



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0039288

(51)⁷ C12N 5/0783

(13) B

-
- (21) 1-2018-02159 (22) 31/10/2016
(86) PCT/EP2016/076264 31/10/2016 (87) WO 2017/072367 04/05/2017
(30) 1519198.4 30/10/2015 GB; 1612731.8 22/07/2016 GB
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/04/2019 373A
(73) 1. CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED (GB)
Angel Building, 407 St John Street, London, Greater London EC1V 4AD, United Kingdom
2. KING'S COLLEGE LONDON (GB)
Strand, London, Greater London WC2R 2LS, United Kingdom
3. THE FRANCIS CRICK INSTITUTE LIMITED (GB)
1 Midland Road London, Greater London, NW1 1AT, United Kingdom.
(72) HAYDAY, Adrian (GB); NUSSBAUMER, Oliver (AT); WOOLF, Richard (GB).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) PHƯƠNG PHÁP NHÂN RỘNG TẾ BÀO T γδ CƯ TRÚ Ở MÔ KHÔNG TẠO MÁU

(57) Sáng chế đề cập tới việc nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu *in vitro* bằng cách nuôi cấy các lympho bào đã thu được từ mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người khi có mặt interleukin-2 (IL-2) và/hoặc interleukin-15 (IL-15) và không có các tín hiệu kích hoạt TCR hoặc đồng kích thích TCR, mà không có tiếp xúc trực tiếp bất kỳ với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô. Sáng chế đề xuất các phương pháp nhân rộng tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu, cũng như các quần thể của các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu và ứng dụng của chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới phương pháp nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu *ex vivo*. Thuật ngữ “các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu” chỉ phân nhóm các tế bào lympho T cư trú ở các mô không tạo máu, mà không phải ở trong các cơ quan lympho và máu. Các tế bào bao gồm các tế bào không phải là V δ 2, ví dụ các tế bào V δ 1, V δ 3 và V δ 5. Sáng chế cũng đề cập tới việc sử dụng các tế bào này trong liệu pháp tế bào T nhận nuôi và trong liệu pháp thụ thể kháng nguyên khả năng, cũng như việc sử dụng chúng trong phương pháp sàng lọc các chất điều biến điểm kiểm soát. Sáng chế cũng đề cập tới các tế bào được sản xuất bằng cách nhân rộng *ex vivo* các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Mối quan tâm ngày càng tăng đối với liệu pháp miễn dịch tế bào T cho bệnh ung thư đã tập trung vào khả năng rõ ràng của các phân nhóm các tế bào T CD8⁺ (1-4) và CD4⁺ $\alpha\beta$ (5, 6) để nhận biết các tế bào ung thư và điều tiết khả năng hoạt động bảo vệ vật chủ, cụ thể là khi được khử-kìm hãm bằng cách đối kháng các con đường ức chế qua trung gian lâm sàng do hoạt động của PD1(7, 8), CTLA4 (9, 10) và các thụ thể khác (11). Tuy nhiên, nhiều vấn đề vẫn còn chưa được rõ. Ví dụ, dường như có nhiều bệnh cảnh lâm sàng nghiêm trọng, trong đó hiệu lực của các liệu pháp điều trị này là kém (11); thường có các tác dụng bất lợi nghiêm trọng (AEs) (12); khả năng dự đoán hiệu lực hay AEs là cực kỳ hạn chế (13); và rất ít giải thích về các tương tác mà cho phép vật chủ cảm nhận các tế bào khối u (còn gọi là “tính sinh miễn dịch”) mà nhất thiết phải có trước khi kích hoạt các đáp ứng tế bào T CD8⁺ và CD4⁺ $\alpha\beta$ thông thường.

Về các khía cạnh này, nhiều nhà khoa học và các nhà lâm sàng đều đang đánh giá lại tiềm năng của các tế bào T $\gamma\delta$, dòng thứ ba các lympho bào với các thụ thể được tạo ra bằng cách xoma mà tiến hoá được bảo toàn mạnh như các tế bào T $\alpha\beta$ và các tế bào B. Về cơ bản có hai phân nhóm tế bào T $\gamma\delta$ của người: một phân nhóm chiếm chủ yếu trong

máu ngoại vi của người, đa số biểu hiện thụ thể tế bào T (TCR) V δ 2; và một phân nhóm chiếm chủ yếu trong các mô không tạo máu, đa số biểu hiện TCR V δ 1, với quần thể ít hơn biểu hiện các TCR mà có chứa chuỗi V δ 3 hoặc V δ 5 hoặc chuỗi khác không phải là V δ 2 (14).

Ở phần lớn người trưởng thành, các tế bào V δ 2 ở trạng thái ổn định chỉ bao gồm một phần nhỏ và biến thiên nhiều trong số các tế bào T trong máu (0,01-5%), nhưng các tế bào này nhân rộng nhanh chóng, tạm thời đạt đến ~25% các tế bào CD3+, sau khi thử thách bằng một phổ rộng các tác nhân, bao gồm nhiều loại vi khuẩn và ký sinh trùng (14). Căn nguyên chính cho đáp ứng này là nhận biết qua trung gian-TCR V δ 2 “các nhóm phospho” phân tử lượng thấp, bao gồm hydroxyl-metyl but-2-enyl pyrophosphat (HMBPP) (15), một chất trung gian trong con đường quan trọng để sinh tổng hợp cholesterol và các lipit khác của vi khuẩn mà được sử dụng để cải biến các protein, ví dụ bằng cách geranyl hoá hoặc farnesyl hoá. Ở các động vật linh trưởng, quá trình tổng hợp này diễn ra thông qua con đường mevalonat, một chất trung gian của con đường này - isopentenyl pyrophosphat (IPP) – được biểu hiện ở các mức rất cao ở các tế bào được biến nạp và nhiễm virus, và cũng là một đích của quá trình nhận biết qua trung gian TCR V δ 2 (16).

Ngoài ra, đa số các tế bào T V δ 2 biểu hiện các mức cao thụ thể NKG2D mà có thể kích hoạt hoặc đồng kích thích (cùng với TCR) các tiềm năng ly giải tế bào của các tế bào này khi có sự tham gia của các phối tử NKG2D, ví dụ MICA, MICB, và ULBP. Các phối tử đó là các protein chủ mà được điều tiết tăng khi các tế bào này bị phơi nhiễm các tác nhân như stress oxy hoá hoặc thâm thấu hoặc ánh sáng tử ngoại. Các tác nhân này thúc đẩy phát tín hiệu siêu hoạt động của con đường thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu mô (EGFR), con đường này thường bị rối loạn điều tiết ở các khối u rắn của người (17).

Khả năng của các tế bào T V δ 2 phát hiện các tế bào được biến nạp bằng cách sử dụng các TCR của chúng và/hoặc NKG2D (18-20), cùng với các khả năng ly giải tế bào mạnh mẽ của chúng, và một tiềm năng hiển nhiên trình diện các kháng nguyên đến các tế bào T CD8+ (21), gộp lại dẫn đến quan điểm cho là các tế bào T V δ 2 có thể được khai thác trên lâm sàng để chuyển vận liệu pháp miễn dịch ung thư. Cách này có thể đạt được

bằng cách chuyển nhận nuôi các tế bào này, về khía cạnh này, việc không bị hạn chế bởi MHC của các tế bào T $\gamma\delta$ hạn chế một cách đáng kể và có lợi khả năng đối với bệnh cấy ghép chống lại vật chủ (GvHD) (22). Để đạt được điều này, các tế bào T $\gamma\delta$ V γ 9V δ 2 cư trú trong máu có thể được nhân rộng ex vivo bằng cách bổ sung thêm các xytokin như Interleukin (IL)-2, cùng với các tác nhân kích hoạt TCR ngoại sinh như các nhóm phospho (ví dụ BrHPP), hoặc cùng với các bisphosphonat đã được cấp phép trên lâm sàng (ví dụ axit zoledronic) ức chế farnesyl pyrophosphat synthaza trong con đường mevalonat, do đó gây cảm ứng tích lũy nhóm kích hoạt TCR, IPP. Tuy nhiên, kích hoạt mạn tính các tế bào V γ 9V δ 2 thông qua các tác nhân như BrHPP có thể dần dần dẫn đến suy kiệt tế bào và tiềm năng gây độc tế bào giảm.

Theo cách khác, các tế bào T $\gamma\delta$ của chính các bệnh nhân có thể được kích hoạt *in situ* bằng cách sử dụng các dạng được biến đổi về mặt dược lý của HMBPP, hoặc các aminobisphosphonat đã được cấp phép trên lâm sàng. Bằng các cách này, trên 250 bệnh nhân ung thư đã được điều trị, dường như an toàn, nhưng có tỷ lệ rất ít thuyên giảm hoàn toàn. Một bận tâm chủ yếu liên quan đến hiệu lực lâm sàng hạn chế của các tế bào này là xu hướng trở nên bị suy kiệt không phục hồi của chúng do phơi nhiễm kháng nguyên mạn tính. Bận tâm chủ yếu thứ hai là chúng có vẻ bất lực trong việc cư trú ở các khối u rắn và các mô neo giữ các khối u đó (23).

Liệu pháp tế bào T thụ thể kháng nguyên khảm (CAR-T) đang cho thấy có hứa hẹn ở các thể u ác tính tế bào B trên lâm sàng. Tuy nhiên, liên quan đến việc điều trị các khối u rắn, biểu hiện của các tế bào CAR-T cho đến nay là thấp hơn mong đợi thể hiện hiệu quả kém trong việc gây cảm ứng các đáp ứng khối u hoàn toàn và tỷ lệ cao gây độc tính tế bào ngoài khối u (24). Đối với các tế bào T $\gamma\delta$ máu ngoại vi, cản trở chính đối với thành công của các phương pháp CAR-T cho các khối u rắn là tính không có hiệu quả có thể có của các tế bào CAR-T hệ thống di chuyển đến vị trí ác tính và cư trú ở đó ở trạng thái có hiệu quả hoạt động (25). Ngoài ra, dựa vào các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường, các tế bào CAR-T phải khắc phục được các tín hiệu ức chế miễn dịch trong môi trường vi lượng của khối u, ví dụ các tín hiệu được truyền thông qua thụ thể PD1.

Có thể có các lợi ích liên quan đến việc sử dụng các tế bào T $\gamma\delta$ cho các phương pháp CAR-T, vì chúng có thể được tải nạp với các TCR đặc hiệu kháng nguyên khám phản ứng khối u, đồng thời vẫn giữ được các khả năng bẩm sinh của chúng nhận biết các tế bào được biến nạp bằng cách sử dụng các thụ thể như NKG2D. Do đó, chúng có thể đồng thời mang lại các tác dụng qua trung gian (NKG2D) bẩm sinh và thích ứng (TCR) lên các khối u. Tuy nhiên, vẫn có vấn đề là tính có vẻ không có hiệu quả của các tế bào T $\gamma\delta$ của máu người đến cư trú ở các khối u mô rắn và duy trì ở đó ở dạng hoạt tính. Điều này dẫn đến việc xem xét chi tiết hơn các tế bào T $\gamma\delta$ mà thường xuyên cư trú các mô không tạo máu.

Các tế bào T di chuyển đến các mô không tạo máu như là một phần của quá trình phát triển của chúng và như vậy chúng phân biệt với các tế bào T khác, ví dụ các tế bào T ghi nhớ $TCR\alpha\beta^+$ cư trú ở mô (gọi là các tế bào TRM) thâm nhập vào mô sau khi gây miễn cảm sơ bộ hệ thống. Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô chủ yếu được nghiên cứu kỹ ở chuột, ở chuột chúng đã thể hiện là có phổ biến ở da, ruột và các mô sinh sản, ngoài các vị trí khác. Nhiều tế bào này đã chứng tỏ là có tiềm năng hoạt động tương tự bẩm sinh, nhờ đó chúng có thể đáp ứng với các kích thích miễn dịch thông qua kích hoạt thụ thể NKG2D. Các tác giả sáng chế gần đây đã thu được các dữ liệu chứng tỏ là da và ruột của người tương tự cũng có khoảng lớn các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có các hoạt tính tương tự bẩm sinh. Và bất ngờ là nghiên cứu các thể ác tính, viêm nhiễm, tạng dị ứng, dị ứng và các bệnh lý khác hình thành ở các mô không tạo máu phần lớn đã không xem xét tác động tiềm năng của các tế bào T của người tương tự bẩm sinh cư trú ở các mô này, ở đó xuất hiện tổn thương bệnh học.

Các tế bào T $\gamma\delta$ của người cư trú ở các mô không tạo máu chưa được nghiên cứu kỹ bởi vì vị trí khu trú của chúng làm cho khó lấy mẫu các tế bào này, và bởi vì chưa có cách thức thiết lập nuôi cấy chúng. Trong số thông tin tương đối hiếm hoi hiện có, phân nhóm này bao gồm nhiều loại tế bào có tiềm năng huỷ tế bào không bị hạn chế bởi MHC, do chúng không biểu hiện các TCR có chứa $V\gamma 2$, các tế bào này hoàn toàn không phản ứng với các nhóm phospho phân tử lượng thấp. Mặc dù một vài tính đặc hiệu TCR chính xác là đã biết đối với các tế bào này, dữ liệu hiện có gợi ý là các tế bào này phản ứng với

các tự kháng nguyên, như thụ thể protein C biểu mô (EPCR), mà được biểu hiện quá mức bởi các tế bào bị nhiễm virus cự bào (cytomegalovirus - CMV) và bởi nhiều khối u rắn (32). Các tế bào T $\gamma\delta$ liên quan đến mô không tạo máu cũng thường biểu hiện NKG2D (14). Với các tính chất này, và việc cư trú về mặt sinh lý của các tế bào này ở các mô không tạo máu như da và ruột, việc chuyển nhận nuôi các tế bào này cho bệnh nhân ung thư có thể coi là có hiệu quả hơn một cách đáng kể nhằm đích các khối u rắn và tiềm năng ở các bệnh lý miễn dịch khác.

Để khai thác các tế bào không phải là V δ 2 cho liệu pháp miễn dịch đòi hỏi một cách thức nhân rộng các tế bào này *in situ* hoặc thu gom và nhân rộng chúng *ex vivo* trước khi tiêm truyền lại. Cách thứ hai đã được ứng dụng bởi vì không có các tác nhân kích hoạt TCR đã biết mà có khả năng đã được chứng minh là nhân rộng số lượng lớn các tế bào không phải là V δ 2 *in situ*. Để khắc phục thách thức đặt ra là tính khả dụng bị hạn chế của các mô không tạo máu, một số nhà nghiên cứu đã nỗ lực nhân rộng các số lượng rất nhỏ các tế bào không phải là V δ 2 từ máu, trong đó các tế bào biểu hiện V δ 2 là phân nhóm chủ yếu, giả thuyết là các tế bào này là tương đương với các tế bào không phải là V δ 2 cư trú ở mô. Các số lượng nhỏ các tế bào T $\gamma\delta$ không phải là V δ 2 được tìm thấy trong máu nhân rộng một cách đáng kể trong khi bị nhiễm CMV thể hoạt động, thể hiện tính phản ứng ưu việt đối với CMV so với các tế bào T V δ 2, và dường như có khả năng bảo vệ thai nhi của người trong các trường hợp bị nhiễm CMV trong tử cung. Ngoài ra, các tế bào T $\gamma\delta$ không phải là V δ 2 phản ứng CMV có vẻ bảo vệ các bệnh nhân cấy ghép không bị tái kích hoạt CMV trong khi bị ức chế miễn dịch, và thông qua tính phản ứng chéo với các tế bào được biến nạp, làm giảm nguy cơ các thể ác tính thứ cấp (26). Tương tự, có dữ liệu gợi ý là các tế bào T $\gamma\delta$ có các vai trò hữu ích trong kiểm soát nhiễm HIV, trong trường hợp này các tế bào T $\gamma\delta$ không phải là V δ 2 được nhân rộng trong máu so với các tế bào T V δ 2 (24).

Các tế bào không phải là V δ 2 cư trú trong máu đã được nhân rộng *ex vivo* bằng cách bổ sung thêm các tác nhân ngoại sinh mà trực tiếp kích hoạt phát tín hiệu TCR, ví dụ bằng cách sử dụng tác nhân như kháng thể kháng CD3, kháng thể đặc hiệu pan $\gamma\delta$ -TCR hoặc phytohemagglutinin (PHA), hoặc bằng cách đồng nuôi cấy các tế bào T không phải

là Vδ2 được kích thích với các tế bào trình diện kháng nguyên tạo (aAPC), trong đó sự tiếp xúc trực tiếp giữa các tế bào T γδ và aAPC là cần thiết để nhân rộng tế bào T không phải là Vδ2 *ex vivo* (41-44). Theo cách khác, các tế bào này đã được nhân rộng bằng cách tăng cường phát tín hiệu thụ thể NKG2D nhờ sử dụng MICA tái tổ hợp được cố định (phối tử NKG2D), ví dụ như đã được sử dụng để duy trì sự tăng sinh dịch nuôi cấy tế bào T γδ *ex vivo* từ các lympho bào thâm nhiễm ung thư biểu mô (TILs) (28). Tóm lại, các phương pháp hiện có để nhân rộng *ex vivo* các tế bào T γδ trong máu biểu hiện Vδ2 hoặc các tế bào T γδ trong máu không phải là Vδ2 đòi hỏi phải bổ sung thêm các tác nhân, luôn luôn tăng cường kích hoạt các thụ thể TCR và/hoặc NKG2D cùng với các xytokin bổ sung, như interleukin-2 (IL-2) (41-44). Cách kết hợp các tín hiệu kích hoạt thụ thể và các xytokin phản ánh phương pháp tiêu chuẩn để nuôi cấy và nhân rộng các tế bào T, được ứng dụng rộng rãi trong cộng đồng nghiên cứu. Cho đến nay, chưa có phương pháp nào đã mô tả để nhân rộng đáng kể các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu. Phương pháp như vậy được mô tả trong bản mô tả này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như là một phần của xác định đặc tính kiểu hình và chức năng của các tế bào T ở da của người, các tác giả sáng chế đã phân lập một quần thể lớn và phân biệt các tế bào T γδ thường cư trú ở các mô không tạo máu và có các tính chất riêng biệt so với các tế bào T αβ và các tế bào T γδ cư trú ở máu. Các tác giả đã phát hiện ra là các tế bào này thể hiện các đáp ứng mạnh, không phụ thuộc TCR, tương tự bẩm sinh với các phối tử NKG2D và với các xytokin. Trong khi các nỗ lực nhằm nhân rộng các tế bào T αβ sơ cấp thường sử dụng cách đồng nuôi cấy với các tế bào hỗ trợ khác làm nguồn các yếu tố tăng trưởng có lợi (29), các tác giả sáng chế bất ngờ đã chứng tỏ rằng các tế bào T γδ cư trú ở da và các mô không tạo máu khác bị ức chế mạnh và đặc hiệu bằng cách đồng nuôi cấy các tế bào này tiếp xúc với các nguyên bào sợi da tự thân và tiềm năng các thành phần cơ chất khác, như các tế bào keratin và các tế bào biểu mô. Giảm bớt các tương tác này cho phép các tế bào này nhân rộng nhanh chóng với số lượng lớn để cho các ứng dụng tiềm năng trên lâm sàng.

Ngoài ra, trái với các nỗ lực cho đến nay nhằm nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ máu và từ khối u, các tác giả sáng chế đã chứng tỏ rằng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể được nhân rộng mà không cần chủ động bổ sung thêm các tác nhân ngoại sinh bất kỳ mà kích hoạt các con đường phát tín hiệu TCR hoặc NKG2D của chúng.

Sáng chế đề xuất cách thức mới để phân lập một cách hiệu quả và có thể sinh sản và nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người, như da và ruột. Việc nhân rộng này được tăng cường bằng cách làm gián đoạn sự tiếp xúc giữa các tế bào T không phải là V δ 2 thu được từ mô không tạo máu với các nguyên bào sợi tự thân và có thể là các thành phần cơ chất khác, và được duy trì bằng cách nuôi cấy trong interleukin-2 (IL-2) và/hoặc interleukin-15 (IL-15).

Quy trình nhân rộng có tính chọn lọc cao do quy trình nhân rộng các tế bào T $\alpha\beta$ hoặc các tế bào T biểu hiện V δ 2 hoặc các tế bào NK không được cảm ứng bởi sự gián đoạn tiếp xúc của chúng với các nguyên bào sợi tự thân (Fig.3A, Fig.3C, và Fig.3D). Việc nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu bằng cách giải phóng từ quá trình điều biến điểm kiểm soát qua trung gian nguyên bào sợi cũng dẫn đến kích hoạt “tự phát” các tiềm năng hiệu ứng của các tế bào này (Fig.5A và Fig.5B), các tiềm năng này là rất được mong muốn trong trường hợp hoạt tính kháng khối u. Các phát triển này cho phép các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được nhân rộng khi nuôi cấy và được kích hoạt để sử dụng tiềm năng làm các dạng tiêm truyền tế bào “có sẵn” cho bệnh nhân. Đồng thời, việc phát triển kháng thể hoặc dạng chất ức chế khác của quá trình điều biến điểm kiểm soát các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô bởi các nguyên bào sợi (hoặc các tế bào mô đệm hoặc biểu mô khác) cho phép các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được kích hoạt *in situ*, ví dụ ở bệnh nhân ung thư, thông qua phong bế điểm kiểm soát.

Khả năng thu được và phát triển các tế bào T $\gamma\delta$ từ các mô không tạo máu (ví dụ da) đã nhận diện các khác biệt rõ ràng so với các tế bào T V δ 1 thu được từ máu. Ví dụ, các tế bào T V δ 1 thu được từ da thể hiện các chất đánh dấu của quá trình kích hoạt tế bào T trước đó như biểu hiện CD69, dương tính ICOS và TIM3 cũng như rất ít hoặc không biểu hiện phân tử đồng kích thích cổ điển, CD28 (Fig.10A). Ngoài ra, chúng thể hiện biểu

hiện NKG2D mức cao. Trái lại, các tế bào T Vδ1 thu được từ máu của người không biểu hiện CD69 hoặc TIM3, chỉ biểu hiện các mức thấp của ICOS, và cũng dương tính đến mức độ nhất định để biểu hiện CD28. Ngoài ra, mức biểu hiện NKG2D của các tế bào T Vδ1 thu được từ máu ở mức thấp hơn nhiều so với biểu hiện của nó bởi các tế bào T Vδ1 thu được từ da, và trong khi các tế bào T Vδ1 thu được từ da thể hiện tính phản ứng tương tự bẩm sinh với các phối tử NKG2D như MICA tái tổ hợp khi không có kích thích của thụ thể tế bào T, các tế bào T Vδ1 thu được từ máu không thể hiện tính phản ứng này (Fig.10B). Các tế bào T γδ từ các mô không tạo máu như được mô tả trong bản mô tả này cũng có thể thể hiện biểu tăng của CCR3, CD39, CD11b, IL-13 và/hoặc CD9 so với các tế bào T Vδ1 thu được từ máu và các quần thể lympho bào khác.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất phương pháp nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu *in vitro*, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào đã thu được từ mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người khi có mặt IL-2 và/hoặc interleukin-15 (IL-15), trong đó các lympho bào này không tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô trong khi nuôi cấy.

Tốt hơn là, các lympho bào không tiếp xúc trực tiếp với các nguyên bào sợi trong khi nuôi cấy

Các tế bào T γδ thường cư trú ở mô không tạo máu *in vivo*.

Tốt hơn là, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào được thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người khi có mặt IL-2 và IL-15.

Theo một vài phương án, các lympho bào được thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người có thể được nuôi cấy khi không có các chất kích hoạt TCR hoặc các chất đồng kích thích mà gây cảm ứng kích hoạt tế bào T. Ví dụ, các lympho bào có thể được nuôi cấy khi không có mặt các chất chủ vận con đường TCR, ví dụ các chất kích hoạt CD3, như các kháng thể kháng CD3, khi có mặt hoặc không có mặt các chất kích hoạt CD28.

Bổ sung thêm các chất kích hoạt ngoại sinh này của quá trình phát tín hiệu TCR là không cần thiết để nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu bằng cách sử dụng các phương pháp của sáng chế. Do đó, một môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ thích hợp để sử dụng trong các phương pháp của sáng chế có thể không có hoạt tính kích hoạt tế bào T, ví dụ hoạt tính kích hoạt tế bào T $\alpha\beta$ hoặc hoạt tính kích hoạt tế bào T $\gamma\delta$ trong máu, và có thể không kích hoạt hoặc đồng kích thích các TCR.

Ví dụ, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không chứa hoặc về cơ bản không chứa các tác nhân hoặc yếu tố mà kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, như các chất kích hoạt TCR hoặc các chất đồng kích thích TCR, bao gồm các chất chủ vận con đường TCR được bổ sung thêm theo cách ngoại sinh. Môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm IL-2 và/hoặc IL-15. Theo một vài phương án, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng bổ sung, như các xytokin, ngoài IL-2 và/hoặc IL-15. Các yếu tố tăng trưởng thích hợp không thể hiện hoạt tính kích hoạt tế bào T. Theo các phương án khác, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không có các yếu tố tăng trưởng khác ngoài IL-2 và/hoặc IL-15; ví dụ môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể gồm có môi trường cơ bản có bổ sung IL-2 và/hoặc IL-15.

Theo một phương án, các lympho bào thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người có thể được nuôi cấy khi không có các tế bào mô đệm hoặc biểu mô. Ví dụ, các tế bào mô đệm hoặc biểu mô này có thể được loại bỏ trước khi nuôi cấy. Tốt hơn là, các lympho bào thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người có thể được nuôi cấy khi không có các nguyên bào sợi. Ví dụ, các nguyên bào sợi có thể được loại bỏ trước khi nuôi cấy.

Các lympho bào có thể thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người thích hợp bất kỳ, như da, đường tiêu hoá (ví dụ ruột kết hoặc hồi tràng), mô tuyến vú, phổi, gan, tụy, mô mỡ hoặc tiền liệt tuyến.

Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu tốt hơn là các tế bào không phải là V δ 2, đa số thường biểu hiện các TCR có chứa các chuỗi V δ 1, tức là các tế bào V δ 1. Các

tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu cũng có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ gọi là âm tính kép (DN), được xác định là biểu hiện các TCR $\gamma\delta$ không chứa chuỗi V δ 1 hay V δ 2.

Phương pháp này tùy ý bao gồm bước thu được các lympho bào từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người. Ví dụ, các lympho bào có thể thu được từ mẫu mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người. Phương pháp có thể bao gồm cung cấp mẫu mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người và phân tách các lympho bào từ các tế bào không tạo máu của mẫu này để tạo ra một quần thể các lympho bào mà về cơ bản không chứa các tế bào mô đệm.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất phương pháp nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$, phương pháp này bao gồm bước (i) cung cấp quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ đã thu được từ mô không tạo máu; và (ii) nuôi cấy các tế bào T $\gamma\delta$ về cơ bản không có tiếp xúc tế bào mô đệm để tạo ra quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$.

Quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ đã thu được từ mô không tạo máu có thể là quần thể về cơ bản tinh khiết của các tế bào T $\gamma\delta$.

Quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ đã thu được từ mô không tạo máu tốt hơn là các tế bào không phải là V δ 2, đa số thường biểu hiện các TCR có chứa các chuỗi V δ 1, tức là tế bào V δ 1. Quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ cũng có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ DN.

Quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ đã thu được từ mô không tạo máu có thể biểu hiện một hoặc nhiều chất đánh dấu tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô bổ sung, như CLA, IL13, CCL1, CD103 và CCR8. Theo một vài phương án, quần thể các tế bào T $\gamma\delta$ đã thu được từ mô không tạo máu có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1⁺ CCR8⁺.

Các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy khi không có tiếp xúc với các tế bào mô đệm để tạo ra quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$ (tức là không có tiếp xúc giữa các tế bào T $\gamma\delta$ và các tế bào mô đệm trong dịch nuôi cấy tế bào).

Các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy khi không có mặt các tín hiệu kích hoạt TCR hoặc các tín hiệu đồng kích thích TCR. Theo một vài phương án, có thể thực hiện bước nuôi cấy trong môi trường có tế bào mô đệm, hoặc khi có mặt IL-2, IL-15, hoặc tổ hợp của chúng. Ví dụ, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy trong môi trường nhân rộng $\gamma\delta$

bao gồm IL-2 và/hoặc IL-15. Môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ thích hợp có thể không kích hoạt hoặc đồng kích thích các TCR. Ví dụ, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không chứa hoặc về cơ bản không chứa các tác nhân hoặc yếu tố mà kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, như các chất kích hoạt TCR hoặc các chất đồng kích thích TCR, bao gồm các chất chủ vận con đường TCR. Môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm IL-2 và/hoặc IL-15. Theo một vài phương án, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng bổ sung, như các xytokin, ngoài IL-2 và/hoặc IL-15. Các yếu tố tăng trưởng thích hợp không thể hiện hoạt tính kích hoạt tế bào T. Theo các phương án khác, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không có các yếu tố tăng trưởng khác ngoài IL-2 và/hoặc IL-15; ví dụ môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể gồm có môi trường cơ bản có bổ sung IL-2 và/hoặc IL-15.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ bao gồm : (i) cung cấp mô không tạo máu, mô này bao gồm các tế bào không tạo máu và các tế bào T $\gamma\delta$; (ii) phân tách các tế bào T $\gamma\delta$ từ các tế bào không tạo máu để sản xuất một quần thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ mà về cơ bản không chứa các tế bào mô đệm; và (iii) bước nuôi cấy quần thể ở bước (ii) khi không có các tín hiệu kích hoạt TCR hoặc các tín hiệu đồng kích thích TCR để sản xuất một quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$.

Các tế bào T $\gamma\delta$ ví dụ, có thể được phân tách từ các tế bào T $\alpha\beta$.

Quần thể ở bước (ii) có thể là quần thể về cơ bản tinh khiết của các tế bào T $\gamma\delta$.

Các tế bào T $\gamma\delta$ trong quần thể ở bước (ii) có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ không phải là V δ 2, đa số thường biểu hiện các TCR có chứa các chuỗi V δ 1, tức là các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1. Các tế bào T $\gamma\delta$ trong quần thể ở bước (ii) cũng có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ DN.

Các tế bào T $\gamma\delta$ trong quần thể ở bước (ii) cũng có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ mà biểu hiện một hoặc nhiều chất đánh dấu tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô bổ sung, như CLA, CD103 và CCR8. Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ trong quần thể ở bước (ii) có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+CCR8+.

Việc nuôi cấy của bước (iii) có thể về cơ bản không có tiếp xúc tế bào mô đệm với quần thể ở bước (ii) và/hoặc khi không có các tín hiệu kích hoạt TCR hoặc các tín hiệu đồng kích thích TCR. Ví dụ, có thể thực hiện nuôi cấy mà không có tiếp xúc giữa các tế bào T $\gamma\delta$ và các tế bào mô đệm. Theo một vài phương án, việc nuôi cấy của bước (iii) là trong môi trường có tế bào mô đệm hoặc khi có mặt IL-2, IL-15, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy trong môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ bao gồm IL-2 và/hoặc IL-15. Môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ thích hợp có thể không kích hoạt hoặc đồng kích thích các TCR. Ví dụ, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không chứa hoặc về cơ bản không chứa các tác nhân hoặc yếu tố mà kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, ví dụ các chất kích hoạt TCR hoặc các chất đồng kích thích TCR, như các chất chủ vận con đường TCR. Theo một vài phương án, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng bổ sung, như các xytokin, ngoài IL-2 và/hoặc IL-15. Các yếu tố tăng trưởng thích hợp không thể hiện hoạt tính kích hoạt tế bào T. Theo các phương án khác, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể gồm có môi trường cơ bản có bổ sung IL-2 và/hoặc IL-15.

Quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$ theo khía cạnh thứ hai hoặc thứ ba có thể bao gồm các tế bào T $\gamma\delta$ nhiều hơn ít nhất 5 lần, ít nhất 10 lần, ít nhất 15 lần, ít nhất 20 lần, ít nhất 30 lần, ít nhất 40 lần, ít nhất 50 lần, ít nhất 100 lần, ít nhất 500 lần, ít nhất 1000 lần hoặc ít nhất 10000 lần so với các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ mô không tạo máu hoặc được phân tách từ các tế bào không tạo máu. Quần thể được nhân rộng này có thể phát sinh trong vòng 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 10 ngày, 14 ngày, 21 ngày hoặc 28 ngày nuôi cấy.

Các tế bào T $\gamma\delta$ trong quần thể được nhân rộng này tốt hơn là các tế bào T V δ 2⁻. Quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$ có thể bao gồm ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc ít nhất 95% các tế bào V δ 1⁺. Quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$ có thể dương tính ở mức ít nhất là 5%, ít nhất 10%, ít nhất 15%, ít nhất 20%, ít nhất 25%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80% hoặc ít nhất 90% đối với một, hai hoặc cả ba chất trong số CCR4, CCR8 và CD103. Ví dụ, quần thể được nhân rộng này có thể dương tính ít nhất là 10%

đối với CD103, dương tính ít nhất là 30% đối với CCR4 và dương tính ít nhất là 60% đối với CCR8.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu hoặc quần thể của nó thu được bằng phương pháp của khía cạnh thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc chất điều biến điểm kiểm soát của các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu, phương pháp này bao gồm các bước:

(i) nuôi cấy các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu *in vitro* tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc nuôi cấy các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu *in vitro* tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) trong đó biểu hiện của gen thử nghiệm trong các tế bào T γδ và/hoặc trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) được biến đổi; và

(ii) xác định mức độ tăng sinh hoặc kích hoạt các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm này hoặc khi có và không có biến đổi biểu hiện của gen thử nghiệm ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô này (ví dụ các nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T γδ, hoặc xác định tỷ lệ tiêu diệt các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc khi có và không có biến đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T γδ,

trong đó nếu mức độ tăng sinh hoặc kích hoạt các tế bào T cao hơn khi có mặt hợp chất thử nghiệm so với khi không có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc cao hơn khi có biến đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T γδ so với khi không có biến đổi gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên

bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ và/hoặc nếu tỷ lệ tiêu diệt của các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) cao hơn khi có mặt hợp chất thử nghiệm so với khi không có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc cao hơn khi có biến đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ so với khi không có biến đổi gen thử nghiệm này ở các nguyên bào sợi và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$, thì hợp chất thử nghiệm có thể là chất điều biến điểm kiểm soát hoặc gen thử nghiệm có thể là gen điểm kiểm soát ứng viên hoặc chất điều hoà của nó.

Biểu hiện của gen thử nghiệm trong các tế bào T $\gamma\delta$ và/hoặc ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) có thể, ví dụ, được biến đổi nhờ chất nhắm đích ARN, như ARN can thiệp nhỏ (siRNA) hoặc ARN cặp tóc nhỏ (shRNA) hoặc bằng cách chỉnh sửa gen, ví dụ bằng cách sử dụng hệ CRISPR/Cas.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng bằng liệu pháp tế bào T nhận nuôi, trong đó phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của khía cạnh thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế. Đối tượng này tốt hơn là người.

Đối tượng này tốt hơn là bệnh nhân ung thư là người hoặc bệnh nhân nhiễm virus, ví dụ bệnh nhân nhiễm CMV hoặc bệnh nhân nhiễm HIV.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của khía cạnh thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị cho người hoặc động vật không phải người bằng liệu pháp tế bào T nhận nuôi. Tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể có một hoặc nhiều tính chất trong số các tính chất sau:

- (i) thể hiện kiểu hình CD69^{cao}, ICOS^{cao}, TIM3^{cao} và CD28^{thấp/không có}
- (ii) điều tiết tăng một hoặc nhiều chất trong số CCR3, CD11b, CD9 và CD39,
- (iii) sản sinh IFN- γ đáp ứng với phối tử NKG2D khi không có mặt các chất chủ vận TCR,

- (iv) sản sinh IL-13 khi không có mặt các chất chủ vận TCR,
- (v) sản sinh một hoặc nhiều chất trong số IFN- γ , TNF- α và GM-CSF đáp ứng với kích hoạt TCR,
- (vi) không sản sinh hoặc về cơ bản không sản sinh IL-17 đáp ứng với kích hoạt TCR,
- (vii) sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy có chứa IL-2 mà không có yếu tố tăng trưởng bổ sung,
- (viii) thể hiện đáp ứng tế bào T độc tính tế bào khi không có mặt các chất chủ vận TCR, và/hoặc
- (ix) thể hiện độc tính tế bào chọn lọc đối với các tế bào khối u so với các tế bào bình thường.

