(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-525345
(P2023-525345A)
(43)公表日　令和5年6月15日(2023.6.15)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783	４Ｂ０６５

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全59頁）

(21)出願番号	特願2022-568961(P2022-568961)
(86)(22)出願日	令和3年5月12日(2021.5.12)
(85)翻訳文提出日	令和4年11月11日(2022.11.11)
(86)国際出願番号	PCT/GB2021/051144
(87)国際公開番号	WO2021/229226
(87)国際公開日	令和3年11月18日(2021.11.18)
(31)優先権主張番号	2006989.4
(32)優先日	令和2年5月12日(2020.5.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
	最終頁に続く

(71)出願人	519391608 ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド ＧＡＭＭＡＤＥＬＴＡ ＴＨＥＲＡＰＥＵＴＩＣＳ ＬＴＤ イギリス国、ダブリュ２ ６ビーディー ロンドン、キングダム ストリート １ １ Ｋｉｎｇｄｏｍ Ｓｔｒｅｅｔ， Ｗ２ ６ＢＤ Ｌｏｎｄｏｎ， Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ
(74)代理人	100136629 弁理士　鎌田 光宜
(74)代理人	100080791 弁理士　高島 一
(74)代理人	100125070
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ガンマデルタＴ細胞を単離する方法

(57)【要約】
本発明は、非造血組織常在性リンパ球、特にγδＴ細胞を単離する方法に関する。そのようなγδＴ細胞としては、非Ｖδ２細胞、例えばＶδ１、Ｖδ３、及びＶδ５細胞が挙げられ、そのような非造血組織としては皮膚及び腸が挙げられる。そのような単離された非造血組織常在性リンパ球は、養子Ｔ細胞療法、キメラ受容体療法などにおいて非常に有用であることが理解されるであろう。また、単離された組織常在性リンパ球を拡大する方法、特にγδＴ細胞を単離及び拡大する方法も提供される。本発明はまた、本明細書に記載の方法によって産生される個々の細胞と細胞の集団の両方に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
非造血組織試料からリンパ球を単離する方法であって、
（ｉ）インターロイキン－１β（ＩＬ－１β）の存在下で前記非造血組織試料を培養するステップと；
（ｉｉ）前記非造血組織試料から培養されたリンパ球の集団を収集するステップと、を含む前記方法。
【請求項２】
非造血組織試料からγδＴ球を単離する方法であって、
（ｉ）ＩＬ－１βの存在下で前記非造血組織試料を培養するステップと；
（ｉｉ）前記非造血組織試料から培養されたγδＴ細胞の集団を収集するステップと、を含む前記方法。
【請求項３】
ステップ（ｉ）が、インターロイキン－２（ＩＬ－２）及びインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で前記非造血組織試料を培養することをさらに含む、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項４】
ステップ（ｉ）が、インターロイキン－４（ＩＬ－４）及び／またはインターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）の存在下で前記非造血組織試料を培養することをさらに含む、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項５】
前記培養することがインターロイキン－２１（ＩＬ－２１）の非存在下で実施される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項６】
前記培養することが、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍｌの濃度のインターロイキン－２１（ＩＬ－２１）の存在下で実施される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記非造血組織試料が、血清または血漿を含む培地中で培養される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項８】
前記非造血組織が、２．５％のヒト血漿を含む培地中で培養される、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記非造血組織が、１０％のヒトＡＢ血清を含む培地中で培養される、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記リンパ球またはγδＴ細胞が、少なくとも７日間の培養の後に収集される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１１】
前記リンパ球またはγδＴ細胞が、少なくとも１４日間の培養の後に収集される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１２】
前記リンパ球またはγδＴ細胞が、少なくとも３５日間の培養の前に収集される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１３】
前記リンパ球またはγδＴ細胞が、１９日間の培養の後に収集される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１４】
前記リンパ球またはγδＴ細胞が、２１日間の培養の後に収集される、いずれかの先行

請求項に記載の方法。
【請求項１５】
前記非造血組織試料が、無傷の生検である、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１６】
前記非造血組織試料が、皮膚である、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１７】
前記皮膚試料が表皮及び真皮層を含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記非造血組織試料が腸管または胃腸管である、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項１９】
前記非造血組織試料がヒトから得られたものである、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項２０】
前記方法が、ガス透過性物質を含む容器内で実施される、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項２１】
前記単離されたリンパ球またはγδＴ細胞の集団がＶδ１Ｔ細胞の集団を含む、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項２２】
前記単離されたＶδ１Ｔ細胞の集団の８０％未満がＣＤ４５ＲＡを発現し、例えば前記単離されたＶδ１Ｔ細胞の集団の３０％未満がＣＤ４５ＲＡを発現する、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記単離されたＶδ１Ｔ細胞の集団の１０％未満がＮＫＧ２Ａを発現する、請求項２１または請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記単離されたリンパ球またはγδＴ細胞の集団を拡大することをさらに含む、いずれかの先行請求項に記載の方法。
【請求項２５】
非造血組織試料からリンパ球を単離する方法であって、
（ｉ）血清代替物、ヒト血漿、及び／またはヒトＡＢ血清を含む培地中で前記非造血組織試料を培養するステップと；
（ｉｉ）前記非造血組織試料から培養されたリンパ球の集団を収集するステップと、を含む前記方法。
【請求項２６】
血清代替物を含む培地中で前記非造血組織試料を培養することを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記単離されたリンパ球の集団がＴＣＲ陰性細胞の集団を含む、請求項２５または２６のいずれかに記載の方法。
【請求項２８】
ステップ（ｉ）が、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で前記非造血組織試料を培養することをさらに含む、請求項２５～２７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
ステップ（ｉ）が、ＩＬ－４及び／またはＩＬ－１βの存在下で前記非造血組織試料を培養することをさらに含む、請求項２５～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
前記培養することがＩＦＮ－γの非存在下で実施される、請求項２５～２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】

ステップ（ｉ）が、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１の存在下で前記非造血組織試料を培養することをさらに含む、請求項２５～３０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３２】

前記リンパ球が１９日間の培養の後に収集される、請求項２５～３１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３３】

前記リンパ球が２１日間の培養の後に収集される、請求項２５～３１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３４】

非造血組織試料からリンパ球を単離及び拡大する方法であって、

（ｉ）いずれかの先行請求項に記載の方法に従って、前記非造血組織試料からリンパ球の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記リンパ球の集団を少なくとも５日間さらに培養して、拡大されたリンパ球の集団を産生するステップと、を含む前記方法。

【請求項３５】

非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡大する方法であって、

（ｉ）いずれかの先行請求項に記載の方法に従って、前記非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記γδＴ細胞の集団を少なくとも５日間さらに培養して、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するステップと、を含む前記方法。

【請求項３６】

前記単離されたリンパ球またはγδＴ細胞の集団が凍結され、次いでステップ（ｉｉ）の前に解凍される、請求項３４または請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記拡大ステップが、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量の、

（ａ）ＩＬ－２またはＩＬ－９；

（ｂ）ＩＬ－１５；及び任意選択で、

（ｃ）ＩＬ－２１、の存在下で、

前記γδＴ細胞を少なくとも５日間培養すること、を含む、請求項３５または請求項３６に記載の方法。

【請求項３８】

ＩＬ－４の存在下で前記γδＴ細胞を培養することをさらに含む、請求項３７に記載の方法。

【請求項３９】

前記拡大ステップが実質的な間質細胞接触の非存在下で前記γδＴ細胞を培養することを含む、請求項３５～３８のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４０】

前記拡大ステップが外因性ＴＣＲ経路アゴニストの非存在を含む、請求項３５～３９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項４１】

非造血組織試料からγδＴ球を単離する方法であって、

（ｉ）前記非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと、

（ｉｉ）前記単離されたγδＴ細胞の集団を凍結するステップと、を含む前記方法。

【請求項４２】

γδＴ細胞が、任意選択でＩＬ－１β、ＩＬ－４、及び／またはＩＬ－２１と組み合わせて、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で前記非造血組織試料を培養することによって単離される、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】

γδＴ細胞が、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍｌの濃

度のＩＬ－２１の存在下で前記非造血組織試料を培養することによって単離される、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記γδＴ細胞が単離の１９日後に凍結される、請求項４１～４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記γδＴ細胞が単離の２１日後に凍結される、請求項４１～４３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４６】
前記単離されたγδＴ細胞の集団が凍結溶液中で凍結され、液体窒素中（気相）で保存される、請求項４１～４４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４７】
（ｉｉｉ）前記凍結されたγδＴ細胞の集団を解凍することと、（ｉｖ）前記解凍されたγδＴ細胞の集団を少なくとも５日間培養して、γδＴ細胞の拡大された集団を生成することと、をさらに含む、請求項４１～４５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４８】
請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法によって得ることのできる単離されたγδＴ細胞の集団。
【請求項４９】
請求項１～２４のいずれか１項に記載の方法によって得られる単離されたγδＴ細胞の集団。
【請求項５０】
請求項４１～４７のいずれか１項に記載の方法によって得ることのできる凍結された単離されたγδＴ細胞の集団。
【請求項５１】
請求項４１～４７のいずれか１項に記載の方法によって得られる凍結された単離されたγδＴ細胞の集団。
【請求項５２】
請求項３５～４０のいずれか１項に記載の方法によって得ることのできる、単離及び拡大されたγδＴ細胞の集団。
【請求項５２】
請求項３５～４０のいずれか１項に記載の方法によって得られる、単離及び拡大されたγδＴ細胞の集団。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、非造血組織常在性リンパ球、特にγδＴ細胞を単離する方法に関する。そのようなγδＴ細胞としては、非Ｖδ２細胞、例えばＶδ１、Ｖδ３、及びＶδ５細胞が挙げられ、そのような非造血組織としては皮膚及び腸が挙げられる。そのような単離された非造血組織常在性リンパ球は、養子Ｔ細胞療法、キメラ受容体療法などにおいて非常に有用であることが理解されるであろう。本発明はまた、本明細書に記載の方法によって産生される個々の細胞と細胞の集団の両方に関する。
【背景技術】
【０００２】
がんに対するＴ細胞免疫療法への関心の高まりは、ＣＤ８＋及びＣＤ４＋のαβＴ細胞のサブセットががん細胞を認識し、特にＰＤ－１、ＣＴＬＡ－４、及び他の受容体により発揮される抑制経路の臨床的媒介拮抗作用によって抑制が解除された場合、宿主保護機能性を媒介する明らかな能力に焦点を当てている。しかしながら、αβＴ細胞は、移植片対宿主病を引き起こし得るＭＨＣ拘束性である。
【０００３】
ガンマデルタＴ細胞（γδＴ細胞）は、表面に別個の規定的なγδＴ細胞受容体（ＴＣ

Ｒ）を発現するＴ細胞のサブセットを表す。このＴＣＲは、１つのガンマ（γ）鎖及び１つのデルタ（δ）鎖から構成されている。ヒトγδＴＣＲ鎖は、Ｖδ１、Ｖδ２、Ｖδ３の３つの主要なδ鎖と６つのγ鎖から選択される。ヒトγδＴ細胞はＴＣＲ鎖に基づいて大まかに分類できる。これは、特定のγ型及びδ型が、１つ以上の組織型において排他的ではないがより一般的に細胞で見いだされるためである。例えば、血液常在性γδＴ細胞の多くはＶδ２ＴＣＲ、例えばＶγ９Ｖδ２を発現するが、これは組織常在性γδＴ細胞ではあまり一般的ではなく、例えば皮膚ではＶδ１を、腸ではＶγ４をより頻繁に使用する。

【０００４】

リンパ球を単離する方法の大部分は、血液からこれらの細胞型を単離することに依存している。γδＴ細胞などの非造血組織常在性リンパ球は、非造血腫瘍及びその他の標的を標的とするなど、特定の用途に特に適した特性を有し得る。しかしながら、そのような組織常在性リンパ球を臨床的に適切な量で単離することは、特に多くの適応症で10^8細胞以上の範囲の臨床用量が必要とされるため、依然として課題のままである。重要なことに、生産中の重大な細胞損失は、さらに多くの開始細胞を生成する必要があることを意味する。

【０００５】

非造血組織常在性リンパ球、特にγδＴ細胞は、大量に容易に入手できないため、治療への応用について十分に特徴付けられたり研究されたりしていない。したがって、この分野では、非造血組織常在性リンパ球、特にγδＴ細胞を、さらなる拡大に十分な量まで単離し、治療法、例えば養子Ｔ細胞療法として潜在的に適応させる方法が必要とされている。

【０００６】

Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．（２００６）Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．１２６（５）：１０５９－７０は、正常及び疾患の皮膚から皮膚常在性Ｔ細胞を単離する方法を記載している。しかしながら、そこに記載されている方法は、動物性生成物の存在により、特に単離細胞の収率が比較的低く、すなわち組織１ｃｍ^{2}当たり１０^{6}細胞未満であるため、臨床使用には適していない。Ｃｌａｒｋらに記載されている方法は、組織試料の構造的完全性を故意の破壊をもたらす、細かく刻んだ試料を使用する。ＷＯ２０１７０７２３６７及びＷＯ２０１８／２０２８０８は、少なくともインターロイキン－２（ＩＬ－２）及び／またはインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非造血組織から得られたリンパ球を培養することにより、非造血組織常在性γδＴ細胞をインビトロで拡大する方法に関する。ＷＯ２０１５１８９３５６は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１から選択される少なくとも２種類のサイトカインを含むアフェレーシスによって得られた試料から得られたリンパ球を拡大するための組成物を記載する。したがって、臨床使用に適したより多量の細胞を産生する、皮膚などから組織常在性非造血リンパ球を単離する方法が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【０００７】

本発明の第１の態様によれば、非造血組織試料からリンパ球を単離する方法であって：

（ｉ）インターロイキン－１β（ＩＬ－１β）の存在下で非造血組織試料を培養するステップと；

（ｉｉ）非造血組織試料から培養されたリンパ球の集団を収集するステップと、を含む方法が提供される。

【０００８】

さらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離する方法であって：

（ｉ）ＩＬ－１βの存在下で非造血組織試料を培養するステップと；

（ｉｉ）非造血組織試料から培養されたγδＴ細胞の集団を収集するステップと、を含む方法が提供される。

【０００９】

さらなる態様によれば、非造血組織試料からリンパ球を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書に記載の方法に従って、非造血組織試料からリンパ球の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記リンパ球の集団を少なくとも５日間さらに培養して、拡大されたリンパ球の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【００１０】

さらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書に記載の方法に従って、非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記γδＴ細胞の集団を少なくとも５日間さらに培養して、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】すべての条件についての生細胞のγδＴ細胞のパーセンテージ（％）（Ａ）及びグリッドあたりの総γδＴ細胞（Ｂ）である。条件は、タンパク質源（ＡＢ＝ヒト１０％ＡＢ血清、血漿＝２．５％ヒト血漿；ＳＲ＝５％血清代替物）によってグループ化され、ＩＬ－１βの存在（＋）または非存在（－）で細分される。さまざまな条件の詳細については、表２を参照されたい。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す（ＳＴＤ　ＩＳＯ）。

【図２】すべての条件についての生細胞のＶδ１Ｔ細胞の％（Ａ）及びグリッドあたりの総Ｖδ１Ｔ細胞（Ｂ）を示すグラフである。条件は、ＩＬ－１βの存在または非存在でタンパク質源によってグループ化される。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図３】タンパク質源によってグループ化され、ＩＬ－４の存在または非存在で細分化されたグリッドあたりの生細胞の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図４】タンパク質源によってグループ化され、ＩＬ－４の存在または非存在で細分化された生細胞のγδＴ細胞のパーセンテージの結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図５】タンパク質源によってグループ化され、ＩＬ－４の存在または非存在で細分化されたグリッドあたりの総Ｖδ１Ｔ細胞の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図６】タンパク質源によってグループ化され、ＩＬ－４の存在または非存在で細分化されたＶδ１Ｔ細胞上のＮＫＧ２Ａ発現％（Ａ）及びＣＤ４５ＲＡ発現％（Ｂ）の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図７】タンパク質源によってグループ化されたＶδ１Ｔ細胞上のＴＩＧＩＴ発現％の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図８】タンパク質源によってグループ化されたグリッドあたりの総Ｖδ１Ｔ細胞の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図９】タンパク質源によってグループ化されたグリッドあたりの総生細胞の結果を示すグラフである。バーは実験中央値の代表である。点線は、実験的対照の中央値を表す。

【図１０】タンパク質源によってグループ化され、ＩＦＮ－γの存在または非存在で細分化された生細胞の総ＴＣＲ陰性細胞の結果を示すグラフである。点線は、以前の単離方法を使用した中央値を表す。

【図１１】標準的な２サイトカイン単離法と比較した、上位の条件のグリッドあたりの総γδＴ細胞の結果である。

【図１２】新たに得られた単離細胞または拡大前に凍結された単離細胞のいずれかを用いる倍率拡大（Ａ）及びγδＴ細胞拡大％（Ｂ）への影響を示すグラフである。
【図１３】Ａ）ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１βの存在下で、ＩＬ－２１を１８．８ｎｇ／ｍｌで添加した場合と添加しない場合の２１日間の単離培養終了時の総細胞生存率の比較である。点線は、最小許容生存率を表す。Ｂ）解凍後にＩＬ－１β及びＩＬ－２１の存在下で単離されたγδＴ細胞の培養１４日後の拡大を示すグラフである（生細胞のγδＴ細胞％として表示）。
【図１４】「ＩＬ－２１」（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１β、及びＩＬ－２１）（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１β）、または「ＩＬ－２１なし」（ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１β）は、１９日または２１日後に採取される。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
本発明の第１の態様によれば、非造血組織試料からリンパ球を単離する方法であって：
（ｉ）インターロイキン－１β（ＩＬ－１β）の存在下で非造血組織試料を培養するステップと；
（ｉｉ）非造血組織試料から培養されたリンパ球の集団を収集するステップと、を含む方法が提供される。
【００１３】
本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離する方法であって：
（ｉ）ＩＬ－１βの存在下で非造血組織試料を培養するステップと；
（ｉｉ）非造血組織試料から培養されたγδＴ細胞の集団を収集するステップと、を含む方法が提供される。
【００１４】
本明細書に提示された知見は、非造血組織試料から組織常在性γδＴ細胞を単離するための最適なプロトコールを確立するために実施された実験の詳細な設計を示している。驚くべきことに、最高のγδＴ細胞収量を伴うすべての条件にＩＬ－１βが含まれていることが判明した。これは、このサイトカインが、単離プロセス中に高レベルのγδＴ細胞を産生するのに有益であったことを示している。
【００１５】
本明細書で使用される場合、「ＩＬ－１β」は、１つ以上のＩＬ－１受容体（ＩＬ－１Ｒ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＬ－１β、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。ＩＬ－１は、炎症性疾患を含む幅広い疾患で主要な役割を果たす炎症誘発性サイトカインである。これは、限られた配列同一性のみを共有するが、ＩＬ－１受容体（タイプＩ及びタイプＩＩ）への結合を通じて同様の生物学的活性を発揮する、２つの分子種、ＩＬ－１α及びＩＬ－１βからなる。成熟ヒトＩＬ－１βは、Ａｎｄｒｅｉ ｅｔ ａｌ．（２００４）ＰＮＡＳ １０１（２６）：９７４５－９７５０に記載されるように、ＣＡＳＰ１によって前駆体ポリペプチドのＮ末端から１１６アミノ酸が切断された後、１５３アミノ酸配列として発生する。ＩＬ－１βムテインは、ＩＬ－１Ｒに結合する能力を保持しながら、ＩＬ－１βタンパク質に特異的な置換が行われたポリペプチドである。ＩＬ－１βムテインは、天然のＩＬ－１βポリペプチド鎖中または他の残基の１つ以上の部位でのアミノ酸の挿入、欠失、置換及び修飾によって特徴付けることができる。本開示によれば、そのような挿入、欠失、置換、及び修飾のいずれも、ＩＬ－１Ｒ結合活性を保持するＩＬ－１βムテインをもたらす。例示的なムテインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むことができる。
【００１６】
ヒトＩＬ－１βをコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの従来の手

順によって得ることができる。ヒトＩＬ－１β（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　３５５３）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＰ＿０００５６７でＧｅｎｂａｎｋに、またはアクセッション番号Ｐ０１５８４でＵｎｉＰｒｏｔに見られる。マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）のＩＬ－１βアミノ酸配列（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　１６１７６）は、アクセッションロケーターＮＰ＿０３２３８７でＧｅｎｂａｎｋに、またはアクセッション番号Ｐ１０７４９でＵｎｉＰｒｏｔに見られる。

【００１７】

ＩＬ－１βはまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＬ－１βを指すことができる。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＬ－１βバリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＬ－１βタンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＬ－１β結合特性が保持されている。

