



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118871573 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202380017134.1

(22) 申请日 2023.01.12

(30) 优先权数据

22382013.5 2022.01.12 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/050665 2023.01.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/135225 EN 2023.07.20

(71) 申请人 高等科学研究委员会 (CSIC)

地址 西班牙马德里

申请人 单链免疫治疗有限公司

(72) 发明人 M·J·加西亚·莱昂

P·富恩特斯·比利亚雷乔

J·阿尔卡因·桑切斯

M·L·托里比奥·加西亚

L·加西亚·佩雷斯

V·M·迪亚斯·科尔特斯

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 郑元博

(51) Int.Cl.

G12N 5/0783 (2006.01)

G07K 14/705 (2006.01)

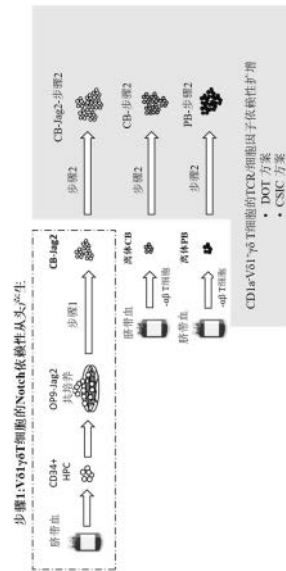
权利要求书2页 说明书29页 附图17页

(54) 发明名称

产生Vδ1+T细胞的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于大规模选择性产生γδT细胞、优选人Vδ1+γδT细胞的新的且有效的方法,其对于在癌症的过继免疫疗法中临床应用来说是最佳的。在这个意义上,考虑到目前在临床上被选为干细胞来源的人脐带血HPC和人早期胸腺祖细胞都可以响应于Notch信号传导而有效地从头产生人γδT细胞,以及响应于Notch配体Jag2而最有效地从头产生人γδT细胞,因此该方法包括通过用Jag2Notch配体激活脐带血CD34+造血祖细胞(HPC)和/或人CD34+早期胸腺祖细胞以诱导它们分化。



1. 一种从包含人HPC如CD34+脐带血HPC和/或人ETP的细胞群体从头产生Notch诱导并分化的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的扩增群体的体外方法,所述方法包括产生包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞的细胞组合物的第一步骤,所述第一步骤包括:

a. 在包含Jag2 Notch配体或其激动剂的充足培养基中培养包含HPC和/或ETP的细胞群体;以及

b. 将培养物中的所述细胞维持足以产生所述 γ δ T细胞的一段时间,优选地该段时间为约2周至约15周,并且所述Jag2 Notch配体或激动剂应当在所述培养时并且在整个培养期间以充足的量存在或添加至细胞的所述培养物中。

其中,由所述第一步骤得到的所述细胞组合物的特征在于其包含CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,并且其中所述方法还包括激活并诱导所述CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞增殖的第二步骤,所述第二步骤包括在 γ δ TCR激动剂存在下和在至少IL21和IL15存在下,在充足培养基中培养所述第一步骤后获得的所述细胞以获得细胞群体,所述细胞群体的特征在于总 γ δ T细胞的至少40%是扩增和激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,并且其中CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体的特征在于:

- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,
- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,
- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,
- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%-100%表达NKG2D标志物,以及
- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%-100%表达DNAM-1标志物,

其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第二步骤包括:

-在至少一种 γ δ TCR激动剂和至少IL21存在下,在充足培养基中培养在所述第一步骤之后获得的细胞5天,以及

-在第5天、优选地第7天,将IL15添加至培养基中,并在至少一种 γ δ TCR激动剂、IL21和IL15存在下培养所述细胞至少7天。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的方法,其中,所述至少一种 γ δ TCR激动剂以0.5 μ g/ml-4 μ g/ml的浓度添加,IL21以7ng/ml-15ng/ml的浓度添加,以及IL15以70ng/ml-150ng/ml的浓度添加。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,所述人HPC来源于CD34+脐带血HPC。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在所述第二步骤后获得的激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的特征还在于它们表达CD25和/或CD69激活标志物,但不表达LAG3和/或CTLA4耗竭标志物。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,在所述第二步骤之后获得的激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于表达CD8标志物并且具有T效应表型,其中所述T效应表型的特征在于CD45RA的表达并且缺乏CD62L标志物的表达。

7. 一种细胞组合物,其包含在权利要求1至6中任一项所述的方法的第二步骤后获得或能够获得的从头Notch诱导并分化的CD1a-V δ 1+ γ δ 。

8. 一种细胞组合物,其包含从头Notch诱导并分化的CD1a-V δ 1+ γ δ T,其中激活的V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于:

- V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,

-V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,
-V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,
-V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%-100%表达NKG2D标志物,以及
-V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%-100%表达DNAM-1标志物,
其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

9. 一种细胞组合物,其包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞,所述细胞组合物在根据权利要求1至6中任一项所述方法的第一步骤后获得或能够获得。

10. 根据权利要求9所述的细胞组合物,其特征在于,在第一步骤后产生的V δ 1+ γ δ T群体依次包含:

a. 第一细胞群体(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞),其特征在于,它们表达所述未成熟表面细胞标志物CD1a,以及

b. 第二细胞群体(CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞),其特征在于,它们不表达所述未成熟表面细胞标志物CD1a。

11. 根据权利要求10所述的细胞组合物,其中,所述第一细胞群体的特征在于所述细胞不表达表面细胞标志物CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。

12. 根据权利要求9或10所述的细胞组合物,其中,所述第二细胞群体的特征在于所述细胞表达表面标志物CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。

13. 一种CAR T细胞,其使用权利要求7-12中任一项所述的细胞组合物获得或能够获得。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求7-12中任一项所述的细胞组合物或权利要求13所述的CAR T细胞,并且还包含药学上可接受的药剂或载剂。

15. 用于疗法用途的根据权利要求14所述的药物组合物。

16. 根据权利要求15所述的药物组合物,其用于细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗的用途。

产生V δ 1+T细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,特别是,本发明涉及用于大规模选择性产生人V δ 1+ γ δ T细胞的新的且有效的方法,其对于在癌症的过继免疫疗法中临床应用来说是最佳的。

背景技术

[0002] MHC(主要组织相容性复合体)差异造成的障碍通常限制了过继T细胞疗法的使用。因此,目前T-细胞产品如表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(CAR-T)的临床应用依赖于逐个病例的自体T细胞产生。然而,患者T细胞通常由于持续施用攻击性药物治疗而功能受损。此外,个性化定制的自体T细胞生产过程限制了T细胞在特定肿瘤类型(如T细胞肿瘤)中的广泛应用。因此,需要通用的同种异体T细胞来制备可作为用于大规模临床应用的“现成(off-the-shelf)”即用型治疗剂的T细胞产品。

[0003] 最近, γ δ T细胞已成为 $\alpha\beta$ T细胞用于细胞免疫疗法的替代品,因为它们不受肿瘤相关肽的MHC呈递的限制,并且显示出有限的同种异体潜力。尽管如此, γ δ T细胞在病毒感染和肿瘤进展中发挥重要作用,提供稳健和持久的抗肿瘤反应(Vantourout和Hayday, Nat Rev Immunol., 2013; Silva-Santos等人, Nat. Rev. Immunol., 2015)。特别是,V δ 1+ γ δ T细胞是癌症过继细胞疗法的非常有吸引力的候选者,因为它们通常在肿瘤浸润中占主导地位(超过V δ 2+),对激活诱导的细胞死亡不太敏感,并且可以作为肿瘤反应性淋巴细胞长期存在(Siegers等人, Mol. Ther. 2014)。然而,V δ 1+ γ δ T细胞,代表出生时普遍的 γ δ T细胞的V δ 1+T细胞亚型(Morita等人, J. Immunol. 1994),在外周血中稀少分布,并且合适的扩增/分化方法的缺乏已经排除了其治疗用途。在这种意义上,Bruno Silva-Santos的小组最近开发了临床级方法,使用TCR激动剂和细胞因子来选择性扩增从外周血分离的细胞毒性V δ 1T细胞(Correia等人, Blood 2011; Almeida等人, Clin. Cancer Res. 2016)。名为 δ 1T(Delta One T, DOT)细胞的细胞产品在慢性淋巴细胞白血病(CLL)的临床前模型中显示出治疗潜力,为其在癌症过继免疫疗法中的临床应用提供了原理论证。

[0004] 尽管如此,可从外周血中分离的V δ 1+T细胞的数量有限,强调了需要开发用于稳健产生/扩增细胞毒性V δ 1+抗肿瘤T细胞的补充性方案。更重要的是,由于响应于外周免疫挑战(例如CMV)而发生克隆扩增(Ravens等人, Nature Immunol. 2017),新生的V δ 1+T细胞的分散的和多样性的T细胞受体(TCR)库在成年期变得非常有限并集中于少数优势克隆型(Davey等人, Nature Commun. 2016)。V δ 1+细胞的克隆扩增导致从V δ 1T细胞幼稚表型分化为以CD27下调为特征的V δ 1T细胞效应/记忆表型(Davey等人, Trends Immunol. 2018)。由于人幼稚源性效应T细胞(human naive-derived effector T cell)保留较长的端粒,最能够体外扩增和T细胞受体转基因表达,并且已经与临床试验中的更大功效相关联,因此已经假定幼稚细胞抵抗终末分化或“耗竭”,维持高复制潜力,并且因此可以是用于过继免疫疗法的更优越的亚群(Hinrichs等人, Blood 2011)。

发明内容

[0005] 本发明为解决上述问题而做出,其目的涉及用于大规模选择性产生人V δ 1+ γ δ T细胞、优选同种异体人V δ 1+ γ δ T细胞的新的且有效的方法,其对于在癌症的过继免疫疗法中临床应用来说是最佳的。在这种意义上,考虑到本发明的发现,即目前在临床上被选为造血干细胞来源的人脐带血CD34+造血干/祖细胞(HPC)和人CD34+早期胸腺祖细胞(early thymic progenitor,ETP)都可以响应Notch信号传导而有效地从头产生人V δ 1+ γ δ T细胞,因此,本发明的方法包括通过用Jag2 Notch配体激活人HPC(优选脐带血CD34+HPC)和/或人CD34+ETP以诱导它们分化,其中所述配体在骨髓来源的基质细胞系的表面上过表达。优选地,该方法包括将人HPC(优选脐带血CD34+HPC)或人CD34+ETP在过表达Jag2的基质细胞(优选补充有Flt3+SCF+IL-7)上共培养长达9周。然后,如上所述以Notch依赖性TCR非依赖性方式产生的V δ 1+ γ δ T细胞(步骤1),将按照本领域已知的在TCR激活时诱导V δ 1+ γ δ T细胞增殖的任何方法,如通过使用抗CD3 mAb和包括IL-4、IFN- γ 和IL-15在内的细胞因子(Almeida等人,Clin.Cancer Res.2016),进行激活和扩增(步骤2)。

[0006] 发明内容

[0007] 本发明涉及从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或人ETP的细胞群体中从头产生Notch诱导并分化的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的扩增群体的体外方法,该方法包括产生包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞的细胞组合物的第一步骤,第一步骤包括:

[0008] a.在包含Jag2 Notch配体或其激动剂的充足培养基中培养包含HPC和/或ETP的细胞群体;以及

[0009] b.将培养物中的细胞维持足以产生 γ δ T细胞的一段时间,优选地该段时间为约2周至约15周,并且jag2 Notch配体或激动剂应当在培养时并且在整个培养期间以充足的量存在或在添加至细胞的所述培养物中,

[0010] 其中,由第一步骤得到的细胞组合物的特征在于其包含CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,并且其中该方法还包括激活并诱导所述CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的增殖的第二步骤,第二步骤包括在 γ δ TCR激动剂存在下和在至少IL21和IL15存在下,在充足培养基中培养第一步骤后获得的细胞以获得细胞群体,该细胞群体的特征在于总 γ δ T细胞的至少40%是扩增和激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,并且其中CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体的特征在于:

[0011] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,

[0012] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,

[0013] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,

[0014] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%-100%表达NKG2D标志物,以及

[0015] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%-100%表达DNAM-1标志物,

[0016] 其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0017] 优选地,第二步骤包括:

[0018] -在至少一种 γ δ TCR激动剂和至少IL21存在下,在充足培养基中培养在第一步骤之后获得的细胞5天,以及

[0019] -在第5天、优选地第7天,将IL15添加至培养基中,并在至少一种 γ δ TCR激动剂、IL21和IL15存在下培养细胞至少7天。

[0020] 优选地,至少一种 γ δ TCR激动剂以0.5 μ g/ml-4 μ g/ml的浓度添加,IL21以7ng/ml-

15ng/ml的浓度添加,以及IL15以70ng/ml-150ng/ml的浓度添加。

[0021] 优选地,人HPC是CD34+脐带血HPC。

[0022] 优选地,在第二步骤后获得的激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的特征还在于它们表达CD25和/或CD69激活标志物,但不表达LAG3和/或CTLA4耗竭标志物。

[0023] 优选地,在第二步骤后获得的激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于表达CD8标志物并且具有T效应表型,其中T效应表型的特征在于CD45RA的表达并且缺乏CD62L标志物的表达。

[0024] 本发明还提供了细胞组合物,其包含在上述方法的第二步骤后获得或可获得的从头Notch诱导并分化的CD1a-V δ 1+ γ δ 。优选地,激活的V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于:

[0025] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,

[0026] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,

[0027] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,

[0028] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%-100%表达NKG2D标志物,以及

[0029] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%-100%表达DNAM-1标志物,

[0030] 其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0031] 本发明还提供了在上文定义的方法的第一步骤之后获得或可获得的包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞的细胞组合物。优选地,细胞组合物的特征在于,在第一步骤后产生的V δ 1+ γ δ T的群体依次包含:

[0032] a. 第一细胞群体(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞),其特征位于,它们表达未成熟表面细胞标志物CD1a,以及

[0033] b. 第二细胞群体(CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞),其特征位于,它们不表达未成熟表面细胞标志物CD1a。

[0034] 优选地,第一细胞群体的特征在于细胞不表达表面细胞标志物CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。优选地,第二细胞群体的特征在于细胞表达表面标志物CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D中的至少一种或至少两种或更多种的组合、优选全部。

[0035] 本发明还提供了使用上文定义的细胞组合物获得或可获得的CAR T细胞。

[0036] 本发明还提供了药物组合物,其包含上文定义的细胞组合物或CAR T,并且还包含药学上可接受的药剂或载剂。

[0037] 本发明还提供了用于疗法用途的如上定义的药物组合物。优选地,该用途用于细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗。

附图说明

[0038] 以下附图提供了用于说明本说明书的优选实施方式,并且不应被视为限制本发明的范围。

[0039] 图1.从CD34+早期人胸腺祖细胞(ETP)中产生Notch诱导的 γ δ (和 $\alpha\beta$)T细胞,其中Jag2是用于 γ δ T细胞产生的最有效配体。Jag2在培养第30天诱导了250倍-300倍的从CD34+人ETP产生 γ δ T细胞的产量。

[0040] 图2. Jag2-Notch信号传导支持从ETP产生V δ 1+ γ δ T细胞。从人CD34+ETP产生的Jag2诱导的V δ 1+ γ δ T细胞(100倍产量)在培养第30天生产IFN γ ,但不生产IL-17。

[0041] 图3. Jag2介导的体外从人CD34+ETP产生V δ 1+ γ δ T细胞的效率。

[0042] 图4. 从人CD34+脐带血造血干/祖细胞 (HPC) 产生Jag2-Notch诱导的V δ 1+ γ δ T细胞。显示了由Jag2诱导的从人CD34+脐带血HPC扩增总细胞和产生 γ δ T细胞的动力学。点图显示第50天从头产生的 γ δ T细胞上的V δ 1表达。

[0043] 图5. 9周培养物中在Jag2-Notch信号传导下从人CD34+脐带血HPC生产总 γ δ T细胞和V δ 1+ γ δ T细胞的效率(步骤1)。

[0044] 图6. 从接受人Jag2信号传导的人CD34+CB HPC (CB-Jag2) 产生, 或从脐带血离体 (CB离体) 或外周血离体 (PB离体) 分离的CD3+T细胞中总 γ δ T细胞 (左) 和V δ 1+ γ δ T细胞 (中) 的比例。每个点代表一个独立的实验或生物样品 (n=4)

[0045] 图7. 从CD34+早期人胸腺祖细胞 (ETP) 产生Notch诱导的 γ δ (和 $\alpha\beta$) T细胞, 其中缺乏人Notch配体 (OP9-GFP) 的基质细胞不能支持ETP细胞扩增/分化。

[0046] 图8. 从接受人Jag2信号传导的人CD34+CB HPC产生的V δ 1+ γ δ T细胞的表型。(A) V δ 1+ γ δ T细胞包括显示CD4+或CD4+CD8+双阳性 (DP) 或CD4-CD8- 双阴性 (DN) 表型的CD1a+未成熟 γ δ T细胞亚群, 以及DN或CD8+细胞的CD1a-成熟 γ δ T细胞亚群。(B) 成熟的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞是表达 γ δ T细胞分化标志物CD73和不同水平的NKp44、NKp30和NKG2D细胞毒性NK受体的幼稚CD27+。

[0047] 图9. 从接受人Jag2信号传导的人CD34+CB HPC产生的成熟CD1a-V δ 1+ γ δ 幼稚T细胞与PB中驻留的V δ 1+细胞 (CD1a-) 在CD73和细胞毒性NK受体的表达方面不同。每个点代表一个独立的实验或生物样品。

[0048] 图10. 在转导的OP9细胞中Jag2 Notch配体的表达增加(过表达)。数字表示未转导(左图) 或用Jag2转导(右图) 的OP9基质细胞的细胞表面上表达的Jag2的平均荧光强度。用抗人Jag2的PE偶联的mAb标记细胞, 并通过流式细胞术分析。

[0049] 图11. 驻留在人胸腺中或从ETP体外发育的 γ δ T细胞V δ 亚群的异质性。(A) 条形图表示人胸腺中体内存在的总 γ δ T细胞的指定V δ 亚群(左) 的平均+/-SEM频率; 右: 人胸腺中体内V δ 1和V δ 2 γ δ T细胞亚群中CD1a+、低表达CD1a^{int}的CD1a和CD1a-的平均+/-SEM频率。(B) 在所示Notch配体OP9细胞系中共培养的人ETP胸腺细胞上表达的V δ 1和V δ 2的流式细胞动力学分析。象限中的数字显示所示细胞亚群的平均+/-SEM频率 (C) 从如在B中培养31天的ETP产生的V δ 1+、V δ 2+和V δ 1-V δ 2- γ δ T细胞数量的绝对动力学。数据显示3次独立实验的平均+/-SEM细胞数。

[0050] 图12. 从CB HPC产生(步骤1) 和扩增(步骤2) 人V δ 1+ γ δ T细胞的两步方案。将从人CB样品中分离的CD34+HPC与F1t3配体、SCF和IL-7在表达Jag2的OP9细胞上共培养长达8周(步骤1)。在补充有抗TCR激动剂和细胞因子的悬浮培养物中体外扩增从步骤1获得的细胞 (CB-Jag2) 和从人CB或人外周血 (PB) 离体分离并耗竭TCR $\alpha\beta$ +细胞的细胞悬浮液(步骤2)。

[0051] 图13: 大多数CB-Jag2-步骤2V δ 1+ γ δ T细胞是CD8+CD1a-成熟效应细胞。在使用DOT方案(上图) 或CSIC步骤2方案(下图) 扩增的指定CB-Jag2-步骤2、CB-步骤2和PB-步骤2群体中包含的V δ 1+ γ δ T细胞亚群中分析CD8、CD1a、CD27、CD45RA和CD62L的表达。CD62L和CD45RA的表达用于确定T细胞的以下表型, (T效应记忆 (T_{EM}): CD62L-CD45RA-; T中心记忆 (T_{CM}): CD62L+CD45RA-); T幼稚 (T_N): CD62L+CD45RA+; 以及T效应 (T_{eff}): CD62L-5RA+)。条形代表平均值+/-SEM。点代表独立实验或生物样品: CB-Jag2-步骤2n=3; CB-步骤2n=4; PB-步骤2n

=6。进行了单因素方差分析、克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal Wallis)检验(* $p < 0.05$),以评估统计学显著性。