Theo một phương án được ưu tiên, người là bệnh nhân ung thư hoặc bệnh nhân nhiễm virus, ví dụ bệnh nhân nhiễm CMV hoặc bệnh nhân nhiễm HIV, trong đó nhiễm CMV hoặc HIV là có liên quan đến MICA.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng bằng liệu pháp thụ thể kháng nguyên khảm, phương pháp này bao gồm bước cho đối tượng cần điều trị dùng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của khía cạnh thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế. Đối tượng này tốt hơn là người.

Theo một phương án được ưu tiên, đối tượng này là bệnh nhân ung thư là người.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của khía cạnh thứ nhất, thứ hai hoặc thứ ba của sáng chế để sử dụng trong phương pháp điều trị cho người hoặc động vật không phải là người bằng liệu pháp thụ thể kháng nguyên khảm.

Theo một phương án được ưu tiên, người là bệnh nhân ung thư.

Mỗi phương án trong số các phương án nêu trên có thể được kết hợp với một hoặc nhiều phương án bất kỳ trong số các phương án còn lại.

Các khía cạnh này và các khía cạnh khác của sáng chế được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A- Fig.1D thể hiện da của người bao gồm quần thể đáng kể của các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú. Fig.1A: Các lympho bào cư trú ở da được phân lập bằng cách sử dụng quy trình nuôi cấy tế bào kiểu cơ quan được Clark và các đồng tác giả công bố (29), “the Clark protocol”. Trong các tế bào CD45+, kháng thể kháng CD3 được sử dụng để nhuộm màu cho các tế bào T và kháng thể kháng CD56 tương ứng để nhận diện các tế bào tiêu diệt tự nhiên (NK), CD3- CD56+. Trong các tế bào CD3+, các kháng thể kháng thụ thể tế bào T $\gamma\delta$ pan được sử dụng để nhận diện các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da, và kháng thể kháng CD8alpha để nhận diện tỷ lệ của các tế bào T $\alpha\beta$ dương tính CD4 và CD8 thông thường trong công- pan $\gamma\delta$ TCR, CD3+. Fig.1B thể hiện tóm tắt các thử nghiệm này đối với 7-10 người cho bằng cách sử dụng quy trình Clark. Bằng cách sử dụng quy trình này, các lympho bào trong da của người vẫn tiếp xúc với các nguyên bào sợi của da, và hoàn toàn không bổ sung các xytokin hoặc có bổ sung interleukin-2 (IL-2), interleukin-15 (IL-15) hoặc IL-2 và IL-15 cho thấy việc sử dụng các xytokin không làm thay đổi thành phần lympho bào cư trú ở da ngoại trừ quần thể tế bào T $\gamma\delta$ lớn hơn một chút khi bổ sung môi trường nuôi cấy bằng IL-15 hoặc IL-2 và IL-15, công nhận quy trình của Clark và các đồng tác giả. Các thành phần lympho bào sau 3 tuần nuôi cấy da kiểu cơ quan được thể hiện bằng cách sử dụng các xytokin được chỉ định dưới dạng tóm tắt cho 4 người cho. Fig.1C: Các tế bào $\gamma\delta$ cư trú ở da bao gồm chủ yếu các tế bào T $\gamma\delta$ biểu hiện V δ 1 (76,24% $\pm$ 17,3), một quần thể nhỏ của các tế bào T biểu hiện V δ 2 (3,06% $\pm$ 6,1) và một quần thể các tế bào dương tính pan- $\gamma\delta$ TCR mà nhuộm màu âm tính đối với V δ 1 hoặc V δ 2, còn được đề cập đến trong bản mô tả này là các tế bào T $\gamma\delta$ âm tính kép (DN) (20,7% $\pm$ 13,97). Nhuộm màu đối chứng máu của người tình nguyện khoẻ mạnh cho thấy sự phân vùng mạnh mẽ của các tế bào T $\gamma\delta$ của người, vì trong máu, quần thể chiếm ưu thế của các tế bào T $\gamma\delta$ có biểu hiện chuỗi TCR V δ 2. Fig.1D: Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện các chất đánh dấu trước đó có liên quan đến các tế bào T mà đã được kích hoạt mạn tính, mặc dù các chất đánh dấu này là các chất chỉ thị dấu hiệu cho việc cư trú ở mô

chứ không nhất thiết phản ánh sự kích hoạt mạn tính. Các biểu đồ thể hiện nhuộm màu các chất đánh dấu được chỉ ra trên các tế bào T $\gamma\delta$ (biểu đồ tô đậm) so với đối chứng isotyp thích hợp đối với mỗi kháng thể (biểu đồ không tô đậm).

Fig.2A - Fig.2D thể hiện các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thu được trực tiếp từ da của người bằng quy trình Clark thể hiện đáp ứng được gọi là thiên hướng TH1 khi kích hoạt bằng các cách thông thường để kích hoạt các tế bào T và tương tự thể hiện đáp ứng thiên hướng TH1 khi kích hoạt bằng các phối tử NKG2D đơn độc. Fig.2A: Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện biểu hiện mạnh của thụ thể kích hoạt và liên kết tế bào NK NKG2D (biểu đồ tô đậm, trái với isotyp được biểu thị bằng biểu đồ không tô đậm). Khi kích hoạt bằng cách sử dụng MICA tái tổ hợp gắn kết đĩa, một trong số các phối tử đã biết cho các thụ thể NKG2D, các tế bào T $\gamma\delta$ của da đáp ứng mà không có kích thích nào khác bất kỳ và không phụ thuộc vào quá trình nổi TCR do đáp ứng này mất đi khi có mặt các kháng thể NKG2D phong bế. Các tế bào này được kích thích trong 6 giờ khi có mặt brefeldin A và 100 đơn vị IL-2/ml và sau đó được phân tích để khử hạt bằng cách nhuộm màu đối với CD107a. Sản sinh TNF α và INF- γ được phân tích bằng cách tạo tính thấm sau khi nhuộm màu bề mặt và nhuộm màu sau đó các xytokin nội bào. Phorbol 12-myristat 13-axetat (P) kết hợp với ionomycin (I) được sử dụng làm đối chứng dương để kích hoạt các tế bào T. Fig.2B: Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện đáp ứng thiên hướng TH1. Các tế bào T $\gamma\delta$ được thu hồi theo quy trình Clark và được kích thích bằng PMA và ionomycin trong 6 giờ khi có mặt brefeldin A và được nhuộm màu đối với các xytokin nội bào. Các tế bào T $\gamma\delta$ mới được phân lập từ da của người sản sinh TNF α và IFN- γ khi kích thích, nhưng chỉ lượng rất nhỏ hoặc không thể phát hiện của các xytokin, ví dụ IL-4, IL-17A, IL-13, IL-22, mà liên kết với các tế bào TH2 hoặc TH-17, trong khi đó các tế bào T $\alpha\beta$ CD4 $^{+}$ thông thường thể hiện sự sản sinh nhiều loại xytokin hơn. Fig.2C: Trong số các lympho bào thu được trực tiếp từ da của người, các mức độ biến thiên của thụ thể NKG2D được biểu hiện bởi các tế bào T $\gamma\delta$, các tế bào T $\alpha\beta$ CD8a $^{+}$ thông thường và các tế bào NK. Trong số các tế bào này, các tế bào NK đáp ứng khi phơi nhiễm các phối tử NKG2D đơn độc, nhưng trong số các tế bào T, chỉ quần thể tế bào T $\gamma\delta$ thể hiện đáp ứng xytokin khi kích thích bằng các phối tử NKG2D khi không có kích thích TCR bất kỳ (xem đồ thị hàng trên của

các đồ thị đếm tế bào dòng chảy). Đáp ứng này có thể bị phong bế bằng cách sử dụng các kháng thể kháng NKG2D phong bế có thể hoà tan chỉ ra rằng đáp ứng này được điều tiết riêng biệt thông qua thụ thể NKG2D. Fig.2D: Trong số các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da, chỉ các tế bào T V δ 1 và các tế bào T $\gamma\delta$ DN thể hiện tiềm năng tương tự bẩm sinh là bị kích hoạt bởi MICA tái tổ hợp đơn độc (được biểu thị bằng dấu *). Các tế bào T biểu hiện V δ 2 được tìm thấy với lượng nhỏ trong da không thể hiện đáp ứng này.

Fig.3A- Fig.3D thể hiện các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da chỉ đáp ứng khi phân tách từ tế bào mô đệm da bằng kích hoạt và tăng sinh mạnh. Fig.3A: Các lympho bào cư trú ở da được phân lập bằng cách sử dụng quy trình Clark. Sau 3 tuần nuôi cấy kiểu cơ quan, các lympho bào da được thu gom và được phân tách từ các tế bào da còn lại bất kỳ bao gồm các nguyên bào sợi và cho vào các giếng nuôi cấy mô ở mật độ 1 triệu lympho bào/ml và có bổ sung 100 U/ml IL-2. Sau 3 tuần nữa, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú đã nhân rộng mạnh mẽ và được làm giàu trong dịch nuôi cấy lympho bào da. Hiện tượng tăng sinh mạnh mẽ này là chỉ ở các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da, được biểu thị bởi đa số các tế bào T V δ 1+ mà đã tăng sinh trung bình gấp 127,18 lần trong 3 tuần, trong khi đó các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường chỉ tăng sinh trung bình gấp 5,21 lần; nghĩa là kém hơn trên 20 lần. Fig.3B: Các tế bào T V δ 1 cư trú ở da đáp ứng với việc mất mô bằng cách điều tiết tăng mạnh chất đánh dấu Ki-67 (chỉ thị cho chu trình tế bào) trong 14 ngày (đối chứng isotyp được biểu thị bởi biểu đồ không tô đậm được viền bằng đường nét đứt; biểu hiện Ki-67 ở ngày 0 được biểu thị bởi biểu đồ không tô đậm; biểu hiện Ki-67 ở ngày 7 được biểu thị bởi biểu đồ màu ghi nhạt; biểu hiện Ki-67 ở ngày 14 nhuộm màu được biểu thị bởi biểu đồ màu ghi sẫm). Ngoài ra, các tế bào T V δ 1 cư trú ở da, mà đa số là âm tính đối với thụ thể IL-2 alpha (CD25) khi tiếp xúc với mô đệm của da, điều tiết tăng CD25 sau khi phân tách từ mô này (đối chứng isotyp: biểu đồ viền đường nét đứt, ngày 0 nhuộm màu: biểu đồ màu ghi nhạt, ngày 7 nhuộm màu: biểu đồ màu ghi sẫm).

Fig.3C: Tốc độ chu trình tế bào cao như chỉ ra bởi cường độ huỳnh quang trung vị (MFI) của Ki-67 chỉ nhận thấy ở các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da, được biểu thị bởi các tế bào T V δ 1+, và không được nhận thấy ở cả các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường hay ở các tế bào NK, trong đó MFI thực tế giảm đi trong 14 ngày. Fig.3D: Các lympho bào da được phân

tách từ các tế bào mô đệm thể hiện quần thể tế bào T $\gamma\delta$ cư trú được làm giàu nhiều sau 3 tuần nuôi cấy. Quần thể tế bào T $\gamma\delta$ này có chứa đa số các tế bào dương tính V δ 1 (77,49% $\pm$ 17,04) và các tế bào T DN dương tính pan $\gamma\delta$ TCR (21,46% $\pm$ 16,92). Quần thể tế bào T V δ 2 nhỏ ban đầu được nhận thấy ở các lympho bào da mới được thu gom bằng cách sử dụng quy trình Clark, giảm dần và gần như mất đi (0,6% $\pm$ 1,204) sau 3 tuần nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ mô.

Fig.4A và Fig.4B thể hiện các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da đáp ứng với việc mất mô và được kiểm soát thông qua cơ chế phụ thuộc tiếp xúc của các tế bào mô đệm da, cụ thể là các nguyên bào sợi. Fig.4A: các lympho bào da hỗn hợp được thu gom sau khi nuôi cấy kiểu cơ quan như trong quy trình Clark sau 3 tuần. Các lympho bào đã trộn sau đó được nhân giống lên trên lớp hợp dòng của các nguyên bào sợi da tự thân và trong đĩa Transwell để kiểm soát sự có mặt của các chất ức chế hoà tan do các nguyên bào sợi sản sinh ra. Sau 14 ngày, xác định sự nhân rộng theo số lần được tính bằng số lượng tế bào tuyệt đối có mặt của các tế bào T $\gamma\delta$ và các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường. Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện đáp ứng tăng sinh mạnh khi được phân tách khỏi mô và khi có mặt các nguyên bào sợi, nhưng chỉ khi không tiếp xúc tế bào trực tiếp với các nguyên bào sợi tự thân. Các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường không thể hiện đáp ứng này trong điều kiện bất kỳ được thử nghiệm. Fig.4B: các lympho bào hỗn hợp đã thu được từ nuôi cấy kiểu cơ quan được nhân giống lên trên lớp đơn các nguyên bào sợi tự thân (biểu đồ màu ghi nhạt) hoặc được nhân giống vào các giếng rỗng (biểu đồ màu ghi sẫm) có bổ sung IL-2 và được nuôi cấy trong 7 ngày. Các tế bào T V δ 1 cư trú ở da (panen bên trái) cũng như các tế bào T, DN, pan $\gamma\delta$ TCR+, (panen bên phải) vẫn không hoạt động khi có mặt trực tiếp các nguyên bào sợi nhưng thể hiện kích hoạt mạnh khi được phân tách từ dịch nuôi cấy kiểu cơ quan ở da và không có mặt các nguyên bào sợi như được chỉ ra bởi mức biểu hiện được điều tiết tăng (MFI) của CD25, yếu tố phiên mã kết hợp TH T-bet, và chất đánh dấu chu trình tế bào Ki-67 (biểu đồ không tô đậm, gạch nét đứt biểu thị đối chứng isotyp tương ứng).

Fig.5A và Fig.5B cho thấy các tế bào T $\gamma\delta$ của da nhân rộng thể hiện các dấu hiệu khử kìm hãm và có được tiềm năng độc tính thể bào mạnh. Fig.5A: Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da được để nhân rộng trong 14 ngày sau khi tách khỏi dịch nuôi cấy tế bào kiểu cơ

quan. Các tế bào T $\gamma\delta$ tiếp đó được phân loại đếm tế bào dòng chảy âm tính bằng cách loại trừ tất cả các tế bào T thông thường được nhuộm màu bằng kháng thể đơn dòng pan $\alpha\beta$ TCR. Sau đó 150.000 tế bào T $\gamma\delta$ đã được phân loại được gieo vào đĩa nuôi cấy 96 giếng phẳng, lặp lại hai lần và để nuôi cấy không có bổ sung xytokin cũng như không bổ sung phối tử kích hoạt bất kỳ trong 24 giờ. Các dịch nổi được thu gom và được phân tích xytokin đã sản sinh bằng cách sử dụng bảng xytokin dựa trên LUMINEX® của Affymetrix. Fig.5B: các tế bào T $\gamma\delta$ đã được phân loại âm tính cũng được nhân giống lên các dòng tế bào ung thư được nhân giống 1 ngày trước đó ở nồng độ 10.000 tế bào/giếng. Các tế bào T $\alpha\beta$ của da thông thường đã được phân loại âm tính được sử dụng làm đối chứng. Các tế bào T được nhân giống theo tỷ lệ chất hiệu ứng: tỷ lệ đích được chỉ ra khi có mặt và không có mặt kháng thể NKG2D phong bế khi có mặt IL-2 ở 100U/ml. Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện khả năng tiêu diệt tốt, như được thể hiện bởi sự giải phóng xytokeratin 18 (CK18) đặc hiệu biểu mô bị phân cắt bởi caspaza được xác định bằng ELISA, của các dòng tế bào ác tính so với các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường. Độc tính tế bào được điều tiết ít nhất một phần qua thụ thể NKG2D, như chứng tỏ bởi hiện tượng giảm độc tính này trong các dịch nuôi cấy có chứa kháng thể phong bế thụ thể NKG2D.

Fig.6A-Fig.6D thể hiện phân tích của các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô trong ruột của người. Fig.6A: Sự đáp ứng quy trình Clark cho phép phân lập các lympho bào cư trú ở ruột. Các lympho bào của ruột hỗn hợp có chứa quần thể lớn các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô thường bao gồm chủ yếu các tế bào V δ 1, nhưng cũng có chứa V δ 2 và các tế bào T $\gamma\delta$ âm tính kép. Fig.6B: các tế bào T $\gamma\delta$ được phân lập từ dịch nuôi cấy kiểu cơ quan ruột thể hiện các đáp ứng tương tự với các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da ở chỗ chúng điều tiết tăng Ki-67 theo thời gian khi chúng được phân tách từ mô đệm của ruột. Fig.6C: Các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ ruột đáp ứng với các tác nhân kích thích tương tự bẩm sinh như MICA tái tổ hợp bằng cách sản sinh IFN- γ và bằng cách khử hạt, như được xác định theo mức điều tiết tăng CD107a. Fig.6D: các tế bào T $\gamma\delta$ được phân lập từ dịch nuôi cấy sinh trưởng tạo cơ quan ruột thể hiện các đáp ứng tương tự với các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da và nhân rộng theo thời gian trong nuôi cấy tế bào như được nhận thấy bằng cách làm giàu tổng thể trong các dịch nuôi cấy lympho bào mà không có tiếp xúc với mô đệm của ruột.

Fig.7A và Fig.7B thể hiện kiểu hình mô của các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da đã nhân rộng. Fig.7A: Các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da nhuộm màu dương tính đối với kháng nguyên lympho bào của da (CLA), các thụ thể chemokin cư trú ở da CCR4 và CCR8. Fig.7B: Các mức biểu hiện là khác nhau trên các tế bào T $\gamma\delta$ đã nhân rộng lần lượt thu được từ da hoặc máu.

Fig.8 thử nghiệm khử kìm hãm các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da, mà không có bất kỳ kích thích nào của TCR, dẫn đến sản sinh xytokin TH-1 tức thời và thú vị là và trái ngược với các tế bào T $\gamma\delta$ được kích hoạt TCR, mới, trong sản xuất xytokin dị ứng IL-13. Phù hợp với các tế bào T $\gamma\delta$ mới thu được, các tế bào T $\gamma\delta$ được khử kìm hãm và nhân rộng sản xuất lượng không đáng kể các xytokin liên quan đến-TH-2, ví dụ IL-4 và IL-5. Các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da được để nhân rộng trong 14 ngày và được phân loại âm tính bằng cách loại trừ các tế bào T $\alpha\beta$ thông thường. 150.000 tế bào T $\gamma\delta$ hỗn hợp được nuôi cấy ở mật độ 1 triệu tế bào/ml trong đĩa phẳng 96 giếng, lặp lại hai lần, cho 4 người cho mà không có kích thích hoặc bổ sung xytokin bất kỳ. Các dịch nổi được thu gom sau 24 giờ và được phân tích bằng cách sử dụng bảng xytokin dựa trên LUMINEX® của Affymetrix.

Fig.9A - Fig.9C thể hiện các tế bào T $\gamma\delta$ đã nhân rộng và được phân loại âm tính thu được từ da thể hiện độc tính tế bào mạnh kháng lại nhiều loại dòng tế bào khối u của người mà được đồng nuôi cấy (Fig.9A: HCT1954, Fig.9B: HCT116, Fig.9C: MD231) như được đo bằng mức giải phóng xytokeratin 18 được phân cắt bởi caspaza bởi các tế bào đích, bằng cách sử dụng ELISA.

Fig.10A và Fig.10B thể hiện các tế bào T V δ 1 thu được từ da không được nhân rộng, mới thể hiện các chất đánh dấu cho quá trình kích hoạt tế bào T trước đó. Fig.10A: Các tế bào T V δ 1 thu được từ da biểu hiện CD69, ICOS và TIM3 ở mức cao và CD28 ở mức thấp. Ngoài ra, chúng thể hiện mức biểu hiện cao chất đánh dấu kích hoạt NKG2D. Kiểu hình này được duy trì bởi các tế bào T V δ 1 thu được từ da trong quá trình nhân rộng in vitro. Trái lại, các tế bào T V δ 1 thu được từ máu của người không có các dấu hiệu kích hoạt này, không biểu hiện CD69 hoặc TIM3, và chỉ biểu hiện các mức nhỏ của ICOS. So với các tế bào T V δ 1 thu được từ da, mức biểu hiện NKG2D trên các tế bào T V δ 1 thu được từ máu thấp hơn nhiều, trong khi đó các tế bào T V δ 1 thu được từ máu biểu hiện

phân tử đồng kích thích CD28. Fig.10B: Chỉ các tế bào T Vδ1 thu được từ da phản ứng với các phối tử NKG2D như MICA tái tổ hợp khi không có mặt các tác nhân kích thích khác, như phối tử cho thụ thể tế bào T. Các tế bào T Vδ1 hoặc Vδ2 thu được từ máu không thể hiện độ đáp ứng với các tác nhân kích thích tương tự bẩm sinh. Các tế bào này được nhân giống vào các đĩa 96 giếng với MICA tái tổ hợp hoặc các kháng thể kháng CD3 hoặc cả hai như được chỉ ra. Các tế bào này được nuôi cấy trong 6 giờ trong IL-2 100U/ml và BFA trong 4 giờ cuối cùng, tiếp đó nhuộm màu kháng nguyên bề mặt, tạo tính thấm và nhuộm màu nội bào cho IFN- γ .

Fig.11 thể hiện rằng các tế bào T Vδ1 thu được từ da biểu hiện các mức CD16 thấp, nhưng thể hiện có biểu hiện đáng kể thụ thể IgG ái lực cao CD64. Do đó, ngoài hoạt tính độc tính tế bào trực tiếp, các tế bào T Vδ1 thu được từ mô cũng có thể được sử dụng để làm gia tăng hiệu lực của các liệu pháp kháng thể đơn dòng như các liệu pháp CD20 hoặc Her2 do các liệu pháp này sẽ được dẫn hướng bởi kháng thể đến các vị trí ác tính và di căn, nhận biết các tế bào khối u được opsonin hoá và tiêu diệt chúng thông qua độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Các kết quả được thể hiện là từ một người cho đại diện (trong số 4 người).

FIG.12 thể hiện sự nhân rộng của các tế bào T Vδ1 trong IL-2 (panen bên trái), IL-15 (panen ở giữa) và IL-2 + IL-15 (panen bên phải). Các lympho bào thu được từ da mới được phân lập được nuôi cấy trong các đĩa đáy bằng 96 giếng trong môi trường RPMI có chứa 10% FCS và 1% Pen/Strep và lần lượt được bổ sung IL-2, hoặc IL-15 hoặc IL-2+IL-15 trong 7 ngày. Cả IL-2 và IL-15 cũng như kết hợp cả hai xytokin gây cảm ứng tăng sinh các tế bào T Vδ1 như được chỉ ra bởi sự dịch chuyển nhuộm màu KI-67 so với nhuộm màu isotyp (âm tính thực sự) khi không có mặt các tế bào mô đệm bất kỳ. Ki-67 chỉ nhuộm màu các tế bào mà đã qua giai đoạn G0 của chu trình tế bào và thường liên quan đến sự tăng sinh.

Fig.13 thể hiện các kết quả đếm tế bào dòng chảy mà cho thấy có biểu hiện CD9, CCR3 và CD39 trên bề mặt các tế bào T $\gamma\delta$ Vδ1 đã nhân rộng vào ngày 21. Các tế bào T Vδ1 thu được từ da đã nhân rộng duy trì các mức cao của các chất đánh dấu bề mặt tế

bào, CCR3, CD39 và CD9 như được chỉ ra bằng (biểu đồ sẫm màu) so với nhuộm màu isotyp tương đương (âm tính thực sự, biểu đồ không được tô màu).

Fig.14 thể hiện có biểu hiện mARN của CCR3 và CD9 ở các tế bào T Vδ1 thu được từ da (các thanh sẫm) và các tế bào T Vδ1 thu được từ máu (các thanh nhạt). Các tế bào T Vδ1 thu được từ da được nhân rộng như được đề cập trong bản mô tả này, và các tế bào T Vδ1 thu được từ máu được nhân rộng bằng cách sử dụng các kháng thể gắn kết đĩa cho thụ thể tế bào T Vδ (20μg/ml). Sau khi nhân rộng, các tế bào T Vδ1 được phân lập bằng cách sử dụng cách phân loại tế bào được kích hoạt huỳnh quang (FACS) và ARN được phân lập từ 3 người cho cho cả hai nhóm (máu=màu ghi so với da=màu đen). mARN toàn phần được giải trình tự và mức độ biểu hiện của các mARN được chỉ ra được chuẩn hoá và biến đổi log 2. Tất cả các mức biểu hiện được thể hiện theo cách so sánh trực tiếp, và theo tỷ lệ với GAPDH, một gen quản gia hay gặp được biểu hiện ở các mức cao ở đa số các tế bào của người.

Fig.15 thể hiện biểu hiện mARN của IL-13 ở các tế bào T Vδ1 thu được từ da (các thanh sẫm) và các tế bào T Vδ1 thu được từ máu (các thanh nhạt). Các tế bào T Vδ1 thu được từ da được nhân rộng như được đề cập trong bản mô tả này, và các tế bào T Vδ1 thu được từ máu được nhân rộng bằng cách sử dụng các kháng thể liều cao gắn kết đĩa cho thụ thể tế bào T Vδ (20μg/ml). Sau khi nhân rộng, các tế bào T Vδ1 được phân lập bằng cách sử dụng FACS và ARN được phân lập từ 3 người cho cho cả hai nhóm (máu=màu ghi so với da=màu đen). mARN toàn phần được giải trình tự và các mức biểu hiện của ARN_{tt} cho IL-13 được chuẩn hoá và biến đổi log 2. Tất cả các mức biểu hiện được thể hiện theo cách so sánh trực tiếp, và theo tỷ lệ với GAPDH.

Fig.16A và Fig.16B thể hiện sự sản sinh các xytokin ở các tế bào T Vδ1 thu được từ da sau khi kích thích TCR bằng PMA/Ionomycin (Fig.16A) hoặc kháng CD3 (Fig.16B). Sau khi phân lập và nhân rộng, các tế bào T Vδ1 thu được từ da được tinh chế bằng cách sử dụng phương pháp sắp xếp tế bào được kích hoạt huỳnh quang (FACS). 150000 tế bào T Vδ1 được nhân giống vào đĩa đáy bằng 96 giếng, lặp lại hai lần cho 3 người cho và được kích thích bằng kháng CD3 gắn kết đĩa (5μg/ml) hoặc

PMA/Ionomyxin trong 24 giờ. Các dịch nổi được phân tích các lượng tuyệt đối của các xytokin được chỉ ra bằng cách sử dụng hệ thống LUMINEX®.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tế bào T delta gamma (các tế bào T $\gamma\delta$) là phân nhóm nhỏ các tế bào T mà biểu hiện trên bề mặt của chúng, thụ thể tế bào T (TCR) xác định, phân biệt. TCR này gồm có một chuỗi gamma (γ) và một chuỗi delta (δ).

Có hai phân nhóm tế bào T $\gamma\delta$ chính của người: một loại chủ yếu trong máu ngoại vi và một loại chủ yếu ở các mô không tạo máu.

Việc khu trú ở mô không tạo máu của phân nhóm tế bào T $\gamma\delta$ thứ hai của người làm cho khó lấy mẫu hơn và chưa có cách thức được thiết lập để nuôi cấy các tế bào này. Để đáp ứng nhu cầu này, sáng chế đề cập tới phương pháp nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu, theo cách khác được gọi trong bản mô tả này là các tế bào T $\gamma\delta$ nguyên thủy ở mô không tạo máu. Các tế bào T $\gamma\delta$ này thường cư trú ở các mô không tạo máu. Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu để sử dụng như được mô tả trong bản mô tả này có nguồn gốc từ hoặc thu được từ mô không tạo máu. Các mô không tạo máu có thể có chứa các tế bào không tạo máu và các tế bào T $\gamma\delta$.

Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này đề xuất cách thức nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ từ mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người bất kỳ mà có thể lấy từ một bệnh nhân, bao gồm da, đường tiêu hoá (ví dụ ruột kết), mô tuyến vú, phổi, tiền liệt tuyến, gan, lách và tụy. Các tế bào T $\gamma\delta$ cũng có thể cư trú ở các mô ung thư của người, ví dụ các khối u vú và tiền liệt tuyến. Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể là từ các mô ung thư của người. Theo các phương án khác, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể là từ mô không tạo máu ngoại trừ mô ung thư của người.

Các tế bào T $\gamma\delta$ mà chủ yếu ở máu cơ bản là các tế bào T V δ 2, trong khi các tế bào T $\gamma\delta$ chủ yếu ở các mô không tạo máu cơ bản là các tế bào T V δ 1, sao cho các tế bào T V δ 1 bao gồm khoảng 70-80% quần thể tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu. Tuy nhiên, một số tế bào T V δ 2 cũng tìm thấy ở các mô không tạo máu, ví dụ ở ruột, ở đây chúng có thể bao gồm khoảng 10-20% tế bào T $\gamma\delta$ (Fig.6). Một số các tế bào T $\gamma\delta$ mà cư

trú ở các mô không tạo máu không biểu hiện TCR V δ 1 hay V δ 2 và các tác giả đã đặt tên chúng là các tế bào T $\gamma\delta$ âm tính kép (DN). Các tế bào T $\gamma\delta$ DN này có thể đa số biểu hiện V δ 3 với lượng nhỏ các tế bào biểu hiện V δ 5.

Do đó, các tế bào T $\gamma\delta$ mà thông thường cư trú ở các mô không tạo máu và được nhân rộng bằng phương pháp của sáng chế tốt hơn là là các tế bào T không phải là V δ 2, ví dụ các tế bào T V δ 1, với bao gồm lượng nhỏ hơn các tế bào T $\gamma\delta$ DN.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các tế bào T $\gamma\delta$ “âm tính kép” (các tế bào T $\gamma\delta$ DN) chỉ các tế bào T $\gamma\delta$ mà biểu hiện các thụ thể $\gamma\delta$ (có nghĩa là, nhuộm màu dương tính đối với pan-TCR) nhưng âm tính đối với các thụ thể V δ 1 và V δ 2. Các tế bào T $\gamma\delta$ DN bao gồm các tế bào biểu hiện các thụ thể V δ ngoại trừ V δ 1 và V δ 2 (ví dụ, V δ 3, V δ 4, V δ 5, hoặc V δ 8). Tế bào có thể được xác định đặc tính là dương tính đối với chất đánh dấu (ví dụ, V δ 1⁺) nếu biểu hiện chất đánh dấu của nó là cao hơn tế bào đối chứng âm tính như được xác định bằng các phương pháp cổng FACS tiêu chuẩn.

Phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào được thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người *in vitro*.

Các lympho bào có thể thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người thích hợp bất kỳ. Mô không tạo máu là mô ngoại trừ máu, tuỷ xương, hoặc mô tủy ức. Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ không thu được từ các loại mẫu dịch sinh phẩm cụ thể, như máu hoặc hoạt dịch. Các ví dụ về các mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người bao gồm da hoặc một phần của nó (ví dụ, hạ bì, biểu bì), đường tiêu hoá (ví dụ biểu mô dạ dày-ruột, ruột kết, ruột non, dạ dày, ruột thừa, manh tràng, hoặc trực tràng), mô tuyến vú, phổi (tốt hơn là trong đó mô này không thu được bằng cách rửa phế quản-phế nang), tiền liệt tuyến, gan, lách và tụy. Các tế bào T $\gamma\delta$ cũng có thể cư trú ở các mô ung thư của người, ví dụ vú và tiền liệt tuyến. Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ không thu được từ mô ung thư của người. Các mẫu mô không tạo máu có thể thu được bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn ví dụ, bằng cách cấy mô bên ngoài (ví dụ, sinh thiết).

Các lympho bào có thể thu được bằng phương pháp thích hợp bất kỳ cho phép phân lập các lympho bào từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người. Một phương pháp như vậy được đưa ra trong tài liệu của Clark và các đồng tác giả (29), mô tả quy trình cấy mô bên ngoài da ba chiều để phân lập các lympho bào từ da của người. Mô cấy bên ngoài có thể được bám dính vào khung lưới tổng hợp để tạo thuận lợi cho lympho bào thoát ra khỏi mô cấy bên ngoài lên trên khung lưới. Khung lưới tổng hợp chỉ cấu trúc ba chiều không phải nguyên thủy thích hợp để hỗ trợ tăng trưởng tế bào. Các khung lưới tổng hợp có thể được xây dựng từ các nguyên liệu như các polyme (ví dụ, các polyme tự nhiên hoặc tổng hợp, ví dụ, các poly vinyl pyrrolidon, polymethylmetacrylat, methyl xenluloza, polystyren, polypropylen, polyuretan), gốm (ví dụ, tricanxi phosphat, canxi aluminat, canxi hydroxyapatit), hoặc các kim loại (tantali, titan, platin và các kim loại trong cùng nhóm nguyên tố như platin, niobi, hafni, vonfram, và tổ hợp các hợp kim của chúng). Các yếu tố sinh học (ví dụ, collagen (ví dụ, collagen I hoặc collagen II), fibronectin, laminin, integrin, yếu tố sinh mạch, yếu tố chống viêm, glycosaminoglycan, vitrogen, kháng thể và các mảnh của chúng, các xytokin (ví dụ, interleukin-2 (IL-2) hoặc interleukin-15 (IL-15), và tổ hợp của chúng) có thể được phủ lên bề mặt khung lưới này hoặc được đóng nang bên trong vật liệu khung lưới để tăng cường sự bám dính, di chuyển, sống sót hoặc tăng sinh của tế bào, theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Phương pháp này và các phương pháp khác có thể được sử dụng để phân lập các lympho bào từ một số loại mô không tạo máu khác, ví dụ ruột, tiền liệt tuyến và vú. Các ví dụ khác về các phương pháp thích hợp bao gồm thủy phân bằng enzym mô này và phương pháp “bò ra” được Carrasco và các đồng tác giả (30) mô tả, trong đó mô được cắt nhỏ và IL-2 được thêm vào sao các lympho bào “bò ra”.

Như đề cập ở trên, mô không tạo máu thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng, như da, đường tiêu hoá (ví dụ ruột kết), mô tuyến vú, phổi, tiền liệt tuyến, gan, lách và tụy.

Các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu tốt hơn là thu được từ mô của người. Tuy nhiên, các tế bào này có thể thu được từ mô không tạo máu từ động vật không phải là người thích hợp bất kỳ, như chuột nhắt, chuột cống, chó, ngựa, và lợn.

Bước quan trọng là bước tách chủ động, ví dụ sau một vài ngày ngày hoặc tuần nuôi cấy, các tế bào T cư trú ở mô không tạo máu (ví dụ trong quần thể lympho bào hỗn hợp, mà ví dụ có thể bao gồm các tế bào T $\alpha\beta$, $\gamma\delta 2$ và không phải là $\gamma\delta 2$) cách xa các tế bào không tạo máu, (ví dụ các tế bào mô đệm, cụ thể là các nguyên bào sợi) của mô mà từ đó thu được các tế bào T, và quá trình nuôi cấy tiếp theo của các tế bào này dưới dạng các lympho bào trong các xytokin như được mô tả dưới đây. Quá trình này cho phép nhân rộng chọn lọc và được đánh dấu các tế bào T $\gamma\delta$ DN và $\gamma\delta 1$ thu được từ mô trong các ngày và tuần sau đó.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “quy trình phân tách”, “được phân tách” hoặc “phân tách” chỉ hành động phá vỡ hoặc ngăn cản sự tiếp xúc vật lý giữa các quần thể tế bào phân biệt. Phân tách có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách dùng lực hút bằng pipet quần thể hỗn hợp các tế bào này để phá vỡ liên kết giữa các màng, hoặc bằng cách gây cảm ứng “bò ra” của quần thể các tế bào này từ, ví dụ, chất nền mô, bằng cách nuôi cấy với, ví dụ, các chemokin hoặc các xytokin, như Carrasco và các đồng tác giả (30) mô tả. Quy trình phân tách có thể được duy trì trong khi nuôi cấy bằng cách sử dụng hệ nuôi cấy Transwell hoặc bằng các phương pháp nuôi cấy tương tự mà ngăn ngừa sự tiếp xúc vật lý giữa các quần thể tế bào phân biệt.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “về cơ bản tinh khiết” chỉ độ tinh khiết lớn 90% theo số lượng, khối lượng hoặc thể tích. “Về cơ bản không chứa” chỉ có ít hơn 5% theo số lượng, khối lượng hoặc thể tích của một thành phần đã cho. Các lympho bào thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người có thể được nuôi cấy trong ít nhất 3 ngày, ít nhất 4 ngày, ít nhất 5 ngày, ít nhất 6 ngày, ít nhất 7 ngày, ít nhất 8 ngày, ít nhất 9 ngày, ít nhất 10 ngày, ít nhất 2 tuần, ít nhất 3 tuần, hoặc ít nhất 4 tuần.

Phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào được thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người khi có mặt IL-2. Nồng độ của IL-2 tốt hơn là ít nhất là 10 đơn vị quốc tế/ml (IU/ml, hoặc U/ml), ít nhất 20 U/ml, ít nhất 30 U/ml, ít nhất 40 U/ml, ít nhất 50 U/ml, ít nhất 60 U/ml, ít nhất 70 U/ml, ít nhất 80 U/ml, ít nhất 90 U/ml hoặc ít nhất 100 U/ml.

Sử dụng IL-2 để thúc đẩy nhân rộng các tế bào T γδ thu được từ da không phải hiển nhiên do các tế bào này biểu hiện các mức rất thấp của thụ thể-IL-2 ái lực cao, còn gọi là CD25 (Fig.1D). Tuy nhiên, thụ thể này được điều tiết tăng trên các phân nhóm đơn lẻ của các tế bào T γδ do phân ly khỏi các loại tế bào khác, như các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ các nguyên bào sợi) (xem Fig.3B và Fig.4B) làm cho các tế bào này đặc biệt nhạy cảm với IL-2.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “IL-2” chỉ IL-2 kiểu hoang (ví dụ, nguyên thủy hoặc tái tổ hợp) hoặc tác nhân mà hoạt động như chất chủ vận cho một hoặc nhiều cấu trúc siêu phân tử của thụ thể IL-2 (IL-2R) (ví dụ, IL-2 mutein, các chất tương tự IL-2 tác dụng kéo dài, đơn vị con của chúng, phức hợp thụ thể của chúng). Các tác nhân này có thể hỗ trợ tăng sinh dòng tế bào phụ thuộc IL-2, CTLL-2 (33; American Type Culture Collection (ATCC®) TIB 214). IL-2 của người trưởng thành là trình tự 133 axit amin (ít peptit tín hiệu, gồm có 20 axit amin đầu tận cùng N), như Fujita, và các đồng tác giả (34) mô tả. IL-2 mutein là một polypeptit trong đó đã hình thành các thay thế cụ thể đối với protein interleukin-2 trong khi vẫn giữ được khả năng gắn kết IL-2Rβ, như được mô tả trong US 2014/0046026. Các IL-2 mutein có thể được xác định đặc tính bằng các cài xen, khuyết đoạn, thay thế và cải biến axit amin ở một hoặc nhiều vị trí trong hoặc ở các gốc còn lại của chuỗi polypeptit IL-2 nguyên thủy. Theo bản mô tả này, cài xen, khuyết đoạn, thay thế và cải biến axit amin này cho IL-2 mutein mà giữ được hoạt tính gắn kết IL-2Rβ. Các mutein tiêu biểu có thể bao gồm các thay thế của 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều hơn 10 axit amin.

Axit nucleic mã hoá IL-2 của người có thể thu được bằng các quy trình thông thường như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Trình tự axit amin của IL-2 của người (Gene ID 3558) được tìm thấy trong Genbank theo số lưu giữ NP_000577.2 GI: 28178861. Trình tự axit amin của IL-2 của chuột nhắt (*Mus musculus*) (Gene ID 16183) được tìm thấy trong Genbank theo số lưu giữ NP_032392.1 GI: 7110653.

Các lympho bào tốt hơn là được nuôi cấy khi có mặt IL-2 và IL-15, do bổ sung thêm IL-15 kết hợp với IL-2 dẫn đến nhân rộng tăng cường các tế bào T γδ cư trú ở mô

không tạo máu có tính tăng sinh so với chỉ bổ sung IL-2. Nồng độ của IL-15 tốt hơn ít nhất là 10 ng/ml.

IL-15, tương tự IL-2, là một yếu tố tăng trưởng tế bào T đã biết có thể hỗ trợ tăng sinh dòng tế bào phụ thuộc IL-2, CTLL-2. IL-15 lần đầu tiên được Grabstein và các đồng tác giả (35) báo cáo là protein trưởng thành có 114 axit amin. Thuật ngữ, "IL-15" như được sử dụng trong bản mô tả này, là IL-15 nguyên thủy hoặc tái tổ hợp và các mutein, chất tương đồng, đơn vị con của chúng, hoặc phức hợp của chúng (ví dụ, các phức hợp thụ thể, ví dụ, các peptit sushi, như được mô tả trong WO2007/046006), và mỗi chất này sẽ kích thích tăng sinh các tế bào CTLL-2. Trong các thử nghiệm tăng sinh CTLL-2, các dịch nổi của các tế bào này được chuyển nhiễm với tiền chất được biểu hiện tái tổ hợp và các thể dung hợp trong khung của các dạng trưởng thành của IL-15 có thể gây cảm ứng tăng sinh tế bào CTLL-2.

Thuật ngữ, IL-15, như được sử dụng trong bản mô tả này, nghĩa là IL-15 như thu được từ nhiều loài động vật có vú, bao gồm, ví dụ, người, khỉ, bò, lợn, ngựa và động vật gặm nhấm. "Mutein" hoặc "biến thể" IL-15, như được đề cập trong bản mô tả này, là polypeptit về cơ bản tương đồng với trình tự của IL-15 của động vật có vú nguyên thủy nhưng có trình tự axit amin khác với polypeptit IL-15 của động vật có vú nguyên thủy do khuyết đoạn, cài xen hoặc thay thế axit amin. Các biến thể có thể bao gồm các trình tự được thay thế bảo toàn, nghĩa là gốc axit amin đã cho được thay thế bằng một gốc có các đặc tính lý hoá tương tự. Các ví dụ về các thay thế bảo toàn bao gồm thay thế gốc béo cho một gốc khác, như Ile, Val, Leu, hoặc Ala cho một gốc khác, hoặc thay thế một gốc phân cực cho một gốc khác, như thay thế giữa Lys và Arg; Glu và Asp; hoặc Gln và Asn. Các thay thế bảo toàn tương tự khác, ví dụ, các thay thế toàn bộ các vùng có các đặc tính kỵ nước tương tự là đã biết. Các biến thể IL-15 có trong tự nhiên cũng được bao gồm trong sáng chế. Ví dụ về các biến thể này là các protein thu được từ các sự kiện cắt nối intron xen kẽ của mARN hoặc từ phân giải thủy phân protein IL-15, trong đó vẫn giữ tính chất gắn kết IL-15. Sự kiện cắt nối intron xen kẽ của mARN có thể tạo ra protein IL-15 được làm cùn, nhưng có hoạt tính sinh học. Các biến đổi do thủy phân protein, ví dụ, bao gồm các khác biệt ở đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C khi biểu hiện ở các loại tế bào chủ

khác nhau, do loại bỏ bằng cách thủy phân một hoặc nhiều axit amin đầu tận cùng từ protein IL-15 (thường từ 1 đến 10 axit amin).

IL-15 của người có thể thu được theo các quy trình được Grabstein và các đồng tác giả (35) mô tả hoặc bằng các quy trình thông thường như phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Nộp lưu cADN IL-15 của người cho ATCC® ngày 19/12/1993 và được cấp số nộp lưu 69245.

Trình tự axit amin của IL-15 của người (Gen ID 3600) được tìm thấy trong Genbank theo số lưu giữ NP000576.1 GI: 10835153 (isoform 1) và NP_751915.1 GI: 26787986 (isoform 2). Trình tự axit amin của IL-15 (Gen ID 16168) của chuột nhắt (*Mus musculus*) được tìm thấy trong Genbank theo số lưu giữ NP_001241676.1 GI: 363000984.

Các lympho bào có thể được nuôi cấy khi không có IL-6, IL-23 và IL-1B, hoặc khi có mặt các xytokin với nồng độ thấp (ví dụ nhỏ hơn 20 ng/ml), do bổ sung thêm kết hợp này của các xytokin dường như làm giảm tăng sinh các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu. Điều này là phát hiện bất ngờ, do các xytokin này được cho là thúc đẩy tăng sinh.

Các lympho bào đã thu được từ mô không tạo máu có thể được nuôi cấy khi không có các tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T (ví dụ các chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T (TCR)). Ví dụ, các lympho bào đã thu được từ mô không tạo máu có thể được nuôi cấy trong một môi trường không hỗ trợ hoặc gây cảm ứng tăng sinh hoặc kích hoạt các tế bào T $\alpha\beta$ và các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở máu. Môi trường thích hợp có thể không chứa hoặc về cơ bản không chứa các chất chủ vận TCR hoặc các tác nhân khác mà kích hoạt phát tín hiệu tế bào T. Trái lại, nuôi cấy các tế bào T $\gamma\delta$ từ các mô tạo máu đòi hỏi phải có mặt tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, như zoledronat (41, 42) hoặc kháng thể kháng CD3, như OKT3 (43).

Các tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T chỉ các hợp chất gây cảm ứng tăng sinh hoặc kích hoạt các tế bào T, như các tế bào T $\alpha\beta$ và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở máu, thông qua phát tín hiệu hoặc đồng kích thích TCR. Các chất điều biến phát tín hiệu tế bào T hoạt động bằng cách kích hoạt lần lượt protein tyrosin kinaza liên quan đến Src

(PTK), LcK và Fyn, và protein kinaza kết hợp chuỗi zeta (TCR) có 70kDA (ZAP70). Các PTK này dẫn đến phosphoryl hoá các polypeptit bao gồm chất kích hoạt liên kết đối với các tế bào T (LAT), mà dẫn đến kích thích xuôi dòng thông qua kinaza được điều tiết bởi tín hiệu ngoại bào (ERK), c-Jun kinaza đầu tận cùng N (JNK), và yếu tố nhân của tế bào T được kích hoạt (NFAT). Quy trình đồng kích thích, ví dụ thông qua CD28 và CD45, có thể tăng cường quy trình phosphoryl hoá và tăng cường các con đường phát tín hiệu TCR. Do đó, tác nhân bất kỳ nhằm đích một phần của TCR hoặc con đường đồng kích thích TCR có thể kích hoạt phát tín hiệu tế bào T. Các tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T có thể là hoà tan hoặc gắn kết màng và, ví dụ, có thể được trình diện trên các tế bào, như các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPCs). aAPCs thích hợp để kích hoạt phát tín hiệu tế bào T là đã biết trong lĩnh vực này (44).

Theo một vài phương án, các lympho bào có thể được nuôi cấy khi không có các chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T được bổ sung thêm theo cách ngoại sinh, như chất kích hoạt CD3 và/hoặc CD28 (ví dụ các kháng thể đơn dòng kháng CD3 và/hoặc kháng CD28); phytohemagglutinin (PHA); concanavalin A, các phosphoantigen tổng hợp, như BrHPP (bromohydrin pyrophosphat), 2M3B1PP (2-metyl-3-butenyl-1-pyrophosphat), HMBPP ((E)-4-hydroxy-3-metyl-but-2-enyl pyrophosphat), hoặc IPP (isopentenyl pyrophosphat); các N-bisphosphonat, như zoledronat; CD70 tái tổ hợp; các kháng thể đơn dòng kháng CD2; các kháng thể đơn dòng kháng CD27; các kháng thể kháng pan- $\gamma\delta$ TCR; các kháng thể đơn dòng kháng CD277; hoặc các tế bào trình diện kháng nguyên nhân tạo (aAPC). Các tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T cũng bao gồm các phân tử gắn kết bề mặt tế bào, như các phức hợp MHC hoặc HLA kết hợp với các tế bào trình diện kháng nguyên (APC) hoặc APC nhân tạo. Các phương pháp thích hợp để kích hoạt các tế bào T bằng cách bổ sung thêm theo cách ngoại sinh các chất chủ vận con đường TCR là đã biết trong lĩnh vực này và được tóm tắt trên Fig.1 của Deniger và các đồng tác giả (44).

Ví dụ, các lympho bào có thể được nuôi cấy trong môi trường không có hoặc về cơ bản không có chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T được bổ sung thêm theo cách ngoại sinh. Việc bổ sung thêm các tác nhân kích hoạt tín hiệu thụ thể tế bào T là không cần thiết

để nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu bằng cách sử dụng phương pháp của sáng chế. Trái lại, việc nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ mô tạo máu đòi hỏi phải có mặt cả IL-2 và tác nhân kích hoạt phát tín hiệu thụ thể tế bào T, như zoledronat (41, 42).

Theo một vài phương án, các lympho bào có thể được nuôi cấy trong môi trường được điều hòa từ các dịch nuôi cấy tế bào mô đệm để cung cấp các chất bổ sung cho tăng trưởng tế bào T $\gamma\delta$.

Theo một vài phương án, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy trong môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ bao gồm IL-2 và/hoặc IL-15. Môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ thích hợp là không có hoạt tính kích hoạt tế bào T, ví dụ tế bào T $\alpha\beta$ hoặc hoạt tính kích hoạt tế bào T $\gamma\delta$ trong máu, và có thể, ví dụ, không có hoặc về cơ bản không có các chất chủ vận TCR hoặc các tác nhân đồng kích thích TCR. Theo một vài phương án, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể bao gồm một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng bổ sung, như các xytokin, ngoài IL-2 và/hoặc IL-15. Các yếu tố tăng trưởng thích hợp không thể hiện hoạt tính kích hoạt tế bào T. Theo các phương án khác, môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể không có các yếu tố tăng trưởng ngoại trừ IL-2 và/hoặc IL-15; ví dụ môi trường nhân rộng $\gamma\delta$ có thể gồm có môi trường cơ bản có bổ sung IL-2 và/hoặc IL-15.

Nhiều loại môi trường nuôi cấy cơ bản thích hợp để sử dụng trong tăng sinh các tế bào T $\gamma\delta$ là sẵn có, cụ thể là các môi trường toàn vẹn, như AIM-V, môi trường Iscoves và RPMI-1640 (Life Technologies). Môi trường có thể được bổ sung các yếu tố môi trường khác, như huyết thanh, protein huyết thanh và chất chọn lọc, như kháng sinh. Ví dụ, theo một vài phương án, môi trường RPMI-1640 có chứa 2 mM glutamin, 10% FBS, 10 mM HEPES, pH 7,2, 1% penixilin-streptomycin, natri pyruvat (1 mM; Life Technologies), các axit amin không thiết yếu (ví dụ 100 μ M Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro và Ser; 1X MEM các axit amin không thiết yếu của Life Technologies), và 10 μ L/L β -mercaptoetanol. Môi trường cơ bản có thể được bổ sung IL-2 và/hoặc IL-15 ở các nồng độ chuẩn mà chuyên gia trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được bằng cách thử nghiệm thường quy.

Thuận tiện là, các tế bào này được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường khí ẩm có chứa 5% CO₂ trong môi trường nuôi cấy thích hợp.

Các tế bào T γδ có thể được nuôi cấy như được mô tả trong bản mô tả này trong hệ thống thích hợp bất kỳ, bao gồm các thùng lên men kèm khuấy, thiết bị lên men vận chuyển bằng không khí, các chai trực lẫn, các túi hoặc đĩa nuôi cấy, và các thiết bị phản ứng sinh học khác, cụ thể là các thiết bị phản ứng sinh học sợi rỗng. Sử dụng các hệ thống này là đã biết trong lĩnh vực này.

Các phương pháp và kỹ thuật để nuôi cấy các lympho bào là đã biết trong lĩnh vực này (36-39).

Trong khi nuôi cấy, các lympho bào không tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô. Lý do là tiếp xúc trực tiếp của các lympho bào với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô này dường như ức chế nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô.

Các tế bào mô đệm là các tế bào mô liên kết không tạo máu của cơ quan bất kỳ và hỗ trợ chức năng của các tế bào nhu mô của cơ quan. Các ví dụ về các tế bào mô đệm bao gồm các nguyên bào sợi, tế bào ngoại mạch, tế bào trung mô, tế bào keratin, tế bào biểu mô và tế bào khối u không tạo máu. Tốt hơn là, các lympho bào không tiếp xúc trực tiếp với các nguyên bào sợi trong khi nuôi cấy.

Các tế bào biểu mô là các tế bào không tạo máu mà lót các khoang và bề mặt của các mạch máu và các cơ quan trong toàn bộ cơ thể. Các tế bào này thường có hình dạng vảy, cột hoặc lập thể và có thể được sắp xếp dưới dạng đơn lớp các tế bào hoặc dưới dạng các lớp của hai hoặc nhiều tế bào.

Các nguyên bào sợi và/hoặc tế bào mô đệm hoặc biểu mô khác tốt hơn là có mặt trong khi nuôi cấy các lympho bào, do các yếu tố được bài tiết bởi các tế bào này có thể thúc đẩy nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu, nhưng không tiếp xúc trực tiếp với các lympho bào, do tiếp xúc trực tiếp ức chế sự nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu. Ví dụ, các lympho bào có thể được nuôi cấy trong Transwell, như thế cho phép phân tách về mặt vật lý các lympho bào và nguyên bào sợi. Các ví dụ về các dòng tế bào nguyên bào sợi mà có thể được sử dụng bao gồm các nguyên bào sợi bao quy

đầu của người (ví dụ BJ (ATCC® CRL-2522™)), các nguyên bào sợi của da bình thường (ví dụ CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™)) và các nguyên bào sợi phổi (ví dụ HEL 299 (ATCC® CRL-137™)).

Bằng cách sử dụng quy trình Clark, lympho bào cư trú ở mô không tạo máu có thể được thu gom và được phân tách khỏi tế bào mô đệm, như nguyên bào sợi của da, ví dụ bằng cách hút mạnh bằng pipet. Lympho bào thu gom có thể được rửa tiếp qua rây bằng nylon cỡ 40µm để giữ lại các thể kết tụ nguyên bào sợi mà có thể trở nên lỏng lẻo trong quá trình này. Các lympho bào cũng có thể được phân lập bằng cách sử dụng cách thức phân loại tế bào kết hợp huỳnh quang hoặc từ tính bằng cách sử dụng, ví dụ, các kháng thể CD45. Để giảm tối thiểu kích hoạt các tế bào T, các lympho bào này cũng có thể được phân loại chỉ dựa vào các tiêu chí về tính chất phân tán tiến và bên cạnh của chúng. Lympho bào tiếp đó có thể để sinh trưởng biệt lập với tế bào mô đệm (ví dụ nguyên bào sợi) hoặc khi có mặt các tế bào này nhưng không tiếp xúc trực tiếp. Ví dụ, các lympho bào có thể được sinh trưởng trong rổ Transwell với đơn lớp hợp dòng các nguyên bào sợi trong giếng nuôi cấy tế bào ở bên dưới để cho phép trao đổi các yếu tố tăng trưởng hoà tan được sản sinh bởi nguyên bào sợi, mà không để có tiếp xúc trực tiếp bất kỳ. Theo cách khác, nguyên bào sợi có thể được nuôi cấy trong rổ Transwell với lympho bào sinh trưởng trong giếng nuôi cấy tế bào bên dưới. Cũng có thể sử dụng môi trường được điều hòa bởi các tế bào không tạo máu (ví dụ, nguyên bào sợi) để bổ sung nhân rộng lympho bào.

Các môi trường được điều hòa có chứa các yếu tố hoà tan được bài tiết bởi các tế bào không tạo máu (ví dụ, các tế bào mô đệm, như các nguyên bào sợi). Các môi trường được điều hòa có thể có chứa hoặc có thể không chứa tế bào bài tiết các yếu tố này. Ví dụ, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được nuôi cấy với sự có mặt của các tế bào bài tiết các yếu tố điều hòa trong khi nuôi cấy tế bào T $\gamma\delta$. Theo cách khác, tế bào không tạo máu có thể được loại bỏ khỏi môi trường trước khi nuôi cấy tế bào T $\gamma\delta$, để lại các yếu tố đã bài tiết của chúng trong môi trường này. Môi trường được điều hòa cũng bao gồm môi trường đã có bổ sung yếu tố tế bào không tạo máu mà được điều chế từ trước (ví dụ, dưới dạng cô đặc hoặc bột đông khô).

Mặc dù các tế bào mô đệm hoặc biểu mô tốt hơn là có mặt trong khi nuôi cấy lympho bào (nhưng không tiếp xúc trực tiếp với lympho bào), chúng có thể được loại bỏ sao cho lympho bào được nuôi cấy khi không có tế bào mô đệm hoặc biểu mô, ví dụ khi không có mặt nguyên bào sợi.

Theo một số phương án, sau khi nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu khi không có tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, như chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T được bổ sung thêm theo cách ngoại sinh, như mô tả ở trên, các tế bào T $\gamma\delta$ đã nhân rộng có thể còn được nuôi cấy khi có mặt một hoặc nhiều tác nhân kích hoạt phát tín hiệu tế bào T, như các chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T được bổ sung thêm theo cách ngoại sinh, và/hoặc một hoặc nhiều yếu tố tăng trưởng, như xytokin. Sau khi nhân rộng như được mô tả trong bản mô tả này và nuôi cấy tiếp tùy ý, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể được phân lập hoặc được tinh chế tiếp, được bảo quản, phối trộn với các chất khác, như các tá dược được dùng và/hoặc được sử dụng, khi cần.

Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế có thể phân biệt với các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ máu khác ở chỗ chúng đáp ứng với phối tử NKG2D (MICA), phối tử này có liên quan nhiều đến tính ác tính, khi không có phối tử kích thích thụ thể tế bào T bất kỳ, ví dụ do gia tăng sản sinh TNF α , IFN γ , và CD107a (Fig.2A - Fig.2D, Fig.10A và Fig.10B). Chúng cũng thực hiện đáp ứng tế bào T độc tính tế bào mà không trải qua kích hoạt về mặt được lý kiểu ngoại sinh hoặc qua trung gian phối tử của thụ thể tế bào T và do đó có độc tính tế bào khi không có kích thích (Fig.3 và Fig.5). Nghĩa là so với các tế bào T $\gamma\delta$ khác, với tế bào T $\alpha\beta$ hoặc với tế bào NK, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế là duy nhất về khả năng đáp ứng và tăng sinh khi không bổ sung thêm các tác nhân ngoại sinh bất kỳ kích hoạt phát tín hiệu thụ thể tế bào T (Fig.3). Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế cũng nhuộm màu dương tính đối với CD69 và PD-1, không biểu hiện CD28, và thể hiện CD25 chỉ ở mức rất thấp (xem Fig.1D). Tổ hợp này của các chất đánh dấu không được biểu hiện bởi các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ máu. Ngoài ra, chúng thể hiện mức biểu hiện cao hơn của các thụ thể cư trú ở mô như CCR4 và CCR8 so với các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 2 được nhân rộng thu được

từ máu (Fig.7B). Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng các phương pháp của sáng chế có thể nuôi cấy được khi có mặt IL2 và/hoặc IL15 mà không có các chất chủ vận TCR hoặc các yếu tố tăng trưởng khác. Ví dụ, tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể sinh trưởng trong môi trường gồm có môi trường RPMI 1640 có bổ sung IL-2.

Do đó, tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế có thể có một hoặc nhiều tính chất trong số các tính chất sau:

- (i) thể hiện kiểu hình CD69^{cao}, ICOS^{cao}, TIM3^{cao} và CD28^{thấp/không có}
- (ii) điều tiết tăng một hoặc nhiều chất trong số CCR3, CD39, CD11b, và CD9
- (iii) sản sinh IFN- γ đáp ứng với phối tử NKG2D khi không có chất chủ vận TCR,
- (iv) sản sinh IL-13 khi không có chất chủ vận TCR,
- (v) sản sinh một hoặc nhiều chất trong số IFN- γ , TNF- α và GM-CSF đáp ứng với kích hoạt TCR,
- (vi) không sản sinh hoặc về cơ bản không sản sinh IL-17 đáp ứng với kích hoạt TCR,
- (vii) sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy có chứa IL-2 mà không có yếu tố tăng trưởng bổ sung,
- (viii) thể hiện đáp ứng tế bào T độc tính tế bào khi không có chất chủ vận TCR và/hoặc
- (ix) thể hiện độc tính tế bào chọn lọc đối với các tế bào khối u so với các tế bào bình thường.

Tốt hơn là tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được sản xuất bằng phương pháp của sáng chế sản sinh IL-13 khi không có chất chủ vận TCR và/hoặc sản sinh IFN- γ đáp ứng với phối tử NKG2D khi không có chất chủ vận TCR.

Các tế bào T $\gamma\delta$ được thu được bằng phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng trong phương pháp sàng lọc chất điều biến điểm kiểm soát của các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú

ở mô không tạo máu. Việc nhận diện các chất điều biến điểm kiểm soát này có thể là hữu ích để phát triển liệu pháp miễn dịch cho bệnh ung thư, do chất điều biến điểm kiểm soát là đích tiềm năng để trị liệu ung thư.

Để xác định xem liệu hợp chất thử nghiệm có phải là chất điều biến điểm kiểm soát hay không, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể được nuôi cấy *in vitro* tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) khi có mặt hoặc không có mặt hợp chất thử nghiệm. Tốc độ tăng sinh hoặc mức độ kích hoạt các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được xác định khi có mặt và không có mặt hợp chất thử nghiệm. Nếu tốc độ tăng sinh hoặc mức độ kích hoạt cao hơn khi có mặt hợp chất thử nghiệm so với khi không có mặt hợp chất thử nghiệm, thì hợp chất thử nghiệm có thể là chất điều biến điểm kiểm soát ứng viên. Lý do là hợp chất thử nghiệm có khả năng giảm nhẹ ức chế tiếp xúc của các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi).

Hợp chất thử nghiệm được chọn dựa trên tiềm năng điều biến điểm kiểm soát cho các tế bào T cư trú ở mô.

Sự gia tăng rõ rệt trong quá trình tăng sinh tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu cũng có thể là do ức chế chết tế bào và có thể được đo theo mức gia tăng số lượng tế bào T hoặc các chất đánh dấu của nó và theo mức biểu hiện giảm của các chất đánh dấu chết tế bào theo chương trình. Có thể đánh giá sự kích hoạt gia tăng bằng cách đo mức giải phóng các xytokin như IFN- γ mà được bài tiết bởi các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô được kích hoạt.

Theo cách khác, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu có thể được nuôi cấy *in vitro* tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi), trong đó biểu hiện của gen thử nghiệm trong các tế bào T $\gamma\delta$ và/hoặc các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) hoặc cả hai loại tế bào này được thay đổi. Biểu hiện của gen thử nghiệm trong các tế bào T $\gamma\delta$ và/hoặc trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi), ví dụ, có thể được thay đổi nhờ chất nhắm đích ARN, như ARN can thiệp nhỏ (siRNA) hoặc ARN cặp tóc nhỏ (shRNA) hoặc bằng cách chỉnh sửa gen, ví dụ bằng cách sử dụng hệ CRISPR/Cas. Tốc độ tăng sinh hoặc mức độ kích hoạt của tế

bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được xác định khi có mặt và không có mặt sự thay đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$. Nếu tốc độ tăng sinh hoặc kích hoạt cao hơn khi có mặt sự thay đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ so với khi không có mặt sự thay đổi gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$, thì gen thử nghiệm có thể là gen điểm kiểm soát ứng viên.

Theo cách khác, nếu tỷ lệ tiêu diệt của các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) cao hơn khi có mặt hợp chất thử nghiệm so với khi không có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc cao hơn khi có sự thay đổi biểu hiện của gen thử nghiệm này trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ so với không có mặt biến đổi gen thử nghiệm này ở các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$, thì hợp chất thử nghiệm có thể là một chất điều biến điểm kiểm soát hoặc gen thử nghiệm có thể là gen điểm kiểm soát ứng viên. Tỷ lệ tiêu diệt, ví dụ, có thể được đo bằng cách định lượng các phân tử do các tế bào sẽ chết giải phóng ra. Tỷ lệ tiêu diệt tế bào cao hơn khi có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc khi có mặt sự thay đổi biểu hiện của gen thử nghiệm trong các tế bào mô đệm hoặc biểu mô (ví dụ nguyên bào sợi) và/hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ chỉ ra là điểm kiểm soát mà kìm hãm tiêu diệt tế bào đã được giải phóng và do đó có thể kết luận là hợp chất thử nghiệm có thể là chất điều biến điểm kiểm soát hoặc gen thử nghiệm có thể là gen điểm kiểm soát ứng viên.

Ví dụ về dòng tế bào nguyên bào sợi mà có thể được sử dụng trong mỗi phương án bao gồm nguyên bào sợi bao quy đầu của người (ví dụ BJ (ATCC® CRL-2522™)), nguyên bào sợi của da bình thường (ví dụ CCD-1059Sk (ATCC® CRL-2072™)) và nguyên bào sợi phổi (ví dụ HEL 299 (ATCC® CRL-137™)).

Để nhận diện hợp chất thử nghiệm như chất điều biến điểm kiểm soát ứng viên hoặc để nhận diện gen thử nghiệm như gen điểm kiểm soát ứng viên, tỷ lệ tăng sinh và hoặc kích hoạt các tế bào T $\gamma\delta$ khi có mặt hợp chất thử nghiệm hoặc khi có mặt sự thay đổi gen thử nghiệm này có thể cao hơn ít nhất là 1,5 lần, ít nhất 2 lần, ít nhất 3 lần, ít nhất 4 lần hoặc ít nhất 5 lần so với khi không có hợp chất thử nghiệm hoặc khi không có sự

thay đổi gen thử nghiệm này. Có thể đo chu trình tế bào bằng một số cách thức, như số lượng tế bào tuyệt đối vào ngày 0 và ngày 7, các mức biểu hiện của Ki-67 và CD25 (đây là các chất đánh dấu chu trình tế bào) và bằng cách sử dụng các chất nhuộm màu nuôi cấy tế bào, như CFSE hoặc tím CELLTRACE™. Có thể đo kích hoạt tế bào bằng mức sản sinh các protein hiệu ứng như IFN- γ . Gia tăng rõ rệt sự tăng sinh các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu cũng có thể là do sự ức chế quá trình chết tế bào và có thể được đo bằng mức gia tăng số lượng tế bào T hoặc các chất đánh dấu của nó và theo mức biểu hiện giảm của các chất đánh dấu quay trình chết tế bào theo chương trình.

Các tế bào T $\gamma\delta$ được thu được bằng phương pháp của sáng chế có thể được sử dụng làm thuốc, ví dụ cho liệu pháp tế bào T nhận nuôi. Việc sử dụng này bao gồm chuyển các tế bào T $\gamma\delta$ thu được bằng phương pháp của sáng chế cho bệnh nhân. Liệu pháp này có thể là tự thân, tức là, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được chuyển ngược trở lại cho chính bệnh nhân mà thu được các tế bào này, hoặc liệu pháp này có thể là dị sinh, có nghĩa là các tế bào T $\gamma\delta$ từ một người có thể được chuyển cho bệnh nhân khác. Phương pháp điều trị có thể bao gồm bước:

cung cấp mẫu mô không tạo máu đã thu được từ cá thể cho,

nuôi cấy các tế bào T $\gamma\delta$ từ các mẫu nêu trên để tạo ra quần thể được nhân rộng, và;

cho cá thể tiếp nhận dùng quần thể được nhân rộng này của các tế bào T $\gamma\delta$.

Cá thể cho và cá thể tiếp nhận có thể là giống nhau hoặc khác nhau.

Các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được dùng cho bệnh nhân hoặc đối tượng cần điều trị bằng phương pháp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, các tế bào T $\gamma\delta$ có thể được dùng cho bệnh nhân hoặc đối tượng cần điều trị qua đường tĩnh mạch hoặc trong khối u.

Bệnh nhân hoặc đối tượng sẽ điều trị tốt hơn là bệnh nhân ung thư hoặc bệnh nhân nhiễm virus, ví dụ, bệnh nhân nhiễm CMV hoặc bệnh nhân nhiễm HIV.

Do các tế bào T $\gamma\delta$ không bị hạn chế bởi MHC, nên chúng không nhận biết vật chủ mà chúng được chuyển vào như là ngoại lai, nghĩa là chúng ít có khả năng gây bệnh mãnh

ghép chồng lại vật chủ. Nghĩa là chúng có thể được sử dụng “sẵn có” và được chuyển cho đối tượng nhận bất kỳ, ví dụ, cho liệu pháp tế bào T nhận nuôi khác loài.

Do các tế bào này thường cư trú ở các mô không tạo máu, các tế bào T $\gamma\delta$ DN và V δ 1 cư trú ở mô cũng có khả năng đến cư trú và được giữ lại trong các khối u hơn là so với các tế bào đối ứng cư trú trong máu tuần hoàn và việc chuyển nhận nuôi các tế bào này có thể sẽ hiệu quả hơn để nhằm đích các khối u rắn và tiềm năng ở các bệnh lý miễn dịch có liên quan đến mô không tạo máu khác.

Theo một vài phương án, phương pháp điều trị cá thể có khối u ở mô không tạo máu có thể bao gồm bước;

cung cấp mẫu mô không tạo máu thu được từ cá thể cho,

nuôi cấy các tế bào T $\gamma\delta$ từ mẫu nêu trên để tạo ra quần thể được nhân rộng, và;

cho cá thể có khối u này dùng quần thể được nhân rộng của các tế bào T $\gamma\delta$.

Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được thu được bằng các phương pháp của sáng chế biểu hiện NKG2D và đáp ứng với phối tử NKG2D (ví dụ MICA), phối tử này có liên quan chặt chẽ đến thể ác tính. Các tế bào cũng biểu hiện profin độc tính tế bào khi không có kích hoạt bất kỳ và do đó có khả năng hữu hiệu tiêu diệt các tế bào khối u. Ví dụ, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu thu được như được mô tả trong bản mô tả này có thể biểu hiện một hoặc nhiều, tốt hơn là tất cả các chất IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, Granulysin, Granzyme A và B, và Perforin khi không có kích hoạt bất kỳ. IL-17A có thể không được biểu hiện.

Do đó, các phát hiện nêu trong bản mô tả này cung cấp bằng chứng thuyết phục cho tính thực tiễn và thích hợp của ứng dụng trên lâm sàng của các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô không tạo máu được thu được bằng phương pháp của sáng chế dưới dạng chất trị liệu miễn dịch “có sẵn”. Các tế bào này có khả năng tiêu diệt tương tự bẩm sinh, không có hạn chế MHC và thể hiện khả năng cư trú đến và/hoặc giữ lại được cải thiện ở trong các khối u so với các tế bào T khác.

Các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của sáng chế cũng có thể được sử dụng cho liệu pháp CAR-T. Việc sử dụng này bao gồm tạo ra các thụ thể tế bào T (TCR) được thao tác di truyền để lập trình lại tế bào T này với tính đặc hiệu mới, ví dụ tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng. TCR được thao tác di truyền có thể làm cho các tế bào T đặc hiệu với các tế bào ác tính và do đó hữu ích cho liệu pháp miễn dịch ung thư. Ví dụ, các tế bào T có thể nhận biết các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên khối u, như kháng nguyên liên quan đến khối u (TAA) mà không được biểu hiện bởi tế bào xoma bình thường từ mô của đối tượng. Do đó, các tế bào T được cải biến CAR có thể được sử dụng cho liệu pháp tế bào T nhận nuôi, ví dụ, cho bệnh nhân ung thư.

Việc sử dụng các tế bào T γδ cư trú ở máu cho CAR đã được mô tả. Tuy nhiên, các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu thu được bằng phương pháp của sáng chế có thể là các chất dẫn đặc biệt tốt cho hương pháp CAR-T, do chúng có thể được tải nạp với TCR đặc hiệu-kháng nguyên khảm đồng thời vẫn giữ được khả năng tương tự bẩm sinh là nhận biết các tế bào được biến nạp, và có khả năng xâm nhập khối u tốt hơn và các khả năng giữ lại tốt hơn ở khối u so với các tế bào T γδ cư trú ở máu hoặc thông thường, các tế bào T αβ toàn thân. Ngoài ra, chúng không có khả năng trình diện kháng nguyên phụ thuộc MHC sẽ làm giảm khả năng mắc bệnh mảnh ghép chống lại vật chủ và cho phép chúng nhắm đích khối u biểu hiện các mức thấp của MHC. Tương tự, chúng không dựa vào quá trình đồng kích thích thông thường, ví dụ thông qua sự kết nối với CD28 tăng cường nhắm đích các khối u biểu hiện các mức thấp của phối tử đối với thụ thể đồng kích thích.

