 또는 IL-2, IL-15, 또는 이의 조합의 존재하에 있다.
- [0043] 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  T 세포는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma\delta$  T 증식 배지에서 배양될 수 있다. 적절한  $\gamma\delta$  증식 배지는 TCR을 활성화시키거나 공동 자극하지 않을 수 있다. 예를 들어,  $\gamma\delta$  증식 배지는 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제 또는 인자, 예를 들어, TCR 경로 작용제와 같은 TCR 활성화제 또는 공동 자극제를 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 외에도, 사이토카인과 같은 1종 이상의 추가적인 성장 인자를 포함할 수 있다. 적절한 성장 인자는 T 세포 활성화 활성을 나타내지 않는다. 다른 구현예에서,  $\gamma\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15로 보충된 기본 배지로 이루어질 수 있다.
- [0044] 제2 또는 제3 양태에 따른 증식된  $\gamma\delta$  T 세포 집단은 비-조혈조직으로부터 수득된 또는 비-조혈세포로부터 분리된  $\gamma\delta$  T 세포보다 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 적어도 1000배, 또는 적어도 10000배 이상의  $\gamma\delta$  T 세포를 포함할 수 있다. 증식된 집단은 배양 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 21일, 또는 28일 이내에 생성될 수 있다.
- [0045] 증식된 집단에서  $\gamma\delta$  T 세포는 바람직하게는 V $\delta$ 2<sup>-</sup> T 세포이다. 증식된  $\gamma\delta$  T 세포 집단은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 V $\delta$ 1<sup>+</sup> 세포를 포함할 수 있다. 증식된  $\gamma\delta$  T 세포 집단은 CCR4, CCR8 및 CD103 중 하나, 둘 또는 셋 모두에 대해 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 양성일 수 있다. 예를 들어, 증식된 집단은 CD103에 대해 적어도 10% 양성, CCR4에 대해 적어도 30% 양성, 및 CCR8에 대해 적어도 60% 양성일 수 있다.
- [0046] 제4의 양태에서, 본 발명은 본 발명의 제1, 제2, 또는 제3 양태의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 또는 이의 집단을 제공한다.
- [0047] 제5의 양태에서, 본 발명은 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 체크포인트 조절인자를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 방법은
- [0048] (i) 시험 화합물의 존재 및 부재하에 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 직접적으로 접촉시켜 시험관 내(*in vitro*)에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 배양하거나,  $\gamma\delta$  T 세포 내 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)에서의 시험 유전자의 발현이 변경된 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 직접적으로 접촉시켜 시험관 내에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 배양하는 단계; 및
- [0049] (ii) 시험 화합물의 존재 및 부재하에 또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재 및 부재하에 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 또는 활성화 속도를 결정하거나, 시험 화합물의 존재 및 부재하에 또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재 및 부재하에 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아

세포)의 살해 속도를 결정하는 단계를 포함하며,

- [0050] 여기에서, T 세포의 증식 또는 활성화 속도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시험 화합물의 존재하에서 더 높거나 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 변경의 부재하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높은 경우, 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)의 살해 속도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시험 화합물의 존재하에서 더 높거나 섬유아세포 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 변경의 부재하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma \delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높은 경우, 시험 화합물은 체크포인트 조절인자이거나 시험 유전자가 체크포인트 유전자 후보 또는 이의 조절인자(regulator)일 가능성이 있다.
- [0051]  $\gamma \delta$  T 세포 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)에서 시험 유전자의 발현은 예를 들어, 소간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA)와 같은 RNA 표적화제(targeting agent)에 의해, 또는 유전자 편집(gene editing)에 의해, 예를 들어 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 변경될 수 있다.
- [0052] 제6의 양태에서, 본 발명은 입양 T 세포 치료법에 의해 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 여기에서 방법은 본 발명의 제1, 제2 또는 제3 양태의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 대상체는 바람직하게는 인간이다.
- [0053] 대상체는 바람직하게는 인간 암 환자 또는 바이러스 감염 환자, 예를 들어 CMV 감염 환자 또는 HIV 감염 환자이다.
- [0054] 제7 양태에서, 본 발명은 입양 T 세포 치료법에 의한 인간 또는 비인간 동물의 치료 방법에 사용하기 위한, 본 발명의 제1, 제2, 또는 제3 양태의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 제공한다. 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 하기 특성 중 하나 이상을 가질 수 있다:
- [0055] (i) 표현형 CD69<sup>높음</sup>, ICOS<sup>높음</sup>, TIM3<sup>높음</sup> 및 CD28<sup>낮음/없음</sup>을 나타내고,
- [0056] (ii) CCR3, CD11b, CD9 및 CD39 중 하나 이상을 상향 조절하고,
- [0057] (iii) TCR 작용제의 부재하에 NKG2D 리간드에 반응하여 IFN- $\gamma$ 를 생성하고,
- [0058] (iv) TCR 작용제의 부재하에 IL-13을 생성하고,
- [0059] (v) TCR 활성화에 반응하여 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 GM-CSF 중 하나 이상을 생성하고,
- [0060] (vi) TCR 활성화에 반응하여 IL-17을 전혀 또는 실질적으로 생성하지 않고,
- [0061] (vii) 추가적인 성장 인자 없이 IL-2를 함유하는 배양 배지에서 성장하고,
- [0062] (viii) TCR 작용제의 부재하에 세포독성 T 세포 반응을 나타내고, 및/또는
- [0063] (ix) 정상 세포보다 종양 세포에 대해 선택적 세포독성을 나타낸다.
- [0064] 바람직한 구현예에서, 인간은 인간 암 환자 또는 바이러스 감염 환자, 예를 들어 CMV 감염 또는 HIV 감염 환자이고, 여기에서 CMV 또는 HIV 감염은 MICA 관련된 감염이다.
- [0065] 제8 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 치료법에 의한 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 본 발명의 제1, 제2, 또는 제3 양태의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 대상체는 바람직하게는 인간이다.
- [0066] 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간 암 환자이다.
- [0067] 제9 양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 치료법에 의한 인간 또는 비인간 동물의 치료 방법에 사용하기 위한, 본 발명의 제1, 제2, 또는 제3 양태의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 제공한다.
- [0068] 바람직한 구현예에서, 이러한 인간은 인간 암 환자이다.
- [0069] 상기 기술된 구현예 각각은 임의의 다른 구현예 중 임의의 하나 이상과 조합될 수 있다.

- [0070] 본 발명의 이러한 양태 및 다른 양태를 아래에서 더욱 상세하게 기술한다.
- [0071] 감마델타 T 세포( $\gamma\delta$  T 세포)는 표면에 뚜렷하고, 특징적인 T 세포 수용체(T-cell receptor, TCR)를 발현하는 T 세포의 작은 서브셋을 나타낸다. 이 TCR은 하나의 감마( $\gamma$ ) 및 하나의 델타( $\delta$ ) 사슬로 구성된다.
- [0072] 인간  $\gamma\delta$  T 세포의 2가지 주요한 하위 유형이 있으며, 그 중 하나는 말초 혈액에 우세하고, 나머지 하나는 비-조혈조직에 우세하다.
- [0073] 두 번째 인간  $\gamma\delta$  T 세포 하위 유형의 비-조혈조직의 국제성은 샘플을 만들기 어렵게 하며, 이러한 세포를 배양하는 확립된 방법은 아직 없다. 이러한 필요성을 충족시키기 위해, 본 발명은 본원에서 비-조혈조직 천연  $\gamma\delta$  T 세포라고 대안적으로 지칭되는, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 증식시키는 방법에 관한 것이다. 이들  $\gamma\delta$  T 세포는 일반적으로는 비-조혈조직에 상재한다. 본원에 기술된 용도를 위한 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 비-조혈조직으로부터 유래하거나 비-조혈조직으로부터 획득될 수 있다. 비-조혈조직은 비-조혈세포 및  $\gamma\delta$  T 세포를 함유할 수 있다.
- [0074] 본원에 기술된 방법은 피부, 위장관(예컨대, 결장), 유선 조직, 폐, 전립선, 간, 비장 및 췌장을 포함하여 환자로부터 제거될 수 있는 임의의 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터  $\gamma\delta$  T 세포를 증식시키는 수단을 제공한다.  $\gamma\delta$  T 세포는 또한 인간의 암 조직, 예를 들어 유방 및 전립선의 종양에 상재할 수도 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  T 세포는 인간 암 조직으로부터 유래할 수 있다. 다른 구현예에서,  $\gamma\delta$  T 세포는 인간 암 조직 이외의 비-조혈조직으로부터 유래할 수 있다.
- [0075] 혈액에 우세한  $\gamma\delta$  T 세포는 주로 V $\delta$ 2 T 세포인 반면, 비-조혈조직에 우세한  $\gamma\delta$  T 세포는 주로 V $\delta$ 1 T 세포로, V $\delta$ 1 T 세포는 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 집단의 약 70~80%를 포함한다. 그러나, 일부 V $\delta$ 2 T 세포는 또한 비-조혈조직, 예를 들어 소화관에서도 발견되며, 그것들은  $\gamma\delta$  T 세포의 약 10~20%를 포함할 수 있다(도 6). 비-조혈조직에 상재하는 일부  $\gamma\delta$  T 세포는 V $\delta$ 1 TCR뿐만 아니라 V $\delta$ 2 TCR도 발현하지 않으며, 본 발명자들은 그것들에 이중 음성(DN)  $\gamma\delta$  T 세포라는 이름을 붙였다. 이러한 DN  $\gamma\delta$  T 세포는 소수의 V $\delta$ 5를 발현하는 T 세포와 함께 주로 V $\delta$ 3를 발현할 것으로 예상된다.
- [0076] 따라서, 정상적으로 비-조혈조직에 상재하며, 본 발명의 방법에 의해 증식되는  $\gamma\delta$  T 세포는 바람직하게는 비 V $\delta$ 2 T 세포, 예를 들어 V $\delta$ 1 T 세포이며, 소량의 DN  $\gamma\delta$  T 세포를 포함한다.
- [0077] 본 설명에 사용된 "이중 음성(double negative)"  $\gamma\delta$  T 세포(DN  $\gamma\delta$  T 세포)는  $\gamma\delta$  수용체를 발현(즉, pan-TCR에 대해 양성 염색)하지만, V $\delta$ 1 및 V $\delta$ 2 수용체에 대해서는 음성인  $\gamma\delta$  T 세포를 말한다. DN  $\gamma\delta$  T 세포는 V $\delta$ 1 및 V $\delta$ 2 이외의 V $\delta$  수용체(예를 들어, V $\delta$ 3, V $\delta$ 4, V $\delta$ 5 또는 V $\delta$ 8)를 발현하는 세포들을 포함한다. 세포는 그것의 마커의 발현이 일반적인 FACS 게이팅 방법으로 결정된 것과 같은 음성 대조군 세포보다 더 높은 경우 마커에 대해 양성(예를 들어, V $\delta$ 1<sup>+</sup>)인 것으로 특징지어질 수 있다.
- [0078] 본원에 기술된 방법은 시험관 내에서 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 획득된 림프구를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0079] 림프구는 임의의 적절한 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 획득될 수 있다. 비-조혈조직은 혈액, 골수, 또는 흉선 조직 이외의 조직이다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  T 세포는 혈액 또는 관절 낭액과 같은 생물학적 유체 샘플의 특정 유형으로부터 획득되지 않는다. 이러한 적절한 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직의 예는 피부 또는 이의 일부분(예를 들어, 진피, 표피), 위장관(예를 들어, 위장 상피, 결장, 소장, 위, 충수, 막창자, 또는 직장), 유선 조직, 폐(바람직하게는, 이러한 조직은 기관지 폐포 세척에 의해 획득되지 않음), 전립선, 간, 비장 및 췌장을 포함한다.  $\gamma\delta$  T 세포는 인간 암 조직, 예를 들어 유방 및 전립선에 상재할 수도 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma\delta$  T 세포는 인간 암 조직으로부터 획득되지 않는다. 비-조혈조직 샘플은 일반적인 기술, 예를 들어 외식편(explant)(예를 들어, 생검)에 의해 획득될 수 있다.
- [0080] 림프구는 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 림프구의 분리를 가능하게 하는 임의의 적절한 방법에 의해 획득될 수 있다. 한 가지 이러한 방법은 인간 피부로부터 림프구를 분리하기 위한 3차원적 피부 외식편 프로토콜을 기술하고 있는 Clark *et al.*(29)에 기재되어 있다. 체외 이식편은 합성 스캐폴드에 부착되어, 체외 이식편으로부터 스캐폴드로 림프구가 빠져나가는 것을 용이하게 할 수 있다. 합성 스캐폴드는 세포 성장을 지지하기에 적합한 비천연(non-native)의 3차원 구조물을 말한다. 합성 스캐폴드는 고분자(예를 들어, 천연 또는 합성 고분자, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈, 폴리메틸메타크릴레이트, 메틸 셀룰로스, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄), 세라믹(예를 들어, 트리칼슘 포스페이트, 칼슘 알루미늄이트, 칼슘 하이드록시아파타이트), 또는

금속(탄탈륨, 티타늄, 플래티늄 및 플래티늄과 동족 원소, 니오븀, 하프늄, 텅스텐 및 이의 합금의 조합)과 같은 물질로부터 구축될 수 있다. 당해 분야에 공지된 방법에 따라, 생물학적 인자(예를 들어, 콜라겐(예를 들어, 콜라겐 I 또는 콜라겐 II), 피브로넥틴, 라미닌, 인테그린, 혈관형성 인자, 항염증 인자, 글리코사미노글리칸, 비트로젠, 항체 및 이의 단편, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨-2(IL-2) 또는 인터루킨-15(IL-15), 및 이의 조합))이 스캐폴드 표면에 코팅되거나 스캐폴드 물질 내에 캡슐화되어, 세포 부착, 이동, 생존, 또는 증식을 증진할 수 있다. 이 방법 및 다른 방법을 이용하여 다수의 다른 비-조혈조직 유형, 예를 들어 소화관, 전립선 및 유방으로부터 림프구를 분리할 수 있다. 적절한 방법의 다른 예는 조직의 효소적 소화 및 Carrasco *et al*(30)에 기술된 조직을 잘게 썰고, IL-2를 첨가하여, 림프구가 서서히 나오게 하는(crawl out) "크롤 아웃(crawl out)" 방법을 포함한다.

- [0081] 상기 언급된 바와 같이, 피부, 위장관(예를 들어, 결장), 유선 조직, 폐, 전립선, 간, 비장 및 췌장과 같은, 임의의 적절한 비-조혈조직이 이용될 수 있다.
- [0082] 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta T$  세포는 바람직하게는 인간 조직으로부터 획득된다. 그러나, 그것들은 마우스, 랫트, 개, 말, 돼지와 같은 임의의 적절한 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 획득될 수 있다.
- [0083] 중요한 단계는 T 세포가 획득된 조직의 비-조혈세포(예를 들어, 기질 세포, 특히 섬유아세포)로부터 떨어져 있는 (예를 들어,  $\alpha \beta$ ,  $\gamma \delta 2$  및 비  $\gamma \delta 2 T$  세포를 포함할 수 있는, 혼합 림프구 집단 내의) 비-조혈조직에 상재하는 T 세포의 예를 들어, 수일 또는 수 주간 배양한 후의 신중한 분리 및 후술하는 바와 같이 사이토카인 중에서 림프구로서의 세포의 후속 배양이다. 이는 다음 며칠 또는 몇 주 동안 조직 유래  $\gamma \delta 1$  및 DN  $\gamma \delta T$  세포에 대한 선택적이고 현저한 증식을 가능하게 한다.
- [0084] 본원에 사용된 "분리(separation)", "분리된(separated)" 또는 "분리하다(separate)"는 구별되는 세포 집단들 사이의 물리적 접촉을 단절하거나 금지하는 행동을 지칭한다. 분리는 예를 들어, 혼합된 세포 집단을 강제로 피펫팅함으로써 막간(inter-membrane) 결합을 파괴하거나, Carrasco *et al* (30)에 기술된 바와 같이 예를 들어, 케모카인 또는 사이토카인과 함께 배양하여 예를 들어, 조직 매트릭스로부터 세포 집단의 "크롤-아웃"을 유도함으로써 수행될 수 있다. 분리는 트랜스웰 배양 시스템을 이용하거나 구별되는 세포 집단 사이의 물리적 접촉을 방지하는 유사한 배양 방법에 의해 배양 중에 유지될 수 있다.
- [0085] 본원에 사용된 "실질적으로 순수한(substantially pure)"은 수, 질량, 또는 부피 기준으로 90%를 초과하는 순도를 지칭한다. "실질적으로 포함하지 않는(substantially free of)"은 주어진 성분의 수, 질량, 또는 부피 기준으로 5% 미만을 가짐을 지칭한다. 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 획득된 림프구는 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 2주, 적어도 3주, 또는 적어도 4주 동안 배양될 수 있다.
- [0086] 방법은 IL-2의 존재하에 인간 또는 비인간 동물의 비-조혈조직으로부터 획득된 림프구를 배양하는 단계를 포함한다. IL-2의 농도는 바람직하게는 적어도 10 국제 단위(international units)/ml(IU/ml, 또는 U/ml), 적어도 20 U/ml, 적어도 30 U/ml, 적어도 40 U/ml, 적어도 50 U/ml, 적어도 60 U/ml, 적어도 70 U/ml, 적어도 80 U/ml, 적어도 90 U/ml 또는 적어도 100 U/ml이다.
- [0087] 피부 유래  $\gamma \delta T$  세포는 CD25로 알려져 있는 고 친화성 IL-2 수용체를 매우 낮은 수준으로 발현하기 때문에, 이의 증식을 촉진하기 위한 IL-2의 사용은 자명하지 않다(도 1d). 그러나, 이 수용체는 기질 세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 같은 다른 세포 유형으로부터의 분리(dissociation)에 의해 별개의  $\gamma \delta T$  세포 서브셋 상에서 상향 조절되어(도 3b 및 도 4b 참조) 세포를 IL-2에 매우 취약하게 만든다.
- [0088] 본원에 사용된 "IL-2"는 (예를 들어, 천연 또는 재조합의) 야생형 IL-2, 또는 하나 이상의 IL-2 수용체(IL-2R) 서브유닛에 대한 작용제로서 작용하는 약제(예를 들어, IL-2 뮤테인, 지속 작용성 IL-2 유사체, 이의 서브유닛, 이의 수용체 복합체)를 지칭한다. 이러한 약제는 IL-2 의존성 세포주인 CTLL-2(33; American Type Culture Collection(ATCC<sup>®</sup>) TIB 214)의 증식을 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-2는 문헌[Fujita, *et al.* (34)]에 기술된 바와 같이, 133개 아미노산 서열(신호 펩티드가 적고, 추가적인 20개의 N-말단 아미노산으로 이루어짐)로서 발생한다. IL-2 뮤테인은 IL-2R $\beta$ 에 결합하는 능력을 보유하면서 인터루킨-2 단백질에 대한 특이적인 치환이 이루어진 폴리펩티드, 예컨대 US 2014/0046026에 기술된 것들이다. IL-2 뮤테인은 천연 IL-2 폴리펩티드 사슬 내의 하나 이상의 부위에서 또는 이의 다른 잔기에서의 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변경에 의해 특징지어질 수 있다. 본 개시에 따르면, 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변경은 IL-2R $\beta$  결합 활성을 보유하는 IL-2 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수

있다.

- [0089] 인간 IL-2를 암호화하는 핵산은 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 절차에 의해 획득될 수 있다. 인간 IL-2의 아미노산 서열(유전자 ID 3558)은 Genbank의 등록 로케이터 NP\_000577.2 GI: 28178861에서 볼 수 있다. 뮤린(무스 무스쿨루스, *Mus musculus*) IL-2 아미노산 서열(유전자 ID 16183)은 Genbank의 등록 로케이터 NP\_032392.1 GI: 7110653에서 볼 수 있다.
- [0090] 림프구는 IL-2와 조합하여 IL-15를 첨가하면 IL-2 단독과 비교하여 증식성 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식이 증진되기 때문에, 바람직하게는 IL-2 및 IL-15의 존재하에 배양된다. IL-15의 농도는 바람직하게는 적어도 10 ng/ml이다.
- [0091] IL-2처럼 IL-15는 IL-2 의존성 세포주인 CTLL-2의 증식을 지지할 수 있는 공지된 T 세포 성장 인자이다. IL-15는 114개 아미노산의 성숙한 단백질로서 문헌[Grabstein et al (35)]에 의해 최초로 보고되었다. 본원에 사용된 용어 "IL-15"는 천연 또는 재조합 IL-15 및 이의 뮤테인, 유사체, 서브유닛, 또는 이들의 복합체(예를 들어, 수용체 복합체, 예를 들어, W02007/046006에 기술된 바와 같은 수시 펩티드(sushi peptide))를 의미하며, 이들 각각은 CTLL-2 세포의 증식을 자극할 것이다. CTLL-2 증식 검정에서, 재조합 발현시킨 전구체 및 성숙한 형태의 IL-15의 삽입 융합(in-frame fusion)으로 형질감염시킨 세포의 상층액은 CTLL-2 세포 증식을 유도할 수 있다.
- [0092] 본원에 사용된 용어 IL-15는 또한 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 돼지, 말 및 쥐를 포함하는, 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-15를 의미한다. 본원에서 언급된 것과 같은 IL-15 "뮤테인(mutein)" 또는 "변이체(variant)"는 천연의 포유동물 IL-15의 서열에 실질적으로 상동한 폴리펩티드지만, 아미노산 결실, 삽입 또는 치환 때문에 천연의 포유동물 IL-15 폴리펩티드와는 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특성을 갖는 잔기로 교체되는 것을 의미한다. 보존적 치환의 예는 예를 들어, Ile, Val, Leu 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기의 다른 지방족 잔기로의 치환, 또는 Lys과 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln과 Asn 사이와 같은 하나의 극성 잔기의 다른 극성 잔기로의 치환을 포함한다. 기타 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성(hydrophobicity) 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 잘 알려져 있다. 자연 발생적인 IL-15 변이체 또한 본 발명에 포함된다. 이러한 변이체의 예는 대안적 mRNA 스플라이싱(alternate mRNA splicing) 사건 또는 IL-15 단백질의 단백질 가수분해성 절단으로 인해 생긴 단백질이며, 여기에서 IL-15 결합 특성은 유지된다. mRNA의 대안적 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성이 있는 IL-15 단백질을 생성할 수 있다. 단백질 가수분해로 인해 생긴 변형은 예를 들어, IL-15 단백질로부터의 하나 이상의 말단 아미노산(보통 1~10개 아미노산)의 단백질 가수분해성 제거로 인한, 상이한 유형의 숙주 세포에서의 발현 시 N-말단 또는 C-말단의 차이를 포함한다.
- [0093] 인간 IL-15는 문헌[Grabstein et al (35)]에 기술된 절차에 따라 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 절차에 의해 획득될 수 있다. 인간 IL-15 cDNA의 기탁은 1993년 2월 19일에 ATCC®로 이루어졌고, 등록 번호 69245를 부여받았다.
- [0094] 인간 IL-15의 아미노산 서열(유전자 ID 3600)은 Genbank의 등록 로케이터 NP000576.1 GI: 10835153(아이소타입 1)과 NP\_751915.1 GI: 26787986(아이소타입 2)에서 볼 수 있다. 뮤린(무스쿨루스, *Mus musculus*) IL-15 아미노산 서열(유전자 ID 16168)은 Genbank의 등록 로케이터 NP\_001241676.1 GI: 363000984에서 볼 수 있다.
- [0095] 사이토카인의 이러한 조합의 첨가는 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식을 감소시키는 것으로 보이기 때문에, 림프구는 IL-6, IL-23 및 IL-1B의 부재하에 또는 낮은 농도의 이들 사이토카인의 존재하에(예를 들어, 20 ng/ml 미만) 배양될 수 있다. 이들 사이토카인은 증식을 촉진할 것으로 예상되었기 때문에 놀랍다.
- [0096] 비-조혈조직으로부터 획득된 림프구는 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제(예를 들어, T 세포 수용체(TCR) 경로 작용제)의 부재하에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 비-조혈조직으로부터 획득된 림프구는  $\alpha \beta$  T 세포 및 혈액에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식 또는 활성화를 지지하거나 유도하지 않는 배지에서 배양될 수 있다. 적절한 배지는 TCR 작용제 또는 다른 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제를 포함하지 않거나 실질적으로 포함하지 않을 수 있다. 반대로, 조혈조직으로부터의  $\gamma \delta$  T 세포의 배양은 줄레드로네이트(41, 42) 또는 항-CD3 항체, 예컨대 OKT3(43)와 같은 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제의 존재를 필요로 한다.
- [0097] T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제는 TCR 신호전달 또는 공동 자극을 통해,  $\alpha \beta$  T 세포 및/또는 혈액에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포와 같은 T 세포의 증식 또는 활성화를 유도하는 화합물을 지칭한다. T 세포 신호전달 조절인자는 Src 관련 단백질 티로신 키나아제(PTK), Lck 및 Fyn, 및 70kDA의 제타 사슬(TCR) 관련 단백질 키나아제(ZAP70)의 순차적인 활성화에 의해 기능한다. 이러한 PTK는 T 세포의 링커 활성화인자(linker activator for T

cells, LAT)를 포함하는 폴리펩티드의 인산화를 초래하며, 이는 세포 외 신호 조절 키나아제(extracellular signal regulated kinase, ERK), c-Jun N-말단 키나아제(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 및 활성화된 T 세포의 핵 인자(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)를 통한 하류 자극으로 이어진다. 예를 들어, CD28과 CD45를 통한 공동 자극은 인산화를 증진시킬 수 있고, TCR 신호전달 경로를 증진시킬 수 있다. 따라서, TCR 또는 공동 자극 경로의 일부분을 표적으로 하는 임의의 약제는 T 세포 신호전달을 활성화시킬 수 있다. T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제는 가용성 또는 막 결합성일 수 있고, 예를 들어, 인공 항원 제시 세포(aAPC)과 같은 세포 상에 제시될 수 있다. T 세포 신호전달을 활성화시키는 적절한 aAPC는 당해 분야에 공지되어 있다(44).

