(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0010209
(43) 공개일자 2023년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A01N 1/02* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A01N 1/0221 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7041283
(22) 출원일자(국제) 2021년05월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년11월24일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2021/051144
(87) 국제공개번호 WO 2021/229226
국제공개일자 2021년11월18일
(30) 우선권주장
2006989.4 2020년05월12일 영국(GB)

(71) 출원인
감마델타 테라퓨틱스 엘티디
영국 런던 킹덤 스트리트 1 (우: 더블유2 6비디)
(72) 발명자
달지엘, 매들린
영국 더블유12 7에프큐 런던 화이트 시티 플레이스 우드 레인 195 웨스트웍스 감마델타 테라퓨틱스 리미티드 (내)
허턴, 앤드류
영국 더블유12 7에프큐 런던 화이트 시티 플레이스 우드 레인 195 웨스트웍스 감마델타 테라퓨틱스 리미티드 (내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

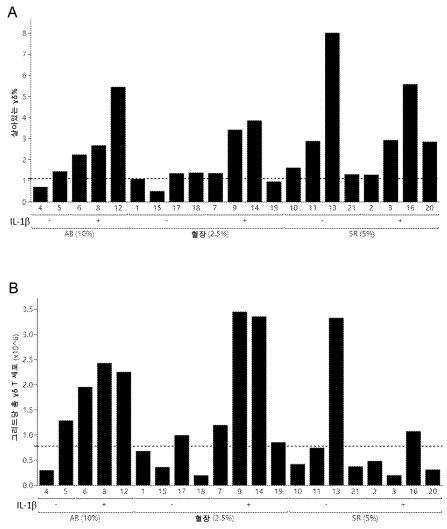
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 **감마 델타 T 세포를 단리하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 비-조혈 조직-상주 림프구, 특히 γδ T 세포의 단리 방법에 관한 것이다. 이러한 γδ T 세포는 비-Vδ2 세포, 예를 들어 Vδ1, Vδ3 및 Vδ5 세포를 포함하고 이러한 비-조혈 조직은 피부 및 장을 포함한다. 이러한 단리된 비-조혈 조직-상주 림프구가 입양 T 세포 요법, 키메라 수용체 요법 등에서 큰 유용성을 발견함이 이해될 것이다. 또한 단리된 조직-상주 림프구를 확장하는 방법, 특히 γδ T 세포를 단리 및 확장하는 방법이 제공된다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 개별 세포 및 세포 집단 둘 모두에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
C12N 5/0062 (2013.01)
C12N 5/0625 (2013.01)
C12N 2501/2301 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2304 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/2321 (2013.01)
C12N 2501/24 (2013.01)
(72) 발명자
오패럴, 숀
영국 더블유12 7에프큐 런던 화이트 시티 플레이스 우드 레인 195 웨스트웍스 감마델타 테라퓨틱스 리미티드 (내)
누스바우머, 올리버
영국 더블유12 7에프큐 런던 화이트 시티 플레이스 우드 레인 195 웨스트웍스 감마델타 테라퓨틱스 리미티드 (내)

명 세 서

청구범위

청구항 1

비-조혈 조직 샘플로부터 림프구를 단리하는 방법으로서,

(i) 인터루킨-1β(IL-1β)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

(ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 림프구 집단을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 2

비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하는 방법으로서,

(i) IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

(ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 γδ T 세포 집단을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)가 인터루킨-2(IL-2) 및 인터루킨-15(IL-15)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)가 인터루킨-4(IL-4) 및/또는 인터페론-γ(IFN-γ)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양하는 단계가 인터루킨-21(IL-21)의 부재에서 수행되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양하는 단계가 15 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/ml의 농도에서 인터루킨-21(IL-21)의 존재에서 수행되는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-조혈 조직 샘플이 혈청 또는 혈장을 함유하는 배지에서 배양되는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 비-조혈 조직이 2.5% 인간 혈장을 함유하는 배지에서 배양되는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 비-조혈 조직이 10% 인간 AB 혈청을 함유하는 배지에서 배양되는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포가 적어도 배양 7일 후에 수집되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포가 적어도 배양 14일 후에 수집되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포가 배양 35일 전에 수집되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포가 배양 19일 후에 수집되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포가 배양 21일 후에 수집되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-조혈 조직 샘플이 온전한 생검물인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-조혈 조직 샘플이 피부인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 피부 샘플이 표피층 및 진피층을 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-조혈 조직 샘플이 장 또는 위장관인, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-조혈 조직 샘플이 인간으로부터 수득된, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 기체 투과성 물질을 포함하는 용기에서 수행되는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구 또는 γδ T 세포의 단리된 집단이 Vδ1 T 세포 집단을 포함하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 80% 미만이 CD45RA를 발현하고, 예컨대 Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 30% 미만이 CD45RA를 발현하는, 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 10% 미만이 NKG2A를 발현하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 림프구 또는 γδ T 세포의 단리된 집단을 확장하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 25

비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 방법으로서,

(i) 비-조혈 조직 샘플을 혈청 대체물, 인간 혈장 및/또는 인간 AB 혈청을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

(ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 림프구 집단을 수집하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 비-조혈 조직 샘플을 혈청 대체물을 포함하는 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 림프구의 단리된 집단이 TCR-음성 세포 집단을 포함하는, 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)가 IL-2 및 IL-15의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)가 IL-4 및/또는 IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 30

제25항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 배양하는 단계가 IFN-γ의 부재에서 수행되는, 방법.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)가 IL-21의 존재에서 15 ng/mL 내지 25 ng/mL 농도에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구가 배양 19일 후에 수집되는, 방법.

청구항 33

제25항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 림프구가 배양 21일 후에 수집되는, 방법.

청구항 34

비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 및 확장을 위한 방법으로서,

(i) 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 집단을 단리하는 단계; 및

(ii) 적어도 5일 동안 상기 림프구 집단을 추가로 배양하여 림프구의 확장된 집단을 생산하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 35

비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 및 확장을 위한 방법으로서,

(i) 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

(ii) 적어도 5일 동안 상기 γδ T 세포 집단을 추가로 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 단리된 림프구 또는 γδ T 세포 집단이 단계 (ii) 전에 동결된 후 해동되는, 방법.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 확장 단계가

(a) IL-2 또는 IL-9;

(b) IL-15; 및 임의로

(c) IL-21

의 존재에서 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 γδ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, IL-4의 존재에서 γδ T 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장 단계가 실질적인 기질 세포 접촉의 부재에서 γδ T 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 확장 단계가 외인성 TCR 경로 작용제의 부재를 포함하는, 방법.

청구항 41

비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하는 방법으로서,

(i) 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

(ii) γδ T 세포의 단리된 집단을 동결하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, γδ T 세포가 IL-2 및 IL-15의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 임의로 IL-1β, IL-4 및/또는 IL-21과 조합하여 배양함으로써 단리되는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, γδ T 세포가 IL-21의 존재에서 15 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/ml 농도에서 비-조혈 조직 샘플을 배양함으로써 단리되는, 방법.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 γδ T 세포가 단리 19일 후에 동결되는, 방법.

청구항 45

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 γδ T 세포가 단리 21일 후에 동결되는, 방법.

청구항 46

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 γδ T 세포의 단리된 집단을 동결 용액에서 동결하고 액체 질소(기상)에 저장하는, 방법.

청구항 47

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, (iii) γδ T 세포의 동결된 집단을 해동하는 단계; 및 (iv) γδ T 세포의 해동된 집단을 적어도 5일 동안 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 48

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능한 단리된 γδ T 세포 집단.

청구항 49

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 단리된 γδ T 세포 집단.

청구항 50

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능한 동결된 단리된 γδ T 세포 집단.

청구항 51

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 동결된 단리된 γδ T 세포 집단.

청구항 52

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득가능한 단리되고 확장된 γδ T 세포 집단.

청구항 53

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득된 단리되고 확장된 γδ T 세포 집단.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비-조혈 조직-상주 림프구, 특히 γδT 세포의 단리 방법에 관한 것이다. 이러한 γδT 세포는 비-Vδ2 세포, 예를 들어 Vδ1, Vδ3 및 Vδ5 세포를 포함하고 이러한 비-조혈 조직은 피부 및 장을 포함한다. 이러한 단리된 비-조혈 조직-상주 림프구가 입양 T 세포 요법, 키메라 수용체 요법 등에서 큰 유용성을 발견함이 이해될 것이다. 본 발명은 또한 본원에 기재된 방법에 의해 생산된 개별 세포 및 세포 집단 둘 모두에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암에 대한 T 세포 면역요법에 대한 증가하는 관심은 특히 PD-1, CTLA-4 및 다른 수용체에 의해 나타나는 억제 경로의 임상적으로 매개된 길항작용에 의해 탈-억제(de-repressed)될 때 암 세포를 인식하고 숙주-보호 기능 잠재력을 매개하는 CD8+ 및 CD4+ αβ T 세포의 하위집합의 명백한 능력에 초점을 맞추었다. 그러나 αβ T 세포는 MHC-제한되어(MHC-restricted) 이는 이식편 대 숙주 질환을 야기할 수 있다.

[0003] 감마 델타 T 세포(γδ T 세포)는 γδ T-세포 수용체(TCR)를 정의하는 이의 고유한 표면을 발현하는 T 세포의 하위집합을 나타낸다. 이 TCR은 1개의 감마(γ) 및 1개의 델타(δ) 사슬로 이루어진다. 인간 γδ TCR 사슬은 3개의 주요 δ 사슬, Vδ1, Vδ2 및 Vδ3 및 6개의 γ 사슬로부터 선택된다. 인간 γδ T 세포는 이의 TCR 사슬을 기반으로 광범위하게 분류될 수 있고, 특정 γ 및 δ 유형은 하나 이상의 조직 유형에서 배타적이지는 않지만 더 널리 세포에서 발견되기 때문이다. 예를 들어, 대부분의 혈액-상주 γδ T 세포는 Vδ2 TCR, 예를 들어 Vγ9Vδ2를 발현하는 반면, 이는 피부에서 Vδ1을, 장에서 Vγ4를 더 자주 사용하는 조직-상주 γδ T 세포 사이에서 덜 일반적이다.

[0004] 림프구를 단리하는 방법의 대부분은 혈액으로부터 이러한 세포 유형을 단리하는 데 의존해왔다. γδ T 세포와 같은 비-조혈 조직 상주 림프구는 비-조혈 종양 및 다른 표적 표적화와 같은 특정 적용에 특히 적합한 특성을

가질 수 있다. 그러나, 임상적으로 적절한 양으로 이러한 조직 상주 림프구를 단리하는 것은 특히 많은 적응증에 대해 10^8 세포 이상 범위의 임상 용량이 필요하기 때문에 도전으로 남아 있다. 중요하게는, 생산 중 유의한 세포 손실은 훨씬 더 많은 출발 세포가 생성되어야 함을 의미한다.

[0005] 비-조혈 조직-상주 림프구, 특히 γδ T 세포는 높은 수로 쉽게 수득될 수 없기 때문에, 이들은 치료 적용을 위해 잘 특징화되거나 연구되지 않았다. 따라서, 비-조혈 조직-상주 림프구, 특히 γδ T 세포를 추가 확장에 충분한 양으로 단리하고 잠재적으로 요법, 예를 들어 입양 T 세포 요법으로서 적응시키는 방법에 대한 분야의 필요성이 존재한다.

[0006] Clark 등 (2006) J. Invest. Dermatol. 126(5): 1059-70은 정상 피부 및 병든 피부로부터 피부 상주 T 세포를 단리하는 방법을 기재한다. 그러나, 이에 기재된 방법은 동물성 생성물의 존재로 인해 임상 사용에 부적합하지만 특히 단리된 세포의 상대적으로 낮은 수율, 즉 cm^2 조직 당 10^6개 미만의 세포로 인해 부적합하다. Clark 등에 기재된 방법은 조직 샘플의 구조적 무결성을 의도적으로 파괴하는 다진 샘플을 사용한다. WO2017072367 및 WO2018/202808은 적어도 인터루킨-2(IL-2) 및/또는 인터루킨-15(IL-15)의 존재에서 비-조혈 조직으로부터 수득된 림프구를 배양함으로써 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포를 시험관 내에서 확장시키는 방법에 관한 것이다. WO2015189356은 IL-2, IL-15 및 IL-21로부터 선택되는 적어도 2가지 유형의 사이토카인을 포함하는 성분채집(aphaeresis)에 의해 수득된 샘플로부터 수득된 림프구 확장용 조성물을 기재한다. 따라서, 임상 사용에 적합한 더 많은 양의 세포를 생산하는 피부로부터와 같은 조직-상주 비-조혈 림프구를 단리하는 방법에 대한 필요성이 여전히 남아 있다.

발명의 내용

[0007] **요약**

[0008] 본 발명의 첫 번째 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 방법이 제공된다:

[0009] (i) 인터루킨-1β(IL-1β)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

[0010] (ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 림프구 집단을 수집하는 단계.

[0011] 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 방법이 제공된다:

[0012] (i) IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

[0013] (ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 γδ T 세포 집단을 수집하는 단계.

[0014] 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구를 단리 및 확장하는 방법이 제공된다:

[0015] (i) 본원에 기재된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구 집단을 단리하는 단계; 및

[0016] (ii) 적어도 5일 동안 상기 림프구 집단을 추가로 배양하여 확장된 림프구 집단을 생산하는 단계.

[0017] 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리 및 확장하는 방법이 제공된다:

[0018] (i) 본원에 기재된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0019] (ii) 적어도 5일 동안 상기 γδ T 세포 집단을 추가로 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1: 살아있는 세포의 γδ T 세포 (A)의 백분율(%) 및 모든 조건에 대한 그리드당 총 γδ T 세포(B). 조건은 단백질 공급원(AB = 인간 10% AB 혈청; 혈장 = 2.5% 인간 혈장; SR = 5% 혈청 대체물)별로 그룹화되고 IL-1β의 존재(+) 또는 부재(-)로 세분화된다. 상이한 조건에 대한 자세한 설명은 표 2를 참조한다. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다(STD ISO).

도 2: 살아있는 세포의 % Vδ1 T 세포(A) 및 모든 조건에 대한 그리드당 총 Vδ1 T 세포(B)를 보여주는 그래프. 조건은 IL-1β의 존재 또는 부재에서 단백질 공급원으로 그룹화된다. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은

실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 3: 단백질 공급원별로 그룹화되고 IL-4의 존재 또는 부재로 세분화된 그리드당 생존 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 4: 단백질 공급원별로 그룹화되고 IL-4의 존재 또는 부재로 세분화된 살아있는 세포의 % γδ T 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 5: 단백질 공급원별로 그룹화되고 IL-4의 존재 또는 부재로 세분화된 그리드당 총 Vδ1 T 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 6: 단백질 공급원별로 그룹화되고 IL-4의 존재 또는 부재로 세분화된 Vδ1 T 세포에서 % NKG2A 발현(A) 및 % CD45RA 발현(B)에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 7: 단백질 공급원별로 그룹화된 Vδ1 T 세포에서 % TIGIT 발현에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 8: 단백질 공급원별로 그룹화된 그리드당 총 Vδ1 T 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 9: 단백질 공급원별로 그룹화된 그리드당 총 생존 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 막대는 실험 중앙값을 나타낸다. 점선은 실험 대조군의 중앙값을 나타낸다.

도 10: 단백질 공급원별로 그룹화되고 IFN-γ의 존재 또는 부재로 세분화된 총 TCR-음성 세포에 대한 결과를 보여주는 그래프. 점선은 이전의 단리 방법을 사용한 중앙값을 나타낸다.

도 11: 표준 2 사이토카인 단리 방법에 비해 상위 조건에 대한 그리드당 총 γδ T 세포의 결과.

도 12: 신선하게 수득된 단리된 세포 또는 확장 전에 동결된 단리된 세포를 사용하여 배수 확장 (A) 및 % γδ T 세포 확장(B)에 대한 효과를 보여주는 그래프.

도 13: A) IL-21을 18.8 ng/ml에서 첨가하거나 첨가하지 않은 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-1β의 존재에서 21일 단리 배양 종료 시 총 세포 생존성의 비교. 점선은 최소 허용 가능한 생존성을 나타낸다. B) 해동 후 IL-1β 및 IL-21의 존재에서 단리된 γδ T 세포의 배양 14일 후의 확장(살아있는 γδ T 세포 %로 표시됨)을 보여주는 그래프.

도 14: 19일 또는 21일 후에 수확된 "IL-21"(IL-2, IL-4, IL-15, IL-1β 및 IL-21)(IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-1β) 또는 "IL-21 없음"(IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-1β)을 사용한 단리 배양의 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 첫 번째 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 방법이 제공된다:

[0022] (i) 인터루킨-1β(IL-1β)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

[0023] (ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 림프구 집단을 수집하는 단계.

[0024] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 방법이 제공된다:

[0025] (i) IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 단계; 및

[0026] (ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 γδ T 세포 집단을 수집하는 단계.

[0027] 본원에 제시된 발견은 비-조혈 조직 샘플로부터 조직-상주 γδ T 세포를 단리하기 위한 최적의 프로토콜을 설정하기 위해 수행된 실험의 자세한 설계를 보여준다. 놀랍게도 최고의 γδ T 세포 수율을 갖는 모든 조건이 IL-1β를 함유한다는 것이 발견되었는데, 이는 이 사이토카인이 단리 공정 동안 높은 수준의 γδ T 세포를 생산하는 데 유리하다는 것을 나타낸다.

[0028] 본원에 사용된 "IL-1β"는 하나 이상의 IL-1 수용체(IL-1R) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인(mutein), 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연

또는 재조합 IL-1β 또는 이의 변이체를 지칭한다. IL-1은 염증성 질환을 포함한 광범위한 질환에서 중요한 역할을 하는 전염증성 사이토카인이다. 이는 두 가지 분자종, IL-1α 및 IL-1β으로 이루어지며, 이는 제한된 서열 동일성만을 공유하지만 IL-1 수용체(유형 I 및 유형 II)에 결합하여 유사한 생물학적 활성을 나타낸다. 성숙한 인간 IL-1β는 Andrei 등 (2004) PNAS 101(26): 9745-9750에 기재된 바와 같이, CASP1에 의해 전구 폴리펩티드에서 N-말단으로부터 116개의 아미노산의 절단 후 153개의 아미노산 서열로 발생한다. IL-1β 뮤테인은 IL-1R에 결합하는 능력을 유지하면서 IL-1β 단백질에 대한 특이적 치환이 이루어진 폴리펩티드이다. IL-1β 뮤테인은 천연 IL-1β 폴리펩티드 사슬의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형으로 특징규명될 수 있다. 본 개시내용에 따르면, 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-1R 결합 활성을 유지하는 IL-1β 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0029] 인간 IL-1β를 암호화하는 핵산은 중합효소 연쇄 반응(PCR)과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-1β의 아미노산 서열(유전자 ID 3553)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP_000567로 또는 UniProt에서 기탁 번호 P01584로 발견된다. 뮤린(*Mus musculus*) IL-1β 아미노산 서열(유전자 ID 16176)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP_032387로 또는 UniProt에서 기탁 번호 P10749로 발견된다.

[0030] IL-1β는 또한 예를 들어 인간, 유인원(simian), 소(bovine), 돼지(porcine), 말(equine), 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-1β를 지칭할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어, 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IL-1β 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IL-1β 단백질의 단백질 분해 절단으로 인한 단백질이며, 여기서 IL-1β 결합 특성은 유지된다.

[0031] **단리 방법**

[0032] 본원에서 세포, 특히 림프구 및/또는 γδ T 세포의 "단리(isolation)" 또는 "단리하는 것(isolating)"에 대한 언급은 세포가 조직 또는 세포의 풀로부터 제거, 분리, 정제, 농축되거나 그렇지 않으면 꺼내지는 방법 또는 공정을 지칭한다. 이러한 언급은 "분리된", "제거된", "정제된", "농축된" 등의 용어를 포함한다는 것이 이해될 것이다. γδ T 세포의 단리는 온전한 비-조혈 조직 샘플 또는 비-조혈 조직의 기질 세포(예를 들어, 섬유아세포 또는 상피 세포)로부터 세포의 단리 또는 분리를 포함한다. 이러한 단리는 대안적으로 또는 추가로 다른 조혈 세포(예를 들어, αβ T 세포 또는 다른 림프구)로부터 γδ T 세포의 단리 또는 분리를 포함할 수 있다. 단리는 정의된 기간 동안일 수 있으며, 예를 들어 조직 외식편 또는 생검물(biopsy)이 분리 배양에 배치되는 시간부터 시작하여 단리된 세포 집단을 확장 배양으로 옮기거나 다른 목적으로 사용하기 위한 원심분리 또는 다른 수단에 의해 세포가 배양에서 수집되거나 원래 조직 외식편 또는 생검물이 배양물로부터 제거될 때 끝날 수 있다. 단리 단계는 적어도 약 3일 내지 약 45일 동안일 수 있다. 한 구현예에서, 단리 단계는 적어도 약 10일 내지 적어도 28일 동안이다. 추가 구현예에서, 단리 단계는 적어도 14일 내지 적어도 21일 동안이다. 따라서, 단리 단계는 적어도 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 32일, 약 35일, 약 40일, 또는 약 45일 동안일 수 있다. 한 구현예에서, 단리 단계는 19일 동안이다. 또 다른 구현예에서, 단리 단계는 21일 동안이다. 단리된 세포 증식이 이 단리 단계 동안 실질적이지 않을 수 있지만 반드시 부재한 것은 아님이 이해될 것이다. 실제로 당업자는 단리된 세포가 또한 분열을 시작하여 조직 및/또는 스캐폴드를 함유하는 단리 용기 내에서 복수의 이러한 세포를 생성할 수 있음을 인지한다.

[0033] 따라서, 본원에서 "단리된 γδ T 세포", "단리된 γδ T 세포 집단", "γδ T 세포의 단리된 집단", "분리된 γδ T 세포", "분리된 γδ T 세포 집단" 또는 "γδ T 세포의 분리된 집단"에 대한 언급은 세포가 비-조혈 세포 또는 온전한 비-조혈 조직 내에 함유된 세포와 실질적으로 접촉하지 않도록 기원(origin)의 비-조혈 조직 샘플로부터 단리, 분리, 제거, 정제 또는 농축된 γδ 세포를 포함하는 조혈 세포 또는 조혈 세포 집단을 지칭한다고 이해될 것이다. 마찬가지로, 본원에서 "Vδ1 T 세포의 단리되거나 분리된 집단"에 대한 언급은 세포가 비-조혈 세포 또는 온전한 비-조혈 조직 내에 함유된 세포와 실질적으로 접촉하지 않도록 기원의 비-조혈 조직 샘플로부터 단리, 분리, 제거, 정제 또는 농축된 Vδ1 T 세포를 포함하는 조혈 세포를 지칭한다. 따라서, 단리 또는 분리는 비-조혈 세포(예를 들어, 기질 세포, 섬유아세포 및/또는 상피 세포)로부터 조혈 세포(예를 들어, γ

δ T 세포 또는 다른 림프구)의 단리, 분리, 제거, 정제 또는 농축을 지칭한다.

