



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0128324
(43) 공개일자 2023년09월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7025924
- (22) 출원일자(국제) 2022년02월04일
심사청구일자 2023년07월28일
- (85) 번역문제출일자 2023년07월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2022/004542
- (87) 국제공개번호 WO 2022/168959
국제공개일자 2022년08월11일
- (30) 우선권주장
JP-P-2021-017831 2021년02월05일 일본(JP)

- (71) 출원인
고쿠리츠다이가쿠호진 고베다이가쿠
일본 효고켄 고베시 나다쿠 롯코다이쵸 1방 1고
- (72) 발명자
아오이, 타카시
일본 효고켄 657-8501 고베시 나다쿠 롯코다이쵸 1방 1고, 고쿠리츠다이가쿠호진 고베다이가쿠 내
무라이, 노부유키
일본 효고켄 657-8501 고베시 나다쿠 롯코다이쵸 1방 1고, 고쿠리츠다이가쿠호진 고베다이가쿠 내
- (74) 대리인
특허법인뉴코리아

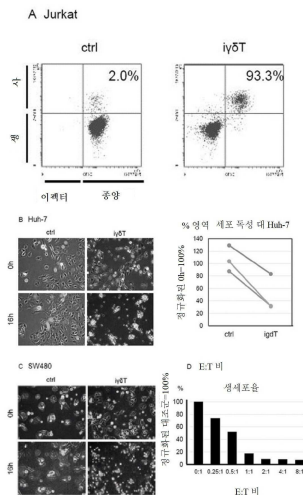
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **인공 다능성 줄기 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포 및 그 제작방법**

(57) 요약

치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보하기 위한 $\gamma\delta$ T 세포를 제공한다. 나아가서는 해당 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법을 제공한다. 보다 상세하게는, 균질한 $\gamma\delta$ T 세포이며, 세포의 피폐에 영향을 받지 않는 뛰어난 $\gamma\delta$ T 세포를 제공한다. 인공 다능성 줄기 세포(iPS 세포)를 분화 유도 처리로 얻어진 $\gamma\delta$ T 세포에 의한다. 구체적으로는 $\gamma\delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포($\gamma\delta$ TCR형 iPS 세포)를 분화 유도 처리하여 제작된 $\gamma\delta$ T 세포에 의한다. 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법에 따르면, MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 뛰어난 기능을 가지며, 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포에 비해 균질하고 효과가 높은 $\gamma\delta$ T 세포 및 $\gamma\delta$ T 세포의 세포 집단을 제공할 수 있었다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61K 39/4632 (2023.05)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

C12N 2501/125 (2013.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/26 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인공 다능성 줄기 세포(iPS 세포) 유래 T 세포로서, 상기 T 세포가 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상호 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 iPS 세포가 $\alpha \beta$ T 세포 유래가 아닌 iPS 세포인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서,

상기 iPS 세포가 $\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

청구항 4

$\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포를 분화 유도 처리하여 제작된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

청구항 5

$\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포를 분화 유도 처리하여 얻은 혈구 전구 세포를, 기본 배지에 FLT3L(tyrosine kinase 3 ligand), SCF(stem cell factor), IL-2, IL-7, TPO(thrombopoietin), L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정 이후, $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 7

청구항 5 또는 6에 있어서,

기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정이 피더 세포와 공동 배양하여 배양하는 공정인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 8

청구항 5 또는 6에 있어서,

기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정이 피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정이 VCAM1(vascular cell adhesion molecule-1) 및 DLL4(Delta-Like Protein 4) 혹은 DLL1(Delta-Like Protein 1)로 코팅한 배양 기재를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 10

청구항 8 또는 9에 있어서,

피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정이 추가로 DKK1 및/또는 AZA(Azelaic acid)를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 11

청구항 6 내지 10 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$ T 세포 자극제를 포함하는 배지가 $\gamma\delta$ T 세포 자극제, IL-2 및 IL-15로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 포함하는 배지인 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 12

청구항 6 내지 11 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma\delta$ T 세포 자극제가 이소프레노이드 생합성 경로 대사물인 인산 화합물 또는 그 유도체 혹은 이소프레노이드 생합성 경로의 율속 효소인 FPP(farnesyl pyrophosphate) 합성 효소의 특이적 저해 물질인 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 13

청구항 6 내지 12 중 어느 한 항에 있어서,

혈청을 포함하지 않는 조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 14

청구항 6 내지 13 중 어느 한 항에 있어서,

저산소 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법.

청구항 15

청구항 5 내지 14 중 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 제작 방법에 의해 제작된 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 16

청구항 1 내지 4 및 청구항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포의 세포 집단과 비교하여 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단이 항원 특이적으로 높은 세포 상해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 18

$\gamma\delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, TCR 유전자의 CDR3 영역이 동일한 염기 서열을 갖는 $\gamma\delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma\delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 $\gamma\delta$ T 세포의 세포 집단.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

$\gamma \delta$ T 세포가 1×10^5 개 이상 포함되는 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 20

$\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, CD7 및/또는 CD8a의 발현량에 대하여, 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에 비해 높은 발현량을 보이는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단.

청구항 21

청구항 18 내지 20 중 어느 한 항에 있어서,

$\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, 미분화 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 10% 이하인 것을 특징으로 하는 세포 집단.

청구항 22

청구항 1 내지 4 및 청구항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 항원 특이적 세포성 면역 치료제.

청구항 23

액체 배지 중에서 비즈 형상 담체를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 것을 특징으로 하는 청구항 1 내지 4 및 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 배양 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 4 및 청구항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 암, 감염증, 자가 면역 부전 등의 질환의 치료제.

청구항 25

청구항 1 내지 4 및 청구항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 의약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인공 다능성(多能性) 줄기 세포(iPS 세포) 유래 $\gamma \delta$ T 세포 및 그 제작 방법에 관한 것이다. 구체적으로는, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포로서, MHC 비구속성으로 작용하는 T 세포 및 그 제작 방법에 관한 것이다. 기본 배지로 할 수 있다. 추가로서는 해당 제작된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다.

[0002] 본 출원은 참조에 의해 여기에 완용되는 바의 일본 출원 특원 2021-017831호 우선권을 청구한다.

배경 기술

[0003] 인간의 성숙 T 세포는 T 세포 수용체가 α 사슬(鎖)과 β 사슬로 구성되는 $\alpha \beta$ (알파 베타) T 세포와 γ 사슬과 δ 사슬로 구성되는 $\gamma \delta$ (감마 델타) T 세포의 두 그룹으로 크게 나뉘어진다. $\alpha \beta$ T 세포는 다양성이 매우 높고, 어느 한 종류의 $\alpha \beta$ T 세포가 공격할 수 있는 세포의 종류는 MHC(Major Histocompatibility Complex, 주요조직 적합성 복합체) 구속성이 있어 적은 데 반해, $\gamma \delta$ T 세포에서는 어느 한 종류의 $\gamma \delta$ T 세포가 MHC 비구속성으로 많은 종류의 암세포를 공격하는 것이 알려져 있다. $\gamma \delta$ T 세포는 한 종류의 T 세포 수용체(TCR)로 많은 종류의 암세포를 인식하고 직접적으로 상해한다. 그러나 $\gamma \delta$ T 세포는 통상적으로 말초 혈액 중에 1~5%밖에 존재하지 않으므로, 소량의 혈액을 채취하여 $\gamma \delta$ T 세포를 활성화 및/또는 증식시켜도 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보할 수 없다는 문제가 있다. 또한, 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보하기 위하여 환자로부터의 채혈량을 많게 하면 환자에게 많은 부담이 된다는 문제도 있다. 환자 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포를

체의 증식시켜 환자에게 수주(輸注)하는 치료가 이미 행해지고 있는데, 이러한 방법으로는 세포수 확보의 어려움, 세포의 피폐(exhaustion) 때문에 충분한 증폭과 활성화를 얻을 수 없었다.

[0004] γ δ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포(γ δ TCR형 iPS 세포)의 제작 방법에 대하여 개시가 있다(특허문헌 1, 비특허문헌 1). 특허문헌 1 및 비특허문헌 1에서는 γ δ TCR형 iPS 세포를 혈구 전구 세포까지 더 분화 유도한 것이 개시되어 있다. 그러나, 상기 혈구 전구 세포로부터 더 T 세포로 분화 유도한 것까지는 개시되어 있지 않다.

[0005] T 세포 유래 iPS 세포로부터 T 세포로 분화 유도하는 방법에 대하여 개시가 있다(특허문헌 2). 또한, 암항원 특이적 TCR 유전자 재구성을 갖는 T 세포로부터 iPS 세포를 제작하고 분화 유도함으로써, 원래의 세포와 동일한 재구성을 갖는 T 세포를 얻을 수 있음이 보고되었다. CD8⁺ α β T 세포 유래 인간 iPS 세포를 분화 유도하고 인간 종양 항원 특이적 α β T 세포를 재구성한 것(비특허문헌 2), 분화 유도하여 얻어진 인간 종양 항원 특이적 α β T 세포가 항원 특이적으로 세포 상해성을 보인 것이 보고된 바 있다(비특허문헌 3, 특허문헌 3, 4). 종양 항원 특이적 TCR 유전자 재구성을 갖는 T 세포로부터 iPS 세포를 제작하고 분화 유도함으로써 원래의 세포와 동일한 재구성을 갖는 T 세포를 얻을 수 있음이 보고된 바 있다. 그러나, 모두 α β T 세포에 관한 보고이며, γ δ T 세포에 대해서는 개시되어 있지 않다. 상기 α β T 세포는 모두 특정 α β TCR을 갖는 세포이므로, 해당 항원을 발현하는 암의 종류가 적은 것과 MHC 구속성이 있는 것으로 인해 치료의 대상이 될 수 있는 환자가 한정적이었다.

[0006] ES 세포(embryonic stem cells, 배아 줄기세포) 또는 iPS 세포 등의 줄기 세포로부터 분화 유도된 T 세포가 γ δ T 세포와 유사한 표현형을 보였다고 하는 보고가 있다(비특허문헌 4, 특허문헌 5). 그러나, 상기 문헌에 나타내는 T 세포에서는 유전자 발현 패턴 등에 있어서 γ δ T 특징적인 표현형과 유사한 부분은 인정되지만, 실제로 γ δ T 세포 수용체를 발현하고 그에 의해 항원을 인식하고 표적 세포를 상해하는 T 세포 즉 γ δ T 세포라고는 할 수 없다.

[0007] MHC 비구속성으로 많은 종류의 암세포를 공격 가능한 T 세포를 효과적으로 조절하는 방법이 요망되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 국제 공개 W02018/143243호 공보(PCT/JP2018/003120)
- (특허문헌 0002) 국제 공개 W02011/096482호 공보
- (특허문헌 0003) 국제 공개 W02016/010153호 공보
- (특허문헌 0004) 국제 공개 W02016/010155호 공보
- (특허문헌 0005) 국제 공개 W02014/165707호 공보

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Stem cells translational medicine, 7(1), 34-44 (2018)
- (비특허문헌 0002) Cell Stem Cell, 12, 31-36 (2013),
- (비특허문헌 0003) Cancer Research, 76(23), 6839 (2016)
- (비특허문헌 0004) Nat Biotechnol, 31, 928-3 (2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] γ δ T 세포는 통상적으로 말초 혈액 중에 1~5%밖에 존재하지 않으므로 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보할 수 없다는 문제가 있었다. 또한, 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보하기 위하여 채혈량을 많게 하면 피체

혈자에게 많은 부담이 된다는 문제도 있었다. 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포를 체외 증폭시키는 방법으로는 세포수 확보의 어려움 외에 세포의 피폐 때문에 충분한 증폭과 활성화를 얻을 수 없었다.

[0011] 본 발명은 효과적으로 $\gamma \delta$ T 세포를 제작하고 제공하는 것을 과제로 한다. 보다 상세하게는, 균질한 $\gamma \delta$ T 세포이며, 세포의 피폐에 영향을 받지 않는 뛰어난 $\gamma \delta$ T 세포를 제공하는 것을 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 iPS 세포에 착안하고 분화 유도 처리 방법에 대하여 예의 검토를 거듭한 결과, $\gamma \delta$ T 세포의 기능을 유지한 뛰어난 $\gamma \delta$ T 세포를 제작하는 것에 성공하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 즉, 본 발명은 이하로 이루어진다.

[0014] 1. 인공 다능성 줄기 세포(iPS 세포) 유래 T 세포로서, 상기 T 세포가 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

[0015] 2. 전항 1에 있어서, 상기 iPS 세포가 $\alpha \beta$ T 세포 유래가 아닌 iPS 세포인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

[0016] 3. 전항 1 또는 2에 있어서, 상기 iPS 세포가 $\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

[0017] 4. $\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포를 분화 유도 처리하여 제작된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.

[0018] 5. $\gamma \delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포를 분화 유도 처리하여 얻은 혈구 전구 세포를 기본 배지에 FLT3L(tyrosine kinase 3 ligand), SCF(stem cell factor), IL-2, IL-7, TPO(thrombopoietin), L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0019] 6. 전항 5에 있어서, 기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정 이후, $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0020] 7. 전항 5 또는 6에 있어서, 기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정이 피더(feeder) 세포와 공동 배양(共培養)하여 배양하는 공정인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0021] 8. 전항 5 또는 6에 있어서, 기본 배지에 FLT3L, SCF, IL-2, IL-7, TPO, L-아스코르브산으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 선택하여 가한 배지를 이용하여 배양하는 공정이 피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0022] 9. 전항 8에 있어서, 피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정이 VCAM1(vascular cell adhesion molecule-1) 및 DLL4(Delta-Like Protein 4) 혹은 DLL1(Delta-Like Protein 1)로 코팅한 배양 기체를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0023] 10. 전항 8 또는 9에 있어서, 피더 세포와 공동 배양하지 않고 배양하는 공정이 추가로 DKK1 및/또는 AZA(Azelaic acid)를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0024] 11. 전항 6 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 포함하는 배지가 $\gamma \delta$ T 세포 자극제, IL-2 및 IL-15로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 포함하는 배지인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0025] 12. 전항 6 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포 자극제가 이소프레노이드 생합성 경로 대사물인 인산 화합물 또는 그 유도체, 혹은 이소프레노이드 생합성 경로의 율속 효소인 FPP(farnesyl pyrophosphate) 합성 효소의 특이적 저해 물질인 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0026] 13. 전항 6 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 혈청을 포함하지 않는 조건으로 배양하는 것을 특징으로 하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

[0027] 14. 전항 6 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 저산소 조건 하에서 배양하는 것을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법.

- [0028] 15. 전항 5 내지 14 중 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법에 의해 제작된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포.
- [0029] 16. 전항 1 내지 4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0030] 17. 전항 16에 있어서, 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단과 비교하여 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단이 항원 특이적으로 높은 세포 상해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 집단.
- [0031] 18. $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, TCR 유전자의 CDR3 영역이 동일한 염기 서열을 갖는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함하는 것을 특징으로 하는 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단.
- [0032] 19. 전항 18에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포가 1×10^5 개 이상 포함되는 것을 특징으로 하는 세포 집단.
- [0033] 20. $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, CD7 및 CD8a의 발현량에 대하여, 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에 비해 높은 발현량을 보이는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함하는 것을 특징으로 하는 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단.
- [0034] 21. 전항 18 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단으로서, 미분화 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 10% 이하인 것을 특징으로 하는 세포 집단.
- [0035] 22. 전항 1 내지 4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 항원 특이적 세포성 면역 치료제.
- [0036] 23. 액체 배지 중에서 비즈 형상 담체를 포함하는 배지를 이용하여 배양하는 것을 특징으로 하는 전항 1 내지 4 및 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 배양 방법.
- [0037] 24. 전항 1 내지 4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 암, 감염증, 자가 면역 부전 등의 질환의 치료제.
- [0038] 25. 전항 1 내지 4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 한 항에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 유효 성분으로 하는 의약 조성물.
- [0039] 26. 전항 1~4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 하나에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 것에 의한 항원 특이적 세포성 면역 세포 치료 방법.
- [0040] 27. 전항 1~4 및 전항 15로부터 선택되는 어느 하나에 기재된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 것에 의한 암, 감염증, 자가 면역 부전 등의 질환에 대한 치료 방법.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 iPS 세포 분화 유도 처리에 의한 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법에 따르면, 피채혈자의 부담 없이, 세포의 피폐에 영향을 받지 않고 $\gamma \delta$ T 세포를 효과적으로 제작할 수 있다. 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법에 따르면, 피더 세포 및/또는 혈청을 포함하지 않는 조건 또는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 조건으로도 뛰어난 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 뛰어난 기능을 가지며 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에 비해 균질하고 효과가 높은 $\gamma \delta$ T 세포 집단으로 할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- [0042] [도 1] 도 1A는 분화 유도 10일차의 세포에 대하여 CD34/CD43의 발현을 유세포 분석(Flow Cytometry)으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 1B는 분화 유도 31일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 1)
- [도 2] 도 2A는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD7(T 세포 분화 마커)의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 2B는 분화 유도 54일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR/CD45RA의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 2)
- [도 3] 도 3A는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도

3B는 분화 유도 55일차의 세포에 대하여 CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 3C는 분화 유도 55일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 3)

[도 4] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도 프로토콜을 나타낸다.(실시예 4)

[도 5] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 33일차, 35일차 및 37일차의 세포에 대하여 CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 4)

[도 6] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도 프로토콜을 나타낸다.(실시예 5)

[도 7] 도 7A는 분화 유도 37일차의 세포에 대하여 위상차 현미경을 이용하여 세포를 관찰한 결과를 나타낸다. 도 7B는 나아가 CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 5)

[도 8] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도 프로토콜을 나타낸다.(실시예 6)

[도 9] 분화 유도 32일차의 세포에 대하여, 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 각 배지에서 배양하였을 때의 위상차 현미경에 의해 세포를 관찰한 결과를 나타낸다.(실시예 6)

[도 10] 분화 유도 32일차의 세포에 대하여, 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 각 배지에서 배양하였을 때의 CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 6)

[도 11] 분화 유도 35일차의 세포에 대하여, 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 각 배지에서 배양하였을 때의 Jurkat 세포에 대하여 세포 상해성이 있음을 나타낸다.(실시예 6)

[도 12] 분화 유도 35일차의 세포에 대하여, 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 각 배지에서 배양하였을 때의 Jurkat 세포와 혼합 배양 시작 1일 후 및 4일 후의 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 6)

[도 13] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 24일차의 세포에 대하여, T 세포 분화 마커인 CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 7)

[도 14] 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로, 배양 접시를 코팅하는 대신 VCAM1과 DLL4를 코팅한 자기(磁氣) 비즈를 혼합 배양함으로써 T 세포로 분화 유도하고 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 T 세포 분화 마커인 CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 8)

[도 15] 실시예 9에서 제작한 γ δ T 세포의 iPS 세포로부터의 분화 유도 프로토콜을 나타낸다.(실시예 9)

[도 16] 도 16A는 분화 과정에서의 세포의 형상을 위상차 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸다. 도 16B는 분화 과정에서의 세포에 대하여 유세포 분석으로 세포 표면 마커에 대하여 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 9)

[도 17] 분화 유도 38일차의 γ δ T 세포에 대하여 각종 종양 세포에 대한 항종양 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 17A는 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 17B는 Huh-7 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 17C는 SW480 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 17D는 iPS 세포 유래 γ δ T 세포(E)와 Jurkat 세포(T)의 혼합 배양 시에 E:T 비를 단계적으로 변경하였을 때의 생세포율을 나타낸다.(실시예 9)

[도 18] 분화 유도 36일차의 γ δ T 세포에 대하여 TCR 재구성의 유지(保持) 및 세포 상해 메커니즘에 대하여 확인한 결과를 나타낸다. 도 18A는 순화(純化)되지 않은 γ δ T 세포(igdT)와 말초 혈액 단핵 세포(PB)에 대하여 세포 표면의 α β TCR의 발현을 평가한 결과를 나타낸다. 도 18B는 TCR 유전자(V γ 9, V δ 2)의 재구성을 계층 PCR로 확인한 결과를 나타낸다. 도 18C는 γ δ T 세포가 그랜자임 B(Granzyme B), 퍼포린(Perforin)을 발현하고 있음을 확인한 결과를 나타낸다. 도 18D는 순화된 γ δ T 세포(igdT)에 대하여 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다. γ δ T 세포에 대하여 순화의 유무로 사세포율(死細胞率)에 큰 차이는 없었다.(실시예 9)

[도 19] iPS 세포 유래 γ δ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 γ δ T 세포에서의 유전자 발현 패턴을 싱글 셀(single cell) RNA-seq 분석(RNA 염기서열 분석)에 의해 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 10)

[도 20] iPS 세포 유래 γ δ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 γ δ T 세포에서의 세포 표면 발현 마커 중 CD25에 대하여 유세포 분석에 의해 분석한 결과를 나타낸다.(실시예 10)

[도 21] iPS 세포 유래 γ δ T 세포의 활성 방법을 확인하기 위한 γ δ T 세포의 iPS 세포로부터의 분화 유도 프로토콜을 나타낸다.(실시예 11)

[도 22] iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 방법에 관하여 IL-2 및/또는 IL-15에 대하여 검토한 결과를 나타낸다. 도 22A는 생세포수를 확인한 결과를 나타내고 도 22B는 $CD3^+/\gamma \delta TCR^+$ 세포에 대하여 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 11)

[도 23] $\gamma \delta$ T 세포 유래 iPS 세포인 121-3주로부터 분화 유도하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포에 대하여 나타낸다. 도 23A는 미분화 iPS 세포(121-3주)와 그로부터 분화 유도하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포의 TCR 유전자(V γ 9, V γ 2)의 재구성을 게놈 PCR로 확인한 결과를 나타낸다. 도 23B는 $\gamma \delta$ T 세포와 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포의 TCR γ 와 TCR δ 의 서열을 차세대 시퀀서(sequencer)에 의해 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 12)

[도 24] 분화 유도 39일차의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포 또는 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포를 Jurkat 세포와 4시간 공동 배양한 후의 IFN γ 의 발현을 유세포 분석에 의해 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 13)

[도 25] 피더 세포를 사용하는 방법으로 분화 유도하여 얻어진 분화 유도 40일차의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단과 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단(CD3 양성 또는 TCR γ 9 양성)에 있어서의 다양한 표면 마커의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 14)

[도 26] 도 26A는 $\gamma \delta$ T 세포를 자극하는 공정을 17일차부터 수행하는 프로토콜을 나타낸다. 도 26B는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 26C는 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 15)