[0098] 일부 구현예에서, 림프구는 외인성으로 첨가된 T 세포 수용체 경로 작용제, 예컨대, CD3 및/또는 CD28 활성화제 (예를 들어, 항-CD3 및/또는 항-CD28 단일클론 항체); 피토헤마글루티닌(PHA); 콘카나발린 A, 합성 인산항원 (phosphoantigen), 예컨대, BrHPP(브로모하이드린 피로포스페이트), 2M3B1PP(2-메틸-3-부테닐-1-피로포스페이트), HMBPP((E)-4-하이드록시-3-메틸-부트-2-에닐 피로포스페이트), 또는 IPP(이소펜테닐 피로포스페이트); N-비스포스포네이트, 예컨대 졸레드로네이트; 제조항 CD70; 항-CD2 단일클론 항체; 항-CD27 단일클론 항체; 항-pan-TCR  $\gamma$   $\delta$  항체; 항-CD277 단일클론 항체; 또는 인공 항원 제시 세포(aAPC)의 부재하에 배양될 수 있다. 또한, T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제는 세포 표면 결합 분자, 예컨대, 항원 제시 세포(antigen-presenting cell, APC) 또는 인공 APC와 결합된 MHC 또는 HLC 복합체를 포함한다. TCR 경로 작용제를 외인성으로 첨가하여 T 세포를 활성화시키는 적절한 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 문헌[Deniger et al (44)]의 도 1에 요약되어 있다.

[0099] 예를 들어, 림프구는 외인성으로 첨가된 T 세포 수용체 경로 작용제를 포함하지 않는 또는 실질적으로 포함하지 않는 배지에서 배양될 수 있다. 이러한 T 세포 수용체 신호전달 활성화제의 첨가는 본 발명의 방법을 이용하여 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma$   $\delta$  T 세포를 증식시키는 데에는 요구되지 않는다. 반대로, 조혈조직 유래  $\gamma$   $\delta$  T 세포의 증식은 IL-2와 T 세포 수용체 신호전달 활성화제, 예컨대, 졸레드로네이트 둘 다의 존재를 필요로 한다 (41, 42).

[0100] 일부 구현예에서, 림프구는  $\gamma$   $\delta$  T 세포 성장을 위한 보충물을 제공하기 위해 기질세포 배양물로부터의 조정 배지에서 배양될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서,  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 IL-2 및/또는 IL-15를 포함하는  $\gamma$   $\delta$  증식 배지에서 배양될 수 있다. 적절한  $\gamma$   $\delta$  증식 배지는 T 세포 활성화 활성, 예를 들어  $\alpha$   $\beta$  T 세포 또는 혈액  $\gamma$   $\delta$  T 세포 활성화 활성이 없고, 예를 들어, TCR 작용제 또는 공동 자극 작용제를 포함하지 않거나 실질적으로 포함하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서,  $\gamma$   $\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외에 1종 이상의 추가적인 성장 인자, 예컨대 사이토카인을 포함할 수 있다. 적절한 성장 인자는 T 세포 활성화 활성을 나타내지 않는다. 다른 구현예에서,  $\gamma$   $\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15 이외의 성장 인자가 없을 수 있고; 예를 들어, 이러한  $\gamma$   $\delta$  증식 배지는 IL-2 및/또는 IL-15가 보충된 기본 배지로 이루어질 수 있다.

[0102]  $\gamma$   $\delta$  T 세포의 증식용으로 적합한 다수의 기본 배양 배지가 이용 가능하며, 특히 완전 배지, 예컨대 AIM-V, 이스코브 배지 및 RPMI-1640(라이프 테크놀로지스, Life Technologies)을 이용할 수 있다. 배지는 다른 배지 인자, 예컨대, 혈청, 혈청 단백질 및 선택적 약제, 예컨대, 항생제가 보충될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, RPMI-1640 배지는 2 mM 글루타민, 10% FBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 피루브산 나트륨(1 mM; 라이프 테크놀로지스), 비필수 아미노산(예컨대 100  $\mu$ M Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro 및 Ser; 1X MEM 비필수 아미노산, 라이프 테크놀로지스), 및 10  $\mu$ l/L  $\beta$ -머캅토에탄올을 함유한다. 기본 배지는 통상적인 실험에 의해 당업자가 용이하게 결정할 수 있는 표준적인 농도로 IL-2 및/또는 IL-15가 보충될 수 있다.

[0103] 편리하게는, 세포는 적절한 배양 배지 중에서 5% CO<sub>2</sub>를 함유하는 습윤 분위기하의 37°C에서 배양된다.

[0104]  $\gamma$   $\delta$  T 세포는 교반 탱크 발효기, 에어리프트 발효기, 회전 병, 배양 백 또는 접시, 및 다른 생물반응기, 특히 중공섬유(hollow fiber) 생물반응기를 포함하는 임의의 적절한 시스템에서 본원에 기술된 바와 같이 배양될 수 있다. 이러한 시스템의 사용은 당해 분야에 잘 알려져 있다.

[0105] 림프구의 배양 방법 및 기술은 당해 분야에 잘 알려져 있다(36-39).

[0106] 배양 중에, 림프구는 기질세포 또는 상피세포와 직접적으로 접촉하지 않는다. 이는 기질세포 또는 상피세포와 림프구의 직접적인 접촉이 조직에 상재하는  $\gamma$   $\delta$  T 세포의 증식을 억제하는 것으로 보이기 때문이다.

- [0107] 기질세포는 임의의 기관의 비-조혈 결합조직 세포이며, 그 기관의 실질세포(parenchymal cell)의 기능을 뒷받침한다. 기질세포의 예는 섬유아세포, 혈관주위세포, 중간엽세포, 각질형성세포, 상피세포 및 비 혈액 종양 세포를 포함한다. 바람직하게는, 림프구는 배양 중에 섬유아세포와 직접적으로 접촉하지 않는다.
- [0108] 상피세포는 신체 전반에 걸쳐 혈관과 기관의 공동 및 표면을 따라 늘어선 비-조혈세포이다. 그것들은 일반적으로 편평형, 원주형 또는 입방형이며, 단일 세포층으로 또는 둘 이상의 세포의 층들로 배열될 수 있다.
- [0109] 섬유아세포 및/또는 다른 기질세포 또는 상피세포는, 이들 세포가 분비하는 인자들이 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식을 촉진할 수 있으므로 바람직하게는 림프구의 배양 중에 존재하지만, 직접적인 접촉은 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식을 억제하므로 림프구와 직접적으로 접촉하지는 않는다. 예를 들어, 림프구는 트랜스웰에서 배양될 수 있고, 트랜스웰은 림프구와 섬유아세포의 물리적 분리를 가능하게 한다. 사용될 수 있는 섬유아세포 세포주의 예에는 인간 포피(foreskin) 섬유아세포(예를 들어, BJ(ATCC® CRL-2522™)), 정상 세포 섬유아세포(예를 들어, CCD-1059Sk(ATCC® CRL-2072™)) 및 폐 섬유아세포(예를 들어, HEL 299(ATCC® CRL-137™))가 포함된다.
- [0110] 클라크 프로토콜을 이용하여, 비-조혈조직에 상재하는 림프구가 수확되고, 예를 들어 단호한 피펫팅에 의해 진피 섬유아세포와 같은 기질세포로부터 분리될 수 있다. 림프구 수확물은 공정 중에 느슨해졌을 수 있는 섬유아세포 응집체를 유지하기 위하여 40  $\mu$ m 나일론 메쉬를 통해 추가로 세척될 수 있다. 또한, 림프구는 예를 들어, CD45 항체를 이용하는 형광 또는 자성 관련 세포 분류법을 이용하여 단리될 수 있다. T 세포의 활성화화를 최소화하기 위해, 그것들은 또한 전방 산란 및 측면 산란 성질의 기준에 의해서만 분류될 수 있다. 그런 다음, 림프구는 기질세포(예를 들어, 섬유아세포)의 단리 또는 그것들의 존재하에서 그러나 직접적으로 접촉하지는 않은 채 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 임의의 직접적인 접촉 없이 섬유아세포에 의해 생성된 가용성 성장 인자의 교환을 가능하게 하기 위하여 훨씬 아래의 세포 배양물 중의 섬유아세포의 전면 단일층과 함께 림프구를 트랜스웰 바스켓에서 성장시킬 수 있다. 대안적으로, 섬유아세포를 훨씬 아래의 세포 배양물 중에서 성장하는 림프구와 함께 트랜스웰 바스켓에서 배양할 수 있다. 림프구 증식을 보충하기 위하여 비-조혈세포(예를 들어, 섬유아세포)에 의한 조정 배지를 사용할 수도 있다.
- [0111] 조정 배지는 비-조혈세포(예를 들어, 섬유아세포와 같은 기질세포)가 분비한 가용성 인자를 함유한다. 조정 배지는 인자들을 분비하는 세포들을 함유할 수 있거나 함유하지 않을 수 있다. 예를 들어,  $\gamma \delta$  T 세포는  $\gamma \delta$  T 세포의 배양 중에 조정 인자들을 분비하는 세포의 존재하에서 배양될 수 있다. 대안적으로, 비-조혈세포는  $\gamma \delta$  T 세포 배양 전에 배지로부터 제거되어, 배지 중에 그것들의 분비된 인자들을 남겨둘 수 있다. 또한, 조정 배지는 (예를 들어, 농축물 또는 동결건조 분말로서) 이전에 제조된 비-조혈세포 인자가 보충된 배지를 포함한다.
- [0112] 기질세포 또는 상피세포는 바람직하게는 림프구의 배양 중에 존재하지만(그러나 림프구와 직접적으로 접촉하지는 않음), 림프구가 기질세포 또는 상피세포의 부재하에서, 예를 들어 섬유아세포의 부재하에서 배양되도록 그것들은 제거될 수 있다.
- [0113] 일부 구현예에서, 상기 기술된 바와 같은 외인성으로 첨가된 T 세포 수용체 경로 작용제와 같이 T 세포 신호전달을 활성화시키는 약제의 부재하에서 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 증식 후, 증식된  $\gamma \delta$  T 세포는 외인성으로 첨가된 T 세포 수용체 경로 작용제와 같이 T 세포 신호전달을 활성화시키는 하나 이상의 약제 및/또는 하나 이상의 성장 인자, 예컨대 사이토카인의 존재하에 추가적으로 배양될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같은 증식 및 선택적인 추가적인 배양 후, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 필요에 따라 단리되거나 추가적으로 정제, 보관, 약학적으로 허용 가능한 부형제 같은 다른 시약과 혼합, 및/또는 사용될 수 있다.
- [0114] 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 예를 들어, TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  및 CD107a의 증가된 생성에 의해, 임의의 T 세포 수용체 자극 리간드의 부재하에서, 악성 종양과 밀접한 관련이 있는 NKG2D 리간드(MICA)에 반응한다는 점에서 다른 혈액 유래  $\gamma \delta$  T 세포와 구별될 수 있다(도 2a 내지 도 2d, 도 10a 및 도 10b). 또한, 그것들은 T 세포 수용체의 임의의 외인성 약물학적 또는 리간드 매개성 활성화를 거치지 않고 세포독성 T 세포 반응을 일으키고, 따라서 자극의 부재하에서 세포독성을 나타낸다(도 3 및 도 5). 이는 다른  $\gamma \delta$  T 세포,  $\alpha \beta$  T 세포, 또는 NK 세포와 비교하여, 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포가 T 세포 수용체 신호전달을 활성화시키는 임의의 외인성 약제의 첨가의 부재하에 반응하고 증식하는 그것들의 능력에 있어서 아주 특별하다는 것을 의미한다(도 3). 또한, 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 CD69 및 PD-1을 양성 염색하였고, CD28의 발현이 결여되었으며, 낮은 수준의 CD25만을 보여주었다(도 1d 참조). 이러한 마커의 조합은 혈액 유래  $\gamma \delta$  T 세포에 의해서는 발현되지 않는다.

나아가, 그것들은 혈액 유래의, 증식된 Vd2  $\gamma\delta$  T 세포와 비교하여, CCR4 및 CCR8과 같은 조직 표적지향 수용체의 더 높은 발현을 보여주었다(도 7b). 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 TCR 작용제 또는 다른 성장 인자 없이 IL2 및/또는 IL15의 존재하에서 배양 가능할 수 있다. 예를 들어, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 IL-2가 보충된 RPMI 1640 배지로 이루어지는 배지에서 성장할 수 있다.

[0115] 따라서, 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 다음 성질 중 하나 이상을 가질 수 있다:

- [0116] (i) 표현형 CD69<sup>높음</sup>, ICOS<sup>높음</sup>, TIM3<sup>높음</sup> 및 CD28<sup>낮음/없음</sup>을 나타내고,
- [0117] (ii) CCR3, CD39, CD11b, 및 CD9 중 하나 이상을 상향 조절하고,
- [0118] (iii) TCR 작용제의 부재하에 NKG2D 리간드에 반응하여 IFN- $\gamma$ 를 생성하고,
- [0119] (iv) TCR 작용제의 부재하에 IL-13을 생성하고,
- [0120] (v) TCR 활성화에 반응하여 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 GM-CSF 중 하나 이상을 생성하고,
- [0121] (vi) TCR 활성화에 반응하여 IL-17을 전혀 또는 실질적으로 생성하지 않고,
- [0122] (vii) 추가적인 성장 인자 없이 IL-2를 함유하는 배양 배지에서 성장하고,
- [0123] (viii) TCR 작용제의 부재하에 세포독성 T 세포 반응을 나타내고, 및/또는
- [0124] (ix) 정상 세포보다 종양 세포에 대해 선택적인 세포독성을 나타낸다.

[0125] 바람직하게는, 본 발명의 방법에 의해 생성된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 TCR 작용제의 부재하에서 IL-13을 생성하고/생성하거나, TCR 작용제의 부재하에서 NKG2D 리간드에 반응하여 IFN- $\gamma$ 를 생성한다.

[0126] 본 발명의 방법에 의해 수득된  $\gamma\delta$  T 세포는 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 체크포인트 조절인자를 스크리닝하는 방법에 이용될 수 있다. 체크포인트 조절인자는 암 치료법의 잠재적인 표적이므로 이러한 체크포인트 조절인자의 확인은 암 면역요법을 개발하는 데 유용할 수 있다.

[0127] 시험 화합물이 체크포인트 조절인자인지의 여부를 결정하기 위하여, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 시험 화합물의 존재 또는 부재하에서 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 직접적으로 접촉시켜 시험관 내에서 배양할 수 있다. 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 속도 또는 활성화 정도는 시험 화합물의 존재 및 부재하에서 결정된다. 증식 속도 또는 활성화 정도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시험 화합물의 존재하에서 더 높다면, 이러한 시험 화합물은 체크포인트 조절인자 후보일 가능성이 크다. 이는 시험 화합물이 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)에 의한 접촉 억제를 완화할 수 있기 때문이다.

[0128] 시험 화합물은 조직에 상재하는 T 세포의 체크포인트를 조절할 수 있는 가능성에 기반하여 선택된다.

[0129] 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 증식의 명백한 증가는 세포 사멸의 억제에 기인할 수도 있고, T 세포 수 또는 이의 마커의 증가 및 프로그램된 세포 사멸 마커의 감소된 발현에 의해 측정될 수 있다. 증가된 활성화는 활성화된 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포에 의해 분비되는 IFN- $\gamma$ 와 같은 사이토카인의 방출을 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0130] 대안적으로, 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)와 직접적으로 접촉하여 시험관 내에서 배양될 수 있으며, 여기에서  $\gamma\delta$  T 세포 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 또는 둘 다의 세포 유형 내에서의 시험 유전자의 발현이 변경된다.  $\gamma\delta$  T 세포 및/또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 내에서의 시험 유전자의 발현은 예를 들어, 짧은 간섭 RNA(siRNA) 또는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)와 같은 RNA 표적화제에 의해, 또는 유전자 편집에 의해, 예를 들어 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 변경될 수 있다. 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 속도 또는 활성화 정도는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 발현 변경의 존재 및 부재하에서 결정된다. 증식 또는 활성화의 속도가 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서 시험 유전자의 변경의 부재하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높다면, 시험 유전자는 체크포인트 유전자 후보일 가능성이 크다.

[0131] 대안적으로, 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포)의 살해 속도가 시험 화합물의 부재하에서보다 시

시험 화합물의 존재하에서 더 높거나 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서 시험 유전자의 변경의 부재 하에서보다 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서 더 높다면, 시험 화합물은 체크포인트 조절인자이거나 시험 유전자가 체크포인트 유전자 후보일 가능성이 크다. 살해 속도는 예를 들어, 죽어가는 세포에 의해 방출되는 분자의 정량화에 의해 측정될 수 있다. 시험 화합물의 존재하 또는 기질세포 또는 상피세포(예를 들어, 섬유아세포) 및/또는  $\gamma\delta$  T 세포에서의 시험 유전자의 발현 변경의 존재하에서의 더 높은 속도의 세포 살해는 세포 살해를 억제하고 있던 체크포인트가 완화되었음을 나타내며, 따라서 이러한 시험 화합물이 체크포인트 조절인자일 가능성이 크거나 이러한 시험 유전자가 체크포인트 유전자 후보일 가능성이 크다는 판단을 내릴 수 있다.

[0132] 각 구현예에 이용될 수 있는 섬유아세포 세포주의 예에는 인간 포피 섬유아세포(예를 들어, BJ(ATCC® CRL-2522™)), 정상 피부 섬유아세포(예를 들어, CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™)) 및 폐 섬유아세포(예를 들어, HEL 299 (ATCC® CRL-137™))가 포함된다.

[0133] 시험 화합물이 체크포인트 조절인자 후보임을 확인하기 위해서 또는 시험 유전자가 체크포인트 유전자 후보임을 확인하기 위해서는, 시험 화합물의 존재하에서 또는 시험 유전자의 변경의 존재하에서  $\gamma\delta$  T 세포의 증식 및 또는 활성화의 속도가 시험 화합물의 부재하에서 또는 시험 유전자의 변경 부재하에서보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배 또는 적어도 5배 더 높을 수 있다. 세포 주기는 0일과 7일에서의 절대적인 세포 수, (세포 주기 마커인) Ki-67과 CD25 발현 수준과 같은 다수의 수단에 의해, 그리고 CFSE 또는 셀트레이스 (CELLTRACE™) 바이올렛과 같은 세포 배양 염료를 이용하여 측정될 수 있다. 세포 활성화는 IFN- $\gamma$ 와 같은 이펙터 단백질의 생성에 의해 측정될 수 있다. 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 증식의 명백한 증가는 세포 사멸의 억제로 인한 것일 수도 있고, T 세포 수 또는 이의 마커의 증가에 의해 그리고 프로그램된 세포 사멸 마커의 감소된 발현에 의해 측정될 수 있다.

[0134] 본 발명의 방법에 의해 수득된  $\gamma\delta$  T 세포는 약제, 예를 들어 입양 T 세포 치료법을 위한 약제로서 이용될 수 있다. 이것은 본 발명의 방법에 의해 수득된  $\gamma\delta$  T 세포의 환자로의 전달을 수반한다. 이러한 치료법은 자가유래(autologous), 즉  $\gamma\delta$  T 세포는 그것들이 수득된 동일한 환자에게 다시 전달될 수 있고; 또는 이러한 치료법은 동종이계(allogenic), 즉 한 사람으로부터의 수득된  $\gamma\delta$  T 세포가 다른 환자에게 전달될 수 있다. 치료 방법은

[0135] 공여자 개체로부터 수득된 비-조혈조직의 샘플을 제공하는 단계;

[0136] 상기 기술된 것과 같은 샘플로부터  $\gamma\delta$  T 세포를 배양하여 증식된 집단을 생성하는 단계; 및

[0137]  $\gamma\delta$  T 세포의 증식된 집단을 수여자 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0138] 공여자 개체와 수여자 개체는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0139]  $\gamma\delta$  T 세포는 임의의 적절한 방법에 의해 치료를 필요로 하는 환자 또는 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어,  $\gamma\delta$  T 세포는 정맥 내로 또는 종양 내로 치료를 필요로 하는 환자 또는 대상체에 투여될 수 있다.

[0140] 치료될 환자 또는 대상체는 바람직하게는 인간 암 환자 또는 바이러스 감염 환자, 예컨대, CMV 감염 환자 또는 HIV 감염 환자이다.

[0141]  $\gamma\delta$  T 세포는 비-MHC 제한적이므로, 그것들이 이물질로서 전달된 숙주를 인식하지 못하며, 이는  $\gamma\delta$  T 세포가 이식편대숙주병을 일으킬 가능성이 적다는 것을 의미한다. 이는  $\gamma\delta$  T 세포가 "상용 기성품(off the shelf)"으로 이용되어 예를 들어, 동종이계 입양 T 세포 치료법을 위하여 임의의 수여자 내로 전달될 수 있음을 의미한다.

[0142]  $\gamma\delta$  T 세포는 정상적으로 비-조혈조직에 상재하므로, 조직에 상재하는 V $\delta$ 1 T 및 DN  $\gamma\delta$  T 세포는 또한 전신 혈액(systemic blood)에 상재하는 대응물(counterpart)보다 종양 덩어리에 표적지향적이며 종양 덩어리 내에 유지될 가능성이 있고, 이러한 세포의 입양 전달은 고형 종양 및 잠재적으로 다른 비-조혈조직과 관련된 면역병리학을 표적으로 하는 데 더욱 효과적일 가능성이 있다.

