

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293273** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.11

(22) Дата подачи заявки
2021.05.12

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A01N 1/02 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОК

(31) 2006989.4

(32) 2020.05.12

(33) GB

(86) PCT/GB2021/051144

(87) WO 2021/229226 2021.11.18

(71) Заявитель:
**ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Долзил Мэдэлин, Хаттон Эндрю,
О'Фаррелл Шон, Нусбаумер Оливер
(GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способам выделения присущих негемопоэтической ткани лимфоцитов, в частности $\gamma\delta$ Т-клеток. Такие $\gamma\delta$ Т-клетки включают не-V δ 2 клетки, например клетки V δ 1, V δ 3 и V δ 5, а такие негемопоэтические ткани включают ткань кожи и кишечника. Следует понимать, что такие выделенные присущие негемопоэтической ткани лимфоциты очень полезны в адоптивной Т-клеточной терапии, терапии на основе химерных рецепторов и т.п. Также предложены способы экспансии выделенных присущих ткани лимфоцитов, в частности способы выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток. Настоящее изобретение также относится как к отдельным клеткам, так и к популяциям клеток, полученным описанными в данном документе способами.

202293273

A1

A1

202293273

СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОК**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Данное изобретение относится к способам выделения присущих негемопоэтической ткани лимфоцитов, в частности $\gamma\delta$ Т-клеток. Такие $\gamma\delta$ Т-клетки включают не-V δ 2 клетки, например, клетки V δ 1, V δ 3 и V δ 5, а такие негемопоэтические ткани включают ткань кожи и кишечника. Следует понимать, что такие выделенные присущие негемопоэтической ткани лимфоциты очень полезны в адоптивной Т-клеточной терапии, терапии на основе химерных рецепторов и т.п. Настоящее изобретение также относится как к отдельным клеткам, так и к популяциям клеток, полученным описанными в данном документе способами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака сфокусирован на очевидной способности субпопуляций CD8⁺ и CD4⁺ $\alpha\beta$ Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать иммунологические защитные функциональные потенциалы, в частности при дерепрессии клинически опосредованным антагонизмом ингибирующих путей, определяющихся PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами. Однако $\alpha\beta$ Т-клетки являются МНС-рестриктированными, что может привести к болезни «трансплантат против хозяина».

Гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta$ Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отличающийся специфический $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма (γ)- и одной дельта (δ)-цепи. Цепи $\gamma\delta$ TCR человека выбирают из трех основных δ -цепей, V δ 1, V δ 2 и V δ 3, и шести γ -цепей. Человеческие $\gamma\delta$ Т-клетки можно в общих чертах классифицировать на основании их цепей TCR, так как определенные типы γ и δ обнаруживаются на клетках чаще, хоть и не исключительно, в одном или более типах тканей. Например, большинство присущих крови $\gamma\delta$ Т-клеток экспрессируют V δ 2 TCR, например, V γ 9V δ 2, тогда как это является менее распространенным среди присущих тканям $\gamma\delta$ Т-клеток, которые чаще используют V δ 1, например, в коже, и V γ 4 в кишечнике.

Большинство способов выделения лимфоцитов основано на выделении этих типов клеток из крови. Присущие негемопоэтической ткани лимфоциты, такие как $\gamma\delta$ Т-клетки, могут обладать свойствами, особенно подходящими для определенных применений, таких как нацеливание на негемопоэтические опухоли и другие мишени. Однако выделение таких тканевых лимфоцитов в клинически значимых количествах остается сложной задачей, особенно потому, что для многих показаний требуются клинические дозы в диапазоне от 10⁸ клеток и выше. Важно отметить, что значительная потеря клеток в процессе производства означает необходимость создания еще большего количества исходных клеток.

Поскольку присущие негемопоэтической ткани лимфоциты, особенно $\gamma\delta$ Т-клетки,

нелегко получить в больших количествах, они не были хорошо охарактеризованы или изучены с целью их терапевтического применения. Следовательно, в данной области техники существует потребность в способах выделения присущих негемопэтической ткани лимфоцитов, в частности $\gamma\delta$ Т-клеток, в количествах, достаточных для дальнейшей экспансии, и потенциальной адаптации в качестве терапии, например, в качестве адоптивной Т-клеточной терапии.

В Clark et al. (2006) J. Invest. Dermatol. 126(5): 1059-70 описан способ выделения присущих коже Т-клеток из нормальной и пораженной кожи. Однако описанные там способы непригодны для применения в клинических целях из-за присутствия продуктов животного происхождения, но особенно из-за относительно низкого выхода выделенных клеток, а именно менее 10^6 клеток на см^2 ткани. В способе, описанном в Clark et al., используются измельченные образцы, что приводит к преднамеренному нарушению структурной целостности образца ткани. WO 2017072367 и WO 2018/202808 относятся к способам экспансии *in vitro* присущих негемопэтической ткани $\gamma\delta$ Т-клеток путем культивирования лимфоцитов, полученных из негемопэтических тканей, в присутствии по меньшей мере интерлейкина-2 (IL-2) и/или интерлейкина-15 (IL-15). В WO 2015189356 описана композиция для экспансии лимфоцитов, полученных из образца, полученного методом афереза, которая содержит по меньшей мере два типа цитокинов, выбранных из IL-2, IL-15 и IL-21. Следовательно, все еще остается потребность в способе выделения присущих негемопэтической ткани лимфоцитов, например, из кожи, который позволяет получить большее количество клеток, пригодных для применения в клинической практике.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предложен способ выделения лимфоцитов из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии интерлейкина-1 β (IL-1 β); и
- (ii) сбор популяции лимфоцитов, культивируемых из образца негемопэтической ткани.

В соответствии с дополнительным аспектом предложен способ выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии IL-1 β ; и
- (ii) сбор популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, культивируемых из образца негемопэтической ткани.

В соответствии с дополнительным аспектом предложен способ выделения и экспансии лимфоцитов из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) выделение популяции лимфоцитов из образца негемопэтической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и
- (ii) дальнейшее культивирование указанной популяции лимфоцитов в течение по

меньшей мере 5 дней для получения увеличенной популяции лимфоцитов.

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

(i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Процент (%) $\gamma\delta$ Т-клеток живых клеток (А) и общее количество $\gamma\delta$ Т-клеток на сетку для всех условий (В). Условия сгруппированы по источнику белка (АВ=10% сыворотка АВ человека; плазма=2,5% человеческая плазма; SR=5% заменитель сыворотки) и подразделены на наличие (+) или отсутствие (-) IL-1 β . Подробную информацию о различных условиях см. в таблице 2. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля (STD ISO).

Фиг. 2: График, демонстрирующий % V δ 1 Т-клеток живых клеток (А) и общее количество V δ 1 Т-клеток на сетку для всех условий (В). Условия сгруппированы по источнику белка в присутствии или отсутствии IL-1 β . Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 3: График, демонстрирующий данные по жизнеспособным клеткам на сетку, которые сгруппированы по источнику белка и разделены по присутствию или отсутствию IL-4. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 4: График, демонстрирующий данные по % $\gamma\delta$ Т-клеток на сетку, которые сгруппированы по источнику белка и разделены по присутствию или отсутствию IL-4. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 5: График, демонстрирующий данные по общему количеству V δ 1 Т-клеток на сетку, которые сгруппированы по источнику белка и разделены по присутствию или отсутствию IL-4. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 6: График, демонстрирующий данные по % экспрессии NKG2A (А) и % экспрессии CD45RA (В) на V δ 1 Т-клетках, которые сгруппированы по источнику белка и разделены по присутствию или отсутствию IL-4. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 7: График, демонстрирующий данные по % экспрессии TIGIT на V δ 1 Т-клетках, которые сгруппированы по источнику белка. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану

экспериментального контроля.

Фиг. 8: График, демонстрирующий данные по общему количеству Т-клеток V δ 1 на сетку, которые сгруппированы по источнику белка. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 9: График, демонстрирующий данные по общему количеству жизнеспособных клеток на сетку, которые сгруппированы по источнику белка. Столбцы отражают экспериментальную медиану. Пунктирная линия представляет собой медиану экспериментального контроля.

Фиг. 10: График, демонстрирующий данные по общему количеству отрицательных по TCR клеток, которые сгруппированы по источнику белка и разделены по присутствию или отсутствию IFN- γ . Пунктирная линия представляет собой медиану с использованием предыдущих способов выделения.

Фиг. 11: Данные по общему количеству $\gamma\delta$ Т-клеток на сетку для лучших условий по сравнению со стандартным способом выделения с использованием 2 цитокинов.

Фиг. 12: График, демонстрирующий влияние на кратность экспансии (А) и % экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток (В) при применении либо свежеполученных выделенных клеток, либо выделенных клеток, которые были заморожены перед экспансией.

Фигура 13: А) Сравнение общей жизнеспособности клеток в конце 21-дневной культуры для выделения в присутствии IL-2, IL-4, IL-15 и IL-1 β с добавлением или без добавления IL-21 в концентрации 18,8 нг/мл. Пунктирная линия представляет минимально допустимую жизнеспособность. В) График, демонстрирующий экспансию после 14 дней культивирования (отображаемую как % $\gamma\delta$ Т-клеток от живых) $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных в присутствии IL-1 β и IL-21 после оттаивания.

Фиг. 14: Краткие данные по культурам для выделения с «IL-21» (IL-2, IL-4, IL-15, IL-1 β и IL-21) (IL-2, IL-4, IL-15 и IL-1 β) или «без IL-21» (IL-2, IL-4, IL-15 и IL-1 β), собранным через 19 или 21 день.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом изобретения предложен способ выделения лимфоцитов из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии интерлейкина-1 β (IL-1 β); и
- (ii) сбор популяции лимфоцитов, культивируемых из образца негемопэтической ткани.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии IL-1 β ; и
- (ii) сбор популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, культивируемых из образца негемопэтической ткани.

Представленные в данном документе результаты отражают подробный дизайн

экспериментов, проведенных для определения оптимального протокола для выделения тканевых $\gamma\delta$ Т-клеток из образцов негемопоэтической ткани. Неожиданно было обнаружено, что все условия с лучшим выходом $\gamma\delta$ Т-клеток включали IL-1 β , что указывает на то, что этот цитокин был эффективен для достижения высокого уровня $\gamma\delta$ Т-клеток в процессе выделения.

В контексте данного документа термин «IL-1 β » относится к нативному или рекомбинантному IL-1 β или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-1 (IL-1R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). IL-1 представляет собой провоспалительный цитокин, который играет важную роль в широком спектре заболеваний, включая воспалительные заболевания. Он состоит из двух видов молекул, IL-1 α и IL-1 β , которые обладают лишь ограниченной идентичностью последовательностей, но проявляют сходную биологическую активность посредством связывания с рецептором IL-1 (тип I и тип II). Зрелый человеческий IL-1 β представляет собой последовательность из 153 аминокислот после отщепления 116 аминокислот от N-конца в полипептиде-предшественнике с помощью CASP1, как описано в Andrei et al. (2004) PNAS 101(26): 9745-9750. Мутеин IL-1 β представляет собой полипептид, в котором были произведены специфические замены в белке IL-1 β с сохранением способности связывать IL-1R. Мутеины IL-1 β могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-1 β . В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-1 β , который сохраняет активность связывания IL-1R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-1 β , можно получить с помощью стандартных процедур, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность IL-1 β человека (Gene ID 3553) находится в Genbank под номером доступа NP_000567 или в UniProt под номером доступа P01584. Аминокислотная последовательность IL-1 β мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16176) находится в Genbank под номером доступа NP_032387 или в UniProt под номером доступа P10749.

IL-1 β также может относиться к IL-1 β , полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например,

замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты Π -1 β также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка Π -1 β , при этом свойство связывания Π -1 β сохраняется.

Способы выделения

Ссылки в данном документе на «выделение» или «процесс выделения» клеток, в частности лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, относятся к способам или процессам, в 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.п. Выделение $\gamma\delta$ Т-клеток включает выделение или отделение клеток из образца интактной ткани или из стромальных клеток негемопозитических 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 осуществляться в течение определенного периода времени, например, начиная с момента помещения эксплантата ткани или биоптата в культуру для выделения и заканчивая сбором клеток из культуры, например, путем центрифугирования или других способов переноса популяции выделенных клеток для экспансии культуры или используются для других целей, или исходный тканевый эксплантат или биоптат удаляют из культуры. Стадия выделения может длиться от по меньшей мере около трех дней до около 45 дней. В одном варианте осуществления стадия выделения длится от по меньшей мере около 10 дней до по меньшей мере 28 дней. В дополнительном варианте осуществления стадия выделения длится от по меньшей мере 14 дней до по меньшей мере 21 дней. Таким образом, стадия выделения может длиться по меньшей мере три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, семь дней, восемь дней, девять дней, десять дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 день, 32 дня, около 35 дней, около 40 дней или около 45 дней. В одном варианте стадия выделения длится 19 дней. В еще одном варианте осуществления стадия выделения длится 21 день. Можно понять, что, хотя пролиферация выделенных клеток может быть незначительной во время этой стадии выделения, она не обязательно отсутствует. Действительно, специалисту в данной области техники известно, что выделенные клетки могут также начать делиться с образованием множества таких клеток в сосуде для выделения, содержащем ткань и/или каркас.

Таким образом, ссылки в данном документе на «выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки», «выделенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток», «выделенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток», «отделенные $\gamma\delta$ Т-клетки», «отделенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток» или «отделенную популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток» будет пониматься как относящийся к гемопозитическим клеткам или популяции гемопозитической клеток, включая $\gamma\delta$ клетки, которые были выделены,

отделены, удалены, очищены или обогащены из образца негемопозитической ткани, таким образом, что клетки не находятся в существенном контакте с негемопозитическими клетками или клетки, содержащиеся в интактной негемопозитической ткани. Аналогичным образом, ссылки в данном документе на «выделенную или отделенную популяцию V δ 1 Т-клеток» относятся к гемопозитическим клеткам, включая V δ 1 Т-клетки, которые были выделены, отделены, удалены, очищены или обогащены из образца негемопозитической ткани, таким образом, что клетки не находятся в существенном контакте с негемопозитическими клетками или клетки, содержащиеся в интактной негемопозитической ткани. Таким образом, выделение или отделение относится к выделению, отделению, удалению, очистке или обогащению гемопозитических клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток или других лимфоцитов) из негемопозитических клеток (например, стромальных клеток, фибробластов и/или эпителиальных клеток).

Способы выделения $\gamma\delta$ Т-клеток, как определено в данном документе, 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 данном документе, могут включать «выход» $\gamma\delta$ Т-клеток и других типов клеток из образца интактной негемопозитической ткани или тканевого матрикса эксплантата или биоптата, при этом тканевые лимфоциты физически отделяются от тканевого матрикса, не требуя разрушения тканевого матрикса. Поддерживая целостность тканевого матрикса, было обнаружено, что присущие ткани лимфоциты предпочтительно выходят из тканевого матрикса с небольшим или нулевым выходом ингибирующих типов клеток, таких как фибробласты, которые остаются в эксплантате или биоптате, которые затем могут быть легко удалены по окончании выделения. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления применение образца интактной негемопозитической ткани или тканевого матрикса приводит к высвобождению небольшого количества фибробластов из ткани в культуру. Такие способы «выхода» с применением интактной негемопозитической ткани или тканевого матрикса имеют преимущество, которое заключается в уменьшении необходимости в избыточной обработке образца негемопозитической ткани или тканевого матрикса, сохранении структурной целостности негемопозитической ткани или тканевого матрикса, и они могут обеспечить неожиданное преимущество, которое заключается в повышении выхода выделенных клеток.

Таким образом, способы выделения лимфоцитов негемопозитической ткани, как определено в данном документе, включают способы выделения лимфоцитов негемопозитической ткани из интактного биоптата или эксплантата негемопозитической ткани. Такой интактный биоптат или эксплантат представляет собой материал, в котором структурная целостность биоптата или эксплантата не была преднамеренно нарушена в пределах периметра иссечения, в результате которого биоптат или эксплантат был удален из образца ткани. Такой интактный биоптат или эксплантат будет иметь в значительной степени сохраненную трехмерную структуру, за исключением незначительных нарушений, вызванных манипуляциями. Таким образом, этот интактный биоптат или

эксплантат не подвергался механическому разрушению, например, измельчению или размельчению, или, например, химическому ферментативному разрушению. Однако в способах выделения по настоящему изобретению можно использовать поврежденную ткань. В одном варианте осуществления выделенный лимфоцит представляет собой $\alpha\beta$ Т-клетку. В альтернативном варианте осуществления выделенный лимфоцит представляет собой $\gamma\delta$ Т-клетку. В дополнительном варианте осуществления выделенный лимфоцит представляет собой TCR-отрицательную клетку (т.е. клетку, которая является отрицательной в отношении экспрессии $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR). TCR-отрицательные клетки являются хорошим индикатором наличия натуральных клеток-киллеров (NK). Следовательно, в другом варианте осуществления выделенный лимфоцит представляет собой NK-клетку. Понятно, что на одной и той же стадии выделения можно выделить более одного типа лимфоцитов.

Способы выделения $\gamma\delta$ Т-клеток с использованием «выхода» или, например, способы, как определено в данном документе, включают культивирование клеток и/или образца негемопэтической ткани в присутствии цитокинов и/или хемокинов, достаточных для индукции выделения или отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или других лимфоцитов, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии интерлейкина-2 (IL-2). В еще одном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии интерлейкина-15 (IL-15). В еще одном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии IL-2 и IL-15.

В контексте данного документа термин «IL-2» относится к нативному или рекомбинантному IL-2 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток, CTLL-2 (33; Американская коллекция типовых культур (ATCC®) TIB 214). Зрелый человеческий IL-2 встречается в виде последовательности из 133 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 20 N-концевых аминокислот), как описано у Fujita, et al. Cell 1986. 46.3:401-407. Мутеин IL-2 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-2 с сохранением способности связывать IL-2R β , такие как описанные в US 2014/0046026. Мутеины IL-2 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-2. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-2, который сохраняет активность связывания IL-2R β . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-2, можно получить с помощью обычных процедур, таких как ПЦР. Аминокислотная последовательность IL-2 человека (Gene ID 3558) находится в Genbank под номером доступа NP_000577.2 GI: 28178861. Аминокислотная последовательность IL-2 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16183) находится в Genbank под номером доступа NP_032392.1 GI: 7110653.

