

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190871 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.09.15

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.11.08

## (54) СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК

(31) 18205287.8

(72) Изобретатель:

(32) 2018.11.08

Бхандари Шристи, Флоренс Сэмюэл,

(33) EP

Хаттон Эндрю, Матиас Луиза,

(86) PCT/GB2019/053164

Нуссбаумер Оливер, Содерстрём

(87) WO 2020/095058 2020.05.14

Калле, Уден Марк (GB)

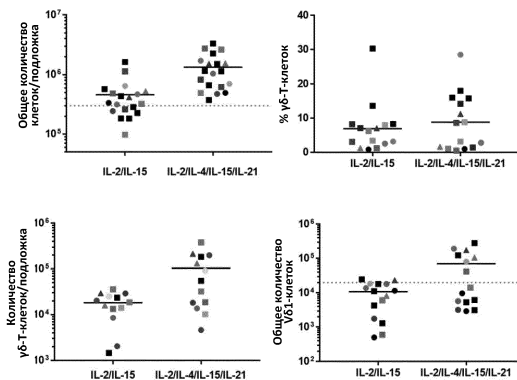
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС  
ЛИМИТЕД (GB)

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу выделения лимфоцитов (в частности,  $\gamma\delta$ -Т-клеток) из образца негемопозитической ткани, включающему этапы культивирования указанного образца негемопозитической ткани в присутствии (a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9), (b) интерлейкина-15 (IL-15) и (c) интерлейкина-21 (IL-21) и сбор популяции лимфоцитов, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани. Предложены способы последующего размножения клеток, а также популяции выделенных клеток, полученные с помощью указанного способа, и способы их применения.



A1

202190871

202190871

A1

## СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение относится к способам выделения и/или размножения резидентных лимфоцитов негемопозитической ткани, в частности,  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Такие  $\gamma\delta$ -Т-клетки включают клетки, не представляющие собой V $\delta$ 2-клетки, например V $\delta$ 1-, V $\delta$ 3- и V $\delta$ 5-клетки, а также негемопозитические ткани включают ткани кожи и кишечника. Следует понимать, что такие выделенные и/или размноженные резидентные лимфоциты негемопозитической ткани находят большое применение в адаптивных Т-клеточных терапиях, терапиях на основе химерных рецепторов и т.д. Настоящее изобретение также относится как к отдельным клеткам, так и популяциям клеток, полученных с помощью способов, описанных в настоящей заявке.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака был сфокусирован на очевидной способности субпопуляций CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать защитные функции хозяина, в частности, при дерепрессии ингибирующих путей, активируемых рецепторами PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами, в результате опосредованного медицинскими препаратами антагонизма. Однако  $\alpha\beta$ -Т-клетки рестриктированы по MHC, что может приводить к болезни «трансплантат против хозяина».

Гамма-дельта-Т-клетки ( $\gamma\delta$ -Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный характерный  $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор (TCR). Указанный TCR состоит из одной гамма ( $\gamma$ ) и одной дельта ( $\delta$ ) цепи. Человеческие  $\gamma\delta$ -цепи TCR могут быть выбраны из трех основных  $\delta$ -цепей, V $\delta$ 1, V $\delta$ 2 и V $\delta$ 3, и шести  $\gamma$ -цепей. Человеческие  $\gamma\delta$ -Т-клетки можно обобщенно классифицировать на основе их TCR-цепей, поскольку определенные типы  $\gamma$ - и  $\delta$ -цепей встречаются преимущественно, но не исключительно, в клетках одного или более типов тканей. Например, большинство резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток крови экспрессирует V $\delta$ 2-TCR, например, V $\gamma$ 9V $\delta$ 2, тогда как его экспрессия реже встречается среди тканевых резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которые чаще экспрессируют V $\delta$ 1 в коже и V $\gamma$ 4 в кишечнике.

Большинство способов выделения лимфоцитов основывалось на выделении указанных типов клеток из крови. Резидентные лимфоциты негемопозитической ткани, такие как  $\alpha\beta$ -Т-клетки,  $\gamma\delta$ -Т-клетки и NK-клетки, могут обладать свойствами, особо подходящими для конкретных способов применения, таких как нацеливание на негемопозитические опухоли и другие мишени. Однако выделение таких тканевых резидентных лимфоцитов в

клинически значимых количествах остается проблемой, тем более что для многих показаний требуются клинические дозы в диапазоне от  $10^8$  клеток и выше. Важно отметить, что значительная потеря клеток во время обработки указывает на необходимость получения еще большего количества исходных клеток.

5

Поскольку резидентные лимфоциты негемопозитической ткани, в частности,  $\alpha\beta$ -Т-клетки,  $\gamma\delta$ -Т-клетки и NK-клетки, нелегко получить в большом количестве, они не были хорошо охарактеризованы или изучены для терапевтического применения. Таким образом, существует потребность в данной области техники в способах выделения и размножения резидентных лимфоцитов негемопозитических тканей, в частности  $\gamma\delta$ -Т-клеток, в количествах, достаточных для изучения и возможной адаптации для применения в качестве терапии, например, в качестве адоптивной Т-клеточной терапии.

10

Кларк и др. (Clark *et al.* (2006) *J. Invest. Dermatol.* 126(5): 1059-70) описали способ выделения резидентных Т-клеток кожи из нормальной и нездоровой кожи. Однако способы, описанные в данном источнике, не подходят для клинического применения из-за присутствия продуктов животного происхождения и в особенности из-за относительно низкого выхода выделенных клеток, а именно, менее  $10^6$  клеток на  $\text{см}^2$  ткани. В способе, описанном Кларком и др., используется измельчение образцов, что приводит к преднамеренному нарушению структурной целостности образца ткани. Международные публикации WO 2017072367 и WO 2018/202808 относятся к способам размножения резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани *in vitro* путем культивирования лимфоцитов, полученных из негемопозитических тканей, в присутствии по меньшей мере интерлейкина-2 (IL-2) и/или интерлейкина-15 (IL-15). В международной публикации WO 2015189356 описана композиция для размножения лимфоцитов, полученных из образца, приготовленного путем афереза, содержащая по меньшей мере два типа цитокинов, выбранных из IL-2, IL-15 и IL-21. Таким образом, все еще остается потребность в способе выделения резидентных лимфоцитов негемопозитической ткани, такой как кожа, обеспечивающих получение большего количества клеток, подходящих для клинического применения.

20

25

30

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

35

- (i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:
  - (a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9),

(b) интерлейкина-15 (IL-15) и

(c) интерлейкина-21 (IL-21) и

(ii) сбор популяции лимфоцитов, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.

5

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:

10

(a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9),

(b) интерлейкина-15 (IL-15) и

(c) интерлейкина-21 (IL-21) и

(ii) сбор популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.

15

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

20

(i) выделение популяции лимфоцитов из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке, и

(ii) дополнительное культивирование указанной популяции лимфоцитов в течение по меньшей мере 5 дней для получения размноженной популяции лимфоцитов.

25

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

30

(i) выделение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке, и

(ii) дополнительное культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

35

Фигура 1: А – Общий выход клеток и долю  $\gamma\delta$ -Т-клеток и  $V\delta 1$ -клеток определяли для способов выделения, включающих 2 цитокина (IL-2 и IL-15) и 4 цитокина (IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21). В – Доля  $\gamma\delta$ -Т-клеток и  $V\delta 1$ -клеток, полученных с использованием способа,

включающего 4 цитокина, показана как процент от доли соответствующих клеток, полученных с помощью способа, включающего 2 цитокина.

5 Фигура 2: А – Общий выход клеток определяли для способов выделения, включающих 2 цитокина ('2СК', IL-2 и IL-15), 3 цитокина ('3СК', IL-2, IL-15 и IL-21) и 4 цитокина ('4СК', IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21), в 6-луночных планшетах G-REX при использовании среды AIM-V, содержащей 5% заменителя сыворотки. Также показана: В – доля  $\gamma\delta$ -Т-клеток; С – доля V $\delta$ 1-клеток в популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

10 Фигура 3: Фенотип V $\delta$ 1-клеток, выделенных с использованием способа, включающего 2СК и 4СК в среде AIM-V, содержащей 5% человеческой АВ-сыворотки, в 24-луночных планшетах, анализировали путем измерения процентной экспрессии TIGIT и CD27.

15 Фигура 4: Фенотип V $\delta$ 1-клеток, выделенных с использованием способа, включающего 2СК, 3СК и 4СК в среде AIM-V, содержащей 5% заменителя сыворотки, в 6-луночных планшетах G-REX, анализировали путем измерения: А – процентной экспрессии CD27, В – процентной экспрессии TIGIT.

20 Фигура 5: Первоначальное тестирование для сравнения общего выхода клеток из пункционного биоптата диаметром 3 мм и образцов, полученных с помощью стандартных методов измельчения кожи.

25 Фигура 6: Выход  $\gamma\delta$ -клеток из выделенных пункционных биоптатов различного размера на 24-луночных планшетах в среде AIM-V, содержащей 5% человеческой АВ-сыворотки, по сравнению с контрольным образцом, измельченным с помощью скальпеля.

30 Фигура 7: Общий выход клеток на биоптат (верхний график) и на планшет (нижний график) при использовании различных емкостей для культивирования в среде AIM-V, содержащей 5% человеческой АВ-сыворотки.

Фигура 8: Уровни экспрессии CD27 в клетках, выделенных с использованием протокола выделения, включающего 2 цитокина, 3 цитокина и 4 цитокина.

35 Фигура 9: Фенотип V $\delta$ 1-клеток, выделенных с использованием способа, включающего 2СК и 4СК, на 6-луночных планшетах G-REX в среде, содержащей 10% человеческой АВ-сыворотки (результаты на графике слева) или 5% заменителя сыворотки (результаты на графике справа), анализировали путем измерения: А – процентной экспрессии

CD27 и В – процентной экспрессии TIGIT. С – экспрессию PD-1 также измеряли на αβ-Тклетках (CD3+, пан-γδ-клетки), выделенных с использованием способа, включающего 2СК и 4СК, в среде, содержащей 10% человеческой АВ-сыворотки.

5 Фигура 10: Графики, показывающие результаты сравнения различных сред, используемых в способах выделения, как описано в Примере 6.

10 Фигура 11: Сравнение общего выхода клеток после выделения в течение 2 недель (верхний график) или 3 недель (нижний график) в среде AIM-V с указанной сывороточной добавкой в планшетах G-REX6.

15 Фигура 12: Общий выход клеток и доля Vδ1-клеток, выделенных с использованием среды AIM-V, содержащей 5% заменителя сыворотки (serum replacement, SR), по сравнению с человеческой АВ-сывороткой (AB) в концентрации 5% или 10% в планшетах G-REX6.

20 Фигура 13: Распределение клеточных типов в популяциях, выделенных с использованием: А – способа, включающего 2СК, или В – способа, включающего 4СК, с последующим размножением с использованием способа, включающего 4СК.

Фигура 14: Анализ экспрессии различных маркеров Vδ1-клеток, выделенных с использованием способа, включающего 2СК или 4СК, с последующим размножением с использованием способа, включающего 4СК.

25 Фигура 15: Общее количество γδ-клеток и Vδ1-клеток, выделенных с использованием способа, включающего 2СК или 4СК, с последующим размножением с использованием способа, включающего 4СК.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

30 В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, где указанный способ включает следующие этапы:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:

- 35 (a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9),  
 (b) интерлейкина-15 (IL-15) и  
 (c) интерлейкина-21 (IL-21) и

(ii) сбор популяции лимфоцитов, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.

5 В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:

(a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9),

(b) интерлейкина-15 (IL-15) и

10 (c) интерлейкина-21 (IL-21) и

(ii) сбор популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.

Ссылки в настоящей заявке на «изолирование» или «выделение» клеток, в частности, лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, относятся к способам или процессам, при которых клетки удаляют, отделяют, очищают, обогащают или иным образом извлекают из ткани или пула клеток. Следует понимать, что такие ссылки включают термины «отделенный», «удаленный», «очищенный», «обогащенный» и т.д. Выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток включает выделение или отделение клеток от интактного образца негемопозитической ткани или от стромальных клеток негемопозитической ткани (например, фибробластов или эпителиальных клеток). Такое выделение может альтернативно или дополнительно включать выделение или отделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток от других гемопозитических клеток (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток или других лимфоцитов). Выделение может проводиться в течение определенного периода времени, например, начиная с момента помещения тканевого эксплантата или биоптата в выделенную культуру и заканчивая моментом сбора клеток из культуры (например, посредством центрифугирования или других способов переноса выделенной клеточной популяции в культуру для размножения) или использованием указанного тканевого эксплантата или биоптата для других целей или удалением исходного тканевого эксплантата или биоптата из культуры. Этап выделения может длиться в течение по меньшей мере от примерно трех дней до примерно 45 дней. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, этап выделения длится от по меньшей мере примерно 10 дней до по меньшей мере 28 дней. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, этап выделения длится от по меньшей мере 14 дней до по меньшей мере 21 дня. Этап выделения, таким образом, может длиться в течение по меньшей мере трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней, восьми дней, девяти дней, десяти дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней,

23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, примерно 35 дней, примерно 40 дней или примерно 45 дней. Следует понимать, что несмотря на то, что на данном этапе выделения может не наблюдаться существенной пролиферации выделяемых клеток, пролиферация не обязательно отсутствует. В самом деле, для специалиста в данной области техники очевидно, что выделенные клетки могут также начать делиться с образованием множества таких клеток внутри емкости для выделения, содержащего ткань и/или скаффолд.

Таким образом, следует понимать, что упоминания в настоящей заявке о «выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клетках», «выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток», «выделенной  $\gamma\delta$ -Т-клеточной популяции», «отделенных  $\gamma\delta$ -Т-клетках», «отделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток» или «отделенной  $\gamma\delta$ -Т-клеточной популяции» относятся к гемопоэтическим клеткам или популяции гемопоэтических клеток, включая  $\gamma\delta$  Т-клетки, которые были выделены, отделены, удалены, очищены или обогащены из образца ткани негемопоэтического происхождения таким образом, что указанные клетки не имеют существенного контакта с негемопоэтическими клетками или клетками, содержащимися в интактной негемопоэтической ткани. Подобным образом, упоминание в настоящей заявке о «выделенной или отделенной популяции V $\delta$ 1-клеток» относится к гемопоэтическим клеткам, включая V $\delta$ 1-клетки, которые были выделены, отделены, удалены, очищены или обогащены из образца ткани негемопоэтического происхождения таким образом, что указанные клетки не имеют значительного контакта с негемопоэтическими клетками или клетками, содержащимися внутри интактной негемопоэтической ткани. Таким образом, выделение или отделение относится к выделению, отделению, удалению, очистке или обогащению гемопоэтических клеток (например,  $\gamma\delta$ -Т-клеток или других лимфоцитов) от негемопоэтических клеток (например, стромальных клеток, фибробластов и/или эпителиальных клеток).

Способы выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток, как определено в настоящей заявке, могут включать разрушение ткани (например, измельчение) с последующим отделением  $\gamma\delta$ -Т-клеток от других типов клеток. Предпочтительно способы выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток, как определено в настоящей заявке, могут включать «выползание»  $\gamma\delta$ -Т-клеток и других типов клеток из образца интактной негемопоэтической ткани или тканевого матрикса эксплантата или биоптата, где резидентные тканевые лимфоциты отделяют от тканевого матрикса физическим путем без необходимости разрушения указанного тканевого матрикса. Неожиданно было обнаружено, что при сохранении целостности тканевого матрикса наблюдается преимущественный выход из указанного тканевого матрикса резидентных тка-



невых лимфоцитов с незначительным выходом или с отсутствием выхода ингибирующих типов клеток, таких как фибробласты, которые остаются в эксплантате или биоптате и могут затем с легкостью удаляться по окончании выделения. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, применение интактного образца негемопозитической ткани или тканевого матрикса приводит к высвобождению небольшого количества фибробластов из ткани в культуру. Такие методы «выползания» с использованием интактной негемопозитической ткани или тканевого матрикса обладают преимуществом, связанным со снижением необходимости избыточной обработки образца негемопозитической ткани или тканевого матрикса, поддерживают структурную целостность негемопозитической ткани или тканевого матрикса и могут обеспечить неожиданное преимущество, связанное с обеспечением высокого выхода выделенных клеток.

Таким образом, способы выделения лимфоцитов, происходящих из негемопозитической ткани, как определено в настоящей заявке, включают способы выделения происходящих из негемопозитической ткани лимфоцитов из интактного биоптата или эксплантата указанной негемопозитической ткани. Такой интактный биоптат или эксплантат представляет собой биоптат или эксплантат, структурная целостность которого не была преднамеренно нарушена в пределах периметра иссечения, позволяющего удалить указанный биоптат или эксплантат из образца ткани. Трехмерная структура такого интактного биоптата или эксплантата в значительной степени сохраняется, за исключением незначительных повреждений, вызванных манипуляциями. Указанный интактный биоптат или эксплантат, таким образом, не был разрушен ни механическим путем, например, посредством измельчения или дробления, ни химическим ферментативным воздействием, например. Однако разрушенная ткань может применяться в способах выделения согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенный лимфоцит представляет собой  $\alpha\beta$ -Т-клетку. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения, выделенный лимфоцит представляет собой  $\gamma\delta$ -Т-клетку. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, выделенный лимфоцит представляет собой NK-клетку. Следует понимать, что один этап выделения может приводить к выделению более чем одного типа лимфоцитов.

Способы выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток с использованием способов «выползания» или, например, способов, определенных в настоящей заявке, могут включать культивирование клеток и/или образца негемопозитической ткани в присутствии цитокинов и/или хемокинов,

достаточных для стимуляции выделения или отделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или других лимфоцитов, как определено в настоящей заявке. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани включает культивирование указанного образца негемопозитической ткани в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения, выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани включает культивирование указанного образца негемопозитической ткани в присутствии IL-9, IL-15 и IL-21.

- 10 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерлейкина-4 (IL-4). Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в присутствии IL-2, IL-15, IL-2 и IL-4. Согласно дополнительному альтернативному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в присутствии IL-9, IL-15, IL-21 и IL-4.

При использовании в настоящей заявке «IL-2» относится к нативному или рекомбинантному IL-2 или его варианту, который действует как агонист одной или более субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, комплексам с рецептором, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой клеточной линии CTLL-2 (33; Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC®, TIB 214)). Зрелый человеческий IL-2 встречается в виде последовательности из 133 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 20 N-концевых аминокислот), как описано в источнике: Fujita, *et al. Cell* 1986, 46,3: 401-407. Мутеин IL-2 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфичные замены относительно белка интерлейкина-2 при сохранении способности связываться с IL-2R $\beta$ , как описано в патенте США 2014/0046026. Мутеины IL-2 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями по одному или более сайтам в остатках нативной полипептидной цепи IL-2 или заменами на другие остатки. В соответствии с настоящим изобретением, любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-2, сохраняющего активность связывания IL-2R $\beta$ . Типичные мутеины могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновая кислота, кодирующая IL-2 человека, может быть получена с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность человеческого IL-2 (ID гена: 3558) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NP\_000577,2 GI: 28178861. Мышиную (*Mus musculus*) аминокислотную последовательность IL-2 (ID гена: 16183) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NP\_032392,1 GI: 7110653.

IL-2 может также относиться к IL-2, происходящему из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быка, свинью, лошадь и мышь. Варианты могут включать последовательности с консервативными заменами, что означает, что данный аминокислотный остаток заменяется остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, замены Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Другие такие консервативные замены, например, замены целых участков, имеющих сходные характеристики гидрофобности, хорошо известны. Природные варианты IL-2 также включены согласно настоящему изобретению. Примерами таких вариантов являются белки, образующиеся в результате событий альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-2, у которых сохраняется свойство связывания IL-2. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к усеченному, но биологически активному белку IL-2. Варианты, обусловленные протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в разных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-2 (в целом, от 1 до 10 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, концевую или внутреннюю часть белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, концевая или внутренняя часть белка могут быть модифицированы с помощью дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

При использовании в настоящей заявке «IL-15» относится к нативному или рекомбинантному IL-15 или его варианту, который действует как агонист одной или более субъединиц рецептора IL-15 (IL-15R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, комплексам с рецептором, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). IL-15 подобно IL-2 представляет собой известный фактор роста Т-клеток, который мо-

жет поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой клеточной линии CTLL-2. IL-15 впервые был описан Грабштейном и др. (Grabstein, *et al. Science* 1994. 264,5161: 965-969) как зрелый белок, состоящий из 114 аминокислот. Термин «IL-15» при использовании в настоящей заявке относится к нативному или рекомбинантному IL-15 и его мутеинам, аналогам, субъединицам или их комплексам (например, рецепторным комплексам, например, sushi-пептидам, как описано в международной публикации WO 2007/046006), каждый из которых может стимулировать пролиферацию клеток CTLL-2. В анализах пролиферации CTLL-2 супернатанты клеток, трансфицированных рекомбинантно экспрессируемым предшественником со слиянием зрелых форм IL-15 в рамке считывания могут вызывать пролиферацию клеток CTLL-2.

Человеческий IL-15 можно получать в соответствии с процедурами, описанными Грабштейном и др. (Grabstein, *et al. Science* 1994. 264,5161: 965-969) или стандартными процедурами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). 19 февраля 1993 г. была произведена закладка кДНК человеческого IL-15 в ATCC®, ему был присвоен номер доступа 69245.

Аминокислотную последовательность человека IL-15 (ID гена: 3600) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NP000576,1 GI: 10835153 (изоформа 1) и NP\_751915,1 GI: 26787986 (изоформа 2). Мышиную (*Mus musculus*) аминокислотную последовательность IL-15 (ID гена: 16168) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NP\_001241676,1 GI: 363000984.

IL-15 может также относиться к IL-15, происходящему из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быка, свинью, лошадь и мышь. «Мутеин» или «вариант» IL-15, как упоминается в настоящей заявке, представляет собой полипептид, в значительной степени гомологичный последовательности нативного IL-15 млекопитающего, но имеющий аминокислотную последовательность, отличную от нативного полипептида IL-15 млекопитающего в результате аминокислотной делеции, вставки или замены. Варианты могут включать последовательности с консервативными заменами, что означает, что данный аминокислотный остаток заменяется остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, замены Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Другие такие консервативные замены, например, замены целых участков, имеющих сходные характеристики гидрофобности, хорошо известны. Природные варианты IL-15 также включены согласно

настоящему изобретению. Примерами таких вариантов являются белки, образующиеся в результате событий альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-15, у которых сохраняется свойство связывания IL-15. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к получению усеченного, но биологически активного белка IL-15. Варианты, обусловленные протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-15 (в целом, от 1 до 10 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, конец белка может быть модифицирован для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76: 687-694). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, концевая или внутренняя часть белка могут быть модифицированы с помощью дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90: 3574-3577).

При использовании в настоящей заявке термин «IL-4» относится к нативному или рекомбинантному IL-4 или его варианту, который действует как агонист в отношении одной или более субъединиц рецептора IL-4 (IL-4R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, комплексам с рецептором, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие агенты могут поддерживать дифференцировку наивных Т-хелперов (Th0-клеток) в Th2-клетки. Зрелая форма человеческого IL-4 встречается в виде последовательности из 129 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 24 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-4 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфичные замены относительно белка интерлейкина-4 при сохранении способности связываться с IL-4R $\alpha$ , такой как полипептид, описанный в патенте США № 6 313 272. Мутеины IL-4 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями по одному или более сайтам в остатках нативной полипептидной цепи IL-4 или заменами на другие остатки. В соответствии с настоящим изобретением, любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-4, который сохраняет способность связываться с IL-2R $\alpha$ . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL-4, может быть получена с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность человеческого IL-4 (ID гена: 3565) можно найти в базе данных

Genbank под кодом доступа NG\_023252. Мышиную (*Mus musculus*) аминокислотную последовательность IL-4 (ID гена: 16189) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NC\_000077.6.

5 IL-4 также может относиться к IL-4, происходящему из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быка, свинью, лошадь и мышь. Варианты могут включать последовательности с консервативными заменами, что означает, что  
10 данный аминокислотный остаток заменяется остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, замены Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых участков, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-4 также включены согласно настоящему изобретению. Примерами  
15 таких вариантов являются белки, образующиеся в результате событий альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-4, у которых сохраняются связывающие свойства IL-4. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к получению усеченного, но биологически активного белка IL-4. Варианты, обусловленные протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в  
20 различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-4 (в целом, от 1 до 10 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, конец белка может быть модифицирован для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, концевая или внутренняя часть белка могут быть модифицированы с помощью дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

При использовании в настоящей заявке термин «IL-21» относится к нативному или рекомбинантному IL-21 или его варианту, который действует как агонист в отношении одной или более субъединиц рецептора IL-21 (IL-21R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, комплексам с рецептором, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию естественных киллеров (NK-клеток) и цитотоксических (CD8<sup>+</sup>) Т-клеток. Зрелая форма человеческого IL-21  
30 встречается в виде аминокислотной последовательности из 133 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 22 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-21 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфичные замены

относительно белка интерлейкина-21 при сохранении способности связываться с IL-21R $\alpha$ , такой как полипептид, описанный в патенте США № 9 388 241. Мутеины IL-21 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями по одному или более сайтам в остатках нативной полипептидной цепи IL-21 или заменами на другие остатки. В соответствии с настоящим изобретением, любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-21, который сохраняет активность связывания с IL-21R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

- 10 Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL-21, может быть получена с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность человеческого IL-21 (ID гена: 59067) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NC\_000004.12. Мышиную (*Mus musculus*) IL-21 аминокислотную последовательность (ID гена: 60505) можно найти в базе данных Genbank под кодом доступа NC\_000069.6.