[0143] 일부 구현예에서, 비-조혈조직 내 종양을 가지는 개체의 치료 방법은

[0144] 공여자 개체로부터 수득된 상기 비-조혈조직의 샘플을 제공하는 단계;

[0145] 상기 기술된 샘플로부터  $\gamma\delta$  T 세포를 배양하여 증식된 집단을 생성하는 단계; 및

- [0146]  $\gamma \delta$  T 세포의 증식된 집단을 종양을 가지는 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0147] 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 NKG2D를 발현하고, 악성 종양과 밀접한 관련이 있는 NKG2D 리간드(예를 들어, MICA)에 반응한다. 또한, 그것들은 임의의 활성화의 부재하에서 세포독성 프로파일을 나타내며, 따라서 종양 세포를 죽이는데 효과적일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 임의의 활성화의 부재 하에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL4, IL-13, 그라눌리신(Granulysin), 그랜자임(Granzyme) A와 B, 및 퍼포린(Perforin) 중 하나 이상, 바람직하게는 이들 전부를 발현할 수 있다. IL-17A는 발현되지 않을 수 있다.
- [0148] 따라서, 본 설명에 보고된 결과는 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 "상용 기성품" 면역치료 시약으로서의 임상적 적용을 위한 실용성 및 적합성의 설득력 있는 증거를 제공한다. 이들 세포는 선천성 살상력을 가지고, MHC 제한이 없으며, 다른 T 세포보다 종양에 대한 개선된 표적지향 및/또는 종양 내에서의 향상된 유지를 나타낸다.
- [0149] 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 CAR-T 치료법에 이용될 수도 있다. 이것은 새로운 특이성, 예를 들어 단일클론 항체의 특이성을 갖는 T 세포를 리프로그래밍하기 위해 d조작된(engineered) T 세포 수용체(TCR)의 생성을 수반한다. 조작된 TCR은 T 세포를 악성 종양 세포에 대해 특이성을 나타내도록 만들 수 있고, 따라서 암 면역요법에 유용할 수 있다. 예를 들어, T 세포는 대상체 조직으로부터 유래된 정상적인 체세포에 의해서는 발현되지 않는 종양 관련 항원(tumour associated antigen, TAA)과 같은 종양 항원을 발현하는 암 세포를 인식할 수 있다. 따라서, CAR 변경된 T 세포는 예를 들어, 암 환자의 입양 T 세포 치료법에 이용될 수 있다.
- [0150] CAR에 대한 혈액에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 사용은 기술된 바 있다. 그러나, 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈조직에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포는 형질전환된 세포를 인식하는 선천성 능력을 보유하면서 키메라 항원 특이적 TCR로 형질도입될 수 있으므로 CAR-T 접근법을 위한 특별히 우수한 비히클일 가능성이 있고, 혈액에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포 또는 통상적인, 전신성  $\alpha \beta$  T 세포보다 더 우수한 종양 침투 및 보유 능력을 가질 가능성이 있다. 나아가, 그것들의 MHC 의존성 항원 제시의 결여는 이식편대숙주병의 가능성을 감소시키고, 낮은 수준의 MHC를 발현하는 종양을 표적으로 하는 것을 가능하게 한다. 마찬가지로, 예를 들어 CD28의 참여를 통한 통상적인 공동 자극에 대한 그것들의 비 의존성은 공동 자극 수용체에 대해 낮은 수준의 리간드를 발현하는 종양의 표적화를 향상시킨다.
- [0151] 암은 악성 암세포의 비정상적인 증식을 특징으로 할 수 있고, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프구성 백혈병(ALL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)과 같은 백혈병; 호지킨 림프종, 비 호지킨 림프종 및 다발성 골수종과 같은 림프종; 및 육종, 피부암, 흑색종, 방광암, 뇌암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 폐암, 결장직장암, 자궁경부암, 간암, 두경부암, 식도암, 췌장암, 신장암, 부신암, 위암, 고환암, 담낭 및 담도암, 갑상선암, 흉선암, 골암 및 대뇌암과 같은 고형 암을 포함할 수 있다.
- [0152] 암 환자 내의 암세포는 개체의 정상적인 체세포와 면역학적으로 구별될 수 있다(즉, 암성 종양은 면역원성일 수 있다). 예를 들어, 암세포는 암 세포에 의해 발현된 하나 이상의 항원에 대해 암 환자에서 전신성 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 면역 반응을 유발하는 항원은 종양 항원일 수 있거나, 정상적인 세포에 의해 공유될 수 있다. 암 환자는 당해 분야에 공지된 임상적 기준에 따라 암을 진단하기에 충분한 적어도 하나의 식별 가능한 징후, 증상, 또는 검사 결과를 나타낼 수 있다. 이러한 임상적 기준의 예는 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine (40)]과 같은 의학 교과서에서 찾아볼 수 있다. 일부 예에서, 개체에서의 암 진단은 이러한 개체로부터 수득된 체액 샘플 또는 조직 샘플에서 특정 세포 유형(예를 들어, 암 세포)의 확인을 포함할 수 있다.
- [0153] 상기 기술된 바와 같은 치료에 적합한 환자, 대상체 또는 개체는 설치류(예를 들어, 기니피그, 햄스터, 랫트, 마우스), 쥐과 동물(예를 들어, 마우스), 개과 동물(예를 들어, 개), 고양이과 동물(예를 들어, 고양이), 말(예를 들어, 말), 영장류, 원숭이(예를 들어, 원숭이 또는 유인원), 원숭이(예를 들어, 마모셋 또는 개코원숭이), 유인원(예컨대, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄 또는 긴팔원숭이), 또는 인간과 같은 포유동물일 수 있다.
- [0154] 일부 바람직한 구현예에서, 이러한 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다. 다른 바람직한 구현예에서, 비인간 포유동물, 특히 인간에서 치료적 효능을 증명하기 위한 모델로서 통상적으로 사용되는 포유동물(예를 들어, 쥐과 동물, 영장류, 돼지, 개 또는 토끼)이 이용될 수 있다.
- [0155] 일부 구현예에서, 이러한 환자, 대상체 또는 개체는 최초의 암 치료 후 미세 잔존 질환(minimal residual

disease, MRD)을 가질 수 있다.

- [0156] 치료는 인간 또는 동물(예를 들어, 수의학적 적용에서)에 관계없이 어떤 바람직한 치료적 효과, 예를 들어 상태의 진행의 억제 또는 지연이 달성되는 임의의 치료 및 치료법일 수 있고, 진행 속도의 감소, 진행 속도의 중단, 상태의 개선, 상태의 치유 또는 관해(부분 또는 전체에 관계없이), 상태의 하나 이상의 증상 및/또는 징후의 예방, 지연, 완화 또는 억제, 또는 치료 부재하에서 예상되는 것 이상의 대상체 또는 환자의 생존 연장을 포함한다.
- [0157] 예방 조치로서의 치료(즉, 예방) 또한 포함된다. 예를 들어, 암 발병 또는 재발에 취약하거나 암 발병 또는 재발 위험이 있는 환자, 대상체 또는 개체는 본원에 기술된 바와 같이 치료될 수 있다. 이러한 치료는 환자, 대상체 또는 개체에서의 암 발병 또는 재발을 방지하거나 지연시킬 수 있다.
- [0158] 특히, 치료는 완전 암 관해(complete cancer remission)를 포함한 암 성장 억제 및/또는 암 전이 억제를 포함할 수 있다. 암 성장은 일반적으로 더욱 발달된 형태의 암의 변화를 나타내는 다수의 지표 중 임의의 하나를 지칭한다. 따라서, 암 성장 억제를 측정하기 위한 지표는 암 세포 생존의 감소, (예를 들어, 전산화 단층 촬영(CT), 초음파 촬영, 또는 기타 영상화 방법을 이용하여 결정된) 종양 부피 또는 형태의 감소, 지연된 종양 성장, 종양 맥관구조의 파괴, 지연성 과민성 피부 시험에서의 개선된 성적, 세포독성 T 림프구 활성의 증가, 및 종양 특이적 항원 수준의 감소를 포함한다. 개체에서 암성 종양의 면역 억제를 감소시키는 것은 암 성장, 특히 대상체에 이미 존재하는 암의 성장에 저항하는 개체의 능력을 향상시키고/향상시키거나, 개체에서의 암 성장 경향을 감소시킬 수 있다.
- [0159] 본 발명의 다른 양태 및 구현예는 "로 이루어진(consisting of)"이라는 용어에 의해 대체된 용어 "포함하는(comprising)"과 함께 상기 기술된 양태 및 구현예, 그리고 "필수적으로 ~로 이루어진(consisting essentially of)"이라는 용어에 의해 대체된 용어 "포함하는"과 함께 상기 기술된 양태 및 구현예를 제공한다.
- [0160] 본 출원은 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 상기 양태 및 위에 기술된 구현예 중 임의의 것과 서로와의 모든 조합을 개시한다고 이해되어야 한다. 마찬가지로, 본 출원은 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 바람직한 특징 및/또는 선택적인 특징의 모든 조합을 단독으로 또는 다른 양태들 중 임의의 것과 함께 개시한다.
- [0161] 위의 구현예의 변경, 추가적인 구현예 및 이의 변경은 본 개시를 읽는 당업자에게 명백할 것이며, 따라서 이들은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0162] 본 명세서에 언급된 모든 문서 및 서열 데이터베이스 항목은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로서 본 설명에 포함된다.
- [0163] 본 설명에 사용된 "및/또는"은 두 개의 명시된 특징 또는 구성요소 중 각각을 다른 하나의 특징 또는 구성요소와 함께 또는 다른 하나의 특징 또는 구성요소 없이 구체적인 개시 내용으로 취급한다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 각각이 본 설명에서 개별적으로 기재된 것처럼 (i) A, (ii) B 및 (iii) A와 B 중 각각을 구체적인 개시 내용으로 취급한다.

**도면의 간단한 설명**

- [0164] 도 1a 내지 도 1d는 인간의 피부가 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포의 주목할 만한 집단을 포함한다는 것을 보여준다. 도 1a: 피부에 상재하는 림프구를 Clark et al(29)의 "클라크 프로토콜(the Clark protocol)"에 공개된 기관형(organotypic) 세포 배양을 이용하여 분리하였다. CD45+ 세포 내에서, 항-CD3을 이용하여 T 세포를 염색하고, 항-CD56 항체를 이용하여 NK 세포의 CD3- CD56+ 각각을 확인하였다. CD3+ 세포 내에서, pan  $\gamma \delta$  T 세포 수용체에 대한 항체를 이용하여 피부에 상재하는  $\gamma \delta$  T 세포를 확인하였고, 항-CD8알파를 이용하여 CD3+, pan  $\gamma \delta$  TCR-게이트 내의 통상적인 CD4 및 CD8 양성  $\alpha \beta$  T 세포의 비율을 확인하였다. 도 1b는 클라크 프로토콜을 이용하여 7~10명의 공여자(donor)에 대한 이들 실험의 요약을 보여준다. 이 프로토콜을 이용하여, 인간 피부 내의 림프구를 계속해서 진피 섬유아세포와 접촉시키고, 사이토카인을 전혀 보충하지 않거나 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-15(IL-15) 또는 IL-2 및 IL-15를 보충하였으며, 이는 사이토카인의 사용이 배양물에 IL-15 또는 IL-2 및 IL-15를 보충할 때 약간 더 큰  $\gamma \delta$  T 세포 집단을 제외하고는 피부에 상재하는 림프구의 조성을 변화시키지 않음을 보여주어, 클라크 등(Clark et al.)의 프로토콜의 타당성을 확인하였다. 3주의 기관형 피부 배양 후 림프구 조성을 지정된 사이토카인을 사용하여 4명의 공여자에 대한 요약으로서 도시하였다. 도 1c: 피부에 상재하는  $\gamma \delta$  세포는 주로 V $\delta$ 1을 발현하는  $\gamma \delta$  T 세포(76.24%±17.3), V $\delta$ 2를 발현하는 T 세포의 작은 집단(3.06%±6.1), 및 본원에서 이중 음성(DN)  $\gamma \delta$  T 세포로도 지칭되는, V $\delta$ 1 또는 V $\delta$ 2에 대해 음성 염색하는 pan- $\gamma \delta$

TCR 양성 세포의 집단(20.7%±13.97)을 포함한다. 혈액 내에서  $\gamma\delta$  T 세포의 우세한 집단이 V $\delta$ 2 TCR 사슬을 발현하기 때문에, 건강한 지원자의 혈액의 대조군 염색은 인간  $\gamma\delta$  T 세포의 강한 구획화를 보여준다. 도 1d: 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 만성적으로 활성화된 T 세포들과 이전에 관련이 있었던 마커를 보여주지만, 이들 마커는 필연적으로 만성적인 활성화를 반영한다기 보다는 조직 상재성을 나타내는 특징적인 지표이다. 히스토그램은  $\gamma\delta$  T 세포 상의 표시된 마커(속이 채워진 히스토그램) 대 각 항체에 대한 적절한 아이소타입 대조군(속이 빈 히스토그램)의 염색을 보여준다.

도 2a 내지 도 2d는 클라크 프로토콜을 통해 인간 피부로부터 직접적으로 유래된 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 T 세포를 활성화시키는 통상적인 수단에 의해 활성화될 때 소위 TH1에 편향된(TH1-biased) 반응을 나타내고, 마찬가지로 NKG2D 리간드 단독에 의한 활성화 시 TH1에 편향된 반응을 나타냄을 보여준다. 도 2a: 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 활성화 및 NK 세포 관련 수용체 NKG2D의 강한 발현을 보여준다(속이 채워진 히스토그램; 속이 빈 히스토그램으로 표시된 아이소타입과 대조적임). 플레이트에 결합된 NKG2D 수용체에 대한 공지된 리간드 중 하나인 제조항 MICA를 이용한 활성화 시, 피부  $\gamma\delta$  T 세포는 임의의 다른 자극 없이 반응하고, 그 반응은 블로킹(blocking) NKG2D 항체의 존재하에 저지되므로 TCR 라이게이션과 무관하다. 브레펠딘 A(brefeldin A)와 100 단위의 IL-2/ml의 존재하에 6시간 동안 세포를 자극하였고, 그 후 CD107a에 대한 염색으로 탈과립을 분석하였다. 표면 염색 후 투과화(permeabilisation) 다음에 세포 내 사이토카인의 염색에 의해 TNF $\alpha$  및 INF- $\gamma$ 의 생성을 분석하였다. 이오노마이신 (I)과 결합한 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (P)를 T 세포를 활성화시키기 위한 양성 대조군으로 사용하였다. 도 2b: 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 TH1에 편향된 반응을 보여준다. 클라크 프로토콜을 이용하여  $\gamma\delta$  T 세포를 회수하고, 브레펠딘 A의 존재하에 6시간 동안 PMA와 이오노마이신으로 자극하고, 세포 내 사이토카인에 대해 염색하였다. 인간 피부로부터 새롭게 단리된  $\gamma\delta$  T 세포는 자극 시 TNF $\alpha$ 와 INF- $\gamma$ 를 생성하지만, 작거나 검출 불가능한 양의 TH2 또는 TH-17 세포와 관련이 있는 사이토카인, 예를 들어 IL-4, IL-17A, IL-13, IL-22만을 생성하는 반면, 통상적인 CD4+  $\alpha\beta$  T 세포는 훨씬 더 다양한 사이토카인 생성을 보여준다. 도 2c: 인간 피부로부터 직접적으로 유래된 림프구 중에서, 다양한 수준의 NKG2D 수용체가  $\gamma\delta$  T 세포, CD8a+ 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포 및 NK 세포에 의해 발현되었다. 이들 세포 가운데, NK 세포는 NKG2D 리간드 단독 노출에 반응하지만, T 세포 내에서는 임의의 TCR 자극의 부재하에서 NKG2D 리간드로 자극 시 사이토카인 반응을 보여주는 것은  $\gamma\delta$  T 세포 집단뿐이다(유세포 분석 점 도표(dot plot)의 윗줄 참조). 반응은 가용성 블로킹 항-NKG2D 항체를 이용하여 차단될 수 있으며, 이는 반응이 NKG2D 수용체를 통해 독점적으로 매개됨을 보여준다. 도 2d: 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 중에서, V $\delta$ 1 세포와 DN  $\gamma\delta$  T 세포만이 (\*로 표시된) 제조항 MICA 단독에 의해서 활성화되는 선천적으로 유사한(innate-like) 잠재력을 보여준다. 피부 내에서 적은 수로 발견되는 V $\delta$ 2 발현 T 세포는 이러한 반응을 전혀 보이지 않는다.

도 3a 내지 도 3d는 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 오로지 강한 활성화 및 증식으로 인해 피부 기질로부터의 분리에 대해서만 반응함을 보여준다. 도 3a: 피부에 상재하는 림프구를 클라크 프로토콜을 이용하여 분리하였다. 3주의 기관형 배양 후, 피부 림프구를 수확하고 섬유아세포를 포함하는 임의의 잔여 피부 세포로부터 분리하여, 백만 개 림프구/ml의 밀도로 조직 배양 웰에 넣고 100 U/ml의 IL-2를 보충하였다. 3주가 더 지난 후, 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 강력하게 증식하였고, 피부 림프구 배양물 내에 농축되었다. 이러한 강력한 증식 현상은 3주 이내에 평균 127.18배로 증식된, V $\delta$ 1+ T 세포의 대다수로 대표되는 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포에만 존재하는 반면, 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포는 평균 5.21배 증식되었으며; 이는 20배가 넘지 않는다. 도 3b: 피부에 상재하는 V $\delta$ 1+ T 세포는 14일에 걸쳐 (세포 주기를 나타내는) 마커 Ki-67을 강하게 상향 조절함으로써 조직 소실에 반응한다(아이소타입 대조군은 가장자리를 점선으로 표시한 속이 빈 히스토그램으로 표시함; 0일째의 Ki-67 발현은 속이 빈 히스토그램으로 표시; 7일째의 Ki-67 발현은 옅은 회색 히스토그램으로 표시; 14일째의 Ki-67 발현은 짙은 회색 히스토그램으로 표시). 나아가, 피부 기질과 접촉 시 대부분이 IL-2 수용체 알파(CD25)에 대해 음성인, 피부에 상재하는 V $\delta$ 1 T 세포는 조직으로부터 분리 후에 CD25를 상향 조절한다(아이소타입 대조군: 점선 히스토그램, 0일째 염색: 옅은 회색 히스토그램, 7일째 염색: 짙은 회색 히스토그램).

도 3c: Ki-67의 중간 형광 강도(median fluorescence intensity, MFI)로 표시된 높은 비율의 세포 주기는 V $\delta$ 1+ T 세포로 대표되는 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포에서만 관찰되며, 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포 및 NK 세포에서는 관찰되지 않고, 이들 세포에서는 MFI가 실제로 14일에 걸쳐 감소한다. 도 3d: 기질 세포로부터 분리된 피부 림프구는 3주의 배양 후에 강하게 농축된 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포 집단을 보여준다. 이러한  $\gamma\delta$  T 세포 집단은 다수의 V $\delta$ 1 양성 세포(77.49%±17.04)와 pan  $\gamma\delta$  TCR 양성 DN T 세포(21.46%±16.92)를 포함한다. 클라크 프로토콜을 이용하여 새롭게 수확된 피부 림프구에서 관찰되는 초기의 작은 V $\delta$ 2 T 세포 집단은 조직  $\gamma\delta$  T 세포의 3주 증식 후에는 감소하고 거의 소실된다(0.6%±1.204).

도 4a 및 4b는 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포가 조직의 소실에 반응하며, 피부 기질세포, 특히 섬유아세포에 의한 접촉 의존성 메커니즘을 통해 억제됨을 보여준다. 도 4a: 3주 후 클라크 프로토콜에서와 같이 기관형 배양 후 혼합 피부 림프구를 수확하였다. 그런 다음, 자가 피부 섬유아세포의 전면배양 층(confluent layer)의 위에, 그리고 섬유아세포에 의해 생성된 가용성 억제제의 존재를 제어하기 위해 트랜스웰 내에 혼합 림프구를 씨딩하였다. 14일 후, 존재하는 절대 세포 수(absolute cell number)를 통해 산출된 증식 배수(fold-wise)를  $\gamma\delta$  T 세포 및 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포에 대해 측정하였다. 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 조직으로부터 분리될 때 섬유아세포의 존재하에서 강한 증식 반응을 보였으나, 자가 섬유아세포와 직접적으로 세포 접촉하지 않는 경우에만 그러했다. 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포는 시험된 어떠한 조건에서도 이러한 반응을 보이지 않았다. 도 4b: 기관형 배양으로부터 수득된 혼합 림프구를 자가 섬유아세포의 단일층 위에 씨딩하거나(열은 회색 히스토그램) IL-2가 보충된 빈 웰 내에 씨딩하고(질은 회색 히스토그램), 7일 동안 배양하였다. 피부에 상재하는  $V\delta 1+$  T 세포(왼쪽 패널)뿐만 아니라 pan  $\gamma\delta$  TCR+, DN T 세포(오른쪽 패널)도 섬유아세포의 직접적인 존재하에서는 정지 상태(quiescent)를 유지하였으나, CD25, TH 관련된 전사 인자인 T-bet, 및 세포 주기 마커 Ki-67의 상향 조절된 발현(MFI)으로 표시된 바와 같이, 섬유아세포가 존재하지 않고 피부 기관형 배양물로부터 분리될 때 강한 활성화를 보였다(점선, 속이 빈 히스토그램은 일치되는 아이소타입 대조군을 나타냄).

도 5a 및 도 5b는 증식하는 피부  $\gamma\delta$  T 세포가 탈억제 및 강한 세포독성 잠재력 획득의 징후를 나타냄을 보여준다. 도 5a: 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 기관형 세포 배양물로부터 분리한 후 14일 동안 증식시켰다. 그런 다음,  $\gamma\delta$  T 세포는 pan  $\alpha\beta$  TCR 단일클론 항체로 염색된 모든 통상적인 T 세포를 배제함으로써 유세포 분석법에 의해 음성으로 분류되었다. 그런 다음, 150,000개의 분류된  $\gamma\delta$  T 세포를 평균 96웰 배양 플레이트에 2중으로(in duplicate) 씨딩하고, 사이토카인의 보충 및 임의의 활성화 리간드의 보충 없이, 24시간 동안 배양하였다. 상층액을 수확하고, 애피메트릭스(Affymetrix) 루미넥스(LUMINEX®) 기반의 사이토카인 어레이를 이용하여 생성된 사이토카인을 분석하였다. 도 5b: 음성으로 분류된  $\gamma\delta$  T 세포 또한 1일 전에 씨딩한 암 세포주 상에 웰당 10,000개 세포의 농도로 씨딩하였다. 대조군으로서, 음성으로 분류된 통상적인 피부  $\alpha\beta$  T 세포를 이용하였다. T 세포를 100U/ml의 IL-2의 존재하에서 블로킹 NKG2D 항체의 존재 및 부재하에 지정된 이펙터:표적 비율로 씨딩하였다. 피부에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포는 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포에 비해 악성 세포주 중에서, ELISA를 통해 측정된 카스파제 절단 상피 특이적 사이토케라틴 18(CK18) 방출에 의해 도시된 바와 같이, 우수한 살해를 보여주었다. 세포독성은, NKG2D 수용체를 차단하는 항체를 함유하는 배양물에서의 그것의 감소로 도시된 바와 같이, NKG2D 수용체를 통해 적어도 부분적으로 매개되었다.

도 6a 내지 도 6d는 인간 소화관에서 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포를 분석한 결과를 보여준다. 도 6a: 클라크 프로토콜의 적용은 소화관에 상재하는 림프구 분리를 가능하게 하였다. 혼합 소화관 림프구는 보통은 주로  $V\delta 1$  세포를 포함하는 조직에 상재하는  $\gamma\delta$  T 세포의 대규모 집단을 포함하지만,  $V\delta 2$  및 이중 음성  $\gamma\delta$  T 세포도 포함한다. 도 6b: 소화관 기관형 배양물로부터 분리된  $\gamma\delta$  T 세포는 일단 소화관의 기질로부터 분리되면 시간이 경과함에 따라 Ki-67을 상향 조절하므로, 피부에서 유래된  $\gamma\delta$  T 세포와 비슷한 반응을 보여준다. 도 6c: 소화관 유래  $\gamma\delta$  T 세포는 IFN- $\gamma$ 를 생성하는 것에 의해, 그리고 CD107a 상향조절에 의해 측정된 바와 같이 탈과립에 의해, 재조합 MICA와 같은 선천적으로 유사한 자극에 대해 반응한다. 도 6d: 소화관 기관형 배양물로부터 분리된  $\gamma\delta$  T 세포는 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포에 대해 비슷한 반응을 보이며, 소화관 기질과의 접촉이 결여된 림프구 배양물에서 전반적인 농축으로 관찰되는 바와 같이 세포 배양물에서 시간이 경과함에 따라 증식한다.

