(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202390484 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.31

(22) Дата подачи заявки
2016.06.08

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0783*** (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ TCRγδ$^+$ Т-КЛЕТОК

(31) **20151000047568; 20161000032002**
(32) **2015.06.09; 2016.05.12**
(33) **PT**
(62) **201890013; 2016.06.08**

(71) Заявитель:
ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
Анжуш Диогу Антониу Ремешиду, Коррейя Даниэль Варгас, Мартинш Ди Алмейда Афонсу Роша (PT)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Данное изобретение относится к новым способам выделения и селективного размножения Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток ex vivo, а также к их клиническому применению.

202390484 A1

202390484 A1

Способы получения TCR гамма дельта $^{+}$ Т-клеток

Область изобретения

Данное изобретение относится к новым способам выделения и селективного размножения Vδ2^{-} TCRγδ^{+} Т-клеток *ex vivo*, а также к их клиническому применению.

Уровень техники

TCRγδ^{+} Т-клетки

Иммунная система челюстноротых включает различные популяции лимфоцитов, способных распознавать и уничтожать опухолевые клетки, что составляет основу иммунотерапии рака. Одна из популяций характеризуется экспрессией рецепторов Т-клеток (TCR), образованных объединением гамма (γ) цепи и дельта (δ) цепи. TCRγδ^{+} Т-клетки (в настоящей заявке также обозначенные как γδ Т-клетки) составляют 1-10% лимфоцитов периферической крови человека (peripheral blood lymphocytes, PBL), но их количество существенно выше в эпителиальных тканях здоровых людей, где оно достигает 50% всех Т-клеток.[1] TCRγδ^{+} Т-клетки обладают сильной цитотоксичностью по отношению к злокачественным и инфицированным клеткам, не ограниченной MHC (главный комплекс гистосовместимости, MHC), которая при этом не повреждает здоровые клетки и ткани. Таким образом, указанные клетки обычно рассматриваются в качестве первичного контрольного механизма защиты от инфекций и опухолей.[1]

У человека различные подгруппы или субпопуляции TCRγδ^{+} Т-клеток идентифицируют и классифицируют на основе генов, кодирующих их δ цепь. Приблизительно 60-95% TCRγδ^{+} Т-клеток в периферической крови экспрессируют Vδ2 цепь в ассоциации с Vγ9 цепью, тогда как большинство оставшихся TCRγδ^{+} Т-клеток экспрессируют Vδ1 цепь в ассоциации с различными Vγ элементами: Vγ2, Vγ3, Vγ4, Vγ5 или Vγ8. Другие (более редкие) популяции TCRγδ^{+} Т клеток человека экспрессируют Vδ3, Vδ5, Vδ6, Vδ7 и Vδ8 цепи.[2-4]

Vδ2^{+} TCRγδ^{+} Т-клетки

Современные подходы адоптивной иммунотерапии, основанные на TCRγδ$^+$ Т-клетках, ограничиваются субпопуляциями Vδ2$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток (также в настоящей заявке обозначаемые как Vδ2$^+$ Т-клетки).[5, 6] Большинство Vδ2$^+$ Т-клеток специфично реагируют на непептидные алкилфосфаты, такие как изопентенил пирофосфат (IPP), который образуется на аномальном уровне в опухолевых клетках и у пациентов, принимающих для укрепления костей аминобисфосфонаты, такие как золедронат и памидронат. Эти соединения в комбинации с интерлейкином-2 стимулируют пролиферацию и противоопухолевую цитотоксическую функцию Vδ2$^+$ Т-клеток *in vitro* и обеспечивают получение очищенных клеточных популяций для клинического применения.[5-7] Однако, завершенные в настоящее время клинические исследования показали низкий процент объективных ответов у пациентов, имеющих рак.[8] Таким образом, современные способы лечения на основе γδ Т-клеток, будучи практичными и безопасными, обладают определенными ограничениями.[6]

Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки

Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки человека (также в настоящей заявке называемые Vδ1$^+$ Т-клетки) составляют 1-40% всех TCRγδ$^+$ PBL, но являются основной популяцией γδ Т-клеток эпителия, такого как эпителий внутренних органов и эпителий кожи. Несмотря на то, что соответствующие клинические исследования никогда не проводились, эта подгруппа клеток также может проявлять значительную противоопухолевую активность. Vδ1$^+$ Т-клетки, инфильтрующие опухоли кожи, кишечника, почки и легких, проявляли цитотоксичность в отношении и аутологичных, и аллогенных раковых клеток.[9-13] Была обнаружена вызывающая интерес корреляция между увеличением количества полученных от донора Vδ1$^+$ Т-клеток периферической крови и увеличенным 5-10-летним периодом выживаемости без рецидивов после трансплантации костного мозга при остром лимфобластозном лейкозе (ALL).[14] Немаловажно, что введенные Vδ1$^+$ Т-клетки сохранялись у этих пациентов в течение нескольких лет.[14, 15] В других условиях, у пациентов с низкодифференцированной неходжкинской лимфомой с большим количеством Vδ1$^+$ Т-клеток, наблюдали стабильное течение болезни при наблюдении в течение года и улучшенную клиническую картину по сравнению с пациентами с более низким количеством Vδ1$^+$ Т-клеток.[16] Повышенное количество циркулирующих Vδ1$^+$ Т-клеток также обычно наблюдают у пациентов с хроническим лимфолейкозом (CLL) [17] и ассоциируют с отсутствием прогрессирования заболевания у пациентов с B-CLL с низким уровнем риска.[18] Наконец, количественное увеличение циркулирующих Vδ1$^+$ Т-

клеток также наблюдали при вирусе иммунодефицита человека (HIV)[19] и малярии[20], а также инфекции цитомегаловирусом человека (HCMV) с последующей трансплантацией почки.[4, 21] При этом, в других условиях субпопуляции Vδ1$^+$ Т-клеток могут проявлять иммуноподавляющие и регуляторные свойства, то есть свойства, которые также можно использовать в терапевтических целях.[22]

Было описано некоторое количество способов специфического размножения Vδ1$^+$ Т-клеток *in vitro*, хотя ни один из них не подходит для клинического применения (см. Siegers,G. *et al.*, 2014, ссылка[22]). У Meeh *et al*. впервые было описано, что количество Vδ1$^+$ Т-клеток от здоровых доноров может увеличиваться *ex vivo* в ответ на лейкобласты ALL.[23] Knight, A. с коллегами и Merims, S. с коллегами выделили Vδ1$^+$ Т-клетки периферической крови и обрабатывали их в присутствии фитогемагглютинина (PHA) или моноклонального антитела (mAb) специфичного к CD3, IL-2, и облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в течение 3 недель.[24, 25] В более позднем исследовании, PHA использовали в комбинации с интерлейкином-7 (IL-7).[26] У Siegers, G. *et al*, описан двухстадийный протокол культивирования, в котором отсортированные TCRγδ$^+$ Т-клетки вначале обрабатывали конканавалином-А (ConA), IL-2 и IL-4 в течение 6-8 дней, после чего стимулировали IL-2 и IL-4 в течение еще 10 дней.[27] После периода культивации, количество Vδ1$^+$ Т-клеток увеличилось в 59% культур, и они стали доминантной субпопуляцией (в среднем 70% Vδ1$^+$ Т-клеток) в половине этих культур; однако, этим способом возможно достичь только 25-ти кратного увеличения количества Vδ1$^+$ Т-клеток.[27] Этот двухстадийный способ культивирования также был раскрыт в международной заявке на патент№ PCT/CA99/01024 (опубликованной как WO 00/26347). Согласно авторам указанной заявки, для постоянной пролиферации клеток после удаления митогена существенным является присутствие и IL-2, и IL-4 во вторичной культуральной среде. Позднее была разработана модификация этого протокола, в которой общее количество PBMC вначале культивировали в присутствии ConA, IL-2 и IL-4 в течение 6-13 дней, после чего проводили магнитное истощение контаминантных TCR$\alpha\beta^+$ Т-клеток и стимуляцию оставшихся клеток с помощью IL-2, IL-4 и ConA в течение еще 10 дней. После 21 дней, количество Vδ1$^+$ Т-клеток увеличивалось в 136-24384 раз, хотя достигаемый уровень чистоты был намного ниже (Vδ1$^+$ Т-клетки составляли менее 30% всех клеток культуры), тогда как большинство контаминантных Т-клеток (приблизительно 55% клеток) составляли Vδ2$^+$ Т-клетки.[28]

Наконец, ранее группа авторов данного изобретения описала способ селективного размножения и дифференциации клеточных популяций, обогащенных Vδ1$^+$ Т-клетками, экспрессирующих природные рецепторы цитотоксичности (NCR) которые могут служить посредниками в уничтожении клеточных линий лейкоза и неопластических клеток пациентов с CLL.[29] Этот запатентованный способ состоял в культивировании TCRγδ$^+$ Т-клеток или их предшественников в среде для культивирования при одновременной стимуляции обычными цитокинами с γ-цепью (такими как IL-2 или IL-15) и TCR агонистами (например, PHA или моноклональным антителом, специфичным к CD3) в течение 2-3 недель (международная заявка на патент № PCT/IB2012/052545, опубликованная как WO 2012/156958). Одним из важных недостатков этого способа является малое число полученных клеток, не подходящее для клинического применения.

Другие субпопуляции TCRγδ$^+$ Т-клеток человека

Большинство не-Vδ1$^+$ и не-Vδ2$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток человека экспрессируют Vδ3 цепь TCR. TCRγδ$^+$ Vδ3$^+$ Т-клетки человека составляют приблизительно 0,2% циркулирующих Т-клеток,[30] но их количество повышено в периферической крови у индивидуумов с трансплантатами почки и стволовых клеток с активацией CMV,[4, 21] у пациентов с HIV инфекцией[31] или с B-CLL,[17] а также в здоровой печени.[32] Активированные TCRγδ$^+$ Vδ3$^+$ Т-клетки способны уничтожать CD1d$^+$ клетки и опухоли эпителия *in vitro.*[4] Однако, известные способы культивирования клеток не могут обеспечить большое количество TCRγδ$^+$ Vδ3$^+$ Т-клеток для клинического применения.

Другие способы получения клеточных популяций, обогащенных TCRγδ$^+$ Т-клетками

Известно несколько способов для одновременного размножения нескольких субпопуляций TCRγδ$^+$ Т-клеток *in vitro*. Полный набор PBMC обрабатывали связанными на планшете моноклональными антителами, специфичными к TCRγδ, и IL-2 в течение 3 недель, получив приблизительно 90% TCRγδ$^+$ Т-клеток, большинство из которых было Vδ2$^+$ Т-клетками, и небольшое количество Vδ1$^+$ Т-клеток.[33] У Lopez, *et al,* описано получение устойчивых к апоптозу TCRγδ$^+$ Т-клеток путем обработки клеток высокими дозами интерферона-γ (IFN-γ), IL-12, моноклональными антителами, специфичными к CD2, и растворимыми моноклональными антителами, специфичными к CD3, в присутствии IL-2. Vδ2$^+$ Т-клетки были доминирующей субполуляцией после

размножения клеток.[34] В недавнем исследовании поликлональные TCRγδ$^+$ Т-клетки размножали в присутствии γ-облученных искусственно полученных антиген-представляющих клеток (aAPC) опухолевого происхождения, генетически модифицированных для совместного экспрессирования CD19, CD64, CD86, CD137L, и связанного с мембраной IL-15.[3, 35] После этого клетки культивировали в присутствии растворимых IL-2 и IL-21.

Необходимость в улучшенных способах размножения Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток *in vitro*

Недавние исследования показали, что TCRγδ$^+$ Т-клетки с Vδ1 цепью, а также не имеющие как Vδ1, так и Vδ2 цепей, обладают свойствами, делающими их более перспективными противораковыми эффекторами при адоптивной иммунотерапии.[36] Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетки (также в настоящей заявке называемые Vδ2$^-$ γδ Т-клетками) проявляют более высокую противоопухолевую цитотоксичность и повышенную способность к выживанию по сравнению с Vδ2$^+$ Т-клетками, как *in vitro* так и *in vivo*.[26, 29, 37] Вследствие этого можно ожидать, что медицинский продукт, высоконасыщенный Vδ2$^-$ γδ Т-клетками, будет обладать более выраженными противопухолевыми эффектами и будет более полезен для получающих его пациентов. Несмотря на то, что в последние 5 лет было описано несколько способов получения существенного количества нацеленных на опухоль Vδ2$^-$ γδ Т-клеток *in vitro*, продолжают существовать ключевые проблемы, препятствующие клиническому применению этих клеток: 1) использование небезопасных реагентов и материалов в производственном процессе; 2) высокий уровень изменчивости состава конечных клеточных продуктов, особенно клеточных продуктов, полученных от разных доноров или от пациентов с раком; и/или 3) низкая противоопухолевая активность конечного продукта.[22, 27, 28, 38] В данной области техники существует потребность в надежных клинических способах культивирования клеток, способных обеспечить получение большого количества по существу чистых Vδ2$^-$ γδ Т-клеток (то есть, содержащих >90% этих клеток) *in vitro* или *ex vivo*, систематически и с одинаковой эффективностью от разных доноров, в особенности от пациентов с раком. Предыдущие клинические данные по Vδ2$^+$ Т-клеткам, введенным путем инфузии, позволяют предположить, что клинически значимая доза TCRγδ$^+$ Т-клеток для лечения заболевания содержит по меньшей мере приблизительно 1x10^9 живых клеток.[39] Вследствие этого способы, нацеленные на создание Vδ2$^-$ γδ Т-клеток для клинического применения, должны обеспечивать по меньшей мере 1000-кратное размножение этих

клеток *in vitro*. Однако, Vδ2$^-$ γδ Т-клетки не реагируют на алкилфосфаты, а возможность их размножения *in vitro* ограничивает крайне скудная информация о распознаваемых или антигенах. Для размножения и обогащения (до очень высокой степени чистоты) этих клеток *in vitro* в доклиническом масштабе использовали лектины растений, такие как PHA и Con-A. Соответственно, и по еще неизвестным причинам, эти обычные митогены являются весьма селективными в отношении Vδ2$^-$ γδ Т-клеток, способствуя их пролиферации в культуральной среде, одновременно ингибируя рост (или способствуя апоптозу) контаминантных Vδ2$^+$ Т-клеток.[27, 29] Несмотря на это, лектины растений могут быть токсичными при непреднамеренном введении людям, и регулирующие органы не рекомендуют их применение в клинической практике по соображениям безопасности. Более того, по данным авторов этого изобретения, растительные лектины не так эффективны для стимуляции размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клетки *in vitro*, как моноклональные антитела, приводя к образованию меньшего количества клеток. Несколько научных групп занимались культивированием TCRγδ$^+$ Т-клеток в присутствии моноклональных антител, специфичных к CD3, вместо PHA. Однако, моноклональные антитела, специфичные к CD3, связываются с CD3 молекулами, также экспрессирующимися на контаминантных CD3$^+$ TCRαβ$^+$ Т-клетках и CD3$^+$ Vδ2$^+$ Т-клетках, вызывая понижение уровня чистоты финального клеточного продукта. Вследствие этого, перед стимуляцией с помощью моноклональных антител, специфичных к CD3, Vδ2$^-$ γδ Т-клетки необходимо выделять с помощью активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) или с помощью активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS).[25, 40] Такие способы еще больше осложняются тем, что ключевые реагенты, такие как моноклональное антитело, специфичное к TCRγδ, моноклональное антитело, специфичное к TCRVδ1, и моноклональное антитело, специфичное к TCRVδ3, применяемые для выделения всех TCRγδ$^+$ Т-клеток, TCRγδ$^+$ Vδ1$^+$ Т-клеток и TCRγδ$^+$ Vδ3$^+$ Т-клеток, соответственно, в данное время не производятся или не являются одобренными (соответствующими регулирующими органами) для клинического применения. Таким образом, невозможно генерировать достаточное для прямого применения на людях количество очищенных Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.[22] В данной области техники существует потребность в способах, не основывающихся на лектинах растений и других небезопасных реагентах для получения очищенных популяций Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

В предыдущем исследовании, Deniger *et al*. разработали искусственно полученные антиген-представляющие клетки (aAPC) опухолевого происхождения для размножения

больших количеств TCRγδ$^+$ Т-клеток, экспрессирующих поликлональный набор γ и δ цепей TCR.[37] Однако, как было указано авторами,[41] данный способ не позволяет преодолеть ключевые сложности, связанные с клиническим применением TCRγδ$^+$ Т-клеток. Например, большинство ингредиентов в настоящее время не производятся в соответствии с требованиями GMP и дальнейшее развитие все еще зависит от будущего интереса производителей и сложной процедуры одобрения регулирующими органами, даже при условии, что одинаковый клеточный продукт может быть получен при использовании разных реагентов, и от пациентов, имеющих рак. К тому же, в исследовании были пропущены ключевые детали, касающиеся точного состава (и его изменчивости) получаемых клеточных продуктов, тем самым затрудняя потенциальное применение данного способа.

Интерлейкин-2, интерлейкин-7 и интерлейкин-15 являются в высокой степени плейотропными молекулами, обладающими сильным стимулирующим эффектом на многие иммунные клетки, включая TCRαβ$^+$ Т и Vδ2$^+$ Т-клетки. Вследствие этого, эти реагенты не подходят для размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток *in vitro*, так как контаминантные клетки также будут размножаться в среде, ухудшая клеточную чистоту продукта. К тому же, типичная комбинация этих провоспалительных цитокинов с агонистами γδTCR часто ведет к индуцированной активацией клеточной смерти (AICD) стимулированных клеток и к уменьшению количества получаемых клеток. В данной области техники существует потребность в способах, которые позволяют использовать более селективные реагенты для размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток из исходных образцов низкой чистоты.

Комбинацию IL-2 и IL-4 с некоторым успехом использовали для размножения Vδ1$^+$ Т-клеток *in vitro*. Однако, авторы данного изобретения обнаружили, что присутствие IL-4 в культуральной среде вызывает сильную деактивацию рецепторов, активирующих природные киллеры (NK) (таких как NKG2D и NCRs) на Vδ2$^-$ γδ Т-клетках, ослабляя их противоопухолевые эффекты (**Таблица 3**). Ингибиторный эффект IL-4 в отношении Vδ2$^-$ γδ Т-клеток наблюдали даже в присутствии IL-2. Аналогичным образом, в независимом исследовании Mao, Y. и коллеги недавно показали, что культивируемые Vδ1$^+$ Т-клетки, обработанные с помощью IL-4 и моноклонального антитела, специфичного к TCRVδ1, выделяют существенно меньше IFN-γ и больше IL-10, по сравнению с Vδ2$^+$ Т-клетками. К тому же, обработанные IL-4 Vδ1$^+$ Т-клетки экспрессируют меньшее количество NKG2D, что также свидетельствует о том, что IL-4 ослабляет опосредованный TCRγδ$^+$ Т-клетками противоопухолевый иммунный ответ.[42]

Эти наблюдения, вместе с недавно открытыми стимулирующими опухоль эффектами Vδ1$^+$ Т-клеток, производящих интерлейкин-17 (ссылки [43, 44]), вызвали сомнения в возможности их применения, а также обострили необходимость в детальном исследовании эффекторных Vδ1$^+$ лимфоцитов, которые возможно пригодны для адоптивной клеточной терапии. В данной области техники существует однозначная потребность в способах размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток *in vitro* без иммуноподавляющего или ингибиторного эффекта IL-4.

Наконец, несколько опубликованных способов размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток *ex vivo* требуют присутствия природных или искусственных питающих (фидерных) клеток, обычно в форме инфицированных вирусом или трансформированных клеток или клеточных линий, бактерий и паразитов. Эти способы культивирования являются более сложными, более подверженными микробному загрязнению и менее подходящими для клинического применения.

Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены новые способы размножения и дифференцировки Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток человека *in vitro*, без необходимости использования питающих клеток, или микробных или вирусных компонентов. В первую очередь авторы данного изобретения имели цель улучшить размножение и чистоту культивируемых Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток. Был разработан новый, более эффективный и селективный способ размножения этих клеток в присутствии митогена Т-клеток и IL-4, и в отсутствии IL-2, IL-7 и IL-15. Наконец, полученные Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетки были дифференцированы по более цитотоксическому фенотипу посредством дополнительных стадий оптимизации *in vitro*. После удаления IL-4 и добавления в культуральную среду митогена Т-клеток и IL-15, IL-2, или IL-7, ранее полученные Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетки производили провоспалительные цитокины и экспрессировали большое количество активирующих рецепторов природных киллеров (NKR), служащих посредниками для уничтожения опухолевых клеток *in vitro*. Важно отметить, что после инфузии мышам, дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки сохраняли свой цитотоксический фенотип и ингибировали рост опухоли *in vivo*.

Описанный в настоящей заявке способ культивирования клеток является очень надежным, в высокой степени воспроизводимым и полностью совместимым с широкомасштабным клиническим применением. Он позволяет получать достаточное

количество дифференцированных Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток для применения в адоптивной иммунотерапии рака и для разнообразных экспериментальных, терапевтических и коммерческих применений.

Соответственно, в одном аспекте, данное изобретение описывает способ размножения и дифференциации Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток в образце, включающий:
(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере один фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью; при отсутствии фактора роста, обладающего интерлейкин-15-подобной активностью; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии 1, во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, при отсутствии фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью.

Предпочтительным образом, данное изобретение представляет способ размножения и дифференциации Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток в образце, включающий:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4; при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии 1, во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-15, при отсутствии интерлейкина-4.

Данный новый способ (подробно описанный в этом документе), основывается на ранее не описанных биологических свойствах Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток и нигде более не раскрыт.

Подробное описание сущности изобретения

Данное изобретение относится к новым *in vitro* /*ex vivo* способам выделения и селективного размножения и дифференциации Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток, а также к их клиническому применению. Авторы данного изобретения протестировали множество

комбинаций антител агонистов и цитокинов для клинического применения на их способность к размножению и дифференциации (в течение 2-3 недель) Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток периферической крови в культуральной среде. TCRγδ$^+$ Т-клетки выделяли и размножали в культуральной среде при отсутствии питающих клеток и молекул микробного происхождения. Авторы данного изобретения показали, что Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетки (также в этом тексте называемые Vδ2$^-$ γδ Т-клетки), можно селективно размножать *in vitro* путем культивирования этих клеток в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15, и дополнительного культивирования этих клеток во второй культуральной среде, содержащий митоген Т-клеток и интерлейкин-15, интерлейкин-2, или интерлейкин-7, при отсутствии интерлейкина-4. Другие ключевые факторы роста, такие как интерферон-γ, интерлейкин-21 и интерлейкин-1β, также добавляли в одну или обе культуральные среды для дальнейшего усиления размножения и повышения уровня чистоты культивируемых Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

Первая культуральная среда поддерживает селективное выживание и размножение Vδ2$^-$ γδ Т-клеток (увеличение количества Vδ1$^+$ Т-клеток в 8000 раз за 14 дней; **Таблица 3**). Важно отметить, что отсутствие интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15 в первые дни культивирования способствовало истощению и апоптозу контаминантных Т-клеток (включая TCRαβ$^+$ Т и Vδ2$^+$ Т-клетки), выживание которых ключевым образом зависит от этих цитокинов.

Наконец, присутствие IL-2, IL-7, или IL-15 и отсутствие IL-4 во второй культуральной среде создает возможность для дифференциации ранее выбранной популяции Vδ2$^-$ γδ Т-клеток, которые размножались *in vitro* с увеличением их количества в несколько тысяч раз и достигали уровня в >90% от общего числа клеток через 21 день культивирования (**Таблицы 3 и 7**). Вторая стадия культивирования необходима для изменения физиологических свойств клеток в сторону более подходящего фенотипа для применения при противоопухолевом или антивирусном лечении. Размноженные и дифференцированные Vδ2$^-$ γδ Т PBL клетки, полученные после второй стадии культивирования, проявляли высокий уровень активации рецепторов природных киллеров (NKR), включая NKp30 и NKp44, которые синергетически действуют с рецепторами Т-клеток для опосредования нацеливания на опухолевые клетки *in vitro,* при этом не нацеливаясь на здоровые клетки. Введение размноженных и дифференцированных Vδ2$^-$ γδ Т PBL клеток иммунодефицитным мышам с опухолью приводило к ингибированию роста опухоли и к ограничению полиорганного

распространения опухоли, по сравнению с контрольными необработанными животными. Ассоциированной с лечением токсичности по результатам биохимического и гистологического анализов обнаружено не было. Важно отметить, что размноженные и дифференцированные Vδ2$^-$ γδ T PBL клетки, полученные из образцов крови здоровых людей и больных лейкозом, обладали схожей эффективностью. Наконец, данное изобретение раскрывает способы выделения и культивирования клеток, при которых используют материалы и реагенты, полностью совместимые с промышленным и клиническим применением. Вначале TCRγδ$^+$ Т-клетки были отсортированы в ходе двухстадийного процесса, подходящего для аппаратной клинической клеточной сортировки (CliniMACS; Miltenyi Biotec, GmbH; Германия). Затем клетки культивировали с минимумом манипуляций в свободной от сыворотки культуральной среде. В качестве клеточных приемников, вместо открытых планшетов или колб, использовали закрытые крупные газопроницаемые пластиковые пакеты для клеточного культивирования. Все использованные реагенты и материалы (или эквивалентные реагенты и материалы) в данное время доступны и производятся в соответствующем для клинического применения качестве или в качестве, соответствующем стандарту GMP, и не содержат компонентов животного происхождения. Таким образом, клетки, полученные данным способом, можно использовать в различных экспериментальных, терапевтических и коммерческих целях.

В первом аспекте, в настоящем изобретении предложен способ размножения и дифференциации Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток из образца, содержащего TCRγδ$^+$ Т-клетки или их предшественники, включающий:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере один фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью; при отсутствии факторов роста, обладающих интерлейкин-15-подобной активностью; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии 1, во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере один фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, при отсутствии факторов роста, обладающих интерлейкин-4-подобной активностью.

Способ по первому аспекту данного изобретения приводит к размножению клеточных популяций Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток. Под "размножением" понимается то, что количество желаемых или целевых клеточных типов в конечном продукте больше, чем их количество в исходной или стартовой клеточной популяции.

Термин “митоген Т-клеток” обозначает любой агент, способный стимулировать Т-клетки посредством сигнального пути TCR, включая, но не ограничиваясь этим, лектины растительного происхождения, такие как фитогемагглютинин (PHA) и конканавалин А (ConA) и лектины не растительного происхождения, антитела, активирующие Т-клетки, и другие митогены, не являющимися лектинами/антителами. Предпочтительные клоны антител включают антитела, специфичные к CD3, такие как OKT-3 и UCHT-1 клоны, антитела, специфичные к TCRγδ, такие как B1 и IMMU510, или антитела, специфичные к TCRVδ1, такие как δTCS1. В контексте данного изобретения понимают, что антитела включают моноклональные антитела (mAbs), поликлональные антитела, фрагменты антител (например, Fab, и F(ab’)2), одноцепочечные антитела, одноцепочечные вариабельные фрагменты (ScFv) и рекомбинантно полученные партнеры по связыванию. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, антитело является моноклональным антителом (mAb), специфичным к CD3. Другие митогены включают форбол 12-миристат-13-ацетат (TPA) и его родственные соединения, такие как мезереин или бактериальные соединения (например, Staphylococcal enterotoxin A (SEA) и Streptococcal protein A). Митоген Т-клеток может быть растворен или иммобилизован, также согласно способу по данному изобретению можно использовать боле чем один митоген Т-клеток.

В данном изобретении было убедительно показано, что две различные группы цитокинов, интерлейкин-4 с одной стороны, и интерлейкин-15, интерлейкин-2 и интерлейкин-7 с другой стороны, оказывают противоположное действие на культивируемые Vδ2$^-$ γδ Т-клетки и должны использоваться с совершенно определенный целью на каждой из стадий процесса культивации. На основании данных настоящего исследования об эффектах IL-4 и IL-15 /IL-2 /IL-7 на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки, любому специалисту в данной области должно быть понятно, что две данные группы цитокинов являются репрезентативными членами двух групп факторов роста, одной обладающей “интерлейкин-4-подобной активностью” и второй обладающей

“интерлейкин-15-подобной активностью”, которые можно использовать в рамках данного изобретения.

Термин "фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью” обозначает любое соединение, обладающее такой же активностью, как IL-4, в отношении его способности оказывать подобное физиологическое действие на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки в культуральной среде и включает, не ограничиваясь этим, миметики IL-4 и IL-4, или любые функциональные эквиваленты IL-4. Физиологическое действие, оказываемое IL-4 на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки (как описано в данном изобретении), включает понижение уровней экспрессии NKG2D и NCR, ингибирование цитотоксической функции и улучшение селективного выживания. Некоторые из упомянутых действий IL-4 на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки также независимо описывались другой группой исследователей. В настоящем исследовании, IL-4 в существенной степени ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов, включая IFN-γ, TNF-α, из активированных TCRγδ$^+$ Т-клеток.[45]

Термин "фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью" обозначает любое соединение, обладающее такой же активностью, как IL-15 в отношении его способности оказывать подобное физиологическое действие на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки в культуральной среде и включает, не ограничиваясь этим, миметики IL-15 и IL-15, или любые функциональные эквиваленты IL-15, включая IL-2 и IL-7. Физиологическое действие, оказываемое IL-15, IL-2 и IL-7 на культивируемые Vδ2$^-$ γδ Т-клетки (как описано в данном изобретении) было по существу одинаковым, а именно, выражалось в индуцировании клеточной дифференциации в сторону более цитотоксического фенотипа, включая повышение уровней экспрессии NKG2D и NCR (NKp30 и NKp44), усиление противоопухолевой цитотоксической функции и усиление производства провоспалительных цитокинов, таких как IFN-γ.

Термины “при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7” и “при отсутствии интерлейкина-4” относятся не только к полному отсутствию этих цитокинов в культуральной среде, но также включают использование таких цитокинов при настолько низком уровне их концентрации, чтобы они не могли послужить причиной пригодного к измерению ответа или физиологического воздействия на целевые клетки, и тем самым их можно было считать отсутствующими с практической точки зрения. К тому же, “пригодное к измерению физиологическое действие на целевые клетки”

обозначает любое доступное для измерения изменение в физиологическом состоянии клеток, в объеме данного изобретения и в соответствии со стандартными определениями. Например, изменение в физиологическом состоянии клеток можно определить по изменению их состояния активации (распознаваемого по увеличению или снижению уровней экспрессии клеточного маркера ранней активации CD69); или по изменению их состояния дифференциации (распознаваемого по увеличению или снижению уровней NKG2D или NCRs), через несколько часов или дней после контакта с такими цитокинами. Измеримым физиологическим действием может быть также изменение в скорости пролиферации клетки, которое измеряется с помощью CFSE окрашивания или любым другим способом, известным специалистам в данной области. Для любого специалиста в данной области должно быть понятно, что клетки, культивируемые в первой культуральной среде не должны подвергаться влияющему на функциональность воздействию IL-2, IL-7 и IL-15 или функционально похожих факторов роста. Кроме того, клетки во второй культуральной среде не должны подвергаться влияющему на функциональность воздействию IL-4 или функционально похожих факторов роста. Предпочтительным образом, эти цитокины не должны присутствовать в клеточной культуральной среде в конечных концентрациях выше чем 2нг/мл; более предпочтительным образом, не выше чем 1нг/мл, более предпочтительным образом не выше чем 0,1нг/мл, более предпочтительным образом, они должны отсутствовать.

Предпочтительным образом, в настоящем изобретении предложен способ размножения и дифференциации $V\delta2^-$ γδ Т-клетки в образце, включающий:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4; при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-15, при отсутствии интерлейкина-4.

В другом варианте осуществления данного изобретения, в настоящем изобретении предложен способ размножения и дифференциации $V\delta2^-$ γδ Т-клетки в образце включающий:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4; при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1) во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-2, при отсутствии интерлейкина-4.

Дополнительным образом, в другом варианте осуществления данного изобретения, в настоящему изобретении предложен способ размножения и дифференциации Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в образце, включающий:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4; при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-7, при отсутствии интерлейкина-4.

Первая или вторая культуральная среда, или обе культуральные среды, могут дополнительно содержать другие ингредиенты, которые могут помогать росту и размножению Vδ2$^-$ γδ Т-клеток. Примерами таких ингредиентов, которые могут быть добавлены, служат, не ограничиваясь этим, плазма или сыворотка, очищенные белки, такие как альбумин, источники липидов, такие как липопротеин низкой плотности (LDL), витамины, аминокислоты, стероиды и любые другие добавки, поддерживающие или стимулирующие рост и/или выживание клеток.

Первая или вторая культуральная среда, или обе культуральные среды, могут дополнительно содержать другие факторы роста, включая цитокины, которые могут дополнительно улучшать размножение Vδ2$^-$ γδ Т-клеток. Примеры таких цитокинов включают, не ограничиваясь этим: (**i**) интерферон-γ и любой фактор роста, обладающий интерферон-γ-подобной активностью, (**ii**) интерлейкин-21 и любой фактор роста, обладающий интерлейкин-21-подобной активностью и (**iii**) IL-1β и любой фактор роста, обладающий интерлейкин-1β-подобной активностью. Примерами других факторов

роста, которые можно добавить, включают ко-стимуляторные молекулы, такие как антитело человека, специфичное к SLAM, любой растворимый лиганд CD27, или любой растворимый лиганд CD7. В первую или вторую культуральную среду, или в обе среды, можно добавить любую комбинацию этих факторов роста.