[도 27] iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 방법에 관하여 IL-2 또는 IL-15, 혹은 IL 15 또는 IL-15+HMBPP에 대하여 검토한 결과를 나타낸다. 도 27A는 분화 유도 37일차 또는 33일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 27B는 분화 유도 23일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다.(실시예 16)

[도 28] 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 24일차의 세포를 동결 용해한 후, Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 17)

[도 29] 도 29A는 분화 유도 10일차의 세포에 대하여 CD34/CD43의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 29B는 나아가 분화 유도 10일차의 세포를 동결 용해하고 분화 유도 37일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 29C는 분화 유도 37일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 18)

[도 30] 도 30A는 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포를 동결 용해한 후, 피더 세포를 사용하지 않고 혈청을 포함하지 않는 조건에서의 분화 유도를 수행하는 프로토콜을 나타낸다. 도 30B는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 30C는 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 19)

[도 31] 도 31A는 혈구 전구 세포를 저산소 조건 하에서 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도를 수행하는 프로토콜을 나타낸다. 도 31B는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 31C는 분화 유도 29일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 20)

[도 32] 동물 유래 성분을 포함하지 않는 조건으로 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포가 분화 유도된 것을 나타낸다. 도 32A는 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 32B는 분화 유도 31일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 21)

[도 33] 세포 집단 중에 미분화 세포가 존재하지 않는 것에 대하여 나타낸다. 도 33A는 피더 세포를 사용하지 않고 혈청을 포함하지 않는 조건에서의 분화 유도 35일차의 세포 집단에 있어서의 미분화 마커 TRA-1-85의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과를 나타낸다. 도 33B는 세포 집단에 대하여 미분화 세포의 콜로니가 출현하는지를 확인하는 프로토콜을 나타낸다. 도 33C는 세포 집단에 대하여 미분화 세포의 콜로니가 출현하지 않는 것을 나타낸다.(실시예 22)

[도 34] 도 34A는 피더 세포를 사용하지 않고 혈청을 포함하지 않는 조건에서의 세포 집단 중으로부터 CD3/ $\gamma\delta$ T 양성 세포의 순화를 나타낸다. 도 34B는 나아가 순화된 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 활성을 확인한 결과를 나타낸다.(실시예 23)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 본 발명은 iPS 세포 유래 T 세포로서, 상기 T 세포가 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포에 관한 것이다.
- [0044] 인간의 성숙 T 세포는 T 세포 수용체(TCR)가 α 사슬과 β 사슬로 구성되는 $\alpha\beta$ 형 T 세포와 γ 사슬과 δ 사슬로 구성되는 $\gamma\delta$ 형 T 세포의 두 그룹으로 나뉘어진다. 본 명세서에 있어서 " $\gamma\delta$ T 세포"란 $\gamma\delta$ 형 T 세포를 말한다. 혈액 중에서는 $\alpha\beta$ T 세포가 대다수를 차지하는 데 반해 $\gamma\delta$ T 세포는 전체 T 세포의 1~5%로 소수이다. 다양한 항원과 결합하기 위하여 TCR 유전자의 재구성을 수행하는 것과 기억 세포가 남는 것으로 인해 $\gamma\delta$ T 세포는 획득 면역계의 한 요소로 간주할 수 있음과 아울러, $\gamma\delta$ T 세포는 TCR에 의한 항원 인식을 필요로 하지 않고, 자연 면역 세포의 NK 세포(Natural Killer cell, 자연 살해 세포)와 동일한 항원 인식에 의해 예를 들면 종양 세포를 공격하는 기능도 갖는다. 그리고 $\gamma\delta$ T 세포는 자연 면역계와 획득 면역계의 두 기능을 갖는다고 생각된다. 한편 종양 항원에 대하여 $\alpha\beta$ T 세포 유래 세포 상해성 T 세포(CTL)는 수상(樹狀) 세포로부터의 항원 정보를 필요로 하는 획득 면역계라고 할 수 있다. 이와 같이 $\gamma\delta$ T 세포와 $\alpha\beta$ T 세포에서는 단순히 혈액 중에 존재하는 비율뿐만 아니라 그 기능이 완전히 상이하고, 두 세포의 분화 과정도 상이한 것이 알려져 있다 (비특허문헌 3).
- [0045] 본 명세서에 있어서 "iPS 세포"란 체세포를 다양한 방법으로 초기화함으로써 수립된 미분화 세포를 말한다. 본 발명의 출발 원료가 되는 iPS 세포는 $\alpha\beta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포가 아닌 iPS 세포인 것이 적합하다. 가장 적합하게는 $\gamma\delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포이다. 해당 $\gamma\delta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포를 이하 단순히 " $\gamma\delta$ TCR형 iPS 세포"라고도 칭한다. 본 명세서에 있어서 " $\gamma\delta$ TCR 재구성 유전자"란 TCR을 코딩하는 유전자 중 TCRG 영역의 재구성과 TCRD 영역의 재구성의 양쪽이 일어난 것을 말한다. TCRG 영역은 V γ -J γ 로 이루어지며, TCRD 영역은 V δ -D δ -J δ 로 이루어진다.
- [0046] 본 명세서에 있어서의 iPS 세포는 자체 공지의 방법 또는 향후 개발될 모든 방법에 의해 제작할 수 있다. 예를 들면 특허문헌 1 및 비특허문헌 1의 기재에 의거하여 제작할 수 있다.
- [0047] (iPS 세포의 제작 방법)
- [0048] 본 발명의 $\gamma\delta$ T 세포 제작을 위하여 사용하는 iPS 세포는 자체 공지의 방법 혹은 향후 개발될 모든 방법으로 제작할 수 있다. 구체적으로는 예를 들면 특허문헌 1이나 비특허문헌 1에 기재된 방법으로 제작할 수 있다. 예를 들면, 이하의 1)~3)의 공정을 포함하는 iPS 세포의 제작 방법에 의해 제작할 수 있다.
- [0049] 1) 채취한 혈액 세포를 IL-2 및 비스포스포네이트(Bisphosphonate)(예를 들면, 졸레드론산(zoledronic acid), 파미드론산(pamidronate), 알렌드론산(alendronate), 리세드론산(risedronate), 이반드론산(ibandronate), 인카드론산(incadronate), 에티드론산(etidronate), 미노드론산(minodronate), 그들의 염 및 그들의 수화물(水和物)로부터 선택되는 1종 혹은 복수 종이며, 바람직하게는 졸레드론산)로 자극하는 공정;
- [0050] 2) 센다이 바이러스(SeV) 백터를 이용하여 상기 혈액 세포에 세포 초기화 인자(예를 들면, OCT3/4, SOX2, KLF4 및 c-MYC)를 발현할 수 있는 유전자를 적어도 4종류 도입하는 공정;
- [0051] 3) 유전자가 도입된 세포를 배양하는 공정.
- [0052] (iPS 세포의 배양)
- [0053] iPS 세포의 유지 배양에 사용 가능한 기본 배지로서 StemFit^(R) AK02N(상품명), StemFit^(R) AK03N(상품명), ReproStem(상품명), iPSellon(상품명), Essential 8(상품명), TeSR-E8(상품명) 등의 각종 줄기 세포 유지 배지를 사용할 수 있다. 특히 바람직하게는 StemFit^(R) AK02N(상품명)이다. 각 배지에 첨가하는 물질은 목적에 따라 적당히 증감할 수 있다. 첨가하는 물질의 예로서, Rho-관련 코일 키나제(Rho-Associated Coil Kinase)(ROCK) 저해제(inhibitor)인 Y27632를 사용할 수 있다. 세포 접착이나 증식을 촉진하기 위하여 배양 접시 등의 배양 기재(基材)에 예를 들면 라미닌(laminin) 511-E8 프래그먼트(fragment)를 사용할 수 있다. 구체적으로는 iMatrix-511 silk(상품명)나 iMatrix-511(상품명)을 사용할 수 있다. 사용할 시약 등은 동등한 기능을 발휘할 수 있는 것이라면 제조·판매원은 특별히 한정되지 않는다. iPS 세포의 계대 시 배양 용기로부터 세포를 벗길

때에는 트립신 등의 프로테아제를 사용할 수 있으며, 예를 들면 TrypLE Select(상품명)를 사용할 수 있다.

[0054]

(iPS 세포로부터 혈구 전구 세포로의 분화 유도)

[0055]

iPS 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포의 분화 유도 처리 공정에서, 먼저 iPS 세포로부터 혈구 전구 세포로 분화 유도된다. 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법에서는 iPS 세포로부터 혈구 전구 세포로 분화 유도된 세포를 출발 원료로 하고, 혈구 전구 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도 처리 공정을 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법으로 할 수 있다. 나아가서는, iPS 세포로부터 혈구 전구 세포로의 공정을 포함하는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법으로 할 수 있다. 또한 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포를 동결하여 용해(融解)한 세포를 본 발명의 방법에 사용할 수도 있다. 동결 기간은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 2주일~1년 등을 들 수 있다. 어느 경우라 하더라도 본 발명의 iPS 세포는 $\alpha \beta$ TCR 재구성 유전자를 갖는 iPS 세포가 아닌 iPS 세포가 적합하다. 가장 적합하게는 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포이다.

[0056]

iPS 세포로부터 혈구 전구 세포까지의 분화 유도 공정은 특별히 한정되지 않으며, 자체 공지의 방법 또는 향후 개발될 모든 공정을 채용할 수 있다. 혈구 전구 세포까지의 분화 유도 공정에서는 배지에는 예를 들면 FLT3L(tyrosine kinase 3 ligand, 티로신 키나제 3 리간드), SCF(stem cell factor, 줄기세포 인자), BMP4(bone morphogenetic protein-4, 골형성 단백질 4), bFGF(basic fibroblast growth factor, 염기성 섬유아세포 성장인자), VEGF(vascular endothelial growth factor, 혈관 내피 성장인자), IL-6(인터류킨 6), IGF-1(insulin-like growth factors, 인슐린 유사 성장인자), IL-7, IL-11, EPO(erythropoietin, 에리스로포이에틴), TPO(thrombopoietin, 트롬보포이에틴), IL-15, IL-3 등의 사이토카인으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종을 적당히 선택하여 가할 수 있다. 배지에는 FBS(fetal bovine serum, 우태 혈청)나 FCS(fetal calf serum, 우아 혈청)도 적당히 가할 수도 있다.

[0057]

본 발명의 iPS 세포로부터 혈구 전구 세포로는 예를 들면 다음의 1-1)~1-4)에 나타낸 배지에서 배양하고 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 분화 유도 처리할 수 있다. 혈구 전구 세포까지는 ROCK 저해제(inhibitor)인 Y27632를 끝(終) 농도 0~50 μ M, 바람직하게는 1~30 μ M, 보다 바람직하게는 10 μ M, 라미닌-511 E8 단편, 예를 들면 iMatrix-511(상품명)을 0~50 μ l, 바람직하게는 1~30 μ l, 보다 바람직하게는 약 5 μ l 부근으로 사용할 수 있고, 다음날에는 ROCK 저해제(inhibitor)나 라미닌 511-E8을 포함하지 않는 StemFit^(R) AK02N으로 배지 교환하고 수 일에 한 번, 예를 들면 2일마다 배지 교환하여 배양할 수 있다. 배지 교환의 빈도, 배지 교환량 등은 특별히 한정되지 않으며 적당히 적절한 빈도, 양을 결정할 수 있다. 또한 파종할 세포수는 적당히 증감할 수 있다. 또한 사용할 시약 등은 동등한 기능을 발휘할 수 있는 것이라면 제조·판매원은 특별히 한정되지 않는다. 배양은 모두 37±0.5°C, 5% CO₂ 조건으로 수행할 수 있다. 계대(繼代)에는, 배양 용기로부터 세포를 벗길 때에는 트립신 등의 프로테아제, 예를 들면 TrypLE Select(상품명)를 사용할 수 있다.

[0058]

1-1) 분화 유도 0일차

[0059]

StemFit^(R) AK02N(상품명)을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 GSK-3 α/β 저해제(CHIR99021, CAS 번호: 252917-06-9) 0~20 μ M, 바람직하게는 0.5~10 μ M, 보다 바람직하게는 4 μ M, BMP 4 0~400 ng/ml, 바람직하게는 10~200 ng/ml, 보다 바람직하게는 80 ng/ml, VEGF 0~400 ng/ml, 바람직하게는 10~200 ng/ml, 보다 바람직하게는 80 ng/ml을 포함하는 배양계에서 배양할 수 있다.

[0060]

1-2) 분화 유도 2일차

[0061]

Advanced DMEM/F12(상품명) 또는 Essential 6(상품명)을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 선택적 ALK5, 4, 7 저해제(SB431542) 0~20 μ M, 바람직하게는 0.5~10 μ M, 보다 바람직하게는 2~4 μ M, bFGF 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, SCF 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml 및 VEGF 0~400 ng/ml, 바람직하게는 10~200 ng/ml, 보다 바람직하게는 80 ng/ml을 포함하는 배양계에서 배양할 수 있다. 상기 외에, 추가로 L-글루타민(L-Glutamine), 페니실린/스트렙토마이신, iPS/ES 세포용 분화 유도 서플리먼트(supplement)(예를 들면 StemFit(상품명) For Differentiation: 이하 "AS401") 등을 적당히 선택하여 가할 수 있다. 최적의 첨가량은 적당히 결정할 수 있다.

[0062]

1-3) 분화 유도 4일차

[0063]

Advanced DMEM/F12(상품명) 또는 StemPro-34 SFM(상품명)을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 L-글루타민(L-Glutamine) 0~20 mM, 바람직하게는 0.5~10 mM, 보다 바람직하게는 2 mM, IL-3 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, IL-6 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보

다 바람직하게는 50 ng/ml, FLT3L 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, SCF 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, VEGF 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 20 ng/ml 및 EPO 0~100 IU/ml, 바람직하게는 1~50 IU/ml, 보다 바람직하게는 10 IU/ml를 포함하는 배양계에서 배양할 수 있다. 상기 외에, 추가로 페니실린/스트렙토마이신, iPS/ES 세포용 분화 유도 서플리먼트(예를 들면 AS401) 등을 적당히 선택하여 가할 수 있다. 최적의 첨가량은 적당히 결정할 수 있다.

[0064] 1-4) 분화 유도 6~8일차

[0065] Advanced DMEM/F12(상품명) 또는 StemPro-34 SFM(상품명)을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 L-글루타민(L-Glutamine) 0~50 mM, 바람직하게는 1~20 mM, 보다 바람직하게는 2 mM, IL-3 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, IL-6 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml, SCF 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 50 ng/ml 및 EPO 0~100 IU/ml, 바람직하게는 1~50 IU/ml, 보다 바람직하게는 10 IU/ml를 포함하는 배양계에서 배양할 수 있다. 상기 외에, 추가로 페니실린/스트렙토마이신, iPS/ES 세포용 분화 유도 서플리먼트(예를 들면 AS401) 등을 적당히 선택하여 가할 수 있다. 최적의 첨가량은 적당히 결정할 수 있다.

[0066] (피더 세포)

[0067] iPS 세포의 배양이나 iPS 세포를 분화 유도 처리할 때, 피더 세포를 공동 배양할 수 있다. 피더 세포로는, 예를 들면 MEF(마우스 태아 섬유아 세포)나 OP9, OP9/DLL1, OP9-DL4 및 10T1/2/DL4 세포 등으로부터 선택되는 1종 또는 복수 종의 세포주를 사용할 수 있다. 한편, iPS 세포를 분화 유도하여 얻은 세포를 세포 요법 등으로 인간에게 투여하는 경우에는 동물 유래 물질을 포함하지 않고 안정적으로 생산하는 방법이 요망되고 있다. 본 발명에서는 상술한 라미닌-511 E8 단편이나 배지 성분을 궁리함으로써 피더 세포를 사용하지 않고 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포로 분화 유도할 수도 있다.

[0068] (iPS 세포 유래 혈구 전구 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도)

[0069] iPS 세포 유래 혈구 전구 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도 과정은 피더 세포와의 공동 배양을 수행할 수도 있고 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 배양할 수도 있다. 나아가 혈청을 포함하지 않는 조건으로 배양할 수도 있고 동물 유래 성분을 포함하지 않는 조건으로 배양할 수도 있다. 또한 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도 과정은 저산소 조건 하에서 배양할 수도 있다. 저산소 조건 하란 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포로부터 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화 유도 과정에 있어서의 배양 조건에서의 O_2 농도가 통상적으로 배양되는 O_2 농도보다 낮은 것을 의미한다. 저산소 조건 하에서 배양하는 O_2 농도는 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 20%(v/v) 미만이고, 바람직하게는 10%(v/v) 미만이다.

[0070] 또한 원하는 $\gamma \delta$ T 세포를 얻기 위하여 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가할 수도 있고 배양 조건에 따라서는 가하지 않을 수도 있다. $\gamma \delta$ T 세포 자극제로는 이소프레노이드 생합성 경로의 메발론산(mevalonic acid) 경로 또는 비메발론산 경로의 대사물인 인산 화합물을 예로 들 수 있으며, 혹은 그들의 유도체를 예로 들 수 있다. 이소프레노이드 생합성 경로의 메발론산 경로 또는 비메발론산 경로의 대사물인 인산 화합물의 예로서, 예를 들면 HMBPP((E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate, (E)-4-하이드록시-3-메틸뷰트-2-엔일 피로인산)나 IPP(isopentenyl diphosphate, 이소펜테닐2인산)를 예로 들 수 있다. 상기 유도체로는 예를 들면 BrHBP(브로모히드린2인산)를 들 수 있다. $\gamma \delta$ T 세포 자극제로는 이 밖에 상기 생합성 경로의 율속(律速) 효소인 FPP(farnesyl pyrophosphate, 파르네실피로인산) 합성 효소의 특이적 저해 물질을 예로 들 수 있다. FPP 합성 효소의 특이적 저해 물질에 의하면 상기 인산 화합물의 세포 내 축적이 촉진된다. FPP 합성 효소 특이적 저해 물질로서 예를 들면 질소 함유 비스포스폰산(nitrogen-containing bisphosphonates: N-BPs), 구체적으로는 졸레드론산(zoledronic acid)이나 파미드론산(pamidronate)을 들 수 있다. 나아가 IL-15나 IL-2에 대해서도 $\gamma \delta$ T 세포 자극제로서의 기능을 갖는다.

[0071] A. 피더 세포와의 공동 배양을 수행하는 계(系)

[0072] A-1) 분화 유도 10일차~

[0073] 예를 들면 상기한 처리 1-1)~1-4)에 의해 iPS 세포로부터 분화 유도 후 10일차(혈구 전구 세포) 이후의 배양은 α MEM(상품명)을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 FBS 0~30%, 바람직하게는 0~20%, 보다 바람직하게는 10~20%, SCF 0~100 ng/ml, 바람직하게는 1~50 ng/ml, 보다 바람직하게는 10 ng/ml, IL-7 0.1~

20 ng/ml, 바람직하게는 0.5~10 ng/ml, 보다 바람직하게는 5 ng/ml, FLT3L 0.1~50 ng/ml, 바람직하게는 1~20 ng/ml, 보다 바람직하게는 5 ng/ml, L-아스코르브산(L-ascorbic acid) 1~1000 µg/ml, 바람직하게는 10~500 µg/ml, 보다 바람직하게는 100 µg/ml을 포함하는 배양계에서 배양할 수 있다. 추가로 IL-2 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 10 ng/ml을 포함할 수도 있고, 또는 TPO 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 10 ng/ml을 포함할 수도 있다. 상기 외에, 추가로 페니실린/스트렙토마이신 등을 적당히 선택하여 가할 수 있다. 또한, FBS 대신 0.1% Polyvinyl alcohol+4% B27(상품명) 서플리먼트 등을 이용할 수도 있다. 사용할 시약 등은 동등한 기능을 발휘할 수 있는 것이라면 제조·판매원은 특별히 한정되지 않는다. 최적의 첨가량은 적당히 결정할 수 있다. 배양은 피더 세포를 과종한 배양 접시 등의 배양 기구에 분화 유도 후 10일차의 세포(혈구 전구 세포)를 과종하여 배양할 수 있다. 배지는 예를 들면 2일마다 교환하고 분화 유도 후 12일차, 18일차 및 24일차에 피펫팅(pipetting)하여 웃물을 회수하고 새로운 피더 세포로 옮겨 배양을 계속할 수 있다. 배지 교환의 빈도, 배지 교환량 등은 특별히 한정되지 않으며 적당히 적절한 빈도, 양을 결정할 수 있다.

[0074] A-2) 분화 유도 30일차 또는 31일차~

[0075] 상기 배지를 이용하여 분화 유도 후 10일차부터 30일차 또는 31일차까지 배양한 세포는 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 배양할 수 있다. 이러한 조건에서의 배양은 RPMI 1640 배지를 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 FBS 0~30%, 바람직하게는 0~20%, 보다 바람직하게는 10~20% 포함하는 배지에서 배양할 수 있다. FBS 대신 0.1% Polyvinyl alcohol+4% B27(상품명) 서플리먼트 등을 이용할 수도 있다. 추가로 IL-2 및/또는 IL-15 0~200 ng/ml, 바람직하게는 1~100 ng/ml, 보다 바람직하게는 10 ng/ml을 포함하는 배양계에서 배양할 수도 있고 또는 Immunace(상품명) 0~1000 IU/ml, 10~500 IU/ml, 바람직하게는 100 IU/ml와 2-Me(2-Mercaptoethanol, 2-머캅토에탄올) 0~100 µM, 1~50 µM, 바람직하게는 10 µM을 포함하는 배양계에서 배양할 수도 있다. 상기 외에, 추가로 페니실린/스트렙토마이신 등을 적당히 가할 수 있다.

[0076] 나아가, $\gamma \delta$ T 세포 자극제로서 예를 들면 HMBPP를 첨가할 수도 있다. 첨가 농도는 $\gamma \delta$ T 세포가 자극되고, 세포 독성을 동반하지 않는 농도이면 되며, 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 0~100 nM, 바람직하게는 0.01~20 nM, 보다 바람직하게는 1 nM로 할 수 있다.

[0077] B. 피더 세포를 사용하지 않고 배양을 수행하는 계

[0078] B-1) 분화 유도 10일차~

[0079] 예를 들면 상기의 처리 1-1)~1-4)에 의해 iPS 세포로부터 분화 유도 후 10일차(혈구 전구 세포) 이후의 배양은 VCAM1(vascular cell adhesion molecule-1, 혈관 세포 부착 분자 1) 및 DLL4(Delta-Like Protein 4, 델타 유사 단백질 4) 혹은 DLL1(Delta-Like Protein 1, 델타 유사 단백질 1)로 코팅한 배양 기구를 이용하여 배양할 수 있다. 분화 유도 10~24일차까지는, 예를 들면 StemSpan™ T cell generation kit(상품명)에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium(상품명)으로 배양할 수 있다. 배지 교환은 StemSpan™ 키트의 프로토콜대로 수행하였다. 구체적으로는 분화 유도 13일차에 배지를 추가적으로 가하고, 분화 유도 17일차 및 20일차에 각각 상기 배지를 교환할 수 있다. 분화 유도 17일~24일차 경에 상기 키트에 포함되는 T cell progenitor Maturation Medium(상품명)으로 교환할 수 있다. 분화 유도 27일차에 상기 배지를 추가적으로 가하고, 이후에는 분화 유도 31일차 및 34일차 등 주 2회 정도 배지를 교환할 수 있다. 배지 교환의 빈도, 배지 교환량 등은 특별히 한정되지 않으며 적당히 적절한 빈도, 양을 결정할 수 있다.

[0080] B-2) 분화 유도 17일차~24일차 경~

[0081] B-1)에 기재된 방법으로 계속하여 배양할 수도 있으나, 분화 유도 17일~24일 경부터 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가한 배지에서 배양할 수 있다. 분화 유도 17일~24일 경부터 세포수의 감소 경향이 보이는 경우가 있으며, $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가함으로써 개선된다. 구체적으로는, A-2에 나타난 배지로서, IL-2 및/또는 IL-15와 HMBPP 및 FPP 합성 효소 특이적 저해 물질 등의 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가한 배지에서 배양할 수 있다. A-2에 나타난 배지 중 FBS를 포함하지 않는 배지로서, 마찬가지로 HMBPP를 가한 배지에서 배양할 수도 있다. A-2에 나타난 배지 대신 AS401을 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양으로서, IL-2 및/또는 IL-15와 HMBPP를 가한 배지에서 배양할 수도 있다.

[0082] B-3) 분화 유도 10일차~

[0083] B-1)에 기재된 배지 조건에 추가로 DKK1(Dickkopf-1, 디코프 1) 및/또는 아젤라산(AZA: Azelaic acid)을 포함

하는 방법으로 계속하여 배양할 수도 있다. 추가로 분화 유도 17일~24일 경부터 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가한 배지에서 배양할 수 있다. 분화 유도 17일~24일 경부터 구체적으로는 A-2에 나타낸 배지로서 HMBPP를 가한 배지에서 배양할 수 있다. A-2에 나타낸 배지 중 FBS를 포함하지 않는 배지로서, 마찬가지로 HMBPP를 가한 배지에서 배양할 수도 있다. A-2에 나타낸 배지 대신 AS401을 포함하는 RPMI 1640 배지로서, IL-2 및/또는 IL-15와 HMBPP 등의 $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가한 배지에서 배양할 수도 있다.

[0084] C. 비즈를 이용한 배양

[0085] 본 발명의 분화 유도 방법으로 배양한 세포는 비즈를 이용하여 배양할 수 있다. 비즈의 크기는 특별히 한정되지 않으며, 세포의 크기보다 작은 것일 수도 있고 세포의 크기 이상의 크기일 수도 있다. 예를 들면 분화 유도 10일차의 세포를 상기 각종 조건으로 배양할 때, 배지에 비즈를 혼입하여 배양할 수 있다. 비즈로는 세포 배양에 사용 가능한 재질의 비즈이면 되며, 특별히 한정되지 않으나, 구체적으로는 Dynabeads Protein G(상품명)를 사용할 수 있다. 비즈를 예를 들면 VCAM1 및 DLL4로 코팅함으로써 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 배양할 수도 있다.

[0086] D. 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지를 이용한 배양

[0087] D-1) 분화 유도 10일차~

[0088] 본 발명의 분화 유도 방법으로 배양한 세포는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지를 이용한 조건으로 배양할 수도 있다. 예를 들면 상기의 처리 1-1)~1-4)에 의해 iPS 세포로부터 분화 유도 후 10일차(혈구 전구 세포) 이후의 배양은 VCAM1(vascular cell adhesion molecule-1) 및 DLL4(Delta-Like Protein 4) 혹은 DLL1(Delta-Like Protein 1)로 코팅한 배양 기재를 이용하여 배양할 수 있다. 분화 유도 10일~24일 경에는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지로서 예를 들면 AS401을 포함하는 RPMI 1640을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 추가로 A-1에 나타낸 SCF, IL-7, FLT3L, L-아스코르브산(L-ascorbic acid), IL2, TPO 등을 포함할 수도 있다.

[0089] D-2) 분화 유도 17일차~24일차 경~

[0090] 분화 유도 17일차~24일 경부터 A-2에 나타낸 IL-2, IL-15, $\gamma \delta$ T 세포 자극제를 가한 배지에서 배양할 수 있다. 이러한 배지는 AS401을 포함하는 RPMI 1640을 기본 배지로 할 수 있다. 추가로 수 있다. 분화 유도 17일차~24일 경부터 구체적으로는 IL-2, IL-15 및 HMBPP 중 하나 또는 복수 개를 가한 배지에서 배양할 수 있다.

[0091] (분화 유도하여 얻어진 $\gamma \delta$ T 세포)

[0092] 본 발명의 분화 유도 방법에 의해 제작되는 $\gamma \delta$ T 세포는 표면에 γ 사슬과 δ 사슬로 이루어지는 특유의 T 세포 수용체(TCR)를 갖는 T 세포이다. 이러한 세포 표면에 대하여, 예를 들면 CD3, CD7, CD8a, CD45RA 및 $\gamma \delta$ TCR 등의 세포 마커의 발현을 확인할 수 있다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포로서 특히 CD7, CD8a 및 CD45RA로부터 선택되는 하나 또는 복수 개를 발현한 것이 바람직하고, 한편 CD25, IFN γ , CD5 및 CD27로부터 선택되는 하나 또는 복수 개를 발현하지 않은 것이 바람직하다. 얻어진 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 나아가 본 발명의 iPS 세포를 분화 유도하여 제작한 $\gamma \delta$ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에서의 세포 표면 마커의 패턴에는 차이가 인정된다. 예를 들면 CD7, CD8a에 대해서는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포 쪽이 높은 발현 경향을 보이고 IL2RA(CD25), CD5, IFN γ 에 대해서는 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포 쪽이 높은 발현 경향을 보인다. 또한 예를 들면 CD45RA에 대해서는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포 쪽이 높은 발현 경향을 보이고 및 CD27에 대해서는 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포 쪽이 높은 발현 경향을 보인다.

[0093] 이와 같이 분화 유도된 $\gamma \delta$ T 세포는 공지의 기법을 적당히 선택하여 단리(單離)할 수 있다. 이러한 공지의 기법으로는, 예를 들면, 후술하는 실시예에 나타낸 바와 같은 세포 표면 마커에 대한 항체와 세포 분리기(cell sorter)를 이용한 유세포 분석을 들 수 있다. "원하는 항원 특이성을 갖는 T 세포"를 인간으로부터 단리하는 경우에 있어서는 원하는 항원을 고정화한 어피니티 칼럼(Affinity Column) 등을 이용하여 정제하는 방법을 채용할 수도 있다.

[0094] 정제된 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단은 균질한 세포로 구성되고, 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포로 구성되는 세포 집단과는 구별되며, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포 집단과 비교하여 항원 특이적으로 높은 세포 상해 활성을 갖는다.

[0095] 해당 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단은, 예를 들면 TCR 유전자의 상보성 결정 영역(complementarity determining region: CDR)이 동일한 염기 서열을 갖는 세포를 많이 포함한다. CDR 중 특히 CDR3 영역이 동일한

염기 서열을 갖는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포 중 많은 비율로 포함되고, 예를 들면 90% 이상의 비율로 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단에는 $\gamma \delta$ T 세포를 1×10^5 개 이상 포함하는 것이 가능하다.

[0096] 나아가 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단은 CD7 및/또는 CD8a의 발현량에 대하여 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에 비해 높은 발현량을 보이는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함된다. 나아가 CD25, INF γ 및 CD5로부터 선택되는 하나 또는 복수 개의 발현량에 대하여 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포에 비해 낮은 발현량을 보이는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 90% 이상의 비율로 포함된다. 나아가 CD45RA의 발현량이 말초 혈액으로부터 분리하고 체외 증폭한 $\gamma \delta$ T 세포에 비하면 높고, 및 CD27의 발현량이 말초 혈액으로부터 분리하고 체외 증폭한 $\gamma \delta$ T 세포에 비하면 낮은 발현량을 보이는 $\gamma \delta$ T 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 70% 이상의 비율로 포함된다.

[0097] 또한 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포를 포함하는 세포 집단은 미분화 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포의 10% 이하인 것을 특징으로 하고, 나아가 미분화 세포가 해당 세포 집단을 구성하는 $\gamma \delta$ T 세포에 존재하지 않는 것이 적합하다. 어느 한 세포가 미분화 세포인지 여부는, 예를 들면 TRA-1-85 등의 미분화를 보이는 마커에 의해 판정할 수 있다.

[0098] 본 발명의 분화 유도 처리 방법에 의해 처리하고 제작된 $\gamma \delta$ T 세포는 뛰어난 면역 기능을 갖기 때문에, 예를 들면 종양, 감염증(예를 들면 바이러스 감염증), 자가 면역 부진 등의 질환의 치료 또는 예방을 위하여 사용할 수 있다. 나아가서는, 본 발명의 방법에 의해 제조한 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단을 유효 성분으로 포함하는 항원 특이적 세포성 면역 치료제 또는 의약 조성물로서 이용할 수 있다. 본 발명의 분화 유도 처리 방법에 의해 처리하고 제작된 $\gamma \delta$ T 세포는 동결 용해한 후라 하더라도 이들 제제화에 이용할 수 있다. 해당 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 이용한 면역 세포 치료 방법에도 응용할 수 있을 것이 기대된다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포 집단은 면역 체크 포인트 저해제와 병용함으로써 $\gamma \delta$ T 세포의 효과를 보다 높이는 것이 기대된다. 면역 체크 포인트 저해제로는 자체 공지이거나 향후 개발될 것에 한정되지 않으나, 예를 들면 PD-1, PD-L1이나 CTLA-4 등의 면역 체크 포인트를 표적으로 한 약제를 들 수 있다. 나아가 NK 세포와 마찬가지로 각종 암의 치료에 사용되고 있는 분자 표적 치료약·항체 제제(예를 들면 허셉틴(HERCEPTIN), 리투산(RITUXAN) 등)의 효과를 높이는 항체 의존성 세포상해(ADCC) 작용이 기대되며, 이들 항체 제제와 병용함으로써 높은 치료 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 포함하는 의약 조성물은 공지의 제제학적 방법으로 제제화함으로써 조제할 수 있다.

[0099] 이들 제제화에 있어서는, 약리학상 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는 멸균수나 생리식염수, 식물유, 용제, 기제(基劑), 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제, 희석제, 등장화제(等張化劑), 무통화제(無痛化劑), 증량제, 붕괴제, 완충제, 코팅제, 활택제(滑澤劑), 착색제, 용해 보조제 혹은 기타 첨가제 등과 적당히 조합할 수 있다. 또한, 상기 질환의 치료 또는 예방에 사용되는 공지의 의약 조성물이나 면역 활성화제(賦活劑) 등과 병용할 수도 있다. 본 발명의 의약 조성물을 투여하는 경우, 그 투여량은 대상의 나이, 체중, 증상, 건강상태, 조성물의 종류 등에 따라 적당히 선택된다.

[0100] 본 발명은 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 것에 의한 항원 특이적 세포성 면역 치료 방법도 포함된다. 나아가 본 발명은 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 투여하는 것에 의한 암, 감염증, 자가 면역 부진 등의 질환에 대한 치료 방법도 포함된다. 본 발명의 방법에 있어서, 대상자에 대한 유효 성분의 투여량은 대상자의 체중이나 나이, 증상, 투여 방법 등에 따라 변동되는데, 당업자라면 적당히 선택하는 것이 가능하다.

[0101] 실시예

[0102] 본 발명의 이해를 깊게 하기 위하여 이하에 실시예를 나타내어 본 발명을 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이들 실시예들에 한정되는 것은 아님은 물론이다.

[0103] (실시예 1) iPS 세포로부터의 분화 유도

[0104] 본 실시예에서는 비특허문헌 1의 방법으로 제작한 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포로부터 제작한 $\gamma \delta$ T 세포의 분화 유도 처리 방법에 대하여 나타내었다.

[0105] (1-1) $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포(62B3주)의 배양

[0106] 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 배양한 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포(62B3주) 2×10^3 /well을 6웰 플레이트에 계대 하고 유지 배양하였다. 유지 배양은 1.6 μ g/well의 iMatrix-511(니피(Nippi, Inc.) 제조)을 포함하는 StemFit^(R) AK02N(아지노모토(Ajinomoto Co., Inc.) 제조)을 사용하였다. 계대 시의 세포의 박리·분산은 0.5X TrypLETM select(써모피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific Inc.) 제조)를 사용하였고 계대 배양에는 StemFit^(R) AK02N에 Y27632(와코 순약 공업(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 제조)를 끝 농도 10 μ M과 iMatrix-511 3.2 μ l가 되도록 첨가한 배지를 사용하였다. 다음 날에 Y27632 및 iMatrix-511을 포함하지 않는 StemFit^(R) AK02N으로 교환하고 이후 2일마다 배지를 교환하였다. 배지는 1.5 ml/well 첨가하였다. 배양은 이하의 공정 및 후술하는 실시예도 포함하여 모두 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 5% CO₂ 조건으로 수행하였다.

[0107] (1-2) 분화 유도 0일차(Day 0)

[0108] 상기 (1-1)의 계대 7일 후에 표 1에 나타낸 배지(Step 1) 2 ml/well을 교환하였다.

표 1

[0109]

Step 1	제조사	품번	농도
Stem Fit	아지노모토	AK02N	
CHIR99021	TOCRIS	4423	4 μ M
rh BMP4	R&D	314-BP	80 ng/ml
rh VEGF	R&D	293-VE	80 ng/ml

[0110] (1-3) 분화 유도 2일차(Day 2)

[0111] 상기 (1-2)의 2일 후에 표 2에 나타낸 배지(Step 2) 2 ml/well을 교환하였다.

표 2

[0112]

Step 2	제조사	품번	농도
Advanced DMEM/F12	gibco	12634-10	
AS401	아지노모토	20170228A	20%(v/v)
L-글루타민	gibco	25030-081	2 mM
Penicillin-Streptomycin	gibco	15140-122	50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep
SB43152	후지필름 와코 순약	033-24631	2 μ M
rh VEGF	R&D	293-VE	80 ng/ml
bFGF	Wako	060-04543	50 ng/ml
SCF	R&D	255-SC	50 ng/ml

[0113] (1-4) 분화 유도 4일차(Day 4)

[0114] 상기 (1-3)의 2일 후에 표 3에 나타낸 배지(Step 3) 2 ml/well을 교환하였다.

표 3

[0115]

Step 3	제조사	품번	농도
Advanced DMEM/F12	gibco	12634-10	
AS401	아지노모토	20170228A	20%(v/v)

L-글루타민	gibco	25030-081	2 mM
Penicillin-Streptomycin	gibco	15140-122	50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep
SCF	R&D	255-SC	50 ng/ml
IL3	Reprotech	AF-200-03	50 ng/ml
IL6	R&D	206-IL-050	50 ng/ml
Flt3L	R&D	308-FK-025	50 ng/ml
rh VEGF	R&D	293-VE	20 ng/ml
EPO	교와 발효 기린		10 IU/ml

[0116] (1-5) 분화 유도 6일차(Day6)

[0117] 상기 (1-4)의 2일 후에 표 4에 나타난 배지(Step 4) 2 ml/well을 교환하였다.

표 4

[0118]

Step 4	제조사	품번	농도
Advanced DMEM/F12	gibco	12634-10	
AS401	아지노모토	20170228A	20%(V/v)
L-글루타민	gibco	25030-081	2 mM
Penicillin-Streptomycin	gibco	15140-122	50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep
SCF	R&D	255-SC	50 ng/ml
IL6	R&D	206-IL-050	50 ng/ml
EPO	교와 발효 기린		10 IU/ml

[0119] (1-6) 분화 유도 8일차(Day8)

[0120] 상기 (1-5)의 2일 후에 표 4에 나타난 배지(Step 4)와 동일한 배지 2 ml/well을 교환하였다.

[0121] (1-7) 분화 유도 10일차(Day 10)의 세포 평가

[0122] CD34/CD43의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD34⁺/CD43⁺ 세포 및 CD34⁻/CD43⁺ 세포가 다수 개 검출되었다. 즉, 혈구 전구 세포로 분화되어 있었다(도 1A).

[0123] (1-8) 분화 유도 10일차(Day 10)

[0124] 상기 (1-7)에서 유세포 분석에 제공한 것 이외의 세포를 피더 세포인 OP9/N-DLL1 세포를 파종한 12웰 배양 접시에 뿌렸다. 표 5에 나타난 조성의 배지에서 배지량은 1 ml/well로 하고 2일마다 배지를 반량 교환하였다.

표 5

[0125]

Step 5	day10 ⁻	제조사	품번	농도
20% FBS/ α MEM	gibco	11900-016		
Penicillin-Streptomycin	gibco	15140-122		50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep

IL2	Reprotech	200-02	10 ng/ml
IL7	R&D	207-1L-010	5 ng/ml
Flt3L	R&D	308-FK-025	5 ng/ml
L-아스코르브산	나칼라이(nacalai)	03420-52	100 µg/ml

[0126]

(1-9) 분화 유도 31일차(Day 31)의 세포의 평가

[0127]

CD3⁺γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가한 결과, CD3⁺/TCR⁺ 세포가 다수 개 검출되었고, TCR 세포로의 분화가 확인되었다(도 1B). 얻어진 세포를 이후 본 실시예에서는 "iPS 세포 유래 γ δ T 세포"라고 한다.

[0128]

(1-10) 분화 유도 31일차(Day 31)의 세포의 평가

[0129]

Jurkat 세포(인간 백혈병 T 세포 유래)에 대한 세포 상해 어세이(assay)를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester, 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르)로 염색한 Jurkat 세포(T)를 5X10⁴개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 1X10⁵개의 iPS 세포 유래 γ δ T 세포(E)를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D, 7-아미노-악티노마이신 D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다. 즉, iPS 세포 유래 γ δ T 세포는 세포 상해 기능을 가지고 있음이 확인되었다. 본 실시예에서는 γ δ T 세포의 활성화 자극 배양을 수행하지 않았음에도 불구하고 세포 상해 활성이 확인되었다.

[0130]

(실시예 2) iPS 세포로부터의 분화 유도

[0131]

본 실시예에서는 비특허문헌 1의 방법으로 제작한 γ δ TCR형 iPS 세포로부터 분화 유도 처리에 의해 제작한 γ δ T 세포에 관하여 분화 유도 10일 이후의 배지 성분과 분화 유도 31일차 이후의 배지 성분이 실시예 1과 상이하다. 특히 분화 유도 31일차 이후의 배지 성분에는 γ δ T 세포 자극제인 HMBPP를 포함한다.

[0132]

(2-1) 분화 유도 처리 10일차까지는 실시예 1의 (1-1)-(1-6)과 동일한 처리를 수행하였다.

[0133]

(2-2) 분화 유도 10일차~ (Day 10~)

[0134]

상기 실시예 1의 (1-6)에서 제작한 세포를 피더 세포인 OP9/N-DLL1 세포를 파종한 12웰 배양 접시에 뿌렸다. 표 6에 나타낸 배지(Step 5)의 조성의 배지 1 ml/well을 7일마다 전량 교환하였다.

표 6

[0135]

Step 5 (실시예 2)	Day 10-		
	제조사	품번	농도
20% FBS/ αMEM	gibco	11900-016	
Penicillin-Streptomycin	gibco	15140-122	50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep
SCF	R&D	255-SC	100 ng/ml
Flt3L	R&D	308-FK-025	100 ng/ml
TPO	Peprtech	AF-300-18-10	100 ng/ml
IL7	R&D	207-IL-010	100 ng/ml
L-아스코르브산	나칼라이	03420-52	100 µg/ml

[0136]

(2-3) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가

[0137]

CD7(T 세포 분화 마커)의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD7 양성 세포를 인지하였고, T 세포로 분화가 진행되어 있음이 명백해졌다(도 2A).

[0138]

(2-4) 분화 유도 31일차~ (Day 31~)

[0139] 표 7에 나타난 $\gamma \delta$ T 세포 자극 배지로 2일마다 배지를 반량 교환하였다. $\gamma \delta$ T 세포 자극 배지에는 HMBPP를 포함한다.

표 7

$\gamma \delta$ T 자극 배지	day31-		
	제조사	품번	농도
RPMI 1640	나칼라이	30264-85	
FBS	SIGMA	F7524	10%(v/v)
Penicillin- Streptomycin	gibco	15140-122	50 Unit/ml Pen 50 ug/ml Strep
IL-2	Reprotech	200-02	100 ng/ml
HMBPP	cayman chemical company	13580	1 nM

[0141] (2-5) 분화 유도 54일차(Day 54)의 세포의 평가

[0142] (2-5) 분화 유도 54일차(Day 54)의 세포의 평가

[0143] CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포가 다수 개 검출되었고, TCR 세포로의 분화가 확인되었다. 즉 얻어진 세포는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다. 또한, 일반적으로 T 세포의 성숙의 지표로 사용되는 CD45RA의 발현에 대해서도 평가하였더니, CD3⁺ 세포는 CD45RA⁺ 세포와 CD45RA⁻ 세포 양쪽을 포함하여 명백해졌다(도 2B).

[0144] (실시예 3) 피더 세포를 이용한 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도

[0145] 본 실시예에서는 실시예 1과 동일하게 비특허문헌 1의 방법으로 제작한 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포로부터 분화 유도 처리에 의해 제작한 $\gamma \delta$ T 세포에 대하여 나타내었다. 실시예 1과 동일하게 분화 유도 처리를 수행하였고, 31일차 이후 실시예 2의 (2-4)와 동일하게 $\gamma \delta$ T 세포 자극 배지(HMBPP 및 FBS를 포함함)를 2일마다 반량 교환하였다. 그 이후에 마커 발현의 평가와 함께 세포 상해 어세이를 수행하였다.

[0146] (3-1) 분화 유도 처리 10일차까지는 실시예 1에 나타난 (1-1)-(1-6) 및 (1-8)과 동일한 처리를 수행하였다.

[0147] (3-2) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가

[0148] CD7(T 세포 분화 마커)의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD7 양성 세포를 검출하였고 T 세포로 분화가 진행되어 있음이 명백해졌다(도 3A).

[0149] (3-3) 분화 유도 55일차(Day 55)의 세포의 평가

[0150] CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포를 다수 개 검출하였고 $\gamma \delta$ T 세포로의 분화가 확인되었다(도 3B). 얻어진 세포를 이후 본 실시예에서는 "iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포"라고 한다.

[0151] (3-4) 분화 유도 55일차(Day 55)의 세포의 평가

[0152] Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. 96웰 배양 접시의 한 웰 당 CFSE로 염색한 Jurkat 세포 5 X 10⁴개를 가하고, 추가로 분화 유도 55일차의 1 X 10⁵개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하고, E:T 비=2:1로 16시간 배양 후, 7-AAD 염색(사세포 염색)을 수행하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)가 7-AAD 양성이었고, 사세포가 많이 확인되었다. 즉, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 종양 세포에 대하여 세포 상해 기능을 가지고 있음이 확인되었다(도 3C).

[0153] (실시예 4) 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도

[0154] 본 실시예에서는 실시예 1과 동일하게 비특허문헌 1의 방법으로 제작한 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포로부터 분화 유도 처리에 의해 제작한 $\gamma \delta$ T 세포에 관하여 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 방법에 대하여 나타내었다. 본 실시예에서는 도 4에 나타난 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도 처리를 수행하였다.

- [0155] (4-1) 분화 유도 처리 8일차까지는 실시예 1에 나타낸 (1-1)-(1-6)과 동일한 처리를 수행하였다.
- [0156] (4-2) 분화 유도 10일차(Day 10)
- [0157] VCAM1과 DLL4로 코팅한 48웰 배양 접시를 이용하여 한 웰 당 StemSpan™ T cell generation kit(Stem Cell Technologies)에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium 250 μ l에 분화 유도 10일차의 세포를 1.2×10^4 개 현탁한 것을 과중하였다. VCAM1 5 μ g/ml 및 DLL4 10 μ g/ml를 용해한 PBS(-)를 세포 접촉을 위한 친수화 처리를 하지 않은 시판 48웰 배양 접시(cell culture-non-treated, 세포 배양 무처리)에 한 웰 당 100 μ l 가 하고, 4°C에서 하룻밤 정치하여 용액을 제거하고 PBS(-)로 1회 세정한 것을 VCAM1과 DLL4로 코팅한 배양 접시로 사용하였다. Lymphoid progenitor Expansion Medium을 사용하는 공정에서는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 배양하였다.
- [0158] (4-3) 이후의 배지 교환은 StemSpan™ 키트의 프로토콜에 따라 수행하였다. 구체적으로는 분화 유도 13일차(Day 13)에 배지 250 μ l를 추가적으로 가하고, 분화 유도 17일차(Day 17) 및 20일차(Day 20)에 각각 상기 배지를 반량 교환하였다. 분화 유도 24일차(Day 24)에 상기 키트에 포함되는 T cell progenitor Maturation Medium으로 교환하였다. 분화 유도 27일차(Day 27)에 상기 배지를 추가적으로 가하고, 이후, 분화 유도 31일차(Day 31) 및 34일차(Day 34) 등 주 2회 배지를 반량 교환하였다.
- [0159] (4-4) 분화 유도 33일차, 35일차 및 37일차의 세포의 평가
- [0160] CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포를 다수 개 검출하였고 TCR 세포로의 분화가 확인되었으며, iPS 세포 유래 γ δ T 세포임이 확인되었다(도 5). 본 결과는 3회의 독립적인 분화 유도 실험 결과를 보였다. 평가한 날(분화 유도 시작을 Day 0)은 도면 중에 나타내었다.
- [0161] (실시예 5) 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도
- [0162] 본 실시예에서는 실시예 4와 동일하게 γ δ TCR형 iPS 세포로부터 분화 유도 처리에 의해 제작한 γ δ T 세포에 관하여 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 방법에 대하여 나타내었다. 본 실시예에서는 도 6에 나타낸 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도 처리를 수행하였다.
- [0163] (5-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-3)과 동일한 처리를 수행하였고, 분화 유도 10~24일차에는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 배양하였다.
- [0164] (5-2) 분화 유도 24일차(Day 24)
- [0165] 실시예 2(2-4)의 표 7에 나타낸 γ δ T 세포 자극 배지(HMBPP 및 FBS를 포함함)로 교환하고 이후에는 3일마다 배지를 반량 교환하였다.
- [0166] (5-3) 분화 유도 37일차(Day 37)의 세포의 평가
- [0167] 상기 세포에 대하여 위상차 현미경을 이용하여 세포수를 관찰하였다. 실시예 4에서 γ δ T 세포 자극제(HMBPP)를 포함하지 않는 배지에서 배양하고 제작한 세포에 대해서도 동일하게 관찰하였다. 그 결과, γ δ T 세포 자극 배지에서 배양한 쪽이 명백하게 세포수가 많이 관찰되었다(도 7A). 나아가 CD3/ γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였더니, CD3⁺/TCR⁺ 세포가 다수 개 검출되었고, TCR세포로의 분화가 확인되었다(도 7B). 얻어진 세포는 iPS 세포 유래 γ δ T 세포임이 확인되었다
- [0168] (실시예 6) 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도
- [0169] 본 실시예에서는 실시예 4와 동일하게 γ δ TCR형 iPS 세포로부터 분화 유도 처리에 의해 제작한 γ δ T 세포에 관하여 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도 방법에 대하여 나타내었다. 본 실시예에서는 도 8에 나타낸 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도 처리를 수행하였다.
- [0170] (6-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-3)과 동일한 처리를 수행하고, 분화 유도 10~24일차에는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 배양하였다.
- [0171] (6-2) 분화 유도 24일차(Day 24)
- [0172] 분화 유도 24일차에 a. 실시예 2(2-4)의 표 7에 나타낸 γ δ T 세포 자극 배지(HMBPP 및 FBS를 포함함), b. 표 7에 나타낸 γ δ T 세포 자극 배지의 기초 배지(10% FBS/RPMI 1640) 대신 AS401을 포함하는 RPMI 1640(HMBPP

포함함) 배지 및 c. StemSpan™ 키트에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium의 각 배지로 교환하고 실시예 5(5-2)와 동일한 기법에 의해 배지를 교환하였다.

- [0173] (6-3) 분화 유도 32일차(Day 32)의 세포의 평가 2
- [0174] 분화 유도 32일차의 세포에 대하여 위상차 현미경을 이용하여 세포수를 관찰하였다. c.의 StemSpan™ 키트에 포함되는 배지에서는 명백하게 세포수가 적은 데 반해, b.의 무혈청 배지에서는 a.의 혈청 배지와 동등한 세포 밀도가 관찰되었다(도 9). 나아가 상기 세포에 대하여 CD3/γ δ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. 어느 조건에서도 CD3⁺/TCR⁺ 세포가 다수 개 검출되었고, iPS 세포 유래 γ δ T 세포임이 확인되었다(도 10). 얻어진 세포를 이후 본 실시예에서는 "iPS 세포 유래 γ δ T 세포"라고 한다.
- [0175] (6-4) 분화 유도 35일차(Day 35)의 세포의 평가 1
- [0176] 분화 유도 35일차의 세포에 대하여 a. 및 b.의 배지 조건으로 얻어진 세포를 이용하여 실시예 1의 (1-10)과 동일한 기법에 의해 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. 96웰 배양 접시의 한 웰 당 CFSE로 염색한 Jurkat 세포 5X10⁴개를 가하고, 추가로 분화 유도 35일차의 1X10⁵개의 iPS 세포 유래 γ δ T 세포를 가하고, E:T 비=2:1로 혼합 배양 시작 1일 후(d1)와 4일 후(d4)에 평가하였더니, T 세포의 활성화를 보이는 세포 덩어리가 보였다. 이펙터 세포(iPS 세포 유래 γ δ T 세포)를 첨가하지 않는 대조군(control)(ctrl)과 비교하여, a. 및 b.의 배지 조건으로 얻어진 세포는 명백하게 적은 모습이 관찰되었다(도 11). 혼합 배양 시작 1일 후, a.의 배지 조건과 비하면 적지만, b.의 혈청을 포함하지 않는 배지 조건에서도 세포 상해가 명백하였고, 4일 후에는 더 현저하고 자명한 세포 상해 활성이 확인되었다(도 12).
- [0177] (실시예 7) 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도
- [0178] 본 실시예에서는 실시예 4와 동일하게 γ δ TCR형 iPS 세포를 분화 유도 처리하고 γ δ T 세포를 제작하였다.
- [0179] (7-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-2)와 동일한 처리를 수행하고 배양하였다.
- [0180] (7-2) 다만 분화 유도 10일차에 있어서, (4-2)와 동일한 조건(i) 외에, 여기에 (ii) DKK1(Dickkopf-1)을 끝 농도 30 ng/ml 첨가한 조건, (iii) AZA(Azelaic acid)를 끝 농도 5 mM 첨가한 조건, (iv) DKK1(Dickkopf-1)과 AZA 양쪽을 각각 (ii)와 (iii)과 동일한 농도로 가한 조건으로 수행하였다.
- [0181] (7-3) 이후의 배지 교환은 StemSpan™ 키트의 프로토콜에 따라 수행하였다. 즉, 분화 유도 13일차(Day 13)에 (7-2)에 나타낸 각 배지를 250 μl 추가하고 분화 유도 17일차(Day 17) 및 20일차(Day 20)에 각 배지를 반량 교환하였다.
- [0182] (7-4) 분화 유도 24일차(Day 24)의 세포의 평가
- [0183] 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 T 세포 분화 마커인 CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. 그 결과, DKK1 및 AZA에 대하여 각각 분화 유도 효율에 양의 효과를 가지며, 병용하여 처리함으로써 보다 효과가 높음을 알 수 있었다(도 13).
- [0184] (실시예 8) 자기 비즈를 이용한 분화 유도 방법
- [0185] 본 실시예에서는 피더 세포를 사용하지 않는 조건으로 배양 접시를 코팅하는 대신 VCAM1과 DLL4를 코팅한 자기 비즈를 혼합 배양함으로써 T 세포로 분화 유도하였다.
- [0186] (8-1) 분화 유도 처리8일차까지는 실시예 1의 (1-1)-(1-6)과 동일한 처리를 수행하였다.
- [0187] (8-2) VCAM1과 DLL4를 코팅한 자기 비즈 용액의 조제
- [0188] 자기 비즈(Dynabeads™ Protein G(Invitrogen 제조)를 보텍스(vortex)로 교반하고 이를 5 μl와 PBS(phosphate-buffered saline, 인산완충 생리식염수) 1 ml를 튜브에 넣고, 자기 비즈 포착용 마그네틱 스탠드(magnetic stand)에서 1분간 정치(靜置)하였다. PBS를 제거하여 스탠드로부터 분리하고, PBS 200 μl, VCAM1(100 μg/ml 용액) 4.26 μl, DLL4(100 μg/ml 용액) 4.26 μl를 가하고, 실온에 15분 정치하였다. 마그네틱 스탠드에서 1분간 정치하고, 상기 용액을 제거하고 스탠드로부터 제거하였다. StemSpan™ 키트에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium 500 μl를 가하고, 피펫팅으로 현탁하였다.

- [0189] (8-3) 분화 유도 10일차(Day 10)
- [0190] 상기 (8-1)에서 제작한 세포 4.75×10^5 개를 (8-2)에서 조제한 자기 비즈 용액 500 μ l로 현탁하고 24웰의 저접착 배양 접시(PrimeSurface™)에 파종하고 배양하였다.
- [0191] (8-4) 분화 유도 13일차(Day 13)에 상기 배지 500 μ l를 추가하고 분화 유도 17일차 및 20일차에 각각 배지를 반량 교환하였다.
- [0192] (8-5) 분화 유도 24일차(Day 24)의 세포의 평가
- [0193] 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 T 세포 분화 마커인 CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. 그 결과, 0.3%로 비율은 낮지만, 대조군(동종형 대조군(isotype control))과 비교하면 명백하게 CD7 양성 세포가 존재해 있음이 확인되었다. 즉, 자기 비즈를 혼합 배양하는 본 방법에 의해서도 T 세포로의 분화가 가능성이 명백해졌다(도 14).
- [0194] (실시예 9) $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포로부터 제작한 $\gamma \delta$ T 세포
- [0195] 본 실시예에서는 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포로부터 제작한 $\gamma \delta$ T 세포(iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포)의 특성을 확인하였다. 먼저 처음에 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법을 나타내고 계속해서 세포의 각종 특성에 대하여 나타내었다.
- [0196] (9-1) iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법
- [0197] 도 15에 나타낸 방법으로 $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다.
- [0198] · iPS 세포의 수립
- [0199] 비특허문헌 1의 방법으로 제작한 $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포를 이용하였다. iPS 세포의 유지 배양에는 Stemfit^(R) AK02N(아지노모토)을 이용하였다. 계대에는 0.5 X TrypLE™ select(쓰모피셔 사이언티픽 제조)를 이용하였다. 혈구 전구 세포로의 분화 유도 처리는 각 공정에서 6웰의 배양 플레이트를 사용하고, 2×10^3 cells/well로 파종하였다. 1일 간격으로 배지를 흡인하고 전체 배지 2.0 ml/well을 교환하였다.
- [0200] · 분화 유도 0일차(Day 0): $\gamma \delta$ TCR형 iPS 세포의 상태(HPC1)
- [0201] Stemfit AK02N(Ajinomoto, Tokyo, Japan, AK02N)
- [0202] CHIR99021(Tocris, Bristol, UK, 4423) 4 μ M
- [0203] BMP4 (R&D, Minneapolis, MN, 314-BP) 80 ng/ml
- [0204] VEGF (R&D, Minneapolis, MN, 293-VE) 80 ng/ml
- [0205] · 분화 유도 2일차(Day 2): (HPC2)
- [0206] Essential 6 (Thermofisher, Waltham, MA, A1516501)
- [0207] SB431542 (WAKO, Osaka, Japan, 033-24631) 2 μ M
- [0208] bFGF(WAKO, Osaka, Japan, 060-04543) 50 ng/ml
- [0209] SCF (R&D, Minneapolis, MN, 255-SC) 50 ng/ml
- [0210] VEGF (R&D, Minneapolis, MN, 293-VE) 80 ng/ml
- [0211] · 분화 유도 4일차(Day 4): (HPC3)
- [0212] StemPRO34SFM (Thermofisher, Waltham, MA, 10639-011)
- [0213] L-Glutamine(Life technologies, 25036-081) 2 mM
- [0214] IL-3(Peprotech, Cranbury, NJ, AF-200-03) 50 ng/ml
- [0215] IL-6(R&D, Minneapolis, MN, 206-IL) 50 ng/ml

- [0216] FLT3L(R&D, Minneapolis, MN, 308-FK) 50 ng/ml
- [0217] SCF (R&D, Minneapolis, MN, 255-SC) 50 ng/ml
- [0218] VEGF (R&D, Minneapolis, MN, 293-VE) 20 ng/ml
- [0219] EPO(Kyowa Kirin, Tokyo, Japan) 10 IU/ml
- [0220] · 분화 유도 6, 8일차(Day6, 8): (HPC4)
- [0221] StemPRO34SFM (Thermofisher, Waltham, MA,10639-011)
- [0222] L-Glutamine(Life technologies, 25036-081) 2 mM
- [0223] IL-6(R&D, Minneapolis, MN, 206-IL) 50 ng/ml
- [0224] SCF (R&D, Minneapolis, MN, 255-SC) 50 ng/ml
- [0225] EPO(Kyowa Kirin, Tokyo, Japan) 10 IU/ml
- [0226] · 분화 유도 10일차~ (Day 10~): 피더 세포(OP9/N-DLL1) 상에서의 하기에 나타낸 T 세포(cell) 분화 배지에
서의 배양
- [0227] 세포의 계대는 Accutase(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, 12679-54)를 이용하였다. 이후 2일마다 배지를 반량
교환하였다. 또한, 12일차, 18일차 및 24일차에 피펫팅하여 웃물을 회수하고 새로운 피더 세포(OP9/N-DLL1) 위
에 과종하였다.
- [0228] (T 세포(cell) 분화 배지)
- [0229] αMEM(Gibco, 11900-016)
- [0230] FBS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, F7524) 20%
- [0231] SCF (R&D, Minneapolis, MN, 255-SC) 10 ng/ml
- [0232] TPO(R&D, Minneapolis, MN,) 10 ng/ml
- [0233] IL-7 (R&D, Minneapolis, MN, 207-IL) 5 ng/ml
- [0234] FLT3L(R&D, Minneapolis, MN, 308-FK) 5 ng/ml
- [0235] L-ascorbic acid(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, 30264-56) 100 μg/ml
- [0236] · 분화 유도 30일차~ (Day 30~): γ δ T 활성화 배지에서의 배양
- [0237] Accutase로 처리한 세포를 하기 γ δ T 활성화 배지에 현탁하고 피더 세포를 포함하지 않는 배지에서
배양하였다. 이후 2일마다 배지를 반량 교환하였다. 활성화 배양 7~14일의 세포를 세포 상해 어세이에 제공하였
다.
- [0238] (γ δ T 활성화 배지)
- [0239] RPMI 1640 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, 30264-56)
- [0240] FBS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, F7524) 10%
- [0241] HMBPP(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, 13580) 1 nM
- [0242] Immunace(Shionogi pharmaceuticals, Osaka, Japan) 100 IU/ml
- [0243] 2-Me(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 10 μM
- [0244] (9-2) γ δ TCR형 iPS 세포로부터 γ δ T 세포로의 분화 과정
- [0245] 분화 과정에서의 세포의 형상을 위상차 현미경으로 관찰하고(도 16A), 및 유세포 분석으로 세포 표면 마커에 대
하여 확인하였다(도 16B).
- [0246] d0: 분화 유도 0일차: γ δ TCR형 iPS 세포

- [0247] d10: 분화 유도 10일차: 혈구 전구 세포로 분화한 세포
- [0248] d30: 분화 유도 30일차: $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 자극 전의 $\gamma \delta$ T 세포
- [0249] d51: 분화 유도 51일차: $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 자극 후의 $\gamma \delta$ T 세포
- [0250] (9-3) 항종양 효과
- [0251] 분화 유도 38일차의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 이용하여 각종 종양 세포에 대한 항종양 활성을 확인하였다 (도 17). 이들 실험에서는 순화되지 않은 $\gamma \delta$ T 세포를 이용하였다. 대조군으로서 $\gamma \delta$ T 세포를 가하지 않고 종양 세포만을 배양한 조건을 이용하였다.
- [0252] A. Jurkat 세포(인간 백혈병 T 세포 유래)에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포 5×10^4 개를 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양한 다음, 7-AAD 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 대조군에 비해 명백하게 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 Jurkat 세포에 대하여 세포 상해 활성이 높았다(도 17A).
- [0253] B. Huh-7 세포(인간 간암 세포 유래)에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Huh-7 세포 5×10^4 개를 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양한 다음, 위상차 현미경으로 관찰하고 종양 면적을 측정하였다. 대조군에 비해 명백하게 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 Huh-7 세포에 대하여 세포 상해 활성이 높았다(도 17B).
- [0254] C. SW480 세포(인간 결장암 유래)에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 SW480 세포 5×10^4 개를 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양한 다음, 위상차 현미경으로 관찰하고 종양 면적을 측정하였다. 대조군에 비해 명백하게 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포는 SW480 세포에 대하여 세포 상해 활성이 높았다(도 17C).
- [0255] D. iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포 (E)와 Jurkat 세포(T)의 혼합 배양 시에 E:T 비를 단계적으로 변경하였다. 0:1의 생세포율을 100%로 하여 생세포율을 비교하였다(도 17D).
- [0256] (9-4) TCR 재구성의 유지 · 세포 상해 메커니즘
- [0257] 분화 유도 36일차의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 이용하여 TCR 재구성의 유지 및 세포 상해 메커니즘에 대하여 확인하였다(도 18).
- [0258] A. 순화되지 않은 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포(igdT)와 말초 혈액 단핵 세포 (PB)에 대하여 세포 표면의 $\alpha \beta$ TCR의 발현을 평가하였다. PB에서는 $\alpha \beta$ TCR의 발현이 검출되었으나, 본 발명의 $\gamma \delta$ T 세포 (igdT)에서는 $\alpha \beta$ TCR의 발현은 검출되지 않았다(도 18A).
- [0259] B. TCR 유전자 재구성을 게놈 PCR
- [0260] TCR 유전자(Vg9, Vd2)의 재구성을 게놈 PCR로 확인하였다. $\gamma \delta$ T 세포(igdT)를 유세포 분석으로 분리(sort)한 것은 미분화(undiff)의 상태와 동일하게 TCR 유전자 재구성을 유지하고 있음이 확인되었다(도 18B). 양성 대조군으로서 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 이용하였다.
- [0261] C. 사전에 CD3을 표지(標識)한 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포(igdT)와 Jurkat 세포를 브레펠딘 A(Brefeldin A) $3 \mu\text{g/ml}$ 하에서 공동 배양하였다. iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 그랜자임 B(Granzyme B), 퍼포린(Perforin)을 발현하고 있음이 확인되었다(도 18C). 그랜자임 B(Granzyme B)나 퍼포린(Perforin)은 T 세포에 의한 세포 상해 기능의 분자 실태이고, 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포가 세포 상해성을 가짐이 확인되었다
- [0262] D. $\gamma \delta$ T 세포(igdT)를 유세포 분석(FACS)으로 순화한 것에 대하여 세포 상해 어세이를 수행하였다. 세포 상해 어세이의 조건은 (9-3)의 A.에 나타난 방법으로 수행하였다. 도 18D에 있어서 대조군(ctrl)으로서 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하지 않고 Jurkat 세포만을 배양한 것을 이용하였다. 또한 순화되지 않은 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 bulk로 하고 순화된 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 sort로 명기하였다. iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포에 대하여 순화의 유무로 사세포율에 큰 차이는 없었다(도 18D).
- [0263] E. iPS 세포주 및 종양 세포의 HLA(Human Leukocyte Antigen, 인간 백혈구 항원) 타입
- [0264] 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포에 사용한 iPS 세포 및 실시예 3, 6 및 본 실시예에서 사용한 각 종양 세

포의 HLA 타입에 대하여 확인한 결과를 표 8에 나타내었다. iPS 세포의 HLA 타입은 각 종양 세포의 HLA 타입과는 일치되어 있지 않으나, 각 종양 세포에 대하여 항종양 작용이 인정되었다(본 실시예 A.~C.). 이에 따라, 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포가 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 가짐이 확인되었다

표 8

[0265]

	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
62B3 *	02:01	24:02	40:01	54:01	01:02	03:04	04:03	04:05
121-3 *	24:01	31:01	35:01	52:01	04:01	12:02	09:01	13:02
Jurkat **	03:01	-	07:02	35:03	04:01	07:02	07:01	15:01
Huh-7 **	11:01	-	54:01	-	01:02	-	08:03	-
SW480 **	02:01	24:02	07:02	15:18	07:02	07:04	01:03	13:01

[0266] * iPS 세포주

[0267] ** 종양 세포주

[0268] (실시예 10) iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포의 비교

[0269] 본 실시예에서는 iPS 세포를 분화 유도하여 제작한 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포(igdT)와 말초 혈액에 존재하는 $\gamma\delta$ T 세포(PB-gdT)에서의 세포 표면 발현 마커 유전자에 대하여 비교하였다. 본 실시예의 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포는 실시예 1에 나타낸 방법 및 실시예 9의 (9-1)에 나타낸 방법으로 배양하였고, 분화 유도 36~42일차의 세포를 이용하였다. 말초 혈액으로부터 분리된 단핵구를 실시예 9(9-1)에 나타낸 $\gamma\delta$ T 활성 배지에서 배양하여 얻은 세포를 본 실시예의 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포로 이용하였다.