도 7a 및 도 7b는 증식된 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포의 조직 표현형을 보여준다. 도 7a: 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포는 피부 림프구 항원(cutaneous lymphocyte antigen, CLA), 피부 표적지향 케모카인 수용체(skin homing chemokine receptor)인 CCR4와 CCR8에 대해 양성 염색된다. 도 7b: 발현 수준은 각각 피부 또는 혈액으로부터 유래된 증식된  $\gamma\delta$  T 세포 상에서 상이하다.

도 8은 임의의 TCR의 자극 없이, 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포의 탈억제가 자발적인 TH-1 사이토카인 생성을 초래하며, 놀랍게도 그리고 신선한 TCR 활성화된  $\gamma\delta$  T 세포와는 반대로, 아토피성 사이토카인 IL-13의 생성을 초래함을 보여준다. 새롭게 유래된  $\gamma\delta$  T 세포와 일관되게, 탈억제되고 증식 중인  $\gamma\delta$  T 세포는 무시할만한 양의 TH-2 관련 사이토카인, 예를 들어 IL-4 및 IL-5를 생성한다. 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포를 14일 동안 증식시키고, 통상적인  $\alpha\beta$  T 세포를 배제시킴으로써 음성으로 분류하였다. 150,000개의 혼합  $\gamma\delta$  T 세포를 임의의 자극 또는 사이토카인 보충 없이 4명의 공여자에 대해 2중으로 96 플레이트 평판 웰에 1백만 개 세포/ml의 밀도로 배양하였다. 24시간 후 상층액을 수집하고, 애피메트릭스의 루미넥스 기반의 사이토카인 어레이를 이용하여 분석하였다.

도 9a 내지 도 9c는 ELISA를 이용하여 표적 세포에 의한 카스파제 절단 사이토케라틴 18의 방출로 측정된 바와

같이, 증식되어 음성으로 분류된 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포가 함께 배양된 다양한 인간 종양 세포주에 대해 강한 세포독성을 나타냄을 보여준다(도 9a: HCT1954, 도 9b: HCT116, 도 9c: MD231).

도 10a 및 도 10b는 신선한, 증식되지 않은 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포가 T 세포 활성화 이전의 마커를 보여준다는 점을 보여준다. 도 10a: 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 CD69, ICOS 및 TIM3을 높게 발현하고, CD28을 적게 발현한다. 나아가, 이 세포는 활성화 마커 NKG2D의 높은 발현을 보여준다. 이러한 표현형은 시험관 내에서 증식시키는 동안 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포에 의해 지속된다. 이와 반대로, 인간 혈액으로부터 유래된 V $\delta$ 1 T 세포는 이러한 활성화의 징후가 결여되어 있고, CD69 또는 TIM3을 발현하지 않으며, 낮은 수준의 ICOS만을 발현한다. 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포와 비교하여, 혈액 유래의 V $\delta$ 1 T 세포에서의 NKG2D 발현은 훨씬 낮은 반면, 혈액 유래의 V $\delta$ 1 T 세포는 공동 자극 분자 CD28을 발현한다. 도 10b: 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포만이 T 세포 수용체에 대한 리간드와 같은, 임의의 다른 자극의 부재하에서 재조합 MICA와 같은 NKG2D 리간드에 대해 반응성을 나타낸다. 혈액 유래 V $\delta$ 1 또는 V $\delta$ 2 T 세포는 선천적으로 유사한 자극에 대해 이러한 반응성을 보여주지 않는다. 표시된 바와 같이 재조합 MICA 또는 항-CD3 항체 또는 둘 다를 함유하는 96웰 플레이트에 세포를 씨딩하였다. 세포를 IL-2 100U/ml 중에서 6시간에 걸쳐 배양하고, 마지막 4시간 동안 BFA 중에서 배양한 후, 표면 항원 염색, 투과화 및 IFN- $\gamma$ 에 대한 세포 내 염색을 수행하였다.

도 11은 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포가 낮은 수준의 CD16을 발현하지만, 높은 친화도의 IgG 수용체 CD64의 상당한 발현을 보여준다는 점을 보여준다. 따라서, 직접적인 세포독성 활성 이외에도, 조직 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 항체에 의해 악성 종양 및 전이 쪽으로 이끌리므로 CD20 또는 Her2 치료법과 같은 단일클론 항체요법의 효능을 증가시키고, 옹소닌화된 종양 세포를 인식하며, 그것들을 항체 의존적 세포 매개성 세포독성(ADCC)을 통해 살해하는데 사용될 수도 있다. 도시된 결과는 (네 명 중) 한 명의 대표적인 공여자로부터 유래된 것이다.

도 12는 IL-2(왼쪽 패널), IL-15(가운데 패널) 및 IL-2 + IL-5(오른쪽 패널)에서의 V $\delta$ 1 T 세포의 증식을 보여준다. 신선하게 분리된 피부 유래 림프구를 10% FCS 및 1% Pen/Strep을 함유하는 RPMI 배지 중의 96웰 평판 플레이트에서 배양하고, 7일 동안 각각 IL-2, IL-15 또는 IL-2+IL-15를 보충하였다. IL-2와 IL-15뿐만 아니라, 이들 사이토카인의 조합은 임의의 기질 세포의 부재하에서 아이소타입(진 음성(true negative)) 염색과 비교하여 KI-67 염색에서의 변화로 표시된 바와 같이 V $\delta$ 1 T 세포의 증식을 유도하였다. Ki-67은 G0의 세포 주기를 벗어난 세포만을 염색하며, 이는 일반적으로 증식과 관련이 있다.

도 13은 21일째에 증식된 V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T 세포의 표면에서의 CD9, CCR3 및 CD39의 발현을 나타내는 유세포 분석 결과를 보여준다. 증식된 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포는 동등한 아이소타입 염색(진 음성, 열린 히스토그램)에 비해(겉은 색 히스토그램)으로 표시된 바와 같이 높은 수준의 세포 표면 마커 CCR3, CD39 및 CD9를 유지하였다.

도 14는 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포(겉은 색 막대)와 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포(열은 색 막대)에서의 CCR3 및 CD9의 mRNA 발현을 보여준다. 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포를 본원에 개시된 바와 같이 증식시키고, 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포를 V $\delta$  T 세포 수용체에 대한 플레이트에 결합된 항체(20  $\mu$ g/ml)를 이용하여 증식시켰다. 증식 후, V $\delta$ 1 T 세포를 형광 활성화 세포 분류법(Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)을 이용하여 단리하고, 양 그룹의 3명의 공여자로부터 RNA를 단리하였다(혈액=회색 대 피부=검은색). 전체 mRNA를 시퀀싱하고, 지정된 mRNA의 발현 수준을 정규화하고 로그 2 변환시켰다. 모든 발현 수준을 직접적으로 비교하여, 대부분의 인간 세포에서 높은 수준으로 발현되는 공통적인 하우스키핑(housekeeping) 유전자인 GAPDH에 대한 비율로 도시하였다.

도 15는 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포(겉은 색 막대)와 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포(열은 색 막대)에서의 IL-13의 mRNA 발현을 보여준다. 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포를 본원에 개시된 바와 같이 증식시키고, 혈액 유래 V $\delta$ 1 T 세포를 V $\delta$  T 세포 수용체에 대한 플레이트에 결합된 고용량 항체(20  $\mu$ g/ml)를 이용하여 증식시켰다. 증식 후, V $\delta$ 1 T 세포를 FACS를 이용하여 단리하고, 양 그룹의 3명의 공여자로부터 RNA를 단리하였다(혈액=회색 대 피부=검은색). 전체 mRNA를 시퀀싱하고, IL-13에 대한 mRNA의 발현 수준을 정규화하고 로그 2 변환시켰다. 발현 수준을 직접적으로 비교하여, GAPDH에 대한 비율로 도시하였다.

도 16a 및 16b는 PMA/이오노마이신(도 16a) 또는 항-CD3(도 16b)으로의 TCR 자극 후, 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포에서의 사이토카인의 생성을 보여준다. 단리 및 증식 후, 피부 유래 V $\delta$ 1 T 세포를 형광 활성화 세포 분류법(FACS)을 이용하여 정제하였다. 150,000개의 V $\delta$ 1 T 세포를 세 명의 공여자에 대해 이중으로 96웰 평판 플레이트에 씨딩하고, 24시간 동안 플레이트에 결합된 항 CD3(5  $\mu$ g/ml) 또는 PMA/이오노마이신으로 자극하였다. 상층액을 대상으로 루미넥스 플랫폼을 이용하여 지정된 사이토카인의 절대량을 분석하였다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0165] 이제 본 발명의 일부 양태 및 구현예를 실시예로써, 그리고 위에 기술된 도면을 참조하여 설명할 것이다.

[0166] **방법**

[0167] **3차원적 외식편 배양에 의한 인간 피부로부터 림프구의 단리**

[0168] 다른 곳에 기술된 바와 같이(29), 3차원적 피부 외식편 프로토콜을 확립하였다. 9 mm x 9 mm x 1.5 mm 셀폼 매트릭스(Cellfoam Matrix, 사이토매트릭스 사(Cytomatrix Pty Ltd), 오스트레일리아 빅토리아 주)를 가압 멸균 처리한 다음, 실온에서 30분 동안 PBS 중 100 mg/ml 랫트 꼬리 콜라겐 I(BD 바이오사이언스(Biosciences))의 용액에 배양한 다음, PBS 중에서 1회 행구었다. 성인 인간 피부 샘플을 피부 수술 3 - 6시간 이내에 취득하였다. 피하 지방을 제거하고, 남아 있는 피부 조직을 대략 1 mm x 1 mm 절편으로 잘게 썰었다. 대략 다섯 개의 피부 절편/외식편을 각 매트릭스 표면 위에 놓고 아래로 눌렀다. 각각의 매트릭스를 10% 열불활성화 소태아혈청(라이프 테크놀로지스), L-글루타민(292 µg/ml; 라이프 테크놀로지스), 페니실린(100 단위/ml, 라이프 테크놀로지스), 스트렙토마이신(100 µg/ml; 라이프 테크놀로지스), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설펜산(HEPES; 0.01 M; 라이프 테크놀로지스), 피루브산 나트륨(1mM; 라이프 테크놀로지스), 최소 필수 배지(MEM) 비 필수 아미노산(1X; 라이프 테크놀로지스) 및 3.5 µl/L 2-머캅토에탄올(라이프 테크놀로지스)이 있는 "피부-T(Skin-T)" 배지(이스코브 변형 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM; 라이프 테크놀로지스) 2 ml을 함유하는 24웰 플레이트(코닝(Corning))의 각각의 웰에 위치시켰다. 배양 첫 7일 동안, 암포테리신(2.5 µg/ml; 라이프 테크놀로지스)을 배지에 첨가하였다. 배지를 주 3회 새로 공급하였다. 양분 공급을 위해, 배지의 상위 1 ml을 각 웰로부터 흡인하고, 새로운 매질로 교체하였다. 배양 초기부터 21일의 림프구 단리 시까지 각각의 배지 교체 시에 IL-2와 IL-15를 첨가하였다. 인간 재조합 IL-2(프로류킨; 노바티스 파마슈티컬 UK사(Novartis Pharmaceutical UK Ltd))를 100 IU/ml로 첨가하였다. 인간 재조합 IL-15(바이오레전드(Biolegend))를 20 ng/ml로 첨가하였다. 각 공여자에 대해 최대 96웰(네 개의 24웰 플레이트)의 배양을 셋업하였다.

[0169] 림프구를 단리하기 위해, 매트릭스를 0.01 mM HEPES가 포함된 10 ml 헵크스 균형 염 용액(HBSS; 라이프 테크놀로지스)을 함유하는 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다(최대 12 매트릭스/관). 매트릭스를 10 ml 피펫을 이용하여 세포 현탁액으로 행구고, 세포 현탁액을 70-µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통해 새로운 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다. 매트릭스의 '세척'을 두 차례 더 반복하였다. 배양 웰로부터의 배지 또한 흡인하여, 70-µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통해 새로운 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다. 웰을 0.01 mM HEPES/HBSS 1 ml로 두 차례 더 세척하고, 70 µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통과시켰다. 이어서, 세포를 원심분리(1600 rpm, 15분)에 의해 단리시켰다. 펠릿을 '피부-T' 배지에 재현탁시켰다. 이후 유세포 분석법 또는 기능적 연구를 위해 최종 세포 펠릿을 '피부-T' 배지에 재현탁시켰다. 세포 수가 필요할 때, 이 단계에서 (1) 트리판 블루(trypan blue) 염색(0.4%)(라이프 테크놀로지스) 및 혈구계산기, 또는 (2) CASY® 모델 TT 세포 계수기 및 분석기(로슈(Roche))에 의해, 백혈구를 계수하였다.

[0170] 림프구를 단리하기 위해, 매트릭스를 0.01 mM HEPES가 포함된 10 ml 헵크스 균형 염 용액(HBSS; 라이프 테크놀로지스)을 함유하는 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다(최대 12 매트릭스/관). 매트릭스를 10 ml 피펫을 이용하여 세포 현탁액으로 행구고, 이러한 세포 현탁액을 70-µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통해 새로운 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다. 매트릭스의 '세척'을 두 차례 더 반복하였다. 배양 웰로부터의 배지 또한 흡인하여, 70-µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통해 새로운 50 ml 원심분리관(코닝)으로 옮겼다. 웰을 0.01 mM HEPES/HBSS 1 ml로 두 차례 더 세척하고, 70 µm 필터(BD 바이오사이언스)를 통과시켰다. 이어서, 세포를 원심분리(1600 rpm, 15분)에 의해 단리시켰다. 펠릿을 '피부-T' 배지에 재현탁시켰다. 이후 유세포 분석법 또는 기능적 연구를 위해 최종 세포 펠릿을 '피부-T' 배지에 재현탁시켰다. 세포 수가 필요할 때, 이 단계에서 (1) 트리판 블루(trypan blue) 염색(0.4%)(라이프 테크놀로지스) 및 혈구계산기, 또는 (2) CASY® 모델 TT 세포 계수기 및 분석기(로슈(Roche))에 의해, 백혈구를 계수하였다.

[0171] 1차 소화관 샘플은 오염되기 쉬우므로, 획득한 생검을 잘게 썰어 그리드 위에 놓기 전에 우선 10% FCS, 페니실린 500 U/mL, 스트렙토마이신 500 µg/mL, 겐타마이신 100 µg/mL, 암포테리신 B 12.5 µg/mL 및 메트로니다졸 5 µg/mL을 함유하는 IMDM로 2회 세척하였다. 소화관 그리드 배양물을 소화관-T 배지(IMDM, 10% FCS, 페니실린 100 U/mL, 스트렙토마이신 100 µg/mL, 겐타마이신 20 µg/mL, 메트로니다졸 1 µg/mL)에서 성장시켰다. 성장 첫 1주 동안, 본 발명자들은 피부와 유사하게, 암포테리신 B 2.5 µg/mL도 이용하였다. 이러한 배지는 IL-2(100IU/ml)와 IL-15(20ng/ml)를 함유하였고, 주 3회 교체하였다. 소화관 구조물은 피부보다 더 느슨하였으므로, 1주일 후에 림프구를 수확할 수 있었다.

[0172] **조직  $\gamma\delta$  T 세포의 증식**

[0173] 인간 피부 유래  $\gamma\delta$  T 세포 증식을 위해, 그리드 배양 3 내지 4주 후에 수확한 혼합 림프구를 PBS에 세척하고, 스피다운시키고, 10% 열불활성화 소태아혈청(라이프 테크놀로지스), L-글루타민(292  $\mu\text{g/ml}$ ; 라이프 테크놀로지스), 페니실린(100 단위/ml; 라이프 테크놀로지스), 스트렙토마이신(100  $\mu\text{g/ml}$ ; 라이프 테크놀로지스), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설펜산(HEPES; 0.01 M; 라이프 테크놀로지스), 피루브산 나트륨(1 mM; 라이프 테크놀로지스), 최소 필수 배지(MEM) 비 필수 아미노산(1X; 라이프 테크놀로지스) 및 10  $\mu\text{l/L}$  2-머캅토에탄올(라이프 테크놀로지스)를 함유하는 로스웰 파크 메모리얼 연구소 1640 배지(RPMI-1640; 라이프 테크놀로지스)에  $1 \times 10^6$ 개/ml의 밀도로 재현탁시키고, IL-2(100 IU/ml) 단독 또는 IL-2 플러스 IL-15(20 ng/ml)를 보충하였다. 증식을 위해, 세포를 96웰 평판 플레이트(코닝)에  $2 \times 10^5$ 개/웰 또는 12웰 플레이트(코닝)에  $2 \times 10^6$ 개/웰로 씨딩하였다. 매일 현미경으로 세포를 모니터링하고, 신선한 배지를 공급하였으며, 주 3회 사이토카인을 첨가하였다. 완전한 합류(full confluence) 및 세포 응집체가 가시화되면, 세포를 각각 추가적인 웰과 플레이트에 1:1로 나누었다. 분석에 따라 7일, 14일, 또는 21일 후에 세포를 수확하고, 유세포 분석법을 이용하여 분석하거나 기능 분석에 이용하였다. 순수한  $\gamma\delta$  T 세포가 필요한 경우, 세포를 1 ml FACS 완충액(2% 열불활성화 소태아혈청 및 0.01M EDTA를 함유하는 PBS)에 재현탁시키고, 어두운 곳의 얼음 위에서 30분 동안  $\alpha\beta$  T 세포 수용체(바이오레전드, 클론 IP26, 1:50)를 염색시키고, DIVA를 실행하는 아리아(Aria) 분류기(BD 바이오사이언스)를 이용하여 모든 음성 세포를 분류하였다.

[0174] **섬유아세포와의 공동 배양**

[0175] 모든 그리드 배양 준비를 위해, 본 발명자들은 메스를 이용하여 곳곳을 스크래치한 두 개의 페트리 접시(100 x 25 mm, 코닝)를 준비하였다. 잘게 썬 피부 조각들을 스크래치 위에 위치시켰다. 공기 중에서 5 내지 10분 건조시킨 후, 피부 조각들은 통상적으로 접시에 들러붙었고, 10 ml의 피부-T 배지를 첨가하였다. 주 1회 배지를 교체하였고, 성장 3주 후 1차 섬유아세포를 아큐타제(ACCUTASE®, 라이프 테크놀로지스)로 처리한 후 수확하였다. 섬유아세포를  $1 \times 10^4$ 개로 48웰 플레이트에, 또는 트랜스웰 실험의 경우,  $2 \times 10^4$ 개로 24웰 플레이트의 바닥 챔버에 씨딩하였다. 2 내지 3일 후, 섬유아세포가 합류에 이르렀고, 48웰 플레이트의 경우  $2 \times 10^5$ 개 혼합 피부 림프구, 또는 24웰 플레이트의 경우, 바닥 웰뿐만 아니라 트랜스웰에  $3 \times 10^5$ 개 림프구를 첨가하여 RPMI 및 표시된 사이토카인을 이용하는 공동 배양 실험을 시작하였다.

[0176] **유세포 분석법**

[0177] 지정된 형광 색소에 결합된 다음의 항체를 이용하여 유세포 분석법을 수행하였다: Ki-67-BV421, CD3-BV510, V $\delta$ 1-PeVio770, TIM-3-PE, CD9-PE, CCR3-BV421, CD39-BV421. 또한, eFluor770NIR을 이용하여 모든 샘플을 생존 능력에 대해 염색하였다. 상용 항체는 바이오레전드 또는 밀테니(Miltenyi)로부터 구입하였다. (IR에 가까운) 생존 능력 염료는 이바이오사이언스(eBioscience)로부터 구입하였다. Ki-67 염색은 Foxp3 염색 완충액 세트(이바이오사이언스)를 이용하여 고정 및 투과시킨 세포 상에서 수행되었다. 각 실험이 완료되면, 세포 집단을 PBS 중 세척하고, 절반으로 나누었다. 생존 능력에 대해 세포를 eFluor770 NIR로 염색하고 세척한 다음, 염색 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 트루스테인(TrueStain, 바이오레전드)으로 염색하였다. 샘플 절반은 지정된 표면 마커에 대해 염색하였는데, 나머지 절반은 계통 마커(CD3, V $\delta$ 1)에 대해서만 염색하고, 동등한 아이소타입 대조군으로 사용된 표면 마커에 대해 염색하였다. 이것은 동일한 형광 색소에 접합된, 대응된 마우스 아이소타입 항체가 동일한 농도로 사용되었음을 의미한다. 아이소타입 대조군은 미지의 인간 항원과 결합하며, 따라서 비특이적인 결합 또는 위양성을 나타낸다. 이것은 진음성으로도 알려져 있다. 각각의 히스토그램(길은 색)을 상응하는 아이소타입 대조군(열린, 점선)과 비교하여 도시하였다. 데이터 요약은 비교된 지정된 마커에 대해 양성으로 염색되고, 따라서 아이소타입보다 더 높은 수준으로 염색된 세포의 백분율을 나타낸다. 유세포 분석법 데이터 분석은 플로우조(FlowJo, 버전 10.1)에서 수행하였다.

[0178] **RNA 시퀀싱**

[0179] (T 세포 수용체에 의해 개시된 증식 후의) 인간 피부로부터의 V $\delta$ 1 T 세포 및 인간 혈액  $\delta$ 1 T 세포를 분류하고 (FACS), 원심분리하고, 세포 펠릿을 RLT 완충액에 재현탁시켰다. RNA-마이크로-플러스 키트(퀴아젠, QIAGEN)를 이용하여 RNA를 제조하였다. KAPA Stranded RNA-seq Kit with RiboErase (HMR)(카파 바이오시스템스, KAPA BIOSYSTEMS)를 이용하여 RNA 라이브러리를 생성하였다. 신속한 검사(rapid run) 화학(리드(read) 길이: 100 bp)을 이용하여 HiSeq 2500(일루미나, illumina)으로 페어드 엔드(paired-end) 시퀀싱을 하였다. Bowtie2와 함

계 RSEM(v1.2.11)을 이용하여 101개 염기쌍 페어드 엔드 리드를 정렬하고, 정량화하였다. 리드를 인간 전사체에 정렬시켜 계수값을 log2로 변환하고 사분위수(quantile)를 정규화하였다.

[0180] **사이토카인 정량화**

[0181] 인간 피부로부터의 Vδ1 세포를 PMA 및 이오노마이신 또는 플레이트에 결합된 항-CD3 mAb(OKT3, 5 μg/ml)으로 24시간 동안 자극하였다. 그 후, 상층액을 취하여 이바이오사이언스의 프로카르타플렉스 인간 사이토카인 & 케모카인 패널 1A(ProcartaPlex Human Cytokine & Chemokine Panel 1A, 34 플렉스)를 이용하여 분석하였다. 루미넥스 플렉스맵3D(Luminex FlexMap3D, 루미넥스 사(Luminex Corp))를 이용하여 분석하였다. 데이터를 마이크로소프트 엑셀로 분석하였고, 3명 공여자 평균(2반복으로 실행)을 도시하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

[0182] **혈액 유래 γδ T 세포의 증식**

[0183] PBMC 내의 혈액 유래 γδ T 세포는 TCR 리간드(Vδ2의 경우, 예를 들어 IPP, HMBPP, 비스포스포네이트)(41, 42), 또는 TCR 수용체(mAb) 또는 TCR 관련 키나아제 CD3을 교차 결합시키는 항체 보충(43)으로 자극된 경우에만 증식될 수 있다. TCR 교차 결합의 동일한 효과는 PHA와 같은 렉틴을 이용하여 달성될 수도 있다. 이러한 TCR 자극제 첨가의 부재하에서, PBMC 중의 γδ T 세포는 며칠 동안은 생존하지만, 증식에는 실패하여 약간의 변화를 가지는 T 세포 서브셋의 초기 조성으로 남아 있다.