[0034] 본원에 정의된 바와 같은 γδ T 세포의 단리 방법은 조직의 파괴(예를 들어, 다지는 것)에 이은 다른 세포 유형으로부터 γδ T 세포의 분리를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 본원에 정의된 바와 같은 γδ T 세포의 단리 방법은 외식편 또는 생검물의 온전한 비-조혈 조직 샘플 또는 조직 매트릭스로부터 γδ T 세포 및 다른 세포 유형의 "크롤-아웃(crawl-out)"을 포함할 수 있으며, 여기서 조직 상주 림프구는 물리적으로 조직 매트릭스의 파괴에 대한 필요 없이 조직 매트릭스에서 분리된다. 조직 매트릭스의 무결성을 유지함으로써, 조직 상주 림프구가 조직 매트릭스로부터 우선적으로 유출되는 것으로 밝혀졌으며, 섬유아세포와 같은 억제 세포 유형의 유출은 거의 또는 전혀 없었고, 이는 단리 종료 시 이후 쉽게 제거될 수 있는 외식편 또는 생검물에서 유지된다. 따라서, 일부 구현예에서, 온전한 비-조혈 조직 샘플 또는 조직 매트릭스의 사용은 적은 수의 섬유아세포가 조직으로부터 배양물로 방출되도록 한다. 온전한 비-조혈 조직 또는 조직 매트릭스를 이용하는 이러한 "크롤-아웃" 방법은 비-조혈 조직 샘플 또는 조직 매트릭스의 과도한 처리에 대한 필요성을 감소시키고 비-조혈 조직 또는 조직 매트릭스의 구조적 무결성을 유지하는 이점이 있고, 더 높은 단리된 세포 수율을 생산하는 예상치 못한 이점을 제공할 수 있다.

[0035] 따라서, 본원에 정의된 바와 같은 비-조혈 조직 유래 림프구의 단리 방법은 비-조혈 조직의 온전한 생검물 또는 외식편으로부터 비-조혈 조직 유래 림프구를 단리하는 방법을 포함한다. 이러한 온전한 생검물 또는 외식편은 조직 샘플로부터 생검물 또는 외식편을 제거하는 절제의 둘레 내에서 생검물 또는 외식편의 구조적 무결성이 의도적으로 파괴되지 않은 것이다. 이러한 온전한 생검물 또는 외식편은 취급으로 인한 경미한 파괴를 제외하고는 대체로 유지된 3차원 구조를 가질 것이다. 따라서 이러한 온전한 생검물 또는 외식편은 예컨대 다지기 또는 쪼개기에 의해 기계적으로 파괴되지 않았고, 예를 들어 화학적으로도 효소적으로도 파괴되지 않았다. 그러나, 파괴된 조직이 본 발명의 단리 방법에 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 단리된 림프구는 αβ T 세포이다. 대안적인 구현예에서, 단리된 림프구는 γδ T 세포이다. 추가 구현예에서, 단리된 림프구는 TCR-음성 세포(즉, αβ TCR 및 γδ TCR 발현에 대해 음성인 세포)이다. TCR 음성 세포는 자연 살해(NK) 세포의 존재의 양호한 지표이다. 따라서, 다른 구현예에서, 단리된 림프구는 NK 세포이다. 하나 이상의 유형의 림프구가 동일한 단리 단계에서 단리될 수 있음이 이해될 것이다.

[0036] "크롤-아웃" 또는 예를 들어 본원에 정의된 방법을 이용한 γδ T 세포의 단리 방법은 γδ T 세포 및/또는 본원에 정의된 다른 림프구의 단리 또는 분리를 유도하기에 충분한 사이토카인 및/또는 케모카인의 존재에서 세포 및/또는 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다.

[0037] 한 구현예에서, 단계 (i)는 인터루킨-2(IL-2)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 단계 (i)는 인터루킨-15(IL-15)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 추가 구현예에서, 단계 (i)는 IL-2 및 IL-15의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다.

[0038] 본원에 사용된 "IL-2"는 하나 이상의 IL-2 수용체(IL-2R) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연 또는 재조합 IL-2 또는 이의 변이체를 지칭한다. 이러한 제제는 IL-2-의존성 세포주, CTLL-2(33; American Type Culture Collection(ATCC®) TIB 214)의 증식을 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-2는 Fujita, 등. *Cell* 1986. 46.3:401-407에 기재된 바와 같이 133개의 아미노산 서열 (추가의 20개의 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩티드 미만)로 발생한다. IL-2 뮤테인은 US 2014/0046026에 기재된 것과 같이 IL-2Rβ에 결합하는 능력을 유지하면서 인터루킨-2 단백질에 대한 특이적 치환이 이루어진 폴리펩티드이다. IL-2 뮤테인은 천연 IL-2 폴리펩티드 사슬의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형에 의해 특징규명될 수 있다. 본 개시내용에 따르면 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-2Rβ 결합 활성을 유지하는 IL-2 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0039] 인간 IL-2를 암호화하는 핵산은 PCR과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-2(유전자 ID 3558)의 아미노산 서열은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP_000577.2 GI: 28178861로 발견된다. 뮤린 (*Mus musculus*) IL-2 아미노산 서열(유전자 ID 16183)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP_032392.1 GI: 7110653로 발견된다.

[0040] IL-2는 또한 예를 들어 인간, 유인원, 소, 돼지, 말 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-2를 지칭할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가

유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IL-2 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IL-2 단백질의 단백질 분해 절단으로 인한 단백질이며, 여기서 IL-2 결합 특성은 유지된다. mRNA의 대체 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-2 단백질을 생산할 수 있다. 단백질 분해에 기인하는 변이는 예를 들어 IL-2 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산의 단백질 분해 제거(일반적으로 1-10 아미노산)로 인한 상이한 유형의 숙주 세포에서의 발현 시 N- 또는 C-말단의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학기로 변형되어 이의 물리적 특성을 변경할 수 있다(Yang, 등. *Cancer* 1995. 76: 687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가 아미노산으로 변형될 수 있다(Clark-Lewis, 등. *PNAS* 1993. 90:3574-3577).

[0041] 본원에 사용된 "IL-15"는 하나 이상의 IL-15 수용체(IL-15R) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연 또는 재조합 IL-15 또는 이의 변이체를 지칭한다. IL-2와 마찬가지로 IL-15는 IL-2-의존성 세포주인 CTLL-2의 증식을 지지할 수 있는 공지된 T-세포 성장 인자이다. IL-15는 114-아미노산 성숙한 단백질로서 Grabstein 등에 의해 처음 보고되었다(Grabstein, 등. *Science* 1994. 264.5161: 965-969). 본원에 사용된 용어 "IL-15"는 천연 또는 재조합 IL-15 및 이의 뮤테인, 유사체, 하위단위, 또는 이의 복합체(예를 들어, WO 2007/046006에 기재된 바와 같은 수용체 복합체, 예를 들어 스시 펩티드)를 의미하고, 각각의 CTLL-2 세포의 증식을 자극할 수 있다. CTLL-2 증식 검정에서, 재조합적으로 발현된 전구체 및 IL-15의 성숙한 형태의 프레임 내 융합으로 형질감염된 세포의 상청액은 CTLL-2 세포 증식을 유도할 수 있다.

[0042] 인간 IL-15는 Grabstein, 등(Grabstein, 등. *Science* 1994. 264.5161: 965-969)에 의해 기재된 절차에 따라 또는 PCR과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-15 cDNA의 기탁은 1993년 2월 19일 ATCC®로 이루어졌으며 기탁 번호 69245로 지정되었다.

[0043] 인간 IL-15(유전자 ID 3600)의 아미노산 서열은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP000576.1 GI: 10835153(이소형 1) 및 NP_751915.1 GI: 26787986(이소형 2)에서 발견된다. 뮤린(*Mus musculus*) IL-15 아미노산 서열(유전자 ID 16168)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NP_001241676.1 GI: 363000984로 발견된다.

[0044] IL-15는 또한 예를 들어 인간, 유인원, 소, 돼지, 말 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-15를 지칭할 수 있다. 본원에 언급된 IL-15 "뮤테인" 또는 "변이체"는 천연 포유동물 IL-15의 서열과 실질적으로 상동하지만 아미노산 결실, 삽입 또는 치환으로 인해 천연 포유동물 IL-15 폴리펩티드와 상이한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드이다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IL-15 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IL-15 단백질의 단백질 분해 절단으로 인한 단백질이며, 여기서 IL-15 결합 특성은 유지된다. mRNA의 대체 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-15 단백질을 생산할 수 있다. 단백질 분해에 기인하는 변이는 예를 들어 IL-15 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산의 단백질 분해 제거(일반적으로 1-10 아미노산)로 인한 상이한 유형의 숙주 세포에서의 발현 시 N- 또는 C-말단의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학기로 변형되어 이의 물리적 특성을 변경할 수 있다(Yang, 등. *Cancer* 1995. 76:687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가 아미노산으로 변형될 수 있다(Clark-Lewis, 등. *PNAS* 1993. 90:3574-3577).

[0045] 한 구현예에서, 본 발명에 따른 림프구 또는 γδ T 세포의 단리는 인터루킨-4(IL-4)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 따라서, 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 IL-1β 및 IL-4의 존재에서 배양된다.

[0046] 본원에 사용된 "IL-4"는 하나 이상의 IL-4 수용체(IL-4R) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연 또는 재조합 IL-4 또는 이의 변이체를 지칭한다. 이러한 제제는 나이브 헬퍼 T 세포(Th0 세포)의 Th2 세포로의 분화를 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-4는 129개 아미노산 서열(추가 24개 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩티드 미

만)로 발생한다. IL-4 뮤테인은 미국 특허 제6,313,272호에 기재된 것과 같이 IL-4Rα에 결합하는 능력을 유지하면서 인터루킨-4 단백질에 대한 특이적 치환이 이루어진 폴리펩티드이다. IL-4 뮤테인은 천연 IL-4 폴리펩티드 사슬의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형에 의해 특징규명될 수 있다. 본 개시내용에 따르면 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-4Rα 결합 활성을 유지하는 IL-4 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0047] 인간 IL-4를 암호화하는 핵산은 PCR과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-4의 아미노산 서열(유전자 ID 3565)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NG_023252로 발견된다. 뮤린(*Mus musculus*) IL-4 아미노산 서열(유전자 ID 16189)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NC_000077.6으로 발견된다.

[0048] IL-4는 또한 예를 들어 인간, 유인원, 소, 돼지, 말 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-4를 지칭할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IL-4 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IL-4 단백질의 단백질 분해 절단으로 인한 단백질이며, 여기서 IL-4 결합 특성은 유지된다. mRNA의 대체 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-4 단백질을 생산할 수 있다. 단백질 분해에 기인하는 변이는 예를 들어 IL-4 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산의 단백질 분해 제거(일반적으로 1-10 아미노산)로 인한 상이한 유형의 숙주 세포에서의 발현 시 N- 또는 C-말단의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학기로 변형되어 이의 물리적 특성을 변경할 수 있다(Yang, 등. *Cancer* 1995. 76:687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가 아미노산으로 변형될 수 있다(Clark-Lewis, 등. *PNAS* 1993. 90:3574-3577).

[0049] 한 구현예에서, 본 발명에 따른 림프구 또는 γδ T 세포의 단리는 인터페론-γ(IFN-γ)의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 따라서, 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 IL-1β 및 IFN-γ의 존재에서 배양된다.

[0050] 본원에 사용된 "IFN-γ"는 하나 이상의 IFN-γ 수용체(IFNGR) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연 또는 재조합 IFN-γ 또는 이의 변이체를 지칭한다. 특히, IFN-γ는 인터페론 감마 수용체 1(IFNGR1) 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNGR2)로 이루어진 이종이량체 수용체와 상호작용한다. 성숙한 인간 IFN-γ는 143개 아미노산 서열(추가 23개 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩티드 미만)로 발생한다. IFN-γ 뮤테인은 미국 특허 제9,296,804호에 기재된 것과 같이 IFNGR에 결합하는 능력을 유지하면서 IFN-γ 단백질에 대한 특이적 치환이 이루어진 폴리펩티드이다. IFN-γ 뮤테인은 천연 IFN-γ 폴리펩티드 사슬의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형에 의해 특징규명될 수 있다. 본 개시내용에 따르면 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IFN-γR 결합 활성을 유지하는 IFN-γ 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0051] 인간 IFN-γ를 암호화하는 핵산은 PCR과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IFN-γ의 아미노산 서열(유전자 ID 3458)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NG_015840.1로 또는 UniProt에서 기탁 번호 P01579로 발견된다. 뮤린(*Mus musculus*) IFN-γ 아미노산 서열(유전자 ID 15978)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NC_000076.6으로 또는 UniProt에서 기탁 번호 P01580으로 발견된다.

[0052] IFN-γ는 또한 예를 들어 인간, 유인원, 소, 돼지, 말 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IFN-γ를 지칭할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IFN-γ 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IFN-γ 단백질의 단백질 분해 절단으로부터 생성되는 단백질이며, 여기서 IFN-γ 결합 특성은 유지된다.

[0053] 한 구현예에서, 본 발명에 따른 림프구 또는 γδ T 세포의 단리는 인터루킨-21(IL-21)의 존재에서 비-조혈 조

직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 따라서, 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 IL-1β 및 IL-21의 존재에서 배양된다.

[0054] 본원에 사용된 "IL-21"은 하나 이상의 IL-21 수용체(IL-21R) 하위단위(예를 들어, 이의 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 하위단위, 수용체 복합체, 단편, 이소형 및 펩티드모방체)에 대한 작용제로 작용하는 천연 또는 재조합 IL-21 또는 이의 변이체를 지칭한다. 이러한 제제는 자연 살해(NK) 및 세포독성($CD8^+$) T 세포의 증식을 지지할 수 있다. 성숙한 인간 IL-21은 133개 아미노산 서열(추가 22개 N-말단 아미노산으로 이루어진 신호 펩티드 미만)로 발생한다. IL-21 뮤테인은 미국 특허 제9,388,241호에 기재된 것과 같이 IL-21Rα에 결합하는 능력을 유지하면서 인터루킨-21 단백질에 대한 특이적 치환이 이루어진 폴리펩티드이다. IL-21 뮤테인은 천연 IL-21 폴리펩티드 사슬의 하나 이상의 부위에서 또는 다른 잔기에서 아미노산 삽입, 결실, 치환 및 변형에 의해 특징규명될 수 있다. 본 개시내용에 따르면 임의의 이러한 삽입, 결실, 치환 및 변형은 IL-21R 결합 활성을 유지하는 IL-21 뮤테인을 생성한다. 예시적인 뮤테인은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 아미노산의 치환을 포함할 수 있다.

[0055] 인간 IL-21을 암호화하는 핵산은 PCR과 같은 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 인간 IL-21의 아미노산 서열(유전자 ID 59067)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NC_000004.12로 발견된다. 뮤린(*Mus musculus*) IL-21 아미노산 서열(유전자 ID 60505)은 Genbank에서 기탁 위치 지정자 NC_000069.6으로 발견된다.

[0056] IL-21은 또한 예를 들어 인간, 유인원, 소, 돼지, 말 및 뮤린을 포함하는 다양한 포유동물 종으로부터 유래된 IL-21을 지칭할 수 있다. 변이체는 보존적으로 치환된 서열을 포함할 수 있으며, 이는 주어진 아미노산 잔기가 유사한 물리화학적 특징을 갖는 잔기로 대체됨을 의미한다. 보존적 치환의 예는 Ile, Val, Leu, 또는 Ala와 같은 하나의 지방족 잔기에서 다른 것으로의 치환, 또는 Lys와 Arg; Glu와 Asp; 또는 Gln와 Asn 사이와 같이 하나의 극성 잔기에서 다른 것으로의 치환을 포함한다. 다른 이러한 보존적 치환, 예를 들어 유사한 소수성 특징을 갖는 전체 영역의 치환은 널리 공지되어 있다. 자연적으로 발생하는 IL-21 변이체 또한 본 발명에 포괄된다. 이러한 변이체의 예는 대체 mRNA 스플라이싱 이벤트 또는 IL-21 단백질의 단백질 분해 절단으로 인해 발생하는 단백질이며, 여기서 IL-21 결합 특성은 유지된다. mRNA의 대체 스플라이싱은 절단되었지만 생물학적으로 활성인 IL-21 단백질을 생산할 수 있다. 단백질 분해에 기인하는 변이는 예를 들어 IL-21 단백질로부터 하나 이상의 말단 아미노산의 단백질 분해 제거(일반적으로 1-10 아미노산)로 인한 상이한 유형의 숙주 세포에서 발현 시 N- 또는 C-말단의 차이를 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 말단은 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜과 같은 화학기로 변형되어 이의 물리적 특성을 변경할 수 있다(Yang, 등. *Cancer* 1995. 76:687-694). 일부 구현예에서, 단백질의 말단 또는 내부는 추가 아미노산으로 변형될 수 있다(Clark-Lewis, 등. *PNAS* 1993. 90:3574-3577).

[0057] 대안적인 구현예에서, 배양은 IL-21의 부재에서 수행된다. 대안적인 구현예에서, 배양은 IFN-γ의 부재에서 수행된다. 본원에 기재된 실험에서 수득된 결과의 통계적 분석 후, 단리 배양물에서 IL-1β의 존재는 IFN-γ 및 IL-21이 부재할 때와 같이, 적어도 IFN-γ가 부재할 때 더 유리할 수 있는 것으로 나타난다. 본원에 기재된 결과는 특정 조건 하에서 IL-21이 부재하거나 IL-21이 15ng/mL 내지 25ng/mL의 농도, 특히 18 내지 20ng/ml, 예컨대 18, 19 또는 20ng/ml, 예를 들어 18.8ng/ml의 농도로 존재할 때 단리 배양물에 IL-1β의 존재가 유리할 수 있음을 추가로 입증한다.

[0058] 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 적어도 10 IU/mL의 농도, 예컨대 적어도 100 IU/mL의 농도(예를 들어, 10 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 20 IU/mL 내지 800 IU/mL, 25 IU/mL 내지 750 IU/mL, 30 IU/mL 내지 700 IU/mL, 40 IU/mL 내지 600 IU/mL, 50 IU/mL 내지 500 IU/mL, 75 IU/mL 내지 250 IU/mL, 또는 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 예를 들어, 10 IU/mL 내지 20 IU/mL, 20 IU/mL 내지 30 IU/mL, 30 IU/mL 내지 40 IU/mL, 40 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 75 IU/mL, 75 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 150 IU/mL, 150 IU/mL 내지 200 IU/mL, 200 IU/mL 내지 500 IU/mL, 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL)로 IL-2를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 1,000 IU/mL 미만, 예컨대 500 IU/mL 미만 농도의 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 100 IU/mL, 예컨대 138 IU/mL 농도의 IL-2를 포함한다.

[0059] 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 적어도 10 IU/mL, 예컨대 적어도 100 IU/mL, 특히 적어도 500 IU/mL의 농도(예를 들어, 10 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 20 IU/mL 내지 900 IU/mL, 25 IU/mL 내지 750 IU/mL, 30 IU/mL 내지 600 IU/mL, 40 IU/mL 내지 500 IU/mL, 50 IU/mL 내지 400 IU/mL, 75 IU/mL 내지 250 IU/mL, 또는 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 예를 들어, 100 IU/mL 내지 900 IU/mL, 200 IU/mL 내지 800 IU/mL, 300 IU/mL 내지 700 IU/mL, 400 IU/mL 내지 600 IU/mL, 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL)로 IL-15를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 1,000 IU/mL 미만, 예컨대 700 IU/mL 미만 농도

의 IL-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 600 IU/mL 농도의 IL-15를 포함한다.

[0060] 일부 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리는 각각 상기 열거된 임의의 농도에서 IL-2 및 IL-15 둘 모두의 존재에서 배양물을 포함한다. 일부 경우에서, IL-2의 농도는 약 138 IU/mL이고 IL-15의 농도는 600 IU/mL이다.

[0061] 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 적어도 0.01 IU/mL, 예컨대 적어도 0.1 IU/mL (예를 들어, 0.01 IU/mL 내지 100 IU/mL, 0.05 IU/mL 내지 50 IU/mL, 0.1 IU/mL 내지 10 IU/mL, 1 IU/mL 내지 5 IU/mL, 예를 들어, 0.01 IU/mL 내지 0.05 IU/mL, 0.05 IU/mL 내지 0.1 IU/mL, 0.1 IU/mL 내지 1 IU/mL, 5 IU/mL 내지 10 IU/mL, 10 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 100 IU/mL)의 농도로 IL-21을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 10 IU/mL 미만, 예컨대 5 IU/mL 미만 농도로 IL-21을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 1 IU/mL, 예컨대 1.05 IU/mL 농도로 IL-21을 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 15 내지 25ng/mL 농도로 IL-21을 포함한다. 따라서, 한 구현예에서, 방법은 15ng/mL 내지 25ng/mL 농도로 IL-21을 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 18 내지 20 ng/ml, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/ml, 예를 들어 18.8 ng/ml의 농도로 IL-21을 포함한다.

[0062] 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 적어도 1 IU/mL, 예컨대 적어도 10 IU/mL (예를 들어, 1 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 5 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 예를 들어, 1 IU/mL 내지 5 IU/mL, 5 IU/mL 내지 10 IU/mL, 10 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 150 IU/mL)의 농도로 IL-4를 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 500 IU/mL 미만, 예컨대 100 IU/mL 미만 농도의 IL-4를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 100 IU/mL, 예컨대 95 IU/mL 농도의 IL-4를 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 약 30 IU/mL, 예컨대 31.6 IU/mL 농도의 IL-4를 포함한다.

[0063] 따라서, 일부 구현예에서 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리는 각각 상기 열거된 임의의 농도에서 IL-2, IL-15, IL-4 및 IL-21의 존재에서 배양을 포함한다. 추가 구현예에서, IL-2의 농도는 약 138 IU/mL이고, IL-15의 농도는 600 IU/mL이고, IL-4의 농도는 95 IU/mL이고, IL-21의 농도는 15 ng/mL 내지 25ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/mL, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/mL, 예를 들어 18.8 ng/mL이다. 따라서, 특정 구현예에서, γδ T 세포의 단리는 138 IU/mL 농도의 IL-2, 600 IU/mL 농도의 IL-15, 95 IU/mL 농도의 IL-4, 4500 IU/mL 농도의 IL-1β, 및 임의로 18.8 ng/mL 농도의 IL-21의 존재에서 배양을 포함한다.

