

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391141** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

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

(22) Дата подачи заявки
2018.05.03

(54) **ЭКСПАНСИЯ $\gamma\delta$ -Т-КЛЕТОК, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **1707048.3**

(32) **2017.05.03**

(33) **GB**

(62) **201992610; 2018.05.03**

(71) Заявитель:

**КИНГ'З КОЛЛЕДЖ ЛОНДОН;
ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Битсон Ричард, Хэйдэй Адриан,
Нусбаумер Оливер, Вулф Ричард,
Ианнитто Мария Луиза, Маунт
Натали (GB)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток из источника негемопоэтической ткани. Настоящее изобретение также относится к композициям подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток и способам применения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, как часть адоптивной Т-клеточной терапии).

A1

202391141

202391141

A1

ЭКСПАНСИЯ $\gamma\delta$ -Т-КЛЕТОК, КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований сфокусирован на очевидной способности субпопуляций $CD8^+$ и $CD4^+$ $\alpha\beta$ -Т-клеток распознавать злокачественные клетки и опосредовать защитные функциональные активности, в частности, при дерепрессии с помощью клинически опосредованного антагонизма ингибиторных путей, на которые влияют PD-1, CTLA-4 и другие рецепторы. Несмотря на это, остается множество вопросов. Например, по-видимому, существует множество значимых клинических сценариев, в которых эффективность такого лечения оказывается плохой. Зачастую наблюдают выраженные нежелательные явления, возможность прогнозирования эффективности или нежелательных явлений является крайне ограниченной, и еще не полностью понятны взаимодействия, позволяющие организму-хозяину распознавать опухолевые клетки ("иммуногенность"), предшествующих активации ответов обычных, антиген-специфических $CD8^+$ и $CD4^+$ $\alpha\beta$ -Т-клеток.

Гамма-дельта-Т-клетки ($\gamma\delta$ -Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности отдельный характерный $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор (TCR). Этот TCR состоит из одной гамма-цепи (γ) и одной дельта-цепи (δ). $\gamma\delta$ -Т-клетки человека можно приблизительно классифицировать как резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки периферической крови одного или двух типов и резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей. Большинство резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток крови экспрессирует V δ 2 TCR, что реже встречается среди резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток ткани, в которых чаще обнаруживают V δ 1 и/или другие цепи V δ . Т.к. резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей трудно получать в большом количестве, и не существует общепринятых способов их выделения или экспансии, они плохо охарактеризованы или изучены на предмет терапевтического применения. Таким образом, в этой области существует неудовлетворенная потребность в способах выделения и экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей в количествах, достаточных для их исследования и, потенциально, адаптации в качестве терапевтических средств, например, в качестве адоптивной Т-клеточной терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) из источника негемопозитической ткани (например, $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, например, V δ 1-Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани). Способы экспансии включают культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, $\gamma\delta$ -Т-клеток, отделенных от стромальных клеток негемопозитической ткани) в отсутствие значительной стимуляции TCR и/или в присутствии IL-4, IL-15, IL-21 и/или IL-2. Настоящее изобретение также относится к композициям подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-

клеток (например, $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, например, V δ 1-Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани) и способам применения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, как часть адоптивной Т-клеточной терапии, например, для лечения злокачественных новообразований).

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-21, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , тромбоцитарного лизата человека (HPL) и фактора стромальных клеток-1 (SDF-1), в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно культивировать в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-4; ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21; или ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-4 и ИЛ-21.

В другом аспекте изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21 в течение по меньшей мере 5 дней. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает после стадии (i) отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, и стадия (ii) включает: (a) культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками; (b) культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта с опухолевыми клетками и/или (c) культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта с фидерными клетками.

В другом аспекте способ экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток включает стадии: (i) получения негемопозитической ткани, содержащей негемопозитические клетки и $\gamma\delta$ -Т-клетки; (ii) отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток и (iii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-21, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , HPL и SDF-1, в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-4 и/или ИЛ-21 (например, ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-4; ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21; или ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-4 и ИЛ-21). В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-4 и/или ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта $\gamma\delta$ -Т-клеток со стромальными клетками. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает

культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, включающему стадии: (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани; и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. $\gamma\delta$ -Т-клетки можно одновременно подвергать воздействию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21, например, в течение по меньшей мере 5 дней, или их можно подвергать воздействию одного или более факторов перед воздействием других. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии рекомбинантного ИЛ-2 человека, рекомбинантного ИЛ-4 человека, рекомбинантного ИЛ-15 человека и рекомбинантного ИЛ-21 человека в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR (например, антитела против CD3), например, в отсутствие значительной активации пути TCR. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-21 в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, приблизительно 10 нг/мл или приблизительно 100 нг/мл). Стадия (ii) также может включать культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , тромбоцитарного лизата человека (HPL) и фактора стромальных клеток-1 (SDF-1).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством стадий: (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани; и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления этого аспекта $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию ИЛ-2 и ИЛ-15. Стадия (ii) может включать культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR или в отсутствие значительной активации пути TCR. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-21, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , HPL и SDF-1. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки культивируют в присутствии ИЛ-4 и/или ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21. ИЛ-21 может находиться в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл или 100 нг/мл).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством стадий: (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительной активации пути TCR в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой

экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2 и IL-15. В некоторых случаях $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию IL-4 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL и SDF-1. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно культивировать в присутствии IL-4, IL-21 или и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки культивируют в присутствии IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21. IL-21 может находиться в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл или 100 нг/мл).

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов способ дополнительно включает после стадии (i) отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, и стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками, в отсутствие значительного контакта с опухолевыми клетками и/или в отсутствие значительного контакта с фидерными клетками (например, облученными фидерными клетками, В-клетками или антигенпрезентирующими клетками).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством стадий: (i) получения негемопозитической ткани, включающей негемопозитические клетки и $\gamma\delta$ -Т-клетки, (ii) отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток и (iii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта $\gamma\delta$ -Т-клеток со стромальными клетками в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR и/или в отсутствие значительной активации пути TCR. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2 и IL-15. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно одновременно подвергать воздействию IL-2 и IL-15. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из IL-4, IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , HPL и SDF-1. Например, в некоторых случаях стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-4, IL-21 или и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21. IL-21 может находиться в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл или 100 нг/мл).

В другом аспекте изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством стадий: (i) получения негемопозитической ткани, включающей негемопозитические клетки и $\gamma\delta$ -Т-клетки, (ii) отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток и (iii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2 и IL-15 в течение по меньшей мере 5 дней

для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта $\gamma\delta$ -Т-клеток со стромальными клетками. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR или в отсутствие значительной активации пути TCR. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15. $\gamma\delta$ -Т-клетки можно одновременно подвергать воздействию ИЛ-2 и ИЛ-15. В некоторых случаях стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-21, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , HPL и SDF-1. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно культивировать в присутствии ИЛ-4 и/или ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21. ИЛ-21 может находиться в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл или 100 нг/мл).

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством стадий: (i) получения негемопозитической ткани, включающей негемопозитические клетки и $\gamma\delta$ -Т-клетки, (ii) отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток и (iii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительной активации пути TCR в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых случаях стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR и/или в отсутствие значительного контакта $\gamma\delta$ -Т-клеток со стромальными клетками. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно одновременно подвергать воздействию ИЛ-2 и ИЛ-15. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии одного или более факторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-21, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , HPL и SDF-1. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно культивировать в присутствии ИЛ-2 и/или ИЛ-21. В некоторых вариантах осуществления стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21. ИЛ-21 может находиться в концентрации от 1 нг/мл до 1000 нг/мл (например, 10 нг/мл или 100 нг/мл).

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих способов стадия отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток и негемопозитических клеток на каркасе, сконфигурированном для облегчения выхода клеток из негемопозитической ткани. В некоторых вариантах осуществления стадия отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток и негемопозитических клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 или и того, и другого. В некоторых вариантах осуществления отделенная популяция лимфоцитов включает отделенную популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток, и отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает отделенную популяцию $V\delta 1$ -Т-клеток и/или двойные отрицательные клетки (DN-клетки).

В некоторых случаях перед стадией экспансии 1–10% отделенной популяции лимфоцитов представляют собой $\gamma\delta$ -Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления перед стадией экспансии 1–10% отделенной популяции лимфоцитов представляют собой V δ 1-Т-клетки. Перед стадией экспансии по меньшей мере 80% отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток могут представлять собой V δ 1-Т-клетки, и/или менее 10% отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток могут представлять собой V δ 2-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления из отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, перед стадией экспансии) удаляют $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления перед стадией экспансии отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает по меньшей мере 10% CCR3⁺ клеток, по меньшей мере 10% CCR4⁺ клеток, по меньшей мере 10% CCR7⁺ клеток, по меньшей мере 10% CCR8⁺ клеток или по меньшей мере 10% CD103⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления перед стадией экспансии отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает большее количество CCR3⁺ клеток, CCR4⁺ клеток, CCR7⁺ клеток и/или CCR8⁺ клеток, чем референсная популяция (например, референсная популяция резидентных V δ 2-Т-клеток крови). В некоторых вариантах осуществления перед стадией экспансии отделенная популяция V δ 1-Т-клеток включает большее количество NKG2D⁺ клеток, CD56⁺ клеток, CD69⁺ клеток и/или TIM3⁺ клеток, чем референсная популяция (например, референсная популяция резидентных V δ 2-Т-клеток крови).

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов в течение 14 дней культивирования во время стадии экспансии подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает по меньшей мере в 20 раз больше $\gamma\delta$ -Т-клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии. Дополнительно или альтернативно, в течение 21 дня культивирования во время стадии экспансии подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать по меньшей мере в 50 раз больше $\gamma\delta$ -Т-клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией. Подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает подвергнутую экспансии популяцию V δ 1-Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления в течение 14 дней культивирования во время стадии экспансии подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток включает по меньшей мере в 20 раз больше V δ 1-Т-клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток перед экспансией. Дополнительно или альтернативно, в течение 21 дня культивирования во время стадии экспансии подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток включает по меньшей мере в 50 раз больше V δ 1-Т-клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток перед экспансией.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток экспрессирует CD27. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь более высокую медиану поверхностной экспрессии CD27, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых случаях подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет медиану поверхностной экспрессии CD27 по меньшей мере в два раза выше, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-

клеток. Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь более высокую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь по меньшей мере на 5% более высокую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток экспрессирует CD27. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток имеет более высокую медиану поверхностной экспрессии CD27, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь медиану поверхностной экспрессии CD27 по меньшей мере в два раза выше, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь более высокую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь по меньшей мере на 5% более высокую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более низкую медиану поверхностной экспрессии TIGIT, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь медиану поверхностной экспрессии TIGIT по меньшей мере на 50% меньше, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь по меньшей мере на 20% более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток имеет более низкую медиану поверхностной экспрессии TIGIT, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь медиану поверхностной экспрессии TIGIT по меньшей мере на 50% меньше, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток может иметь по меньшей мере на 20% более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция V δ 1-Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более высокую поверхностную экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь более высокую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров,

выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более низкую поверхностную экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь более низкую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии).

В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция V δ 1-Т-клеток имеет более высокую поверхностную экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более высокую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более низкую поверхностную экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В других вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более низкую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии).

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов стадия (iii) включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками, в отсутствие значительного контакта с фидерными клетками и/или в отсутствие значительного контакта с опухолевыми клетками. В некоторых вариантах осуществления негемопоетическая ткань не является опухолевой тканью.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов негемопозитическая ткань представляет собой кожу (например, кожу человека, например, кожу, полученную посредством щипковой биопсии). В других вариантах осуществления негемопозитическая ткань является тканью кишечника.

В любом из предшествующих аспектов и вариантов осуществления способ экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток можно осуществлять *in vitro*.

В любом из предшествующих аспектов и вариантов осуществления стадия получения негемопозитической ткани может включать получение негемопозитической ткани, полученной из индивидуума, например, человека или не являющегося человеком животного.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к подвергнутой экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетке, полученной способом по любому из предшествующих аспектов.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей подвергнутую экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетку по предшествующему аспекту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит дополнительное терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из иммунотерапевтического средства, цитотоксического средства, средства, ингибирующего рост, средства для лучевой терапии, антиангиогенного средства или комбинации двух или более средств. В некоторых случаях дополнительное терапевтическое средство является иммунотерапевтическим средством (например, IL-2, например, IL-2 в низкой дозе, например, от $0,3 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ МЕ IL-2 в сутки, например, $1,0 \times 10^6$ МЕ IL-2 в сутки).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции по предшествующему аспекту для применения в способе лечения индивидуума посредством адоптивной Т-клеточной терапии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к подвергнутой экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетке по любому из предшествующих аспектов для применения в способе лечения индивидуума посредством адоптивной Т-клеточной терапии.

В еще одном аспекте изобретение относится к применению подвергнутой экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетки или ее фармацевтической композиции по любому из предшествующих аспектов в производстве лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования (например, солидной опухоли), инфекции (например, инфекции цитомегаловируса (CMV)) или иммунопатологии у индивидуума.

В другом аспекте изобретение относится к подвергнутой экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетке или ее фармацевтической композиции по любому из предшествующих аспектов для применения в способе лечения злокачественного новообразования (например, солидной опухоли), инфекции (например, инфекции цитомегаловируса (CMV)) или иммунопатологии у индивидуума.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума посредством адоптивной Т-клеточной терапии посредством введения нуждающемуся в

этом индивидууму терапевтически эффективного количества подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных способами по любым из предшествующих вариантов осуществления. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток составляет менее 10×10^{12} клеток на дозу или менее 10×10^{12} клеток за курс лечения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение нуждающемуся в этом индивидууму одного или более дополнительных терапевтических средств. Дополнительное терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из иммунотерапевтического средства, цитотоксического средства, средства, ингибирующего рост, средства для лучевой терапии, антиангиогенного средства или комбинации двух или более средств. Дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно, до или после введения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является иммунотерапевтическим средством. В одном из вариантов осуществления иммунотерапевтическое средство является ИЛ-2 (например, ИЛ-2 в низкой дозе, например, от $0,3 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ МЕ ИЛ-2 в сутки, например, $1,0 \times 10^6$ МЕ ИЛ-2 в сутки). Эти варианты осуществления относятся к любым из предшествующих или следующих аспектов, касающихся применения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных способами, представленными в настоящем описании (или фармацевтической композиции, включающей эти $\gamma\delta$ -Т-клетки), в способе лечения индивидуума посредством адоптивной Т-клеточной терапии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума посредством адоптивной Т-клеточной терапии посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по любому из предшествующих аспектов.

В некоторых вариантах осуществления любого из предшествующих аспектов индивидуум является человеком (например, пациентом-человеком со злокачественным новообразованием (например, пациентом-человеком со злокачественным новообразованием, подвергаемым лечению солидной опухоли), или пациентом-человеком со злокачественным новообразованием, подвергаемым лечению инфекции (например, инфекции вируса, такого как CMV)).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, включающему (i) получение популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, и (ii) культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии: (a) ИЛ-2 или ИЛ-9, (b) ИЛ-15 и (c) ИЛ-21 в течение по меньшей мере 5 дней в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки на стадии (ii) культивируют также в присутствии ИЛ-4

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток посредством (i) получения популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопозитической ткани, и (ii) культивирования $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из ИЛ-21, фактора стромальных клеток (SDF,

например, SDF-1), IL-1 β , IL-12, IL-18 и IL-33, в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в отсутствие экзогенных агонистов пути TCR. В некоторых вариантах осуществления стадия (ii) включает культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в бессывороточной среде. В некоторых вариантах осуществления после стадии (i) $\gamma\delta$ -T-клетки отделяют от негемопоэтических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток. Кроме того, стадия (ii) может включать культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками, культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в отсутствие значительного контакта с опухолевыми клетками и/или культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в отсутствие значительного контакта с фидерными клетками.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток посредством стадий: (i) получения негемопоэтической ткани, включающей негемопоэтические клетки и $\gamma\delta$ -T-клетки, (ii) отделение $\gamma\delta$ -T-клеток от негемопоэтических клеток для получения отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток и (iii) культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в присутствии IL-2, IL-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из IL-21, SDF, IL-1 β , IL-12, IL-18 и IL-33, в течение по меньшей мере 5 дней для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток. $\gamma\delta$ -T-клетки можно культивировать в присутствии IL-2, IL-15 и IL-21. Дополнительно или альтернативно, $\gamma\delta$ -T-клетки можно культивировать в бессывороточной среде.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, имеющих фенотип любой из указанных выше подвергнутых экспансии популяций $\gamma\delta$ -T-клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ -T-клеток из выделенной популяции экспрессируют CD27 и, по существу, не экспрессируют TIGIT. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 50% $\gamma\delta$ -T-клеток из выделенной популяции экспрессируют V δ 1.

В другом аспекте настоящее изобретение включает фармацевтические композиции выделенных $\gamma\delta$ -T-клеток по предшествующему аспекту.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума посредством адоптивной T-клеточной терапии посредством введения нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически эффективного количества описанных выше подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток, описанной выше выделенной популяции или описанной выше фармацевтической композиции.

Любой вариант осуществления, описанный в настоящей заявке, можно комбинировать с любым другим описанным вариантом осуществления в каждом из аспектов по изобретению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1A-1D показано, что кожа человека включает характерную популяцию

резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток. Фиг. 1А: Резидентные лимфоциты кожи выделяли с использованием органотипической культуры клеток, описанной Clark, et al (Clark, et al., *Journal of Investigational Dermatology*. 2006. 126(5):1059–70; "способ Clark"). В случае $CD45^+$ клеток антитело против CD3 использовали для окрашивания на Т-клетки, а антитело против CD56 – для идентификации NK-клеток, $CD3^-CD56^+$, соответственно. В случае $CD3^+$ клеток антитела против пан- $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора использовали для идентификации резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи, а антитела против CD8 α – для идентификации доли обычных CD4- и CD8-положительных $\alpha\beta$ -Т-клеток среди $CD3^+$, гейтирование по пан- $\gamma\delta$ TCR $^-$. На фиг. 1В показано обобщение этих экспериментов для 7–10 доноров с использованием способа Clark. При использовании этого способа лимфоциты в коже человека все равно контактируют с дермальными фибробластами, и их либо не дополняют цитокинами, либо дополняют интерлейкином-2 (IL-2), интерлейкином-15 (IL-15) или IL-2, и IL-15, что свидетельствует о том, что использование цитокинов не изменяет композицию резидентных лимфоцитов кожи, за исключением немного большей популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток при дополнении культуры IL-15 или IL-2, и IL-15, что позволяет валидировать способ Clark. Композиции лимфоцитов после 3-недельного органотипического культивирования кожи показаны с указанием использованных цитокинов в виде обобщения для 4 доноров. Фиг. 1С: Резидентные $\gamma\delta$ -клетки кожи включают, главным образом, V δ 1-экспрессирующие $\gamma\delta$ -Т-клетки (76,24% \pm 17,3), небольшую популяцию V δ 2-Т-клеток (3,06% \pm 6,1) и популяцию пан- $\gamma\delta$ -TCR-положительных клеток, отрицательно окрашиваемых на V δ 1 или V δ 2, также обозначаемых в настоящем описании как двойные отрицательные (DN) $\gamma\delta$ -Т-клетки (20,7% \pm 13,97). При контрольном окрашивании крови здоровых добровольцев наблюдали выраженную компартментализацию $\gamma\delta$ -Т-клеток человека, т.к. в крови преобладающая популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток экспрессировала цепь V δ 2 TCR. Фиг. 1D: На резидентных $\gamma\delta$ -Т-клетках кожи обнаруживали маркеры, ранее ассоциированные с Т-клетками, являющимися хронически активированными, хотя эти маркеры являются характерными индикаторами резидентности в ткани, а не обязательно отражает хроническую активацию. На гистограммах показано окрашивание указанных маркеров на $\gamma\delta$ -Т-клетках (закрашенная гистограмма) относительно соответствующего изотипического контроля для каждого антитела (незакрашенная гистограмма).

На фиг. 2А–2D показано, что резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи, полученные непосредственно из кожи человека способом Clark, отражают Th1-смещенный ответ после активации общепринятыми способами активации Т-клеток и аналогичным образом отражают Th1-смещенный ответ после активации лигандами NKG2D в отдельности. Фиг. 2А: Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрировали выраженную экспрессию активирующего и NK-клеточно-ассоциированного рецептора NKG2D (закрашенная гистограмма, относительно изотипического контроля, представленного на незакрашенной гистограмме). После активации с использованием связанного с планшетом рекомбинантного МІСА, одного из известных лигандов рецепторов NKG2D, $\gamma\delta$ -Т-клетки

кожи отвечали без какой-либо другой стимуляции и независимо от лигирования TCR, т.к. ответ прекращался в присутствии блокирующих антител против NKG2D. Клетки стимулировали в течение 6 часов в присутствии брефелдина А и 100 единиц IL-2/мл, а затем анализировали на дегрануляцию посредством окрашивания на CD107a. Продукцию ФНО α и ИФН γ анализировали посредством пермеабиллизации после поверхностного окрашивания и последующего окрашивания внутриклеточных цитокинов. В качестве положительного контроля активации Т-клеток использовали форбол-12-мирикат-13-ацетат (P) в комбинации с иономицином (I). Фиг. 2B: Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрировали Th1-смещенный ответ. $\gamma\delta$ -Т-клетки получали способом Clark, стимулировали PMA и иономицином в течение 6 ч. в присутствии брефелдина А и окрашивали на внутриклеточные цитокины. $\gamma\delta$ -Т-клетки, свежесыведенные из кожи человека, после стимуляции продуцируют ФНО α и ИФН γ , но лишь небольшое или недетектируемое количество цитокинов, например, IL-4, IL-17A, IL-13, IL-22, ассоциированных с клетками Th2 или Th-17, в то время как обычные CD4 $^+$ $\alpha\beta$ -Т-клетки демонстрируют более широкий спектр продукции цитокинов. Фиг. 2C: Среди лимфоцитов, полученных непосредственно из кожи человека, $\gamma\delta$ -Т-клетки, обычные CD8a $^+$ $\alpha\beta$ -Т-клетки и NK-клетки экспрессируют различные уровни рецептора NKG2D. Среди этих клеток NK-клетки отвечают на воздействие лигандов NKG2D в отдельности, но среди Т-клеток только популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток демонстрирует цитокиновый ответ после стимуляции лигандами NKG2D в отсутствие какой-либо стимуляции TCR (см. верхний ряд графиков проточной цитометрии). Ответ можно блокировать с использованием растворимых блокирующих антител против NKG2D, что свидетельствует о том, что ответ опосредован исключительно рецептором NKG2D. Фиг. 2D: Среди резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи только V δ 1- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки демонстрируют подобный врожденному потенциал активации рекомбинантным MICA в отдельности (указано символом *). V δ 2-экспрессирующие Т-клетки, обнаруживаемые в коже в небольших количествах, не демонстрируют такой ответ.

На фиг. 3A-3D показано, что резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи отвечают исключительно на отделение от дермальной стромы выраженной активацией и пролиферацией. Фиг. 3A: Резидентные лимфоциты кожи выделяли способом Clark. Через 3 недели органотипического культивирования лимфоциты кожи собирали и отделяли от каких-либо остаточных клеток кожи, включая фибробласты, помещали в лунки для культивирования ткани при плотности 1 миллион лимфоцитов/мл и дополняли 100 ед./мл IL-2. Через еще 3 недели резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки подвергались выраженной экспансии, и их обогащали в культуре лимфоцитов кожи. Это выраженное пролиферативное явление являлось исключительным признаком резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи, представленных, главным образом, V δ 1-Т-клетками, пролиферирующими в среднем в 127,18 раз в течение 3 недель, в то время как обычные $\alpha\beta$ -Т-клетки пролиферировали в среднем лишь в 5,21 раз, что составляет более чем 20-кратное различие. Фиг. 3B: Резидентные V δ 1-Т-клетки кожи отвечают на утрату ткани посредством выраженной положительной регуляции маркера Ki-67 (свидетельствующего о прохождении клеточного цикла) в течение 14 дней

(изотипический контроль, представленный на незакрашенной гистограмме, ограниченной пунктирной линией; экспрессия Ki-67 в день 0 представлена на незакрашенной гистограмме; экспрессия Ki-67 в день 7 представлена на светло-серой гистограмме; экспрессия Ki-67 в день 14 представлена на темно-серой гистограмме). Кроме того, резидентные V δ 1-T-клетки кожи, в большинстве своем являющиеся отрицательными по рецептору IL-2 альфа (CD25) при контакте со стромой кожи, имеют положительную регуляцию CD25 после отделения от ткани (изотипический контроль: заштрихованная гистограмма, окрашивание в день 0: светло-серая гистограмма, окрашивание в день 7: темно-серая гистограмма). Фиг. 3C: Высокие скорости прохождения клеточного цикла, о которых свидетельствует медиана интенсивности флуоресценции (MFI) Ki-67, наблюдаются только в резидентных $\gamma\delta$ -T-клетках кожи, представленных V δ 1-T-клетками, но не в обычных $\alpha\beta$ -T-клетках и NK-клетках, где MFI, по существу, снижается в течение 14 дней. Фиг. 3D: В лимфоцитах кожи, отделенных от стромальных клеток, определяли сильно обогащенную популяцию резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток после 3 недель культивирования. Эта популяция $\gamma\delta$ -T-клеток содержит, главным образом, V δ 1-положительные клетки (77,49% \pm 17,04) и пан- $\gamma\delta$ -TCR-положительные DN-T-клетки (21,46% \pm 16,92). Исходная небольшая популяция V δ 2-T-клеток, определяемая в свежесобранном способом Clark лимфоцитах кожи, снижается и практически исчезает (0,6% \pm 1,204) после 3 недель экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток ткани.

На фиг. 4A и 4B показано, что резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки кожи отвечают на утрату ткани, и стромальные клетки кожи, в частности, фибробласты, контролируют их с помощью контактного механизма. Фиг. 4A: Смешанные лимфоциты кожи собирали после органотипического культивирования способом Clark через 3 недели. Затем смешанные лимфоциты высевали поверх конфлюэнтного слоя аутологичных фибробластов кожи и в систему Transwell для контроля наличия растворимых ингибиторов, продуцируемых фибробластами. Через 14 дней измеряли кратное изменение экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток и обычных $\alpha\beta$ -T-клеток, вычисленное с помощью абсолютных количеств клеток. Резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки кожи демонстрировали выраженный пролиферативный ответ при отделении от ткани и в присутствии фибробластов, но только не в условиях прямого клеточного контакта с аутологичными фибробластами. Обычные $\alpha\beta$ -T-клетки не демонстрировали такой ответ в каких-либо тестируемых условиях. Фиг. 4B: Смешанные лимфоциты, полученные из органотипической культуры, высевали на монослой аутологичных фибробластов (светло-серые гистограммы) или высевали в пустые лунки (темно-серые гистограммы) с IL-2 и культивировали в течение 7 дней. Резидентные V δ 1-T-клетки кожи (левые панели), а также пан- $\gamma\delta$ -TCR+, DN-T-клетки (правые панели) оставались покоящимися в присутствии фибробластов, но демонстрировали сильную активацию при отделении от органотипической культуры кожи и отсутствии фибробластов, о чем свидетельствует повышенная экспрессия (MFI) CD25, Th-1-ассоциированного фактора транскрипции T-bet и маркера клеточного цикла Ki-67 (заштрихованные гистограммы, незаштрихованные гистограммы соответствуют изотипическому контролю).

На фиг. 5А и 5В показано, что подвергаемые экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрируют признаки дерепрессии и приобретения сильного цитотоксического потенциала. Фиг. 5А: Резидентным $\gamma\delta$ -Т-клеткам кожи позволяли расти в течение 14 дней после отделения от органотипической культуры клеток. Затем $\gamma\delta$ -Т-клетки подвергали отрицательной сортировке с использованием проточной цитометрии посредством исключения всех обычных Т-клеток, окрашенных с использованием моноклонального антитела против пан- $\alpha\beta$ -TCR. Затем 150000 сортированных $\gamma\delta$ -Т-клеток высевали в 96-луночный плоскодонный планшет для культивирования в двух параллелях и оставляли в культуре на 24 часа без дополнения цитокинами или какими-либо активирующими лигандами. Собирали супернатанты и анализировали их на продуцируемые цитокины с использованием чипа для анализа цитокинов на основе Affymetrix LUMINEX®. Фиг. 5В: Отрицательно сортированные $\gamma\delta$ -Т-клетки также высевали на линии злокачественных клеток, высеянные за 1 день до этого, в концентрации 10000 клеток на лунку. В качестве контроля использовали отрицательно сортированные обычные $\alpha\beta$ -Т-клетки кожи. Т-клетки высевали при указанных соотношениях эффектор:мишень в присутствии и отсутствие блокирующего антитела против NKG2D в присутствии IL-2 в количестве 100 ед./мл. Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрировали превосходящую цитолитическую активность, о чем свидетельствует высвобождение расщепленного каспазами эпителиального цитокератина 18 (СК18), измеряемое посредством ELISA, из линий злокачественных клеток по сравнению с обычными $\alpha\beta$ -Т-клетками. Цитотоксичность по меньшей мере частично была опосредована рецептором NKG2D, о чем свидетельствует ее снижение в культурах, содержащих антитело, блокирующее рецептор NKG2D.

На фиг. 6А–6Д показан анализ резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток тканей в кишечнике человека. Фиг. 6А: Адаптация способа Clark, позволяющая выделять резидентные лимфоциты кишечника. Смешанные лимфоциты кишечника содержат крупную популяцию резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток тканей, как правило, включающих, главным образом, V δ 1-Т-клетки, но также содержащих V δ 2-Т-клетки и двойные отрицательные $\gamma\delta$ -Т-клетки. Фиг. 6В: $\gamma\delta$ -Т-клетки, выделенные из органотипической культуры кишечника, демонстрируют ответы, схожие с полученными из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетками, т.к. они имеют положительную регуляцию Ki-67 с течением времени после их отделения от стромы кишечника. Фиг. 6С: Полученные из кишечника $\gamma\delta$ -Т-клетки отвечают на подобные врожденным стимулы, такие как рекомбинантный MICA, продукцией ИФН γ и дегрануляцией, измеряемой по положительной регуляции CD107a. Фиг. 6Д: $\gamma\delta$ -Т-клетки, выделенные из органотипической культуры кишечника, демонстрируют ответы, схожие с полученными из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетками, и растут с течением времени в культуре клеток, о чем свидетельствует общее обогащение в культурах лимфоцитов, в которых отсутствует контакт со стромой кишечника.

На фиг. 7А и 7В показан тканевой фенотип подвергнутых экспансии полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток. Фиг. 7А: Полученные из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетки положительно окрашивали на хемокиновые хоминг-рецепторы кожи CCR4 и CCR8. Фиг. 7В: Уровни экспрессии

отличаются от подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из кожи или крови, соответственно.

На фиг. 8 показано, что дерепрессия полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток без какой-либо стимуляции TCR приводит к спонтанной продукции цитокинов Th1 и, неожиданно, в отличие от свежих TCR-активированных $\gamma\delta$ -Т-клеток, к продукции атопического цитокина IL-13. Аналогично свежеполученным $\gamma\delta$ -Т-клеткам, дерепрессированные и подвергнутые экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетки продуцируют незначительные количества Th2-ассоциированных цитокинов, например IL-4 и IL-5. Полученным из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеткам позволяли расти в течение 14 дней и подвергали их отрицательной сортировке посредством исключения обычных $\alpha\beta$ -Т-клеток. 150000 смешанных $\gamma\delta$ -Т-клеток культивировали при плотности 1 миллион клеток/мл в 96-луночном плоскодонном планшете в двух параллелях для 4 доноров без какой-либо стимуляции или добавления цитокинов. Через 24 ч. собирали супернатанты и анализировали с использованием анализа цитокинов на основе LUMINEX® Affymetrix.

На фиг. 9 показано, что подвергнутые экспансии и отрицательной сортировке полученные из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетки демонстрируют выраженную цитотоксичность в отношении различных линий опухолевых клеток человека, с которыми их сокультивировали, что измеряли с использованием ELISA по высвобождению клетками-мишенями расщепленного каспазами цитокератина 18.

На фиг. 10А и 10В показано, что свежие, неподвергнутые экспансии полученные из кожи V δ 1-Т-клетки демонстрируют маркеры предшествующей активации Т-клеток. Фиг. 10А: Полученные из кожи V δ 1-Т-клетки имеют высокую экспрессию CD69 и TIM3 и низкую экспрессию CD28. Кроме того, они демонстрируют высокую экспрессию маркера активации NKG2D. Полученные из кожи V δ 1-Т-клетки сохраняют этот фенотип во время экспансии *in vitro*. В отличие от этого, у V δ 1-Т-клеток, полученных из крови человека, отсутствуют эти признаки активации, они не экспрессируют CD69 или TIM3. По сравнению с полученными из кожи V δ 1-Т-клетками, экспрессия NKG2D на полученных из крови V δ 1-Т-клетках является гораздо более низкой, в то время как полученные из крови V δ 1-Т-клетки экспрессируют костимуляторную молекулу CD28. Фиг. 10В: Только полученные из кожи V δ 1-Т-клетки являются реакционноспособными в отношении лигандов NKG2D, таких как рекомбинантный MICA, в отсутствие любого другого стимула, такого как лиганд для Т-клеточного рецептора. Полученные из крови V δ 1- или V δ 2-Т-клетки не демонстрировали такую ответственность на подобные врожденным стимулы. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с рекомбинантным MICA, или антителами против CD3, или и с тем, и с другим. Клетки культивировали в течение 6 ч. в присутствии 100 ед./мл IL-2 и в присутствии BFA в течение последних 4 часов с последующим окрашиванием поверхностных антигенов, пермеабиллизацией и внутриклеточным окрашиванием на ИФН γ .

На фиг. 11 показано, что полученные из кожи V δ 1-Т-клетки экспрессируют незначительные уровни CD16, но демонстрируют значительную поверхностную экспрессию высокоаффинного IgG-рецептора CD64. Таким образом, в дополнение к

прямой цитотоксической активности, полученные из ткани V δ 1-T-клетки также можно использовать для повышения эффективности терапии моноклональными антителами, такими как направленные на CD20 или Her2 способы терапии, т.к. их можно будет направлять с помощью антитела к очагам злокачественных новообразований и метастазирования, они будут распознавать опсонизированные опухолевые клетки и уничтожать их посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Представленные результаты соответствуют одному типичному донору (из четырех).

На фиг. 12 показана экспансия V δ 1-T-клеток в присутствии IL-2 (левая панель), IL-15 (центральная панель) и IL-2+IL-15 (правая панель). Свежевыделенные полученные из кожи лимфоциты культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в среде RPMI, содержащей 10% FCS и 1% пенициллина/стрептомицина и дополняли IL-2, IL-15 или IL-2+IL-15, соответственно, в течение 7 дней. IL-2 и IL-15, а также комбинация этих цитокинов, индуцировали пролиферацию V δ 1-T-клеток, о чем свидетельствует сдвиг окрашивания Ki-67 по сравнению с окрашиванием изотипическим контролем (истинно отрицательные) в отсутствие каких-либо стромальных клеток. С помощью Ki-67 специфически окрашивают клетки, покинувшие фазу G₀ клеточного цикла, и, как правило, он ассоциирован с пролиферацией.

На фиг. 13 показаны результаты проточной цитометрии, свидетельствующие об экспрессии CD9, CCR3 и CD39 на поверхности подвергнутых экспансии V δ 1-T-клеток в день 21. Подвергнутые экспансии полученные из кожи V δ 1-T-клетки поддерживали высокие уровни поверхностных клеточных маркеров CCR3, CD39 и CD9, как указано на закрашенной гистограмме, по сравнению с эквивалентным окрашиванием изотипическим контролем (истинно отрицательные, незакрашенная гистограмма).

На фиг. 14 показана экспрессия мРНК CCR3 и CD9 в полученных из кожи V δ 1-T-клетках (темные столбики) и полученных из крови V δ 1-T-клетках (светлые столбики). Полученные из кожи V δ 1-T-клетки подвергали экспансии, как представлено в настоящем описании, и полученные из крови V δ 1-T-клетки подвергали экспансии с использованием связанных с планшетом антител против V δ -T-клеточного рецептора (20 мкг/мл). После экспансии V δ 1-T-клетки выделяли с использованием активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) и выделяли РНК из 3 доноров в обеих группах (кровь отмечена серым цветом, кожа – черным). Секвенировали цельную мРНК, нормализовали уровни экспрессии указанных мРНК и подвергали их log₂-преобразованию. Все уровни экспрессии показаны в виде прямого сравнения и по отношению к GAPDH, распространенного гена "домашнего хозяйства", экспрессирующегося на высоких уровнях в большинстве клеток человека.

На фиг. 15 показана экспрессия мРНК IL-13 в полученных из кожи V δ 1-T-клетках (темные столбики) и полученных из крови V δ 1-T-клетках (светлые столбики). Полученные из кожи V δ 1-T-клетки подвергали экспансии, как представлено в настоящем описании, и полученные из крови V δ 1-T-клетки подвергали экспансии с использованием связанных с планшетом антител против V δ -T-клеточного рецептора в большом количестве (20 мкг/мл).

После экспансии V δ 1–T клетки выделяли с использованием FACS и выделяли РНК из 3 доноров в обеих группах (кровь отмечена серым цветом, кожа – черным). Секвенировали цельную мРНК, нормализовали уровни экспрессии мРНК IL-13 и подвергали их log₂–преобразованию. Уровни экспрессии показаны в виде прямого сравнения и по отношению к GAPDH.

На фиг. 16А и 16В показана продукция цитокинов в полученных из кожи V δ 1–T–клетках после стимуляции TCR РМА/иономицином (фиг. 16А) или антителом против CD3 (фиг. 16В). После выделения и экспансии полученные из кожи V δ 1–T–клетки очищали с использованием активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS). 150000 V δ 1–T–клеток высевали в 96–луночный плоскодонный планшет в двух параллелях для трех доноров и стимулировали связанным с планшетом антителом против CD3 (5 мкг/мл) или РМА/иономицином в течение 24 часов. Супернатанты анализировали на абсолютное количество указанных цитокинов с использованием платформы LUMINEX®.

На фиг. 17А–17Н показаны результаты для условий экспансии. На фиг. 17А и 17В показаны типичные графики проточной цитометрии и схемы гейтирования для отделенных лимфоцитов (через 21 день раздельного культивирования; фиг. 17А) и лимфоцитов, подвергнутых экспансии в присутствии IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 в течение 20 дней (фиг. 17В). На фиг. 17С показана кратная экспансия V δ 1–T–клеток в различных условиях, нормализованная по экспансии V δ 1–T–клеток в присутствии IL-2 (100 ед./мл) и IL-15 (10 нг/мл). На фиг. 17D показана кратная экспансия относительно отделенной популяции в результате обработки IL-2+IL-15, IL-2+IL-15+IL-4, IL-2+IL-15+IL-21 и IL-2+IL-15+IL-4+IL-21. На фиг. 17Е показаны абсолютные количества V δ 1⁺ T–клеток в день 21 (перед экспансией) и в день 42 (после экспансии). Экспансии осуществляли в 100 ед./мл IL-2, 100 ед./мл IL-2+10 нг/мл IL-15 или 100 ед./мл IL-2+5 нг/мл IL-4+10 нг/мл IL-15+100 нг/мл IL-21, как указано. (n=8–17). На фиг. 17F показаны средние количества V δ 1⁺ T–клеток (+ SEM) для каждого условия в оба момента времени. ** p=0,001. Непарный t–критерий Стьюдента. (n=8–17). На фиг. 17G показана экспансия V δ 1⁺ T–клеток с использованием разных концентраций IL-21, нормализованная по экспансии с использованием 100 ед./мл IL-2, 5 нг/мл IL-4 и 10 нг/мл IL-15 в отдельности (n=3). На фиг. 17H показана экспансия V δ 1⁺ T–клеток с использованием 100 ед./мл IL-2+5 нг/мл IL-4+10 нг/мл IL-15+10 нг/мл IL-21, нормализованная по экспансии с использованием IL-2 в отдельности.

На фиг. 18А–18D охарактеризована экспрессия CD27 подвергнутыми экспансии V δ 1–T–клетками. На фиг. 18А показана кратная экспрессия CD27 (по MFI) в различных условиях, нормализованная по экспрессии CD27 при использовании IL-2 (100 ед./мл) и IL-15 (10 нг/мл). На фиг. 18В показана MFI CD27 относительно отделенной популяции в результате обработки IL-2+IL-15, IL-2+IL-15+IL-4, IL-2+IL-15+IL-21 и IL-2+IL-15+IL-4+IL-21. На фиг. 18С показана экспрессия V δ 1⁺ CD27 с использованием разных концентраций IL-21, нормализованная по экспансии с использованием 100 ед./мл IL-2, 5 нг/мл IL-4 и 10 нг/мл IL-15 в отдельности, оцениваемая посредством проточной цитометрии (n=3). На фиг. 18D показана экспрессия V δ 1⁺ CD27 с использованием 100 ед./мл IL-2+5 нг/мл IL-4+10

нг/мл IL-15+10 нг/мл IL-21, нормализованная по экспансии с использованием только IL-2, оцениваемая посредством проточной цитометрии. (n=4).

На фиг. 19 охарактеризована поверхностная экспрессия TIGIT подвергнутыми экспансией V δ 1-T-клетками. На фиг. 19 показана кратная экспрессия TIGIT (по MFI) в различных условиях, нормализованная по экспрессии TIGIT в результате обработки IL-2 и IL-15.

Фиг. 20 представляет собой график, на котором показана поверхностная экспрессия TIGIT отдельными клетками как функция экспрессии CD27.

Фиг. 21 представляет собой график, на котором показано использование цитокинов для поддержания экспансии и обогащения полученных из ткани $\gamma\delta$ -T-клеток в присутствии или отсутствие полученных из крови сыворотки или плазмы. Смешанные популяции лимфоцитов, выделенных из образца ткани, содержащие 2% $\gamma\delta$ -T-клеток, подвергали экспансии в средах, содержащих IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 с 10% сыворотки АВ человека или без нее. Данные свидетельствуют об успешной и эквивалентной экспансии (432-кратной) и обогащении (с 2% до 77%) без сыворотки человека по сравнению с условиями с сывороткой (295-кратная экспансия, обогащение с 2% до 75%).

Фиг. 22А–22D представляют собой графики, на которых показан пример обогащения полученных из ткани $\gamma\delta$ -клеток из выделенных смешанных популяций лимфоцитов. Клетки выделяли из одного образца ткани человека, подвергали делению, а затем подвергали экспансии в средах TechMACS с IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21, содержащих 10% сыворотки (левые колонки) или 5% сыворотки Cell Therapy System (CTS™) (правые колонки). Представлены профили культур выделенных и подвергнутых экспансии клеток, как указано. На фиг. 22А показано, что исходные выделенные культуры содержат относительно низкое количество (<10%) желаемых полученных из ткани $\gamma\delta$ -T-клеток. В отличие от этого, на фиг. 22В–22D показано, что после экспансии полученная популяция клеток сильно обогащена полученными из ткани $\gamma\delta$ -T-клетками.

Фиг. 23 представляет собой график, на котором показана конститутивная экспрессия TIGIT на резидентных V δ 1-клетках кишечника. Данные получали с использованием V δ 1-клеток, выделенных из эпителия кишечника с использованием стандартного способа выделения для высвобождения интраэпителиальных лимфоцитов толстого кишечника.

Фиг. 24А и 24В представляют собой графики, на которых показано, что полиовирусный рецептор (PVR) специфически ингибирует передачу сигнала TCR, что измеряют по экспрессии ИФН γ (фиг. 24А) и ФНО α (фиг. 24В). Клетки инкубировали с IL-2 и IL-15 и активировали антителом против CD3.

