



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.04

(21) Номер заявки
201792041

(22) Дата подачи заявки
2016.04.14

(51) Int. Cl. **C12N 5/0783** (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C07K 14/725 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ГАММА-ДЕЛЬТА-Т-КЛЕТКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 1506423.1; PCT/GB2015/051985

(32) 2015.04.15; 2015.07.08

(33) GB

(43) 2018.04.30

(86) PCT/GB2016/051050

(87) WO 2016/166544 2016.10.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТиСи БАЙОФАРМ ЛТД (GB)

(72) Изобретатель:
**Лик Майкл Дэвид, Ханниган Адель,
Патакас Агапитос, Парузина Дарья
(GB)**

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

(56) DREW C. DENIGER ET AL.: "Bispecific T-cells Expressing Polyclonal Repertoire of Endogenous [gamma][delta] T-cell Receptors and Introduced CD19-specific Chimeric Antigen Receptor", MOLECULAR THERAPY, vol. 21, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 638-647, XP055278535, GB ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2012.267, cited in the application, page 638 - page 639, page 644 - page 655

M. CHMIELEWSKI ET AL.: "T cells redirected by a CD3[zeta] chimeric antigen receptor can establish self-antigen-specific tumour protection in the long term", GENE THERAPY, vol. 20, no.

2, 1 February 2013 (2013-02-01), pages 177-186, XP055278560, GB ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2012.21, page 178; figure 1, page 185, left-hand column

ADRIENNE H. LONG ET AL.: "4-1BB costimulation ameliorates T cell exhaustion induced by tonic signaling of chimeric antigen receptors", NATURE MEDICINE, vol. 21, no. 6, 4 May 2015 (2015-05-04), pages 581-590, XP055278553, US ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.3838, page 581, page 584 - page 588

JEAN-JACQUES FOURNIE ET AL.: "What lessons can be learned from [gamma][delta] T cell-based cancer immunotherapy trials?", CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 10, no. 1, 17 December 2012 (2012-12-17), pages 35-41, XP055216559, ISSN: 1672-7681, DOI: 10.1038/cmi.2012.39, page 38 - page 39

KUNZMANN V. ET AL.: "Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 96, no. 2, 15 July 2000 (2000-07-15), pages 384-392, XP002276947, ISSN: 0006-4971, page 386 - page 389; figure 1

SJOUKJE J. C. VAN DER STEGEN ET AL.: "The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors", NATURE REVIEWS. DRUG DISCOVERY, vol. 14, no. 7, 1 July 2015 (2015-07-01), pages 499-509, XP055276028, GB ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd4597, page 500; figure 1, page 503

(57) Изобретение относится к композиции и способам лечения злокачественного новообразования или инфекционных заболеваний человека. Настоящее изобретение включает получение и введение гамма-дельта-Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен, костимуляторный сигнальный домен с сигнальным доменом CD3 дзета или без него. Экспрессия последовательности CAR, в котором отсутствует сигнальный домен CD3 дзета, в гамма-дельта-Т-клетках позволяет осуществлять терапию CAR-T in vivo, которые будут осуществлять цитотоксичность только клеток-мишеней, обеспечивая лиганды для активации гамма-дельта-Т-клеточного рецептора (TCR).

Область изобретения

Настоящая заявка относится к способам получения и применения гамма-дельта-Т-клеток ($\gamma\delta$ -Т-клеток), соответственно, применению гамма-дельта-Т-клеток для аллогенных или аутологичных реципиентов для лечения состояний, включающих вирусную инфекцию, грибковую инфекцию, протозойную инфекцию и злокачественное новообразование, в частности к применению $\gamma\delta$ -Т-клеток, модифицированных с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR). Изобретение также относится к способам получения $\gamma\delta$ -Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы, и детекции экспрессии CAR. Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтическому применению клеток, полученных способами, представленными в настоящем описании, в лечении заболеваний, таких как злокачественное новообразование и инфекционное заболевание.

Гамма-дельта-Т-лимфоциты представляют собой минорную субпопуляцию в периферической крови у людей (менее 10%). Гамма-дельта-Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор V γ 9V δ 2 (гамма 9 дельта 2), распознают эндогенный изопентил пирогосфат (IPP), гиперпродуцирующийся в злокачественных клетках в результате дисрегуляции пути мевалоната. Способность гамма-дельта-Т-лимфоцитов продуцировать избыток провоспалительных цитокинов, подобных ИФН-гамма, их мощная цитотоксическая эффекторная функция и МНС-независимое распознавание антигенов делает их важным уровнем иммунотерапии злокачественных новообразований. Показано, что гамма-дельта-Т-клетки способны уничтожать множество разных типов линий опухолевых клеток и опухоль *in vitro*, включая лейкоз, нейробластому и различные карциномы. Кроме того, показано, что гамма-дельта-Т-клетки могут распознавать и уничтожать множество различных дифференцированных опухолевых клеток спонтанно или после обработки различными бисфосфонатами, включая золедронат. Опухолевые клетки человека могут эффективно презентировать аминобисфосфонат и пирогосфомоноэфирные соединения гамма-дельта-Т-клеткам, индуцируя их пролиферацию и продукцию ИФН-гамма.

Стратегии аутологичной трансплантации гамма-дельта-Т-клеток используют для преодоления недостатков, ассоциированных с трансплантацией аллогенных стволовых клеток. Как часть таких способов аутологичной трансплантации, ранее описаны способы индукции и культивирования достаточных количеств гамма-дельта-Т-клеток для аутологичного вызывания терапевтического эффекта, например, в US 2002/0107392. Однако, аутологичные стратегии лечения имеют ряд недостатков.

Таким образом, необходимы альтернативные и/или улучшенные стратегии лечения с использованием гамма-дельта-Т-клеток.

Сущность изобретения

Сложность идентификации и экспансии опухолеспецифических клонов Т-клеток привела к разработке химерных антигенных рецепторов (CAR). В CAR используют моноклональные антитела для перенаправления специфичности Т-клеток против целевых антигенов независимо от распознавания TCR-МНС/пептид. К настоящему времени во множестве клинических исследований используют CAR-трансдукцию альфа-бета ($\alpha\beta$)-Т-клеток, в то время как никто не осуществлял подобное с использованием гамма-дельта ($\gamma\delta$)-Т-клеток/лимфоцитов. Авторы настоящего изобретения определили, что предпочтительной может быть CAR-трансдукция гамма-дельта-Т-клеток/лимфоцитов.

Как указано выше, большинство $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов в периферической крови имеют изотип Vgamma9 Vdelta2. $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор Vgamma9 Vdelta2, распознают эндогенный изопентил пирогосфат (IPP), гиперпродуцируемый в злокачественных клетках в результате дисрегуляции пути мевалоната. Авторы настоящего изобретения считают, что способность гамма-дельта ($\gamma\delta$) Т-лимфоцитов продуцировать избыток провоспалительных цитокинов, подобных ИФН-гамма, их мощная цитотоксическая эффекторная функция и их МНС-независимое распознавание антигенов делает их ключевым элементом иммунотерапии злокачественных новообразований.

Осуществляли ограниченные исследования *in vitro* для изучения способности CAR повышать активность гамма-дельта ($\gamma\delta$)-Т-клеток (Rischer et al., 2004, Deniger et al., 2013). Однако, такие исследования не раскрыли потенциал использования CAR-модифицированных $\gamma\delta$ -Т-клеток от одного индивидуума для осуществления терапии второго индивидуума (аллогенное использование). Кроме того, в таких исследованиях не выявлен способ, которым можно получать CAR-модифицированные $\gamma\delta$ -Т-клетки таким образом, чтобы обеспечивать "настраиваемый" ответ.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, где химерный антигенный рецептор имеет специфичность связывания для антигена заболевания.

Соответственно, модифицированная $\gamma\delta$ -Т-клетка может содержать химерный антигенный рецептор, где химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен со специфичностью связывания для антигена заболевания, шарнирный домен, трансмембранный домен и

- (i) одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и нефункциональный активационный домен/сигнальный домен CD3 дзета (настраиваемый CAR), или
- (ii) активационный домен/сигнальный домен CD3 дзета, или
- (iii) одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и функциональный активационный

домен/сигнальный домен CD3 дзета.

В вариантах осуществления модифицированная $\gamma\delta$ -Т-клетка может содержать химерный антигенный рецептор, где химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен со специфичностью связывания для антигена заболевания, шарнирный домен, трансмембранный домен, одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и нефункциональный домен активации CD3 дзета.

В вариантах осуществления модифицированная $\gamma\delta$ -Т-клетка может содержать нефункциональный активационный домен CD3 дзета, что обеспечивается отсутствием активационного домена CD3 дзета в химерном антигенном рецепторе.

Соответственно, в вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетка экспрессирует TCR любой пары гамма-дельта-TCR из V γ 1-9 и V δ 1-8. В вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетка имеет подтип V γ 9V δ 2.

Второй аспект настоящего изобретения относится к модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетке по первому аспекту изобретения для применения в лечении состояний, таких как злокачественное новообразование или инфекции.

Третий аспект настоящего изобретения относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR состоит из внеклеточного антигенраспознающего домена, такого как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), шарнирного и трансмембранного домена, одной или нескольких костимуляторных сигнальных областей и, необязательно, активационного домена CD3 дзета. Подходящий домен CD3 дзета также можно считать активационным доменом или передачи сигнала CD3 дзета. Что касается нефункционального домена CD3 дзета, считают, что передача сигнала не обеспечивается или обеспечивается в недостаточной степени для вызывания активации.

В вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать химерный антигенный рецептор (CAR), где CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, шарнирный домен, трансмембранный домен и

(i) одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и нефункциональный домен активации CD3 дзета, или

(ii) домен активации CD3 дзета, или

(iii) одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и активационный домен CD3 дзета.

В вариантах осуществления нефункциональный активационный домен CD3 дзета можно получать благодаря отсутствию активационного домена CD3 дзета в химерном антигенном рецепторе.