Термин "фактор роста, обладающий интерферон-γ-подобной активностью" обозначает любое соединение, обладающее такой же активностью, как IFN-γ, в отношении его способности способствовать выживанию или пролиферации Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в культуральной среде и включает, не ограничиваясь этим, IFN-γ и IFN-γ миметики, или любой функциональный эквивалент IFN-γ.

Термин "фактор роста, обладающий интерлейкин-21-подобной активностью" обозначает любое соединение, обладающее такой же активностью, как IL-21, в отношении его способности способствовать выживанию или пролиферации Vδ2$^-$ γδ Т-клетки в культуральной среде и включает, не ограничиваясь этим, IL-21 и IL-21 миметики, или любой функциональный эквивалент IL-21.

Термин "фактор роста, обладающий интерлейкин-1β-подобной активностью" обозначает любое соединение, обладающее такой же активностью, как IL-1β, в отношении его способности способствовать выживанию или пролиферации Vδ2$^-$ γδ Т-клетки в культуральной среде и включает, не ограничиваясь этим, IL-1β и IL-1β миметики, или любой функциональный эквивалент IL-1β.

В частности, авторы данного изобретения обнаружили, что добавление второго фактора роста, обладающего интерферон-γ-подобной активностью, к первой или второй культуральной среде, или к обеим культуральным средам, привело к усилению размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток, в сравнении с размножением при использовании одного фактора роста.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4 и интерферон-γ, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-15 и интерферон-γ, при отсутствии интерлейкина-4, для размножения и дифференциации Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

Предпочтительным образом, фактор роста, обладающий IFN-γ-подобной активностью, присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 2 до приблизительно 500 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 20 до приблизительно 200 нг/мл. Более предпочтительным образом, вторая культуральная среда содержит приблизительно 70 нг/мл фактора роста, обладающего IFN-γ-подобной активностью, такого как IFN-γ.

Авторы данного изобретения обнаружили, что добавление второго фактора роста, обладающего IFN-γ-подобной активностью, и третьего фактора роста, обладающего IL-21-подобной активностью, к первой или второй культуральной среде, или к обеим культуральным средам, приводит к усилению размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток, в сравнении с размножением при использовании одного или двух факторов роста.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, интерферон-γ и интерлейкин-21, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-15 и интерферон-γ, при отсутствии интерлейкина-4, для размножения и дифференциации Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

Предпочтительным образом, фактор роста, обладающий IL-21-подобной активностью, присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 500 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 2 до приблизительно 200 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 5 до приблизительно

100 нг/мл. Наиболее предпочтительным образом, вторая культуральная среда содержит приблизительно 15 нг/мл фактора роста, обладающего IL-21-подобной активностью, такого как IL-21.

Авторы данного изобретения также обнаружили, что добавление второго фактора роста, обладающего IFN-γ-подобной активностью, и третьего фактора роста, обладающего IL-21-подобной активностью, и четвертого фактора роста, обладающего IL-1β-подобной активностью, к первой или второй культуральной среде, или к обеим культуральным средам, привело к усилению размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в сравнении с размножением при использовании одного, двух или трех факторов роста.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, интерферон-γ, интерлейкин-21 и интерлейкин-1β, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-15, интерферон-γ и интерлейкин-21, при отсутствии IL-4, для размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

Предпочтительным образом, фактор роста, обладающий IL-1β-подобной активностью, присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 500 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 2 до приблизительно 200 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 5 до приблизительно 100 нг/мл. Наиболее предпочтительным образом, вторая культуральная среда содержит приблизительно 15 нг/мл фактора роста, обладающего IL-1β-подобной активностью, такого как IL-1β.

Авторы данного изобретения также обнаружили, что добавление ко-стимуляторной молекулы к первой или второй культуральной среде, или к обеим культуральным средам, привело к усилению размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в сравнении с размножением без использования такой молекулы.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, и любой молекулярный лиганд CD27, или любой молекулярный лиганд SLAM, или любой молекулярный лиганд CD7 рецепторов, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-15, при отсутствии IL-4, для размножения $V\delta2^-$ γδ Т-клеток.

Термин “молекулярный лиганд” обозначает любую молекулу или соединение, которое связывается со специфическим рецептором-мишенью. В частности, авторы данного изобретения обнаружили, что добавление растворимого лиганда CD27, или растворимого лиганда CD7, или растворимого лиганда SLAM, привело к усилению размножения $V\delta2^-$ γδ Т-клеток. Эти растворимые лиганды являются функциональными агонистами каждого из этих молекулярных рецепторов, и любые подобные агонисты, связывающиеся с этими рецепторами, могут оказывать такое же действие на $V\delta2^-$ γδ Т-клетки, например, агонистические антитела, такие как антитела человека, специфичные к SLAM, антитела человека, специфичные к CD27 и антитела человека, специфичные к CD7.

Общий период культивирования может включать более одной стадии суб-культивирования. Например, каждая из описанных выше стадий культивирования может быть разделена еще на две стадии суб-культивирования (1a) и (1b), и (2a) и (2b), при этом могут использоваться разные комбинации ингредиентов, в соответствии с описанным способом.

Соответственно, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, интерферон-γ, интерлейкин-1β и интерлейкин-21, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2a) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-15 и интерлейкин-21, при отсутствии интерлейкина-4; и

(2b) культивирование клеток, полученных на стадии (2a) в третьей культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-15 и интерферон-γ, при отсутствии интерлейкина-4, для размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

В другом варианте осуществления данного изобретения, способ по первому аспекту изобретения включает:

(1a) культивирование клеток образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, интерферон-γ, и интерлейкин-21, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(1b) культивирование клеток, полученных на стадии (1a), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток, интерлейкин-4, интерферон-γ, и интерлейкин-1β, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1b) в третьей культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-15, при отсутствии интерлейкина-4; для размножения Vδ2$^-$ γδ Т-клеток.

TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные способом, описанным в данном изобретении, можно использовать для множества различных экспериментальных, терапевтических и коммерческих целей. Они включают, не ограничиваясь этим, дальнейшую генетическую модификацию или генетическое редактирование таких клеток, например, с целью улучшения их терапевтического потенциала. Например, с целью перенаправления специфичности TCRγδ$^+$ Т-клеток через экспрессию рецептора химерного антигена (CAR) или TCR на этих клетках. Экспрессию CAR можно индуцировать с помощью электропорации TCRγδ$^+$ клеток для введения генетического материала, или с помощью инфицирования этих клеток вирусными векторами, такими как лентивирусы или ретровирусы, содержащими нужный генетический материал. Такое генетическое редактирование может улучшить активность TCRγδ$^+$ Т-клеток путем улучшения хоминга, производства цитокинов, возобновления киллинга, и/или улучшения приживления трансплантата.

Данное изобретение представляет новые способы селективного размножения Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток в культуральной среде. Способы согласно первому аспекту данного изобретения осуществляются на образце, также называемом в этом документе “исходный образец”. Способы могут осуществляться как на нефракционированных образцах, так и на образцах, обогащенных TCRγδ$^+$ Т-клетками.

Упомянутый образец может быть любым образцом, содержащим TCRγδ$^+$ Т-клетки или их предшественники, включая, но не ограничиваясь этим, кровь, костный мозг, лимфатическую ткань, эпителий, вилочковую железу, печень, селезенку, раковые ткани, ткань лимфоузла, инфицированную ткань, зародышевую ткань, а также их фракции и обогащенные части. Упомянутый образец предпочтительным образом является образцом крови, включая периферическую кровь, или пуповинную кровь, или их фракции, включая клетки лейкоцитарной пленки, продукты лейкафереза, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и мононуклеарные клетки низкой плотности (LDMC). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец является образцом крови человека или ее фракции. Клетки могут быть извлечены из образца крови с помощью способов, известных специалистам в данной области, таких как центрифугирование по градиенту плотности. Например, цельную кровь можно поместить на эквивалентный объем Ficoll-Hypaque™ и центрифугировать при 400g в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Межфазный материал будет содержать мононуклеарные клетки низкой плотности, которые можно собрать и промыть в культуральной среде, и центрифугировать при 200g в течение 10 минут при комнатной температуре.

Выделенные или неочищенные TCRγδ$^+$ Т-клетки можно культивировать или сохранять в любой подходящей для клеток млекопитающих культуральной среде, такой как AIM-V™, RPMI 1640, OPTMIZER CTS™ (Gibco, Life Technologies), EXVIVO-10, EXVIVO-15 или EXVIVO-20 (Lonza), в присутствии сыворотки или плазмы. Клетки можно перенести, например, в статические газопроницаемые пакеты для клеточного культивирования в клинических условиях VueLife® (Saint Gobain) или в клинические пакеты для клеточного культивирования Miltenyi Biotecs. Клеточные пакеты, содержащие клетки и культуральную среду, можно поместить в инкубатор при 37ºC и 5% CO_2, в темноте.

Перед культивированием образца или его фракции (такого как PBMC) в первой

культуральной среде, образец или его фракцию можно обогатить определенным типом клеток и/или обеднить в отношении других типов клеток. В частности, образец или его фракцию можно обогатить Т-клетками, или TCRγδ$^+$ Т-клетками, или обеднить в отношении TCRαβ$^+$ Т-клеток или не-TCRγδ$^+$ Т-клеток. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения, образец сначала обедняют в отношении TCRαβ$^+$ Т-клеток, и затем обогащают CD3$^+$ клетками.

Образец может быть обогащен или обеднен в отношении определенных видов клеток при помощи способов, известных в этой области техники. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, образец или его фракцию можно обеднить в отношении клеток определенного фенотипа при помощи его культивирования со смесью антител, связывающихся со специфическими молекулами на клетках, в отношении которых проводится обеднение. Предпочтительным образом, антитела в смеси закреплены на магнитных микрогранулах, чтобы таким образом можно было обеднить или обогатить целевые клетки при пропускании их через магнитную колонну.

После того, как клетки образца фракционировали и обогатили, при необходимости, эти клетки подвергают культивированию в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере один фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, такой как интерлейкин-4, при отсутствии факторов роста, обладающих интерлейкин-15-подобной активностью, таких как интерлейкин-15, интерлейкин-2 и интерлейкин-7.

Предпочтительным образом, митоген Т-клеток в первой культуральной среде присутствует в количестве от приблизительно 10 до приблизительно 5000 нг/мл. Более предпочтительным образом, митоген Т-клеток присутствует в количестве от приблизительно 20 до приблизительно 2000 нг/мл. Более предпочтительным образом, митоген Т-клеток присутствует в количестве от приблизительно 50 до приблизительно 1000 нг/мл. Наиболее предпочтительным образом, среда содержит 70 нг/мл митогена Т-клеток.

Предпочтительным образом, фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве

от приблизительно 5 до приблизительно 500 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 20 до приблизительно 200 нг/мл. Наиболее предпочтительным образом, среда содержит 100 нг/мл фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью, такого как IL-4.

Клетки предпочтительным образом культивируют в первой культуральной среде в течение периода времени от приблизительно 2 дней до приблизительно 21 дней. Более предпочтительным образом, от приблизительно 3 дней до приблизительно 14 дней. Более предпочтительным образом, от приблизительно 4 дней до 8 дней.

После культивирования в первой культуральной среде, клетки субкультивируют во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере один фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, такой как IL-15, IL-2 или IL-7, при отсутствии факторов роста, обладающих интерлейкин-4-подобной активностью, таких как IL-4. Если клетки субкультивируют, например, в присутствии как IL-15, так и IL-4, то пролиферация продолжается, но понижается выживаемость, и ключевые NK рецепторы, находящиеся на клеточной поверхности (такие как NKG2D, NKp30 и NKp44), интернализируются внутрь клетки. Вследствие этого, эти рецепторы больше не могут связываться со своими лигандами, экспрессируемыми на опухолевых клетках, что понижает противоопухолевуювую цитотоксическую активность этих клеток.

Стадия субкультивирования состоит в культивировании клеток, полученных на стадии 1, в другой культуральной среде. Это можно осуществить, добавляя новую культуральную среду к первой культуральной среде, предпочтительным образом после удаления части первой культуральной среды. Это можно произвести путем центрифугирования и/или декантирования клеток, удаления части первой культуральной среды, и повторного суспендирования клеток во второй культуральной среде. Предпочтительным образом, стадия субкультивирования включает удаление по меньшей мере 3/4 первой культуральной среды. Стадию субкультивирования необходимо проводить, так как для размножения и дифференциации $V\delta2^-$ γδ Т-клеток важно, чтобы фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, был удален во время стадия субкультивирования.
Предпочтительным образом, во второй культуральной среде митоген Т-клеток присутствует в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мкг/мл. Более

предпочтительным образом, митоген Т-клеток присутствует в количестве от приблизительно 0,3 до приблизительно 10 мкг/мл. Более предпочтительным образом, митоген Т-клеток присутствует в количестве от приблизительно 0,5 до приблизительно 5 мкг/мл. Наиболее предпочтительным образом, среда содержит 1 мкг/мл митогена Т-клеток.

Предпочтительным образом, фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, такой как IL-15, IL-2 или IL-7, присутствует в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 1000 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 2 до приблизительно 500 нг/мл. Более предпочтительным образом, этот фактор роста присутствует в количестве от приблизительно 20 до приблизительно 200 нг/мл. Наиболее предпочтительным образом, вторая культуральная среда содержит приблизительно 70 нг/мл фактора роста, обладающего интерлейкин-15-подобной активностью, такого как IL-15, IL-2 или IL-7.

Клетки предпочтительным образом культивируют во второй культуральной среде в течение периода времени от приблизительно 2 дней до приблизительно 30 дней. Более предпочтительным образом, от приблизительно 5 дней до приблизительно 21 дней. Более предпочтительным образом, от приблизительно 10 дней до 15 дней.

Предпочтительным образом, в соответствии с первым аспектом данного изобретения, и первая и вторая культуральная среда содержат сыворотку или плазму. Количество плазмы в первой и второй культуральной среде предпочтительным образом составляет от приблизительно 0,5% до приблизительно 25% по объему, например, от приблизительно 2% до приблизительно 20% по объему или от приблизительно 2,5% до приблизительно 10% по объему, например, равняется 5% по объему. Сыворотка или плазма могут быть получены из любого источника, включая, но не ограничиваясь этим, периферическую кровь человека, пуповинную кровь, или кровь, происходящую от другого вида млекопитающих. Плазма может быть от одного донора или от нескольких доноров. Если аутологичные TCRγδ$^+$ Т-клетки предназначены для клинического применения, то есть будут введены тому же пациенту, у которого был получен исходный образец, то предпочтительно использовать также аутологичную плазму (то есть от того же пациента) для исключения возможности введения пациенту вредных продуктов

(например, вирусов). Для исключения возможности введения пациенту продукта животного происхождения, плазма должна быть плазмой человека.

TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные в соответствии с первым аспектом по данному изобретению, можно отделить от других клеток, которые могут присутствовать в конечной культуральной среде, с помощью способов, известных специалистам в данной области техники, включая клеточную сортировку, иммуномагнитное разделение, аффинную колоночную хроматографию, центрифугирование по градиенту плотности и клеточный пэннинг.

TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные по способу в соответствии с первым аспектом данного изобретения, также пригодны к использованию. Соответственно, авторы данного изобретения описывают клеточный препарат TCRγδ$^+$ Т-клеток.

Во втором аспекте, данное изобретение представляет клеточный препарат, обогащенный TCRγδ$^+$ Т-клетками, полученными в соответствии со способом по первому аспекту данного изобретения.

В третьем аспекте, данное изобретение представляет клеточный препарат, обогащенный TCRγδ$^+$ Т-клетками, в котором TCRγδ$^+$ Т-клетки составляют более 80% от общего количества клеток.

Предпочтительным образом, во втором и третьем аспекте данного изобретения, TCRγδ$^+$ Т-клетки составляют более 80%, более предпочтительным образом более 90%, и наиболее предпочтительным образом более 95% от общего количества клеток обогащенной клеточной популяции.

TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные по способу в соответствии с первым и вторым аспектом данного изобретения, можно использовать для любых целей. TCRγδ$^+$ Т-клетки считаются первой линией защиты против инфекционных патогенов. Кроме того, TCRγδ$^+$ Т-клетки обладают природной цитолитической активностью, направленной против трансформированных клеток различного происхождения, включая В-клеточные лимфомы, саркомы и карциномы. В результате TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные и культивированные *ex vivo* по способам в соответствии с данным изобретением, могут

быть введены пациенту для лечения или предотвращения инфекций, рака, или заболеваний, возникших в результате подавления иммунитета.

Соответственно, в четвертом аспекте данное изобретение представляет способ модуляции иммунного ответа, включающий введение эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым или вторым аспектом данного изобретения, животному, нуждающемуся в этом.

Термин "эффективное количество" при использовании в этом документе обозначает количество, эффективное для достижения желаемого результата в необходимой для этого дозировке за необходимый период времени.

Термин "животное" при использовании в этом документе включает всех существ животного мира. Предпочтительным образом, это животное является млекопитающим, более предпочтительным образом оно является человеком.

В пятом аспекте, данное изобретение представляет способ лечения инфекции, включающий введение эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым или вторым аспектом данного изобретения, или полученных из клеточного препарата по второму или третьему аспекту данного изобретения, животному, нуждающемуся в этом.

Примеры инфекций для лечения включают, не ограничиваясь этим, бактериальные инфекции, такие как вызываемые *Mycobacteria* (например, туберкулез), вирусные инфекции, такие как вызываемые вирусом простого герпеса (HSV), вирусом иммунодефицита человека (HIV) или вирусами гепатита, и паразитные инфекции, такие как вызываемые *Plasmodium* (например, малярия).

В шестом аспекте, данное изобретение представляет способ лечения рака, включающий введение эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым или вторым аспектом данного изобретения или полученных из клеточного препарата по второму или третьему аспекту данного изобретения, животному, нуждающемуся в этом.

Примеры рака, подходящего для лечения, включают, не ограничиваясь этим, лейкоз, включая хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, острый миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, Т-клеточные и В-клеточные лейкозы, лимфомы (Ходжкина или неходжкинскую), лимфопролиферативные заболевания, плазмацитомы, гистоцитомы, меланомы, аденомы, саркомы, карциномы твердых тканей, гипоксические опухоли, плоскоклеточная карцинома, урогенитальный рак, такой как рак шейки матки или рак мочевого пузыря, гемопоэтический рак, рак головы и шеи, и рак нервной системы.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, рак, подвергаемый лечению, является хроническим лимфолейкозом. В таком варианте осуществления данного изобретения, PBMC можно получить от пациента, страдающего хроническим лимфолейкозом (CLL). После культивирования и размножения TCRγδ$^+$ Т-клеток, размноженные клетки не будут содержать существенного количества раковых CLL клеток, что позволит им быть пригодными для обратного ведения пациенту.

Эти аспекты данного изобретения также распространяются на TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные по способу в соответствии с первым или вторым аспектом данного изобретения, или полученные из клеточного препарата по второму или третьему аспекту данного изобретения, для применения по способу модулирования иммунного ответа, лечения инфекции, или лечения рака, как было описано выше. Данное изобретение далее включает применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым или вторым аспектом данного изобретения, в производстве медикамента или фармацевтической композиции для модулирования иммунного ответа, лечения инфекции, или лечения рака, как было описано выше.

TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные в соответствии с данным изобретением, также можно применять в экспериментальных моделях, например, для дальнейшего изучения и выявления функций этих клеток. Дополнительным образом, эти клетки можно использовать для исследований, направленных на идентификацию антигенов/эпитопов, распознаваемых TCRγδ$^+$ Т-клетками, и для дизайна и разработки вакцин.

Соответственно, в седьмом аспекте, данное изобретение представляет способ вакцинации животного, включающий введение эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым аспектом данного изобретения, или полученных из клеточного препарата в соответствии со вторым или третьим аспектом данного изобретения, животному, нуждающемуся в этом. Такая вакцина может быть введена пациенту с иммунной недостаточностью или индивидууму с повышенным риском развития инфекционного заболевания или рака.

Этот аспект данного изобретения также распространяется на применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных в соответствии с первым аспектом данного изобретения или полученных их клеточного препарата в соответствии со вторым или третьим аспектом данного изобретения, для производства вакцины, и на применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных по способу в соответствии с первым аспектом данного изобретения, или полученных их клеточного препарата в соответствии со вторым или третьим аспектом данного изобретения, в способе вакцинации животного.

Полученные TCRγδ$^+$ Т-клетки, в соответствии с данным изобретением, могут незамедлительно применяться для вышеописанных терапевтических, экспериментальных или коммерческих целей, или эти клетки могут быть заморожены для использования в будущем.

Предпочтительные признаки второго и последующих аспектов данного изобретения соответствуют описанию первого аспекта данного изобретения *mutatis mutandis*.
Другие признаки и преимущества данного изобретения являются очевидными из его приведенного подробного описания. Следует однако также понимать, что подробное описание и специфические примеры, указывающие на предпочтительные варианты осуществления данного изобретения, приведены только для примера, так как различные изменения и модификации данного изобретения являются очевидными для специалиста в данной области техники из приведенного подробного описания изобретения.

Настоящее изобретение полностью отличается от других изобретений, ранее описанных в данной области. В патентной заявке № PCT/CA1999/001024 (WO/2000/026347; дата подачи 04.11.1999) описан способ получения TCRγδ$^+$ Т-клеток. Этот способ включает две стадии, в которых TCRγδ$^+$ Т-клетки из исходного образца

культивируют в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и по меньшей мере два цитокина, предпочтительным образом интерлейкин-2 и интерлейкин-4. Клетки, полученные в первой стадии затем культивируют во второй культуральной среде, содержащей по меньшей мере два цитокина, являющихся предпочтительным образом интерлейкином-2 и интерлейкином-4. Важно отметить, что цитокины, используемые на каждой стадии, могут быть одинаковыми или разными.

В противоположность этому, данное изобретение раскрывает двухстадийный способ селективного размножения и дифференциации Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в культуральной среде, в котором первая и вторая стадии культивирования обязательно отличаются одна от другой. Первая стадия включает культивирование TCRγδ$^+$ Т-клеток из исходного образца в культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий IL-4-подобной активностью, предпочтительным образом интерлейкин-4, при отсутствии интерлейкина-2, интерлейкина-7 и интерлейкина-15. В настоящем изобретении было четко показано, что IL-4 и IL-2 (или IL-7, или IL-15) выполняют очень специфическую функцию на каждой стадии культивирования, и обладают противоположным действием. Первая культуральная среда содержит фактор роста, обладающий IL-4-подобной активностью, который нельзя смешивать с (IL-2 /IL-7 /IL-15-подобными) факторами роста, так как в противном случае жизнеспособность и пролиферация клеток понизятся и желаемый клеточный продукт получен не будет. Первая стадия клеточного культивирования используется для многократного размножения TCRγδ$^+$ Т-клеток в течение исключительно малого промежутка времени, приводя к получению продукта, высокообогащенного Vδ2$^-$ γδ Т-клетками. Фактически, отсутствие IL-2/IL-7-IL15-подобных факторов роста в культуральной среде позволяет избежать многих загрязнений (клеток других типов), которых не удалось бы избежать без этой инновации. Размножившиеся Vδ2$^-$ γδ Т-клетки находятся в менее дифференцированном состоянии из-за отсутствия контакта с интерлейкин-2/-15/-7-подобными факторами роста. С целью дифференциации клеток в сторону более цитотоксического и провоспалительного фенотипа, Vδ2$^-$ γδ Т-клетки, полученные в результате первой стадии, необходимо прокультивировать во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, при отсутствии фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью. Опять же, критически важным является отсутствие смешения этих различных факторов роста, так как присутствие IL-4 во второй культуральной среде

приводит к понижению жизнеспособности и цитотоксичности клеток. Вторая стадия культивирования приводит к дальнейшему размножению Vδ2$^-$ γδ Т-клеток в культуральной среде и делает их более качественными эффекторными клетками, приводя к получению специфического клеточного продукта, который можно использовать в различных терапевтических целях.

В патентной заявке США № US2003/0157060 A1 (№ US10239854, дата приоритета 03.04.2000), описывается другой способ размножения TCRγδ$^+$ Т-клеток в культуральной среде. Этот способ также включает две стадии, в которых TCRγδ$^+$ Т-клетки исходного образца культивируют в первой культуральной среде, содержащий (1) митоген Т-клеток, (2) фактор роста, обладающий интерлейкин-2-подобной активностью и (3) фактор роста, обладающий интерлейкин-7-подобной активностью. Клетки, полученные в результате первой стадии, культивируют во второй культуральной среде, содержащей (1) фактор роста, обладающий интерлейкин-2-подобной активностью и (2) фактор роста, обладающий интерлейкин-7-подобной активностью, для размножения TCRγδ$^+$ Т-клеток.

В противоположность этому, настоящее изобретение отличается от упомянутого, так как две стадии культивирования обязательно отличаются одна от другой, так как служат разным целям. Данное изобретение четко исключает использование факторов роста, обладающих интерлейкин-2-подобной активностью или интерлейкин-7-подобной активностью из первой стадии культивирования, по причинам, изложенным ранее (см. выше). Несмотря на то, что настоящее изобретение описывает присутствие других факторов роста в первой и/или второй культуральной среде, включая цитокины, такие как интерферон-γ, IL-1β и IL-21, эти цитокины не могут рассматриваться как обладающие интерлейкин-2-подобной или интерлейкин-7-подобной активностью, так как физиологические эффекты, которые они производят на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки, являются очень различными. Например, клетки, культивированные в присутствии интерферона-γ, IL-1β и IL-21 (при отсутствии IL-2, IL-7 и IL-15) не могут приобрести свою полную цитотоксическую функцию и состояние дифференциации, при этом интерферон-γ, IL-1β и IL-21 не могут имитировать сильное провоспалительное действие IL-2, IL-7 и IL-15 на культивируемые Vδ2$^-$ γδ Т-клетки (**Таблица 2**). Дополнительным образом, некоторые из этих цитокинов, такие как Интерферон-γ и IL-1β, принадлежат к структурно отличающемуся семейству цитокинов.

Данное изобретение далее будет описано со ссылками на следующие примеры и чертежи, в которых:

Чертежи:

На Фиг.1 показана процентная доля TCRγδ⁺ T PBL в образце периферической крови, взятом у здорового донора, до и после активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS). 50-150 мл свежей периферической крови получили от здорового добровольца и разбавили в соотношении 1:1 (по объему) с PBS (Invitrogen Gibco) и центрифугировали с использованием Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) в объемном соотношении 1:3 (1 часть фиколла к 3 частям разбавленной крови) в течение 35 минут при 1500 об/мин и 25°C. Межфазный слой, содержащий мононуклеарные клетки (PBMC) собрали и промыли (в PBS). Общий объем TCRγδ⁺ T-клеток пометили при помощи анти-TCRγδ mAb, связанных с магнитными микрогранулами, и выделили TCRγδ⁺ T-клетки (до приблизительно 75% чистоты) используя магнитную колонку (Miltenyi Biotec, German). Клетки пометили следующими флуоресцентными моноклональными антителами: анти-CD3–PerCP-Cy5.5 (Biolegend; клон SK7); анти-TCR-Vδ1-APC (Miltenyi Biotec, клон REA173); анти–мышный IgG1κ-APC Isotype Ctrl (Miltenyi Biotec; клон IS5-21F5). Клетки анализировали при помощи проточного цитометра Fortessa II (BD Biosciences). Показаны репрезентативные результаты шести независимых экспериментов.

На Фиг.2 показана процентная доля TCRγδ⁺ T PBL в образце периферической крови, взятом у ранее выбранного здорового донора, до и после двухстадийной сортировочной процедуры MACS. 50-150 мл свежей периферической крови получили от здоровых добровольцев и разбавили в соотношении 1:1 (по объему) с PBS (Invitrogen Gibco) и центрифугировали с использованием Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) в объемном соотношении 1:3 (1 часть фиколла к 3 частям разбавленной крови) в течение 35 минут при 1500 об/мин и 25°C. Межфазный слой, содержащий мононуклеарные клетки (PBMCs) собрали и промыли (в PBS). Затем нежелательные TCRαβ⁺ T лимфоциты пометили путем инкубации в присутствии моноклонального антитела мыши, специфичного к TCRαβ (mAb) человека, связанного с Biotin (Miltenyi

Biotec Ref#701-48, клон BW242/412). Затем клетки снова пометили моноклональным антителом мыши, специфичным к биотину, связанным с магнитными микрогранулами (Miltenyi Biotec Ref#173-01). Наконец, клеточную суспензию загрузили в магнитную колонку (Miltenyi Biotec, Германия) и магнитным образом обеднили в отношении $TCR\alpha\beta^+$ Т лимфоцитов (которые утилизировали). Клетки $CD3^+$ (большинство из которых являлось $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетками), присутствующие в оставшейся клеточной популяции, пометили с помощью моноклонального антитела мыши, специфичного к CD3 человека (Miltenyi Biotec Ref#273-01, клон OKT-3, нацелен на эпитоп, расположенный на цепи CD3 эпсилон), связанного с суперпарамагнитными частицами декстрана железа. Клетки загрузили в магнитную MACS разделительную колонну и положительно выбрали (очистили) $CD3^+$ клетки. Клетки окрасили на TCRγδ, CD3, TCRVδ1 и TCRVδ2 маркеры, и проанализировали с помощью проточного цитометра Fortessa II (BD Biosciences). Показаны репрезентативные результаты шести независимых экспериментов.

На Фиг.3 показан обзор протестированных условий культивирования. A-C. $TCR\gamma\delta^+$ PBL от здорового донора выделили с помощью MACS согласно описанию, приведенному выше, и культивировали на 96-луночных планшетах в количестве 1 миллиона клеток на лунку в полной культуральной среде (Optmizer CTS, GIBCO) с добавкой 5% сыворотки человека, 1 ммоль L-глютамина, при 37°C и 5% CO_2. Клетки равномерно распределили по лункам и культивировали в присутствии трех фиксированных комбинаций моноклонального антитела, специфичного к CD3, и IL-4, с добавками различных концентраций IL-2, IL-7, IL-15 или IFN-γ. Свежую среду с добавками тех же факторов роста добавляли каждые 5-6 дней. В конце культивационного периода, клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью проточной цитометрии. Каждый фактор роста использовали отдельно в серии разбавлений от 500 нг/мл до 0,1 нг/мл. На графиках показаны лучшие условия культивирования из проверенных (то есть, с наибольшим увеличением количества $V\delta1^+$ клеток), для каждого цитокина (IL-2, IL-7, IL-15 и IFN-γ). Контрольный образец содержал только IL-4 и моноклональное антитело, специфичное к CD3. **D.** Общее количество $CD3^+$ PBL выделили с помощью MACS с моноклональным антителом, специфичным к CD3 человека (связанным с парамагнитными гранулами) из периферической крови того же самого донора и культивировали и анализировали согласно описанию, приведенному выше. Показано среднее ±SD из 3 технических повторов. Статистический анализ проводили с помощью компьютерной программы Graphpad-Prism. Разницу

между популяциями оценивали с помощью *t* теста Стьюдента и указали, где она достоверна, как *$P < .05$; **$P < .01$; и ***$P < .001$ на чертежах.

На Фиг.4 показана процентная доля Vδ1$^+$ T PBL до и после культивирования *in vitro* в течение 15 дней. TCRγδ$^+$ PBL от здорового донора выделили с помощью MACS согласно описанию, приведенному выше, и культивировали в присутствии 200 нг/мл IFN-γ, 1 мкг/мл α-CD3 и 100 нг/мл IL-4. Свежую среду с добавками тех же факторов роста добавляли каждые 5-6 дней. Показан анализ графика FACS на 15 день. Репрезентативные результаты трех независимых экспериментов.

На Фиг.5 показана панель тестов клеток в культуральных средах. TCRγδ$^+$ T PBL от здорового донора выделили с помощью MACS согласно описанию, приведенному выше, и культивировали в различных коммерчески доступных бессывороточных средах клинического уровня для клеточного культивирования. Клетки культивировали в первой культуральной среде в присутствии 70 нг/мл IFN-γ, 1 мкг/мл α-CD3 и 100 нг/мл IL-4, а затем культивировали во второй культуральной среде в присутствии 100 нг/мл IL-15 и 2 мкг/мл моноклонального антитела, специфичного к CD3, (при отсутствии IL-4). Показано конечное количество клеток и процентное содержание клеток по FACS анализу на 15 день. Показано среднее значение ±SD от трех технических повторений.

