

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292674** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2022.11.10**

(22) Дата подачи заявки  
**2020.03.20**

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 31/675* (2006.01)  
*A61K 31/7076* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)  
*C12N 5/00* (2006.01)

---

(54) **V $\delta$ 1+ Т-КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОИДНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ  
НОВООБРАЗОВАНИЙ**

---

(86) **PCT/GB2020/050763**

(87) **WO 2021/186137 2021.09.23**

(71) Заявитель:  
**ГАММАДЕЛЬТА ТЕРАПЬЮТИКС  
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:  
**Симойш Андре Гонкалу ду Эшпириту  
Санту, Ди Лоренцо Бьяджо, Кословски  
Майкл, Силва-Сантос Бруно Мигель  
де Карвало э, Хаттон Эндрю Джон,  
Рикалдин Тимоти Джоэл, Фаулер  
Дэниел, Бромли Элис, Нусбаумер  
Оливер (GB)**

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

---

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим V $\delta$ 1+ Т-клетки для применения при лечении миелоидных злокачественных новообразований. Настоящее изобретение также относится к способам лечения с применением указанных композиций.

**202292674**  
**A1**

**202292674**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576215EA/042

### У ДЕЛЬТА1+ Т-КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОИДНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим V $\delta$ 1+Т-клетки для применения при лечении миелоидных злокачественных новообразований. Настоящее изобретение также относится к способам лечения с применением указанных композиций.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Острый миелоидный лейкоз (AML) остается клинической проблемой из-за частой резистентности к химиотерапии и смертельных рецидивов. AML характеризуется низкой (10%) выживаемостью среди пожилых людей (в возрасте 65 лет и старше), в основном из-за резистентности к стандартному лечению. Доступное лечение состоит из комбинации цитарабина с антрациклиновым препаратом, который, хотя и эффективен для индукции полной ремиссии, в конечном итоге выбирает химиорезистентные клоны, которые вызывают рефрактерные рецидивы. Многообещающими альтернативами химиотерапии являются таргетная терапия и разрабатываемые иммунотерапевтические средства, которые оказались эффективными при В-клеточных злокачественных новообразованиях.

Измеряемая остаточная болезнь (MRD) является независимым постдиагностическим прогностическим показателем при AML и миелодиспластическом синдроме (MDS), который важен для стратификации риска и планирования лечения, поскольку пациенты с MRD+ более склонны к рецидивам и имеют более короткие показатели выживаемости даже при морфологически полной ремиссии. Элиминация MRD при AML и MDS является механизмом, в котором существует большая неудовлетворенная потребность, и при этом является сложной задачей из-за отсутствия специфических антигенов, экспрессируемых на лейкоэмических бластах.

Было продемонстрировано, что присутствие  $\gamma\delta$  Т-клеток положительно коррелирует с прогнозом при ряде солидных и гематологических видов рака (Deniger et al. Clin. Cancer Res. (2014) 20(22): 5708- 5719; Gentles et al. Nat. Med. (2015) 21(8): 938-945). Несмотря на то, что применение V $\delta$ 2+ Т-клеток в таком лечении было достаточно изучено, клиническое манипулирование V $\delta$ 1+ Т-клетками является затрудненным из-за их относительно низкой численности (<0,5%) среди лимфоцитов периферической крови. Однако способы, такие как описанные в WO 2016/198480, недавно обеспечили повышенный выход V $\delta$ 1+ Т-клеток, которые могут быть пригодны для клинического применения с целью удовлетворения потребности в лечении миелоидных злокачественных новообразований, как описано в данном документе.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предлагается аллогенная композиция, содержащая V $\delta$ 1+ Т-клетки, для применения при лечении пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предлагается доза, содержащая аллогенную композицию, для применения, как описано в данном документе.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предлагается способ лечения миелоидного злокачественного новообразования, включающий введение терапевтически эффективного количества аллогенной композиции, содержащей V $\delta$ 1+T-клетки, пациенту с указанным миелоидным злокачественным новообразованием.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Figure 1: Композиция  $\gamma\delta$  T-клеток демонстрирует более высокое клональное разнообразие, чем ex vivo V $\delta$ 1 T-клетки.** Графическое представление репертуаров TRGV и TRDV и распределения длины CDR3 (количество нуклеотидов) V $\delta$ 1+ T-клеток, отсортированных с помощью FACS, из продуктов периферической крови/PB или DOT-клеток, полученных от 4 независимых здоровых доноров (HD# A-D). Каждый квадрат представляет собой отдельный клонотип (с отличной последовательностью нуклеотидов), при этом его площадь пропорциональна относительной численности в образце; а цвет группирует клонотипы по цепочкам.

**Figure 2: Влияние фенотипа экспрессии CD27 на разнообразие репертуара TCR и реактивность относительно AML композиции  $\gamma\delta$  T-клеток.** (A) Уничтожение in vitro KG-1-клеток AML DOT-клетками, полученными из предварительно отсортированных CD27+ или CD27- V $\delta$ 1+ T-клеток (культивируемых в течение 21 дня) Клетки совместно инкубировали в течение 3 часов при соотношении 10:1 (E:T) и затем анализировали с помощью окрашивания аннексином V (процент положительных явлений среди предварительно меченых KG-1-клеток). Данные указывают среднее значение двух технических повторностей для каждого донора. (B) Экспрессия NKp30 и NKp44 в клетках CD27+ (черный) и в клетках CD27- (белый) после размножения DOT-клеток. Указано среднее значение технических повторностей.

**Figure 3: Реактивность композиции клональных  $\gamma\delta$  T-клеток в отношении клеток AML.** (A) и (B) демонстрируют in vitro уничтожение KG-1-клеток AML с помощью клонов DOT-клеток, полученных из отдельных V $\delta$ 1 T-клеток, отсортированных от здоровых доноров. Клетки совместно инкубировали в течение 3 часов при соотношении 10:1 (E:T) и затем анализировали с помощью окрашивания аннексином V (процент положительных явлений среди предварительно меченых KG-1-клеток). Каждая полоса представляет собой уничтожение KG-1-клеток при совместной инкубации с отдельными клонами. Пунктирная горизонтальная линия представляет собой средний показатель гибели базальных опухолевых клеток (без DOT-клеток). На панели B, к культурам добавляли либо mAb, специфичные к V $\delta$ 1 TCR, либо изотипический контроль. Показаны клоны, в которых блокада привела к более четкому снижению KG-1 нацеливания. Данные представляют собой среднее значение двух технических повторностей и получены от 4 независимых здоровых доноров (HD).

**Figure 4: Композиция  $\gamma\delta$  T-клеток нацелена на множество типов клеток AML, но не на здоровые лейкоциты.** Анализы уничтожения in vitro с применением DOT-

клеток, полученных от 3-4 здоровых доноров, совместно инкубированных в течение 3 часов в соотношении 10:1 (E:T) с указанными клеточными линиями AML (A), первичными образцами AML (B) или нормальными популяциями лейкоцитов, FACS-сортированными из периферической крови (C). На панели A, пунктирная горизонтальная линия представляет средний показатель гибели базальных опухолевых клеток; а на панели B, CTR относится также только к опухолевым клеткам (без DOT-клеток). Эксперименты проводили с техническими трехкратными повторностями. (D) Анализы уничтожения *in vitro* с неразмноженными свежими («ex vivo») V $\delta$ 1+ Т-клетками, собранными от 3 здоровых доноров, совместно инкубированными в течение 3 часов при соотношении 10:1 (E:T) с указанным HEL- или KG-1 клеточными линиями. DOT-клетки, полученные из HD#1, показаны в качестве положительного контроля. (E) Экспрессия гранзима В и перфорина в DOT-клетках, оцененная с помощью внутриклеточной проточной цитометрии. (F) Процент CD107a+ DOT-клеток после совместной инкубации с опухолевыми мишенями AML; или при стимуляции PMA/иономицином (положительный контроль); или без добавления (отрицательный контроль). Результаты получены от двух здоровых доноров, протестированных в двух повторностях.

**Figure 5: Цитотоксическая активность V $\delta$ 1+ Т-клеток в отношении гематологических опухолевых линий и сохранение здоровых РВМС.** 20-часовые анализы цитотоксичности V $\delta$ 1+ Т-клеток *in vitro* в отношении ряда опухолевых мишеней AML (MV4-11, Kasumi-1, HL-60), NHL (Raji) и ALL (NALM-6), а также здоровых аллогенных РВМС, в различных соотношениях эффектор:мишень. Приведен процент лизиса клеток-мишеней. N=2.

**Figure 6: Нацеливание композиции  $\delta$  Т-клеток на AML *in vivo*.** (A) Облученных (200-225 рад) мышей NOD-SCID $\gamma$ c<sup>-/-</sup>-SGM3 (NSGS) в возрасте 8-12 недель анестезировали и впоследствии им трансплантировали в правую большеберцовую кость (во внутрикостный мозг - i.b.m.)  $1 \times 10^6$  первичных клеток AML человека. (B) Облученным (200-225 рад) NSG мышам NOD-SCID $\gamma$ c<sup>-/-</sup> (NSG) в возрасте 8-12 недель внутривенно (в/в) вводили  $2 \times 10^6$  KG-1-клеток человека. (C) Облученных (225-250 рад) мышей NOD.Rag1- $\gamma$ c<sup>-/-</sup>-SGM3 (NRGS) в возрасте 8-12 недель анестезировали и впоследствии им трансплантировали в правую большеберцовую кость (i.b.m.)  $1 \times 10^4$  HEL-клеток человека. На панелях (A) и (C), приживление опухоли оценивали путем обнаружения\* по меньшей мере 100 опухолевых клеток (триггер опухоли) в крови через 1 неделю после инъекции опухолевых клеток. Лечение начинали, как только в крови мыши обнаруживали 100 опухолевых клеток (триггер опухоли). На панели (B), введение PBS- или DOT-клеток начинали через 10 дней после внутривенной инъекции опухолевых клеток. Животным вводили три внутривенные инъекции PBS или  $2 \times 10^7$  DOT-клеток с интервалом в 5 дней. Приведены кривые выживаемости для HEL-несущих NRGS-хозяев (n=5 КОНТР, 4 мыши, получавшие DOT; p < 0,05). DOT-клетки (3 инъекции по  $2 \times 10^7$  клеток) переносили мышам NSG (n=6 КОНТР, 7 мышей, получавших DOT), которым предварительно вводили KG-1-клетки AML (D-E); или мышам NSGS (n=5 КОНТР, 5 мышей, получавших DOT),

несущим первичные клетки AML (F-G; ксенотрансплантат, полученный от пациента, PDX). Опухолевую нагрузку оценивали в крови и печени через неделю после последнего переноса DOT-клеток (D); или посредством еженедельные кровопусканий (F). Кривые выживания приведены на панелях E ( $P < 0,05$ ) и G ( $P < 0,01$ ). (H-I) Была разработана вторая первичная модель AML. (H) Опухолевая нагрузка в крови прогрессирует. (I) Приведены кривые выживаемости для NSGS-хозяев, несущих первичный AML (n=5 КОНТР, 5 мышей, получавших DOT). Животных умерщвляли, когда наблюдались прогрессирующие симптомы заболевания (такие как паралич задней конечности). Указано среднее  $\pm$  SEM; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ .

**Figure 7: Композиция  $\gamma\delta$  Т-клеток, (повторно) нацеленная на химиорезистентный AML.** Сравнение *in vitro* анти-AML активности DOT-клеток и стандартной химиотерапии. (A) DOT-клетки и стандартные протоколы химиотерапии AML (доксорубин плюс цитарабин) были протестированы в отношении клеток AML, ранее не подвергавшихся химиотерапии (дикий тип, wt) или химиорецидивных клеток AML (CR, повторно выращенных после  $> 99\%$  элиминации HEL-клеток). Приведены проценты аннексин V+ HEL-клеток после 3 часов обработки. (B) Количество HEL-клеток AML до и после 72 часов обработки DOT-клетками (при соотношении E:T 5:1). Выжившие клетки ( $< 1\%$ ) пересаживали и давали им вырасти, таким образом получая образцы (C-E), обработанные DOT (DT). (C) DOT-клетки совместно инкубировали в течение 3 часов с необработанными (NT) или предварительно обработанными DOT (DT) HEL-клетками AML в соотношении 5:1 или 10:1 (E:T). Приведены проценты аннексин V+ HEL-клеток. (D) Количество одноклеточных линий AML со штрих-кодом в необработанных (NT), обработанных химиотерапией (CT) или обработанных DOT (DT) HEL-клетках AML. (E) Корреляция Пирсона для распределения одноклеточных линий AML со штрих-кодом между различными видами обработки. Пунктирные линии представляют низкую (0,2), среднюю (0,4) и высокую (0,8) корреляцию соответственно. Указано среднее  $\pm$  SEM (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

**Figure 8: Повторяющаяся цитотоксичность размноженных популяций  $V\delta 1$ +Т-клеток в отношении гематологических опухолевых линий.** В левой части графика показан процент явлений CTV+ve (опухолевые мишени HL-60), которые были Sytox+ve, во время заражения 1, а в правой части графика показан процент явлений CTV+ve, которые были Sytox+ ve, во время заражения 2. Приведено среднее значение со стандартным отклонением для 2 доноров.

**Figure 9: Продукция цитокинов стимулированными  $V\delta 1$ -размноженными клетками.** Продукция цитокинов (пг на миллион клеток в час)  $V\delta 1$ -размноженными клетками при стимуляции TCR (A). На круговой диаграмме представлены основные цитокины, продуцируемые  $V\delta 1$ -размноженными клетками, стимулированными физиологическими уровнями ОКТ3 и IL-15 (B) или сверхфизиологическими стимулами с IL-15 (C). Продукция IL-6 и TNF $\alpha$  при совместном культивировании образцов крови (PBMC или лейкоцитарных пленок) с  $V\delta 1$ -размноженными клетками (D),

**Фиг. 10: Селективная цитотоксическая активность размноженных популяций V $\delta$ 1+ Т-клеток в отношении клеток NALM-6 и здоровых В-клеток.** На графике показан процент явлений CTV+ve (здоровые В-клетки), которые были Sytox+ve, и процент явлений CFSE+ve (опухолевые клетки NALM-6), которые были Sytox+ve, при различных соотношениях Е:Т. Приведено среднее значение и SD (технические повторности). 1 эксперимент представляет 3 биологических доноров.

Figure 11: (A) PBL, выделенные из препаратов крови лейкоцитарной пленки и облученные для остановки потенциала деления клеток, совместно культивировали в соотношении 1:1 с окрашенными CTV аллогенными или аутологичными популяциями Т-клеток крови в течение 5 дней без цитокиновой поддержки. Деление клеток в ответ на совместное культивирование с облученными PBL затем оценивали с помощью проточного цитометрического анализа разбавления красителя CTV. Приведен общий % разделенных  $\alpha\beta$  Т-клеток. N=3. (B) PBL, выделенные из препаратов крови лейкоцитарной пленки и облученные для остановки потенциала клеточного деления, культивировали в соотношении 1:1 либо с окрашенными CTV Т-клетками крови, либо с клетками GDX012, полученными от двух разных доноров (LK008, LK009). Т-клетки крови и клетки GDX012 были получены от одного и того же донора. Совместные культуры инкубировали в течение 5 дней без цитокиновой поддержки. Деление клеток в ответ на совместное культивирование с облученными PBL затем оценивали с помощью проточного цитометрического анализа разбавления красителя CTV. Приведен общий %  $\alpha\beta$  Т-клеток (для Т-клеток крови) или общий % разделенных живых клеток GDX023. Данные представлены в технических трехкратных повторностях. Н.О.=не обнаружено.

Figure 12: **Контроль опухоли в модели *in vivo* после однократного внутривенного введения GDX012.** Рост опухоли отслеживали с помощью BLI всего тела у мышей NSG, которым внутривенно вводили инъекцию  $0,5 \times 10^6$  клеток NALM-6-FLuc/GFP, а затем, на следующий день, однократно внутривенно вводили или не вводили  $20 \times 10^6$  клеток GDX012. Все контрольные и пролеченные мыши получали внутрибрюшинные инъекции рекомбинантного человеческого IL-15 (1 мкг/мышь каждые 3 суток на протяжении всего исследования). Средние значения  $\pm$  SEM (n=8) показаны между днем 14 и 28, а также приведены индивидуальные данные и вентральные изображения BLI всего тела для моментов времени - день 17 и день 28.

**Фиг. 13: «Хоуминг» костного мозга в модели *in vivo* после однократного внутривенного введения GDX012.** Мышам NSG, получившим внутривенную инъекцию  $0,5 \times 10^6$  или  $1 \times 10^6$  клеток NALM-6-FLuc/GFP, однократно вводили или не вводили путем внутривенной инъекции  $20 \times 10^6$  клеток GDX012 либо через 24 часа, либо через 6 дней. Все контрольные и пролеченные мыши получали внутрибрюшинные инъекции рекомбинантного человеческого IL-15 (1 мкг/мышь каждые 2-3 дня на протяжении всего исследования). Исследование прекращали через 4 недели для оценки биораспределения GDX012 и опухолевой нагрузки в костном мозге. Проточную цитометрию проводили на костном мозге длинных костей задних конечностей и оценивали процент клеток TCR $\gamma\delta$ +

(GDХ012) и клеток CD19<sup>+</sup> (клетки NALM-6) в живых синглетах. Приведены репрезентативные графики проточной цитометрии и индивидуальные данные.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предлагается аллогенная композиция, содержащая V $\delta$ 1<sup>+</sup> Т-клетки, для применения при лечении пациента с миелоидным злокачественным новообразованием. Представленные в данном документе данные демонстрируют, что V $\delta$ 1<sup>+</sup>Т-клетки, полученные от аллогенных доноров, были высоко поликлональными и лишены доминантных клонов, что делает их подходящими в качестве терапевтических средств для применения у широкого круга доноров. Дальнейшие эксперименты также показали, что такие композиции обладают ограниченным потенциалом вызывать синдром высвобождения цитокинов и не опосредуют реакции смешанных лимфоцитов, что является важным аспектом безопасности при рассмотрении методов адоптивной клеточной терапии. Кроме того, V $\delta$ 1<sup>+</sup> Т-клетки по настоящему изобретению обладают высокой селективностью и цитотоксичностью по отношению к миелоидным клеточным линиям и первичным клеткам, сохраняя при этом незлокачественные «здоровые» клетки того же типа.

### **Миелоидные злокачественные новообразования**

Миелоидные злокачественные новообразования представляют собой клональные заболевания, возникающие в гемопоэтических стволовых клетках или клетках-предшественниках. Они могут характеризоваться неконтролируемой пролиферацией и/или блокированием дифференцировки аномальных миелоидных клеток-предшественников. Было идентифицировано несколько мутаций, ассоциированных с этими злокачественными новообразованиями, в основном относящихся к пяти классам: белки сигнальных путей (например, CBL, FLT3, JAK2, RAS), факторы транскрипции (например, CEBPA, ETV6, RUNX1), эпигенетические регуляторы (например, ASXL1, DNMT3A, EZH2, IDH1, IDH2, SUZ12, TET2, UTX), опухолевые супрессоры (например, TP53) и компоненты сплайсосомы (например, SF3B1, SRSF2) (Murati et al. (2012) BMC Cancer 12: 304).

Миелоидное злокачественное новообразование может включать хроническую (включая миелодиспластические синдромы, миелопролиферативные новообразования и хронический миеломоноцитарный лейкоз) и острую (острый миелоидный лейкоз) стадии.

На основании морфологии, цитохимии, иммунофенотипа, генетики и клинических особенностей миелоидных заболеваний Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) классифицирует миелоидные новообразования на пять основных типов: (1) острый миелоидный лейкоз; (2) миелодиспластические синдромы; (3) миелопролиферативные новообразования; (4) миелодиспластические и миелопролиферативные новообразования; и (5) миелоидные новообразования, ассоциированные с эозинофилией и аномалиями рецепторов фактора роста, происходящие из тромбоцитов или фибробластов. Классификация описана дополнительно в Tefferi and Vardiman (2008) Leukemia 22:14-22.

Следовательно, в одном варианте осуществления миелоидное злокачественное

новообразование выбирают из острого миелоидного лейкоза (AML), миелодиспластического синдрома (MDS), миелопролиферативных новообразований (MPN), миелодиспластических и миелопролиферативных (MDS/MPN) новообразований и миелоидных новообразований, ассоциированных с эозинофилией и аномалиями рецепторов фактора роста, происходящих из тромбоцитов или фибробластов. В другом варианте осуществления миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML, MDS или MPN, в частности, AML или MDS.

В одном варианте осуществления миелоидное злокачественное новообразование представляет собой AML. AML возникает в результате клональной экспансии миелоидных бластов в периферической крови, костном мозге или других тканях. Это вызвано тем, что либо миелоидные стволовые клетки продуцируют аномальные миелобласты, которые не становятся здоровыми лейкоцитами, либо слишком много миелоидных стволовых клеток становятся аномальными эритроцитами или тромбоцитами. В результате лейкемические бласты или незрелые клеточные формы накапливаются в костном мозге, периферической крови и иногда в других тканях, а продукция нормальных эритроцитов, тромбоцитов и зрелых гранулоцитов снижается.

В альтернативном варианте осуществления миелоидное злокачественное новообразование представляет собой MDS. Часто считается, что MDS и MPN являются предшественниками миелоидных злокачественных новообразований, таких как AML. Низкое количество клеток крови, также называемое «цитопенией», является отличительной чертой MDS и ответственно за многие симптомы, ассоциированные с MDS, такие как инфекции, анемия, спонтанные кровотечения или легкие кровоподтеки.

Типы MDS включают рефрактерную цитопению с однолинейной дисплазией (RCUD), рефрактерную анемию с кольцевыми сидеробластами (RARS), рефрактерную цитопению с мультилинейной дисплазией (RCMD), рефрактерную анемию с избытком бластов (RAEB-1 и RAEB-2), миелодиспластический синдром, ассоциированный с выделенным del (5q) и неклассифицированный миелодиспластический синдром (MDS-U). RCUD влияет на один тип клеток крови и может быть разделен на 3 подтипа: рефрактерная анемия (низкое количество эритроцитов), рефрактерная нейтропения (низкое количество лейкоцитов) и рефрактерная тромбоцитопения (низкое количество тромбоцитов). RARS похож на рефрактерную анемию, но в костном мозге имеется большее количество ранних эритроцитов, содержащих в себе кольцо железа (кольцевые сидеробласты). RCMD поражает более одного типа клеток крови и характеризуется очень небольшим количеством или отсутствием незрелых клеток (бластов) в крови и небольшим количеством бластов в костном мозге. При RAEB, уровень одной или большего количества клеток крови является низким, и многие из этих клеток выглядят аномально в костном мозге. При RAEB-2, в крови и костном мозге больше бластных клеток, чем при RAEB-1.