Как указано выше, терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) является способом иммунотерапии, где Т-клетки генетически конструируют с использованием синтетического рецептора для распознавания и направленного воздействия на конкретный антиген или белок (мишень клеточной поверхности), независимо от ограничения по HLA.

Как правило, "классические" CAR 2-го или 3-го поколения конструируют модульным способом, как правило, содержащими внеклеточный домен, связывающий мишень, как правило, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), шарнирную область, трансмембранный домен, заякоривающий CAR в мембране клетки, и один или несколько внутриклеточных сигнальных доменов. Сигнальный домен, как правило, состоит из элементов активационного домена цепи CD3 дзета (CD3 ζ), обеспечивающего TCR-подобную стимуляцию (обозначаемую как сигнал 1), и элементов сигнальных остатков CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD244 или ICOS, обеспечивающих костимуляторные сигналы (обозначаемую как сигнал 2). В таких типичных CAR-экспрессирующих Т-клетках сигнал 1 и сигнал 2 необходимы для освобождения Т-клеток из состояния покоя. В отсутствие дополнительных костимуляторных сигналов (сигнал 2) наличия сигнала 1 в отдельности недостаточно для активации Т-клеток, и оно может делать их неотвечающими/энергичными. Таким образом, для индукции активации Т-клеток необходимо наличие обоих сигналов.

В клинических испытаниях с использованием CAR-экспрессирующих Т-клеток (CAR-T) показан подход CAR-T, и в 2014 году терапия CAR Т-клетками против CD19 одобрена FDA США. Хотя в исследованиях CAR-T наблюдают впечатляющие доли отвечающих, в настоящее время технология ограничена отсутствием истинных антигенов заболевания, т.е. антигенов, экспрессируемых лишь в клетках при заболевании, но не в здоровых клетках. К настоящему времени основная часть способов терапии CAR-T направлена на CD19. CD19 экспрессируется в В-клеточных злокачественных опухолях, но также экспрессируется на здоровых В-клетках. В этом контексте CD19-направленная терапия CAR-T может быть переносимой, однако пациенты имеют повышенный риск инфекций, т.к. их иммунная система в значительной степени скомпрометирована. Это не характерно для большинства других типов опухолей, особенно солидных опухолей, когда направленное воздействие на здоровую ткань будет непереносимым.

Дополнительным ограничением способов терапии CAR-T, исследованных к настоящему времени в клинических условиях, является рецидивирование по причине развития резистентности к терапии CAR-T. Это наблюдали в клинических испытаниях CD19-направленной терапии CAR-T, что является результатом появления злокачественных клеток, демонстрирующих альтернативный сплайсинг и/или вредо-

носные мутации гена мишени (CD19). Эти "ускользающие варианты" приводят к модифицированному белку мишени (CD19), нераспознаваемому scFv-частью CAR (одновременно сохраняя достаточную часть функциональности гена). Это является ограничением любого подхода с использованием одной мишени; что касается пролиферирующих клеток, т.е. злокачественного новообразования, это накладывает положительное давление селекции для устранения экспрессии антигена-мишени.

В настоящем изобретении используют природную способность $\gamma\delta$ -Т-клеток специфически распознавать находящиеся в состоянии стресса/больные клетки (т.е. злокачественные клетки или инфицированные клетки) в комбинации с мощной, направленной на антиген цитотоксической эффекторной функцией технологии химерного антигенного рецептора. $\gamma\delta$ -Т-клетка, трансдуцированная с использованием классического CAR, проявляет усиленные эффекторные функции против клеток-мишеней, экспрессирующих CAR-запускающий антиген, и повышенное персистирование *in vivo*. Авторы настоящего изобретения считают, что CAR-модифицированные гамма-дельта-Т-клетки могут делать злокачественные или инфицированные клетки, которые могут быть резистентными к нормальным $\gamma\delta$ -Т-клеткам, восприимчивыми к опосредованному $\gamma\delta$ -Т-клетками уничтожению. Соответственно, не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения считают, что $\gamma\delta$ -Т-клетка, коэкспрессирующая классический CAR, будет способна распознавать и, таким образом, направлять к цитолизу, клетки, экспрессирующие фосфоантигены или антиген, являющийся мишенью CAR, таким образом, увеличивая диапазон клеток, которые можно подвергать направленному воздействию таких модифицированных гамма-дельта-Т-клеток. Также считают, что ограничение существующих способов терапии CAR-Т, развитие резистентности по причине положительной селекции злокачественных клеток, не экспрессирующих антиген CAR, будет ослабляться CAR-экспрессирующими $\gamma\delta$ -Т-клетками, которые будут иметь двойную антигенную специфичность. Соответственно, такие CAR-модифицированные гамма-дельта-Т-клетки будут вводить аллогенному индивидууму, т.е. индивидууму, иному, чем тот, из которого исходно получали гамма-дельта-Т-клетки.

Как будет понятно специалистам в этой области, эффекты, достигаемые посредством обеспечения $\gamma\delta$ -Т-клетки последовательностями CAR и их использования, как представлено в настоящем описании, можно соответствующим образом достигать посредством обеспечения $\gamma\delta$ -Т-подобной клетки последовательностью CAR. Соответственно, $\gamma\delta$ -Т-подобная клетка может включать любую клетку, генетически сконструированную для экспрессии функционального $\gamma\delta$ -TCR. Например, $\alpha\beta$ -Т-клетку или NKT-клетку, генетически сконструированную для экспрессии функционального $\gamma\delta$ -TCR, таким образом, перенаправляющую специфичность клетки на определенные антигены $\gamma\delta$ -TCR, такие как IPP, в отношении TCR Vgamma9Vdelta2.

Считают, что общепринятая технология CAR-Т обременена рядом проблем с безопасностью, препятствующих успеху подхода при использовании *in vivo*, а именно "специфичной для мишени", но "внеопухолевой" токсичности, по причине экспрессии CAR-запускающего антигена на здоровых тканях. Варианты осуществления относятся к CAR-модифицированной гамма-дельта-Т-клетке, в которой домен CD3 ζ удален или сделан нефункциональным, одновременно сохраняя функцию МНС-независимого распознавания антигена (например, с помощью scFv) и костимуляторную функцию (с помощью одного или нескольких костимуляторных доменов).

В вариантах осуществления нефункциональный или неактивный домен CD3 дзета неспособен обеспечивать сигнал 1, как представлено в настоящем описании. Соответственно, настоящее изобретение может относиться к модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетке, содержащей химерный антигенный рецептор, где химерный антигенный рецептор содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен со специфичностью связывания для ассоциированного с заболеванием антигена, шарнирный домен, трансмембранный домен, одну или несколько костимуляторных сигнальных областей, и в нем отсутствует функциональный домен, обеспечивающий сигнал 1. Как будет понятно специалисту в этой области, сигнал 1 может обеспечивать домен CD3 дзета или подобный ему.

В таких вариантах осуществления CAR неспособен обеспечивать сигнал 1, одновременно сохраняя функцию сигнала 2 благодаря наличию одного или нескольких костимуляторных доменов. Предпочтительно, это приводит к неспособности CAR вызывать цитотоксическую эффекторную функцию в отсутствие сигнала TCR/сигнала 1. Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что, хотя этот дизайн CAR будет неэффективным в поликлональной популяции $\alpha\beta$ -Т-клеток по причине отсутствия сигнала 1, экспрессия такого CAR в подвергнутой экспансии *in vitro* популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток обеспечивает получение эффективного CAR при активации $\gamma\delta$ -TCR. Варианты осуществления могут относиться к CAR-экспрессирующей $\gamma\delta$ -Т-клетке изотипа V γ 9V δ 2, в которой домен CD3 ζ , CAR удален или сделан неактивным или нефункциональным. В таких вариантах осуществления сигнал 1 может обеспечиваться фосфоантигенной стимуляцией TCR V γ 9V δ 2. Соответственно, в таких вариантах осуществления только в присутствии фосфоантигенов CAR могут вызывать клеточно-опосредованный цитолиз и продукцию цитокинов. Соответственно, в таком дизайне CAR можно использовать определенную специфичность Т-клеток V γ 9V δ 2 в отношении фосфоантигенов (присутствующих

только на клетках, находящихся в состоянии стресса), и она делает возможной активацию, которую можно настраивать посредством передачи сигнала через Т-клеточный рецептор.

В вариантах осуществления предполагают, что гамма-дельта-Т-клетку по настоящему изобретению, в частности клетку V γ 9V δ 2, или популяции гамма-дельта-Т-клеток можно модифицировать так, чтобы они содержали химерный антигенный рецептор, направляющий гамма-дельта-Т-клетку против конкретного антигена или белка (мишени поверхности клетки (где мишени поверхности клетки могут включать лиганды, обнаруживаемые в конкретном клеточном окружении (т.е. опухолевом окружении), но не связываемые с клеткой-мишенью)). В вариантах осуществления мишень поверхности клетки можно соединять с клеткой-мишенью. Это позволяет располагать гамма-Т-клетку с химерным антигенным рецептором (CAR) вблизи клетки-мишени, в частности, клетки-мишени, включающей мишень поверхности клетки, и запускать активацию гамма-дельта-Т-клетки. Такие гамма-Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR) образуют аспект настоящего изобретения.

В вариантах осуществления антигенраспознающий домен конструкции CAR может являться одноцепочечным варибельным фрагментом (ScFv) или доменом участка связывания антигена (Fab), выбранным из библиотек, специфически распознающих и способных связываться с мишенью поверхности клетки или природным лигандом, вовлекающим его когнатный рецептор в отношении клетки-мишени.

В вариантах осуществления антиген заболевания, связанный химерным антигенным рецептором, как представлено в настоящем описании, может являться мишенью поверхности клетки, ассоциированным с заболеванием антигеном, например, антигеном, ассоциированным с состоянием заболевания, например, при злокачественном новообразовании или инфекции, где ассоциированный с заболеванием антиген может находиться на клетке или вблизи клетки, подлежащей направленному воздействию $\gamma\delta$ -Т-клетки, таким образом, что $\gamma\delta$ -Т-клетка может направленно воздействовать на указанную клетку, подлежащую направленному воздействию. В вариантах осуществления мишень поверхности клетки может являться антигеном, обнаруживаемым при клеточной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции или протозойной инфекции, или может являться активным или инактивированным вирусным фрагментом, пептидом, белком, антигенным сегментом или т.п. из такого вируса. Альтернативно, мишень поверхности клетки может включать опухолеспецифический антиген и/или опухолеассоциированный антиген.