[0184] 건강한 지원자의 혈액을 이용하여 피콜(Ficoll) 위에 전혈을 쌓아올린 후, 400 g에서 20분 동안 원심분리하여 적혈구, 혈장 및 백색 림프구/단핵 세포를 분리하여 PBMC를 분리하였다. 백혈구를 스트리펫으로 조심스럽게 수확하고, 차가운 PBS로 4회 세척하였다. 세포를 1 x 10<sup>6</sup> 개/ml의 밀도로 10% 열불활성화 소태아혈청(라이프 테크놀로지스), L-글루타민(292 μg/ml; 라이프 테크놀로지스), 페니실린(100 단위/ml; 라이프 테크놀로지스), 스트렙토마이신(100 μg/ml; 라이프 테크놀로지스), N-2-하이드록시에틸피페라진-N-2-에탄 설포산(HEPES; 0.01 M; 라이프 테크놀로지스), 피루브산 나트륨(1 mM; 라이프 테크놀로지스), 최소 필수 배지(MEM) 비 필수 아미노산(1X; 라이프 테크놀로지스)을 함유하는 RPMI-1640 배지(라이프 테크놀로지스)에 재현탁시키고, IL-2(100 IU/ml)를 보충하였다. 세포 이동 90분 전에 pan γδ TCR 단일클론 항체(20 μg/ml, 클론 B1, 바이오레전드)로 코팅한 24웰 플레이트로 세포를 옮겼다. 세포를 14일 동안 성장시키고, 2 - 3일마다 배지를 교체하고, 새로운 사이토카인을 첨가하였다. 합류에 도달하면, 세포를 1:1로 나누었다. 이러한 조건 하에서, 14일 후, 본래의 γδ T 세포의 소집단은 일반적으로는 (CD69 및 CD25의 경우, 상향 조절에 의해 나타난 바와 같이) TCR을 통해 고도로 활성화되고, 크게 농축되어 주로 Vδ2 T 세포로 구성되나, Vδ1 T 세포(모든 γδ T 세포의 최대 30%)로도 구성된다. 이후에 Vδ1 T 세포는 기능, 표현형 또는 유전학 분석을 위해 FACS를 이용하여 분리될 수 있다.

[0185] **결과**

[0186] 인간 γδ T 세포는 피부에 풍부하고, 비 Vδ2 TCR을 발현하며, 인간 림프성 스트레스 감시 반응에 참여한다

[0187] 클라크 프로토콜(29)을 이용하여, 본 발명자들은 IL-2 및 IL-15가 보충된 인간의 잔여 피부 샘플을 이용하여, 3주의 과정에 걸쳐 조직에 상재하는 림프구의 증식을 가능하게 하여, 그리드 당 평균 240,000개 세포의 림프구 집단을 획득하였다. 이전의 보고(29)와 일관되게, 본 발명자들은 별개의 피부에 상재하는 림프구 서브셋을 확인할 수 있었으며, 세포의 대부분은 주로 조직에 상재하는 "TRM" 유형의 통상적인 αβ TCR을 발현하였다. 전체적으로, CD45+ 세포의 59.9%(±8.6)는 CD4+였고, 18.3%(±2.8)는 CD8+ αβ T 세포였고, NK 세포 비율은 8.7%(±3.6)였다. 추가적으로, 본 발명자들은 공여자에서 γδ T 세포의 큰 집단(CD45+ 세포의 평균 8.513%, ±6.564%)을 발견하였다(도 1a 및 도 3d). 기관형 배양 후의 이러한 림프구 서브셋 표현은 대략 100명의 공여자에서 재현성이 매우 높았고, 새롭게 소화시킨 피부 샘플과 비슷하였고, 조금 증가된 γδ 집단에서만 차이가 있었으나, 실제적 유용성이 있으며, 일반적인 조직 소화 프로토콜과 비교하여 훨씬 더 크고 순수한 림프구 집단을 제공하였다. TCR 델타 사슬을 기초로 한 인간 γδ T 세포의 조직 구획화에 관한 문헌에 따르면, 대부분의 인간 피부 γδ T 세포는 유세포 분석법으로 확인된 다양한 γ 사슬과 짝을 이룬 Vδ1 TCR 사슬을 발현하였다. 이것은 Vγ9에 연결된 Vδ2 사슬의 단일 특이적인 TCR 헤테로다이머를 보여주며, 인간 피부 샘플에는 사실상 부재했던 말초 혈액 γδ T 세포의 대부분과는 대조된다. 그러나 실질적인 서브셋은 Vδ1 TCR도 Vδ2 TCR 중 어느 것도 발현하지 않았고, "이중 음성" γδ T 세포를 불러 일으킨다는 점을 아는 것이 중요하다(도 1c).

[0188] 이러한 방식으로 성장시킨 피부에 상재하는 γδ T 세포는 CD45RA의 발현이 결여되고 다양한 수준의 공동 자극 분자 CCR7을 발현하는 비-말단성 분화 기억 표현형(non-terminally differentiated memory phenotype)을 보여 주었다. 통상적인 전신성 T 세포와의 유사점 때문에, 프로그램된 사멸 수용체 1(PD-1)의 발현과 함께 표면 단백질 CD69의 강력한 발현; 낮은 수준 내지 결여 수준의 IL-2 수용체 α(CD25); 및 공동 자극 분자 CD28의 결여는

이전에 활성화되었거나 만성적으로 활성화된 T 세포의 그림으로 나타내었다(도 1d). 조직 국제성과 일관되게, V $\delta$ 1 및 DN 세포는 CLA, CCR4, CCR8 및 인테그린  $\alpha$ E(CD103)와 같은 피부 및 조직 표적지향 마커(homing marker) 발현을 보여준다(도 7 참조). 이 조직 표적지향 마커 세트는 아마도 면역요법 환경에서 유익할 것으로 생각될 수 있다. 추가적으로, 피부에 상재하는  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 활성화 수용체 NKG2D에 대해 높은 수준의 발현을 보여준다(도 2a), 림프성 스트레스 감시 반응에서의 이들 세포의 가능한 역할을 암시한다. NKG2D 리간드, 예컨대, MICA, MICB 및 ULBP 각각은 DNA 손상, EGF 수용체 활성화 및 산화 스트레스에 대한 반응으로 세포에 의해 상향 조절되며, 따라서 NKG2D를 발현하는 T 세포가 스트레스를 받거나 형질전환된 세포를 확인하여 없앨 수 있게 하여 조직 항상성을 유지한다. 이 원리에 따라, 본 발명자들은 본 발명의 방법에 의해 증식시킨 피부에 상재하는  $\gamma$  $\delta$  T 세포가 NKG2D 수용체의 재조합 리간드(MICA, ULBP2)에 대한 노출 시 활성화되어, 리소좀 관련 막 단백질 CD107a의 상향 조절에 의해 측정된 바와 같이 탈과립을 보여줌을 확인하였다(도 2a). 다른 조직에 상재하는 T 세포(도 2c)와 전신성  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 이 반응이 결여되었으므로(도 10b), 이러한 선천성 특징은 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포에 유일하다.

[0189] 전체적으로, 활성화된 피부에 상재하는 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 PMA/이오노마이신에 의해, 또는 NKG2D 리간드, 예를 들어 재조합 MICA 단백질에 의해 활성화될 때(도 2a 및 도 2b) 전 염증성 TH1에 편향된 사이토카인 프로그램을 실행하여(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 GM-CSF에 대해 양성 염색), 이들 세포의 선천성 반응을 강력히 주장했다. 실제로, MICA에 대한 반응은 항체에 의해 NKG2D 수용체를 차단함으로써 거의 완전하게 저해되었다(도 2b 및 도 2c).

[0190]  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 건선과 같은 특정 질병 환경하에서, 그리고 일부 유형의 종양 내에서 IL-17을 분비하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 방법에 의해 증식된  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 심지어 대규모 활성화 시에도 낮은 수준의 IL-17을 생성하거나 IL-17을 전혀 생성하지 않는다(도 2b 및 도 8). 반대로, 조직에 상재하는 CD4를 발현하는  $\alpha$  $\beta$  T 세포는 TCR 활성화 시 IL-17을 생성하지 않았다(도 2b). 전반적으로, 숙주 보호와 관련된 TH1에 편향된 프로그램으로 제한된 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포와 비교하여  $\alpha$  $\beta$  T 세포는 PMA/이오노마이신에 대응하여 훨씬 더 다양한 사이토카인 레퍼토리를 보여주었다.

[0191] **조직으로부터의 분리는 인간 조직  $\gamma$  $\delta$  T 세포의 활성화 및 대량 증식을 유발한다**

[0192] 인간 조직,  $\gamma$  $\delta$  T 세포 및 그것들의 생물학을 더 연구하기 위하여, 본 발명자들은 혼합 피부 림프구를 세포 배양 웰로 옮기고 시간 경과에 따른 생존 능력을 유지하기 위하여 IL-2를 보충하였다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 기관형 배양물에 존재하는 기질세포 및 상피세포로부터의 분리에 의해 V $\delta$ 1 T 세포가 유례없이 임의의 다른 첨가된 자극 없이 활성화 및 증식의 징후를 보여준다는 점을 빠르게 발견하였다. 7일 미만 이내에, V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 유례없이, 그리고 엄청나게 핵 인자 Ki-67을 상향 조절하였고, IL-2 수용체  $\alpha$ (CD25)의 표면 발현을 증가시켰다(도 3b 및 도 4b). 놀랍게도, 3주의 기간에 걸쳐, 그리고 오로지 IL-2의 존재 하에서, 조직 유래 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 모든 다른 T 세포 서브셋보다 더 많아져 모든 피부 림프구의 최대 65%에 해당하게 되어 평균 127.18배 세포 수가 증가한 반면,  $\alpha$  $\beta$  T 세포는 절대적인 세포 수로 측정된 바에 따라 단지 5.21배(p=0.0124) 증식하였다(도 3a). 세포 주기 관련 핵 인자 KI-67의 MFI는 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포에서 14일 내에 2664.5( $\pm$ 1876.1)에서 8457.7( $\pm$ 4574.2)까지 증가한 반면,  $\alpha$  $\beta$  T 세포에서는 이러한 MFI가 동일한 시간 경과에 따라 592.8( $\pm$ 390.5)에서 284.7( $\pm$ 140.1)까지 감소하였다. 이러한 선택적인, 피부에 상재하는  $\gamma$  $\delta$  T 세포의 증식 현상은 추가적인 재조합 IL-15를 이용하여 더 뒷받침될 수 있었으며, 추가적인 재조합 IL-15는 림프구의 생존 능력 및 총 수를 증가시켰다.

[0193] **피부  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 접촉 의존적인 방식으로 섬유아세포에 의해 적극적으로 억제된다**

[0194] 이전 단락에 기술된 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포의 현저한 증식은 광범위한 섬유아세포 증식이 있었던 기관형 배양 시스템에서는 결코 일어나지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 자가 섬유아세포의 V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포와의 공동 배양이 T 세포 증식을 억제할 것인지를 직접적으로 시험하기 위해 자가 섬유아세포를 키웠다. 3주의 그리드 배양 후, 본 발명자들은 빈 웰 또는 이전에 확립된 섬유아세포의 전면 단일층을 함유한 웰에 혼합 피부 림프구를 씨딩하였고, 각각의 경우에 T 세포 성장을 지속시키기 위해 배지에 외인성 IL-2를 보충하였다. 추가적으로, 본 발명자들은 T 림프구가 동일한 웰 내에서 섬유아세포와 직접적으로 접촉하는 것을 방지하지만 섬유아세포에 의해 만들어진 임의의 가용성 인자에 의해 T 림프구가 영향 받을 수 있게 하는 트랜스웰을 사용하였다. 14일의 공동 배양에서, V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포는 섬유아세포가 없는 웰에서, 그리고 T 세포가 섬유아세포와 직접적으로 접촉하지 못하도록 한 웰에서 증식을 시작하였다. 이전과 같이,  $\alpha$  $\beta$  T 세포 증식은 모든 조건 하에서 낮았다. 두드러지게, T 세포가 섬유아세포와 직접적으로 접촉하도록 했을 때, V $\delta$ 1+ 및 DN  $\gamma$  $\delta$  T 세포

의 2주에 걸친 성장 속도는 섬유아세포 접촉이 없는 웰의 22.6(SEM 8.07)배에서 3.3(SEM 0.17)배까지 상당히 감소되었다(도 4a). 이러한 접촉 매개성 억제제는 단독으로 성장시킨 림프구와 비교하여 7일 동안 Vδ1에서 CD25, Ki-67 및 전사 인자 T-bet의 상향 조절의 부재에 의해 추가적으로 확인되었다(도 4b). 일부 형태의 조직 매개성 면역체계 제어는 조직 항상성 유지에 핵심적인 것으로 보이며, 이는 이것 없이는 지속적인 염증 가능성이 있기 때문이다. 기질 섬유아세포에 의한 Vδ1+ 및 DN γδ T 세포의 억제적 조절은 이러한 제어의 예인 것으로 보인다.

[0195] 요약하면, 피부에 상재하는 Vδ1+ 및 DN γδ T 세포의 표현형 및 그것들의 현저한 기능적 잠재력은 앞으로 특징이 분석될 접촉 의존적 매커니즘을 통해 이웃하는 피부 섬유아세포에 의해 정상적으로 억제되는 사전 활성화된 T 세포를 반영한다. 섬유아세포와의 접촉으로부터 T 세포를 해방시킴으로써 그 매커니즘을 불활성화시키면 선택적으로 Vδ1+ 및 DN γδ T 세포를 현저히 증식시킬 수 있지만, 피부의 다른 T 세포는 영향 받지 않는다.

[0196] **접촉 매개성 억제의 해제는 피부 Vδ1 T 세포에 의한 세포독성 TH1에 편향된 사이토카인 반응을 유도한다**

[0197] 혼합 피부 유래 림프구를 14일 동안 증식시키고, 형광 관련 세포 분류법을 이용하여 γδ T 세포로부터 αβ T 세포를 제거하여 최대 90%의 순도로 γδ T 세포를 획득할 수 있었다. 이렇게 고도로 농축된 세포를 10% FCS를 함유하는 RPMI 배지에 150,000개 세포/웰의 농도로 세포 배양 웰에 넣은 후, 24시간 후에 상층액을 수집하여 루미넥스 기반의 어레이를 이용하여 광범위한 이펙터 사이토카인에 대해 평가하였다. 전혀 예상치 못하게도, (오로지 γδ T 세포의 섬유아세포로부터의 분리에 의해서 유발된) γδ T 세포의 증식은 자발적으로 IFN-γ (12,383.46 ± 16,618.90 pg/ml), GM-CSF(4,316.73 ± 4,534.96 pg/ml)와 같은 다량의 TH1 관련 사이토카인 및 전 염증성 케모카인인 CCL4(14,877.34 ± 10,935.64 pg/ml) 및 CCL3(1,303.07 ± 757.23 pg/ml)을 생성하였다(도 5a).

[0198] 나아가, 이러한 세포는 증식 중에, 그리고 새로이 단리된 피부 유래의 TCR 활성화된 γδ T 세포와는 대조적으로, 아토피 반응과 관련된 다량의 자발적 IL-13을 생성하였다. 다른 사이토카인은 훨씬 낮은 수준으로 생성되었거나 전혀 생성되지 않았다. 예컨대, IL-17A(도 8). 이러한 세포의 높은 효과인자 잠재력은 재조합 MICA(NKG2D 리간드), 항 CD3 교차 결합, 또는 PMA/이오노마이신으로의 자극 후에 더 증가될 수 있다. 악성 종양 표적 세포에 대한 증식된 γδ T 세포의 세포독성 잠재력을 평가하기 위해, 본 발명자들은 24시간 공동 배양 실험에서 확립된 형질변환 세포주를 사용하였다. Vδ1+ 및 DN γδ T 세포는 통상적인 조직 αβ T 세포보다 훨씬 더 우수하게, 용량 의존적인 방식으로, HeLa 세포(자궁경부) 및 Caco2(결장)에 대해 매우 높은 세포독성 활성을 보였다(도 5b). 나아가, γδ 세포 매개성 세포독성은 가용성 단일클론 항체를 이용하여 NKG2D 수용체를 차단함으로써 강력하게 억제될 수 있으며, 이는 수용체가 탈억제된 인간 피부 유래 γδ T 세포에 의한 종양 감시에 적어도 부분적으로 관여함을 나타낸다. 나아가, 본 발명자들은 다른 표적: HCT1954, MDAMB231(둘 다 유방 암종) 및 HCT116(결장)을 이용하여 이러한 세포의 세포독성 잠재력을 확인하였다(도 9).

[0199] **인간 소화관의 조직에 상재하는 γδ T 세포**

[0200] 본 발명자들은 또한 인간 결장으로부터 유래된 그리드 배양물에서 Vδ1 T 세포 수용체를 발현하는, 비-조혈조직에 상재하는 γδ T 세포 집단을 확인하였다(도 6). 세 명의 공여자에서, 본 발명자들은 4 내지 5주에 걸쳐, 피부 세포에 대해 이용했던 것과 동일한 방법을 이용하여 이들 세포를 증식시킬 수 있었다. 증식시키는 동안, 결장 유래 Vδ1+ 및 DN γδ T 세포는 섬유아세포가 풍부한 기관형 세포 배양물로부터의 단리 후에 유사한 Ki-67 상향 조절 패턴을 보여주었다. 마찬가지로, 결장에 상재하는 Vδ1+ 및 DN γδ T 세포는 NKG2D 수용체에 대한 리간드 제공에 의해 강하게 자극되었다. 이전에, 혈액 유래 γδ T 세포는 CD16 발현을 통해 항체 의존적 세포 매개성 세포독성을 만들어내기에 적합한 능력을 갖추고 있어, 리투시맵과 조합하였을 때 CD20 양성 B 계통 림프종에 대해 표적화된 세포독성 증진을 나타냈다고 보고된 바 있다. 마찬가지로, 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL) 및 HER2 양성 유방암 세포는 단일클론 항체로 표적화될 때 더욱 효과적으로 살해되었다(31). 항체 흡소닌화된 표적 세포를 표적화하는 피부 유래 Vδ1 T 세포의 잠재력을 평가하기 위해, 본 발명자들은 세 개의 IgG1 관련 Fc 수용체 CD16, CD32 및 CD64의 발현 수준을 조사하였다. 피부 유래 Vδ1 T 세포는 적은 수준의 FC 수용체 CD16을 발현하지만, 고친화성 IgG 수용체 CD64에 대해서는 우수한 발현 수준을 보여준다(도 11). 따라서, 조직 유래 Vδ1 T 세포는 항체에 의해 악성 종양 및 전이 쪽으로 안내될 것이므로 CD20 또는 Her2 치료법과 같은 단일클론 항체요법에 대한 보조제로서 사용되며, 흡소닌화된 종양 세포를 인식하고, ADCC를 통해 표적을 살해하기에 적합한 능력을 갖추고 있을 수 있다.

[0201] **참고문헌**

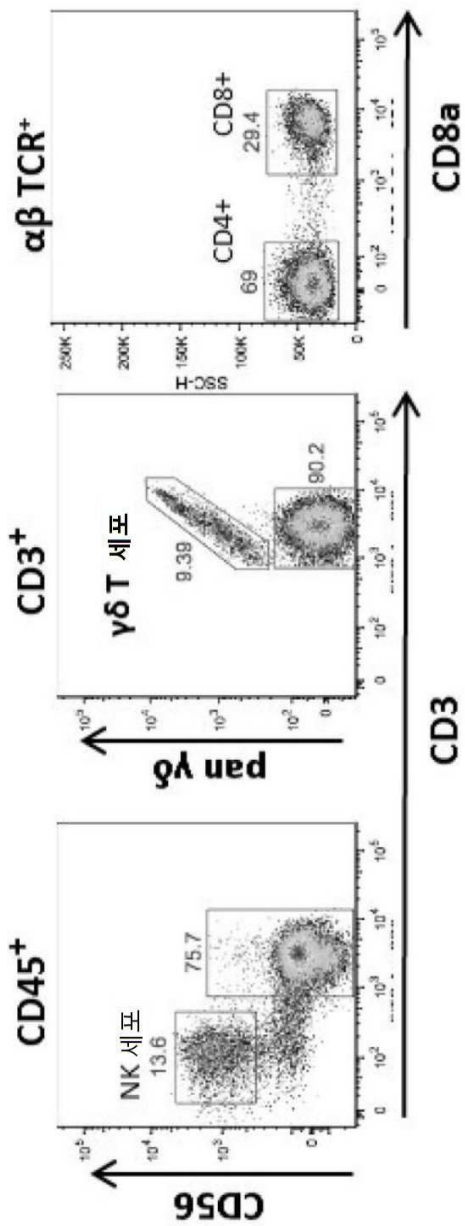
- [0202] 1. Sensi M et al. *Cancer Research*. 2005;65(2):632~40.
- [0203] 2. Gaudin C et al. *Journal of Immunology*. 1999;162(3):1730~8.
- [0204] 3. Echchakir H et al. *Cancer Research*. 2001;61(10):4078~83.
- [0205] 4. Karanikas V et al. *Cancer Research*. 2001;61(9):3718~24.
- [0206] 5. Pieper R et al. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189(5):757~66.
- [0207] 6. Wang RF et al. *Science*. 1999;284(5418):1351~4.
- [0208] 7. Topalian SL et al. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2443~54.
- [0209] 8. Brahmer JR et al. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2455~65.
- [0210] 9. Hodi FS et al. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363(8):711~23.
- [0211] 10. Robert C et al. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2517~26.
- [0212] 11. Pardoll DM. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252~64.
- [0213] 12. Fecher LA et al. *The Oncologist*. 2013;18(6):733~43.
- [0214] 13. Ribas A. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2517~9.
- [0215] 14. Vantourout P, Hayday A. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):88~100.
- [0216] 15. Hintz M et al. *FEBS Letters*. 2001;509(2):317~22.
- [0217] 16. Freed-Pastor WA et al. *Cell*. 2012;148(1-2):244~58.
- [0218] 17. Vantourout P et al. *Science Translational Medicine*. 2014;6(231):231ra49.
- [0219] 18. Wrobel P et al. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007;66(2-3):320~8.
- [0220] 19. Todaro M et al. *Journal of Immunology*. 2009;182(11):7287~96.
- [0221] 20. Gertner-Dardenne J et al. *Journal of Immunology*. 2012;188(9):4701~8.
- [0222] 21. Mao C et al. *Journal of Immunol Research*. 2014;2014:593562.
- [0223] 22. Godder KT et al. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;39(12):751~7.
- [0224] 23. Fournie JJ et al. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013;10(1):35~41.
- [0225] 24. Curran KJ et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33(15):1703~6.
- [0226] 25. Hillerdal V et al. *BioDrugs*. 2015;29(2):75~89.
- [0227] 26. Couzi L et al. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010; 21(1):181~8.
- [0228] 27. Zheng J et al. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013; 10(1):50~57.
- [0229] 28. Deniger DC et al. *Molecular Therapy*. 2013; 21(3):638~47.
- [0230] 29. Clark RA et al. 2006. *Journal of Investigational Dermatology*. 126(5):1059~70.
- [0231] 30. Carrasco A. et al 2013. *Journal of Immunological Methods*. 389(1-2):29~37.
- [0232] 31. Tokuyama H. et al. *International Journal of Cancer*. 2008; 122(11):2526~34.
- [0233] 32. Willcox CR et al. *Nature Immunology*. 2012; 13(9):872~9.
- [0234] 33. Gillis and Smith. *Nature*. 1977; 268(5616):154~6.
- [0235] 34. Fujita et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1984; 80(24):7437~41.
- [0236] 35. Grabstein et al. *Science*. 1994; 264(5161):965~8.
- [0237] 36. Helgason C et al. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. U.S. (15 Oct 2004) ISBN:

1588295451.

