

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290191 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.09

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.08.14

(54) ПОПУЛЯЦИИ ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОК EX VIVO

(31) 1911799.3; 2010760.3; 2012172.9

(32) 2019.08.16; 2020.07.13; 2020.08.05

(33) GB

(86) PCT/GB2020/051956

(87) WO 2021/032961 2021.02.25

(71) Заявитель:
ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Бергерхофф Катарина, Полякова
Оксана, Нуссбаумер Оливер (GB)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам ex vivo модуляции Vδ1-Т-клеток с применением антител к Vδ1 или их фрагментов.

A1

202290191

202290191

A1

ПОПУЛЯЦИИ ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОК EX VIVO

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к популяциям гамма-дельта-Т-клеток, приведенным в контакт с антителами к вариабельной области 1 дельта-цепи Т-клеточного рецептора (TCR) (антителами к V δ 1).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Растущий интерес к Т-клеточной иммунотерапии рака был сфокусирован на очевидной способности субпопуляций CD8⁺ и CD4⁺ альфа-бета ($\alpha\beta$) Т-клеток распознавать раковые клетки и опосредовать защитные функции хозяина, в частности, при обратной репрессии ингибирующих путей, осуществляемых рецепторами PD-1, CTLA-4 и другими рецепторами, в результате опосредуемого медицинскими препаратами антагонизма. Однако $\alpha\beta$ -Т-клетки рестриктированы по ГКГС, что может приводить к болезни «трансплантат против хозяина».

Гамма-дельта-Т-клетки ($\gamma\delta$ -Т-клетки) представляют собой субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный характерный $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор (TCR). Указанный TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи, каждая из которых подвергается реаранжировке цепи, но имеет ограниченное количество V-генов по сравнению с $\alpha\beta$ -Т-клетками. Основные сегменты гена TGRV, кодирующие V γ , представляют собой TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV8, TRGV9 и TRGV11, а также нефункциональные гены TRGV10, TRGV11, TRGVA и TRGVB. Наиболее частые сегменты гена TRDV кодируют V δ 1, V δ 2 и V δ 3, а также несколько V-сегментов, которые имеют оба обозначения V δ и V α (Adams *et al.*, 296:30-40 (2015) *Cell Immunol.*). $\gamma\delta$ -Т-клетки человека можно обобщенно классифицировать на основании их TCR-цепей, поскольку определенные типы γ - и δ -цепей встречаются преимущественно, но не исключительно, на клетках одного или более типов тканей. Например, большинство резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток крови экспрессируют V δ 2-TCR, обычно V γ 9V δ 2, в то время как это реже встречается среди тканевых резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток, таких как клетки в коже, которые чаще используют V δ 1-TCR, спаренный с гамма-цепями, например, часто спаренный с V γ 4 в кишечнике.

Чтобы использовать $\gamma\delta$ -Т-клетки для иммунотерапии требуется либо средство для размножения клеток *in situ*, либо для их сбора и размножения *ex vivo* перед повторной инфузией. Последний подход был описан ранее с использованием добавления экзогенных цитокинов, например, см. WO2017/072367 и WO2018/212808. Способы размножения

собственных $\gamma\delta$ -Т-клеток пациентов были описаны с использованием фармакологически модифицированных форм гидроксиметил-бут-2-енилпирофосфата (НМВРР) или клинически одобренных аминокислосфосфонатов. Благодаря этим подходам более 250 пациентов, имеющих рак, прошли лечение, по-видимому, безопасно, но с редкими случаями полной ремиссии. Однако все еще существует потребность в активирующих агентах, обладающих доказанной способностью обеспечивать размножение больших количеств $\gamma\delta$ -Т-клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* модуляции V δ 1-Т-клеток, включающий введение антитела человека к вариабельной области 1 дельта-цепи TCR (антитела к V δ 1) или его фрагмента, которые связываются с эпитопом вариабельной области 1 дельта-цепи (V δ 1) $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора (TCR), содержащим один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

- (i) 3-20 из SEQ ID NO: 1; и/или
- (ii) 37-77 из SEQ ID NO: 1

в популяцию клеток, содержащую V δ 1-Т-клетки.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* модуляции V δ 1-Т-клеток, включающий введение антитела к V δ 1 или его фрагмента, содержащих одно или более из:

определяющего комплементарность участка (CDR) 3, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2); и/или

CDR1, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61;

в популяцию клеток, содержащую V δ 1-Т-клетки.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена популяция V δ 1-Т-клеток, полученная с помощью способа *ex vivo*, определенного в настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена композиция, содержащая популяцию V δ 1-T-клеток, определенную в настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию V δ 1-T-клеток, определенную в
5 настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества популяции V δ 1-T-клеток или фармацевтической композиции, определенных в
10 настоящей заявке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Обнаружение методом ИФА антигена, непосредственно нанесенного в виде покрытия, с использованием антитела к V δ 1 (REA173, Miltenyi Biotec). Обнаружение наблюдали только для тех антигенов, которые содержат домен V δ 1. Формат лейциновой молнии (LZ), по-видимому, является более эффективным, чем формат Fc, что согласуется с клеточным цитометрическим анализом конкурентного связывания (данные не показаны).

Фигура 2: Данные DELFIA для поликлонального фага для отборов DV1. А) Отборы гетеродимеров: формат гетеродимерного LZ TCR в раунде 1 и 2, с отменой отборов на гетеродимерном LZ TCR в обоих раундах. В) Отборы гомодимеров: раунд 1 выполняли с использованием гомодимерного Fc-слитого TCR с отменой отбора на Fc IgG1 человека с последующим раундом 2 на гетеродимерном LZ TCR с отменой отбора на гетеродимерном LZ TCR. Каждый график включает два столбика для каждой мишени,
25 чтобы представить отборы из разных библиотек.

Фигура 3: Захват IgG: слева) Сенсограммы взаимодействия IgG против L1 с L1, справа) аппроксимации в равновесном состоянии, если доступно. Все эксперименты выполняли при комнатной температуре на приборе MASS-2. Аппроксимация в равновесном состоянии соответствует модели связывания Ленгмюра 1:1.

Фигура 4: Результаты анализа отрицательной регуляции TCR для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (А) или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09, 1251_P02_G10 и 1252_P01_C08 (В).

Фигура 5: Результаты анализа дегрануляции Т-клеток для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (A) или клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09 и 1251_P02_G10 (B).

5 **Фигура 6:** Результаты анализа цитолитической активности (анализ методом проточной цитометрии THP-1) для клонов 1245_P01_E07, 1252_P01_C08, 1245_P02_G04, 1245_P01_B07 и 1251_P02_C05 (A) или для клонов 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06, 1245_P01_G09, 1138_P01_B09 и 1251_P02_G10 (B).

Фигура 7: Данные по картированию эпитопов для 1245_P01_E07.

10 Графическое представление сайта связывания эпитопа 1245_P01_E07 на SEQ ID NO: 1.

Фигура 8: Данные по картированию эпитопов для 1252_P01_C08.

Графическое представление сайта связывания эпитопа 1252_P01_C08 на SEQ ID NO: 1.

Фигура 9: Данные по картированию эпитопов для 1245_P02_G04.

Графическое представление сайта связывания эпитопа 1245_P02_G04 на SEQ ID NO: 1.

15 **Фигура 10:** Данные по картированию эпитопов для 1251_P02_C05.

Графическое представление сайта связывания эпитопа 1251_P02_C05 на SEQ ID NO: 1.

Фигура 11: Данные по картированию эпитопов для 1141_P01_E01.

Графическое представление сайта связывания эпитопа 1141_P01_E01 на SEQ ID NO: 1.

Фигура 12: Общее количество клеток во время Эксперимента 1 из Примера

20 **10.** Образцы культивировали с различной концентрацией антител к V δ 1, описанных в настоящей заявке, и сравнивали с образцами, культивированными с антителами, используемыми для сравнения, или контролями. На графиках показано общее количество клеток в (A) день 7, (B) день 14 и (C) день 18.

Фигура 13: Анализ V δ 1-Т-клеток во время Эксперимента 1 из Примера 10.

25 На графиках показано (A) процентное содержание V δ 1-Т-клеток, (B) количество V δ 1-Т-клеток и (C) кратное изменение V δ 1 в образцах в день 18.

Фигура 14: Общее количество клеток во время Эксперимента 2 из Примера

10. Образцы культивировали с различной концентрацией антител к V δ 1, описанных в настоящей заявке, и сравнивали с образцами, культивированными с антителами, используемыми для сравнения, или контролями. На графиках показано общее количество
30 клеток в (A) день 7, (B) день 11 и (C) день 14 и (D) день 17.

Фигура 15: Анализ V δ 1-Т-клеток во время Эксперимента 2 из Примера 10.

На графиках показано (A) процентное содержание V δ 1-Т-клеток, (B) количество V δ 1-Т-клеток и (C) кратное изменение V δ 1 в образцах в день 17.

Фигура 16: Анализ клеточного состава. Типы клеток, присутствующие в образцах (включая клетки, не относящиеся к V δ 1), измеряли в день 17 Эксперимента 2. Клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии V δ 1, V δ 2 и $\alpha\beta$ TCR. Процентные значения также приведены в

5 Таблице 6.

Фигура 17: Результаты анализа цитолитической активности методом проточной цитометрии с использованием SYTOX. Функциональность клеток тестировали с использованием анализа цитолитической активности методом проточной цитометрии с использованием SYTOX, и результаты представлены для (А) Эксперимента 10 1 в день 14 с использованием клеток в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 10:1, и (В) Эксперимента 2 в день 17 (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток в соотношении Е:Т 1:1 и 10:1.

Фигура 18: Общее количество клеток после замораживания-оттаивания. График показывает общее количество клеток через 7 дней культивирования клеток после 15 замораживания-оттаивания для культур, приведенных в контакт с антителами B07, C08, E07, G04 или ОКТ-3 до замораживания.

Фигура 19: Контроль размножения клеток. Общее количество клеток контролировали до дня 42 для клеток, культивированных после замораживания-оттаивания.

Фигура 20: Антитело к V δ 1 обеспечивало модуляцию и пролиферацию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в опухолях человека. Исследования на почечно-клеточной карциноме (RCC) +/- антитела А) кратное увеличение количества V δ 1⁺ TIL-клеток. В) Общее количество V δ 1⁺ TIL-клеток. С) Пример стратегии гейтирования D) Сравнительный фенотипический профиль клеточной поверхности V δ 1⁺ TIL-клеток. Е) 25 Анализ гейтированной V δ 1-отрицательной фракции TIL.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в данной 30 заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В настоящей заявке следующие термины имеют значения, приписываемые им ниже.

Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки представляют собой небольшую субпопуляцию Т-клеток, которые экспрессируют на своей поверхности отдельный характерный Т-

клеточный рецептор (TCR). Указанный TCR состоит из одной гамма (γ) и одной дельта (δ) цепи. Каждая цепь содержит переменную (V) область, константную (C) область, трансмембранную область и цитоплазматический хвост. V-область содержит антигенсвязывающий сайт. Существует два основных подтипа $\gamma\delta$ -Т-клеток человека:

- 5 преобладающий в периферической крови и преобладающий в негемопоэтических тканях. Два подтипа могут быть определены по типу δ и/или γ , присутствующих на клетках. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые являются преобладающими в периферической крови, в основном экспрессируют переменную область 2 дельта-цепи (V δ 2). $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые являются преобладающими в негемопоэтических тканях (т.е. являются
- 10 тканевыми резидентами), в основном экспрессируют переменную область 1 дельта-цепи (V δ 1). Ссылки на «V δ 1-Т-клетки» относятся к $\gamma\delta$ -Т-клеткам с V δ 1-цепью, т.е. V δ 1⁺ Т-клеткам.

Ссылки на «переменную область 1 дельта-цепи» также могут упоминаться как V δ 1 или V δ 1, в то время как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область,

- 15 может упоминаться как «TRDV1». Все антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR, являются по существу антителами или их фрагментами, которые связываются с V δ 1 и могут называться «антитела к переменной области 1 дельта-цепи TCR или их фрагменты» или «антитела к V δ 1 или их фрагменты».

В настоящей заявке сделаны дополнительные ссылки на другие дельта-цепи, такие

- 20 как «переменная область 2 дельта-цепи». На них можно ссылаться аналогичным образом. Например, переменная область 2 дельта-цепи может называться V δ 2, в то время как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может называться «TRDV2». Согласно предпочтительным вариантам реализации антитела или их фрагменты, которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR, не взаимодействуют с
- 25 другими дельта-цепями, такими как V δ 2.

В настоящей заявке также сделаны ссылки на «переменные области гамма-цепи». Они могут называться γ -цепи или V γ , в то время как нуклеотид, кодирующий цепь TCR, содержащую эту область, может называться TRGV. Например, TRGV4 относится к цепи V γ 4. Согласно предпочтительным вариантам реализации антитела или их фрагменты,

- 30 которые взаимодействуют с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR, не взаимодействуют с гамма-цепями, такими как V γ 4.

Термин «антитело» включает любую конструкцию белка антитела, содержащую по меньшей мере один переменный домен антитела, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт (ABS). Антитела включают, но не ограничиваются

перечисленными, иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы).
 Общая структура антител иммуноглобулина G (IgG), собранных из двух идентичных
 полипептидов тяжелой (H) цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи,
 хорошо известна и высоко консервативна у млекопитающих (Padlan (1994) *Mol. Immunol.*
 5 31:169-217).

Обычное антитело или иммуноглобулин (Ig) представляет собой белок, содержащий
 четыре полипептидные цепи: две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. Каждая цепь
 разделена на константную область и переменный домен. Переменные домены тяжелой
 (H) цепи сокращены в настоящей заявке как VH, а переменные домены легкой (L) цепи
 10 сокращены в настоящей заявке как VL. Эти домены, связанные с ними домены и
 полученные из них домены могут называться в настоящей заявке переменными
 доменами цепи иммуноглобулина. Домены VH и VL (также называемые областями VH и
 VL) могут быть дополнительно подразделены на области, называемые «определяющими
 комплементарность участками» («CDR»), которые чередуются с более консервативными
 15 областями, называемыми «каркасными участками» («FR»). Каркасные участки и
 определяющие комплементарность участки были точно определены (Kabat *et al.* *Sequences
 of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human
 Services*, (1991) NIH Publication Number 91-3242). Также существуют альтернативные
 правила нумерации для последовательностей CDR, например, изложенные в Chothia *et al.*
 20 (1989) *Nature* 342: 877-883. В обычном антителе каждая VH и VL состоит из трех CDR и
 четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1,
 CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Тетрамер обычного антитела из двух тяжелых цепей
 иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина образуется тяжелыми и легкими
 цепями иммуноглобулина, соединенными между собой, например, дисульфидными
 25 связями, и тяжелыми цепями, соединенными сходным образом. Константная область
 тяжелой цепи включает три домена, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи
 состоит из одного домена, CL. Переменный домен тяжелых цепей и переменный
 домен легких цепей представляют собой связывающие домены, которые взаимодействуют
 с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с
 30 тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы
 (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы
 комплемента.

Фрагмент антитела (который также может упоминаться как «фрагмент антитела»,
 «фрагмент иммуноглобулина», «антигенсвязывающий фрагмент» или

«антигенсвязывающий полипептид») в контексте настоящей заявки относится к части антитела (или конструкций, содержащих указанную часть), которая специфично связывается с мишенью, вариабельной областью 1 (V δ 1) дельта-цепи $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора (например, молекула, в которой одна или более иммуноглобулиновых цепей не являются полноразмерными, но которая специфично связывается с мишенью). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином фрагмент антитела, включают:

(i) фрагмент Fab (одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1);

(ii) фрагмент F(ab')₂ (двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области);

(iii) фрагмент Fd (состоящий из доменов VH и CH1);

(iv) фрагмент Fv (состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела);

(v) одноцепочечный вариабельный фрагмент scFv (состоящий из доменов VL и VH, соединенных, используя рекомбинантные способы, синтетическим линкером, который позволяет получить их в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул);

(vi) VH (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VH);

(vii) VL (вариабельный домен цепи иммуноглобулина, состоящий из домена VL);

(viii) доменное антитело (dAb, состоящее из домена VH или VL);

(ix) минитело (состоящее из пары фрагментов scFv, которые связаны за счет доменов CH3); и

(x) диатело (состоящее из нековалентного димера фрагментов scFv, которые состоят из домена VH из одного антитела, соединенного небольшим пептидным линкером с доменом VL из другого антитела).

«Антитело человека» относится к антителам, имеющим вариабельные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. У субъектов-людей, которым вводят указанные антитела человека, не вырабатываются межвидовые гуморальные ответы (например, так называемые НАМА-ответы - антитело человека к антителу мыши) на первичные аминокислоты, содержащиеся в указанных антителах. Указанные антитела человека могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные с помощью случайного или сайт-

специфического мутагенеза или соматической мутации), например, в CDR, и, в частности, в CDR3. Однако термин не предусматривает включение антител, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Антитела человека, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, такие как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку хозяина, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, антитела, выделенные у животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека, или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК, также могут называться «рекомбинантными антителами человека».

Замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в каркасной области переменного домена нечеловеческого иммуноглобулина соответствующим остатком из переменного домена человека называется «гуманизацией». Гуманизация переменного домена может снизить иммуногенность у человека.

«Специфичность» относится к числу различных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми может связываться конкретное антитело или его фрагмент. Специфичность антитела представляет собой способность антитела распознавать конкретный антиген как уникальный молекулярный объект и отличать его от другого. Антитело, которое «специфично связывается» с антигеном или эпитопом, является термином, хорошо известным в данной области техники. Считается, что молекула проявляет «специфичное связывание», если она реагирует чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным целевым антигеном или эпитопом, чем с альтернативными мишенями. Антитело «специфично связывается» с целевым антигеном или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, легче и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими веществами.

«Аффинность», представленная равновесной константой диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (KD), представляет собой меру силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антителе (или его фрагменте): чем меньше значение KD, тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом. В качестве альтернативы,

аффинность также может быть выражена как константа аффинности (KA), которая представляет собой $1/KD$. Аффинность может быть определена известными способами, в зависимости от конкретного антигена, представляющего интерес.

Любое значение KD менее 10^{-6} считается указывающим на связывание.

- 5 Специфичное связывание антитела или его фрагмента с антигеном или антигенной детерминантой может быть определено любым подходящим известным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (РИА), иммуноферментные анализы (EIA) и конкурентные анализы в формате «сэндвич», равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ИФА, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с использованием флуоресцентного анализа) и их различные варианты, известные в данной области техники.

- «Авидность» представляет собой меру силы связывания между антителом или его фрагментом и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и ее антигенсвязывающим сайтом на антителе, так и с количеством соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антителе.

- «Тканевые $V\delta 1^+$ клетки человека», «гемопозитические $V\delta 1^+$ клетки и $V\delta 1^+$ клетки крови» и « $V\delta 1^+$ инфильтрирующие опухоль лимфоцитарные клетки (TIL)» определяют как $V\delta 1^+$ клетки, содержащиеся в ткани человека или гемопозитической системе или опухолях человека или происходящие из них, соответственно. Все указанные типы клеток могут быть идентифицированы по их (i) местоположению или по месту их происхождения и (ii) экспрессии ими $V\delta 1^+$ TCR.

- «Модулирующие антитела» представляют собой антитела, которые приводят к измеримому изменению, включая, но не ограничиваясь перечисленными, измеримое изменение клеточного цикла и/или количества клеток, и/или жизнеспособности клеток, и/или одного или более маркеров клеточной поверхности, и/или секреции одной или более секреторных молекул (например, цитокинов, хемокинов, лейкотриенов и т.д.) и/или функции (такой как цитотоксичность в отношении клетки-мишени или пораженной клетки) при контакте или связывании с клеткой, экспрессирующей мишень, с которой связывается антитело.

Способ «модуляции» клетки или ее популяции относится к способу, в котором запускается по меньшей мере одно измеримое изменение в указанной клетке или клетках, или секреция из них, с получением одной или более «модулированных клеток».

«Иммунный ответ» представляет собой измеримое изменение по меньшей мере в одной клетке или одном типе клеток, или одном эндокринном пути, или одном экзокринном пути иммунной системы (включая, но не ограничиваясь перечисленными, клеточно-опосредуемый ответ, гуморальный ответ, цитокиновый ответ, хемокиновый ответ) при добавлении модулирующего антитела.

«Иммунная клетка» определяется как клетка иммунной системы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, CD34+ клетки, В-клетки, CD45+ (общий антиген лимфоцитов) клетки, альфа-бета Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, хелперные Т-клетки, плазматические клетки, нейтрофилы, моноциты, макрофаги, эритроциты, тромбоциты, дендритные клетки, фагоциты, гранулоциты, врожденные лимфоидные клетки, естественные клетки-киллеры (NK) и гамма-дельта Т-клетки. Обычно иммунные клетки классифицируют с помощью комбинированного анализа молекул клеточной поверхности (например, с помощью проточной цитометрии) для идентификации или группировки, или кластеризации, чтобы дифференцировать иммунные клетки на субпопуляции. Затем они могут быть дополнительно подразделены с помощью дополнительного анализа. Например, CD45+ лимфоциты могут быть дополнительно подразделены на $\gamma\delta$ -положительные популяции и $\gamma\delta$ -отрицательные популяции.

«Модельные системы» представляют собой биологические модели или биологические представления, предназначенные для облегчения понимания того, как лекарственное средство, такое как антитело или его фрагмент, может функционировать в качестве лекарственного средства для облегчения признака или симптома заболевания. Такие модели обычно включают применение *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* пораженных клеток, непораженных клеток, здоровых клеток, эффекторных клеток и тканей и т. д., и в которых исследуется и сравнивается эффективность указанных лекарственных средств.

«Пораженные клетки» проявляют фенотип, ассоциированный с прогрессированием заболевания, такого как рак, инфекции, такой как вирусная инфекция, или воспалительного состояния или воспалительного заболевания. Например, пораженная клетка может представлять собой опухолевую клетку, аутоиммунную тканевую клетку или инфицированную вирусом клетку. Соответственно, указанные пораженные клетки могут быть определены как опухолевые или инфицированные вирусом, или воспалительные.

«Здоровые клетки» относятся к нормальным клеткам, которые не являются пораженными. Они также могут называться «нормальными» или «непораженными» клетками. Непораженные клетки включают нераковые или неинфицированные, или

невоспалительные клетки. Указанные клетки часто применяют вместе с соответствующими пораженными клетками для определения специфичности в отношении пораженных клеток, придаваемой лекарственным средством, и/или лучшего понимания терапевтического индекса лекарственного средства.

5 «Специфичность в отношении пораженных клеток» представляет собой показатель эффективности эффекторной клетки или их популяции (такой как, например, популяция $V\delta 1^+$ клеток) в различении и уничтожении пораженных клеток, таких как раковые клетки, при одновременном сохранении непораженных или здоровых клеток. Этот потенциал может быть измерен в модельных системах и может включать сравнение склонности
10 эффекторной клетки или популяции эффекторных клеток селективно уничтожать или лизировать пораженные клетки по сравнению с потенциалом указанной эффекторной клетки(клеток) уничтожать или лизировать непораженные или здоровые клетки. Указанная специфичность в отношении пораженных клеток может свидетельствовать о потенциальном терапевтическом индексе лекарственного средства.

15 «Повышенная специфичность в отношении пораженных клеток» описывает фенотип эффекторной клетки, такой как, например, $V\delta 1^+$ клетка или их популяция, которая была модулирована для дополнительного увеличения ее способности специфично уничтожать пораженные клетки. Такое повышение может быть измерено различными способами, включая кратное изменение или процентное увеличение специфичности или
20 селективности уничтожения пораженных клеток.

Является приемлемым, когда антитело или его фрагмент (т.е. полипептид) согласно настоящему изобретению является выделенным. «Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, который извлекают из его исходной среды. Термин «выделенный» может быть использован для обозначения антитела, которое по существу не содержит
25 других антител, имеющих другие виды антигенной специфичности (например, выделенное антитело, которое специфично связывает $V\delta 1$, или его фрагмент, по существу не содержит антител, которые специфично связывают антигены, отличные от $V\delta 1$). Термин «выделенный» также может быть использован для обозначения препаратов, в которых выделенное антитело является достаточно чистым для введения в
30 терапевтических целях, когда оно изготовлено в виде активного ингредиента фармацевтической композиции, или является чистым по меньшей мере на 70-80% (масс./масс.), более предпочтительно является чистым по меньшей мере на 80-90% (масс./масс.), еще более предпочтительно является чистым по меньшей мере на 90-95%; и

наиболее предпочтительно является чистым по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% (масс./масс.).

Является приемлемым, когда полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенный» полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который извлекают из его исходной среды. Например, встречающийся в природе полинуклеотид является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонирован в вектор, который не является частью его природной среды, или если он содержится в кДНК.

Антитело или его фрагмент могут представлять собой «функционально активный вариант», который также включает встречающиеся в природе аллельные варианты, а также мутанты или любые другие не встречающиеся в природе варианты. Как известно в данной области техники, аллельный вариант представляет собой альтернативную форму (поли)пептида, которая характеризуется тем, что имеет замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, что по существу не изменяет биологическую функцию полипептида. В качестве неограничивающего примера, указанные функционально активные варианты могут по-прежнему функционировать, когда каркасы, содержащие CDR, модифицированы, когда сами CDR модифицированы, когда указанные CDR привиты на альтернативные каркасы или когда включены N- или C-концевые удлинения. Кроме того, CDR, содержащие связывающие домены, могут быть спарены с различными партнерскими цепями, такими как те, которые используются совместно с другим антителом. При совместном использовании с так называемыми «общими» легкими или «общими» тяжелыми цепями указанные связывающие домены по-прежнему могут функционировать. Кроме того, указанные связывающие домены могут функционировать при мультимеризации. Кроме того, «антитела или их фрагменты» также могут содержать функциональные варианты, в которых VH или VL или константные домены были модифицированы для уменьшения или увеличения сходства с другой канонической последовательностью (например, как перечислено на IMGT.org) и которые по-прежнему функционируют.

Для целей сравнения двух близкородственных полипептидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью может быть рассчитан с использованием NCBI BLAST v2.0 с использованием стандартных настроек для полипептидных последовательностей (BLASTP). Для целей сравнения двух

близкородственных полинуклеотидных последовательностей «% идентичности последовательности» между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью может быть рассчитан с использованием NCBI BLAST v2.0 с использованием стандартных настроек для нуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Считается, что полипептидные или полинуклеотидные последовательности являются аналогичными или «идентичными» другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100% идентичности последовательности по всей их длине. Остатки в последовательностях пронумерованы слева направо, т. е. от N- к С-концу для полипептидов; от 5' к 3' -концу для полинуклеотидов.

«Различие» между последовательностями относится к вставке, делеции или замене одного аминокислотного остатка в некотором положении второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или более таких аминокислотных различий. Вставки, делеции или замены во второй последовательности, которая в остальном идентична (100% идентичности последовательности) первой последовательности, приводят к снижению % идентичности последовательности. Например, если идентичные последовательности представляют собой 9 аминокислотных остатков в длину, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательности 88,9%. Если первая и вторая полипептидные последовательности представляют собой 9 аминокислотных остатков в длину и имеют 6 одинаковых остатков, первая и вторая полипептидные последовательности имеют более 66% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 66,7% идентичности).

В качестве альтернативы, для целей сравнения первой референсной полипептидной последовательности со второй сравниваемой полипептидной последовательностью может быть установлено количество добавлений, замен и/или делеций, сделанных в первой последовательности для получения второй последовательности. «Добавление» представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на любом конце первого полипептида). «Замена» представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида одним другим аминокислотным остатком. Указанная замена может быть консервативной или неконсервативной. «Делеция» представляет собой делецию одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая делецию на любом конце первого полипептида).

«Консервативная» аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком сходной химической структуры и которая, как ожидается, будет оказывать незначительное влияние на функцию, активность или другие биологические свойства полипептида. Является приемлемым, когда такие консервативные замены представляют собой замены, в которых одна аминокислота в группах, приведенных ниже, заменена другим аминокислотным остатком из той же группы:

Группа	Аминокислотный остаток
Неполярные алифатические	Глицин
	Аланин
	Валин
	Метионин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматические	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярные незаряженные	Серин
	Треонин
	Цистеин
	Пролин
	Аспарагин
	Глутамин
Отрицательно заряженные	Аспартат
	Глутамат
Положительно заряженные	Лизин
	Аргинин
	Гистидин

Является приемлемым, когда остаток гидрофобной аминокислоты представляет собой неполярную аминокислоту. Является более приемлемым, когда гидрофобный аминокислотный остаток выбран из V, I, L, M, F, W или C.

В настоящей заявке нумерация полипептидных последовательностей и определения CDR и FR приведены в соответствии с системой Kabat (Kabat *et al.*, 1991, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки).

«Соответствующий» аминокислотный остаток между первой и второй полипептидной последовательностью представляет собой аминокислотный остаток в первой последовательности, который имеет одинаковое положение в соответствии с системой Kabat с аминокислотным остатком во второй последовательности, в то время как

5 аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться по идентичности от первой последовательности. Является приемлемым, когда соответствующие остатки будут иметь одинаковый номер (и букву), если каркас и CDR имеют одинаковую длину в соответствии с определением Kabat. Выравнивание можно осуществлять вручную или с использованием, например, известного компьютерного

10 алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN) с использованием стандартных настроек.

Ссылки в настоящей заявке на «эпитоп» относятся к части мишени, которая специфично связана антителом или его фрагментом. Эпитопы также могут называться «антигенными детерминантами». Антитело связывает «по существу тот же эпитоп», что и

15 другое антитело, когда они оба распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Способы, обычно используемые для определения того, связываются ли два антитела с идентичными или перекрывающимися эпитопами, представляют собой конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы в ряде различных форматов (например, луночные планшеты с использованием радиоактивных или

20 ферментных меток или проточная цитометрия на антиген-экспрессирующих клетках) с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела.

Эпитопы, обнаруженные на белковых мишенях, могут быть определены как «линейные эпитопы» или «конформационные эпитопы». Линейные эпитопы образуются непрерывной последовательностью аминокислот в белковом антигене. Конформационные

25 эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в белковой последовательности, но которые сближаются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин «вектор», в контексте настоящей заявки, предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую

30 кислоту, с которой она связана. Одним из типов вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в

которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих и дрожжей). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и реплицируются

5 таким образом вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящей заявке «рекомбинантными векторами экспрессии» (или просто «векторами экспрессии»). В целом, векторы экспрессии, которые можно применять в методиках рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В настоящем

10 описании «плазида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако предусмотрено, что настоящее изобретение включает другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, а также

15 системы на основе бактериофагов и фагмид. Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), в контексте настоящей заявки, предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки, например, когда указанное потомство применяется для

20 получения линии клеток или банка клеток, который затем необязательно хранится, обеспечивается, продается, передается или применяется для изготовления антитела или его фрагмента, описанных в настоящей заявке.

Ссылки на «субъекта», «пациента» или «индивидуума» относятся к субъекту, в частности, к субъекту-млекопитающему, подлежащему лечению. Субъекты-

25 млекопитающие включают человека, приматов, отличных от человека, сельскохозяйственных животных (таких как коровы), спортивных животных или домашних животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы или мыши. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой человека. Согласно альтернативным вариантам реализации субъект представляет собой

30 млекопитающее, отличное от человека, такое как мышь.

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения целевого эффекта. Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое является эффективным для облегчения симптома заболевания или нарушения. Терапевтически эффективное количество может представлять собой

«профилактически эффективное количество», поскольку профилактика может рассматриваться как терапия.

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

Заболевание или нарушение является «облегченным», если уменьшается тяжесть признака или симптома заболевания или нарушения, частота, с которой субъект испытывает такой признак или симптом, или и то, и другое.

В настоящей заявке термин «лечение заболевания или нарушения» означает снижение частоты и/или тяжести по меньшей мере одного признака или симптома заболевания или нарушения, испытываемого субъектом.

Термин «рак», в контексте настоящей заявки, относится к патологическому росту или делению клеток. Обычно рост и/или продолжительность жизни раковой клетки превышает и не координируется с таковыми нормальных клеток и тканей вокруг нее.

Разные виды рака могут быть доброкачественными, предзлокачественными или злокачественными. Рак возникает в различных клетках и тканях, включая ротовую полость (например, рот, язык, глотку и т.д.), пищеварительную систему (например, пищевод, желудок, тонкую кишку, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчный проток, желчный пузырь, поджелудочную железу и т.д.), дыхательную систему (например, гортань, легкое, бронхи и т.д.), кости, суставы, кожу (например, базальную клетку, плоскую клетку, менингиому и т.д.), молочную железу, половую систему (например, матку, яичники, предстательную железу, яички и т.д.), мочевую систему (например, мочевой пузырь, почку, мочеточник и т.д.), глаз, нервную систему (например, головной мозг и т.д.), эндокринную систему (например, щитовидную железу и т.д.) и кроветворную систему (например, лимфому, миелому, лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз и т.д.).

Способы модуляции $\gamma\delta$ -Т-клеток

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* модуляции Т-клеток, содержащих переменную область 1 дельта-цепи (V δ 1), включающий введение антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке, в популяцию клеток, содержащую V δ 1-Т-клетки. Следует понимать, что «введение» антитела или его фрагмента включает «приведение в контакт» V δ 1-Т-клеток.

Модуляция V δ 1-Т-клеток может включать:

- размножение V δ 1-Т-клеток, например, путем селективного увеличения количества V δ 1-Т-клеток или стимуляции выживания V δ 1-Т-клеток;

- стимуляцию V δ 1-Т-клеток, например, путем увеличения активности V δ 1-Т-клеток, т.е. увеличения уничтожения клеток-мишеней;

- предотвращение истощения V δ 1-Т-клеток, например, путем повышения устойчивости V δ 1-Т-клеток;

- дегрануляцию V δ 1-Т-клеток;

- иммуносупрессию V δ 1-Т-клеток, например, путем отрицательной регуляции экспрессии V δ 1-TCR на поверхности клеток, т.е. вызывая интернализацию V δ 1-TCR или снижение экспрессии белка V δ 1-TCR или блокируя связывание V δ 1-TCR;

- снижение количества V δ 1-Т-клеток, например, путем ингибирования пролиферации V δ 1-Т-клеток или путем индукции гибели V δ 1-Т-клеток (т.е. уничтожения V δ 1-Т-клеток).

Такая модуляция V δ 1-Т-клеток может включать, например, активацию V δ 1-Т-клеток или ингибирование V δ 1-Т-клеток. Согласно одному варианту реализации V δ 1-Т-клетки активируют путем введения антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке. Согласно альтернативному варианту реализации V δ 1-Т-клетки ингибируют путем введения антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке. Согласно альтернативному варианту реализации V δ 1-Т-клетки не ингибируются при введении пациенту антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке.

Согласно одному варианту реализации модуляция V δ 1-Т-клеток включает введение антитела к переменной области 1 дельта-цепи TCR или его фрагмента в V δ 1-Т-клетки в культуре (т.е. *in vitro* или *ex vivo*). V δ 1-Т-клетки могут присутствовать в смешанной популяции клеток, например, в популяции клеток, содержащей другие типы лимфоцитарных клеток (например, $\alpha\beta$ -Т-клетки или NK-клетки).

Согласно одному варианту реализации популяцию клеток, содержащую V δ 1-T-клетки, выделяют (т.е. из образца, как описано в настоящей заявке) перед введением антитела к V δ 1 или его фрагмента. Согласно дополнительному варианту реализации популяцию клеток обогащают T-клетками перед введением антитела к V δ 1 или его
 5 фрагмента. Согласно дополнительному варианту реализации популяцию клеток обогащают $\gamma\delta$ -T-клетками перед введением антитела к V δ 1 или его фрагмента.

Способ также может быть выполнен на популяции клеток, содержащей очищенную фракцию $\gamma\delta$ -T-клеток. Согласно таким вариантам реализации популяцию клеток истощают по типам клеток, отличным от $\gamma\delta$ -T-клеток, присутствующим в образце, таким
 10 как $\alpha\beta$ -T-клетки и/или NK-клетки, перед введением антитела к V δ 1 или его фрагмента. Популяция клеток может быть дополнительно или альтернативно обогащена типами клеток, которые могут содержать V δ 1, такими как T-клетки и/или $\gamma\delta$ -клетки, перед введением антитела к V δ 1 или его фрагмента. Например, перед культивированием образца указанный образец может быть обогащен T-клетками или обогащен $\gamma\delta$ -T-клетками, или
 15 истощен по $\alpha\beta$ -T-клеткам, или истощен по клеткам, отличным от $\gamma\delta$ -T-клеток. Согласно одному варианту реализации образец сначала истощают по $\alpha\beta$ -T-клеткам, а затем обогащают CD3⁺ клетками. Обогащение или истощение может быть достигнуто с использованием методик, известных в данной области техники, таких как использование магнитных гранул, покрытых антителами, которые связываются с молекулами на
 20 поверхности клетки, относящимися к фенотипу, подлежащему обогащению/истощению.

Наличие в клеточной культуре типов клеток, отличных от лимфоцитов, может ингибировать размножение V δ 1-клеток. Такие клетки, например, стромальные, эпителиальные, опухолевые и/или питающие клетки, могут быть удалены перед культивированием. Таким образом, согласно одному варианту реализации, популяция
 25 клеток не находится в непосредственном контакте со стромальными клетками во время культивирования. Примеры стромальных клеток включают фибробласты, перициты, мезенхимальные клетки, кератиноциты, эндотелиальные клетки и негематологические опухолевые клетки. Предпочтительно лимфоциты не находятся в непосредственном контакте с фибробластами во время культивирования. Согласно одному варианту
 30 реализации популяция клеток не находится в непосредственном контакте с эпителиальными клетками во время культивирования. Согласно одному варианту реализации популяция клеток не находится в непосредственном контакте с опухолевыми клетками и/или питающими клетками во время культивирования.

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование V δ 1-T-клеток в отсутствие значительного контакта со стромальными клетками. Согласно дополнительному варианту реализации способ включает культивирование V δ 1-T-клеток в отсутствие значительного контакта с фибробластами.

- 5 Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование V δ 1-T-клеток в среде, которая по существу не содержит сыворотки (например, бессывороточной среде или среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). Таким образом, согласно одному варианту реализации, способ включает культивирование в бессывороточной среде. Такая бессывороточная среда также может включать среду, содержащую
- 10 заменитель сыворотки, где указанный заменитель сыворотки основывается на химически определенных компонентах во избежание применения сыворотки человеческого или животного происхождения. Согласно альтернативному варианту реализации способ включает культивирование в среде, содержащей сыворотку (например, сыворотку АВ человека или фетальную бычью сыворотку (ФБС)). Согласно одному варианту реализации
- 15 среда содержит заменитель сыворотки. Согласно одному варианту реализации среда не содержит продуктов животного происхождения.

Следует понимать, что образец, культивируемый в бессывороточной среде, имеет преимущество, заключающееся в избегании проблем с фильтрованием, осаждением, загрязнением и обеспечением сыворотки. Кроме того, продукты животного

20 происхождения не являются предпочтительными для использования в изготовлении терапевтических средств клинической категории для применения у человека. Применение бессывороточной среды для клеток, в частности, V δ 1-T-клеток, существенно повышает количество клеток, полученных из образца, по сравнению с применением среды, содержащей сыворотку АВ.