IL-21 также может относиться к IL-21, происходящему из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быка, свинью, лошадь и мышь. Варианты могут включать последовательности с консервативными заменами, что означает, что данный аминокислотный остаток заменяется остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, замены Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых участков, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-21 также включены согласно настоящему изобретению. Примерами таких вариантов являются белки, образующиеся в результате событий альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-21, сохраняющие связывающие свойства IL-21. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к получению усеченного, но биологически активного белка IL-21. Варианты, обусловленные протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-21 (в целом, от 1 до 10 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, конец белка может быть модифицирован для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). Согласно некоторым вариантам

реализации изобретения, концевая или внутренняя часть белка могут быть модифицированы с помощью дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, *et al.* PNAS 1993. 90:3574-3577).

- 5 При использовании в настоящей заявке термин «IL-9» относится к нативному или рекомбинантному IL-9 или его варианту, который действует как агонист в отношении одной или более субъединиц рецептора IL-9 (IL-9R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, комплексам с рецептором, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Зрелая форма человеческого IL-9 встречается в виде последовательности из 144 аминокислот. Мутеин IL-9 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфичные замены относительно белка интерлейкина-9 при сохранении способности связываться с IL-9R. Мутеины IL-9 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями по одному или более сайтам в остатках нативной полипептидной цепи IL-9 или заменами на другие остатки. В соответствии с настоящим изобретением, любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-9, сохраняющего активность связывания с IL-9R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.
- 10
- 15
- 20 Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IL-9, может быть получена с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность человеческого IL-9 представлена в базе данных UniProtKB под кодом доступа P15248.
- 25 IL-9 также может относиться к IL-9, происходящему из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быка, свинью, лошадь и мышь. Варианты могут включать последовательности с консервативными заменами, что означает, что данный аминокислотный остаток заменяется остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, замены Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, замены между Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Другие такие консервативные замены, например, замены целых участков, имеющих сходные характеристики гидрофобности, хорошо известны. Природные варианты IL-9 также включены согласно настоящему изобретению. Примерами таких вариантов являются белки, образующиеся в результате событий альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-9, сохраняющие связывающие свойства IL-9. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к получению
- 30
- 35



усеченного, но биологически активного белка IL-9. Варианты, обусловленные протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-9 (в целом, от 1 до 10 аминокислот). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, конец белка может быть модифицирован для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, *et al. Cancer* 1995. 76:687-694). Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, концевая или внутренняя часть белка могут быть модифицированы с помощью дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, *et al. PNAS* 1993. 90:3574-3577).

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, включают IL-2, как правило, в концентрации по меньшей мере 10 МЕ/мл, такой как по меньшей мере 100 МЕ/мл (например, от 10 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 800 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 700 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 600 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, например, от 10 МЕ/мл до 20 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 30 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 40 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 75 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, включают IL-2, как правило, в концентрации менее 1000 МЕ/мл, например, менее 500 МЕ/мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, способы включают IL-2 в концентрации примерно 100 МЕ/мл.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, включают IL-15, как правило, в концентрации по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 10 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 100 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 40 нг/мл до 70 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 50 нг/мл до 60 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 до 1000 нг/мл). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, включают IL-15, как

правило, в концентрации менее 500 нг/мл, например, менее 100 нг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, способы включают IL-15 в концентрации примерно 50 нг/мл.

- 5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани включает культивирование в присутствии как IL-2, так и IL-15, каждый из которых присутствует в любой из концентраций, перечисленных выше. В некоторых случаях содержание IL-2 составляет 100 МЕ/мл, а содержание IL-15 составляет 55 нг/мл.

10

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-21, как правило, в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 1,0 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 1,000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл

15

до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 10 нг/мл, от 4 нг/мл до 8 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 6 нг/мл до 8 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 20 нг/мл). Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-21, как правило, в концентрации, составляющей менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл.

20

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы включают IL-21 в концентрации, составляющей примерно 6 нг/мл, такой как, примерно 6,25 нг/мл.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-4, как правило, в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 10 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 1000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 40 нг/мл, от 4 нг/мл до 30 нг/мл, от 5 нг/мл до 20 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 25 нг/мл, от 5 нг/мл до 25 нг/мл). Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения,

25

способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-4, как правило, в концентрации, составляющей менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл, в частности, менее 20 нг/мл.

30

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы включают IL-4 в концентрации, составляющей примерно 15 нг/мл.

35

Упоминания в настоящей заявке о «негемопозитических тканях» или «образце негемопозитической ткани» включают ткань кожи (например, кожи человека) и кишечника (например, кишечника человека). Негемопозитическая ткань представляет собой ткань,

отличную от крови, костного мозга или ткани тимуса. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани представляет собой ткань кожи (например, кожи человека). Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани представляет собой

5 ткань кишечника или желудочно-кишечного тракта (например, кишечника человека или желудочно-кишечного тракта человека). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки не получают из конкретных типов образцов биологических жидкостей, таких как кровь или синовиальная жидкость. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани, из которой выделяют лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки в соответствии

10 со способами, определенными в настоящей заявке, представляет собой кожу (например, кожу человека), которая может быть получена с помощью методов, известных в данной области техники. Альтернативно, способы выделения лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, предложенные в настоящей заявке, можно применять для тканей желудочно-

15 кишечного тракта (например, толстой кишки или тонкой кишки), молочной железы, легкого, предстательной железы, печени, селезенки, поджелудочной железы, матки, влагалища и других кожных, слизистых или серозных оболочек. Лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки также могут являться резидентными клетками в образцах опухолевой ткани человека, например, опухолей молочной железы или предстательной железы. Согласно

20 некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут происходить из образцов опухолевой ткани человека (например, тканей солидных опухолей). Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть получены из образца негемопозитической ткани, отличной от опухолевой ткани человека (например, ткани, не содержащей значи-

25 тельного количества опухолевых клеток). Например, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть получены из участка кожи (например, здоровой кожи), отделенной от соседней или прилегающей опухолевой ткани. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения,  $\gamma\delta$ -Т-клетки не получены из опухолевой ткани человека. Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения,

30 лимфоциты не получены из опухолевой ткани человека.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани в способах, определенных в настоящей заявке, получен от человека. Согласно альтернативному варианту реализации изобретения, образец негемопозитической

35 ткани в способах, определенных в настоящей заявке, получен от животного, не представляющего собой человека.

Способы получения таких тканей известны в данной области техники. Примеры таких способов включают полученный с помощью скальпеля эксплантат или пункционный биоптат, которые могут варьировать по размеру в соответствии со способом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани получают путем пункционной биопсии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани представляет собой интактный биоптат. Упоминания в настоящей заявке о «интактном биоптате» или «эксплантате» включают ткань и образец ткани, который не разрушен или по существу не разрушен таким образом, что структурная целостность указанного биоптата или эксплантата не была преднамеренно нарушена в пределах периметра иссечения, позволяющего удалить указанный биоптат или эксплантат из образца ткани. Трехмерная структура такого интактного биоптата или эксплантата в значительной степени сохраняется, за исключением незначительных повреждений, вызванных манипуляциями. Указанный интактный биоптат или эксплантат, таким образом, не был разрушен ни механическим путем, например, посредством измельчения или дробления, ни химическим ферментативным воздействием, например. Интактный биоптат или интактный образец ткани могут содержать всю ткань, цельную ткань, часть ткани или все элементы указанной ткани. Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, интактный биоптат включает все слои кожи. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат включает эпидермальный и дермальный слои кожи. Следует понимать, что в таких вариантах реализации настоящего изобретения, где биоптат является интактным, сохраняется разделение и разграничение между такими слоями. Таким образом, упоминания в настоящей заявке о «интактном» дополнительно включают полнослойные биоптаты образца негемопозитической ткани.

Таким образом, согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани не измельчен. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, интактный биоптат представляет собой пункционный биоптат. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, интактный биоптат получают с помощью пункционной биопсии. Варианты реализации настоящей изобретения, представленные в настоящей заявке, в которых образец негемопозитической ткани представляет собой интактный биоптат, обеспечивают неожиданное преимущество, которое заключается в получении высокого количества выделенных или отделенных клеток из неизмельченного и/или интактного образца негемопозитической ткани. Более того, как показано в настоящей заявке, клетки, полученные из

неизмельченного и/или интактного образца негемопозитической ткани в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, могут сохранять фенотип, полезный для последующих способов размножения и/или методов инженерии, известных в данной области техники.

5

Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, интактный биоптат представляет собой биоптат кожи (например, кожи человека) или кишечника (например, кишечника человека). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальное поперечное сечение по меньшей мере 1 мм. Следует понимать, что «минимальное поперечное сечение» относится к минимальной или самой маленькой длине, измеренной через центр тяжести образца ткани. Также следует понимать, что «максимальное поперечное сечение» относится к максимальной или самой большой длине, измеренной через центр тяжести образца ткани. Термин «центр тяжести» при использовании в настоящей заявке представляет собой усредненное или среднее положение всех точек образца ткани. Следует понимать, что в соответствии с другими вариантами реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальное поперечное сечение по меньшей мере 2 мм, по меньшей мере 3 мм, по меньшей мере 4 мм, по меньшей мере 5 мм, по меньшей мере 6 мм, по меньшей мере 7 мм или по меньшей мере 8 мм. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальное поперечное сечение 8 мм или менее, 7 мм или менее, 6 мм или менее, 5 мм или менее, 4 мм или менее, 3 мм или менее, или 2 или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальное поперечное сечение между 1 мм и 8 мм (включительно), например, между 2 мм и 4 мм. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальное поперечное сечение примерно 3 мм. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет поперечное сечение примерно 3 мм. Следует понимать, что в соответствии с другими вариантами реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальное поперечное сечение по меньшей мере 2 мм, по меньшей мере 3 мм, по меньшей мере 4 мм, по меньшей мере 5 мм, по меньшей мере 6 мм, по меньшей мере 7 мм или по меньшей мере 8 мм. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальное поперечное сечение 8 мм или менее, 7 мм или менее, 6 мм или менее, 5 мм или менее, 4 мм или менее, 3 мм или менее, 2 мм или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальное поперечное

сечение между 1 мм и 8 мм (включительно), например, между 2 мм и 4 мм. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальное поперечное сечение примерно 3 мм.

- 5 В соответствии с другими вариантами реализации, образец негемопозитической ткани имеет минимальную площадь поперечного сечения по меньшей мере 1 мм<sup>2</sup>. Следует понимать, что «минимальная площадь поперечного сечения» относится к площади наименьшего поперечного сечения, измеренной относительно центра тяжести образца ткани. Будет очевидно, что «максимальная площадь поперечного сечения» относится к
- 10 площади наибольшего поперечного сечения, измеренной относительно центра тяжести образца ткани. Термин «центр тяжести» при использовании в настоящей заявке представляет собой усредненное или среднее положение всех точек образца ткани. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальную площадь поперечного сечения по меньшей
- 15 мере 2 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 3 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 4 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 5 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 6 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 7 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 8 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 9 мм<sup>2</sup> или по меньшей мере 10 мм<sup>2</sup>. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальную
- 20 площадь поперечного сечения 50 мм<sup>2</sup> или менее, 40 мм<sup>2</sup> или менее, 30 мм<sup>2</sup> или менее, 25 мм<sup>2</sup> или менее, 20 мм<sup>2</sup> или менее, 15 мм<sup>2</sup> или менее, 10 мм<sup>2</sup> или менее или 8 мм<sup>2</sup> или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальную площадь поперечного сечения между 1 мм<sup>2</sup> и
- 25 50 мм<sup>2</sup>, например, между 3 мм<sup>2</sup> и 12 мм<sup>2</sup>. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет минимальную площадь поперечного сечения примерно 7 мм<sup>2</sup>. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет
- 30 максимальную площадь поперечного сечения по меньшей мере 2 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 3 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 4 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 5 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 6 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 7 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 8 мм<sup>2</sup>, по меньшей мере 9 мм<sup>2</sup> или по меньшей мере 10 мм<sup>2</sup>. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальную площадь поперечного сечения 50 мм<sup>2</sup> или менее, 40 мм<sup>2</sup> или менее, 30 мм<sup>2</sup> или менее, 25 мм<sup>2</sup> или менее, 20 мм<sup>2</sup>
- 35 или менее, 15 мм<sup>2</sup> или менее, 10 мм<sup>2</sup> или менее или 8 мм<sup>2</sup> или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальную площадь поперечного сечения между 1 мм<sup>2</sup> и 50 мм<sup>2</sup>, например, между 3 мм<sup>2</sup> и 12 мм<sup>2</sup>. Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего

изобретения, образец негемопозитической ткани имеет максимальную площадь поперечного сечения примерно  $7 \text{ мм}^2$ .

5 Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, объем образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере  $5 \text{ мм}^3$ . Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, объем образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере  $8 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $10 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $15 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $20 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $25 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $30 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $35 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $40 \text{ мм}^3$ , по меньшей мере  $50 \text{ мм}^3$  или  
10 по меньшей мере  $60 \text{ мм}^3$ . Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, объем образца негемопозитической ткани составляет  $250 \text{ мм}^3$  или менее,  $200 \text{ мм}^3$  или менее, например,  $180 \text{ мм}^3$  или менее,  $160 \text{ мм}^3$  или менее,  $140 \text{ мм}^3$  или менее,  $120 \text{ мм}^3$  или менее,  $100 \text{ мм}^3$  или менее,  $80 \text{ мм}^3$  или менее,  $60 \text{ мм}^3$  или менее,  $50 \text{ мм}^3$  или менее или  $40 \text{ мм}^3$  или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, объем образца негемопозитической ткани составляет от  $5 \text{ мм}^3$  до  $250 \text{ мм}^3$ ,  
15 например, от  $15 \text{ мм}^3$  до  $65 \text{ мм}^3$ . Согласно одному конкретному варианту реализации настоящего изобретения, объем образца негемопозитической ткани составляет примерно  $35 \text{ мм}^3$ .

20 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани представляет собой пункционный биоптат. Пункционный биоптат может иметь любую форму, хотя обычно он имеет круглое поперечное сечение и, соответственно, имеет диаметр не менее  $1 \text{ мм}$ . Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани содержит пункционный  
25 биоптат, имеющий диаметр по меньшей мере  $2 \text{ мм}$ , например, по меньшей мере  $3 \text{ мм}$ , по меньшей мере  $4 \text{ мм}$ , по меньшей мере  $5 \text{ мм}$ , по меньшей мере  $6 \text{ мм}$ , по меньшей мере  $7 \text{ мм}$  или по меньшей мере  $8 \text{ мм}$ . Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат диаметром  $8 \text{ мм}$  или менее, например,  $7 \text{ мм}$  или менее,  $6 \text{ мм}$  или менее,  $5 \text{ мм}$  или менее  
30 или  $3 \text{ мм}$  или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец содержит пункционный биоптат диаметром от  $1 \text{ мм}$  до  $8 \text{ мм}$ , например, диаметром между  $2 \text{ мм}$  и  $4 \text{ мм}$ . Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат диаметром  
3 мм.

35 Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани содержит биоптат (например, пункционный биоптат, в частности,

пункционный биоптат круглого сечения) в соответствии с размерами, площадями, объемами и/или диаметрами, определенными выше, и максимальная глубина определяется в соответствии с участком взятия биопсии (хотя глубина может быть уменьшена). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат представляет собой биоптат кожи и содержит эпидермальный и дермальный слои. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат по существу не содержит подкожной жировой клетчатки. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат содержит эпидермальный и дермальный слои и по существу не содержит слой подкожной жировой клетчатки. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат не содержит подкожной жировой клетчатки. Альтернативно, подкожная жировая клетчатка не удалена и, таким образом, присутствует (или по меньшей мере частично присутствует) в указанном биоптате. Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат состоит из эпидермального и дермального слоев. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, биоптат содержит полнослойный образец негемопозитической ткани.

Способы согласно настоящему изобретению включают культивирование образца негемопозитической ткани, как определено в настоящей заявке. Упоминания в настоящей заявке о «культивировании» включают добавление клеток и/или образца негемопозитической ткани, включая выделенные, отделенные, удаленные, очищенные или обогащенные клетки из образца негемопозитической ткани, к среде, содержащей ростовые факторы и/или основные питательные вещества, которые необходимы и/или предпочтительны для клеток и/или образца негемопозитической ткани. Следует понимать, что такие условия культивирования могут быть адаптированы в соответствии с клетками или клеточной популяцией, подлежащей выделению из указанного образца негемопозитической ткани согласно изобретению, или могут быть адаптированы в соответствии с клетками или клеточной популяцией, подлежащей выделению и размножению из указанного образца негемопозитической ткани.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, культивирование образца негемопозитической ткани осуществляется в течение периода времени, достаточного для выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из указанного образца негемопозитической ткани. Согласно альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения, культивирование образца негемопозитической ткани осуществляется в течение периода времени, достаточного для выделения лимфоцитов, отличных от  $\gamma\delta$ -Т-клеток, из образца негемопозитической ткани (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или НК-клеток (естественных киллерных



клеток). Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, составляет по меньшей мере 14 дней. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, составляет менее 45 дней, например, менее 30 дней, например, менее 25 дней. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, составляет между 14 и 35 днями, например, между 14 и 21 днем. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, составляет примерно 21 день.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки, выделенные в соответствии со способами, как определено в настоящей заявке, собирают из культуры образца негемопозитической ткани после культивирования указанного образца негемопозитической ткани. Сбор лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, как определено в настоящей заявке, может включать физический сбор лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток из культуры, выделение лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток из популяции других лимфоцитов (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток,  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или NK-клеток) или выделение и/или отделение лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток от стромальных клеток (например, фибробластов). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают механическим способом (например, пипетированием). Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают посредством магнитного разделения и/или мечения. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают с помощью методов проточной цитометрии, таких как FACS. Таким образом, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения,  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают посредством специфического мечения  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты собирают посредством специфического мечения, чтобы отличить указанные лимфоциты от других клеток в культуре. Следует понимать, что такой сбор лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать физическое удаление из культуры образца негемопозитической ткани, перенос в отдельную емкость для культивирования или в отдельные или другие условия культивирования.

Следует понимать, что такой сбор лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток осуществляется после периода времени, достаточного для получения выделенной популяции лимфоцитов

и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней или по меньшей мере 14 дней культивирования образца негемопозитической ткани. Подходящим образом, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через 40 дней или менее, например, 38 дней или менее, 36 дней или менее, 34 дня или менее, 32 дня или менее, 30 дней или менее, 28 дней или менее, 26 дней или менее или 24 дня или менее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через по меньшей мере 14 дней культивирования образца негемопозитической ткани. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через 14-21 день культивирования образца негемопозитической ткани.

Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в среде, которая по существу не содержит сыворотку (например, среде, не содержащей сыворотку, или среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в бессывороточной среде. Такая среда, не содержащая сыворотки, может также включать среду, содержащую заменитель сыворотки, где указанный заменитель сыворотки основывается на химически определенных компонентах во избежание применения сыворотки человеческого или животного происхождения. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей сыворотку (например, АВ-сыворотку человека или эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС)). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей заменитель сыворотки. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани культивируется в среде, не содержащей продуктов животного происхождения.

Следует понимать, что варианты реализации настоящего изобретения, в которых образец негемопозитической ткани культивируют в бессывороточной среде, имеют преимущество, заключающееся в избежании проблем с фильтрованием, осаждением, загрязнением и обеспечением сыворотки. Более того, продукты животного происхождения не являются предпочтительными для использования в клиническом производстве меди-

цинских препаратов для человека. Как можно видеть из настоящей заявки, авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что применение бессывороточной среды для выделения клеток, в частности, V $\delta$ 1- $\gamma\delta$ -клеток, существенно повышает количество клеток, полученных из образца негемопозитической ткани, по сравнению с применением  
5 среды, содержащей АВ-сыворотку. В частности, выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, культивируемой в бессывороточной среде, увеличивает выход V $\delta$ 1-клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, осуществляются в емкости для выделения. Упоминание «емкости для выделения» относится к емкости, содержащей образец негемопозитической  
10 ткани для отделения лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, необязательно также содержащему синтетический скаффолд. Следует отметить, что емкость для выделения можно использовать только в способе выделения, но не в дальнейших этапах размножения  
15 клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, осуществляются в емкости (например, емкости для выделения), содержащей газопроницаемый материал. Такие материалы проницаемы для газов, таких как кислород, углекислый газ и/или азот, для обеспечения газообмена между  
20 содержимым емкости и окружающей атмосферой. Следует понимать, что упоминания в настоящей заявке о «емкости» включают культуральные чашки, культуральные планшеты, однолуночные чашки, многолуночные чашки, многолуночные планшеты, флаконы, многоуровневые флаконы, бутылки (такие как роллерные флаконы), биореакторы,  
25 пакеты, пробирки и т.д. Такие емкости известны в данной области техники для применения в методах, связанных с размножением неадгезирующих клеток и других лимфоцитов. Однако, как показано в настоящей заявке, емкости, содержащие газопроницаемый материал, также неожиданным образом находят применение в выделении  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которые считаются обычно адгезирующими клетками. Было обнаружено, что  
30 применение таких емкостей для культивирования значительно увеличивает выход выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани. Было также обнаружено, что такие емкости преимущественно поддерживают выход  $\gamma\delta$ -Т-клеток и других лимфоцитов по сравнению с фибробластами и другими стромальными клетками (например, эпителиальными клетками), включая адгезирующие типы клеток. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, емкости, определенные  
35 в настоящей заявке, преимущественно поддерживают выход  $\gamma\delta$ -Т-клеток и других лим-

фоцитов (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или NK-клеток). Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, фибробласты и/или другие стромальные клетки (например, эпителиальные клетки) отсутствуют в культурах, получаемых в емкостях, содержащих газопроницаемый материал.

5

Такие емкости, содержащие газопроницаемый материал, могут дополнительно содержать непористый газопроницаемый материал. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, газопроницаемый материал является непористым. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, газопроницаемый материал представляет собой мембранную пленку, такую как пленка на основе силикона, фторэтиленполипропилена, полиолефина или сополимера этиленвинилацетата. Более того, такие емкости могут содержать только часть газопроницаемого материала, газопроницаемой мембранной пленки или непористого газопроницаемого материала. Таким образом, в соответствии с другим вариантом реализации настоящего изобретения, указанная емкость имеет верхнюю поверхность, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, где по меньшей мере часть указанного дна емкости содержит газопроницаемый материал, который находится по существу в горизонтальной плоскости, когда верхняя поверхность указанной емкости находится над указанным дном. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, указанная емкость имеет верхнюю поверхность, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, где по меньшей мере часть указанного дна содержит газопроницаемый материал, который находится в горизонтальной плоскости, когда верхняя поверхность находится над указанным дном. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, емкость имеет верхнюю поверхность, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, где указанная по меньшей мере одна боковая стенка содержит газопроницаемый материал, который может находиться в вертикальной плоскости, когда верхняя поверхность находится над указанным дном, или может находиться в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя поверхность не находится над указанным дном. Следует понимать, что в таких вариантах реализации изобретения только часть указанного дна или указанной боковой стенки может содержать газопроницаемый материал. Альтернативно, вся поверхность указанного дна или вся боковая стенка может содержать газопроницаемый материал. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, верхняя поверхность указанной емкости, содержащей газопроницаемый материал, может быть запечатана, например, с использованием уплотнительного кольца. Такие варианты реализации изобретения будут иметь ценность для предотвращения разлива или снижения выпаривания содержимого емкости. Таким образом, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, емкость содержит запечатанный от протекания

35

контейнер, содержащий газопроницаемый материал для обеспечения газообмена. Согласно альтернативным вариантам реализации настоящего изобретения, указанная верхняя поверхность емкости, содержащей газопроницаемый материал, находится в горизонтальной плоскости и расположена над указанным дном и не запечатана. Таким образом, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, указанная верхняя поверхность сконструирована таким образом, чтобы обеспечить газообмен в верхней части емкости. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, указанное дно газопроницаемого контейнера сконструировано таким образом, чтобы обеспечить газообмен в нижней части емкости. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, указанная емкость, содержащая газопроницаемый материал, может представлять собой запечатанный от протекания контейнер и также содержать впускные и выпускные отверстия или трубки. Таким образом, согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, емкость, содержащая газопроницаемый материал, имеет верхнюю поверхность, дно и необязательно по меньшей мере одну боковую стенку, где по меньшей мере часть указанной верхней стенки и указанного дна содержит газопроницаемый материал и по меньшей мере часть по меньшей мере одной боковой стенки (в случае ее наличия) содержит газопроницаемый материал. Примеры емкостей описаны в международной публикации WO 2005035728 и патенте США US9255243, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки. Указанные емкости также являются коммерчески доступными, например, устройства для культивирования клеток G-REX®, поставляемые компанией Wilson Wolf Manufacturing, такие как 6-луночный планшет G-REX, 24-луночный планшет G-REX и колбу G-REX10.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопэтической ткани помещают на синтетический скаффолд. При использовании в настоящей заявке, «синтетический скаффолд», «скаффолд» и «подложка» используются взаимозаменяемо и относятся к неприродной трехмерной структуре, подходящей для поддержания клеточного роста. Образец негемопэтической ткани можно либо помещать на указанный синтетический скаффолд, либо прикреплять к нему для облегчения выхода лимфоцитов из эксплантата на указанный скаффолд. Синтетические скаффолды могут быть сконструированы из природных и/или синтетических материалов, таких как полимеры (например, природные или синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (например, фосфат трикальция, алюминат кальция, гидроксипатит кальция) или металлы (например, тантал, титан, платина и металлы той же группы элементов, что и платина, ниобий, гафний, вольфрам, и комбинации их сплавов). Согласно

одному варианту реализации настоящего изобретения, синтетический скаффолд покрыт танталом. Биологические факторы (например, коллагены, такие как коллаген I или коллаген II, фибронектины, ламинины, интегрины, ангиогенные факторы, противовоспалительные факторы, гликозаминогликаны, витрогены, антитела и их фрагменты, цитокины (например, IL-2, IL-15, L-4, IL-21, IL9 и их комбинации) могут быть нанесены на поверхность скаффолда, инкапсулированы в материал скаффолда или добавлены в среду для усиления клеточной адгезии, миграции, выживаемости или пролиферации в соответствии с методами, известными в данной области техники. Эти и другие методы можно применять для выделения лимфоцитов из ряда других типов негемопозитической ткани, например, кожи, кишечника, предстательной железы и молочной железы.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, образец негемопозитической ткани помещают на синтетический скаффолд внутри емкости, используемой для выделения лимфоцитов из указанного образца негемопозитической ткани. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, синтетический скаффолд сконструирован таким образом, что облегчает выход лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани на дно емкости. Преимущество такого варианта реализации заключается в том, что он позволяет выделять и/или отделять лимфоциты (например,  $\gamma\delta$ -Т-клетки,  $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или NK-клетки) из образца негемопозитической ткани и/или стромальных клеток (например, фибробластов и/или эпителиальных клеток). Кроме того, такие варианты реализации позволяют собирать лимфоциты (например,  $\gamma\delta$ -Т-клетки,  $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или NK-клетки) из образца негемопозитической ткани на дно культуральной емкости. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, синтетический скаффолд сконструирован таким образом, что облегчает выход  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, синтетический скаффолд сконструирован таким образом, что облегчает выход лимфоцитов, таких как  $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или NK-клетки, из образца негемопозитической ткани.