Bệnh ung thư có thể được đặc trưng bởi tăng sinh bất thường các tế bào ung thư ác tính và có thể bao gồm bệnh bạch cầu, như bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính (AML), bệnh bạch cầu dòng tủy mạn tính (CML), bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính (ALL) và bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), u lympho, như u lympho Hodgkin, u lympho không phải Hodgkin và đa u tủy, và các thể ung thư rắn như các sacôm, ung thư da, u melanin, ung thư bàng quang, ung thư não, ung thư vú, ung thư tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư tiền liệt tuyến, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư cổ tử cung, ung thư gan, ung thư đầu và cổ, ung thư thực quản, ung thư tụy, ung thư thận, ung thư

tuyến thượng thận, ung thư dạ dày, ung thư tinh hoàn, ung thư túi mật và ung thư ống mật, ung thư tuyến giáp, ung thư tuyến ức, ung thư xương, và ung thư não.

Các tế bào ung thư ở bệnh nhân ung thư có thể là khác biệt về mặt miễn dịch so với các tế bào xoma bình thường ở cá thể (tức là khối u ung thư có thể có tính gây miễn dịch). Ví dụ, các tế bào ung thư có thể có khả năng gây đáp ứng miễn dịch toàn thân ở bệnh nhân ung thư kháng lại một hoặc nhiều kháng nguyên do các tế bào ung thư biểu hiện. Các kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch này có thể là các kháng nguyên khối u hoặc có thể được các tế bào bình thường chia sẻ. Bệnh nhân mắc ung thư có thể thể hiện ít nhất một dấu hiệu, triệu chứng hoặc kết quả xét nghiệm có thể nhận diện mà đủ để chẩn đoán bệnh ung thư theo các tiêu chuẩn lâm sàng đã biết trong lĩnh vực. Các ví dụ về các tiêu chuẩn lâm sàng này có được tìm thấy trong các sách giáo khoa y khoa như Harrison's Principles of Internal Medicine (40). Trong một vài trường hợp, chẩn đoán bệnh ung thư ở cá thể có thể bao gồm nhận diện loại tế bào cụ thể (ví dụ tế bào ung thư) trong mẫu dịch cơ thể hoặc mô thu được từ cá thể này.

Bệnh nhân, đối tượng, hoặc cá thể thích hợp để điều trị như mô tả ở trên có thể là động vật có vú, như động vật gặm nhấm (ví dụ chuột lang, chuột đồng, chuột cống, chuột nhắt), các loại chuột (ví dụ chuột nhắt), giống chó (ví dụ chó), giống mèo (ví dụ mèo), giống ngựa (ví dụ ngựa), động vật linh trưởng, giống khỉ (ví dụ khỉ hoặc khỉ không đuôi), giống khỉ (ví dụ khỉ đuôi sóc hoặc khỉ đầu chó), giống khỉ không đuôi (ví dụ khỉ đột, con tinh tinh, đười ươi hoặc vượn), hoặc người.

Theo một vài phương án được ưu tiên, bệnh nhân, đối tượng, hoặc cá thể là người. Theo các phương án được ưu tiên khác, các động vật có vú không phải là người, đặc biệt là các động vật có vú mà được sử dụng một cách thuận tiện làm mô hình để chứng tỏ hiệu lực trị liệu ở người (ví dụ chuột, động vật linh trưởng, lợn, chó, hoặc thỏ) có thể được sử dụng.

Theo một vài phương án, bệnh nhân, đối tượng, hoặc cá thể có thể có bệnh tồn lưu tối thiểu (MRD) sau khi điều trị ung thư bước đầu.

Việc điều trị có thể là phương pháp điều trị và liệu pháp bất kỳ, dù cho người hay động vật (ví dụ trong các ứng dụng cho thú y), trong đó đạt được tác dụng trị liệu mong muốn nhất định, ví dụ, ức chế hoặc làm chậm tiến triển của tình trạng bệnh, và bao gồm giảm tốc độ tiến triển, dừng tốc độ tiến triển, cải thiện tình trạng bệnh, chữa khỏi hoặc thuyên giảm (một phần hoặc hoàn toàn) tình trạng bệnh, ngăn ngừa, làm chậm, giảm bớt hoặc ngừng một hoặc nhiều triệu chứng và/hoặc dấu hiệu của tình trạng bệnh này hoặc kéo dài thời gian sống sót của đối tượng hoặc bệnh nhân quá thời gian kỳ vọng khi không có điều trị.

Việc điều trị như một biện pháp dự phòng (có nghĩa là phòng bệnh) cũng được bao gồm. Ví dụ, bệnh nhân, đối tượng, hoặc cá thể nhạy cảm với hoặc có nguy cơ mắc hoặc tái phát bệnh ung thư có thể được điều trị như được mô tả trong bản mô tả này. Việc điều trị này có thể ngăn ngừa hoặc làm chậm sự xuất hiện hoặc tái phát bệnh ung thư ở bệnh nhân, đối tượng, hoặc cá thể này.

Cụ thể là, việc điều trị có thể bao gồm ức chế tăng trưởng ung thư, bao gồm thuyên giảm ung thư hoàn toàn, và/hoặc ức chế di căn ung thư. Tăng trưởng ung thư nói chung chỉ một chỉ số bất kỳ trong số các chỉ số cho thấy có sự thay đổi ở bệnh ung thư này sang thể phát triển hơn. Do đó, các chỉ số để đo lường mức ức chế tăng trưởng ung thư bao gồm mức giảm sống sót tế bào ung thư, giảm thể tích khối u hoặc hình thái khối u (ví dụ, như được xác định bằng cách sử dụng chụp cắt lớp vi tính (CT), siêu âm, hoặc phương pháp chiếu chụp khác), tăng trưởng khối u chậm, phá huỷ mạng lưới mạch khối u, biểu hiện cải thiện trong xét nghiệm da quá mẫn chậm, tăng hoạt tính các lympho bào T ly giải tế bào, và giảm nồng độ các kháng nguyên đặc hiệu khối u. Giảm ức chế miễn dịch trong các khối u ung thư ở cá thể có thể cải thiện khả năng của cá thể này chống lại quá trình tăng trưởng ung thư, cụ thể là tăng trưởng của bệnh ung thư đã có ở đối tượng này và/hoặc giảm xu hướng tăng trưởng ung thư ở cá thể này.

Các khía cạnh và phương án khác của sáng chế đề xuất các khía cạnh và phương án được mô tả ở trên với thuật ngữ “bao gồm” được thay bằng thuật ngữ “về cơ bản bao gồm” và các khía cạnh và phương án được mô tả ở trên với thuật ngữ “bao gồm” được thay bằng thuật ngữ “chủ yếu bao gồm”.

Nên hiểu là đơn sáng chế này bộc lộ tất cả các tổ hợp của bất kỳ khía cạnh và phương án nào trong số các khía cạnh và phương án nêu trên với nhau, trừ khi ngữ cảnh có yêu cầu khác. Tương tự, đơn sáng chế này bộc lộ tất cả các tổ hợp của các dấu hiệu được ưu tiên và/hoặc tùy ý ở dạng đơn độc hoặc cùng với khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh khác, trừ khi ngữ cảnh có yêu cầu khác.

Các cải biến các phương án nêu trên, các phương án khác nữa và các cải biến của chúng sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia khi đọc bản mô tả này, và do đó là thuộc phạm vi của sáng chế.

Tất cả các tài liệu viện dẫn cơ sở dữ liệu trình tự đề cập trong bản mô tả này được hợp nhất ở đây để tham khảo.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “và/hoặc” được coi là đề cập cụ thể đến từng dấu hiệu hoặc thành phần trong số hai dấu hiệu hoặc thành phần được xác định cụ thể với nhau hoặc không cùng với nhau. Ví dụ “A và/hoặc B” được coi là đề cập cụ thể đến (i) A, (ii) B và (iii) A và B, như là mỗi dấu hiệu được nêu riêng rẽ trong bản mô tả này.

Một số khía cạnh và phương án của sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ và dẫn chiếu đến các hình vẽ nêu trên.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Phân lập các lympho bào từ da của người bằng cách nuôi cấy mô bên ngoài ba chiều

Quy trình cấy mô da bên ngoài ba chiều đã được thiết lập, như được mô tả trong tài liệu (29). Các tấm chất nền Cellfoam (Cytomatrix Pty Ltd, Victoria, Australia) kích cỡ 9 mm x 9 mm x 1,5 mm được hấp tiệt trùng, tiếp đó được ủ trong dung dịch có chứa 100 mg/ml collagen I của đuôi chuột cống (BD Biosciences) trong PBS trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng, tiếp đó rửa một lần trong PBS. Các mẫu da của người trưởng thành thu được trong vòng 3-6 giờ phẫu thuật da. Loại bỏ mỡ dưới da và cắt nhỏ mô da còn lại thành các mảnh kích cỡ khoảng 1 mm x 1 mm. Khoảng 5 mảnh da/cấy mô bên ngoài được đặt lên và ép vào bề mặt của mỗi tấm. Mỗi tấm được cho vào giếng riêng biệt của đĩa 24 giếng (Corning) có chứa 2 ml môi trường ‘Da-T’ (môi trường Dulbecco được cải

biển Iscove (IMDM; Life Technologies) với 10% huyết thanh bào thai bò được bất hoạt bằng nhiệt (Life Technologies), L-glutamin (292 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies), penixilin (100 đơn vị/ml; Life Technologies), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies), axit N-2-hydroxyetyl piperazin-N-2-etan sulfonic (HEPES; 0,01 M; Life Technologies), natri pyruvat (1mM; Life Technologies), môi trường thiết yếu tối thiểu (MEM) các axit amin không thiết yếu (1X; Life Technologies) và 3,5 $\mu\text{l/L}$ 2-mercaptoetanol (Life Technologies). Trong 7 ngày nuôi cấy đầu tiên, thêm Amphotericin (2,5 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies) vào môi trường này. Môi trường được thay mới 3 lần/tuần. Để tiếp liệu, hút 1 ml môi trường phía trên từ mỗi giếng và thay thế bằng môi trường mới. Thêm IL-2 và IL-15 vào từ lúc bắt đầu nuôi cấy và mỗi lần thay môi trường mới cho đến khi phân lập các lympho bào ở 21 ngày. IL-2 tái tổ hợp của người (Proleukin; Novartis Pharmaceutical UK Ltd) được thêm vào ở nồng độ 100 IU/ml. IL-15 tái tổ hợp của người (Biolegend) được thêm vào ở nồng độ 20 ng/ml. Tối đa 96 giếng (bốn đĩa 24 giếng) được dùng nuôi cấy cho mỗi người cho.

Để phân lập các lympho bào, các tấm chất nền được chuyển vào ống ly tâm 50ml (Corning) có chứa 10 ml dung dịch muối cân bằng Hanks (HBSS; Life Technologies) kèm theo 0,01 mM HEPES (tối đa 12 tấm chất nền/ống). Các tấm chất nền được rửa bằng huyền phù tế bào sử dụng pipet 10 ml, và huyền phù tế bào được cho qua màng lọc 70 μm (BD Biosciences) vào ống nghiệm ly tâm 50ml mới (Corning). Bước ‘rửa’ các tấm chất nền được lặp lại 2 lần nữa. Môi trường từ giếng nuôi cấy cũng được hút ra và được cho qua màng lọc 70 μm (BD Biosciences) vào ống ly tâm 50ml (Corning) mới. Rửa các giếng thêm 2 lần nữa bằng 1ml HEPES/HBSS 0,01 mM và được cho qua màng lọc 70 μm (BD Biosciences). Các tế bào này sau đó được phân lập bằng cách ly tâm (1600 vòng/phút trong 15 phút). Pellet được tái tạo huyền phù lại trong môi trường ‘Da-T’. Pellet tế bào cuối cùng được tái tạo huyền phù lại trong môi trường ‘Da-T’ để phân tích đếm tế bào dòng chảy sau này hoặc nghiên cứu chức năng. Khi cần đếm số lượng tế bào, đếm số lượng bạch cầu ở giai đoạn này bằng cách; (1) nhuộm màu xanh da trời trypan (0,4 %) (Life Technologies) và bộ đếm hồng cầu, hoặc (2) thiết bị đếm và phân tích tế bào CASY® Model TT (Roche).

Để phân lập các lympho bào, các tấm chất nền được chuyển vào ống ly tâm 50ml (Corning) có chứa 10 ml dung dịch muối cân bằng Hanks (HBSS; Life Technologies) kèm theo 0,01 mM HEPES (tối đa 12 tấm chất nền/ống). Các tấm chất nền được rửa bằng huyền phù tế bào sử dụng pipet 10 ml, và huyền phù tế bào được cho qua màng lọc 70 μ m (BD Biosciences) vào ống nghiệm ly tâm 50ml mới (Corning). Bước ‘rửa’ các tấm chất nền được lặp lại 2 lần nữa. Môi trường từ giếng nuôi cấy cũng được hút ra và được cho qua màng lọc 70 μ m (BD Biosciences) vào ống ly tâm 50ml (Corning) mới. Rửa các giếng thêm 2 lần nữa bằng 1ml HEPES/HBSS 0,01 mM và được cho qua màng lọc 70 μ m (BD Biosciences). Các tế bào này sau đó được phân lập bằng cách ly tâm (1600 vòng/phút trong 15 phút). Pellet được tái tạo huyền phù lại trong môi trường ‘Da-T’. Pellet tế bào cuối cùng được tái tạo huyền phù lại trong môi trường ‘Da-T’ để phân tích đếm tế bào dòng chảy sau này hoặc nghiên cứu chức năng. Khi cần đếm số lượng tế bào, đếm số lượng bạch cầu ở giai đoạn này bằng cách; (1) nhuộm màu xanh da trời trypan (0,4 %) (Life Technologies) và bộ đếm hồng cầu, hoặc (2) thiết bị đếm và phân tích tế bào CASY® Model TT (Roche).

Do các mẫu ruột sơ cấp có dễ bị nhiễm bẩn hơn, nên các mẫu sinh thiết thu được trước tiên được rửa trong IMDM có chứa 10% FCS, penixilin 500 U/mL, streptomycin 500 μ g/mL, gentamixin 100 μ g/mL, Amphotericin B 12,5 μ g/mL và Metronidazol 5 μ g/mL hai lần trước khi cắt nhỏ và đặt lên các khung lưới. Nuôi cấy ruột trên khung lưới được để sinh trưởng trong môi trường Ruột-T (IMDM, 10% FCS, penixilin 100 U/mL, streptomycin 100 μ g/mL, gentamixin 20 μ g/mL, Metronidazol 1 μ g/mL. Trong tuần đầu tiên sinh trưởng, các tác giả cũng sử dụng Amphotericin B 2,5 μ g/mL, tương tự như da. Môi trường có chứa IL-2 (100 IU/ml) và IL-15 (20ng/ml) và được thay 3 lần/tuần. Do cấu trúc của ruột lỏng lẻo hơn so với da, nên các lympho bào có thể được thu gom sau một tuần.

Nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ của mô

Để nhân rộng các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da của người, các lympho bào hỗn hợp được thu gom sau từ 3 đến 4 tuần nuôi cấy trên khung lưới, được rửa trong PBS, quay ly tâm và tái tạo huyền phù trong môi trường của Roswell Park Memorial Institute 1640

(RPMI-1640; Life Technologies) với 10% huyết thanh bào thai bò được bất hoạt bằng nhiệt (Life Technologies), L-glutamin (292 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies), penixilin (100 đơn vị/ml; Life Technologies), streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$; Life Technologies), axit N-2-hydroxyetyl piperazin-N-2-etan sulfonic (HEPES; 0,01 M; Life Technologies), natri pyruvat (1 mM; Life Technologies), môi trường thiết yếu tối thiểu (MEM) các axit amin không thiết yếu (1X; Life Technologies) và 10 $\mu\text{l/L}$ 2-mercaptoetanol (Life Technologies)] ở mật độ $1 \times 10^6/\text{ml}$ và có bổ sung IL-2 (100IU/ml) đơn độc hoặc IL-2 + IL-15 (20ng/ml). Các tế bào này được nhân giống ở mật độ $2 \times 10^5/\text{giếng}$ vào các đĩa đáy bằng 96 giếng (Corning) hoặc ở mật độ $2 \times 10^6/\text{giếng}$ vào các đĩa 12 giếng (Corning) để nhân rộng. Các tế bào này được theo dõi hàng ngày bằng kính hiển vi, được nạp liệu môi trường mới và xytokin được thêm vào 3 lần/tuần. Khi hợp dòng hoàn toàn và các thể kết tụ tế bào có thể nhìn thấy được, các tế bào này được chia theo tỷ lệ 1:1 tương ứng vào các giếng và đĩa bổ sung. Các tế bào này được thu gom và phân tích bằng cách sử dụng đếm tế bào dòng chảy hoặc được sử dụng cho các thử nghiệm chức năng sau 7, 14 hoặc 21 ngày tùy thuộc vào thử nghiệm này. Nếu cần đến các tế bào T $\gamma\delta$ tinh khiết, các tế bào này được tái tạo huyền phù trong 1ml dịch đệm FACS (PBS có chứa 2% huyết thanh bào thai bò được bất hoạt bằng-nhiệt và 0,01M EDTA) và nhuộm màu cho thụ thể tế bào T $\alpha\beta$ (Biolegend, clon IP26, 1:50) trong 30 phút trong bóng tối trên đá và tất cả các tế bào âm tính được phân loại bằng cách sử dụng thiết bị phân loại Aria chạy DIVA (BD Biosciences).

Đồng nuôi cấy với các nguyên bào sợi

Cho mỗi lần chuẩn bị nuôi cấy trên khung lưới, các tác giả đã chuẩn bị 2 đĩa petri (100x25mm, Corning) mà được làm xước ở một vài chỗ bằng cách dùng dao mổ. Các mảnh da đã cắt nhỏ được đặt lên các vết xước. Sau từ 5 đến 10 phút làm khô trong không khí, các mảnh da này thường dính vào đĩa và 10 ml môi trường Da-T được thêm vào. Môi trường được thay mới 1 lần/tuần và các nguyên bào sợi sơ cấp được thu gom sau khi xử lý bằng ACCUTASE® (Life Technologies) sau 3 tuần sinh trưởng. Các nguyên bào sợi được nhân giống trong đĩa 48 giếng ở 1×10^4 hoặc vào buồng đáy bằng của các đĩa 24 giếng ở 2×10^4 trong các thử nghiệm Transwell. Sau từ 2 đến 3 ngày, các nguyên bào sợi

đạt đến trạng thái hợp dòng và bắt đầu các thử nghiệm đồng nuôi cấy bằng cách sử dụng RPMI và các xytokin được chỉ ra, thêm vào 2×10^5 lympho bào của da hỗn hợp trong trường hợp các đĩa 48 giếng, hoặc 3×10^5 các lympho bào trong trường hợp các đĩa 24 giếng, các giếng đáy bằng cũng như Transwell.

Đếm tế bào dòng chảy

Thực hiện đếm tế bào dòng chảy bằng cách sử dụng các kháng thể sau đây, được ghép với các chất tạo màu huỳnh quang được chỉ ra: Ki-67-BV421, CD3-BV510, Vδ1-PeVio770, TIM-3-PE, CD9-PE, CCR3-BV421, CD39-BV421. Tất cả các mẫu cũng luôn được nhuộm màu đối với khả năng sống, bằng cách sử dụng eFluor770NIR. Các kháng thể có bán sẵn được mua từ Biolegend hoặc Miltenyi. Chất nhuộm màu khả năng sống (gần hồng ngoại (IR)) là của eBioscience. Thực hiện nhuộm màu Ki-67 trên các tế bào được cố định và tạo tính thấm bằng cách sử dụng bộ đệm nhuộm màu Foxp3 (eBioscience). Khi mỗi thử nghiệm kết thúc, rửa quần thể tế bào trong PBS và chia làm đôi. Các tế bào này được nhuộm màu bằng eFluor770 NIR đối với khả năng sống và được rửa, tiếp đó bằng TrueStain (Biolegend) để tránh gắn kết không đặc hiệu của các kháng thể nhuộm màu. Một nửa mẫu này được nhuộm màu cho các chất đánh dấu bề mặt đã chỉ ra, trong khi nửa còn lại chỉ được nhuộm màu các chất đánh dấu dòng giống (CD3, Vδ1) và với đối chứng isotyp tương đương cho các chất đánh dấu bề mặt được sử dụng. Nghĩa là kháng thể isotyp của chuột phù hợp được tiếp hợp với cùng chất tạo màu huỳnh quang này được sử dụng ở cùng nồng độ. Đối chứng isotyp không gắn kết với kháng nguyên của người đã biết và do đó chỉ thị sự gắn kết không đặc hiệu hoặc các dương tính giả. Đây còn được gọi là âm tính thực sự. Mỗi biểu đồ (sắc màu) được thể hiện so với đối chứng isotyp của nó (không tô màu, đường nét đứt). Các tóm tắt dữ liệu cho thấy tỷ lệ % các tế bào mà nhuộm màu dương tính đối với chất đánh dấu được chỉ ra và do đó ở mức cao hơn so với isotyp. Thực hiện phân tích đếm tế bào dòng chảy trên FlowJo (Phiên bản 10.1).

Giải trình tự ARN

Các tế bào T Vδ1 từ da của người và các tế bào T Vδ1 trong máu của người (sau khi nhân rộng được khởi đầu bằng thụ thể tế bào T) được phân loại (FACS), ly tâm và

pellet tế bào được tái tạo huyền phù trong dịch đệm RLT. ARN được điều chế bằng cách sử dụng bộ kit RNA-Micro-plus (QIAGEN). Các thư viện ARN được tạo ra bằng cách sử dụng bộ kit KAPA Stranded RNA-seq với RiboErase (HMR) (KAPA BIOSYSTEMS). Bước giải trình tự đầu được ghép cặp trên HiSeq 2500 (illumina) sử dụng hoá học chạy nhanh (độ dài đọc: 100 cặp bazơ (bp)). Các kết quả đọc đầu được ghép cặp 101 cặp bazơ được sắp thẳng và định lượng bằng cách sử dụng RSEM (v1,2.11) với Bowtie2. Các kết quả đọc được sắp thẳng theo hệ phiên mã của người, các giá trị đọc được biến đổi log2 và được chuẩn hoá điểm phân vị.

Định lượng xytokin

Các tế bào T Vδ1 từ da của người được kích thích bằng PMA và Ionomycin hoặc mAb kháng CD3 gắn kết đĩa (OKT3, 5µg/ml) trong 24 giờ. Sau đó, thu lấy các dịch nổi và phân tích bằng cách sử dụng xytokin của người ProcartaPlex & pan chemokine 1A (34 plex) của eBioscience. Phân tích các thử nghiệm bằng cách sử dụng Luminex FlexMap3D (Luminex Corp). Phân tích dữ liệu trong Microsoft Excel, giá trị trung bình của 3 người cho (tiến hành lặp lại hai lần) được thể hiện. Các thanh sai số chỉ độ lệch chuẩn.

Nhân rộng các tế bào T γδ thu được từ máu

Các tế bào T γδ thu được từ máu trong PBMC chỉ có thể được nhân rộng nếu được kích thích bằng các phối tử TCR (trong trường hợp Vδ2, ví dụ IPP, HMBPP, bisphosphonat) (41, 42) hoặc bổ sung kháng thể để liên kết ngang thụ thể TCR (mAb) hoặc kinaza kết hợp TCR CD3 (43). Cũng có thể đạt được hiệu quả liên kết ngang TCR tương tự bằng cách sử dụng lectin, như PHA. Khi không bổ sung thêm các tác nhân kích thích TCR này, các tế bào T γδ trong PBMC sống sót trong vài ngày, nhưng không nhân rộng được và vẫn giữ được thành phần ban đầu của các phân nhóm tế bào T của chúng với các thay đổi không đáng kể.

Máu từ người tình nguyện khoẻ mạnh được sử dụng để phân lập các PBMC bằng cách phết lớp máu toàn phần lên Ficoll, tiếp đó ly tâm ở 400g trong 20 phút để phân tách các tế bào hồng cầu, huyết tương và các lympho bào bạch cầu/các bạch cầu đơn nhân. Các

tế bào bạch cầu được thu gom cẩn thận bằng Stripette và rửa bốn lần trong PBS lạnh. Các tế bào này được tái tạo huyền phù trong môi trường RPMI-1640 (Life Technologies) với 10% huyết thanh bào thai bò được bất hoạt bằng nhiệt (Life Technologies), L-glutamin (292 µg/ml; Life Technologies), penixilin (100 đơn vị/ml; Life Technologies), streptomycin (100 µg/ml; Life Technologies), axit N-2-hydroxyetyl piperazin-N-2-etan sulfonic (HEPES; 0,01 M; Life Technologies), natri pyruvat (1 mM; Life Technologies), môi trường thiết yếu tối thiểu (MEM) các axit amin không thiết yếu (1X; Life Technologies) ở mật độ 1×10^6 /ml và có bổ sung IL-2 (100IU/ml). Các tế bào này được chuyển vào đĩa 24 giếng có phủ kháng thể đơn dòng pan $\gamma\delta$ TCR (20µg/ml, clon B1, Biolegend) 90 phút trước khi chuyển tế bào. Các tế bào này được sinh trưởng trong 14 ngày, môi trường được thay 2-3 ngày một lần và xytokin mới được thêm vào. Khi đạt đến hợp dòng, các tế bào này được chia 1:1. Trong các điều kiện này, sau 14 ngày, quần thể thứ yếu ban đầu của các tế bào T $\gamma\delta$ thường được kích hoạt mạnh thông qua TCR của chúng (như được chỉ ra bằng quá trình điều tiết tăng nếu là CD69 và CD25) và được làm giàu phần lớn gồm có chủ yếu các tế bào T V δ 2 nhưng cả các tế bào T V δ 1 (tối đa 30% trong toàn bộ các tế bào T $\gamma\delta$). Các tế bào T V δ 1 có thể được phân lập sau đó bằng cách sử dụng FACS để phân tích chức năng, kiểu hình, hoặc di truyền.

Kết quả

Các tế bào T $\gamma\delta$ của người có nhiều ở da, biểu hiện TCR không phải là V δ 2 và tham gia vào đáp ứng giám sát căng thẳng bạch huyết ở người

Sử dụng quy trình Clark (29), các tác giả đã sử dụng các mẫu da dư thừa của người có bổ sung IL-2 và IL-15 để tạo điều kiện cho tăng trưởng nhanh các lympho bào cư trú ở mô trong thời gian 3 tuần thu được quần thể lympho bào chứa trung bình 240.000 tế bào/khung lưới. Phù hợp với các báo cáo trước đây (29), các tác giả có thể nhận diện các phân nhóm lympho bào cư trú ở da phân biệt, với đa số các tế bào biểu hiện TCR $\alpha\beta$ thông thường, phần lớn thuộc loại “TRM” cư trú ở mô. Nói chung, 59,9% ($\pm 8,6$) tế bào CD45+ là CD4+, và 18,3% ($\pm 2,8$) tế bào T $\alpha\beta$ CD8+ với tỷ lệ nhỏ tế bào NK 8,7% ($\pm 3,6$). Ngoài ra, các tác giả phát hiện ra rằng quần thể chủ yếu của các tế bào T $\gamma\delta$ (trung bình 8,513% tế bào CD45+, $\pm 6,564\%$) ở người cho (Fig.1A và Fig.3D). Đại diện phân nhóm

các lympho bào này sau khi nuôi cấy kiểu cơ quan có tính sinh sản cao ở khoảng 100 người cho, và tương đương với các mẫu da mới thủy phân, chỉ khác biệt ở chỗ quần thể $\gamma\delta$ gia tăng nhẹ, nhưng xét theo tính ứng dụng thực tiễn, cho các quần thể lympho bào lớn hơn nhiều và thuần khiết hơn so với các quy trình thủy phân mô tiêu chuẩn. Theo các tài liệu tham khảo về vấn đề phân buồng mô của các tế bào T $\gamma\delta$ của người dựa trên chuỗi delta TCR của chúng, đa số các tế bào T $\gamma\delta$ của da người biểu hiện chuỗi TCR V δ 1 ghép cặp với nhiều chuỗi γ được nhận diện bằng cách đếm tế bào dòng chảy. Điều này trái với đa số các tế bào T $\gamma\delta$ của máu ngoại vi, thể hiện heterodime TCR đặc hiệu đơn nhất của chuỗi V δ 2 được liên kết với V γ 9 và hầu như không có trong các mẫu da của người. Tuy nhiên, điều quan trọng cần lưu ý là phân nhóm đáng kể không biểu hiện TCR V δ 1 hay TCR V δ 2, dẫn đến tên gọi các tế bào T $\gamma\delta$ “âm tính kép” (Fig.1C).

Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da được đề sinh trưởng theo cách này thể hiện kiểu hình ghi nhớ được biệt hoá không theo cách đầu tận cùng, không có biểu hiện CD45RA và biểu hiện các mức thay đổi phân tử đồng kích thích CCR7. Tương tự với các tế bào T trong máu tuần hoàn thông thường, có biểu hiện mạnh protein bề mặt CD69 cùng với biểu hiện thụ thể chết theo chương trình 1 (PD-1); các mức từ thấp cho đến không có thụ thể IL-2 α (CD25); và không có phân tử đồng kích thích CD28 cho thấy là các tế bào T được kích hoạt trước đó hoặc được kích hoạt mạn tính (Fig.1D). Phù hợp với việc khu trú ở mô của chúng, các tế bào V δ 1 và DN thể hiện có biểu hiện các chất đánh dấu cư trú ở da và mô, như CLA, CCR4, CCR8 và integrin α E (CD103) (xem Fig.7). Bộ chất đánh dấu cư trú ở mô này có thể chứng minh là có lợi trong bối cảnh liệu pháp miễn dịch. Ngoài ra, các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da thể hiện các mức biểu hiện cao đối với thụ thể kích hoạt NKG2D (Fig.2A), ngụ ý vai trò có thể có của các tế bào này trong đáp ứng giám sát căng thẳng bạch huyết. Các phối tử NKG2D, như MICA, MICB và ULBPs, tương ứng được điều tiết tăng bởi các tế bào đáp ứng với tổn thương ADN, kích hoạt thụ thể EGF và căng thẳng oxy hoá và do đó có thể cho phép các tế bào T biểu hiện NKG2D để nhận diện và tiêu diệt các tế bào bị căng thẳng hoặc đã biến nạp, nhờ đó duy trì cân bằng nội mô. Phù hợp với nguyên tắc này, các tác giả đã phát hiện ra rằng các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da được nhân rộng bằng phương pháp của sáng chế được kích hoạt khi phơi nhiễm với các phối tử

tái tổ hợp đối với thụ thể NKG2D (MICA, ULBP2) chứng tỏ quá trình khử hạt như được đo bằng mức điều tiết tăng protein màng kết hợp lysosom CD107a (Fig.2A). Dấu hiệu tương tự bẩm sinh này là độc nhất với các tế bào T $\gamma\delta$ DN và V δ 1+, do các tế bào T cư trú ở mô khác (Fig.2C) và tế bào T $\gamma\delta$ trong máu tuần hoàn hoàn toàn không có đáp ứng này (Fig.10B).

Nói chung, các tế bào T $\gamma\delta$ DN và V δ 1+ cư trú ở da được kích hoạt thực hiện chương trình xytokin có xu hướng TH1 tiền viêm (nhuộm màu dương tính đối với IFN- γ , TNF- α và GM-CSF) khi được kích hoạt bằng PMA/ionomycin hoặc bằng các phối tử NKG2D, ví dụ protein tái tổ hợp MICA (Fig.2A và Fig.2B), nhờ đó khẳng định các đáp ứng tương tự bẩm sinh của các tế bào này. Thực vậy, các đáp ứng với MICA hầu như hoàn toàn bị huỷ bỏ nhờ phong bế thụ thể NKG2D bằng kháng thể (Fig.2B và Fig.2C).

Các tế bào T $\gamma\delta$ đã biết là bài tiết IL-17 trong các trường hợp bệnh nhất định như bệnh vẩy nến và trong một số loại khối u. Các tế bào T $\gamma\delta$ được nhân rộng bằng phương pháp của sáng chế sản sinh IL-17 ở mức thấp hoặc không sản sinh IL-17 thậm chí ngay cả khi kích hoạt mạnh (Fig.2B và Fig.8). Trái lại, các tế bào T $\alpha\beta$ biểu hiện CD4 cư trú ở mô sản sinh IL-17 khi kích hoạt TCR (Fig.2B). Nói chung, các tế bào T $\alpha\beta$ thể hiện danh mục xytokin đa dạng hơn nhiều khi đáp ứng với PMA/ionomycin so với các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN, mà bị hạn chế ở chương trình có xu hướng TH1 kết hợp với bảo vệ vật chủ.

Phân tách từ mô gây kích hoạt và tăng sinh ở các tế bào T $\gamma\delta$ ở mô của người

Để nghiên cứu tiếp mô của người, các tế bào T $\gamma\delta$ và sinh học của chúng, các tác giả đã chuyển các lympho bào da hỗn hợp vào các giếng nuôi cấy tế bào và bổ sung thêm IL-2 để duy trì khả năng sống theo thời gian. Thú vị là, các tác giả đã nhanh chóng phát hiện ra rằng nhờ phân tách khỏi các tế bào mô đệm và biểu mô có mặt trong quy trình nuôi cấy kiểu cơ quan, các tế bào T V δ 1 thể hiện một cách độc đáo các dấu hiệu kích hoạt và tăng sinh mà không cần bổ sung thêm kích thích bất kỳ nào khác. Trong thời gian ít hơn 7 ngày, các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN điều tiết tang duy nhất và ở yếu tố nhân Ki-67 và gia tăng biểu hiện bề mặt của thụ thể IL-2 α (CD25) (Fig.3B và Fig.4B). Nổi bật là, trong thời gian 3 tuần và chỉ với sự có mặt của IL-2, các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN thu được từ mô tăng trưởng nhanh hơn tất cả các phân nhóm tế bào T khác, để biểu thị đến

65% trong số toàn bộ các lympho bào của da, gia tăng về số lượng trung bình 127,18 lần, trong khi các tế bào T $\alpha\beta$ chỉ nhân lên 5,21 lần ($p=0,0124$) như được đo bằng số lượng tế bào tuyệt đối (Fig.3A). MFI của yếu tố nhân kết hợp chu trình tế bào KI-67 gia tăng từ 2664,5($\pm 1876,1$) đến 8457,7($\pm 4574,2$) trong 14 ngày ở các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN, trong khi đó ở các tế bào T $\alpha\beta$, MFI giảm từ 592,8($\pm 390,5$) xuống còn 284,7($\pm 140,1$) trong cùng khoảng thời gian này (Fig.3C). Hiện tượng tăng trưởng nhanh của tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở da chọn lọc này có thể được chứng minh tiếp bằng cách sử dụng IL-15 tái tổ hợp bổ sung, chất này gia tăng khả năng sống và tổng số các lympho bào.

Các tế bào T $\gamma\delta$ của da bị ức chế tích cực bởi các nguyên bào sợi theo cách phụ thuộc tiếp xúc

Sự nhân rộng đáng kể các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN đã mô tả ở trên không bao giờ xảy ra trong các hệ nuôi cấy kiểu cơ quan, trong đó có tăng trưởng mạnh mẽ nguyên bào sợi. Do đó, các tác giả đã nuôi cấy các nguyên bào sợi tự thân để thử nghiệm trực tiếp liệu quá trình đồng nuôi cấy của chúng với các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN có ức chế sự nhân rộng các tế bào T này hay không. Sau 3 tuần nuôi cấy trên khung lưới, các tác giả đã nhân giống các lympho bào da hỗn hợp vào các giếng không có gì hoặc có chứa đơn lớp hợp dòng đã thiết lập trước đó của các nguyên bào sợi, và trong mỗi trường hợp có bổ sung môi trường này với IL-2 ngoại sinh, để duy trì tăng trưởng của tế bào T. Ngoài ra, các tác giả đã sử dụng Transwell mà ngăn ngừa các tế bào lympho T không cho tiếp tiếp xúc trực tiếp các nguyên bào sợi trong cùng giếng, nhưng cho phép chúng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố hoà tan bất kỳ của nguyên bào sợi. Trong 14 ngày đồng nuôi cấy, với các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN bắt đầu tăng sinh trong các giếng trong đó không có nguyên bào sợi và trong các giếng trong đó tế bào T bị ngăn không cho tiếp xúc trực tiếp với nguyên bào sợi. Như trước đây, quá trình tăng sinh tế bào T $\alpha\beta$ là ở mức thấp trong tất cả các điều kiện. Đáng chú ý là, khi các tế bào T được cho phép tiếp xúc với các nguyên bào sợi, thì tốc độ tăng trưởng trong 2 tuần của các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN bị giảm đáng kể, từ 22,6 (SEM 8,07) lần trong các giếng không có tiếp xúc nguyên bào sợi xuống còn 3,3 (SEM 0,17) lần (Fig.4A). Sự ức chế qua trung gian tiếp xúc này còn được khẳng định tiếp bằng việc không có điều tiết tăng CD25, Ki-67 và yếu tố phiên mã T-bet ở V δ 1 trong thời gian 7

ngày so với các lympho bào được sinh trưởng đơn độc (Fig.4B). Dạng kiểm soát qua trung gian-mô nhất định của hệ thống miễn dịch đường như có vai trò cơ bản để duy trì cân bằng nội mô, do nếu không có kiểm soát này, sẽ có nguy cơ bị viêm nhiễm dai dẳng. Sự điều tiết mang tính ức chế các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN bởi các nguyên bào sợi mô đệm đường như là một ví dụ của kiểm soát này.