В вариантах осуществления CAR, например ScFv, представленный на внеклеточной поверхности гамма-дельта-Т-клетки, можно соединять с помощью спейсера или подвергать слиянию непосредственно с трансмембранным доменом, пересекающим мембрану клетки, и соединять с внутриклеточным сигнальным доменом.

В вариантах осуществления CAR, например ScFv, можно подвергать слиянию с помощью трансмембранного домена с CD3 дзета (получая сигнал 1) и костимуляторным иммунорецепторным тирозиновым активирующим мотивом (ITAM) (сигнал 2).

Считают, что, как правило, CAR перенаправляет специфичность Т-клеток в отношении мишени поверхности клетки и позволяет преодолевать проблемы, связанные с Т-клеточной толерантностью. Как будет понятно, как правило, мишень поверхности клетки можно выбирать так, чтобы обеспечивать направленное воздействие гамма-дельта-Т-клетки на интересующие клетки, например, опухолевые клетки или инфицированные вирусом клетки, вместо здоровых клеток.

Как будет понятно, например, на целевой опухолевой клетке и нормальной ткани, где экспрессируется мишень поверхности клетки, технология химерного антигенного рецептора, хотя и высокоактивная, может быть восприимчива к "специфичной для мишени, внеопухолевой токсичности".

Как указано выше, в системах таргетинга CAR, в которых в химерном антигенном рецепторе компоненты сигнала 1 и сигнала 2 подвергают слиянию в единую конструкцию, они могут обеспечивать очень мощные и чувствительные, зависящие от мишени эффекторные ответы. Однако, такие системы таргетинга CAR нельзя настроить на уровень мишени поверхности клетки, экспрессируемой на клетке-мишени.

Считают, что опосредованное TCR V γ 9V δ 2 распознавание обеспечивает дополнительную CAR-независимую стратегию таргетинга, позволяющую "настраивать" ответ CAR таким образом, что стимулирующий сигнал от CAR будет транслироваться в функциональный ответ только в отношении стимуляции TCR V γ 9V δ 2. Это делает возможным, например, направленное воздействие на широкий диапазон опухолевых мишеней (мишеней связанного со стрессом пути HMBPP/IPR) с использованием дополнительной мишени поверхности клетки посредством CAR-модифицированной гамма-дельта-Т-клетки. Эти CAR-модифицированные гамма-дельта-Т-клетки по изобретению обеспечивают настраиваемый ответ, где в случае дозы опухолеассоциированного антигена, пирогосфата/фосфоната (лекарственного средства) генерируется субоптимальный ответ на силу сигнала 1 со способностью обеспечивать синергию с сигналом 2 из специфического "костимуляторного CAR".

В вариантах осуществления можно использовать анализы активации *in vitro* для определения относительных доз лекарственного средства для оптимального "настраиваемого ответа", чтобы сделать возможной максимальную дискриминацию между целевыми опухолевыми линиями, экспрессирующими

высокие уровни опухолеассоциированного антигена (более высокая сила сигнала 2) и соответствующими нетрансформированными клетками, экспрессирующими более низкие уровни (генерирующие более низкую силу сигнала). В вариантах осуществления можно использовать множество CAR для направленного воздействия на различные типы опухолей/клеток. Такие многочисленные CAR можно предоставлять на одной гамма-дельта-Т-клетке, в частности клетке V γ 9V δ 2, или можно получать множество гамма-дельта-Т-клеток, в частности, клеток V γ 9V δ 2, с различными CAR на каждой клетке (лечебный банк) и использовать соответствующую CAR-гамма-дельта-клетку для конкретной опухоли и/или типа клеток.

Считают, что экспрессия гетеродимерного $\gamma\delta$ -TCR на гамма-дельта-Т-клетке, не распознающей молекулы МНС, означает, что такие гамма-дельта-клетки способны осуществлять мощный эффекторный ответ. В частности, такие клетки (например, V γ 9V δ 2) могут быть высокоцитотоксичными, продуцируя высокие уровни Th1-цитокинов, включая ИФН γ и ФНО.

В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетка может дополнительно содержать ингибиторный химерный антигенный рецептор (ICAR), где ICAR минимизирует активацию клеток, не являющихся мишенями, например неопухолевых клеток, где мишень поверхности клетки является опухолеассоциированным, но не опухолеспецифическим антигеном. Для минимизации, например, такой "специфической для мишени, внеопухолевой токсичности" наличие второго антигена на клетке, не являющейся мишенью, который может быть связан ингибиторным CAR, будет вызывать сигнал, обеспечиваемый любым связыванием CAR с мишенью поверхности клетки, подлежащей ингибированию.

В вариантах осуществления гамма-дельта-клетка может содержать дополнительный CAR, способный связываться с другим антигеном, присутствующим на клетке-мишени, или с растворимыми сигнальными белками, присутствующими, например, в окружении опухоли или инфицированной вирусом клетки, например, ИЛ-12, который может стимулировать активацию и рекрутирование гамма-дельта-Т-клеток.

В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетка, по меньшей мере, с первым химерным антигенным рецептором и, необязательно, по меньшей мере, первым ингибиторным химерным антигенным рецептором, является Т-клеткой V γ 9V δ 2.

Обеспечение гамма-дельта-Т-клетки химерным антигенным рецептором можно осуществлять способами, известными в этой области для обеспечения Т-клеток химерными антигенными рецепторами.

Таким образом, четвертый аспект изобретения относится к способу получения CAR-модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетки, где нуклеиновую кислоту по третьему аспекту встраивают/трансдуцируют в $\gamma\delta$ -Т-клетку для генетической модификации $\gamma\delta$ -Т-клетки. Соответственно, в способе можно использовать лентивирусную конструкцию CAR. Соответственно, способом одновременно трансдуцируют конструкцию CAR в клетку и подвергают селективной экспансии CAR-трансдуцированные $\gamma\delta$ -Т-клетки.

Считают, что варианты осуществления способа позволяют получать "TCR-настраиваемый" или "костимуляторный" CAR.

Как указано выше, в таких вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие костимуляторный CAR, будут активироваться только в присутствии фосфоантигенов (присутствующих на поверхности клеток при инфицировании или злокачественном новообразовании), но не здоровых клеток. Считают, что это позволит преодолеть "специфичную для мишени", но "внеопухолевую" токсичность, наблюдаемую при общепринятых способах терапии CAR-Т. В таких вариантах осуществления считают, что активность костимуляторного CAR можно настраивать посредством сопутствующей передачи сигнала TCR через $\gamma\delta$ -Т-клеточный рецептор.

В вариантах осуществления третьего аспекта изобретения последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая CAR, может включать лидерную последовательность, которая будет направлять белок к мембране клетки (такую как секреторный сигнал GMCSF-R или CD8), антигенсвязывающий домен, шарнирный домен и трансмембранный домен, одну или несколько костимуляторных сигнальных областей и наличие или отсутствие сигнального домена CD3 дзета. Как представлено в настоящем описании, отсутствие сигнального домена CD3 дзета можно обеспечивать с помощью неактивного или нефункционального домена CD3 дзета.

В вариантах осуществления нуклеиновой кислоты, включающей домен CD3 дзета, CAR считают "классическим" или "ненастраиваемым". В вариантах осуществления, в которые не включен домен CD3 дзета, CAR является "костимуляторным" или "TCR-настраиваемым" CAR.

В вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая "классический" или "ненастраиваемый" CAR может содержать scFv, распознающий В-клеточный белок CD19. В конкретных вариантах осуществления "классический" CAR может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1, которая, соответственно, может кодировать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2-6.

В вариантах осуществления, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует "костимуляторный" или "TCR-настраиваемый" CAR, нуклеиновая кислота может содержать scFv, распознающий В-клеточный белок CD19. В конкретных вариантах осуществления последовательность нуклеиновой ки-

слоты может содержать нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 7, которая может кодировать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-11.

В вариантах осуществления нуклеиновая кислота может кодировать внеклеточный антигенсвязывающий домен, являющийся единственным scFv, специфически распознающим и способным связываться с мишенью поверхности клетки. Соответственно, в вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, предпочтительно scFv, распознает и связывается с B-клеточным антигеном CD19, ранее описанным клоном, известным как FMC63 (Nicholson IC et al., 1997).

В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен CAR связывается с мишенью поверхности клетки, опухолевым антигеном и/или опухолеассоциированным антигеном. В вариантах осуществления мишень поверхности клетки может являться антигеном, обнаруживаемым при клеточной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции, протозойной инфекции или вирусной инфекции, или может являться активным или инактивированным вирусным фрагментом, пептидом, белком, антигенным сегментом или т.п. из такого вируса.

Соответственно, в вариантах осуществления настоящего изобретения внеклеточный антигенсвязывающий домен может распознавать и связываться с опухолеспецифическим антигеном, присутствующим только на опухолевых клетках, но не на любых других клетках, и/или опухолеассоциированным антигеном, присутствующим на некоторых опухолевых клетках, а также некоторых нормальных клетках. Такие опухолеспецифические антигены могут включать, в качестве неограничивающих примеров, CD19, EGFRvIII, ErbB2, GM3, GD2, GD3, CD20, CD22, gp100, NY-ESO-1, карбоангидразу IX, WT1, раково-эмбриональный антиген, CA-125, MUC-1, MUC-3, эпителиальный опухолевый антиген и антиген MAGE-типа, включая MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2, или LAGE1 или вирусные антигены или их комбинации или посттрансляционно модифицированные белки, которые могут включать, в качестве неограничивающих примеров, карбамоилированные и цитруниллированные белки.

В вариантах осуществления антиген поверхности клетки может являться лигандом иммунных контрольных точек, например PD-L1.

