

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090527** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.25

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.01

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЙ CAR-T

(31) **1715918.7**

(72) Изобретатель:
**Патакас Агапитос, Лондон Тимоги,
Косимо Эмилио (GB)**

(32) **2017.09.29**

(33) **GB**

(86) **PCT/GB2018/052801**

(87) **WO 2019/064030 2019.04.04**

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

(71) Заявитель:

ТиСи БАЙОФАРМ ЛИМИТЕД (GB)

(57) Настоящее изобретение относится к гамма-дельта($\gamma\delta$)-Т-клеткам и/или к природным клеткам-киллерам (NK), экспрессирующим конструкции для обеспечения экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), включающего сигнальный домен рецепторов Fc γ . В соответствии с этим настоящее изобретение также относится к конструкциям, включающим такие CAR, и к способам введения таких CAR в клетки и экспрессии таких CAR в клетках, содержащих рецепторы гамма-дельта($\gamma\delta$)-Т-клеток и/или природных клеток-киллеров (NK).

A Костимулирующий CAR с общей целью Fc γ

Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации общей цели Fc γ
Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Трансмембранный домен и домен активации общей цели Fc γ	

B Костимулирующий CAR со стимулирующим доменом CD32a

Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации CD32a
-------------------------	---------------------------------------	--	-----------------------

C Костимулирующий CAR со стимулирующим доменом CD32c

Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации CD32c
-------------------------	---------------------------------------	--	-----------------------

A1

202090527

202090527

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562106EA/042

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ CAR-T

Область техники

Настоящее изобретение относится к гамма-дельта($\gamma\delta$)-Т-клеткам и/или к природным клеткам-киллерам (NK), экспрессирующим конструкции для обеспечения экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR), включающего сигнальный домен Fc γ -рецепторов. В соответствии с этим, настоящее изобретение также относится к конструкциям, включающим такие CAR, и к способам введения таких CAR в клетки и экспрессии таких CAR в клетках, содержащих рецепторы гамма-дельта($\gamma\delta$)-Т-клеток и/или природных клеток-киллеров (NK).

Предпосылки создания изобретения

Клеточные рецепторы иммуноглобулинов (Ig) (Fc-рецепторы) были идентифицированы четыре десятилетия назад, и эти рецепторы играют центральную роль в инициации и продуцировании иммунного ответа. Эти рецепторы определяют пороговые значения для активации В-клеток, регулируют созревание дендритных клеток и обеспечивают взаимосвязь между специфичностью гуморальных ответов и природными эффекторными функциями, такими как фагоцитоз и антитело-зависимая клеточно-опосредуемая цитотоксичность (ADCC). У всех видов млекопитающих, изученных до настоящего времени, были идентифицированы Fc-рецепторы (FcR) четырех различных классов, а именно, Fc γ RI (CD64), FcR γ II (CD32), FcR γ III (CD16) и FcR γ IV, которые распознают IgG. В зависимости от их функции, они могут быть подразделены на два класса: активирующие и ингибирующие рецепторы, которые передают сигналы посредством мотива активации иммунорецептора на основе тирозина (ITAM) или мотива ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (ITIM), соответственно. Fc γ RIII принадлежит к семейству иммуноингибирующих рецепторов, которые включают CTLA-4 и PD-1, регулирующие иммунные ответы. Активирующие Fc γ R включают Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIII и Fc γ RIV. Связывание активирующих Fc γ -рецепторов запускает множество биологических функций, таких как пролиферация В-клеток, фагоцитоз макрофагами, цитолиз, дегрануляция и активация транскрипции генов, кодирующих цитокины, которые инициируют воспалительные ответы. Большинство FcR активирующего типа ассоциируется с общей γ -цепью Fc-рецептора (FcR γ), которая содержит ITAM (цепь FcR (общая γ -цепь FcR) отличается от общей γ -цепи (CD132), используемой рецепторами цитокинов). С другой стороны, активирующие рецепторы CD32a и CD32c имеют внутриклеточные ITAM-содержащие домены. Агрегация Fc-рецептора после связывания лиганда приводит к фосфорилированию ITAM и активации клеток.

Иммунные клетки, такие как гамма-дельта-Т-клетки и NK-клетки, экспрессируют Fc γ -рецепторы, которые опосредуют по меньшей мере часть их функций. Эти клетки являются частью врожденной иммунной системы и необходимы для выработки иммунитета против рака и инфекций. Они используют ряд рецепторов для распознавания

и уничтожения инфицированных и раковых клеток. Один из путей, посредством которых они опосредуют свою цитотоксическую активность, осуществляется посредством Fcγ-рецепторов по механизму антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Этот механизм представляет собой иммунный механизм, посредством которого эффекторная клетка иммунной системы активно лизирует клетку-мишень, где антигены мембранной поверхности на этой клетке-мишени связываются со специфическими антителами. Гамма-дельта-Т-клетки и NK-клетки экспрессируют Fcγ-рецепторы CD32 и CD16, которые опосредуют ADCC. Клетки обоих этих типов были исследованы на возможность их применения в качестве клеточной терапии против рака различных типов (например, меланомы, почечно-клеточной карциномы и т.п.), и такая терапия продемонстрировала безопасность и терапевтическую эффективность. Исследования *in vitro* показали, что эффекторные функции этих клеток могут быть усилены моноклональными антителами, что, предположительно, обусловлено активирующими сигналами, инициированными экспрессированными FcR. Это позволило предположить, что такая клеточная терапия должна быть проведена в комбинации с терапией моноклональными антителами, например трастузумабом, нацеленным на рецептор HER2. Таким образом, активность этих клеток будет направлена на клетки, связанные с антителом (Tokuyama et al, *International journal of Cancer*, 2011, Vγ9Vδ2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs-Rituximab and trastuzumab and Gertner-Dardenne et al, *Blood*, 2009, Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies).

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

Наиболее эффективным механизмом перенацеливания и нацеливания на активность иммунной системы против специфических мишеней является экспрессия химерных антигенных рецепторов (CAR) на клетке иммунной системы. CAR представляют собой модульные белки, которые сообщают специфичность моноклонального антитела (mAb) к эффекторной функции иммунной клетки. Эти белки, в своей обычной форме, представляют собой белки трансмембранного домена типа I с антиген-распознающим аминоконцом, спейсером и трансмембранным доменом, которые связаны с сигнальным эндодоменом, передающим сигналы выживания и активации.

CAR может представлять собой гибрид одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), происходящих от моноклональных антител, которые распознают антиген-мишень, и присоединенных посредством спейсера и трансмембранного домена к сигнальному эндодому. Сначала они были разработаны для перенацеливания иммунной функции альфа-бета-Т-клеток против раковых клеток, которые экспрессируют антиген-мишень. Это было обусловлено невозможностью идентифицировать и размножить специфичные для рака альфа-бета-Т-клеточные клоны для использования в клинических испытаниях из-за того, что они редко встречаются в периферической крови или в биоптатах. Выбор сигнальных доменов, используемых в таких CAR, зависит от продуцирования CAR в альфа-бета-Т-клетках. Большинство CAR обычно включают сигнальные домены цепи

CD3дзета (ζ), которая обеспечивает стимуляцию, подобную стимуляции Т-клеточным рецептором (сигнал 1), и домены CD28 или CD137, которые обеспечивают костимуляцию (сигнал 2). После распознавания антигена-мишени под действием CAR происходит активация Т-клеток, что приводит к сообщению цитотоксичности, направленной непосредственно на антиген-экспрессирующие клетки. Несмотря на то, что в исследованиях с использованием альфа-бета-Т-клеток, экспрессирующих CAR, были получены впечатляющие ответы, однако, они всегда сопровождалась серьезными побочными эффектами, такими как синдром высвобождения цитокинов (CRS), нейротоксичность и, во многих случаях, летальный исход. В некоторой степени, это связано с нерегулируемой активацией Т-клеток под действием CAR и их нацеливанием на здоровые клетки, которые экспрессируют антиген, то есть, иначе говоря, это связано с токсичностью, нацеленной на мишень, не являющуюся опухолью. Кроме того, постоянная активация этих альфа-бета-Т-клеток вследствие антигензависимой или антиген-независимой активации CAR может приводит к истощению и снижению биологической активности.

Сущность изобретения

Существует необходимость в разработке альтернативных подходов, основанных на CAR с большей селективностью и снижением токсичности, нацеленной на мишень, не являющуюся опухолью. Сообщалось об использовании природных клеток, таких как гамма-дельта-Т-клетки и НК-клетки, в качестве носителей CAR. Однако, в этих исследованиях использовались CAR с такими же доменами передачи сигналов, как и альфа-бета-Т-CAR, например CD3 ζ и CD28 или CD137, что было связано с аналогичными проблемами, такими как токсичность, нацеленная на мишень, не являющуюся опухолью.

Эффекторные функции гамма-дельта-Т- и НК-клеток, в отличие от альфа-бета-Т-клеток, ассоциируются с такими молекулами, как Fc γ R. Авторами настоящего изобретения были определены гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующие CAR, который включает стимулирующие домены общей цепи Fc γ -рецептора, которые будут повышать эффекторные функции (например, цитотоксичность, продуцирование цитокинов, захват и презентацию антигена), и которые можно использовать для разработки клеточной терапии. Поэтому, авторами настоящего изобретения были разработаны конструкции CAR, которые, при связывании антигена с внеклеточной частью CAR, стимулируют внутриклеточные сигнальные домены, происходящие от Fc γ -рецепторов, и вызывают активацию путей передачи сигнала, обычно ассоциированных с Fc γ -рецепторами.

Считается, что гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки или клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор, ассоциированный с гамма-дельта-Т-клеткой или НК-клеткой, которая дополнительно экспрессирует конструкцию, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий сигнальный домен одного или более Fc γ -рецепторов, включая, но не ограничиваясь ими, сигнальные домены γ -цепи Fc-рецептора, CD32a, CD32c или CD64 или их функциональные варианты и фрагменты и их

комбинации, могут обладать способностью распознавать клетку-мишень и вызывать ее гибель по механизму, аналогичному антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) при связывании с клеткой-мишенью. Гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки, экспрессирующие такую конструкцию, могут обладать повышенными эффекторными функциями, такими как повышенный уровень продуцирования воспалительных цитокинов, захват и презентация антигена или способность активировать адаптивные иммунные ответы. В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам или НК-клеткам или к клеткам, экспрессирующим Т-клеточный рецептор, ассоциированный с гамма-дельта-Т-клетками или НК-клетками, которые дополнительно экспрессирует конструкцию, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), состоящий или, в основном, состоящий из сигнального домена одного или более Fc γ -рецепторов, включая, но не ограничиваясь ими, сигнальные домены γ -цепи Fc-рецептора, CD32a, CD32c или CD64 или их функциональные варианты и фрагменты и их комбинации, которые могут обладать способностью распознавать клетку-мишень и приводить к ее гибели по механизму, аналогичному антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) при связывании с клеткой-мишенью.

В соответствии с этим, в своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к клетке, выбранной из гамма-дельта-Т-клеток, НК-клеток или клеток, экспрессирующих рецепторы цитотоксичности гамма-дельта-Т-клеток или природных НК-клеток, где клетка дополнительно содержит CAR, включающий домен внутриклеточной передачи сигнала, выбранный из одной или более из γ -цепи Fc γ R или CD32a или CD32c или CD64 или их функционального варианта.

В соответствии с этим, CAR может содержать:

- (i) антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом,
- (ii) домен передачи сигнала внутриклеточной активации (эндодомен),

где домен передачи сигнала внутриклеточной активации содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов Fc γ , предпочтительно выбранных из сигнальных доменов по меньшей мере одного из Fc-рецептора CD16 (γ -цепи Fc γ R) или CD32a или CD32c или CD64 или комбинаций сигнальных доменов, так чтобы связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводило к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR.

Подходящая передача сигнала посредством CAR, содержащего внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из по меньшей мере одного из Fc-рецепторов CD16 (γ -цепи Fc γ R) или CD32a или CD32c или CD64, или комбинаций сигнальных доменов в клетке, выбранной из гамма-дельта-Т-клетки, НК клетки или клетки, экспрессирующей рецепторы цитотоксичности гамма-дельта-Т-клеток или природных НК-клеток, может стимулировать гибель клетки, например, по механизму, аналогичному ADCC, то есть, клетки, связанной с CAR.

В вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен CAR может быть связан с трансмембранным доменом посредством спейсера.

Сигнальный домен CD16 представляет собой γ -цепь FcR и является общим для ряда Fc-рецепторов. Кроме того, CD32a и CD32c и их сигнальные домены экспрессируются гамма-дельта-T-клетками и NK-клетками. Эти рецепторы и их сигнальные домены, экспрессируемые NK-клетками и гамма-дельта-T-клетками, играют важную роль в эффекторной функции гамма-дельта-T- и NK-клеток и опосредуют, например, ADCC, продуцирование цитокинов, а также захват и презентацию антигенов. В соответствии с этим, конструкция для обеспечения CAR может быть использована вместе с NK-клетками. В соответствии с этим, в вариантах осуществления изобретения, CAR могут включать только внутриклеточные сигнальные домены, выбранные из общей цепи Fc γ R или CD32a или CD32c или CD64.

В вариантах осуществления изобретения, эндодомен CAR, экспрессируемого в клетке, выбранной из гамма-дельта-T-клетки, NK-клетки или клетки, экспрессирующей рецепторы цитотоксичности гамма-дельта-T-клеток или природных NK-клеток, содержит внутриклеточный сигнальный домен, включающий одну или более из γ -цепи FcR или CD32a или CD32c, которые могут содержать внутриклеточный домен с последовательностью SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3 или их функциональные варианты или фрагменты или их комбинацию.

SEQ ID NO: 1 - γ -цепь FcR

MIPAVLLLLL LLVEQAAALG EPQLCYILDA ILFLYGIVLT LLYCRLKIQV
RKAATSIEK SDGVYTGSLT RNQETYETLK HEKPPQ

SEQ ID NO: 2 - CD32a (FCGR2A)

MTMETQMSQN VCPRLWLLQ PLTVLLLLAS ADSQAAAPPK AVLKLEPPWI
NVLQEDSVTL TCQGARSPEL DSIQWFHNGN LIPHTQPSY RFKANNNDSG
EYTCQTGQTS LSDPVHLLTVL SEWLVLQTPH LEFQEGETIM LRCHSWKDKP
LVKVTFFQNG KSQKFSHLDP TFSIPQANHS HSGDYHCTGN IGYTLFSSKP
VTITVQVPSM GSSSPMGIIV AVVIATAVAA IVAAVVALIY CRKKRISANS
TDPVKAQFE PPGRQMIAIR KRQLEETNND YETADGGYMT LNPRAPTDDD
KNIYLTLPN DHVNSNN

SEQ ID NO: 3 - CD32c (FCGR2C)

MGILSFLPVL ATESDWADCK SPQPWGHMLL WTAVLFLAPV AGTPAAPPKA
VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
FKANNNDSGE YTCQTGQTS SDPVHLLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL
RCHSWKDKPL VKVTFFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHSH SGDYHCTGNI
GYTLYSSKPV TITVQAPSSS PMGIIVAVVT GIAVAIVAA VVALIYCRKK
RISANSTDPV KAAQFEPGR QMIAIRKRQP EETNNDYETA DGGYMTLNPR
APTDDDKNIIY LTLPPNDHVN SNN

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что связывание антигена посредством CAR, где внутриклеточный сигнальный домен CAR включает одну или более γ -цепей FcR или CD32a или CD32c, экспрессируемых в клетке, выбранной из гамма-дельта-T-клетки, NK-клетки или клетки, экспрессирующей

рецепторы цитотоксичности гамма-дельта-TCR или природных NK-клеток, будет приводить к фосфорилированию ITAM внутриклеточного сигнального домена членами семейства Src-киназ и последующему рекрутингу SH-2-содержащих киназ, таких как члены семейства Syk-киназ. Это, в конечном счете, будет приводить к рекрутингу фосфатидилинозит-3-киназы (PI3-K) и фосфолипазы-C γ (PLC γ), которые запускают активацию протеинкиназы C (PKC) и устойчивое повышение уровня кальция, и тем самым, к обеспечению функционального эффекта в зависимости от типа клеток, экспрессирующих CAR, но в случае гамма-дельта-T-клеток, такими функциями являются ADCC, продуцирование цитокинов (например, TNF) и, возможно, повышение уровня захвата и презентации антигенов.

В вариантах осуществления изобретения, функциональный вариант или фрагмент сигнального домена экспрессированного CAR могут включать одну или более аминокислотных мутаций последовательностей «дикого типа», представленных как SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3, таких как инсерции/делеции/замены, а именно, до 20, 15, 10, 5 мутаций, выбранных из инсерций/делеций/замен для встраивания/удаления/замены одной или более аминокислот. В соответствии с этим, могут рассматриваться по меньшей мере одна, две, три, четыре или пять мутаций, где эндодомен CAR имеет на одну, две, три, четыре или пять меньше или больше аминокислот, чем сигнальная последовательность дикого типа, или он может иметь аминокислоты, отличающиеся от аминокислот сигнальной последовательности дикого типа, от которой они происходят.

В вариантах осуществления изобретения, клетка, в которой экспрессируется CAR, может быть выбрана из гамма-дельта-T-клетки или природной клетки-киллера (NK), а предпочтительно, из гамма-дельта-T-клетки.

Во втором своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения клетки согласно первому аспекту изобретению, где указанный способ включает стадию введения конструкции нуклеиновой кислоты или вектора, кодирующего CAR, включающий:

- (i) антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом,
- (ii) домен передачи сигнала внутриклеточной активации (эндодомен),

где домен передачи сигнала внутриклеточной активации содержит один или более общих внутриклеточных сигнальных доменов Fc γ R, предпочтительно выбранных из сигнальных доменов по меньшей мере одного из: Fc-рецептора CD16 (γ -цепи Fc γ R) или CD32a или CD32c или CD64 или их функциональных вариантов или комбинаций сигнальных доменов, так, чтобы связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводило к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR в клетке, выбранной из гамма-дельта-T-клетки, NK-клетки, клетки, экспрессирующей рецепторы цитотоксичности гамма-дельта-TCR или природной NK-клетки, где внутриклеточный сигнальный домен клетки содержит одну или более γ -цепей FcR или CD32a или CD32c или CD64.

В вариантах осуществления изобретения, клетка, в которую вводят конструкцию или вектор, может быть частью образца, взятого у индивидуума, или она может происходить от этого образца.

Клетка, используемая в способе согласно второму аспекту изобретения, может быть получена из образца, выделенного у пациента, родственного или неродственного донора гемопоэтического трансплантата, или совершенно неродственного донора, и из пуповинной крови; может быть дифференцирована из эмбриональной клеточной линии, из индуцибельной линии клеток-предшественников или она может быть получена из трансформированной клеточной линии.

В своем третьем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей множество клеток согласно первому аспекту изобретения или клеток, полученных способом согласно второму аспекту изобретения. Композиция может представлять собой композицию аутологических гамма-дельта-Т- и/или НК-клеток.

В своем четвертом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения и/или профилактики заболевания, где указанный способ включает стадию введения множества клеток согласно первому аспекту изобретения или клеток, полученных способом согласно второму аспекту изобретения, или фармацевтической композиции согласно третьему аспекту изобретения, индивидууму, нуждающемуся в этом.

Способ может включать следующие стадии:

(i) выделения, но необязательно, образца, содержащего гамма-дельта-Т-клетки и/или НК-клетки, у индивидуума;

(ii) трансдукции или трансфекции гамма-дельта-Т- и/или НК-клеток конструкцией нуклеиновой кислоты или вектором, кодирующим CAR, включающий

(a) антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом,

(b) домен передачи сигнала внутриклеточной активации (эндодомен),

где домен передачи сигнала внутриклеточной активации содержит один или более общих внутриклеточных сигнальных доменов цепи FcγR, предпочтительно выбранных из сигнального домена по меньшей мере одного из: γ-цепи FcγR, Fc-рецептора CD16 или CD32a или CD32c или CD64 или их функциональных вариантов или комбинаций сигнальных доменов, так, чтобы связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводило к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR с получением активированных гамма-дельта-Т-клеток или НК-клеток, экспрессирующих CAR; и

(iii) введения индивидууму гамма-дельта-Т- и/или НК-клеток стадии (ii).

Подходящим индивидуумом, которому вводят гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки, может быть индивидуум, у которого были взяты гамма-дельта-Т-клетки и/или НК-клетки. Альтернативно, индивидуум, которому вводят гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки, может отличаться от индивидуума, у которого были взяты гамма-дельта-Т-клетки и/или НК-клетки. В соответствии с этим, индивидуум, которому вводят гамма-дельта-Т-клетки или НК-клетки, может быть не родственником индивидууму, от которого были

получены эти клетки.

Настоящее изобретение также относится к клетке согласно первому аспекту изобретения или к клетке, полученной согласно второму аспекту изобретения, или к фармацевтической композиции согласно третьему аспекту изобретения в целях ее применения для лечения и/или профилактики заболевания.

Настоящее изобретение также относится к клетке согласно первому аспекту изобретения или к клетке, полученной согласно второму аспекту изобретения, для приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

Подробное описание

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

CAR представляют собой химерные трансмембранные белки типа I, которые связывают внеклеточный антиген-распознающий домен с внутриклеточным сигнальным доменом (эндодоменом). Антиген-распознающий домен обычно представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), происходящий от моноклонального антитела (mAb), но он может быть получен и в другой форме, которая содержит антитело-подобный антигенсвязывающий сайт. Спейсерный домен обычно необходим для отделения связывающего вещества от мембраны для сообщения ему подходящей ориентации. Обычно, используемым спейсерным доменом является Fc IgG1 или IgG4. Может оказаться достаточным использовать более компактные спейсеры, например стебель от CD8a и даже только одну шарнирную область IgG1 в зависимости от антигена. Домены IgG могут быть модифицированы для снижения уровня связывания с Fc-рецепторами. Трансмембранный домен заякоривает белок в клеточной мембране и соединяет антигенсвязывающий сайт/спейсер с эндодоменом.

Конструкции CAR первого поколения состояли из эндодоменов, происходящих от внутриклеточных частей γ -цепи Fc ϵ R1 или CD3 ζ . Эти конструкции, в основном, применялись к альфа-бета-T-клеткам. Сигнал активации, инициируемый этими доменами, был достаточным для запуска уничтожения когнатных клеток-мишеней T-клетками в анализах *in vitro*, но он не мог полностью активировать T-клетки для пролиферации и выживания. Вскоре было обнаружено, что использование этих доменов приводит к альфа-бета-T-клеточной анергии. Кроме того, также сообщалось, что использование γ -цепи Fc ϵ R1 не было эффективным для активации альфа-бета-T-клеток, а поэтому оно было быстро прекращено. Конструкции CAR второго поколения содержали эндодомены, которые включали гибрид внутриклеточной части T-клеточной костимулирующей молекулы с CD3 ζ . Они могут передавать активирующий и костимулирующий сигнал одновременно после распознавания антигена. Наиболее часто используемым костимулирующим доменом является домен CD28. Он обеспечивает наиболее мощный костимулирующий сигнал, а именно, иммунологический сигнал 2, который запускает пролиферацию T-клеток. Также были описаны некоторые рецепторы, которые включают эндодомены семейства рецепторов TNF, такие как близкородственные OX40 и 4-1BB, которые передают сигналы выживания. Костимулирующие домены, наиболее часто

используемые в клинических испытаниях, представляют собой CD28 или 4-1BB (CD137).

Другие конструкции CAR, включающие часть костимулирующего сигнала, описаны, например, в WO 2016/166544.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, могут быть перенесены в Т-клетки с использованием, например, ретровирусных векторов. Подходящими могут быть и лентивирусные векторы.

В вариантах осуществления изобретения, CAR, экспрессируемые в гамма-дельта-Т-клетке, в НК-клетке и в клетке, экспрессирующей гамма-дельта-TCR или рецепторы цитотоксичности природных НК, где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более сигнальных доменов рецептора Fcγ, могут быть представлены как:

SEQ ID NO: 4 (CD19^{scFv}-линкер-мус-CD28[EX]-FcR-гамма[TM-IN])

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD
TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAASGGGGSEQKLISEEDLIEVMYPPP
YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPLCYILDAILFLYGIVLTLLYCRLKIQRKAA
ITSYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKPPQAAA.