Фиг. 25А и 25В представляют собой графики, на которых показано, что ингибиторный эффект PVR утрачивается на TIGIT-отрицательных V δ 1+/V δ 3+ клетках, что измеряют по ИФН γ (фиг. 25А) или ФНО α (фиг. 25В). Клетки инкубировали с IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21 и активировали антителом против CD3.

Фиг. 26А и 26В представляют собой графики, на которых показано, что IL-9 может замещать функцию IL-2 при экспансии полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток. Ткани кожи от

трех доноров (TS052, TS056 и SK073) помещали на сетки 9 мм и культивировали в течение трех недель в среде, дополненной IL-2 и IL-15. Затем выделенные лимфоциты подвергали экспансии в среде, дополненной IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 (левые столбики) или IL-4, IL-9, IL-15 и IL-21 (правые столбики). Вычисляли конечный выход $\gamma\delta$ -T-клетки/сетку (фиг. 26A) и $V\delta 1$ -клеток/сетку (фиг. 26B) после 3 недель экспансии. Замена IL-2 на IL-9 при экспансии полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток приводила к эквивалентной эффективности экспансии. На гистограммах представлены средние значения \pm SEM.

Фиг. 27A–27C представляют собой графики, на которых показано, что IL-9 может замещать функцию IL-2 при экспансии полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток, что измеряют по кратному изменению (фиг. 27A), % $\gamma\delta$ TCR+ T-клеток (фиг. 27B) и % $V\delta 1$ + T-клеток (фиг. 27C). Ткани кожи получали от шести доноров (SK073, SK075, SK077, TS052, TS053 и TS056). 2СК=2 цитокина (IL-2+IL-15) и 4СК=4 цитокина (IL-2+IL-15+IL-21+IL-4).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Введение

Настоящее изобретение относится к способам экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не- $V\delta 2$ -T-клеток, например, $V\delta 1$ -T-клеток и/или двойных отрицательных T-клеток) из источника негемопозитической ткани (например, $\gamma\delta$ -T-клеток, полученных из негемопозитической ткани, например, $V\delta 1$ -T-клеток, полученных из негемопозитической ткани). Способы экспансии включают культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток (например, $\gamma\delta$ -T-клеток, отделенных от стромальных клеток негемопозитической ткани) в отсутствие значительной стимуляции TCR и/или в присутствии интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-21 (IL-21) и/или интерлейкина-2 (IL-2). Настоящее изобретение также относится к композициям подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не- $V\delta 2$ -T-клеток, например, $V\delta 1$ -T-клеток и/или DN-T-клеток) и способам применения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток (например, как часть адоптивной T-клеточной терапии, например, для лечения злокачественных новообразований).

II. Определения

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления изобретения, представленные в настоящем описании, включают "содержащие", "состоящие" и "по существу, состоящие" аспекты и варианты осуществления. В рамках изобретения форма в единственном числе включает ссылку на множественное число, если не указано иначе.

В рамках изобретения термин "приблизительно" относится к общепринятому диапазону погрешности для соответствующего значения, известному специалисту в этой области. Ссылка на "приблизительное" значение или параметр в настоящем описании включает (и с помощью нее описывают) варианты осуществления, относящиеся к этому значению или параметру самому по себе. В некоторых случаях термин "приблизительно" включает колебания +20%, в некоторых случаях – +10%, в некоторых случаях – +5%, в некоторых случаях – +1%, или в некоторых случаях – +0,1% от указанного значения, т.к. такие колебания подходят для осуществления описываемых способов.

В рамках изобретения термины "значительный" и "по существу" относятся к качественному состоянию проявления полной или практически полной степени интересующей характеристики или свойства. Специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если вообще, достигают завершения и/или полноты или достигают абсолютного результата. Таким образом, термин "по существу" используют в настоящем описании для охвата потенциального отсутствия завершенности, свойственного многим биологическим и химическим явлениям. При описании физического сценария, такого как взаимодействие рецептор/лиганд или межклеточный контакт, сценарий является значительным, если его функциональный результат можно определять общепринятыми способами, доступными специалисту, осуществляющему способ. Например, термин "значительная активация TCR" относится к детектируемому уровню активации TCR в популяции клеток (например, статистически значимой степени активации TCR). В некоторых вариантах осуществления TCR значительно активируется после воздействия до 0,1%, до 0,5%, до 1%, до 5%, до 10%, до 20%, до 30% или до 40% EC₅₀ агониста пути TCR (например, антитела, например, антитела против CD3, или лектина) на соответствующую популяцию клеток. Аналогично, термин "значительный контакт клеток" (например, значительный контакт с фидерными клетками, значительный контакт со стромальными клетками или значительный контакт с опухолевыми клетками) относится к степени межклеточного контакта, способного индуцировать детектируемое изменение в подвергаемой экспансии клетке (например, для снижения экспансии). В некоторых случаях значительный контакт клеток происходит, когда в компартменте культуры присутствует контаминирующий тип клеток (например, фидерная клетка, стромальная клетка или опухолевая клетка) в концентрации до 0,1%, до 0,5%, до 1%, до 5%, до 10% или до 20% относительно подвергаемой экспансии популяции клеток. Аналогично термин "значительное количество" клеток или "значительное количество" средства относится к количеству, необходимому для индуцирования значительного эффекта, как определено выше.

В рамках изобретения термин "негемопозитические клетки" включают стромальные клетки и эпителиальные клетки. Стромальные клетки являются негемопозитическими клетками соединительной ткани любого органа и поддерживают функцию паренхимальных клеток этого органа. Примеры стромальных клеток включают фибробласты, перициты, мезенхимальные клетки, кератиноциты, эндотелиальные клетки и негематологические опухолевые клетки. Эпителиальные клетки являются негемопозитическими клетками, выстилающими полости и поверхности кровеносных сосудов и органов во всем организме. Как правило, они являются плоскими, цилиндрическими или кубическими по своей форме и могут располагаться в виде одного слоя клеток или слоев двух или более клеток.

В рамках изобретения термины "резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей", "полученные из негемопозитической ткани" и "нативные для негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клетки" относятся к $\gamma\delta$ -T-клеткам, присутствовавшим в негемопозитической ткани на момент эксплантации ткани. Резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей

можно получать из любой подходящей негемопозитической ткани человека или не являющегося человеком животного. Негемопозитическая ткань является тканью, иной, чем кровь или костный мозг. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки не получают из конкретных типов образцов биологических жидкостей, таких как кровь или синовиальная жидкость. Примеры таких подходящих негемопозитических тканей человека или не являющегося человеком животного включают кожу или ее часть (например, дерму или эпидермис), желудочно-кишечный тракт (например, желудочно-кишечный эпителий, толстый кишечник, тонкий кишечник, желудок, аппендикс, слепая кишка или прямая кишка), ткань молочной железы, легкое (предпочтительно, где ткань не получают посредством бронхоальвеолярного лаважа), предстательную железу, печень и поджелудочную железу. В некоторых вариантах осуществления резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей можно получать из лимфоидной ткани, такой как тимус, селезенка или миндалина. $\gamma\delta$ -Т-клетки также могут являться резидентными для злокачественных тканей человека, например, молочной железы и предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки не получают из злокачественной ткани человека. Образцы негемопозитической ткани можно получать стандартными способами, например, посредством эксплантации (например, биопсии). Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей включают не-V δ 2-Т-клетки, например, V δ 1-Т-клетки, двойные отрицательные (DN) Т-клетки, V δ 3-Т-клетки и V δ 5-Т-клетки.

В рамках изобретения термин "IL-2" относится к нативному или рекомбинантному IL-2 или его варианту, действующему в качестве агониста одной или более субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, рецепторным комплексам, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие средства могут поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток CTLL-2 (33; American Type Culture Collection (ATCC®) TIB 214). Зрелый IL-2 человека существует в виде последовательности 133 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 20 N-концевых аминокислот), как описано в Fujita, et al. *Cell* 1986. 46,3:401-407. Мутеин IL-2 является полипептидом, полученным посредством конкретных замен в белке интерлейкина-2 при сохранении способности связываться с IL-2R β , как описано в US 2014/0046026. Мутеины IL-2 могут отличаться инсерциями, делециями, заменами и модификациями аминокислот в одном или более участках в других остатках нативной полипептидной цепи IL-2. В настоящем описании любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-2, сохраняющего активность связывания IL-2R β . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислоты.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-2 человека, можно получать общепринятыми способами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность IL-2 человека (Gene ID 3558) можно найти в Genbank под регистрационным номером NP_000577.2 GI: 28178861. Аминокислотную последовательность IL-2 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16183) можно найти в Genbank под

регистрационным номером NP_032392.1 GI: 7110653.

Термин "IL-2" также может относиться к IL-2, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьян, коров, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут содержать консервативно замещенные последовательности, что означает, что указанный аминокислотный остаток заменяют остатком, имеющим схожие физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка другим, таким как Ile, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка другим, например, Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-2 также включены в настоящее изобретение. Примерами таких вариантов являются белки, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-2, сохраняющие связывающие свойства IL-2. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к образованию укороченного, но биологически активного белка IL-2. Вариации, приписываемые протеолизу, включают, например, различия в N- или C-концах после экспрессии в разных типах клеток-хозяев по причине протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-2 (как правило, 1–10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. *Cancer* 1995. 76: 687–694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать с использованием дополнительных аминокислот (Clark–Lewis, et al. *PNAS* 1993. 90:3574–3577).

В рамках изобретения термин "IL-15" относится к нативному или рекомбинантному IL-15 или его варианту, действующему в качестве агониста одной или более субъединиц рецептора IL-15 (IL-15R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, рецепторным комплексам, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). IL-15, подобно IL-2, является известным фактором роста T-клеток, который может поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой линии клеток CTLL-2. IL-15 впервые описан Grabstein, et al. (Grabstein, et al. *Science* 1994. 264,5161: 965–969) в виде зрелого белка из 114 аминокислот. В рамках изобретения термин "IL-15" означает нативный или рекомбинантный IL-15 и его мутеины, аналоги, субъединицы или комплексы (например, рецепторные комплексы, например, пептиды sushi, как описано в WO 2007/046006), и каждый из которых может стимулировать пролиферацию клеток CTLL-2. В анализах пролиферации CTLL-2 супернатанты клеток, трансфицированных с использованием рекомбинантно экспрессируемого предшественника и слитого в рамке считывания белка зрелых форм IL-15, могут индуцировать пролиферацию клеток CTLL-2.

IL-15 человека можно получать способами, описанными Grabstein, et al. (Grabstein, et al. *Science* 1994. 264,5161: 965–969), или общепринятыми способами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Депозит кДНК IL-15 человека сделан в ATCC® 19

февраля 1993 года, и ему приписан регистрационный номер 69245.

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

Термин "IL-15" также может относиться к IL-15, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьян, коров, свиней, лошадей и мышей. В рамках изобретения "мутеин" или "вариант" IL-15 является полипептидом, по существу, гомологичным последовательности нативного IL-15 млекопитающего, но имеющим аминокислотную последовательность, отличающуюся от нативного полипептида IL-15 млекопитающего в результате делеции, инсерции или замены аминокислот. Варианты могут содержать консервативно замещенные последовательности, что означает, что указанный аминокислотный остаток заменяют остатком, имеющим схожие физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка другим, таким как Ile, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка другим, например, Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-15 также включены в настоящее изобретение. Примерами таких вариантов являются белки, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-15, где сохраняющие связывающие свойства IL-15. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к образованию укороченного, но биологически активного белка IL-15. Вариации, приписываемые протеолизу, включают, например, различия в N- или C-концах после экспрессии в разных типах клеток-хозяев по причине протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-15 (как правило, 1–10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. *Cancer* 1995. 76:687–694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать с использованием дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, et al. *PNAS* 1993. 90:3574–3577).

В рамках изобретения "IL-4" относится к нативному или рекомбинантному IL-4 или его варианту, действующему в качестве агониста одной или более субъединиц рецептора IL-4 (IL-4R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, рецепторным комплексам, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие средства могут поддерживать дифференцировку наивных хелперных T-клеток (Th0-клеток) в Th2-клетки. Зрелый IL-4 человека существует в виде последовательности 129 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 24 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-4 является полипептидом, полученным посредством конкретных замен в белке

интерлейкина-4 при сохранении способности связываться с IL-4R α , как описано в патенте США № 6313272. Мутеины IL-4 могут отличаться инсерциями, делециями, заменами и модификациями аминокислот в одном или более участках в других остатках нативной полипептидной цепи IL-4. В настоящем описании любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-4, сохраняющего активность связывания IL-2R α . Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-4 человека, можно получать общепринятыми способами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность IL-4 человека (Gene ID 3565) можно найти в Genbank под регистрационным номером NG_023252. Аминокислотную последовательность IL-4 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 16189) можно найти в Genbank под регистрационным номером NC_000077.6.

Термин "IL-4" также может относиться к IL-4, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьян, коров, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут содержать консервативно замещенные последовательности, что означает, что указанный аминокислотный остаток заменяют остатком, имеющим схожие физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка другим, таким как Ile, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка другим, например, Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-4 также включены в настоящее изобретение. Примерами таких вариантов являются белки, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-4, сохраняющие связывающие свойства IL-4. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к образованию укороченного, но биологически активного белка IL-4. Вариации, приписываемые протеолизу, включают, например, различия в N- или C-концах после экспрессии в разных типах клеток-хозяев по причине протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-4 (как правило, 1–10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. *Cancer* 1995. 76:687–694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать с использованием дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, et al. *PNAS* 1993. 90:3574–3577).

В рамках изобретения термин "IL-21" относится к нативному или рекомбинантному IL-21 или его варианту, действующему в качестве агониста одной или более субъединиц рецептора IL-21 (IL-21R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, рецепторным комплексам, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Такие средства могут поддерживать пролиферацию естественных киллеров (NK) и цитотоксических

(CD8⁺) Т-клеток. Зрелый IL-21 человека существует в виде последовательности 133 аминокислот (без сигнального пептида, состоящего из дополнительных 22 N-концевых аминокислот). Мутеин IL-21 является полипептидом, полученным посредством конкретных замен в белке интерлейкина-21 при сохранении способности связываться с IL-21R α , как описано в патенте США № 9388241. Мутеины IL-21 могут отличаться инсерциями, делециями, заменами и модификациями аминокислот в одном или более участках в других остатках нативной полипептидной цепи IL-21. В настоящем описании любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-21, сохраняющего активность связывания IL-21R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-21 человека, можно получать общепринятыми способами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотную последовательность IL-21 человека (Gene ID 59067) можно найти в Genbank под регистрационным номером NC_000004.12. Аминокислотную последовательность IL-21 мыши (*Mus musculus*) (Gene ID 60505) можно найти в Genbank под регистрационным номером NC_000069.6.

Термин "IL-21" также может относиться к IL-21, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьян, коров, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут содержать консервативно замещенные последовательности, что означает, что указанный аминокислотный остаток заменяют остатком, имеющим схожие физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка другим, таким как Ile, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка другим, например, Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-21 также включены в настоящее изобретение. Примерами таких вариантов являются белки, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-21, сохраняющие связывающие свойства IL-21. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к образованию укороченного, но биологически активного белка IL-21. Вариации, приписываемые протеолизу, включают, например, различия в N- или C-концах после экспрессии в разных типах клеток-хозяев по причине протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-21 (как правило, 1–10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. *Cancer* 1995. 76:687–694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать с использованием дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, et al. *PNAS* 1993. 90:3574–3577).

В рамках изобретения термин "IL-9" относится к нативному или рекомбинантному IL-9 или его варианту, действующему в качестве агониста одной или более субъединиц

рецептора IL-9 (IL-9R) (например, его мутантам, мутеинам, аналогам, субъединицам, рецепторным комплексам, фрагментам, изоформам и пептидомиметикам). Зрелый IL-9 человека существует в виде последовательности 144 аминокислот. Мутеин IL-9 является полипептидом, полученным посредством конкретных замен в белке интерлейкина-9 при сохранении способности связываться с IL-9R. Мутеины IL-9 могут отличаться инсерциями, делециями, заменами и модификациями аминокислот в одном или более участках в других остатках нативной полипептидной цепи IL-9. В настоящем описании любые такие инсерции, делеции, замены и модификации приводят к образованию мутеина IL-9, сохраняющего активность связывания IL-9R. Примеры мутеинов могут включать замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислот.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-9 человека, можно получать общепринятыми способами, такими как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Аминокислотная последовательность IL-9 человека приведена в UniProtKB P15248.

Термин "IL-9" также может относиться к IL-9, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьян, коров, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут содержать консервативно замещенные последовательности, что означает, что указанный аминокислотный остаток заменяют остатком, имеющим схожие физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка другим, таким как Ile, Val, Leu или Ala, или замены одного полярного остатка другим, например, Lys и Arg; Glu и Asp или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих схожие характеристики гидрофобности. Природные варианты IL-9 также включены в настоящее изобретение. Примерами таких вариантов являются белки, являющиеся результатом альтернативного сплайсинга мРНК или протеолитического расщепления белка IL-9, сохраняющие связывающие свойства IL-9. Альтернативный сплайсинг мРНК может приводить к образованию укороченного, но биологически активного белка IL-9. Вариации, приписываемые протеолизу, включают, например, различия в N- или C-концах после экспрессии в разных типах клеток-хозяев по причине протеолитического удаления одной или более концевых аминокислот из белка IL-9 (как правило, 1–10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления конец белка можно модифицировать для изменения его физических свойств, например, с использованием химической группы, такой как полиэтиленгликоль (Yang, et al. *Cancer* 1995. 76:687–694). В некоторых вариантах осуществления конец или внутреннюю часть белка можно модифицировать с использованием дополнительных аминокислот (Clark-Lewis, et al. *PNAS* 1993. 90:3574–3577).

Любой один или более из указанных выше факторов можно включать в способ экспансии в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток. В рамках изобретения фраза "в количестве, эффективном для" относится к количеству, индуцирующему детектируемый результат (например, количеству клеток, имеющих статистически значимо повышенное количество относительно исходной

популяции, например, с $p < 0,05$). В случаях, когда одновременно присутствует множество факторов, термин "эффективное количество" относится к комплексному эффекту всех факторов (например, комплексному эффекту ИЛ-2 и ИЛ-15, или комплексному эффекту ИЛ-2 или ИЛ-9, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21).

Термины "агонисты пути Т-клеточного рецептора (TCR)" или "средства, активирующие путь TCR" относятся к соединениям, индуцирующим пролиферацию или другие последствия активации Т-клеток, таких как $\alpha\beta$ -Т-клетки и/или резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки крови, посредством передачи сигнала TCR. Модуляторы передачи сигнала Т-клеток функционируют посредством последовательной активации Src-родственных белковых тирозинкиназ (PTK), Lck и Fyn, и джета-цепь (TCR)-ассоциированной протеинкиназы массой 70 кДа (ZAP70). Эти PTK приводят к фосфорилированию полипептидов, включающих линкер-активатор Т-клеток (LAT), что приводит к нижележащей стимуляции с помощью регулируемой внеклеточным сигналом киназы (ERK), N-концевой киназы с-Jun (JNK) и ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Костимуляция, например, посредством CD28 и CD45, может повышать фосфорилирование и усиливать пути передачи сигнала TCR. Таким образом, любое средство, направленно воздействующее на часть TCR или костимуляторный путь, может активировать передачу сигнала Т-клеток. Агонисты пути TCR включают антитела (например, моноклональные антитела, например, антитела против TCR V δ 1, антитела против TCR δ TCR-1, антитела против TCR PAN $\gamma\delta$ и антитела против CD3), лектины (например, растительные лектины, например, конканавалин А, лектины из *Phaseolus vulgaris* (PHA-P), *Phytolacca Americana*, *Triticum vulgare*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Maackia amurensis*, *Pisum sativum* и *Sambucus nigra*), синтетические фосфоантигены (например, BrHPP (бромгидрин пиродифосфат), 2M3B1PP (2-метил-3-бутенил-1-пиродифосфат), HMBPP ((E)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпиродифосфат) или IPP (изопентенилпиродифосфат)) и N-бисфосфонаты (например, золедронат). Агонисты пути TCR включают агонистов корцептора, включая антитела (например, моноклональные антитела, например, антитела против CD2, антитела против CD6, антитела против CD9, антитела против CD28, антитела против CD43, антитела против CD94, антитела против CD160, антитела против SLAM, антитела против NKGD2, антитела против 2B4, антитела против HLA-A, антитела против HLA-b, антитела против HLA-C и антитела против ICAM-3) и белки (например, рекомбинантные белки, например, рекомбинантные белки человека, например, CD7L, CD26, CD27L, CD30L, CD40L, OX40L, 4-1BBL, ICAM-1, фибронектин, гидрокортизон и их варианты, например, Fc-слитые белки, например, CD27L-Fc). Агонисты пути TCR могут являться растворимыми или мембраносвязанными и, например, могут присутствовать на клетках, таких как искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC), как в случае комплексов MHC или HLA. В этой области известны подходящие aAPC для активации передачи сигнала Т-клеток. Подходящие способы активации Т-клеток с помощью экзогенно добавляемых агонистов пути TCR хорошо известны в этой области и приведены на фигуре 1 в Deniger, et al. (Deniger, et al. *Frontiers in Immunology*. 2014. 5(636):1-10).

Термин "экзогенные агонисты пути TCR" относится к агонистам пути TCR, не происходящим из негемопозитической ткани или ее донора (т.е. их добавляют экзогенно). Таким образом, следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления изобретения агонист пути TCR может присутствовать в культуре в виде остаточного материала из негемопозитической ткани (например, растворимый фибронектин или связанный с клетками ICAM-1). В некоторых вариантах осуществления остаточный агонист пути TCR находится в незначительной концентрации и, по существу, не активирует Т-клетки.

В рамках изобретения термины "синтетический каркас", "каркас" и "сетка" используют взаимозаменяемо, и они относятся к ненативной трехмерной структуре, подходящей для поддержки роста клеток. Эксплантат можно прикреплять к синтетическому каркасу для облегчения выхода лимфоцитов из эксплантата на каркас. Синтетические каркасы можно конструировать из природных и/или синтетических материалов, таких как полимеры (например, природные или синтетические полимеры, например, поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (например, трифосфат кальция, алюминат кальция, гидроксипатит кальция) или металлы (тантал, титан, платина и металлы в той же группе элементов, что и платина, ниобий, гафний, вольфрам и комбинации их сплавов). Биологические факторы (например, коллагены (например, коллаген I или коллаген II), фибронектины, ламинины, интегрины, ангиогенные факторы, противовоспалительные факторы, гликозаминогликаны, витрогены, антитела и их фрагменты, цитокины (например, IL-2 или IL-15 и их комбинации) можно наносить в виде покрытия на поверхность каркаса или инкапсулировать в материале каркаса для повышения адгезии, миграции, выживания или пролиферации клеток известными в этой области способами. Эти и другие способы можно использовать для выделения лимфоцитов из ряда других типов негемопозитических тканей, например, кишечника, предстательной железы и молочной железы. Примером синтетического каркаса, предусмотренного для использования в качестве части настоящего изобретения, включают каркас, используемый в способе Clark.

В рамках изобретения термины "отделение", "отделенный" или "отделять" относятся к действию разрыва или запрета физического контакта между отдельными популяциями клеток (например, отделению гемопозитических клеток (например, лимфоцитов) от негемопозитических клеток). Отделение можно осуществлять, например, посредством интенсивного пипетирования смешанной популяции клеток для разрыва межмембранных ассоциаций, или посредством индукции "выхода" популяции клеток из, например, матрикса ткани, посредством культивирования, например, с хемокинами или цитокинами, как описано Carrasco, et al. (Carrasco A. et al. *Journal of Immunological Methods* 2013. 389(1-2):29-37). Отделение можно поддерживать во время культивирования с использованием системы культивирования Transwell или схожих способов культивирования, предотвращающих контакт между отдельными популяциями клеток.

В рамках изобретения термин "отделенная популяция $\gamma\delta$ -клеток" относится к популяции гемопозитических клеток, включая $\gamma\delta$ -клетки, отделенных от негемопозитической

ткани, из которой они происходят, таким образом, что они находятся вне значительного контакта с негемопозитическими клетками (например, в любом из способов отделения, представленных в настоящем описании). Аналогично, термин "отделенная популяция V δ 1-T-клеток" относится к популяции гемопозитических клеток, включая V δ 1-T-клетки, отделенных от негемопозитической ткани, из которой они происходят, таким образом, что они находятся вне значительного контакта с негемопозитическими клетками (например, в любом из способов отделения, представленных в настоящем описании). Таким образом, в этих случаях термин "отделение" относится к отделению гемопозитических клеток (например, лимфоцитов) от негемопозитических клеток (например, стромальных клеток и/или эпителиальных клеток).

Термин "антитело" используют в самом широком смысле, и он конкретно охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желательную биологическую активность.

В рамках изобретения термин "стадия экспансии" относится к фазе культивирования, осуществляемой после отделения, в которой количество конкретной $\gamma\delta$ -T-клетки повышают посредством деления клеток. Следует понимать, что деление клеток может происходить во время фазы отделения, в то время как $\gamma\delta$ -T-клетки контактируют со стромальными клетками, но стадию экспансии не начинают до завершения отделения. Таким образом, если отделенную популяцию клеток охарактеризовывают как находящуюся "перед стадией экспансии", это означает момент времени после разделения культуры и перед экспансией культуры.

В рамках изобретения термин "подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ клеток" относится к популяции гемопозитических клеток, включая $\gamma\delta$ -T-клетки, культивируемых в условиях и в течение времени, индуцирующих экспансию $\gamma\delta$ -клеток, т.е. увеличивающих количество $\gamma\delta$ -клеток. Аналогично, в рамках изобретения термин "подвергнутая экспансии популяция V δ 1-T-клеток" относится к популяции гемопозитических клеток, включая V δ 1-T-клетки, культивируемых в условиях и в течение времени, индуцирующих экспансию V δ 1-T-клеток, т.е. увеличивающих количество V δ 1-клеток.

В рамках изобретения термин "фидерная клетка" относится к любой экзогенной клетке, добавляемой в культуру для обеспечения межклеточного поверхностного контакта для полученных из негемопозитической ткани клеток. Фидерные клетки могут являться первичными клетками (например, полученными из ткани) или полученными из линии клеток. Фидерные клетки могут являться живыми или облученными и включают опухолевые клетки, фибробласты, В-клетки и другие антигенпрезентирующие клетки.

В настоящем описании термин "маркер" относится к ДНК, РНК, белку, углеводу, гликолипиду или клеточному молекулярному маркеру, экспрессию или наличие которого в образце пациента можно определять стандартными способами (или способами, представленными в настоящем описании).

Клетка или популяция клеток, "экспрессирующих" интересующий маркер, является клеткой или популяцией, в которых, как определяют, присутствуют мРНК, кодирующая белок, или сем белок, включая его фрагменты. Экспрессию маркера можно определять различными способами. Например, в некоторых вариантах осуществления термин "экспрессия маркера" относится к поверхностной плотности маркера на клетке. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI), например, как используют в качестве считывания данных проточной цитометрии, соответствует плотности маркера на популяции клеток. Специалисту в этой области будет понятно, что значения MFI зависят от параметров окрашивания (например, концентрации, длительности и температуры) и композиции флуорохрома. Однако MFI может являться количественной при рассмотрении в отношении соответствующих контролей. Например, можно указывать, что популяция клеток экспрессирует маркер, если MFI антитела против этого маркера значимо выше MFI соответствующего антитела изотипического контроля на той же популяции клеток, окрашенных в эквивалентных условиях. Дополнительно или альтернативно, можно указывать, что популяция клеток экспрессирует маркер при анализе по всем клеткам с использованием положительного и отрицательного гейтирования в общепринятых аналитических способах проточной цитометрии (например, при гейтировании по изотипу или контролю "флуоресценция минус один" (FMO)). В связи с этим, можно указывать, что популяция "экспрессирует" маркер, если количество клеток, определенных как положительные по маркеру, значимо выше фона (например, при гейтировании по изотипическому контролю).

В рамках изобретения, если экспрессию в популяции указывают как процентную долю положительных клеток, и эту процентную долю сравнивают с соответствующей процентной долей положительных клеток в референсной популяции, разница процентных долей представляет собой процентную долю родительской популяции для каждой соответствующей популяции. Например, если маркер экспрессируется на 10% клеток популяции А, и тот же маркер экспрессируется на 1% клеток популяции В, то указывают, что популяция А имеет на 9% большую долю маркер-положительных клеток, чем популяция В (т.е. $10\% - 1\%$, а не $10\% \div 1\%$). Если долю умножают на количество клеток в родительской популяции, вычисляют разницу абсолютного количества клеток. В указанном выше примере, если есть 100 клеток в популяции А и 10 клеток в популяции В, то популяция А содержит 100-кратное количество клеток относительно популяции В, т.е. $(10\% \times 100) \div (1\% \times 10)$.

Уровень экспрессии маркера может являться уровнем экспрессии нуклеиновой кислоты (например, уровнем экспрессии ДНК или уровнем экспрессии РНК, например, уровнем экспрессии мРНК). Можно использовать любой подходящий способ определения уровня экспрессии нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии нуклеиновой кислоты определяют с использованием qPCR, rtPCR, секвенирования РНК, мультиплексной qPCR или RT-qPCR, микрочипов, серийного анализа экспрессии генов (SAGE), способа MassARRAY, гибридизации *in situ* (например,

FISH) или их комбинаций.

В рамках изобретения термин "референсная популяция" клеток относится к популяции клеток, соответствующей интересующим клеткам, относительно которой измеряют фенотип интересующих клеток. Например, уровень экспрессии маркера на отделенной популяции полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -клеток можно сравнивать с уровнем экспрессии того же маркера на полученной из гемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клетке (например, резидентной $\gamma\delta$ -клетке крови, например, резидентной $\gamma\delta$ -клетке крови, полученной из того же донора или другого донора) или полученной из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клетке, подвергнутой экспансии в других условиях (например, в присутствии значительной активации TCR, в присутствии экзогенного средства активации TCR (например, антитела против CD3) или в значительном контакте со стромальными клетками (например, фибробластами)). Популяцию также можно сравнивать с ней самой на более ранней стадии. Например, референсной популяцией может являться отделенная популяция клеток перед экспансией. В этом случае подвергнутой экспансии популяцию сравнивают с ее собственной композицией перед стадией экспансии, т.е. в этом случае ее прошлая композиция является референсной популяцией.

Термин "злокачественное новообразование" относится к аномальной пролиферации злокачественных клеток и включает лейкозы, такие как острый миелолейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый лимфобластный лейкоз (ALL) и хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфомы, такие как лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома и множественная миелома, и солидные злокачественные новообразования, такие как саркомы, рак кожи, меланома, рак мочевого пузыря, злокачественное новообразование головного мозга, рак молочной железы, рак матки, рак яичника, рак предстательной железы, рак легких, колоректальный рак, рак шейки матки, рак печени, рак головы и шеи, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак почки, рак надпочечника, рак желудка, рак яичка, рак желчного пузыря и желчных путей, рак щитовидной железы, рак тимуса, злокачественное новообразование костной ткани и злокачественное новообразование головного мозга.

Злокачественные клетки у пациента со злокачественным новообразованием могут иммунологически отличаться от нормальных соматических клеток индивидуума (например, злокачественная опухоль может являться иммуногенной). Например, злокачественные клетки могут вызывать системный иммунный ответ у пациента со злокачественным новообразованием против одного или более антигенов, экспрессируемых злокачественными клетками. Антигены, вызывающие иммунный ответ, могут являться опухолевыми антигенами или могут быть общими с нормальными клетками. У пациента со злокачественным новообразованием можно наблюдать по меньшей мере один идентифицируемый признак, симптом или лабораторный показатель, достаточный для постановки диагноза злокачественного новообразования в соответствии с клиническими стандартами, известными в этой области. Примеры таких клинических стандартов можно найти в медицинских руководствах, таких как Harrison's Principles of Internal Medicine

(Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson J, Loscalzo J. eds. 18e. New York, NY: McGraw–Hill; 2012). В некоторых случаях диагностика злокачественного новообразования у индивидуума может включать идентификацию конкретного типа клеток (например, злокачественной клетки) в образце физиологической жидкости или ткани, полученном из индивидуума.

В рамках изобретения "солидная опухоль" является любым злокачественным новообразованием ткани организма, иной, чем кровь, костный мозг или лимфатическая система. Солидные опухоли можно дополнительно подразделять на имеющие эпителиальное происхождение и неэпителиальное происхождение. Примеры солидных опухолей эпителиальных клеток включают опухоли желудочно–кишечного тракта, ободочной кишки, молочной железы, предстательной железы, легких, почек, печени, поджелудочной железы, яичника, головы и шеи, ротовой полости, желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника, толстого кишечника, ануса, желчного пузыря, губ, носоглотки, кожи, матки, мужских половых органов, органов мочевого пузыря и кожи. Солидные опухоли неэпителиального происхождения включают саркомы, опухоли головного мозга и опухоли костной ткани.

Пациент или индивидуум, подходящий для лечения, как описано выше, может являться млекопитающим, таким как грызун (например, морская свинка, хомяк, крыса, мышь), мышинные (например, мышь), псовые (например, собака), кошачьи (например, кошка), лошадиные (например, лошадь), примат, обезьянообразные (например, мартышковые и человекообразные обезьяны), мартышковые (например, игрушка или бабуин), человекообразные обезьяны (например, горилла, шимпанзе, орангутан или гиббон) или человек.

В некоторых вариантах осуществления пациент или индивидуум является человеком. В других предпочтительных вариантах осуществления можно использовать не являющихся человеком млекопитающих, в частности млекопитающих, общепринято используемых в качестве моделей для демонстрации терапевтической эффективности у людей (например, мышей, приматов, свиней, собак или кроликов).

В рамках изобретения термин "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить") относится к клиническому вмешательству в отношении человека или животного (например, в ветеринарии), при котором достигают некоторого желаемого терапевтического эффекта, например, ингибирования или задержки прогрессирования состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, прекращение прогрессирования, улучшение состояния, излечение или ремиссию (частичную или полную) состояния, профилактику, задержку, ослабление или купирование одного или более симптомов и/или признаков состояния или пролонгирования выживания индивидуума или пациента сверх ожидаемого в отсутствие лечения.

Также включено лечение в качестве профилактической меры (т.е. профилактика). Например, пациента или индивидуума, склонного или имеющего риск развития или рецидивирования злокачественного новообразования, можно лечить, как представлено в

настоящем описании. Такое лечение может предотвращать или задерживать развитие или рецидивирование злокачественного новообразования у пациента или индивидуума.

В частности, лечение может включать ингибирование роста злокачественного новообразования, включая полную ремиссию злокачественного новообразования, и/или ингибирование метастазирования злокачественного новообразования. Термин "рост злокачественного новообразования", как правило, относится к любому из ряда показателей, свидетельствующих об изменении злокачественного новообразования в более развитую форму. Таким образом, показатели для измерения ингибирования роста злокачественного новообразования включают снижение выживания злокачественных клеток, уменьшение объема опухоли или изменение морфологии (например, как определяют с использованием компьютерной томографии (КТ), ультразвукового исследования или другого способа визуализации), замедление роста опухоли, деструкцию сосудистой сети опухоли, улучшение результатов кожного теста реакции гиперчувствительности замедленного типа, повышение активности цитолитических Т-лимфоцитов и снижение уровней опухолеспецифических антигенов. Снижение иммунной супрессии в злокачественных опухолях у индивидуума может улучшать способность индивидуума сопротивляться росту злокачественного новообразования, в частности, росту злокачественного новообразования, уже имеющегося у индивидуума, и/или снижению предрасположенности к росту злокачественного новообразования у индивидуума.

В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетки (например, $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные из негемопозитической ткани, например, V δ 1-Т-клетки, полученные из негемопозитической ткани) вводят для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания или нарушения.

В рамках изобретения термин "введение" означает способ введения пациенту дозы терапевтического средства (например, адоптивного Т-клеточного терапевтического средства, содержащего, например, полученные из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -Т-клетки) или композиции (например, фармацевтической композиции, например, фармацевтической композиции, включающей $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные из негемопозитической ткани). Композиции, используемые в способах, представленных в настоящем описании, можно вводить, например, внутримышечно, внутривенно, внутривожно, чрезкожно, внутриартериально, интраперитонеально, в очаг повреждения, интракраниально, внутрисуставно, в предстательную железу, внутривлевро, интратрахеально, интратекально, интраназально, внутривлагалищно, внутрипрямокишечно, местно, внутриопухолево, перитонеально, подкожно, субконъюнктивально, интравезикулярно, в слизистые оболочки, интраперикардially, интраумбиликально, внутривидным способом, интраорбитально, интравитреально (например, посредством интравитреальной инъекции), с помощью глазных капель, перорально, местно, трансдермально, посредством ингаляции, инъекции, имплантации, инфузии, непрерывной инфузии, локальной перфузии, омывающей непосредственно клетки-мишени, посредством катетера, лаважа, в кремах или в липидных композициях. Композиции, используемые в способах, представленных в

настоящем описании, также можно вводить системно или местно. Способ введения можно варьировать в зависимости от различных факторов (например, вводимого терапевтического средства или композиции и тяжести подвергаемого лечению состояния, заболевания или нарушения).

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству терапевтического средства для лечения или профилактики заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае злокачественных новообразований, с помощью терапевтически эффективного количества терапевтического средства (например, $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из негемопэтической ткани) можно снижать количество злокачественных клеток; уменьшать размер первичной опухоли; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, прекращать) инфильтрацию злокачественными клетками периферических органов; ингибировать (т.е. замедлять до некоторой степени и, предпочтительно, прекращать) метастазирование опухоли; ингибировать до некоторой степени рост опухоли; и/или облегчать до некоторой степени один или более симптомов, ассоциированных с нарушением. В тех случаях, когда лекарственное средство может предотвращать рост и/или уничтожать существующие злокачественные клетки, оно может являться цитостатическим и/или цитотоксическим. В случае терапии злокачественных новообразований, эффективность *in vivo*, например, можно измерять посредством оценки длительности выживаемости, времени до прогрессирования заболевания (ТТР), частоты ответов (например, полного ответа (CR) и частичного ответа (PR)), длительности ответа и/или качества жизни.

Термин "одновременно" используют в настоящем описании для обозначения введения двух или более терапевтических средств, где по меньшей мере часть введения перекрывается по времени. Таким образом, одновременное введение включает схему дозирования, когда введение одного или более средств продолжается после прекращения введения одного или более других средств. Например, в некоторых вариантах осуществления полученную из негемопэтической ткани $\gamma\delta$ -Т-клетку и IL-2 можно вводить одновременно.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, находящемуся в такой форме, которая позволяет биологической активности одного или более активных ингредиентов, содержащихся в нем, быть эффективной, и несодержащему дополнительные компоненты, являющиеся неприемлемо токсичными для пациента, которому будут вводить состав.

III. Способы отделения и экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток

Изобретение относится к способам выделения и экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) из любой негемопэтической ткани человека или не являющегося человеком животного, которую можно удалять или удалили из пациента. В некоторых вариантах осуществления негемопэтическая ткань, из которой получают и подвергают экспансии $\gamma\delta$ -Т-клетки, является кожей (например, кожей человека), которую можно получать

известными в этой области способами. В некоторых вариантах осуществления кожу получают посредством щипковой биопсии. Альтернативно, способы выделения и экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, представленные в настоящем описании, можно использовать по отношению к желудочно-кишечному тракту (например, толстому кишечнику), молочной железе, легкому, предстательной железе, печени, селезенке и поджелудочной железе. $\gamma\delta$ -Т-клетки также могут являться резидентными для злокачественных тканей человека, например, опухолей молочной железы или предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки можно получать из злокачественных тканей человека (например, тканей солидной опухоли). В других вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки можно получать из негемопозитической ткани, иной, чем злокачественная ткань человека (например, ткань без значительного количества опухолевых клеток). Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно получать из области кожи (например, здоровой кожи) отдельно от близлежащей или смежной злокачественной ткани.

$\gamma\delta$ -Т-клетки, преобладающие в крови, являются, главным образом, V δ 2-Т-клетками, в то время как $\gamma\delta$ -Т-клетки, преобладающие в негемопозитических тканях, являются, главным образом, V δ 1-Т-клетками, таким образом, что V δ 1-Т-клетки составляют приблизительно 70–80% популяции резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани. Однако в негемопозитических тканях также обнаруживают некоторые V δ 2-Т-клетки, например, в кишечнике, где они могут составлять приблизительно 10–20% $\gamma\delta$ -Т-клеток (фиг. 6). Некоторые $\gamma\delta$ -Т-клетки, являющиеся резидентными в негемопозитических тканях, не экспрессируют ни V δ 1, ни V δ 2 TCR, и авторы настоящего изобретения назвали их двойными отрицательными (DN) $\gamma\delta$ -Т-клетками. Эти DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки, вероятно, являются, главным образом, V δ 3-экспрессирующими Т-клетками с незначительной долей V δ 5-экспрессирующих Т-клеток. Таким образом, $\gamma\delta$ -Т-клетки, как правило, являющиеся резидентными в негемопозитических тканях и подвергнутые экспансии способом по изобретению, предпочтительно, являются не-V δ 2-Т-клетками, например, V δ 1-Т-клетками, за исключением меньших количеств DN- $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Специалистам в этой области следует понимать, что некоторые негемопозитические ткани могут являться хорошо васкуляризованными, и, на практике, образец негемопозитической ткани подвержен контаминации резидентными клетками периферической крови. Во избежание или для минимизации такой контаминации, необходимо обеспечивать исключение периферической крови из культур для выделения и экспансии известными в этой области способами, например, тщательно промывая ткань подходящим буфером для удаления резидентных клеток крови. Например, в некоторых вариантах осуществления популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток, выделенных из ткани легкого, не получают посредством бронхоальвеолярного лаважа.

Отделение резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей от негемопозитической ткани

В некоторых вариантах осуществления критической стадией является умышленное

отделение, например, через несколько дней или недель культивирования, резидентных Т-клеток негемопозитической ткани (например, в смешанной популяции лимфоцитов, которая, например, может содержать $\alpha\beta$ -клетки, естественные киллеры (NK), В-клетки и $\gamma\delta 2$ -Т-клетки и не- $\gamma\delta 2$ -Т-клетки) от негемопозитических клеток (например, стромальных клеток, в частности фибробластов) ткани, из которой получали Т-клетки. Это делает возможной преференциальную и быструю экспансию полученных из негемопозитической ткани $V\delta 1$ -Т-клеток и DN- $\gamma\delta$ -Т-клеток в течение следующих дней и недель.

Изобретение относится к способам, включающим отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, не- $V\delta 2$ -Т-клеток, например, $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN-Т-клеток) от негемопозитической ткани (например, кожи, например, кожи, полученной посредством щипковой биопсии). В одном из вариантов осуществления отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопозитических клеток включает культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток и негемопозитических клеток на синтетическом каркасе, сконфигурирован для облегчения выхода клеток из негемопозитической ткани. Можно использовать любой каркас, подходящий для отделения лимфоцитов от солидной ткани. Синтетические каркасы можно конструировать из природных и/или синтетических материалов, таких как полимеры (например, природные или синтетические полимеры, например, поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (например, трифосфат кальция, алюминат кальция, гидроксипатит кальция), или металлы (тантал, титан, платина и металлы в той же группе элементов, что и платина, ниобий, гафний, вольфрам и комбинации их сплавов). Биологические факторы (например, коллагены (например, коллаген I или коллаген II), фибронектины, ламинины, интегрины, ангиогенные факторы, противовоспалительные факторы, гликозаминогликаны, витрогены, антитела и их фрагменты, цитокины (например, IL-2 или IL-15 и их комбинации), хемокины и/или хемоаттрактанты можно наносить в виде покрытия на поверхность каркаса или инкапсулировать в материале каркаса для повышения адгезии, миграции, выживания или пролиферации клеток известными в этой области способами. В некоторых вариантах осуществления синтетический каркас является каркасом Cellfoam, как описано в способе Clark. Альтернативно, можно использовать другие способы выделения лимфоцитов из ряда других типов негемопозитических тканей, например, посредством ферментативной деградации компонентов внеклеточного матрикса (например, с помощью коллагеназы).