【００１８】

単離方法

本明細書における細胞、特にリンパ球及び／またはγδＴ細胞の「単離」または「単離すること」への言及は、組織または細胞のプールから細胞を取り出す、分離する、精製する、濃縮する、または別の方法で取り出す方法またはプロセスを指す。このような言及には、「分離された」、「取り出された」、「精製された」、「濃縮された」などの用語が含まれることを理解されたい。γδＴ細胞の単離としては、無傷の非造血組織試料からの、または非造血組織の間質細胞（例えば、線維芽細胞または上皮細胞）からの細胞の単離または分離が挙げられる。そのような単離は、代替的にまたは追加的に、他の造血細胞（例えば、αβＴ細胞または他のリンパ球）からのγδＴ細胞の単離または分離を含み得る。単離は、例えば、組織外植片または生検が単離培養物に置かれた時点から開始し、遠心分離もしくは単離された細胞の集団を拡大培養に使用するか、他の目的に使用するために移すための他の手段などによって細胞が培養物から収集されるか、または元の組織外植片または生検を培養物から除去する時点で終了する、定義された期間であり得る。単離ステップは、少なくとも約３日間～約４５日間であり得る。一実施形態では、単離ステップは、少なくとも約１０日間～少なくとも２８日間である。さらなる実施形態では、単離ステップは、少なくとも１４日間～少なくとも２１日間である。したがって、単離ステップは、少なくとも３日間、４日間、５日間、６日間、７日間、８日間、９日間、１０日間、１１日間、１２日間、１３日間、１４日間、１５日間、１６日間、１７日間、１８日間、１９日間、２０日間、２１日間、２２日間、２３日間、２４日間、２５日間、２６日間、２７日間、２８日間、２９日間、３０日間、３１日間、３２日間、約３５日間、約４０日間、または約４５日間であり得る。一実施形態では、単離ステップは１９日間である。さらなる実施形態では、単離ステップは２１日間である。単離された細胞の増殖は、この単離ステップ中に実在しない可能性があるが、必ずしも存在しないというわけではないことを理解することができる。実際、当業者には、単離された細胞が分裂を開始して、組織及び／または足場を含む単離容器内で複数のそのような細胞を生成することもあることが認識されている。

【００１９】

したがって、本明細書における「単離されたγδＴ細胞」、「単離されたγδＴ細胞の集団」、「単離されたγδＴ細胞の集団」、「分離されたγδＴ細胞」、「分離されたγδＴ細胞の集団」または「分離されたγδＴ細胞の集団」への言及は、細胞が、非造血細胞または無傷の非造血組織内に含まれる細胞と実質的に接触しないように、元の非造血組

織試料から単離されたか、分離されたいか、取り出されたか、精製されたか、または濃縮されたγδ細胞を含む造血細胞または造血細胞の集団を指すと理解されるであろう。同様に、本明細書における「単離または分離されたＶδ１Ｔ細胞の集団」への言及は、細胞が、非造血細胞または無傷の非造血組織内に含まれる細胞と実質的に接触しないように、元の非造血組織試料から単離されたか、分離されたいか、取り出されたか、精製されたか、または濃縮されたＶδ１細胞を含む造血細胞または造血細胞の集団を指すと理解されるであろう。したがって、単離または分離は、非造血細胞（例えば、間質細胞、線維芽細胞、及び／または上皮細胞）からの造血細胞（例えば、γδＴ細胞または他のリンパ球）の単離、分離、取り出し、精製、または濃縮を指す。

【００２０】

本明細書で定義されるγδＴ細胞の単離方法は、組織の破壊（例えば、ミンチ）とそれに続く他の細胞型からのγδＴ細胞の分離を含み得る。好ましくは、本明細書で定義されるγδＴ細胞の単離方法は、無傷の非造血組織試料または外植片もしくは生検の組織マトリックスからのγδＴ細胞及び他の細胞型の「クロールアウト」を含んでもよく、組織常在性リンパ球は組織マトリックスの破壊を必要とせずに、組織マトリックスから物理的に分離される。組織基質の完全性を維持することにより、組織常在性リンパ球は組織基質から優先的に放出し、線維芽細胞などの阻害細胞型はほとんど、またはまったく放出せず、外植片または生検に保持され、その後単離の最後に容易に除去できることがわかっている。したがって、いくつかの実施形態では、無傷の非造血組織試料または組織マトリックスの使用により、組織から培養物中に放出される線維芽細胞の数が少なくなる。無傷の非造血組織または組織マトリックスを利用するそのような「クロールアウト」法は、非造血組織試料または組織マトリックスの過剰な処理の必要性を減らし、非造血組織または組織マトリックスの構造的完全性を維持するという利点を有し、より高い単離細胞収量を提供するという予想外の利点を提供できる。

【００２１】

したがって、本明細書で定義される非造血組織由来リンパ球の単離方法は、非造血組織の無傷生検または外植片から非造血組織由来リンパ球を単離する方法を含む。そのような無傷の生検または外植片は、組織試料から生検または外植片を除去する切除の周囲内で、生検または外植片の構造的完全性が故意に破壊されていないものである。このような無傷の生検または外植片は、取り扱いによって引き起こされる小さな混乱を除いて、三次元構造がほぼ維持される。したがって、この無傷の生検または外植片は、例えば、ミンチまたはチョッピングなどによって機械的に破壊されたり、化学的に酵素的に破壊されたりしていない。しかしながら、破壊された組織は、本発明の単離方法において使用することもできる。一実施形態では、単離されたリンパ球はαβＴ細胞である。別の実施形態では、単離されたリンパ球はγδＴ細胞である。さらなる実施形態では、単離されたリンパ球はＴＣＲ陰性細胞（すなわち、αβＴＣＲ及びγδＴＣＲ発現について陰性である細胞）である。ＴＣＲ陰性細胞は、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の存在の良好な指標である。したがって、別の実施形態では、単離されたリンパ球はＮＫ細胞である。同じ単離ステップから、１つを超える型のリンパ球が単離され得ることが理解され得る。

【００２２】

「クロールアウト」または例えば本明細書で定義される方法を利用するγδＴ細胞の単離方法は、細胞の培養、及び／またはサイトカイン存在下での非造血組織試料、及び／またはγδＴ細胞及び／または本明細書で定義される他のリンパ球の単離または分離を誘導するのに十分なケモカインを含む。

【００２３】

一実施形態では、ステップ（ｉ）は、インターロイキン－２（ＩＬ－２）の存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｉ）は、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）の存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。なおもさらなる実施形態では、ステップ（ｉ）は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。

【００２４】
明細書で使用される場合、「ＩＬ－２」は、１つ以上のＩＬ－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＬ－２、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。このような薬剤は、ＩＬ－２依存性細胞株であるＣＴＬＬ－２（３３；Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ（登録商標））ＴＩＢ ２１４）の増殖をサポートすることができる。成熟ヒトＩＬ－２は、Ｆｕｊｉｔａ，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １９８６．４６．３：４０１－４０７に記載されているように、１３３アミノ酸配列（追加の２０のＮ末端アミノ酸からなるシグナルペプチドを除く）として発生する。ＩＬ－２ムテインは、ＩＬ－２Ｒβに結合する能力を保持しながら、インターロイキン－２タンパク質に特異的な置換が行われたポリペプチドであり、例えば、ＵＳ２０１４／００４６０２６に記載されるものである。ＩＬ－２ムテインは、天然のＩＬ－２ポリペプチド鎖中または他の残基の１つ以上の部位でのアミノ酸の挿入、欠失、置換及び修飾によって特徴付けることができる。本開示によれば、そのような挿入、欠失、置換、及び修飾のいずれも、ＩＬ－２Ｒβ結合活性を保持するＩＬ－２ムテインをもたらす。例示的なムテインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むことができる。

【００２５】
ヒトＩＬ－２をコードする核酸は、ＰＣＲなどの従来の手順によって得ることができる。ヒトＩＬ－２（Ｇｅｎｅ ＩＤ ３５５８）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＰ＿０００５７７．２ ＧＩ：２８１７８８６１でＧｅｎｂａｎｋに見られる。マウス（Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ）のＩＬ－２アミノ酸配列（Ｇｅｎｅ ＩＤ １６１８３）は、アクセッションロケーターＮＰ＿０３２３９２．１ ＧＩ：７１１０６５３でＧｅｎｂａｎｋに見られる。

【００２６】
ＩＬ－２はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＬ－２を指すことができる。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＬ－２バリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＬ－２タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＬ－２結合特性が保持されている。ｍＲＮＡの選択的スプライシングにより、切り詰められたが生物学的に活性なＩＬ－２タンパク質をもたらし得る。タンパク質分解に起因するバリエーションには、例えば、ＩＬ－２タンパク質からの１つ以上の末端アミノ酸（一般的に１～１０アミノ酸）のタンパク質分解による除去に起因する、さまざまな種類の宿主細胞での発現時のＮ末端またはＣ末端の違いを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変更することができる（Ｙａｎｇ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ １９９５．７６：６８７－６９４）。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部を追加のアミノ酸で改変することができる（Ｃｌａｒｋ－Ｌｅｗｉｓ，ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ １９９３．９０：３５７４－３５７７）。

【００２７】
本明細書で使用される場合、「ＩＬ－１５」は、１つ以上のＩＬ－１５受容体（ＩＬ－１５Ｒ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＬ－１５、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニ

ット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。ＩＬ－１５は、ＩＬ－２と同様に、ＩＬ－２依存性細胞株であるＣＴＬＬ－２の増殖をサポートできる既知のＴ細胞増殖因子である。ＩＬ－１５は、１１４アミノ酸の成熟タンパク質として、Ｇｒａｂｓｔｅｉｎら（Ｇｒａｂｓｔｅｉｎ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ１９９４．２６４．５１６１：９６５－９６９）によって初めて報告された。本明細書で使用される場合、「ＩＬ－１５」という用語は、天然または組換えのＩＬ－１５及びムテイン、その類似体、サブユニット、またはその複合体（例えば受容体複合体、例えばＷＯ２００７／０４６００６に記載のｓｕｓｈｉペプチド）を意味し、それぞれがＣＴＬＬ－２細胞の増殖を刺激することができる。ＣＴＬＬ－２増殖アッセイでは、組換え発現されたＩＬ－１５の前駆体及び成熟型のインフレーム融合体でトランスフェクトされた細胞の上清が、ＣＴＬＬ－２細胞増殖を誘導することができる。

【００２８】

ヒトＩＬ－１５は、Ｇｒａｂｓｔｅｉｎら（Ｇｒａｂｓｔｅｉｎ，ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ１９９４．２６４．５１６１：９６５－９６９）によって記載された手順に従って、またはＰＣＲなどの従来の手順によって得ることができる。１９９３年２月１９日にＡＴＣＣ（登録商標）にヒトＩＬ－１５のｃＤＮＡの寄託が行われ、アクセッション番号６９２４５が割り当てられた。

【００２９】

ヒトＩＬ－１５（Ｇｅｎｅ ＩＤ ３６００）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＰ０００５７６．１ ＧＩ：１０８３５１５３（アイソフォーム１）及びＮＰ＿７５１９１５．１ ＧＩ：２６７８７９８６（アイソフォーム２）でＧｅｎｂａｎｋに見られる。マウス（Ｍｕｓ ｍｕｓｃｕｌｕｓ）のＩＬ－１５アミノ酸配列（Ｇｅｎｅ ＩＤ １６１６８）は、アクセッションロケーターＮＰ＿００１２４１６７６．１ ＧＩ：３６３０００９８４でＧｅｎｂａｎｋに見られる。

【００３０】

ＩＬ－１５はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＬ－１５を指すことができる。本明細書で言及される場合、ＩＬ－１５の「ムテイン」または「バリアント」は、天然の哺乳動物のＩＬ－１５の配列と実質的に相同であるが、アミノ酸の欠失、挿入または置換により、天然の哺乳動物のＩＬ－１５ポリペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＬ－１５バリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＬ－１５タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＬ－１５結合特性が保持されている。ｍＲＮＡの選択的スプライシングにより、切り詰められたが生物学的に活性なＩＬ－１５タンパク質をもたらし得る。タンパク質分解に起因するバリエーションには、例えば、ＩＬ－１５タンパク質からの１つ以上の末端アミノ酸（一般的に１～１０アミノ酸）のタンパク質分解による除去に起因する、さまざまな種類の宿主細胞での発現時のＮ末端またはＣ末端の違いを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変更することができる（Ｙａｎｇ，ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ １９９５．７６：６８７－６９４）。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部を追加のアミノ酸で改変することができる（Ｃｌａｒｋ－Ｌｅｗｉｓ，ｅｔ ａｌ．ＰＮＡＳ １９９３．９０：３５７４－３５７７）。

【００３１】

一実施形態では、本発明によるリンパ球またはγδＴ細胞の単離は、インターロイキン

－４（ＩＬ－４）の存在下で非造血組織試料を培養することをさらに含む。したがって、さらなる実施形態では、非造血組織試料は、ＩＬ－１β及びＩＬ－４の存在下で培養される。

【００３２】

本明細書で使用される場合、「ＩＬ－４」は、１つ以上のＩＬ－４受容体（ＩＬ－４Ｒ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＬ－４、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。このような薬剤は、ナイーブヘルパーＴ細胞（Ｔｈ０細胞）からＴｈ２細胞への分化をサポートすることができる。成熟ヒトＩＬ－４は１２９アミノ酸配列（追加の２４のＮ末端アミノ酸からなるシグナルペプチドを除く）として発生する。ＩＬ－４ムテインは、ＩＬ－４Ｒαに結合する能力を保持しながら、インターロイキン－４タンパク質に特異的な置換が行われたポリペプチドであり、例えば、ＵＳ特許第６，３１３，２７２号に記載されるものである。ＩＬ－４ムテインは、天然のＩＬ－４ポリペプチド鎖中または他の残基の１つ以上の部位でのアミノ酸の挿入、欠失、置換及び修飾によって特徴付けることができる。本開示によれば、そのような挿入、欠失、置換、及び修飾のいずれも、ＩＬ－４Ｒα結合活性を保持するＩＬ－４ムテインをもたらす。例示的なムテインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むことができる。

【００３３】

ヒトＩＬ－４をコードする核酸は、ＰＣＲなどの従来の手順によって得ることができる。ヒトＩＬ－４（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　３５６５）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＧ＿０２３２５２でＧｅｎｂａｎｋに見られる。マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）のＩＬ－４アミノ酸配列（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　１６１８９）は、アクセッションロケーターＮＣ＿０００００７７．６でＧｅｎｂａｎｋに見られる。

【００３４】

ＩＬ－４はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＬ－４を指すことができる。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＬ－４バリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＬ－４タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＬ－４結合特性が保持されている。ｍＲＮＡの選択的スプライシングにより、切り詰められたが生物学的に活性なＩＬ－４タンパク質をもたらし得る。タンパク質分解に起因するバリエーションには、例えば、ＩＬ－４タンパク質からの１つ以上の末端アミノ酸（一般的に１～１０アミノ酸）のタンパク質分解による除去に起因する、さまざまな種類の宿主細胞での発現時のＮ末端またはＣ末端の違いを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変更することができる（Ｙａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　１９９５．７６：６８７－６９４）。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部を追加のアミノ酸で改変することができる（Ｃｌａｒｋ－Ｌｅｗｉｓ，ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　１９９３．９０：３５７４－３５７７）。

【００３５】

一実施形態では、本発明によるリンパ球またはγδＴ細胞の単離は、インターフェロン－γ（ＩＦＮ－γ）の存在下で非造血組織試料を培養することをさらに含む。したがって、さらなる実施形態では、非造血組織試料は、ＩＬ－１β及びＩＦＮ－γの存在下で培養される。

【００３６】
本明細書で使用される場合、「ＩＦＮ－γ」は、１つ以上のＩＦＮ－γ受容体（ＩＦＮＧＲ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＦＮ－γ、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。特に、ＩＦＮ－γは、インターフェロンガンマ受容体１（ＩＦＮＧＲ１）及びインターフェロンガンマ受容体２（ＩＦＮＧＲ２）からなるヘテロ二量体受容体と相互作用する。成熟ヒトＩＦＮ－γは１４３アミノ酸配列（追加の２３のＮ末端アミノ酸からなるシグナルペプチドを除く）として発生する。ＩＦＮ－γムテインは、ＩＦＮＧＲに結合する能力を保持しながら、ＩＦＮ－γタンパク質に特異的な置換が行われたポリペプチドであり、例えば、ＵＳ特許第９，２９６，８０４号に記載されるものである。ＩＦＮ－γムテインは、天然のＩＦＮ－１βポリペプチド鎖中または他の残基の１つ以上の部位でのアミノ酸の挿入、欠失、置換及び修飾によって特徴付けることができる。本開示によれば、そのような挿入、欠失、置換、及び修飾のいずれも、ＩＦＮ－γＲ結合活性を保持するＩＦＮ－γムテインをもたらす。例示的なムテインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むことができる。

【００３７】
ヒトＩＦＮ－γをコードする核酸は、ＰＣＲなどの従来の手順によって得ることができる。ヒトＩＦＮ－γ（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　３４５８）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＧ＿０１５８４０．１でＧｅｎｂａｎｋに、またはアクセッション番号Ｐ０１５７９でＵｎｉＰｒｏｔに見られる。マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）の０１５７９アミノ酸配列（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　１５９７８）は、アクセッションロケーターＮＣ＿０００００７６．６でＧｅｎｂａｎｋに、またはアクセッション番号Ｐ０１５８０でＵｎｉＰｒｏｔに見られる。

【００３８】
ＩＦＮ－γはまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＦＮ－γを指すことができる。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＦＮ－γバリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＦＮ－γタンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＦＮ－γ結合特性が保持されている。

【００３９】
一実施形態では、本発明によるリンパ球またはγδＴ細胞の単離は、インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）の存在下で非造血組織試料を培養することをさらに含む。したがって、さらなる実施形態では、非造血組織試料は、ＩＬ－１β及びＩＬ－２１の存在下で培養される。

【００４０】
本明細書で使用される場合、「ＩＬ－２１」は、１つ以上のＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）サブユニットに対してアゴニストとして作用する、天然もしくは組換えのＩＬ－２１、またはそれらのバリアントを指す（例えば、変異体、ムテイン、類似体、サブユニット、受容体複合体、その断片、アイソフォーム、及びペプチド模倣物）。このような薬剤は、ナチュラルキラー（ＮＫ）及び細胞傷害性（ＣＤ８$^{+}$）Ｔ細胞の増殖をサポートすることができる。成熟ヒトＩＬ－２１は１３３アミノ酸配列（追加の２２のＮ末端アミノ酸からなるシグナルペプチドを除く）として発生する。ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒαに結合する能力を保持しながら、インターロイキン－２１タンパク質に特異的な置

換が行われたポリペプチドであり、例えば、ＵＳ特許第９，３８８，２４１号に記載されるものである。ＩＬ－２１ムテインは、天然のＩＬ－２１ポリペプチド鎖中または他の残基の１つ以上の部位でのアミノ酸の挿入、欠失、置換及び修飾によって特徴付けることができる。本開示によれば、そのような挿入、欠失、置換、及び修飾のいずれも、ＩＬ－２１Ｒ結合活性を保持するＩＬ－２１ムテインをもたらす。例示的なムテインは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上のアミノ酸の置換を含むことができる。

【００４１】

ヒトＩＬ－２１をコードする核酸は、ＰＣＲなどの従来の手順によって得ることができる。ヒトＩＬ－２１（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　５９０６７）のアミノ酸配列は、アクセッションロケーターＮＣ＿０００００４．１２でＧｅｎｂａｎｋに見られる。マウス（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ）のＩＬ－２１アミノ酸配列（Ｇｅｎｅ　ＩＤ　６０５０５）は、アクセッションロケーターＮＣ＿０００００６９．６でＧｅｎｂａｎｋに見られる。

【００４２】

ＩＬ－２１はまた、例えば、ヒト、サル、ウシ、ブタ、ウマ、及びマウスを含むさまざまな哺乳動物種に由来するＩＬ－２１を指すことができる。バリアントは、保存的に置換された配列を含むことができ、これは所与のアミノ酸残基が類似の物理化学的特徴を有する残基によって置換されることを意味する。保存的置換の例としては、ある脂肪族残基の別の残基への置換、例えば、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、もしくはＡｌａの互いへの置換、またはある極性残基の別の残基への置換、例えば、ＬｙｓとＡｒｇ；ＧｌｕとＡｓｐ；もしくはＧｌｎとＡｓｎの間の置換が挙げられる。他のそのような保存的置換、例えば類似の疎水性特性を有する全領域の置換はよく知られている。天然に存在するＩＬ－２１バリアントも本発明に包含される。そのようなバリアントの例は、選択的ｍＲＮＡスプライシング事象またはＩＬ－２１タンパク質のタンパク質分解切断から生じるタンパク質であり、ＩＬ－２１結合特性が保持されている。ｍＲＮＡの選択的スプライシングにより、切り詰められたが生物学的に活性なＩＬ－２１タンパク質をもたらし得る。タンパク質分解に起因するバリエーションには、例えば、ＩＬ－２１タンパク質からの１つ以上の末端アミノ酸（一般的に１～１０アミノ酸）のタンパク質分解による除去に起因する、さまざまな種類の宿主細胞での発現時のＮ末端またはＣ末端の違いを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端を、例えばポリエチレングリコールなどの化学基を用いて修飾して、その物理的特性を変更することができる（Ｙａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　１９９５．７６：６８７－６９４）。いくつかの実施形態では、タンパク質の末端または内部を追加のアミノ酸で改変することができる（Ｃｌａｒｋ－Ｌｅｗｉｓ，ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ　１９９３．９０：３５７４－３５７７）。

【００４３】

代替的な実施形態では、培養することはＩＬ－２１の非存在下で実施される。代替的な実施形態では、培養することはＩＦＮ－γの非存在下で実施される。本明細書に記載の実験から得られた結果の統計分析の後、単離培養物中のＩＬ－１βの存在は、ＩＦＮ－γ及びＩＬ－２１が存在しない場合など、少なくともＩＦＮ－γが存在しない場合により有益であり得る。本明細書に記載の結果は、特定の条件下では、ＩＬ－２１が存在しない場合、またはＩＬ－２１が１５～２５ｎｇ／ｍＬの濃度、特に１８～２０ｎｇ／ｍＬ、例えば１８、１９、２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度で存在する場合に有益であり得る。

