(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월16일
(11) 등록번호 10-2444170
(24) 등록일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/12* (2020.01)
A61K 35/17 (2014.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7002824
(22) 출원일자(국제) 2017년06월27일
심사청구일자 2020년06월26일
(85) 번역문제출일자 2019년01월28일
(65) 공개번호 10-2019-0022828
(43) 공개일자 2019년03월06일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2017/050716
(87) 국제공개번호 WO 2018/002924
국제공개일자 2018년01월04일
(30) 우선권주장
62/354,950 2016년06월27일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2013035099 A1
WO2012032526 A2
WO2010049935 A2
OPHIR ERAN et al., BLOOD (2010) 115(10):2095-2104

(73) 특허권자
예다 리서치 앤드 디벨럽먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스
(72) 발명자
레이즈너, 야이르
이스라엘 6803775 올드 자파 마잘 카샤트 스트리트 4
오르-게바, 노가
이스라엘 7610002 레호보트 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 컴퍼니 리미티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **기억 T 세포로부터 생성된 베토 세포**

(57) 요 약

중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법으로서, 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로의 회귀(homing)할 수 있는 것인 방법에 개시된다. 상기 방법은 (a) 70% 이상의 기억 T 세포의 집단을 준비하는 단계; (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포의 농축시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포들을 사이토카인의 존재 하에서 배양하여 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포들을 증식시켜, 비-GvHD 유도 세포들의 단리된 집단을 생성하는 단계를 포함한다. 상기 방법에 의해 생성된 세포, 의약적 조성물 및 치료 방법 또한 개시된다.

(52) CPC특허분류
A61K 39/001 (2013.01)
C12N 5/0087 (2013.01)
A61K 2035/122 (2013.01)
A61K 2039/5158 (2013.01)
C12N 2501/2307 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/2321 (2013.01)
C12N 2502/1121 (2013.01)

(72) 발명자
기드론 부도프스키, 로템
이스라엘 7610002 레호보트 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 컴퍼니 리미티드 내
바차르-러스틱, 에스더
이스라엘 7610002 레호보트 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 컴퍼니 리미티드 내
라스크, 아사프
이스라엘 7610002 레호보트 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 컴퍼니 리미티드 내
카간, 시반
이스라엘 7610002 레호보트 피오 박스 95 앳 더 웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스 예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 컴퍼니 리미티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 50% 이상의 기억 T 세포를 포함하는 T 세포의 집단을 준비하는 단계,

(b) 상기 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에 바이러스, 박테리아 또는 종양 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭(enrichment)시키는 단계,

(c) 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포들을 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재 하에서 배양하여 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포들을 증식시켜, 비-GvHD 유도 세포들의 단리된 집단을 생성하는 단계를 포함하고,

상기 세포는 내성 유도 세포이고항-바이러스, 항-박테리아 또는 항-종양 활성이 부여된 것이며, 이식 후 림프절로 회귀(homing)할 수 있는 것인,

중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 T 세포의 집단은 상기 바이러스, 박테리아 또는 종양 항원 또는 항원들에 대해 증폭된 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 T 세포 집단은 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약, 또는 $CD45RO^+$, $CD8^+$ 세포를 선별할 수 있는 시약으로 처리하여 획득되는 것인, 방법.

청구항 4

(a) 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약, 또는 $CD45RO^+$, $CD8^+$ 세포를 선별할 수 있는 시약으로 처리하여 $CD45RO^+CD45RA^-CD8^+$ 표현형을 포함하는 기억 T 세포의 집단을 얻는 단계;

(b) 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 바이러스, 박테리아 또는 종양 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)로부터 얻어진 상기 세포를 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재 하에서 배양함으로써 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포를 증식시켜 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 단계;를 포함하고,

상기 세포는 내성 유도 세포이고 항-바이러스, 항-박테리아 또는 항-종양 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로 회귀할 수 있는 것인,

중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 항원 또는 항원들은

자가 유래의 항원 제시 세포, 비-자가 유래의 항원 제시 세포, 인공 비히클 또는 인공 항원 제시 세포에 의해 제시되며; 또는

상기 기억 T 세포와 동일 기원의 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것인, 방법.

청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은

둘 이상의 바이러스성 펩타이드를 포함하고; 또는

EBV 펩타이드, CMV 펩타이드, 아데노바이러스 (Adv) 펩타이드, 및 BK 바이러스 펩타이드를 포함하며; 또는

3개의 EBV 펩타이드, 2개의 CMV 펩타이드 및 2개의 아데노바이러스 (Adv) 펩타이드를 포함하고; 또는

EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-penton(Adv-펜톤) 및 Adv-헥손(Adv-hexon)으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 또는

둘 이상의 EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-펜톤 및 Adv-헥손을 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제4항에 있어서,

(i) 상기 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 상기 항원 또는 항원들과 접촉시키는 것은 12시간 내지 5일 동안, 또는 3일 동안 수행되는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제4항에 있어서,

(ii) 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포를 IL-21, IL-15 및는 IL-7의 존재 하에서 배양하는 것은 12시간 내지 15일 동안, 또는 4일 내지 10일 동안, 또는 6일 내지 10일 동안 수행되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 비-GvHD 유도 세포를 생성하는 시간의 총 길이는 10일이고; 또는

상기 방법은 엑스-비보에서 수행되는 것인, 방법.

청구항 10

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 방법은 단계 (c) 이후 상기 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 상기 세포로부터 동종반응성 세포(alloreactive cells)를 제거하는 것을 추가로 포함하고, 선택적으로 상기 동종반응성 세포를 제거하는 것은 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 상기 세포를 숙주 항원 제시 세포(APCs)와 접촉시킨 후 $CD137^+$ 및 $CD25^+$ 세포를 제거하여 수행되며; 또는

상기 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 갖는 상기 세포는 $CD3^+$, $CD8^+$, $CD62L^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$ 특성을 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 또는 제4항의 방법에 따라 생성된, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 갖는 세포를 포함하는 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단으로서,

상기 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 갖는 세포는 $CD3^+$, $CD8^+$, $CD62L^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$ 특성을 포함하고,

상기 세포의 단리된 집단의 50% 이상은 상기 특성을 가지며,

상기 세포는 내성 유도 세포이고 항-바이러스, 항-박테리아 또는 항-종양 활성이 부여된 것이며, 이식 후 림프절로 회귀할 수 있는 것인, 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단.

청구항 12

활성 성분으로서 제11항의 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 갖는 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단 및 의약적으로 허용되는 담체를 포함하는, 세포 또는 조직 이식물의 생착 촉진용 의약적 조성물로서,

상기 세포는 내성 유도 세포이고 항-바이러스, 항-박테리아 또는 항-종양 활성이 부여된 것이며, 이식 후 림프절로 회귀할 수 있는 것인, 세포 또는 조직 이식물의 생착 촉진용 의약적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 그의 일부 구체예에서 기억 T 세포로부터 생성된 베토 세포(veto cell)에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 그러나 비배타적으로, 이의 제조 및 이의 이식과 질병 치료에서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 누적되는 증거는 인간에서, CD45RA-결핍(depleted) 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)가 감소된 이식편대숙주(graft versus host, GvH) 반응성을 나타내는 것을 보여준다. 이 접근의 전제는 항원을 경험한 T 세포에서 CD45RA 발현의 하향 조절과 관련이 있으며, 이런 이유로 $CD45RA^{+}$ 세포를 감소시킴으로써 나이브(naive) T 세포는 제거되고, 기억 T 세포를 포함한 기능성 항원 경험 세포는 유지된다. 결론적으로, 이식편대숙주질환(graft versus host disease, GvHD)의 위험은 현저하게 제거하고, T 세포-결핍 줄

기세포(T cell-depleted stem cell, TCD) 이식 단독을 사용한 접근에 비해 생착(engraftment), 면역 재구성(immune reconstitution) 및 이식편대 백혈병/림프종(graft versus leukemia/lymphoma, GvL)은 향상된다. 또한, T 조절 세포(Treg)는 또한 $CD45RA^-$ 집단에 속하고, 이 세포 집단에 의해 입증된 면역관용성 효과(tolerogenic effect)에 기여할 수 있다. 이 접근은 마우스 CD4 기억 T 세포뿐만 아니라 효과기 기억 CD8 T 세포(effector memory CD8 T-cells)가 이식편대숙주(GvH) 반응성이 없음을 증명하는 전임상 연구에 기초한다 [Anderson BE et al. *J Clin Invest* (2003) 112 (1) : 101-8].

[0003] 그러나 Zheng [Zheng H.et al. *Immunol*. (2009) 182 (10) : 5938-48] 등은 $CD8^+$ 중심 기억 T 세포(central memory T cell, T_{cm})가 나이브 T 세포와 비교하여 유의미한, 비록 다소 감소되었지만, GvHD를 나타내는 것을 입증했다.

[0004] 이러한 감소된 GvHD가 항원을 경험한 기억 T 세포의 풀(pool)에서 동종반응성(alloreactive) 클론의 감소된 빈도와 관련이 있는 것을 고려하여, Juchem 등은 수여자에서 편재적으로(ubiquitously) 발현되는 항원성 펩티드에 대하여 유사한 수준의 TCR 트랜스진(transgene)를 발현하는 나이브 T 세포와 기억 T 세포 사이에서 가능한 내재적 차이에 대하여 추가로 정보를 얻었다 [Juchem KW et al. *Blood*. (2011) 118 (23):6209-19]. 이 연구는 상이한 회귀(homing) 패턴 및/또는 INFγ를 분비하는 이들 세포의 상이한 능력으로 인해 효과기 기억 T 세포(T_{em})가 낮은 GvH 반응성을 나타내더라도, T_{cm}은 나이브 T 세포들과 비교하여 높은 GvH 반응성을 나타내는 것을 보여준다 [Juchem KW. (2011), homing].

[0005] 최근에 두 주요 연구가 백혈병 환자에서 $CD45RA^+$ 결핍 조혈 모세포 이식 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)을 사용하려고 시도하였으나 [Bleakley M. 등, *J Clin Invest*. (2015) 125(7):2677-89; Triplett, B.M. et al. *Bone Marrow Transplant*. (2015) 50(7):968-977], GvHD 발생은 완전히 제거되지 않았다. 이것은 많은 수의 주입된 $CD45RA^+$ T 세포와 T_{cm}이 GvHD의 유력한 유발 인자임을 분명히 보여주는 전임상 데이터와 상관없이 CD45RA-결핍 분획이 T_{em}와 T_{cm}을 모두 포함하기 때문일 수 있다.

[0006] 항-제3자(anti-third party) 공여자-유래 중심 기억(central memory) $CD8^+$ T 세포(veto T_{cm})는 비-골수제거 감소된 조건(non-myeloablative reduced conditioning) 하에서 동종이계(allogeneic) T 세포 결핍 골수 이식(T-cell depleted bone marrow transplant, TDBMT) 생착(engraftment)을 선호하여, GvHD를 일으키지 않고 공여자-유형 장기 이식에 대한 면역관용성 유도를 초래하는 것으로 이전에 밝혀졌다[Ophir, E. et al. *Blood*. (2013) 121(7):1220-1228]. 또한, 항-제3자 중심 기억 T 세포(T_{cm})는 강력한 생체 내 베토 활성(veto activity)를 갖는 것으로, 특히 GVHD를 유발하지 않으면서 2차 림프 기관의 숙주 항-공여자 T 세포에서 세포사멸(apoptosis)를 유도하는 것으로 나타났다 [Ophir, E. et al. Blood. (2010) 115(10): 2095-2104].

[0007] 또한, GvH 반응성이 없는 면역관용성 유도 세포(예를 들어, 비토 세포)의 생성 및 이식편 이식을 위한 보조제(adjuvant) 처리와 같은 용도를 위하여 다양한 접근법이 고려되며, 일부는 하기에 요약된다.

[0008] PCT 공개 제WO 2001/49243호는 공여자로부터 유래된 이식물 (transplant)을 수여자에게 이식하는 방법을 개시하고, 상기 방법은 (a) 이식물을 수여자에게 이식하는 단계; 및 (b) 비-동종반응성 항-제3자 세포 독성 T-림프구(CTL)를 포함하는 투여량을 수여자에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 비-동종반응성 항-제3자 CTL은 제3자 항원 또는 항원들에 대하여 공여자의 T-림프구를 지시(directed)함으로써 생성되고(외인성 IL-2의 부존재), 상기 투여량은 동종반응성 CTL로 발전할 수 있는 T-림프구 (예, $CD4^+$ T 세포 및/또는 $CD56^+$ 자연 살해 세포)를 실질적으로 제거시켜서, 수여자에 의한 이식편 거부 및 이식편대 숙주 질환을 예방하거나 개선한다.

[0009] PCT 공개 제WO 2007/023491호는 개체에서 비-동계(non-syngeneic) 이식편의 이식 거부를 감소 또는 방지하기 위한 면역관용원성(tolerogenic) 세포의 용도를 개시한다. 상기 개시된 면역관용원성 T 조절 세포(예, $CD4^+CD25^+$ 세포)는 개체 및 상기 이식편("제3자" 면역관용원성 세포) 모두와 비-동계성인 임의의 공여자로부터 유래될 수 있다. 상기 이식편(예, 골수)은 개체와 동종이계이거나 또는 이종성(xenogeneic)인 임의의 이식편 공여자로부터 유래될 수 있다.

[0010] PCT 공개 제WO 2010/049935 호는 중심 기억 T-림프구(T_{cm}) 표현형을 갖는 비-GVHD 유도성 항-제3자 세포를 포함하는 단리된 세포 집단을 개시하며, 상기 세포는 면역관용원성-유도성 세포(tolerance-inducing cell)이고, 이

식 후에 림프절로 회귀(homing)할 수 있다. 상기 WO 제2010/049935호에 따르면, 상기 세포는 (a) GVH 반응성 세포(예, 사이토카인이 제거된 배양물)의 제거를 허용하는 조건 하에 제3자 항원 또는 항원들과 비-동계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 접촉시키는 단계; 및 (b) T_{cm} 표현형을 포함하는 세포의 증식을 허용하는 조건(IL-7 및/또는 IL-21의 존재) 하에 단계 (a)로부터 생성된 세포를 IL-15의 존재 하에 배양하는 단계를 포함한다.

[0011] PCT 공개 제WO 2002/032526호는 아래 단계를 포함하는 대상의 질병 치료 방법을 개시한다: (a) 비-동계 세포 또는 조직 이식편을 대상에 이식하는 단계; 및 (b) 대상에 중심 기억 T-림프구(T_{cm}) 표현형을 갖는 항-제3자 세포를 유도하는 비-이식편대 숙주(GvHD)를 포함하는 단리된 세포 집단의 치료학적 유효량을 투여하는 단계, 상기 세포는 면역관용원성-유도 세포이고 이식 후 림프절에 회귀할 수 있다. 상기 제WO 2012/032526호에 따르면, 상기 세포는 아래 단계에 의하여 생성된다: (a) GVH 반응성 세포의 제거를 허용하는 조건(예, 1-5일 동안 배양) 하에 제3자 항원 또는 항원들과 PBMC를 IL-21의 존재 또는 부존재 상태로 접촉시키는 단계; 및 (b) T_{cm} 표현형을 포함하는 세포의 증식을 허용하는 조건(예, 추가로 IL-7의 존재) 하에 무항원 환경에서 IL-15의 존재 하에 단계 (a)로부터 생성된 세포를 배양하는 단계.

[0012] PCT 공개 제WO 2013/035099호는 중심 기억 T-림프구(T_{cm}) 표현형을 갖는 항-제3자 세포를 포함하는 단래된 세포 집단을 생성하는 새로운 방법을 개시하며, 상기 세포는 면역관용원성-유도 세포이고, 및/또는 항-질병 활성이 부여된 것이며, 이식 후 림프절로 회귀할 수 있다. 상기 제WO 2013/035099호에 따르면, 상기 세포는 아래 단계에 의하여 생성된다: (a) PBMC를 IL-21의 존재 하에 제3자 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 풍부하게 하는 단계; 및 (b) Tcm 표현형을 포함하는 세포의 증식을 허용하도록 무항원 환경에서 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재하에 단계 (a)로부터 수득한 세포를 배양하는 단계.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, (a) 70% 이상의 기억 T 세포의 집단을 준비하는 단계; (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭(enrichment)시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포들을 사이토카인의 존재 하에서 배양하여 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포들을 증식시켜, 비-GvHD 유도 세포들의 단리된 집단을 생성하는 단계를 포함하고, 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로의 회귀(homing)할 수 있는 것인, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법이 제공된다.

[0014] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면 (a) 비부착성 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약으로 처리하여 $CD45RA^-CD8^+$ 표현형을 포함하는 기억 T 세포의 집단을 얻는 단계; (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)로부터 얻어진 상기 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하여 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포를 증식시켜 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 것을 포함하고, 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로의 회귀(homing)할 수 있는 것인, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법이 제공된다.

[0015] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, (a) 비부착성 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약으로 처리하여 $CD45RA^-CD8^+$ 표현형을 포함하는 기억 T 세포의 집단을 얻는 단계; (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 바이러스 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)로부터 얻어진 상기 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하여 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포를 증식시켜 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 것을 포함하고, 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로의 회귀(homing)할 수 있는 것인, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법이 제공된다.

[0016] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, 본 발명의 일부 구체예의 상기 방법에 따라 생성된, 중심 기억 T-

림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단으로서, 여기에서 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로의 회귀(homing)할 수 있는 것인, 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단이 제공된다.

[0017] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, 활성 성분으로서 본 발명의 일부 구체예의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단 및 의약적으로 허용되는 담체를 포함하는 의약적 조성물이 제공된다.

[0018] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, 치료적 유효량의 본 발명의 일부 구체예의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 대상체에게 투여하여 대상체에서 질환을 치료하는 것을 포함하는 이를 필요로 하는 대상체에서의 질환의 치료 방법이 제공된다.

[0019] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, 이를 필요하는 대상체에서의 질환의 치료를 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 일부 구체예에서의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 용도가 제공된다.

[0020] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, (a) 질환과 관련된 항원 또는 항원들의 존재에 대해 대상체의 생물학적 시료를 분석하는 단계; (b) 본 발명의 일부 구체예의 방법에 따라 상기 질환과 관련된 항원 또는 항원들에 대한 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하여 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및 (c) 대상체에 상기 단계 (b)의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여 상기 대상체에서의 질환을 치료하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0021] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, (a) 대상체에 세포 또는 조직 이식물을 이식하는 단계; 및 (b) 본 발명의 일부 구체예의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 치료적 유효량을 대상체에 투여하여 상기 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 대상체를 치료하는 것을 포함하는, 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0022] 본 발명의 일부 구체예의 일 측면에 따르면, 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 대상체에게 세포 또는 조직 이식을 위한 보조적 치료로서의 의약의 제조를 위한 본 발명의 일구 구체예의 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 용도가 제공된다.

[0023] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포에는 $CD45RA^+$ 세포가 없다.

[0024] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 기 기억 T 세포에는 $CD4^+$ 및/또는 $CD56^+$ 세포가 없다.

[0025] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포의 집단과 항원 또는 항원들과의 접촉은 IL-21의 존재 하에서 수행한다.

[0026] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 사이토카인의 존재 하에서 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포를 배양하는 것은 상기 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7 중 어느 하나의 존재 하에서 배양하는 것을 포함한다.

[0027] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 방법은 70% 이상의 기억 T 세포의 집단을 준비하기 전에 항원 또는 항원들로 세포 공여자를 처리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0028] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 70% 이상의 기억 T 세포의 집단은 상기 항원 또는 항원들에 대해 증폭된 것이다.

[0029] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 종양 항원, 자가면역질환 관련 항원, 단백질 추출물, 정제된 단백질 및 합성 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

[0030] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 기 항원 또는 항원들은 자가 유래의 항원 제시 세포, 비-자가 유래의 항원 제시 세포, 인공 비히클 또는 인공 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것이다.

[0031] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 상기 기억 T 세포와 동일 기원의 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것이다.

[0032] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 자가 유래의 항원 제시 세포, 비-자가 유래의 항원 제시 세포, 인공 비히클 또는 인공 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것이다.

[0033] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 PBMCs와 동일 기원의 항원 제시 세포에 의해 제시되는 것이다.

[0034] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 항원 제시 세포는 수지상 세포이다.

[0035] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 둘 이상의 바이러스성 펩타이드를 포함한다.

[0036] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 EBV 펩타이드, CMV 펩타이드 및/또는 아데노바이러스 (Adv) 펩타이드를 포함한다.

[0037] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 3개의 EBV 펩타이드, 2개의 CMV 펩타이드 및 2개의 아데노바이러스 (Adv) 펩타이드를 포함한다.

[0038] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 기 바이러스 항원 또는 항원들은 EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-penton(Adv-펜톤) 및 Adv-헥손(Adv-hexon)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이다.

[0039] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 둘 이상의 EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-펜톤 및 Adv-헥손을 포함하는 것이다.

[0040] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 바이러스 항원 또는 항원들은 추가로 박테리아 항원을 포함한다.

[0041] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재하에서 접촉시키는 것은 12 시간 내지 5일 동안 수행된다.

[0042] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재하에서 접촉시키는 것은 3일 동안 수행된다.

[0043] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하는 것은 12시간 내지 10일 동안 수행된다.

[0044] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하는 것은 4일 내지 8일 동안 수행된다.

[0045] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하는 것은 6일 동안 수행된다.

[0046] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 비-GvHD 유도 세포를 생성하는 시간의 총 길이는 10일이다.

[0047] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 방법은 상기 단계 (c) 후 동종반응성(alloreactive cells)를 제거하는 것을 추가로 포함한다.

[0048] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 동종반응성 세포를 제거하는 것은 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 상기 세포를 숙주 항원 제시 세포(APCs)와 접촉시킨 후 CD137+ 및/또는 CD25+ 세포를 제거하여 수행된다.

[0049] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 방법은 엑스-비보에서 수행된다.

[0050] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 PBMCs는 대상체에 대해 비동계(non-syngeneic)이다.

[0051] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 PBMCs는 대상체에 대해 동종이형(allogeneic)이다.

[0052] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, T 중심 기억 표현형을 갖는 상기 세포는 $CD3^+$, $CD8^+$, $CD62L^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$ 특성을 포함한다.

[0053] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 제38항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 척수액, 림프액 및 조직 생검(tissue biopsy)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0054] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 종양 항원, 및 자가면역질환 관련 항원으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0055] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 방법은 세포 또는 조직 이식물을 대상체에 이식하는 것을 추가로 포함한다.

[0056] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 의약은 추가로 세포 또는 조직 이식물을 포함한다.

[0057] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 이식은 상기 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 투여와 동시에, 이전에 또는 후에 수행된다.

[0058] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 질환은 악성 질환이다.

[0059] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 질환은 비-악성 질환이다.

[0060] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단은 상기 세포 또는 조직 이식의 전에, 동시에, 또는 후에 투여하기 위한 것이다.

[0061] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 본 발명의 일부 구체예의 방법에서 (b)는 (a) 이전에 수행된다.

[0062] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 본 발명의 일부 구체예의 방법에서 a) 및 (b)는 동시에 수행된다.

[0063] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 방법은 상기 이식 전에 상기 대상체를 준치사(sublethal), 치사(lethal), 또는 전치사(supralethal) 조건 하에서 컨디셔닝하는 것을 추가로 포함한다.

[0064] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 용도는 준치사(sublethal), 치사(lethal), 또는 전치사(supralethal) 컨디셔닝 프로토콜을 추가로 포함한다.

[0065] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 준치사(sublethal), 치사(lethal), 또는 전치사(supralethal) 조건은 전신 방사선 조사 (total body irradiation , TBI), 부분 신체 방사선 조사,(partial body irradiation), 골수파괴 컨디셔닝(myeloablative conditioning), 비골수파괴 컨디셔닝(non-myeloablative conditioning), 공동-자극 차단제(co-stimulatory blockade), 화학요법제 및 항체 면역요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0066] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 세포 또는 조직 이식물이 대상체와 비-동계이다.

[0067] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식물 및 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단은 동일한 공여자로부터 얻은 것이다.

[0068] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식물은 HLA 동일 동종이형 공여자, HLA 비동일 동종이형 공여자 및 이종개체 공여자로 이루어진 군으로부터 선택된 공여자로부터 유래한 것이다.

[0069] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 세포 또는 조직 이식물은 미성숙 조혈세포를 포함한다.

[0070] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 세포 또는 조직 이식물은 간, 췌장, 비장, 신장, 심장, 폐, 피부, 장, 뇌, 난소 및 림프성/조혈세포 또는 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0071] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 세포 또는 조직 이식물은 여러 장기의 공동-이식을 포함한다.

[0072] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 공동-이식은 미성숙 조혈세포 및 고형 장기의 이식을 포함한다.

[0073] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 미성숙 조혈세포 및 고형 장기는 동일한 공여자로부터 얻은 것이다.

[0074] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 조혈세포는 상기 고형 장기의 이식 전, 동시에, 또는 후에 이식된다.

[0075] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 대상체는 악성 질환을 갖고 있다.

[0076] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 악성 질환은 고형 종양 또는 종양 전이이다.

[0077] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 악성 질환은 혈액학적 악성 종양(hematological malignancy)이다.

[0078] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 악성 질환은 백혈병, 림프종, 골수종, 흑색종, 육종, 신경모세포종, 대장암, 결장 직장암(colorectal cancer), 유방암, 난소암, 식도암, 활액막세포암(synovial cell cancer), 간암 및 췌장암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 대상체는 비악성 질환을 갖고 있다.

[0080] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 비악성 질환이 장기 기능 부전 또는 장해(organ dysfunction or failure), 혈액학적 질환, 이식편 관련 질환, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증, 알레르기, 외상 및 상해로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0081] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 감염성 질환이 바이러스성 질환 또는 박테리아성 질환이다.

[0082] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 대상체는 인간이다.

[0083] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및/또는 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 구체예를 실행 또는 시험하는데 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및/또는 재료가 하기에 기술된다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함한 특허 명세서가 통제할 것이다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 반드시 제한하려는 것으로 의도되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0084] 본 발명의 일부 실시 양태들은 본원에서 첨부되는 도면을 참조로 예시로만 공개된다. 이제 도면을 구체적으로 참조하되, 도면에서 제시되는 특정 부분들은 예시이며, 본 발명의 실시 양태를 예시적으로 설명하기 위한 것이다. 이러한 면에서, 도면과 더불어 상세한 설명은 당해 기술분야의 당업자가 본 발명의 실시 양태가 실행될 수 있는 방법에 대해 알 수 있도록 한다.

도 1은 OVA 면역화 마우스의 $CD44^+CD8^+$ 기억 T 세포에서 유래한 베토(veto) Tcm 세포를 사용한 감소된 조건(reduced conditioning) T 세포 결핍 골수 이식 (TDBMT) 모델의 개략도이다.

도 2A는 T 세포 결핍(TCD) 동종이계 줄기 세포 이식(SCT)에 대해 면역관용성을 갖는 난백알부민(ovalbumin)으로 OT1 마우스를 면역화한 후에 항원을 경험한 세포($CD8^+CD44^+$)의 전체 집단으로부터 제조된 베토 Tcm 세포를 도시하는 그래프이다. 치사량으로 방사선조사된(5.25 Gy) Balb/c($H\text{-}2^d$) 마우스에 C57BL/6-누드($H\text{-}2^b$) BM 세포 $20x10^6$개를 동종이계 C57BL/6 베토 Tcm 세포($H\text{-}2^b$) $5x10^6$개 또는 OT-1 OVA 면역화 마우스로부터 유래된 $CD8^+CD44^+$ 세포 $5x10^6$개와 함께 또는 없이 이식하였다. 말초 혈액에서 공여자 세포의 백분율은 항-숙주($H\text{-}2D^d$) 항-공여자($H\text{-}2K^b$) 항체를 사용하여 이식 후 45일에 FACS로 분석하였다.

도 2B 및 2C는 엄격한 마우스 모델(stringent murine model)에서 $CD8^+CD44^+$ Tcm 세포가 GvHD를 유도하지 않음을 도시하는 그래프이다. 치사량으로 방사선조사된(5.25 Gy) Balb/c(H-2d) 마우스에 동종이계 OVA 면역화 C57BL/6(H-2b) 유래의 $CD8^+CD44^+$ T_{cm} 세포 또는 신규 $CD8^+CD44^+$ T 세포를 $5x10^6$ 또는 $10x10^6$ 이식하였다. $CD8^+CD4^-$ 나이브 세포는 GvHD에 대한 양성 대조군으로 사용되었다. (도 2B) 세포 이식 후 62일 동안의 평균 체중 변화. (도 2C) 생존 플롯은 특정 그룹에서 마우스의 생존 시간 라인을 나타낸다.

도 2D는 자연 발생(naturally occurring) 기억 세포 (예, $CD44^+CD8^+$ 항-OVA)로부터 유도된 T_{cm} 세포에 의한 면역관용원성 유도를 시험하기 위한 감소된 강도 조절(reduced intensity conditioning, RIC) 모델의 개략도이다.

도 2E는 자연 발생 기억 세포($CD44^+CD8^+$)의 집단으로부터 제조된 베토 T_{cm} 세포가 TCD alloSCT에 대한 면역관용원성을 유도하는 것을 도시하는 그래프이다. 치사량으로 방사선조사된(5 Gy) Balb/c($H\text{-}2^d$) 마우스에 C57BL/6-누드($H\text{-}2^b$) BM 세포 $20x10^6$개를 동종이계 C57BL/6 베토 T_{cm} 세포($H\text{-}2^b$) $5x10^6$개 또는 OVA 면역화 마우스로부터 유래된 $CD8^+CD44^+$ 세포 $5x10^6$개 또는 동종이계 C57BL/6에서 신규 분리된 $CD8^+CD44^+$ 세포 $5x10^6$개와 함께 또는 없이 이식하였다. 말초 혈액에서 공여자 세포의 백분율은 항-숙주($H\text{-}2D^d$) 항-공여자($H\text{-}2K^b$) 항체를 사용하여 FACS로 이식 후 55일에 분석하였다.

도 3A 내지 3D는 바이러스성 펩티드를 사용하여 항-제3자 $CD4^-CD56^-$ 베토 Tcm 세포의 생성을 도시하는 그래프이다. 0일차의 공여자 PBMC로부터 $CD4^+$ 및 $CD56^+$ 세포를 제거하여 확립된 인간 $CD4^-CD56^-$ 응답자(responder)를 EBV, CMV 및 아데노바이러스의 바이러스성 펩티드로 펄스된, 방사선조사된 공여자 유래 DC와 IL-21과 함께 +3일까지, 추가로 IL-21, IL-15 및 IL-7과 함께 +3일부터 +9일까지 배양하였다. (도 3A 내지 3B) 0일차에 응답자 $CD4^-CD56-$ 세포(도 3A) 및 배양 9일차에 상기 응답자 세포에서 생성된 항-바이러스성 T_{cm} 세포(도 3B)의 베토 T_{cm} 표현형의 FACS 분석. (도 3C 내지 3D) +9일에, 세포를 회수하여 방사선조사된 숙주 PBMC에 대해 5일 동안 배양하고(즉, 벌크 배양), 이후 회수하여, 효과기(effector) 표현형의 유도를 위해 IL-2의 존재 하에 제한적 희석 분석(limiting dilution analysis)으로 방사선조사된(irradiated) 숙주 PBMC에 대해 7일 동안 재자극하였다.

+21일에, ConA-블라스트(ConA-blasts) 숙주 기원에 대해 S35-메티오닌 LDA 살상 분석 (S35-Methionine LDA killing assay) 분석을 수행하였다. 5시간 혼합 림프구 반응 (mixed lymphocyte reaction, MLR) 후, 상등액을 웰로부터 수거하고 베타 계수기로 방사능 계수를 측정하였다. (도 3C) 반응성 배양액(responding cultures) 대 세포수/배양액의 % 플롯을 나타낸다. (도 3D) 비-반응 배양액 대 세포수/배양액의 % 선형 회귀 플랏을 나타낸다. 특정 배양액에서 항-숙주 클론의 빈도(f)는 선형 회귀선 기울기로부터 계산하였다.