SEQ ID NO: 5 (CD19^{scFv}-линкер-мус-CD28[EX-TM]-FcR-гамма [IN])

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD
TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAASGGGGSEQKLISEEDLIEVMYPPP
YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRL
KIQRKAAITSYEKSDGVYTG LSTRNQETYETLKHEKPPQ.

SEQ ID NO: 6 (CD19^{scFv}-линкер-мус-CD28[EX-TM]-CD32a[IN])

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD
TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAASGGGGSEQKLISEEDLIEVMYPPP
YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVCR
KKRISANSTDPVKAQFEPGRQMIARKRQLEETNNDYETADGGYMTLNPRAPTDDDK
NIYLTLPNDHVNNSNN, или

SEQ ID NO: 7 (CD19^{scFv}-линкер-мус-CD28[EX-TM]-CD32c[IN])

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLPDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNW
YQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDD

TAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAASGGGGSEQKLISEEDLIEVMYPPP
 YLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVCR
 KKRISANSTDPVKAQFEPGRQMIARKRQPEETNNDYETADGGYMTLNPRAPTDDDK
 NIYLTLPNDHVNSNN.

EX=внеклеточный домен

TM=трансмембранный домен

IN=внутриклеточный домен

В соответствии с этим, функциональный вариант может иметь последовательности, которые, например, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичны последовательностям, представленным как SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 7, при условии, что функциональный вариант представляет собой CAR, способный связываться с описанным антигеном и передавать сигнал посредством внутриклеточного сигнального домена, способного активировать Т-клетку или НК-клетку в комбинации с сигналом гамма-дельта-Т-клеточного или НК-рецептора. В соответствии с этим, варианты конструкции CAR согласно изобретению могут быть представлены любой из SEQ ID NO: 4, 5, 6 или 7. Методы выравнивания последовательностей и определения их идентичности хорошо известны специалистам в данной области и могут быть осуществлены с использованием подходящих программ выравнивания. % Идентичности последовательностей означает процент идентичных аминокислотных или нуклеотидных остатков в двух последовательностях при их оптимальном выравнивании. Гомология или идентичность нуклеотидных и белковых последовательностей могут быть определены с использованием стандартных алгоритмов, таких как программа BLAST (Basic Local alignment Search Tool at the National Center for Biotechnology Information) с параметрами по умолчанию, которая является общедоступной на сайте <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Другими алгоритмами определения идентичности или гомологии последовательностей являются: LALIGN (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/osa/lalign/>) и <http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/nucleotide.html>). AMAS (Анализ множества выровненных последовательностей, на сайте <http://www.compbio.dundee.ac.uk/Software/Amas/amas.html>). FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). SIM (<http://web.expasy.org/sim/>) и EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html).

Связывание CAR, экспрессируемого клетками, с нужным антигеном, может быть протестировано с использованием химерного белка, содержащего антиген, являющийся мишенью для CAR, и Fc-часть человеческого IgG. Связывание химерного белка с CAR может быть детектировано такими методами, как проточная цитометрия, Вестерн-блот-анализ, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) с использованием соответствующих «вторых» антител, детектирующих Fc-часть химерного белка.

В других аспектах изобретения, функциональность CAR, экспрессирующих $\gamma\delta$ -Т-или НК-клетки, может быть протестирована на их действие против раковых клеточных

линий или первичных опухолевых клеток, экспрессирующих антиген-мишень, методами, известными специалистам, включая, но не ограничиваясь этим, анализ на цитотоксичность аннексина V/PI, анализ на высвобождение хрома, анализы на дегрануляцию CD107, анализы на внутриклеточные цитокины, Luminex. Соответствующий контроль, такой как нетрансдуцированные $\gamma\delta$ -T- или NK-клетки и клеточные линии, которые не экспрессируют антиген-мишень, может быть использован для того, чтобы продемонстрировать, вызвано ли повышение эффекторных функций специфической активностью CAR.

В вариантах осуществления изобретения, CAR, содержащий сигнальные домены CD32a или CD32c, экспрессируется $\gamma\delta$ -T-клетками. Связывание CAR с его мишенью инициирует передачу сигнала, которая может приводить к повышению уровня захвата и презентации антигена $\gamma\delta$ -T-клеткой, экспрессирующей CAR. $\gamma\delta$ -T-клетки могут захватывать и презентировать антиген для инициации и усиления адаптивных иммунных ответов (Brandes et al., Science, 2005). $\gamma\delta$ -T-клетка может захватывать антиген посредством взаимодействия с опсонизированными клетками-мишенями (Himoudi et al., JI 2012) и действовать как профессиональные антигенпрезентирующие клетки. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что $\gamma\delta$ -T-клетка, экспрессирующая CAR, содержащий CD32a или CD32c или костимулирующие домены γ -цепи FcR, будет обладать повышенной способностью к захвату и презентации антигена. В вариантах осуществления изобретения, повышенная способность CAR-экспрессирующих клеток согласно изобретению захватывать и презентировать антиген, может быть продемонстрирована с помощью анализов, известных специалистам, включая, но не ограничиваясь этим, фагоцитоз флуоресцентных сфер, экспрессирующих антиген-мишень, или детектирование презентации антигена с использованием моделированных антигенов и антител, которые распознают HLA-пептидные антигены.

Антигенсвязывающий домен

Антигенсвязывающий домен представляет собой часть CAR, которая распознает антиген. Антигенсвязывающие домены могут включать: антигенсвязывающий сайт антитела, фрагмент антитела, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), однодоменное антитело (sdAb), Fab, F(ab')₂, Fc, легкую и тяжелую цепи антитела или любые их комбинации, которые связываются с антигеном клеточной поверхности, ассоциированным с заболеванием, или пептид, происходящий от ассоциированного с заболеванием антигена, экспрессируемого в виде комплекса с главным комплексом гистосовместимости (МНС). В вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающая часть может представлять собой биспецифическую конструкцию, содержащую два различных антитела, направленных на два различных антигена, на различные эпитопы одного и того же антигена или на ассоциированный с заболеванием антиген и на костимулирующую(ие) или коингибирующую(ие) молекулу(ы) или рецептор(ы) хоминга/миграции. В других вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен может представлять собой рецептор альфа-бета-T-клеток или

рецептор гамма-дельта-Т-клеток. Антитела, используемые для получения антигенсвязывающего домена, могут происходить от человеческих В-клеток, мышинных В-клеток, крысиных В-клеток или из гибридных клеточных линий. Гибридная клеточная линия может происходить от иммунизированных мышей дикого типа или гуманизированных мышей, крысиных В-клеток, крысиных гибридных клеток, выделенных у иммунизированных крыс дикого типа или гуманизированных крыс, или из библиотек антител, полученных от человека, мыши, крысы, верблюда, акулы или ламы. Так, например, антигенсвязывающий домен может содержать: одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), происходящий от моноклонального антитела; природный лиганд антигена-мишени; пептид, обладающий достаточной аффинностью к мишени; однодоменное антитело; или одноцепочечное антитело, происходящее от Т-клеточного рецептора.

В соответствии с этим, внеклеточный антигенсвязывающий домен может распознавать опухолеспецифический или ассоциированный с заболеванием антиген и связываться с этим антигеном, где указанный антиген присутствует только на опухолевых/пораженных клетках, но не на каких-либо других клетках, и/или указанный домен может распознавать ассоциированный с заболеванием антиген и связываться с этим антигеном, где указанный антиген присутствует на некоторых пораженных клетках, а также на некоторых нормальных клетках. Такими ассоциированными с заболеванием антигенами могут быть, но не ограничиваются ими, CD19, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, GM3, GD2, GD3, CD20, CD22, CD30, CD37, CD38, CD70, CD75, CD79b, CD33, CD138, gp100, NY-ESO-1, MICA, MICB, MART1, AFP, ROR1, ROR2, PSMA, PSCA, мутированные Ras, p53, B-Raf, c-met, VEGF, угольная кислота-ангидраза IX, WT1, карциноэмбриональный антиген, CA-125, MUC-1, MUC-3, эпителиальный опухолевый антиген и антиген типа MAGE, включая MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2 или LAGE1 или вирусные антигены или их комбинации или посттрансляционно модифицированные белки, которые могут включать, но не ограничиваются ими, карбамилированные и цитрунированные белки.

В вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен может связываться с антигеном, присутствующим в клеточной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или вирусной инфекции или в активном или инактивированном вирусном фрагменте, пептиде, белке, антигенном сегменте вируса или т.п.

В вариантах осуществления изобретения, внеклеточный антигенсвязывающий домен может распознавать лиганд иммунной контрольной точки, например, PD-L1.

В вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий домен может представлять собой внеклеточную часть рецептора клеточной поверхности, которая затем присоединяется к трансмембранному и костимулирующему доменам, как описано выше.

Спейсерный домен

CAR обычно содержат спейсерную последовательность для связывания антигенсвязывающего домена с трансмембранным доменом. Спейсерный домен отделяет антигенсвязывающий домен от эндодомена, и гибкий спейсер позволяет антигенсвязывающему домену ориентироваться в разных направлениях для облегчения связывания.

Спейсерная последовательность для CAR может, например, содержать Fc-область IgG1, шарнирную область IgG1 или стебель человеческого CD8 или стебель мышинового CD8. Альтернативно, спейсер может содержать чередующуюся линкерную последовательность, которая имеет такую же длину и/или расстояние между доменами, как и Fc-область IgG1, шарнирная область IgG1 или стебель CD8. Спейсер человеческого IgG1 может быть модифицирован для удаления Fc-связывающих мотивов.

Примеры аминокислотных последовательностей для этих спейсеров приведены ниже:

SEQ ID NO: 8 (шарнирная область-CH2CH3 человеческого IgG1)
 AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCWVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

SEQ ID NO: 9 (стебель человеческого CD8):

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

SEQ ID NO: 10 (шарнирная область человеческого IgG1):

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

SEQ ID NO: 11 (эктодомен CD2):

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKCKKIAQFRKEKETFK
 EKDTYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIIYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTC
 INTTLTCEVMNGTDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSV
 EPVSCP EKGLD

SEQ ID NO: 12 (эктодомен CD34)

SLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSYQETTTTPSTLGSTSLHPVSQHGNEATTNIT
 ETTVKFTSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTT
 STSLATSPTKPYTSSSPILSDIKAEIKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLA
 RVLCGEEQADADAGAQCSSLQAQSEVRPQCLLLVLANRTEISSKLQLMKKHQSDLKK
 LGILDFTEQDVA SHQSYSQKT

SEQ ID NO: 13 (стебель человеческого CD28)

IEVMYPPPYLDNEKSNGTPIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP

SEQ ID NO: 14 (линкер SGGGS)

SGGGGS

SEQ ID NO: 15 (метка тус)

EQKLISEEDL

Трансмембранный домен

Трансмембранный домен представляет собой последовательность CAR, которая охватывает мембрану.

Трансмембранный домен может представлять собой любую белковую структуру, которая является термодинамически стабильной в мембране.

Трансмембранный домен может происходить от CD28, который обеспечивает хорошую стабильность рецептора. Альтернативно, трансмембранная область может происходить от CD3, CD4, CD8, γ -цепи Fc γ R, CD16 (Fc γ RIIA), CD32a (Fc γ RIIA), CD32c (Fc γ RIIC) или CD64 (Fc γ RIA).

Сигнальный домен

Активирующий эндодомен CAR может содержать сигнальный домен Fc γ -рецепторов, по существу, состоять из него, или состоять из этого сигнального домена. Примерами этих рецепторов являются Fc γ RIIA (CD16), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIC (CD32c) или Fc γ RIA (CD64). В вариантах осуществления изобретения, CAR может включать активирующие домены γ -цепи FcR, Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIC (CD32c) или их комбинации. В вариантах осуществления изобретения, активирующие эндодомены Fc γ -рецепторов могут быть объединены с другими активирующими доменами, включая, но не ограничиваясь ими, CD28, CD2, ICOS, JAMAL, CD27, CD30, OX40, CD46, CD137 (4-1BB), Дупах-активирующий белок (DAP)-10, DAP-12, общая γ -цепь IL-2, рецептор IL-12, CD244.

В соответствии с этим, внутриклеточная сигнальная последовательность может содержать внутриклеточный сигнальный домен «дикого типа» γ -цепи FcR (SEQ ID NO: 1), CD32a (SEQ ID NO: 2) или CD32c (SEQ ID NO: 3).