[0052] 图14:CB-Jag2-步骤2V δ 1+ γ δ T细胞是具有低耗竭细胞谱的激活T细胞。使用步骤2DOT方案(上图)或步骤2CSIC方案(下图)扩增的CB-Jag2-步骤2、CB-步骤2和PB-步骤2群体中包含的V δ 1+门控 γ δ T细胞中激活标志物(CD25和CD69)和耗竭相关表面标志物(LAG3和CTLA4)的表达。每个点代表一个独立的实验或生物样品:CB-Jag2-步骤2 $n=2-3$;CB-步骤2 $n=3-4$;PB-步骤2 $n=6$ 。进行了单因素方差分析、克鲁斯卡尔-沃利斯检验(* $p < 0.05$),以评估统计学显著性。

[0053] 图15:大多数CB-Jag2-步骤2V δ 1+细胞显示了细胞毒性相关的激活受体。使用步骤2DOT方案(上图)或步骤2CSIC方案(下图)扩增的指定CB-Jag2-步骤2、CB-步骤2和PB-步骤2群体中包含的V δ 1+ γ δ T细胞亚群中细胞毒性相关表面标志物的表达。每个点代表一个独立的实验或生物样品:CB-Jag2-步骤2 $n=2-3$;CB-步骤2 $n=3-4$;PB-步骤2 $n=6$ 。进行了单因素方差分析、克鲁斯卡尔-沃利斯检验(* $p < 0.05$),以评估统计学显著性。

[0054] 图16:CB-Jag2-步骤2细胞显示了对白血病细胞系的高体外细胞毒性潜力。在48小时测定中以指定的E:T比率测定在步骤2DOT方案(上图)或步骤2CSIC方案(下图)后扩增的CB-Jag2-步骤2、CB-步骤2和PB-步骤2群体针对Jurkat和Molm13白血病细胞的细胞毒性。 $(n=3)$,显示了平均值 \pm SD数据采用Holm-Sidak多重比较t检验进行统计学分析。多重比较t检验进行统计学分析。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 。

[0055] 图17在步骤1(CB-Jag2)和步骤1+步骤2(DOT或CSIC方案)培养后从CB细胞产生人V δ 1+CD1a- γ δ T细胞的效率。在表达Jag2的OP9基质上培养8周(步骤1)并在DOT或CSIC方案(步骤2)后进一步扩增($n=4$)时,从总CB细胞(10^6)分离的由CD34+HPC产生的V δ 1+CD1a- γ δ T细胞的数量(左图)。在步骤2DOT和CSIC方案后回收的T细胞内 γ δ TCR+细胞的百分比显示在中间图中, γ δ TCR+细胞内V δ 1+细胞的百分比表示在右图中($n=3$)。

[0056] 图18.步骤2DOT和CSIC扩增方案的示意图。

具体实施方式

[0057] 定义

[0058] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有在申请时如本发明所属的领域中的技术人员通常所理解的含义。然而,在任何潜在的歧义的情况下,本文提供的定义优先于任何其他定义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,并且复数术语也应包括单数形式。

[0059] 在本公开中,“包含”(comprises或comprising)、“含有”和“具有”等可以具有欧洲和美国专利法中赋予它们的含义,并且可以表示“包括(includes或including)”等;“基本上由……组成”或“基本上由……构成”同样具有欧洲和美国专利法中赋予的含义,并且该术语是开放式的,允许存在比所叙述的更多的内容,只要所叙述的内容的基本或新颖的特征不因存在多于所叙述的内容而改变,但不包括现有技术实施方式。

[0060] 本发明主要涉及从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体分化的Notch诱导的V δ 1+ γ δ T细胞的从头产生。“de novo”是拉丁语表达,意思是“新的”或“从头开始”,即,如本文所用,从头(de novo)应理解为不基于先前存在的V δ 1+ γ δ T细胞的,新

的Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞的创建。

[0061] 在本发明的上下文中，“Notch配体”被理解为能够结合表面Notch受体的蛋白质，其提供介导细胞命运决定的细胞信号，包括造血祖细胞的激活和分化 (Artavanis-Tsakonas等人, Science 1999)。因此，本文所用的术语包括天然存在的蛋白质配体，例如Delta家族配体和锯齿状/锯齿形 (Serrate/Jagged) 家族配体，以及经改造的Notch配体和Notch激动剂，包括针对Notch受体的抗体、肽模拟物和对天然配体具有相应生物学效应的小分子。在一些实施方式中，Notch配体是Jag2 Notch配体。优选的Notch配体选自DLL1、DLL4、Jag1或Jag2。

[0062] 如本文所用，“DLL1”理解为果蝇Notch Delta配体的天然存在的人同源物 (Delta样1)。该术语可进一步优选地包括经改造的Notch配体和具有天然Delta样1配体的生物学效应的Notch受体激动剂。

[0063] 如本文所用，“DLL4”理解为果蝇Notch Delta配体的天然存在的人同源物 (Delta样4)。该术语可进一步优选地包括经改造的Notch配体和具有天然Delta样4配体的生物学效应的Notch受体激动剂。

[0064] 如本文所用，“Jag1”理解为果蝇Notch锯齿形/锯齿状的配体的天然存在的人同源物 (锯齿状1)。该术语可进一步优选地包括经改造的Notch配体和具有天然锯齿状1配体的生物学效应的Notch受体激动剂。

[0065] 如本文所用，“Jag2”理解为果蝇Notch锯齿形/锯齿状配体的天然存在的人同源物 (锯齿状2)。该术语可进一步优选地包括经改造的Notch配体和具有天然锯齿状2配体的生物学效应的Notch受体激动剂。

[0066] 如本文所用，“V δ 1+ γ δ T细胞”理解为表达这样的TCR的T细胞，该TCR由 γ 链结合表达V δ 1可变区的 δ 链再结合CD3组分而组成。V δ 1+ γ δ T细胞可以通过使用特异性抗V δ 1抗体进行表型分析或通过V δ 区域测序来鉴定。

[0067] 如本文所用，“ γ δ TCR激动剂”理解为与TCR γ δ 异二聚体或TCR的V δ 1结构域或TCR γ δ 相关的CD3组分 (主要是CD3 ϵ 组分) 特异性结合的诱导细胞激活和增殖的抗体、肽模拟物和小分子。

[0068] 如本文所用，“人造血干细胞/祖细胞 (HPC)”理解为通过用抗CD34抗体进行表型分析鉴定并且从人脐带血、胎盘血、外周血、骨髓或胎肝离体获得或在体外来源自多能干细胞如iPSC (诱导多能干细胞) 的人CD34+细胞。

[0069] 如本文所用，“CD34+早期胸腺祖细胞 (ETP)”理解为通过用抗CD34抗体进行表型分析鉴定并且从人胎儿、新生儿或出生后胸腺离体获得的人CD34+细胞。

[0070] 在本发明的背景中，“功能性天然细胞毒性受体 (NCR)”应理解为在IL-2或IL-15存在下用强TCR激动剂或有丝分裂原刺激后，由自然杀伤 (NK) 细胞和人 γ δ T细胞 (几乎仅由V δ 1+ γ δ T细胞亚群) 表达的表面受体 (Correia等人, Blood. 2011)。NCR触发在细胞激活中起核心作用，调节对原发性白血病细胞和肿瘤细胞系的细胞毒性并增强IFN- γ 的表达。

[0071] 如本文所用的术语“过表达”是指与对照细胞中所述Notch配体的基础表达水平相比，Notch配体在细胞中的表达在统计学上显著增加。细胞优选是哺乳动物细胞、更优选是基质细胞。高于基础水平的表达包括所述Notch配体的药理学的和人工的上调和过表达。Notch配体或其激动剂在细胞上的过表达可以通过不同的手段实现，例如通过用编码Notch

配体的基因的质粒转染细胞,该基因可操作地连接至用于在所述细胞中表达Notch配体的合适启动子,或者通过使用遗传工程方法(例如Crispr、整合病毒载体或同源重组方法)将编码所述Notch配体的基因引入细胞的基因组中。术语“参考的细胞”或“参考细胞”是指未处理的对照细胞,即,未被遗传修饰或人工操作以诱导所述Notch配体表达超过天然表达(即,基础表达)的细胞。参考细胞优选是参考基质细胞。因此,参考基质细胞不表达Notch配体或以基础水平表达Notch配体。可以通过RNA表达技术(逆转录聚合酶链反应、荧光原位杂交、Northern印迹等)或蛋白质表达技术(Western印迹、流式细胞术等)检测在细胞上过表达的或与细胞的基础表达水平相比具有在统计学上显著增加的表达的Notch配体基因。

[0072] “Notch配体表达在统计学上显著增加”在本文中是指通过分析者对表达水平增加的确不能仅通过偶然来解释。统计假设检验是本领域技术人员进行该确定的方法。该检验提供了p值,其是假设结果确实是由偶然因素引起的,观察到与数据中的结果一样极端的结果的概率。0.1或更低(优选0.05、0.01、0.001或更低)的p值在本文中被认为是在统计学上显著的。例如,当进行统计学检验以将Notch配体在细胞(优选在基质细胞中)中的表达增加与如上文所定义的参考细胞(优选参考基质细胞)的基础表达水平进行比较时,且其中所述统计学检验的所得p值为0.1或更低,优选0.05、0.01、0.001或更低,则Notch配体在细胞中、优选地在基质细胞中的表达的增加是统计学显著的。

[0073] 如本文所用,术语“充足培养基”应理解为任何合适的哺乳动物细胞培养基。优选地,作为任何培养基,对于本发明的方法的步骤1,优选补充有20%胎牛血清以及优选L-谷氨酰胺和无动物重组人(rh)细胞因子如IL-7(200IU/ml)、Flt3L(100IU/ml)和SCF(100IU/ml)的无血清培养基(α -MEM(即浓度约2mmol/l);或对于本发明的方法的步骤2,无血清培养基(Optimizer-CTS),其任选地补充有自体血浆(即5%自体血浆)或人AB血清以及优选L-谷氨酰胺和无动物重组人(recombinant human,rh)细胞因子如rh IL-4(优选浓度为约100ng/ml)、IFN- γ (优选浓度为约70ng/ml)、IL-21(优选浓度为约7ng/ml)、IL-1 β (优选浓度为约15ng/ml)。应注意,适用于 γ δ T细胞增殖的许多基础培养基是可获得的,特别是完全培养基,例如AIM-V、Iscoves培养基和RPMI-1640(Life Technologies)。培养基可以补充有其他培养基因子,例如血清、血清蛋白和选择剂,例如抗生素。例如,在一些实施方式中,RPMI-1640培养基含有2mM谷氨酰胺、10%FBS、10mM HEPES(pH7.2)、1%青霉素-链霉素、丙酮酸钠(1mM;Life Technologies)、非必需氨基酸(如100 μ M Gly、Ala、Asn、Asp、Glu、Pro和Ser;1X MEM非必需氨基酸Life Technologies)。基础培养基可以补充标准浓度的IL-2和/或IL-15,者可以由技术人员通过常规实验容易地确定。

[0074] “治疗(treating,to treat或treatment)”是指但不限于抑制、限制、减少、稳定或减缓疾病的生长。

[0075] “医药”或“医药产品”是指广泛接受的用于治愈、治疗或预防动物(包括人)疾病的任何药物组合物或兽医组合物(也称为药物、药剂或简称药)。

[0076] “药物组合物”是指制备用于预防和/或治疗用途的最终药物产品的活性物质或活性物质的组合。

[0077] “药学上可接受的”是指不是生物学上或其他方面不期望的材料,即,该材料可以与本发明的组合物一起施用至对象,而不会引起任何不期望的生物学效应或以有害的方式与此组合物的任何组分相互作用。如本文所用,术语“药学上可接受的载剂(carrier)”和

“药学上可接受的媒剂(vehicle)”是可互换的,并且是指用于含有药物组合物的活性物质的媒剂,其可以向对象和/或环境施用而没有副作用。合适的药学上可接受的载剂包括但不限于无菌水、纯化水、盐水、葡萄糖、右旋糖或缓冲溶液。载剂可包括助剂,包括但不限于稀释剂、稳定剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、乳化剂、pH缓冲剂(例如磷酸盐缓冲液)、粘度添加剂等。

[0078] 如本文所用,“自体的”应理解为是指供者和受者是同一个体的细胞制备物。如本文所用,“同种异体”应理解为是指供者和受者不是同一个体的细胞制备物。

[0079] 术语“分离的”表示所指的细胞或细胞群体不在其天然环境中。该细胞或细胞群体已与周围组织基本上分离。

[0080] 本发明中提及的细胞组合物产品的标志物谱可以进一步通过另外的标志物的存在和/或不存在、或通过存在和不存在的标志物的组合的特定谱来定义。在每种情况下,标志物的特定组合可以作为细胞群体内的特定谱和/或群体内个体细胞上的标志物的特定谱存在。

[0081] 如本文所用的术语“标志物”涵盖可以检测其存在、浓度、活性或磷酸化状态并用于鉴定细胞表型的任何生物分子。

[0082] 然后,本发明的细胞对某些表型标志物是阳性的,而对其他表型标志物是阴性的。“阳性”是指标志物在细胞内表达。为了被认为是表达的,标志物必须以可检测的水平存在。

[0083] 术语“表达的(expressed)”用于描述标志物在细胞表面上或细胞内的存在。为了被认为是表达的,标志物必须以可检测水平存在。“可检测水平”是指标志物可以使用标准实验室方法(例如PCR、印迹、免疫荧光、ELISA或FACS分析)之一检测到。“表达的”可以指但不限于蛋白质、蛋白质的磷酸化状态或编码蛋白质的mRNA的可检测存在。如果在25个PCR循环后、优选在30个PCR循环后可以合理地检测到表达(这对应于细胞中的表达水平为至少约75个至100个拷贝/细胞),则认为基因被本发明的细胞或本发明的群体的细胞表达。术语“表达”(express和expression)具有相应的含义。在低于该阈值的表达水平下,认为标志物不表达。

[0084] 如果细胞群体中至少约60%、优选约80%的细胞显示可检测的标志物表达,则认为本文定义的细胞群体表达标志物。优选地,群体中至少约85%、至少约90%或至少约95%或至少约97%或至少约98%或更多的细胞显示可检测的标志物表达。在某些方面,群体中至少约99%或100%的细胞显示出可检测的标志物表达。表达可以通过使用任何合适的手段如RT-PCR、免疫印迹、免疫荧光、ELISA或通过荧光激活细胞分选(FACS)或流式细胞术来检测。应当理解该清单仅是举例提供,并不意在是限制性的。如果在本发明的细胞中标志物的表达水平比在对照细胞中(例如在离体分离的细胞或非从头产生的细胞(如离体PB或CB)中)更高,则认为本文定义的细胞群体表达标志物,如图13所示。在本文中,“大于”是指本发明的细胞群体中标志物表达的水平是对照细胞中的水平的至少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍。

[0085] 表征本文定义的细胞群体的另一种方式是通过特定标志物或标志物组合的可检测水平表达的缺乏。如本文所定义的,这些标志物被称为阴性标志物。在一些实施方式中,如果细胞群体的至少约60%、优选地约80%的细胞不显示可检测的标志物表达,则认为本文定义的细胞群体不表达标志物。在其他实施方式中,细胞群体的至少约85%、至少约90%

或至少约95%或至少约97%或至少约98%或至少约99%或100%的细胞不显示任何可检测的标志物表达。同样,可使用RT-PCR、免疫印迹、免疫荧光、ELISA或使用FACS或流式细胞术来证明可检测表达的缺乏。

[0086] 如果在PCR的30个循环的水平下不能合理地检测到表达(这对应于细胞中的表达水平小于约100个拷贝/细胞的)和/或不能通过免疫荧光、免疫印迹、ELISA或FACS容易地检测到,则认为细胞不表达本文所述的标志物。

[0087] 本文定义的细胞群体的标志物谱可以进一步通过标志物的存在和/或不存在,或通过存在和不存在的标志物的组合的特定谱来定义。在每种情况下,标志物的特定组合可以作为细胞群体内的特定谱和/或群体内个体细胞上的标志物的特定谱存在。

[0088] 术语“细胞群体”是指一群细胞。当细胞群体包含不同群的细胞时,细胞群体是异质的,其中各群通过存在一种或多种区别特征(例如表达或不表达特定标志物或存在不同功能)而与其他群区分开。

[0089] 术语“基质细胞”是指骨髓来源的基质细胞系。

[0090] 描述

[0091] 下面,将参考附图具体描述本发明的有利实施方式。

[0092] 胸腺是从HPC从头产生主要 $\alpha\beta$ T细胞亚群和次要 $\gamma\delta$ T细胞亚群的主要器官。 $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ T细胞在出生后胸腺中代表占主导的 $\gamma\delta$ T细胞亚群,但在外周血中代表次要 $\gamma\delta$ T细胞亚群。胸腺中 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞的产生都依赖于Notch信号传导,其中D114对于体内T细胞定型和发育是不可或缺的(Koch等, *J. Exp. Med.* 2008; Hozumi等人, *J. Exp. Med.* 2008)。在本发明中,我们显示了通过人Notch配体Jag2的过表达而特异性提供的强且持久的Notch信号传导相比 $\alpha\beta$ T细胞更偏好产生 $\gamma\delta$ T细胞,而使用任何其他Notch配体(Jag1、D114和D111)的Notch信号传导的过表达则相比 $\gamma\delta$ T细胞更偏好产生 $\alpha\beta$ T细胞(参见图1)。基于这些依据和基于本发明的作者关于从人胸腺祖细胞(如CD34+ETP)从头生产人T细胞的体外方法的知识,开发了支持从获得自任何生物样品(例如从胸腺和从脐带血造血祖细胞中)的CD34+造血祖细胞优先产生人 $\gamma\delta$ T细胞(其中, $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ T细胞)的培养方法。该方法包括将所述CD34+细胞在用人Jag2转导的鼠OP9基质细胞系上共培养。首先,我们发现,接收四种配体(即D111、D114、Jag1、Jag2)由它们在人类胸腺中表达的OP9细胞中过表达而提供的强Notch信号(García-León等人, *Development* 2018)的ETP可以分化为 $\alpha\beta$ T细胞和 $\gamma\delta$ T细胞,而在未转导的OP9细胞上培养的ETP不能在体外存活和/或分化并从培养物中消失(参见图7)。然而,我们还发现,人Jag2信号传导是不同于在其他Notch配体存在下观察到的唯一的选择性诱导ETP分化模式的Notch配体,其 $\alpha\beta$ T细胞产生非常少并且优先分化成 $\gamma\delta$ T细胞(到第30天富集高达300倍)(参见图1)。正如在体内情况下在出生后人胸腺中发现的那样(图11),响应于OP9细胞上过表达的人Jag2信号传导,从ETP体外分化的 $\gamma\delta$ T细胞显示了, $V\delta 1$ 和 $V\delta 1+$ 细胞的占主导的表达响应于Jag2随着培养显著扩增(图11)。约35%的 $\gamma\delta$ T细胞为 $V\delta 1+$ (图2),表明OP9细胞中Jag2的过表达导致培养4周后的100倍的 $V\delta 1+$ T细胞产量(图3)。

[0093] 此外,值得注意的是,如图4所示,我们在本文中证明了人Jag2-Notch信号传导也支持从人脐带血CD34+HPC体外产生 $\gamma\delta$ T细胞,并且具有与从ETP产生相似的效率。事实上,9周后,从脐带血HPC产生的总 $\gamma\delta$ T细胞在OP9-Jag2培养中富集了210倍-250倍,其中 $V\delta 1+$ $\gamma\delta$ T细胞高达40%(图4)。因此,我们进一步提出使用脐带血作为产生大量(高达约100倍产量)