IL-2 также может относиться к IL-2, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-2 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-2, при этом свойство связывания IL-2 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-2. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-2 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец 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). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

В контексте данного документа термин «IL-15» относится к нативному или рекомбинантному IL-15 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-15 (IL-15R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). IL-15, как и IL-2, является известным фактором роста Т-клеток, который может поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток, CTLL-2. Впервые об IL-15 сообщили Grabstein, et al. (Grabstein, et al. Science 1994. 264.5161: 965-969) как 114-аминокислотный зрелый белок. Термин «IL-15», используемый в данном документе, означает нативный или рекомбинантный IL-15 и мутеины, аналоги, его субъединицы или их комплексы (например, рецепторные комплексы, например, пептиды sushi, как описано в WO 2007/046006), и каждый из которых могут стимулировать пролиферацию клеток CTLL-2. В анализах пролиферации CTLL-2 супернатанты клеток,

трансфицированных рекомбинантно экспрессированным предшественником и слияниями зрелых форм IL-15 внутри рамки считывания, могут индуцировать пролиферацию клеток CTLL-2.

IL-15 человека может быть получен в соответствии с процедурами, описанными Grabstein, et al. (Grabstein, et al. Science 1994. 264:5161: 965-969) или с помощью стандартных процедур, таких как ПЦР. кДНК IL-15 человека была депонирована в ATCC® 19 февраля 1993 г., и ей был присвоен номер доступа 69245.

Аминокислотная последовательность IL-15 человека (Gene ID 3600) находится в Genbank под номером доступа NP000576.1 GI: 10835153 (изоформа 1) и NP_751915.1 GI: 26787986 (изоформа 2). Аминокислотная последовательность IL-15 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16168) находится в Genbank под номером доступа NP_001241676.1 GI: 363000984.

IL-15 также может относиться к IL-15, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. «Мутеин» или «вариант» IL-15, как упоминается в данном документе, представляет собой полипептид, по существу гомологичный последовательности нативного IL-15 млекопитающих, но имеющий аминокислотную последовательность, отличную от нативного полипептида IL-15 млекопитающих из-за аминокислотной делеции, вставки или замены. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-15 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-15, при этом свойство связывания IL-15 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-15. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-15 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. Cancer 1995. 76:687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

В одном варианте осуществления выделение лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток по

изобретению дополнительно включает культивирование образца негемопоэтической ткани в присутствии интерлейкина-4 (IL-4). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления образец негемопоэтической ткани культивируют в присутствии IL-1 β и IL-4.

В контексте данного документа термин «IL-4» относится к нативному или рекомбинантному IL-4 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-4 (IL-4R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать дифференцировку наивных Т-хелперов (клеток Th0) в клетки Th2. Зрелый IL-4 человека встречается в виде последовательности из 129 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 24 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-4 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-4 с сохранением способности связывать IL-4R α , такие как описанные в патент США № 6313272. Мутеины IL-4 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-4. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-4, который сохраняет активность связывания IL-4R α . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-4, можно получить с помощью обычных процедур, таких как ПЦР. Аминокислотная последовательность человеческого IL-4 (Gene ID 3565) находится в Genbank под номером доступа NG_023252. Аминокислотная последовательность IL-4 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16189) находится в Genbank под номером доступа NC_000077.6.

IL-4 также может относиться к IL-4, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-4 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-4, при этом свойство связывания IL-4 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-4. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах

при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-4 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. Cancer 1995. 76:687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

В одном варианте осуществления выделение лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток по изобретению дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерферона- γ (IFN- γ). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления образец негемопозитической ткани культивируют в присутствии IL-1 β и IFN- γ .

В контексте данного документа термин «IFN- γ » относится к нативному или рекомбинантному IFN- γ или его варианту, который действует как агонист одной или более субъединиц рецептора IFN- γ (IFNGR) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). В частности, IFN- γ взаимодействует с гетеродимерным рецептором, состоящим из рецептора интерферона-гамма 1 (IFNGR1) и рецептора интерферона-гамма 2 (IFNGR2). Зрелый IFN- γ человека встречается в виде последовательности из 143 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 23 N-концевых аминокислот). Мутеин IFN- γ представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены в белке IFN- γ с сохранением способности связывать IFNGR, например, описанные в патенте США № 9296804. Мутеины IFN- γ могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IFN- γ . В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IFN- γ , который сохраняет активность связывания IFN- γ R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновая кислота, кодирующая человеческий IFN- γ , может быть получена с помощью стандартных процедур, таких как ПЦР. Аминокислотная последовательность IFN- γ человека (Gene ID 3458) находится в Genbank под номером доступа NG_015840.1 или в UniProt под номером доступа P01579. Аминокислотная последовательность IFN- γ мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 15978) находится в Genbank под номером доступа NC_000076.6 или в UniProt под номером доступа P01580.

IFN- γ также может относиться к IFN- γ , полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-

химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IFN- γ также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IFN- γ , при этом свойство связывания IFN- γ сохраняется.

В одном варианте осуществления выделение лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток по изобретению дополнительно включает культивирование образца негемопоэтической ткани в присутствии интерлейкина-21 (IL-21). Таким образом, в дополнительном варианте осуществления образец негемопоэтической ткани культивируют в присутствии IL-1 β и IL-21.

В контексте данного документа термин «IL-21» относится к нативному или рекомбинантному IL-21 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-21 (IL-21R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию натуральных киллеров (NK) и цитотоксических (CD8⁺) Т-клеток. Зрелый IL-21 человека встречается в виде последовательности из 133 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 22 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-21 представляет собой полипептид, в котором были сделаны специфические замены белка интерлейкина-21 с сохранением способности связывать IL-21R α , такие как описанные в патент США № 9388241. Мутеины IL-21 могут характеризоваться аминокислотными вставками, делециями, заменами и модификациями в одном или более сайтах или в других остатках цепи нативного полипептида IL-21. В соответствии с данным изобретением любые такие вставки, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-21, который сохраняет активность связывания IL-21R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую человеческий IL-21, можно получить с помощью обычных процедур, таких как ПЦР. Аминокислотная последовательность IL-21 человека (Gene ID 59067) находится в Genbank под номером доступа NC_000004.12. Аминокислотная последовательность IL-21 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 60505) находится в Genbank под номером доступа NC_000069.6.

IL-21 также может относиться к IL-21, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного

алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замену одного полярного остатка на другой, например, замену между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-21 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате явлений альтернативного сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-21, при этом свойство связывания IL-21 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-21. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-21 (обычно от 1 до 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. Cancer 1995. 76:687-694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать дополнительными аминокислотами (Clark-Lewis, et al. PNAS 1993. 90:3574-3577).

В альтернативных вариантах культивирование проводят в отсутствие IL-21. В альтернативных вариантах осуществления культивирование проводят в отсутствие IFN- γ . После статистического анализа результатов, полученных в описанных в данном документе экспериментах, оказалось, что присутствие IL-1 β в культуре для выделения может быть более полезным при отсутствии по меньшей мере IFN- γ , например, при отсутствии IFN- γ и IL-21. Описанные в данном документе результаты дополнительно демонстрируют, что при определенных условиях присутствие IL-1 β в культуре для выделения также может быть полезным, когда IL-21 отсутствует или когда IL-21 присутствует в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, в частности, в концентрации от 18 до 20 нг/мл, такой как 18, 19 или 20 нг/мл, например, 18,8 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-2, как правило, в концентрации по меньшей мере 10 МЕ/мл, например, 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). В некоторых вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-2, как правило, в концентрации менее 1000 МЕ/мл, например, менее 500 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-2 в концентрации около 100 МЕ/мл, например, 138 МЕ/мл.

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-15, как правило, в концентрации по меньшей мере 10 МЕ/мл, например, по меньшей мере 100 МЕ/мл, в частности, по меньшей мере 500 МЕ/мл (например, от 10 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 900 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 600 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, например, от 100 МЕ/мл до 900 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 800 МЕ/мл, от 300 МЕ/мл до 700 МЕ/мл, от 400 МЕ/мл до 600 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл). В определенных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-15, как правило, в концентрации менее 1000 МЕ/мл, например, менее 700 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-15 в концентрации около 600 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопоэтической ткани включает культивирование в присутствии как IL-2, так и IL-15, каждый в любой из перечисленных выше концентраций. В некоторых случаях концентрация IL-2 составляет около 138 МЕ/мл, а концентрация IL-15 составляет 600 МЕ/мл.

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-21, как правило, в концентрации по меньшей мере 0,01 МЕ/мл, например, по меньшей мере 0,1 МЕ/мл (например, от 0,01 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 0,05 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 0,1 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 1 МЕ/мл до 5 МЕ/мл, например, от 0,01 МЕ/мл до 0,05 МЕ/мл, от 0,05 МЕ/мл до 0,1 МЕ/мл, от 0,1 МЕ/мл до 1 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 100 МЕ/мл). В определенных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-21, как правило, в концентрации менее 10 МЕ/мл, например, менее 5 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-21 в концентрации около 1 МЕ/мл, например, 1,05 МЕ/мл. В дополнительных вариантах осуществления способы включают IL-21 в концентрации от 15 до 25 нг/мл. Таким образом, в одном варианте осуществления способы включают IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл. В дополнительном варианте осуществления способы включают IL-21 в концентрации от 18 до 20 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл, например, 18,8 нг/мл.

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-4, как правило, в концентрации по меньшей мере 1 МЕ/мл, например, по меньшей мере 10 МЕ/мл (например, от 1 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, например, от 1 МЕ/мл до 5 МЕ/мл, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 150 МЕ/мл). В определенных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-4, как правило, в концентрации менее 500 МЕ/мл, например, менее 100 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-4 в концентрации около 100 МЕ/мл, например, 95 МЕ/мл. В дополнительных вариантах осуществления способы включают IL-4 в концентрации около

30 МЕ/мл, например, 31,6 МЕ/мл.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани включает культивирование в присутствии IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21, каждый в любой из перечисленных выше концентраций. В дополнительных вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет около 138 МЕ/мл, концентрация IL-15 составляет 600 МЕ/мл, концентрация IL-4 составляет 95 МЕ/мл, а концентрация IL-21 составляет от 15 нг/мл и 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл, например, 18,8 нг/мл. Так, в конкретном варианте выделение $\gamma\delta$ Т-клеток включает культивирование в присутствии IL-2 в концентрации 138 МЕ/мл, IL-15 в концентрации 600 МЕ/мл, IL-4 в концентрации 95 МЕ/мл, IL-1 β в концентрации 4500 МЕ/мл и необязательно IL-21 в концентрации 18,8 нг/мл.

Ссылки в данном документе на «негемопозитические ткани» или «образец негемопозитической ткани» включают кожу (например, кожу человека) и кишечник (например, кишечник человека). Негемопозитическая ткань представляет собой ткань, отличную от ткани крови, костного мозга или тимуса. В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой образец кожи (например, образец кожи человека). В дополнительном варианте осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой ткань кишечника или желудочно-кишечного тракта (например, ткань кишечника человека или желудочно-кишечного тракта человека). В некоторых вариантах осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки не получают из конкретных типов образцов биологических жидкостей, таких как кровь или синовиальная жидкость. В некоторых вариантах осуществления образец негемопозитической ткани, из которого выделяют лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки в соответствии со способами, определенными в данном документе, представляет собой кожу (например, кожу человека), которую можно получить способами, известными в данной области техники. В качестве альтернативы способы выделения лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, представленные в данном документе, могут быть применены к желудочно-кишечному тракту (например, толстой кишке или кишечнику), молочной железе, легкому, предстательной железе, печени, селезенке, поджелудочной железе, матке, влагалищу и другим кожным, слизистым или серозным оболочкам. Лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки также могут находиться в образцах раковой ткани человека, например, опухолях молочной железы или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки могут происходить из образцов раковой ткани человека (например, тканей солидной опухоли). В других вариантах осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть получены из образца негемопозитической ткани, отличной от раковой ткани человека (например, ткани без значительного количества опухолевых клеток). Например, лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть из участка кожи (например, здоровой кожи), отделенного от близлежащей или соседней раковой ткани. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки не получают из раковой ткани человека. В дополнительных вариантах осуществления лимфоциты не получают из раковой ткани человека.

В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани способами, определенными в данном документе, был получен от человека. В альтернативном варианте осуществления образец негемопозитической ткани способами, определенными в данном документе, был получен от субъекта-животного, отличного от человека.

Способы получения таких тканей известны специалистам в данной области техники. Примеры таких способов включают взятие эксплантата скальпелем или щипковую биопсию и могут различаться по размеру в зависимости от способа. В некоторых вариантах осуществления образец негемопозитической ткани получают с помощью щипковой биопсии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения образец негемопозитической ткани представляет собой интактный биоптат. Ссылки в данном документе на «интактный» биоптат или «эксплантат» включают ткань и образец ткани, которые существенно не разрушены или не разрушены, так что структурная целостность биоптата или эксплантата не была преднамеренно нарушена в пределах периметра иссечения, в результате которого биоптат или эксплантат был удален из образца ткани. Такой интактный биоптат или эксплантат будут иметь в значительной степени сохраненную трехмерную структуру, за исключением незначительных нарушений, вызванных манипуляциями. Таким образом, этот интактный биоптат или эксплантат не подвергался механическому разрушению, например, измельчению или размельчению, или, например, химическому ферментативному разрушению. Интактный биоптат или образец интактной ткани могут включать цельную ткань, всю ткань, часть ткани или все элементы указанной ткани. Например, в одном варианте осуществления интактный биоптат включает все слои кожи. В дополнительном варианте осуществления биоптат включает эпидермальный и дермальный слои кожи. Следует понимать, что в таких вариантах осуществления, когда биоптат является интактным, сохраняется разделение и различие между такими слоями. Таким образом, ссылки в данном документе на «интактный» дополнительно включают биоптаты образца негемопозитической ткани на всю толщину.

Таким образом, в одном конкретном варианте осуществления настоящего изобретения образец негемопозитической ткани не измельчается. В дополнительных вариантах осуществления интактный биоптат представляет собой щипковый биоптат. В еще одном варианте осуществления интактный биоптат получают путем щипковой биопсии.

В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой щипковый биоптат. Щипковый биоптат может быть любой формы, но в большинстве случаев он имеет круглое поперечное сечение и, как правило, не менее 1 мм в диаметре. В еще одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани включает щипковый биоптат диаметром по меньшей мере 2 мм, например, по меньшей мере 3 мм в диаметре, по меньшей мере 4 мм в диаметре, по меньшей мере 5 мм в диаметре, по меньшей мере 6 мм в диаметре, по меньшей мере 7 мм в диаметре или по

меньшей мере 8 мм в диаметре. В дополнительных вариантах осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой щипковый биоптат диаметром 8 мм или менее, например, диаметром 7 мм или менее, диаметром 6 мм или менее, диаметром 5 мм или менее, или диаметром 3 мм или менее. В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой щипковый биоптат диаметром от 1 мм до 8 мм, например, диаметром от 2 мм до 4 мм. В конкретном варианте осуществления образец негемопозитической ткани представляет собой щипковый биоптат диаметром 3 мм.

В одном варианте осуществления биоптат представляет собой биоптат кожи и включает эпидермальный и дермальный слои. В дополнительном варианте осуществления биоптат по существу не включает подкожный жир. Таким образом, в одном варианте осуществления биоптат включает эпидермальный и дермальный слои и по существу не содержит слой подкожного жира. В дополнительном варианте осуществления биоптат не содержит подкожный жир. В качестве альтернативы подкожный жир не удаляется, поэтому он присутствует (или по меньшей мере частично присутствует) в биоптате. Таким образом, в еще одном варианте осуществления биоптат состоит из эпидермального и дермального слоев. В одном варианте осуществления биоптат включает образец негемопозитической ткани на всю толщину.

Способы по настоящему изобретению включают культивирование образца негемопозитической ткани, как определено в данном документе. Ссылки в данном документе на «культивирование» включают добавление клеток и/или образца негемопозитической ткани, включая выделенные, отделенные, удаленные, очищенные или обогащенные клетки из образца негемопозитической ткани, в среду, содержащую факторы роста и/или незаменимые питательные вещества, необходимые и/или предпочтительные для клеток и/или образца негемопозитической ткани. Следует понимать, что такие условия культивирования могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, которые должны быть выделены из образца негемопозитической ткани согласно изобретению, или могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, которые должны быть выделены и размножены из образца негемопозитической ткани.

В определенных вариантах осуществления культивирование образца негемопозитической ткани проводят в течение периода времени, достаточного для выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани. В альтернативных вариантах осуществления культивирование образца негемопозитической ткани проводят 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 NK-клеток (натуральных киллеров)). В некоторых вариантах осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет по меньшей мере 7 дней. В определенных вариантах осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет по меньшей мере 14 дней. В определенных вариантах осуществления

продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет менее 45 дней, например, менее 40 дней, например, менее 35 дней, например, менее 30 дней, например, менее 25 дней. В дополнительном варианте осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет от 14 дней до 35 дней, например, от 14 дней до 21 дня. В еще одном варианте осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет около 19 дней, например, 19 дней. В еще одном варианте осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в данном документе, составляет около 21 дня, например, 21 день.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки, выделенные в соответствии со способами, определенными в данном документе, собирают из культуры образца негемопозитической ткани после культивирования образца негемопозитической ткани. Сбор лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, как определено в данном документе, может включать физический сбор лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток из культуры, выделение лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток из 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). В одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают механическими способами (например, с помощью пипетирования). В дополнительном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают посредством магнитной сепарации и/или мечения. В еще одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают с помощью методов проточной цитометрии, например, FACS. Таким образом, в определенных вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки собирают посредством специфического мечения $\gamma\delta$ Т-клеток. В дополнительных вариантах осуществления лимфоциты собирают посредством специфического мечения лимфоцитов, чтобы отличить их 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 отдельный сосуд для культивирования или в разные или отличающиеся условия культивирования.