В соответствии с этим, могут рассматриваться варианты предложенных внутриклеточных сигнальных последовательностей «дикого типа», в которых модифицированная последовательность домена, активирующего Fc γ -рецептор, может быть по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3, при условии, что эта последовательность будет иметь эффективный внутриклеточный сигнальный домен.

В соответствии с этим, активность сигнального домена CAR может быть протестирована известными методами. Такие методы могут включать внутриклеточное проточно-цитометрическое окрашивание на фосфорилированные формы сигнальных молекул, расположенных ниже сигнального каскада, инициированного доменами, включенными в CAR, такими как SYK, ERK, p38 и JNK, или определение внутриклеточных изменений уровня кальция. Селективное связывание CAR под действием рекомбинантных или химерных белков может быть применено для инициации связывания CAR для стимуляции передачи сигналов. В соответствии с этим, активность сигнальных доменов может быть оценена с помощью функциональных анализов, которые позволяют определить последующие эффекторные функции, инициированные связыванием CAR. Этот анализ может включать, но не ограничивается ими, анализы на цитотоксичность аннексина V/PI, анализ на высвобождение хрома, анализы на

дегрануляцию CD107, анализы на внутриклеточные цитокины или Luminex. Соответствующий контроль, такой как нетрансдуцированные $\gamma\delta$ -T- или NK-клетки и клеточные линии, которые не экспрессируют антиген-мишень, может быть использован для того, чтобы продемонстрировать, вызвано ли повышение эффекторных функций специфической активностью CAR.

В вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, может включать лидерную последовательность, которая будет направлять белок в клеточную мембрану (такой как секреторный сигнал GM-CSF-R или CD8).

Клетка

Клетка, содержащая CAR согласно первому аспекту изобретения, может представлять собой иммунную эффекторную клетку, такую как гамма-дельта($\gamma\delta$)-T-клетка или природная клетка-киллер (NK).

Гамма-дельта-T-клетки представляют собой иммунные клетки со свойствами, подобными природным свойствам, которые необходимы для выработки эффективного иммунитета против инфекций и рака. В отличие от альфа-бета($\alpha\beta$)-T-клеток, эти клетки экспрессируют гамма- и дельта-цепь TCR, и считается, что они имеют более ограниченное клональное разнообразие. Гамма-дельта-T-клетки распознают не-пептидные антигены по не-MHC-рестриктированному механизму. В крови, они представляют незначительную субпопуляцию у человека (менее 10%). Большая часть гамма-дельта-T-клеток экспрессирует рецептор V γ 9V δ 2 (гамма-9-дельта 2)-T-клеток, который распознает эндогенный изопентенилпирофосфат (IPP), который избыточно продуцируется только в раковых клетках в результате нарушения регуляции мевалонатного пути. Это позволяет гамма-дельта-T-клеткам отличать здоровые клетки от трансформированных. Кроме того, гамма-дельта-T-клетки экспрессируют ряд рецепторов NK-клеток, таких как CD56, NKG2D, NKp80 и NKp46, которые опосредуют их цитотоксические функции. Способность гамма-дельта-T-лимфоцитов продуцировать избыточные провоспалительные цитокины, такие как IFN-гамма и TNF, и их сильная цитотоксическая эффекторная функция и MHC-независимое распознавание антигенов делают их важным инструментом для иммунотерапии рака. Было показано, что гамма-дельта-T-клетки способны уничтожать многие опухолевые клеточные линии многих различных типов *in vitro*, включая клеточные линии лейкоза, нейробластомы и различных карцином. Кроме того, было продемонстрировано, что гамма-дельта-T-клетки могут распознавать и уничтожать множество различных дифференцированных опухолевых клеток, либо спонтанно, либо после обработки различными бисфосфонатами, включая золедронат. Обработка бисфосфонатом приводит к накоплению эндогенного IPP, который стимулирует активацию гамма-дельта-T-клеток.

NK-клетки представляют собой часть природной иммунной системы, наделенной мощной цитолитической функцией, которая обеспечивает защиту хозяина от микробных инфекций и опухолей. У человека, они фенотипически характеризуются как CD3⁺CD56⁺-

лимфоциты и экспрессируют ряд природных рецепторов цитотоксичности (NCR), которые регулируют их функции. После активации, NK-клетки демонстрируют прямую цитотоксичность и экспрессируют провоспалительные цитокины, такие как IFN-гамма и TNF.

В отличие от альфа-бета-T-клеток, гамма-дельта-T-клетки и NK-клетки опосредуют свою функцию через Fcγ-рецепторы, а через них опосредуют ADCC. Клетки обоих типов экспрессируют Fcγ-рецепторы, а ADCC, предположительно, опосредуется, главным образом, Fcγ-рецептором RIIA (CD16). Кроме того, очевидно, что гамма-дельта-T-клетки захватывают антиген после физического взаимодействия с клетками-мишенями, покрытыми антителом. Такое взаимодействие облегчается Fcγ-рецепторами, экспрессируемыми на гамма-дельта-T-клетках, а в частности, рецепторами Fcγ RIIA (CD16), Fcγ RIIA (CD32a) и Fcγ RIIc (CD32c). Авторами настоящего изобретения было высказано предположение, что экспрессия CAR, который включает активирующие домены Fcγ-рецепторов, будет имитировать природное связывание этих рецепторов с антителами и создавать биологический эффект в природных иммунных клетках, таких как гамма-дельта-T-клетки или NK-клетки. Альфа-бета-T-клетки не могут быть подходящими хозяевами для конструкции CAR, включающей общий внутриклеточный сигнальный домен Fcγ, поскольку альфа-бета-T-клетки не опосредуют свою функциональную активность через Fcγ-рецепторы. Гамма-дельта-T-клетки, экспрессирующие описанный CAR, будут иметь повышенный цитотоксический потенциал, обладать повышенной способностью продуцировать эффекторные цитокины и повышенной способностью захватывать и презентировать антигены, ассоциированные с заболеванием. Последний эффект может повышать их способность индуцировать адаптивные альфа-бета-иммунные ответы.

CAR-экспрессирующие клетки могут быть получены либо *ex vivo*, либо они могут быть выделены из периферической крови пациента (1-я группа), либо посредством трансплантации гемопоэтических стволовых клеток из донорской периферической крови (2-я группа), либо из периферической крови неродственного донора (3-я группа).

Настоящее изобретение также относится к клеточной композиции, содержащей CAR-экспрессирующие клетки, такие как CAR-экспрессирующие гамма-дельта-T- и/или NK-клетки согласно изобретению. Клеточная композиция может быть получена путем трансдукции пробы крови *ex vivo* конструкцией нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Альтернативно, CAR-экспрессирующие клетки могут быть получены *ex vivo* посредством дифференцировки индуцибельных клеток-предшественников или эмбриональных клеток-предшественников в клетки соответствующего типа, такие как гамма-дельта-T-клетки. Альтернативно, может быть использована иммортализованная клеточная линия, такая как гамма-дельта-T-клеточная линия, которая сохраняет свою литическую функцию и может действовать как терапевтическое средство.

Во всех этих вариантах осуществления изобретения, CAR-клетки могут быть

получены путем введения ДНК или РНК, кодирующих CAR, одним из множества способов, включая трансдукцию вирусным вектором или трансфекцию ДНК или РНК.

CAR-T-клетка согласно изобретению может представлять собой гамма-дельта-T-клетку, взятую у индивидуума *ex vivo*. В соответствии с этим, гамма-дельта-T-клетки для их использования в настоящем изобретении могут быть получены из мононуклеарных клеток крови (МКК) или биоптата раковых или инфицированных тканей. В соответствии с этим, МКК могут быть получены любым методом центрифугирования в градиенте плотности, известным специалистам, из цельной крови, из материала для лейкофереза или из пуповинной крови (UCB). Методы центрифугирования в градиенте плотности могут включать, но не ограничиваются ими, центрифугирование в градиенте фиколла или центрифугирование с использованием лимфопрепарата. Кроме того, выделение клеток может быть осуществлено с помощью клеточного сортирования с магнитной активацией (MACS) или клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS).

В соответствии с этим, в вариантах осуществления изобретения, гамма-дельта-T-клетки могут быть размножены из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), мононуклеарных клеток крови пупочного канатика (МККПК) или из клеток ткани в культуральной среде с определенным химическим составом, которая может включать, но не ограничивается ими, среду ALySS505, RPMI, TexMACS, IMDM, CTS OpTmizer, X-VIVO 10 или AIM-V. Среда для культивирования клеток может быть дополнена фетальной телячьей сывороткой (FCS), человеческой сывороткой АВ, аутологичной плазмой, лизатом тромбоцитов человека или химическими заменителями сыворотки определенного состава, например, заменителем иммунной сыворотки CTS. Кроме того, к культуральному раствору добавляют сыворотку/плазму/заменитель сыворотки в количестве от 0,1 до 20% (об/об).

В соответствии с этим, в вариантах осуществления изобретения, гамма-дельта-T-клетки подтипа V-гамма-9 могут быть селективно размножены из МКПК или МККПК или из клеток ткани в культуральной среде с определенным химическим составом, включая IL-2, сыворотку/плазму/заменитель сыворотки, и могут быть активированы путем добавления аминокислоты, такой как золедроновая кислота. Может быть использовано множество гамма-дельта-TCR-изотипов, происходящих от любых гамма-дельта-TCR после их спаривания с V γ 1-9 и V δ 1-8. Специалистам в данной области будет очевидно, что условия культивирования, а в частности, способ активации TCR, будет зависеть от изотипа, который должен быть размножен. В качестве примера, δ 2-T-клетки могут быть активированы и размножены с использованием аминокислот и т.п., тогда как δ 1-T-клетки могут быть, предпочтительно, размножены с использованием лигандов NKG2D, таких как MICA или MICB, или анти-TCR антител. Выделенные МКПК/МККПК могут быть свежесекретированными или криоконсервированными до размножения в культуре.

Бисфосфонат представляет собой аналог пирофосфорной кислоты и представляет собой соединение, в котором O (атом кислорода) остова пирофосфорной кислоты P-O-P

заменен С (атомом углерода) (P-C-P). Это соединение обычно используется в качестве терапевтического средства для лечения остеопороза. Среди бисфосфонатов, аминокислот бисфосфонат представляет собой соединение, имеющее N (атом азота). Так, например, аминокислот бисфосфонат, используемый в настоящем изобретении, не имеет конкретных ограничений, и его примерами являются памидроновая кислота, ее соль и/или гидрат; алендроновая кислота, ее соль и/или гидрат и золедроновая кислота, ее соль и/или гидрат. Концентрация аминокислот бисфосфонатов, предпочтительно, составляет от 1 до 30 мкМ для памидроновой кислоты, ее соли и/или гидрата, от 1 до 30 мкМ для алендроновой кислоты, ее соли и/или гидрата и от 0,1 до 10 мкМ для золедроновой кислоты, ее соли и/или гидрата. В данном случае, в качестве примера, добавляют 5 мкМ золедроновой кислоты.

В соответствии с этим, антиген, стимулированный посредством аминокислот бисфосфоната, может быть заменен синтетическими антигенами, такими как изопентенилпирофосфат (IPP), фосфостим/бромгидринпирофосфат (BrHPP), (E)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат (HMBPP) или DMAPP. Антигенная стимуляция также может быть осуществлена путем совместного культивирования с облученными и/или искусственными антигенпрезентирующими клетками (иАПК). Добавление таких компонентов обеспечивает среду для культивирования, которая позволяет проводить позитивный отбор гамма-дельта-T-клеток, обычно, в количестве 70-100% от общего числа клеток в образце культуры.

Размножение гамма-дельта-T-клеток может быть также стимулировано одним или более антителами против CD3, гамма-дельта-TCR, CD28 и CD137. Они могут быть растворимыми, связанными с планшетом или конъюгированными с соответствующими сферами, такими как Dynabeads или MACSibeads.

Гамма-дельта-T-клетки могут быть культивированы и размножены с использованием любых из ранее описанных методик. Гамма-дельта-T-клетки любого изотипа могут быть выборочно размножены в течение определенного периода времени, по меньшей мере, в течение 7 дней, а более предпочтительно, 14 дней. В соответствии с этим, период культивирования может составлять приблизительно 9 дней или более до достижения большого количества, по существу, очищенных CAR-экспрессирующих популяций гамма-дельта-T-клеток. Гамма-дельта-T-клетки могут быть размножены с использованием антигенов TCR или лигандов NKG2D, таких как MICA или MICB. Размноженные гамма-дельта-T-клетки могут быть подвергнуты криоконсервации и восстановлению в более поздний момент времени для дальнейшего их размножения в культуре.