- 25 Согласно одному варианту реализации антитело к V δ 1 или его фрагмент находится в растворимой или иммобилизованной форме. Например, антитело или его фрагмент можно вводить в V δ 1-T-клетки в растворимой форме. В качестве альтернативы, антитело или его фрагмент можно вводить в V δ 1-T-клетки, когда антитело или его фрагмент связаны или ковалентно связаны с поверхностью, такой как гранула или планшет (т.е. в
- 30 иммобилизованной форме). Согласно одному варианту реализации антитело иммобилизовано на поверхности, такой как лунки, покрытые Fc. В качестве альтернативы, антитело или его фрагмент связано с поверхностью клетки (например, иммобилизовано на поверхности антигенпрезентирующей клетки (APC)). Согласно дополнительному

варианту реализации антитело не иммобилизовано на поверхности, когда популяцию клеток приводят в контакт с указанным антителом.

- Популяция клеток, приведенная в контакт с антителом к V δ 1 или его фрагментом, может быть получена из различных типов образцов (способы выделения дополнительно описаны ниже). Согласно одному варианту реализации образец представляет собой образец негемопозитической ткани. Ссылки в настоящей заявке на «негемопозитические ткани» или «образец негемопозитической ткани» включают кожу (например, кожу человека) и кишечник (например, кишечник человека). Негемопозитическая ткань представляет собой ткань, отличную от крови, костного мозга, лимфоидной ткани, ткани лимфатического узла или ткани тимуса. Согласно одному варианту реализации образец негемопозитической ткани представляет собой кожу (например, кожу человека). Согласно некоторым вариантам реализации популяцию клеток (например, $\gamma\delta$ -Т-клетки) не получают из конкретных типов образцов биологических жидкостей, таких как кровь или синовиальная жидкость. Согласно некоторым вариантам реализации популяцию клеток (например, $\gamma\delta$ -Т-клетки) получают из кожи (например, кожи человека), которая может быть получена с помощью методов, известных в данной области техники. Например, популяция клеток может быть получена из образца негемопозитической ткани путем культивирования образца негемопозитической ткани на синтетическом каркасе, сконструированном таким образом, чтобы облегчить выход клеток из образца негемопозитической ткани. В качестве альтернативы, способы можно применять к популяции клеток (например, $\gamma\delta$ -Т-клеток), полученной из желудочно-кишечного тракта (например, толстой кишки или тонкой кишки), молочной железы, легкого, предстательной железы, печени, селезенки, поджелудочной железы, матки, влагалища и других кожных, слизистых или серозных оболочек.
- Согласно альтернативному варианту реализации образец представляет собой гемопозитический образец или его фракцию (т.е. популяцию клеток получают из гемопозитического образца или его фракции). Ссылки в настоящей заявке на «гемопозитический образец» или «образец гемопозитической ткани» включают кровь (такую как периферическая кровь или пуповинная кровь), костный мозг, лимфоидную ткань, ткань лимфатических узлов, ткань тимуса и их фракции или обогащенные части. Образец предпочтительно представляет собой кровь, включая периферическую кровь или пуповинную кровь или ее фракции, включая клетки лейкоцитарной пленки, продукты лейкоцитоза, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и мононуклеарные клетки низкой плотности (МКНП). Согласно некоторым вариантам реализации образец

представляет собой кровь человека или ее фракцию. Клетки могут быть получены из образца крови с использованием методик, известных в данной области техники, таких как центрифугирование в градиенте плотности. Например, цельная кровь может быть наслена на равный объем FICOLL-HYPRAQUE с последующим центрифугированием при 400xg в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Материал на границе фаз будет содержать моноклеарные клетки низкой плотности, которые можно собрать и промыть в культуральной среде и центрифугировать при 200xg в течение 10 минут при комнатной температуре.

Популяция клеток может быть получена из образца опухолевой ткани (т.е. $\gamma\delta$ -Т-клетки также могут являться резидентными клетками в образцах опухолевой ткани), например, опухолей молочной железы или предстательной железы. Согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток может быть получена из образцов опухолевой ткани человека (например, тканей солидных опухолей). Согласно дополнительным вариантам реализации популяция клеток может быть получена из образца, отличного от опухолевой ткани человека (например, ткани, не содержащей значительного количества опухолевых клеток). Например, популяция клеток может быть получена из участка кожи (например, здоровой кожи), отделенной от соседней или прилегающей опухолевой ткани. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации популяция клеток не получена из опухолевой ткани (например, опухолевой ткани человека).

Популяция клеток может быть получена из ткани человека или животного, отличного от человека. Таким образом, способ может дополнительно включать этап получения популяции клеток из ткани человека или животного, отличного от человека. Согласно одному варианту реализации образец получен от человека. Согласно альтернативному варианту реализации образец получен от субъекта-животного, отличного от человека.

Размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток

Согласно одному варианту реализации модуляция включает активацию V δ 1-Т-клеток, в частности, размножение V δ 1-Т-клеток. Таким образом, в соответствии с аспектом настоящего изобретения предложен способ *ex vivo* размножения V δ 1-Т-клеток, включающий введение антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке, в популяцию клеток, содержащую V δ 1-Т-клетки. Такое размножение V δ 1-Т-клеток может быть достигнуто путем селективного увеличения количества V δ 1-Т-клеток и/или путем стимуляции выживания V δ 1-Т-клеток. Согласно одному варианту реализации размножение V δ 1-Т-клеток включает введение антитела к вариабельной области 1 дельта-

цепи TCR или его фрагмента в V δ 1-T-клетки в культуре (т.е. *in vitro* или *ex vivo*). V δ 1-T-клетки могут присутствовать в смешанной популяции клеток, например, в популяции клеток, содержащей другие типы лимфоцитарных клеток (например, $\alpha\beta$ -T-клетки или NK-клетки).

5 Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены способы *ex vivo* получения обогащенной популяции $\gamma\delta$ -T-клеток (например, V δ 1-T-клеток). Обогащенная популяция может быть получена из выделенных смешанных популяций клеток (например, полученных из образцов, взятых у пациентов/доноров) способом, включающим приведение смешанной популяции клеток или ее очищенной фракции в контакт с
10 антителом или его фрагментом. Указанное антитело (или его фрагмент) обеспечивает селективное размножение V δ 1-T-клеток путем связывания с эпитопом, специфическим для V δ 1-цепи $\gamma\delta$ -TCR.

 Также предложена размноженная популяция V δ 1-T-клеток, полученная в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке. В соответствии с этим
15 аспектом настоящего изобретения следует понимать, что такая размноженная популяция V δ 1-T-клеток может быть получена и/или размножена *in vitro* или *ex vivo*. В одном аспекте предложена размноженная популяция V δ 1, полученная в соответствии со способом, определенным в настоящей заявке, причем указанную популяцию V δ 1 выделяют и размножают *in vitro* или *ex vivo*.

20 Антитела или их фрагменты, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы в способах размножения $\gamma\delta$ -T-клеток (например, V δ 1-T-клеток). Указанные способы можно осуществлять *in vitro*. Если способы размножения осуществляют *in vitro*, антитела (или их фрагменты) можно применять к выделенным $\gamma\delta$ -T-клеткам (например, V δ 1-T-клеткам), полученным, как описано выше. Согласно некоторым вариантам
25 реализации $\gamma\delta$ -T-клетки размножают из популяции клеток, которая была выделена из образца негемопоэтической ткани. Согласно альтернативному варианту реализации $\gamma\delta$ -T-клетки размножают из популяции клеток, которая была выделена из образца гемопоэтической ткани, такого как образец крови.

 Размножение $\gamma\delta$ -T-клеток (например, V δ 1-T-клеток) может включать
30 культивирование образца в присутствии антитела или его фрагмента, описанного в настоящей заявке, и цитокина. Цитокины могут включать интерлейкины, лимфокины, интерфероны, колониестимулирующие факторы и хемокины. Согласно одному варианту реализации указанный цитокин выбран из группы, состоящей из интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-8

(IL-8), интерлейкина-9 (IL-9), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-18 (IL-18), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-33 (IL-33), инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерферона- γ (IFN- γ) и фактора стромальных клеток 1 (SDF-1). Следует понимать, что ссылки на цитокины, как описано в настоящей заявке, могут включать любое соединение, которое обладает такой же активностью, что и указанный цитокин, в отношении его способности стимулировать сходные физиологические эффекты на V δ 1-T-клетки в культуре, и которое включает, но не ограничивается перечисленными, миметики или любой их функциональный эквивалент.

Согласно одному варианту реализации указанный цитокин представляет собой члена семейства цитокинов с общей гамма-цепью цитокинового рецептора (γ_c). Согласно дополнительному варианту реализации γ_c -цитокин выбран из: IL-2, IL 4, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15, IL-21 или их смесей.

Используемый цитокин (например, интерлейкин) может быть человеческого или животного происхождения, предпочтительно человеческого происхождения. Он может представлять собой белок дикого типа или любой биологически активный фрагмент или вариант, то есть способный связывать его рецептор. Такое связывание может индуцировать активацию $\gamma\delta$ -T-клеток в условиях способа в соответствии с настоящим изобретением. Более предпочтительно цитокины могут быть в растворимой форме, слиты или связаны в комплекс с другой молекулой, такой как, например, пептид, полипептид или биологически активный белок. Предпочтительно используют рекомбинантный цитокин человека. Более предпочтительно диапазон концентраций интерлейкина может варьироваться от 1 до 10000 Ед./мл, еще более предпочтительно от 100 до 1000 Ед./мл.

Согласно дополнительному варианту реализации цитокин представляет собой хемокин. Также следует понимать, что хемокин будет изменяться и будет выбран в зависимости от образца, используемого для получения $\gamma\delta$ -T-клеток.

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-2, IL-9 и/или IL-15. Согласно дополнительному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-2 и/или IL-15 (т.е. IL-2, IL-15 или их комбинации). Согласно альтернативному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-9 и/или IL-15 (т.е. IL-9, IL-15 или их комбинации). Согласно одному варианту реализации способ включает популяцию клеток в присутствии IL-2, IL-9 и/или IL-15 и дополнительного фактора роста (например, IL-21). Согласно дополнительным вариантам реализации способ включает культивирование популяции клеток в среде, не содержащей факторов роста,

отличных от IL-2 и/или IL-15. Согласно альтернативным вариантам реализации способ включает культивирование популяции клеток в среде, не содержащей факторов роста, отличных от IL-9 и/или IL-15. Согласно дополнительному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в среде, которая состоит из основной среды, дополненной IL-2, IL-9 и/или IL-15. Согласно дополнительному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в среде, которая состоит из основной среды, дополненной IL-2 и/или IL-15.

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-21.

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-4. Стимулируемые IL-4 физиологические эффекты на V δ 1-T-клетки (как описано в WO2016/198480) включают снижение уровней экспрессии NKG2D и NCR, ингибирование цитотоксической функции и улучшение селективной выживаемости. Кроме того, ранее было показано, что отсутствие IL-4 в более поздние дни культивирования может изменить физиологические свойства клеток в сторону фенотипа, более подходящего для применения в качестве противоопухолевого или противовирусного лечения. Таким образом, согласно одному варианту реализации, способ размножения включает дальнейшее культивирование образца в отсутствие факторов роста, обладающих IL-4-подобной активностью, таких как IL-4. Согласно одному варианту реализации способ размножения включает культивирование образца в отсутствие IL-4.

Согласно одному варианту реализации цитокин представляет собой фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, т.е. любое соединение, которое обладает той же активностью, что и IL-15, в отношении его способности стимулировать сходные физиологические эффекты на V δ 1 T-клетки в культуре, и включает, но не ограничивается перечисленными, IL-15 и миметики IL-15, или любой функциональный эквивалент IL-15, включая IL-2 и IL-7. Стимулируемые IL-15, IL-2 и IL-7 физиологические эффекты на культивируемые V δ 1-T-клетки (как описано в WO2016/198480) были по существу эквивалентны, а именно индукция дифференцировки клеток в сторону более цитотоксического фенотипа. Кроме того, ранее было показано, что отсутствие IL-2, IL-7 и IL-15 в первые дни культивирования способствовало голоданию и апоптозу загрязняющих клеток (включая TCR $\alpha\beta$ + T-клетки и V δ 2+ T-клетки), которые критически зависят от этих цитокинов для выживания. Таким образом, согласно одному

варианту реализации, способ размножения включает сначала культивирование образца в отсутствие факторов роста, имеющих IL-15-подобную активность.

Таким образом, согласно одному варианту реализации, способ включает культивирование популяции клеток в первой культуральной среде, содержащей IL-4, а
5 затем культивирование популяции клеток во второй культуральной среде, содержащей IL-15.

Согласно одному варианту реализации первая культуральная среда не содержит IL-15, IL-2 и/или IL-7. Согласно одному варианту реализации вторая культуральная среда не содержит IL-4.

10 Таким образом, согласно одному варианту реализации, способ размножения включает:

(1) культивирование клеток в образце в первой культуральной среде, содержащей антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке, и IL-4; в отсутствие IL-15, IL-2 и IL-7; и

15 (2) культивирование клеток, полученных на этапе (1), во второй культуральной среде, содержащей антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке, и IL-15, в отсутствие IL-4.

Как описано в настоящей заявке, культуральная среда также может содержать другие факторы роста, включая цитокины, которые могут дополнительно усиливать размножение
20 V δ 1-T-клеток. Примеры таких цитокинов включают, но не ограничиваются ими: (i) IFN- γ и любой фактор роста, обладающий IFN- γ -подобной активностью, (ii) IL-21 и любой фактор роста, обладающий IL-21-подобной активностью, и (iii) IL-1 β и любой фактор роста, обладающий IL-1 β -подобной активностью. Примеры других факторов роста, которые могут быть добавлены, включают костимулирующие молекулы, такие как
25 антитело человека к SLAM, любой растворимый лиганд CD27 или любой растворимый лиганд CD7. Любая комбинация этих факторов роста может быть включена в среду.

Согласно одному варианту реализации первая или вторая культуральная среда, или обе культуральные среды, содержит один или более дополнительных цитокинов. Первая и/или вторая культуральная среда может содержать второй, третий и/или четвертый
30 цитокин. Согласно дополнительному варианту реализации дополнительные цитокины выбраны из IL-21, IFN- γ и IL-1 β .

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в присутствии IL-15 и фактора, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IL-4,

IL-21, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, IL-1 β , IFN- γ , лизата тромбоцитов человека (HPL) и фактора стромальных клеток 1 (SDF-1).

Размножение $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать культивирование образца в присутствии по меньшей мере одного дополнительного Т-клеточного митогена. Термин «Т-клеточный митоген» (который также может называться «агонистом $\gamma\delta$ -TCR») означает любой агент, который может стимулировать Т-клетки посредством передачи сигналов TCR, включая, но не ограничиваясь перечисленными, растительные лектины, такие как фитогемагглютинин (PHA) и конканавалин А (ConA), и лектины нерастительного происхождения. Согласно одному варианту реализации Т-клеточный митоген представляет собой моноклональное антитело (MAT) к CD3. Другие митогены включают форбол 12-миристат-13-ацетат (TPA) и его родственные соединения, такие как мезереин, или бактериальные соединения (например, стафилококковый энтеротоксин А (SEA) и стрептококковый белок А). Т-клеточный митоген может быть растворимым или иммобилизованным, и в способе размножения можно применять более одного Т-клеточного митогена.

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

Согласно одному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток 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 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей

мере 28 дней или более, например, в течение от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или в течение приблизительно 21 дня). Согласно дополнительному варианту реализации способ включает культивирование популяции клеток в течение по меньшей мере 7 дней, например, по меньшей мере 11 дней или по меньшей мере 14 дней.

- 5 Согласно дополнительным вариантам реализации способ включает культивирование популяции клеток 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 18 дней, по меньшей мере 21 дня, 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 в течение приблизительно 21 дня) и в количестве, эффективном для получения размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

- Согласно одному варианту реализации популяцию клеток культивируют в течение периода от 5 до 60 дней, например, по меньшей мере от 7 до 45 дней, от 7 до 21 дня или от 7 до 18 дней. Если способ включает период выделения культуры (например, от 1 до 40 дней, например, от 14 до 21 дня), этапы выделения и размножения, согласно некоторым вариантам реализации, могут длиться от 21 до 39 дней.

- Способ может включать регулярное добавление антитела к V δ 1 или его фрагмента и/или фактора роста во время культивирования. Например, антитело к V δ 1 или его фрагмент и/или фактор роста могут быть добавлены каждые 2-5 дней, более предпочтительно каждые 3-4 дня. Согласно одному варианту реализации антитело к V δ 1 или его фрагмент и/или фактор роста добавляют через 7 дней культивирования и каждые 3-4 дня после этого.

- Способы размножения обеспечивают размноженную популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток, количество клеток которой превышает количество клеток референсной популяции. Согласно некоторым вариантам реализации количество клеток в размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) превышает количество клеток в выделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения (например, по меньшей мере в 2 раза по количеству клеток, по меньшей мере в 5 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 10 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 25 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 60 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 70 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 80 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 90 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 200 раз по количеству клеток, по

меньшей мере в 300 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 400 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 500 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 600 раз по количеству клеток, по меньшей мере в 1000 раз по количеству клеток или более по сравнению с выделенной популяцией $\gamma\delta$ -Т-клеток до этапа размножения).

5 одному варианту реализации количество клеток размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) превышает количество клеток популяции, культивируемой в течение такого же периода времени без присутствия антитела или его фрагмента. Согласно одному варианту реализации количество клеток размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) превышает количество клеток популяции, культивируемой в течение такого же периода времени в присутствии TS8.2 или TS-1.

Способы размножения обеспечивают размноженную популяцию V δ 1-Т-клеток, которая имеет более высокое процентное содержание V δ 1-Т-клеток, чем референсная популяция. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток содержит более приблизительно 50% V δ 1-Т-клеток, например, более

15 приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 87%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% V δ 1-Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток содержит более приблизительно 85% V δ 1-Т-клеток, например, более приблизительно 90% V δ 1-Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) содержит менее приблизительно 10% $\alpha\beta$ -Т-клеток, например, менее приблизительно 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% или 0,05% $\alpha\beta$ -Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации настоящего изобретения размноженная популяция V δ 1-Т-клеток содержит менее приблизительно 1% $\alpha\beta$ -Т-клеток. Т-клетки с $\alpha\beta$ -рецепторами являются высокореактивными, поэтому подходящие

25 популяции клеток для введения пациентам в контексте настоящего изобретения могут содержать только низкие уровни $\alpha\beta$ -Т-клеток. Антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы для селективного размножения популяции V δ 1-Т-клеток, что снижает потребность в интенсивных способах очистки после размножения с целью удаления $\alpha\beta$ -Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) содержит менее приблизительно 10% V δ 2-Т-клеток, например, менее приблизительно 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1% или 0,05% V δ 2-Т-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток содержит менее приблизительно 0,5% V δ 2-Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, V δ 1-Т-клеток) содержит менее приблизительно 10% естественных клеток-киллеров (NK) (также называемых CD56⁺CD3⁻ клетками), например, менее приблизительно 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5% или 1% NK-клеток. Согласно

5 дополнительному варианту реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток содержит менее приблизительно 2% NK-клеток.

Повышение или снижение уровня экспрессии маркеров клеточной поверхности можно дополнительно или альтернативно использовать для характеристики одной или более размноженных популяций V δ 1-Т-клеток, включая CD27, CD69, TIGIT, PD-1 и TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток экспрессирует высокий уровень CD27 (CD27^{high}). Например, более приблизительно 70%, например, более приблизительно 80%, 85%, 90% размноженной популяции V δ 1-Т-клеток экспрессируют CD27 (т.е. CD27⁺). Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток имеет более высокую среднюю экспрессию CD27

10 по сравнению с выделенной популяцией V δ 1-Т-клеток, например, до размножения. Согласно некоторым вариантам реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток экспрессирует низкий уровень CD69, TIGIT, PD-1 и/или TIM-3. Например, менее приблизительно 40%, например, менее приблизительно 30% размноженной популяции V δ 1-Т-клеток экспрессирует CD69, TIGIT, PD-1 и/или TIM-3. Согласно некоторым

15 вариантам реализации размноженная популяция V δ 1-Т-клеток имеет более низкое среднее значение уровня экспрессии одного или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD69, TIGIT, PD-1 и TIM-3, по сравнению с выделенной популяцией V δ 1-Т-клеток.

Доступны многочисленные основные питательные среды, подходящие для применения в обеспечении пролиферации $\gamma\delta$ -Т-клеток, в частности, среда, такая как AIM-V, среда Искова и RPMI-1640 (Life Technologies), EXVIVO-10, EXVIVO-15 или EXVIVO-20 (Lonza), в присутствии сыворотки или плазмы. Среда может быть дополнена другими факторами среды, определенными в настоящей заявке, такими как сыворотка, белки сыворотки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, согласно некоторым вариантам реализации, среда RPMI-1640 содержит 2 мМ глутамина, 10% ФБС, 10 мМ

25 HEPES, pH 7,2, 1% раствор пенициллина-стрептомицина, пируват натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 мкМ Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser; 1x MEM, содержащая заменимые аминокислоты (Life Technologies)) и 10 мкл/л β -меркаптоэтанола. Согласно альтернативному варианту реализации среда AIM-V может быть дополнена заменителем сыворотки для иммунных клеток CTSTTM и амфотерицином

30

В. Согласно определенным вариантам реализации среда также может быть дополнена IL-2, IL-4, IL-9 и/или IL-15, как описано в настоящей заявке. Для удобства клетки культивируют при 37 °C в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в подходящей культуральной среде во время выделения и/или размножения.

5 В культуру для размножения $\gamma\delta$ -Т-клеток также можно добавлять другие факторы. Согласно одному варианту реализации для размножения клеток используют такие факторы, которые способствуют селективному размножению $\gamma\delta$ -Т-клеток. Например, размножение может дополнительно включать добавление экзогенных цитокинов в культуру для размножения, таких как интерлейкины. Такое размножение может включать
10 культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-2 и IL-15. В качестве альтернативы, размножение может включать культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии IL-9 и IL-15. Следует понимать, что любой этап размножения выполняют в течение периода времени, эффективного для получения размноженной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Способы размножения $\gamma\delta$ -Т-клеток могут включать время удвоения популяции,
15 составляющее менее чем 5 дней (например, менее чем 4,5 дня, менее чем 4,0 дня, менее чем 3,9 дня, менее чем 3,8 дня, менее чем 3,7 дня, менее чем 3,6 дня, менее чем 3,5 дня, менее чем 3,4 дня, менее чем 3,3 дня, менее чем 3,2 дня, менее чем 3,1 дня, менее чем 3,0 дня, менее чем 2,9 дня, менее чем 2,8 дня, менее чем 2,7 дня, менее чем 2,6 дня, менее чем 2,5 дня, менее чем 2,4 дня, менее чем 2,3 дня, менее чем 2,2 дня, менее чем 2,1 дня, менее
20 чем 2,0 дня, менее чем 46 часов, менее чем 42 часа, менее чем 38 часов, менее чем 35 часов, менее чем 32 часа).

Способы выделения $\gamma\delta$ -Т-клеток

Как описано в настоящей заявке, антитела (или их фрагменты) можно применять к $\gamma\delta$ -Т-клеткам в культуре, т.е. $\gamma\delta$ -Т-клеткам, которые были получены из образца. Согласно
25 одному варианту реализации популяцию клеток выделяют из образца перед введением антитела к V δ 1 или его фрагмента. Таким образом, предложен способ модуляции (в частности, размножения) V δ 1-Т-клеток, включающий введение антитела к V δ 1 или его фрагмента, определенного в настоящей заявке, в популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, популяцию клеток, содержащую V δ 1-Т-клетки), выделенную из образца.

30 $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые являются преобладающими в негемопоэтических тканях (т.е. являются тканевыми резидентами), в основном содержат переменную область 1 дельта-цепи, поэтому антитела к V δ 1, описанные в настоящей заявке, находят особое применение в $\gamma\delta$ -Т-клетках, выделенных из негемопоэтических тканей. Таким образом, согласно одному варианту реализации, образец представляет собой образец негемопоэтической

ткани, такой как кожа. В качестве альтернативы, способы согласно настоящему изобретению можно применять для размножения популяции V δ 1-T-клеток в образце, который в основном не содержит V δ 1-цепь, например, в образце крови. Таким образом, способ можно применять для увеличения количества V δ 1-T-клеток в образце.

- 5 Ссылки в настоящей заявке на «выделение» или «осуществлять выделение» клеток, в частности, $\gamma\delta$ -T-клеток, относятся к способам или процессам, при которых клетки удаляют, отделяют, очищают, обогащают или иным образом извлекают из ткани или пула клеток. Следует понимать, что такие ссылки включают термины «отделенный», «удаленный», «очищенный», «обогащенный» и т.д. Выделение $\gamma\delta$ -T-клеток включает
- 10 выделение или отделение клеток от интактного образца негемопоэтической ткани или от стромальных клеток негемопоэтической ткани (например, фибробластов или эпителиальных клеток). Такое выделение может альтернативно или дополнительно включать выделение или отделение $\gamma\delta$ -T-клеток от других гемопоэтических клеток (например, $\alpha\beta$ -T-клеток или других лимфоцитов). Выделение может проводиться в
- 15 течение определенного периода времени, например, начиная с момента помещения тканевого эксплантата или биоптата в выделенную культуру и заканчивая моментом сбора клеток из культуры, например, посредством центрифугирования или других способов переноса выделенной популяции клеток в культуру для размножения, или использования для других целей, или первоначальный тканевой эксплантат или биоптат извлекают из
- 20 культуры. Этап выделения может длиться в течение по меньшей мере от приблизительно 3 дней до приблизительно 45 дней. Согласно одному варианту реализации этап выделения длится от по меньшей мере приблизительно 10 дней до по меньшей мере 28 дней. Согласно дополнительному варианту реализации этап выделения длится от по меньшей мере 14 дней до по меньшей мере 21 дня. Этап выделения, таким образом, может длиться
- 25 в течение по меньшей мере 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, приблизительно 35 дней, приблизительно 40 дней или приблизительно 45 дней. Следует понимать, что, несмотря на то, что существенная пролиферация клеток может не
- 30 наблюдаться на данном этапе выделения, пролиферация не обязательно отсутствует. В самом деле, для специалиста в данной области техники понятно, что выделенные клетки могут также начать делиться с образованием множества таких клеток внутри сосуда для выделения, содержащего образец.

Таким образом, следует понимать, что ссылки в настоящей заявке на «выделенные $\gamma\delta$ -Т-клетки», «выделенную $\gamma\delta$ -Т-клеточную популяцию» или «выделенную популяцию $\gamma\delta$ -Т-клеток» относятся к $\gamma\delta$ -клеткам, которые были выделены, отделены, удалены, очищены или обогащены из образца, такого как образец ткани негемопозитического происхождения, так, что клетки не имеют существенного контакта с клетками, содержащимися в интактном образце (негемопозитической ткани). Ссылки в настоящей заявке на «выделенные V δ 1-Т-клетки», «выделенную V δ 1-Т-клеточную популяцию», «выделенную популяцию V δ 1-Т-клеток», «отделенные V δ 1-Т-клетки», «отделенную V δ 1-Т-клеточную популяцию» или «отделенную популяцию V δ 1-Т-клеток» следует понимать, как относящиеся к V δ 1-Т-клеткам, которые были выделены, отделены, удалены, очищены или обогащены из образца, такого как образец ткани негемопозитического происхождения, так, что клетки не имеют существенного контакта с клетками, содержащимися в интактном образце (негемопозитической ткани).

Популяция клеток может быть получена любым подходящим способом, который позволяет выделять лимфоциты, в частности, V δ 1-Т-клетки, из образцов человека или животных, отличных от человека, таких как образец негемопозитической ткани. Один из таких способов изложен в работе *Clark et al. (2006) J. Invest. Dermatol. 126(5): 1059-70*, в которой описан протокол для трехмерного эксплантата кожи для выделения лимфоцитов из кожи человека. Эксплантат может быть прикреплен к синтетическому каркасу для облегчения выхода лимфоцитов из эксплантата на указанный каркас. Синтетический каркас относится к неприродной трехмерной структуре, подходящей для поддержания клеточного роста. Синтетические каркасы могут быть сконструированы из материалов, таких как полимеры (например, природные или синтетические полимеры, например, поливинилпирролидоны, полиметилметакрилат, метилцеллюлоза, полистирол, полипропилен, полиуретан), керамика (например, трехзамещенный фосфат кальция, алюминат кальция, гидроксипатит кальция) или металлы (тантал, титан, платина и металлы той же группы 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) могут быть нанесены на поверхность каркаса или инкапсулированы в материал каркаса для усиления клеточной адгезии, миграции, выживаемости или пролиферации в соответствии с методами, известными в данной области техники. Эти и другие методы можно применять для

выделения популяции клеток из ряда других типов негемопоэтической ткани, например, кишечника, предстательной железы и молочной железы. В других примерах подходящих способов выделения используют способы «выползания», которые могут включать культивирование популяции клеток и/или образца в присутствии цитокинов и/или хемокинов, достаточных для индукции выделения или отделения $\gamma\delta$ -Т-клеток, в частности, V δ 1-Т-клеток. Выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца (например, образца негемопоэтической ткани) может включать культивирование образца в присутствии IL-2 и IL-15.

Резидентные лимфоциты негемопоэтической ткани могут быть собраны и отделены от стромальных клеток, таких как дермальные фибробласты, например, с помощью сильного пипетирования. Сбор лимфоцитов может быть дополнительно промыт через 40 мкм нейлоновую сетку для удержания агрегатов фибробластов, которые могли стать рыхлыми во время процесса. Лимфоциты также могут быть выделены с использованием флуоресцентной или магнитной сортировки клеток с использованием, например, антител к CD45.

В качестве альтернативы, выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца (например, образца гемопоэтической ткани) может включать культивирование образца в присутствии Т-клеточного митогена (например, агониста $\gamma\delta$ -TCR) и цитокина (в частности, члена семейства цитокинов с общей гамма-цепью цитокинового рецептора (γ_c)), как описано в WO2012/156958. В качестве другой альтернативы, выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца (например, образца гемопоэтической ткани) может включать культивирование образца в присутствии Т-клеточного митогена и цитокина, как описано в WO2016/198480.

Выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать культивирование образца в присутствии по меньшей мере одного цитокина. Например, способ может включать культивирование образца в присутствии по меньшей мере агента, такого как хемокин. Также следует понимать, что хемокины будут выбраны в зависимости от выделяемых $\gamma\delta$ -Т-клеток. Более того, хемокины будут изменяться и будут выбраны в зависимости от образца, используемого для выделения $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать дополнительное культивирование образца в присутствии по меньшей мере одного цитокина. Указанный цитокин может отличаться от цитокина, используемого в исходной культуре.

Способы выделения могут включать культивирование образца. Ссылки в настоящей заявке на «культивирование» включают добавление образца, включая выделенные, отделенные, удаленные, очищенные или обогащенные клетки из образца, к средам,

содержащим факторы роста и/или основные питательные вещества, которые необходимы и/или предпочтительны для клеток и/или образца. Следует понимать, что такие условия культивирования могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, подлежащей выделению из указанного образца, или могут быть адаптированы в соответствии с клетками или популяцией клеток, подлежащей выделению и размножению из указанного образца.

Согласно определенным вариантам реализации культивирование образца осуществляется в течение периода времени, достаточного для выделения $\gamma\delta$ -Т-клеток из указанного образца. Согласно определенным вариантам реализации продолжительность культивирования составляет по меньшей мере 14 дней. Согласно определенным вариантам реализации продолжительность культивирования составляет менее 45 дней, например, менее 30 дней, например, менее 25 дней. Согласно дополнительному варианту реализации продолжительность культивирования составляет от 14 дней до 35 дней, например, от 14 дней до 21 дня. Согласно дополнительному варианту реализации продолжительность культивирования составляет приблизительно 21 день.

Согласно конкретным вариантам реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают из культуры после культивирования образца. Сбор $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать физический сбор $\gamma\delta$ -Т-клеток из культуры, выделение $\gamma\delta$ -Т-клеток из других лимфоцитов (например, $\alpha\beta$ -Т-клеток и/или NK-клеток) или выделение и/или отделение $\gamma\delta$ -Т-клеток от других клеток, присутствующих в образце, например, стромальных клеток, таких как фибробласты. Согласно одному варианту реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают механическим способом (например, пипетированием). Согласно дополнительному варианту реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают посредством магнитного разделения и/или мечения. Согласно дополнительному варианту реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают с помощью методик проточной цитометрии, таких как FACS. Таким образом, согласно определенным вариантам реализации, $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают посредством специфичного мечения $\gamma\delta$ -Т-клеток. Следует понимать, что такой сбор $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать физическое удаление из культуры образца, перенос в отдельный сосуд для культивирования или в отдельные или другие условия культивирования.

Следует понимать, что такой сбор $\gamma\delta$ -Т-клеток выполняют после периода времени, достаточного для получения выделенной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток из образца. Согласно определенным вариантам реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через по меньшей мере одну неделю, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней или по меньшей мере 14 дней культивирования образца. Является

приемлемым, когда $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через 40 дней или менее, например, 38 дней или менее, 36 дней или менее, 34 дня или менее, 32 дня или менее, 30 дней или менее, 28 дней или менее, 26 дней или менее или 24 дня или менее. Согласно одному варианту реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают по меньшей мере через 14 дней культивирования образца. Согласно дополнительному варианту реализации $\gamma\delta$ -Т-клетки собирают через 14-21 день культивирования образца.

Согласно одному варианту реализации образец культивируют в среде, которая по существу не содержит сыворотки (например, бессывороточной среде или среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). Таким образом, согласно одному варианту реализации, образец культивируют в бессывороточной среде. Такая бессывороточная среда также может включать среду, содержащую заменитель сыворотки, где указанный заменитель сыворотки основывается на химически определенных компонентах во избежание применения сыворотки человеческого или животного происхождения. Согласно одному варианту реализации среда не содержит продуктов животного происхождения. Согласно альтернативному варианту реализации образец культивируют в среде, содержащей сыворотку (например, сыворотку АВ человека или фетальную бычью сыворотку (ФБС)).

Культуральная среда может дополнительно включать другие ингредиенты, которые могут способствовать росту и размножению $\gamma\delta$ -Т-клеток. Примеры других ингредиентов, которые могут быть добавлены, включают, но не ограничиваются перечисленными, плазму или сыворотку, очищенные белки, такие как альбумин, источник липидов, такой как липопротеины низкой плотности (ЛПНП), витамины, аминокислоты, стероиды и любые другие добавки, поддерживающие или способствующие росту и/или выживанию клеток.

$\gamma\delta$ -Т-клетки, которые преобладают в крови, в основном представляют собой V δ 2-клетки, в то время как $\gamma\delta$ -Т-клетки, которые преобладают в негемопозитической ткани, в основном представляют собой V δ 1-Т-клетки, таким образом V δ 1-Т-клетки составляют приблизительно 70-80% популяции резидентных $\gamma\delta$ -Т-клеток негемопозитической ткани. Согласно одному предпочтительному варианту реализации выделенные $\gamma\delta$ -Т-клетки содержат популяцию V δ 1-Т-клеток.

Антитела или их фрагменты

Согласно настоящему изобретению предложены антитела или их фрагменты, способные специфично связываться с вариабельной областью 1 дельта-цепи (V δ 1) $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора (TCR).

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, переменный домен (например, VH или VL), диантитело, минитело или моноклональное антитело. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент представляет собой scFv.

5 Антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть любого класса, например, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD или их изотипов, и могут содержать легкую каппа- или лямбда-цепь. Согласно одному варианту реализации антитело представляет собой антитело IgG, например, по меньшей мере один из изотипов, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Согласно
10 дополнительному варианту реализации антитело может быть в формате, таком как формат IgG, который был модифицирован для придания целевых свойств, таких как мутация Fc для снижения эффекторной функции, увеличения периода полувыведения, изменения АЗКЦ или улучшения стабильности шарнира. Такие модификации хорошо известны в данной области техники.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент является
15 человеческим. Таким образом, антитело или его фрагмент может происходить из последовательности иммуноглобулина (Ig) человека. CDR, каркас и/или константная область антитела (или его фрагмента) может происходить из последовательности Ig человека, в частности, последовательности IgG человека. CDR, каркас и/или константная область могут быть по существу идентичны последовательности Ig человека, в частности,
20 последовательности IgG человека. Преимущество применения антител человека заключается в том, что они обладают низкой или отсутствующей иммуногенностью у человека.

Антитело или его фрагмент также может быть химерным, например, химерным антителом, происходящим от мыши и человека.

25 В качестве альтернативы, антитело или его фрагмент происходит из вида, не относящегося к человеку, такого как мышь. Такие антитела нечеловеческого происхождения могут быть модифицированы для повышения их сходства с вариантами антител, продуцируемыми в природе у человека, таким образом, антитело или его фрагмент могут быть частично или полностью гуманизированы. Таким образом, согласно
30 одному варианту реализации, антитело или его фрагмент является гуманизированным.

Антитела, нацеленные на эпитопы

Согласно настоящему изобретению предложены антитела (или их фрагменты), которые связываются с эпитопом Vδ1-цепи γδ-TCR. Такое связывание необязательно может оказывать влияние на активность γδ-TCR, такую как активация или ингибирование.

Согласно одному варианту реализации эпитоп может представлять собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ -Т-клетки. «Активирующий» эпитоп может включать, например, стимуляцию функции TCR, такой как дегрануляция, отрицательная регуляция TCR, цитотоксичность, пролиферация, мобилизация, повышенная выживаемость или

5 устойчивость к истощению, внутриклеточная сигнализация, секреция цитокинов или факторов роста, фенотипическое изменение или изменение экспрессии генов. Например, связывание активирующего эпитопа может стимулировать размножение (т.е. пролиферацию) популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, предпочтительно популяции $V\delta 1^+$ -Т-клеток. Соответственно, эти антитела можно применять для модуляции активации $\gamma\delta$ -Т-клеток и,

10 таким образом, для модуляции иммунного ответа. Таким образом, согласно одному варианту реализации, связывание активирующего эпитопа отрицательно регулирует $\gamma\delta$ -TCR. В дополнительном или альтернативном варианте реализации связывание активирующего эпитопа активирует дегрануляцию $\gamma\delta$ -Т-клетки. Согласно дополнительному дополнительному или альтернативному варианту реализации

15 связывание активирующего эпитопа активирует цитолитическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток.

В качестве альтернативы, антитела (или их фрагменты) могут оказывать блокирующий эффект путем предотвращения связывания или взаимодействия другого антитела или молекулы. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены выделенные антитела или их фрагменты, которые блокируют $V\delta 1$ и

20 предотвращают связывание TCR (например, посредством стерического препятствия). Блокируя $V\delta 1$, антитело может предотвращать активацию и/или передачу сигналов TCR. Эпитоп может представлять собой ингибирующий эпитоп $\gamma\delta$ -Т-клетки. «Ингибирующий» эпитоп может включать, например, блокирование функции TCR, что ингибирует активацию TCR.

25 Эпитоп предпочтительно состоит по меньшей мере из одной внеклеточной, растворимой, гидрофильной, внешней или цитоплазматической части $V\delta 1$ -цепи $\gamma\delta$ -TCR.