Раздельное культивирование можно осуществлять в течение любого периода времени от 1 часа (например, в случае простого расщепления) до 42 дней (в случае культивирования на каркасе). В случаях, в которых стадию отделения осуществляют на каркасе, культивирование можно осуществлять в течение по меньшей мере 5 дней (например, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 24 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней или по меньшей мере 40 дней, например,

от 7 до 14 дней, от 14 до 21 дня или от 21 до 35 дней, например, приблизительно 14 дней или приблизительно 21 день).

Во время отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) негемопэтическую ткань и полученные из нее клетки можно культивировать в присутствии биологических факторов для повышения выхода из ткани или для стимуляции жизнеспособности одной или более субпопуляций клеток. В некоторых вариантах осуществления отдельная культура включает ИЛ-2, например, ИЛ-2 в концентрации по меньшей мере 10 МЕ/мл (например, от 10 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 800 МЕ/мл, от 25 МЕ/мл до 750 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 700 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 600 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 250 МЕ/мл или от 100 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, например, от 10 МЕ/мл до 20 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 30 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 40 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 75 МЕ/мл, от 75 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 500 МЕ/мл или от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл). В некоторых вариантах осуществления отдельная культура включает ИЛ-2 в концентрации приблизительно 100 МЕ/мл. Дополнительно или альтернативно, отдельная культура может включать ИЛ-15, например, ИЛ-15 в концентрации по меньшей мере 0,1 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1000 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления отдельная культура включает ИЛ-15 в концентрации приблизительно 20 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток от негемопэтической ткани включает культивирование в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15, каждый в любой из указанных выше концентраций. В некоторых случаях, концентрация ИЛ-2 составляет приблизительно 100 МЕ/мл, и концентрация ИЛ-15 составляет 20 нг/мл.

$\gamma\delta$ -Т-клетки (например, полученные из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетки и/или не-V δ 2-Т-клетки, например, V δ 1-Т-клетки и/или DN-Т-клетки) можно культивировать в отсутствие ИЛ-6, ИЛ-23 и ИЛ-1 β или в присутствии низких концентраций этих цитокинов (например, менее 20 нг/мл), т.к. добавление этой комбинации цитокинов может снижать пролиферацию резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток).

После отделения от негемопэтической ткани (например, кожи) $\gamma\delta$ -Т-клетки, как правило, будут частью более крупной популяции лимфоцитов, содержащей, например, $\alpha\beta$ -Т-клетки, В-клетки и естественные киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления 1%-10% отделенной популяции лимфоцитов представляют собой $\gamma\delta$ -Т-клетки перед экспансией (например, 1-10% отделенной популяции полученных из кожи лимфоцитов являются $\gamma\delta$ -Т-клетками перед экспансией). В большинстве случаев популяция $\gamma\delta$ -Т-

клеток (например, полученная из кожи популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток) будет включать крупную популяцию $V\delta 1$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления 1–10% отделенной популяции лимфоцитов (например, полученных из кожи лимфоцитов) представляют собой $V\delta 1$ -Т-клетки перед экспансией (например, $V\delta 1$ -Т-клетки могут представлять собой более 50%, более 60%, более 70%, более 80% или более 90% отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией). В некоторых случаях менее 10% отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой $V\delta 2$ -Т-клетки перед экспансией (например, менее 10% отделенной популяции полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой $V\delta 2$ -Т-клетки перед экспансией).

Не- $V\delta 1$ -Т-клетки или не-DN-Т-клетки, такие как $V\delta 2$ -Т-клетки, $\alpha\beta$ -Т-клетки, В-клетки или NK-клетки, можно удалять из отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, до, во время или после экспансии).

Перед экспансией отделенные $\gamma\delta$ -Т-клетки (например, $\gamma\delta$ -Т-клетки, отделенные от кожи, например, $V\delta 1$ -Т-клетки, отделенные от кожи) имеют фенотип, отличающийся от соответствующих полученных из гемопоэтической ткани клеток (например, полученных из крови $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, полученных из крови $V\delta 2$ -Т-клеток). Например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может экспрессировать более высокий уровень CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103, чем референсная популяция, например, TCR-активированная популяция резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей, или соответствующая популяция полученных из гемопоэтической ткани клеток (например, полученных из крови $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, полученных из крови $V\delta 2$ -Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR3⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR4⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR7⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CCR8⁺ клеток; и/или по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CD103⁺ клеток. Отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может экспрессировать один или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более или все шесть из CCR3, CCR4, CCR7, CCR8 или CD103.

В некоторых вариантах осуществления отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, полученных из кожи $V\delta 1$ -Т-клеток) экспрессирует более высокий уровень NKGD2, CD56, CD69 и/или TIM3, чем референсная популяция, например, TCR-активированная популяция резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей, или соответствующая популяция полученных из гемопоэтической ткани клеток (например, полученных из крови $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, полученных из крови $V\delta 2$ -Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток включает по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более NKGD2⁺ клеток; по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более CD56⁺ клеток; по меньшей мере 5%,

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

Отделенную популяцию полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток, например, полученных из кожи V δ 1-T-клеток) также можно охарактеризовывать по ее функции. Можно осуществлять функциональные анализы, известные в этой области и проиллюстрированные в примере 3, для определения функциональных различий между любой полученной из негемопозитической ткани клетки по изобретению (например, отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, например, полученных из кожи V δ 1-T-клеток, или подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, например, полученных из кожи V δ 1-T-клеток) и референсной клеткой (например, TCR-активированной популяцией резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей или соответствующей популяции полученных из гемопозитической ткани клеток, например, полученных из крови $\gamma\delta$ -T-клеток, например, полученных из крови V δ 2-T-клеток). В некоторых вариантах осуществления отделенная популяция полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток, не находящаяся в контакте со значительной активацией пути TCR) секретирует более высокий уровень IL-13, чем референсная популяция (например, TCR-активированная популяция резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей, например, активированная антителом против CD3 популяция резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей). Например, отделенная популяция полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток) может секретировать в 1,1 раз, 1,2 раз, 1,3 раз, 1,4 раз, 1,5 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз, 1000 раз или более больше IL-13, чем референсная популяция клеток (например, TCR-активированная популяция резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей, например, активированная антителом против CD3 популяция резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей). Аналогично, количество или доля полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток в отделенной популяции, секретирующих IL-13, может быть больше, чем в референсной популяции клеток (например, TCR-активированной популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей, например, активированной антителом против CD3 популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей). Например, доля IL-13-секретирующих клеток в отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток (например, доля IL-13-секретирующих клеток в отделенной популяции V δ 1-T-клеток) может быть выше, чем в референсной популяции клеток (TCR-активированной популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей, например, активированной антителом против CD3 популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток

негемопозитических тканей). В некоторых вариантах осуществления доля IL-13-секретирующих клеток в отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток (например, доля IL-13-секретирующих клеток в отделенной популяции DN-T-клеток или V δ 1-T-клеток по изобретению) составляет на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% больше, чем в референсной популяции клеток (TCR-активированной популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей, например, активированной антителом против CD3 популяции резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей).

Экспансия резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей

Настоящее изобретение относится к способам экспансии резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток). Эти способы можно осуществлять *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей подвергают экспансии из популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, отделенных от негемопозитической ткани описанными выше способами. В основном, резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей могут подвергаться спонтанной экспансии после удаления физического контакта со стромальными клетками (например, фибробластами кожи). Таким образом, способы культивирования на каркасе, описанные выше, можно использовать для индуцирования такого отделения, что приводит к дерепрессии $\gamma\delta$ -T-клеток для запуска экспансии. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления значительная активация пути TCR отсутствует на стадии экспансии (например, в культуру не включают экзогенные активаторы пути TCR). Кроме того, изобретение относится к способам экспансии резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей, где способы не включают приведение в контакт с фидерными клетками, опухолевыми клетками и/или антигенпрезентирующими клетками.

Авторы настоящего изобретения разработали способы экспансии, включающие культивирование резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей в присутствии эффективных смесей биологических факторов для поддержания эффективной экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток. В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток посредством получения популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, полученных из негемопозитической ткани (например, отделенной популяции полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток, например, популяции, отделенной способами, представленными в настоящем описании) и культивирование $\gamma\delta$ -T-клеток в присутствии IL-2, IL-4, IL-15 и/или IL-21. Эти цитокины или их аналоги можно культивировать с клетками в течение периода времени (например, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей

мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней или более, например, от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или приблизительно 21 день) и в количестве, эффективном для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления количество IL-2, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет от 1 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл (например, от 5 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 250 МЕ/мл, или приблизительно 100 МЕ/мл, например, от 5 МЕ/мл до 10 МЕ/мл, от 10 МЕ/мл до 20 МЕ/мл, от 20 МЕ/мл до 30 МЕ/мл, от 30 МЕ/мл до 40 МЕ/мл, от 40 МЕ/мл до 50 МЕ/мл, от 50 МЕ/мл до 60 МЕ/мл, от 60 МЕ/мл до 70 МЕ/мл, от 70 МЕ/мл до 80 МЕ/мл, от 80 МЕ/мл до 90 МЕ/мл, от 90 МЕ/мл до 100 МЕ/мл, от 100 МЕ/мл до 120 МЕ/мл, от 120 МЕ/мл до 140 МЕ/мл, от 140 МЕ/мл до 150 МЕ/мл, от 150 МЕ/мл до 175 МЕ/мл, от 175 МЕ/мл до 200 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 300 МЕ/мл, от 300 МЕ/мл до 400 МЕ/мл, от 400 МЕ/мл до 500 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл, от 1000 МЕ/мл до 1500 МЕ/мл, от 1500 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл или более). В некоторых вариантах осуществления количество IL-2, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет приблизительно 100 МЕ/мл.

В некоторых вариантах осуществления количество IL-4, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не- $V\delta 2$ -Т-клеток, например, $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN-Т-клеток), составляет по меньшей мере 0,1 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл, или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1000 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления количество IL-4, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет приблизительно 5 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления количество IL-15, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не- $V\delta 2$ -Т-клеток, например, $V\delta 1$ -Т-клеток и/или DN-Т-клеток), составляет по меньшей мере 0,1 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1000 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления количество IL-15, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет приблизительно 10 нг/мл.

В некоторых вариантах осуществления количество IL-21, эффективное для

получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток), составляет по меньшей мере 0,1 нг/мл (например, от 0,1 нг/мл до 10000 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 1000 нг/мл, от 5 нг/мл до 800 нг/мл, от 10 нг/мл до 750 нг/мл, от 20 нг/мл до 500 нг/мл, от 50 нг/мл до 400 нг/мл или от 100 нг/мл до 250 нг/мл, например, от 0,1 нг/мл до 1,0 нг/мл, от 1,0 нг/мл до 5,0 нг/мл, от 5,0 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 50 нг/мл, от 50 нг/мл до 100 нг/мл, от 100 нг/мл до 200 нг/мл, от 200 нг/мл до 500 нг/мл или от 500 нг/мл до 1000 нг/мл). В некоторых вариантах осуществления количество ИЛ-21, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет приблизительно 10 нг/мл. В других вариантах осуществления количество ИЛ-21, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, составляет приблизительно 10 нг/мл.

В настоящем описании также предусмотрены замена или добавление других факторов в культуру для экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей. Например, в некоторых вариантах осуществления в дополнение к ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21 или вместо любого из них включают любой один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-33, IGF-1, ИЛ-1 β , тромбоцитарного лизата человека (HPL) и фактора стромальных клеток-1 (SDF-1). Подходящие концентрации каждого из этих факторов приведены в примере 3 в таблице 2.

Следует понимать, что количество каждого из указанных выше цитокинов, необходимых для получения подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, будет зависеть от концентраций одного или более из других цитокинов. Например, если концентрацию ИЛ-2 повышают или снижают, таким образом, можно снижать или повышать концентрацию ИЛ-15, соответственно. Как указано выше, термин "количество, эффективное для получения подвергнутой экспансии популяции" в настоящем описании относится к комплексному эффекту всех факторов в отношении экспансии клеток.

В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию каждого из факторов (например, $\gamma\delta$ -Т-клетки одновременно подвергают воздействию ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-15 и ИЛ-21, например, в течение по меньшей мере 5 дней). В других случаях $\gamma\delta$ -Т-клетки подвергают воздействию некоторых факторов перед культивированием с другими факторами. Например, культуру для экспансии можно постепенно дополнять дополнительными факторами в течение экспансии, или, альтернативно, $\gamma\delta$ -Т-клетки можно переносить из культуры с одним фактором или группой факторов в другую.

В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки подвергают экспансии в культуре в течение периода от нескольких часов (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18 или 21 часа) до приблизительно 35 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней). В одном из вариантов осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки подвергают экспансии в течение периода от 14 до 21 дня. Таким образом, включая период отдельного культивирования

(например, от 1 до 40 дней, например, от 14 до 21 дня), стадии отделения и экспансии в некоторых вариантах осуществления могут занимать от 28 до 56 дней или приблизительно 41 день.

Способы экспансии обеспечивают получение подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, по количеству превышающей референсную популяцию. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток больше по количеству, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии (например, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 30 раз, по меньшей мере 35 раз, по меньшей мере 40 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз или более, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии).

Таким образом, изобретение относится к способам получения крупных популяций полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) с высокой скоростью (например, посредством устранения контакта со стромальными клетками и/или стимуляции TCR или посредством культивирования в присутствии эффективного количества факторов). В некоторых вариантах осуществления на стадии экспансии, представленной в настоящем описании, осуществляют экспансию $\gamma\delta$ -Т-клеток с небольшим временем удвоения популяции, определяемым следующим уравнением:

$$\text{Время удвоения} = \frac{\text{Продолжительность} * \log(2)}{\log(\text{Конечная концентрация}) - \log(\text{Начальная концентрация})}$$

Учитывая информацию, представленную в настоящем описании, например, в примере 3 ниже, специалистам в этой области будет понятно, что изобретение относится к способам экспансии полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) при времени удвоения популяции менее 5 дней (например, менее 4,5 дней, менее 4,0 дней, менее 3,9 дней, менее 3,8 дней, менее 3,7 дней, менее 3,6 дней, менее 3,5 дней, менее 3,4 дней, менее 3,3 дней, менее 3,2 дней, менее 3,1 дней, менее 3,0 дней, менее 2,9 дней, менее 2,8 дней, менее 2,7 дней, менее 2,6 дней, менее 2,5 дней, менее 2,4 дней, менее 2,3 дней, менее 2,2 дней, менее 2,1 дней, менее 2,0 дней, менее 46 часов, менее 42 часов, менее 38 часов, менее 35 часов, менее 32 часов).

В некоторых вариантах осуществления в течение 7 дней культивирования подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, подвергнутая экспансии

мере 10000–кратное количество $\gamma\delta$ –Т–клеток относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ –Т–клеток перед экспансией). В некоторых вариантах осуществления в течение 28 дней культивирования подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток (например, подвергнутая экспансии популяция $V\delta 1$ –Т–клеток и/или DN –Т–клеток) содержит по меньшей мере 100–кратное количество $\gamma\delta$ –Т–клеток относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ –Т–клеток перед экспансией (например, по меньшей мере 110–кратное, по меньшей мере 120–кратное, по меньшей мере 130–кратное, по меньшей мере 140–кратное, по меньшей мере 150–кратное, по меньшей мере 200–кратное, по меньшей мере 300–кратное, по меньшей мере 400–кратное, по меньшей мере 500–кратное, по меньшей мере 600–кратное, по меньшей мере 700–кратное, по меньшей мере 800–кратное, по меньшей мере 900–кратное, по меньшей мере 1000–кратное, по меньшей мере 2000–кратное, по меньшей мере 3000–кратное, по меньшей мере 4000–кратное, по меньшей мере 5000–кратное, по меньшей мере 6000–кратное, по меньшей мере 7000–кратное, по меньшей мере 8000–кратное, по меньшей мере 9000–кратное, по меньшей мере 10000–кратное, по меньшей мере 12000–кратное или по меньшей мере 15000–кратное количество $\gamma\delta$ –Т–клеток относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ –Т–клеток перед экспансией).

Полученные из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ –Т–клетки (например, полученные из кожи $\gamma\delta$ –Т–клетки и/или не– $V\delta 2$ –Т–клетки, например, $V\delta 1$ –Т–клетки и/или DN –Т–клетки), подвергнутые экспансии способами по настоящему изобретению, могут иметь фенотип, хорошо подходящий для противоопухолевой эффективности. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток (например, полученные из кожи $V\delta 1$ –Т–клетки) имеют более высокую среднюю экспрессию $CD27$, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток имеет среднюю экспрессию $CD27$ по меньшей мере в 2 раза больше, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток (например, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере 4 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 6 раз, по меньшей мере 7 раз, по меньшей мере 8 раз, по меньшей мере 9 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз, по меньшей мере 20 раз, по меньшей мере 25 раз, по меньшей мере 30 раз, по меньшей мере 40 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 60 раз, по меньшей мере 70 раз, по меньшей мере 80 раз, по меньшей мере 90 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 150 раз, по меньшей мере 200 раз, по меньшей мере 300 раз, по меньшей мере 400 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 600 раз, по меньшей мере 700 раз, по меньшей мере 800 раз, по меньшей мере 900 раз, по меньшей мере 1000 раз, по меньшей мере 5000 раз, по меньшей мере 10000 раз, по меньшей мере 20000 раз или более, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ –Т–клеток).

Отдельная часть подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ –Т–клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ –Т–клеток и/или не– $V\delta 2$ –Т–клеток, например, $V\delta 1$ –Т–клеток и/или DN –Т–клеток) может иметь положительную регуляцию $CD27$, в то время как другая часть является $CD27^{low}$ или $CD27^{-}$. В этом случае доля $CD27^{+}$ клеток в подвергнутой экспансии

популяции может быть выше, чем в отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь по меньшей мере на 5% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией). В некоторых вариантах осуществления можно повышать количество CD27⁺ клеток в подвергнутой экспансии популяции относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь по меньшей мере 2-кратное количество CD27⁺ клеток относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией).

В некоторых вариантах осуществления способами экспансии по настоящему изобретению получают подвергнутую экспансии популяцию полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток), имеющих низкую экспрессию TIGIT относительно референсной популяции (например, отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем референсная популяция (например, отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток имеет среднюю экспрессию TIGIT по меньшей мере на 10% меньше, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% меньше, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток).

Отдельная часть подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) может экспрессировать TIGIT, например, высокие уровни TIGIT, в то время как другая часть является TIGIT^{low} или TIGIT⁻. В этом случае доля TIGIT⁺ клеток в подвергнутой экспансии популяции может быть ниже, чем в отделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток может иметь по меньшей мере на 5% более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%,

по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% более низкую долю TIGIT⁺ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией). В некоторых вариантах осуществления количество TIGIT⁺ клеток в подвергнутой экспансии популяции может быть ниже, чем в отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток может иметь по меньшей мере на 10% меньше TIGIT⁺ клеток относительно количества TIGIT⁺ клеток в отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% меньше TIGIT⁺ клеток относительно количества TIGIT⁺ клеток в отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией).

В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток) содержит большое количество или долю CD27⁺ клеток и низкую долю TIGIT⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток имеет высокую долю CD27⁺TIGIT⁻ клеток относительно референсной популяции (например, относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией). Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток может иметь по меньшей мере на 5% большую долю CD27⁺ TIGIT⁻ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺ TIGIT⁻ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией). В некоторых вариантах осуществления количество CD27⁺ TIGIT⁻ клеток в подвергнутой экспансии популяции может быть повышено относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток может иметь по меньшей мере 2-кратное количество CD27⁺ TIGIT⁻ клеток относительно отделенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺TIGIT⁻ клеток, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией).

В некоторых случаях средняя экспрессия TIGIT на популяции CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток в подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток) является низкой относительно референсной популяции. В некоторых вариантах осуществления

подвергнутая экспансии популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток имеет более низкую среднюю экспрессию TIGIT, чем референсная популяция (например, отделенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток перед стадией экспансии). В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток имеет среднюю экспрессию TIGIT по меньшей мере на 10% меньше, чем отделенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток (например, на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% меньше, чем отделенная популяция CD27⁺ $\gamma\delta$ -T-клеток).

Дополнительно или альтернативно, медиана экспрессии CD27 на популяции TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток в подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток) является высокой относительно референсной популяции. Например, подвергнутая экспансии популяция TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток может иметь по меньшей мере на 5% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией). В некоторых вариантах осуществления количество CD27⁺ клеток в подвергнутой экспансии популяции может быть повышено относительно отделенной популяции TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток. Например, подвергнутая экспансии популяция TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток может содержать по меньшей мере 2-кратное количество CD27⁺ клеток относительно отделенной популяции TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией (например, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или до 100% большую долю CD27⁺ клеток, чем отделенная популяция TIGIT⁻ $\gamma\delta$ -T-клеток перед экспансией).

Повышение или снижение экспрессии других маркеров можно дополнительно или альтернативно использовать для характеристики одной или более подвергнутых экспансии популяций полученных из негемопозитической ткани $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток), включая CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганд, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30, CD2, NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64. В некоторых случаях подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток и/или не-V δ 2-T-клеток, например, V δ 1-T-клеток и/или DN-T-клеток) имеет более высокую среднюю экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31,

KLRG1, CD30 и CD2, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, перед экспансией. Дополнительно или альтернативно, подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) может иметь более высокую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD124, CD215, CD360, CTLA4, CD1b, BTLA, CD39, CD45RA, Fas-лиганда, CD25, ICAM-1, CD31, KLRG1, CD30 и CD2, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) имеет более низкую среднюю экспрессию одного или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток. Подвергнутая экспансии популяция аналогичным образом может иметь более низкую долю клеток, экспрессирующих один или более из маркеров, выбранных из группы, состоящей из NKp44, NKp46, ICAM-2, CD70, CD28, CD103, NKp30, LAG3, CCR4, CD69, PD-1 и CD64, чем отделенная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Таким образом, резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, могут иметь одно или более из следующих свойств: (i) имеют фенотип CD69^{high}, TIM3^{high} и CD28^{low/absent}; (ii) имеют положительную регуляцию одного или более из CCR3, CD39, CD11b и CD9; (iii) продуцируют ИФН γ в ответ на лиганд NKG2D в отсутствие агонистов TCR; (iv) продуцируют IL-13 в отсутствие агонистов TCR; (v) продуцируют один или более из ИФН γ , ФНО α и ГМ-КСФ в ответ на активацию TCR; (vi) не продуцируют или, по существу, не продуцируют IL-17 в ответ на активацию TCR; (vii) растут в среде для культивирования, содержащей IL-2, без дополнительных факторов роста; (viii) демонстрируют ответ цитотоксических Т-клеток в отсутствие агонистов TCR; и/или (ix) демонстрируют селективную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками.

В некоторых случаях резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, продуцируют IL-13 в отсутствие агонистов TCR и/или продуцирует ИФН γ в ответ на лиганд NKG2D в отсутствие агонистов TCR.

Доступно множество базальных сред для культивирования, которые можно использовать для пролиферации $\gamma\delta$ -Т-клеток, в частности, полные среды, такие как AIM-V, среда Искова и RPMI-1640 (Life Technologies). Среду можно дополнять другими факторами для сред, такими как сыворотка, белки сыворотки и средства селекции, такие как антибиотики. Например, в некоторых вариантах осуществления среда RPMI-1640 содержит 2 mM глутамина, 10% FBS, 10 mM HEPES, pH 7,2, 1% пенициллина-стрептомицина, пируват натрия (1 mM; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 мкM Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser; 1-кратные заменимые аминокислоты для MEM, Life Technologies) и 10 мкл/L β -меркаптоэтанола. Условно, клетки культивируют при 37°C во влажной камере, содержащей 5% CO₂, в подходящей среде для

культивирования.

$\gamma\delta$ -Т-клетки можно культивировать, как представлено в настоящем описании, в любой подходящей системе, включая ферментеры с перемешиванием, эрлифтные ферментеры, роллерные флаконы, культуральные мешки или чашки и другие биореакторы, в частности, половолоконные биореакторы. Использование таких систем хорошо известно в этой области. Общие способы культивирования лимфоцитов хорошо известны в этой области.

Способы, представленные в настоящем описании, могут включать несколько стадий селекции, например, несколько стадий истощения. Обогащение популяции Т-клеток посредством отрицательной селекции можно осуществлять, например, с использованием комбинации антител против поверхностных маркеров, уникальных для подвергнутых отрицательной селекции клеток. Одним из способов является сортировка клеток и/или селекция посредством отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которых используют смесь моноклональных антител против поверхностных клеточных маркеров, присутствующих на клетках, подвергаемых отрицательной селекции.

IV. Фармацевтические композиции и способы лечения

$\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные способом по изобретению, можно использовать в качестве лекарственного средства, например, для адоптивной Т-клеточной терапии. Это включает перенос $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных способом по изобретению, пациенту. Терапевтическое средство может являться аутологичным, т.е. $\gamma\delta$ -Т-клетки можно переносить обратно тому же пациенту, из которого их получали, или терапевтическое средство может являться аллогенным, т.е. $\gamma\delta$ -Т-клетки одного индивидуума можно переносить другому пациенту. В случаях, включающих аллогенный перенос, $\gamma\delta$ -Т-клетки, по существу, могут не содержать $\alpha\beta$ -Т-клетки. Например, $\alpha\beta$ -Т-клетки можно истощать в популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, после экспансии, любыми подходящими способами, известными в этой области (например, посредством отрицательной селекции, например, с использованием магнитных частиц). Способ лечения может включать: получение образца негемопозитической ткани, полученной от донора; культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца, как описано выше, для получения подвергнутой экспансии популяции; и введение подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму-реципиенту.

Пациент или индивидуум, подвергаемый лечению, предпочтительно, является пациентом-человеком со злокачественным новообразованием (например, пациентом-человеком со злокачественным новообразованием, подвергаемым лечению солидной опухоли) или пациентом с вирусной инфекцией (например, пациентом с инфекцией CMV или инфекцией ВИЧ). В некоторых случаях пациента подвергали и/или подвергают лечению солидной опухоли.

Т.к. в норме они являются резидентными в негемопозитических тканях, резидентные V δ 1-Т-клетки и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки ткани также, более вероятно, будут подвергаться хомингу в опухолевые массы и удерживаться в них, чем соответствующие системные резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки крови, и адоптивный перенос этих клеток, вероятно, будет более

эффективным в таргетинге солидных опухолей и, гипотетически, других ассоциированных с негемопозитическими тканями иммунопатологий.

Т.к. $\gamma\delta$ -Т-клетки являются не-МНС-рестрицированными, они не распознают организм, в который его переносят, как чужеродный, что означает, что менее вероятно, что они будут вызывать реакцию "трансплантат против хозяина". Это означает, что их можно использовать "в готовом виде" и переносить любому реципиенту, например, для аллогенной adoptивной Т-клеточной терапии.

Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные способами по изобретению, экспрессируют NKG2D и отвечают на лиганд NKG2D (например, MICA), сильно ассоциированный со злокачественными новообразованиями. Они также экспрессируют цитотоксический профиль в отсутствие какой-либо активации, и, таким образом, вероятно, они будут эффективными в уничтожении опухолевых клеток. Например, резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные, как представлено в настоящем описании, могут экспрессировать один или более, предпочтительно, все из ИФН γ , ФНО α , ГМ-КСФ, SCL4, IL-13, гранулина, гранзима А и В и перфорина в отсутствие какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

Таким образом, результаты, представленные в настоящем описании, являются убедительным доказательством целесообразности и пригодности для клинического применения резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей, полученных способом по изобретению, в виде "готового к использованию" иммунотерапевтического реагента. Эти клетки обладают подобной врожденной способностью к цитолизу, не имеют рестрикции по МНС и демонстрируют улучшенный хоминг к опухолям и/или удержание в них по сравнению с другими Т-клетками.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения индивидуума с опухолью в негемопозитической ткани может включать: получение образца указанной негемопозитической ткани, полученной от донора, культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца, как описано выше, для получения подвергнутой экспансии популяции и введение подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму с опухолью.

Фармацевтические композиции могут включать подвергнутые экспансии резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, как представлено в настоящем описании, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, дилуентами или эксципиентами. Такие композиции могут включать буферы, такие как нейтральный забуференный физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер и т.п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают, например, DMSO. Композиции можно составлять, например, для внутривенного введения.

В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция, по существу,

не содержит, например, эндотоксины или микоплазму, например, отсутствуют детектируемые уровни загрязнений ими.

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

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

В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей, как представлено в настоящем описании,

содержит приблизительно 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит до приблизительно 1×10^6 , $1,1 \times 10^6$, 2×10^6 , $3,6 \times 10^6$, 5×10^6 , 1×10^7 , $1,8 \times 10^7$, 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 или 5×10^8 клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит приблизительно $1,1 \times 10^6$ – $1,8 \times 10^7$ клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит приблизительно 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит по меньшей мере приблизительно 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток. В некоторых вариантах осуществления доза подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) содержит до приблизительно 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 или 5×10^9 клеток.

В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят от 10^4 до 10^6 подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или не-V δ 2-Т-клеток, например, V δ 1-Т-клеток и/или DN-Т-клеток) на кг массы тела индивидуума. В одном из вариантов осуществления индивидуума подвергают начальному введению популяции резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, начальному введению от 10^4 до 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела индивидуума, например, от 10^4 до 10^5 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела индивидуума) и одному или более (например, 2, 3, 4 или 5) последующим введениям подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей (например, одному или более последующим введениям от 10^4 до 10^6 подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей на кг массы тела индивидуума, например, от 10^4 до 10^5 подвергнутых экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоэтических тканей на кг массы тела индивидуума). В одном из вариантов осуществления одно или более последующих введений осуществляют через менее чем 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения,

например, менее чем 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. В одном из вариантов осуществления индивидууму вводят всего приблизительно 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела индивидуума за курс из по меньшей мере трех введений популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, индивидууму вводят начальную дозу 1×10^5 $\gamma\delta$ -Т-клеток, второе введение 3×10^5 $\gamma\delta$ -Т-клеток и третье введение 6×10^5 $\gamma\delta$ -Т-клеток, и, например, каждое введение осуществляют через менее чем 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, также можно использовать для терапии CAR-T. Она включает получение сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR) для перепрограммирования Т-клеток с новой специфичностью, например, специфичностью моноклонального антитела. Сконструированный TCR может сделать Т-клетки специфическими в отношении злокачественных клеток, и, таким образом, их можно использовать для иммунотерапии злокачественных новообразований. Например, Т-клетки могут распознавать злокачественные клетки, экспрессирующие опухолевый антиген, такой как опухолеассоциированный антиген, не экспрессируемый нормальными соматическими клетками из ткани индивидуума. Таким образом, CAR-модифицированные Т-клетки можно использовать для адоптивной Т-клеточной терапии, например, пациентов со злокачественными новообразованиями.

Описано использование резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток крови для CAR. Однако, резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, вероятно, являются особенно хорошими носителями для подходов CAR-T, т.к. их можно трансдуцировать с использованием химерных антиген-специфических TCR при сохранении их подобных врожденным способностей распознавать трансформированные клетки, и, вероятно, они будут иметь лучшие способности к проникновению в опухоль и удержанию в ней, чем резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки крови или обычные системные $\alpha\beta$ -Т-клетки. Кроме того, отсутствие у них MHC-зависимой презентации антигена уменьшает вероятность реакции "трансплантат против хозяина" и позволяет им направленно воздействовать на опухоли, экспрессирующие низкие уровни MHC. Аналогично, их независимость от общепринятой костимуляции, например, через вовлечение CD28, улучшает таргетинг опухолей, экспрессирующих низкие уровни лигандов для костимуляторных рецепторов.

В некоторых вариантах осуществления индивидууму можно вводить одно или более дополнительных терапевтических средств. Дополнительное терапевтическое средство может быть выбрано из группы, состоящей из иммунотерапевтического средства, цитотоксического средства, средства, ингибирующего рост, средства для лучевой терапии, антиангиогенного средства или комбинации двух или более средств. Дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно, до или после введения подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток. Дополнительное терапевтическое средство может являться иммунотерапевтическим средством, которое может воздействовать на мишень в организме индивидуума (например, собственную иммунную систему индивидуума) и/или

на перенесенные $\gamma\delta$ -Т-клетки.

Введение композиций можно осуществлять любым удобным способом. Композиции, представленные в настоящем описании, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутритропухолево, в узлы, интрамедулярно, внутримышечно, посредством внутривенной инъекции или интраперитонеально, например, посредством внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции резидентных $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей можно инъецировать непосредственно в опухоль, лимфоузел или очаг инфекции.

ПРИМЕРЫ

У большинства взрослых $V\delta 2$ -клетки в равновесном состоянии составляют лишь небольшой и очень вариабельный компонент Т-клеток крови (0,01–5%), но клетки быстро подвергаются экспансии, транзиторно достигая до ~25% $CD3^+$ клеток после стимуляции широким спектром факторов, включая многочисленных бактерий и паразитов. Основой этого ответа является $V\delta 2$ TCR-опосредованное распознавание низкомолекулярных "фосфо-функциональных фрагментов", включая гидроксил-метил-бут-2-енилпирофосфат (HMBPP), промежуточный продукт в критическом микробном пути синтеза холестерина и других липидов, используемых для модификации белков, например, посредством геранилирования или фарнезилирования. У приматов этот синтез происходит через мевалонатный путь, один из промежуточных продуктов которого, изопентенилпирофосфат (IPP), экспрессируется на очень высоких уровнях в инфицированных вирусом и трансформированных клетках, а также является мишенью $V\delta 2$ TCR-опосредованного распознавания.

Кроме того, большинство $V\delta 2$ -Т-клеток экспрессируют высокие уровни рецептора NKG2D, который может активировать или костимулировать (вместе с Т-клеточным рецептором (TCR)) цитолитические активности клеток после вовлечения лигандов NKG2D, например MICA, MICB и ULBP. Эти лиганды являются белками организма-хозяина, подвергаемыми положительной регуляции, когда клетки подвергаются воздействию таких факторов, как оксидативный или осмотический стресс или ультрафиолетовое излучение. Эти факторы способствуют гиперактивной передаче сигнала пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), которая также, как правило, подвергается дисрегуляции в солидных опухолях человека.

Способность $V\delta 2$ -Т-клеток определять трансформированные клетки с использованием их TCR и/или NKG2D вместе с их мощной цитолитической способностью и выраженной способностью презентировать антигены $CD8^+$ Т-клеткам, в совокупности спровоцировали возникновение представления о том, что $V\delta 2$ -Т-клетки можно использовать клинически для доставки противоопухолевых иммунотерапевтических средств. Этого можно достигать посредством адоптивного переноса клеток, в связи с чем невозможность рестрицирования $\gamma\delta$ -Т-клеток по МНС значительно и благоприятно ограничивает возможность реакции "трансплантат против хозяина" (GvHD). Для того чтобы достигнуть этого, резидентные $V\gamma 9V\delta 2$ $\gamma\delta$ -Т-клетки крови можно подвергать

экспансии *ex vivo* посредством добавления таких цитокинов, как интерлейкин-2 (IL-2), вместе с экзогенными TCR-активирующими средствами, такими как фосфо-функциональные фрагменты (например, BгНРР), или вместе с клинически одобренными бисфосфонатами (например, золедроновой кислотой), ингибирующими фарнезилпирофосфатсинтетазу в мевалонатном пути, таким образом, индуцируя накопление TCR-активирующего вещества, IPP. Однако, хроническая активация V γ 9V δ 2-клеток с помощью таких средств, как BгНРР, может постепенно приводить к клеточному истощению и снижению потенциальной цитотоксичности.

Альтернативно, собственные $\gamma\delta$ -T-клетки пациента можно активировать *in situ* с использованием фармакологически модифицированных форм НМВРР или клинически одобренных аминокислотных бисфосфонатов. С помощью этих подходов лечению подвергнуты более 250 пациентов со злокачественными новообразованиями, по-видимому, безопасно, но лишь с очень низкой частотой полной ремиссии. Одной из основных проблем в отношении ограниченной клинической эффективности клеток является их склонность к необратимому истощению при хроническом воздействии антигена. Второй из основных проблем является их кажущаяся неэффективность в отношении хоминга к солидным опухолям и тканям, несущим эти опухоли.

Терапия T-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T) является перспективной в клинических условиях в отношении B-клеточных злокачественных новообразованиях. Однако, что касается лечения солидных опухолей, к настоящему времени показатели CAR-T-клеток не соответствуют ожиданиям, демонстрируя меньшую эффективность в индукции полного противоопухолевого ответа и высокую частоту внеопухолевой цитотоксичности. Как и в случае $\gamma\delta$ -T-клеток периферической крови, основным препятствием для успеха подходов CAR-T в отношении солидных опухолей, вероятно, является неэффективность миграции системных CAR-T-клеток в очаги злокачественных новообразований и их удержания в этих очагах в функционально эффективном состоянии. Кроме того, т.к. CAR-T-клетки основаны на обычных $\alpha\beta$ -T-клетках, им приходится преодолевать иммуносупрессорные сигналы в микроокружении опухоли, например, передаваемые через рецептор PD1.

Могут быть преимущества, связанные с использованием $\gamma\delta$ -T-клеток в подходах CAR-T, т.к. их можно трансдуцировать с использованием реактивных в отношении опухоли, химерных, антиген-специфических TCR при сохранении их врожденных способностей распознавать трансформированные клетки с использованием таких рецепторов, как NKG2D. Таким образом, они одновременно могут подвергаться опухоли воздействию адаптивных (TCR) и врожденных (NKG2D) эффектов. Однако остается проблема кажущейся неэффективности $\gamma\delta$ -T-клеток крови человека в хоминге к опухолям в солидных тканях и их поддержании там в активной форме. Это соображение вызвало более подробное рассмотрение $\gamma\delta$ -T-клеток, как правило, являющихся резидентными в негемопозитических тканях.

Такие T-клетки мигрируют в негемопозитические ткани в рамках своего развития и,

в связи с этим, отличаются от тех Т-клеток, например, резидентных TCR $\alpha\beta$ -Т-клеток памяти ткани (TRM-клеток), инфильтрирующих ткань после системного примирования. Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки тканей лучше всего изучены на мышах, где показано, что они, помимо прочих мест, преобладают в коже, кишечнике и тканях репродуктивных органов. Показано, что многие такие клетки имеют подобные врожденным функциональные активности, посредством которых они могут отвечать на стимуляцию через активацию рецептора NKG2D. Авторы настоящего изобретения недавно получили данные, свидетельствующие о том, что кожа и кишечник человека аналогичным образом имеют крупные компартменты резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей с активностями, подобными врожденным. В исследованиях злокачественных новообразований, воспаления, атопии, аллергии и других патологий, формирующихся в негемопозитических тканях, в значительной степени не учитывали потенциальное влияние этих подобных врожденным Т-клеток человека, находящихся в тканях, в которых возникают патологические очаги.

$\gamma\delta$ -Т-клетки человека, являющиеся резидентными в негемопозитических тканях, гораздо менее изучены, т.к. их локализация затрудняет их получение, и т.к. не существует общепризнанных способов их культивирования. Эта субпопуляция содержит разнообразные клетки с не-MHC-рестрицированным цитолитическим потенциалом, которые, из-за отсутствия экспрессии V δ 2-содержащих TCR, являются полностью инертными к низкомолекулярным фосфо-функциональным фрагментам. Хотя известно несколько конкретных TCR-специфичностей для таких клеток, доступные данные позволяют предполагать, что клетки реагируют на аутоантигены, такие как эндотелиальный рецептор протеина С (EPCR), гиперэкспрессируемые инфицированными цитомегаловирусом (CMV) клетками и многими солидными опухолями. Ассоциированные с негемопозитической тканью $\gamma\delta$ -Т-клетки, как правило, также экспрессируют NKG2D. Учитывая эти свойства, и физиологическую резидентность клеток в негемопозитических тканях, таких как кожа и кишечник, адоптивный перенос таких клеток пациентам со злокачественными новообразованиями может быть значительно более эффективным при таргетинге солидных опухолей и, потенциально, других иммунопатологий.

Для исследования не-V δ 2-клеток для иммунотерапии необходимы способы экспансии клеток *in situ* или их сбор и экспансия *ex vivo* перед обратной инфузией. Внедряют последний из подходов, т.к. не существует известных TCR-активирующих средств, обладающих доказанной способностью вызывать экспансию больших количеств не-V δ 2-Т-клеток *in situ*. Для преодоления проблемы ограниченной доступности негемопозитических тканей некоторые исследователи предпринимали попытки осуществлять экспансию очень небольших количеств не-V δ 2-Т-клеток из крови, где V δ 2-экспрессирующие клетки являются преобладающей субпопуляцией, предполагая, что эти клетки являются эквивалентом резидентных не-V δ 2-Т-клеток ткани. Небольшие количества не-V δ 2-Т-клеток, обнаруживаемых в крови, подвергаются экспансии, по существу, во время активной инфекции CMV, демонстрируют превосходную реактивность

в отношении CMV по сравнению с V δ 2-T-клетками и, по-видимому, могут защищать плод человека в случаях инфекции CMV во время внутриутробного развития. Кроме того, CMV-реактивные не-V δ 2- $\gamma\delta$ -T-клетки, по-видимому, защищают пациентов с трансплантатами от реактивации CMV во время иммуносупрессии и посредством перекрестной реактивности в отношении трансформированных клеток снижают риск вторичных злокачественных новообразований. Аналогично, есть данные, позволяющие предполагать, что $\gamma\delta$ -T-клетки играют благоприятную роль в контроле инфекции ВИЧ, в случае чего не-V δ 2- $\gamma\delta$ -T-клетки подвергаются экспансии в крови относительно V δ 2-T-клеток.

Резидентные не-V δ 2 клетки крови подвергали экспансии *ex vivo* посредством добавления экзогенных средств, напрямую активирующих передачу сигнала TCR, например, с использованием такого средства, как антитело против CD3, пан- $\gamma\delta$ -TCR-специфическое антитело или фитогемагглютинин (PHA), или посредством сокультивирования стимулированных не-V δ 2-T-клеток с искусственными антигенпрезентирующими клетками (aAPC), где прямой контакт между $\gamma\delta$ -T-клетками и aAPC необходим для экспансии не-V δ 2-T-клеток *ex vivo*. Альтернативно, клетки подвергали экспансии посредством стимуляции передачи сигнала рецептора NKG2D с использованием иммобилизованного рекомбинантного MICA (лиганда NKG2D), например, как использовали для поддержания пролиферации культур $\gamma\delta$ -T-клеток *ex vivo* из эпителиальных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL). В целом, для существующих способов экспансии *ex vivo* V δ 2-экспрессирующих $\gamma\delta$ -T-клеток крови или не-V δ 2 $\gamma\delta$ -T-клеток крови необходимо добавление средств, неизменно стимулирующих активацию рецепторов TCR и/или NKG2D вместе с добавочными цитокинами, такими как IL-2. Эта комбинация активирующих рецептор сигналов и цитокинов отражает стандартный подход культивирования и экспансии T-клеток, общепринятый в научном сообществе. К настоящему времени не описан способ значительной экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток, резидентных в негемопозитической ткани. Такой способ представлен в настоящем описании.

Как часть фенотипической и функциональной характеристики резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей человека (например, $\gamma\delta$ -T-клеток кожи), авторы настоящего изобретения выделяли отличающуюся и крупную популяцию $\gamma\delta$ -T-клеток, как правило, являющихся резидентными в негемопозитических тканях и обладающих уникальными свойствами относительно $\alpha\beta$ -T-клеток и резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток крови. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что клетки демонстрируют сильные, TCR-независимые, подобные врожденным ответы на лиганды NKG2D и цитокины. В то время как в попытках экспансии первичных $\alpha\beta$ -T-клеток, как правило, используют сокультивирование с другими поддерживающими клетками в качестве источника благоприятных факторов роста, авторы настоящего изобретения неожиданно показали, что $\gamma\delta$ -T-клетки, являющиеся резидентными в коже и других негемопозитических тканях, сильно и специфически супрессируются при сокультивировании этих клеток в контакте с аутологичными дермальными фибробластами и, потенциально, другими стромальными

компонентами, такими как кератиноциты и эндотелиальные клетки. Устранение таких взаимодействий делает возможной быструю экспансию клеток в больших количествах для потенциального клинического применения.