Tóm lại, kiểu hình của các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN cư trú ở da và các tiềm năng chức năng nổi bật của chúng phản ánh việc các tế bào T được kích hoạt trước đó mà thường bị kiểm soát bởi các nguyên bào sợi của da bên cạnh thông qua cơ chế phụ thuộc tiếp xúc mà chưa được xác định đặc tính. Làm bất hoạt cơ chế đó bằng cách giải phóng các tế bào T không cho tiếp xúc với các nguyên bào sợi cho phép chọn lọc nhân rộng đáng kể các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN, trong khi đó các tế bào T khác ở da không bị ảnh hưởng.

Giải phóng ức chế qua trung gian tiếp xúc làm cho các tế bào T V δ 1 của da đáp ứng xytokin có xu hướng TH1 độc tính tế bào

Các lympho bào thu được từ da hỗn hợp được nhân rộng trong 14 ngày, và phân loại tế bào kết hợp huỳnh quang được sử dụng để loại bỏ các tế bào T $\alpha\beta$ từ các tế bào T $\gamma\delta$ mà nhờ đó có thể thu được với độ tinh khiết lên đến 90%. Các tế bào đã làm giàu này được để lắng vào các giếng nuôi cấy tế bào ở nồng độ 150.000 tế bào/giếng trong môi trường RPMI có chứa 10% FCS, từ đó các dịch nổi được thu gom 24 giờ sau đó và được đánh giá đối với một loạt các xytokin hiệu ứng bằng cách sử dụng bảng dựa trên LUMINEX®. Hoàn toàn bất ngờ, quá trình nhân rộng tế bào T $\gamma\delta$ (chỉ xảy ra khi phân tách chúng khỏi nguyên bào sợi) tự phát sản xuất lượng lớn các xytokin có liên quan đến TH1 như IFN- γ ($12,383,46 \pm 16,618,90$ pg/ml), GM-CSF ($4,316,73 \pm 4,534,96$ pg/ml) và các chemokin tiền viêm CCL4 ($14,877,34 \pm 10,935,64$ pg/ml) và CCL3 ($1,303,07 \pm 757,23$ pg/ml) (Fig.5A).

Ngoài ra, các tế bào này sản xuất lượng lớn IL-13 tự phát, kết hợp với các đáp ứng dị ứng, trong quá trình nhân rộng và trái với các tế bào T $\gamma\delta$ được kích hoạt TCR thu được từ da mới được phân lập; các xytokin khác được sản xuất ở các mức thấp hơn nhiều hoặc

hoàn toàn không được sản xuất, ví dụ IL-17A (Fig.8). Các tiềm năng hiệu ứng cao của các tế bào này có thể được gia tăng hơn nữa sau khi kích thích bằng MICA tái tổ hợp (phối tử NKG2D), bằng liên kết ngang kháng CD3, hoặc bằng PMA/Ionomycin. Để đánh giá tiềm năng độc tính tế bào của các tế bào T $\gamma\delta$ đã nhân rộng kháng lại các tế bào đích ác tính, các tác giả đã sử dụng các dòng tế bào được biến nạp đã thiết lập trong các thử nghiệm đồng nuôi cấy 24 giờ. Các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN thể hiện hoạt tính độc tính tế bào rất cao đối với các tế bào Hela (cổ tử cung) và Caco2 (ruột kết), theo cách phụ thuộc liều dùng, tốt hơn nhiều so với các tế bào T $\alpha\beta$ của mô thông thường (Fig.5B). Ngoài ra, độc tính tế bào qua trung gian tế bào $\gamma\delta$ có thể bị ức chế mạnh bằng cách phong bế thụ thể nhờ sử dụng các kháng thể đơn dòng hoà tan cho thấy là thụ thể này ít nhất phần nào tham gia vào giám sát khối u của các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ da của người đã khử kìm hãm. Các tác giả còn khẳng định được tiềm năng độc tính tế bào của các tế bào này bằng cách sử dụng các đích khác: HCT1954, MDAMB231 (cả hai của caxinom vú) và HCT116 (ruột kết) (Fig.9).

Các tế bào T $\gamma\delta$ cư trú ở mô trong ruột của người

Các tác giả cũng đã nhận diện quần thể cư trú ở mô không tạo máu của các tế bào T $\gamma\delta$ biểu hiện thụ thể tế bào T V δ 1 trong các nuôi cấy khung lưới thu được từ ruột kết của người (Fig.6). Ở 3 người cho, các tác giả có thể nhân rộng các tế bào này bằng cách sử dụng các phương pháp giống như các phương pháp đã sử dụng 15 cho các tế bào da, trong thời gian từ 4 đến 5 tuần. Trong quá trình nhân rộng, các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN thu được từ ruột kết thể hiện kiểu điều tiết tăng Ki-67 tương tự sau khi phân lập chúng từ quy trình nuôi cấy tế bào kiểu cơ quan giàu nguyên bào sợi. Tương tự, các tế bào T $\gamma\delta$ V δ 1+ và DN cư trú ở ruột kết bị kích thích mạnh nhờ cung cấp các phối tử cho thụ thể NKG2D. Trước đây đã có báo cáo là các tế bào T $\gamma\delta$ thu được từ máu được trang bị tốt để có độc tính tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể thông qua biểu hiện CD16, chứng minh độc tính tế bào tăng cường nhắm đích kháng lại u lympho dòng giống tế bào B dương tính CD20 khi kết hợp với rituximab. Tương tự, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL) và các tế bào ung thư vú dương tính HER2 bị tiêu diệt hiệu quả hơn khi được nhắm đích bằng các kháng thể đơn dòng (31). Để đánh giá tiềm năng của các tế bào T

Vδ1 thu được từ da nhắm đích các tế bào đích được opsonin hoá bằng kháng thể, các tác giả đã kiểm tra các mức biểu hiện của 3 thụ thể Fc kết hợp IgG1 CD16, CD32 và CD64. Các tế bào T Vδ1 thu được từ da biểu hiện các mức thấp thụ thể FC CD16 nhưng thể hiện các mức biểu hiện tốt đối với thụ thể IgG CD64 ái lực cao (Fig.11). Do đó, các tế bào T Vδ1 thu được từ mô có thể được trang bị tốt để sử dụng làm chất phụ trợ cho các liệu pháp kháng thể đơn dòng như liệu pháp CD20 hoặc Her2 do chúng sẽ được dẫn hướng bằng kháng thể đến các vị trí ác tính và di căn, nhận biết các tế bào khối u được opsonin hoá và tiêu diệt các đích thông qua ADCC.

Tài liệu viện dẫn

1. Sensi M et al. *Cancer Research*. 2005;65(2):632-40.
2. Gaudin C et al. *Journal of Immunology*. 1999;162(3):1730-8.
3. Echchakir H et al. *Cancer Research*. 2001;61(10):4078-83.
4. Karanikas V et al. *Cancer Research*. 2001;61(9):3718-24.
5. Pieper R et al. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189(5):757-66.
6. Wang RF et al. *Science*. 1999;284(5418):1351-4.
7. Topalian SL et al. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2443-54.
8. Brahmer JR et al. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2455-65.
9. Hodi FS et al. *The New England Journal of Medicine*. 2010;363(8):711-23.
10. Robert C et al. *The New England Journal of Medicine*. 2011;364(26):2517-26.
11. Pardoll DM. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252-64.
12. Fecher LA et al. *The Oncologist*. 2013;18(6):733-43.
13. Ribas A. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(26):2517-9.
14. Vantourout P, Hayday A. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13(2):88-100.
15. Hintz M et al. *FEBS Letters*. 2001;509(2):317-22.
16. Freed-Pastor WA et al. *Cell*. 2012;148(1-2):244-58.
17. Vantourout P et al. *Science Translational Medicine*. 2014;6(231):231ra49.
18. Wrobel P et al. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007;66(2-3):320-8.
19. Todaro M et al. *Journal of Immunology*. 2009;182(11):7287-96.
20. Gertner-Dardenne J et al. *Journal of Immunology*. 2012;188(9):4701-8.
21. Mao C et al. *Journal of Immunol Research*. 2014;2014:593562.
22. Godder KT et al. *Bone Marrow Transplantation*. 2007;39(12):751-7.
23. Fournie JJ et al. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013;10(1):35-41.
24. Curran KJ et al. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33(15):1703-6.
25. Hillerdal V et al. *BioDrugs*. 2015;29(2):75-89.
26. Couzi L et al. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010; 21(1):181-8.
27. Zheng J et al. *Cellular & Molecular Immunology*. 2013; 10(1):50-57.

28. Deniger DC et al. *Molecular Therapy*. 2013; 21(3):638-47.
29. Clark RA et al. 2006. *Journal of Investigational Dermatology*. 126(5):1059-70.
30. Carrasco A. et al 2013. *Journal of Immunological Methods*. 389(1-2):29-37.
31. Tokuyama H. et al. *International Journal of Cancer*. 2008; 122(11):2526-34.
32. Willcox CR et al. *Nature Immunology*. 2012; 13(9):872-9.
33. Gillis and Smith. *Nature*. 1977; 268(5616):154-6.
34. Fujita et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1984; 80(24):7437-41.
35. Grabstein et al. *Science*. 1994; 264(5161):965-8.
36. Helgason C et al. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. U.S. (15 Oct 2004) ISBN: 1588295451.
37. Picot J. *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press Inc., U.S. (9 Dec 2004) ISBN: 1588292223.
38. Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. John Wiley & Sons Inc., (2 Aug 2005) ISBN: 0471453293,
39. Ho WY et al. *Journal of Immunological Methods*. 2006; 310:40-52.
40. Fauci AS et al, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2001; 15th Ed., McGraw-Hill, New York.
41. Petrini I. et al. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009; 39(9):813-8.
42. Gruenbacher et al. *Blood*. 2009; 114(20):4422-31.
43. Almeida et al Clin Cancer Res (2016) 10.1158/1078-0432.CCR-16-0597
44. Deniger D. et al. *Frontiers in Immunology*. 2014;5(636):1-10.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp nhân rộng các tế bào T γδ cư trú ở mô không tạo máu *in vitro*, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào đã thu được từ mô không tạo máu của người hoặc động vật không phải là người khi có mặt interleukin-15 (IL-15), trong đó các lympho bào không tiếp xúc trực tiếp với các tế bào mô đệm hoặc biểu mô trong khi nuôi cấy, và trong đó các lympho bào được nuôi cấy khi không có mặt chất chủ vận con đường thụ thể tế bào T được bổ sung theo cách ngoại sinh.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó các lympho bào này không tiếp xúc trực tiếp với các nguyên bào sợi trong khi nuôi cấy.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào được thu được từ mô không tạo máu của người hoặc của động vật không phải là người khi có mặt IL-2.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy các lympho bào khi không có mặt các tín hiệu kích hoạt TCR hoặc đồng kích thích TCR.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các lympho bào được nuôi cấy khi không có mặt các tế bào mô đệm hoặc biểu mô.
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó các tế bào mô đệm hoặc biểu mô được loại bỏ trước khi nuôi cấy.
7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó các lympho bào được nuôi cấy khi không có mặt các nguyên bào sợi.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó các nguyên bào sợi được loại bỏ trước khi nuôi cấy.
9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các lympho bào được nuôi cấy trong môi trường nhân rộng γδ bao gồm IL-2 và IL-15.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó môi trường nhân rộng γδ không kích hoạt hoặc đồng kích thích các thụ thể tế bào T.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các lympho bào đã thu được từ da, đường tiêu hoá (ví dụ ruột kết), mô tuyến vú, phổi, gan, tụy hoặc tiền liệt tuyến.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó các tế bào T $\gamma\delta$ là các tế bào không phải là V δ 2, như các tế bào V δ 1 hoặc các tế bào T $\gamma\delta$ âm tính kép (DN).

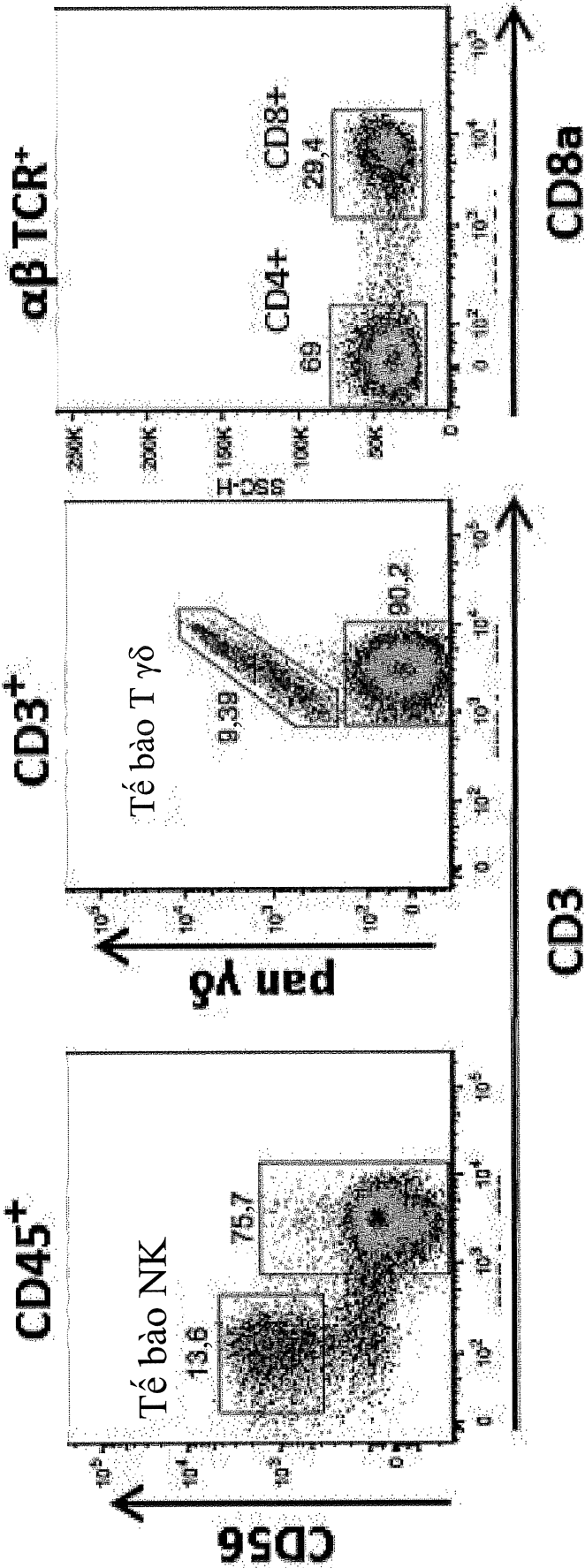


FIG.1A

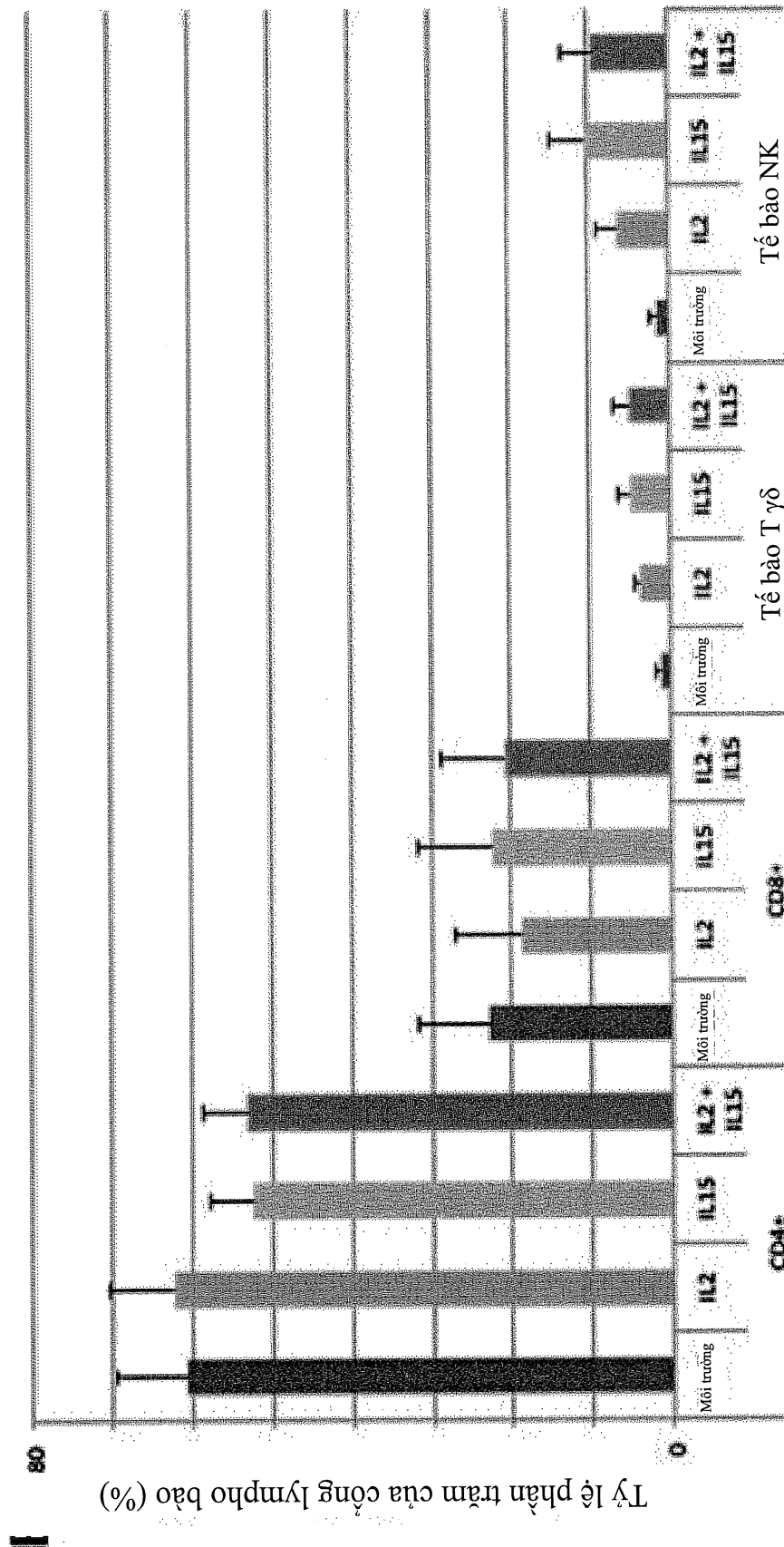


FIG.1B

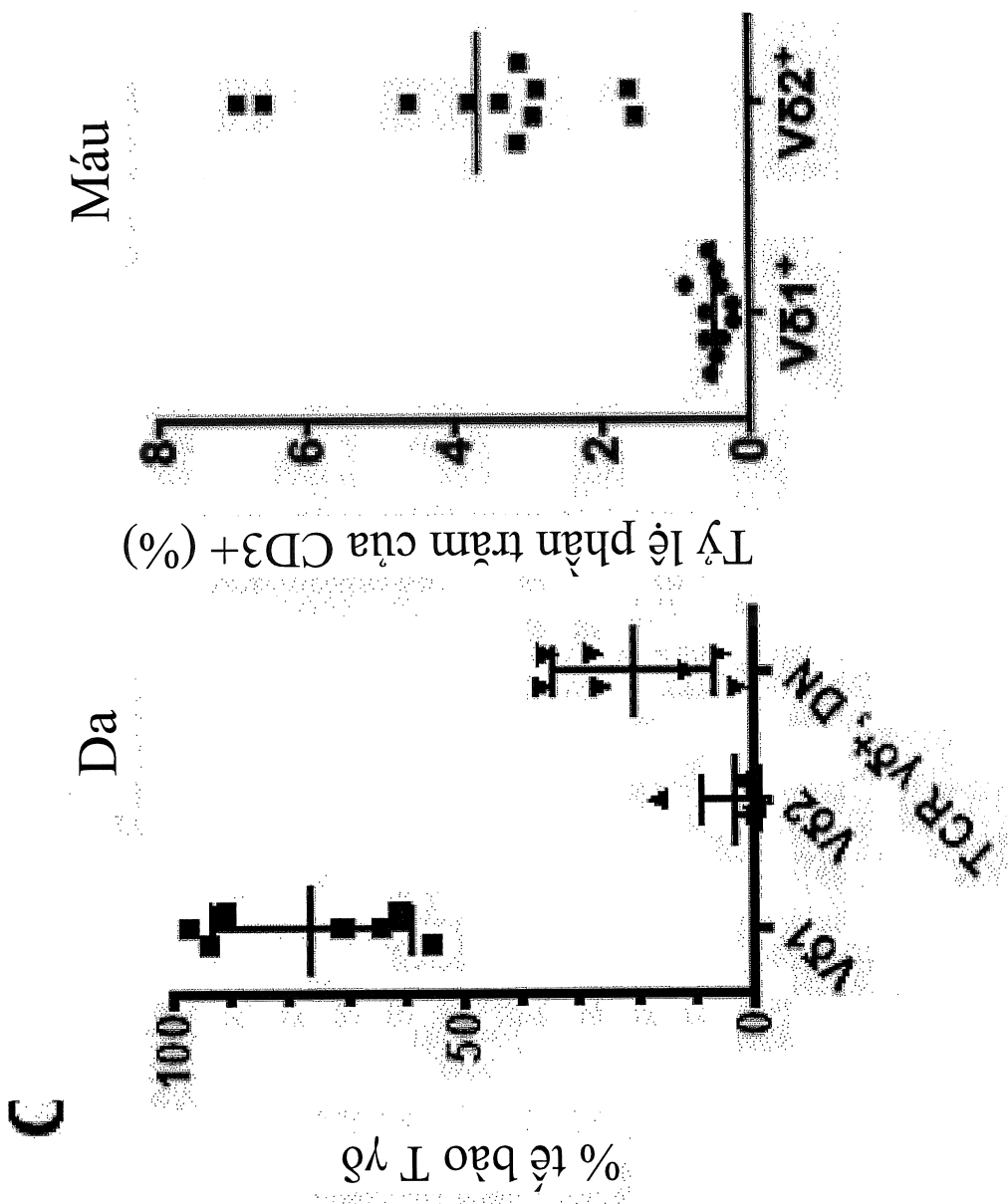


FIG.1C

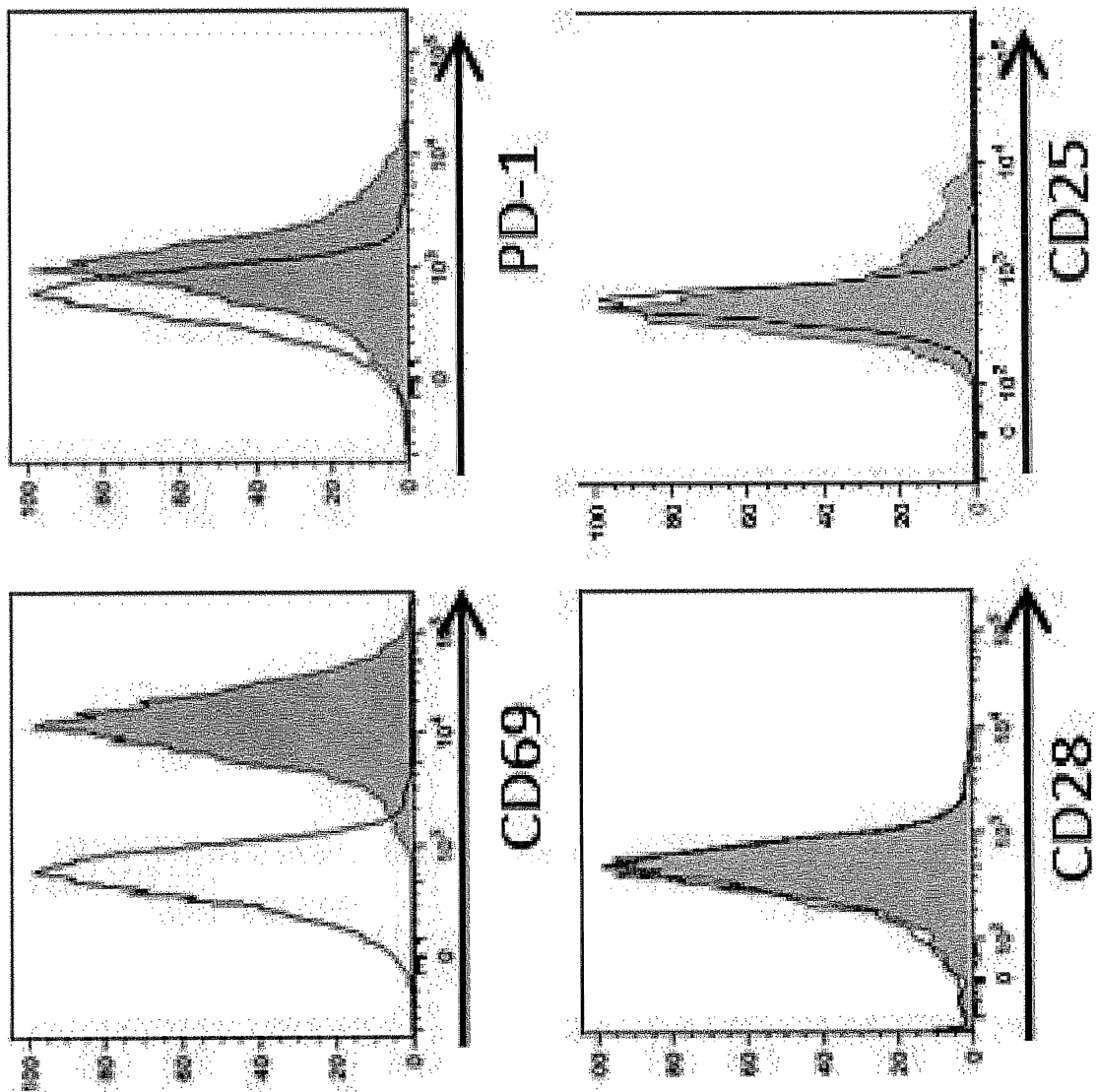


FIG.1D

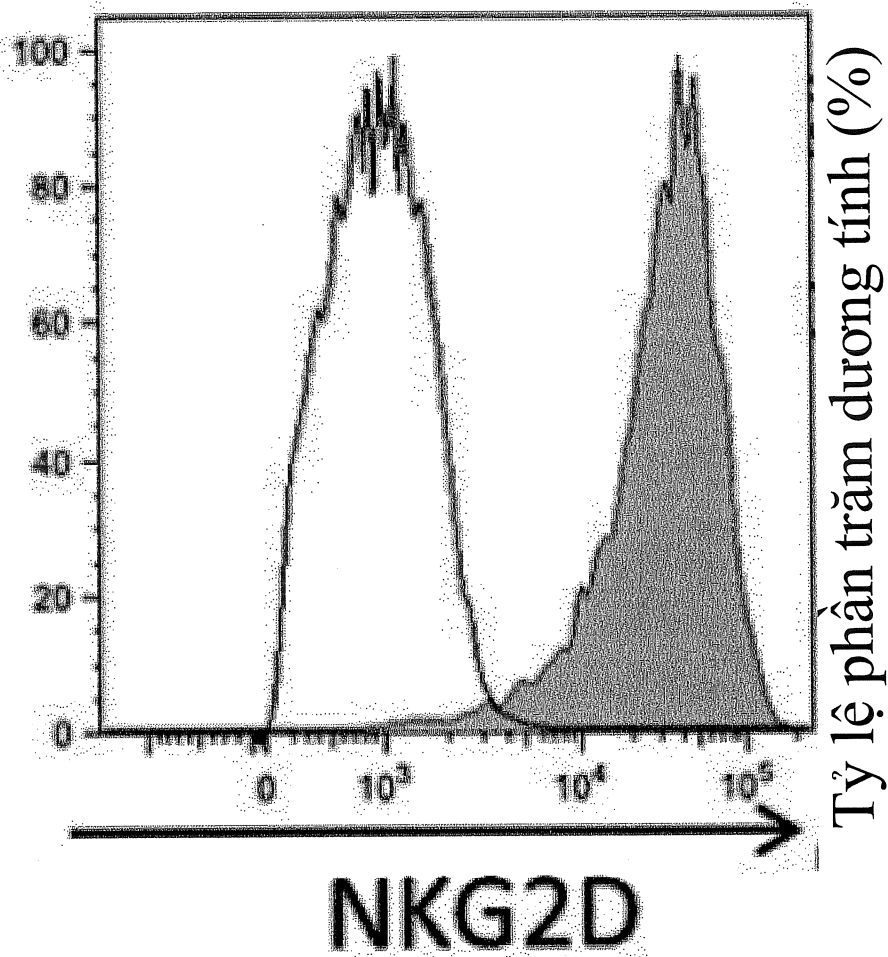
Tế bào T $\gamma\delta$ ở da

FIG.2A

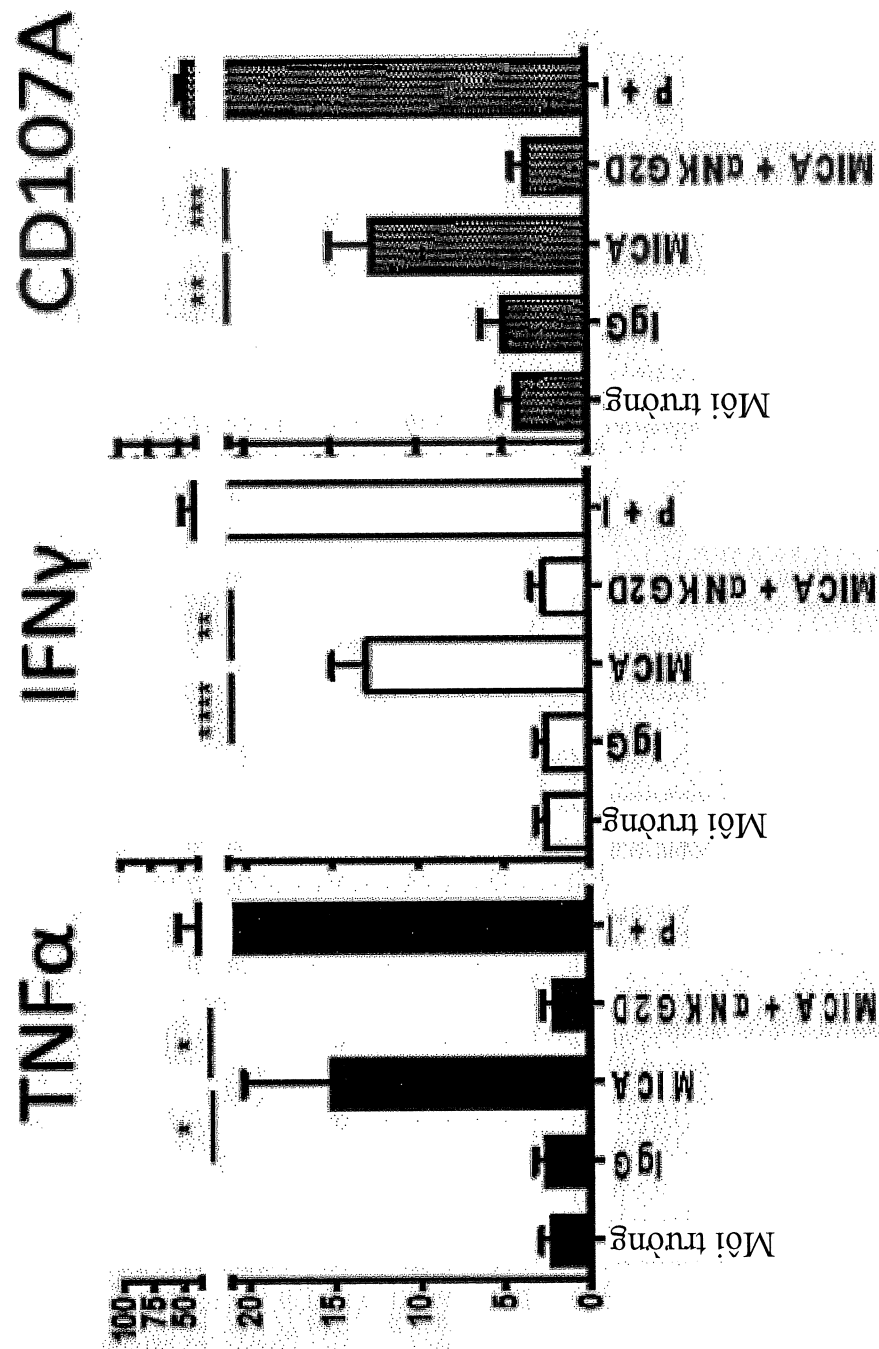


FIG.2A (tiếp)