도 4A는 백혈구성분채집술(leukapheresis) 유래 항-바이러스성 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 인간 베토 T_{cm} 세포의 생성 및 이들의 항-숙주 반응성의 시험을 위한 프로토콜을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 4B는 바이러스성 펩티드가 로딩된 인간 성숙 수지상 세포의 생성을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 5A 및 5B는 제3자 자극으로서 바이러스성 펩티드가 로딩된 자가유래(autologous) DC를 사용하여 $CD56^-CD45RA^-$ 응답자로부터 생성된 항 바이러스성-베토 T_{cm} 세포를 도시하는 그래프이다. (도 5A) 0일의 $CD4^-CD56^-$ 응답자 및 9일차의 T_{cm} 세포(우측 패널)의 표현형. (도 5B) 0일에 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 응답자 및 9일차의 T_{cm} 세포(우측 패널)의 표현형.

도 5C는 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 및 $CD4^-CD56^-$ 세포 분획으로부터 생성된 항-바이러스성 T_{cm} 세포에서 항-숙주 CTL 전구체 빈도의 제한적 희석 분석(LDA)을 신규 $CD4^-CD56^-CD19^-$ T 세포와 비교하여 도시하는 그래프이다. +9일에 신규 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 세포의 대조군 집단은 새롭게 해동된 공여 세포로부터 비드-분류되었다(bead-sorted). +9일에 모든 3종의 공여자 세포 제제(preparations) (즉, 항-바이러스성 베토 T_{cm} $CD4^-CD56^-$, 항-바이러스성 베토 T_{cm} $CD4^-CD56^-CD45RA-$ 및 새로운 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 세포)를 방사선조사된 PBMC에 대해 5일 동안 배양하고(즉, 벌크 배양), 이후 수거하여 효과기 표현형의 유도를 위해 IL-2의 존재 하에 LDA로 방사선조사된 숙주 PBMC에 대해 7일 동안 재자극하였다. 21일에, 숙주 기원의 ConA-블라스트에 대해 S35-메티오닌 LDA 살상 분석을 수행하였다. 5시간 MLR 후, 상등액을 웰로부터 수거하고 베타 계수기로 방사능 계수를 측정하였다. 비-반응성 배양액 대 세포수/배양액 %의 선형 회귀 플롯을 도시하였다. 특정 배양액에서 항-숙주 클론의 빈도(f)는 선형 회귀선 기울기로부터 계산하였다.

도 6은 바이러스성 펩티드에 대한 베토 T_{cm} 세포의 생성 전후(도 4A 및 도 5A-C에서 수행된 바와 같이)의 항-숙주 T-세포 제거를 요약한 표이다. 주목할 것은, 낮은 항-숙주 CTL-p 빈도 및 전체 항-숙주 CTL-p 수준은 LDA 분석 (그래프에서 원으로 표시됨)에 기초한다.

도 7은 기억 T 세포로부터 유래되고, 자가 항원 제시 세포의 구성(context)에서 바이러스성 항원에 대해 배양된 인간 베토 T_{cm} 세포의 생성을 위한 프로토콜의 구체예를 개략적으로 나타낸다.

도 8은 도 7에 제시된 프로토콜에 의해 기억 T 세포로부터 베토 T_{cm} 세포가 생성된 10개의 실험을 요약한 표이다. 주목할 것은, 세포 회수(recovery) 및 순도는 매우 재현가능했다.

도 9A 내지 9H는 도 7에 제시된 프로토콜에 의해 기억 T 세포로부터 생성된 베토 Tcm 세포의 순도를 보여주는 한 실험의 일반적인 FACS 분석을 나타내는 그래프이다. 상기 도면들은 다음과 같이 도 8에 제시된 각 단계의 FACS 분석을 나타낸다: 도 9A 및 9B는 정제 전 말초 혈액 단핵 세포(PBMCs)의 FACS 분석을 나타낸다; 도 9C 및 9D는 $CD4^-CD56^-$ 정제 후의 FACS 분석을 나타낸다; 도 9E 및 9F는 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ 정제 (즉, $CD4^-CD56^-CD45RO^+$ 세포의 증폭(enrichment))) 후의 FACS 분석을 나타낸다; 도 9G 및 9H는 항-바이러스성 T_{cm} 세포의 FACS 분석을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 본 발명은, 이의 일부 구체예에서, 기억 T 세포로부터 생성된 베토세포 (veto cell)에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 하지만 비 독점적으로, 이의 제조방법 및 이식 및 질병 치료에서 이의 용도에 관한 것이다.

[0086] 본 발명의 원리 및 실행은 도면 및 첨부된 설명을 참조하여 더 잘 이해 될 수 있다.

[0087] 본 발명의 적어도 하나의 실시예를 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 그 적용에 있어서 이하의 설명에 기재되거나 실시예에 의해 예시된 세부 사항으로 제한될 필요가 없다는 것이 이해되어야 한다. 본 발명은 다른 구체예가 가능하거나 다양한 방법으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용된 문구 및 용어는 설명의 목적을 위한 것이며 제한적으로 여겨져서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다.

[0088] 골수 (Bone marrow, BM) 이식은 혈액 악성 종양 및 다른 질환 (예: 혈액 질환, 장기 부전 (organ failure)을 가진 많은 환자를 치료할 수 있는 치료법을 제공한다. 더욱이, BM은 키메라 현상 (chimerism)의 유도에 의해 이식 성공을 증가시키기 위해서 다양한 다른 장기 (예를 들어, 동일한 장기 공여자로부터의 신장 또는 간 이식편)와 함께 이식될 수 있다. 그러나, BM 이식편은 숙주 항원 (Ags)에 반응하고 다중-계통 이식편-대-숙주 질환 (GvHD)을 유발하는 공여자 T 세포를 함유한다. 이러한 조건에서 거의 치명적인 GvHD의 문제점은 T 세포 제거된 (depleted) 골수의 이식 (TDBMT, transplantation of T cell depleted bone marrow)으로 예방될 수 있다. 그러나 GvHD 예방의 이점이 현저하게 증가된 이식편 거부 반응율에 의하여 상쇄 될 수 있다.

[0089] 동종이형의 TDBMT의 거부 반응을 극복하기 위한 하나의 방법은 PCT 공개공보 WO 2001/49243, WO 2007/023491, WO 2010/049935, WO 2012/032526 및 WO 2013/035099에 교시된 바와 같이 다양한 베토세포 (veto cell) 제조의 사용이었다. 그러나, 여전히 입양 세포 요법 (adoptive cell therapy), 특히 동종이형 (allogeneic) 이식 환경에서 이식편 거부 및 GvHD는 주요한 문제이다.

[0090] 본 발명을 실시하도록 하는 동안, 본 발명자들은 이식편대숙주 (GvH) 반응을 유도하지 않으면서, 항-질병 활성 (예: 항-바이러스 활성)을 또한 포함하는 개선된 베토세포 집단을 밝혀냈다. 이러한 신규한 세포는 항원 활성화 방법을 거친 기억 T 세포로부터 동종반응성 클론 (alloreactive clone)을 제거하여 생성된다.

[0091] 하기 및 다음의 실시예 부분에서 보여지는 바와 같이, 본 발명자들은 기억 T 세포로부터 시작하여 HLA 미스매치된 (예를 들면, 동종이형의) 사용을 위한 베토세포를 생성시키는 새로운 방법을 제공한다. 구체적으로, 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명자들은 자연 발생 기억 T 세포로부터 베토 Tcm 세포 (veto Tcm cell)의 생성을 위한 마우스 모델을 이용하였다. 기억 T 세포로부터 생성된 Tcm 세포는 이식편대숙주 반응성 없이 (도 2a), 감소된 컨디셔닝 T세포 제거된 골수 이식 (TDBMT) 모델에서 내성을 유도하였고, 감소된 강도 컨디셔닝 프로토콜에 따라 키메라 현상의 현저한 증가를 나타냈다 (도 2e). 그러나, (항원 활성화를 겪지 않은) 프레쉬 $CD8^{+}CD44^{+}$ 기억세포는 GvHD로 인한 현저한 치사 및 중량 감소를 유도한다는 것이 밝혀졌다 (도 2b-c).

[0092] 다음으로, 바이러스성 항원을 사용하여 CD4-CD56- 세포 집단으로부터 인간 Tcm 베토세포를 생성하였다. 도 3a-b에 도시된 바와 같이, 자가 수지상 세포 상에 존재하는 바이러스성 항원의 존재하에서 배양된 세포는 배양 시작으로부터 9일째에 93%가 Tcm 표현형 (CD62+CD45RO+ 세포)을 포함하였다. 또한, 이들 Tcm 세포는 프레쉬 CD4-CD56- 세포와 비교하여 숙주-동종반응성 클론의 2-로그 감소 (depletion)를 제공하였다 (도 3c-d 및 하기 표 2). 그 다음 베토세포는 세포 공여자로부터 얻어진 말초 혈액 단핵구 세포의 CD4+, CD56+ 및 CD45RA+ 세포를 일차로 제거함으로써 인간 기억 세포로부터 생성되었다 (도 4a). 따라서, 나머지 세포의 집단은 공여자 기억 CD8+ T 세포를 포함하였다. 기억 CD8+ T 세포는 항원 (예를 들어, EBV, CMV 및 아데노 바이러스를 포함하는 바이러스 항원 칵테일)을 발현하도록 조작된 (동일한 세포 공여자의) 수지상 세포와 함께 배양되었다. 처음 3일 동안, 세포 배양물 (culture)에 IL-21을 첨가하였고, 그 다음, 3일째부터 9일째까지 IL-21, IL-15 및 IL-7을 배양물에 첨가하였다. 결과 세포의 집단은 Tcm 표현형을 포함하였고 어떠한 항-숙주 반응성도 나타내지 않았다 (도 5a-c 및 6에 예시된 바와 같이).

[0093] 이와 함께, 항원 활성화 (예를 들어, 바이러스성 항원, 종양 항원을 사용)를 거친 T 세포 기억 풀 (pool) 내의 동종반응성 클론의 제거 (depletion)는 기억 T 세포 풀에 잔존하는 잔류 GvHD의 문제를 해결할 수 있다. 또한, 이러한 결과는 기억 세포로부터 생성된 베토세포의 새로운 제조법이 GvHD 합병증이 없는 이식 내성 유도를 위한, 그리고 질병 치료 (예: 항-바이러스 또는 항-암 치료)를 위한 세포 치료법에 사용될 수 있음을 시사한다.

[0094] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따르면, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-이식편대숙주질환 (GvHD) 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법이 제공되며, 상기 세포는 내성 유도 세포이고/거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로 회귀할 수 있는 것으로, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 70% 이상의 기억 T 세포의 집단을 제공하는 것; (b) 항원 반응성 세포를 증폭 (enrichment)시키기 위해 상기 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들과 접촉시키는 것; 및 (c) 중심 기억 T-림프구 (Tcm) 표현형을 포함하는 세포들을 증식시켜, 비-GvHD 유도 세포들의 단리된 집단을 생성하기 위해 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포들을 사이토카인의 존재하에서 배양하는것.

[0095] 본원에서 사용된 문구 "세포의 단리된 집단"은 세포의 자연적인 환경 (예: 인체)로부터 단리된 세포를 의미한다.

[0096] 본원에서 사용된 문구 "비 이식편대숙주질환" 또는 "비-GvHD"는 실질적으로 감소된 이식편대숙주 (GvH) 유도 반응성을 갖거나 이식편대숙주 유도 반응성이 없는 것을 지칭한다. 따라서, 이식된 개체의 생존율, 체중 및 전반적인 외형으로 확인되는 바와 같이, 본 발명의 세포는 이식 후 30 내지 120일째에 이식편대숙주 질환 (GvHD)을 유의적으로 유발하지 않도록 생성된다. 감소된 GvHD에 대한 개체를 평가하는 방법은 통상의 기술자에게 잘 알려져있다.

[0097] 일 구체예에 따르면, 본 발명의 세포는 본 발명 교시에 따라 생성되지 않은 세포와 비교해서 숙주에 대해서 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100%의 감소된 반응성을 갖는다.

[0098] 본원에서 사용된 문구 "중심 기억 T-림프구 (Tcm) 표현형"은 림프절로 회귀하는 세포독성 T 세포의 서브셋(subset)을 지칭한다. 인간에서, Tcm 표현형을 갖는 세포는 전형적으로 CD3+/CD8+/CD62L+/CD45RO+/CD45RA- 시그니쳐를 포함한다. Tcm 세포는 단일 세포 상에 시그니쳐 마커들을 모두 발현할 수 있고, 또는 단일 세포 상에 시그니쳐 마커들 중 일부만 발현할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 세포 표현형의 결정은 통상의 기술자에게 알려진 임의의 방법, 예를 들어 FACS (Fluorescence-activated cell sorting) 또는 캡쳐 ELISA 라벨링,을 이용해서 수행될 수 있다.

[0099] 일 구체예에 따르면, 세포의 단리된 집단의 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100%가 Tcm 세포 시그니쳐를 갖는다.

[0100] 특정 구체예에 따르면, 세포의 단리된 집단의 약 20-40%, 약 30-50%, 약 40-60%, 약 50-70%, 약 60-80 %, 약 70-90%, 약 80-100%, 또는 약 90-100%가 Tcm 세포 시그니쳐를 갖는다.

[0101] 본 발명의 비-GvHD 유도성 세포의 단리된 집단은 또한 본원에서 "Tcm 세포"로 지칭된다.

[0102] 언급된 바와 같이, Tcm 세포는 일반적으로 이식 후 림프절이 있는 곳으로 회귀(home) 한다. 일부 구체예에 따르면, 본 발명의 세포의 단리된 집단은 이식 후 예를 들어 말초 림프절 및 장간막 림프절과 같은 림프절 중 임의의 곳으로 회귀할 수 있다. 이러한 세포의 회귀 (homing) 특성은 빠르고 효과적인 방식으로 베토 (veto) 효과 발휘할 수 있게 한다.

[0103] 본 발명의 Tcm 세포의 단리된 집단은 내성-유도 (tolerance-inducing) 세포이다.

[0104] 본원에서 사용된 문구 "내성 유도 세포 (tolerance inducing cell)"는 내성 유도 세포가 투여되지 않은 수용자의 반응성과 비교해서, 수용자의 세포와 접촉했을 때, 수여자의 세포 (예: 수용자의 T 세포)의 반응성 저하를 유발하는 세포를 지칭한다. 내성 유도 세포는, PCT 공개공보 WO 2001/049243 및 WO 2002/102971에 기술된 바와 같이, 베토세포 (즉, 접촉 시 숙주 T 세포의 세포사멸을 유도하는 T 세포)를 포함한다.

[0105] 본원에서 사용된 문구 "베토 활성 (veto activity)"은 베토세포에 대한 인식 및 결합 시, 항-공여자 수여자 T 세포의 불활성화를 유도하는 면역 세포 (예: 공여자 유래 T 세포)에 관한 것이다. 일 구체예에 따르면, 불활성화는 항-공여자 수여자 T 세포의 세포사멸을 초래한다.

[0106] 부가적으로 또는 대안적으로, 상기 본 발명의 Tcm 세포의 단리된 집단은 항-질병 활성을 포함한다.

[0107] 본원에서 사용된 문구 "항-질병 활성"은 질병세포에 대한 Tcm 세포의 기능을 지칭한다. 항-질병 활성은 질병이 있는 세포에 직접 작용할 수 있는데, 예를 들어 질병 세포를 살상하는 능력이다. 이 활성은 LFA1-I/CAM1 결합에 의해 매개되는 TCR 독립적 살상 때문일 수 있다 [Arditti et al., Blood (2005) 105 (8): 3365-71. Epub 2004.07.06]. 추가적으로 또는 대안적으로, 항-질병 활성은 간접적 일 수 있는데, 일 예로 질병 세포의 사멸을 유도 (예: 사멸시키는 것, 세포사멸, 또는 다른 인자 (예: 항체, 사이토카인 등)의 분비 등에 의하여)하는 다른 유형의 세포의 활성화 (예: CD4+ T 세포, B 세포, 단핵구, 대식세포, NK 세포)에 의한 것이다.

[0108] 질병 세포는 예를 들어, 바이러스 감염된 세포, 박테리아 감염된 세포, 암세포 [예를 들어, 고형 종양 또는 백혈병/림프종 세포, 또한 본원에서 Tcm 세포의 이식편대백혈병 (GVL) 활성이라고도 함], 자가 면역 질환과 관련된 세포, 알레르기 반응과 관련된 세포, 또는 스트레스, 방사선 또는 나이에 의해서 변형된 세포를 포함할 수 있다.

[0109] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 본 발명의 Tcm 세포는 비-유전적으로 조작된 세포 또는 유전적으로 조작된 세포 (예: 특정 유전자, 마커 또는 펩타이드를 발현하거나 발현하지 않도록 또는 특정 사이토카인을 분비하거나 분비하지 않도록 유전공학적으로 조작된 세포) 일 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 방법이 관련 유전자/들의 불활성화 또는 폴리펩타이드 발현을 간섭하는 안티센스 RNA의 삽입에 의해 세포를 유전 공학적으로 조작하는데 수행될 수 있다 (예를 들어 본원에 참조로 포함된 WO/2000/039294 참고).

[0110] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 세포의 단리된 집단을 생성하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 기억 T 세포의 집단을 제공하는 것; (b) 항원 반응성 세포를 증폭(enrichment)시키기 위해 상기 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들과 접촉시키는 것; 및 (c) 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 세포들을 증식시키기 위해 상기 단계 (b)로부터 얻은 세포들을 사이토카인의 존재 하에서 배양하는것.

[0111] 본원에서 사용된 문구 "기억 T 세포 (memory T cell)"는 항원과 이전에 접하였거나 반응하였던 T 림프구의 서브셋(subset)을 지칭하는 것으로, 또한 항원 경험있는 T 세포라고도 지칭된다.

[0112] 일 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포는 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 99% 이상 또는 100%의 세포의 집단을 포함한다.

[0113] 일 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포는 CD8 마커를 발현하는 세포독성 T 세포 (즉, $CD8^+$ T 세포)를 포함한다.

[0114] 일 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포는 $CD8^+CD45RO^+$ 표현형을 포함한다.

[0115] 일 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포는 $CD8^+CD45RA^-$ 표현형을 포함한다.

[0116] 일 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포는 $CD8^+CD45RO^+CD45RA^-$ 표현형을 포함한다.

[0117] 기억 $CD8^+$ T 세포의 선택은 $CD8^+$ 및 $CD45RA^-$를 공동-발현하는 세포 및/또는 $CD8^+$ 및 $CD45RO^+$를 공동-발현하는 세포의 선택에 의하여 영향을 받을 수 있고, 친화력에 기초한 정제 (예: MACS 비드, FACS 분류기 및/또는 캡쳐 ELISA 라벨링의 사용에 의한)와 같은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0118] 기억 $CD8^+$ T 세포의 선택은 이펙터 (effector) T 세포 및 중심 기억 T 세포의 선택에 의하여 더 영향을 받을 수 있고, 후자는 예를 들어 CD62L, CCR7, CD27 및/또는 CD28를 발현하는 것이다.

[0119] 일 구체예에 따르면, 기억 T 세포는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)로부터 얻어진다.

[0120] 일 구체예에 따르면, 기억 T 세포는 림프절 또는 비장과 같은 림프 조직으로부터 얻어진다.

[0121] 높은 순도의 기억 T 세포를 포함하는 세포 집단 (예를 들어, 50-70% 이상의 기억 T 세포)을 얻기 위해 또는 기억 T 세포의 수를 증가시키기 위해서, PBMC에서 나이브 세포 (naive cell, 예: $CD45RA^+$ 세포), 부착세포 (adherent cell, 예: 단핵구세포, 대식세포), $CD4^+$ 세포 (예: T 헬퍼 세포), $CD56^+$ 세포 (예: NK 세포) 또는 기억 T 세포 표현형을 포함하지 않는 임의의 다른 세포가 제거될 수 있다.

[0122] 나이브 T 세포 (예: 발현 $CD45RA^+$ 세포), $CD4^+$ 및/또는 $CD56^+$ 세포의 제거 (depletion)는 친화도에 기초한 정제 (예: MACS 비드, FACS 분류기 및/또는 캡쳐 ELISA 라벨링의 사용에 의한)와 같은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0123] 부착세포의 제거는 당업계에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들면 PBMC를 세포 배양 접시에서 배양하는 것 (일예로 2-6시간 동안) 및 비-부착세포를 모으는 것에 의하여 수행될 수 있다.

[0124] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포에는 $CD45RA^+$ 세포가 없다.

[0125] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 상기 기억 T 세포에는 $CD4^+$ 및/또는 $CD56^+$ 세포가 없다.

[0126] 기억 T 세포 풀로부터 동종반응성 클론 (alloreactive clone)을 제거하기 위해서, 상기 기억 T 세포는 항원 또는 항원들과 접촉된다.

[0127] 본원에서 사용된 문구 "항원 또는 항원들"은 면역 반응을 유발할 수 있는 가용성 또는 비-가용성 (막 관련과 같은) 분자를 지칭한다.

[0128] 예를 들어, 항원 또는 항원들은 전체 세포 (예: 살아있거나 죽은 세포), 세포 분획 (예: 용혈된 세포), 세포 항원들 (예: 세포 표면 항원), 단백질 추출물, 정제된 단백질 또는 합성 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 일부 구체예에서 항원 또는 항원들은 악성 (malignant) 질환과 관련된 항원 (예: 종양 항원), 자가 면역 질환과 관련된 항원 (즉, 자가 면역 항원), 알레르기 반응과 관련된 항원 (즉, 알레르기 항원), 바이러스의 항원 (즉, 바이러스성 항원), 박테리아의 항원 (즉, 박테리아성 항원) 또는 진균의 항원 (예: 진균 항원)이 포함될 수 있다.

[0129] 일 구체예에 따르면, 항원 또는 항원들은 일반적으로 이식 환자와 같은 대상체를 구성하는 면역에 영향을 미치는 감염성 유기체 (예를 들어, 바이러스, 박테리아, 곰팡이 유기체)이다. 환자를 구성하는 면역에 영향을 줄 수 있는 감염성 유기체의 예는 파보바이러스 (예: 파보바이러스 B19), 로타바이러스, 수두-대상 포진 바이러스 (VZV, varicella-zoster virus), 단순포진바이러스 (HSV, Herpes simplex virus), 거대세포바이러스 (CMV, cytomegalovirus), 엡스타인-바 바이러스 (EBV), 폴리오마바이러스 (예: BK 바이러스)와 같은 바이러스; *S pneumoniae*, *P aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *L monocytogenes*, *Nocardia* 종, *Mycobacterium* 종, *S aureus*, *Nocardia* 종, *P aeruginosa*, *Serratia* 종, *Chromobacterium*, streptococci, *Burkholderia*, *Mycobacterium* (예: *Mycobacterium avium-intracellulare* 복합체), *S pneumoniae*, *H influenzae* 및 *N meningitidis*와 같은 피낭성 박테리아와 같은 박테리아; *P jiroveci*, *Candida* 및 *Aspergillus*와 같은 균류; 그리고 *Toxoplasma* 종, 크립토스포리디아 (cryptosporidia) 및 *Strongyloides* 종과 같은 기생충을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 일 구체예에 따르면, 상기 항원은 바이러스성 항원이고, 엡스타인-바 바이러스 (EBV), 아데노바이러스 (Adv), 거대세포바이러스 (CMV), 감기 바이러스, 독감 바이러스 (flu viruse), A형 간염, B형 간염 및 C형 간염 바이러스, HIV, 인플루엔자, 일본 뇌염 (Japanese encephalitis), 홍역, 폴리오 (polio), 광견병 (rabies), 호흡기 세포 융합 (respiratory syncytial), 풍진 (rubella), 천연두 (smallpox), 수두-대상포진 (varicella zoster), 로타바이러스, 웨스트 나일 바이러스, 폴리오마바이러스 (예: BK 바이러스) 또는 지카 바이러스의 항원이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0131] 바이러스성 항원의 추가의 특정 예로서, 아데노바이러스 항원은 Adv-penton 또는 Adv-hexon을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; CMV 항원은 막 당단백질 B (envelope glycoprotein B), CMV IE-1 및 CMV pp65를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; EBV 항원은 EBV LMP2, EBV BZLF1, EBV EBNA1, EBV P18, 및 EBV P23포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 간염 항원은 B형 간염 바이러스의 S, M, 및 L 단백질, B형 간염 바이러스의 전-S 항원, HBCAG DELTA, HBV HBE, C형 간염 바이러스의 RNA, HCV NS3 및 HCV NS4를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; 단순포진 (herpes simplex) 바이러스의 항원은 조기발현 단백질 (immediate early protein) 및 당단백질 D (glycoprotein D)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; HIV 항원은 HIV gp32, HIV gp41, HIV gp120, HIV gp160, HIV P17/24, HIV P24, HIV P55 GAG, HIV P66 POL, HIV TAT, HIV GP36, the Nef 단백질 및 역전사효소와 같은 gag, pol 및 env 유전자의 유전자 산물 (gene product)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; 인플루엔자 항원은 헤마글루티닌 (hemagglutinin) 및 뉴라미다아제 (neuraminidase)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 일본 뇌염 (Japanese encephalitis) 바이러스 항원은 단백질 E, M-E, M-E-NS1, NS1, NS1-NS2A 및 80% E를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; 홍역 (measles) 항원은 홍역 바이러스 융합 단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 광견병 (rabies) 항원은 광견병 당단백질 및 핵단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; 호흡기 세포 융합 바이러스 항원은 RSV 융합 단백질 및 M2 단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 로타바이러스 항원은 VP7sc를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며; 풍진 (rubella) 항원은 단백질 E1 및 E2를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 그리고 수두-대상포진 바이러스 항원은 gpl 및 gpll를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0132] 일 구체예에 따르면, 상기 항원은 박테리아 항원이고, 비 제한적인 예로 탄저병 (anthrax); 그람 음성균 (gram-negative bacilli), 클라미디아 (chlamydia), 디프테리아 (diptheria), 헤모필루스 인플루엔자 (haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리 (Helicobacter pylori), 말라리아 (malaria), 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis), 백일해균 독소 (pertussis toxin), 폐렴구균 (pneumococcus), 리케차 (rickettsiae), 스타필로코커스 (staphylococcus), 스트렙토코커스 (streptococcus) 및 파상풍 (tetanus)의 항원이나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0133] 박테리아 항원의 추가의 특정 구체예로서, 탄저병 항원은 탄저병 방어 항원 (anthrax protective antigen)을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니고; 그람 음성균 항원은 지질 다당류 (lipopolysaccharide)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 헤모필루스 엔플루엔자 항원은 캡슐 다당류 (capsular polysaccharide)를 포함하나, 이

에 한정되는 것은 아니고; 디프테리아 항원은 디프테리아 독소 (diptheria toxin)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis) 항원은 마이콜산 (mycolic acid), HSP65 (heat shock protein 65), 30 kDa 주요 분비 단백질 (30 kDa major secreted protein) 및 항원 85A를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 백일해균 독소 항원은 헤마글루티닌, 퍼탁틴 (pertactin), FIM2, FIM3 및 아데닐산 고리화효소 (adenylate cyclase)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 폐렴구균 항원은 폐렴구균용혈소 (pneumolysin) 및 폐렴구균 캡슐 다당류 (pneumococcal capsular polysaccharide)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 리케차 (rickettsiae) 항원은 rompA를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 스트렙토코커스 항원은 M 단백질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고, 그리고 파상풍 (tetanus) 항원은 파상풍 독소를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0134] 일 구체예에 따르면, 상기 항원은 슈퍼버그 (superbug) 항원 (예: 다중-의약 저항성 박테리아) 이다. 슈퍼버그 (superbug)의 일 예로 Enterococcus faecium, Clostridium difficile, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, 및 장내세균과 (Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter spp.을 포함)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0135] 일 구체예에 따르면, 상기 항원은 진균 항원이다. 진균은 일 예로 칸디다, 콕시디오데스, 크립토코커스, 히스토플라즈마, 리슈마니아, 말라리아 원충, 원생동물, 기생충, 주혈흡충, 백선, 톡소플라즈마, 및 트리파노소마 크루지 (trypanosoma cruzi)를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0136] 진균 항원의 추가의 특정 구체예로서, 콕시디오데스 항원은 소구체 항원 (spherule antigen)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 크립토코커스 항원은 캡슐 다당 (capsular polysaccharide)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 히스토플라즈마 항원은 HSP60(heat shock protein 60)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 리슈마니아 항원은 gp63 및 리포포스포글리칸(lipophosphoglycan)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 말라리아 원충 (plasmodium falciparum) 항원은 낭충 표면 항원 (merozoite surface antigen), 스포로조이트 표면 항원 (sporozoite surface antigen), 포자소체 항원 (circumsporozoite antigen), 생식모세포/생식세포 표면 항원 (gametocyte/gamete surface antigen), 원생동물 및 155/RESA의 혈액-단계 항원을 포함하는 다른 기생 항원을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 주혈흡충 항원은 글루타치온-S-전이효소 및 파라미오신 (paramyosin)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 백선 진균성 항원은 트리코피틴 (trichophytin)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 톡소플라즈마 항원은 SAG-1 및 p30를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니고; 그리고 트리파노소마 크루지 항원은 75-77 kDa 항원 및 56 kDa 항원을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0137] 일 구체예에 따르면 상기 항원은 원하지 않는 자가면역 또는 알레르기 증상과 관련된 세포에 의해서 발현되는 항원이다. 자가 면역 증상의 일 예로 급성 괴사성 출혈성 뇌병증 (acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy), 알레르기성 천식 (allergic asthma), 원형 탈모증 (alopecia areata), 빈혈 (anemia), 아프타성 궤양 (aphthous ulcer), 관절염 (류마티스 관절염, 소아 류마티스 관절염, 골관절염, 건선성 관절염을 포함), 천식 (asthma), 자가면역성 갑상선염 (autoimmune thyroiditis), 결막염 (conjunctivitis), 크론병 (Crohn's disease), 피부 홍반 루푸스 (cutaneous lupus erythematosus), 피부염 (아토피성 피부염 및 습진성 피부염을 포함), 당뇨(diabetes), 진성 당뇨병 (diabetes mellitus), 나병성 결절성 홍반 (erythema nodosum leprosum), 각결막염 (keratoconjunctivitis), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 중증근무력증 (myasthenia gravis), 건선 (psoriasis), 피부경화증 (scleroderma), 쇼그렌 증후군 (쇼그렌 증후군에 2차적인 건성 각결막염 포함), 스티븐스-존스 증후군 (Stevens-Johnson syndrome), 전신성 홍반 루푸스 (systemic lupus erythematosis), 궤양성 대장염 (ulcerative colitis), 질염 (vaginitis) 및 베게너 육아종증 (Wegener's granulomatosis)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0138] 자가면역 항원 (autoimmune antigen)의 예는 GAD 65 (glutamic acid decarboxylase 65), 네이티브 DNA, 수초염기성 단백질 (myelin basic protein), 수초 프로테오리피드 단백질 (myelin proteolipid protein), 아세틸콜린 수용체 성분 (acetylcholine receptor component), 티로글로불린 (thyroglobulin), 갑상성 자극 호르몬 (TSH, thyroid stimulating hormone) 수용체를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0139] 알레르기 항원 (allergic antigen)의 예는 일본 삼나무 꽃가루 항원, 돼지풀 (ragweed) 꽃가루 항원, 라이그라스 (rye grass) 꽃가루 항원과 같은 꽃가루 항원; 동물 유래 항원 (예: 집먼지 진드기 항원 및 고양이 항원); 조직 적합성 항원; 그리고 페니실린 및 다른 치료제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0140] 일 구체예에 따르면, 상기 항원은 종양 세포에 의해 발현된 항원 (또는 이의 일부, 예를 들어 항원 에피토프)이다. 일 구체예에 따르면, 상기 항원 (또는 이의 일부)는 조혈 조직 (예: 백혈병 항원과 같은 조혈 악성 종

양)에서 발현되거나 고형 종양 (예: 흑색종, 췌장암, 간암, 위암 등)에서 발현된 단백질로부터 유래된다.