Кроме того, в отличие от предпринятых к настоящему времени попыток осуществить экспансию полученных из крови и опухоли $\gamma\delta$ -Т-клеток, авторы настоящего изобретения показали, что такие резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки негемопозитических тканей можно подвергать экспансии без умышленного добавления каких-либо экзогенных средств, активирующих пути передачи сигнала TCR или NKG2D.

Настоящее изобретение относится к новым способам эффективного и воспроизводимого выделения и экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток из негемопозитической ткани человека или не являющегося человеком животного, такой как кожа и кишечник. Экспансию стимулируют посредством нарушения контакта полученных из негемопозитической ткани не-V δ 2-Т-клеток с аутологичными фибробластами и, потенциально, другими стромальными компонентами, и поддерживают посредством культивирования с IL-2, IL-15, IL-4 и/или IL-21.

Следующие примеры приведены для предоставления специалистам в этой области полного описания того, как осуществляют, получают и оценивают способы и соединения по настоящему изобретению, и эти примеры приведены исключительно в иллюстративных целях, а не для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением.

Пример 1. Аналитические способы

Если не указано иначе, следующие способы используют для получения результатов в последующих примерах.

Проточная цитометрия

Проточную цитометрию осуществляли с использованием следующих конъюгатов антитело-флуорохром: Ki-67-BV421, CD3-BV510, V δ 1-PerVio770, TIM-3-PE, CD9-PE, CCR3-BV421 и CD39-BV421. Образцы также окрашивали на жизнеспособность с использованием eFluor770NIR. Коммерческие антитела приобретали в Biolegend или Miltenyi. Красители для оценки жизнеспособности (ближняя ИК-область) приобретали в eBioscience. Окрашивание на Ki-67 осуществляли на клетках, фиксированных и пермеабелизованных с использованием набора с буфером для окрашивания Foxp3 (eBioscience). После завершения каждого эксперимента популяцию клеток промывали PBS и разделяли пополам. Клетки окрашивали eFluor770 NIR на жизнеспособность и промывали, а затем окрашивали с помощью TrueStain (Biolegend) во избежание неспецифического связывания окрашивающих антител. Половину образца окрашивали на указанные поверхностные маркеры, а другую половину окрашивали только на маркеры линии дифференцировки (CD3, V δ 1) и с использованием изотипического контроля, эквивалентного используемому для поверхностных маркеров. Соответствующее изотипическое антитело мыши, конъюгированное с тем же флуорохромом, использовали в той же концентрации. Изотипические контроли связываются с неизвестным антигеном человека и, таким образом, свидетельствуют о неспецифическом связывании или

ложноположительных результатах. Гистограммы представлены в сравнении с соответствующим изотипическим контролем или, где указано, FMO (фиг. 1D, 2A, 3B, 4B, 6B, 7A и 11–13). В сводках данных приведена процентная доля клеток, положительно окрашенных по указанному маркеру по сравнению с изотипическим контролем и, таким образом, на уровне, превышающем уровень для изотипического контроля. Анализ данных проточной цитометрии осуществляли с помощью FlowJo (версии 10.1).

Секвенирование РНК

V δ 1–Т–клетки из кожи человека и V δ 1–Т–клетки крови человека (после экспансии, инициированной через Т–клеточный рецептор) сортировали (FACS), центрифугировали и ресуспендировали клеточный осадок в буфере RLT. РНК получали с использованием набора RNA–Micro–plus (QIAGEN). Библиотеки РНК получали с использованием набора KAPA Stranded RNA–seq Kit с RiboErase (HMR) (KAPA BIOSYSTEMS). Осуществляли секвенирование спаренных концов с помощью HiSeq 2500 (Illumina) с использованием режима Rapid Run (длина ридов: 100 п.н.). Риды спаренных оснований длиной 101 п.н. выравнивали и количественно анализировали с использованием RSEM (v1.2.11) с Bowtie2. Риды выравнивали по транскриптому человека, значения счета подвергали log₂–преобразованию и нормализовали по квантилям.

Количественный анализ цитокинов

V δ 1–Т–клетки из кожи человека стимулировали PMA и иономицином или связанным с планшетом mAb против CD3 (ОКТ3, 5 мкг/мл) в течение 24 часов. Затем отбирали супернатанты и анализировали с использованием панели 1А цитокинов и хемокинов человека ProcartaPlex (34–плексной) от eBioscience. Анализы осуществляли с использованием Luminex FlexMap3D (Luminex Corp). Данные анализировали с помощью Microsoft Excel, показано среднее значение для 3 доноров (анализируемых в двух параллелях). Планками погрешностей указано стандартное отклонение.

Сокультивирование с фибробластами

Для каждой отдельной культуры, две чашки Петри (100×25 мм, Corning) процарапывали в нескольких местах с помощью скальпеля. Измельченные фрагменты кожи помещали на царапины. Через 5–10 минут сушки на воздухе фрагменты кожи, как правило, прилипали к чашке, и добавляли 10 мл сред Skin–Т. Среды меняли раз в неделю и собирали первичные фибробласты после обработки ACCUTASE® (Life Technologies) через 3 недели выращивания. Фибробласты высевали в 48–луночные планшеты в количестве 1×10^4 или в нижние камеры 24–луночных планшетов в количестве 2×10^4 в случае экспериментов с использованием системы Transwell. Через 2–3 дня фибробласты достигали конfluence, и начинали эксперименты по сокультивированию с использованием RPMI и указанных цитокинов, добавляя 2×10^5 смешанных лимфоцитов кожи в случае 48–луночных планшетов или 3×10^5 лимфоцитов в случае 24–луночных планшетов в нижние лунки и лунки системы Transwell.

Экспансия полученных из крови $\gamma\delta$ –Т–клеток

Полученные из крови $\gamma\delta$ –Т–клетки в PBMC можно подвергать экспансии только при

стимуляции лигандами TCR (в случае V δ 2, например, IPP, HMBPP, бисфосфонатами) или дополнении антителами для перекрестной сшивки рецептора TCR (mAb) или TCR-ассоциированной киназы CD3. Того же эффекта перекрестной сшивки TCR также можно достигать с использованием лектинов, таких как РНА. В отсутствие добавления таких TCR-стимулирующих средств $\gamma\delta$ -T-клетки в РВМС выживают в течение нескольких дней, но не могут подвергаться экспансии и оставаться в исходной композиции субпопуляции T-клеток с небольшими вариациями.

Кровь здоровых добровольцев использовали для выделения РВМС, наслаивая цельную кровь на фиколл, а затем центрифугируя при 400×g в течение 20 минут для разделения эритроцитов, плазмы крови и лимфоцитов/моноцитов. Лейкоциты осторожно собирали с помощью пипетки и четыре раза промывали холодным PBS. Клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 (Life Technologies) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Life Technologies), L-глутамином (292 мкг/мл; Life Technologies), пенициллином (100 ед./мл; Life Technologies), стрептомицином (100 мкг/мл; Life Technologies), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислоты (HEPES; 0,01 M; Life Technologies), пируватом натрия (1 mM; Life Technologies), заменимыми аминокислотами минимальной питательной среды (MEM) (1-кратными; Life Technologies) при плотности 1×10^6 на мл и дополняли IL-2 (100 ME/мл). Клетки переносили в 24-луночный планшет, покрытый моноклональным антителом против пан- $\gamma\delta$ -TCR (20 мкг/мл, клон B1, Biolegend) за 90 минут до переноса клеток. Клетки выращивали в течение 14 дней, среды меняли каждые 2-3 дня и добавляли свежие цитокины. После достижения конfluence клетки разделяли в соотношении 1:1. В этих условиях через 14 дней исходная минорная популяция $\gamma\delta$ -T-клеток, как правило, является высокоактивированной через TCR (о чем свидетельствует положительная регуляция CD69 и CD25) и в значительной степени обогащенной, состоя, в основном, из V δ 2-T-клеток, но также и V δ 1-T-клеток (до 30% от всех $\gamma\delta$ -T-клеток). Затем V δ 1-T-клетки можно выделять с использованием FACS для функционального или фенотипического (например, генетического) анализа.

Пример 2. Выделение резидентных $\gamma\delta$ -T-клеток негемопозитических тканей из кожи и кишечника

Разрабатывали трехмерный способ эксплантации кожи с использованием способа Clark. Матрицы Cellfoam (Cytomatrix Pty Ltd, Victoria, Australia) или их эквиваленты, имеющие размеры 9 мм × 9 мм × 1,5 мм, автоклавировали и инкубировали в растворе 100 мг/мл коллагена I сухожилий хвостов крыс (BD Biosciences) в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре, а затем однократно промывали PBS. Образцы кожи взрослого человека получали в пределах 3-6 часов после дерматохирургического вмешательства. Удаляли подкожный жир, а остальную ткань кожи измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм × 1 мм. Приблизительно пять фрагментов/эксплантатов кожи помещали на каждую матрицу и прижимали к ее поверхности. Каждую матрицу помещали в отдельную лунку 24-луночного планшета (Corning, содержащего 2 мл среды Skin-T

(модифицированной по способу Исков среды Дульбекко (IMDM; Life Technologies) с 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Life Technologies), L-глутамином (292 мкг/мл; Life Technologies), пенициллином (100 ед./мл; Life Technologies), стрептомицином (100 мкг/мл; Life Technologies), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (HEPES; 0,01 М; Life Technologies), пируватом натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимыми аминокислотами минимальной питательной среды (MEM) (1-кратными; Life Technologies) и 3,5 мкл/л 2-меркаптоэтанолом (Life Technologies). В течение первых 7 дней культивирования в среды добавляли амфотерицин (2,5 мкг/мл; Life Technologies). Среды обновляли три раза в неделю посредством аспирации верхнего 1 мл сред из каждой лунки и добавления 1 мл свежей среды. В начале культивирования добавляли рекомбинантный IL-2 человека (100 МЕ/мл; PROLEUKIN®; Novartis Pharmaceuticals UK Ltd) и рекомбинантный IL-15 человека (20 нг/мл; Biolegend) и во время каждого обновления сред до выделения лимфоцитов через 21–35 дней, как указано в таблице 1. Для каждого донора при культивировании отводили до 96 лунок (четыре 24-луночных планшета).

Для выделения лимфоцитов матрицы и среды переносили в центрифужную пробирку объемом 50 мл (Corning), содержащую 10 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS; Life Technologies) с 0,01 мМ HEPES (до 12 матриц/пробирку). Матрицы промывали суспензией клеток с использованием пипетки объемом 10 мл и суспензию клеток пропускали через фильтр 70 мкм (BD Biosciences) в новую центрифужную пробирку объемом 50 мл. Промывку матриц повторяли еще два раза. Среды из лунок для культивирования также аспирировали и пропускали через фильтр 70 мкм в новую центрифужную пробирку 50 мл. Лунки промывали еще два раза 1 мл 0,01 мМ HEPES/HBSS и пропускали смыв через фильтр 70 мкм. Затем клетки выделяли посредством центрифугирования (1600 об./мин. в течение 15 минут). Осадок ресуспендировали в средах Skin-T. Конечный клеточный осадок ресуспендировали в средах Skin-T для последующего анализа посредством проточной цитометрии или функциональных исследований. Если был необходим подсчет клеток, лимфоциты подсчитывали на этой стадии с помощью (1) окрашивания трипановым синим (0,4%) (Life Technologies) и гемоцитометра или (2) цитометра и анализатора CASY® модели TT (Roche). Результаты примера исследования приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1. Выход выделенных лимфоцитов на донора.

Длительность культивирования	Общее количество лимфоцитов	Количество каркасов	Лимфоциты/каркас
35 дней	$23,5 \times 10^6$	72	$3,26 \times 10^5$
32 дня	$38,87 \times 10^6$	96	$4,04 \times 10^5$
21 день	$29,9 \times 10^6$	96	$3,11 \times 10^5$
21 день	$18,0 \times 10^6$	72	$2,50 \times 10^5$
23 дня	$16,0 \times 10^6$	72	$2,22 \times 10^5$

28 дней	$10,7 \times 10^6$	23	$4,65 \times 10^5$
25 дней	$88,0 \times 10^6$	120	$7,33 \times 10^5$
22 дня	$20,0 \times 10^6$	39	$5,12 \times 10^5$
21 день	$4,1 \times 10^6$	42	$0,97 \times 10^5$
23 дня	$31,4 \times 10^6$	96	$3,27 \times 10^5$
23 дня	$15,21 \times 10^6$	72	$2,11 \times 10^5$
26 дней	$43,0 \times 10^6$	144	$2,99 \times 10^5$
32 дня	$44,5 \times 10^6$	96	$4,64 \times 10^5$
24 дня	$72,4 \times 10^6$	96	$7,54 \times 10^5$
22 дня	$46,0 \times 10^6$	96	$4,79 \times 10^5$
Средние значения:			
25 дней	$33,4 \times 10^6$	82	$3,91 \times 10^5$

Т.к. первичные образцы кишечника более подвержены контаминации, полученные биоптаты сначала промывали IMDM, содержащей 10% FCS, пенициллин (500 ед./мл), стрептомицин (500 мкг/мл), гентамицин (100 мкг/мл), амфотерицин В (12,5 мкг/мл) и метронидазол (5 мкг/мл), дважды перед измельчением и помещали на каркасы. Каркасные культуры кишечника выращивали в средах Gut-T (IMDM, 10% FCS, пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл, гентамицин 20 мкг/мл, метронидазол 1 мкг/мл). В первую неделю выращивания авторы настоящего изобретения также использовали амфотерицин В 2,5 мкг/мл, аналогично экспериментам с кожей. Среда содержала IL-2 (100 МЕ/мл) и IL-15 (20 нг/мл), и их меняли три раза в неделю. Т.к. структура кишечника является более рыхлой, чем кожа, лимфоциты собирали через одну неделю.

Пример 3. Характеризация резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопоезических тканей

$\gamma\delta$ -Т-клетки человека находятся в коже в большом количестве, главным образом V δ 2, и участвуют в ответе лимфоидных тканей "стресс-надзор" у человека

На фиг. 1A–1D показано, что кожа человека содержит значительную популяцию резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток. Используя способ Clark, авторы настоящего изобретения использовали остаточные образцы кожи человека, дополненные IL-2 и IL-15, чтобы сделать возможным разрастание резидентных лимфоцитов ткани в течение трех недель. Средний выход составлял 240000 лимфоцитов на каркас. В соответствии с опубликованными ранее данными, идентифицировали отдельные субпопуляции резидентных лимфоцитов кожи, и основная часть клеток экспрессировала обычный $\alpha\beta$ -TCR, главным образом, резидентный в ткани типа "TRM". В целом, 59,9% ($\pm 8,6\%$) CD45⁺ клеток являлись CD4⁺, и 18,3% ($\pm 2,8\%$) являлись CD8⁺ $\alpha\beta$ -Т-клетками с фракцией NK-клеток 8,7% ($\pm 3,6\%$). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили у доноров значительную популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток (в среднем 8,513% от CD45⁺ клеток, $\pm 6,564\%$) (фиг. 1A и 3D). Этот профиль лимфоцитов был высоко воспроизводимым у приблизительно 100 доноров после органотипического

культивирования и был сравнимым с недавно расщепленными образцами кожи, отличаясь лишь небольшим увеличением популяции $\gamma\delta$ -клеток, но не имеющим практической значимости, что позволяет получать гораздо более крупные и более чистые популяции лимфоцитов по сравнению со стандартными способами расщепления ткани. В соответствии с литературой, касающейся тканевой компартиментализации $\gamma\delta$ -Т-клеток человека с учетом их дельта-цепи TCR, большинство $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи человека экспрессировали V δ 1-цепь TCR, спаренную с различными γ -цепями, что определяли посредством проточной цитометрии. Это контрастирует с основной частью $\gamma\delta$ -Т-клеток периферической крови, имеющих один специфический гетеродимер TCR из V δ 2-цепи, соединенной с V γ 9, и, по существу, отсутствующих в образцах кожи человека. Однако необходимо отметить, что субпопуляция не экспрессировала ни V δ 1 TCR, ни V δ 2 TCR, и ее обозначают в настоящем описании как двойные отрицательные $\gamma\delta$ -Т-клетки (DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки; фиг. 1C).

Резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи, выращенные таким образом, демонстрировали нетерминально дифференцированный фенотип памяти, у них отсутствовала экспрессия CD45RA, и они экспрессировали различные уровни костимуляторной молекулы CCR7. Относительно обычных системных Т-клеток, резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрировали высокую экспрессию поверхностного маркера CD69 вместе с экспрессией рецептора программируемой гибели 1 (PD-1), отсутствием или низкими уровнями рецептора IL-2 α (CD25) и отсутствием костимуляторной молекулы CD28, что позволяет предполагать предшествующую или хроническую активацию (фиг. 1D). В соответствии со своей тканевой локализацией, V δ 1- и DN-клетки демонстрируют экспрессию маркеров хоминга кожи и ткани, таких как CCR4, CCR8 и интегрин α E (CD103; фиг. 7). Этот набор маркеров тканевого хоминга может оказаться благоприятным в условиях иммунотерапии. Кроме того, резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи демонстрируют высокие уровни экспрессии активирующего рецептора NKG2D (фиг. 2A), что позволяет предполагать возможную роль этих клеток в ответе лимфоидных тканей "стресс-надзор". В клетках наблюдают положительную регуляцию лигандов NKG2D, таких как MICA, MICB и ULBP, соответственно, в ответ на повреждение ДНК, активацию рецептора EGF и окислительный стресс и, таким образом, они могут позволять Т-клеткам, экспрессирующим NKG2D, идентифицировать и устранять подвергнутые стрессу или трансформированные клетки, таким образом, поддерживая гомеостаз ткани. В соответствии с этим принципом, авторы настоящего изобретения обнаружили, что резидентные $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи, подвергнутые экспансии способом по изобретению, активируются после воздействия рекомбинантных лигандов рецептора NKG2D (MICA, ULBP2), демонстрируя дегрануляцию, что измеряют по положительной регуляции лизосомально-ассоциированного мембранного белка CD107a (фиг. 2A). Этот подобный врожденному признак являлся исключительным для V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клеток, т.к. у резидентных Т-клеток тканей (фиг. 2C) и системных $\gamma\delta$ -Т-клеток отсутствовал этот ответ (фиг. 10B).

В целом, активированные резидентные V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки кожи выполняли провоспалительную Th1-смещенную цитокиновую программу (положительное

окрашивание на ИФН γ , ФНО α и ГМ-КСФ) при активации РМА/иономицином или лигандами NKG2D, например, рекомбинантным белком МІСА (фиг. 2А и 2В), таким образом, являясь доказательством подобных врожденным ответов клеток. Фактически, ответы на МІСА почти полностью отменяли, блокируя рецептор NKG2D с помощью антитела (фиг. 2В и 2С).

Известно, что $\gamma\delta$ -Т-клетки секретируют ІL-17 в условиях некоторых заболеваний, таких как псориаз и некоторые типы опухолей. $\gamma\delta$ -Т-клетки, подвергнутые экспансии способом по изобретению, продуцируют низкие уровни ІL-17 или не продуцируют его, даже после обширной активации (фиг. 2В и 8). Напротив, резидентные CD4-экспрессирующие $\alpha\beta$ -Т-клетки ткани не продуцировали ІL-17 после активации TCR (фиг. 2В). В основном, $\alpha\beta$ -Т-клетки демонстрировали гораздо более разнообразный репертуар цитокинов в ответ на РМА/иономицин по сравнению с V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетками, ограниченными Th1-смещенной программой, ассоциированной с защитой организма-хозяина.

Отделение от ткани вызывает активацию и массивную пролиферацию $\gamma\delta$ -Т-клеток ткани человека

Для дальнейшего исследования $\gamma\delta$ -Т-клеток ткани человека смешанные лимфоциты кожи переносили в лунки для культивирования клеток и дополняли ІL-2 для поддержания жизнеспособности с течением времени. Примечательно, что при отделении от стромальных и эпителиальных клеток, присутствующих в органотипической культуре, V δ 1-Т-клетки уникальным образом демонстрировали признаки активации и пролиферации без каких-либо дополнительных стимулов. В течение 7 дней в V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетках наблюдали уникальную и массивную положительную регуляцию ядерного фактора Ki-67 и повышенную поверхностную экспрессию рецептора ІL-2 α (CD25; фиг. 3В и 4В). Удивительно, но в течение трех недель и исключительно в присутствии ІL-2 полученные из ткани V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки перерастали все другие субпопуляции Т-клеток таким образом, что они составляли до 65% всех лимфоцитов кожи, увеличиваясь в количестве в среднем в 127,18 раз, в то время как количество $\alpha\beta$ -Т-клеток увеличилось лишь в 5,21 раз ($p=0,0124$), что измеряли по абсолютным количествам клеток (фиг. 3А). MFI ассоциированного с клеточным циклом ядерного фактора KI-67 в V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетках повышалась с 2664,5 ($\pm 1876,1$) до 8457,7 ($\pm 4574,2$) за 14 дней, в то время как в $\alpha\beta$ -Т-клетках за тот же период MFI снижалась с 592,8 ($\pm 390,5$) до 284,7 ($\pm 140,1$) (фиг. 3С). Это явление селективного разрастания резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток кожи можно дополнительно поддерживать с использованием дополнительного рекомбинантного ІL-15, повышающего жизнеспособность и общее количество лимфоцитов.

$\gamma\delta$ -Т-клетки кожи активно супрессируются фибробластами в зависимости от контакта

Удивительная экспансия V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клеток, описанная выше, никогда не происходила в системах органотипических культур, в которых было обширное разрастание фибробластов. Аутологичные фибробласты выращивали для прямого тестирования того,

будет ли их сокультивирование с $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клетками ингибировать экспансию Т-клеток. После трехнедельного культивирования на каркасе смешанные лимфоциты кожи высевали в лунки, пустые или содержащие заранее полученный конфлюэнтный монослой фибробластов, и в каждом случае среду дополняли экзогенным ИЛ-2 для поддержания роста Т-клеток. Кроме того, систему Transwell использовали для предотвращения прямого контакта Т-клеток с фибробластами в одной лунке, в то же время позволяя им подвергаться воздействию растворимых факторов, секретируемых фибробластами. За 14 дней сокультивирования $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клетки начинали пролиферировать в лунках, в которых не было фибробластов, и в лунках, в которых предотвращали прямой контакт Т-клеток с фибробластами. Как и ранее, во всех условиях пролиферация $\alpha\beta$ -Т-клеток была низкой. Когда Т-клеткам позволяли напрямую контактировать с фибробластами, скорость роста $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клеток за две недели значительно снижалась с 22,6-кратной ($\pm 8,07$) в лунках без контакта с фибробластами до 3,3-кратной ($\pm 0,17$) (фиг. 4А). Это опосредованное контактом ингибирование дополнительно подтверждали отсутствием положительной регуляции CD25, Ki-67 и фактора транскрипции Т-bet в $V\delta 1$ -Т-клетках в течение 7 дней по сравнению с лимфоцитами, выращенными отдельно (фиг. 4В). Некоторая форма опосредуемого тканью контроля иммунной системы, по-видимому, является фундаментальной для поддержания тканевого гомеостаза, т.к. без него есть вероятность устойчивого воспаления. Супрессорная регуляция $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клеток стромальными фибробластами, по-видимому, является примером такого контроля.

В целом, фенотип резидентных $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клеток кожи и их удивительный функциональный потенциал отражают состояние пре-активированных Т-клеток, как правило, подвергаемых контролю близлежащими дермальными фибробластами посредством зависящего от контакта механизма. Инактивация этого механизма посредством высвобождения Т-клеток из контакта с фибробластом селективным образом делает возможной экспансию $V\delta 1^{+}$ - и $DN-\gamma\delta$ -Т-клеток, в то время как другие Т-клетки кожи остаются незатронутыми.

Облегчение опосредуемого контактом ингибирования вызывает цитотоксический ТН1-смещенный цитокиновый ответ $V\delta 1$ -Т-клеток кожи

Смешанные полученные из кожи лимфоциты подвергали экспансии в течение 14 дней и использовали активируемую флуоресценцией сортировку клеток для отделения $\alpha\beta$ -Т-клеток от $\gamma\delta$ -Т-клеток, достигая чистоты до 90%. Эти высокообогащенные клетки депонировали в лунках для культивирования клеток в концентрациях 150000 клеток/лунку в среде RPMI, содержащей 10% FCS. Супернатанты собирали через 24 часа и оценивали их на широкий спектр эффекторных цитокинов с использованием анализа на основе LUMINEX®. Совершенно неожиданно, осуществление экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток (вызванное только их отделением от фибробластов) спонтанно приводило к продукции больших количеств ТН1-ассоциированных цитокинов, таких как ИФН γ ($12383,46 \pm 16618,90$ пг/мл), ГМ-КСФ ($4316,73 \pm 4534,96$ пг/мл) и провоспалительных хемокинов CCL4 ($14877,34 \pm 10935,64$ пг/мл) и CCL3 ($1303,07 \pm 757,23$ пг/мл; фиг. 5А).

Кроме того, во время экспансии клетки спонтанно продуцировали большие количества IL-13, ассоциированного с атопическими ответами, в отличие от свежeweыделенных, полученных из кожи, TCR-активированных $\gamma\delta$ -T-клеток. Другие цитокины, такие как IL-17A, продуцировались на гораздо более низких уровнях или вообще не продуцировались (фиг. 8). Высокие эффекторные потенциалы клеток можно дополнительно повышать после стимуляции рекомбинантным MICA (лигандом NKG2D), антителом против CD3 или PMA/иономицином. Для оценки цитотоксического потенциала подвергнутых экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток в отношении злокачественных клеток-мишеней авторы настоящего изобретения использовали стабильные линии трансформированных клеток в 24-часовых экспериментах по сокультивированию. V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -T-клетки демонстрировали очень высокую цитотоксическую активность в отношении клеток HeLa (клеток шейки матки) и Caco2 (клеток толстого кишечника) дозозависимым образом, превосходящую активность обычных $\alpha\beta$ -T-клеток ткани (фиг. 5B). Кроме того, опосредованную $\gamma\delta$ -клетками цитотоксичность можно сильно ингибировать, блокируя рецептор NKG2D с использованием растворимых моноклональных антител, что свидетельствует о том, что этот рецептор по меньшей мере частично участвует в надзоре за опухолями посредством дерепрессии полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток человека. Цитотоксический потенциал этих клеток дополнительно подтверждали с использованием других мишеней: HCT1954 (карцинома молочной железы), MDAMB231 (карцинома молочной железы) и HCT116 (толстый кишечник) (фиг. 9).

Резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, можно дополнительно отличать от других полученных из крови $\gamma\delta$ -T-клеток по тому, что они отвечают на лиганд NKG2D (MICA), сильно ассоциированный со злокачественными новообразованиями, в отсутствие какого-либо стимулирующего T-клеточный рецептор лиганда, например, по повышенной продукции ФНО α , ИФН γ и CD107a (фиг. 2 и фиг. 10). Они также осуществляют цитотоксический T-клеточный ответ, не подвергаясь какой-либо экзогенной фармакологической или лиганд-опосредованной активации T-клеточного рецептора, и, таким образом, являются цитотоксическими в отсутствие стимуляции (фиг. 3 и фиг. 5). Это означает, что, по сравнению с другими $\gamma\delta$ -T-клетками, $\alpha\beta$ -T-клетками или NK-клетками, резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, являются уникальными в своей способности отвечать и пролиферировать в отсутствие добавления каких-либо экзогенных средств, активирующих передачу сигнала T-клеточного рецептора (фиг. 3). Резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки негемопозитических тканей, полученные способом по изобретению, также положительно окрашивали на CD69 и PD-1, у них отсутствовала экспрессия CD28, и они экспрессировали лишь низкие уровни CD25 (см. фиг. 1D). Эту комбинацию маркеров не экспрессируют полученные из крови $\gamma\delta$ -T-клетки. Кроме того, они демонстрировали более высокую экспрессию рецепторов хоминга ткани, таких как CCR4 и CCR8, по сравнению с полученными из крови, подвергнутыми экспансии V δ 2 $\gamma\delta$ -T-клетками (фиг. 7B).

Резидентные $\gamma\delta$ -T-клетки тканей в кишечнике человека

Также идентифицировали полученную из толстого кишечника человека популяцию резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей, экспрессирующих V δ 1 T-клеточный рецептор (фиг. 6). У трех доноров эти клетки подвергали экспансии теми же способами, что и в случае клеток кожи, за период от 4 до 5 недель. Во время экспансии полученные из толстого кишечника V δ 1⁺- и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки демонстрировали схожий профиль положительной регуляции Ki-67 после их выделения из богатой фибробластами органотипической культуры клеток. Аналогично, резидентные V δ 1⁺ и DN- $\gamma\delta$ -Т-клетки толстого кишечника сильно стимулировали посредством лигандов для рецептора NKG2D. Полученные из крови $\gamma\delta$ -Т-клетки хорошо приспособлены для осуществления антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности посредством экспрессии CD16, что свидетельствует о повышенной цитотоксичности, направленной против CD20-положительной В-клеточной лимфомы, при комбинировании с ритуксимабом. Аналогично, клетки хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и клетки HER2-положительного рака молочной железы можно более эффективно уничтожать при направленном воздействии с использованием моноклональных антител. Для оценки потенциала полученных из кожи V δ 1-Т-клеток к направленному воздействию на опсонизированные антителами клетки-мишени, количественно анализировали уровни экспрессии трех IgG1-ассоциированных Fc-рецепторов CD16, CD32 и CD64. Полученные из кожи V δ 1-Т-клетки экспрессируют незначительные уровни Fc-рецептора CD16, но демонстрируют хорошие уровни экспрессии высокоаффинного IgG-рецептора CD64 (фиг. 11). Таким образом, полученные из ткани V δ 1-Т-клетки могут быть хорошо приспособлены для использования в качестве адъюванта для терапии моноклональными антителами, такой как терапия, направленная на CD20 или Her2, посредством направления антитела к очагам злокачественных новообразований и метастазирования, распознавания опсонизированных опухолевых клеток и уничтожения мишеней посредством ADCC.

Пример 4. Оптимизация условий экспансии резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитических тканей

Экспансия полученных из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток

Смешанные лимфоциты собирали после 3–4 недель культивирования на каркасе, промывали PBS, центрифугировали и ресуспендировали в среде Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640; Life Technologies) с профильтрованной 10% термически инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (Life Technologies), L-глутамином (292 мкг/мл; Life Technologies), пенициллином (100 ед./мл; Life Technologies), стрептомицином (100 мкг/мл; Life Technologies), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (HEPES; 0,01 М; Life Technologies), пируватом натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимыми аминокислотами минимальной питательной среды (MEM) (1-кратными; Life Technologies) и 50 мкМ 2-меркаптоэтанола (Life Technologies) в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Исходная популяция V δ 1⁺ клеток составляла 1,12% лимфоцитов. Клетки высевали в количестве 2×10^5 клеток/лунку в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning) или 2×10^6 клеток/лунку в 24-луночные планшеты

(Corning) для экспансии и дополняли указанными факторами в концентрациях, представленных в таблице 2.

Таблица 2. Концентрации каждого фактора, включенного в культуры для экспансии

Фактор	Концентрация
IL-1 β	10 нг/мл
IL-2	100 ед./мл
IL-4	5 нг/мл
IL-6	10 нг/мл
IL-7	25 нг/мл
IL-8	5 нг/мл
IL-9	10 нг/мл
IL-12	2,5 нг/мл
IL-15	10 нг/мл
IL-18	50 нг/мл
IL-21	10 нг/мл
IL-23	10 нг/мл
IL-33	500 нг/мл
SDF1 α	10 нг/мл
IGF-1	100 нг/мл

Клетки ежедневно подвергали мониторингу посредством микроскопии и снабжали свежими средами и цитокинами трижды в неделю. После достижения полной конfluence и агрегации клеток, их разделяли в соотношении 1:1 по дополнительным лункам и планшетах, как указано. Через 21 день клетки собирали с использованием ACCUTASE® (eBioscience), подсчитывали и анализировали с использованием проточной цитометрии. На фиг. 17A и фиг. 17B показаны типичные графики проточной цитометрии до и после экспансии. В таблице 3 показаны значения кратной экспансии, соответствующие фиг. 17C, в дополнение к относительной экспрессии CD27 и TIGIT на подвергнутых экспансии клетках в каждой исследуемой группе. Конечную кратную экспансию V δ 1 вычисляли с использованием общих количеств V δ 1 до и после экспансии (%CD3⁺ пан- γ δ ⁺ V δ 1⁺ клеток \div 100) \times (общее количество клеток).

Таблица 3. Экспансия резидентных V δ 1-T-клеток кожи в присутствии различных факторов.

Фактор экспансии (IL-2+IL-15) +	Экспансия Vδ1, нормализованная по IL-2+IL-15	MFI CD27 на Vδ1, нормализованная по IL-2 +IL-15	MFI TIGIT на Vδ1, нормализованная по IL-2+IL-15
IL-4	1,5 \pm 0,5	1,4 \pm 0,5	NT

IL-6	1,9±0,3	0,9±0,4	1,0±0,1
IL-7	1,6±0,3	0,5±0,7	1,1±0,2
IL-8	1,6±0,2	1,0±0,3	NT
IL-21	2,9±1,6	2,8±0,8	NT
IL-23	1,3±0,5	0,7±0,5	NT
SDF-1	3,9±1,9	0,9±0,4	NT
IL-4+IL-21	7,4±5,0	7,3±2,5	0,4±0,1
IL-1b	3,0±1,4	1,0±0,4	1,1±0,3
IL-12	6,8±4,3	0,7±0,8	NT
IL-18	3,3±1,0	0,8±0,5	0,9±0,2
IL-33	2,5±1,3	1,1±0,4	0,9±0,2
IL-33+IL-4+IL-21	2,0±1,3	0,7±3,5	0,4±0,2
IGF-1	1,1±0,1	0,9±0,1	1,2±0,1
IL-9	0,9±0,4	1,2±0,0	1,3±0,2
IL-9+IL-4+IL-21	1,8±1,3	7,4±3,9	0,3±0,1
IL-4+IL-21+1% HPL	5,3±0,5	5,4± 1,0	0,3±0,1
IL-4+IL-21+5% HPL	4,7±0,9	4,8±2,9	0,4±0,1

По сравнению с экспансией в присутствии только IL-2 и IL-15, добавление других факторов повышало экспансию V δ 1-T-клеток, как показано на фиг. 17C. Учитывая высокий выход V δ 1-T-клеток в ответ на IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21, дополнительно исследовали комбинации этих факторов, как показано на фиг. 17D–17H.

Исходный и конечный фенотипы каждой популяции V δ 1⁺ T-клеток, включая экспрессию CD27 и TIGIT, определяли с использованием средней интенсивности флуоресценции (MFI), и образцы в каждой группе усредняли, используя медиану MFI. Экспрессия CD27 и TIGIT V δ 1⁺ T-клетками в каждом из условий экспансии показана в таблице 4.

Таблица 4. Фенотип резидентных V δ 1-T-клеток кожи, подвергнутых экспансии в присутствии различных факторов.

Фактор экспансии	MFI CD27	MFI TIGIT
IL-2	113±5	7919±179
IL-2, IL-15	226±33	4788±679
IL-2, IL-15, IL-6	140±91	6663±767
IL-2, IL-15, IL-7	128±115	6083±1813
IL-1, IL-15, IL-4, IL-21	1284±1048	1721±308

IL-2, IL-15, IL-1 β	-136 \pm 3,5	9453 \pm 390
IL-2, IL-15, IL-18	121 \pm 75	4396 \pm 2782
IL-2, IL-15, IL-9	260 \pm 21	5247 \pm 2333
IL-2, IL-15, IGF-1	193 \pm 94	6584 \pm 1127
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, IL-9	790 \pm 61	1389 \pm 803
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 1% HPL	990 \pm 258	1203 \pm 222
IL-2, IL-15, IL-4, IL-21, 5% HPL	421 \pm 76	1045 \pm 798

Относительно IL-2 и IL-15 в отдельности, добавление других факторов повышало экспрессию CD27, что измеряли по средней интенсивности флуоресценции, как показано на фиг. 18А. Следует отметить, что добавление IL-4 и IL-21 повышало MFI CD27 приблизительно в 8 раз относительно IL-2 и IL-15 в отдельности. И снова, в случае четверной комбинации IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21 наблюдали наиболее высокую экспрессию CD27 относительно других их комбинаций (фиг. 18В и 18D). Следует отметить, что низкая экспрессия CD27 на Т-клетках зачастую ассоциирована с истощенным, терминально дифференцированным фенотипом с небольшим потенциалом к дальнейшей, длительной пролиферации.

Другую тенденцию наблюдали в отношении экспрессии TIGIT подвергнутыми экспансии V δ 1⁺ Т-клетками (фиг. 19). В частности, экспрессия TIGIT снижалась в ответ на IL-4 и IL-21 в комбинации с IL-2 и IL-15. Для дальнейшего исследования этой тенденции строили график экспрессии TIGIT как функции экспрессии CD27 (фиг. 20). Наблюдали отрицательную корреляцию между TIGIT и CD27. Высокая экспрессия TIGIT может делать Т-клетки восприимчивыми к ингибированию микроокружением опухоли, в котором экспрессия его лиганда полиовирусного рецептора (PVR; CD155) может быть высокой.

Пример 5. Культивирования с четырьмя цитокинами достаточно для замены сыворотки при культивировании клеток

В настоящее время при производстве резидентных Т-клеток ткани или опухоли общепринятым является добавление в среды комплексных, полученных из крови сывороток и плазмы. Однако использование этих сывороток или компонентов плазмы может быть нежелательным из-за свойственной им изменчивости от партии к партии, высокой стоимости таких компонентов, ограниченного предложения при высоком спросе в индустрии лекарственных препаратов для передовой терапии (АТМР) и повышенного риска перекрестной контаминации от таких компонентов. Таким образом, после успешной идентификации цитокинов, поддерживающих экспансию и обогащение желаемых $\gamma\delta$ -Т-клеток, как представлено в настоящем описании, определяли, можно ли посредством использования таких цитокинов устранить какую-либо потребность в комплексных компонентах сыворотки/плазмы, как правило, используемых для экспансии полученных из ткани $\gamma\delta$ -Т-клеток. Для дальнейшего тестирования иммунные клетки подвергали выходу из образца кожи и определяли, необходимы ли плазма/сыворотка для поддержания экспансии и обогащения $\gamma\delta$ -Т-клеток (+/- сыворотка). Таким образом, вышедшие клетки

собирали и высевали на две среды в "день 0". Первая среда содержала среды без компонентов животного происхождения (ADCF) (TechMACS, Miltenyi) с 10% сыворотки человека и цитокинами. Вторая среда содержала те же среды ADCF/смесь цитокинов, стандартную определенную добавку (CTS™, содержащую очищенный сывороточный альбумин человека, рекомбинантный инсулин и трансферрин), но без добавления какой-либо сыворотки. Результаты этого исследования показаны на фиг. 21. Неожиданно, наблюдали эквивалентное обогащение и эквивалентные кратные экспансии при использовании сыворотки человека или без нее. Это свидетельствует о том, что можно осуществлять экспансию и обогащать полученные из ткани $\gamma\delta$ -T-клетки без каких-либо компонентов животного происхождения или сыворотки человека.

Затем этот подход использовали для преференциальной экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток из начальных смешанных популяций лимфоцитов, собранных из стандартных органотипических культур. Если это достижимо, такая преференциальная экспансия будет крайне желательной, в частности, если способ приводит к получению конечной подвергнутой экспансии популяции лимфоцитов, содержащей >50% $\gamma\delta$ -T-клеток. Фактически, к настоящему времени в общепринятых способах обогащения необходимо использование истощения или технологии обогащения, таких как технологии магнитной иммунодеплеции (например, от Miltenyi или Dynal) или технологии сортировки на основе проточной цитометрии (например, от BD Biosciences), для физического отделения меньшинства $\gamma\delta$ -клеток или физического истощения большинства $\alpha\beta$ -клеток. Вместо этого, в настоящем исследовании определяли, можно ли способами по настоящему изобретению обогащать $\gamma\delta$ -клетки, присутствующие в любой указанной начальной смешанной популяции лимфоцитов, без потребности в таких способах физического разделения или истощения. Неожиданно, и в результате селективности способов экспансии $\gamma\delta$ -клеток относительно других типов клеток, также присутствующих в начальной популяции, этими способами экспансии достигали такого обогащения. Это приводило к получению более обогащенной, более чистой популяции $\gamma\delta$ -T-клеток, представляющих более 50% всех клеток, присутствующих в культуре. Этого обогащения достигали в присутствии и/или отсутствие сыворотки, и оно дополнительно показано на фиг. 21 и фиг. 22A–22D, где $\gamma\delta$ -T-клетки подвергали экспансии в >100 раз, повышая чистоту $\gamma\delta$ -T-клеток с <50% до >50% во всех случаях для этого образца ткани.

Способы выделения и экспансии

Смешанные лимфоциты собирали из ткани через три недели культивирования на каркасе с использованием подхода, эквивалентного описанному выше в способе Clark, а также в примере 2. Полученный профиль собранных клеток был схож с описанным в примере 3. Эти собранные клетки промывали HBSS+HEPES, центрифугировали и ресуспендировали в средах TechMACS (Miltenyi), содержащих (i) 10% сыворотки АВ человека (Life Science Production) в дополнение к IL-2 (100 МЕ/л), IL-4 (Biolegend, 5 нг/мл), IL-15 (Biolegend, 20 нг/мл) и IL-21 (Biolegend, 5 нг/мл) или (ii) 5% CTS™ (Thermo Fisher Scientific) в дополнение к IL-2 (100 МЕ/л), IL-4 (Biolegend, 5 нг/мл), IL-15 (Biolegend, 20

нг/мл) и IL-21 (Biolegend, 5 нг/мл). И содержащие сыворотку, и бессывороточные среды также содержали антибиотики пенициллин/стрептомицин (100 ед./мл, 100 мкг/мл, соответственно, Life Technologies). Затем клетки высевали в количестве 2 миллиона клеток/лунку в 24-луночных планшетах (Corning). После того, как клетки становились конфлюэнтными, их подвергали экспансии/пересевали, разделяя в соотношении от 1:2 до 1:4 в новые лунки, содержащие те же среды. В день 21 клетки собирали с помощью раствора для открепления клеток ACCUTASE® (Thermo Fisher) и анализировали посредством проточной цитометрии для определения конечных профилей клеток, как показано на фиг. 21 и фиг. 22A–22D.

Пример 6. Функциональная значимость экспрессии TIGIT

Как показано на фиг. 23, TIGIT конститутивно экспрессировался на резидентных V δ 1-клетках кишечника. Данные получали с использованием V δ 1-клеток, выделенных из кишечника посредством общепринятого расщепления тканей. Конститутивная экспрессия TIGIT резидентными $\gamma\delta$ -T-клетками ткани не связана только с полученными из кожи V δ 1-клетками, и экспрессия TIGIT не являлась артефактом при использовании способа Clark (способа выделения с использованием сетки).

Кроме того, в клетках, инкубируемых только с IL-2 и IL-15, полиовирусный рецептор (PVR) специфически ингибировал передачу сигнала TCR, что измеряли по экспрессии ИФН γ (фиг. 24A) и ФНО α (фиг. 24B). В клетках, инкубируемых с IL-2, IL-15, IL-4 и IL-21, ингибиторный эффект PVR отсутствовал в случае TIGIT-отрицательных V δ 1+/V δ 3+ клеток, что измеряли по ИФН γ (фиг. 25A) или ФНО α (фиг. 25B), что свидетельствует о том, что отрицательность по TIGIT, являющаяся результатом использования смеси четырех цитокинов, преимущественно предотвращает ингибирование TIGIT-опосредованной активации V δ 1+/V δ 3+ T-клеток.