В одном варианте осуществления пациент является положительным в отношении минимальной остаточной болезни (MRD+).



Минимальная остаточная болезнь (MRD) относится к наличию небольшого количества раковых клеток в организме после лечения рака. MRD является независимым постдиагностическим прогностическим показателем при AML и MDS, который важен для стратификации риска и планирования лечения.

Из-за низкого уровня клеток, MRD требует тестирования с помощью чувствительных тестов. Наиболее широко применяемыми тестами являются проточная цитометрия, полимеразная цепная реакция (PCR) и секвенирование нового поколения (NGS) на образцах клеток костного мозга и/или клеток периферической крови. Способы, известные в данной области техники, можно применять для диагностики MRD у пациента. В одном варианте осуществления MRD+ пациент находится в полной ремиссии, не имеет обнаруживаемых лейкоэмических бластов в периферической крови и/или имеет менее 5% лейкоэмических бластов в костном мозге.

Пациент или субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой пациента-человека с раком (например, пациента-человека с раком, которого лечат от рака крови).

В одном варианте осуществления пациент ранее получал химиотерапию. Например, пациент может получить курс химиотерапии по меньшей мере за 3 дня до введения аллогенной композиции.

В одном варианте осуществления химиотерапию выбирают из флударабина и циклофосфида.

#### **Аллогенная композиция**

В одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит по меньшей мере около 90% CD45+ клеток по отношению к общему количеству живых клеток. В другом варианте осуществления аллогенная композиция содержит по меньшей мере около 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% CD45+ клеток по отношению к общему количеству живых клеток.

В одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит по меньшей мере около 60%  $\gamma\delta$  T-клеток по отношению к общему количеству живых клеток. В другом варианте осуществления аллогенная композиция содержит по меньшей мере около 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%  $\gamma\delta$  T-клеток по отношению к общему количеству живых клеток.

В одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит размноженную *ex vivo* популяцию клеток, обогащенную V $\delta$ 1+ T-клетками по сравнению с исходной неразмноженной клеточной популяцией. В одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% V $\delta$ 1+ T-клеток по отношению к общему количеству живых клеток. В другом варианте осуществления аллогенная композиция содержит более 30% V $\delta$ 1+ T-клеток по отношению к общему количеству живых клеток, например, по меньшей мере 33%. В дополнительном варианте осуществления V $\delta$ 1+ T-клетки содержат по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по

меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от общего количества  $\gamma\delta$  Т-клеток аллогенной композиции. В дополнительном варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки содержат по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% от общего количества  $\gamma\delta$  Т-клеток аллогенной композиции.

В одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит менее 0,1%  $\alpha\beta$  Т-клеток по отношению к общему количеству живых клеток. Предпочтительно аллогенная композиция содержит менее 0,09%, менее 0,08%, менее 0,07%, менее 0,06%, менее 0,05%, менее 0,04%, менее 0,03%, менее 0,02% или менее 0,01%  $\alpha\beta$  Т-клеток.

Аллогенная композиция может содержать дозу, подходящую для введения пациенту. Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предлагается доза аллогенной композиции, содержащей  $V\delta 1+$  Т-клетки, для применения при лечении пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.

В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции содержит менее чем около  $1 \times 10^{10}$  общего количества живых клеток, например менее чем около  $9 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$  или  $1 \times 10^6$  общего количества живых клеток. В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции содержит менее чем около  $1 \times 10^8$  общего количества живых клеток. В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции включает более чем около  $1 \times 10^4$  общего количества живых клеток, например более чем около  $3 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  или  $5 \times 10^7$  общего количества живых клеток. В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции содержит более чем около  $1 \times 10^6$  общего количества живых клеток. В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции содержит от около  $1 \times 10^4$  клеток до около  $1 \times 10^{10}$  общего количества живых клеток, например, от около  $1 \times 10^5$  общего количества живых клеток до около  $1 \times 10^9$  клеток, в частности, от около  $1 \times 10^6$  клеток до около  $1 \times 10^8$  общего количества живых клеток. В одном варианте осуществления доза аллогенной композиции содержит от около  $4 \times 10^7$  до  $8 \times 10^9$ , например,  $4 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $1,2 \times 10^9$ ,  $2,4 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$  или  $8 \times 10^9$  общего количества живых клеток.

Аллогенная композиция может содержать дозу (такую как терапевтически эффективная доза) для введения пациенту. В одном варианте осуществления пациенту вводят дозу  $V\delta 1+$  Т-клеток, рассчитанную на кг массы тела пациента. В некоторых вариантах осуществления доза  $V\delta 1+$  Т-клеток, как описано в данном документе, содержит около  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза  $V\delta 1+$  Т-клеток содержит по меньшей мере около  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза  $V\delta 1+$  Т-клеток содержит до около  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления доза  $V\delta 1+$  Т-клеток содержит около  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^8$

клеток/кг.

Доза аллогенной композиции может содержать не более чем  $5 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг, например, не более чем около  $10^4$ ,  $10^3$  или  $10^2$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг. Таким образом, в одном варианте осуществления доза содержит менее чем около  $5 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг. В дополнительном варианте осуществления доза содержит менее чем около  $1 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.

В одном варианте осуществления аллогенную композицию замораживают, а затем оттаивают перед введением. В дополнительном варианте осуществления дозу аллогенной композиции рассчитывают перед замораживанием. В другом варианте дозу рассчитывают после оттаивания. В другом варианте осуществления аллогенную композицию не замораживают.

В контексте данного документа термин «около» включает до 10% включительно больше и до 10% включительно меньше указанного значения, предпочтительно до 5% включительно больше и до 5% включительно меньше указанного значения, особенно указанного значения. Термин «между» включает в себя значения указанных границ.

Фармацевтические композиции могут включать композиции размноженных V $\delta$ 1+ Т-клеток, как описано в данном документе, в комбинации с одним или большим количеством фармацевтически или физиологически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Такие композиции могут включать буферы, например, нейтральный буферный раствор, фосфатно-буферный раствор и т.п.; углеводороды, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатные агенты, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); и консерванты. Растворы для криоконсервации, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают, например, DMSO. Композиции могут быть составлены для любого подходящего введения, например, для внутривенного введения.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по существу не содержит, например, обнаруживаемых уровней контаминанта, например, эндотоксина или микоплазмы.

#### **Гамма-дельта-Т-клетки**

В одном предпочтительном варианте осуществления  $\gamma\delta$  Т-клетки содержат популяцию V $\delta$ 1+ Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки экспрессируют CD27. Например, V $\delta$ 1+ Т-клетки могут иметь частоту клеток CD27+ более 10%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%, более 60%, более 70%, более 80% или более 90%. В альтернативном варианте, V $\delta$ 1+ Т-клетки могут иметь частоту CD27+ клеток около 10%, около 20%, около 30%, около 40%, примерно 60%, около 70%, около 80% или около 90%. В определенных вариантах осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту CD27+ клеток более 10%. Таким образом, в одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту CD27+ клеток около 20%. В дополнительном варианте

осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту CD27+ клеток более 20%. В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту CD27+ клеток около 20%.

В некоторых вариантах осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют низкую долю клеток, экспрессирующих TIGIT. Например, V $\delta$ 1+ Т-клетки могут иметь частоту TIGIT+ клеток менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20% или менее 10%. В альтернативном варианте, V $\delta$ 1+ Т-клетки могут иметь частоту TIGIT+ клеток около 90%, около 80%, около 70%, около 60%, около 50%, примерно 40%, около 30%, около 20% или около 10%. В определенных вариантах осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту TIGIT+ клеток менее 80%. Таким образом, в одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту TIGIT+ клеток около 70%. В дополнительном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту TIGIT+ клеток менее 60%. В еще одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки имеют частоту TIGIT+ клеток около 30%. Таким образом, в одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки по существу не экспрессируют TIGIT.

В другом варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки экспрессируют CD27 и/или по существу не экспрессируют TIGIT.

#### **Способы получения композиций, обогащенных V $\delta$ 1+ Т-клетками**

V $\delta$ 1+ Т-клетки можно получить с помощью способов, известных в данной области техники. Например, V $\delta$ 1+ Т-клетки можно получить с помощью способов, описанных в публикациях WO2016/198480, WO2017/072367 или WO2018/202808, которые включены в данный документ посредством ссылки. С помощью этих способов можно избирательно размножить V $\delta$ 1+ Т-клетки (в частности, V $\delta$ 2- TCR $\gamma\delta$ + Т-клетки) в культуре. Указанные способы выполняют на образце, который также может называться «исходным образцом». В указанных способах можно применять либо нефракционированные образцы, либо образцы, обогащенные TCR $\gamma\delta$ + Т-клетками.

Данные, представленные в приведенных в данном документе примерах, указывают на то, что композиции V $\delta$ 1+ Т-клеток, размноженных с использованием экзогенных факторов роста, обладают улучшенной поликлональностью по сравнению с отсортированными с помощью FACS, неразмноженными V $\delta$ 1 Т-клетками, просто полученными из периферической крови (т.е. ex vivo V $\delta$ 1 Т-клетками), поэтому в одном варианте осуществления аллогенная композиция содержит V $\delta$ 1+ Т-клетки, полученные с помощью способа размножения, в частности при этом указанный способ размножения включает культивирование V $\delta$ 1+ Т-клеток в присутствии экзогенных факторов роста.

Образец может представлять собой любой образец, который содержит  $\gamma\delta$ -Т-клетки или их предшественники, включая, помимо прочего, кровь, костный мозг, лимфоидную ткань, эпителий, тимус, печень, селезенку, раковые ткани, ткань лимфатических узлов, инфицированную ткань, ткань плода и фракции или их обогащенные части. Композиции и способы по настоящему изобретению находят особое применение с V $\delta$ 1+ Т-клетками, полученными из гематологических образцов. Следовательно, в одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца крови.

Образец предпочтительно представляет собой кровь, включая периферическую кровь или пуповинную кровь или их фракции, включая клетки лейкоцитарной пленки, продукты лейкофереза, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и мононуклеарные клетки низкой плотности (LDMC). В одном варианте осуществления образец крови представляет собой периферическую кровь или ее фракцию. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой кровь человека или ее фракцию. Клетки могут быть получены из образца крови с помощью методов, известных в данной области техники, таких как центрифугирование в градиенте плотности. Например, цельная кровь может быть нанесена слоями на равный объем FICOLL-NYPAQUE с последующим центрифугированием при 400xg в течение 15-30 минут при комнатной температуре. Материал среды раздела будет содержать мононуклеарные клетки низкой плотности, которые можно собрать и промыть в культуральной среде и центрифугировать при 200xg в течение 10 минут при комнатной температуре. Образец может быть свежим или замороженным.

В одном варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки получают из образца человека.

Как описано в данном документе, композиции и способы по настоящему изобретению можно применять с  $V\delta 1+$  Т-клетками аллогенного происхождения, т.е. клетками, производными от образца, полученного от другого донора. В одном варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки получают от здорового донора.

Перед культивированием образца или его фракции (например, PBMC), образец или его фракцию можно обогатить определенными типами клеток и/или деплетировать относительно других типов клеток. В одном варианте осуществления образец обогащают Т-клетками. Образец может быть обогащен  $TCR\gamma\delta+$  Т-клетками. Например, образец может быть деплетирован относительно  $TCR\alpha\beta+$  Т-клеток, не- $TCR\gamma\delta+$  Т-клеток и/или обогащен  $CD3+$  клетками. В одном варианте осуществления образец сначала деплетируют относительно  $TCR\alpha\beta+$  Т-клеток, а затем обогащают  $CD3+$  клетками.

Образец может быть обогащен определенными типами клеток или деплетирован относительно определенных типов клеток с помощью методов, известных в данной области техники. В одном варианте осуществления клетки определенного фенотипа могут быть деплетированы путем культивирования образца или его фракции с коктейлем антител, содержащим антитела, которые связываются со специфическими молекулами на клетках, подлежащих деплетированию. Предпочтительно антитела в коктейле связаны с магнитными микрогранулами, которые можно применять для магнитного деплетирования или обогащения клеток-мишеней, когда эти клетки принудительно проходят через магнитную колонку. В одном варианте осуществления образец деплетирован относительно  $\alpha\beta$  Т-клеток.

Сбор  $V\delta 1+$  Т-клеток может включать физический сбор  $V\delta 1+$  Т-клеток из культуры, выделение  $V\delta 1+$ Т-клеток из других лимфоцитов (например,  $\alpha\beta$  Т-клеток,  $\gamma\delta$  Т-клеток и/или НК-клеток) или выделение и/или отделение  $V\delta 1+$  Т-клеток от стромальных клеток (например, фибробластов). В одном варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки собирают

механическими способами (например, пипетированием). В другом варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки собирают с помощью магнитной сепарации и/или мечения. В еще одном варианте осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки собирают с помощью способов проточной цитометрии, таких как FACS. Таким образом, в определенных вариантах осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки собирают посредством специфического мечения  $V\delta 1+$  Т-клеток. Следует понимать, что такой сбор  $V\delta 1+$  Т-клеток может включать физическое удаление из культуры, перенос в отдельный сосуд для культивирования или в отдельные или другие условия культивирования.

После выделения из образца,  $V\delta 1+$  Т-клетки обычно являются частью более крупной популяции лимфоцитов, содержащей, например,  $\alpha\beta$  Т-клетки, В-клетки и естественные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления 0,1%-10% выделенной популяции лимфоцитов составляют  $V\delta 1+$  Т-клетки, например 1-10% выделенной популяции лимфоцитов составляют  $V\delta 1+$  Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание  $V\delta 1+$  Т-клеток измеряют относительно количества  $CD45+$  клеток (общий антиген лейкоцитов). В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция деплетирована относительно других типов клеток (например, деплетирована относительно  $\alpha\beta$  Т-клеток). В некоторых вариантах осуществления выделенная популяция  $CD45+$  клеток, деплетированных относительно  $\alpha\beta$  Т-клеток, содержит по меньшей мере 0,1%  $V\delta 1+$  Т-клеток, например, по меньшей мере 0,5%  $V\delta 1+$  Т-клеток. В большинстве случаев популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток (например, популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток крови) будет включать большую популяцию  $V\delta 1$  Т-клеток. В некоторых случаях менее 10%  $\gamma\delta$  Т-клеток представляют собой  $V\delta 2+$  Т-клетки (например, менее 10%  $\gamma\delta$  Т-клеток представляют собой  $V\delta 2+$  Т-клетки).

После того, как клетки в образце были фракционированы и обогащены, при необходимости, клетки можно культивировать.

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы размножения  $V\delta 1+$  Т-клеток. Эти способы могут быть осуществлены *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления  $V\delta 1+$  Т-клетки размножают из популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые были выделены из образца, как описано в настоящем документе.

В контексте данного документа ссылки на «размноженную» или «размноженную популяцию  $V\delta 1+$  Т-клеток» включают популяции клеток, которые являются больше или содержат большее количество клеток, чем неразмноженная популяция. Такие популяции могут быть многочисленными, малочисленными или могут быть смешанной популяцией с увеличением доли или определенного типа клеток в популяции. Следует понимать, что термин «этап размножения» относится к процессам, которые приводят к размножению или увеличению популяции. Таким образом, увеличенная или размноженная популяция может быть больше по количеству или содержать большее количество клеток по сравнению с популяцией, в которой не был выполнен этап размножения или до какого-либо этапа размножения. Кроме того, следует понимать, что любые количества, указанные в данном документе для обозначения увеличения (например, кратное увеличение или

кратность увеличения), иллюстрируют увеличение количества или размера популяции клеток или количества клеток и указывают на степень увеличения.

В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца способом, включающим культивирование образца в среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-15-подобной активностью.

В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца способом, включающим культивирование образца в среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью.

В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца с помощью способа, включающего:

(1) культивирование клеток в образце в первой культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-15-подобной активностью; и

(2) культивирование клеток, полученных на этапе (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью.

Термины «в отсутствие интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7» и «в отсутствие интерлейкина-4» относятся не только к полному отсутствию этих цитокинов в культуральной среде, но также включают применение этих цитокинов в таких низких концентрациях, что они не могут вызывать измеримую реакцию или физиологический эффект в клетках-мишенях и, таким образом, могут считаться отсутствующими для практических целей. Кроме того, «измеримый физиологический эффект в клетках-мишенях» относится к любому измеримому изменению физиологического состояния клеток в соответствии со стандартными определениями. Например, изменения в физиологическом состоянии клеток могут быть обнаружены по изменениям в их состоянии активации (распознаваемым по повышающей или понижающей регуляции уровней экспрессии клеточного маркера ранней активации CD69); или выявляются по изменениям в состоянии их дифференцировки (распознаваемым по повышающей или понижающей регуляции NKG2D или NCR) через несколько часов или дней после контакта с такими цитокинами. Измеримым физиологическим эффектом также может быть изменение скорости пролиферации клеток, измеряемое окрашиванием CFSE или другими способами, известными в данной области техники. Для любого специалиста в данной области техники должно быть очевидно, что клетки, культивированные в первой культуральной среде, не должны подвергаться функционально релевантной стимуляции посредством ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 или функционально подобных факторов роста. Кроме того, клетки во второй культуральной среде не должны подвергаться функционально релевантной стимуляции посредством ИЛ-4 или функционально подобных факторов роста.

Предпочтительно эти цитокины не должны присутствовать в среде для культивирования клеток в конечной концентрации выше 2 нг/мл; более предпочтительно не выше 1 нг/мл, более предпочтительно не выше 0,1 нг/мл, еще предпочтительнее они должны отсутствовать.

Термин «фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью» означает любое соединение, которое обладает той же активностью, что и IL-15, в отношении его способности стимулировать аналогичные физиологические эффекты на  $\gamma\delta$  Т-клетки в культуре и включает, помимо прочего, IL-15 и миметики IL-15 или любой функциональный эквивалент IL-15, включая IL-2 и IL-7. Физиологические эффекты, стимулируемые IL-15, IL-2 и IL-7, на культивируемые  $\gamma\delta$  Т-клетки, включают индукцию клеточной дифференцировки в сторону более цитотоксического фенотипа, такую как повышение уровней экспрессии NKG2D и NCR (NKp30 и NKp44), повышение противоопухолевой цитотоксической функции и повышение продукция провоспалительных цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ .

В одном варианте осуществления фактор роста, обладающий, интерлейкин-15-подобной активностью, представляет собой интерлейкин-15 (IL-15), интерлейкин-2 (IL-2) или интерлейкин-7 (IL-7), предпочтительно IL-15.

В контексте данного документа термин «IL-15» относится к нативному или рекомбинантному IL-15 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-15 (IL-15R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). IL-15, как и IL-2, является известным фактором роста Т-клеток, который может поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой клеточной линии, CTLL-2.

IL-15 также может относиться к IL-15, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. «Мутеин» или «вариант» IL-15, как упоминается в данном документе, представляет собой полипептид, по существу гомологичный последовательности нативного IL-15 млекопитающих, но имеющий аминокислотную последовательность, отличную от нативного полипептида IL-15 млекопитающих из-за аминокислотной делеции, вставки или замены. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-15 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате альтернативных явлений сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-15, при этом свойство связывания IL-15 сохраняется. В результате



альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-15. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-15 (обычно от 1 до 10 аминокислот).

В контексте данного документа термин «IL-2» относится к нативному или рекомбинантному IL-2 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-2 (IL-2R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать пролиферацию IL-2-зависимой клеточной линии, STLL-2 (33; Американская коллекция типовых культур (ATCC®) TIB 214).

IL-2 также может относиться к IL-2, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-2 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате альтернативных явлений сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-2, при этом свойство связывания IL-2 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-2. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-2 (обычно от 1 до 10 аминокислот).

В контексте данного документа термин «IL-7» относится к нативному или рекомбинантному IL-7 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-7 (IL-7R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Зрелый IL-7 человека встречается в виде последовательности из 152 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 25 N-концевых аминокислот).

IL-7 также может относиться к IL-7, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что

означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или замены одного полярного остатка на другой, например, между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-7 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате альтернативных явлений сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-7, при этом свойство связывания IL-7 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-7. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-7 (обычно от 1 до 10 аминокислот).

Термин «фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью» означает любое соединение, которое обладает той же активностью, что и IL-4, в отношении его способности стимулировать аналогичные физиологические эффекты на  $\gamma\delta$  Т-клетки в культуре и включает, помимо прочего, IL-4 и миметики IL-4 или любой функциональный эквивалент IL-4. Было показано, что физиологические эффекты, стимулируемые IL-4, на  $\gamma\delta$  Т-клетки включают снижение уровней экспрессии NKG2D и NCR, ингибирование цитотоксической функции и улучшение селективной выживаемости. Было также показано, что IL-4 значительно ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов, включая IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , из активированных TCR $\gamma\delta^+$  Т-клеток.

В одном варианте осуществления фактор роста, обладающий, интерлейкин-4-подобной активностью, представляет собой интерлейкин-4 (IL-4).

В контексте данного документа термин «IL-4» относится к нативному или рекомбинантному IL-4 или его варианту, который действует как агонист одной или большего количества субъединиц рецептора IL-4 (IL-4R) (например, мутантов, мутеинов, аналогов, субъединиц, рецепторных комплексов, фрагментов, изоформ и их пептидомиметиков). Такие агенты могут поддерживать дифференцировку наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в клетки Th2. Зрелый IL-4 человека встречается в виде последовательности из 129 аминокислот (за вычетом сигнального пептида, состоящего из дополнительных 24 N-концевых аминокислот).