В вариантах осуществления антигенсвязывающий домен может являться внеклеточной частью рецептора поверхности клетки, который затем подвергают слиянию с трансмембранными и костимуляторными доменами, как описано выше.

В вариантах осуществления трансмембранный домен CAR может содержать один или несколько трансмембранных доменов CD3, или CD4, или CD8, или CD28.

В вариантах осуществления костимуляторная сигнальная область CAR может содержать один или несколько внутриклеточных доменов CD28, CD137 (4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD244, NKG2D.

Соответственно, $\gamma\delta$ -Т-клетки для использования в изобретении можно получать из моноклеарных клеток крови (ВМС) или биоптатов злокачественных новообразований или инфицированных тканей. Соответственно, ВМС можно получать способом центрифугирования при любой плотности, известным специалистам в этой области, из цельной крови, лейкоцитарного материала или пуповинной крови (UCB). Способы центрифугирования в градиенте плотности могут включать, в качестве неограничивающих примеров, градиент фиколла или Lymphoprep. Кроме того, выделение клеток можно осуществлять посредством активируемой магнитным полем сортировки клеток (MACS) или активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS).

Соответственно, в вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки можно выращивать из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC), моноклеарных клеток пуповинной крови (CBMC) или клеток, полученных из ткани, в химически определенной среде для культивирования, которая может включать, в качестве неограничивающих примеров, среды RPMI, TexMACS, IMDM, CTS OpTmizer или AIM-V. Среда для культивирования клеток можно дополнять, например, эмбриональной телячьей сывороткой (FCS), сывороткой АВ человека, аутологичной плазмой, тромбоцитарным лизатом человека или химически определенными заменителями сыворотки. Кроме того, сыворотку/плазму/заменитель добавляют в культуральный раствор в количестве от 0,1 до 20 об./об. %.

Соответственно, в вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки подтипа Vgamma9 можно селективно выращивать из PBMC, или CBMC, или клеток, полученных из ткани, в химически определенной среде для культивирования, включающей ИЛ-2, сыворотку/плазму, и подвергаемую активации аминокислотом, таким как золедроновая кислота. Можно использовать множество изоформ $\gamma\delta$ -TCR из любой пары гамма-дельта-TCR из V γ 1-9 и V δ 1-8. Специалистам в этой области будет понятно, что условия культивирования, в частности, способ активации TCR, будут определять изоформ, подлежащий экспансии. В качестве примера, δ 2-Т-клетки активируют и выращивают с помощью аминокислотом и т.п., в то время как δ 1-Т-клетки можно предпочтительно выращивать с использованием лигандов NKG2D, таких как MICA или MICB. Выделенные PBMC/CBMC могут являться свежесекретированными или криоконсервированными перед экспансией в культуре.

Бисфосфонат является аналогом пирофосфорной кислоты и соединением, в котором О (атом кисло-

рода) скелета пирофосфорной кислоты Р-О-Р замещен С (атомом углерода) (Р-С-Р). Как правило, его используют в качестве терапевтического лекарственного средства от остеопороза. Аминобисфосфонат относится к соединению, имеющему N (атом азота) в бисфосфонате. Например, аминобисфосфонат, используемый в настоящем изобретении, в частности не ограничен; его примеры включают памидроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат, алендроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат, и золедроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат. Концентрация аминобисфосфонатов, предпочтительно, составляет от 1 до 30 мкМ в случае памидроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата, от 1 до 30 мкМ в случае алендроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата и от 0,1 до 10 мкМ в случае золедроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата. В этом случае в качестве примера добавляют 5 мкМ золедроновой кислоты.

Соответственно, цитокин ИЛ-2 также можно включать в количестве от 50 до 2000 МЕ/мл, более предпочтительно - от 400 МЕ/мл до 1000 МЕ/мл. Соответственно, культуру также можно дополнять одним или несколькими цитокинами, такими как ИЛ-15, ИЛ-18 или ИЛ-21 в дозе от 50 до 2000 МЕ/мл.

Соответственно, предоставление антигена с помощью аминобисфосфоната можно заменять синтетическими антигенами, такими как изопентенил пирофосфат (IPP), фосфостим/бромгидрин пирофосфат (BrHPP), (E)-4-гидроксиг-3-метил-бут-2-енил пирофосфат (HMBPP) или DMAPP. Антигенную стимуляцию также можно обеспечивать посредством сокультивирования с облученными и/или искусственными антигенпрезентирующими клетками (aAPC).

Добавление таких компонентов обеспечивает культуральное окружение, делающее возможной положительную селекцию гамма-дельта-Т-клеток, как правило, при 70-100% от количества всех клеток в образце культуры.

Экспансию $\gamma\delta$ -Т-клеток также можно стимулировать одним или несколькими антителами против CD3, гамма-дельта-TCR, CD28 и CD137. Они могут являться растворимыми, связанными с планшетом или конъюгированными с подходящими частицами, такими как Dynabeads или MACSibeads.

$\gamma\delta$ -Т-клетки можно выращивать и подвергать экспансии с использованием любого из описанных выше способов.

Соответственно, CAR-экспрессирующие клетки можно подвергать селективной экспансии с использованием рекомбинантного белка, распознаваемого CAR, например, рекомбинантной химеры CD19-Fc или рекомбинантного CD19 в случае CD19-направленного CAR. Он может быть связан с планшетом, растворимым или располагаться на подходящих частицах, таких как Dynabeads или MACSibeads. $\gamma\delta$ -Т-клетки любого изотипа можно подвергать селективной экспансии в течение периода времени по меньшей мере 7 дней, более предпочтительно 14 дней. Соответственно, период культивирования может составлять приблизительно 9 дней или более для получения больших количеств в значительной степени очищенных популяций CAR-экспрессирующих гамма-дельта-Т-клеток. $\gamma\delta$ -Т-клетки можно подвергать экспансии с использованием антигенов TCR или лигандов NKG2D, таких как MICA или MICB. Выделенные PBMC могут являться свежеевыделенными или криосохраненными перед экспансией в культуре. Выращенные $\gamma\delta$ -Т-клетки можно подвергать криопротекции и восстанавливать позднее для дальнейшей экспансии в культуре.

Способ генетической модификации $\gamma\delta$ -Т-клетки для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей конструкцию CAR, может включать любой способ, известный специалистам в этой области. Подходящие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, вирусную трансдукцию с использованием лентивирусов/ретровирусов/аденовирусов, клеточную трансфекцию посредством электропорации, реагенты для трансфекции на основе липидов, наночастицы, способы трансфекции на основе хлорида кальция или полученных из бактерий транспозонов.

В вариантах осуществления, когда можно использовать лентивирус/ретровирус/аденовирус для трансдукции, можно включать химические реагенты, как будет понятно специалистам в этой области, для усиления этого способа. Они включают, в качестве неограничивающих примеров, гексадиметрин бромид (полибрен), рекомбинантный фибронектин человека (такой как RetroNectin-Takara Clontech) и усилитель вирусной трансдукции TransPlus (Stem cell Advancements).

Соответственно, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, можно встраивать в PBMC, CBMC или подвергнутые экспансии, полученные из ткани $\gamma\delta$ -Т-клетки в любой момент времени в течение периода культивирования.

Определение эффективности трансдукции и экспрессии конструкций CAR с использованием $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать любой способ, известный специалистам в этой области, и может включать, в качестве неограничивающих примеров, количественную ПЦР и способы детекции на основе антител, такие как проточная цитометрия или вестерн-блоттинг.

Один из аспектов изобретения относится к способу детекции классического CAR и костимуляторного CAR с использованием по меньшей мере одной пары праймеров, выбранных из группы SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, и SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 15.

Прямой (SEQ ID NO: 12)	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'
Обратный (SEQ ID NO: 13)	5'-GGAGTTTCTTTCTGCCCCGT-3'
Прямой (SEQ ID NO: 14)	5'-CTGTAGCTGCCGATTTCCAGA-3'
Обратный (SEQ ID NO: 15)	5'-CATCGTACTCCTCTCTTCGTCC-3'

Соответственно, указанный способ позволяет осуществлять количественную детекцию классического CAR и костимуляторного CAR. Соответственно, указанный способ делает возможным различение классического CAR и костимуляторного CAR.

В одном из вариантов осуществления можно использовать проточную цитометрию, например, можно использовать антитело против идиотипа, конъюгированное с флуорохромом или антигеном, который можно определять с использованием вторичного реагента, такого как флуоресцентно меченый стрептавидин. В вариантах осуществления реагент, используемый для детекции CAR, может являться химерным белком, содержащим рекомбинантный белок, распознаваемый CAR, слитый с фракцией Fc антитела млекопитающего, например, химерой CD19-Fc. Его можно определять с использованием антитела против Fc-части белка. Эти реагенты можно комбинировать с конъюгированными с флуорохромом антителами против иммунофенотипических маркеров, которые могут включать, в качестве неограничивающих примеров, Vgamma9, CD3, гамма-дельта-TCR, альфа-бета-TCR, CD4, CD8 и CD56.

Способы лечения с использованием CAR-модифицированных гамма-дельта-клеток

В вариантах осуществления второго аспекта изобретения $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие настраиваемый/костимуляторный CAR или классический CAR, можно вводить пациенту для лечения заболевания, такого как вирусная, бактериальная, грибковая или протозойная инфекция или злокачественное новообразование.

В вариантах осуществления $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие настраиваемый/костимуляторный CAR, можно вводить индивидууму совместно с аминокислотой или его заменителем, где заменитель способен повышать уровни фосфоантигенов, присутствующих на клетках-мишенях, посредством дисрегуляции физиологического пути мевалоната. Считают, что такое совместное введение может являться предпочтительным для использования распознавания TCR V γ 9V δ 2, чтобы сделать возможным "настраиваемое с помощью лекарственного средства" титрование силы сигнала 1 от активированного фосфоантигеном $\gamma\delta$ -TCR.

Настраиваемый/костимуляторный CAR может обеспечивать новый сигнал 2, ограниченный клетками с подвергаемым воздействию CAR, ассоциированным с заболеванием антигеном.