В частности, эпитоп не содержит эпитопа, обнаруженного в гипервариабельной области $V\delta 1$ -цепи $\gamma\delta$ -TCR, в частности, в CDR3 $V\delta 1$ -цепи. Согласно предпочтительному варианту реализации эпитоп находится в пределах невариабельной области $V\delta 1$ -цепи $\gamma\delta$ -

30 TCR. Следует понимать, что такое связывание обеспечивает уникальное распознавание $V\delta 1$ -цепи без ограничения по последовательностям TCR, которые являются высоко вариабельными (в частности, CDR3). Различные комплексы $\gamma\delta$ -TCR, которые распознают ГКГС-подобные пептиды или антиген, могут быть распознаны таким способом, исключительно по наличию $V\delta 1$ -цепи. Таким образом, следует понимать, что любой $\gamma\delta$ -

TCR, содержащий V δ 1-цепь, может быть распознан с использованием антител или их фрагментов, определенных в настоящей заявке, независимо от специфичности $\gamma\delta$ -TCR. Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 SEQ ID NO: 1, например, 5 частей V δ 1-цепи, которые не являются частью последовательностей CDR1 и/или CDR3. Согласно одному варианту реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 91-105 (CDR3) из SEQ ID NO: 1.

Сходно с хорошо охарактеризованными $\alpha\beta$ -Т-клетками, $\gamma\delta$ -Т-клетки используют 10 отличный набор соматически реаранжированных переменных (V), обеспечивающих разнообразие (D), соединяющих (J) и константных (C) генов, хотя $\gamma\delta$ -Т-клетки содержат меньше V-, D- и J-сегментов, чем $\alpha\beta$ -Т-клетки. Согласно одному варианту реализации эпитоп, связанный антителами (или их фрагментами), не содержит эпитопа, обнаруженного в J-области V δ 1-цепи (например, в одной из четырех J-областей, кодируемых в дельта-цепи одной зародышевой линии человека: SEQ ID NO: 131 (J1*0) или 15 132 (J2*0) или 133 (J3*0) или 134 (J4*0)). Согласно одному варианту реализации эпитоп, связанный антителами (или их фрагментами), не содержит эпитопа, обнаруженного в C-области V δ 1-цепи (например, SEQ ID NO: 135 (C1*0), которая содержит C-концевую околосмембранную/трансмембранную область). Согласно одному варианту реализации эпитоп, связанный антителами (или их фрагментами), не содержит эпитопа, 20 обнаруженного в N-концевой лидерной последовательности V δ 1-цепи (например, SEQ ID NO: 129). Таким образом, антитело или фрагмент могут связываться только в V-области V δ 1-цепи (например, SEQ ID NO: 130). Таким образом, согласно одному варианту реализации, эпитоп состоит из эпитопа в V-области $\gamma\delta$ -TCR (например, аминокислотных остатков 1-90 из SEQ ID NO: 1).

25 Ссылка на эпитоп сделана в отношении последовательности V δ 1, происходящей из последовательности, описанной в Luoma *et al.* (2013) *Immunity* 39: 1032-1042, и записях RCSB Protein Data Bank: 4MNH и 3OMZ, показанной как SEQ ID NO: 1:

AQKVTQAQSSVSM PVRKAVTLNCLYETSWWSYYIFWYKQLPSKEMIFLIRQGSDE
QNAKSGRYSVNFKKAAKSVALTISALQLEDSAKYFCALGESLTRADKLIFGKGTRVTVE
30 PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDVYITDKTVLDMRSMDFK
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS (SEQ ID NO: 1)

SEQ ID NO: 1 представляет собой растворимый TCR, содержащий V-область (также называемую переменным доменом), D-область, J-область и константную область TCR. V-область содержит аминокислотные остатки 1-90, D-область содержит аминокислотные

остатки 91-104, J-область содержит аминокислотные остатки 105-115 и константная область содержит аминокислотные остатки 116-209. В V-области CDR1 определяется как аминокислотные остатки 25-34 из SEQ ID NO: 1, CDR2 определяется как аминокислотные остатки 50-54 из SEQ ID NO: 1 и CDR3 определяется как аминокислотные остатки 93-104 из SEQ ID NO: 1 (Xu et al., PNAS USA 108(6):2414-2419 (2011)).

Таким образом, согласно одному варианту реализации выделенное антитело или его фрагмент связывается с эпитопом вариабельной области 1 дельта-цепи (V δ 1) $\gamma\delta$ -T-клеточного рецептора (TCR), содержащим один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

- (i) 3-20 из SEQ ID NO: 1; и/или
- (ii) 37-77 из SEQ ID NO: 1.

Согласно дополнительному варианту реализации антитела или их фрагменты дополнительно распознают полиморфную V-область, содержащую аминокислотные остатки 1-90 эпитопа из SEQ ID NO:128. Следовательно, аминокислоты 1-90 из SEQ ID NO:1 и полиморфная вариантная последовательность зародышевой линии (аминокислоты 1-90 из SEQ ID NO:128) могут считаться взаимозаменяемыми при определении эпитопов, описанных в настоящей заявке. Антитела согласно настоящему изобретению могут распознавать оба варианта этой последовательности зародышевой линии. В качестве примера, если указано, что антитела или их фрагменты, определенные в настоящей заявке, распознают эпитопы, содержащие один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-24 и/или 35-90 из SEQ ID NO:1, это также относится к тем же областям SEQ ID NO:128; в частности, к аминокислотным областям 1-24 и/или 35-90 из SEQ ID NO:128.

Согласно одному варианту реализации антитела или их фрагменты распознают один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 1-90 из SEQ ID NO:1 и эквивалентно расположенные аминокислоты из областей 1-90 в SEQ ID NO:128. Более конкретно, согласно одному варианту реализации антитела или их фрагменты, определенные в настоящей заявке, распознают эпитоп зародышевой линии человека, причем указанная зародышевая линия кодирует либо аланин (A), либо валин (V) в положении 71 из SEQ ID NO:1.

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более аминокислотных остатков в пределах описанных областей.

Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 3-20 из SEQ ID NO: 1. Согласно альтернативному варианту реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 37-77 из SEQ ID NO: 1 (например, аминокислотной области 50-54). Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 3-20 (например, 5-20 или 3-17) и один или более (например, 5 или более, например, 10 или более) аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 37-77 (например, 62-77 или 62-69) из SEQ ID NO: 1.

Также следует понимать, что указанное антитело (или его фрагмент) не обязательно должно связываться со всеми аминокислотами в пределах определенного диапазона. Такие эпитопы могут называться линейными эпитопами. Например, антитело, которое связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки в пределах аминокислотной области 5-20 из SEQ ID NO: 1, может связываться только с одним или более аминокислотными остатками в указанном диапазоне, например, аминокислотными остатками на каждом конце диапазона (т.е. аминокислотами 5 и 20), необязательно включая аминокислоты в пределах диапазона (т.е. аминокислоты 5, 9, 16 и 20).

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит по меньшей мере один из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 из SEQ ID NO: 1. Согласно другим вариантам реализации эпитоп содержит одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 37, 42, 50, 53, 59, 62, 64, 68, 69, 72 или 77 из SEQ ID NO: 1.

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах следующих аминокислотных областей из SEQ ID NO: 1 (или SEQ ID NO:128, как описано выше):

- (i) 3-17;
- (ii) 5-20;
- (iii) 37-53;
- (iv) 50-64;
- (v) 59-72;
- (vi) 59-77;

(vii) 62-69; и/или

(viii) 62-77.

Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 из SEQ ID NO: 1.

Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 из SEQ ID NO: 1 или приемлемо состоит из аминокислотных остатков: 3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68 и 69 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 из SEQ ID NO: 1 или приемлемо состоит из аминокислотных остатков: 5, 9, 16, 20, 62, 64, 72 и 77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 из SEQ ID NO: 1 или приемлемо состоит из аминокислотных остатков: 37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73 и 77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 50, 53, 59, 62 и 64 из SEQ ID NO: 1 или приемлемо состоит из аминокислотных остатков: 50, 53, 59, 62 и 64 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит аминокислотные остатки: 59, 60, 68 и 72 из SEQ ID NO: 1 или приемлемо состоит из аминокислотных остатков: 59, 60, 68 и 72 из SEQ ID NO: 1.

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и/или 62-77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 и 62-77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 5-20 или 62-77 из SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все из последовательностей 1245_P01_E07, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1245_P01_E07. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR из 1245_P01_E07 или одну или обе из последовательностей VH и VL из 1245_P01_E07, могут связывать такие эпитопы.

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 50-64 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 50-64 из SEQ ID NO: 1.

5 Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все из последовательностей 1252_P01_C08, или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1252_P01_C08. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR из 1252_P01_C08 или одну или обе из последовательностей VH и VL из 1252_P01_C08, могут связывать такие эпитопы.

10 Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и/или 59-77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 и 59-77 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп содержит один
15 или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей 37-53 или 59-77 из SEQ ID NO: 1. Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все из последовательностей 1245_P02_G04 или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1245_P02_G04. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR из 1245_P02_G04 или одну или обе
20 из последовательностей VH и VL из 1245_P02_G04, могут связывать такие эпитопы.

Согласно одному варианту реализации эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 из SEQ ID NO: 1. Согласно дополнительному варианту реализации эпитоп состоит из одного или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59-72 из SEQ ID NO: 1.
25 Антитела или их фрагменты, имеющие такие эпитопы, могут иметь некоторые или все из последовательностей 1251_P02_C05 или такие антитела или их фрагменты могут происходить из 1251_P02_C05. Например, антитела или их фрагменты, имеющие одну или более последовательностей CDR из 1251_P02_C05 или одну или обе из последовательностей VH и VL из 1251_P02_C05, могут связывать такие эпитопы.

30 Согласно одному варианту реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 11-21 из SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 21-28 из SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 59 и

60 из SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту реализации эпитоп не содержит аминокислотных остатков в пределах аминокислотной области 67-82 из SEQ ID NO: 1.

5 Согласно одному варианту реализации эпитоп не является тем же эпитопом, что и связанный коммерчески доступным антителом к V δ 1, таким как TS-1 или TS8.2. Как описано в WO2017197347, связывание TS-1 и TS8.2 с растворимыми TCR было обнаружено, когда δ 1-цепь включала последовательности V δ 1 J1 и V δ 1 J2, но не с цепью V δ 1 J3, это указывает на то, что связывание TS-1 и TS8.2 включало критические остатки в области дельта J1 и дельта J2.

10 Ссылки на «в пределах» в настоящей заявке включают концы определенного диапазона. Например, «в пределах аминокислотных областей 5-20» относится ко всем аминокислотным остаткам от остатка 5 включительно до остатка 20 включительно.

В данной области техники известны различные методики определения того, какой эпитоп связан антителом. Примерные методики включают, например, рутинные анализы перекрестной блокировки, мутационный анализ путем сканирования аланином, 15 пептидные блот-анализы, анализ расщепления пептида, кристаллографические исследования и ЯМР-анализ. Кроме того, могут быть использованы такие методы как вырезание эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов. Еще одним методом, который можно использовать для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, 20 обнаруживаемый с помощью масс-спектрометрии (как описано в Примере 9). В общих чертах, метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и обмениваемые протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются 25 обратному обмену дейтерий-водород с более низкой скоростью, чем обмениваемые протоны в аминокислотах, которые не являются частью границы фаз. В результате аминокислоты, которые образуют часть границы фаз белок/антитело, могут удерживать дейтерий и, следовательно, проявлять относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в границу фаз. После диссоциации антитела целевой 30 белок подвергают расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, выявляя тем самым меченые дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело.

Последовательности антител

Выделенные антитела к Vδ1 или их фрагменты можно описать со ссылкой на их последовательности CDR.

5 Согласно одному варианту реализации антитело к Vδ1 или его фрагмент содержит одно или более из:

CDR3, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

10 CDR2, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и/или

CDR1, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

15 Согласно одному варианту реализации выделенное антитело к Vδ1 или его фрагмент содержит CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2). Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR1, 20 содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. Согласно 25 одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2). Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR1, содержащий последовательность, 30 имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25. Согласно

одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит CDR2, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2). Согласно одному варианту

5 реализации антители или его фрагмент содержит CDR1, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61.

Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую последовательность CDR3, имеющую по меньшей мере 80%
10 идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25. Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности
15 последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере
20 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25. Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности
25 последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере
30 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25. Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности

последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область
 5 VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25. Согласно одному
 10 варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13, и область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область
 15 VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, например, 2, 3 или 4, и область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности, 14-18, например, 14, 15 или 16. Согласно одному варианту
 20 реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, например, 2, 3 или 4, и область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности,
 25 14-18, например, 14, 15 или 16.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область
 VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, такой как 2, 3 или 4, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий
 30 последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности, 14-18, такой как 14, 15 или 16. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, например, 2, 3 или 4,

и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности, 14-18, например, 14, 15 или 16.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область
 5 VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, такой как 2, 3 или 4, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с
 10 любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности, 14-18, такой как 14, 15 или 16. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-7, в частности, 2-6, например, 2, 3 или 4, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по
 15 меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-19, в частности, 14-18, например, 14, 15 или 16.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность,
 20 имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую
 25 CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10
 30 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с

любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область
 5 VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23. Согласно одному варианту реализации антитело
 10 или его фрагмент содержит область VH, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8-13, в частности, 8, 9, 10 или 11, и/или область VL, содержащую CDR3, состоящий из последовательности, имеющей по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 20-25, в частности, 20, 21, 22 или 23.

15 Варианты реализации, которые в настоящей заявке относятся к «по меньшей мере 80%» или «80% или более», следует понимать, как включающие все значения, равные или превышающие 80%, такие как 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит по меньшей мере 85%, например, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%,
 20 по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с указанной последовательностью.

Вместо процента идентичности последовательности варианты реализации также могут быть определены с использованием одного или более аминокислотных изменений, например, одного или более добавлений, замен и/или делеций. Согласно одному варианту
 25 реализации последовательность может содержать до пяти аминокислотных изменений, например, до трех аминокислотных изменений, в частности, до двух аминокислотных изменений. Согласно дополнительному варианту реализации последовательность может содержать до пяти аминокислотных замен, например, до трех аминокислотных замен, в частности, до одной или двух аминокислотных замен. Например, CDR3 антитела или его
 30 фрагмента содержит или более подходящим образом состоит из последовательности, имеющей не более 2, более подходящим образом не более 1 замены по сравнению с любой из SEQ ID NO: 2-25.

Является приемлемым, когда любые остатки CDR1, CDR2 или CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-61 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ: A1-

A12, представляют собой консервативные замены по отношению к их соответствующим остаткам. Например, любые остатки CDR3, отличающиеся от их соответствующих остатков в SEQ ID NO: 2-25, являются консервативными заменами по отношению к их соответствующим остаткам.

5 Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит:

(i) область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

10 (ii) область VH, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37;

(iii) область VH, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49;

15 (iv) область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25;

(v) область VL, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из
20 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и/или

(vi) область VL, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61.

25 Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую:

(i) область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-13;

30 (ii) область VH, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37; и

(iii) область VH, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-49.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит легкую цепь, содержащую:

(i) область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID

5 NO: 14-25;

(ii) область VL, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12; и

(iii) область VL, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID
10 NO: 50-61.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID
15 NO: 2, 3, 4, 5 или 6, например, 2, 3, 4 или 5, в частности, 2, 3 или 4. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VH, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 или 30, например, 26, 27, 28 или 29, в частности, 26, 27 или 28. Согласно одному варианту
20 реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VH, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41 или 42, например, 38, 39, 40 или 41, в частности, 38, 39 или 40.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или
25 состоит из нее) область VH, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 8, 9, 10 или 11. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VH, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с
30 любой из SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VH, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 44, 45, 46 или 47.

5 последовательности SEQ ID NO: 26 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO:
38.

10 реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 3, CDR2 состоит из
последовательности SEQ ID NO: 27 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO:
39.

15 28, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 40. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 4, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 28, и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 40.

20 последовательность SEQ ID NO: 5, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 29, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 41. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 5, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 29 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 41.

25 Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 30, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 42. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 6, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 30 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 30 42.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 32, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 44. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 8, CDR2 состоит из

последовательности SEQ ID NO: 32 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 44.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 45. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 9, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 33 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 45.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 из SEQ ID NO: 34 и последовательность CDR1 из SEQ ID NO: 46. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 10, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 34 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 46.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11, последовательность CDR2 из SEQ ID NO: 35 и последовательность CDR1 из SEQ ID NO: 47. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 11, CDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 35 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 47.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VL, содержащую CDR3, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 14-25, такой как SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 или 18, такой как 14, 15, 16 или 17, в частности, 14, 15 или 16. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VL, содержащую CDR2, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2), такой как ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: A1, A2, A3, A4 или A5, такой как A1, A2, A3 или A4, в частности, A1, A2 или A3. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит (или состоит из нее) область VL, содержащую CDR1, содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 50-61, такой как SEQ ID NO: 50, 51, 52, 53 или 54, такой как 50, 51, 52 или 53, в частности, 50, 51 или 52.

NO: 20, CDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A7 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 56.

5 Согласно одному варианту реализации область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A8, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 57. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 21, CDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A8 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

10 Согласно одному варианту реализации область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 22, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A9, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 58. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, CDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A9 и CDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 58.

15 Согласно одному варианту реализации область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A10, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 59. Согласно одному варианту реализации CDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 23, CDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A10 и CDR1
20 состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 26, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 38, и область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 14, CDR2, содержащий последовательность
25 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A1, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 50. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 2, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 26, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 38, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 14, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A1 и LCDR1
30 состоит из последовательности SEQ ID NO: 50.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 27, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 39, и область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 15, CDR2, содержащий последовательность

18, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A5 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 54.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 7, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 31, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 43, и область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 19, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A6, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 55. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 7, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 31, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 43, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 19, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A6 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 55.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 32, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 44, и область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 20, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A7, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 56. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 8, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 32, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 44, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 20, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A7 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 56.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 9, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 45, и область VL содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 21, CDR2, содержащий последовательность ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A8, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 57. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 9, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 33, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 45, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 21, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A8 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 57.

Согласно одному варианту реализации область VH содержит CDR3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 10, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO:

5 NO: 10, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 34, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 46, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 22, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: А9 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 58.

10 последовательность SEQ ID NO: 11, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO:
35, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 47, и область VL содержит CDR3,
содержащий последовательность SEQ ID NO: 23, CDR2, содержащий последовательность
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A10, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO:
59. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID
15 NO: 11, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 35, HCDR1 состоит из
последовательности SEQ ID NO: 47, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO:
23, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A10 и LCDR1
состоит из последовательности SEQ ID NO: 59.

20 последовательность SEQ ID NO: 12, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO:
36, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 48, и область VL содержит CDR3,
содержащий последовательность SEQ ID NO: 24, CDR2, содержащий последовательность
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A11, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO:
60. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID
25 NO: 12, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 36, HCDR1 состоит из
последовательности SEQ ID NO: 48, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO:
24, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A11 и LCDR1
состоит из последовательности SEQ ID NO: 60.

30 последовательность SEQ ID NO: 13, CDR2, содержащий последовательность SEQ ID NO:
37, CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 49, и область VL содержит CDR3,
содержащий последовательность SEQ ID NO: 25, CDR2, содержащий последовательность
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A12, и CDR1, содержащий последовательность SEQ ID NO:
61. Согласно одному варианту реализации HCDR3 состоит из последовательности SEQ ID

NO: 13, HCDR2 состоит из последовательности SEQ ID NO: 37, HCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 49, LCDR3 состоит из последовательности SEQ ID NO: 25, LCDR2 состоит из последовательности ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: A12 и LCDR1 состоит из последовательности SEQ ID NO: 61.

5 Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более последовательностей CDR, описанных в **Таблице 2**. Согласно дополнительному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1252_P01_C08, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или

10 более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P01_E07, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P02_G04, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона

15 1245_P02_B07, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1251_P02_C05, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1139_P01_E04, описанных в **Таблице 2**. Согласно

20 альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P02_F07, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1245_P01_G06, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона

25 1245_P01_G09, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1138_P01_B09, описанных в **Таблице 2**. Согласно альтернативному варианту реализации антители или его фрагмент содержит одну или более (например, все) последовательностей CDR клона 1251_P02_G10, описанных в **Таблице 2**.

30

Является приемлемым, когда каждая из областей VH и VL, указанных выше, содержит четыре каркасных участка (FR1-FR4). Согласно одному варианту реализации антители или его фрагмент содержит каркасный участок (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности

последовательности с каркасным участком в любой из SEQ ID NO: 62-85. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит каркасный участок (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащий последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, 97% или 99% идентичности

5 последовательности с каркасным участком в любой из SEQ ID NO: 62-85. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит каркасный участок (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), содержащий последовательность в любой из SEQ ID NO: 62-85. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит каркасный участок (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4), состоящий из
10 последовательности в любой из SEQ ID NO: 62-85.

Антитела, описанные в настоящей заявке, могут быть определены на основании их полноразмерных переменных последовательностей легкой цепи и/или тяжелой цепи. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности
15 последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-85.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73. Согласно дополнительному варианту реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по
20 меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, например, 62, 63, 64 или 65, в частности, 62, 63 или 64. Согласно дополнительному варианту реализации область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65 или 66, такой как 62, 63, 64 или 65, в частности, 62, 63
25 или 64. Согласно дополнительному варианту реализации область VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, например, 68, 69, 70 или 71. Согласно дополнительному варианту реализации область VH состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности
30

последовательности с любой из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 71, 72 или 73, такой как 68, 69, 70 или 71.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. Согласно дополнительному варианту реализации область VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, например, 74, 75, 76 или 77, в частности, 74, 75 или 76. Согласно дополнительному варианту реализации область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 77 или 78, такой как 74, 75, 76 или 77, в частности, 74, 75 или 76. Согласно дополнительному варианту реализации область VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, например, 80, 81, 82 или 83. Согласно дополнительному варианту реализации область VL состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 83, 84 или 85, такой как 80, 81, 82 или 83.

Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (1252_P01_C08). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит

область VH, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 71 (1245_P01_G09), и область VL, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 83 (1245_P01_G09).

В случае фрагментов, содержащих обе области VH и VL, они могут быть ассоциированы либо ковалентно (например, за счет дисульфидных связей или линкера), либо нековалентно. Фрагмент антитела, описанный в настоящей заявке, может содержать scFv, т.е. фрагмент, содержащий область VH и область VL, соединенные линкером. Согласно одному варианту реализации области VH и VL соединены (например, синтетическим) полипептидным линкером. Полипептидный линкер может содержать линкер $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n = от 1 до 8, например, 2, 3, 4, 5 или 7. Полипептидный линкер может содержать линкер $[(\text{Gly}_4\text{Ser})_n(\text{Gly}_3\text{AlaSer})_m]_p$, где n = от 1 до 8, например, 2, 3, 4, 5 или 7, m = от 1 до 8, например, 0, 1, 2 или 3, и p = от 1 до 8, например, 1, 2 или 3. Согласно дополнительному варианту реализации линкер содержит SEQ ID NO: 98. Согласно дополнительному варианту реализации линкер состоит из SEQ ID NO: 98.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-97. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности

последовательности с любой из SEQ ID NO: 86-97. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 86-97. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 87 (1252_P01_C08). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 86 (1245_P01_E07). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 88 (1245_P02_G04). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 92 (1139_P01_E04). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 93 (1245_P02_F07). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 94 (1245_P01_G06). Согласно альтернативному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95 (1245_P01_G09).

Специалист в данной области техники поймет, что конструкции scFv могут быть сконструированы и изготовлены с включением N-концевых и C-концевых модификаций для облегчения трансляции, очистки и обнаружения. Например, на N-конце последовательности scFv дополнительный аминокислотный остаток метионина и/или аланина может быть включен перед каноническими последовательностями VH (например, начальными QVQ или EVQ). На C-конце (т.е. C-конце канонической последовательности домена VL, заканчивающейся в соответствии с определением IMGT) могут быть включены дополнительные последовательности, такие как (i) неполная последовательность константного домена и/или (ii) дополнительные синтетические последовательности, включая метки, такие как His-метки и Flag-метки, для облегчения очистки и обнаружения. Согласно одному варианту реализации SEQ ID NO: 124 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. Согласно одному варианту реализации SEQ ID NO: 125 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 86, 88-90, 92-97. Согласно одному варианту реализации SEQ ID NO: 126 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. Согласно одному варианту реализации SEQ ID NO: 127 добавлена к C-концу любой из SEQ ID NO: 87 или 91. Хорошо известно, что указанные N- или C-концевые последовательности scFv являются необязательными и могут быть удалены,

модифицированы или заменены, если приняты альтернативные стратегии конструирования, трансляции, очистки или обнаружения scFv.

Как описано в настоящей заявке, антитела могут быть в любом формате. Согласно предпочтительному варианту реализации антитело имеет формат IgG1. Таким образом, согласно одному варианту реализации, антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 111-122. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 111-122. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111-116, такую как SEQ ID NO: 111-113 и 116. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 117-122, такую как SEQ ID NO: 117-120. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такую как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 111-122. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 111-122. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111-116, такой как SEQ ID NO: 111-113 и 116. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 117-122, такой как SEQ ID NO: 117-120. Согласно дополнительному варианту реализации антитело или его фрагмент состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 111, 112, 116-120, такой как SEQ ID NO: 111, 112 или 116, или SEQ ID NO: 117-120.

Согласно одному варианту реализации антитело связывается с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, определенные в настоящей заявке, или конкурирует с ними. С помощью стандартных методов, известных в данной области техники, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и референсное антитело к Vδ1, или конкурирует за связывание с ним. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и

референсное антитело к V δ 1, референсному антителу позволяют связаться с белком или пептидом V δ 1 в условиях насыщения. Далее оценивают способность тестируемого антитела связываться с V δ 1-цепью. Если тестируемое антитело способно связываться с V δ 1 после насыщения связывания с референсным антителом к V δ 1, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем референсное антитело к V δ 1. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с V δ 1-цепью после насыщения связывания с референсным антителом к V δ 1, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный референсным антителом к V δ 1.

Настоящее изобретение также включает антитела к V δ 1, которые конкурируют за связывание с V δ 1 с антителом или его фрагментом, определенным в настоящей заявке, или антителом, имеющим последовательности CDR любого из примерных антител, описанных в настоящей заявке. Например, конкурентные анализы могут быть выполнены с антителом, чтобы определить, какие белки, антитела и другие антагонисты конкурируют за связывание с V δ 1-цепью с антителом и/или имеют общий эпитоп. Эти анализы хорошо известны специалистам в данной области техники; они оценивают конкуренцию между антагонистами или лигандами за ограниченное количество сайтов связывания на белке, например, V δ 1. Антитело (или его фрагмент) иммобилизуют или переводят в нерастворимую форму до или после конкуренции, и образец, связанный с V δ 1-цепью, отделяют от несвязанного образца, например, путем декантации (если антитело предварительно не растворяли) или центрифугирования (если антитело осаждали после конкурентной реакции). Кроме того, конкурентное связывание может быть определено на основании того, изменяется ли функция в результате связывания или отсутствия связывания антитела с белком, например, ингибирует или стимулирует ли молекула антитела ферментативную активность, например, метки. Можно использовать ИФА и другие функциональные анализы, известные в данной области техники и описанные в настоящей заявке.

Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентно ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном-мишенью. Иными словами, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. В качестве альтернативы, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если по существу все аминокислотные мутации в

антигене-мишени, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Затем может быть проведен дополнительный стандартный эксперимент (например, анализы мутаций и связывания пептида) для подтверждения того, действительно ли
 5 наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, что и для референсного антитела, или отсутствие наблюдаемого связывания обусловлено стерическим блокированием (или другим явлением). Эксперименты такого типа могут быть выполнены с помощью ИФА, RIA, поверхностного плазмонного резонанса, проточной цитометрии или любого другого количественного или
 10 качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации антитело или его фрагмент содержит модифицированную эффекторную функцию путем изменения сахаров, связанных с Asn 297 (схема нумерации EU). В еще одной указанной модификации Asn 297 не является фукозилированным или проявляет уменьшенное фукозилирование (т.е.
 15 дефукозилированное антитело или нефукозилированное антитело). Фукозилирование включает добавление сахара фукозы к молекуле, например, присоединение фукозы к N-гликанам, O-гликанам и гликолипидам. Соответственно, в дефукозилированном антителе фукоза не присоединена к углеводным цепям константной области. Антитело может быть модифицировано для предотвращения или ингибирования фукозилирования антитела.
 20 Обычно модификации гликозилирования включают экспрессию указанного антитела или его фрагмента в клетке-хозяине, содержащей альтернативные возможности процессинга гликозилирования, либо посредством целевого конструирования, либо посредством целевого или вероятностного отбора хозяина или клона. Эти и другие эффекторные модификации дополнительно обсуждаются в недавних обзорах, таких как Xinhua Wang et al. (2018) Protein & Cell 9: 63-73 и Pereira et al. (2018) mAbs 10(5): 693-711, и которые
 25 включены в настоящую заявку.

Модификации последовательности антитела

Антитела и их фрагменты могут быть модифицированы с использованием известных способов. Модификации последовательности в молекулах антител, описанных в
 30 настоящей заявке, могут быть легко встроены специалистами в данной области техники. Следующие примеры являются неограничивающими.

Во время обнаружения антител и выделения последовательностей из фаговых библиотек целевые вариабельные домены антител могут быть переформатированы в полноразмерный IgG путем субклонирования. Для ускорения процесса вариабельные

домены часто переносят с использованием рестрикционных ферментов. Эти уникальные сайты рестрикции могут вводить дополнительные/альтернативные аминокислоты и удалять их из канонической последовательности (такие канонические последовательности можно найти, например, в международной информационной системе ImMunoGeneTics [IMGT], см. <http://www.imgt.org>). Они могут быть введены в виде модификаций последовательности легкой каппа- или лямбда-цепи.

Модификации легкой каппа-цепи

Вариабельные последовательности легкой каппа-цепи могут быть клонированы с использованием сайтов рестрикции (например, NheI-NotI) при переформатировании в полноразмерный IgG. Более конкретно, дополнительная последовательность Ala-Ser была введена на N-конце легкой каппа-цепи, чтобы облегчить клонирование. Предпочтительно эту дополнительную последовательность AS затем удаляют во время дальнейшей разработки таким образом, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, согласно одному варианту реализации, содержащие легкую каппа-цепь антитела, описанные в настоящей заявке, не содержат последовательности AS на своих N-концах, т.е. SEQ ID NO: 74, 76-78 и 80-85 не содержат исходной последовательности AS. Согласно дополнительному варианту реализации SEQ ID NO: 74 и 76-78 не содержат исходной последовательности AS. Следует понимать, что этот вариант реализации также применим к другим последовательностям, включенным в настоящую заявку, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 86, 88-90 и 92-97).

Дополнительные аминокислотные изменения могут быть внесены, чтобы облегчить клонирование. Например, для антител, описанных в настоящей заявке, на границе вариабельного домена/константного домена легкой каппа-цепи была введена замена валина аланином, чтобы облегчить клонирование. Это привело к модификации константного домена каппа. В частности, в результате этого константный домен начинается с RTAAAPS (с сайта рестрикции NotI). Предпочтительно эта последовательность может быть модифицирована во время дальнейшей разработки для получения канонических константных областей легкой каппа-цепи, которые начинаются с RTVAAPS. Следовательно, согласно одному варианту реализации, содержащие легкую каппа-цепь антитела, описанные в настоящей заявке, содержат константный домен, начинающийся с последовательности RTV. Таким образом, согласно одному варианту реализации, последовательность RTAAAPS из SEQ ID NO: 111-114 и 117-122 заменена последовательностью RTVAAPS.

Модификации легкой лямбда-цепи

Аналогично примеру с каппа-цепью, приведенному выше, переменные домены легкой лямбда-цепи также могут быть клонированы путем введения сайтов рестрикции (например, Nhe1-Not1) во время переформатирования в полноразмерный IgG. Более
 5 конкретно, дополнительная последовательность Ala-Ser может быть введена на N-конце легкой лямбда-цепи, чтобы облегчить клонирование. Предпочтительно эту дополнительную последовательность AS затем удаляют во время дальнейшей разработки таким образом, чтобы получить каноническую N-концевую последовательность. Следовательно, согласно одному варианту реализации, содержащие легкую лямбда-цепь
 10 антитела, описанные в настоящей заявке, не содержат последовательности AS на своих N-концах, т.е. SEQ ID NO: 75 и 79 не содержат исходной последовательности AS. Следует понимать, что этот вариант реализации также применим к другим последовательностям, включенным в настоящую заявку, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 87, 91, 115 и 116). Согласно одному варианту реализации SEQ ID NO: 75 не
 15 содержит шести первоначальных остатков, т.е. последовательность ASSYEL удалена.

В качестве другого примера, для антител, описанных в настоящей заявке, на границе переменного домена/константного домена легкой лямбда-цепи было введено изменение последовательности с лизина на аланин, чтобы облегчить клонирование. Это привело к модификации константного домена лямбда. В частности, в результате этого константный
 20 домен начинается с GQPAAAPS (с сайта рестрикции NotI). Предпочтительно эта последовательность может быть модифицирована во время дальнейшей разработки для получения канонической константной области легкой лямбда-цепи, которая начинается с GQPKAAPS. Следовательно, согласно одному варианту реализации, содержащие легкую лямбда-цепь антитела, описанные в настоящей заявке, содержат константный домен,
 25 который начинается с последовательности GQPK. Таким образом, согласно одному варианту реализации, последовательность GQPAAAPS из SEQ ID NO: 115 или 116 заменена последовательностью GQPKAAPS.

Модификации тяжелой цепи

Обычно переменные последовательности тяжелой цепи человека начинаются либо
 30 с основного глутамина (Q), либо с кислого глутамата (E). Однако обе такие последовательности затем, как известно, превращаются в кислый аминокислотный остаток, пироглутамат (pE). Превращение Q в pE приводит к изменению заряда антитела, в то время как превращение E в pE не изменяет заряда антитела. Следовательно, чтобы избежать переменного изменения заряда с течением времени, одним из вариантов

является модификация начальной последовательности тяжелой цепи с Q на E в первую очередь. Следовательно, согласно одному варианту реализации, тяжелая цепь антитела, описанная в настоящей заявке, содержит модификацию Q в E на N-конце. В частности, первоначальный остаток SEQ ID NO: 62, 64 и/или 67-71 может быть модифицирован с Q на E. Следует понимать, что этот вариант реализации также применим к другим последовательностям, включенным в настоящую заявку, которые содержат эту последовательность (например, SEQ ID NO: 86, 88, 91-97 и 111, 112, 115, 117-120).

Кроме того, С-конец константного домена IgG1 заканчивается PGK. Однако концевой основной лизин (K) затем часто отщепляется во время экспрессии (например, в клетках CHO). Это, в свою очередь, приводит к изменению заряда антитела посредством различной потери С-концевого остатка лизина. Таким образом, одним из вариантов является удаление лизина в первую очередь, что приводит к однородной и постоянной С-концевой последовательности тяжелой цепи, заканчивающейся на PG. Следовательно, согласно одному варианту реализации, в тяжелой цепи антитела, описанного в настоящей заявке, концевой K удален с ее С-конца. В частности, антитело согласно настоящему изобретению может содержать любую из SEQ ID NO: 111-122, где концевой остаток лизина был удален.

Необязательные аллотипические модификации

Во время обнаружения антител могут применяться специфические аллотипы человека. Во время разработки антитела необязательно могут быть переключены на различные аллотипы человека. В качестве неограничивающего примера, для каппа-цепи существуют три аллотипа человека, обозначенные Km1, Km1,2 и Km3, которые определяют три аллеля Km (с использованием нумерации аллотипов): Km1 коррелирует с валином 153 (IMGT V45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); Km1,2 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и лейцином 191 (IMGT L101); и Km3 коррелирует с аланином 153 (IMGT A45.1) и валином 191 (IMGT V101). Таким образом, необязательно можно модифицировать последовательность с одного аллотипа на другой с помощью стандартных подходов к клонированию. Например, изменение L191V (IMGT L101V) будет превращать аллотип Km1,2 в аллотип Km3. Дополнительную информацию о таких аллотипах см. в Jefferis and Lefranc (2009) *MAbs* 1(4):332-8, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Следовательно, согласно одному варианту реализации, антитело, описанное в настоящей заявке, содержит аминокислотные замены, полученные из другого аллотипа человека этого же гена. Согласно дополнительному варианту реализации антитело

содержит замену L191V (IMGT L101V) в каппа-цепи для превращения с-домена из аллотипа km1,2 в km3.

Связывание антител

Антитело или его фрагмент могут связываться с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, которая менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). Согласно предпочтительному варианту реализации KD составляет менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ). Согласно дополнительному варианту реализации KD составляет $1,3 \times 10^{-7}$ М (т.е. 130 нМ) или менее, например, $1,0 \times 10^{-7}$ М (т.е. 100 нМ) или менее. Согласно дополнительному варианту реализации KD составляет менее $5,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 50 нМ), например, менее $4,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее $2,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ). Например, в соответствии с одним аспектом предложено антитело человека к V δ 1, которое связывается с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, которая менее $1,5 \times 10^{-7}$ М (т.е. 150 нМ).

Согласно одному варианту реализации антитело или его фрагмент связывается с V δ 1-цепью $\gamma\delta$ -TCR с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, которая менее $4,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 40 нМ), менее $3,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 30 нМ) или менее $2,0 \times 10^{-8}$ М (т.е. 20 нМ).

Согласно одному варианту реализации аффинность связывания антитела или его фрагмента устанавливают путем прямого или опосредованного (например, путем захвата с помощью антитела к Fc IgG человека) покрытия поверхности сенсора (например, аминного чипа высокой емкости или его эквивалента) антителом или его фрагментом, при этом мишень, связываемую антителом или его фрагментом (т.е., V δ 1-цепь $\gamma\delta$ -TCR), пропускают над чипом для обнаружения связывания. Является приемлемым, когда прибор MASS-2 (который также может называться Sierra SPR-32) используют при 25 °C в рабочем буфере ФСБ + 0,02% Tween 20 при 30 мкл/мин.

В настоящей заявке описаны другие анализы, которые могут применяться для определения функции антитела. Например, антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке, могут быть оценены на основании задействования $\gamma\delta$ -TCR, например, путем измерения отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR при связывании антитела. Поверхностная экспрессия $\gamma\delta$ -TCR после применения антитела или его фрагмента (необязательно презентированного на поверхности клетки) может быть измерена, например, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке, также могут быть оценены путем измерения дегрануляции $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Например, экспрессия CD107a, маркера дегрануляции клеток, может быть измерена после внесения антитела или его фрагмента (необязательно презентируемого на поверхности клетки) к $\gamma\delta$ -Т-клеткам, например, с помощью проточной цитометрии. Антитело или его фрагмент, описанные в настоящей заявке, также могут быть оценены путем измерения цитолитической активности $\gamma\delta$ -Т-клеток (чтобы протестировать, оказывает ли антитело влияние на цитолитическую активность $\gamma\delta$ -Т-клетки). Например, клетки-мишени могут быть инкубированы с $\gamma\delta$ -Т-клетками в присутствии антитела или его фрагмента (необязательно презентируемого на поверхности клетки). После инкубации культуру можно окрасить красителем для определения жизнеспособности клеток, чтобы отличить живые и мертвые клетки-мишени. Затем можно измерить долю мертвых клеток, например, с помощью проточной цитометрии.