人V δ 1+T细胞的CD34+祖细胞的最佳来源(图5),其随后可以扩增用于过继细胞疗法。细胞的表型分析表明,获得的V δ 1+T细胞群体是包括未激活的CD25-幼稚 γ δ T细胞的异质细胞群体(图8)。在出生后的人胸腺中发现的(图11),所述V δ 1+T细胞群体包括未成熟的显示CD4+、双阳性(DP)CD4+CD8+或CD4-CD8-双阴性(DN)表型的CD1a+细胞的主要亚群,以及主要由DN或CD8+细胞组成的成熟CD1a- γ δ T细胞的次要群体。值得注意的是,成熟的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞显示出幼稚CD27+表型,并且主要表达 γ δ T细胞分化标志物CD73和不同水平的几种细胞毒性NK受体(参见图8),因此与成人外周血V δ 1+T细胞相比,更类似于脐带血中的幼稚V δ 1+胚胎细胞(参见图9)。从分离自单个CB单元并接受人Jag2信号传导的CD34+HPC从头产生的幼稚V δ 1+ γ δ T细胞的比例和数量显著高于从单个CB或外周血单元或从相同数量的起始CB或PB总细胞中离体获得的比例和数量(表2)。

[0094] 因此,本发明的目的涉及用于大规模选择性产生对于在癌症的过继免疫疗法中临床应用来说最佳的人 γ δ T细胞、更优选地同种异体人V δ 1+ γ δ T细胞的新的有效的方法。在这种意义上,考虑到人脐带血HPC(目前在临床上被选为干细胞的优选来源)和人ETP都可以响应于Notch信号传导而有效地从头产生人 γ δ T细胞,因此该方法包括通过由Notch配体(优选DLL1、DLL4、Jag1或Jag2 Notch配体、更优选Jag2)介导的Notch激活来诱导包含造血干细胞/祖细胞的任何生物来源(例如脐带血CD34+HPC和/或人胸腺ETP)的分化。具体地,该方法包括将HPC(优选人CD34+HPC细胞)或人ETP在过表达Notch配体的细胞(优选人Jag2过表达基质细胞)上共培养(优选地补充有Flt3、SCF和IL-7)优选地长达15周、优选地长达10周、9周、8周、7周、6周、5周或长达4周。然后,如上所述以TCR非依赖性Notch依赖性方式获得的包含V δ 1+ γ δ T细胞群体的所产生的 γ δ T细胞(在本文中称为步骤1),将按照本领域已知的任何激活并诱导所述V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法,例如通过使用抗CD3mAb和包括IL-4、IFN γ 和IL-15在内的细胞因子,进行扩增(本文称为步骤2)(Almeida等人,Clin.Cancer Res.2016)。

[0095] 因此,本发明的第一方面(也称为步骤1)涉及Notch配体(优选Jag2 Notch配体)用于从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或人ETP的细胞群体从头产生细胞组合物的体外用途,该细胞组合物包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞。优选地,Notch配体(优选Jag2)在细胞(优选基质细胞)上表达,其中与参考细胞(优选参考基质细胞)中配体的基础表达水平相比,所述细胞呈现所述Notch配体的在统计学上显著增加的表达。因此,本文提供了一种Notch配体(优选Jag2),其在细胞上(优选在细胞表面上)表达高于基础水平以及用于从包含HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体从头产生细胞组合物,该细胞组合物包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞。优选地,其中Notch配体过表达的细胞是基质细胞系、最优选地是OP9细胞。术语“参考细胞”和“统计学显著增加的表达”已经在上文中定义,并且适用于整个专利说明书。

[0096] 细胞(优选基质细胞)中Notch配体(优选Jag2)过表达的程度与参考细胞(优选参考基质细胞)中的Notch配体基础表达水平相比可以是约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100.000倍的增加的表达。图10显示了在Jag2转导的基质细胞与参考(未转导的)基质细胞相比500倍的过表达。Notch配体(优选Jag2)的表达高于基础水平(即,过表达)可以通过本领域技术人员已知的任何方法来实现。例如,高于基础水平的表达可以通过调节天然基因组Notch配体的调控来诱导。这可以通过增加Notch配体的转录和/或翻

译;和/或通过将异源调控序列引入Notch配体的天然调控区或Notch配体的天然调控区的附近;和/或通过用这种异源调控序列替换Notch配体的天然调控区,例如通过同源重组;和/或通过破坏或下调负调控、阻断或下调所述Notch配体的转录、翻译或功能的分子来实现。

[0097] 通过向细胞(优选基质细胞)提供增加水平的转录激活剂,例如通过使细胞与这种激活剂接触或通过用编码激活剂的核酸转化细胞,可以增加Notch配体的转录高于基础水平。或者,通过用Notch配体的转录抑制剂的反义核酸转化细胞,可以增加转录。

[0098] 作为增加内源性Notch配体的转录和/或翻译的替代方案或补充,可以通过将Notch配体的一个或多个额外拷贝引入细胞(优选基质细胞)中引起高于基础水平的Notch配体的表达,例如通过用编码Notch配体的核酸转染或转导细胞来进行。转化的Notch配体可以被包含在基因组外载体上,或者其可以优选稳定地并入基因组中。它可以可操作地连接至驱动其在细胞中高于基础水平表达的启动子。“可操作地连接”意指作为同一核酸分子的一部分连接,适当地定位和取向以从启动子起始转录。

[0099] 将基因引入细胞的方法是本领域技术人员熟知的。载体可用于将Notch配体引入细胞中,无论Notch配体是保留在载体上还是并入基因组中。可以选择或构建含有合适调控序列的合适的载体,该调控序列包括启动子序列、终止子片段、多聚腺苷酸化序列、增强子序列。载体可以含有标记基因和其他合适的序列。调控序列可以驱动Notch配体在细胞内的表达。例如,载体可以是基因组外表达载体,或者调控序列可以与Notch配体一起并入基因组中。载体可以是质粒或病毒载体。

[0100] 包含Notch配体的编码序列的核酸可以整合到细胞(优选基质细胞)的基因组中。根据标准技术,可以通过包含在促进与基因组重组的转导或转染的核酸序列中来促进整合。整合的核酸可以包含能够驱动Notch配体高于基础水平的表达的调控序列。核酸可以包含引导其整合至基因组中的这样的位点的序列,在该位点处Notch配体编码序列将受到能够驱动和/或控制其在细胞内表达的调控元件的控制。整合的核酸可以来源于用于将Notch配体核酸转导或转染至细胞中的载体。

[0101] 包含Notch配体的核酸的引入,无论该核酸是线性的、分支的还是环状的,通常可以被称为但不限于“转染”或“转导”。其可以使用任何可用的技术。合适的技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、机械技术(如显微注射)、直接DNA摄取、受体介导的DNA转移、使用逆转录病毒或另一种病毒的转导和脂质体介导的转染。当将选定的基因构建体引入细胞中时,必须考虑本领域技术人员公知的某些考量因素。

[0102] 用于用Notch配体体内转染或转导细胞(优选基质细胞)以提供过表达所述Notch配体的细胞(优选基质细胞)的合适载体和技术是本领域技术人员公知的。合适的载体包括腺病毒、乳多空病毒、痘苗病毒、疱疹病毒和逆转录病毒。失能的病毒载体可以在辅助细胞系中产生,其中辅助细胞系表达产生感染性病毒颗粒所需的基因。合适的辅助细胞系是本领域技术人员熟知的。

[0103] 在优选的实施方式中,Notch配体过表达,即细胞(优选基质细胞)中Notch配体表达水平在统计学上的显著增加通过用这样的核酸转导或转染所述细胞来实现,该核酸包含可操作地连接至强表达启动子(例如巨细胞病毒(CMV)、SV40、延伸因子(EF)-1启动子)的编码所述Notch配体(优选人Jag2Notch配体)的基因。因此,在本发明第一方面的一个实施方

式中,HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP在这样的培养基中培养,该培养基包含在细胞系中(优选地在基质细胞系中、优选地在OP9细胞中)过表达的Notch配体(优选人Jag2),其中所述细胞系用包含所述Notch配体的基因的核酸转导或转染,该核酸驱动所述Notch配体在细胞中的过表达。

[0104] 可用于本发明的包含CD34+HPC的有用来源是包含HPC的骨髓和/或外周血,优选从骨髓中动员的HPC。包含HPC的其他来源包括胎盘血和胎肝以及来源于多能干细胞如诱导多能干细胞(iPSC)的CD34+细胞,其也可适用于实施本发明。包含HPC的其他来源包括胎盘血、胎肝或来源于多能干细胞如诱导多能干细胞(iPSC)的CD34+细胞,其也可适用于实施本发明。优选地,Notch诱导的分化的 γ δ T细胞(优选V δ 1+ γ δ T细胞)所源自的包含人HPC(例如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体是基本上纯的或同质的群体。在本发明的背景中,基本上纯的群体是其中HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP可以是基本上分离的细胞的群体。在一个实施方式中,HPC(如CD34+脐带血HPC)代表组合物中细胞的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%。在另一个实施方式中,人CD34+ETP代表组合物中细胞的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%。

[0105] 在本发明第一方面的其他实施方式中,HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP在包含这样的细胞(优选基质细胞)群体的培养基中培养,该细胞群体过表达经改造的Notch配体(优选Jag2)或具有天然配体的生物学效应的Notch激动剂(包括针对Notch受体的抗体、肽模拟物和小分子);或者与固定在基质上(即塑料表面上或微珠上)的这些化合物一起培养。优选地,HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP可以进一步在这样的培养基中培养,该培养基包含固定在细胞系上的Notch配体(优选Jag2)或具有天然配体的生物学效应的包含针对Notch受体的抗体、肽模拟物和小分子在内的Notch激动剂。优选地,Notch配体是人Notch配体、优选人Jag2。在本发明的一些方面,Notch配体或Notch激动剂可以固定在悬浮于培养基中的固体基质上,这有助于HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP与Notch配体或Notch激动剂的相互作用。该方法还包括将细胞在培养物中维持足以产生V δ 1+ γ δ T细胞的一段时间。在一些实施方式中,该段时间为约2周至约15周、优选地约2周至9周。

[0106] 在一些实施方式中,无细胞系统用于固定Notch配体(优选Jag2)或Notch激动剂。所述无细胞系统具有更易于临床应用扩展的优点。优选地,无细胞系统包括3D支架。如本文所用,“3D支架”是指人工的、生物相容的可延展结构,细胞植入或接种在其上,并且其可以支持三维细胞生长和分化。此外,支架可用于递送生化因子例如分化诱导配体、生长因子、细胞营养物至体内,以支持和引导器官或组织的新细胞的生长。支架可以是天然或合成材料的支架,并且可以是永久性的、可生物降解的或可生物吸收的。天然支架材料的实例包括琼脂糖、胶原、一些线性脂肪族聚酯、壳聚糖和糖胺聚糖如透明质酸。常用的合成可生物降解支架材料包括聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA);聚(D,L-丙交酯-共-乙交酯)(PGLA)和聚己内酯(PCL)。支架通常具有高孔隙率,以促进细胞接种和在整个结构中扩散。在一个实施方式中,3D支架包含或缀合至Notch配体(优选Jag2)或其激动剂,使得培养的细胞被所述Notch配体刺激。

[0107] 在另一个实施方式中,无细胞系统包括悬浮支持物。如本文所用,术语“悬浮支持物”是指当与Notch配体(优选Jag2)或激动剂缀合时允许Notch配体(或其激动剂)悬浮在培

培养基中的任何材料。悬浮支持物可以由各种材料制成,并且可以是各种形式。可用作悬浮支持物的支持物的实例包括但不限于颗粒、珠(包括微珠)、蛋白质、脂质、核酸分子、过滤器、纤维、筛网、网、管、中空纤维、生物组织及其任何组合。在一个实施方式中,悬浮支持物是颗粒。颗粒可以具有任何形状,包括但不限于球形、椭圆形、棒状或矩形。颗粒可以是各种材料的颗粒,包括但不限于天然或合成聚合物、天然或合成蜡、陶瓷、金属、生物材料或其组合。在一个实施方式中,悬浮支持物包括微珠。如本文所用,术语“微珠”是指直径为0.01 μm (10nm)至500 μm 、任选地1 μm 至200 μm 的球形或基本上球形的珠。在另一个实施方式中,微珠的直径为6.5 μm 至100 μm 、任选地20 μm 至30 μm 、24 μm 至26 μm 或25 μm 。

[0108] 本文考虑了各种类型的微珠。在一个实施方式中,微珠是聚合物、二氧化硅或磁性微珠、超磁性微珠、顺磁性微珠或铁磁性微珠。在其他实施方式中,微珠是聚苯乙烯微珠或金纳米颗粒。在另一个实施方式中,微珠与聚苯乙烯交联或涂覆有铁的氧化物。在另一个实施方式中,微珠包被有乳酸和乙醇酸的共聚物(PLGA)。

[0109] 优选地,Notch配体(优选Jag2)或其激动剂与3D支架或悬浮支持物缀合。将蛋白质缀合至支持物的各种手段是本领域已知的。“缀合”在本文中是指其中两种化合物(例如微珠和Jag2 Notch配体)连接在一起的情况。蛋白质可以直接或间接缀合至悬浮支持物或3D支架,例如缀合至微珠。在一个实施方式中,使用生物素/链霉亲和素系统将Notch配体缀合至悬浮支持物或3D支架。在此,Notch配体被生物素化,然后缀合至链霉亲和素包被的悬浮支持物或3D支架(例如,链霉亲和素包被的微珠)。在另一个实施方式中,Notch配体通过蛋白G或蛋白A与悬浮支持物或3D支架缀合。在悬浮培养物中,细胞在培养基中自由漂浮生长。相比之下,在3D支架培养中,细胞在人工基质上以单层生长。

[0110] 在如本文所述的合适条件下培养包含人HPC的细胞群体以产生包含 γ δ T细胞的群体。优选地,在一种Notch配体或激动剂的存在下(优选地在Jag2的存在下)培养包含人HPC的细胞群体,其中Notch配体或激动剂与悬浮支持物或与3D支架缀合,并且其中将所述细胞与所述Notch配体接触培养足够的时间以形成 γ δ T细胞谱系的细胞。优选地,Notch配体(优选Jag2)与悬浮支持物缀合,优选地与包含在悬浮支持物中的微珠缀合,使得包含人HPC的细胞群体在悬浮液中培养并与Notch配体(优选Jag2)接触。在另一个实施方式中,Notch配体(优选Jag2)与3D支架缀合,优选地与包含在所述3D支架中包含的微珠缀合,使得包含人HPC的细胞群体在支架的人工基底上培养并与Notch配体(优选Jag2)接触。

[0111] 在另一个实施方式中,在生物反应器中培养包含人HPC的细胞群体,该生物反应器可以是可渗透气体的快速膨胀(Gas Permeable Rapid Expansion,G-Rex)系统生物反应器,其任选地是封闭生物反应器或封闭自动化生物反应器,其中Notch配体与悬浮支持物或3D支架缀合。在一个实施方式中,悬浮支持物或3D支架包含与微珠缀合的Notch配体(优选Jag2),其中微珠具有与生物反应器相容的直径。各种生物反应器是本领域已知的,并且可以包括分批、补料分批或连续生物反应器。连续生物反应器的一个实例是连续搅拌罐反应器模型。

[0112] Notch配体对悬浮支持物或3D支架的取向方向可以增强Notch信号传导。因此,在一个实施方式中,Notch配体的C-末端与悬浮支持物或3D支架缀合。这可以例如通过在Notch配体的C末端添加可以与生物素分子酶促缀合的序列来改造。在另一个实施方式中,存在于C-末端区域中的融合蛋白Notch配体-Fc的Fc区段可以直接结合与悬浮支持物或3D

支架缀合的蛋白A或蛋白G。还可以向培养物中添加一种或多种额外的分子,其各自都与悬浮支持物或3D支架缀合。在一个实施方式中,额外的分子是促进T细胞发育(例如,促进T细胞谱系细胞的定型和分化)的分子,也称为T细胞共刺激分子。

[0113] 培养条件需要将包含人CD34+HPC的细胞群体与Notch配体(优选Jag2)接触培养足够的一段时间,使得 $\gamma\delta$ T细胞以比 $\alpha\beta$ T细胞更高的量产生。应当理解,可以将细胞维持实现本文所述的期望细胞组合物所需的合适量的时间。优选地,培养时间为30天或更长、优选35天或更长、优选30天至50天。

[0114] 细胞与微珠的比率(也称为微珠与细胞比率)可以根据培养条件和为细胞的生长和分化提供的刺激而变化。在一个实施方式中,Notch配体(优选Jag2)或其激动剂与微珠缀合,其中微珠缀合的Notch配体与人HPC的比率为1:1至27:1、任选地5:1至15:1、8:1至10:1或9:1。技术人员知道如何根据培养条件建立最佳微珠与细胞的比率。

[0115] 或者,本发明的第一方面还涉及从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)的细胞群体和/或从CD34+ETP产生包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物的体外方法。在本发明方法中有用的包含HPC的另一种来源是骨髓或外周血,优选地包含从骨髓中动员的HPC的外周血。包含HPC的其他来源包括胎盘血、胎肝或来源于多能干细胞(如iPSC)的CD34+细胞,也可适用于实施本发明的方法。优选地,该方法包括在充足培养基中培养包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体,该培养基优选是包含固定在基质上或在细胞系中过表达的Notch配体(优选DLL1、DLL4、Jag1或Jag2 Notch配体,更优选Jag2)或Notch受体激动剂的培养基。在本发明的一些方面,Notch配体或Notch激动剂可以固定在悬浮于培养基中的固体基质上,这有助于HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP与Notch配体或Notch激动剂的相互作用。在一些其他实施方式中,Notch配体(优选Jag2)在基质细胞系上过表达。该方法还包括将细胞在培养物中维持足以产生富含 $\gamma\delta$ T细胞(优选V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞)的组合物的一段时间。在一些实施方式中,该段时间为约2至约15周、优选地约2至9周。所述Notch配体或Notch激动剂可以在培养时以及在整個培养期间存在或添加到所述细胞培养物中。在优选的实施方式中,Notch配体(优选Jag2、最优选人Jag2)在细胞系(优选基质细胞)中过表达,优选在其表面上过表达,其中共培养所述细胞以与包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或来自CD34+ETP的细胞群体相互作用。术语“过表达”已经在上文中解释并适用于此处。

[0116] 鉴于上述情况,本发明的第一方面提供了过表达的Notch配体(优选Jag2)的用途,以及产生包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物的方法,并且该细胞组合物从包含人HPC(例如CD34+脐带血HPC)和/或从CD34+ETP的细胞群体获得。如实施例1和图1至图3)所示,人Jag2 Notch配体是当在基质细胞系上过表达时唯一的选择性诱导分化模式的配体,其中 $\gamma\delta$ T细胞以高于 $\alpha\beta$ T细胞的比例产生。因此,在可应用于如上所定义的用途和方法的第一方面的实施方式中,在此使用过表达的Jag2 Notch配体从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体中相比 $\alpha\beta$ T细胞偏向产生 $\gamma\delta$ T细胞。优选地,富含 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物是包含 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞两者的T细胞群体,其中根据第一方面的用途和方法,在培养至少30天、优选培养60天后, $\gamma\delta$ T细胞代表总T细胞的至少80%至95%、优选地90%至95%。在一个实施方式中,根据第一方面的用途和方法,在培养至少30天、优选地培养60天后,T细胞代表总T细胞的小于15%、优选地5%至10%。优选地,至少30%、优选地30%至40%的 $\gamma\delta$ T细胞是V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞,优选地,V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞是同种异

体Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞。在本发明的第二方面中提供了根据第一方面的用途和方法获得或可获得的 γ δ T细胞的更详细的描述。

[0117] 本发明的第二方面涉及从第一方面的用途和方法获得或可获得的包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 γ δ T细胞的细胞组合物。优选地,根据第一方面的用途和方法,在培养至少30天、优选地培养60天后,细胞组合物的T细胞总数的至少80%至95%、优选地90%至95%是 γ δ T细胞。在一个实施方式中,根据第一方面的用途和方法,在培养至少30天、优选培养60天后,细胞组合物中包含的T细胞总数的小于15%、优选地5%至10%是 $\alpha\beta$ T细胞。

[0118] 在第二方面的一个实施方式中,细胞组合物中包含的 γ δ T细胞依次是异质细胞群体,其中:

[0119] i) γ δ T细胞总数的至少30%、优选地30%至40%是V δ 1+ γ δ T细胞,

[0120] ii) γ δ T细胞总数的至少4%、优选地4%至7%是V δ 2+ γ δ T,以及

[0121] iii) γ δ T细胞总数的约50%既不是V δ 2+细胞也不是V δ 1+细胞。

[0122] 此外,在优选的实施方式中,V δ 1+ γ δ T细胞,优选的i)的V δ 1+ γ δ T细胞,也是异质细胞群体,其进而包含以下细胞群体:

[0123] a) 第一细胞群体(在本文中命名为CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞),其特征在于它们表达未成熟表面细胞标志物CD1a,以及

[0124] b) 第二细胞群体(在本文中命名为CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞),其特征在于它们不表达未成熟表面细胞标志物CD1a。

[0125] 包含a)和b)的异质V δ 1+ γ δ T细胞群体显示在实施例中,特别是图8和图9中。

[0126] 在一个实施方式中,第一T细胞群体(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞)代表异质V δ 1+ γ δ T细胞群体中包含的大多数V δ 1+ γ δ T细胞。优选地,V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,优选地85%至95%之间是CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞(第一群体)。因此,V δ 1+ γ δ T细胞群体富含CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞。优选地,V δ 1+ γ δ T细胞总数的8%至12%是CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)。优选地,V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或超过70%是CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第一群体)。

[0127] 在优选的实施方式中,从第一方面的方法和用途可获得或获得的细胞组合物是富含 γ δ T细胞的异质细胞群体,因为在培养至少30天、优选地培养60天后,T细胞总数的至少80%至95%、优选地90%至95%是 γ δ T细胞,并且其中:

[0128] i) γ δ T细胞总数的至少30%、优选地30%至40%是V δ 1+ γ δ T细胞,

[0129] ii) γ δ T细胞总数的至少4%、优选地4%至7%是V δ 2+ γ δ T,以及

[0130] iii) γ δ T细胞总数的约50%既不是V δ 2+细胞也不是V δ 1+细胞,

[0131] 并且其中i)的群体富含CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞,因为总V δ 1+ γ δ T细胞的85%至95%是CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞,并且总V δ 1+ γ δ T细胞的8%至12%是CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞。

[0132] 优选地,参见图2,V δ 1+ γ δ T细胞产生IFN γ 但不产生IL-17。

[0133] 上述每种细胞群体及其比例的测量方法是本领域已知的,并在本发明的说明书中建立。特别地,每种类型T细胞的测量方法是使用自动细胞计数器进行总细胞计数和分类细胞计数来进行的。细胞百分比和表达CD1a的细胞百分比可使用流式细胞仪测量。

[0134] 在第二方面的一个实施方式中,第一细胞群体(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞)的特征还在

于它们不表达以下表面标志物中的至少一种、优选全部:CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。在一个实施方式中,参见图8和图9,第一群体的细胞可以表达或不表达CD4、CD8或两者,即,它们可以是CD4+CD8⁻、CD4⁻CD8⁺、CD4+CD8⁺或CD4⁻CD8⁻。

[0135] 在第二方面的一个实施方式中,参见图8和图9,第二细胞群体(CD1a⁻V δ 1+ γ δ T细胞)的特征还在于它们表达以下表面标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部:CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D。

[0136] 优选地,根据第二方面的细胞组合物包含根据本发明的第一方面获得的或可获得的人同种异体细胞毒性V δ 1+ γ δ 细胞。

[0137] 本发明的第三方面涉及细胞组合物,其包含如第二方面中所定义的第一V δ 1+ γ δ T细胞群体。因此,根据第三方面的细胞组合物包含V δ 1+ γ δ T细胞,该V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于它们至少表达CD1a表面标志物,并且优选地,它们不表达以下表面标志物中的至少一种、优选全部:CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。本发明的第四方面涉及细胞组合物,其包含如第二方面中所定义的第二V δ 1+ γ δ T细胞群体。因此,根据第四方面的细胞组合物包含V δ 1+ γ δ T细胞,该V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于它们不表达CD1a表面标志物,并且优选地,它们表达以下表面标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部:CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D。

[0138] 在优选的实施方式中,第三方面和第四方面的细胞群体是基本上纯的或同质的群体。在本发明的背景下,基本上纯的群体是其中细胞可以是基本上分离的细胞的群体。在一个实施方式中,细胞或细胞群体代表组合物中细胞的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%。术语“基本上纯的”包括“完全纯的”,并且可以与该术语互换使用。

[0139] 本发明的第五方面涉及自体或同种异体V δ 1+ γ δ T细胞的异质细胞群体,其中所述异质细胞群体包含V δ 1+ γ δ T细胞的第一亚群和第二亚群,其中第一亚群包含表达未成熟表面细胞标志物CD1a的细胞(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞),并且其中第二亚群包含不表达未成熟表面细胞标志物CD1a的细胞(CD1a⁻V δ 1+ γ δ T细胞)。在一个实施方式中,第一细胞亚群(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞)代表异质细胞群体中包含的大多数细胞。优选地,第一细胞亚群代表异质细胞组合物中包含的总V δ 1+ γ δ T细胞的至少60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%。所提及的每种细胞亚群及其比例的测量方法是本领域已知的,并在本发明的说明书中建立。特别地,每种V δ 1+ γ δ T细胞的测量方法是使用自动细胞计数器进行总细胞计数和差别细胞计数来进行的。细胞百分比和表达CD1a的细胞百分比可使用流式细胞仪测量。

[0140] 在第五方面的一个实施方式中,第一亚群的细胞(CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞)的特征还在于它们不表达以下表面标志物中的至少一种、优选全部:CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。在一个实施方式中,参见图8,第一亚群的细胞可以表达或不表达CD4、CD8或两者,即,它们可以是CD4+CD8⁻、CD4⁻CD8⁺、CD4+CD8⁺或CD4⁻CD8⁻。

[0141] 在第五方面的一个实施方式中,参见图8,第二亚群的细胞(CD1a⁻V δ 1+ γ δ T细胞)的特征还在于它们表达以下表面标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部:CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D。

[0142] 本发明的第六方面涉及细胞组合物,其包含如第五方面中所定义的第一细胞亚群。因此,根据第六方面的细胞组合物包含V δ 1+ γ δ T细胞,该V δ 1+ γ δ T细胞的特征在于它们

至少表达CD1a表面标志物,并且优选地,它们不表达以下表面标志物中的至少一种、优选全部:CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。本发明的第七方面涉及细胞组合物,其包含如第五方面中所定义的第二细胞亚群。因此,根据第五方面的细胞组合物包含V δ 1+ γ δ T细胞,该V δ 1+ γ δ T细胞特征在于它们不表达至少CD1a表面标志物,并且优选地,它们表达以下表面标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部:CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D。

[0143] 在优选的实施方式中,第六方面和第七方面的细胞群体是基本上纯的或同质的群体。在本发明的背景中,基本上纯的群体是其中细胞可以是基本上分离的细胞的群体。在一个实施方式中,细胞或细胞群体代表组合物中细胞的至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或100%。

[0144] 因此,第一方面的方法(步骤1)可用于从CD34+细胞、优选从脐带血CD34+细胞产生V δ 1+ γ δ T细胞群体。所述V δ 1+ γ δ T细胞群体是包含本文第二方面至第七方面中定义的CD1a+V δ 1+ γ δ T细胞(第一群体)和CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)的异质群体。当CD34+祖细胞来自脐带血时,则第一方面的方法或用途的所得细胞在本文中称为CB-Jag2细胞。

[0145] 根据第一方面(步骤1)从头产生的V δ 1+ γ δ T细胞,特别是包含CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的第二群体可以在第二步骤(步骤2)中进一步扩增,目的是激活它们并诱导它们的增殖。完整的两步方案如图12所示,其中在Jag2 Notch配体的存在下将从人脐带血分离的CD34+HPC培养长达8周(步骤1或第一方面的方法),得到细胞CB-Jag2细胞,其对应于第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中定义的细胞组合物。然后将所述CB-Jag2细胞扩增并激活(步骤2),目的是提供扩增的和高细胞毒性的V δ 1+ γ δ T细胞群体,称为CB-Jag2-步骤2细胞。应注意,从离体CB或PB获得的V δ 1+ γ δ T细胞(在图12中称为离体CB和离体PB)不是第一方面至第七方面中定义的V δ 1+ γ δ T,因为离体CB和离体PB是已经存在于CB和PB中的V δ 1+ γ δ T细胞,因此它们不是从造血祖细胞CD34+细胞从头产生的。

[0146] 参见图13,两步法的结果显示,CB-Jag2-步骤2细胞(即第一方面至第七方面定义的从头获得的并且随后在步骤2中扩增的细胞)中的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞包含比在步骤2中随后扩增的从PB和CB获得的离体分离的细胞群体(CB-步骤2和PB-步骤2)内的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞更多的CD8+效应细胞。参见图14,如通过较低的LAG3和CTLA-4表达所评估的,CD1a-V δ 1+CB-Jag2-步骤2细胞还显示出比CB-步骤2和PB-步骤2内产生的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞更低的耗竭细胞谱。如图15所示,CD1a-V δ 1+CB-Jag2-步骤2细胞还显示出比CD1a-V δ 1+CB-步骤2和PB-步骤2 γ δ T细胞更高水平的细胞毒性相关激活受体。最后,CB-Jag2-步骤2表现出比分别通过步骤2-扩增从CB和PB分离的离体细胞而获得的CB-步骤2和PB-步骤2细胞更高的针对白血病细胞系的体外细胞溶解潜力。

[0147] 这些结果导致本发明的作者得出结论,即以下的组合导致CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体具有更高的细胞毒性潜力和降低的耗竭谱:

[0148] -使用造血祖细胞(CD34+细胞),优选地来自脐带血,

[0149] -使用步骤1(第一方面的方法或用途)从头产生CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,以及

[0150] -使用步骤2扩增和激活从步骤1从头获得的所述CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞。

[0151] 鉴于上述结果,本发明的第八方面涉及激活并诱导本发明的第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中定义的V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法(也称为步骤

2)。如上所强调的, V δ 1+ γ δ T细胞(在步骤1(本发明的第一方面)之后获得的)是V δ 1+ γ δ T细胞的异质群体, 其中它们中的一些表达CD1a+标志物(第一群体), 并且它们中的一些是CD1a- (第二群体)。本发明的步骤2(即, 第八方面的方法) 优选地具体涉及激活和扩增(即, 增殖)CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体。

[0152] 因此, 优选地, 步骤2的激活和增殖在CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞亚群(如上定义的第二群体)中特异性进行。第八方面的方法可优选地包括使用激活剂, 例如 γ δ TCR激动剂, 包括但不限于抗CD3 mAb, 以及细胞因子, 包括但不限于IL-4、IFN γ 和IL-15。为此, 并且如实施例1或实施例2中所示, 通过任何有用的技术, 例如使用抗TCR $\alpha\beta$ mAb和磁珠(Miltenyi Biotec)的磁性细胞分选, 使根据本发明的第一方面获得或可获得的包含V δ 1+ γ δ T细胞的细胞组合物优选地耗竭 $\alpha\beta$ T细胞。TCR $\alpha\beta$ 耗竭的细胞悬浮液将在RPMI 1640培养基中在激活剂(如抗CD3 mAb OKT3)加细胞因子(如IL-2、IL-4、IFN- γ 、IL-21、IL-15和/或IL-1 β)的存在下培养例如7天(2.5×10^5 个细胞/ml)。然后任选地洗涤细胞, 并与激活剂和一种或多种细胞因子再次培养细胞一次或多次。通常在第10天至第30天、优选第10天至第25天、更优选第15天至第25天、更优选第15天至第16天停止培养, 或者可以任选地稀释细胞, 并在激活剂和一种或多种细胞因子存在下对细胞进行第二轮扩增。注意, 本发明的第一方面和第八方面的组合(即, 步骤1和步骤2的组合)构成了两步法, 预期该方法使得CD1a-V δ 1+T细胞产量得到提升($(250-950) \times 10^6$ 个CB-Jag2-步骤2细胞/ 10^6 个CD34+CB HPC)。

[0153] 应注意, 从本发明的第八方面获得的V δ 1+ γ δ T细胞的最终亚群应稳定地表达与对淋巴样白血病细胞的细胞毒性增强相关的天然功能性细胞毒性受体。所述亚群优选地是细胞毒性和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞, 并且在本发明的第九方面中进一步定义。

[0154] 在本发明的第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中所定义的激活并诱导V δ 1+ γ δ T细胞、优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)的增殖的仅说明性的进一步潜在有用的方法, 将通过在 γ δ TCR激动剂存在下、优选通过定期添加(更优选地连续添加)所述(优选可溶的或固定的)激动剂, 以及在至少一种细胞因子(例如选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IFN- γ 、IL-21、IL-15和/或IL-1 β 的那些)存在下、优选通过定期添加(更优选地连续添加)所述细胞因子, 在充足培养基中培养这些细胞来进行。所述 γ δ TCR激动剂和细胞因子在培养时以及在整个培养期间, 优选地每3天至6天添加至所述细胞培养物中, 使得所述培养物中 γ δ TCR激动剂和细胞因子的浓度通常总是大于零。可以进行所述 γ δ TCR激动剂和细胞因子的添加, 直到至少40%、更优选地至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、95%的细胞表达天然细胞毒性受体。在一个更优选的实施方式中, 可以进行所述 γ δ TCR激动剂和细胞因子的添加, 直至实现超过5000万、超过1亿、超过2亿的活的功能性细胞表达天然细胞毒性受体(即包含NKp30或由NKp30组成的天然细胞毒性受体)。优选地, 可以进行所述 γ δ TCR激动剂和细胞因子的添加, 直到至少40%、更优选地至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、95%、100%的细胞表达NKp30。在所公开的方法的优选实施方式中, 所述细胞因子是指常见的细胞因子, 优选白细胞介素, 即IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- γ 、IL-1 β 或其混合物等, 优选IL-7或IL-15。所用的白介素可以是人或动物来源的白介素, 优选人来源的白介素。它可以是野生型蛋白质或任何生物活性片段或变体, 也就是说, 能够在根据本发明的方法的条件下结合其受体并诱导 γ δ T细胞的激活。更优选地, 细胞因子可以是可溶形式, 与另一种分子(例如肽、多肽或生物活性蛋白)融合或复合。优选地, 使用人

重组细胞因子。更优选地,白细胞介素浓度的范围可以在1U/ml-10000U/ml之间变化、甚至更优选地在100U/ml-1000U/ml之间变化。在所公开的方法的其他优选实施方式中,所述 $\gamma\delta$ TCR激动剂和 γc -细胞因子的定期添加可以进行2天至60天、更优选9天至25天、甚至更优选15天至25天,即15天、16天、17天、18天、19天、20天或21天。优选地,细胞在36°C至38°C、优选37°C的温度下培养。

[0155] 最优选地,第八方面的方法是激活并诱导在本发明的第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面定义的V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法,优选是激活并诱导在本发明的第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面定义的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)增殖的方法,该方法包括在至少一种 γ δ TCR激动剂的存在下、优选通过定期添加(更优选地连续添加)所述(优选地可溶的或固定的)激动剂,以及在至少IL21和IL15的存在下,在充足培养基中培养所述V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞),以获得包含V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)的扩增和激活的细胞群体的步骤。优选地,首先在至少一种 γ δ TCR激动剂存在下和在至少IL21存在下培养V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)至少5天、优选地至少7天,并在培养的第5天、优选第7天,将IL-15添加至培养基中,同时在培养基中维持至少一种 γ δ TCR激动剂和至少IL21存在。优选地,在添加IL15后,将细胞培养至少7天、优选至少9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天或多于16天的一段时间,以获得包含V δ 1+ γ δ T细胞、优选地包含CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的扩增和激活的细胞群体。

[0156] 最优选地,第八方面的方法是激活并诱导V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法,优选地激活并诱导本发明第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中所定义的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)增殖的方法,该方法包括:

[0157] -在至少一种 γ δ TCR激动剂存在下和在至少IL21存在下,在充足培养基中培养所述V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)至少5天,其中所述培养优选地通过定期添加(更优选地连续添加)所述(优选可溶性或固定的)激动剂和细胞因子来进行,以及

[0158] -在培养的第5天、优选地在培养的第7天,向培养基中添加IL-15,同时在培养基中维持至少一种 γ δ TCR激动剂和IL21的存在,

[0159] 其中培养时间进行到直至至少40%的总 γ δ T细胞是CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,和/或其中培养时间进行至少7天、8天,优选9天、10天、11天、12天,优选13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天或20天。

[0160] 在一个实施方式中,第八方面的方法包括以下步骤:

[0161] -在补充有血浆(优选自体血浆或人血清)的无血清培养基中,并在抗TCR γ δ mAb和IL-21的存在下,培养从第一方面的方法获得的或第一至第七方面中任一方面定义的细胞至少7天,

[0162] -在培养的第7天,将IL-15添加至培养基中,并且任选地,用新鲜的抗TCR γ δ mAb和IL-21替换IL-21和抗TCR γ δ mAb,

[0163] -再培养细胞至少7天(即,直至培养的第14天),优选地直至培养的第15天至16天,以获得激活的和细胞毒性的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,以及

[0164] -任选地,进行第二轮扩增,其中在至少抗TCR γ δ mAb、IL-15和IFN- γ 存在下培养细胞直至第18天至21天,

[0165] 最优选地,第八方面的方法是激活并诱导CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法,优选地激活并诱导本发明第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中定义的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(第二群体)增殖的方法,方法包括:

[0166] -在至少一种 γ δ TCR激动剂存在下和在至少IL-21、IL-4、IFN- γ 、IL-21和IL-1 β 存在下,在充足培养基中培养所述V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)至少5天(优选7天),其中所述培养优选地通过定期添加(更优选地连续添加)所述(优选地可溶的或固定的)激动剂和细胞因子来进行,以及

[0167] -在培养的第5天、优选地在培养的第7天,添加IL-15至培养基中,同时在培养基中维持至少一种 γ δ TCR激动剂和IL21的存在,

[0168] 其中培养时间进行到直至至少40%的总 γ δ T细胞是CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞,和/或其中培养时间进行至少7天、8天,优选9天、10天、11天、12天,优选13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天或20天。

[0169] 在另一个实施方式中,第八方面的方法是激活并诱导本发明第二方面、第三方面、第四方面、第五方面、第六方面和第七方面中定义的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞增殖的方法,该方法包括:

[0170] -在至少一种 γ δ TCR激动剂(优选抗-CD3 mAb如OKT3)存在下和在至少细胞因子IL-4、IFN- γ 、IL-21和IL-1 β 存在下,在充足培养基中培养所述V δ 1+ γ δ T细胞,

[0171] -在培养的第5天、优选地在培养的第6或7天,添加新的(新鲜的)培养基,该培养基包含至少一种 γ δ TCR激动剂(优选抗CD3如OKT3)并且包含IL21和IL15,

[0172] -在培养的第10天、优选地在培养的第11或12天,添加新的(新鲜的)培养基,该培养基包含至少一种 γ δ TCR激动剂(优选抗CD3如OKT3)并且包含IL15,以及

[0173] -任选地,在培养的第15天、优选地在培养的第16天,添加新的(新鲜的)培养基,该培养基包含至少一种 γ δ TCR激动剂(优选抗CD3如OKT3)并且包含IL15和IFN- γ 。

[0174] 在第八方面的一个实施方式中,至少一种 γ δ TCR激动剂以0.5 μ g/ml至4 μ g/ml、优选地2 μ g/ml的浓度添加。在第八方面的一个实施方式中,IL21以7ng/ml至15ng/ml、优选地13ng/ml的浓度添加。在第八方面的一个实施方式中,IL15以70ng/ml至150ng/ml、优选地100ng/ml的浓度添加。在第八方面的一个实施方式中,IFN至 γ 以30ng/ml至80ng/ml、优选地70ng/ml的浓度添加。在第八方面的一个实施方式中,IL至4以50ng/ml至150ng/ml、优选地100ng/ml的浓度添加。在第八方面的一个实施方式中,IL-1 β 以5ng/ml至20ng/ml、优选地15ng/ml的浓度添加。任选地,细胞可以在无血清培养基中培养,并且任选地补充有血浆或人血清和/或谷氨酰胺。