В соответствии с этим, цитокин IL-2 может быть также включен в количестве от 50 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, более предпочтительно от 400 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл. В соответствии с этим, культура может также быть дополнена одним или более цитокинами, такими как IL-15, IL-18, IL-7, IL-4, IL-9 или IL-21, в количестве от 50 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл.

Клетки могут быть культивированы в подходящем устройстве для культивирования, включая, но не ограничиваясь ими, колбу для тканевой культуры, G-REX, пакеты или автоматизированную систему для культивирования клеток, такую как Miltenyi Prodigy.

CAR-экспрессирующая клетка согласно изобретению может представлять собой НК-клетку. В соответствии с этим, НК-клетки согласно изобретению могут быть получены из мононуклеарных клеток крови (МНК) или биоптата раковых или инфицированных тканей. В соответствии с этим, МНК могут быть получены любым методом центрифугирования в градиенте плотности, известным специалистам, из цельной крови, из материала для лейкофереза или из пуповинной крови (UCB). Методы центрифугирования в градиенте плотности могут включать, но не ограничиваются ими, центрифугирование в градиенте фикола или центрифугирование с использованием лимфопрепарата. Кроме того, выделение клеток может быть осуществлено с помощью клеточного сортирования с магнитной активацией (MACS) или клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS).

В соответствии с этим, в аспектах настоящего изобретения, исходный материал для размножения НК-клеток может быть истощен в отношении клеток, экспрессирующих CD3, с применением известных методов, таких как MACS.

НК-клетки могут быть размножены из МНК, МНКП, клеток ткани или из материала, не содержащего CD3⁺-клеток в культуральной среде с определенным химическим составом, которая может включать, но не ограничивается ими, среду ALyss505, RPMI, TexMACS, IMDM, CTS OpTmizer, X-VIVO 10 или AIM-V. Среда для культивирования клеток может быть дополнена фетальной телячьей сывороткой (FCS), человеческой сывороткой АВ, аутологичной плазмой, лизатом тромбоцитов человека или химическими заменителями сыворотки определенного состава, например, заменителем иммунной сыворотки CTS. Кроме того, к культуральному раствору добавляют сыворотку/плазму/заменитель сыворотки в количестве от 0,1 до 20% (об/об).

Для размножения НК-клеток, цитокин IL-2 может быть также включен в количестве от 50 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, более предпочтительно от 400 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл. В соответствии с этим, культура может также быть дополнена одним или более цитокинами, такими как IL-15, IL-18 или IL-21, в количестве от 50 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл.

В соответствии с этим, CAR-экспрессирующие клетки могут быть селективно размножены с использованием рекомбинантного белка, распознаваемого CAR, например, рекомбинантной химеры CD19-Fc или рекомбинантного CD19, в случае CAR, нацеленного на CD19. Они могут быть связанными с планшетом или могут быть растворимыми или конъюгированными с соответствующими сферами, такими как Dynabeads или MACSibeads. Альтернативно, иАПК, экспрессирующие антиген, распознаваемый CAR, могут быть использованы для селективного размножения CAR-экспрессирующих клеток, таких как клетки K562, генетически модифицированные для экспрессии CD19, в случае CAR, нацеленного на CD19.

Способ генетической модификации гамма-дельта-Т-клеток или НК-клеток для включения нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR согласно изобретению, может включать любую методику, известную специалистам в данной области.

Подходящие методы включают, но не ограничиваются ими, трансдукцию вирусами, например, лентивирусами/ретровирусами/аденовирусами, клеточную трансфекцию нуклеиновыми кислотами посредством электропорации, нуклеофекцию, методы с использованием реагентов для трансфекции на основе липидов, методы с использованием наночастиц, методы трансфекции на основе хлорида кальция или методы с использованием бактериальных транспозонов, ДНК-транспозонов или ретротранспозонов, и технологии TALENS или CRISPR/Cas9.

В соответствии с этим, нуклеиновая кислота может быть получена в форме ДНК (кДНК, плазмидной, линейной, эписомной, миникольцевой ДНК), РНК или РНК, транскрибированной *in vitro* (IVT). Помимо нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательности CAR, нуклеиновая кислота может также кодировать белки/ферменты/последовательности, необходимые для облегчения интеграции генетической информации в геном хозяина.

Если для трансдукции используются лентивирусы/ретровирусы/аденовирусы, то для улучшения такого процесса, может быть осуществлено включение химических реагентов, как очевидно для специалистов в данной области. Такими реагентами являются, например, но не ограничиваются ими, бромид гексадиметрина (полибрен), фибронектин, рекомбинантный человеческий фибронектин (такой как RetroNectin-Takara Clontech), DEAE-декстран и усилитель трансдукции вируса TransPlus (ALSTEM Cell Advancements), Lentiboost (Sirion Biotech), сульфат протамина.

В соответствии с этим, нуклеиновые кислоты, кодирующие CAR, могут быть включены в гамма-дельта-Т- или НК-клетки, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), мононуклеарные клетки крови пупочного канатика (МККПК) или выделенные из ткани гамма-дельта-Т- или НК-клетки, размноженные в любой момент времени в течение периода культивирования.

CAR-экспрессирующая клетка согласно изобретению может быть получена путем:

(i) взятия образца, содержащего гамма-дельта-Т-клетки или, НК-клетки, у индивидуума или из других источников, перечисленных выше; и

(ii) трансдукции или трансфекции гамма-дельта-Т-клеток или НК-клеток конструкцией нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR, включающий внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из Fc γ RIIA (CD16), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIc (CD32c) и CD64. Затем, Т-клетки или НК-клетки могут быть очищены, например, путем отбора на основе экспрессии CAR.

Вектор

Вектор, содержащий определенную здесь CAR-кодирующую конструкцию нуклеиновой кислоты, может быть использован для введения последовательности (последовательностей) нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина так, чтобы она (они)

экспрессировала(и) CAR.

Вектор может, например, представлять собой плазмиду или вирусный вектор, такой как ретровирусный вектор или лентивирусный вектор, или вектор на основе транспозона или синтетическую мРНК.

Остов вектора может содержать бактериальный ориджин репликации, такой как, например, pBR322, и селективный маркер, сообщающий резистентность к антибиотику, такой как, но не ограничиваясь ими, ген бета-лактамазы, сообщающий резистентность к антибиотику ампициллину, для обеспечения достаточной степени амплификации плазмидной ДНК в бактериальном хозяине. Вектор может включать, но необязательно, бактериальные и фаговые сайты присоединения (attB и attP) интегразы, такой как phiC31, в комбинации с сайтами распознавания эндонуклеазы, такими как I-SceI, для обеспечения образования мини-колец без бактериального остова. Вектор может также включать последовательность, кодирующую экспрессию CAR и связанную с подходящей промоторной последовательностью, для экспрессии в представляющей интерес клетке-мишени, а наиболее предпочтительно, в гамма-дельта-T-клетке или в NK-клетке. Вектор может включать, но необязательно, ген резистентности к антибиотику для позитивного отбора в клетках млекопитающих, и может также включать репортерный ген для идентификации экспрессии, такой как, но не ограничиваясь ими, экспрессия белка флуоресцирующего в зеленом диапазоне спектра (GFP). Дополнительная экспрессия репортерного и/или селективного гена может быть стимулирована с помощью отдельных промоторов, двунаправленного промотора, либо она может быть достигнута с использованием IRES или самоотщепляющейся последовательности T2A.

Вектор может обладать способностью трансфецировать или трансдуцировать гамма-дельта-T-клетку или NK-клетку.

Фармацевтическая композиция

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей множество CAR-экспрессирующих клеток, таких как гамма-дельта-T-клетки или NK-клетки согласно изобретению. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Фармацевтическая композиция может содержать, но необязательно, один или более других фармацевтически активных полипептидов и/или соединений. Такая композиция может быть получена, например, в форме, подходящей для внутривенного вливания.

Способ лечения

Клетки согласно изобретению могут обладать способностью уничтожать клетки-мишени, такие как раковые клетки. Клетки согласно изобретению могут быть использованы для лечения инфекции, такой как вирусная инфекция.

Клетки согласно изобретению могут быть также использованы для регуляции патогенных иммунных ответов, например, при аутоиммунных заболеваниях, аллергиях и при реакции «трансплантат против хозяина». Клетки согласно изобретению могут быть

использованы для лечения раковых заболеваний, таких как рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак почек (почечно-клеточный рак), лейкоз, рак легких, меланома, неходжкинская лимфома, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы.

Этот способ лечения является особенно подходящим для лечения солидных опухолей, где доступность отдельных в высокой степени селективных мишеней ограничена.

Клетки согласно изобретению могут быть использованы для лечения рака полости рта и глотки, включая рак языка, рта и глотки; рака пищеварительной системы, включая рак пищевода, желудка и прямой и ободочной кишки; рака печени и желчных протоков, включая гепатоцеллюлярные карциномы и холангиокарциномы; рака дыхательной путей, включая бронхогенный рак и рак гортани; рака костей и суставов, включая остеосаркому; рака кожи, включая меланому; рака молочной железы; рака половых путей, включая рак матки, рак яичника и рак шейки матки у женщин; рака предстательной железы и рака яичек у мужчин; рака почечных протоков, включая почечно-клеточную карциному и карциному переходных клеток мочеточника или мочевого пузыря; рака головного мозга, включая глиому, мультиформную глиобластому и медуллобластому; рака эндокринной системы, включая рак щитовидной железы; карциномы коры надпочечников; и раковых заболеваний, ассоциированных с множественными синдромами эндокринных новообразований; лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому; множественной миеломы и плазмцитомы; лейкоза, как острого, так и хронического, миелоидного или лимфоидного лейкоза; и рака других и точно не определенных участков, включая нейробластому.

В соответствии с еще одним своим аспектом, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей клетку согласно изобретению вместе с терапевтическим агентом.

В соответствии с этим, терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из радионуклеотида, атомов бора, гадолиния или урана, иммуномодулятора, иммуноконъюгата, цитокина, гормона, агониста гормона, фермента, ингибитора фермента, фотоактивного терапевтического агента, цитотоксического лекарственного средства, токсина, ингибитора ангиогенеза, ингибитора иммунной контрольной точки, терапевтического антитела, конъюгата «антитело-лекарственное средство» (ADC) или их комбинации.

Терапевтический агент может содержать комплекс иммуноконъюгат/ADC, включающий цитотоксическое лекарственное средство. Подходящим цитотоксическим лекарственным средством может быть лекарственное средство, пролекарство, фермент или токсин.

В вариантах осуществления изобретения, способ лечения рака у индивидуума, например, у млекопитающего, а в частности, у человека, может включать лечение индивидуума терапевтически эффективным количеством клеток согласно изобретению. В

вариантах осуществления изобретения, клетка может быть получена в форме терапевтически эффективного клеточного препарата в дозе от 1×10^4 клеток на кг массы тела до свыше 5×10^6 клеток на кг массы тела индивидуума на дозу.

В вариантах осуществления изобретения, способ может включать многократное введение терапевтически эффективной композиции клеток.

В соответствии с этим, опухолевый ответ может быть оценен по изменению морфологии опухоли, например, в отношении опухолевой нагрузки, размера опухоли и т.п., или путем МРТ-сканирования, рентгеновского сканирования, КТ-сканирования, визуализации кости или биопсии. В данном случае, выделенная молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая была идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной примесной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике данной нуклеиновой кислоты.

В вариантах осуществления изобретения, клетки согласно изобретению могут быть использованы для лечения вирусной инфекции, где указанным вирусом является ВИЧ, вирус гриппа, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гриппа, варианты вируса герпеса, цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барра, вирус ветряной оспы, папилломавирус, вирус опоясывающего лишая или вирус натуральной оспы.

В вариантах осуществления изобретения, вирусом гриппа может быть вирус гриппа А (Flu A). В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирус гриппа может представлять собой пандемический птичий или свиной вирус гриппа, например, H5N1, H7N3, H7N7, H7N9 и H9N2 (птичьих подтипов) или H1N1, H1N2, H2N1, H3N1, H3N2 H2N3 (свиных подтипов).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам для лечения индивидуума с раком или инфекцией, где указанное лечение является аллогенным.