【００４４】

特定の実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－２を、典型的には少なくとも１０ＩＵ／ｍＬ、例えば少なくとも１００ＩＵ／ｍＬ（例えば、１０ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ、２０ＩＵ／ｍＬ～８００ＩＵ／ｍＬ、２５ＩＵ／ｍＬ～７５０ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ～７００ＩＵ／ｍＬ、４０ＩＵ／ｍＬ～６００ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、７５ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、または１００ＩＵ／ｍＬ～２００ＩＵ／ｍＬ、例えば、１０ＩＵ／ｍＬ～２０ＩＵ／ｍＬ、２０ＩＵ／ｍＬ～

３０ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ～４０ＩＵ／ｍＬ、４０ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～７５ＩＵ／ｍＬ、７５ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～１５０ＩＵ／ｍＬ、１５０ＩＵ／ｍＬ～２００ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、または５００ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ）の濃度で含む。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－２を、典型的には１，０００ＩＵ／ｍＬ未満、例えば５００ＩＵ／ｍＬ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－２を、約１００ＩＵ／ｍＬ、例えば１３８ＩＵ／ｍＬの濃度で含む。

【００４５】

さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－１５を、典型的には少なくとも１０ＩＵ／ｍＬ、例えば少なくとも１００ＩＵ／ｍＬ、特に少なくとも５００ＩＵ／ｍＬ（例えば、１０ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ、２０ＩＵ／ｍＬ～９００ＩＵ／ｍＬ、２５ＩＵ／ｍＬ～７５０ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ～６００ＩＵ／ｍＬ、４０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～４００ＩＵ／ｍＬ、７５ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、または１００ＩＵ／ｍＬ～２００ＩＵ／ｍＬ、例えば１００ＩＵ／ｍＬ～９００ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ～８００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ～７００ＩＵ／ｍＬ、４００ＩＵ／ｍＬ～６００ＩＵ／ｍＬ、または５００ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ）の濃度で含む。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－１５を、典型的には１，０００ＩＵ／ｍＬ未満、例えば７００ＩＵ／ｍＬ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－１５を、約６００ＩＵ／ｍＬの濃度で含む。

【００４６】

いくつかの実施形態では、非造血組織試料からのγδＴ細胞の単離は、ＩＬ－２とＩＬ－１５の両方の存在下での培養を含み、それぞれ上に列挙した濃度のいずれかである。場合によっては、ＩＬ－２の濃度が約１３８ＩＵ／ｍＬであり、ＩＬ－１５の濃度が６００ＩＵ／ｍＬである。

【００４７】

さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－２１を、典型的には少なくとも０．０１ＩＵ／ｍＬ、例えば少なくとも０．１ＩＵ／ｍＬ（例えば、０．０１ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、０．０５ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、０．１ＩＵ／ｍＬ～１０ＩＵ／ｍＬ、１ＩＵ／ｍＬ～５ＩＵ／ｍＬ、例えば０．０１ＩＵ／ｍＬ～０．０５ＩＵ／ｍＬ、０．０５ＩＵ／ｍＬ～０．１ＩＵ／ｍＬ、０．１ＩＵ／ｍＬ～１ＩＵ／ｍＬ、５ＩＵ／ｍＬ～１０ＩＵ／ｍＬ、１０ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ）の濃度で含む。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－２１を、典型的には１０ＩＵ／ｍＬ未満、例えば５ＩＵ／ｍＬ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－２１を、約１ＩＵ／ｍＬ、例えば１．０５ＩＵ／ｍＬの濃度で含む。さらなる実施形態では、方法は、ＩＬ－２１を１５～２５ｎｇ／ｍＬの濃度で含む。したがって、一実施形態では、本方法は、ＩＬ－２１を、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬの濃度で含む。さらなる実施形態では、方法は、ＩＬ－２１を１８～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば、１８、１９、２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度で含む。

【００４８】

さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－４を、典型的には少なくとも１ＩＵ／ｍＬ、例えば少なくとも１０ＩＵ／ｍＬ（例えば、１ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ、５ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、１０ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１５０ＩＵ／ｍＬ、例えば１ＩＵ／ｍＬ～５ＩＵ／ｍＬ、５ＩＵ／ｍＬ～１０ＩＵ／ｍＬ、１０ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～１５０ＩＵ／ｍＬ）の濃度で含む。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－４を、典型的には５００ＩＵ／ｍＬ未満、例えば１００ＩＵ／ｍＬ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－４を、約１００ＩＵ／ｍＬ、例えば９５ＩＵ／ｍＬの濃度で含む。さらなる実施形態では、方法は、ＩＬ－

４を、約３０ＩＵ／ｍＬ、例えば３１．６ＩＵ／ｍＬの濃度で含む。

【００４９】

したがって、いくつかの実施形態では、非造血組織試料からのγδＴ細胞の単離は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－４、及びＩＬ－２１の存在下での培養を含み、それぞれ上に列挙した濃度のいずれかである。さらなる実施形態では、ＩＬ－２の濃度は約１３８ＩＵ／ｍＬであり、ＩＬ－１５の濃度は６００ＩＵ／ｍＬであり、ＩＬ－４の濃度は９５ＩＵ／ｍＬであり、ＩＬ－２１の濃度は１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば、１８、１９、２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬである。したがって、特定の実施形態では、γδＴ細胞の単離には、１３８ＩＵ／ｍＬの濃度のＩＬ－２、６００ＩＵ／ｍＬの濃度のＩＬ－１５、９５ＩＵ／ｍＬの濃度のＩＬ－４、４５００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１β、及び任意選択での１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１の存在下での培養が含まれる。

【００５０】

本明細書における「非造血組織」または「非造血組織試料」への言及には、皮膚（例えば、ヒトの皮膚）及び腸（例えば、ヒトの腸）が含まれる。非造血組織は、血液、骨髄、または胸腺組織以外の組織である。一実施形態では、非造血組織試料は皮膚（例えば、ヒトの皮膚）である。さらなる実施形態では、非造血組織試料は、腸または胃腸管（例えば、ヒトの腸またはヒトの胃腸管）である。いくつかの実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、血液または滑液などの特定の種類の体液試料からは得られない。いくつかの実施形態では、本明細書で定義される方法に従って単離されるリンパ球及び／またはγδＴ細胞が由来する非造血組織試料は、当技術分野で知られている方法によって得ることができる皮膚（例えば、ヒトの皮膚）である。あるいは、本明細書で提供されるリンパ球の及び／またはγδＴ細胞の単離方法は、胃腸管（例えば結腸または腸）、乳腺、肺、前立腺、肝臓、脾臓、膵臓、子宮、膣、及び他の皮膚、粘膜または漿の膜に適用することができる。リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、乳房または前立腺の腫瘍など、ヒトのがん組織試料にも常在し得る。いくつかの実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、ヒトがん組織試料（例えば、固形腫瘍組織）に由来し得る。他の実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、ヒトがん組織以外の非造血組織試料（例えば、実質的な数の腫瘍細胞を含まない組織）由来し得る。例えば、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、近くのまたは隣接するがん組織から離れた皮膚の領域（例えば、健康な皮膚）に由来し得る。したがって、いくつかの実施形態では、γδＴ細胞はヒトがん組織から得られない。さらなる実施形態では、リンパ球はヒトがん組織から得られない。

【００５１】

一実施形態では、本明細書で定義される方法の非造血組織試料は、ヒトから得られたものである。代替的な実施形態では、本明細書で定義される方法の非造血組織試料は、非ヒト動物対象から得られたものである。

【００５２】

そのような組織を得る方法は、当技術分野で知られている。このような方法の例としては、外科用メスの外植片またはパンチ生検があり、方法によってサイズは変動し得る。いくつかの実施形態では、非造血組織試料は、パンチ生検によって得られる。

【００５３】

本発明のいくつかの実施形態では、非造血組織試料は無傷の生検である。本明細書における「無傷の」生検または「外植片」への言及は、生検または外植片の構造的完全性が、組織試料から生検または外植片を取り出す切除の周囲内で意図的に破壊されていないように、実質的に破壊されていないか、または破壊されていない組織及び組織試料を含む。このような無傷の生検または外植片は、取り扱いによって引き起こされる小さな混乱を除いて、三次元構造がほぼ維持される。したがって、この無傷の生検または外植片は、例えば、ミンチまたはチョッピングなどによって機械的に破壊されたり、化学的に酵素的に破壊されたりしていない。無傷の生検または無傷の組織試料は、組織全体、完全な組織、組織の一部、または前記組織のすべての要素を含み得る。例えば、一実施形態では、無傷の生

検は皮膚のすべての層を含む。さらなる実施形態では、生検は、皮膚の表皮及び真皮の層を含む。生検が無傷であるそのような実施形態では、そのような層の間の分離及び区別が維持されることが理解されるであろう。したがって、本明細書における「無傷」への言及は、非造血組織試料の全層の生検をさらに含む。

【００５４】

したがって、本発明の１つの特定の実施形態では、非造血組織試料は細切されない。さらなる実施形態では、無傷の生検はパンチ生検である。なおもさらなる実施形態では、無傷の生検はパンチ生検によって得られる。

【００５５】

一実施形態では、非造血組織試料はパンチ生検である。パンチ生検は、任意の形状であってもよいが、好都合には円形の横断切片であり、適切には直径が少なくとも１ｍｍである。なおもさらなる実施形態では、非造血組織試料は、直径が少なくとも２ｍｍ、例えば直径が少なくとも３ｍｍ、直径が少なくとも４ｍｍ、直径が少なくとも５ｍｍ、直径が少なくとも６ｍｍ、直径が少なくとも７ｍｍ、または直径が少なくとも８ｍｍのパンチ生検を含む。さらなる実施形態では、非造血組織試料は、直径７ｍｍ以下、直径６ｍｍ以下、直径５ｍｍ以下、または直径３ｍｍ以下など、直径８ｍｍ以下のパンチ生検を含む。一実施形態では、非造血組織試料は、直径が１ｍｍ～８ｍｍ、例えば直径２ｍｍ～４ｍｍのパンチ生検を含む。特定の実施形態では、非造血組織試料は、直径３ｍｍのパンチ生検を含む。

【００５６】

一実施形態では、生検は皮膚生検であり、表皮及び真皮の層を含む。さらなる実施形態では、生検は皮下脂肪を実質的に含まない。したがって、一実施形態では、生検は、表皮及び真皮の層を含み、皮下脂肪の層を実質的に含まない。さらなる実施形態では、生検は皮下脂肪を含まない。代替的に、皮下脂肪は除去されず、したがって生検に存在する（または少なくとも部分的に存在する）。したがって、なおもさらなる実施形態では、生検は表皮及び真皮の層からなる。一実施形態では、生検は、非造血組織試料の全層を含む。

【００５７】

本発明の方法は、本明細書で定義される非造血組織試料を培養することを含む。本明細書における「培養すること」への言及は、非造血組織試料から単離されたか、分離されたか、取り出されたか、精製されたか、または濃縮された細胞を含む、細胞及び／または非造血組織試料の、細胞及び／または非造血組織試料によって要求される及び／または好まれる、増殖因子及び／または必須栄養素を含む培地への添加が含まれる。そのような培養条件は、本発明に従って非造血組織試料から単離される細胞または細胞の集団に従って適合され得るか、または非造血組織試料から単離及び拡大されるべき細胞または細胞の集団に従って適合され得ることが理解されるであろう。

【００５８】

特定の実施形態では、非造血組織試料を培養することは、非造血組織試料からのγδＴ細胞の単離に十分な期間である。代替的な実施形態では、非造血組織試料を培養することは、非造血組織試料からγδＴ細胞以外のリンパ球（例えば、αβＴ細胞及び／またはＮＫ（ナチュラルキラー）細胞）を単離するのに十分な時間である。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、少なくとも７日間である。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、少なくとも１４日間である。特定の実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、４５日未満、例えば４０日未満、例えば３５日未満、例えば３０日未満、例えば２５日未満である。さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、１４日～２１日間など、１４日～３５日間である。さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、約１９日間、例えば１９日間である。別の実施形態では、本明細書で定義される方法による培養期間は、約２１日間、例えば２１日間である。

【００５９】

本発明の特定の実施形態では、本明細書で定義される方法に従って単離されるリンパ球

及び／またはγδＴ細胞は、非造血組織試料を培養した後に、非造血組織試料の培養物から収集される。本明細書で定義されるリンパ球及び／またはγδＴ細胞の収集は、培養物からのリンパ球及び／またはγδＴ細胞の物理的収集、他のリンパ球（例えば、αβＴ細胞、γδＴ細胞、及び／またはＮＫ細胞）からのリンパ球及び／またはγδＴ細胞の単離、または間質細胞（例えば、線維芽細胞）からのリンパ球及び／またはγδＴ細胞の単離及び／または分離を含む。一実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、機械的手段（例えば、ピペッティング）によって収集される。さらなる実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、磁気分離及び／または標識化によって収集される。なおもさらなる実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、ＦＡＣＳなどのフローサイトメトリー技術によって収集される。したがって、特定の実施形態では、γδＴ細胞は、γδＴ細胞を特異的に標識化する手段によって収集される。さらなる実施形態では、リンパ球は、リンパ球を特異的に標識化して培養物中の他の細胞と区別する手段によって収集される。このようなリンパ球及び／またはγδＴ細胞の収集は、非造血組織試料の培養物からの物理的除去、別の培養容器への移動、または別のもしくは異なる培養条件への移動を含み得る。

【００６０】

このようなリンパ球及び／またはγδＴ細胞の収集は、非造血組織試料からのリンパ球及び／または単離されたγδＴ細胞の集団を達成するのに十分な期間の後に行われることが理解されるであろう。特定の実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、非造血組織試料を少なくとも１週間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１３日間、または少なくとも１４日間培養した後に収集される。適切には、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、４０日以内、例えば３８日以内、３６日以内、３４日以内、３２日以内、３０日以内、２８日以内、２６日以内、または２４日以内に収集される。一実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、非造血組織試料を少なくとも１４日間培養した後に収集される。さらなる実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、非造血組織試料を１４～２１日間培養した後に収集される。なおさらなる実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、約１９日間、例えば１９日間培養した後に収集される。別の実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、約２１日間、例えば２１日間培養した後に収集される。

【００６１】

本発明の特定の実施形態では、非造血組織試料は、血清（例えば、ヒトＡＢ血清またはウシ胎仔血清（ＦＢＳ））を含む培地中で培養される。さらなる実施形態では、非造血組織は、１０％ヒトＡＢ血清を含む培地中で培養される。別の実施形態では、非造血組織は、５％ヒトＡＢ血清を含む培地中で培養される。この実施形態によれば、以下に定義される血清代替物がさらに培地に含まれ得る。したがって、なおもさらなる実施形態では、非造血組織は、５％ヒトＡＢ血清と５％血清代替物を含む培地中で培養される。

【００６２】

本発明の特定の実施形態では、非造血組織試料は、血漿（例えば、ヒト血漿）を含む培地中で培養される。さらなる実施形態では、造血組織は、２．５％のヒト血漿を含む培地中で培養される。

【００６３】

本発明の代替的な実施形態では、非造血組織試料は、実質的に血清を含まない培地（例えば、無血清培地または血清代替物（ＳＲ）を含む培地）中で培養される。さらなる実施形態では、造血組織は、５％血清代替物を含む培地中で培養される。したがって、一実施形態では、非造血組織試料は無血清培地中で培養される。そのような無血清培地はまた、血清代替物培地を含み得、血清代替物は、ヒトまたは動物由来の血清の使用を避けるために、化学的に定義された成分に基づく。

【００６４】

一実施形態では、非造血組織試料は、動物由来生成物を含まない培地で培養される。

【００６５】

一実施形態では、本明細書で定義される方法は、単離容器内で実施される。「単離容器」への言及は、リンパ球及び／またはγδＴ細胞の分離のための非造血組織サンプを含み、任意選択で合成足場をさらに含む容器を指す。単離容器は、単離方法のためだけに使用でき、さらなる拡大ステップには使用できないことに留意されたい。

【００６６】

一実施形態では、本明細書で定義される方法は、ガス透過性物質を含む容器（例えば単離容器）内で実施される。このような物質は、酸素、二酸化炭素、及び／または窒素などのガスを透過し、容器の内容物と周囲の大気との間のガス交換を可能にする。本明細書における「容器」への言及は、培養皿、培養プレート、単一ウェル皿、マルチウェル皿、マルチウェルプレート、フラスコ、多層フラスコ、ボトル（ローラーボトルなど）、バイオリアクター、バッグ、チューブなどを含む。このような容器は、非接着細胞及び他のリンパ球の拡大を伴う方法で使用することが当技術分野で知られている。しかしながら、驚くべきことに、ガス透過性物質を含む容器は、通常接着性であると考えられるγδＴ細胞の単離にも有用性を見出す。このような容器を培養に使用すると、非造血組織試料から単離されたγδＴ細胞の収量が大幅に増加することがわかった。そのような血管はまた、接着性細胞型を含む、線維芽細胞及び他の間質細胞（例えば、上皮細胞）よりも、γδＴ細胞及び他のリンパ球を優先的にサポートすることもわかった。したがって、一実施形態では、本明細書で定義されるガス透過性物質を含む容器は、γδＴ細胞及び他のリンパ球（例えば、αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）を優先的にサポートする。さらなる実施形態では、線維芽細胞及び／または他の間質細胞（例えば、上皮細胞）は、ガス透過性物質を含む容器で行われる培養には存在しない。

【００６７】

ガス透過性物質を含むそのような容器は、非多孔性であるガス透過性物質をさらに含むことができる。したがって、一実施形態では、ガス透過性物質は非多孔性である。いくつかの実施形態では、ガス透過性物質は、シリコーン、フルオロエチレンポリプロピレン、ポリオレフィン、またはエチレンビニルアセテートコポリマーなどの膜フィルムである。さらに、そのような容器は、ガス透過性物質、ガス透過性膜フィルム、または非多孔性ガス透過性物質の一部のみを含むことができる。したがって、なおもさらなる実施形態によれば、容器は、頂部、底部、及び少なくとも１つの側壁を含み、前記容器底部の少なくとも一部は、前記頂部が前記底部の上に存在するときに実質的に水平面にあるガス透過性物質を含む。一実施形態では、容器は、頂部、底部、及び少なくとも１つの側壁を含み、前記底部の少なくとも一部は、前記頂部が前記底部の上にあるときに水平面内にあるガス透過性物質を含む。さらなる実施形態では、容器は、頂部、底部、及び少なくとも１つの側壁を含み、前記少なくとも１つの側壁は、前記頂部が前記底部の上にあるときに垂直面にあり得るか、または前記頂部が前記底部の上にないときに水平面に選り得る、ガス透過性物質を含む。そのような実施形態では、前記底部または前記側壁の一部のみがガス透過性物質を含んでもよいことが理解されるであろう。代替的に、前記底部全体または前記側壁全体がガス透過性物質を含んでもよい。なおもさらなる実施形態では、ガス透過性物質を含む前記容器の前記頂部は、例えばＯリングを利用することによって密封されてもよい。そのような実施形態は、容器内容物のこぼれを防止するか、または蒸発を低減することが理解されよう。したがって、特定の実施形態では、容器は、ガス交換を可能にするガス透過性物質を含む液体密封された容器を含む。代替的な実施形態では、ガス透過性物質を含む前記容器の前記頂部は、水平面内で前記底部の上にあり、密封されていない。したがって、特定の実施形態では、前記頂部は、容器の頂部からのガス交換を可能にするように構成されている。さらなる実施形態では、ガス透過性容器の前記底部は、容器の底部からのガス交換を可能にするように構成されている。なおもさらなる実施形態では、ガス透過性物質を含む前記容器は、液体密封された容器であってもよく、入口及び出口のポートまたは管をさらに含む。したがって、特定の実施形態では、ガス透過性物質を含む容器は、頂部、底部、及び任意選択で少なくとも１つの側壁を含み、前記頂部及び前記底部の少なくとも一部はガス透過性物質を含み、存在する場合は少なくとも１つの側壁の少なくとも一

部は、ガス透過性物質を含む。例示的な容器は、ＷＯ２００５０３５７２８及びＵＳ９２５５２４３に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。これらの容器は、Ｇ－ＲＥＸ６ウェルプレート、Ｇ－ＲＥＸ２４ウェルプレート及びＧ－ＲＥＸ１０容器など、Ｗｉｌｓｏｎ Ｗｏｌｆ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇによって提供されるＧ－ＲＥＸ（登録商標）細胞培養デバイスなどのように市販されている。

【００６８】

一実施形態では、非造血組織試料は合成足場上に配置される。本明細書で使用される場合、「合成足場」、「足場」、及び「グリッド」は、交換可能に使用され、細胞増殖をサポートするのに適した非天然の三次元構造を指す。非造血組織試料は、外植片から足場上へのリンパ球の放出を促進するために、合成足場に置かれるか、または接着され得る。合成足場は、天然物質及び／または合成物質、例えば、ポリマー（例えば、天然または合成のポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、ポリメチルメタクリレート、メチルセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリウレタン）、セラミック（例えば、リン酸三カルシウム、アルミン酸カルシウム、カルシウムヒドロキシアパタイト）、または金属（例えば、タンタル、チタン、白金、及び白金、ニオブ、ハフニウム、タングステンと同じ元素群の金属、ならびにそれらの合金の組み合わせ）から構築することができる。本発明の一実施形態では、合成足場はタンタルコーティングされている。生物学的因子（例えば、コラーゲン（コラーゲンＩまたはコラーゲンＩＩなど）、フィブロネクチン、ラミニン、インテグリン、血管新生因子、抗炎症因子、グリコサミノグリカン、ビトロゲン、抗体及びその断片、サイトカイン（例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－４、ＩＬ－２１、ＩＬ－１β、及びそれらの組み合わせ、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－４、ＩＬ－２１、及びそれらの組み合わせ）は、足場表面上にコーティングされるか、足場内にカプセル化されるか、または培地に添加されて、当該技術分野に知られる方法に従って、細胞接着、遊走、生存、または増殖を増強することができる。この方法及び他の方法を使用して、多くの他の非造血組織タイプ、例えば、皮膚、腸、前立腺、及び乳房からリンパ球を単離することができる。