Следует понимать, что такой сбор лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток проводят по прошествии времени, достаточного для получения выделенной популяции лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани. В определенных вариантах осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают по меньшей мере через 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. Соответственно, 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 меньше или 24 дня или меньше. В одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают после

по меньшей мере 14 дней культивирования образца негемопозитической ткани. В дополнительном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают после 14-21 дня культивирования образца негемопозитической ткани. В еще одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через около 19 дней культивирования, например, через 19 дней. В еще одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через около 21 день культивирования, например, через 21 день.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей сыворотку (например, сыворотку АВ человека или фетальную бычью сыворотку (FBS)). В дополнительном варианте осуществления негемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 10% сыворотки АВ человека. В еще одном варианте осуществления негемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 5% сыворотки АВ человека. В соответствии с этим вариантом осуществления заменитель сыворотки, как определено ниже, может дополнительно содержаться в среде. Таким образом, в еще одном варианте осуществления негемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 5% сыворотки АВ человека и 5% заменителя сыворотки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей плазму (например, плазму человека). В другом варианте осуществления гемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 2,5% плазмы человека.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения образец негемопозитической ткани культивируют в среде, по существу не содержащей сыворотки (например, в среде, не содержащей сыворотки, или в среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). В дополнительном варианте осуществления гемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 5% заменителя сыворотки. Таким образом, в одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани культивируют в среде, не содержащей сыворотку. Такая бессывороточная среда может также включать среду из заменителем сыворотки, при этом заменитель сыворотки основан на химически определенных компонентах, чтобы избежать применения сыворотки человека или животных.

В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани культивируют в среде, не содержащей продуктов животного происхождения.

В одном варианте осуществления способы, как определено в данном документе, осуществляют в сосуде для выделения. Ссылка на «сосуд для выделения» относится к сосуду, содержащему образец негемопозитической ткани для выделения лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, необязательно дополнительно содержащему синтетический каркас. Следует отметить, что сосуд для выделения можно использовать только для способа выделения, а не для дальнейших стадий экспансии.

В одном варианте осуществления способы, как они определены в данном

документе, осуществляются в сосуде (например, сосуде для выделения), содержащем газопроницаемый материал. Такие материалы проницаемы для газов, таких как кислород, двуокись углерода и/или азот, что обеспечивает газообмен между содержимым сосуда и окружающей атмосферой. Следует иметь в виду, что ссылки на «сосуд» в данном документе включают чашки для культивирования, планшеты для культивирования, чашки с одной лункой, чашки с множеством лунок, планшеты с множеством лунок, колбы, многослойные колбы, флаконы (такие как роллерные флаконы), биореакторы, пакеты, тубы и тому подобное. Такие сосуды известны в данной области техники для применения в способах, включающих экспансию неадгезивных клеток и других лимфоцитов. Однако сосуды, содержащие газопроницаемый материал, также неожиданно находят применение при выделении $\gamma\delta$ Т-клеток, которые считаются обычно адгезивными. Было обнаружено, что применение таких сосудов для культивирования значительно увеличивает выход выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани. Также было обнаружено, что такие сосуды предпочтительно поддерживают $\gamma\delta$ Т-клетки и другие лимфоциты по сравнению с фибробластами и другими стромальными клетками (например, эпителиальными клетками), включая адгезивные типы клеток. Таким образом, в одном варианте осуществления сосуды, содержащие газопроницаемый материал, как определено в данном документе, предпочтительно поддерживают $\gamma\delta$ Т-клетки и другие лимфоциты (например, $\alpha\beta$ Т-клетки и/или НК-клетки). В дополнительном варианте осуществления фибробласты и/или другие стромальные клетки (например, эпителиальные клетки) отсутствуют в культурах, полученных в сосудах, содержащих газопроницаемый материал.

Такие сосуды, содержащие газопроницаемые материалы, могут дополнительно содержать газопроницаемый материал, который не является пористым. Таким образом, в одном варианте осуществления газопроницаемый материал не является пористым. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый материал представляет собой мембранную пленку, такую как силикон, фторэтилен, полипропилен, полиолефин или сополимер этилена и винилацетата. Кроме того, такие сосуды могут состоять только из части газопроницаемого материала, газопроницаемой мембранной пленки или непористого газопроницаемого материала. Таким образом, согласно еще одному варианту осуществления сосуд включает в себя верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанного дна сосуда содержит газопроницаемый материал, который находится по существу в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть находится над указанным дном. В одном варианте осуществления сосуд включает верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанного дна содержит газопроницаемый материал, который находится в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть находится над указанным дном. В дополнительном варианте осуществления сосуд включает верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом указанная по меньшей мере одна боковая стенка содержит газопроницаемый материал, который может находиться в вертикальной плоскости, когда указанная верхняя часть

находится над указанным дном, или может находиться в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть не находится над указанным дном. Следует понимать, что в таких вариантах осуществления только часть указанного дна или указанной боковой стенки может содержать газопроницаемый материал. В альтернативном варианте все указанное дно или вся указанная боковая стенка могут состоять из газопроницаемого материала. В еще одном варианте осуществления указанная верхняя часть указанного сосуда, содержащая газопроницаемый материал, может быть герметизирована, например, с помощью уплотнительного кольца. Предполагается, что такие варианты осуществления предотвращают утечку или уменьшают испарение содержимого сосуда. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сосуд представляет собой герметичный контейнер для жидкости, содержащий газопроницаемый материал, обеспечивающий газообмен. В альтернативных вариантах осуществления указанная верхняя часть указанного сосуда, содержащая газопроницаемый материал, находится в горизонтальной плоскости и над указанным дном и не герметизирована. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанная верхняя часть выполнена с возможностью газообмена от верхней части сосуда. В дополнительных вариантах осуществления указанное дно газопроницаемого контейнера выполнено с возможностью газообмена от дна сосуда. В еще одном варианте осуществления указанный сосуд, содержащий газопроницаемый материал, может быть герметичным контейнером для жидкости и дополнительно содержать впускные и выпускные отверстия или трубки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сосуд, содержащий газопроницаемый материал, включает верхнюю часть, дно и, необязательно, по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанной верхней части и указанного дна содержат газопроницаемый материал и, если он присутствует, то по меньшей мере часть по меньшей мере одной боковой стенки содержит газопроницаемый материал. Примеры сосудов описаны в WO 2005035728 и US 9255243, которые включены в данный документ посредством ссылки. Эти сосуды также имеются в продаже, например, устройства для культивирования клеток G-REX®, поставляемые Wilson Wolf Manufacturing, такие как луночный планшет G-REX6, луночный планшет G-REX24 и сосуд G-REX10.

В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани помещают на синтетический каркас. В контексте данного документа термины «синтетический каркас», «каркас» и «сетка» используются взаимозаменяемо и относятся к ненативной трехмерной структуре, подходящей для поддержки роста клеток. Образец негемопозитической ткани может быть либо помещен на синтетический каркас, либо прикреплен к нему, чтобы облегчить выход лимфоцитов из эксплантата на каркас. Синтетические каркасы могут быть изготовлены из природных и/или синтетических материалов, таких как полимеры (например, природные или синтетические полимеры, такие как поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (например, трикальцийфосфат, алюминат кальция, кальций гидроксипатит) или металлы (например, тантал, титан, платина и металлы той же группы элементов, что и

платина, ниобий, гафний, вольфрам и комбинации их сплавов). В одном варианте осуществления настоящего изобретения синтетический каркас имеет танталовое покрытие. 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, IL-4, IL-21, IL-1 β и их комбинации, такие как IL-2, IL-15, IL-4, IL-21 и их комбинации) могут быть нанесены на поверхность каркаса, инкапсулированы в материал каркаса или добавлены в среду для улучшения адгезии, миграции, выживаемости или пролиферации клеток в соответствии со способами, известными в данной области техники. Этот и другие способы могут быть использованы для выделения лимфоцитов из ряда других типов негемопозитических тканей, например, кожи, кишечника, предстательной железы и молочной железы.

В одном варианте осуществления образец негемопозитической ткани помещают на синтетический каркас внутри сосуда, используемого для выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани. В другом варианте осуществления синтетический каркас сконфигурирован для облегчения выхода лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани на дно сосуда. Такой вариант осуществления имеет преимущество, которое заключается в возможности выделения и/или отделения лимфоцитов (например, $\gamma\delta$ Т-клеток, $\alpha\beta$ Т-клеток и/или НК-клеток) из образца негемопозитической ткани и/или стромальных клеток (например, фибробластов и/или эпителиальных клеток). Кроме того, такие варианты осуществления позволяют собирать лимфоциты (например, $\gamma\delta$ Т-клетки, $\alpha\beta$ Т-клетки и/или НК-клетки) из образца негемопозитической ткани на дно сосуда для культивирования. В конкретном варианте осуществления синтетический каркас сконфигурирован для облегчения выхода $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани. В дополнительном варианте осуществления синтетический каркас сконфигурирован для облегчения выхода лимфоцитов, таких как $\alpha\beta$ Т-клетки и/или НК-клетки, из образца негемопозитической ткани.

Таким образом, в одном из аспектов способов, определенных в данном документе, синтетический каркас сконфигурирован для облегчения выхода лимфоцитов из образца негемопозитической ткани на дно сосуда для культивирования. В дополнительном аспекте способов, определенных в данном документе, синтетический каркас сконфигурирован для облегчения выхода $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани на дно сосуда.

Способы по настоящему изобретению обеспечивают более высокий общий выход клеток, чем описано ранее. В одном варианте осуществления общее количество выделенных клеток составляет по меньшей мере 10^6 клеток/см², по меньшей мере 2×10^6 клеток/см², по меньшей мере 5×10^6 клеток/см², по меньшей мере 10×10^6 клеток/см², по меньшей мере 20×10^6 клеток/см², по меньшей мере 30×10^6 клеток/см², по меньшей мере 40×10^6 клеток/см², по меньшей мере 50×10^6 клеток/см², по меньшей мере 60×10^6 клеток/см², по меньшей мере 70×10^6 клеток/см², по меньшей мере 80×10^6 клеток/см², по меньшей мере 90×10^6 клеток/см², по меньшей мере 100×10^6 клеток/см², по меньшей мере

150×10⁶ клеток/см², по меньшей мере 200×10⁶ клеток/см² образца ткани. В конкретном варианте осуществления общее количество выделенных клеток составляет по меньшей мере 50×10⁶ клеток/см². В еще одном варианте осуществления общее количество выделенных клеток составляет по меньшей мере 100×10⁶ клеток/см².

γδ Т-клетки, которые преобладают в крови, представляют собой в основном Vδ2 Т-клетки, в то время как γδ Т-клетки, которые доминируют в негемопоэтических тканях, представляют собой в основном Vδ1 Т-клетки, так что Vδ1 Т-клетки содержат около 70-80% популяции γδ Т-клеток, не присущих гемопоэтическим тканям. Однако некоторые Vδ2 Т-клетки также обнаруживаются в негемопоэтических тканях, например, в кишечнике, где они могут содержать около 10-20% γδ Т-клеток. Некоторые γδ Т-клетки, присущие негемопоэтическим тканям, не экспрессируют ни Vδ1, ни Vδ2 TCR, и называются в данном документе двойными отрицательными (DN) γδ Т-клетками. Эти DN γδ Т-клетки, вероятно, в основном экспрессируют Vδ3 с меньшинством Т-клеток, экспрессирующих Vδ5. Таким образом, γδ Т-клетки, которые обычно присущи негемопоэтическим тканям и которые выделены с помощью способа по данному изобретению, предпочтительно не являются Vδ2 Т-клетками, т.е. Т-клетки Vδ1 с включением меньшего количества DN γδ Т-клеток.

Таким образом, в одном предпочтительном варианте осуществления γδ Т-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в данном документе, содержат популяцию Vδ1 Т-клеток. В одном варианте осуществления γδ-Т-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в данном документе, включают популяцию DN γδ-Т-клеток. В одном варианте осуществления γδ Т-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в данном документе, содержат популяцию Vδ3 Т-клеток. В одном варианте осуществления γδ Т-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в данном документе, включают популяцию Vδ5 Т-клеток.

γδ Т-клетки также можно определить по типу γ-цепи, которую они экспрессируют. В дополнительном варианте осуществления γδ Т-клетки, выделенные с помощью способов, определенных в данном документе, содержат популяцию Vγ4 Т-клеток. Чаще всего Vγ4 Т-клетки получают из образцов тканей кишечника.

Способы выделения обеспечивают выделенную популяцию γδ Т-клеток, количество которых больше, чем в эталонной популяции (например, в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 30 раз, по меньшей мере 35 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 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз).

В некоторых вариантах осуществления популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных в соответствии со способами по изобретению, имеет низкую долю клеток, экспрессирующих NKG2A. Например, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту NKG2A⁺ клеток менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. Альтернативно, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту NKG2A⁺ клеток около 40%, около 30%, около 20%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1%. В определенных вариантах осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту NKG2A⁺ клеток менее 10%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту NKG2A⁺ клеток около 8%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки по существу не экспрессируют NKG2A.

В некоторых вариантах осуществления популяция V δ 1 Т-клеток, выделенных в соответствии со способами по изобретению, имеет низкую долю клеток, экспрессирующих NKG2A. Например, выделенная популяция V δ 1 Т-клеток может иметь частоту NKG2A⁺ клеток менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. Альтернативно, выделенная популяция V δ 1 Т-клеток может иметь частоту NKG2A⁺ клеток около 40%, около 30%, около 20%, около 10%, около 9%, около 8%, около 7%, около 6%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2% или около 1%. В определенных вариантах осуществления выделенная популяция V δ 1 Т-клеток имеет частоту NKG2A⁺ клеток менее 10%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенная популяция V δ 1 клеток имеет частоту NKG2A⁺ клеток около 9%. В другом варианте осуществления выделенная популяция V δ 1 клеток имеет частоту NKG2A⁺ клеток около 7%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенные V δ 1 клетки по существу не экспрессируют NKG2A. В одном варианте менее 10% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKG2A.

В некоторых вариантах осуществления популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных в соответствии со способами по изобретению, имеет низкую долю клеток, экспрессирующих CD45RA. CD45RA является маркером, связанным с терминальной дифференцировкой, поэтому желательно снизить экспрессию этого маркера в популяции изолированных клеток. Например, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту CD45RA⁺ клеток менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40% или менее 30%. Альтернативно, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту CD45RA⁺ клеток около 50%, около 40%, около 30%, около 20% или около 10%. В определенных вариантах осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту CD45RA⁺ клеток менее 30%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту CD45RA⁺ клеток около 10%.

В некоторых вариантах осуществления популяция V δ 1 Т-клеток, выделенных в соответствии со способами по изобретению, имеет низкую долю клеток, экспрессирующих CD45RA. Например, выделенная популяция V δ 1 Т-клеток может иметь частоту клеток CD45RA⁺ менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40% или

менее 30%. Альтернативно, выделенная популяция V δ 1 Т-клеток может иметь частоту клеток CD45RA⁺ около 50%, около 40%, около 30%, около 20% или около 10%. В определенных вариантах осуществления выделенная популяция V δ 1 Т-клеток имеет частоту CD45RA⁺ клеток менее 30%. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенная популяция V δ 1 клеток имеет частоту CD45RA⁺ клеток около 10%. В одном варианте осуществления менее 80% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD45RA, например, менее 30% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD45RA.

При выделении из негемопозитической ткани (например, кожи) $\gamma\delta$ Т-клетки, как правило, будут частью большей популяции лимфоцитов, содержащей, например, $\alpha\beta$ Т-клетки, В-клетки и натуральные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления 1-10% выделенной популяции лимфоцитов составляют $\gamma\delta$ Т-клетки (например, 1-10% выделенной популяции лимфоцитов кожи составляют $\gamma\delta$ -Т-клетки). В большинстве случаев популяция $\gamma\delta$ Т-клеток (например, популяция $\gamma\delta$ Т-клеток кожи) будет включать большую популяцию V δ 1 Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления 1-10% выделенной популяции лимфоцитов (например, лимфоцитов кожи) представляют собой Т-клетки V δ 1 (например, Т-клетки V δ 1 могут составлять более 50%, более 60%, более 70%, более 80% или более 90% выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток). В некоторых случаях менее 10% выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток представляют собой Т-клетки V δ 2 (например, менее 10% выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток кожи составляют V δ 2 Т-клетки).

Не-V δ 1 Т-клетки, или не-DN Т-клетки, такие как V δ 2 Т-клетки, $\alpha\beta$ Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, могут быть удалены из выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, до, во время или после стадии экспансии).

Выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки (например, $\gamma\delta$ Т-клетки кожи, например, V δ 1 Т-клетки кожи) имеют фенотип, отличный от фенотипа соответствующих клеток гемопоэтической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клетки крови и/или V δ 2 Т-клетки крови). Например, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может экспрессировать более высокий уровень CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103, чем эталонная популяция, например, активированная TCR популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, или соответствующая популяция клеток гемопоэтической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клетки крови и/или V δ 2 Т-клетки крови). В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток включает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше CCR3⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше CCR4⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше CCR7⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше CCR8⁺ клеток; и/или по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше CD103⁺ 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

CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103.

Выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток негемопоэтической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клетки кожи и/или V δ 1 Т-клетки кожи) также может быть охарактеризована по функции. Функциональные анализы, известные в данной области техники, могут быть выполнены для определения функциональных различий между любыми клетками негемопоэтической ткани согласно изобретению (например, выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток, V δ 1 Т-клетками кожи или увеличенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток, и/или V δ 1 Т-клетками кожи) и эталонной клеткой (например, TCR-активированной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих гемопоэтической ткани, или соответствующей популяцией клеток гемопоэтической ткани, например, $\gamma\delta$ Т-клетками крови и/или V δ 2 Т-клетками крови). Такие анализы могут включать анализы пролиферации, анализы цитотоксичности, анализы связывания, анализы определения персистенции и/или локализации и т. д.

Таким образом, в одном аспекте изобретения способы выделения популяции лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, как определено в данном документе, дают популяцию, имеющую поверхностный фенотип, соответствующий популяции неистощенных лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток.

Также было показано, что способы по изобретению улучшают выделение других лимфоцитов, таких как TCR-отрицательные клетки. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения лимфоцитов из образца негемопоэтической ткани, включающий следующие стадии:

(i) культивирование образца негемопоэтической ткани в среде, содержащей заменитель сыворотки, человеческую плазму и/или сыворотку АВ человека; и

(ii) сбор популяции лимфоцитов, культивируемых из образца негемопоэтической ткани. Подходящая среда содержит заменитель сыворотки.