[0141] 종양 항원의 예로 다음을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: A33, BAGE, Bcl-2, BCMA (B cell maturation antigen), BCR-ABL, β-catenin, CTA (cancer testis antigens; 예, MAGE-1, MAGE-A2/A3 및 NY-ESO-1), CA 125, CA 19-9, CA 50, CA 27.29 (BR 27.29), CA 15-3, CD5, CD19, CD20, CD21, CD22, CD33, CD37, CD45, CD123, CEA, c-Met, CS-1, 사이클린 B1 (cyclin B1), DAGE, EBNA, EGFR, ELA2, ㅇ에프린B2 (ephrinB2), 에스트로겐 수용체 (estrogen receptor), FAP, 페리틴 (ferritin), 엽산-결합 단백질 (folate-binding protein), GAGE, G250/CA IX, GD-2, GM2, gp75, gp100 (Pmel 17), HA-1, HA-2, HER-2/neu, HM1.24, HPV E6, HPV E7, hTERT, Ki-67, LRP, 메소텔린 (mesothelin), MCA (mucin-like cancer-associated antigen), MUC1, p53, PR1, PRAME, PRTN3, RHAMM (CD168), WT-1. 추가의 종양 항원은 Molldrem *J. Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2006) 12:13-18; Alatrash G. and Molldrem J., *Expert Rev Hematol.* (2011) 4(1): 37-50; Renkvist et al., *Cancer Immunol Immunother* (2001) 50:3-15; van der Bruggen P, Stroobant V, Vigneron N, Van den Eynde B. Peptide database: T cell-defined tumor antigens. *Cancer Immun* (2013), www(dot)cancerimmunity(dot)org/peptide/; Rittenhouse, Manderino, 및 Hass, *Laboratory Medicine* (1985) 16(9) 556-560에서 제공되며; 이들 모두는 본원에 참고로 포함된다.

[0142] 다음은 본 발명의 일부 구체예의 교시에 따라 사용될 수 있는 종양 항원의 목록이다.

표 1

[0143]

암	*TAA/Marker*	*종양 항원의 GenBank 등록번호*	*HLA*
이행세포암종 (Transitional cell carcinoma)	UPKII (Uroplakin II)	NP_006751.1	HLA-A2
이행세포암종	UPK1A (Uroplakin Ia)	NP_001268372.1; NP_008931.1	HLA-A2
전립선암	NPSA (prostate specific antigen)	AAO16090.1	HLA-A2
전립선암	PSCA (prostate specific membrane antigen)	NP_005663.2	HLA-A2
전립선암	ACPP (prostate acid phosphatase)	NP_001090.2; NP_001127666.1; NP_001278966.1	HLA-A2
유방암	BA-46 MFGE8 milk fat globule-EGF factor 8 protei [lactadherin]	NP_001108086.1; NP_005919.2;	HLA-A2
유방암	MUC1 (Mucin 1)	NP_001018016.1; NP_001018017.1; NP_001037855.1; NP_001037856.1; NP_001037857.1; NP_001037858.1; NP_001191214.1; NP_001191215.1; NP_001191216.1; NP_001191217.1; NP_001191218.1; NP_001191219.1; NP_001191220.1; NP_001191221.1; NP_001191222.1; NP_001191223.1; NP_001191224.1; NP_001191225.1; NP_001191226.1; NP_002447.4	HLA-A2
흑색종	PMEL (premelanosome protein, Gp100로도 알려짐)	NP_001186982.1; NP_001186983.1; NP_008859.1	HLA-A2
흑색종	MLANA (melan-A; MART1로도 알려짐)	NP_005502.1;	HLA-A2
모든 종양	TERT (telomerase reverse transcriptase)	NP_001180305.1; NP_937983.2	HLA-A2
백혈병 및 버킷림프종	TAX tax p40 [Human T-lymphotropic virus 1] 및 Tax [Human T-lymphotropic virus 4];	NP_057864.1; YP_002455788.1	HLA-A2
암종 (Carcinoma)	CTAG1B (NY-ESO cancer/testis antigen 1B)	NP_001318.1	HLA-A2

흑색종	MAGEA1 (Melanoma antigen family A1)	NP_004979.3	HLA-A2
흑색종	MAGEA3 (MAGE-A3; Melanoma antigen family A3)	NP_005353.1	HLA-A24
암종 (Carcinoma)	ERBB2 (HER2; erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)	NP_001005862.1; NP_001276865.1; NP_001276866.1; NP_001276867.1; NP_004439.2;	HLA-A2
흑색종	Beta-catenine; catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1)	NP_001091679.1; NP_001091680.1; NP_001895.1;	HLA-A24
흑색종	TYR (Tyrosinase)	NP_000363.1	HLA-DRB1
백혈병	Bcr-abl	AAA35594.1	HLA-A2
두경부	CASP8 (caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase)	NP_001073593.1; NP_001073594.1; NP_001219.2; NP_203519.1; NP_203520.1; NP_203522.1	HLA-B35

[0144] 일 구체예에 따라, 상기 항원은 하나의 항원 (예를 들어, 바이러스성, 박테리아성, 또는 종양성 항원)을 포함한다.

[0145] 일 구체예에 따라, 상기 항원 또는 항원들은 둘 이상의 항원 (예를 들어, 항원, 일 예로 바이러스성 항원 종양 항원 등의 하나의 군의 항원 혼합물; 또는 상이한 군의 항원, 일 예로 바이러스성 및 박테리아성 항원, 바이러스성 및 종양 항원, 바이러스성 및 자가면역 항원, 종양 및 자가면역 항원 또는 자가면역 및 알레르기성 항원, 유래의 항원의 혼합물)을 포함한다.

[0146] 일 구체예에 따라, 상기 항원 또는 항원들은 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 항원 (예를 들어, 단일 제제의 또는 여러 제제의)을 포함한다.

[0147] 일 구체예에 따라, 상기 항원 또는 항원들은 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 종양 항원 (예를 들어, 단일 제제의 또는 여러 제제의)을 포함한다.

[0148] 일 구체예에 따라, 상기 항원 또는 항원들은 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 바이러스성 항원 (예를 들어, 단일 제제의 또는 여러 제제의)을 포함한다.

[0149] 특정 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 세 개의 바이러스성 항원, 예를 들어, EBV 펩타이드, CMV 펩타이드 및 Adv 펩타이드를 포함한다.

[0150] 특정 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-penton 및 Adv-hexon에서 둘 이상 (예를 들어, e.g. 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯 또는 7개 항원 모두)을 포함한다.

[0151] 특정 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 펩믹스 (pepmixes)의 혼합물을 포함하며, 여기서 펩믹스는 3개 바이러스의 전체 단백질 서열에 걸친 중첩되는 펩타이드 라이브러리 (예를 들어, 11개의 아미노산이 중첩되는 15mer) 이다: CMV, EBV, 및 아데노 (이러한 펩믹스는 예를 들어 JPT Technologies (베를린, 독일)로부터 상업적으로 구입할 수 있다.)

[0152] 다른 특정 구체예에 따르면, 상기 항원 또는 항원들은 EBV-LMP2, EBV-BZLF1, EBV-EBNA1, CMV-pp65, CMV-IE-1, Adv-penton 및 Adv-hexon에 걸친 7개의 펩믹스의 혼합물을 일 예로, 100 ng/펩타이드 또는 상기 7개 펩타이드 혼합물의 700 ng/혼합물의 농도로 포함한다.

[0153] 특정 구체예에 따르면, 상기 바이러스성 항원은 박테리아성 항원 또는 항원들을 더 포함한다.

[0154] 기억 T 세포의 면역 반응을 자극하기 위해, 오브알부민 (ovalbumin), DNP (dinitrophenyl), KLH (keyhole limpet hemocyanin)와 같은 부가적인 자극 항원을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0155] 일 구체예에 따라, 상기 항원 또는 항원들은 "제3자 항원 또는 항원들" 즉, 공여자 또는 수여자에는 존재하지 않는 가용성 또는 비-가용성 (막 관련과 같은) 항원 또는 항원들이다. 예를 들어, 제3자 항원은 제3자 세포일 수 있다.

[0156] 제3자 세포는 공여자 또는 수여자에 대해 동종이형 또는 이종개체일 수 있다 (이하에서 더 상세하게 설명된다). 동종의 제3자 세포의 경우, 이러한 세포는 공여자의 항원과 상이하지만 수여자의 HLA 항원과 교차 반응하지 않아, 이러한 세포에 대해 생성된 항-제3자 세포가 이식되거나 수여자 항원에 대해 반응성이 없는 HLA 항원를 갖

는다.

[0157] 본 발명의 구체예에 따르면, 동종이형 또는 이종이형의 제3자 세포는 말초혈액림프구(PBL)로부터 정제된 세포, 비장 또는 림프절, 사이토카인이 동원된 PBL, 인 비트로 확장된 항원-제시 세포(APC), 인 비트로 확장된 수지상 세포(DC) 및 인공 항원 제시 세포로 구성된 군에서 선택된 자극성 세포이다.

[0158] 본 발명의 항원은 세포, 바이러스, 곰팡이 또는 박테리아 표면에 제시될 수 있거나 이로부터 유래 및/또는 정제될 수 있다. 부가적으로, 바이러스, 곰팡이 또는 박테리아 항원은 감염된 세포에 표시될 수 있고, 또는 세포성 항원은 인공 비히클(예를 들어, 리포좀) 또는 인공 항원 제시 세포(예를 들어, 항원 또는 항원들에 형질감염된 세포주)에 표시될 수 있다. 따라서, 바이러스, 박테리아 또는 곰팡이 항원은 그것에 감염된 세포에 의해 제시되거나, 그렇지 않으면 바이러스/박테리아/곰팡이 펩타이드를 발현하도록 제조될 수 있다. 유사하게, 종양 항원, 자가면역 항원 또는 동종이형 항원들은 이들 단백질을 발현하도록 제조된 세포에 의해 제시될 수 있다.

[0159] 항원으로 세포, 바이러스 감염된 세포, 박테리아 감염된 세포, 바이러스 펩타이드 제시 세포 또는 박테리아 펩타이드 제시 세포를 이용하는 것은 그러한 항원들이 다양한 배열의 항원 결정기를 함유하고, 이와 같이 그러한 재구성이 예를 들어, 이후의 치사 또는 준치사의 방사선 조사 또는 화학요법 절차(아래에서 구체적으로 토론됨)를 요구하거나 질병을 퇴치하기 위한(아래 구체적으로 토론됨) 경우에 T 세포의 더 빠른 재구성에 추가로 제공할 수 있는 다양한 집단의 Tcm 세포의 형성을 지시하므로 특히 유리하다.

[0160] 따라서, 항원 제시 세포(아래 토론되는 바와 같이, 자가 또는 비-자가), 세포주, 인공 비히클(리포좀과 같은) 또는 인공 항원 제시 세포(예를 들어, 항원 또는 항원들로 형질감염된 백혈병 또는 섬유아세포주)는 그것에 융합 또는 로딩된 짧은 합성 펩타이드를 제시하거나 단백질 추출물 또는 정제된 단백질을 제시하는데 사용될 수 있다. 그러한 짧은 펩타이드, 단백질 추출물 또는 정제된 단백질은 바이러스-, 박테리아-, 곰팡이-, 종양-, 자가면역- 또는 동종이형-항원 유래 펩타이드 또는 임의의 다른 항원을 제시하는 펩타이드일 수 있다.

[0161] 면역원성 짧은 펩타이드, 즉, 주 조직적합성 복합체(MHC) 클래스 I 또는 MHC 클래스 II와 관련하여 제시할 수 있는 펩타이드를 동정하기 위한 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 종양, 자가면역 또는 동종이형 항원 서열을 분석하기 위해 전용 소프트웨어가 사용될 수 있다.

[0162] 게다가, 본 발명의 인공 비히클 또는 인공 APC는 외인성 펩타이드로 펄스되지 않고도 MHC를 나타내도록 조작될 수 있다. 따라서, 일 구체예에 따르면, 인공 APC는 MHC 결정기 및 보조-자극 분자로 형질감염된 K562 종양 세포(예를 들어, 기억 T 세포에 대해 자가성)[이전에 기술된 Suhoski MM et al., Mol Ther. (2007) 15(5): 981-8] 또는 동일한 것이 형질감염된 섬유아세포를 포함한다.

[0163] 일 구체예에 따르면, MHC 클래스 I 또는 MHC 클래스 II와 관련하여 기억 T 세포 인식을 가능하게 하기 위해 항원 또는 항원들은 기억 T 세포에 대해 자가의, 예를 들어, 동일 기원의(예를 들어, 동일 공여자의) 항원 제시 세포(예를 들어, DC)에 의해 제시된다.

[0164] 일 구체예에 따르면, 항원 또는 항원들은 기억 T 세포에 의해 인식될 수 있는 MHC 항원들(인간 백혈구 항원(HLA)로도 지칭됨)을 나타내는 유전자 변형된 항원 제시 세포 또는 인공 항원 제시 세포에 의해 제시된다.

[0165] 일 구체예에 따르면, 항원 제시 세포는 인간 세포를 포함한다.

[0166] 일 구체예에 따르면, 항원 제시 세포는 수지상 세포(DC)를 포함한다.

[0167] 일 구체예에 따르면, 항원 제시 세포는 성숙한 수지상 세포를 포함한다.

[0168] 일 구체예에 따르면, 항원 제시 세포는 방사선 조사를 받은 수지상 세포(irradiated dendritic cell)를 포함한다.

[0169] 따라서, 일 구체예에 따르면, DCs는 약 5-10 Gy, 약 10-20 Gy, 약 20-30 Gy, 약 20-40 Gy, 약 20-50 Gy, 약 10-50 G의 방사선 조사를 받는다. 특정 구체예에 따르면, DCs는 약 10-50 Gy(예를 들어, 30 Gy)의 방사선 조사를 받는다.

[0170] APCs로 수지상 세포를 이용하는 방법은 종래기술에 공지되어 있다. 따라서, 비-제한적 예시로서, 말초혈액단핵구(PBMCs)는 세포 공여자로부터 얻을 수 있다[예를 들어, 기억 T 세포와 동일한 세포 공여자로부터]. PBMCs는 배양 플레이트에 파종되고, 인간 혈청(예를 들어, 1% 인간 혈청) 및 페니실린/스트렙토마이신(예를 들어, 1% 페니실린/스트렙토마이신)이 보충된 DC 세포 배지(예를 들어, Cellgro DC 배지)를 이용하여 37℃, 5% CO_2/O_2에서 1-5 시간(예를 들어, 3시간) 동안 인큐베이션 된다. 상등액 세포(T 세포 포함)를 버리고, 잔류하는 세포(즉, 부

착 세포)를 사이토카인 GM-CSF(예를 들어, 800-1600 IU/ml) 및 IL-4(예를 들어, 750 IU/ml)(예를 들어, 독일 함부르크 Peprotech 사로부터 이용할 수 있음)를 추가하여 같은 배양 조건에서 48-96 시간(예를 들어, 72시간) 동안 추가 인큐베이션 한다. 2일 내지 4일(예를 들어, 3일) 후, 부유 세포를 수확하고(즉, 대부분 미성숙 수지상 세포를 포함함), DCs의 성숙화를 위한 사이토카인, 예를 들어, GM-CSF(예를 들어, 800 IU/ml), IL-4(예를 들어, 750 IU/ml), LPS(예를 들어, *E.coli* O55:B5 유래, 예를 들어, 40 ng/ml에서) 및 IFN-γ(예를 들어, 200 IU/ml)(예를 들어, 독일 함부르크 Peprotech 사로부터 이용할 수 있음)과 함께 파종되며, 밤새도록 인큐베이션 된다. 다음날, 비부착성 세포를 버리고, 예를 들어, 2 mM EDTA 및 1% HS를 포함하는 예를 들어, 차가운 PBS를 이용하여 부착된 성숙한 DCs를 서서히 버리고, 얼음에서 10-60분 동안(예를 들어, 30분) 인큐베이션 후, 성숙한 DC로 구성된 거대 세포를 얻을 수 있다.

[0171] APCs(예를 들어, 성숙한 DCs) 상에 항원 또는 항원들을 제시하기 위해, 37℃, 5% CO_2/O_2에서 약 30분 내지 3시간 동안(예를 들어, 1시간) 항원 또는 항원들을 APCs(예를 들어, DCs)와 공배양한다. 예를 들어, DCs는 37℃, 5% CO_2/O_2에서 약 1시간 동안 인큐베이션하여 펩믹스(pepmixes)의 칵테일(바이러스 펩타이드)로 로딩될 수 있다. 그리고 나서, 항원이 로딩된 APCs(예를 들어, DCs)는 본 발명의 일부 구체예에 따른 기억 T 세포의 집단으로부터 Tcm 세포의 생성에 사용할 준비가 된다.

[0172] 본 발명의 Tcm 세포는 전형적으로 IL-21가 보충된 배양에서(예를 들어, 다른 사이토카인이 없는 배양에서, 즉, 임의의 부가적인 사이토카인의 첨가 없이) 항원 또는 항원들과 기억 T 세포의 집단을 먼저 접촉시켜 생성된다. 이 단계는 전형적으로 약 12-24 시간, 약 12-36 시간, 약 12-72 시간, 12-96 시간, 12-120 시간, 약 24-36 시간, 약 24-48 시간, 약 24-72 시간, 약 36-48 시간, 약 36-72 시간, 약 48-72 시간, 약 48-96 시간, 약 48-120 시간, 0.5-1 일, 0.5-2 일, 0.5-3 일, 0.5-5 일, 1-2 일, 1-3 일, 1-5 일, 1-7 일, 1-10 일, 2-3 일, 2-4 일, 2-5 일, 2-6 일, 2-8 일, 3-4 일, 3-5 일, 3-7 일, 4-5 일, 4-8 일, 5-7 일, 6-8 일 또는 8-10 일 동안 실시되고, 그리하여 항원 반응성 세포를 증폭(enrichment)시킬 수 있다.

[0173] 특정 구체예에 따르면, IL-21이 보충된 배양(다른 사이토카인이 없는 배양)에서 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들(상기 기술된 바와 같은)과 접촉시키는 것은 1-5일 동안(예를 들어, 3일) 수행된다.

[0174] IL-21이 보충된 배양에서 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들(상기 기술된 바와 같은)과 접촉시키는 것은 전형적으로 약 0.001-3000 IU/ml, 0.01-3000 IU/ml, 0.1-3000 IU/ml, 1-3000 IU/ml, 10-3000 IU/ml, 100-3000 IU/ml, 1000-3000 IU/ml, 0.001-1000 IU/ml, 0.01-1000 IU/ml, 0.1-1000 IU/ml, 1-1000 IU/ml, 10-1000 IU/ml, 100-1000 IU/ml, 250-1000 IU/ml, 500-1000 IU/ml, 750-1000 IU/ml, 10-500 IU/ml, 50-500 IU/ml, 100-500 IU/ml, 250-500 IU/ml, 100-250 IU/ml, 0.1-100 IU/ml, 1-100 IU/ml, 10-100 IU/ml, 30-100 IU/ml, 50-100 IU/ml, 1-50 IU/ml, 10-50 IU/ml, 20-50 IU/ml, 30-50 IU/ml, 1-30 IU/ml, 10-30 IU/ml, 20-30 IU/ml, 10-20 IU/ml, 0.1-10 IU/ml, 또는 1-10 IU/ml IL-21의 존재에서 시행된다. 특정 구체예에 따르면, IL-21의 농도는 50-500 IU/ml(예를 들어, 100 IU/ml)이다.

[0175] 특정 구체예에 따르면, 기억 T 세포의 집단을 항원 또는 항원들과 접촉시키는 것은 사이토카인이 없는 배양(예를 들어, 단지 IL-21만 보충됨)에서 수행되는데, 그러한 배양 조건은 이들 세포가 그들의 생존을 가능케 하는 사이토카인(예를 들어, IL-2)을 분비하므로(모든 나머지 세포들은 이들 배양 조건하에서 죽음) 항원 또는 항원들에 의해 자극 및 활성화를 겪는 단지 그들 세포의(즉, 항원 반응성 세포의) 생존 및 증폭을 가능케 한다.

[0176] 기억 T 세포에 대한 항원 또는 항원들(예를 들어, 항원이 펄스 된 수지상 세포와 같은 APCs에 제시된)의 비는 전형적으로 약 1:4, 약 1:5, 약 1:6, 약 1:8 또는 약 1:10과 같은 약 1:2 내지 약 1:10이다. 특정 구체예에 따르면, 기억 T 세포에 대한 항원 또는 항원들(예를 들어, APCs에 제시된)의 비는 약 1:2 내지 약 1:8 (예를 들어 1:5)이다.

[0177] 다음으로, Tcm 표현형을 포함하는 세포를 증식하기 위해 결과적인 기억 T 세포(즉, IL-21과의 배양 후)는 항원이 없는 환경에서(즉, 항원 또는 항원들의 첨가 없이) IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재에서 배양된다. 이 단계는 전형적으로 약 12-24 시간, 약 12-36 시간, 약 12-72 시간, 약 12-96 시간, 약 12-120 시간, 약 12-240 시간, 24-36 시간, 24-48 시간, 약 24-72 시간, 24-96 시간, 24-120 시간, 24-240 시간, 약 48-72 시간, 약 48-120 시간, 약 48-240 시간, 약 96-240 시간, 약 120-144 시간, 약 120-240 시간, 약 144-240 시간, 0.5-1 일, 0.5-2 일, 0.5-3 일, 0.5-5 일, 0.5-10 일, 1-2 일, 1-3 일, 1-4 일, 1-6 일, 1-8 일, 1-10 일, 1-15 일, 2-3 일, 2-4 일, 2-5 일, 2-6 일, 2-8 일, 2-10 일, 4-5 일, 4-6 일, 4-8 일, 4-10 일, 5-6 일, 5-7 일, 5-8 일, 5-10 일, 5-15 일, 6-7 일, 6-8 일, 6-10 일, 7-8 일, 7-9 일, 7-10 일, 7-13 일, 7-15 일, 8-10 일, 10-

12 일, 10-14 일, 12-14 일, 14-16 일, 14-18 일, 16-18 일 또는 18-20 일 동안 실시된다. 특정 구체예에 따르면, 결과적인 기억 T 세포(즉, IL-21과의 배양 후)는 항원이 없는 환경에서 약 4-8 일(예를 들어, 6일) 동안 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재에서 배양된다.

[0178] 이 단계는 전형적으로 약 0.001-3000 IU/ml, 0.01-3000 IU/ml, 0.1-3000 IU/ml, 1-3000 IU/ml, 10-3000 IU/ml, 100-3000 IU/ml, 1000-3000 IU/ml, 0.001-1000 IU/ml, 0.01-1000 IU/ml, 0.1-1000 IU/ml, 1-1000 IU/ml, 10-1000 IU/ml, 100-1000 IU/ml, 250-1000 IU/ml, 500-1000 IU/ml, 750-1000 IU/ml, 10-500 IU/ml, 50-500 IU/ml, 100-500 IU/ml, 250-500 IU/ml, 100-250 IU/ml, 0.1-100 IU/ml, 1-100 IU/ml, 10-100 IU/ml, 30-100 IU/ml, 50-100 IU/ml, 1-50 IU/ml, 10-50 IU/ml, 20-50 IU/ml, 30-50 IU/ml, 1-30 IU/ml, 10-30 IU/ml, 20-30 IU/ml, 10-20 IU/ml, 0.1-10 IU/ml, 또는 1-10 IU/ml IL-21 농도에서 IL-21의 존재에서 실시된다. 특정 구체예에 따르면, IL-21의 농도는 50-500 IU/ml(예를 들어, 100 IU/ml)이다.

[0179] 이 단계는 약 0.001-3000 IU/ml, 0.01-3000 IU/ml, 0.1-3000 IU/ml, 1-3000 IU/ml, 10-3000 IU/ml, 100-3000 IU/ml, 125-3000 IU/ml, 1000-3000 IU/ml, 0.001-1000 IU/ml, 0.01-1000 IU/ml, 0.1-1000 IU/ml, 1-1000 IU/ml, 10-1000 IU/ml, 100-1000 IU/ml, 125-1000 IU/ml, 250-1000 IU/ml, 500-1000 IU/ml, 750-1000 IU/ml, 10-500 IU/ml, 50-500 IU/ml, 100-500 IU/ml, 125-500 IU/ml, 250-500 IU/ml, 250-500 IU/ml, 125-250 IU/ml, 100-250 IU/ml, 0.1-100 IU/ml, 1-100 IU/ml, 10-100 IU/ml, 30-100 IU/ml, 50-100 IU/ml, 1-50 IU/ml, 10-50 IU/ml, 20-50 IU/ml, 30-50 IU/ml, 1-30 IU/ml, 10-30 IU/ml, 20-30 IU/ml, 10-20 IU/ml, 0.1-10 IU/ml, 또는 1-10 IU/ml IL-15의 농도에서 IL-15의 존재에서 추가로 실시된다. 특정 구체예에 따르면, IL-15의 농도는 50-500 IU/ml(예를 들어, 125 IU/ml)이다.

[0180] 이 단계는 약 0.001-3000 IU/ml, 0.01-3000 IU/ml, 0.1-3000 IU/ml, 1-3000 IU/ml, 10-3000 IU/ml, 30-3000 IU/ml, 100-3000 IU/ml, 1000-3000 IU/ml, 0.001-1000 IU/ml, 0.01-1000 IU/ml, 0.1-1000 IU/ml, 1-1000 IU/ml, 10-1000 IU/ml, 30-1000 IU/ml, 100-1000 IU/ml, 250-1000 IU/ml, 500-1000 IU/ml, 750-1000 IU/ml, 10-500 IU/ml, 30-500 IU/ml, 50-500 IU/ml, 100-500 IU/ml, 250-500 IU/ml, 100-250 IU/ml, 0.1-100 IU/ml, 1-100 IU/ml, 10-100 IU/ml, 30-100 IU/ml, 50-100 IU/ml, 1-50 IU/ml, 10-50 IU/ml, 20-50 IU/ml, 30-50 IU/ml, 1-30 IU/ml, 10-30 IU/ml, 20-30 IU/ml, 10-20 IU/ml, 0.1-10 IU/ml, 또는 1-10 IU/ml IL-7의 농도에서 IL-7의 존재에서 추가로 실시된다. 특정 구체예에 따르면, IL-7의 농도는 1-100 IU/ml(30 IU/ml)이다.

[0181] 남아있는 항원 또는 항원들은 IL-21과의 배양 후(즉, 예를 들어, IL-21, IL-15 및 IL-7의 첨가를 포함하는 Tcm 증식 단계에서) 세포 배양에서 제시될 수 있고, 따라서, 항원이 없는 환경은 보충 항원 또는 항원들의 첨가 없는 세포 배양과 관련되는 것으로 이해될 것이다.

[0182] 본 교시에 따라 실시될 수 있는 추가 단계는 결과적인 기억 T 세포(즉, IL-21과의 배양 후)를 항원 또는 항원들과 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재에서 배양하는 것을 포함한다(즉, 항원이 없는 환경을 만들기 전에). 이 단계는 전형적으로 약 12-24 시간, 약 12-36 시간, 약 12-72 시간, 24-48 시간, 24-36 시간, 약 24-72 시간, 약 48-72 시간, 1-2 일, 2-3 일, 1-3 일, 2-4 일, 1-5 일 또는 2-5 일 동안 실시되며, 상기 언급된 동일한 양의 IL-21, IL-15 및 IL-7에서 수행된다. 특정 구체예에 따르면, IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재에서 기억 세포를 항원 또는 항원들과 배양하는 것은 12시간 내지 4일(예를 들어, 1-2 일) 동안 실시된다. 일 구체예에 따르면, Tcm 세포를 생성하는 시간의 총 길이는 약 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일(예를 들어, 9일)이다.

[0183] 본 교시에 따라 실시될 수 있는 추가 단계는 활성화된 세포의 선별 및 제거를 포함한다. 그러한 선별 단계는 잠재적 숙주 반응성 T 세포의 제거를 돕는다.

[0184] 활성화된 세포를 분리하는 것은 2단계 접근법으로 실시될 수 있다. 제1단계에서, 활성화된 세포는 IL-21, IL-15 및 IL-7의 존재에서 세포를 배양하기 전에 선별된다. 이 제1단계는 전형적으로 기억 T 세포를 IL-21의 존재에서 항원 또는 항원들과 초기에 접촉시킨 후 실시된다. 이 선별 공정은 항원 또는 항원들에 의해 활성화된(예를 들어, 아래 기술된 활성화 마커를 발현하는) 그들 세포만을 선발하며, 전형적으로 기억 T 세포를 항원 또는 항원들과 초기에 접촉시킨 후 약 12-24 시간, 약 24-36 시간, 약 12-36 시간, 약 36-48 시간, 약 12-48 시간, 약 48-60 시간, 약 12-60 시간, 약 60-72 시간, 약 12-72 시간, 약 72-84 시간, 약 12-84 시간, 약 84-96 시간, 약 12-96 시간 수행된다. 특정 구체예에 따르면, 선별 공정은 기억 T 세포를 항원 또는 항원들과 초기에 접촉시킨 후 약 12-24 시간(예를 들어, 14시간) 수행된다.

[0185] 활성화된 세포를 분리하는 것은 친화도 기반 정제(예를 들어, MACS 비드, FACS 소터 및/또는 캡쳐 ELISA 표지화의 사용에 의해서와 같이)에 의해 수행될 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137와

같은 세포 표면 마커, 또는 이에 제한되지는 않으나 IFN-γ 및 IL-2와 같은 비-세포 표면 마커를 포함한 임의의 활성화 마커에 대해 수행될 수 있다. 또한, 활성화된 세포를 분리하는 것은 종래기술에 공지된 임의의 방법(예를 들어, FACS에 의해)을 사용한 형태학 기반 정제(예를 들어, 거대 세포의 분리)에 의해 수행될 수 있다. 전형적으로, 활성화된 세포는 또한 $CD8^+$ 세포의 발현을 위해 선별된다. 게다가, 활성화된 세포를 효율적으로 분리하기 위해 상기 방법들의 임의의 조합이 사용될 수 있다.

[0186] 본 발명의 구체예에 따르면, 활성화된 세포에 대한 선별은 CD137+ 및/또는 CD25+ 세포의 선별에 의해 수행된다.

[0187] 활성화된 세포의 분리의 제2단계는 전형적으로 배양 말기에 실시된다(즉, IL-21, IL-15 및 IL-7과의 항원 없는 환경에서 배양한 후). 이 단계는 중심 기억 T-림프구(Tcm)을 방사선 조사된 숙주 항원 제시 세포(APCs, 예를 들어, 수지상 세포)를 접촉시킨 후에 활성화된 그들 세포를 제거하여 동종반응성 세포를 제거한다. 상기 언급된 바와 같이, 활성화된 세포를 분리하는 것은 친화도 기반 정제(예를 들어, MACS 비드, FACS 소터 및/또는 캡쳐 ELISA 표지화의 사용에 의해서와 같이)에 의해 수행될 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 CD69, CD44, CD25, CFSE, CD137와 같은 세포 표면 마커, 또는 이에 제한되지는 않으나 IFN-γ 및 IL-2와 같은 비-세포 표면 마커를 포함한 임의의 활성화 마커에 대해 수행될 수 있다.

[0188] 본 발명의 구체예에 따르면, 동종반응성 세포를 제거하는 것은 CD137+ 및/또는 CD25+ 세포의 제거에 의해 수행된다.