IL-4 также может относиться к IL-4, полученному из различных видов млекопитающих, включая, например, человека, обезьяну, быков, свиней, лошадей и мышей. Варианты могут включать консервативно замещенные последовательности, что означает замену данного аминокислотного остатка остатком, имеющим сходные физико-химические характеристики. Примеры консервативных замен включают замену одного алифатического остатка на другой, например, Ile, Val, Leu или Ala друг на друга, или

замены одного полярного остатка на другой, например, между Lys и Arg; Glu и Asp; или Gln и Asn. Хорошо известны другие такие консервативные замены, например, замены целых областей, имеющих сходные характеристики гидрофобности. Встречающиеся в природе варианты IL-4 также охватываются настоящим изобретением. Примерами таких вариантов являются белки, которые возникают в результате альтернативных явлений сплайсинга мРНК или в результате протеолитического расщепления белка IL-4, при этом свойство связывания IL-4 сохраняется. В результате альтернативного сплайсинга мРНК можно получить укороченный, но биологически активный белок IL-4. Вариации, связанные с протеолизом, включают, например, различия в N- или C-концах при экспрессии в различных типах клеток-хозяев из-за протеолитического удаления одной или большего количества концевых аминокислот из белка IL-4 (обычно от 1 до 10 аминокислот).

В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ T-клетки получают из образца с помощью способа, включающего:

(1) культивирование клеток в образце в первой культуральной среде, содержащей митоген T-клеток и интерлейкин-4; в отсутствие интерлейкина-15, интерлейкина-2 и интерлейкина-7; а также

(2) культивирование клеток, полученных на этапе (1), во второй культуральной среде, содержащей митоген T-клеток и интерлейкин-15, в отсутствие интерлейкина-4.

Способы получения V $\delta$ 1+ T-клеток из образца могут включать дополнительные факторы роста. Следовательно, в одном варианте осуществления первая или вторая культуральная среда или обе культуральные среды дополнительно содержат один или большее количество дополнительных факторов роста. Указанные дополнительные факторы роста могут быть выбраны из: интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), интерлейкина-21 (IL-21), интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и их комбинаций. Предпочтительно дополнительным фактором роста является IFN- $\gamma$ . Эти факторы роста могут быть добавлены к одной или обоим культуральным средам для дальнейшего повышения уровней размножения и чистоты культивируемых V $\delta$ 1+ T-клеток. Дополнительные факторы роста могут включать IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12, IL-18, IL-33, IGF-1, лизат тромбоцитов человека (HPL) и фактор-1, полученный из стромальных клеток (SDF-1). В одном варианте осуществления для размножения используют такие факторы, которые избирательно способствуют размножению V $\delta$ 1+ T-клеток.

Термин «митоген T-клеток» означает любой агент, который может стимулировать T-клетки посредством передачи сигналов TCR, включая, помимо прочего, растительные лектины, такие как фитогемагглютинин (PHA) и конканавалин А (ConA), и лектины не растительного происхождения, антитела, которые активируют T-клетки и другие митогены, не содержащие лектинов и антител. Предпочтительные клоны антител включают антитела анти-CD3, такие как клоны ОКТ-3 и UCНТ-1, антитела анти- $\gamma\delta$ , такие как В1 и IMMU510, или антитела анти-V $\delta$ 1. В контексте настоящего изобретения под антителами понимаются моноклональные антитела (mAb), поликлональные антитела,

фрагменты антител (например, Fab и F(ab')<sub>2</sub>), одноцепочечные антитела, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv) и рекомбинантно полученные партнеры по связыванию. В одном варианте осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело анти-CD3 (mAb). В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело анти-V $\delta$ 1. Другие митогены включают форбол-12-мирикат-13-ацетат (ТРА) и его родственные соединения, такие как мезереин, или бактериальные соединения (например, стафилококковый энтеротоксин А (SEA) и стрептококковый белок А). Т-клеточный митоген может быть растворимым или иммобилизованным, и в описанном способе можно применять более одного Т-клеточного митогена.

В одном варианте осуществления митоген Т-клеток представляет собой антитело или его фрагмент. Антитело или его фрагмент могут представлять собой антитело анти-CD3, например, ОКТ-3. В альтернативном или дополнительном варианте антитело или его фрагмент могут представлять собой антитело анти-TCR $\gamma\delta$ , такое как антитело к pan- $\gamma\delta$  TCR или антитело анти-TCRV $\delta$ 1.

Ссылки в данном документе на «культивирование» включают добавление клеток в среду, содержащую факторы роста и/или основные питательные вещества, необходимые и/или предпочтительные для клеток и/или образца некроветворной ткани. Культивирование может осуществляться путем селективного размножения, например, путем выбора условий культивирования, при которых V $\delta$ 1+ Т-клетки предпочтительно размножаются по сравнению с другими типами клеток, присутствующими в образце. В альтернативном варианте условия размножения не являются селективными, и за культивированием может следовать деплетирование клеток, не являющихся мишенями (например, клеток, отличных от V $\delta$ 1+ Т-клеток, таких как  $\alpha\beta$  Т-клетки). В альтернативном варианте условия размножения не являются селективными, и перед культивированием осуществляют деплетирование клеток, не являющихся мишенями (например, клеток, отличных от V $\delta$ 1+ Т-клеток, таких как  $\alpha\beta$  Т-клетки).

В одном варианте осуществления культивирование проводят в отсутствие питающих клеток.

В одном варианте осуществления культивирование проводят в отсутствие значительного контакта стромальных клеток. В дополнительном варианте осуществления культивирование проводят в отсутствие значительного контакта фибробластных клеток.

В одном варианте осуществления V $\delta$ 1+ Т-клетки собирают после по меньшей мере 11 дней культивирования, например, по меньшей мере 14 дней культивирования. В определенных вариантах осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящем документе, составляет по меньшей мере 14 дней. В определенных вариантах осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящем документе, составляет менее 45 дней, например, менее 30 дней, например, менее 25 дней. В дополнительном варианте осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящем документе, составляет от 14

дней до 35 дней, например, от 14 дней до 21 дня. В еще одном варианте осуществления продолжительность культивирования в соответствии со способами, определенными в настоящем документе, составляет около 21 дня.

В дополнительных вариантах осуществления культивирование проводят в течение определенного периода времени (например, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день, по меньшей мере 28 дней или дольше, например, от 5 дней до 40 дней, от 7 дней до 35 дней, от 14 дней до 28 дней или около 21 дня) в количестве, эффективном для получения размноженной популяции V $\delta$ 1+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование проводят в течение периода от нескольких часов (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 18 или 21 часа) до около 35 дней (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 дней). В одном варианте осуществления культивирование проводят в течение периода от 14 до 21 дня.

Следует понимать, что при использовании двух культуральных сред культивирование в каждой среде может происходить в течение различных периодов времени. Например, клетки можно культивировать в первой культуральной среде в течение периода времени от около 2 дней до около 21 дня. Более предпочтительно от около 3 дней до около 14 дней. Более предпочтительно от около 4 дней до 8 дней. Клетки можно культивировать во второй культуральной среде в течение периода времени от около 2 дней до около 30 дня. Более предпочтительно от около 5 дней до около 21 дней. Более предпочтительно от около 10 дней до 15 дней.

В одном варианте осуществления культивирование проводят в сосуде, содержащем газопроницаемый материал. Такие материалы являются проницаемыми для газов, таких как кислород, двуокись углерода и/или азот, что обеспечивает газообмен между содержимым сосуда и окружающей атмосферой. Следует иметь в виду, что ссылки на «сосуд» в данном документе включают чашки для культивирования, планшеты для культивирования, чашки с одной лункой, чашки с множеством лунок, планшеты с множеством лунок, колбы, многослойные колбы, флаконы (такие как роллерные флаконы), биореакторы, пакеты, тубы и тому подобное. Такие сосуды известны в данной области техники для применения в способах, включающих размножение неадгезивных клеток и других лимфоцитов. Было обнаружено, что сосуды, состоящие из газопроницаемого материала, увеличивают выход выделенных V $\delta$ 1+ Т-клеток. Также было обнаружено, что такие сосуды предпочтительно поддерживают V $\delta$ 1+ Т-клетки и другие лимфоциты по сравнению с фибробластами и другими стромальными клетками (например, эпителиальными клетками), включая адгезивные типы клеток. В дополнительном варианте осуществления фибробласты и/или другие стромальные клетки (например, эпителиальные клетки) отсутствуют в культурах, полученных в сосудах, содержащих газопроницаемый материал.

Такие сосуды, содержащие газопроницаемые материалы, могут дополнительно содержать газопроницаемый материал, который не является пористым. Таким образом, в одном варианте осуществления газопроницаемый материал не является пористым. В некоторых вариантах осуществления газопроницаемый материал представляет собой мембранную пленку, такую как силикон, фторэтилен, полипропилен, полиолефин или сополимер этилена и винилацетата. Кроме того, такие сосуды могут состоять только из части газопроницаемого материала, газопроницаемой мембранной пленки или непористого газопроницаемого материала. Таким образом, согласно еще одному варианту осуществления сосуд включает в себя верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанного дна сосуда содержит газопроницаемый материал, который находится по существу в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть находится над указанным дном. В одном варианте осуществления сосуд включает в себя верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанного дна содержит газопроницаемый материал, который находится в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть находится над указанным дном. В дополнительном варианте осуществления сосуд включает верхнюю часть, дно и по меньшей мере одну боковую стенку, при этом указанная по меньшей мере одна боковая стенка содержит газопроницаемый материал, который может находиться в вертикальной плоскости, когда указанная верхняя часть находится над указанным дном, или может находиться в горизонтальной плоскости, когда указанная верхняя часть не находится над указанным дном. Следует понимать, что в таких вариантах осуществления только часть указанного дна или указанной боковой стенки может содержать газопроницаемый материал. В альтернативном варианте все указанное дно или вся указанная боковая стенка могут состоять из газопроницаемого материала. В еще одном варианте осуществления указанная верхняя часть указанного сосуда, содержащая газопроницаемый материал, может быть герметизирована, например, с помощью уплотнительного кольца. Предполагается, что такие варианты осуществления предотвращают утечку или уменьшают испарение содержимого сосуда. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сосуд представляет собой герметичный контейнер для жидкости, содержащий газопроницаемый материал, обеспечивающий газообмен. В альтернативных вариантах осуществления указанная верхняя часть указанного сосуда, содержащая газопроницаемый материал, находится в горизонтальной плоскости и над указанным дном и не герметизирована. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанная верхняя часть выполнена с возможностью газообмена от верхней части сосуда. В дополнительных вариантах осуществления указанное дно газопроницаемого контейнера выполнено с возможностью газообмена от дна сосуда. В еще одном варианте осуществления указанный сосуд, содержащий газопроницаемый материал, может быть герметичным контейнером для жидкости и дополнительно содержать впускные и выпускные отверстия или трубки. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сосуд, содержащий

газопроницаемый материал, включает верхнюю часть, дно и, необязательно, по меньшей мере одну боковую стенку, при этом по меньшей мере часть указанной верхней части и указанного дна содержат газопроницаемый материал и, если он присутствует, то по меньшей мере часть по меньшей мере одной боковой стенки содержит газопроницаемый материал. Примеры сосудов описаны в документах WO 2005/035728 и US 9255243, которые включены в данный документ посредством ссылки. Эти сосуды также имеются в продаже, например, устройства для культивирования клеток G-REX®, поставляемые Wilson Wolf Manufacturing, такие как луночный планшет G-REX6, луночный планшет G-REX24 и сосуд G-REX10.

В определенных вариантах осуществления образец культивируют в среде, по существу не содержащей сыворотки (например, в среде, не содержащей сыворотки, или в среде, содержащей заменитель сыворотки (SR)). Таким образом, в одном варианте образец культивируют в бессывороточной среде. Такая бессывороточная среда может также включать среду для замены сыворотки, при этом замена сыворотки основана на химически определенных компонентах, чтобы избежать применения сыворотки человека или животных. В альтернативном варианте осуществления образец культивируют в среде, содержащей сыворотку (например, человеческую сыворотку АВ или эмбриональную бычью сыворотку (FBS)). В одном варианте осуществления образец культивируют в среде, содержащей заменитель сыворотки. В одном варианте осуществления образец культивируют в среде, не содержащей продуктов животного происхождения.

Следует понимать, что варианты осуществления, в которых образец культивируют в среде, не содержащей сыворотки, имеют то преимущество, что позволяют избежать проблем с фильтрацией, преципитацией, контаминацией и поставкой сыворотки. Кроме того, продукты животного происхождения не являются предпочтительными для использования при изготовлении медицинских препаратов клинического уровня для людей.

Доступны многочисленные базовые культуральные среды, подходящие для применения при пролиферации  $\gamma\delta$  Т-клеток, в частности среда, такая как AIM-V, среда Iscoves и RPMI-1640 (Life Technologies). Среда может быть дополнена другими факторами среды, как определено в данном документе, такими как сыворотка, белки сыворотки и селективные агенты, такие как антибиотики. Например, в некоторых вариантах осуществления среда RPMI-1640 содержит 2 мМ глутамина, 10% FBS, 10 мМ HEPES, pH 7,2, 1% пенициллин-стрептомицина, пируват натрия (1 мМ; Life Technologies), заменимые аминокислоты (например, 100 пМ Gly, Ala, Asn, Asp, Glu, Pro и Ser, 1X MEM заменимых аминокислот (Life Technologies)) и 10 мкл/л  $\beta$ -меркаптоэтанола. В альтернативном варианте осуществления среда AIM-V может быть дополнена заменителем сыворотки CTS Immune и амфотерицином В. Обычно клетки культивируют при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в подходящей культуральной среде во время выделения и/или размножения.

Примеры других ингредиентов, которые могут быть добавлены в культуральную

среду, включают, помимо прочего, плазму или сыворотку, очищенные белки, такие как альбумин, источник липидов, такой как липопротеины низкой плотности (LDL), витамины, аминокислоты, стероиды и любые другие добавки, поддерживающие или стимулирующие рост и/или выживание клеток.

V $\delta$ 1+ Т-клетки, полученные в соответствии с описанными способами, могут быть отделены от других клеток, которые могут присутствовать в конечной культуре, с помощью методов, известных в данной области техники, включая сортировку клеток с активированной флуоресценцией, иммуномагнитное разделение, аффинную колоночную хроматографию, центрифугирование в градиенте плотности и пэннинг клеток.

Полученные V $\delta$ 1+ Т-клетки могут быть немедленно использованы в терапевтических, экспериментальных или коммерческих целях, описанных в настоящем документе, или клетки могут быть криоконсервированы для использования в более поздние сроки.

### **Способы лечения**

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предлагается способ лечения миелоидного злокачественного новообразования, включающий введение терапевтически эффективного количества аллогенной композиции, содержащей V $\delta$ 1+Т-клетки, пациенту с указанным миелоидным злокачественным новообразованием.

В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, эффективное в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемых результатов.

Как описано выше, миелоидное злокачественное новообразование может быть выбрано из острого миелоидного лейкоза (AML) и миелодиспластического синдрома (MDS). Настоящее изобретение находит особое применение у пациентов, являющихся положительными относительно минимальной остаточной болезни (MRD+).

В одном варианте осуществления описанный способ дополнительно включает введение химиотерапии.

В одном варианте осуществления пациент может получить курс химиотерапии по меньшей мере за 3 суток до введения аллогенной композиции. Химиотерапия может быть выбрана, например, из флударабина и циклофосфида.

В одном варианте осуществления пациенту вводят дозу V $\delta$ 1+ Т-клеток, рассчитанную на кг массы тела пациента. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит около  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит около  $1 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит до около  $1 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  клеток/кг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит около  $1 \times 10^6$ -  $1 \times 10^8$  клеток/кг. В одном



варианте осуществления терапевтически эффективное количество содержит менее чем около  $1 \times 10^8$  клеток/кг.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит менее чем около  $1 \times 10^{10}$  общего количества живых клеток, например, содержит менее чем около  $1 \times 10^9$  общего количества живых клеток или содержит менее чем около  $1 \times 10^8$  общего количества живых клеток. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит около  $8 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $2,4 \times 10^9$ ,  $1,2 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^7$  или  $4 \times 10^7$  живых клеток в целом.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество содержит менее чем около  $5 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг. В дополнительном варианте осуществления терапевтически эффективное количество содержит менее чем около  $1 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.

В одном варианте осуществления субъекту первоначально вводят  $V\delta 1+$  Т-клетки (например, первоначальное введение от  $10^6$  до  $10^8$   $V\delta 1+$  Т-клеток на кг массы тела субъекта, например, от  $10^6$  до  $10^7$   $V\delta 1+$  Т-клеток на кг массы тела субъекта), и осуществляют одно или большее количество (например, 2, 3, 4 или 5) последующих введений  $V\delta 1+$  Т-клеток. В одном варианте осуществления одно или большее количество последующих введений осуществляют менее чем за 15 дней, например, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения, т.е. менее чем через 4, 3 или 2 дня после предыдущего введения.

В некоторых вариантах осуществления субъекту можно вводить один или большее количество дополнительных терапевтических агентов. Дополнительный терапевтический агент может быть выбран из группы, состоящей из иммунотерапевтического агента, цитотоксического агента, агента, подавляющего рост, агента лучевой терапии, ангиогенного агента или комбинации двух или большего количества из них. Дополнительный терапевтический агент можно вводить одновременно, до или после введения размноженных  $V\delta 1+$  Т-клеток. Дополнительный терапевтический агент может представлять собой иммунотерапевтический агент, который может действовать на мишень в организме субъекта (например, на собственную иммунную систему субъекта) и/или на перенесенные  $V\delta 1+$  Т-клетки.

Введение композиций можно осуществлять любым удобным способом. Композиции, описанные в настоящем документе, можно вводить пациенту трансартериально, подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной инъекции или внутрибрюшинно, например, путем внутрикожной или подкожной инъекции. В частности, композиции вводят посредством внутривенной инфузии.

Следует понимать, что все варианты осуществления, описанные в данном документе, могут быть применены ко всем аспектам настоящего изобретения.

Некоторые аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы в качестве примера и со ссылкой на графические материалы,

описанные выше.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Материалы и способы**

#### Заявление об этике

Клетки первичного острого миелоидного лейкоза (AML) были получены из периферической крови пациентов при первом поступлении после получения информированного согласия и одобрения институционального наблюдательного совета. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией.

#### Мыши

Мыши NOD SCID  $\gamma_c^{-/-}$  (NSG), NOD SCID  $\gamma_c^{-/-}$  SGM3 (NSGS) и NOD Rag1 $^{-/-}$   $\gamma_c^{-/-}$  SGM3 (NRGS) были получены от Jackson Laboratories. Мышей соответствующего пола и возраста случайным образом распределяли по разным группам. Развитие заболевания отслеживали по еженедельным кровотечениям (в моделях внутрикостного мозга), а конечный критерий оценки заболевания достигался при первых признаках снижения подвижности задней ноги. Все процедуры на животных проводились в соответствии с национальными рекомендациями от Direcao Geral de Veterinaria и одобрены Комитетом по этике животных Instituto de Medicina Molecular Joao Lobo Antunes (Лиссабон, Португалия).

#### Композиция $\gamma\delta$ Т-клеток и анализ репертуара TCR

Композицию  $\gamma\delta$  Т-клеток получали с помощью способов, описанных в WO 2016/198480. В частности, клеточный протокол «Delta One T» (DOT) относится к исследовательской версии протокола размножения, как описано в публикации Almeida et al. (2016) Clin. Cancer Res. 22: 5795-804, в то время как «GDX012» относится к более крупномасштабной версии протокола размножения с использованием более крупных сосудов, например, сосуда G-Rex. Вкратце, MACS-отсортированные  $\gamma\delta$  Т-клетки ресуспендировали в безсывороточной культуральной среде (OpTmizer-CTS), дополненной 5% аутологичной плазмой и 2 ммоль/л L-глутамина (Thermo Fisher Scientific). В среду добавляли цитокины человека, не содержащие компонентов от животных, рекомбинантный IL-4 [rIL4] (100 нг/мл), рекомбинантный интерферон- $\gamma$  [rIFN $\gamma$ ] (70 нг/мл), рекомбинантный IL-21 [rIL21] (7 нг/мл) и рекомбинантный IL-1 $\beta$  [rIL1 $\beta$ ] (15 нг/мл) и растворимое mAb к CD3 (клон ОКТ-3, 70 нг/мл). Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, через равные промежутки времени подпитывали свежей средой, включающей рекомбинантный IL-15 [rIL15] (70 нг/мл), IFN $\gamma$  (30 нг/мл) и анти-CD3 (1 мг/мл). Клетки необязательно замораживали после размножения и оттаивали перед применением.

Для анализа репертуара TRGV и TRDV, V $\delta$ 1+ Т-клетки подвергали FACS-сортировке либо из исходного образца крови (ex vivo), либо из конечного DOT-клеточного продукта, полученного, как описано выше. Секвенирование следующего поколения проводили, как описано ранее (Verstichel et al. (2017) Sci. Immunol. 2: eaah4232; Ravens et al. (2017) Nat. Immunol. 18: 393-401; Di Lorenzo et al. (2019) Sci Data 6: 115). Для получения клона DOT-клеток отдельные CD3+ TCRV $\delta$ 1+ TCRV $\delta$ 2- клетки сортировали с помощью FACS в 96-луночные планшеты; и культивировали в течение 21 дня по

протоколу с применением DOT-клеток, как описано выше, в присутствии (еженедельно обновляемых)  $10^4$  облученных аутологичных мононуклеарных клеток периферической крови (питающие клетки).

#### Нацеливание на клетки AML in vitro и in vivo

Линии клеток AML (THP-1, HEL, AML-193, MV4-11, HL-60, U-937, OCI-AML3, Kasumi-1 и KG-1) были получены и аутентифицированы Немецким ресурсным центром биологических материалов (DSMZ); и применялись при пассажах p3-p8. Lentивирусное штрих-кодирование клеток AML выполняли и анализировали, как подробно описано ранее (Naik et al. (2013) Nature 496: 229-232). Для нацеливания in vitro, клеточные линии AML или первичные образцы совместно инкубировали с клетками DOT в течение 3 часов; и окрашивали аннексином V, как описано ранее (Nobrega-Pereira et al. (2018) Cancer Res. 78: 731-741). Для нацеливания in vivo были созданы три модели ксенотрансплантатов hAML, как продемонстрировано на Фиг. 6A-C. Ксенотрансплантат, полученный от пациента (интратрибиальная инъекция), был описан ранее (12). Опухолевую нагрузку оценивали путем окрашивания античеловеческими CD45 (HI30) и CD33 (P67.6). Проточную цитометрию выполняли на аппарате LSR Fortessa (BD Biosciences), а данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo X (Tree Star).