На Фиг.6 показано размножение Vδ1$^+$ Т-клеток *in vitro* и превращение их в доминирующую субпопуляцию в культуральной среде. 70 мл концентрированной периферической крови (соответствует 450 мл периферической крови) получили из 8 лейкоцитарных пленок от 8 здоровых доноров. Кровь центрифугировали неразбавленной в Ficoll-Paque (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich) в объемном соотношении 1:3 (1 часть фиколла на 3 части крови) в течение 35 минут при 1600 об/мин и 25°C. Межфазный слой, содержащий мононуклеарные клетки (PBMC) собрали и промыли (в солевом растворе). TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью ранее описанной двухстадийной процедуры MACS и повторно суспендировали в бессывороточной культуральной среде (OPTMIZER, GIBCO) с добавкой 5% аутологичной плазмы и 1 ммоль L-глютамина. Клетки посеяли при концентрации $0,5x10^6$ клеток на мл и размножали в закрытых газопроницаемых 1л пластиковых пакетах для клеточного культивирования в инкубаторе при 37°C и 5% CO_2. Факторы роста добавили к клеточной культуральной среде в соответствии с ранее описанным двухстадийным протоколом:

70 нг/мл моноклонального антитела, специфичного к CD3, 100 нг/мл IL-4, 70 нг/мл IFN-γ, 7 нг/мл IL-21 и 15 нг/мл IL-1β добавили к первой культуральной среде, и 70 нг/мл IL-15, 100 нг/мл IFN-γ, 15 нг/мл IL-21 и 1 мкг/мл моноклонального антитела, специфичного к CD3, добавили ко второй культуральной среде. Фракцию старой среды удаляли и добавляли новую среду с факторами роста каждые 5-6 дней. Дополнительные "питающие" клетки в этой системе не были необходимы. Левая панель показывает процентную долю $CD3^+V\delta1^+$ клеток по отношению к общему количеству живых клеток по результатам проточного цитометрического анализа. Правая панель показывает кратность увеличения абсолютного количества $CD3^+$ $V\delta1^+$ Т-клеток относительно исходного количества клеток. Подсчет живых клеток произвели с помощью Trypan Blue-положительного исключения в гемоцитометре. Показаны средние результаты трех измерений количества клеток.

На Фиг.7 показана экспрессия нескольких маркеров клеточной поверхности в размноженных *in vitro* $V\delta1^+$ Т-клетках. Показана экспрессия активирующих рецепторов NKp30, NKp44 и NKG2D в $CD3^+V\delta1^+$ Т-клетках после 16 дней культивирования (как в Таблице 8). Также показано контрольное окрашивание изотипа моноклонального антитела (нужно заметить, что контроль для экспрессии NKp30 и NKp44 одинаковый).

На Фиг.8 показано, что размноженные *in vitro* $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки являются цитотоксичными по отношению к CLL клеткам, но не по отношению к аутологичным PBMC. После 21 дня размножения и дифференциации (как изображено на Фиг.6), полученные $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки ко-инкубировали с целевыми клетками (предварительно помеченными DDAO-SE) в течение 3ч при 37ºC, и оценивали гибель целевых клеток по окрашиванию Annexin V. **(A)** Проточный цитометрический анализ восприимчивых MEC-1 CLL клеток (верхняя панель) и невосприимчивых аутологичных PBMC (нижняя панель). Репрезентативные схемы трех технических повторений. (**B**) Влияние разных соотношений мишень:эффектор и блокирующих антител против NKG2D или NKp30 на уничтожение клеток лейкоза MEC-1. Планки погрешностей выражают стандартное отклонение (SD) (n = 3, $*P< .05$). **(C)** Размноженные (и дифференцированные) $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки (называемые в настоящей заявке “DOT-клетки”) от донора A совместно инкубировали с тремя первичными образцами клеток B-CLL (собранными из периферической крови CLL/SLL пациентов и обогащенные CD19 с

помощью MACS) или с аутологичными здоровыми PBMC. Показано среднее значение +SD трех технических повторений.

Подробное описание: Клеточную линию MEC-1 CLL[46] получили из Центра ресурсов биологических материалов Германии (DSMZ). Опухолевые клетки MEC-1 культивировали в T25 колбах в полной среде 10% RPMI 1640 с 10% бычьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль L-глютамина, и поддерживали количество клеток в количестве от 10^5 до 10^6 клеток на мл путем разбавления и разделения в отношении 1:3 каждые 3-4 дня. Для анализа на цитотоксичность, размноженные *in vitro* TCRγδ$^+$ T-клетки поместили в 96-луночный планшет с круглодонными лунками. Клеточные линии опухоли или первичные образцы лейкоза окрашивали с помощью CellTrace Far Red DDAO-SE (1 мкмоль; Molecular Probes, Invitrogen) и инкубировали при указанном соотношении мишень:эффектор с TCRγδ$^+$ T-клетками в среде RPMI 1640 в течение 3 часов при 37°C и 5% CO_2, в присутствии 70 нг/мл IL-15. Затем все клетки окрасили с помощью Annexin V–FITC (BD Biosciences) и проанализировали методом проточной цитометрии.

На Фиг.9 показано, что активированные TCRγδ$^+$ T-клетки производят высокий уровень IFN-γ. TCRγδ$^+$ T-клетки от двух здоровых доноров получили в пакетах для клеточного культивирования за 21 день и провели культивирование по двухстадийному протоколу согласно описанию, приведенному выше. Клетки промыли, поместили на 96-луночный планшет и повторно стимулировали свежей средой с содержанием 100 нг/мл IL-15 и 2 мкг/мл анти-CD3 mAb. Через 48 ч надосадочную жидкость клеточной культуры проанализировали методом проточной цитометрии с помощью Cytometric bead array (BD Biosciences). «Оптимайзер» относится к клеткам, содержавшимся в среде без добавления активирующих компонентов. Показаны средние значения +SD трех технических повторений. Планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (SD) (n = 3, $^{**}P < .01$).

На Фиг.10 показано, что TCRγδ$^+$ T-клетки от CLL/SLL пациентов интенсивно размножаются *in vitro* и являются высокотоксичными в отношении CLL/SLL клеток и CMV-инфицированных клеток. MACS-отсортированные TCRγδ$^+$ PBL от трех CLL/SLL пациентов культивировали в течение 21 дня с цитокинами и mAb согласно описанию, приведенному выше. Левая панель: клетки анализировали методом проточной цитометрии на ко-экспрессию TCRVδ1/CD3 и вычисляли порядок увеличения

числа $CD3^+V\delta1^+$ Т-клеток. Живые клетки идентифицировали методом проточной цитометрии с использованием красителя жизнеспособности (Zombie Violet; Biolegend) и определили количество с применением Trypan Blue в гемоцитометре. Правая панель: $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки от CLL/SLL пациента совместно культивировали в течение 3 ч в соотношении 1:10 мишень:эффектор на 96-луночном планшете с полученными из CLL/SLL MEC-1 клетками или с фибробластами крайней плоти человека (FFB), как здоровыми, так и ранее инфицированными YFP^+ цитомегаловирусом штамма AD169 (m.o.i 0.005; планки погрешностей обозначают стандартное отклонение (SD) (n=3 для каждой группы). Относительное количество мертвых опухолевых клеток перед инкубацией с DOT-клетками составляло приблизительно 20% в каждой группе. SLL означает малую лимфоцитарную лимфому.

На Фиг.11 показано, что *in vitro* размноженные $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки являются цитотоксичными по отношению к раковым клеткам различных тканей. $TCR\gamma\delta^+$ Т-лимфоциты периферической крови одного здорового донора подвергли MACS-сортировке и стимуляции *ex vivo* в присутствии цитокинов и моноклонального антитела, специфичного к CD3, в течение 21 дня, в соответствии с ранее описанным протоколом двухстадийного культивирования. Клетки ко-инкубировали в течение 3 ч на 96-луночных планшетах с панелью клеточных линий опухоли: MOLT-4 (острый лимфобластный лейкоз; ALL); HL-60 (острый миелолейкоз; AML); K562 (хронический миелолейкоз; CML); MEC-1 (хронический лимфолейкоз; CLL); HELA (карцинома шейки матки); Daudi (лимфома Бёркита); THP-1 (острый моноцитарный лейкоз; AMoL); MDA-231 (карцинома молочной железы), PA-1 (карцинома яичника); PC3 (карцинома предстательной железы) и HCT116 (карцинома толстой кишки). Гибель опухолевых клеток оценивали по окрашиванию Annexin-V (n=3 технических повторений).

На Фиг.12 показано, что введенные $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки приживаются и выживают в моделях ксенотрансплантатной опухоли. **А.** $2x10^7$ $TCR\gamma\delta^+$ Т-клеток перенесли (MEC-1 CLL\SLL клеточная линия) NSG иммунодефицитным носителям с опухолью. Через 30 дней после переноса $TCR\gamma\delta^+$ Т-клеток, животных умертвили и проанализировали потомство $TCR\gamma\delta^+$ Т-клеток в указанной ткани с помощью FACS. Необходимо отметить, что $TCR\gamma\delta^+$ Т-клетки присутствовали во всех проанализированных тканях, а также что $CD3^+V\delta1^+$Т-клетки сильно размножились, что позволяет предположить их

предпочтительную приспособляемость и/или активацию в присутствии CLL опухоли. Показаны точечные диаграммы от репрезентативного животного из 6 проанализированных животных. **B**. Введенные TCRγδ$^+$ Т-клетки экспрессируют NCR *in vivo*. TCRγδ$^+$ Т-клетки, извлеченные из печени через 30 дней после переноса, проанализировали с помощью FACS на экспрессию NCR. Необходимо отметить высокую экспрессию NKp30 и NKG2D. Верхние точечные диаграммы соответствуют изотипному контролю. Показаны данные репрезентативного животного из трех проанализированных. **C.** Введенные TCRγδ$^+$ Т-клетки способны приживаться у BRG иммунодефицитных носителей. 10^7 TCRγδ$^+$ Т-клетки от другого донора перенесли BRG носителям с опухолью CLL и количественно оценили с помощью FACS через 72 часа после переноса. TCRγδ$^+$ Т-клетки возможно извлечь из печени и легких, также TCRVδ1$^+$-экспрессирующие клетки были обнаружены в пропорциях, аналогичных первоначальному введению. Показаны данные от одного животного из двух.

На Фиг.13 показано, что TCRγδ$^+$ Т-клетки могут ограничивать рост опухоли *in vivo*. 10^7 экспрессирующих люциферазу MEC-1 CLL/SLL клеток опухоли подкожно вводили иммунодефицитным BRG носителям. Через 10 и 15 дней после переноса, 10^7 TCRγδ$^+$ Т-клеток или контроль PBS перенесли i.v. носителям с опухолью CLL, что подтверждено люминесцентным анализом. Рост CLL/SLL опухоли периодически измеряли с помощью калипера. Показан размер опухоли, необходимо отметить видимый эффект действия TCRγδ$^+$ Т-клеток на размер CLL опухоли (n=8 мышей в группе).

На Фиг.14 показано, что TCRγδ$^+$ Т-клетки ограничивают распространение CLL опухоли. A. 10^7 экспрессирующих люциферазу MEC-1 клеток опухоли CLL/SLL подкожно внедрили иммунодефицитным NSG носителям. Через 10 и 15 дней после переноса, TCRγδ$^+$ Т-клетки ($2x10^7$) или контроль PBS перенесли i.v. носителям с опухолью CLL/SLL, что подтверждено люминесцентным анализом. Рост CLL/SLL опухоли периодически измеряли с помощью калипера. Показан размер опухоли, необходимо отметить частичную временную тенденцию на раннем этапе лечения, но TCRγδ$^+$ Т-клетки оказались не в состоянии ограничить более быстрый рост CLL/SLL опухоли у этих носителей. **B-D.** В этих экспериментах линия клеток опухоли CLL/SLL способна распространяться в другие органы. Диаграмма B изображает FACS анализ органов, извлеченных по окончанию эксперимента из NSG носителей, получавших

TCRγδ⁺ Т-клетки или контроль PBS. Авторы наблюдали общее снижение количества опухолевых клеток CLL/SLL, извлеченных из разных органов, но этот эффект был более выражен в печени, главном органе распространения опухоли в этой модели. **C.** Гистологический анализ (H&E) репрезентативного животного из каждой группы, демонстрирующий метастазирование CLL/SLL опухоли в указанных анатомических точках PBS-обработанных животных, и отсутствие опухолевого инфильтрата у животных, получивших лечение. (*p<0.05; **p<0.01) **D.** Сводные результаты гистологического анализа, показывающие животных из каждой группы, в которых был обнаружен инфильтрат опухоли CLL/SLL, против животных без опухолевого инфильтрата. Оценка была проведена слепым методом сертифицированным патологом на окрашенных гематоксилин-эозином гистологических образцах из указанных тканей животных из экспериментов, показанных на Фиг.15. Результаты показаны для всех проанализированных животных и указывают на четкое уменьшение общего распространения опухоли в группе животных, получивших размноженные *in vitro* TCRγδ⁺ Т-клетки.

На Фиг.15 показано, что TCRγδ⁺ Т-клетки могут инфильтрировать первичную опухоль и активируются *in vivo*. A. Показан IHC анализ CD3-окрашеных срезов первичной опухоли CLL/SLL у NSG животных, которым были перенесены клетки опухоли MEC-1 и которые были обработаны TCRγδ⁺ Т-клетками. **B.** Авторы проанализировали экспрессию CD69 (n=3, показана репрезентативная диаграмма), Nkp30 и NKG2D (n=2) *in vivo* в различных органах и обнаружили недавно активированные TCRγδ⁺ Т-клетки, с основной экспрессией этих активационных маркеров в TCRγδ⁺ Т-клетках, извлеченных из опухолей CLL/SLL.

На Фиг.16 показан биохимический анализ образцов крови. (A) Кровь отбирали во время аутопсии у животных из эксперимента, показанного на Фиг.14, проводили биохимический анализ на аланин-аминотрасферазу (ALT/GPT), аспартат аминотрансферазу (AST/GOT), азот мочевины крови (BUN), креатинин, креатин фосфокиназу (CPK) и лактат дегидрогеназу (LDH). (**B)** То же, что на A, для животных по Фиг.11. Авторы не обнаружили доказательств токсичности, ассоциированной с лечением DOT клетками.

Подробное описание способов *in vivo* исследований:

Balb/c $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ [47] животные были получены от Taconic США); NOD-SCID$\gamma c^{-/-}$ [48] мыши были получены от Jackson Laboratories (США). BRG и NSG мыши получали подкожную инъекцию MEC-1 клеток и через 6 и 11 дней два внутривенных введения 10^7 или $2x10^7$ DOT-клеток, после чего мышей подвергали анализу (размер опухоли, гистология, проточная цитометрия опухолевого или тканевого инфильтрата, биохимия крови) как было описано. Все процедуры с животными проводили в соответствии с национальными нормативными требованиями Direção Geral de Veterinária, и которые были одобрены соответствующим Комитетом Этики. Для фенотипирования после *in vivo* трансфера DOT-клеток животных умерщвляли при помощи Эвтазила (Eutasil) с целью отбора крови посредством сердечной пункции; и проводили быструю перфузию с PBS + гепарин. Органы гомогенизировали и промывали с 70 мкмоль клеточного красителя. Бедренные кости промывали и отфильтровывали. Клетки окрашивали следующими антителами от ebioscience, Biolegend, Myltenyi Biotec или Beckton Dickinson: антитело специфичное к CD45 мыши (30-F11), и антитело специфичное к CD45 человека (HI30). Другие использованные антитела являются типичными для *in vitro* исследований. Антитела соединяли с FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, Pacific Blue, Brilliant Violet 421 и Brilliant Violet 510 флуорохромами. Статистический анализ проводили с помощью компьютерной программы Graphpad-Prism. Данные образцов сравнивали при помощи непарного *t*-теста Стьюдента. В случае, если отклонения двух образцов оказывались различными в результате F-теста, данные логарифмировали, и если после этого отклонения не оказывались различными, непарный *t*-тест применяли к логарифмированным данным. Для данных выживаемости использовали логранговый критерий (Mantel-Cox).

Дизайн *in vivo* экспериментов: Авторы использовали ранее описанную модель ксенотрансплантированных CLL человека, полученную посредством подкожного адоптивного переноса CLL/SLL-производных MEC-1 клеток Balb/c$Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ (BRG) животным, которые авторы данного изобретения адаптировали применительно к NOD-SCID$\gamma c^{-/-}$ (NSG) животным в качестве носителей. С целью убедиться, что животные, получившие лечение или PBS контроль являются носителями опухолей, авторы данного изобретения трансфицировали MEC-1 CLL клетки люциферазой светлячков с целью определения и измерения приживления опухоли на ранних стадиях перед назначением обработки клеток. Через 7 или 4 дней (в разных исследованиях) авторы данного изобретения вводили люциферин i.p. для определения опухолевой массы как

функции от люминесценции, перед назначением лечения (или PBS контроля) животным. Животных распределяли по вольерам случайным образом и им назначалось лечение (PBS или DOT-клетки) в зависимости от люминесценции на 7 день, таким образом, что животное с наибольшей люминесценцией получало лечение, животное со следующим наибольшим значением люминесценции получало PBS, животное со следующим наибольшим значением люминесценции получало лечение, и т.д. Это привело к неслучайному распределению на группы, но к случайному распределению в разных вольерах. 2 дополнительных животных получили DOT-клетки в указанных экспериментах для исходного анализа хоуминга. Авторы данного изобретения проводили два введения 10^7 или $2x10^7$ DOT-клеток (в течение 5 дней), используя клетки разных доноров в разных экспериментах. Опухоли измеряли с помощью калипера тремя перпендикулярными измерениями. Использовали формулу ½ x длина x ширина x высота.[49] Животных умерщвляли, когда размер опухоли достигал 1000 $мм^3$.

Люминесцентный анализ: после трансдукции MEC-1 клеточной линии с GFP-светлячковой люциферазой, растущие клетки подвергали скринингу и сортировке в соответствии с GFP-экспрессией с помощью FACS-Aria (Becton Dickinson, USA), до >95% GFP положительных клеток. Эти клетки затем содержали в культуральной среде до подкожного введения животным-носителям (в 50 мкл PBS). В указанные моменты времени после введения, животных анестезировали (кетамин/медетомидин) и вводили люциферин (i.p.). Через 4 минуты измеряли активность люциферазы с помощью IVIS Lumina (Calliper LifeSciences) с помощью аппаратуры для биовизуализации IMM. После этого животных восстанавливали от анестезии и возвращали в вольеры.

Количество лимфоцитов: количество клеток определяли с помощью гемоцитометра или с помощью цитометра Accuri Flow (Becton Dickinson, USA). Количество клеток в органе оценивали исходя из гистологического анализа части органа и взвешивания органа до и после отделения образца. Показанные данные затем корректировали в отношении всего органа. В данных по костному мозгу абсолютные значения вычислили и показали в отношении одной бедренной кости.

Гистопатология и иммуногистохимия: мышей умерщвляли с помощью передозировки анестезии, проводили аутопсию и изымали необходимые органы (легкое, сердце, кишечник, селезенку, печень, почки, репродуктивные органы, мозг, мозжечок, спинной мозг, и бедренные кости), фиксировали в 10% нейтральном буферном растворе формалина, помещали в парафин и 3 мкм срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Кости перед этим декальцифицировали в Calci-Clear™ (Fisher Scientific).

Срезы тканей исследовались патологом по слепой относительно экспериментальных групп методике, с помощью микроскопа Leica DM2500, соединенного с микроскопной камерой Leica MC170 HD. Иммуногистохимическое окрашивание на CD3 (Dako, cat. no. A0452) проводили в Лаборатории гистологии и сравнительной патологии IMM, по стандартным протоколам, с помощью аппарата Dako Autostainer Link 48. Тепловое демаскирование антигена проводили с помощью DAKO PT в растворе с низким pH (pH 6), и после инкубирования при помощи набора ENVISION (пероксидаза/DAB определительная система, DAKO, Santa Barbara, CA) подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином по Гарри (Bio Otica, Milan, IT). Негативный контроль включал отсутствие первичных антител; также в негативном контроле отсутствовало CD3 окрашивание. Изображения получили с помощью микроскопа Leica DM2500, соединенного с микроскопной камерой Leica MC170 HD.

Биохимия крови мыши: мышей вводили в глубокую анестезию и отбирали кровь из сердца с помощью трубочек, покрытых гепарином, после чего посылали на анализ биохимических параметров в независимую лабораторию. Биохимические параметры измеряли в сыворотке при помощи клинического химического анализатора RX monaco (RANDOX).

На Фиг.17 показано TCRγδ$^+$ PBL обогащение после двухстадийной MACS-сортировки.

Периферическую кровь (полученную из лейкоцитарных плеток) получили от 4 здоровых добровольцев, и все количество TCRγδ$^+$ Т-клеток выделили с помощью MACS: вначале провели TCRαβ обеднение, и затем положительный выбор CD3$^+$ клеток. Клетки окрашивали на TCRγδ, CD3 и TCRVδ1 и анализировали с помощью проточной цитометрии. На диаграммах показаны фракции TCRγδ$^+$ PBL до и после каждой стадии MACS-сортировки (левые панели); а также исходное и конечное процентное содержание Vδ1$^+$ Т-клеток (правые панели).

На Фиг.18 показано исследование активации и фенотипа созревания полученных Vδ1$^+$ Т-клеток.

(**A**) Проточно-цитометрическое сравнение фенотипа клеточной поверхности Vδ1$^+$ Т-клеток на 21 день культивирования (с использованием ранее описанного протокола двухстадийного культивирования); (сплошные линии) со свежевыделенными Vδ1$^+$ Т-клетками (точечные линии), по результатам анализа с помощью LEGENDScreen kit

(Biolegend). Показано наложение гистограмм для нескольких маркеров, имеющих отношение к активации и дифференциации лимфоцитов, и маркеров, вовлеченных в адгезию и миграцию. Показаны клетки от одного здорового донора. (**B**) Тепловая карта, демонстрирующая процентное содержание положительных клеток для каждого маркера поверхности культивированных Vδ1$^+$ Т-клеток (на 21 день культивирования), полученных от 4 разных здоровых доноров (Cultur. 1-4), в сравнении со свежевыделенными Vδ1$^+$ Т-клетками (от доноров 1 и 2). Цветомаркировка расположена с правой стороны. Фенотипирование после получения клеток: клетки окрашивали анти-CD3-APC (клон UCHT1), анти-TCRVδ1–FITC и панелью рецепторов с помощью набора LegendScreen kit (Biolegend).

На Фиг.19 показана TCR/ NCR-зависимая цитотоксичность TCRγδ$^+$ Т-клеток по отношению к клеткам лейкоза (но не к здоровым клеткам).

Размноженные и дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные от двух здоровых доноров (согласно ранее описанному протоколу двухстадийного культивирования), протестировали в ходе двух различных экспериментов на взаимодействие с MEC-1 (CLL) клетками-мишенями при повышенных соотношениях эффектор/мишень (левая диаграмма, серый цвет) и также в присутствии блокирующих антител к (α, анти-) указанным молекулам, индивидуально (Эксперимент 1) или в комбинациях (Эксперимент 2). Наибольшее соотношение эффектор/мишень (10:1) использовали в блокирующих экспериментах и серая полоска при этом соотношении (с антителом IgG изотипа) служит контролем. Показаны процентные доли мертвых (Annexin-V$^+$) MEC-1 клеток-мишеней. Знаки * и # обозначают достоверную разницу относительно IgG изотипного контроля или α-TCRVδ1, соответственно (Среднее+стандартное отклонение (SD); $^{*,\#}p<0.05$; $^{**,\#\#}p<0.01$; t-тест Стьюдента).

Для анализа цитотоксичности, клетки опухоли MEC-1 культивировали в T25 колбах в полной среде 10% RPMI 1640 с 10% телячьей эмбриональной сыворотки и 2 ммоль L-глютамина, и поддерживали на уровне от 10^5 до 10^6 клеток на мл путем разбавления и разделения в соотношении 1:3 каждые 3-4 дней. Размноженные *in vitro* TCRγδ$^+$ Т-клетки поместили на 96-луночные круглодонные планшеты. Клетки опухоли окрашивали с помощью CellTrace Far Red DDAO-SE (1 мкмоль; Molecular Probes, Invitrogen) и инкубировали в указанном соотношении мишень:эффектор с TCRγδ$^+$ Т-клетками в среде RPMI 1640 в течение 3 часов при 37°C и 5% CO_2, в присутствии 70 нг/мл IL-15.

Для блокировки рецепторов γδ, PBL предварительно инкубировали в течение 1 часа со следующими блокирующими антителами: антителами человека, специфичными к TCRγδ (клон B1); антителами человека, специфичными к NKG2D (клон 1D11); антителами человека, специфичными к CD2 (клон RPA-2.10); антителами человека, специфичными к CD3 (клон OKT-3); антителами человека, специфичными к NKp30 (клон P30-15); антителами человека, специфичными к NKp44 (клон P44-8), IgG1 мыши,k антителами (клон MOPC-21), IgG2b антителами мыши (клон MPC-11), IgG3k антителами мыши (клон MG3-35), все производства Biolegend. Антитела человека, специфичные к CD226 (клон DX11) были получены от BD Biosciences. Антитела человека, специфичные к Vδ1 TCR (клоны TCS-1 или TS8.2) получили от Fisher Scientific, и антитела человека, специфичные к TCRγδ (клон IMMU510) получили от BD Biosciences. В ходе киллинг-анализов блокирующие антитела содержали в культуральной среде.
Наконец, все клетки затем окрашивали с помощью Annexin V–FITC (BD Biosciences) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

На Фиг.20 показана экспрессия активирующих NK рецепторов клеточной поверхности в *in vitro* размноженных Vδ1$^+$ и Vδ1$^-$Vδ2$^-$ Т-клетках. Размноженные и дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки получили от двух здоровых доноров согласно ранее описанному протоколу двухстадийного культивирования. Показана экспрессия активирующих рецепторов NKp30 и NKp44 в CD3$^+$ Vδ1$^+$ клетках и в CD3$^+$ Vδ1$^-$ Vδ2$^-$ Т-клетках через 21 день культивирования. Сначала CD3$^+$Vδ2$^+$ клетки были идентифицированы (при помощи антител, специфичных к CD3, и моноклональных антител, специфичных к Vδ2, конъюгированных на флюорохромах) и исключены из анализа. Оставшиеся CD3+ клетки проанализировали на экспрессию Vδ1 и NKp30, NKp44 и изотипного контроля. Показаны репрезентативные результаты из 4 независимых экспериментов с 4 разными донорами.

На Фиг.21 показана цитотоксичность размноженных Vδ1$^-$Vδ2$^-$ Т-клеток, являющихся субпопуляцией TCRγδ$^+$ Т-клеток, в отношении клеток лейкоза.
Размноженные и дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки, полученные от одного здорового донора (согласно ранее описанному протоколу двухстадийного культивирования), подвергли окрашиванию на CD3, Vδ1 и Vδ2 Т-клеточные маркеры с моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, и популяции CD3+Vδ1$^-$Vδ2$^-$ Т-клеток выделили с помощью проточной цитометрии. Выделенные

клетки затем протестировали в киллинг-анализе *in vitro* в отношении клеток-мишеней миелолейкомы (AML) (KG-1, THP-1, HL-60 и NB-4) при соотношении эффектор/мишень, равном 10:1. Кллинг-анализ проводили согласно описанию, приведенному выше.

Таблицы:

В таблице 1 описаны молекулы, использованные для стимуляции пролиферации Vδ1$^+$ Т-клеток на стадии оптимизации. Реагенты использовали в интервале концентраций от 0,1 нг/мл до 80 мкг/мл. В правой колонке указан дистрибьютор или производитель реагента.

В таблице 2 обобщены условия культивирования. TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью MACS от здорового донора и культивировали при концентрации 1 миллион клеток на мл на 96-луночных планшетах, при 37ºC и 5% CO_2. Клетки подвергали размножению в полной среде (Optmizer CTS, GIBCO) с добавкой 5% аутологичной плазмы, 1ммоль L-глютамина и описанных факторов роста. В конце периода культвации клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью проточной цитометрии. Показаны выборочные результаты от 4 последовательных экспериментов. Лучшие условия культивирования в каждом эксперименте расположены по кратности размножения. Кратность размножения Vδ1$^+$ Т-клеток вычисляли следующим образом: (абсолютное количество Vδ1$^+$ Т-клеток в конце периода культивирования) / (абсолютное количество Vδ1$^+$ Т-клетки в день начала культивирования). Показаны репрезентативные результаты от 2 независимых экспериментов.

В таблице 3 обобщены условия культивирования. TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью MACS от здорового донора и культивировали в течение 14 дней в присутствии описанных факторов роста. На 14 день культивирования клетки разделили: одну фракцию клеток культивировали как и до того, тогда как другую фракцию клеток культивировали при отсутствии IL-4 и в присутствии описанных факторов роста. На 21 день клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью FACS. Показаны репрезентативные результаты из 2 независимых экспериментов. Анализ цитотоксичности проводили также на 21 день, используя генерированные TCRγδ$^+$ клетки против MOLT-4 лейкоза в качестве мишеней (способ описан на Фиг.8).

Апоптические (умирающие) клетки-мишени определяли по положительному окрашиванию с помощью реагента Annexin-V в проточном цитометрическом аппарате Fortessa II (BD Biosciences). Базисная смертность опухолевых клеток (то есть, процентная доля апоптических опухолевых клеток в образцах опухоли, которые не культивировали совместно с TCRγδ$^+$ клетками) составила 10±3%. Показаны средние данные от двух технических повторений.

В таблице 4 обобщены условия культивирования. TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью MACS от здорового донора и культивировали с течение 15 дней по протоколам двухстадийного и трехстадийного культивирования, в присутствии описанных факторов роста. Клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью FACS в конце культивационного периода. Показаны репрезентативные результаты от 2 независимых экспериментов.

В таблице 5 обобщены условия культивирования. TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью MACS от здорового донора по протоколу двухстадийного культивирования и культивировали в течение 21 дня в присутствии описанных факторов роста. Клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью FACS в конце культивационного периода. Показаны репрезентативные результаты от 2 независимых экспериментов.

В таблице 6 описаны чистота и фенотип TCRγδ$^+$ PBL, выделенных по двухстадийному MACS протоколу.
PBMC, собранные из продуктов лейкоцитарных пленок 8 здоровых доноров, получили с помощью центрифугирования по градиенту плотности в фиколле. TCRγδ$^+$ Т-клетки далее выделяли согласно двухстадийному MACS протоколу как описано на Фиг.2. Клеточный фенотип определяли с помощью проточного цитометрического анализа антигенов клеточной поверхности. Данные соответствуют процентной доле относительно общего числа живых клеток.

В таблице 7 описаны чистота и фенотип размноженных *in vitro* TCRγδ$^+$ Т-клеток.
MACS-отсортированные TCRγδ$^+$ Т-клетки от здоровых доноров (такие же как в Таблице 6) культивировали в течение 21 дня в пакетах для клеточного культивирования, согласно ранее описанному протоколу двухстадийного культивирования. Популяции

клеток охарактеризовали с помощью проточной цитометрии. Указаны относительные количества TCRγδ$^+$ Т-клеток и контаминантных клеток относительно общего количества живых клеток в культуральной среде.

В таблице 8 описано размножение NCR и NKG2D в свежеизолированных и культивированных Vδ1$^+$ Т-клетках. Экспрессия активирующих рецепторов NKp30, NKp44 и NKG2D в CD3$^+$Vδ1$^+$ Т-клетках после 16 или 21 дней обработки цитокином и моноклональным антителом, специфичным к CD3. Данные в этой таблице являются репрезентативными, полученными от 10 независимых доноров, при этом надо отметить что экспрессия NKp30 и NKp44 варьируется от приблизительно 10% до 70% у разных доноров, тогда как NKG2D экспрессировался на более чем 80% от Vδ1$^+$ PBL у всех протестированных доноров.

В таблице 9 описана чистота и фенотип TCRγδ$^+$ PBL от CLL/SLL пациентов до и после MACS-сортировки. Клетки В-клеточного хронического лимфолейкоза (CLL) получили из периферической крови пациентов на первой презентации, после получения информированного согласия и одобрения институциональной комиссии. TCRγδ$^+$ Т-клетки подвергли MACS-сортировке из периферической крови трех CLL пациентов (CLL-1-3) и исследовали фенотип клеточной популяции с помощью проточного цитометрического анализа антигенов клеточной поверхности. Указаны процентные доли TCRγδ$^+$ Т-клеток и контаминантных клеток, полученных сразу до и после процедуры двухстадийного магнитного выделения. Каждая субпопуляция клеток была гейтирована относительно общего числа живых клеток.

В таблице 10 показано, что контаминантные аутологичные B-CLL клетки становятся остаточной популяцией в культуральной среде. TCRγδ$^+$ Т-клетки подвергли MACS-сортировке из периферической крови трех CLL/SLL пациентов (CLL-1-3; как в Таблице 9) и культивировали *in vitro* в течение 16 дней согласно описанию, приведенному выше. Фенотип клеточной популяции исследовали с помощью проточного цитометрического анализа антигенов клеточной поверхности. Указаны процентные доли TCRγδ$^+$ Т-клеток и контаминантных клеток. Каждая субпопуляция клеток была гейтирована относительно общего числа живых клеток, кроме экспрессии NKp30 и NKG2D, которую гейтировали по Vδ1$^+$ Т-клеткам.