[0189] 본 발명의 구체예에 따르면, 동종반응성 세포를 제거하는 것은 Tcm 세포를 방사선 조사된 숙주 항원 제시 세포(APCs, 예를 들어, 수지상 세포)와 배양 개시(즉, 기억 T 세포를 항원 또는 항원들과 배양의 첫날이 되는 0일)로부터 예를 들어, 12-24 시간(예를 들어, 16시간) 약 6-9 일(예를 들어, 8일) 동안 배양하여 수행된다.

[0190] 일 구체예에 따르면, 활성화된 세포의 분리는 상기 토론된 제1단계의 이용에 의해서만 실시된다.

[0191] 다른 구체예에 따르면, 활성화된 세포의 분리는 상기 토론된 제2단계의 이용에 의해서만 실시된다.

[0192] 일 구체예에 따르면, 본 발명의 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 갖는 비-GvHD 유도 세포는 자연적으로 발생하지 않으며, 자연의 산물이 아니다. 이들 세포는 전형적으로 엑스-비보 조작(ex-vivo manipulation)(즉, 특정 사이토카인의 존재에서 항원 또는 항원들에 노출)에 의해 생산된다.

[0193] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 생성 방법이 제공되고, 상기 세포는 거부 세포(veto cell)이고/이거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로 회귀(homing) 할 수 있으며, 상기 방법은

[0194] (a) 비부착성 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약으로 처리하여 $CD45RA^-CD8^+$ 표현형을 포함하는 기억 T 세포의 집단을 얻는 단계;

[0195] (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및

[0196] (c) 상기 단계 (b)로부터 얻어진 상기 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하여 Tcm 표현형을 포함하는 세포를 증식시켜 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 단계를 포함한다.

[0197] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 중심 기억 T-림프구(Tcm) 표현형을 포함하는 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 생성 방법이 제공되고, 세포는 거부 세포(veto cell)이고/이거나 항-질병 활성이 부여된 것이고, 이식 후 림프절로 회귀(homing) 할 수 있으며, 상기 방법은

[0198] (a) 비부착성 말초혈액단핵구(PBMCs)를 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거할 수 있는 시약으로 처리하여 $CD45RA^-CD8^+$ 표현형을 포함하는 기억 T 세포의 집단을 얻는 단계;

[0199] (b) 상기 기억 T 세포의 집단을 IL-21의 존재 하에서 바이러스 항원 또는 항원들과 접촉시켜 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및

[0200] (c) 상기 단계 (b)로부터 얻어진 상기 세포를 IL-21, IL-15 및/또는 IL-7의 존재 하에서 배양하여 Tcm 표현형을 포함하는 세포를 증식시켜 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하는 단계를 포함한다.

[0201] 일 구체예에 따르면, 항원 또는 항원들에 특이적인 기억 T 세포를 얻기 위해, 그것으로부터 기억 T 세포를 얻기

전(예를 들어, 적어도 70% 기억 T 세포의 집단을 제공하기 전)에 기억 T 세포 공여자에 항원/항원들(예를 들어, 종양 항원, 바이러스 항원)이 투여된다. 면역원성 반응(예를 들어, 기억 T 세포의 생성)을 유도하기 위해 항원에 대해 세포 공여자를 면역화하는 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0202] 항원은 그대로 또는 어쥬번트(예를 들어, Complete Freund's adjuvant(CFA) 또는 Incomplete Freund's adjuvant(IFA))를 포함하는 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 일 구체예에 따르면, 항원은 기억 T 세포 공여자에 한번 투여된다. 일 구체예에 따르면, 기억 T 세포 공여자는 항원의 적어도 한번 추가(예를 들어, 부스트) 투여(예를 들어, 2, 3, 4 또는 그 이상의 투여)를 받는다. 그러한 추가 투여는 항원의 첫 투여 후 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 21, 30일 또는 그 이상 수행될 수 있다.

[0203] 본 발명의 일부 구체예와 사용될 수 있는 종양 항원으로 대상체를 면역화하는 추가의 방법들(예를 들어, 펩타이드-특이적인 DC 백신, 백신화를 위한 백혈병-유래 DCs를 이용한 정의되지 않은 에피토프에 대한 DC 백신과 같은 세포 기반 백신, GVAX 플랫폼)은 참고문헌으로 여기에 포함된 Alatrash G. and Molldrem J., *Expert Rev Hematol.* (2011) 4(1): 37-50에 기술되어 있다.

[0204] 특정 항원/항원들에 대해 기억 T 세포를 추가로 증폭하기 위해 및 기억 T 세포 풀로부터 동종반응성 클론을 제거하기 위해, 상기 기술된 바와 같이, 기억 T 세포를 동일한 항원 또는 항원들(예를 들어, 세포 공여자에 투여되는 것과 같은 항원)과 추가로 접촉시킬 수 있다.

[0205] 상기 기술된 프로토콜은 전형적으로 비-동계(non-syngeneic) 적용에 사용되며, 그러므로 사용된 기억 T 세포 또는 PBMC는 전형적으로 대상체(예를 들어, 동종이형 공여자 유래)에 대해 동종이형이다. 마찬가지로, 이종이형(xenogeneic) 적용이 유익할 수 있는 경우, 사용된 기억 T 세포 또는 PBMC는 아래 토론되는 이종이형 기원의 것일 수 있다.

[0206] 그러나 이종이형 적용이 유익할 수 있는 경우, 사용된 기억 T 세포 또는 PBMC는 대상체(예를 들어, 대상체 유래)에 대해 자가일 수 있다. 그러한 결정은 특히 제공된 개시물의 관점에서 당업자의 능력 내에 있다.

[0207] 따라서, 언급된 바와 같이, 기억 T 세포 또는 PBMC는 대상체에 대해 동계 또는 비-동계일 수 있다.

[0208] 본 명세서에 사용된 용어 "동계" 세포는 본질적으로 유전적으로 대상체 또는 본질적으로 대상체의 모든 림프구와 동일한 세포를 지칭한다. 동계 세포의 예시는 대상체(종래기술에서는 "자가"로도 지칭됨), 대상체의 복제(clone) 또는 대상체의 일란성 쌍둥이에서 유래한 세포를 포함한다.

[0209] 본 명세서에 사용된 용어 "비-동계" 세포는 본질적으로 유전적으로 대상체 또는 본질적으로 대상체의 모든 림프구와 동일하지 않은 세포, 예컨대, 동종이형 세포 또는 이종이형 세포를 지칭한다.

[0210] 본 명세서에 사용된 용어 "동종이형"은 대상체와 같은 종의 공여자에서 유래한 세포를 지칭하지만, 실질적으로 대상체의 비-복제성이다. 전형적으로, 같은 종의 비근교계, 비-접합 쌍둥이 포유동물은 서로 동종이형이다. 동종이형 세포가 대상체에 대해 HLA 동일, 특히 HLA 동일 또는 HLA 비-동일(즉, 하나 이상이 HLA 결정기를 표시하는)할 수 있음을 이해할 것이다.

[0211] 일 구체예에 따르면, 세포 공여자는 인간이다.

[0212] 본 명세서에 사용된 용어 "이종이형"은 대상체의 림프구의 실질적인 비율의 종에 대해 다른 종의 항원들을 실질적으로 발현하는 세포를 지칭한다. 전형적으로 다른 종의 비근교계 포유동물은 서로 이종이형이다.

[0213] 본 발명은 이종이형 세포가 다양한 종에서 유래하는 것을 구상한다. 따라서, 일 구체예에 따르면, 세포는 임의의 포유동물에서 유래할 수 있다. 세포에 적당한 종 기원은 주요 가축화된 또는 가축 동물 및 영장류를 포함한다. 그러한 동물은 이에 제한되지는 않으나, 돼지과(예를 들어, 돼지), 소과(예를 들어, 젖소), 말과(예를 들어, 말), 양과(예를 들어, 염소, 양), 고양이과(예를 들어, 집고양이(*Felis domestica*)), 개과(예를 들어, 개(*Canis domestica*)), 설치류(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 기니아피그, 저빌, 햄스터) 및 영장류(예를 들어, 침팬지, 붉은털원숭이, 일본원숭이, 마모셋)을 포함한다.

[0214] 이종이형 기원의 세포(예를 들어, 돼지과 기원)는 바람직하게는 돼지 내인성 레트로바이러스와 같은 인수공통전염병이 없는 것으로 알려진 출처로부터 얻는다. 유사하게, 인간-유래 세포 또는 조직은 바람직하게는 실질적으로 병원균이 없는 출처로부터 얻는다.

[0215] 따라서, 기억 T 세포 또는 PBMCs의 출처는 세포의 의도된 용도와 관련하여 결정될 것이며(이후의 추가 세부사항

참조), 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시에 비추어 당업자의 능력 내에 있다.

[0216] 베토 세포의 이용은 동종이형 또는 이종이형 세포 또는 조직의 이식에서와 같이 이식편 거부를 제거하고 이식편 대숙주질환(GvHD)을 극복할 필요가 있는 상황에서 특히 유익하다.

[0217] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 베토 세포는 항-질병 활성을 추가로 가지며, 그리하여 대상체, 예를 들어 이식된 대상체가 이식 전 또는 후(예를 들어, 면역 재구성이 확립되기 전에), 질환 또는 증상(예를 들어, 악성, 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 자가면역 또는 동종이형 질환 또는 증상)를 갖는 상황에서 유익하다.

[0218] 따라서, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 이를 필요로 하는 대상체에서의 질환의 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 치료적 유효량의 본 발명의 일부 구현예들의 비-GvHD 유도 세포(예를 들어, Tcm 세포)의 단리된 집단을 대상체에게 투여하여 대상체에서 질환을 치료하는 것을 포함한다.

[0219] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 대상체의 치료 방법이 제공되며, 상기 방법은 (a) 세포 또는 조직 이식물을 대상체에게 이식하는 단계; 및 (b) 치료적 유효량의 본 발명의 일부 구현예들의 비-GvHD 유도 세포 (예를 들어, Tcm 세포)의 단리된 집단을 대상체에게 투여하여 세포 또는 조직 이식을 필요로 하는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.

[0220] 본 명세서에 사용된 용어 "치료"는 증상의 진행을 억제, 실질적으로 억제, 지연 또는 역전, 증상의 임상적 또는 심미적 징후를 실질적으로 개선 또는 증상의 임상적 또는 심미적 징후의 출현을 실질적으로 예방하는 것을 포함한다.

[0221] 본 명세서에 사용된 용어 "대상체" 또는 "이를 필요로 하는 대상체"는 세포 또는 조직 이식을 필요로 하거나 Tcm 세포가 처리될 수 있는 질환을 앓고 있는 포유동물, 바람직하게는 임의의 연령의 인간 남성 또는 여성을 지칭한다. 전형적으로 대상체는 세포 또는 조직 이식을 통해 치료가 가능한 장애 또는 병리학적 또는 원치 않은 증상, 상태, 또는 징후, 또는 물리적, 형태학적 또는 생리학적 이상으로 인해 세포 또는 조직 이식을 필요로 한다(본 명세서에서 수혜자로도 지칭됨). 그러한 장애의 예시는 아래 추가로 제공된다.

[0222] 본 명세서에 사용된 용어 "치료적 유효량"은 내성(즉, 베토 효과), 항-질병 효과, 항-종양 효과 및/또는 GvHD 유도 없는 면역 재구성에 효과적인 Tcm 세포의 양이다. 본 발명의 Tcm 세포는 이식 후 림프절로 회귀(homing)하기 때문에, 세포의 유익한 효과(들)(예를 들어, 내성, 항-질병, 항-종양 효과 및/또는 면역 재구성)을 달성하는데 더 적은 양의 세포(이전에 사용된 세포의 투여량과 비교하여, 예를 들어, WO 2001/049243 참조)가 필요할 수 있다. 본 발명의 Tcm 세포와 함께 더 적은 수준의 면역억제 약물(아래 토론됨)이 필요할 수 있는 것으로(예를 들어, 치료 프로토콜에서 라파마이신의 배제) 이해될 것이다.

[0223] 치료적 유효량의 결정은 특히 본 명세서에 제공된 상세한 개시에 비추어 당업자의 능력 내에 있다.

[0224] 본 발명의 방법들에 사용된 임의의 조제품에 대해, 치료적 유효량 또는 투여량은 인 비트로 및 세포 배양 어세이로부터 초기에 추정될 수 있다. 예를 들어, 투여량은 원하는 농도 또는 역가를 달성하기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.

[0225] 예를 들어, 세포 이식의 경우, 수혜자에 주입된 Tcm 세포의 수는 1×10^4/Kg 체중 이상이어야 한다. 수혜자에 주입된 Tcm 세포의 수는 전형적으로 1×10^3 /Kg 체중 내지 1×10^4 /Kg 체중, 1×10^4 /Kg 체중 내지 1×10^5 /Kg 체중, 1×10^4 /Kg 체중 내지 1×10^6 /Kg 체중, 1×10^4 /Kg 체중 내지 10×10^7 /Kg 체중, 1×10^4 /Kg 체중 내지 1×10^8 /Kg 체중, 1×10^3 /Kg 체중 내지 1×10^5 /Kg 체중, 1×10^4 /Kg 체중 내지 1×10^6 /Kg 체중, 1×10^6 /Kg 체중 내지 10×10^7 /Kg 체중, 1×10^5 /Kg 체중 내지 10×10^7 /Kg 체중, 1×10^6 /Kg 체중 내지 1×10^8 /Kg 체중이어야 한다. 특정 구체예에 따르면, 수혜자에 주입된 Tcm 세포의 수는 1×10^5 /Kg 체중 내지 10×10^7 /Kg 체중이어야 한다.

[0226] 따라서, 본 발명의 방법은 임의의 질환, 예컨대, 이에 제한되지는 않으나, 악성 질환, 이식편의 이식과 연관된 질환(예를 들어, 이식편 거부, 이식편대숙주 질환), 감염성 질환(예를 들어, 바이러스성 질환, 곰팡이성 질환 또는 박테리아성 질환), 염증성 질환, 자가면역 질환 및/또는 알레르기 질환 또는 증상을 치료하는데 적용될 수 있다.

[0227] 일 구체예에 따르면, 대상체는 악성 질환을 갖는다.

[0228] 악성 질환(또한, 암으로 지칭됨)은 임의의 고형 또는 비-고형 종양 및/또는 종양 전이일 수 있다.

[0229] 암의 예시는 이에 제한되지는 않으나, 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함한다. 그러한 암의 보다 구체적인 예시는 편평세포암, 연-조직 육종, 카포시 육종, 흑색종, 폐암(소-세포 폐암, 비-소-세포 폐암, 폐의 선암 및 폐의 편평상피암종을 포함), 복막의 암, 간세포성 암, 위 또는 위장 암(위장관암 포함), 췌장암, 아교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 대장암, 결장 직장암(colorectal cancer), 직장암, 자궁내막 또는 자궁암종, 직장유암종, 침샘암종, 신장 또는 신장부암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간암종, 중피종, 다발성 골수종, 후 림프증식성 질환(PTLD), 및 다양한 유형의 두경부암(예를 들어, 뇌종양)을 포함한다. 본 발명의 치료에 따르는 암의 증상은 전이성 암을 포함한다.

[0230] 일 구체예에 따르면, 악성 질환은 혈액학적 악성종양이다. 예시적인 혈액학적 악성종양은 이에 제한되지는 않으나, 백혈병[예를 들어, 급성 림프구성, 급성 림프아구성, 급성 림프아구성성 전-B 세포성, 급성 림프아구성 T 세포 백혈병, 급성-거대핵세포성, 단핵구성, 급성 골수성(myelogenous), 급성 골수성(myeloid), 호산구증이 있는 급성 골수성 (myeloid), B 세포성, 호염기성, 만성 골수성, 만성 B 세포, 호산성, 프리엔드, 과립성 또는 골수성(myelocytic), 모양세포성, 림프구성, 거대핵세포성, 단핵구성, 단핵구-대식세포성, 골수모세포성, 골수성(myeloid), 골수단핵구성, 혈장세포성, 전-B 세포성, 전골수세포성, 아급성, T 세포성, 림프증식성, 골수성 악성종양에 걸리기 쉬운 소인, 급성 비림프구성 백혈병, T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL) 및 B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-CLL)] 및 림프종[예를 들어, 낮은 등급/소포성을 포함하여, 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 버킷(Burkitt), 피부 T 세포, 조직구성, 림프아구성, T 세포성, 흉선성, B 세포성; 소 림프구성(SL) NHL; 중간 등급/소포성 NHL; 중간 등급의 확산성 NHL; 높은 등급의 면역아구성 NHL; 높은 등급의 림프아구성 NHL; 높은 등급의 작은 비-절단 세포 NHL; 벌키 질환 NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증]을 포함한다.

[0231] 특정 구체예에 따르면, 악성 질환은 백혈병, 림프종, 골수종, 육종, 신경모세포종, 대장암, 결장암, 유방암, 난소암, 식도암, 활액막세포암, 간암 및 췌장암이다.

[0232] 일 실시예에 따르면, 상기 대상체는 비-악성 질환을 가진다.

[0233] 일 실시예에 따르면, 상기 비-악성 질환은 장기 기능 부전 또는 장해, 혈액학적 질환, 이식편 관련 질환, 감염성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 알레르기, 외상 및 상해이다.

[0234] **염증성 질환들** - 만성 염증성 질환 및 급성 염증성 질환을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0235] **과민반응과 관련된 염증성 질환들**

[0236] 과민반응의 예로는 제 1형 과민반응, 제 2형 과민반응, 제 3형 과민반응, 제4형 과민반응, 즉시 과민반응, 항체 관련 과민반응, 면역 복합체 관련 과민반응, T 림프구 관련 과민반응 및 DTH를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0237] 천식과 같은 제 1형 또는 즉시 과민반응

[0238] 제 2형 과민반응은 류마티스 질환(rheumatoid diseases), 류마티스성 자가 면역 질환(rheumatoid autoimmune diseases), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) (Krenn V. *et al.,* Histol Histopathol 2000 Jul;15 (3):791), 척추염(spondylitis), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis) (Jan Voswinkel *et al.,* Arthritis Res 2001; 3 (3): 189), 전신 질환(systemic diseases), 전신성 자가면역 질환(systemic autoimmune diseases), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus) (Erikson J. *et al.,* Immunol Res 1998;17 (1-2):49), 경화증(sclerosis), 전신 경화증(systemic sclerosis) (Renaudineau Y. *et al.,* Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156); Chan OT. *et al.,* Immunol Rev 1999 Jun;169:107), 선상 질환(glandular diseases), 선상 자가면역 질환(glandular autoimmune diseases), 췌장성 자가면역 질환(pancreatic autoimmune diseases), 당뇨(diabetes), 제 1형 당뇨(Type I diabetes) (Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125), 갑상선 질환(thyroid diseases), 갑상선 자가면역 질환(autoimmune thyroid diseases), 그래이브 질환(Graves' disease) (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339), 갑상선염(thyroiditis), 자발성 자가면역 갑상선염(spontaneous autoimmune thyroiditis) (Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262), 하시모토 병(Hashimoto's thyroiditis) (Toyoda N. *et al.,* Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810), 점액수종(myxedema), 특발성 점액수종(idiopathic myxedema) (Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (8):1759); 자가면역 생식기 질환(autoimmune

reproductive diseases), 난소 질환(ovarian diseases), 난소 자가면역 질환(ovarian autoimmunity) (Garza KM. *et al.,* J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87), 자가면역 항-정자 불임(autoimmune anti-sperm infertility) (Diekman AB. *et al.,* Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134), 반복적 유산(repeated fetal loss) (Tincani A. *et al.,* Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9), 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases), 신경 질환(neurological diseases), 신경성 자가면역 질환(neurological autoimmune diseases), 다발성 경화증(multiple sclerosis) (Cross AH. *et al.*, J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1), 알츠하이머(Alzheimer's disease) (Oron L. *et al.,* J Neural Transm Suppl. 1997;49:77), 중증근무력증(myasthenia gravis) (Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83), 운동신경병질(motor neuropathies) (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191), 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 신경통(neuropathies) 및 자가면역 신경통(autoimmune neuropathies) (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234), 근염증(myasthenic diseases), 람베르-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome) (Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204), 방종양성 신경질환(paraneoplastic neurological diseases), 소뇌위축증(cerebellar atrophy), 방종양성 소뇌위축증(paraneoplastic cerebellar atrophy), 비-방종양성 강직인간증후군(non-paraneoplastic stiff man syndrome), 소뇌위축증(cerebellar atrophies), 진행성 소뇌위축증(progressive cerebellar atrophies), 뇌염(encephalitis), 라스무센뇌염(Rasmussen's encephalitis), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 시데남무도병(Sydenham chorea), 질레 드라 뚜렛 증후군(Gilles de la Tourette syndrome), 다발성 내분비병증(polyendocrinopathies), 자가면역 내분비병증(autoimmune polyendocrinopathies) (Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23); 신경통(neuropathies), 염증성 신경통(dysimmune neuropathies) (Nobile-Orazio E. *et al.,* Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419); 신경근긴장증(neuromyotonia), 후천적 신경근 긴장증(acquired neuromyotonia), 선천성 다발관절만곡증(arthrogryposis multiplex congenital) (Vincent A. *et al.,* Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482), 심혈관질환(cardiovascular diseases), 심혈관 자가면역 질환(cardiovascular autoimmune diseases), 죽상동맥경화증(atherosclerosis) (Matsuura E. *et al.,* Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135), 심근경색증(myocardial infarction) (Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132), 혈전증(thrombosis) (Tincani A. *et al.,* Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9), 육아종성 림프종(granulomatosis), 베게너 육아종성 림프종(Wegener's granulomatosis), 동맥염(arteritis), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis) 및 카와사키 증후군(Kawasaki syndrome) (Praprotnik S. *et al.,* Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112 (15-16):660); anti-factor VIII autoimmune disease (Lacroix-Desmazes S. *et al.,* Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157); 맥관염(vasculitises), 괴사성 소혈관 맥관염(necrotizing small vessel vasculitises), 현미경적 다발혈관염(microscopic polyangiitis), 처그 스트라우스 증후군(Churg and Strauss syndrome), 사구체신염(glomerulonephritis), 파우치-면역 초점 괴사성 사구체신염(pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis), 초승달 사구체신염(crescentic glomerulonephritis) (Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151 (3):178); 항인지질항체 증후군(antiphospholipid syndrome) (Flamholz R. *et al.,* J Clin Apheresis 1999;14 (4):171); 심부전(heart failure), 심부전에서 길항제 유사 베타-아드레날린 수용체 항체(agonist-like b-adrenoceptor antibodies) (Wallukat G. *et al.,* Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H), 혈소판감소성자반병(thrombocytopenic purpura) (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14 (2):114); 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia) (Efremov DG. *et al.,* Leuk Lymphoma 1998 Jan;28 (3-4):285), 위장 질환(gastrointestinal diseases), 위장관 자가면역 질환(autoimmune diseases of the gastrointestinal tract), 장 질환(intestinal diseases), 만성 염증성 장 질환(chronic inflammatory intestinal disease) (Garcia Herola A. *et al.,* Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23 (1):16), 셀리악병(celiac disease) (Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138 (2):122), 근조직 자가면역 질환(autoimmune diseases of the musculature), 근염(myositis), 자가면역 근염(autoimmune myositis), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome) (Feist E. *et al.,* Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92); 평활근 자가면역 질환(smooth muscle autoimmune disease) (Zauli D. *et al.,* Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234), 간질환(hepatic diseases), 간 자가면역 질환(hepatic autoimmune diseases), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis) (Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326) 및 원발성 담즙성 간경화(primary biliary cirrhosis) (Strassburg CP. *et al.,* Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11 (6):595)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0239] 제 4형 또는 T 세포 관련 과민반응은 류마티스 질환(rheumatoid diseases), 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) (Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Jan 18;91 (2):437), 전신 질환(systemic

diseases), 전신 자가면역 질환(systemic autoimmune diseases), 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus) (Datta SK., Lupus 1998;7 (9):591), 선상 질환(glandular diseases), 선상 자가면역 질환(glandular autoimmune diseases), 췌장 질환(pancreatic diseases), 췌장성 자가면역 질환(pancreatic autoimmune diseases), 제 1형 당뇨병(Type 1 diabetes) (Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647); 갑상선 질환(thyroid diseases), 자가면역 갑상선 질환(autoimmune thyroid diseases), 그래이브 질환(Graves' disease) (Sakata S. *et al.,* Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92 (1):77); 난소 질환(ovarian diseases) (Garza KM. *et al.,* J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87), 전립선염(prostatitis), 자가면역 전립선염(autoimmune prostatitis) (Alexander RB. *et al.,* Urology 1997 Dec;50 (6):893), 다발성 증후군(polyglandular syndrome), 자가면역 다발성 증후군(autoimmune polyglandular syndrome), 제 1형 자가면역 다발성 증후군(Type I autoimmune polyglandular syndrome) (Hara T. *et al.,* Blood. 1991 Mar 1;77 (5):1127), 신경 질환(neurological diseases), 자가면역 신경 질환(autoimmune neurological diseases), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 신경통(neuritis), 시신경염(optic neuritis) (Soderstrom M. *et al.,* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544), 중증근무력증(myasthenia gravis) (Oshima M. *et al.,* Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563), 강직 인간 증후군(stiff-man syndrome) (Hiemstra HS. *et al.,* Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Mar 27;98 (7):3988), 심혈관 질환(cardiovascular diseases), 샤가스 질환의 심장 자가면역(cardiac autoimmunity in Chagas' disease) (Cunha-Neto E. *et al.,* J Clin Invest 1996 Oct 15;98 (8):1709), 자가면역 혈소판 감소 자반병(autoimmune thrombocytopenic purpura) (Semple JW. *et al.,* Blood 1996 May 15;87 (10):4245), 항-헬퍼 T 림프구 자가면역(anti-helper T lymphocyte autoimmunity) (Caporossi AP. *et al.,* Viral Immunol 1998;11 (1):9), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia) (Sallah S. *et al.,* Ann Hematol 1997 Mar;74 (3):139), 간 질환(hepatic diseases), 간 자가면역 질환(hepatic autoimmune diseases), 간염(hepatitis), 만성 활동성 간염(chronic active hepatitis) (Franco A. *et al.*, Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54 (3):382), 담즙성 간경화(biliary cirrhosis), 원발성 담즙성 간경화(primary biliary cirrhosis) (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551), 신장 질환(nephric diseases), 신장 자가면역 질환(nephric autoimmune diseases), 신장염(nephritis), 간질성 신염(interstitial nephritis) (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140), 연결조직 질환(connective tissue diseases), 귀 질환(ear diseases), 자가면역 연결조직 질환(autoimmune connective tissue diseases), 자가면역 귀 질환(autoimmune ear disease) (Yoo TJ. *et al.*, Cell Immunol 1994 Aug;157 (1):249), 귀 내부 질환(disease of the inner ear) (Gloddek B. *et al.*, Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266), 피부 질환(skin diseases), 피부 질환(cutaneous diseases), 피부 질환(dermal diseases), 수포 피부 질환(bullous skin diseases), 심상성천포창(pemphigus vulgaris), 수포성 유사 천포창(bullous pemphigoid) 및 낙엽상천포창(pemphigus foliaceus)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0240] 지연형 과민반응의 예시로는 접촉성 피부염 및 약물 발진을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0241] T 림프구 관련 과민반응의 예시로는 헬퍼 T 림푸구 및 세포독성 T 림프구를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0242] 헬퍼 T 림프구 관련 과민반응의 예시로는 T_h1 림프구 관련 과민반응 및 T_h1 림프구 관련 과민반응을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0243] ***자가면역 질환***

[0244] 심혈관 질환, 류마티스 질환, 선상 질환, 위장 질환, 피부 질환, 간 질환, 신경 질환, 근 질환, 신장 질환, 생식 관련 질환, 연결 조직 질환 및 전신 질환을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0245] 자가면역 심혈관 질환의 예시로는 죽상경화증(atherosclerosis) (Matsuura E. *et al.,* Lupus. 1998;7 Suppl 2:S135), 심근경색증(myocardial infarction) (Vaarala O. Lupus. 1998;7 Suppl 2:S132), 혈전증(thrombosis) (Tincani A. *et al.,* Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 타카야수 동맥염(Takayasu's arteritis), 카와사키 증후군(Kawasaki syndrome) (Praprotnik S. *et al.,* Wien Klin Wochenschr 2000 Aug 25;112 (15-16):660), anti-factor VIII autoimmune disease (Lacroix-Desmazes S. *et al.,* Semin Thromb Hemost.2000;26 (2):157), 괴사성 소혈관 맥관염(necrotizing small vessel vasculitis), 현미경적 다발혈관염(microscopic polyangiitis), 처그 및 스트라우스 증후군(Churg and Strauss syndrome), 파우치-면역 초점 괴사성 및 초승달 사구체신염(pauci-immune focal necrotizing and crescentic glomerulonephritis) (Noel LH. Ann Med Interne (Paris). 2000 May;151 (3):178), 항인지질항체증후군(antiphospholipid syndrome) (Flamholz R. *et al.,* J Clin Apheresis 1999;14 (4):171), 항체 유도성 심부전