Как описано в настоящей заявке, антитела или их фрагменты, используемые в анализах, могут быть презентированы на поверхности, например, на поверхности клетки, такой как клетка, содержащая Fc-рецептор. Например, антитела или их фрагменты могут быть презентированы на поверхности клеток ТНР-1, таких как клетки TIB-202™ (доступны из Американской коллекции типовых культур (ATCC)). В качестве альтернативы, антитела или их фрагменты могут быть использованы непосредственно в анализах.

В таких функциональных анализах выход может быть измерен путем расчета половины максимальной концентрации, также называемой «ЭК50» или «эффективной концентрации при 50 процентах». Термин «ИК50» относится к ингибирующей концентрации. Как ЭК50, так и ИК50 могут быть измерены с использованием методов, известных в данной области техники, таких как методы проточной цитометрии. Во избежание сомнений, значения ЭК50 в настоящей заявке представлены с использованием IgG1-форматированного антитела. Такие значения могут быть легко преобразованы на основе молекулярной массы формата антитела для эквивалентных значений следующим образом:

$$(\text{мкг/мл}) / (\text{мол.масса в кДа}) = \text{мкМ}$$

ЭК50 для отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее 0,50 мкг/мл, например, менее 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,05 мкг/мл. Согласно предпочтительному варианту реализации ЭК50 для отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее 0,10 мкг/мл. В частности, ЭК50 для отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR при связывании антитела (или фрагмента) может

составлять менее 0,06 мкг/мл, например, менее 0,05 мкг/мл, 0,04 мкг/мл или 0,03 мкг/мл. В частности, указанные значения ЭК50 являются такими, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение ЭК50 для отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR может быть измерено с использованием проточной цитометрии (например, как описано в анализе

5 из Примера 6).

ЭК50 для дегрануляции $\gamma\delta$ -Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее 0,050 мкг/мл, например, менее 0,040 мкг/мл, 0,030 мкг/мл, 0,020 мкг/мл, 0,015 мкг/мл, 0,010 мкг/мл или 0,008 мкг/мл. В частности, ЭК50 для дегрануляции $\gamma\delta$ -Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее 0,005 мкг/мл, например, менее 0,002 мкг/мл. Согласно предпочтительному варианту реализации ЭК50 для дегрануляции $\gamma\delta$ -Т-клеток при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее 0,007 мкг/мл. В частности, указанные значения ЭК50 являются такими, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение ЭК50 для дегрануляции $\gamma\delta$ -Т-клеток может быть измерено путем обнаружения экспрессии CD107a (т.е. маркера дегрануляции клеток) с использованием проточной цитометрии (например, как описано в анализе из Примера 7). Согласно одному варианту реализации экспрессию CD107a измеряют с использованием антитела к CD107a, такого как антитело к CD107a человека BV421 (клон H4A3) (BD Biosciences).

ЭК50 для уничтожения $\gamma\delta$ -Т-клетками при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее 0,50 мкг/мл, например, менее 0,40 мкг/мл, 0,30 мкг/мл, 0,20 мкг/мл, 0,15 мкг/мл, 0,10 мкг/мл или 0,07 мкг/мл. Согласно предпочтительному варианту реализации ЭК50 для уничтожения $\gamma\delta$ -Т-клетками при связывании антитела (или фрагмента) составляет менее 0,10 мкг/мл. В частности, ЭК50 для уничтожения $\gamma\delta$ -Т-клетками при связывании антитела (или фрагмента) может составлять менее 0,060 мкг/мл, например, менее 0,055 мкг/мл, в частности, менее 0,020 мкг/мл или 0,010 мкг/мл. В частности, указанные значения ЭК50 являются такими, когда антитело измеряют в формате IgG1. Например, значение ЭК50 для уничтожения $\gamma\delta$ -Т-клетками может быть измерено путем обнаружения доли мертвых клеток (т.е. с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток) с использованием проточной цитометрии после инкубации антитела, $\gamma\delta$ -Т-клетки и клеток-мишеней (например, как описано в анализе из Примера 8). Согласно одному варианту реализации гибель клетки-мишени измеряют с использованием красителя для определения жизнеспособности клеток, представляющего собой краситель для определения жизнеспособности eFluor™ 520 (ThermoFisher).

В анализах, описанных в этих аспектах, антитело или его фрагмент могут быть презентированы на поверхности клетки, такой как клетка ТНР-1, например, TIB-202™ (ATCC). Клетки ТНР-1 необязательно мечены красителем, таким как CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher).

- 5 Антитела (или фрагменты) могут быть получены и подвергнуты манипуляциям с использованием методик, раскрытых, например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

10 Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридомной технологии путем слияния специфической В-клетки, продуцирующей антитело, с клеткой миеломы (В-клеточный рак), которая выбрана на основании ее способности расти в тканевой культуре и на основании отсутствия синтеза цепей антитела.

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, может быть получено, например, путем:

- 15 а) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с использованием иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы, чтобы получить гибридому,

б) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, обладающие целевой специфичностью.

20 В качестве альтернативы, применение гибридомной клетки не требуется. Антитела, способные связываться с антигенами-мишенями, как описано в настоящей заявке, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител с помощью обычной практики, например, с использованием технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея млекопитающих, известной в данной области техники.

25 Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью способа, включающего следующие этапы:

- а) клонирование в векторы, в частности, в фаги и, более конкретно, нитевидные бактериофаги, последовательностей ДНК или кДНК, полученных из лимфоцитов, в частности, лимфоцитов периферической крови животного (подходящим
- 30 образом ранее иммунизированного определенными антигенами),

б) трансформацию прокариотических клеток векторами, указанными выше, в условиях, обеспечивающих продукцию антител,

с) отбор антител, подвергая их антиген-аффинному отбору,

д) выделение антител, обладающих целевой специфичностью.

Фармацевтические композиции

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена композиция, содержащая популяцию V δ 1-T-клеток, полученную с помощью способа, определенного в настоящей заявке. Согласно одному варианту реализации популяция V δ 1-T-клеток представляет собой размноженную популяцию V δ 1-T-клеток. Согласно таким вариантам реализации композиция может содержать клетки, необязательно в комбинации с другими вспомогательными веществами. Также включены композиции, содержащие один или более дополнительных активных агентов (например, активных агентов, подходящих для лечения заболеваний, упомянутых в настоящей заявке).

Фармацевтические композиции могут содержать V δ 1-T-клетки, в частности, размноженные V δ 1-T-клетки, как описано в настоящей заявке, в комбинации с одним или более фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, разбавителями или вспомогательными веществами. Такие композиции могут включать буферы, такие как нейтральный буферный солевой раствор, фосфатно-солевой буфер и т.д.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки, полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия) и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые могут применяться в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению, включают, например, ДМСО. Композиции могут быть изготовлены, например, для внутривенного введения.

Согласно одному варианту реализации фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, отсутствуют обнаруживаемые уровни загрязнителя, например, эндотоксина или микоплазмы.

Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный, интратекальный). Согласно предпочтительному варианту реализации композицию вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. Согласно другому предпочтительному варианту реализации композицию вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

В объем настоящего изобретения включено применение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению в терапевтических способах лечения заболеваний, как описано в настоящей заявке, в качестве дополнения или в сочетании с другими установленными видами терапии, обычно используемыми в лечении таких заболеваний.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения популяцию клеток, композицию или фармацевтическую композицию вводят последовательно, одновременно или по отдельности по меньшей мере с одним активным агентом.

Способы лечения с применением популяций клеток

- 5 В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена популяция клеток, полученная с помощью способа, определенного в настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства. В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена размноженная популяция клеток, определенная в настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства.
- 10 Ссылки в настоящей заявке на популяцию клеток «для применения» в качестве лекарственного средства или в терапии ограничиваются введением популяции клеток субъекту. Такие варианты применения не включают введение антитела или его фрагмента непосредственно пациенту, т.е., когда указанное антитело применяют в качестве терапевтического средства.
- 15 Согласно одному варианту реализации популяция клеток предназначена для применения в лечении рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания. Согласно дополнительному варианту реализации популяция клеток предназначена для применения в лечении рака.
- 20 Согласно одному варианту реализации популяция клеток для применения в качестве лекарственного средства содержит более 50% V δ 1-T-клеток, например, более 60%, более 70%, более 80%, более 90%, более 95% или более 99% V δ 1-T-клеток. Согласно дополнительному варианту реализации популяция клеток для применения в качестве лекарственного средства состоит из V δ 1-T-клеток.
- 25 Согласно одному варианту реализации популяция клеток для применения в качестве лекарственного средства содержит менее 10% $\alpha\beta$ -T-клеток, например, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4% или менее 3% $\alpha\beta$ -T-клеток. Согласно одному варианту реализации популяция клеток для применения в качестве лекарственного средства содержит менее 10% V δ 2-T-клеток, например, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4% или менее 3% V δ 2-T-клеток. Согласно одному варианту реализации популяция
- 30 клеток для применения в качестве лекарственного средства содержит менее 50% NK-клеток, например, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10% или менее 5% NK-клеток. Согласно одному варианту реализации менее 50% клеток, присутствующих в популяции клеток для применения в качестве лекарственного средства, экспрессируют

CD56, например, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10% или менее 5% экспрессируют CD56.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, определенную в
 5 настоящей заявке, для применения в качестве лекарственного средства. Согласно одному варианту реализации фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, предназначена для применения в лечении рака, инфекционного заболевания или
 воспалительного заболевания. Согласно дополнительному варианту реализации фармацевтическая композиция, содержащая популяцию клеток, предназначена для
 10 применения в лечении рака.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен способ модулирования иммунного ответа у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества популяции клеток, определенной в
 настоящей заявке.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен
 15 способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества популяции клеток, определенной в настоящей заявке. В альтернативном варианте вводят терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции,
 20 содержащей популяцию клеток.

В соответствии с дополнительными аспектами настоящего изобретения предложено применение популяции клеток, определенной в настоящей заявке, для изготовления
 лекарственного средства, например, для лечения рака, инфекционного заболевания или
 воспалительного заболевания.

25 Адоптивная Т-клеточная терапия

Гамма-дельта-Т-клетки, полученные с помощью способов размножения согласно
 настоящему изобретению, можно применять в качестве лекарственного средства,
 например, для адоптивной Т-клеточной терапии. Такая терапия включает перенос $\gamma\delta$ -Т-
 клеток пациенту. Терапия может представлять собой аутологичную терапию, т.е. $\gamma\delta$ -Т-
 30 клетки могут быть перенесены обратно тому же пациенту, от которого они были
 получены, или терапия может представлять собой аллогенную терапию, т.е. $\gamma\delta$ -Т-клетки
 от одного человека могут быть перенесены другому пациенту. В примерах, включающих
 аллогенный перенос, $\gamma\delta$ -Т-клетки могут по существу не содержать $\alpha\beta$ -Т-клеток. Например,
 $\alpha\beta$ -Т-клетки могут быть истощены из популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, после

размножения с использованием подходящего способа, известного в данной области техники (например, путем отрицательной селекции, например, с использованием магнитных гранул). Способ лечения может включать: обеспечение образца (например, образца негемопоэтической ткани), полученного от донора; культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из образца, как описано в настоящей заявке, например, для получения размноженной популяции; и введение популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток реципиенту.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой имеющего рак пациента-человека (например, имеющего рак пациента-человека, проходящего лечение от солидной опухоли) или пациента, инфицированного вирусом (например, пациента, инфицированного ЦМВ или ВИЧ). В некоторых случаях пациент имеет солидную опухоль и/или проходит лечение от солидной опухоли. Поскольку тканевые резидентные V δ 1-Т-клетки в норме находятся в негемопоэтической ткани, они также с большей вероятностью будут возвращаться и поддерживаться в опухолевых массах по сравнению с их аналогами, которые являются резидентными клетками системного кровотока, и адоптивный перенос этих клеток, вероятно, будет более эффективным при нацеливании на солидные опухоли и потенциально другие иммунологические патологии, ассоциированные с негемопоэтической тканью.

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

$\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные способами, описанными в настоящей заявке, могут экспрессировать NKG2D и отвечать на лиганд NKG2D (например, MICA), который сильно ассоциирован со злокачественной трансформацией. Они также могут проявлять цитотоксический профиль экспрессии в отсутствие какой-либо активации и, таким образом, с большей вероятностью могут эффективно уничтожать опухолевые клетки. Например, $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные, как описано в настоящей заявке, могут экспрессировать один или более, предпочтительно все из IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, CCL4, IL-13, гранулизина, гранзима А и В и перфорины в отсутствие какой-либо активации. IL-17A может не экспрессироваться.

Согласно некоторым вариантам реализации способ лечения индивидуума, имеющего опухоль, может включать: обеспечение образца указанной опухоли, полученного от донора, культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из указанного образца, как описано

выше, и введение указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму, имеющему опухоль. Согласно дополнительному варианту реализации способ лечения индивидуума, имеющего опухоль в негемопозитической ткани, может включать; обеспечение образца указанной негемопозитической ткани, полученного от донора, культивирование $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из указанного образца, как описано выше, и; введение указанной популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму, имеющему опухоль.

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

Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективное количество $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-Т-клеток) составляет менее чем 10×10^{12} клеток в течение курса лечения (например, менее чем 9×10^{12} клеток, менее чем 8×10^{12} клеток, менее чем 7×10^{12} клеток, менее чем 6×10^{12} клеток, менее чем 5×10^{12} клеток, менее чем 4×10^{12} клеток, менее чем 3×10^{12} клеток, менее чем 2×10^{12}

клеток, менее чем 1×10^{12} клеток, менее чем 9×10^{11} клеток, менее чем 8×10^{11} клеток, менее чем 7×10^{11} клеток, менее чем 6×10^{11} клеток, менее чем 5×10^{11} клеток, менее чем 4×10^{11} клеток, менее чем 3×10^{11} клеток, менее чем 2×10^{11} клеток, менее чем 1×10^{11} клеток, менее чем 9×10^{10} клеток, менее чем $7,5 \times 10^{10}$ клеток, менее чем 5×10^{10} клеток, менее чем $2,5 \times 10^{10}$ клеток, менее чем 1×10^{10} клеток, менее чем $7,5 \times 10^9$ клеток, менее чем 5×10^9 клеток, менее чем $2,5 \times 10^9$ клеток, менее чем 1×10^9 клеток, менее чем $7,5 \times 10^8$ клеток, менее чем 5×10^8 клеток, менее чем $2,5 \times 10^8$ клеток, менее чем 1×10^8 клеток, менее чем $7,5 \times 10^7$ клеток, менее чем 5×10^7 клеток, менее чем $2,5 \times 10^7$ клеток, менее чем 1×10^7 клеток, менее чем $7,5 \times 10^6$ клеток, менее чем 5×10^6 клеток, менее чем $2,5 \times 10^6$ клеток, менее чем 1×10^6 клеток, менее чем $7,5 \times 10^5$ клеток, менее чем 5×10^5 клеток, менее чем $2,5 \times 10^5$ клеток или менее чем 1×10^5 клеток в течение курса лечения).

Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-Т-клеток), как описано в настоящей заявке, 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. Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-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. Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-Т-клеток) содержит приблизительно $1,1 \times 10^6$ - $1,8 \times 10^7$ клеток/кг. Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-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. Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-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. Согласно некоторым вариантам реализации доза $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-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.

Согласно одному варианту реализации субъекту вводят от 10^4 до 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток и/или V δ 1-Т-клеток) на кг массы тела указанного субъекта. Согласно одному варианту реализации субъекту осуществляют первоначальное введение популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, первоначальное введение от 10^4 до 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта, например, от 10^4 до 10^5 $\gamma\delta$ -Т-

клеток на кг массы тела указанного субъекта) и одно или более (например, 2, 3, 4 или 5) последующих введений $\gamma\delta$ -Т-клеток (например, одно или более последующих введений от 10^4 до 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта, например, от 10^4 до 10^5 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта). Согласно одному варианту реализации

5 одно или более последующих введений осуществляют менее чем через 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения, например, менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения. Согласно одному варианту реализации субъект получает в общей сложности приблизительно 10^6 $\gamma\delta$ -Т-клеток на кг массы тела указанного субъекта в течение курса по меньшей мере из трех введений

10 популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток, например, субъект получает первоначальную 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 менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

Согласно некоторым вариантам реализации субъекту можно вводить один или более

15 дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунотерапевтического агента, цитотоксического агента, ингибирующего рост агента, агента лучевой терапии, антиангиогенного агента или комбинации из двух или более указанных агентов. Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, до или после введения $\gamma\delta$ -Т-клеток. Дополнительный

20 терапевтический агент может представлять собой иммунотерапевтический агент, который может действовать на мишень в организме субъекта (например, собственной иммунной системы субъекта) и/или на перенесенные $\gamma\delta$ -Т-клетки.

Композиции можно вводить любым удобным способом. Композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить пациенту трансартериальным, подкожным,

25 внутрикожным, внутриопухолевым, интранодальным, интрамедуллярным, внутримышечным путем, с помощью внутривенной инъекции или внутрибрюшинно, например, путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции $\gamma\delta$ -Т-клеток можно вводить непосредственно в опухоль, лимфатический узел или очаг инфекции.

Генная инженерия

30 $\gamma\delta$ -Т-клетки, полученные с помощью способа согласно настоящему изобретению, также могут быть модифицированы с помощью генной инженерии для усиления терапевтических свойств, например, для терапии Т-клетками, содержащими химерный антигенный рецептор (CAR-T). Это включает получение сконструированных Т-клеточных рецепторов (TCR) для перепрограммирования Т-клетки для придания ей нового вида

специфичности, например, специфичности моноклонального антитела. Сконструированный TCR может обеспечить специфичность Т-клеток в отношении злокачественных клеток и, таким образом, сделать их применимыми для иммунотерапии рака. Например, Т-клетки могут распознавать раковые клетки, экспрессирующие

5 опухолевый антиген, такой как ассоциированный с опухолью антиген, который не экспрессируется нормальными соматическими клетками из ткани субъекта. Таким образом, CAR-модифицированные Т-клетки можно применять для адоптивной Т-клеточной терапии, например, у имеющих рак пациентов.

Другие варианты применения антител или их фрагментов

10 В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложено применение антитела к V δ 1 или его фрагмента, описанных в настоящей заявке, для исследования распознавания антигена, активации, передачи сигнала или функции $\gamma\delta$ -Т-клеток (в частности, V δ 1-Т-клеток). Как описано в настоящей заявке, было показано, что антитела являются активными в анализах, которые можно применять для изучения

15 функции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Такие антитела также можно применять для индукции пролиферации $\gamma\delta$ -Т-клеток, поэтому их можно применять в способах размножения $\gamma\delta$ -Т-клеток (таких как V δ 1-Т-клетки).

Антитела, которые связываются с V δ 1-цепью, можно применять для обнаружения $\gamma\delta$ -Т-клеток (т.е. в качестве метки). Предпочтительно антитела, используемые в качестве

20 метки, не будут стимулировать пролиферацию клеток так, что связывание антител не влияет на целевую V δ 1-Т-клетку. Например, антитело может быть мечено обнаруживаемой меткой или репортерной молекулой или использовано в качестве захватывающего лиганда для селективного обнаружения и/или выделения V δ 1-Т-клеток в образце. Меченые антитела находят применение во многих способах, известных в данной

25 области техники, например, иммуногистохимии и ИФА.

Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может представлять собой радиоизотоп, такой как H³, C¹⁴, P³², S³⁵ или I¹²⁵; флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как изотиоцианат флуоресцеина или родамин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, β -галактозидаза, пероксидаза хрена или

30 люцифераза. Флуоресцентные метки, нанесенные на антитела согласно настоящему изобретению, затем могут применяться в способах сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS).

Полинуклеотиды и векторы экспрессии

Также предложены полинуклеотиды, кодирующие антитело к V δ 1 или фрагменты согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации антитело к V δ 1 или фрагмент кодируется полинуклеотидом, который содержит или состоит из

5 последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-110. Согласно одному варианту реализации антитело к V δ 1 или фрагмент кодируется вектором экспрессии, который содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110. Согласно другому варианту

10 реализации антитело к V δ 1 или фрагмент кодируется вектором экспрессии, который содержит область VL из SEQ ID NO: 99-110. Согласно дополнительному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. Согласно дополнительному аспекту предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из

15 последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-110. Согласно одному варианту реализации вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110. Согласно другому варианту реализации вектор экспрессии содержит область VL из SEQ

20 ID NO: 99-110. Согласно дополнительному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-110. Согласно дополнительному аспекту предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%,

25 например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. Согласно одному варианту реализации вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. Согласно другому варианту реализации указанный вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. Согласно дополнительному

30 варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101 или 105-108. Согласно дополнительному аспекту предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%,

например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 99-101. Согласно одному варианту реализации вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-101. Согласно другому варианту реализации вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-101. Согласно дополнительному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из SEQ ID NO: 99-101. Согласно дополнительному аспекту предложена кДНК, содержащая указанный полинуклеотид.

Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует CDR1, CDR2 и/или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-110, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту реализации полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101 или 105-108, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина. Согласно одному варианту реализации

полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей по меньшей мере 70%, например, по меньшей мере 80%, например, по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, например, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из частей SEQ ID NO: 99-101, которая кодирует FR1, FR2, FR3 и/или FR4

5 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

Полинуклеотиды и векторы экспрессии согласно настоящему изобретению также могут быть описаны со ссылкой на кодируемую аминокислотную последовательность. Таким образом, согласно одному варианту реализации, полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность любой

10 из SEQ ID NO: 62-85. Согласно одному варианту реализации вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 62-73. Согласно другому варианту реализации вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-85.

15 Для экспрессии антител или их фрагментов полинуклеотиды, кодирующие неполные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, как описано в настоящей заявке, встраивают в векторы экспрессии таким образом, что гены функционально связаны с транскрипционными и трансляционными контрольными последовательностями. Таким образом, согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен вектор экспрессии,

20 содержащий полинуклеотидную последовательность, определенную в настоящей заявке. Согласно одному варианту реализации вектор экспрессии содержит область VH из SEQ ID NO: 99-110, такой как SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108. Согласно другому варианту реализации вектор экспрессии содержит область VL из SEQ ID NO: 99-110, такой как SEQ ID NO: 99, 100, 101, 105, 106, 107 или 108.

25 Следует понимать, что нуклеотидные последовательности, описанные в настоящей заявке, содержат дополнительные последовательности, кодирующие аминокислотные остатки для облегчения трансляции, очистки и обнаружения, однако в зависимости от используемой системы экспрессии могут применяться альтернативные последовательности. Например, девять первоначальных (5'-концевых) нуклеотидов из

30 SEQ ID NO: 99-110 и 36 конечных (3'-концевых) нуклеотидов из SEQ ID NO: 99-100, 102-103, 105-110 или 39 конечных (3'-концевых) нуклеотидов из SEQ ID NO: 101 и 104 представляют собой необязательные последовательности. Эти необязательные последовательности могут быть удалены, модифицированы или заменены, если приняты альтернативные стратегии конструирования, трансляции, очистки или обнаружения.

В ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, могут быть внесены мутации, которые являются молчащими в отношении аминокислотной последовательности полипептида, но которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине. Известны предпочтительные кодоны для трансляции нуклеиновой кислоты, например, в *E. coli* и *S. cerevisiae*, а также у млекопитающих, в частности, человека.

Мутация полипептидов может быть достигнута, например, путем замен, добавлений или делеций в нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид. Замены, добавления или делеции могут быть введены в нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, многими способами, включая, например, подверженную ошибкам ПЦР, перестановку, олигонуклеотид-направленный мутагенез, ПЦР-сборку, ПЦР-мутагенез, мутагенез *in vivo*, каскадный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфический мутагенез, повторную сборку генов, искусственный синтез генов, насыщающий мутагенез участка гена (GSSM), синтетическую повторную сборку лигированием (SLR) или комбинацию этих способов. Модификации, добавления или делеции могут быть введены в нуклеиновую кислоту с помощью способа, включающего рекомбинацию, рекурсивную рекомбинацию последовательности, мутагенез фосфотиоат-модифицированной ДНК, мутагенез урацил-содержащей матрицы, мутагенез с применением дуплексной ДНК с разрывом, мутагенез на основе дефекта репарации точечного несоответствия, мутагенез в штамме-хозяине с дефектом репарации, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез путем рестрикции-селекции, мутагенез путем рестрикции-очистки, множественный мутагенез, создание мультимера химерной нуклеиновой кислоты или их комбинацию.

В частности, можно использовать искусственный синтез генов. Ген, кодирующий полипептид согласно настоящему изобретению, может быть получен синтетически, например, с помощью твердофазного синтеза ДНК. Целые гены могут быть синтезированы *de novo* без потребности в матричной ДНК-предшественнике. Для получения целевого олигонуклеотида строительные блоки последовательно соединяют с растущей олигонуклеотидной цепью в порядке, требуемом на основании последовательности продукта. После завершения сборки цепи продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, снимаются защиту и собирают. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с получением целевых олигонуклеотидов высокой чистоты.

Векторы экспрессии включают, например, плазмиды, ретровирусы, космиды, дрожжевые искусственные хромосомы (YAC) и эписомы, происходящие из вируса Эпштейна-Барр (EBV). Полинуклеотид лигируют в вектор таким образом, что транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности в векторе

5 выполняют свою предусмотренную функцию регулирования транскрипции и трансляции полинуклеотида. Экспрессионные и/или контрольные последовательности могут включать промоторы, энхансеры, терминаторы транскрипции, стартовый кодон (т.е. ATG), расположенный в 5'-направлении от кодирующей последовательности, сигналы сплайсинга для интронов и стоп-кодона. Вектор экспрессии и последовательности

10 контроля экспрессии выбирают так, чтобы они были совместимы с клеткой-хозяином, используемой для экспрессии. SEQ ID NO: 99-110 содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие одноцепочечные вариабельные фрагменты согласно настоящему изобретению, содержащие область VH и область VL, соединенные синтетическим линкером (например, кодируется SEQ ID NO: 98). Следует понимать, что

15 полинуклеотиды или векторы экспрессии согласно настоящему изобретению могут содержать область VH, область VL или и то, и другое (необязательно включая линкер). Таким образом, полинуклеотиды, кодирующие области VH и VL, могут быть вставлены в отдельные векторы, альтернативно, последовательности, кодирующие обе области, вставляют в один и тот же вектор экспрессии. Полинуклеотид(ы) вставляют в вектор

20 экспрессии стандартными способами (например, лигированием комплементарных сайтов рестрикции на полинуклеотиде и векторе или лигированием тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют).

Удобный вектор представляет собой вектор, кодирующий функционально полную последовательность СН или CL иммуноглобулина человека, с соответствующими сайтами

25 рестрикции, сконструированными таким образом, что любая последовательность VH или VL может быть легко вставлена и экспрессирована, как описано в настоящей заявке. Вектор экспрессии также может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию антитела (или его фрагмента) из клетки-хозяина. Полинуклеотид может быть клонирован в вектор таким образом, что сигнальный пептид связан в рамке считывания с

30 аминоконцом антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из неиммуноглобулинового белка).

Клетка-хозяин может содержать первый вектор, кодирующий легкую цепь антитела или его фрагмента, и второй вектор, кодирующий тяжелую цепь антитела или его

фрагмента. В качестве альтернативы, тяжелая и легкая цепи обе закодированы на одном и том же векторе экспрессии, введенном в клетку-хозяина. Согласно одному варианту реализации полинуклеотид или вектор экспрессии кодирует мембранный якорь или трансмембранный домен, слитый с антителом или его фрагментом, причем указанное

5 антитело или его фрагмент присутствует на внеклеточной поверхности клетки-хозяина.

Трансформацию можно выполнять любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области техники и включают декстран-опосредуемую трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, полибрен-

10 опосредуемую трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, инкапсуляцию полинуклеотида(ов) в липосомы, биолистическую инъекцию и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов.

Линии клеток млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо

15 известны в данной области техники и включают множество иммортализованных линий клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают, в частности, клетки яичника китайского хомяка (CHO), NSO, клетки SP2, клетки HeLa, клетки почки новорожденного хомяка (BHK), клетки почки обезьяны (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), клетки A549, клетки 3T3 и

20 ряд других линий клеток. Клетки-хозяева млекопитающих включают клетки человека, мыши, крысы, собаки, обезьяны, свиньи, козы, быка, лошади и хомяка. Особенно предпочтительные линии клеток выбирают путем определения того, какие линии клеток имеют высокие уровни экспрессии. Другие линии клеток, которые могут быть использованы, представляют собой линии клеток насекомых, такие как клетки Sf9, клетки

25 амфибий, бактериальные клетки, клетки растений и клетки грибов. Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты scFv и Fv, могут быть выделены и экспрессированы в *E. coli* с использованием методов, известных в данной области техники.

Антитела продуцируются путем культивирования клеток-хозяев в течение периода

30 времени, достаточного для обеспечения экспрессии антитела в клетках-хозяевах или, более предпочтительно, секретиции антитела в культуральную среду, в которой растут клетки-хозяева. Антитела могут быть выделены из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белков.

Антитела (или фрагменты) согласно настоящему изобретению могут быть получены и подвергнуты манипуляциям с использованием методик, раскрытых, например, в Green and Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2012) 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

5 Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридной технологии путем слияния специфической В-клетки, продуцирующей антитело, с клеткой миеломы (В-клеточный рак), которая выбрана на основании ее способности расти в

10 тканевой культуре и на основании отсутствия синтеза цепей антитела.
Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, может быть получено, например, путем:

- а) иммортализации лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, с использованием
- 15 иммортализованной клетки и предпочтительно клеток миеломы, чтобы получить гибридому,
- б) культивирования полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделения клеток, продуцирующих антитела, обладающие целевой специфичностью.

В качестве альтернативы, применение гибридной клетки не требуется. Антитела, способные связываться с целевыми антигенами, как описано в настоящей заявке, могут быть выделены из подходящей библиотеки антител с помощью обычной практики,

20 например, с использованием технологии фагового дисплея, дрожжевого дисплея, рибосомного дисплея или дисплея млекопитающих, известной в данной области техники. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью способа, включающего следующие этапы:

- а) клонирование в векторы, в частности, в фаги и, более конкретно,
- 25 нитевидные бактериофаги, последовательностей ДНК или кДНК, полученных из лимфоцитов, в частности, лимфоцитов периферической крови животного (подходящим образом ранее иммунизированного определенными антигенами),
- б) трансформацию прокариотических клеток векторами, указанными выше, в условиях, обеспечивающих продукцию антител,
- 30 в) отбор антител, подвергая их антиген-аффинному отбору,
- д) выделение антител, обладающих целевой специфичностью.

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

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут понятны из описания, представленного в настоящей заявке. Однако следует понимать, что описание изобретения и конкретные примеры, хотя в них и описаны предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения, приведены исключительно в целях иллюстрации, так как разные изменения и модификации будут понятны специалистам в данной области техники. Настоящее изобретение будет далее описано с использованием следующих неограничивающих примеров:

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. Материалы и методы

Обнаружение антител человека

Фаговый дисплей человека применяли для получения антител к вариабельному домену $V\delta 1^+$ человека, как описано в настоящей заявке. Библиотеку конструировали, как описано в Schofield et al (*Genome biology* 2007, **8**(11): R254), она содержала библиотеку, экспонирующую одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), из ~40 миллиардов человеческих клонов. Эту библиотеку подвергали скринингу с использованием антигенов, способов, стратегий отбора, отмены отбора, скрининга и характеристики, описанных в настоящей заявке.

Приготовление антигена

Конструкцию растворимых гетеродимеров $\gamma\delta$ -TCR, содержащих константные области TCR α и TCR β , используемых в приведенных ниже Примерах, получали в соответствии с Xu *et al.* (2011) *PNAS* 108: 2414-2419. Домены $V\gamma$ или $V\delta$ сливали в рамке считывания с константной областью TCR α или TCR β , не содержащей трансмембранного домена, за которой следовала последовательность лейциновой молнии или последовательность Fc и гистидиновая метка/линкер.

Конструкцию для экспрессии временно трансфицировали в суспензию клеток млекопитающих EXPI НЕК293 (либо по отдельности, либо путем совместной трансфекции для гетеродимера). Секретированные рекомбинантные белки выделяли и очищали из культурального супернатанта с помощью аффинной хроматографии. Для обеспечения хорошего выделения мономера антигена образцы дополнительно очищали с использованием препаративной эксклюзионной хроматографии (SEC). Чистоту очищенных антигенов анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а состояние агрегации анализировали с помощью аналитической SEC.

Функциональная валидация антигена

Специфичность антигенов, содержащих варибельную область 1 дельта-цепи (V δ 1), подтверждали в иммуноанализе DELFIA (Perkin Elmer) и в анализе методом проточной цитометрии при конкуренции с $\gamma\delta$ -Т-клетками с использованием антитела к V δ 1 REA173-

5 Miltenyi Biotec.

Усиленный диссоциацией лантанидный флуоресцентный иммуноанализ (DELFLIA)

Для подтверждения специфичности антигена выполняли иммуноанализ DELFLIA с антигеном, нанесенным непосредственно на планшет (3 мкг/мл антигена в 50 мкл ФСБ при 4 °C в течение ночи (Nunc, № по каталогу 437111), и последовательным разведением первичных антител, начиная с 300 нМ. Для обнаружения в качестве вторичного антитела использовали DELFLIA Eu-N1 против IgG человека (Perkin Elmer, № по каталогу 1244-330) в разведении 1/500 в 50 мкл 3% МФСБ (ФСБ + 3% (масс./об.) сухого обезжиренного молока). Окрашивание проявляли с использованием 50 мкл раствора для усиления DELFLIA (Perkin Elmer, № по каталогу 4001-0010).

15 Ранжирование по аффинности представляющего интерес антитела выполняли с использованием иммуноанализа DELFLIA, в котором антитела захватывали с помощью белка G, нанесенного на планшет, и добавляли растворимый биотинилированный антиген L1 (DV1-GV4) при 5 нМ в 50 мкл (3МФСБ). Для обнаружения использовали 50 мкл стрептавидина-Eu (1:500 в буфере для анализа, Perkin Elmer), и сигнал проявляли с
20 использованием раствора для усиления DELFLIA. В качестве отрицательного контроля использовали D1.3 hIgG1 (описанный в England *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162: 2129-2136).

Продукты отборов фагового дисплея субклонировали в вектор экспрессии scFv pSANG10 (Martin *et al.* (2006) *BMC Biotechnol.* 6: 46). Растворимые scFv экспрессировали и подвергали скринингу на связывание в DELFLIA на непосредственно иммобилизованных
25 мишенях. Попадания определяли как сигнал DELFLIA выше 3000 единиц флуоресценции.

Приготовление антител

Отобранные scFv субклонировали в каркасы IgG1 с использованием коммерчески доступных плазмид. Суспензию клеток exрi293F трансфицировали указанными плазмидами для экспрессии антител. Для удобства, если не указано иное, антитела,
30 охарактеризованные в этих Примерах, относятся к IgG1-форматированным антителам, отобранным из фагового дисплея как scFv. Однако антитела согласно настоящему изобретению могут быть в любом формате антител, как обсуждалось ранее.

Очистка антител

Антитела IgG очищали партиями от супернатантов с использованием хроматографии на белке А. Концентрированные элюаты с белка А затем очищали с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC). Качество очищенного IgG анализировали с использованием ИФА, электрофореза в ДСН-ПААГ и эксклюзионной хроматографии-ВЭЖХ (SEC-HPLC).

Приготовление $\gamma\delta$ -Т-клеток

Популяции обогащенных $\gamma\delta$ -Т-клеток готовили в соответствии со способами, описанными в WO2016/198480 (т.е. происходящие из крови $\gamma\delta$ -Т-клетки) или WO2020/095059 (т.е. происходящие из кожи $\gamma\delta$ -Т-клетки). В общих чертах, для происходящих из крови $\gamma\delta$ -Т-клеток МКПК получали из крови и подвергали магнитному истощению $\alpha\beta$ -Т-клеток. Затем $\alpha\beta$ -истощенные МКПК культивировали в среде CTS OpTmiser (ThermoFisher) в присутствии ОКТ-3 (или соответствующего антитела к V δ 1), IL-4, IFN- γ , IL-21 и IL-1 β в течение 7 дней. В день 7 культивирования среду дополняли ОКТ-3 (или соответствующим антителом к V δ 1), IL-21 и IL-15 в течение следующих 4 дней. В день 11 культивирования среду дополняли ОКТ-3 (или соответствующим антителом к V δ 1) и IL-15 в течение следующих 3 дней. В день 14 культивирования половину среды заменяли свежей полной средой OpTmiser и дополняли ОКТ-3 (или соответствующим антителом к V δ 1), IL-15 и IFN- γ . Со дня 17 культивирования и далее культуру дополняли ОКТ-3 (или соответствующим антителом к V δ 1) и IL-15 каждые 3-4 дня; половину среды заменяли свежей средой каждые 7 дней.

Для происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток образцы кожи готовили путем удаления подкожного жира и использовали 3 мм пункционную биопсию для выполнения нескольких пункций. Пункции помещали на решетки углеродной матрицы и помещали в лунку G-REX6 (Wilson Wolf). Каждую лунку заполняли полной средой для выделения, содержащей среду AIM-V (Gibco, Life Technologies), заменитель сыворотки для иммунных клеток CTST[™] (Life Technologies), IL-2 и IL-15. В течение первых 7 дней культивирования использовали полную среду для выделения, содержащую амфотерицин В (Life Technologies) («+AMP»). Среду меняли каждые 7 дней, осторожно отбирая верхний слой среды и заменяя ее 2х полной средой для выделения (без AMP), стараясь не повредить клетки на дне планшета или биореактора. После трех недель культивирования полученные вышедшие клетки затем пассировали в свежие сосуды для культивирования тканей и свежую среду (например, среду AIM-V или среду TexMAX (Miltenyi)) с добавлением рекомбинантного IL-2, IL-4, IL-15 и IL-21 перед сбором. Необязательно $\alpha\beta$ -

Т-клетки, также присутствующие в культуре, затем удаляют с помощью наборов для истощения $\alpha\beta$ -Т-клеток и связанных с ними протоколов, таких как те, которые предоставлены Miltenyi. Для получения дополнительной информации см. WO2020/095059.

Анализ связывания $\gamma\delta$ -Т-клеток

- 5 Связывание антител с $\gamma\delta$ -Т-клетками тестировали путем инкубации фиксированной концентрации очищенных антител с 250000 $\gamma\delta$ -Т-клеток. Эту инкубацию выполняли в условиях блокирования для предотвращения неспецифического связывания антител за счет Fc-рецептора. Обнаружение выполняли путем добавления вторичного, конъюгированного с флуоресцентным красителем антитела к IgG1 человека. Для отрицательных контролей клетки готовили а) только с изотипическим антителом (рекомбинантным IgG человека), б) только с конъюгированным с флуоресцентным красителем антителом к IgG человека и с) с комбинацией а) и б). Также приготовили и проанализировали контрольную лунку с полностью неокрашенными клетками. В качестве положительных контролей использовали очищенное мышинное моноклональное антитело 15 IgG2 к CD3 человека и очищенное мышинное моноклональное антитело IgG1 к V δ 1-TCR человека в двух различных концентрациях и окрашивали конъюгированным с флуоресцентным красителем вторичным козым антителом к Ig мыши. Анализ принимали, если средняя интенсивность флуоресценции в канале FITC у положительных контролей с более низкой концентрацией была по меньшей мере в десять раз выше, чем у 20 самых высоких отрицательных контролей.