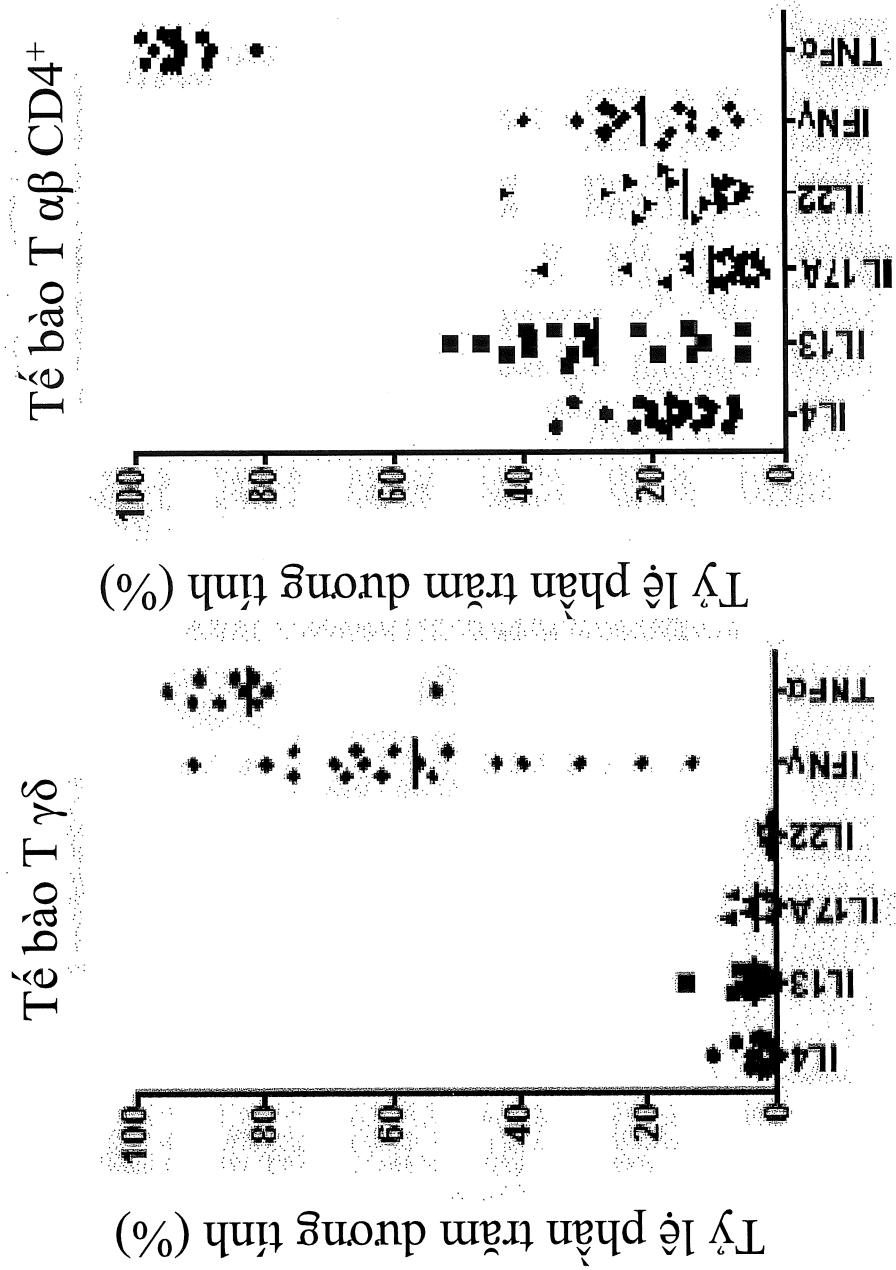


FIG.2B

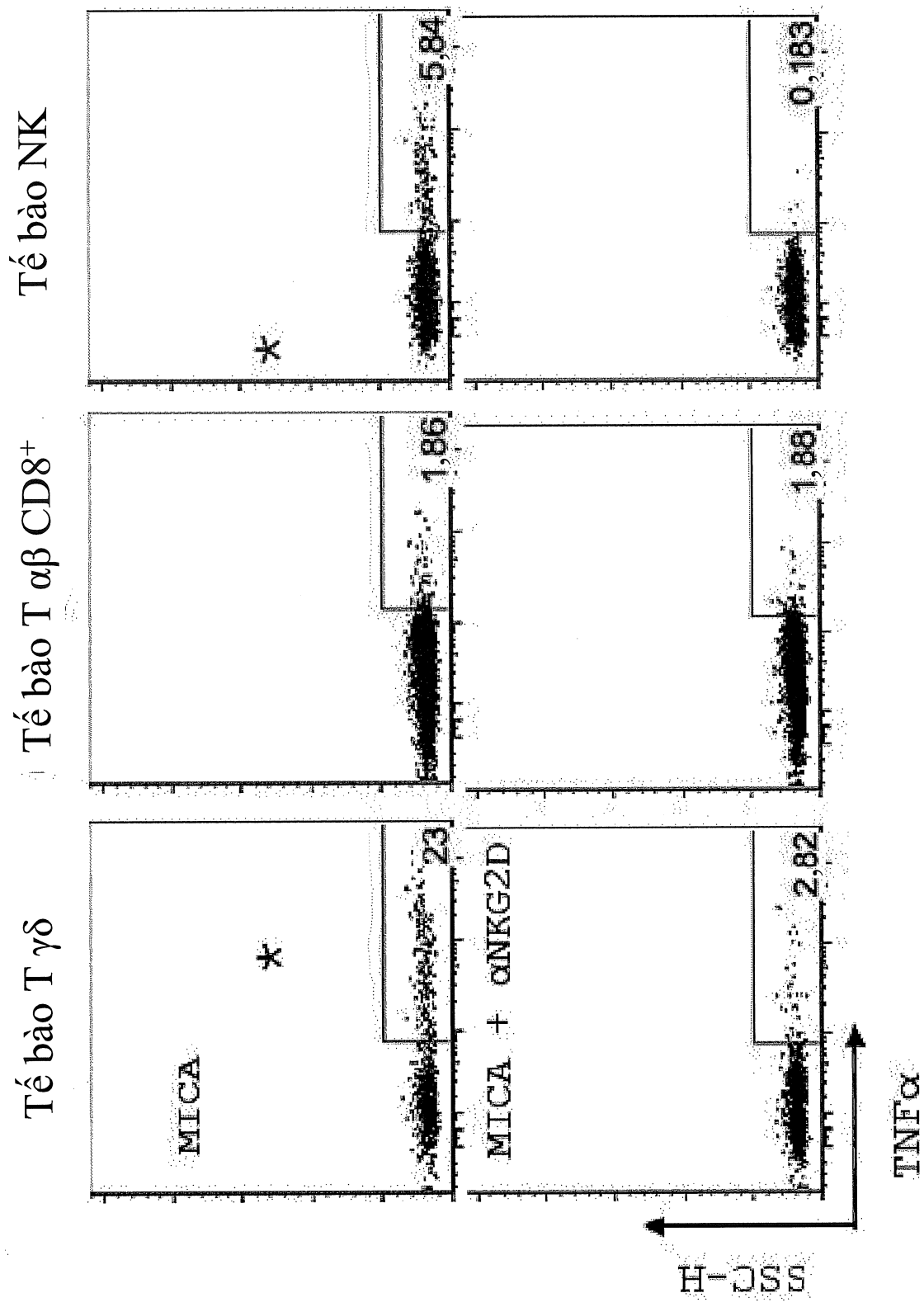


FIG.2C

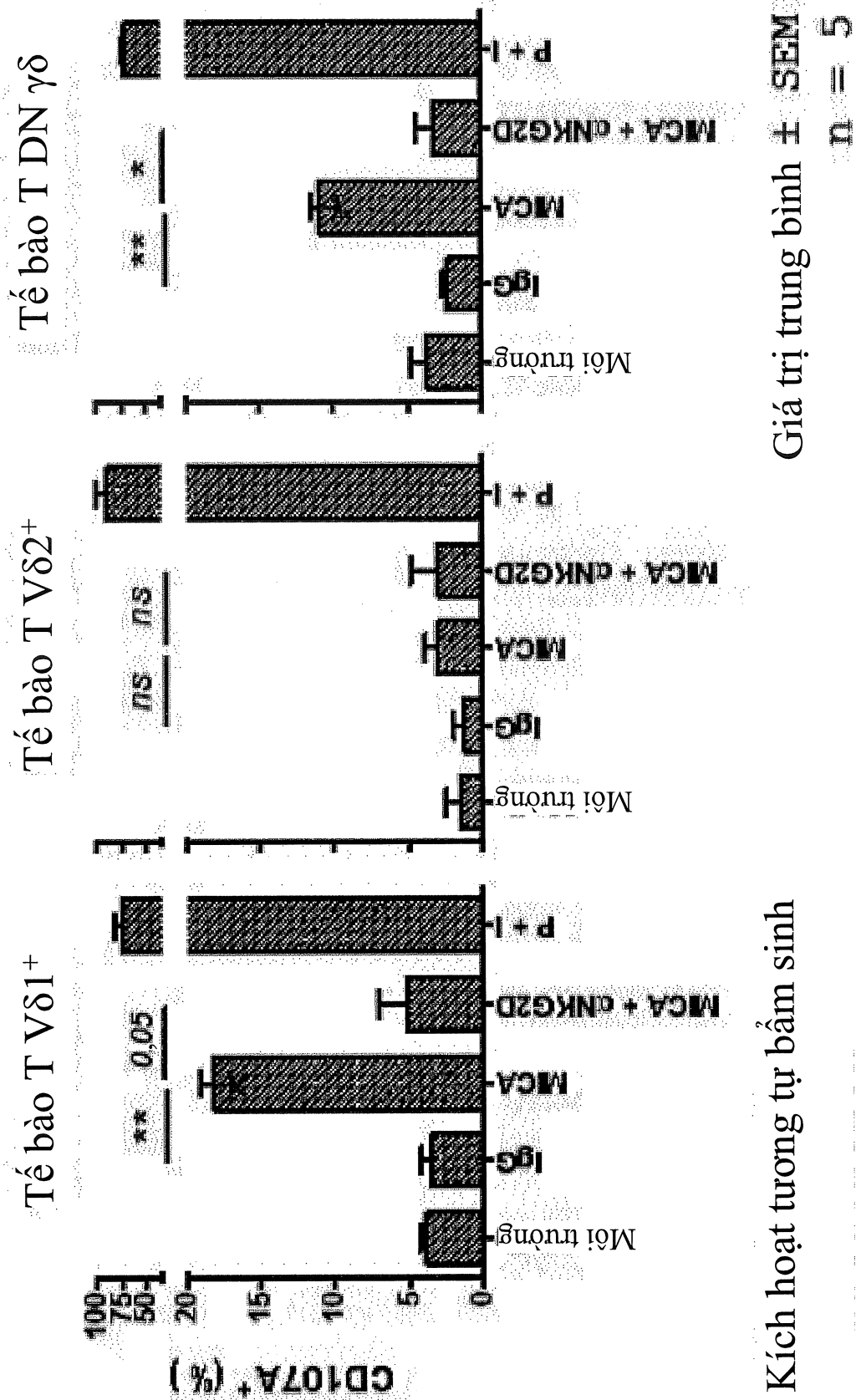


FIG.2D

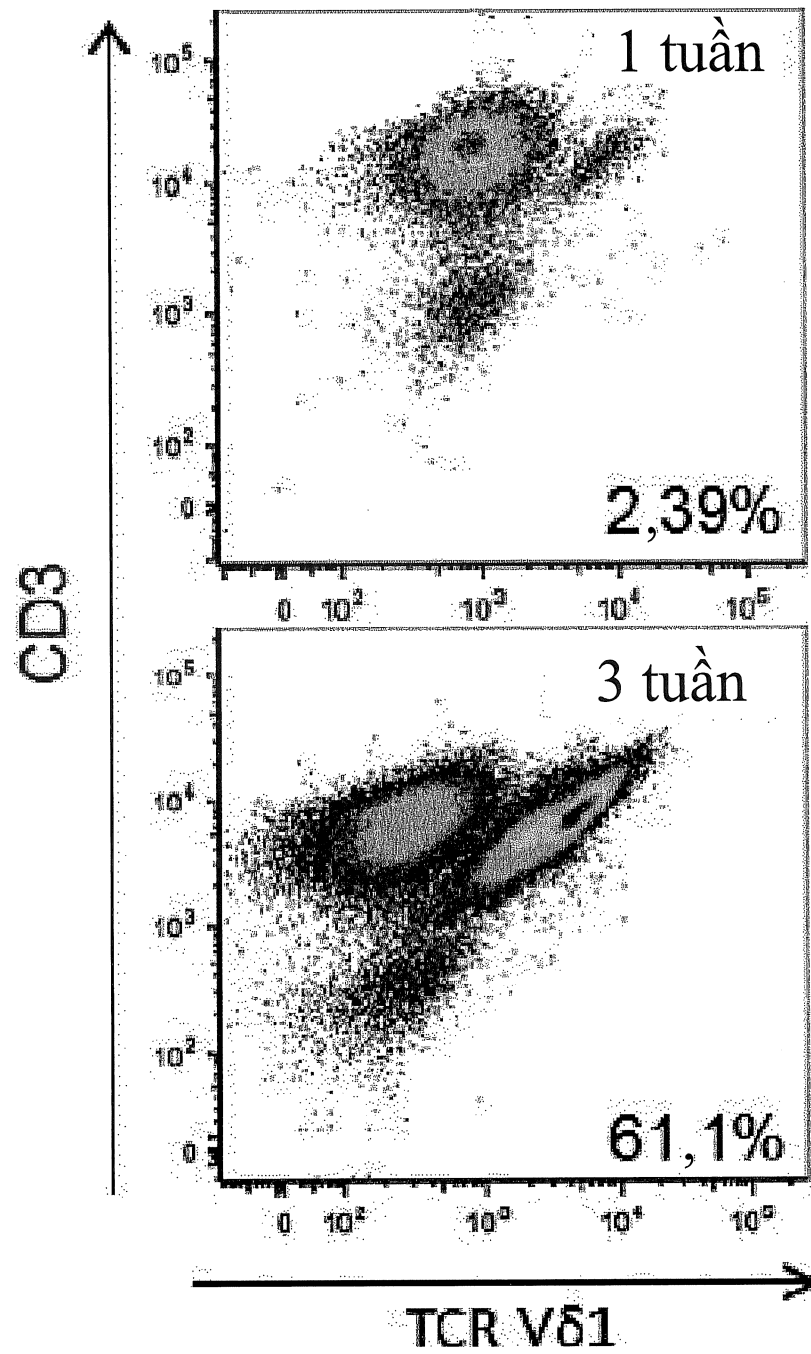


FIG.3A

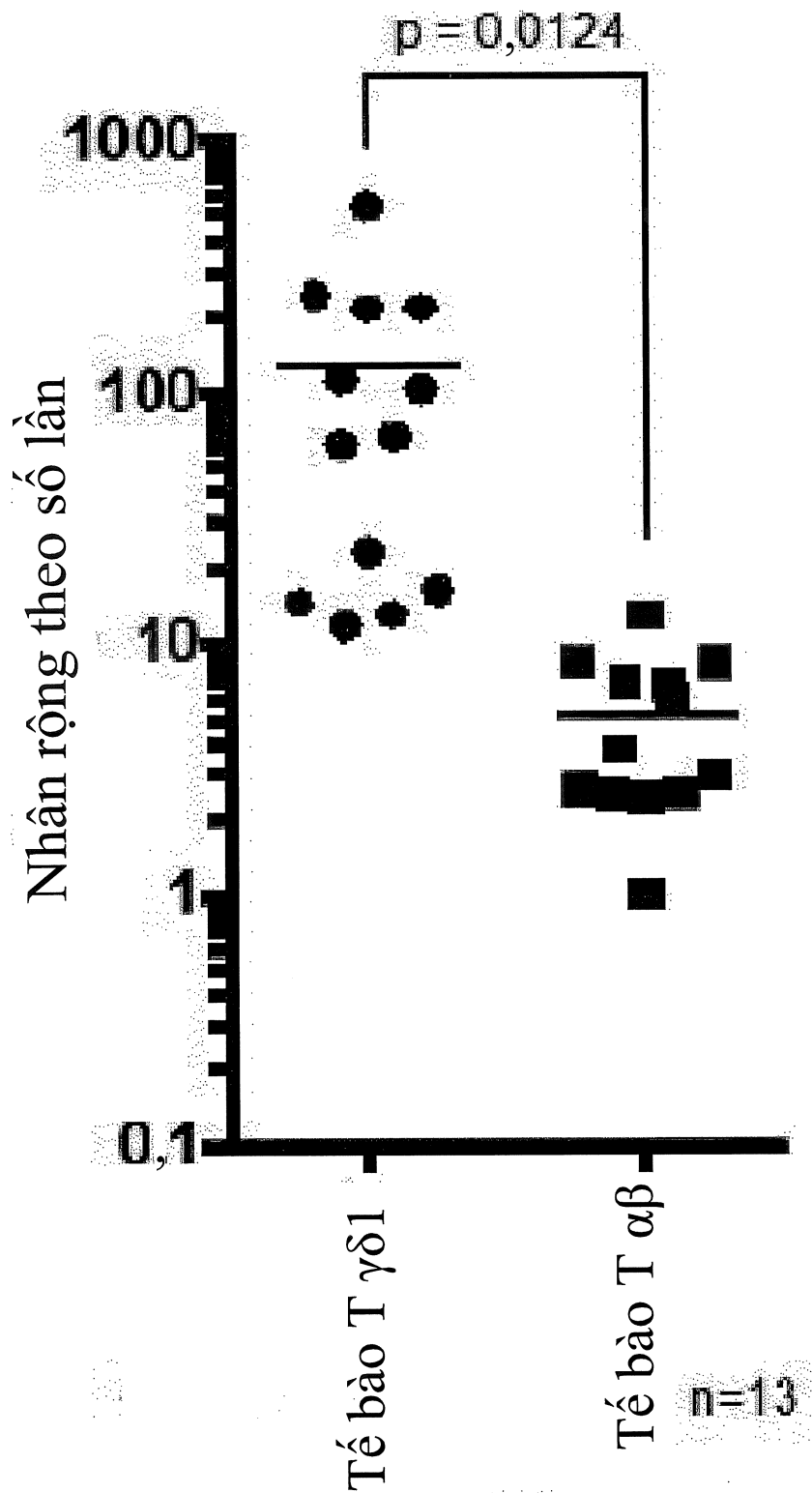


FIG.3A (tiếp)

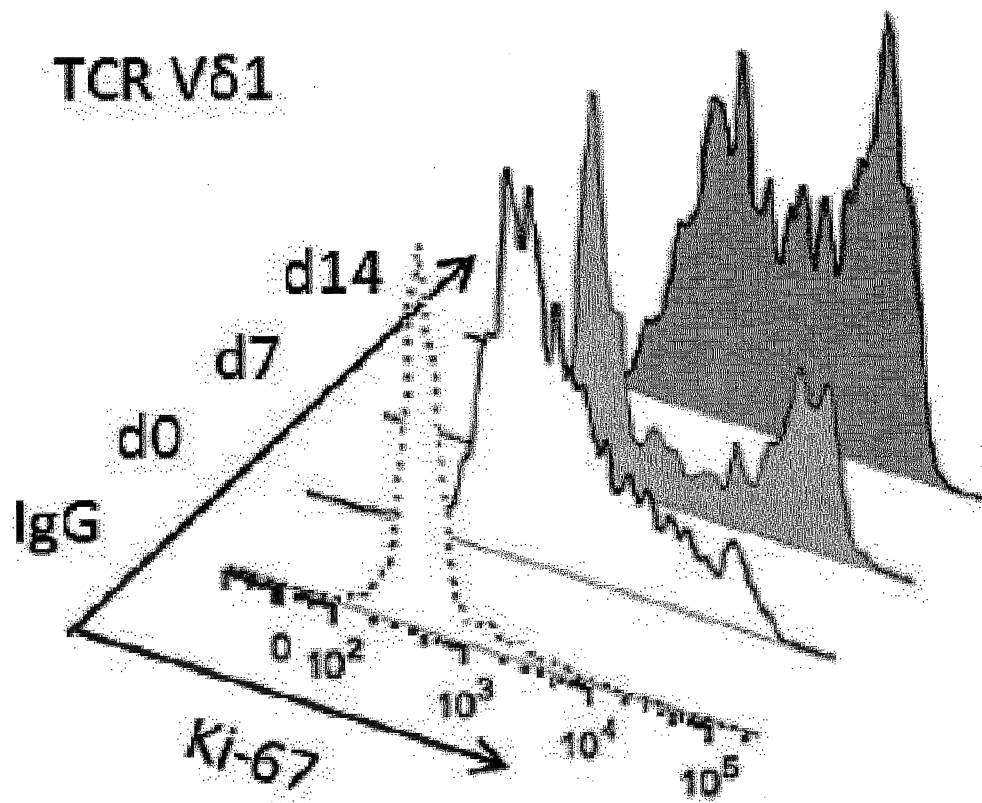


FIG.3B

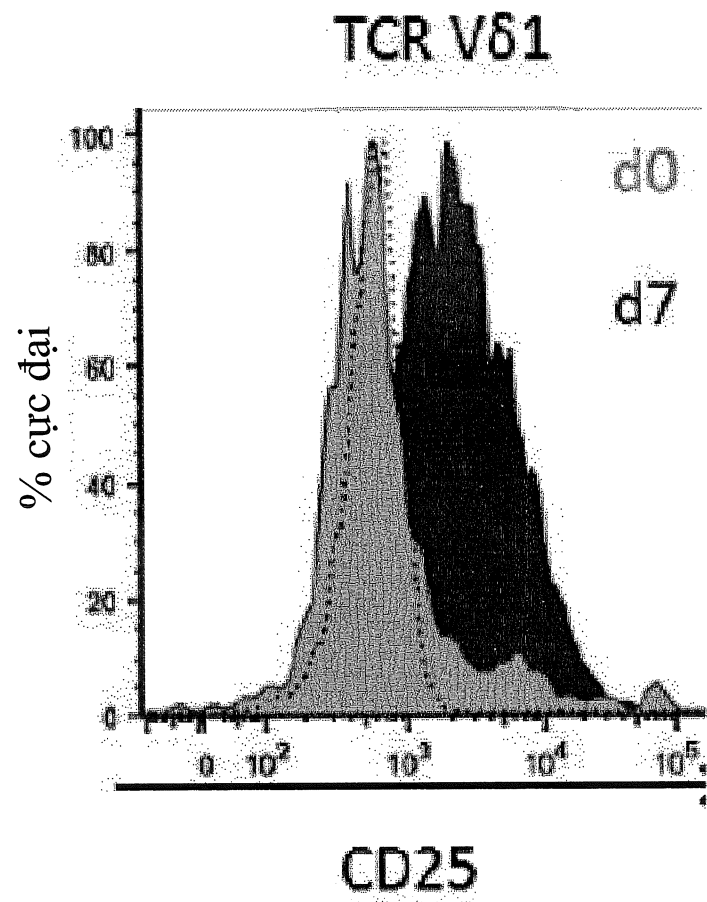


FIG.3B (tiếp)

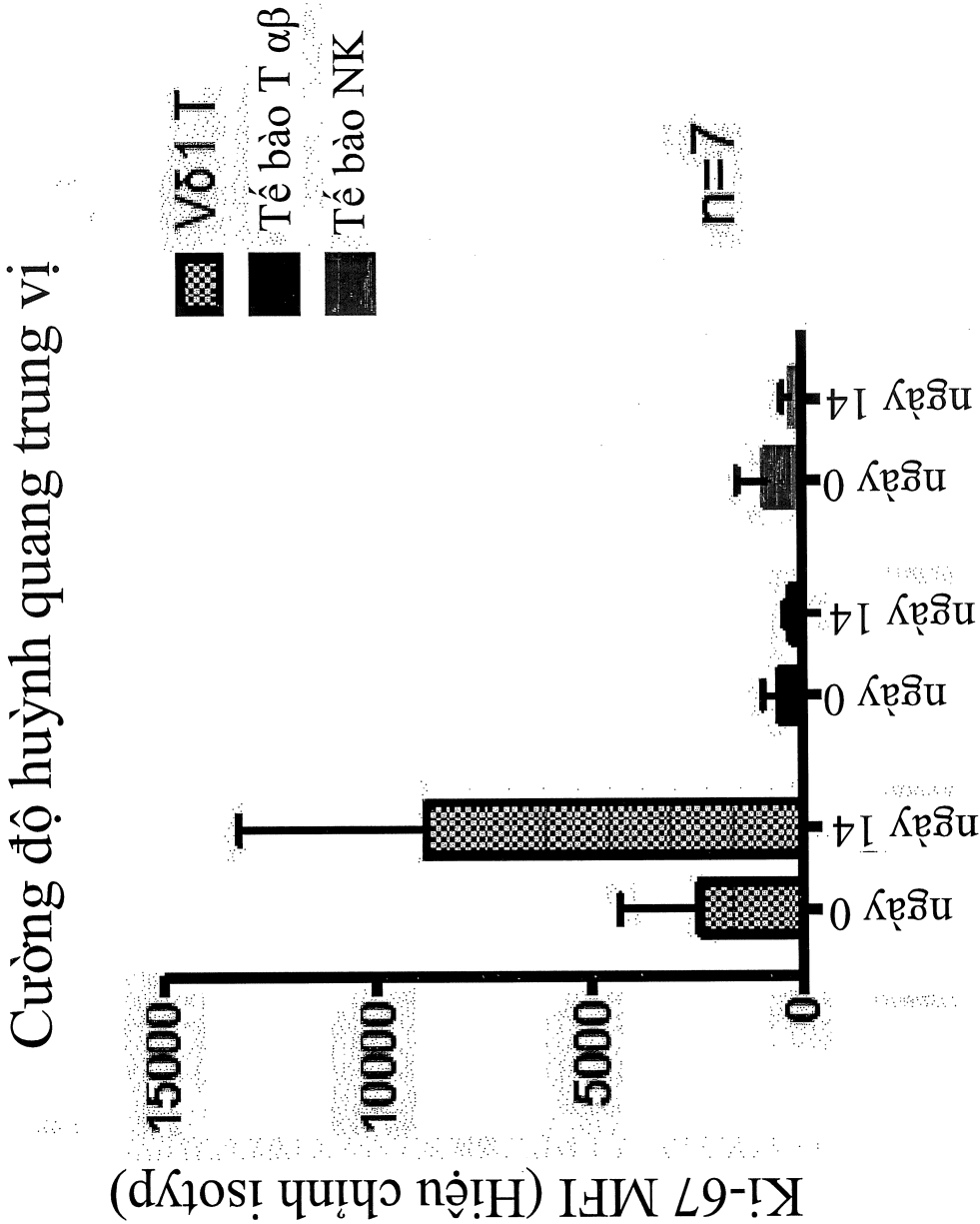


FIG.3C

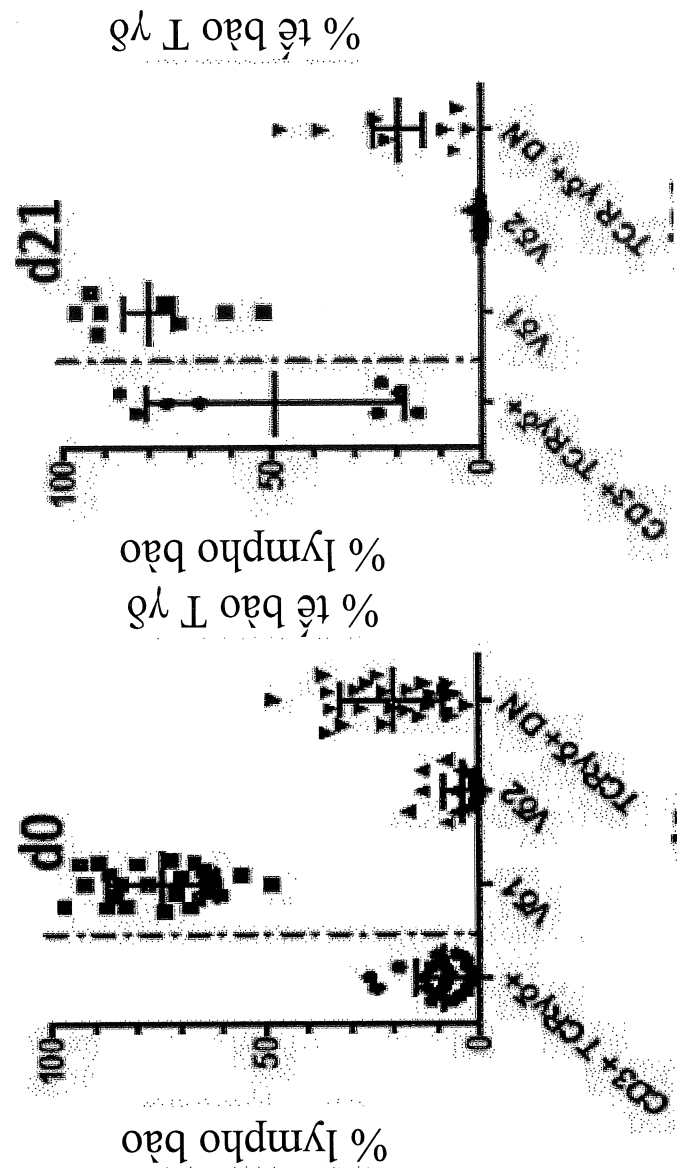


FIG.3D

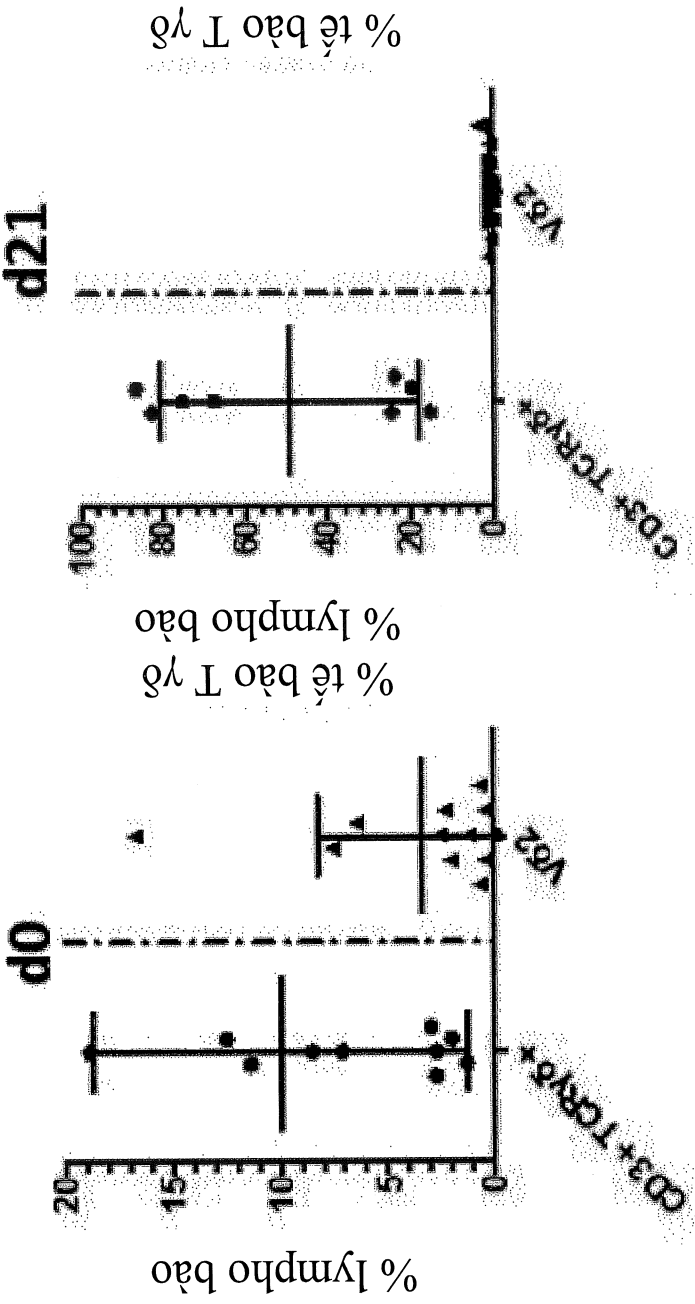


FIG.3D (tiếp)

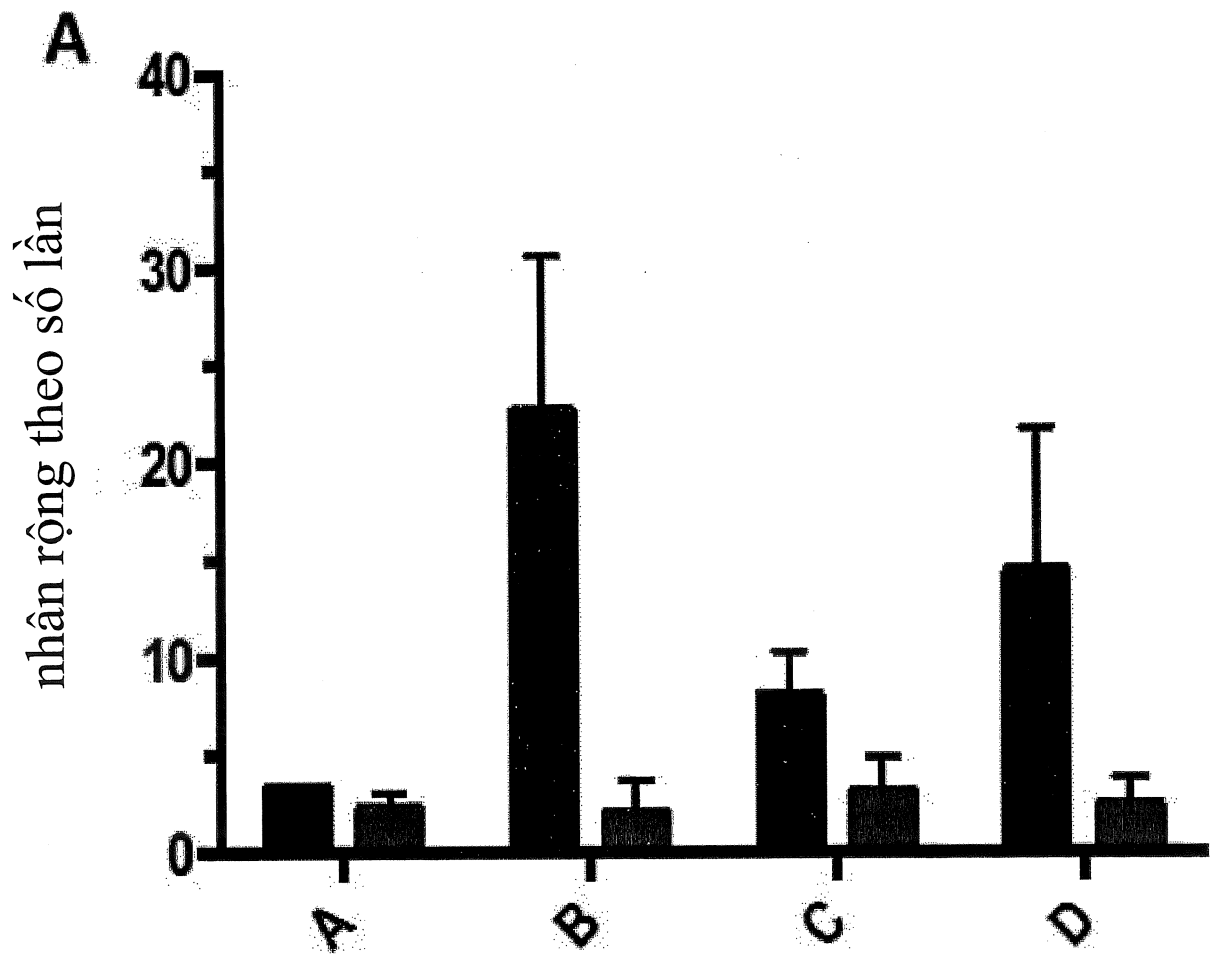


FIG.4A

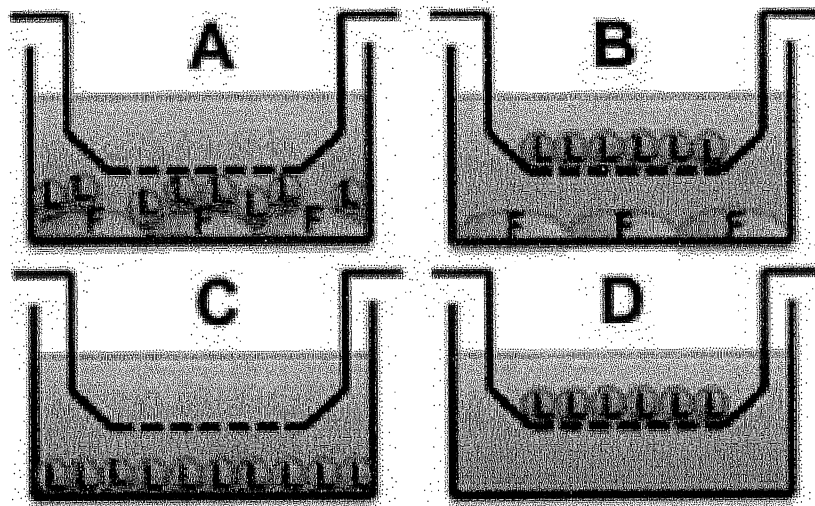
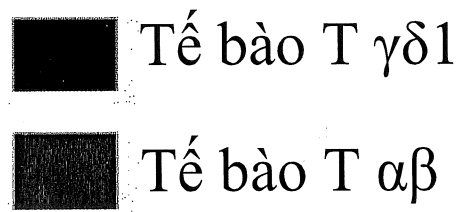


FIG.4A (tiếp)