В конкретных вариантах осуществления в случае указанного ассоциированного с заболеванием антигена дозу аминокислоты или его заменителя можно адаптировать для получения субоптимальной силы сигнала 1, для синергического действия с сигналом 2 от конкретного настраиваемого/костимуляторного CAR. Активацию *in vitro* можно использовать для оценки соответствующих доз лекарственного средства для оптимальной "настройки", чтобы сделать возможным максимальное различие линий клеток, экспрессирующих ассоциированный с заболеванием антиген, экспрессирующих высокие уровни антигена (более высокая сила сигнала 2), и нетрансформированных клеток, экспрессирующих более низкие уровни (генерирующие более низкую силу сигнала 2). Например, совместно вводимый аминокислота, используемый в настоящем изобретении, может включать зольдроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат, аллендроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат и памидроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат.

Считают, что аллогенное использование гамма-дельта-Т-клеток по настоящему изобретению в терапии, где указанные гамма-дельта-клетки, в качестве которых используют CAR-модифицированные гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению, не рассматривают, как правило, по причине потенциальных проблем, связанных с опосредованным иммунной системой отторжением. Авторы настоящего изобретения считают, что гамма-дельта-Т-клетки, как правило, не вызывают реакцию "трансплантат против хозяина", и что выбор гамма-дельта-Т-клеток для аллогенной трансплантации будет позволять вводить Т-клетки реципиенту с минимальным риском реакции "трансплантат против хозяина". Считают, что т.к. гамма-дельта-Т-клетки не являются МНС-рестрицированными, аллогенная трансплантация будет эффективной терапией, где гамма-дельта-Т-клетки способны направлять клетки к цитолизу независимо от гаплотипа МНС. В свете отсутствия распознавания МНС-презентированных антигенов гамма-дельта-Т-клетками, авторы настоящего изобретения считают, что риск GVHD будет минимизирован при аллогенном переносе высокой чистоты гамма-дельта-Т-клеток, в достаточной степени очищенных от других лейкоцитов, включая В-клетки и Т-клетки с альфа-бета-Т-клеточным рецептором (TCR). Кроме того, считают, что будет небольшая вероятность отторжения трансплантата по причине иммуносупрессивного состояния реципиента при конкретных состояниях заболевания, включая, в качестве неограничивающих примеров, пациентов с тяжелыми вирусными инфекциями, например, вирусом Эбола, ВИЧ и гриппа, а также пациентов с PTLN-EBV и другими типами злокачественных новообразований.

Как указано, предшествующие стратегии лечения включали удаление Т-клеток из крови донора, в

частности, периферической крови, с использованием отрицательной селекции или положительной селекции перед аллогенной трансплантацией стволовых клеток.

Настоящее изобретение относится к способу лечения, включающему: забор клеток у донора, обработку таких донорских клеток для получения достаточных количеств гамма-дельта-Т-клеток, аллогенных для реципиента, где указанная обработка включает стадию модификации гамма-дельта-Т-клеток для включения химерного антигенного рецептора таким образом, что модифицированные гамма-дельта-Т-клетки можно вводить аллогенным индивидуумам для вызывания терапевтического эффекта у реципиента.

В качестве примера, способ экспансии гамма-дельта-Т-клеток может включать выделение мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) из крови или лейкоцитарного материала с использованием центрифугирования в градиенте плотности. Выделенные РВМС можно подвергать криоконсервации перед экспансией в культуре, в то время как плазму коэкстрагируют и сохраняют в качестве аутологичного эксципиента для использования на последующих стадиях культивирования гамма-дельта-Т-клеток. В вариантах осуществления свежесыведенные РВМС (или восстановленные после криоконсервации) можно инокулировать в среды для выращивания, содержащие рекомбинантный ИЛ-2 человека (например, в концентрации до 1000 Ед./мл) и золедроновую кислоту (например, 5 мкМ). Популяцию $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов можно активировать и селективно подвергать пролиферации из РВМС посредством добавления золедроновой кислоты (день 0) и последующего включения ИЛ-2 в течение 14-дневного периода культивирования. Суспензию клеток можно подвергать серийной экспансии (как правило, при индексе разведения 1:2) в течение этого периода времени. Через 14 дней после начала культивирования клетки можно собирать и ресуспендировать в растворе лактата Рингера и HSA перед переносом в бутылку для инфузий, содержащую 100 мл физиологического раствора. Альтернативно, клетки можно подвергать криоконсервации для восстановления впоследствии.

В вариантах осуществления после экспансии гамма-дельта-Т-клеточный продукт соответствует следующим минимальным требованиям: более 80% всех клеток являются Т-лимфоцитами (CD3-положительными), гамма-дельта-Т-лимфоциты составляют 60% или более всей популяции Т-лимфоцитов (Vgamma9-положительные), NK-клетки составляют менее 25% всей популяции Т-лимфоцитов (CD3-отрицательные/CD56-положительные), цитотоксические Т-клетки составляют менее 10% всей популяции Т-лимфоцитов (CD3/CD8-положительные) и Т-хелперные клетки составляют менее 5% всей популяции Т-лимфоцитов (CD3/CD4-положительные). В вариантах осуществления популяции клеток, удовлетворяющих этим требованиям, можно использовать в качестве исходного материала для получения банков аллогенных клеток высокой частоты, которые должны содержать более 99% гамма-дельта-Т-клеток.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения гамма-дельта-Т-клеток, аллогенных для второго индивидуума, включающую стадии:

получения образца гамма-дельта-Т-клеток из первого индивидуума;

культивирования гамма-дельта-Т-клеток, чтобы сделать их подходящими для введения второму индивидууму, где гамма-дельта-Т-клетки модифицируют для получения CAR-модифицированных гамма-дельта-Т-клеток.

В вариантах осуществления стадия получения может включать стадию сбора гамма-дельта-Т-клеток из первого индивидуума. Можно осуществлять забор у донора, где донор не имеет текущих выявленных нарушений состояния здоровья. Соответственно, реципиент может являться позвоночным, например, млекопитающим, например человеком, или коммерчески важным домашним скотом, исследовательским животным, лошадью, коровой, козой, крысой, мышью, кроликом, свиньей и т.п. В вариантах осуществления первый и второй индивидуумы могут являться человеком. Как будет понятно, в контексте настоящего изобретения первый индивидуум является донором, из которого получают гамма-дельта-Т-клетки, и клетки используют в аллогенном лечении другого, второго индивидуума (реципиента). Соответственно, первый индивидуум имеет предзаболевание. В рамках изобретения термин "предзаболевание" охватывает абсолютный термин "здоровый", "отсутствие заболевания", "и относительный термин градуирования потенциального прогрессирования заболевания", "здоровее, чем" или "менее пораженный, чем" после заболевания. Так как "предзаболевание" можно определять по времени перед постановкой индивидууму диагноза заболевания, первый индивидуум может быть здоровым в его абсолютном термине или может уже иметь заболевание, где заболевание еще не манифестировало само по себе или не диагностировано или определено. В вариантах осуществления способ может включать стадию культивирования гамма-дельта-Т-клеток, полученных из первого индивидуума, чтобы сделать гамма-дельта-Т-клетки подходящими для введения второму индивидууму.

В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетки можно собирать из периферической крови или мононуклеарных клеток периферической крови, полученных после афереза или лейкоцитарного афереза или из пуповинной крови. При экспансии ex vivo гамма-дельта-Т-клеток из периферической крови будут преимущественно получать гамма-дельта-Т-клетки фенотипа V γ 9V δ 2 при активации фосфоантигенами или аминокислотами. Использование пуповинной крови в качестве исходного материала для экспан-

сии *ex vivo* делает возможной селективную экспансию нескольких подтипов клеток с Т-клеточным рецептором (TCR) в зависимости от активирующего антигена. Эти изотипы TCR могут включать любые пары гамма-дельта-TCR из V γ 1-9 и V δ 1-8, в качестве неограничивающих примеров, варианты TCR V δ 1, V δ 2 и V δ 3. Гамма-дельта-Т-клетки различных подтипов распознают различные антигены и, таким образом, будут демонстрировать различные уровни цитотоксичности в зависимости от антигенов, презентируемых клетками-мишенями. Относительный избыток каждого подтипа дельта-TCR зависит, главным образом, от условий культивирования и конкретных презентируемых антигенов. Условия культивирования можно адаптировать для предпочтительной экспансии клеток с желаемым изотипом TCR из пуповинной крови. Например, гамма-дельта-Т-клетки, экспрессирующие единственный изотип TCR, могут быть более эффективными в лечении конкретного типа злокачественного новообразования или для лечения конкретной вирусной инфекции.

В вариантах осуществления стадия забора может включать стадию введения первому индивидууму средства, потенцирующего гамма-дельта-Т-клетки, перед забором гамма-дельта-Т-клеток из первого индивидуума.

В вариантах осуществления способ забора гамма-дельта-Т-клеток может включать стадию введения первому индивидууму потенцирующего средства, такого как фактор роста, индуцирующий мобилизацию лейкоцитов из костного мозга, такой как Г-КСФ, аминобисфосфонат, в частности, памидроновая кислота, алендроновая кислота, золедроновая кислота, ризедроновая кислота, ибандоновая кислота, инкадроновая кислота, их соль и/или их гидрат.

В варианте осуществления обработка или способ может включать любую одну или несколько из стадий:

получения крови, например, пуповинной крови или полученных при аферезе/лейкаферезе клеток из первого индивидуума (донора),

отделения моноклеарных клеток периферической крови от крови,

добавления аминобисфосфоната и целевого антигена к моноклеарным клеткам периферической крови и

культивирования моноклеарных клеток периферической крови для пролиферации/индуцирования целевых антиген-специфических цитотоксических Т-клеток (CTL) и гамма-дельта-Т-клеток, модификации гамма-дельта-Т-клеток для получения CAR-модифицированных гамма-дельта-Т-клеток, как представлено в настоящем описании, и, необязательно, сокультивирования РВМС, или СВМС, или Т-клеток с искусственными антигенпрезентирующими клетками (аАРС) для пролиферации/индуцирования целевых антигенспецифических цитотоксических Т-клеток (CTL) и гамма-дельта-Т-клеток.