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism. Все данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  SEM. Сравнение двух групп осуществляли по критерию Стьюдента; более двух групп - по тесту ANOVA с пост-тестом Даннета. Сравнения выживаемости животных проводили по лог-ранговому тесту (Мантела-Кокса)

**ПРИМЕР 1: Композиция  $\gamma\delta$  T-клеток демонстрирует более высокое клональное разнообразие, чем ex vivo V $\delta$ 1+T-клетки.**

Продукт  $\gamma\delta$  T-клеток первоначально характеризовали при размножении ар-деплементированных мононуклеарных клеток периферической крови по протоколу с применением DOT-клеток, описанного в разделе «Материалы и способы». Поскольку в сообщениях описывалась клональное размножение и фокусирование репертуара V $\delta$ 1+T-клеток периферической крови взрослых, вероятно, вызванные распространенными патогенами, такими как цитомегаловирус (CMV), было проанализировано влияние размножения на репертуар TCR. Секвенирование следующего поколения выполняли для областей CDR3 в генах TRGV и TRDV до и после того, как клетки находились в культуре в течение 3 недель. Было обнаружено, что размноженные V $\delta$ 1+ клетки являются сильно поликлональными и лишены доминантных клонов, в отличие от свежих неразмноженных ex vivo V $\delta$ 1 T-клеток от всех проанализированных доноров (**Фиг. 1A-D**).

Это было проиллюстрировано вкладом 20 лучших размноженных клонов в общий репертуар V $\delta$ 1 TCR. Хотя эти 20 клонов представляли >60% в периферической крови, они составляли менее 10% в продуктах V $\delta$ 1+ T-клеток. Кроме того, несколько клонотипов (особенно для TRDV) были общими для идентифицированных неразмноженных клеток ex

vivo и размноженных V $\delta$ 1+ клеток (Табл. 1).

Таблица 1: Подсчет клонотипов до (ex vivo) или после размножения и количество общих клонотипов.

	$\gamma$ цепь			$\delta$ цепь		
	Ex vivo	Размножены	Общие	Ex vivo	Размножены	Общие
HD#1	488	2706	57	775	7376	11
HD#2	561	1734	63	602	4791	20
HD#3	29	3844	4	50	4591	0
HD#4	222	6868	28	807	9592	7

Была исследована причина разнообразия размноженного репертуара Т-клеток V $\delta$ 1+. Учитывая предыдущую связь понижающей регуляции CD27 с предварительно размноженными/дифференцированными V $\delta$ 1+Т-клетками, было проведено сравнение клоальности TCR размноженных клеток, полученных из предварительно отсортированных подмножеств CD27- по сравнению с CD27+, и было показано, что они демонстрируют различные способности к пролиферации в соответствии с протоколом размножения V $\delta$ 1+ Т-клеток. Было обнаружено, что генерация разнообразных V $\delta$ 1+ Т-клеток после размножения была ограничена предшественниками CD27+. Кроме того, было продемонстрировано, что популяция V $\delta$ 1+Т-клеток (полученная из массы V $\delta$ 1 Т-клеток) в основном состоит из клеток CD27+. V $\delta$ 1+ Т-клеточные продукты, происходящие из предварительно отсортированных клеток CD27+, экспрессировали NKp30 и были высокоцитотоксичными в отношении клеток KG-1 AML (Фиг. 2А-В).

#### ПРИМЕР 2: Реактивность композиции $\gamma\delta$ Т-клеток в отношении клеток AML.

Чтобы оценить функциональную значимость поликлоальности V $\delta$ 1+ Т-клеток, клоны генерировали из отсортированных по отдельности V $\delta$ 1+ Т-клеток, размноженных/дифференцированных по адаптированному протоколу размножения DOT-клеток, включая добавление питающих клеток. Цитотоксичность этих клеток тестировали в отношении клеточной линии AML KG-1 (Фиг. 3А). Было обнаружено, что большинство клонов (от разных доноров) эффективно индуцируют апоптоз клеток KG-1 при короткой (3-часовой) совместной инкубации in vitro (Фиг. 3А). Эти результаты показывают, что размноженная популяция V $\delta$ 1+ Т-клеток состоит из множества клонов с характерной способностью нацеливаться на клетки AML. Чтобы функционально проверить, участвует ли TCR в этой реактивности, анализ уничтожения проводили в присутствии V $\delta$ 1-TCR-специфического блокирующего моноклонального антитела (или изотипического контроля), и при этом наблюдали лишь умеренное снижение нацеливания на клетки KG-1 в ряде клонов от разных доноров (Фиг. 3В).

Для дальнейшей оценки активности в отношении AML, объемные продукты DOT-клеток от нескольких доноров были протестированы в сравнении с различными другими клеточными линиями AML, а также с первичными образцами, полученными от пациентов при постановке диагноза. Во всех случаях размноженная популяция V $\delta$ 1+ Т-клеток легко (в течение 3 часов) уничтожала клетки AML in vitro (Фиг. 4А-В), аналогично тому, что

сообщалось для CAR-T-клеток (Mardiros et al. (2013) Blood 122: 3138-3148; Gill et al. (2014) Blood 123: 2343-2354; Petrov et al. (2018) 32: 1317-1326), и в отличие от неразмноженных свежих ex vivo V $\delta$ 1 T-клеток (Фиг. 4D). Цитотоксичность была ассоциирована с повышенной дегрануляцией и экспрессией перфорина и гранзима В при распознавании опухолевых клеток (Фиг. 4E-F). Размноженные V $\delta$ 1+ T-клетки не нацеливаются на нормальную популяцию лейкоцитов (миелоидных или лимфоидных) из периферической крови здоровых добровольцев (Фиг. 4C), включая миелоидные клетки-предшественники CD33+ и CD123+, чье целевое деплетирование соответствующими CAR-T-клетками, как известно, ответственно за нежелательную миелоабляцию.

Композиции аллогенных  $\gamma\delta$  T-клеток также тестировали в отношении других линий гематологических опухолевых клеток.

#### Поколение РВМС из лейкоцитарной пленки

Лейкоцитарные пленки разбавляли 1 частью крови с 3 частями PBS и наносили слоями в пробирки Leucoser (20 мл смеси лейкоцитарной пленки и PBS на пробирку). Пробирки Leucoser вращали в течение 20 минут при комнатной температуре, 2000 об/мин (около 800g) с тормозом центрифуги, установленным на 1. Границу раздела собирали и объединяли в одну пробирку, еще раз промывали в PBS и затем применяли в последующих анализах.

Клетки GDX012 («эффекторы»), полученные от 2 доноров, подвергали анализу цитотоксичности проточной цитометрией в отношении следующих опухолевых и здоровых линий («мишеней»):

-NALM-6

-Raji

-MV4-11

-Kasumi

-HL-60

-Здоровые аллогенные мононуклеары периферической крови

Клетки-мишени промывали PBS и окрашивали CellTrace Violet (CTV) в течение 20 минут при комнатной температуре. Через 20 минут клетки промывали средой, содержащей не менее 10% сыворотки, и ресуспендировали в среде клеток-мишеней (RPMI) без цитокинов. Затем клетки-мишени совместно культивировали с эффекторными клетками в соотношениях 10:1, 5:1, 2:1 и 1:1 (эффектор:мишень) в двух или трех повторностях в течение 20 часов при 37 °C. Анализ проводили в отсутствие цитокинов.

Через 20 часов мертвые клетки окрашивали путем добавления SytoxAADvanced в культуральную среду в течение 10 минут при комнатной температуре и немедленно анализировали на MACSQuant10. Процент лизиса рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ лизис} = 100 \frac{\text{CTV}^+ \text{Sytox}^+ \text{ (в условиях теста)}}{\text{общее количество CTV}^+ \text{клеток (в условиях только мишеней)}} * 100$$

В целом, все опухолевые линии были чувствительны к нацеливанию, опосредованному V $\delta$ 1+ Т-клетками. Более высокие отношения Е:Т приводили к более высоким уровням цитотоксичности. И наоборот, здоровые РВМС были полностью сохранены, независимо от соотношения Е:Т. Таким образом, размноженные V $\delta$ 1+ Т-клетки способны нацеливаться на широкий спектр гематологических опухолевых мишеней, не затрагивая при этом здоровые аллогенные клетки. Результаты приведены на **Фиг. 5**.

**ПРИМЕР 3: Модели ксенотрансплантата для нацеливания на AML in vivo посредством композиции  $\gamma\delta$  Т-клеток**

Для тестирования DOT-размноженных V $\delta$ 1+ Т-клеток в отношении активности против AML in vivo были созданы различные независимые модели ксенотрансплантатов AML (**Фиг. 6А-С**). Как в моделях клеточной линии AML (**Фиг. 6С-Е**), так и в двух ксенотрансплантатах, полученных от пациентов (**Фиг. 6F-I**), введение DOT-размноженных V $\delta$ 1+Т-клеток снижало опухолевую нагрузку и повышало выживаемость хозяина без заметной токсичности. Хотя сообщалось, что CAR-Т-клетки обеспечивают большее преимущество относительно выживаемости в ксенотрансплантатах AML (Mardiros et al. (2013); Gill et al. (2014); Petrov et al. (2018)), эти модели были необъективны относительно клеточных линий AML, равномерно экспрессирующих антигены-мишени. С другой стороны, токсичность способа, предположительно вызывающего миелоабляцию у пациентов, не может быть оценена при применении ксенотрансплантатов. Эти данные подтверждают комбинированные профили безопасности и эффективности V $\delta$ 1+ обогащенной композиции  $\gamma\delta$  Т-клеток, что делает ее кандидатом для адоптивной клеточной терапии AML.

**ПРИМЕР 4: Композиция  $\gamma\delta$  Т-клеток, нацеленная на химиорезистентный AML.**

Химиорезистентность приводит к смертельным рецидивам в контексте терапии AML, поэтому DOT-размноженные V $\delta$ 1+ Т-клетки оценивали на предмет нацеливания на химиорезистентные клетки AML. С этой целью клетки AML обрабатывали цитарабином с доксорубицином в течение 72 часов, что приводило к элиминации опухолевых клеток >99%, прежде чем дать выжившим клеткам отрасти, а затем обработать культуру химиотерапией или V $\delta$ 1+ Т-клетками. Хотя цитотоксическая эффективность химиотерапии была снижена, эффективность нацеливания V $\delta$ 1+ Т-клеток не изменилась (**Фиг. 7А**), демонстрируя превосходную способность V $\delta$ 1+ Т-клеток нацеливаться на химиорезистентные клетки AML.

В свете этого и принимая во внимание поликлональный и мультиреактивный репертуар V $\delta$ 1+ Т-клеток (приведен на **Фиг. 1**), авторы изобретения поставили под сомнение способность V $\delta$ 1+ Т-клеток перенацеливаться на клетки AML после первой обработки V $\delta$ 1+ Т-клетками, которая элиминировала > 99% опухолевых клеток за 72 часа (**Фиг. 7В**). Оставшиеся, примерно 0,1% клеток AML, присутствующих через 72 часа, были отсортированы с помощью FACS и им дали возможность вырасти перед повторной

обработкой V $\delta$ 1+ T-клетками. V $\delta$ 1+ T-клетки уничтожали предварительно обработанные клетки AML так же эффективно, как и необработанные контроли (Фиг. 7С), что свидетельствует о том, что обработка V $\delta$ 1+T-клетками не отбирала специфическую подгруппу V $\delta$ 1+ T-резистентных клеток AML. Чтобы отслеживать клональную динамику AML при терапевтическом (V $\delta$ 1+ T-клетки или химиотерапия) давлении, отдельные клетки AML были помечены клеточными штрих-кодами (некодирующие последовательности ДНК, которые можно отслеживать с помощью NGS). Хотя химиотерапия избирательно нацеливается примерно на половину всех одноклеточных кодированных линий AML, V $\delta$ 1+ T-клетки сохранили клональную архитектуру популяции AML (Фиг. 7D-E).

Эти данные в совокупности свидетельствуют о том, что широта нацеливания на AML посредством размноженных V $\delta$ 1+ T-клеток позволяет избежать отбора резистентных линий и позволяет эффективно проводить повторное лечение. Необходимо предотвратить появление рефрактерных рецидивов после химиотерапии. Таким образом, эта работа предоставляет обоснование клинического применения композиции  $\gamma\delta$  T-клеток при лечении AML.

#### **EXAMPLE 5: Повторяющаяся цитотоксичность популяций V $\delta$ 1+T-клеток**

##### Анализ цитотоксичности с повторным заражением

Чтобы определить способность V $\delta$ 1+ T-клеток к повторной цитотоксичности в отношении соответствующих линий опухолевых клеток, GDX012-размноженные V $\delta$ 1+ T-клетки, полученные от 2 доноров, подвергали анализу цитотоксичности проточной цитометрией в отношении клеток-мишеней AML HL-60. Вкратце, клетки-мишени HL-60 промывали PBS и окрашивали CellTrace Violet (CTV) в течение 20 минут при комнатной температуре. Через 20 минут клетки промывали средой, содержащей не менее 10% сыворотки, и ресуспендировали в среде клеток-мишеней (RPMI) без цитокинов. Затем клетки-мишени совместно культивировали с эффекторными клетками в соотношении 10:1 (эффектор:мишень) в двух или трех повторностях в течение 48 часов при 37 °C. Анализ проводили в присутствии 2 нг/мл IL-15. Через 48 часов мертвые клетки окрашивали путем добавления SytoxAADvanced в культуральную среду в течение 10 минут при комнатной температуре и немедленно анализировали на MACSQuant10. Процентное содержание Sytox+ve рассчитывали путем количественного определения процента клеток CTV+ve, которые были положительными в отношении окрашивания SytoxAADvanced.

Для второго или повторного анализа уничтожения, неиспользованные лунки из первого анализа уничтожения собирали энергичным пипетированием, центрифугировали (300g, 5 минут), удаляли надосадочную жидкость и ресуспендировали в свежей среде для культуры клеток-мишеней. Клетки подсчитывали и добавляли в новые лунки. Свежие клетки HL-60, окрашенные CTV, как и ранее, ресуспендировали и добавляли к новым эффекторным клеткам, в таком же соотношении эффектор:мишень 10:1. В лунки повторно добавляли свежий IL-15 в концентрации 2 нг/мл и оставляли еще на 72 часа. Уничтожение клеток-мишеней количественно оценивали с использованием SytoxAADvanced, как

описано выше. Результаты приведены на **Фиг. 8**.

В целом, опухолевая линия HL-60 была чувствительна к двум циклам нацеливания, опосредованного Vd1 клетками, в течение 5 дней при добавлении цитокина IL-15, и, таким образом, размноженные Vd1 клетки способны обеспечивать пролонгированную способность нацеливания на опухолевые клетки.

**EXAMPLE 6: Композиция  $\gamma\delta$  Т-клеток имеет ограниченный потенциал относительно индуцирования синдрома высвобождения цитокинов**

Синдром высвобождения цитокинов (CRS) является ключевой проблемой безопасности других видов иммунотерапии, таких как  $\alpha\beta$ -Т-клеточная терапия. Для оценки потенциального риска цитокинового выброса в результате применения предлагаемого продукта уровни цитокинов измеряли в супернатантах криоконсервированных клеток GDX012, размороженных и культивируемых в течение 21 часа в нескольких различных условиях. Фактически, физиологическая стимуляция клеток GDX012 либо посредством TCR (**Фиг. 9A**), либо посредством IL-15, который, как известно, индуцирует мощные ответы V $\delta$ 1+ Т-клеток (**Фиг. 9B**), вызывает высвобождение в основном цитокинов, связанных с Th1, и едва определяемые уровни ключевых цитокинов, ответственных за CRS. Даже при сверхфизиологических стимулах с IL-15 (**Фиг. 9C**) уровни IL-6 не обнаруживались в ходе проведенного анализа, тогда как некоторые уровни TNF $\alpha$  начинали обнаруживаться. Такие характеристики указывают на то, что предлагаемая композиция имеет благоприятный профиль безопасности. Кроме того, дальнейшие исследования продемонстрировали очень ограниченный риск выброса цитокинов при совместном культивировании клеток GDX012 с образцами аллогенной крови, PBMC и лейкоцитарными пленками (**Фиг. 9D**) с практически неопределяемыми уровнями IL-6 и TNF $\alpha$  через 21 час совместного культивирования.

**ПРИМЕР 7: Композиция  $\gamma\delta$  Т-клеток сохраняет аллогенные В-клетки**

Чтобы определить селективность клеток, GDX012-размноженные V $\delta$ 1+ Т-клетки, полученные от 3 доноров, запускали в анализах цитотоксичности с помощью проточной цитометрии в отношении смеси CFSE-меченных клеток NALM-6 (опухолегенные В-клетки), и CTV-меченных В-клеток (неопухолегенные первичные В-клетки).

Выделение первичных В-клеток

100E6 PBMC брали из свежеполученной лейкоцитарной пленки и центрифугировали при 300g в течение 7 минут. Супернатант удаляли и клетки ресуспендировали в 40 мкл буфера MACS/10 мкл коктейля пан-В-клеточный биотин-антитело на  $10^7$  клеток. Суспензию клеток оставляли в холодильнике на 5 минут. К клеточной суспензии добавляли 30 мкл буфера MACS/20 мкл антибиотинных микрогранул на  $10^7$  клеток и оставляли в холодильнике на 10 минут. Тем временем колонку LS, вставленную в quadroMACS на магнитной подставке, уравнивали, пропуская через указанную колонку 3 мл буфера MACS. Клеточную суспензию наносили на колонку и собирали эффлюент. Промывочный раствор из 3 мл буфера MACS наносили на колонку и собирали. Это представляло собой отрицательно обогащенную фракцию В-



клеток.

#### Анализы цитотоксичности

В-клетки промывали PBS и окрашивали CellTrace Violet (CTV) в течение 20 минут при комнатной температуре. NALM-6 клетки промывали PBS и окрашивали с помощью CFSE в течение 20 минут при комнатной температуре. Через 20 минут клетки промывали средой, содержащей не менее 10% сыворотки, и ресуспендировали в среде клеток-мишеней (RPMI) без цитокинов. Затем клетки-мишени совместно культивировали с эффекторными клетками в соотношениях 10:1:1, 5:1:1, 2:1:1 и 1:1:1 (эффектор : NALM-6 : В-клетка) в двух или трех повторностях в течение 20 часов при 37 °С. Анализ проводили в отсутствие цитокинов. Через 20 часов мертвые клетки окрашивали путем добавления SytoxAADvanced в культуральную среду в течение 10 минут при комнатной температуре и немедленно анализировали на MACSQuant10. Процентное содержание Sytox+ve рассчитывали путем количественного определения процента клеток CTV+ve или CFSE+ve, которые были положительными в отношении окрашивания SytoxAADvanced. Результаты приведены на **Фиг. 10**.

В целом, клетки NALM-6 были значительно поражены, в то время как здоровые В-клетки были полностью сохранены. Нацеливание на клетки NALM-6 зависело от соотношения Е:Т. Более высокие отношения Е:Т приводили к более высоким уровням цитотоксичности. И наоборот, здоровые В-клетки были полностью сохранены, независимо от соотношения Е:Т. Таким образом, размноженные Vd1+ Т-клетки специфически нацеливались на В-клеточные опухоли, не вызывая побочного повреждения здоровых В-клеток, культивируемых на том же планшете.

#### **ПРИМЕР 8: Композиция γδ Т-клеток не опосредует смешанную лимфоцитарную реакцию (MLR)**

Чтобы продемонстрировать систему культивирования, пригодную для обнаружения аллогенных ответов, Т-клетки донорской крови выделяли, окрашивали CTV и культивировали с облученными лимфоцитами периферической крови (PBL) либо из аутологичных, либо из аллогенных источников. Культуры выращивали в течение 5 дней, после чего деление αβ Т-клеток оценивали с помощью проточного цитометрического анализа разведения красителя CTV. Способы описаны в настоящем документе.

Результаты этого эксперимента ясно показывают на **Фиг. 11А**, что облученные PBL могут вызывать устойчивый аллогенный ответ от Т-клеток крови в системе культур смешанного ответа лимфоцитов, в то время как аутологичные культуры продемонстрировали значительно сниженный уровень пролиферации Т-клеток. Это указывает на пригодность данной системы культивирования для воздействия на аллореактивный потенциал данной популяции Т-клеток.

Для воздействия на аллореактивный потенциал размноженных Vd1+ Т-клеток, клетки GDX012 культивировали с облученными PBL от аллогенных доноров. В качестве контроля соответствующие Т-клетки крови того же индивидуума, от которого был получен продукт GDX012, окрашивали CTV и культивировали по отношению к

облученным PBL от тех же аллогенных доноров. Культуры выращивали в течение 5 дней, после чего деление клеток оценивали с помощью проточной цитометрии.

Результаты, приведенные на **Фигуре 11В**, показали, что  $\alpha\beta$  Т-клетки крови четко делились в присутствии аллогенных PBL, в то время как клетки GDX012 (размноженные V $\delta$ 1+ Т-клетки) не сохранялись в культуре в каком-либо значительном количестве. Вызванный ответ  $\alpha\beta$  на аллогенные PBL демонстрирует пролиферацию Т-клеток, типичную для смешанной реакции лимфоцитов. Несмотря на это несоответствие, клетки GDX012 не пролиферировали в присутствии тех же облученных PBL, что указывает на то, что клетки GDX012 неспособны вызывать аллогенные ответы таким же образом, как  $\alpha\beta$  Т-клетки. В совокупности эти результаты показывают, что GDX012 не может опосредовать GvHD таким же образом, как  $\alpha\beta$  Т-клетки.

#### Приготовление лейкоцитарных пленок, деплетирование CD14-явлений и облучение полученных лимфоцитов периферической крови

Кровяная лейкоцитарная пленка подвергалась сепарации в градиенте плотности для выделения фракции PBMC. Небольшую часть полученных PBMC замораживали в 10% криоконсервирующей среде Cryostor10 и замораживали при -80 °С. Оставшиеся PBMC промывали, метили CD14 человека, и деплетирование CD14 проводили с помощью колонок Miltenyi MACS LS. Затем полученную фракцию PBL культивировали в полной среде RPMI (среда RPMI, содержащая 10% фетальной телячьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина, 1% HEPES, 1% заменимых аминокислот и 1% пирувата натрия) в течение ночи при 37 °С, 5%CO<sub>2</sub>.

На следующий день PLB собирали с помощью пипетки и подвергали рентгеновскому облучению 40 Гр для остановки потенциала пролиферации клеток. Эти клетки представляют фракцию клеток-«стимуляторов» в анализах MLR.