[0064] 본원에서 "비-조혈 조직" 또는 "비-조혈 조직 샘플"에 대한 언급은 피부(예를 들어, 인간 피부) 및 장(예를 들어, 인간 장)을 포함한다. 비-조혈 조직은 혈액, 골수 또는 흉선 조직 이외의 조직이다. 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 피부(예를 들어, 인간 피부)이다. 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 장 또는 위장관(예를 들어, 인간 장 또는 인간 위장관)이다. 일부 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 혈액 또는 활액과 같은 생물학적 유체의 특정 유형의 샘플로부터 수득되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따라 림프구 및/또는 γδ T 세포가 단리된 비-조혈 조직 샘플은 피부(예를 들어, 인간 피부)이며, 이는 당업계에 공지된 방법에 의해 수득될 수 있다. 대안적으로, 본원에 제공된 림프구 및/또는 γδ T 세포의 단리 방법은 위장관(예를 들어, 결장 또는 장), 유선, 폐, 전립선, 간, 비장, 췌장, 자궁, 질 및 다른 피부, 점막 또는 장액막에 적용될 수 있다. 림프구 및/또는 γδ T 세포는 또한 인간 암 조직 샘플, 예를 들어 유방 또는 전립선의 종양에 상주할 수 있다. 일부 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 인간 암 조직 샘플(예를 들어, 고형 종양 조직)로부터 유래될 수 있다. 다른 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 인간 암 조직(예를 들어, 실질적인 수의 종양 세포가 없는 조직) 이외의 비-조혈 조직 샘플로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 근처 또는 인접한 암 조직으로부터 분리된 피부 영역(예를 들어, 건강한 피부)으로부터 유래할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, γδ T 세포는 인간 암 조직으로부터 수득되지 않는다. 추가 구현예에서, 림프구는 인간 암 조직으로부터 수득되지 않는다.

[0065] 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법의 비-조혈 조직 샘플은 인간으로부터 수득되었다. 대안적인 구현예에서, 본원에 정의된 방법의 비-조혈 조직 샘플은 비-인간 동물 대상체로부터 수득되었다.

[0066] 이러한 조직을 수득하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법의 예는 메스(scalpel) 외식편 또는 펀치 생검을 포함하고 방법에 따라 크기가 다를 수 있다. 일부 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 펀치 생검에 의해 수득된다.

[0067] 본 발명의 일부 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 온전한 생검물이다. 본원에서 "온전한" 생검물 또는 "외식

편"에 대한 언급은 실질적으로 파괴되지 않거나 파괴되지 않은 조직 및 조직 샘플을 포함하여, 조직 샘플로부터 생검물 또는 외식편을 제거하는 절제의 둘레 내에서 생검물 또는 외식편의 구조적 무결성이 의도적으로 파괴되지 않도록 한다. 이러한 온전한 생검물 또는 외식편은 취급으로 인한 경미한 파괴를 제외하고는 대체로 유지된 3차원 구조를 가질 것이다. 따라서 이러한 온전한 생검물 또는 외식편은 예컨대 다지기 또는 쪼개기에 의해 기계적으로 파괴되지 않았고, 예를 들어 화학적으로도 효소적으로도 파괴되지 않았다. 온전한 생검물 또는 온전한 조직 샘플은 전체 조직, 완전한 조직, 조직의 일부 또는 상기 조직의 모든 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 구현예에서 온전한 생검물은 피부의 모든 층을 포함한다. 추가 구현예에서, 생검물은 피부의 표피 및 진피층을 포함한다. 생검물이 온전한 이러한 구현예에서, 이러한 층 사이의 분리 및 구별이 유지된다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 본원에서 "온전한"에 대한 언급은 전체 두께의 비-조혈 조직 샘플의 생검물을 추가로 포함한다.

[0068] 따라서, 본 발명의 한 특정 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 다져지지 않는다. 추가 구현예에서, 온전한 생검은 펀치 생검이다. 또 다른 구현예에서, 온전한 생검물은 펀치 생검에 의해 수득된다.

[0069] 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 펀치 생검이다. 펀치 생검은 편리하게 원형 단면이고 적합하게는 직경이 적어도 1㎜이지만 임의의 모양일 수 있다. 또 다른 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 적어도 직경 2㎜, 예컨대 적어도 직경 3㎜, 적어도 직경 4㎜, 적어도 직경 5㎜, 적어도 직경 6㎜, 적어도 직경 7㎜ 또는 적어도 직경 8㎜의 펀치 생검을 포함한다. 추가 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 직경 8㎜ 이하, 예컨대 직경 7㎜ 이하, 직경 6㎜ 이하, 직경 5㎜ 이하 또는 직경 3㎜ 이하의 펀치 생검을 포함한다. 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 직경 1㎜ 내지 8㎜, 예컨대 직경 2㎜ 내지 4㎜의 펀치 생검을 포함한다. 특정 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 직경 3㎜의 펀치 생검을 포함한다.

[0070] 한 구현예에서, 생검물은 피부 생검물이고 표피 및 진피 층을 포함한다. 추가 구현예에서, 생검물은 실질적으로 피하 지방을 포함하지 않는다. 따라서, 한 구현예에서, 생검물은 표피 및 진피 층을 포함하고 실질적으로 피하 지방 층을 포함하지 않는다. 추가 구현예에서, 생검물은 피하 지방을 포함하지 않는다. 대안적으로, 피하 지방은 제거되지 않으므로 생검물에 존재(또는 적어도 부분적으로 존재)한다. 따라서, 또 다른 추가 구현예에서, 생검물은 표피 및 진피 층으로 이루어진다. 한 구현예에서, 생검물은 전체 두께의 비-조혈 조직 샘플을 포함한다.

[0071] 본 발명의 방법은 본원에 정의된 바와 같은 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다. 본원에서 "배양"에 대한 언급은 세포 및/또는 비-조혈 조직 샘플에 필요하고/하거나 바람직한 성장 인자 및/또는 필수 영양소를 포함하는 배지에 비-조혈 조직 샘플로부터 단리, 분리, 제거, 정제 또는 농축된 세포를 포함하는 세포 및/또는 비-조혈 조직 샘플을 첨가하는 것을 포함한다. 이러한 배양 조건은 본 발명에 따른 비-조혈 조직 샘플로부터 단리될 세포 또는 세포 집단에 따라 적응될 수 있거나 비-조혈 조직 샘플로부터 단리되고 확장될 세포 또는 세포 집단에 따라 적응될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0072] 특정 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플의 배양은 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하기에 충분한 기간 동안이다. 대안적인 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플의 배양은 비-조혈 조직 샘플(예를 들어, αβ T 세포 및/또는 NK(자연 살해) 세포)로부터 γδ T 세포 이외의 림프구를 단리하기에 충분한 기간 동안이다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 적어도 7일이다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 적어도 14일이다. 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 45일 미만, 예컨대 40일 미만, 예컨대 35일 미만, 예컨대 30일 미만, 예컨대 25일 미만이다. 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 14일 내지 35일, 예컨대 14일 내지 21일이다. 또 다른 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 약 19일, 예컨대 19일이다. 다른 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따른 배양 기간은 약 21일, 예컨대 21일이다.

[0073] 본 발명의 특정 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 따라 단리된 림프구 및/또는 γδ T 세포는 비-조혈 조직 샘플의 배양 후 비-조혈 조직 샘플의 배양물로부터 수집된다. 본원에 정의된 바와 같은 림프구 및/또는 γδ T 세포의 수집은 배양물로부터 림프구 및/또는 γδ T 세포의 물리적 수집, 다른 림프구로부터 림프구 및/또는 γδ T 세포의 단리(예를 들어, αβ T 세포, γδ T 세포 및/또는 NK 세포) 또는 기질 세포(예를 들어, 섬유아세포)로부터 림프구 및/또는 γδ T 세포의 단리 및/또는 분리를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 기계적 수단(예를 들어, 피펫팅)에 의해 수집된다. 추가 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 자기 분리 및/또는 표지화에 의해 수집된다. 또 다른 추가 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 FACS와 같은 유세포 분석 기술에 의해 수집된다. 따라서, 특정 구현예에서, γδ T 세포는 γδ T 세포를 특이적 표지화함으로써 수집된다. 추가 구현예에서, 림프구는 배양물 내의 다른 세포와 구별하기 위해 림프구의 특

이적 표지화에 의해 수집된다. 림프구 및/또는 γδ T 세포의 이러한 수집은 비-조혈 조직 샘플의 배양물로부터의 물리적 제거, 별도의 배양 용기로의 이동, 또는 별도의 또는 상이한 배양 조건으로의 이동을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

[0074] 림프구 및/또는 γδ T 세포의 이러한 수집은 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구 및/또는 γδ T 세포의 단리된 집단을 달성하기에 충분한 시간의 기간 후에 수행된다는 것이 이해될 것이다. 특정 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 비-조혈 조직 샘플의 배양의 적어도 1주, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일 또는 적어도 14일 후에 수집된다. 적합하게는, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 40일 이하, 예컨대 38일 이하, 36일 이하, 34일 이하, 32일 이하, 30일 이하, 28일 이하, 26일 이하 또는 24일 이하 후에 수집된다. 한 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 비-조혈 조직 샘플의 배양 적어도 14일 후에 수집된다. 추가 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 비-조혈 조직 샘플의 배양 14 내지 21일 후에 수집된다. 또 다른 추가 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 배양 약 19일 후, 예컨대 19일 후에 수집된다. 다른 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 배양 약 21일 후, 예컨대 21일 후에 수집된다.

[0075] 본 발명의 특정 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 혈청(예를 들어, 인간 AB 혈청 또는 태아 소 혈청(FBS))을 함유하는 배지에서 배양된다. 추가 구현예에서, 비-조혈 조직은 10% 인간 AB 혈청을 함유하는 배지에서 배양된다. 또 다른 구현예에서, 비-조혈 조직은 5% 인간 AB 혈청을 함유하는 배지에서 배양된다. 이 구현예에 따르면, 하기에 정의된 바와 같은 혈청 대체물이 배지에 추가로 함유될 수 있다. 따라서, 또 다른 추가 구현예에서 비-조혈 조직은 5% 인간 AB 혈청 및 5% 혈청 대체물을 함유하는 배지에서 배양된다.

[0076] 본 발명의 특정 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 혈장(예를 들어, 인간 혈장)을 함유하는 배지에서 배양된다. 추가 구현예에서, 조혈 조직은 2.5% 인간 혈장을 함유하는 배지에서 배양된다.

[0077] 본 발명의 대안적인 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 실질적으로 혈청이 없는 배지(예를 들어, 무혈청 배지 또는 혈청-대체물(SR)을 함유하는 배지)에서 배양된다. 추가 구현예에서, 조혈 조직은 5% 혈청 대체물을 함유하는 배지에서 배양된다. 따라서, 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 무혈청 배지에서 배양된다. 이러한 무혈청 배지는 또한 혈청 대체물 배지를 포함할 수 있으며, 여기서 혈청 대체물은 인간 또는 동물 유래 혈청의 사용을 피하기 위해 화학적으로 정의된 성분을 기반으로 한다.

[0078] 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 동물-유래 생성물을 함유하지 않는 배지에서 배양된다.

[0079] 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 단리 용기에서 수행된다. "단리 용기"에 대한 언급은 임의로 합성 스캐폴드를 추가로 포함하는 림프구 및/또는 γδ T 세포의 분리를 위한 비-조혈 조직 샘플을 포함하는 용기를 지칭한다. 단리 용기는 단리 방법에만 사용될 수 있고 추가 확장 단계에는 사용할 수 없다.

[0080] 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 기체 투과성 물질을 포함하는 용기 (예를 들어, 단리 용기)에서 수행된다. 이러한 물질은 산소, 이산화탄소 및/또는 질소와 같은 기체를 투과하여 용기의 내용물 및 주변 대기 사이의 기체 교환을 허용한다. 본원에서 "용기"에 대한 언급은 배양 접시, 배양 플레이트, 단일-웰 접시, 다중-웰 접시, 다중-웰 플레이트, 플라스크, 다층 플라스크, 병(예컨대 롤러 병), 생물반응기, 백, 튜브 등을 포함한다. 이러한 용기는 비-부착 세포 및 다른 림프구의 확장을 포함하는 방법에 사용하기 위해 당업계에 공지되어 있다. 그러나, 기체 투과성 물질을 포함하는 용기는 또한 놀랍게도 일반적으로 부착되는 것으로 간주되는 γδ T 세포의 단리에 유용성을 발견한다. 배양을 위한 이러한 용기의 사용은 비-조혈 조직 샘플로부터 단리된 γδ T 세포의 수율을 크게 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 이러한 용기는 또한 섬유아세포 및 부착 세포 유형을 포함하는 다른 기질 세포(예를 들어, 상피 세포)보다 γδ T 세포 및 다른 림프구를 우선적으로 지지하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 한 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 기체 투과성 물질을 포함하는 용기는 γδ T 세포 및 다른 림프구(예를 들어, αβ T 세포 및/또는 NK 세포)를 우선적으로 지지한다. 추가 구현예에서, 섬유아세포 및/또는 다른 기질 세포(예를 들어, 상피 세포)는 기체 투과성 물질을 포함하는 용기에서 수행된 배양물에 존재하지 않는다.

[0081] 기체 투과성 물질을 포함하는 이러한 용기는 비다공성인 기체 투과성 물질을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 한 구현예에서, 기체 투과성 물질은 비다공성이다. 일부 구현예에서, 기체 투과성 물질은 실리콘, 플루오로에틸렌 폴리프로필렌, 폴리올레핀, 또는 에틸렌 비닐 아세테이트 공중합체와 같은 막 필름이다. 또한, 이러한 용기는 기체 투과성 물질, 기체 투과성 막 필름 또는 비다공성 기체 투과성 물질의 일부만을 포함할 수 있다. 따라서, 또 다른 추가 구현예에 따르면, 용기는 상부, 하부 및 적어도 하나의 측벽을 포함하고, 여기서 상기 용기 하부의 적어도 일부는 상기 상부가 상기 하부 위에 있을 때 실질적으로 수평인 평면에 있는 기체 투과성 물질을

포함한다. 한 구현예에서, 용기는 상부, 하부, 및 적어도 하나의 측벽을 포함하고, 여기서 상기 하부의 적어도 일부는 상기 상부가 상기 하부 위에 있을 때 수평면에 있는 기체 투과성 물질을 포함한다. 추가 구현예에서, 용기는 상부, 하부 및 적어도 하나의 측벽을 포함하고, 여기서 상기 적어도 하나의 측벽은 상기 상부가 상기 하부 위에 있을 때 수직 평면에 있을 수 있는 기체 투과성 물질을 포함하거나 상기 상부가 상기 하부보다 위에 있지 않을 때의 수평면에 있을 수 있다. 이러한 구현예에서, 상기 하부 또는 상기 측벽의 일부만이 기체 투과성 물질을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 대안적으로, 상기 하부의 전체 또는 상기 측벽의 전체는 기체 투과성 물질을 포함할 수 있다. 또 다른 추가 구현예에서, 기체 투과성 물질을 포함하는 상기 용기의 상기 상부는 예를 들어 O-링의 이용에 의해 밀봉될 수 있다. 이러한 구현예는 유출을 방지하거나 용기 내용물의 증발을 감소시키는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 특정 구현예에서, 용기는 기체 교환을 허용하는 기체 투과성 물질을 포함하는 액체 밀봉 용기를 포함한다. 대안적인 구현예에서, 기체 투과성 물질을 포함하는 상기 용기의 상기 상부는 수평면에 있고 상기 하부 위에 있으며 밀봉되지 않는다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 상부는 용기의 상부로부터 기체 교환을 허용하도록 구성된다. 추가 구현예에서, 기체 투과성 용기의 상기 하부는 용기의 하부로부터 기체 교환을 허용하도록 구성된다. 또 다른 추가 구현예에서, 기체 투과성 물질을 포함하는 상기 용기는 액체 밀봉 용기일 수 있고 유입구 및 유출구 포트 또는 튜브를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 기체 투과성 물질을 포함하는 용기는 상부, 하부 및 임의로 적어도 하나의 측벽을 포함하고, 여기서 상기 상부 및 상기 하부의 적어도 일부는 기체 투과성 물질을 포함하고, 존재하는 경우 적어도 하나의 측벽의 적어도 일부는 기체 투과성 물질을 포함한다. 예시적인 용기는 WO2005035728 및 US9255243에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. G-REX6 웰 플레이트, G-REX24 웰 플레이트 및 G-REX10 용기와 같은 Wilson Wolf Manufacturing에서 제공하는 G-REX® 세포 배양 장치와 같은 이러한 용기 또한 상업적으로 이용 가능하다.

[0082] 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 합성 스캐폴드 상에 배치된다. 본원에 사용된 바와 같이, "합성 스캐폴드", "스캐폴드" 및 "그리드"는 상호교환적으로 사용되며 세포 성장을 지지하기에 적합한 비-천연 3차원 구조를 지칭한다. 비-조혈 조직 샘플은 합성 스캐폴드 상에 배치되거나 이에 부착되어 외식편에서 스캐폴드로 림프구가 유출되는 것을 촉진할 수 있다. 합성 스캐폴드는 중합체(예를 들어, 천연 또는 합성 중합체, 예를 들어 폴리 비닐 피롤리돈, 폴리메틸메타크릴레이트, 메틸 셀룰로오스, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄), 세라믹(예를 들어, 인산삼칼슘, 칼슘 알루미네이트, 칼슘 히드록시아파타이트) 또는 금속(예를 들어, 탄탈륨, 티타늄, 백금 및 백금, 니오븀, 하프늄, 텅스텐 및 이들의 합금 조합과 동일한 원소 그룹의 금속)과 같은 천연 및/또는 합성 물질로 구성될 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 합성 스캐폴드는 탄탈륨 코팅된다. 생물학적 인자(예를 들어, 콜라겐(예컨대, 콜라겐 I 또는 콜라겐 II), 피브로넥틴, 라미닌, 인테그린, 혈관신생 인자, 항염증 인자, 글리코사미노글리칸, 비트로겐, 항체 및 이의 단편, 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, IL-1β 및 이들의 조합, 예컨대, IL-2, IL-15, IL-4, IL-21 및 이들의 조합)은 스캐폴드 표면 상에 코팅되거나 스캐폴드 물질 내에 캡슐화되거나 당업계에 공지된 방법에 따라 배지에 첨가되어 세포 부착, 이동, 생존 또는 증식을 향상시킨다. 이 방법 및 다른 방법이 사용되어 많은 다른 비-조혈 조직 유형, 예를 들어 피부, 장, 전립선 및 유방으로부터 림프구를 단리할 수 있다.

[0083] 한 구현예에서, 비-조혈 조직 샘플은 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구를 단리하는 데 사용되는 용기 내부의 합성 스캐폴드 상에 배치된다. 추가 구현예에서, 합성 스캐폴드는 림프구 및/또는 γδ T 세포가 비-조혈 조직 샘플로부터 용기의 하부로 유출되는 것을 촉진하도록 구성된다. 이러한 구현예는 비-조혈 조직 샘플 및/또는 기질 세포(예를 들어, 섬유아세포 및/또는 상피 세포)로부터 림프구(예를 들어, γδ T 세포, αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 단리 및/또는 분리를 허용하는 이점을 갖는다. 또한, 이러한 구현예는 비-조혈 조직 샘플로부터 배양 용기의 하부로 림프구(예를 들어, γδ T 세포, αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 수집을 허용한다. 특정 구현예에서, 합성 스캐폴드는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 유출을 촉진하도록 구성된다. 추가 구현예에서, 합성 스캐폴드는 비-조혈 조직 샘플로부터의 αβ T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구의 유출을 촉진하도록 구성된다.

[0084] 따라서, 본원에 정의된 방법의 한 양태에서, 합성 스캐폴드는 비-조혈 조직 샘플로부터 배양 용기의 하부로 림프구 유출을 촉진하도록 구성된다. 본원에 정의된 방법의 추가 양태에서, 합성 스캐폴드는 비-조혈 조직 샘플에서 용기 하부로 γδ T 세포 유출을 촉진하도록 구성된다.

[0085] 본 발명의 방법은 이전에 기재된 것보다 더 큰 총 세포 수율을 제공한다. 한 구현예에서, 총 단리된 세포 수는 적어도 10^6 세포/cm^2, 적어도 $2x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $5x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $10x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $20x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $30x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $40x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $50x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $60x10^6$ 세포/cm^2, 적

어도 $70x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $80x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $90x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $100x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $150x10^6$ 세포/cm^2, 적어도 $200x10^6$ 세포/cm^2이다. 특정 구현예에서, 총 단리된 세포 수는 적어도 $50x10^6$ 세포/cm^2이다. 또 다른 구현예에서, 총 단리된 세포 수는 적어도 $100x10^6$ 세포/cm^2이다.

[0086] 혈액에서 우세한 γδ T 세포는 주로 Vδ2 T 세포인 반면, 비-조혈 조직에서 우세한 γδ T 세포는 주로 Vδ1 T 세포이며, 따라서 Vδ1 T 세포는 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포 집단의 약 70-80%를 포함한다. 그러나, 일부 Vδ2 T 세포는 비-조혈 조직, 예를 들어 장에서 또한 발견되며, 여기서 이들은 γδ T 세포의 약 10-20%를 포함할 수 있다. 비-조혈 조직에 상주하는 일부 γδ T 세포는 Vδ1 또는 Vδ2 TCR 중 어느것도 발현하지 않으며 본원에서는 이중 음성(DN) γδ T 세포로 지칭된다. 이들 DN γδ T 세포는 대부분 Vδ3-발현이고 소수의 Vδ5-발현 T 세포일 수 있다. 따라서, 일반적으로 비-조혈 조직에 상주하고 본 발명의 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 바람직하게는 더 적은 양의 DN γδ T 세포를 포함하는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어 Vδ1 T 세포이다.

[0087] 따라서, 한 바람직한 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 Vδ1 T 세포 집단을 포함한다. 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 DN γδ T 세포 집단을 포함한다. 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 Vδ3 T 세포 집단을 포함한다. 한 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 Vδ5 T 세포 집단을 포함한다.

[0088] γδ T 세포는 또한 이들이 발현하는 γ 사슬의 유형에 의해 정의될 수 있다. 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법에 의해 단리된 γδ T 세포는 Vγ4 T 세포 집단을 포함한다. 대부분의 경우 Vγ4 T 세포는 장 조직 샘플에서 수득한다.