В таблице 11 более детально показаны условия культивирования из Таблицы 2. TCRγδ$^+$ PBL выделили с помощью MACS от здорового донора и культивировали при концентрации 1 миллион клеток на мл на 96-луночных планшетах при 37ºC и 5% CO_2. Клетки размножали в полной среде (Optmizer CTS, GIBCO) с добавками 5% аутологичной плазмы, 1 ммоль L-глютамина и описанных факторов роста. В конце культивационного периода, клетки сосчитали и проанализировали клеточный фенотип с помощью проточной цитометрии. Показаны выборочные результаты от 4 последовательных экспериментов (те же эксперименты описаны в Таблице 2, но здесь более полно раскрыты результаты условий параллельного контрольного культивирования, отмеченные звездочкой, для более полного понимания результатов). Также указаны относительные количества NKp30$^+$ Vδ1$^+$ Т-клеток, полученных в каждых условиях. Условия культивирования в каждом эксперименте расположены в порядке увеличения кратности. Порядок размножения Vδ1$^+$ Т-клеток рассчитывали как: (абсолютное количество Vδ1$^+$ Т-клеток по окончанию культивирования) / (абсолютное количество Vδ1$^+$ Т-клетки на начало культивирования). Показаны репрезентативные результаты от 2 независимых экспериментов.

В таблице 12 обобщены условия культивирования.
TCRγδ$^+$ PBL выделили от здорового донора и размножили в соответствии с ранее приведенным описанием в присутствии описанных факторов роста. Показаны выборочные результаты от одного эксперимента с разными условиями культивирования. Для лучшего понимания эффекта IL15 /IL-2 /IL-7 и IFN-γ на культивируемые TCRγδ$^+$ клетки, TCRγδ$^+$ клетки культивировали в культуральной среде при трех различных концентрациях IL-4 и моноклонального антитела, специфичного к CD3, в присутствии и отсутствии IL15 /IL-2 /IL-7 и IFN-γ. Показан негативный эффект IL-15, IL-2 и IL-7 на размножение TCRγδ$^+$ Т клеток, когда эти клетки культивировали в присутствии IL-4 и IFN-γ. Показаны репрезентативные результаты от 2 независимых экспериментов.

В таблице 13 показано общее абсолютное количество TCRγδ$^+$ клеток, полученных до и после крупномасштабного двухстадийного клеточного культивирования. MACS-отсортированные TCRγδ$^+$ клетки периферической крови, полученные от здоровых доноров (показаны на Фиг.6) пересчитали с помощью гемоцитометра до и после клеточного размножения / дифференциации. Лейкоцитарные пленки

сконцентрировали из 450 мл периферической крови, и они содержали приблизительно 450-550 миллионов PBMC. В среднем, с помощью MACS из каждой порции лейкоцитарных пленок можно собрать 17 миллионов TCRγδ$^+$ Т-клеток. Однако, при будущем клиническом применении, исходные образцы будут продуктами лейкафереза, содержащими большое количество клеток и собираемыми с помощью аппарата для афереза. В предыдущих исследованиям нестимулированные продукты лейкафереза, собранные у пациентов с лейкозом, содержали в среднем 13,4x10^9 (в интервале 4,4–20,6x10^9) клеток периферической крови, из которых приблизительно 160 миллионов TCRγδ$^+$ Т-клеток (в интервале 1,0–3,0x10^8) были получены с помощью MACS (Wilhelm, M., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of haploidentical gammadelta T-cells.* J Transl Med, 2014. **12**: p. 45.). Это в среднем в 9 раз больше исходных клеток, чем было получено из лейкоцитарных пленок. Вследствие этого, среднее оценочное количество клеток, которые можно получить из такой же культивировочной системы при условии использования продуктов лейкафереза в качестве исходных образцов, составляет приблизительно 10,2x10^9 клеток (в интервале от 3,9x10^9 до 14,4 x10^9 клеток).

В таблице 14 показаны реагенты и материалы, использованные для получения TCRγδ$^+$ Т-клеток фармацевтического качества.

Примеры

Оптимизация *ex-vivo* размножения Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток человека

Авторы данного изобретения провели серию экспериментов, нацеленных на улучшение размножения и уровня чистоты культивированных *in vitro* Vδ2$^-$ γδ Т-клеток. Так как коммерчески доступного антитела, специфичного к Vδ3$^+$ цепи TCR не существует, для идентификации Vδ1$^+$ Т-клеток в клеточных образцах на стадии оптимизации культивирования использовали моноклональные антитела, специфичные к TCRVδ1. TCRγδ$^+$ Т PBL от группы здоровых доноров выделили с помощью MACS и протестировали в отношении их способности к *in vitro* стимуляции с IL-2 и PHA (то есть, на поддающиеся измерению изменения в клеточной активации и пролиферации). Один донор с реактивными Vδ1$^+$ PBL был выбран для использования его образцов в дальнейшем исследовании оптимизации. Выбор одного конкретного

предпочтительного донора является важным, так как позволяет провести более надежное сравнение результатов разных экспериментов. Выбранный донор отличался нормальным (но при этом высоким) относительным уровнем содержания TCRγδ$^+$ Т-клеток в периферической крови (10%-12% от общего числа PBL), но при этом очень низким относительным содержанием Vδ1$^+$ PBL (0,3% от общего числа PBL, или 3,0% от общего числа TCRγδ$^+$ Т PBL; **Фиг. 1**). Он был сочтен подходящим донором для использования в этих экспериментах, поскольку каждое минимальное улучшение в конечном количестве и уровне чистоты культивированных Vδ1$^+$ Т-клеток можно с легкостью определить с помощью проточной цитометрии.

Одностадийный MACS протокол, использованный для выделения TCRγδ$^+$ Т-клеток из PBMC, был очень эффективен, и позволил получить клеточные популяции высокой чистоты (**Фиг.1**). Однако, один критически важный реагент (а именно, моноклональное антитело человека, специфичное к TCRγδ, конъюгированное с магнитными микрогранулами, производства Miltenyi Biotec) в данное время не является одобренным для клинического применения. Производство, валидация и нормативное одобрение клинического уровня для такого реагента может занять много лет, и эта проблема препятствует немедленному применению описанного протокола в клинической практике. Поэтому был разработан и адаптирован другой, но при этом эквивалентный способ выделения TCRγδ$^+$ Т-клеток. Процесс состоит из двух стадий магнитного разделения клеток, как описано на **Фиг.2.** Конечный уровень чистоты полученных TCRγδ$^+$ Т-клеток был ниже, чем при использовании предыдущего (одностадийного) способа, но все еще приемлем для клеточного культивирования. Важно отметить, что в этом новом способе выделения клеток используются только реагенты, уже имеющие одобрение для клинического применения (производства Miltenyi Biotec GmbH, Германия).

Авторы данного изобретения протестировали множество комбинаций агонистов антител и цитокинов клинического уровня на их способность обеспечивать размножение и дифференциацию (в течение 2-3 недель) Vδ1$^+$ Т-клеток из периферической крови. MACS-отсортированные TCRγδ$^+$ PBL от ранее выбранных здоровых доноров инкубировали в культуральной среде в течение 2-3 недель на 96-луночных планшетах при 37ºC и 5% CO_2, в присутствии 58 различных T/NK молекул для клеточной активации (**Таблица 1**). Это количество включало 13 различных TCR

агонистов, 23 различных агонистов ко-рецепторов и 22 различных цитокина, которые протестировали в 2488 различных комбинациях и концентрациях. Антитела использовали как в растворимом виде, так и закрепленными на пластиковой основе. Цитокины тестировали при концентрациях от 0,1 нг/мл до 1000нг/мл; TCR агонисты тестировали при концентрациях от 0,1 нг/мл до 40мкг/мл, и агонисты ко-рецепторов тестировали при конечных концентрациях от 0,5 мкг/мл до 80мкг/мл.

Несколько последовательных экспериментов по выделению клеток и их размножению проводили на одном доноре, в каждом эксперименте тестировали эффект приблизительно 100-400 различных комбинаций активирующих молекул. Оптимизацию начинали с базовой неоптимизированной смеси (то есть, с культивирования TCRγδ$^+$ Т-клеток в присутствии IL-2 и PHA). Свежую среду, содержащую такую же смесь активирующих молекул, добавляли каждые 5 дней. Через 14 дней клетки собирали и определяли их фенотип методом проточной цитометрии. Идентифицировали лучшие условия каждого эксперимента (в которых наблюдали наибольший рост количества Vδ1$^+$ Т-клеток), и выбирали их для дальнейшей оптимизации в отношении всех доступных реагентов и концентраций. Кратность размножения и уровень чистоты Vδ1$^+$ Т-клеток постепенно повышали в ходе оптимизационной стадии, и после каждой стадии определяли наилучшие условия культивирования.

Результаты экспериментов 1-4 обобщены в **Таблице 2**. В ходе эксперимента №1 были подтверждены предыдущие наблюдения, связанные с тем, что IL-4 является ключевым фактором роста в способствовании пролиферации Vδ1$^+$ Т клеток и обогащения ими культуральной среды.[27, 42] В этом эксперименте, авторы данного изобретения проверили влияние 22 различных цитокинов на культивируемые TCRγδ$^+$ Т-клетки в присутствии митогена Т-клеток и IL-2. Очевидно, что IL-4 был уникален в своей способности инициировать активное размножение этих клеток. В противоположность этому, применение повышенных концентраций IL-2 или комбинации IL-2 с другими митогенами Т-клеток, не привело к эквивалентному эффекту, вероятнее всего по причине повышенной индуцированной активацией клеточной смерти (AICD) культивируемых клеток (условия 2-3; **Таблица 2**).

Таблица 1

TCR агонисты	Моноклональные антитела (растворимые и связанные с планшетом)	моноклональное антитело, специфичное к **TCR Vδ1** человека (Клон TS8.2) ; очищенное моноклональное антитело, специфичное к **TCR δTCS-1** (Клон TS-1) человека; очищенное моноклональное антитело, специфичное к **TCR PAN γδ** человека (Клон IMMU510); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD3** человека (Клон OKT3) ; очищенное	Thermo Fisher Sci. Thermo Fisher Sci. Beckman Coulter BioXcell/ Biolegend
	Растительные лектины (растворимые)	Лектин из ***Phaseolus vulgaris*** (красная фасоль ; PHA-P), очищенный **Concanavalin A** (из *Canavalia ensiformis*; Con-A), очищенный Лектин из ***Phytolacca americana*** ; очищенный Лектин из ***Triticum vulgaris*** (пшеница) ; очищенный Лектин из ***Lens culinaris*** (lentil) ; очищенный Лектин из ***Glycine max*** (соевые бобы) ; очищенный Лектин из ***Maackia amurensis*** ; очищенный Лектин из ***Pisum sativum*** (горох) ; очищенный Лектин из ***Sambucus nigra*** (elder) ; очищенный	Sigma-Aldrich, Co.
Агонисты ко-рецепторов	Моноклональные антитела (растворимые и связанные с планшетом)	моноклональное антитело, специфичное к **CD2** человека (Клон S5.2); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD6** человека (Клон UMCD6/3F7B5); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD9** человека (Клон MEM-61); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD28** человека (Клон CD28.2); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD43** человека (Клон MEM-59); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD94** человека (Клон HP-3B1); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **CD160** человека (Клон CL1-R2); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **SLAM** человека [Клон A12(7D4)]; очищенное моноклональное антитело, специфичное к **NKG2D** человека (Клон 1D11); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **2B4** человека (Клон C1.7); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **HLA-A,B,C** человека (Клон W6/32) ; очищенное моноклональное антитело, специфичное к **ICAM-3** человека (Клон MEM-171); очищенное моноклональное антитело, специфичное к **ICOS** человека (Клон C398.4A); очищенное	BD Biosciences Ancell Corporation Exbio Praha, a.s. Biolegend Exbio Praha, a.s. Santa Cruz Biotech Novus Biologicals Biolegend Exbio Praha, a.s. Biolegend Biolegend Exbio Praha, a.s. Biolegend
	Рекомбинантные белки (растворимые)	**SECTM-1/Fc Chimera** человека (CD7 лиганд) **CD26** человека (Dipeptidyl Peptidase IV) **CD27L** человека (CD27 лиганд); **CD30L** человека (CD30 лиганд); **CD40L** человека (CD40 лиганд); **OX40L** человека (OX40 лиганд); **4-1BBL** человека (4-1BB лиганд) **ICAM-1** человека **Фибронектин** человека	R&D Systems Sigma-Aldrich, Co. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. Sigma-Aldrich, Co.

		Гидрокортизон человека	Sigma-Aldrich, Co.
Цитокины	Рекомбинантные белки (растворимые)	**IFN-γ** человека (Интерферон-γ) ; **TGF-β** человека (Трансформирующий фактор роста бета) ; **IL-1-β** человека (интерлейкин-1β) ; **IL-2** человека (интерлейкин-2) ; **IL-3** человека (интерлейкин-3) ; **IL-4** человека (интерлейкин-4) ; **IL-6** человека (интерлейкин-6) ; **IL-7** человека (интерлейкин-7) ; **IL-9** человека (интерлейкин-9) ; **IL-10** человека (интерлейкин-10) ; **IL-12** человека (интерлейкин-12) ; **IL-13** человека (интерлейкин-13) ; **IL-15** человека (интерлейкин-15) ; **IL-18** человека (интерлейкин-18) ; **IL-21** человека (интерлейкин-21) ; **IL-22** человека (интерлейкин-22) ; **IL-23** человека (интерлейкин-23) ; **IL-27** человека (интерлейкин-27) ; **IL-31** человека (интерлейкин-31) ; **IL-33** человека (интерлейкин-33) ; **GM-CSF** человека (гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор); **FLT3-L** человека (лиганд FMS-подобной тирозин киназы 3) ;	PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. Biolegend PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc Southern Biotech PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. Biolegend PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc. PeproTech, inc.

Таблица 2

Эксп.	Усл. №	Условия: (культивировали 1 миллион клеток на мл в течение 14 дней на 96-луночных планшетах)	Всего живых клеток (%)	Vδ1⁺ Т-клетки (%)	Кратность увеличения количества Vδ1⁺ Т-клеток
1	1	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	68,9	31,6	77
	2	500нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA**	63,3	10,5	4
	3	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** *(контроль)*	68,8	1,90	1
2	1	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	90,0	51,7	75
	2	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-Vδ1 TCR mAb** + 20нг/мл **IL-4**	85,2	55,9	69
	3	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	84,0	61,9	62
	4	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4** *(ранее лучший)*	72,0	45,3	27
	5	100нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	71,3	55,7	22
	6	300нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	71,3	57,0	21

3	1	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	91,7	61,4	138
	2	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	81,4	59,4	124
	3	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4** (*ранее лучший)*	84,2	45,4	105
	4	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	68,0	76,2	21
	5	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	60,1	69,1	19
	6	20нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	68,6	69,9	13
	7	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	62,9	67,7	11
4	1	20нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	87,1	79,5	1 349
	2	3нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	85,5	67,4	1 014
	3	2нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	87,9	81,6	909
	4	1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	85,9	67,8	804
	5	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4** (*ранее лучший)*	78,9	69,4	624

Результаты эксперимента №2 показали, что для увеличения пролиферации и размножения Vδ1⁺ Т-клеток в культуральной среде IL-2 (в присутствии IL-4 и PHA) необходимо использовать в малых концентрациях, (условия 3-7, **Таблица 2**). Этот эффект не наблюдали в предыдущем эксперименте (Эксп. №1), в котором кратность размножения была выше в присутствии PHA и высоких уровней IL-2, при отсутствии IL-4. К тому же, было показано, что моноклональное антитело, специфичное к CD3, является наиболее эффективным митогеном, способствующим выживанию и пролиферации Vδ1⁺ Т-клеток в культуральной среде (см. условие 1 vs условие 2, **Таблица 2**).

Результаты эксперимента №3 (**Таблица 2**) подтвердили предыдущие наблюдения и показали, что даже более низкие (чем ранее использованные) уровни концентрации IL-2 (в присутствии IL-4 и митогена Т-клеток), способствовали даже более интенсивной пролиферации Vδ1⁺ Т-клеток, их выживанию и размножению в культуральной среде. Также, при использовании в такой же концентрации, IL-15 был более эффективен, чем IL-2, в способствовании выживанию, размножению и пролиферации Vδ1⁺ Т-клеток. И снова моноклональное антитело, специфичное к CD3, оказалось наиболее эффективным митогеном в тестах.

Результаты эксперимента №4 далее показали, что присутствие высоких уровней IL-15 в культуральной среде негативно влияло на пролиферацию Vδ1$^+$ Т-клеток. Фактически, даже более низкие (чем ранее использованные) уровни концентрации IL-15 способствовали даже более высокому уровню размножения Vδ1$^+$ Т-клеток, в присутствии IL-4 и α-CD3 (условия 3-5, **Таблица 2**).
Наконец, совершенно неожиданно, замена IL-15 на INF-γ (то есть, отсутствие IL-15 и присутствие IFN-γ в культуральной среде), привела к увеличению уровня размножения культивированных Vδ1$^+$ Т-клеток.

Несмотря на то, что параллельно тестировали большое количество вариантов концентраций и комбинаций IL-2, IL-7 и IL-15, IFN-γ постоянно оказывался намного более эффективным реагентом для стимуляции селективного размножения Vδ1$^+$ Т-клеток в культуральной среде (при использовании в присутствии IL-4 и митогена Т-клеток, такого как моноклональное антитело, специфичное к CD3; **Фиг.3**). Более высокая производительность IFN-γ в этих условиях была независимой от использованной концентрации IL-4 и моноклонального антитела, специфичного к CD3 (**Фиг.3A-C и Фиг.4**). Важно отметить, что использование IFN-γ (но не IL-2, IL-15 или IL-7), вызывало сильное увеличение уровней обогащения и размножения Vδ1$^+$ Т-клеток в смешанной культуре CD3$^+$ Т-клеток (**Фиг.3D**). В этих культурах контаминантные TCRαβ$^+$ Т-клетки, присутствовавшие в исходных образцах, реагировали и размножались в присутствии IL-2, IL-15 и IL-7, но не в присутствии IFN-γ, который выглядит более селективным активатором Vδ1$^+$ Т-клеток. Эти эксперименты показали, что специфическая (и ранее не описанная) комбинация IFN-γ с IL-4 и митогеном Т-клеток, при отсутствии IL-2, IL-7 и IL-15, обладает уникальными преимуществами в отношении производства Vδ1$^+$ Т-клеток, которые можно использовать в разнообразных новых терапевтических и коммерческих целях.

IFN-γ является димеризованным растворимым цитокином и представляет собой единственный член класса интерферонов II типа.[50] Он структурно и функционально отличается от обычных γ-цепочечных цитокинов, таких как IL-2, IL-4, IL-7 или IL-15, и серологически отличается от интерферонов I типа: он является кислотонеустойчивым, тогда как разновидности I типа являются кислотоустойчивыми.

Несмотря на то, что авторы данного изобретения разработали новый и улучшенный способ размножения и обогащения популяции Vδ1$^+$ Т-клеток в культуральной среде, они также попытались проанализировать противоопухолевую функцию полученных клеток *in vitro*. Авторы данного изобретения обнаружили, что присутствие IL-4 в культуральной среде сильно ингибирует или понижает экспрессию активирующих рецепторов, таких как природные рецепторы цитотоксичности (NCR, а конкретно NKp30 и NKp44), и NKG2D на размноженных Vδ1$^+$ Т-клетках (**Таблица 3**).

Рецепторы, активирующие природные киллеры (NK) (такие как NKp30, NKp44 и NKG2D), известны как играющие критическую роль в противоопухолевой и антивирусной функции Vδ1$^+$ Т-клеток посредством связывания с их молекулярными лигандами, экспрессируемыми на поверхности опухолевых или инфицированных клеток. Связывание рецептор-лиганд запускает производство и высвобождение Vδ1$^+$ Т-клетками гранзимов и перфоринов, что приводит к смерти клеток-мишеней.[29] В данном исследовании его авторы обнаружили, что присутствие IL-4 в культуральной среде вызывает снижение уровней активации NK рецепторов, расположенных на поверхности культивируемых TCRγδ$^+$ Т-клеток, тем самым снижая их цитотоксическую функцию против клеток лейкоза MOLT-4 (**Таблица 3**). Необходимо отметить, что ингибирование, вызываемое IL-4, очевидно влияет на все субпопуляции TCRγδ$^+$ Т-клеток, присутствующие в конечном клеточном продукте, включая как Vδ1$^-$, так и Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки (**Таблица 3**).

Таблица 3

№ условий	**Условия культивирования (1-14 дней)**	**Условия культивирования (15-21 дней)**	**Живые клетки (%)**	**Vδ1$^+$ Т-клетки (%)**	**Порядок увеличения количества Vδ1$^+$ Т-клеток**	**Vδ1$^+$ NKp30$^+$ Т-клетки (%)**	**Vδ1$^+$ NKp44$^+$ Т-клетки (%)**	**Vδ1$^+$ NKG2D$^+$ Т-клетки (%)**	**Мертвые опухолевые клетки-мишени (%)**
1	100нг/мл **IL-15** 1мкг/мл a-CD3 mAb (контроль)		61,4	50,3	108	45,0	38,0	99,8	62,6
2	100нг/мл **IL-4** 70нг/мл IFN-γ 1мкг/мл a-CD3 mAb		81,0	92,6	8 064	0,9	0,2	48,2	14,0

3	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл a-CD3 mAb		83,1	83,1	2 185	0,1	0,3	46,4	17,5
4	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл a-TCRVδ1 mAb		68,4	92,8	1 263	1,6	1,1	38,4	13,3
5	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл PHA		69,6	73,8	464	1,5	2,2	58,7	9,0
6	100нг/мл **IL-4** 70нг/мл IFN-γ 1мкг/мл a-CD3 mAb	100нг/мл **IL-15** 1мкг/мл a-CD3 mAb	87,3	85,9	24 152	30,1	14,7	98,9	68,5
7		100нг/мл **IL-2** 1мкг/мл a-CD3 mAb	80,1	88,1	16 374	29,0	18,2	99,4	70,2
8		100нг/мл **IL-7** 1мкг/мл a-CD3 mAb	78,3	85,4	18 366	15,6	15,4	99,2	67,6
9	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл a-CD3 mAb	100нг/мл **IL-15** 1мкг/мл a-CD3 mAb	83,1	80,6	9 636	19,5	17,7	99,0	64,6
10		100нг/мл **IL-2** 1мкг/мл a-CD3 mAb	84,0	85,5	7 747	23,0	12,9	98,4	54,4
11		100нг/мл **IL-7** 1мкг/мл a-CD3 mAb	76,5	83,0	10 567	10,1	4,4	99,2	50,6
12	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл a-Vδ1 mAb	100нг/мл **IL-15** 1мкг/мл a-Vδ1 mAb	69,4	72,6	5 564	23,2	6,6	95,4	54,5
13	100нг/мл **IL-4** 1мкг/мл PHA	100нг/мл **IL-15** 1мкг/мл PHA	67,8	65,6	2 454	17,6	13,4	95,6	46,0

Это соответствует недавнему исследованию, в котором было показано, что IL-4 способствует образованию регуляторных Vδ1$^+$ Т-клеток посредством производства IL-10. IL-4-обработанные Vδ1$^+$ Т-клетки секретировали достоверно меньше IFN-γ и больше IL-10 по сравнению с Vδ2$^+$ Т-клетками. К тому же, Vδ1$^+$ Т-клетки демонстрировали относительно низкие уровни экспрессии NKG2D в присутствии IL-4, что позволяет предположить, что Vδ1$^+$ Т-клетки ослабляют противоопухолевый иммунный ответ, который происходит с участием TCRγδ$^+$ Т-клеток.[42]

Так как авторы данного изобретения искали новые способы культивирования с целью улучшения противоопухолевых эффекторных функций Vδ1$^+$ Т-клеток, они произвели попытку восстановить экспрессию активирующих NK рецепторов на IL-4–обработанных клетках, также восстановив цитотоксический фенотип этих клеток, что никогда ранее не производилось.

TCRγδ$^+$ Т-клетки культивировали по двухстадийному протоколу. Первая стадия состояла из обработки клеток в культуральной среде в присутствии митогена Т-клеток (такого как моноклональное антитело, специфичное к CD3, или PHA) и IL-4, и при отсутствии IL-2, IL-15 и IL-7, для стимуляции селективного размножения Vδ1$^+$ Т-клеток. Вторая стадия культивирования состояла из обработки клеток в культуральной среде при отсутствии IL-4, и в присутствии митогена Т-клеток и IL-2, или IL-7 или IL-15, для стимуляции клеточной дифференциации, и экспрессии NKR (**Таблица 3 и Таблица 4**).

Условия 1-5 (**Таблица 3**) подтвердили предыдущие результаты, показав, что Vδ1$^+$ Т-клетки культивированные в присутствии IL-4, могут размножаться в культуральной среде в несколько тысяч раз, но не могут дифференцироваться, становясь неэффективными киллерами опухолевых клеток. В противоположность этому, как показано в условиях 6-13, если клетки субкультивировали во второй культуральной среде при отсутствии IL-4 и в присутствии митогена Т-клеток и IL-2, или IL-7, или IL-15, способность к уничтожению опухоли радикально увеличивалась. Присутствие любого из этих трех цитокинов (IL-2, IL-7 и IL-15), одного или в комбинации, позволяло восстановить фенотип культивированных Vδ1$^+$ Т-клеток, и поэтому может использоваться для этих целей.

Результаты экспериментов №6 и №7 (**Таблица 4**) показали, что двухстадийные протоколы, и даже трехстадийные протоколы могут более эффективно использовать для стимуляции пролиферации и дифференциации Vδ1$^+$ Т-клеток. В случае трехстадийного протокола, при котором клетки культивировали в 3 разных культуральных средах (см. например условие 2 эксперимента №7 из Таблицы 4), было очень важным разделить IL-4-содержащую среду и среду, содержащую IL-2 или IL-7 или IL-15. Из этих результатов можно также заключить, что фракцию предыдущей культуральной среды необходимо удалять во время каждой стадии субкультивирования для улучшения размножения клеток; и что во второй

культуральной среде IL-15 немного более эффективен, чем IL-2, в стимуляции пролиферации Vδ1⁺ Т-клеток.

Дополнительные эксперименты с использованием протоколов трехстадийного и четырехстадийного культивирования далее продемонстрировали, что другие факторы роста можно добавлять к первой и/или второй культуральной среде (**Таблица 3 и Таблица 4**) для повышения уровней размножения Vδ1⁺ Т-клеток и экспрессии NK рецепторов на этих клетках. INF-γ, IL-21 и IL-1β идентифицировали в качестве эффективных стимуляторов размножения и выживания Vδ1⁺ Т-клеток (**Таблица 5**). Эти факторы роста можно использовать в первой или во второй культуральной среде.

Наконец, добавление растворимого лиганда CD27 рецептора, или растворимого лиганда CD7 рецептора, или растворимого лиганда SLAM рецептора, привело к усилению размножения Vδ1⁺ Т-клеток (условия 3-6 **Таблицы 5**). CD27 рецептор обычно необходим для производства и долговременного поддержания иммунитета Т-клеток. Он связывается со своим лигандом CD70 и играет ключевую роль в регулировании активации В-клеток и синтеза иммуноглобулина. CD7 рецептор является членом суперсемейства иммуноглобулинов. Этот белок находят на тимоцитах и взрослых Т-клетках. Он играет существенную роль во взаимодействиях Т-клеток, а также во взаимодействии Т-клеток с В-клетками во время раннего развития лимфоидов. SLAM рецептор является членом семейства молекул сигнальной лимфоцитной активации иммуномодуляторных рецепторов.

Таблица 4

Эксп.№	№ условий	Условия: (культивировали 5x10^5 миллионов клеток на мл в течение 15 дней на 96-луночных планшетах):	Vδ1⁺ Т-клетки (%)	Порядок увеличения количества Vδ1⁺ Т-клеток	Vδ1⁺ NKp30⁺ Т-клетки (%)
6	1	**0-5 Дней:** 100нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-15 Дней:** 100нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3**	72,4	7 635	39,4

	2	**0-5 Дней:** 100нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-15 Дней:** 100нг/мл **IL-7** + 2мкг/мл **α-CD3**	60,1	5 100	37,9
	3	**0-5 Дней:** 100нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-15 Дней:** 100нг/мл **IL-2**+ 2мкг/мл **α-CD3**	68,2	4 135	36,5
7	1	**0-5 Дней:** 100нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-10 Дней:** 100нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3** **11-15 Дней:** удаление среды, 100нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3**	65,0	4 468	45,4
	2	**0-5 Дней:** 30нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-10 Дней:** 100нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** + 2нг/мл **IL-21** **11-15 Дней:** 100нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** + 5нг/мл **IL-21**	80,5	3 987	36,0
	3	**0-5 Дней:** 100нг/мл **IL-4** + 1мкг/мл **α-CD3** + 70нг/мл **IFN-γ** **6-10 Дней:** удаление среды, 100нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3** **11-15 Дней:** 100нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3**	64,0	3 683	41,0

Стоит отметить, что было протестировано несколько разных культуральных сред (**Фиг.5**). Эти тесты показали, что настоящее изобретение очень хорошо работает с очень разными культуральными средами, включая коммерчески доступные,

бессывороточные, клинического качества среды от разных производителей, подходящие для клинического применения.

Таблица 5

Номер условий:	Условия культивирования (1-6 дней)	Условия культивирования (7-11 дней)	Условия культивирования (12-16 дней)	Условия культивирования (17-21 дней)	Vδ1⁺ Т-клетки (%)	Порядок увеличения количества Vδ1⁺ Т-клеток	Vδ1⁺ NKp30⁺ Т-клетки (%)
1	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb 70нг/мл **IL-21** 15нг/мл **IL-1β**	70нг/мл IFN-γ 2мкг/мл α-CD3 mAb 100нг/мл IL-15			75,0	61 417	54,1
2	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb 70нг/мл **IL-21**	70нг/мл IFN-γ 2мкг/мл α-CD3 mAb 100нг/мл IL-15			80,1	37 457	38,5
3	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb 1мкг/мл **sCD27L**	1мкг/мл α-CD3 mAb 100нг/мл IL-15			72,4	10 535	22,5
4	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb 1мкг/мл **α-SLAM mAb**				69,6	9 566	25,4
5	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb 1мкг/мл **sCD7L**				70,7	7 764	24,5
6	100нг/мл IL-4 70нг/мл IFN-γ 70нг/мл α-CD3 mAb				72,8	5 594	21,4

***In vitro* исследование крупномасштабного размножения TCRγδ⁺ Т-клеток**

Создав эффективный протокол для выделения и размножения Vδ1⁺ Т-клеток в культуральной среде, авторы данного изобретения попытались протестировать его на образцах крови, полученных от большого количества здоровых доноров, а также от пациентов с опухолью. Это было необходимо для проверки надежности и общей применимости нового способа культивирования. Более того, вместо пластиковых планшетов или колб, клетки культивировали в закрытых, больших, газопроницаемых клеточных пакетах, разработанных для клинического применения.

Принятый двухстадийный способ активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) позволили произвести популяции жизнеспособных клеток, обогащенных TCRγδ$^+$ Т-клетками, от 8 различных доноров (**Таблица 6**). Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки составляли только от приблизительно 1% до 44% от общего количества жизнеспособных клеток, присутствовавших изначально перед MACS. Однако, в течение 11-21 дней обработки после оптимизированного двухстадийного культивирования и в присутствии описанной смеси цитокинов и митогенов Т-клеток, Vδ1$^+$ Т-клетки стали доминантной субпопуляцией в культуральной среде, составляя 60-80% от общего числа клеток от разных доноров (**Фиг.6**). Стоит отметить, что удалось достигнуть очень воспроизводимого размножения, и состав конечного клеточного продукта у разных доноров был удивительно одинаковым (**Фиг. 6, Таблица 7)**. Важно, что non-Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки в конечных продуктах оказались преимущественно Vδ1$^-$ Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетками (которые составили приблизительно 17%-37% от общего числа клеток). Эти клетки вероятно состояли из Vδ3$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток, так как это третья по распространенности субпопуляция TCRγδ$^+$ Т-клеток в периферической крови. Удалось подсчитать процентную долю Vδ1$^-$ Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клеток в конечных клеточных продуктах, вычтя процентную долю Vδ1$^+$ Т-клеток и Vδ2$^+$ Т-клеток из процентной доли всех TCRγδ$^+$ Т-клеток (**Таблица 7**). Кратность размножения в этих пластиковых пакетах была, согласно ожиданиям, ниже, чем на планшетах, но все еще достаточна для клинической трансляции.

Экспрессия активирующих природных рецепторов цитотоксичности (NCR; включая NKp30 и NKp44), и NKG2D была сильно понижена у долговременно культивированных Vδ1$^+$ Т-клеток у всех протестированных доноров (**Таблица 8** и **Фиг.7)**. Полученные TCRγδ$^+$ Т-клетки (включающие и Vδ1$^+$, и Vδ1$^-$Vδ2$^-$ клеточные субпопуляции) были очень цитотоксичны в отношении CLL клеток (как MEC-1 клеточной линии, так и первичных CLL образцов пациентов), но не нацеливались на здоровые аутологичные PBMC (**Фиг.8A** и **Фиг.8C**). Предварительные эксперименты с использованием блокирующих антител против активирующих рецепторов TCRγδ$^+$ Т-клеток показали, что противоопухолевая цитотоксичность частично зависела от NKG2D и NKp30 рецепторов (**Фиг.8B**). К тому же, размноженные и дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки производили высокий уровень провоспалительного цитокина IFN-γ (**Фиг.9**).