Таким образом, согласно одному аспекту способов, определенных в настоящей заявке, синтетический скаффолд сконструирован таким образом, что облегчает выход лимфоцитов из образца негемопозитической ткани на дно культуральной емкости. Согласно другому аспекту способов, определенных в настоящей заявке, синтетический скаффолд сконструирован таким образом, что облегчает выход  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани на дно емкости.

Способы согласно настоящему изобретению обеспечивают намного больший общий выход клеток, чем описано ранее. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, общее число выделенных клеток составляет по меньшей мере  $10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $2 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $5 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $10 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $20 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $30 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $40 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $50 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $60 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $70 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $80 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $90 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $100 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $150 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>, по меньшей мере  $200 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup> образца ткани. Согласно конкретному варианту реализации настоящего изобретения, общее число выделенных клеток составляет по меньшей мере  $50 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения, общее число выделенных клеток составляет по меньшей мере по меньшей мере  $100 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>.

γδ-T-клетки, которые преобладают в крови, представляют собой, в первую очередь, Vδ2-клетки, тогда как γδ-T-клетки, которые преобладают в негемопозитической ткани, представляют собой, в первую очередь, Vδ1-T-клетки таким образом, что Vδ1-T-клетки составляют примерно 70-80% популяции резидентных γδ-T-клеток негемопозитической ткани. Однако некоторое количество Vδ2-клеток также встречается в негемопозитической ткани, например, в кишечнике, где они могут составлять примерно 10-20% γδ-T-клеток. Некоторые γδ-T-клетки, которые являются резидентными клетками негемопозитической ткани, не экспрессируют ни Vδ1-, ни Vδ2-TCR и называются в настоящей заявке дважды отрицательными (DN) γδ-T-клетками. Указанные DN γδ-T-клетки, вероятно, главным образом представляют собой Vδ3-экспрессирующие T-клетки с меньшим количеством Vδ5-экспрессирующих T-клеток. Таким образом, γδ-T-клетки, которые обычно являются резидентными клетками негемопозитической ткани и которые выделяют с помощью способа согласно настоящему изобретению, предпочтительно не являются Vδ2-T-клетками, например, представляют собой Vδ1-T-клетки с содержанием меньшего количества DN γδ-T-клеток.

Таким образом, согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, γδ-T-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в настоящей заявке, содержат популяцию Vδ1-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, γδ-T-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в настоящей заявке, содержат популяцию DN γδ-T-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, γδ-T-клетки, выделенные с помощью способов,

определенных в настоящей заявке, содержат популяцию V $\delta$ 3-T-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения,  $\gamma\delta$ -T-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в настоящей заявке, содержат популяцию V $\delta$ 5-T-клеток.

5  $\gamma\delta$ -T-клетки также могут быть определены по типу  $\gamma$ -цепи, которую они экспрессируют. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения,  $\gamma\delta$ -T-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в настоящей заявке, содержат популяцию V $\gamma$ 4-T-клеток. Чаще всего V $\gamma$ 4-T-клетки получают из образцов ткани кишечника.

10

Способы выделения обеспечивают выделенную популяцию  $\gamma\delta$ -T-клеток, численно превышающую референсную популяцию (например, превышающую по количеству по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8  
15 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в  
20 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 10000 раз).

25 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, популяция  $\gamma\delta$ -T-клеток, выделенная в соответствии с изобретением, содержит низкую долю клеток, экспрессирующих TIGIT. Например, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -T-клеток может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. Альтернативно, встречае-  
30 мость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -T-клеток может составлять примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20% или примерно 10%. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -T-клеток может составлять менее 80%. Таким образом, согласно одному варианту  
35 реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -T-клеток может составлять примерно 70%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной



популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять менее 60%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять примерно 30%. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенные  $\gamma\delta$ -Т-клетки по существу не экспрессируют TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток наблюдается низкая встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток. Например, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток по отношению к другим популяциям V $\delta$ 1-клеток может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. Альтернативно, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток может составлять примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20% или примерно 10%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет менее 80%. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет примерно 70%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет менее 60%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет примерно 30%. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенные V $\delta$ 1-клетки по существу не экспрессируют TIGIT.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, выделенных в соответствии со способами изобретения, экспрессирует CD27. Например, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять более чем 10%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80% или более чем 90%. Альтернативно, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90%. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет более чем 10%. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в вы-

деленной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет примерно 20%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет более 20%. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет примерно 20%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выделенная популяция V $\delta$ 1-клеток экспрессирует CD27. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, выделенные  $\gamma\delta$ -Т-клетки экспрессируют CD27. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет более чем 10%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80% или более чем 90%. Альтернативно, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток может составлять примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет более 10%. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет примерно 20%. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет более 20%. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции V $\delta$ 1-клеток составляет примерно 20%.

Согласно некоторым вариантам реализации любого из предшествующих аспектов изобретения, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более высокая поверхностная экспрессия одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с референсной популяцией (например, по сравнению с популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток, выделенных с использованием альтернативных методов). Дополнительно или альтернативно, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может наблюдаться более высокая встречаемость клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с референсной популяцией. В частности, маркеры выбраны из CD45RA и CD25. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкая поверхностная экспрессия одного

или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с референсной популяцией. Дополнительно или альтернативно, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может наблюдаться более низкая встречаемость клеток, экспрессирующих один или не-

5 несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с референсной популяцией.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной

10 популяции V $\delta$ 1-клеток наблюдается более высокая поверхностная экспрессия одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с референсной популяцией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более вы-

15 сокая встречаемость клеток, экспрессирующих один или несколько маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с референсной популяцией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкая поверхностная

20 экспрессия одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с референсной популяцией. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкая встреча-

25 емость клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с референсной популяцией.

После выделения из негемопозитической ткани (например, кожи)  $\gamma\delta$ -Т-клетки в целом являются частью большей популяции лимфоцитов, содержащей, например,  $\alpha\beta$ -Т-клетки,

30 В-клетки и естественные киллеры (NK). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, 1-10% выделенной популяции лимфоцитов представляют собой  $\gamma\delta$ -Т-клетки (например, 1-10% выделенной популяции лимфоцитов, происходящих из кожи, являются  $\gamma\delta$ -Т-клетками). В большинстве случаев популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи) содержит большую популяцию V $\delta$ 1-Т-клеток.

35 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, 1-10% выделенной популяции лимфоцитов (например, происходящих из кожи лимфоцитов) представляют собой V $\delta$ 1-Т-клетки (например, V $\delta$ 1-Т-клетки могут составлять более 50%, более

60%, более 70%, более 80% или более 90% популяции выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток). В некоторых случаях менее 10% выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой V $\delta$ 2-Т-клетки (например, менее 10% выделенной популяции происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой V $\delta$ 2-Т-клетки).

5

Т-клетки, не относящиеся к V $\delta$ 1-клеткам, или клетки, не относящиеся к DN Т-клеткам, такие как V $\delta$ 2-клетки,  $\alpha\beta$ -Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, можно удалять из выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, до, во время или после этапа размножения).

10 Выделенные  $\gamma\delta$ -Т-клетки (например  $\gamma\delta$ -Т-клетки, выделенные из кожи, например, V $\delta$ 1-клетки, выделенные из кожи) имеют фенотип, отличный от соответствующих клеток, происходящих из гемопоэтической ткани (например, происходящих из крови  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из крови V $\delta$ 2-клеток). Например, выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток может экспрессировать CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103 на более высоком

15 уровне по сравнению с референсной популяцией, например, популяцией TCR-активированных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтической ткани или соответствующей популяцией клеток, происходящих из гемопоэтической ткани (например, происходящих из крови  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из крови V $\delta$ 2-Т-клеток). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-

20 клеток содержит по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR3<sup>+</sup> клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR4<sup>+</sup> клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR7<sup>+</sup> клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более

25 CCR8<sup>+</sup> клеток и/или по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CD103<sup>+</sup> клеток. Выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток может экспрессировать один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или все шесть из CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103.

30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из кожи V $\delta$ 1-Т-клеток) экспрессирует NKGD2, CD56, CD69 и/или TIM3 на более высоком уровне по сравнению с референсной популяцией, например, TCR-активированной популяцией резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток гемопоэтической ткани и/или соответствующей по-

35 пуляцией клеток, происходящих из гемопоэтической ткани (например, происходящих из крови  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из крови V $\delta$ 2-Т-клеток). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток

5 одержит по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более NKGD2<sup>+</sup> клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CD56<sup>+</sup> клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CD69<sup>+</sup> клеток; и/или по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более TIM3<sup>+</sup> клеток. Выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток может экспрессировать один или более, два или более, три или более, четыре или более или все пять из NKGD2, CD56, CD69 и/или TIM3.

10 Выделенную популяцию  $\gamma\delta$ -Т-клеток, происходящих из негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из кожи V $\delta$ 1-Т-клеток), также можно характеризовать по функциональной активности. Функциональные анализы, известные в данной области техники, можно проводить для определения функциональных различий между любыми клетками согласно изобретению, происходящими из негемопозитической ткани (например, между выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток, происходящих из кожи V $\delta$ 1-Т-клеток или размноженной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из кожи V $\delta$ 1-Т-клеток и референсной клеткой, например, TCR-активированной популяцией резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани или соответствующей популяцией происходящих из гемопозитической ткани клеток, например, 15 происходящих из крови  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или происходящих из крови V $\delta$ 2-клеток). Такие анализы могут включать анализы пролиферации, анализы цитотоксичности, анализы связывания, анализы для измерения устойчивости и/или расположения и т.д.

20

25 Таким образом, согласно одному аспекту настоящего изобретения, способы, определенные в настоящей заявке, для выделения популяции лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, приводят к получению популяцию, обладающей поверхностным фенотипом, соответствующим неистощенной популяции лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

30 В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, предложена выделенная популяция лимфоцитов (например, происходящих из кожи  $\alpha\beta$ Т-клеток и/или НК-клеток), полученная с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

35 В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, предложена выделенная популяция лимфоцитов (например, происходящих из кожи  $\alpha\beta$ Т-клеток и/или НК-клеток), которую можно получать с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложена выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

- 5 В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложена выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которую можно получать с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

- 10 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит более 5%  $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, между 7% и 12%  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит  $V\delta 1$ -клетки, где менее 50%, например, менее 40% указанных  $V\delta 1$ -клеток экспрессируют TIGIT. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит  $V\delta 1$ -клетки, где более 50%, например, более 60% указанных
- 15  $V\delta 1$ -клеток экспрессируют CD27.

Выделенные резидентные лимфоциты негемопозитической ткани могут подходить для применения без дальнейшего размножения, или же они могут размножаться на дополнительном этапе.

- 20 Согласно конкретным вариантам реализации, настоящее изобретение включает способы размножения резидентных лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\alpha\beta$ -Т-клеток, НК-клеток,  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -клетки, таких как  $V\delta 1$ -клетки и/или DN Т-клетки).
- 25 Указанные способы можно осуществлять *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения,  $\gamma\delta$ -Т-клетки размножают из популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которая была выделена из образца негемопозитической ткани в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке. В целом, резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани способны спонтанно пролиферировать при устранении физического
- 30 контакта со стромальными клетками (например, фибробластами кожи). Способы, определенные в настоящей заявке, можно применять для осуществления такого разделения, приводящего к дерепрессии  $\gamma\delta$ -Т-клеток для запуска пролиферации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты (например, происходящие из кожи  $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или НК-клетки, происходящие из кишечника  $\alpha\beta$ -Т-
- 35 клетки и/или НК-клетки) размножают из популяции лимфоцитов, выделенных из образца негемопозитической ткани в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке.

При использовании в настоящей заявке упоминания о «размножении» или «размноженной популяции лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток» включают популяции клеток, которые больше или содержат большее количество клеток по сравнению с неразмноженной популяцией. Такие популяции могут быть большими по количеству, малыми по количеству или представлять собой смешанную популяцию с размножением части популяции или определенного типа клеток в указанной популяции. Следует понимать, что термин «этап размножения» относится к процессам, которые приводят к размножению или получению размноженной популяции. Таким образом, размножение или размноженная популяция может быть количественно больше или содержать большее количество клеток по сравнению с популяцией, для которой не осуществляли этап размножения, или по сравнению с указанной популяцией до какой-либо этапа размножения. Также следует понимать, что любые числа, указанные в настоящей заявке для обозначения размножения (например, кратность увеличения или кратность размножения), показывают увеличение численности или размера популяции клеток или количества клеток и отражают степень размножения.

Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, размножают  $\gamma\delta$ -Т-клетки, выделенные в соответствии со способами согласно изобретению. Такое размножение может включать культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21, необязательно включая IL-4. Альтернативно, размножение может включать культивирование Т-  $\gamma\delta$ -клеток в присутствии IL-9, IL-15 и IL-21, необязательно включая IL-4. Следует понимать, что любой этап размножения осуществляется в течение периода времени, эффективного для получения размноженной популяции лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, продолжительность времени, эффективная для получения размноженной популяции лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет по меньшей мере 5 дней. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15, IL-21 и IL-4 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15 и IL-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количе-

стве, эффективном для размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15, IL-21 и IL-4 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

5

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение времени (например, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 28 дней или более, например от 5 до 40 дней, от 7 до 35 дней, от 14 до 28 дней или примерно в течение 21 дня) в количестве, эффективном для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки размножают в культуре в течение периода времени, составляющего от нескольких часов (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18 или 21 часа) до примерно 35 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки размножают в течение периода времени, составляющего от 14 до 21 дня. Таким образом, включая период культивирования (например, от 1 до 40 дней, например, от 14 до 21 дня), этапы выделения и размножения, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, могут длиться от 28 до 56 дней или примерно 41 день.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 28 дней или более, например, в течение от 5 до 40 дней, от 7 до 35 дней, от 14 до 28 дней или примерно в течение 21 дня. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, этап размножения включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение по меньшей мере 10, 15 или 20 дней для получения размноженной популяции. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, этап размножения включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение между 5 и 25 днями, например, между 14 и 21 днями. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, этап размножения включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение примерно 20 дней.



Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, типичное количество IL-2, эффективное для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет от 1 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл (например, от 5 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или примерно 100 МЕ/мл, например, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 20 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 30 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 40 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 60 МЕ/мл, от 60 МЕ/мл до 70 МЕ/мл, от 70 МЕ/мл до 80 МЕ/мл, от 80 МЕ/мл до 90 МЕ/мл, от 90 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 120 МЕ/мл, от 120 МЕ/мл до 140 МЕ/мл, от 140 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 175 МЕ/мл, от 175 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 300 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 400 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 1000 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 1500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или более). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество IL-2, эффективное для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет примерно 100 МЕ/мл.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, типичное количество IL-15, эффективное для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-клетки, таких как V $\delta$ 1-клетки и/или DN Т-клетки), составляет по меньшей мере 0,1 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1000 нг/мл). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество IL-15, эффективное для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет примерно 10 нг/мл.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, типичное количество IL-21 эффективное для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-клетки, таких как V $\delta$ 1-клетки и/или DN Т-клетки), составляет по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 1,0 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 1,000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 10 нг/мл, от 4 нг/мл до 8 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 6 нг/мл до 8 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 20 нг/мл). Согласно

дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, количество IL-21, как правило, представляет собой концентрацию, составляющую менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы включают IL-21 в концентрации, составляющей примерно 6 нг/мл, например, примерно 5 6,25 нг/мл.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-4, как правило, в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 нг/мл, например, по меньшей мере 10 нг/мл (например, от 10 0,1 нг/мл до 1,000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 100 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 50 нг/мл, от 2 нг/мл до 50 нг/мл, от 3 нг/мл до 40 нг/мл, от 4 нг/мл до 30 нг/мл, от 5 нг/мл до 20 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 25 нг/мл, от 5 нг/мл до 25 нг/мл). Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, способы, описанные в настоящей заявке, включают IL-4, как правило, в концентрации, 15 составляющей менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл, в частности, менее 20 нг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения, способы включают IL-4 в концентрации, составляющей примерно 15 нг/мл.

Также в настоящей заявке предложено замещение или добавление других факторов в культуру для размножения резидентных лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, согласно некоторым вариантам реализации изобретения, любой один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 $\beta$ , лизата тромбоцитов человека (human platelet lysate, HPL) и фактора стромальных клеток 1 (stromal cell-derived factor 1, SDF-1) включены дополнительно или вместо 25 любого из IL-2 и IL-15. Такие дополнительные или альтернативные факторы для размножения лимфоцитов, таких как  $\alpha\beta$ -Т-клетки или NK-клетки, известны в данной области техники. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, для размножения клеток используются такие факторы, которые способствуют селективному размножению  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего 30 изобретения, для размножения клеток используются такие факторы, которые способствуют селективному размножению лимфоцитов, таких как  $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или NK-клетки.

Следует понимать, что количество каждого из вышеперечисленных цитокинов, необходимое для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, будет зависеть от концентрации одного или более других цитокинов. Например, если концентрация IL-2 повышается или снижается, то концентрация IL-15 может соответствующим образом снижаться 35

или повышаться соответственно. Как отмечалось выше, количество, эффективное для получения размноженной популяции, относится в настоящей заявке к совместному эффекту всех факторов на рост клеток.

5 Способы размножения обеспечивают размноженную популяцию  $\gamma\delta$ -Т-клеток, численность которой превышает численность референсной популяции. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, размноженная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток превышает по количеству выделенную популяцию указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа раз-

10 множения (например, превышает по количеству по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 35 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере

15 в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 10000 раз или более выделенную

20 популяцию указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, этап размножения включает культивирование выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками. Согласно дополнительному варианту реализации

25 настоящего изобретения, этап размножения включает культивирование выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие существенного контакта с фибробластами.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения, этап размножения дополнительно включает культивирование выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присут-

30 ствии IL-4. Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, размножение включает культивирование выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21. Альтернативно, размножение может включать культивирование выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15, IL-4 и IL-21.

35 Следует понимать, что способы размножения, определенные в настоящей заявке, также применимы к размножению других лимфоцитов (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или НК-

клеток). Согласно таким вариантам реализации изобретения, этап размножения включает культивирование выделенных лимфоцитов в присутствии соответствующих факторов роста и/или питательных веществ (например, цитокинов и/или хемокинов) для получения размноженной популяции лимфоцитов (например,  $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или НК-клеток).

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, способы размножения популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, как определено в настоящей заявке, включают культивирование указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток или других лимфоцитов в бессывороточной среде. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения, способы размножения популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, как определено в настоящей заявке, включают культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в среде, содержащей заменитель сыворотки. Таким образом, следует понимать, что такое размножение  $\gamma\delta$ -Т-клеток в бессывороточной среде или среде, содержащей заменитель сыворотки, обеспечивает сходные преимущества для описанных выше способов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, во время этапа размножения не наблюдается существенной активации пути TCR (например, в культуру не добавляют экзогенные активаторы пути TCR). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, на этапе размножения отсутствуют экзогенные агонисты пути TCR. Более того, в настоящей заявке предложены способы размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток, выделенных в соответствии со способами, определенными в настоящей заявке, где указанные способы размножения не включают контакт с фидерными клетками, опухолевыми клетками и/или антиген-презентирующими клетками. Таким образом, согласно дополнительному варианту реализации способов, определенных в настоящей заявке, размножение  $\gamma\delta$ -Т-клеток включает культивирование указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие существенного контакта со стромальными клетками.

Также предложен способ получения больших популяций  $\gamma\delta$ -Т-клеток, происходящих из негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клетки) с высокой скоростью (например, путем устранения контакта со стромальными клетками и/или стимуляции TCR, или путем культивирования в присутствии эффективного количества факторов). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, этап размножения, описанный в настоящей заявке, приводит к размножению  $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов с малым временем удвоения популяции, которое выражается с помощью следующего уравнения:

$$\text{Время удвоения} = \frac{\text{продолжительность} * \log(2)}{\log(\text{конечная концентрация}) - \log(\text{исходная концентрация})}$$

- С учетом информации, предложенной в настоящей заявке, специалисту в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение обеспечивает способы размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток, происходящих из негемопоэтической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клеток) при времени удвоения популяции, составляющем менее 5 дней (например, менее 4,5 дня, менее 4,0 дня, менее 3,9 дней, менее 3,8 дней, менее 3,7 дней, менее 3,6 дней, менее 3,5 дней, менее 3,4 дня, менее 3,3 дня, менее 3,2 дня, менее 3,1 день, менее 3,0 дня, менее 2,9 дней, менее 2,8 дней, менее 2,7 дней, менее 2,6 дней, менее 2,5 дней, менее 2,4 дня, менее 2,3 дня, менее 2,2 дня, менее 2,1 день, менее 2,0 дня, менее 46 часов, менее 42 часа, менее 38 часов, менее 35 часов, менее 32 часа).
- 15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, за 7 дней культивирования в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, размноженной популяции V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) количество  $\gamma\delta$ -Т-клеток увеличивается по меньшей мере в 10 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 150 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере в меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900
- 20 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере по меньшей мере в 2000 раз, по меньшей мере в 3000, по меньшей мере в 4000, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 6000 раз, по меньшей мере в 7000 раз или по меньшей мере в 8000 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, за 14 дней культивирования в
- 30 размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, размноженной популяции V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) количество указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток увеличивается по меньшей мере в 20 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 150 раз,
- 35

по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 2000 раз, по меньшей мере в 3000 раз, по меньшей мере в 4000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 6000 раз, по меньшей мере в 7000 раз, по меньшей мере в 8000 раз, по меньшей мере в 9000 раз или по меньшей мере в 10000 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, за 21 день культивирования в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, размноженной популяции V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) количество указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток увеличивается по меньшей мере в 50 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 150 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 2000 раз, по меньшей мере в 3000 раз, по меньшей мере в 4000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 6000 раз, по меньшей мере в 7000 раз, по меньшей мере в 8000 раз, по меньшей мере в 9000 раз или по меньшей мере в 10000 раз по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, за 28 дней культивирования в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, размноженной популяции V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) количество указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток увеличивается по меньшей мере 100 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере в 110 раз, по меньшей мере в 120 раз, по меньшей мере в 130 раз, по меньшей мере в 140 раз, по меньшей мере в 150 раз, по меньшей мере в 200 раз, по меньшей мере в 300 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 2000 раз, по меньшей мере в 3000 раз, по меньшей мере в 4000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 6000 раз, по меньшей мере в 7000 раз, по меньшей мере в 8000 раз, по меньшей мере в 9000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, по меньшей мере в 12000 раз или по меньшей мере в 15000 раз по сравнению с выделенной популяцией указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения).

$\gamma\delta$ -Т-клетки, происходящие из негемопозитической ткани (например, происходящие из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клетки и/или Т-клетки, не представляющие собой V $\delta$ 2-Т-клетки, такие как V $\delta$ 1-

Т-клетки и/или DN Т-клетки), размноженные с помощью способов, предложенных в настоящей заявке, могут иметь фенотип, хорошо подходящий для обеспечения противоопухолевой эффективности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи V $\delta$ 1-Т-клеток) наблюдается более высокий средний уровень экспрессии CD27 по сравнению с референсной популяцией (например, выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более высокий средний уровень экспрессии CD27, превышающий по меньшей мере в 2 раза указанный уровень в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 15 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 25 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере 40 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 150 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере в 500 раз, по меньшей мере в 600 раз, по меньшей мере в 700 раз, по меньшей мере в 800 раз, по меньшей мере в 900, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз, по меньшей мере в 20000 раз или более по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток).

В отдельной части размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клетки) может активироваться CD27, в то время как в другой части наблюдается низкий уровень CD27 или отсутствие CD27. В этом случае встречаемость CD27-положительных клеток в размноженной популяции может быть больше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, встречаемость CD27-положительных клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть по меньшей мере на 5% больше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50 %, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или на 100% больше по сравнению с встречаемостью CD27-положительных клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество CD27-положительных клеток

может быть увеличено в размноженной популяции по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, количество CD27-положительных клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть выше по меньшей мере в 2 раза по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения. Встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять более чем 10%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80% или более чем 90%. Альтернативно, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять примерно 10%, примерно 20%, примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80% или примерно 90%. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет более чем 50%..