[0089] 단리 방법은 기준 집단보다 수가 더 많은 γδ T 세포의 단리된 집단을 제공한다(예를 들어, 수적으로 적어도 2배, 수적으로 적어도 3배, 수적으로 적어도 4배, 수적으로 적어도 5배, 수적으로 적어도 6배, 수적으로 적어도 7배, 수적으로 적어도 8배, 수적으로 적어도 9배, 수적으로 적어도 10배, 수적으로 적어도 15배, 수적으로 적어도 20배, 수적으로 적어도 25배, 수적으로 적어도 30배, 수적으로 적어도 35배, 수적으로 적어도 40배, 수적으로 적어도 50배, 수적으로 적어도 60배, 수적으로 적어도 70배, 수적으로 적어도 80배, 수적으로 적어도 90배, 수적으로 적어도 100배, 수적으로 적어도 200배, 수적으로 적어도 300배, 수적으로 적어도 400배, 수적으로 적어도 500배, 수적으로 적어도 600배, 수적으로 적어도 700배, 수적으로 적어도 800배, 수적으로 적어도 900배, 수적으로 적어도 1,000배 수적으로 적어도 5,000배, 수적으로 적어도 10,000배).

[0090] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 단리된 γδ T 세포 집단은 NKG2A를 발현하는 세포의 낮은 비율을 갖는다. 예를 들어, γδ T 세포의 단리된 집단은 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만의 NKG2A+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, γδ T 세포의 단리된 집단은 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 약 9%, 약 8%, 약 7%, 약 6%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1%의 NKG2A+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 10% 미만의 NKG2A+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 약 8%의 NKG2A+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서 단리된 γδ T 세포는 NKG2A를 실질적으로 발현하지 않는다.

[0091] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 단리된 Vδ1 T 세포 집단은 NKG2A를 발현하는 세포의 낮은 비율을 갖는다. 예를 들어, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만의 NKG2A+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10%, 약 9%, 약 8%, 약 7%, 약 6%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1%의 NKG2A+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 10% 미만의 NKG2A+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서, Vδ1 세포의 단리된 집단은 약 9%의 NKG2A+ 세포의 빈도를 갖는다. 또 다른 구현예에서, Vδ1 세포의 단리된 집단은 약 7%의 NKG2A+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서 단리된 Vδ1 세포는 NKG2A를 실질적으로 발현하지 않는다. 한 구현예에서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 10% 미만이 NKG2A를 발현한다.

[0092] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 단리된 γδ T 세포 집단은 CD45RA를 발현하는 세포의 낮은 비율을 갖는다. CD45RA는 말단 분화와 관련된 마커이므로 단리된 세포 집단에서 이 마커의 발현을 감소시키는 것이 바람직하다. 예를 들어, γδ T 세포의 단리된 집단은 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만 또는 30% 미만의 CD45RA+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, γδ T 세포의 단리된 집단은 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20% 또는 약 10%의 CD45RA+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 30% 미만의 CD45RA+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 약 10%의

CD45RA+ 세포의 빈도를 갖는다.

[0093] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 단리된 Vδ1 T 세포 집단은 CD45RA를 발현하는 세포의 낮은 비율을 갖는다. 예를 들어, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만 또는 30% 미만의 CD45RA+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20% 또는 약 10%의 CD45RA+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단은 30% 미만의 CD45RA+ 세포의 빈도를 갖는다. 따라서, 한 구현예에서, Vδ1 세포의 단리된 집단은 약 10%의 CD45RA+ 세포의 빈도를 갖는다. 한 구현예에서, Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 80% 미만이 CD45RA를 발현하고, 예컨대 Vδ1 T 세포의 단리된 집단의 30% 미만이 CD45RA를 발현한다.

[0094] 비-조혈 조직(예를 들어, 피부)으로부터 단리 시, γδ T 세포는 일반적으로 예를 들어 αβ T 세포, B 세포 및 자연 살해(NK) 세포를 함유하는 더 큰 림프구 집단의 일부가 될 것이다. 일부 구현예에서, 림프구의 단리된 집단의 1%-10%는 γδ T 세포이다(예를 들어, 피부-유래 림프구의 단리된 집단의 1-10%는 γδ T 세포임). 대부분의 경우, γδ T 세포 집단(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 집단)은 Vδ1 T 세포의 대규모 집단을 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 림프구(예를 들어, 피부-유래 림프구)의 단리된 집단의 1-10%는 Vδ1 T 세포(예를 들어, Vδ1 T 세포는 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 또는 단리된 집단 γδ T 세포 집단의 90%). 일부 예에서, γδ T 세포의 단리된 집단의 10% 미만은 Vδ2 T 세포이다(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포의 단리된 집단의 10% 미만은 Vδ2 T 세포임).

[0095] Vδ2 T 세포, αβ T 세포, B 세포, 또는 NK 세포와 같은 비-Vδ1 T 세포 또는 비-DN T 세포는 γδ T 세포의 단리된 집단으로부터 제거될 수 있다(예를 들어, 확장 단계 이전, 동안, 또는 이후).

[0096] 단리된 γδ T 세포(예를 들어, 피부에서 단리된 γδ T 세포, 예를 들어, 피부에서 단리된 Vδ1 T 세포)는 상응하는 조혈 조직-유래 세포(예를 들어, 혈액-유래 γδ T 세포 및/또는 혈액-유래 Vδ2 T 세포)와 구별되는 표현형을 가진다. 예를 들어, γδ T 세포의 단리된 집단은 기준 집단, 예를 들어 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 TCR 활성화 집단 또는 조혈 조직-유래 세포(예를 들어, 혈액-유래 γδ T 세포 및/또는 혈액-유래 Vδ2 T 세포)의 상응하는 집단보다 더 높은 수준의 CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 또는 CD103을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 $CCR3^+$ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 $CCR4^+$ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 $CCR7^+$ 세포; 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 $CCR8^+$ 세포; 및/또는 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 $CD103^+$ 세포를 포함할 수 있다. γδ T 세포의 단리된 집단은 CCR3, CCR4, CCR7, CCR8, 또는 CD103 중 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 또는 6개 모두를 발현할 수 있다.

[0097] 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 피부-유래 Vδ1 T 세포)의 단리된 집단은 또한 기능에 의해 특징규명될 수 있다. 당업계에 공지된 기능적 검정은 본 발명의 임의의 비-조혈 조직-유래 세포 (예를 들어, γδ T 세포의 단리된 집단, 피부-유래 Vδ1 T 세포, 또는 γδ T 세포 및/또는 피부-유래 Vδ1 T 세포의 확장된 집단) 및 기준 세포(예를 들어, 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 TCR 활성화 집단 또는 조혈 조직-유래 세포, 예를 들어, 혈액-유래 γδ T 세포 및/또는 혈액 유래 Vδ2 T 세포의 상응하는 집단) 사이의 기능적 차이를 결정하기 위해 수행될 수 있다. 이러한 검정은 증식 검정, 세포독성 검정, 결합 검정, 지속성 및/또는 위치 측정 검정 등을 포함할 수 있다.

[0098] 따라서, 본 발명의 한 양태에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포 집단을 단리하기 위한 본원에 정의된 방법은 고갈되지 않은 림프구 및/또는 γδ T 세포 집단과 일치하는 표면 표현형을 포함하는 집단을 생산한다.

[0099] 본 발명의 방법은 또한 TCR-음성 세포와 같은 다른 림프구의 단리를 개선하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 방법이 제공된다:

[0100] (i) 비-조혈 조직 샘플을 혈청 대체물, 인간 혈장 및/또는 인간 AB 혈청을 포함하는 배지에서 배양하는 단계; 및

[0101] (ii) 비-조혈 조직 샘플로부터 배양된 림프구 집단을 수집하는 단계. 적합하게는 배지는 혈청 대체물을 포함한다.

[0102] 본원에 제시된 실시예에 나타난 바와 같이, 단백질 공급원은 비-조혈 조직 샘플로부터 단리된 TCR-음성 세포의 수에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 한 구현예에서 림프구의 단리된 집단은 TCR-음성 세포 집단을 포함한다. TCR-음성 세포 집단은 종종 많은 수의 NK 세포를 함유하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. TCR-음성 세포의 단리된 집단은 NK 세포를 함유할 수 있다. 한 구현예에서, TCR-음성 세포의 단리된 집단의 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 70% 또는 80%는 NK 세포이다.

[0103] 본 발명의 이러한 양태에서 사용되는 배양 방법은 본원에 기재된 다른 조건을 함유할 수 있다. 한 구현예에서, 단계 (i)는 IL-2 및 IL-15의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다.

[0104] 한 구현예에서, 단계 (i)는 IL-4, IL-1β, IL-21 및/또는 IFN-γ의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 단계 (i)는 IL-4 및/또는 IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 추가로 포함한다.

[0105] 한 구현예에서, 배양은 IFN-γ의 부재에서 수행된다. 본원에 기재된 실험에서 수득한 결과의 통계적 분석 후, IFN-γ의 부재할 때 단리 중에 수득한 TCR-음성 세포의 수가 증가할 수 있는 것으로 나타난다. 한 구현예에서, 배양은 IL-21의 부재에서 수행된다. 대안적인 구현예에서, 단계 (i)는 15ng/mL 내지 25ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/mL, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/mL의 농도에서 IL-21의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 배양은 18.8 ng/mL의 농도에서 IL-21의 존재에서 수행된다.

[0106] 한 구현예에서, 방법은 림프구 또는 γδ T 세포의 단리된 집단을 동결시키는 것을 포함한다. 세포는 예를 들어 Cryostor10 세포 동결 용액에서 동결될 수 있다. 많은 동결 용액 및 매개변수가 당업계에 공지되어 있고 본 발명의 이러한 양태에서 유용할 것이다. 동결된 세포는 사용에 필요할 때까지 예를 들어 -80℃ 내지 -200℃에서 임의로 액체 질소(기상)에 보관될 수 있다.

[0107] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득된 림프구(예를 들어, 피부-유래 αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 단리된 집단이 제공된다. 추가 구현예에서, 림프구의 단리된 집단은 동결된다.

[0108] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득가능한 림프구(예를 들어, 피부-유래 αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 단리된 집단이 제공된다.

[0109] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득된 γδ T 세포의 단리된 집단이 제공된다. 추가 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단이 동결된다.

[0110] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득가능한 γδ T 세포의 단리된 집단이 제공된다.

[0111] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 방법이 제공된다:

[0112] (i) 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0113] (ii) γδ T 세포의 단리된 집단을 동결시키는 단계.

[0114] 이전 방법은 확장 후 γδ T 세포를 동결시키는 것을 포함했지만, 본 발명자는 단리 후 동결된 세포가 농축되고 적어도 신선한 등가물만큼 확장된다는 것을 발견했다. 동결 후-단리는 막대한 자원 비용이 들고 작동자-중심의 (operator-intensive) 대규모 확장에 착수하기 전에 기증자에 대한 소규모 품질 관리 확장 검증을 수행할 시간을 허용한다. 또한 이는 단일 기증자로부터 세포의 배치의 생산이 생산되게 할 수 있다(즉, 필요에 따라 나중에 동일한 기증자로부터 추가 배치를 생산할 가능성이 있는 확장된 세포의 한 배치를 생산하기 위해).

[0115] 본 발명의 이러한 양태에서, 단리 방법은 본원에 기재된 방법, 또는 IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21 또는 이들의 조합, 예컨대 IL-2 및 IL-15, 특히 IL-4 및/또는 IL-21과 임의로 조합된 IL-2, IL-15의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것과 같은 대안적 단리 방법을 포함할수 있다. 한 구현예에서, γδ T 세포는 IL-2 및 IL-15의 존재에서, 임의로 IL-1β, IL-4 및/또는 IL-21과 조합하여 비-조혈 조직 샘플을 배양함으로써 단리된다. 이 구현예에 따르면, 존재하는 경우 IL-21은 15 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 따라서, 추가 구현예에서, 존재하는 경우 IL-21은 18.8ng/mL의 농도이다.

[0116] 한 구현예에서, 단리 단계 (i)는 적어도 14일의 기간을 갖는다. 다른 구현예에서, 단리 단계 (i)는 21일 미만의 기간을 갖는다. 또 다른 추가 구현예에서, 단리 단계 (i)는 14일 내지 35일의 기간, 예컨대 약 또는 19일 내지 21일의 기간을 갖는다. 따라서, 한 구현예에서, 단리 단계 (i)는 약 19일, 예컨대 19일의 기간을 갖는다. 또 다

른 구현예에서, 단리 단계 (i)는 약 21일, 예컨대 21일의 기간을 갖는다.

[0117] 세포는 Cryostor10 세포 동결 용액과 같은 적합한 동결 용액에서 동결될 수 있다. 많은 동결/동결보존 용액 및 매개변수가 당업계에 공지되어 있고 본 발명의 이러한 양태에서 유용할 것이다. 적합한 동결 용액은 DMSO 및 다른 적합한 배지보충물, 예컨대 인간 혈청 알부민, 덱스트란, 덱스트로스, NaCl, Hespan 또는 PlasmaLyte A를 함유할 수 있다. 이후 세포는 약 -80℃ 내지 약 -200℃, 예컨대 약 -80℃ 내지 약 -135℃의 온도로 동결된다.

[0118] 동결보존은 바이알을 동결 용기에 넣은 다음 -80℃ 동결고에 예를 들어 1-3일 동안 보관한 다음 액체 질소 저장 시스템의 기상으로 옮겨서 수행될 수 있다. 대안적인 구현예에서, 단리된 γδ T 세포는 제어된 속도 동결고에서 동결된다.

[0119] 동결된 세포는 장기 보관에 적합하므로 단리된 세포는 후속적인 해동(defrosting) 및 확장 전에 일정 기간 동안 동결된 상태로 유지될 수 있음을 이해해야 한다. 동결된 세포는 사용에 필요할 때까지, 예를 들어 -80℃ 내지 -200℃에서 임의로 액체 질소(기상)에 보관할 수 있다.

[0120] 동결보존 후, 세포는 예를 들어 37℃ 수조에서 해동(thawed)(즉, 해동(defrosted))될 수 있다. 해동된 세포는 이후에 확장 방법에 사용될 수 있다. 확장 방법은 본원에 기재된 임의의 방법 또는 당업계에 기재된 바와 같은 방법을 포함할 수 있다 (예를 들어, WO2017072367 및 WO2018202808 참조).

[0121] 따라서, 방법은 γδ T 세포의 동결된 집단을 해동하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 방법은 γδ T 세포의 해동된 집단을 적어도 5일 동안 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계를 포함할 수 있다.

[0122] 따라서, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 분리 및 확장하는 방법이 제공된다:

[0123] (i) 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계;

[0124] (ii) 단리된 γδ T 세포를 동결시키는 단계;

[0125] (iii) γδ T 세포를 해동하는 단계; 및

[0126] (iv) 해동된 γδ T 세포를 적어도 5일 동안 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계.

[0127] 특정 구현예에서, 단리 단계 (i)는 15 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/mL, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/mL, 예를 들어 18.8ng/mL의 농도에서 IL-21, 및 약 19일, 예컨대 19일의 기간 동안 IL-1β의 존재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 단리 단계 (i)는 비-조혈 조직 샘플을 IL-1β의 존재 및 IL-21의 부재에서 약 19일, 예컨대 19일 또는 약 21일, 예컨대 21일의 기간 동안 배양하는 것을 포함한다. 본원에 제시된 데이터는 이러한 단리 조건이 단계 (iii)에서 해동 후 생존 γδ T 세포 및 후속 확장 배양 동안 확장하는 능력, 즉 단계 (iv)에서 확장된 γδ T 세포 집단을 효과적으로 생산하는 능력을 생산함을 입증한다.

[0128] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에 기재된 방법에 의해 수득된 동결된 단리된 γδ T 세포 집단(즉, 단계 (ii)에서 수득된 동결된 γδ T 세포)이 제공된다.

[0129] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본원에 기재된 방법에 의해 수득가능한 동결된 단리된 γδ T 세포 집단(즉, 단계 (ii)에서 수득된 동결된 γδ T 세포)이 제공된다.

[0130] **확장 방법**

[0131] 특정 구현예에서, 본 발명은 비-조혈 조직-상주 림프구 및/또는 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 αβ T 세포, NK 세포, γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 확장하는 방법을 특징으로 한다. 이러한 방법은 *시험관 내*에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, γδ T 세포는 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 단리된 γδ T 세포 집단으로부터 확장된다. 일반적으로, 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포는 기질 세포(예를 들어, 피부 섬유아세포)와의 물리적 접촉을 제거하면 자발적으로 확장할 수 있다. 본원에 정의된 방법은 이러한 분리를 유도하는 데 사용될 수 있으며, 결과적으로 γδ T 세포가 탈-억제되어 확장을 촉발할 수 있다. 특정 구현예에서, 림프구(예를 들어, 피부-유래 αβ T 세포 및/또는 NK 세포, 장-유래 αβ T 세포 및/또는 NK 세포)는 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 단리된 림프구 집단으로부터 확장될 수 있다.

[0132] 본원에 사용된 "확장된" 또는 "림프구 및/또는 확장된 γδ T 세포 집단"에 대한 언급은 비-확장된 집단보다 더 크거나 더 많은 수의 세포를 함유하는 세포 집단을 포함한다. 이러한 집단은 수적으로 많거나, 수적으로 적거나 집단 내 비율 또는 특정 세포 유형의 확장이 있는 혼합된 집단일 수 있다. 용어 "확장 단계"는 확장 또는 확장된 개체군을 초래하는 과정을 의미한다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 확장 또는 확장된 집단은 확장 단계가 수행되지 않았거나 임의의 확장 단계 이전의 집단에 비해 수적으로 많거나 더 많은 수의 세포를 함유할 수 있다. 확장(예를 들어, 배수-증가 또는 배수-확장)을 나타내기 위해 본원에 나타낸 임의의 숫자는 세포 집단의 수 또는 크기 또는 세포 수의 증가를 예시하고 확장의 양을 나타낸다.

[0133] 따라서, 한 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 단리된 림프구 또는 γδ T 세포가 확장된다. 한 구현예에서, 단리된 림프구 또는 γδ T 세포 집단은 동결된 다음 확장 전에 해동된다.

[0134] 이러한 확장은 임의로 IL-4를 포함하는 IL-2, IL-15 및 IL-21의 존재에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 확장은 임의로 IL-4를 포함하는 IL-9, IL-15 및 IL-21의 존재에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 임의의 확장 단계는 림프구 및/또는 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 기간 동안 수행된다는 것이 이해될 것이다. 한 구현예에서, 림프구 및/또는 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 기간은 적어도 5일이다. 따라서, 한 구현예에서, 확장은 IL-2, IL-15 및 IL-21의 존재에서 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 확장은 IL-2, IL-15, IL-21 및 IL-4의 존재에서 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 추가 구현예에서, 확장은 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 IL-9, IL-15 및 IL-21의 존재에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, 확장은 IL-9, IL-15, IL-21 및 IL-4의 존재에서 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0135] 추가 구현예에서, 확장은 림프구 및/또는 γδ T 세포를 일정 기간(예를 들어, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 21일, 적어도 28일, 또는 그 이상, 예를 들어 5일 내지 40일, 7일 내지 35일, 14일 내지 28일, 또는 약 21일) 동안 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 수 시간(예를 들어, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, 또는 21시간)의 기간 동안 약 35일까지(예를 들어, 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 또는 35일) 배양물에서 확장된다. 한 구현예에서, 림프구 및/또는 γδ T 세포는 14 내지 21일의 기간 동안 확장된다. 따라서, 단리 배양 기간(예를 들어, 1 내지 40일, 예컨대 14 내지 21일)을 포함하여, 일부 구현예에서, 단리 및 확장 단계는 28일 내지 56일, 또는 약 41일 동안 지속될 수 있다.

[0136] 추가 구현예에서, 확장은 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 8일, 적어도 9일, 적어도 10일, 적어도 11일, 적어도 12일, 적어도 13일, 적어도 14일, 적어도 21일, 적어도 28일, 또는 그 이상, 예를 들어 5일 내지 40일, 7일 내지 35일, 14일 내지 28일, 또는 약 21일 동안 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, 확장 단계는 적어도 10, 15 또는 20일 동안 γδ T 세포를 배양하여 확장된 집단을 생산하는 것을 포함한다. 한 구현예에서, 확장 단계는 5 내지 25일, 예컨대 14 내지 21일에 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 확장 단계는 약 20일 동안 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0137] 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는데 효과적인 IL-2의 전형적인 양은 1 IU/mL 내지 2,000 IU/mL(예를 들어, 5 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 10 IU/mL 내지 500 IU/mL, 20 IU/mL 내지 400 IU/mL, 50 IU/mL 내지 250 IU/mL, 또는 약 100 IU/mL, 예를 들어 5 IU/mL 내지 10 IU/mL, 10 IU/mL 내지 20 IU/mL, 20 IU/mL 내지 30 IU/mL, 30 IU/mL 내지 40 IU/mL, 40 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 60 IU/mL, 60 IU/mL 내지 70 IU/mL, 70 IU/mL 내지 80 IU/mL, 80 IU/mL 내지 90 IU/mL, 90 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 120 IU/mL, 120 IU/mL 내지 140 IU/mL, 140 IU/mL 내지 150 IU/mL, 150 IU/mL 내지 175 IU/mL, 175 IU/mL 내지 200 IU/mL, 200 IU/mL 내지 300 IU/mL, 300 IU/mL 내지 400 IU/mL, 400 IU/mL 내지 500 IU/mL, 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 1,000 IU/mL 내지 1,500 IU/mL, 1,500 IU/mL 내지 2,000 IU/mL 또는 그 이상)이다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는데 효과적인 IL-2의 양은 약 100 IU/mL이다.

[0138] 일부 구현예에서, γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 확장된 집단을 생산하는데 효과적인 IL-15의 전형적인 양은 적어도 0.1 ng/mL(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 5 ng/mL 내지 800 ng/mL, 10 ng/mL 내지 750

ng/mL, 20 ng/mL 내지 500 ng/mL, 50 ng/mL 내지 400 ng/mL, 또는 100 ng/mL 내지 250 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5.0 ng/mL, 5.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 50 ng/mL, 50 ng/mL 내지 100 ng/mL, 100 ng/mL 내지 200 ng/mL, 200 ng/mL 내지 500 ng/mL, 또는 500 ng/mL 내지 1,000 ng/mL)이다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는데 효과적인 IL-15의 양은 약 10 ng/mL이다.