(antibody-induced heart failure) (Wallukat G. *et al.,* Am J Cardiol. 1999 Jun 17;83 (12A):75H), 혈소판 감소성 자반병(thrombocytopenic purpura) (Moccia F. Ann Ital Med Int. 1999 Apr-Jun;14 (2):114; Semple JW. *et al.,* Blood 1996 May 15;87 (10):4245), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia) (Efremov DG. *et al.,* Leuk Lymphoma 1998 Jan;28 (3-4):285; Sallah S. *et al.,* Ann Hematol 1997 Mar;74 (3):139), 샤가스 병에서 심장 자가면역(cardiac autoimmunity in Chagas' disease) (Cunha-Neto E. *et al.,* J Clin Invest 1996 Oct 15;98 (8):1709) 및 항-헬퍼 T 림프구 자가면역(anti-helper T lymphocyte autoimmunity) (Caporossi AP. *et al.,* Viral Immunol 1998;11 (1):9)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0246] 자가면역 류마티스 질환의 예시로는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis) (Krenn V. *et al.,* Histol Histopathol 2000 Jul;15 (3):791; Tisch R, McDevitt HO. Proc Natl Acad Sci units S A 1994 Jan 18;91 (2):437) 및 강직성 척추염(ankylosing spondylitis) (Jan Voswinkel *et al.,* Arthritis Res 2001; 3 (3): 189)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0247] 자가면역 선상 질환의 예시로는 췌장 질환(pancreatic disease), 제 1형 당뇨병(Type I diabetes), 갑상선 질환(thyroid disease), 그래이브 질환(Graves' disease), 갑상선염(thyroiditis), 자발적 자가면역 갑상선염(spontaneous autoimmune thyroiditis), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성 점액수종(idiopathic myxedema), 난소 자가면역(ovarian autoimmunity), 자가면역 항-정자 불임(autoimmune anti-sperm infertility), 자가면역 전립선염(autoimmune prostatitis) 및 제 1형 자가면역 다발성 증후군(Type I autoimmune polyglandular syndrome)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 질환들은 췌장의 자가면역 질환, 제 1형 당뇨병(Type 1 diabetes) (Castano L. and Eisenbarth GS. Ann. Rev. Immunol. 8:647; Zimmet P. Diabetes Res Clin Pract 1996 Oct;34 Suppl:S125), 자가면역 갑상선 질환(autoimmune thyroid diseases), 그래이브 질환(Graves' disease) (Orgiazzi J. Endocrinol Metab Clin North Am 2000 Jun;29 (2):339; Sakata S. *et al.,* Mol Cell Endocrinol 1993 Mar;92 (1):77), 자발적 자가면역 갑상선염(spontaneous autoimmune thyroiditis) (Braley-Mullen H. and Yu S, J Immunol 2000 Dec 15;165 (12):7262), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis) (Toyoda N. *et al.,* Nippon Rinsho 1999 Aug;57 (8):1810), 특발성 점액수종(idiopathic myxedema) (Mitsuma T. Nippon Rinsho. 1999 Aug;57 (8):1759), 난소 자가면역(ovarian autoimmunity) (Garza KM. *et al.,* J Reprod Immunol 1998 Feb;37 (2):87), 자가면역 항-정자 불임(autoimmune anti-sperm infertility) (Diekman AB. *et al.,* Am J Reprod Immunol. 2000 Mar;43 (3):134), 자가면역 전립선염(autoimmune prostatitis) (Alexander RB. *et al.,* Urology 1997 Dec;50 (6):893) 및 제1형 자가면역 다발성 증후군(Type I autoimmune polyglandular syndrome) (Hara T. *et al.,* Blood. 1991 Mar 1;77 (5):1127)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0248] 자가면역 위장질환의 예시로는 만성 연증성 장 질환(chronic inflammatory intestinal diseases) (Garcia Herola A. *et al.,* Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;23 (1):16), 셀리악 병(celiac disease) (Landau YE. and Shoenfeld Y. Harefuah 2000 Jan 16;138 (2):122), 대장염(colitis), 회장염(ileitis) 및 크론병(Crohn's disease)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0249] 자가면역 피부 질환의 예시로는 심상성천포창(pemphigus vulgaris), 수포성 유사 천포창(bullous pemphigoid) 및 낙엽상천포창(pemphigus foliaceus)과 같은 자가면역 수포성 피부 질환(autoimmune bullous skin diseases)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0250] 자가면역 간 질환의 예시로는 자가면역 만성 활성형 간염(autoimmune chronic active hepatitis) (Franco A. *et al.,* Clin Immunol Immunopathol 1990 Mar;54 (3):382), 원발성 담즙성 간경화(primary biliary cirrhosis) (Jones DE. Clin Sci (Colch) 1996 Nov;91 (5):551; Strassburg CP. *et al.,* Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Jun;11 (6):595) 및 자가면역 간염(autoimmune hepatitis) (Manns MP. J Hepatol 2000 Aug;33 (2):326)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0251] 자가면역 신경 질환의 예시로는 다발성 경화증(multiple sclerosis) (Cross AH. *et al.,* J Neuroimmunol 2001 Jan 1;112 (1-2):1), 알츠하이머(Alzheimer's disease) (Oron L. *et al.,* J Neural Transm Suppl. 1997;49:77), 중증근무력증(myasthenia gravis) (Infante AJ. And Kraig E, Int Rev Immunol 1999;18 (1-2):83; Oshima M. *et al.,* Eur J Immunol 1990 Dec;20 (12):2563), 신경염(neuropathies), 운동신경병질(motor neuropathies) (Kornberg AJ. J Clin Neurosci. 2000 May;7 (3):191); 길랭-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome) 및 자가면역 신경염(autoimmune neuropathies) (Kusunoki S. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):234), 근무력증(myasthenia), 람베르트-이튼 근무력 증후군(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)

(Takamori M. Am J Med Sci. 2000 Apr;319 (4):204); 방종양성 신경 질환(paraneoplastic neurological diseases), 소뇌위축증(cerebellar atrophy), 방종양성 소뇌위축증(paraneoplastic cerebellar atrophy) 및 강직 인간 증후군(stiff-man syndrome) (Hiemstra HS. *et al.,* Proc Natl Acad Sci units S A 2001 Mar 27;98 (7):3988); 비-방종양성 강직 인간 증후군(non-paraneoplastic stiff man syndrome), 진행성 소뇌위축증(progressive cerebellar atrophies), 뇌염(encephalitis), 라스무센뇌염(Rasmussen's encephalitis), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 시데남무도병(Sydenham chorea), 질레 드 라 뚜렛 증후군(Gilles de la Tourette syndrome) 및 자가면역 다발성 내분비병증(autoimmune polyendocrinopathies) (Antoine JC. and Honnorat J. Rev Neurol (Paris) 2000 Jan;156 (1):23); 염증성 신경통(dysimmune neuropathies) (Nobile-Orazio E. *et al.,* Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl 1999;50:419); 후천성 신경 섬유종(acquired neuromyotonia), 선천성 다발관절 만곡증(arthrogryposis multiplex congenital) (Vincent A. *et al.,* Ann N Y Acad Sci. 1998 May 13;841:482), 신경염(neuritis), 시신경염(optic neuritis) (Soderstrom M. *et al.,* J Neurol Neurosurg Psychiatry 1994 May;57 (5):544) 및 퇴행성 신경질환(neurodegenerative diseases)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0252] 자가면역 근 질환의 예시로는 근염(myositis), 자가면역 근염(autoimmune myositis) 및 원발성 쇼그렌 증후군(primary Sjogren's syndrome) (Feist E. *et al.,* Int Arch Allergy Immunol 2000 Sep;123 (1):92) 및 평활근 자가면역 질환(smooth muscle autoimmune disease) (Zauli D. *et al.,* Biomed Pharmacother 1999 Jun;53 (5-6):234)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0253] 자가면역 신장질환의 예시로는 신장염(nephritis) 및 자가면역 간질 신장염(autoimmune interstitial nephritis) (Kelly CJ. J Am Soc Nephrol 1990 Aug;1 (2):140)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0254] 생식과 관련된 자가면역 질환의 예시로는 반복 유산(repeated fetal loss) (Tincani A. *et al.,* Lupus 1998;7 Suppl 2:S107-9)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0255] 자가면역 연결 조직 질환의 예시로는 귀 질환(ear diseases), 자가면역 귀 질환(autoimmune ear diseases) (Yoo TJ. *et al.*, Cell Immunol 1994 Aug;157 (1):249) 및 귀 내부 자가면역 질환(autoimmune diseases of the inner ear) (Gloddek B. *et al.*, Ann N Y Acad Sci 1997 Dec 29;830:266)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0256] 자가면역 전신 질환의 예시로는 전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus) (Erikson J. *et al.,* Immunol Res 1998;17 (1-2):49) 및 전신 경화증(systemic sclerosis) (Renaudineau Y. *et al.,* Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Mar;6 (2):156); Chan OT. *et al.,* Immunol Rev 1999 Jun;169:107)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0257]

[0258] ***감염성 질환***

[0259] 감염성 질환의 예시로는 만성 감염성 질환(chronic infectious diseases), 아급성 감염성 질환(subacute infectious diseases), 급성 감염성 질환(acute infectious diseases), 바이러스 질환(viral diseases), 박테리아성 질환(bacterial diseases), 원충병(protozoan diseases), 기생병(parasitic diseases), 곰팡이성 질환(fungal diseases), 마이코플라즈마 질환(mycoplasma diseases) 및 프리온 질환(prion diseases)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0260] 본 발명의 가르침에 따라 치료가능한 감염성 질환을 야기하는 바이러스 병원균의 구체적인 형태들은 레트로바이러스(retroviruses), 써코바이러스(circoviruses), 파보바이러스(parvoviruses), 파포바바이러스(papovaviruses), 아데노바이러스(adenoviruses), 허페스바이러스(herpesviruses), 이리도바이러스(iridoviruses), 폭스바이러스(poxviruses), 헤파드나바이러스(hepadnaviruses), 피코마바이러스(picornaviruses), 칼리시바이러스(caliciviruses), 토가바이러스(togaviruses), 플라비바이러스(flaviviruses), 레오바이러스(reoviruses), 오르쏘마이옥소바이러스(orthomyxoviruses), 파라마이옥소바이러스(paramyxoviruses), 랍도바이러스(rhabdoviruses), 버니아바이러스(bunyaviruses), 코로나바이러스(coronaviruses), 아레나바이러스(arenaviruses) 및 필로바이러스(filoviruses)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0261] 본 발명의 가르침에 따라 치료될 수 있는 바이러스성 감염의 특정 예시로는 HIV(human immunodeficiency virus) 유래 후천성 면역 결핍증(AIDS), 인플루엔자(influenza), 리노바이러스성 감염(rhinoviral infection), 바이러

스성 수막염(viral meningitis), 엡스타인-바 바이러스성 감염(Epstein-Barr virus (EBV) infection), A형, B형 또는 C형 간염 바이러스성 감염(hepatitis A, B or C virus infection), 홍역(measles), 파필로마 바이러스성 감염/사마귀(papilloma virus infection/warts), 사이토메갈로바이러스성 감염(cytomegalovirus (CMV) infection), 헤르페스바이러스성 감염(Herpes simplex virus infection), 황열(yellow fever), 에볼라 바이러스성 감염(Ebola virus infection), 광견병(rabies), 아데노바이러스(Adenovirus (Adv)), 감기 바이러스(cold viruses), 플루 바이러스(flu viruses), 일본 뇌염(Japanese encephalitis), 소아마비(polio), 호흡기 세포융합(respiratory syncytial), 풍진(rubella), 천연두(smallpox), 수두 대상포진(varicella zoster), 로타바이러스(rotavirus), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus) 및 지카바이러스(zika virus)에 의해 야기되는 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0262] 본 발명의 가르침에 따라 치료될 수 있는 박테리아성 감염의 특정 예시로는 탄저병(anthrax); 그람 음성균(gram-negative bacilli), 클라미디아(chlamydia), 디프테리아(diptheria), 헤모필루스 인플루엔자(haemophilus influenza), 헬리코박터 파일로리(Helicobacter pylori), 말라리아(malaria), 결핵균(Mycobacterium tuberculosis), 백일해균 독소(pertussis toxin), 폐렴구균(pneumococcus), 리케차(rickettsiae), 포도상구균(staphylococcus), 연쇄상구균(streptococcus) 및 파상풍(tetanus)에 의해 야기되는 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0263] 본 발명의 가르침에 따라 치료될 수 있는 슈퍼버그 감염(예, 다중 약물 내성 박테리아)의 특정 예시로는 엔테로코커스 패시움(Enterococcus faecium), 글로스트리듐 디피실리균(Clostridium difficile), 아시네토박터 바우마니균(Acinetobacter baumannii), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 및 장내세균과(Enterobacteriaceae) (대장균(Escherichia coli), 폐렴간균(Klebsiella pneumoniae), 엔테로박터 종(Enterobacter spp.)을 포함하는)에 의해 야기되는 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0264] 본 발명의 가르침에 따라 치료될 수 있는 곰팡이 감염의 특정 예시로는 캔디다(candida), 코시디오데스(coccidiodes), 크립토코커스(cryptococcus), 히스토플라즈마(histoplasma), 레이쉬마니아(leishmania), 플라즈모디움(plasmodium), 원생동물(protozoa), 기생충(parasites), 주혈흡충(schistosomae), 백선(tinea), 톡소플라즈마(toxoplasma) 및 크루지 파동편모충(trypanosoma cruzi)에 의해 야기되는 감염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0265]

[0266] ***이식편 거부반응 질환***

[0267] 다른 구체예에 따르면, 상기 질환은 이식편의 이식과 관련된다. 이식편의 이식과 관련된 질환의 예시로는 이식편 거부반응(graft rejection), 만성 이식편 거부반응(chronic graft rejection), 아급성 이식편 거부반응(subacute graft rejection), 과잉예민성 이식편 거부반응(hyperacute graft rejection), 급성 이식편 거부반응(acute graft rejection), 동종이식편 거부반응(allograft rejection), 이종이식편 거부반응(xenograft rejection) 및 이식편대숙주질환(graft-versus-host disease (GVHD))을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0268] ***알레르기***

[0269] 알레르기의 예시로는 천식(asthma), 두드러기(hives), 두드러기(urticarial), 화분 알레르기(pollen allergy), 집먼지 진드기 알레르기(dust mite allergy), 독 알레르기(venom allergy), 화장품 알레르기(cosmetics allergy), 고무 알레르기(latex allergy), 화학물 알레르기(chemical allergy), 약물 알레르기(drug allergy), 곤충 물림 알레르기(insect bite allergy), 동물 비듬 알레르기(animal dander allergy), 쏘는 식물 알레르기(stinging plant allergy), 덩굴옻나무 알레르기(poison ivy allergy) 및 음식 알레르기(food allergy)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0270] ***비-악성 혈액학적 질환***

[0271] 비-악성 혈액학적 질환의 예시로는 빈혈(anemia), 골수 장애(bone marrow disorders), 심부정맥 혈전증/폐색전증(deep vein thrombosis/pulmonary embolism), 다이아몬드 블랙판 빈혈(diamond blackfan anemia), 혈색소증(hemochromatosis), 혈우병(hemophilia), 면역 혈액학적 장애(immune hematologic disorders), 철 대사 장애(iron metabolism disorders), 겸상 적혈구 빈혈(sickle cell disease), 지중해빈혈(thalassemia), 혈소판감소증(thrombocytopenia) 및 폰 빌레브란트병(Von Willebrand disease)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0272] Tcm 세포의 항-질환 활성을 증진시키기 위해, 치료될 질병과 관련된 항원 또는 항원들을 선택하고 치료를 위해

항원 특이적 Tcm 세포를 생성하는 것이 유리하다.

[0273] 따라서, 일 구체예에 따르면, 상기 방법은 (a) 질병과 관련된 항원 또는 항원들의 존재에 대해 대상체의 생물학적 시료를 분석하는 단계; (b) 본 발명의 일부 구체예의 방법에 따라 상기 질환과 관련된 항원 또는 항원들에 대한 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단을 생성하여 항원 반응성 세포를 증폭시키는 단계; 및 (c) (b)의 대상체에 비-GvHD 유도 세포의 단리된 집단의 치료적 유효량을 투여하여 상기 대상체의 질환을 치료하는 단계를 포함한다.

[0274] 본 명세서에 사용된 "생물학적 시료"는 대상체로부터 유래된 액체 또는 조직 시료의 샘플을 지칭한다. "생물학적 시료"의 예로는 전혈, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 소변, 림프액, 조직 생검, 및 호흡기, 장 및 비뇨 생식기의 다양한 외부 분비물, 눈물, 타액, 우유, 백혈구, 조직, 세포 배양액(예: 기본 배양액)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0275] 그러한 생물학적 시료들을 얻는 방법은 표준 혈액 회수 절차, 소변 수집 및 요추 천자를 포함하는 당업계에 알려진 방법이며, 이에 한정되지 않는다.

[0276] 생물학적 시료에서 항원 또는 항원들의 존재를 결정하는 것은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면 (병원균의 존재를 확인하는) 혈청학, 박테리아 배양, 박테리아 감수성 테스트, 곰팡이, 바이러스, 마이코박테리아(AFB 테스트) 및/또는 기생충 테스트, 전기 영동, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 웨스턴 블랏 분석 및 형광(Fluorescence) 활성화된 세포 분류 (FACS)를 사용하여 수행될 수 있다.

[0277] 일단 분석이 이루어지면, 항원 또는 항원들이 선택되고 질환에 특이적인 항원 또는 항원들 (예: 종양 항원, 바이러스 항원, 박테리아 항원 등)을 사용하여 Tcm 세포가 기억 T 세포 집단에서 생성되며 치료를 위해 대상체에 투여된다.

[0278] 전술한 바와 같이, 본 발명의 Tcm 세포는 거부 활성이 부여된다. 따라서, 본 발명의 Tcm 세포는 세포 또는 조직 이식을 위한 보조 요법으로 사용될 수 있다. 본 발명의 Tcm 세포에도 항-질환 활성이 부여되기 때문에, 본 발명의 방법은 세포 또는 조직의 이식의 수반과 동시에 대상체에서 질환을 치료하는데 유리하게 적용될 수 있다.

[0279] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "세포 또는 조직 이식"은 신체 세포 (예를 들어, 단일 세포 또는 세포군) 또는 조직 (예를 들어, 전체 또는 부분으로 이식될 수 있는 고형 조직/장기 또는 연조직)을 지칭한다. 본 발명에 따라 이식할 수 있는 예시적인 조직 또는 기관은 간, 췌장, 비장, 신장, 심장, 폐, 피부, 장 및 림프 성/조혈 조직 (예: 림프절, 파이어 패치 흉선(Peyer's patches thymus) 또는 골수)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따라 이식될 수 있는 예시적인 세포는 줄기 세포, 심장 세포, 간세포, 췌장 세포, 비장 세포, 폐 세포, 뇌 세포, 신장 세포, 장/췌장 세포, 난소 세포, 피부 세포 (예: 이 세포들의 단리된 집합)을 포함하는 미성숙 조혈 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 전체 기관, 예를 들어 신장, 심장, 간 또는 피부의 이식을 또한 고려한다.

[0280] 적용예에 따라, 상기 방법은 대상체와 동종이거나 비-동종인 세포 또는 조직을 사용하여 수행될 수 있다.

[0281] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 대상체 및 공여자는 모두 인간이다.

[0282] 적용 및 이용 가능한 공급원에 따라, 본 발명의 세포 또는 조직들은 태아 유기체, 출생 후의 유기체, 성인 또는 사체 공여자로부터 수득될 수 있다. 또한 필요한 응용 분야에 따라 세포 또는 조직들이 천연이거나 유전자 변형될 수 있다. 이러한 결정은 통상의 기술자의 능력 범위 내에 있다.

[0283] 당업계에 알려진 임의의 방법은 (예를 들어, 이식을 위해) 세포 또는 조직을 수득하기 위해 도입될 수 잇다.

[0284] 세포 또는 조직을 대상체로 이식하는 것은, 예를 들어, 세포 또는 조직 형태; 수혜자의 질병(예: 장기 부전)의 종류, 병기 또는 중증도; 대상체에 특정한 물리적 또는 생리학적 파라미터; 및/또는 원하는 치료 결과와 같은 다양한 파라미터에 따라 다양한 방식으로 수행될 수 있다.

[0285] 본 발명의 세포 또는 조직 이식편을 이식하는 것은 세포 또는 조직 이식편을 용도에 따라 다양한 해부학적 위치 중 어느 하나에 이식함으로써 수행될 수 있다. 세포 또는 조직 이식편은 동종의 해부학적 위치 (이식을 위한 정상적인 해부학적 위치) 또는 이소성 해부학적 위치 (이식을 위한 비정상적인 해부학적 위치)로 이식 될 수 있다. 적용에 따라, 세포 또는 조직 이식편은 신장 캡슐 아래, 또는 신장, 고환 지방, 후두개, 망막, 문맥, 간, 비장, 심장 공동, 심장, 흉강, 폐, 피부, 췌장 및/또는 복강 내 공간로 유리하게 임플란트될 수 있다.

[0286] 예를 들어, 본 가르침에 따른 간 조직은 간, 문맥, 신장 캡슐, 피하조직, 장막, 비장 및 복강 내 공간으로 이식

될 수 있다. 이과 같은 다양한 해부학적 위치로의 간 이식은 간 이식을 통한 치료가 가능한 질환(예: 간 기능 부전)을 치료하기 위해 당업계에서 통상적으로 실시된다. 유사하게, 본 발명에 따른 췌장 조직의 이식은 유리하게는 조직을 문맥, 간, 췌장, 고환 지방, 피하조직, 장막, 장 루프 (소장의 U루프의 아형) 및/또는 복부 공간에 이식함으로써 유리하게 수행될 수 있다. 췌장 조직의 이식은 췌장 이식을 통한 치료가 가능한 질환(예를 들어, 당뇨병)을 치료하는데 사용될 수 있다. 마찬가지로, 신장, 심장, 폐 또는 피부 조직과 같은 조직의 이식은 예를 들어 신부전, 심부전, 폐 손상 또는 피부 손상(예: 화상)으로 고통받는 수혜자를 치료하기 위한 목적으로 전술한 임의의 해부학적 위치로 수행될 수 있다. 단리된 세포가 이식되는 경우, 그러한 세포는 예를 들어, 정맥 내 경로, 기관 내 경로, 복강 내 경로 또는 비강 내 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0287] 본 발명의 방법은 또한 예를 들어, 비성숙 조혈 세포 이식을 요구하는 질환으로 고통받는 수혜자를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0288] 후자의 경우, 예를 들어 공여자의 골수, 동원된 말초 혈액 (예: 백혈구 수혈에 의한), 태아 간, 난황낭 및/또는 제대혈로부터 유래될 수 있는 미성숙 자가, 동종 또는 이종 조혈 모세포(줄기 세포 포함)는 질병을 앓고 있는 수혜자에게 이식할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 미성숙 조혈 모세포는 T 세포가 고갈된 CD34 + 미성숙 조혈 모세포이다. 이러한 질병에는 백혈병 [급성 림프성(acute lymphatic), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia (ALL)), 급성 림프구성 전구-B 세포(acute lymphoblastic pre-B cell), 급성 림프구성 T 세포 백혈병(acute lymphoblastic T cell leukemia), 급성 거핵아구성(acute - megakaryoblastic), 단핵구성(monocytic), 급성 골수성(acute myelogenous), 급성 골수성(acute myeloid), 호산구성이 있는 급성 골수성(acute myeloid with eosinophilia), B 세포(B cell), 호염기성(basophilic), 만성 골수성(chronic myeloid), 만성(chronic), B 세포(B cell), 호산구성(eosinophilic), 친화형(Friend), 과립형 또는 골수성(granulocytic or myelocytic), 급성 골수성 백혈병(acute myelocytic leukemia (AML)) 또는 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia (CML)), 모발 세포(hairy cell), 림프구성(lymphocytic), 거핵아구성(megakaryoblastic), 단핵구성(monocytic), 단핵구-대식세포성(monocytic-macrophage), 골수아구성(myeloblastic), 골수성(myeloid), 골수단핵구성(myelomonocytic), 플라즈마 세포(plasma cell), 전구-B 세포(pre-B cell), 전골수성(promyelocytic), 아급성(subacute), T 세포(T cell), 림프 신생(lymphoid neoplasm), 골수 악성 종양에 대한 소인(predisposition to myeloid malignancy), 급성 비림프구성 백혈병(acute nonlymphocytic leukemia), 급성 비림프구성 백혈병(acute nonlymphoblastic leukemia (ANLL)), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-cell acute lymphocytic leukemia (T-ALL)) 및 B-세포 만성 림프구성 백혈병(B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL))], 림프종(lymphoma) (예 : 호지킨 병(Hodgkin's disease), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma), B 세포(B cell), 버킷(Burkitt), 피부 T세포 (cutaneous T cell), 조직구성(histiocytic), 림프구성(lymphoblastic), T세포(T cell), 흉성(thymic)), 아데노신 디아미나아제 (ADA), 골 화석증(osteopetrosis), 재생 불량성 빈혈(aplastic anemia), 고셔병(Gaucher's disease), 지중해빈혈증(thalassemia) 및 기타 선천적 또는 유전학적으로 결정된 조혈 모세 혈관 장애를 포함하는 중증 합병 면역결핍 증후군(severe combined immunodeficiency syndromes (SCID))을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0289] 본 발명의 미성숙 자가, 동종 또는 이종 조혈모 세포는 세포 주입 (예를 들어, I.V.) 또는 복강 내 경로를 통해서와 같지만 이에 한정되지 않는 세포 이식을 위한 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 수혜자에게 이식될 수 있음을 이해해야 할 것이다.

[0290] 임의로, 본 발명의 세포 또는 조직 이식편을 결함이 있는 장기를 갖는 대상체로 이식하는 경우, 이식편의 최적 발달 및 대상체의 해부학적/생리학적 부분과의 구조적/기능적 통합을 가능하게 하기 위해 우선 장애가 있는 장기를 적어도 부분적으로 대상체에서 제거하는 것이 유리할 수 있다.

[0291] 일 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식편은 동종 공여자로부터 유래된다. 일 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식편은 HLA 동일 동종 공여자 또는 HLA 비-동일 동종 공여자로부터 유래된다. 일 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식편은 이종 공여자로부터 유래된다.

[0292] 일 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식편 및 단리된 Tcm 세포 집단은 동일한(예를 들, 비-동계) 공여자로부터 유래된다.

[0293] 일 구체예에 따르면, 세포 또는 조직 이식편 및 단리된 Tcm 세포 집단은 상이한 (예컨대, 비-동계) 공여자로부터 유래된다. 따라서, 세포 또는 조직 이식 편은 Tcm 세포와 비-동계일 수 있다.

[0294] 일 구체예에 따르면, 미성숙 조혈모 세포 및 단리된 Tcm 세포 집단은 동일(예를 들면, 비-동계) 공여자로부터

유래된다.

[0295] 일 구체예에 따르면, 미성숙 조혈모 세포 또는 및 단리된 Tcm 세포 집단은 상이한 (예컨대, 비-동계) 공여자로부터 유래된다. 따라서, 미성숙 조혈모 세포는 Tcm 세포와 비-동계일 수 있다

[0296] 본 발명의 방법은 또한 대상체가 그러한 절차에 의해 유리하게 수행될 수 있는 경우에 여러 기관들 (예를 들어, 심장 및 폐 조직)의 공동 이식을 고려한다.

[0297] 일 구체예에 따르면, 상기 공동 이식은 미성숙 조혈모 세포 및 고형 조직/기관 또는 다수의 고형 기관들/조직들의 이식을 포함한다.

[0298] 일 구체예에 따르면, 상기 미성숙 조혈모 세포 및 고형 기관은 동일한 공여자로부터 수득된다.

[0299] 일 구체예에 따르면, 상기 미성숙 조혈모 세포 및 고형 기관/조직 또는 기관들/조직들은 다른(예를 들면, 비-동계) 공여자로부터 수득된다.

[0300] 일 구체예에 따르면, 미성숙 조혈모 세포들은 고형 기관의 이식 전, 동시에, 또는 후에 이식된다.

[0301] 일 구체예에 따르면, 조혈모 키메리즘(chimerism)은 본 발명의 Tcm 세포와 함께 미성숙 조혈모 세포의 이식에 의해 대상체에서 먼저 유도되어 동일 공여자로부터 이식된 다른 조직/기관들의 내성을 유도한다.

[0302] 일 구체예에서, 상기 본 발명의 Tcm 세포들은 동일한 공여자로부터 이식되는 조직/기관들에 대한 이식 거부를 감소시키기 위해 그 자체로 사용된다.

[0303] 본 발명에 따른 세포 또는 조직 이식편을 대상체에 이식한 후에, 표준 의료 관행에 따라 다양한 표준 기술 중 어느 하나에 따라 기관의 성장 기능 및 면역 적합성을 모니터하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 췌장 조직 이식의 기능은 표준 췌장 기능 검사 (예: 혈청 인슐린 수치 분석)에 의해 이식 후에 모니터링될 수 있다. 마찬가지로 간 조직 이식은 표준 간 기능 검사 (예: 알부민, 총 단백질, ALT, AST 및 빌리루빈의 혈청 수준 분석 및 혈액 응고 시간 분석)로 이식한 후 모니터링할 수 있다. 세포 또는 조직의 구조적 발달은 컴퓨터 단층 촬영 또는 초음파 이미징을 통해 모니터링 할 수 있다.

[0304] 이식 문맥에 따라, 세포 또는 조직 이식편의 이식을 용이하게 하기 위해, 상기 방법은 이식 전에 상기 대상체를 준-치사, 치사 또는 전치사 조건 하에서 컨디셔닝하는 것을 추가로 유리하게 포함할 수 있다.

[0305] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 본 발명의 대상체를 컨디셔닝하는 것과 관련되어, "준 치사", "치사" 및 "전치사"라는 용어는 다음의 대상체들의 대표 집단에 적용될 때 골수 독성 및/또는 림프구 독성 치료를 지칭하는 것으로, 각각 일반적으로 다음의 경우이다: 본질적으로 집단의 모든 구성원에게 치명적이지 않은; 집단의 일부에게는 치명적이지만 모든 구성원에게는 그렇지 않은; 또는 일반적인 불임 조건하에서 본질적으로 집단의 모든 구성원에게 치명적인.

[0306] 본 발명의 일부 구체예에 따르면, 준 치사, 치사 또는 전 치사 컨디션화는 전신 방사선 조사 (TBI), 총 림프계 방사선 조사 (TLI, 즉 모든 림프절, 흉선 및 비장의 노출), 부분 신체 방사선 조사 (예를 들어, 폐, 신장, 뇌 등의 노출), 골수 파괴 컨디셔닝 및/또는 비 골수파괴 컨디셔닝을 포함하고, 공동-자극 차단체, 화학 요법제 및/또는 항체 면역요법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 조합을 포함한다. 본 발명의 일부 구체예에 따라, 컨디셔닝은 전술한 컨디셔닝 프로토콜의 임의의 조합(예를 들어, 화학요법제 및 TBI, 공동 자극 차단제 및 화학요법제, 항체 면역 요법 및 화학요법제 등)을 포함한다.

[0307] 일 구체예에 따르면, 상기 TBI는 0.5-1 Gy, 0.5-1.5 Gy, 0.5-2.5 Gy, 0.5-5 Gy, 0.5-7.5 Gy, 0.5-10 Gy, 0.5-15 Gy, 1-1.5 Gy, 1-2 Gy, 1-2.5 Gy, 1-3 Gy, 1-3.5 Gy, 1-4 Gy, 1-4.5 Gy, 1-1.5 Gy, 1-7.5 Gy, 1-10 Gy, 2-3 Gy, 2-4 Gy, 2-5 Gy, 2-6 Gy, 2-7 Gy, 2-8 Gy, 2-9 Gy, 2-10 Gy, 3-4 Gy, 3-5 Gy, 3-6 Gy, 3-7 Gy, 3-8 Gy, 3-9 Gy, 3-10 Gy, 4-5 Gy, 4-6 Gy, 4-7 Gy, 4-8 Gy, 4-9 Gy, 4-10 Gy, 5-6 Gy, 5-7 Gy, 5-8 Gy, 5-9 Gy, 5-10 Gy, 6-7 Gy, 6-8 Gy, 6-9 Gy, 6-10 Gy, 7-8 Gy, 7-9 Gy, 7-10 Gy, 8-9 Gy, 8-10 Gy, 10-12 Gy 또는 10-15 Gy 범위 내의 단일 또는 분획화된 방사선 조사량을 포함한다.

[0308] 특정 구체예에 따르면, 상기 TBI는 1-7.5 Gy 의 단일 또는 분획화된 방사선 조사량을 포함한다.

[0309] 일 구체예에 따르면, 상기 컨디셔닝은 골수파괴 조건 하에서와 같은 전 치사 조건 하에서 대상체를 컨디셔닝함으로써 수행된다.

[0310] 또한, 상기 컨디셔닝은 골수 재생 조건 또는 비-골수 파괴 조건 하에서 대상체를 컨디셔닝하는 것과 같은 치사

또는 준 치사 조건 하에서 대상체를 컨디셔닝함으로써 수행된다.

[0311] 일 구체예에 따르면, 상기 컨디셔닝은 골수 파괴 약물(예를 들면 부설판(Busulfan) 또는 Melfaln) 또는 비-골수 파괴 약물(예를 들면, 사이클로포스포아마이드(Cyclophosphamide) 및/또는 플루다라빈(Fludarabin))로 대상체를 컨디셔닝함으로써 수행된다.

[0312] 방사선 조사, 약학적 제제 및 내성 유도 세포(전술한 바와 같은)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 컨디셔닝 제제들이 대상체를 컨디셔닝하는데 사용될 수 있다.

[0313] 의약적 제제(pharmacological agents)의 예로는 골수 독성 약물(myelotoxic drugs), 림프구세포독성(lymphocytotoxic) 약물 및 면역억제 약물을 포함한다(이하 상세히 기술함).

[0314] 골수 독성 약물의 예로는, 부설판(busulfan), 다이메틸 밀레란(dimethyl mileran), 멜팔란(melphalan) 및 티오테파(thiotepa)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0315] 추가적으로 또는 대안적으로, 상기 방법은 세포 또는 조직물의 이식 전에, 동시에 또는 후에 면역억제 요법과 함께 대상체를 컨디셔닝하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0316] 면역억제 요법의 적합한 유형의 예로는, 면역억제 약물의 투여, 관용성-유도성 세포군(tolerance inducing cell populations)의 투여(예. 상기에서 상세히 기술된 Tcm 세포), 및/또는 면역억제 방사선 치료를 포함한다.