Наконец, Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т-клетки можно эффективно выделить и размножить из PBL пожилых CLL пациентов с очень тяжелым состоянием, вызванным опухолью (**Таблица 9** и **Таблица 10** и **Фиг.10А**), и они продемонстрировали высокую противоопухолевую и антивирусную активность (**Фиг.10В**). Стоит отметить, что контаминантные аутологичные В-клетки лейкоза были уничтожены во время *in vitro* культивирования TCRγδ$^+$ Т-клеток (**Таблица 10).**

Этот набор данных во всей полноте демонстрирует уникальную способность данного изобретения генерировать функциональные Vδ2$^-$ γδ Т-клетки (а именно, от пациентов с раком) для аутологичной или аллогенной адоптивной клеточной терапии. Данный способ является надежным в отношении обогащения (>60%) и размножения (до порядка увеличения в 2000 раз) Vδ1$^+$ Т-клетки из в высшей степени неочищенных образцов, полученных от CLL пациентов, дифференцируя их в NKR-экспрессирующие и в высшей степени цитотоксичные TCRγδ$^+$ Т-клетки.

Важно отметить, что предварительные тесты также продемонстрировали *in vitro* реакционность культивированных TCRγδ$^+$ Т-клеток по отношению к опухолевым клеткам тканей другого происхождения (**Фиг.11**), что позволяет предположить, что размноженные и дифференцированные Vδ2$^-$ γδ Т-клетки можно использовать для лечения этих заболеваний.

Таблица 6

Клеточная линия: / **Донор**	**В клетки** (CD19$^+$ CD20$^+$ клетки)	**NK клетки** (CD56$^+$ CD3$^-$ клетки)	**Т-клетки** (CD3$^+$ клетки)	**TCRαβ$^+$ Т-клетки** (TCRαβ$^+$ CD3$^+$ клетки)	**TCRγδ$^+$ Т-клетки** (TCRγδ$^+$ CD3$^+$ клетки)	**Vδ1$^+$ Т-клетки** (TCRVδ1$^+$ CD3$^+$ клетки)	**Vδ2$^+$ Т-клетки** (TCRVδ2$^+$ CD3$^+$ клетки)	**Общая жизнеспособность клеток** (Trypan Blue$^-$ клетки)
A	24,6	9,92	43,5	0,01	41,9	13,5	23,6	79,4
B	6,69	0,07	75,0	0,71	63,2	21,6	30,0	80,1

C	1,36	0,36	95,3	0,37	94,5	1,25	92,6	95,2
D	13,9	6,79	41,2	0,76	40,2	18,3	21,5	89,1
E	17,0	1,84	65,8	2,80	59,6	17,7	40,9	89,9
F	0,28	8,14	91,4	0,81	90,0	2,05	86,1	93,7
G	7,32	0,25	87,5	0,58	81,8	24,0	45,0	84,0
H	3,51	0,10	88,8	0,80	84,8	44,0	27,0	86,0

Таблица 7

Клеточная линия: / **Донор**	**B клетки** ($CD19^+$ $CD20^+$ клетки)	**NK клетки** ($CD56^+$ $CD3^-$ клетки)	**T-клетки** ($CD3^+$ клетки)	**$TCR\alpha\beta^+$ T-клетки** ($TCR\alpha\beta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$TCR\gamma\delta^+$ T-клетки** ($TCR\gamma\delta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$V\delta1^+$ T-клетки** ($TCRV\delta1^+$ $CD3^+$ клетки)	**$V\delta2^+$ T-клетки** ($TCRV\delta2^+$ $CD3^+$ клетки)	**Общая жизнеспособность клеток** (Trypan $Blue^-$ клетки)
A	0	0,50	99,5	0,01	99,3	82,6	3,9	89,0
B	0	0,02	99,7	0,06	99,5	80,8	3,7	93,3
C	0	0,50	96,3	0,03	92,8	69,9	4,2	90,3
D	0	0,03	99,6	0,02	99,1	62,2	2,3	94,5
E	0	0,11	99,5	0,01	99,2	63,3	3,3	95,9
F	0	0	99,9	0,02	98,0	73,3	4,3	93,2
G	0	0,10	99,4	0,01	98,4	71,7	3,5	90,0
H	0	0,40	97,5	0	98,2	72,0	1,6	89,0

Таблица 8

Донор	**Активирующий рецептор**	**День 0**	**День 16**	**День 21**
A	NKp30	0,51	66,8	65,0
	NKp44	0,30	18,3	23,3

	NKG2D	46,0	96,5	98,0
B	NKp30	0,56	71,6	68,0
	NKp44	0	37,2	38,7
	NKG2D	55,0	90,7	95,1

Таблица 9

Клеточная линия: / **Донор**	**B клетки** ($CD19^+$ $CD20^+$ клетки)	**NK клетки** ($CD56^+$ $CD3^-$ клетки)	**T-клетки** ($CD3^+$ клетки)	**$TCR\alpha\beta^+$ T-клетки** ($TCR\alpha\beta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$TCR\gamma\delta^+$ T-клетки** ($TCR\gamma\delta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$V\delta1^+$ T-клетки** ($TCRV\delta1^+$ $CD3^+$ клетки)	**Жизнеспособность клеток** (Trypan Blue$^-$ клетки)
<u>До</u> MACS (День 0)							
CLL-1	63,4	1,22	30,4	27,5	0,66	0,22	92,0
CLL-2	85,7	0,92	8,35	6,97	0,43	0,03	90,0
CLL-3	90,4	0,15	3,74	3,31	0,35	$1.9x10^{-3}$	87,0
<u>После</u> MACS (День 0)							
CLL-1	38,0	0,72	37,2	0,19	7,32	4,00	88,0
CLL-2	35,4	0,26	61,3	0,05	36,7	1,70	83,0
CLL-3	57,0	0,45	39,5	0,02	10,4	0,28	80,0

Таблица 10

Клеточный фенотип после *in vitro* культивирования (21 день)								
Клеточная линия: / **Донор**	**B клетки** ($CD19^+$ $CD20^+$ клетки)	**NK клетки** ($CD56^+$ $CD3^-$ клетки)	**T-клетки** ($CD3^+$ клетки)	**$TCR\alpha\beta^+$ T-клетки** ($TCR\alpha\beta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$TCR\gamma\delta^+$ T-клетки** ($TCR\gamma\delta^+$ $CD3^+$ клетки)	**$V\delta1^+$ T-клетки** ($TCRV\delta1^+$ $CD3^+$ клетки)	**$NKp30^+$ $V\delta1^+$ T-клетки** (pre-gated)	**$NKG2D^+$ $V\delta1^+$ T-клетки** (pre-gated)

CLL-1	0,04	0,11	96,8	0,08	94,1	60,1	23,0	95,6
CLL-2	0,07	0,01	99,5	0,02	97,4	80,0	11,0	98,9
CLL-3	0,05	0,01	99,8	0,01	99,6	70,1	13,4	97,2

In vivo исследования размноженных TCRγδ$^+$ Т-клеток

Успешно разработав способ создания больших количеств функциональных TCRγδ$^+$ Т-клеток, которые авторы данного изобретения назвали “DOT-клетками”, авторы данного изобретения далее исследовали их хоминг-активность и противолейкотическую активность *in vivo*. Авторы данного изобретения выбрали ксенотрансплантатную модель CLL человека, ранее известную как воспроизводящую несколько аспектов этого заболевания, и использовавшуюся для проверки эффективности других видов клеточной терапии, включая CAR-Т-клетки.[51, 52] Эта модель основана на адоптивном переносе MEC-1 клеток, происходящих от CLL/SLL, Balb/c Rag$^{-/-}$ γc$^{-/-}$ (BRG) животным, лишенным всех лимфоцитов, и поэтому не отторгающим клетки человека немедленно. Однако, некоторое отторжение ксенотрансплантатов человека с участием миелоидной линии все же происходит. Это отторжение различается по интенсивности в зависимости от использованной породы мышей, из-за разных аллелей кодирующих SIRP-α [53]. Поэтому авторы данного изобретения далее адаптировали эту модель с целью исследования TCRγδ$^+$ Т-клеток в более поздний период после их переноса, используя NOD-SCID γc$^{-/-}$ (NSG) животных в качестве носителей. Фактически, после переноса клеток имеющим опухоли NSG носителям, авторам данного изобретения удалось извлечь TCRγδ$^+$ Т-клетки из всех проанализированных тканей, через 30 дней после переноса, с сильным обогащением CD3$^+$Vδ1$^+$ Т-клетками (**Фиг.12**). Важно отметить, что авторы данного изобретения обнаружили экспрессию NKp30 и NKG2D в извлеченных TCRγδ$^+$ Т-клетках, продемонстрировав, что они стабильно сохраняют свои характеристики *in vivo*. Стоит отметить, что после переноса клеток BRG животным, авторам данного изобретения не удалось извлечь TCRγδ$^+$ Т-клетки на таком позднем этапе, но авторы данного изобретения наблюдали их в легких и печени через 72 часа после переноса (**Фиг.12**). Эти эксперименты подтверждают лучшую пригодность NSG животных для ксенотрансплантирования клеток человека, одновременно позволяя использовать две различные модели для проверки противоопухолевых свойств размноженных Vδ2$^-$ γδ Т-клеток *in vivo*.

С целью динамического исследования роста опухоли с помощью биолюминесценции, авторы данного изобретения трансфицировали MEC-1 клетки светлячковой люциферазой-GFP, и подкожно перенесли 10^7 MEC-1 клеток BRG животным. Через 7 дней авторы данного изобретения ввели люциферин i.p. для определения опухолевой массы как функции от люминесценции, перед назначением животным лечения (или PBS контроля). Авторы данного изобретения произвели два переноса TCRγδ$^+$ Т-клеток в течение 5 дней. Затем авторы данного изобретения измерили размер опухоли как функцию от времени с помощью калипера; важно отметить, что авторы данного изобретения отметили явное уменьшение размера первичной опухоли у животных, получавших лечение, в сравнении с контрольными животными (**Фиг.13**). Это уменьшение было значительным через 9 дней после второго переноса TCRγδ$^+$ Т-клеток. Данный результат демонстрирует эффективность TCRγδ$^+$ Т-клеток *in vivo*, даже при том, что более интенсивному исследованию их противоопухолевых свойств воспрепятствовал короткий период полувыведения клеток человека у BRG-носителей. Для преодоления этого ограничения, авторы данного изобретения далее произвели подобный эксперимент на NSG животных в качестве носителей.

У NSG носителей скорость развития опухоли была выше, что, казалось бы, препятствовало вмешательству TCRγδ$^+$ Т-клеток в рост первичной опухоли (**Фиг.14**). Однако, в более позднем периоде этой модели опухоль распространяется на различные органы, и авторы данного изобретения обнаружили, что TCRγδ$^+$ Т-клетки способны поразительно успешно ограничивать распространение опухоли, что подтверждается результатами анализов образцов тканей методами проточной цитометрии и гистологическими исследованиями (**Фиг.14B-D**). Этот эффект включал такие области распространения, как костный мозг и печень. Данные, полученные на двух ксенотрансплантатных моделях, суммарно демонстрируют эффективность TCRγδ$^+$ Т-клеток *in vivo* в отношении снижения размера первичной опухоли (у BRG носителей; **Фиг.13**) и контроля распространения опухоли в органы-мишени (у NSG носителей; **Фиг.14**).

Исследование потомства TCRγδ$^+$ Т-клеток в конце эксперимента на NSG модели подтвердило массовую инфильтрацию в опухолевую ткань (**Фиг.15A**) и стабильную экспрессию NKp30 и NKG2D на TCRγδ$^+$ Т-клетках (**Фиг.15B**). Интересно заметить, что авторы данного изобретения обнаружили сильную экспрессию активационного маркера

CD69 именно на инфильтрующих опухоль TCRγδ$^+$ Т-клетках, что позволяет предположить оптимальную активацию TCRγδ$^+$ Т-клеток внутри опухоли (**Фиг.15В**). Важно отметить, что в ходе гистологического анализа (ряда органов) и биохимического анализа крови, собранной во время аутопсии, авторы данного изобретения не обнаружили никаких признаков ассоциированной с лечением токсичности (**Фиг.16**).

В целом, эти данные исследований *in vivo* уверенно свидетельствуют о высокой безопасности и эффективности полученных TCRγδ$^+$ Т-клеток для лечения CLL, тем самым мотивируя применять их в клинике.

В заключение, авторы данного изобретения разработали новый надежный (характеризующийся высокой воспроизводимостью) способ клинического уровня, не нуждающийся в питающих клетках, для селективного и крупномасштабного размножения и дифференциации цитотоксических Vδ2$^-$ γδ Т-клеток, и протестировали его терапевтический потенциал на доклинических моделях хронического лимфолейкоза (CLL). Раскрытый клеточный продукт, названный DOT-клетками, не включает никаких генетических манипуляций, и специфически атакует целевые клетки лейкоза, не затрагивая здоровые клетки *in vitro*; и предотвращает широкое распространение опухоли в периферические органы *in vivo*, без признаков повреждения здоровой ткани. Результаты данного изобретения предоставляют новые средства и принципиальное доказательство для клинического применения DOT-клеток в адоптивной иммунотерапии рака.

Дополнительные данные

В следующем разделе раскрываются дополнительные данные, полученные при использовании ранее описанного изобретения. Эти данные подтверждают предыдущие результаты и распространяются на предыдущие наблюдения, и должны использоваться как дополнительная информация для лучшего понимания объекта изобретения.

Как объяснялось ранее, комбинацию интерлейкина-2 (IL-2) и интерлейкина-4 (IL-4) использовали с некоторым успехом для размножения Vδ1$^+$ Т-клеток *in vitro*. Однако,

авторы данного изобретения обнаружили, что присутствие IL-4 в культуральной среде вызывает сильное снижение уровня рецепторов, активирующих природные киллеры (NK) (таких как NKG2D, NKp30 и NKp44) на культивируемых TCRγδ$^+$ Т-клетках, ослабляя их противоопухолевую реакцию.

Здесь представлены более детальные результаты экспериментов 1-4 (см. **Таблица 11**). Показаны дополнительные результаты, полученные в параллельных условиях культивирования (помеченных звездочками), для более полного понимания результатов. Также здесь описывается процентная доля NKp30$^+$Vδ1$^+$ Т-клеток после культивирования в каждых условиях. Наблюдаемое снижение уровня экспрессии NKp30 на культивируемых клетках также подтверждает, что значительный ингибиторный эффект IL-4 на Vδ2$^-$ γδ Т-клетки также оказывается если IL-2 присутствует в культуральной среде (то есть, если в культуральной среде содержатся и IL-2, и IL-4). Эти данные подтверждают, что ингибиторный эффект IL-4 является доминантным над активирующим эффектом IL-2 на культивируемые TCRγδ$^+$ Т-клетки, и подчеркивает важность удаления IL-4 из второй стадии культивирования.

Как было объяснено ранее, хотя параллельно проверялось множество различных концентраций и комбинаций IL-2, IL-7 и IL-15, IFN-γ постоянно оказывался намного более эффективным реагентом для активации селективного размножения Vδ1$^+$ Т-клеток в культуральной среде (при использовании в присутствии IL-4 и митогена Т-клеток, такого как моноклональное антитело, специфичное к CD3). Как было ранее предположено (но формально не показано), использование IFN-γ отдельно было более эффективным (относительно активации размножения клеток в культуральной среде), чем комбинация IFN-γ с любым из IL-2, IL-7 или IL-15, или чем комбинация IL-2 с любым из IL-15 или IL-7 (**Таблица 12**). Эти данные подтверждают, что IL-15, IL-2 и IL-7 обладают негативным эффектом на размножение TCRγδ$^+$ Т-клеток, если клетки культивируют в присутствии IL-4 и IFN- γ.

Как было объяснено ранее, порядок размножения в крупных пакетах для клеточной культивации был, в соответствии с ожиданием, по величине ниже, чем на 96-луночных планшетах, но количество полученных клеток все еще позволяло их клиническое использование. Общее абсолютное количество клеток, полученных после крупномасштабного клеточного культивирования в пакетах клинического уровня детально показано в **Таблице 13**.

Как было объяснено ранее, протокол клеточного культивирования, разработанный при применении ранее описанного способа, подходит для клинического применения. Фактически, некоторые материалы и реагенты уже одобрены по меньшей мере одним регуляторным органом (таким как Европейское медицинское агентство или Управление по продовольствию и лекарствам США) для клинического применения. Полные данные представлены в **Таблице 14**.

Согласно описанию, приведенному выше, двухстадийный способ выделения клеток, раскрываемый в данном изобретении, позволяет получить образцы, обогащенные TCRγδ$^+$ Т-клетками, которые являются жизнеспособными и могут быть культивированы далее**.** На **Фиг.17** более детально изображена FACS-диаграмма обогащения TCRγδ$^+$ PBL после двухстадийной MACS-сортировки.

Как было объяснено ранее, способ по настоящему изобретению обеспечивает хорошо воспроизводимое размножение клеток, и состав конечного клеточного продукта был достаточно постоянен для всех использованных доноров.
Для более полного исследования клеток, полученных при осуществлении ранее описанного изобретения, и придания новизны описанному способу и полученному клеточному продукту, авторы данного изобретения произвели широкое фенотипирование 332 различных маркеров клеточной поверхности **(Фиг.18)**. Vδ1$^+$ Т-клетки сравнивали в начале (день 0) и в конце (день 21) культивационного процесса. Авторы данного изобретения наблюдали достоверное повышение уровней активационных маркеров CD69 и CD25 и HLA-DR, а также ко-стимуляторных рецепторов CD27, CD134/OX-40 и CD150/SLAM, индикаторов улучшенного пролиферативного потенциала *in vitro*-генерированных Vδ1$^+$ Т-клеток (по сравнению с их базовыми Vδ1$^+$ Т-клетками-аналогами). Более того, размноженные Vδ1$^+$ Т-клетки увеличивали экспрессию NK клеточно-ассоциированных рецепторов активации/цитотоксичности, а именно NKp30, NKp44, NKG2D, DNAM-1 и 2B4, которые являются известными важными участниками таргетинга опухолевых клеток. Напротив, ключевые ингибиторы и молекулы, ассоциирующиеся с истощением, такие как PD-1, CTLA-4 или CD94, экспрессировались или на очень низких уровнях, или не экспрессировались совсем, демонстрируя убедительную приспособляемость размноженных и дифференцированных TCRγδ$^+$ Т-клеток даже через 21 день

культивирования в стимулирующих условиях. Важно заметить, что повышение уровня экспрессии нескольких молекул, вовлеченных в клеточную адгезию (например, CD56, CD96, CD172a/ SIRPα, Integrin-β7 и ICAM-1) и хемокинных рецепторов (CD183/CXCR3, CD196/CCR6, и CX3CR1) позволяет предположить высокий потенциал миграции и рециркуляции между кровью и тканями. Стоит отметить, что IL-18Rα и Notch1, которые известны как участвующие в стимуляции ответов 1 типа (интерферон-γ-производящих), также активно экспрессировались размноженными и дифференцированными TCRγδ$^+$ Т-клетками. В поддержку надежности описанного способа важно отметить, что авторы данного изобретения обнаружили поразительно похожие клеточные фенотипы у всех 4 протестированных доноров, что показано на диаграмме **(Фиг.18В)**. Эти данные коллективно характеризуют размноженные и дифференцированные TCRγδ$^+$ Т-клетки как в высшей степени воспроизводимый клеточный продукт активированных (не истощенных) лимфоцитов, обладающий миграционным потенциалом и природной цитотоксичностью.

Как было объяснено ранее, предварительные эксперименты по применению блокирующих антител против активирующих рецепторов, экспрессируемых на TCRγδ$^+$ Т-клетках, показали, что противоопухолевая цитотоксичность отчасти зависит от NKG2D и NKp30 рецепторов, экспрессируемых на размноженных TCRγδ$^+$ Т-клетках. Приведены дополнительные эксперименты, раскрывающие роль γδTCR в распознавании опухолевых клеток (**Фиг.19**).

Как было объяснено ранее, экспрессия активирующих природных рецепторов цитотоксичности (NCR; включая NKp30 и NKp44), и NKG2D, достоверно активировалась в долговременно культивируемых Vδ1$^+$ Т-клетках. Здесь авторы данного изобретения показывают, что такой же эффект наблюдался на субпопуляции Vδ1$^-$Vδ2$^-$ клеток. Когда авторы данного изобретения применили гейт (в FACS анализе) к размноженным (и дифференцированным) CD3$^+$Vδ1$^-$Vδ2$^-$ клеточным субпопуляциям одной и той же культуры, авторы данного изобретения обнаружили, что эти клетки экспрессируют приблизительно такие же уровни NCR, какие экспрессируются дифференцированными Vδ1$^+$ клетками (**Фиг.20)**. Эти данные далее подтверждают, что в ходе двухстадийного протокола, описанного в настоящем изобретении, могут размножаться и дифференцироваться как Vδ1$^+$ так и Vδ1$^-$ Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т клеточные субпопуляции. На первой стадии культивирования, в присутствии митогена Т-клеток и IL-4 (и при

отсутствии IL-15, IL-2 или IL-7), и Vδ1$^+$ и Vδ1$^-$ Vδ2$^-$ TCRγδ$^+$ Т клеточные субпопуляции размножаются в культуральной среде, но не могут дифференцироваться в направлении цитотоксического фенотипа. Когда полученные клетки субкультивируют во второй культуральной среде в присутствии митогена Т-клеток и IL-2, или IL-7, или IL-15 (и при отсутствии IL-4), обе клеточные субпопуляции дифференцировались, экспрессируя высокие уровни активирующих NK рецепторов что, в свою очередь, способствует уничтожению опухолевых клеток.

Как было объяснено ранее, размноженные и дифференцированные Vδ1$^+$ клетки, полученные по способу в соответствии с настоящим изобретением, являются очень цитотоксичными в отношении клеток лейкоза *in vitro*. Здесь авторы данного изобретения более детально показывают, что размноженные и дифференцированные Vδ1$^-$Vδ2$^-$ клеточные субпопуляции также являются очень цитотоксичными по отношению к опухолевым мишеням. Авторы данного изобретения проводили сортировку CD3$^+$Vδ1$^+$ клеток и CD3$^+$Vδ1$^-$Vδ2$^-$ клеток из одних образцов культивированных клеток при помощи проточной цитометрии и совместено культивировали каждую субпопуляцию с опухолевыми клетками-мишенями *in vitro*. Авторы данного изобретения наблюдали, что обе субпопуляции могут эффективно уничтожать клетки-мишени (**Фиг.21).**

Таблица 11

Эксп.	№ условий	Условия: (культивировали 1 миллион клеток на мл в течение 14 дней на 96-луночных планшетах)	Vδ1$^+$ Т-клетки (%)	Порядок увеличения количества Vδ1$^+$ Т-клеток	NKp30+ Vδ1$^+$ Т-клетки (%)
1	1	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	31,6	77	0,5
	2*	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-Vδ1 TCR mAb**	4,7	8	6,2
	3	500нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA**	10,5	4	13,4

	4*	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb	5,3	2	9,1
	5	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** *(контроль)*	1,9	1	10,6
2	1	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	51,7	75	0,0
	2	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-Vδ1 TCR mAb** + 20нг/мл **IL-4**	55,9	69	0,2
	3	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	61,9	62	0,0
	4*	1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	79,6	38	0,3
	5	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4** *(ранее лучший)*	45,3	27	0,2
	6	100нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	55,7	22	0,4
	7	300нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	57,0	21	1,6
	8*	20нг/мл **IL-2** + 20нг/мл **IL-4**	2,4	2	0,0
3	1	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	61,4	138	0,3
	2	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	59,4	124	1,2
	3	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4** (*ранее лучший)*	45,4	105	1,0
	4	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	76,2	21	1,2
	5	5нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	69,1	19	1,6
	6	20нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	69,9	13	1,3
	7	20нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **PHA** + 20нг/мл **IL-4**	67,7	11	1,0
4	1	20нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	79,5	1 349	0,8
	2	3нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	67,4	1 014	0,4
	3	2нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4**	81,6	909	1,8
	4	5нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 20нг/мл **IL-4** *(ранее лучший)*	69,4	624	1,9

Таблица 12

№ условий	Условия: (культивировали 1 миллион клеток на мл в течение 14 дней на 96-луночных планшетах)	Всего живых клеток (%)	Vδ1⁺ Т-клетки (%)	Порядок увеличения количества Vδ1⁺ Т-клеток
1	20нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	85,9	80,1	12 166
2	7нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	89,9	93,0	10 757
3	2нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	87,3	75,2	9 394
4	0,3нг/мл **IL-15** + 2нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	77,1	59,7	4 361
5	2нг/мл **IL-15** + 2нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	90,0	67,0	811
6	0,3нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	89,7	75,5	614
7	7нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	85,7	83,2	10 083
8	2нг/мл **IL-2** + 2нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	87,5	59,4	7 208
9	2нг/мл **IL-2** + 7нг/мл **IFN-γ** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	80,4	71,6	7 151
10	7нг/мл **IL-7** + 2нг/мл **IL-15** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	91,1	65,6	6 193
11	2нг/мл **IL-2** + 1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	88,7	70,5	5 192
12	1мкг/мл **α-CD3** mAb + 60нг/мл **IL-4**	89,0	68,3	1 890
13	0,3нг/мл **IFN-γ** + 2мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	82,7	59,9	6 139

14	2нг/мл **IL-7** + 0,3нг/мл **IFN-γ** + 2мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	87,6	72,9	5 290
15	0,3нг/мл **IL-15** + 0,3нг/мл **IFN-γ** + 2мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	85,9	80,1	4 840
16	0,3нг/мл **IL-15** + 2мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	90,0	64,2	2 943
17	2мкг/мл **α-CD3** mAb + 100нг/мл **IL-4**	85,8	73,0	1 826

Таблица 13

	Общее количество живых клеток, генерированных из 1 единицы лейкоцитарных пленок: (миллионов клеток)	
Донор:	**День 0**	**День 21**
A	2,4	968,0
B	4,8	1 004,0
C	83,3	440,0
D	5,7	1 152,0
E	9,2	1 024,0
F	25,0	1 564,0
G	4,0	1 604,0
H	2,0	1 276,0

Таблица 14

Реагент / Материал	**Производитель**	**Ссылка на продукт**	**Система качества производителя ***
Для магнитного обеднения TCRα/β$^+$ клеток:			
CliniMACS® Plus Instrument	Miltenyi Biotec, GmbH	151-01	cGMP, ISO 13485 совместимая
CliniMACS® TCRα/β набор		200-070-407	
CliniMACS® Depletion Tubing Set		261-01	
CliniMACS® PBS/EDTA буфер		700-25	

Для магнтного обогащения CD3$^+$ клеток:			
CliniMACS® CD3 реагент	Miltenyi Biotec, GmbH	273-01	cGMP, ISO 13485 совместимая
CliniMACS® Tubing Set TS		161-01	
Для клеточного культивирования:			
Кассеты для клеточного культивирования	Saint-Gobain	CC-0500	cGMP, 21 CFR 820 совместимая
Зажимы	Saint-Gobain	1C-0022	
VueLife® FEP пакет для клеточного культивирования	Saint-Gobain	750-C1	
OpTmizer™ среда для размножения Т-клеток	Thermo Fisher Scientific	A10485-01	cGMP, ISO 13485:2003 или ISO 9001:2008 совместимая
L-Глютамин	Thermo Fisher Scientific	25030-032	
моноклональное антитело, специфичное к CD3 человека (клон OKT-3)	Miltenyi Biotec, GmbH	170-076-116	
Рекомбинантный IL-4 человека	CellGenix GmbH	1003-050	
Рекомбинантный IL-21 человека	CellGenix GmbH	1019-050	
Рекомбинантный IFN-γ человека	R&D Systems	285-GMP	
Рекомбинантный IL-1β человека	CellGenix GmbH	1011-050	
Рекомбинантный IL-15 человека	CellGenix GmbH	1013-050	
*Примечание: некоторые продукты продаются как сертифицированные медицинские изделия для использования в ЕС и/или США. Все прочие продукты продаются для целей производства клеточных продуктов для клинических исследований. Их можно использовать в клинических испытаниях по линии Экспериментального лекарственного средства (Investigational New Drug, IND) или Освобождения для медицинского изделия (Investigational Device Exemption, IDE).			

Полный список литературных источников, упоминаемых в описании изобретения

1. Hayday AC. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* 2009; **31**(2): 184-96.
2. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of gammadelta T-cell subsets in mouse and human. *Immunology* 2012; **136**(3): 283-90.
3. Deniger DC, Maiti S, Mi T, et al. Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. *Clin Cancer Res* 2014.
4. Halary F, Pitard V, Dlubek D, et al. Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2005; **201**(10): 1567-78.

5. Bennouna J, Bompas E, Neidhardt EM, et al. Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**(11): 1599-609.
6. Fisher JP, Heuijerjans J, Yan M, Gustafsson K, Anderson J. gammadelta T cells for cancer immunotherapy: A systematic review of clinical trials. *Oncoimmunology* 2014; **3**(1): e27572.
7. Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, et al. Targeting human {gamma}delta} T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2007; **67**(15): 7450-7.
8. Gomes AQ, Martins DS, Silva-Santos B. Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer Res* 2010; **70**(24): 10024-7.
9. Zocchi MR, Ferrarini M, Migone N, Casorati G. T-cell receptor V delta gene usage by tumour reactive gamma delta T lymphocytes infiltrating human lung cancer. *Immunology* 1994; **81**(2): 234-9.
10. Maeurer MJ, Martin D, Walter W, et al. Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 1996; **183**(4): 1681-96.
11. Choudhary A, Davodeau F, Moreau A, Peyrat MA, Bonneville M, Jotereau F. Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 1995; **154**(8): 3932-40.
12. Cordova A, Toia F, La Mendola C, et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. *PLoS One* 2012; **7**(11): e49878.
13. Donia M, Ellebaek E, Andersen MH, Straten PT, Svane IM. Analysis of Vdelta1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *Oncoimmunology* 2012; **1**(8): 1297-304.
14. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; **39**(12): 751-7.
15. Lamb LS, Jr., Henslee-Downey PJ, Parrish RS, et al. Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother* 1996; **5**(5): 503-9.
16. Catellani S, Poggi A, Bruzzone A, et al. Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. *Blood* 2007; **109**(5): 2078-85.
17. Bartkowiak J, Kulczyck-Wojdala D, Blonski JZ, Robak T. Molecular diversity of gammadelta T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Neoplasma* 2002; **49**(2): 86-90.
18. Poggi A, Venturino C, Catellani S, et al. Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res* 2004; **64**(24): 9172-9.

19. De Maria A, Ferrazin A, Ferrini S, Ciccone E, Terragna A, Moretta L. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* 1992; **165**(5): 917-9.
20. Hviid L, Kurtzhals JA, Adabayeri V, et al. Perturbation and proinflammatory type activation of V delta 1(+) gamma delta T cells in African children with Plasmodium falciparum malaria. *Infection and immunity* 2001; **69**(5): 3190-6.
21. Dechanet J, Merville P, Lim A, et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1999; **103**(10): 1437-49.
22. Siegers GM, Lamb LS, Jr. Cytotoxic and regulatory properties of circulating Vdelta1+ gammadelta T cells: a new player on the cell therapy field? *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2014; **22**(8): 1416-22.
23. Meeh PF, King M, O'Brien RL, et al. Characterization of the gammadelta T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**(9): 1072-80.
24. Knight A, Mackinnon S, Lowdell MW. Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy* 2012.
25. Merims S, Dokouhaki P, Joe B, Zhang L. Human Vdelta1-T cells regulate immune responses by targeting autologous immature dendritic cells. *Hum Immunol* 2011; **72**(1): 32-6.
26. Wu D, Wu P, Wu X, et al. expanded human circulating Vdelta1 gammadeltaT cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer. *Oncoimmunology* 2015; **4**(3): e992749.
27. Siegers GM, Dhamko H, Wang XH, et al. Human Vdelta1 gammadelta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy* 2011; **13**(6): 753-64.
28. Siegers GM, Ribot EJ, Keating A, Foster PJ. Extensive expansion of primary human gamma delta T cells generates cytotoxic effector memory cells that can be labeled with Feraheme for cellular MRI. *Cancer Immunol Immunother* 2012.
29. Correia DV, Fogli M, Hudspeth K, da Silva MG, Mavilio D, Silva-Santos B. Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* 2011; **118**(4): 992-1001.
30. Mangan BA, Dunne MR, O'Reilly VP, et al. Cutting edge: CD1d restriction and Th1/Th2/Th17 cytokine secretion by human Vdelta3 T cells. *J Immunol* 2013; **191**(1): 30-4.
31. Kabelitz D, Hinz T, Dobmeyer T, et al. Clonal expansion of Vgamma3/Vdelta3-expressing gammadelta T cells in an HIV-1/2-negative patient with CD4 T-cell deficiency. *Br J Haematol* 1997; **96**(2): 266-71.
32. Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol* 2004; **113**(1): 56-63.