Пример 7. Замена IL-2 на IL-9 в культурах для экспансии

Ткани кожи от трех доноров (TS052, TS056 и SK073) помещали на сетки размером 9 мм и культивировали в течение трех недель в среде, дополненной IL-2 и IL-15. Выделенные лимфоциты инкубировали в средах, дополненных IL-2, IL-4–IL-15 и IL-21 (фиг. 26A и 26B, левые столбики) или IL-4, IL-9, IL-15 и IL-21 (фиг. 26A и 26B, правые столбики). Вычисляли конечный выход $\gamma\delta$ -T-клеток/сетку (фиг. 26A) и V δ 1-клеток/сетку (фиг. 26B) после трех недель экспансии.

Как показано на фиг. 27A–27C, IL-9 было достаточно для замещения функции IL-2 при экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток кожи, что измеряли по кратному изменению (фиг. 27A), % $\gamma\delta$ TCR+ T-клеток (фиг. 27B) и % V δ 1+ T-клеток (фиг. 27C). Ткани кожи получали от шести доноров (SK073, SK075, SK077, TS052, TS053 и TS056). Смесь двух цитокинов включала IL-2 и IL-15, и смесь четырех цитокинов включала IL-2, IL-15, IL-21 и IL-4.

Как показано на фиг. 28A и 28B, IL-9 было достаточно для замещения функции IL-2 при экспансии $\gamma\delta$ -T-клеток кожи, что измеряли по средней интенсивности флуоресценции (MFI) экспрессии CD27 на V δ 1+ T-клетках (фиг. 28A) и нормализованной MFI экспрессии CD27 на V δ 1+ T-клетках (фиг. 28B). Не наблюдали различий экспрессий CD27 при

сравнении со стандартными условиями культивирования. Ткани кожи получали от четырех доноров (SK073, TS052, TS053 и TS056). Смесь двух цитокинов состояла из IL-2 и IL-15, и смесь четырех цитокинов состояла из IL-2, IL-15, IL-21 и IL-4.

Экспансия полученных из кожи $\gamma\delta$ -T-клеток

Смешанные лимфоциты собирали после трех недель культивирования на каркасе, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), центрифугировали и ресуспендировали в RPMI-1640 с профильтрованной 10% термически инактивированной FBS (Life Technologies), L-глутамином (292 мкг/мл; Life Technologies), пенициллином (100 ед./мл; Life Technologies), стрептомицином (100 мкг/мл; Life Technologies), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновой кислотой (HEPES; 0,01 M; Life Technologies), пируватом натрия (1 mM; Life Technologies), заменимыми аминокислотами минимальной питательной среды (MEM) (1-кратными; Life Technologies) и 50 mM 2-меркаптоэтанолом (Life Technologies) в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Клетки высевали в количестве 2×10^6 клеток/лунку в 24-луночных планшетах (Corning) для экспансии со средой, дополненной указанными цитокинами в следующих конечных концентрациях: IL-2: 100 ед./мл, IL-4: 5 нг/мл, IL-9: 10 нг/мл, IL-15: 20 нг/мл и IL-21: 10 нг/мл.

Клетки подвергали ежедневному мониторингу посредством микроскопии и снабжали свежими средами и цитокинами трижды в неделю, заменяя 1 мл среды для культивирования 1 мл свежей среды для культивирования, содержащей цитокины в двойной концентрации, т.е. IL-2: 200 ед./мл, IL-4: 10 нг/мл, IL-9: 20 нг/мл, IL-15: 40 нг/мл и IL-21: 20 нг/мл.

После достижения полной конfluence и агрегации клеток клетки разделяли в соотношении 1:1 в дополнительные лунки и планшеты, как указано. Через 21 день клетки собирали с использованием ACCUTASE® (eBioscience), подсчитывали и анализировали с использованием проточной цитометрии. Конечные количества $\gamma\delta$ -T-клеток и V δ 1-клеток вычисляли с использованием количеств до и после экспансии, и данные представлены как конечный выход клеток на сетку после экспансии.

Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящей заявке, включены в нее в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана как включенная в качестве ссылки.

Хотя изобретение описано по отношению к конкретным вариантам осуществления, следует понимать, что можно осуществлять дополнительные модификации, и настоящая заявка предназначена для охвата любых вариантов, применения или адаптаций изобретения, в основном, следуя принципам изобретения и включая такие отклонения от настоящего изобретения, которые соответствуют известной или обычной практике в области, к которой относится изобретение, и могут быть приложены к изложенным выше существенным признакам и соответствуют объему формулы изобретения.

Другие варианты осуществления входят в формулу изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экспансии $\gamma\delta$ -Т-клеток, включающий стадии:

(i) отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток от стромальных и эпителиальных клеток, присутствующих в образце кожи, полученном от субъекта, с получением популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток; и

(ii) культивирования указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21:

в течение по меньшей мере 5 дней с получением подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток;

где менее чем 10% клеток в культуре стадии (ii) представляют собой стромальные клетки.

2. Способ по п.1, где менее чем 1% клеток в культуре стадии (ii) представляют собой стромальные клетки.

3. Способ по п.1 или 2, где стадия (ii) дополнительно включает культивирование популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-4.

4. Способ по любому из пп.1–3, где стадия (ii) дополнительно включает: культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии ИЛ-2, ИЛ-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из фактора стромальных клеток (SDF), ИЛ-1 β , ИЛ-12, ИЛ-18 и ИЛ-33, в течение по меньшей мере 5 дней с получением подвергнутой экспансии популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

5. Способ по любому из пп.1–4, где стадия (ii) включает культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток в бессывороточной среде.

6. Способ по любому из пп.1–5, где стадия (ii) дополнительно включает культивирование указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток в отсутствие значительного контакта с фидерными клетками.

7. Способ по любому из пп.1–6, где указанный субъект представляет собой человека.

8. Способ по любому из пп.1–7, где стадия (i) включает культивирование образца кожи на синтетическом каркасе, сконфигурированном для облегчения выхода клеток из указанного образца кожи.

9. Способ по любому из пп.1–8, где стадия (i) включает культивирование образца кожи в присутствии ИЛ-2 и/или ИЛ-15.

10. Способ по любому из пп.1–9, где указанная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток содержит V δ 1-Т-клетки.

11. Способ по любому из пп.1–10, где по меньшей мере 80% указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой V δ 1-Т-клетки перед стадией (ii).

12. Способ по любому из пп.1–11, где менее чем 80% указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток представляют собой V δ 2-Т-клетки перед стадией (ii).

13. Способ по любому из пп.1–12, дополнительно включающий $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или НК-клеток из указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

14. Способ по любому из пп.1–13, где указанная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток перед

стадией (ii) содержит:

а. более высокую долю CCR3+ клеток, CCR4+ клеток, CCR7+ клеток и/или CCR8+ клеток относительно референсной популяции резидентных V δ 2-T-клеток крови;

б. более высокую долю NKG2D+ клеток, CD56+ клеток, CD69+ клеток и/или TIM3+ клеток относительно референсной популяции резидентных V δ 1-T-клеток крови; или оба из (а) и (б).

15. Способ по любому из пп.1–14, где в течение 14 дней с начала культивирования стадии (ii) подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток содержит по меньшей мере 20-кратное количество $\gamma\delta$ -T-клеток относительно указанной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед стадией (ii).

16. Способ по любому из пп.1–15, где в течение 21 дня с начала культивирования стадии (ii) подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток содержит по меньшей мере 50-кратное количество $\gamma\delta$ -T-клеток относительно указанной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед стадией (ii).

17. Способ по любому из пп.1–16, где в течение 14 дней с начала культивирования стадии (ii) подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток содержит по меньшей мере 20-кратное количество V δ 1-T-клеток относительно количества V δ 1-T-клеток в указанной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед стадией (ii).

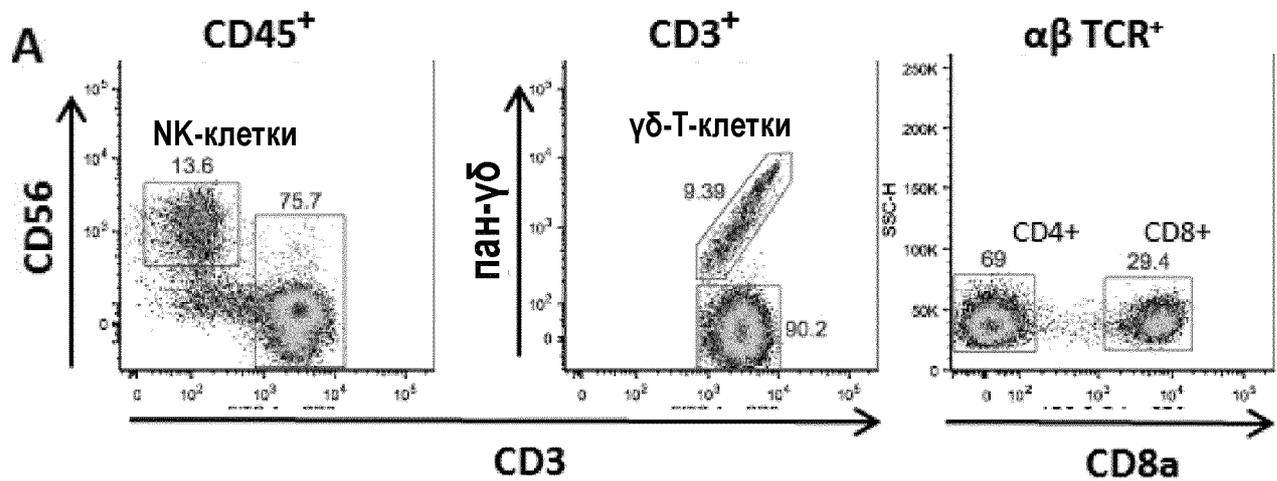
18. Способ по любому из пп.1–17, где в течение 21 дня с начала культивирования стадии (ii) подвергнутая экспансии популяция $\gamma\delta$ -T-клеток содержит по меньшей мере 50-кратное количество V δ 1-T-клеток относительно количества V δ 1-T-клеток в указанной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток перед стадией (ii).

19. Способ по любому из пп.1–18, где указанный образец кожи содержит щипковую биопсию.

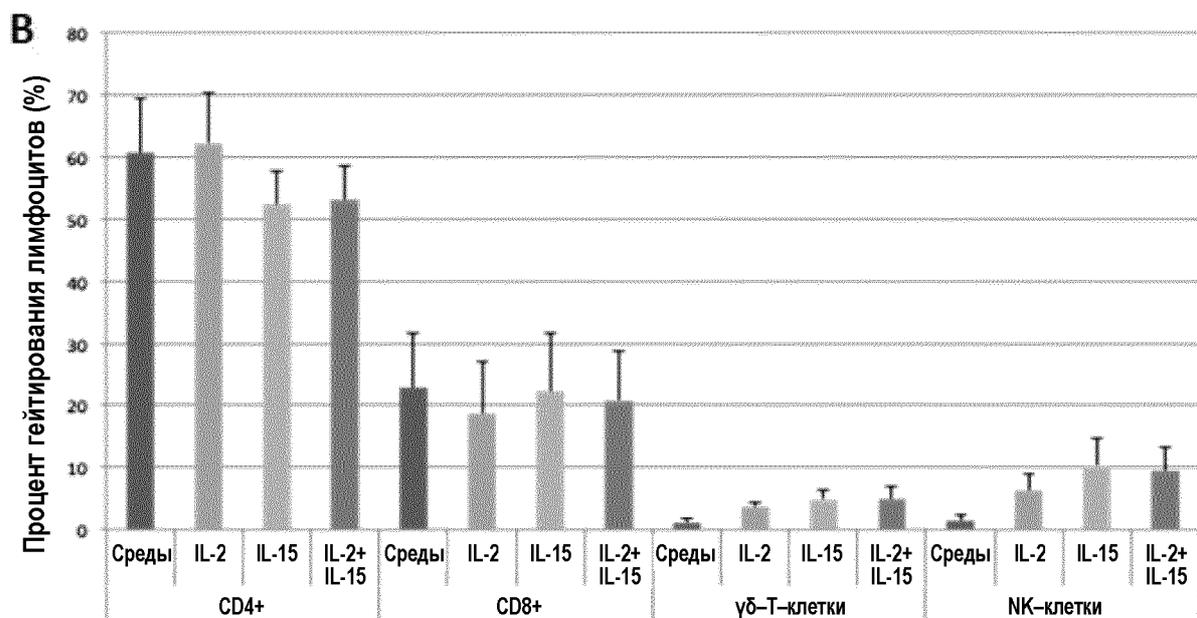
20. Способ по любому из пп.1–19, где указанный образец кожи измельчают перед стадией (i).