Способы размножения, используемые в настоящей заявке, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, приводят к получению размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, происходящих из негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клетки), имеющей низкий уровень экспрессии TIGIT по сравнению с референсной популяцией (например, выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкий средний уровень экспрессии TIGIT по сравнению с референсной популяцией (например, выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается средний уровень экспрессии TIGIT, который по меньшей мере на 10% меньше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, по меньшей мере на 20% меньше, по меньшей мере на 30% меньше, по меньшей мере на 40% меньше, по меньшей мере на 50% меньше, по меньшей мере на 60% меньше, по меньшей мере на 70% меньше, по меньшей мере на 80% меньше, по меньшей мере на 90% меньше или на 100% меньше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток). Встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. Альтернативно, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может составлять примерно 90%, примерно 80%, примерно 70%, примерно 60%, примерно 50%, примерно 40%, примерно 30%, примерно 20% или примерно 10%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет менее 80%.



Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клетки) наблюдается высокое количество или встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток и низкая встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается высокая встречаемость CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток по сравнению с референсной популяцией (например, выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Например, встречаемость CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть по меньшей мере на 5% больше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или на 100% больше по сравнению с встречаемостью CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в размноженной популяции может быть повышено по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, количество CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть по меньшей мере в 2 раз выше по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или на 100% выше по сравнению с встречаемостью CD27<sup>+</sup> TIGIT<sup>-</sup> клеток в выделенной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток до размножения).

В некоторых примерах средний уровень экспрессии TIGIT в популяции CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -Т-клеток в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, например, V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) является низким по сравнению с референсной популяцией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкий средний уровень экспрессии TIGIT по сравнению с референсной популяцией (выделенной популяцией CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции CD27<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается

средний уровень экспрессии TIGIT, который по меньшей мере на 10% ниже по сравнению с выделенной популяцией CD27<sup>+</sup> γδ-T-клеток (например, по меньшей мере на 20% ниже, по меньшей мере на 10% ниже, по меньшей мере на 30% ниже, по меньшей мере на 40% ниже, по меньшей мере на 50% ниже, по меньшей мере на 60% ниже, по меньшей мере на 70% ниже, по меньшей мере на 80% ниже, по меньшей мере на 90% ниже или на 100% ниже по сравнению с выделенной популяцией CD27<sup>+</sup> γδ T-клеток).

Дополнительно или альтернативно, срединное значение экспрессии CD27 в популяции TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток в размноженной популяции γδ-T-клеток (например, происходящих из кожи γδ-T-клеток и/или T-клеток, не представляющих собой Vδ2-клетки, таких как Vδ1-T-клетки и/или DN T-клетки) является высоким по сравнению с референсной популяцией. Например, встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток может быть по меньшей мере на 5% выше по сравнению с выделенной популяцией TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток до размножения (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или на 100% выше по сравнению с встречаемостью CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток до размножения). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, количество CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции может быть повышено по сравнению с выделенной популяцией TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток. Например, количество CD27<sup>+</sup> клеток в размноженной популяции TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток может быть по меньшей мере в 2 раза больше по сравнению с выделенной популяцией TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток до размножения (например, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или на 100% больше по сравнению с встречаемостью CD27<sup>+</sup> клеток в выделенной популяции TIGIT<sup>-</sup> γδ-T-клеток до размножения).

Повышение или снижение уровня экспрессии других маркеров можно дополнительно или альтернативно использовать для характеристики одной или более размноженных популяций γδ-T-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи γδ-T-клеток и/или T-клеток, не представляющих собой Vδ2-T-клетки, таких как Vδ1-T-клетки и/или T-клетки DN), включая CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганд, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70,

CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64. В некоторых примерах в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, таких как V $\delta$ 1-Т-клетки и/или DN Т-клетки) наблюдается более высокое среднее значение экспрессии одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, до размножения. Дополнительно или альтернативно, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток может наблюдаться более высокая встречаемость клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток наблюдается более низкое среднее значение экспрессии одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток. В размноженной популяции может подобным образом наблюдаться более низкая встречаемость клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, по сравнению с выделенной популяцией  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Резидентная  $\gamma\delta$ -Т-клетка негемопозитической ткани, полученная с помощью способов согласно настоящему изобретению, может, таким образом, обладать одним или более их следующих свойств: (i) обладать фенотипом с высоким уровнем экспрессии CD69, высоким уровнем экспрессии TIM3 и низким уровнем экспрессии/отсутствием экспрессии CD28; (ii) активировать один или более из CCR3, CD39, CD11b и CD9; (iii) продуцировать IFN- $\gamma$  в ответ на NKG2D-лиганд в отсутствие агонистов TCR; (iv) продуцировать IL-13 в отсутствие агонистов TCR; (v) продуцировать один или более из IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и GM-CSF в ответ на активацию TCR; (vi) не продуцировать или по существу не продуцировать IL-17 в ответ на активацию TCR; (vii) расти в среде для культивирования, содержащей IL-2, без дополнительных факторов роста; (viii) проявлять цитотоксический Т-клеточный ответ в отсутствие агонистов TCR и/или (ix) проявлять селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками.

В некоторых примерах резидентная  $\gamma\delta$ -Т-клетка негемопозитической ткани, полученная с помощью способов согласно настоящему изобретению, продуцирует IL-13 в отсутствие агонистов TCR и/или продуцирует IFN- $\gamma$  в ответ на NKG2D-лиганд в отсутствие агонистов TCR.

5

Доступны многочисленные основные питательные среды, подходящие для применения в обеспечении пролиферации  $\gamma\delta$ -Т-клеток, в частности, такие среды, как AIM-V, Iscove и RPMI-1640 (Life Technologies). Среда может быть дополнена другими факторами, как определено в настоящей заявке, такими как сыворотка, белки сыворотки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, согласно вариантам реализации настоящего изобретения, среда RPMI-1640 содержит 2 мМ глутамин, 10% ЭБС, 10 мМ HEPES, pH 7,2, 1% раствор пенициллина-стрептомицина, пируват натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 мкМ Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser; 1XMEM, содержащая заменимые аминокислоты (Life Technologies)) и 10 мкл/л  $\beta$ -меркаптоэтанола. Согласно альтернативному варианту реализации настоящего изобретения, среда AIM-V может быть дополнена заменителем сыворотки CTS Immune и амфотерицином В. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, как определено в настоящей заявке, среда может также быть дополнена IL-2 и IL-15. Для удобства клетки культивируют при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5%-ым содержанием CO<sub>2</sub> в подходящей культуральной среде во время выделения и/или раз-

10

15

20

множения.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

25

- (i) выделение популяции лимфоцитов из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке; и
- (ii) дополнительное культивирование указанной популяции лимфоцитов (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения размноженной популяции лимфоцитов.

30

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты содержат  $\alpha\beta$ -Т-клетки. Таким образом, в соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения  $\alpha\beta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

35

- (i) выделение популяции  $\alpha\beta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке; и

- (ii) дополнительное культивирование указанной популяции  $\alpha\beta$ -Т-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения размноженной популяции  $\alpha\beta$ -Т-клеток.

5 Культивирование на этапе (ii) может осуществляться путем селективного размножения, например, путем выбора условий культивирования, при которых преимущественно размножаются  $\alpha\beta$ -Т-клетки по сравнению с другими типами клеток, присутствующих в выделенной популяции на этапе (i). Альтернативно, условия размножения не являются селективными, и культивирование на этапе (ii) может сопровождаться последующим истощением нецелевых клеток (например, клеток, отличных от  $\alpha\beta$ -Т-клеток). Альтернативно, условия размножения не являются селективными, и истощение нецелевых клеток (например, клеток, отличных от  $\alpha\beta$ -Т-клеток) происходит до культивирования на этапе (ii). Следует отметить, что целью указанных вариантов реализации изобретения является увеличение общего количества  $\alpha\beta$ -Т-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты содержат НК-клетки. Таким образом, в соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения НК-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

- (i) выделение популяции НК-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке; и
- (ii) дополнительное культивирование указанной популяции НК-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения размноженной популяции НК-клеток.

Культивирование на этапе (ii) может осуществляться путем селективного размножения, например, путем выбора условий культивирования, при которых преимущественно размножаются НК-клетки по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в выделенной популяции на этапе (i). Альтернативно, условия роста не являются селективными, и культивирование на этапе (ii) может сопровождаться последующим истощением нецелевых клеток (например, клеток, отличных от НК-клеток). Альтернативно, условия размножения не являются селективными, и истощение нецелевых клеток (например, клеток, отличных от НК-клеток), происходит до культивирования на этапе (ii). Следует отметить, что целью указанных вариантов реализации изобретения является увеличение общего количества НК-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, лимфоциты содержат  $\gamma\delta$ -Т-клетки. Таким образом, в соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

- (i) выделение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке; и
- (ii) дополнительное культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Культивирование на этапе (ii) может осуществляться путем селективного размножения, например, путем выбора условий культивирования, при которых преимущественно размножаются  $\gamma\delta$ -Т-клетки по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в выделенной популяции на этапе (i). Альтернативно, условия размножения не являются селективными, и культивирование на этапе (ii) может сопровождаться последующим истощением нецелевых клеток (например, клеток, отличных от  $\gamma\delta$ -Т-клеток). Альтернативно, условия размножения не являются селективными, и истощение нецелевых клеток (например, клеток, отличных от  $\gamma\delta$ -Т-клеток) происходит до культивирования на этапе (ii). Следует отметить, что целью указанных вариантов реализации изобретения является увеличение общего количества  $\gamma\delta$ -Т-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

Таким образом, согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения, предложен способ выделения и размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

- (i) выделение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке, и
- (ii) культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии:

- (a) IL-2 или IL-9,
- (b) IL15 и
- (c) IL-21

в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Согласно конкретным вариантам реализации данного аспекта настоящего изобретения, культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток дополнительно включает IL-4. Таким

образом, согласно дополнительному аспекту настоящей изобретения, предложен способ выделения и размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

- 5 (i) выделение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке; и
- (ii) культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии:
  - (a) IL-2 или IL-9,
  - (b) IL15 и
  - (c) IL-21 и
  - 10 (d) IL-4

в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

15 В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения, обеспечивается размноженная популяция выделенных лимфоцитов (например, происходящих из кожи  $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или NK-клеток), полученных с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

20 В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, обеспечивается размноженная популяция выделенных лимфоцитов, которые можно получать с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, обеспечивается размноженная популяция выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

25

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения, обеспечивается размноженная популяция выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которые можно получать с помощью любого из способов, определенных в настоящей заявке.

30 Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит более чем 50%  $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, более чем 75%  $\gamma\delta$ -Т-клеток, в частности, более чем 85%  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит  $V\delta 1$ -клетки, где менее 50%, например, менее 25% указанных  $V\delta 1$ -клеток экспрессируют TIGIT. Согласно одному варианту ре-

35 ализации настоящего изобретения, выделенная популяция содержит  $V\delta 1$ -клетки, где более чем 50%, например, более чем 60%  $V\delta 1$ -клеток экспрессируют CD27.

Лимфоциты и/или  $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные с помощью способа согласно настоящему изобретению, можно применять в качестве лекарственного средства, например, для адоптивной Т-клеточной терапии. Указанная терапия включает перенос пациенту лимфоцитов и/или  $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных с помощью способа согласно настоящему изобретению. Терапия может представлять собой аутологичную терапию, т.е.  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть перенесены обратно тому же пациенту, из которого они были получены, или терапия может представлять собой аллогенную терапию, т.е.  $\gamma\delta$ -Т-клетки от одного человека могут быть перенесены другому пациенту. В примерах, включающих аллогенный перенос,  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут по существу не содержать  $\alpha\beta$ -Т-клетки. Например, может происходить истощение  $\alpha\beta$ -Т-клеток из популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, после размножения с использованием подходящего способа, известного в данной области техники (например, путем отрицательной селекции, например, с использованием магнитных гранул). Способ лечения может включать предоставление образца негемопозитической ткани, полученной от субъекта-донора; получение культуры  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца, как описано выше, для получения размноженной популяции и введение указанной размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток субъекту-реципиенту.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой страдающего раком человека (например, пациента, представляющего собой страдающего раком человека, проходящего лечение от солидной опухоли) или пациента, инфицированного вирусом (например, пациента, инфицированного ЦМВ или ВИЧ). В некоторых примерах пациент страдает солидной опухолью и/или проходит лечение от солидной опухоли.

Поскольку резидентные  $V\delta 1$ -Т-клетки и DN  $\gamma\delta$ -Т-клетки в норме находятся в негемопозитической ткани, они также с большей вероятностью будут возвращаться и поддерживаться в опухолевых массах по сравнению с их аналогами, которые являются резидентными клетками системного кровотока, и адоптивный перенос этих клеток, вероятно, будет более эффективным при нацеливании на солидные опухоли и потенциально другие иммунологические патологии, связанные с негемопозитической тканью.

Поскольку  $\gamma\delta$ -Т-клетки не рестриктивны по МНС, они не распознают организм-хозяина, в который их переносят, как чужеродный. Это означает, что указанные клетки с меньшей вероятностью будут вызывать болезнь «трансплантат против хозяина». Это означает, что их можно использовать в готовом виде и переносить любому реципиенту, например, для аллогенной адоптивной Т-клеточной терапии.



Резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани, полученные согласно настоящему изобретению, экспрессируют NKG2D и отвечают на NKG2D-лиганд (например, MICA), который сильно связан со злокачественной трансформацией. Они также проявляют цитотоксический профиль экспрессии в отсутствие какой-либо активации и, таким образом, вероятно, могут эффективно уничтожать опухолевые клетки. Например, резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани, полученные, как описано в настоящей заявке, могут экспрессировать один или более, предпочтительно, все из IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, CCL4, IL-13, гранулизина, гранзима А и В и перфорина в отсутствие какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

10

Данные, изложенные в настоящей заявке, таким образом, обеспечивают убедительные доказательства практической пригодности и пригодности для клинического применения резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани, полученных с помощью способа согласно настоящему изобретению в качестве «готового к применению» иммунотерапевтического реагента. Эти клетки обладают присущей им способностью к уничтожению, не рестриктированы по МНС и демонстрируют повышенный хоуминг и/или удерживание в опухолях по сравнению с другими Т-клетками.

15

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, способ лечения субъекта, страдающего опухолью негемопозитической ткани, может включать предоставление образца негемопозитической ткани, полученного от донора, культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток из указанного образца, как описано выше, для получения размноженной популяции, и введение указанной размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток субъекту, страдающему опухолью.

25

Фармацевтические композиции могут содержать размноженные резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани, как описано в настоящей заявке, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут содержать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и т.д.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые могут применяться в фармацевтических композициях согласно изобретению, включают, например, ДМСО. Композиции могут быть составлены, например, для внутривенного введения.

35

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, фармацевтическая композиция по существу не содержит (например, не содержит на выявляемом уровне) загрязнитель, например, эндотоксин или микоплазму.

5 В некоторых примерах размноженные  $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные с помощью любого из способов, описанных выше, можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве (например, для лечения рака, например, для лечения солидных опухолей). В некоторых примерах терапевтически эффективное количество размноженных  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет менее 10 $\times 10^{12}$  клеток на дозу (например, менее 9 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 8 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 7 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 6 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 4 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 3 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 2 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^{12}$  клеток на дозу, менее 9 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 8 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 7 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 6 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 4 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 3 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 2 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^{11}$  клеток на дозу, менее 9 $\times 10^{10}$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^{10}$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^{10}$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^{10}$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^{10}$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^9$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^9$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^9$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^9$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^8$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^8$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^8$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^8$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^7$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^7$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^7$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^7$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^6$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^6$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^6$  клеток на дозу, менее 1 $\times 10^6$  клеток на дозу, менее 7,5 $\times 10^5$  клеток на дозу, менее 5 $\times 10^5$  клеток на дозу, менее 2,5 $\times 10^5$  клеток на дозу или менее 1 $\times 10^5$  клеток на дозу).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, терапевтически эффективное количество размноженных  $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет менее 10 $\times 10^{12}$  клеток в течение курса лечения (например, менее 9 $\times 10^{12}$  клеток, менее 8 $\times 10^{12}$  клеток, менее 7 $\times 10^{12}$  клеток, менее 6 $\times 10^{12}$  клеток, менее 5 $\times 10^{12}$  клеток, менее 4 $\times 10^{12}$  клеток, менее 3 $\times 10^{12}$  клеток, менее 2 $\times 10^{12}$  клеток, менее 1 $\times 10^{12}$  клеток, менее 9 $\times 10^{11}$  клеток, менее 8 $\times 10^{11}$  клеток, менее 7 $\times 10^{11}$  клеток, менее 6 $\times 10^{11}$  клеток, менее 5 $\times 10^{11}$  клеток, менее 4 $\times 10^{11}$  клеток, менее 3 $\times 10^{11}$  клеток, менее 2 $\times 10^{11}$  клеток, менее 1 $\times 10^{11}$  клеток, менее 9 $\times 10^{10}$  клеток, менее 7,5 $\times 10^{10}$  клеток, менее 5 $\times 10^{10}$  клеток, менее 2,5 $\times 10^{10}$  клеток, менее 1 $\times 10^{10}$  клеток, менее 7,5 $\times 10^9$  клеток, менее 5 $\times 10^9$  клеток, менее 2,5 $\times 10^9$  клеток, менее 1 $\times 10^9$  клеток, менее 7,5 $\times 10^8$  клеток, менее 5 $\times 10^8$  клеток, менее 2,5 $\times 10^8$  клеток, менее 1 $\times 10^8$  клеток, менее 7,5 $\times 10^7$  клеток, менее

$5 \times 10^7$  клеток, менее  $2,5 \times 10^7$  клеток, менее  $1 \times 10^7$  клеток, менее  $7,5 \times 10^6$  клеток, менее  $5 \times 10^6$  клеток, менее  $2,5 \times 10^6$  клеток, менее  $1 \times 10^6$  клеток, менее  $7,5 \times 10^5$  клеток, менее  $5 \times 10^5$  клеток, менее  $2,5 \times 10^5$  клеток или менее  $1 \times 10^5$  клеток в течение курса лечения).

- 5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани, как описано в настоящей заявке, составляет примерно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -Т-клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет по меньшей мере примерно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -Т-клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет вплоть до примерно  $1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3,6 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,8 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -Т-клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) содержит примерно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -Т-клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) содержит по меньшей мере примерно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, доза размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой  $V\delta 2$ -Т-клетки, например,  $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN Т-клеток) содержит вплоть до примерно  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$  или  $5 \times 10^9$  клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, субъекту вводят от  $10^4$  до  $10^6$  размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, происходящих из кожи  $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или Т-клеток, не представляющих собой V $\delta$ 2-Т-клетки, например, V $\delta$ 1-Т-клеток и/или DN Т-клеток) на кг массы тела указанного субъекта. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, субъекту осуществляют первоначальное введение популяции резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, первоначальное введение от  $10^4$  до  $10^6$   $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта, например, от  $10^4$  до  $10^5$   $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта) и одно или более (например, 2, 3, 4 или 5) последующих введений размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани (например, одно или более последующих введений от  $10^4$  до  $10^6$  размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани на кг массы тела указанного субъекта, например, от  $10^4$  до  $10^5$  размноженных резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани на кг массы тела указанного субъекта). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, одно или более последующих введений осуществляют менее через 15 дней, например, через 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения, например, менее через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения, субъект получает в общем примерно  $10^6$   $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела в течение курса из по меньшей мере трех введений популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, субъект получает первоначальную дозу, содержащую  $1 \times 10^5$   $\gamma\delta$ -Т-клеток, второе введение  $3 \times 10^5$   $\gamma\delta$ -Т-клеток и третье введение  $6 \times 10^5$   $\gamma\delta$ -Т-клеток, где, например, каждое введение осуществляют менее через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

Резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани, полученные с помощью способа согласно настоящему изобретению, также могут быть модифицированы с помощью генной инженерии для усиления терапевтических свойств, например, для CAR-Т-терапии. Генная инженерия включает конструирование инженерных Т-клеточных рецепторов (TCR) для перепрограммирования Т-клеток для придания новых свойств специфичности, например, специфичности моноклональных антител. Сконструированный TCR может обеспечить специфичность Т-клеток в отношении злокачественных клеток и, таким образом, сделать их применимыми для иммунотерапии раковых опухолей. Например, Т-клетки могут распознавать раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как ассоциированный с опухолью антиген, который не экспрессируется нормальными соматическими клетками из ткани субъекта. Таким образом, CAR-модифицированные Т-клетки можно применять для проведения адоптивной Т-клеточной терапии, например, у страдающих раком пациентов.

Было описано применение резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток крови для CAR. Однако резидентные  $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитической ткани, полученные с помощью способа согласно настоящему изобретению, вероятно, являются особо хорошими носителями для CAR-Т-подходов, поскольку они могут быть трансдуцированы гибридными антиген-специфичными TCR при сохранении присущей им способности распознавать трансформированные клетки, и, вероятно, обладают лучшей способностью проникать и удерживаться в опухолях по сравнению с резидентными  $\gamma\delta$ -Т-клетками крови или классическими  $\alpha\beta$ -Т-клетками системного кровотока. Более того, отсутствие у указанных клеток MHC-зависимой презентации антигена снижает вероятность возникновения болезни «трансплантат против хозяина» и позволяет им нацеливаться на опухоли, экспрессирующие MHC на низком уровне. Подобным образом, независимость указанных клеток от классической костимуляции, например, посредством вовлечения CD28, повышает нацеливание на опухоли, экспрессирующие лиганды костимулирующих рецепторов на низком уровне.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, субъекту можно вводить один или более дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунотерапевтического агента, цитотоксического агента, ингибирующего рост агента, агента лучевой терапии, антиангиогенного агента или комбинации из двух или более указанных агентов. Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, до или после введения размноженных  $\gamma\delta$ -Т-клеток. Дополнительный терапевтический агент может представлять собой иммунотерапевтический агент, который может действовать в отношении мишени в теле субъекта (например, собственной иммунной системы субъекта) и/или в отношении трансплантированных  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Композиции можно вводить любым удобным способом. Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить пациенту трансартериальным, подкожным, внутрикожным, внутриопухолевым, пероральным, интранодальным, интрамедуллярным, внутримышечным путем, с помощью внутривенной инъекции или внутрибрюшинно, например, путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

Следует понимать, что все варианты реализации, описанные в настоящей заявке, могут применяться ко всем аспектам настоящего изобретения.

При использовании в настоящей заявке термин «примерно» включает значения вплоть до указанного значения, включая значения, превышающие указанное значение на 10%, а также значения вплоть до указанного значения, включая значения, составляющие на 10% меньше указанного значения, предпочтительно, значения вплоть до указанного значения, включая значения, превышающие на 5% указанное значение, и значения вплоть до указанного значения, включая значения, составляющие на 5% меньше указанного значения, в частности, указанное значение. Термин «между» включает значения в пределах указанных границ.

10

Некоторые аспекты и варианты реализации настоящего изобретения проиллюстрированы далее с помощью примеров со ссылкой на описанные выше фигуры.

## ПРИМЕРЫ

15

### ПРИМЕР 1. Аналитические методы

Если иное не указано, для получения результатов последующих примеров использовались следующие методы.

#### 20 *Проточная цитометрия*

Проточную цитометрию проводили с использованием следующих конъюгатов антитело-флуорохром: Ki-67-BV421, CD3-BV510, V $\delta$ 1-PerVio770, TIM-3-PE, CD9-PE, CCR3-BV421 и CD39-BV421. Образцы также окрашивали для оценки жизнеспособности с использованием eFluor770NIR. Коммерческие антитела были приобретены в компании Biolegend или Miltenyi. Краситель для оценки жизнеспособности (ближний ИК-спектр) был получен в компании eBioscience. Окрашивание Ki-67 проводили на фиксированных и пермеабелизированных клетках с использованием набора буферов для окрашивания Foxp3 (eBioscience). По окончании каждого эксперимента популяцию клеток промывали ФСБ и разделяли пополам. Клетки окрашивали eFluor770 NIR для определения жизнеспособности и промывали с последующим окрашиванием TrueStain (Biolegend), чтобы избежать неспецифического связывания окрашивающих антител. Половину образца окрашивали на указанные поверхностные маркеры, а другую половину окрашивали только на маркеры клеточной линии (CD3, V $\delta$ 1) с использованием эквивалентного изотипического контроля для используемых поверхностных маркеров. Подходящие мышечные антитела против изотипов, конъюгированные с одним и тем же флуорохромом, использовали в одинаковой концентрации. Изотипические контроли не связываются ни с

35

одним известным человеческим антигеном и, следовательно, показывают неспецифическое связывание или ложноположительные результаты. Гистограммы приведены относительно соответствующих изотипических контролей или как указано. Обобщенные данные показывают процентное содержание клеток, которые положительно окрашивались на указанный сравниваемый маркер, соответственно, с интенсивностью, превышающей окраску изотипа. Анализ данных проточной цитометрии выполняли в программе FLOWJO (Версия 10.1).

Изначальный и конечный фенотип каждой клеточной популяции, включая экспрессию CD27 и TIGIT, также определяли с использованием значений средней интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI).