Как показано в примерах, представленных в данном документе, источник белка может оказывать влияние на количество TCR-отрицательных клеток, выделенных из образца негемопоэтической ткани. Таким образом, в одном варианте осуществления выделенная популяция лимфоцитов содержит популяцию TCR-отрицательных клеток. В данной области техники известно, что популяции TCR-отрицательных клеток часто содержат большое количество NK-клеток. Выделенная популяция TCR-отрицательных клеток может содержать NK-клетки. В одном варианте осуществления по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60%, 70% или 80% выделенной популяции TCR-отрицательных клеток представляют собой NK-клетки.

Способы культивирования, используемые в этом аспекте изобретения, могут иметь другие описанные в данном документе условия. В одном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопоэтической ткани в присутствии IL-2 и IL-15.

В одном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопоэтической ткани в присутствии IL-4, IL-1 β , IL-21 и/или IFN- γ . В другом варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает

культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии IL-4 и/или IL-1 β .

В одном варианте осуществления культивирование проводят в отсутствие IFN- γ . После статистического анализа результатов, полученных в описанном в данном документе эксперименте, оказалось, что количество TCR-отрицательных клеток, полученных во время выделения, может быть увеличено в отсутствие IFN- γ . В одном варианте осуществления культивирование проводят в отсутствие IL-21. В альтернативном варианте осуществления стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопэтической ткани в присутствии IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл, например 18, 19 или 20 нг/мл. В дополнительном варианте осуществления культивирование проводят в присутствии IL-21 в концентрации 18,8 нг/мл.

В одном варианте осуществления способ включает замораживание выделенной популяции лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток. Клетки могут быть заморожены, например, в растворе для замораживания клеток Cryostor10. Многие растворы и параметры замораживания известны в данной области техники и могут быть использованы в этом аспекте изобретения. Замороженные клетки можно хранить, например, при температуре от -80°C до -200°C, необязательно в жидком азоте (парообразная фаза), до тех пор, пока они не потребуются для применения.

В соответствии с одним аспектом изобретения обеспечивается выделенная популяция лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ Т-клетки кожи и/или НК-клетки), полученная любым из способов, определенных в данном документе. В другом варианте осуществления выделенную популяцию лимфоцитов замораживают.

В соответствии с одним аспектом изобретения обеспечивается выделенная популяция лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ Т-клетки кожи и/или НК-клетки), которую можно получить любым из способов, определенных в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная любым из способов, определенных в данном документе. В дополнительном варианте осуществления выделенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток замораживают.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения обеспечивается выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить любым из способов, определенных в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани; и
- (ii) замораживание выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

Предыдущие способы включали замораживание $\gamma\delta$ Т-клеток после экспансии, однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что клетки, замороженные после выделения, обогащаются и размножаются, по меньшей мере, так же, как и свежие эквиваленты. Замораживание после выделения дает время для проведения проверок качества экспансии в малом масштабе на донорах перед началом крупномасштабной

экспансии, которая требует больших затрат ресурсов и большого количества работников. Это также позволяет производить партии клеток от одного донора (т. е. для производства одной партии размноженных клеток с перспективой производства дополнительных партий от того же донора в более поздние сроки по мере необходимости).

В этом аспекте изобретения способ выделения может включать способы, описанные в данном документе, или альтернативные способы выделения, такие как культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21 или их комбинации, такие как IL-2 и IL-15, в частности IL-2, IL-15, необязательно в комбинации с IL-4 и/или IL-21. В одном варианте осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют путем культивирования образца негемопозитической ткани в присутствии IL-2 и IL-15, необязательно в комбинации с IL-1 β , IL-4 и/или IL-21. В соответствии с данным применением IL-21 обнаруживается в концентрациях от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления IL-21 присутствует в концентрации 18,8 нг/мл.

В одном варианте осуществления стадия выделения (i) имеет продолжительность по меньшей мере 14 дней. В других вариантах осуществления стадия выделения (i) имеет продолжительность менее 21 дня. В еще одном варианте осуществления стадия выделения (i) имеет продолжительность от 14 дней до 35 дней, например, около или от 19 дней до 21 дня. Таким образом, в одном варианте осуществления стадия выделения (i) имеет продолжительность около 19 дней, например, 19 дней. В еще одном варианте осуществления стадия выделения (i) имеет продолжительность около 21 дня, например, 21 день.

Клетки можно заморозить в подходящем растворе для замораживания, таком как раствор для замораживания клеток Cryostor10. Многие растворы и параметры для замораживания/криоконсервации известны в данной области техники и будут полезны в этом аспекте изобретения. Подходящие растворы для замораживания могут содержать ДМСО и другие подходящие добавки к средам, такие как человеческий сывороточный альбумин, декстран, декстроза, NaCl, Hespan или PlasmaLyte A. Затем клетки замораживают до температуры от около -80°C до около -200°C, например, от около -80°C до около -135°C.

Криоконсервация может быть осуществлена путем помещения флаконов в контейнер для замораживания и последующего хранения в морозильной камере при температуре -80°C, например, в течение 1-3 дней с последующим переносом в газовую фазу системы хранения с жидким азотом. В альтернативном варианте осуществления выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки замораживают в программируемый криозамораживатель.

Следует понимать, что замороженные клетки подходят для длительного хранения, поэтому выделенные клетки могут оставаться замороженными в течение определенного периода времени перед последующим размораживанием и экспансией. Замороженные клетки можно хранить, например, при температуре от -80°C до -200°C, необязательно в жидком азоте (парообразная фаза), до тех пор, пока они не потребуются для применения.

После криоконсервации клетки можно разморозить (т.е. оттаивать), например, на водяной бане при 37°C. Размороженные клетки впоследствии можно использовать в способе экспансии. Способы экспансии могут включать любой из способов, описанных в данном документе, или способов, описанных в данной области техники, например, см. WO 2017072367 и WO 2018202808.

Таким образом, способ может дополнительно включать размораживание замороженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. Кроме того, способ может включать культивирование размороженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

Таким образом, в соответствии с другим аспектом изобретения предложен способ выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопоетической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопоетической ткани;
- (ii) замораживание выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток;
- (iii) размораживание $\gamma\delta$ Т-клеток; и
- (iv) культивирование размороженных $\gamma\delta$ Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней для получения расширенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

В конкретном варианте осуществления стадия выделения (i) включает культивирование образца негемопоетической ткани в присутствии IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл, например, 18,8 нг/мл, и IL-1 β в течение около 19 дней, например, 19 дней. В еще одном варианте осуществления стадия выделения (i) включает культивирование образца негемопоетической ткани в присутствии IL-1 β и в отсутствие IL-21 в течение около 19 дней, например, 19 дней, или около 21 дня, например, 21 дня. Данные, представленные в данном документе, демонстрируют, что такие условия выделения дают жизнеспособные $\gamma\delta$ Т-клетки после оттаивания на стадии (iii) и способность размножаться во время последующего культивирования для экспансии, т.е. эффективно получать увеличенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток на стадии (iv).

В соответствии с другим аспектом изобретения предложена замороженная выделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью описанного в данном документе способа, (т.е. замороженные $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные на стадии (ii)).

В соответствии с другим аспектом изобретения предложена замороженная выделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, которую можно получить с помощью описанного в данном документе способа, (т.е. замороженные $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные на стадии (ii)).

Способы экспансии

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к способам экспансии присущих негемопоетической ткани лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\alpha\beta$ Т-клеток кожи, NK-клеток, $\gamma\delta$ Т-клеток и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки). Эти способы могут быть осуществлены *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки размножают из популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, которые

были выделены из образца негемопозитической ткани в соответствии со способами, определенными в данном документе. В целом, $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопозитическим тканям, способны спонтанно размножаться после устранения физического контакта со стромальными клетками (например, фибробластами кожи). Определенные в данном документе способы можно использовать для индуцирования такого разделения, что приводит к дерепрессии $\gamma\delta$ Т-клеток для запуска экспансии. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты (например, $\alpha\beta$ Т-клетки и/или НК-клетки кожи, $\alpha\beta$ Т-клетки и/или НК-клетки кишечника) размножают из популяции лимфоцитов, которая была выделена из образца негемопозитической ткани согласно способам, определенным в данном документе.

Используемые в данном документе ссылки на «размноженную» или «увеличенную популяцию лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток» включают популяции клеток, которые являются больше или содержат большее количество клеток, чем неувеличенная популяция. Такие популяции могут быть многочисленными, малочисленными или могут быть смешанной популяцией с увеличением доли или определенного типа клеток в популяции. Следует понимать, что термин «стадия экспансии» относится к процессам, которые приводят к экспансии или увеличению популяции. Таким образом, размноженная или увеличенная популяция может быть больше по количеству или содержать большее количество клеток по сравнению с популяцией, для которой не была проведена стадия экспансии или перед любой стадией экспансии. Кроме того, следует понимать, что любые количества, указанные в данном документе для обозначения экспансии (например, кратное увеличение или кратность экспансии), иллюстрируют увеличение количества или размера популяции клеток или количества клеток и указывают на степень экспансии.

Таким образом, в одном варианте осуществления лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки, выделенные в соответствии со способами по изобретению, размножают. В одном варианте осуществления выделенную популяцию лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток замораживают, а затем оттаивают перед экспансией.

Такая экспансия может включать культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21, необязательно включая IL-4. Альтернативно экспансия может включать культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15 и IL-21, необязательно включая IL-4. Следует понимать, что любую стадию экспансии проводят в течение времени, эффективного для получения увеличенной популяции лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления продолжительность времени, эффективного для получения увеличенной популяции лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток, составляет по меньшей мере 5 дней. Таким образом, в одном варианте осуществления экспансия включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В другом варианте осуществления экспансия 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 количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В еще одном варианте

осуществления экспансия включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15 и IL-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В одном варианте осуществления экспансия 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 количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

В дополнительных вариантах осуществления экспансия включает культивирование лимфоцитов и/или $\gamma\delta$ Т-клеток в течение определенного периода 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 день, по меньшей мере 28 дней или дольше, например, от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или около 21 дня) в количестве, эффективном для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки размножают в культуре в течение от нескольких часов (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18, или 21 часа) до около 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). В одном варианте осуществления лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки размножают в течение периода от 14 до 21 дня. Таким образом, включая период культивирования для выделения (например, от 1 до 40 дней, например, от 14 до 21 дня), стадии выделения и экспансии в некоторых вариантах осуществления могут длиться от 28 до 56 дней или около 41 день.

В дополнительных вариантах осуществления экспансия включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в течение 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 день, по меньшей мере 28 дней или дольше, т.е. от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или около 21 дня. В одном варианте осуществления стадия экспансии включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в течение по меньшей мере 10, 15 или 20 дней для получения увеличенной популяции. В одном варианте осуществления стадия экспансии включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в период от 5 до 25 дней, например, от 14 до 21 дня. В другом варианте осуществления стадия экспансии включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в течение около 20 дней.

В некоторых вариантах осуществления типичное количество IL-2, эффективное для получения увеличенной 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 около 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 выше). В некоторых вариантах осуществления количество IL-2, эффективное для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, составляет около 100 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления типичное количество IL-15, эффективное для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-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). В некоторых вариантах осуществления количество IL-15, эффективное для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, составляет около 10 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления типичное количество IL-21, эффективное для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-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 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 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). В дополнительных вариантах осуществления количество IL-21, как правило, составляет менее 200 нг/мл, например, 188,8 нг/мл. В других вариантах осуществления количество IL-21, как правило, составляет менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл, например, 37,5 нг/мл. В других вариантах осуществления количество IL-21, как правило, составляет 20 нг/мл или менее, например, от 18 до 20 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл, например, 18,8 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-21 в концентрации около 6 нг/мл, например, около 6,25 нг/мл.

В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-4, 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 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). В дополнительных вариантах осуществления способы, определенные в данном документе, включают IL-4, как правило, в концентрации менее 100 нг/мл, например, менее 50 нг/мл, в частности, менее 20 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления способы включают IL-4 в концентрации около 15 нг/мл.

В данном документе также предложена замена или добавление других факторов в культуру для экспансии лимфоцитов, присущих негемопоетической ткани, и/или $\gamma\delta$ Т-клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления 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 β , лизата тромбоцитов человека (HPL) и стромального клеточного фактора-1 (SDF-1), включают в дополнение или вместо любого из IL-2 и IL-15. Такие дополнительные или альтернативные факторы для экспансии лимфоцитов, например, $\alpha\beta$ Т-клеток или NK-клеток, известны в данной области техники. В одном варианте осуществления для экспансии используют такие факторы, которые избирательно способствуют экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток. В другом варианте осуществления для экспансии используют такие факторы, которые избирательно способствуют экспансии лимфоцитов, например, $\alpha\beta$ Т-клеток и/или NK-клеток.

Следует понимать, что количество каждого из вышеуказанных цитокинов, необходимое для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, будет зависеть от концентрации одного или более других цитокинов. Например, если концентрация IL-2 увеличивается или уменьшается, концентрация IL-15 может соответственно уменьшаться или увеличиваться, соответственно. Как отмечалось выше, количество, эффективное для получения увеличенной популяции, относится в данном документе к совокупному эффекту всех факторов на экспансию клеток.

Способы экспансии обеспечивают увеличенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток, количество которых больше, чем в эталонной популяции. В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток больше по количеству, чем выделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток до стадии экспансии (например, в по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 30 раз, по меньшей мере 35 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 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз или более по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток перед стадией экспансии).

В одном варианте осуществления стадия экспансии включает культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками. В другом варианте осуществления стадия экспансии включает культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток в отсутствие значительного контакта с фибробластами.

В дополнительных вариантах осуществления стадия экспансии дополнительно включает культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-4. Следовательно, в одном варианте экспансия включает культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток в

присутствии IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21. Альтернативно экспансия может включать культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-9, IL-15, IL-4 и IL-21.

Следует понимать, что определенные в данном документе способы экспансии также применимы к экспансии других лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ Т-клеток и/или NK-клеток). В таких вариантах осуществления стадия экспансии включает культивирование выделенных лимфоцитов в присутствии соответствующих факторов роста и/или питательных веществ (например, цитокинов и/или хемокинов) для получения увеличенной популяции лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ Т-клеток и/или NK-клеток).

В одном варианте осуществления способы увеличения популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, как определено в данном документе, включают культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток или других лимфоцитов в среде, содержащей сыворотку или плазму. В альтернативных вариантах осуществления способы экспансии популяции $\gamma\delta$ Т-клеток или других лимфоцитов, как определено в данном документе, включают культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в бессывороточной среде. В другом варианте осуществления способы экспансии популяции $\gamma\delta$ Т-клеток или других лимфоцитов, как определено в данном документе, включают культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в среде, содержащей заменитель сыворотки.

в некоторых вариантах осуществления на стадии экспансии не происходит существенной активации пути TCR (например, в культуру не включаются экзогенные активаторы пути TCR). В одном варианте осуществления стадия экспансии включает отсутствие экзогенных агонистов пути TCR. Кроме того, в данном документе предложены способы экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток, выделенных в соответствии со способами, определенными в данном документе, при этом указанные способы экспансии не включают контакт с питающими клетками, опухолевыми клетками и/или антигенпрезентирующими клетками. Таким образом, в дополнительном варианте осуществления способов, определенных в данном документе, экспансия $\gamma\delta$ Т-клеток включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками.

Также предложено средство для получения больших популяций $\gamma\delta$ Т-клеток негемопоетической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 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). В некоторых вариантах осуществления на стадии экспансии, описанной в данном документе, размножает $\gamma\delta$ Т-клетки при малом времени удвоения популяции, которое определяется следующим уравнением:

$$\text{Время Удвоения} = \frac{\text{продолжительность} * \log(2)}{\log(\text{Конечная Концентрация}) - \log(\text{Исходная Концентрация})}$$

Учитывая информацию, представленную в данном документе, квалифицированный специалист поймет, что изобретение обеспечивает способы экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток негемопоетической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и /или DN Т-клетки) при времени удвоения популяции менее 5 дней

(например, менее 4,5 дня, менее 4,0 дней, менее 3,9 дня, менее 3,8 дня, менее 3,7 дня, менее 3,6 дня, менее 3,5 дня, менее 3,4 дня, менее 3,3 дня, менее 3,2 дня, менее 3,1 дня, менее 3,0 дней, менее 2,9 дня, менее 2,8 дня, менее 2,7 дня, менее 2,6 дня, менее 2,5 дня, менее 2,4 дня, менее 2,3 дня, менее 2,2 дня, менее 2,1 дня, менее 2,0 дней, менее 46 часов, менее 42 часов, менее 38 часов, менее 35 часов, менее 32 часов).

В некоторых вариантах осуществления в течение 7 дней культивирования увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток (например, увеличенная популяция V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере 10-кратное количество $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток перед экспансией (например, в по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 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 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 2000 раз, по меньшей мере 3000 раз, по меньшей мере 4000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 6000 раз, по меньшей мере 7000 раз или в по меньшей мере 8000 раз больше числа $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления в течение 14 дней культивирования увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток (например, увеличенная популяция V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере 20-кратное количество $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток перед экспансией (например, в по меньшей мере 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 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 2000 раз, по меньшей мере 3000 раз, по меньшей мере 4000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 6000 раз, по меньшей мере 7000 раз, по меньшей мере 8000 раз, по меньшей мере 9000 раз или в по меньшей мере 10000 раз больше числа $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления в течение 21 дня культивирования увеличенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, увеличенная популяция V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере 50-кратное количество $\gamma\delta$ -Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток перед экспансией (например, в 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 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 2000 раз, по меньшей мере 3000 раз, по меньшей мере 4000 раз, по

меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 6000 раз, по меньшей мере 7000 раз, по меньшей мере 8000 раз, по меньшей мере 9000 раз или в по меньшей мере 10000 раз больше числа $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления в течение 28 дней культивирования увеличенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, увеличенная популяция V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере 100-кратное количество $\gamma\delta$ -Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток перед экспансией (например, в по меньшей мере 110 раз, по меньшей мере 120 раз, по меньшей мере 130 раз, по меньшей мере 140 раз, по меньшей мере 150 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 2000 раз, по меньшей мере 3000 раз, по меньшей мере 4000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 6000 раз, по меньшей мере 7000 раз, по меньшей мере 8000 раз, по меньшей мере 9000 раз, по меньшей мере 10000 раз, по меньшей мере 12000 раз или в по меньшей мере 15000 раз больше числа $\gamma\delta$ Т-клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии).