[0317] 이식에 적합한 면역억제 요법을 선택 및 투여하기 위한 충분한 지침은 당해 기술분야의 문헌에서 제공된다 (예를 들어, 다음을 참조한다: Kirkpatrick CH. and Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. et al., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. and Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. et al., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. et al., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. et al., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. et al., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. et al. 1998. Lancet 351, 623).

[0318] 바람직하게는, 면역억제 요법은 적어도 하나의 면역억제제(immunosuppressive agents)를 대상체에 투여하는 것으로 이루어진다.

[0319] 면역억제제의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 타크로리무스(Tacrolimus)(FK-506 또는 후지마이신(fujimycin)으로도 지칭됨, 상품명: 프로그랍(Prograf), 아드바그랍(Advagraf), 프로토픽(Protopic)), 미코페놀산모페틸(Mycophenolate Mofetil), 미코페놀레이트나트륨(Mycophenolate Sodium), 프레드니손(Prednisone), 메토트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드수화물(cyclophosphamide), 사이클로스포린(cyclosporine), 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 클로로퀸(chloroquine), 하이드록시클로로퀸(hydroxychloroquine), 설파살라진(sulfasalazine) (설파살라조피린(sulphasalazopyrine)), 금염(gold salts), D-페니실라민(D-penicillamine), 레플루노미드(leflunomide), 아자티오프린(azathioprine), 아나킨라(anakinra), 인플릭시마브(infliximab) (REMICADE), 에타너셉트(etanercept), TNF.알파. 차단제(TNF.alpha. blockers), 염증성 사이토카인을 표적으로 하는 생물학적 제제, 및 비-스테로이드성 항-염증성 약물(NSAIDs)을 포함한다. NSAIDs의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 아세틸 살리실산(acetyl salicylic acid), 콜린 마그네슘 살리실레이트(choline magnesium salicylate), 디플루니살(diflunisal), 마그네슘 살리실레이트(magnesium salicylate), 살살레이트(salsalate), 소듐 살리실레이트(sodium salicylate), 디클로페낙(diclofenac), 에토돌락(etodolac), 페노프로펜(fenoprofen), 플루르비프로펜(flurbiprofen), 인도메타신(indomethacin), 케토프로펜(ketoprofen), 케토롤락(ketorolac), 메클로페나민산(meclofenamate), 나프록센(naproxen), 나부메톤(nabumetone), 페닐부타존(phenylbutazone), 피록시캄(piroxicam), 설린닥(sulindac), 톨메틴(tolmetin), 아세트아미노펜(acetaminophen), 이부프로펜(ibuprofen), Cox-2 저해제(Cox-2 inhibitors), 트라마돌(tramadol), 라파마이신(rapamycin)(시롤리무스(sirolimus) 및 라파마이신 유사체(CCI-779, RAD001, AP23573과 같은)를 포함한다. 이들 제제는 개별적으로 또는 조합하여 투여될 수 있다.

[0320] 이식 유형에 관계 없이, 이식편 거부 반응(graft rejection) 및 이식편대숙주질환(graft versus host disease)을 피하기 위해, 본 발명의 방법은 신규한 Tcm 세포를 이용한다(상기에서 상세히 기술됨).

[0321] 본 발명의 방법에 따르면, 이들 Tcm 세포는 세포 또는 조직물의 이식과 동시에, 이식 전에, 또는 이식 후에 투여된다.

[0322] Tcm 세포는 세포 주입(예. 정맥 내) 또는 복강 내 경로 등과 같으나 이에 제한되지 않는, 세포 이식을 위해 당

업계에 알려진 임의의 방법을 통해 투여될 수 있다.

[0323] 본 발명의 일부 실시양태의 Tcm 세포는 생물체 그 자체(*per se*)에 투여되거나, 또는 적합한 담체나 부형제와 함께 혼합된 경우 의약적 조성물에서 투여될 수 있다.

[0324] 본원에서 사용된 바와 같이, "의약적 조성물(pharmaceutical compositon)"은 생리학적으로 적합한 담체 및 부형제와 같은 다른 화학적 성분을 갖는 본원에 기술된 하나 이상의 활성성분의 제제를 의미한다. 의약적 조성물의 목적은 생물체에 대한 화합물의 투여를 용이하게 하는 것이다.

[0325] 본원에서 용어 "활성성분(active ingredient)"은 생물학적 효과를 설명할 수 있는 Tcm 세포를 의미한다.

[0326] 여기서, 상호교환적으로 사용할 수 있는 "생리학적으로 허용되는 담체" 및 "의약적으로 허용되는 담체"라는 문구는 생물체를 상당히 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다. 이러한 문맥 하에서 보조제(adjuvant)도 포함된다.

[0327] 본원에서 용어 "부형제(excipient)"는 활성성분의 투여를 더욱 용이하게 하기 위해 의약적 조성물에 첨가되는 비활성 물질을 의미한다. 부형제의 예로는, 이에 제한되는 것은 아니나, 탄산칼슘(calcium carbonate), 인산칼슘(calcium phosphate), 전분의 다양한 당과 유형, 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 식물성 오일 및 폴리에틸렌글리콜을 포함한다.

[0328] 약물의 제제화 및 투여를 위한 기술은, 본 명세서에 참조로 포함되어 있는 "레밍턴 약학(Remington's Pharmaceutical Sciences)" (Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition)에서 발견될 수 있다.

[0329] 적합한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 직장(rectal), 점막관통(transmucosal), 특히 경비(transnasal), 창자 또는 비경구 전달(근육내, 피하, 및 골수내 주사뿐만 아니라 척추강내, 직접 심실내, 심장내, 예를 들어 우실 또는 좌실 강으로, 공통 관상 동맥으로, 정맥, 복강내, 비강내, 또는 안구내 주사를 포함하는)을 포함할 수 있다.

[0330] 중추 신경계(CNS)로의 약물 전달을 위한 통상적인 접근법은 다음을 포함한다: 신경외과적(neurosurgical) 전략(예를 들어, 뇌내(intracerebral) 주사 또는 뇌실내(intracerebroventricular) 주입); BBB의 내생 운반 경로 중 하나를 개발하기 위한 시도로, 물질(agent)의 분자적 조작(molecular manipulation) (예를 들어, 그 자체가 BBB를 크로싱할 수 없는 약제와 공동으로 내피 세포 표면 분자에 대한 친화성을 갖는 운반 펩타이드(transport peptide)를 포함하는 키메릭 융합 단백질의 생성); 물질의 지질 용해도를 증가시키도록 고안된 약리학적 전략(예를 들어, 수용성 물질과 지질 또는 콜레스테롤 담체와의 접합(conjugation)); 및 고삼투압성 분열(hyperosmotic disruption)에 의한 BBB의 무결성(integrity)의 일시적인 분열(경동맥으로 만니톨 용액을 주입하거나, 앤지오텐신 펩타이드(angiotensin peptide)와 같은 생물학적으로 활성인 성분을 사용하여서 생기는). 그러나, 각각의 이러한 전략은, 침습적 외과 절차와 관련된 고유한 위험, 내생 운반 시스템(endogenous transport systems)에서의 고유한 한계에 의해 부과된 크기 제한, CNS의 외부에서 활성일 수 있는 캐리어 모티프(carrier motif)로 이루어진 키메릭 분자의 조직적인 투여와 연관된 잠재적으로 바람직하지 않은 생물학적 부작용, 및 BBB가 분열된 경우 뇌의 영역 내에서 뇌 손상의 가능한 위험(이를 차선의 전달 방법이 되게 한다)와 같은 한계를 갖는다.

[0331] 대안적으로, 예를 들어 의약적 조성물을 환자의 조직 영역에 직접 주입함으로써 전신적 방식보다는 국부적 방식으로 의약적 조성물을 투여할 수 있다.

[0332] 본 발명의 일부 실시양태의 의약적 조성물은 당업계에 잘 알려진 방법, 예를 들어, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정-제조(dragee-making), 분쇄(levigating), 유화, 캡슐화, 포획 또는 동결건조 방법의 수단에 의해 제조될 수 있다.

[0333] 따라서 본 발명의 일부 실시양태에 따라 사용하기 위한 의약적 조성물은 의약적으로 사용될 수 있는 제제로 활성 성분을 가공하는 것을 용이하게 하는 부형제와 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 통상적인 방식으로 제제화될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다.

[0334] 주사(injection)를 위해, 의약적 조성물의 활성성분은 수용액, 바람직하게는 행크 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution), 또는 생리학적 염 완충액과 같은 생리학적으로 호환가능한(compatible) 완충액으로 제제화될 수 있다. 점막 투여(transmucosal administration)를 위해, 투과될 장벽에 적합한 침투제(penetrants)가 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있다.

[0335] 경구 투여(oral administration)를 위해, 의약적 조성물은 당업계에 잘 알려진 의약적으로 허용되는 담체와 활성성분을 혼합함으로써 용이하게 제제화될 수 있다. 이러한 담체는 의약적 조성물이 환자에 의해 경구 섭취되기 위한 정제(tablets), 알약(pills), 당의정(dragees), 캡슐(capsules), 액체(liquids), 겔(gels), 시럽(syrups), 슬러리(slurries), 현탁액(suspensions) 등으로 제형화될 수 있게 한다. 경구용 의약 제제는 고체 부형제를 사용하여, 선택적으로 생성된 혼합물을 분쇄하고, 원하는 경우 적합한 보조제를 첨가한 후 과립의 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 코어(dragee cores)를 수득할 수 있다. 적합한 부형제는 특히, 락토오스, 수크로오스, 만니톨 또는 솔비톨을 포함하는 당과 같은 충진제(fillers); 셀룰로오스 제제, 예를 들어 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검(gum tragacanth), 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 소듐 카보메틸셀룰로오스; 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)와 같이 생리학적으로 허용되는 폴리머이다. 원하는 경우, 가교결합된(cross-linked) 폴리비닐피롤리돈, 한천(agar) 또는 알긴산(alginic acid) 또는 소듐 알지네이트(sodium alginate)와 같은 이들의 염과 같은 붕해제(disintegrating agents)를 첨가할 수 있다.

[0336] 당의정 코어(dragee cores)는 적합한 코팅과 함께 제공된다. 이 목적을 위해, 선택적으로 아라비아검(gum arabic), 탈크(talc), 폴리비닐피롤리돈, 카보폴 겔(carbopol gel), 폴리에틸렌글리콜, 티타늄디옥사이드(titanium dioxide), 래커 용액(lacquer solution) 및 적합한 유기용매 또는 용매 혼합물을 포함할 수 있는 농축된 당 용액이 사용될 수 있다. 염료(dyestuffs) 또는 안료(pigments)는 정제 또는 당의정 코팅에 첨가되어 확인하거나 또는 활성 화합물 복용량(doses)의 상이한 배합을 나타낼 수 있다.

[0337] 경구로 사용될 수 있는 의약적 조성물은 젤라틴으로 제조된 푸쉬-핏(push-fit) 캡슐뿐만 아니라 젤라틴과, 글리세롤 또는 솔비톨과 같은 가소제로 제조된 연질의 밀봉된 캡슐을 포함한다. 푸쉬-핏 캡슐은 락토오스와 같은 충진제, 전분과 같은 결합제(binders), 탈크 또는 마그네슘스테아레이트(magnesium stearate)와 같은 윤활제(lubricants) 및 선택적으로, 안정화제(stabilizers)를 구비한 혼합물(admixture)에 활성 성분을 혼합하여 함유할 수 있다. 연질 캡슐(soft capsuless)에서, 활성성분은 지방유(fatty oils), 액체 파라핀(liquid paraffin), 또는 액체 폴리에틸렌글리콜(liquid polyethylene glycol)과 같은 적합한 용액에 용해되거나 현탁될 수 있다. 또한, 안정화제가 첨가될 수 있다. 경구 투여를 위한 모든 제제는 선택된 투여 경로에 적합한 투여량이어야 한다.

[0338] 구강 투여(buccal administration)를 위해, 조성물은 통상적인 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지(lozenges) 형태를 취할 수 있다.

[0339] 비강 흡입(nasal inhalation)에 의한 투여를 위해, 본 발명의 일부 실시양태에 따라 사용하기 위한 활성성분은 적합한 추진제(propellant), 예컨대 다이클로로다이플루오로메테인(dichlorodifluoromethane), 트라이클로로플루오로메테인(trichlorofluoromethane), 다이클로로-테트라플루오로에테인(dichloro-tetrafluoroethane) 또는 이산화탄소(carbon dioxide)를 사용하여 가압 팩(pack) 또는 분무기(nebulizer)로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투여량 단위(dosage unit)은 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 화합물의 분말 혼합물과 락토오스 또는 전분과 같이 적절한 분말 베이스를 함유하는 캡슐과 카트리지(예를 들어, 디스펜서에 사용하기 위한 젤라틴의)가 제제화될 수 있다.

[0340] 본원에서 기술한 의약적 조성물은 비경구(parenteral) 투여, 예컨대 정맥 주사(bolus injection) 또는 연속 주입(continous infusion)을 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제형은 투여량 단위 형태, 예컨대 앰플 또는 다회 투여용 용기에 선택적으로 방부제를 첨가하여 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클의 현탁액, 용액 또는 유화액일 수 있고, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화제(foumulatory agents)를 함유할 수 있다.

[0341] 비경구 투여를 위한 의약적 조성물은 수용성 형태(water-soluble form)의 활성 제제의 수용액을 포함한다. 또한, 활성성분의 현탁액은 적절한 유성 또는 수성 기반 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 참깨유(sesame oil)와 같은 지방유, 또는 올레산에틸(ethyl oleate), 트라이글리세라이드 또는 리포좀과 같은 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수용성 주사 현탁액은 소듐 카복시메틸 셀룰로오스(sodium carboxymethyl cellulose), 솔비톨 또는 덱스트란과 같은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 포함할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한 고농도 용액의 제제를 위한 활성성분의 용해도를 증가시키는 적합한 안정화제 또는 성분을 포함할 수 있다.

[0342] 대안적으로, 활성성분은 사용하기 전에, 적합한 비히클, 예를 들어 멸균, 무발열원 수용액(pyrogen-free water

based solution)과 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0343] 또한 본 발명의 일부 실시양태의 의약적 조성물은, 예컨대, 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드와 같은 통상적인 좌약 기재를 사용하여 좌약(suppositories) 또는 보유관장제(retention enemas)와 같은 직장 조성물로 제제화될 수 있다.

[0344] 본 발명의 일부 실시양태와 관련하여 사용하기 적합한 의약적 조성물은 활성성분이 의도하는 목적을 달성하는데 유효한 양으로 함유된 조성물을 포함한다. 보다 구체적으로, 치료적 유효량은 질환(예를 들어, 악성 또는 비-악성 질환)의 증상을 예방, 완화 또는 경감시키거나 치료되는 대상체의 생존을 연장시키는데 유효한 활성성분(Tcm 세포)의 양을 의미한다.

[0345] 치료적 유효량의 결정은, 특히, 본원에서 제공된 상세한 설명에 비추어 당업자의 능력 범위 내에 있다.

[0346] 본 발명의 방법에서 사용된 임의의 제제에 대해, 치료적 유효량 또는 투여량은 초기에 시험관내(in vitro) 및 세포 배양 분석으로부터 예측될 수 있다. 예를 들어, 투여량은 목적하는 농도 또는 역가(titer)를 달성하기 위해 동물 모델에서 제제화할 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 유용한 투여량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다.

[0347] 본원에 기술된 활성성분의 독성 및 치료 효능은 시험관내(in vitro), 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약제 절차에 의해 결정될 수 있다. 시험관내 및 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 수득한 데이터는 인간에 사용하기 위한 투여량의 범위를 정하는데 사용될 수 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 정확한 제제, 투여 경로 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개인의 의사에 의해 선택될 수 있다(예컨대 Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1 참조).

[0348] 투여량 및 투여 간격은 생물학적 효과(최소 유효 농도, MEC)를 유도 또는 억제하기에 충분한 활성성분의 앰플 레벨(ample level)을 제공하기 위해 개별적으로 조정될 수 있다. MEC는 각각의 제제에 따라 달라지지만, 시험관내(in vitro) 데이터로부터 예측될 수 있다. MEC를 달성하는데 필요한 투여량은 개인의 특성과 투여 경로에 의존한다. 검출 분석은 플라즈마 농도를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0349] 치료되는 상태의 중증도와 반응성에 따라, 투약은 수 일 내지 수 주에서 지속되는 치료 과정 또는 치료가 이루어지거나 질병 상태의 감소가 달성될 때까지 단일 또는 복수의 투여일 수 있다.

[0350] 치료되는 병의 중증도와 반응성에 따라, 수 일 내지 수 주동안 지속되는 치료 경과와 함께 치료가 이루어지거나 질병 상태의 감소가 달성될 때까지, 투약은 단일 또는 복수의 투여일 수 있다.

[0351] 투여되는 조성물의 양은, 물론, 치료되는 대상체, 고통의 중증도, 투여 방식, 처방 의사의 판단 등에 따라 달라질 것이다.

[0352] 본 발명의 일부 실시양태의 조성물은, 필요하다면, 활성성분을 포함하는 하나 이상의 투여량 단위(unit dosage) 형태를 포함할 수 있는, FDA 승인 키트와 같은 팩(pack) 또는 디스펜서 장치(dispenser device)로 제공될 수 있다. 예를 들어, 팩은 블리스터 팩(blister pack)과 같은 금속 또는 플라스틱 호일을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치는 투여에 관한 지시서가 첨부될 수 있다. 또한 팩 또는 디스펜서는 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부기관에 의해 규정된 형태로 용기와 관련된 안내서를 수용할 수 있으며, 안내서는 기관에 의한 조성물 또는 인간 또는 가축 투여의 형태 승인을 반영한다. 이러한 안내서는, 예를 들어, 처방 약물을 위해 미국식품의약국(FDA)에 의해 승인된 라벨 표시(labeling) 또는 승인된 제품 삽입물(insert)의 안내서일 수 있다. 호환가능한 의약적으로 허용되는 담체에서 제제화된 본 발명의 제제를 포함하는 조성물은 또한 제조되어 적절한 용기에 담기고, 그리고 상술한 바와 같이 지시된 병의 치료를 위해 라벨 표시될 수 있다.

[0353] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 ± 10 %를 의미한다.

[0354] 용어 "구성되다", "구성되는", "포함하다", "포함하는", "가지는" 및 이들의 활용형(conjugate)는 "~을 포함하나 제한되지 않는"을 의미한다.

[0355] 용어 "~로 이루어지는"은 "~을 포함하나 이에 제한되지 않는"을 의미한다.

[0356] 용어 "본질적으로 ~로 이루어지는"은 부가적인 성분, 단계 및/또는 부분(part)이, 청구되는 조성물, 방법 또는 구조의 기본적이고 신규한 특징들을 실질적으로 변경시키지 않는다면, 상기 조성물, 방법 또는 구조가 상기 부가적인 성분, 단계 및/또는 부분을 포함할 수 있음을 의미한다.

[0357] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥상 명확하게 다르게 지시되지 않는 한, 복수형을 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 하나의 화합물"은 이의 혼합물을 비롯한 복수의 화합물을 포함할 수 있다.

[0358] 본 출원 전반에 걸쳐서, 본 발명의 다양한 실시양태는 범위 포맷(range format)으로 제시될 수 있다. 범위 포맷에서의 설명은 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며, 본 발명의 범위에 대한 불변의 제한으로 간주되어서는 안됨을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 모든 가능한 하위범위(subrange)뿐만 아니라 그 범위 내의 개별적인 수치를 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위단위, 및 그 범위의 개별적인 수, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 이는 상기 범위의 폭에 관계 없이 적용된다.

[0359] 본원에서 수치 범위가 지시되는 경우에는 임의의 인용된 수(분수 또는 정수)가 상기 지시된 범위 내에 포함되는 것을 의미한다. 제1표시 수(indicate number) 내지 제2표시 수 "범위의/범위이다"라는 문구와, 및 제1표시 수부터 제2표시 수까지 "범위의/범위이다"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 제1표시 수와 제2표시 수, 및 이 두 수 사이의 분수와 정수를 모두 포함되는 것으로 의미된다.

[0360] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "방법"은 화학, 약동학, 생물학, 생화학 및 의학 분야의 실시자들에게 공지되어 있거나, 이들에 의해 알려진 방식, 수단, 기술 및 절차로부터 용이하게 개발되는 방식, 수단, 기술 및 절차를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 임의의 과제를 수행하기 위한 방식, 수단, 기술 및 절차를 의미한다.

[0361] 또한, 명확한 설명을 위해, 별도의 실시양태와 관련하여 기술된 본 발명의 특정 특징들은 개별적인 실시양태에서 조합하여 제공될 수 있는 것으로 이해된다. 역으로, 간결성을 위해, 개별적인 실시양태와 관련하여 기술된 본 발명의 다양한 특징들은 개별적으로, 또는 임의의 적절한 하위 조합으로, 또는 본 발명에서 기술된 다른 실시양태에 적절하게 제공될 수도 있다. 다양한 실시양태들의 맥락에서 기술된 특정한 특징들은, 그 실시양태가 구성요소 없이는 작동하지 않는 한, 이들 실시양태의 본질적인 특성으로 간주되어서는 안된다.

[0362] 앞에서 기술되고 하기 청구항 부분에 청구된 것과 같은 본원발명의 다양한 실시양태 및 측면은 하기 실시예에서 실험적 지지를 얻는다.

[0363] **실시예**

[0364] 이제 상기 설명과 함께 이하의 실시예를 참조하여 본 발명을 비-한정적으로 설명한다.

[0365] 일반적으로, 본원에서 사용되는 명명법 및 본 발명에 이용되는 실험 과정은 분자, 생화학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 포함한다. 이러한 기술은 문헌에서 충분히 설명된다. 예를 들어, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); " Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, " A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley&Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis : A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 미국 특허 제4,666,828호; 제4,683,202호; 제4,801,531호; 제5,192,659호 및 제5,272,057호에 제시된 방법론들; " Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology"(8판), Appleton&Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); 이용가능한 면역분석법은 특허 및 과학 문헌에 광범위하게 기술되어 있으며, 예를 들어, 미국 특허 제3,791,932호; 제3,839,153호; 제3,850,752호; 제3,850,578호; 제3,853,987호; 제3,867,517호; 제3,879,262호; 제3,901,654호; 제3,935,074호; 제3,984,533호; 제3,996,345호; 제4,034,074호; 제4,098,876호; 제4,879,219호; 제5,011,771호 및 제5,281,521호; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); “Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, RI, ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes"IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B. (1984) 및 "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996);를 참조하며, 이들은 모두 원용에 의해 본 명세서에 완전히 기재되어 있는

것과 마찬가지로 포함된다. 다른 일반적인 참조문헌은 본 문헌 전체에 제공된다. 그 안의 절차들은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있는 것으로 여겨지며, 독자의 편의를 위해 제공된다. 그 안에 포함된 정보는 모두 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0366] 일반적인 재료 및 실험 절차

[0367] 동물

[0368] 암컷 6- 내지 12-주령 BALB/c, FVB, C57BL/6 및 BALB/c-누드 마우스는 하를란 래보레토리(Harlan Laboratories)로부터 수득하였다. 유사유전자형 (congenic) B6.SJL, C57BL/6-Tg (CAG-OVA)916Jen/J 마우스(OVA-발현 마우스) 및 OT1 마우스(H2Kb MHC-I의 구성에서 난백알부민(OVA) 잔기 257-264를 인식하도록 설계된 형질전환(Tg) TCR을 발현) 및 OT1/Rag-/CD45.1은 바이츠만 연구소 동물 센터에서 사육시켰다. 모든 마우스는 작은 케이지(각 케이지당 5마리)에 넣고 멸균된 음식과 산성수를 공급했다. 바이츠만 과학 연구소(The Weizmann Institute of Science)의 실험 동물 운영 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)는 이러한 연구를 승인했다.

[0369] 마우스 기억 T 세포로부터 베토 세포(veto cell)의 생성

[0370] H2Kb MHC-I의 구성에서 난백알부민(OVA) 잔기 257-264를 인식하도록 설계된 형질전환(Tg) TCR을 발현하는 OT1 마우스를 사용하였다. 이들 마우스는 베토 T_{cm} 세포의 기증자 역할을 했다. 이러한 OT1 CD8 T 세포를 수확하기 전에, 완전 프로인트 보조제(Complete Freund's adjuvant, CFA)와 혼합된 OVA-펩티드로 마우스를 면역화시켰고, OVA-펩티드+불완전 프로인트 보조제(Incomplete Freund's adjuvant, IFA)를 사용하여 초기 챌린지 14일 후에 면역을 강화(boost)시켰다. 면역화 7일 내지 14일 후 마우스를 희생시키고, 그들의 비장 및 림프절을 제거 및 분쇄하여, 자성 비드 분류(magnetic beads sorting)를 이용하여 일반적인(general) $CD8^+$ 세포 풀로부터 기억 세포($CD8+CD44^+$)를 단리시켰다. 결과 집단은 OVA-발현 마우스의 비장에서 생성되어, 방사선조사된 비장세포(splenocyte)와 사이토카인 결핍 하에 공-배양함으로써 제3자 자극을 받았다. 공-배양 개시 60시간 후에, 야생형(WT) T_{cm}에 대해 하기 기술된 바와 같이 T_{cm} 유사 표현형을 발현하도록 세포를 밀어 내기 위해 배양액에 인간 IL-15 (hIL-15)(10 ng/㎖)를 첨가하였으며, 즉, 이전에 입증된 바와 같이 전체 비장 또는 말초 혈액 단핵 세포로부터 제조된, 이전에 기술된 베토 T_{cm} 세포 [Ophir, E. (2013), supra]).

[0371] 바이러스성 펩티드가 로딩된 인간 수지상 세포의 생성

[0372] 바이러스성 펩티드가 로딩된 인간 수지상 세포(dendritic cells, DC)는 도 4B에 예시된 바와 같이 제조하였다. 간략하게, 공여자 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)를 배양 플레이트에 분주(seed)하고 37℃에서 5% CO_2/O_2로 3시간 동안 배양하였다. 상등액 세포(T 세포 포함)를 버리고, 부착된 세포는 사이토카인 IL-4 및 GM-CSF를 첨가하여 72시간 동안 추가로 배양하였다(동일한 배양 조건). 3일 후, 유동 세포를 모으고(미성숙 수지상 세포), 분주하여하며, DC의 성숙을 위해 사이토카인 INF-γ, IL-4, GM-CSF 및 LPS와 함께 밤새 배양하였다. 4일차에, 부착된 세포(성숙한 DC, 즉 mDC)를 떼어내고, 바이러스성 펩티드의 칵테일을 로딩하여 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 바이러스성 칵테일은 EBV, CMV 및 아데노바이러스(Adv)의 7개 펩믹스(pepmixes)로 이루어진다. 펩믹스는 JPT 테크놀로지(베를린, 독일)에서 구입한, 관심 항원의 전체 단백질 서열에서 11개 아미노산과 겹쳐지는(overlapping) 15개 머(mer)이다. EBV (LMP2, BZLF1, EBNA1), Adv-(Penton, Hexon) 및 CMV-(pp65, IE-1)에 걸친 펩믹스가 사용되었다. 바이러스성 펩티드가 로딩된 인간 mDC에 30 Gy로 방사선조사하고 하기 기술된 바와 같이 T 세포 분획에 첨가 하였다.

[0373] 바이러스성 펩티드를 사용한 인간 항-제3자 Tcm 세포의 생성

[0374] 항-제3자 인간 베토 세포는 먼저 세포 공여자로부터 얻은 $CD4^+$ 및 $CD56^+$ 세포에서 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 제거함으로써(Milteni Biotec의 자성 비드를 사용한 자성 세포 분류 이용) 생성하였다. 나머지 세포 집단은 방사선조사된(30Gy) 수지상 세포(동일한 세포 공여자의 것)와 공-배양하였고, 상기 수지상 세포는 제3자 항원 (예, EBV, CMV 및 아데노 바이러스를 포함하는 바이러스성 항원 칵테일)을 발현하도록 펄스된 것이다. 배양 첫 3일 동안, 세포에 IL-21만을 보충하고, +3일부터 +9일까지 IL-21, IL-15 및 IL-7을 배양액에 첨가하였다.

[0375] 바이러스성 펩티드를 사용하여 기억 T 세포에서 인간 베토 T_{cm} 세포의 생성

[0376] 베토 세포는 먼저 세포 공여자로부터 얻은 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포에서 말초 혈액 단핵구(PBMC)를 제거함으로써(Milteni Biotec의 자성 비드를 사용한 자성 세포 분류 이용) 생성하였다. 나머지 세포 집단은 $CD8^+CD45RO^+$ 기억 T 세포를 포함한다. 다음으로, 기억 $CD8^+CD45RO^+$ T 세포를 방사선조사된(30Gy) 수지상 세포(동일한 세포 공여자의 것)와 공-배양하고, 상기 수지상 세포는 항원 (예, EBV, CMV 및 아데노 바이러스를 포함하는 바이러스성 항원 칵테일)을 발현하도록 펄스된 것이다. 배양 첫 3일 동안, 세포에 IL-21만을 보충하고, +3일부터 +9일까지 IL-21, IL-15 및 IL-7을 배양액에 첨가하였다.

[0377] 종양 펩티드를 사용하여 기억 T 세포에서 인간 베토 Tcm 세포의 생성

[0378] 베토 세포는 먼저 세포 공여자를 종양 펩티드 (예, Molldrem J. Biology of Blood and Marrow Transplantation (2006) 12:13-18; Alatrash G. and Molldrem J., Expert Rev Hematol. (2011) 4(1): 37-50에 설명된 BCR-ABL, ELA2, G250/carbonic anhydrase IX, HA-1, HA-2, hTERT, MAGE-1, MUC1, NY-ESO-1, PRAME, PR1, PRTN3, RHAMM 및 WT-1, 또는 이들의 조합) 및 완전 프로인트 보조제와 함께 면역화시키고, 초기 챌린지 14일 후에 종양 펩티드+불완전 프로인트 보조제를 사용하여 면역을 증가시켰다. 다음으로, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 수득하여 $CD4^+$, $CD56^+$ 및 $CD45RA^+$ 세포를 제거하였다(Milteni Biotec의 자성 비드를 사용한 자성 세포 분류 이용). 나머지 세포 집단은 $CD8^+CD45RO^+$ 기억 T 세포를 포함한다. 다음으로, 기억 $CD8^+CD45RO$+ T 세포를 방사선조사된(30Gy) 수지상 세포(동일한 세포 공여자의 것)와 공-배양하고, 상기 수지상 세포는 종양 항원을 발현하도록 펄스된 것이다. 배양 첫 3일 동안, 세포에 IL-21만을 보충하고, +3일부터 +9일까지 IL-21, IL-15 및 IL-7을 배양액에 첨가하였다.

[0379] 유세포 분석기 분석

[0380] $CD8CD45RO^+CD62L^+$ 및 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$인 생성된 T_{cm} 세포의 순도 및 표현형 수준을 결정하기 위해 Becton Dickinson FACScanto II를 사용하여 형광-활성 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS) 분석을 수행 하였다. 세포는 2개의 패널에서 다음의 항체로 염색되었다:

[0381] 패널 1: CD8- 플루오레신 이소티오시아네이트 (FITC), CD45RO- 피코에리트린 (PE), $CD62L^-$ 알로피코시아닌 (APC), CD56- APC-Cy7, CD3- 브릴리언트 바이올렛 711, CD16-PE-Cy7 및 7AAD-PerCp.

[0382] 패널 2: CD3- 브릴리언트 바이올렛 711, CD8-FITC, CD45RA-PE-Cy7, CD45RO-APC-Cy7, CD20-PE 및 7AAD-PerCp.