[0175] 在一个实施方式中,如图16所示,在步骤2之后(即,在本发明的第八方面之后)通过扩增步骤1细胞扩增获得的细胞群体,比步骤2之后从分离的生物样品(例如脐带血或外周血)获得的细胞更具有细胞毒性,其中优选地使用Jurkat和/或MOLM13靶细胞测量细胞毒性。优选地,在第八方面的方法之后获得的细胞群体的细胞毒性是根据第八方面的方法激活和扩增的从分离的生物样品(优选脐带血或外周血)获得的细胞的细胞毒性的至少1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、8倍或10倍,优选地,其中使用白血病细胞(优选Jurkat或Molm13细胞系),以1:8或1:4的效应物-靶标(E:T)比,并且在共培养至少24h、优选地48h后进行细胞毒性的测量。

[0176] 另外,参见图15,不仅从头获得的细胞群体比在步骤2之后从分离的生物样品获得的细胞更具细胞毒性,而且CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(从CD34+祖细胞从头产生的)并且包含在所述群体中导致与步骤2后从获得自脐带血或外周血的体外分离的细胞扩增的等同CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞(CB-步骤2、PB-步骤2)相比具有更好的细胞毒性谱(通过细胞毒性标志物的存在而测量)。因此,本发明的第九方面涉及包含激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体的组合物,优选包含根据本发明的第八方面获得或可获得的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体的组合物。优选地,本发明涉及包含同种异体的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体、优选根据本发明的第八方面获得或可获得的同种异体的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体的组合物。优选地,如图17所示,第九方面的细胞群体包含的总细胞的至少30%至90%、优选地约40%至60%是 γ δ T细胞, γ δ T细胞中的至少40%、优选地约40%至60%、优选地超过50%是CD1a-和V δ 1+的(即,是V δ 1+ γ δ T细胞)。

[0177] 在优选的实施方式中,如图13所示,第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体包含CD8+T效应细胞。在优选的实施方式中,至少60%、70%、75%、80%、85%或90%的第九方面的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达CD8标志物。在优选的实施方式中,至少50%、或至少60%、优选地至少70%或80%的第九方面的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞呈现T效应表型,其中T效应表型的特征在于CD45RA标志物的表达和/或缺乏CD62L标志物的表达。在优选的实施方式中,少于60%、优选少于50%、40%、30%或20%的第九方面的V δ 1+ γ δ T细胞表达CD27标志物。

[0178] 在优选的实施方式中,如图14所示,第九方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)的特征在于不具有耗竭表型,其中耗竭表型通过耗竭相关表面标志物如LAG3和/或CTLA4的表达来测量。优选地,至少约80%、85%、90%、95%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞不表达可检测水平的LAG3和/或CTLA4耗竭标志物。优选地,少于20%、15%、10%或5%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测水平的LAG3标志物。优选地,少于20%、15%、10%或5%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测水平的CTLA4标志物+。

[0179] 参见图14,第九方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)的特征还在于具有激活的表型,其中激活的表型通过表面激活标志物CD25和/或CD69的表达来测量。优选地,至少40%、50%、55%、60%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测水平的CD25标志物。优选地,至少80%、85%、90%、95%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测水平的CD69标志物。

[0180] 在优选的实施方式中,如图15所示,第九方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体)的特征在于包含细胞毒性相关的激活受体。所述V δ 1+ γ δ T细胞、优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞的特征还在于包含CD56、Nkp44、Nkp30、NKG2D和DNAM-1细胞毒性相关标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。在一个实施方式中,至少80%、85%、90%、95%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测水平的Nkp44、Nkp30和NKG2D标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。在一个具体的实施方式中,至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的第九方面的激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞表达可检测的水平水平的CD56、Nkp44、Nkp30、NKG2D和DNAM-1标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。

[0181] 在一个实施方式中,第九方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体)的特征在于:

[0182] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56,或

[0183] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,或

[0184] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,或

[0185] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%至100%表达NKG2D标志物,或

[0186] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%至100%表达DNAM-1标志物,

[0187] 其中表面标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0188] 优选地,第九方面的扩增和激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T群体的特征在于:

[0189] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,

[0190] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,

[0191] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,

[0192] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%至100%表达NKG2D标志物,以及

[0193] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%至100%表达DNAM-1标志物,

[0194] 其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0195] 本发明的第十方面涉及包含如第九方面所定义的从头Notch诱导并分化并扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选从头Notch诱导并分化并扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体)的组合。因此,根据第十方面的细胞组合物包含具有低的耗竭标志物表达的高细胞毒性和激活的V δ 1+ γ δ T细胞(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)。优选地,第十方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞)的特征在于,它们表达可检测水平的CD56、NKp44、NKp30、NKG2D和DNAM-1标志物中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。

[0196] 优选地,第十方面的激活和扩增的V δ 1+ γ δ T细胞群体(优选CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体)的特征在于:

[0197] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56,或

[0198] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44,或

[0199] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30,或

[0200] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%至100%表达NKG2D,或

[0201] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%至100%表达DNAM-1,

[0202] 其中表面标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0203] 优选地,第十方面的扩增和激活的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体的特征在于:

[0204] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少40%、优选地至少50%或60%表达CD56标志物,

[0205] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp44标志物,

[0206] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少60%、优选地至少70%或80%表达NKp30标志物,

[0207] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少70%、优选地80%至100%表达NKG2D标志物,和

[0208] -V δ 1+ γ δ T细胞总数的至少80%、优选地90%至100%表达DNAM-1标志物,

[0209] 其中上述标志物的表达水平优选地通过流式细胞术测量。

[0210] 在本发明的优选实施方式中,第二方面至第七方面或第九方面或第十方面的组合物用于生产嵌合抗原受体(CAR)T细胞。

[0211] 本发明的第十一方面涉及包含用本发明的第二方面至第七方面或第九方面或第

十方面的任何组合物获得或可获得的CAR T细胞的组合物。

[0212] 在本发明的优选的实施方式中,第二方面至第七方面或第九方面或第十方面的组合物是可注射的。在优选的实施方式中,可注射组合物包含由超过80% (即超过80%、85%、90%、95%) 的表达功能性天然细胞毒性受体的本发明的功能性V δ 1+ γ δ 细胞组成的细胞群体,其中该细胞群体优选地包含超过1亿个表达功能性天然细胞毒性受体的本发明的V δ 1+ γ δ 细胞。优选地,组合物还包含药学上可接受的药剂或载剂和更优选地稳定剂,即人血清白蛋白。细胞可以是自体的,也就是说,来源于相同的生物制备物(或来源于相同的供者),然而,细胞更优选地是同种异体性质的,也就是说,不来源于相同的生物制备物(或不来源于相同的供体)。更优选地,它们通过诸如由所公开的主题描述的方法的方法获得。所公开的主题的另一方面是包含本发明第二方面至第七方面、第九方面或第十方面的细胞的组合物在医药中的用途。

[0213] 在更优选的实施方式中,第二方面至第七方面或第九方面或第十方面中公开的组合物可用于自体或同种异体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤等。更优选地,在第二方面至第七方面、第九方面或第十方面中公开的组合物可用于自体或同种异体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤等。

[0214] 在一个更优选的实施方式中,本发明公开的组合物可用于治疗病毒感染。

[0215] 本发明还包括以下条款:

[0216] 1. Notch配体用于从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或CD34+ETP的细胞群体从头产生Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞(优选同种异体Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞)的体外用途,其中Notch配体是Jag2(锯齿状2)。

[0217] 2. 从包含人HPC(如CD34+脐带血HPC)和/或人ETP的细胞群体从头产生Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞(优选同种异体Notch诱导的分化的V δ 1+ γ δ T细胞)的体外方法,该方法包括:

[0218] a. 在包含(优选固定在基质上或细胞系上的)Jag2 Notch配体或Notch受体激动剂的充足培养基中培养包含HPC和/或ETP的细胞群体;以及

[0219] b. 将培养物中的细胞维持足以产生V δ 1+ γ δ T细胞的一段时间,优选地该段时间为约2周至约15周,并且所述Notch配体或激动剂应当在培养时而且在整个培养期间以充足的量存在或添加至细胞的所述培养物中,

[0220] 3. 根据条款1或2中任一项所述的方法,其中,人HPC来源于CD34+脐带血HPC、CD34+骨髓HPC、CD34+外周血HPC,或来源于源自多能干细胞(如iPSC)的CD34+细胞。

[0221] 4. 根据条款1或3中任一项所述的方法,其中,人造血祖细胞是人CD34+ETP。

[0222] 5. 包含根据条款1至4中任一项获得或可获得的人细胞毒性V δ 1+ γ δ 细胞的细胞组合物。

[0223] 6. 激活并诱导通过条款1至5中任一项所述的方法获得的V δ 1+ γ δ T细胞的增殖的方法,方法包括:

[0224] a. 在 γ δ TCR激动剂存在下、优选地通过定期添加(更优选地连续添加)所述(优选地可溶的或固定的)激动剂,以及在至少一种细胞因子(例如选自IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IFN- γ 、IL-21、IL-15和/或IL-1 β 的那些)存在下,在充足培养基中培养包含通过条款2至4中任一项的方法获得的V δ 1+ γ δ T细胞的细胞组合物;和

[0225] b. 添加所述 γ δ TCR激动剂和细胞因子,直到至少40%、更优选地至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、95%的细胞表达天然细胞毒性受体。

[0226] 7. 包含根据条款6获得或可获得的人细胞毒性V δ 1+ γ δ 细胞的细胞组合物。

[0227] 8. 根据条款7所述的组合物,其中,该组合物包含由超过80%的表达功能性天然细胞毒性受体的功能性V δ 1+ γ δ 细胞组成的细胞群体,其中,其优选地包含超过1亿个表达功能性天然细胞毒性受体的V δ 1+ γ δ 细胞。

[0228] 9. 根据条款7或8中任一项所述的组合物,其中,该组合物是药物组合物,其还包含药学上可接受的药剂或载剂和更优选地稳定剂,即人血清白蛋白。

[0229] 10. 根据条款7至9中任一项所述的组合物,其中,该组合物用于同种异体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、t细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤。

[0230] 11. 根据条款7至9中任一项所述的组合物,其中所述组合物用于自体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤。

[0231] 12. 根据条款7或8中任一项的所述组合物用于制造CAR T细胞的用途。

[0232] 13. 根据条款12获得或可获得的包含人细胞毒性V δ 1+ γ δ 细胞的CAR T细胞组合物。

[0233] 14. 根据条款13的所述的组合物,其中,该组合物是药物组合物,其还包含药学上可接受的药剂或载剂和更优选地稳定剂,即人血清白蛋白。

[0234] 15. 根据条款13至14中任一项所述的组合物,其中,组合物用于同种异体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤。

[0235] 16. 根据条款13至14中任一项所述的组合物,其中,组合物用于自体过继细胞疗法、肿瘤或癌症治疗、肿瘤或癌症免疫疗法和/或白血病治疗,或用于治疗急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、结肠癌、膀胱癌、肾细胞癌或皮肤黑色素瘤。

[0236] 本发明还包括以下条款:

[0237] 1. Jag2 Notch配体用于从包含人HPC (如CD34+脐带血HPC) 和/或CD34+ETP的细胞群体产生细胞组合物的体外用途,该细胞组合物包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 $\gamma\delta$ T细胞,其中Jag2 Notch配体在基质细胞系的表面上表达,并且其中所述基质细胞系与参考基质细胞相比,呈现Jag2 Notch配体在统计学上显著增加的表达,其中所述参考基质细胞是表达基础水平的所述配体的基质细胞。

[0238] 2. 根据条款1所述的用途,其中,基质细胞系是OP9细胞系。

[0239] 3. 一种从包含人HPC (如CD34+脐带血HPC) 和/或人ETP的细胞群体产生包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 $\gamma\delta$ T细胞 (优选同种异体Notch诱导的分化的 $\gamma\delta$ T细胞) 的细胞组合物的体外方法,该方法包括:

[0240] a. 在包含基质细胞系的细胞群体的充足培养基中培养包含HPC和/或ETP的细胞群体,其中所述基质细胞系与参考基质细胞相比,呈现Jag2 Notch配体在统计学上显著增加的表达,其中所述参考基质细胞是表达基础水平的所述配体的基质细胞;以及

[0241] b. 将在培养物中的细胞维持足以产生 $\gamma\delta$ T细胞的一段时间,优选地该段时间为约2周至约15周,并且所述Notch配体或激动剂应当在培养时而且在整个培养期间以充足的量存在或添加至细胞的所述培养物中。

[0242] 4. 根据条款3所述的方法,其中,人HPC来源于CD34+脐带血HPC、CD34+骨髓HPC、CD34+外周血HPC,或来源于源自多能干细胞 (如iPSC) 的CD34+细胞。

[0243] 5. 根据条款3至4中任一项所述的方法,其中,人造血祖细胞是人CD34+ETP。

[0244] 6. 根据条款3至5中任一项所述的方法,其中,至少30%的 $\gamma\delta$ T细胞是V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞。

[0245] 7. 根据条款3至6中任一项获得或可获得的包含比 $\alpha\beta$ T细胞更高量的 $\gamma\delta$ T细胞的细胞组合物。

[0246] 8. 根据条款7所述的细胞组合物,其中,该细胞组合物的特征在于至少30%的 $\gamma\delta$ T细胞是V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞。

[0247] 9. 根据条款8所述的细胞组合物,其中,V δ 1+ $\gamma\delta$ T群体依次包含:

[0248] a. 第一细胞群体 (CD1a+V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞),其特征在于,它们表达未成熟细胞表面标志物CD1a,以及

[0249] b. 第二细胞群体 (CD1a-V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞),其特征在于,它们不表达未成熟细胞表面标志物CD1a。

[0250] 10. 根据条款8所述的细胞组合物,其中,第一细胞群体的特征在于细胞不表达细胞表面标志物CD25、CD27、NKp44、NKp30和NKG2D。

[0251] 11. 根据条款9或10所述的细胞组合物,其中,第二细胞群体的特征在于,细胞表达表面标志物CD27、CD73、CD69、NKp44、NKp30和NKG2D中的至少一种、或至少两种或更多种的组合、优选全部。

[0252] 12. 根据条款7至11中任一项所述的细胞组合物,其中,第一细胞群体代表包含在细胞组合物中的总V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞的至少90%。

[0253] 13. 通过条款3至6中任一项所述的方法获得的激活并诱导V δ 1+ $\gamma\delta$ T细胞的增殖的方法,该方法包括:

[0254] a. 在 $\gamma\delta$ TCR激动剂存在下、优选地通过定期添加 (更优选地连续添加) 所述 (优选地

可溶的或固定的) 激动剂, 以及在至少一种细胞因子 (例如选自 IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IFN- γ 、IL-21、IL-15 和/或 IL-1 β 的那些) 存在下, 在充足培养基中培养包含通过条款 3 至 6 中任一项的方法获得的 V δ 1+ γ δ T 细胞的细胞组合物; 和

[0255] b. 添加所述 γ δ TCR 激动剂和细胞因子, 直到至少 40%、更优选地至少 50%、60%、70%、75%、80%、85%、95% 的细胞表达天然细胞毒性受体。

[0256] 以下实施例仅用于说明本发明, 而不限制本发明。

[0257] 实施例

[0258] 实施例 1. 从人 CD34+ 早期胸腺祖细胞 (ETP) 产生 V δ 1+ 人 T 细胞

[0259] - 从用 Jag2 激活的人 CD34+ETP 从头产生 V δ 1+ γ δ T 细胞的体外培养条件 (步骤 1)

[0260] 根据赫尔辛基宣言 (the Declaration of Helsinki), 在提供知情同意后, 通过对年龄为 3 天至 4 岁的患者心脏矫正手术期间取出的胸腺组织进行机械破碎和 Ficol1-Hypaque (LymphoprepTM; ATOM) 离心, 分离人出生后胸腺细胞。根据西班牙研究理事会 (CSIC) 的研究伦理委员会 (Research Ethics Board) 建立的经批准的指南进行实验。通过 CD34-磁性细胞分选 (Dyna1, CD34 祖细胞选择系统, Invitrogen) 从胸腺细胞悬浮液中分离 CD34+ETP, 并使用抗 CD1a 和抗 CD123 MicroBeads (AutoMACS, Miltenyi Biotec) 进一步耗竭 CD34+CD1a+ 和 CD34+CD123+ 祖细胞。分离的 CD34+ETP (>96% CD34+CD1a-CD123-) 在接种有 OP9 基质细胞的 p24 孔板中培养 (10⁵ 个细胞/孔), 所述 OP9 基质细胞经作为细胞示踪剂的 GFP 和显示以相似的表面水平表达的 DLL1、DLL4、Jag1 或 Jag2 Notch 配体各自转导, 或经 GFP 单独转导作为对照。用编码 GFP、DLL1、DLL4、Jag1 或 Jag2 的质粒转导 OP9 细胞导致所述蛋白质在细胞上过表达, 特别是在 Notch 配体的情况下在细胞表面上过表达。特别地, 如通过流式细胞术测量的, Jag2 在转导的 OP9 细胞中的增加表达是约 500 倍的增加表达 (图 10)。在补充有 20% 胎牛血清 (FCS)、2mmol/l L-谷氨酰胺、200IU/ml 重组人 (rh) IL-7 (NIBSC) 和 100IU/ml rhFlt3L (PeproTech) 的 α -MEM 培养基 (Gibco) 中建立培养。每 3 至 4 天重新接种培养物并通过流式细胞术分析 γ δ T 细胞的产生, 持续长达 30 天。这些分析显示, Jag2 是促进 γ δ T 细胞分化的最有效的 Notch 配体 (图 1), 而当 OP9 细胞仅表达 GFP 时, 不诱导细胞分化 (图 7)。事实上, Jag2 介导的信号传导导致在 30 天内分别以 300 倍: 20 倍的产量优先产生 γ δ T 细胞超过 $\alpha\beta$ T 细胞。值得注意的是, 用抗 V δ 1 和抗 V δ 2mAb 进行的流式细胞术分析揭示了, 响应于人 Jag2 信号传导而从 ETP 分化的 γ δ T 细胞优先是 V δ 1+ 细胞, 并且产生 IFN γ 而不是 IL-17 (图 2)。因此, 可以从用 Jag2 激活的单个 ETP 产生显示抗肿瘤外周 γ δ T 细胞特征的多达 100 个 V δ 1+ γ δ T 细胞 (图 3)。

[0261] 实施例 2. 从脐带血 CD34+ 造血祖细胞 (HPC) 产生 V δ 1+ 人 T 细胞

[0262] - 从用 Jag2 激活的人脐带血 CD34+HPC 从头产生 V δ 1+ γ δ T 细胞的体外培养条件 (步骤 1)

[0263] 脐带血样本是根据 CSIC 研究伦理委员会制定的批准指南从马德里社区输血中心 (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid) 获得的。使用 CD34 祖细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec) 通过免疫磁性分选从 Ficol1 Hypaque 分离的细胞样品获得 HPC。经再分析, 证明分选的群体中 >98% 为 CD34+, 并且 CD3、CD4、CD8、CD13、CD14、CD19 和 CD56 谱系标志物 (Lin-) 呈阴性。在接种有表达人 Jag2 Notch 配体的 OP9 基质细胞的 p24 孔板中, 在补充有 20% 胎牛血清 (FCS)、2mmol/l L-谷氨酰胺和 200IU/ml 重组人 (rh) IL-7 (NIBSC)、100IU/

ml rhFlt3L (PeproTech) 和 100IU/ml rhSCF (PeproTech) 的 α -MEM 培养基 (Gibco) 中培养分离的脐带血 CD34+HPC (10^5 个细胞/孔)。每 3 至 4 天分析分化的 $\gamma \delta$ 幼稚 T 细胞的产生, 持续长达 9 周, 揭示了总细胞扩增了 4000 倍和 $\gamma \delta$ T 细胞产量为 210 个至 250 个 (图 4)。高达 40% 的这些 Jag2 分化的 $\gamma \delta$ 幼稚 T 细胞是 V δ 1+ 的 (图 4)。因此, 可以从用 Jag2 激活的 100 万个人脐带血 HPC 产生多达 1 亿个 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞 (图 5)。

[0264] 实施例 3. 从脐带血 CD34+造血祖细胞 (HPC) 产生未激活的幼稚 V δ 1+ 人 T 细胞不同于成人外周血中存在的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞。

[0265] 从脐带血分离的 CD34+HPC 产生的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞与过表达 Jag2 的 OP9 细胞一起培养, 代表了包含表型未成熟的 CD1a+ 和成熟的 CD1a- V δ 1+ 细胞的异质细胞群体。成熟的 CD1a- V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞亚群主要由未激活的幼稚 CD25- CD27+ 细胞组成 (图 8), 与成人外周血分离的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞不同的是, 未激活的幼稚 CD25- CD27+ 细胞表达细胞毒性 NK 受体 NKp30 和 NKG2D (图 9)。