【００６９】

一実施形態では、非造血組織試料は、非造血組織試料からリンパ球を単離するために使用される容器内の合成足場上に配置される。さらなる実施形態では、合成足場は、リンパ球及び／またはγδＴ細胞が、非造血組織試料から培養容器の底に放出することを促進するように構成されている。そのような実施形態は、非造血組織試料及び／または間質細胞（例えば線維芽細胞及び／または上皮細胞）からのリンパ球（例えば、γδＴ細胞、αβＴ細胞、及び／またはＮＫ細胞）の単離及び／または分離を可能にするという利点を有する。さらに、そのような実施形態は、非造血組織試料から培養容器の底へのリンパ球（例えば、γδＴ細胞、αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）の収集を可能にする。特定の実施形態では、合成足場は、非造血組織試料からのγδＴ細胞の放出を促進するように構成されている。さらなる実施形態では、合成足場は、非造血組織試料からのαβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞などのリンパ球の放出を促進するように構成されている。

【００７０】

したがって、本明細書で定義される方法の一態様では、合成足場は、非造血組織試料から培養容器の底へのリンパ球の放出を促進するように構成されている。本明細書で定義される方法のさらなる態様では、合成足場は、非造血組織試料から容器の底へのγδＴ細胞の放出を促進するように構成されている。

【００７１】

本発明の方法は、以前に記載されたよりも多い総細胞収量を提供する。一実施形態では、単離された細胞の総数は、組織試料の少なくも10^6細胞／cm^2、少なくとも2×10^6細胞／cm^2、少なくとも5×10^6細胞／cm^2、少なくとも10×10^6細胞／cm^2、少なくとも20×10^6細胞／cm^2、少なくとも30×10^6細胞／cm^2、少なくとも40×10^6細胞／cm^2、少なくとも50×10^6細胞／cm^2、少なくとも60×10^6細胞／cm^2、少なくとも70×10^6細胞／cm^2、少なくとも８０×

１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}、少なくとも９０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}、少なくとも１００×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}、少なくとも１５０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}、少なくとも２００×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}である。特定の実施形態では、単離された細胞の総数は、少なくとも少なくとも５０×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}である。別の実施形態では、単離された細胞の総数は、少なくとも少なくとも１００×１０^{6}細胞／ｃｍ^{2}である。

【００７２】

血液で優勢であるγδＴ細胞は主にＶδ２Ｔ細胞であり、非造血組織で優勢なγδＴ細胞は主にＶδ１Ｔ細胞であり、そのためＶδ１Ｔ細胞は非造血組織常在性γδＴ細胞の集団の約７０～８０％を構成する。しかしながら、一部のＶδ２Ｔ細胞は、非造血組織、例えば腸内にも見られ、γδＴ細胞の約１０～２０％を占め得る。非造血組織に常在する一部のγδＴ細胞は、Ｖδ１　ＴＣＲもＶδ２　ＴＣＲも発現せず、本明細書では二重陰性（ＤＮ）γδＴ細胞と呼ばれている。これらのＤＮ　γδＴ細胞は、少数のＶδ５発現Ｔ細胞とともに、大部分がＶδ３発現である可能性がある。したがって、元々非造血組織に存在し、本発明の方法によって単離されるγδＴ細胞は、好ましくは非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞であり、少量のＤＮγδＴ細胞が含まれる。

【００７３】

したがって、好ましい一実施形態では、本明細書で定義される方法によって単離されるγδＴ細胞は、Ｖδ１Ｔ細胞の集団を含む。一実施形態では、本明細書で定義される方法によって単離されるγδＴ細胞は、ＤＮ　γδＴ細胞の集団を含む。一実施形態では、本明細書で定義される方法によって単離されるγδＴ細胞は、Ｖδ３Ｔ細胞の集団を含む。一実施形態では、本明細書で定義される方法によって単離されるγδＴ細胞は、Ｖδ５Ｔ細胞の集団を含む。

【００７４】

γδＴ細胞は、それらが発現するγ鎖のタイプによっても定義され得る。さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法によって単離されるγδＴ細胞は、Ｖγ４Ｔ細胞の集団を含む。ほとんどの場合、Ｖγ４Ｔ細胞は腸組織試料から得られる。

【００７５】

単離方法は、参照集団よりも多い（例えば、数が少なくとも数が少なくとも２倍、数が少なくとも３倍、数が少なくとも４倍、数が少なくとも５倍、数が少なくとも６倍、数が少なくとも７倍、数が少なくとも８倍、数が少なくとも９倍、数が少なくとも１０倍、数が少なくとも１５倍、数が少なくとも２０倍、数が少なくとも２５倍、数が少なくとも３０倍、数が少なくとも３５倍、数が少なくとも４０倍、数が少なくとも５０倍、数が少なくとも６０倍、数が少なくとも７０倍、数が少なくとも８０倍、数が少なくとも９０倍、数が少なくとも１００倍、数が少なくとも２００倍、数が少なくとも３００倍、数が少なくとも４００倍、数が少なくとも５００倍、数が少なくとも６００倍、数が少なくとも７００倍、数が少なくとも８００倍、数が少なくとも９００倍、数が少なくとも１，０００倍、数が少なくとも５，０００倍、数が少なくとも１０，０００倍）γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団を提供する。

【００７６】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って単離されるγδＴ細胞の集団は、ＮＫＧ２Ａを発現する細胞の割合が低い。例えば、単離されたγδＴ細胞の集団は、４０％未満、３５％未満、３０％未満、２０％未満、または未満１０％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、単離されたγδＴ細胞の集団は、約４０％、約３０％、約２０％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、１０％未満のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約８％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、単離されるγδＴ細胞はＮＫＧ２Ａを実質的に発現しない。

【００７７】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って単離されるＶδ１Ｔ細胞の集団は、ＮＫＧ２Ａを発現する細胞の割合が低い。例えば、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、４０％未満、３５％未満、３０％未満、２０％未満、または未満１０％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約４０％、約３０％、約２０％、約１０％、約９％、約８％、約７％、約６％、約５％、約４％、約３％、約２％、または約１％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、１０％未満のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約９％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有する。別の実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約７％のＮＫＧ２Ａ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、単離されるＶδ１Ｔ細胞はＮＫＧ２Ａを実質的に発現しない。一実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団の１０％未満がＮＫＧ２Ａを発現する。

【００７８】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って単離されるγδＴ細胞の集団は、ＣＤ４５ＲＡを発現する細胞の割合が低い。ＣＤ４５ＲＡは最終分化に関連するマーカーであるため、単離される細胞の集団におけるこのマーカーの発現を減らすことが望ましい。例えば、単離されたγδＴ細胞の集団は、８０％未満、７０％未満、６０％未満、５０％未満、４０％未満、または未満３０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、単離されたγδＴ細胞の集団は、約５０％、約４０％、約３０％、約２０％、または約１０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、３０％未満のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約１０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有する。

【００７９】

いくつかの実施形態では、本発明の方法に従って単離されるＶδ１Ｔ細胞の集団は、ＣＤ４５ＲＡを発現する細胞の割合が低い。例えば、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、８０％未満、７０％未満、６０％未満、５０％未満、４０％未満、または未満３０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約５０％、約４０％、約３０％、約２０％、または約１０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、３０％未満のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有する。したがって、一実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、約１０％のＣＤ４５ＲＡ＋細胞の頻度を有する。一実施形態では、Ｖδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団の８０％未満がＣＤ４５ＲＡを発現し、例えばＶδ１Ｔ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団の３０％未満がＣＤ４５ＲＡを発現する。

【００８０】

非造血組織（例えば、皮膚）から単離すると、γδＴ細胞は一般的に、αβＴ細胞、Ｂ細胞、及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を含む、より大きなリンパ球集団の一部になる。いくつかの実施形態では、リンパ球の単離されたγδＴ細胞の集団の１％～１０％がγδＴ細胞である（例えば、皮膚由来リンパ球の単離されたγδＴ細胞の集団の１～１０％がγδＴ細胞である）。ほとんどの場合、γδＴ細胞の集団（例えば、皮膚由来のγδＴ細胞の集団）には、大量のＶδ１Ｔ細胞の集団が含まれる。いくつかの実施形態では、単離されるリンパ球集団（例えば、皮膚由来リンパ球）の１～１０％がＶδ１Ｔ細胞である（例えば、Ｖδ１Ｔ細胞は、単離されるγδＴ細胞の集団の、５０％超、６０％超、７０％超、８０％超、または９０％超の集団を表し得る）。場合によっては、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団の１０％未満がＶδ２Ｔ細胞である（例えば、皮膚由来γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団の１０％未満がＶδ２Ｔ細胞である）。

【００８１】

Ｖδ２Ｔ細胞、αβＴ細胞、Ｂ細胞、またはＮＫ細胞などの非Ｖδ１Ｔ細胞または非Ｄ

Ｎ　Ｔ細胞は、単離されたγδＴ細胞の集団から除去することができる（例えば、拡大ステップの前、間、または後に）。

【００８２】

単離されたγδＴ細胞（例えば、皮膚から単離されたγδＴ細胞、例えば、皮膚から単離されたＶδ１Ｔ細胞など）は、対応する造血組織由来の細胞（例えば、血液由来のγδＴ細胞及び／または血液由来のＶδ２Ｔ細胞）とは異なる表現型を有している。例えば、単離されたγδＴ細胞の集団は、参照集団、例えば非造血組織常在性γδＴ細胞のＴＣＲ活性化集団または造血組織由来細胞の対応する集団（例えば、血液由来γδＴ細胞及び／または血液由来Ｖδ２Ｔ細胞）よりも高いレベルのＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８、またはＣＤ１０３を発現し得る。いくつかの実施形態では、単離されたγδＴ細胞の集団は、少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくはそれ以上のＣＣＲ３$^{+}$細胞；少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくはそれ以上のＣＣＲ４$^{+}$細胞；少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくはそれ以上のＣＣＲ７$^{+}$細胞；少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくはそれ以上のＣＣＲ８$^{+}$細胞；及び／または少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくはそれ以上のＣＤ１０３$^{+}$細胞を含む。γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８、またはＣＤ１０３のうちの１つ以上、２つ以上、３つ以上、４つ以上、５つ以上、または６つすべてを発現し得る。

【００８３】

非造血組織由来の単離されたγδＴ細胞の集団（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または皮膚由来Ｖδ１Ｔ細胞）も機能によって特徴付けることができる。当技術分野で知られている機能アッセイを実施して、本発明の任意の非造血組織由来細胞（例えば、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団、皮膚由来Ｖδ１Ｔ細胞、またはγδＴ細胞及び／または皮膚由来Ｖδ１Ｔ細胞の拡大された集団）と参照細胞（例えば、非造血組織常在性γδＴ細胞のＴＣＲ活性化集団または造血組織由来細胞の対応する集団、例えば血液由来γδＴ細胞及び／または血液由来Ｖδ２Ｔ細胞）との間の機能的差異を決定することができる。このようなアッセイには、増殖アッセイ、細胞傷害性アッセイ、結合アッセイ、持続性及び／または場所を測定するアッセイなどが含まれ得る。

【００８４】

したがって、本発明の一態様では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞の集団を単離するための本明細書で定義される方法は、疲弊していないリンパ球及び／またはγδＴ細胞の集団と一致する表面表現型を含む集団をもたらす。

【００８５】

本発明の方法は、ＴＣＲ陰性細胞などの他のリンパ球の単離を改善することも示されている。したがって、本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からリンパ球を単離する方法であって：

（ｉ）血清代替物、ヒト血漿、及び／またはヒトＡＢ血清を含む培地中で非造血組織試料を培養するステップと；

（ｉｉ）非造血組織試料から培養されたリンパ球の集団を収集するステップと、を含む方法が提供される。適切には、培地は血清代替物を含む。

【００８６】

本明細書に示される実施例に示されるように、タンパク質源は、非造血組織試料から単離されたＴＣＲ陰性細胞の数に影響を及ぼし得る。したがって、一実施形態では、リンパ球の単離されたγδＴ細胞の集団は、ＴＣＲ陰性細胞の集団を含む。ＴＣＲ陰性細胞の集団はしばしば多数のＮＫ細胞を含むことが当技術分野で知られている。単離されたＴＣＲ陰性細胞の集団にはＮＫ細胞が含まれ得る。一実施形態では、単離されたＴＣＲ陰性細胞

の集団の少なくとも５０％、少なくとも６０％、７０％、または８０％がＮＫ細胞である。

【００８７】

本発明のこの態様で使用される培養方法は、本明細書に記載の他の条件を含み得る。一実施形態では、ステップ（ｉ）は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。

【００８８】

一実施形態では、ステップ（ｉ）は、ＩＬ－４、ＩＬ－１β、ＩＬ－２１、及び／またはＩＦＮ－γの存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。別の実施形態では、ステップ（ｉ）は、ＩＬ－４及び／またはＩＬ－１βの存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。

【００８９】

一実施形態では、培養することはＩＦＮ－γの非存在下で実施される。本明細書に記載の実験から得られた結果の統計分析の後、単離中に得られたＴＣＲ陰性細胞の数は、ＩＦＮ－γが存在しない場合に増加し得るようである。一実施形態では、培養することはＩＬ－２１の非存在下で実施される。代替的な実施形態では、ステップ（ｉ）は、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば、１８、１９、または２０ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１の存在下で非造血組織試料を培養するステップをさらに含む。さらなる実施形態では、培養することは、濃度１８．８ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２１の存在下で実施される。

【００９０】

一実施形態では、方法は、リンパ球またはγδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団を凍結することを含む。細胞は、例えば、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ１０細胞凍結溶液中で凍結され得る。多くの凍結溶液及びパラメーターが当技術分野で知られており、本発明のこの態様において有用である。凍結された細胞は、使用が必要になるまで、任意選択で液体窒素（気相）中で、例えば－８０℃～－２００℃で保存することができる。

【００９１】

本発明の一態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得られる単離されたリンパ球集団（例えば、皮膚由来αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）が提供される。さらなる実施形態では、リンパ球の単離されたγδＴ細胞の集団は凍結される。

【００９２】

本発明の一態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得ることのできる単離されたリンパ球集団（例えば、皮膚由来αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）が提供される。

【００９３】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される方法によって得られる単離されたγδＴ細胞の集団が提供される。さらなる実施形態では、γδＴ細胞の単離されたγδＴ細胞の集団は凍結される。

【００９４】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得ることのできる単離されたγδＴ細胞の集団が提供される。

【００９５】

本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離する方法であって：

（ｉ）非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと、

（ｉｉ）単離されたγδＴ細胞の集団を凍結するステップと、を含む方法が提供される。

【００９６】

以前の方法は、拡大後にγδＴ細胞を凍結することを含んでいたが、本発明者らは、単離後に凍結された細胞が濃縮され、少なくとも新鮮な等価物と同様に拡大することを発見

した。単離後の凍結により、ドナーに対して小規模な品質管理拡大検証を実行してから、莫大なリソースコストとオペレーター集約型の大規模拡大を開始する時間ができる。また、単一のドナーから細胞のバッチを生産することもできる（すなわち、必要に応じて後日同じドナーからさらにバッチを生産する可能性を考慮して、拡大された細胞の１つのバッチを生産するため）。

【００９７】

本発明のこの態様では、単離方法は、本明細書に記載の方法、またはＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、またはその組み合わせ、例えばＩＬ－２及びＩＬ－１５、特に任意選択でＩＬ－４及び／またはＩＬ－２１と組み合わせたＩＬ－２、ＩＬ－１５の存在下で非造血組織試料を培養することなどの代替的な単離方法を含んでもよい。一実施形態では、γδＴ細胞は、任意選択でＩＬ－１β、ＩＬ－４、及び／またはＩＬ－２１と組み合わせて、ＩＬ－２及びＩＬ－１５の存在下で非造血組織試料を培養することによって単離される。この実施形態によれば、ＩＬ－２１が存在する場合、ＩＬ－２１は１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば１８、１９、または２０ｎｇ／ｍＬの濃度である。したがって、さらなる実施形態では、存在する場合、ＩＬ－２１は１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度である。

【００９８】

一実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、少なくとも１４日間の期間を有する。他の実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、２１日未満の期間を有する。なおもさらなる実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、１４日間～３５日間、例えば約１９日間～２１日間などの期間を有する。したがって、一実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、約１９日間、例えば１９日間の期間を有する。別の実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、約２１日、例えば２１日の期間を有する。

【００９９】

細胞は、Ｃｒｙｏｓｔｏｒ１０細胞凍結溶液などの適切な凍結溶液中で凍結され得る。多くの凍結／凍結保存溶液及びパラメーターが当技術分野で知られており、本発明のこの態様において有用である。適切な凍結溶液は、ＤＭＳＯ、及びヒト血清アルブミン、デキストラン、デキストロース、ＮａＣｌ、Ｈｅｓｐａｎ、またはＰｌａｓｍａＬｙｔｅ Ａなどの他の適切な培地添加物を含むことができる。次いで、細胞は、約－８０℃～約－２００℃、例えば、約－８０℃～約－１３５℃の温度まで凍結される。

【０１００】

凍結保存は、バイアルを凍結容器に入れ、次いで－８０℃の冷凍庫で例えば１～３日間保存し、続いて液体窒素保存システムの気相に移すことによって達成され得る。代替的な実施形態では、単離されたγδＴ細胞は速度制御された冷凍庫で凍結される。

【０１０１】

凍結された細胞は長期保存に適しており、したがって、単離された細胞は、その後の解凍及び拡大の前に一定期間凍結したままであり得ることが理解されるであろう。凍結された細胞は、使用が必要になるまで、任意選択で液体窒素（気相）中で、例えば－８０℃～－２００℃で保存することができる。

【０１０２】

凍結保存後、細胞は、例えば３７℃のウォーターバスで解凍（すなわち、解凍）することができる。解凍された細胞は、続いて拡大法で使用され得る。拡大の方法は、本明細書に記載の方法、または当技術分野で説明されている方法のいずれかを含むことができ、例えば、ＷＯ２０１７０７２３６７及びＷＯ２０１８２０２８０８を参照されたい。

【０１０３】

したがって、この方法は、γδＴ細胞の凍結された集団を解凍することをさらに含み得る。さらに、この方法は、解凍されたγδＴ細胞の集団を少なくとも５日間培養して、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生することを含んでもよい。

【０１０４】

したがって、本発明の別の態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡

大する方法であって：
（ｉ）非造血組織試料からγδＴ細胞を単離するステップと、
（ｉｉ）単離されたγδＴ細胞を凍結するステップと、
（ｉｉｉ）γδＴ細胞を解凍するステップと、
（ｉｖ）解凍されたγδＴ細胞を少なくとも５　日間培養して、拡大されたγδＴ細胞の集団を生成するステップと、を含む方法が提供される。
【０１０５】
特定の実施形態では、単離するステップ（ｉ）は、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８、１９、または２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１、及びＩＬ－１βの存在下で、約１９日間、例えば１９日間の期間、非造血組織試料を培養することを含む。別の実施形態では、単離ステップ（ｉ）は、ＩＬ－１βの存在下、かつＩＬ－２１の非存在下で、約１９日間、例えば１９日間、または約２１日間、例えば２１日間、非造血組織試料を培養することを含む。本明細書に示されるデータは、そのような単離条件が、ステップ（ｉｉｉ）での解凍後に生存γδＴ細胞をもたらし、その後の拡大培養中に拡大する能力、すなわち、ステップ（ｉｖ）で拡大されたγδＴ細胞の集団を効果的に産生する能力を示している。
【０１０６】
本発明の別の態様によれば、本明細書に記載の方法によって得られた凍結された単離されたγδＴ細胞の集団（すなわち、ステップ（ｉｉ）で得られた凍結されたγδＴ細胞）が提供される。
【０１０７】
本発明の別の態様によれば、本明細書に記載の方法によって得ることのできる凍結された単離されたγδＴ細胞の集団（すなわち、ステップ（ｉｉ）で得られた凍結されたγδＴ細胞）が提供される。
【０１０８】
拡大方法
特定の実施形態では、本発明は、非造血組織常在性のリンパ球及び／またはγδＴ細胞（例えば、皮膚由来αβＴ細胞、ＮＫ細胞、γδＴ細胞、及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）を拡大する方法を特徴とする。これらの方法は、インビトロで実施することができる。いくつかの実施形態では、γδＴ細胞は、本明細書で定義される方法に従って非造血組織試料から単離されたγδＴ細胞の集団から拡大される。一般に、非造血組織常在性γδＴ細胞は、間質細胞（例えば、皮膚の線維芽細胞）との物理的接触を取り除くと、自発的に拡大することができる。本明細書で定義される方法は、そのような分離を誘導するために使用することができ、その結果、γδＴ細胞の抑制が解除されて拡大が引き起こされる。特定の実施形態では、リンパ球（例えば、皮膚由来αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞、腸由来αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）は、本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料から単離されたリンパ球の集団から拡大される。
【０１０９】
本明細書で使用されるように、「拡大された」または「拡大されたリンパ球及び／またはγδＴ細胞の集団」への言及には、拡大していない集団よりも大きいか、またはより多くの数の細胞を含む細胞の集団が含まれる。そのような集団は、多数、少数、または集団内の割合または特定の細胞型の拡大を伴う混合された集団であり得る。「拡大ステップ」という用語は、拡大または拡大された集団をもたらすプロセスを指すことが理解されるであろう。したがって、拡大または拡大された集団は、拡大ステップを行っていない集団またはいずれかの拡大ステップの前の集団と比較して、数が多いか、またはより多くの細胞を含み得る。拡大（例えば倍率増加または倍率拡大）を示すために本明細書に示される任意の数字は、細胞の集団の数もしくはサイズまたは細胞の数の増加を示し、拡大の量を示すことがさらに理解されるであろう。
【０１１０】