[0139] 일부 구현예에서, γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 확장된 집단을 생산하는데 효과적인 IL-21의 전형적인 양은 적어도 0.1ng/mL, 예컨대 적어도 1.0ng/mL(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 100 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 50 ng/mL, 2 ng/mL 내지 50 ng/mL, 3 ng/mL 내지 10 ng/mL, 4 ng/mL 내지 8 ng/mL, 5 ng/mL 내지 10 ng/mL, 6 ng/mL 내지 8 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 10 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 5 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 10 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 20 ng/mL)이다. 추가 구현예에서, IL-21의 양은 전형적으로 200ng/mL 미만, 예컨대 188.8ng/mL의 농도이다. 다른 구현예에서, IL-21의 양은 전형적으로 100ng/mL 미만, 예컨대 50ng/mL 미만, 예컨대 37.5ng/mL의 농도이다. 또 다른 구현예에서, IL-21의 양은 전형적으로 20ng/mL 이하, 예컨대 18 내지 20ng/mL, 예컨대 18, 19 또는 20ng/mL, 예를 들어 18.8ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 방법은 약 6 ng/mL, 예컨대 약 6.25 ng/mL의 농도로 IL-21을 포함한다.

[0140] 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 적어도 0.1ng/mL, 예를 들어 적어도 10ng/mL (예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 1,000 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 100 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 50 ng/mL, 2 ng/mL 내지 50 ng/mL, 3 ng/mL 내지 40 ng/mL, 4 ng/mL 내지 30 ng/mL, 5 ng/mL 내지 20 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 1.0 ng/mL 내지 25 ng/mL, 5 ng/mL 내지 25 ng/mL)의 농도로 IL-4를 포함한다. 추가 구현예에서, 본원에 정의된 방법은 전형적으로 100ng/mL 미만, 예컨대 50ng/mL 미만, 특히 20ng/mL 미만의 농도로 IL-4를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 약 15ng/mL 농도의 IL-4를 포함한다.

[0141] 비-조혈 조직-상주 림프구 및/또는 γδ T 세포의 확장 배양물에서 다른 인자의 대체 또는 첨가가 또한 본원에서 제공된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1β, 인간 혈소판 용해물(HPL) 및 기질 세포-유래 인자-1(SDF-1)은 IL-2 및 IL-15 중 어느 하나에 추가로 또는 이를 대신하여 포함된다. αβ T 세포 또는 NK 세포와 같은 림프구의 확장을 위한 이러한 첨가 또는 대안의 인자는 당업계에 공지되어 있다. 한 구현예에서, 이러한 인자는 γδ T 세포의 확장을 선택적으로 증진시키는 확장에 사용된다. 추가 구현예에서 이러한 인자는 αβ T 세포 및/또는 NK 세포와 같은 림프구의 확장을 선택적으로 증진시키는 확장에 사용된다.

[0142] 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 데 필요한 상기 사이토카인 각각의 양은 하나 이상의 다른 사이토카인의 농도에 의존할 것이라는 것이 이해될 것이다. 예를 들어, IL-2의 농도가 증가하거나 감소하면 그에 따라 IL-15의 농도가 각각 감소하거나 증가할 수 있다. 상기에 언급한 바와 같이, 확장된 집단을 생산하는 데 효과적인 양은 본원에서 세포 확장에 대한 모든 인자의 복합 효과를 지칭한다.

[0143] 확장 방법은 기준 집단보다 수적으로 더 많은 확장된 γδ T 세포 집단을 제공한다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 단계 이전의 γδ T 세포의 단리된 집단보다 수적으로 더 많다 (확장 단계 이전에 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 예를 들어 수적으로 적어도 2배, 수적으로 적어도 3배, 수적으로 적어도 4배, 수적으로 적어도 5배, 수적으로 적어도 6배, 수적으로 적어도 7배, 수적으로 적어도 8배, 수적으로 적어도 9배, 수적으로 적어도 10배, 수적으로 적어도 15배, 수적으로 적어도 20배, 수적으로 적어도 25배, 수적으로 적어도 30배, 수적으로 적어도 35배, 수적으로 적어도 40배, 수적으로 적어도 50배, 수적으로 적어도 60배, 수적으로 적어도 70배, 수적으로 적어도 80배, 수적으로 적어도 90배, 수적으로 적어도 100배, 수적으로 적어도 200배, 수적으로 적어도 300배, 수적으로 적어도 400배, 수적으로 적어도 500배, 수적으로 적어도 600배, 수적으로 적어도 700배, 수적으로 적어도 800배, 수적으로 적어도 900배, 수적으로 적어도 1,000배 수적으로 적어도 5,000배, 수적으로 적어도 10,000배, 또는 그 이상).

[0144] 한 구현예에서, 확장 단계는 실질적인 기질 세포 접촉의 부재에서 단리된 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 확장 단계는 실질적인 섬유아세포 접촉의 부재에서 단리된 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0145] 추가 구현예에서, 확장 단계는 IL-4의 존재에서 단리된 γδ T 세포를 배양하는 것을 추가로 포함한다. 따라서, 한 구현예에서, 확장은 IL-2, IL-15, IL-4 및 IL-21의 존재에서 단리된 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 대안적으로, 확장은 IL-9, IL-15, IL-4 및 IL-21의 존재에서 단리된 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있

다.

[0146] 본원에 정의된 확장 방법은 또한 다른 림프구(예를 들어, αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 확장에도 적용된다는 것이 이해될 것이다. 이러한 구현예에서, 확장 단계는 관련 성장 인자 및/또는 영양소(예를 들어, 사이토카인 및/또는 케모카인)의 존재에서 단리된 림프구를 배양하여 림프구(예를 들어, αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 확장된 집단을 생산하는 것을 포함한다.

[0147] 한 구현예에서, 본원에 정의된 γδ T 세포 집단을 확장하는 방법은 혈청 또는 혈장을 함유하는 배지에서 γδ T 세포 또는 다른 림프구를 배양하는 것을 포함한다. 대안적인 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 γδ T 세포 또는 다른 림프구의 집단을 확장하는 방법은 무혈청 배지에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 γδ T 세포 또는 다른 림프구의 집단을 확장하는 방법은 혈청-대체물을 함유하는 배지에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0148] 일부 구현예에서, 확장 단계 동안 실질적인 TCR 경로 활성화가 존재하지 않는다(예를 들어, 외인성 TCR 경로 활성화제가 배양물에 포함되지 않음). 한 구현예에서, 확장 단계는 외인성 TCR 경로 작용제의 부재를 포함한다. 추가로, 본원에 정의된 방법에 따라 단리된 γδ T 세포를 확장시키는 방법이 제공되며, 여기서 상기 확장 방법은 배양보조세포, 종양 세포, 및/또는 항원-제시 세포와의 접촉을 포함하지 않는다. 따라서, 본원에 정의된 방법의 추가 구현예에서, γδ T 세포의 확장은 실질적인 기질 세포 접촉의 부재에서 γδ T 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0149] 또한 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 큰 집단을 높은 속도에서 생산하는 수단이 제공된다(예를 들어, 기질 세포 접촉 및/또는 TCR 자극을 제거함으로써, 또는 유효량의 인자의 존재에서 배양함으로써). 일부 구현예에서, 본원에 기재된 확장 단계는 하기 방정식에 의해 제공되는 낮은 집단 배가 시간(doubling time)에서 γδ T 세포를 확장시킨다:

[0150] $$\text{배가 시간} = \frac{\text{기간} * \log(2)}{\log(\text{최종 농도}) - \log(\text{처음 농도})}$$

[0151] 본원에 제공된 정보가 주어지면, 당업자는 본 발명이 5일 미만(예를 들어 4.5 일 미만, 4.0 일 미만, 3.9 일 미만, 3.8 일 미만, 3.7 일 미만, 3.6 일 미만, 3.5 일 미만, 3.4 일 미만, 3.3 일 미만, 3.2 일 미만, 3.1 일 미만, 3.0 일 미만, 2.9 일 미만, 2.8 일 미만, 2.7 일 미만, 2.6 일 미만, 2.5 일 미만, 2.4 일 미만, 2.3 일 미만, 2.2 일 미만, 2.1 일 미만, 2.0 일 미만, 46 시간 미만, 42 시간 미만, 38 시간 미만, 35 시간 미만, 32 시간 미만)의 집단 배가 시간에서 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 확장하는 방법을 제공한다는 것을 인지할 것이다.

[0152] 일부 구현예에서, 배양 7일 이내에, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 확장된 집단)은 확장 전에 단리된 γδ T 세포의 집단에 비해 적어도 10배 수의 γδ T 세포를 포함한다. (예를 들어, 확장 전에 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 또는 적어도 8,000배 수의 γδ T 세포). 일부 구현예에서, 배양 14일 이내에, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 확장된 집단)은 확장 전에 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 적어도 20배 수의 γδ T 세포를 포함한다 (예를 들어, 확장 전에 단리된 γδ T 세포의 집단에 비해 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 또는 적어도 10,000배 수의 γδ T 세포). 일부 구현예에서, 배양 21일 이내에, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 확장된 집단)은 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 적어도 50배 수의 γδ T 세포를 포함한다(예를 들어, 확장 전에 단리된 γδ T 세포의 집단에 비해 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배,

적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 또는 적어도 10,000배 수의 γδ T 세포). 일부 구현예에서, 배양 28일 이내에, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포의 확장된 집단)은 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 적어도 100배 수의 γδ T 세포를 포함한다. (예를 들어, 확장 전에 단리된 γδ T 세포의 집단에 비해 적어도 110배, 적어도 120배, 적어도 130배, 적어도 140배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 2,000배, 적어도 3,000배, 적어도 4,000배, 적어도 5,000배, 적어도 6,000배, 적어도 7,000배, 적어도 8,000배, 적어도 9,000배, 적어도 10,000배, 적어도 12,000배, 또는 적어도 15,000배 수의 γδ T 세포).

[0153] 본원에 제공된 방법에 의해 확장된 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)는 항-종양 효능에 매우 적합한 표현형을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, 피부-유래 Vδ1 T 세포)은 기준 집단(예를 들어, 확장 단계 이전의 γδ T 세포의 단리된 집단)보다 CD27의 더 큰 평균 발현을 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 적어도 2배(예를 들어, 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1,000배, 적어도 5,000배, 적어도 10,000배, 적어도 20,000배 또는 그 이상)의 CD27의 평균 발현을 갖는다.

[0154] 확장된 γδ T 세포 집단의 고유한 부분(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)은 CD27을 상향조절할 수 있는 반면, 다른 부분은 $CD27^{저}$ 또는 $CD27^{음성}$이다. 이 경우, γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 확장된 집단에서 $CD27^{양성}$ 세포의 빈도가 더 클 수 있다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전의 γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 $CD27^{양성}$ 세포의 빈도가 적어도 5% 더 높을 수 있다 (예를 들어 확장 전에 단리된 γδ T 세포의 집단의 빈도에 대해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 더 큰 $CD27^{양성}$ 세포의 빈도). 일부 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 확장된 집단에서 $CD27^{양성}$ 세포의 수가 증가될 수 있다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전의 γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 적어도 2배의 $CD27^{양성}$ 세포 수를 가질 수 있다. 확장된 γδ T 세포 집단은 10% 초과, 20% 초과, 30% 초과, 40% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과의 또는 90% 초과의 CD27+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, 확장된 γδ T 세포 집단은 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80% 또는 약 90%의 CD27+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 50% 초과의 CD27+ 세포의 빈도를 갖는다.

[0155] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 바와 같은 확장 방법은 기준 집단(예를 들어, 확장 단계 이전의 γδ T 세포의 단리된 집단)에 비해 TIGIT의 낮은 발현을 갖는 확장된 집단 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 생산한다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 기준 집단(예를 들어, 확장 단계 이전의 γδ T 세포의 단리된 집단)보다 TIGIT의 더 낮은 평균 발현을 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 γδ T 세포의 단리된 집단보다 적어도 10% 더 적은 TIGIT의 평균 발현을 갖는다(예를 들어, 확장 단계 이전의 γδ T 세포보다 적어도 20% 미만, 적어도 30% 미만, 적어도 40% 미만, 적어도 50% 미만, 적어도 60% 미만, 적어도 70% 미만, 적어도 80% 미만, 적어도 90% 미만, 또는 최대 100% 미만). 확장된 γδ T 세포 집단은 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만의 TIGIT+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 대안적으로, 확장된 γδ T 세포 집단은 약 90%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20% 또는 약 10%의 TIGIT+ 세포의 빈도를 가질 수 있다. 특정 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단은 80% 미만의 TIGIT+ 세포의 빈도를 갖는다.

[0156] 일부 구현예에서, γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 확장된 집단은 높은 수 또는 빈도의 $CD27^{+}$ 세포 및 낮은 빈도의 $TIGIT^{+}$ 세포를 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 기준 집단에 비해 (예를 들어, 확장 전 γδ T 세포의 단리된 집단에

비해) 높은 빈도의 $CD27^{+}TIGIT^{-}$세포를 갖는다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전 γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 $CD27^{+}$ $TIGIT^{-}$ 세포의 빈도가 적어도 5% 더 높을 수 있다 (예를 들어, 확장 전 γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 더 큰 빈도의 $CD27^{+}$ $TIGIT^{-}$ 세포). 일부 구현예에서, γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 확장된 집단에서 $CD27^{+}$ $TIGIT^{-}$ 세포의 수가 증가될 수 있다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전의 γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 적어도 2배의 $CD27^{+}TIGIT^{-}$ 세포의 수를 가질 수 있다 (예를 들어, 확장 전 γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 더 큰 빈도의 $CD27^{+}TIGIT^{-}$ 세포).

[0157] 일부 예에서, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)에서 $CD27^{+}$ γδ T 세포의 집단에 대한 TIGIT의 평균 발현은 기준 집단에 비해 낮다. 일부 구현예에서, $CD27^{+}$ 확장된 γδ T 세포 집단은 기준 집단(예를 들어, 확장 단계 전의 $CD27^{+}$ γδ T 세포의 단리된 집단)보다 낮은 TIGIT의 평균 발현을 갖는다. 일부 구현예에서, $CD27^{+}$ 확장된 γδ T 세포 집단은 $CD27^{+}$ γδ T 세포의 단리된 집단보다 적어도 10% 적은 TIGIT의 평균 발현을 갖는다 (예를 들어, $CD27^{+}$ γδ T 세포의 단리된 집단보다 적어도 20% 미만, 적어도 30% 미만, 적어도 40% 미만, 적어도 50% 미만, 적어도 60% 미만, 적어도 70% 미만, 적어도 80% 미만, 적어도 90% 미만, 또는 최대 100% 미만).

[0158] 추가적으로 또는 대안적으로, 확장된 γδ T 세포 집단(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)에서 $TIGIT^{-}$ γδ T 세포 집단에 대한 CD27 중앙값 발현은 기준 집단에 비해 높다. 예를 들어, $TIGIT^{-}$ 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전 $TIGIT^{-}$ γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 $CD27^{+}$ 세포의 빈도가 적어도 5% 더 높을 수 있다 (예를 들어, 확장 전 $TIGIT^{-}$ γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 더 큰 빈도의 $CD27^{+}$ 세포). 일부 구현예에서, $TIGIT^{-}$ γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 확장된 집단에서 $CD27^{+}$ 세포의 수가 증가될 수 있다. 예를 들어, $TIGIT^{-}$ 확장된 γδ T 세포 집단은 확장 전의 $TIGIT^{-}$ γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 적어도 2배의 $CD27^{+}$ 세포 수 (예를 들어, 확장 전 $TIGIT^{-}$ γδ T 세포의 단리된 집단의 빈도에 비해 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 최대 100% 더 큰 빈도의 $CD27^{+}$ 세포)를 가질 수 있다.

[0159] 다른 마커의 발현 증가 또는 감소는 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64를 포함하는 비-조혈 조직-유래 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 하나 이상의 확장된 집단을 사용하는 것으로 추가적으로 또는 대안적으로 특징규명될 수 있다. 일부 예에서, γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예컨대 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 확장된 집단은 예를 들어 확장 전의 γδ T 세포의 분리된 집단에 비해 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커 세포의 더 큰 발현을 갖는다. 추가적으로 또는 대안적으로, 확장된 γδ T 세포 집단은 γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas 리간드, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 및 CD2로 이루어진 군으로부터 선택된 마커 중 하나 이상을 발현하는 세포의 더 큰 빈도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포 집단은 단리된 γδ T 세포 집단에 비해 NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택된 마커 중 하나 이상의 더 낮은 평균 발현을 갖는다. 확장된 집단은 γδ T 세포의 단리된 집단에 비해 NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, 및 CD64로 이루어진 군으로부터 선택된 마커 중 하나 이상을 발현하는 세포의 더 낮은 빈도를 유사

하게 가질 수 있다.

[0160] γδ T 세포의 배양 및/또는 증식에 사용하기에 적합한 수많은 기본 배양 배지, 특히 AIM-V, Iscoves 배지 및 RPMI-1640(Life Technologies)과 같은 배지가 이용 가능하다. 배지는 본원에 정의된 바와 같은 다른 배지 인자, 예컨대 혈청, 혈청 단백질 및 선택적 제제, 예컨대 항생제로 보충될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, RPMI-1640 배지는 2mM 글루타민, 10% FBS, 10mM HEPES, pH 7.2, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 피루브산나트륨(1mM; Life Technologies), 비필수 아미노산(예를 들어, 100 μM Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro 및 Ser; 1X MEM 비필수 아미노산(Life Technologies)) 및 10 μl/L β-메르캅토에탄올을 함유한다. 대안적인 구현예에서, AIM-V 배지는 CTS 면역 혈청 대체물 및 암포테리신 B로 보충될 수 있다. 본원에 정의된 특정 구현예에서, 배지는 IL-2 및 IL-15로 추가로 보충될 수 있다. 편리하게, 세포는 단리 및/또는 확장 동안 적합한 배양 배지에서 5% CO_2를 함유하는 가습된 대기에서 37℃에서 배양된다.

[0161] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0162] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 림프구 집단을 단리하는 단계; 및

[0163] (ii) 상기 림프구 집단을 (예컨대 적어도 5일 동안) 추가로 배양하여 확장된 림프구 집단을 생산하는 단계.

[0164] 한 구현예에서, 림프구는 αβ T 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 αβ T 세포의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0165] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 αβ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0166] (ii) 상기 αβ T 세포 집단을 (예컨대 적어도 5일 동안) 추가로 배양하여 확장된 αβ T 세포 집단을 생산하는 단계.

[0167] 단계 (ii)에서 배양은 αβ T 세포가 단계 (i)에서 단리된 집단에 존재하는 다른 세포 유형보다 우선적으로 확장되는 배양 조건을 선택하는 것과 같은 선택적 확장에 의한 것일 수 있다. 대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 단계 (ii)에서 배양한 후에 비-표적 세포(예를 들어, αβ T 세포 이외의 세포)가 고갈될 수 있다. 대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 비-표적 세포(예를 들어, αβ T 세포 이외의 세포)의 고갈은 단계 (ii)에서 배양하기 전에 발생한다. 이들 구현예의 목적은 αβ T 세포의 총 수를 확장시키면서 또한 집단에서 이들의 비율을 증가시키는 것임에 주목한다.

[0168] 한 구현예에서, 림프구는 NK 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 NK 세포의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0169] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 NK 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0170] (ii) 상기 NK 세포 집단을 (예컨대 적어도 5일 동안) 추가로 배양하여 NK 세포의 확장된 집단을 생산하는 단계.

[0171] 단계 (ii)에서의 배양은 NK 세포가 단계 (i)에서 단리된 집단에 존재하는 다른 세포 유형보다 우선적으로 확장되는 배양 조건을 선택하는 것과 같은 선택적 확장에 의한 것일 수 있다. 대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 단계 (ii)에서 배양한 후에 비-표적 세포(예를 들어, NK 세포 이외의 세포)가 고갈될 수 있다. 대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 비-표적 세포(예를 들어, NK 세포 이외의 세포)의 고갈은 단계 (ii)에서 배양하기 전에 발생한다. 이들 구현예의 목적은 NK 세포의 총 수를 확장시키면서 집단에서 이들의 비율을 증가시키는 것임에 주목한다.

[0172] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0173] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0174] (ii) 상기 γδ T 세포 집단을 (예컨대 적어도 5일 동안) 추가로 배양하여 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하는 단계.

[0175] 단계 (ii)에서의 배양은 γδ T 세포가 단계 (i)에서 단리된 집단에 존재하는 다른 세포 유형보다 우선적으로 확장되는 배양 조건을 선택하는 것과 같은 선택적 확장에 의한 것일 수 있다. 대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 단계 (ii)에서 배양한 후에 비-표적 세포(예를 들어, γδ T 세포 이외의 세포)가 고갈될 수 있다.

대안적으로, 확장 조건은 선택적이지 않으며 비-표적 세포(예를 들어, γδ T 세포 이외의 세포)의 고갈은 단계 (ii)에서 배양하기 전에 발생한다. 이들 구현예의 목적은 γδ T 세포의 총 수를 확장시키면서 집단에서 이들의 비율을 증가시키는 것임에 주목한다.

[0176] 한 구현예에서, 단리된 림프구 또는 γδ T 세포 집단은 동결된 다음 단계 (ii) 전에 해동된다. 놀랍게도 단리된 세포의 동결된 집단이 적어도 신선한 등가물만큼 농축되고 확장된다는 것이 발견되었다. 특히, 본원에 제시된 데이터는 해동 후 양호한 생존성 및 후속 확장 배양 동안 잘 확장하는 능력, 즉 단계 (ii)에서 확장된 γδ T 세포 집단을 효과적으로 생산하는 능력을 갖는 단리된 γδ T 세포가 달성된다는 것을 입증하고, 여기서 단리 단계 (i)는 15 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예컨대 18 내지 20 ng/ml, 예컨대 18, 19 또는 20 ng/mL, 예를 들어 18.8 ng/mL의 농도에서 IL-21 및 약 19일, 예컨대 19일의 기간 동안 IL-1β의 존재에서, 또는 대안적으로 약 19일, 예컨대 19일, 또는 21일, 예컨대 21일의 기간 동안 IL-1β의 존재 및 IL-21의 부재에서 비-조혈 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다.

[0177] 한 구현예에서, 림프구는 γδ T 세포를 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가 양태에 따르면, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0178] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0179] (ii) 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 하기의 존재에서 상기 γδ T 세포 집단을 배양하는 단계:

[0180] (a) IL-2 또는 IL-9;

[0181] (b) IL15; 및

[0182] (c) IL-21.

[0183] 본 발명의 이러한 양태의 특정 구현예에서, 상기 γδ T 세포 집단을 배양하는 것은 IL-4의 존재를 추가로 포함한다. 따라서, 본 발명의 추가 양태에서, 하기 단계를 포함하는 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포의 단리 및 확장을 위한 방법이 제공된다:

[0184] (i) 본원에 정의된 방법에 따라 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포 집단을 단리하는 단계; 및

[0185] (ii) 확장된 γδ T 세포 집단을 생산하기에 효과적인 양으로 적어도 5일 동안 하기의 존재에서 상기 γδ T 세포 집단을 배양하는 단계:

[0186] (a) IL-2 또는 IL-9;

[0187] (b) IL15; 및

[0188] (c) IL-21; 및

[0189] (d) IL-4.

[0190] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득된 단리된 림프구(예를 들어, 피부-유래 αβ T 세포 및/또는 NK 세포)의 확장된 집단이 제공된다.

[0191] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득가능한 단리된 림프구 세포의 확장된 집단이 제공된다.

[0192] 본 발명의 또 다른 추가 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득된 단리된 γδ T 세포의 확장된 집단이 제공된다.

[0193] 본 발명의 또 다른 추가 양태에 따르면, 본원에 정의된 임의의 방법에 의해 수득가능한 단리된 γδ T 세포의 확장된 집단이 제공된다.

[0194] **세포에 대한 응용**

[0195] 본 발명의 방법에 의해 수득된 림프구 및/또는 γδ T 세포는 예를 들어 입양 T 세포 요법을 위한 약제로서 사용될 수 있다. 이것은 본 발명의 방법에 의해 수득된 림프구 및/또는 γδ T 세포를 환자에게 전달하는 것을 포함한다. 요법은 자가 유래일 수 있으며, 즉 γδ T 세포는 이들이 수득한 동일한 환자에게 다시 전달될 수 있거나, 요법은 동종이계(allogeneic)일 수 있으며, 즉 한 사람의 γδ T 세포가 상이한 환자에게 전달될 수 있다.

동종이계 전달을 포함하는 경우에, γδ T 세포는 αβ T 세포가 실질적으로 없을 수 있다. 예를 들어, αβ T 세포는 예를 들어 확장 후 당업계에 공지된 임의의 적합한 수단을 사용하여 (예를 들어, 자기 비드를 사용하는 음성 선택에 의해) γδ T 세포 집단으로부터 고갈될 수 있다. 치료 방법은 하기를 포함할 수 있다; 기증자 개체로부터 수득한 비-조혈 조직의 샘플을 제공하는 단계; 본원에 기재된 바와 같이 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계; 단리된 γδ T 세포를 배양하여 확장된 집단을 생산하는 단계; 및 확장된 γδ T 세포 집단을 수용자 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0196] 치료될 환자 또는 대상체는 바람직하게는 인간 암 환자(예를 들어, 고형 종양에 대해 치료되는 인간 암 환자) 또는 바이러스-감염 환자(예를 들어, CMV-감염 또는 HIV 감염 환자)이다. 일부 예에서, 환자는 고형 종양을 갖고/갖거나 치료를 받고 있다.

[0197] 이들은 일반적으로 비-조혈 조직에 상주하기 때문에, 조직-상주 Vδ1 T 및 DN γδ T 세포는 또한 이들의 전신 혈액-상주 대응물(counterparts)보다 종양 덩어리에 더 잘 귀소하고(home) 유지될 가능성이 높으며 이러한 세포의 입양 전달은 고형 종양 및 잠재적으로 다른 비-조혈 조직-관련 면역병리학을 표적화하는 데 더 효과적일 수 있다.

[0198] γδ T 세포는 비-MHC 제한적이기 때문에, 이들이 전달된 숙주를 이물질로 인식하지 못하고, 이는 이식편-대-숙주 질환을 일으킬 가능성이 적다는 것을 의미한다. 이는 이들이 "기성품(off the shelf)"으로 사용될 수 있고, 예를 들어 동종이계 입양 T 세포 요법을 위해 임의의 수용자에게 전달될 수 있음을 의미한다.

[0199] 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포는 NKG2D를 발현하고 악성 종양과 강하게 관련된 NKG2D 리간드(예를 들어, MICA)에 반응한다. 이들은 또한 어떤 활성화도 없을 때 세포독성 프로파일을 나타내므로 종양 세포를 죽이는 데 효과적일 가능성이 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이 수득된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포는 IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, CCL4, IL-13, 그래눌리신, 그랜자임 A 및 B, 및 임의의 활성화의 부재에서 퍼포린 중 하나 이상, 바람직하게는 모두를 발현할 수 있다. IL-17A는 발현되지 않을 수 있다.

[0200] "기성품" 면역치료 시약으로서 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 임상 적용을 위한 실용성 및 적합성에 대한 강력한 증거가 있다. 이 세포는 선천적-유사 사멸을 가지고 있고 MHC 제한이 없으며 다른 T 세포보다 종양에 대한 개선된 귀소(homing) 및/또는 종양 내 체류를 나타낸다.

[0201] 일부 구현예에서, 비-조혈 조직에 종양이 있는 개체를 치료하는 방법은 하기를 포함할 수 있다; 기증자 개체로부터 수득한 상기 비-조혈 조직의 샘플을 제공하고, 샘플로부터 γδ T 세포를 배양하여 확장된 집단을 생산하는 단계, 및; 종양을 갖는 개체에게 확장된 γδ T 세포 집단을 투여하는 단계.

[0202] 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 본원에 기재된 바와 같은 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 포도당, 만노오스, 수크로오스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 방부제를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 동결보존 용액은 예를 들어 DMSO를 포함한다. 조성물은 예를 들어 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다.

[0203] 한 구현예에서, 약학적 조성물은 예를 들어, 내독소 또는 마이코플라스마와 같은 오염물의 검출가능한 수준이 실질적으로 없다.

[0204] 일부 경우에, 상기 기재된 임의의 방법에 의해 수득된 치료적 유효량의 확장된 γδ T 세포는 (예를 들어, 암의 치료, 예를 들어 고형 종양의 치료를 위해) 대상체에게 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 확장된 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 치료적 유효량은 용량당 10×10^{12} 세포 미만(예를 들어, 9×10^{12} 세포 미만, 용량당 8×10^{12} 세포 미만, 용량당 7×10^{12} 세포 미만, 용량당 6×10^{12} 세포 미만, 용량당 5×10^{12} 세포 미만, 용량당 4×10^{12} 세포 미만, 용량당 3×10^{12} 세포 미만, 용량당 2×10^{12} 세포 미만, 용량당 1×10^{12} 세포 미만, 용량당 9×10^{11} 세포 미만, 용량당 8×10^{11} 세포 미만, 용량당 7×10^{11} 세포 미만, 용량당 6×10^{11} 세포 미만, 용량당 5×10^{11} 세포 미만, 용량당 4×10^{11} 세포 미만, 용량당 3×10^{11} 세포 미만, 용량당 2×10^{11} 세포 미만, 용량당 1×10^{11} 세포 미만, 용량당 9×10^{10} 세포 미만, 용량당 7.5×10^{10} 세포 미만, 용량당 5×10^{10} 세포 미만, 용량

당 2.5 x 10^{10} 세포 미만, 용량당 1 x 10^{10} 세포 미만, 용량당 7.5 x 10^{9} 세포 미만, 용량당 5 x 10^{9} 세포 미만, 용량당 2.5 x 10^{9} 세포 미만, 용량당 1 x 10^{9} 세포 미만, 용량당 7.5 x 10^{8} 세포 미만, 용량당 5 x 10^{8} 세포 미만, 용량당 2,5 x 10^{8} 세포 미만, 용량당 1 x 10^{8} 세포 미만, 용량당 7.5 x 10^{7} 세포 미만, 용량당 5 x 10^{7} 세포 미만, 용량당 2,5 x 10^{7} 세포 미만, 용량당 1 x 10^{7} 세포 미만, 용량당 7.5 x 10^{6} 세포 미만, 용량당 5 x 10^{6} 세포 미만, 용량당 2,5 x 10^{6} 세포 미만, 용량당 1 x 10^{6} 세포 미만, 용량당 7.5 x 10^{5} 세포 미만, 용량당 5 x 10^{5} 세포 미만, 용량당 2,5 x 10^{5} 세포 미만, 또는 용량당 1 x 10^{5} 세포 미만)이다.

[0205] 일부 구현예에서, 확장된 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 치료적 유효량은 치료 과정 동안 10 x 10^{12} 미만 (예를 들어, 치료 과정 동안 9 x 10^{12} 세포 미만, 8 x 10^{12} 세포 미만, 7 x 10^{12} 세포 미만, 6 x 10^{12} 세포 미만, 5 x 10^{12} 세포 미만, 4 x 10^{12} 세포 미만, 3 x 10^{12} 세포 미만, 2 x 10^{12} 세포 미만, 1 x 10^{12} 세포 미만, 9 x 10^{11} 세포 미만, 8 x 10^{11} 세포 미만, 7 x 10^{11} 세포 미만, 6 x 10^{11} 세포 미만, 5 x 10^{11} 세포 미만, 4 x 10^{11} 세포 미만, 3 x 10^{11} 세포 미만, 2 x 10^{11} 세포 미만, 1 x 10^{11} 세포 미만, 9 x 10^{10} 세포 미만, 7.5 x 10^{10} 세포 미만, 5 x 10^{10} 세포 미만, 2.5 x 10^{10} 세포 미만, 1 x 10^{10} 세포 미만, 7.5 x 10^{9} 세포 미만, 5 x 10^{9} 세포 미만, 2.5 x 10^{9} 세포 미만, 1 x 10^{9} 세포 미만, 7.5 x 10^{8} 세포 미만, 5 x 10^{8} 세포 미만, 2,5 x 10^{8} 세포 미만, 1 x 10^{8} 세포 미만, 7.5 x 10^{7} 세포 미만, 5 x 10^{7} 세포 미만, 2,5 x 10^{7} 세포 미만, 1 x 10^{7} 세포 미만, 7.5 x 10^{6} 세포 미만, 5 x 10^{6} 세포 미만, 2,5 x 10^{6} 세포 미만, 1 x 10^{6} 세포 미만, 7.5 x 10^{5} 세포 미만, 5 x 10^{5} 세포 미만, 2,5 x 10^{5} 세포 미만, 또는 1 x 10^{5} 세포 미만)이다.

[0206] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 용량은 약 1 x 10^{6}, 1.1 x 10^{6}, 2 x 10^{6}, 3.6 x 10^{6}, 5 x 10^{6}, 1 x 10^{7}, 1.8 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 또는 5 x 10^{8} 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 적어도 약 1 x 10^{6}, 1.1 x 10^{6}, 2 x 10^{6}, 3.6 x 10^{6}, 5 x 10^{6}, 1 x 10^{7}, 1.8 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 또는 5 x 10^{8} 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 최대 약 1 x 10^{6}, 1.1 x 10^{6}, 2 x 10^{6}, 3.6 x 10^{6}, 5 x 10^{6}, 1 x 10^{7}, 1.8 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 또는 5 x 10^{8} 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 약 1.1 x 10^{6}- 1.8 x 10^{7} 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 약 1 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 5 x 10^{8}, 1 x 10^{9}, 2 x 10^{9}, 또는 5 x 10^{9} 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 적어도 약 1 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 5 x 10^{8}, 1 x 10^{9}, 2 x 10^{9}, 또는 5 x 10^{9} 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어, Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)의 용량은 최대 약 1 x 10^{7}, 2 x 10^{7}, 5 x 10^{7}, 1 x 10^{8}, 2 x 10^{8}, 5 x 10^{8}, 1 x 10^{9}, 2 x 10^{9}, 또는 5 x 10^{9} 세포를 포함한다.

[0207] 한 구현예에서, 대상체는 대상체의 체중 kg당 10^{4} 내지 10^{6} 확장된 비-조혈 조직- 상주 γδ T 세포(예를 들어, 피부-유래 γδ T 세포 및/또는 비-Vδ2 T 세포, 예를 들어 Vδ1 T 세포 및/또는 DN T 세포)를 투여받는다. 한 구현예에서, 대상체는 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포 집단의 초기 투여(예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^{4} 내

지 10^6 γδ T 세포, 예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 γδ T 세포의 투여), 및 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 1회 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 또는 5) 후속 투여 (예를 들어, 대상체의 체중 kg당 1회 이상의 10^4 내지 10^6 확장된 비-조혈 조직 상주 γδ T 세포의 후속 투여, 예를 들어, 대상체의 체중 kg당 10^4 내지 10^5 확장된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포)를 받는다. 한 구현예에서, 1회 이상의 후속 투여는 이전 투여 후 15일 미만, 예를 들어, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2일 후, 예를 들어, 이전 투여 후 4, 3, 또는 2일 미만에 투여된다. 한 구현예에서, 대상체는 γδ T 세포 집단의 적어도 3회의 투여 과정에 걸쳐 대상체의 체중 kg당 총 약 10^6 γδ T 세포를 받고, 예를 들어 대상체는 1 x 10^5 γδ T 세포의 초기 용량, 3 x 10^5 γδ T 세포의 2차 투여, 및 6 x 10^5 γδ T 세포의 3차 투여를 받고, 예를 들어, 각각의 투여는 이전 투여 후 4, 3, 또는 2일 미만에 투여된다.

[0208] 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포는 또한 CAR-T 요법과 같은 향상된 치료 특성을 위해 유전자 조작될 수 있다. 이는 새로운 특이성, 예를 들어 단일클론 항체의 특이성을 갖는 T 세포를 재프로그래밍하기 위해 조작된 T 세포 수용체(TCR)의 생성을 포함한다. 조작된 TCR은 T 세포를 악성 세포에 특이적으로 만들 수 있으므로 암 면역 요법에 유용하다. 예를 들어, T 세포는 대상체 조직으로부터의 정상 체세포에 의해 발현되지 않는 종양 관련 항원과 같은 종양 항원을 발현하는 암 세포를 인식할 수 있다. 따라서, CAR-변형된 T 세포는 예를 들어 암 환자의 입양 T 세포 요법에 사용될 수 있다.

[0209] CAR에 대한 혈액-상주 γδ T 세포의 사용이 기재되었다. 그러나, 본 발명의 방법에 의해 수득된 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포는 형질전환된 세포를 인식하는 선천적-유사 능력을 유지하면서 키메라 항원-특이적 TCR로 형질도입될 수 있고, 혈액-상주 γδ T 세포 또는 기존의 전신 αβ T 세포보다 더 나은 종양 침투 및 보유 능력을 가질 가능성이 있기 때문에, CAR-T 접근법을 위한 특히 양호한 비히클이 될 가능성이 있다. 또한, MHC 의존성 항원 제시의 부족은 이식편-대-숙주 질환의 가능성을 감소시키고 낮은 수준의 MHC를 발현하는 종양을 표적으로 할 수 있게 한다. 마찬가지로, 예를 들어 CD28의 결합을 통한 기존의 공동 자극에 대한 비의존성은 공동 자극 수용체에 대한 낮은 수준의 리간드를 발현하는 종양의 표적화를 향상시킨다.

[0210] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에게 투여될 수 있다. 추가 치료제는 면역치료제, 세포독성제, 성장 억제제, 방사선 요법제, 항-혈관신생제, 또는 이들의 2종 이상의 제제의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 추가 치료제는 확장된 γδ T 세포의 투여와 동시에, 투여 전 또는 후에 투여될 수 있다. 추가 치료제는 대상체의 신체(예를 들어, 대상체 자신의 면역계) 내의 표적 및/또는 전달된 γδ T 세포에 작용할 수 있는 면역치료제일 수 있다.

[0211] 조성물의 투여는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 경동맥, 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 주사, 또는 복강내, 예를 들어 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 비-조혈 조직-상주 γδ T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위에 직접 주사될 수 있다.

[0212] 본원에 기재된 모든 구현예는 본 발명의 모든 양태에 적용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0213] 본원에 사용된 용어 "약"은 본원에 사용된 경우 명시된 값, 특히 지정된 값보다 10% 이상 및 10% 이하를 포함하고, 적합하게는 5% 이상 및 5% 이하를 포함한다. 용어 "사이"는 지정된 경계의 값을 포함한다.

[0214] 본 발명의 특정 양태 및 구현예는 이제 실시예로서 그리고 상기에 기재된 도면을 참조하여 예시될 것이다.

[0215] **실시예**

[0216] **실시예 1. 방법 및 물질**

[0217] 달리 명시되지 않는 한, 하기 방법을 이용하여 후속 실시예의 결과를 생성하였다.

[0218] *물질*

[0219] 실험 조건에 사용된 물질의 출처는 표 1에 요약되어 있다.

[0220] 표 1. 연구에 사용된 물질

시약	공급업체
AIM-V	Fisher
CTS 면역 혈청 대체물	Life Technologies
인간 혈청 알부민	Sigma-Aldrich
인간 혈장	Merck Chemicals Ltd.
인간 IL-2, 프리미엄 등급	Miltenyi
인간 IL-15, 프리미엄 등급	Miltenyi
인간 IL-4, 프리미엄 등급	Miltenyi
인간 IL-21	Peprotech
인간 IFN-γ	Peprotech
인간 IL-1β	Peprotech

[0221]

[0222] *실험 모델링의 설계*

[0223] 실험 설계(DoE)를 JMP 소프트웨어 15.0을 사용하여 생성하였다. DoE 맞춤형 설계를 적용하여 실험을 생성하여 γδ T 세포 농축과 같은 정의된 결과에 대한 단백질 공급원, IL-1β, IFN-γ, IL-21 및 IL-4의 효과를 분석하였다. 단백질 공급원은 범주형 변수로 처리하고 IL-1β, IFN-γ, IL-21 및 IL-4는 연속 변수로 처리하였다. 또한 JMP 스크립트를 사용하여 IL-4 단독을 함유하는 실험 조건을 허용하지 않았다.

[0224] 차수 2에 대한 계승 설계를 적용하여 선형 및 2차 상호작용을 결정하였다(예를 들어, IL-21* IL-1β). 실험 테스트를 위해 21개 조건의 설계를 채택하였다.

[0225] 실험 데이터 수집 시, 응답 판독값으로 % γδ T 세포를 기반으로 하는 스튜던트화된(studentised) 잔차의 계산에 의해 이상값 제거를 적용하였다. % γδ T 세포에 대해 > 4 또는 < 4의 스튜던트화 잔차를 생산하는 임의의 행을 분석에서 제외하였다. 총 84개의 행 중 7개의 행을 제외하였다.

[0226] 이상치를 제거한 후, 각 기증자로부터 주어진 응답에 대한 값을 기반으로 표준 최소 제곱 피팅을 주어진 응답에 적용하였다. 기증자 변이를 설명하기 위해, 기증자 ID를 최소 제곱 피트 모델에 독립형 변수로 추가하였다. % γδ T 세포 또는 % TIGIT+ γδ T 세포와 같은 선택된 결과와 관련된 단백질 공급원 및 사이토카인 상호작용 p-값은 $p < 0.05$와의 상호작용만 남을 때까지 단계별 방법에서 제거하였다.

[0227] *단리 설정 및 수확*

[0228] 샘플이 도착하기 전에, 관련 배지를 준비하고 20mm x 1.5mm 탄소 매트릭스('그리드')(Cytomatrix Pty Ltd, Australia 또는 Ultramet, USA)를 고압멸균하였다. 이후 그리드를 인산완충식염수(PBS)로 헹구고 사용할 때까지 PBS에 담근다.

[0229] *기관형 피부 배양물 제조*

[0230] 피부 샘플은 집게, 가위 및 메스를 사용하여 피하 지방을 제거하여 제조한다. 한 번에 한 조각의 조직을 채취하여 3mm 생검 펀치를 사용하여 여러 펀치를 만든다. 3개의 조직 펀치를 각 그리드에 배치한다.

[0231] G-REX6(Wilson Wolf)의 웰당 하나의 그리드가 배치된다. 각 웰을 5ml의 관련 기본 배지 및 5ml의 2X 관련 조건 배지로 채웠다(10ml의 1X 관련 조건 배지 생성). 100μL의 암포테리신 B(Life Technologies)를 각 웰에 추가한다(1% 암포테리신 B 생성). 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 21일 동안 인큐베이팅한다. 배양물은 7일 및 14일에 각 웰에 2X 관련 배지 10ml를 부드럽게 추가하여 공급한다.

[0232] *단리 수확*

[0233] 매트릭스를 제거한다. 세포를 피펫을 사용하여 각 웰에 재현탁하고 원심분리 튜브로 옮긴다. 웰을 PBS로 세척하고 세척액 또한 원심분리기 튜브로 옮긴다. 단리된 세포를 이후에, 예를 들어 세포 계수 또는 유세포 분석에서 분석할 수 있다.

[0234] *단리된 세포의 동결*

[0235] 단리된 세포를 분석하면, 세포 현탁액을 원심분리기에서 회전시킨다. 상청액을 버리고 세포 펠렛을 Cryostor10 세포 동결 용액(Sigma Aldrich)에 100 x 10^6 세포/ml의 최종 농도로 재현탁한다. 이후에 세포 현탁액을 동결 바이알로 옮기고 냉각 셀 또는 Mr Frosty 동결 장치(Thermo Scientific)에 넣고 밤새 -80℃ 동결고에 배치한다. 다음날, 세포를 액체 질소 저장소(기상)로 옮긴다.

[0236] *유세포 분석*

[0237] 유세포 분석을 하기 항체-형광색소 접합체를 사용하여 수행하였다:

[0238] a) 배치 방출 패널: CD45-FITC, CD25-PE, PAN αβ-PerCP Vio700, NKG2D-PEVio770, Vδ1-Vioblue, PAN γδ-APC.

[0239] b) 기능 패널: CD45RA-FITC, TIGIT-PE, PAN αβ-PerCP Vio700, NKG2A-PEVio770, Vδ1-Vioblue, PD1-BV510, PAN γδ-APC.

[0240] 상업용 항체를 Biolegend 또는 Miltenyi에서 구입하였다. 생존성 염료(eFluor780)를 ThermoFischer Scientific에서 구입하였다. 유세포 분석 데이터 분석은 FLOWJO(버전 10.6.2)에서 수행하였다.

[0241] *총 세포 수 결정*

[0242] 총 세포 수는 NC-250 Nucleocounter(Chemometec, 덴마크 코펜하겐) 및 제조업체의 지침을 사용하여 생성하였다.

[0243] **실시예 2. 단리 최적화 실험**

[0244] 비-조혈 조직 샘플로부터 γδ T 세포를 단리하기 위한 프로토콜의 최적화를 조사하여 단리 시 γδ T 세포 수율을 개선하고 잠재적으로 Vδ1 T 세포 품질을 개선하였다. 출발 물질을 개선하는 것은 후속 확장 단계에서 수율 및 품질을 개선하는 것을 돕는다.