$\gamma\delta$ Т-клетки негемопоетической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клетки кожи и/или не-V δ 2 Т-клетки, такие как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки), размноженные с помощью способов, представленных в данном документе, могут иметь фенотип, хорошо подходящий для противоопухолевой эффективности. В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток (например, V δ 1 Т-клеток кожи) имеет более высокую среднюю экспрессию CD27, чем эталонная популяция (например, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток до стадии экспансии). В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет среднюю экспрессию CD27, которая по меньшей мере в 2 раза выше, чем в выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, в по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 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 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз, по меньшей мере 20000 раз или более по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток).

Отдельная часть увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клетки кожи и/или не-V δ 2 Т-клетки, такие как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки) может повышать уровень CD27, в то время как другая часть является CD27^{низкий} или CD27^{отрицательный}. В этом случае частота CD27-положительных клеток в увеличенной популяции по

отношению к выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток может быть выше. Например, увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь на по меньшей мере 5% большую частоту CD27-положительных клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% выше частота CD27-положительных клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления количество CD27-положительных клеток в увеличенной популяции по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть увеличено. Например, увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь по меньшей мере в 2 раза больше CD27-положительных клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии. Увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту CD27+ клеток более 10%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80% или более 90%. В качестве альтернативы увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту CD27+ клеток около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80% или около 90%. В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту CD27+ клеток более 50%.

Способы экспансии, предложенные в данном документе, в некоторых вариантах осуществления, позволяют получить увеличенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток негемопоетической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки), имеющих низкую экспрессию TIGIT по сравнению с эталонной популяцией (например, выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до стадии экспансии). В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем эталонная популяция (например, выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток до стадии экспансии). В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет среднюю экспрессию TIGIT, которая на по меньшей мере 10% ниже, чем в выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, на по меньшей мере 20% ниже, по меньшей мере 30% ниже, по меньшей мере 40% ниже, по меньшей мере 50% ниже, по меньшей мере 60% ниже, по меньшей мере 70% ниже, по меньшей мере 80% ниже, по меньшей мере 90% ниже или до 100% ниже, чем в выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток). Увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту TIGIT+ клеток менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. В качестве альтернативы увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь частоту TIGIT+ клеток около 90%, около 80%, около 70%, около 60%, около 50%, около 40%, около 30%, около 20% или около 10%. В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет частоту TIGIT+ клеток менее 80%.

В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток

(например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи или не-V δ 2 Т-клеток, такие как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки) имеет высокое количество или частоту CD27⁺ клеток и низкую частоту TIGIT⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления расширенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет высокую частоту CD27⁺TIGIT⁺ клеток по сравнению с эталонной популяцией (например, по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). Например, увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь на по меньшей мере 5% большую частоту CD27⁺ TIGIT⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% выше частота CD27⁺ TIGIT⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления количество CD27⁺ TIGIT⁺ клеток в увеличенной популяции по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть увеличено. Например, увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь в по меньшей мере 2 раза большее количество CD27⁺ TIGIT⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% выше частоты CD27⁺TIGIT⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии).

В некоторых случаях средняя экспрессия TIGIT в популяции CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток в увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клеток) является низкой по сравнению с эталонной популяцией. В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем эталонная популяция (например, выделенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток до стадии экспансии). В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток имеет среднюю экспрессию TIGIT, которая на по меньшей мере 10% ниже, чем в выделенной популяции CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток (например, на по меньшей мере 20% ниже, по меньшей мере 30% ниже, по меньшей мере 40% ниже, по меньшей мере 50% ниже, по меньшей мере 60% ниже, по меньшей мере 70% ниже, по меньшей мере 80% ниже, по меньшей мере 90% ниже или до 100% ниже, чем в выделенной популяции CD27⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток).

Дополнительно или альтернативно медиана экспрессии CD27 в популяции TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток в увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки) является высокой по сравнению с эталонной популяцией. Например, увеличенная популяция TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь на по меньшей мере 5% большую частоту CD27⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии (например, на по

меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% выше частота CD27⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии). В некоторых вариантах осуществления количество CD27⁺ клеток в увеличенной популяции по сравнению с выделенной популяцией TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток может быть увеличено. Например, увеличенная популяция TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь в по меньшей мере 2 раза большее количество CD27⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% выше частоты CD27⁺ клеток по сравнению с выделенной популяцией TIGIT⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток до экспансии).

Увеличение или уменьшение экспрессии других маркеров можно дополнительно или альтернативно использовать для характеристики одной или более увеличенных популяций $\gamma\delta$ Т-клеток негемопозитической ткани (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи, и/или V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки), включая CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, лиганд Fas, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1, и CD64. В некоторых случаях увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, таких как V δ 1 Т-клетки и/или DN Т-клетки) имеет более высокую среднюю экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, лиганда Fas, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток, например, до экспансии. Дополнительно или альтернативно увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток может иметь большую частоту клеток, экспрессирующих один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, лиганда Fas, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток имеет более низкую среднюю экспрессию 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. Увеличенная популяция может также иметь более низкую частоту 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.

Доступны многочисленные базовые культуральные среды, подходящие для применения при культивировании и/или пролиферации $\gamma\delta$ Т-клеток, в частности среда,

такая как AIM-V, среда Iscoves и RPMI-1640 (Life Technologies). Среда может быть дополнена другими факторами среды, как определено в данном документе, такими как сыворотка, белки сыворотки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, в некоторых вариантах осуществления среда RPMI-1640 содержит 2 мМ глутамина, 10% FBS, 10 мМ HEPES, pH 7,2, 1% пенициллин/стрептомицина, пируват натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 мкМ Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser, 1X MEM заменимых аминокислот (Life Technologies)) и 10 мкл/л β -меркаптоэтанола. В альтернативном варианте осуществления среда AIM-V может быть дополнена заместителем сыворотки для иммунных клеток CTS и амфотерицином В. В определенных вариантах осуществления, как определено в данном документе, среда может быть дополнительно дополнена IL-2 и IL-15. Как правило, клетки культивируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в подходящей культуральной среде во время выделения и/или экспансии.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения и экспансии лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) выделение популяции лимфоцитов из образца негемопозитической ткани в соответствии с определенным в данном документе способом; и
- (ii) дальнейшее культивирование указанной популяции лимфоцитов (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения увеличенной популяции лимфоцитов.

В одном варианте осуществления лимфоциты содержат $\alpha\beta$ Т-клетки. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения и экспансии $\alpha\beta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

- (i) выделение популяции $\alpha\beta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и
- (ii) дальнейшее культивирование указанной популяции $\alpha\beta$ Т-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения увеличенной популяции $\alpha\beta$ Т-клеток.

Культивирование на стадии (ii) может осуществляться путем селективной экспансии, например, путем выбора условий культивирования, при которых $\alpha\beta$ Т-клетки предпочтительно размножают по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в выделенной популяции на стадии (i). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и за культивированием на стадии (ii) может следовать деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от $\alpha\beta$ Т-клеток). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и перед культивированием на стадии (ii) осуществляют деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от $\alpha\beta$ Т-клеток). Следует отметить, что целью этих вариантов осуществления является увеличение общего количества $\alpha\beta$ Т-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

В одном варианте осуществления лимфоциты содержат NK-клетки. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения и

экспансии НК-клеток из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

(i) выделение популяции НК-клеток из образца негемопэтической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и

(ii) дальнейшее культивирование указанной популяции НК-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения увеличенной популяции НК-клеток.

Культивирование на стадии (ii) может осуществляться путем селективной экспансии, например, путем выбора условий культивирования, при которых НК-клетки предпочтительно размножают по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в выделенной популяции на стадии (i). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и за культивированием на стадии (ii) может следовать деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от НК-клеток). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и перед культивированием на стадии (ii) осуществляют деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от НК-клеток). Следует отметить, что целью этих вариантов осуществления является увеличение общего количества НК-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани, включающий следующие стадии:

(i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопэтической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и

(ii) дальнейшее культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток (например, в течение по меньшей мере 5 дней) для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

Культивирование на стадии (ii) может осуществляться путем селективной экспансии, например, путем выбора условий культивирования, при которых $\gamma\delta$ Т-клетки предпочтительно размножают по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в выделенной популяции на стадии (i). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и за культивированием на стадии (ii) может следовать деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от $\gamma\delta$ Т-клеток). Альтернативно, условия экспансии не являются селективными, и перед культивированием на стадии (ii) осуществляют деплетирование нецелевых клеток (например, клеток, отличных от $\gamma\delta$ Т-клеток). Следует отметить, что целью этих вариантов осуществления является увеличение общего количества $\gamma\delta$ Т-клеток при одновременном увеличении их доли в популяции.

В одном варианте осуществления выделенную популяцию лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток замораживают, а затем оттаивают перед стадией (ii). Неожиданно было обнаружено, что замороженные популяции выделенных клеток обогащаются и количественно увеличиваются, по меньшей мере, так же, как и свежие эквиваленты. В частности, представленные в данном документе данные демонстрируют, что получают выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки с хорошей жизнеспособностью после оттаивания и способностью хорошо размножаться во время последующего культивирования для экспансии, т.е.

эффективно получать увеличенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток на стадии (ii), если стадия выделения (i) включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл, например, 18, 19 или 20 нг/мл, например 18,8 нг/мл, и IL-1 β в течение около 19 дней, например, 19 дней, или, альтернативно, в присутствии IL-1 β и в отсутствие IL-21 в течение около 19 дней, например, 19 дней, или около 21 дня, например, 21 дня.

В одном варианте осуществления лимфоциты содержат $\gamma\delta$ Т-клетки. Таким образом, в соответствии с еще одним аспектом изобретения предложен способ выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

(i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; 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 количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления этого аспекта изобретения культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток дополнительно включает присутствие IL-4. Таким образом, в еще одном аспекте изобретения предложен способ выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

(i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани в соответствии с описанным в данном документе способом; и

(ii) культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии:

(a) IL-2 или IL-9;

(b) IL15; и

(c) IL-21; и

(d) IL-4

в течение по меньшей мере 5 дней в количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложена увеличенная популяция выделенных лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ Т-клеток кожи и/или НК-клеток), полученных любым из способов, определенных в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложена увеличенная популяция выделенных клеток лимфоцитов, которую можно получить любым из определенных в данном документе способов.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложена увеличенная популяция выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных любым из способов, определенных в данном документе.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения предложена увеличенная популяция выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить любым из способов, определенных в данном документе.

Применение клеток

Лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способом по изобретению, можно использовать в качестве лекарственного препарата, например, для адоптивной Т-клеточной терапии. В этом случае лимфоциты и/или $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способом по изобретению, переносят пациенту. Терапия может быть аутологичной, то есть $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть перенесены обратно тому же пациенту, от которого они были получены, или терапия может быть аллогенной, то есть $\gamma\delta$ Т-клетки от одного человека могут быть перенесены другому пациенту. В случаях, связанных с аллогенным переносом, $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть по существу свободны от $\alpha\beta$ Т-клеток. Например, $\alpha\beta$ Т-клетки могут быть деплетированы из популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, например, после экспансии, с использованием любых подходящих средств, известных в данной области техники (например, путем негативной селекции, например, с использованием магнитных частиц). Способ лечения может включать; предоставление образца негемопоэтической ткани, полученной от донора; выделение $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопоэтической ткани, как описано в данном документе; культивирование выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток для получения увеличенной популяции; и введение увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток реципиенту.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой пациента-человека со злокачественным новообразованием (например, пациента-человека со злокачественным новообразованием, у которого лечат солидную опухоль) или пациента, инфицированного вирусом (например, пациента, инфицированного ЦМВ или ВИЧ). В некоторых случаях пациент имеет и/или у него лечат солидную опухоль.

Поскольку они обычно находятся в негемопоэтической тканях, тканевые V δ 1 Т-клетки и DN $\gamma\delta$ Т-клетки также с большей вероятностью будут размещаться и удерживаться в опухолевой массе, чем их системные аналоги, присущие крови, и адоптивный перенос этих клеток, вероятно, будет быть более эффективными в отношении солидных опухолей и потенциально других иммунопатологий, связанных с негемопоэтическими тканями.

Поскольку $\gamma\delta$ Т-клетки не рестриктированы по МНС, они не распознают хозяина, в которого они перенесены, как чужеродного, что означает, что они с меньшей вероятностью вызывают реакцию «трансплантат против хозяина». Это означает, что их можно использовать «с полки» и передавать любому реципиенту, например, для аллогенной адоптивной Т-клеточной терапии.

$\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопоэтической ткани, полученные с помощью способов по изобретению, экспрессируют NKG2D и отвечают на лиганд NKG2D (например, MICA), который тесно связан со злокачественным новообразованием. Они также экспрессируют цитотоксический профиль в отсутствие какой-либо активации и, следовательно, вероятно, эффективны для уничтожения опухолевых клеток. Например, $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие

негемопэтической ткани, полученные, как описано в данном документе, могут экспрессировать один или более, или предпочтительно все из IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, гранулина, гранзима А и В, и перфорина в отсутствие какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

Существуют неопровержимые доказательства практичности и пригодности для клинического применения $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопэтической ткани, полученных с помощью способа по данному изобретению, в качестве «пригодного для использования» иммунотерапевтического препарата. Эти клетки имеют врожденную способность к киллингу, они не рестриктированы по МНС и демонстрируют более эффективное прикрепление к опухоли и/или удержание в ней, чем другие Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения индивида с опухолью в негемопэтической ткани может включать: обеспечение образца указанной негемопэтической ткани, полученной от донора, культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток из образца, как описано выше, для получения увеличенной популяции, и; введение увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток индивиду с опухолью.

Фармацевтические композиции могут включать размноженные $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопэтической ткани, как описано в данном документе, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами. Такие композиции могут содержать буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные средства, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, например, ДМСО. Композиции могут быть составлены, например, для внутривенного введения.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, обнаруживаемые уровни контаминанта, например, эндотоксина или микоплазмы.

В некоторых случаях терапевтически эффективное количество размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, полученных любым из способов, описанных выше, можно вводить субъекту в терапевтически эффективном количестве (например, для лечения злокачественного новообразования, например, для лечения солидной опухоли). В некоторых случаях терапевтически эффективное количество размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) меньше 10×10^{12} клеток на дозу (например, менее 9×10^{12} клеток на дозу, менее 8×10^{12} клеток на дозу, менее 7×10^{12} клеток на дозу, менее 6×10^{12} клеток на дозу, менее 5×10^{12} клеток на дозу, менее 4×10^{12} клеток на дозу, менее 3×10^{12} клеток на дозу, менее 2×10^{12} клеток на дозу, менее 1×10^{12} клеток на дозу, менее 9×10^{11} клеток на дозу, менее 8×10^{11} клеток на дозу, менее 7×10^{11} клеток на дозу, менее 6×10^{11} клеток на дозу, менее 5×10^{11} клеток на

дозу, менее 4×10^{11} клеток на дозу, менее 3×10^{11} клеток на дозу, менее 2×10^{11} клеток на дозу, менее 1×10^{11} клеток на дозу, менее 9×10^{10} клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее 5×10^{10} клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^{10}$ клеток на дозу, менее 1×10^{10} клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее 5×10^9 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^9$ клеток на дозу, менее 1×10^9 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее 5×10^8 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^8$ клеток на дозу, менее 1×10^8 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее 5×10^7 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^7$ клеток на дозу, менее 1×10^7 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее 5×10^6 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^6$ клеток на дозу, менее 1×10^6 клеток на дозу, менее $7,5 \times 10^5$ клеток на дозу, менее 5×10^5 клеток на дозу, менее $2,5 \times 10^5$ клеток на дозу или менее 1×10^5 клеток на дозу).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет менее 10×10^{12} клеток в течение курса лечения (например, менее 9×10^{12} клеток, менее 8×10^{12} клеток, менее 7×10^{12} клеток, менее 6×10^{12} клеток, менее 5×10^{12} клеток, менее 4×10^{12} клеток, менее 3×10^{12} клеток, менее 2×10^{12} клеток, менее 1×10^{12} клеток, менее 9×10^{11} клеток, менее 8×10^{11} клеток, менее 7×10^{11} клеток, менее 6×10^{11} клеток, менее 5×10^{11} клеток, менее 4×10^{11} клеток, менее 3×10^{11} клеток, менее 2×10^{11} клеток, менее 1×10^{11} клеток, менее 9×10^{10} клеток, менее $7,5 \times 10^{10}$ клеток, менее 5×10^{10} клеток, менее $2,5 \times 10^{10}$ клеток, менее 1×10^{10} клеток, менее $7,5 \times 10^9$ клеток, менее 5×10^9 клеток, менее $2,5 \times 10^9$ клеток, менее 1×10^9 клеток, менее $7,5 \times 10^8$ клеток, менее 5×10^8 клеток, менее $2,5 \times 10^8$ клеток, менее 1×10^8 клеток, менее $7,5 \times 10^7$ клеток, менее 5×10^7 клеток, менее $2,5 \times 10^7$ клеток, менее 1×10^7 клеток, менее $7,5 \times 10^6$ клеток, менее 5×10^6 клеток, менее $2,5 \times 10^6$ клеток, менее 1×10^6 клеток, менее $7,5 \times 10^5$ клеток, менее 5×10^5 клеток, менее $2,5 \times 10^5$ клеток или менее 1×10^5 в течение курса лечения).