По доверенности

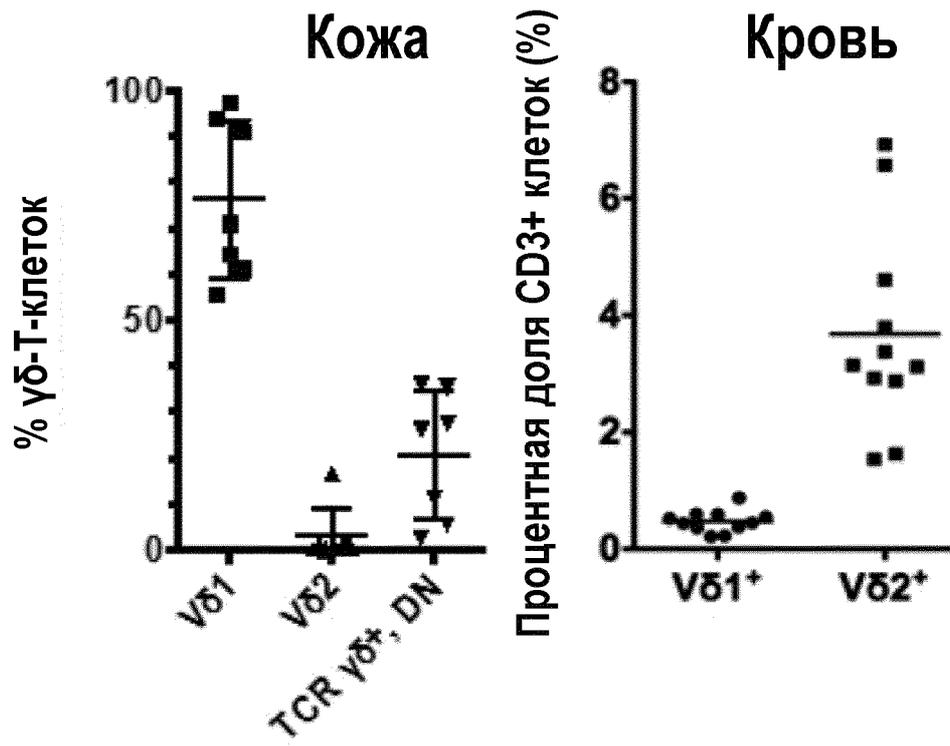
ФИГ.1А



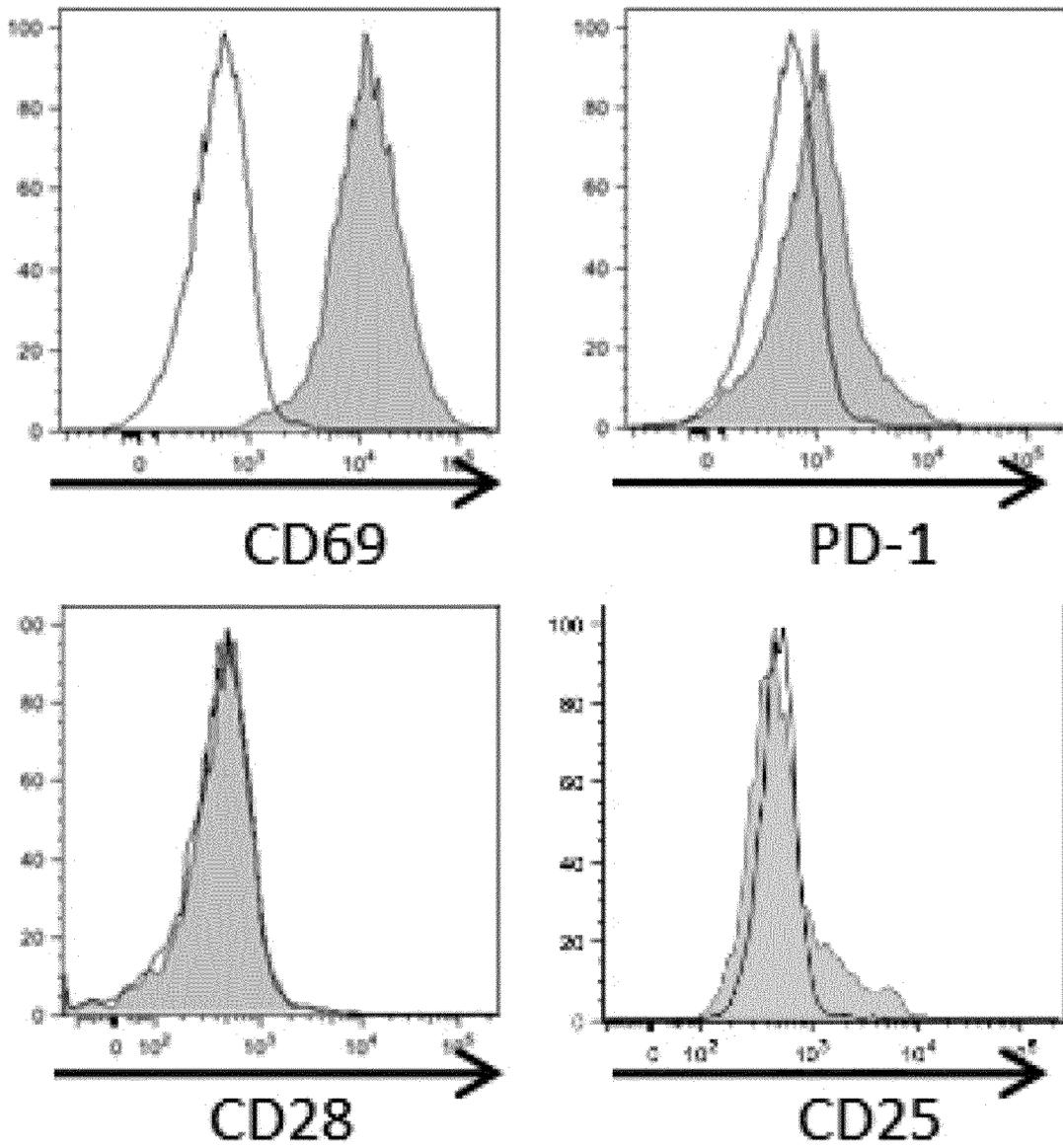
ФИГ.1В



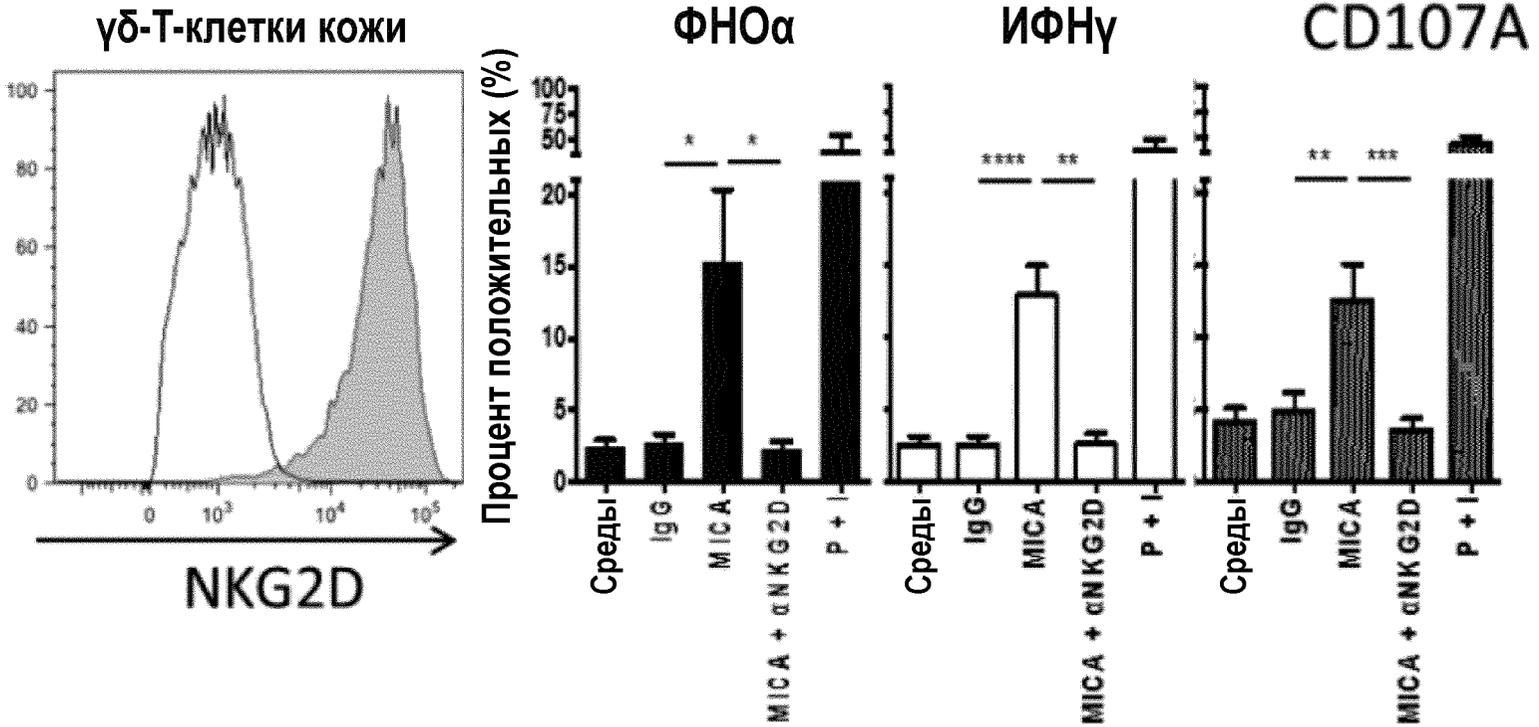
ФИГ.1С



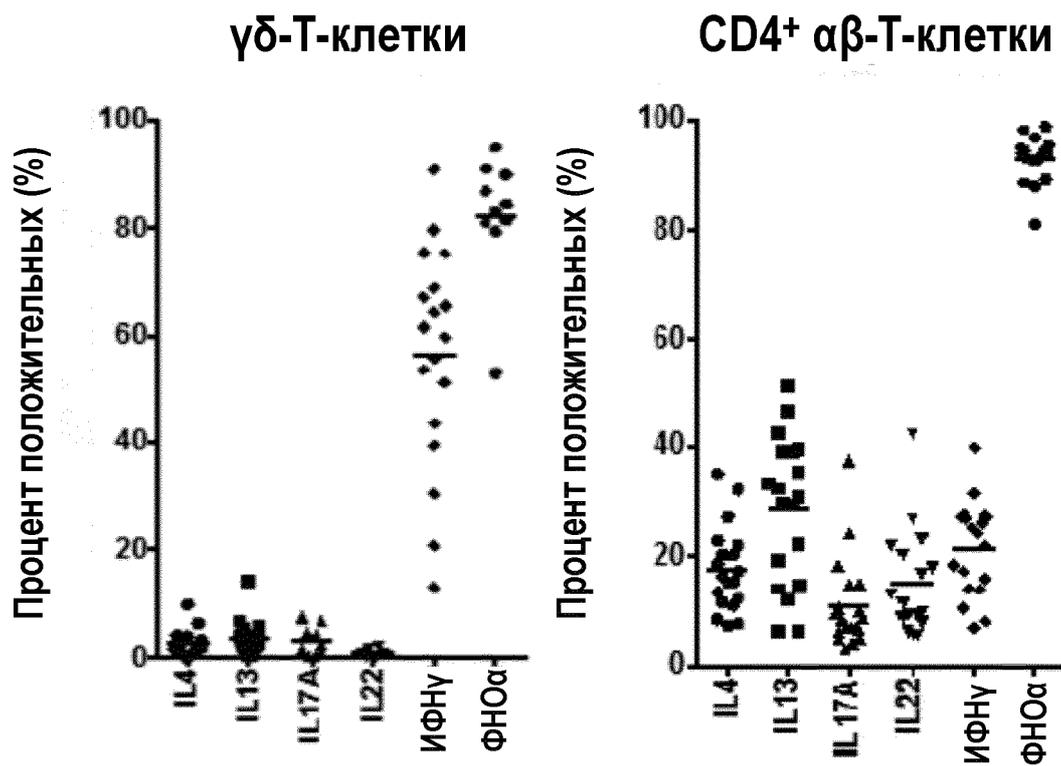
ФИГ.1D



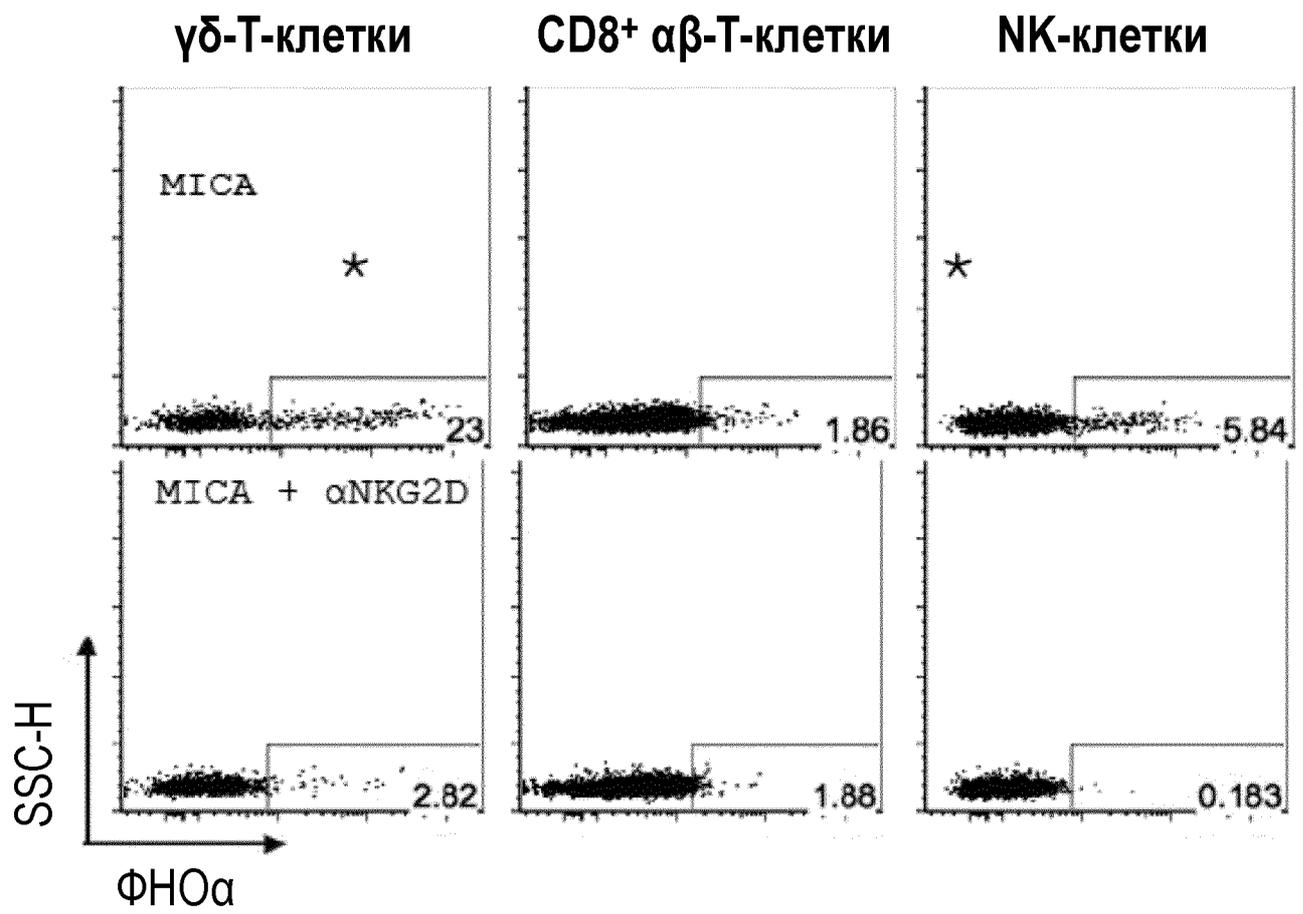
ФИГ.2А



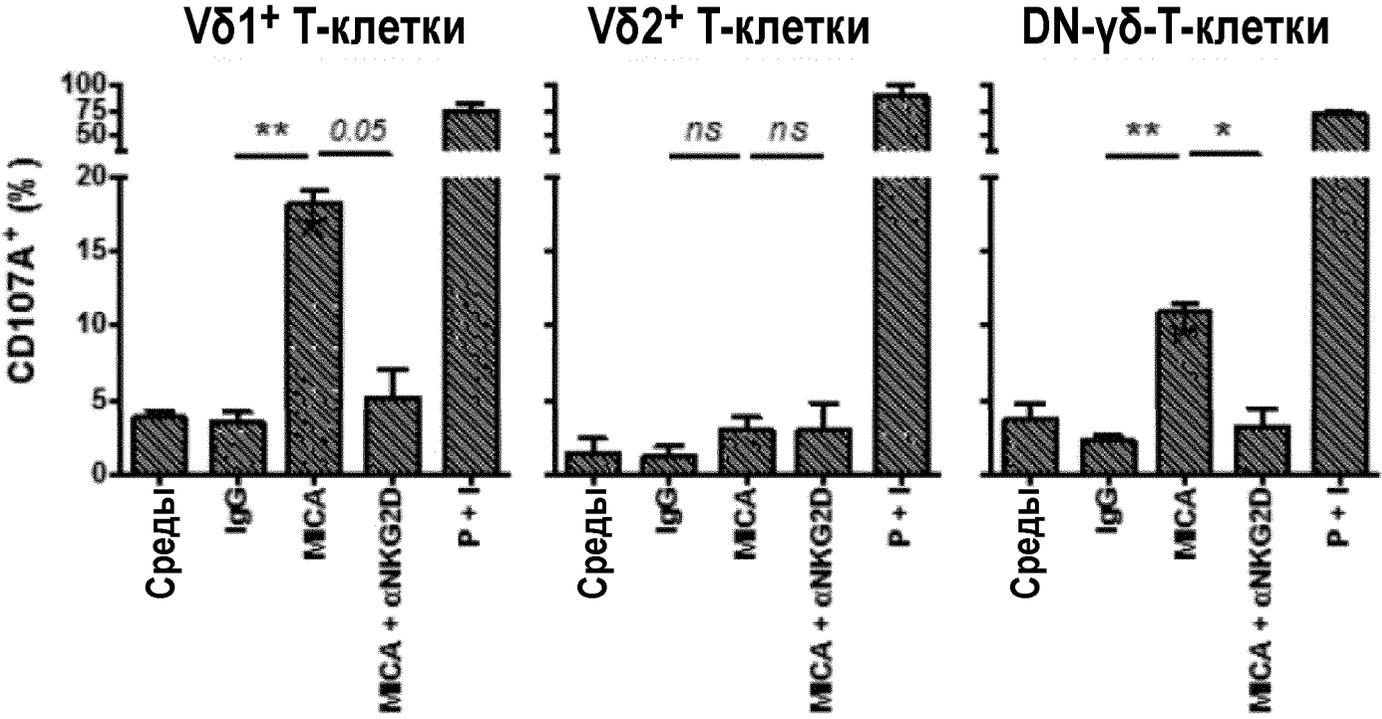
ФИГ.2В



ФИГ.2С



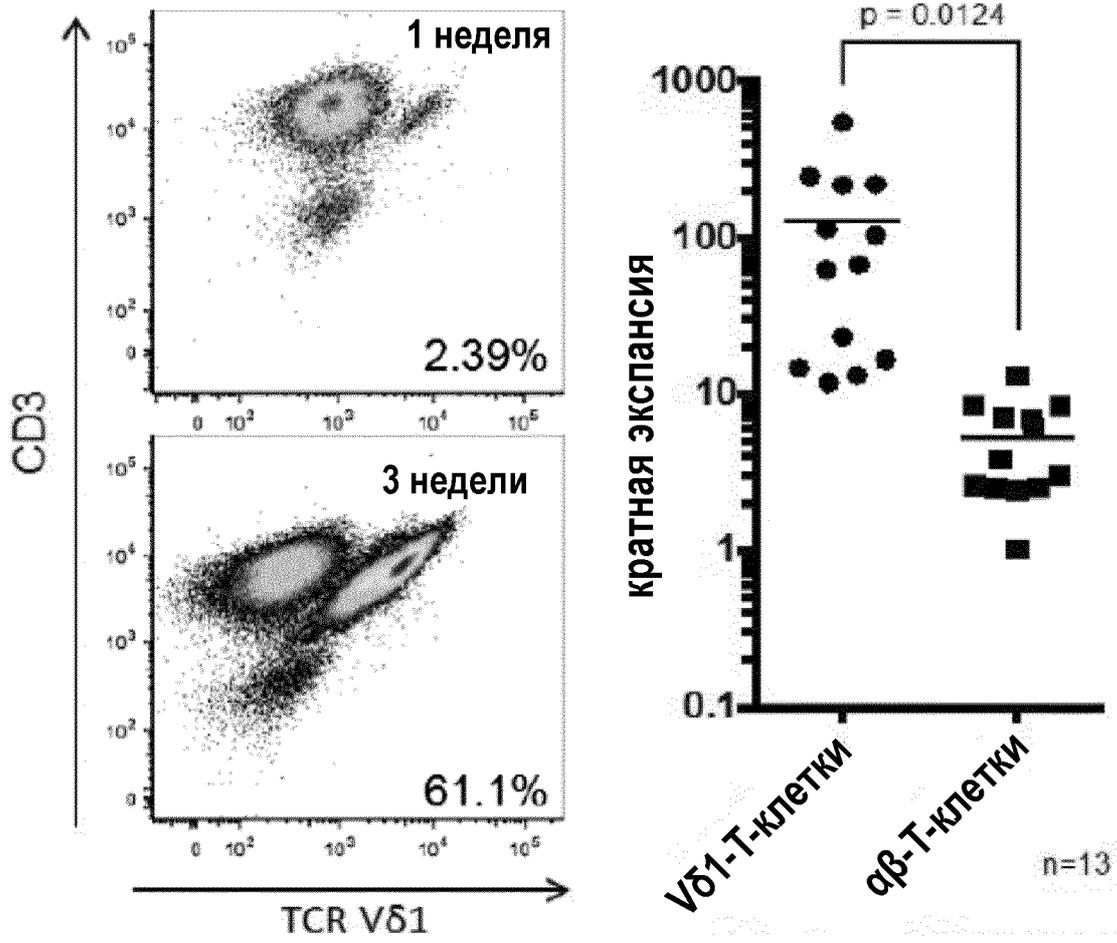
ФИГ.2D



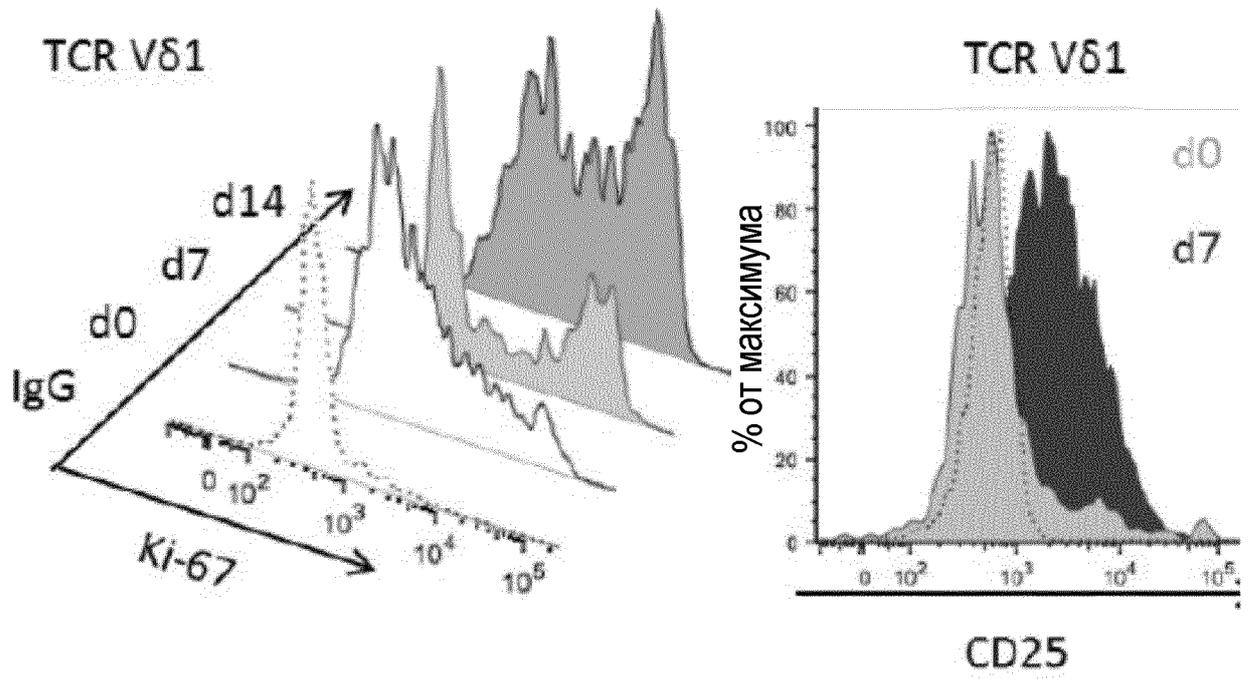
* Подобная врожденной активация

Среднее ± SEM
n = 5

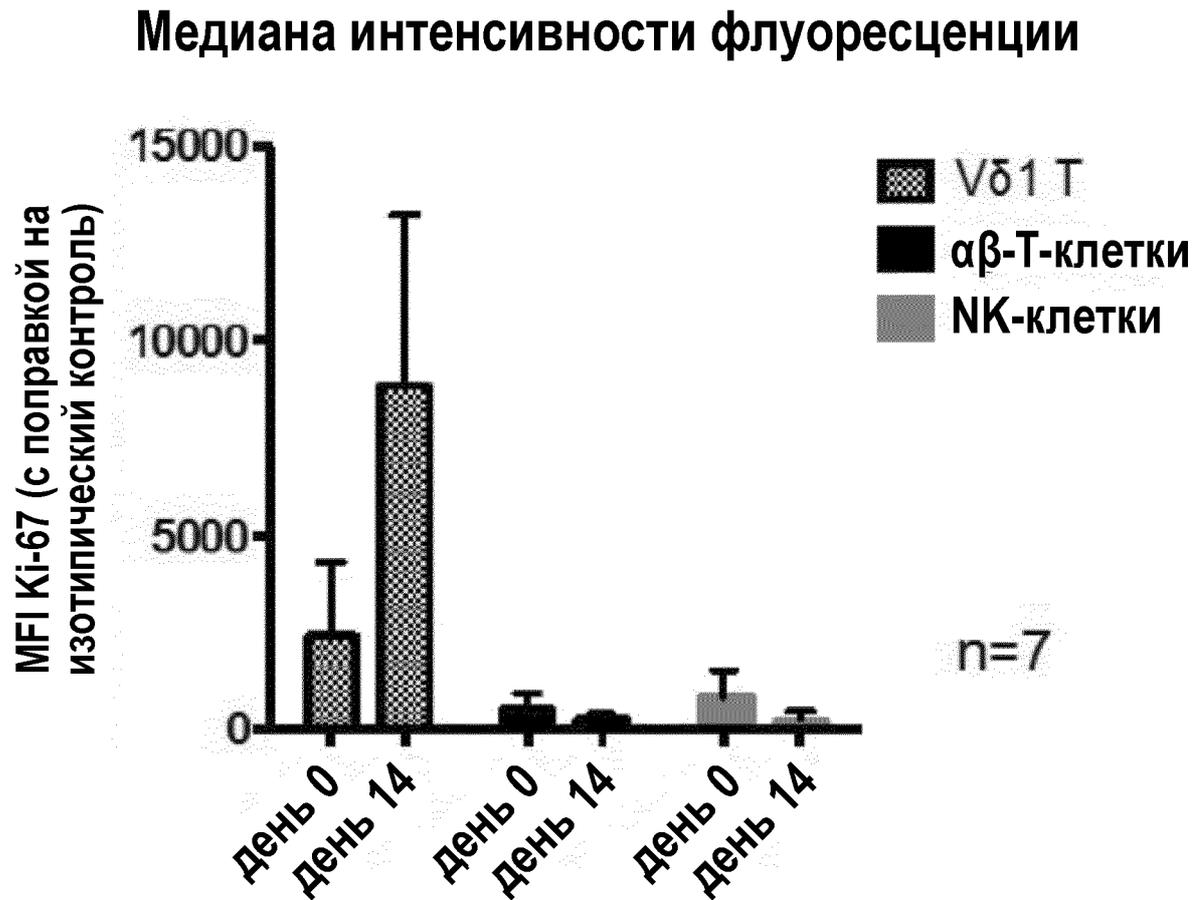
ФИГ.3А



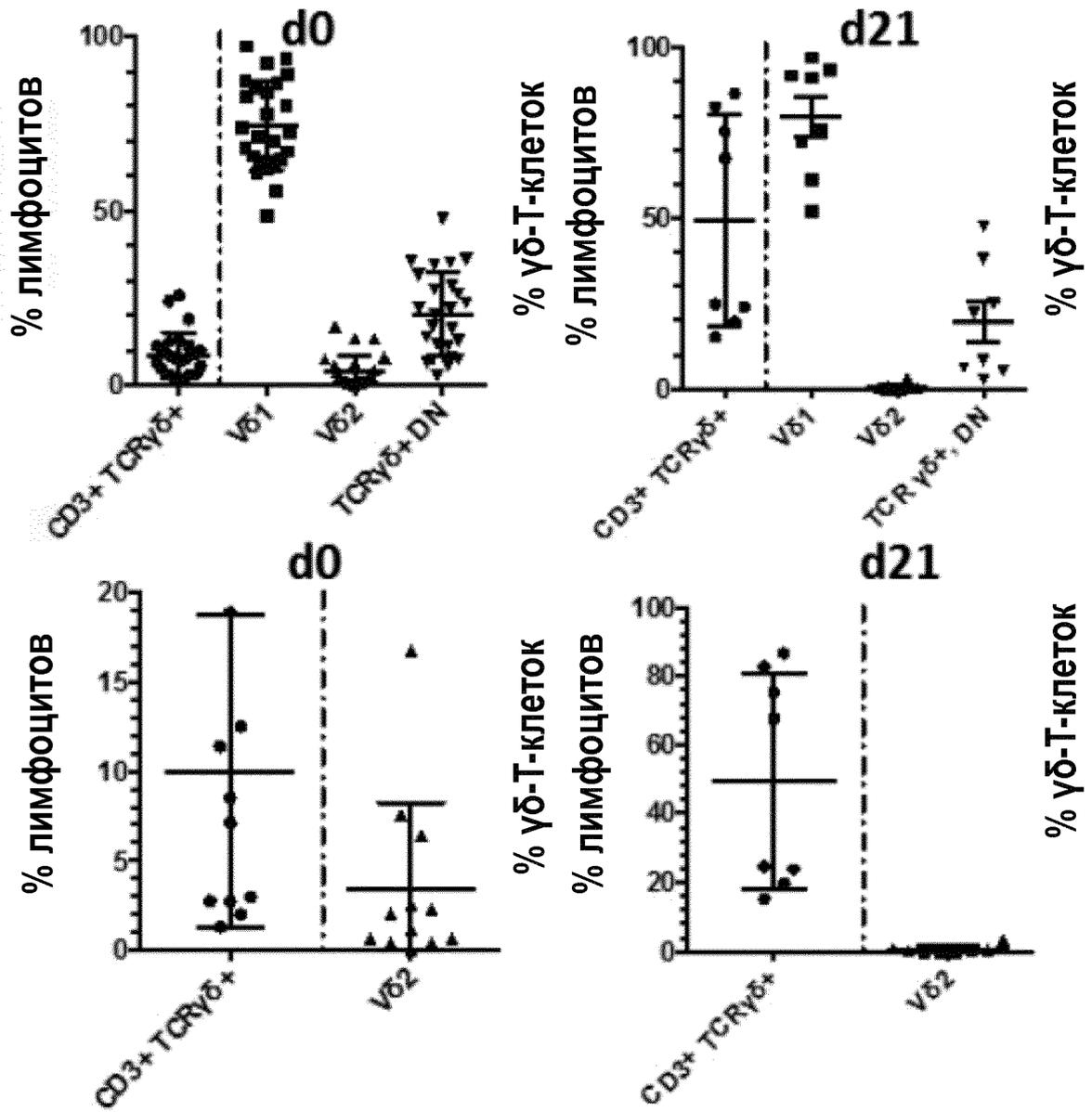
ФИГ.3В



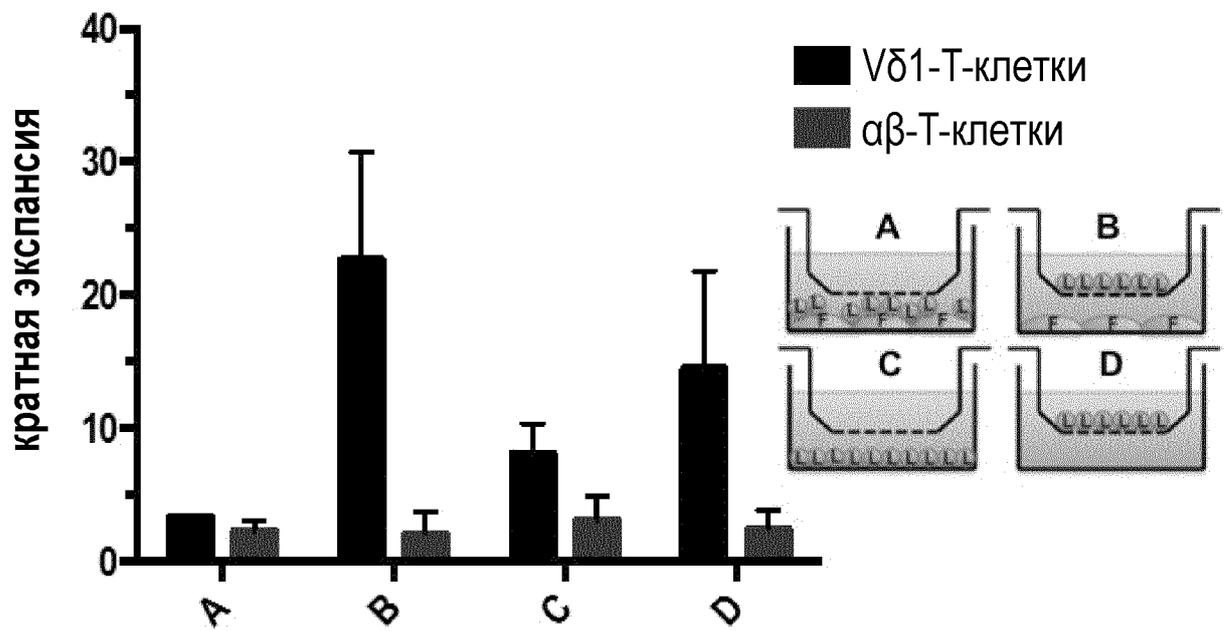
ФИГ.3С



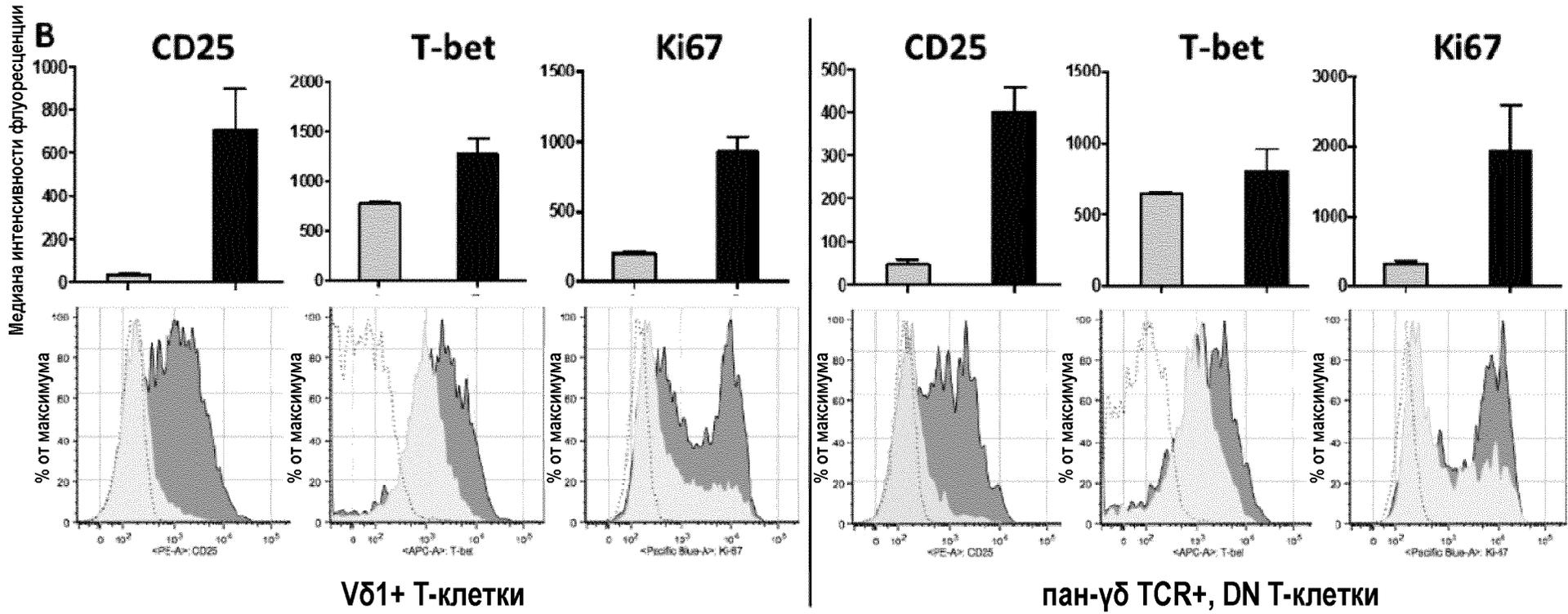
ФИГ.3D



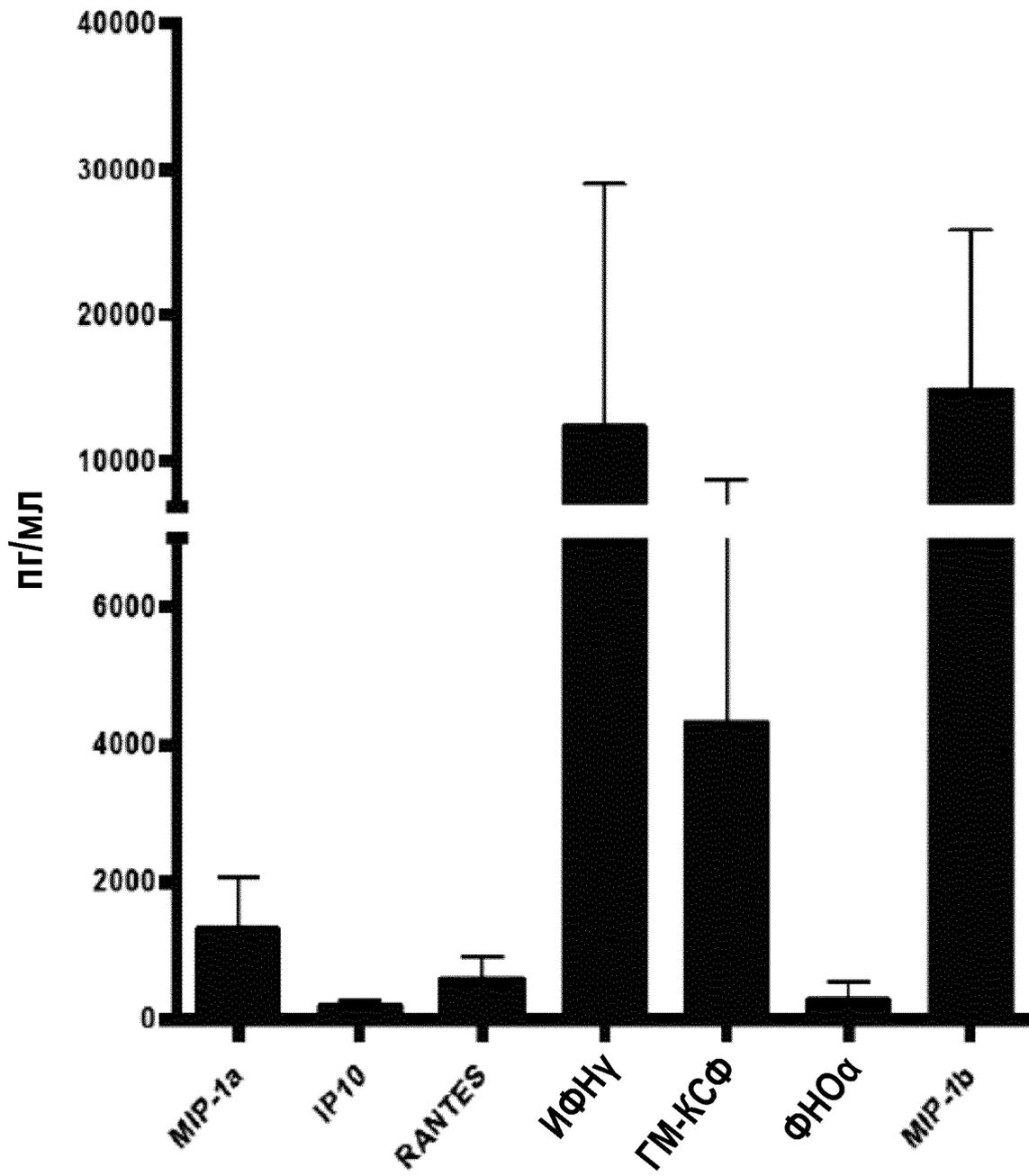
ФИГ.4А



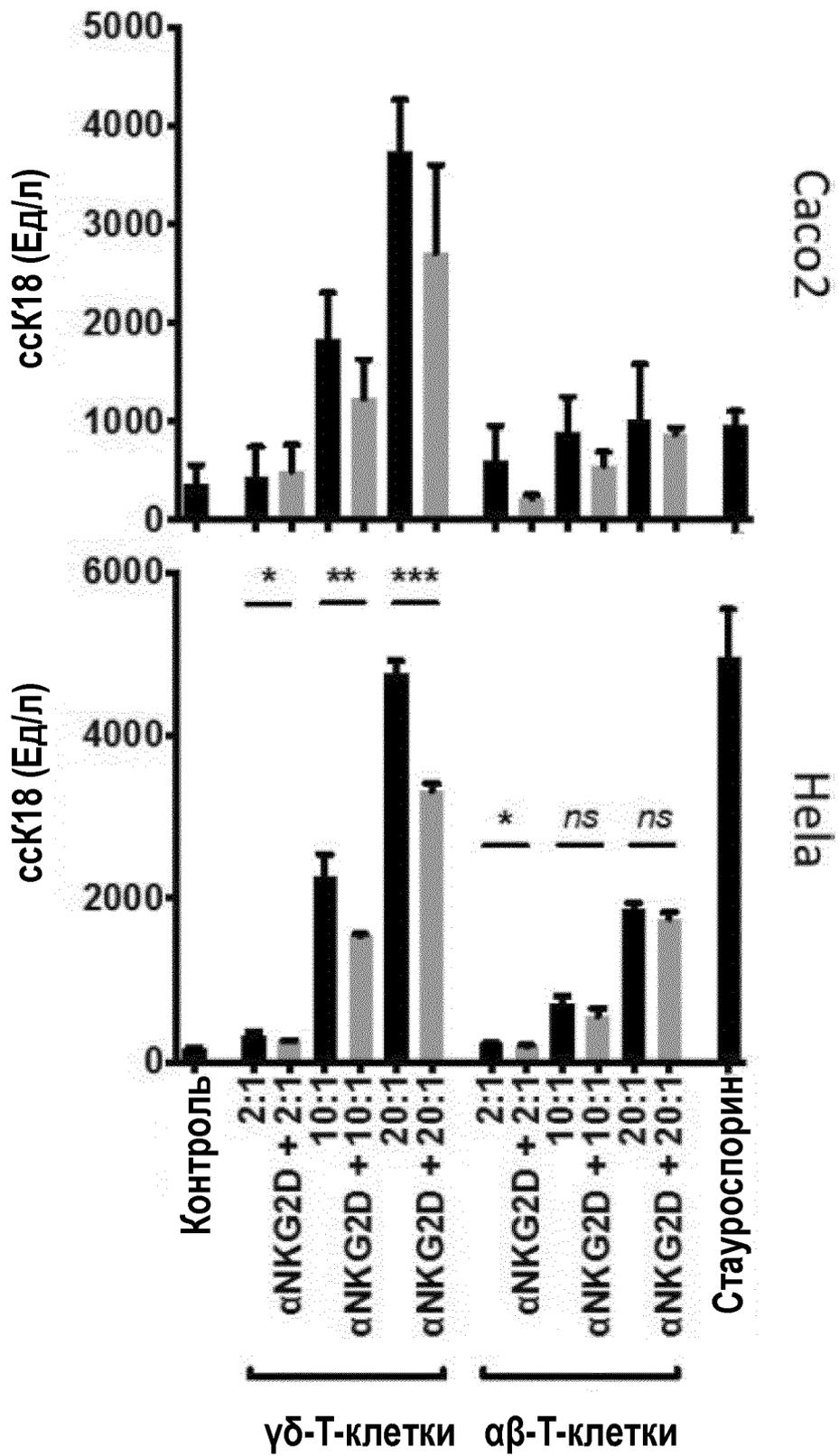
ФИГ.4В



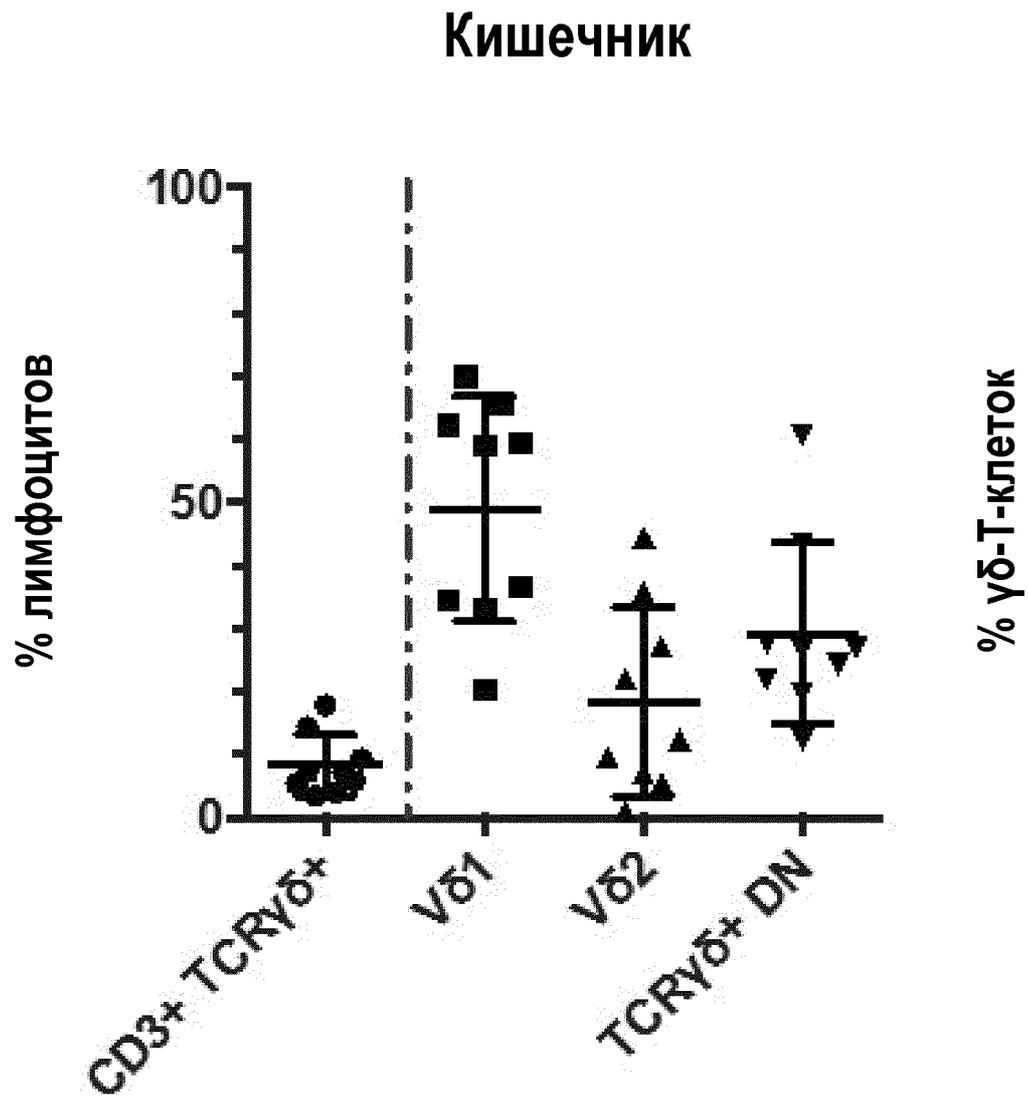
ΦΙΓ.5Α



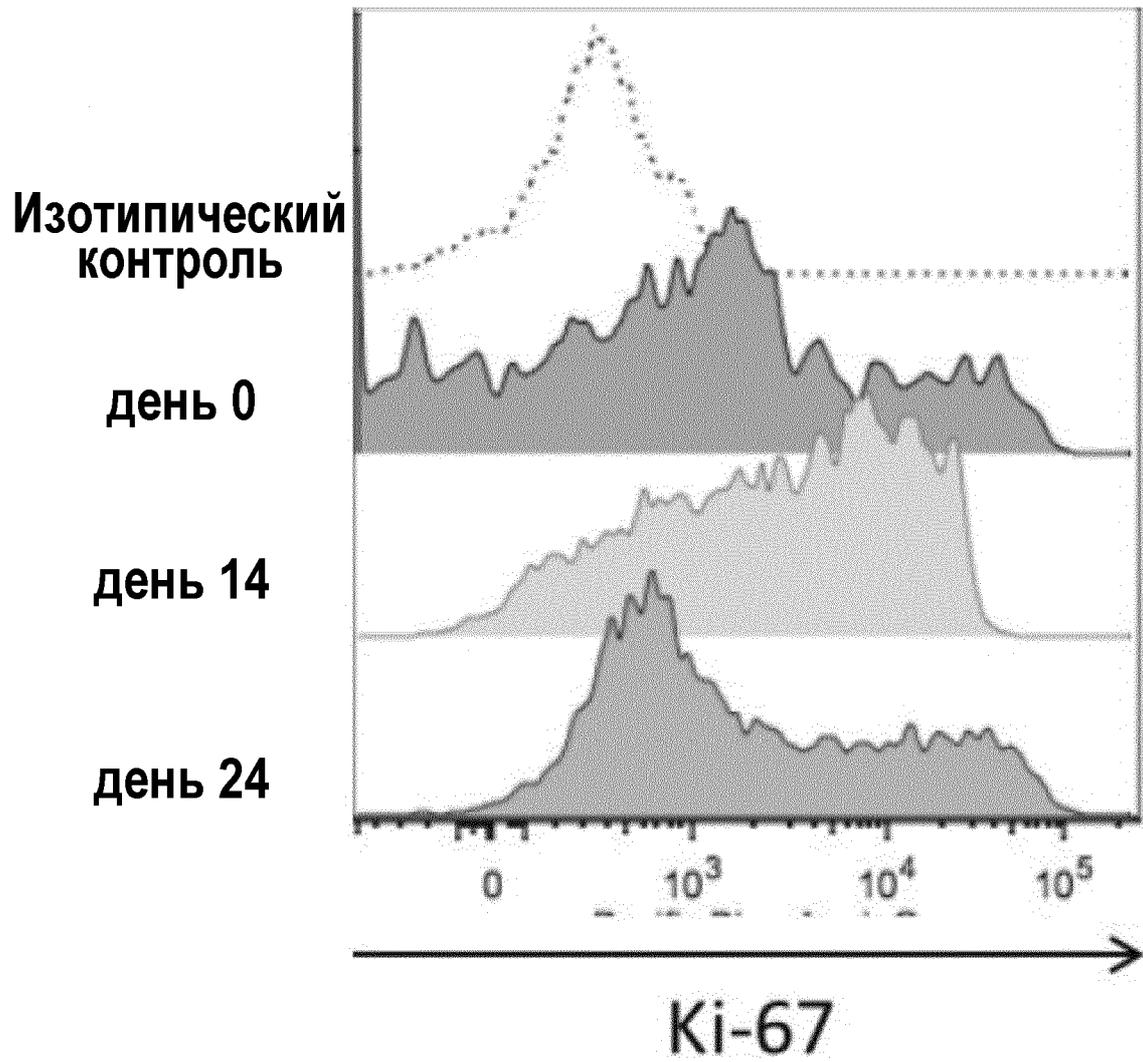
ФИГ.5В



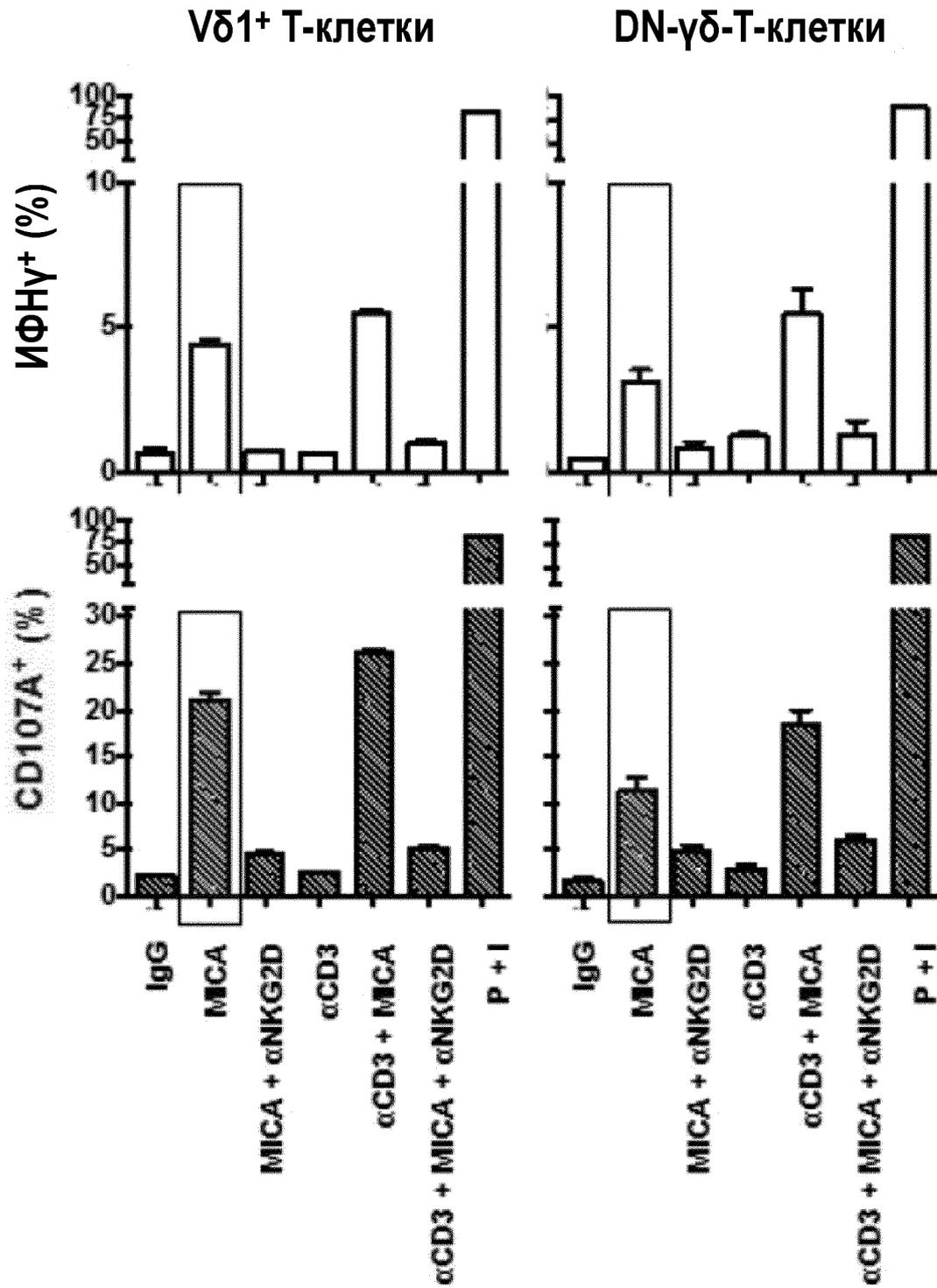
ФИГ.6А



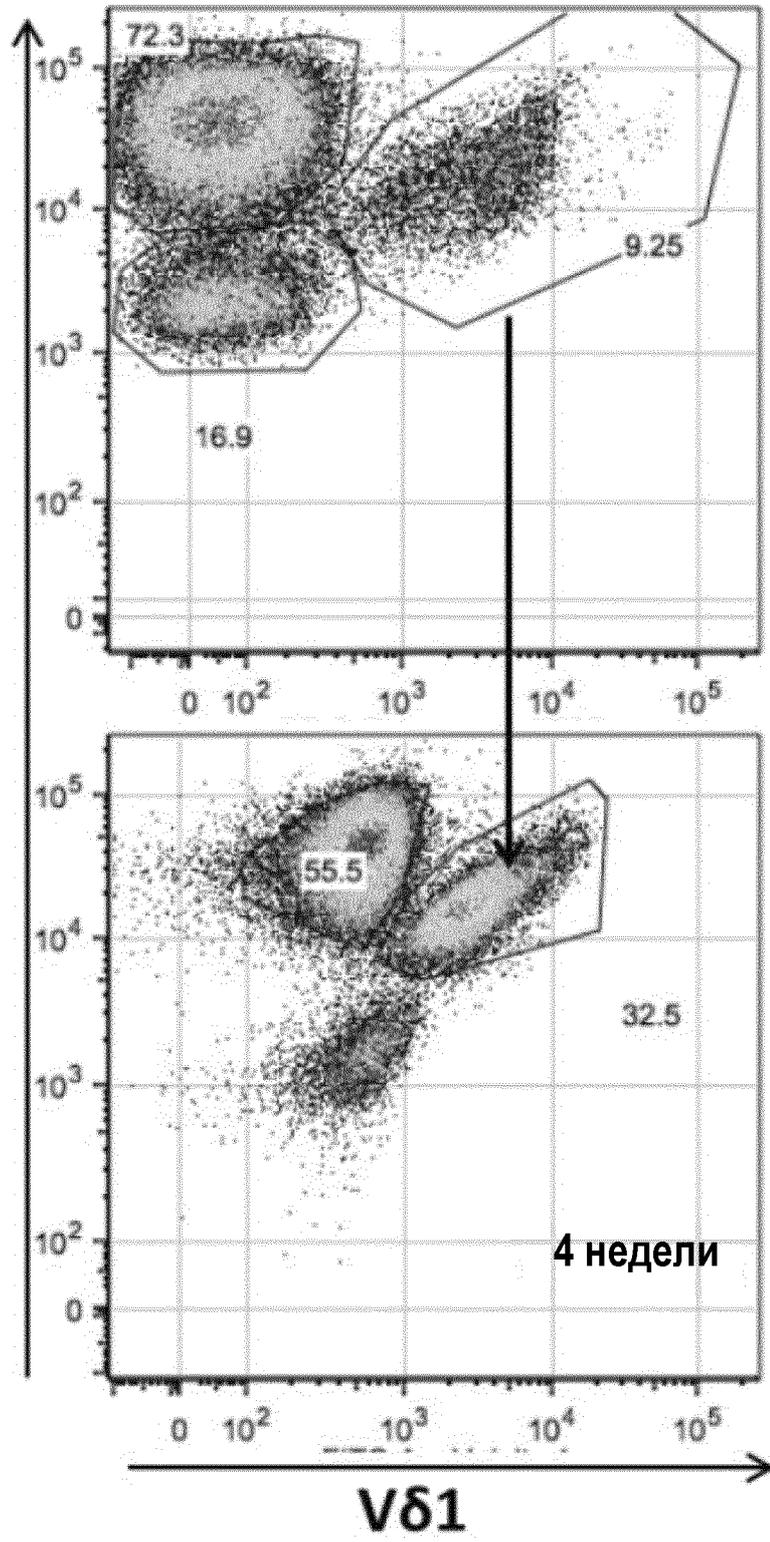
ФИГ.6В



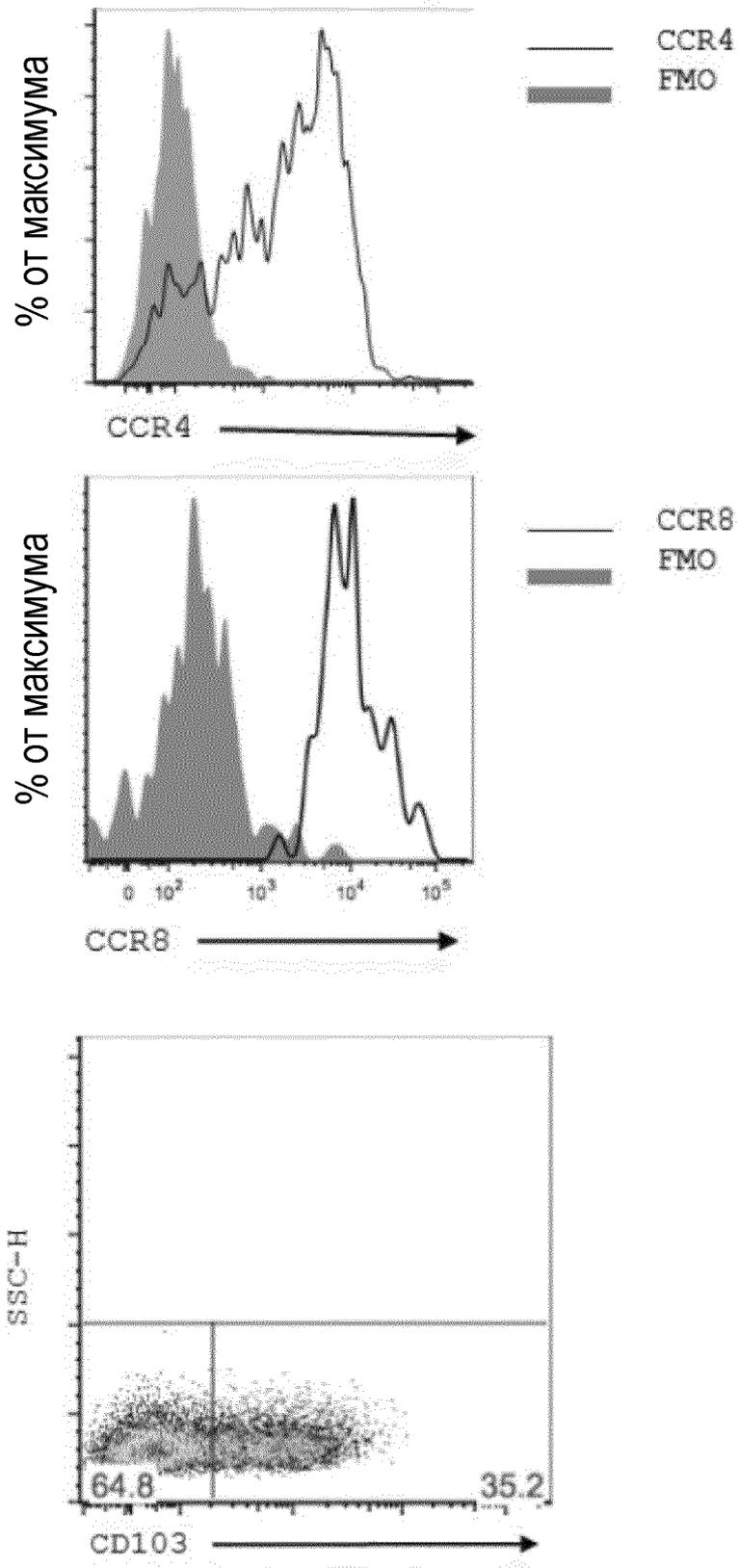
ФИГ.6С



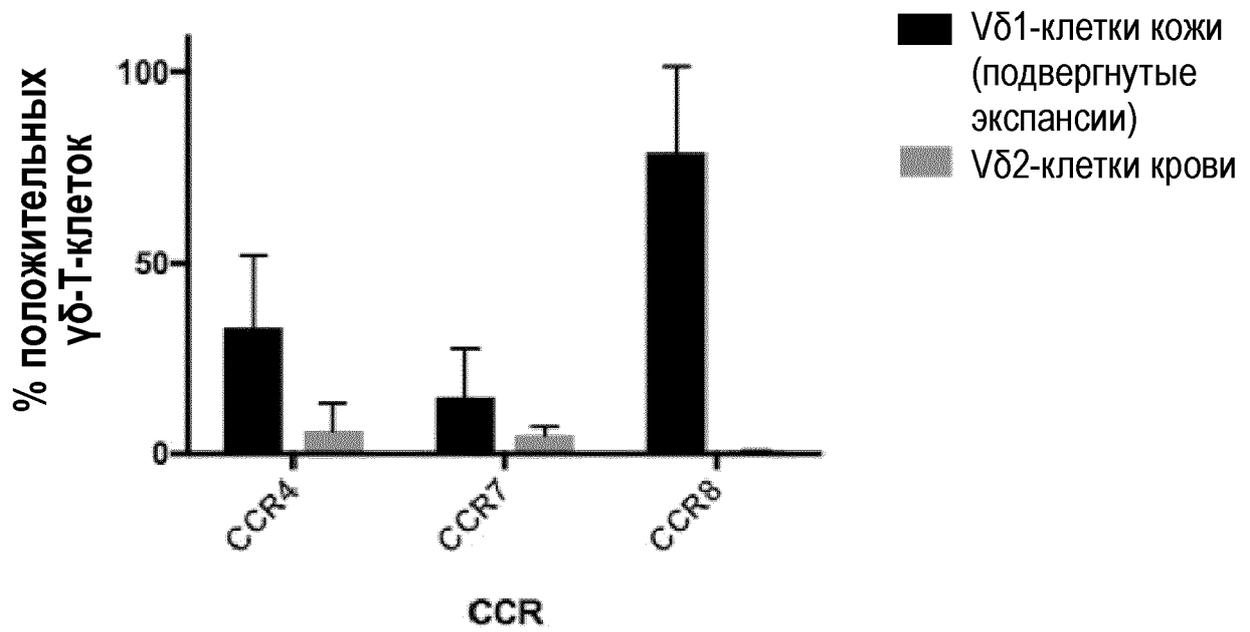
ФИГ.6D



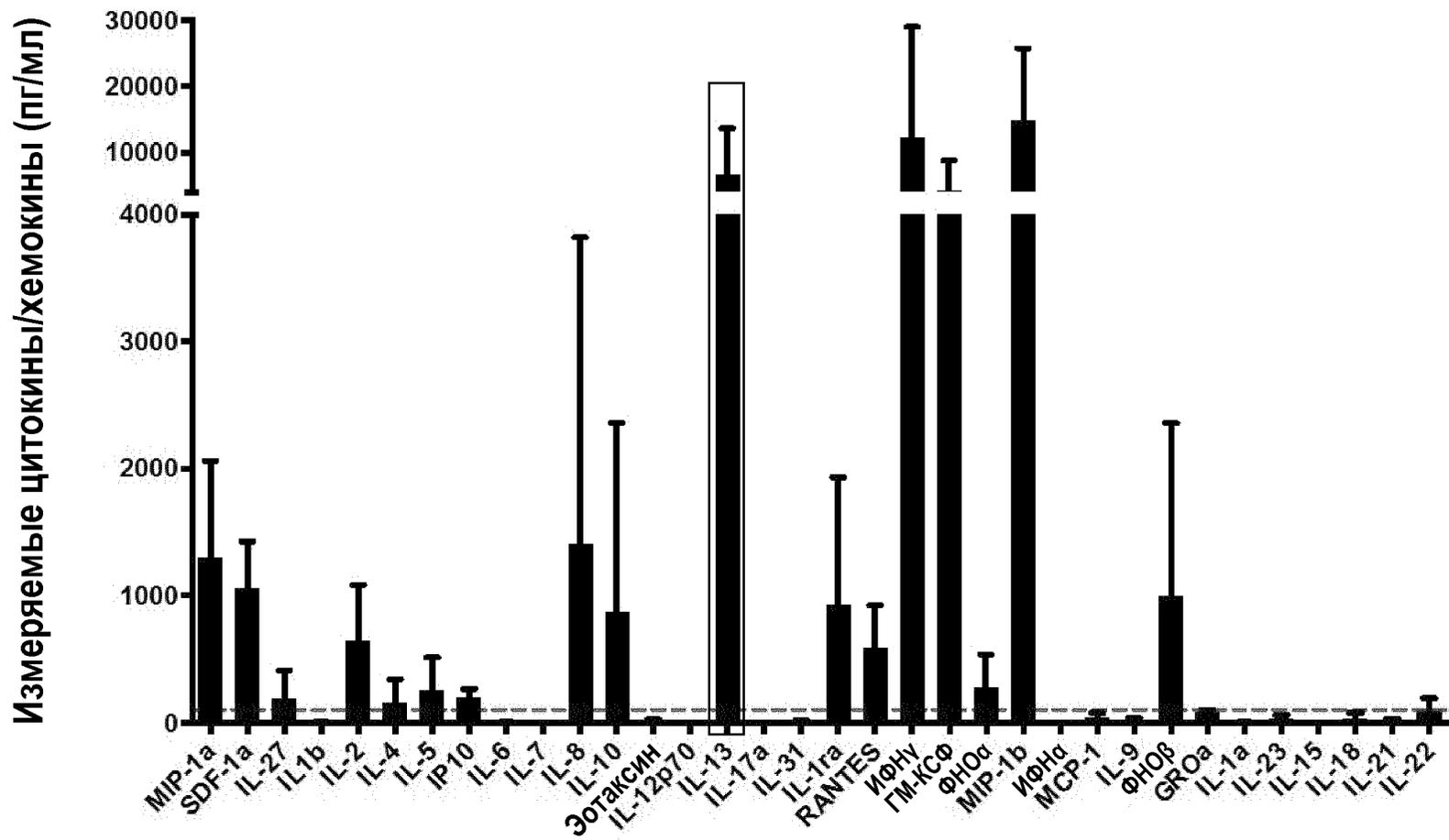
ФИГ.7А



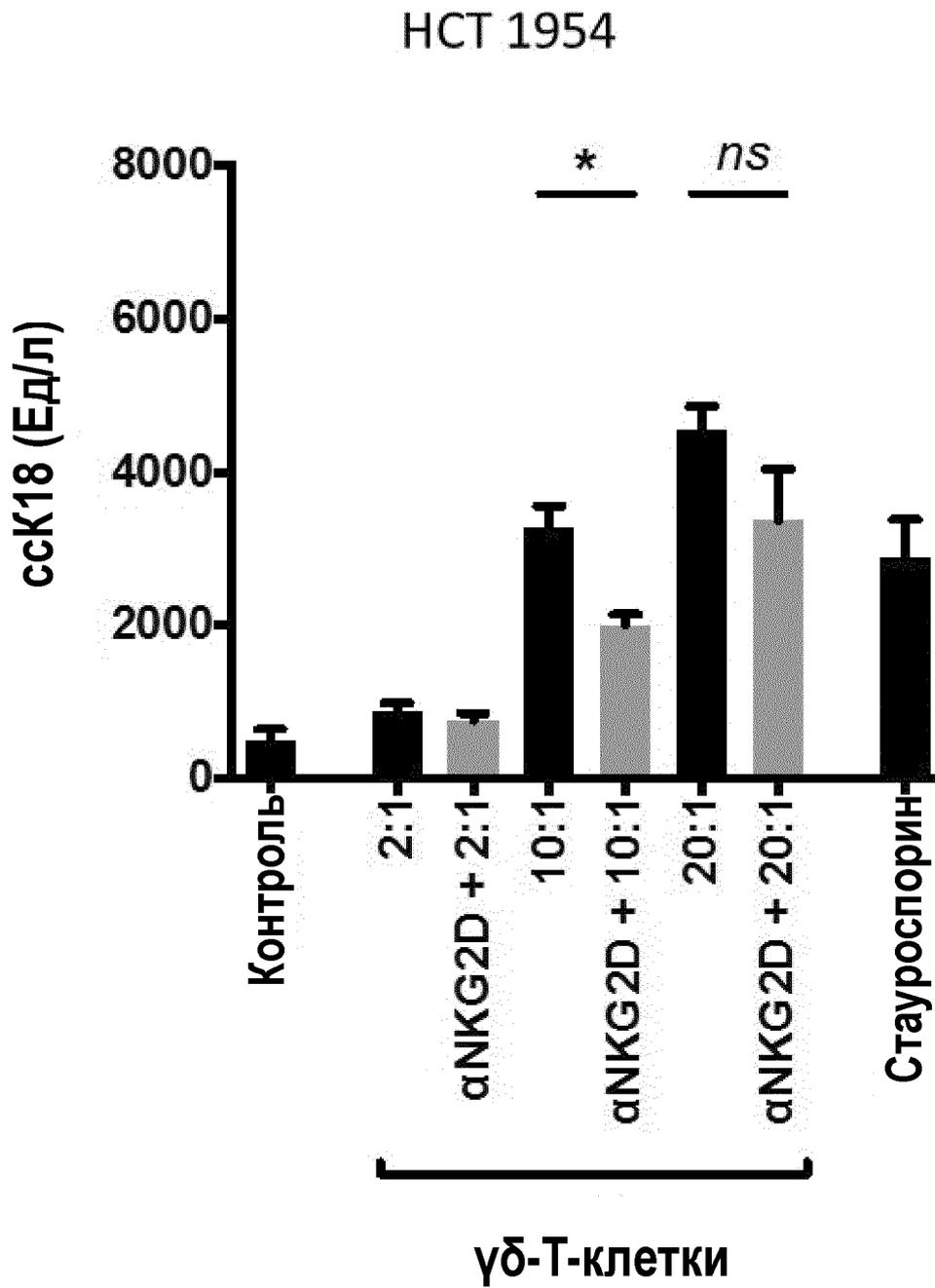
ФИГ.7В



ФИГ.8

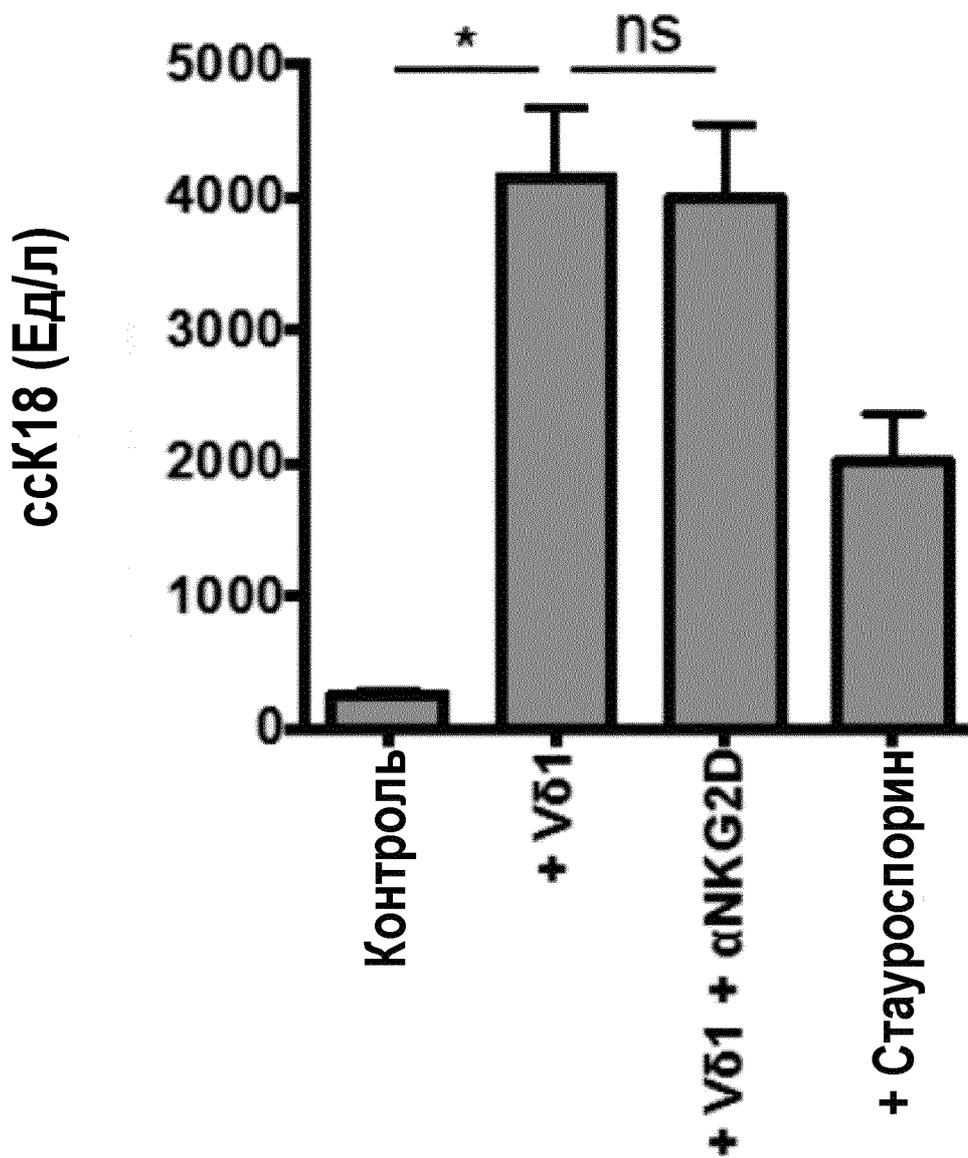


ФИГ.9А