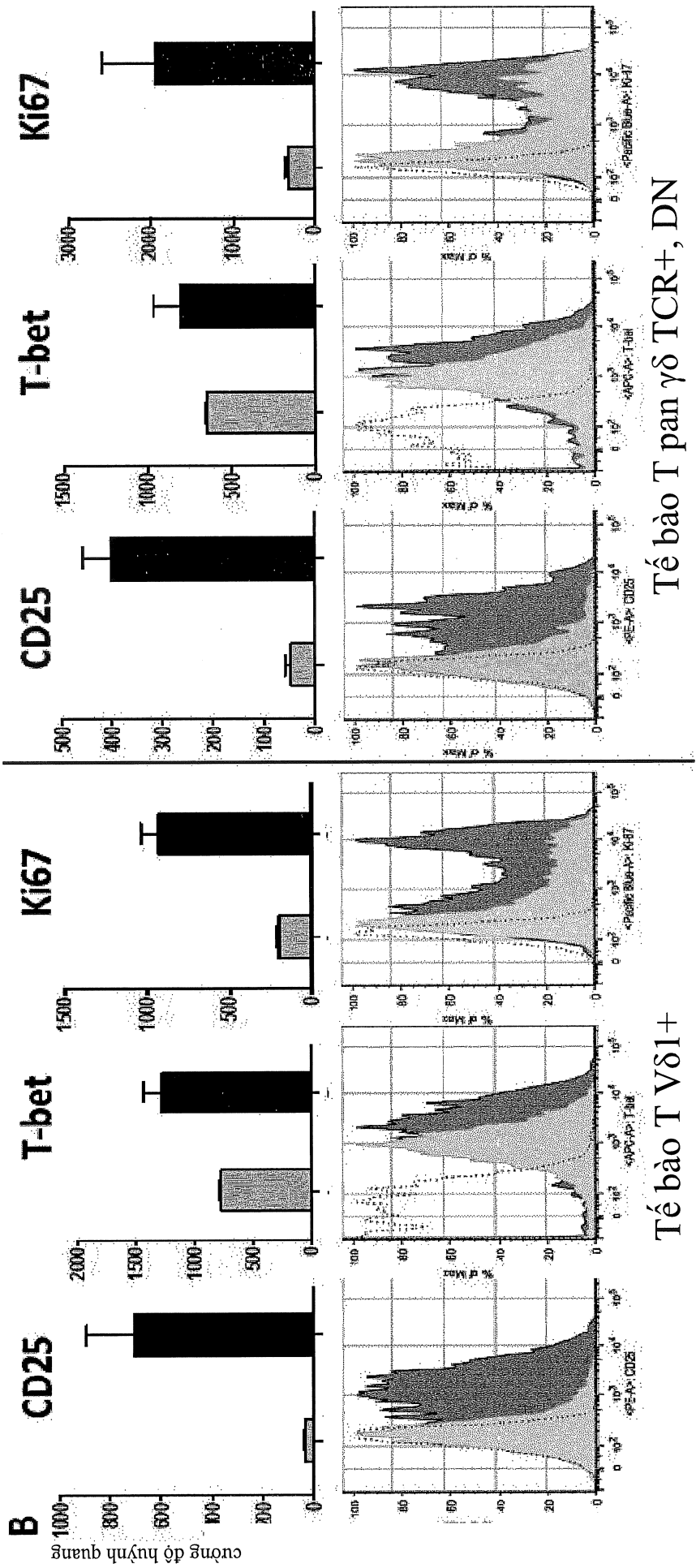


FIG.4B

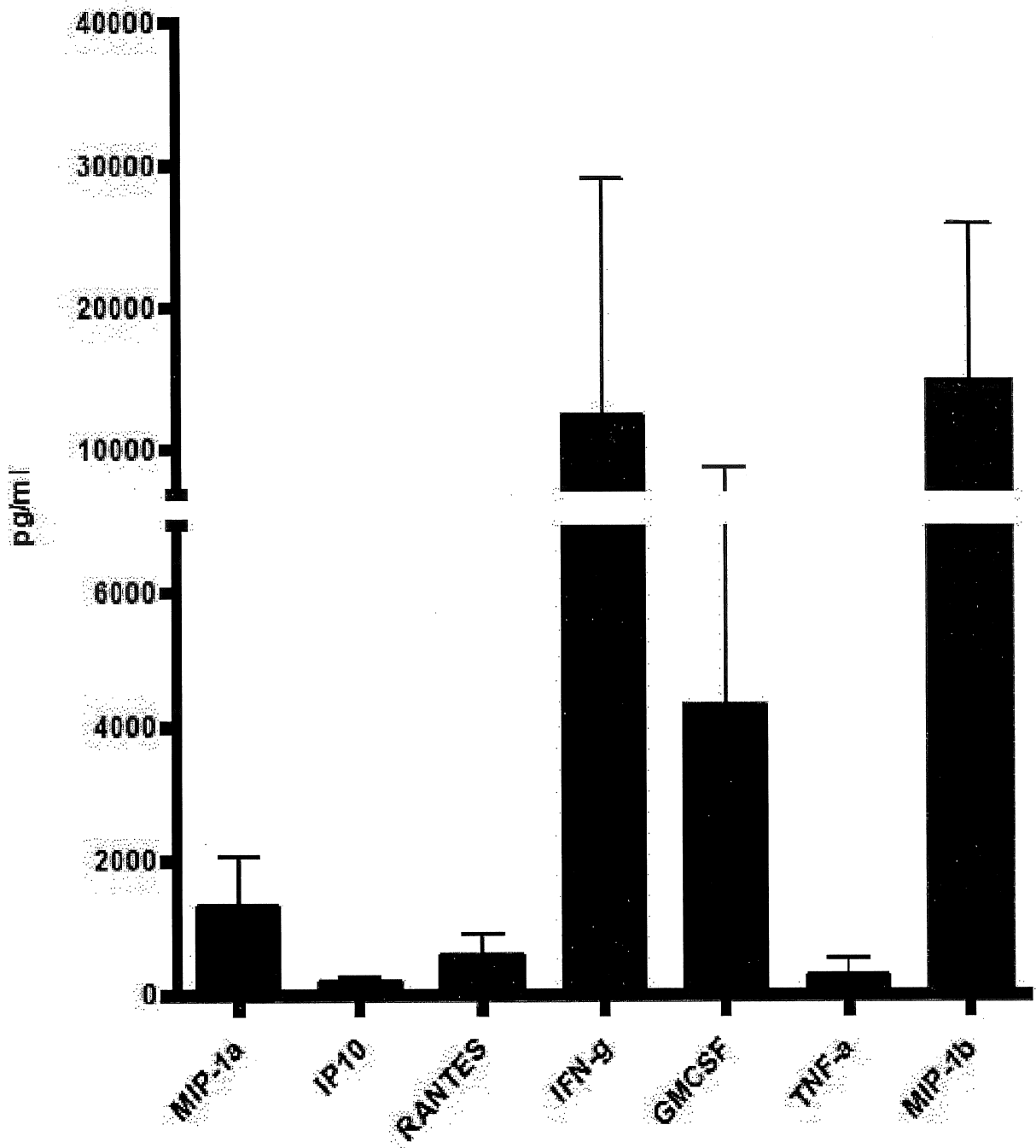


FIG.5A

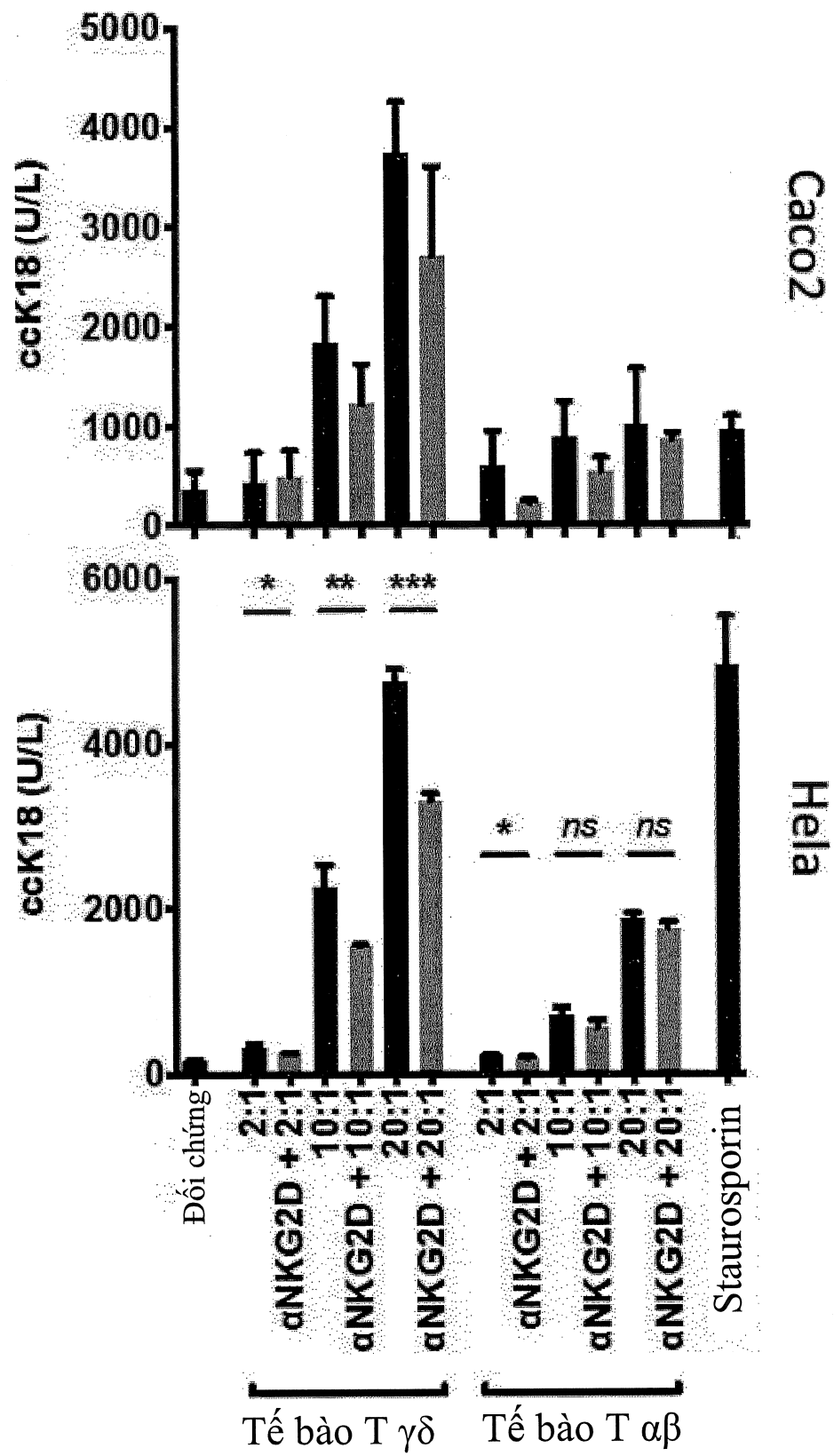


FIG.5B

Ruột

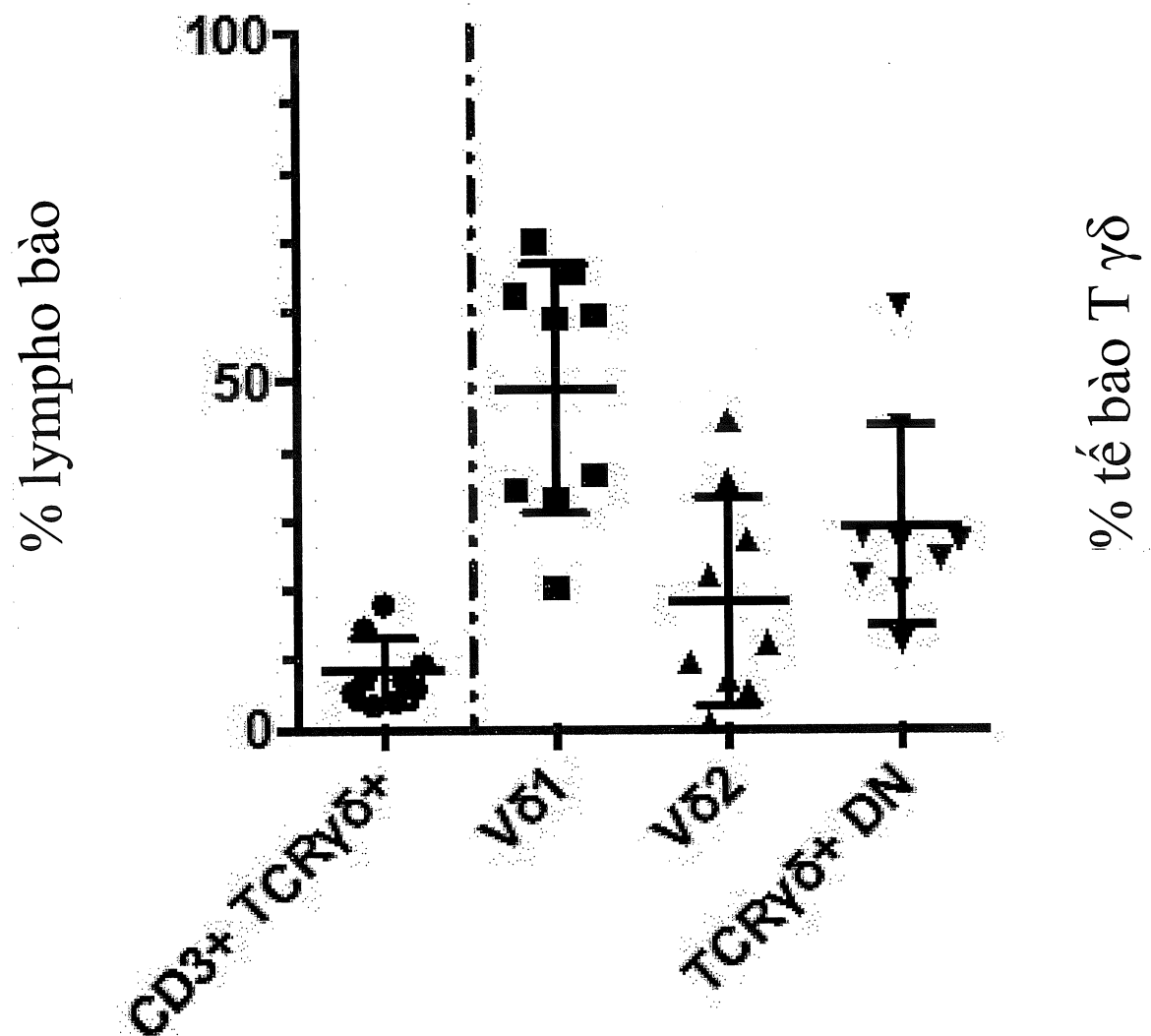


FIG.6A

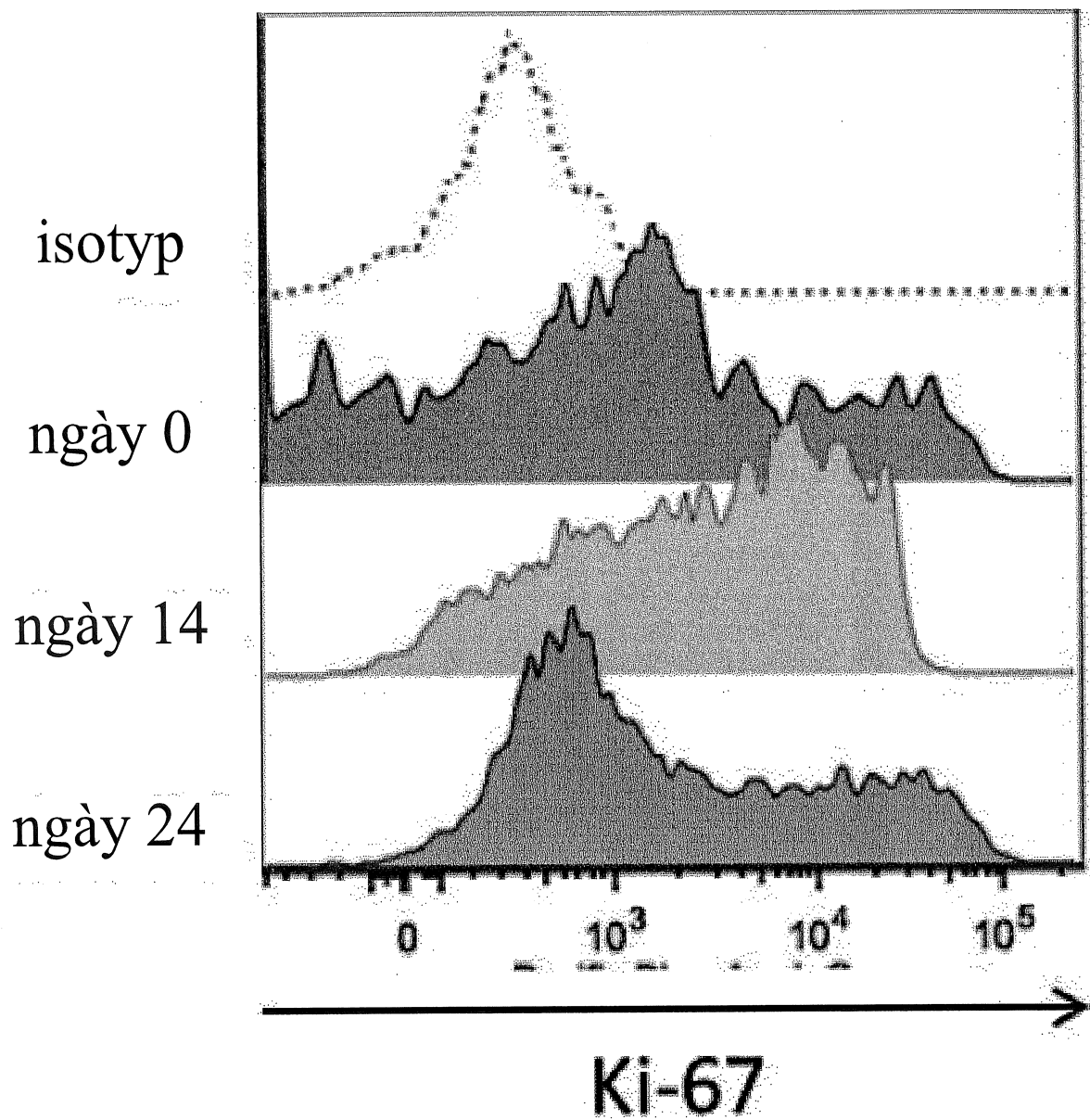


FIG.6B

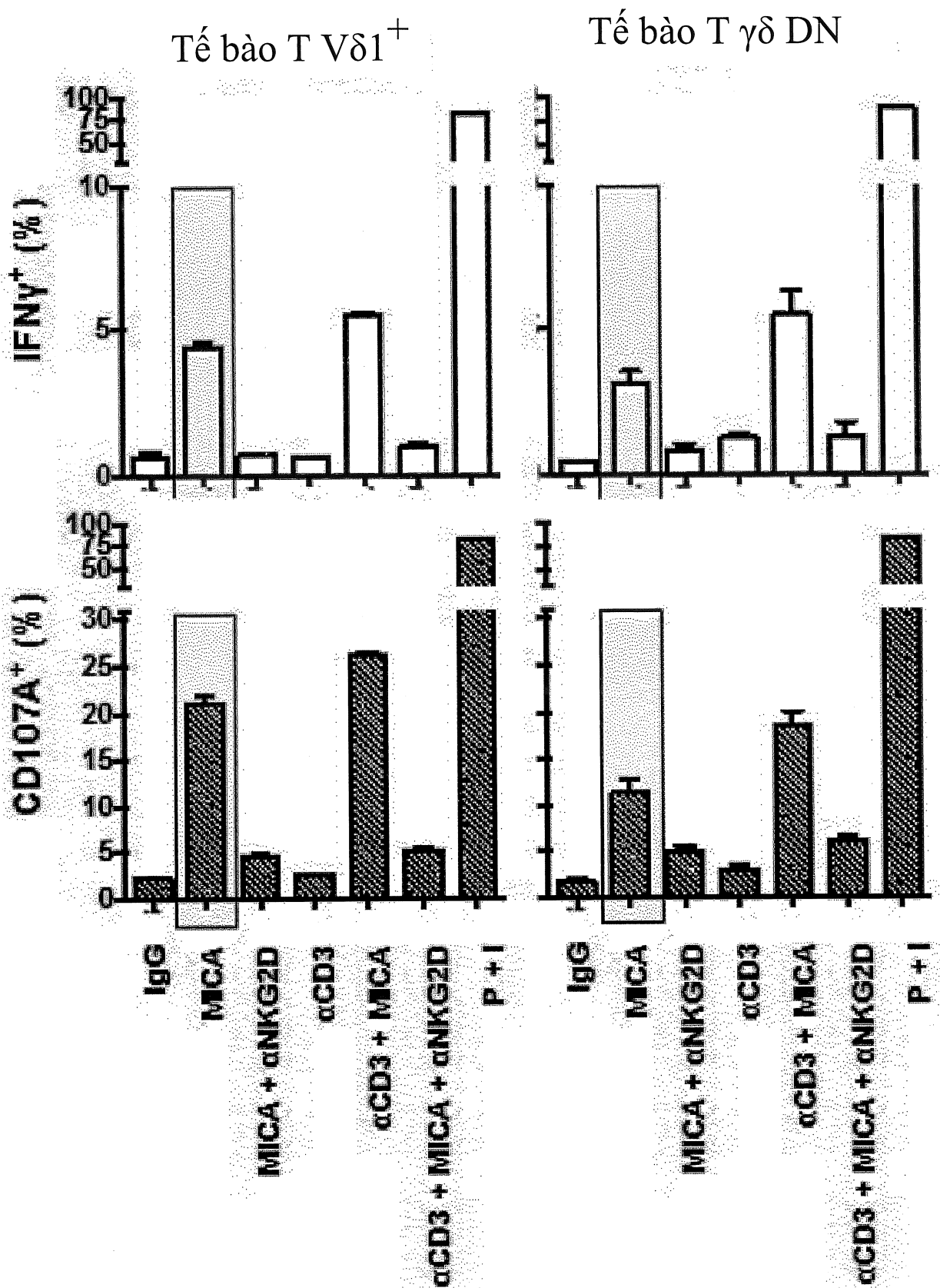
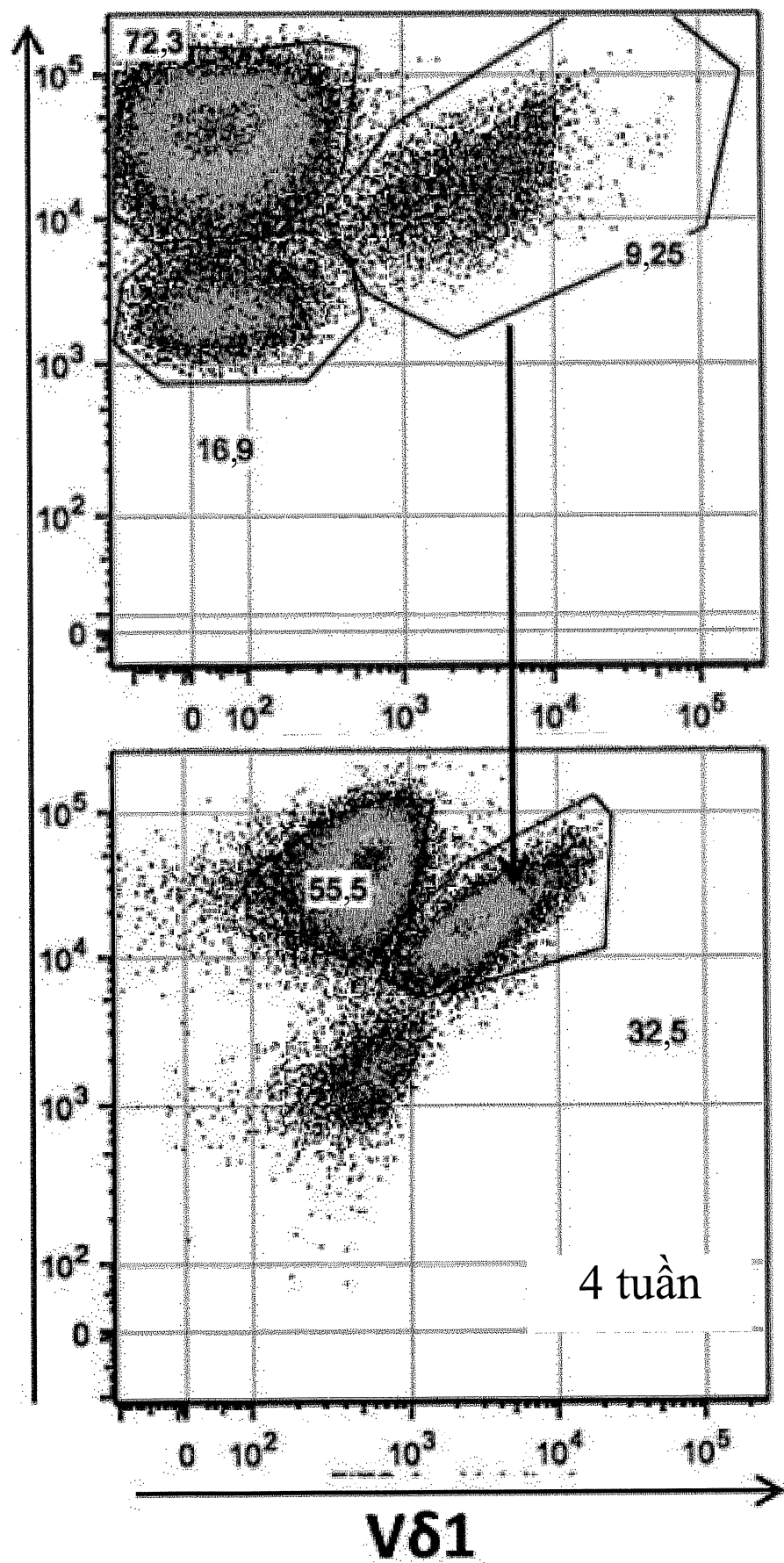