Авторы настоящего изобретения считают, что получение гамма-дельта-Т-клеток, по существу, выделенных из других компонентов цельной крови, будет снижать недостаточность трансплантата, когда эти, по существу, выделенные гамма-дельта-Т-клетки аллогенно вводят второму индивидууму. Таким образом, способ по настоящему изобретению может включать стадию очистки гамма-дельта-Т-клеток из цельной крови или ее компонентов. Так как менее 10% периферической крови от общего количества клеток состоит из гамма-дельта-Т-клеток, считают, что очистка образца цельной крови или ее компонентов, например, с использованием антител против гамма-дельта-Т-клеток таким образом, что более 10% по массе образца состоит из гамма-дельта-Т-клеток, будет повышать эффективность аллогенного лечения реципиента. Таким образом, способ по настоящему изобретению может включать стадию очистки образца цельной крови или ее компонентов для достижения того, чтобы более 10, 25, 50, 75, 85, 90, 95 или 98% общего количества клеток в очищенном образце были гамма-дельта-Т-клетками.

Любой способ, известный специалисту в этой области, с помощью которого можно выделять гамма-дельта-Т-клетки из цельной крови, пуповинной крови или ее компонентов, может являться частью настоящего изобретения. Несомненно, стадия очистки не должна влиять или минимально влиять на жизнеспособность гамма-дельта-Т-клеток. Например, следующие стадии можно использовать в комбинации, или в отдельности, для достижения указанной выше очистки гамма-дельта-Т-клеток: способ диализа (например, аферез и/или лейкоферез); дифференциальное центрифугирование; выращивание гамма-дельта-Т-клеток в культуре (например, предпочтительное выращивание в культуре).

Стадию очистки, по меньшей мере, частично, можно осуществлять в течение стадии культивирования. Например, в течение стадии культивирования добавление по меньшей мере одного или комбинации конкретных компонентов, таких как аминобисфосфонат, в частности, памидроновая кислота, алендроновая кислота, золедроновая кислота, ризедроновая кислота, ибандоновая кислота, инкадроновая кислота, ее соль и/или ее гидрат, делает возможной экспансию гамма-дельта-Т-клеток в культуре. Очистки в течение культивирования клеток также можно достигать посредством добавления синтетических антигенов, таких как фосфостим/бромгалагидрин пирогосфат (BrHPP), синтетический изопентенил пирогосфат (IPP), (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енил пирогосфат (HMB-PP), или сокультивирования с искусственными антигенпрезентирующими клетками (аАРС) (Wang et al., 2011). Добавление таких компонентов создает культуральное окружение, делающее возможной положительную селекцию гамма-дельта-Т-

клеток, как правило, в количестве 70% или более от общего количества клеток в очищенном образце. Добавление таких компонентов создает культуральное окружение, делающее возможной положительную селекцию гамма-дельта-Т-клеток, как правило, в количестве 70% от общего количества клеток в очищенном образце.

Аминобисфосфонат можно добавлять в любое время с первого дня культивирования гамма-дельта-Т-клеток. Аминобисфосфонат можно добавлять в концентрации от 0,05 до 100 мкмоль, предпочтительно - от 0,1 до 30 мкмоль, к моноклеарным клеткам периферической крови. Соответственно, бисфосфонат является аналогом пирофосфорной кислоты и соединением, в котором О (атом кислорода) скелета пирофосфорной кислоты Р-О-Р замещен С (атомом углерода) (Р-С-Р). Его, как правило, используют в качестве терапевтического лекарственного средства от остеопороза. Аминобисфосфонат относится к соединению, содержащему N (атом азота) в бисфосфонате. Например, аминобисфосфонат, используемый в настоящем изобретении, конкретно не ограничен; можно использовать аминобисфосфонаты и т.п., как описано в WO 2006/006720 и WO 2007/029689. Их конкретные примеры включают памидроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат, алендроновую кислоту, ее соль и/или их гидрат, и золедроновую кислоту, ее соли и/или их гидрата. Концентрация аминобисфосфонатов, предпочтительно, составляет от 1 до 30 мкМ в случае памидроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата, от 1 до 30 мкМ в случае алендроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата, и от 0,1 до 10 мкМ в случае золедроновой кислоты, ее соли и/или их гидрата. В этом случае, в качестве примера, добавляют 5 мкМ золедроновой кислоты.

Соответственно, если период культивирования составляет 7 дней или более, можно получать группу клеток, содержащую гамма-дельта-Т-клетки, с высокой чистотой; однако, культивирование, предпочтительно, осуществляют в течение приблизительно 14 дней для дополнительного повышения количества гамма-дельта-Т-клеток.

В вариантах осуществления период культивирования может составлять приблизительно 7 дней или более. Соответственно, период культивирования может составлять приблизительно 14 дней или более для получения больших количеств в значительной степени очищенных популяций гамма-дельта-Т-клеток. Культивирование, как правило, осуществляют в течение 14 дней, после чего гамма-дельта-Т-клетки прекращают экспоненциально пролиферировать. Однако конкретные варианты осуществления относятся к длительному культивированию и селективной экспансии гамма-дельта-Т-клеток до большего числа. Такие варианты осуществления включают введение синтетических антигенов в культуру (например, синтетического IPP, DMAPP, Br-HPP, HMB-PP), подвергание циклическому воздействию искусственных или облученных антигенпрезентирующих клеток, использование иммобилизованных антигенов или антител или использование пуповинной крови в качестве исходного материала для культивирования клеток.

Соответственно, клетки можно культивировать в этом окружении в течение периода по меньшей мере 7 дней для перенастройки их профиля рецепторов поверхности клетки после минимум двух удвоений популяции.

Необязательно, стадия культивирования гамма-дельта-Т-клеток может включать стадии изменения профиля рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток.

Например, стадия культивирования может включать одну или несколько подстадий, на которых снижают или удаляют один или несколько типов рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток, присутствующих в гамма-дельта-Т-клетках, представленных в образце от первого индивидуума. Можно видеть, что такие стадии "перенастраивают" или "частично перенастраивают" профиль рецепторов гамма-дельта-Т-клеток обратно в наивную или частично наивную форму. Предполагают, что такая перенастройка повышает способность гамма-дельта-Т-клеток лечить злокачественное новообразование и вирусную инфекцию. Известно, что некоторые Т-клеточные рецепторы могут индуцироваться при наличии злокачественного новообразования или вирусов у индивидуума, из которого Т-клетки получают, и обнаружено, что эти рецепторы в некоторых случаях могут ингибировать респонсивность Т-клеток в отношении опухоли или вирусной инфекции. Таким образом, удаление таких рецепторов может повышать эффективность гамма-дельта-Т-клеток по настоящему изобретению.

Снижения или устранения одного или нескольких типов рецепторов гамма-дельта-Т-клеток можно достигать способом по настоящему изобретению посредством культивирования гамма-дельта-Т-клеток, полученных из первого индивидуума, за ряд дней, за которые популяция клеток увеличилась в размере ряд раз.

Например, клетки можно культивировать в течение периода по меньшей мере 7 дней для перенастройки их профиля рецепторов поверхности клеток после минимум двух удвоений популяции.

В случаях, когда профиль рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток перенастроен, рецепторы поверхности клеток, присутствующие на первичных, некультивированных гамма-дельта-клетках, таких как опухолеспецифические рецепторы поверхности клеток B7-H1/PD-L1, B7-DC/PD-L2, PD-1 и CTLA-4, можно удалять или, по существу, снижать их количество в течение периода экспансии культуры.

Стадия культивирования может дополнительно включать стадию мониторинга профиля рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток для определения подходящей длительности стадии культивирования, необходимой для значительного снижения или удаления выбранных рецепторов поверхности гамма-

дельта-Т-клеток (например, любого рецептора или любой комбинации рецепторов, описанной выше). Способ мониторинга рецепторов гамма-дельта-Т-клеток, например, можно осуществлять способом точной цитометрии, таким как описываемые Chan et al., *Genes and Immunity* (2014) 15, 25 to 32. В кратком изложении, антитела, специфичные для рецепторов и/или лигандов ингибиторов иммунных контрольных точек, будут использоваться для идентификации субпопуляций гамма-дельта-Т-клеток (например, совместно окрашенных с использованием антител против Vgamma9), экспрессирующих ингибиторы иммунных контрольных точек на поверхности клеток.

Дополнительно или необязательно, стадия культивирования по настоящему изобретению может включать стадии, с помощью которых индуцируют экспрессию в гамма-дельта-Т-клетках типов рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток, не присутствующих на поверхности некультивируемых гамма-дельта-клеток при выделении из первого индивидуума, или стадии, с помощью которых индуцируют повышение степени экспрессии типов рецепторов поверхности клеток, присутствующих на поверхности некультивированных гамма-дельта-клеток при выделении из первого индивидуума. Этого можно достигнуть посредством сенсibilизации гамма-дельта-Т-клеток антигеном, полученным из злокачественного новообразования, бактерий, грибов, простейших или вирусов. Этот антиген можно добавлять в среды для экспансии культуры для повышения эффективности, потенциала презентирования антигена и цитотоксичности подвергаемых экспансии гамма-дельта-Т-клеток. Соответственно, антигены можно предоставлять в различных форматах, включая, в качестве неограничивающих примеров, иммобилизованные антигены или антитела, облученные линии опухолевых клеток, искусственные антигенпрезентирующие клетки и добавление синтетических растворимых антигенов. Антиген можно добавлять в среды для экспансии культур в первый день культивирования. В вариантах осуществления вирус можно выбирать из вируса гриппа, ВИЧ, гепатита С, гепатита В, вариантов вируса герпеса, цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна-Барр, ветряной оспы, папилломавируса, вируса лихорадки Эбола, вируса варицелла-зостер или натуральной оспы. Альтернативно, антиген может являться антигеном, обнаруживаемым при клеточной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции или протозойной инфекции. В частности, целевой антиген может быть из вируса гриппа, ВИЧ, гепатита С, гепатита В, вариантов вируса герпеса, цитомегаловируса (CMV), вируса Эбола, вируса Эпштейна-Барр, ветряной оспы, папилломавируса, вируса варицелла-зостер или натуральной оспы.

Соответственно, антиген может включать активный или инактивированный вирусный фрагмент, пептид, белок, антигенный сегмент или т.п. из такого вирусного организма.

Соответственно, антиген может включать опухолеспецифический антиген, присутствующий только на опухолевых клетках, но не на любых других клетках, и/или опухоле-ассоциированный антиген, присутствующий на некоторых опухолевых клетках, а также некоторых нормальных клетках. Такие опухолеспецифические антигены могут включать, в качестве неограничивающих примеров, раково-эмбриональный антиген, CA-125, MUC-1, эпителиальный опухолевый антиген и антиген MAGE-типа, включая MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2 или LAGE1, или их комбинации.

Соответственно, можно использовать лизат инфицированной клетки, некротической клетки или злокачественной клетки для получения подходящего антигена. В вариантах осуществления антиген может являться синтезированным антигеном, например синтетическим пептидом. Альтернативно, антиген можно получать из индивидуума. Соответственно, к клеткам на стадии культивирования можно добавлять приблизительно 0,02-2 мкг на мл антигена.

В вариантах осуществления на стадии культивирования мононуклеарных клеток периферической крови можно добавлять факторы, стимулирующие пролиферацию гамма-дельта-Т-клеток и поддержание клеточного фенотипа, такие как ИЛ-2, ИЛ-15 или ИЛ-18 (Garcia V. et al., 1998, Nussbaumer O. et al., 2013). Соответственно, в таких вариантах осуществления можно добавлять ИЛ-2, ИЛ-15 или ИЛ-18 или их комбинации в культуральную среду в диапазоне 50-2000 Ед./мл, более предпочтительно 400-1000 Ед./мл. Культивирование, как правило, осуществляют при 34-38°C, более предпочтительно 37°C в присутствии от 2 до 10%, более предпочтительно 5% CO₂. Среду для культивирования можно добавлять в зависимости от культивируемых клеток.

Соответственно, сыворотку можно добавлять в культуральный раствор в количестве от 0,1 до 20%. В качестве сыворотки можно использовать, например, эмбриональную телячью сыворотку, сыворотку АВ или аутоплазму. Соответственно, вместо сыворотки или плазмы можно использовать химически определенный заменитель сыворотки.

В вариантах осуществления в среду для культивирования можно добавлять факторы, стимулирующие восстановление истощенных или энергичных гамма-дельта-Т-клеток. Соответственно, эти факторы могут включать цитокины, такие как ИЛ-15 или ИЛ-18, или антитела против специфических рецепторов или лигандов ингибиторов иммунных контрольных точек, например, антитело против PD-L1 (Chang K. et al., 2014), но также могут включать антитела против CTLA-4, PD-1, PD-2, LAG3, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, TIM3 или A2aR.

В вариантах осуществления стадия получения может включать забор крови или пуповинной крови у донора. Такой забор крови можно осуществлять в объеме, например, приблизительно 15-25 мл крови

донора. В вариантах осуществления стадия получения может включать стадию забора, где стадия забора является забором, по меньшей мере, гамма-дельта-Т-клеток из первого индивидуума за один забор. В вариантах осуществления стадию забора можно осуществлять в ходе множества сессий.

В вариантах осуществления изобретения способ получения гамма-дельта-Т-клеток может включать стадию анализа для определения по меньшей мере одной характеристики клетки, полученной из первого индивидуума. В вариантах осуществления по меньшей мере одна характеристика клетки может являться последовательностью ДНК или РНК или аминокислотной последовательностью клетки, протеомом клетки или поверхностным клеточным маркером клетки. В вариантах осуществления способ может включать стадию тканевого типирования гамма-дельта-Т-клеток. Характеристики поверхностного клеточного маркера гамма-дельта-клеток могут включать (в качестве неограничивающих примеров) CD3, CD4, CD8, CD69, CD56, CD27 CD45RA, CD45, TCR-Vg9, TCR-Vd2, TCR-Vd1, TCR-Vd3, TCR-pan g/d, NKG2D, моноклональные антитела против хемокиновых рецепторов CCR5, CCR7, CXCR3 или CXCR5 или их комбинации. Это типирование может включать генотипическую или фенотипическую информацию. Фенотипическая информация может включать наблюдаемые или измеряемые характеристики на микроскопическом, клеточном или молекулярном уровне. Генотипическая информация может относиться к конкретным генетическим вариантам или мутациям, например, лейкоцитарного антигена человека (тип HLA донора).

Соответственно, гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению могут представлять собой банки линий клеток клинической категории, которые можно подвергать экспансии и дифференцировке для применения на большом количестве пациентов. В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетки можно подвергать экспансии *ex vivo* из исходного материала пуповинной крови и комбинировать клетки от множества доноров для получения достаточных количеств гамма-дельта-Т-клеток для получения банка клеток. Такие банки клеток и выделенные клетки в них образуют отдельные аспекты изобретения. В вариантах осуществления такой банк, соответственно, будут получать с использованием гамма-дельта-Т-клеток, полученных из здоровых добровольных доноров с группой крови О, выбранных для максимизации возможности совпадения лейкоцитарных антигенов человека (HLA) и, таким образом, минимизации риска отторжения аллотрансплантата или потребности в постоянном использовании иммуносупрессорных лекарственных средств. Например, такие банки для пациентов в UK/EU могут содержать следующее, что делает возможным лечение значительной доли популяции UK/EU со сниженным риском отторжения:

HLA-A	HLA-B	HLA-DR
A1	B8	DR17 (3)
A2	B44 (12)	DR4
A3	B7	DR15 (2)
A2	B7	DR15 (2)
A2	B44 (12)	DR7
A2	B62 (15)	DR4
A1	B57 (17)	DR7
A3	B35	DR1
A29 (19)	B44 (12)	DR7
A2	B60 (40)	DR4
A2	B8	DR17 (3)
A2	B27	DR1
A2	B44 (12)	DR13 (6)
A3	B7	DR4
A1	B8	DR4
A2	B57 (17)	DR7
A2	B60 (40)	DR13 (6)
A11	B35	DR4
A2	B44 (12)	DR11 (5)
A24 (9)	B7	DR15 (2)
A30 (19)	B13	DR7
A31 (19)	B60 (40)	DR4
A3	B7	DR1
A11	B35	DR1
A3	B65 (14)	DR13 (6)

В вариантах осуществления собранные и обработанные гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению можно хранить в банках для последующего использования в банке или депозитории клеток. Таким образом, клетки можно хранить в криопротекторе, таком как DMSO или CryoStor™, и подвергать замораживанию с контролируемой скоростью и хранению в жидком азоте. Гамма-дельта-Т-клетки можно хранить в объединенном хранилище определенных единиц или доз, необходимых для однократных или многократных стадий лечения.

В варианте осуществления способ может включать стадию обработки популяции клеток, собранных из первого индивидуума, средством для улучшения хранения, жизнеспособности или терапевтической способности гамма-дельта-Т-клеток в собранном образце. В варианте осуществления способ может включать стадию консервации, где средство для криоконсервации добавляют к гамма-дельта-Т-клеткам в образце гамма-дельта-Т-клеток.

В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетка может являться подвергнутой экспансии с фосфоантигеном изопентенил пирогосфатом (IPP) Т-клеткой V γ 9V δ 2 человека.

Преобладающая субпопуляция $\gamma\delta$ -Т-клеток периферической крови экспрессирует канонический V γ 9V δ 2 TCR, распознающий клетки-мишени TCR-зависимым образом с учетом дисрегуляции пути мевалоната посредством распознавания повышенных уровней низкомолекулярных (~350 Да) пирогосфатных антигенов. Они могут являться полученными экзогенно, что указывает на бактериальную инфекцию (такую как HMBPP), или эндогенно, что указывает на повышенный синтез изопреноида при онкогенезе (IPP).

По-видимому, клетки V γ 9V δ 2 распознают гликопротеин поверхности клетки BTN3A1, экспрессирующийся на очень широком диапазоне клеток-мишеней, содержащий цитоплазматический домен B30.2, специфически связывающийся с пирогосфатными антигенами, что приводит к кластеризации BTN3A1 и продуктивному распознаванию TCR. Важно, что хотя активация V γ 9V δ 2 зависит от передачи сигнала TCR, опосредуемого CD3 дзета и ZAP-70, на нее сильно влияют костимуляторные пути, которые могут опосредоваться костимуляторными рецепторами, такими как CD28, или "стрессовыми" рецепторами, такими как NKG2D, усиливающими сигналы PI3-киназного пути, в конечном итоге, интегрированными с TCR-опосредованной передачей сигнала.

В вариантах осуществления гамма-дельта-Т-клетка может являться подвергнутой экспансии V δ 1 Т, V δ 2 Т или V δ 3 Т-клеткой человека.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения инфекции или злокачественного новообразования у индивидуума, включающему стадию введения указанному индивидууму гамма-дельта-Т-клеток, полученных от другого индивидуума. Таким образом, гамма-дельта-Т-клетки донора используют для лечения инфекции, например вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной, или для лечения злокачественного новообразования у реципиента, где донор и реципиент не являются одним и тем же индивидуумом. Как будет понятно, перед введением гамма-дельта-Т-клеток второму индивидууму, эти гамма-дельта-Т-клетки модифицируют, как представлено в настоящем описании, для получения CAR модифицированных гамма-дельта-Т-клеток.