Анализ методом SPR

- Для выполнения анализа методом SPR использовали прибор MASS-2 с аминным чипом высокой емкости (оба от Sierra Sensors, Германия). 15 нМ IgG захватывали за счет белка G на аминный чип высокой емкости (100 нМ для TS8.2). Антиген L1 (DV1-GV4) 25 пропускали над ячейкой в ряде разведений 1:2 от 2000 нМ до 15,625 нМ со следующими параметрами: ассоциация 180 с, диссоциация 600 с, скорость потока 30 мкл/мин, рабочий буфер ФСБ + 0,02% Tween 20. Все эксперименты выполняли при комнатной температуре на приборе MASS-2. Аппроксимацию в равновесном состоянии определяли в соответствии с моделью связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Sierra Analyzer 3.2. 30

Антитела, используемые для сравнения

Антитела сравнивали с коммерчески доступными антителами в тестовых анализах, как описано.

Антитело	Источник	№ по
----------	----------	------

		каталогу
Очищенное антитело к CD3 человека Ultra-LEAF™ (ОКТ3), функциональное	Biolegend	317326
Очищенное антитело к IgG2a человека Ultra-LEAF™ (изотипический контроль для ОКТ3)	Biolegend	400264
Очищенное МАТ к Vδ1-TCR человека (функциональное TS8.2)	ThermoFisher	TCR1730
Очищенный мышинный IgG1 Ultra-LEAF™, антитело для контроля изотипа к для TS8.2	Biolegend	400166
Антитело к CD107a человека BV421 (клон H4A3)	BD Biosciences	562623
Мышинный IgG1 BV421, клон X40 для контроля изотипа к (RUO)	BD Biosciences	562438
Анти-TCR Vδ1-PE-Vio770, человеческое (цитометрия, выпуск прекращен)	Miltenyi	130-100-540

Анализ отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR и дегрануляции

Клетки-мишени THP-1 (TIB-202™, ATCC), загруженные тестируемыми антителами или не загруженные ими, метили CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) и инкубировали с $\gamma\delta$ -Т-клетками в соотношении 2:1 в присутствии антитела к CD107a (антитело к CD107a человека BV421 (клон H4A3) BD Biosciences 562623). Через 2 часа инкубации поверхностную экспрессию $\gamma\delta$ -TCR (для измерения отрицательной регуляции TCR) и экспрессию CD107a (для измерения дегрануляции) на $\gamma\delta$ Т-клетках оценивали с помощью проточной цитометрии.

Анализ цитолитической активности

Цитолитическую активность гамма-дельта-Т-клеток и эффект тестируемых антител на цитолитическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии. После 4 часов совместного культивирования *in vitro* при соотношении 20:1 $\gamma\delta$ -Т-клетки и CellTracker™ Orange CMTMR (ThermoFisher, C2927) меченые клетки THP-1 (загруженные антителом или не загруженные им) окрашивали красителем для определения жизнеспособности eFluor™ 520 (ThermoFisher, 520 65-0867-14), чтобы отличить живые и мертвые клетки-мишени THP-1. Во время регистрации образцов клетки-мишени гейтировали по положительному сигналу CellTracker™ Orange CMTMR и исследовали гибель клеток на основе поглощения красителя для определения жизнеспособности. Двойные положительные клетки по CMTMR и eFluor™ 520 были признаны мертвыми

клетками-мишенями. Цитолитическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток представляли как % мертвых клеток-мишеней.

Картирование эпитопов

5 Все образцы белка (антиген L1 (DV1-GV4) и антитела 1245_P01_E07, 1245_P02_G04, 1252_P01_C08, 1251_P02_C05 и 1141_P01_E01), используемые для картирования эпитопов, анализировали на целостность белка и уровень агрегации с использованием MALDI для высокомолекулярных объектов.

10 Для определения эпитопа комплексов L1(DV1-GV4)/1245_P01_E07, L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04, L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08, L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05 и L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 с высоким разрешением белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментному протеолизу с использованием трипсина, химо tripsина, Asp-N, эластазы и термолизина. После обогащения сшитых пептидов образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-LTQ-Orbitrap MS), а полученные данные
15 анализировали с использованием программного обеспечения XQuest и Stavrox.

Анализ цитолитической активности методом проточной цитометрии с использованием SYTOX

Анализ с использованием SYTOX позволяет количественно оценить цитолиз клеток-мишеней, опосредуемый Т-клетками, с использованием проточной цитометрии.
20 Мертвые/умирающие клетки обнаруживают по окраске мертвых клеток (SYTOX[®] AADvanced[™], Life Technologies, S10274), которая проникает только в клетки с нарушенными плазматическими мембранами, но не может пересекать интактные клеточные мембраны здоровых клеток. Клетки-мишени NALM-6 метили красителем CTV (Cell Trace Violet[™], Life Technologies, C34557), и, таким образом, их можно было
25 отличить от немеченых эффекторных Т-клеток. Мертвые/умирающие клетки-мишени идентифицируют на основании двойного окрашивания красителем мертвых клеток и красителем остатков клеток.

Через 16 часов совместного культивирования *in vitro* эффекторных и CTV-меченых клеток-мишеней в указанных соотношениях эффектор-мишень (Е:Т, 1:1 или 10:1) клетки
30 окрашивали SYTOX[®] AADvanced[™] и регистрировали на FACSLytic[™] (BD). Результаты по цитолитической активности представлены как % снижения количества клеток-мишеней, который рассчитывается с учетом количества живых клеток-мишеней (количество в образце) в тестируемых образцах, деленного на количество живых клеток-

мишеней в контрольных лунках без добавленных эффекторных клеток (максимальное количество):

$$\% \text{ снижения количества клеток – мишеней} = 100 - \left(\frac{\text{количество в образце}}{\text{максимальное количество}} \right) \times 100$$

ПРИМЕР 2. Конструкция антигена

5 Гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-клетки являются поликлональными с поликлональностью CDR3. Чтобы избежать ситуации, когда полученные антитела будут отобраны против последовательности CDR3 (поскольку последовательность CDR3 будет отличаться у разных клонов TCR), конструкция антигена включала сохранение одинаковой последовательности CDR3 в различных форматах. Дизайн был направлен на получение
10 антител, распознающих последовательность в пределах вариабельного домена, которая кодируется зародышевой линией и, следовательно, одинакова во всех клонах, что обеспечивает антитела, распознающие более широкую субпопуляцию $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Другим важным аспектом способа приготовления антигена была разработка антигенов, которые подходят для экспрессии в виде белка. $\gamma\delta$ -TCR представляет собой
15 сложный белок, содержащий гетеродимер с межцепочечными и внутрицепочечными дисульфидными связями. Для получения растворимых антигенов TCR для использования в отборах фагового дисплея использовали формат лейциновой молнии (LZ) и формат Fc. Оба формата LZ и Fc хорошо экспрессировались и успешно экспонировали TCR (в частности, гетеродимерные TCR, например, V δ 1V γ 4).

20 Было обнаружено, что последовательность CDR3 из записи в общедоступной базе данных для $\gamma\delta$ -TCR экспрессируется также хорошо, как и белки (записи RCSB Protein Data Bank: 3OMZ). Таким образом, она была выбрана для приготовления антигена.

Антигены, содержащие вариабельную область 1 дельта-цепи, экспрессировали в форматах LZ в виде гетеродимера (т. е. в комбинации с различными вариабельными
25 гамма-цепями – «L1», «L2», «L3») и в формате Fc либо в виде гетеродимера («F1», «F2», «F3»), либо в виде гомодимера (т. е. в комбинации с другой вариабельной областью 1 дельта-цепи – «Fc1/1»). Все вариабельные области 1 дельта-цепи антигенов содержали CDR3 3OMZ. Конструировали еще одну серию антигенов $\gamma\delta$ -TCR с использованием сходных форматов, содержащих различные вариабельные области дельта-цепи (такие как
30 вариабельная область 2 дельта-цепи и вариабельная область 3 дельта-цепи) и применяемых для отмены отбора антител с неспецифическим или нецелевым связыванием («L4», «F9», «Fc4/4», «Fc8/8»). Эти антигены также были сконструированы таким образом, чтобы включать CDR3 3OMZ, чтобы обеспечить отмену отбора антител, связывающихся в участке CDR3.

Функциональную валидацию антигена выполняли для подтверждения того, что сконструированные антигены будут пригодны для получения антител к TRDV1 (вариабельная область 1 дельта-цепи TCR). Обнаружение наблюдали только для антигенов, содержащих домен $\delta 1$ (Фигура 1).

5 ПРИМЕР 3. Фаговый дисплей

Отборы фагового дисплея выполняли против библиотек scFv человека с использованием любого формата гетеродимерного LZ TCR в раунде 1 и 2, с отменами отбора на гетеродимерном LZ TCR в обоих раундах. Или раунд 1 выполняли с использованием гомодимерного Fc-слитого TCR с отменой отбора на Fc IgG1 человека с последующим раундом 2 на гетеродимерном LZ TCR с отменой отбора на гетеродимерном LZ TCR (см. Таблицу 1).

Таблица 1. Обзор отборов фагового дисплея

Мишень	Отбор раунда 1	Отмена отбора раунда 1	Отбор раунда 2	Отмена отбора раунда 2
DV1	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)	bt-L3 (DV1-GV8)	L4 (DV2-GV4)
DV1	bt-Fc1/1 (DV1-DV1)	Fc	bt-L1 (DV1-GV4)	L4 (DV2-GV4)

bt = биотин.

Отборы выполняли в жидкой фазе с использованием 100 нМ биотинилированных белков. Отмены отбора выполняли с использованием 1 мкМ небитинилированных белков.

Успех отборов фагового дисплея анализировали с помощью поликлонального фагового ИФА (DELFIА). Все продукты отбора DV1 показали целевое связывание с мишенями Fc 1/1, L1, L2, L3, F1 и F3. Обнаружили различные степени связывания с нецелевыми L4, F9, Fc 4/4, Fc 8/8 и Fc (см. Фигуру 2А и В).

ПРИМЕР 4. Отбор антител

Попадания, полученные в Примере 3, секвенировали (с использованием стандартных методов, известных в данной области техники). Идентифицировали 130 уникальных клонов, которые показали уникальную комбинацию CDR3 VH и VL. Из этих 130 уникальных клонов 125 показали уникальный CDR3 VH и 109 показали уникальный CDR3 VL.

Уникальные клоны повторно группировали, и специфичность анализировали с помощью ИФА (DELFIА). В результате отборов выявили панель из 94 уникальных

связывающих агентов scFv человека, которые связывают TRDV1 (L1, L2, L3, F1, F2, F3), но не TRDV2 (L4).

- 5 Для облегчения отбора клонов в будущем включили ранжирование по аффинности отобранных связывающих агентов. Большое количество связывающих агентов показали аффинность в наномолярном диапазоне, реагируя с 25-100 нМ биотинилированного антигена. Несколько связывающих агентов показали сильную реакцию с 5 нМ антигена, указывающую на возможную аффинность в наномолярном диапазоне, выраженном однозначным числом. Некоторые связывающие агенты не показали реакции со 100 нМ антигена, что указывает на аффинность в микромолярном диапазоне.
- 10 Чтобы продолжить отбор клонов с превращением в IgG, требовалось включить как можно больше зародышевых линий и как можно больше различных CDR3. Кроме того, были исключены обязательства по последовательности, такие как гликозилирование, сайты связывания интегрина, сайты связывания CD11c/CD18, непарные цистеины. Кроме того, было включено множество значений аффинности.
- 15 Отобранные клоны подвергали скринингу на связывание с природными, экспрессируемыми на клеточной поверхности $\gamma\delta$ -TCR с использованием происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных от различных доноров. Клоны, отобранные для превращения в IgG, показаны в **Таблице 2**.

Таблица 2. Связывающие агенты DV1 для превращения в IgG

Идентификатор клона	CDR1 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR2 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR3 тяжелой цепи	SE Q ID NO .	CDR1 легкой цепи	SE Q ID NO .	CDR2 легкой цепи	SEQ	CDR3 легкой цепи	SE Q ID NO .	100 нМ L1
1245_P01_E07	GFTFSDYY	38	ISSSGSTI	26	VDYADAFDI	2	QSIGTY	50	VAS	A1	QQSYSTLLT	14	162591
1252_P01_C08	GFTVSSNY	39	IYSGGST	27	PIELGAFDI	3	NIGSQS	51	YDS	A2	QVWDSSSDHVV	15	1977
1245_P02_G04	GDSVSSKSAA	40	TYYRSKWST	28	TWSGYVDV	4	QDINDW	52	DAS	A3	QQSYSTPQVT	16	5896
1245_P01_B07	GFTFSDYY	41	ISSSGSTI	29	ENYLNAFDI	5	QSLSNY	53	AAS	A4	QQSYSTPLT	17	64271
1251_P02_C05	GFTFSSYA	42	ISGGGGTT	30	DSGVAFDI	6	QNIRTW	54	DAS	A5	QQFKRYPPT	18	65269
1141_P01_E01	GYSFTSYW	43	IYPGDSDT	31	HQVDTRTADY	7	RSDVGGYNY	55	EVS	A6	SSYTSTSTLV	19	136780
1139_P01_E04	GDSVSSNSAA	44	TYYRSKWYN	32	SWNDAFDI	8	QSISTW	56	DAS	A7	QQSYSTPLT	20	23786
1245_P02_F07	GDSVSSNSAA	45	TYYRSKWYN	33	DYYYSMDV	9	QSISSW	57	DAS	A8	QQSHSHPPT	21	10450
1245_P01_G06	GFTFSDYY	46	ISSSGSTI	34	HSWNDAFDV	10	QSISSY	58	AAS	A9	QQSYSTPDT	22	22474
1245_P01_G09	GDSVSSNSAA	47	TYYGSKWYN	35	DYYYSMDV	11	QSISTW	59	DAS	A10	QQSYSTPVT	23	18430
1138_P01_B09	GFTFSDYY	48	ISSSGSTI	36	HSWSDAFDI	12	QDISNY	60	DAS	A11	QQSYSTPLT	24	29193
1251_P02_G10	GFTFSDYY	49	ISSSGSTI	37	HSWNDAFDI	13	QSISSH	61	AAS	A12	QQSYSTLLT	25	17053

ПРИМЕР 5: Анализ антител методом SPR

Приготовленные антитела IgG анализировали на связывание с $\gamma\delta$ -клетками, и 5 лучших связывающих агентов отбирали для дальнейшей функциональной и биофизической характеристики. Для определения равновесных констант диссоциации (K_D) выполняли анализ методом SPR. Сенсограммы взаимодействия тестируемого антитела с анализируемым веществом, а также аппроксимации в равновесном состоянии (при наличии) представлены на **Фигуре 3**. Связывание TS8.2 не было обнаружено, при этом на чипе было захвачено 80 RU IgG. Результаты обобщены в **Таблице 3**.

Таблица 3. Результаты захвата IgG

Анализируемое вещество	Идентификатор клона	K_D (нМ)	K_D (М)
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_E07	12,4	$1,24 \times 10^{-8}$
L1 (DV1-GV4)	1252_P01_C08	100	$1,00 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_G04	126	$1,26 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_B07	341	$3,41 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_C05	1967*	$1,97 \times 10^{-6}$
L1 (DV1-GV4)	1139_P01_E04	251	$2,51 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1245_P02_F07	193	$1,93 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G06	264	$2,64 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1245_P01_G09	208	$2,08 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1138_P01_B09	290	$2,90 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	1251_P02_G10	829	$8,29 \times 10^{-7}$
L1 (DV1-GV4)	TS8.2 (коммерческое антитело к $V\delta 1$)	44	$4,40 \times 10^{-8}$

10 *Связывание 1252_P02_C05 не достигло насыщения, поэтому данные были экстраполированы

ПРИМЕР 6: Анализ задеирования TCR

Авторы настоящего изобретения разработали несколько анализов для использования для функциональной характеристики отобранных антител. Первый анализ оценивал задеирование $\gamma\delta$ -TCR путем измерения отрицательной регуляции $\gamma\delta$ -TCR при связывании антител. Отобранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к $V\delta 1$, которые использовали в качестве положительных контролей, или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). Коммерческое антитело к общей популяции $\gamma\delta$ -клеток использовали в качестве отрицательного контроля, поскольку оно представляет собой

15

20

антитело к общей популяции $\gamma\delta$ -клеток, распознающее все $\gamma\delta$ -Т-клетки независимо от вариабельной цепи, и поэтому, вероятно, имеет другой способ действия.

Анализ выполняли с использованием происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из трех различных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на **Фигуре 4**. Значения ЭК₅₀ обобщены в **Таблице 4** ниже.

ПРИМЕР 7: Анализ дегрануляции Т-клеток

Второй анализ оценивал дегрануляцию $\gamma\delta$ -Т-клеток. Считается, что $\gamma\delta$ -Т-клетки могут опосредовать уничтожение клеток-мишеней путем опосредуемой перфорином-гранзимом активации апоптоза. Литические гранулы в цитоплазме $\gamma\delta$ -Т-клетки могут высвободиться в направлении клетки-мишени при активации Т-клетки. Таким образом, мечение клеток-мишеней антителами к CD107a и измерение экспрессии с помощью проточной цитометрии может быть использовано для идентификации дегранулирующих $\gamma\delta$ -Т-клеток.

Как и в **Примере 6**, отобранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к V δ 1 в качестве положительных контролей или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09). Антитела IgG2a, IgG1 и D1.3 использовали в качестве отрицательных контролей. Анализ выполняли с использованием происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных из трех различных донорских образцов (образцы с чистотой 94%, 80% и 57%). Результаты показаны на **Фигуре 5**. Значения ЭК₅₀ обобщены в **Таблице 4** ниже.

ПРИМЕР 8: Анализ цитолитической активности

Третий анализ оценивал способность $\gamma\delta$ -Т-клеток, активированных отобранными антителами, уничтожать клетки-мишени.

Как и в **Примере 6**, отобранные антитела тестировали против коммерческих антител к CD3 и к V δ 1 в качестве положительных контролей или против 1252_P01_C08 в качестве положительного контроля (для 1139_P01_E04, 1245_P02_F07, 1245_P01_G06 и 1245_P01_G09) и антител к общей популяции $\gamma\delta$ -клеток в качестве отрицательного контроля. Антитела IgG2a, IgG1 и D1.3 также использовали в качестве контролей изотипа. Анализ выполняли с использованием происходящих из кожи $\gamma\delta$ -Т-клеток, полученных от двух доноров (чистота 94% и 80%), и результаты показаны на **Фигуре 6**.

Результаты трех функциональных анализов, протестированных в **Примерах 6-8**, обобщены в **Таблице 4**.

Таблица 4. Обобщенные результаты, полученные в функциональных анализах

Идентификатор	Отрицательная	Дегрануляция	Т-	Анализ
---------------	---------------	--------------	----	--------

клона	регуляция TCR (ЭК50 мкг/мл – 3 донора)	клеток (ЭК50 мкг/мл – 3 донора)	цитолитической активности (ЭК50 мкг/мл – 2 или 3 донора)
1245_P01_E07	0,04-0,11	0,007-0,004	0,06
1252_P01_C08	0,02-0,03	0,001-0,0006	0,02
1245_P02_G04	0,01-0,05	0,002	0,10
1245_P01_B07	Положительный; 0,35 (только 1 донор)	Положительный; 0,1 (только 1 донор)	0,13
1251_P02_C05	Положительный; Н/О	Положительный; Н/О	Н/О*
1139_P01_E04	0,027-0,057	0,005	0,005-0,019
1245_P02_F07	0,032-0,043	0,001-0,002	0,006-0,018
1245_P01_G06	0,042-0,055	0,001	0,007-0,051
1245_P01_G09	0,029-0,040	0,001	0,003-0,008
1138_P01_B09	0,078-0,130	Н/О	0,055-0,199
1251_P02_G10	0,849; Н/О	Н/О	Н/О**
ОКТ3 (антитело к CD3)	0,03-0,04	0,001-0,008	0,05
TS8.2 (антитело к Vδ1)	0,48-0,8	0,07-0,16	Н/О*

Н/О: не поддается определению; Н/О*: не поддается определению, кривая титрования не достигла плато; Н/О**: профиль уменьшенного уничтожения, ЭК50 не установлена.

ПРИМЕР 9: Картирование эпитопов

5 Для определения эпитопа комплексов антиген/антитело с высоким разрешением белковые комплексы инкубировали с дейтерированными сшивающими агентами и подвергали мультиферментному расщеплению. После обогащения сшитых пептидов образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (nLC-LTQ-Orbitrap MS), а полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения XQuest (версия 2.0) и Stavrox (версия 3.6).

10 После протеолиза трипсином, химотрипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1245_P01_E07 с дейтерированным d0d12 анализ nLC-орбитальной ионной ловушки MC/MC обнаружил 13 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1245_P01_E07. Результаты представлены на **Фигуре 7**.

После протеолиза трипсином, химо трипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1252_P01_C08 с дейтерированным d0d12 анализ nLC-орбитальной ионной ловушки MC/MC обнаружил 5 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1252_P01_C08. Результаты представлены на **Фигуре 8**.

5 После протеолиза трипсином, химо трипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1245_P02_G04 с дейтерированным d0d12 анализ nLC-орбитальной ионной ловушки MC/MC обнаружил 20 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1245_P02_G04. Результаты представлены на **Фигуре 9**.

10 После протеолиза трипсином, химо трипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1251_P02_C05 с дейтерированным d0d12 анализ nLC-орбитальной ионной ловушки MC/MC обнаружил 5 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1251_P02_C05. Результаты представлены на **Фигуре 10**.

15 Также тестировали связывание эпитопа с другим антителом, идентиф. клона 1141_P01_E01. После протеолиза трипсином, химо трипсином, Asp-N, эластазой и термолизином белкового комплекса L1(DV1-GV4)/1141_P01_E01 с дейтерированным d0d12 анализ nLC-орбитальной ионной ловушки MC/MC обнаружил 20 сшитых пептидов между L1(DV1-GV4) и антителом 1141_P01_E01. Результаты представлены на **Фигуре 11**.

Обобщенные результаты картирования эпитопов представлены в **Таблице 5**.

Таблица 5. Результаты картирования эпитопов для комплексов антиген/антитело

Идентификатор клона	Картирование эпитопов, нумерация аминокислот SEQ ID NO: 1
1245_P01_E07	5, 9, 16, 20, 62, 64, 72, 77
1252_P01_C08	50, 53, 59, 62, 64
1245_P02_G04	37, 42, 50, 53, 59, 64, 68, 69, 72, 73, 77
1251_P02_C05	59, 60, 68, 72
1141_P01_E01	3, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 62, 64, 68, 69

20 ПРИМЕР 10: Размножение V δ 1-T-клеток

Размножение выделенных $\gamma\delta$ -T-клеток изучали в присутствии отобранных антител и антител, используемых для сравнения. Антитела, используемые для сравнения, отбирали из: антитела к CD3 OKT3 в качестве положительного контроля, без антитела в качестве отрицательного контроля или антитела IgG1 в качестве изотипического контроля.

25 Коммерчески доступные антитела к V δ 1 TS-1 и TS8.2 также тестировали для сравнения.

Эксперимент 1:

Первоначальное изучение проводили путем посева 70000 клеток/лунку с Complete Optimizer и цитокинами, как описано в разделе «Приготовление $\gamma\delta$ -Т-клеток» для происходящих из крови $\gamma\delta$ -Т-клеток согласно Примеру 1. Отобранные антитела и антитела, используемые для сравнения, тестировали в различных концентрациях в диапазоне от 4,2 нг/мл до 420 нг/мл. Этот эксперимент проводили с использованием планшетов для культивирования тканей, которые позволяют связывать/иммобилизовать антитела на пластике.

Клетки собирали в дни 7, 14 и 18, и общее количество клеток определяли с использованием счетчика клеток (NC250, ChemoMetec). Результаты показаны на **Фигуре 12**. Жизнеспособность V δ 1-клеток-Т-клеток также измеряли в каждом сборе, и было показано, что все антитела сохраняют жизнеспособность клеток на протяжении экспериментов (данные не показаны). В день 18 также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратное изменение количества V δ 1-Т-клеток. Результаты показаны на **Фигуре 13**.

Как можно видеть на **Фигуре 12**, общее количество клеток, продуцируемых в культурах с антителами, неуклонно увеличивалось на протяжении культивирования и было сопоставимо или лучше, чем для коммерческих антител к V δ 1. В день 18 доля V δ 1-положительных клеток в присутствии антител 1245_P02_G04 («G04»), 1245_P01_E07 («E07»), 1245_P01_B07 («B07») и 1252_P01_C08 («C08») в большинстве протестированных концентраций была выше, чем в культурах, где присутствовали контрольные антитела OKT3, TS-1 или TS8.2 (см. **Фигуру 13А**).

Эксперимент 2:

Последующий эксперимент выполняли на выделенных клетках в культуральном сосуде с цитокинами, как описано в разделе «Приготовление $\gamma\delta$ -Т-клеток» Примера 1. По сравнению с Экспериментом 1 использовали другой сосуд для культивирования, поверхность которого не облегчает связывание/иммобилизацию антител. Отобранные антитела и антитела, используемые для сравнения, тестировали в различных концентрациях в диапазоне от 42 пг/мл до 42 нг/мл. Во время Эксперимента 2 получали результаты экспериментов, выполненных с тремя повторами.

Клетки собирали в дни 7, 11, 14 и 17, и общее количество клеток определяли с использованием счетчика клеток, как и раньше. Результаты показаны на **Фигуре 14**. В день 17 также анализировали процентное содержание, количество клеток и кратное изменение количества V δ 1-Т-клеток. Результаты показаны на **Фигуре 15**.

Во время Эксперимента 2 также измеряли состав клеток, включая клетки, не относящиеся к V δ 1. Клетки со дня 17 собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии для определения поверхностной экспрессии V δ 1, V δ 2 и $\alpha\beta$ TCR. Доли каждого типа клеток в каждой культуре показаны графически на **Фигуре 16**, а процентные значения приведены в **Таблице 6**.

Таблица 6. Состав клеток на день 17 - Процентное содержание живых клеток каждой субпопуляции

	$\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -	V δ 1	V δ 2	не V δ 1/V δ 2	$\alpha\beta$
Без антитела	63,00	18,17	0,86	7,10	0,37
ОКТ-3	25,63	50,43	0,25	20,13	1,13
IgG1	65,77	15,59	1,11	6,91	0,42
TS8.2 42 нг/мл	30,60	53,57	3,59	7,46	0,14
TS-1 42 нг/мл	18,77	65,90	0,91	9,51	0,12
C08 42 нг/мл	0,79	96,43	0,08	2,51	0,05
C08 4,2 нг/мл	1,91	94,67	0,18	2,63	0,05
C08 420 пг/мл	8,47	80,57	0,28	8,42	0,04
C08 42 пг/мл	35,97	25,93	3,04	19,50	0,31
B07 42 нг/мл	0,94	95,57	0,46	2,73	0,05
B07 4,2 нг/мл	1,79	94,10	0,40	3,28	0,01
B07 420 пг/мл	3,08	91,80	0,29	3,94	0,02
B07 42 пг/мл	17,93	62,90	0,85	9,16	0,07
E07 42 нг/мл	2,29	85,13	0,19	11,65	0,04
E07 4,2 нг/мл	2,15	91,23	0,13	5,77	0,04
E07 420 пг/мл	9,25	73,90	0,42	13,05	0,02
E07 42 пг/мл	49,23	18,67	2,17	7,70	0,43
G04 42 нг/мл	1,90	88,53	0,47	8,09	0,05
G04 4,2 нг/мл	4,25	89,67	0,93	3,98	0,02
G04 420 пг/мл	25,97	50,60	1,45	12,72	0,11
G04 42 пг/мл	44,00	13,77	2,33	26,30	0,32
C05 42 нг/мл	25,00	42,03	3,75	13,67	1,32
C05 4,2 нг/мл	46,87	22,03	2,58	16,46	0,38
C05 420 пг/мл	33,53	44,60	2,23	11,13	0,22

C05 42 пг/мл	36,83	25,23	6,16	18,00	0,30
---------------------	-------	-------	------	-------	------

Как можно видеть из этих результатов, доля Vδ1-положительных клеток выше в культурах, в которых присутствуют B07, C08, E07 и G04, по сравнению с контролями ОКТ3, TS-1 или TS8.2. Таким образом, тестируемые антитела продуцируют и размножают Vδ1-положительные клетки более эффективно, чем коммерчески доступные антитела, даже если они присутствуют в культуре в низких концентрациях.

Клетки со дня 17 Эксперимента 2 также анализировали на наличие дополнительных клеточных маркеров, включая CD3⁺CD56⁺, для выявления наличия естественных клеток-киллеров (NK) и Vδ1-T-клеток, которые экспрессируют CD27 (т.е. CD27⁺). Результаты обобщены в **Таблице 7**.

Таблица 7. Состав клеток на день 17 - Процентное содержание NK и CD27⁺ клеток

	% CD56+CD3-		%CD27 ⁺ от Vδ1	
	Среднее значение	СОС	Среднее значение	СОС
Без антитела	66,33	8,49	92,43	1,58
ОКТ-3	7,90	1,04	99,03	0,14
IgG1	70,67	6,41	87,87	0,81
TS8.2 42 нг/мл	31,63	1,99	66,73	5,55
TS-1 42 нг/мл	22,97	1,75	94,40	1,14
C08 42 нг/мл	1,00	0,15	98,17	0,31
C08 4,2 нг/мл	2,06	0,07	95,07	1,23
C08 420 пг/мл	8,63	1,64	88,43	3,65
C08 42 пг/мл	45,10	3,44	91,50	2,50
B07 42 нг/мл	1,40	0,39	95,47	1,37
B07 4,2 нг/мл	1,70	0,16	96,70	0,43
B07 420 пг/мл	3,47	0,38	95,17	0,86
B07 42 пг/мл	22,03	4,66	88,03	3,00
E07 42 нг/мл	2,59	0,93	92,27	2,10
E07 4,2 нг/мл	1,98	0,09	95,77	0,52
E07 420 пг/мл	8,72	1,33	92,43	0,14
E07 42 пг/мл	67,73	1,23	93,60	1,16
G04 42 нг/мл	2,20	0,32	93,80	0,36

G04 4,2 нг/мл	3,53	0,51	91,63	1,80
G04 420 пг/мл	30,53	5,00	81,37	3,11
G04 42 пг/мл	51,13	8,90	94,20	0,93
C05 42 нг/мл	37,17	6,53	93,80	0,87
C05 4,2 нг/мл	52,27	8,16	85,40	4,46
C05 420 пг/мл	37,93	1,57	90,83	2,01
C05 42 пг/мл	43,40	8,64	92,17	2,02

СОС: Стандартная ошибка среднего

ПРИМЕР 11: Функциональность Vδ1-Т-клеток

Vδ1-Т-клетки, размноженные в присутствии отобранных антител, сохранили поликлональный репертуар участков CDR3, а также были протестированы на функциональность с использованием анализа цитолитической активности методом проточной цитометрии с использованием SYTOX. Результаты представлены для клеток, полученных в ходе Эксперимента 1 в день 14 с использованием клеток в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 10:1 (**Фигура 17А**), и для клеток, полученных в ходе Эксперимента 2 в день 17 (после замораживания-оттаивания) с использованием клеток в соотношении Е:Т 1:1 и 10:1 (**Фигура 17В**).

Как можно видеть на **Фигуре 17**, Vδ1-положительные клетки размножались в присутствии всех антител, эффективно лизировали клетки-мишени, это указывает на то, что они являются функциональными даже после замораживания и оттаивания клеток.

ПРИМЕР 12: Функциональность клеток после хранения

Также изучали функциональность клеток после этапа хранения при замораживании и последующего оттаивания. Часть клеток удаляли из культуры в день 17 Эксперимента 2 и замораживали. Затем клетки оттаивали и дополнительно размножали в культуре с IL-15. На **Фигуре 18** показано общее количество клеток через 7 дней культивирования клеток после замораживания-оттаивания для культур, приведенных в контакт с антителами B07, C08, E07, G04 или ОКТ-3 до замораживания. Все культуры продемонстрировали способность к пролиферации после хранения. Культивирование продолжали до 42 дня, и в течение этого периода контролировали общее количество клеток (результаты показаны на **Фигуре 19**). Общее количество клеток поддерживалось или увеличивалось в культурах, ранее подвергавшихся воздействию отобранных антител.

ПРИМЕР 13: Антитело к V δ 1 обеспечивает модуляцию и пролиферацию иммунных клеток в TIL

Проводили исследования для изучения антител к V δ 1, обеспечивающих модуляцию и пролиферацию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов человека (TIL). Для этих исследований биопсии опухолей почечно-клеточной карциномы (RCC) человека отправляли в свежем виде и обрабатывали после получения. В частности, ткань измельчали на $\sim 2 \text{ мм}^2$. В каждую пробирку Miltenyi C помещали до 1 г ткани вместе с 4,7 мл RPMI и ферментами из набора для диссоциации опухолей от Miltenyi в концентрациях, рекомендованных производителем, за исключением фермента R, который использовали в 0,2x концентрации, чтобы предотвратить расщепление соответствующих молекул клеточной поверхности. С-пробирки помещали на диссоциатор gentleMACS™ Octo с нагревателями. Была выбрана программа 37C_h_TDK_1 для диссоциации мягких опухолей. Затем гидролизат фильтровали через 70 мМ фильтр для получения суспензии отдельных клеток. RPMI, содержащую 10% ФБС, добавляли к гидролизату для нейтрализации ферментативной активности. Клетки промывают 2 раза RPMI/10%ФБС и ресуспендируют для подсчета. Затем полученные клетки высевали в лунки TC (24-луночный G-REX, Wilson Wolf) при $2,5 \times 10^6$ на лунку. Затем клетки инкубировали с цитокинами или без них и с антителами или без них в течение 18 дней. Антитела, включенные в исследование, представлены на **Фигуре 20**. Они включают ОКТ3 (до 50 нг/мл) и 1252_P01_C08, иначе «C08» в настоящей заявке (до 500 нг/мл). При включении болюсные добавки этих антител добавляли в день 0, 7, 11 и 14. Во время указанной инкубации среду заменяли свежей средой в день 11 и день 14. Анализ методом проточной цитометрии выполняли в день 0 и день 18 для определения фенотипа лимфоцитов, а также кратного изменения количества клеток. Клетки сначала гейтировали по живым CD45+ клеткам, а затем, как указано. В группах, в которых были включены рекомбинантные цитокины, они были добавлены следующим образом. День 0: IL-4, IFN- γ , IL-21, IL-1 β . Дополнительный IL-15 включали в день 7, 11, 14. Дополнительные IL-21 и IFN- γ включали в день 7 и день 14, соответственно. На **Фигуре 20 (А)** показано кратное увеличение количества V δ 1⁺ TIL-клеток после 18 дней культивирования в присутствии C08 или ОКТ3 с цитокиновой поддержкой (СК) или без нее, где это указано. Эти результаты показывают значительное кратное увеличение количества V δ 1⁺ TIL-клеток при применении либо антитела C08, либо антитела, используемого для сравнения, ОКТ3 в присутствии цитокинов по сравнению с антителом или цитокинами по отдельности. На **Фигуре 20 (В)** показано увеличение общего количества V δ 1-клеток при последующем

сборе. Эти результаты показывают значительное увеличение количества $V\delta 1^+$ TIL-клеток после культивирования с C08 или антителом, использованным для сравнения, ОКТ3 в присутствии цитокинов по сравнению с антителом или цитокинами по отдельности. На **Фигуре 20 (C)** представлена примерная стратегия гейтирования, используемая в анализе

5 клеток методом проточной цитометрии. Из популяции живых клеток $CD45^+$ клетки гейтировали по лимфоцитам на основании их свойств прямого и бокового рассеяния (не показано), затем $\gamma\delta$ -Т-клетки отделяли от $\alpha\beta$ -Т-клеток путем окрашивания Т-клеточных рецепторов. Наконец, определяли долю $V\delta 1$ -клеток в общей популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток. Примеры данных для дня 18 показаны для 2 условий, как указано (+/-1252_P01_C08):

10 64,3% клеток представляли собой $CD45^+$, из этих $CD45^+$ клеток 53,1% представляли собой $\gamma\delta^+$, а из клеток $\gamma\delta^+$ 89,7 представляли собой $V\delta 1^+$. На **Фигуре 20 (D)** представлен фенотипический профиль клеточной поверхности $V\delta 1^+$ TIL-клеток при сборе. Более высокие уровни $CD69$ наблюдали после культивирования с антителом C08. На **Фигуре 20 (E)** представлен анализ $\gamma\delta$ -отрицательной, $CD8$ -положительной фракции TIL-лимфоцитов

15 при гейтировании по живым $CD45$ -положительным клеткам при сборе. Таким образом, объединенные результаты подчеркивают модулирующие эффекты, обеспечиваемые антителом к $V\delta 1$ согласно настоящему изобретению, описанным в настоящей заявке, на популяции TIL.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ *ex vivo* модуляции V δ 1-T-клеток, включающий введение антитела человека к вариабельной области 1 дельта-цепи TCR (антитело к V δ 1) или его фрагмента, которые связываются с эпитопом вариабельной области 1 дельта-цепи (V δ 1) $\gamma\delta$ -T-клеточного рецептора (TCR), содержащим один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей:

(i) 3-20 из SEQ ID NO: 1; и/или

(ii) 37-77 из SEQ ID NO: 1

в популяцию клеток, содержащую V δ 1-T-клетки.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный эпитоп содержит один или более аминокислотных остатков в пределах аминокислотных областей: 5-20 и 62-77; 50-64; 37-53 и 59-72; 59-77; или 3-17 и 62-69 из SEQ ID NO: 1.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что указанный эпитоп представляет собой активирующий эпитоп $\gamma\delta$ -T-клетки.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что связывание происходит только с эпитопом в V-области V δ 1-цепи $\gamma\delta$ -TCR.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что не происходит связывания с эпитопом, обнаруженным в CDR3 V δ 1-цепи $\gamma\delta$ -TCR.

6. Способ *ex vivo* модуляции V δ 1-T-клеток, включающий введение антитела к V δ 1 или его фрагмента, содержащих одно или более из:

CDR3, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 2-25;

CDR2, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 26-37 и ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: A1-A12 (из Таблицы 2); и/или

CDR1, содержащего последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 38-61;

в популяцию клеток, содержащую V δ 1-T-клетки.