#### *Популяционный анализ*

Резидентные лимфоциты кожи были выделены с использованием способов, описанных в настоящей заявке. Для окрашивания CD45<sup>+</sup> Т-клеток использовали антитела против CD3 и для идентификации CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-клеток использовали антитела против CD56 соответственно. При анализе популяции CD3<sup>+</sup> клеток антитела против пан- $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора использовали для идентификации резидентных  $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи, а антитела против CD8 $\alpha$  использовали для идентификации доли классических CD4- и CD8-положительных  $\alpha\beta$ -Т-клеток в популяции CD3<sup>+</sup> пан- $\gamma\delta$ -TCR-клеток.

20

#### *Определение общего числа клеток*

Общее количество клеток определяли с использованием счетчика NC-250 Nucleocounter (Chemometec, Копенгаген, Дания) в соответствии с инструкциями производителя.

25

#### **ПРИМЕР 2. Выделение лимфоцитов из образцов кожи человека**

Протокол получения трехмерного эксплантата кожи был разработан и описан в настоящей заявке. Покрытые танталом сетчатые скаффолды из стекловидного углерода (Ultramet, Калифорния, США), также называемые подложками, или их эквиваленты, имеющие размеры 20 ммх1,5 мм, автоклавировали и промывали, а затем полностью погружали в ФСБ перед использованием.

Была приготовлена полная среда для выделения, содержащая 1 л среды AIM-V (Gibco, Life Technologies), 50 мл заменителя сыворотки CTS Immune (Life Technologies), человеческий рекомбинантный IL-2 (Miltenyi Biotec, каталожный номер 130-097-746) и человеческий рекомбинантный IL-15 (Miltenyi Biotec, каталожный номер 130-095-766), также содержащая человеческий рекомбинантный IL-21 (Miltenyi Biotec, каталожный

35

номер 130-095-784) в случае измерений в присутствии 3 цитокинов (3СК) и человеческого рекомбинантный IL-4 (Miltenyi Biotec, каталожный номер 130-093-922 ) в концентрациях, описанных ниже, в случае измерений в присутствии 4 цитокинов (4СК). В течение первых 7 дней культивирования использовали полную среду для выделения, содержащую 10 мкг амфотерицина В (Amphotericin B, AMP, 250 мкг/мл, Life Technologies) Целевая конечная концентрация цитокинов в полной среде для выделения была следующей:

Таблица 1: Конечная концентрация цитокинов в полной среде для выделения

| Цитокин | Целевая конечная концентрация в 1хсреде     |
|---------|---|
| IL-2    | 20 мкг/л<br>(20 нг/мл)<br>(>100 МЕ/мл)      |
| IL-4    | 15 мкг/л<br>(15 нг/мл)<br>(>75 МЕ/мл)       |
| IL-15   | 55 мкг/л<br>(55 нг/мл)<br>(>275 МЕ/мл)      |
| IL-21   | 6,25 мкг/л<br>(6,25 нг/мл)<br>(0,125 МЕ/мл) |

10

Образцы кожи взрослого человека получали, транспортировали и обрабатывали в пределах 48 часов после их сбора. Лишнюю подкожную жировую клетчатку и волосы удаляли из образцов с помощью скальпеля и щипцов. Образцы кожи размещали эпидермальным слоем вверх и для разрезания кожи проводили пункционную биопсию с подходящим размером биоптата, удерживая кожу вокруг указанного биоптата стерильными щипцами.

15

Три биоптата размещали с равными интервалами эпидермальным слоем вверх и прикрепляли к поверхности одной углеродной подложки, покрытой танталом. С помощью стерильных пинцетов подложку переносили в емкость для тканевых культур с газопроницаемой мембраной, например, в лунку 6-луночного планшета G-REX (Wilson Wolf Manufacturing), содержащего 30 мл полной среды для выделения (с добавлением амфотерицина, AMP), или в биореактор G-REX100 (Wilson Wolf Manufacturing), содержащий 300 мл полной среды для выделения (с добавлением AMP). По одной подложке помещали в каждую лунку 6-луночного планшета G-REX, по три подложки помещали в

20



биореактор G-REX10 или по десять подложек – в биореактор G-REX100. Альтернативно, биоптаты можно культивировать в стандартных 24-луночных планшетах. Культуры инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5%-ым содержанием CO<sub>2</sub>.

5 Если иное не указано, среду меняли каждые 7 дней, осторожно отбирая верхний слой среды и замещая ее на двукратную полную среду для выделения (без AMP), стараясь не повредить клетки на дне планшета или биореактора.

10 Для выделения лимфоцитов подложки с кожей удаляли из 6-луночного планшета G-REX или биореактора G-REX10 или G-REX100 и выбрасывали для утилизации. Клетки, находящиеся на дне планшета или биореактора, ресуспендировали, перенесли в центрифужные пробирки на 500 мл и затем центрифугировали (например, при скорости 300 g в течение 10 минут).

Когда требовался подсчет клеток, количество лимфоцитов определяли на этой стадии, как описано в Примере 1. Результаты типичного исследования показаны в Таблице 2:

15

Таблица 2. Выход выделенных лимфоцитов на донора.

|   | Среднее значение (5 доноров) |          |
|---|------------------------------|----------|
|   | 2СК                          | 4СК      |
| Общее количество лимфоцитов (на подложку)               | 3,50E+07                     | 3,75E+07 |
| Общее количество $\gamma\delta$ -Т-клеток (на подложку) | 3,53E+06                     | 8,30E+06 |
| Общее количество V $\delta$ 1-Т-клеток (на подложку)    | 2,58E+06                     | 5,88E+06 |

### ПРИМЕР 3. Использование дополнительных цитокинов на этапе выделения

20 Проводили оценку использования дополнительных цитокинов во время этапа выделения. Оценивали способы выделения, включающие 3 цитокина (т.е. IL-2, IL-15 и IL-21) и 4 цитокина (т.е. IL-2, IL-15, IL-21 и IL-4) и сравнивали непосредственно со способом выделения, включающим 2 цитокина (т.е. IL-2 и IL-15). Образцы кожи готовили, как описано в Примере 2.

25 Общий выход клеток и долю  $\gamma\delta$ -Т-клеток и V $\delta$ 1-Т-клеток определяли, как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 1. Было показано, что использование 4 цитокинов при выделении приводит к улучшению выхода клеток и повышению количества выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток и V $\delta$ 1-клеток. Результаты, представленные на Фиг. 2, также

показали, что для повышения выхода клеток и количества выделенных  $\gamma\delta$ -Тклеток и V $\delta$ 1-клеток также можно использовать 3 цитокина.

Фенотип выделенных V $\delta$ 1-клеток анализировали путем измерения экспрессии TIGIT и CD27 с использованием способов, описанных в Примере 1. V $\delta$ 1-клетки с низким уровнем экспрессии TIGIT и высоким уровнем экспрессии CD27 рассматривались как клетки, обладающие желаемым фенотипом. Результаты показаны на Фиг. 3 и 4. В целом, наблюдался более низкий уровень экспрессии TIGIT и более высокий уровень экспрессии CD27 в клетках, выделенных с использованием 4 цитокинов и 3 цитокинов по сравнению с клетками, выделенными с использованием 2 цитокинов.

10

#### **ПРИМЕР 4 Оптимизация размера пункционного биоптата**

Первоначальное тестирование показало, что пункционная биопсия с диаметром биоптата 3 мм превосходит стандартные методы измельчения кожи (Фиг.5).

Оптимальный размер пункционного биоптата дополнительно анализировали путем тестирования пункционных биоптатов размером 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм и 8 мм с использованием измельченного скальпелем эксплантата размером 2 мм в качестве контроля. Образцы кожи были приготовлены, как описано в Примере 2. Биоптат каждого размера анализировали путем прикрепления одного биоптата эпидермальным слоем вверх к поверхности углеродной подложки и помещения в лунку 24-луночного планшета (Corning). Каждая лунка содержала среду AIM-V с 10% АВ-сыворотки человека с добавлением IL-2 и IL-15 в концентрациях, указанных выше, и стандартной концентрации  $\beta$ -меркаптоэтанола (2ME) и раствора пенициллин/стрептомицин (P/S).

Биоптаты инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> в течение 21 дня до сбора клеток и анализа выхода клеток, при этом смену среды проводили три раза в неделю (замещение среды наполовину).

Общий выход клеток определяли, как описано в Примере 1. Результаты показаны в Таблице 2. Результаты показали, что биоптаты диаметром 2-4 мм обеспечивают самый высокий выход клеток.

30 Таблица 3: Общий выход клеток, полученный при использовании биоптатов разного типа.

| Размер эксплантата                               | Количество на ткань | Средний выход на биоптат | Потенциальный выход клеток на 2x5 см ткани |
|--|---------------------|--------------------------|--|
| измельченный скальпелем эксплантат размером 2 мм | 250                 | 3,5E+05                  | 2,9E+07                                    |
| пункционный биоптат диаметром 1 мм               | 950                 | 8,4E+05                  | 7,9E+08                                    |

|                                    |     |         |         |
|------------------------------------|-----|---------|---------|
| пункционный биоптат диаметром 2 мм | 240 | 1,2E+06 | 2,9E+08 |
| пункционный биоптат диаметром 3 мм | 96  | 8,9E+05 | 8,6E+07 |
| пункционный биоптат диаметром 4 мм | 60  | 4,3E+05 | 2,6E+07 |
| пункционный биоптат диаметром 8 мм | 12  | 3,0E+04 | 3,5E+05 |

Долю  $\gamma\delta$ -Т-клеток, присутствующих в полученной популяции клеток, определяли, как описано в Примере 1. Результаты представлены на Фиг. 6. Результаты показали, что биоптаты диаметром 3 мм обеспечивают максимальный выход  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

5

#### ПРИМЕР 5. Оптимизация емкости для выделения

Выделение в 24-луночных планшетах сравнивали с применением емкостей, содержащих газопроницаемый материал, таких как 6-луночный планшет G-REX (Wilson Wolf Manufacturing). Образцы кожи были приготовлены, как описано в Примере 2. Биоптаты прикрепляли к поверхности углеродной подложки эпидермальным слоем вверх и затем помещали в лунку 24-луночного планшета или 6-луночного планшета G-REX. Подложки диаметром 9 мм использовали для 24-луночного планшета и подложки диаметром 20 мм использовали для 6-лучного планшета G-REX. Все образцы помещали в среду AIM-V, содержащую 10% АВ-сыворотки, с добавлением P/S, 2-меркаптоэтанола, IL-2 и IL-15. В случае 24-луночных планшетов среду меняли три раза в неделю. В случае 6-лучных планшетов G-REX требовалось только 1 смена среды в неделю. Биоптаты инкубировали при 37 °C в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> в течение 21 дня до анализа выхода клеток.

Общий выход клеток на планшет и на биоптат определяли, как описано в Примере 1. Эксперименты показали, что 6-луночный планшет G-REX обеспечивал повышенный выход клеток на биоптат и на планшет по сравнению с 24-луночными планшетами (Фиг. 7 и Таблица 4). 6-луночный планшет G-REX позволял культивировать большее количество ткани (в 2,5 раза превышающее количество ткани для 24-луночного планшета), однако его использование приводило к поразительному 25-кратному увеличению количества клеток.

25

**Таблица 4. Общий выход клеток, полученных на 24-луночном планшете, по сравнению с 6-луночным планшетом G-REX**

| Емкость | Количество биоптатов /фрагментов на подложку | Количество биоптатов на ткань | Количество подложек на ткань | Средний выход клеток на подложку | Потенциальный выход клеток |
|---------|--|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
|---------|--|-------------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------|

|                          |     |     |       |         |           |
|--------------------------|-----|-----|-------|---------|-----------|
| 24-луночный планшет      | 3-4 | 250 | 62-83 | 350,000 | 8,75.E+07 |
| 6-луночный планшет G-REX | 3   | 96  | 33    | 3.E+07  | 9.E+08    |

Оценивали применение биореактора G-REX в протоколах выделения, включающих 2 цитокина, 3 цитокина и 4 цитокина. Фенотип V $\delta$ 1-клеток анализировали путем измерения экспрессии TIGIT и CD27 с использованием способов, описанных в Примере 1. Экспрессию PD-1 измеряли на выделенных  $\alpha\beta$ -Т-клетках (CD3+, пан- $\gamma\delta$ -Т-клетки). Результаты показаны на Фиг. 8 и 9. Результаты подтверждают, что в V $\delta$ 1-клетках, выделенных в присутствии 4 цитокинов с использованием биореактора G-REX, наблюдался более низкий уровень экспрессии TIGIT и более высокий уровень экспрессии CD27 по сравнению с V $\delta$ 1-клетками, выделенными в присутствии 2 цитокинов с использованием биореактора G-REX, тогда как в  $\alpha\beta$ -Т-клетках, выделенных в присутствии 4 цитокинов, наблюдался более низкий уровень экспрессии PD-1 по сравнению с  $\alpha\beta$ -Т-клетками, выделенными в присутствии 2 цитокинов.

#### ПРИМЕР 6. Оптимизация протокола выделения

Применение пункционных биоптатов диаметром 3 мм дополнительно тестировали для оптимизации протокола выделения. Готовили и получали образцы кожи с помощью пункционной биопсии с диаметром биоптата 3 мм, как описано в Примере 2.

Проводили сравнение между разными средами. Биоптаты помещали на подложку и культивировали в 24-луночных планшетах в любой из следующих сред:

- среде AIM-V, содержащей 5% человеческой АВ-сыворотки и IL-2/IL-15 (2СК) или IL-2/IL-15/IL-21/IL-4 (4СК), или
- среде SKIN-T, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) и IL-2/IL-15 (2СК) или IL-2/IL-15/IL-21/IL-4 (4СК).

Биоптаты инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5%-ым содержанием CO<sub>2</sub> в течение 14 дней (в случае AIM-V) или 21 дня (в случае SKIN-T) до анализа выход клеток. Общий выход клеток на подложку определяли, как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 10. Выделение в среде AIM-V приводило к лучшему выходу клеток и более высокому общему количеству V $\delta$ 1-клеток, даже за более короткий период времени.

Также оценивали продолжительность выделения клеток. Биоптаты диаметром 3 мм наносили на подложку и помещали в 6-луночный планшет G-REX или G-REX10-

биореактор, как описано в Примере 2. Биоптаты культивировали в среде AIM-V (содержащей 5% заменителя сыворотки (SR), 5% человеческой АВ-сыворотки или смесь 5% SR/5% АВ) с добавлением 2-меркаптоэтанола, P/S и IL2/15 и инкубировали при 37 °С в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO<sub>2</sub> в течение 14 или 21 дня до анализа выхода

5 клеток. Общий выход клеток на подложку определяли, как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 11. Выделение через 3 недели приводило к улучшению выхода клеток по сравнению с выделением через 2 недели для всех используемых типов сред.

Также оценивали применение заменителя сыворотки по сравнению с АВ-сывороткой человека (5% или 10%). Биоптаты инкубировали при 37 °С в инкубаторе с содержанием 5% CO<sub>2</sub> в течение 21 дня до анализа клеток. Общий выход клеток на подложку и процентное содержание Vδ1-клеток измеряли, как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 12. Повышенный выход клеток и более высокая доля Vδ1-клеток наблюдалась при использовании среды с добавлением 5% заменителя сыворотки по сравнению с человеческой АВ-сывороткой.

15

#### **ПРИМЕР 7. Размножение клеток**

После выделения клеток с помощью описанных выше протоколов их можно размножать с использованием методов, известных в данной области техники. Например, селективное размножение γδ-T-клеток может обеспечиваться с использованием метода размножения, описанного в международной публикации WO 2017072367.

20

Также оценивали размножение γδ-T-клеток с использованием дополнительных цитокинов. Лимфоциты ткани кожи, выделенные с использованием 2 цитокинов (2СК) или 4 цитокинов (4СК), как описано в Примере 2, собирали через 21 день культивирования. Собранные клетки культивировали в среде TechMACs (Miltenyi Biotech), содержащей 5% заменителя сыворотки и человеческий рекомбинантный IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21. Клеточный тип анализировали с использованием FACS и как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 13. Применение 4 цитокинов во время этапа выделения приводило к получению большей популяции γδ-T-клеток после этапа размножения по сравнению с использованием 2 цитокинов в процессе выделения.

25

30

Фенотип Vδ1-клеток анализировали путем измерения экспрессии различных маркеров с использованием способов, описанных в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 14. Применение 4 цитокинов во время этапа выделения и затем во время этапа размножения приводило к получению клеток с более высоким уровнем экспрессии CD27 по сравнению с клетками, выделенными с помощью 2 цитокинов.

35

Общее количество γδ-клеток и Vδ1-клеток на подложку измеряли, как описано в Примере 1. Результаты показаны на Фиг. 15. Было показано, что использование 4 цитокинов во время выделения повышает общий выход Vδ1-клеток после размножения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:
  - (i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:
    - (a) интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-9 (IL-9),
    - (b) интерлейкина-15 (IL-15) и
    - (c) интерлейкина-21 (IL-21) и
  - (ii) сбор популяции лимфоцитов, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.
  
2. Способ выделения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:
  - (i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии:
    - (a) IL-2 или IL-9,
    - (b) IL-15 и
    - (c) IL-21 и
  - (ii) сбор популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток, культивированных из указанного образца негемопозитической ткани.
  
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что этап (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерлейкина-4 (IL-4).
  
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что популяция лимфоцитов, собранная из культуры образца негемопозитической ткани, представляет собой популяцию  $\alpha\beta$ -Т-клеток.
  
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что популяция лимфоцитов, собранная из культуры образца негемопозитической ткани, представляет собой популяцию NK-клеток.
  
6. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что лимфоциты или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через по меньшей мере 7 дней культивирования.
  
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что лимфоциты или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через по меньшей мере 14 дней культивирования.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что лимфоциты или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают за 35 дней до культивирования.
9. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что лимфоциты или  $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают за 21 день до культивирования.
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани культивируют в бессывороточной среде.
11. Способ по любому из пп. 1 - 9, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей сыворотку или заменитель сыворотки.
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани представляет собой интактный биоптат.
13. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани не измельчают до этапа (i).
14. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что минимальное поперечное сечение образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере 1 мм.
15. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что минимальное поперечное сечение образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере 2 мм.
16. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что минимальное поперечное сечение образца негемопозитической ткани составляет примерно 3 мм.
17. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что максимальное поперечное сечение образца негемопозитической ткани составляет не более 8 мм.
18. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что максимальное поперечное сечение образца негемопозитической ткани составляет не более 4 мм.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что минимальная площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере  $1 \text{ мм}^2$ .
20. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что минимальная площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет по меньшей мере  $4 \text{ мм}^2$ .
21. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет примерно  $7 \text{ мм}^2$ .
22. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что максимальная площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет не более  $64 \text{ мм}^2$ .
23. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что максимальная площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет не более  $50 \text{ мм}^2$ .
24. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что максимальная площадь поперечного сечения образца негемопозитической ткани составляет не более  $16 \text{ мм}^2$ .
25. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат, диаметр которого составляет по меньшей мере  $1 \text{ мм}$ .
26. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат, диаметр которого составляет по меньшей мере  $2 \text{ мм}$ .
27. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат, диаметр которого составляет примерно  $3 \text{ мм}$ .



28. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат, диаметр которого составляет не более 8 мм.
29. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит пункционный биоптат, диаметр которого составляет не более 4 мм.
30. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани представляет собой ткань кожи.
31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани содержит эпидермальный и дермальный слой.
32. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани представляет собой ткань кишечника или желудочно-кишечного тракта.
33. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанный способ осуществляют в емкости, содержащей газопроницаемый материал.
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что емкость содержит запечатанный от протекания контейнер, содержащий газопроницаемый материал для возможности газообмена.
35. Способ по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что дно указанной емкости сконструировано с возможностью газообмена в области указанного дна емкости.
36. Способ по любому из пп. 33 - 35, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани помещен на синтетический скаффолд внутри емкости.
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что синтетический скаффолд покрыт танталом.
38. Способ по п. 36 или 37, отличающийся тем, что синтетический скаффолд сконструирован с возможностью облегчения выхода лимфоцитов из образца негемопозитической ткани на дно емкости.

39. Способ по п. 36 или 37, отличающийся тем, что синтетический скаффолд сконструирован с возможностью облегчения выхода  $\gamma\delta$ -Т-клеток из негемопозитической ткани на дно емкости.
40. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что образец негемопозитической ткани получен из ткани человека.
41. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что IL-2 представляет собой IL-2 человека или его функциональный эквивалент.
42. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что IL-9 представляет собой IL-9 человека или его функциональный эквивалент.
43. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что IL15 представляет собой IL-15 человека или его функциональный эквивалент.
44. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что IL-21 представляет собой IL-21 человека или его функциональный эквивалент.
45. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что IL-4 представляет собой IL-4 человека или его функциональный эквивалент.
46. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что выделенная популяция клеток содержит популяцию  $V\delta 1$ -Т-клеток.
47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что популяция  $V\delta 1$ -Т-клеток экспрессирует CD27 и/или по существу не экспрессирует TIGIT.
48. Способ по п. 46 или п. 47, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции  $V\delta 1$ -Т-клеток составляет менее 80%.
49. Способ по любому из пп. 46 - 48, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции  $V\delta 1$ -Т-клеток составляет менее 60%.
50. Способ по любому из пп. 46 - 49, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции  $V\delta 1$ -Т-клеток составляет примерно 40%.

51. Способ по любому из пп. 46 - 50, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет примерно 30%.
52. Способ по любому из пп. 46 - 51, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет примерно 20%.
53. Способ по любому из пп. 46 - 52, отличающийся тем, что встречаемость TIGIT<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет примерно 10%.
54. Способ по любому из пп. 46 - 53, отличающийся тем, что популяция V $\delta$ 1-T-клеток по существу не экспрессирует TIGIT.
55. Способ по любому из пп. 46 - 54, отличающийся тем, что встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет более 10%.
56. Способ по любому из пп. 46 - 55, отличающийся тем, что встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет более 20%.
57. Способ по любому из пп. 46 - 56, отличающийся тем, что встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет примерно 40%.
58. Способ по любому из пп. 46 - 57, отличающийся тем, что встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет примерно 80%.
59. Способ по любому из пп. 46 - 58, отличающийся тем, что встречаемость CD27<sup>+</sup> клеток в популяции V $\delta$ 1-T-клеток составляет более 80%.
60. Способ по любому из пп. 46 - 59, отличающийся тем, что популяция V $\delta$ 1-T-клеток экспрессирует CD27.
61. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий размножение выделенной популяции лимфоцитов или  $\gamma\delta$ -T-клеток.
62. Способ выделения и размножения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

(i) выделение популяции лимфоцитов из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом по любому из предшествующих пунктов и

(ii) дополнительное культивирование указанной популяции лимфоцитов в течение по меньшей мере 5 дней для получения размноженной популяции лимфоцитов.

63. Способ выделения и размножения  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие этапы:

(i) выделение популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии со способом по любому из предшествующих пунктов и

(ii) дополнительное культивирование указанной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней для получения размноженной популяции  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

64. Способ по п. 62 или п. 63, отличающийся тем, что этап размножения включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии:

(a) IL-2 или IL-9,

(b) IL-15 и

(c) IL-21

в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения размноженной популяции указанных  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

65. Способ по п. 64, дополнительно включающий культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-4.

66. Способ по любому из пп. 61 - 65, отличающийся тем, что этап размножения включает культивирование лимфоцитов или  $\gamma\delta$ -Т-клеток в бессывороточной среде.

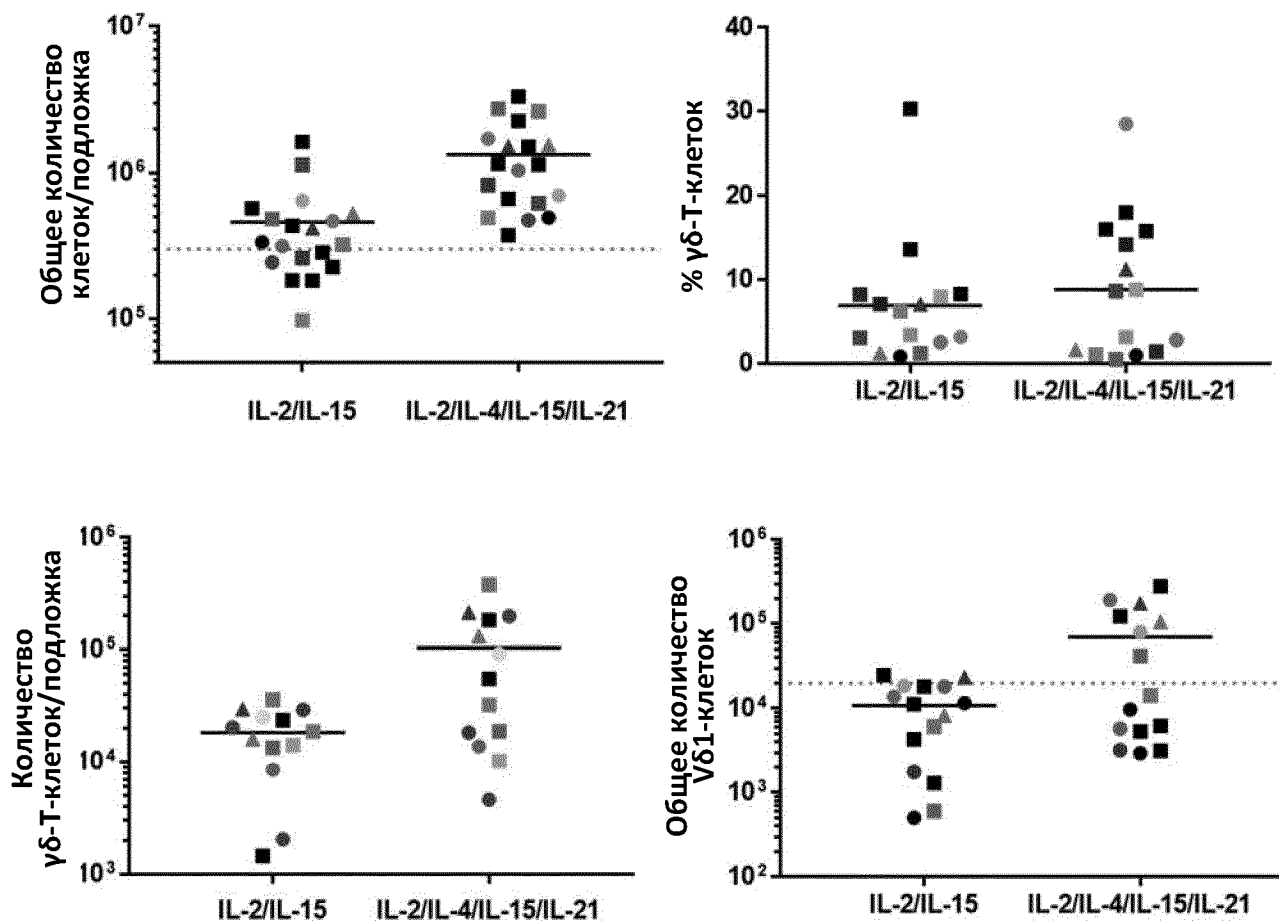
67. Способ по любому из пп. 61 - 65, отличающийся тем, что этап размножения включает культивирование лимфоцитов или  $\gamma\delta$ -Т-клеток в среде, содержащей сыворотку или заменитель сыворотки.