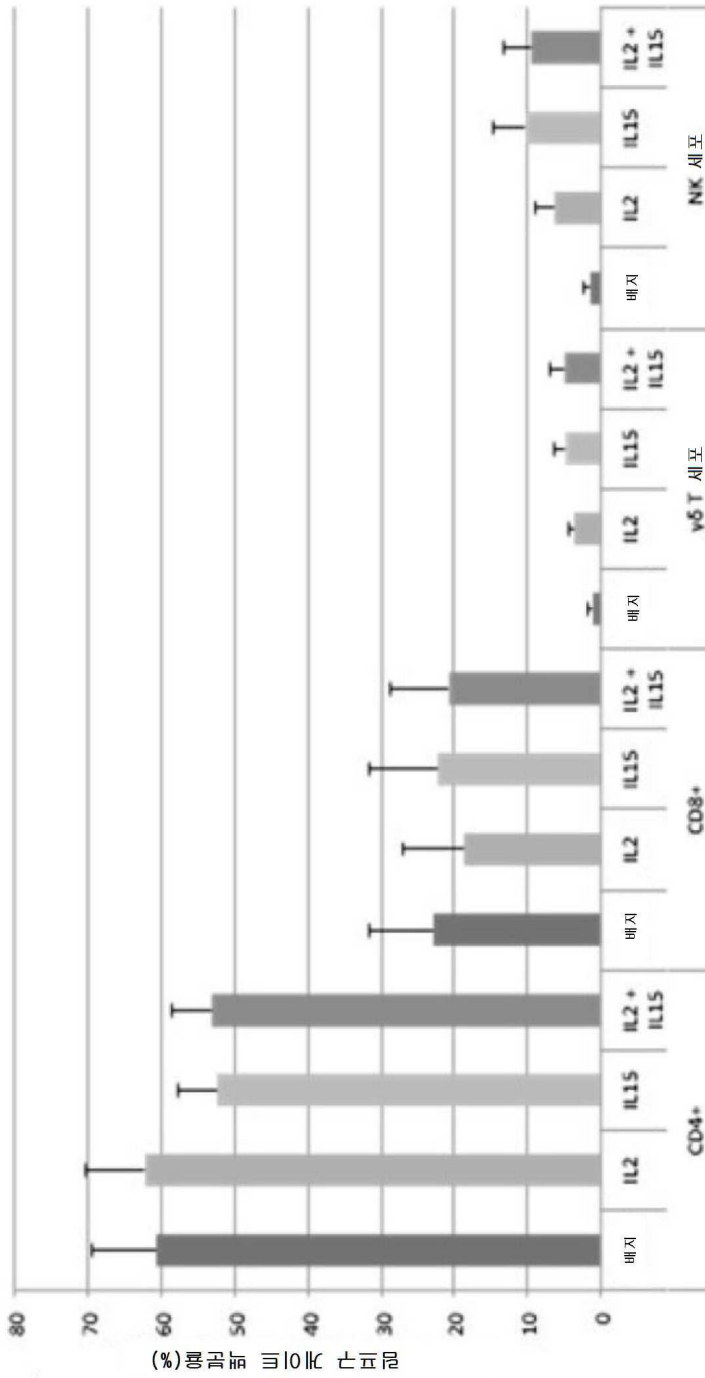
- [0238] 37. Picot J. *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press Inc., U.S. (9 Dec 2004) ISBN: 1588292223.
- [0239] 38. Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. John Wiley & Sons Inc., (2 Aug 2005) ISBN: 0471453293,
- [0240] 39. Ho WY et al. *Journal of Immunological Methods*. 2006; 310:40~52.
- [0241] 40. Fauci AS et al, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2001; 15th Ed., McGraw-Hill, New York.
- [0242] 41. Petrini I. et al. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009; 39(9):813~8.
- [0243] 42. Gruenbacher et al. *Blood*. 2009; 114(20):4422~31.
- [0244] 43. Almeida et al Clin Cancer Res (2016) 10.1158/1078-0432.CCR-16-0597
- [0245] 44. Deniger D. et al. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(636):1~10.