[0383] 제한적 희석 분석(LDA) 및 35S-메티오닌 살상 분석

[0384] $CD4^-CD56^-$ (즉, 농축된 $CD8^+$ 세포) 또는 $CD4^-CD56^-CD45RA^-$ (즉, 기억 세포)와 같이, 정제의 다른 단계에서 PBMC로부터 생성된 항-제3자 Tcm 배양액 내에 남아있는 항 숙주 반응성 세포의 빈도를 평가하기 위해 $CD4^-CD56^-CD19^-$ 세포(동종이계 양성 대조군으로 사용)와 비교하여 제한적 희석 분석(LDA)을 수행 하였다. 3종의 시험된 세포 제제를 방사선조사된 숙주 PBMC와 MLR 배양액에서 5일 동안 배양하여(즉, 벌크 배양) 항-숙주 활성을 유도하였다. 5일 후, 상기 MLR 배양액에서 이펙터 세포(effector cell)를 수확하고 피콜(Ficoll) 위에서 분리 하였다. 이펙터 세포를 96-웰 원형-바닥 플레이트(입력 번호당 16 반복)에 상이한 희석(범위, 웰당 1 내지 40,000 세포)으로 플레이팅하였다. 벌크 MLR에 사용된 방사선 방사선조사된(30 Gy) 호스트 자극제 또한 각 웰에 첨가하였다. 상기 제한 희석 배양액은 항-숙주 신호의 종점의 적정(titration of the end point)을 허용하기 위해 사용하였고, 이펙터 신호의 증폭을 위해 IL-2의 존재 하에 7일 동안 유지하였다.

[0385] 7일 후, 35S-메티오닌-표지 세포에 대해 세포 독성 활성을 표준 5시간 분석법으로 측정하였다. 간략하게, 표적 세포로 사용된 숙주로부터 콘카나발린 A-준비된 블라스트(concanavalin A-prepared blasts)(Sigma, St Louis, MO)을 35S- 메티오닌으로 표지하고, 시험한 유도된 이펙터 세포의 다양한 희석액과 함께 플레이팅하였다. 5시간 배양한 후, 16개 반복 샘플의 상등액에서 평균 방사능을 계산하고, 특이적 용해의 백분율을 다음식에 의해 계산하였다: 100x(평균 실험 방출-평균 자연 방출)/(평균 전체 방출-평균 자발 방출). 표적 세포에 의해 방출된 35S-메티오닌의 수준은 항-숙주 반응성의 수준을 나타내는 살상 수준을 나타낸다.

[0386] 제한 희석 배양 판독값으로부터 빈도를 계산하기 위해 다음식을 사용하였다: $ln y = -fx + ln a$ (푸아송 분포의 0차 항(zero-order term)을 나타냄), 여기서 y는 비-반응성 배양액의 백분율, x는 배양액 당 반응성 세포의 수이고, f는 반응성 전구체의 빈도이고, a는 이론적으로 100%와 같은 y 절편이다. 표적 세포만을 포함하는 16개의 웰의

평균+3 표준 편차가 배경 방사능에 대한 컷오프 값으로 결정되었다. 실험한 웰은 컷오프 값을 초과할 때 용해에 대해 양성으로 기록하였다. 배양액에 반응하는 백분율은 양성 배양의 백분율을 계산하여 정의하였다. CTL-p 빈도(f) 및 표준 오차(SE)는 데이터의 선형 회귀 분석을 이용하여 그려진 선의 기울기로부터 결정되었다.

[0387] 인터페론-감마-엘리스팟(IFN-γ-Elispot) 분석

[0388] 단일 세포 수준에서 사이토카인-분비 세포의 빈도를 측정하는 매우 민감한 면역측정법인 효소-결합된 면역스팟(enzyme-linked immunospot, ELISpot) 분석법이 사용되었다. IFN-γ가 주로 활성화된 T 세포와 NK 세포에서 생성되므로, INF-γ 엘리스팟 분석은 항-제3자 T_{cm} 배양액 내에 남아 있는 항-숙주 반응성 세포의 빈도를 평가하기 위해 사용하였다.

[0389] 간략하게, 96-웰 PVDF 막 마이크로 타이터 플레이트(96-well PVDF membrane microtiter plate)의 막 표면을 분석하고자 하는 사이토카인(IFN-γ)의 특이적 에피토프(epitope)에 결합하는 포획 항체(정제된 항-인간 INF-γ)로 코팅하였다. MLR 및 자극 단계의 16시간 동안, 시험된 세포의 다양한 희석액 (웰당 1 내지 40,000 세포의 범위)은 방사선처리된 항-숙주 자극제와 함께 플레이트의 웰에 분주되었다. 이들은 상기 웰의 상기 막 표면에 단일층을 형성하였다. 항-숙주-특이적 세포가 활성화됨에 따라, 이들은 IFN-γ를 방출하며, IFN-γ는 고정된 항체에 의해 막 표면에 직접 포획된다. 따라서 IFN-γ는 배양 배지로 확산되거나, 또는 단백질분해효소에 의해 분해되고 방관자 세포(bystander cell) 상의 수용체에 결합할 기회를 갖기 전에 분비 세포를 직접 둘러싸는 영역에서 "포획(captured)"된다. 후속 검출 단계는 고정화된 IFN-γ를 면역스팟(ImmunoSpot)으로 시각화한다. 세포, 파편(debris) 및 배지 성분을 제거하기 위해 웰을 세척한 후, 인간 IFN-γ에 특이적인 바이오틴화 항체를 웰에 첨가하였다. 이 항체는 IFN-γ 사이토카인의 별개의 에피토프(distinct epitope)와 반응하여 포획된 사이토카인을 검출하는데 사용된다. 임의의 결합되지 않은 바이오티닐화된 항체를 제거하기 위해 세척한 후, 검출된 사이토카인을 스트렙타비딘이 결합된 효소 서양고추냉이(HRP) 및 침전 기질(예, AEC, BCIP/NBT)을 사용하여 시각화하였다. 발색된 최종 생성물(적색 점, (HRP 용))은 일반적으로 개별 IFN-γ 생성 세포를 나타낸다. 반점을 수동으로(예, 해부 현미경으로) 계수하거나 자동화된 판독기를 사용하여 마이크로웰 이미지를 포착하고 스팟의 수와 크기를 분석한다.

[0390] **실시예 1**

[0391] **동족 항원(cognate antigen)에 대하여 증식된 TCR 형질전환 CD8 기억 T 세포는 완전한 동종이계 T 세포 제거 골수의 생착을 현저하게 향상시킨다.**

[0392] 기억 T 세포가 GvHD에 대한 위험 감소와 연관될 가능성은 지난 10년 동안 논의되어 왔다. 원칙적으로, 기억 풀은 항-바이러스성 클론이 풍부하므로 감소된 수준의 동종반응성(alloreactive) T 세포를 포함할 수 있다. 그러나 최근에 백혈병 환자에서 $CD45RA^{+}$ 제거된 HSCT를 사용하려고 시도한 두 주요 연구에서 이식 후 GvHD 예방법을 사용한 경우에도 상당한 수준의 GvHD가 보고되었다[Bleakley M. et al. J Clin Invest. (2015) 125 (7): 2677-89; Triplett, B.M. et al. Bone Marrow Transplant. (2015) 50 (7): 968-977]. 따라서, 항-제3자 T 세포 활성화 및 증식을 통해 T 세포 기억 풀에서 동종반응성 클론을 제거하면 CD45RA 세포의 제거 후에도 존재하는 잔여 GvHD의 문제를 해결할 수 있다. 또한, 제3자 자극제로서 일반적인 바이러스성-항원 펩티드의 사용은 동종반응성이 제거되고, 항-바이러스성 활성이 부여된 베토 T_{cm} 세포를 잠재적으로 만들 수 있다.

[0393] 이를 위해, 본 발명자는 기존의 기억 T 세포 풀의 TCR이 향하는 특정 펩티드를 사용하여 자극을 확립함으로써 항-제3자 베토 Tcm 세포의 생성에 대한 이전의 프로토콜을 변형시켰다. 따라서 개념을 증명하는 실험은 H2Kb MHC-I의 구성에서 난백알부민(OVA) 잔기 257-264를 인식하도록 설계된 형질전환(Tg) TCR을 발현하는 OT1 마우스를 사용한 마우스 모델에서 수행되었다. 이 마우스들은 베토 Tcm 세포의 공여자로 사용되었다. 이들에서 OT1 CD8 T 세포를 수확하기 전에 완전 프로인트 보조제(CFA)와 혼합한 OVA-펩티드로 마우스를 면역화시켰고, 초기 챌린지(challenge) 14일 후에 OVA-펩티드+불완전 프로인트 보조제(IFA)를 사용하여 면역을 강화시켰다 (도 1의 예시 참조). 면역화 7일 내지 14일 후 마우스를 희생시키고, 비장 및 림프절을 제거하여 분쇄하고, 자성 비드 분류를 이용하여 일반적인 CD8+ 세포-풀로부터 기억 세포(CD8+CD44+)를 단리시켰다. 그에 따른 집단은 OVA-발현 마우스의 비장에서 생성되어 방사선조사된 비장세포와 함께 공-배양하여 사이토카인 제거 하에 제3자 자극을 받았다. 공-배양 개시 후 60시간, WT Tcm에 대해 전술한 바와 같이 Tcm 유사 표현형을 발현하도록 세포를 밀어내기 위해 배양액에 hIL-15(10 ng/㎖)를 첨가하였다 (즉, '일반(regular)' Tcm 세포, 아래 설명된 대로). 도 2A에 도시된 바와 같이, 기억 세포(CD8+CD44+)의 출발 집단으로부터 생성된 OT-1 Tcm 세포는 '일반' 제3자 Tcm 세포에 의해 유도된 키메라와 유사하게 동종이계 T 세포 제거 골수 이식의 생착성(engraftment)을 향상시킬 수

있다 (즉, 이전에 입증된 바와 같이 전체 비장 또는 말초 혈액 단핵 세포로부터 준비된 이전에 기술된 베토 Tcm 세포 [Ophir, E. (2013), 상기와 동일]). 이러한 결과를 함께 종합하면 동족 펩티드에 대해 증식된 CD8+CD44+ 유래 Tcm 세포는 GvHD를 발휘하지 않고 실제로 면역관용을 유도할 수 있음을 보여준다.

[0394] **실시예 2**

[0395] **CD8 기억 T 세포에서 생성된 Tcm 베토 세포는 GVHD로 인한 위험 감소와 함께 현저한 베토 활성을 제공한다.**

[0396] 다음으로, 본 발명자들은 OVA로 면역화시킨 후 B6-WT 기억 CD8 T 세포로부터 T_{cm} 세포를 얻는 것을 시도하였다. 이를 위해, C57BL/6 마우스의 면역화 후, CD8+CD44+ 기억 T 세포를 자성 분류하고, 모든-OVA 자극기를 사용하여 Tcm 생성을 위한 동일한 프로토콜을 수행하였다. 초기에 본 발명자들은 이전에 임상(clinic)에서 사용되었던 CD8+CD44+의 초기 집단과 비교하여, 이들 CD8+CD44+ Tcm 세포가 GvHD를 유도하는 능력을 시험하였다.

[0397] $CD8^{+}CD44+$ T_{cm} 세포는 관련 TCR을 보유한 T 세포 클론만을 선택적으로 활성화시키는 OVA 펩티드를 사용한 항원성 자극으로 인하여 자가반응성 클론 (alloreactive clone)의 제거가 예상된다.

[0398] 실제로, CD8+CD44+ Tcm 세포는 동물 모델에서 현저한 GvHD 증상을 유도하지 않는 반면, 제3자 활성화를 받지 않은 CD8+CD44+ 새로운 기억 세포는 GvHD로 인해 현저한 치사율 및 체중 감소를 유도하는 것이 밝혀졌다(도 2B 내지 C). 다음으로, 본 발명자들은 이들 세포가 감소 강도 조건 (RIC) 모델에서 면역관용원성을 유도할 수 있는지 평가하기를 원했다(도 2D에 예시됨).

[0399] 도 2E에서 알 수 있는 바와 같이, CD8+CD44+ Tcm은 5Gy TBI로 컨디션된 Balb/c 수여자에 대한 C57BL-누드-BM의 이식 후 키메리즘(chimerism)의 현저한 생착을 나타냈다.

[0400] **실시예 3**

[0401] **바이러스성 항원을 사용한 항-제3자 인간 Tcm 세포의 생성**

[0402] 본 발명자들은 자가반응성의 제거를 위한 2단계 자성 분류 접근을 사용하여, GvHD에 대한 최소 위험을 갖는 CD4-CD56- 세포 시작 집단으로부터 인간 유래 항-제3자 베토 Tcm 세포를 생성하는 프로토콜을 이전에 개발하였다.

[0403] 이 프로토콜은 3명의 세포 공여자를 사용하여 개발되었으며, 상기 제3자 공여자는 GvHD 예방 목적을 위해 HLA 클래스 I 대립 유전자(alleles)가 숙주의 HLA 클래스 I 대립 유전자와 공유되지 않도록 선정되었다.

[0404] 현재의 실험에서, 마우스 개념 증명 실험에서 상술한 것과 유사하게, 본 발명자들은 자연 발생 기억-CD8 세포의 용도를 베토 Tcm 세포의 제조를 위한 출발 물질로서 이용하였으며, 이들 세포는 나이브 세포와 비교하여 GvHD 유도에 대해 감소된 경향을 갖는 것으로 보고되었다. 이 옵션은 최근에 나이브 T 세포의 제거를 위한 GMP-등급 CD45RA 자성 비드의 출시로 현실이 되었다. 전술한 바와 같이 및 전술한 '기술분야 및 배경기술'에서, CD45RA-세포를 주입하는 접근은 백혈병 환자의 두 임상 시험에서 시험되었다 [Bleakley M.et al. (2015) supra; Triplett, B.M. et al. (2015)] 그러나 GvHD는 이식 후 면역 억제로 치료를 받더라도 심각한 형태의 GvHD를 보이는 일부 환자에게는 예방되지 못했다. 이 결과는 본 발명자들로 하여금 특정 항원에 대한 CD45RA-제거 CD8 T 세포의 자극이 모든 GvH 반응성의 이들 세포를 완전히 고갈시킬 수 있는 가능성을 평가하도록 하였다. 이 기억 풀 내 대부분의 세포의 TCR은 일반적인 바이러스성 및 세균성 항원에 대한 것이며 따라서 자연적으로 숙주-자가반응성(host-alloreactive)일 가능성이 적기 때문에, 본 발명자들은 자극제로서 공여자 DC (즉, 상기 Tcm 세포와 동일한 세포 공여자) 상에 로딩된 바이러스성 항원 펩티드 (예, CMV, EBV 및 아데노바이러스)가 편리하게 사용될 수 있다고 이론화하였다(theorized). 이 접근법을 사용하면, 그들의 베토 활성 이외에 이들 세포의 잠재적 항-바이러스성 활성의 이점이 얻어질 수 있으며, 이것은 바이러스 재-활성화가 흔히 발생하는 이식 수술(transplantation setup)의 경우 특히 매력적인 속성이다.

[0405] 이 가정을 해결하기 위해, 항원에 대한 상기 자극이 제3자 DC에 대한 제3 HLA-데스퍼레이트 공여자(HLA-desperate donor) 대신 세 주요 바이러스(EBV, CMV 및 아데노바이러스)의 바이러스성 펩티드 혼합물로 펄스된 공여자 DC에 대하여 수행되는 것을 제외하고는 베토 Tcm 세포의 동일한 배양 조건을 사용하는 예비 실험이 개시되었다. 주목할 것은, 이 실험은 이전에 기술된 CD4-CD56- 집단으로부터 시작되었다(즉, CD45RA+ 세포는 제거되지 않았다). 도 3A 내지 3B에서 알 수 있는 바와 같이, 베토 Tcm 세포는 이 항-바이러스성 자극에 반응하여 잘 자랐으며, 베토 Tcm 표현형을 나타내는 세포의 높은 비율(93.2 %)과 함께 +9일에 10배 증식을 나타내었다.

[0406] 제한적 희석 분석(LDA)에 의해 분석된 항-숙주 반응성은 도 3C 및 3D에 나타내었고 관련 매개 변수는 아래의 표 2에 요약되어 있다. 결과는 이 방법이 다른 HLA 공여자에 대한 '제 3의 정기적인 활성화'를 사용하는 이전의 결과와 유사하게, 호스트 - 연쇄 반응 클론의 2 로그 고갈을 제공한다는 것을 보여 주었다. 결과는 이 방법이 이질적인(disparate) HLA 공여자에 대한 '일반적인'제3자 활성화를 사용한 이전의 결과와 유사하게, 숙주-자가 반응성 클론의 2-로그 제거를 제공한다는 것을 보여 주었다. 이러한 결과는 IFNγ-Elispot 분석(벌크 배양 후 수행됨)에 의해 뒷받침되었으며, 숙주 활성화시 새로운 세포(CD4-CD56-CD19-)가 10^6 T 세포당 약 25,000 스팟을 생성했다(데이터는 표시되지 않음).

표 2

바이러스성 펩티드에 대한 베토 Tcm 세포의 생성 전후 항-숙주 T 세포 제거

세포 분획	벌크 배양 대, 숙주를 위해 분주된 세포 수 (Day 9)	벌크 배양 후 회수된 세포 수 (Day 14)	LDA 기반 항-숙주 CTL-p 빈도	LDA 기반 전체 항-숙주 CTL-p($x10^8$) 빈도 ($100x10^8$에 정규화됨)	제거율 (depletion Factor)
새로운 $CD4^-56^-19^-$	50 x 10^8	32.4 x 10^8	1/2251	28,700	x
항바이러스성 Tcm $CD4^-56^-$	200 x 10^8	19.4 x 10^8	1/32,664	290	98.9

[0407]

[0408] **실시예4**

[0409] **바이러스성 항원을 사용한 기억 T 세포로부터 인간 베토 세포의 생성**

[0410] 다음으로, 본 발명자들은 공여자 DC (즉, Tcm 세포와 동일한 세포 공여자)에 제시된 바이러스성 항원에 대해 활성화된 CD45RA-제거 집단으로부터 성장한 Tcm 세포의 반응성을 시험하였다(도 4A 및 4B 참조).

[0411] 이 출발 집단(CD4-CD56-CD45RA- 세포)으로부터 성장한 베토 Tcm 세포의 반응성은 LDA 살상 분석을 사용하여 시험하였다. 결과로부터 명백한 바와 같이, 기억 세포로부터 생성된 베토 세포는 어떠한 항-숙주 반응성도 나타내지 않는다는 것이 명백하다 (도 5A 내지 5C 및 도 6).

[0412] 종합적으로 말하자면, 이러한 결과는 자극제로서의 항-바이러스성 펩티드의 접근이 상대적으로 낮은 GvHD 성향으로 알려지고, CD45RA가 제거된 반응 세포의 시작 집단(예, CD4-CD56-CD45RA- 세포)에 적용될 수 있음을 강력히 시사한다. 나타낸 바와 같이, 이 세포 집단은 항-바이러스성 자극시 추정상의 (putative) 항-숙주 클론으로 추가로 희석될 수 있으며, 이는 생산할 수 있고 매우 안전한 무-GvHD 세포 제제이다.

[0413] **실시예 5**

[0414] **비-바이러스성 항원을 사용한 기억 T 세포로부터 인간 베토 세포의 생성**

[0415] 본 발명자들은 암으로 확인된 펩티드(예, 고형 종양 또는 조혈 악성 종양(hematopoietic malignancy))를 포함하는 비-바이러스성 펩티드로 자극된 기억 세포(CD45RA- 세포)의 시작 집단으로부터 베토 세포를 만들었다.

[0416] 상기 기재한 바와 같이, 베토 세포는 공여자로부터 수득한 기억 T 세포 (즉, CD45RA 제거 집단)를 공여자 DC 상에 제시된 종양 항원으로 처리함으로써 생성된다.

[0417] 다른 방법으로, 베토 세포는 완전 프로인트 보조제(CFA)와 함께 종양 펩티드 (상기 '일반적인 재료 및 실험 절차'에 논의됨)로 세포 공여자를 먼저 면역화하고, 초기 챌린지 14일 후에 종양 펩타이드+불완전 프로인트 보조제 (IFA)로 면역을 강화시켜 생성된다. 다음으로, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)가 피험자로부터 얻어지고 CD4+CD56 +CD45RA+ 세포가 제거된다. 나머지 세포 집단(즉, CD8+CD45RO+ 기억 T 세포)은 공여자 DC 상에 제시된 종양 항원과 함께 공-배양된다.

[0418] 이 세포들은 잔여 암세포의 치료적 제거를 위해 추가로 사용될 수 있다.

[0419] **실시예 6**

[0420] **항-바이러스성 중심 기억 CD8 베토 T 세포(Tcms)의 대규모 생산을 위한 우수의약품제조관리기준(GMP)**

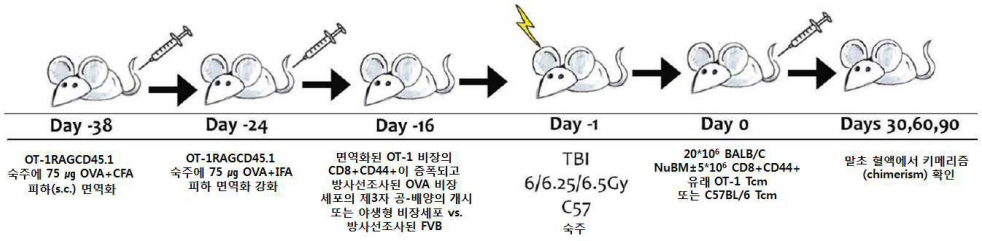
[0421] 본 발명자들은 자가 항원 제시 세포(autologous antigen presenting cells)에 존재하는 바이러스성 항원을 사용하여 기억 T 세포로부터 인간 베토 세포를 생성하는 프로토콜을 성공적으로 10회 반복하였다(도 7). 도 8 및 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 새로운 프로토콜의 세포 회수 및 순도는 매우 재현가능하였다.

[0422] 본 발명은 이의 구체적인 실시 양태와 함께 기술되었지만, 당해 기술분야의 당업자는 다수의 변경, 변형 및 변화를 알게 될 것이 분명하다. 따라서, 첨부되는 청구항의 사상 및 광범위한 범위에 속하는 이러한 변경, 변형 및 변화를 모두 아우르는 것으로 의도된다.

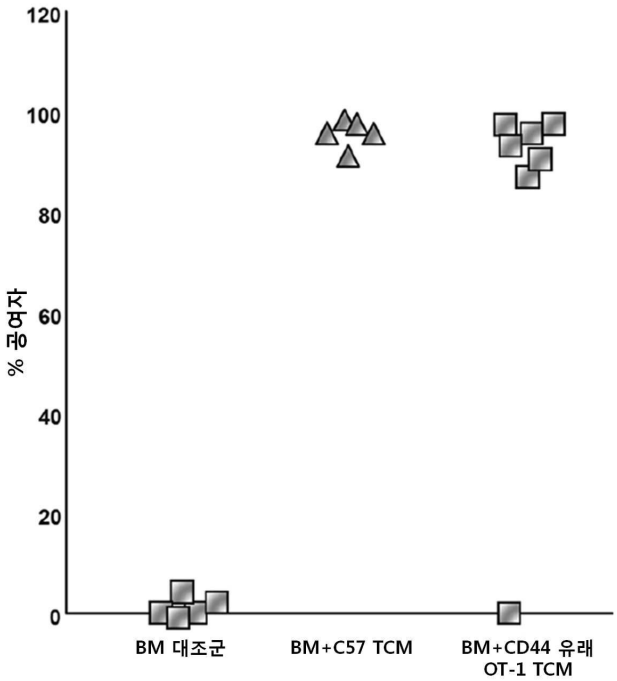
[0423] 본 명세서에서 언급된 모든 공개, 특허 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 공개, 특허 또는 특허 출원이 원용에 의해 본 명세서에 포함되는 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 지시되는 것과 같이, 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 또한, 본 출원에서 참조문헌의 언급 또는 식별은, 이러한 참조문헌이 본 발명의 선행 기술로서 이용되는 허락으로서 간주해서는 안된다. 섹션 주제(section heading)가 사용되는 한도에서, 이들은 본질적으로 한정하려는 것으로 간주해서는 안된다.

도면

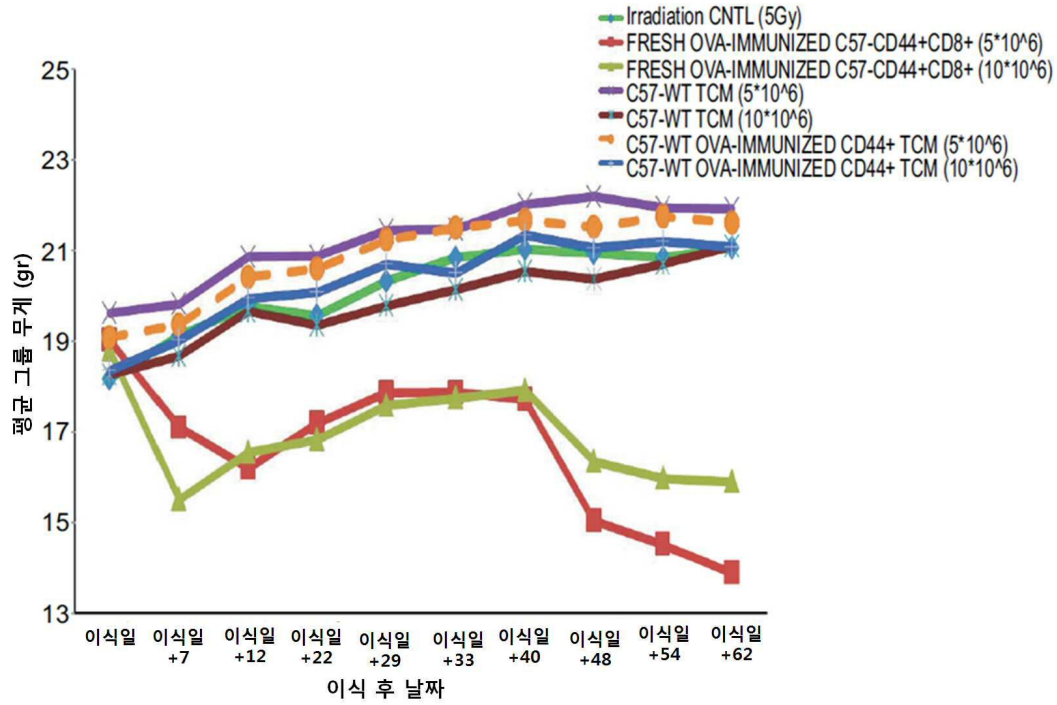
도면1



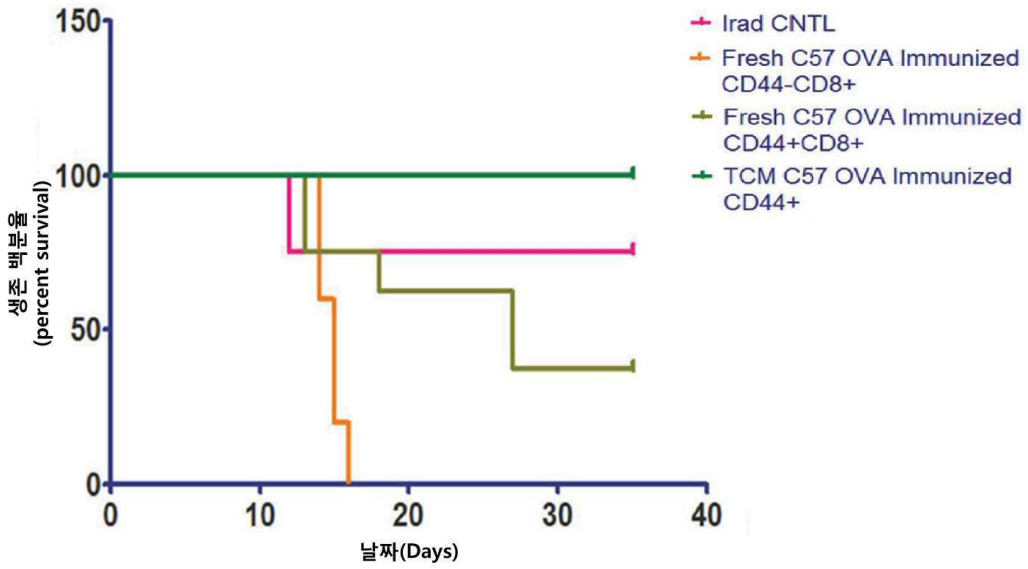
도면2a



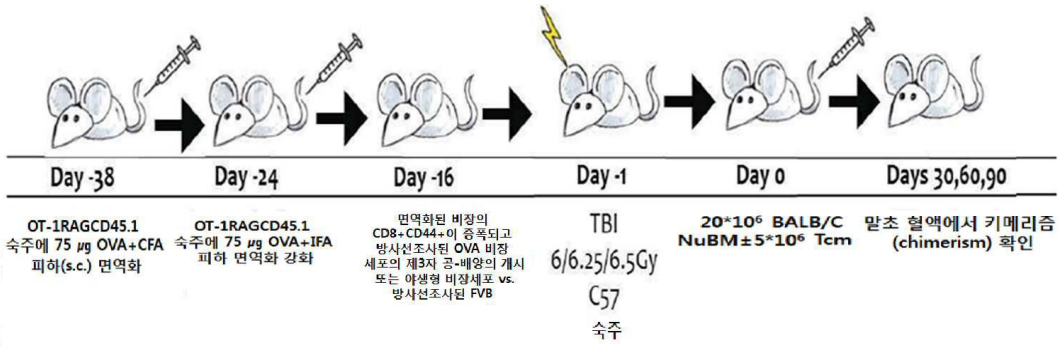
도면2b


Irradiation CNTL (5Gy)
FRESH OVA-IMMUNIZED C57-CD44+CD8+ (5*10^6)
FRESH OVA-IMMUNIZED C57-CD44+CD8+ (10*10^6)
C57-WT TCM (5*10^6)
C57-WT TCM (10*10^6)
C57-WT OVA-IMMUNIZED CD44+ TCM (5*10^6)
C57-WT OVA-IMMUNIZED CD44+ TCM (10*10^6)
평균 그룹 무게 (gr)
25
23
21
19
17
15
13
이식일
이식일 +7
이식일 +12
이식일 +22
이식일 +29
이식일 +33
이식일 +40
이식일 +48
이식일 +54
이식일 +62
이식 후 날짜

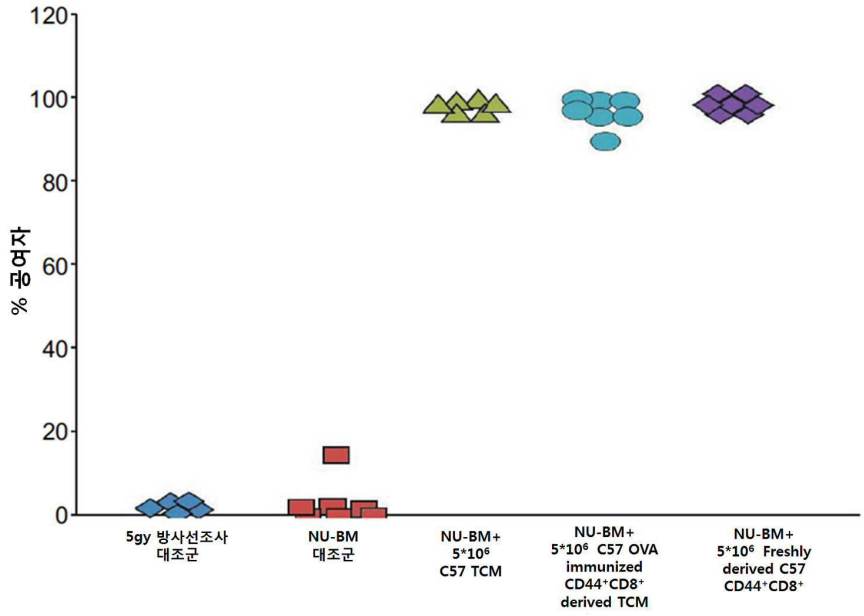
도면2c


Irad CNTL
Fresh C57 OVA Immunized CD44-CD8+
Fresh C57 OVA Immunized CD44+CD8+
TCM C57 OVA Immunized CD44+
생존 백분율 (percent survival)
150
100
50
0
0
10
20
30
40
날짜(Days)