Лечение клетками согласно изобретению может способствовать предотвращению выхода или высвобождения опухолевых клеток, что часто наблюдается при стандартных подходах.

В соответствии с другим своим аспектом, настоящее изобретение относится к конструкциям CAR, включающим по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен, выбранный из Fc γ RIIIA (CD16), Fc γ RIIA (CD32a), Fc γ RIIC (CD32c) и CD64 или их комбинаций.

Настоящее изобретение более подробно проиллюстрировано на Примерах и чертежах, которые позволяют специалисту лучше понять настоящее изобретение и никоим образом не рассматриваются как ограничение объема изобретения.

Чертежи

На фигуре 1 проиллюстрированы предложенные структуры конструкций CAR, содержащих активирующие домены Fc γ -рецепторов.

На фигуре 2 проиллюстрирован механизм действия гамма-дельта-Т-клеток,

экспрессирующих CAR, содержащий домен активации Fc γ -рецепторов, где гамма-дельта-T-клетки, экспрессирующие TCR Vgamma9 Vdelta2, активируются фосфоантигенами, специфически аккумулирующимися в раковых клетках, с одновременной передачей сигнала CAR после связывания с антигеном, что приводит к фосфорилированию ITAM, и, в конечном итоге, к активации пути PKC, приводящей к повышению цитотоксичности и уровня продуцирования цитокинов и, возможно, к увеличению уровня презентации антигенов CAR-экспрессирующими гамма-дельта-T-клетками.

Фигура 3. А) Гамма-дельта-T-клетки были трансдуцированы для экспрессии CAR, содержащего анти-CD19 scFv, исходную и трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен Fc γ . Гамма-дельта-T-клетки были размножены, и экспрессия CAR была исследована с помощью проточной цитометрии. В) CAR-трансдуцированные и нетрансдуцированные клетки были совместно культивированы с клеточной линией лимфомы Беркитта в отношении 10:1, и их цитотоксическую активность оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания аннексином V и PI. CAR-трансдуцированные гамма-дельта-T-клетки обладали цитотоксической активностью, которая почти в два раза превышала активность нетрансдуцированных (контрольных) гамма-дельта-T-клеток.

На фигуре 4 схематическое представлены конструкции CAR. А) Конструкция CAR, нацеленная на CD19 с эндодоменом Fc ϵ RI- γ . В) Конструкция CAR, нацеленная на CD33 с эндодоменом Fc γ . С) Конструкция CAR, нацеленная на CD33 с эндодоменом CD3z. D) Конструкция CAR, нацеленная на CD33 с костимулирующим эндодоменом 41BB.

На фигуре 5 проиллюстрированы гамма-дельта-T-клетки, трансдуцированные для экспрессии CAR, содержащего анти-CD19 scFv, стеблевую и трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен Fc ϵ RI- γ , как показано на фигуре 4. Клетки совместно инкубировали с CD19-позитивными раковыми клетками Ramos и Дауди, с CD19-негативными раковыми клетками K562 и с CD19-позитивными здоровыми В-клетками в соотношении 10:1, и их цитотоксическую способность оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания аннексином V и PI. CAR-трансдуцированные гамма-дельта-T-клетки обладали значимой дополнительной цитотоксичностью против CD19-позитивных клеток, но не против CD19-негативных клеток K562 по сравнению с нетрансдуцированными (контрольными) гамма-дельта-T-клетками.

На фигуре 6 проиллюстрированы гамма-дельта-T-клетки, трансдуцированные для экспрессии CAR, содержащего анти-CD19 scFv, исходную и трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен Fc ϵ RI- γ , как показано на фигуре 4. Клетки совместно инкубировали с CD19-позитивными раковыми клетками Ramos и Дауди, с CD19-негативными раковыми клетками K562 и с CD19-позитивными здоровыми В-клетками в соотношении 1:1. Экспрессию CD107a определяли с помощью проточной цитометрии в качестве маркера дегрануляции в CAR-позитивных (А) и CAR-негативных (В) гамма-дельта-T-клетках. Дегрануляция значительно увеличивалась в CAR-позитивных гамма-дельта-T-клетках при совместном инкубировании с CD19-позитивными раковыми

клетками или В-клетками, но не с CD19-негативными раковыми клетками.

На фигуре 7 проиллюстрированы гамма-дельта-Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии CAR, включающего анти-CD33 scFv, шарнирную область Fc IgG1, трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен FcεRI-γ или CD3z, как показано на фигуре 4. Клетки совместно инкубировали с CD33-раковыми клетками HL-60 или с CD33-позитивными здоровыми моноцитами в отношении 10:1, и их цитотоксическую способность оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания аннексином V и PI. CAR, содержащие эндодомен FcεRI-γ и CD3z, обладали эквивалентной цитотоксичностью против CD33-позитивных раковых клеток или моноцитов.

На фигуре 8 проиллюстрированы гамма-дельта-Т-клетки, трансдуцированные для экспрессии CAR, включающего анти-CD33 scFv, шарнирную область Fc IgG1, трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен FcεRI-γ или 41BB, как показано на фигуре 4. Затем клетки стимулировали сферами MACSiBeads, покрытыми антителами против TCR или против растворимого CD33 для стимуляции CAR или их комбинациями. Дегрануляцию измеряли посредством детектирования поверхностного CD107a с помощью проточной цитометрии и коррелировали в зависимости от присутствия или отсутствия CAR. Стимуляция посредством только CAR приводила к дегрануляции, если CAR содержит FcεRI-γ, но не эндодомен 41BB.

Примеры

Пример 1. Получение вектора для трансфекции гамма-дельта-Т-клеток и NK-клеток.

ДНК, кодирующую CAR, нацеленный на CD19 и содержащий сигнал секреции рецептора GMCSF; scFv, происходящий от FMC63; шарнирный и трансмембранный домен CD28 и активирующий домен CD32c, продуцировали в остове pDONR221 между сайтами рекомбинации attL1 и attL2.

Пример 2. Трансдукция гамма-дельта-Т-клеток с использованием лентивируса

МКПК выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности (с использованием лимфопрепарата) из материала для лейкофереза и подвергали криоконсервации. МКПК восстанавливали, и МКПК, стимулированные золедроновой кислотой (5 мкМ), культивировали в присутствии IL-2 (1000 МЕ/мл) и 5% человеческой сыворотки АВ в среде для культивирования. После выдерживания в течение 24 часов в культуре (37°C, 5% CO₂, в атмосфере повышенной влажности), клетки трансдуцировали лентивирусом с CAR, нацеленным на CD19 и включающим домен активации CD32c (как показано на фигуре 1С). Клетки культивировали в колбах для культивирования G-REX100 в течение 10 дней после трансдукции, и экспрессию CAR оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела против внеклеточной части CAR.

Пример 3 - Трансдукция NK с использованием лентивируса

МКПК выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности (с использованием лимфопрепарата) из материала для лейкофереза. CD3⁺-клетки истощали с

использованием MACS. МКПК с дефицитом CD3 культивировали в присутствии IL-2 (1000 МЕ/мл) и IL-15 (10-100 нг/мл) и 5% человеческой сыворотки АВ в среде для культивирования клеток. После выдерживания в течение 24-72 часов в культуре (37°C, 5% CO₂, в атмосфере повышенной влажности), клетки трансдуцировали лентивирусом с CAR, нацеленным на CD19 и включающим домен активации CD32c (как показано на фигуре 1С). Клетки культивировали в колбах для культивирования G-REX100 в течение 10 дней после трансдукции, и экспрессию CAR оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием антитела против внеклеточной части CAR.

Пример 4. Использование системы на основе транспозона для трансфекции гамма-дельта-Т-клеток.

Конструкцию CAR Примера 1 клонировали в вектор PB51× (System Bioscience). Т-клетки совместно трансфецировали вектором PB51× и вектором для экспрессии транспозазы PiggyBac «Super» (System Bioscience) с помощью системы нуклеофекции (Lonza) или системы электропорации Neon (Thermo Fisher).

Пример 5. Иллюстрация повышения цитотоксического потенциала CAR-экспрессирующих гамма-дельта-Т-клеток

Гамма-дельта-Т-клетки трансдуцировали для экспрессии CAR, состоящего из анти-CD19 scFv, исходной и трансмембранной области CD28 и сигнального эндодомена Fcγ. Гамма-дельта-Т-клетки размножали, и экспрессию CAR оценивали с помощью проточной цитометрии.

CAR-трансдуцированные и нетрансдуцированные клетки были совместно культивированы с клеточной линией лимфомы Беркитта в отношении 10:1, и их цитотоксическую активность оценивали с помощью проточной цитометрии путем окрашивания аннексином V и PI. Результаты, представленные на фигуре 3, показали, что CAR-трансдуцированные гамма-дельта-Т-клетки обладали цитотоксической активностью, которая почти в два раза превышала активность нетрансдуцированных (контрольных) гамма-дельта-Т-клеток.

Кроме того, как показано на фигуре 4, совместное инкубирование гамма-дельта-Т-клеток, трансдуцированных для экспрессии CAR, содержащего анти-CD19 scFv, стеблевую и трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен FcεRI-γ, с CD19-позитивными раковыми клетками Ramos и Дауди, с CD19-негативными раковыми клетками K562 и с CD19-позитивными здоровыми В-клетками в соотношении 10:1, показало, что CAR-трансдуцированные гамма-дельта-Т-клетки обладали значимой дополнительной цитотоксичностью против CD19-позитивных клеток, но не против CD19-негативных клеток K562.

Как показано на фигуре 5, очевидно, что CAR-индуцированные трансдуцированные гамма-дельта-Т-клетки по сравнению с нетрансдуцированными (контрольными) гамма-дельта-Т-клетками (где гамма-дельта-Т-клетки были трансдуцированы для экспрессии CAR, содержащего анти-CD19 scFv, стеблевую и трансмембранную область CD28 и сигнальный эндодомен FcεRI-γ), обладали значимой

дополнительной цитотоксичностью против CD19-позитивных клеток, но не против CD19-негативных клеток K562 по сравнению с нетрансдуцированными (контрольными) гамма-дельта-T-клетками.

Различные модификации и варианты описанных способов и систем согласно изобретению будут очевидны для специалистов в данной области и не выходят за рамки объема изобретения. Хотя настоящее изобретение было описано на конкретных предпочтительных вариантах его осуществления, однако, следует отметить, что заявленное изобретение не должно излишне ограничиваться такими конкретными вариантами его осуществления. Действительно, различные модификации описанных способов осуществления изобретения, которые будут очевидны для специалистов в области молекулярной биологии, биологии клетки, иммунологии или в смежных областях, не должны выходить за рамки объема нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гамма-дельта-Т-клетка или природная клетка-киллер, содержащая конструкцию нуклеиновой кислоты, включающую:

- (i) антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом,
- (ii) домен передачи сигнала внутриклеточной активации,

где внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более внутриклеточных сигнальных доменов Fc γ -рецептора, в результате чего связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводит к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR.

2. Гамма-дельта-Т-клетка или природная клетка-киллер по п. 1, где внутриклеточный сигнальный домен Fc γ -рецептора выбран из сигнального домена по меньшей мере одного из: общей гамма-цепи FcR, рецептора CD16, или CD32a, или CD32c, или CD64 или его функционального варианта.

3. Гамма-дельта-Т-клетка по п. 1 или 2, где связывание рецептора гамма-дельта-Т-клеток с лигандом-мишенью, с которым специфически связывается рецептор гамма-дельта-Т-клеток, приводит к передаче первого внутриклеточного сигнала, а связывание антигенсвязывающего домена CAR с лигандом-мишенью, с которым специфически связывается CAR, приводит к передаче второго внутриклеточного сигнала, где первый и второй внутриклеточные сигналы отдельно или в комбинации вызывают активацию гамма-дельта-Т-клеток.

4. Природная клетка-киллер (NK) по п. 1 или 2, где связывание рецептора NK-клеток с лигандом-мишенью, с которым специфически связывается рецептор NK-клеток, приводит к передаче первого внутриклеточного сигнала, а связывание антигенсвязывающего домена CAR с лигандом-мишенью, с которым специфически связывается CAR, приводит к передаче второго внутриклеточного сигнала, где первый и второй внутриклеточные сигналы отдельно или в комбинации вызывают активацию NK-клеток.