#### Выделение Т-клеток крови и установка планшетов MLR

PBMC либо из источников лейкоцитарной пленки, либо из повторно замороженного материала лейкопак брали из замороженного хранилища и оттаивали. Затем PBMC промывали, метили гранулами для выделения пан-Т-клеток и выделяли Т-клетки крови с помощью колонок MACS LS. Затем полученные фракции Т-клеток крови промывали и окрашивали с помощью Cell Tracker Violet (CTV). Затем CTV+ Т-клетки крови совместно культивировали с облученными PBL-стимуляторами. Параллельно замороженные флаконы с GDX12 размораживали, промывали и сразу же окрашивали CTV. Затем клетки CTV+ GDX012 совместно культивировали с облученными PBL-стимуляторами. Во всех случаях на лунку устанавливали соотношение эффекторных и стимулирующих клеток 1:1. Совместные культуры помещали в полные среды RPMI. Затем указанные культуры инкубировали при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 дней. Культуры не подпитывали дополнительной средой после этой первоначальной установки.

#### **ПРИМЕР 8: Композиция размноженных V $\delta$ 1+ Т-клеток предотвращает рост опухоли *in vivo***

Модель ксенотрансплантата, полученную из клеточной линии, применяли для

оценки биораспределения и эффективности GDX012 *in vivo*. Иммунодефицитным мышам NOD SCID гамма (NSG) внутривенно вводили путем инъекции через хвостовую вену либо  $0,5 \times 10^6$  или  $1 \times 10^6$  клеток из клеточной линии В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (ALL) человека, NALM-6, которая была стабильно трансдуцирована для экспрессии люциферазы светлячка (FLuc) и гена зеленого флуоресцентного белка (GFP). Впоследствии мышам однократно вводили путем внутривенной инъекции через хвостовую вену  $20 \times 10^6$  клеток GDX012 через 24 часа или 6 дней после заражения опухолью, или не осуществляли указанного введения. Все контрольные и пролеченные мыши получали внутрибрюшинные инъекции рекомбинантного человеческого IL-15 (1 пг/мышь каждые 2-3 дня на протяжении всего исследования) для поддержки выживания GDX012. Опухолевую нагрузку оценивали два раза в неделю с помощью п/к введения люциферина и прижизненной биолюминесцентной визуализации всего тела (BLI). Через 4 недели мышей умерщвляли и удаляли длинные кости задних конечностей. Костный мозг вымывали с длинных костей задних конечностей с помощью RPMI-1640 и собирали для проточного цитометрического анализа. Вкратце, клетки окрашивали фиксируемым красителем eFluor780 для дискриминации живых/мертвых клеток, затем окрашивали FITC-конъюгированными антителами против CD45 человека, PE-конъюгированными антителами против CD19 человека и APC-конъюгированными антителами против TCR $\gamma\delta$  человека. Наконец, клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и анализировали на проточном цитометре MACSQUANT10.

Однократное введение GDX012 в модели системного ALL *in vivo* было способно уменьшить рост диссеминированной опухоли по сравнению с контролем (**Фиг. 12**). Кроме того, клетки GDX012 были способны локализоваться и предпочтительно контролировать опухолевую массу конкретно в костном мозге (**Фиг. 13**).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Аллогенная композиция, содержащая  $V\delta 1+$  Т-клетки, для применения при лечении пациента с миелоидным злокачественным новообразованием.
2. Аллогенная композиция для применения по п. 1, при этом миелоидное злокачественное новообразование выбрано из острого миелоидного лейкоза (AML) и миелодиспластического синдрома (MDS).
3. Аллогенная композиция для применения по п. 1 или п. 2, при этом пациент является положительным относительно минимальная остаточной болезни (MRD+).
4. Аллогенная композиция для применения по п. 3, при этом MRD+ пациент находится в полной ремиссии, не имеет обнаруживаемых лейкоэмических бластов в периферической крови и имеет менее 5% лейкоэмических бластов в костном мозге.
5. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-4, при этом пациент ранее получал курс химиотерапии.
6. Аллогенная композиция для применения по п. 5, при этом пациент получал курс химиотерапии по меньшей мере за 3 суток до введения аллогенной композиции.
7. Аллогенная композиция для применения по п. 5 или п. 6, при этом химиотерапия выбирается из флударабина и циклофосфамида.
8. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-7, которая содержит по меньшей мере около 90%  $CD45+$  клеток по отношению к общему количеству живых клеток.
9. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-8, которая содержит по меньшей мере около 60%  $\gamma\delta$  Т-клеток по отношению к общему количеству живых клеток.
10. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-9, которая содержит по меньшей мере около 50%  $V\delta 1+$  Т-клеток по отношению к общему количеству живых клеток.
11. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-10, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^{10}$  общего количества живых клеток.
12. Аллогенная композиция для применения по п. 11, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^9$  общего количества живых клеток.
13. Аллогенная композиция для применения по п. 12, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^8$  общего количества живых клеток.
14. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-11, при этом указанная аллогенная композиция содержит около  $8 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $2,4 \times 10^9$ ,  $1,2 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^7$  или  $4 \times 10^7$  общего количества живых клеток.
15. Доза, которая содержит аллогенную композицию для применения по любому из пп. 1-14.
16. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^5$  клеток/кг.
17. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^6$  клеток/кг.
18. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^7$  клеток/кг.

19. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $3 \times 10^7$  клеток/кг.
20. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^8$  клеток/кг.
21. Доза по п. 15, которая содержит менее чем около  $5 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.
22. Доза по п. 21, которая содержит менее чем около  $1 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.
23. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-15, при этом V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца способом, включающим культивирование образца в среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-4-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-15-подобной активностью.
24. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 1-15, при этом V $\delta$ 1+ Т-клетки получают из образца способом, включающим культивирование образца в среде, содержащей митоген Т-клеток и фактор роста, обладающий интерлейкин-15-подобной активностью, в отсутствие фактора роста, обладающего интерлейкин-4-подобной активностью.
25. Аллогенная композиция для применения по п. 23 или п. 24, при этом V $\delta$ 1+ Т-клетки собирают по меньшей мере через 11 дней после культивирования.
26. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 23-25, при этом культивирование проводят в сосуде, содержащем газопроницаемый материал.
27. Аллогенная композиция для применения по п. 26, при этом сосуд содержит герметичный контейнер для жидкости, содержащий газопроницаемый материал для обеспечения газообмена.
28. Аллогенная композиция для применения по п. 26 или п. 27, при этом дно указанного сосуда выполнено с возможностью газообмена со дна сосуда.
29. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 23-28, при этом что образец культивируют в бессывороточной среде.
30. Аллогенная композиция для применения по любому из пп. 23-28, при этом образец культивируют в среде, содержащей сыворотку или заменитель сыворотки.
31. Способ лечения миелоидного злокачественного новообразования, включающий введение терапевтически эффективного количества аллогенной композиции, содержащей V $\delta$ 1+Т-клетки, пациенту с указанным миелоидным злокачественным новообразованием.
32. Способ по п. 31, в котором миелоидное злокачественное новообразование выбирают из AML и MDS.
33. Способ по п. 31 или п. 32, в котором пациент является положительным относительно минимальная остаточной болезни (MRD+).
34. Способ по п. 33, в котором MRD+ пациент находится в полной ремиссии, не имеет обнаруживаемых лейкоэмических бластов в периферической крови и имеет менее 5% лейкоэмических бластов в костном мозге.
35. Способ по любому из пп. 31-34, который дополнительно включает введение химиотерапии.
36. Способ по п. 35, в котором пациент получает курс химиотерапии по меньшей

мере за 3 суток до введения аллогенной композиции.

37. Способ по п. 35 или п. 36, в котором химиотерапию выбирают из флударабина и циклофосфида.

38. Способ по п. 31, в котором терапевтически эффективное количество содержит около  $8 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $2,4 \times 10^9$ ,  $1,2 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^7$  или  $4 \times 10^7$  живых клеток в целом.

39. Способ по п. 31, в котором терапевтически эффективное количество составляет менее чем около  $1 \times 10^{10}$  живых клеток в целом.

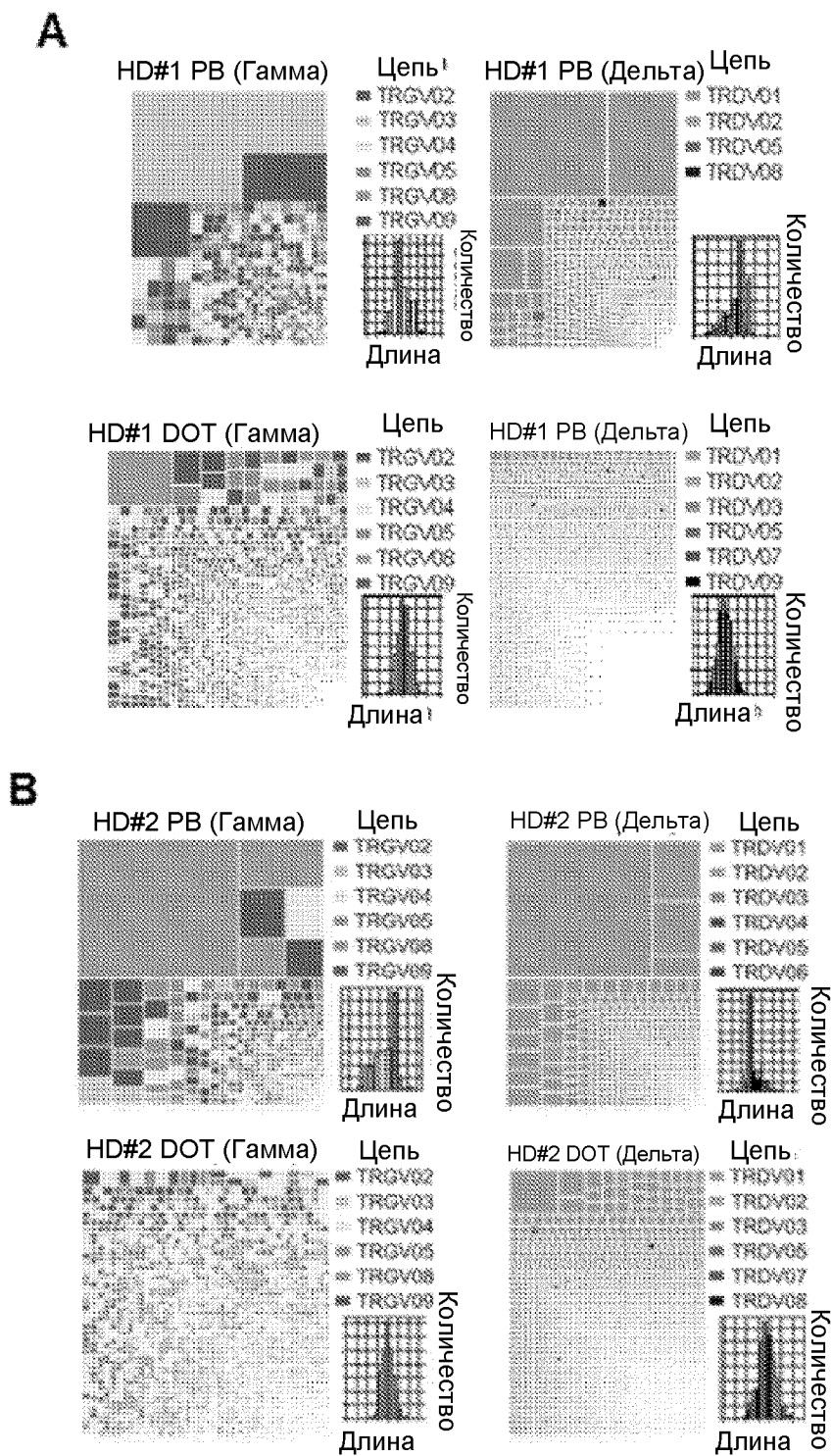
40. Способ по п. 31, в котором терапевтически эффективное количество составляет менее чем около  $1 \times 10^9$  живых клеток в целом.

41. Способ по п. 31, в котором терапевтически эффективное количество составляет менее чем около  $1 \times 10^8$  живых клеток в целом.

42. Способ по п. 31, в котором терапевтически эффективное количество составляет менее чем около  $5 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.

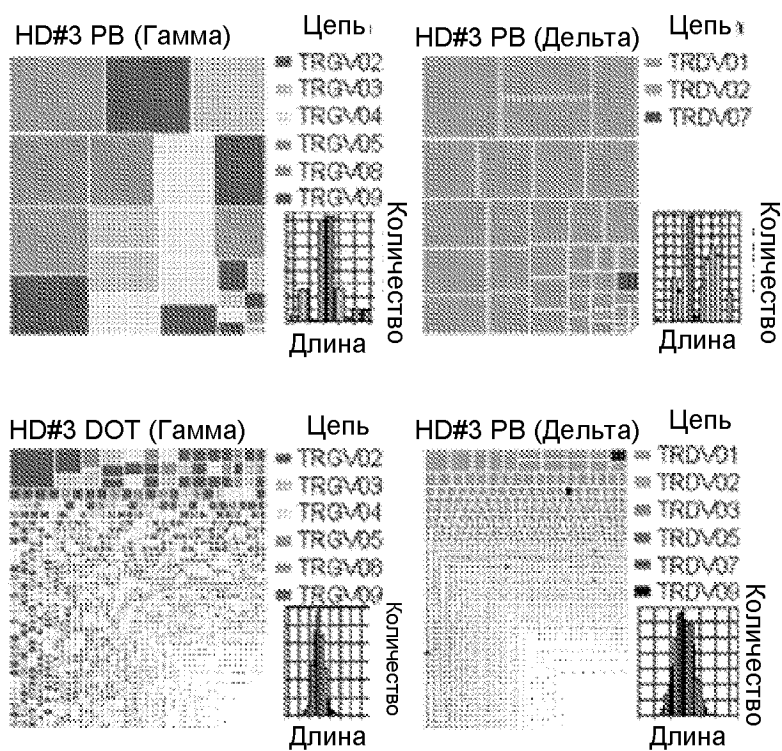
43. Доза по п. 42, при этом терапевтически эффективное количество составляет менее чем около  $1 \times 10^4$   $\alpha\beta$  Т-клеток/кг.

По доверенности

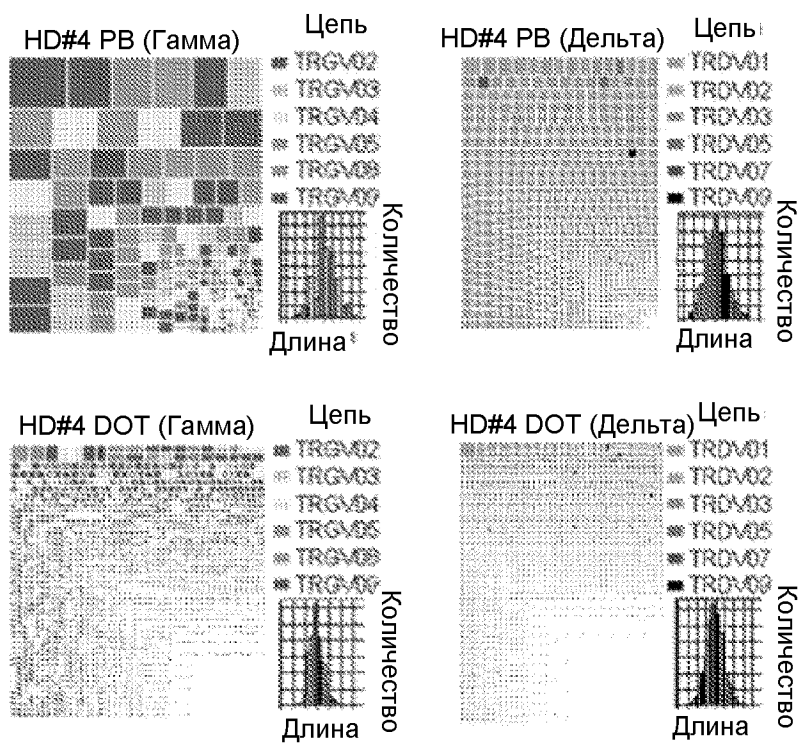


ФИГ. 1

C



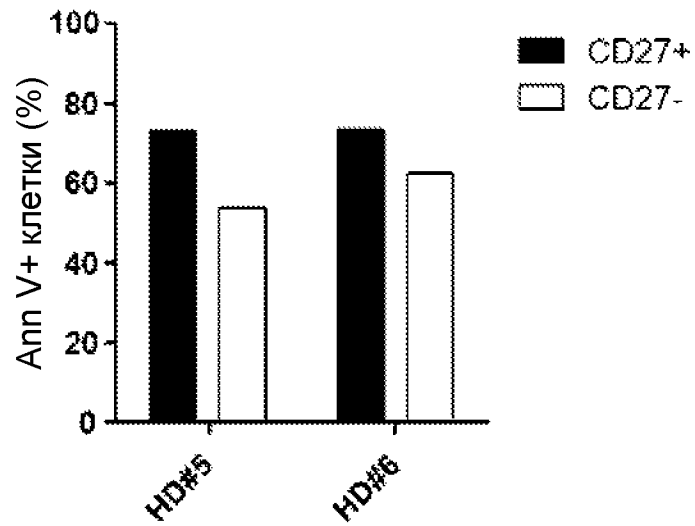
D



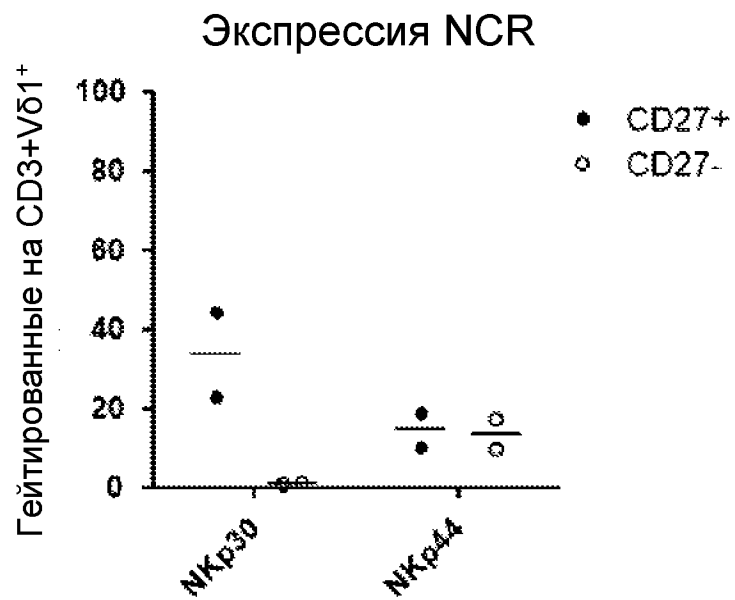
Фиг. 1 (продолжение)



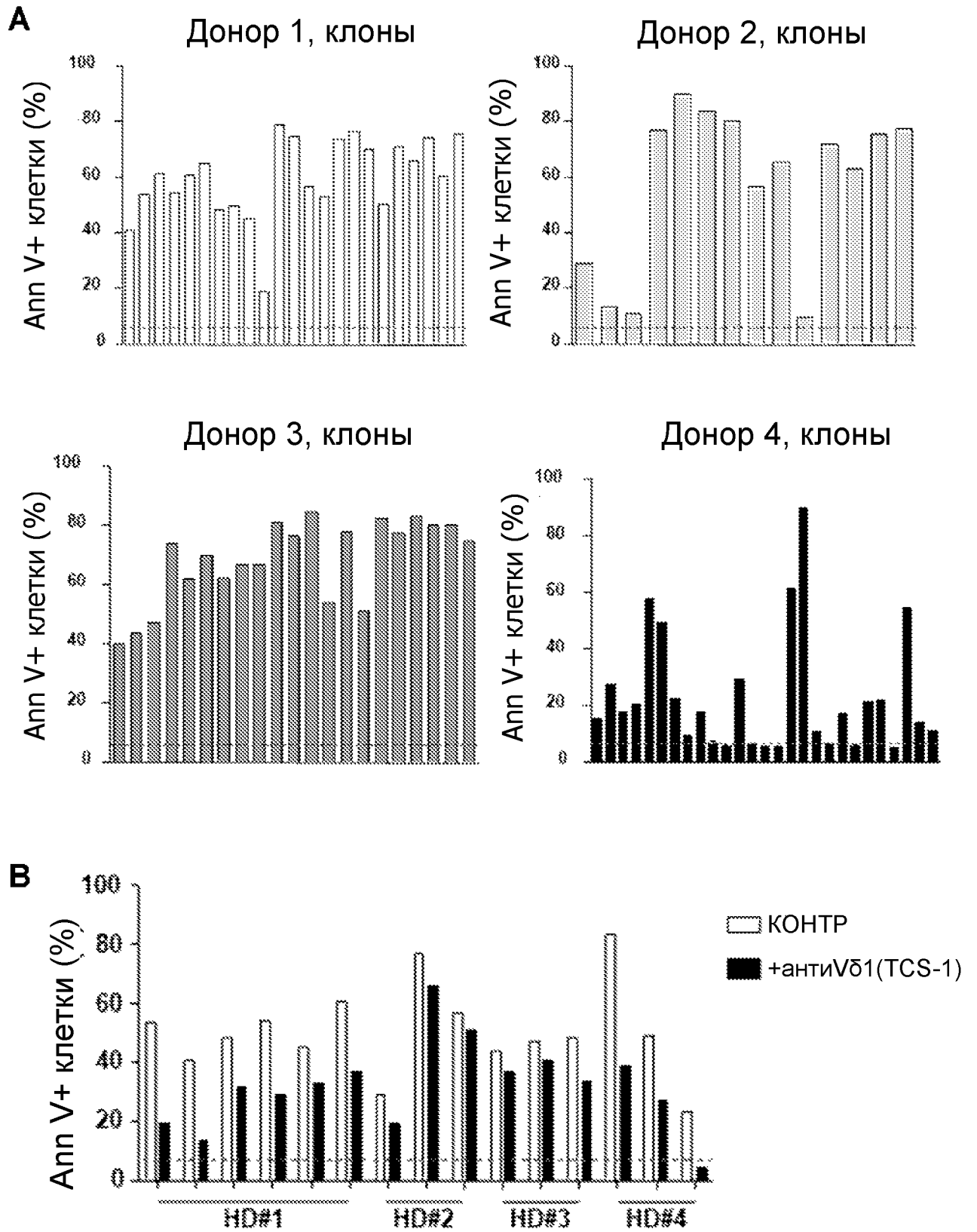
A



B

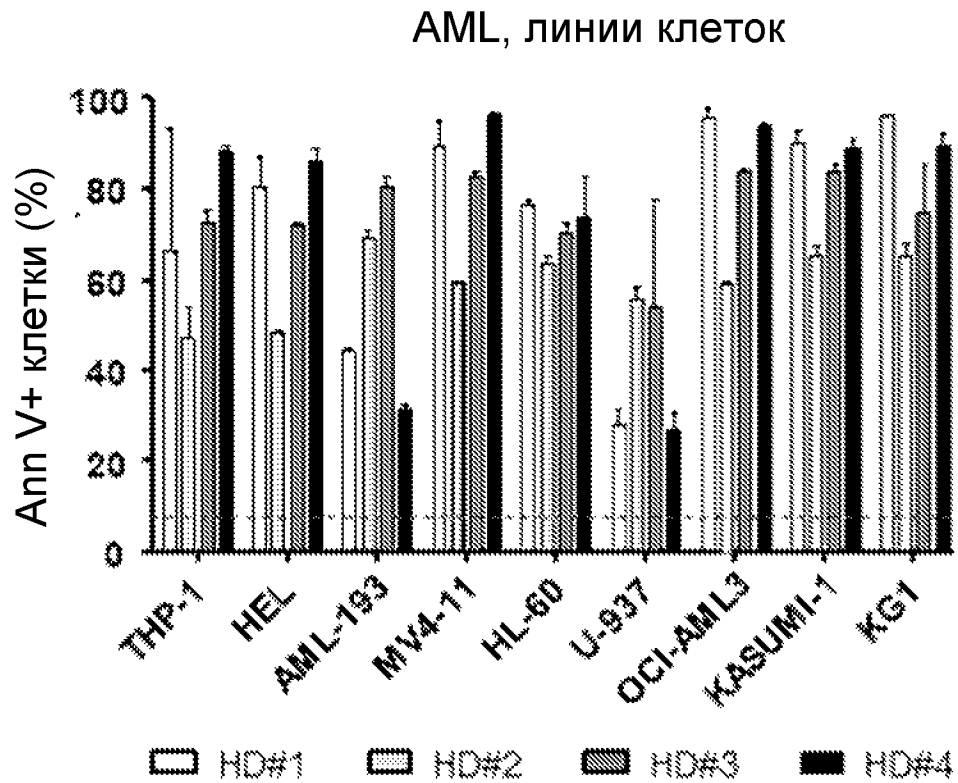


ФИГ. 2

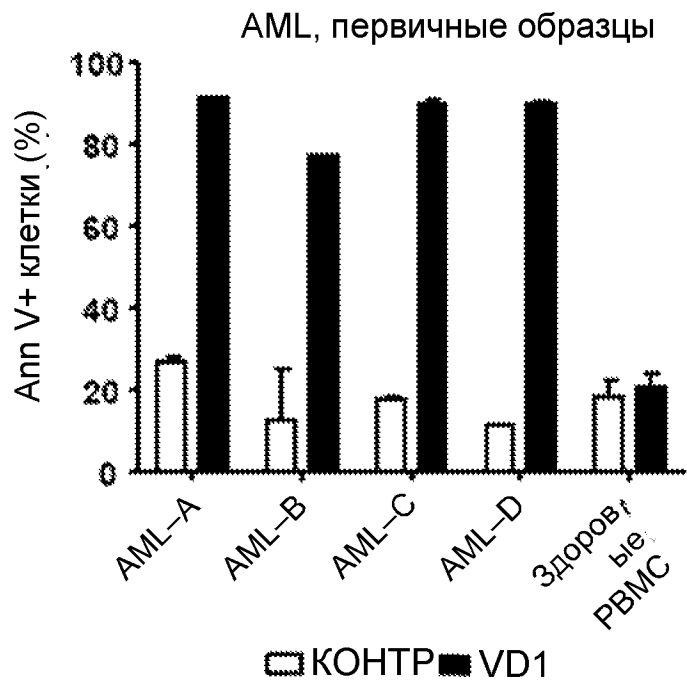


ФИГ. 3

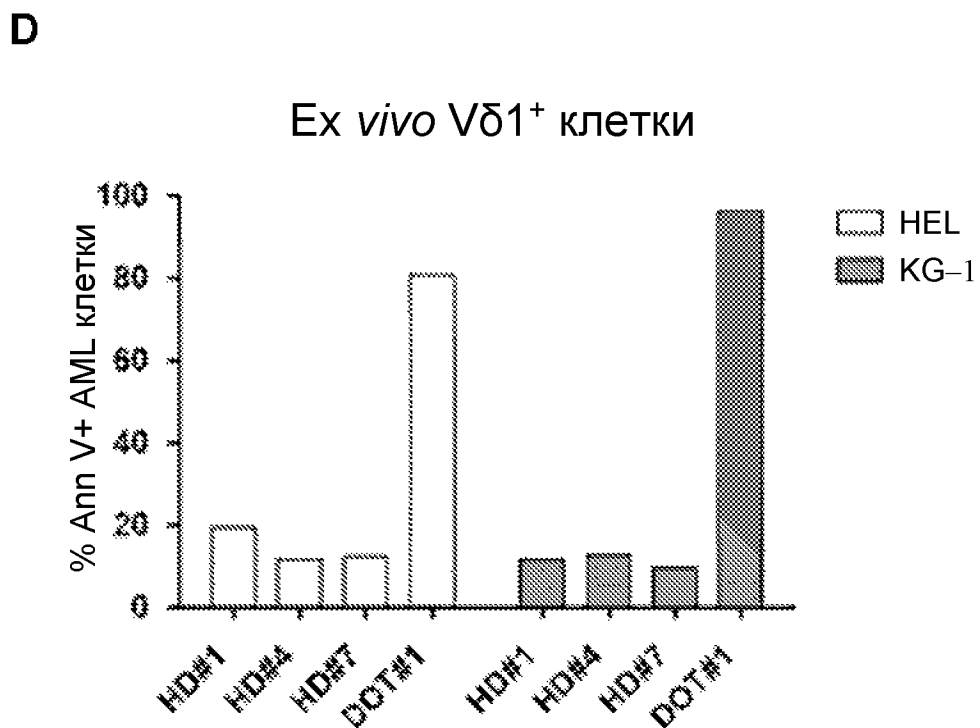
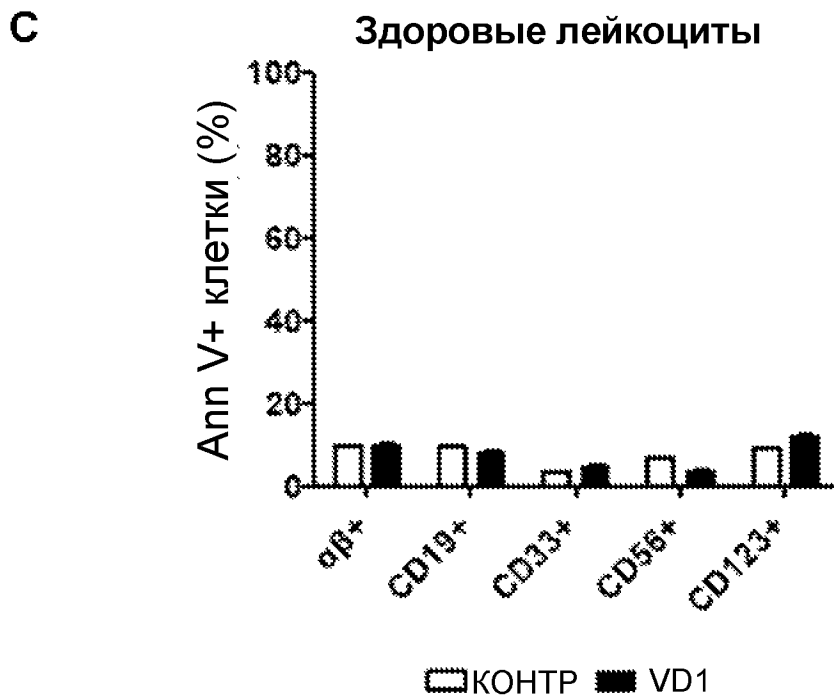
A



B

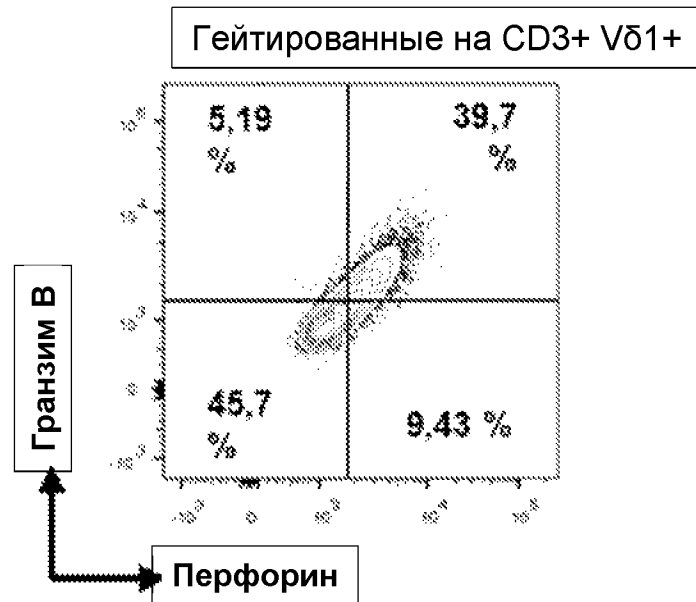


ФИГ. 4

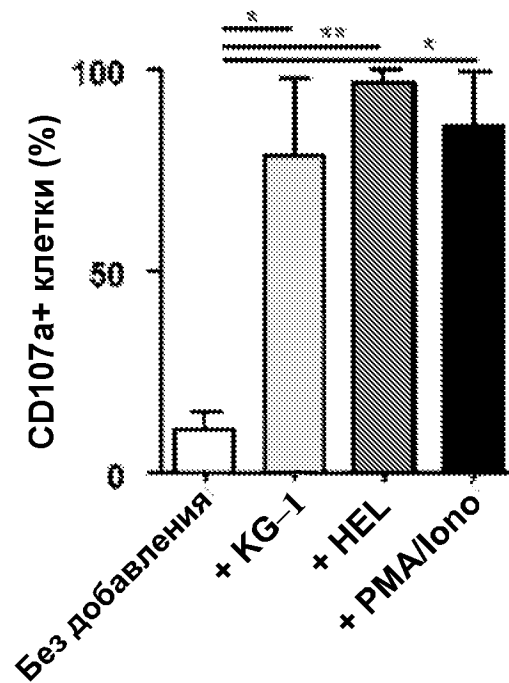


Фиг. 4 (продолжение)

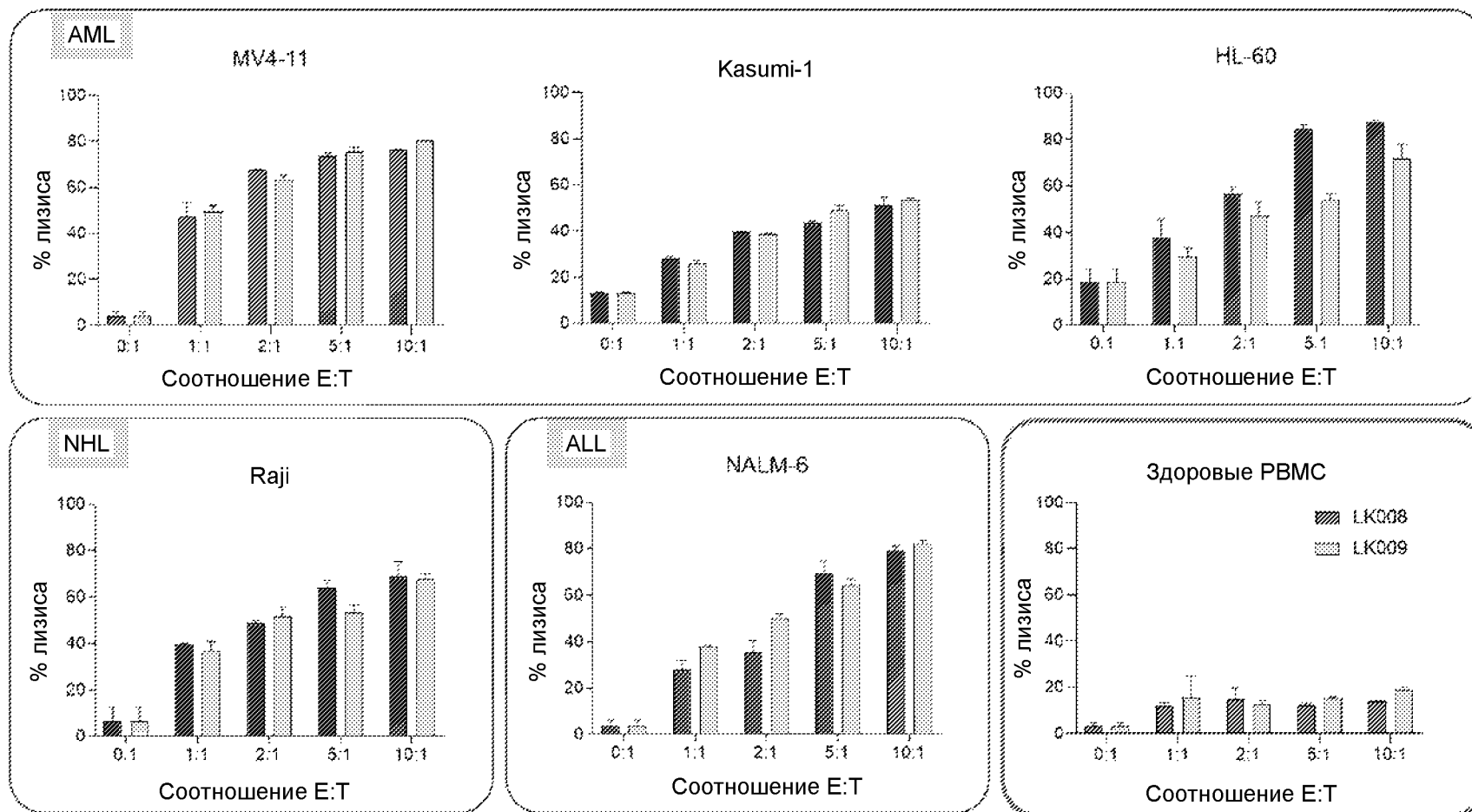
E

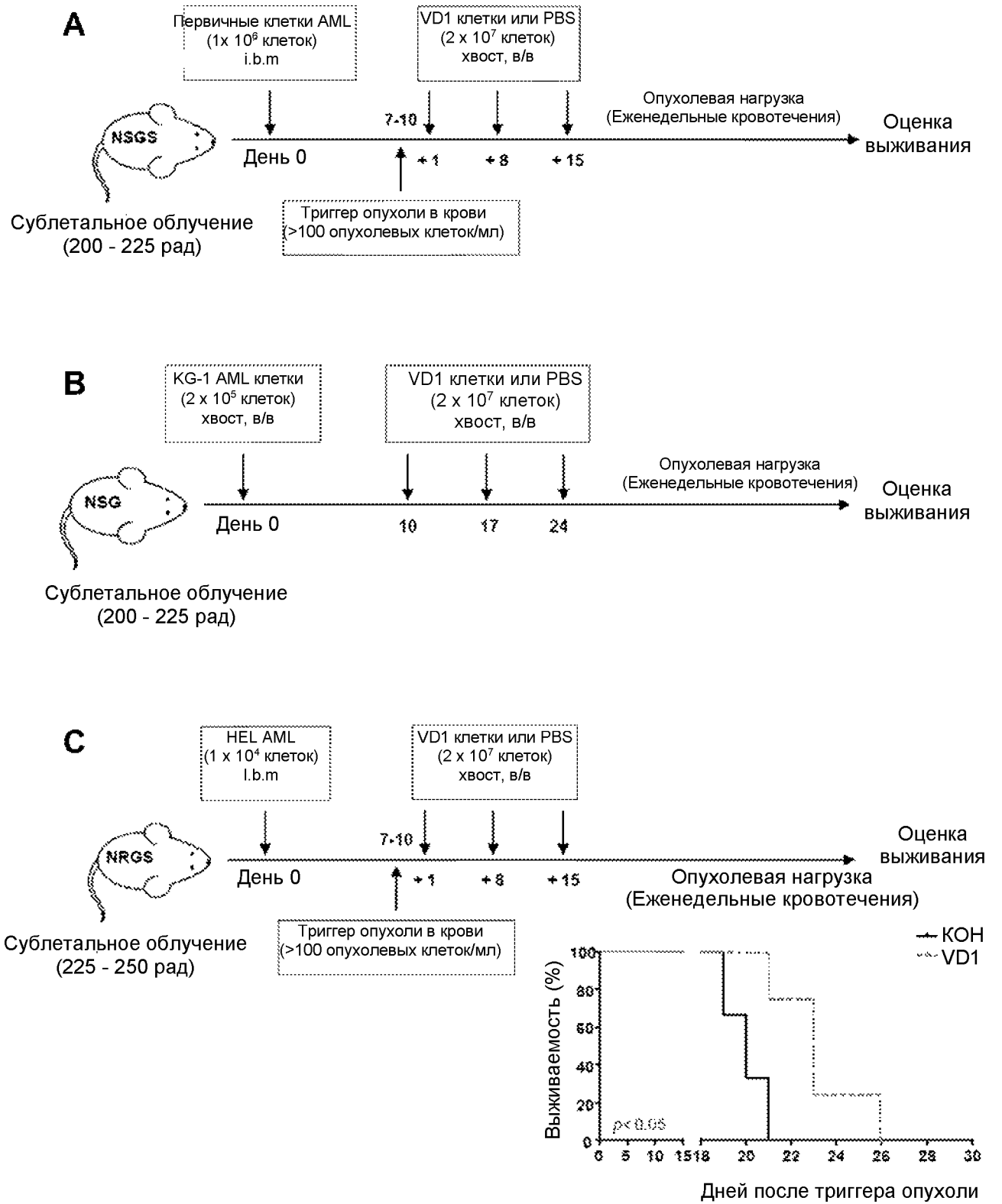


F

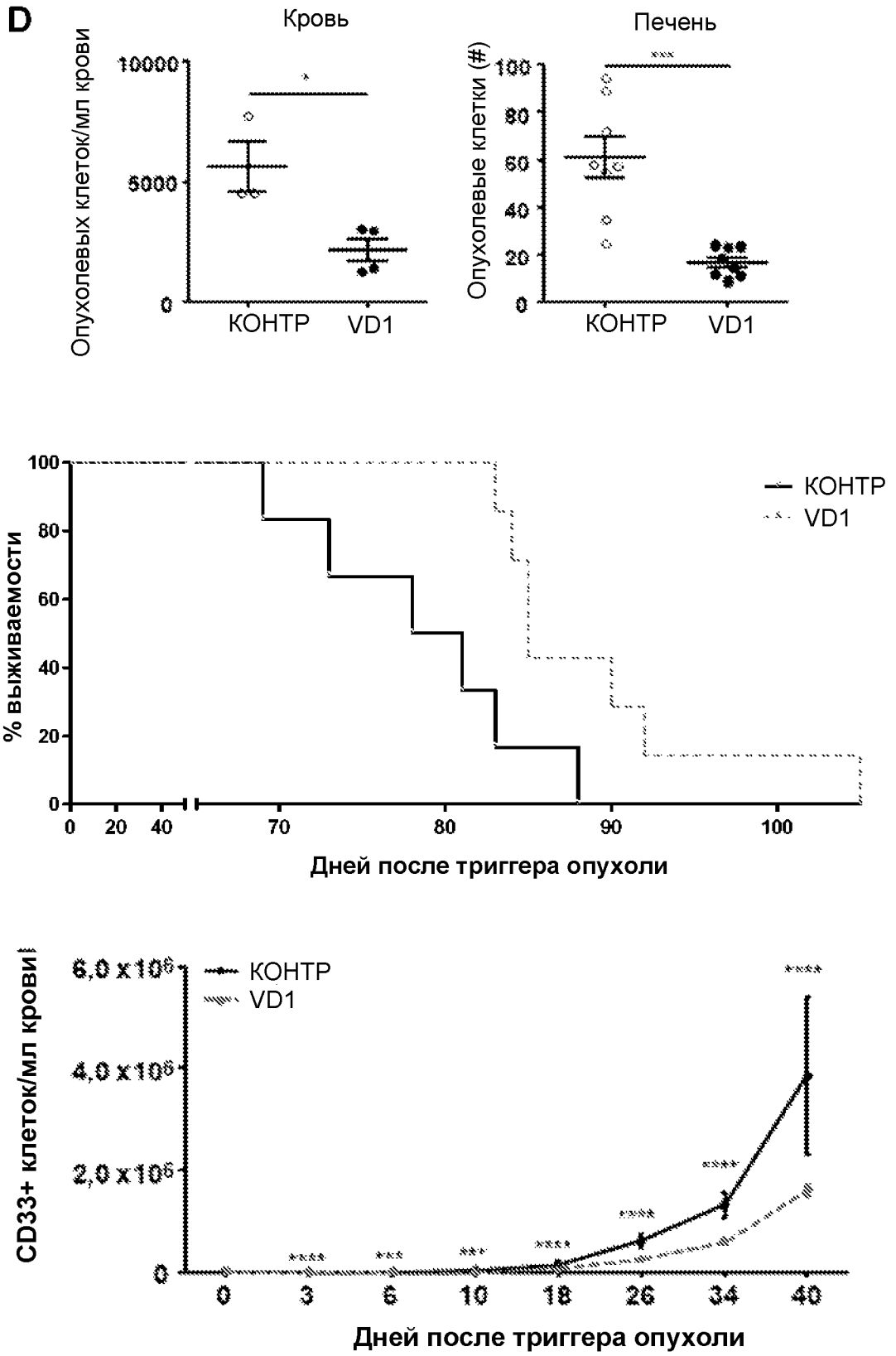


Фиг. 4 (продолжение)