68. Способ по любому из пп. 63 - 67, отличающийся тем, что этап размножения включает культивирование  $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками.

69. Способ по любому из пп. 63 - 68, отличающийся тем, что этап размножения включает отсутствие экзогенных агонистов TCR-пути.

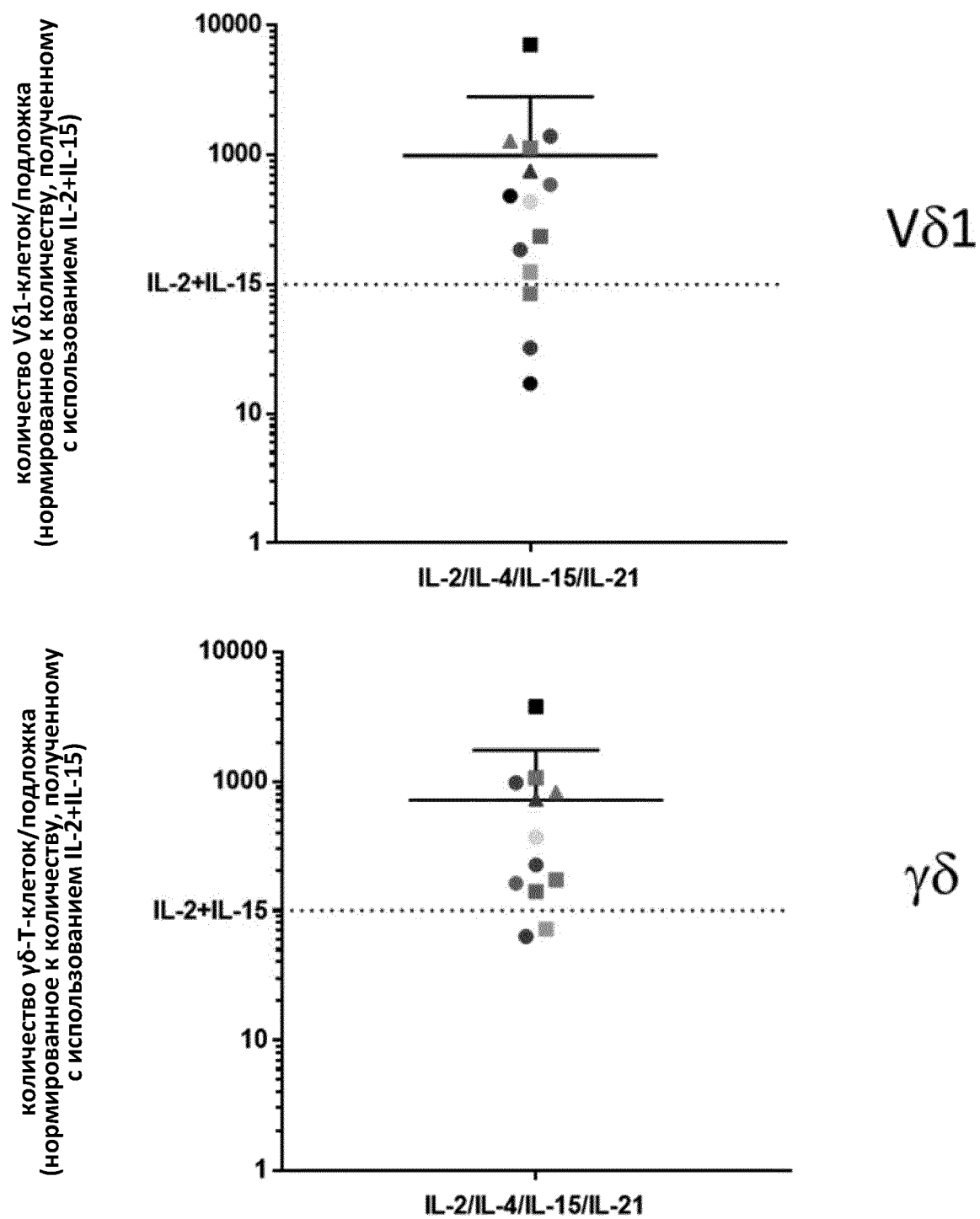
70. Выделенная популяция лимфоцитов, полученная с помощью способа по любому из пп. 1 - 60.
71. Выделенная популяция лимфоцитов, которую можно получать с помощью способа по любому из пп. 1 - 60.
72. Выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 1 - 60.
73. Выделенная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которую можно получать с помощью способа по любому из пп. 1 - 60.
74. Выделенная и размноженная популяция лимфоцитов, полученная с помощью способа по любому из пп. 61 - 67.
75. Выделенная и размноженная популяция лимфоцитов, которую можно получать с помощью способа по любому из пп. 61 - 67.
76. Выделенная и размноженная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 61 - 69.
77. Выделенная и размноженная популяция  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которую можно получать с помощью способа по любому из пп. 61 - 69.

A



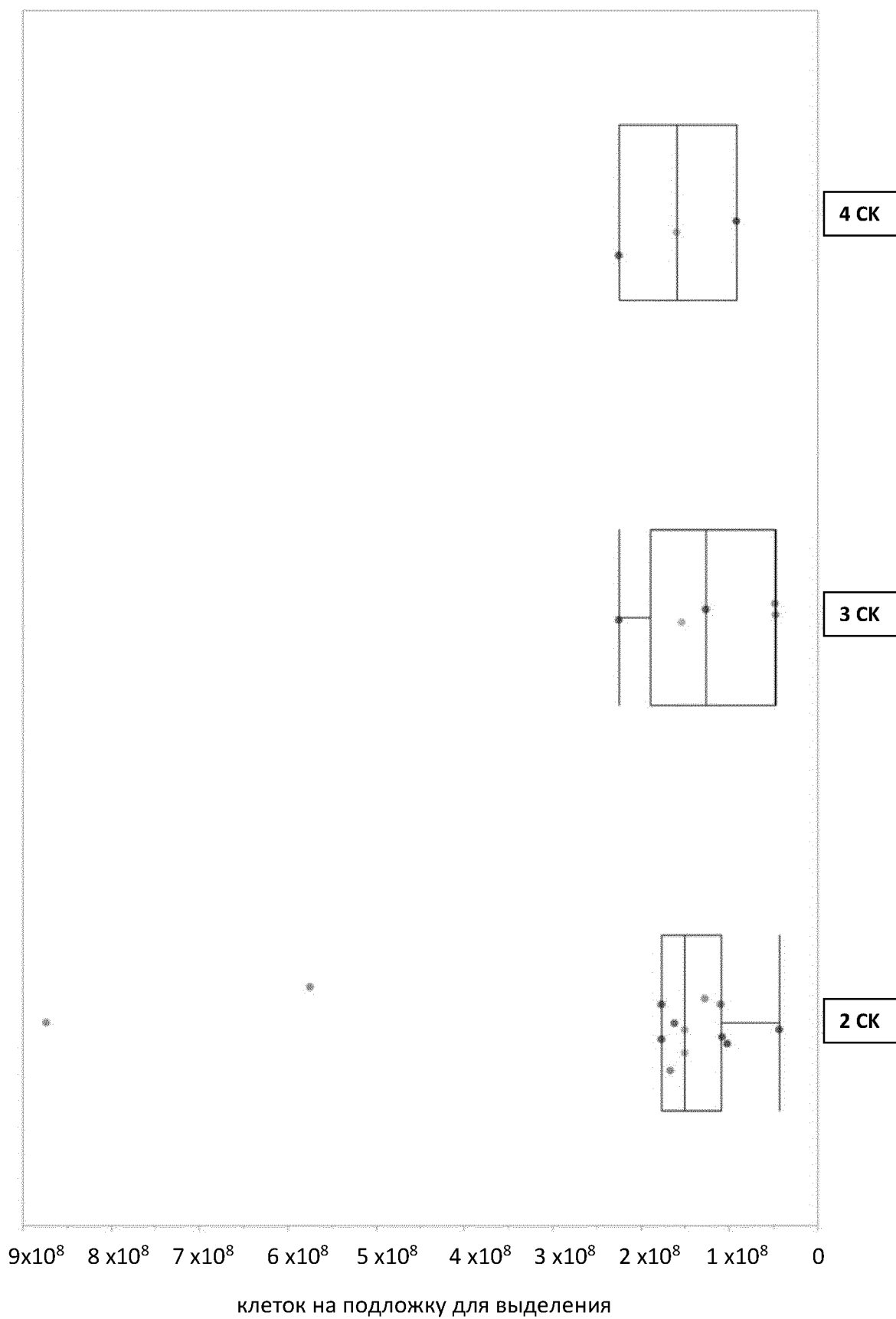
ФИГУРА 1

B



ФИГУРА 1 (продолжение)

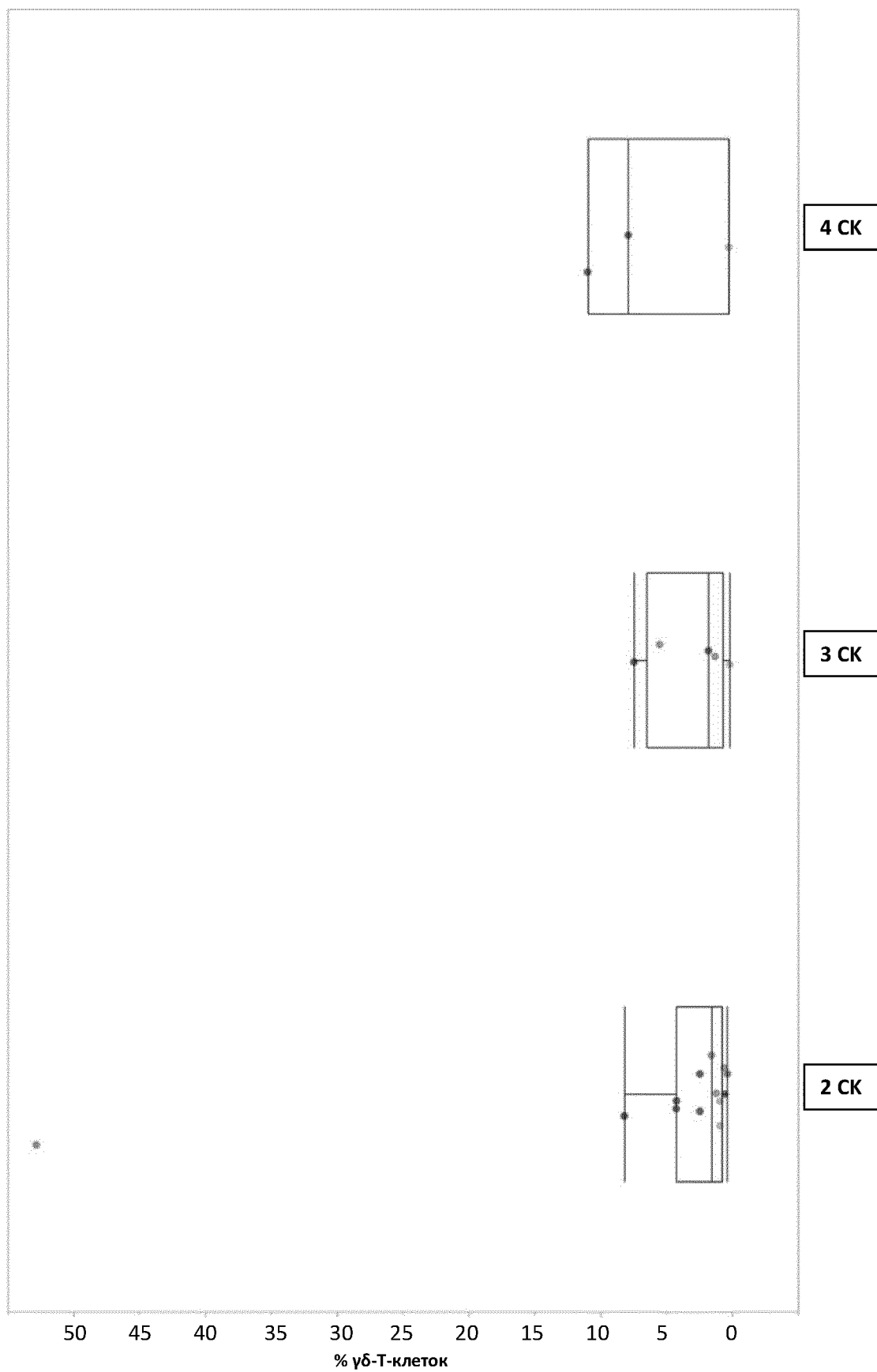
A



ФИГУРА 2

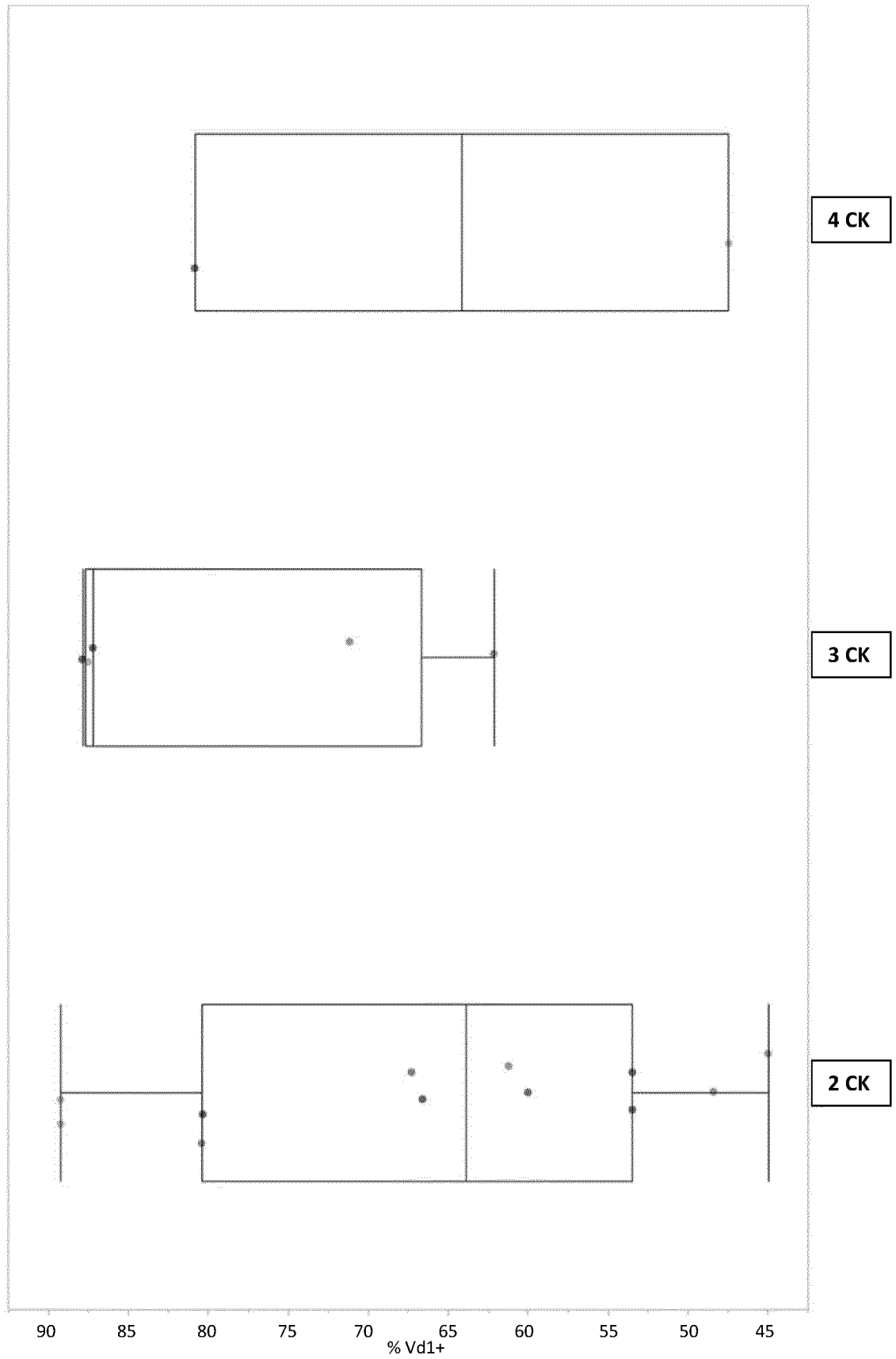


B

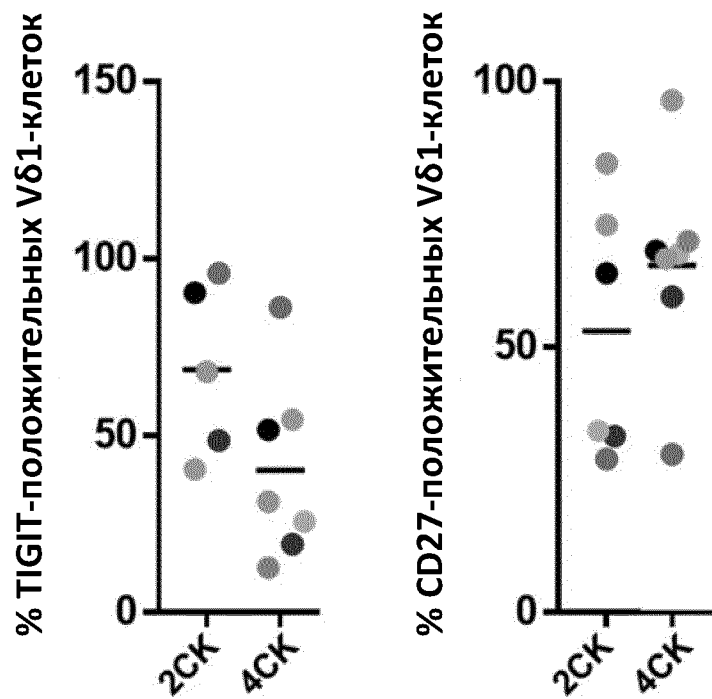


ФИГУРА 2 (продолжение)

C

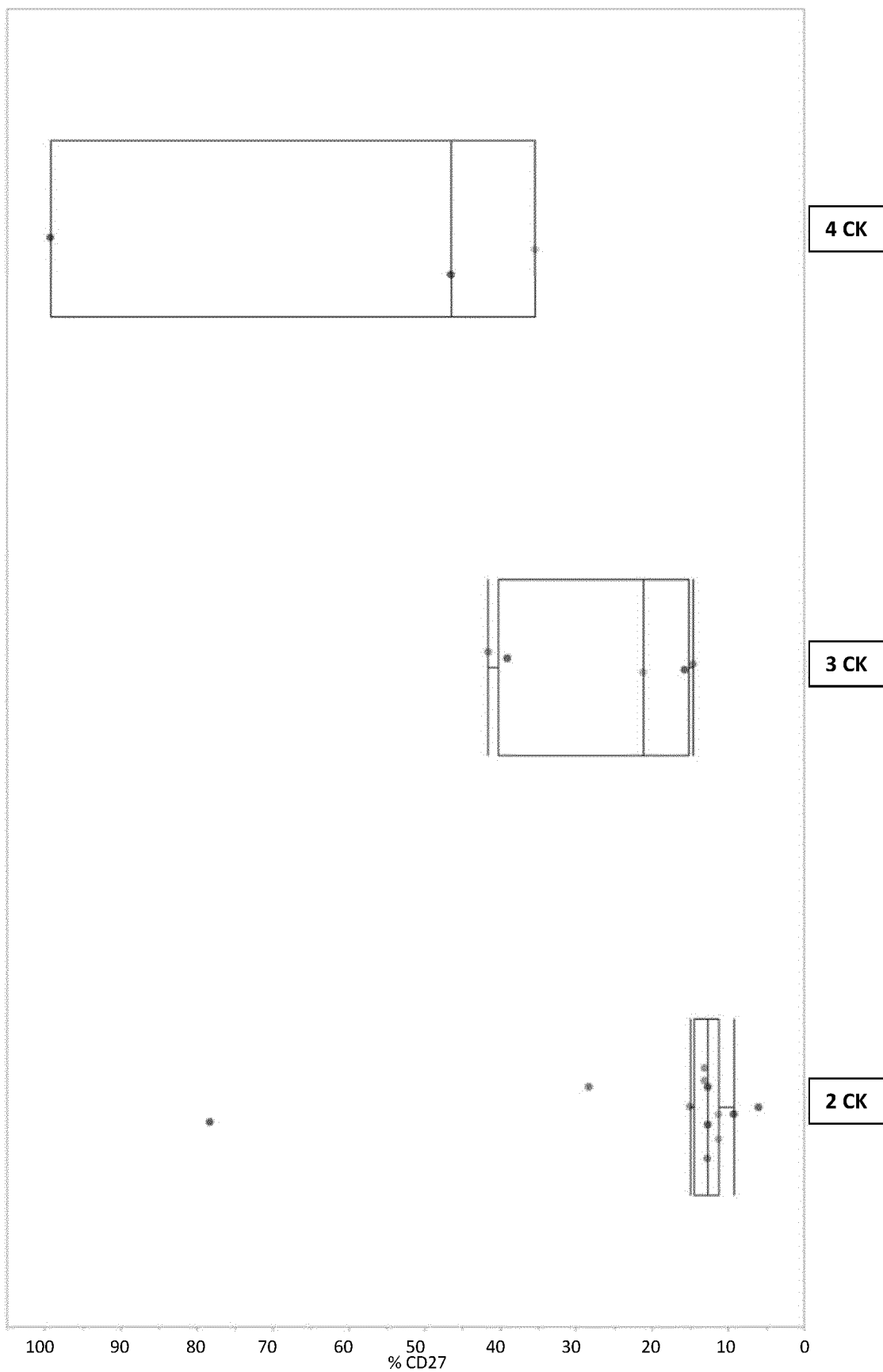


ФИГУРА 2 (продолжение)