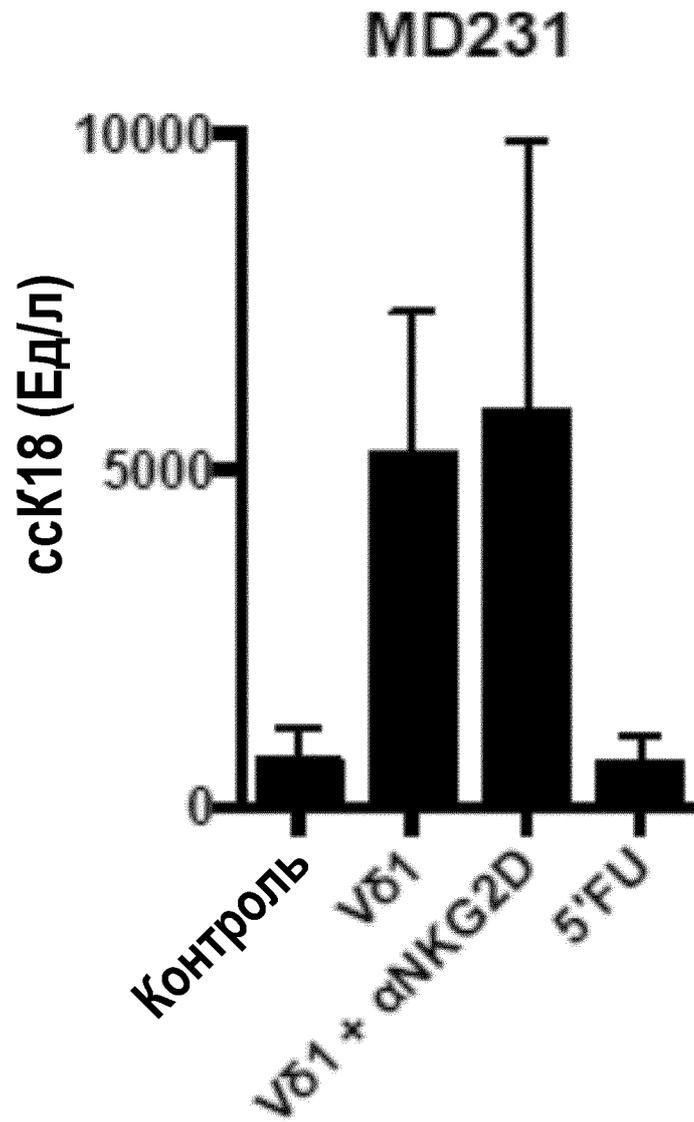


ФИГ.9В

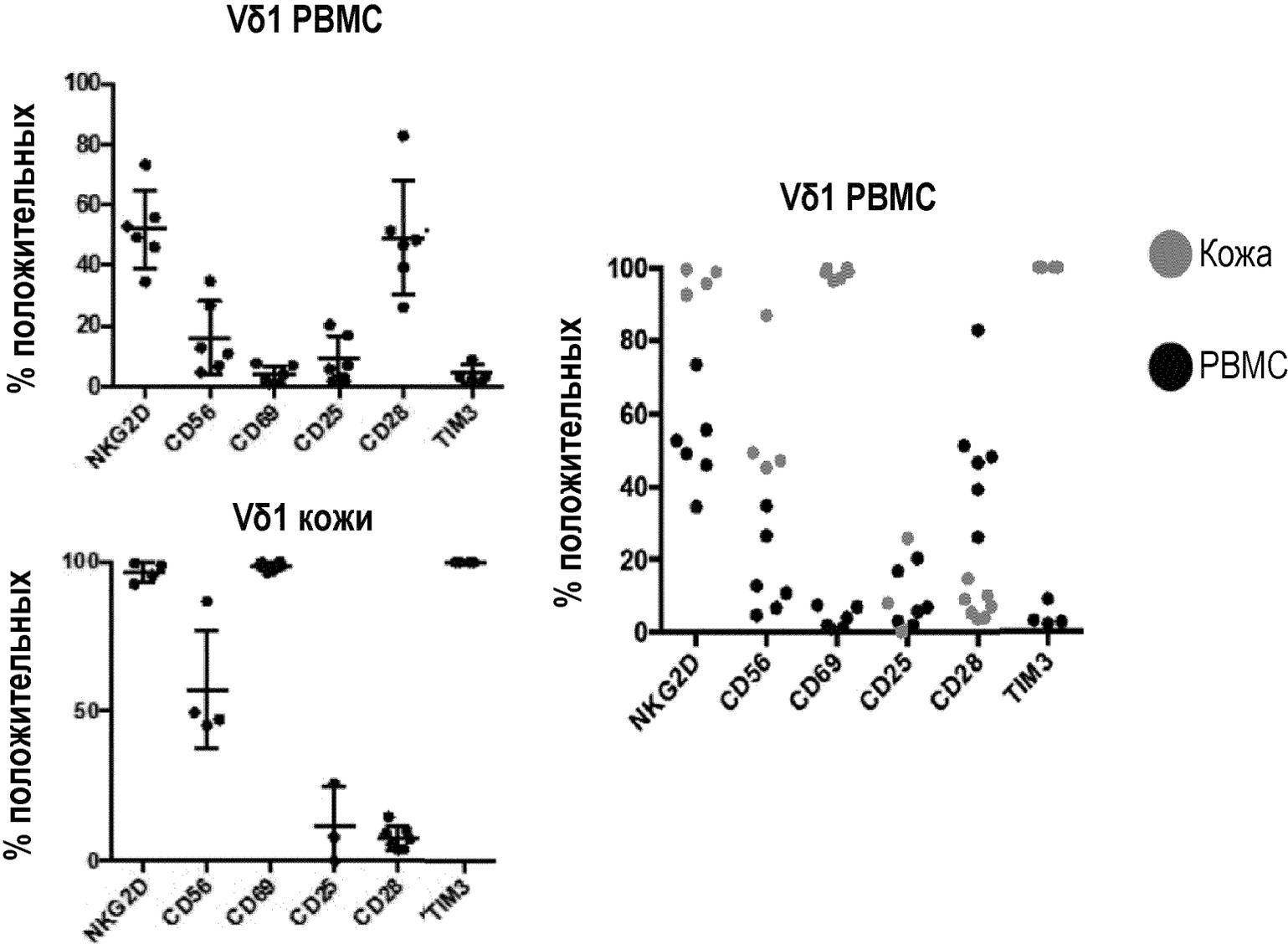
Апоптоз НСТ116



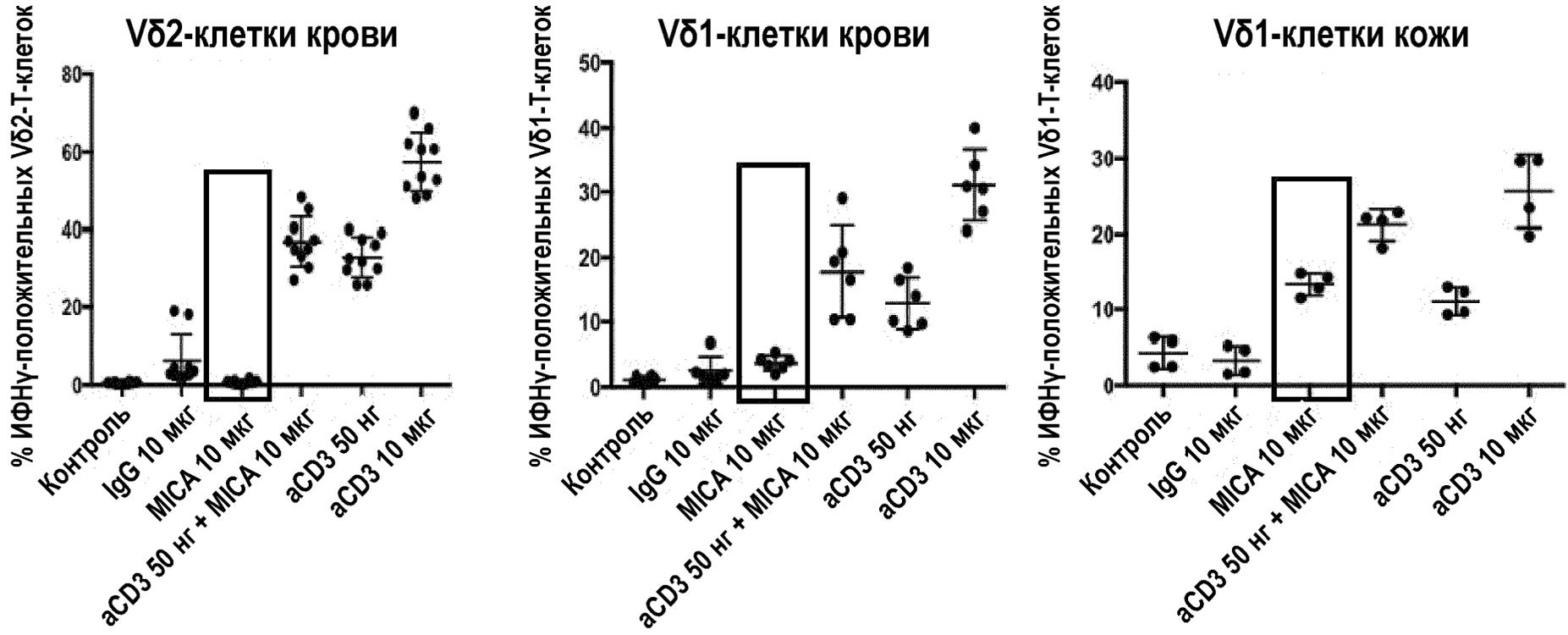
ФИГ.9С



ФИГ.10А



ФИГ.10В



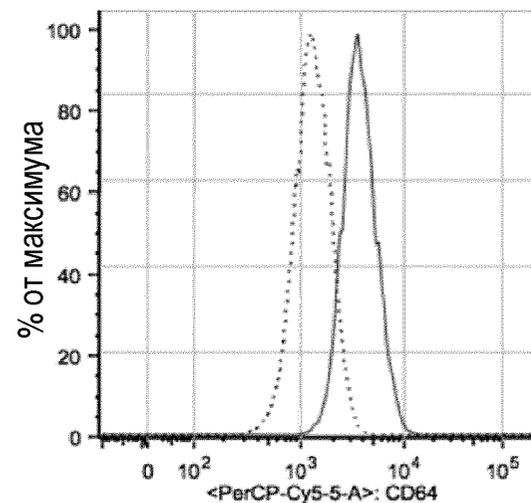
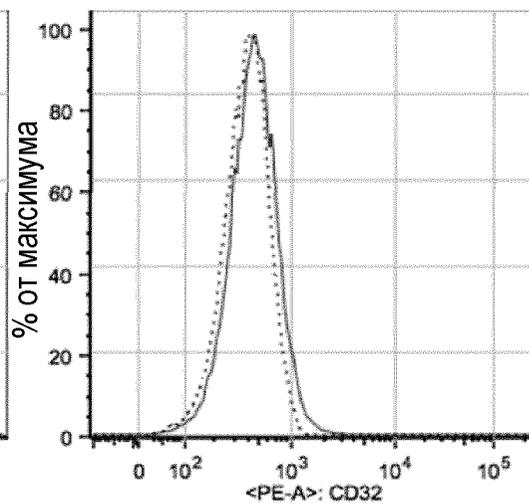
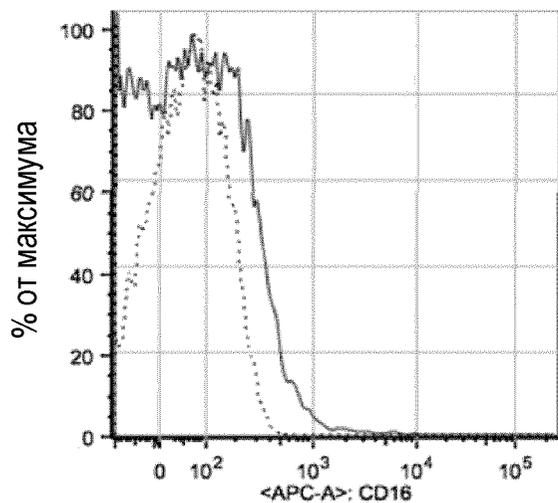
ФИГ.11

Рецептор Fc-гамма

Низкоаффинный рецептор
IIIa Fc-фрагмента IgG
(CD16a)

Низкоаффинный рецептор
IIa Fc-фрагмента IgG
(CD32)

Высокоаффинный рецептор
Ia Fc-фрагмента IgG
(CD64)

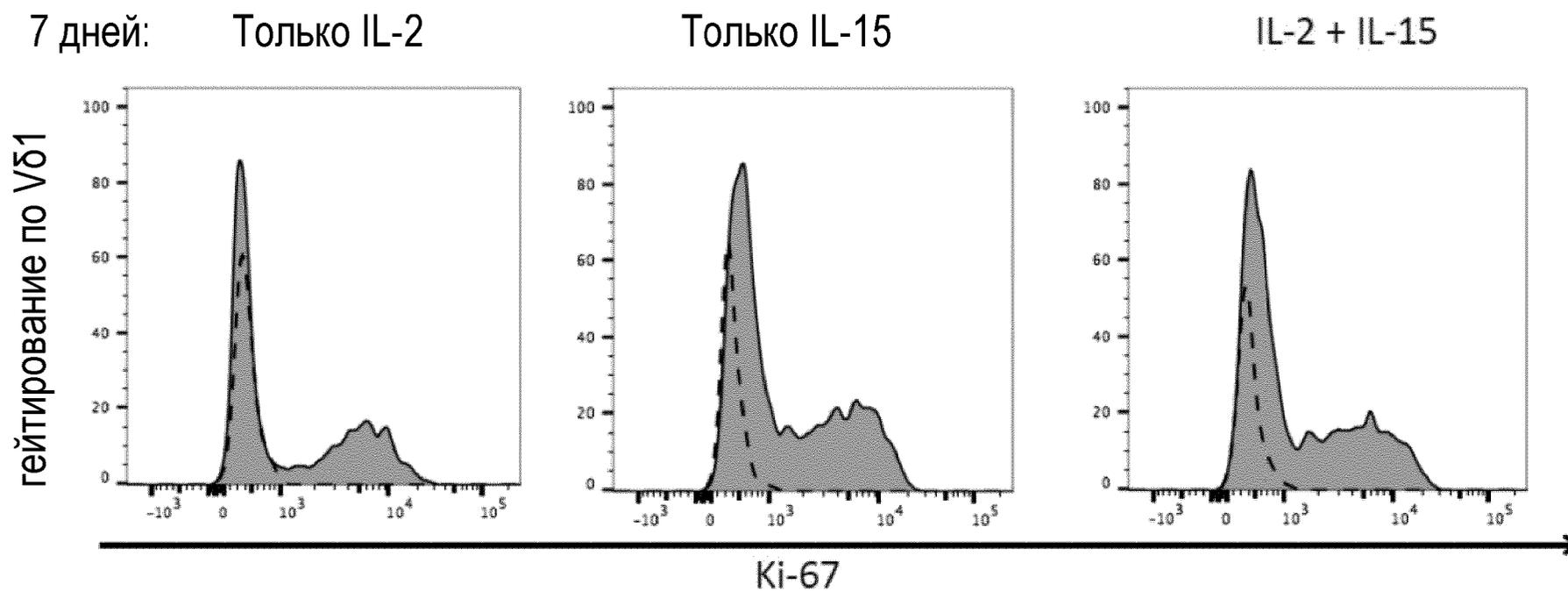


Изотипический контроль

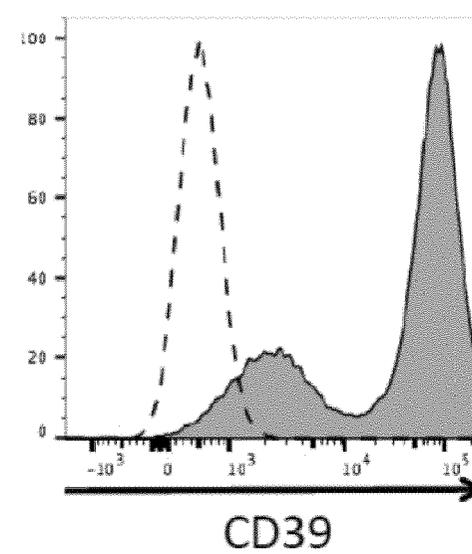
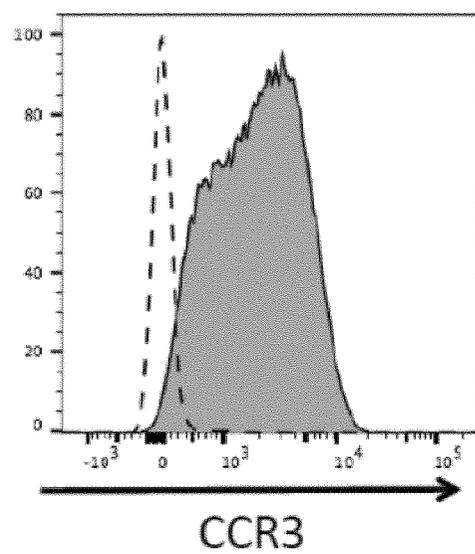
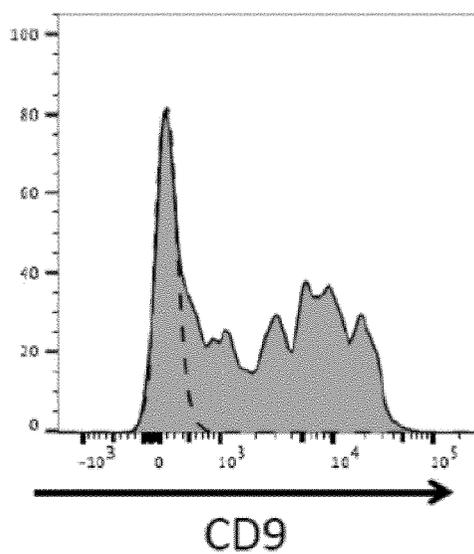
Окрашивание

1 типичный донор (из 4)

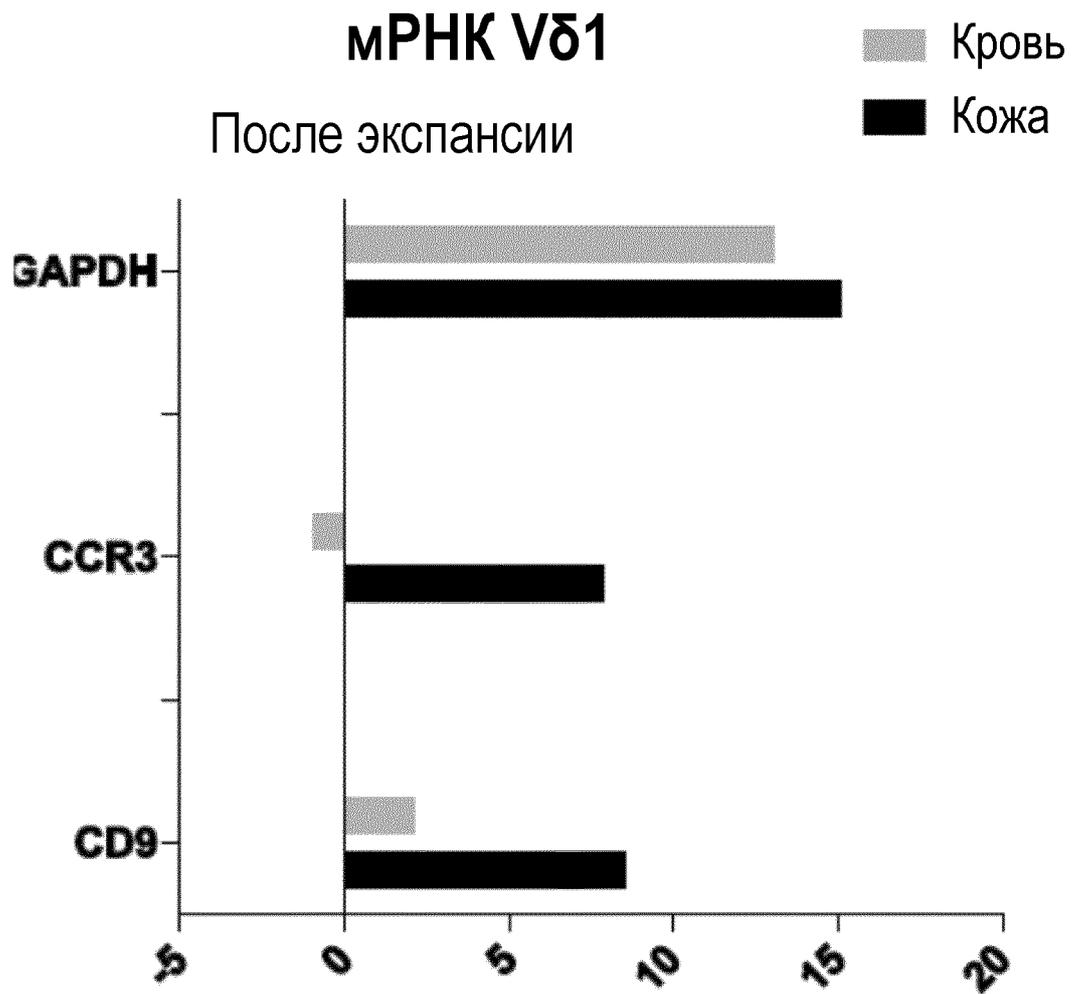
ФИГ.12



ФИГ.13

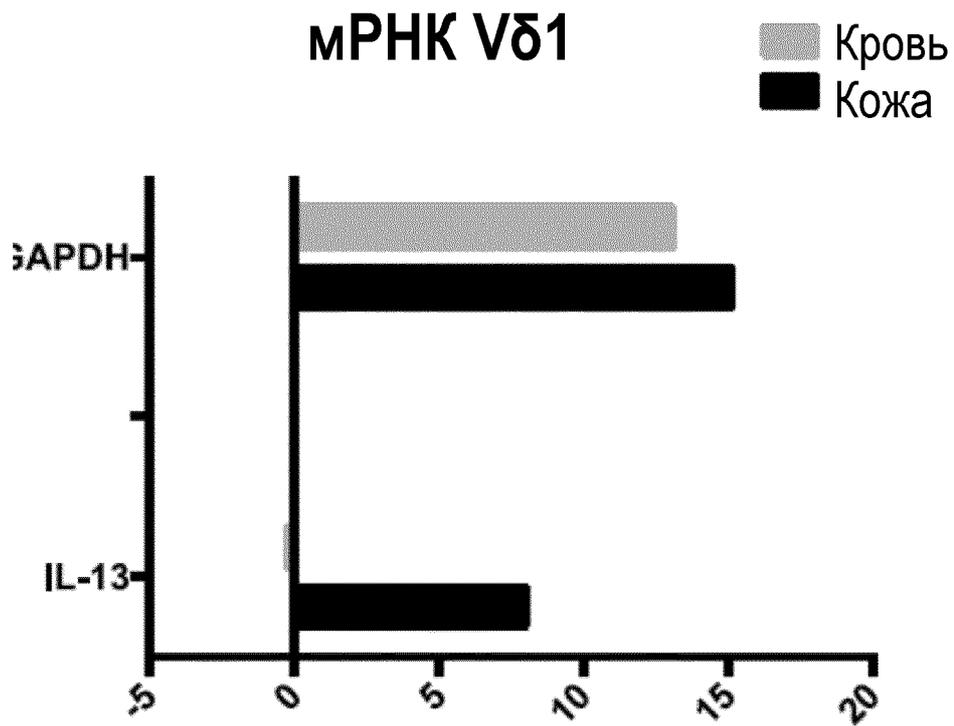


ФИГ.14



Уровни экспрессии, подвергнутые \log_2 -преобразованию и нормализованные по квантилям

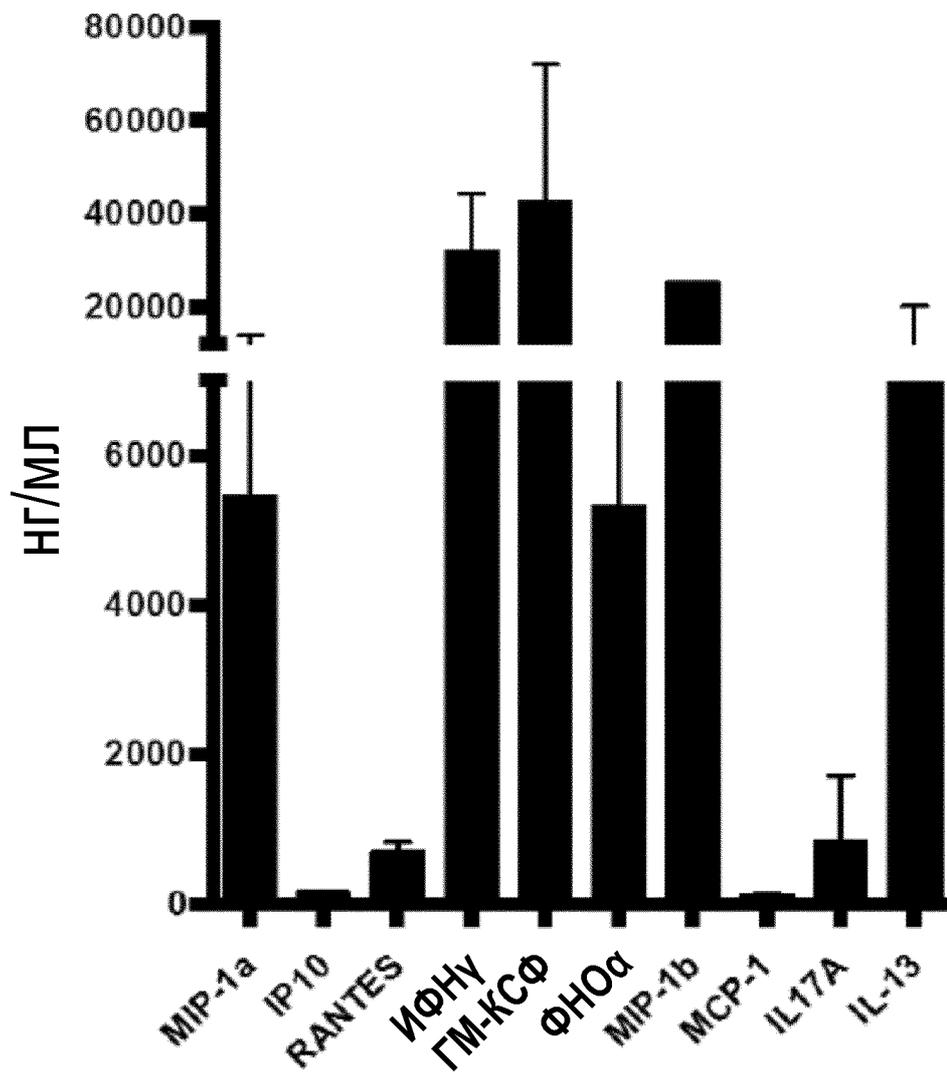
ФИГ.15



Уровни экспрессии, подвергнутые \log_2 -преобразованию и нормализованные по квантилям

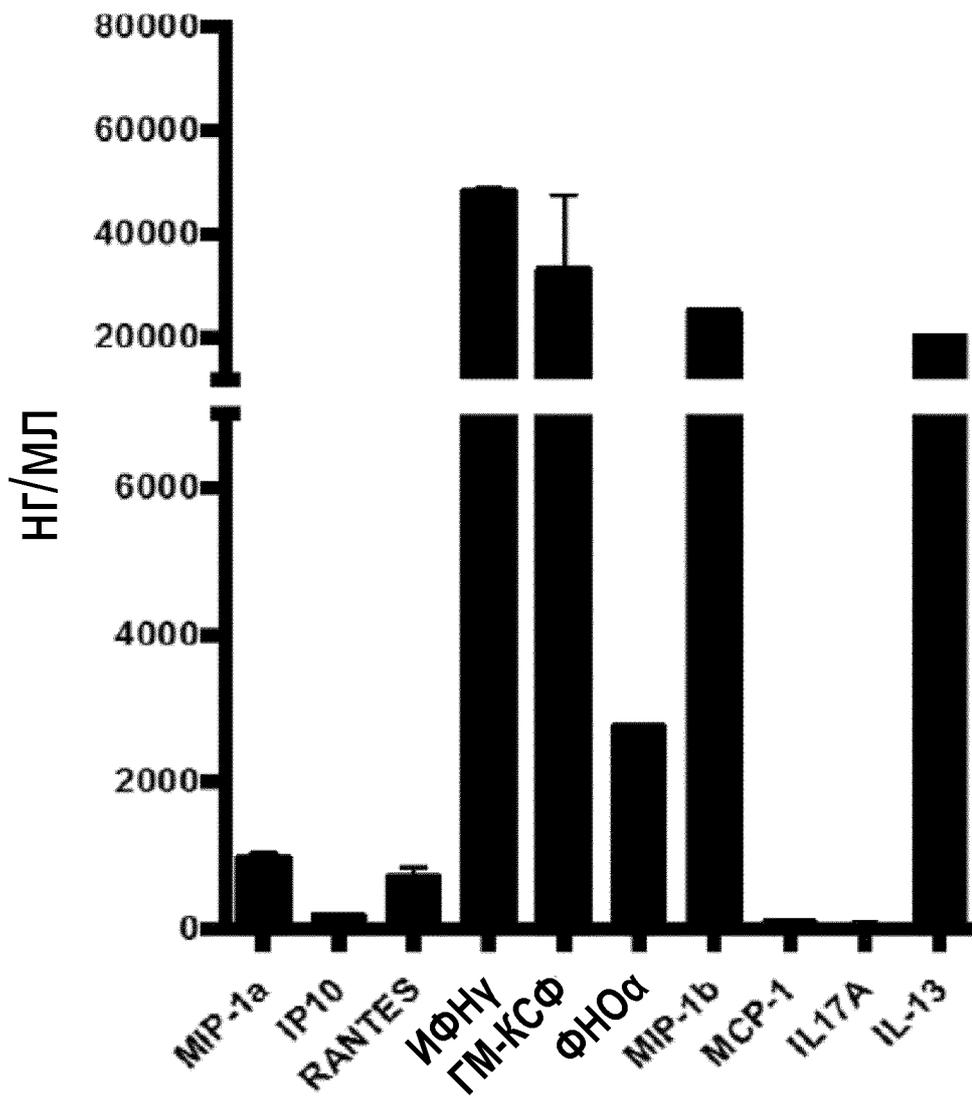
ФИГ.16А

РМА/иономицин

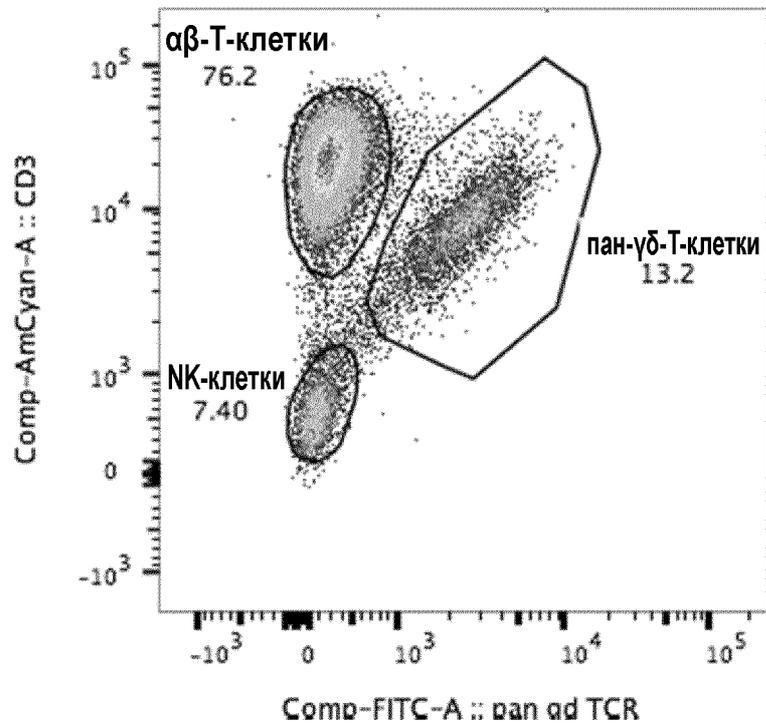


ФИГ.16В

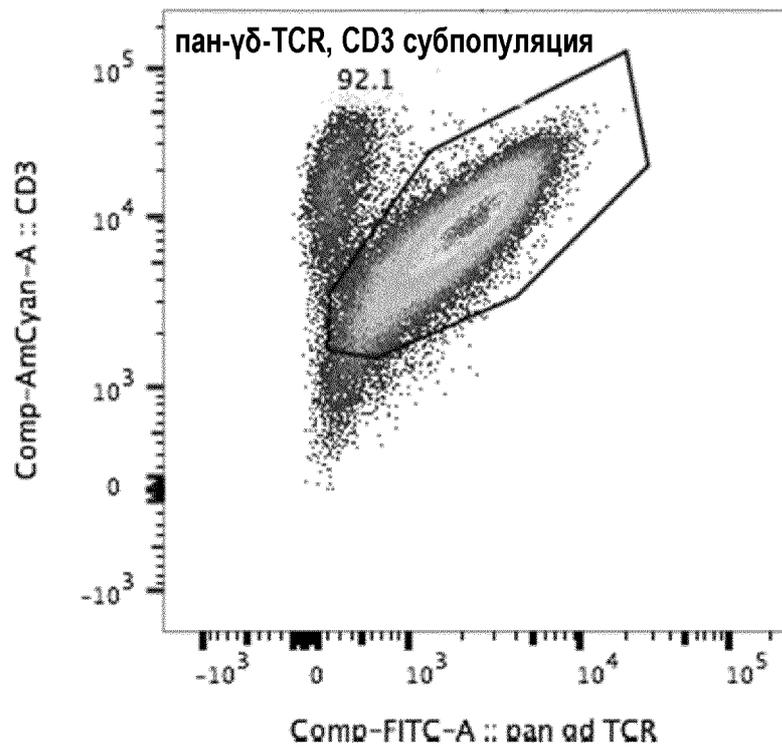
Стимуляция TCR
(антитело против CD3, 5 мкг/мл)