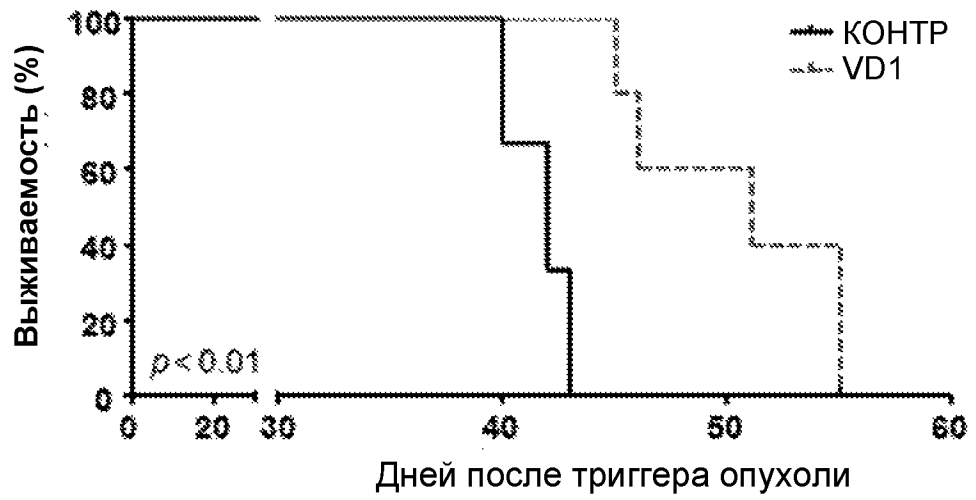
ФИГ. 6



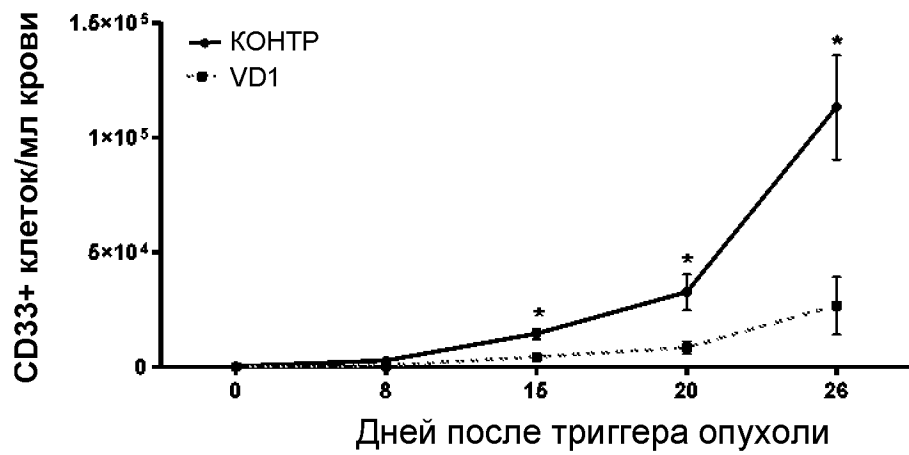
Фиг. 6 (продолжение)



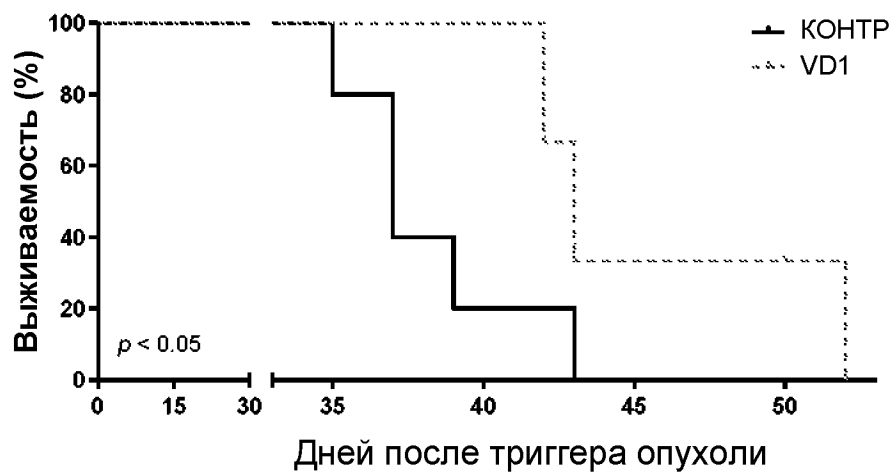
G



H

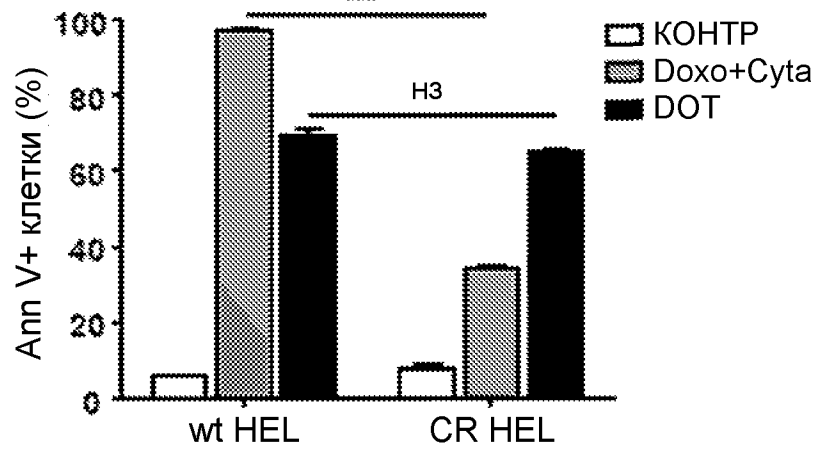


I

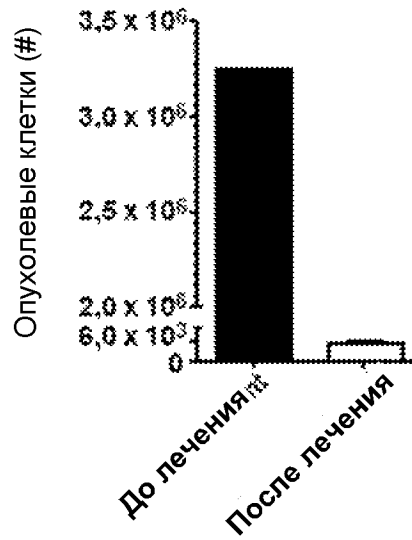


Фиг. 6 (продолжение)

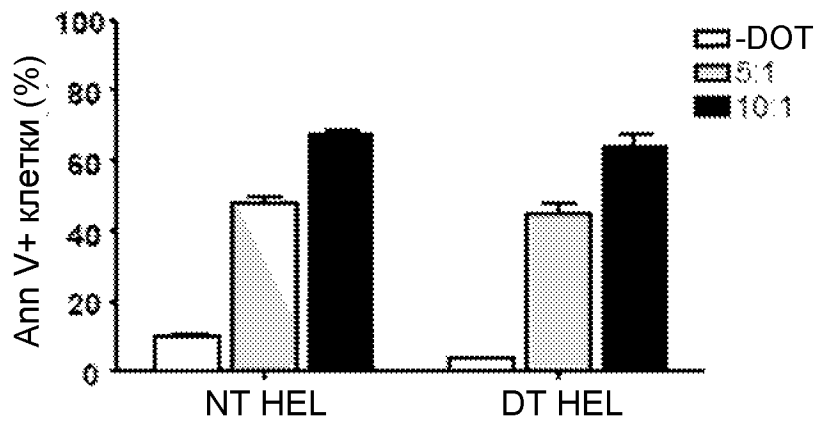
**A**



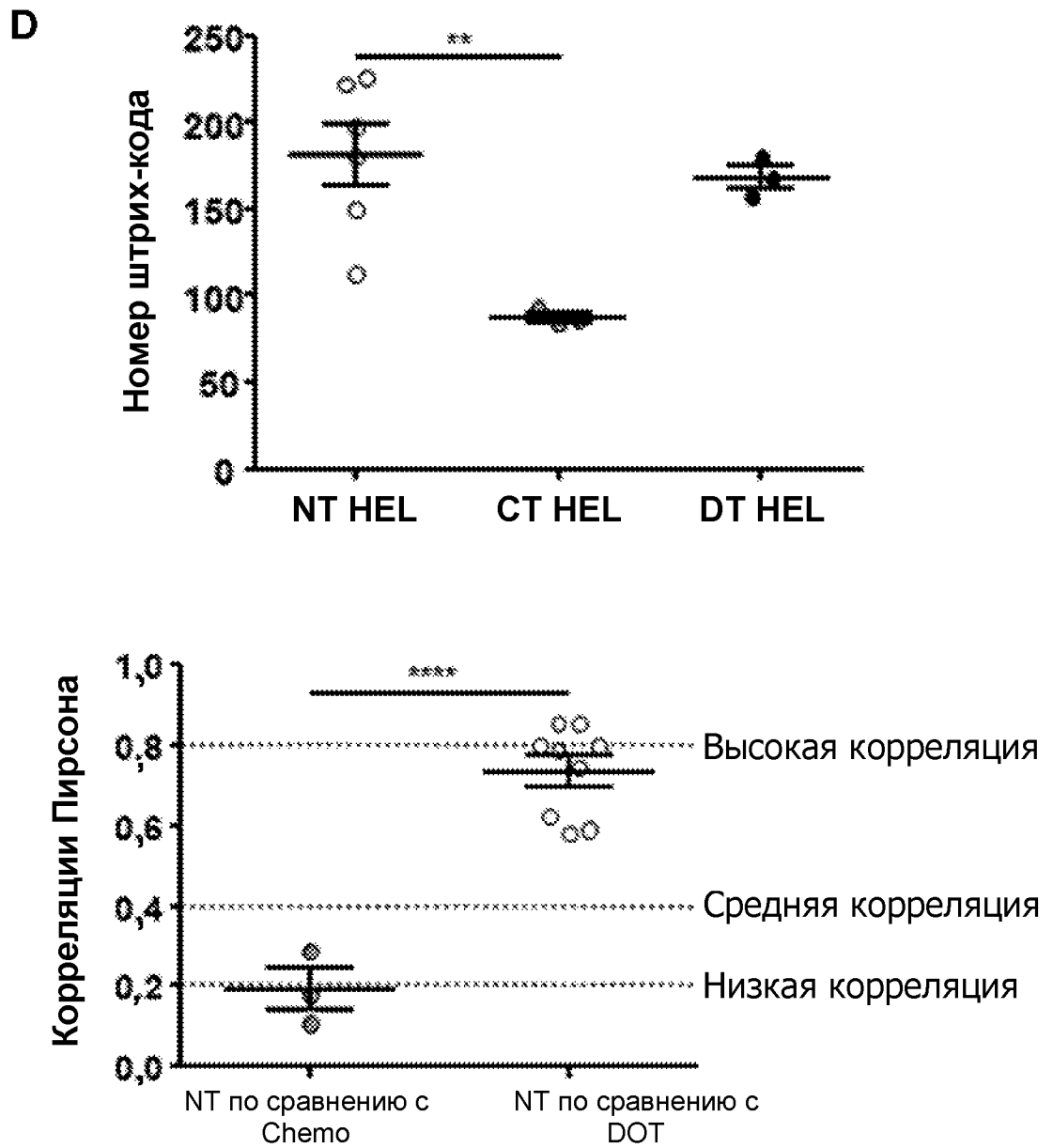
**B**



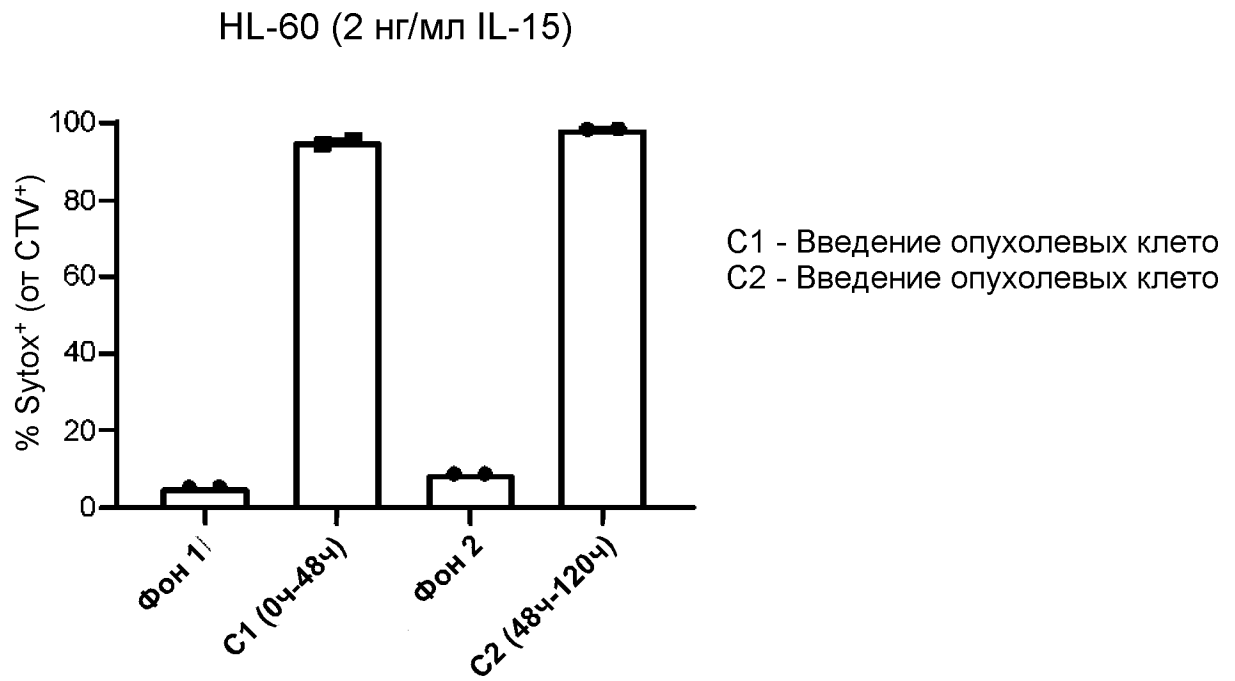
**C**



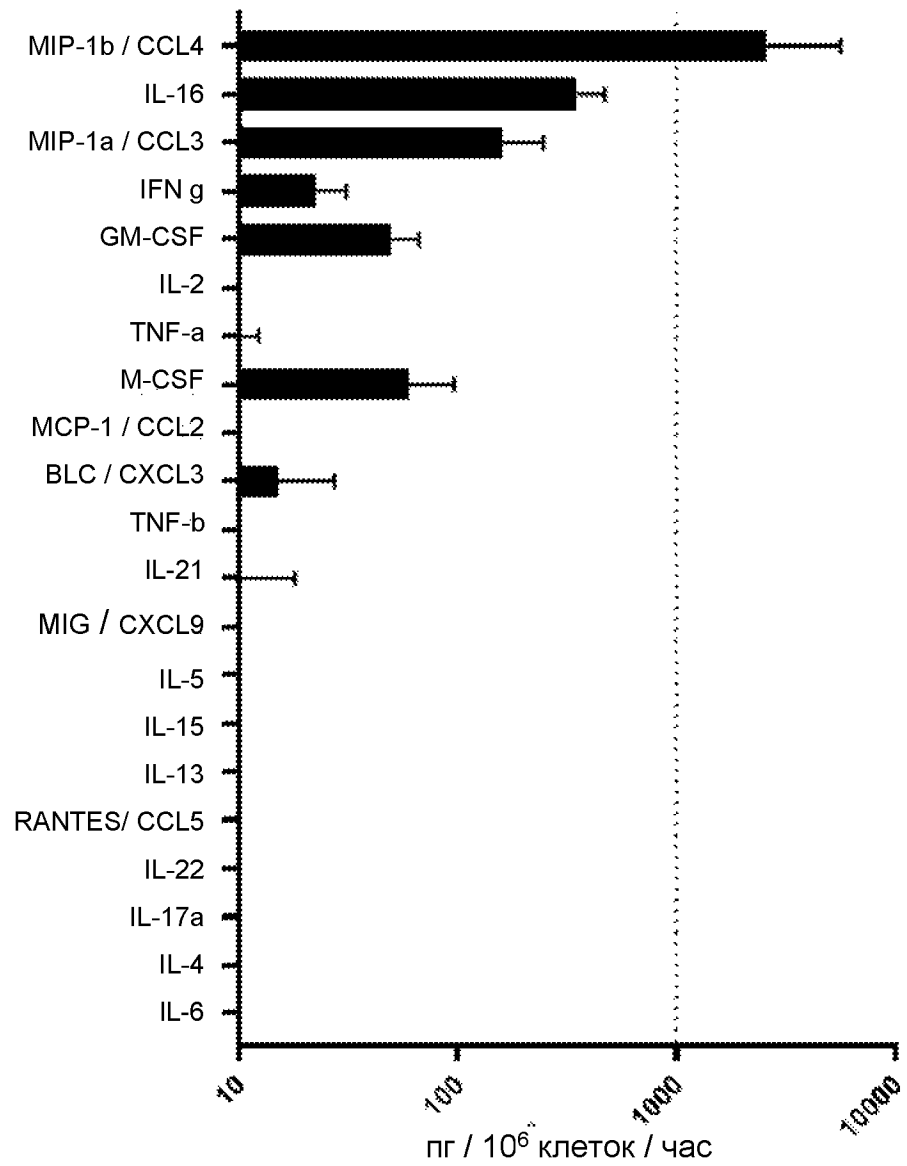
ФИГ. 7



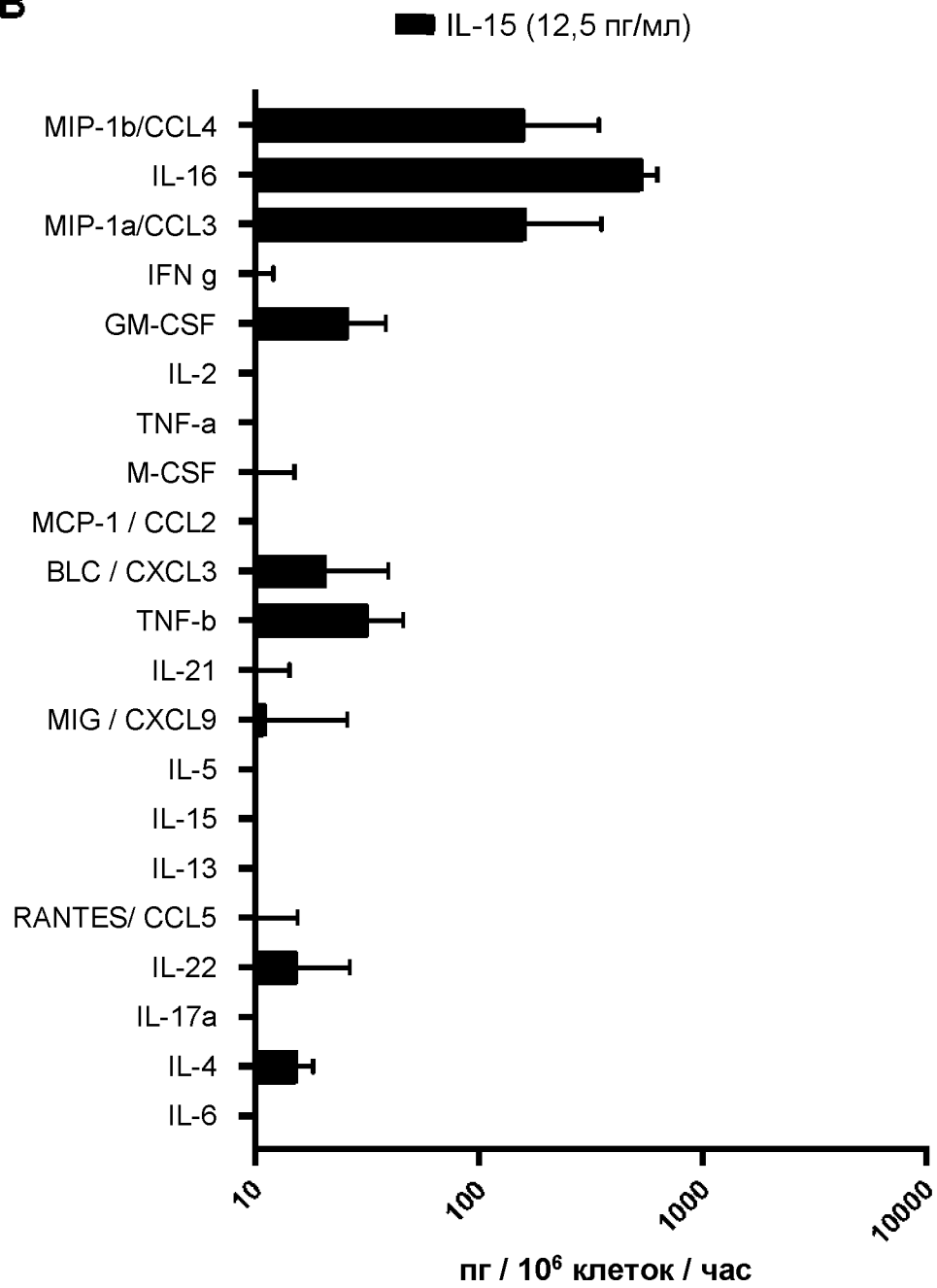
Фиг. 7 (продолжение)