5. Гамма-дельта-Т-клетка по п. 3 или природная клетка-киллер по п. 4, где активация сообщает гамма-дельта-Т-клетке или природной клетке-киллеру по меньшей мере одну повышенную эффекторную функцию, выбранную из цитотоксичности, продуцирования цитокинов, захвата антигена или презентация антигена.

6. Гамма-дельта-Т-клетка по п. 3 или природная клетка-киллер по п. 4, где активация гамма-дельта-Т-клетки или природной клетки-киллера клеткой-мишенью вызывает активацию гамма-дельта-Т-клетки или природной клетки-киллера и тем самым стимуляцию гибели клетки-мишени.

7. Гамма-дельта-Т-клетка или природная клетка-киллер по любому из п.п. 1-6, включающая конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR, где конструкция нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, или их комбинации.

8. Гамма-дельта-Т-клетка или природная клетка-киллер по любому из п.п. 1-6,

включающая конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR выбранный из по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 или их комбинации.

9. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая:

- (i) антигенсвязывающий домен, связанный с трансмембранным доменом,
- (ii) домен передачи сигнала внутриклеточной активации,

где домен передачи сигнала внутриклеточной активации содержит один или более сигнальных доменов Fc γ -рецептора, выбранных из сигнального домена CD32a или CD32c или CD64 или их функционального варианта такого сигнального домена, в результате чего связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводит к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR.

10. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 9, где внутриклеточный сигнальный домен состоит из одного или более внутриклеточных сигнальных доменов Fc γ , выбранных из сигнального домена по меньшей мере одного из сигнальных доменов CD32a или CD32c или CD64 или функционального варианта такого сигнального домена, в результате чего связывание антигена с антигенсвязывающим доменом CAR приводит к передаче сигнала посредством внутриклеточного сигнального домена CAR.

11. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 9 или 10, где функциональные варианты CD32a или CD32c имеют последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

12. Конструкция нуклеиновой кислоты по п. 9 или 10, где указанная конструкция содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7.

13. Вектор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты нуклеиновую кислоту по любому из п.п. 9-12.

14. Вектор по п. 13, где вектор представляет собой лентивирусный вектор.

15. Клетка, содержащая конструкцию по любому из п.п. 9-12, или вектор по п. 13 или 14.

16. Клетка по п. 15, где клетка представляет собой гамма-дельта-T-клетку.

17. Клетка по п. 15, где клетка представляет собой природную клетку-киллера (NK).

18. Способ получения клетки по п. 15, включающий стадию введения конструкции по любому из п.п. 9-12, или вектора по п. 13 или 14 в клетку.

19. Способ получения клетки по любому из п.п. 1-8, включающий стадию введения конструкции по любому из п.п. 9-12, или вектора по п. 13 или 14 в клетку, содержащую рецептор гамма-дельта-T-клеток или рецептор NK-клеток.

20. Способ по п. 18 или 19, где клетку, в которую вводят конструкцию, получают из образца, выделенного у индивидуума, которому вводят клетку, содержащую указанную конструкцию.

21. Способ по п. 18 или 19, где клетку, в которую вводят конструкцию, получают из образца, выделенного у первого индивидуума, и где клетку, содержащую указанную

конструкцию, вводят второму другому индивидууму.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая множество клеток по п.п. 1-8 или 15-17.

23. Способ лечения и/или профилактики заболевания, включающий стадию введения индивидууму клеток по п.п. 1-8 или 15-17.

24. Способ по п. 23, включающий следующие стадии:

(i) трансдукции или трансфекции гамма-дельта-T- и/или NK-клеток, взятых у первого индивидуума, конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 9-12 или вектором по п.п. 13 или 14; и

(ii) введения индивидууму гамма-дельта-T- и/или NK-клеток стадии (i).

25. Способ по п. 23, включающий следующие стадии:

(i) трансдукции или трансфекции гамма-дельта-T- и/или NK-клеток, взятых у первого индивидуума, конструкцией нуклеиновой кислоты по любому из п.п. 9-12 или вектором по п.п. 13 или 14; и

(ii) введения второму другому индивидууму гамма-дельта-T- и/или NK-клеток стадии (i).

26. Способ по любому из п.п. 23-25, где заболевание представляет собой рак.

27. Фармацевтическая композиция по п. 22 для ее применения в целях лечения и/или профилактики заболевания.

28. Применение клетки по любому из п.п. 1-8 или 15-17 в целях приготовления лекарственного средства для лечения и/или профилактики заболевания.

29. Клетка по любому из п.п. 1-8 или 15-17 для ее применения в целях лечения и/или профилактики заболевания, где заболевание выбрано, но необязательно, из рака или инфекции, включая вирусную инфекцию.

По доверенности

ФИГ.1

А Костимулирующий CAR с общей цепью Fc γ

Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации общей цепи Fc γ
Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Трансмембранный домен и домен активации общей цепи Fc γ	

В Костимулирующий CAR со стимулирующим доменом CD32a

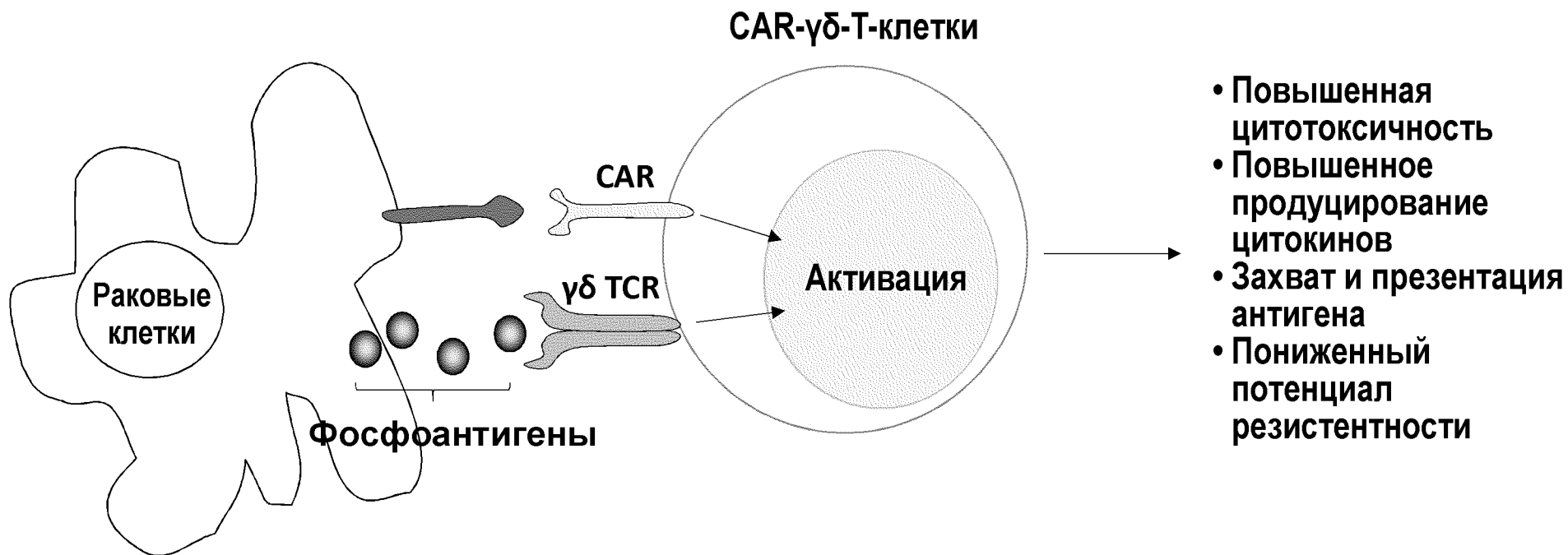
Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации CD32a
-------------------------	---------------------------------------	--	-----------------------

С Костимулирующий CAR со стимулирующим доменом CD32c

Сигнал секреции GMCSF-R	scFv, специфичный к раковому антигену	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации CD32c
-------------------------	---------------------------------------	--	-----------------------

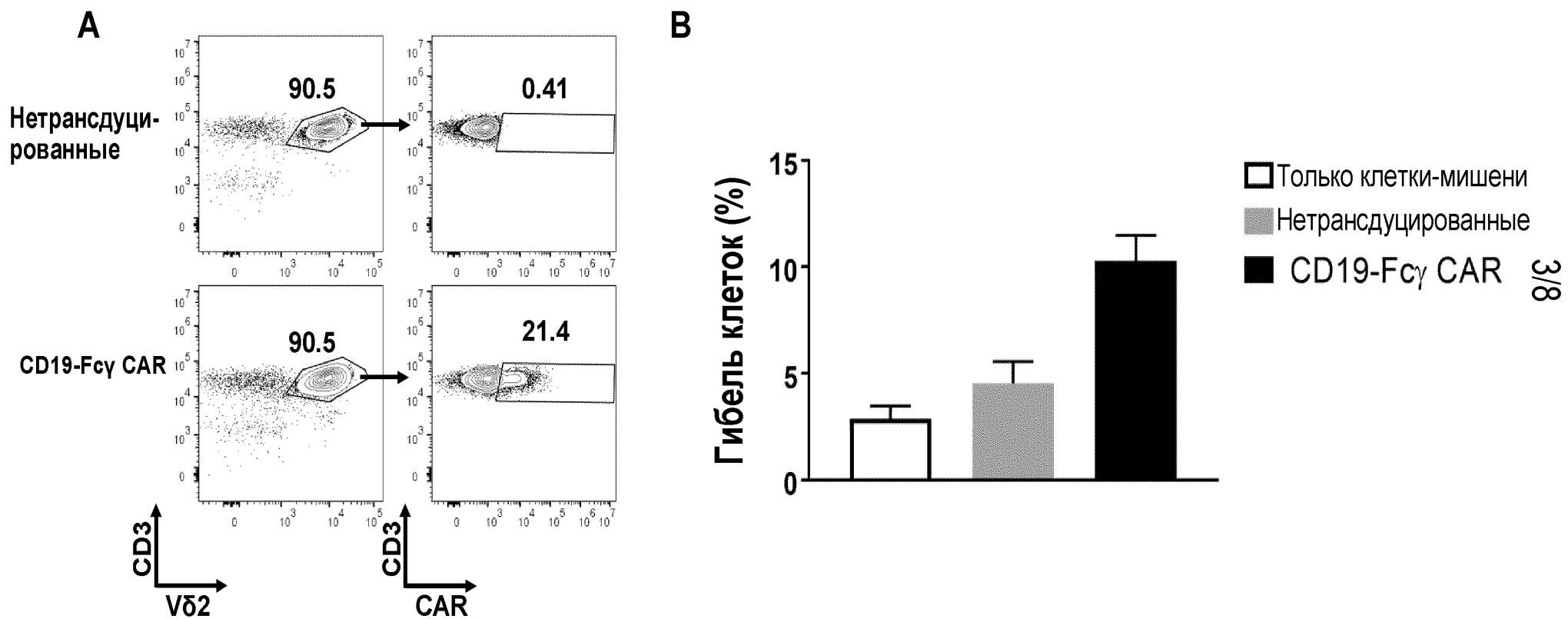
ФИГ.2

Механизм действия CAR в $\gamma\delta$ -Т-клетках



ФИГ.3

Повышенный цитотоксический потенциал CAR-экспрессирующих гамма-дельта-T-клеток



ФИГ.4

A)

CD19 scFv	Шарнирная область и трансмембранный домен CD28	Домен активации общей цепи FcεRI-γ
-----------	--	------------------------------------

B)

CD33 scFv	Шарнирная область Fc IgG1	Трансмембранный домен CD28	Домен активации общей цепи FcεRI-γ
-----------	---------------------------	----------------------------	------------------------------------