В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих гемопоэтической ткани, как описано в данном документе, составляет приблизительно 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопоэтическим тканям, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере около 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопоэтической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет до около 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопоэтической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет около $1,1 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^7$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих

негемопозитической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) включает по меньшей мере около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) составляет до около 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , или 5×10^9 клеток.

В одном варианте осуществления субъекту вводят от 10^4 до 10^6 размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, (например, $\gamma\delta$ Т-клеток кожи и/или не-V δ 2 Т-клеток, например, V δ 1 Т-клеток и/или DN Т-клеток) на кг массы тела субъекта. В одном варианте осуществления субъект получает начальное введение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, (например, начальное введение от 10^4 до 10^6 $\gamma\delta$ Т-клеток на кг массы тела субъекта, например, от 10^4 до 10^5 $\gamma\delta$ Т-клеток на кг массы тела субъекта) и одно или более (например, 2, 3, 4 или 5) последовательных введений размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, (например, одно или более последующих введений от 10^4 до 10^6 размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, на кг массы тела субъекта, например, от 10^4 до 10^5 размноженных $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих негемопозитической ткани, на кг массы тела субъекта). В одном варианте осуществления одно или большее количество последующих введений осуществляют менее чем за 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения, т.е. менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъект получает в общей сложности около 10^6 $\gamma\delta$ Т-клеток на кг массы тела субъекта в течение по меньшей мере трех введений популяции $\gamma\delta$ Т-клеток, например, субъект получает начальную дозу 1×10^5 $\gamma\delta$ Т-клеток, второе введение 3×10^5 $\gamma\delta$ Т-клеток и третье введение 6×10^5 $\gamma\delta$ Т-клеток, и, например, каждое введение вводят менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

$\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопозитической ткани, полученные с помощью способа по изобретению, также могут быть подвергнуты генной инженерии для улучшения терапевтических свойств, таких как CAR Т-терапия. Это включает в себя получение сконструированных рецепторов Т-клеток (TCR) для перепрограммирования Т-клеток с новой специфичностью, например, специфичностью моноклонального антитела. Сконструированный TCR может сделать Т-клетки специфичными к злокачественным клеткам и, следовательно, полезными для иммунотерапии рака. Например, Т-клетки могут распознавать раковые клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, который не экспрессируется нормальными соматическими клетками из ткани субъекта. Таким образом, CAR-модифицированные Т-

клетки можно использовать для адоптивной Т-клеточной терапии, например, пациентов со злокачественным новообразованием.

Описано применение $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих крови, для CAR. Тем не менее, $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие негемопоэтической ткани, полученные с помощью способа по изобретению, вероятно, являются особенно хорошими носителями для подходов на основе CAR-T, поскольку они могут быть трансдуцированы химерными антигенспецифическими TCR, сохраняя при этом свою врожденную способность распознавать трансформированные клетки, и, вероятно, будут иметь лучшие возможности проникновения и удержания в опухоли, чем $\gamma\delta$ Т-клетки, присущие крови, или обычные, системные $\alpha\beta$ Т-клетки. Кроме того, отсутствие у них МНС-зависимой презентации антигена снижает вероятность реакции «трансплантат против хозяина» и позволяет им нацеливаться на опухоли, экспрессирующие низкие уровни МНС. Аналогичным образом, их независимость от обычной костимуляции, например, посредством вовлечения CD28, усиливает нацеливание на опухоли, экспрессирующие низкие уровни лигандов для костимулирующих рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить один или большее количество дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунотерапевтического агента, цитотоксического агента, агента, подавляющего рост, агента лучевой терапии, антиангиогенного агента или комбинации двух или большего количества из них. 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 на мишень в организме субъекта (например, на собственную иммунную систему субъекта) и/или на перенесенные $\gamma\delta$ Т-клетки.

Введение композиций можно осуществлять любым удобным способом. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутривенно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной инъекции или внутривентриально, например, путем внутривенной или подкожной инъекции. Композиции $\gamma\delta$ Т-клеток, присущих гемопоэтической ткани, можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или место инфекции.

Следует понимать, что все варианты осуществления, описанные в данном документе, могут быть применены ко всем аспектам настоящего изобретения.

В контексте данного документа термин «около» включает до 10% включительно больше и до 10% включительно меньше указанного значения, предпочтительно до 5% включительно больше и до 5% включительно меньше указанного значения, особенно указанного значения. Термин «между» включает в себя значения в указанных границах.

Некоторые аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы в качестве примера и со ссылкой на графические материалы,

описанные выше.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Способы и материалы

Если не указано иное, для получения результатов последующих примеров использовали следующие способы.

Материалы

Поставщики материалов, используемых в условиях эксперимента, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Материалы, используемые в исследовании

Реактив	Поставщик
AIM-V	Fisher
Заменитель сыворотки для иммунных клеток CTS	Life Technologies
сывороточный альбумин человека	Sigma-Aldrich
Человеческая плазма	Merck Chemicals Ltd.
IL-2 человека, высшей степени чистоты	Miltenyi
IL-15 человека, высшей степени чистоты	Miltenyi
IL-4 человека, высшей степени чистоты	Miltenyi
IL-21 человека	Peprtech
IFN- γ человека	Peprtech
IL-1 β человека	Peprtech

Моделирование дизайна эксперимента

Дизайн экспериментов (DoE) был создан с использованием программного обеспечения JMP 15.0. Индивидуальный дизайн Министерства энергетики был применен для создания эксперимента по анализу влияния источника белка, IL-1 β , IFN- γ , IL-21 и IL-4 на определенные показатели, такие как обогащение $\gamma\delta$ Т-клеток. Источник белка рассматривали как категориальную переменную, а IL-1 β , IFN- γ , IL-21 и IL-4 рассматривали как непрерывные переменные. Кроме того, использовались сценарии JMP, чтобы не включать в экспериментальные условия только IL-4.

Для определения линейных взаимодействий и взаимодействий 2-й степени (например, IL-21* IL-1 β) применяли факторный дизайн со 2-й степенью. Для экспериментальных исследований был выбран дизайн из 21 условия.

После сбора экспериментальных данных проводили удаление выбросов путем расчета студентизированных остатков на основе % $\gamma\delta$ Т-клеток в качестве показателя ответа. Любые строки, дающие студентизированный остаток > 4 или < -4 для % $\gamma\delta$ Т-клеток, были исключены из анализа. Всего было исключено 7 строк из 84.

После удаления выбросов стандартная аппроксимация методом наименьших

квадратов применялась к заданному ответу на основе значения для данного ответа от каждого донора. Чтобы учесть вариации доноров, идентификатор донора был добавлен в качестве отдельной переменной в модель подбора методом наименьших квадратов. Р-значения источника белка и взаимодействия цитокинов, относящиеся к выбранному результату, такие как % $\gamma\delta$ Т-клеток или % TIGIT+ $\gamma\delta$ Т-клеток, исключались поэтапным методом до тех пор, пока не оставались только взаимодействия с $p < 0,05$.

Схема выделения и сбор клеток

Перед доставкой образца готовят соответствующую среду и автоклавируют углеродные матрицы («сетки») размером 20 мм x 1,5 мм (Cytomatrix Pty Ltd, Австралия или Ultramet, США). Затем сетки промывают в фосфатно-солевом буфере (PBS) и погружают в PBS до применения.

Получение органотипической культуры кожи

Образцы кожи получают путем удаления подкожного жира с помощью щипцов, ножниц и скальпеля. Беря один кусок ткани за раз, с помощью 3-миллиметрового дерматома делают нескольких проб. На каждую сетку помещают по три пробы ткани.

Одна сетка помещается на лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняют 5 мл соответствующей базовой среды и 5 мл 2X соответствующей среды в зависимости от условий (в результате получается 10 мл 1X соответствующей среды в зависимости от условий). В каждую лунку добавляют 100 мкл амфотерицина В (Life Technologies) (в результате получается 1% амфотерицина В). Планшеты инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение 21 дня. Культуру подпитывают на 7-й и 14-й день, осторожно добавляя в каждую лунку 10 мл 2X соответствующих сред.

Выделение собранных клеток

Матрицы удаляют. Клетки ресуспендируют в каждой лунке с помощью пипетки и переносят в центрифужную пробирку. Лунки промывают PBS, а промывную жидкость также переносят в центрифужную пробирку. Затем выделенные клетки могут быть подвергнуты последующему анализу, т.е. подсчету клеток или анализу методом проточной цитометрии.

Замораживание выделенных клеток

После анализа выделенных клеток суспензии клеток центрифугируют. Супернатант удаляют, а клеточный осадок ресуспендируют в растворе для замораживания клеток Cryostor10 (Sigma Aldrich) до конечной концентрации 100×10^6 клеток на мл. Затем клеточную суспензию переносят во флаконы для замораживания и помещают в охлаждающую ячейку или морозильный аппарат Mr Frosty (Thermo Scientific) и помещают в морозильную камеру при температуре -80°C на ночь. На следующий день клетки переносят в хранилище с жидким азотом (парообразная фаза).

Проточная цитометрия

Проточную цитометрию проводили с использованием следующих конъюгатов антитело-флуорохром:

а) Панель партии для выпуска: CD45-FITC, CD25-PE, PAN $\alpha\beta$ -PerCP Vio700,

NKG2D-PEVio770, Vδ1-Vioblue, PANγδ-APC.

б) Функциональная панель: CD45RA-FITC, TIGIT-PE, PANαβ-PerCP Vio700, NKG2A-PEVio770, Vδ1-Vioblue, PD1-BV510, PANγδ-APC.

Коммерческие антитела были приобретены у Biolegend или Miltenyi. Краситель для оценки жизнеспособности клеток (eFluor 780) был получен от Thermo Fischer Scientific. Анализ данных проточной цитометрии был выполнен на FLOWJO (версия 10.6.2).

Определение общего количества клеток

Общее количество клеток рассчитывали с использованием автоматического счетчика Nucleocounter NC-250 (Chemometec, Копенгаген, Дания) и инструкций производителя.

ПРИМЕР 2. Эксперимент по оптимизации выделения

Оптимизация протокола выделения γδ Т-клеток из образцов негемопозитической ткани была исследована для повышения выхода γδ Т-клеток и потенциального улучшения качества Vδ1 Т-клеток при выделении. Улучшение исходного материала поможет повысить выход и качество на последующих стадиях экспансии.

В рамках дизайна эксперимента (DoE) исследовали влияние различных источников белка и цитокинов на культуру для выделения из кожи. Для того чтобы дизайн был осуществимым, тип среды, концентрация IL-15 и IL-2 были неизменными. Были исследованы различные комбинации IL-21, IFN-γ, IL-1β. Также исследовали добавление IL-4, но только при наличии IL-21, IFN-γ или IL-1β.

Все клетки выделяли в средах с добавками среды AIM-V либо с 5% заменителя сыворотки (SR), либо с 2,5% аллогенной плазмы, либо с 10% аллогенной мужской сыворотки АВ. Все культуры были обработаны IL-2 и IL-15 и дополнены различными комбинациями IL-4, IL-21, IFN-γ, IL-1β. Протестированные условия культивирования приведены в таблице 2.

Таблица 2. Сводные данные по протестированным экспериментальным условиям

Прогон	Белок	IL-15 (Ед/мл)	IL-2 (Ед/мл)	IL-21 (Ед/мл)	IFN-γ (Ед/мл)	IL-1b (Ед/мл)	IL-4 (Ед/мл)
1	Плазма (2,5%)	600	138	1,05	0	0	95
2	SR (5%)	600	138	1,05	420	4500	0
3	SR (5%)	600	138	0	0	4500	0
4	AB (10%)	600	138	0	420	0	0
5	AB (10%)	600	138	1,05	0	0	95
6	AB (10%)	600	138	0	0	4500	95
7	Плазма (2,5%)	600	138	1,05	420	4500	95
8	AB (10%)	600	138	1,05	420	4500	95
9	Плазма (2,5%)	600	138	0	420	4500	0
10	SR (5%)	600	138	1,05	0	0	0

11	SR (5%)	600	138	0	420	0	0
12	AB (10%)	600	138	1,05	0	4500	0
13	SR (5%)	600	138	1,05	420	0	95
14	Плазма (2,5%)	600	138	0	0	4500	95
15	Плазма (2,5%)	600	138	1,05	420	0	0
16	SR (5%)	600	138	0	420	4500	95
17	Плазма (2,5%)	600	138	0	420	0	95
18	Плазма (2,5%)	600	138	0	0	0	0
19	Плазма (2,5%)	600	138	1,05	0	4500	0
20	SR (5%)	600	138	1,05	0	4500	95
21	SR (5%)	600	138	1,05	0	0	95
STD ISO	SR (5%)	600	138	0	0	0	0

Результаты условий культивирования представлены на Фиг. 1-10.

Цитокины

Применение IL-1 β , особенно в контексте выделения с плазмой и сывороткой AB, приводило к увеличению общего выхода $\gamma\delta$ Т-клеток и общего выхода выделенных V δ 1 Т-клеток. Данные по % и общему количеству $\gamma\delta$ Т-клеток для всех условий показаны на Фиг. 1, а процент и общее количество V δ 1 Т-клеток показаны на Фиг. 2.

Добавление IL-4 к сыворотке AB привело к увеличению общего количества клеток, выделенных на сетку (Фиг. 3). Более умеренное увеличение наблюдалось в культурах, выделенных из плазмы.

Добавление IL-4 к образцам плазмы, SR или сыворотки AB приводило к увеличению % обогащения $\gamma\delta$ в культурах (Фиг. 4).

Добавление IL-4 к культурам с плазмой приводило к увеличению общего количества V δ 1 клеток, выделенных на сетку (Фиг. 5). Такой же эффект не наблюдался в культурах с SR или сывороткой AB человека; однако использование сыворотки AB увеличивало общее количество V δ 1 клеток, выделенных на сетку, по сравнению с контролем.

Добавление IL-21 к культурам с сывороткой AB приводило к увеличению общего количества выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток. Однако преимущества IL-21 не наблюдались в культурах, выделенных с плазмой или SR. Моделирование DoE для % $\gamma\delta$ Т-клеток для каждого донора в плазме с IL-1 β и IFN- γ демонстрируют, что IL-1 β наиболее полезен при отсутствии IFN- γ и IL-21.

Анализ фенотипа

Добавление IL-4 как к культурам с сывороткой AB, так и с плазмой крови приводило к снижению экспрессии как NKG2A, так и CD45RA на V δ 1 Т-клетках (Фиг. 6).

Использование SR приводило к повышенной экспрессии маркера ингибитора контрольной точки TIGIT на Т-клетках V δ 1 по сравнению с культурами для выделения

как с плазмой, так и с сывороткой АВ (Фиг. 7).

Анализ также продемонстрировал, что использование SR приводило к увеличению экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD45RA и ингибирующего рецептора NKp44 на V δ 1 T-клетках по сравнению как с плазмой, так и с сывороткой АВ (данные не показаны).

Источник белка

Использование как плазмы, так и сыворотки АВ в культуре приводит к увеличению общего количества V δ 1 T-клеток на сетку по сравнению с выделенными клетками из культуры с SR (Фиг. 8). Однако моделирование DoE показало, что добавление IFN- γ к выделенным образцам с SR увеличивало общее количество выделенных $\gamma\delta$ T-клеток.

Использование SR также, по-видимому, приводит к более низкой общей жизнеспособности выделенных клеток по сравнению с плазмой или сывороткой АВ в качестве источника белка (Фиг. 9).

Другие лимфоциты

Были также исследованы условия для получения TCR-отрицательных клеток (т.е. клеток, которые являются отрицательными в отношении $\alpha\beta$ -TCR и $\gamma\delta$ -TCR). Использование SR в качестве источника белка приводит к увеличению числа TCR-отрицательных клеток по сравнению с плазмой или сывороткой АВ (Фиг. 10). Условия, при которых отсутствует IFN- γ , также увеличивают количество TCR-отрицательных клеток.

Заключение

Данные свидетельствуют о том, что общее количество выделенных $\gamma\delta$ клеток может быть значительно улучшено, что дает возможность увеличить начальное количество процедур экспансии. Все условия с лучшим процентом $\gamma\delta$ T-клеток и общим количеством $\gamma\delta$ T-клеток на сетку содержали IL-1 β (условия 6, 8, 9, 12 и 14). Результаты лучших условий по сравнению со стандартным способом выделения с 2 цитокинами показаны на Фиг. 11.

Таким образом, с помощью подходов DoE, предусматривающих титрование комбинации цитокинов человека и сыворотки АВ человека, плазмы пула человека или заменителя сыворотки, был определен коктейль для выделения лимфоцитов кожи, названный «Поколение 2», с использованием объединенной плазмы человека (в предыдущих культурах для выделения использовали заменитель сыворотки) и цитокинов IL-2, IL-4, IL-15 и IL-1 β (ранее использовали только IL-2 и IL-15). Этот новый коктейль для роста, по сравнению с исходной методологией (теперь также известной как «Поколение 1»), увеличил общее количество жизнеспособных лимфоцитов, выделенных из $50-100 \times 10^6$ клеток (ранее), до $75-200 \times 10^6$ лимфоцитов на матрицу (сетку) для выделения клеток. Поколение 2, кроме того, показало в 3 раза более высокое присутствие $\gamma\delta$ T-клеток в конце выделения и в целом имело благоприятный фенотип (например, более низкую экспрессию CD45RA и NKG2A).

ПРИМЕР 3. Исследование замороженных выделенных клеток

Предыдущие условия приводили к большому количеству $\gamma\delta$ Т-клеток, но плохой жизнеспособности после сбора и оттаивания. Был исследован новый процесс выделения и экспансии, при котором выделенные клетки перед экспансией замораживали. После выделения клетки замораживали в соответствии со способом, подробно описанным в Примере 1. Влияние на кратность экспансии и % $\gamma\delta$ Т-клеток на последующих стадиях экспансии показано на Фиг. 12. Было обнаружено, что выделенные клетки, которые были заморожены до экспансии, обогащаются и размножаются, по меньшей мере, так же, как и свежие эквиваленты.

ПРИМЕР 4. Включение IL-21 в состав для выделения может увеличить выход $\gamma\delta$ Т-клеток

Было исследовано применение IL-21, чтобы выяснить, может ли этот цитокин увеличить общий выход $\gamma\delta$ Т-клеток после выделения и последующей экспансии. Улучшение общего содержания $\gamma\delta$ Т-клеток позволит проводить генную инженерию этих клеток в большем масштабе в последующей экспансии, а также потенциально увеличит общий выход эффекторных клеток.