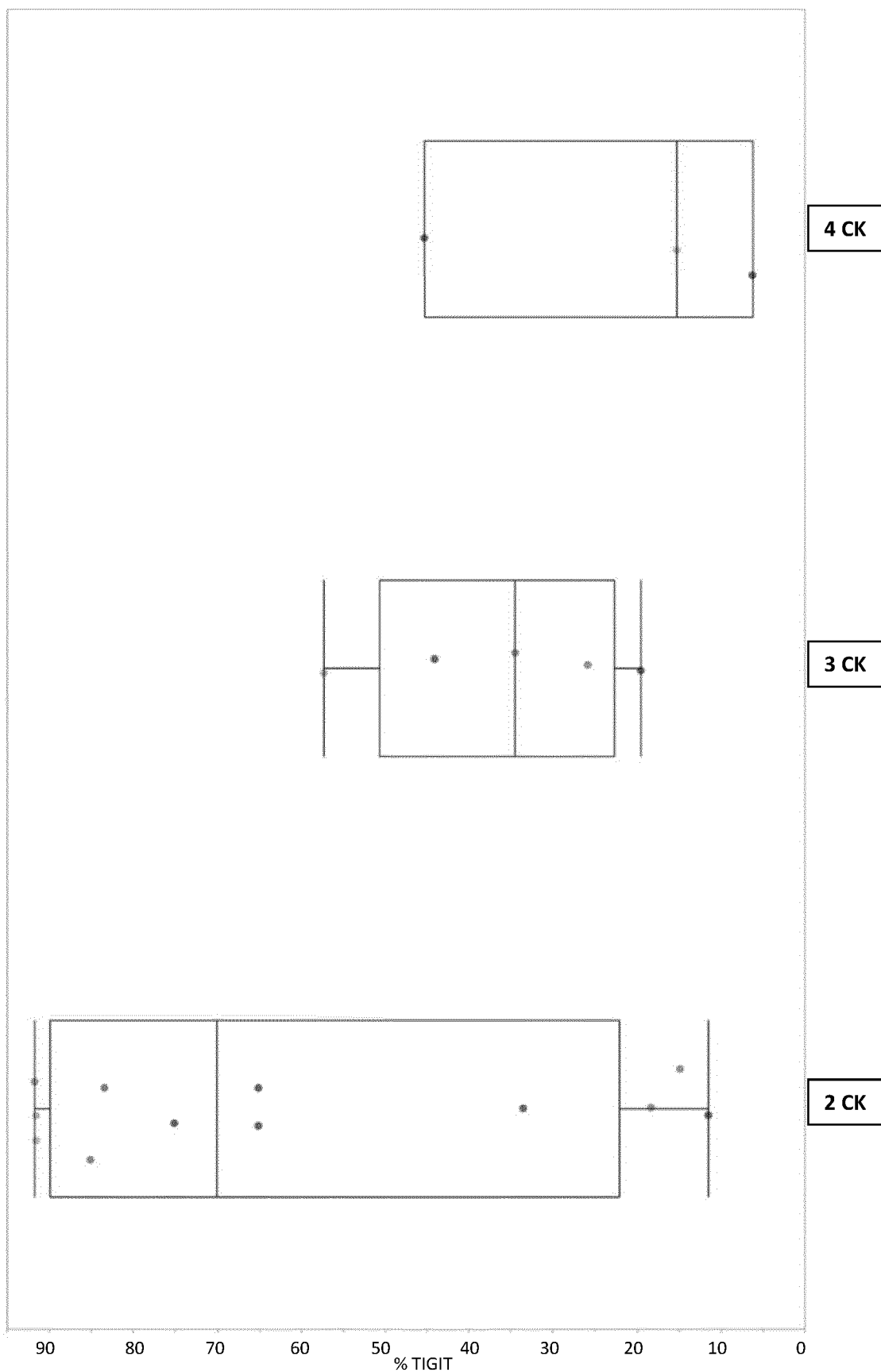
ФИГУРА 3

A

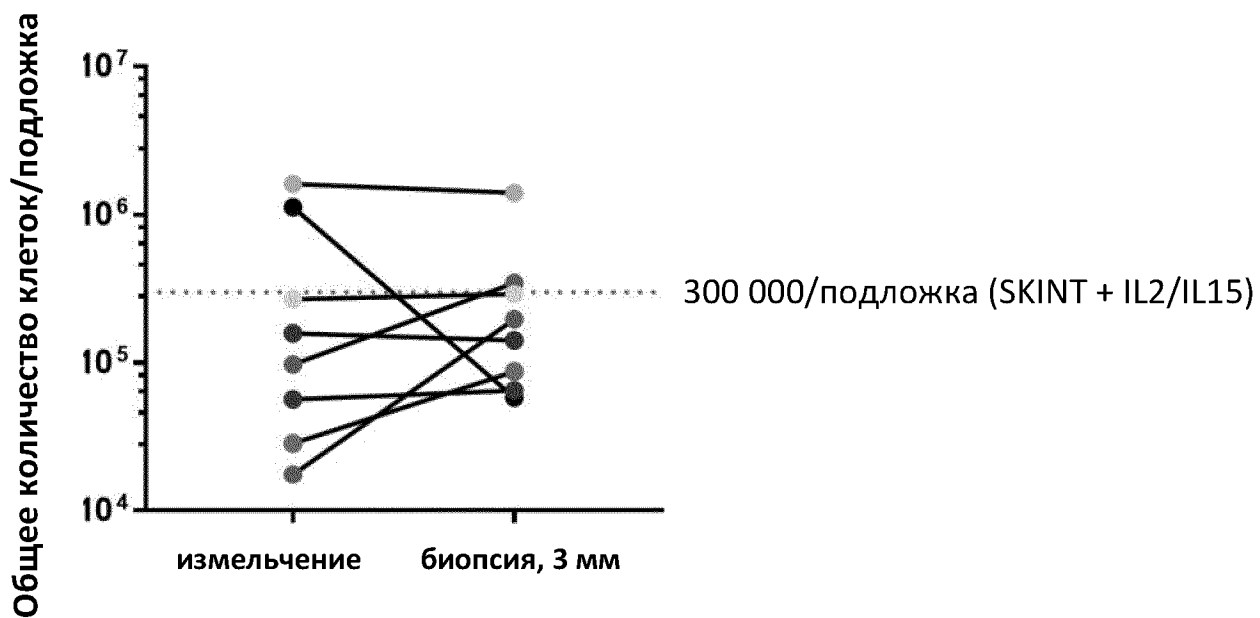


ФИГУРА 4

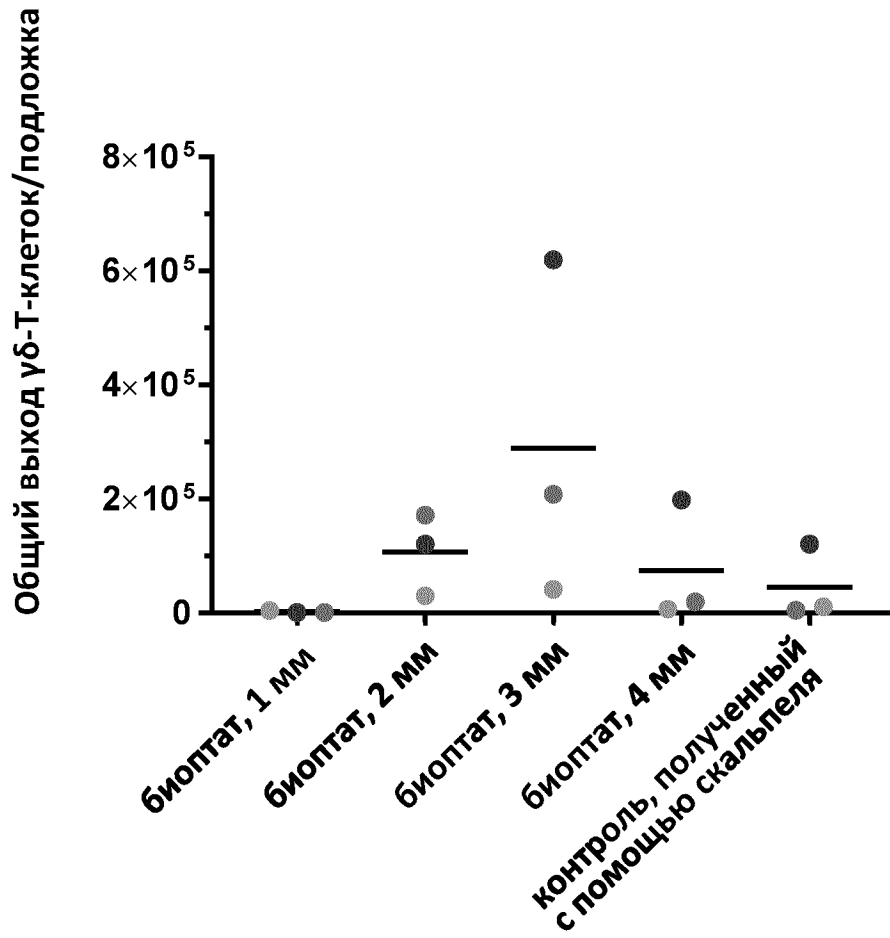
B



ФИГУРА 4 (продолжение)

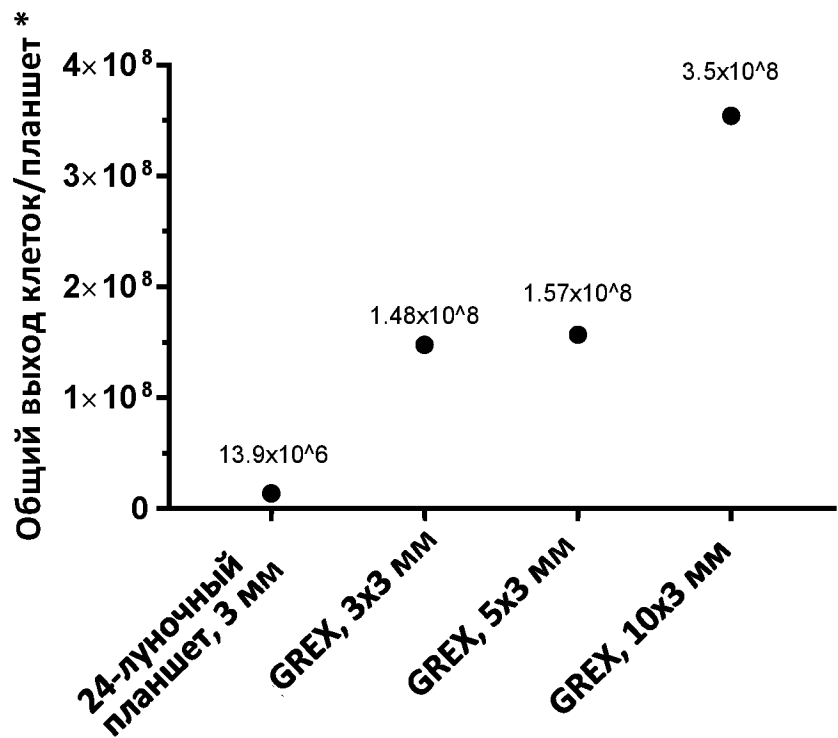
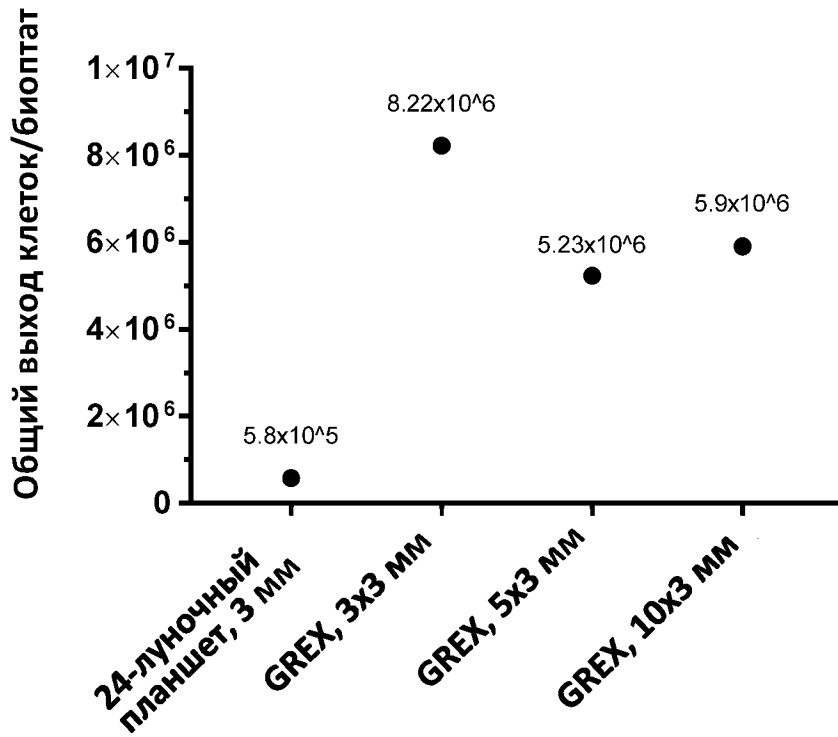


ФИГУРА 5



ФИГУРА 6

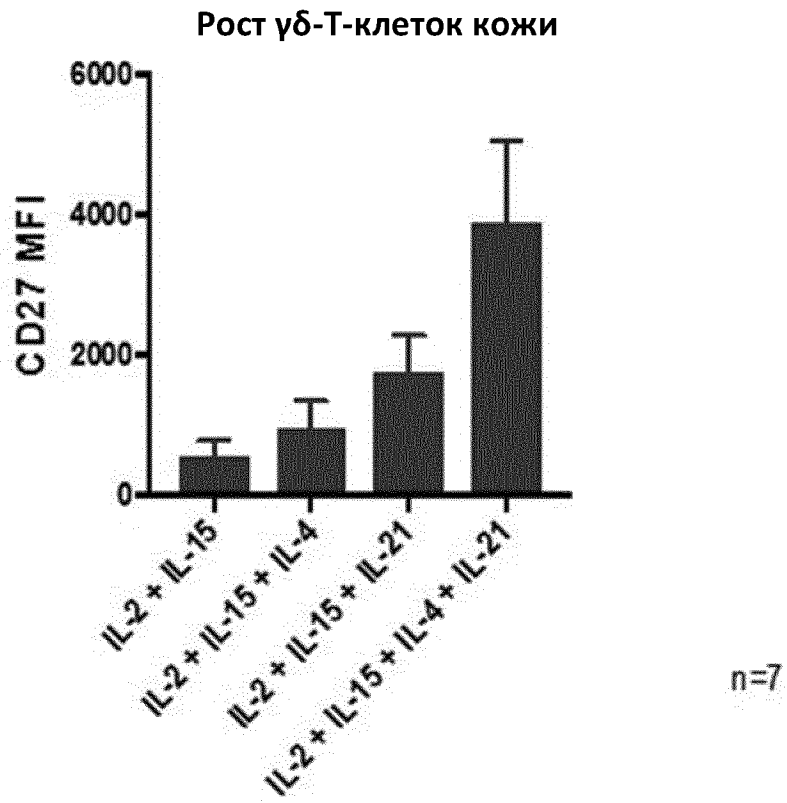
11/22



\*при условии использования всех лунок планшета

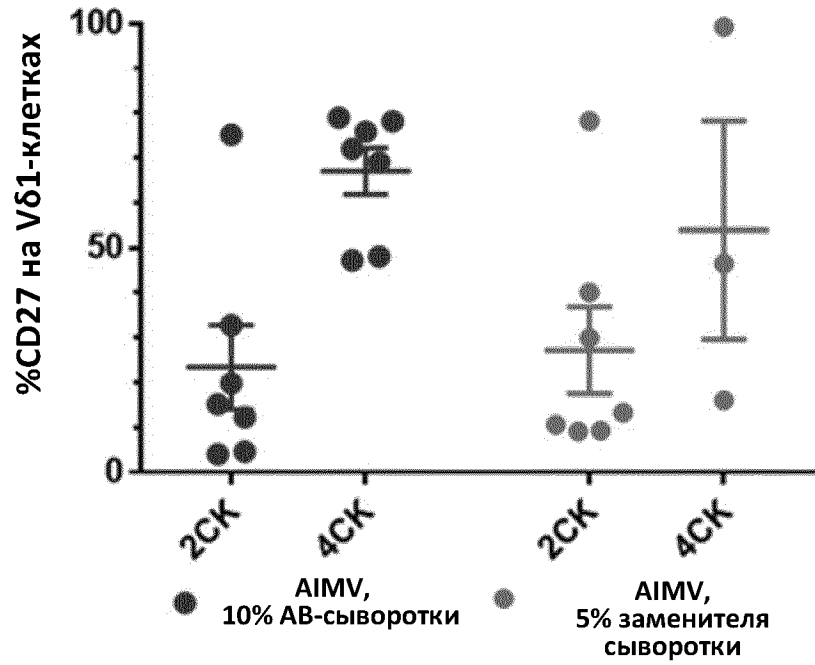
ФИГУРА 7



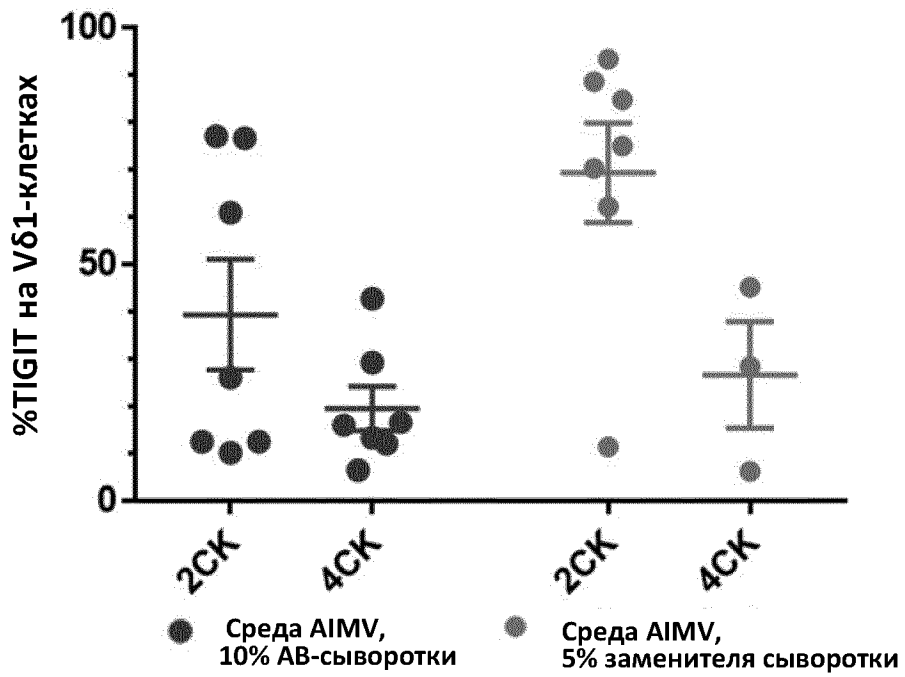


ФИГУРА 8

A

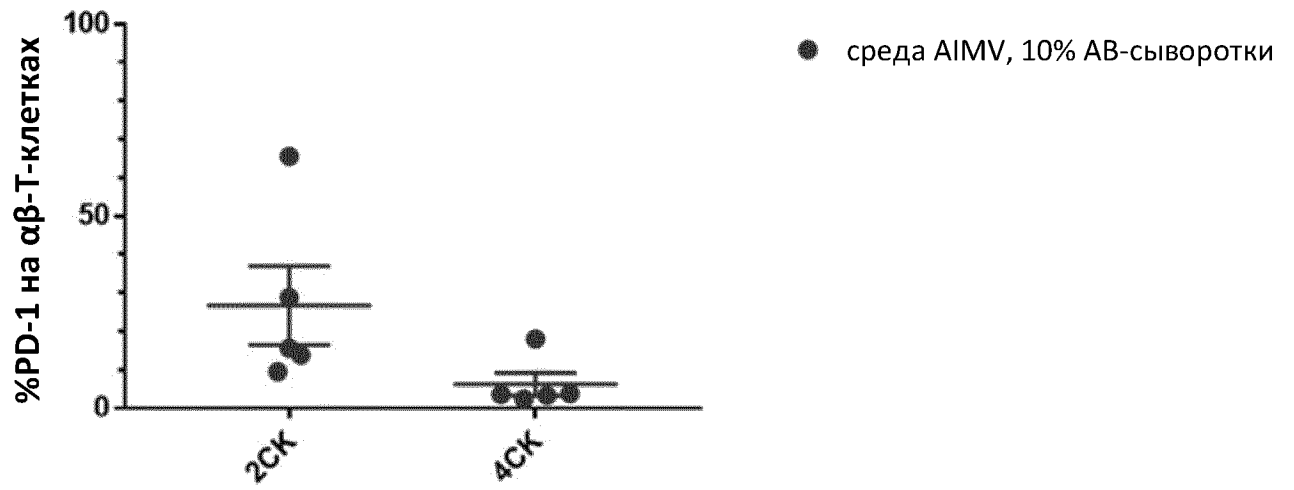


B

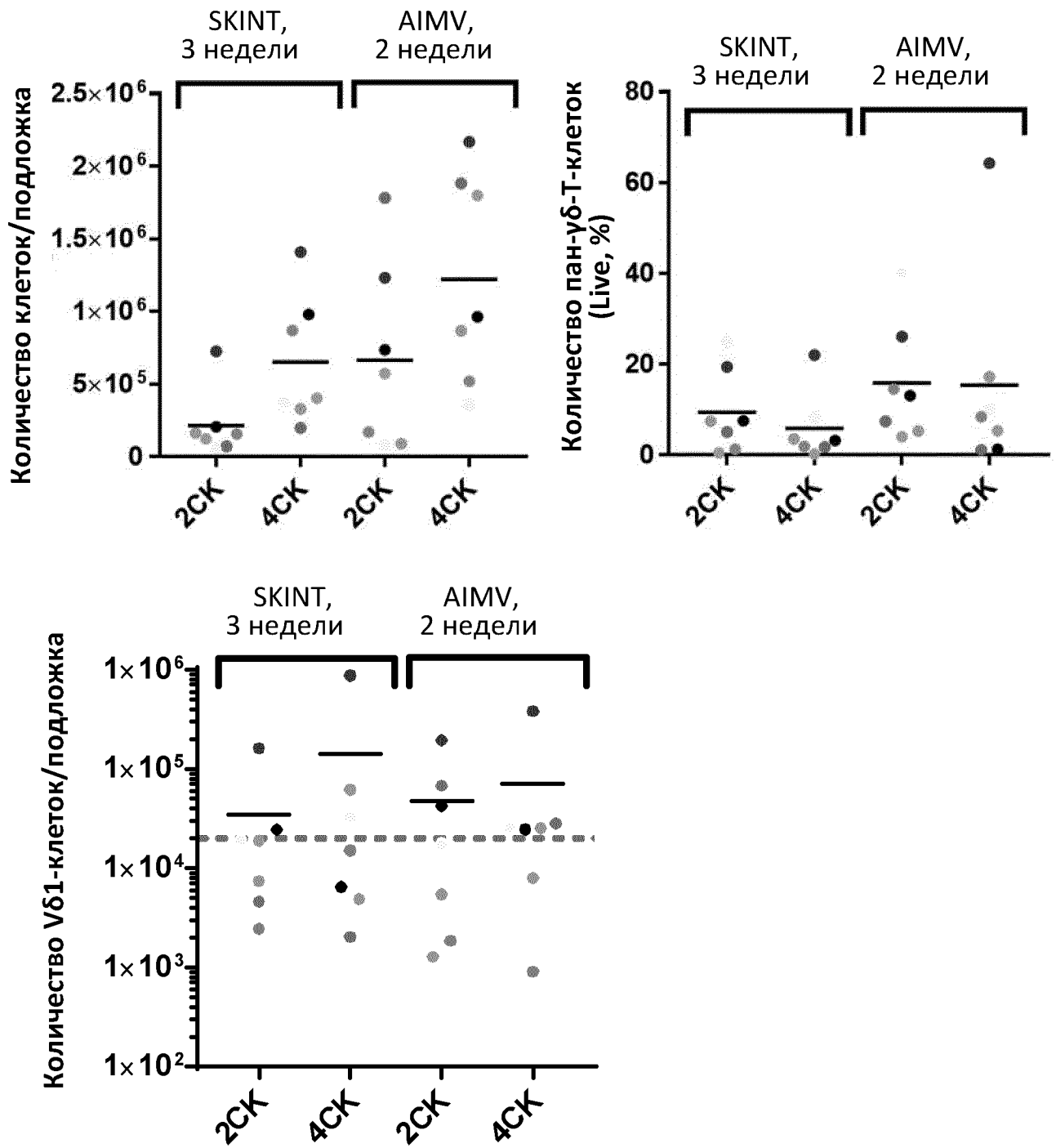


ФИГУРА 9

С



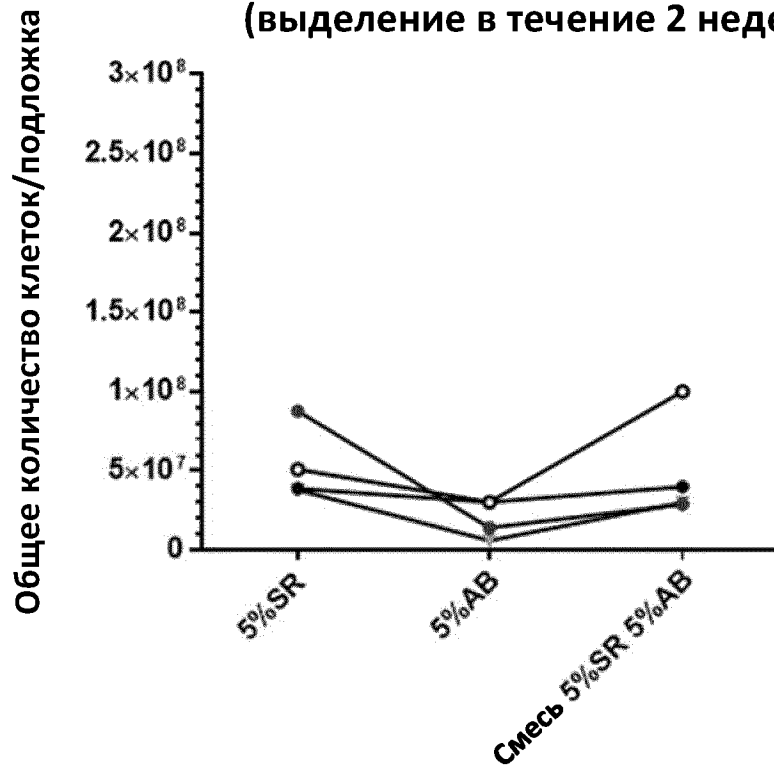
ФИГУРА 9 (продолжение)