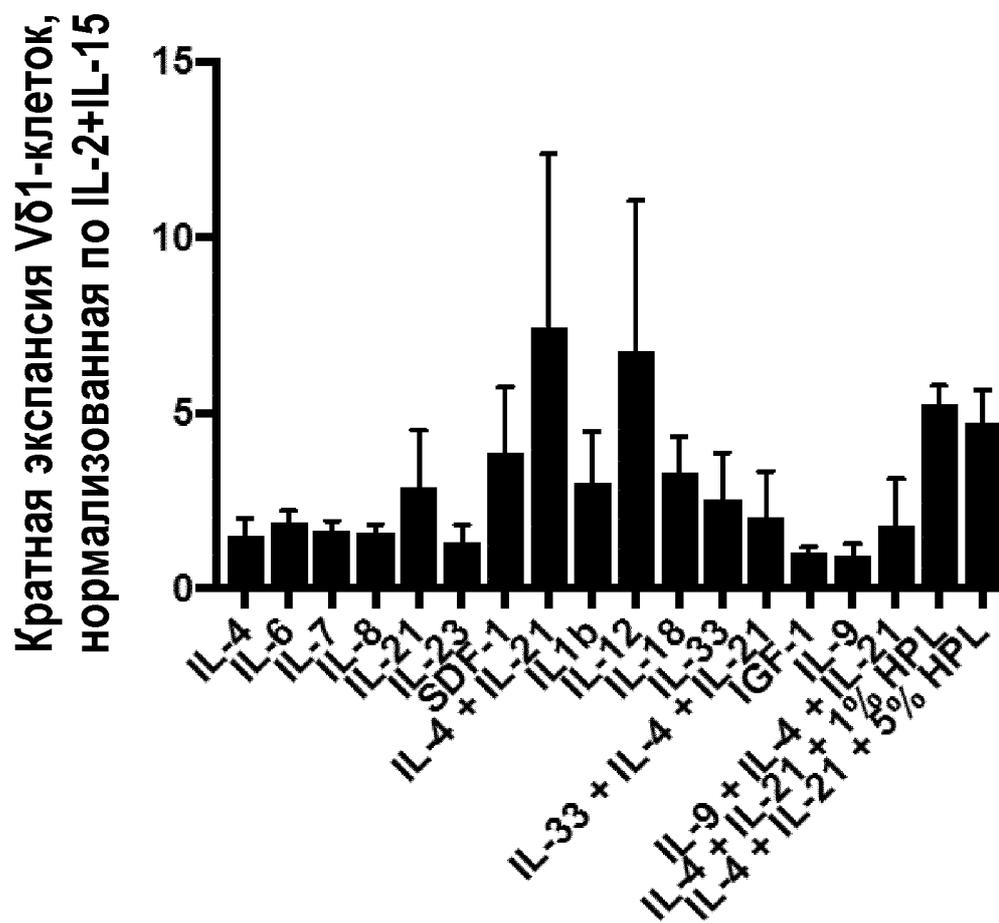
ФИГ.17А



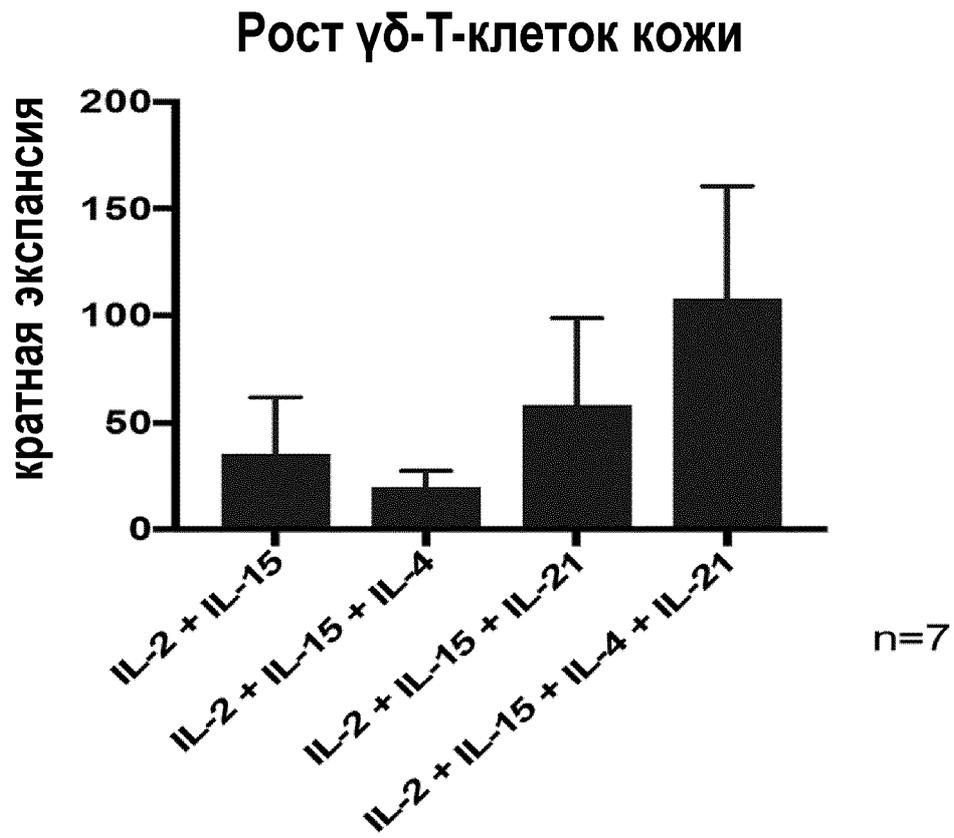
ФИГ.17В



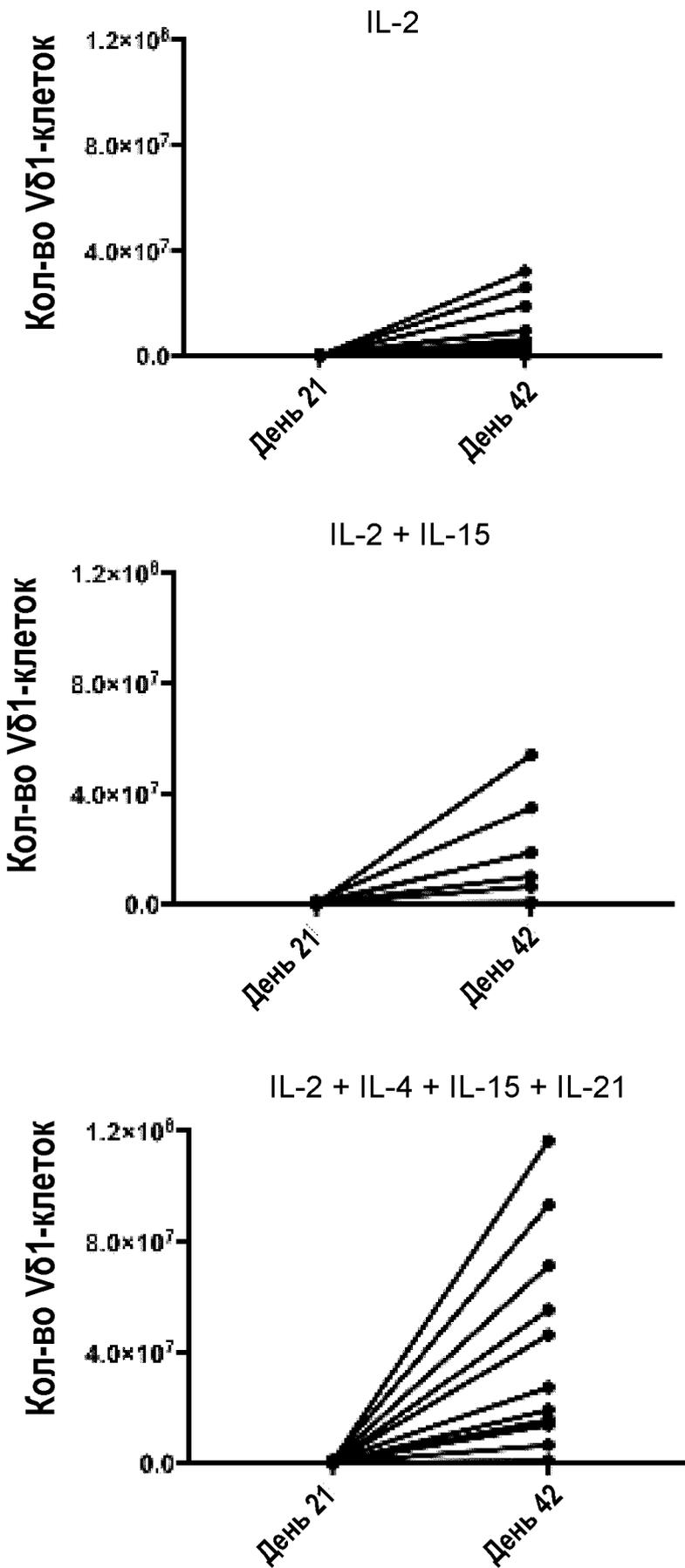
ФИГ.17С



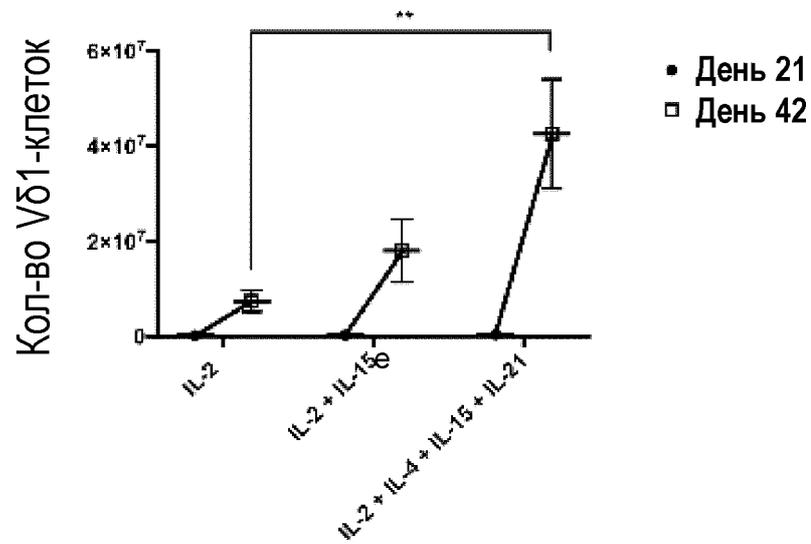
ФИГ.17D



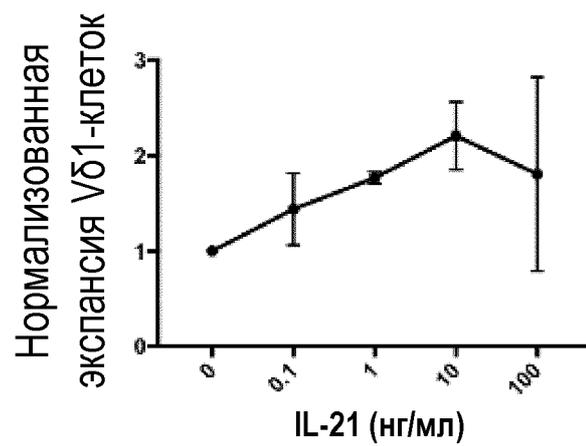
ФИГ.17Е



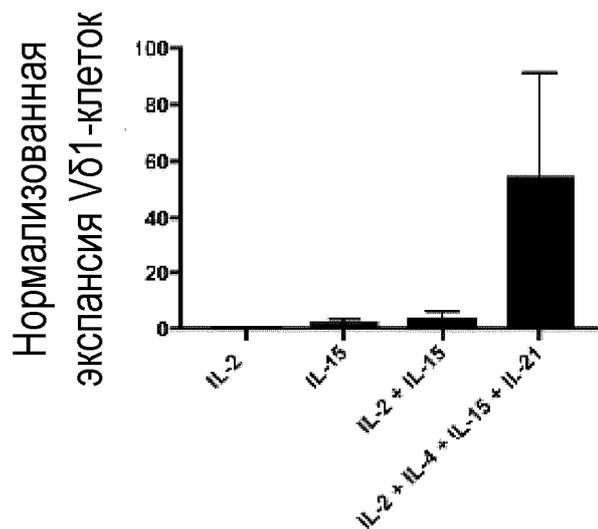
ФИГ.17F



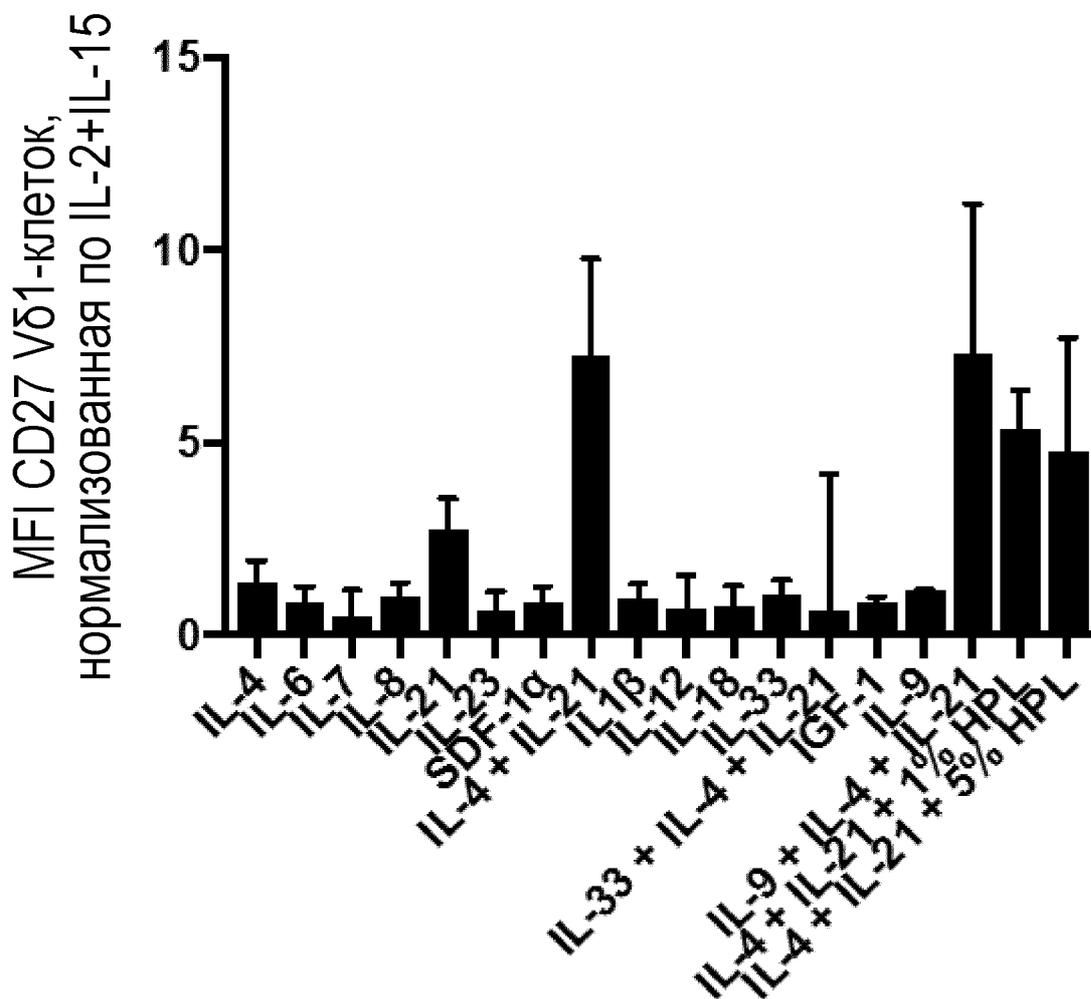
ФИГ.17G



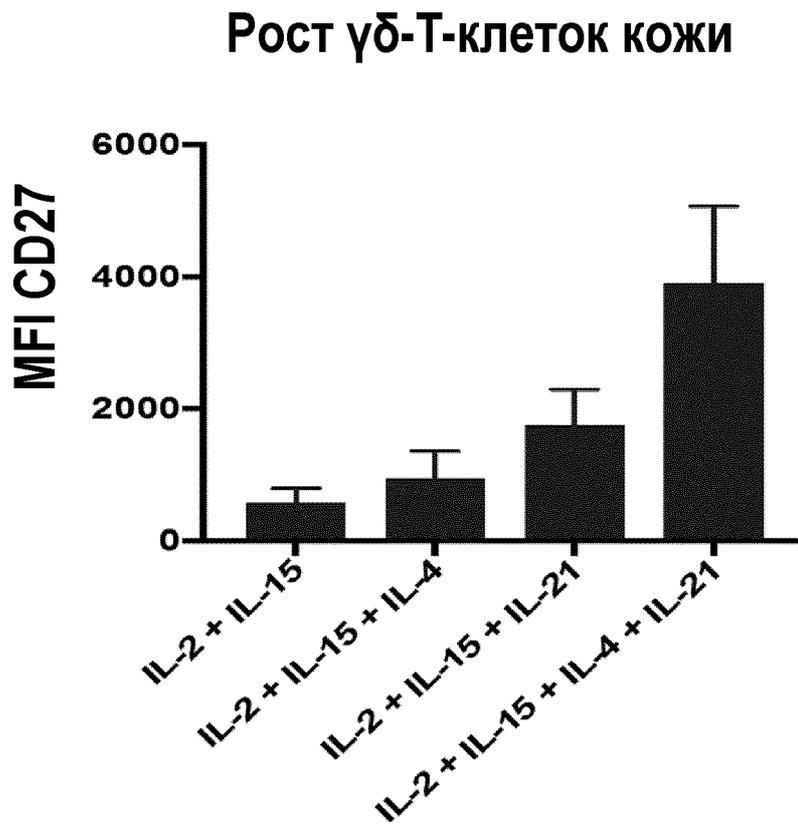
ФИГ.17H



ФИГ.18А

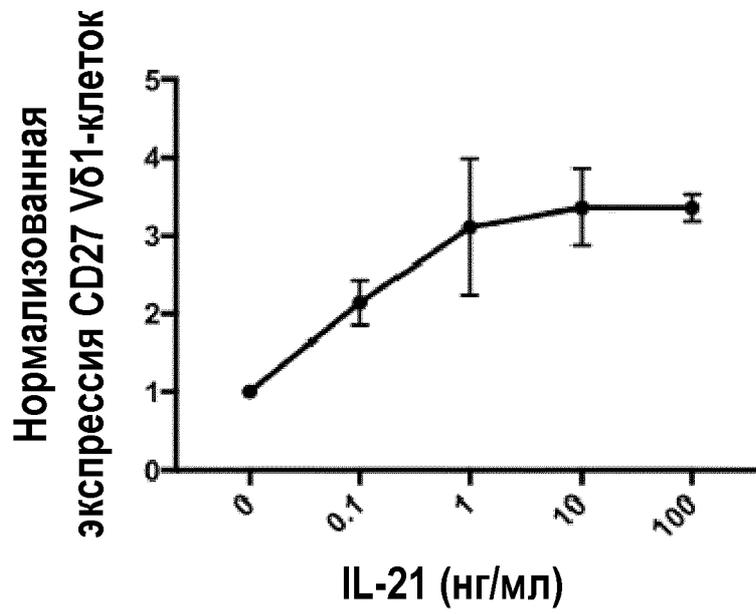


ФИГ.18В

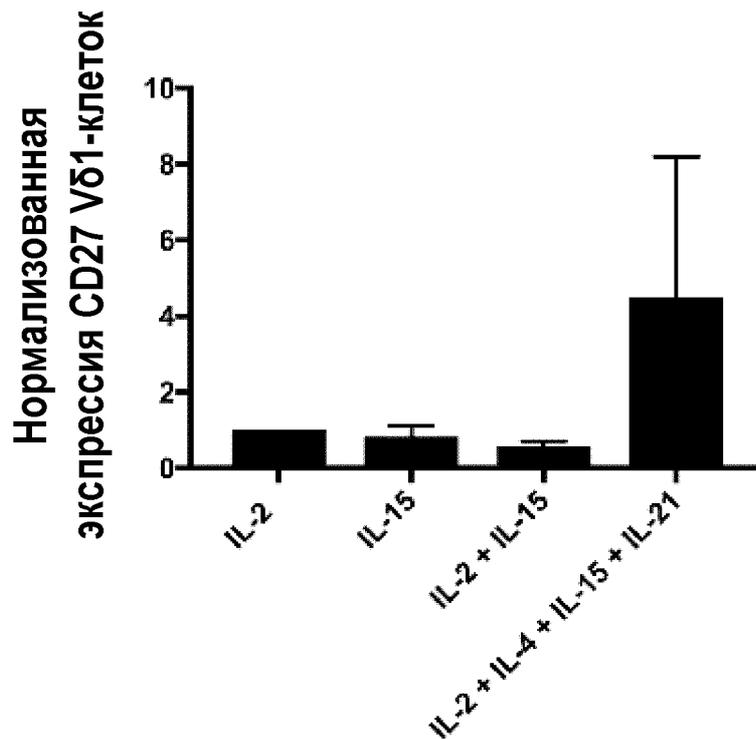


n=7

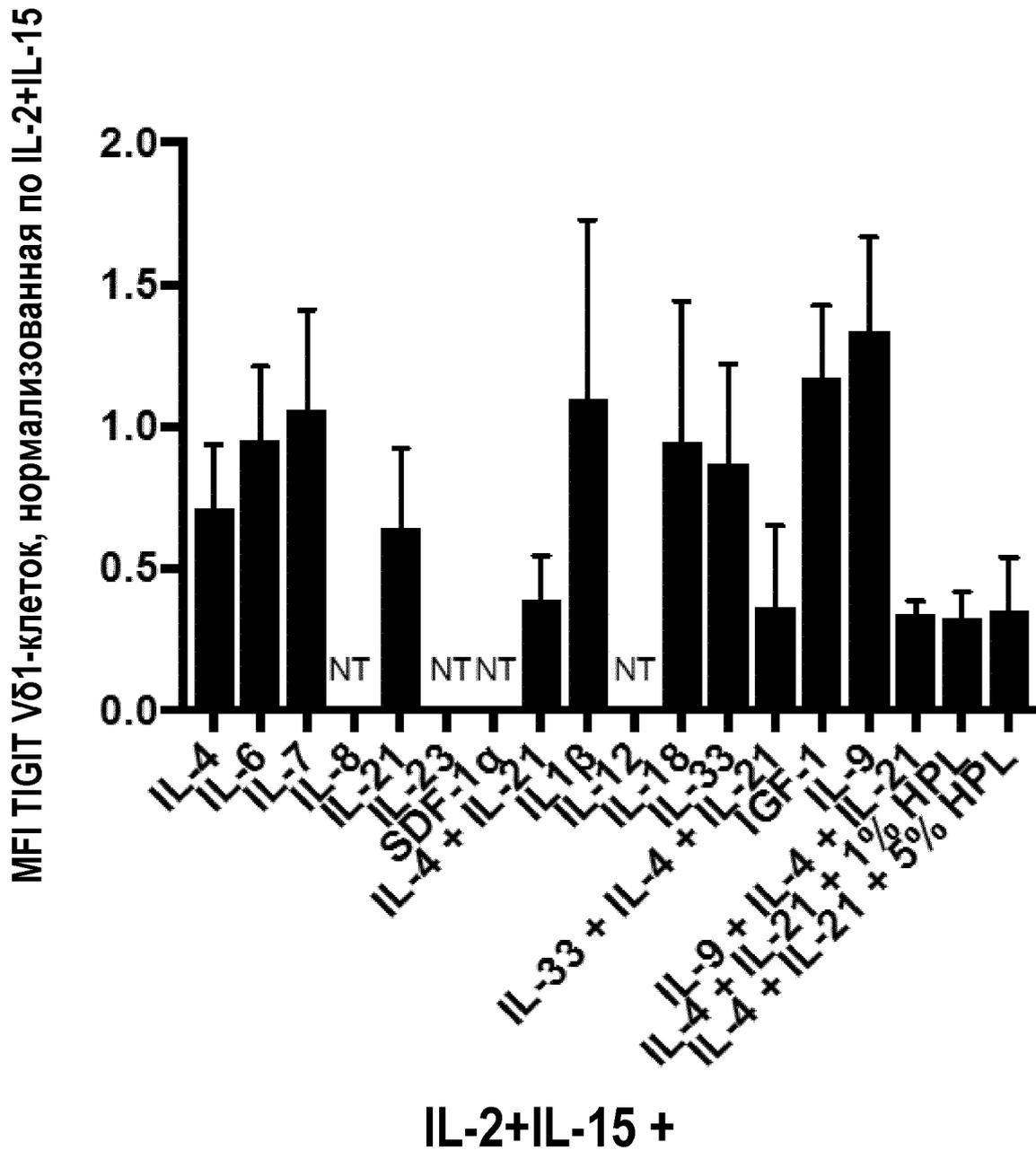
ФИГ.18С



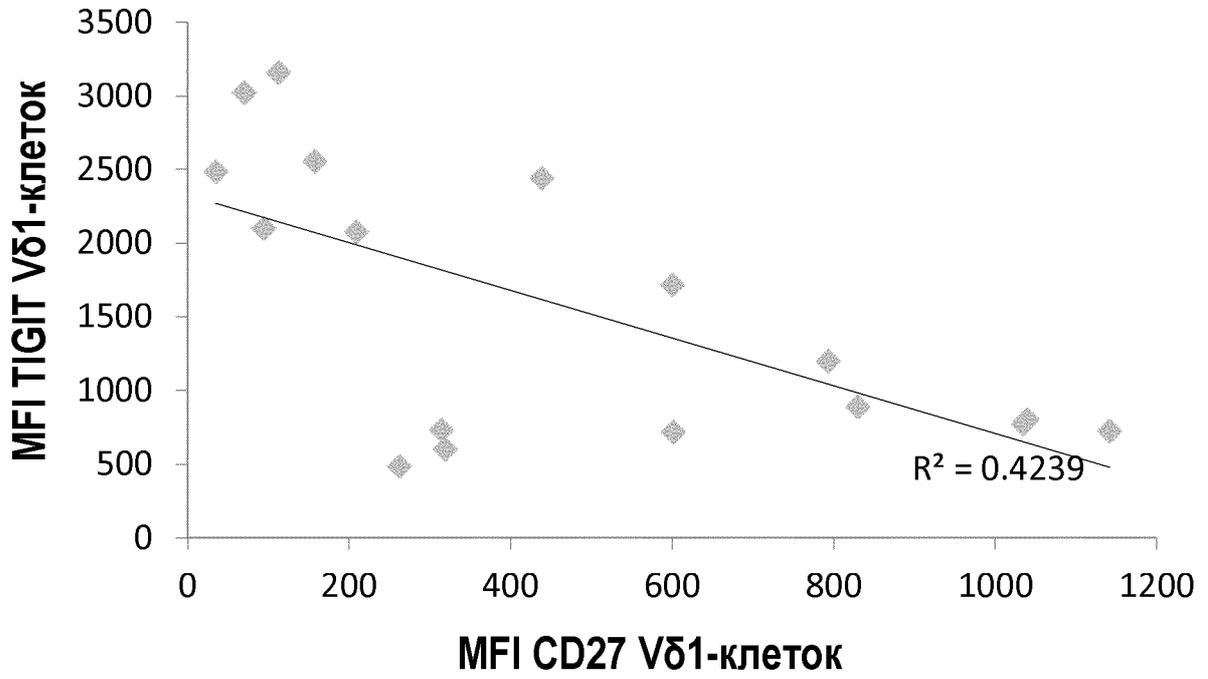
ФИГ.18D



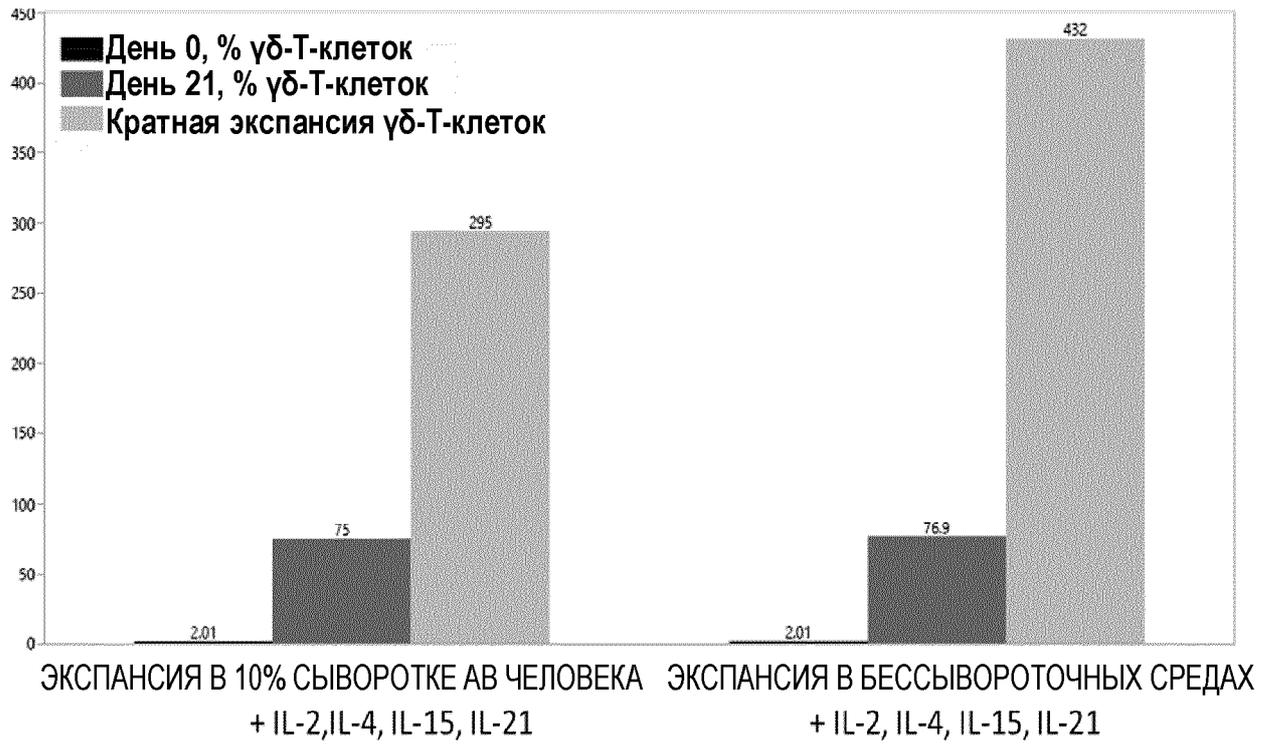
ФИГ.19



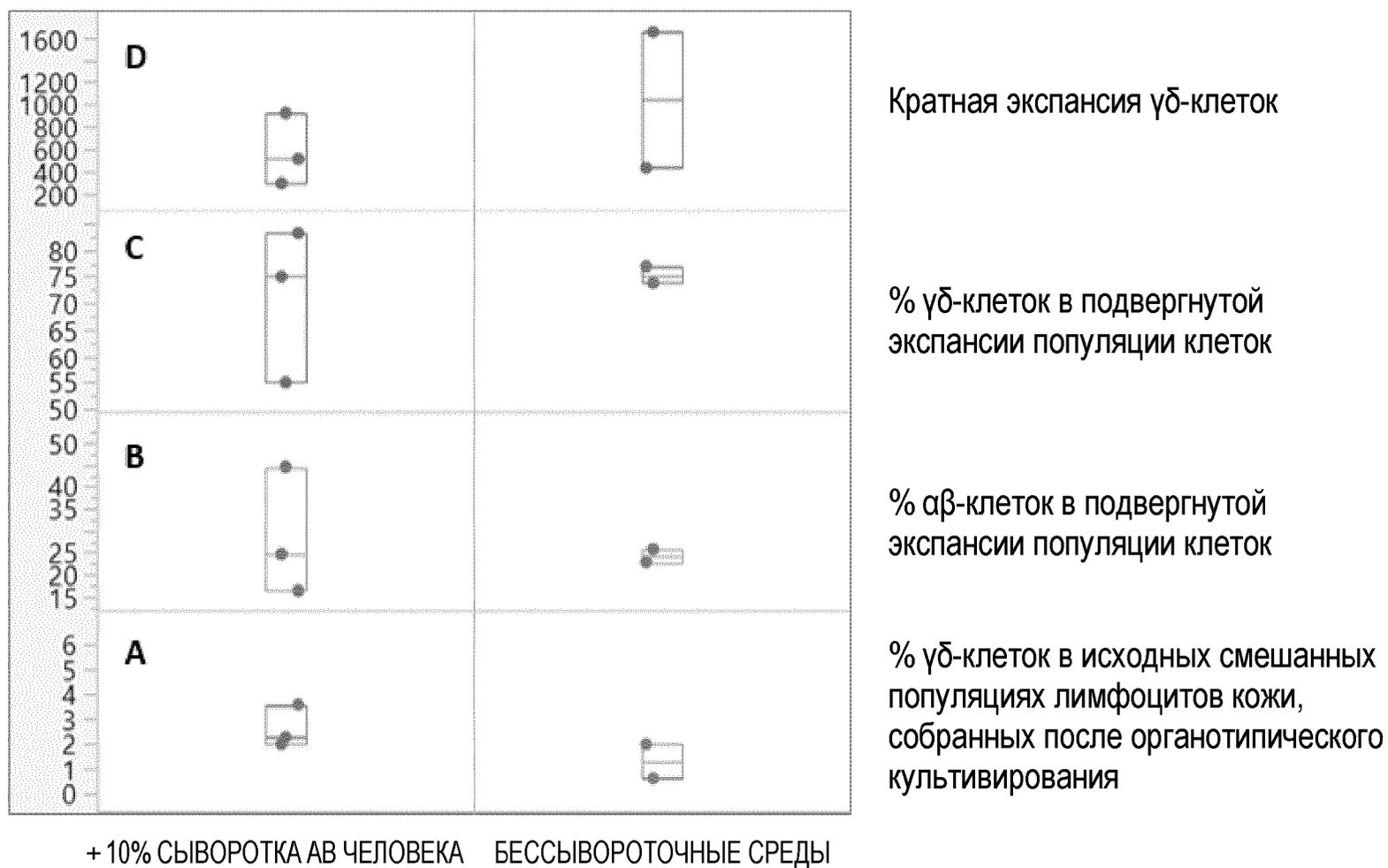
ФИГ.20



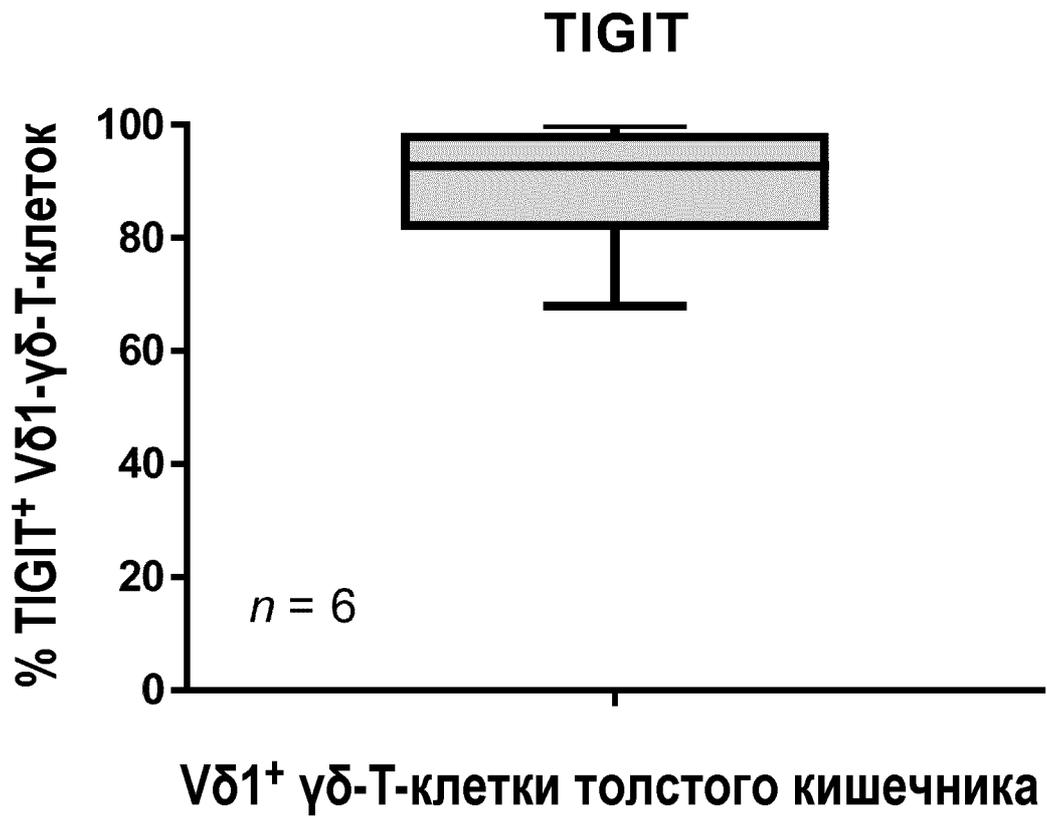
ФИГ.21



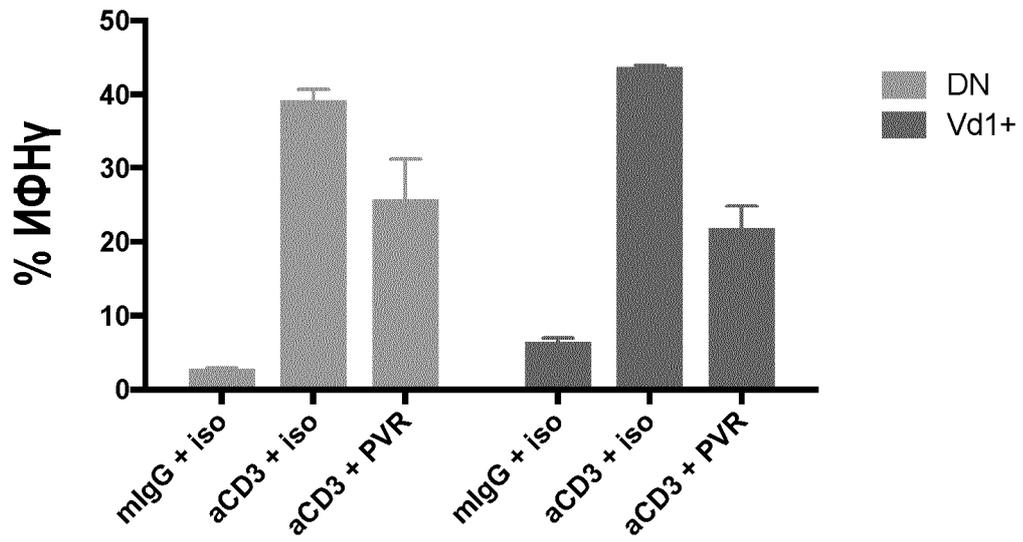
ФИГ.22



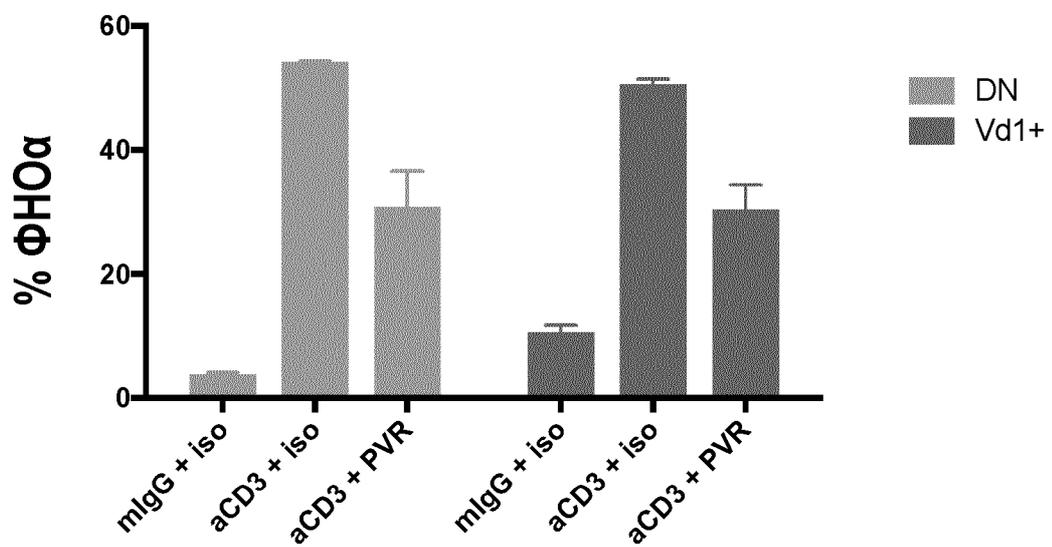
ФИГ.23



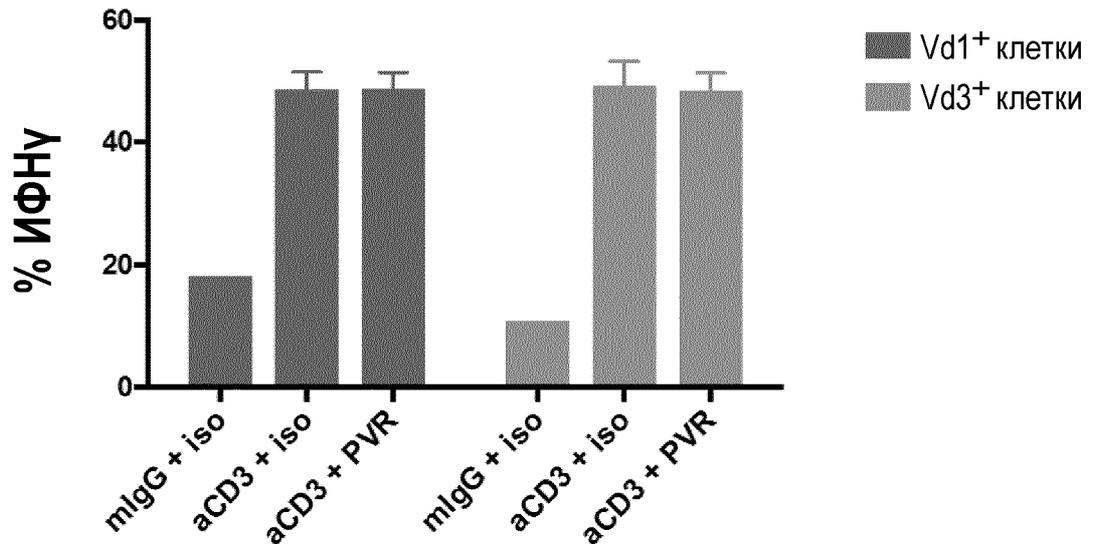
ФИГ.24А



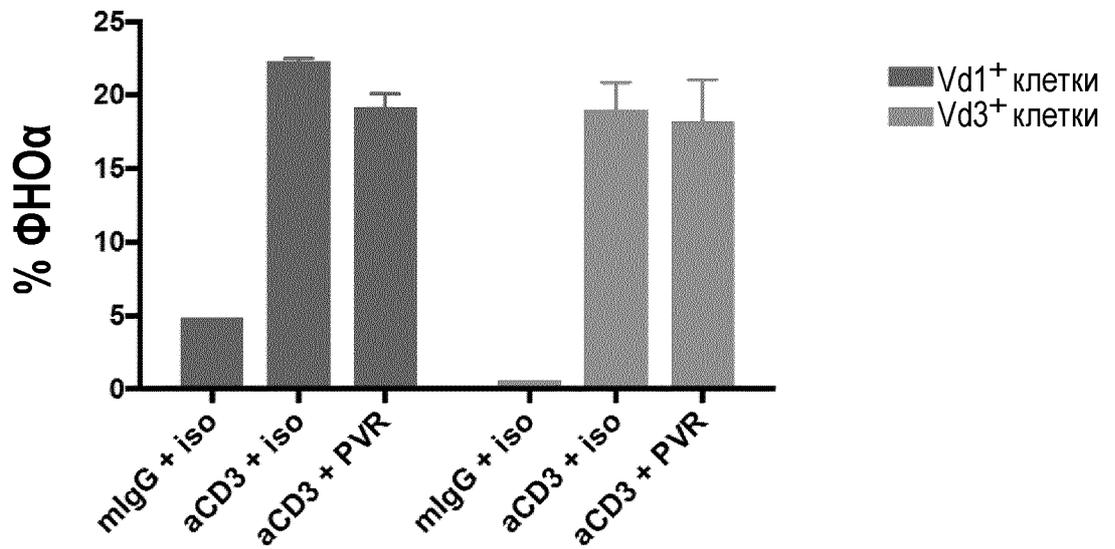
ФИГ.24В



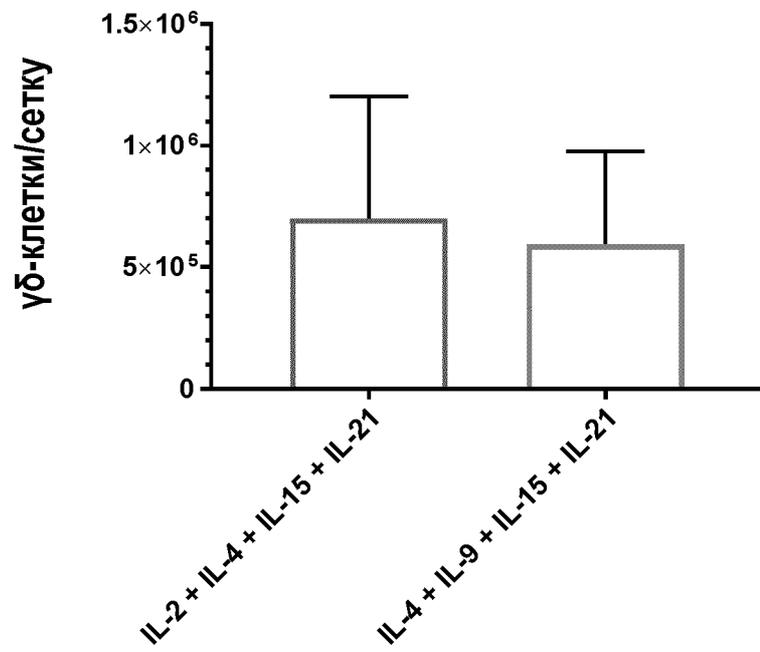
ФИГ.25А



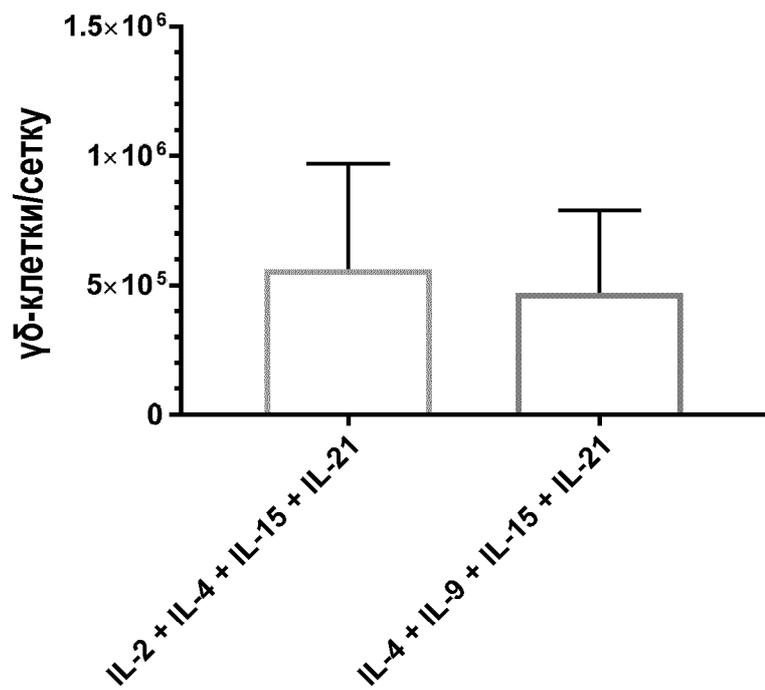
ФИГ.25В



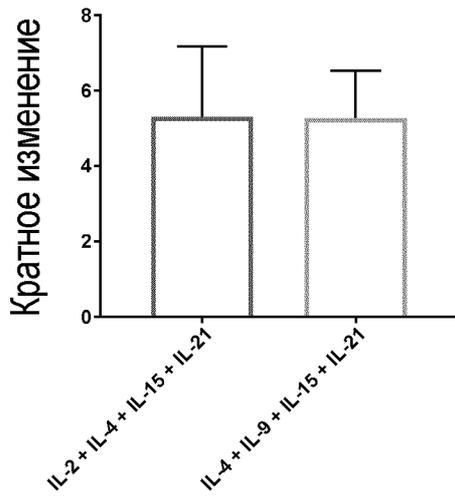
ФИГ.26А



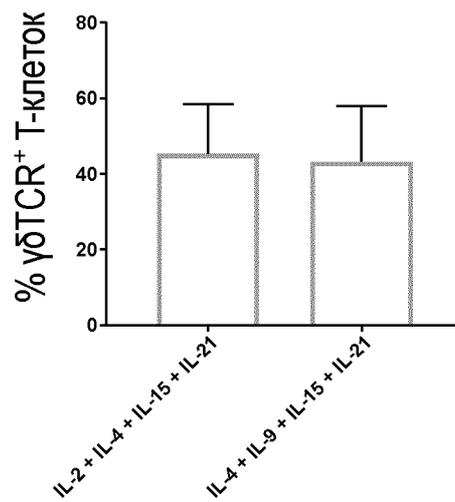
ФИГ.26В



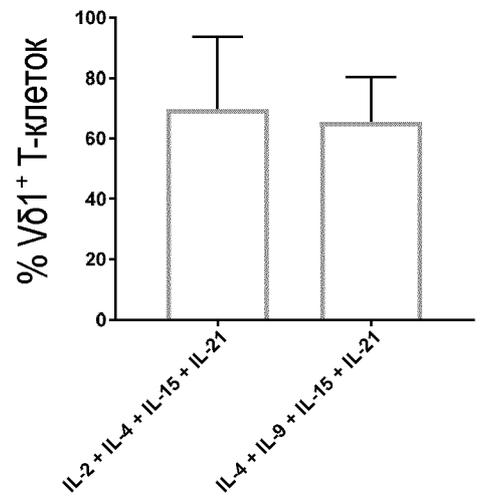
ФИГ.27А



ФИГ.27В



ФИГ.27С



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391141**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

C12N 5/0783 (2010.01)**A61K 35/17** (2015.01)

СПК:

C12N 5/0636**A61K 35/17**

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 5/0783, A61K 35/17, A61K 38/20, A61K 38/21, A61K35/14, A61K 35/26, A61K 39/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, EAPATIS, Patentscope, elubrary.ru, Pubmed, Embase, Google, Яндекс**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2015/189356 A1 (POLYBIOCEPT AB) 2015-12-17 с.5-7, 18-19, 40; п.31; пример 4	1-20
A	WO 2016/198480 A1 (LYMPHACT-LYMPHOCYTE ACTIVATION TECH S.A.) 2016-12-15 с.35-40; таблицы 5, 11, 12; пп.41-62; рис. 6, 8	1-20
A	I. PETRINI ET AL: "Mesenchymal cells inhibit expansion but not cytotoxicity exerted by gamma-delta T cells" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, 2009, Vol 39, pp.813-818 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2009.02171.x	1-20
A	WOOLF RICHARD ET AL: "Potential for innate-like responsiveness of resident T cells in human skin: a new perspective on tissue immunosurveillance", THE LANCET (LETTERS TO THE EDITOR), 2016, Vol. 387 DOI:10.1016/S0140-6736(16)00495-5	1-20

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

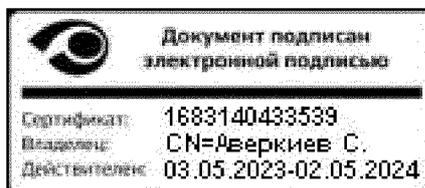
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 24 ноября 2023 (24.11.2023)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев