

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292494 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.26

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)
C07K 16/42 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.03

(54) $\gamma\delta$ Т-КЛЕТКИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/984,445

(32) 2020.03.03

(33) US

(86) PCT/IB2021/051779

(87) WO 2021/176373 2021.09.10

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

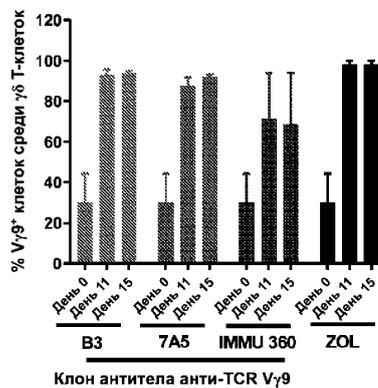
(72) Изобретатель:

Ганешан Раджкумар, Гревал
Икбал С., Сингх Санджая (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Предложены способы размножения и выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС). Также предложены выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки, CAR $\gamma\delta$ Т-клетки и способы их применения.



A1

202292494

202292494

A1

γδ Т-КЛЕТКИ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к размножению и выделению γδ Т-клеток и к использованию γδ Т-клеток для экспрессирования химерного антигенного рецептора для адаптивной Т-клеточной терапии.

10 ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде через EFS-Web как перечень последовательностей в формате ASCII с именем файла «688097.898US Sequence Listing», датой создания 20 февраля 2020 г. и
15 размером 3 Кб. Перечень последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью описания и полностью включен в настоящий документ путем ссылки.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генетическое конструирование Т-клеток для специфического взаимодействия и
20 уничтожения опухолевых клеток мишень-специфичным образом привело к появлению новых терапевтических возможностей для онкологических пациентов, так называемой терапии сконструированных Т-клеток. Такая специфичность к мишени обычно достигается путем генетической манипуляции над полученными от пациента Т-клетками с использованием рекомбинантной молекулы ДНК, которая кодирует
25 химерный антигенный рецептор (CAR). Рецепторы CAR представляют собой синтетические рецепторы, включающие внеклеточный домен-мишень, который связан с линкерным пептидом, трансмембранным (ТМ) доменом и одним или более внутриклеточными сигнальными доменами. Традиционно внеклеточный домен состоит из одноцепочечного фрагмента Fv антитела (scFv), который специфичен для заданного
30 ассоциированного с опухолью антигена (ТАА) или домена-мишени на клеточной поверхности. Внеклеточный домен scFv придает CAR специфичность к опухоли, а сигнальные домены активируют Т-клетку при взаимодействии с ТАА/мишенью. Такие сконструированные Т-клетки (CAR Т-клетки) вводят обратно онкологическим пациентам, и они специфически взаимодействуют с и уничтожают клетки,

экспрессирующие ТАА-мишень рецептора CAR (Maus et al., Blood. 2014 Apr 24;123(17):2625-35; Curran and Brentjens, J Clin Oncol. 2015 May 20;33(15):1703-6).

Аутологическая, адресная для пациента CAR-T терапия стала мощной и потенциально излечивающей терапией для рака, особенно для CD19-положительных гематологических злокачественных опухолей. Однако развитие CAR-T-технологии и ее более широкое применение частично ограничиваются рядом серьезных недостатков, включая а) неэффективный противоопухолевый ответ в солидных опухолях, б) ограниченные проникновение и уязвимость адаптивно перенесенных CAR T-клеток в иммуносупрессивном опухолевом микроокружении (TME), с) слабая устойчивость CAR T-клеток *in vivo*, d) серьезные нежелательные явления у пациентов, включая синдром высвобождения цитокинов (CRS) и реакцию «трансплантат против хозяина» (GVHD), опосредуемые CAR T-клетками, и е) время, требуемое для наработки препарата.

Решению основных проблем с имеющимися сегодня подходами CAR-T-технологии могло бы способствовать развитие альтернативной стратегии CAR-T, включающей получение универсальных аллогенных CAR T-клеток.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном общем аспекте предложен способ размножения и выделения $\gamma\delta$ T-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC). Способы включают этапы, на которых (а) получают клетки PBMC человека; (б) культивируют клетки PBMC человека в культуральной среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) и моноклональное антитело анти-TCR $V\gamma 9$ или его антигенсвязывающий фрагмент для размножения $\gamma\delta$ T-клеток; и (с) выделяют $\gamma\delta$ T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от около 50 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл. Концентрация IL-2 может, например, составлять от около 100 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл. В некоторых вариантах осуществления IL-2 представляет собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2).

В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетка представляет собой $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ T-клетку или $V\gamma 9^-$ $\gamma\delta$ T-клетку. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ T-клетки выделяют посредством проточной цитометрии, магнитного разделения и отрицательного отбора.

Также предложены выделенные $\gamma\delta$ T-клетки, полученные способами настоящего изобретения.

Также предложены способы получения клеток химерный антигенный рецептор (CAR) $\gamma\delta$ Т-клетка. Способы включают этапы, на которых (a) получают выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки настоящего изобретения; (b) приводят $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит

5 (i) внеклеточный домен; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный сигнальный домен, причем CAR необязательно дополнительно включает сигнальный пептид на amino-конце и шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен, и при этом приведение $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, генерирует CAR $\gamma\delta$ Т-клетку.

10 В некоторых вариантах осуществления CAR включает (i) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент; (ii) трансмембранный домен, содержащий CD8 α трансмембранный домен; (iii) внутриклеточный сигнальный домен, содержащий CD3 ζ или 4-1BB внутриклеточный домен; (iv) сигнальный пептид, содержащий CD8 α сигнальный пептид; и (v)

15 шарнирную область, содержащую CD8 α шарнирную область.

В некоторых вариантах осуществления CAR включает (i) трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1; (ii) внутриклеточный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную

20 последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3; (iii) и сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4; и (iv) шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5.

25 В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен включает антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с опухолевым антигеном.

Также предложены CAR $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способами настоящего изобретения.

30 В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая CAR $\gamma\delta$ Т-клетку настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

Также предложены способы лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение

терапевтически эффективного количества фармацевтических композиций настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. Рак может, например, быть выбран из солидного рака или гемобластоза. Рак может быть без ограничений выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака простаты, рака щитовидной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), ходжкинской лимфомы/болезни (БХ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других гемобластозов.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание. Аутоиммунное заболевание может без ограничений представлять собой аутоиммунное заболевание, выбранное из группы, состоящей из алопеции, амилоидоза, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Кастлемана (БК), целиакии, болезни Крона, эндометриоза, фибромиалгии, гломерулонефрита, базедовой болезни, синдрома Гийена — Барре, IgA-нефропатии, волчанки, болезни Лайма, болезни Менъера; множественного склероза, нарколепсии, нейтропении, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, диабета I типа, язвенного колита и витилиго.

Также предложены способы получения фармацевтической композиции, содержащей CAR $\gamma\delta$ T-клетку, причем способы включают объединение CAR $\gamma\delta$ T-клетки настоящего изобретения с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Приведенное выше краткое описание, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения будут более понятны при изучении вместе с приложенными графическими материалами. Однако необходимо понимать, что применение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на графических материалах.

На **ФИГ. 1А–1В** показана экспериментальная стратегия и стратегия гейтирования в проточной цитометрии для размножения и идентификации $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток РВМС. На **ФИГ. 1А** показана схема эксперимента для опосредуемого анти-TCR $V\gamma 9$ mAb размножения $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток РВМС.

5 На **ФИГ. 1В** схематически представлена стратегия гейтирования в проточной цитометрии для идентификации $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клеток среди цельных клеток РВМС или $\gamma\delta$ Т-клеток.

10 На **ФИГ. 2А–2В** показано опосредуемое анти-TCR $V\gamma 9$ mAb размножение $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток РВМС. На **ФИГ. 2А** показаны графики проточной цитометрии для опосредуемого анти-TCR $V\gamma 9$ mAb размножения $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток РВМС. Вкратце, полмиллиона цельных клеток РВМС высевали в лунку 24-луночного планшета с предварительно нанесенными анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (клоны В3, 7А5 и IMMU 360) и культивировали в присутствии 200 МЕ IL-2 и 2 мкг/мл CD28 в течение 15 дней. Числа в квадрантах представительных графиков FACS показывают частоту $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$ Т-клеток среди всех живых клеток РВМС на день 0, 11 и 15 периода культивирования. На **ФИГ. 2В** представлен график, демонстрирующий кратности размножения TCR $\gamma\delta$ Т-клеток. Столбики отражают кратности размножения (средняя частота \pm СО) $\gamma\delta$ Т-клеток среди всех живых клеток РВМС, которые размножали в присутствии либо иммобилизованных на планшете клонов анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (В3, 7А5 и IMMU 360), либо золедроновой кислоты, на день 0, 11 и 15 периода культивирования. $n = 2$ доноров из одного эксперимента.

25 На **ФИГ. 3А–3В** показано опосредуемое анти-TCR $V\gamma 9$ mAb селективное размножение $V\gamma 9^+$ клеток среди цельных $\gamma\delta$ Т-клеток. На **ФИГ. 3А** показаны графики проточной цитометрии для опосредуемого анти-TCR $V\gamma 9$ mAb селективного размножения $V\gamma 9^+$ клеток среди цельных $\gamma\delta$ Т-клеток. Вкратце, полмиллиона цельных клеток РВМС высевали в лунку 24-луночного планшета с предварительно нанесенными анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (клоны В3, 7А5 и IMMU 360) и культивировали в присутствии 200 МЕ IL-2 и 2 мкг/мл CD28 в течение 15 дней. Числа над гейтами в представительных графиках FACS показывают частоту $V\gamma 9^-$ и $V\gamma 9^+$ клеток среди цельных $\gamma\delta$ Т-клеток на день 0, 11 и 15 периода культивирования. На **ФИГ. 3В** представлен график, демонстрирующий долю $V\gamma 9^+$ клеток среди $\gamma\delta$ Т-клеток. Столбики отражают среднюю частоту (\pm СО) $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клеток среди всех $\gamma\delta$ Т-клеток, которые размножали в присутствии либо иммобилизованных на планшете клонов анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (В3, 7А5

и IMMU 360), либо золедроновой кислоты, на день 0, 11 и 15 периода культивирования. n = 2 доноров из одного эксперимента.

На **ФИГ. 4А–4В** показано, что $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клетки, которые размножали с использованием анти-TCR $V\gamma 9$ mAb или золедроновой кислоты, демонстрируют аналогичные способности к активации и трансдукции. На **ФИГ. 4А** показаны графики FACS на день 0 и 15 для $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клеток, которые размножали с использованием либо анти-TCR $V\gamma 9$ mAb, либо золедроновой кислоты. Числа над гейтами в представительных графиках FACS показывают частоту $CD69^+$ клеток среди $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клеток, со дня 0 и дня 15 культивирования, которые размножали в присутствии либо клонов анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (B3, 7A5 и IMMU 360), либо золедроновой кислоты. На **ФИГ. 4В** представлен график, демонстрирующий долю $CD69^+$ клеток среди $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клеток. Столбики показывают среднюю частоту ($\pm CO$) $CD69^+$ клеток среди $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клеток, которые размножали в присутствии либо клонов анти-TCR $V\gamma 9$ mAb (B3, 7A5, IMMU360), либо золедроновой кислоты, на день 0, 11 и 15 периода культивирования. n = 2 доноров из одного эксперимента.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; причем каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании.

Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как

модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает в себя все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в изобретение.

В настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не к исключающему «или». Например, условие «А или В» выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует), и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и второго

элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет

5 требованию термина «и/или».

В настоящем документе термин «состоять из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть
10 добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В настоящем документе термин «состоять по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого
15 перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В настоящем документе термин «субъект» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. В настоящем
20 документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п. и более предпочтительно человека.

Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «по
25 существу», «главным образом» и подобные термины, используемые в данном документе при упоминании размера или характеристики компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или
30 аналогичны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум такие ссылки, содержащие числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, полипептидов CAR и полинуклеотидов CAR, которые их кодируют), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются
5 одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, определяемого с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального осмотра.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность
10 выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытуемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводят испытуемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма
15 последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для испытуемой (-ых) последовательности (-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно
20 проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT,
25 FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или путем визуальной проверки (*см. по существу Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel *et al.*, eds., Current Protocols, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

30 Примерами алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403–410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный

центр биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. T называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul *et al*, выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP с ними. Совпадения слов затем расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать.

Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за не совпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей матрицу подсчета баллов используют для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M = 5$, $N = -4$, а также сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательности алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873–5787 (1993)). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность, при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайным образом. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой

составляет менее около 0,1, более предпочтительно менее около 0,01, а наиболее предпочтительно менее около 0,001.

Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях.

В настоящем документе термин «выделенный» означает, что биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, пептид, белок или клетка) был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т. е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК, белков, клеток и тканей. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды, белки и клетки, которые были «выделены», включают в себя нуклеиновые кислоты, пептиды, белки и клетки, очищенные стандартными методами очистки и методами очистки, описанными в настоящем документе. «Выделенные» нуклеиновые кислоты, пептиды, белки и клетки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида, белка или клетки. Термин также включает в себя нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты.

В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того,

«полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей.

5 «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК,
10 характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

В настоящем документе термин «вектор» представляет собой репликон, в который может быть функционально вставлен другой нуклеотидный сегмент так,
15 чтобы происходила репликация или экспрессия сегмента.

В настоящем документе термин «клетка-хозяин» относится к клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты изобретения. Термин «клетка-хозяин» может относиться к любому типу клетки, например к первичной клетке (например, $\gamma\delta$ Т-клетка), клетке в культуре или клетке из клеточной линии. В одном варианте
20 осуществления «клетка-хозяин» представляет собой клетку, трансфицированную молекулой нуклеиновой кислоты изобретения. В другом варианте осуществления «клетка-хозяин» представляет собой потомство или потенциальное потомство такой трансфицированной клетки. Потомство клетки может быть или не быть идентичным родительской клетке, например, из-за мутаций или воздействий окружающей среды,
25 которые могут происходить в последующих поколениях, или из-за интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все
30 посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения. Экспрессированный CAR может находиться в цитоплазме клетки-хозяина, во внеклеточной среде, такой как среда для выращивания клеточной культуры, или может быть прикрепленным к клеточной мембране.

В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, образованной из аминокислот, и могут быть признаны специалистами в данной области как белок. В настоящем документе используется обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков.

5 Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут применяться взаимозаменяемо и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и неаминокислотные перемишечки. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства; 10 например, это может быть образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгация с маркирующим компонентом. Определение также включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т. п.), а также другие 15 модификации, известные в данной области.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если 20 явным образом не указано иное.

В настоящем документе термин «иммунная клетка» или «иммунная эффекторная клетка» относится к клетке, которая участвует в иммунном ответе, например в стимуляции иммунного эффекторного ответа. Примеры иммунных клеток включают в себя Т-клетки, В-клетки, натуральные киллеры (НК), тучные клетки и 25 фагоциты миелоидного происхождения. Согласно конкретным вариантам осуществления, сконструированные иммунные клетки представляют собой Т-клетки (например, $\gamma\delta$ Т-клетки) и называются CAR Т-клетками (например, CAR $\gamma\delta$ Т-клетки), поскольку они сконструированы для экспрессии CAR настоящего изобретения.

В настоящем документе термин «сконструированная иммунная клетка» 30 относится к иммунной клетке, также называемой иммунной эффекторной клеткой, которая была генетически модифицирована путем добавления дополнительного генетического материала в форме ДНК или РНК к общему генетическому материалу клетки. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения,

сконструированные иммунные клетки были генетически модифицированы для экспрессии конструкта CAR в соответствии с настоящим изобретением.

Способы размножения и очистки $\gamma\delta$ Т-клеток

В настоящем документе предложены готовые аллогенные CAR Т-клеточные продукты на основе $\gamma\delta$ Т-клеток. Использование $\gamma\delta$ Т-клеток позволяет разрабатывать продукт высокого качества, сочетающий в себе присущую $\gamma\delta$ Т-клеткам универсальную природу с их мощными цитолитическими функциями для снижения риска ухода опухоли от иммунного уничтожения. Такой подход позволяет уменьшить побочные эффекты, опосредуемые синдромом высвобождения цитокинов (CRS)/реакций «трансплантат против хозяина» (GVHD), и защищает от долгосрочной аутоиммунитета, обеспечивая при этом высокую эффективность, особенно в солидных опухолях. $\gamma\delta$ Т-клетки присутствуют в крови в большом количестве и имеют хорошие маркеры для сортировки и могут быть легко активированы и размножены в больших количествах хорошо определенными лигандами. Поскольку распознавание $\gamma\delta$ Т-клеток не зависит от главного комплекса гистосовместимости (МНС), $\gamma\delta$ Т-клетки не участвуют в реакции «трансплантат против хозяина» (GVHD), и отсутствует риск аллогенного распознавания, $\gamma\delta$ Т-клетки могут выступать в роли аллогенного источника CAR Т-клеток для более широкой популяции пациентов. Готовые продукты могут иметь ряд преимуществ, включая стабильное качество, возможность сортировки клеток для получения 100% трансдукции, отсутствие ограничений по дозировке, снижение стоимости и значительно сокращение времени до начала терапии у пациентов.

Согласно конкретным аспектам, в настоящем изобретении предложены способы размножения и выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС). В одном общем аспекте способы включают (а) получение клеток РВМС человека; (b) культивируют клетки РВМС человека в культуральной среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) и моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент для размножения $\gamma\delta$ Т-клеток; и (с) выделяют $\gamma\delta$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетка представляет собой V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клетку.

Также предложены выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки, включая выделенные V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способами настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от около 50 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл. Концентрация IL-2 может, например, составлять от

около 50 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около 50 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл, от
около 50 МЕ/мл до около 2000 МЕ/мл, от около 50 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл, от
около 50 МЕ/мл до около 500 МЕ/мл, от около 50 МЕ/мл до около 250 МЕ/мл, от около
100 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около
5 100 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 2000 МЕ/мл, от около
100 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл, от около 100 МЕ/мл до около 500 МЕ/мл, от около
250 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл, от около 250 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около
250 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл, от около 250 МЕ/мл до около 2000 МЕ/мл, от около
250 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл, от около 500 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл, от около
10 500 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около 500 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл, от около
500 МЕ/мл до около 2000 МЕ/мл, от около 500 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл, от около
1000 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл, от около 1000 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около
1000 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл, от около 1000 МЕ/мл до около 2000 МЕ/мл, от около
2000 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл, от около 2000 МЕ/мл до около 4000 МЕ/мл, от около
15 2000 МЕ/мл до около 3000 МЕ/мл или быть равной любой из промежуточных
концентраций. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет
50, 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 МЕ/мл. В
некоторых вариантах осуществления IL-2 представляет собой рекомбинантный IL-2
человека (rhIL-2).

20 Также предложены способы получения клеток химерный антигенный рецептор
(CAR) $\gamma\delta$ Т-клетка. Способы включают этапы, на которых (a) получают выделенные $\gamma\delta$
Т-клетки настоящего изобретения; (b) приводят $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой
кислотой, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит
(i) внеклеточный домен; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный
25 сигнальный домен, причем CAR необязательно дополнительно включает сигнальный
пептид на amino-конце и шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и
трансмембранный домен, и при этом приведение $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой
кислотой, кодирующей CAR, генерирует CAR $\gamma\delta$ Т-клетку.

30 Таким образом, в некоторых вариантах осуществления выделенные $\gamma\delta$ Т-клетки
могут включать кодирующий CAR выделенный полинуклеотид или вектор,
содержащий кодирующий CAR выделенный полинуклеотид. Иммунные клетки,
содержащие выделенные полинуклеотиды и/или векторы, могут называться
«сконструированными иммунными клетками». Предпочтительно сконструированные
иммунные клетки получают от человека (имеют человеческое происхождение, прежде

чем будут сделаны рекомбинантными). Сконструированные иммунные клетки могут, например, представлять собой Т-клетки, и в частности представляют собой $\gamma\delta$ Т-клетки, выделенные способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки представляют собой $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки, выделенные способами, описанными в настоящем документе.

$\gamma\delta$ Т-клетки, включая $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клетки, можно размножать и выделять с использованием способов, описанных в настоящем документе. Иммунные клетки могут дополнительно быть выделены способами, известными в данной области, включая коммерчески доступные способы (см., например, Rowland Jones et al., *Lymphocytes: A Practical Approach*, Oxford University Press, NY (1999)). Источники иммунных клеток или их предшественников без ограничений включают в себя периферическую кровь (например, мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC)), пуповинную кровь, костный мозг или другие источники гемопоэтических клеток. Для отделения или обогащения требуемых иммунных клеток можно использовать различные методики. Например, для удаления клеток, которые не являются требуемыми иммунными клетками, можно использовать способы отрицательного отбора. Кроме того, для выделения или обогащения требуемых иммунных клеток или их предшественников можно использовать способы положительного отбора или можно использовать комбинацию способов положительного и отрицательного отбора. Если необходимо выделить конкретный тип клетки, например конкретную Т-клетку, для разделения клеток можно использовать различные маркеры клеточной поверхности или комбинации маркеров (например, CD3, CD4, CD8, CD34). В некоторых вариантах осуществления $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют посредством проточной цитометрии, магнитного разделения и отрицательного отбора.

$\gamma\delta$ Т-клетки могут быть аутологичными или неаутологичными субъекту, которому их вводят в способах лечения настоящего изобретения. Аутологичные клетки забирают у субъекта, которому необходимо вводить сконструированные иммунные клетки, рекомбинантно экспрессирующие CAR. Альтернативно можно использовать аллогенные клетки от неаутологичного донора, который не является субъектом. В случае неаутологичного донора клетки типизируют и сопоставляют по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA) для определения соответствующего уровня совместимости. Как в случае аутологичных, так и в случае неаутологичных клеток клетки могут быть необязательно криоконсервированы до момента их применения.

Согласно конкретным вариантам осуществления, способ получения сконструированных иммунных клеток включает трансфекцию или трансдукцию иммунных эффекторных клеток, выделенных у индивидуума, так что иммунные эффекторные клетки экспрессируют один или более CAR в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Способы приготовления иммунных клеток для иммунотерапии описаны, например, в WO2014/130635, WO2013/176916 и WO2013/176915, которые включены в настоящий документ путем ссылки. Отдельные стадии, которые можно использовать для получения сконструированных иммунных клеток, раскрыты, например, в WO2014/039523, WO2014/184741, WO2014/191128, WO2014/184744 и WO2014/184143, которые включены в настоящий документ путем ссылки.

В конкретном варианте осуществления иммунные эффекторные клетки, такие как $\gamma\delta$ Т-клетки, генетически модифицируют с помощью CAR настоящего изобретения (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR), а затем активируют и размножают *in vitro*. В различных вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и размножать до или после генетической модификации для экспрессии CAR, используя способы, как описано, например, в US6352694, US6534055, US6905680, US6692964, US5858358, US6887466, US6905681, US7144575, US7067318, US7172869, US7232566, US7175843, US5883223, US6905874, US6797514, US6867041, US2006/121005, которые включены в настоящий документ путем ссылки. Т-клетки можно размножать *in vitro* или *in vivo*. Т-клетки настоящего изобретения по существу можно размножать путем приведения их в контакт с поверхностью, содержащей прикрепленное к ней вещество, которое стимулирует ассоциированный с комплексом CD3/TCR сигнал, и лиганд, который стимулирует костимулирующую молекулу на поверхности Т-клеток. В качестве неограничивающих примеров популяции Т-клеток можно стимулировать, как описано в настоящем документе, например путем приведения в контакт с антителом к CD3, или его антигенсвязывающим фрагментом, или антителом к CD2, иммобилизованным на поверхности, или путем приведения в контакт с активатором протеинкиназы С (например, бриостатином) в комбинации с кальциевым ионофором, или путем активации самого CAR. Для костимуляции вспомогательной молекулы на поверхности Т-клеток используют лиганд, который связывает вспомогательную молекулу. Например, популяцию Т-клеток можно приводить в контакт с антителом к CD3 и антителом к CD28 в условиях, подходящих для стимуляции пролиферации Т-клеток.

Условия, подходящие для культивирования Т-клеток, включают в себя, например, подходящие среды (например, минимальную питательную среду (Minimal Essential Media) или среду RPMI 1640 или X-vivo 5 (Lonza)), которые могут содержать факторы, необходимые для пролиферации и жизнеспособности, включая сыворотку (например, 5 фетальную бычью или человеческую сыворотку), цитокины, такие как IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, инсулин, IFN- γ , GM-CSF, TGF β и/или любые другие добавки для роста клеток, известные специалисту в данной области. В других вариантах осуществления Т-клетки можно активировать и стимулировать для пролиферации с помощью питающих клеток и соответствующих антител и цитокинов с использованием способов, 10 таких как способы, описанные в US6040177, US5827642 и WO2012129514, которые включены в настоящий документ путем ссылки.

Химерные антигенные рецепторы (CAR)

В настоящем документе термин «химерный антигенный рецептор» (CAR) относится к рекомбинантному полипептиду, содержащему по меньшей мере 15 внеклеточный домен, который специфически связывается с антигеном или мишенью, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, активирующий Т-клеточный рецептор. Взаимодействие внеклеточного домена CAR с антигеном-мишенью на поверхности клетки-мишени приводит к кластеризации CAR и доставляет активационный стимул в CAR-содержащую клетку. CAR перенаправляют 20 специфичность иммунных эффекторных клеток и запускают пролиферацию, продукцию цитокинов, фагоцитоз и/или продукцию молекул, которые могут опосредовать гибель клеток целевой антиген-экспрессирующей клетки независимо от главного комплекса гистосовместимости (MHC).

В настоящем документе термин «сигнальный пептид» относится к лидерной 25 последовательности на аминоконце (N-конце) формирующегося белка CAR, который котрансляционно или посттрансляционно направляет зарождающийся белок в эндоплазматический ретикулум и к последующей поверхностной экспрессии.

В настоящем документе термин «внеклеточный антигенсвязывающий домен», «внеклеточный домен» или «внеклеточный лигандсвязывающий домен» относится к 30 части CAR, которая расположена вне клеточной мембраны и способна связываться с антигеном, мишенью или лигандом.

В настоящем документе термин «шарнирная область» относится к части CAR, которая соединяет два смежных домена белка CAR, например внеклеточный домен и трансмембранный домен.

В настоящем документе термин «трансмембранный домен» относится к части CAR, которая проходит через клеточную мембрану и прикрепляет CAR к клеточной мембране.

5 В настоящем документе термин «внутриклеточный сигнальный домен, активирующий T-клеточный рецептор», «цитоплазматический сигнальный домен» или «внутриклеточный сигнальный домен» относится к части CAR, которая расположена внутри клеточной мембраны и способна к трансдукции эффекторного сигнала.

10 В настоящем документе термин «стимулирующая молекула» относится к молекуле, экспрессируемой T-клеткой, которая обеспечивает первичную (-ые) цитоплазматическую (-ие) сигнальную (-ые) последовательность (-и), которая регулирует первичную активацию комплекса T-клеточного рецептора (TCR) стимулирующим путем для по меньшей мере некоторого аспекта сигнального пути T-клетки. Стимулирующие молекулы включают два различных класса цитоплазматической сигнальной последовательности: те, которые инициируют
15 антиген-зависимую первичную активацию (называемые «первичными сигнальными доменами»), и те, которые действуют антиген-независимым образом, чтобы обеспечить вторичный костимулирующий сигнал (называемые «костимулирующими сигнальными доменами»).

20 В некоторых общих аспектах в настоящем документе предложены способы получения $\gamma\delta$ T-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Способы могут включать (a) получение выделенной $\gamma\delta$ T-клетки настоящего изобретения; (b) приводят $\gamma\delta$ T-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит (i) внеклеточный домен; (ii) трансмембранный домен; и (iii) внутриклеточный сигнальный домен, причем CAR необязательно
25 дополнительно включает сигнальный пептид на амино-конце и шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен, и при этом приведение $\gamma\delta$ T-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, генерирует CAR $\gamma\delta$ T-клетку.

30 В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен включает антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент представляет собой фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, F_v, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), минитело, диатело, однодоменное антитело (sdAb), вариабельный домен легкой цепи (VL) или вариабельный домен (V_HH) антитела верблюдовых. В некоторых вариантах

осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой одноцепочечный
вариабельный фрагмент (scFv).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен и/или
антигенсвязывающий фрагмент могут, например, специфически связывать опухолевый
5 антиген. Для связывания антителом или антигенсвязывающим фрагментом может быть
выбран любой приемлемый опухолевый антиген, исходя из типа опухоли и/или рака,
имеющегося у подлежащего терапии субъекта. Приемлемые антигены без ограничений
включают в себя мезотелин (MSLN), простатспецифический мембранный антиген
(PSMA), антиген стволовой клетки простаты (PCSA), антиген созревания В-клеток
10 (BCMA или BCM), член D группы 5 семейства C связанных с G-белком рецепторов
(GPCR5D), акцессорный белок рецептора интерлейкина-1 (IL1RAP), дельта-подобный
белок 3 (DLL3), карбоангидразу IX (CAIX), эмбриональный опухолевый антиген
(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44,
CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиальный гликопротеин-2 (EGP 2),
15 эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), молекулу адгезии эпителиальных клеток
(EpcAM), фолат-связывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор
(AChR), рецептор фолиевой кислоты α и β (FR α и β), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид
G3 (GD3), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER-2/ERB2), рецептор
эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор эпидермального фактора роста vIII
20 (EGFRvIII), ERB3, ERB4, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT),
альфа-субъединицу-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2), k-легкую цепь, рецептор
со встроенным киназным доменом (KDR), антиген Lea (CA19.9), антиген Ley (LeY),
молекулу клеточной адгезии L1 (LICAM), ассоциированный с меланомой антиген 1
(семейство A1 антигена меланомы, MAGE-A1), муцин-16 (Muc-16), муцин 1 (Muc-1),
25 лиганды NKG2D, раково-тестикулярный антиген NY-ESO-1, раково-эмбриональный
антиген (h5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), рецептор
фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), фактор R2 роста эндотелия сосудов (VEGF-
R2), антиген опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранный рецептор тирозин-
протеинкиназы типа 1 (ROR1), B7-H3 (CD276), B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфатный
30 протеогликан-4 (CSPG4), вспомогательную молекулу DNAX (DNAM-1), рецептор 2
эфрина типа A (EphA2), фибробласт-ассоциированный белок (FAP), Gp100/HLA-A2,
глипикан 3 (GPC3), HA-1H, HERK-V, IL-11R α , латентный мембранный белок (LMP1),
молекулу адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56) и рецептор trail (TRAIL R).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR предваряется сигнальным пептидом на amino-конце. В настоящем изобретении можно использовать любой приемлемый сигнальный пептид. Сигнальный пептид может, например, быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Согласно одному варианту осуществления, сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид человека CD8 α , сигнальный пептид человека CD3 δ , сигнальный пептид человека CD3 ζ , сигнальный пептид человека GMCSFR, сигнальный пептид человека 4-1BB или их производное. Согласно конкретным вариантам осуществления, сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид человека CD8 α . Сигнальный пептид человека CD8 α включает аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4, предпочтительно аминокислотную последовательность по последовательности SEQ ID NO: 4. Сигнальный пептид может быть отщеплен сигнальной пептидазой во время или после завершения транслокации CAR с получением зрелого CAR, не содержащего сигнального пептида.

В некоторых вариантах осуществления CAR может дополнительно включать шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен. Шарнирная область выполняет функцию перемещения внеклеточного домена от поверхности сконструированной иммунной клетки, чтобы обеспечить надлежащий контакт клетка/клетка, связывание с мишенью или антигеном и активацию (Patel et al., Gene Therapy 6:412-9 (1999)). В CAR настоящего изобретения может быть использована любая приемлемая шарнирная область. Шарнирная область может быть получена из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Согласно конкретным вариантам осуществления, шарнирная область CAR представляет собой шарнирную область из пептида CD8 α . В конкретных вариантах осуществления шарнирная область включает аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5, предпочтительно аминокислотную последовательность по последовательности SEQ ID NO: 5.

CAR настоящего изобретения включает трансмембранный домен. В CAR настоящего изобретения может быть использован любой приемлемый трансмембранный домен. Трансмембранный домен может быть получен из природного, синтетического, полусинтетического или рекомбинантного источника. Согласно некоторым вариантам осуществления трансмембранный домен представляет собой

трансмембранный домен из пептида, выбранного из группы, состоящей из пептида CD8 α , пептида CD28, пептида CD4, пептида CD3 ζ , пептида CD2, пептида 4-1BB, пептида OX40, пептида ICOS, пептида CTLA-4, пептида PD-1, пептида LAG-3, пептида 2B4, пептида BTLA, пептида GMCSFR и т. п. В конкретных вариантах осуществления трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен CD8 α .

Трансмембранный домен CD8 α может включать аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, предпочтительно аминокислотную последовательность по последовательности SEQ ID NO: 1.

CAR настоящего изобретения включает внутриклеточный сигнальный домен. В CAR настоящего изобретения может быть использован любой приемлемый внутриклеточный домен. В конкретных вариантах осуществления используется весь внутриклеточный сигнальный домен. В других конкретных вариантах осуществления используется усеченная часть сигнального домена, которая трансдуцирует

эффекторный сигнал. Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, внутриклеточный сигнальный домен генерирует сигнал, который стимулирует иммунную эффекторную функцию клетки, содержащей CAR, например CAR T-клетки, включая без ограничений пролиферацию, активацию и/или дифференцировку. В

конкретных вариантах осуществления сигнал стимулирует, например, цитолитическую активность, активность хелперов и/или секрецию цитокинов CAR T-клеткой. Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен CAR

включает сигнальный домен рецептора Fc γ (Fc γ R), рецептора Fc ϵ (Fc ϵ R), рецептора Fc α (Fc α R), неонатального рецептора Fc (FcRn), CD3, CD3 ζ , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD8, CD21, CD22, CD28, CD32, CD40L (CD154), CD45, CD66 δ , CD79 α , CD79 β , CD80, CD86, CD278 (также известный как ICOS), CD247 ζ , CD247 η , DAP10, DAP12, FYN, LAT, Lck, MAPK, комплекс MHC, NFAT, NF- κ B, PLC- γ , iC3 β , C3 $\delta\gamma$, C3 δ и Zap70.

Согласно некоторым вариантам осуществления внутриклеточный сигнальный домен выбирают из группы, состоящей из сигнального домена CD3 ζ , FcR γ , FcR β , CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD22, CD79 α , CD79 β и CD66 δ . В конкретных вариантах осуществления

внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный домен CD3 ζ или 4-1BB.

Внутриклеточный домен CD3 ζ или 4-1BB может включать аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или 3 соответственно, предпочтительно аминокислотную последовательность по последовательности SEQ ID NO: 2 или 3 соответственно.

Согласно конкретным вариантам осуществления, внутриклеточный сигнальный домен дополнительно содержит один или более костимулирующих сигнальных доменов. Костимулирующий домен может, например, включать сигнальный домен пептида, выбранного из: 2B4/CD244/SLAMF4, 4-1BB/TNFSF9/CD137, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BAFF-R/TNFRSF13C, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BLAME/SLAMF8, BTLA/CD272, CD100 (SEMA4D), CD103, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD150, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD2, CD200, CD229/SLAMF3, лиганд CD27/TNFSF7, CD27/TNFRSF7, CD28, CD29, CD2F-10/SLAMF9, лиганд CD30/TNFSF8, CD30/TNFRSF8, CD300a/LMIR1, CD4, CD40 лиганд/TNFSF5, CD40/TNFRSF5, CD48/SLAMF2, CD49a, CD49D, CD49f, CD53, CD58/LFA-3, CD69, CD7, CD8 α , CD8 β , CD82/Kai-1, CD84/SLAMF5, CD90/Thy1, CD96, CDS, CEACAM1, CRACC/SLAMF7, CRTAM, CTLA-4, DAP12, дектин-1/CLEC7A, DNAM1 (CD226), DPPIV/CD26, DR3/TNFRSF25, EphB6, GADS, Gi24/VISTA/B7-H5, лиганд GITR/TNFSF18, GITR/TNFRSF18, HLA класс I, HLA-DR, HVEM/TNFRSF14, IA4, ICAM-1, ICOS/CD278, Ikaros, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , интегрин α 4/CD49d, интегрин α 4 β 1, интегрин α 4 β 7/LPAM-1, IPO-3, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB1, ITGB2, ITGB7, KIRDS2, LAG-3, LAT, LIGHT/TNFSF14, LTBR, Ly108, Ly9 (CD229), функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), лимфотоксин- α /TNF- β , NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), NTB-A/SLAMF6, лиганд OX40/TNFSF4, OX40/TNFRSF4, PAG/Cbp, PD-1, PDCD6, PD-L2/B7-DC, PSGL1, RELT/TNFRSF19L, SELPLG (CD162), SLAM (SLAMF1), SLAM/CD150, SLAMF4 (CD244), SLAMF6 (NTB-A), SLAMF7, SLP-76, TACI/TNFRSF13B, TCL1A, TCL1B, TIM-1/KIM-1/HA VCR, TIM-4, TL1A/TNFSF15, TNF RII/TNFRSF1B, TNF- α , TRANCE/RANKL, TSLP, TSLP R, VLA1 и VLA-6. В некоторых вариантах осуществления костимулирующий домен выбран из группы, состоящей из костимулирующего домена одного или более из CD28, 4-1BB (CD137), CD27, OX40, CD27, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, TNFRSF9, TNFRSF4, TNFRSF8, CD40LG, ITGB2, KLRC2, TNFRSF18, TNFRSF14, HA VCR1, LGALS9, CD83 и лиганда, который специфически связывается с CD83.

Антигенсвязывающие фрагменты

Антитела

Настоящее изобретение по существу относится к конструктам CAR, содержащим антигенсвязывающий фрагмент. Антигенсвязывающий фрагмент может,

например, представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают опухолевый антиген. Антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения обладают одним или более функциональными свойствами, включая без ограничений высокоаффинное связывание с опухолевым антигеном, высокую специфичность к опухолевому антигену, способность стимулировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антитело-зависимый фагоцитоз (ADPC) и/или антитело-зависимую клеточно-опосредуемую цитотоксичность (ADCC) против клеток, экспрессирующих опухолевый антиген, и способность ингибировать рост опухоли у нуждающихся в этом субъектов и у животных моделей при введении изолированно или в комбинации с другими противораковыми терапиями.

Антигенсвязывающий фрагмент может, например, представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают опухолевый антиген. Для связывания антителом или антигенсвязывающим фрагментом может быть выбран любой приемлемый опухолевый антиген, исходя из типа опухоли и/или рака, имеющегося у подлежащего терапии субъекта. Приемлемые антигены без ограничений включают в себя мезотелин (MSLN), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовой клетки простаты (PCSA), карбоангидразу IX (CAIX), антиген созревания В-клеток (BCMA или BCM), член D группы 5 семейства C связанных с G-белком рецепторов (GPCR5D), акцессорный белок рецептора интерлейкина-1 (IL1RAP), дельта-подобный белок 3 (DLL3), эмбриональный опухолевый антиген (CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, эпителиальный гликопротеин-2 (EGP 2), эпителиальный гликопротеин-40 (EGP-40), молекулу адгезии эпителиальных клеток (EPCAM), фолат-связывающий белок (FBP), фетальный ацетилхолиновый рецептор (AChR), рецептор фолиевой кислоты α и β (FR α и β), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид G3 (GD3), рецептор эпидермального фактора роста человека 2 (HER-2/ERB2), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор эпидермального фактора роста vIII (EGFRvIII), ERB3, ERB4, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), альфа субъединицу-2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2), к-легкую цепь, рецептор со встроенным киназным доменом (KDR), антиген Lea (CA19.9), антиген LeY (LeY), молекулу клеточной адгезии L1 (LICAM), ассоциированный с меланомой антиген 1 (семейство A1 антигена меланомы, MAGE-A1), муцин-16 (Muc-16), муцин 1 (Muc-1), лиганды NKG2D, раково-тестикулярный

антиген NY-ESO-1, раково-эмбриональный антиген (h5T4), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72), рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), фактор R2 роста эндотелия сосудов (VEGF-R2), антиген опухоли Вильмса (WT-1), трансмембранный рецептор тирозин-протеинкиназы типа 1 (ROR1), B7-H3 (CD276),
5 B7-H6 (Nkp30), хондроитинсульфатный протеогликан-4 (CSPG4), вспомогательную молекулу DNAX (DNAM-1), рецептор 2 эфрина типа A (EfNA2), фибробласт-ассоциированный белок (FAP), Gp100/HLA-A2, глипикан 3 (GPC3), HA-1H, HERK-V, IL-11R α , латентный мембранный белок (LMP1), молекулу адгезии нервных клеток (N-CAM/CD56) и рецептор trail (TRAIL R).

10 Способы размножения и выделения $\gamma\delta$ T-клеток из клеток PBMC человека, описываемые в настоящем документе, включают стадию культивирования клеток PBMC человека в культуральной среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) и моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент.

15 В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

20 В настоящем документе термин «антитело» используется в широком смысле и включает в себя молекулы иммуноглобулинов или антител, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам (т. е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG
25 дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела изобретения предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител
30 видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа и лямбда. Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. Согласно конкретным вариантам осуществления антитела настоящего изобретения содержат константные

области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т. е. определяющие комплементарность области 1–3; CDR1, CDR2, и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В настоящем документе термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с конкретным опухолевым антигеном, по существу не содержит антител, которые не связываются с данным опухолевым антигеном). Кроме того, выделенное антитело по существу свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В настоящем документе термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением возможных мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела изобретения можно получать с использованием гибридного способа, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов одиночных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, стабилизированный дисульфидными связями фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdAb), scFv-димер (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более областей CDR, верблюжье однодоменное антитело, минитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное

доменное антитело, переменный домен легкой цепи (VL), переменный домен (V_HH) антитела верблюдовых, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не включает полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела.

В настоящем документе термин «одноцепочечное антитело» относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое включает переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот (например, линкерным пептидом).

При использовании в настоящем документе термин «однодоменное антитело» относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

В настоящем документе термин «человеческое антитело» относится к продуцируемому человеком антителу или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую продуцируемому человеком антителу, получаемому любым известным в данной области способом. Данное определение человеческого антитела включает в себя интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один человеческий полипептид тяжелой и/или легкой цепи.

В настоящем документе термин «гуманизованное антитело» относится к нечеловеческому антителу, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности с последовательностью антитела человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в человеческом теле уменьшается.

При использовании в настоящем документе термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Переменная область легкой и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антитела, полученного из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемые специфичность, аффинность и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного из другого вида

млекопитающего (например, человека), для предотвращения возникновения иммунного ответа у данного вида.

В настоящем документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое включает множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, причем первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела или молекулу тетраспецифического антитела.

В настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления биспецифическое антитело включает последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания к

первому эпитопу, а также последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления биспецифическое антитело включает полуантитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания к первому эпитопу, и полуантитело или его фрагмент, обладающие специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющий специфичность связывания к первому эпитопу, и scFv или его фрагмент, имеющий специфичность связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый эпитоп расположен на опухолевом антигене, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD3 и/или других связанных с опухолью иммунных супрессорах или поверхностных антигенах.

В настоящем документе антигенсвязывающий домен или антигенсвязывающий фрагмент, который «специфически связывается с опухолевым антигеном», относится к антигенсвязывающему домену или антигенсвязывающему фрагменту, который связывает опухолевый антиген с константой KD, равной 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин KD означает константу диссоциации, которая представляет собой отношение Kd к Ka (т. е. Kd / Ka) и выражается в молярной концентрации (М). Значения KD для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, величину константы KD для антигенсвязывающего домена или антигенсвязывающего фрагмента можно определять с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например с помощью системы биодатчиков, например системы Biacore®, или с помощью технологии интерферометрии биослоя, такой как система Octet RED96.

Чем меньше величина константы KD для антигенсвязывающего домена или антигенсвязывающего фрагмента, тем выше аффинность, с которой антигенсвязывающий домен или антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью.

Согласно конкретным аспектам настоящее изобретение относится к конструкту CAR, содержащему антигенсвязывающий фрагмент, причем антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает опухолевый антиген. Антитело или антигенсвязывающий

фрагмент могут, например, представлять собой фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), минитело, диатело, однодоменное антитело (sdAb), вариабельный домен легкой цепи (VL) или вариабельный домен (V_HH) антитела верблюдовых.

5 **Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева**

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR) настоящего изобретения. Специалистам в данной области будет понятно, что кодирующая последовательность CAR может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т. п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие рецепторы CAR настоящего изобретения, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

15 В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему CAR настоящего изобретения. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плаزمид. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может быть конститутивным, индуцируемым или репрессируемым промотором. В данной области известен ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, которые могут быть использованы в настоящем изобретении для получения CAR в клетке. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные клональные методы или синтез искусственных генов.

30 В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор настоящего изобретения и/или выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR настоящего изобретения. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии CAR настоящего изобретения можно применять любую клетку-хозяин, известную специалистам в данной области. Приемлемые клетки-хозяева

включают в себя прокариоты, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, CAR, scFv или Fab), клетки CHO-DG44 или CHO-K1 или клетки HEK293 (для экспрессии, например,

5 полноразмерного антитела IgG). Согласно конкретным вариантам осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева традиционными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина так, что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

10 **Фармацевтические композиции**

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенный полинуклеотид настоящего изобретения, выделенный полипептид настоящего изобретения, клетку-хозяина настоящего изобретения и/или сконструированную иммунную клетку настоящего изобретения и

15 фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» означает продукт, содержащий выделенный полинуклеотид настоящего изобретения, выделенный полипептид настоящего изобретения, клетку-хозяина настоящего изобретения и/или сконструированную иммунную клетку настоящего изобретения вместе с фармацевтически приемлемым

20 носителем. Полинуклеотиды, полипептиды, клетки-хозяева и/или сконструированные иммунные клетки настоящего изобретения и содержащие их композиции также используют при производстве лекарственного препарата для терапевтических целей, упомянутых в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому

25 эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа

30 введения для конкретного применения. В контексте настоящего документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывают негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. Согласно конкретным вариантам

осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно применять любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для применения в фармацевтической композиции полинуклеотидов, полипептидов, клеток-хозяев и/или сконструированных иммунных клеток.

5 Состав, содержащий фармацевтически активные ингредиенты с фармацевтически приемлемыми носителями, известен в данной области техники, например в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, издание 21 (2005) и любые последующие издания). Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных ингредиентов включают буферные растворы, разбавители, 10 растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций изобретения.

Способы применения изобретения

В другом общем аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения 15 заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта. Способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных иммунных клеток и/или фармацевтической композиции настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак. Рак может, например, представлять собой солидный 20 рак или гемобластоз. Рак может, например, быть выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака простаты, рака 25 щитовидной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), ходжкинской лимфомы/болезни (БХ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других гемобластозов.

30 Согласно вариантам осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество выделенного полинуклеотида, выделенного полипептида, клетки-хозяина и/или сконструированной иммунной клетки. Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента

или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

5 В настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» со ссылкой на выделенный полинуклеотид, выделенный полипептид, клетку-хозяина, сконструированную иммунную клетку и/или фармацевтическую композицию настоящего изобретения означает количество выделенного полинуклеотида, выделенного полипептида, клетки-хозяина, сконструированной иммунной клетки и/или фармацевтической композиции, которое модулирует иммунный ответ у нуждающегося
10 в этом субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния,
15 подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего
20 лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние,
25 подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости субъекта с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (xi) торможение или подавление
30 заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или симптома, связанного с ним у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство или

состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим.

5 Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены с обеспечением их приемлемости для предполагаемого способа введения субъекту. Например, описанные в данном документе композиции могут быть составлены так, чтобы быть приемлемыми для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

Клетки настоящего изобретения и/или фармацевтические композиции настоящего изобретения можно вводить любым удобным способом, известным специалистам в данной области. Например, клетки настоящего изобретения можно вводить субъекту путем аэрозольной ингаляции, инъекции, проглатывания, трансфузии, имплантации и/или трансплантации. Композиции, содержащие клетки настоящего изобретения, можно вводить трансартериально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, внутриплеврально, путем внутривенной (в/в) инъекцией или внутривенно. В некоторых вариантах осуществления клетки настоящего изобретения можно вводить с лимфодеплецией у субъекта или без нее.

Фармацевтические композиции, содержащие клетки настоящего изобретения, экспрессирующие CAR настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут быть предложены в стерильных жидких препаратах, как правило, изотонических водных растворах с суспензиями клеток или необязательно в виде эмульсий, дисперсий и т. п., которых, как правило, буферизованы до получения выбранного pH. Композиции могут включать носители, например, воду, физиологический раствор, фосфатно-солевой буферный раствор и т. п., подходящие для обеспечения целостности и жизнеспособности клеток и для введения композиции клеток.

30 Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения клеток настоящего изобретения в приемлемое количество соответствующего растворителя с различными другими ингредиентами по необходимости. Такие композиции могут включать в себя фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество, например стерильную воду,

физиологический раствор, глюкозу, декстрозу и т. п., которые подходят для применения с клеточной композицией и для введения субъекту, такому как человек. Приемлемые буферные растворы для обеспечения клеточной композиции хорошо известны в данной области. Любой используемый носитель, разбавитель или добавка совместимы с сохранением целостности и жизнеспособности клеток настоящего изобретения.

Клетки настоящего изобретения и/или фармацевтические композиции настоящего изобретения можно вводить в любом физиологически приемлемом носителе. Популяция клеток, содержащая клетки настоящего изобретения, может включать очищенную популяцию клеток. Специалисты в данной области могут легко определить клетки в популяции клеток с использованием различных хорошо известных способов. Диапазоны чистоты в популяциях клеток, содержащих генетически модифицированные клетки настоящего изобретения, могут составлять от около 50% до около 55%, от около 55% до около 60%, от около 60% до около 65%, от около 65% до около 70%, от около 70% до около 75%, от около 75% до около 80%, от около 80% до около 85%, от около 85% до около 90%, от около 90% до около 95% или от около 95% до около 100%. Специалисты в данной области могут легко скорректировать дозировки, например снижение чистоты может потребовать увеличения дозировки.

Клетки настоящего изобретения по существу вводят с расчетом дозировки исходя из числа клеток на килограмм (клеток/кг) массы тела субъекта, которому вводят клетки и/или содержащие клетки фармацевтические композиции. В общем дозировки клеток находятся в диапазоне от около 10^4 до около 10^{10} клеток/кг массы тела, например, от около 10^5 до около 10^9 , от около 10^5 до около 10^8 , от около 10^5 до около 10^7 или от около 10^5 до около 10^6 в зависимости от режима и места введения. В целом в случае системного введения используется более высокая дозировка, чем в случае местного введения, где иммунные клетки настоящего изобретения вводят в область опухоли и/или рака. Типичные диапазоны дозировок без ограничений включают в себя от 1×10^4 до 1×10^8 , от 2×10^4 до 1×10^8 , от 3×10^4 до 1×10^8 , от 4×10^4 до 1×10^8 , от 5×10^4 до 6×10^8 , от 7×10^4 до 1×10^8 , от 8×10^4 до 1×10^8 , от 9×10^4 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 1×10^8 , от 1×10^5 до 9×10^7 , от 1×10^5 до 8×10^7 , от 1×10^5 до 7×10^7 , от 1×10^5 до 6×10^7 , от 1×10^5 до 5×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 4×10^7 , от 1×10^5 до 3×10^7 , от 1×10^5 до 2×10^7 , от 1×10^5 до 1×10^7 , от 1×10^5 до 9×10^6 , от 1×10^5 до 8×10^6 , от 1×10^5 до 7×10^6 , от 1×10^5 до 6×10^6 , от 1×10^5 до 5×10^6 , от 1×10^5 до 4×10^6 , от 1×10^5 до 4×10^6 , от 1×10^5 до 3×10^6 , от 1×10^5 до 2×10^6 , от 1×10^5 до 1×10^6 , от 2×10^5 до 9

$\times 10^7$, от 2×10^5 до 8×10^7 , от 2×10^5 до 7×10^7 , от 2×10^5 до 6×10^7 , от 2×10^5 до 5×10^7 ,
от 2×10^5 до 4×10^7 , от 2×10^5 до 4×10^7 , от 2×10^5 до 3×10^7 , от 2×10^5 до 2×10^7 , от
 2×10^5 до 1×10^7 , от 2×10^5 до 9×10^6 , от 2×10^5 до 8×10^6 , от 2×10^5 до 7×10^6 , от 2×10^5
до 6×10^6 , от 2×10^5 до 5×10^6 , от 2×10^5 до 4×10^6 , от 2×10^5 до 4×10^6 , от 2×10^5 до 3
5 $\times 10^6$, от 2×10^5 до 2×10^6 , от 2×10^5 до 1×10^6 , от 3×10^5 до 3×10^6 клеток/кг и т. п.

Кроме того, дозировка может быть скорректирована с учетом того, вводят ли
однократную дозу или вводят несколько доз. Точное определение того, что будет
считаться эффективной дозировкой, может быть основано на факторах,
индивидуальных для каждого субъекта.

10 В контексте данного документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение»
относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного
измеряемого физического параметра, относящегося к злокачественному
новообразованию, который не обязательно очевиден у субъекта, но может быть
видимым у субъекта. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также
15 обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по
меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния.
В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение»
относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшению
продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием,
20 расстройством или патологическим состоянием, таким как опухоль или более
предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления термины «лечить»,
«лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства
или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и
«лечение» относятся к повышению выживаемости субъекта, имеющего заболевание,
25 расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить»,
«лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или
состояния у субъекта.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

30 В данном изобретении предложены следующие не имеющие ограничительного
характера варианты осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой способ размножения и выделения
 $\gamma\delta$ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС), при
этом способ включает в себя этапы, на которых:

- a. получают клетки РВМС человека;
- b. культивируют клетки РВМС человека в культуральной среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) и моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент для размножения $\gamma\delta$ Т-клеток; и
- c. выделяют $\gamma\delta$ Т-клетки.

Вариант осуществления 2 представляет собой способ по варианту осуществления 1, в котором концентрация IL-2 составляет от около 50 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл.

Вариант осуществления 3 представляет собой способ по варианту осуществления 2, в котором концентрация IL-2 составляет от около 100 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл.

Вариант осуществления 4 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1–3, в котором IL-2 представляет собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2).

Вариант осуществления 5 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными.

Вариант осуществления 6 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1–4, в котором моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими или гуманизированными.

Вариант осуществления 7 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1–6, в котором $\gamma\delta$ Т-клетка представляет собой V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клетку или V γ 9⁻ $\gamma\delta$ Т-клетку.

Вариант осуществления 8 представляет собой способ по любому из вариантов осуществления 1–7, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют посредством проточной цитометрии, магнитного разделения и отрицательного отбора.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенную $\gamma\delta$ Т-клетку, полученную способом по варианту осуществления 8.

Вариант осуществления 10 представляет собой способ получения $\gamma\delta$ Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает в себя этапы, на которых:

- a. получают выделенную $\gamma\delta$ Т-клетку по варианту осуществления 9;

б. приводят $\gamma\delta$ Т-клетку в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит:

- i. внеклеточный домен;
- ii. трансмембранный домен; и
- iii. внутриклеточный сигнальный домен,

причем CAR необязательно дополнительно содержит сигнальный пептид на аминоконце и шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен, и

при этом приведение $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, генерирует CAR $\gamma\delta$ Т-клетку.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ по варианту осуществления 10, в котором CAR включает:

- i. внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент;
- ii. трансмембранный домен, содержащий CD8 α трансмембранный домен;
- iii. внутриклеточный сигнальный домен, содержащий CD3 ζ или 4-1BB внутриклеточный домен;
- iv. сигнальный пептид, содержащий CD8 α сигнальный пептид; и
- v. шарнирную область, содержащую CD8 α шарнирную область.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ по варианту осуществления 11, в котором CAR включает:

- i. трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1;
- ii. внутриклеточный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3;
- iii. сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4; и
- iv. шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ по варианту осуществления 11 или 12, в котором внеклеточный домен включает

антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с опухолевым антигеном.

Вариант осуществления 14 представляет собой CAR $\gamma\delta$ T-клетку, полученную способами по любому из вариантов осуществления 10–13.

5 Вариант осуществления 15 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую CAR $\gamma\delta$ T-клетку по варианту осуществления 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

10 Вариант осуществления 16 представляет собой способ лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по варианту осуществления 15.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ по варианту осуществления 16, в котором заболевание или состояние представляет собой рак.

15 Вариант осуществления 18 представляет собой способ по варианту осуществления 17, в котором рак выбран из солидного рака или гемобластоза.

20 Вариант осуществления 19 представляет собой способ по варианту осуществления 18, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака простаты, рака щитовидной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), ходжкинской лимфомы/болезни (БХ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других гемобластозов.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ по варианту осуществления 16, в котором заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

30 Вариант осуществления 21 представляет собой способ по варианту осуществления 20, в котором аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из алопеции, амилоидоза, анкилозирующего спондилоартрита, болезни Кастлемана (БК), целиакии, болезни Крона, эндометриоза, фибромиалгии, гломерулонефрита, базедовой болезни, синдрома Гийена — Барре, IgA-нефропатии,

волчанки, болезни Лайма, болезни Менъера, множественного склероза, нарколепсии, нейтропении, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, диабета 1 типа, язвенного колита и витилиго.

5 Вариант осуществления 22 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей CAR $\gamma\delta$ T-клетку, причем способы включает объединение CAR $\gamma\delta$ T-клетки по варианту осуществления 14 с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.

10

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Сокращения

Таблица 1. Сокращения

Сокращения	Определения
мл	Микролитр
мМ	Микромолярный
FMO	Флуоресценция с комбинацией детектируемых меток без одной
FACS	Сортировка клеток с активированной флуоресценцией
FBS	Эмбриональная бычья сыворотка
PBMC	Мононуклеарные клетки периферической крови
PBS	Фосфатно-солевой буферный раствор
RPMI	Среда Онкологического института имени Розуэлла Парка
Сер. №	Серийный номер
мл	Миллилитр
Мин.	Минута
Об/мин	Оборотов в минуту
°C	Градус Цельсия
ME	Международные единицы
Zol	Золедроновой кислоты моногидрат
Полная среда RPMI	RPMI + 10% FBS + 1X Pen/Strep
Конц.	Концентрация
CAR	Химерный антигенный рецептор
LV	Лентивирус
mAb	Моноклональное антитело
MOI	Множественность заражения
IL-2	Интерлейкин-2

Способы

Выделение клеток РВМС из цельной крови

Гепаринизированную кровь разбавляли, добавляя равные объемы доведенной до комнатной температуры стандартной среды RPMI (RPMI + 1% Pen Strep). 30 мл разбавленной крови осторожно наносили ровным слоем на 15 мл градиентной среды LYMPHOPREP™ в пробирке falcon объемом 50 мл, используя капиллярную пипетку Steripette. При нанесении слоя крови на градиентную среду LYMPHOPREP™ следили за тем, чтобы не нарушить градиентность среды. Пробирку falcon объемом 50 мл центрифугировали на 450 x g при комнатной температуре в течение 30 минут. После центрифугирования пробирку falcon осторожно извлекали из центрифуги и удаляли верхний слой плазмы без нарушения границы раздела слоев Плазма-Лейкоцитарная пленка-LYMPHOPREP™. Лейкоцитарную пленку с границы раздела слоев Плазма-Лейкоцитарная пленка-LYMPHOPREP™ переносили в новую пробирку falcon объемом 50 мл, содержащую 30 мл доведенной до комнатной температуры полной среды RPMI (RPMI + 10% FBS + 1% Pen/Strep) без нарушения осадка эритроцитов/гранулоцитов. Пробирку falcon объемом 50 мл центрифугировали при 350 x g в течение 10 минут при комнатной температуре, образовавшийся супернатант удаляли. Лизис эритроцитов проводили путем ресуспендирования клеточного осадка в 1 мл раствора для лизиса АСК при комнатной температуре в течение 5–8 мин. После периода инкубации лизис эритроцитов останавливали добавлением 20 мл полной среды RPMI. Пробирку falcon центрифугировали при 350 x g в течение 10 минут при комнатной температуре и клеточный осадок однократно промывали 35 мл 1 x PBS. Пробирку falcon центрифугировали при 350 x g в течение 10 минут при комнатной температуре и клеточный осадок ресуспендировали в полной среде RPMI. Ресуспендированные клетки подсчитывали на гемоцитометре. Клетки РВМС либо непосредственно использовали для дальнейших приложений, либо замораживали в среде (10% DMSO + 90% FBS) при плотности клеток 25×10^6 /мл.

Опосредуемое золедроновой кислотой селективное размножение $V\gamma 9^+$ $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток РВМС

В день 0 клетки РВМС, выделенные как описано выше из образца цельной крови центрифугированием с градиентом плотности, подсчитывали и доводили плотность клеток до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной среде RPMI (RPMI + 10% FBS + 1x Pen/Strep). Альтернативно, клетки РВМС получали быстрым размораживанием ампулы

замороженных клеток PBMC и их добавлением к 49 мл теплой полной среды RPMI (RPMI + 10% FBS + 1x Pen/Strep) в пробирке falcon объемом 50 мл для разбавления среды для замораживания. Клетки PBMC центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин, затем клетки однократно промывали путем ресуспендирования в 35 мл полной среды RPMI (RPMI + 10% FBS + 1x Pen/Strep). Клеточный осадок ресуспендировали в 5
 5 полной среде RPMI, после чего клетки подсчитывали. Также готовили среду для культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток путем добавления в полную среду RPMI рекомбинантного IL-2 человека (rhIL-2) до конечной концентрации 200 МЕ/мл и золедроновой кислоты до конечной концентрации 5 мкМ. Плотность клеток доводили до 1×10^6 клеток/мл подготовленной средой для культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток. $0,5 \times 10^6$ клеток PBMC высевали в 0,5 мл среды для культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток в 24-луночном планшете. На день 2 в 24-луночный планшет доливали 0,5 мл свежей среды для культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток, дополненной rhIL-2 до концентрации 400 МЕ/мл (конечная концентрация rhIL-2 составляла 200 МЕ/мл). На день 5 клетки
 15 центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки PBMC культивировали на протяжении всего 15 дней, постоянно пополняя среду свежей полной средой RPMI, содержащей 200 МЕ IL-2, на день 4, 6, 8, 11 и 14 периода культивирования. В зависимости от конfluenceности клетки сначала перемещали в 6-луночный планшет на день 6 и затем в колбу T-25 на день 11 культивирования. На день 11 и 15 периода
 20 культивирования клетки профилировали анти-TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, и TCR V γ 9 mAb для определения частоты TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, и TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток среди цельных клеток PBMC.

25 Опосредуемое анти-TCR V γ 9 mAb селективное размножение V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток PBMC

В день 0 лунку 24-луночного планшета покрывали очищенными анти-TCR V γ 9 mAb (клоны B3 (BD Biosciences; Франклин Лейкс, Нью-Джерси), 7A5 (Abcam; Кембридж, Великобритания) и IMM360 (Beckman Coulter; Бреа, Калифорния) в концентрации 1 мкг/мл) в 0,5 мл PBS для инкубации в течение ночи при 4 °С. На день 1 PBS отсасывали из лунки, не касаясь дна лунки. Полмиллиона цельных клеток PBMC, которые были выделены как описано выше, добавляли в лунку в 0,5 мл полной среды RPMI, содержащей 200 МЕ IL-2 и CD28 (2 мкг/мл). На день 2 в 24-луночный планшет доливали 0,5 мл свежей среды для культивирования $\gamma\delta$ Т-клеток, дополненной rhIL-2 до концентрации 400 МЕ/мл (конечная концентрация rhIL-2 составляла 200 МЕ/мл).

Клетки РВМС культивировали на протяжении всего 15 дней, постоянно пополняя среду свежей полной средой RPMI, содержащей 200 МЕ IL-2, на день 4, 6, 8, 11 и 14 периода культивирования. В зависимости от конfluenceности клетки сначала перемещали в 6-луночный планшет на день 6 и затем в колбу T-25 на день 11 культивирования. На день 11 и 15 периода культивирования клетки профилировали анти-TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, и TCR V γ 9 mAb для определения частоты TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, и TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клеток среди цельных клеток РВМС.

Фенотипическое профилирование $\gamma\delta$ T-клеток

Поверхностное фенотипическое профилирование

Культивированные клетки РВМС снимали, однократно промывали буфером для FACS (1x PBS + 2% FBS) и подсчитывали клетки с использованием гемоцитометра. Сто тысяч клеток РВМС центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин в 96-луночном планшете с V-образным дном, супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл 1x PBS, содержащем 0,1 мкл красителя Live/Dead fixable violet dead cell stain и 0,5 мкл блокирующего раствора Human TruStain Fc. Клетки инкубировали в темноте при 4 °C в течение 30 мин. После инкубации в темноте клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин и клеточный осадок однократно промывали 200 мкл буфера для FACS (PBS + 2% FBS). После инкубации клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. В конце периода инкубации добавляли 100 мкл буфера для FACS (PBS + 2% FBS) и клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки однократно промывали 200 мкл буфера для FACS (1x PBS + 2% FBS) и клеткам окрашивали поверхность путем инкубации в 100 мкл буфера для FACS (1x PBS + 2% FBS), содержащем антитела, специфичные к TCR $\gamma\delta$, TCR V γ 9 и TCR $\alpha\beta$ при 4 °C в течение 30 мин. После периода инкубации добавляли 100 мкл буфера для FACS (PBS + 2% FBS) и клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Клетки дважды промывали 200 мкл буфера для FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS. Данные для клеток получали на проточном цитометре (Novocyte).

Трансдукция лентивирусом

Клетки РВМС ($0,5 \times 10^6$ клеток), которые культивировали в присутствии либо связанных с планшетом анти-TCR V γ 9 mAb, либо Zol в течение 15 дней, центрифугировали при 1250 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

Клеточный осадок промывали 1 мл стерильного PBS и центрифугировали при 1250 об/мин в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 500 мкл полной среды RPMI + 100 мкл компонента MAX Enhancer и 2 мкл компонента TRANSDUX MAX™. К ресуспендированным клеткам добавляли 5 мкл 1M буфера HEPES (конечная

5 концентрация 10 мкМ). Смесь клеток PBMC, буфера HEPES и компонентов TRANSDUX MAX™ переносили в лунку 24-луночного планшета. Вирус (частицы анти-PSMA CAR лентивируса или пустого pLLV лентивируса) добавляли к смеси с множественностью заражения (MOI) 10. Клетки спинокулировали путем их

10 центрифугирования при температуре 32 °C при 1350 x g в течение 1,5 часов. После центрифугирования клеток добавляли 1 мл свежей полной среды RPMI и затем содержимое переносили в стерильную пробирку Eppendorf. Клетки центрифугировали при 1250 об/мин в течение 5 мин, супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 0,5 мл свежей полной среды RPMI, содержащей 50 МЕ IL-2. Клетки высевали в 24-

15 луночный планшет и инкубировали в течение 96 часов при температуре 37 °C в инкубаторе с поддержанием атмосферы 5% CO₂. Через 72 часа в лунки добавили 0,5 мл свежей полной среды RPMI, содержащей 50 МЕ IL-2. После 96 часов трансдукции лентивирусом клетки снимали с лунки, однократно промывали, подсчитывали и выполняли поверхностное окрашивание антителами к TCR $\gamma\delta$, TCR $\alpha\beta$, TCR V γ 9 $\gamma\delta$ и кроличьим антиверблюжьим V_HH антителом.

20

Получение данных и анализ

Для поверхностного окрашивания данные для окрашенных клеток получали на проточном цитометре Novocyte с программным обеспечением NovoExpress. Данные переносили через общую папку на рабочий компьютер с программным обеспечением

25 Flow Jo (версия 10.3). Для построения графиков средних частот \pm СО использовали программное обеспечение GraphPad Prism (Версия 7.02 или 8.0).

Результаты

Пример 1. Селективное размножение V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток анти-TCR V γ 9 моноклональными антителами

30

Для селективного размножения TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клеток из цельных клеток PBMC полмиллиона цельных клеток PBMC высевали в лунку 24-луночного планшета с предварительно нанесенными анти-TCR V γ 9 mAb (клоны B3, 7A5 и IMM360) (ФИГ. 1А). Параллельно такое же количество цельных клеток PBMC культивировали в

присутствии золедроновой кислоты и IL-2 для селективного размножения TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клеток из цельных клеток PBMC, как описано в заявке на патент США № 16/691,812, поданной 22 ноября 2019 г. Частоты $\gamma\delta$ $\alpha\beta$ T-клеток определяли на день 0, 11 и 15 периода культивирования. Для определения частоты $\gamma\delta$ T-клеток сначала использовали гейт для всех живых клеток PBMC, исключая дубли, и отложили результаты для живых клеток от гейтов для TCR $\gamma\delta$ и TCR $\alpha\beta$ (ФИГ. 1В). Для определения частоты TCR V γ 9⁺ и TCR V γ 9⁻ клеток среди всех $\gamma\delta$ T-клеток, отложили результаты для живых $\gamma\delta$ T-клеток от гейтов для TCR V γ 9. TCR V γ 9⁺ TCR $\gamma\delta$ ⁺ дважды положительные клетки рассматривали как TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клетки, а TCR $\gamma\delta$ однократно положительные клетки рассматривали как TCR V γ 9⁻ $\gamma\delta$ T-клетки (ФИГ. 1В). По сравнению с частотой TCR $\gamma\delta$ T-клеток среди всех цельных клеток PBMC на день 0 периода культивирования наблюдали значительное размножение V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клеток на день 11 и 15 периода культивирования (ФИГ. 2А) из лунок, покрытых клонами анти-TCR V γ 9 mAb B3, 7A5 и IMMU 360. На день 15 периода культивирования кратности размножения (средняя частота \pm СО) TCR $\gamma\delta$ T-клеток, опосредуемого клонами анти-TCR V γ 9 mAb B3, 7A5 и IMMU 360 составили 24,5, 23,9 и 17,0, соответственно, по сравнению с 32,5-кратным размножением, опосредуемым Zol (ФИГ. 2В). Интересно отметить, что клоны анти-TCR V γ 9 mAb B3 и 7A5 селективно размножали V γ 9⁺, но не V γ 9⁻ $\gamma\delta$ T-клетки среди цельных $\gamma\delta$ T-клеток (ФИГ. 3А и 3В). Для сравнения, клон IMMU 360 либо опосредовал слабое размножение TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клеток, либо давал преимущественное размножение V γ 9⁻ $\gamma\delta$ T-клеток (ФИГ. 3А и 3В). Следует отметить, что частота TCR V γ 9⁺ клеток, которые составляли весь отдел $\gamma\delta$ T-клеток на день 15 периода культивирования с клонами анти-TCR V γ 9 mAb B3, 7A5 и IMMU 360, была равна 94%, 92% и 68% соответственно, по сравнению с 98% для размножения на основе Zol.

Пример 2. V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клетки, размножаемые с использованием либо анти-TCR V γ 9 mAb, либо Zol, демонстрируют аналогичные способности к активации и трансдукции

Чтобы понять, демонстрируют ли TCR V γ 9⁺ $\gamma\delta$ T-клетки, которые были размножены с использованием либо TCR V γ 9 mAb (клоны B3, 7A5 и IMMU 360), либо Zol, аналогичные профили активации, определяли активационный статус клеток путем измерения поверхностной экспрессии CD69 на день 0, 11 и 15 периода культивирования.

Интересно отметить, что $V\gamma 9^+ \gamma\delta$ Т-клетки, получаемые при обоих условиях культивирования, опосредуемых анти-TCR $V\gamma 9$ mAb и опосредуемых Zol, не имели никаких различий в поверхностной экспрессии CD69 классического маркера на активацию лейкоцитов и удержание в ткани (**ФИГ. 4А и 4В**).

- 5 Специалистам в данной области будет понятно, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции изобретения. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения,
- 10 определяемых настоящим описанием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения и выделения $\gamma\delta$ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови человека (РВМС), при этом способ включает в себя этапы, на
5 которых:
 - a. получают клетки РВМС человека;
 - b. культивируют клетки РВМС человека в культуральной среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) и моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент для размножения $\gamma\delta$ Т-клеток; и
10 c. выделяют $\gamma\delta$ Т-клетки.
2. Способ по п. 1, в котором концентрация IL-2 составляет от около 50 МЕ/мл до около 5000 МЕ/мл.
- 15 3. Способ по п. 2, в котором концентрация IL-2 составляет от около 100 МЕ/мл до около 1000 МЕ/мл.
4. Способ по п. 1, в котором IL-2 представляет собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2).
20
5. Способ по п. 1, в котором моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его антигенсвязывающий фрагмент являются химерными.
6. Способ по п. 1, в котором моноклональное антитело анти-TCR V γ 9 или его
25 антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими или гуманизированными.
7. Способ по п. 1, в котором $\gamma\delta$ Т-клетка представляет собой V γ 9⁺ $\gamma\delta$ Т-клетку или V γ 9⁻ $\gamma\delta$ Т-клетку.
- 30 8. Способ по п. 1, в котором $\gamma\delta$ Т-клетки выделяют посредством проточной цитометрии, магнитного разделения и отрицательного отбора.
9. Выделенная $\gamma\delta$ Т-клетка, полученная способом по п. 8.

10. Способ получения $\gamma\delta$ Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR), при этом способ включает в себя этапы, на которых:

- a. получают выделенную $\gamma\delta$ Т-клетку по п. 9;
- b. приводят $\gamma\delta$ Т-клетку в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), причем CAR содержит:

- i. внеклеточный домен;
- ii. трансмембранный домен; и
- iii. внутриклеточный сигнальный домен,

причем CAR необязательно дополнительно содержит сигнальный пептид на аминоконце и шарнирную область, соединяющую внеклеточный домен и трансмембранный домен, и

при этом приведение $\gamma\delta$ Т-клетки в контакт с нуклеиновой кислотой, кодирующей CAR, генерирует CAR $\gamma\delta$ Т-клетку.

11. Способ по п. 10, в котором CAR содержит:

- i. внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент;
- ii. трансмембранный домен, содержащий CD8 α трансмембранный домен;
- iii. внутриклеточный сигнальный домен, содержащий CD3 ζ или 4-1BB внутриклеточный домен;
- iv. сигнальный пептид, содержащий CD8 α сигнальный пептид; и
- v. шарнирную область, содержащую CD8 α шарнирную область.

12. Способ по п. 11, в котором CAR содержит:

- i. трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1;
- ii. внутриклеточный домен, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3;
- iii. сигнальный пептид, имеющий аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4; и
- iv. шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности SEQ ID NO: 5.

13. Способ по п. 10, в котором внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с опухолевым антигеном.

5

14. CAR $\gamma\delta$ T-клетка, полученная способом по п. 10.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая CAR $\gamma\delta$ T-клетку по п. 14 и фармацевтически приемлемый носитель.

10

16. Способ лечения или профилактики заболевания или состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по п. 15.

15 17. Способ по п. 16, в котором заболевание или состояние представляет собой рак.

18. Способ по п. 17, в котором рак выбран из солидного рака или гемобластоза.

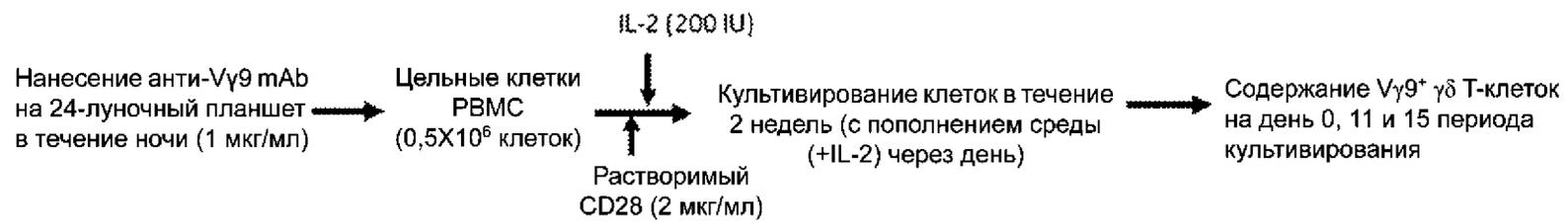
19. Способ по п. 18, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, рака эндометрия, рака простаты, рака щитовидной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), ходжкинской лимфомы/болезни (БХ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других гемобластозов.

20. Способ по п. 16, в котором заболевание или состояние представляет собой аутоиммунное заболевание.

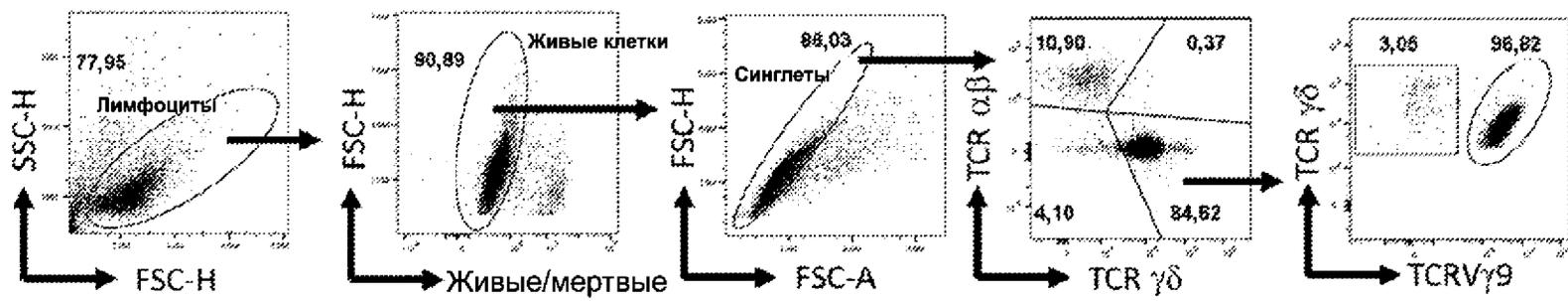
21. Способ по п. 20, в котором аутоиммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из алопеции, амилоидоза, анкилозирующего спондиллоартрита, болезни

Кастлемана (БК), целиакии, болезни Крона, эндометриоза, фибромиалгии, гломерулонефрита, базедовой болезни, синдрома Гийена — Барре, IgA-нефропатии, волчанки, болезни Лайма, болезни Менъера, множественного склероза, нарколепсии, нейтропении, псориаза, псориатического артрита, ревматоидного артрита, саркоидоза, склеродермии, диабета 1 типа, язвенного колита и витилиго.

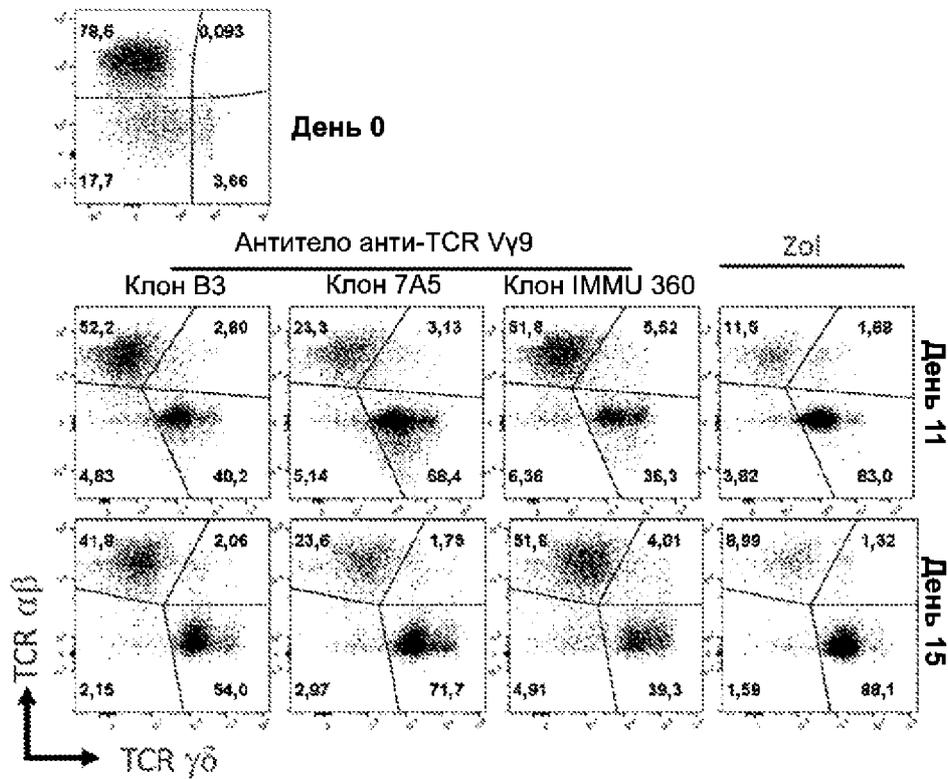
22. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей CAR $\gamma\delta$ T-клетку, причем способ включает объединение CAR $\gamma\delta$ T-клетки по п. 14 с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции.



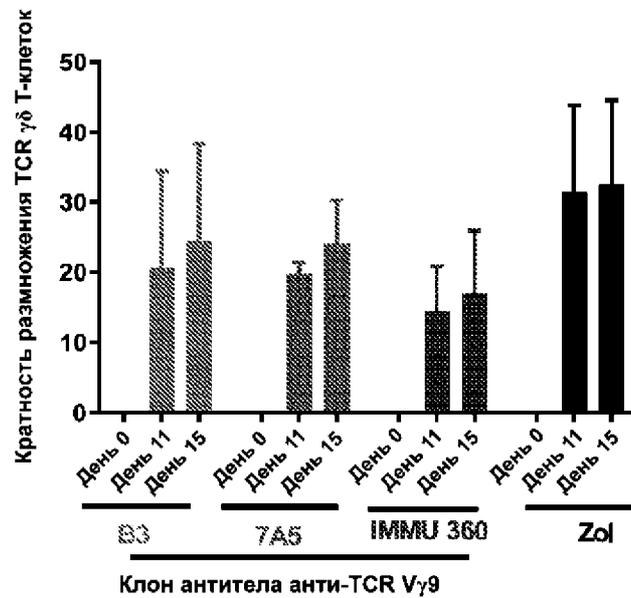
ФИГ. 1А



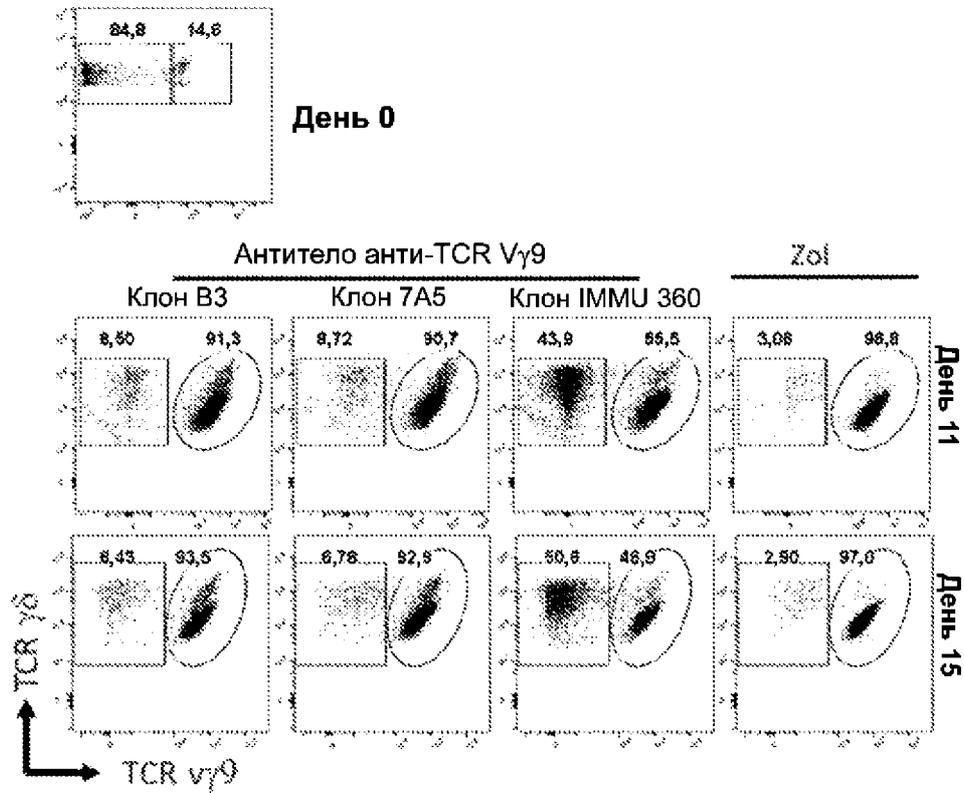
ФИГ. 1В



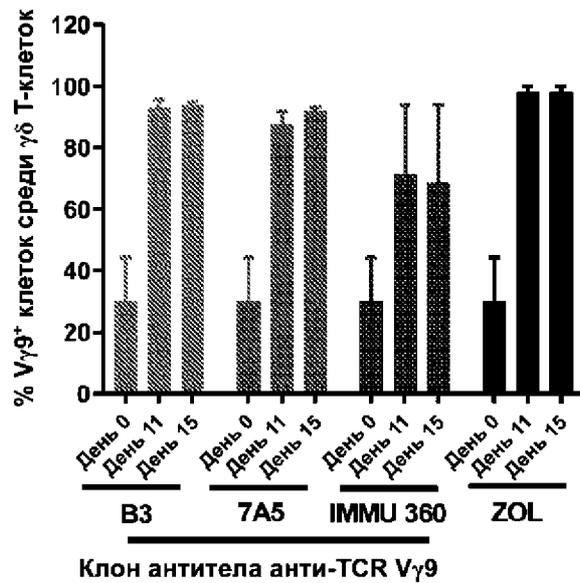
ФИГ. 2А



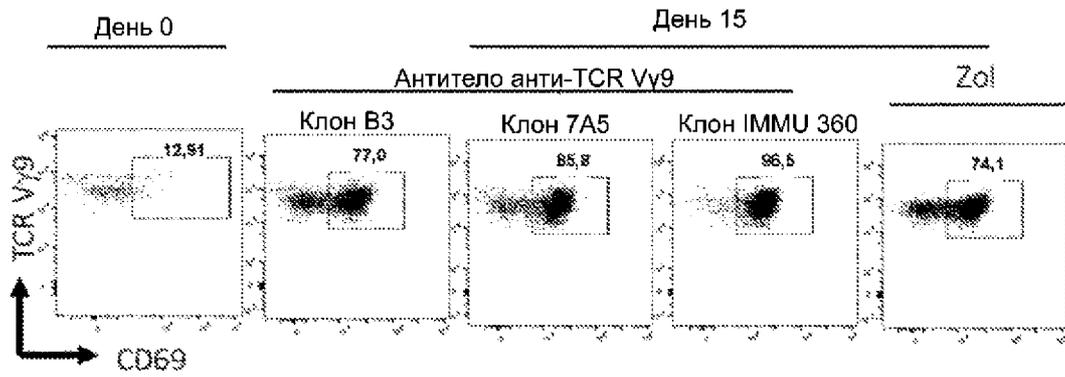
ФИГ. 2В



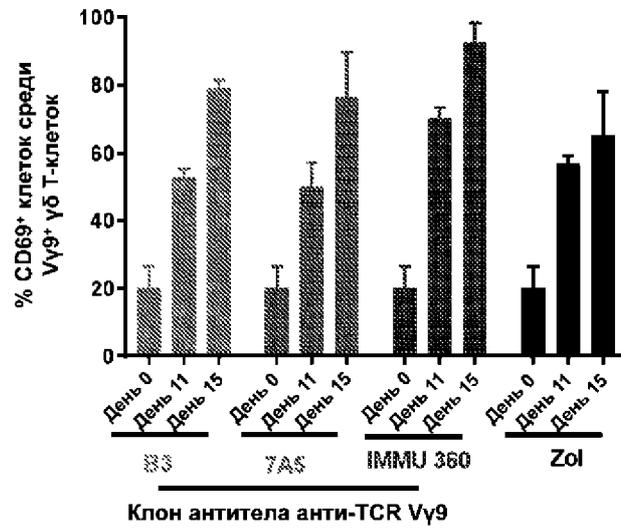
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 4А



ФИГ. 4В