[0245] 실험 설계(DoE)는 다양한 단백질 공급원 및 사이토카인이 피부 단리 배양물에 미치는 영향을 조사하였다. 가능한 설계를 만들기 위해, 배지 유형, IL-15 농도 및 IL-2 농도를 일정하게 유지하였다. IL-21, IFN-γ, IL-1β의 상이한 조합을 조사하였다. IL-21, IFN-γ 또는 IL-1β가 존재하는 경우에만 IL-4의 첨가 또한 조사되었다.

[0246] 모든 세포를 5% 혈청 대체물(SR), 2.5% 동종이계 혈장 또는 10% 동종이계 AB 남성 혈청이 있는 AIM-V 배지 보충물에서 단리하였다. 모든 배양물을 IL-2 및 IL-15로 설정하였고 IL-4, IL-21, IFN-γ, IL-1β의 다양한 조합으로 보충하였다. 테스트된 배양 조건을 표 2에 요약하였다.

[0247] 표 2. 테스트한 실험 조건 요약

실행	단백질	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	혈장(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	혈장 (2.5%)	600	138	1.05	420	4500	95
8	AB (10%)	600	138	1.05	420	4500	95
9	혈장 (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	혈장(2.5%)	600	138	0	0	4500	95
15	혈장(2.5%)	600	138	1.05	420	0	0
16	SR (5%)	600	138	0	420	4500	95
17	혈장(2.5%)	600	138	0	420	0	95
18	혈장(2.5%)	600	138	0	0	0	0
19	혈장(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
표준 ISO	SR (5%)	600	138	0	0	0	0

[0248]

[0249] 배양 조건의 결과를 도 1-10에 제시하였다.

[0250] *사이토카인*

[0251] 특히 혈장 및 AB 혈청 단리의 맥락에서 IL-1β의 사용은 γδ T 세포의 전체 수율 및 단리된 Vδ1 T 세포의 전체 수율을 증가시키는 효과가 있다. 모든 조건에 대한 % 및 총 γδ T 세포의 결과를 도 1에 나타내고 % 및 총 Vδ1 T 세포의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0252] AB 혈청에 IL-4를 첨가하면 그리드당 단리된 전체 세포 수를 증가시키는 효과가 있다(도 3). 혈장 단리 배양물에서 보다 온건한 증가가 관찰되었다.

[0253] 혈장, SR 또는 AB 혈청 샘플에 IL-4를 첨가하면 배양물에서 % γδ 농축을 증가시키는 효과가 있다(도 4).

[0254] 혈장 배양물에 IL-4를 첨가하면 그리드당 단리된 전체 Vδ1 세포 수를 증가시키는 효과가 있다(도 5). SR 또는 인간 AB 혈청 배양물에서는 동일한 효과가 관찰되지 않았으나; AB 혈청의 사용은 대조군에 비해 그리드당 단리된 Vδ1 세포의 전체 수를 증가시켰다.

[0255] AB 혈청 배양물에 IL-21을 첨가하면 단리된 전체 γδ T 세포 수를 증가시키는 효과가 있다. 그러나 IL-21의 이점은 혈장 또는 SR로 분리된 배양물에서는 나타나지 않았다. IL-1β 및 IFN-γ가 있는 혈장의 각 공여자에 대한 % γδ T 세포에 대한 DoE 모델링은 IFN-γ 및 IL-21이 부재할 때 IL-1β가 가장 유익하다는 것을 나타낸다.

[0256] *표현형 분석*

[0257] AB 혈청 및 혈장 배양물 둘 모두에 IL-4를 첨가하면 Vδ1 T 세포에서 NKG2A 및 CD45RA 둘 모두의 발현을 감소시키는 효과가 있다(도 6).

[0258] SR의 사용은 혈장 및 AB 혈청 단리 배양물 둘 모두에 비해 Vδ1 T 세포에서 체크포인트 억제제 마커 TIGIT의 발현을 증가시켰다(도 7).

[0259] 분석은 또한 SR의 사용이 혈장 및 AB 혈청 둘 모두에 비해 Vδ1 T 세포 상의 말단 분화 마커 CD45RA 및 억제 수

용체 NKp44의 발현을 증가시켰음을 보여주었다(데이터는 나타내지 않음).

[0260] *단백질 공급원*

[0261] 배양물에서 혈장 및 AB 혈청 둘 모두를 사용하면 SR 배양물 단리에 비해 그리드당 Vδ1 T 세포의 전체 수를 증가시키는 효과가 있다(도 8). 그러나 DoE 모델링은 SR 단리된 샘플에 IFN-γ를 첨가하면 단리된 전체 γδ T 세포 수를 증가시키는 것으로 나타났다.

[0262] SR의 사용은 또한 단백질 공급원으로서 혈장 또는 AB 혈청에 비해 단리된 세포의 전반적인 생존성을 낮추는 것으로 나타난다(도 9).

[0263] *다른 림프구*

[0264] TCR-음성 세포(즉, αβ-TCR 및 γδ-TCR에 대해 음성인 세포)의 생성에 대한 조건 또한 조사하였다. 단백질 공급원으로 SR을 사용하면 혈장 또는 AB 혈청에 비해 TCR-음성 세포 수가 증가한다(도 10). IFN-γ가 부재한 조건은 또한 TCR-음성 세포 수를 증가시켰다.

[0265] *결론*

[0266] 데이터는 단리된 전체 γδ 세포의 수가 크게 개선되어 초기 확장 설정의 수를 증가시킬 수 있는 가능성을 제공할 수 있음을 시사한다. 그리드당 최고의 % γδ T 세포 및 총 γδ T 세포를 갖는 모든 조건은 IL-1β를 함유한다(조건 6, 8, 9, 12 및 14). 표준 2 사이토카인 단리 방법에 비교한 상위 조건의 결과는 도 11에 나와 있다.

[0267] 따라서, 인간 사이토카인 및 인간 AB 혈청, 인간 풀 혈장 또는 혈청 대체물의 조합을 적정하는 DoE 접근법을 통해 인간 풀 혈장(이전 단리 배양물은 혈청 대체물 사용함) 및 사이토카인 IL-2, IL-4, IL-15 및 IL-1β(이전에는 IL-2 및 IL-15만 사용함)을 사용하여 2세대로 명명된 피부 림프구 단리 칵테일을 식별하였다. 이 새로운 성장 칵테일은 원래의 방법론(또한 현재 1세대로 공지됨)에 비해 단리된 총 생존 림프구 수를 단리 세포 매트릭스(그리드) 당 50-100 x 10^6 세포(이전)에서 75-200 x 10^6 림프구로 개선하였다. 또한 2세대는 단리 말기에서 최대 3배 더 높은 γδ T 세포의 존재를 나타내고 일반적으로 유리한 표현형(예를 들어, 더 낮은 CD45RA 및 NKG2A 발현)을 제시하였다.

[0268] **실시예 3. 동결 단리 조사**

[0269] 이전 조건은 많은 수의 γδ T 세포를 초래하였지만, 수확 및 해동 후 생존성이 불량하였다. 단리된 세포가 확장하기 전에 동결되는 새로운 단리 및 확장 과정을 조사하였다. 단리 후, 세포를 실시예 1에 설명된 방법에 따라 동결하였다. 후속 확장 단계에서 배수 확장 및 % γδ T 세포에 대한 효과는 도 12에 나타나 있다. 확장하기 전에 동결된 단리된 세포는 적어도 신선한 등가물 만큼 농축되고 확장하는 것으로 밝혀졌다.

[0270] **실시예 4. 단리 제형에 IL-21을 포함하면 γδ T 세포 수율을 증가시킬 수 있음**

[0271] IL-21의 사용을 조사하여 이 사이토카인이 단리 및 후속 확장 후에 전체 γδ T 세포 수율을 증가시킬 수 있는지 조사하였다. 전체 γδ T 세포 함량을 개선하면 잠재적으로 전체 효과기 세포 수율을 증가시킬 뿐만 아니라 후속 확장에서 이러한 세포의 대규모 유전자 조작이 가능하다.

[0272] 단리 배양물을 2.5% 동종이계 혈장이 보충된 AIMV 배지와 함께 GREX100M 장치로 준비하였다(자세한 설명을 위해 실시예 1 참조). 이후 표 3에 설명된 대로 배양물에 사이토카인을 보충하였다.

[0273] 표 3. 단리 배양물에 사용되는 사이토카인 조건

[0274]

	"IL-21 없는" 변이 (2세대)	"IL-21" 변이 (18.8ng/mL, 3세대)
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

[0275] 18.8 ng/ml IL-21이 있는 단리 배양물을 21일째에 수확하고 후속 확장을 위해 동결보존(동결)하였다. 이후 세포

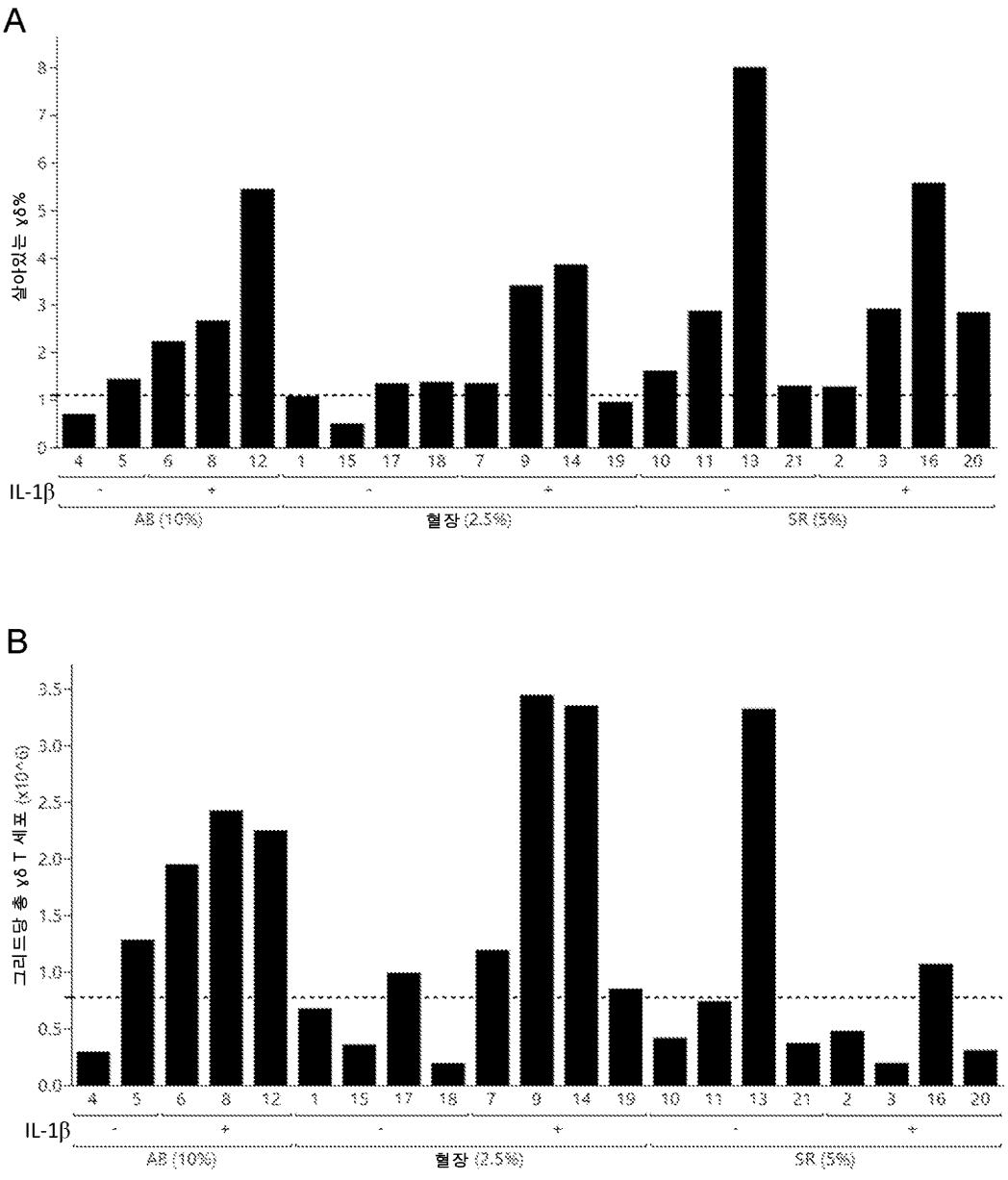
를 해동하고 NC250 자동 세포 계수를 통해 세포 생존성을 측정하고 결과를 도 13a에 나타내었다. 해동 시점에서 세포의 전체 생존성은 IL-21이 있거나 없는 상태 둘 모두에서 최소 허용 가능한 생존성을 초과하였고 평균 % 생존성은 "IL-21 없는" 배양물에서 >80%, "IL-21" 배양물에서 거의 90%였다. 이후 단리된 세포를 상이한 수준(12.53, 18.8, 37.5 및 188 ng/mL)의 IL-21 보충물과 5% 동종이계 혈장 및 IL-15 (80 ng/mL)로 보충된 TexMACS™ 배지(Miltenyi Biotec)의 존재에서 확장하였다. 14일 동안 확장한 후, 세포를 수확하고 도 13b에 나타낸 바와 같이 유세포 분석을 통해 γδ T 세포 농축을 측정하였다. 확장 후, IL-21의 존재에서 단리된 세포는 확장에 사용된 IL-21의 양과 무관하게 14일 배양 과정에 걸쳐 12.5 내지 188.8 ng/mL에 필적하는 성능을 나타내는 γδ T 세포 농축을 입증하였다. 따라서, 단리 배양물에 IL-21이 존재하면 생존 세포가 생산되고 γδ T 세포가 후속적으로 확장될 수 있는 능력이 유지된다. 세포 독성 검정에서 확장 후 이들 세포의 기능 또한 확인하였다.

[0276] **실시예 5. IL-21 없는 단리 배양물 대 18.8ng/ml IL-21의 비교**

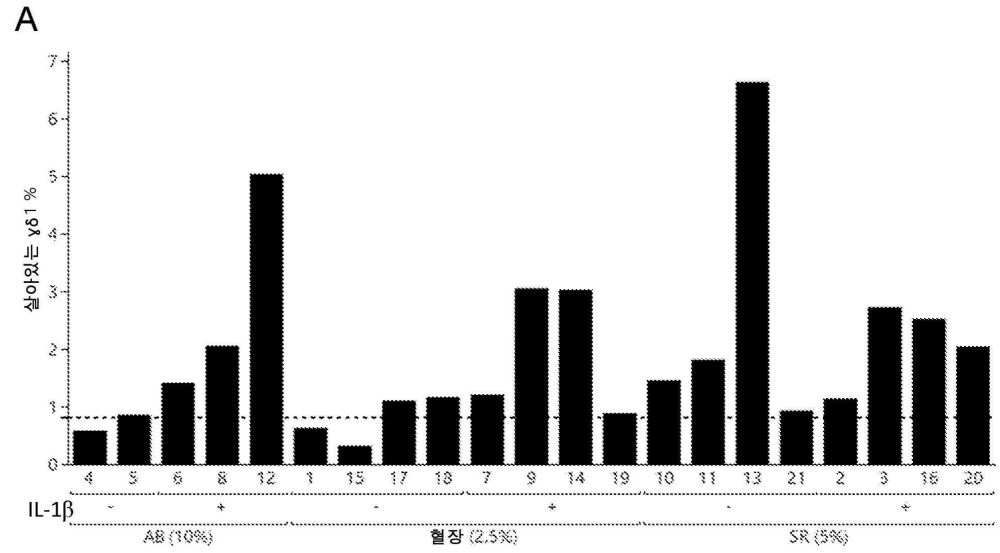
[0277] 기증자-일치하는 피부 샘플을 표 3에 자세히 설명된 바와 같이 "IL-21 없는" 제형 또는 "IL-21"(18.8ng/ml) 사이토카인 제형을 사용하여 단리 배양물에 준비하였다. 모든 단리 배양물을 2.5% 동종이계 혈장이 보충된 AIMV 배지(자세한 설명을 위해 실시예 1 참조)로 준비하였다. "IL-21 없는" 단리 배양물을 19일 또는 21일에 수확한 반면, "IL-21" 단리 배양물을 19일에만 수확하였다. 수확 시점에서, 배양물 그리드당 생존 세포의 총 수, 단리 배양물 그리드당 단리된 γδ T 세포의 총 수 및 단리 배양 그리드당 Vδ1 T 세포의 총 수를 기록하고 그 결과를 도 14에 나타내었다.

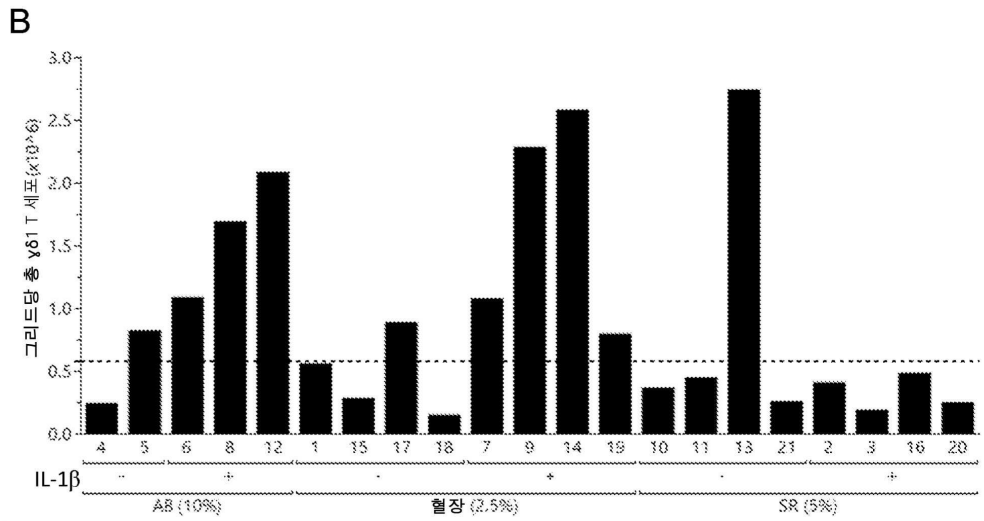
도면

도면1

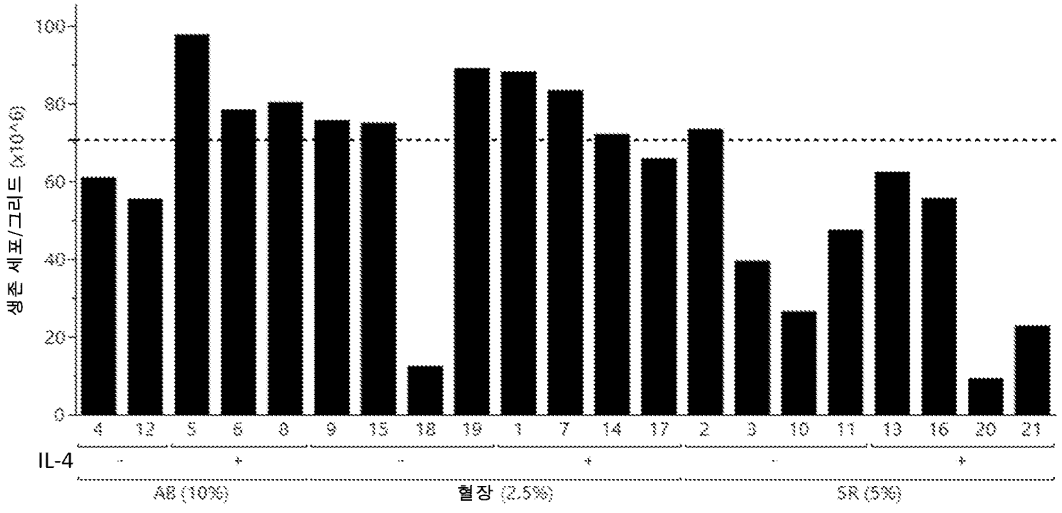

A
살아있는 γδ%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
4 5 6 8 12 1 15 17 18 7 9 14 19 10 11 13 21 2 3 16 20
IL-1β
- + - + - +
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)
B
그리드당 총 γδ T 세포 (x10^3)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4 5 6 8 12 1 15 17 18 7 9 14 19 10 11 13 21 2 3 16 20
IL-1β
- + - + - +
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

도면2

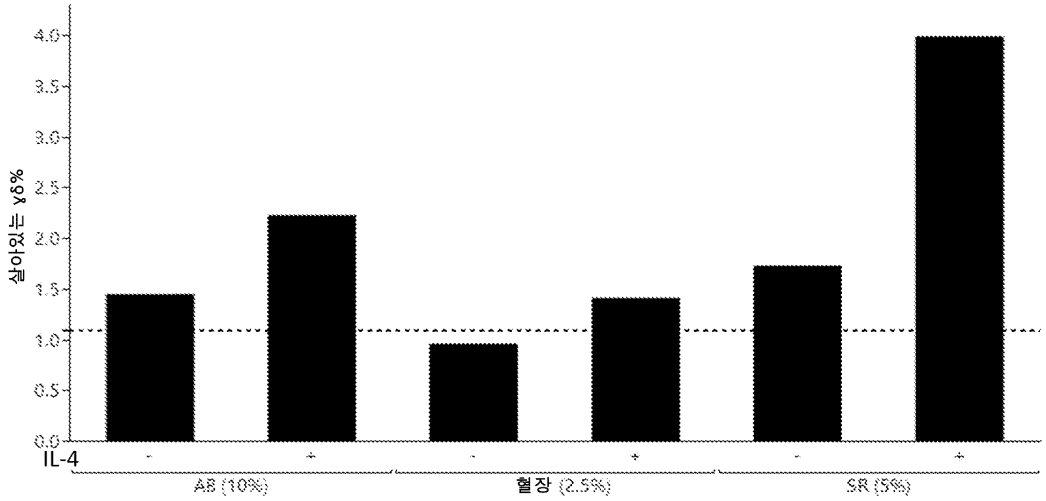

A
살아있는 γδ T %
4 5 6 8 12 1 15 17 18 7 9 14 19 10 11 13 21 2 3 16 20
IL-1β - + - + - +
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)


B
그리드당 총 γδ T 세포(x10^6)
4 5 6 8 12 1 15 17 18 7 9 14 19 10 11 13 21 2 3 16 20
IL-1β - + - + - +
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