[0266] 下表 1 和图 6 显示了从接受人 Jag2 信号传导的人 CD34+CB HPC (CB- Jag2) 产生的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞或从 CB (离体 CB) 或外周血 (离体 PB) 离体分离的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞的比较细胞产量和表型。从来源于单个 CB 单位 (n=4) 的 CB- Jag2 细胞、或从分别分离自 CB 或 PB 单位的离体 CB (n=4) 或离体 PB (n=3) 重新获得的 T 细胞中 TCR $\gamma \delta$ + 细胞和 V δ 1+ 细胞的平均值 \pm SD 百分比。

[0267] 表 1:

来源	T 细胞内 TCR $\gamma\delta$ +%	T 细胞内 V δ 1+%	V δ 1+ 细胞内 CD1a+%
[0268] CB- Jag2	28,5% (\pm 10,1)	9% (\pm 4,9)	91,1% (\pm 0,8)
离体 CB	1,3% (\pm 0,7)	0,9% (\pm 0,3)	11% (\pm 5)
离体 PB	3,6% (\pm 1,3)	0,8% (\pm 0,9)	0,4% (\pm 0,3)

[0269] 此外, 下表 2 显示了每袋 (单位) 血液中从接受人 Jag2 信号传导的人 CD34+CB HPC (CB- Jag2) 产生的或从 CB (离体 CB) 或外周血 (离体 PB) 离体分离的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞的绝对数量的比较细胞产量。

[0270] 可以观察到, 由于从 CD34+ 祖细胞产生, 相对于来自 CB 或 PB 的相同数量的总起始细胞, 在本发明的方法的步骤 1 (CB- Jag2) 之后从头产生的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞的产量高于从 PB 离体获得的 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞的产量 (表 2)。

来源	对总 T 细胞门控 (% \pm SEM)			来自 CB 或 PB 单位的细胞数	来自 10^6 总细胞的 细胞数
	TCR $\alpha\beta$ +	TCR $\gamma\delta$ +	V δ 1+	V δ 1+ ($\times 10^6 \pm$ SEM)	V δ 1+ CD1a-
[0271] CB- Jag2	2 (\pm 0,61)	7,1 (\pm 1,12)	2,4 (\pm 0,42)	71,75 (\pm 42,3)	47002 (\pm 9913)
离体 PB	75,85 (\pm 4,25)	2,7 (\pm 0,71)	0,51 (\pm 0,39)	1,53 (\pm 0,8)	5100 (\pm 3900)

[0272] 每个 CB 袋或单位包含约 100 万个 CD34+ 祖细胞, 由其平均产生 7175 万个 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞。另一方面, 每袋或每单位的 PB 平均包含 3 亿个总细胞, 其中平均 0.51% 是 V δ 1+ $\gamma \delta$ T 细胞,

代表153万个V δ 1+ γ δ T细胞。因此,从脐带血(CB)和过表达Jag2的OP9产生V δ 1+ γ δ T细胞的方法是高效的,从脐带血祖细胞产生的V δ 1+ γ δ T细胞平均是从外周血(PB)细胞产生的V δ 1+ γ δ T细胞的46倍。

[0273] 重要的是,从PB中分离的V δ 1+ γ δ T细胞主要是CD1a⁻(参见表1和图6),而在离体PB中仅发现0.4%的细胞是CD1a⁺。然而,如表1和图6所示,从与OP9-Jag2细胞共培养的CB产生的细胞的约9%至10%是CD1a⁻的。这也在以下代表性实验(来自总共4个实验)中观察到,其中测量从CB单位获得的V δ 1+ γ δ T细胞的CD1a⁺和CD1a⁻的百分比:

		起始1×10 ⁶ CB HPC	
		V δ 1+ T细胞	V δ 1 CD1a ⁻
[0274]	EXP.2	70×10 ⁶	7×10 ⁶

[0275] 鉴于上述情况,可以得出结论,从PB袋中获得约153万个CD1a⁻V δ 1+ γ δ T细胞,而从CB袋中并按照本文要求保护的方法,平均获得700万个CD1a⁻和6300万个CD1a⁺V δ 1+ γ δ T细胞。

[0276] 如报道用于DOT的所产生的V δ 1+ γ δ 幼稚T细胞的TCR依赖性激活和扩增(步骤2)。

[0277] 如上所述以TCR非依赖性Jag2-Notch依赖性方式(步骤1)从脐带血HSC从头产生的V δ 1+幼稚 γ δ T细胞将在体外激活和扩增,如外周血V δ 1+ γ δ T细胞所示(Almeida等人 Clin.Cancer Res.2016),使用抗CD3 mAb和细胞因子,遵循本文命名为步骤2的方案。为此,将通过使用抗TCR $\alpha\beta$ mAb和磁珠(Miltenyi Biotec)进行磁性细胞分选来耗竭从脐带血CD34+HSC分化的细胞(步骤1)的 $\alpha\beta$ T细胞。在补充自体血浆(即5%自体血浆)或人AB血清和2mmol/l L-谷氨酰胺的无血清培养基中(Optimizer-CTS),在1 μ g/ml抗CD3 mAb OKT3加100ng/ml rhIL-4、70ng/ml IFN- γ 、7ng/ml IL-21、和15ng/ml IL-1 β (Peprotech)存在下,将TCR $\alpha\beta$ 耗竭的细胞悬液(2.5×10⁵个细胞/ml)培养7天。在第7天,添加含有2 μ g/ml OKT3加13ng/ml IL-21和70ng/ml IL-15的培养基,然后细胞将与2 μ g/ml OKT3加13ng/ml IL-21和70ng/ml IL-15再培养4天。到第11天,将细胞按1/6稀释,并在2 μ g/ml OKT3加100ng/ml IL-15的存在下再培养4至5天。在第15至16天停止培养,或者将细胞按1/3稀释,并在1 μ g/ml OKT3加70ng/ml IL-15和30ng/ml IFN γ 的存在下进行第二轮扩增直到第18至21天。上述步骤2的扩增和激活方案在本文中称为DOT方案。

[0278] 此外,测试了额外的扩增和激活方案,本文称为CSIC方案。在该方案中,如图18所示,将使用抗TCR mAb和细胞因子在体外激活和扩增(步骤2)如上所述以TCR非依赖性Jag2-Notch依赖性方式从脐带血HSC从头产生的V δ 1+幼稚 γ δ T细胞(步骤1)。为此,将通过使用抗TCR $\alpha\beta$ mAb和磁珠(Miltenyi Biotec)的磁性细胞分选来耗竭从脐带血CD34+HSC分化的细胞(步骤1)的 $\alpha\beta$ T细胞。将TCR $\alpha\beta$ 耗竭的细胞悬液在补充有自体血浆(即5%自体血浆)或人AB血清和2mmol/lL-谷氨酰胺的无血清培养基(OptiTimizer-CTS)中在2 μ g/ml抗TCR γ δ mAb加7ng/ml IL-21(PeproTech)存在下培养7天(2.5×10⁵个细胞/ml)。在第7天,添加含有2 μ g/ml抗TCR γ δ mAb加13ng/ml IL-21和70ng/ml IL-15的培养基,并将细胞再培养7天。培养将在第15至16天停止,或者将细胞按1/3稀释并在2 μ g/ml抗TCR γ δ mAb加70ng/ml IL-15和30ng/ml IFN- γ 存在下进行第二轮扩增,直到第18至21天。

[0279] CSIC和DOT扩增和激活方案均在图18中表示。

[0280] 因此,遵循步骤2,特别是在本文命名为DOT和CSIC的激活/扩增方案,激活并扩增步骤1之后获得的CD1a-V δ 1+T细胞。将所得激活和扩增的CD1a-V δ 1+T细胞与由步骤2扩增的离体分离的PB和CB细胞产生的那些CD1a-V δ 1+T细胞进行比较,以阐明CD34+祖细胞与步骤1和步骤2方法的组合是否将提供改善的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体。结果显示在图13至图15中,其中可以观察到,在本发明的方法之后获得的从头激活和扩增的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞呈现:

[0281] -参见图13,与CB/PB-步骤2的细胞相比,更多的T细胞效应表型,并且表达更多的CD8。

[0282] -参见图14,与CB/PB-步骤2的细胞相比,更激活的表型和更低的耗竭谱。

[0283] -参见图15,与CB/PB-步骤2的细胞相比,更高水平的细胞毒性相关激活受体。

[0284] 上述结果表明,本文所述的方法提供了比从离体样品获得的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体更优越的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体。上述结果还表明,步骤2的两种方案,即CSIC和DOT方案都适合于获得更优越的CD1a-V δ 1+ γ δ T细胞群体。

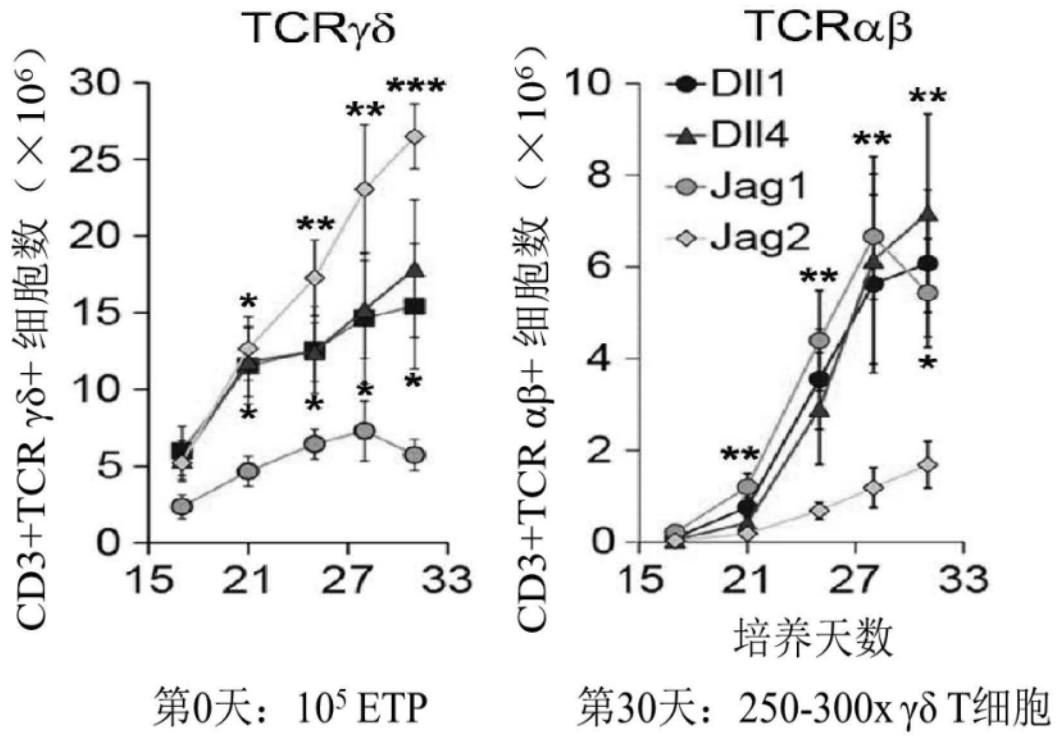
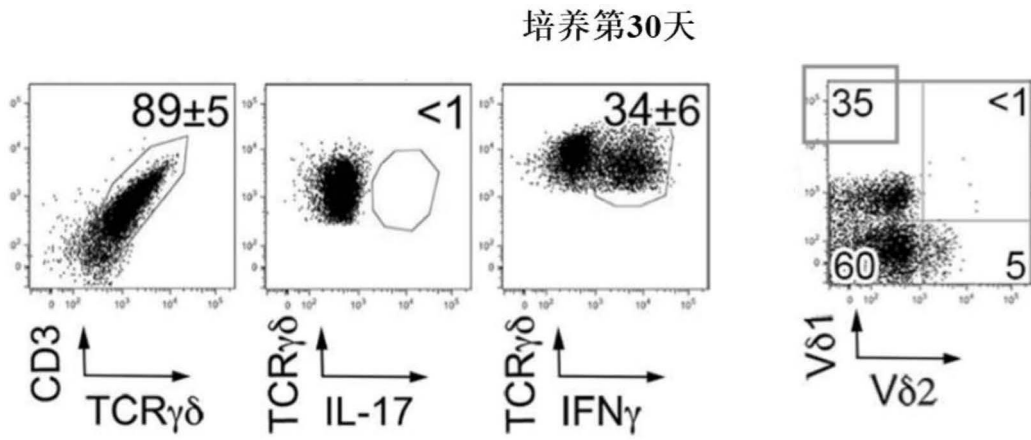


图1

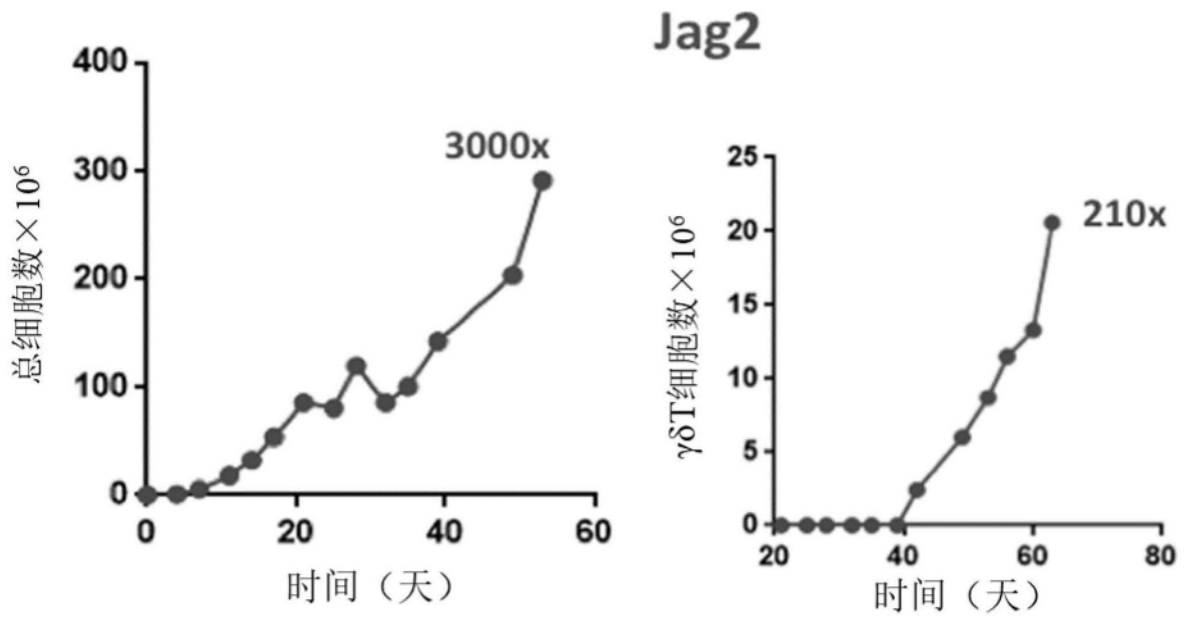


V δ 1细胞产量: 100 X

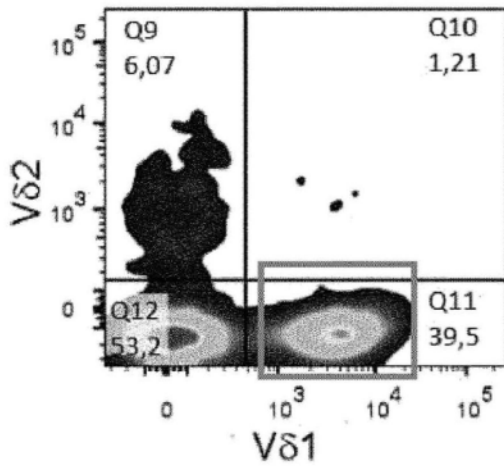
图2

第0天 起始产品 (10^5 ETP)		体外培养30天	第30天 总细胞产品 50×10^6		细胞产量
$\gamma\delta$ TCR+	0%		$\gamma\delta$ TCR+	60% (30×10^6)	
$\alpha\beta$ TCR+	0%	$\alpha\beta$ TCR+	<2% (10^6)		
		V δ 1+	35% (10×10^6)	100X	

图3



第50天



40%的Tγδ

图4

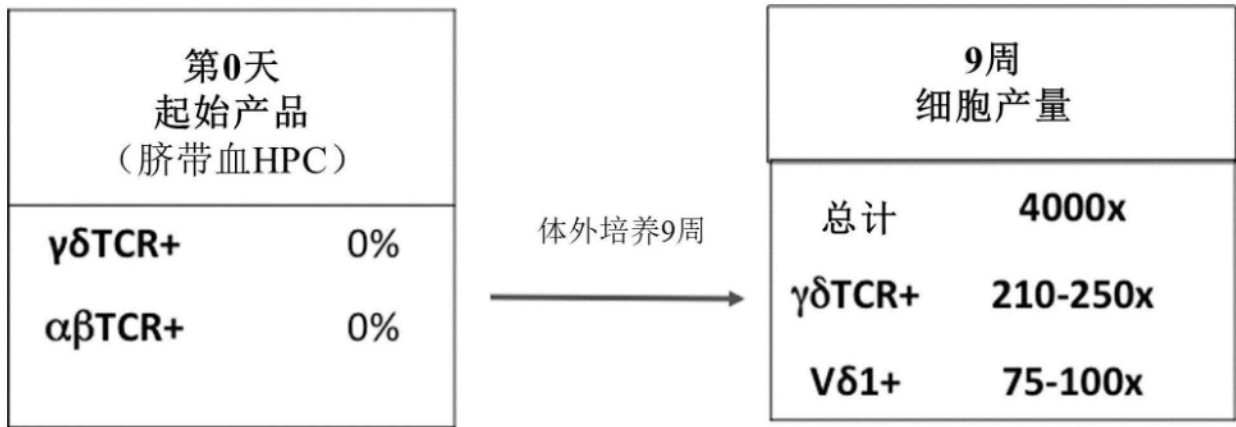


图5

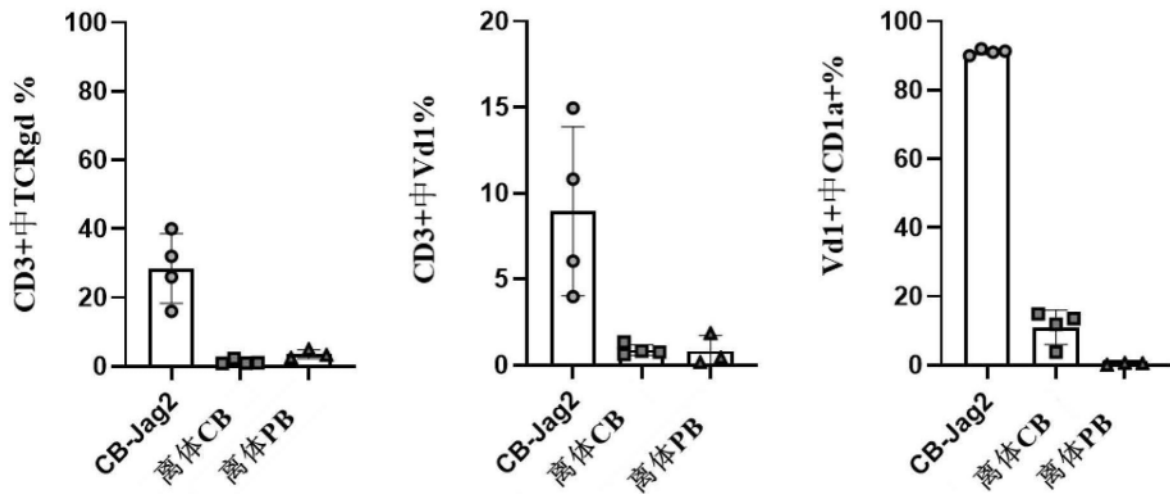
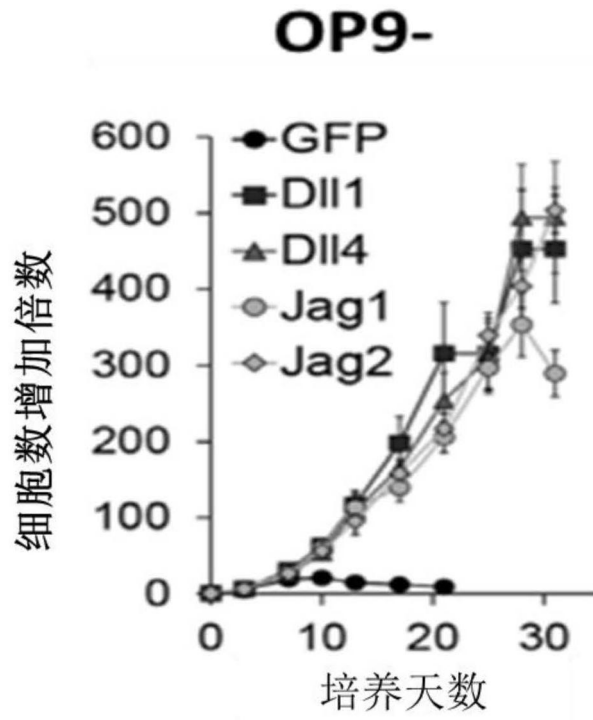