Культуры для выделения помещали в установки GREX100M со средой AIMV с добавлением 2,5% аллогенной плазмы (подробности см. в Примере 1). Затем в культуры добавляли цитокины, как указано в таблице 3.

Таблица 3. Цитокиновые условия, используемые для культур для выделения

	Вариант «Без IL-21» (Поколение 2)	Вариант «IL-21» (18,8 нг/мл; Поколение 3)
IL-2 (Ед/мл)	138	138
IL-4 (Ед/мл)	95	32
IL-15 (Ед/мл)	600	600
IL-1β (Ед/мл)	4500	4500
IL-21 (нг/мл)	0	18,8

Культуры для выделения с 18,8 нг/мл IL-21 собирали на 21 день и криоконсервировали (замораживали) для последующей экспансии. Затем клетки размораживали и измеряли жизнеспособность клеток с помощью автоматического счетчика клеток NC250, а результаты приведены на Фиг. 13А. Общая жизнеспособность клеток в момент оттаивания была выше минимально приемлемой жизнеспособности как с IL-21, так и без него, со средним % жизнеспособности >80% в культурах без IL-21 и почти 90% в культурах с IL-21. Затем выделенные клетки размножали в присутствии среды TechMACS™ (Miltenyi Biotec) с добавлением 5% аллогенной плазмы и IL-15 (80 нг/мл) с различными уровнями добавки в виде IL-21 (12,53, 18,8, 37,5 и 188 нг/мл). После размножения в течение 14 дней клетки собирали и измеряли обогащение $\gamma\delta$ Т-клетками с помощью проточной цитометрии, как показано на Фиг. 13В. После экспансии клетки, которые были выделены в присутствии IL-21, продемонстрировали обогащение $\gamma\delta$ Т-

клетками в течение 14-дневного культивирования, независимо от количества IL-21, использованного для экспансии, демонстрируя сопоставимую эффективность от 12,5 до 188,8 нг/ мл. Следовательно, присутствие IL-21 в культуре для выделения дает жизнеспособные клетки и поддерживает способность $\gamma\delta$ Т-клеток к последующей экспансии. Также была подтверждена функциональность этих клеток после экспансии в анализах цитотоксичности.

Пример 5. Сравнение культур для выделения без IL-21 и с 18,8 нг/мл IL-21

Образцы кожи, совместимые с донором, помещали в культуры для выделения либо с составом «без IL-21», либо с составом с цитокином «IL-21» (18,8 нг/мл), как подробно описано в таблице 3. Все культуры для выделения помещали в среду AIMV с добавлением 2,5% аллогенной плазмы (подробности см. в Примере 1). Культуры для выделения «без IL-21» собирали либо на 19, либо на 21 день, в то время как культуры для выделения «IL-21» собирали только на 19 день. В момент сбора регистрировали общее количество жизнеспособных клеток на сетку для культивирования, общее количество выделенных $\gamma\delta$ Т-клеток на сетку для культуры для выделения и общее количество V δ 1 Т-клеток на сетку для выделения культуры, а результаты приведены на Фиг. 14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерлейкина-1 β (IL-1 β); и

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

2. Способ выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий стадии:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-1 β ; и

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

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) и интерлейкина-15 (IL-15).

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии интерлейкина-4 (IL-4) и/или интерферона- γ (IFN- γ).

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором культивирование проводят в отсутствие интерлейкина-21 (IL-21).

6. Способ по любому из пп. 1-4, в котором культивирование проводят в присутствии интерлейкина-21 (IL-21) в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором образец негемопозитической ткани культивируют в среде, содержащей сыворотку или плазму.

8. Способ по п. 7, в котором негемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 2,5% плазмы человека.

9. Способ по п. 7, в котором негемопозитическую ткань культивируют в среде, содержащей 10% сыворотки АВ человека.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через по меньшей мере 7 дней культивирования.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через по меньшей мере 14 дней культивирования.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают до 35 дня культивирования.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через 19 дней культивирования.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лимфоциты или $\gamma\delta$ Т-клетки собирают через 21 день культивирования.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором образец

негемопозитической ткани представляет собой интактный биоптат.

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором образец негемопозитической ткани представляет собой образец кожи.

17. Способ по п. 16, в котором образец кожи включает эпидермальный и дермальный слой.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором образец негемопозитической ткани представляет собой ткань кишечника или желудочно-кишечного тракта.

19. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором образец негемопозитической ткани был получен от человека.

20. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ осуществляют в сосуде, содержащем газопроницаемый материал.

21. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором выделенная популяция лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток содержит популяцию V δ 1 Т-клеток.

22. Способ по п. 21, в котором менее 80% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD45RA, например, менее 30% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют CD45RA.

23. Способ по п. 21 или п. 22, в котором менее 10% выделенной популяции V δ 1 Т-клеток экспрессируют NKG2A.

24. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий экспансию выделенной популяции лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток.

25. Способ выделения лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

(i) культивирование образца негемопозитической ткани в среде, содержащей заменитель сыворотки, человеческую плазму и/или сыворотку АВ человека; и

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

26. Способ по п. 25, включающий культивирование образца негемопозитической ткани в среде, содержащей заменитель сыворотки.

27. Способ по п. 25 или п. 26, в котором выделенная популяция лимфоцитов включает популяцию TCR-отрицательных клеток.

28. Способ по любому из пп. 25-27, в котором стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-2 и IL-15.

29. Способ по любому из пп. 25-28, в котором стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-4 и/или IL-1 β .

30. Способ по любому из пп. 25-29, в котором культивирование проводят в отсутствие IFN- γ .

31. Способ по любому из пп. 25-30, в котором стадия (i) дополнительно включает культивирование образца негемопозитической ткани в присутствии IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл.

32. Способ по любому из пп. 25-31, в котором лимфоциты собирают через 19 дней культивирования.

33. Способ по любому из пп. 25-31, в котором лимфоциты собирают через 21 день культивирования.

34. Способ выделения и экспансии лимфоцитов из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

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

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

35. Способ выделения и экспансии $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

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

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

36. Способ по п. 34 или п. 35, в котором выделенную популяцию лимфоцитов или $\gamma\delta$ Т-клеток замораживают, а затем размораживают перед стадией (ii).

37. Способ по п. 35 или п. 36, в котором стадия экспансии включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии:

(a) IL-2 или IL-9;

(b) IL-15; и необязательно

(c) IL-21

в течение по меньшей мере 5 дней в количествах, эффективных для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

38. Способ по п. 37, который дополнительно включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в присутствии IL-4.

39. Способ по любому из пп. 35-38, в котором стадия экспансии включает культивирование $\gamma\delta$ Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками.

40. Способ по любому из пп. 35-39, в котором стадия экспансии включает отсутствие экзогенных агонистов пути TCR.

41. Способ выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани, включающий следующие стадии:

(i) выделение популяции $\gamma\delta$ Т-клеток из образца негемопозитической ткани; и

(ii) замораживание выделенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

42. Способ по п. 41, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют путем культивирования образца негемопозитической ткани в присутствии IL-2 и IL-15, необязательно в комбинации с IL-1 β , IL-4 и/или IL-21.

43. Способ по п. 42, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют путем культивирования

образца негемопэтической ткани в присутствии IL-21 в концентрации от 15 нг/мл до 25 нг/мл, например, от 18 до 20 нг/мл.

44. Способ по пп. 41-43, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки замораживают через 19 дней выделения.

45. Способ по любому из пп. 41-43, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки замораживают через 21 дня выделения.

46. Способ по любому из пп. 41-44, в котором выделенную популяцию $\gamma\delta$ Т-клеток замораживают в растворе для замораживания и хранят в жидком азоте (парообразная фаза).

47. Способ по любому из пп. 41-45, который дополнительно включает: (iii) размораживание замороженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток; и (iv) культивирование размороженной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток в течение по меньшей мере 5 дней для получения увеличенной популяции $\gamma\delta$ Т-клеток.

48. Выделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, которую можно получить с помощью способа по любому из пп. 1-24.

49. Выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 1-24.

50. Замороженная выделенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, которую можно получить с помощью способа по любому из пп. 41-47.

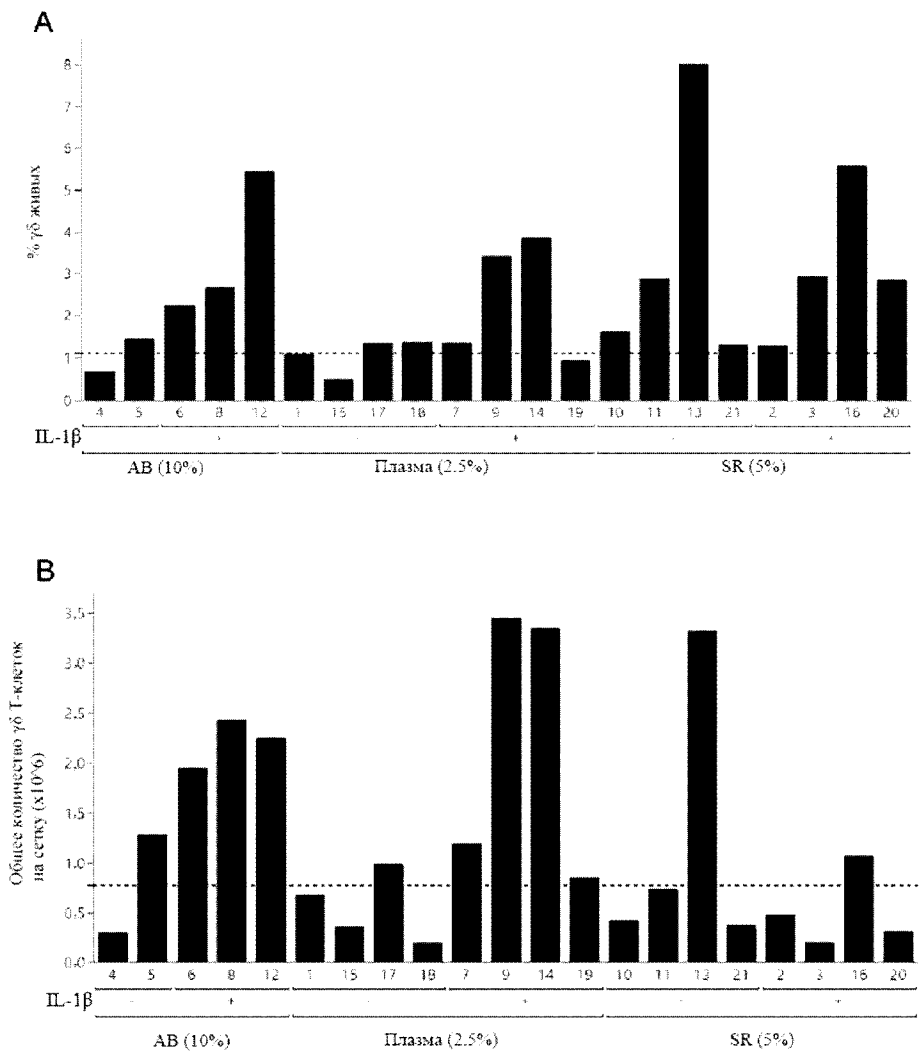
51. Замороженная выделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 41-47.

52. Выделенная и увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 35-40.

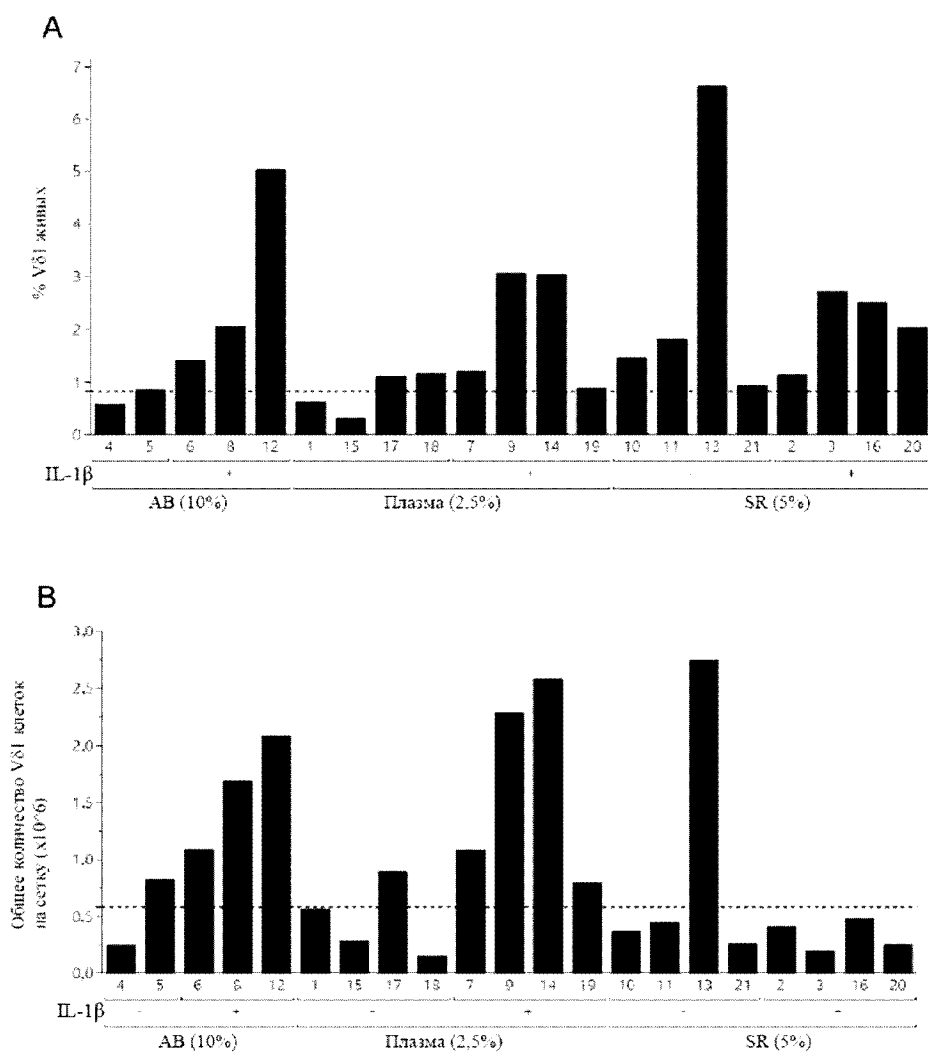
53. Выделенная и увеличенная популяция $\gamma\delta$ Т-клеток, полученная с помощью способа по любому из пп. 35-40.