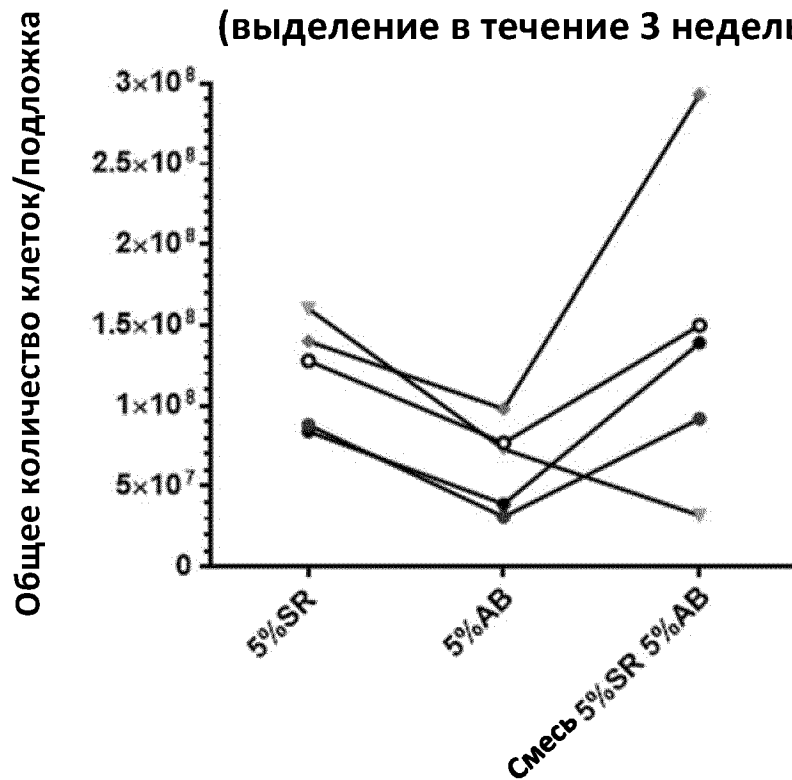
ФИГУРА 10

16/22

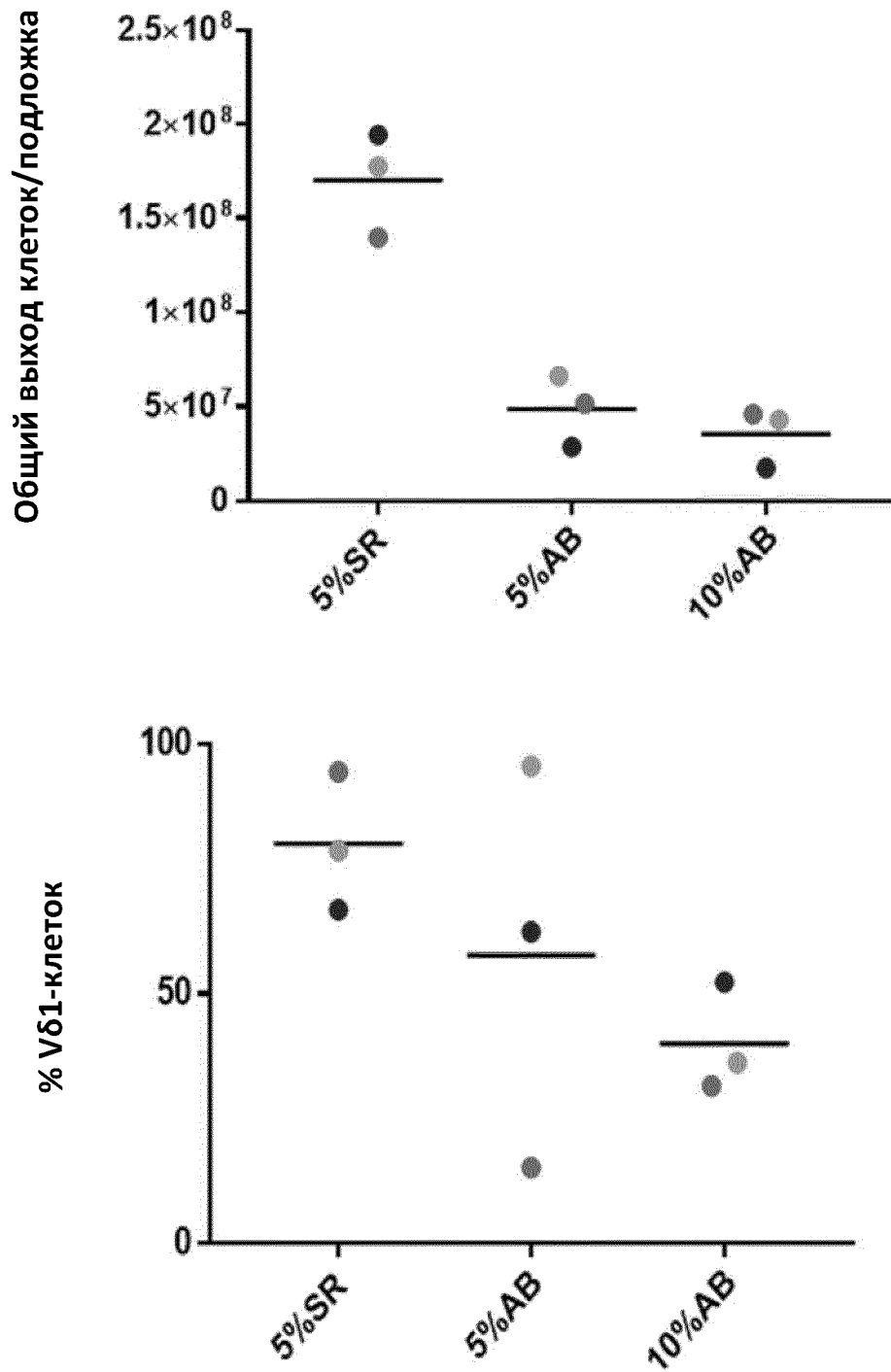
**Общее количество клеток на подложку  
(выделение в течение 2 недель)**



**Общее количество клеток на подложку  
(выделение в течение 3 недель)**

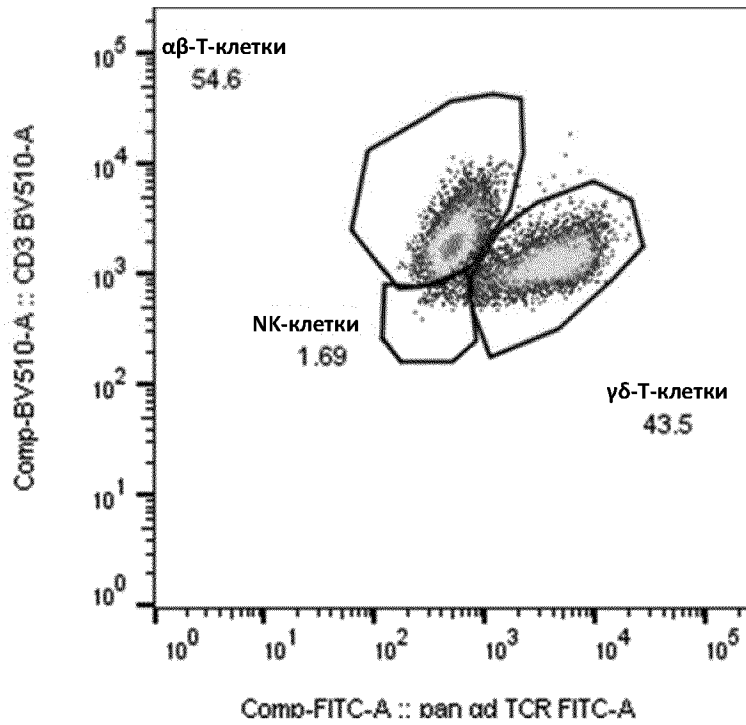


ФИГУРА 11

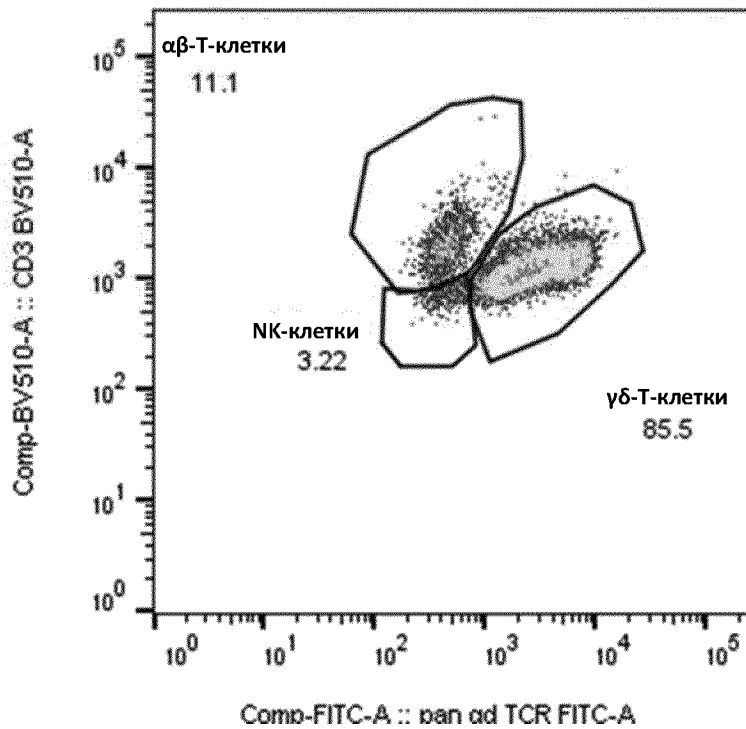


ФИГУРА 12

**A** Выделение в присутствии 2СК  
с последующим размножением в присутствии 4СК



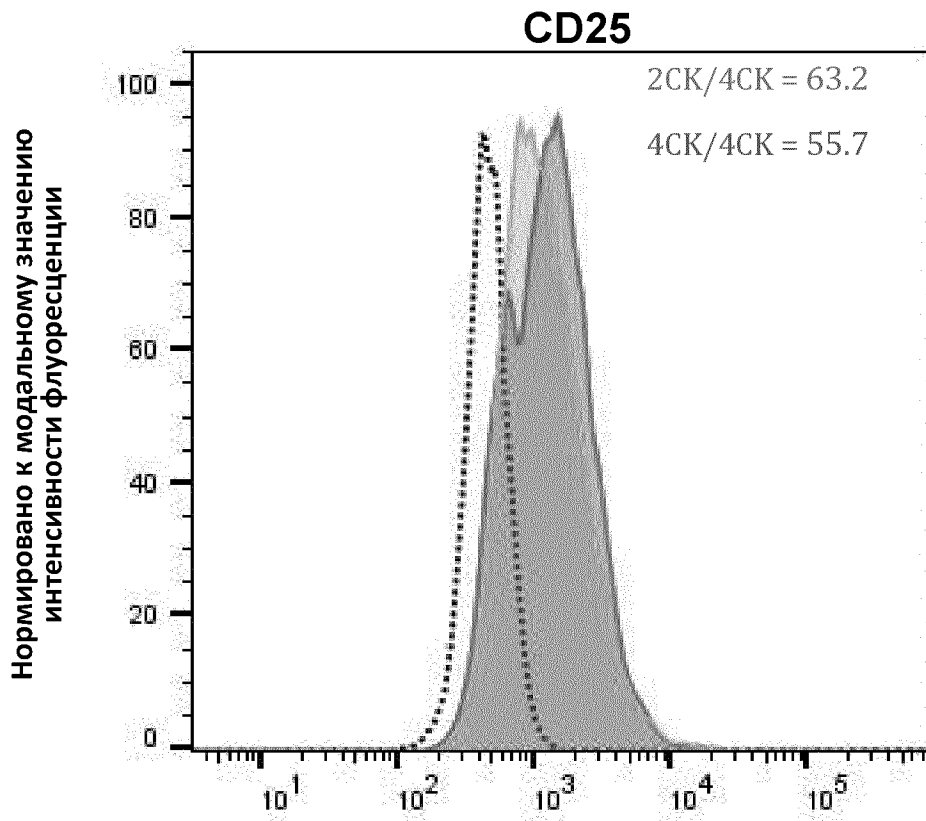
**B** Выделение в присутствии 4СК  
с последующим размножением в присутствии 4СК



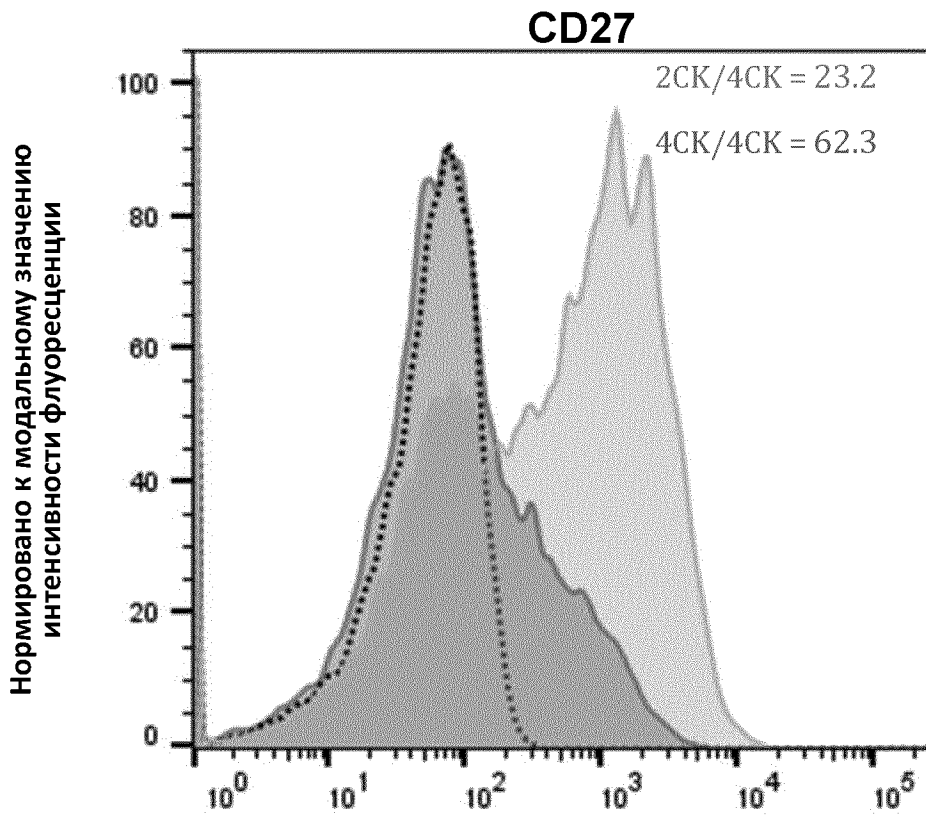
ФИГУРА 13

19/22

**A**



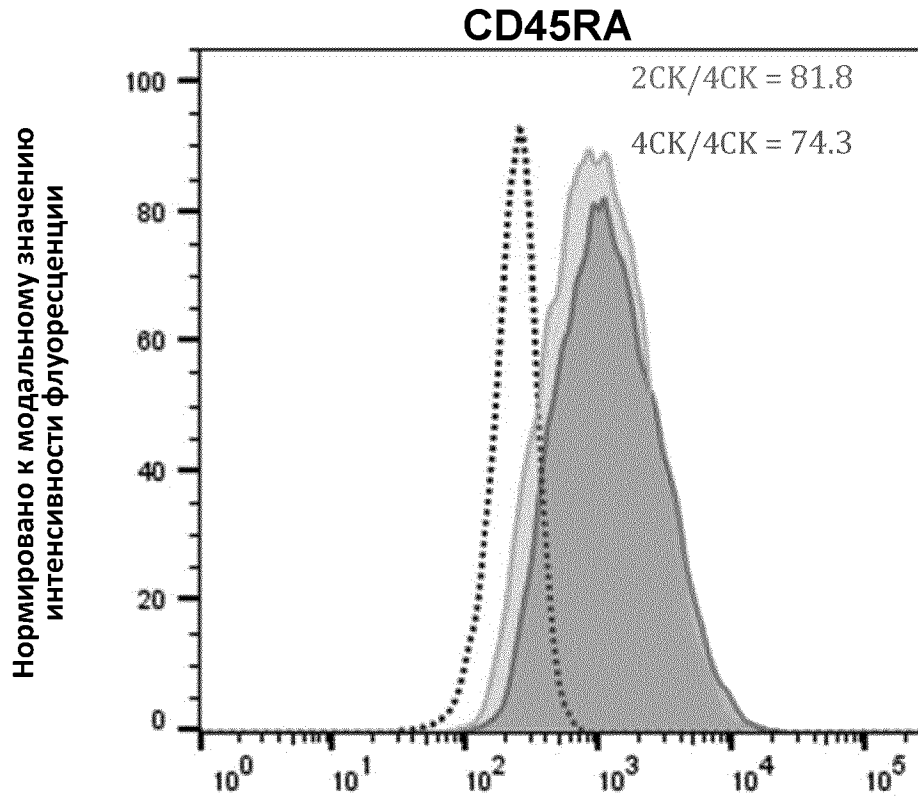
**B**



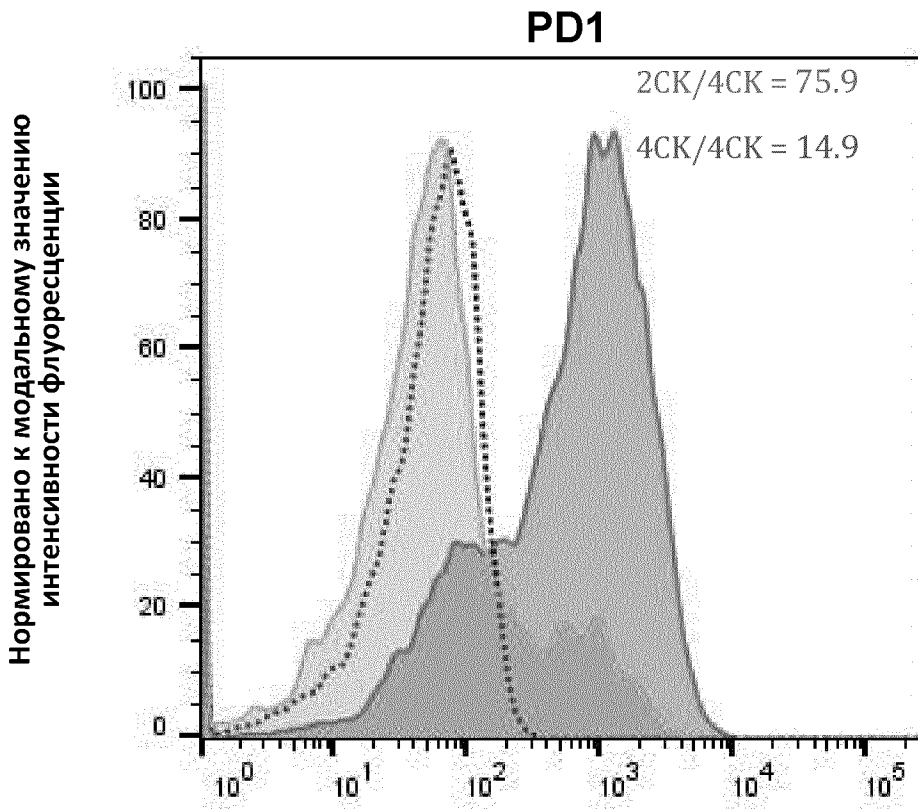
ФИГУРА 14



C

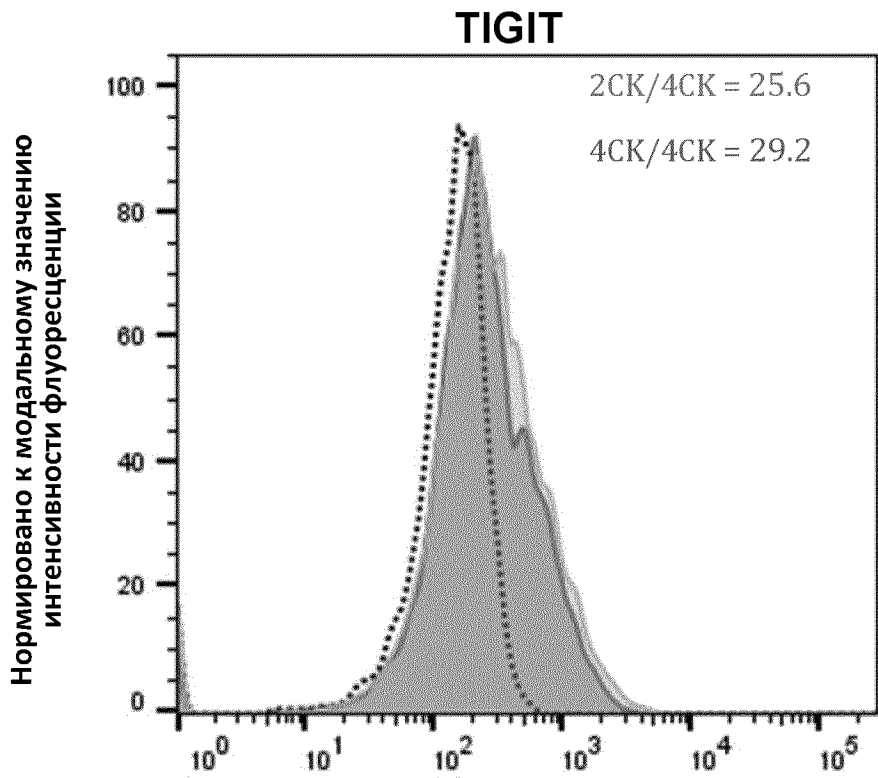


D

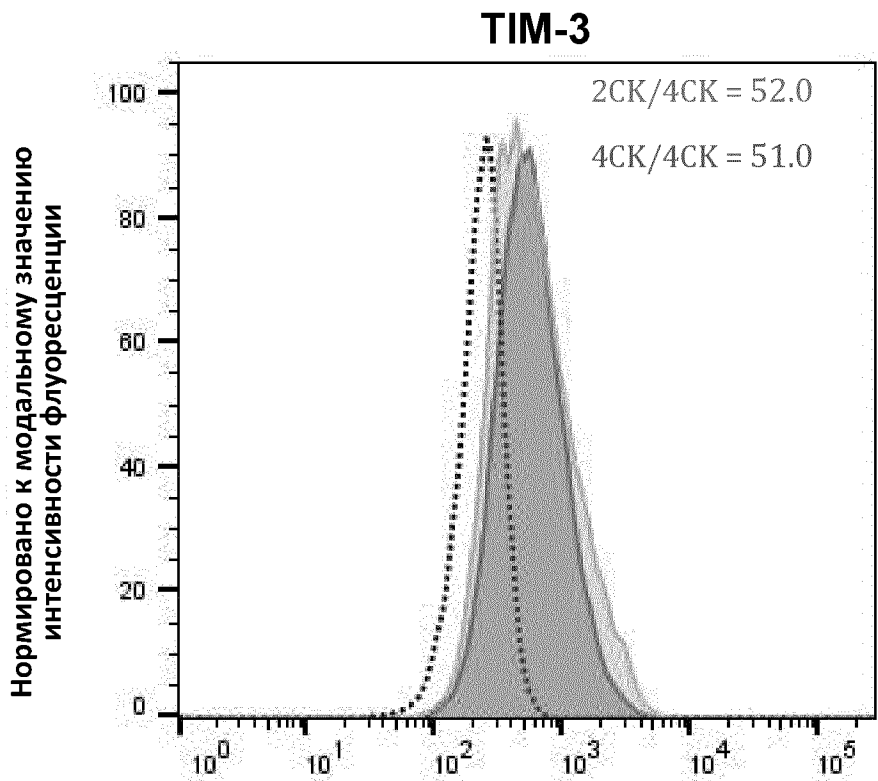


ФИГУРА 14 (продолжение)

**Е**

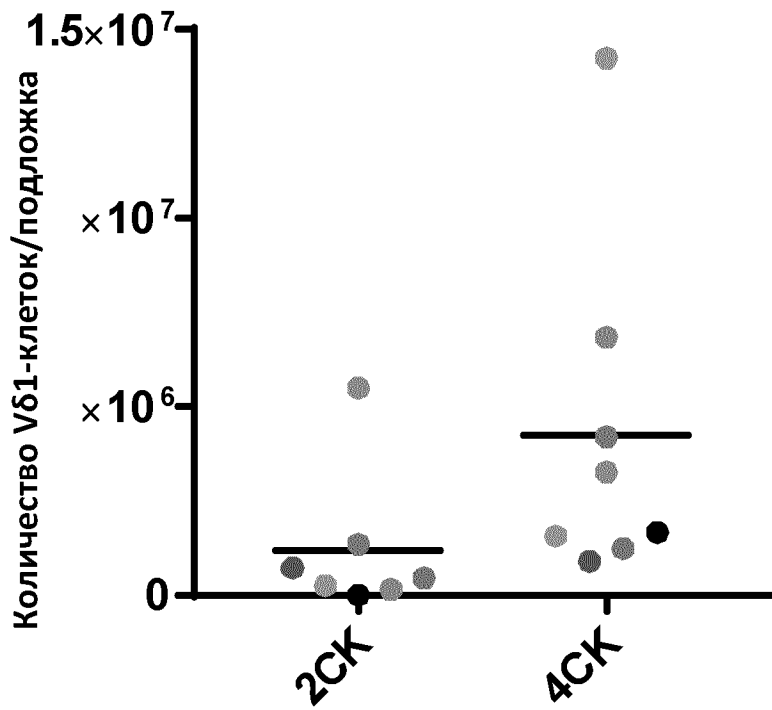
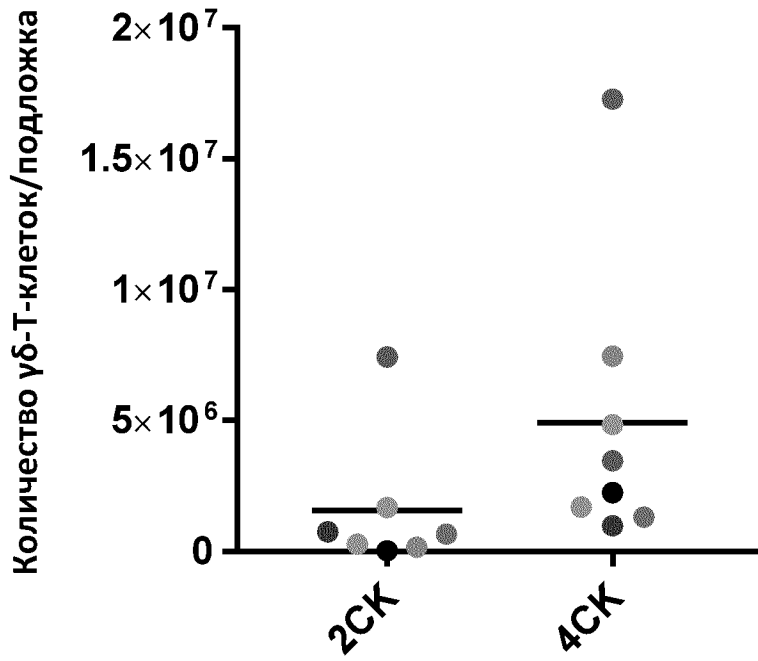


**Ф**



4CK/4CK      2CK/4CK      Изотип

ФИГУРА 14 (продолжение)



ФИГУРА 15