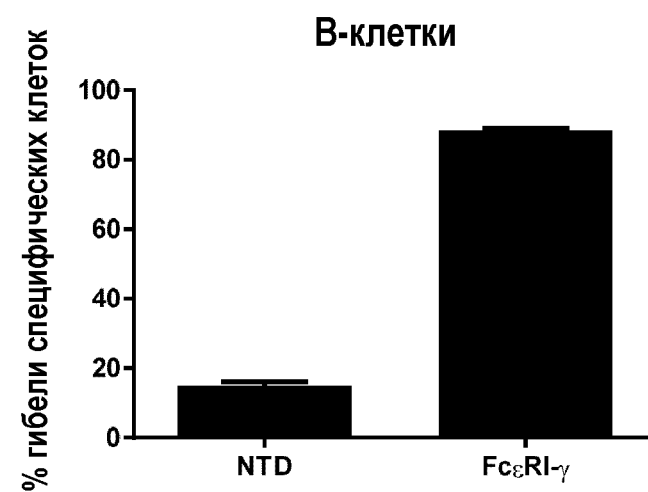
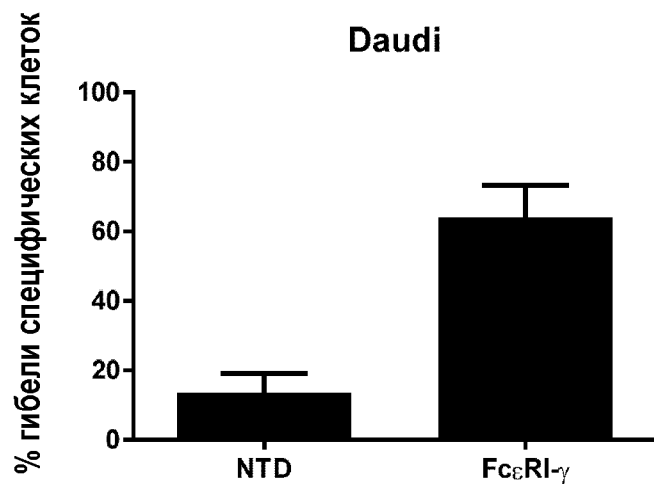
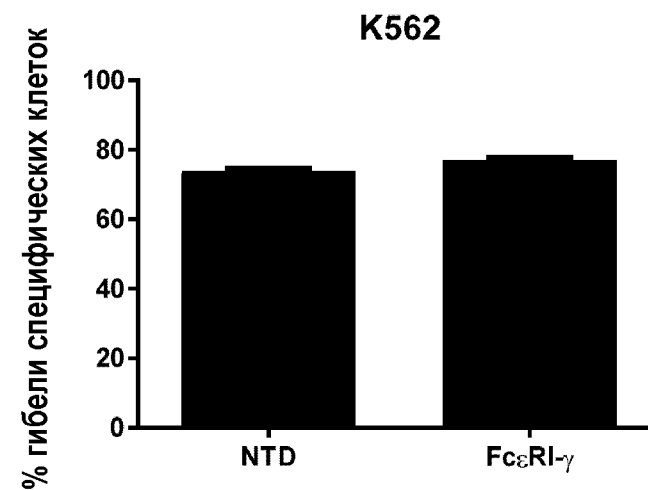
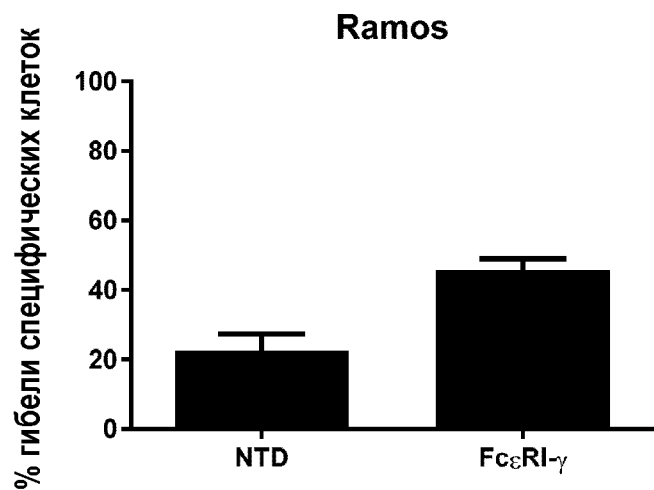
C)

CD33 scFv	Шарнирная область Fc IgG1	Трансмембранный домен CD28	Домен активации CD3z
-----------	---------------------------	----------------------------	----------------------

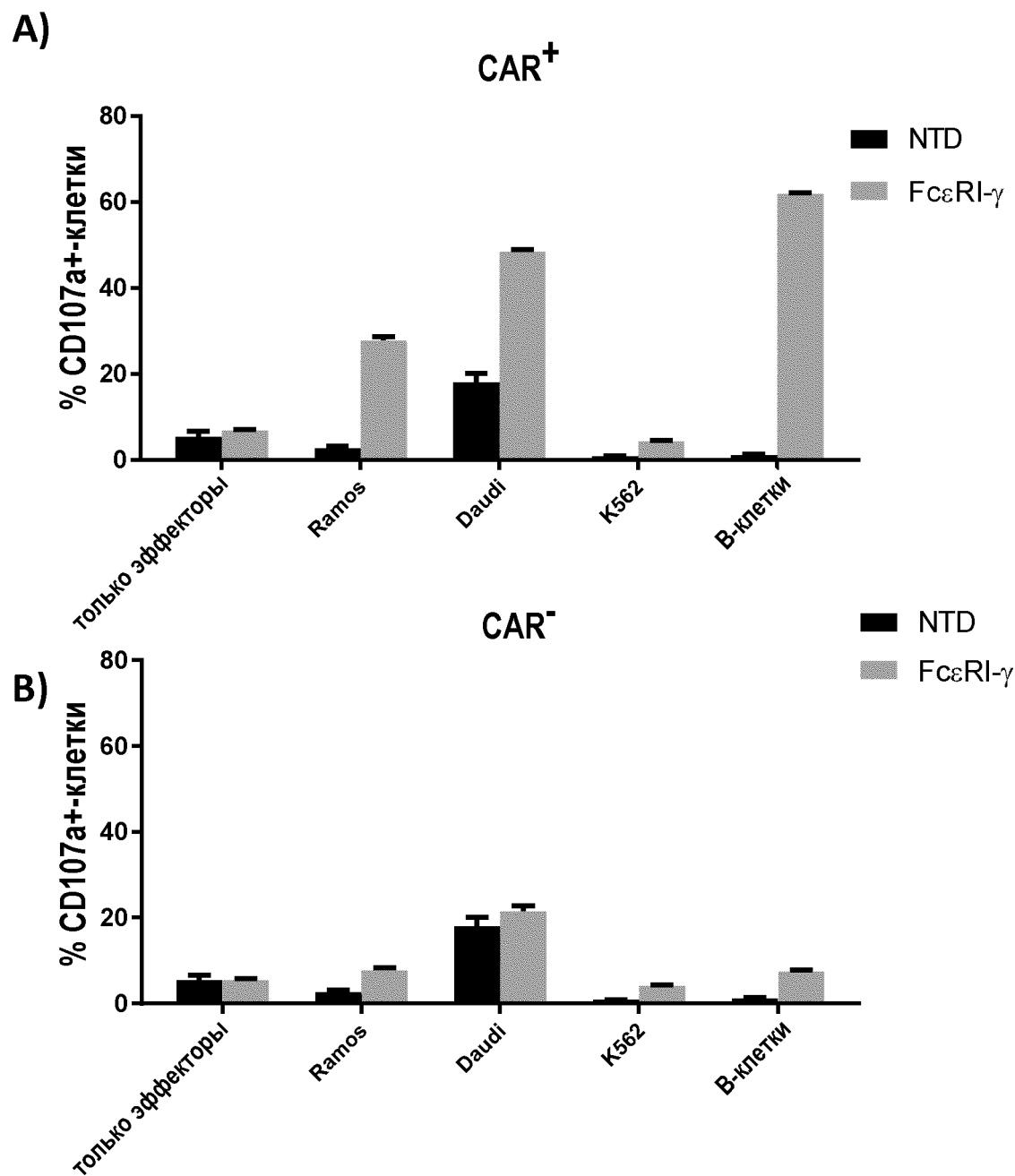
D)

CD33 scFv	Шарнирная область Fc IgG1	Трансмембранный домен CD28	Костимулирующий домен 41BB
-----------	---------------------------	----------------------------	----------------------------

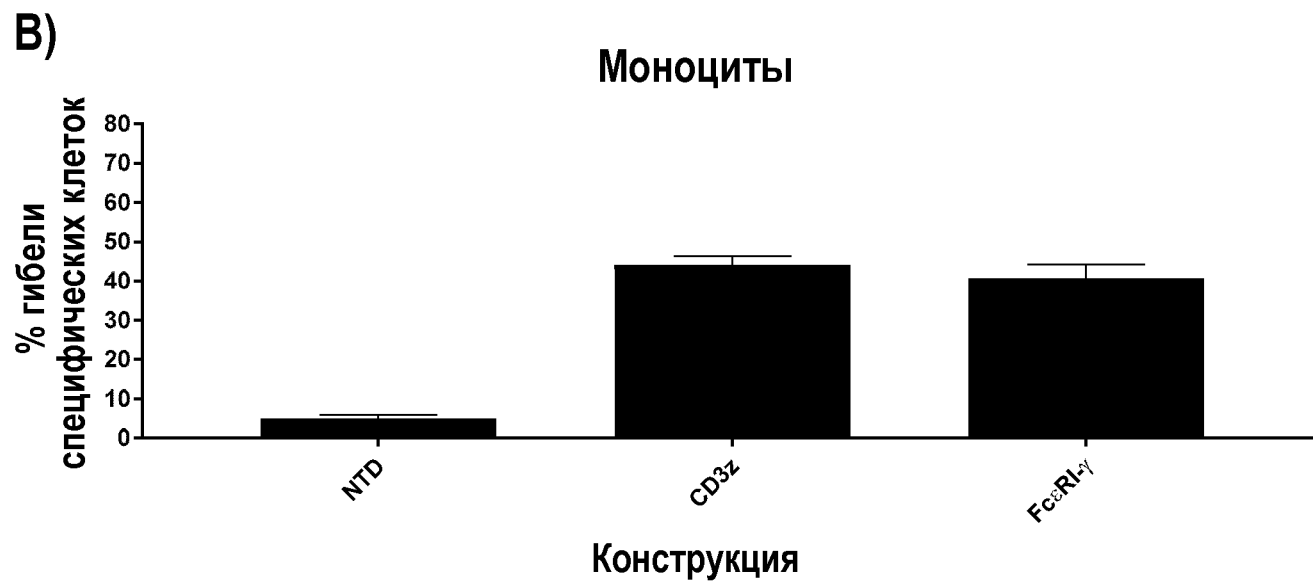
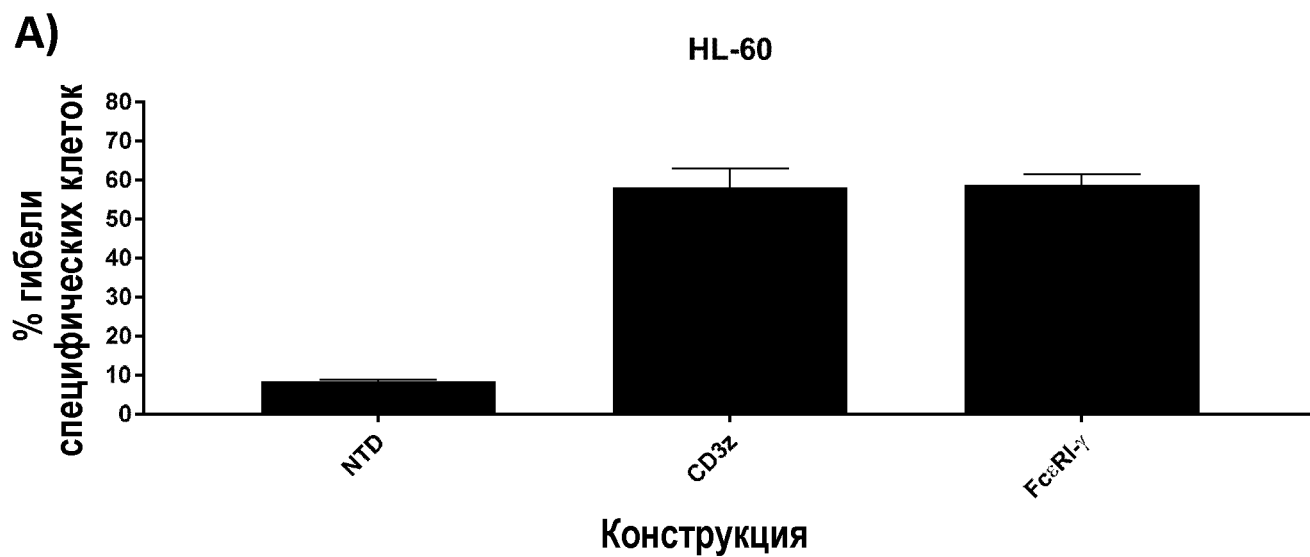
ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