[0270] (10-1) 싱글 셀 RNA-seq 분석

[0271] iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포 및 말초 혈액 중의 $\gamma\delta$ T 세포가 아닌 세포에 대하여 마커 유전자 발현의 차이를 싱글 셀 RNA-seq 분석(解析)에 의해 분석하였다. 그 결과, CD7, CD8a, IL18R1, IL2RA(CD25), IL2RB 및 IFN γ 에 대하여 각각 다른 발현 패턴을 보였다(도 19, 표 9).

표 9

igdT>PB-gdT	CD7, CD8a
igdT=PB-gdT	CD3E, δTCR, IL2RB, IL18R1 Perforin, GranzymeB, NKG7
igdT<PB-gdT	IL2RA, IFNγ

[0272] (10-2) 유세포 분석에 의한 CD25의 분석

[0273] iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포에 있어서의 CD25의 발현을 유세포 분석으로 비교하였다. iPS 세포 유래 TCR-V γ 9 양성 세포에서는 대부분이 CD25 음성 세포인데 반해 말초 혈액으로부터 분리된 TCR-V γ 9 양성 세포에서는 대부분이 CD25 양성 세포였다(도 20).

[0274] 상기에 의해 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma\delta$ T 세포에서는 세포 표면 마커의 패턴이 상이함이 확인되었다.

[0275] (실시예 11) iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 방법

[0276] 본 실시예에서는 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화 방법에 대하여 검토하였다. 구체적으로는 실시예 9의 (9-1)에 나타낸 제작 방법 중 분화 유도 30일차의 세포에 대하여 이하의 $\gamma\delta$ T 활성 배지에 추가로 IL-2 및/또는 IL-15의 어느 하나를 첨가하는 것이 보다 효과적으로 iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포를 제작할 수 있는지에 대하여 검토하였다(도 21 참조).

- [0278] (활성화 배지)
- [0279] RPMI 1640 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan, 30264-56)
- [0280] FBS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, F7524) 10%
- [0281] HMBPP(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, 13580) 1 nM
- [0282] 2-Me(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 10 μ M
- [0283] 생세포수 및 CD3⁺ γ δ T 세포에 대하여 평가한 결과, IL-2에 비해 IL-15의 첨가가 바람직하고, IL-2와의 병용에 비해 도 IL-15 단독 쪽이 보다 효과적이었다(도 22).
- [0284] (실시에 12) γ δ TCR형 iPS 세포(121-3주)로부터 제작한 γ δ T 세포의 특성
- [0285] 본 실시예에서는 γ δ TCR형 iPS 세포(121-3주)로부터 제작한 γ δ T 세포의 특성을 확인하였다.
- [0286] (12-1) 본 실시예에서는 γ δ TCR형 iPS 세포는 62B3주가 아니라 121-3주를 이용하여 실시예 9의 (9-1)에 나타낸 방법으로 배양하였고, 분화 유도 36일차의 세포를 이용하였다.
- [0287] (12-2) TCR 재구성의 유지
- [0288] A. γ δ TCR형 iPS 세포(121-3주)로부터 분화 유도하여 얻어진 γ δ T 세포(i γ δ T)의 TCR 유전자(V γ 9, V γ 2)의 재구성을 계능 PCR로 확인하였다. i γ δ T를 유세포 분석으로 분리(sort)한 것은 미분화(undiff)의 상태와 동일하게 TCR 유전자 재구성을 유지하고 있음이 확인되었다(도 23A).
- [0289] B. γ δ TCR형 iPS 세포(121-3주)로부터 분화 유도하여 얻어진 γ δ T 세포(i γ δ T)와 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 γ δ T 세포(PB γ δ T)의 TCR γ 와 TCR δ 의 서열을 차세대 시퀀서에 의해 분석하였다. 각각의 TCR γ 와 TCR δ 의 CDR3 영역의 염기 서열 및 아미노산 서열을 특정하고 서열마다의 빈도를 원 그래프로 나타내었다(도 23B). PB γ δ T 세포 집단은 다양한 서열을 갖는 세포로 구성되는 데 반해 i γ δ T 세포 집단은 모두 한 종류의 TCR γ 및 TCR δ 유전자 재구성을 갖는 세포로 구성됨이 확인되었다.
- [0290] (실시에 13) γ δ TCR형 iPS 세포(62B3주)로부터 제작한 iPS 유래 γ δ T 세포의 특성
- [0291] 본 실시예에서는 실시예 9에 나타낸 제작 방법에 의해 제작한 iPS 유래 γ δ T 세포에 관하여 분화 유도 39일차의 세포를 Jurkat 세포와 4시간 공동 배양한 세포에 대하여 유세포 분석에 의한 IFN γ 의 발현을 평가하였다.
- [0292] iPS 세포 유래 γ δ T 세포(i γ δ T)와 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 γ δ T 세포(PB γ δ T)에 있어서의 IFN γ (인터페론 감마)의 발현을 그랜자임 B(Granzyme B)의 발현과 함께 유세포 분석기(Flow Cytometer)로 평가하였다. 그 결과, 그랜자임 B(Granzyme B)는 어느 세포 집단에서도 발현되어 있음에 반해 IFN γ 는 PB γ δ T에서만 발현됨이 확인되었고, i γ δ T에서는 발현됨이 확인되지 않았다(도 24).
- [0293] (실시에 14) iPS 세포 유래 γ δ T 세포와 말초 혈액을 증폭하여 얻어진 γ δ T 세포의 비교
- [0294] 본 실시예에서는 γ δ TCR형 iPS 세포(62B3주 또는 121-3주)를 분화 유도하여 제작한 iPS 세포 유래 γ δ T 세포(igdT)와 말초 혈액을 증폭하여 얻어진 γ δ T 세포(PB-gdT)에서의 세포 표면 발현 마커에 대하여 비교하였다.
- [0295] (14-1) 실시예 9의 (9-1)과 동일한 처리를 수행하고, 피더 세포를 사용하는 방법으로 배양하였다.
- [0296] (14-2) 분화 유도 40일차의 세포에 대한 γ δ T 세포를 포함하는 세포 집단(i γ δ T)과 말초 혈액 단핵구를 증폭 배양하여 얻어진 γ δ T 세포(PB γ δ T)를 포함하는 세포 집단(CD3 양성 또는 TCR γ 9 양성)에 있어서의 다양한 세포 표면 마커(CD25, CD7, CD5, CD45RA 및 CD27)의 발현을 유세포 분석기로 평가하였다. PB γ δ T와 비교하여 iPS 세포 유래 γ δ T 세포(i γ δ T 중 CD3 양성 또는 TCR γ 9 양성 세포)에서는 CD7을 발현하는 세포의 비율이 높고, CD5 및 CD25를 발현하는 세포의 비율이 낮으며, 더욱이 CD45RA⁺ CD27⁻의 비율이 높다는 특징을 가짐이 확인되었다(도 25).
- [0297] (실시에 15) γ δ T 세포를 자극하는 공정의 검토
- [0298] 본 실시예에서는 실시예 5와 동일하게 γ δ TCR형 iPS 세포로부터의 분화 유도 처리에 의해 제작한 γ δ T 세포에 관하여 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건 및 γ δ T 세포를 자극하는 공정을 24일차부터가 아니라 17

일차에 수행하는 조건에서의 분화 유도 방법에 대하여 나타내었다. 본 실시예에서는 도 26A(새로운 프로토콜(New protocol))에 나타낸 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도를 수행하였다.

- [0299] (15-1) 실시예 5의 (5-1)과 동일한 처리를 수행하고 배양하였다. 다만, $\gamma \delta$ T 세포를 자극하는 공정은 분화 유도 17일차부터 수행하였다.
- [0300] (15-2) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가
- [0301] 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR(gd TCR)의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포를 검출하였고 TCR 세포로의 분화가 확인되었으며, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다(도 26B). 얻어진 세포를 이후 본 실시예에서는 "iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포"라고 한다.
- [0302] (15-3) 분화 유도 17일차(Day 17)
- [0303] 20% AS401을 포함하는 RPMI 1640을 기본 배지로 하고, 여기에 HMBPP(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, 13580) 1 nM 및 IL2(Reprotech, 200-02) 100 ng/ml을 가한 배지로 교환하고 이후 3일마다 배지를 반량 교환하였다.
- [0304] (15-4) 분화 유도 24일차(Day 24)
- [0305] 나아가 분화 유도 24일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다(도 26C). $\gamma \delta$ T 세포를 자극하는 공정을 단축한 조건으로도 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포가 얻어졌다.
- [0306] (실시예 16) 피더 세포를 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 방법
- [0307] 본 실시예에서 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포 $\gamma \delta$ T 세포의 활성화 방법에 대하여 검토하였다.
- [0308] A. 실시예 15의 (15-1) 및 (15-3)과 동일한 처리를 수행하고, 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 배양하였다. 다만 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 실시예 15의 (15-3)과 동일한 조건 외에 (15-3) 중 IL-2를 IL-15로 교환한 조건으로 수행하였다. 분화 유도 33일차 또는 37일차에 대하여 보다 효과적으로 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있는지에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포를 검출하였고 TCR 세포로의 분화가 확인되었으며, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다(도 27A). $\gamma \delta$ T 세포 자극 공정에서는 IL-2, IL-15의 어느 것이더라도 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작하는 것이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한 IL-2에 비해 IL-15의 첨가에 의해 많은 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 얻을 수 있었다.
- [0309] B. 상기 A 중 $\gamma \delta$ T 세포 자극의 공정에서 IL-15를 이용하여 분화 유도 처리를 수행하고, HMBPP의 첨가의 유무에 의해 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있는지에 대하여 검토하였다. 분화 유도 23일차의 세포에 대하여 CD3/CD7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포를 검출하였고 TCR 세포로의 분화가 확인되었으며, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다. $\gamma \delta$ TCR 자극제인 HMBPP를 첨가하지 않는 조건이라 하더라도 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 얻을 수 있었다(도 27B).
- [0310] (실시예 17) iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 동결 용해 후의 세포 상해 활성화
- [0311] 본 실시예에서는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건에서의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 동결 용해하고 세포 상해 어세이를 수행하였다.
- [0312] (17-1) 실시예 15의 (15-1) 및 (15-3)과 동일한 처리를 수행하고, 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 배양하였다. 다만 실시예 15의 (15-3) 중 IL-2를 IL-15로 교환하여 수행하였다. 분화 유도 24일차에 CS10(코스모 바이오(Cosmo Bio Co., Ltd) 제조)을 이용하여 동결시켰다.
- [0313] (17-2) 분화 유도 24일차(Day 24)의 세포의 평가
- [0314] 상기 동결시킨 세포를 2주일 후에 해동하고 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가지고, 여기에 분화 유도 24일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다(도 28). 즉, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 동결 용해 후라 하더라도 세포 상해 기능을 가지고 있음이 확인되었다.

- [0315] (실시예 18) iPS 세포 유래 혈구 전구 세포 동결 용해 후의 분화 유도
- [0316] 본 실시예에서는 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포 동결 용해 후에 분화 유도를 수행하고, $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다.
- [0317] (18-1) 분화 유도 10일차(Day 10)의 세포의 평가
- [0318] 실시예 1에 나타낸 (1-1)-(1-6)과 동일한 처리를 수행하고, 분화 유도 10일차의 세포를 유세포 분석으로 평가하고 혈구 전구 세포의 단계임을 확인하였다(도 29A).
- [0319] (18-2) 분화 유도 10일차(Day 10)
- [0320] 상기 세포를 CS10(코스모 바이오 제조)을 이용하여 동결시키고 약 1년 후에 해동하였다. 해동 후, 실시예 9의 (9-1)과 동일한 처리로 수행하고 피더 세포를 사용하는 방법으로 분화 유도시켰다.
- [0321] (18-3) 분화 유도 37일차(Day 37)의 세포의 평가 1
- [0322] 분화 유도 37일차(분화 유도 배양 기간이 동결 전후 합하여 37일차)의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포가 검출되었기 때문에 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다(도 29B). 나아가, 분화 유도 37일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 분화 유도 24일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다(도 29C). 즉, iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포는 동결 용해 후라도 하더라도 세포 상해 기능을 가지고 있음이 확인되었다
- [0323] (실시예 19) iPS 세포 유래 혈구 전구 세포 동결 용해 후의 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도
- [0324] 본 실시예에서는 iPS 세포 유래 혈구 전구 세포 동결 용해 후에 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건에서의 분화 유도를 수행하고, $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다. 본 실시예에서는 도 30A에 나타낸 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도를 수행하였다. 아울러 본 실시예에서의 동결은 18일간 수행하였다.
- [0325] (19-1) 분화 유도 8일차까지는 실시예 1에 나타낸 (1-1)-(1-6)과 동일한 처리를 수행하였다. 분화 유도 10일차에 CS10(코스모 바이오 제조)을 이용하여 동결시키고 18일 후에 해동하였다.
- [0326] (19-2) 분화 유도 10일차(Day 10)
- [0327] 상기 해동 후의 세포에 관하여 VCAM1과 DLL4로 코팅한 48웰 배양 접시를 이용하여 한 웰 당 StemSpanTM T cell generation kit(Stem Cell Technologies)에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium에 DKK1 끝 농도 30 ng/ml 및 아젤라산(AZA) 끝 농도 5 mM을 가한 배지에 분화 유도 10일차의 세포를 1.2×10^4 개 현탁한 것을 파종하였다. VCAM1 5 μ g/ml 및 DLL4 10 μ g/ml을 용해한 PBS(-)를 세포 접착을 위한 진수화 처리를 하지 않은 시판 48웰 배양 접시(cell culture-non-treated)에 한 웰 당 100 μ l 가하고, 4°C에서 하룻밤 정치하여 용액을 제거하고 PBS(-)로 1회 세정한 것을 VCAM1과 DLL4로 코팅한 배양 접시로 사용하였다.
- [0328] (19-3) 이후의 배지 교환은 StemSpanTM 키트의 프로토콜에 따라 수행하였다. 구체적으로는 분화 유도 13일차에 배지 250 μ l를 추가적으로 가하였다.
- [0329] (19-4) 분화 유도 17일차(Day 17)
- [0330] 분화 유도 17일차에서는 실시예 15의 (15-3) 중 IL-2를 IL-15로 교환하고 실시예 15의 (15-3)과 동일한 기법을 수행하고, 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 분화 유도를 수행하고, $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다.
- [0331] (19-5) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가
- [0332] 분화 유도 17일차(분화 유도 배양 기간이 동결 전후 합하여 17일차)의 세포에 대하여 CD3/ $\gamma \delta$ TCR의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/TCR⁺ 세포가 검출되었기 때문에 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다(도 30B).

- [0333] (19-6) 분화 유도 24일차(Day 24)의 세포의 평가
- [0334] 분화 유도 24일차(분화 유도 배양 기간이 동결 전후 합하여 24일차)의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96 웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 분화 유도 24일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다(도 30C).
- [0335] (실시예 20) 저산소 조건 하에서의 혈구 전구 세포로부터의 분화 유도
- [0336] 본 실시예에서는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 수행하였다. 다만 저산소 조건 하에서 혈구 전구 세포로부터 분화 유도를 수행하고, $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다. 본 실시예에서는 도 31A에 나타난 프로토콜에 따라 이하의 순서로 분화 유도를 수행하였다.
- [0337] (20-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-2)와 동일한 처리를 수행하였다.
- [0338] (20-2) 다만 분화 유도 10일차의 세포에 있어서, 실시예 4의 (4-2)에 나타난 StemSpan™ T cell generation kit(Stem Cell Technologies)에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium에 DKK1 끝 농도 30 ng/ml 및 아젤라산(AZA) 끝 농도 5 mM을 가한 배지에서 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 수행하고, O₂ 농도를 20%에서 5%로 바꾸어 배양하였다.
- [0339] (20-3) 이후의 배지 교환은 StemSpan™ 키트의 프로토콜에 따라 수행하였다. 구체적으로는 분화 유도 13일차에 (20-2)에 나타난 배지 250 μ l를 추가적으로 가하였다.
- [0340] (20-4) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가
- [0341] 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/D7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다(도 31B). CD3⁺/CD7⁺ 세포가 검출되었기 때문에 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다. 20%O₂에 비해 저산소 (5%O₂)의 조건에서는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 비율 및 절대수 모두 많음을 확인할 수 있었다.
- [0342] (20-5) 분화 유도 17일차(Day 17)
- [0343] 실시예 19의 (19-4)와 동일한 처리 중 O₂ 농도를 20%에서 5%로 바꾸어 배양하였다.
- [0344] (20-6) 분화 유도 29일차
- [0345] 분화 유도 29일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 분화 유도 29일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다(도 31C). 즉 세포 상해 활성은 통상적으로 산소 조건 하에서 유도한 것보다 저산소 조건 하 쪽이 효과적이었다.
- [0346] (실시예 21) 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지 조건 하에서의 iPS 세포로부터의 분화 유도
- [0347] 본 실시예에서는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지 조건 하에서 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다.
- [0348] (21-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-2)와 동일한 처리를 수행하였다.
- [0349] (21-2) 다만 분화 유도 10일차에서는 실시예 2의 표 6에 나타난 것 중 피더 세포를 사용하지 않고 기초 배지 20% FBS/ α MEM을 20% AS401/RPMI 1640로 교환한 것(동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지 조건이 됨)을 실시예 4의 (4-2)에 나타난 Lymphoid progenitor Expansion Medium 대신 사용하여, 실시예 4의 (4-2)와 동일한 기법에 의해 분화 유도를 수행하고, $\gamma \delta$ T 세포를 제작하였다. 분화 유도 13일차에 배지 250 μ l를 추가하였다.
- [0350] (21-3) 분화 유도 17일차(Day 17)의 세포의 평가
- [0351] 분화 유도 17일차의 세포에 대하여 CD3/D7의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. CD3⁺/CD7⁺ 세포가 검출되었기

때문에 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포임이 확인되었다(도 32A).

- [0352] (21-4) 분화 유도 17일차(Day 17)
- [0353] 분화 유도 17일차에서는 실시예 2의 (2-4)의 표 7 중 기초 배지 20% FBS/ α MEM을 20% AS401/RPMI 1640으로, IL-2를 IL-15로 교환하고 실시예 2의 (2-4)와 동일한 기법에 의해 분화 유도하고 배양하였다.
- [0354] (21-5) 분화 유도 31일차(Day 31)
- [0355] 분화 유도 31일차의 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 분화 유도 31일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에 의해 사세포를 염색하였다. 많은 Jurkat 세포(CFSE 양성 세포)에 대하여 세포사(7-AAD 양성)가 확인되었다(도 32B). 현저한 세포 상해 활성이 확인되었다.
- [0356] (실시예 22) iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포에 대한 미분화 세포의 확인
- [0357] 실시예에서는 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 수행하였다. 본 실시예에서는 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포에 대한 미분화 세포의 확인을 하였다.
- [0358] (22-1) 실시예 4의 (4-1)-(4-2)와 동일한 처리를 수행하였다.
- [0359] (22-2) 다만 분화 유도 10일차의 세포에 있어서 실시예 4의 (4-2)에 나타낸 StemSpan™ T cell generation kit(Stem Cell Technologies)에 포함되는 Lymphoid progenitor Expansion Medium에 DKK1 끝 농도 30 ng/ml 및 아젤라산(AZA) 끝 농도 5 mM을 가한 배지에서 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 수행하였다.
- [0360] (22-3) 이후의 배지 교환은 StemSpan™ 키트의 프로토콜에 따라 수행하였다. 구체적으로는 분화 유도 13일차에 배지 250 μ l를 추가적으로 가하고, 분화 유도 17일차 이후에는 주 2회 20% AS401을 포함하는 RPMI 1640을 기본 배지로 하여, 여기에 HMBPP(Cayman chemical, Ann Arbor, MI, 13580) 1 nM 및 IL 15 100 ng/ml을 가한 배지에 반량씩 교환하였다.
- [0361] (22-4) 분화 유도 35일차(Day 35)의 세포 집단의 평가 1
- [0362] 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 분화시킨 35일차의 세포 집단에 있어서의 미분화 마커 TRA-1-85의 발현을 유세포 분석으로 평가하였다. 35일차의 세포 집단에 대하여 TRA-1-85 양성 세포를 전혀 포함하지 않음이 확인되었다(도 33A).
- [0363] (22-5) 분화 유도 35일차(Day 35)의 세포 집단 2
- [0364] 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 조건으로 분화시킨 35일차의 세포 집단을 사용하고 미분화 세포의 콜로니가 출현하는지를 확인하는 프로토콜을 나타내었다(도 33B). 35일차의 세포의 1×10^4 개의 iPS 유래 세포 $\gamma \delta$ T 세포 집단을 미분화 iPS 세포의 유지 배양 조건(실시예 1의 (1-1))으로 파종하고 미분화 세포의 콜로니가 출현하는지를 조사하였다. 양성 대조군으로서 1×10^2 개의 미분화 iPS 세포를 혼합하였다. 11일 후에 알칼리 포스파타아제 염색(AP 염색)을 수행하였다. 미분화 세포의 콜로니는 AP 염색으로 빨강계 물든다. 양성 대조군인 iPS 세포를 첨가한 조건에서는 AP 염색 양성의 콜로니가 다수 개 확인되는 데 반해 iPS 세포를 첨가하지 않은 분화 유도 후의 세포 집단에서는 AP 염색 양성의 콜로니는 하나도 확인되지 않았다(도 33C).
- [0365] (실시예 23) CD3/ $\gamma \delta$ T 양성 세포의 세포 상해 어세이
- [0366] 본 실시예에서는 실시예 22와 동일한 처리에 의해 얻어진 세포 집단 중으로부터 CD3/ $\gamma \delta$ T 양성 세포를 순화하여 세포 상해 어세이를 수행하였다.
- [0367] 분화 유도 35일차(Day 35)의 세포에 대하여, FACS 전과 FACS 후의 유세포 분석으로 평가하였다(도 34A). CD3/ $\gamma \delta$ TCR(gd TCR) 양성 세포가 검출되었기 때문에 순화가 양호하게 수행되어 있음이 확인되었다.
- [0368] 순화된 세포에 대하여 Jurkat 세포에 대한 세포 상해 어세이를 수행하였다. E:T(effector:target) 비=0.2:1, 형광 색소 CFSE로 염색한 Jurkat 세포를 5×10^4 개 96웰 배양 접시의 한 웰에 가하고, 여기에 분화 유도 35일차의 1×10^5 개의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 가하여 16시간 배양하였다. 7-AAD(7-Amino-Actinomycin D) 염색에

의해 사세포를 염색하고 그래프화하였다(도 34B). E:T비 0.2:1이라는 종양 세포에 대하여 공격 측(effector) 세포의 수가 매우 적은 조건임에도 불구하고 강한 세포 상해 활성을 보였다. 지금까지 순화를 수행하지 않는 세포 집단을 이용하여 수행하였던 세포 상해 어세이에 있어서 세포 상해 활성을 가지고 있던 것이 목적 세포인 CD3/ $\gamma \delta$ T 양성 세포(즉 $\gamma \delta$ T 세포)이었음이 명백해졌다.