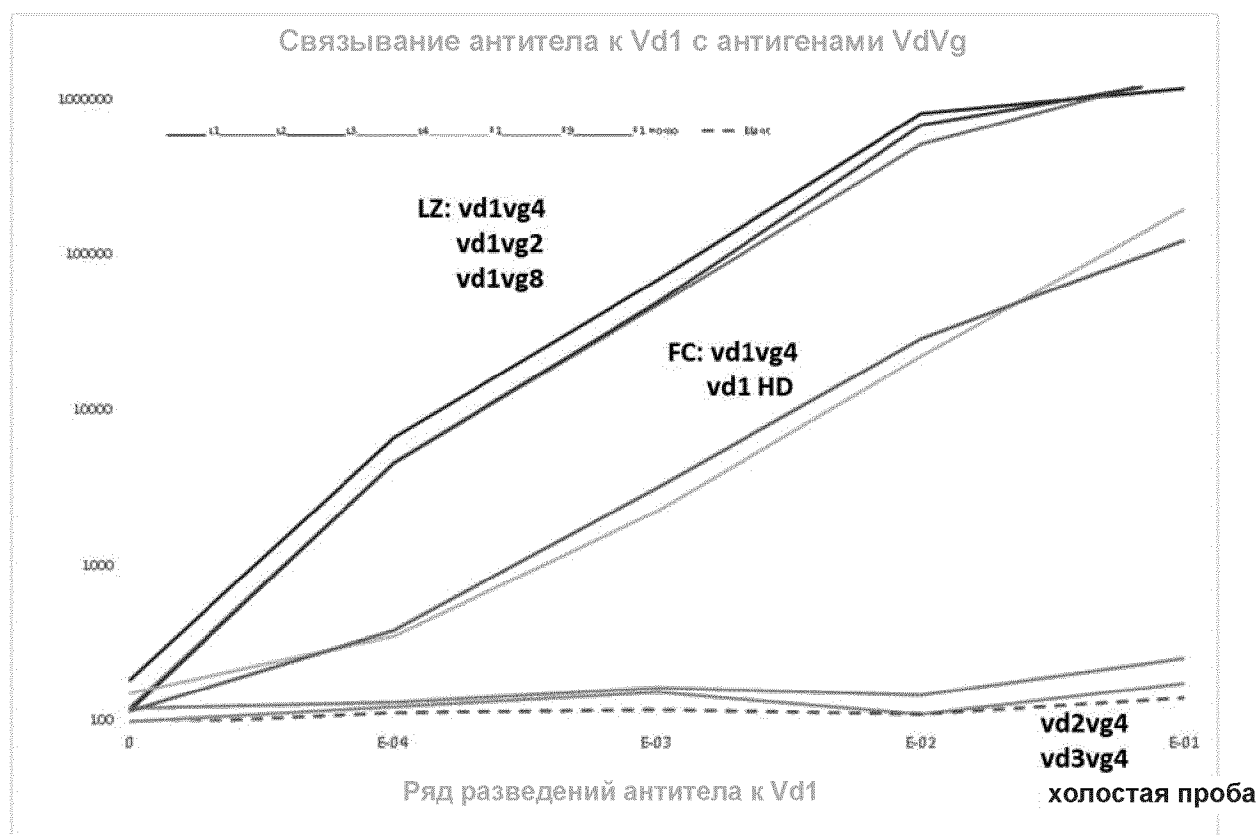
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержат область VH, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 62-73, такой как SEQ ID NO: 63, 62 или 64.
8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержат область VL, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 74-85, такой как SEQ ID NO: 75, 74 или 76.
9. Способ по любому из пп. 6-8, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент содержат аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 86-97, такую как SEQ ID NO: 87, 86 или 88.
10. Способ по любому из пп. 6-9, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент связываются с тем же или по существу тем же эпитопом, что и антитело или его фрагмент, определенные в любом из пп. 6-9, или конкурируют с ними.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент связывают переменную область 1 дельта-цепи (V δ 1) $\gamma\delta$ -Т-клеточного рецептора (TCR) с аффинностью связывания (KD), измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса, составляющей менее $1,5 \times 10^{-7}$ М.
12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанное антитело или его фрагмент представляют собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, переменный домен (например, VH или VL), диантитело, минитело или полноразмерное антитело.
13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что указанная модуляция включает размножение V δ 1-Т-клеток.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что указанный способ обеспечивает размноженную популяцию V δ 1-Т-клеток, которая содержит более, чем приблизительно 85% V δ 1-Т-клеток, например, более чем приблизительно 90% V δ 1-Т-клеток.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в течение по меньшей мере 5 дней.
16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в присутствии по меньшей мере одного цитокина.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанный цитокин выбран из: интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-7 (IL-7), интерлейкина-9 (IL-9), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-21 (IL-21) или их смесей.
18. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в присутствии IL-2, IL-9 и/или IL-15.
19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в присутствии IL-21.
20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в присутствии IL-4.
21. Способ по любому из пп. 1-17, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в первой культуральной среде, содержащей IL-4, и затем культивирование указанной популяции клеток во второй культуральной среде, содержащей IL-15.
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанная первая культуральная среда не содержит IL-15, IL-2 и/или IL-7.
23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанная вторая культуральная среда не содержит IL-4.

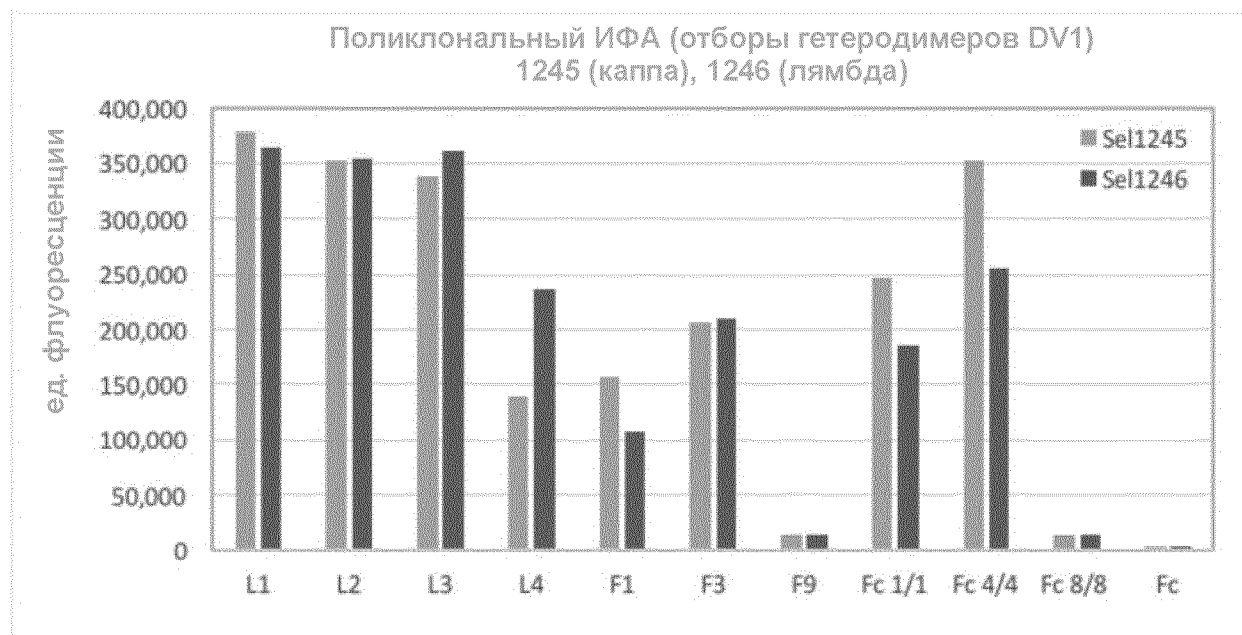
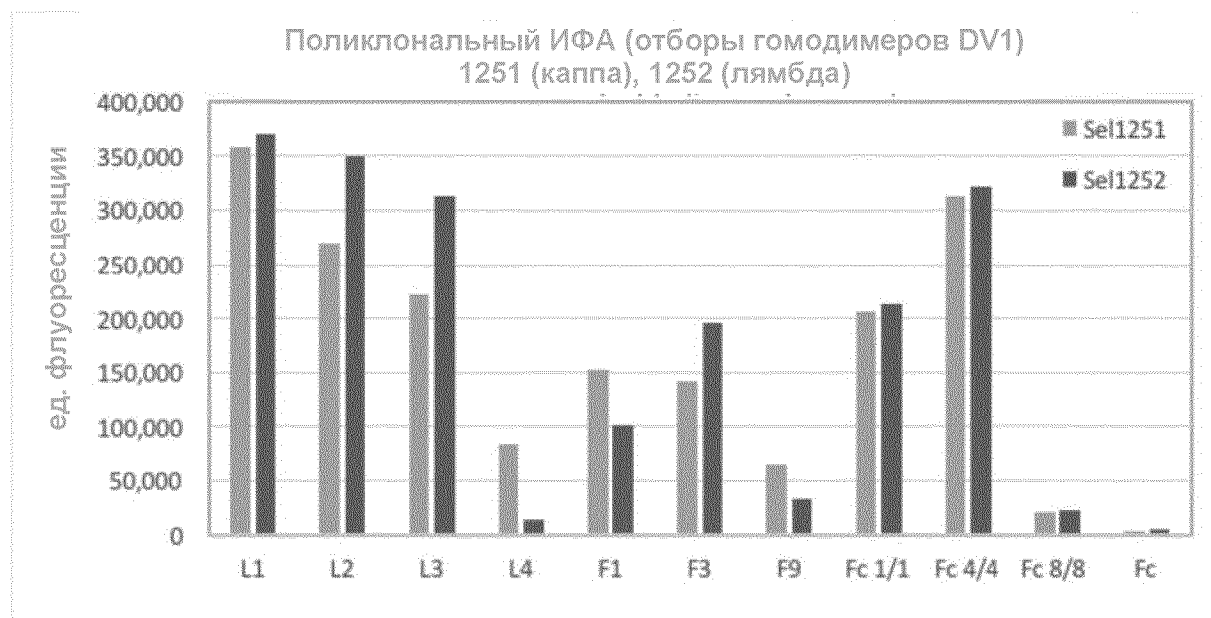
24. Способ по любому из пп. 21-23, отличающийся тем, что указанная первая или вторая культуральная среда или обе культуральные среды содержат один или более дополнительных цитокинов.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что указанные дополнительные цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-21, IFN- γ и IL-1 β .
26. Способ по любому из пп. 15-25, отличающийся тем, что указанная популяция клеток не находится в непосредственном контакте со стромальными и/или эпителиальными клетками во время культивирования.
27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанная популяция клеток не находится в непосредственном контакте с фибробластами во время культивирования.
28. Способ по любому из пп. 15-27, отличающийся тем, что указанная популяция клеток не находится в непосредственном контакте с опухолевыми клетками и/или питающими клетками во время культивирования.
29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что указанный способ включает культивирование указанной популяции клеток в бессывороточной среде.
30. Способ по любому из пп. 1-29, отличающийся тем, что указанная популяция клеток обогащена Т-клетками перед введением указанного антитела или его фрагмента.
31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что указанная популяция клеток обогащена $\gamma\delta$ -Т-клетками перед введением указанного антитела или его фрагмента.
32. Способ по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что указанная популяция клеток истощена по $\alpha\beta$ -Т-клеткам или NK-клеткам перед введением указанного антитела или его фрагмента.
33. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают из гемопоэтического образца или его фракции.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанный гемопоэтический образец выбран из периферической крови, пуповинной крови, лимфоидной ткани, тимуса, костного мозга, ткани лимфатического узла или их фракций.
35. Способ по п. 33 или п. 34, отличающийся тем, что указанный гемопоэтический образец состоит из моноклеарных клеток низкой плотности (LDMC) или моноклеарных клеток периферической крови (МКПК).
36. Способ по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают из образца негемопоэтической ткани, такого как образец кожи, толстой кишки, тонкой кишки, молочной железы, легкого, предстательной железы, печени, селезенки, поджелудочной железы, матки, влагалища или других кожных, слизистых или серозных оболочек.
37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают из образца негемопоэтической ткани путем культивирования указанного образца негемопоэтической ткани на синтетическом каркасе, сконструированном таким образом, чтобы облегчить выход клеток из указанного образца негемопоэтической ткани.
38. Способ по любому из пп. 1-37, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают из образца раковой ткани.
39. Способ по любому из пп. 1-38, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток получают из ткани человека или животного, отличного от человека.
40. Способ по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что указанную популяцию клеток выделяют из образца перед введением указанного антитела к V δ 1 или его фрагмента.
41. Популяция V δ 1-T-клеток, полученная способом *ex vivo* по любому из пп. 1-40.
42. Композиция, содержащая популяцию V δ 1-T-клеток по п. 41.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию V δ 1-T-клеток по п. 41.

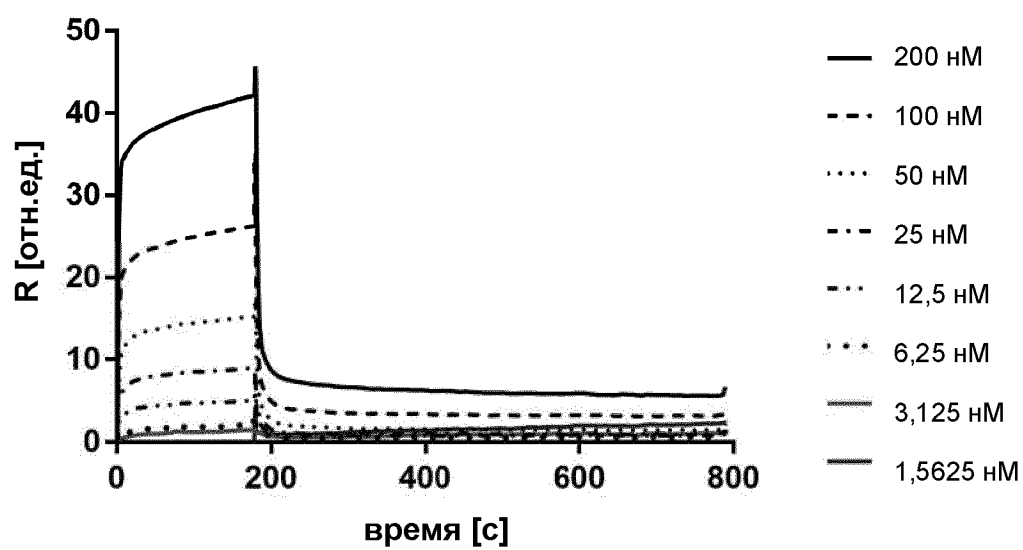
44. Фармацевтическая композиция по п. 43 для применения в качестве лекарственного средства.
45. Фармацевтическая композиция по п. 43 для применения при лечении рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания.
46. Способ лечения рака, инфекционного заболевания или воспалительного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение терапевтически эффективного количества популяции V δ 1-T-клеток по п. 41 или фармацевтической композиции по п. 43.



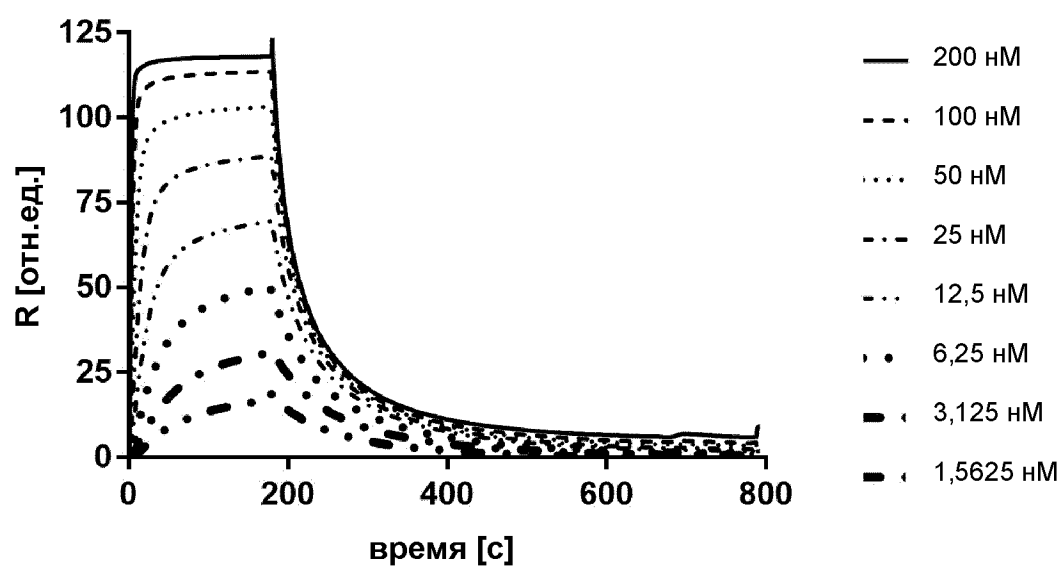
ФИГУРА 1

A**В****ФИГУРА 2**

1245_P01_B07

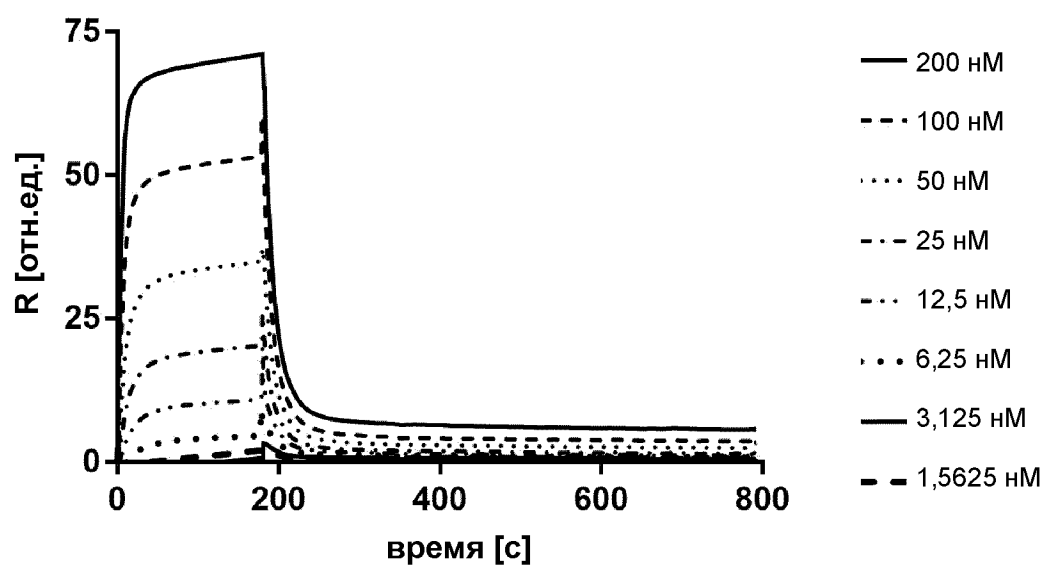


1245_P01_E07

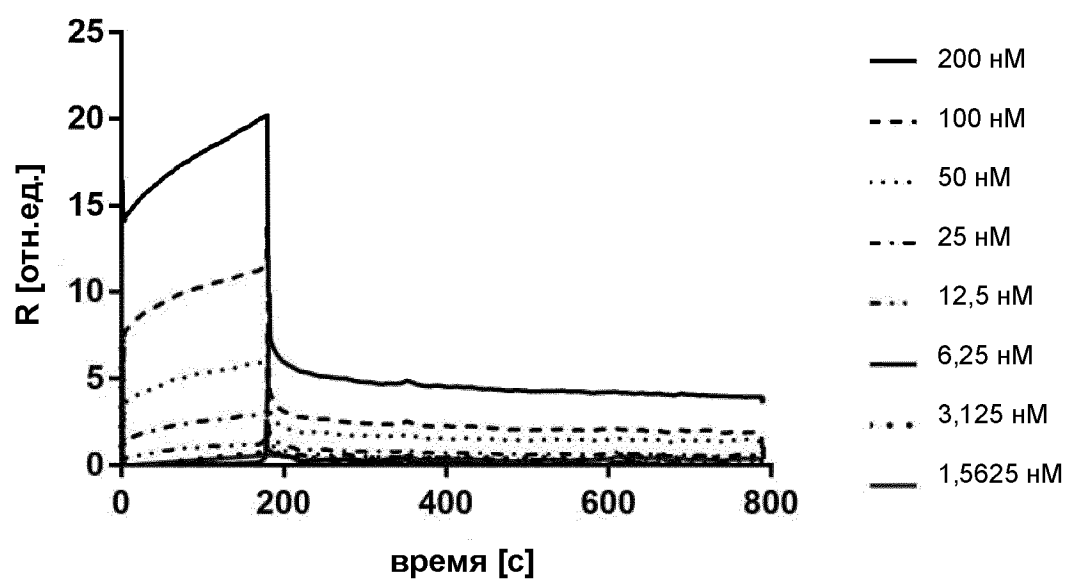


ФИГУРА 3

1245_P02_G04

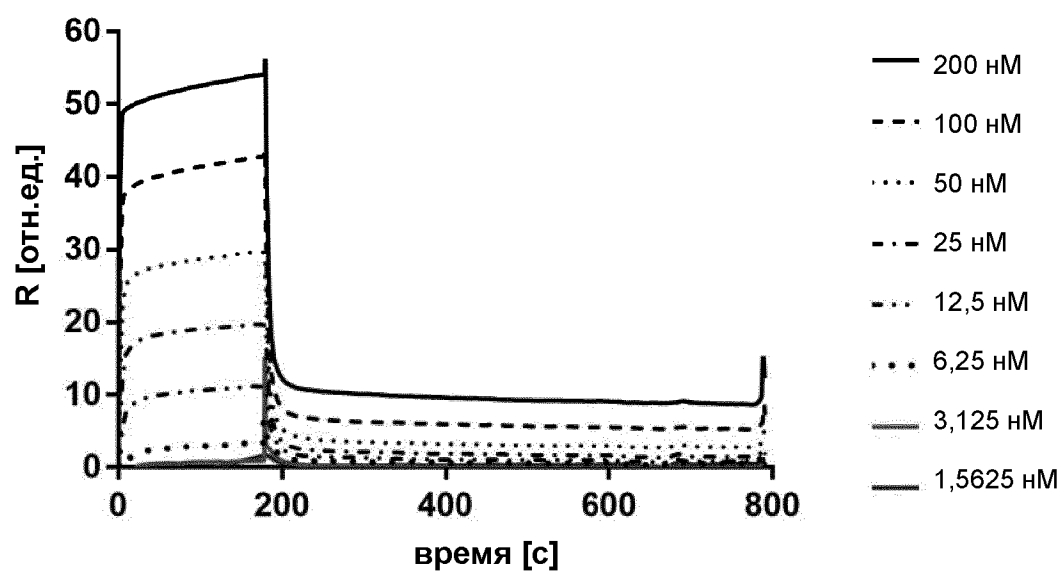


1251_P02_C05

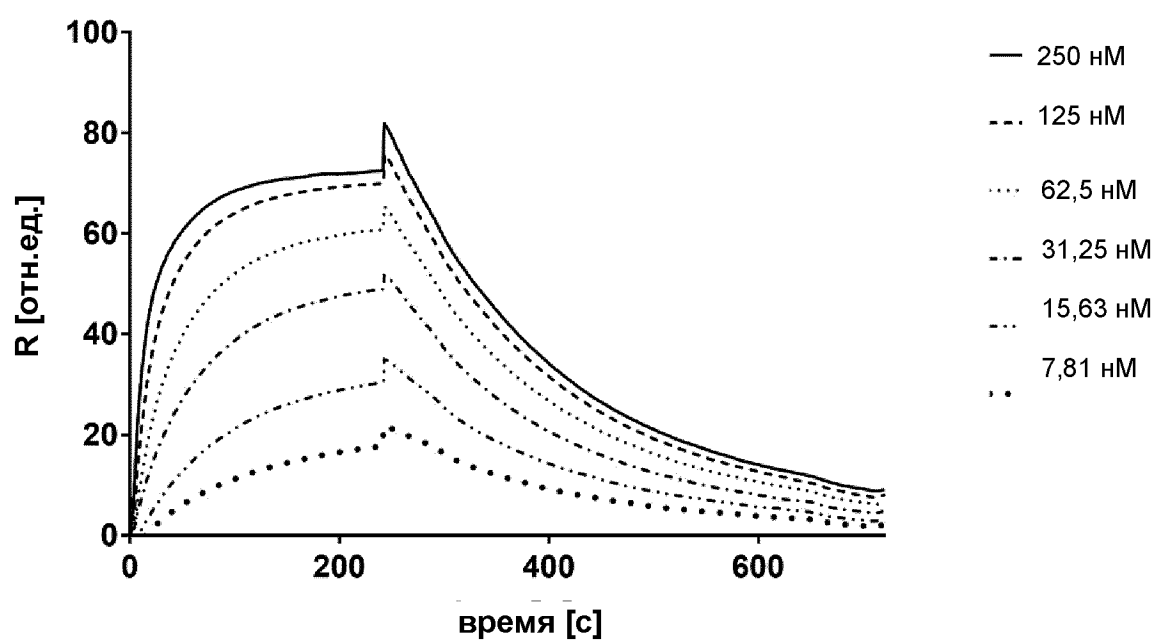


ФИГУРА 3 (продолж.)

1252_P01_C08

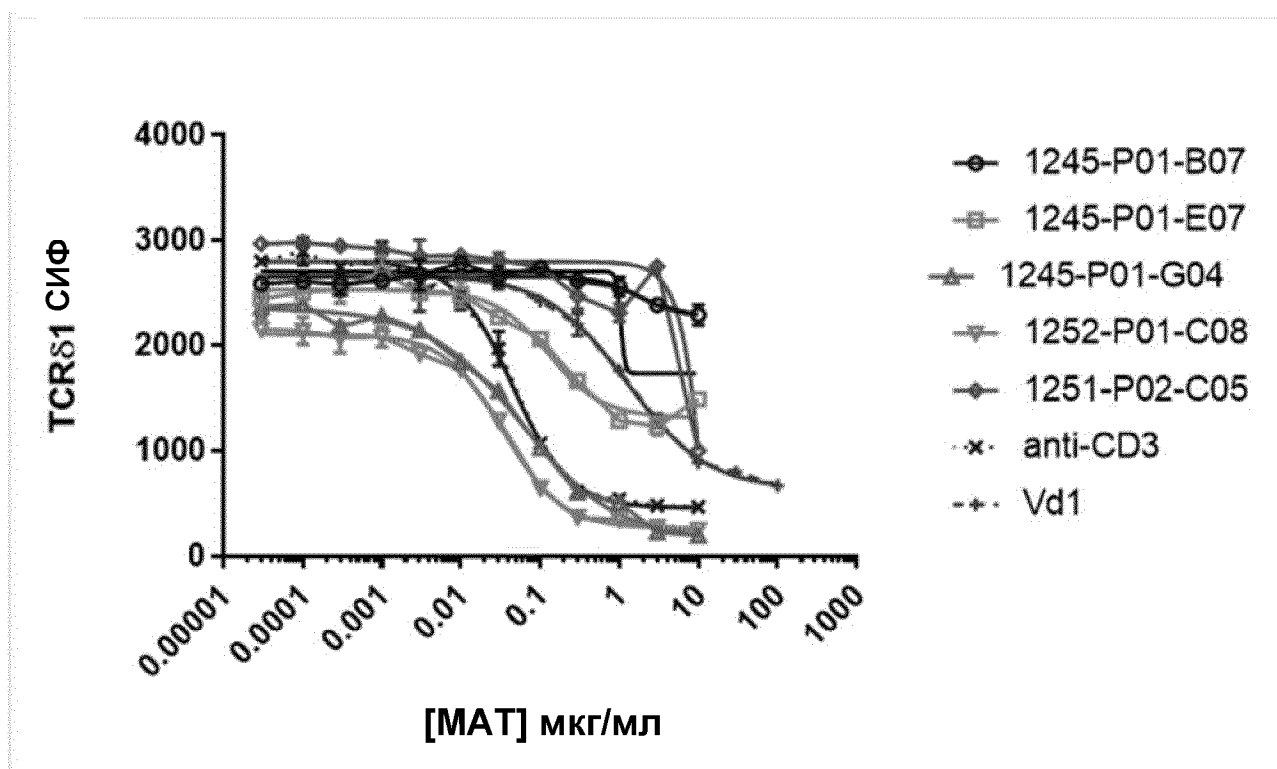


TS8.2_анти-IgG мыши

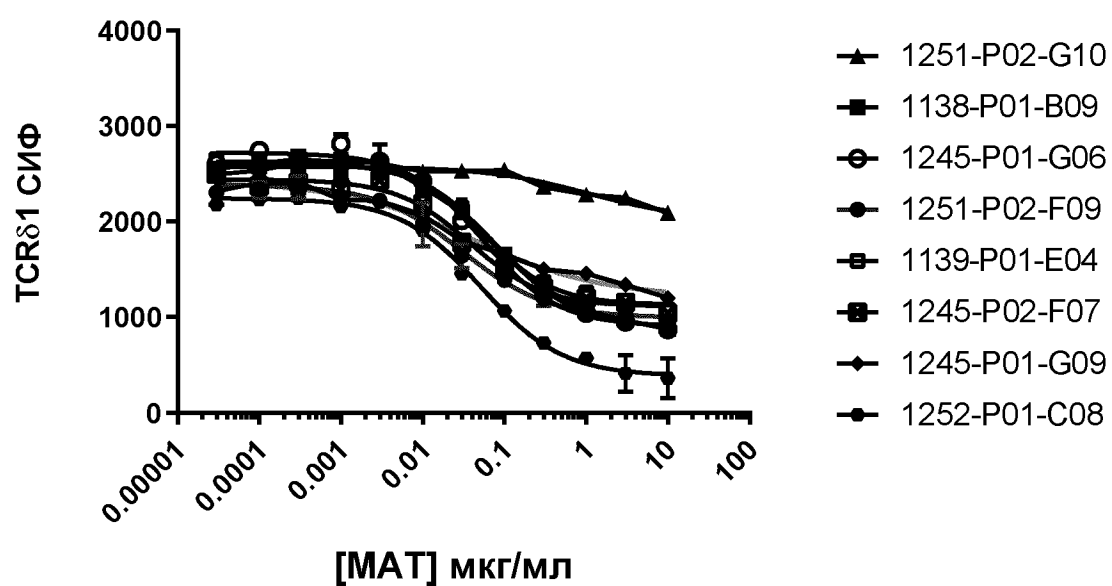


ФИГУРА 3 (продолж.)

A)

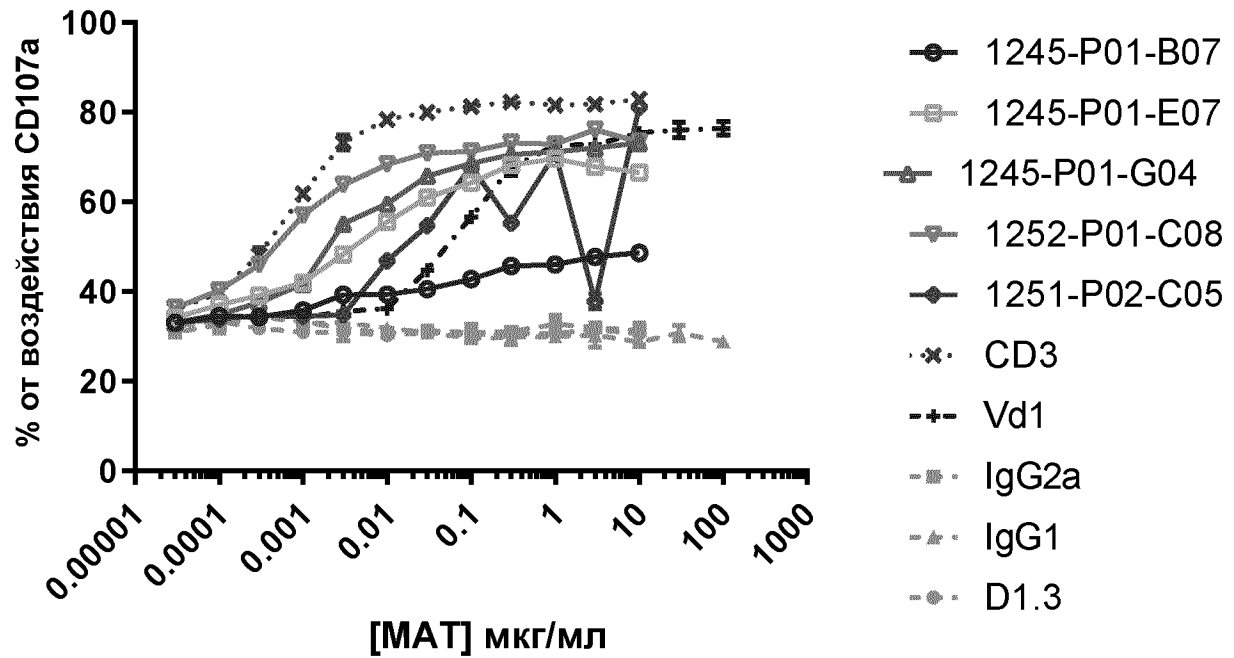


B)

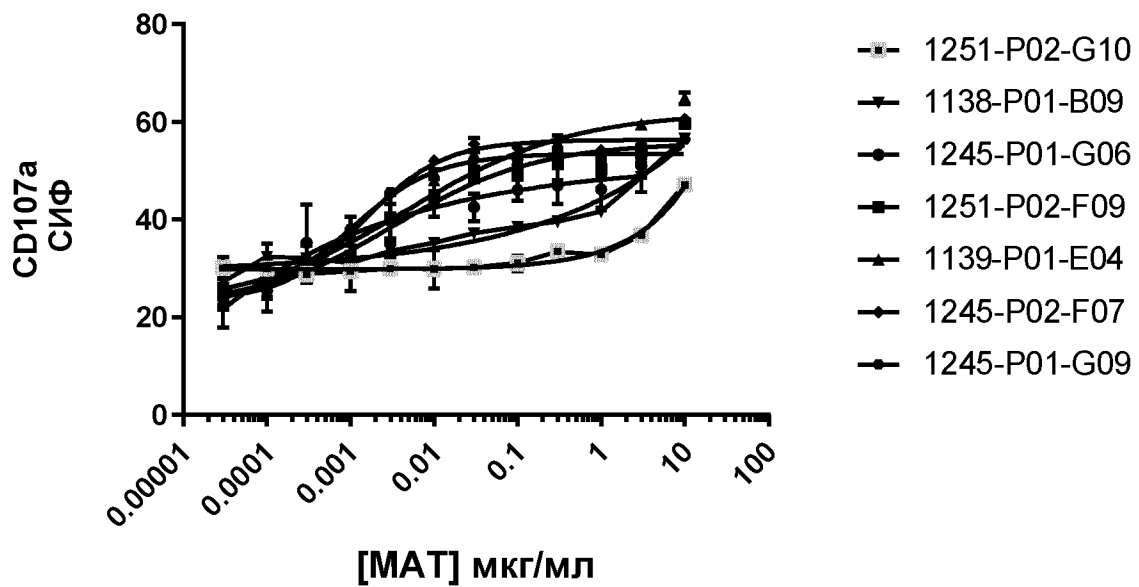


ФИГУРА 4

A)

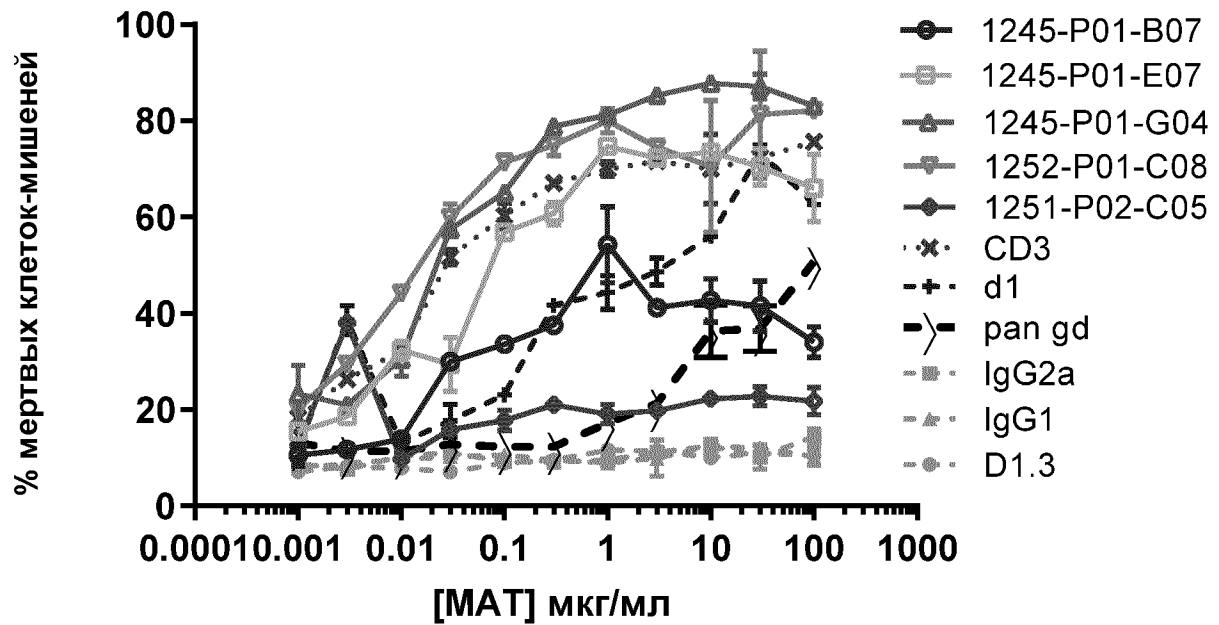


B)

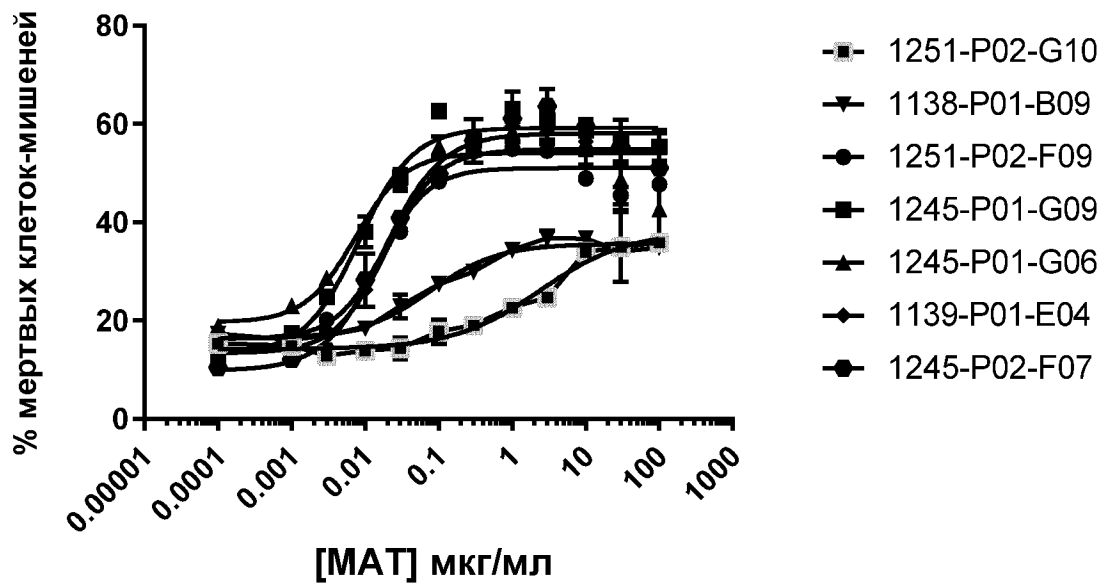


ФИГУРА 5

A)