도면

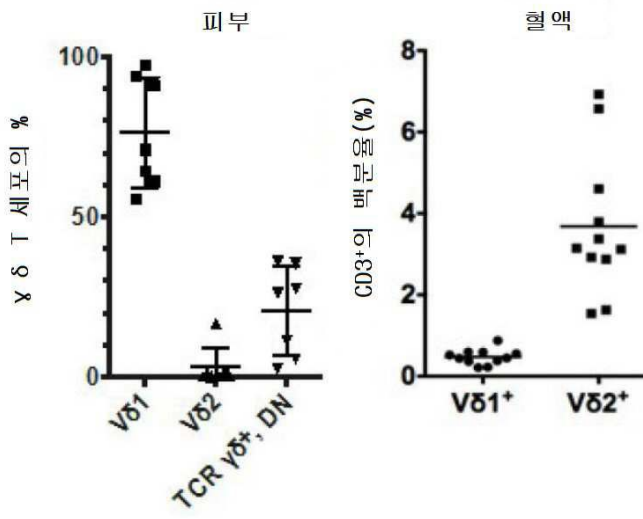
도면1a



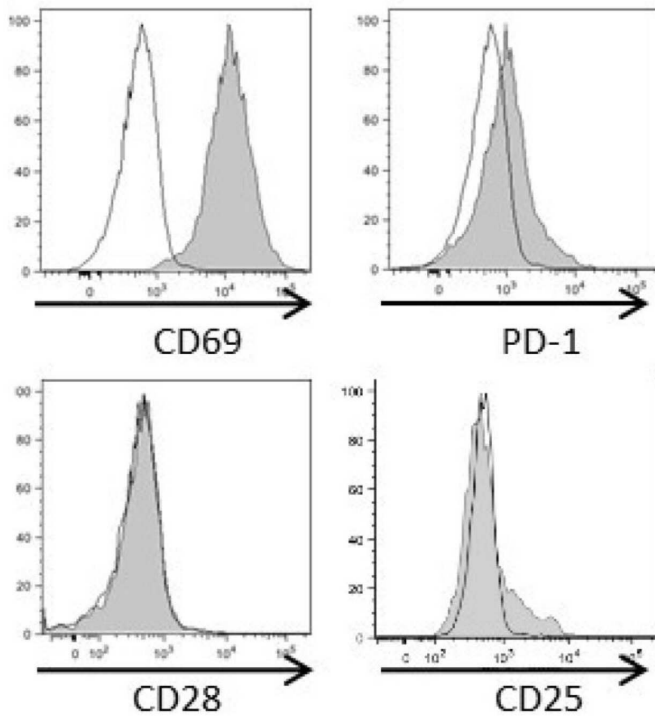
도면1b



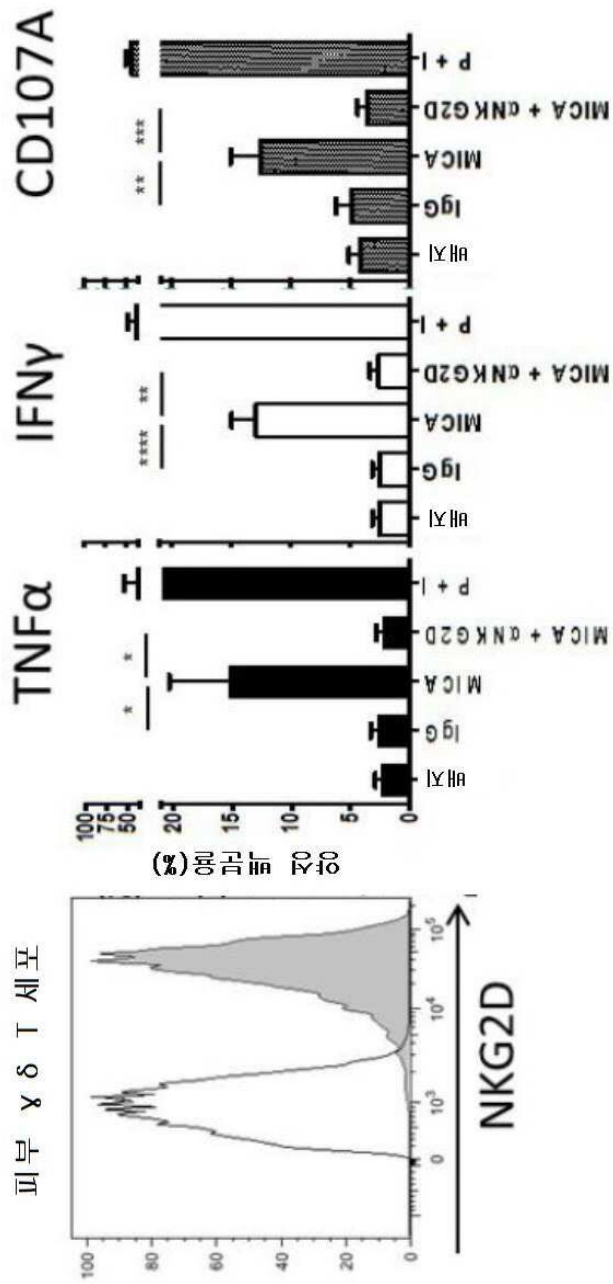
도면1c



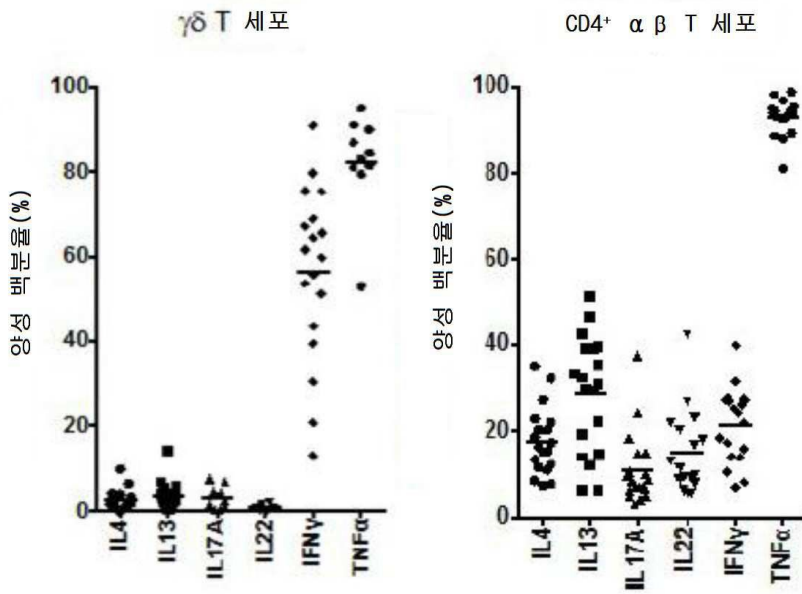
도면1d



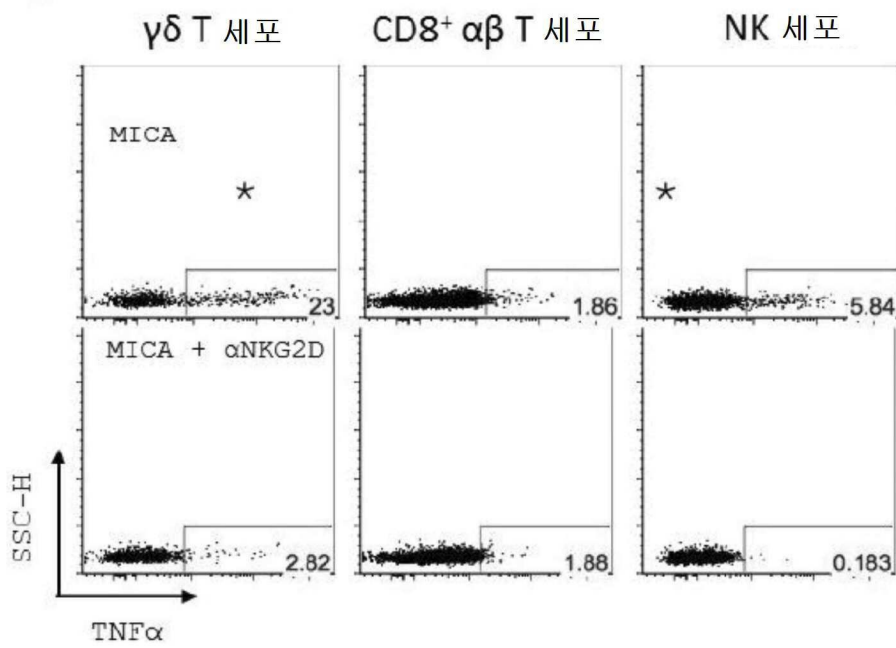
도면2a



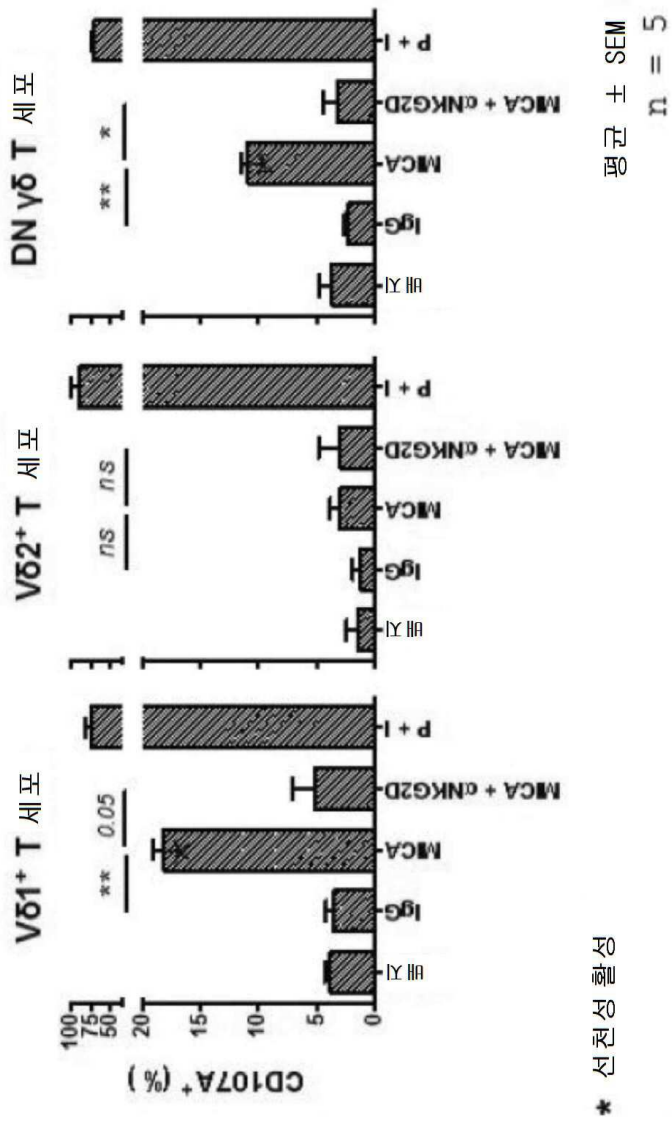
도면2b



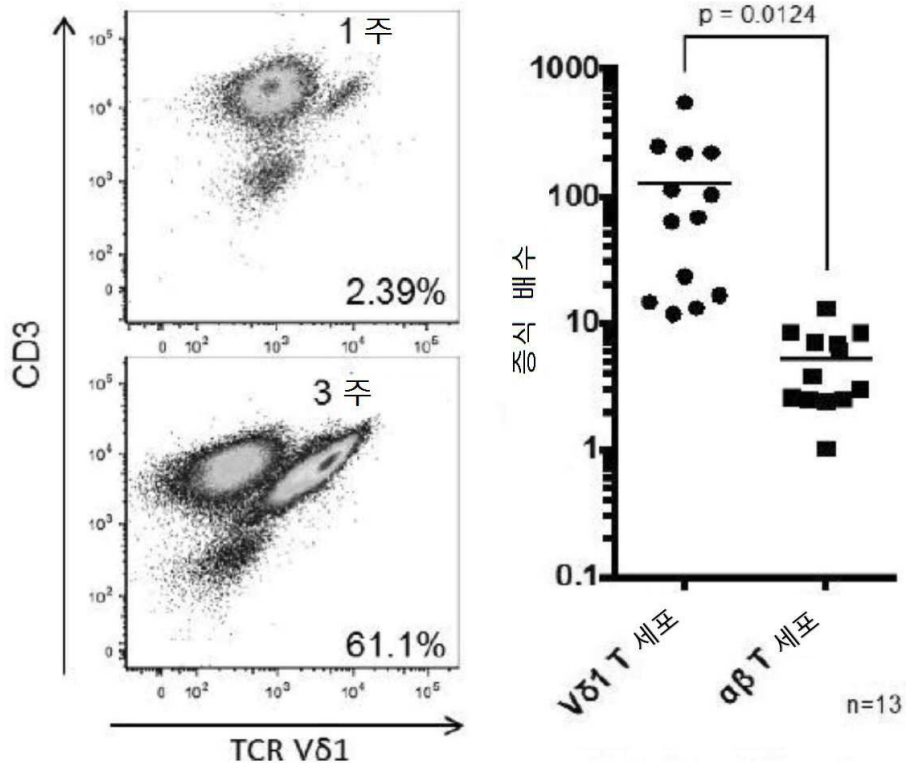
도면2c



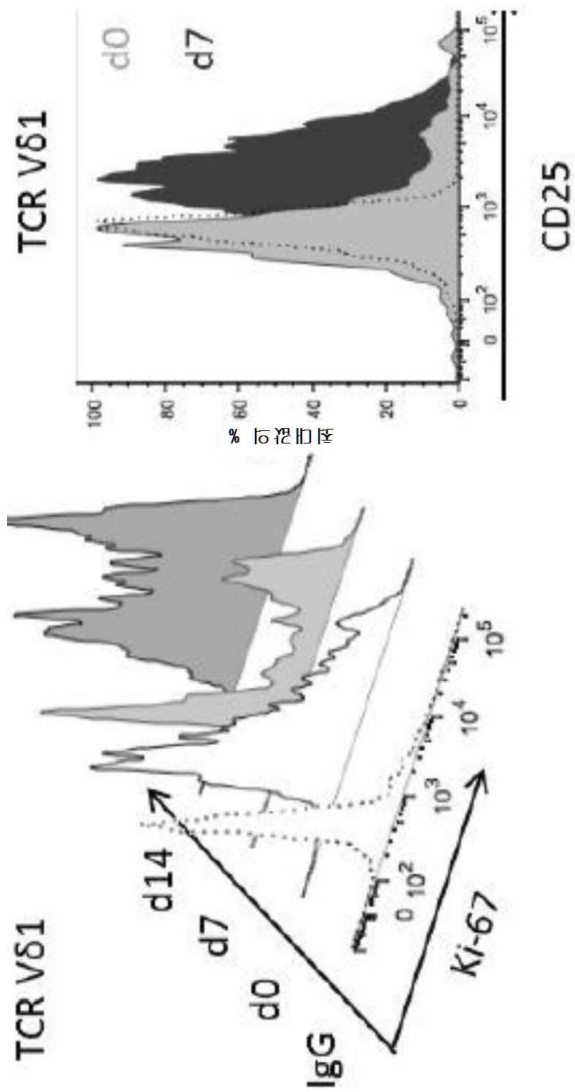
도면2d



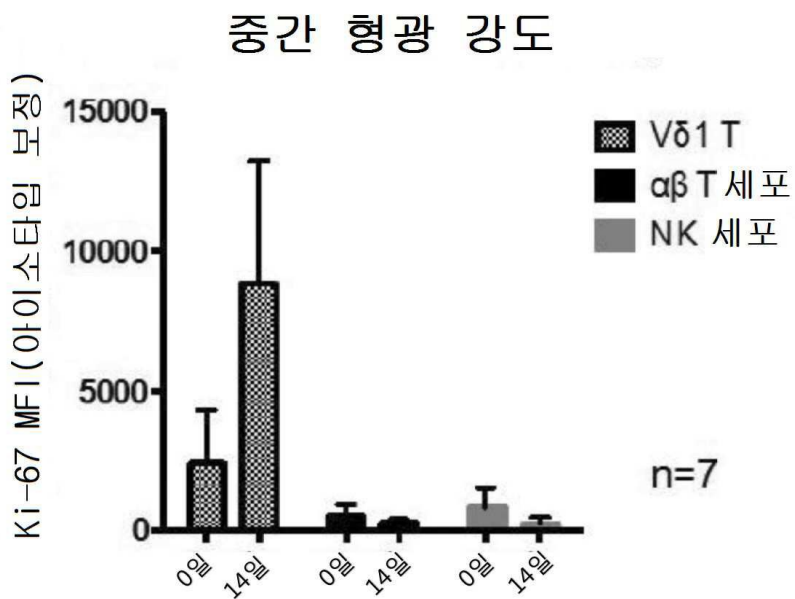
도면3a



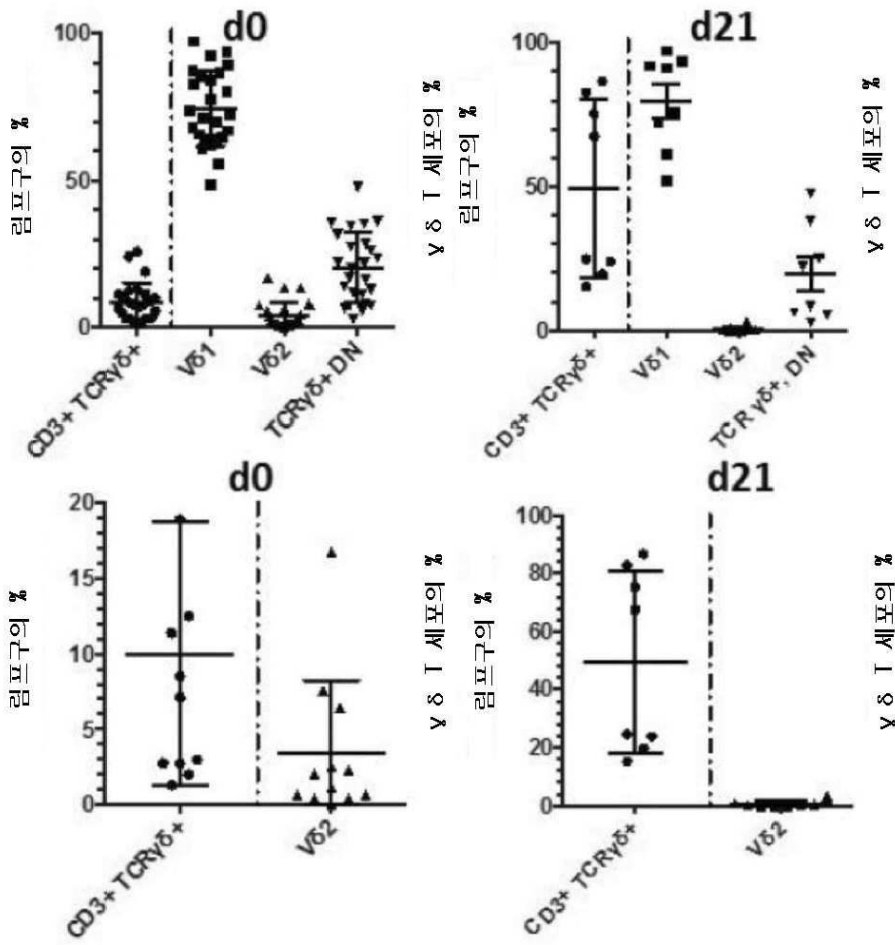
도면3b



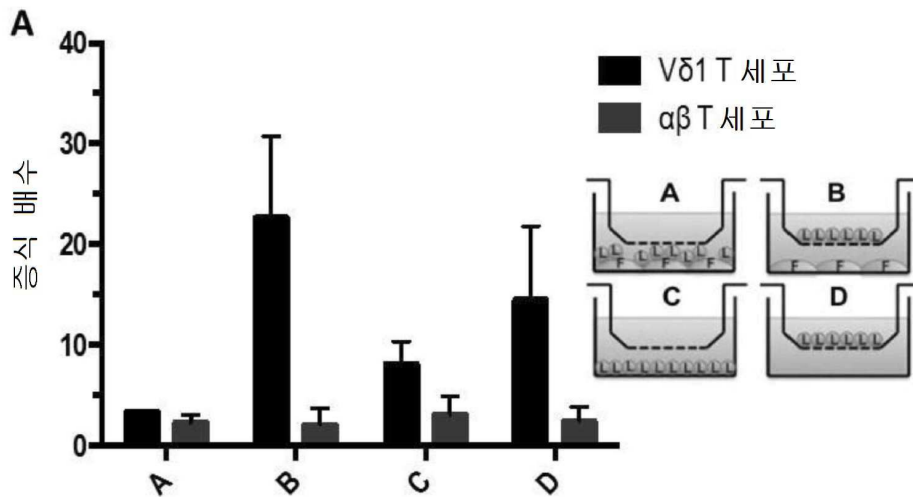
도면3c



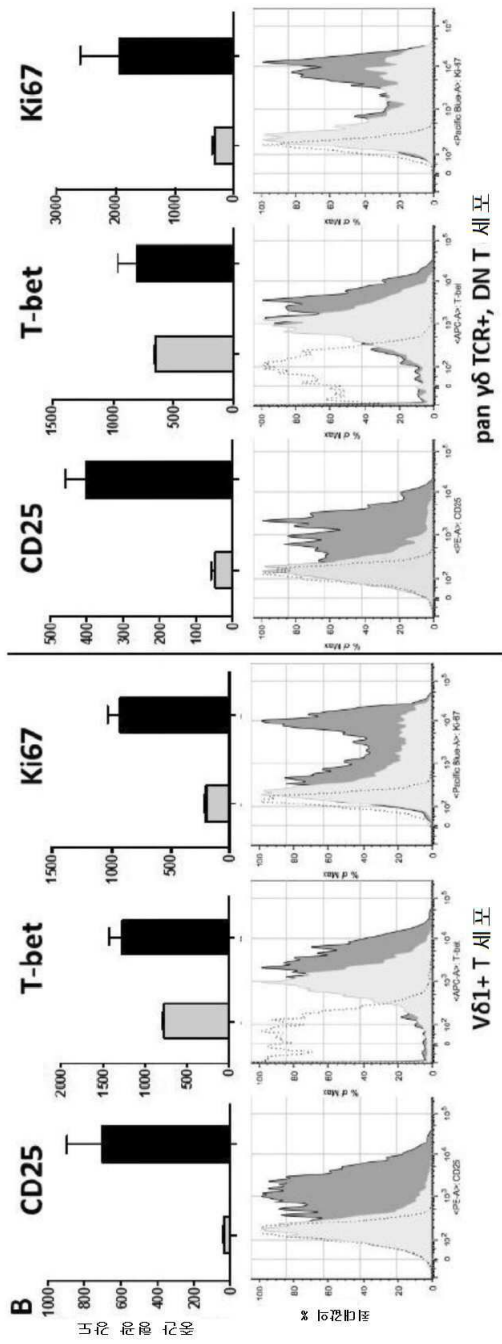
도면3d



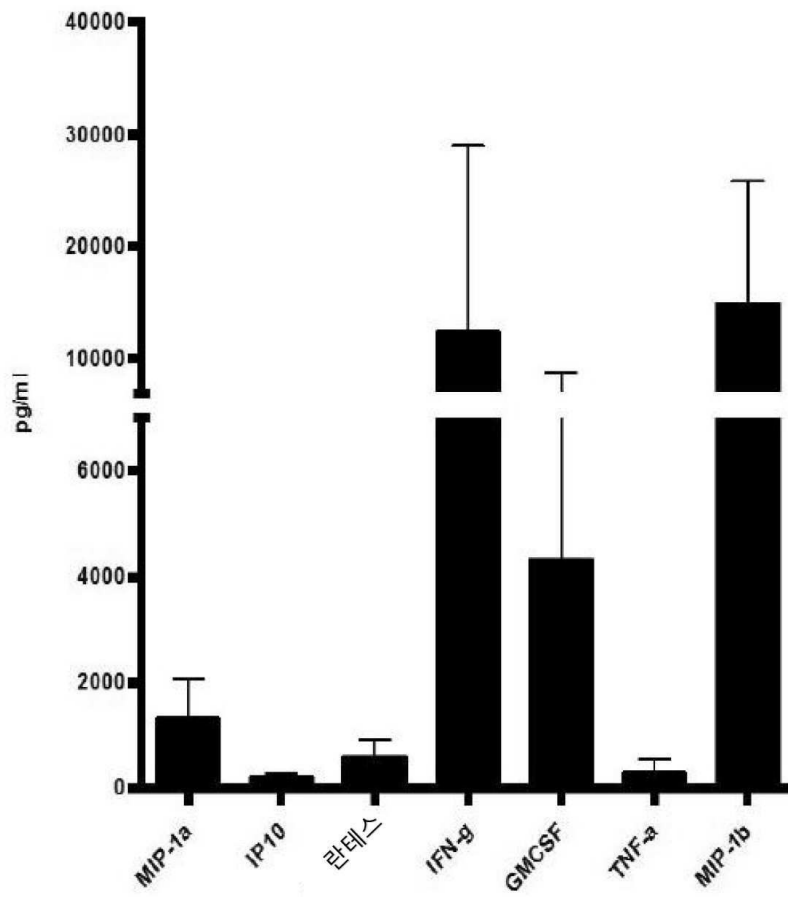
도면4a



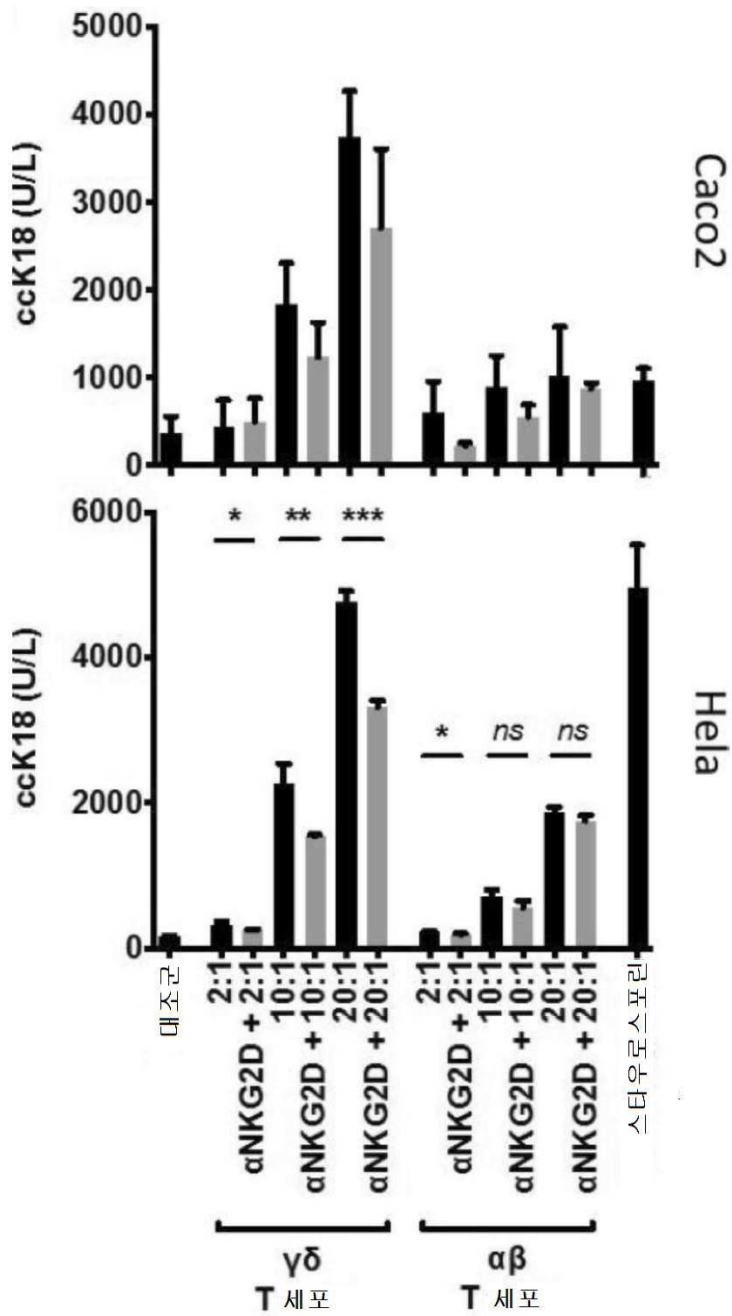
도면4b



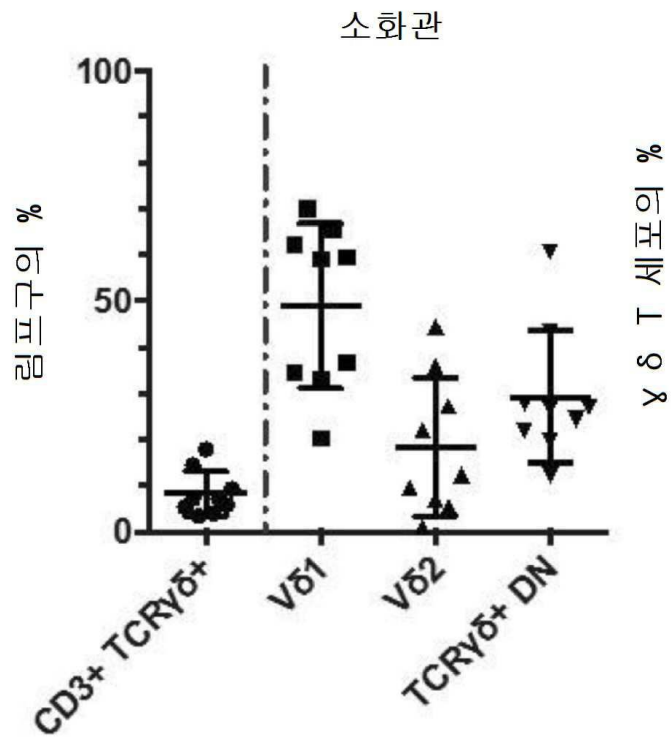
도면5a



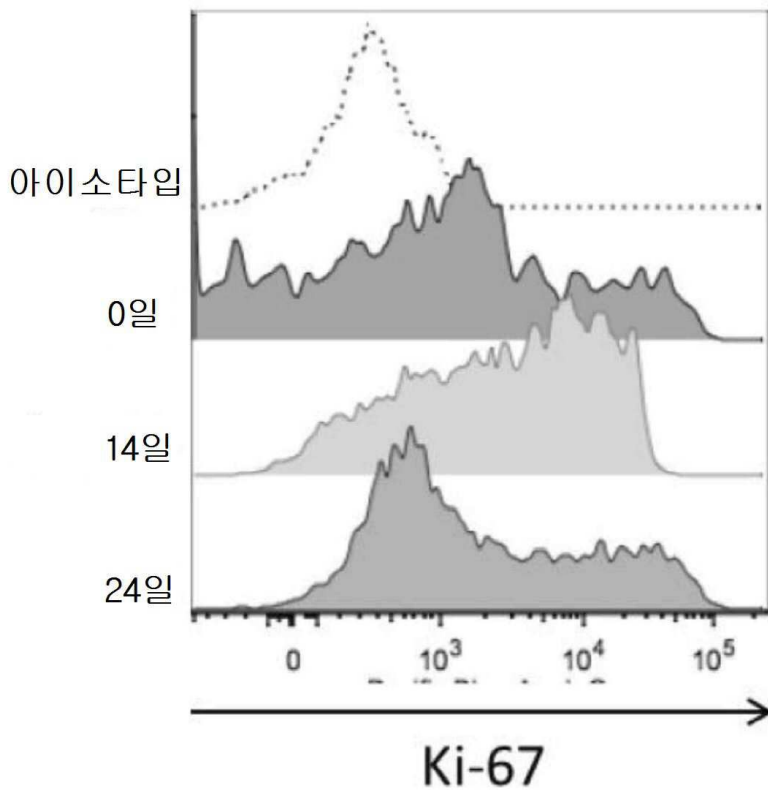
도면5b



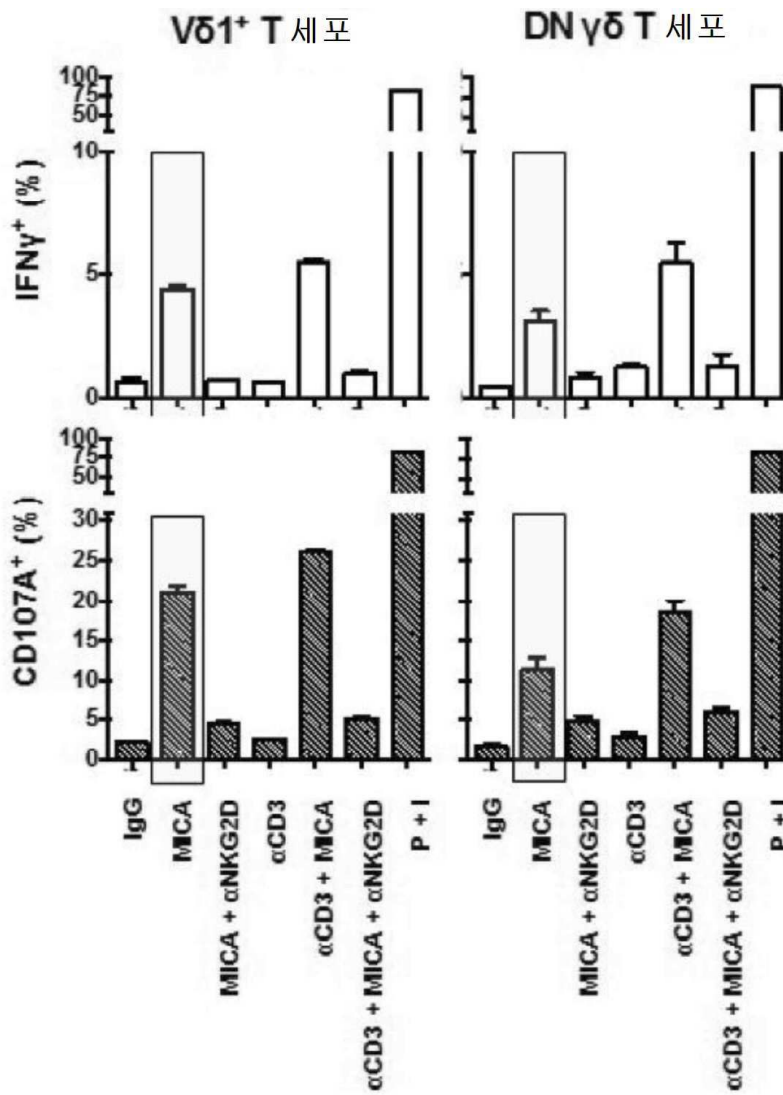
도면6a



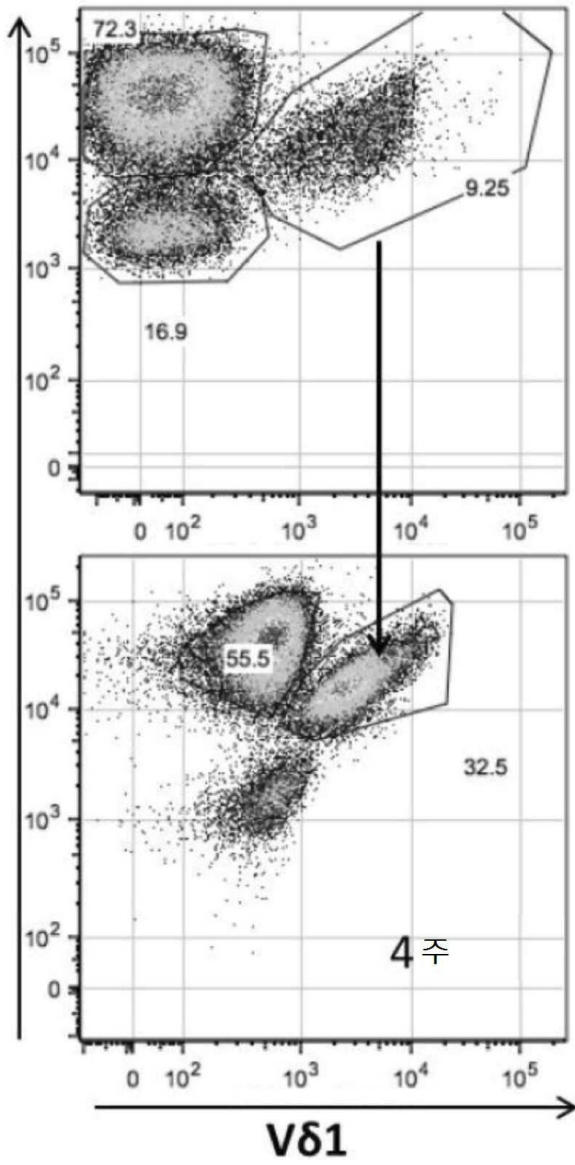
도면6b



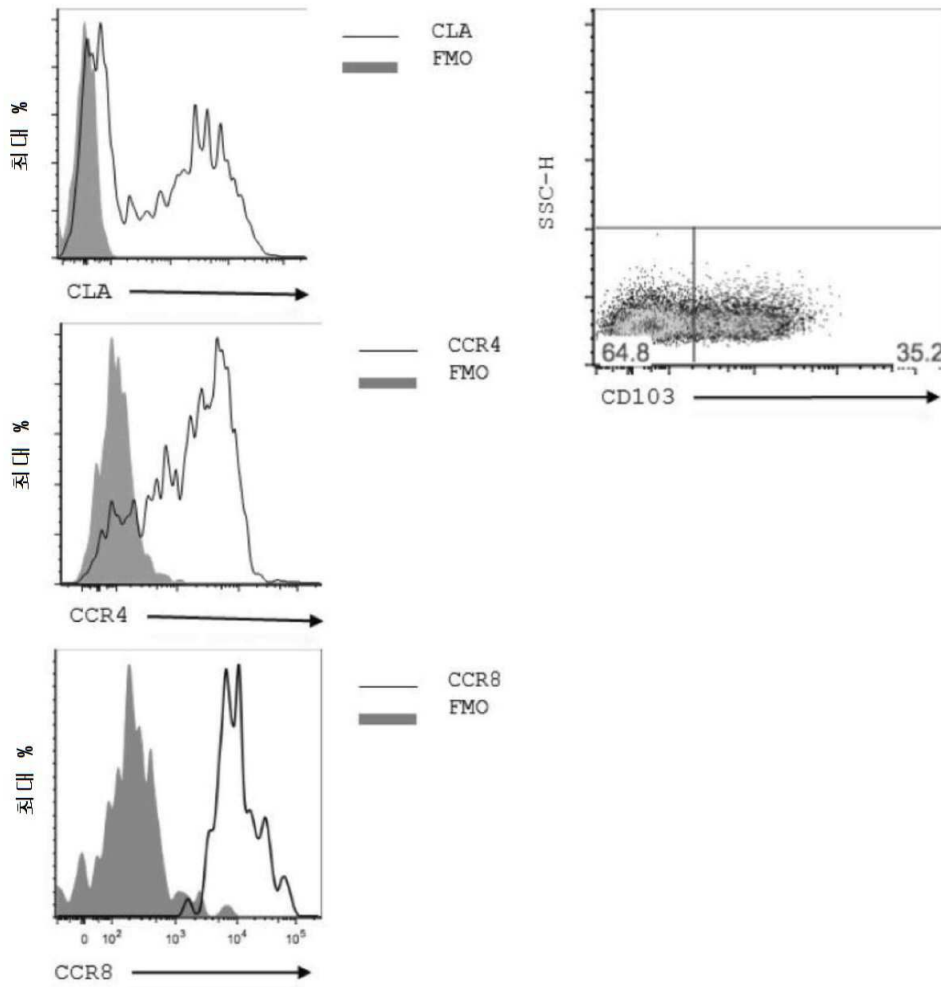
도면6c



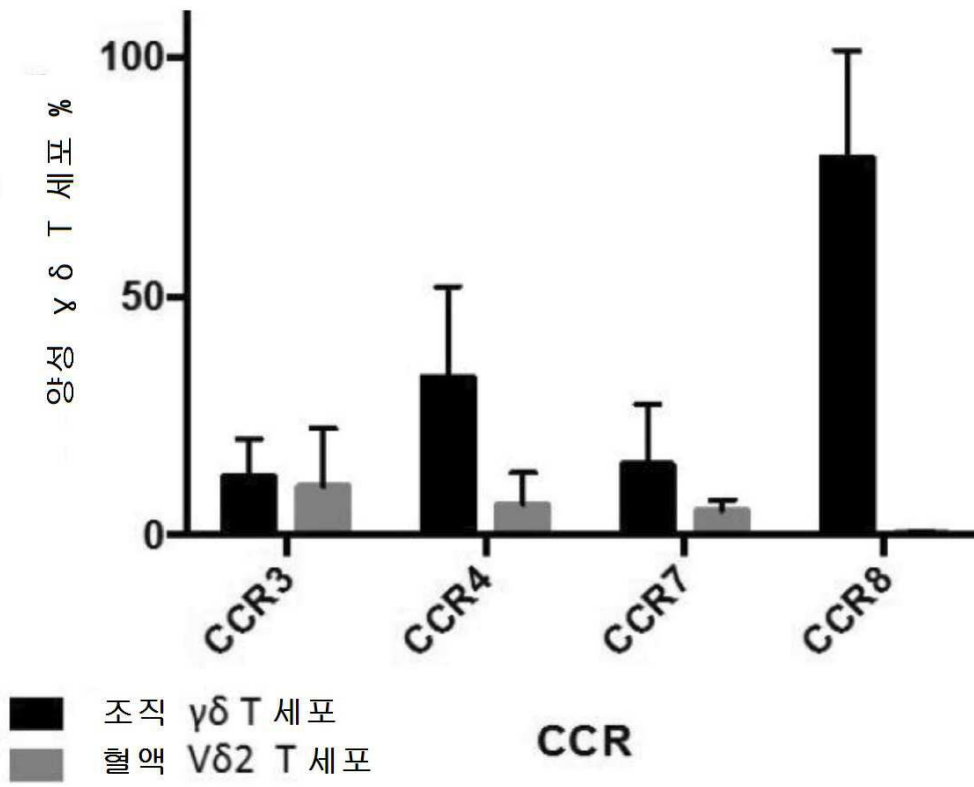