图6



第0天: 10^5 ETP

图7

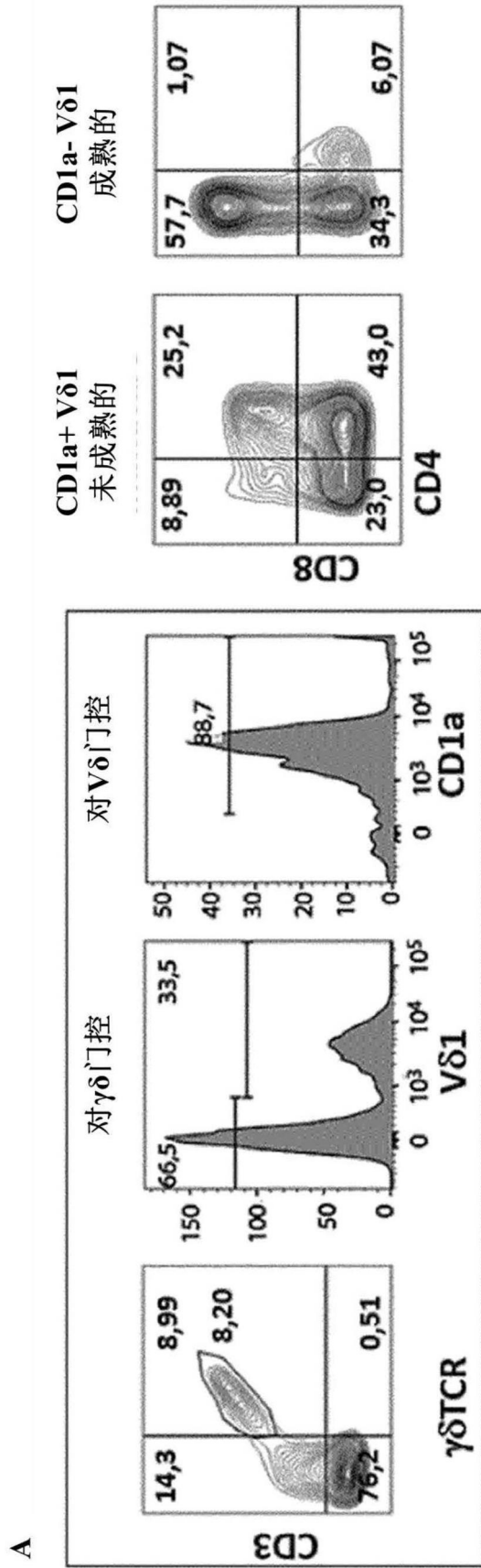


图8

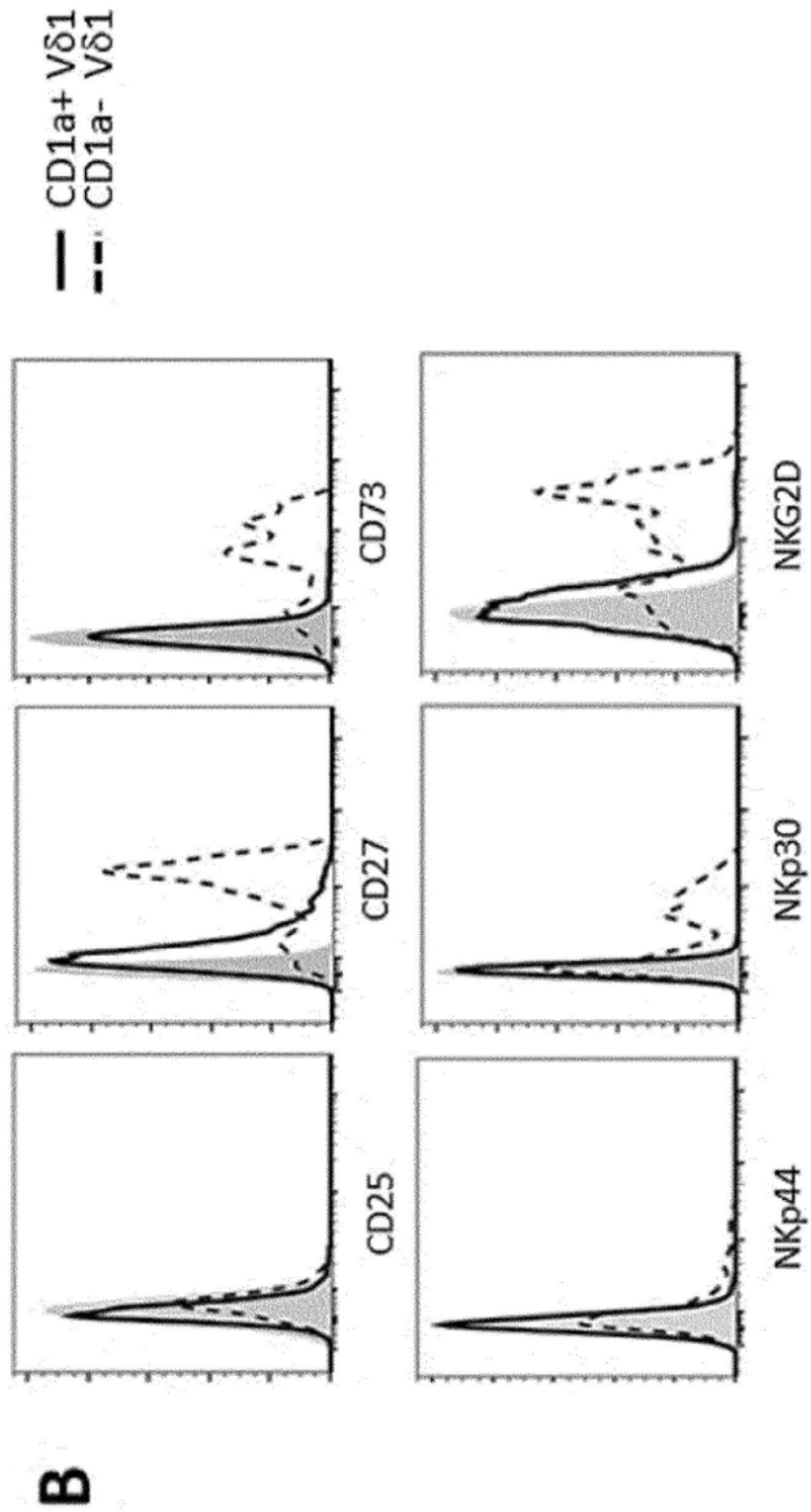
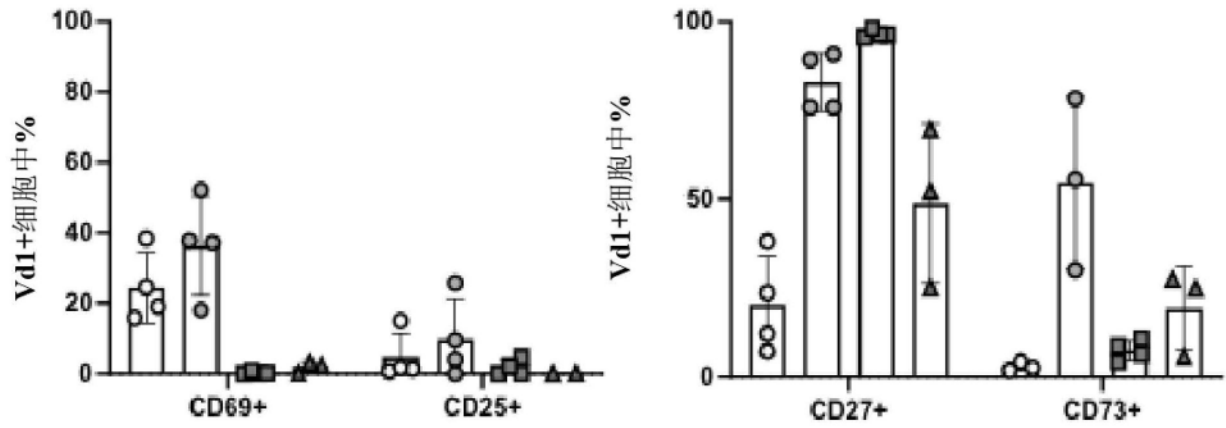


图8(续)

激活标志物

分化标志物



细胞毒性标志物 (NKR)

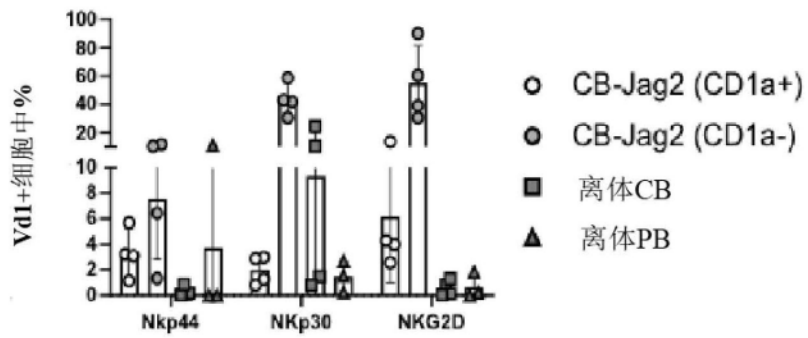
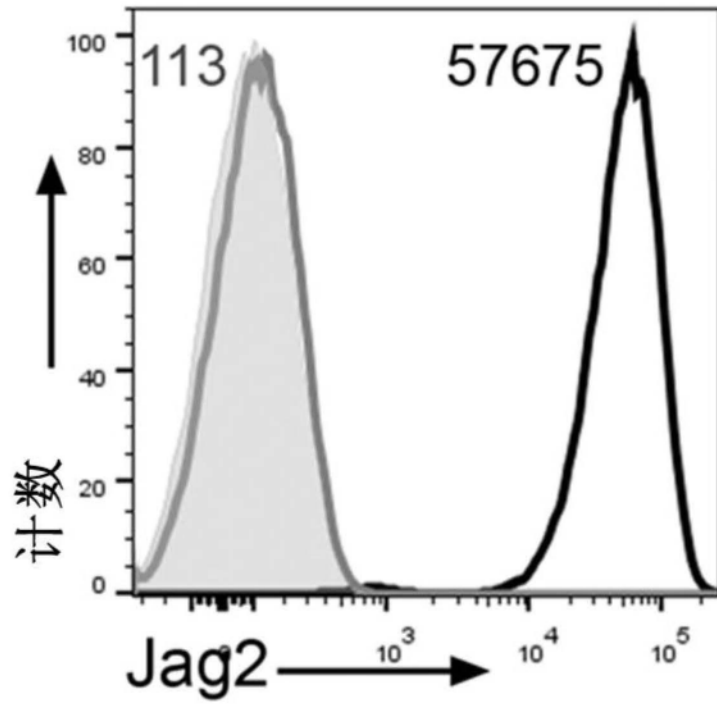


图9



500×表达

图10

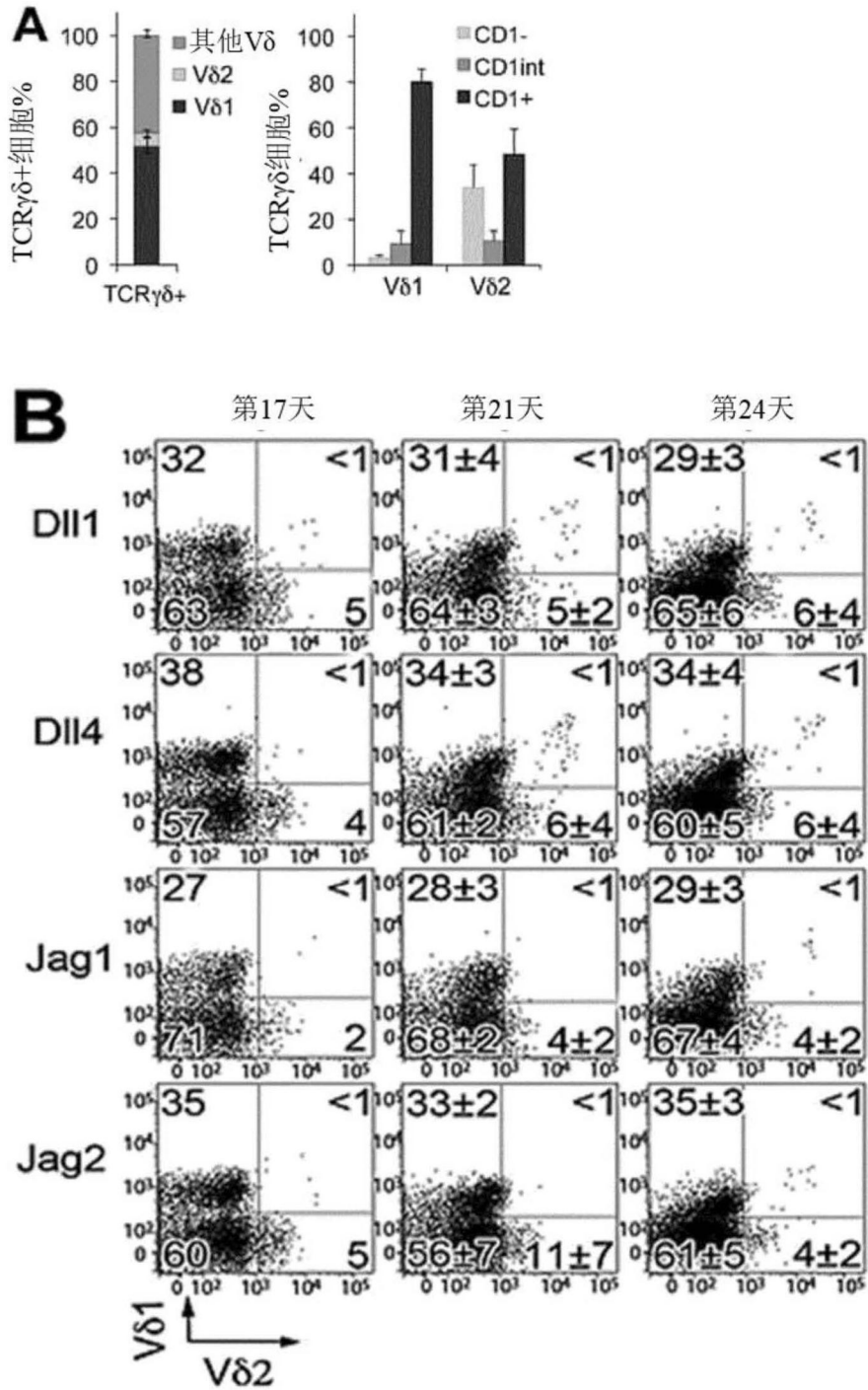


图11

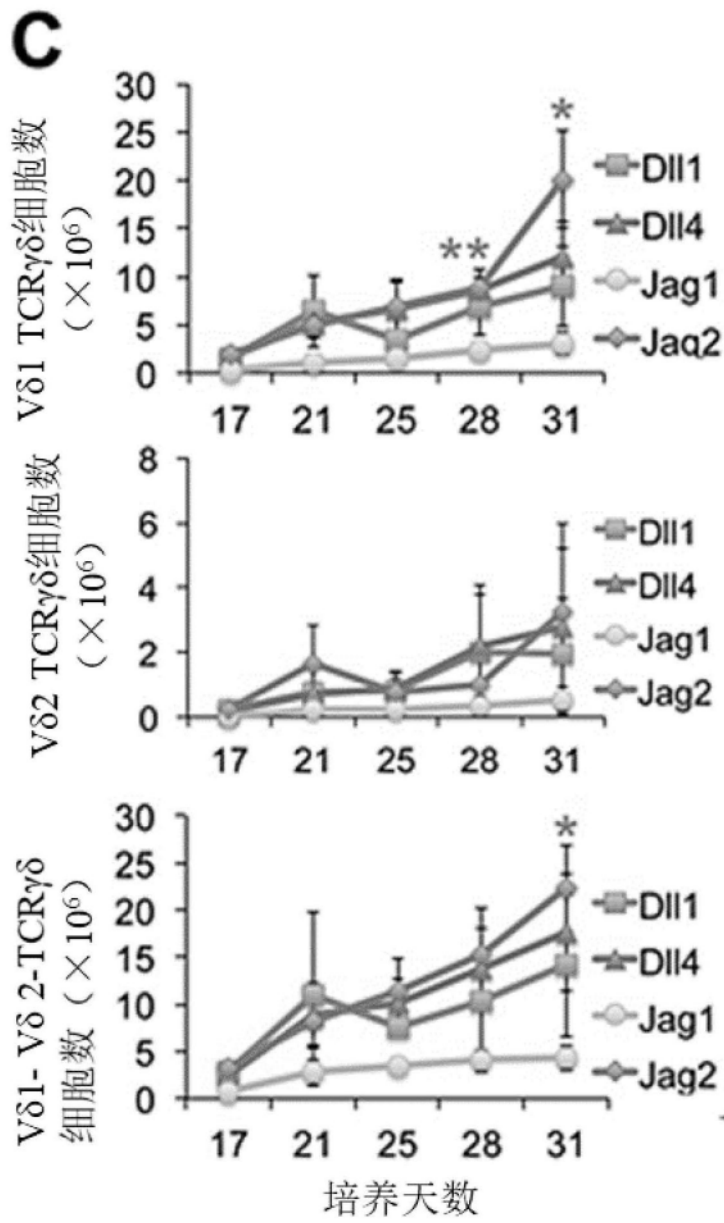


图11(续)