По доверенности

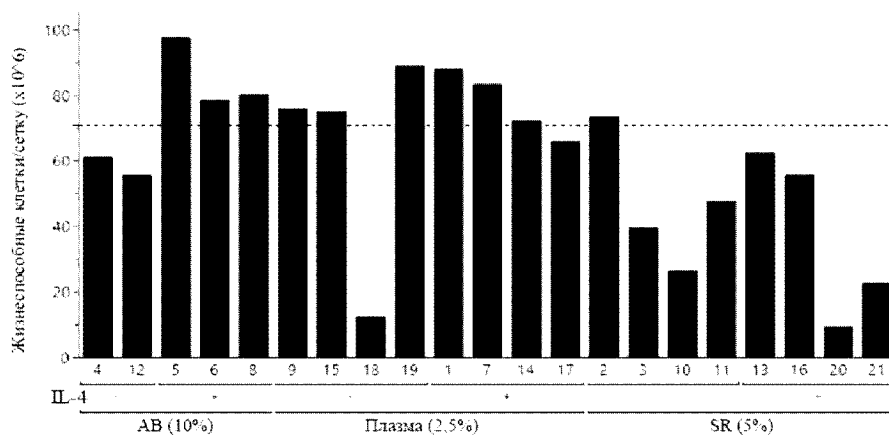
439



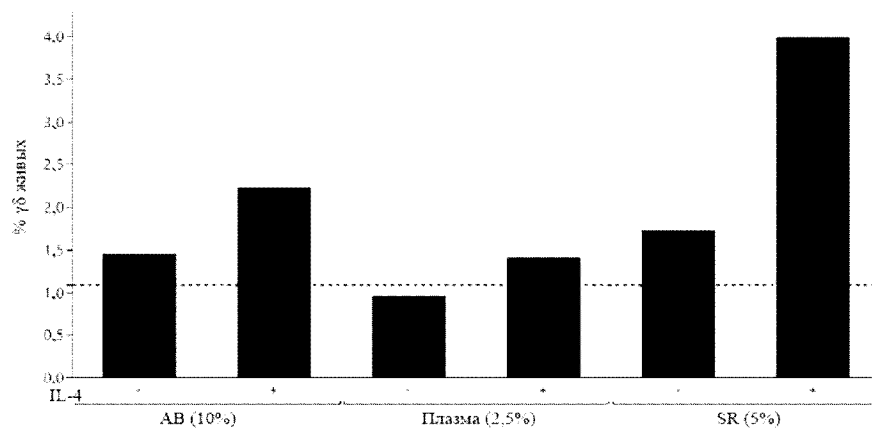
Фиг. 1



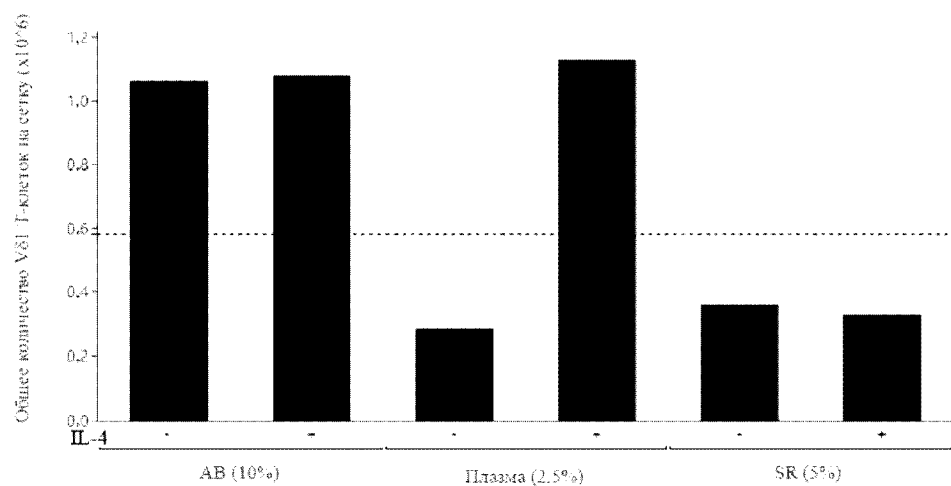
Фиг. 2



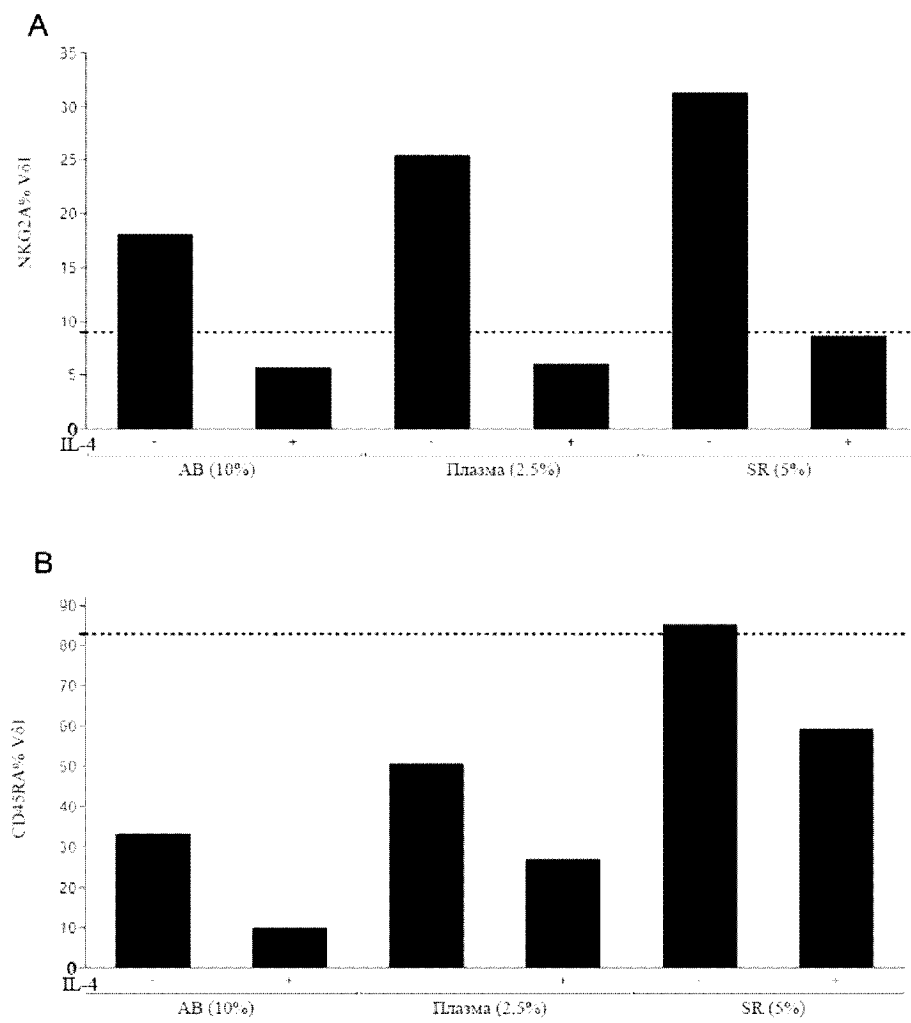
Фиг. 3



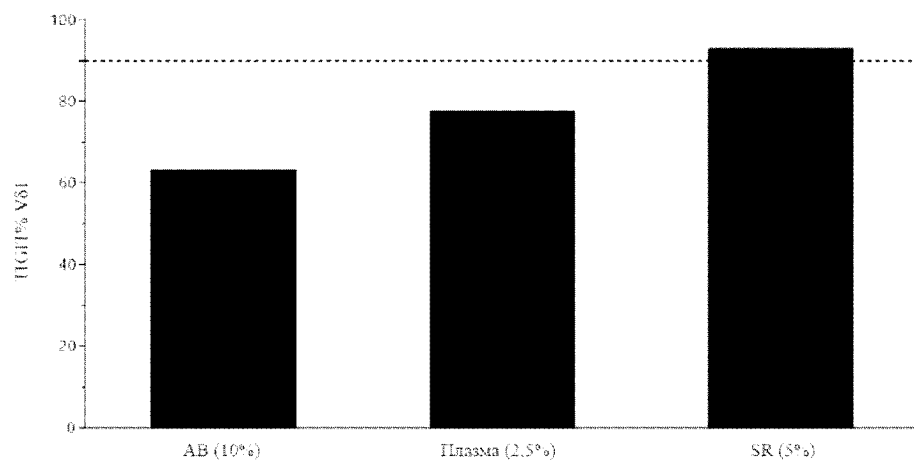
Фиг. 4



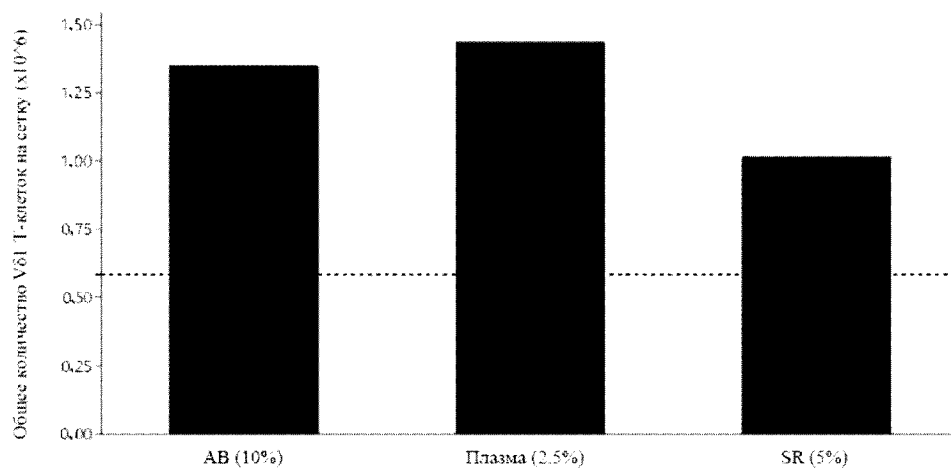
Фиг. 5



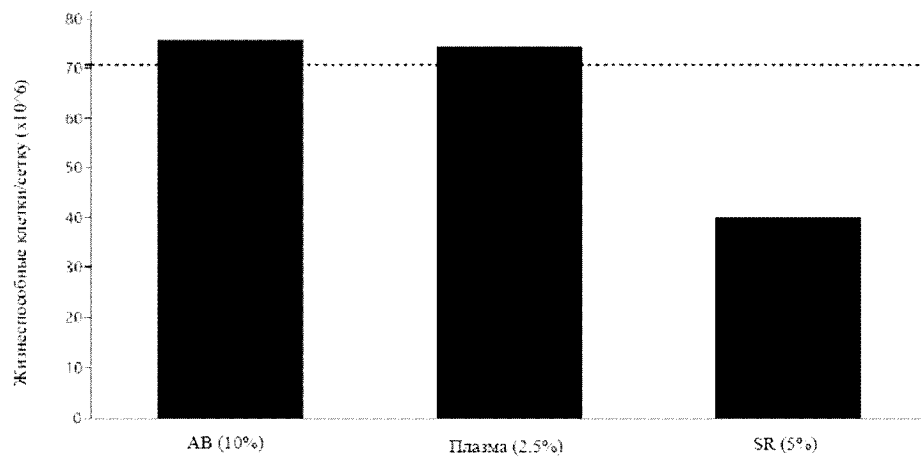
Фиг. 6



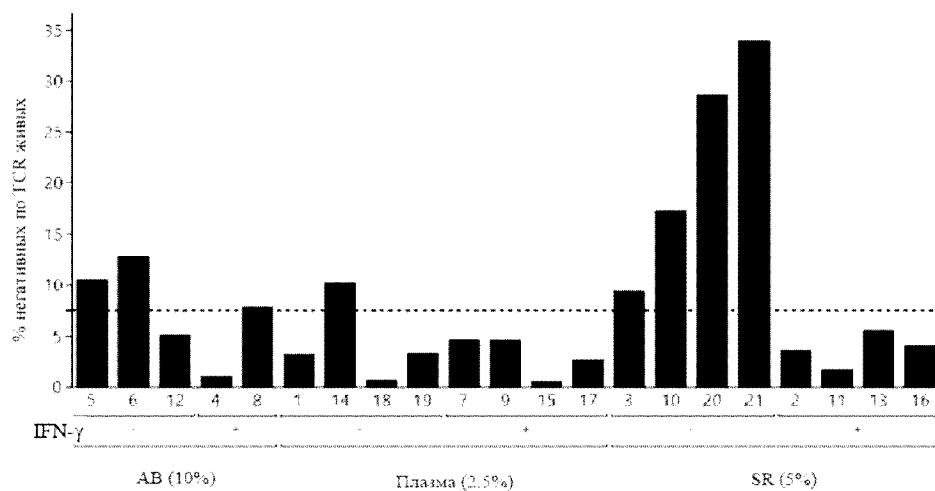
Фиг. 7



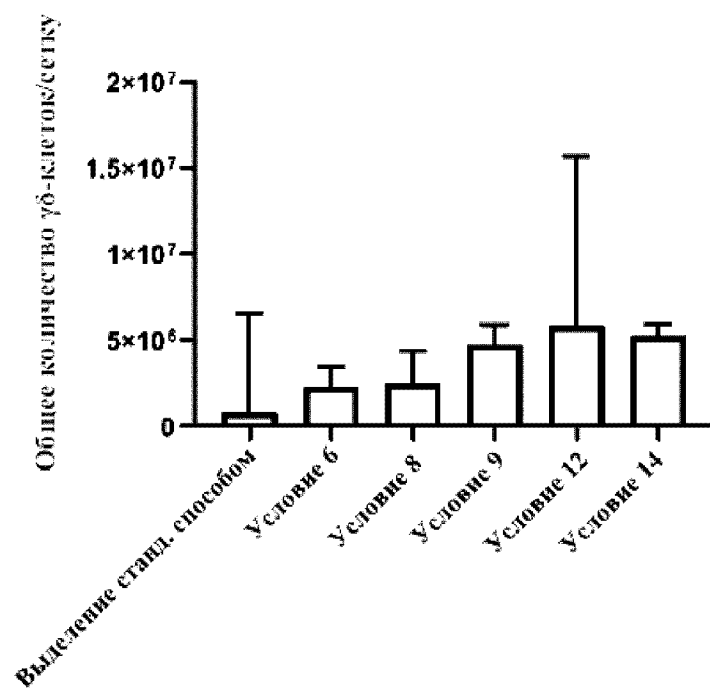
Фиг. 8



Фиг. 9



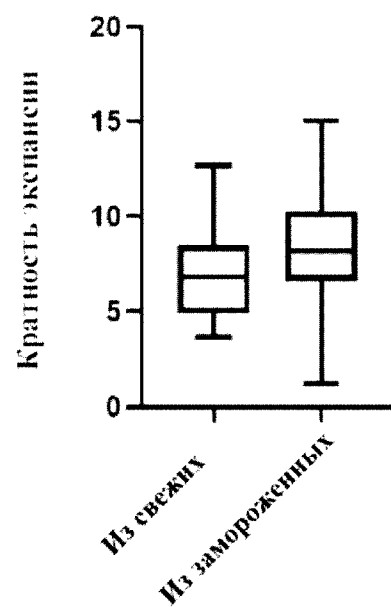
Фиг. 10



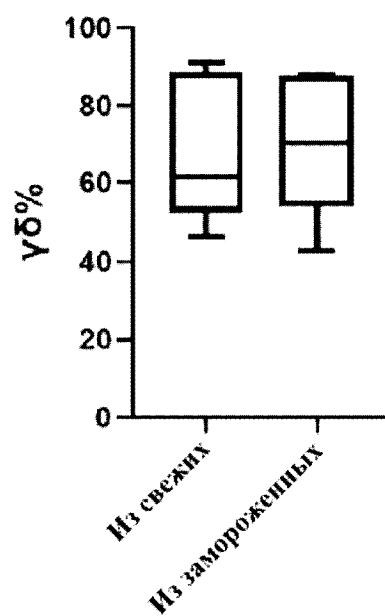
Фиг. 11

А

Кратность экспансии свежих vs. замороженных

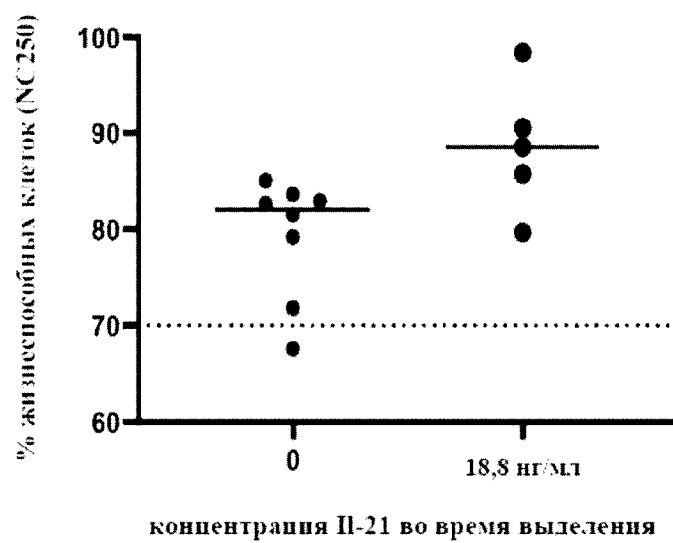


В

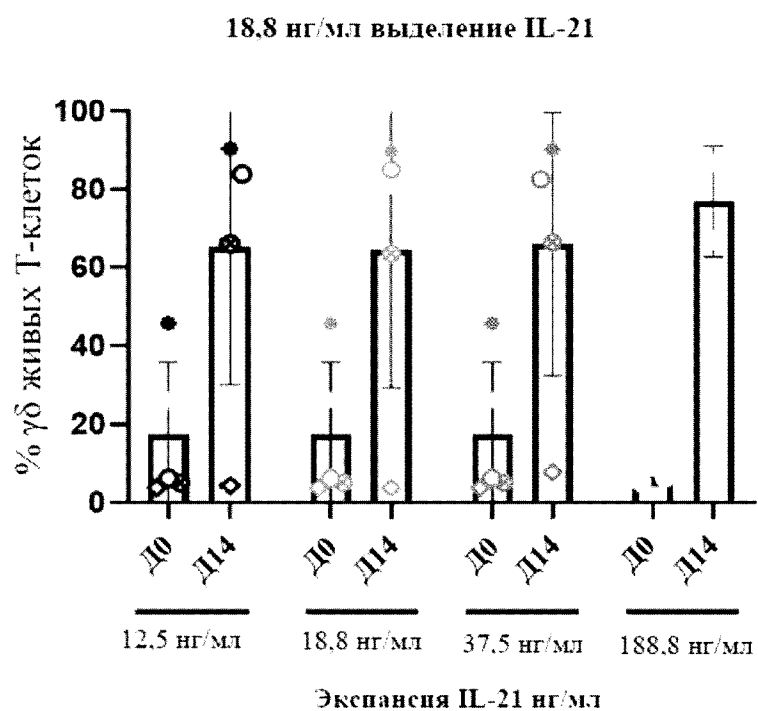
 $\gamma\delta\%$ экспансии свежих vs замороженных

Фиг. 12

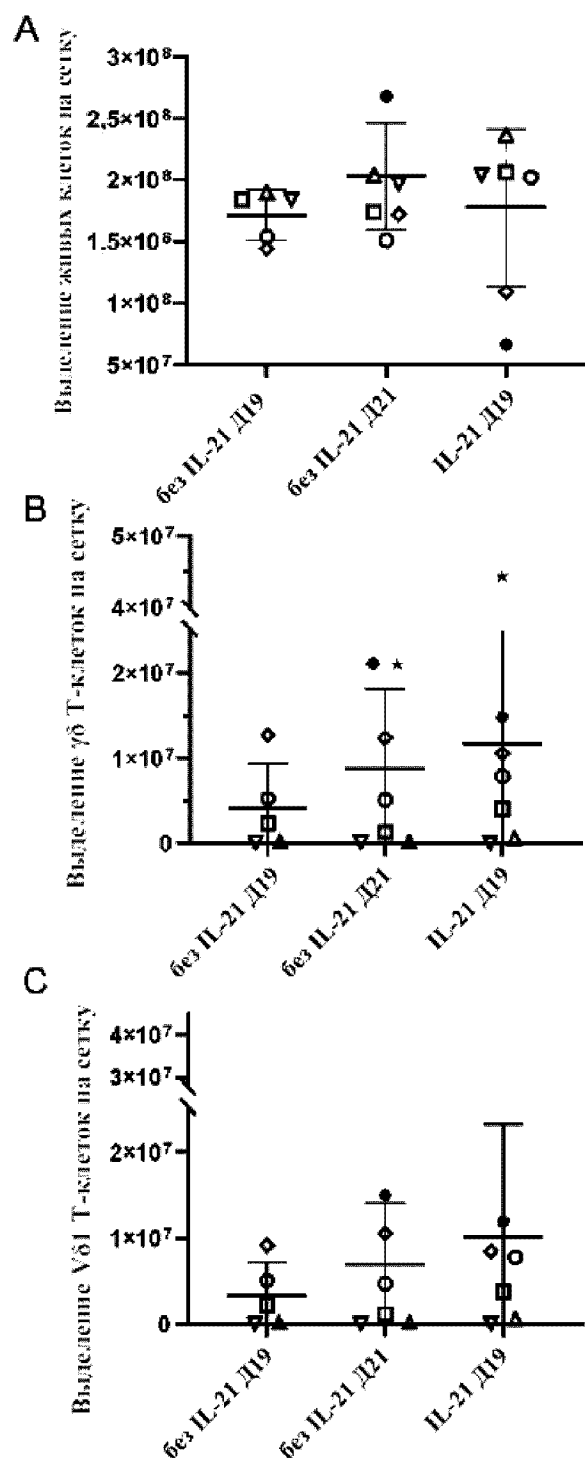
А



В



Фиг. 13



Фиг. 14