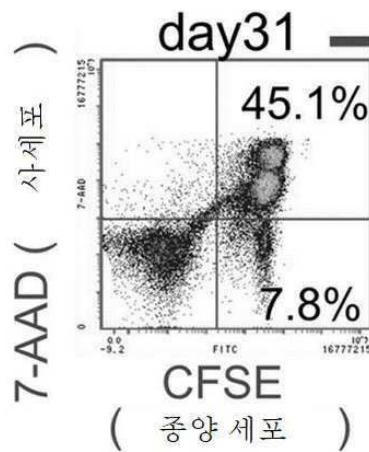
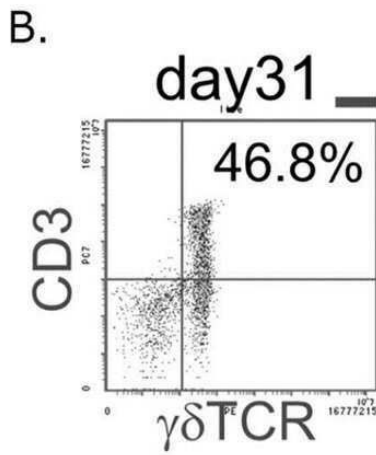
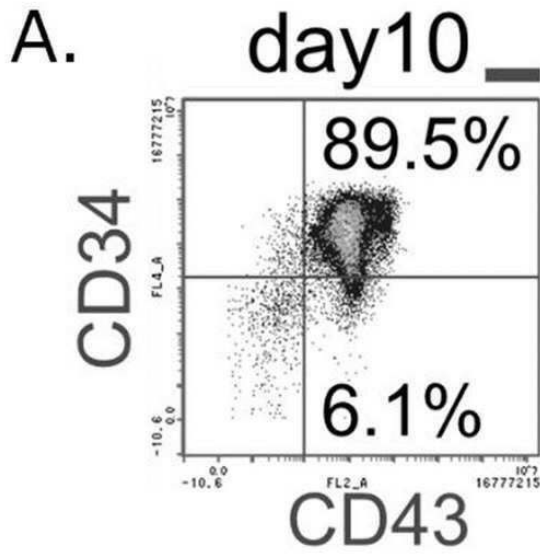
산업상 이용가능성

[0369] 이상 상세하게 설명한 바와 같이, 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포의 제작 방법에 따르면, 피채혈자의 부담없이 세포의 피폐에 영향을 받지 않고 $\gamma \delta$ T 세포를 효과적으로 제작할 수 있다. 나아가 본 발명의 제작 방법에 따르면, 피더 세포를 사용하지 않는 방법으로도 뛰어난 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있다. 또한 나아가 본 발명의 제작 방법에 따르면, 피더 세포도 혈청도 사용하지 않는 방법으로도, 심지어는 동물 유래 성분을 포함하지 않는 배지를 사용하는 방법으로도 뛰어난 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있다. 나아가 본 발명의 제작 방법에 따르면 제작 도중에 동결 용해하여도 뛰어난 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포를 제작할 수 있다.

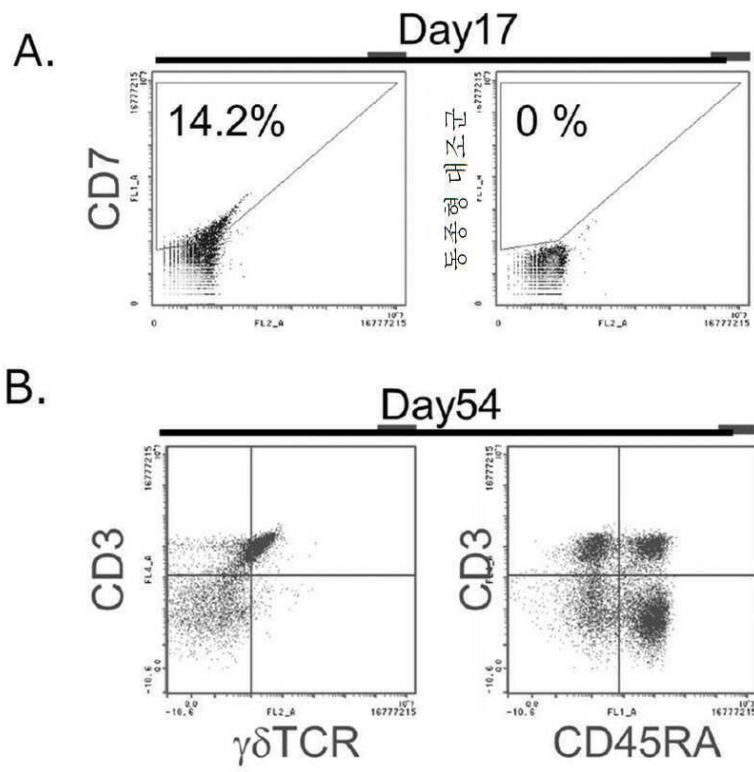
[0370] 본 발명의 iPS 세포 유래 $\gamma \delta$ T 세포에 따르면, 말초 혈액 중의 $\gamma \delta$ T 세포로는 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보할 수 없다는 문제나, 치료에 충분한 순도 및 세포수를 확보하기 위하여 채혈량을 많이 하면 피채혈자에게 많은 부담이 된다는 문제를 극복할 수 있다. 나아가 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포를 체외 증폭시키는 방법으로는 세포수 확보의 어려움 이외에, 세포의 피폐 때문에 충분한 증폭과 활성화를 얻을 수 없다는 문제도 극복할 수 있어 매우 유용하다. 본 발명의 방법으로 제작된 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단은 말초 혈액으로부터 분리된 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단에 비해 보다 균질한 효과가 높은 $\gamma \delta$ T 세포 집단으로 할 수 있고, 보다 효과적으로 MHC 비구속성으로 항원 특이적 세포 상해 활성을 갖는 뛰어난 기능을 갖는다. 나아가 본 발명의 방법으로 제작된 $\gamma \delta$ T 세포의 세포 집단은 미분화 세포의 잔존이 없는 $\gamma \delta$ T 세포 집단으로 할 수 있고, 임상 응용에 있어서 뛰어나다.