したがって、一実施形態では、本発明の方法に従って単離されたリンパ球またはγδＴ細胞が拡大される。一実施形態では、単離されたリンパ球またはγδＴ細胞の集団を凍結し、次いで拡大前に解凍する。

【０１１１】

そのような拡大は任意選択でＩＬ－４を含む、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下でγδＴ細胞を培養することを含み得る。代替的に、拡大は任意選択でＩＬ－４を含む、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下でγδＴ細胞を培養することを含み得る。いずれかの拡大ステップは、リンパ球及び／または拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な期間にわたって実施されることが理解されるであろう。一実施形態では、拡大されたリンパ球及び／またはγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な期間は少なくとも５日間である。したがって、一実施形態では、拡大は、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量のＩＬ－２、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で少なくとも５日間γδＴ細胞を培養することを含む。さらなる実施形態では、拡大は、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量のＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ２１、及びＩＬ－４の存在下で少なくとも５日間γδＴ細胞を培養することを含む。なおもさらなる実施形態では、拡大は、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量のＩＬ－９、ＩＬ－１５、及びＩＬ－２１の存在下で少なくとも５日間γδＴ細胞を培養することを含む。一実施形態では、拡大は、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量のＩＬ－９、ＩＬ－１５、ＩＬ－２１、及びＩＬ－４の存在下で少なくとも５日間γδＴ細胞を培養することを含む。

【０１１２】

さらなる実施形態では、拡大は、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量の期間（例えば、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少なくとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１３日間、少なくとも１４日間、少なくとも２１日間、少なくとも２８日間、またはそれ以上、例えば、５日間～４０日間、７日間～３５日間、１４日間～２８日間、または約２１日間）リンパ球及び／またはγδＴ細胞を培養することを含む。いくつかの実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、数時間（例えば、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、１８、または２１時間）から約３５日間（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、または３５日間）の期間の培養で拡大される。一実施形態では、リンパ球及び／またはγδＴ細胞は、１４～２１日間の期間拡大される。したがって、単離培養期間（例えば、１～４０日間、例えば１４～２１日間）を含めて、単離及び拡大ステップは、いくつかの実施形態では、２８～５６日間、または約４１日間持続することができる。

【０１１３】

さらなる実施形態では、拡大は、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少なくとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１１日間、少なくとも１２日間、少なくとも１３日間、少なくとも１４日間、少なくとも２１日間、少なくとも２８日間、またはそれ以上、例えば、５日間～４０日間、７日間～３５日間、１４日間～２８日間、または約２１日間）γδＴ細胞を培養することを含む。一実施形態では、拡大ステップは、γδＴ細胞を少なくとも１０、１５、または２０日間培養して、拡大された集団を生成することを含む。一実施形態では、拡大ステップは、γδＴ細胞を５～２５日間、例えば１４～２１日間培養することを含む。さらなる実施形態では、拡大ステップは、γδＴ細胞を約２０日間培養することを含む。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効なＩＬ－２の典型的な量は、１ＩＵ／ｍＬ～２，０００ＩＵ／ｍＬ（例えば、５ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ、１０ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、２０ＩＵ／ｍＬ～４００ＩＵ／ｍ

Ｌ、５０ＩＵ／ｍＬ～２５０ＩＵ／ｍＬ、または約１００ＩＵ／ｍＬ、例えば、５ＩＵ／ｍＬ～１０ＩＵ／ｍＬ、１０ＩＵ／ｍＬ～２０ＩＵ／ｍＬ、２０ＩＵ／ｍＬ～３０ＩＵ／ｍＬ、３０ＩＵ／ｍＬ～４０ＩＵ／ｍＬ、４０ＩＵ／ｍＬ～５０ＩＵ／ｍＬ、５０ＩＵ／ｍＬ～６０ＩＵ／ｍＬ、６０ＩＵ／ｍＬ～７０ＩＵ／ｍＬ、７０ＩＵ／ｍＬ～８０ＩＵ／ｍＬ、８０ＩＵ／ｍＬ～９０ＩＵ／ｍＬ、９０ＩＵ／ｍＬ～１００ＩＵ／ｍＬ、１００ＩＵ／ｍＬ～１２０ＩＵ／ｍＬ、１２０ＩＵ／ｍＬ～１４０ＩＵ／ｍＬ、１４０ＩＵ／ｍＬ～１５０ＩＵ／ｍＬ、１５０ＩＵ／ｍＬ～１７５ＩＵ／ｍＬ、１７５ＩＵ／ｍＬ～２００ＩＵ／ｍＬ、２００ＩＵ／ｍＬ～３００ＩＵ／ｍＬ、３００ＩＵ／ｍＬ～４００ＩＵ／ｍＬ、４００ＩＵ／ｍＬ～５００ＩＵ／ｍＬ、５００ＩＵ／ｍＬ～１，０００ＩＵ／ｍＬ、１，０００ＩＵ／ｍＬ～１，５００ＩＵ／ｍＬ、１，５００ＩＵ／ｍＬ～２，０００ＩＵ／ｍＬ、またはそれ以上）である。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効なＩＬ－２の量は、約１００ＩＵ／ｍＬである。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えば、Ｖδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団を産生するのに有効なＩＬ－１５の典型的な量は、少なくとも０．１ｎｇ／ｍＬ（例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～１０，０００ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～１，０００ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～８００ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～７５０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ～４００ｎｇ／ｍＬ、または１００ｎｇ／ｍＬ～２５０　ｎｇ／ｍＬ、例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～１．０ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～５．０ｎｇ／ｍＬ、５．０ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、２０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬ、１００ｎｇ／ｍＬ～２００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ～５００ｎｇ／ｍＬ、または５００ｎｇ／ｍＬ～１，０００ｎｇ／ｍＬ）である。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効なＩＬ－１５の量は、約１０ＩＵ／ｍＬである。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えば、Ｖδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団を産生するのに有効なＩＬ－２１の典型的な量は、少なくとも０．１ｎｇ／ｍＬ、例えば少なくとも１．０ｎｇ／ｍＬ（例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～１，０００ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ～８ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、６ｎｇ／ｍＬ～８ｎｇ／ｍＬ、例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～５ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～１０ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ）である。さらなる実施形態では、ＩＬ－２１の量は、典型的には２００ｎｇ／ｍＬ未満、例えば、１８８．８ｎｇ／ｍＬの濃度である。他の実施形態では、ＩＬ－２１の量は、典型的には１００ｎｇ／ｍＬ未満、例えば、５０ｎｇ／ｍＬ未満、例えば３７．５ｎｇ／ｍＬの濃度である。さらに他の実施形態では、ＩＬ－２１の量は、典型的には２０ｎｇ／ｍＬ未満、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８、１９、または２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度である。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－２１を約６ｎｇ／ｍＬ、例えば６．２５ｎｇ／ｍＬの濃度で含む。

【０１１７】

さらなる実施形態では、本明細書で定義される方法は、ＩＬ－４を典型的には少なくとも０．１ｎｇ／ｍＬ、例えば少なくとも１０ｎｇ／ｍＬ（例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～１，０００ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～１００ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、２ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、３ｎｇ／ｍＬ～４０ｎｇ／ｍＬ、４ｎｇ／ｍＬ～３０ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ～２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、０．１ｎｇ／ｍＬ～５０ｎｇ／ｍＬ、１．０ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ）の濃度で含む。さらなる実施形態では、本明細書で定義さ

れる方法は、ＩＬ－４を典型的には１００ｎｇ／ｍＬ未満、例えば５０ｎｇ／ｍＬ未満、特に２０ｎｇ／ｍＬ未満の濃度で含む。いくつかの実施形態では、方法は、ＩＬ－４を、約１５ｎｇ／ｍＬの濃度で含む。

【０１１８】

非造血組織常在性のリンパ球及び／またはγδＴ細胞の拡大培養における他の因子の置換または追加も本明細書で提供される。例えば、いくつかの実施形態では、ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１２、ＩＬ－１８、ＩＬ－３３、ＩＧＦ－１、ＩＬ－１β、ヒト血小板溶解物（ＨＰＬ）、及び間質細胞由来因子－１（ＳＤＦ－１）からなる群から選択される任意の１つ以上の因子は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５のうちのいずれか１つに加えて、またはそれらの代わりに含まれる。αβＴ細胞またはＮＫ細胞などのリンパ球の拡大のためのそのような追加または代替の因子は、当技術分野で知られている。一実施形態では、そのような因子は、γδＴ細胞の拡大を選択的に促進する拡大に使用される。さらなる実施形態では、そのような因子は、αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞などのリンパ球の拡大を選択的に促進する拡大に使用される。

【０１１９】

拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するために必要な上記サイトカインのそれぞれの量は、他のサイトカインの１つ以上の濃度に依存することが理解されるであろう。例えば、ＩＬ－２の濃度が増加または減少する場合、それに応じてＩＬ－１５の濃度をそれぞれ減少または増加させることができる。上述のように、拡大された集団を生成するのに有効な量は、本明細書では、細胞拡大に対するすべての因子の複合効果を指す。

【０１２０】

拡大方法は、参照集団よりも数が多い拡大されたγδＴ細胞の集団を提供する。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、拡大ステップ前の単離されたγδＴ細胞の集団よりも多い（例えば、拡大ステップ前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、数が少なくとも数が少なくとも２倍、数が少なくとも３倍、数が少なくとも４倍、数が少なくとも５倍、数が少なくとも６倍、数が少なくとも７倍、数が少なくとも８倍、数が少なくとも９倍、数が少なくとも１０倍、数が少なくとも１５倍、数が少なくとも２０倍、数が少なくとも２５倍、数が少なくとも３０倍、数が少なくとも３５倍、数が少なくとも４０倍、数が少なくとも５０倍、数が少なくとも６０倍、数が少なくとも７０倍、数が少なくとも８０倍、数が少なくとも９０倍、数が少なくとも１００倍、数が少なくとも２００倍、数が少なくとも３００倍、数が少なくとも４００倍、数が少なくとも５００倍、数が少なくとも６００倍、数が少なくとも７００倍、数が少なくとも８００倍、数が少なくとも９００倍、数が少なくとも１，０００倍、数が少なくとも５，０００倍、数が少なくとも１０，０００倍、またはそれ以上）。

【０１２１】

一実施形態では、拡大ステップは、実質的な間質細胞接触の非存在下で単離されたγδＴ細胞を培養することを含む。さらなる実施形態では、実質的な線維芽細胞接触の非存在下で単離されたγδＴ細胞を培養することを含む。

【０１２２】

さらなる実施形態では、拡大ステップは、単離されたγδＴ細胞をＩＬ－４の存在下で培養することをさらに含む。したがって、一実施形態では、拡大は、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、ＩＬ－４、及びＩＬ－２１の存在下で単離されたγδＴ細胞を培養することを含む。あるいは、拡大は、ＩＬ－９、ＩＬ－１５、ＩＬ－４、及びＩＬ－２１の存在下で単離されたγδＴ細胞を培養することを含み得る。

【０１２３】

本明細書で定義される拡大方法は、他のリンパ球（例えば、αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）の拡大にも適用されることが理解されるであろう。そのような実施形態では、拡大ステップは、適切な増殖因子及び／または栄養素（例えば、サイトカイン及び／またはケモカイン）の存在下で単離されたリンパ球を培養して、リンパ球（例えば、αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）の集団を拡大することを含む。

【０１２４】
一実施形態では、本明細書で定義されるγδＴ細胞の集団を拡大する方法は、血清または血漿を含む培地中でγδＴ細胞または他のリンパ球を培養することを含む。代替的な実施形態では、γδＴ細胞または本明細書で定義される他のリンパ球の集団を拡大する方法は、γδＴ細胞を無血清培地で培養することを含む。さらなる実施形態では、γδＴ細胞または本明細書で定義される他のリンパ球の集団を拡大する方法は、γδＴ細胞を血清代替物を含む培地で培養することを含む。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、実質的なＴＣＲ経路の活性化は、拡大ステップ中に存在しない（例えば、外因性ＴＣＲ経路活性化因子は培養物に含まれない）。一実施形態では、拡大ステップは、外因性ＴＣＲ経路アゴニストの非存在を含む。さらに、本明細書では、本明細書で定義される方法に従って単離されたγδＴ細胞を拡大する方法であって、前記拡大方法が、フィーダー細胞、腫瘍細胞、及び／または抗原提示細胞との接触を含まない、方法が提供される。したがって、本明細書で定義される方法のさらなる実施形態では、γδＴ細胞の拡大は、実質的な間質細胞接触の非存在下でγδＴ細胞を培養することを含む。
【０１２６】
非造血組織由来γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の大きな集団を高速で産生する手段（例えば、間質細胞との接触及び／またはＴＣＲ刺激を取り除くことによる、または有効量の因子の存在下で培養することによる）もまた提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡大ステップは、以下の式によって与えられる低い集団倍加時間でγδＴ細胞を拡大する：
【０１２７】
【数１】

$$\text{倍加時間} = \frac{\text{期間} * \log(2)}{\log(\text{最終濃度}) - \log(\text{初期濃度})}$$

【０１２８】
本明細書に提供される情報、を考慮すると、当業者は、本発明が非造血組織由来γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）を５日未満（例えば、４．５日未満、４．０日未満、３．９日未満、３．８日未満、３．７日未満、３．６日未満、３．５日未満、３．４日未満、３．３日未満、３．２日未満、３．１日未満、３．０日未満、２．９日未満、２．８日未満、２．７日未満、２．６日未満、２．５日未満、２．４日未満、２．３日未満、２．２日未満、２．１日未満、２．０日未満、４６時間未満、４２時間未満、３８時間未満、３５時間未満、３２時間未満）の集団倍加時間で拡大する方法を提供することを認識するであろう。
【０１２９】
いくつかの実施形態では、培養の７日以内に、拡大されたγδＴ細胞の集団（例えば、拡大されたＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞の集団）は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０倍の数のγδＴ細胞（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、少なくとも６００倍、少なくとも７００倍、少なくとも８００倍、少なくとも９００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも２，０００倍、少なくとも３，０００倍、少なくとも４，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも６，０００倍、少なくとも７，０００倍、または少なくとも

８，０００倍の数のγδＴ細胞）を含む。いくつかの実施形態では、培養の１４日以内に、拡大されたγδＴ細胞の集団（例えば、拡大されたＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞の集団）は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも２０倍の数のγδＴ細胞（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、少なくとも６００倍、少なくとも７００倍、少なくとも８００倍、少なくとも９００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも２，０００倍、少なくとも３，０００倍、少なくとも４，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも６，０００倍、少なくとも７，０００倍、少なくとも８，０００倍、少なくとも９，０００倍、または少なくとも１０，０００倍の数のγδＴ細胞）を含む。いくつかの実施形態では、培養の２１日以内に、拡大されたγδＴ細胞の集団（例えば、拡大されたＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞の集団）は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも５０倍の数のγδＴ細胞（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、少なくとも６００倍、少なくとも７００倍、少なくとも８００倍、少なくとも９００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも２，０００倍、少なくとも３，０００倍、少なくとも４，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも６，０００倍、少なくとも７，０００倍、少なくとも８，０００倍、少なくとも９，０００倍、または少なくとも１０，０００倍の数のγδＴ細胞）を含む。いくつかの実施形態では、培養の２８日以内に、拡大されたγδＴ細胞の集団（例えば、拡大されたＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞の集団）は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１００倍の数のγδＴ細胞（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１１０倍、少なくとも１２０倍、少なくとも１３０倍、少なくとも１４０倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、少なくとも６００倍、少なくとも７００倍、少なくとも８００倍、少なくとも９００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも２，０００倍、少なくとも３，０００倍、少なくとも４，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも６，０００倍、少なくとも７，０００倍、少なくとも８，０００倍、少なくとも９，０００倍、少なくとも１０，０００倍、少なくとも１２，０００倍、または少なくとも１５，０００倍の数のγδＴ細胞）を含む。

【０１３０】

本明細書で提供される方法によって拡大された非造血組織由来γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）は、抗腫瘍効果に十分に適した表現型を有することができる。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団（例えば、皮膚由来Ｖδ１Ｔ細胞）は、参照集団（例えば、拡大ステップ前の単離されたγδＴ細胞の集団）よりもＣＤ２７の平均発現が高い。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して少なくとも２倍（例えば、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少なくとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも１５倍、少なくとも２０倍、少なくとも２５倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、少なくとも１００倍、少なくとも１５０倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、少なくとも６００倍、少なくとも７００倍、少なくとも８００倍、少なくとも９００倍、少なくとも１，０００倍、少なくとも５，０００倍、少なくとも１０，０００倍、少なくとも２０，０００倍、またはそれ以上）であるＣＤ２７の平均発現を有する。

【０１３１】
拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団の異なる部分はＣＤ２７を上昇制御する可能性があるが、別の部分はＣＤ２７^{低}またはＣＤ２７^{陰性}である。この場合、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、拡大された集団におけるＣＤ２７^{陽性}細胞の頻度が高くなり得る。例えば、拡大されたγδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも５％高いＣＤ２７^{陽性}細胞の頻度（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または１００％まで高いＣＤ２７^{陽性}の頻度）を有し得る。いくつかの実施形態では、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、拡大された集団中のＣＤ２７^{陽性}細胞の数が増加し得る。例えば、拡大されたγδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも２倍の数のＣＤ２７^{陽性}細胞を有し得る。拡大されたγδＴ細胞の集団は、１０％より大きい、２０％より大きい、３０％より大きい、４０％より大きい、５０％より大きい、６０％より大きい、７０％より大きい、８０％より大きい、または９０％より大きい、ＣＤ２７＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、拡大されたγδＴ細胞の集団は、約１０％、約２０％。約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％、または約９０％のＣＤ２７＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、５０％を超えるＣＤ２７＋細胞の頻度を有する。

【０１３２】
本明細書で提供される拡大方法は、いくつかの実施形態では、参照集団（例えば、拡大ステップ前の単離されたγδＴ細胞の集団）と比較して、ＴＩＧＩＴの低い発現を有する拡大された非造血組織由来γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団をもたらす。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、参照集団（例えば、拡大ステップ前の単離されたγδＴ細胞の集団）よりもＴＩＧＩＴの平均発現が低い。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、単離されたγδＴ細胞の集団よりも少なくとも１０％少ない（例えば、単離されたγδＴ細胞の集団よりも、少なくとも２０％少ない、少なくとも３０％少ない、少なくとも４０％少ない、少なくとも５０％少ない、少なくとも６０％少ない、少なくとも７０％少ない、少なくとも８０％少ない、少なくとも９０％少ない、または１００％まで少ない）ＴＩＧＩＴの平均発現を有する。拡大されたγδＴ細胞の集団は、９０％未満、８０％未満、７０％未満、６０％未満、５０％未満、４０％未満、３０％未満、２０％未満、または１０％未満のＴＩＧＩＴ＋細胞の頻度を有し得る。代替的に、拡大されたγδＴ細胞の集団は、約９０％、約８０％、約７０％、約６０％、約５０％、約４０％、約３０％、約２０％、または約１０％のＴＩＧＩＴ＋細胞の頻度を有し得る。特定の実施形態では、単離されたγδＴ細胞の集団は、８０％未満のＴＩＧＩＴ＋細胞の頻度を有する。

【０１３３】
いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団は、多くの数または高い頻度のＣＤ２７$^{+}$細胞と低い頻度のＴＩＧＩＴ$^{+}$細胞を有する。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、参照集団と比較して（例えば、拡大前のγδＴ細胞の単離集団と比較して）、高頻度のＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$細胞を有する。例えば、拡大されたγδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも５％高いＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$細胞の頻度（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、

少なくとも９０％、または１００％まで高いＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$の頻度）を有し得る。いくつかの実施形態では、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、拡大された集団中のＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$細胞の数が増加し得る。例えば、拡大されたγδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも２％倍の数のＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$細胞（例えば、拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または１００％まで高いＣＤ２７$^{+}$ＴＩＧＩＴ$^{-}$の頻度）を有し得る。

【０１３４】

場合によっては、拡大されたγδＴ細胞におけるＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団でのＴＩＧＩＴの平均発現は、参照集団と比較して低い。いくつかの実施形態では、拡大されたＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞の集団は、参照集団（例えば、拡大ステップ前の単離されたＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞の集団）よりもＴＩＧＩＴの平均発現が低い。いくつかの実施形態では、拡大されたＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞の集団は、単離されたＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞の集団よりも少なくとも１０％少ない（例えば、単離されたＣＤ２７$^{+}$γδＴ細胞の集団よりも、少なくとも２０％少ない、少なくとも３０％少ない、少なくとも４０％少ない、少なくとも５０％少ない、少なくとも６０％少ない、少なくとも７０％少ない、少なくとも８０％少ない、少なくとも９０％少ない、または１００％まで少ない）ＴＩＧＩＴの平均発現を有する。