도면6d



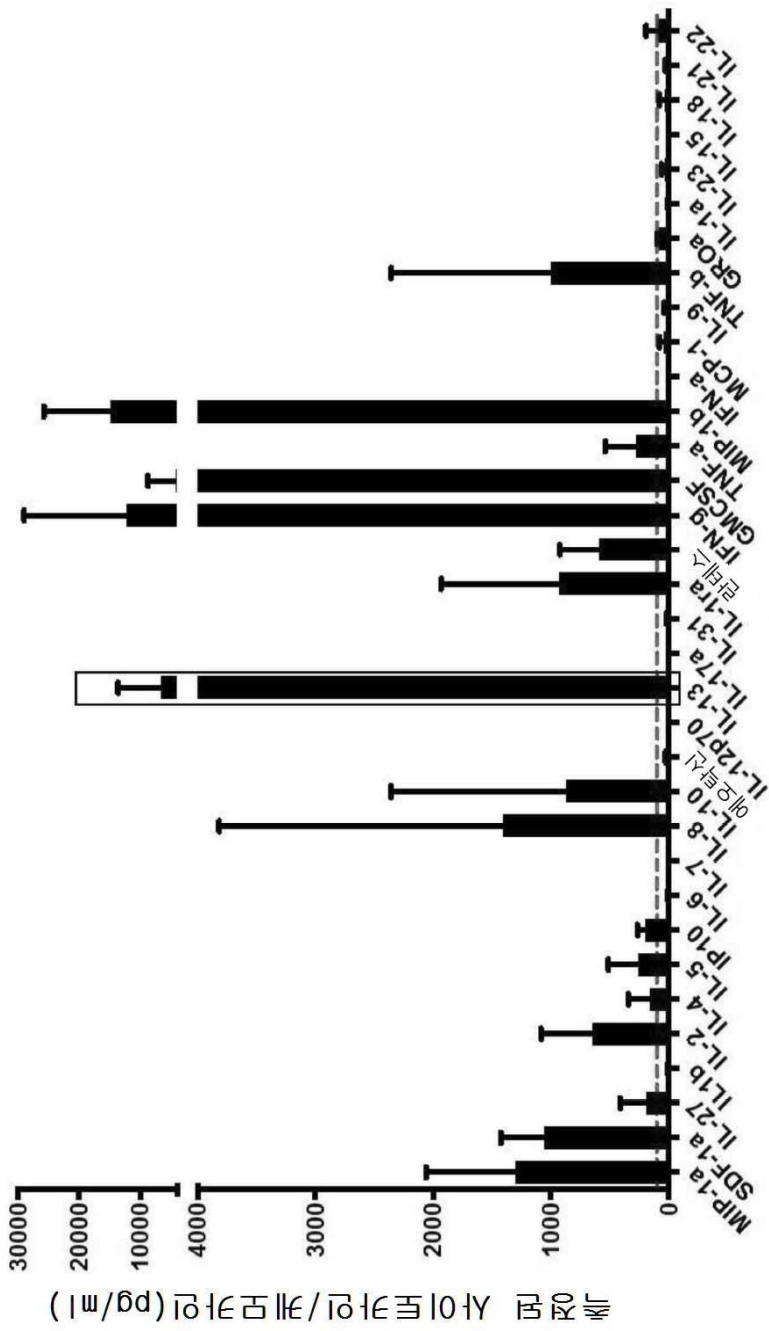
도면7a



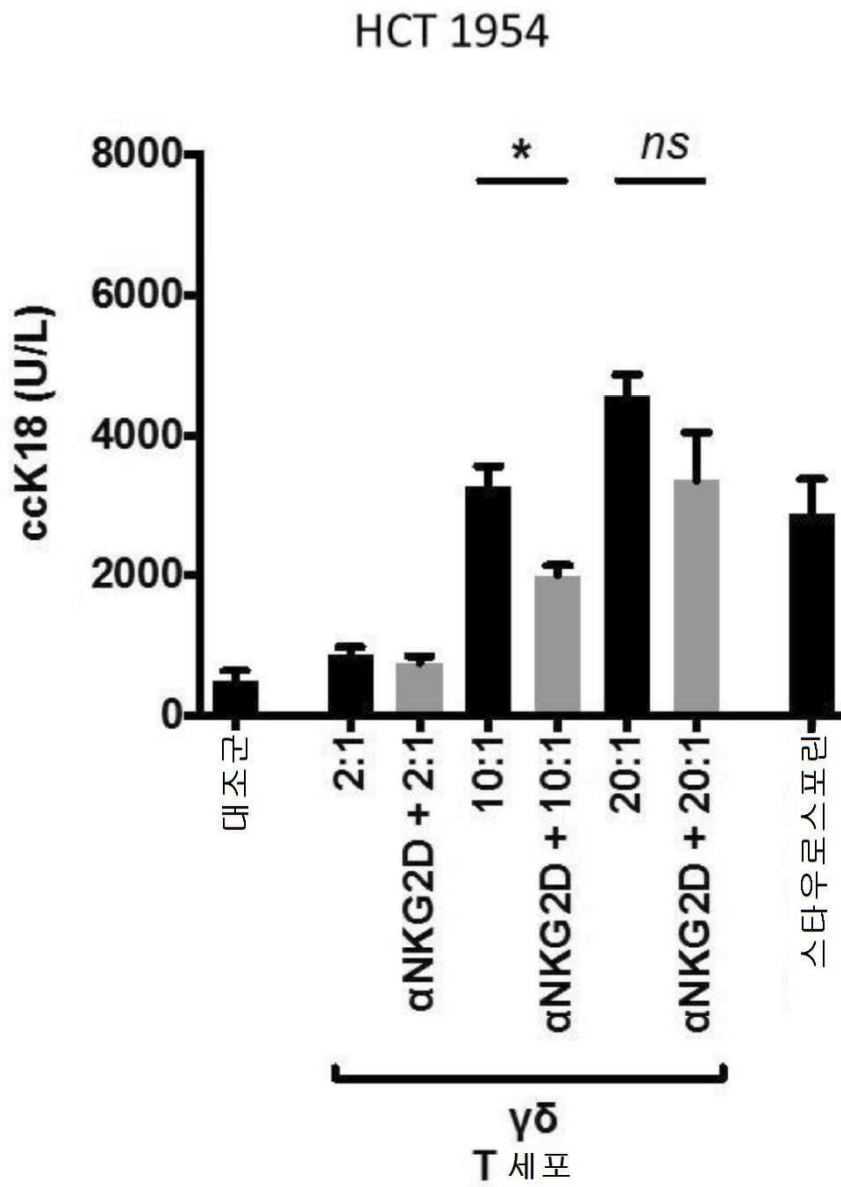
도면7b



도면8

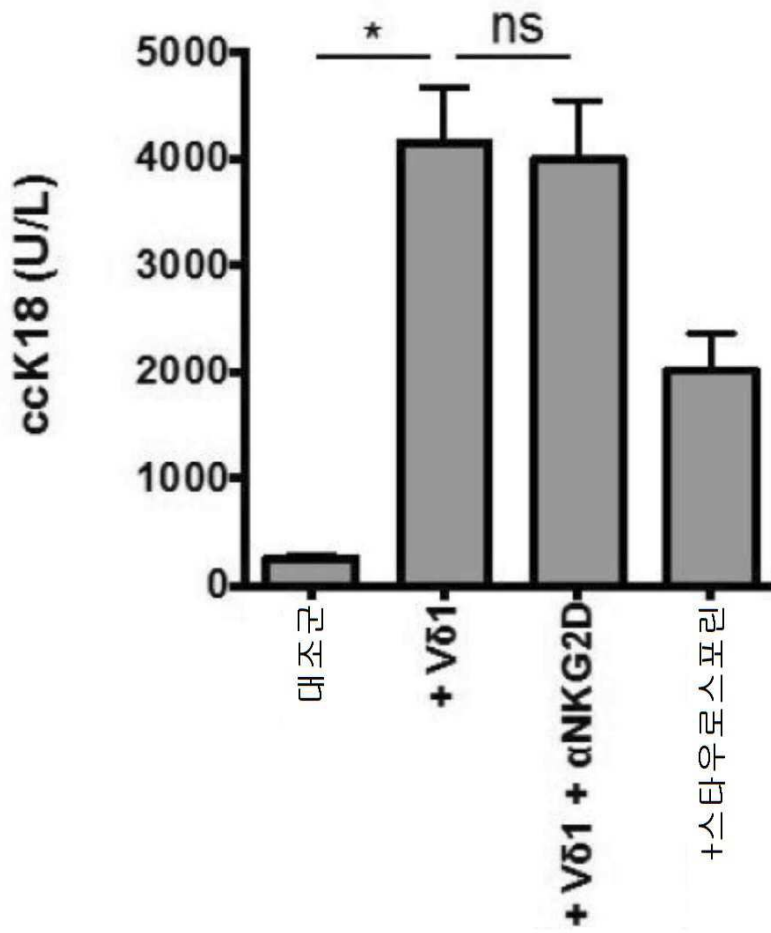


도면9a

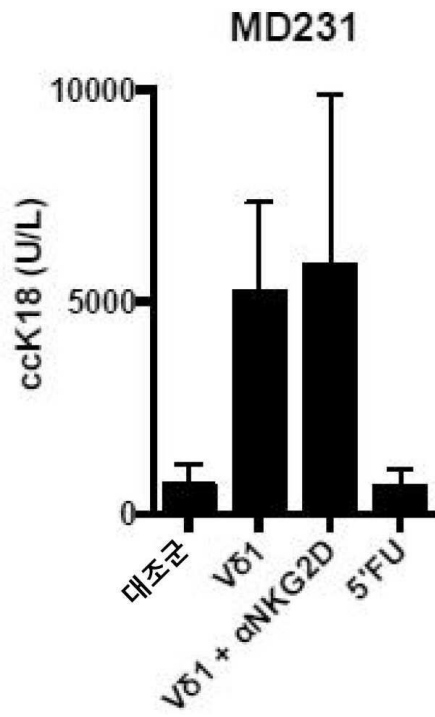


도면9b

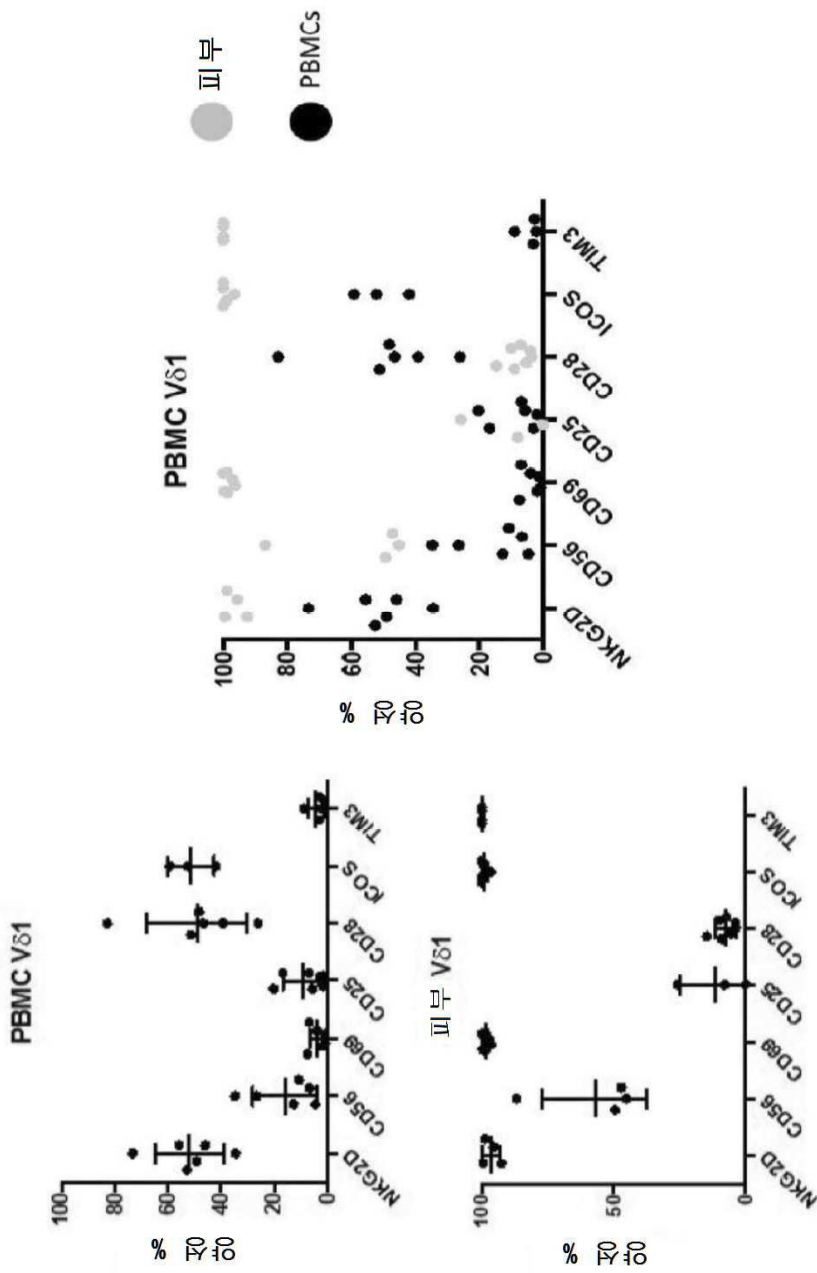
### HCT116 아폽토시스



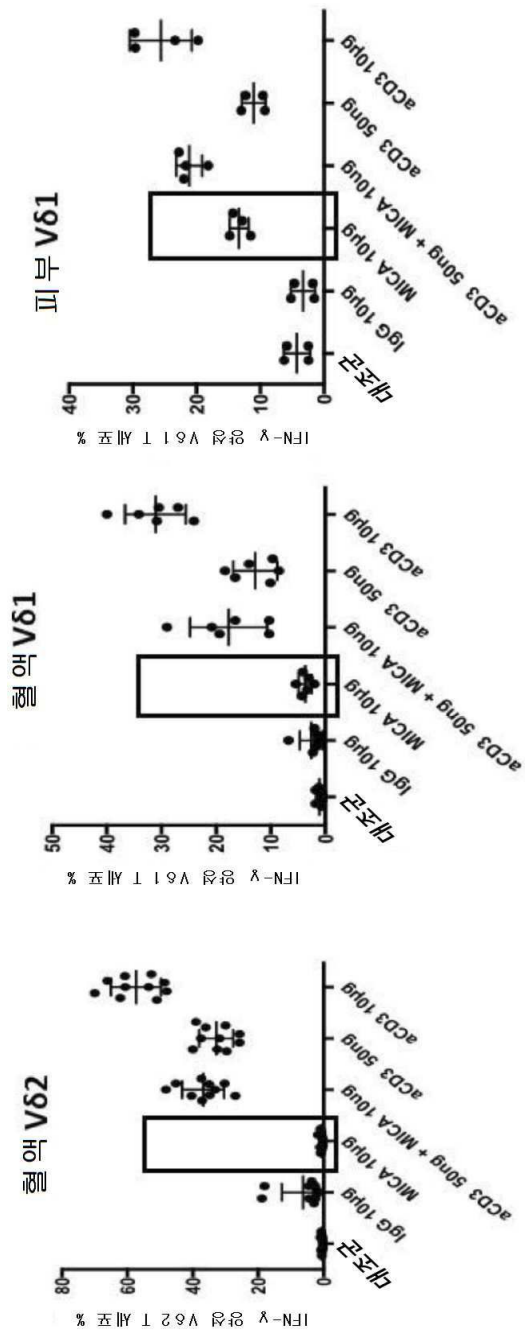
도면9c



도면10a



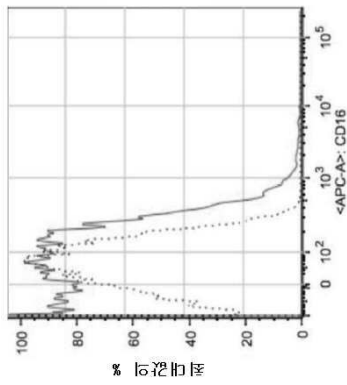
도면10b



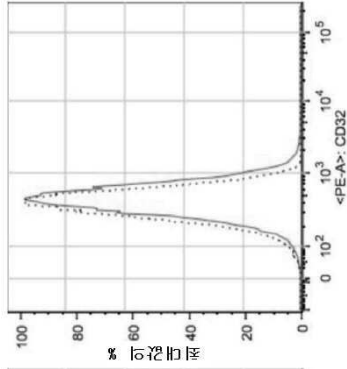
도면11

# Fc 감마 수용체

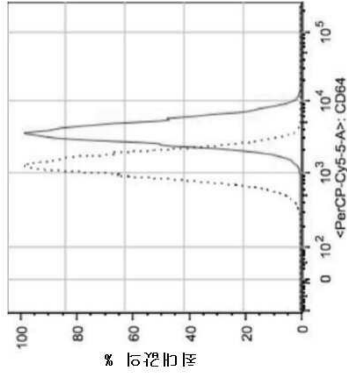
IgG의 Fc 단편,  
지친화도 IIIa, 수용체  
(CD16a)



IgG의 Fc 단편,  
지친화도 IIa, 수용체  
(CD32)



IgG의 Fc 단편,  
고친화도 Ia, 수용체  
(CD64)

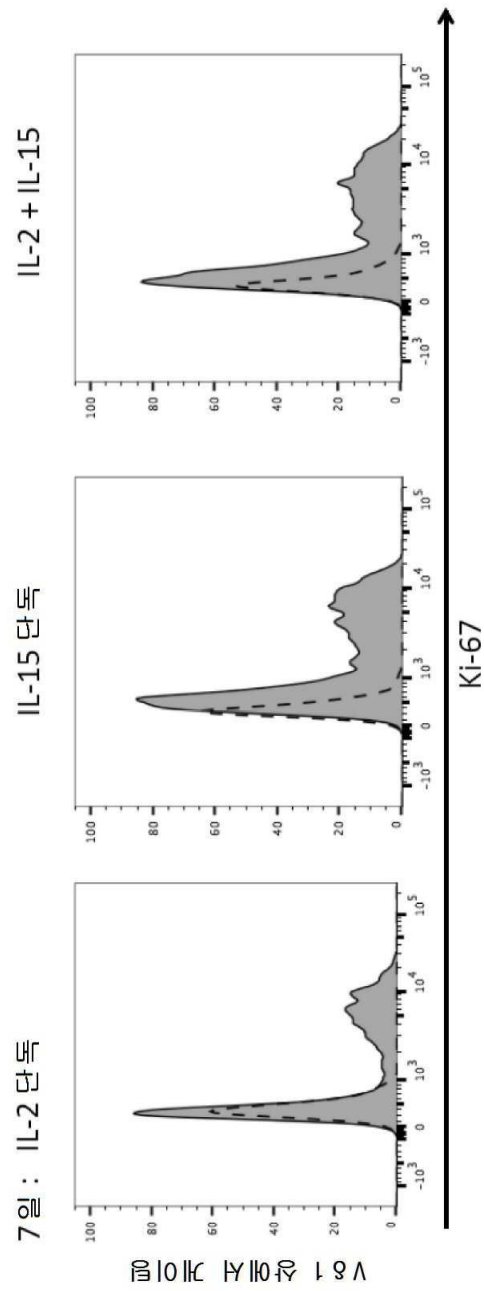


아이소타입

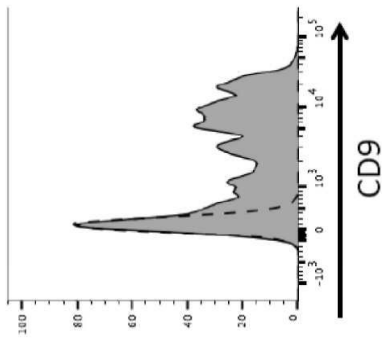
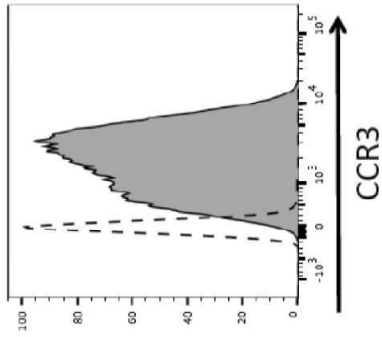
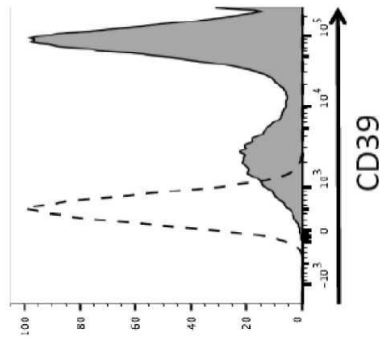
염색

(4명 중) 1명의 대표 공여자

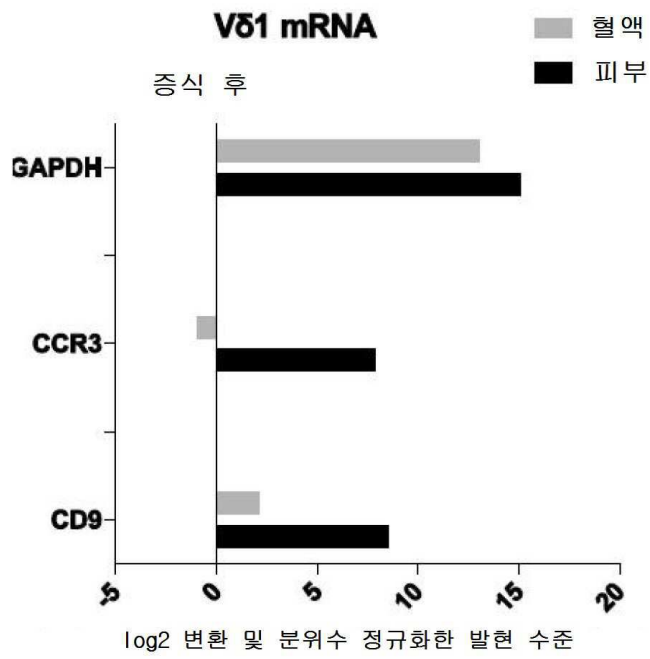
도면12



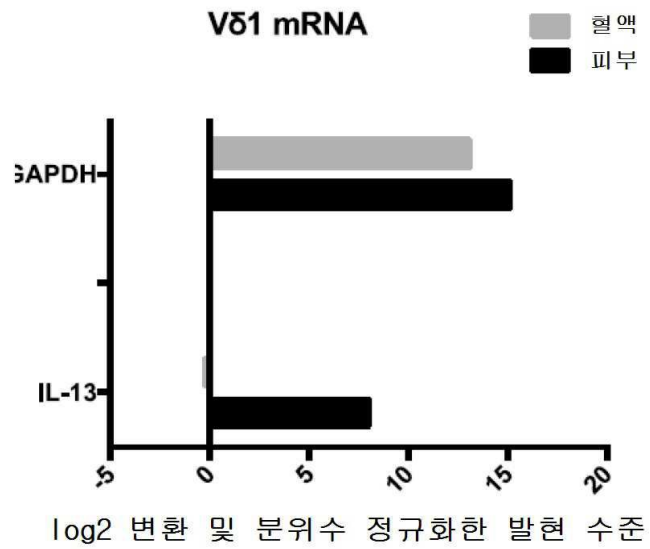
도면13



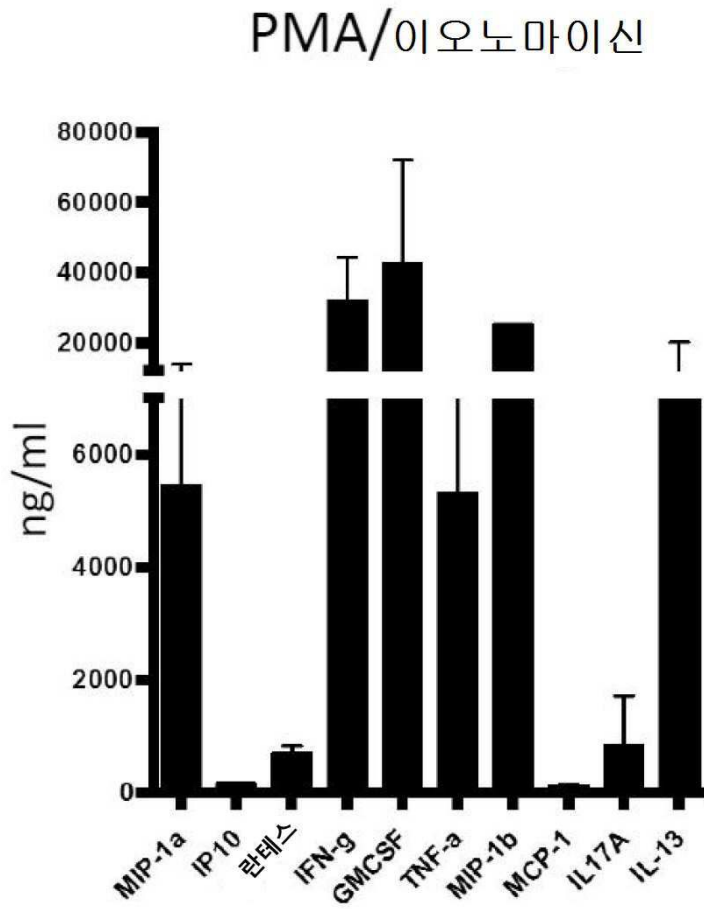
도면14



도면15



도면16a



도면16b