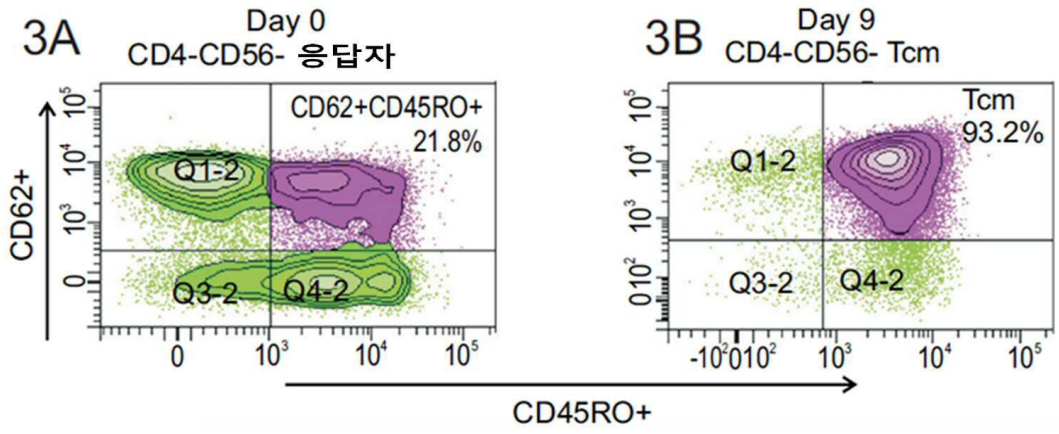
도면2d



도면2e

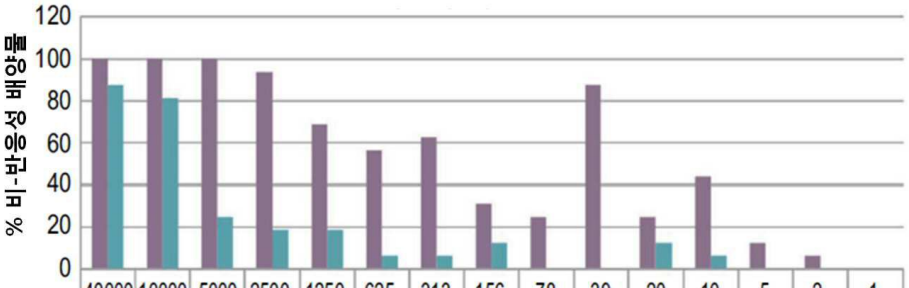


도면3ab



도면3c

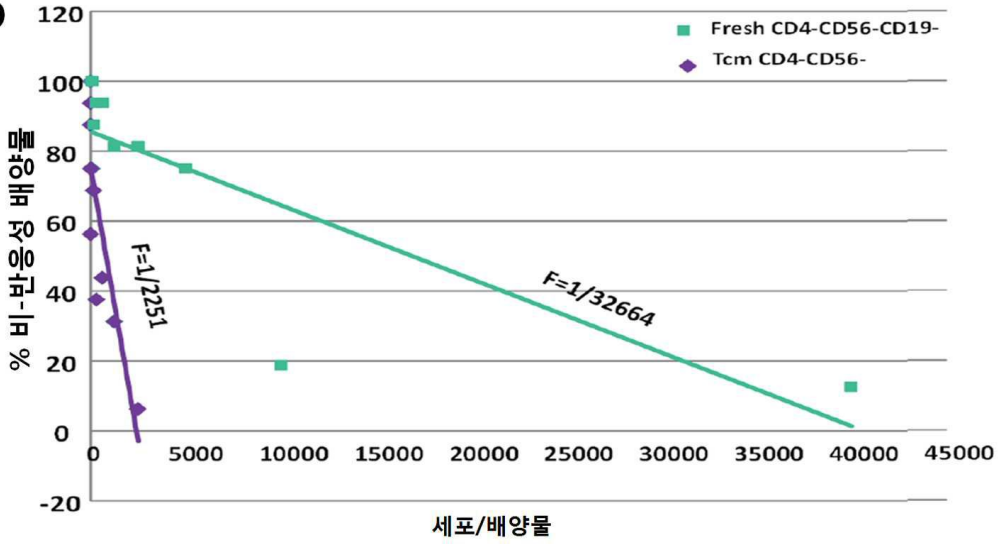
3C



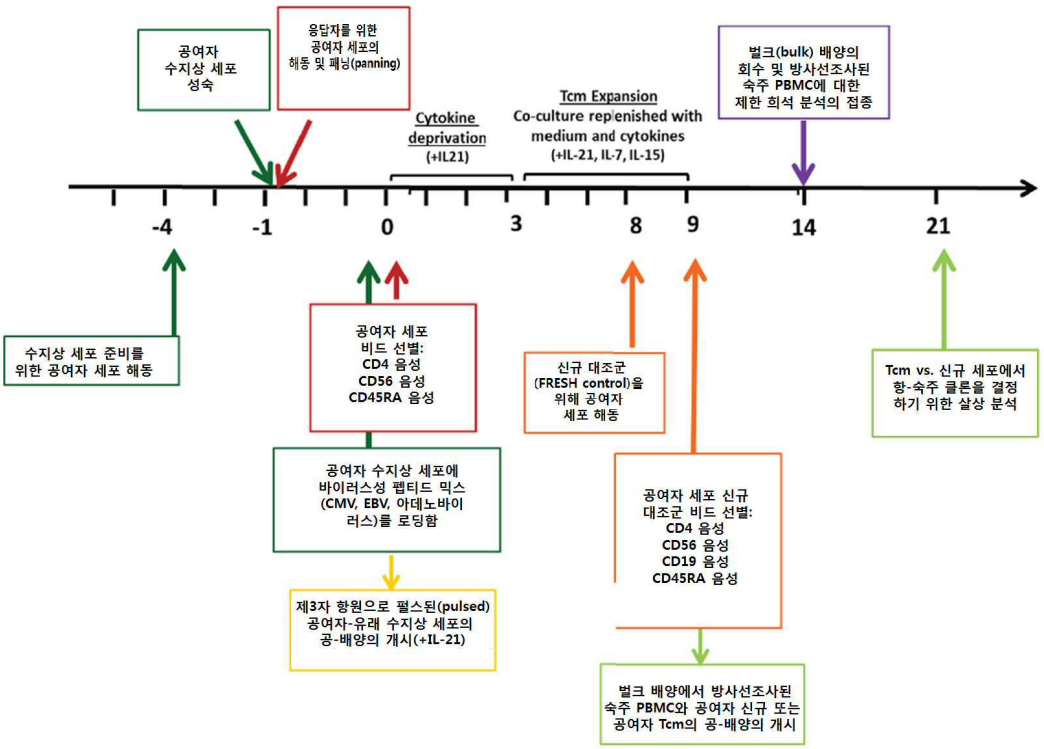
	40000	10000	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10	5	2	1
Fresh Cd4-CD56-CD19-	100.0	100.0	100.0	93.75	68.75	56.25	62.50	31.25	25.00	87.50	25.00	43.75	12.50	6.25	10.00
Tcm CD4-CD56-	87.5	81.25	2.5	18.75	18.75	6.25	6.25	12.5	0	0	12.5	6.25	0	0	0

도면3d

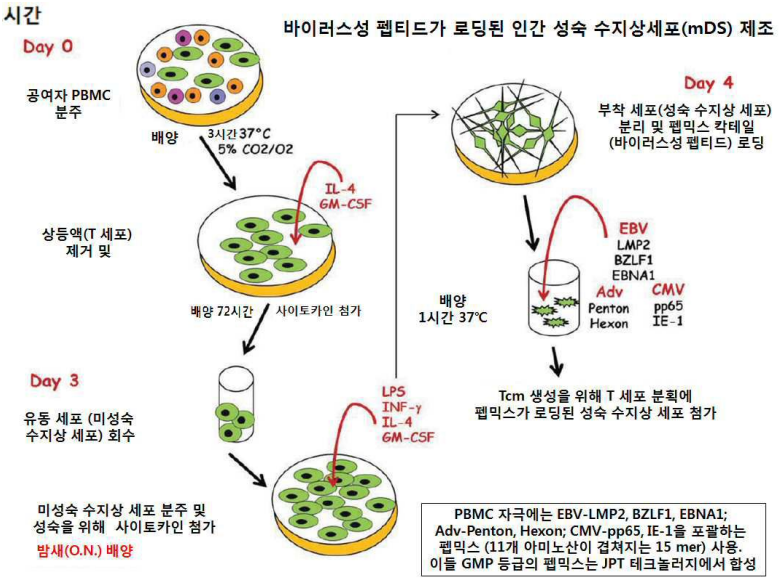
3D



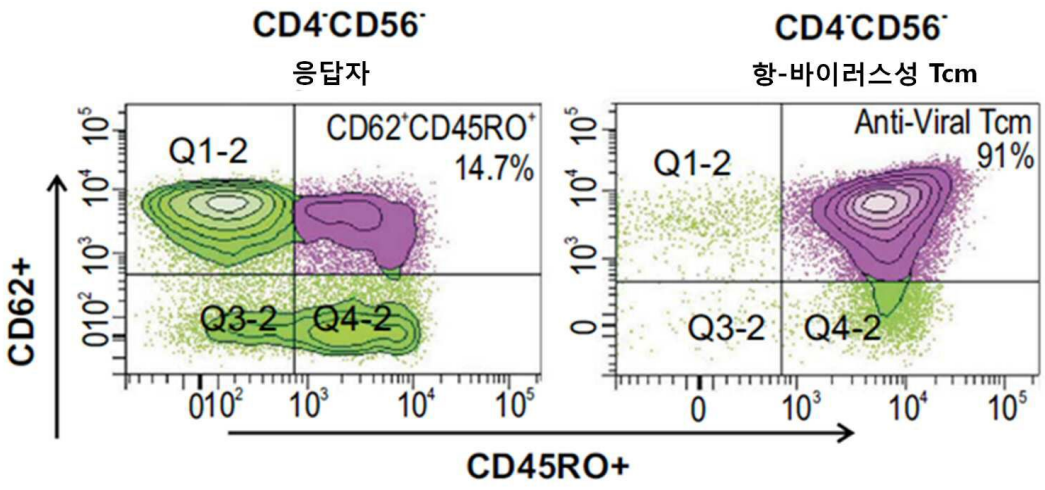
도면4a


공여자
수지상 세포
성숙
응답자를 위한
공여자 세포의
해동 및 패닝(panning)
Cytokine
deprivation
(+IL21)
Tcm Expansion
Co-culture replenished with
medium and cytokines
(+IL-21, IL-7, IL-15)
벌크(bulk) 배양의
회수 및 방사선조사된
숙주 PBMC에 대한
제한 희석 분석의 접종
-4
-1
0
3
8
9
14
21
수지상 세포 준비를
위한 공여자 세포 해동
공여자 세포
비드 선별:
CD4 음성
CD56 음성
CD45RA 음성
신규 대조군
(FRESH control)을
위해 공여자
세포 해동
Tcm vs. 신규 세포에서
항-숙주 클론을 결정
하기 위한 살상 분석
공여자 수지상 세포에
바이러스성 펩티드 믹스
(CMV, EBV, 아데노바이
러스)를 로딩함
공여자 세포 신규
대조군 비드 선별:
CD4 음성
CD56 음성
CD19 음성
CD45RA 음성
제3자 항원으로 펄스된(pulsed)
공여자-유래 수지상 세포의
공-배양의 개시(+IL-21)
벌크 배양에서 방사선조사된
숙주 PBMC와 공여자 신규 또는
공여자 Tcm의 공-배양의 개시

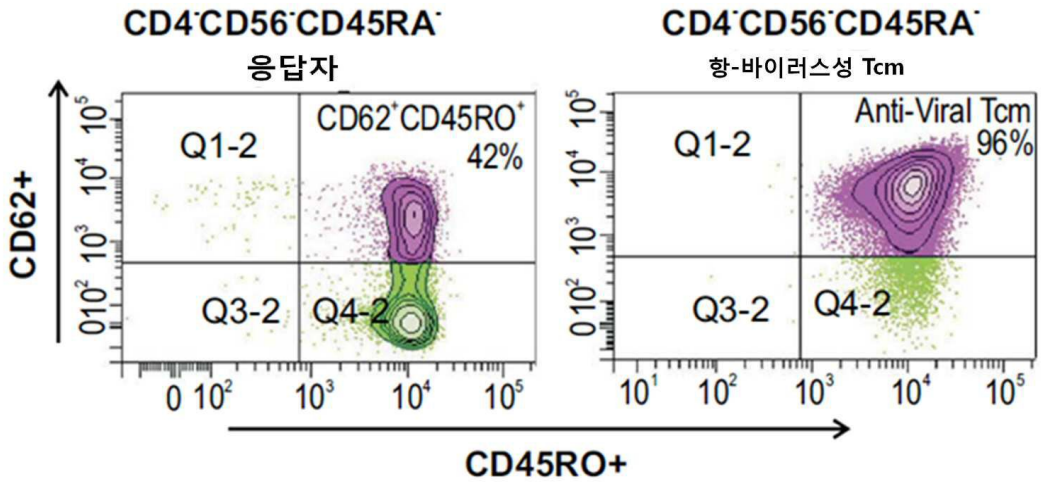
도면4b


시간
바이러스성 펩티드가 로딩된 인간 성숙 수지상세포(mDS) 제조
Day 0
공여자 PBMC
분주
배양
3시간 37°C
5% CO2/O2
IL-4
GM-CSF
상등액(T 세포)
제거 및
배양 72시간
사이토카인 첨가
Day 3
유동 세포 (미성숙
수지상 세포) 회수
LPS
INF-γ
IL-4
GM-CSF
미성숙 수지상 세포 분주 및
성숙을 위해 사이토카인 첨가
밤새(O.N.) 배양
Day 4
부착 세포(성숙 수지상 세포)
분리 및 펩믹스 칵테일
(바이러스성 펩티드) 로딩
EBV
LMP2
BZLF1
EBNA1
Adv
Penton
Hexon
CMV
pp65
IE-1
배양
1시간 37°C
Tcm 생성을 위해 T 세포 분획에
펩믹스가 로딩된 성숙 수지상 세포 첨가
PBMC 자극에는 EBV-LMP2, BZLF1, EBNA1;
Adv-Penton, Hexon; CMV-pp65, IE-1을 포괄하는
펩믹스 (11개 아미노산이 겹쳐지는 15 mer) 사용.
이들 GMP 등급의 펩믹스는 JPT 테크놀러지에서 합성

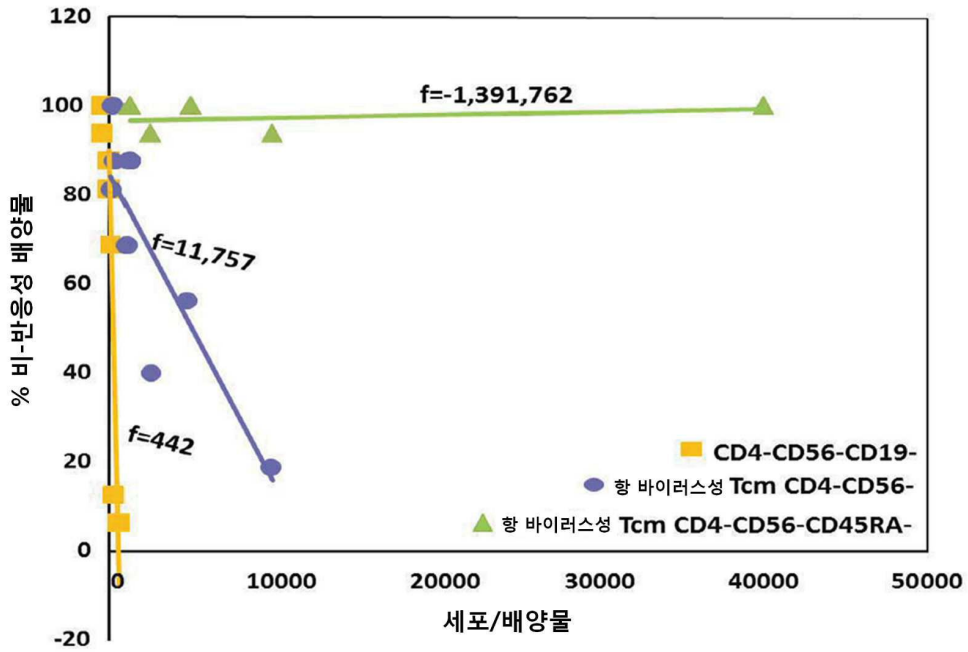
도면5a


CD4-CD56-
응답자
CD4-CD56-
항-바이러스성 Tcm
Q1-2
CD62+CD45RO+
14.7%
Q3-2
Q4-2
Anti-Viral Tcm
91%
CD62+
CD45RO+

도면5b


CD4-CD56-CD45RA-
응답자
CD4-CD56-CD45RA-
항-바이러스성 Tcm
Q1-2
CD62+CD45RO+
42%
Q3-2
Q4-2
Anti-Viral Tcm
96%
CD62+
CD45RO+

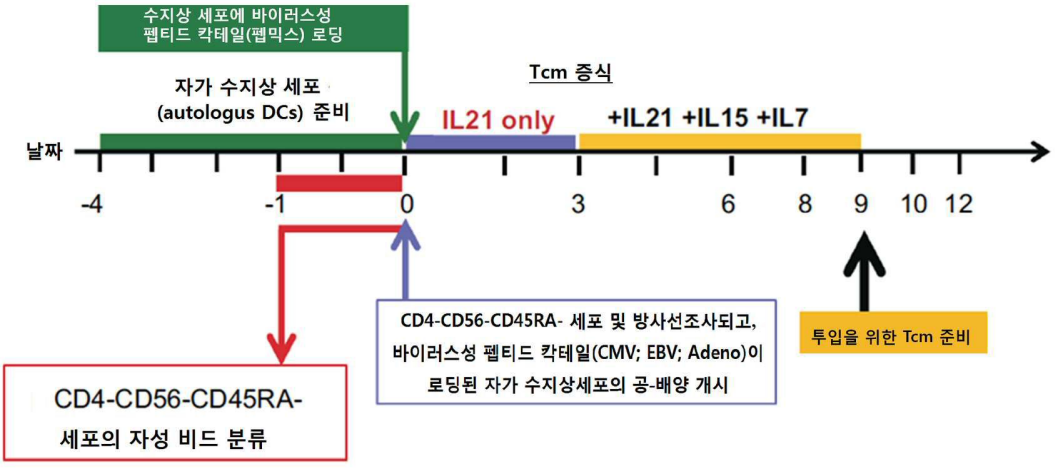
도면5c



도면6

세포 분획	벌크 배양 대. 숙주를 위해 분주된 세포 수 (Day 9)	벌크 배양 후 회수된 세포 수 (Day 14)	LDA 기반 항-숙주 CTL-p 빈도	LDA 기반 전체 항-숙주 CTL-p ($x10^9$) 빈도 ($100x10^6$에 정규화됨)	제거율
새로운 $CD4^-56^-19^-$	$50x10^6$	$30x10^6$	1/442	0.136	
항바이러스성 Tcm $CD4^-56^-$	$200x10^6$	$30x10^6$	1/11,757	0.00128	106
항바이러스성 Tcm $CD4^-56^-RA^-$	$200x10^6$	$60x10^6$	1/-1,391,762	0.000022	6181

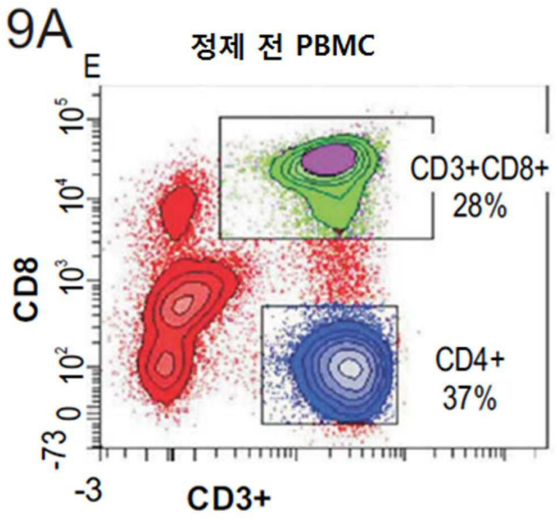
도면7



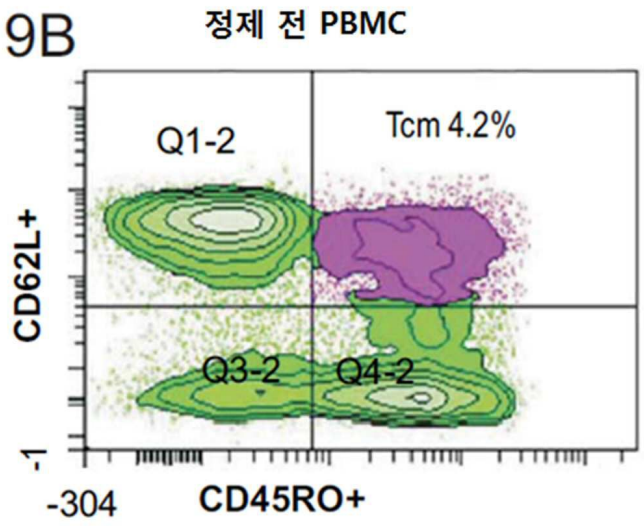
도면8

		Day -1	Day -1	Day 0	Day 0	Day 0		Day 9		Day 9
	# 바이알	해동 전	해동 후	페닝 (penning) 후	CD4-CD56 후	CD4-CD56-RA- 후		항-바이러스성 Tcm		폴드 팽창
		($x10^5$)	($x10^5$)	($x10^6$)	($x10^6$)	Cell#($x10^6$)	%	Cell#($x10^6$)	%	
공여자 A (3개 실험 평균) 전체 세포 #	32	3167	2308	1083	462	26		1158		
공여자 B (2개 실험 평균) 전체 세포 #	22	2200	1450	1000	400	78		404		
공여자 C (2개 실험 평균) 전체 세포 #	30	3000	2025	1150	325	67		338		
공여자 D (1개 실험) 전체 세포 #	30	3000	2120	1000	276	58		583		
공여자 E (2개 실험 평균) 전체 세포 #	30	2950	1943	1300	340	47		783		
평균	29	2863	1969	1107	361	55		653		11.8
표준편차(SD)	4	380	321	125	72	20		331		
공여자 A (3개 실험 평균) CD3+CD8+ 분획의 세포 #						17	67	1088	94	
공여자 B (2개 실험 평균) CD3+CD8+ 분획의 세포 #						19	24	349	86	
공여자 C (2개 실험 평균) CD3+CD8+ 분획의 세포 #						16	25	318	92	
공여자 D (1개 실험) CD3+CD8+ 분획의 세포 #						31	53	550	94	
공여자 E (2개 실험 평균) CD3+CD8+ 분획의 세포 #						14	30	731	93	
평균						19	40	607	92	31.5
표준편차(SD)						7	19	316	3	
공여자 A (3개 실험 평균) CD62L+CD45RO+ 분획의 세포 #						7	27	897	77	
공여자 B (2개 실험 평균) CD62L+CD45RO+ 분획의 세포 #						8	10	187	47	
공여자 C (2개 실험 평균) CD62L+CD45RO+ 분획의 세포 #						8	12	228	65	
공여자 D (1개 실험) CD62L+CD45RO+ 분획의 세포 #						12	20	466	80	
공여자 E (2개 실험 평균) CD62L+CD45RO+ 분획의 세포 #						5	12	699	89	
평균						8	16	495	72	63.8
표준편차(SD)						2	7	304	16	

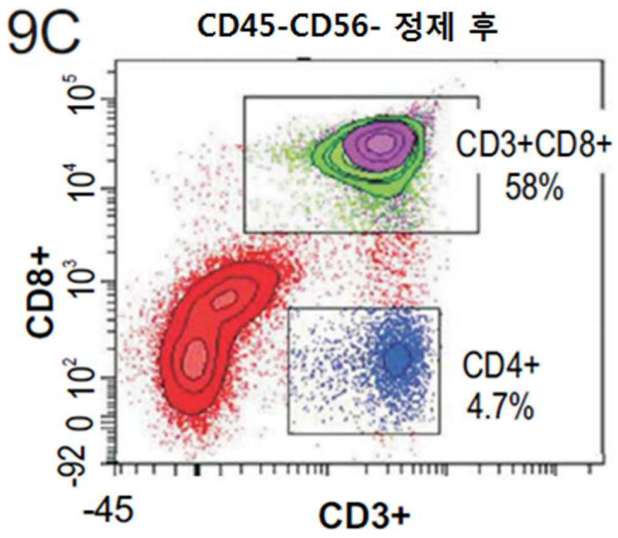
도면9a



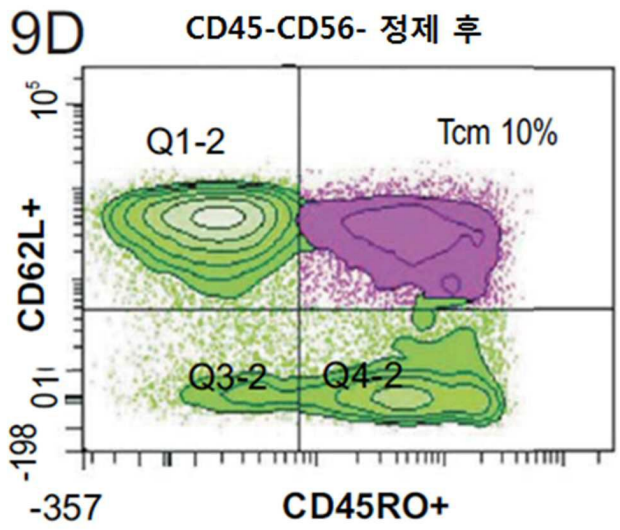
도면9b



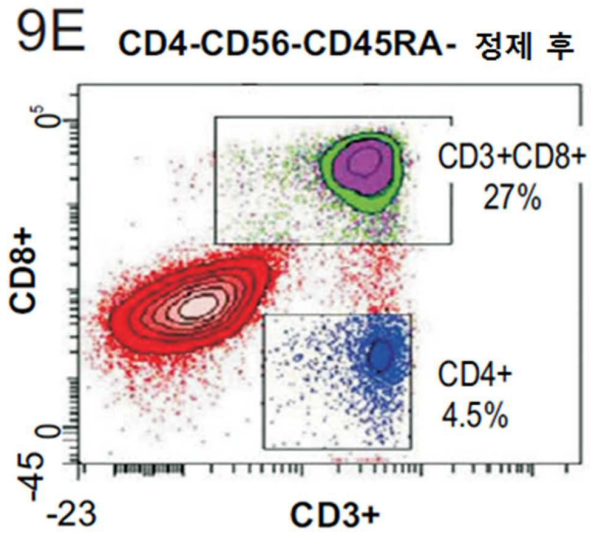
도면9c



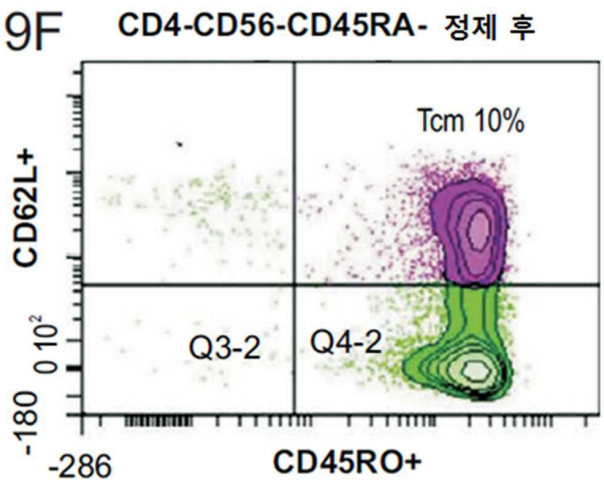
도면9d



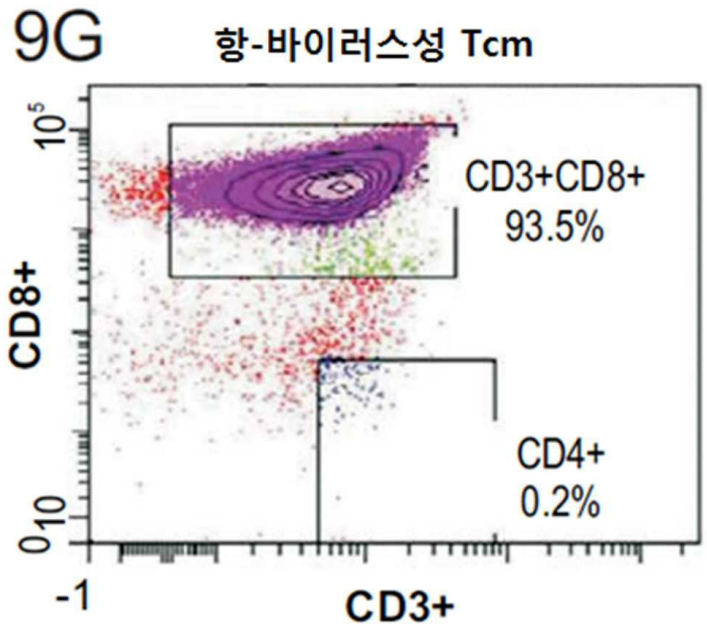
도면9e


9E
CD4-CD56-CD45RA- 정제 후
CD3+CD8+
27%
CD4+
4.5%
CD8+
10^5
0
-45
-23
CD3+

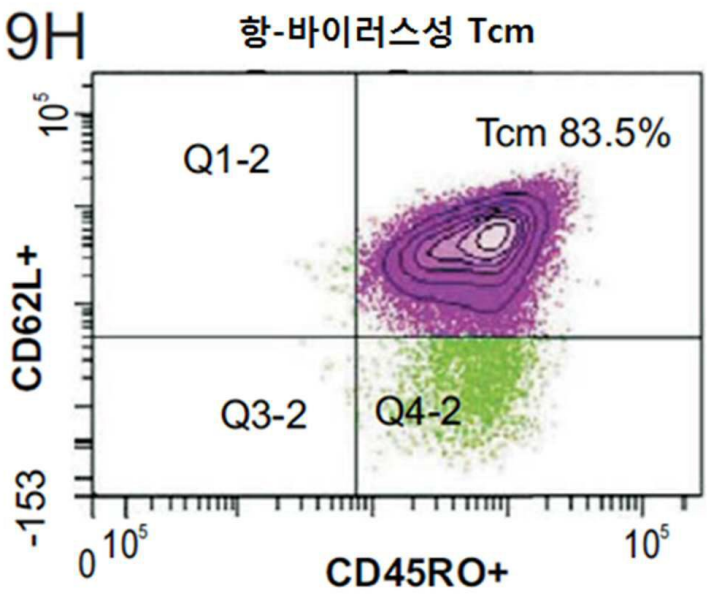
도면9f


9F
CD4-CD56-CD45RA- 정제 후
Tcm 10%
Q3-2
Q4-2
CD62L+
$0\ 10^2$
-180
-286
CD45RO+

도면9g


9G
항-바이러스성 Tcm
CD3+CD8+
93.5%
CD4+
0.2%
CD8+
CD3+
10^5
0
10
-1

도면9h


9H
항-바이러스성 Tcm
Q1-2
Tcm 83.5%
Q3-2
Q4-2
CD62L+
CD45RO+
10^5
0
10^5
-153