【０１３５】

追加的にまたは代替的に、拡大されたγδＴ細胞におけるＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団でのＣＤ２７の発現中央値は、参照集団と比較して高い。例えば、拡大されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも５％高いＣＤ２７$^{+}$細胞の頻度（例えば、拡大前の単離されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または１００％まで高いＣＤ２７$^{+}$の頻度）を有し得る。いくつかの実施形態では、単離されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団と比較して、拡大された集団中のＣＤ２７$^{+}$細胞の数が増加し得る。例えば、拡大されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団は、拡大前の単離されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも２倍の数ＣＤ２７$^{+}$細胞（例えば、拡大前の単離されたＴＩＧＩＴ$^{-}$γδＴ細胞の集団と比較して、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、または１００％まで高いＣＤ２７$^{+}$の頻度）を有し得る。

【０１３６】

ＣＤ１２４、ＣＤ２１５、ＣＤ３６０、ＣＴＬＡ４、ＣＤ１ｂ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３９、ＣＤ４５ＲＡ、Ｆａｓリガンド、ＣＤ２５、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ３１、ＫＬＲＧ１、ＣＤ３０、ＣＤ２、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＩＣＡＭ－２、ＣＤ７０、ＣＤ２８、ＣＤ１０３、ＮＫｐ３０、ＬＡＧ３、ＣＣＲ４、ＣＤ６９、ＰＤ－１、及びＣＤ６４を含む他のマーカーの発現の増加または減少は、拡大された非造血組織由来γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団のうちの１つ以上を特徴づけるのに追加的にまたは代替的に使用できる。場合によっては、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の集団は、例えば拡大前の単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、ＣＤ１２４、ＣＤ２１５、ＣＤ３６０、ＣＴＬＡ

４、ＣＤ１ｂ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３９、ＣＤ４５ＲＡ、Ｆａｓリガンド、ＣＤ２５、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ３１、ＫＬＲＧ１、ＣＤ３０、及びＣＤ２からなる群から選択されるマーカーの１つ以上のより高い平均発現を有する。付加的にまたは代替的に、拡大されたγδＴ細胞の集団は、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、ＣＤ１２４、ＣＤ２１５、ＣＤ３６０、ＣＴＬＡ４、ＣＤ１ｂ、ＢＴＬＡ、ＣＤ３９、ＣＤ４５ＲＡ、Ｆａｓリガンド、ＣＤ２５、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ３１、ＫＬＲＧ１、ＣＤ３０、及びＣＤ２からなる群から選択されるマーカーの１つ以上を発現する細胞のより高い頻度を有し得る。いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞の集団は、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＩＣＡＭ－２、ＣＤ７０、ＣＤ２８、ＣＤ１０３、ＮＫｐ３０、ＬＡＧ３、ＣＣＲ４、ＣＤ６９、ＰＤ－１、及びＣＤ６４からなる群から選択されるマーカーの１つ以上のより低い平均発現を有する。拡大された集団は、単離されたγδＴ細胞の集団と比較して、ＮＫｐ４４、ＮＫｐ４６、ＩＣＡＭ－２、ＣＤ７０、ＣＤ２８、ＣＤ１０３、ＮＫｐ３０、ＬＡＧ３、ＣＣＲ４、ＣＤ６９、ＰＤ－１、及びＣＤ６４からなる群から選択されるマーカーの１つ以上を発現する細胞のより低い頻度を有し得る。

【０１３７】

γδＴ細胞の培養及び／または増殖での使用に適した数多くの基礎培地は、ＡＩＭ－Ｖ、Ｉｓｃｏｖｅｓ培地、及びＲＰＭＩ－１６４０（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）などの特定の培地で利用できる。培地には、血清、血清タンパク質、及び抗生物質などの選択剤など、本明細書で定義される他の培地因子を補充することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ＲＰＭＩ－１６４０培地は、２ｍＭグルタミン、１０％ＦＢＳ、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．２、１％ペニシリン－ストレプトマイシン、ピルビン酸ナトリウム（１ ｍＭ；Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、非必須アミノ酸（例えば、１００μＭのＧｌｙ、Ａｌａ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ、Ｐｒｏ、及びＳｅｒ；１×ＭＥＭ非必須アミノ酸（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））、ならびに１０μｌ／Ｌのβ－メルカプトエタノールを含む。代替的な実施形態では、ＡＩＭ－Ｖ培地にＣＴＳ免疫血清代替物及びアンホテリシンＢを補充することができる。本明細書で定義される特定の実施形態では、培地にＩＬ－２及びＩＬ－１５をさらに補充することができる。便利なことに、細胞は単離及び／または拡大の間に適切な培地中で、３７℃において、５％CO_2を含む加湿雰囲気で培養される。

【０１３８】

本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からリンパ球を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からリンパ球の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記リンパ球の集団を（例えば、少なくとも５日間）さらに培養して、拡大されたリンパ球の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【０１３９】

一実施形態では、リンパ球はαβＴ細胞を含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からαβＴ細胞を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からαβＴ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記αβＴ細胞の集団を（例えば少なくとも５日間）さらに培養して、拡大されたαβＴ細胞の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【０１４０】

ステップ（ｉｉ）における培養することは、αβＴ細胞がステップ（ｉ）において単離された集団中に存在する他の細胞型よりも優先的に拡大される培養条件を選択することによるなど、選択的拡大によるものであり得る。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、ステップ（ｉｉ）における培養することの後に、非標的細胞（例えば、αβＴ細胞以外の細胞）の枯渇が続いてもよい。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、非標的細胞（例えば、αβＴ細胞以外の細胞）の枯渇がステップ（ｉｉ）における培養することの前に起きる

。これらの実施形態の目的は、αβＴ細胞の総数を拡大すると同時に、集団におけるそれらの割合を増加させることであることに留意されたい。

【０１４１】

一実施形態では、リンパ球はＮＫ細胞を含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からＮＫ細胞を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からＮＫ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記ＮＫ細胞の集団を（例えば少なくとも５日間）さらに培養して、拡大されたＮＫ細胞の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【０１４２】

ステップ（ｉｉ）における培養することは、ＮＫ細胞がステップ（ｉ）において単離された集団中に存在する他の細胞型よりも優先的に拡大される培養条件を選択することによるなど、選択的拡大によるものであり得る。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、ステップ（ｉｉ）における培養することの後に、非標的細胞（例えば、ＮＫ細胞以外の細胞）の枯渇が続いてもよい。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、非標的細胞（例えば、ＮＫ細胞以外の細胞）の枯渇がステップ（ｉｉ）における培養することの前に起きる。これらの実施形態の目的は、ＮＫ細胞の総数を拡大すると同時に、集団におけるそれらの割合を増加させることであることに留意されたい。

【０１４３】

本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記γδＴ細胞の集団を（例えば少なくとも５日間）さらに培養して、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するステップと、を含む方法が提供される。

【０１４４】

ステップ（ｉｉ）における培養することは、γδＴ細胞がステップ（ｉ）において単離された集団中に存在する他の細胞型よりも優先的に拡大される培養条件を選択することによるなど、選択的拡大によるものであり得る。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、ステップ（ｉｉ）における培養することの後に、非標的細胞（例えば、γδＴ細胞以外の細胞）の枯渇が続いてもよい。代替的に、拡大条件は選択的ではなく、非標的細胞（例えば、γδＴ細胞以外の細胞）の枯渇がステップ（ｉｉ）における培養することの前に起きる。これらの実施形態の目的は、γδＴ細胞の総数を拡大すると同時に、集団におけるそれらの割合を増加させることであることに留意されたい。

【０１４５】

一実施形態では、単離されたリンパ球またはγδＴ細胞の集団を凍結し、次いでステップ（ｉｉ）の前に解凍する。驚くべきことに、凍結された単離された細胞の集団は、少なくとも新鮮な等価物と同様に濃縮及び拡大することがわかっている。特に、本明細書に示されるデータは、解凍後の生存率が良好で、その後の拡大培養中に良好に拡大する能力、すなわちステップ（ｉｉ）において拡大されたγδＴ細胞の集団を効果的に産生する能力を有する単離されたγδＴ細胞が達成されることを示し、単離するステップ（ｉ）は、１５ｎｇ／ｍＬ～２５ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８～２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８、１９、または２０ｎｇ／ｍＬ、例えば、１８．８ｎｇ／ｍＬの濃度のＩＬ－２１、及びＩＬ－１βの存在下で約１９日間、例えば、１９日間、または約２１日間、例えば２１日間、非造血組織試料を培養することを含む。

【０１４６】

一実施形態では、リンパ球はγδＴ細胞を含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡大する方法であって：

（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと；

（ｉｉ）前記γδＴ細胞の集団を、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量の、
（ａ）ＩＬ－２またはＩＬ－９；
（ｂ）ＩＬ１５；及び
（ｃ）ＩＬ－２１、の存在下で、
少なくとも５日間培養するステップと、を含む方法が提供される。

【０１４７】

本発明のこの態様の特定の実施形態では、前記γδＴ細胞の集団を培養することは、ＩＬ－４の存在をさらに含む。したがって、本発明のさらなる態様によれば、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離及び拡大する方法であって：
（ｉ）本明細書で定義される方法に従って、非造血組織試料からγδＴ細胞の集団を単離するステップと；
（ｉｉ）前記γδＴ細胞の集団を、拡大されたγδＴ細胞の集団を産生するのに有効な量の、
（ａ）ＩＬ－２またはＩＬ－９；
（ｂ）ＩＬ１５；及び
（ｃ）ＩＬ－２１；及び
（ｄ）ＩＬ－４、の存在下で、
少なくとも５日間培養するステップと、を含む方法が提供される。

【０１４８】

本発明の一態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得られる単離されたリンパ球の拡大された集団（例えば、皮膚由来αβＴ細胞及び／またはＮＫ細胞）が提供される。

【０１４９】

本発明のさらなる態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得ることのできる単離されたリンパ球の拡大された集団が提供される。

【０１５０】

本発明のなおもさらなる態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得られる単離されたγδＴ細胞の拡大された集団が提供される。

【０１５１】

本発明のなおもさらなる態様によれば、本明細書で定義される方法のいずれかによって得ることのできる単離されたγδＴ細胞の拡大された集団が提供される。

【０１５２】

細胞の用途

本発明の方法によって得られるリンパ球及び／またはγδＴ細胞は、例えば養子Ｔ細胞療法のための医薬として使用することができる。これには、本発明の方法によって得られるリンパ球及び／またはγδＴ細胞の患者への移植が含まれる。治療は自家療法、すなわちγδＴ細胞を、それらを入手した同じ患者に戻す方法、または同種異系療法、すなわちある人からのγδＴ細胞を別の患者に移植する方法がある。同種異系移植を含む場合、γδＴ細胞はαβＴ細胞を実質的に含まなくできる。例えば、αβＴ細胞は、例えば拡大後に、当技術分野で公知の任意の適切な手段を使用して（例えば、磁気ビーズを使用する陰性選択により）、γδＴ細胞の集団から枯渇させることができる。治療方法には、ドナー個体から得られた非造血組織の試料を提供することと；本明細書に記載のように、非造血組織試料からγδＴ細胞を単離することと；単離されたγδＴ細胞を培養して拡大された集団を生成することと；拡大されたγδＴ細胞の集団をレシピエント個体に投与することと、が含まれ得る。

【０１５３】

治療される患者または対象は、好ましくは、ヒトがん患者（例えば、固形腫瘍の治療を受けているヒトがん患者）またはウイルス感染患者（例えば、ＣＭＶ感染またはＨＩＶ感染の患者）である。場合によっては、患者は固形腫瘍を有する、及び／またはその治療中

である。

【０１５４】

それらは通常、非造血組織に常在するため、組織常在性Ｖδ１Ｔ細胞及びＤＮγδＴ細胞は、全身の血液に常在するそれらの対応物よりも腫瘍塊にホーミングして保持される可能性が高く、これらの細胞の養子移入は固形腫瘍及び潜在的に他の非造血組織関連の免疫病理を標的とするのにより効果的である可能性が高い。

【０１５５】

γδＴ細胞は非ＭＨＣ拘束性であるため、移植先の宿主を外来として認識せず、これは移植片対宿主病を引き起こす可能性が低くなることを意味する。これは、例えば、同種異系養子Ｔ細胞療法のために、「既製品」で使用でき、任意のレシピエントに移植できることを意味する。

【０１５６】

本発明の方法によって得られる非造血組織常在性γδＴ細胞は、ＮＫＧ２Ｄを発現し、悪性腫瘍と強く関連するＮＫＧ２Ｄリガンド（例えば、ＭＩＣＡ）に応答する。それらはまた、活性化がいっさいなくても細胞傷害性プロファイルを発現するため、腫瘍細胞を殺傷するのに効果的である可能性が高い。例えば、本明細書に記載のように得られた非造血組織常在γδＴ細胞は、活性化がない場合に、ＩＦＮ－γ、ＴＮＦ－α、ＧＭ－ＣＳＦ、ＣＣＬ４、ＩＬ－１３、グラヌリシン、グランザイムＡ及びＢ、ならびにパーフォリンのうちの１つ以上、好ましくはすべてを発現し得る。ＩＬ－１７Ａは発現し得ない。

【０１５７】

「既製品」の免疫療法試薬として、本発明の方法によって得られる非造血組織常在性γδＴ細胞の臨床応用に対する実用性及び適合性についての説得力のある証拠が存在する。これらの細胞は先天的殺傷作用を有し、ＭＨＣ拘束がなく、他のＴ細胞よりも改善された腫瘍へのホーミング及び／または滞留を示す。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、非造血組織に腫瘍を有する個体を治療する方法は、ドナー個体から得られる前記非造血組織の試料を提供することと、上記のように試料からγδＴ細胞を培養して拡大された集団を生成することと、拡大されたγδＴ細胞の集団を腫瘍を有する個体に投与することと、を含み得る。

【０１５９】

医薬組成物は、１つ以上の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞を含み得る。このような組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化物質；ＥＤＴＡやグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。本発明の医薬組成物に使用できる凍結保存溶液としては、例えばＤＭＳＯが挙げられる。組成物は、例えば静脈内投与用に製剤化することができる。

【０１６０】

一実施形態では、医薬組成物は、例えばエンドトキシンまたはマイコプラズマなどの汚染物質を実質的に含まない、例えば検出可能なレベルが存在しない。

【０１６１】

場合によっては、上記の方法のいずれかによって得られる拡大されたγδＴ細胞の治療有効量を、対象に治療有効量で投与することができる（例えば、がんの治療、例えば固形腫瘍の治療のため）。場合によっては、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の治療有効量は、１用量あたり10×10^{12}細胞未満（例えば、１用量あたり9×10^{12}細胞未満、１用量あたり8×10^{12}細胞未満、１用量あたり7×10^{12}細胞未満、１用量あたり6×10^{12}細胞未満、１用量あたり5×10^{12}細胞未満、１用量あたり4×10^{12}細胞未満、１用量あたり3×10^{12}細胞未満、１用量あたり2×10^{12}細

胞未満、１用量あたり１×１０^{12}細胞未満、１用量あたり９×１０^{11}細胞未満、１用量あたり８×１０^{11}細胞未満、１用量あたり７×１０^{11}細胞未満、１用量あたり６×１０^{11}細胞未満、１用量あたり５×１０^{11}細胞未満、１用量あたり４×１０^{11}細胞未満、１用量あたり３×１０^{11}細胞未満、１用量あたり２×１０^{11}細胞未満、１用量あたり１×１０^{11}細胞未満、１用量あたり９×１０^{10}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{10}細胞未満、１用量あたり５×１０^{10}細胞未満、１用量あたり２．５×１０^{10}細胞未満、１用量あたり１×１０^{10}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{9}細胞未満、１用量あたり５×１０^{9}細胞未満、１用量あたり２．５×１０^{9}細胞未満、１用量あたり１×１０^{9}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{8}細胞未満、１用量あたり５×１０^{8}細胞未満、１用量あたり２，５×１０^{8}細胞未満、１用量あたり１×１０^{8}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{7}細胞未満、１用量あたり５×１０^{7}細胞未満、１用量あたり２，５×１０^{7}細胞未満、１用量あたり１×１０^{7}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{6}細胞未満、１用量あたり５×１０^{6}細胞未満、１用量あたり２，５×１０^{6}細胞未満、１用量あたり１×１０^{6}細胞未満、１用量あたり７．５×１０^{5}細胞未満、１用量あたり５×１０^{5}細胞未満、１用量あたり２．５×１０^{5}細胞未満、または１用量あたり１×１０^{5}細胞未満）である。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、拡大されたγδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の治療有効量は、治療の過程わたって１０×１０^{12}細胞未満（例えば、治療の過程にわたって、９×１０^{12}細胞未満、８×１０^{12}細胞未満、７×１０^{12}細胞未満、６×１０^{12}細胞未満、５×１０^{12}細胞未満、４×１０^{12}細胞未満、３×１０^{12}細胞未満、２×１０^{12}細胞未満、１×１０^{12}細胞未満、９×１０^{11}細胞未満、８×１０^{11}細胞未満、７×１０^{11}細胞未満、６×１０^{11}細胞未満、５×１０^{11}細胞未満、４×１０^{11}細胞未満、３×１０^{11}細胞未満、２×１０^{11}細胞未満、１×１０^{11}細胞未満、９×１０^{10}細胞未満、７．５×１０^{10}細胞未満、５×１０^{10}細胞未満、２．５×１０^{10}細胞未満、１×１０^{10}細胞未満、７．５×１０^{9}細胞未満、５×１０^{9}細胞未満、２．５×１０^{9}細胞未満、１×１０^{9}細胞未満、７．５×１０^{8}細胞未満、５×１０^{8}細胞未満、２，５×１０^{8}細胞未満、１×１０^{8}細胞未満、７．５×１０^{7}細胞未満、５×１０^{7}細胞未満、２，５×１０^{7}細胞未満、１×１０^{7}細胞未満、７．５×１０^{6}細胞未満、５×１０^{6}細胞未満、２，５×１０^{6}細胞未満、１×１０^{6}細胞未満、７．５×１０^{5}細胞未満、５×１０^{5}細胞未満、２．５×１０^{5}細胞未満、または１×１０^{5}細胞未満）である。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞の用量は、１ｋｇあたり、約１×１０^{6}、１．１×１０^{6}、２×１０^{6}、３．６×１０^{6}、５×１０^{6}、１×１０^{7}、１．８×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、または５×１０^{8}の細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の用量は、１ｋｇあたり、少なくとも約１×１０^{6}、１．１×１０^{6}、２×１０^{6}、３．６×１０^{6}、５×１０^{6}、１×１０^{7}、１．８×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、または５×１０^{8}の細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の用量は、１ｋｇあたり、約１×１０^{6}、１．１×１０^{6}、２×１０^{6}、３．６×１０^{6}、５×１０^{6}、１×１０^{7}、１．８×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、または５×１０^{8}までの細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の用量は、１ｋｇあたり、約１．１×１０^{6}～１．８×１０^{7}の細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例

えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の用量は、約１×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、５×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、または５×１０^{9}の細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）の用量は、少なくとも約１×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、５×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、または５×１０^{9}の細胞を含む。いくつかの実施形態では、拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮＴ細胞）の用量は、約１×１０^{7}、２×１０^{7}、５×１０^{7}、１×１０^{8}、２×１０^{8}、５×１０^{8}、１×１０^{9}、２×１０^{9}、または５×１０^{9}までの細胞を含む。

【０１６４】

一実施形態では、対象は、対象の体重１ｋｇあたり、１０^{4}～１０^{6}の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞（例えば、皮膚由来γδＴ細胞及び／または非Ｖδ２Ｔ細胞、例えばＶδ１Ｔ細胞及び／またはＤＮ　Ｔ細胞）を投与される。一実施形態では、対象は、非造血組織常在性γδＴ細胞の集団の初回投与（例えば、対象の体重１ｋｇあたり１０^{4}～１０^{6}のγδＴ細胞、例えば、対象の体重１ｋｇあたり１０^{4}～１０^{5}のγδＴ細胞の初期投与）を受け、１回以上（例えば、２、３、４、または５回）のその後の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞の投与（例えば、対象の体重１ｋｇあたり１０^{4}～１０^{6}の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞、例えば、対象の体重１ｋｇあたり１０^{4}～１０^{5}個の拡大された非造血組織常在性γδＴ細胞の１回以上のその後の投与）を投与される。一実施形態では、１回以上のその後の投与は、前回の投与から１５日未満、例えば、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、または２日後、例えば、前回の投与から４、３、または２日未満で投与される。一実施形態では、対象は、γδＴ細胞の集団の少なくとも３回の投与の過程にわたって、対象の体重１ｋｇあたり合計約１０^{6}のγδＴ細胞を投与され、例えば、対象は、１×１０^{5}のγδＴ細胞の初回投与、３×１０^{5}のγδＴ細胞の２回目の投与、及び６×１０^{5}のγδＴ細胞の３回目の投与を投与され、例えば、それぞれの投与は、前回の投与の後、４、３、または２日未満で投与される。

【０１６５】

本発明の方法によって得られる非造血組織常在性γδＴ細胞はまた、ＣＡＲ－Ｔ療法などの治療特性を増強するために遺伝子操作されてもよい。これには、Ｔ細胞を新しい特異性、例えばモノクローナル抗体の特異性で再プログラムする操作されたＴ細胞受容体（ＴＣＲ）の生成が含まれる。操作されたＴＣＲは、Ｔ細胞を悪性細胞に特異的にすることができ、したがってがん免疫療法に有用である。例えば、Ｔ細胞は、対象の組織からの正常な体細胞によって発現されない腫瘍関連抗原などの腫瘍抗原を発現するがん細胞を認識し得る。したがって、ＣＡＲ改変Ｔ細胞は、例えばがん患者の養子Ｔ細胞療法に使用することができる。