FIG.6C



V δ 1
FIG.6D

26/40

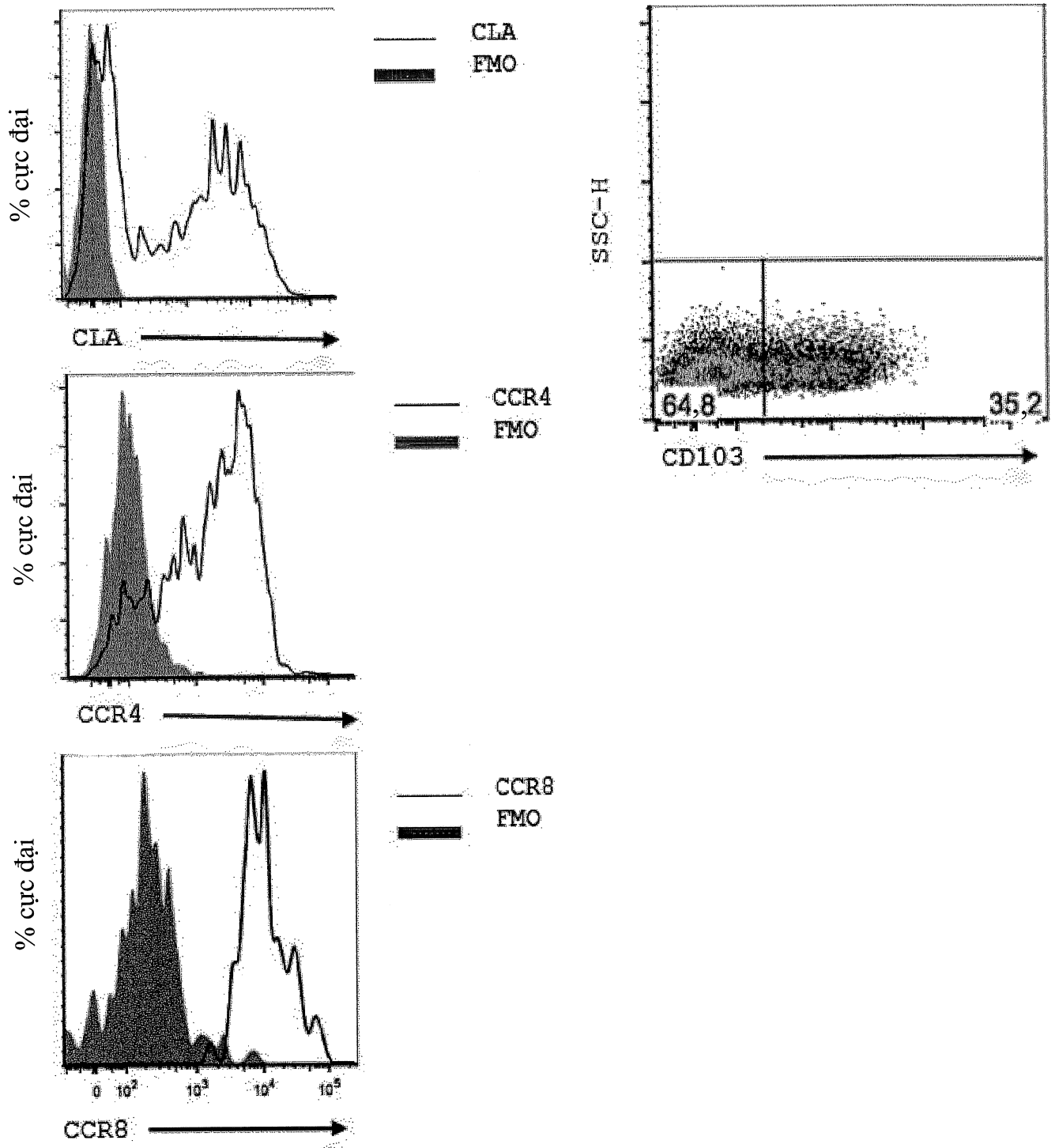


FIG.7A

27/40

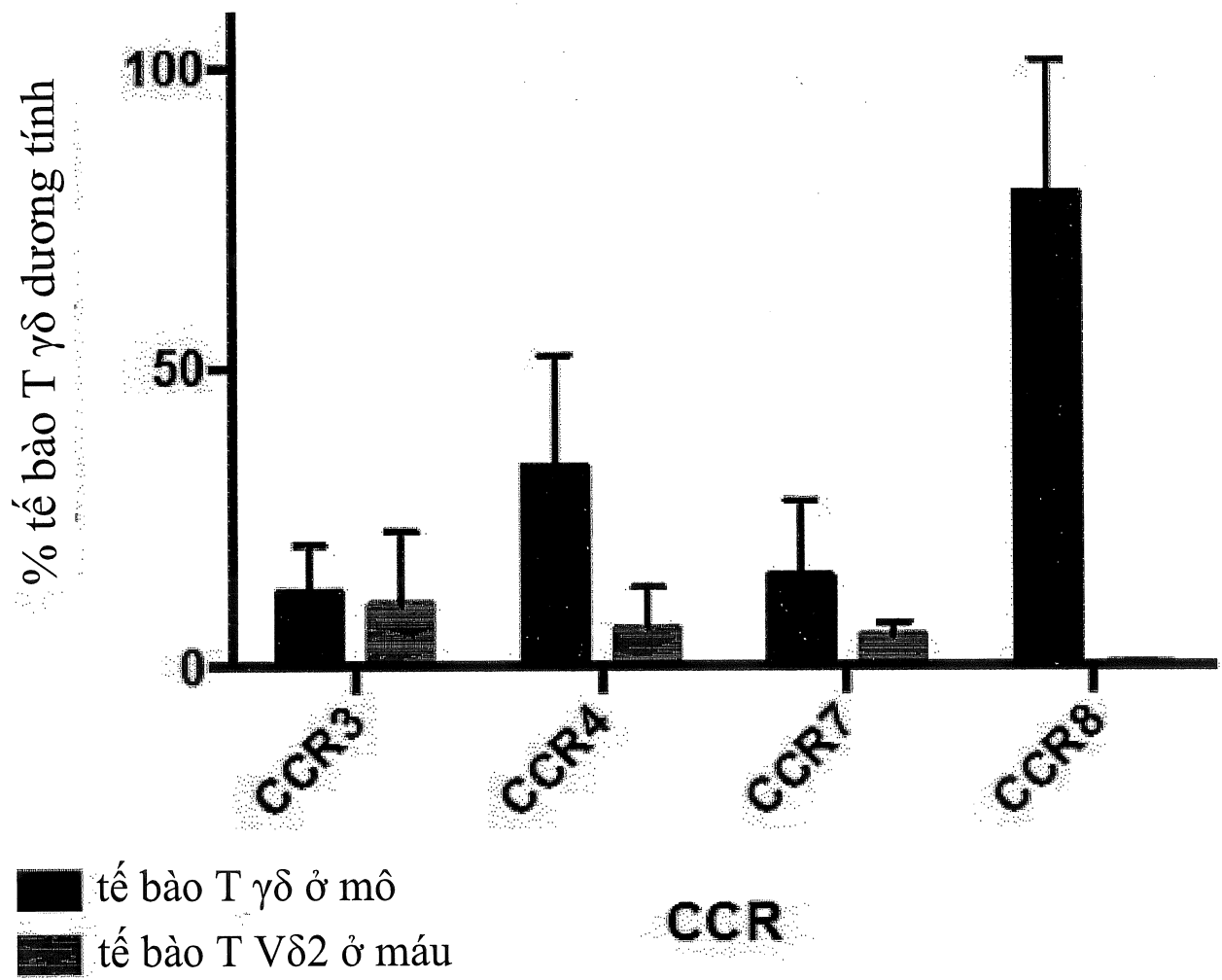


FIG.7B

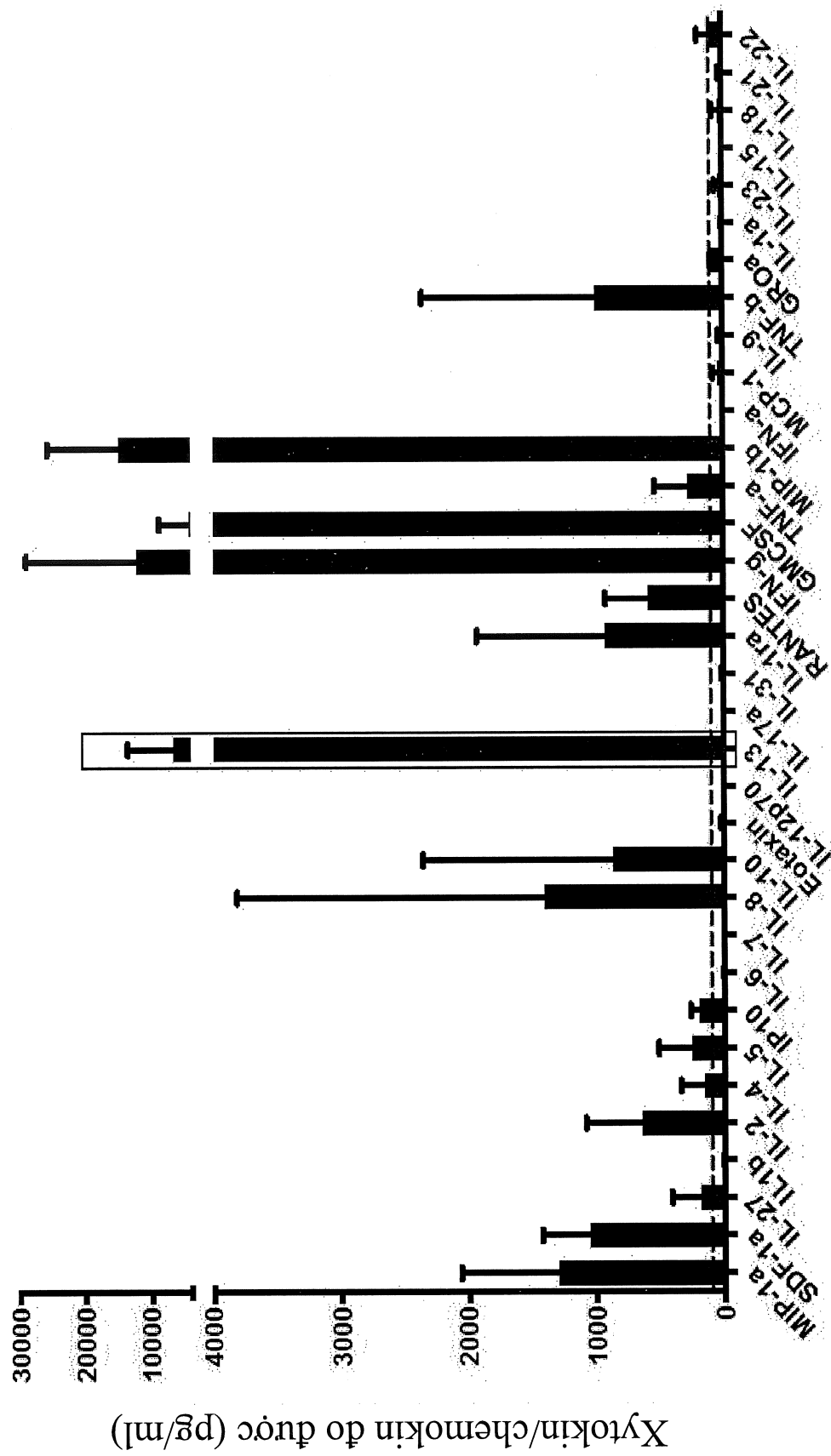


FIG.8

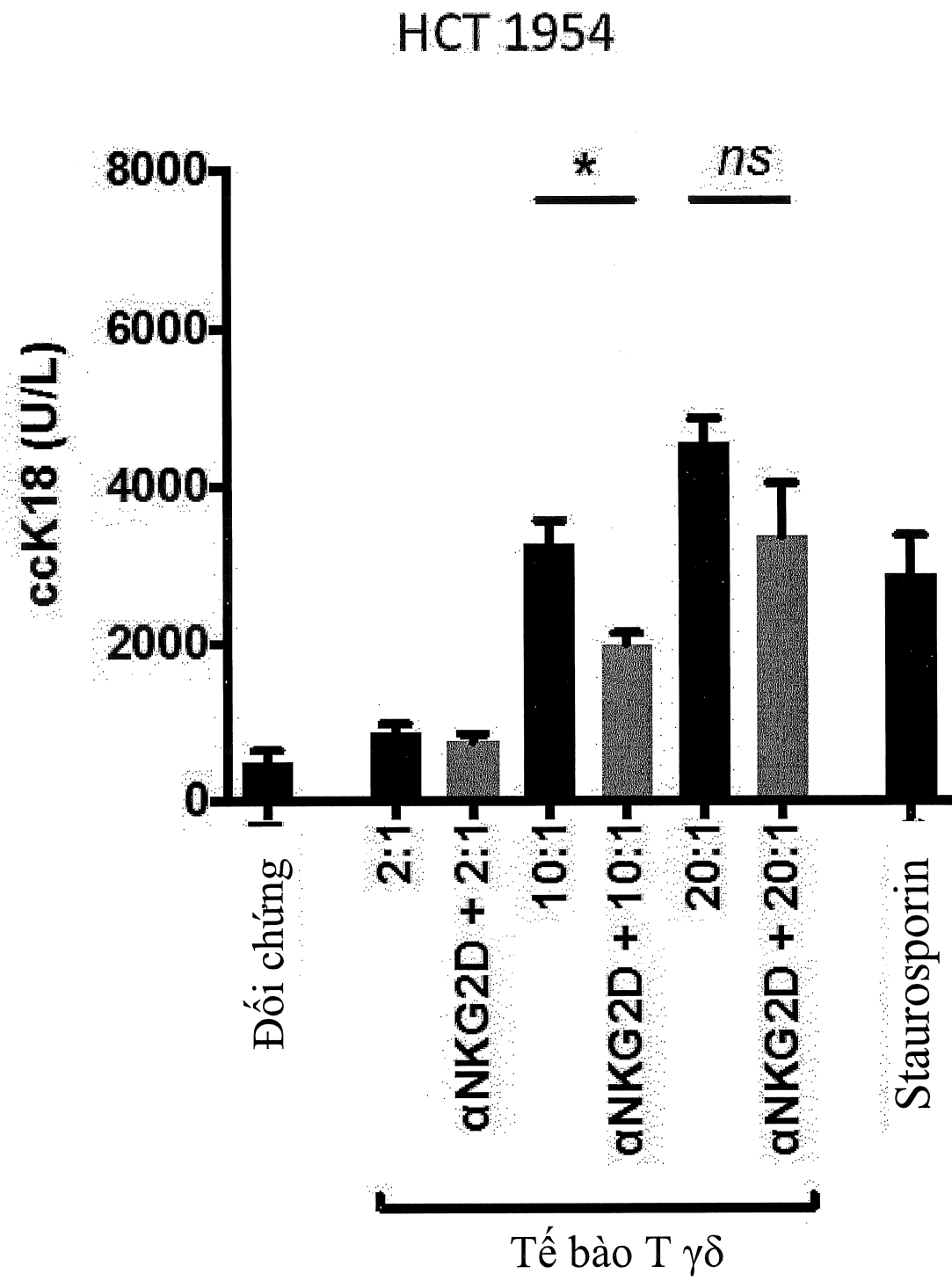


FIG.9A

Sự chết HCT116 theo chương trình

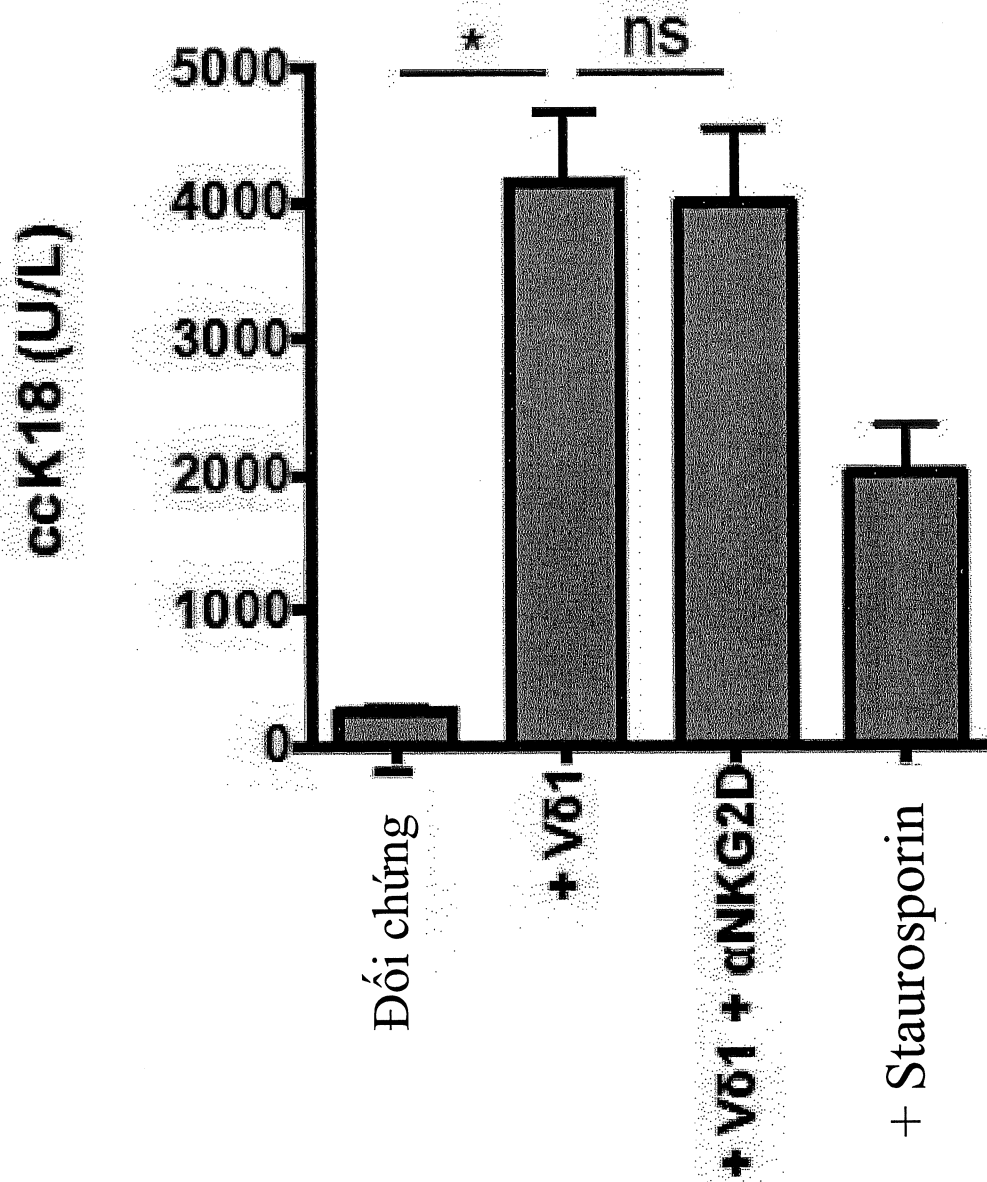


FIG.9B

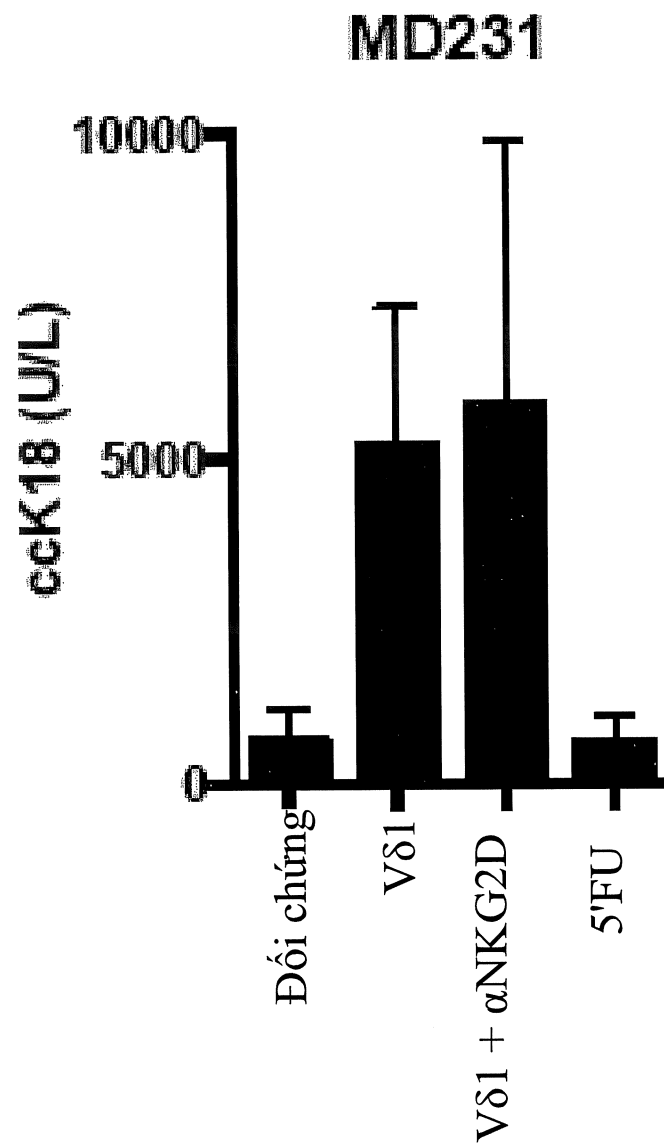


FIG.9C

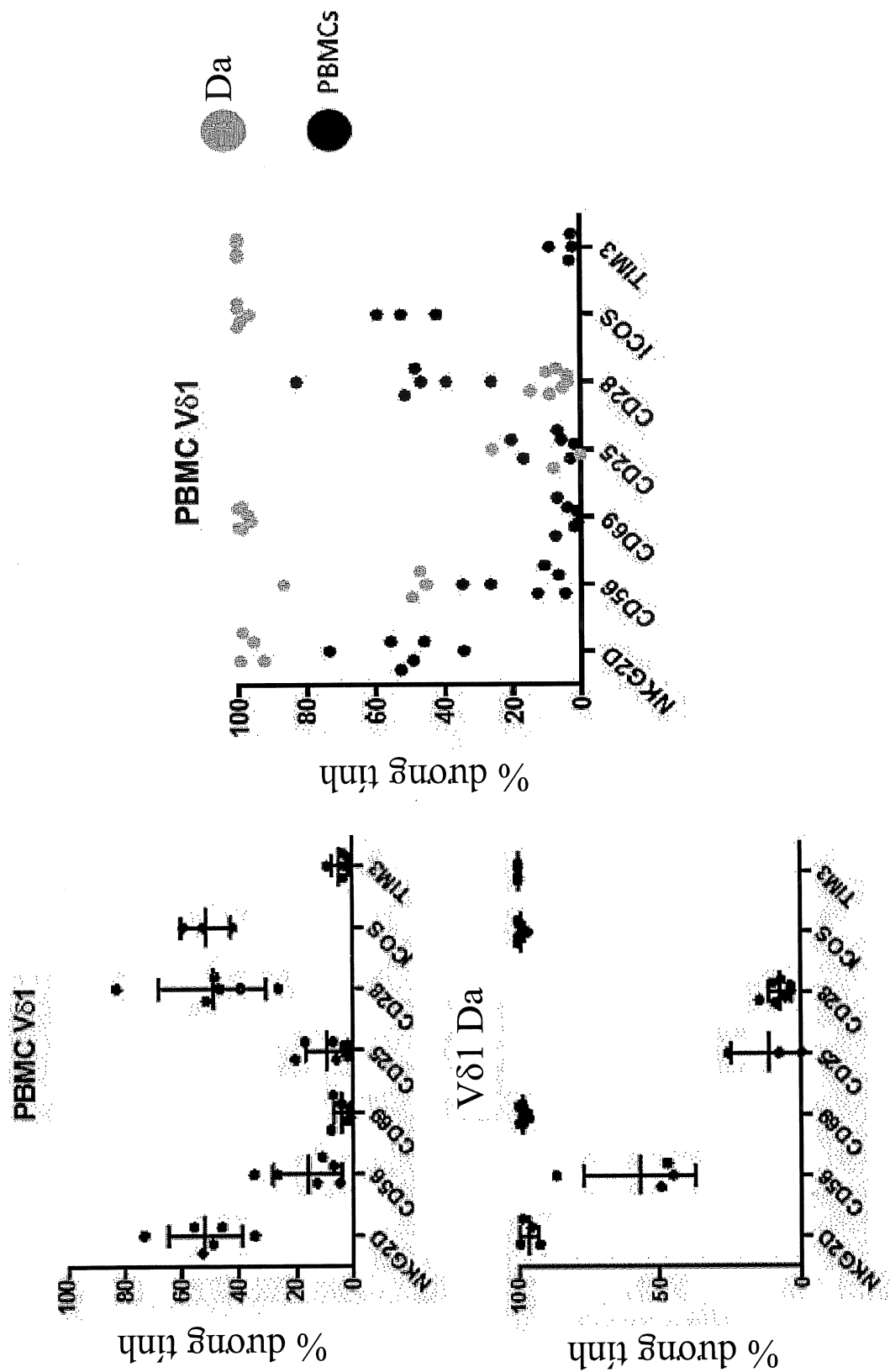


FIG.10A

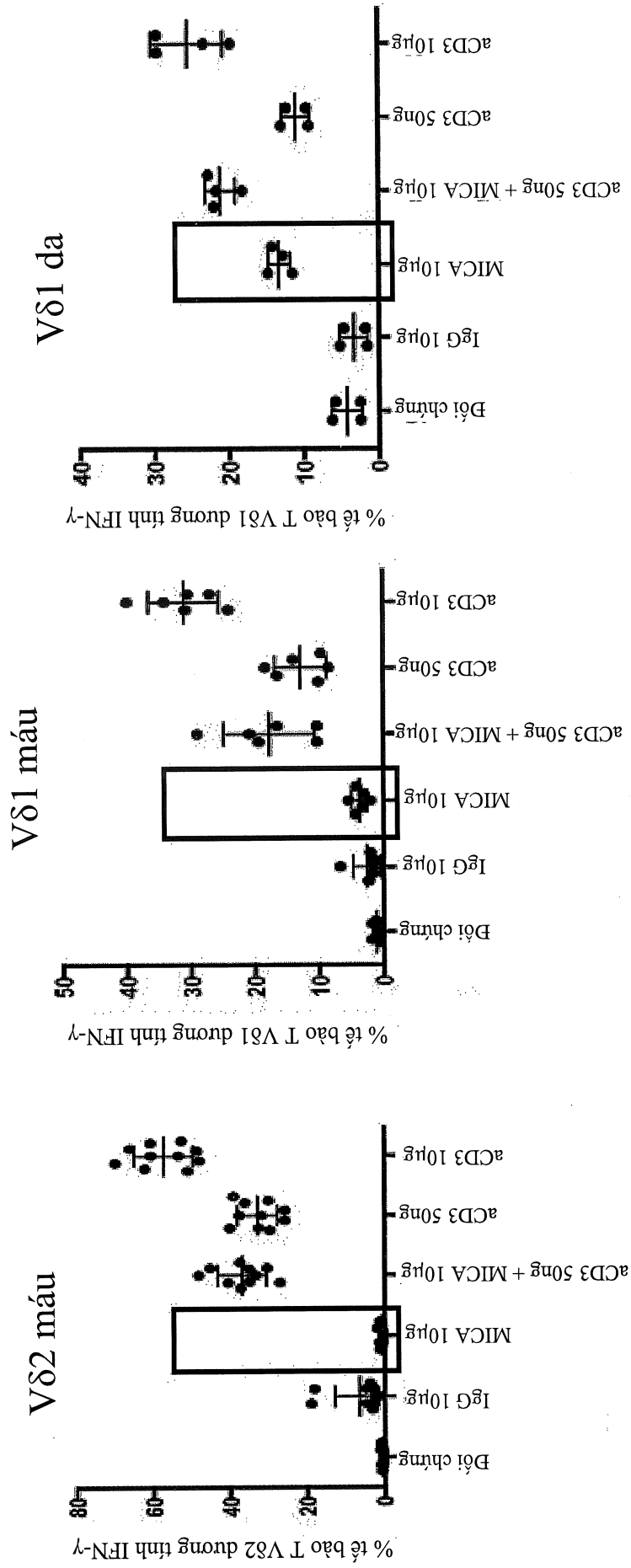


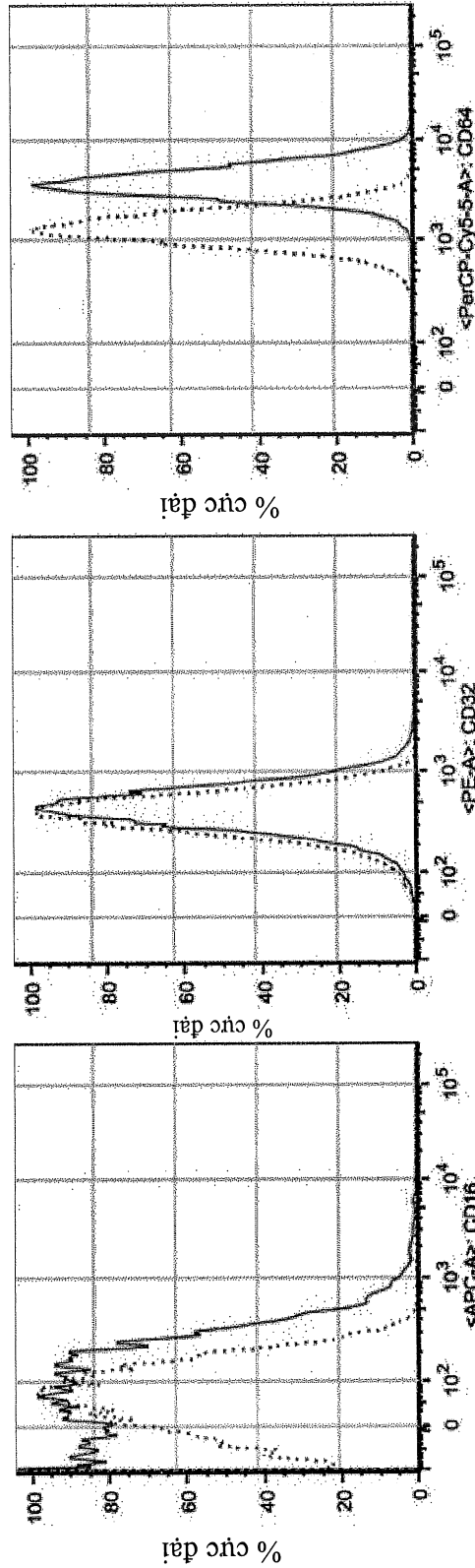
FIG.10B

Thụ thể Fc gamma

Đoạn Fc của IgG, IIIa ái lực thấp, thụ thể (CD64)

Đoạn Fc của IgG, IIIa ái lực thấp, thụ thể (CD32)

Đoạn Fc của IgG, IIIa ái lực thấp, thụ thể (CD16a)

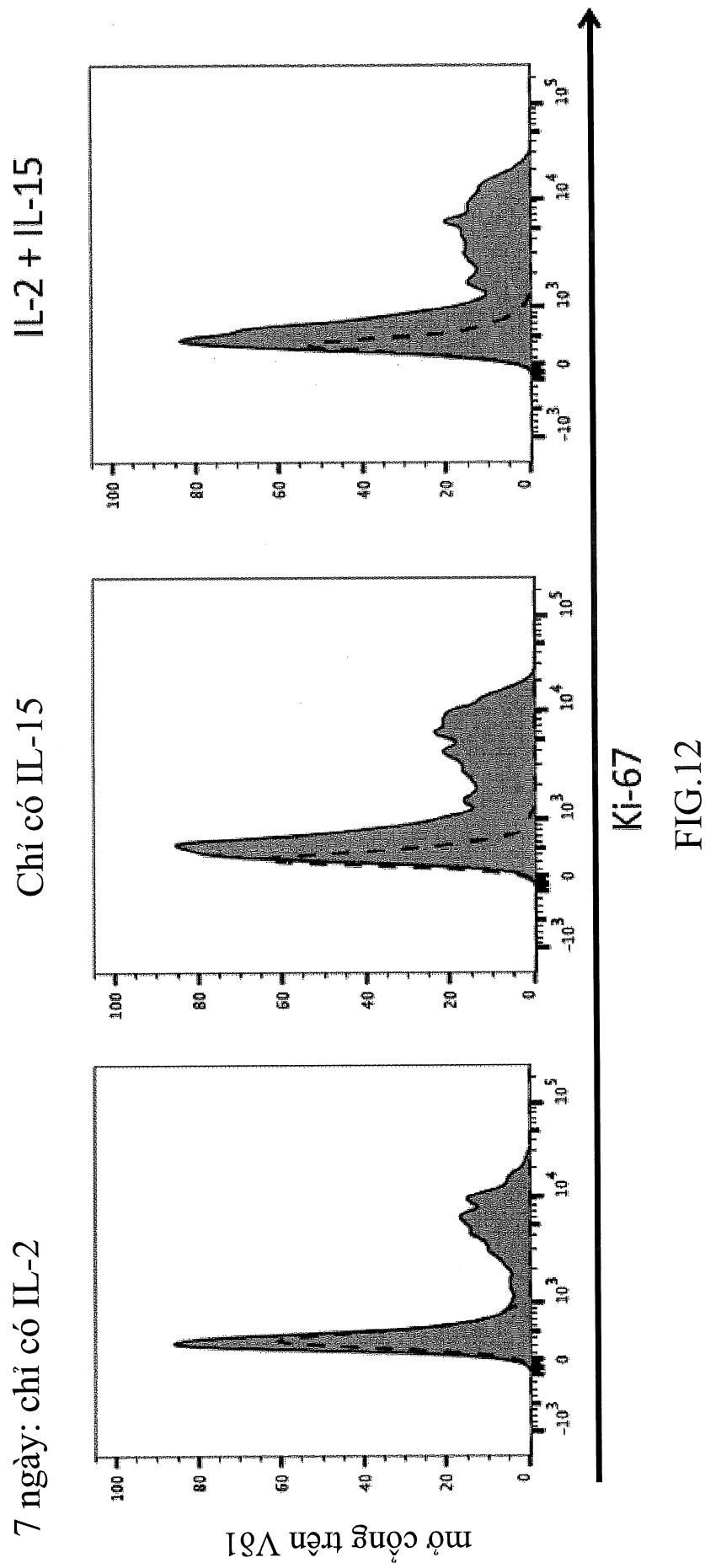


Isotyp

Nhuộm

1 người cho đại diện (trong số 4 người)

FIG.11



36/40

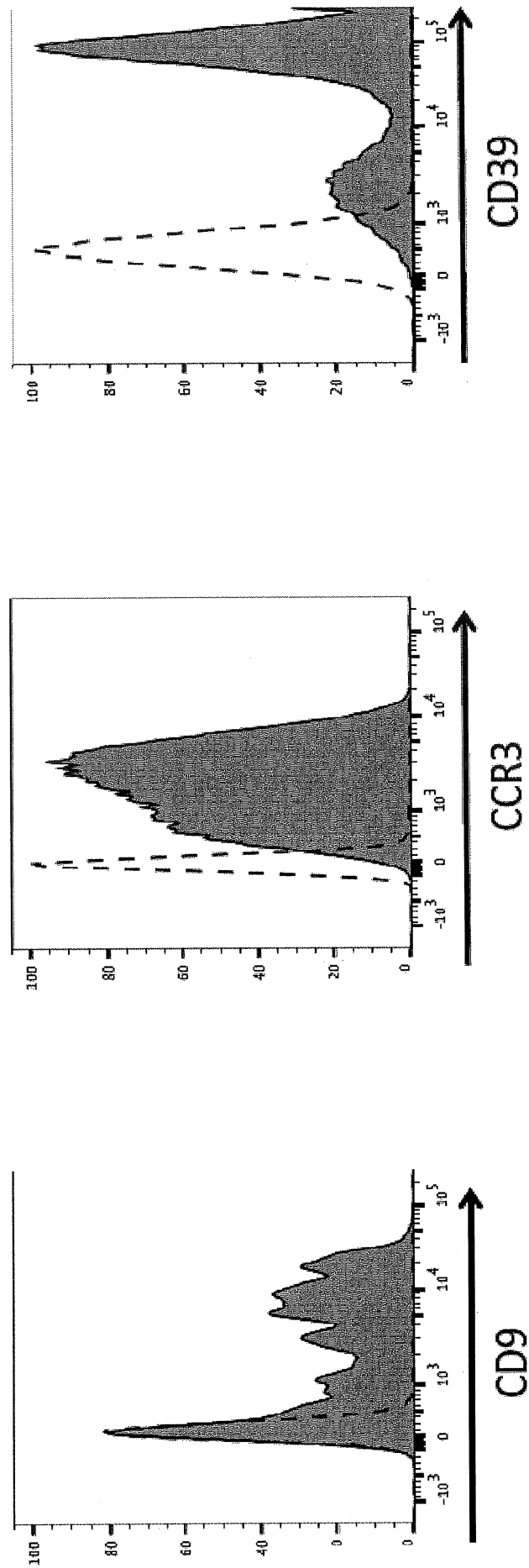
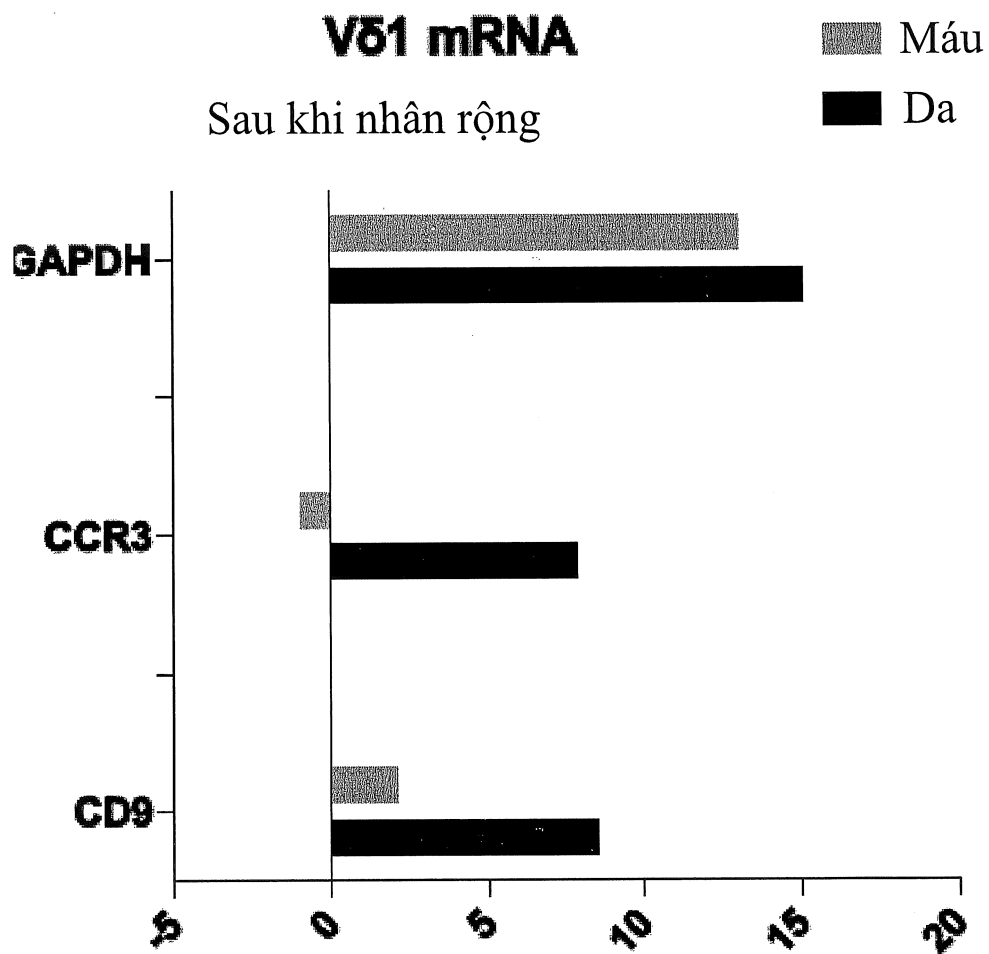


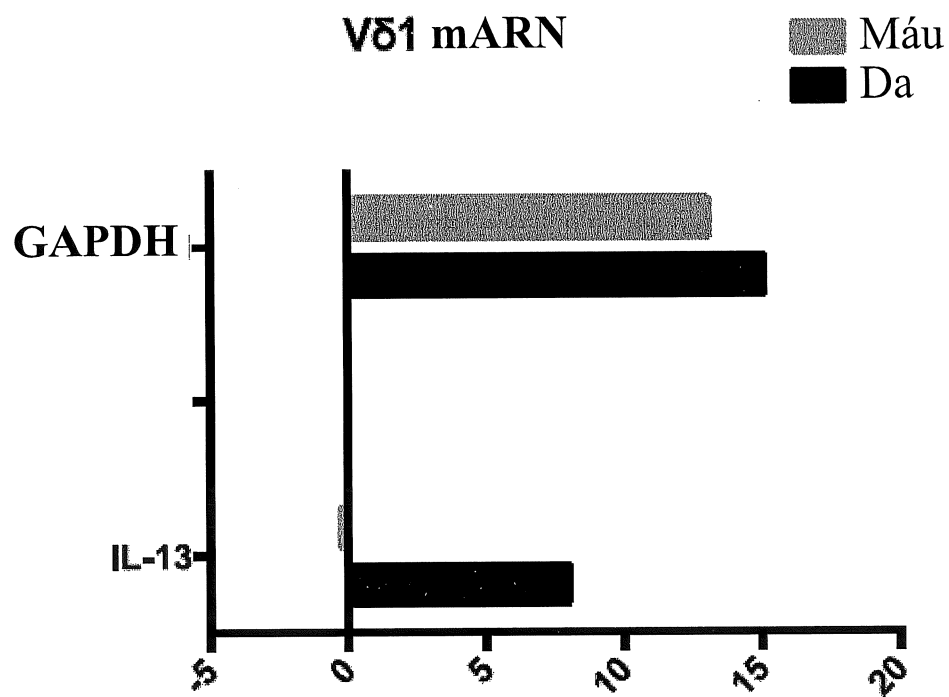
FIG.13

37/40



Mức biểu hiện đã được chuẩn hóa điểm phân vị và biến đổi log2

FIG.14



Mức biểu hiện đã được chuẩn hóa điểm phân vị và biến đổi log2

FIG.15

PMA/Ionomycin

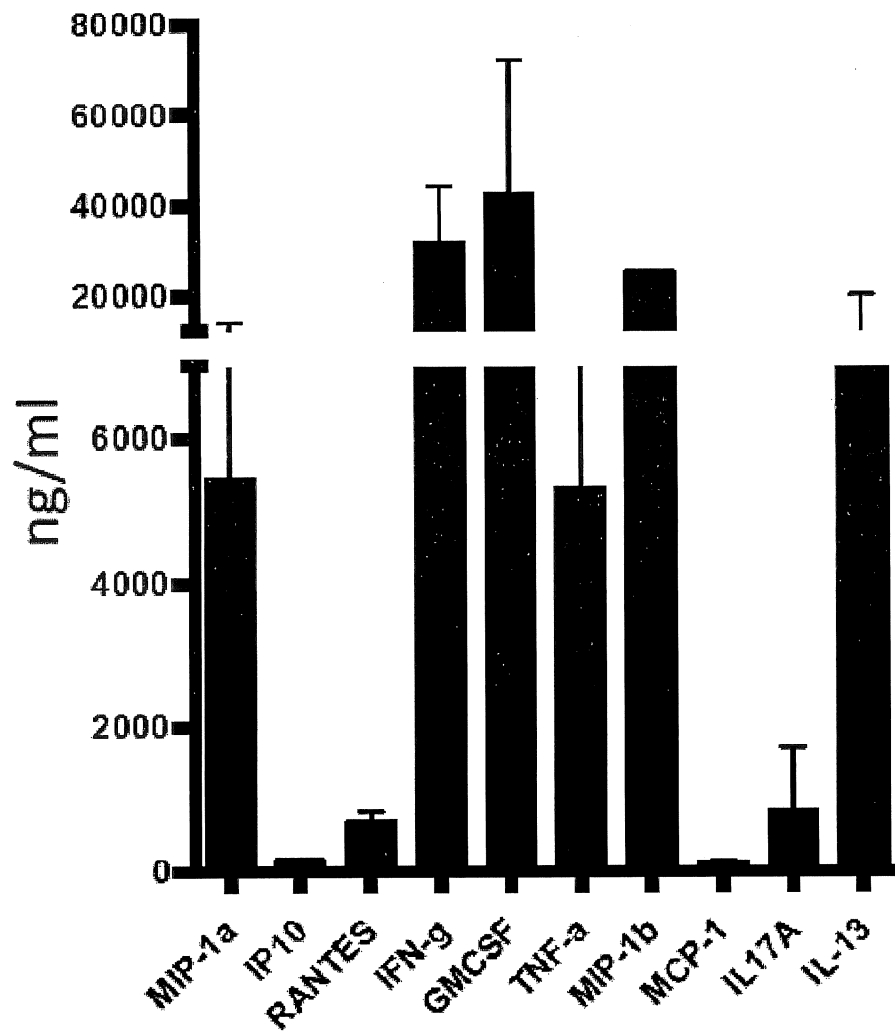


FIG.16A

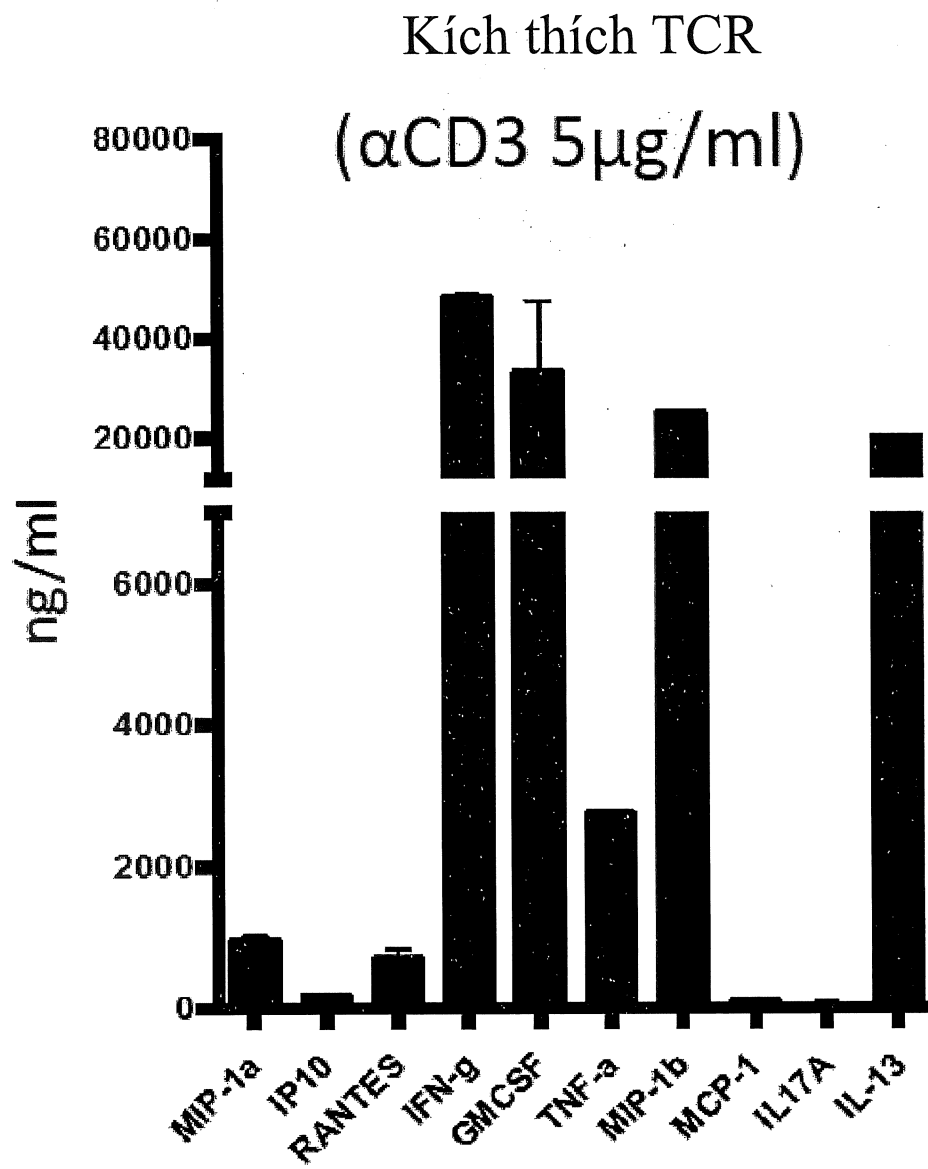


FIG.16B