33. Zhou J, Kang N, Cui L, Ba D, He W. Anti-gammadelta TCR antibody-expanded gammadelta T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cellular & molecular immunology* 2012; **9**(1): 34-44.
34. Lopez RD, Xu S, Guo B, Negrin RS, Waller EK. CD2-mediated IL-12-dependent signals render human gamma delta-T cells resistant to mitogen-induced apoptosis, permitting the large-scale ex vivo expansion of functionally distinct lymphocytes: implications for the development of adoptive immunotherapy strategies. *Blood* 2000; **96**(12): 3827-37.
35. Fisher JP, Yan M, Heuijerjans J, et al. Neuroblastoma killing properties of Vdelta2 and Vdelta2-negative gammadeltaT cells following expansion by artificial antigen-presenting cells. *Clin Cancer Res* 2014; **20**(22): 5720-32.
36. Fisher J, Kramer AM, Gustafsson K, Anderson J. Non-V delta 2 gamma delta T lymphocytes as effectors of cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015; **4**(3): e973808.
37. Deniger DC, Maiti SN, Mi T, et al. Activating and propagating polyclonal gamma delta T cells with broad specificity for malignancies. *Clin Cancer Res* 2014; **20**(22): 5708-19.
38. Siegers GM, Felizardo TC, Mathieson AM, et al. Anti-leukemia activity of in vitro-expanded human gamma delta T cells in a xenogeneic Ph+ leukemia model. *PLoS One* 2011; **6**(2): e16700.
39. Wilhelm M, Kunzmann V, Eckstein S, et al. Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 2003; **102**(1): 200-6.
40. von Lilienfeld-Toal M, Nattermann J, Feldmann G, et al. Activated gammadelta T cells express the natural cytotoxicity receptor natural killer p 44 and show cytotoxic activity against myeloma cells. *Clin Exp Immunol* 2006; **144**(3): 528-33.
41. Deniger DC, Moyes JS, Cooper LJ. Clinical applications of gamma delta T cells with multivalent immunity. *Front Immunol* 2014; **5**: 636.
42. Mao Y, Yin S, Zhang J, et al. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cellular & molecular immunology* 2015.
43. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. gammadelta T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* 2015; **15**(11): 683-91.
44. Wu P, Wu D, Ni C, et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity* 2014; **40**(5): 785-800.
45. Mao Y, Yin S, Zhang J, et al. A new effect of IL-4 on human gammadelta T cells: promoting regulatory Vdelta1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of Vdelta2 T cells. *Cellular & molecular immunology* 2016; **13**(2): 217-28.
46. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leukemia research* 1999; **23**(2): 127-36.

47. Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, et al. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 2004; **304**(5667): 104-7.
48. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005; **174**(10): 6477-89.
49. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 1989; **24**(3): 148-54.
50. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 1982; **298**(5877): 859-63.
51. Bertilaccio MT, Scielzo C, Simonetti G, et al. A novel Rag2-/-gammac-/--xenograft model of human CLL. *Blood* 2010; **115**(8): 1605-9.
52. Giordano Attianese GM, Marin V, Hoyos V, et al. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood* 2011; **117**(18): 4736-45.
53. Takenaka K, Prasolava TK, Wang JC, et al. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 2007; **8**(12): 1313-23.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат клеток для применения в иммунотерапии, обогащенный TCRγδ$^+$ Т-клетками, полученный способом размножения TCRγδ$^+$ Т-клеток в образце, включающим:

(1) культивирование клеток указанного образца в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-4; при отсутствии интерлейкина-15, интерлейкина-2 или интерлейкина-7; и

(2) культивирование клеток, полученных на стадии (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и интерлейкин-15, интерлейкин-2 или интерлейкин-7, при отсутствии интерлейкина-4,

причем TCRγδ$^+$ Т-клетки составляют больше чем 80% от общего количества клеток.

2. Препарат клеток по п. 1, отличающийся тем, что TCRγδ$^+$ Т-клетки составляют больше чем 90% от общего количества клеток.

3. Препарат клеток по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что TCRγδ$^+$ Т-клетки составляют больше чем 95% от общего количества клеток.

4. Препарат клеток по любому из пп. 1-3, содержащий как Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки, так и Vδ2$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клетки, причем предпочтительно указанный препарат клеток содержит приблизительно 55-90% Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток и приблизительно 1-10% Vδ2$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток, от общего количества TCRγδ$^+$ Т-клеток в указанном препарате, более предпочтительно указанный препарат клеток содержит приблизительно 60-80% Vδ1$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток и приблизительно 1-5% Vδ2$^+$ TCRγδ$^+$ Т-клеток, от общего количества TCRγδ$^+$ Т-клеток в указанном препарате.

5. Применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных из препарата клеток согласно любому из пп. 1-4 для производства лекарственного средства для модулирования иммунного ответа.

6. Применение по п. 5, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство применяют для лечения инфекции.

7. Применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных из препарата клеток согласно любому из пп. 1-4 для производства лекарственного средства для лечения рака, причем предпочтительно указанный рак представляет собой хронический лимфолейкоз.

8. Применение по п. 5, отличающееся тем, что указанное лекарственное средство применяют для производства вакцины.

9. Применение TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных из препарата клеток согласно любому из пп. 1-4 для изучения распознавания антигена, активации, передачи сигнала или функции TCRγδ$^+$ Т-клеток.

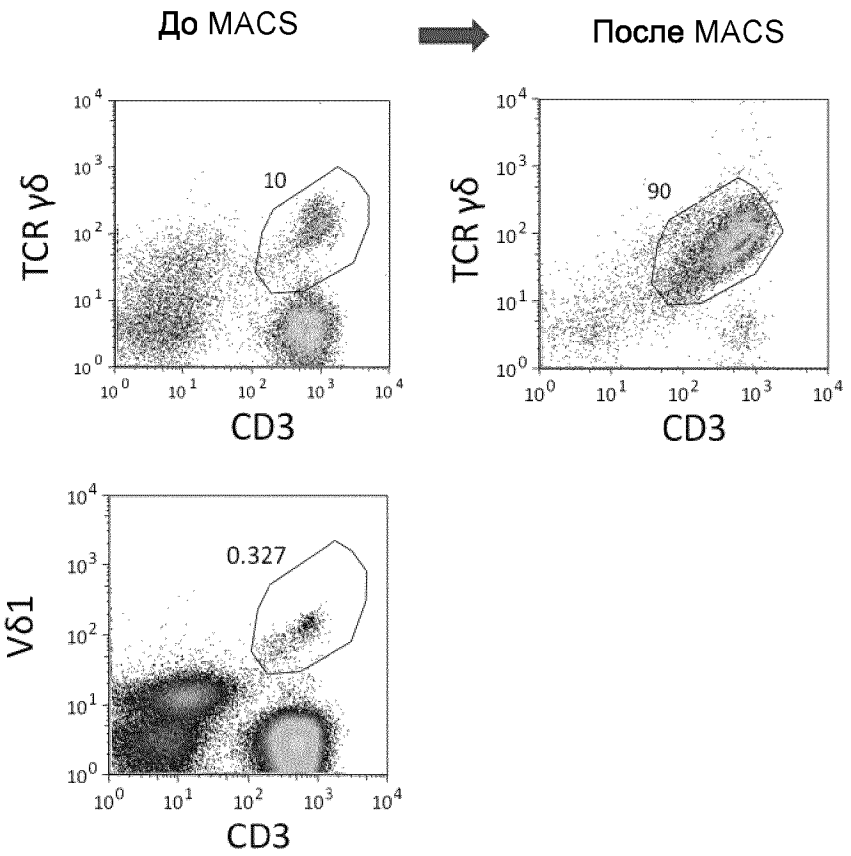
10. Способ модулирования иммунного ответа, включающий введение животному, нуждающемуся в этом, эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных из препарата клеток по любому из пп. 1-4.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что у указанного животного имеется инфекция.

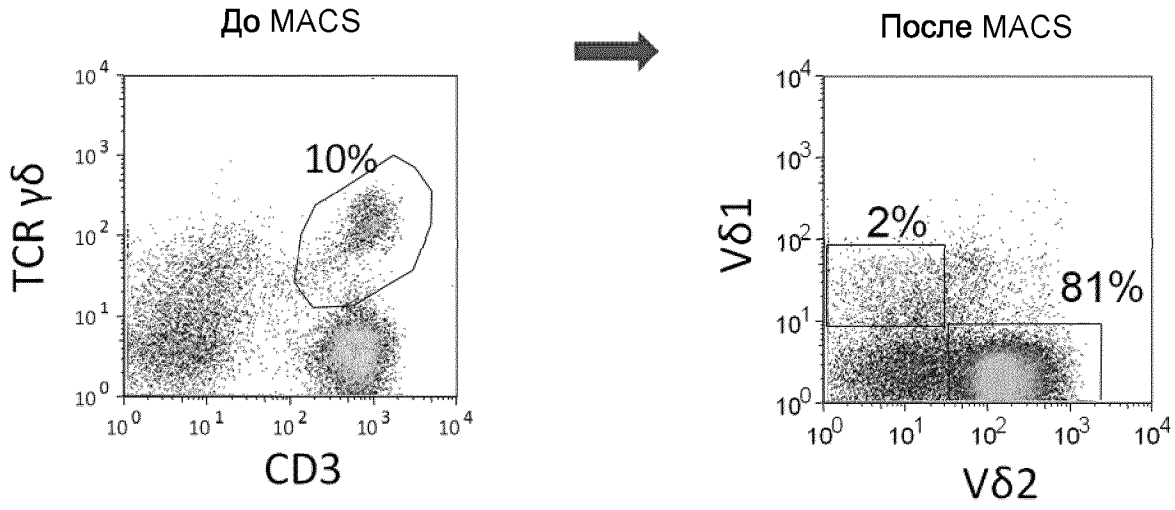
12. Способ лечения рака, включающий введение животному, нуждающемуся в этом, эффективного количества TCRγδ$^+$ Т-клеток, полученных из препарата клеток по любому из пп. 1-4.

13. Способ по п. 12, в котором указанный рак представляет собой хронический лимфолейкоз, хронический миелолейкоз, острый миелолейкоз, острый лимфобластозный лейкоз, Т-клеточный и В-клеточный лейкозы, лимфомы (Ходжкина или неходжкинскую), лимфопролиферативные нарушения, плазмацитомы, гистоцитомы, меланомы, аденомы, саркомы, карциномы твердых тканей, гипоксические опухоли, плоскоклеточные карциномы, урогенитальные типы рака, такие как рак шейки матки и рак мочевого пузыря, гемопоэтические типы рака, типы рака головы и шеи, или типы рака нервной системы.

Фигура 1

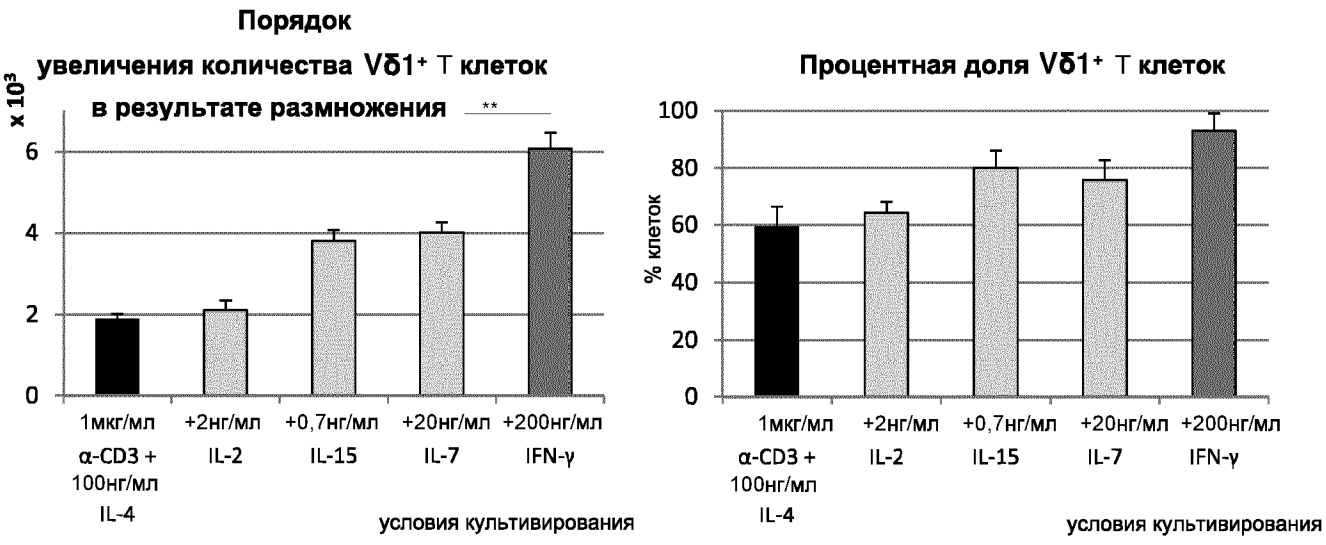


Фигура 2

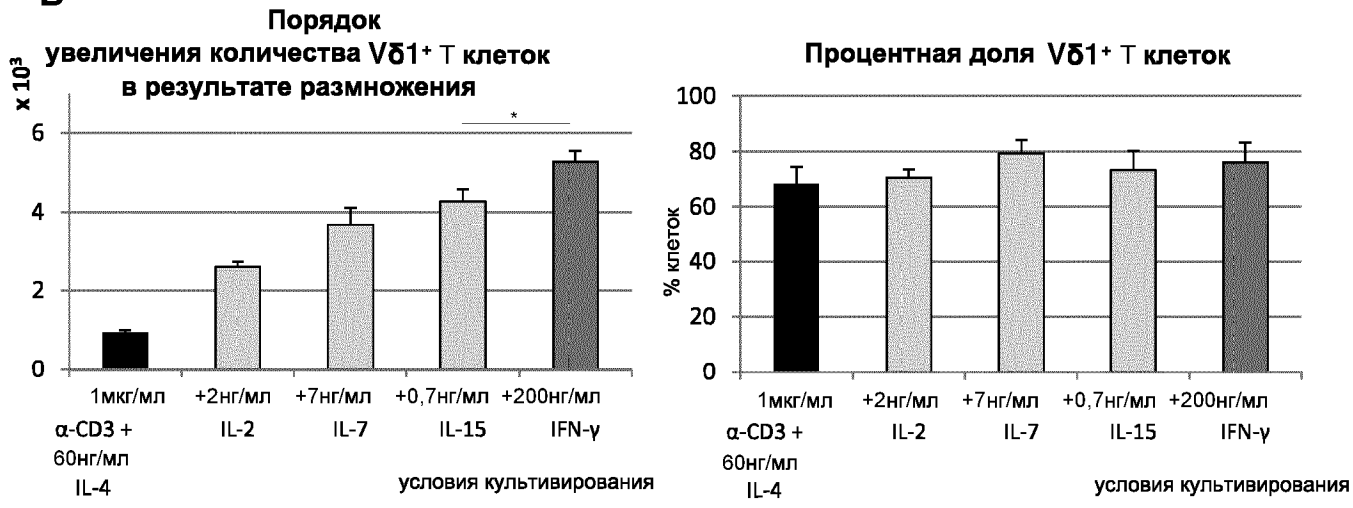


Фигура 3

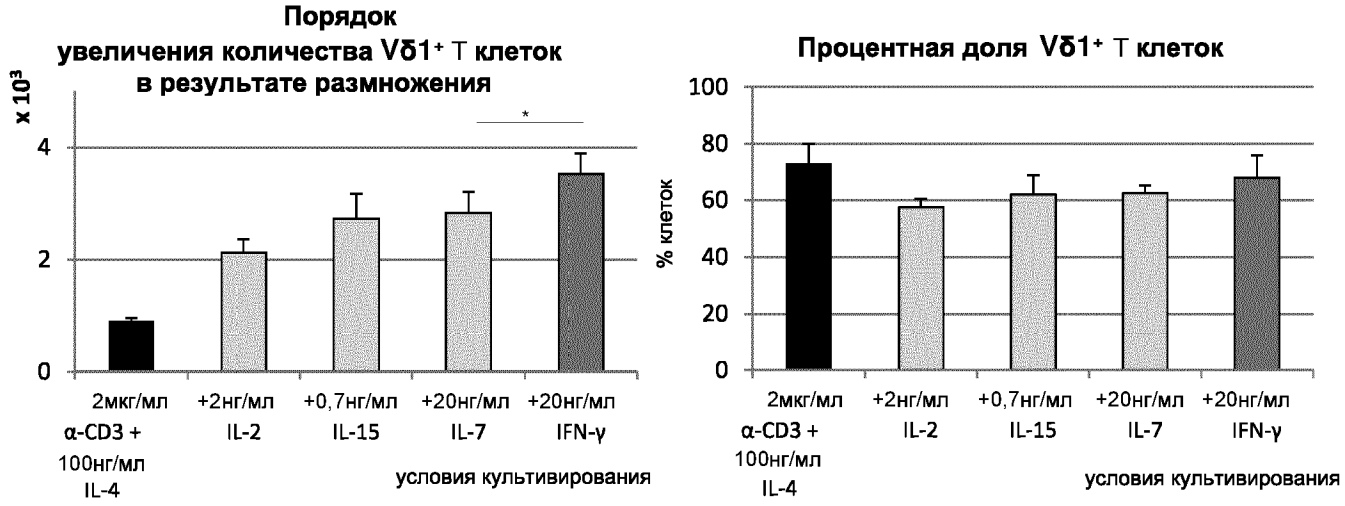
A

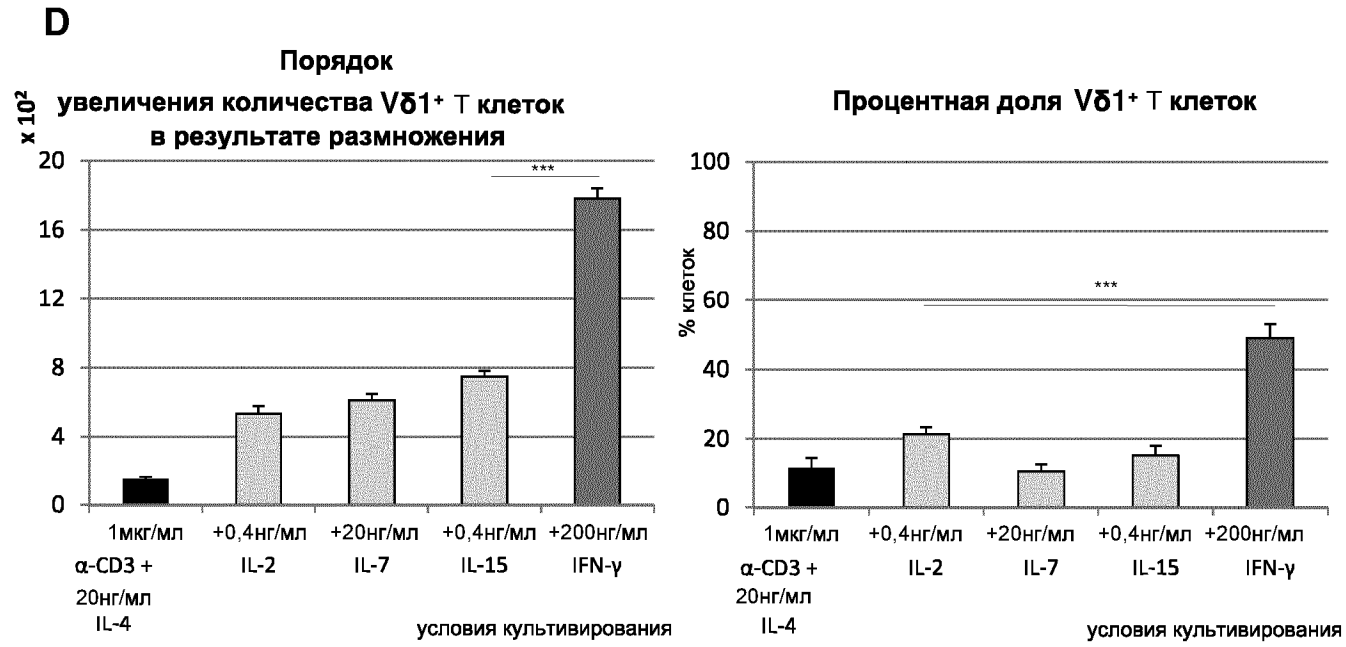

Порядок
увеличения количества Vδ1+ Т клеток
в результате размножения
x 10³
**
0
2
4
6
1мкг/мл α-CD3 + 100нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+0,7нг/мл IL-15
+20нг/мл IL-7
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования
Процентная доля Vδ1+ Т клеток
% клеток
0
20
40
60
80
100
1мкг/мл α-CD3 + 100нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+0,7нг/мл IL-15
+20нг/мл IL-7
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования

B

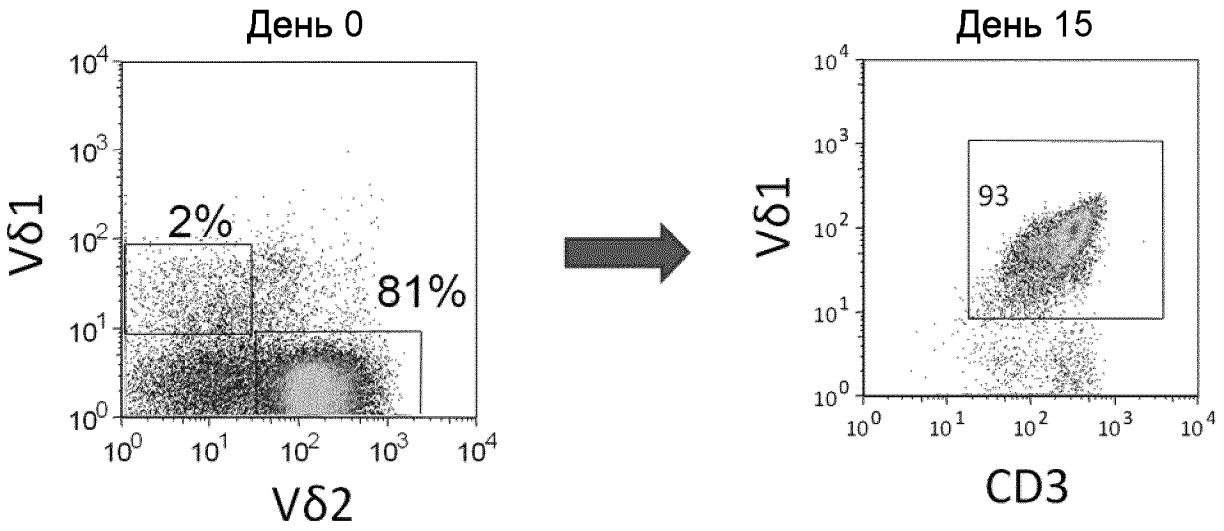

Порядок
увеличения количества Vδ1+ Т клеток
в результате размножения
x 10³
*
0
2
4
6
1мкг/мл α-CD3 + 60нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+7нг/мл IL-7
+0,7нг/мл IL-15
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования
Процентная доля Vδ1+ Т клеток
% клеток
0
20
40
60
80
100
1мкг/мл α-CD3 + 60нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+7нг/мл IL-7
+0,7нг/мл IL-15
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования

C

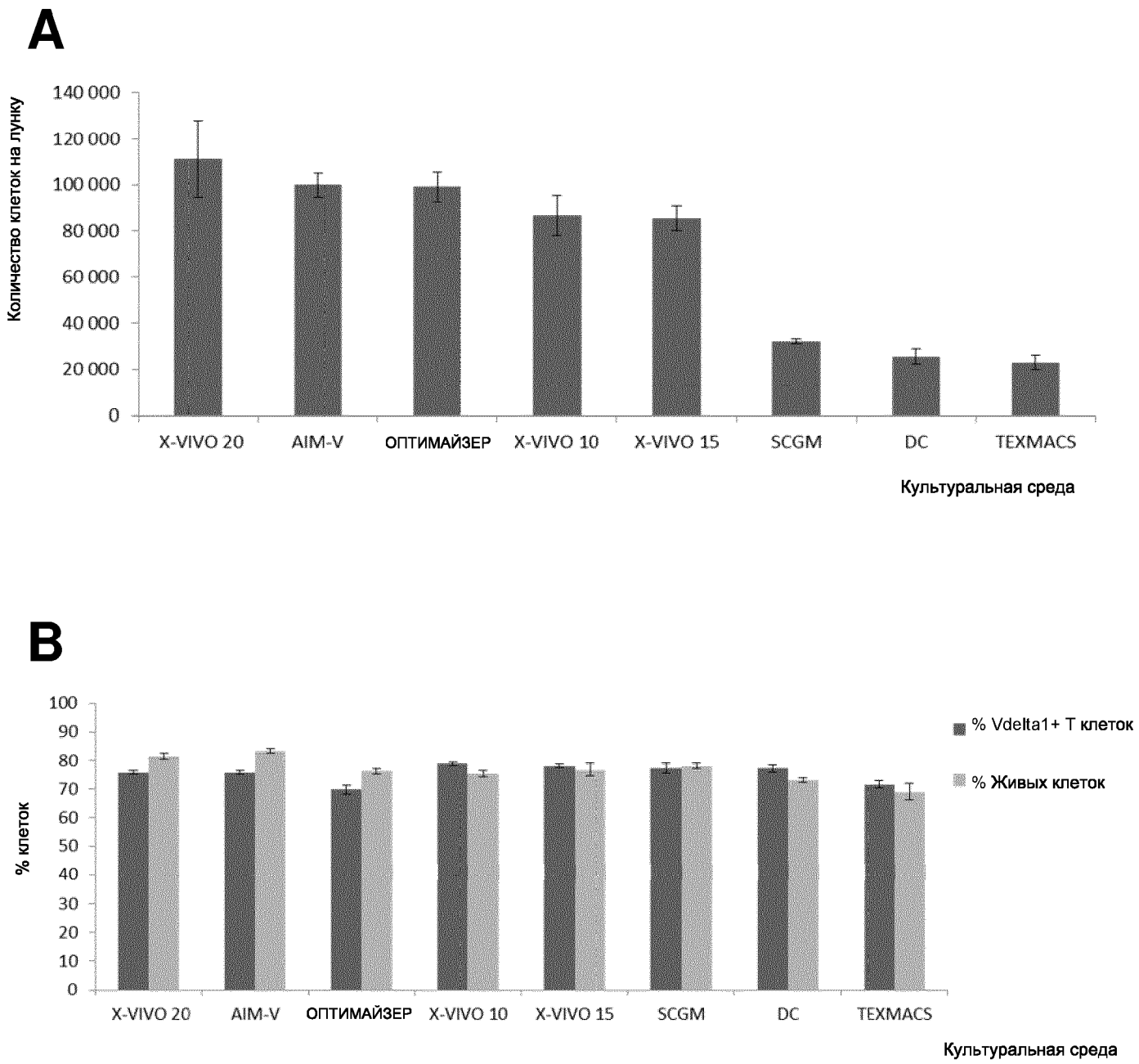

Порядок
увеличения количества Vδ1+ Т клеток
в результате размножения
x 10³
*
0
2
4
2мкг/мл α-CD3 + 100нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+0,7нг/мл IL-15
+20нг/мл IL-7
+20нг/мл IFN-γ
условия культивирования
Процентная доля Vδ1+ Т клеток
% клеток
0
20
40
60
80
100
2мкг/мл α-CD3 + 100нг/мл IL-4
+2нг/мл IL-2
+0,7нг/мл IL-15
+20нг/мл IL-7
+20нг/мл IFN-γ
условия культивирования


D
Порядок
увеличения количества Vδ1+ Т клеток
в результате размножения
x 10²
20
16
12
8
4
0
***
1мкг/мл α-CD3 + 20нг/мл IL-4
+0,4нг/мл IL-2
+20нг/мл IL-7
+0,4нг/мл IL-15
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования
Процентная доля Vδ1+ Т клеток
% клеток
100
80
60
40
20
0
***
1мкг/мл α-CD3 + 20нг/мл IL-4
+0,4нг/мл IL-2
+20нг/мл IL-7
+0,4нг/мл IL-15
+200нг/мл IFN-γ
условия культивирования

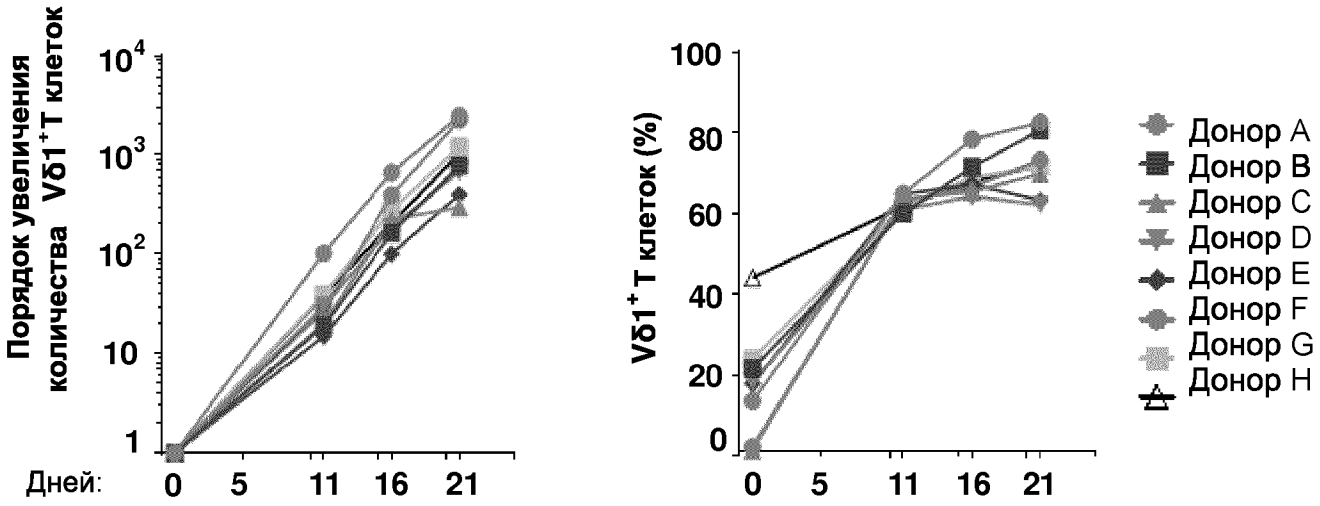
Фигура 4


День 0
Vδ1
Vδ2
2%
81%
День 15
Vδ1
CD3
93

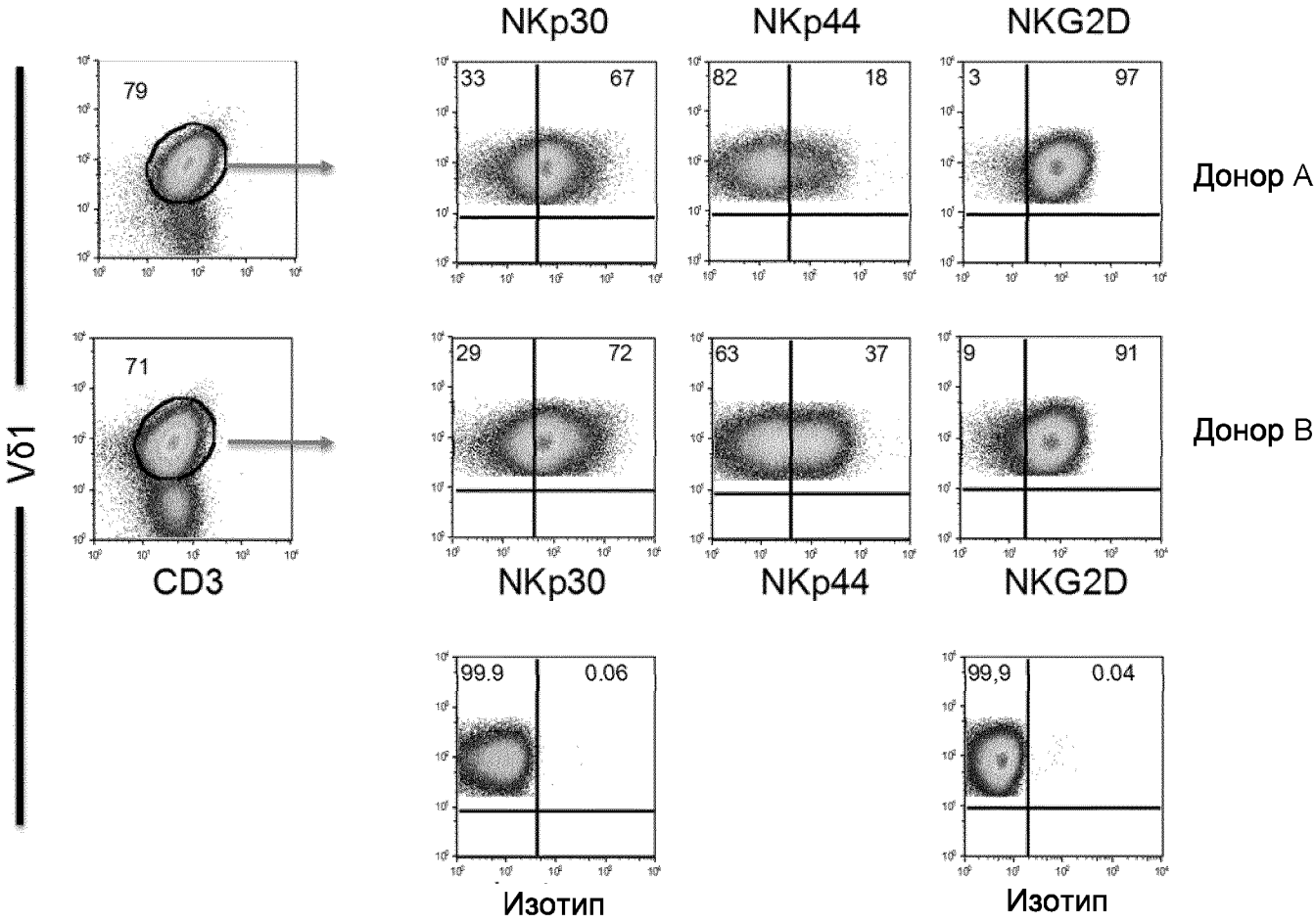
Фигура 5


A
Количество клеток на лунку
140 000
120 000
100 000
80 000
60 000
40 000
20 000
0
X-VIVO 20
AIM-V
ОПТИМАЙЗЕР
X-VIVO 10
X-VIVO 15
SCGM
DC
TEXMACS
Культуральная среда
B
% клеток
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Vdelta1+ T клеток
% Живых клеток
X-VIVO 20
AIM-V
ОПТИМАЙЗЕР
X-VIVO 10
X-VIVO 15
SCGM
DC
TEXMACS
Культуральная среда