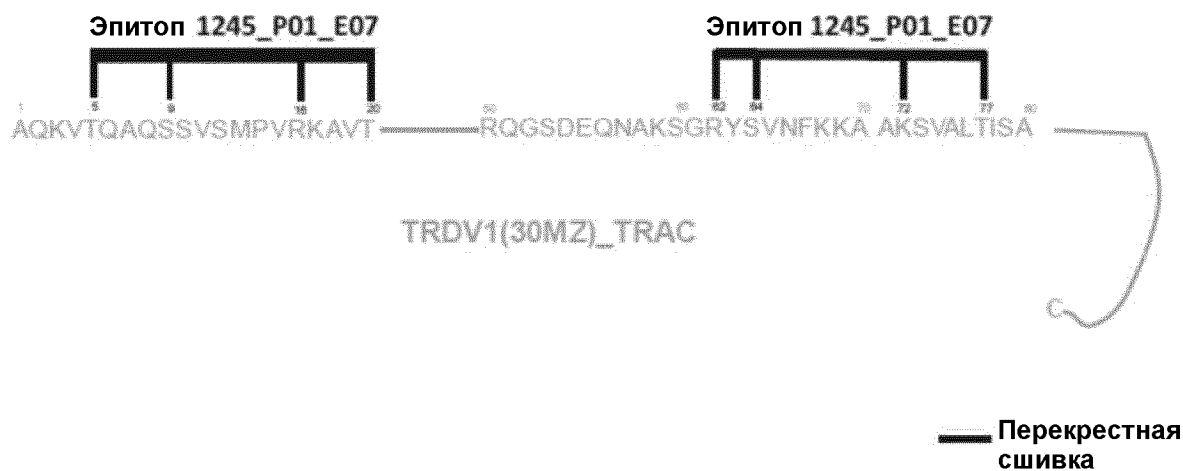


B)

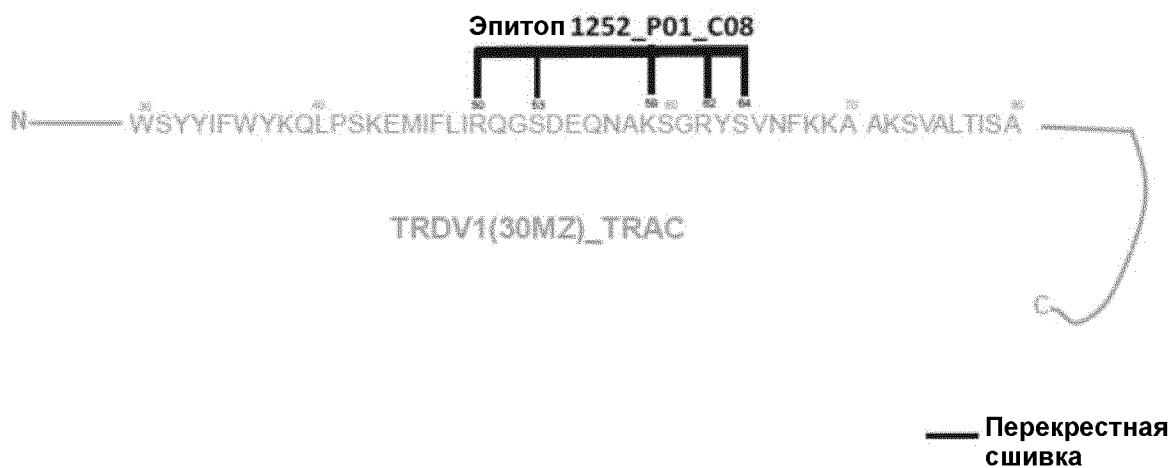


ФИГУРА 6

9/32

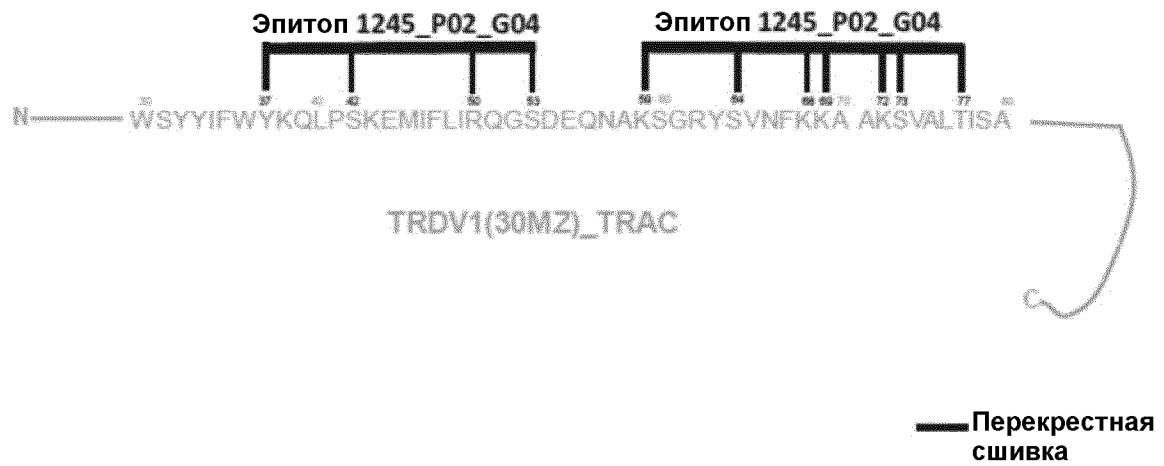


ФИГУРА 7

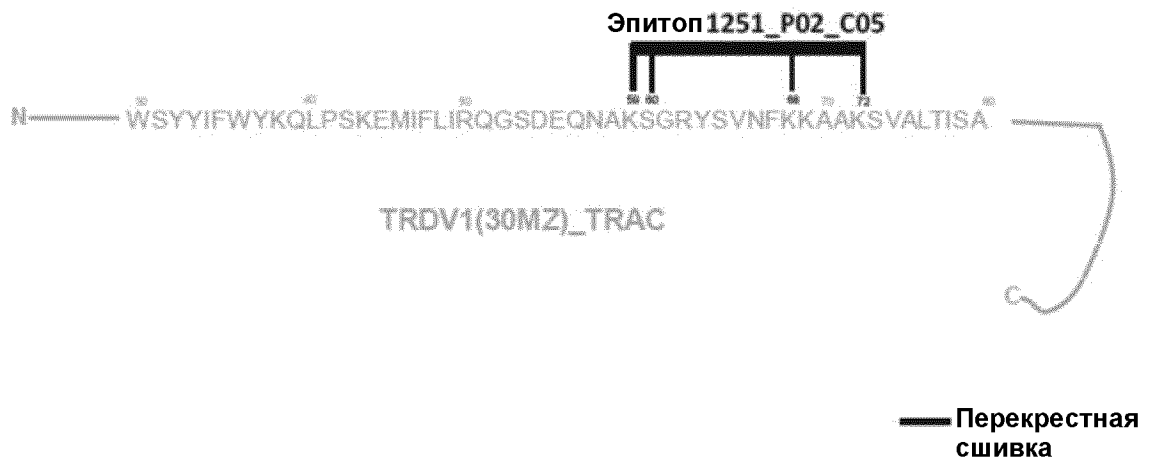


ФИГУРА 8

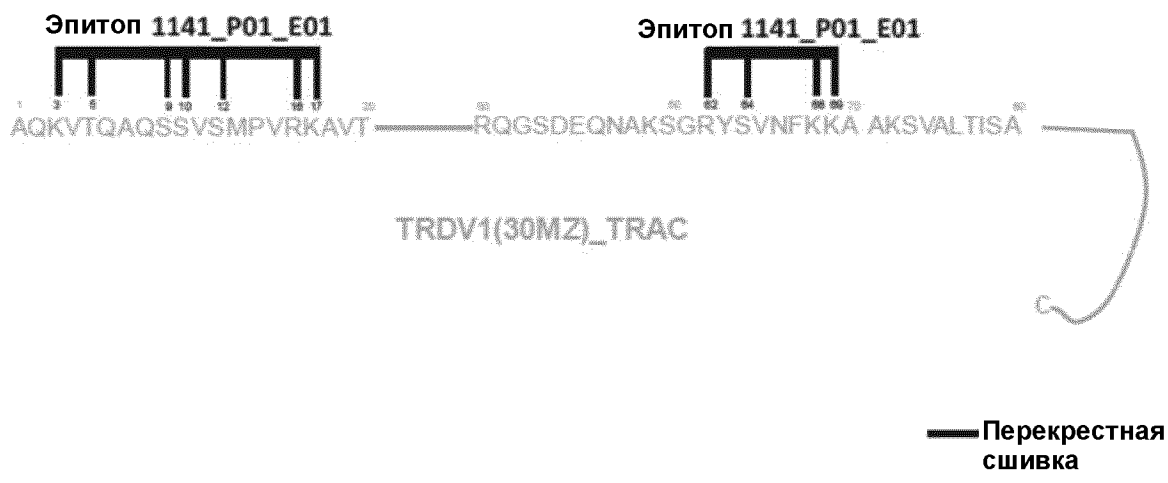
10/32



ФИГУРА 9



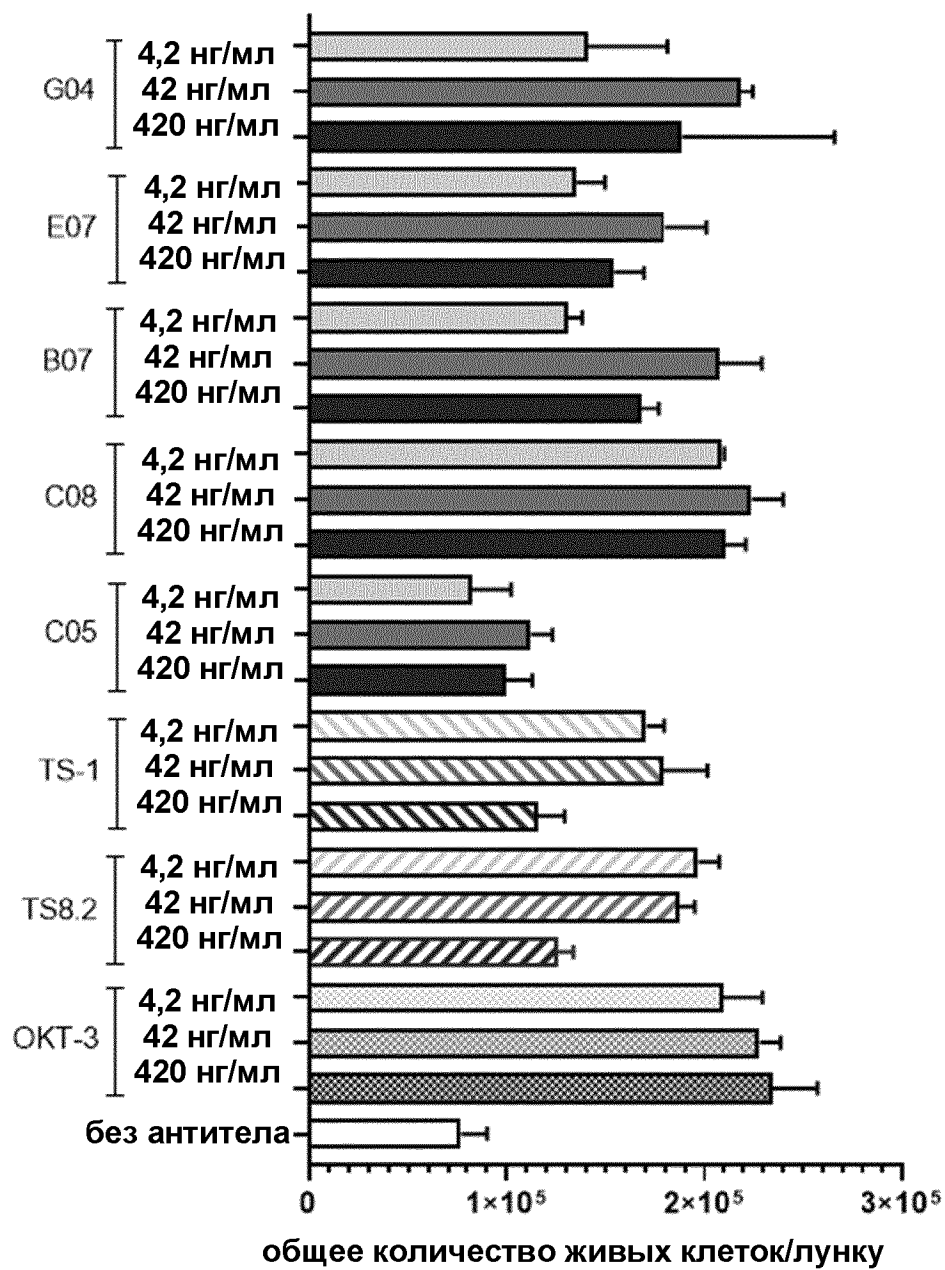
ФИГУРА 10



ФИГУРА 11

А)

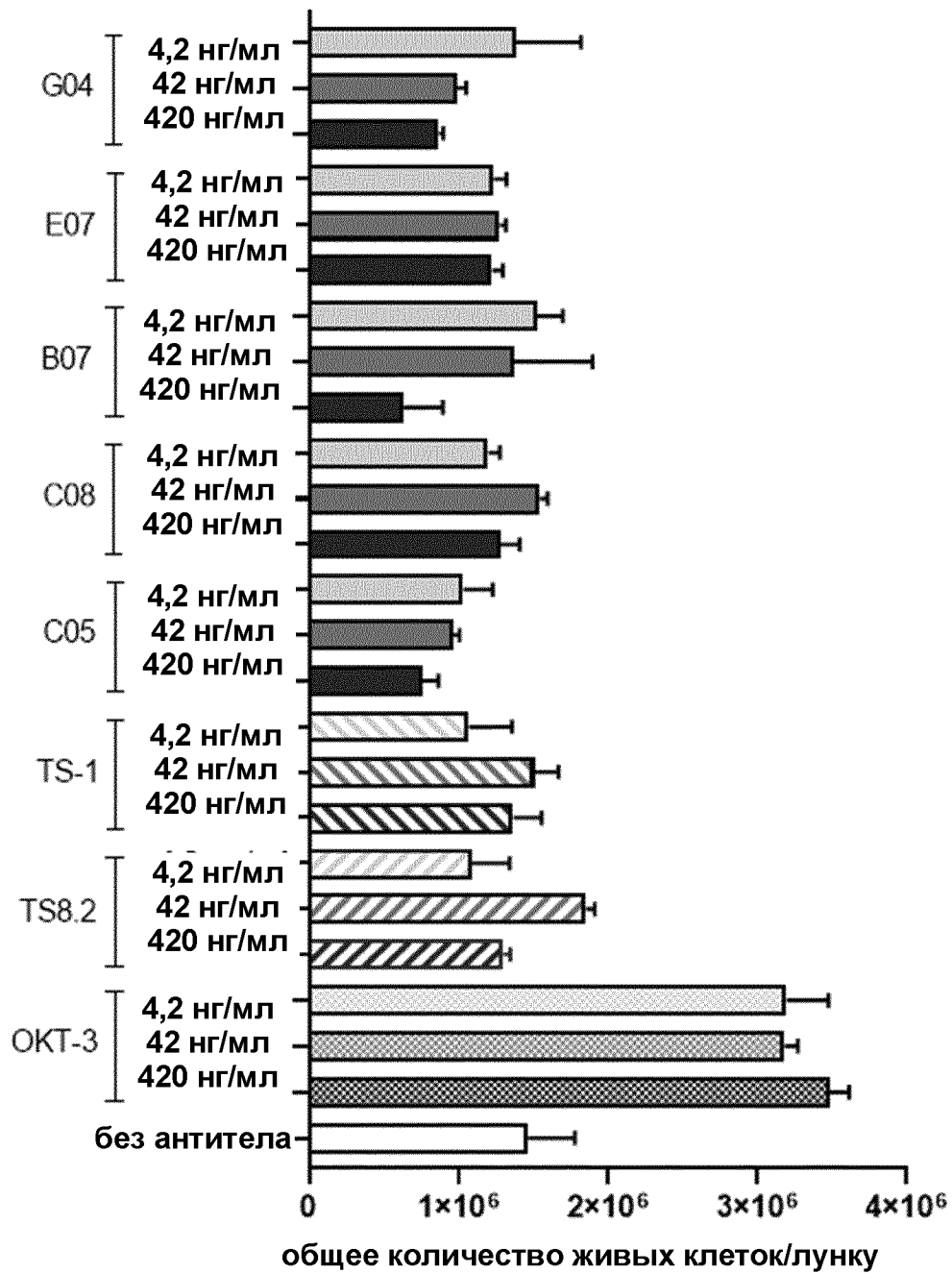
день 7, общее количество клеток – все



ФИГУРА 12

В)

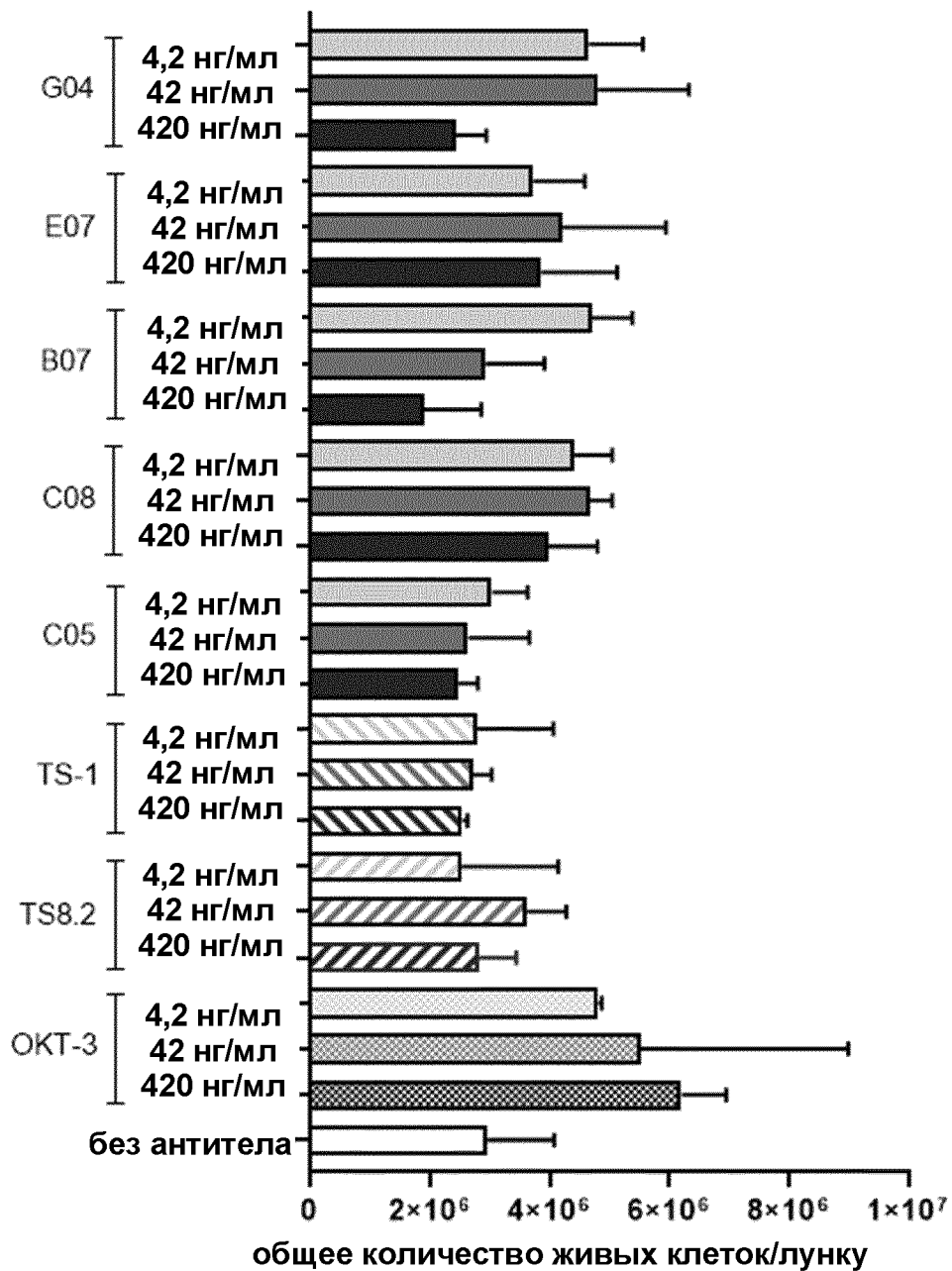
день 14, общее количество клеток – все



ФИГУРА 12 (продолж.)

С)

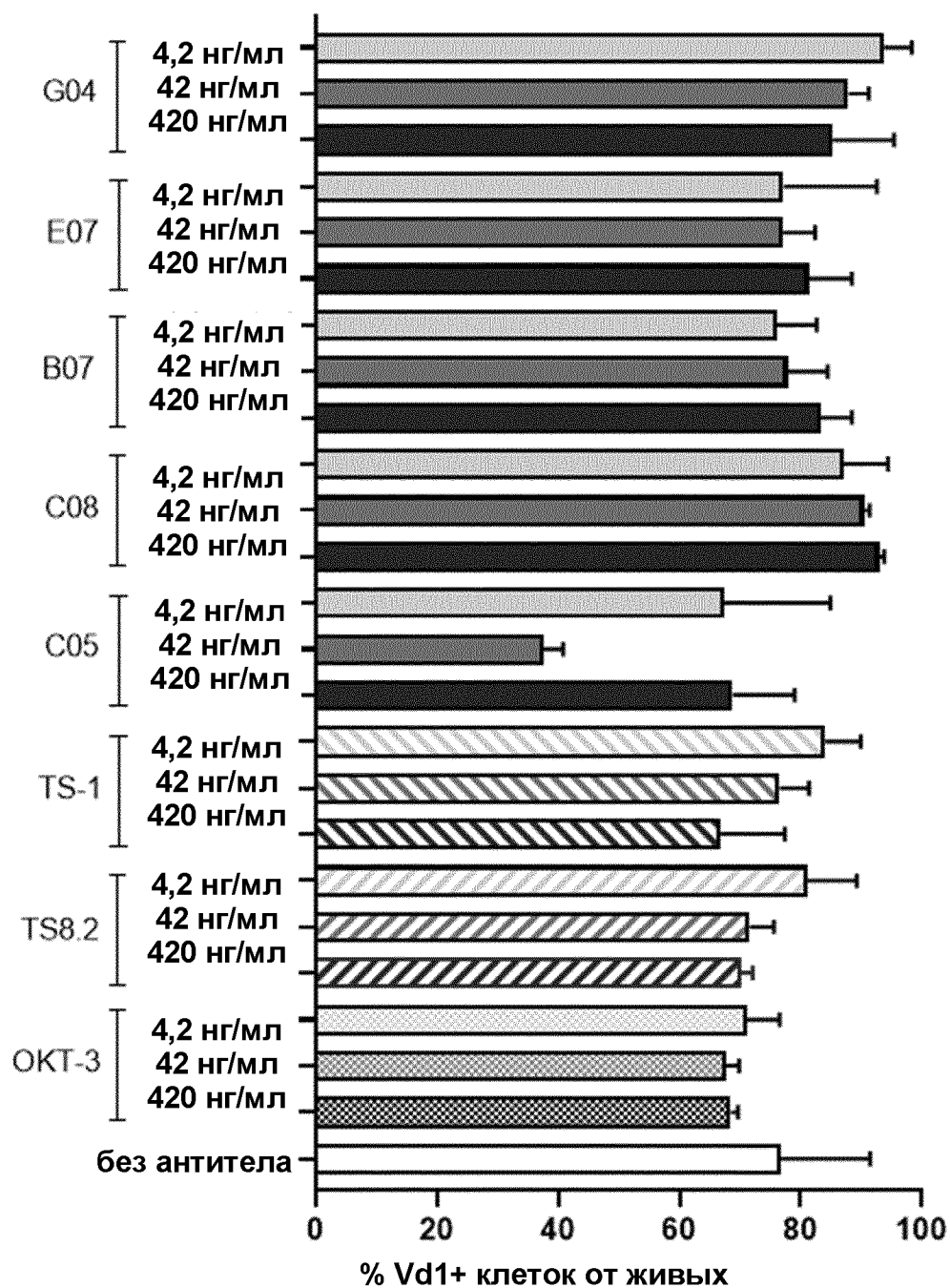
день 18, общее количество клеток – все



ФИГУРА 12 (продолж.)

А)

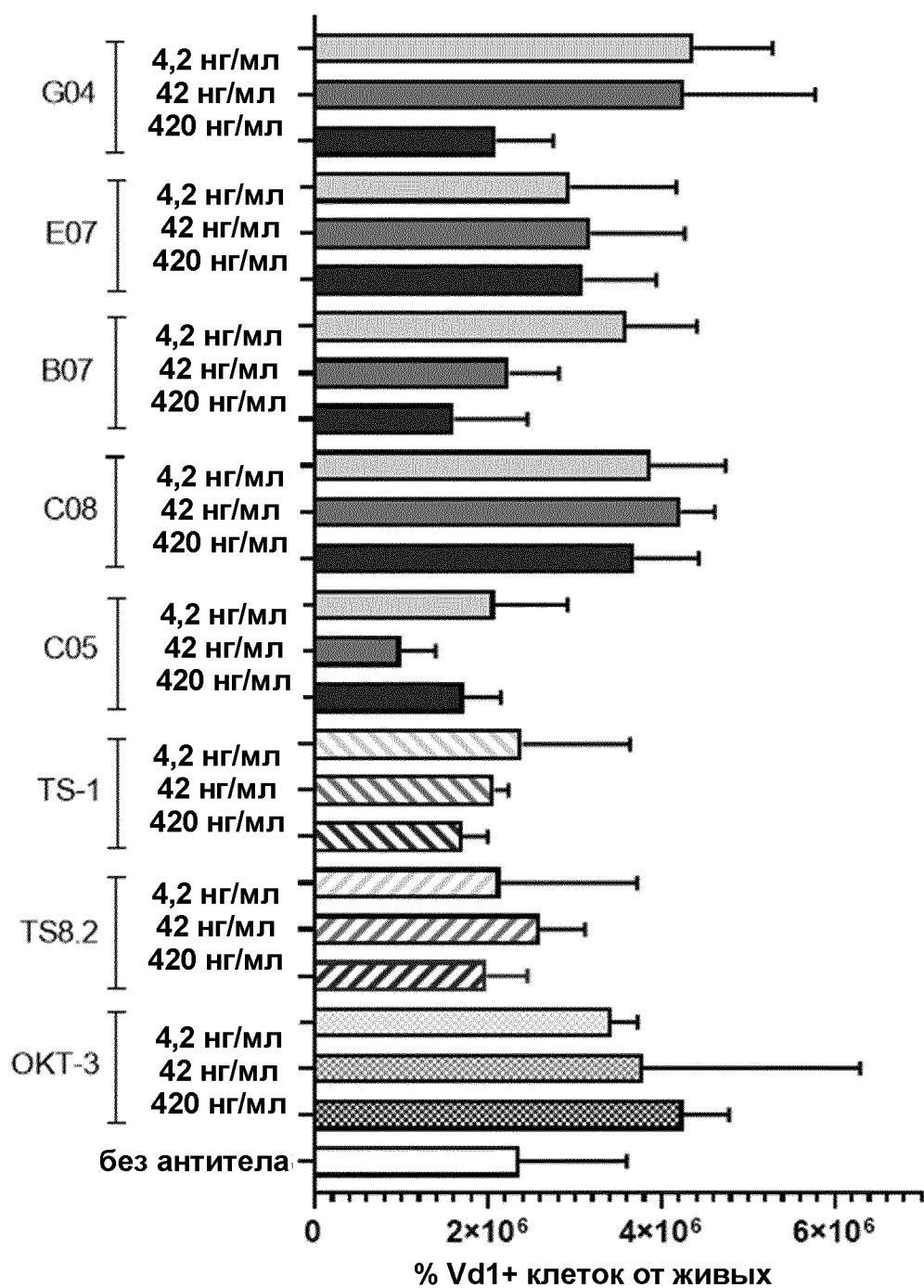
день 18, Vd1 % от живых



ФИГУРА 13

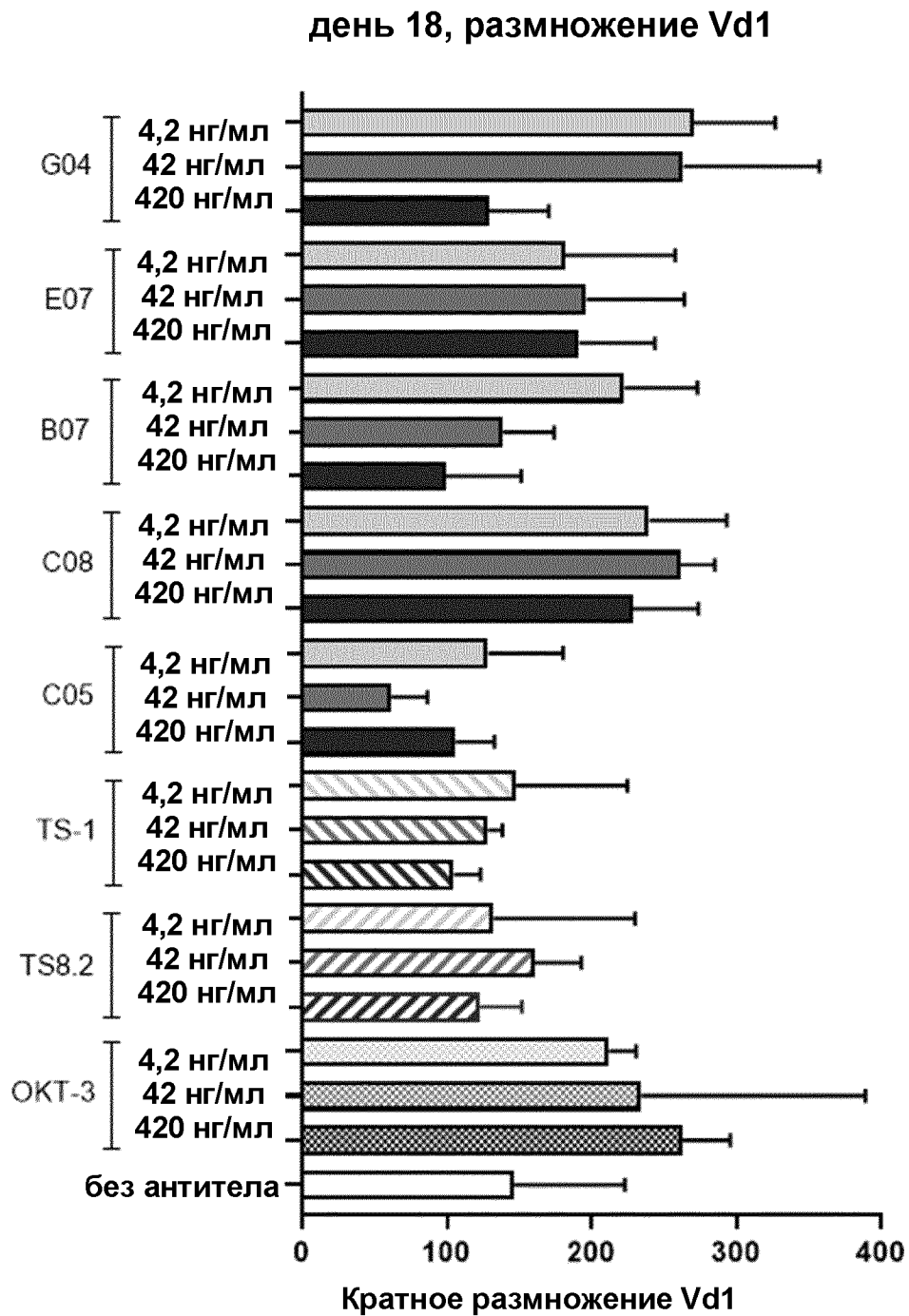
В)

день 18, количество Vd1 клеток



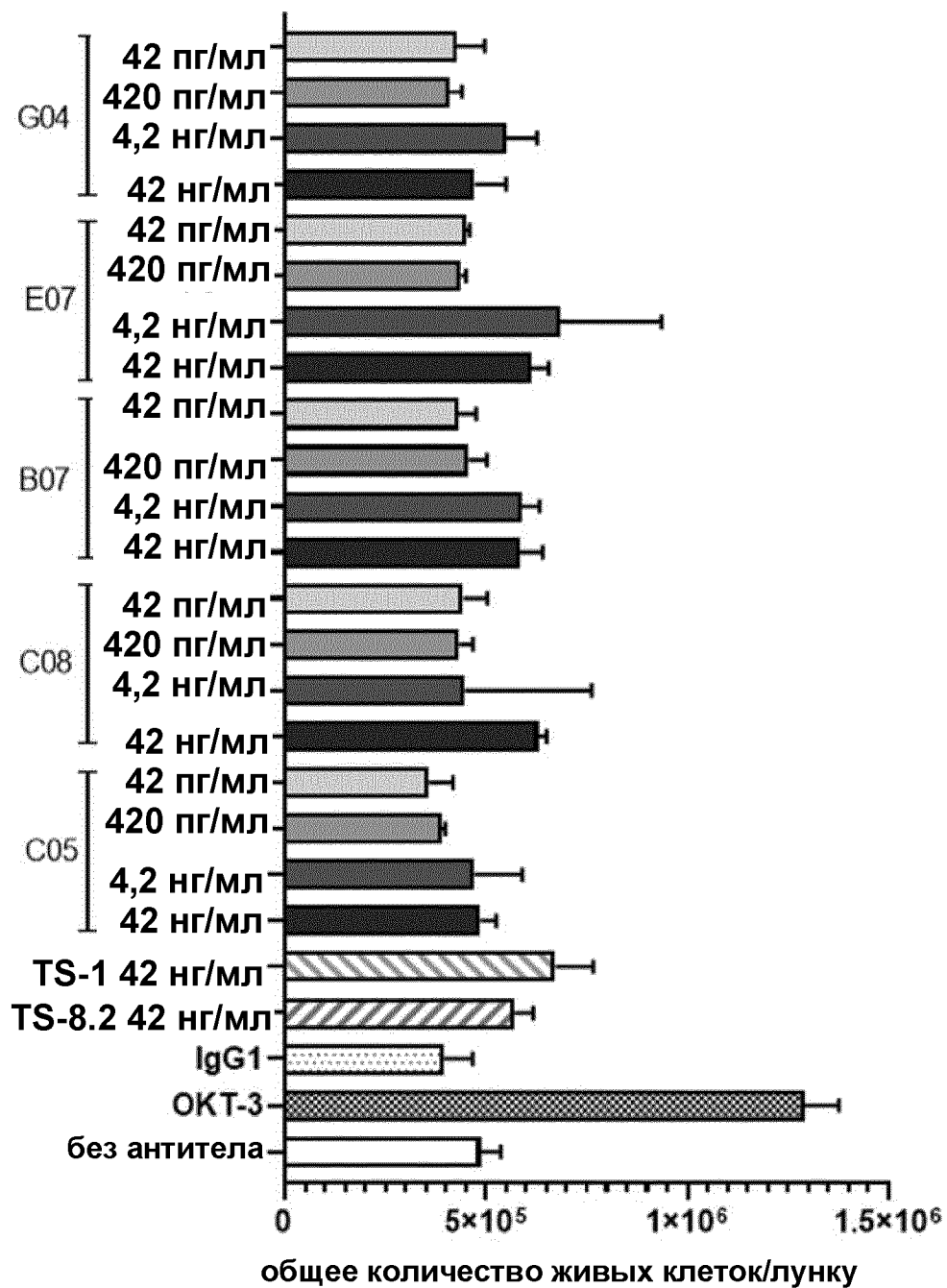
ФИГУРА 13 (продолж.)

С)

**ФИГУРА 13 (продолж.)**

А)

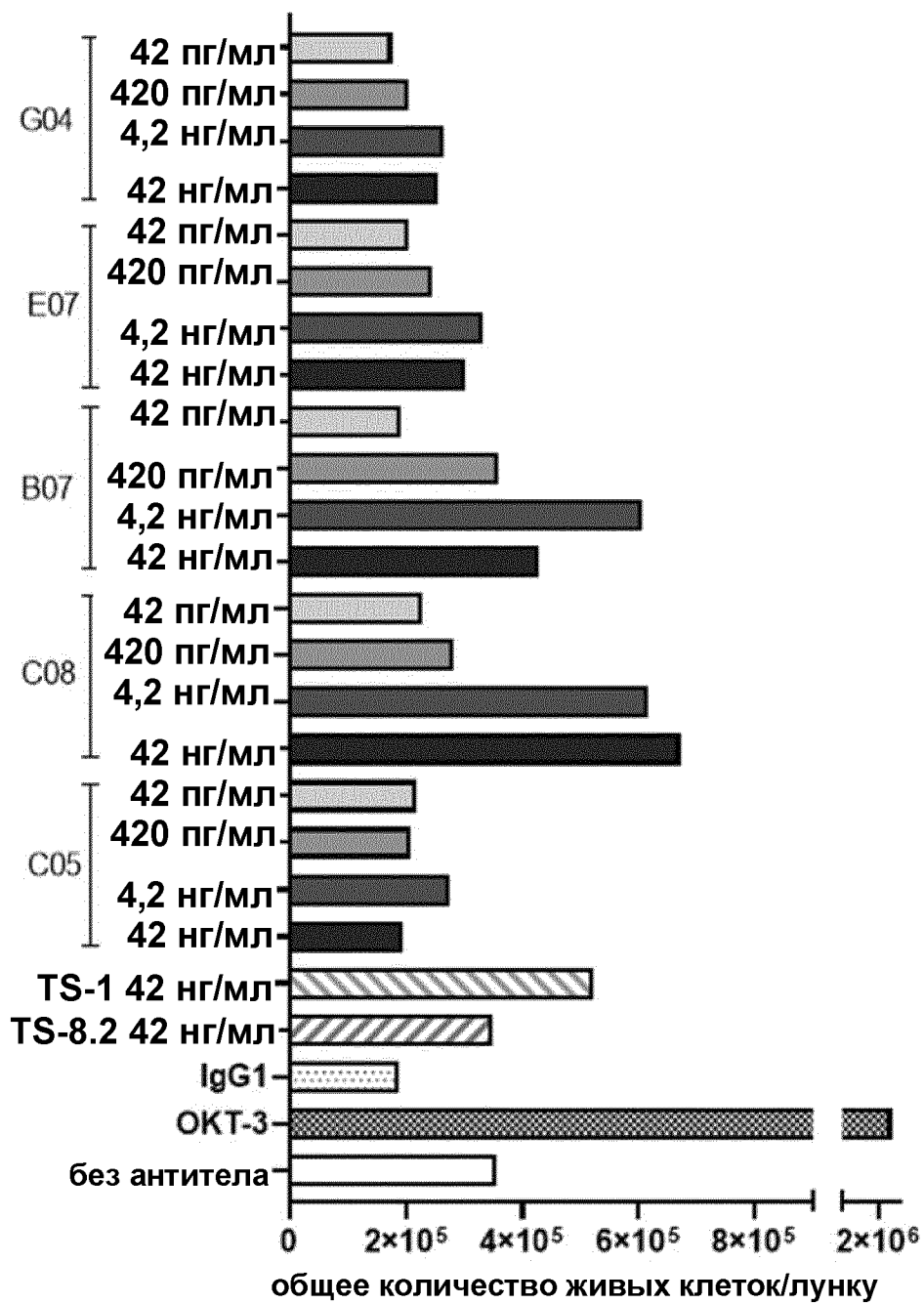
день 7, общее количество клеток



ФИГУРА 14

В)

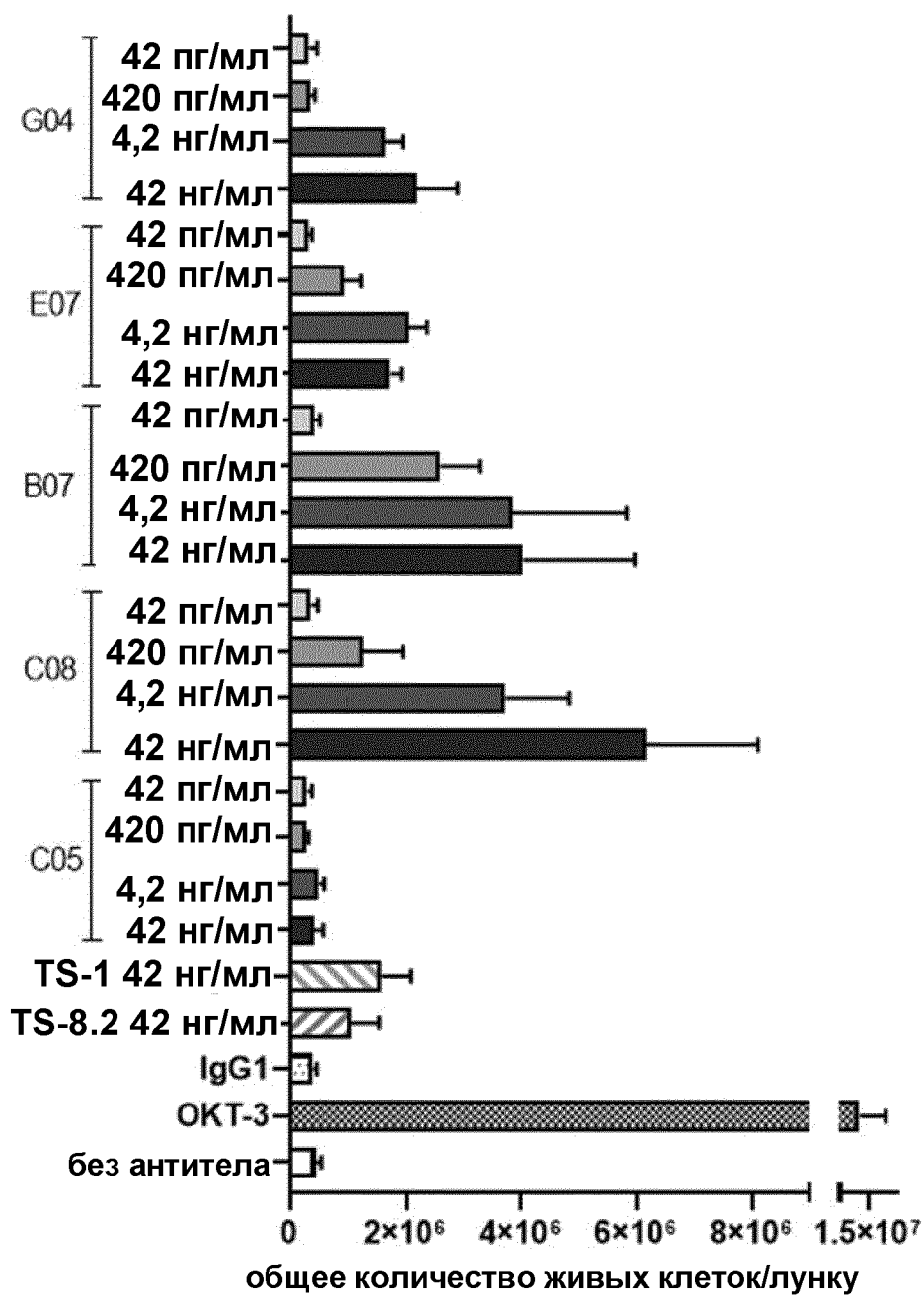
день 11, общее количество клеток



ФИГУРА 14 (продолж.)