【０１６６】

ＣＡＲのための血液常在性γδＴ細胞の使用が記載されている。しかしながら、本発明の方法によって得られる非造血組織常在性γδＴ細胞は、形質転換細胞を認識し、血液常在性γδＴ細胞または従来の全身性αβＴ細胞よりも優れた腫瘍浸透及び保持能力を有する可能性があるため、ＣＡＲ－Ｔアプローチの特に優れたビヒクルである可能性が高い。さらに、ＭＨＣ依存性抗原提示の欠如により、移植片対宿主病の可能性が減少し、低レベルのＭＨＣを発現する腫瘍を標的とすることができる。同様に、例えばＣＤ２８の結合を介した従来の共刺激への非依存性は、共刺激受容体に対する低レベルのリガンドを発現する腫瘍の標的化を強化する。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、１つ以上の追加の治療剤を対象に投与することができる。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、免疫療法剤、細胞毒性剤、増殖阻害剤、放射線療法剤、抗血管新生剤、またはそれらの２つ以上の剤の組み合わせからなる群から選択さ

れ得る。追加の治療剤は、拡大されたγδＴ細胞の投与と同時、その前、またはその後に投与することができる。追加の治療剤は、対象の体内の標的（例えば、対象自身の免疫系）及び／または移植されたγδＴ細胞に作用し得る免疫治療剤であってもよい。

【０１６８】

組成物の投与は、任意の便利な方法で行うことができる。本明細書に記載の組成物は、経動脈的に、皮下に、皮内に、腫瘍内に、結節内に、髄内に、筋肉内に、静脈内注射により、または例えば皮内もしくは皮下注射により腹腔内に、患者に投与され得る。非造血組織常在性γδＴ細胞の組成物は、腫瘍、リンパ節、または感染部位に直接注射され得る。

【０１６９】

本明細書に記載のすべての実施形態は、本発明のすべての態様に適用できることが理解されるであろう。

【０１７０】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、指定された値より１０％大きいもの及び１０％小さいものを含み、好適には指定された値より５％大きいもの及び５％小さいものを含み、特に指定された値を含む。「～の間」という用語には、指定された境界の値が含まれる。

【０１７１】

ここで、本発明の特定の態様及び実施形態を、例として、及び上記の図面を参照して説明する。

【実施例】

【０１７２】

実施例１．方法及び材料

特に明記しない限り、以下の方法を利用して、後続の実施例の結果を得た。

【０１７３】

材料

実験条件で使用される材料の供給源を、表１に要約する。

【０１７４】

【表１】

表１．研究で使用した材料

試薬	供給者
ＡＩＭ－Ｖ	Ｆｉｓｈｅｒ
ＣＴＳ免疫血清代替物	Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ
ヒト血清アルブミン	Ｓｉｇｍａ―Ａｌｄｒｉｃｈ
ヒト血漿	Ｍｅｒｃｋ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ Ｌｔｄ.
ヒトＩＬ－２、プレミアムグレード	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ
ヒトＩＬ－１５、プレミアムグレード	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ
ヒトＩＬ－４、プレミアムグレード	Ｍｉｌｔｅｎｙｉ
ヒトＩＬ－２１	Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ
ヒトＩＦＮ－γ	Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ
ヒトＩＬ－１β	Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ

【０１７５】
実験計画法モデリング
実験計画法（ＤｏＥ）は、ＪＭＰソフトウェア１５．０を使用して生成された。ＤｏＥカスタムデザインを適用して、タンパク質源、ＩＬ－１β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１、及びＩＬ－４がγδＴ細胞濃縮などの定義された結果に及ぼす影響を分析する実験を作成した。タンパク質源はカテゴリ変数として扱われ、ＩＬ－１β、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２１、及びＩＬ－４は連続変数として扱われた。さらに、ＪＭＰスクリプトを使用して、ＩＬ－４のみを含む実験条件を禁止した。
【０１７６】
階乗から次数２の設計を適用して、線形及び２次の相互作用を決定できるようにした（例えば、ＩＬ－２１＊　ＩＬ－１β）。実験的テストのために、２１の条件の設計が採用された。
【０１７７】
実験データの収集時に、応答の読み出しとしてのγδＴ細胞％に基づくスチューデント化された残差の計算によって外れ値の除去が適用された。γδＴ細胞％についての、４を超えるか、または４未満のスチューデント化された残差を生成するいずれの行も分析から除外された。８４行のうち合計７行が除外された。
【０１７８】
外れ値を除去した後、それぞれのドナーからの特定の応答の値に基づいて、標準の最小二乗フィッティングを特定の応答に適用した。ドナーの変動を考慮して、ドナーＩＤをスタンドアロン変数として最小二乗フィッティングモデルに追加した。γδＴ細胞％またはＴＩＧＩＴ＋γδＴ細胞％などの選択した結果に関連するタンパク質源とサイトカイン相互作用のｐ値は、ｐ＜０．０５を有する相互作用のみが残るまで段階的な方法で排除された。
【０１７９】
単離の設定及び収集
試料が到着する前に、関連する培地が準備され、２０ｍｍ×１．５ｍｍのカーボンマトリックス（「グリッド」）（Ｃｙｔｏｍａｔｒｉｘ　Ｐｔｙ　Ｌｔｄ，ＡｕｓｔｒａｌｉａまたはＵｌｔｒａｍｅｔ，ＵＳＡ）がオートクレーブされる。次いで、グリッドをリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）ですすぎ、使用するまでＰＢＳに沈める。
【０１８０】
器官型皮膚培養の調製
ピンセット、ハサミ、外科用メスを使用して皮下脂肪を除去することにより、皮膚試料を調製する。一度に１片の組織を採取し、３ｍｍの生検パンチを使用して複数のパンチを作成する。それぞれのグリッドに３つの組織パンチが配置される。
【０１８１】
Ｇ－ＲＥＸ６（Ｗｉｌｓｏｎ　Ｗｏｌｆ）のウェルごとに１つのグリッドが配置される。それぞれのウェルは、５ｍｌの関連基本培地と５ｍｌの２×関連条件培地で満たされる（１×関連条件培地１０ｍｌになる）。１００μＬのアンホテリシンＢ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）をそれぞれのウェルに添加する（結果として１％のアンホテリシンＢ）。プレートを３７℃、５％CO_2で２１日間インキュベートする。７日目と１４日目に、１０ｍｌの２×関連培地をそれぞれのウェルに静かに添加することにより、培養物に供給する。
【０１８２】
単離収穫
マトリックスが除去される。ピペットを使用して細胞をそれぞれのウェルに再懸濁し、遠心管に移す。ウェルをＰＢＳで洗浄し、洗浄液も遠心管に移す。次いで、単離された細胞は、例えば細胞計数のために、またはフローサイトメトリー分析において、続いて分析され得る。
【０１８３】

単離細胞の凍結

単離された細胞が分析されると、細胞懸濁液を遠心分離機でスピンダウンする。上清を廃棄し、細胞ペレットをＣｒｙｏｓｔｏｒ１０細胞凍結溶液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）に再懸濁して、１ｍｌ当たり１００×１０^{6}細胞の最終濃度にする。次いで、細胞懸濁液を凍結バイアルに移し、冷却セルまたはＭｒ　Ｆｒｏｓｔｙ凍結ユニット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に入れ、－８０℃の冷凍庫に一晩置く。翌日、細胞を液体窒素貯蔵庫（気相）に移す。

【０１８４】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーは、次の抗体－蛍光色素コンジュゲートを使用して実行された：

ａ）バッチリリースパネル：ＣＤ４５－ＦＩＴＣ、ＣＤ２５－ＰＥ、ＰＡＮαβ－ＰｅｒＣＰ　Ｖｉｏ７００、ＮＫＧ２Ｄ－ＰＥＶｉｏ７７０、Ｖδ１－Ｖｉｏｂｌｕｅ、ＰＡＮγδ－ＡＰＣ。

ｂ）機能パネル：ＣＤ４５ＲＡ－ＦＩＴＣ、ＴＩＧＩＴ－ＰＥ、ＰＡＮαβ－ＰｅｒＣＰ　Ｖｉｏ７００、ＮＫＧ２Ａ－ＰＥＶｉｏ７７０、Ｖδ１－Ｖｉｏｂｌｕｅ、ＰＤ１－ＢＶ５１０、ＰＡＮγδ－ＡＰＣ。

【０１８５】

市販の抗体は、ＢｉｏｌｅｇｅｎｄまたはＭｉｌｔｅｎｙｉから購入した。生細胞識別色素（ｅＦｌｕｏｒ７８０）は、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手した。フローサイトメトリーデータ解析は、ＦＬＯＷＪＯ（バージョン　１０．６．２）で実行された。

【０１８６】

総細胞数の決定

総細胞数は、ＮＣ－２５０　Ｎｕｃｌｅｏｃｏｕｎｔｅｒ（Ｃｈｅｍｏｍｅｔｅｃ，Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ　Ｄｅｎｍａｒｋ）及び製造者の使用説明書を使用して得られた。

【０１８７】

実施例２．単離最適化実験

非造血組織試料からγδＴ細胞を単離するためのプロトコールの最適化を調査して、γδＴ細胞の収量を改善し、単離時のＶδ１Ｔ細胞の品質を潜在的に改善した。出発物質を改善することは、その後の拡大ステップでの収量と品質を改善するのに役立つ。

【０１８８】

実験計画法（ＤｏＥ）では、さまざまなタンパク質源とサイトカインが皮膚単離培養に及ぼす影響を調査した。実行可能な設計を行うために、培地の種類、ＩＬ－１５濃度、及びＩＬ－２濃度を一定に保った。ＩＬ－２１、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１βのさまざまな組み合わせが調査された。ＩＬ－２１、ＩＦＮ－γ、またはＩＬ－１βが存在する場合のみであるが、ＩＬ－４の添加も調査した。

【０１８９】

すべての細胞は、５％血清代替物（ＳＲ）、２．５％同種異系血漿、または１０％同種異系ＡＢ男性血清のいずれかを含むＡＩＭ－Ｖ培地サプリメント中で単離された。すべての培養物は、ＩＬ－２及びＩＬ－１５で設定され、ＩＬ－４、ＩＬ－２１、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－１βのさまざまな組み合わせが補充された。試験された培養条件を表２に要約する。

【０１９０】

【表２－１】

表２．試験された実験条件の要約

実行	タンパク質	ＩＬ－１５（U／mL）	ＩＬ－２（U／mL）	ＩＬ－２１（U／mL）	ＩＦＮ－γ（U／mL）	ＩＬ－１ｂ（U／mL）	ＩＬ－４（U／mL）
１	血漿（２．５％）	６００	１３８	１．０５	０	０	９５
２	ＳＲ（５％）	６００	１３８	１．０５	４２０	４５００	０
３	ＳＲ（５％）	６００	１３８	０	０	４５００	０
４	ＡＢ（１０％）	６００	１３８	０	４２０	０	０
５	ＡＢ（１０％）	６００	１３８	１．０５	０	０	９５
６	ＡＢ（１０％）	６００	１３８	０	０	４５００	９５
７	血漿（２．５％）	６００	１３８	１．０５	４２０	４５００	９５
８	ＡＢ（１０％）	６００	１３８	１．０５	４２０	４５００	９５
９	血漿（２．５％）	６００	１３８	０	４２０	４５００	０
１０	ＳＲ（５％）	６００	１３８	１．０５	０	０	０
１１	ＳＲ（５％）	６００	１３８	０	４２０	０	０
１２	ＡＢ（１０％）	６００	１３８	１．０５	０	４５００	０
１３	ＳＲ（５％）	６００	１３８	１．０５	４２０	０	９５
１４	血漿（２．５％）	６００	１３８	０	０	４５００	９５
１５	血漿（２．５％）	６００	１３８	１．０５	４２０	０	０
１６	ＳＲ（５％）	６００	１３８	０	４２０	４５００	９５
１７	血漿（２．５％）	６００	１３８	０	４２０	０	９５
１８	血漿（２．５％）	６００	１３８	０	０	０	０

【０１９１】

【表２－２】

実行	タンパク質	ＩＬ－１５（U／mL）	ＩＬ－２（U／mL）	ＩＬ－２１（U／mL）	ＩＦＮ－γ（U／mL）	ＩＬ－１ｂ（U／mL）	ＩＬ－４（U／mL）
１９	血漿（２．５％）	６００	１３８	１．０５	０	４５００	０
２０	ＳＲ（５％）	６００	１３８	１．０５	０	４５００	９５
２１	ＳＲ（５％）	６００	１３８	１．０５	０	０	９５
ＳＴＤ ＩＳＯ	ＳＲ（５％）	６００	１３８	０	０	０	０

培養条件による結果を図１～１０に示す。

【０１９２】

サイトカイン

ＩＬ－１βの使用は、特に血漿及びＡＢ血清の単離に関連して、単離されたγδＴ細胞の全体的な収量及び単離されたＶδ１Ｔ細胞の全体的な収量を増加させる効果があった。すべての条件に対するγδＴ細胞％及び総γδＴ細胞を図１に示し、Ｖδ１Ｔ細胞％及び総Ｖδ１Ｔ細胞を図２に示す。

【０１９３】

ＩＬ－４をＡＢ血清に添加すると、グリッドあたりの単離される細胞の総数が増加する効果があった（図３）。血漿単離された培養では、より穏やかな増加が見られた。

【０１９４】

血漿、ＳＲ、またはＡＢ血清の試料へのＩＬ－４の添加は、培養物におけるγδ濃縮％が増加する効果があった（図４）。

【０１９５】

ＩＬ－４を血漿培養物に添加すると、グリッドあたりの単離されるＶδ１細胞の総数が増加する効果があった（図５）。同じ効果は、ＳＲまたはヒトＡＢ血清の培養物では観察されなかった。しかしながら、ＡＢ血清を使用すると、対照と比較して、グリッドあたりの単離された　Ｖδ１細胞の総数が増加した。

【０１９６】

ＩＬ－２１をＡＢ血清培養物に添加すると、単離されたγδＴ細胞の総数が増加する効果があった。しかしながら、ＩＬ－２１の利点は、血漿またはＳＲで単離された培養物では見られなかった。ＩＬ－１β及びＩＦＮ－γを含む血漿中のそれぞれのドナーについてのγδＴ細胞％のＤｏＥモデリングは、ＩＦＮ－γ及びＩＬ－２１が存在しない場合にＩＬ－１βが最も有益であることを示している。

【０１９７】

表現型分析

ＩＬ－４をＡＢ血清と血漿の培養物の両方に添加すると、Ｖδ１Ｔ細胞上のＮＫＧ２ＡとＣＤ４５ＲＡの両方の発現を減少させる効果があった（図６）。

【０１９８】

ＳＲを使用すると、Ｖδ１Ｔ細胞上のチェックポイント阻害剤マーカーＴＩＧＩＴの発現が、血漿とＡＢ血清の単離培養の両方と比較して増加した（図７）。

【０１９９】

分析はまた、ＳＲの使用により、血漿とＡＢ血清の両方と比較して、Ｖδ１Ｔ細胞上の

最終分化マーカーＣＤ４５ＲＡ及び抑制性受容体ＮＫｐ４４の発現が増加することを示した（データ示さず）。

【０２００】

タンパク質源

培養物における血漿とＡＢ血清の両方の使用は、ＳＲ培養単離と比較して、グリッドあたりのＶδ１Ｔ細胞の総数を増加させる効果がある（図８）。しかしながら、ＤｏＥモデリングは、ＳＲ単離試料へのＩＦＮ－γの添加により、単離されたγδＴ細胞の総数が増加することを示した。

【０２０１】

ＳＲを使用すると、タンパク質源としての血漿またはＡＢ血清と比較して、単離された細胞の全体的な生存率が低下するようにも見える（図９）。

【０２０２】

その他のリンパ球

ＴＣＲ陰性細胞（すなわち、αβ－ＴＣＲ及びγδ－ＴＣＲが陰性である細胞）の生成についても条件を調べた。タンパク質源としてＳＲを使用すると、血漿またはＡＢ血清と比較してＴＣＲ陰性細胞の数が増加する（図１０）。ＩＦＮ－γが存在しない条件でも、ＴＣＲ陰性細胞数が増加した。

【０２０３】

結論

データは、単離されたγδ細胞の総数を大幅に改善できることを示唆しており、これにより、拡大設定の初期数が増加する可能性をもたらす。グリッドあたりの最高のγδＴ細胞％及び総γδＴ細胞を伴う条件はすべてＩＬ－１βを含んでいた（条件６、８、９、１２及び１４）。標準的な２サイトカイン単離法と比較した上位条件の結果を図１１に示す。

【０２０４】

したがって、ヒトサイトカインと、ヒトＡＢ血清、ヒトプール血漿、または血清代替物のいずれかとの組み合わせを用量設定するＤｏＥアプローチを通じて、ヒトプール血漿（以前の単離培養では血清代替物を使用）とサイトカインＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－１５、及びＩＬ－１β（以前はＩＬ－２及びＩＬ－１５のみを使用）を使用して、ジェネレーション２と呼ばれる皮膚リンパ球単離カクテルが特定された。この新しい増殖カクテルは、元の方法論（現在はジェネレーション１としても知られている）と比較して、単離細胞マトリックス（グリッド）あたりの単離された生存リンパ球の総数を、５０～１００×10^6細胞（以前）から７５～２００×10^6リンパ球に改善した。さらにジェネレーション２は、単離の最後に最大３倍高いγδＴ細胞の存在を示し、一般的に好ましい表現型を示した（例えば、ＣＤ４５ＲＡ及びＮＫＧ２Ａ発現の低下）。

【０２０５】

実施例３．凍結単離株の調査

以前の条件では、多数のγδＴ細胞が得られたが、収穫及び解凍後の生存率は低くなる。単離された細胞が拡大前に凍結された新しい単離及び拡大のプロセスが調査された。単離後、細胞は実施例１に詳述された方法に従って凍結された。その後の拡張ステップでのγδＴ細胞％を図１２に示す。拡大前に凍結された単離された細胞は、少なくとも新鮮な等価物と同様に濃縮及び増殖することが見出された。

【０２０６】

実施例４．単離製剤にＩＬ－２１を含めると、γδＴ細胞の収量を増加させることができる。

ＩＬ－２１の使用を調査して、このサイトカインが単離及びその後の拡大後の全体的なγδＴ細胞収量を増加させることができるかどうかを調べた。全体的なγδＴ細胞含有量を改善すると、その後の拡大でこれらの細胞の大規模な遺伝子操作が可能になるだけでなく、全体的なエフェクター細胞収量が増加し得る。

【０２０７】

単離培養物は、２．５％同種異系血漿を補充したＡＩＭＶ培地を用いてＧＲＥＸ１００Ｍ単位で設定された（詳細については実施例１を参照されたい）。次いで、表３に詳述されているように、培養物にサイトカインを補充した。

【０２０８】

【表３】

表３．単離培養に使用されるサイトカイン条件

	「ＩＬ－２１なし」のバリエーション（ジェネレーション２）	「ＩＬ－２１」バリエーション（１８．８ｎｇ／ｍＬ；ジェネレーション３）
ＩＬ－２（Ｕ／ｍｌ）	１３８	１３８
ＩＬ－４（Ｕ／ｍｌ）	９５	３２
ＩＬ－１５（Ｕ／ｍｌ）	６００	６００
ＩＬ－１β（Ｕ／ｍｌ）	４５００	４５００
ＩＬ－２１（ｎｇ／ｍｌ）	０	１８．８

【０２０９】

１８．８ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１での単離培養を２１日目に採取し、その後の拡大のために凍結保存（凍結）した。次いで細胞を解凍し、ＮＣ２５０自動細胞計数によって細胞生存率を測定し、結果を図１３Ａに示す。解凍時点での細胞の全体的な生存率は、ＩＬ－２１を含むものと含まないものの両方で、最小許容生存率を上回っており、「ＩＬ－２１なし」の培養で８０％を超える平均生存率％であり、「ＩＬ－２１」の培養ではほぼ９０％であった。次いで、単離された細胞を、５％同種異系血漿及び異なるレベルのＩＬ－２１補充（１２．５３、１８．８、３７．５及び１８８ｎｇ／ｍＬ）を含むＩＬ－１５（８０ｎｇ／ｍＬ）を補充したＴｅｘＭＡＣＳ（商標）培地（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ）の存在下で拡大した。１４日間拡大した後、細胞を回収し、図１３Ｂに示すようにフローサイトメトリーを介してγδＴ細胞の濃縮を測定した。拡大後、ＩＬ－２１の存在下で単離された細胞は、拡大に使用されたＩＬ－２１の量とは無関係に、１２．５～１８８．８ｎｇ／ｍＬに匹敵する性能を示し、１４日間の培養過程でのγδＴ細胞の濃縮を実証した。したがって、単離培養物中にＩＬ－２１が存在すると、生存細胞が得られ、γδＴ細胞がその後拡大する能力が維持される。細胞傷害性アッセイにおけるこれらの細胞の拡大後の機能性も確認された。

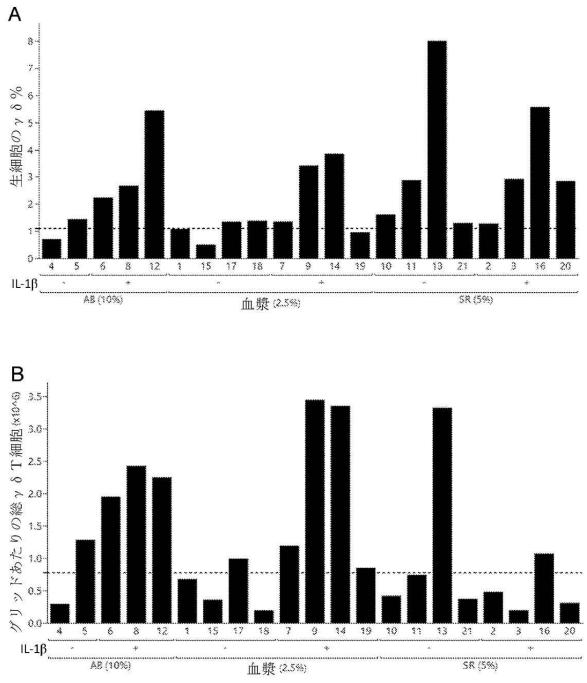
【０２１０】

実施例５．ＩＬ－２１を含まない単離培養物と１８．８ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１を含む単離培養物の比較。