도면

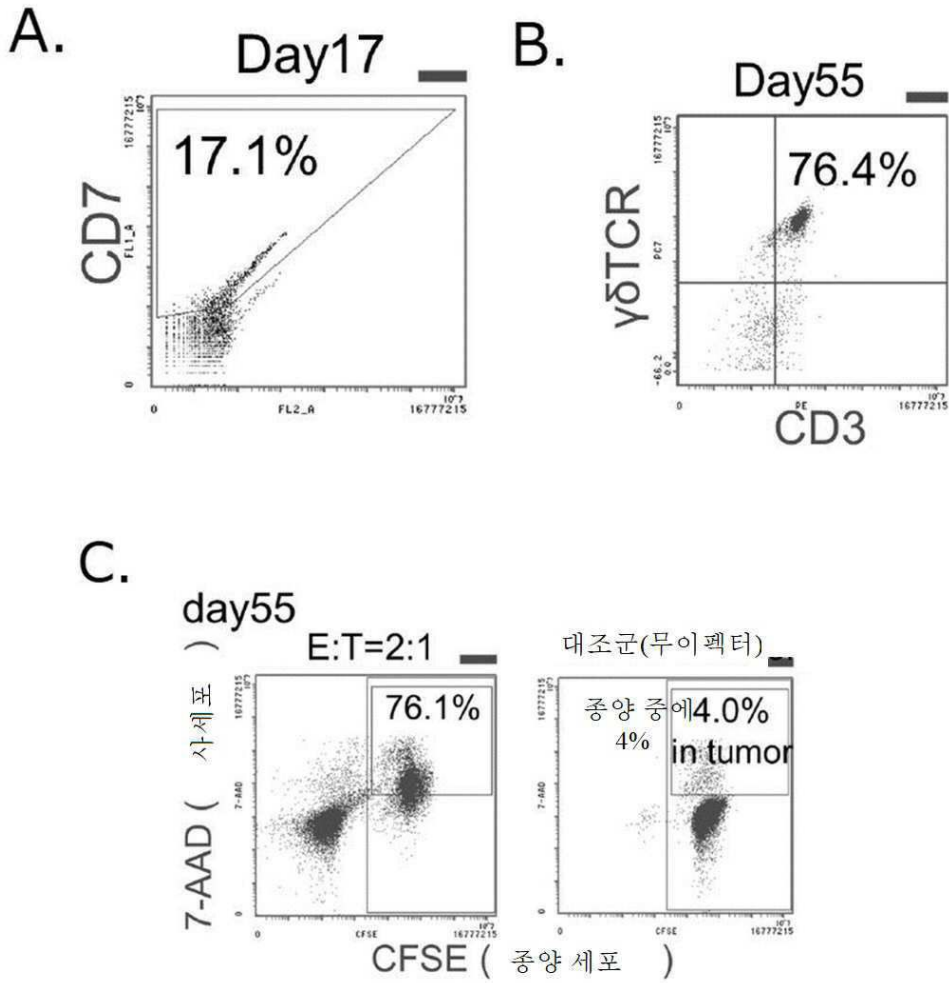
도면1



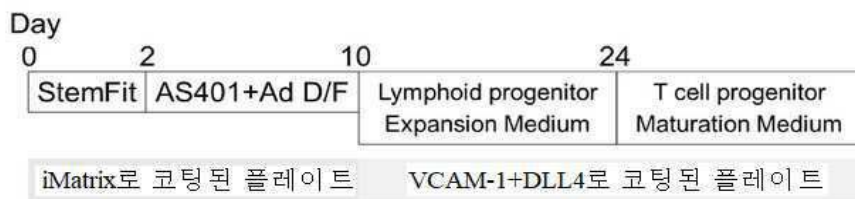
도면2



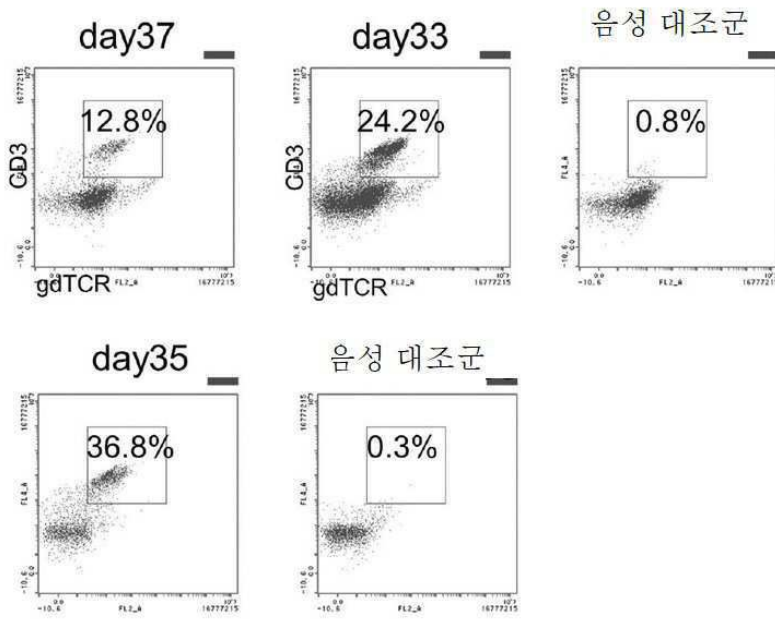
도면3



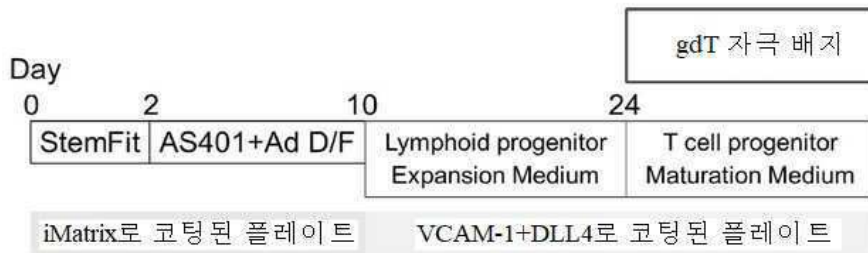
도면4



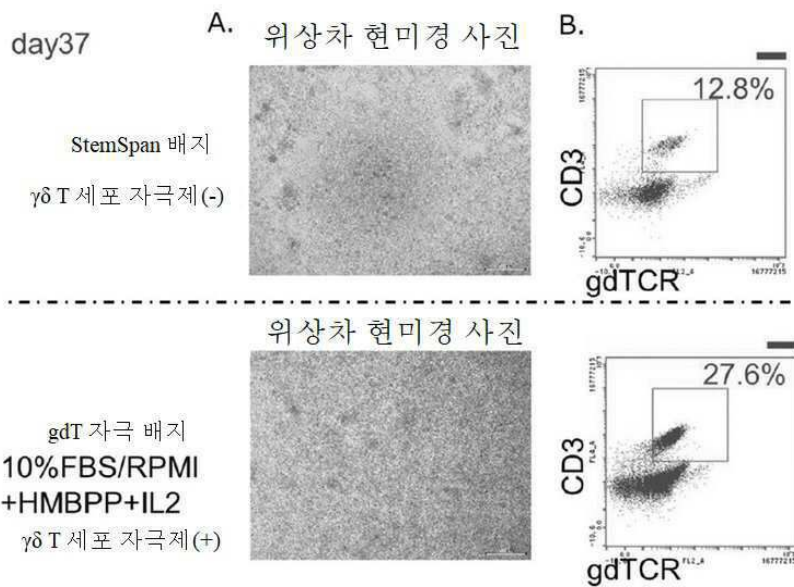
도면5



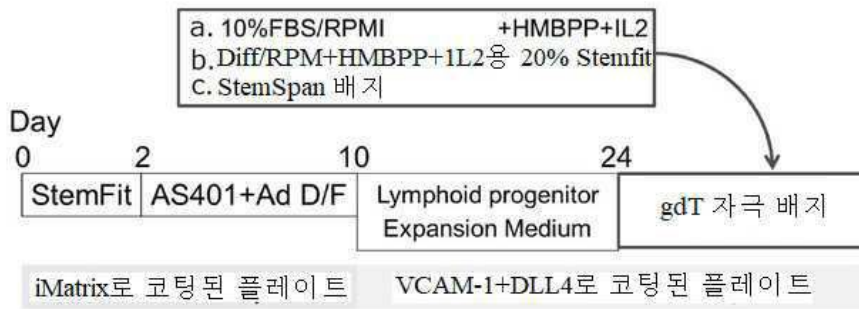
도면6



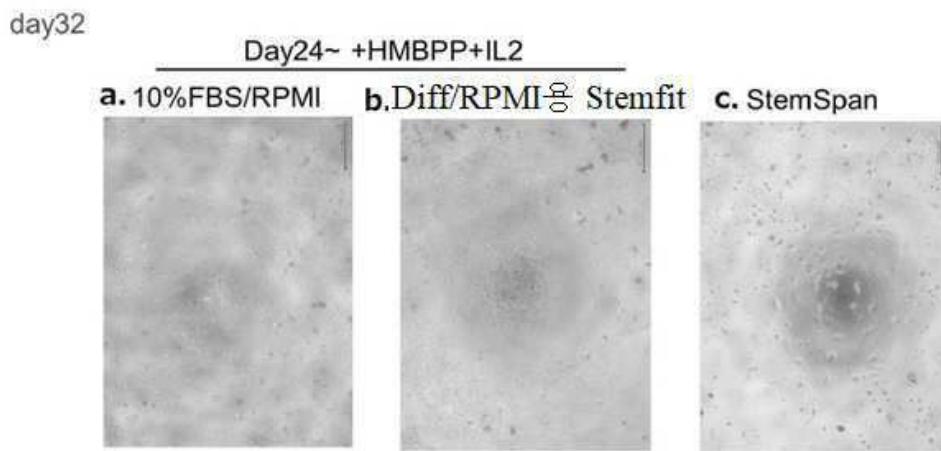
도면7



도면8

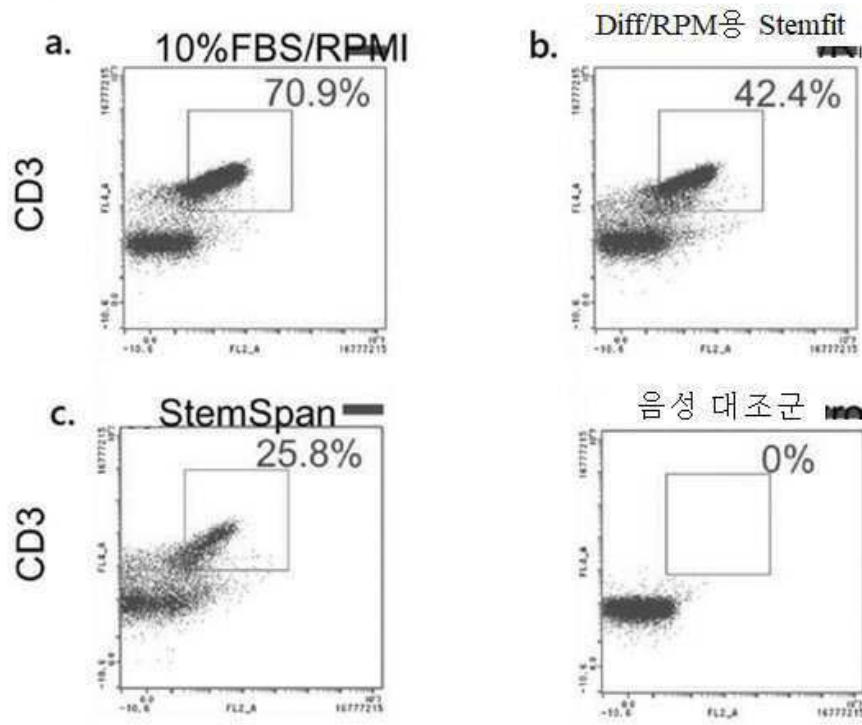


도면9

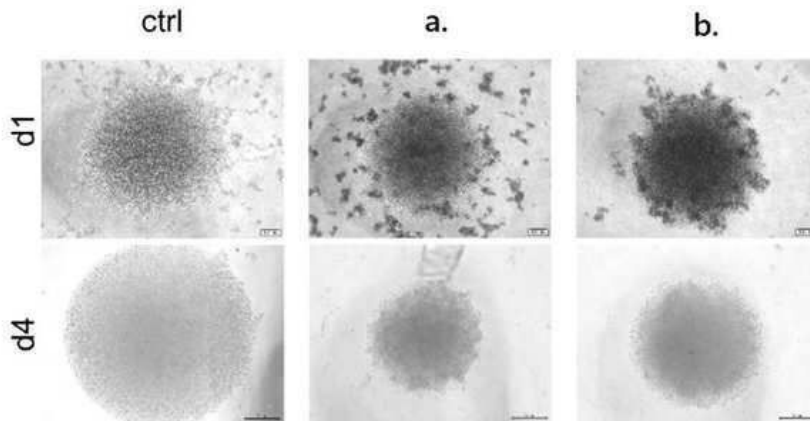


도면10

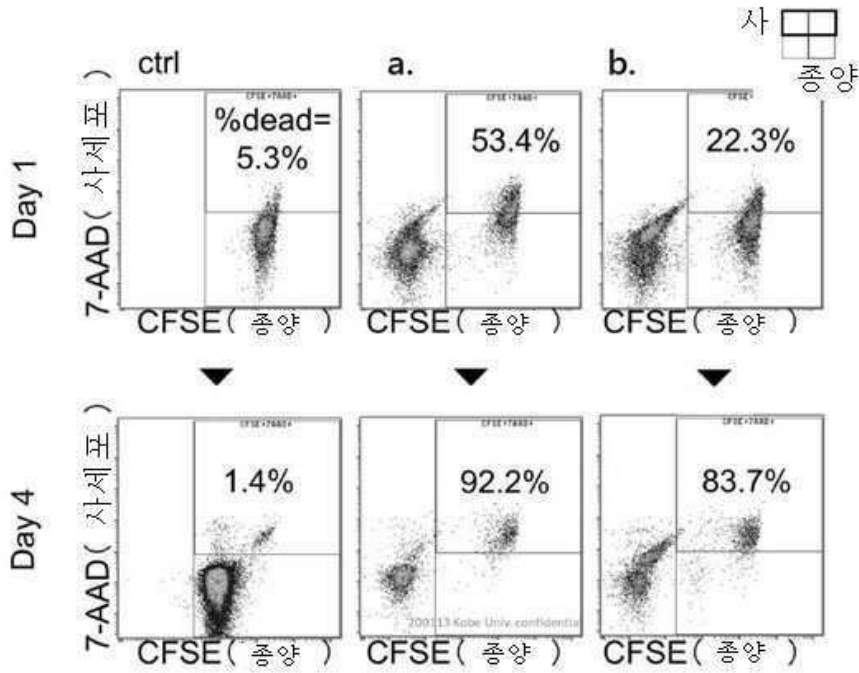
day32



도면11

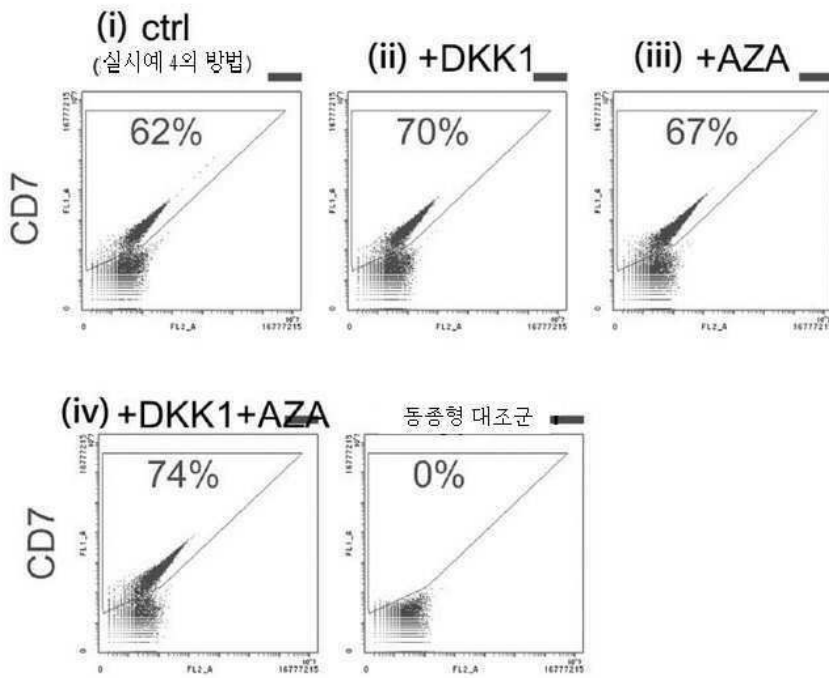


도면12

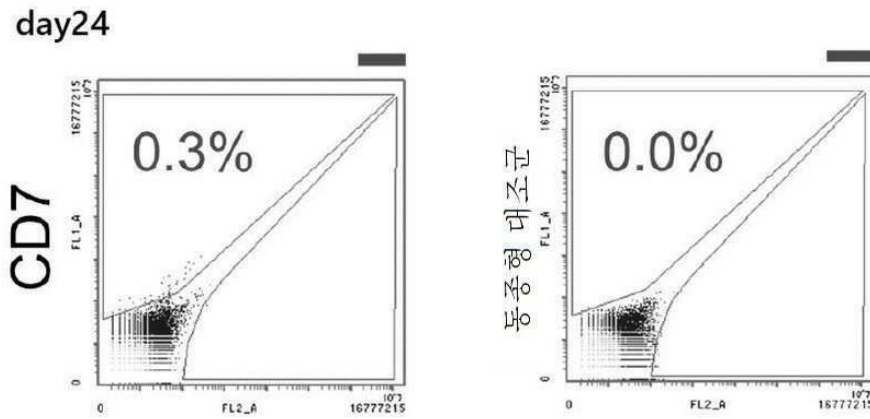


도면13

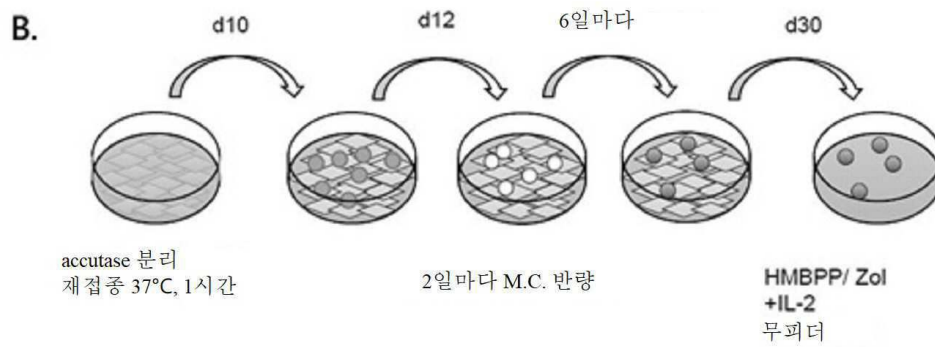
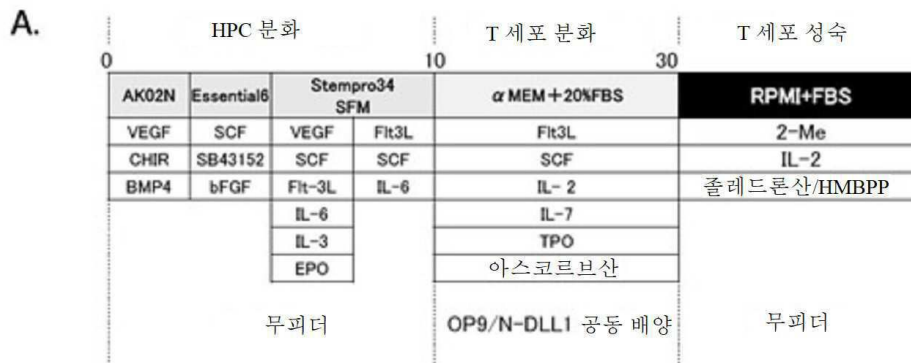
day24



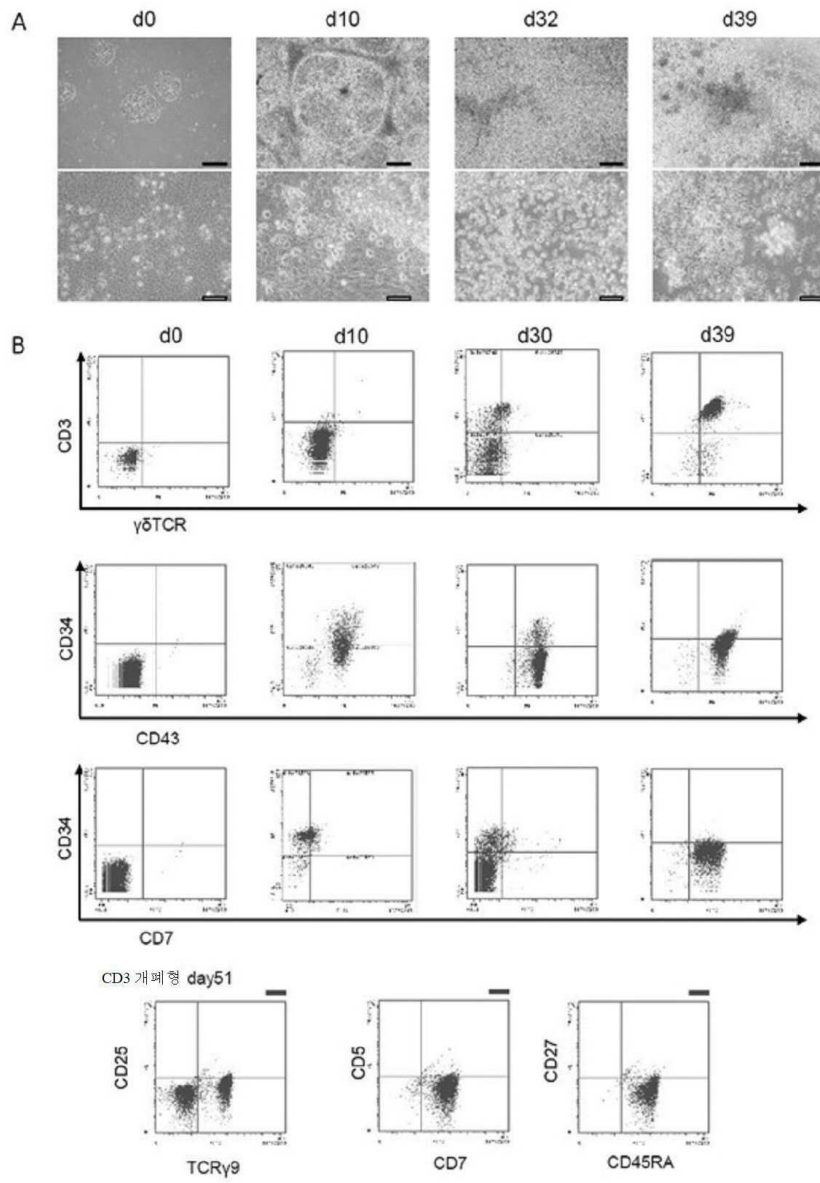
도면14



도면15

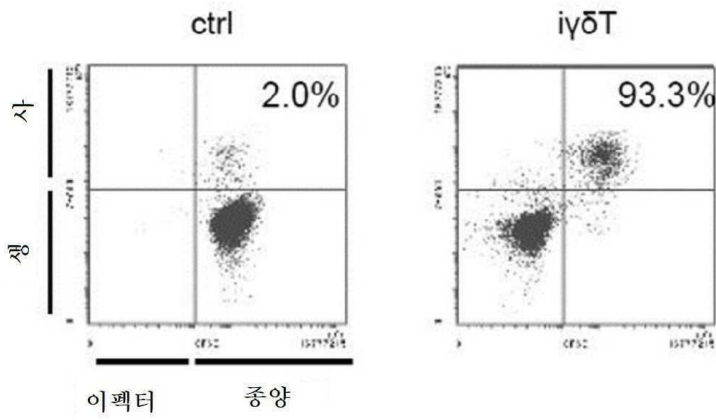


도면16

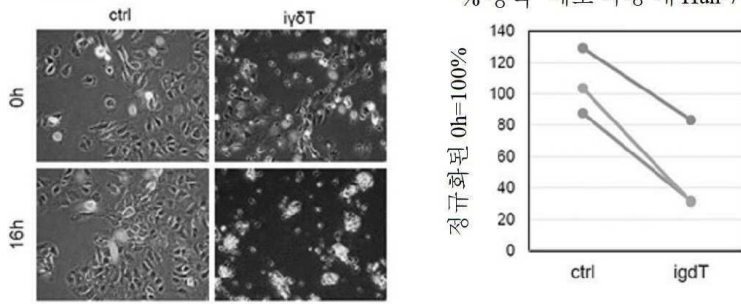


도면17

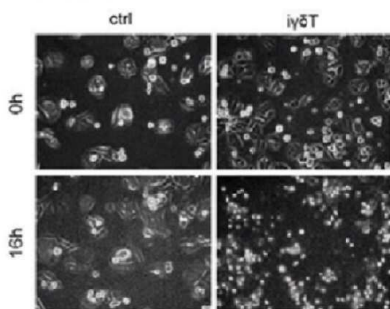
A Jurkat



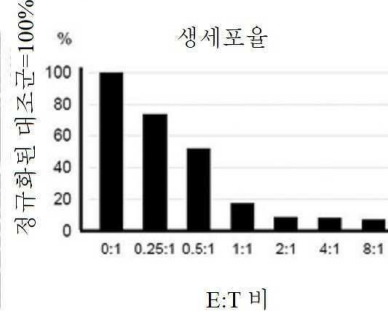
B Huh-7



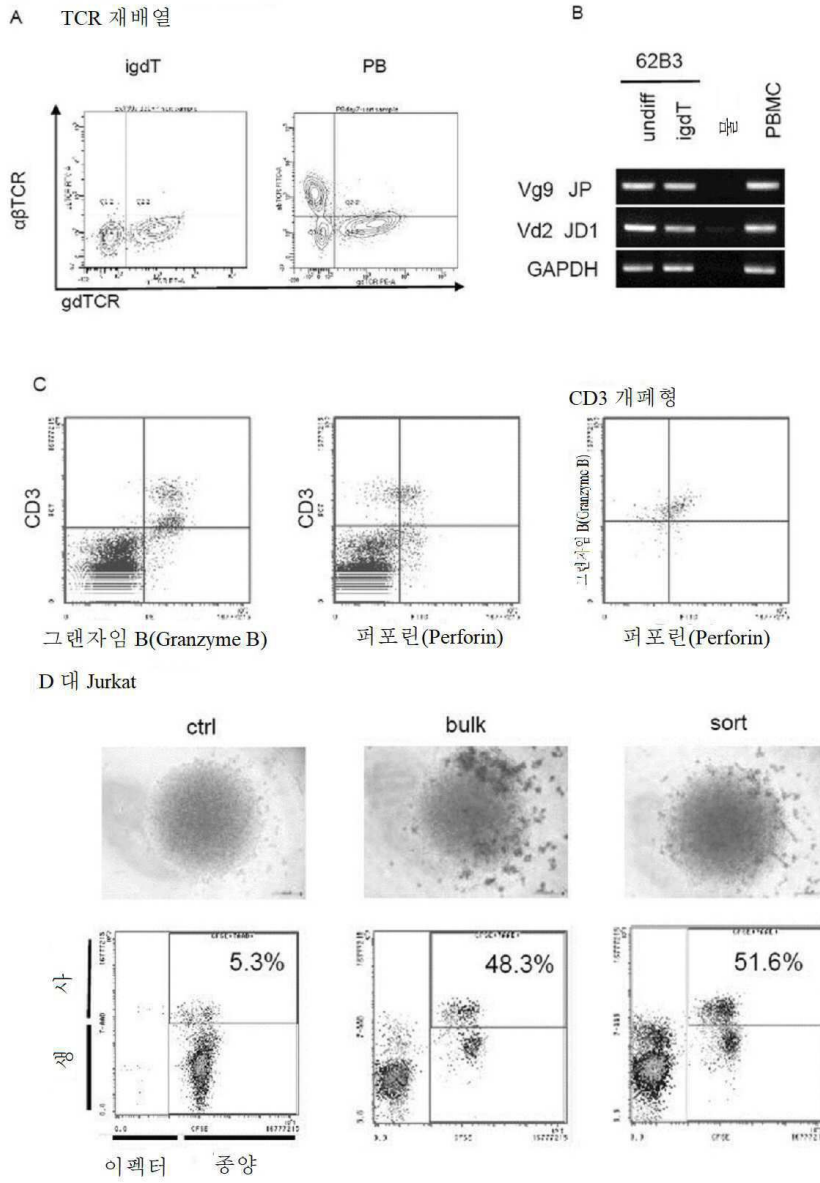
C SW480



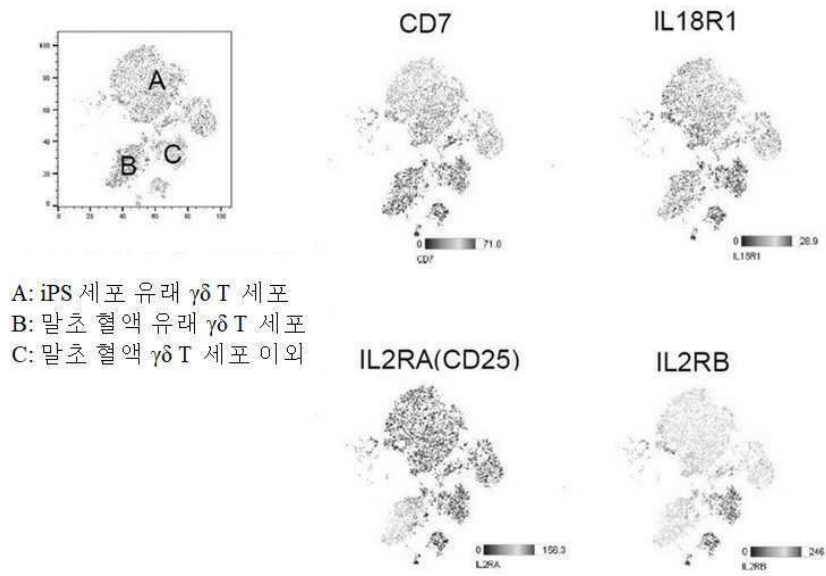
D E:T 비



도면18

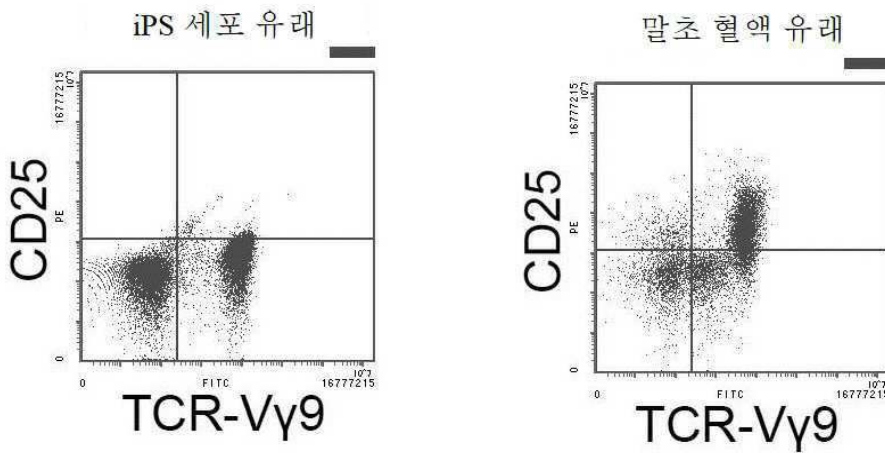


도면19



A: iPS 세포 유래 $\gamma\delta$ T 세포
 B: 말초 혈액 유래 $\gamma\delta$ T 세포
 C: 말초 혈액 유래 $\gamma\delta$ T 세포 이외

도면20

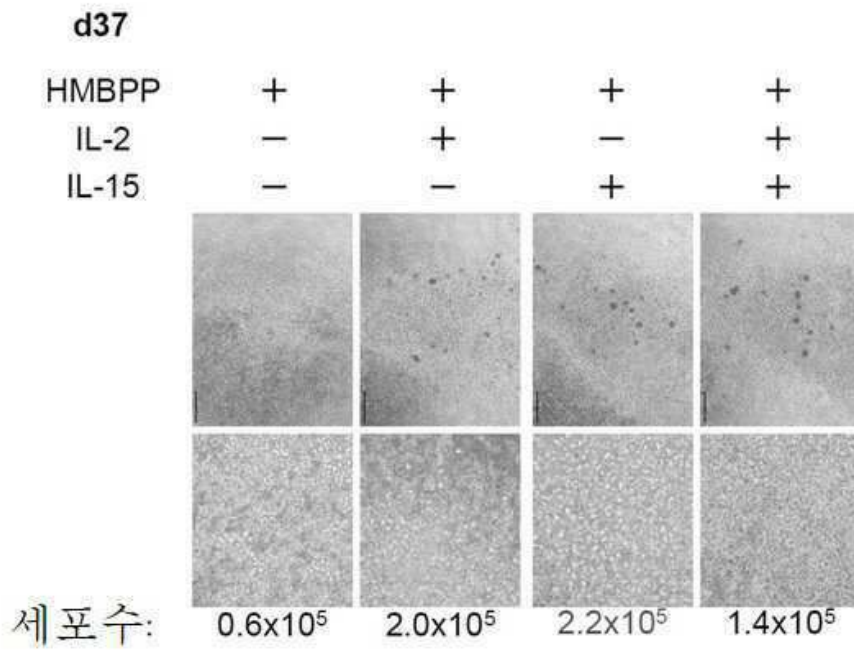


도면21

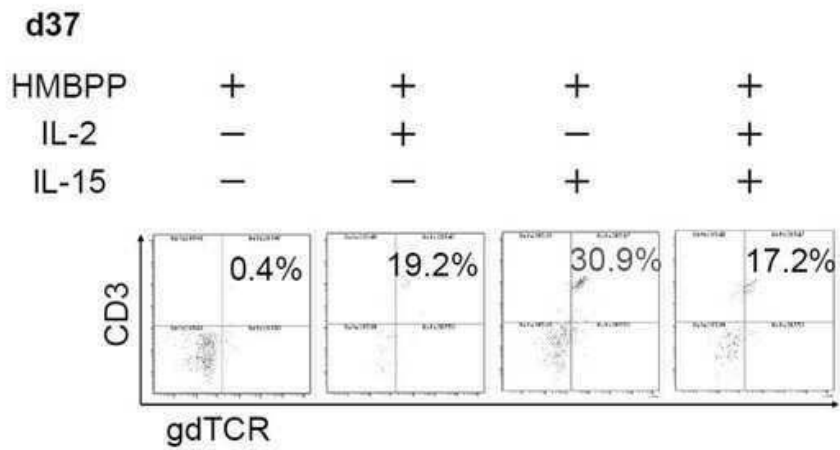


도면22

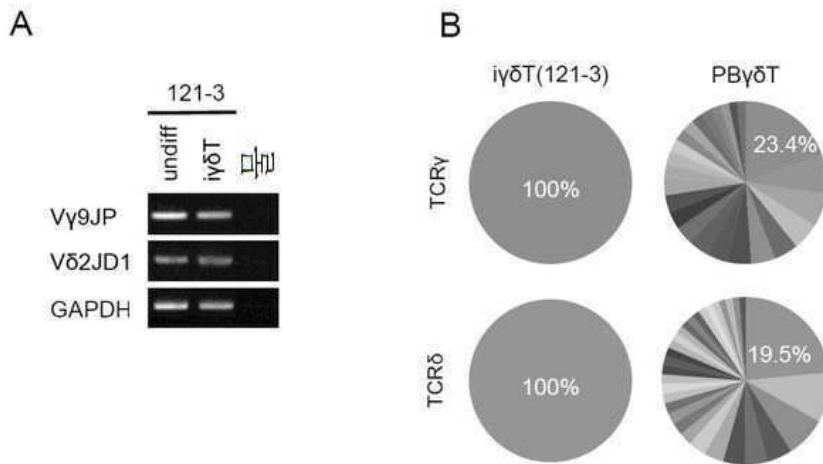
A.



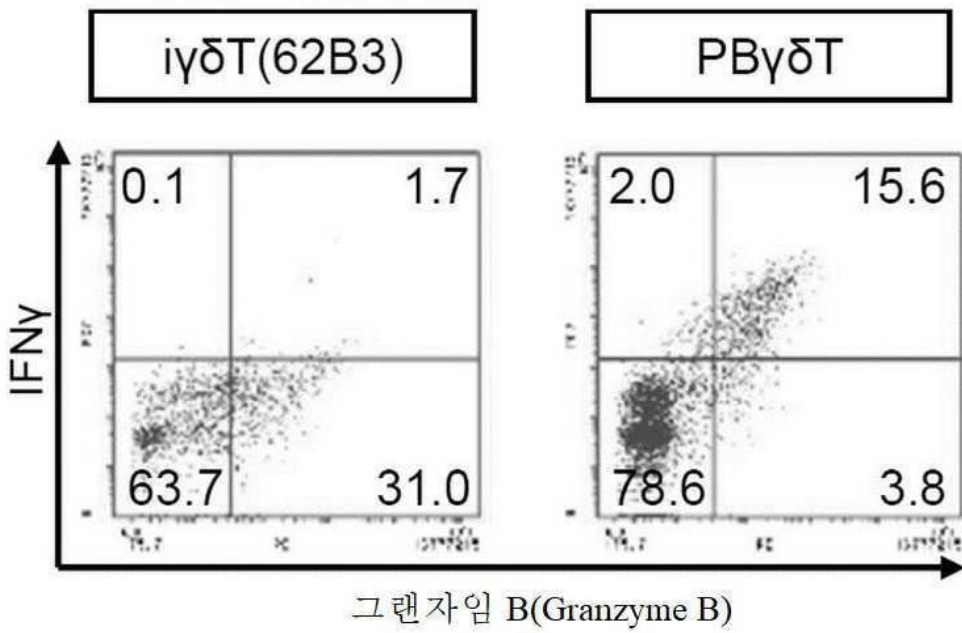
B.