С)

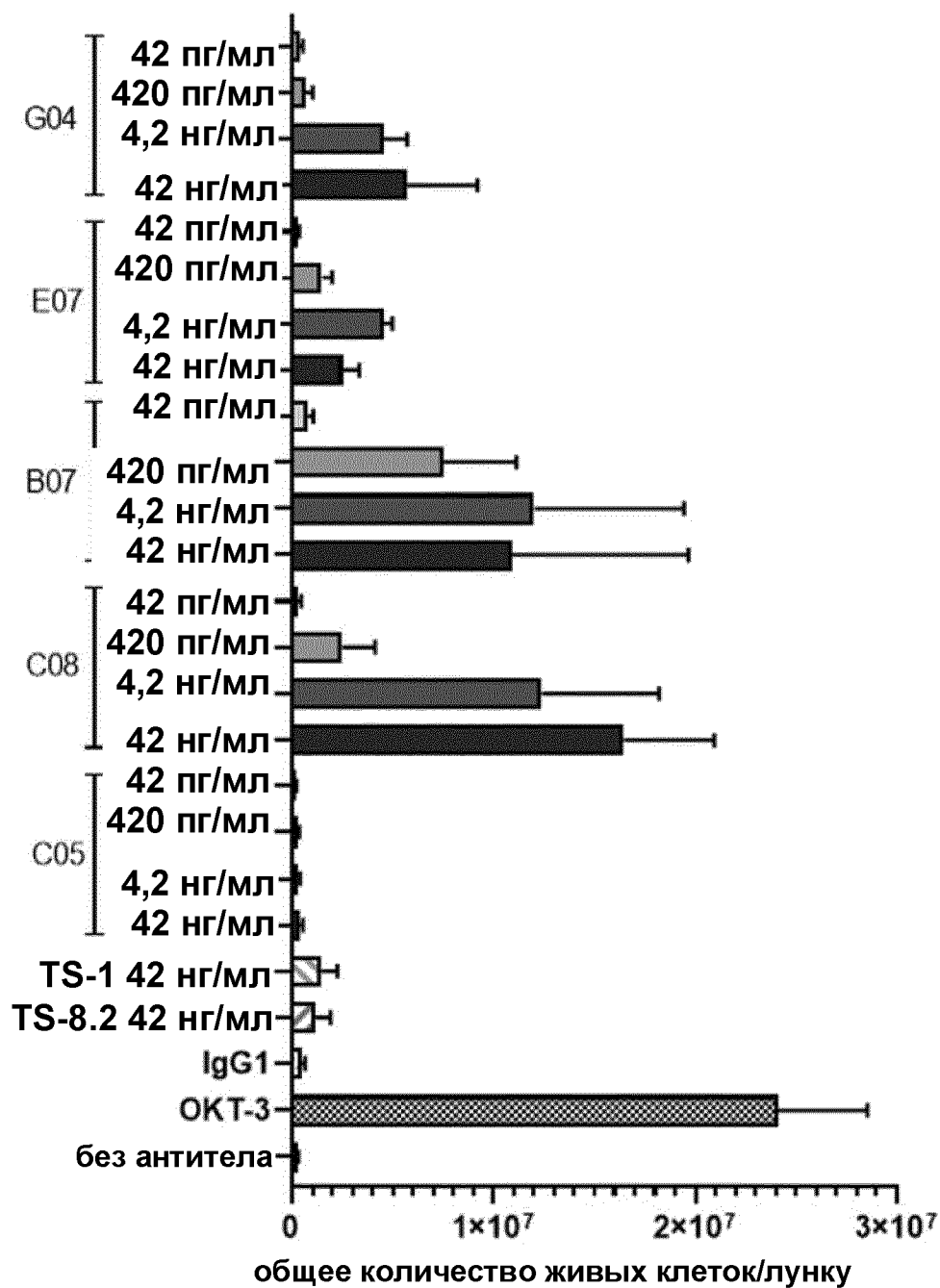
день 14, общее количество клеток



ФИГУРА 14 (продолж.)

D)

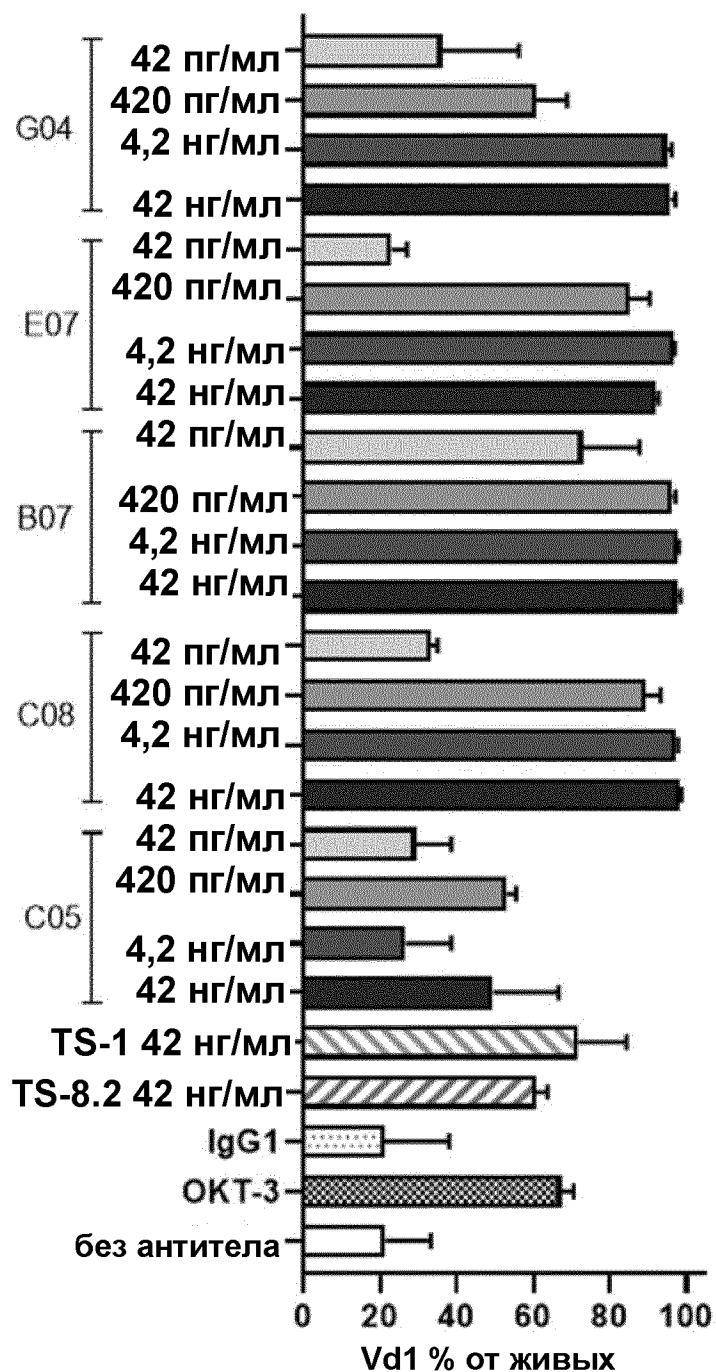
день 14, общее количество клеток



ФИГУРА 14 (продолж.)

A)

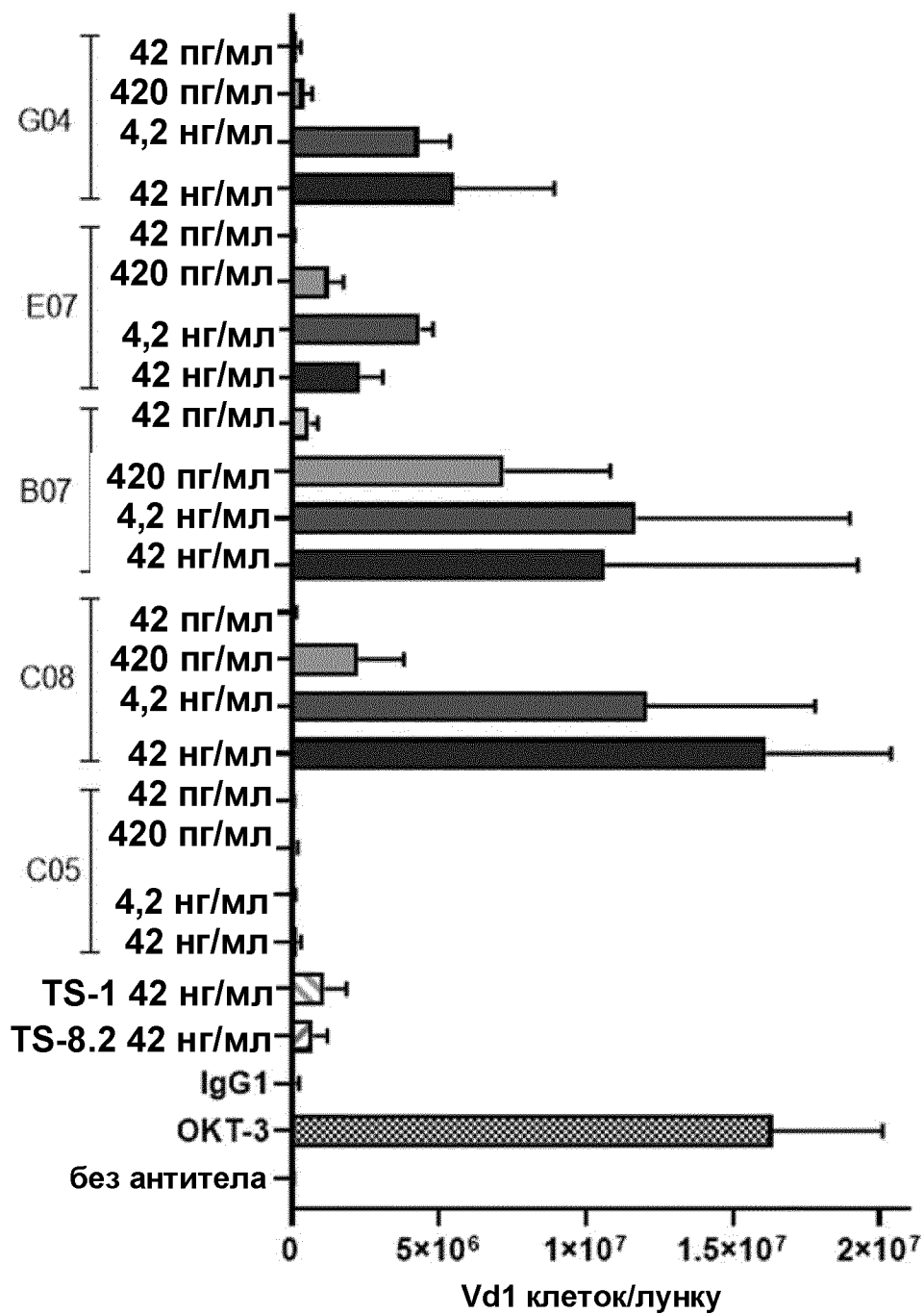
день 17, Vd1 %



ФИГУРА 15

В)

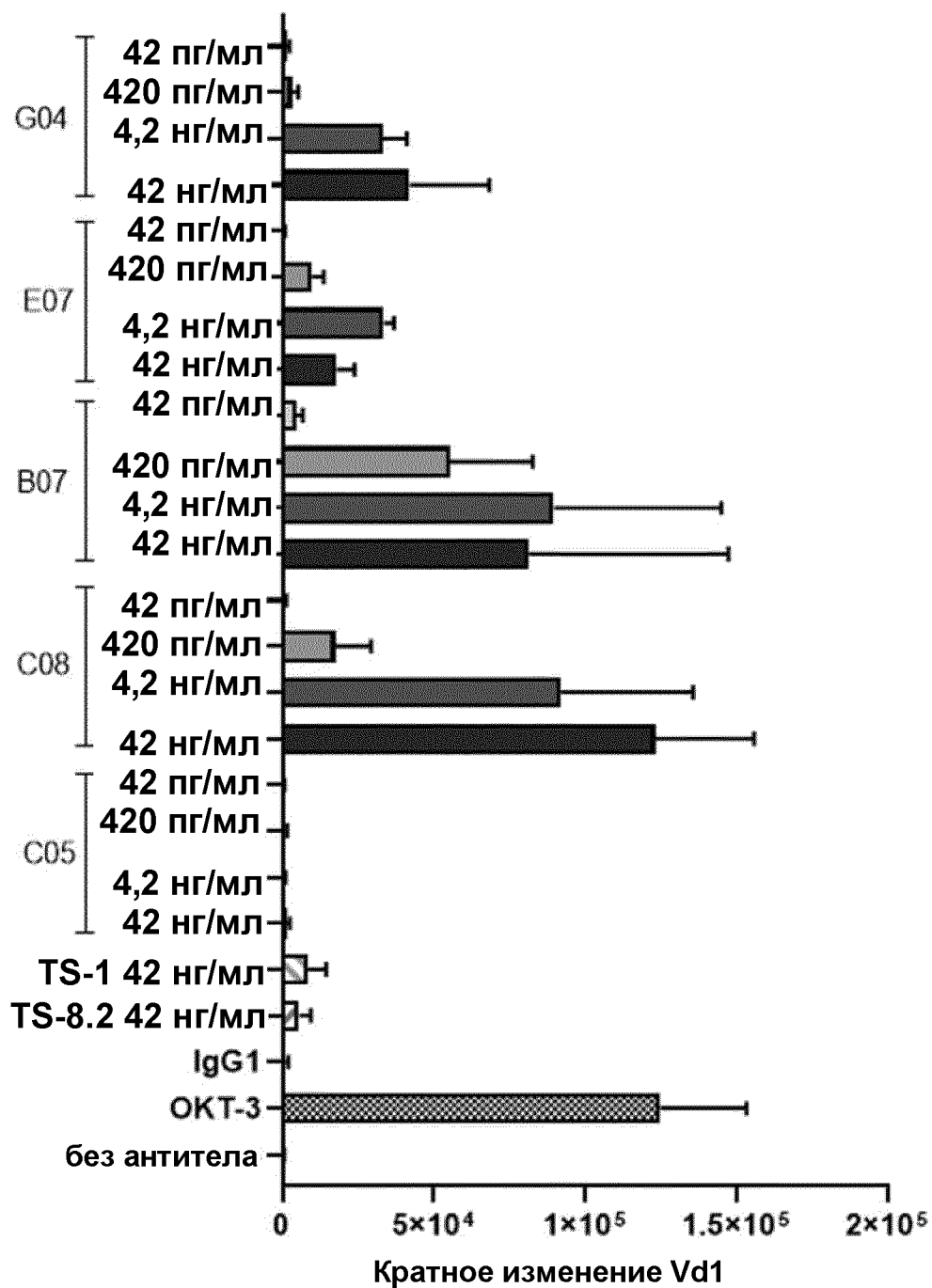
день 17, количество клеток Vd1



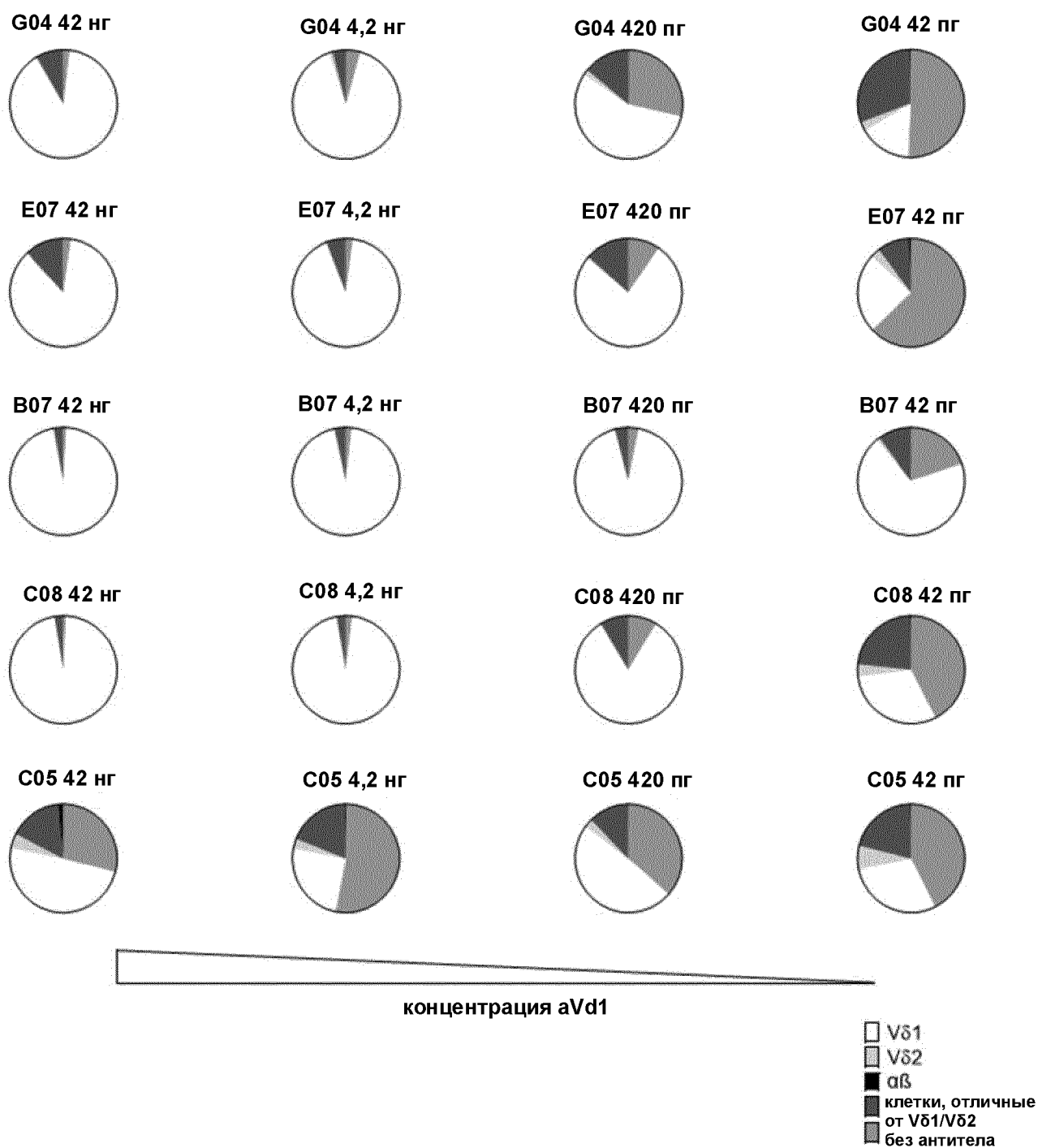
ФИГУРА 15 (продолж.)

С)

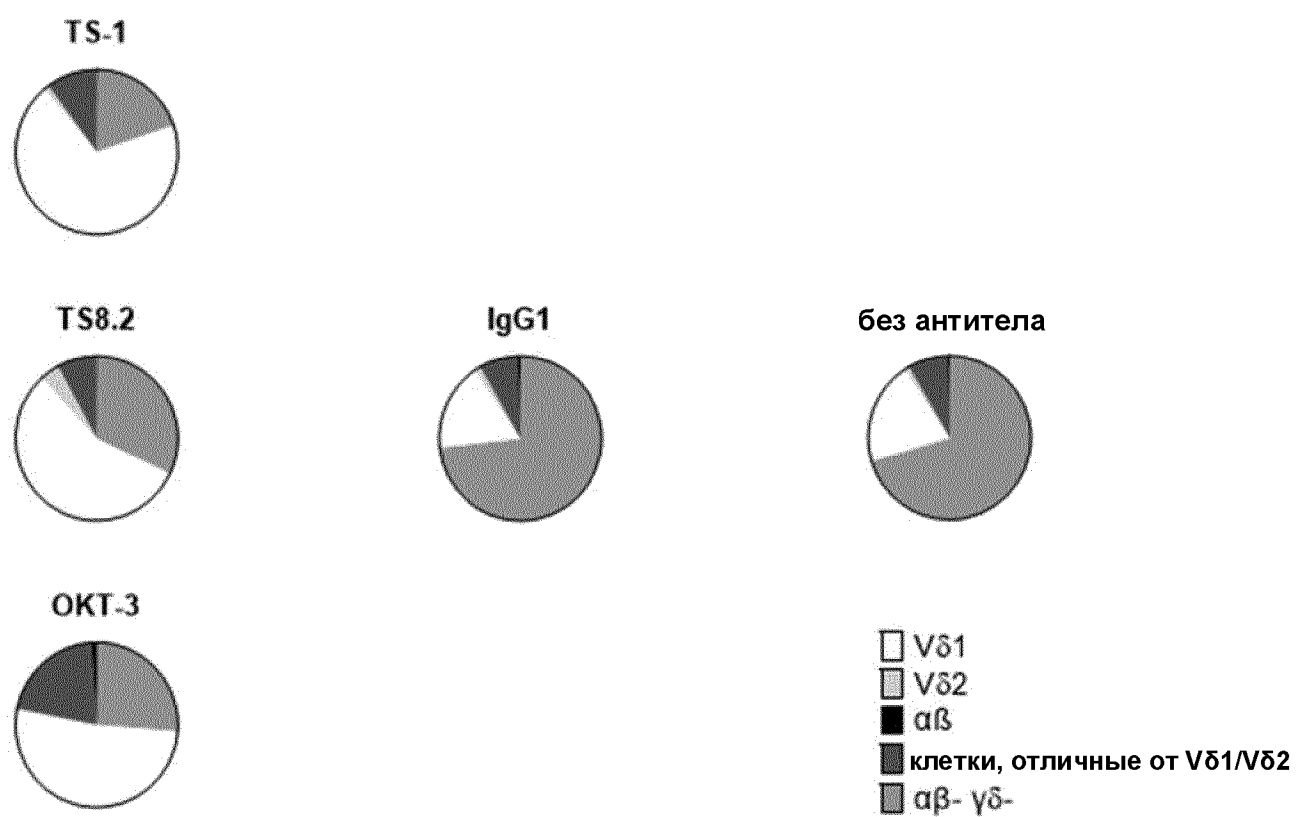
день 17, размножение Vd1



ФИГУРА 15 (продолж.)



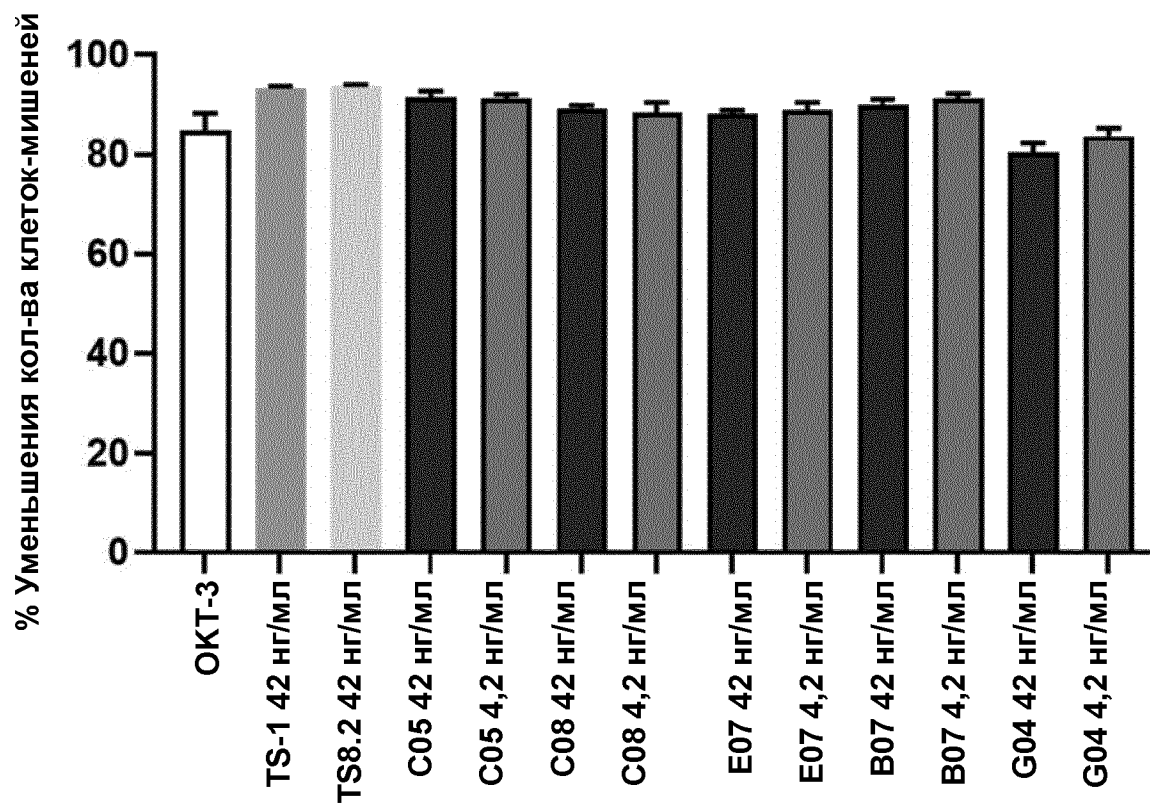
ФИГУРА 16



ФИГУРА 16 (продолж.)

А)

% Уменьшения кол-ва клеток-мишеней NALM-6



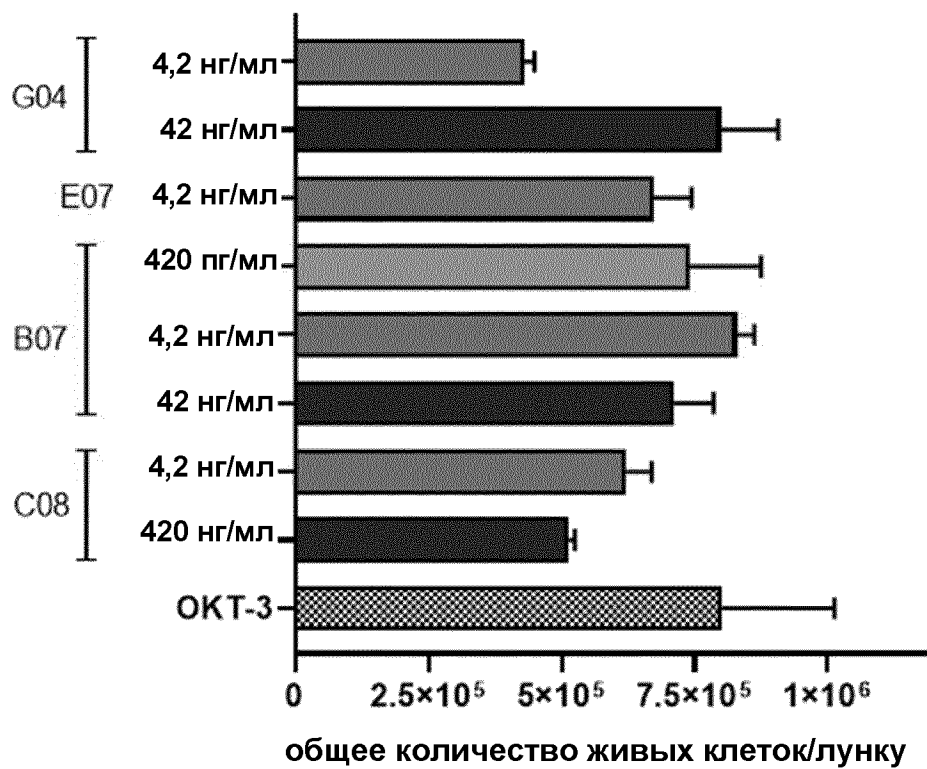
ФИГУРА 17

В)



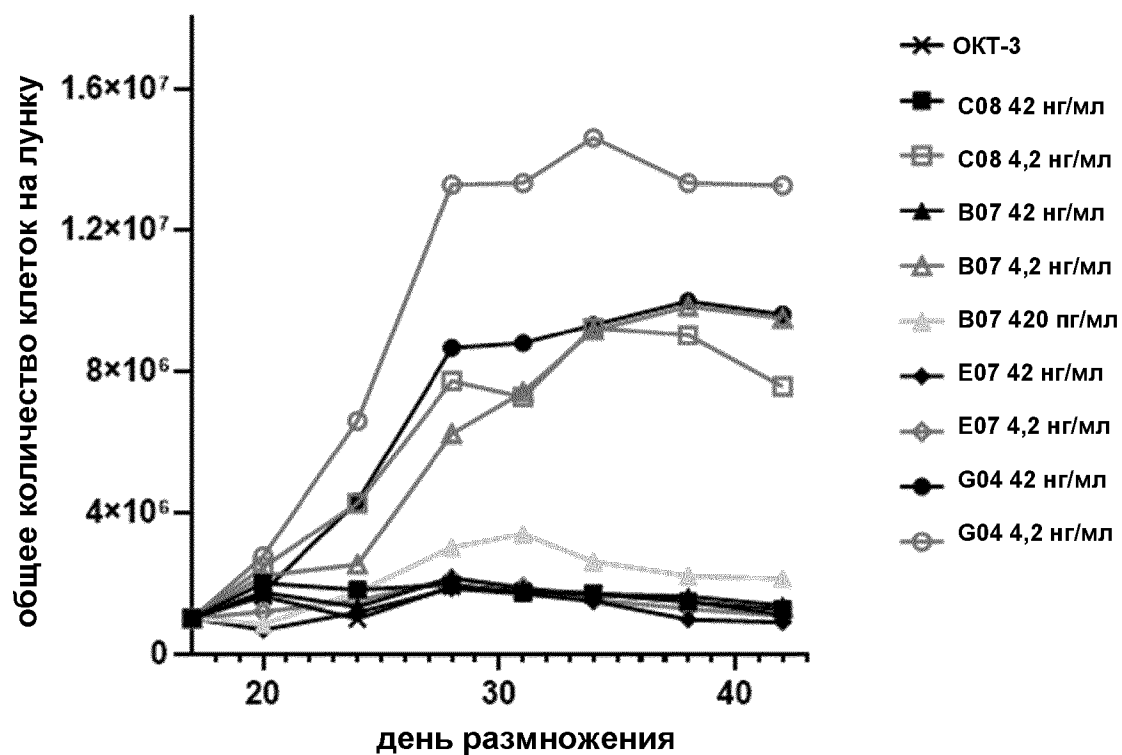
ФИГУРА 17 (продолж.)

Общее количество клеток после
оттаивания + IL-15 на день 7



ФИГУРА 18

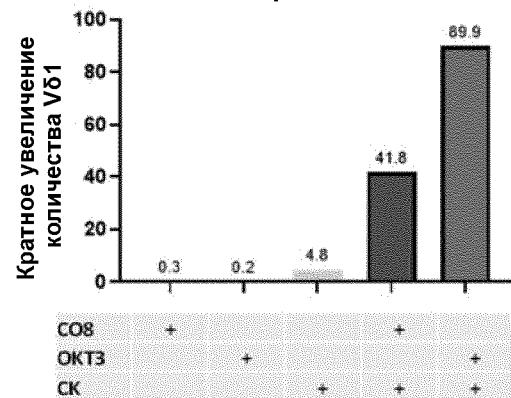
Размножение после повторного посева на день 17:
общее количество клеток



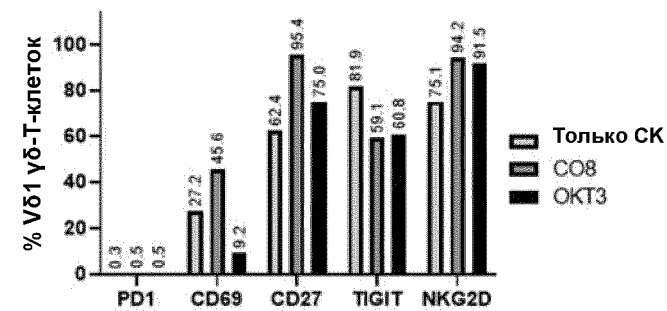
ФИГУРА 19

A)

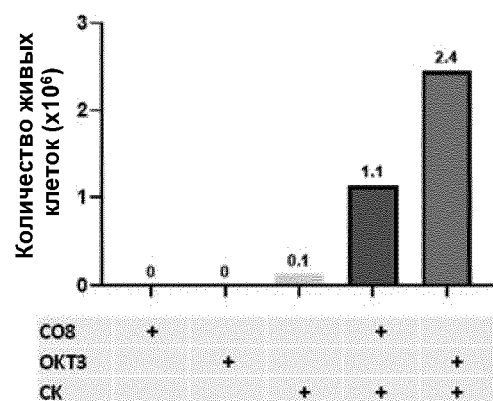
Кратное увеличение количества
V δ 1 $\gamma\delta$ -Т-клеток



D)

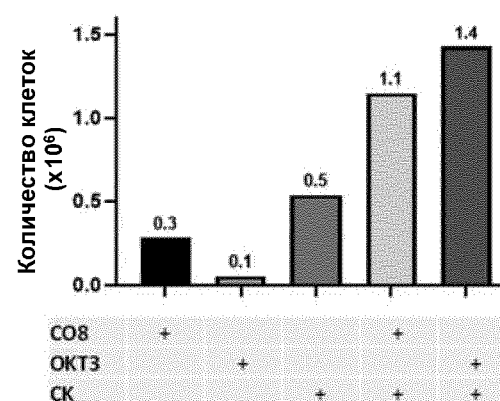


B)

V δ 1 $\gamma\delta$ -Т-клеток

E)

CD8+ лимфоциты



ФИГУРА 20

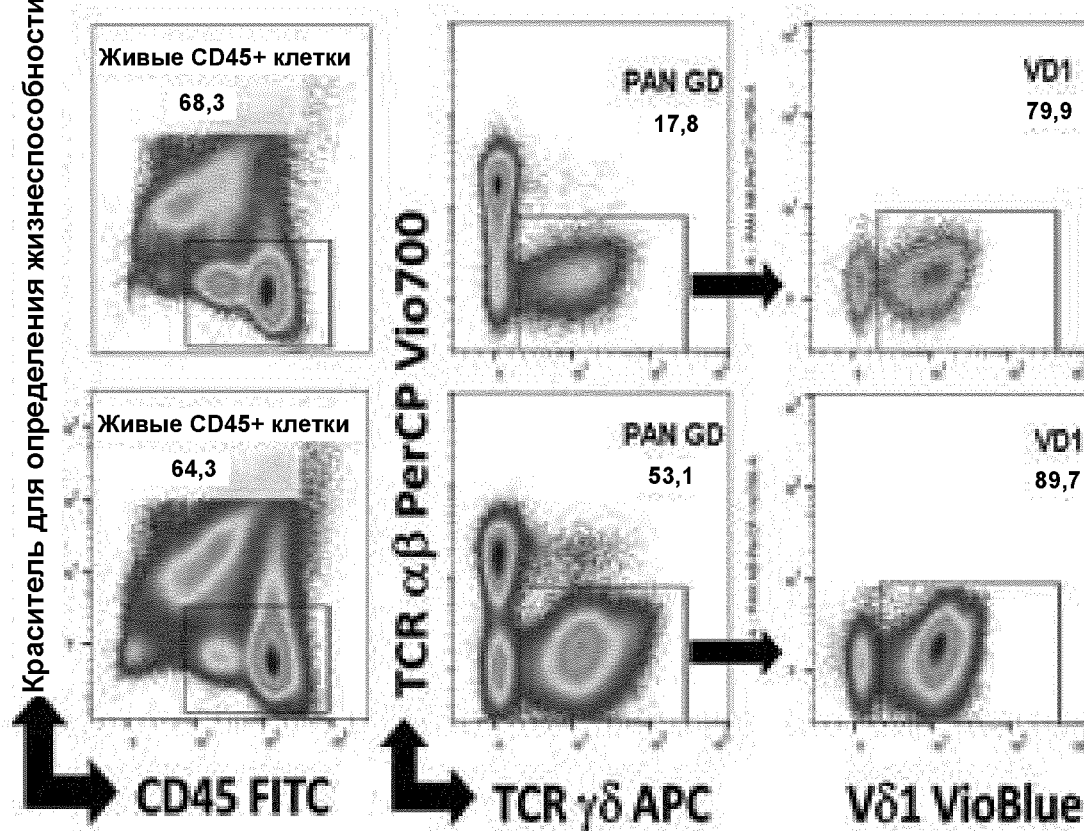
С)

Только СК

CD45 FITC vs TCR γδ APC

СК + C08 (500 нг/мл)

Краситель для определения жизнеспособности eFluor 780



ФИГУРА 20 (продолж.)