ФИГ. 8

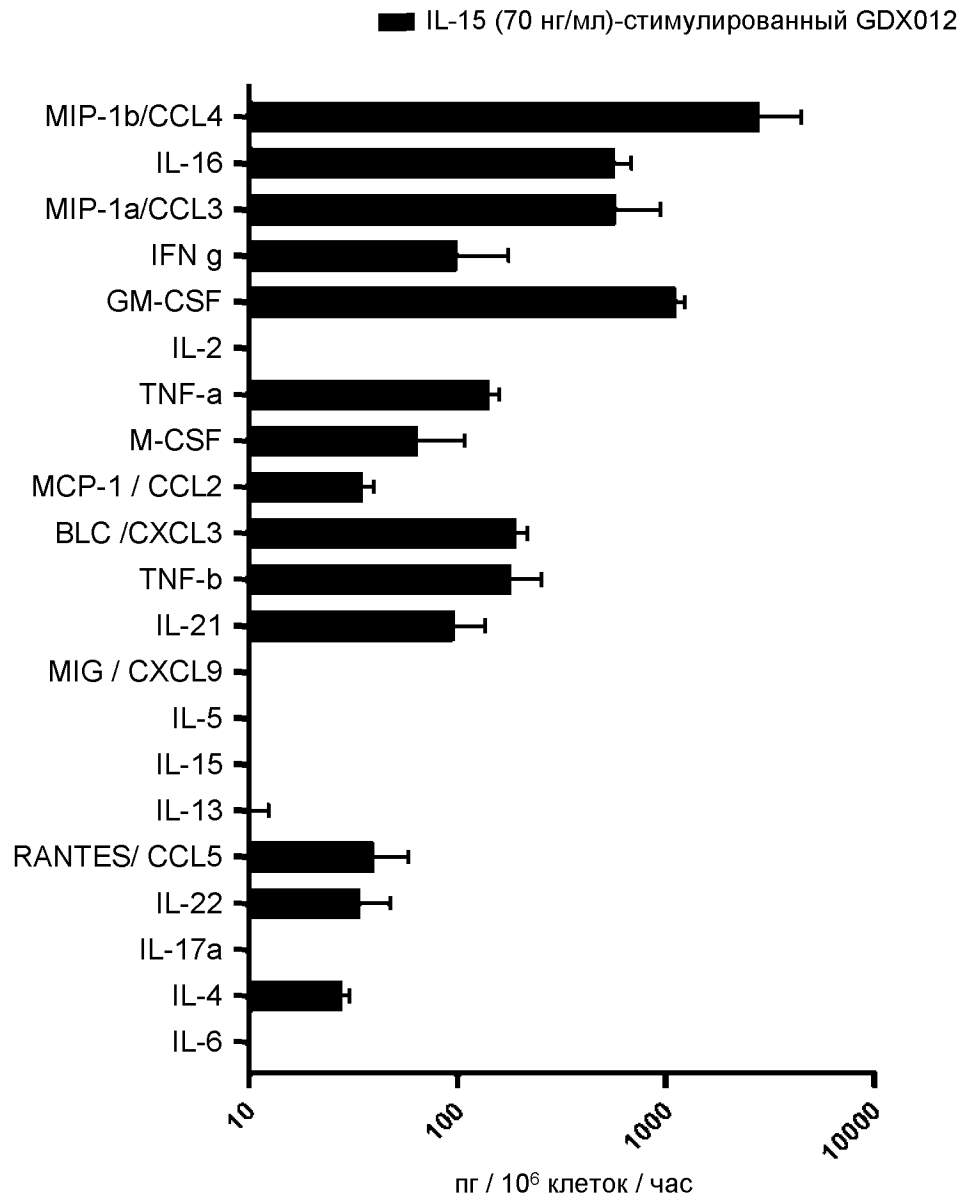
**A****GDX012**  
TCR стим (5 мкг/мл)

ФИГ. 9

**B**

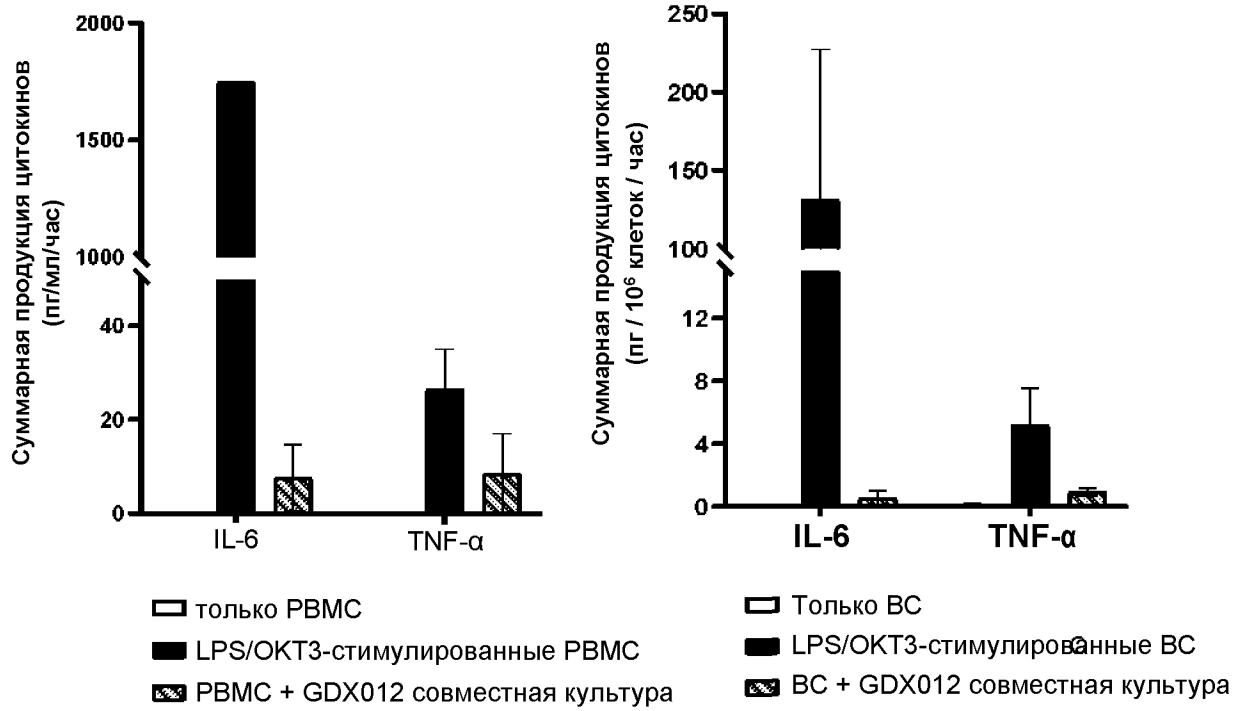
Фиг. 9 (продолжение)

C



Фиг. 9 (продолжение)

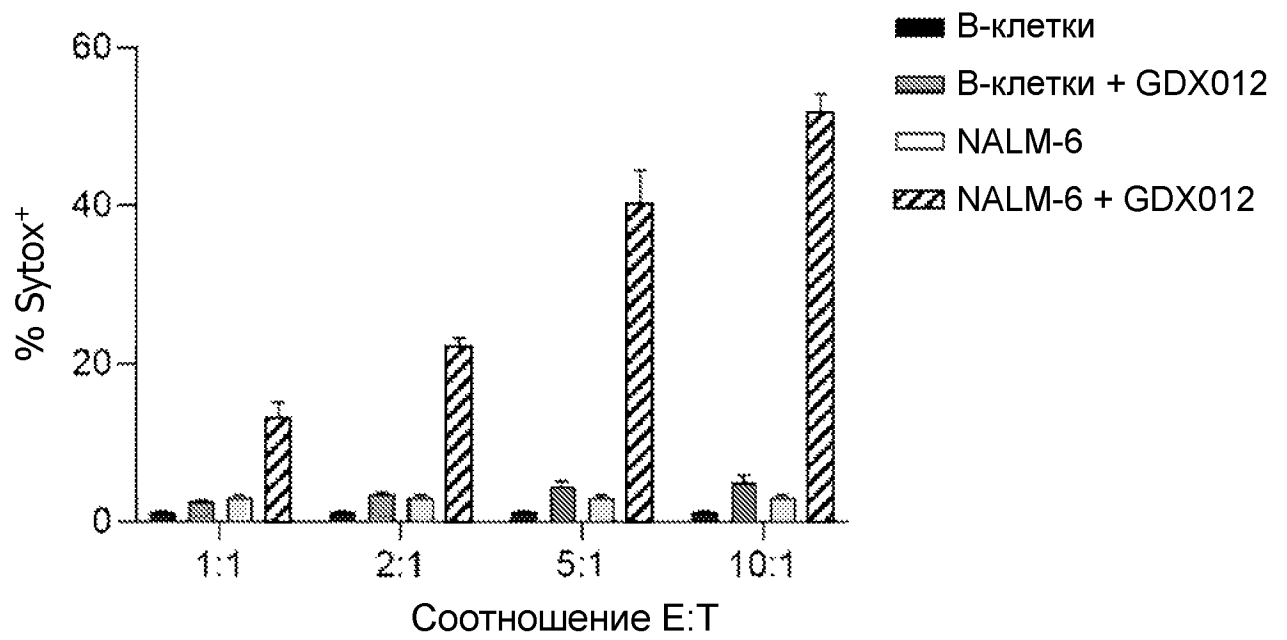
D



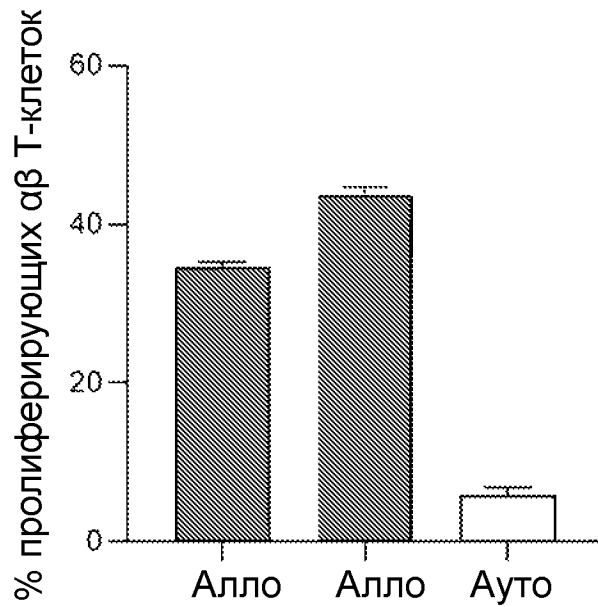
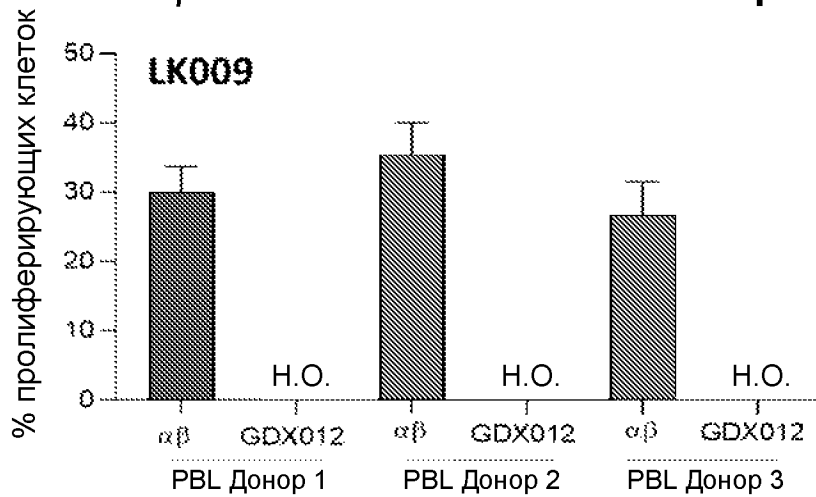
Фиг. 9 (продолжение)



## Цитотоксичность (NALM-6 + В-клетки)

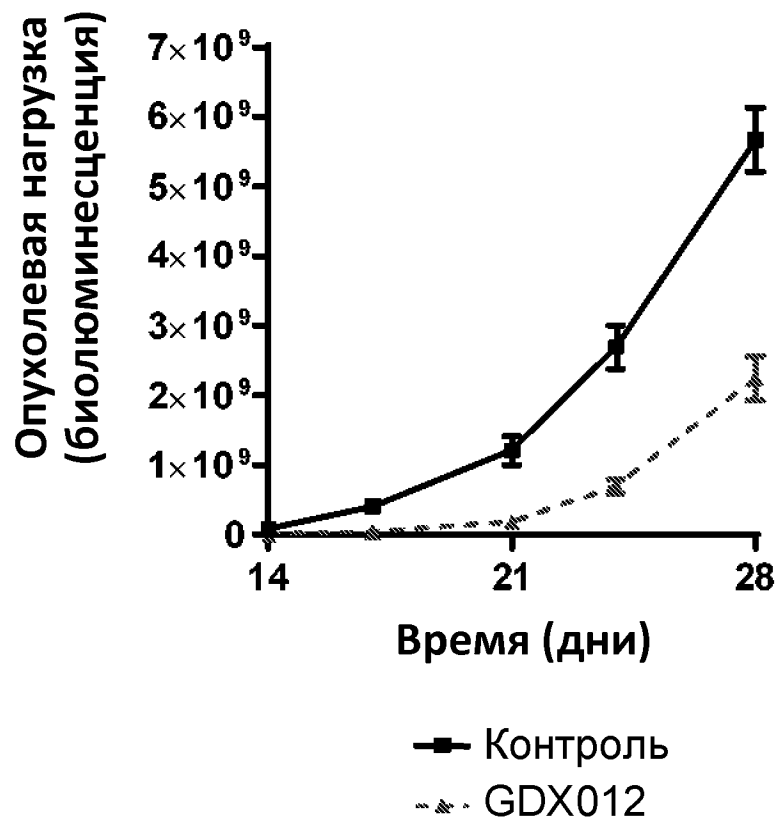


ФИГ. 10

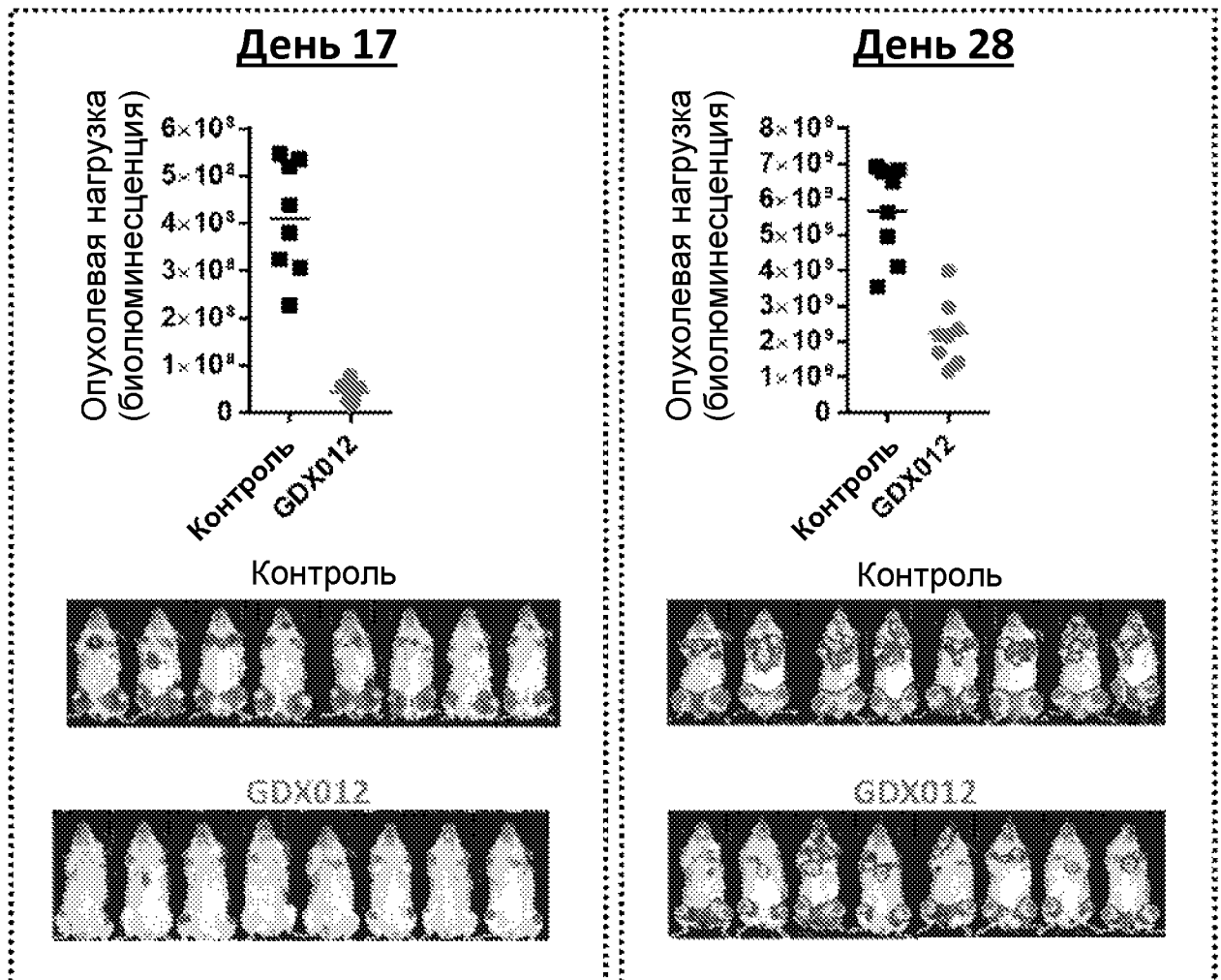
$\alpha\beta$  Т-клетки по сравнению с PBL $\alpha\beta$  Т-клетки или GDХ012 по сравнению с PBL

\*H.O. = не обнаружено.

ФИГ. 11

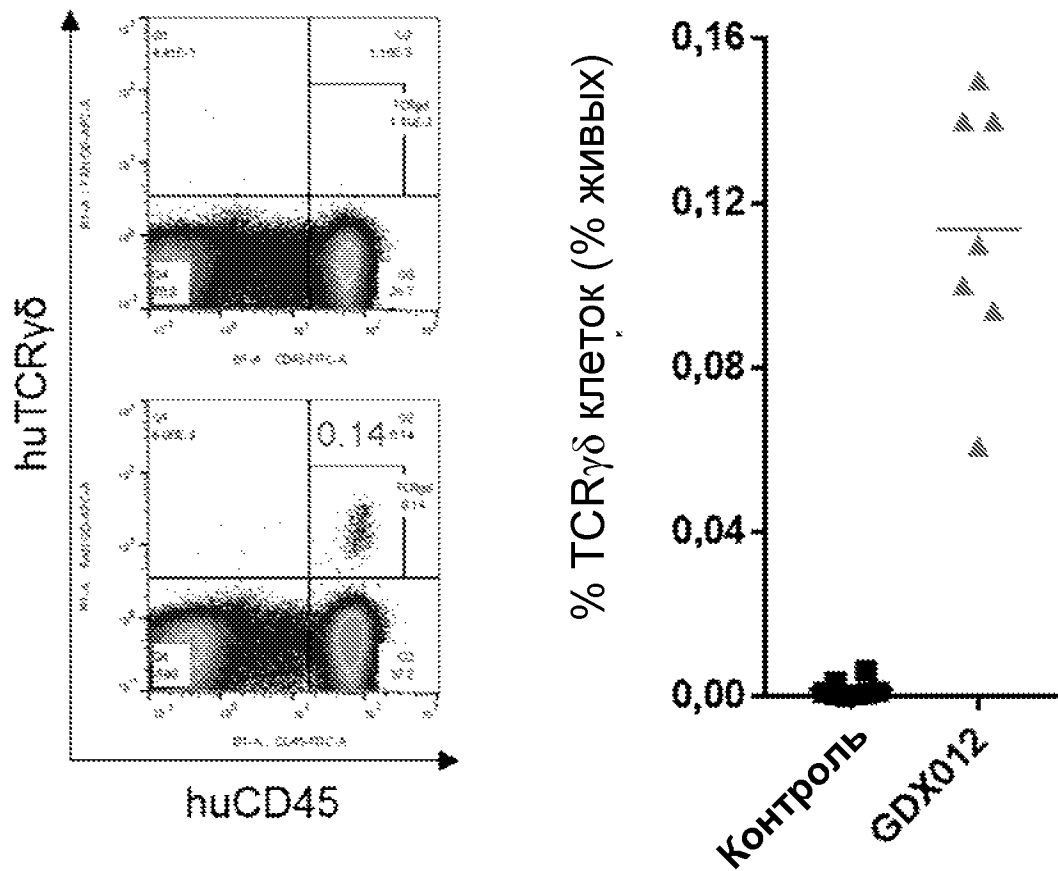


ФИГ. 12



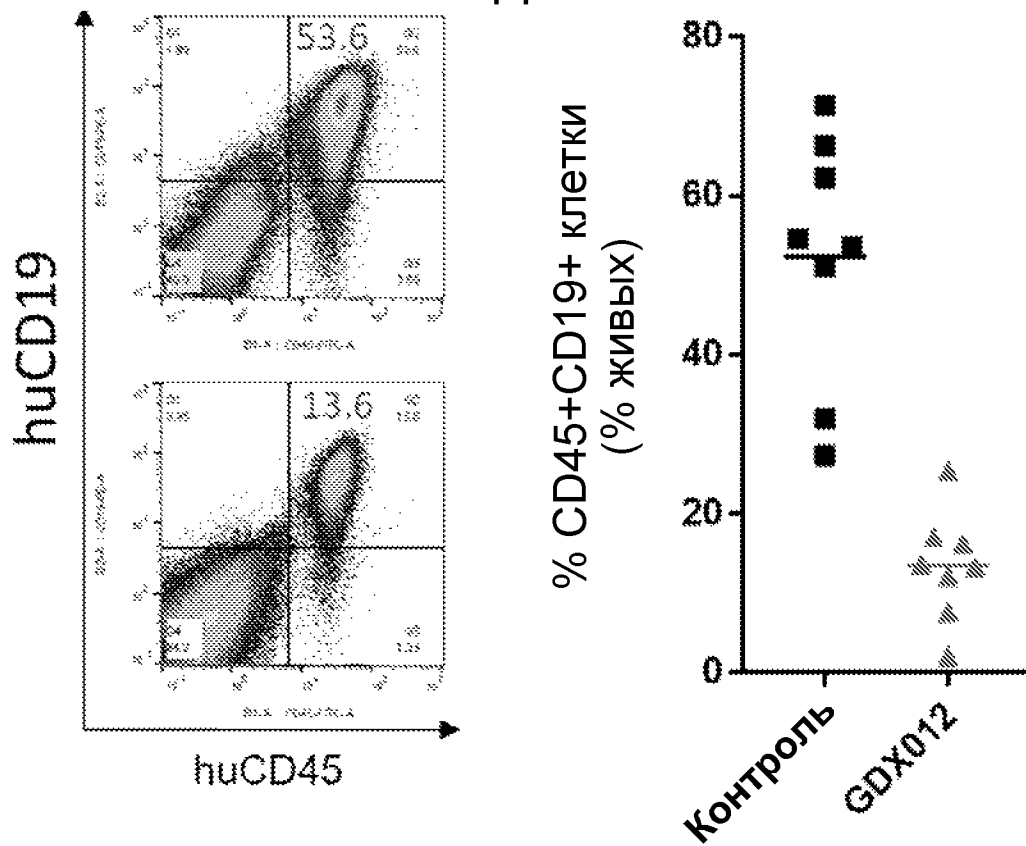
Фиг. 12 (продолжение)

GDX012 в костном мозге:  
конечный критерий оценки в  
исследовании



ФИГ. 13

Опухолевая нагрузка в костном мозге: конечный критерий оценки в исследовании



Фиг. 13 (продолжение)