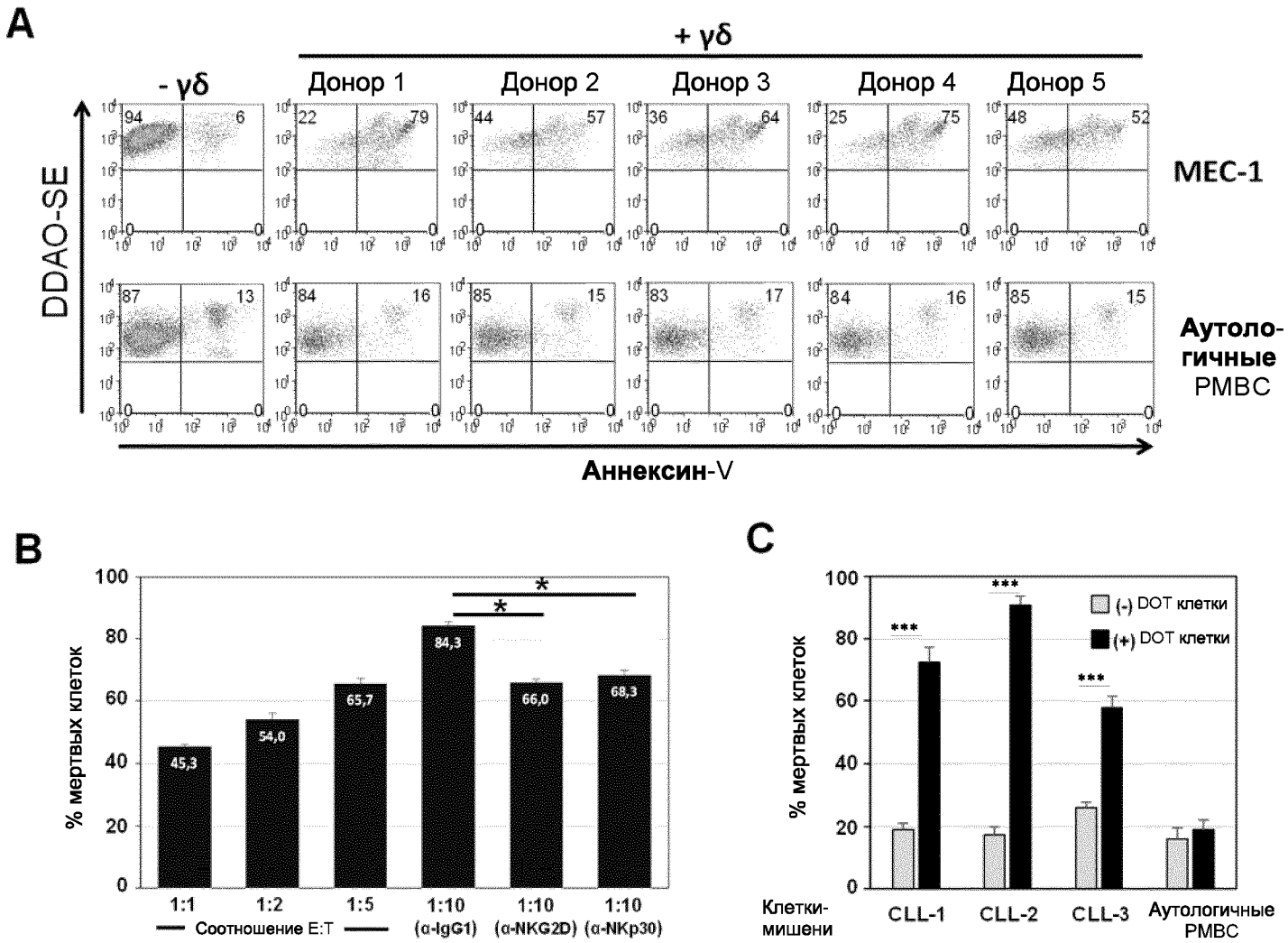
Фигура 6



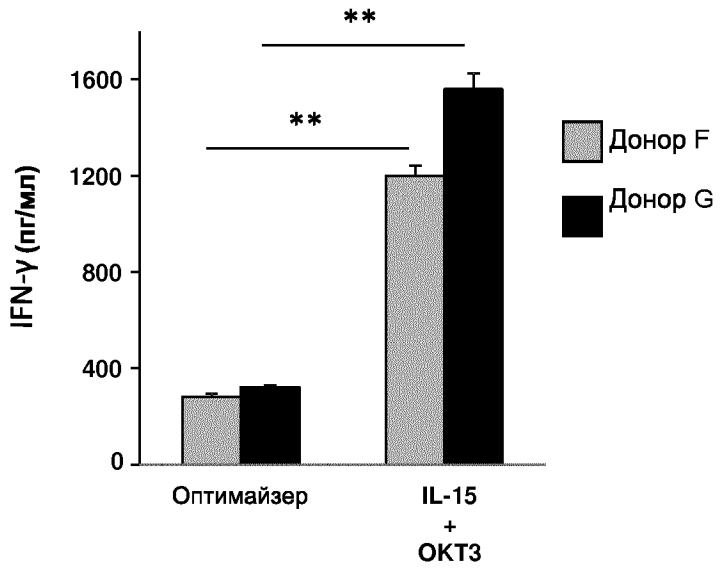
Фигура 7



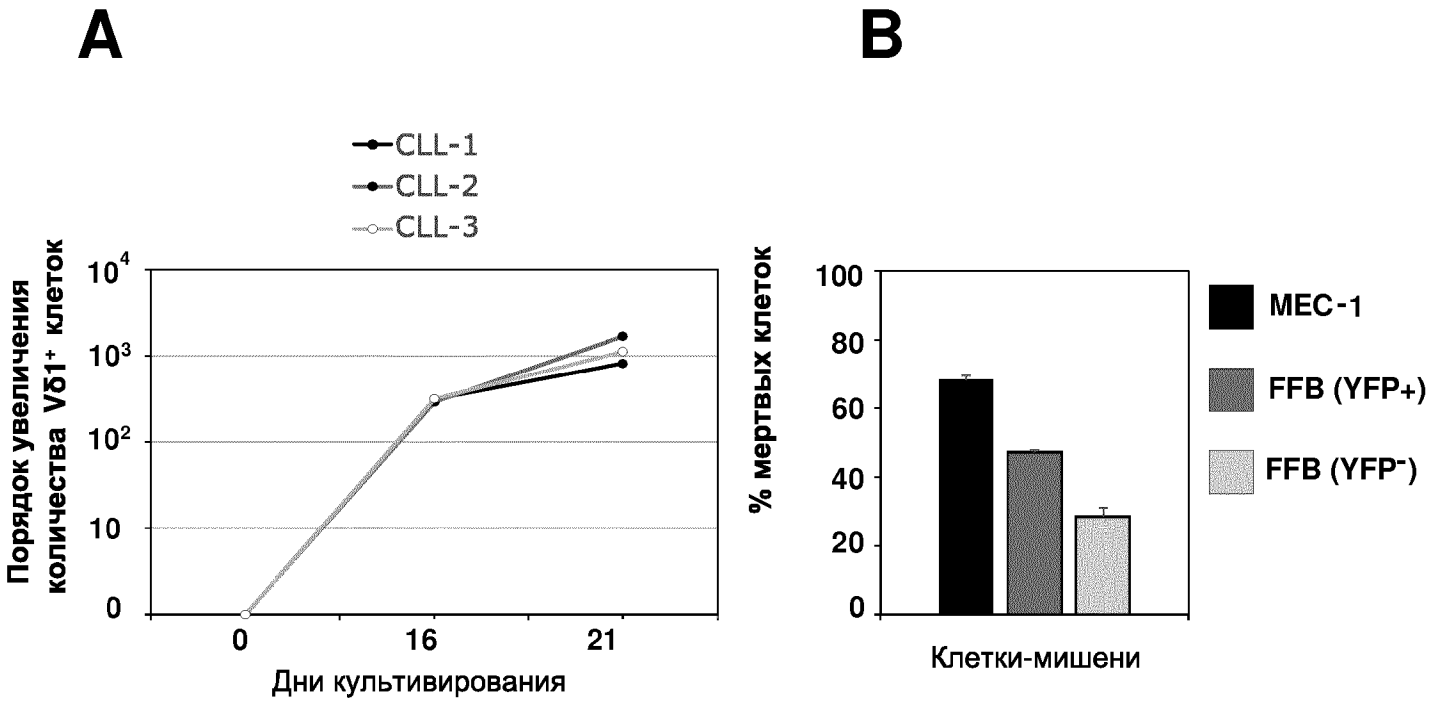
Фигура 8



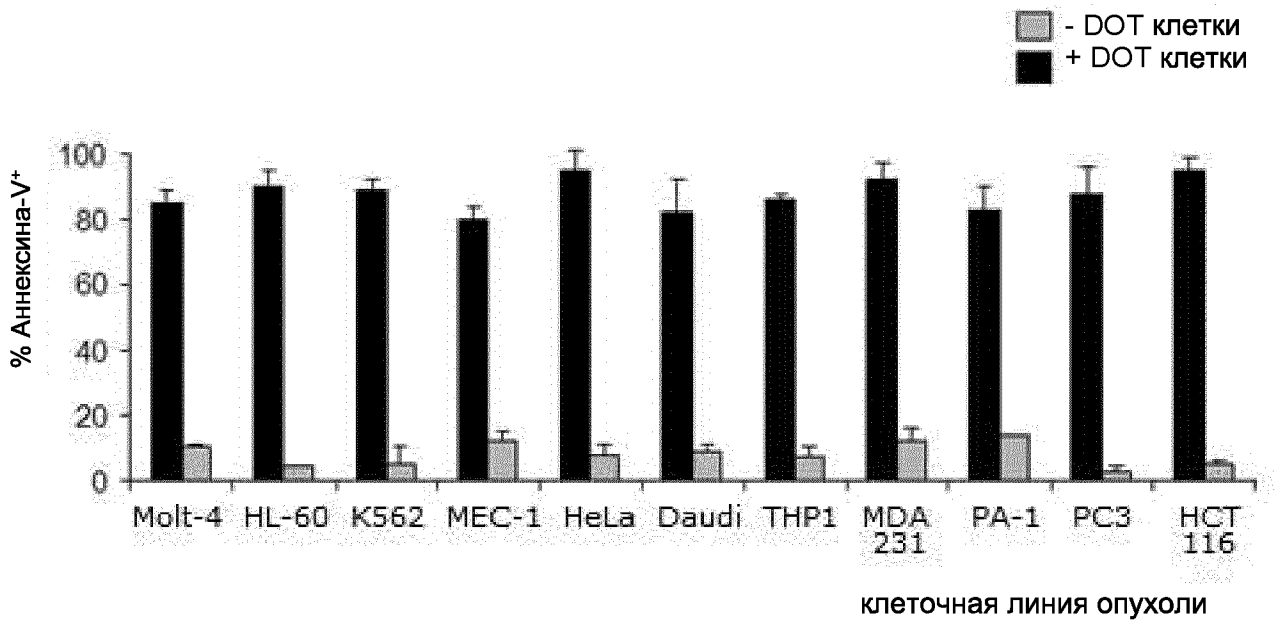
Фигура 9



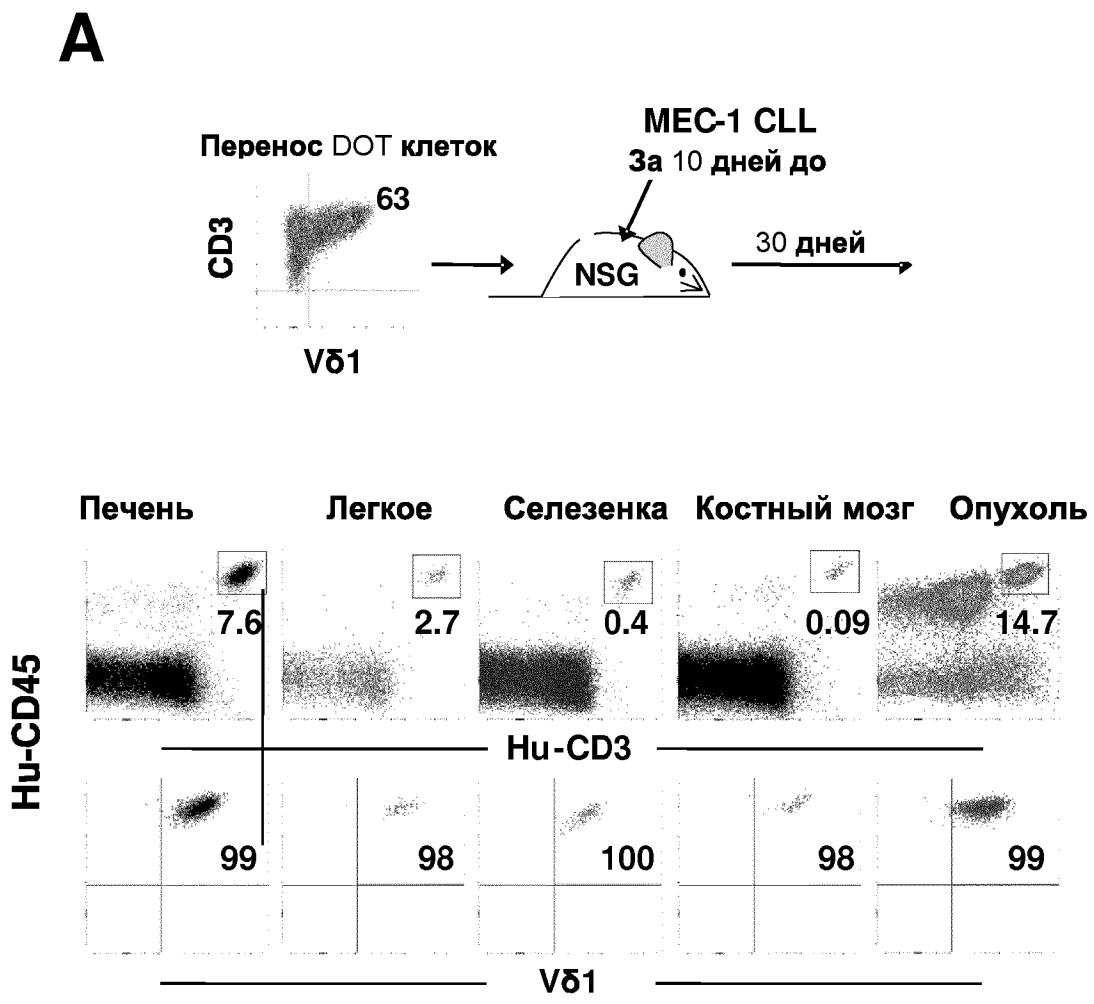
Фигура 10

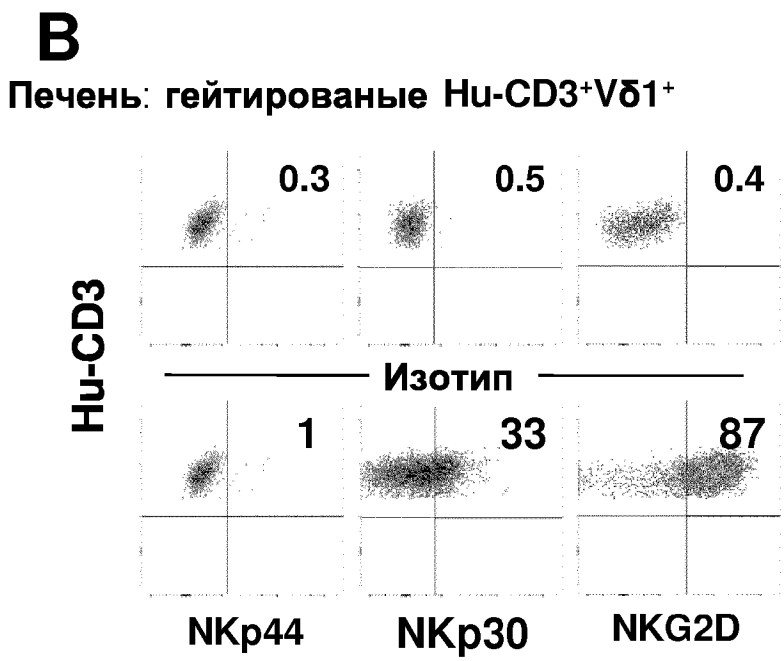


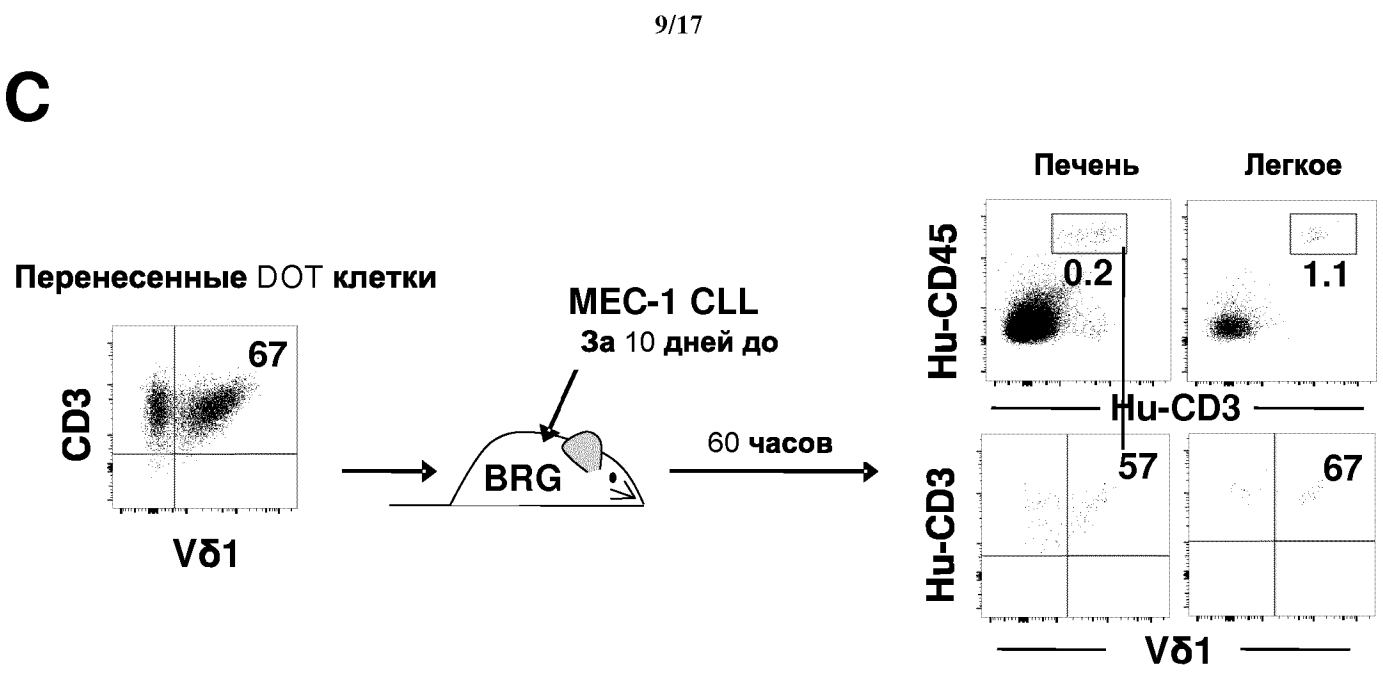
Фигура 11



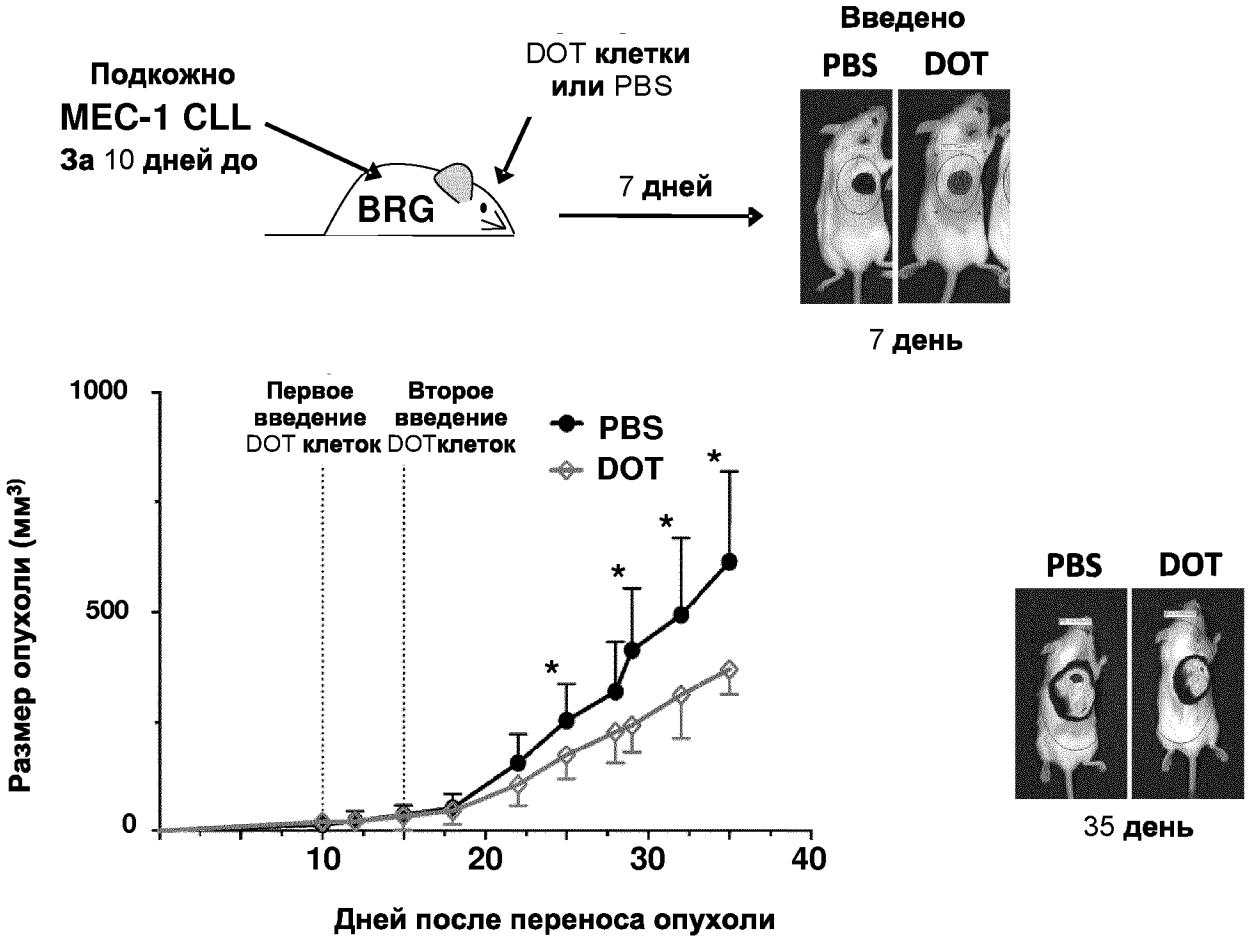
Фигура 12


A
Перенос DOT клеток
CD3
63
Vδ1
MEC-1 CLL
За 10 дней до
NSG
30 дней
Печень
Легкое
Селезенка
Костный мозг
Опухоль
Hu-CD45
7.6
2.7
0.4
0.09
14.7
Hu-CD3
99
98
100
98
99
Vδ1

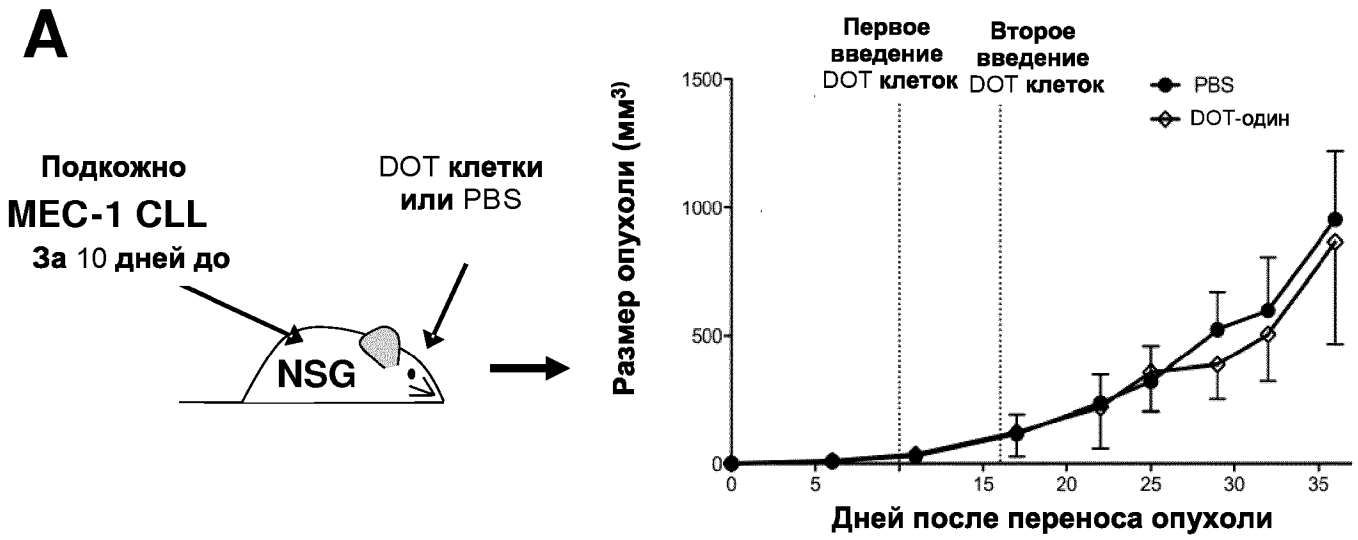

B
Печень: гейтированые Hu-CD3⁺Vδ1⁺
Hu-CD3
0.3
0.5
0.4
Изотип
1
33
87
NKp44
NKp30
NKG2D

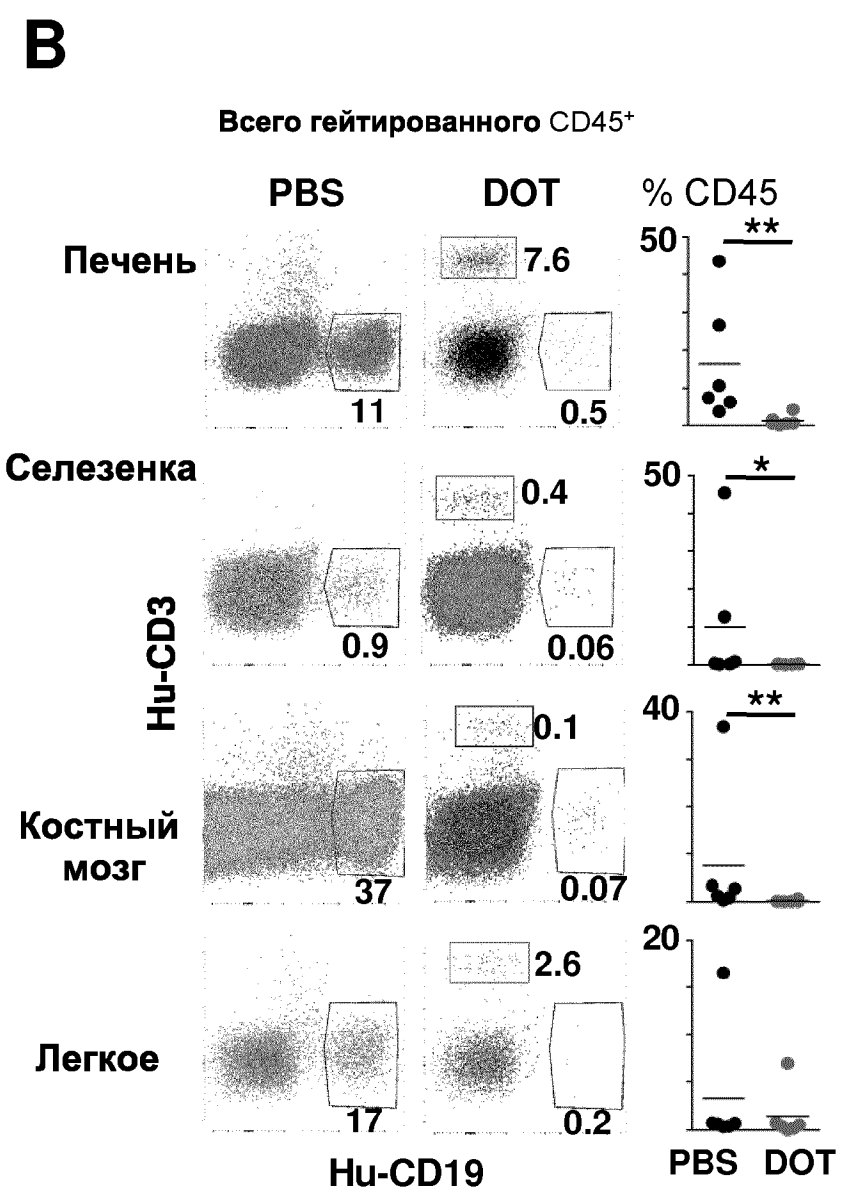

C
Перенесенные DOT клетки
CD3
67
Vδ1
MEC-1 CLL
За 10 дней до
BRG
60 часов
Печень
Легкое
Hu-CD45
0.2
1.1
Hu-CD3
Hu-CD3
57
67
Vδ1

Фигура 13

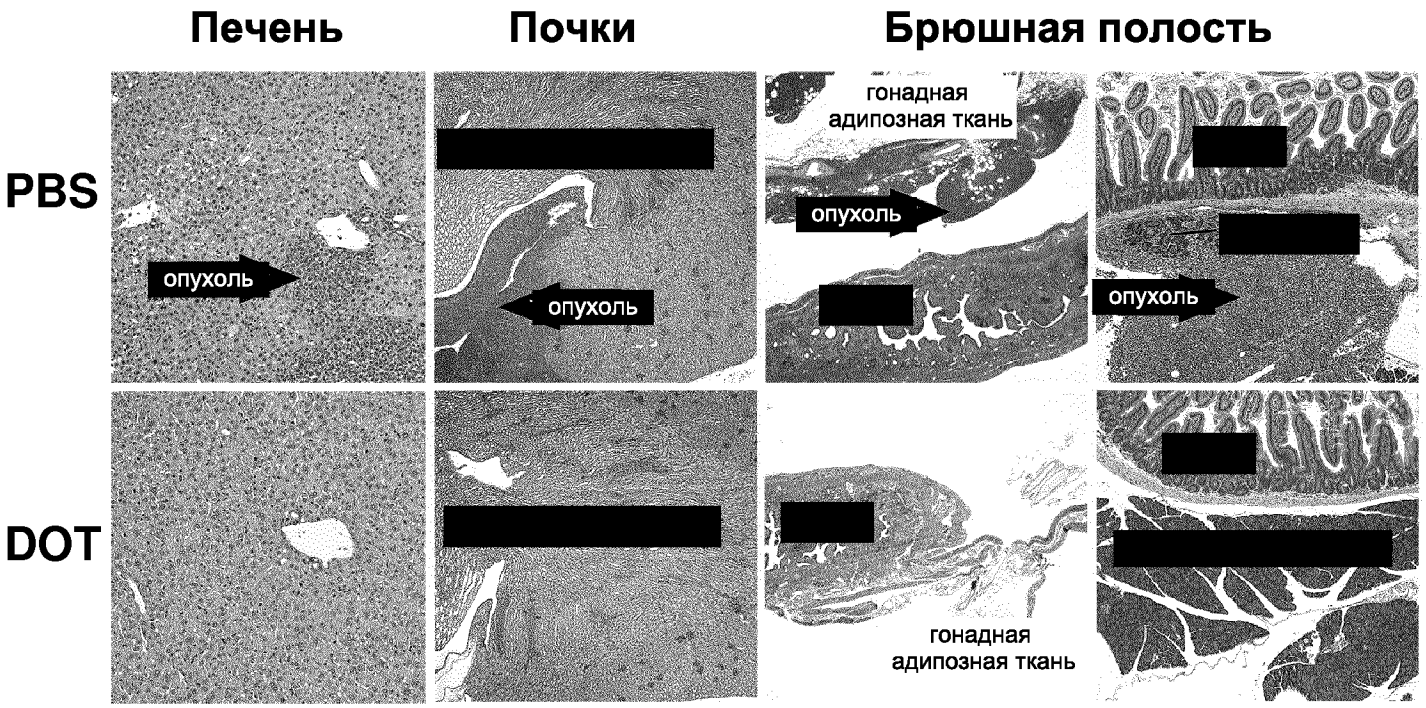

Подкожно
MEC-1 CLL
За 10 дней до
BRG
DOT клетки
или PBS
7 дней
Введено
PBS
DOT
7 день
1000
500
0
Размер опухоли (мм³)
Первое введение DOT клеток
Второе введение DOTклеток
PBS
DOT
10
20
30
40
Дней после переноса опухоли
PBS
DOT
35 день