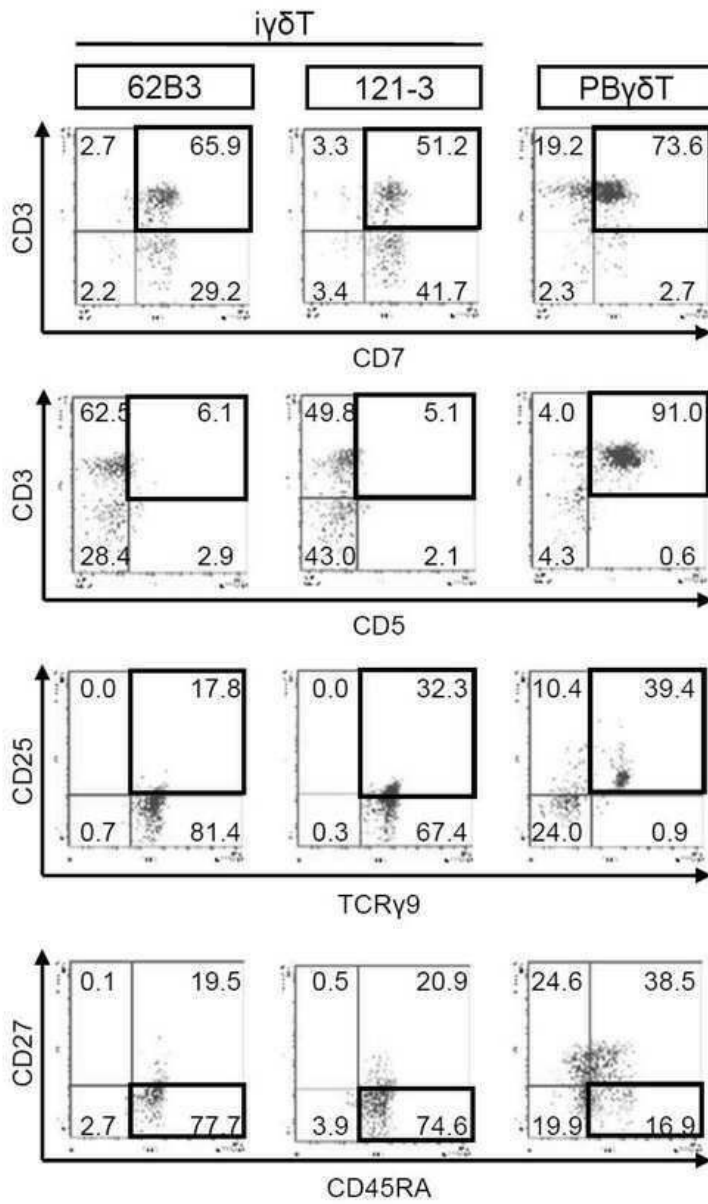
도면23



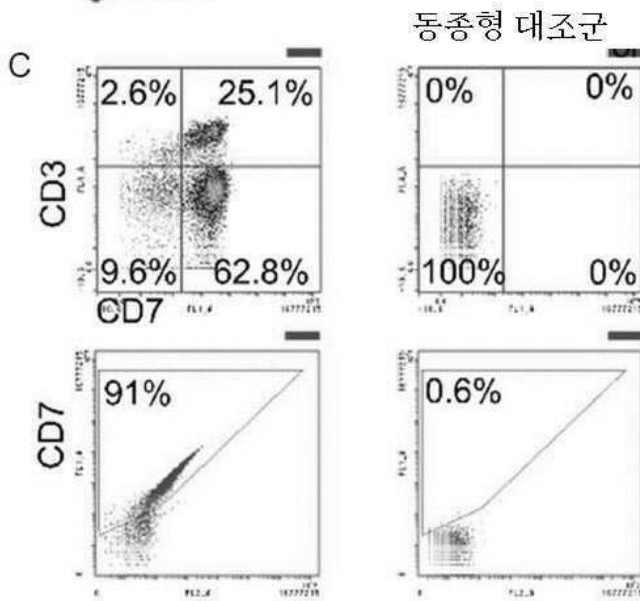
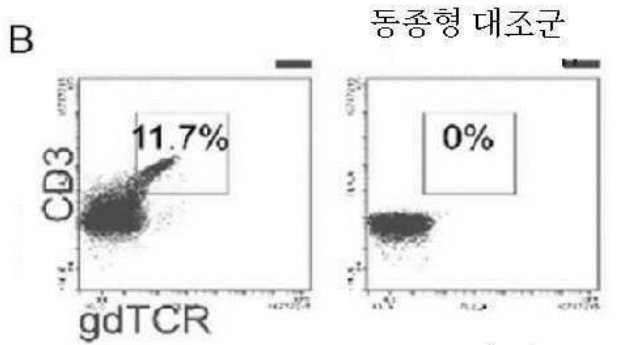
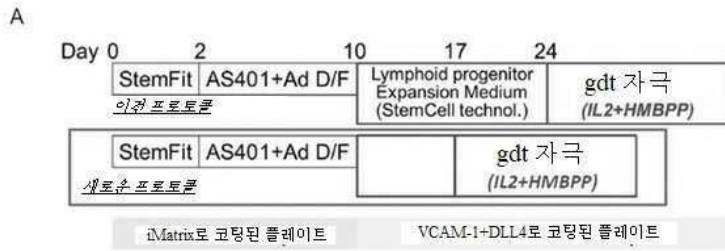
도면24



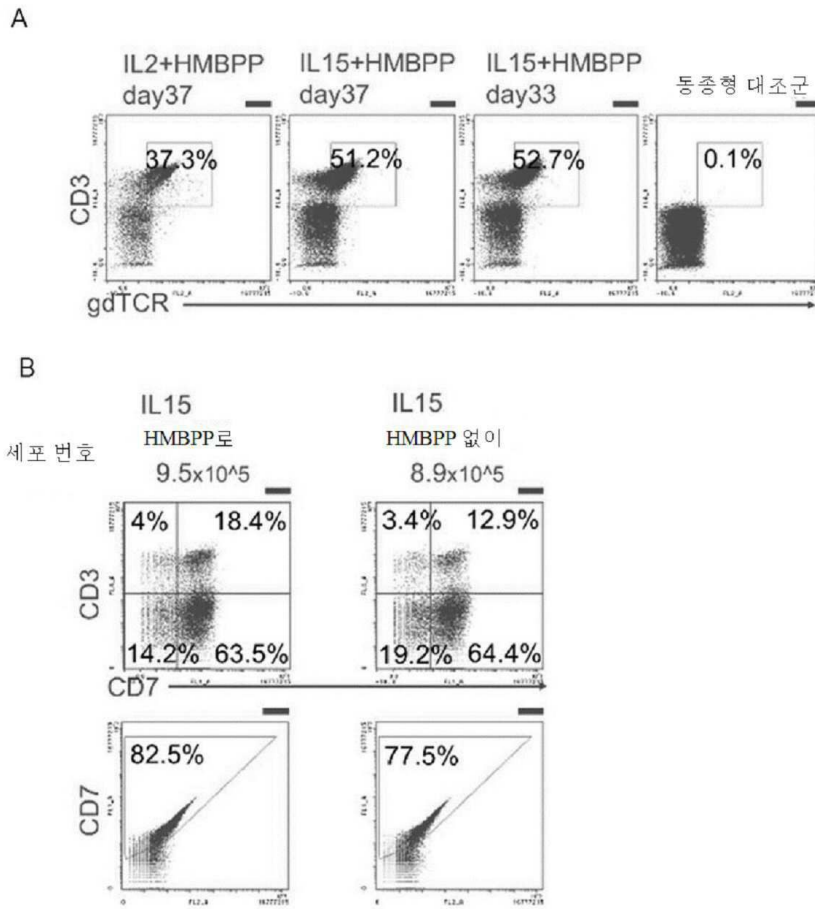
도면25



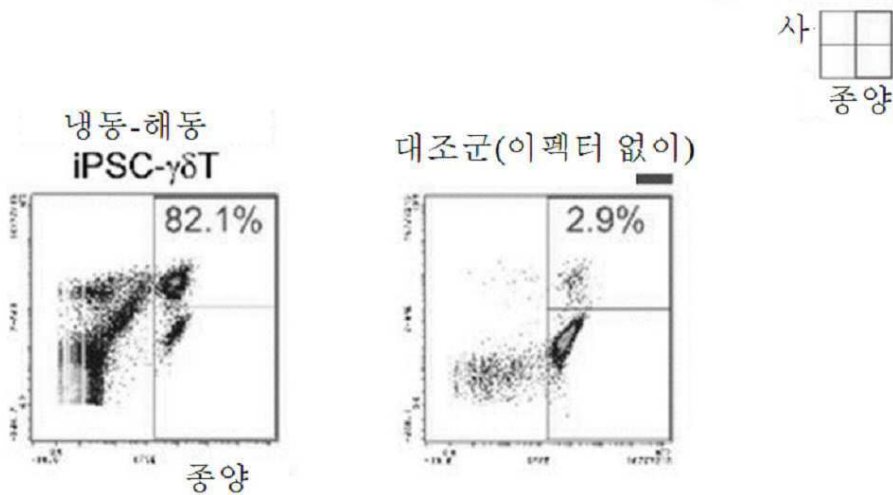
도면26



도면27



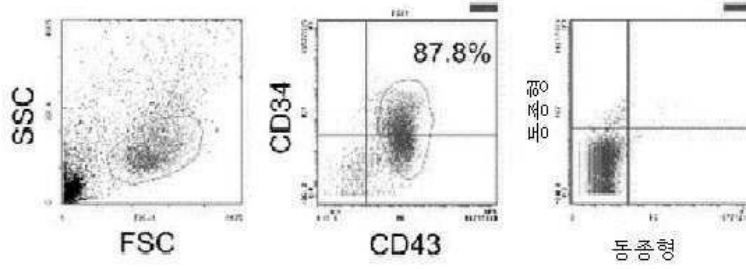
도면28



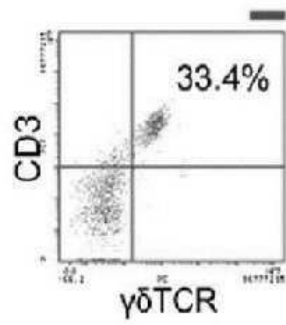
도면29

A

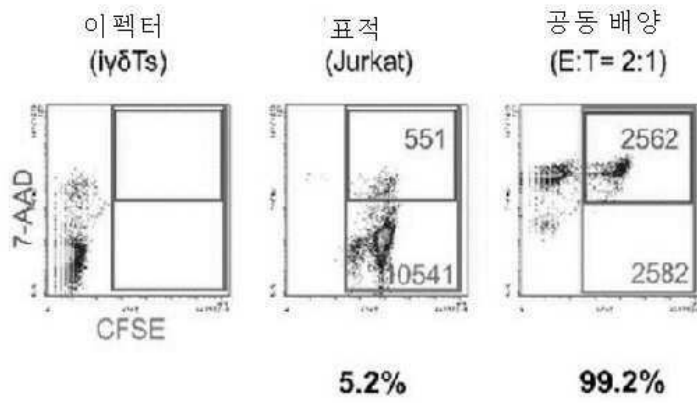
Ex135s day10



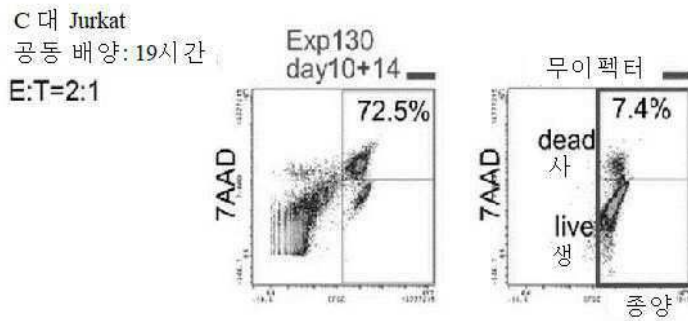
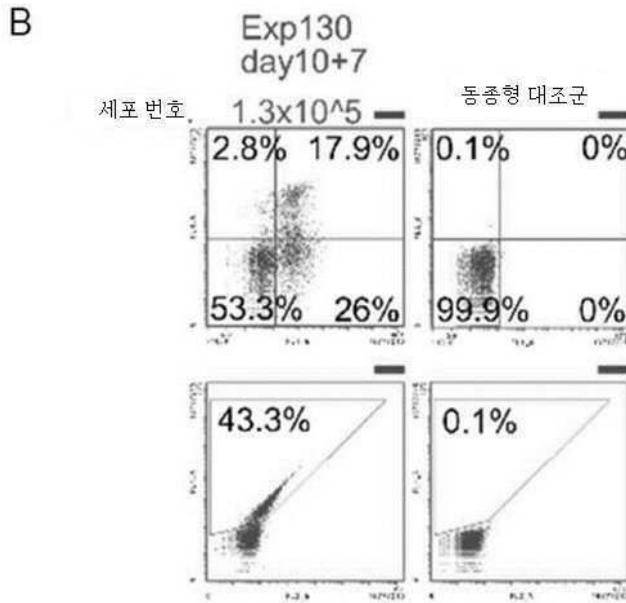
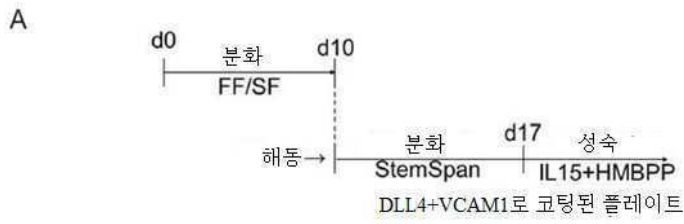
B



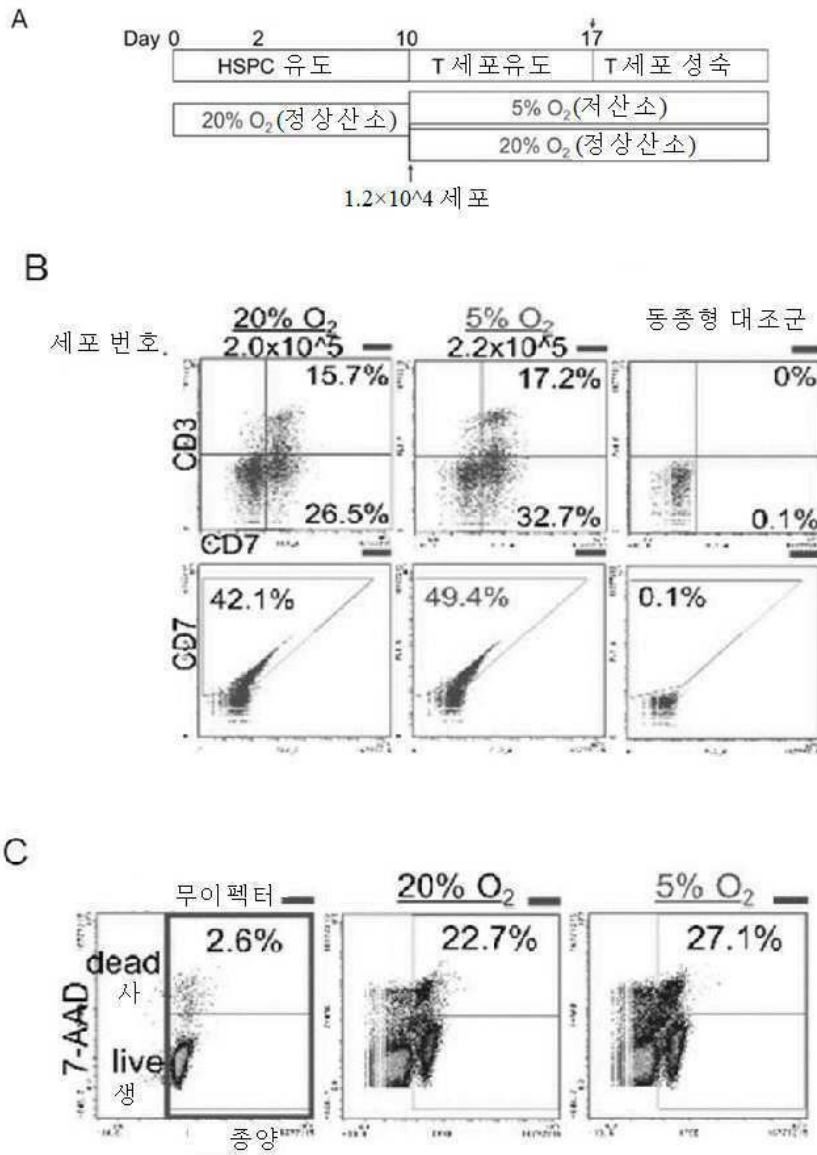
C



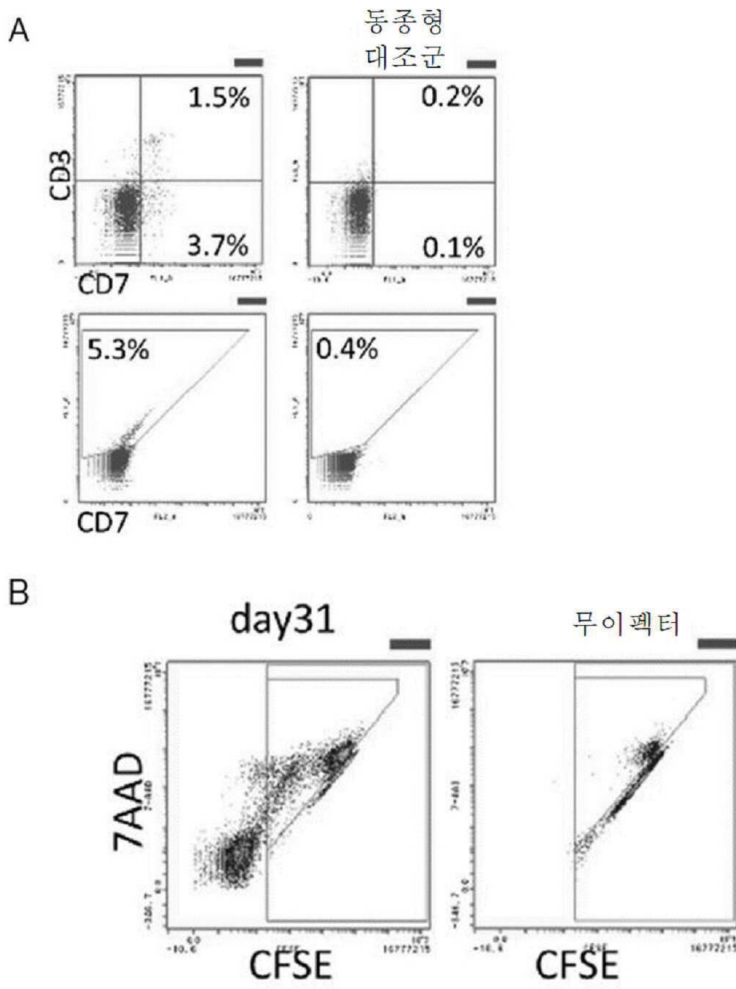
도면30



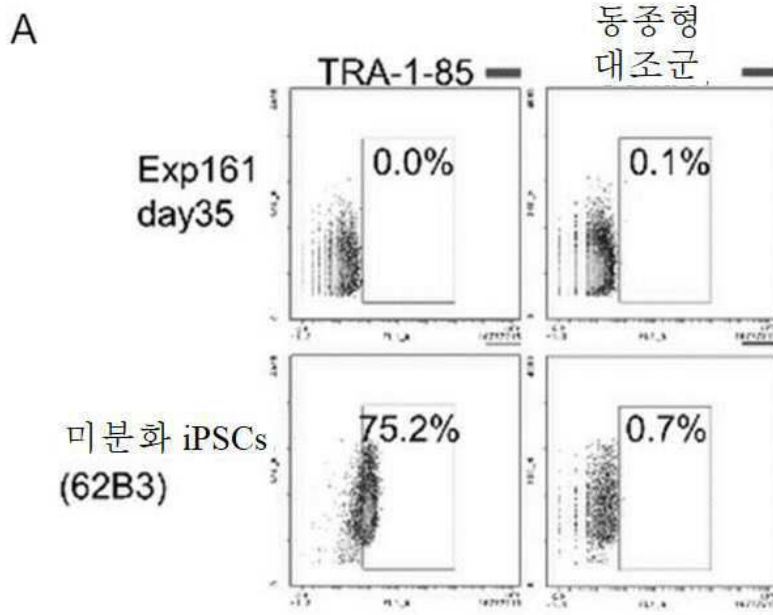
도면31



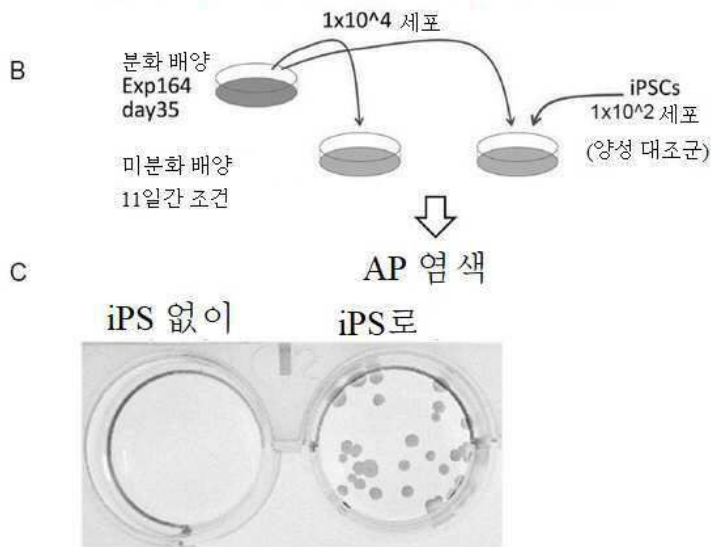
도면32



도면33



미분화 세포용 조건 하에서의 배양



도면34