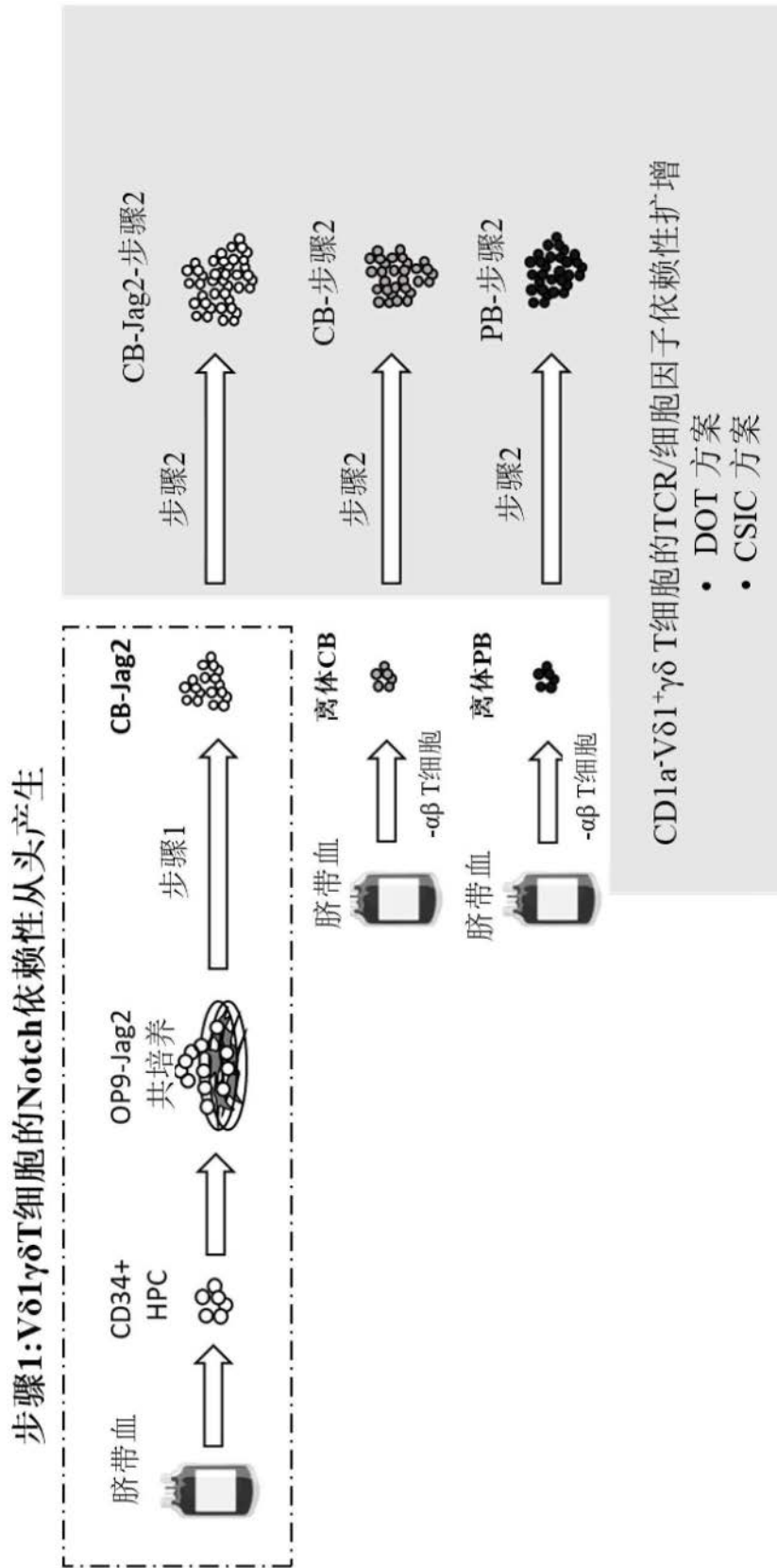


图12

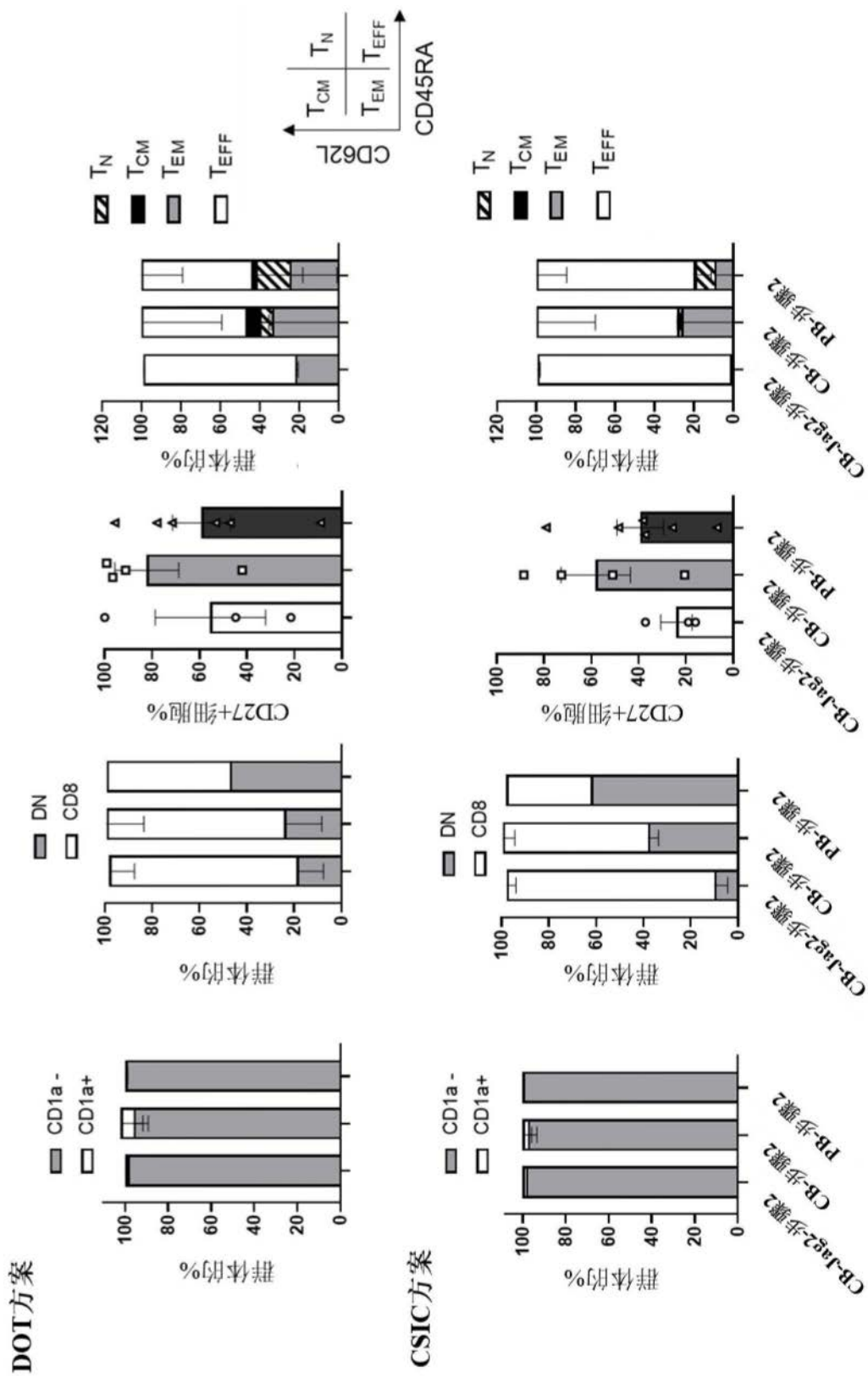


图13

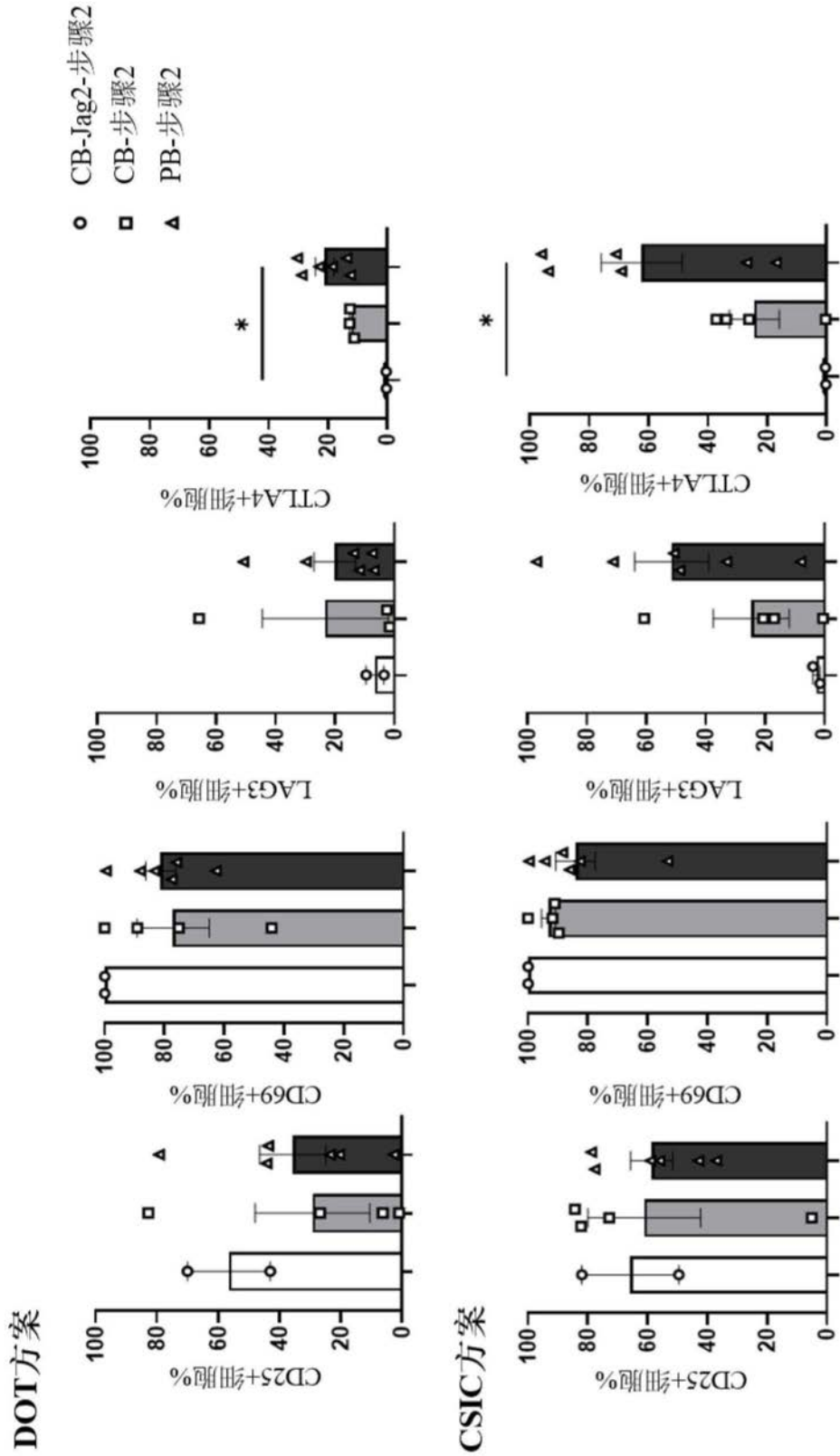


图14

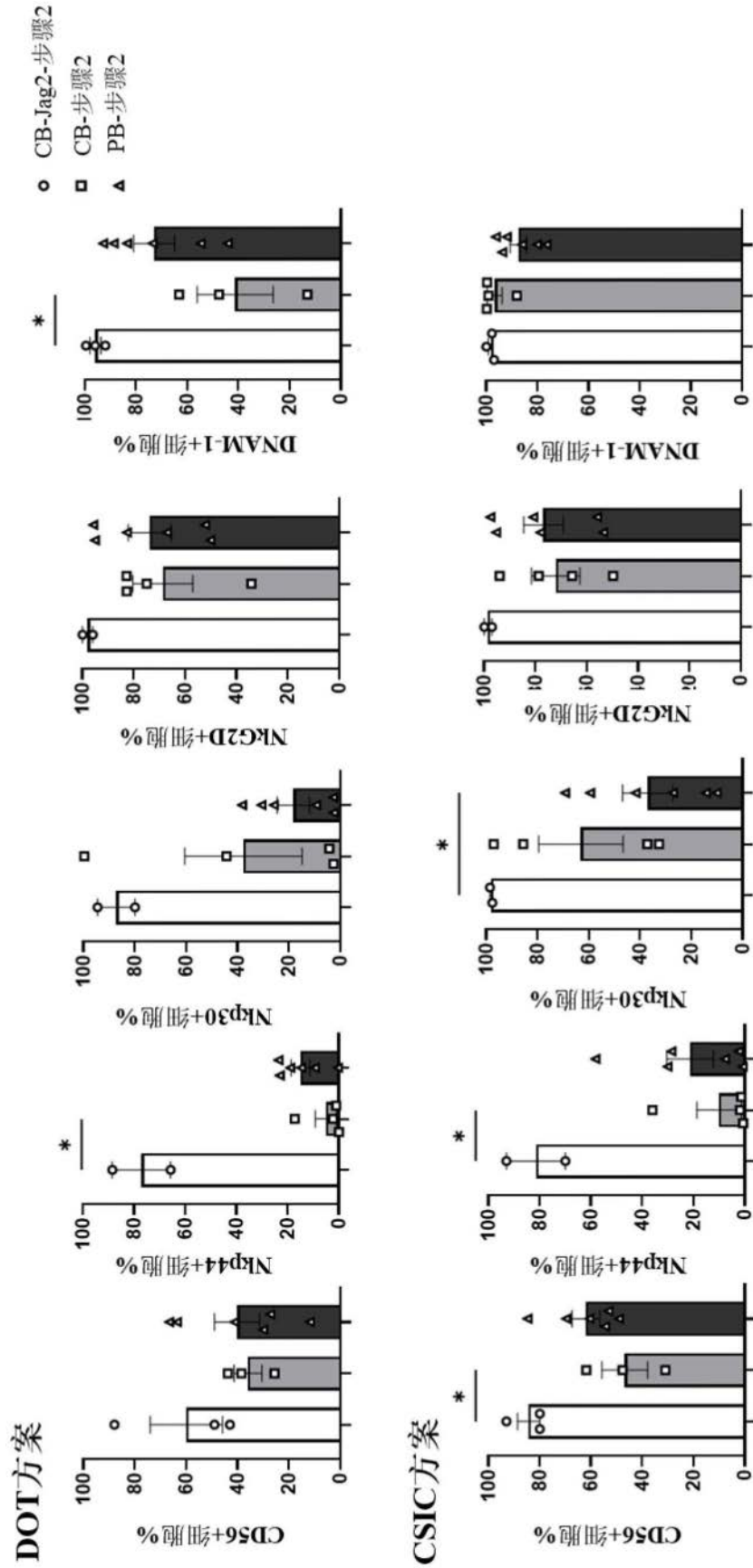


图15

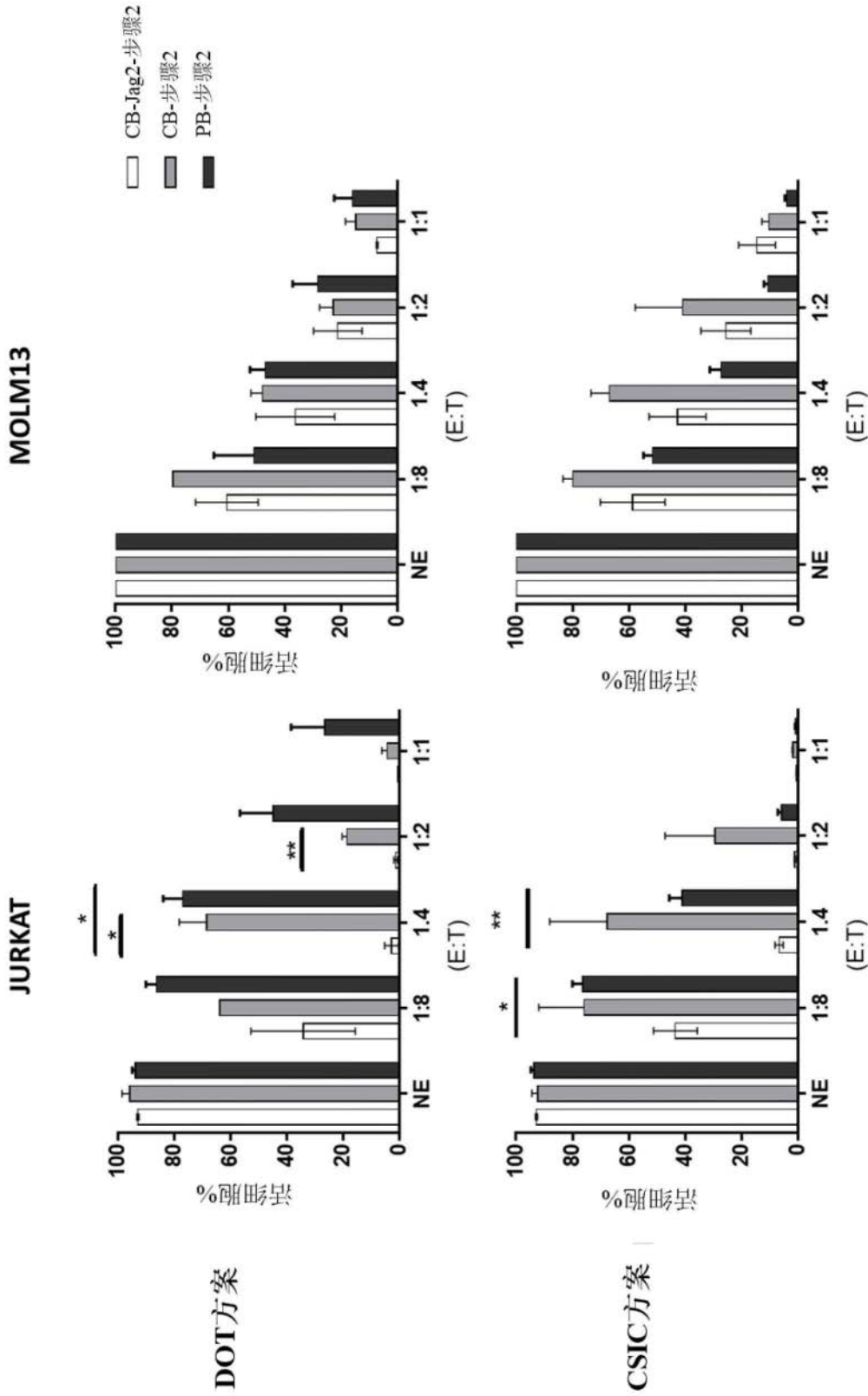


图16

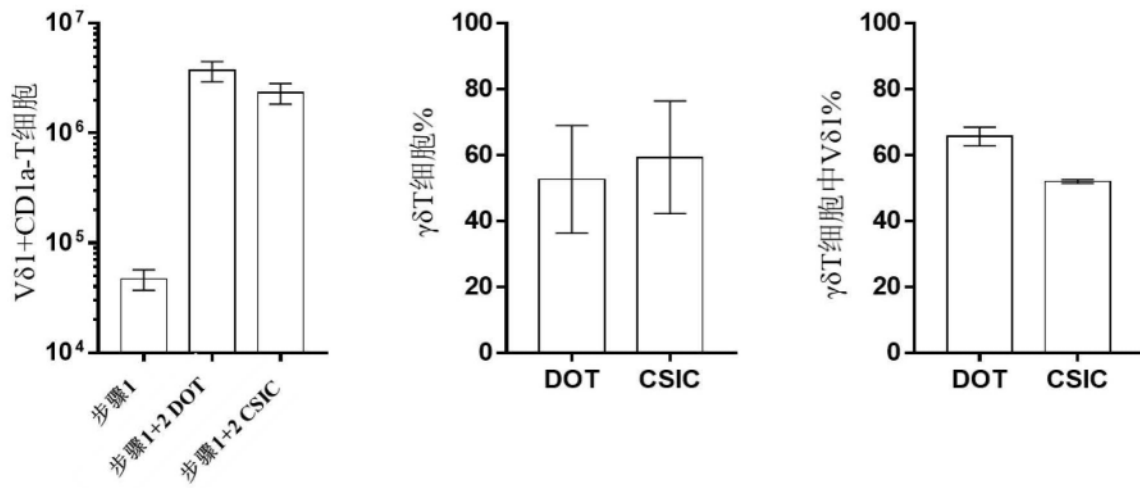


图17

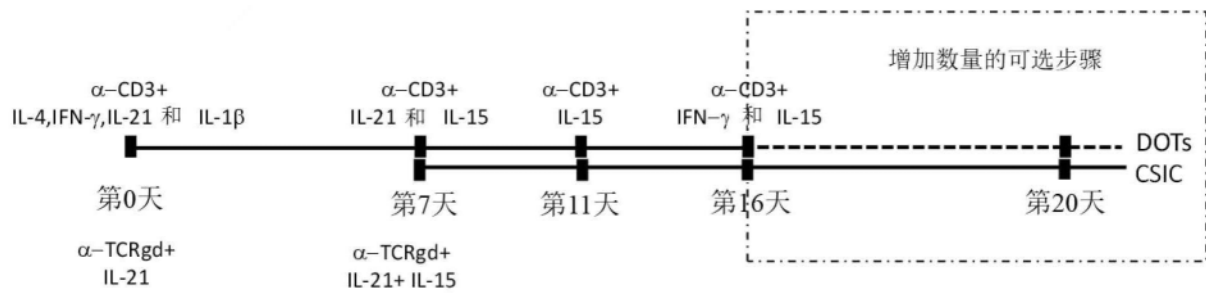


图18