Фигура 14

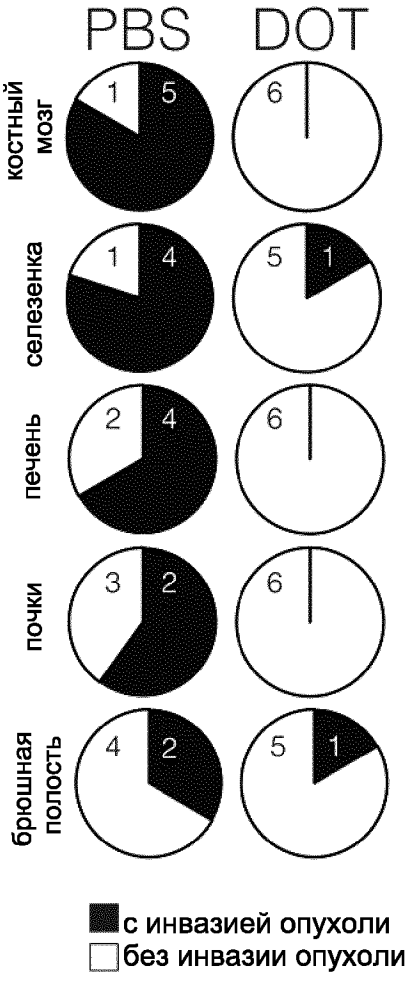

A
Подкожно
MEC-1 CLL
За 10 дней до
DOT клетки
или PBS
NSG
Первое
введение
DOT клеток
Второе
введение
DOT клеток
PBS
DOT-один
Размер опухоли (мм³)
1500
1000
500
0
0
5
15
20
25
30
35
Дней после переноса опухоли


B
Всего гейтированного CD45+
PBS
DOT
% CD45
Печень
Селезенка
Костный
мозг
Легкое
Hu-CD3
Hu-CD19
11
0.5
7.6
0.9
0.06
0.4
37
0.07
0.1
17
0.2
2.6
50
50
40
20
**
*
**
PBS
DOT

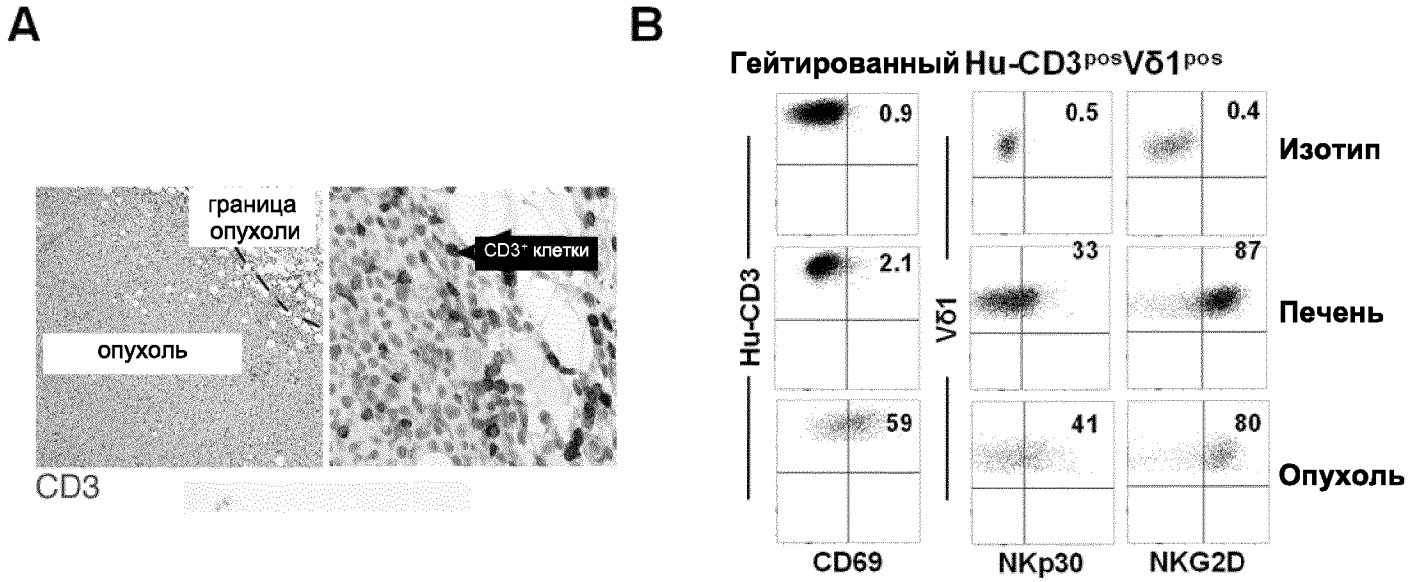
C


Печень
Почки
Брюшная полость
PBS
DOT
опухоль
опухоль
гонадная адипозная ткань
опухоль
опухоль
гонадная адипозная ткань

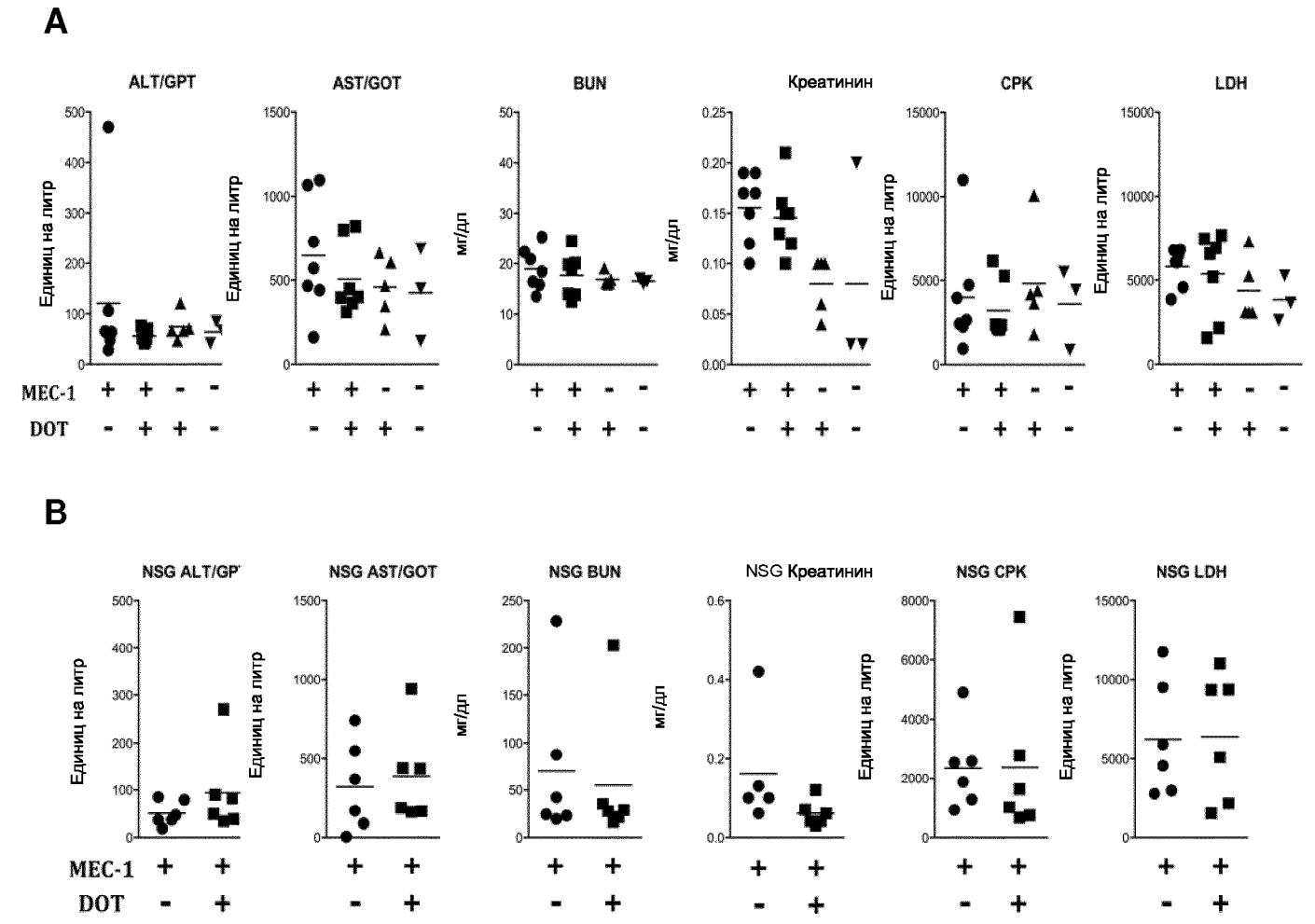
D


PBS
DOT
костный мозг
селезенка
печень
почки
брюшная полость
1 5
6
1 4
5 1
2 4
6
3 2
6
4 2
5 1
с инвазией опухоли
без инвазии опухоли

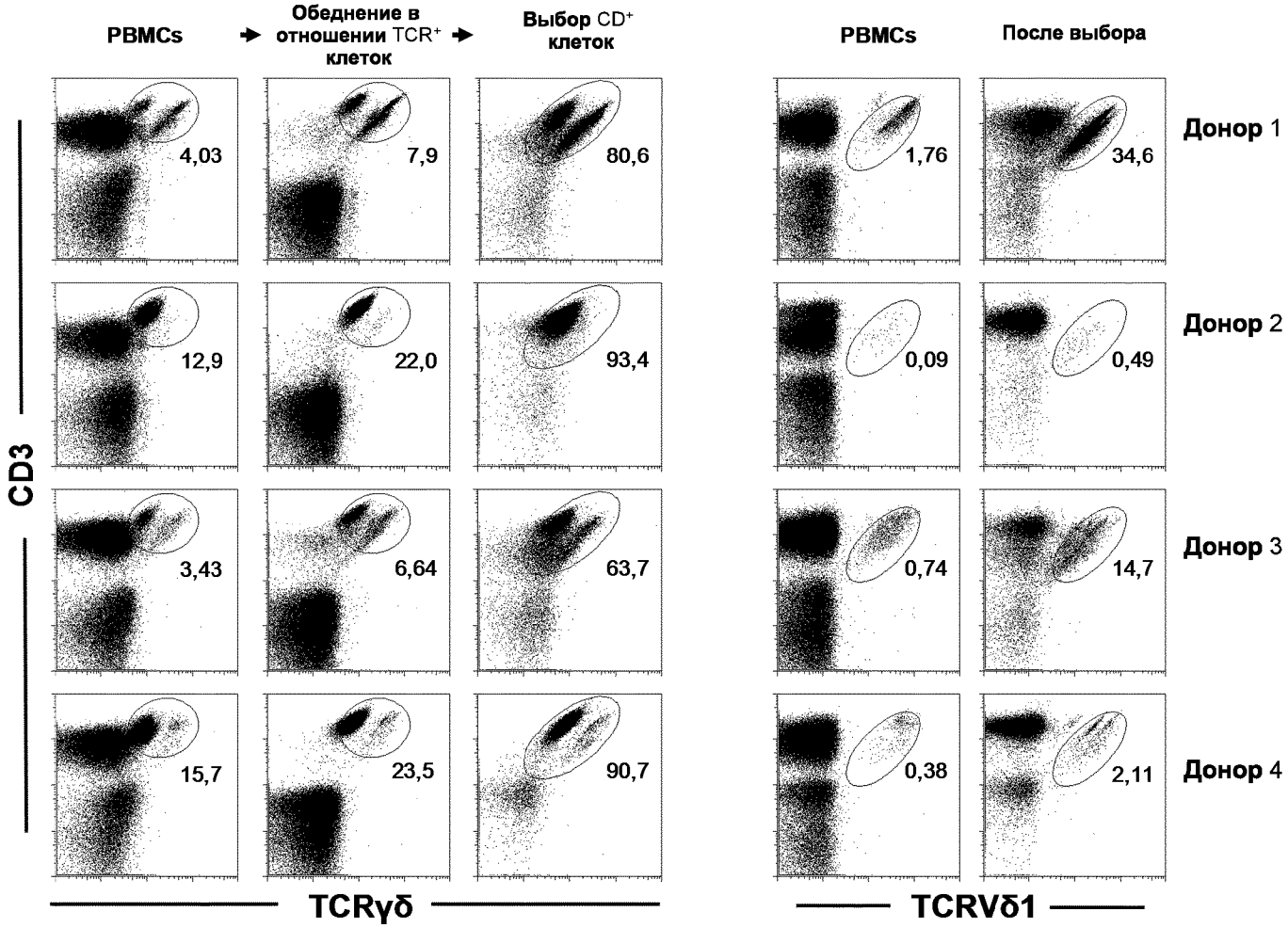
Фигура 15



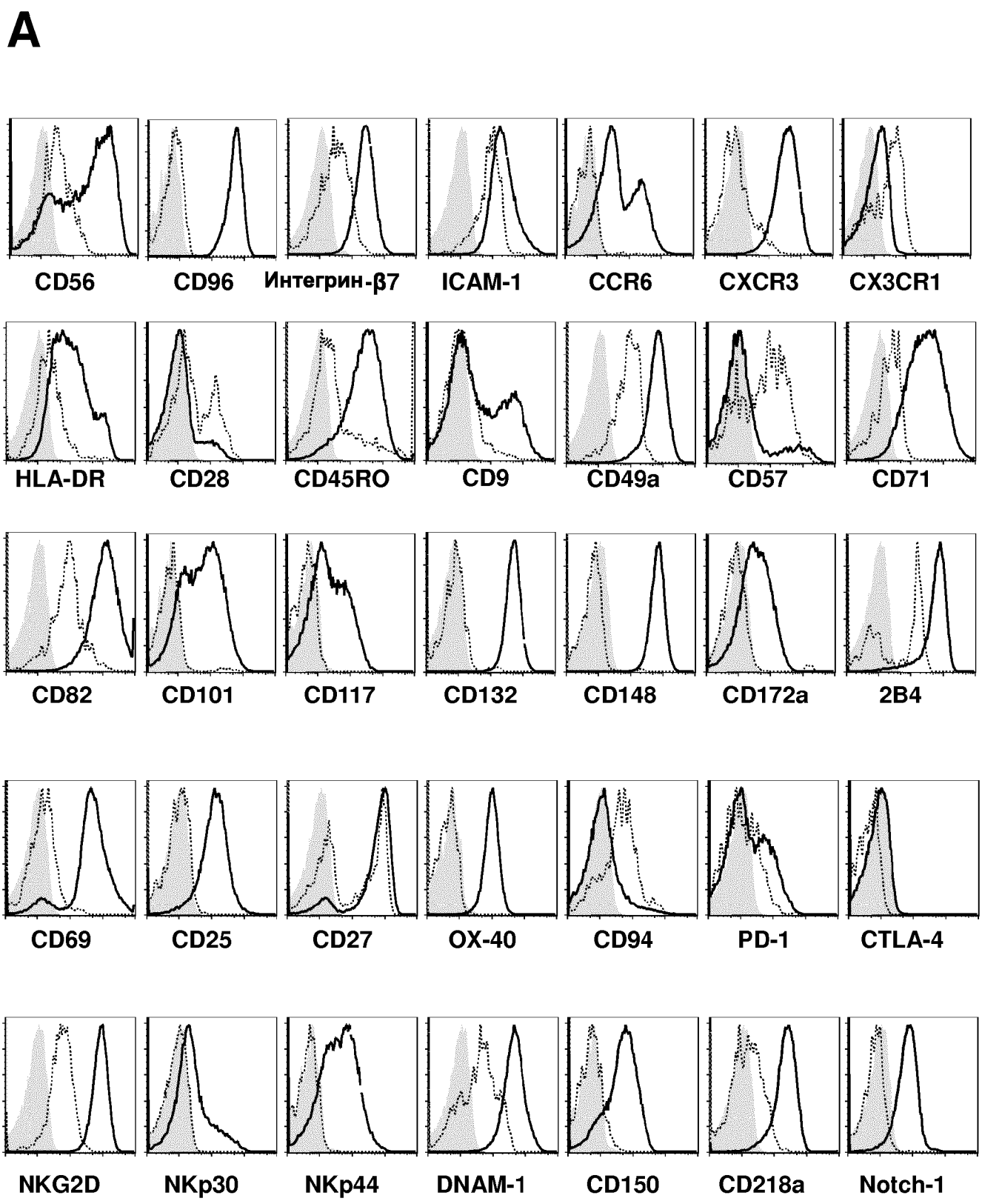
Фигура 16



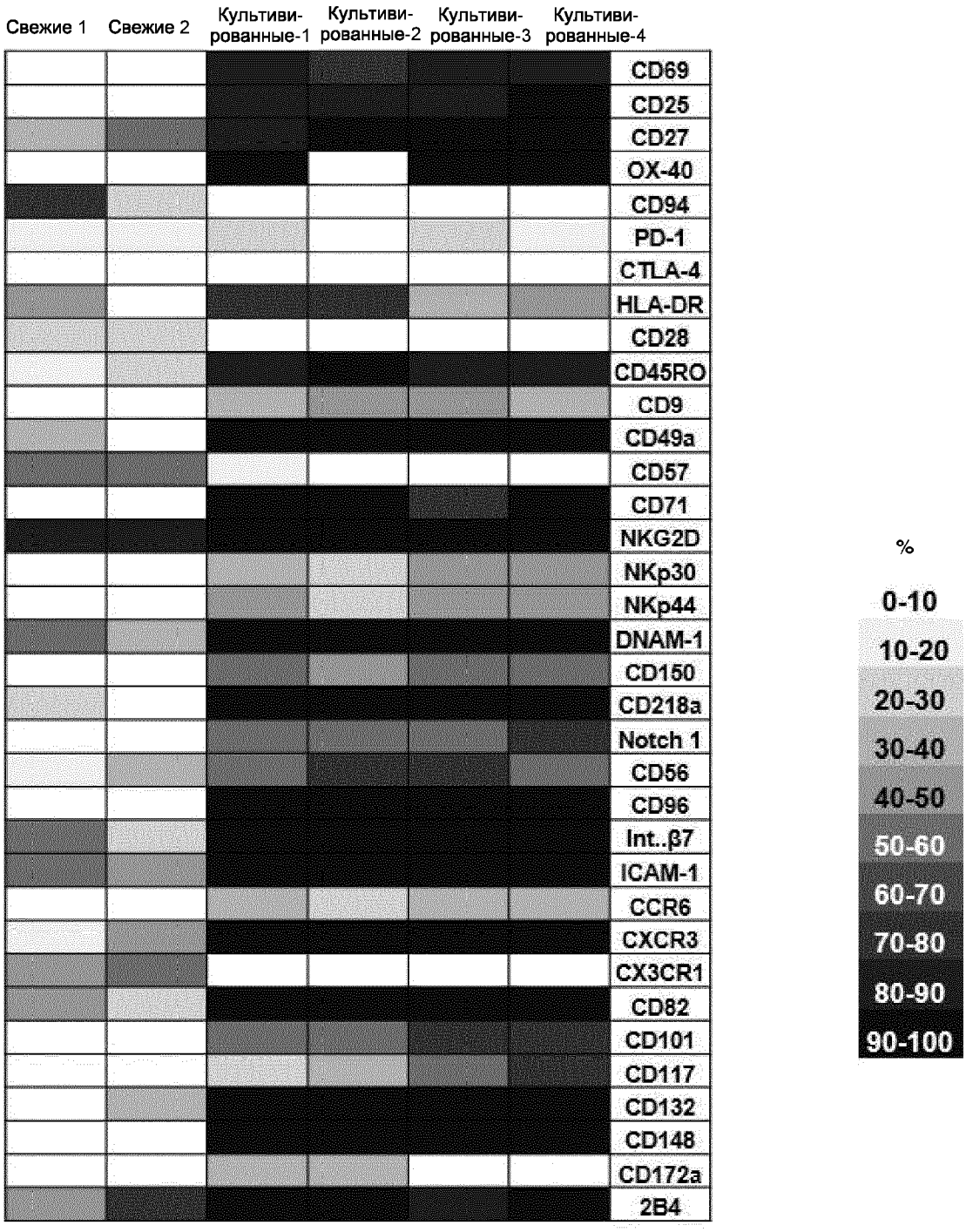
Фигура 17


PBMCs
Обеднение в отношении TCR+ клеток
Выбор CD+ клеток
PBMCs
После выбора
4,03
7,9
80,6
1,76
34,6
Донор 1
12,9
22,0
93,4
0,09
0,49
Донор 2
3,43
6,64
63,7
0,74
14,7
Донор 3
15,7
23,5
90,7
0,38
2,11
Донор 4
CD3
TCRγδ
TCRVδ1

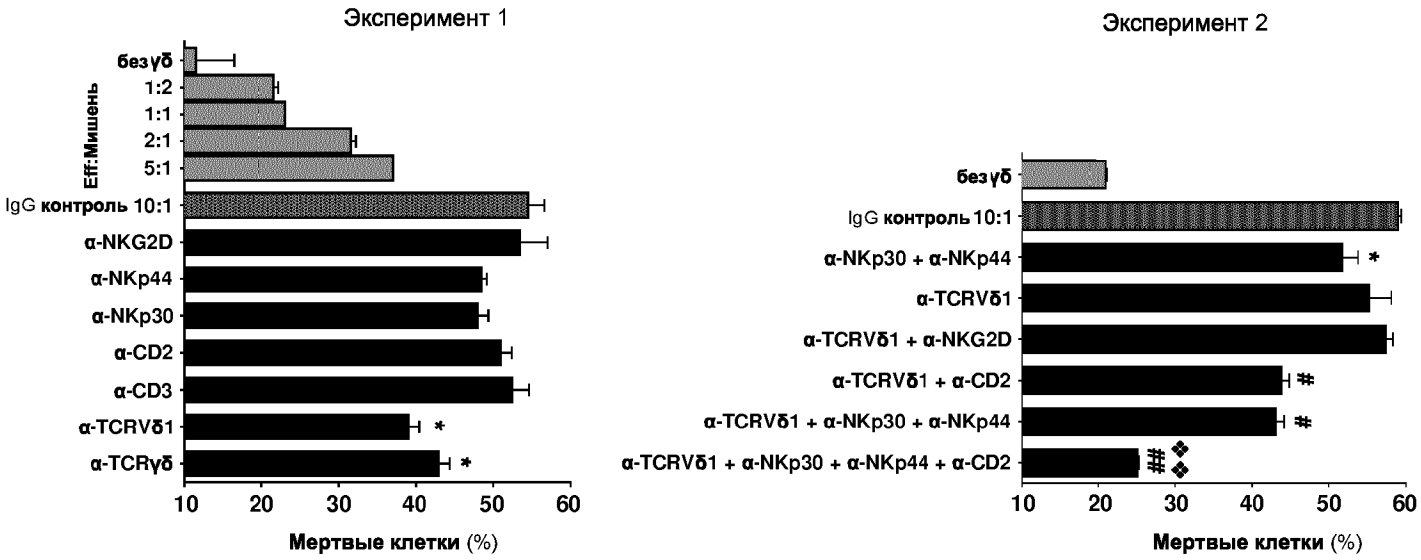
Фигура 18


A
CD56
CD96
Интегрин-β7
ICAM-1
CCR6
CXCR3
CX3CR1
HLA-DR
CD28
CD45RO
CD9
CD49a
CD57
CD71
CD82
CD101
CD117
CD132
CD148
CD172a
2B4
CD69
CD25
CD27
OX-40
CD94
PD-1
CTLA-4
NKG2D
NKp30
NKp44
DNAM-1
CD150
CD218a
Notch-1

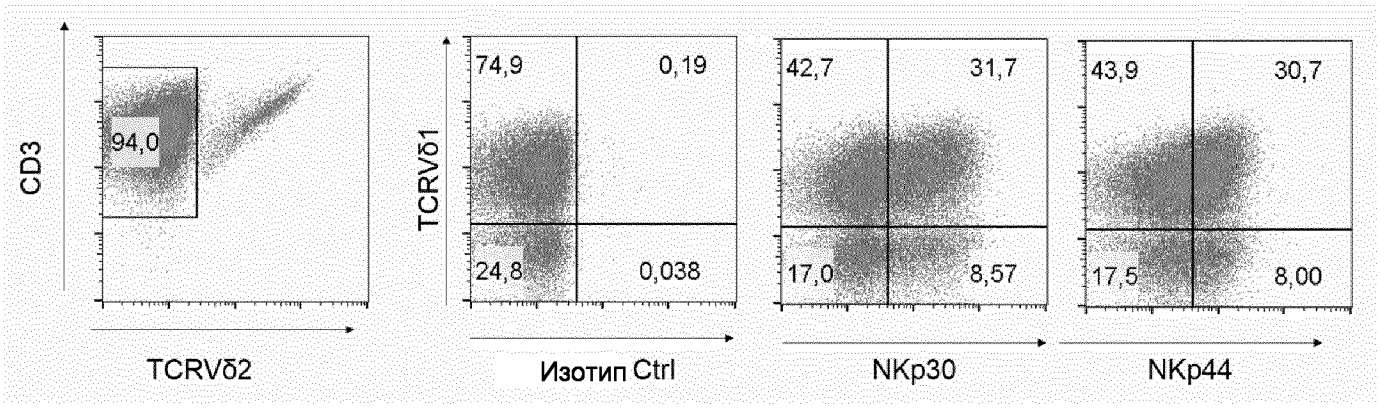
B


Свежие 1
Свежие 2
Культиви-рованные-1
Культиви-рованные-2
Культиви-рованные-3
Культиви-рованные-4
CD69
CD25
CD27
OX-40
CD94
PD-1
CTLA-4
HLA-DR
CD28
CD45RO
CD9
CD49a
CD57
CD71
NKG2D
NKp30
NKp44
DNAM-1
CD150
CD218a
Notch 1
CD56
CD96
Int..β7
ICAM-1
CCR6
CXCR3
CX3CR1
CD82
CD101
CD117
CD132
CD148
CD172a
2B4
%
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
90-100

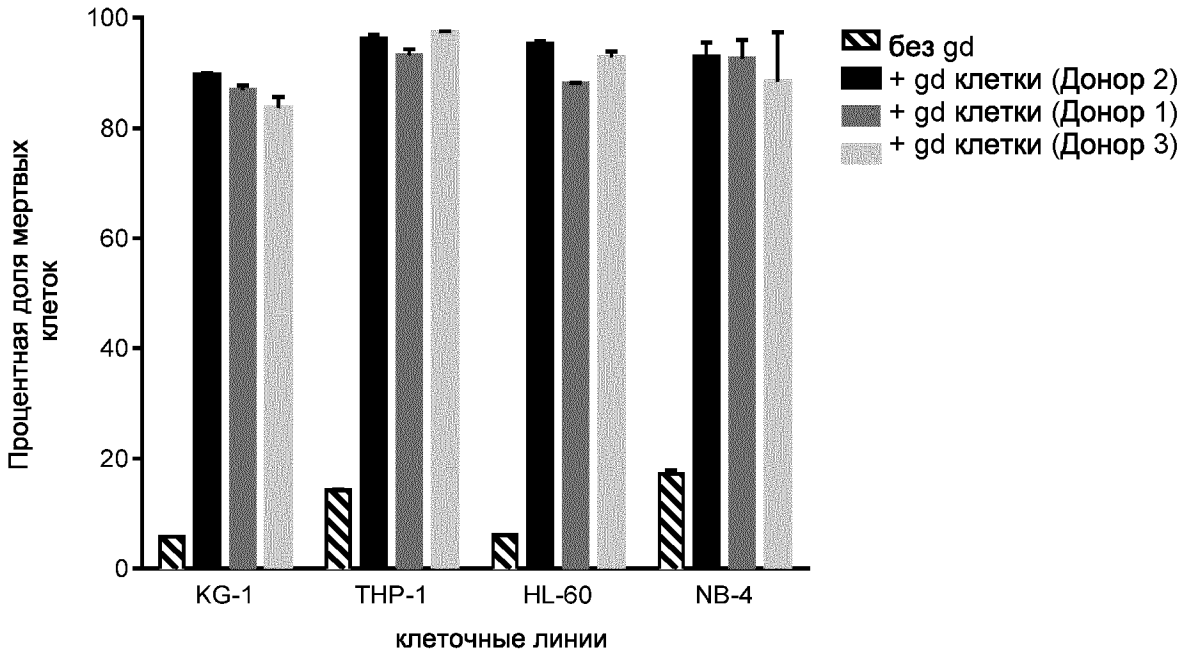
Фигура 19



Фигура 20



Фигура 21


100
80
60
40
20
0
Процентная доля мертвых клеток
KG-1
THP-1
HL-60
NB-4
клеточные линии
без gd
+ gd клетки (Донор 2)
+ gd клетки (Донор 1)
+ gd клетки (Донор 3)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
P61538WO/PBB		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2016/063077	8 June 2016 (08-06-2016)	9 June 2015 (09-06-2015)
Applicant		
LYMPHACT - LYMPHOCYTE ACTIVATION TECHNOLOGIES...		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [ ] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/063077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783 A61K35/17
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/141513 A1 (DE CARVALHO SILVA SANTOS BRUNO MIGUEL [PT] ET AL) 22 May 2014 (2014-05-22) cited in the application paragraph [0021] paragraph [0034] paragraph [0027] -----	41-63
X	WO 2015/061694 A2 (UNIV TEXAS [US]) 30 April 2015 (2015-04-30) paragraph [0008] paragraph [0068] -----	41-63

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 July 2016	10/08/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Paresce, Donata

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. C. RIBOT ET AL: "Human Thymocytes Are Functionally Immature and Differentiate into Cytotoxic Type 1 Effector T Cells upon IL-2/IL-15 Signaling", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 192, no. 5, 1 March 2014 (2014-03-01) , pages 2237-2243, XP055291890, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1303119 page 4 - page 5; figures 2-3 page 7; figures 1-3	41-47,50
X	DANG WU ET AL: "Ex vivo expanded human circulating V[delta]1 [gamma][delta]T cells exhibit favorable therapeutic potential for colon cancer", ONCOIMMUNOLOGY, vol. 4, no. 3, 4 March 2015 (2015-03-04), page e992749, XP055291880, US ISSN: 2162-4011, DOI: 10.4161/2162402X.2014.992749 cited in the application page 1 - page 2 page 9 - page 10	41-50
X	J. P. H. FISHER ET AL: "Neuroblastoma Killing Properties of V 2 and V 2-Negative T Cells Following Expansion by Artificial Antigen-Presenting Cells", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 22, 3 June 2014 (2014-06-03), pages 5720-5732, XP055291674, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3464 cited in the application page 5721 - page 5723; figure 1	41-50
X	SIEGERS GABRIELLE M ET AL: "Human V delta 1 gamma delta T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells", CYTOTHERAPY, ISIS MEDICAL MEDIA, OXFORD, GB, vol. 13, no. 6, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 753-764, XP009163636, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.3109/14653249.2011.553595 cited in the application page 754 page 756	41-50

-/--

1

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	D. VERMIJLEN ET AL: "Distinct Cytokine-Driven Responses of Activated Blood T Cells: Insights into Unconventional T Cell Pleiotropy", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 178, no. 7, 1 April 2007 (2007-04-01) , pages 4304-4314, XP055291870, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.178.7.4304 the whole document -----	1-63

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/063077

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2014141513 A1	22-05-2014	CN 103635573 A	12-03-2014
		JP 2014515259 A	30-06-2014
		US 2014141513 A1	22-05-2014
		WO 2012156958 A2	22-11-2012
WO 2015061694 A2	30-04-2015	AU 2014339926 A1	28-04-2016
		CA 2926859 A1	30-04-2015
		KR 20160068960 A	15-06-2016
		WO 2015061694 A2	30-04-2015