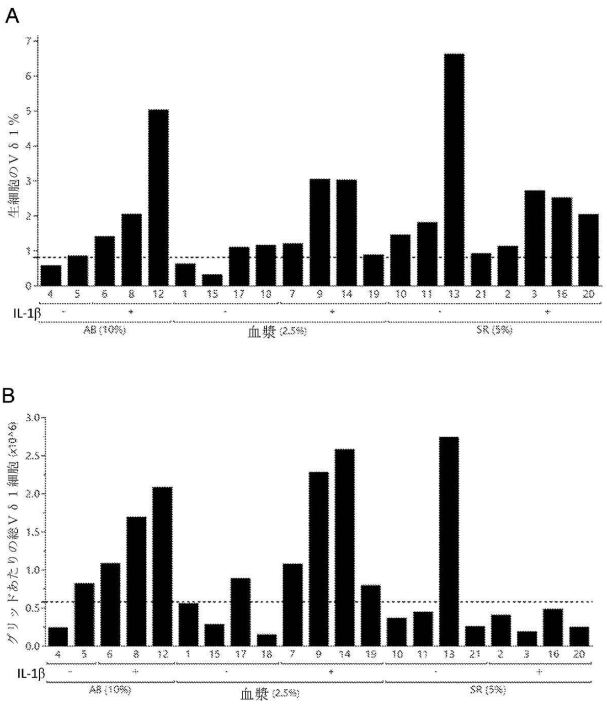
ドナーが一致した皮膚試料は、表３に詳述されるように、「ＩＬ－２１なし」製剤または「ＩＬ－２１」サイトカイン製剤（１８．８ｎｇ／ｍｌ）のいずれかで単離培養物中で設定された。すべての単離培養物は、２．５％の同種異系血漿を添加したＡＩＭＶ培地で設定された（詳細については実施例１を参照されたい）。「ＩＬ－２１なし」単離培養物は１９日目または２１日目のいずれかで採取され、「ＩＬ－２１」単離培養物は１９日目のみで採取された。採取の時点で、培養グリッドあたりの生存細胞の総数、単離培養グリッドあたりの単離されたγδＴ細胞の総数、及び単離培養グリッドあたりのＶδ１Ｔ細胞の総数を記録し、結果を図１４に示す。

【図面】

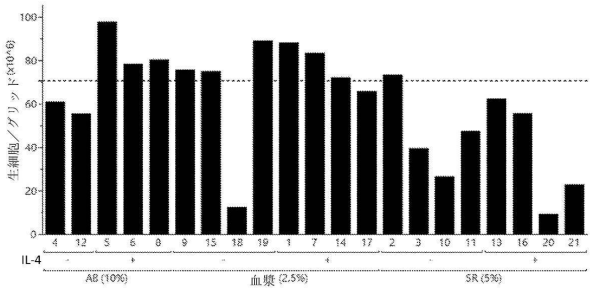
【図１】


A
生細胞のγδ%
IL-1β
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)
B
グリッドあたりの総γδT細胞(×10^6)
IL-1β
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

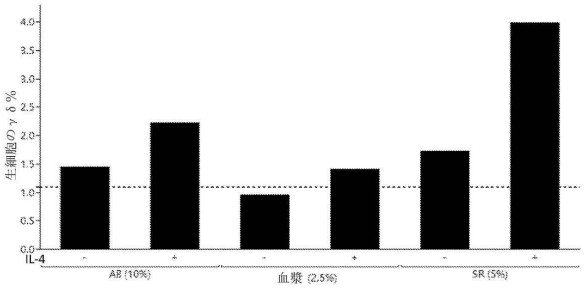
【図２】


A
生細胞のVδ1%
IL-1β
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)
B
グリッドあたりの総Vδ1細胞(×10^6)
IL-1β
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

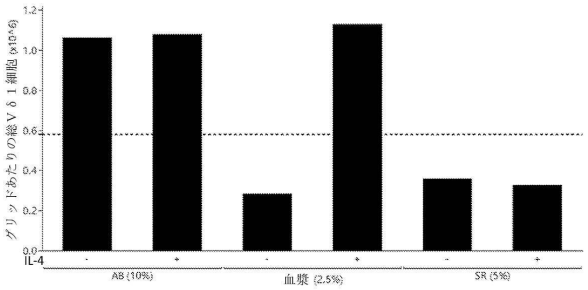
【図３】


生細胞／グリッド(×10^6)
IL-4
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

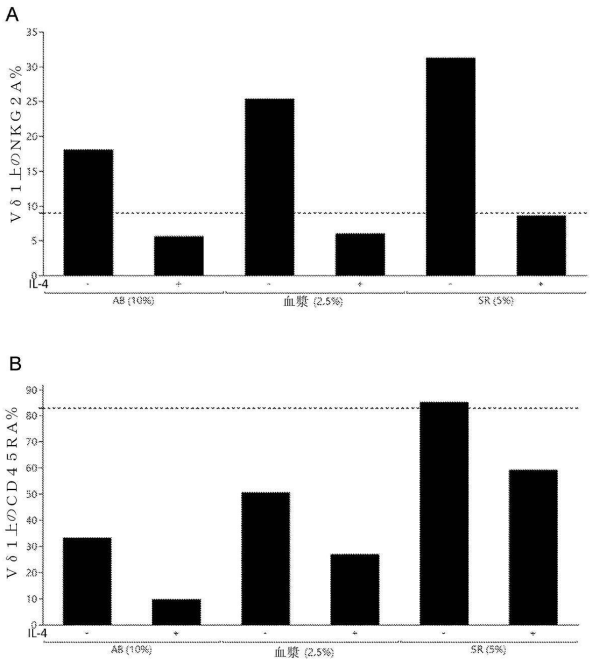
【図４】


生細胞のγδ%
IL-4
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

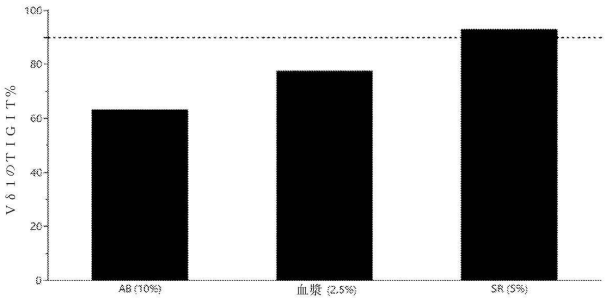
【図５】


グリッドあたりの総Vδ1細胞 (x10^6)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IL-4
- + - + - +
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

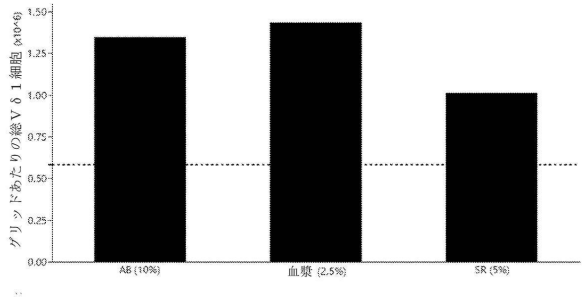
【図６】


A
Vδ1上のNKG2A%
35
30
25
20
15
10
5
0
IL-4
- + - + - +
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)
B
Vδ1上のCD45RA%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IL-4
- + - + - +
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

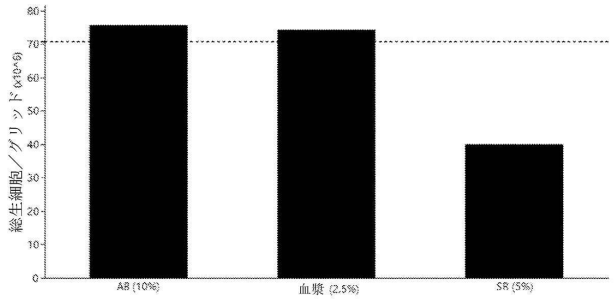
【図７】


Vδ1のTIGIT%
100
80
60
40
20
0
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

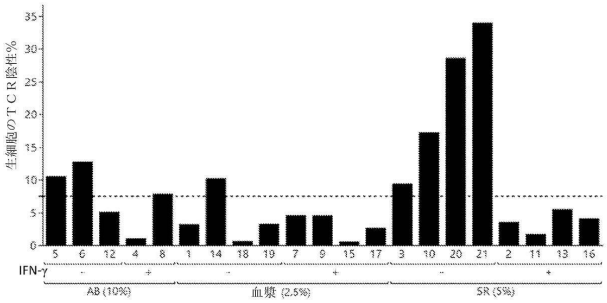
【図８】


グリッドあたりの総Vδ1細胞 (x10^6)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
AB (10%)
血漿 (2.5%)
SR (5%)

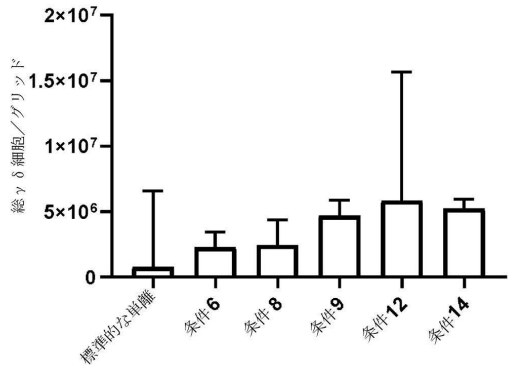
【図９】



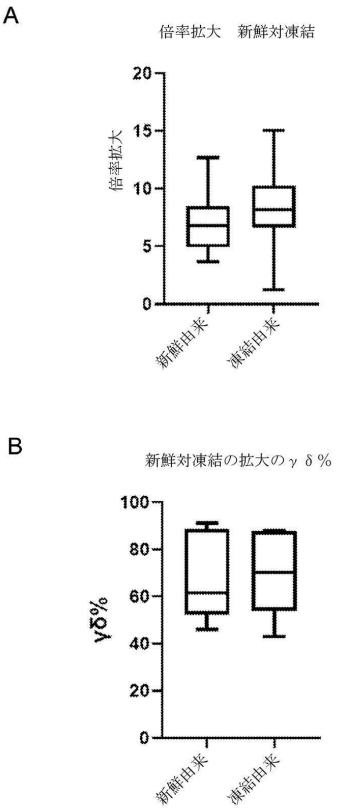
【図１０】



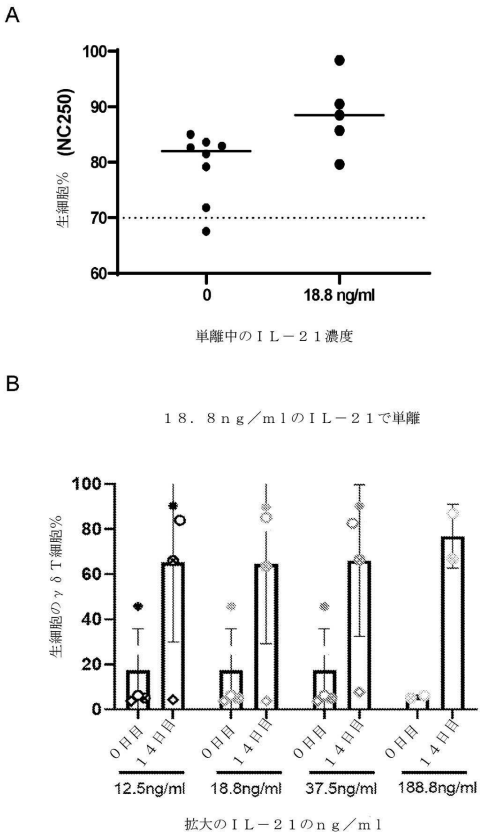
【図１１】



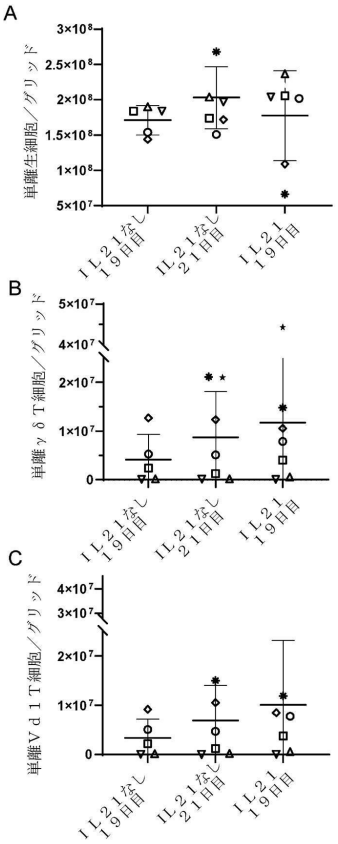
【図１２】



【図１３】


A
生細胞% (NC250)
100
90
80
70
60
0
18.8 ng/ml
単離中のＩＬ－２１濃度
B
１８．８ｎｇ／ｍｌのＩＬ－２１で単離
生細胞のγδＴ細胞%
100
80
60
40
20
0
０日目
１４日目
12.5ng/ml
18.8ng/ml
37.5ng/ml
188.8ng/ml
拡大のＩＬ－２１のｎｇ／ｍｌ

【図１４】


A
単離生細胞／グリッド
3×10⁸
2.5×10⁸
2×10⁸
1.5×10⁸
1×10⁸
5×10⁷
ＩＬ２１なし １９日目
ＩＬ２１なし ２１日目
ＩＬ２１ １９日目
B
単離γδＴ細胞／グリッド
5×10⁷
4×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0
C
単離Ｖｄ１Ｔ細胞／グリッド
4×10⁷
3×10⁷
2×10⁷
1×10⁷
0

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/051144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 C12N5/00 C12N5/071 A61K35/12 A01N1/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RACHAEL A. CLARK ET AL: "A Novel Method for the Isolation of Skin Resident T Cells from Normal and Diseased Human Skin", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 126, no. 5, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 1059-1070, XP055560826, NL ISSN: 0022-202X, DOI: 10.1038/sj.jid.5700199 cited in the application	48,49,52
A	page 1059 - page 1060	1-24, 34-40

X	WO 2018/202808 A2 (KING S COLLEGE LONDON [GB]) 8 November 2018 (2018-11-08) cited in the application	48,49,52
A	page 1; figure 21 page 9; example 3; table 2	1-24, 34-40

	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 July 2021	30/09/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Paresce, Donata

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/051144

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/072367 A1 (CANCER RES TECH LTD [GB]; KING'S COLLEGE LONDON [GB] ET AL.) 4 May 2017 (2017-05-04) cited in the application	48,49,52
A	page 28 - page 30; claims 1-5	1-24, 34-40

X	WO 2017/197347 A1 (ADICET BIO INC [US]) 16 November 2017 (2017-11-16)	48,49,52
A	example 1 page 102 - page 103	1-24, 34-40

X	WO 2019/100023 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 23 May 2019 (2019-05-23)	48,49,52
A	paragraph [[00635]]; figure 3	1-24, 34-40

X	US 2018/207201 A1 (WARDELL SETH [US] ET AL) 26 July 2018 (2018-07-26)	48,49,52
A	figure 1	1-24, 34-40

A	GRAY ELIZABETH E. ET AL: "Cutting Edge: Identification of a Motile IL-17-Producing [gamma][delta] T Cell Population in the Dermis", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 11, 1 June 2011 (2011-06-01) , pages 6091-6095, XP055826576, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1100427 Retrieved from the Internet: URL:https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/186/11/6091.full.pdf> page 6091	1-24, 34-40, 48,49,52

A	MUSCHAWECKH ANDREAS ET AL: "IL-1[beta] and IL-23 Promote Extrathymic Commitment of CD27 + CD122 - [gamma][delta] T Cells to [gamma][delta]T17 Cells", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 199, no. 8, 15 October 2017 (2017-10-15), pages 2668-2679, XP055826577, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1700287 Retrieved from the Internet: URL:https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/199/8/2668.full.pdf> page 2668 - page 2669	1-24, 34-40, 48,49,52

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/051144

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GARGAS SHANNON ET AL: "Isolation and Analysis of Mouse and Human Skin [gamma][delta] T Cells", CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, vol. 127, no. 1, 1 December 2019 (2019-12-01), XP055827057, US ISSN: 1934-3671, DOI: 10.1002/cpim.92 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/cpim.92> the whole document -----	1-24, 34-40, 48,49,52

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2021/051144

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-24, 48, 49(completely); 34-40, 52(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

International Application No. PCT/GB2021/051144

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24, 48, 49(completely); 34-40, 52(partially)

A method for the isolation of lymphocytes or gamma delta T cells from a non-haematopoietic tissue sample comprising the steps of:
(i) culturing the non-haematopoietic tissue sample in the presence of Interleukin-1 beta (IL-1 beta); and
(ii) collecting a population of lymphocytes or gamma delta T cells cultured from the non-haematopoietic tissue sample, as well as the resulting cells thereof.

---

2. claims: 25-33(completely); 34-40, 52(partially)

A method for the isolation of lymphocytes from a non-haematopoietic tissue sample comprising the steps of:(i) culturing the non-haematopoietic tissue sample in media comprising serum replacement, human plasma and/or human AB serum; and (ii) collecting a population of lymphocytes cultured from the non-haematopoietic tissue sample as well as the resulting cells thereof.

---

3. claims: 41-47, 50, 51(completely); 52(partially)

A method of isolation for gamma delta T cells from a non-haematopoietic tissue sample comprising the steps of:
(i) isolating a population of gamma delta T cells from the non-haematopoietic tissue sample; and (ii) freezing the isolated population of gamma delta T cells as well as the frozen gamma delta T cells.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/051144

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018202808 A2	08-11-2018	AU 2018262698 A1	12-12-2019
		BR 112019023076 A2	09-06-2020
		CA 3062386 A1	08-11-2018
		CN 110914410 A	24-03-2020
		EA 201992610 A1	23-04-2020
		EP 3619298 A2	11-03-2020
		JP 2020518289 A	25-06-2020
		KR 20200024770 A	09-03-2020
		PH 12019502485 A1	04-01-2021
		US 2021087528 A1	25-03-2021
		WO 2018202808 A2	08-11-2018
WO 2017072367 A1	04-05-2017	AU 2016344779 A1	14-06-2018
		BR 112018008293 A2	30-10-2018
		CA 3003077 A1	04-05-2017
		CN 108473958 A	31-08-2018
		EP 3368658 A1	05-09-2018
		HK 1253954 A1	05-07-2019
		JP 2018533373 A	15-11-2018
		KR 20180098235 A	03-09-2018
		PH 12018500926 A1	05-11-2018
		RU 2018119684 A	02-12-2019
		US 2018312808 A1	01-11-2018
		WO 2017072367 A1	04-05-2017
WO 2017197347 A1	16-11-2017	AU 2017261804 A1	29-11-2018
		CA 3023993 A1	16-11-2017
		CN 110072533 A	30-07-2019
		EP 3454870 A1	20-03-2019
		JP 2019519210 A	11-07-2019
		KR 20190016960 A	19-02-2019
		US 2019119634 A1	25-04-2019
		WO 2017197347 A1	16-11-2017
WO 2019100023 A1	23-05-2019	AU 2018368786 A1	18-06-2020
		BR 112020009663 A2	10-11-2020
		CA 3082484 A1	23-05-2019
		CN 111601883 A	28-08-2020
		CR 20200251 A	17-07-2020
		EP 3710576 A1	23-09-2020
		JP 2021503281 A	12-02-2021
		KR 20200100060 A	25-08-2020
		PH 12020550642 A1	22-03-2021
		SG 11202004457X A	29-06-2020
		TW 201932594 A	16-08-2019
		US 2020277573 A1	03-09-2020
		WO 2019100023 A1	23-05-2019
US 2018207201 A1	26-07-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/051144

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		WO 2018182817 A1	04-10-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　土井 京子
(74)代理人　100121212
弁理士　田村 弥栄子
(74)代理人　100174296
弁理士　當麻 博文
(74)代理人　100137729
弁理士　赤井 厚子
(74)代理人　100151301
弁理士　戸崎 富哉
(74)代理人　100152308
弁理士　中 正道
(74)代理人　100201558
弁理士　亀井 恵二郎
(72)発明者　ダルジール、マデリーン
イギリス国、ダブリュー１２　７エフキュー ロンドン、ホワイト シティ プレイス、ウッド レーン １９５、ウェストワークス、ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド内
(72)発明者　ハットン、アンドリュー
イギリス国、ダブリュー１２　７エフキュー ロンドン、ホワイト シティ プレイス、ウッド レーン １９５、ウェストワークス、ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド内
(72)発明者　オファレル、ショーン
イギリス国、ダブリュー１２　７エフキュー ロンドン、ホワイト シティ プレイス、ウッド レーン １９５、ウェストワークス、ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド内
(72)発明者　ヌスバウマー、オリヴァー
イギリス国、ダブリュー１２　７エフキュー ロンドン、ホワイト シティ プレイス、ウッド レーン １９５、ウェストワークス、ガンマデルタ セラピューティクス リミティッド内

Ｆターム（参考）　4B065　AA94X BB19 BB23 BC05 BD09 BD12 CA44