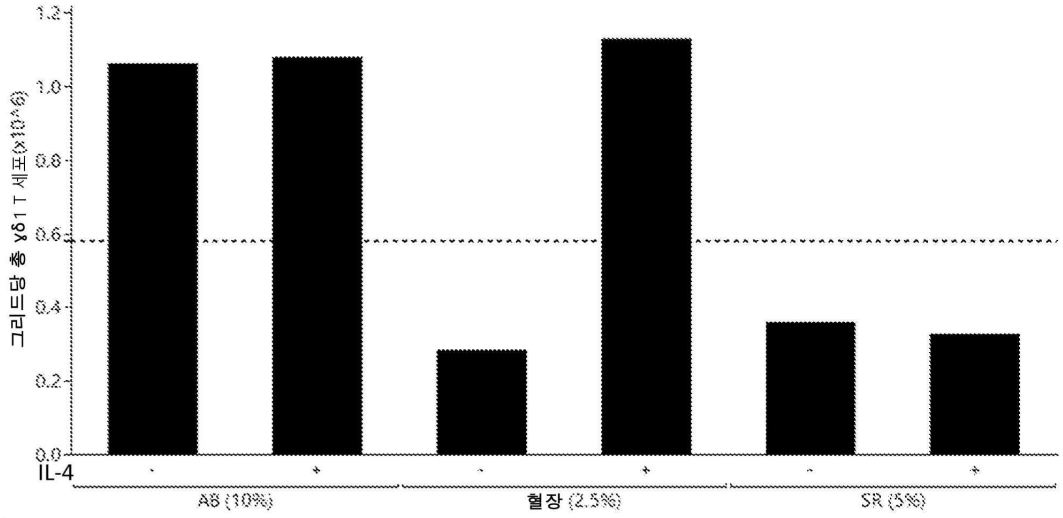
도면3


생존 세포/그리드 (x10^3)
4 12 5 6 8 9 15 18 19 1 7 14 17 2 3 10 11 13 16 20 21
IL-4 - + - + - +
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

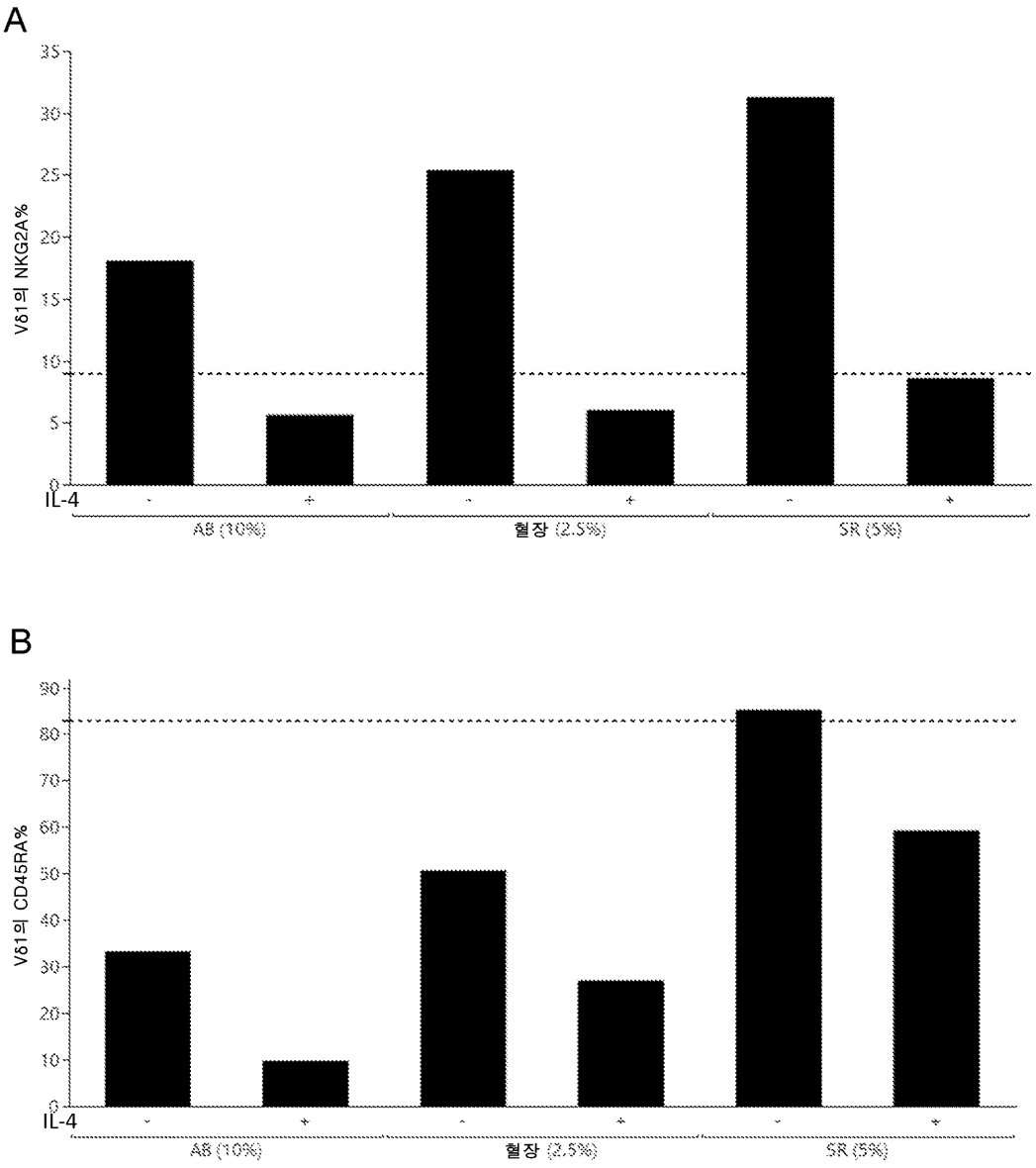
도면4


살아있는 γδ%
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IL-4
-
+
-
+
-
+
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

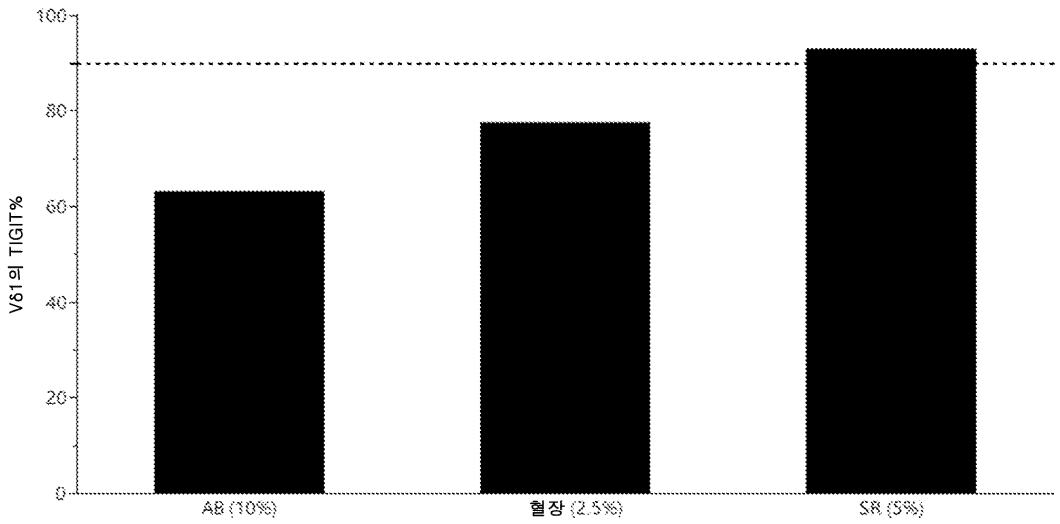
도면5


그리드당 총 γδ1 T 세포(x1만^6)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
IL-4
-
+
-
+
-
+
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

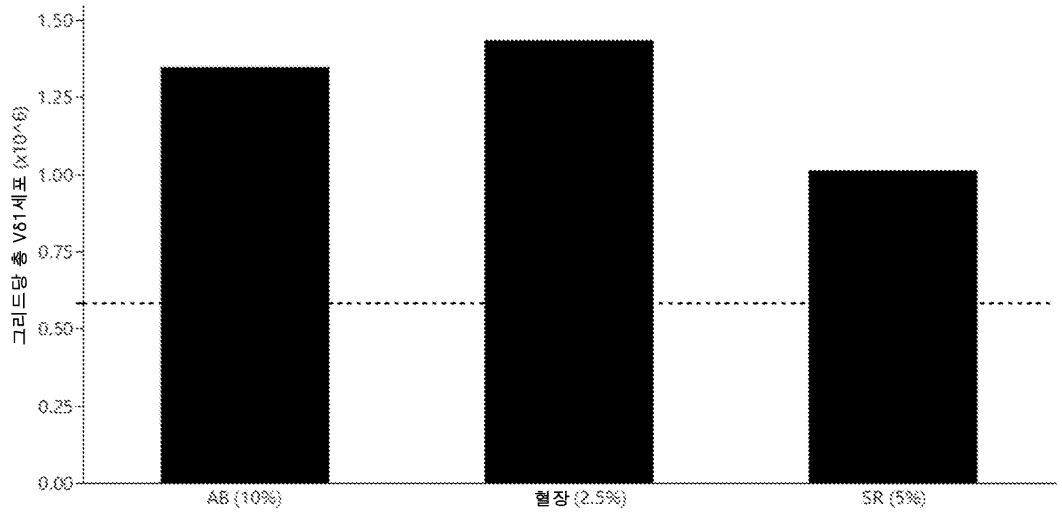
도면6


A
V61의 NKG2A%
35
30
25
20
15
10
5
0
IL-4
-
+
-
+
-
+
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)
B
V61의 CD45RA%
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
IL-4
-
+
-
+
-
+
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

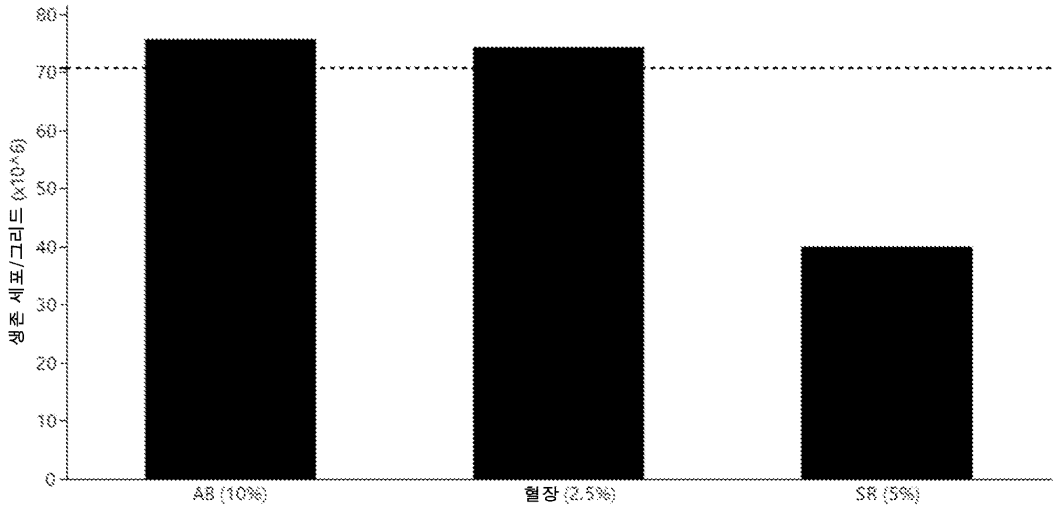
도면7


V61의 TIGIT%
100
80
60
40
20
0
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

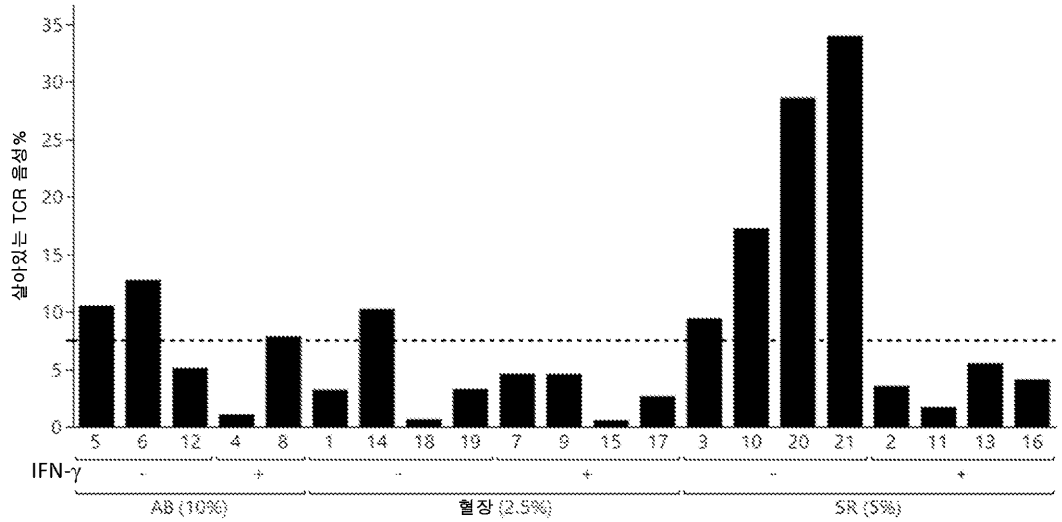
도면8


그리드당 총 V61세포 (x10^6)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

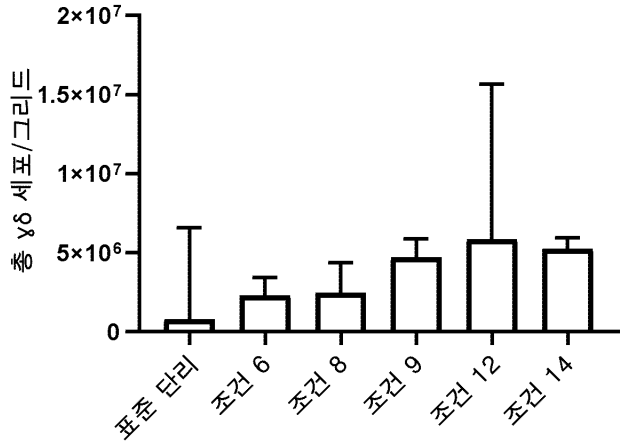
도면9


생존 세포/그리드 (x10^6)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

도면10

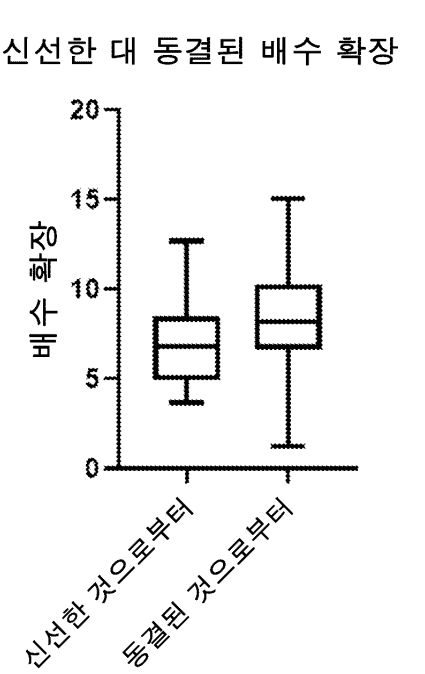

살아있는 TCR 음성%
35
30
25
20
15
10
5
0
5 6 12 4 8 1 14 18 19 7 9 15 17 3 10 20 21 2 11 13 16
IFN-γ
AB (10%)
혈장 (2.5%)
SR (5%)

도면11

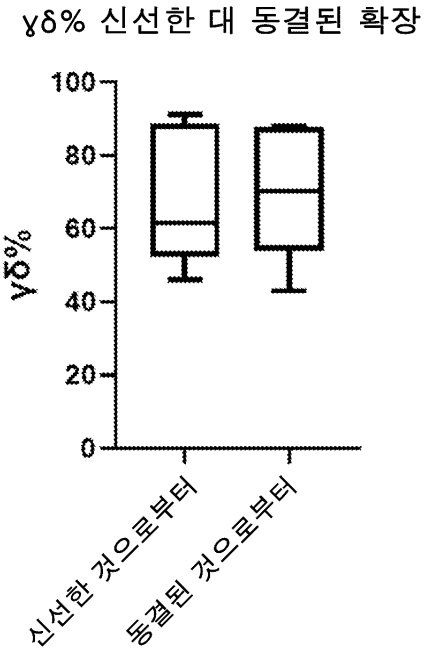


도면12

A

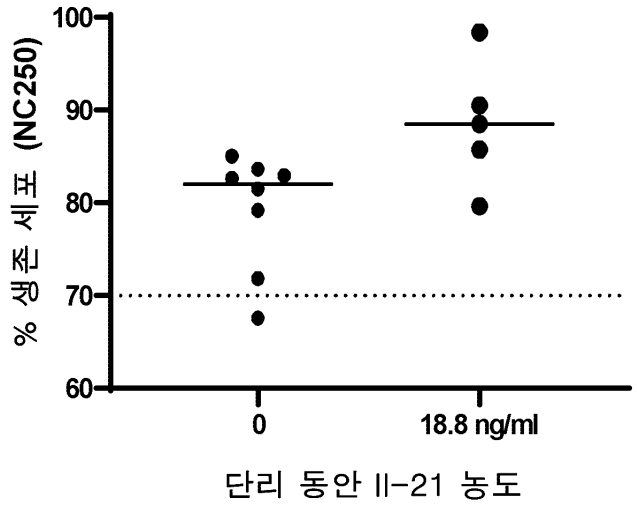

신선한 대 동결된 배수 확장
배수 확장
20
15
10
5
0
신선한 것으로부터
동결된 것으로부터

B

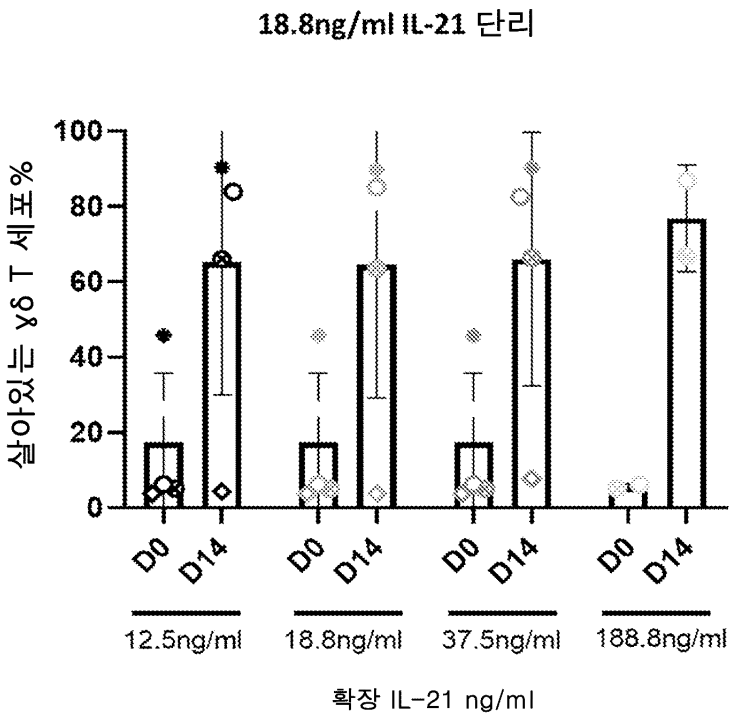

γδ% 신선한 대 동결된 확장
γδ%
100
80
60
40
20
0
신선한 것으로부터
동결된 것으로부터

도면13

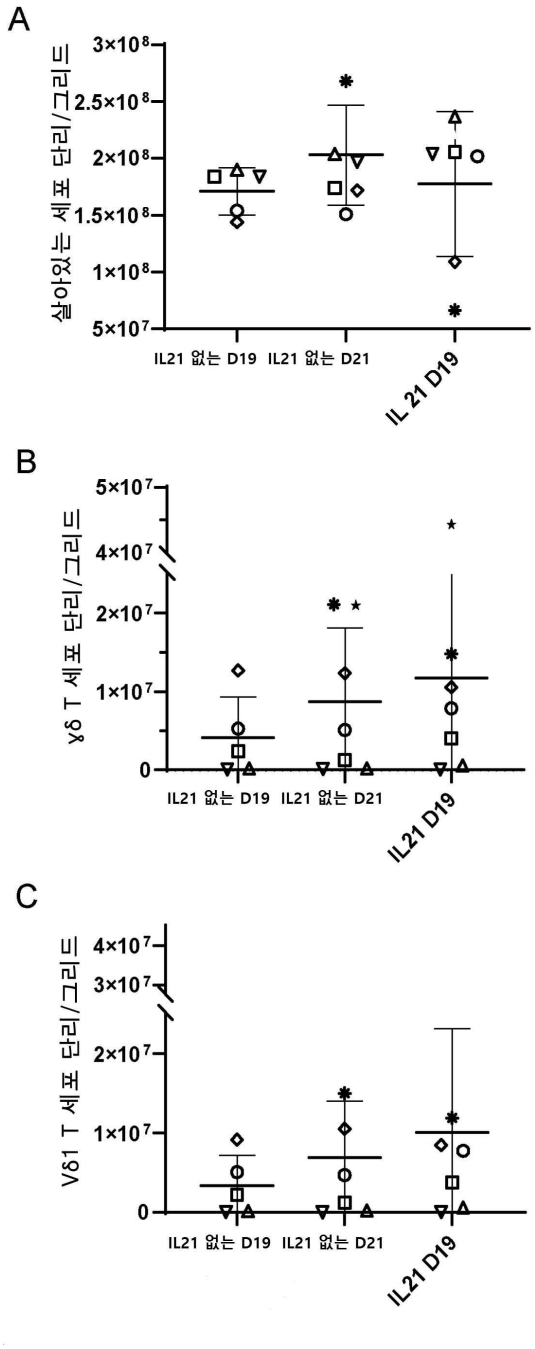
A


100
90
80
70
60
% 생존 세포 (NC250)
0
18.8 ng/ml
단리 동안 IL-21 농도

B


18.8ng/ml IL-21 단리
100
80
60
40
20
0
살아있는 γδ T 세포%
D0
D14
D0
D14
D0
D14
D0
D14
12.5ng/ml
18.8ng/ml
37.5ng/ml
188.8ng/ml
확장 IL-21 ng/ml

도면14


A
살아있는 세포 단리/그리드
3×10^8
2.5×10^8
2×10^8
1.5×10^8
1×10^8
5×10^7
IL21 없는 D19
IL21 없는 D21
IL 21 D19
B
γδ T 세포 단리/그리드
5×10^7
4×10^7
2×10^7
1×10^7
0
IL21 없는 D19
IL21 없는 D21
IL21 D19
C
Vδ1 T 세포 단리/그리드
4×10^7
3×10^7
2×10^7
1×10^7
0
IL21 없는 D19
IL21 없는 D21
IL21 D19