Соответственно, способ введения гамма-дельта-Т-клеток реципиенту может включать внутривенную, внутрикожную или подкожную инъекцию. Можно осуществлять введение индивидууму в пораженную область или системно. Соответственно, способ введения может являться профилактическим, где вводят "профилактически эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" (соответственно, хотя профилактику можно рассматривать как терапию) гамма-дельта-Т-клеток, достаточное для благоприятного эффекта в отношении индивидуума. Точное вводимое количество и скорость и время введения будут зависеть от природы и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Предписание лечения, например, решения о дозе и т.д., входит в сферу ответственности практикующих врачей и других врачей.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам от первого индивидуума для применения в лечении второго, другого индивидуума, инфицированного вирусом, бактериями, грибами или простейшими, где указанное лечение индивидуума является аллогенным.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам из первого индивидуума для лечения второго, другого индивидуума, инфицированного вирусом, где указанный вирус выбран из ВИЧ, вируса гриппа или гепатита, где указанное лечение является аллогенным. В варианте осуществления вирус может являться вирусом гепатита В или гепатита С, вирусом гриппа, вариантами вируса герпеса, цитомегаловирусом (CMV), вирусом Эпштейна-Барр, вирусом ветряной оспы, папилломавирусом, вирусом варицелла-зостер или натуральной оспы.

В вариантах осуществления вирус гриппа может являться вирусом гриппа А (Flu A). В вариантах осуществления вирус гриппа может являться пандемическим вирусом птичьего или свиного гриппа, например, H5N1, H7N3, H7N7, H7N9 и H9N2 (подтипы вируса птичьего гриппа) или H1N1, H1N2, H2N1, H3N1, H3N2 H2N3 (подтипы вируса свиного гриппа).

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам для лечения индивидуума со злокачественным новообразованием, где указанное лечение является аллогенным.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам из первого индивидуума для применения в лечении второго индивидуума, где второй индивидуум страдает по меньшей мере одним из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции. В вариантах осуществления индивидууму, которому вводят гамма-дельта-Т-клетки, можно одновременно, последовательно или раздельно вводить иммуносупрессорные лекарственные средства. Введение иммуносупрессорных лекарственных средств может помочь ослабить любой вредоносный системный ответ на гамма-дельта-Т-клетки.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам для лечения индивидуума с индуцированным вирусом Эпштейна-Барр лимфопролиферативным заболеванием (EBV-LPD).

Вирус Эпштейна-Барр (EBV) является членом семейства гамма-вирусов герпеса и преобладает в западной популяции (>90% взрослых индивидуумов являются сероположительными). EBV поддерживается в виде латентной инфекции цитотоксическими Т-клетками (CTL) хозяина, предотвращающими вирусную реактивацию, таким образом, позволяя EBV персистировать асимптоматически в виде латентной инфекции в β -клетках хозяина.

EBV ассоциирован с рядом злокачественных новообразований β -клеточного происхождения, таких как лимфома Беркитта (BL), лимфома Ходжкина (HL) и посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD), в дополнение к злокачественным новообразованиям эпителиального происхождения, таким как назофарингеальная карцинома (NPC) и рак желудка.

Часто возникает риск PTLD, ассоциированного с трансплантацией солидных органов и трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам из первого индивидуума для применения в лечении второго индивидуума с EBV-ассоциированным злокачественным новообразованием.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам, в частности, клеткам V γ 9V δ 2, содержащим по меньшей мере один костимуляторный CAR, для применения в аутологичном или аллогенном лечении индивидуума.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам с одним или несколькими конкретными изотипами гамма-дельта-TCR для лечения различных вирусных инфекций. Например, подтипы V δ 2^{pos} могут быть наиболее эффективными в лечении инфекции ВИЧ и вирусом гриппа (Wallace M. et al., 1996, Tu W. et al., 2011), в то же время существуют доказательства роли по меньшей мере двух субпопуляций гамма-дельта-Т-клеток в контроле инфицированных EBV клеток; клеток V δ 1^{pos} (Farnault L. et al., 2013) и v δ 2^{pos} (Xiang Z. et al., 2014). Соответственно, можно выбирать и вводить пациенту комбинации субпопуляций гамма-дельта-Т-клеток для повышения эффективности терапии гамма-дельта-Т-клетками. Соответственно, они могут содержать популяции гамма-дельта-Т-клеток одного изотипа, полученные с использованием отдельных условий культивирования, или популяцию мультивалентных гамма-дельта-Т-клеток, полученных параллельно с использованием определенного набора параметров культивирования клеток.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гамма-дельта-Т-клеткам, в частности, клеткам V γ 9V δ 2, и пирогосфатным/фосфонатным лекарственным средствам для применения в аутологичном или аллогенном лечении индивидуума.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу аутологичного введения гамма-дельта-Т-клеток индивидууму, включающему стадии:

получения образца гамма-дельта-Т-клеток из индивидуума;

культивирования гамма-дельта-Т-клеток, чтобы вводить их обратно индивидууму, где указанная стадия культивирования включает модификацию гамма-дельта-Т-клеток для получения CAR-модифицированных гамма-дельта-Т-клеток, предпочтительно, с "костимуляторным" или "TCR-настраиваемым" CAR, как представлено в настоящем описании.

Любую из стадий получения и культивирования, описанных выше, можно использовать в отношении гамма-дельта-Т-клеток по настоящему изобретению. Например, стадия культивирования гамма-дельта-Т-клеток может включать стадии изменения профиля рецепторов поверхности гамма-дельта-Т-клеток, как указано выше.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения инфекции или злокачественного новообразования у индивидуума, включающему стадию введения указанному индивидууму гамма-дельта-Т-клеток, полученных из этого индивидуума, где гамма-дельта-Т-клетки получают способом, представленным в настоящем описании.

В вариантах осуществления злокачественное новообразование может являться миеломой или меланомой. В вариантах осуществления злокачественное новообразование может включать, в качестве неограничивающих примеров, тип опухоли, включающий рак желудка, почечноклеточную карциному, печеночноклеточную карциному, рак поджелудочной железы, острый миелолейкоз, множественную миелому и острый лимфобластный лейкоз, немелкоклеточный рак легких, EBV-LPD, лимфому Беркитта и болезнь

Ходжкина.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной гамма-дельта-Т-клетке, применяемой в настоящем изобретении, в частности клетке V γ 9V δ 2, содержащей по меньшей мере один костимуляторный CAR. В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к выделенной гамма-дельта-Т-клетке, в частности, клетке V γ 9V δ 2, конкретно - гамма-дельта-Т-клетке, например, клетке V γ 9V δ 2, содержащей по меньшей мере один костимуляторный CAR, и пирофосфатному/фосфонатному лекарственному средству в качестве набора для применения в комбинации для аутологичного или аллогенного лечения индивидуума.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гамма-дельта-Т-клетку по настоящему изобретению, или любому из способов по настоящему изобретению.

В вариантах осуществления композиция содержит унифицированную дозу гамма-дельта-Т-клеток, подходящую для вызывания у индивидуума терапевтического эффекта.

В вариантах осуществления фармацевтическая композиция может включать общую дозу более 25×10^9 гамма-дельта-Т-клеток на индивидуума.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению, и иммунотерапевтическое средство на основе антител для применения в лечении злокачественного новообразования.

В вариантах осуществления иммунотерапевтическое средство на основе антител может являться блокаторм иммунного каскада, таким как ингибитор PD-1, PDL-1 и/или CTLA-4, ингибиторы PD-1, PDL-1 и CTLA-4, например, как разрабатываемые Roche и Bristol Myers Squibb.

В вариантах осуществления фармацевтическая композиция может включать антитело, способное блокировать ингибиторные сигналы CTLA-4. Блокирование сигналов CTLA-4 позволяет Т-лимфоцитам распознавать и разрушать клетки. В вариантах осуществления такое антитело может являться ипилимабом (MDX-010, MDX-101).

В вариантах осуществления антитело может ингибировать лиганд программируемой гибели 1 (PDL-1). В вариантах осуществления такое антитело можно выбирать из MPDL3280A (Roche) или MDX-1105.

В вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно комбинировать с цитокином, например ИЛ-2 или ИЛ-12. В вариантах осуществления фармацевтическая композиция может включать интерферон гамма.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению и химиотерапевтическое средство для применения в лечении злокачественного новообразования.

В вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гамма-дельта-Т-клетки по настоящему изобретению и терапевтическое средство для применения в лечении вируса.

В вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно использовать в качестве терапевтического или профилактического средства от злокачественного новообразования или инфекций.

В вариантах осуществления изобретения гамма-дельта-Т-клетка может являться Т-клеткой V γ 9V δ 2.

Соответственно, в вариантах осуществления настоящее изобретение может включать введение последовательности костимуляторного CAR в Т-клетку или Т-клеткоподобную клетку с определенной антигенной специфичностью, например, NKT-клетку со специфичностью в отношении α -GalCer, или, например, ассоциированную со слизистой инвариантную Т-клетку (MAIT) со специфичностью в отношении связанных с витамином В антигенов. В вариантах осуществления CAR (классический (включающий функциональный домен CD3 дзета) или костимуляторный (с нефункциональным/отсутствующим доменом CD3 дзета)) можно встраивать в $\gamma\delta$ -Т-подобную клетку, где $\gamma\delta$ -Т-подобная клетка является $\alpha\beta$ -Т-клеткой, генетически сконструированной для экспрессии функционального гамма-дельта-Т-клеточного рецептора. Соответственно, такие модифицированные клетки формируют один из аспектов изобретения. В вариантах осуществления CAR (классический или костимуляторный) можно встраивать в $\gamma\delta$ -Т-подобную клетку, где $\gamma\delta$ -Т-подобная клетка является любой Т-клеткой, генетически сконструированной для экспрессии функционального гамма-дельта-Т-клеточного рецептора.

Соответственно, такие модифицированные клетки формируют аспект настоящего изобретения.

В вариантах осуществления костимуляторный CAR (с нефункциональным/отсутствующим доменом CD3 дзета) можно встраивать в любую Т-клетку (общепринятую или необщепринятую) с Т-клеточным рецептором с определенной антигенной специфичностью. Такие модифицированные клетки формируют аспекты настоящего изобретения. Соответственно, в вариантах осуществления, описываемых в отношении первого аспекта изобретения, можно использовать эти модифицированные клетки, являющиеся дополнительными аспектами изобретения. Соответственно, такие модифицированные клетки можно использовать, как представлено в настоящем описании в отношении клеток по первому аспекту изобретения и его вариантам осуществления.

Предпочтительные признаки и варианты осуществления каждого аспекта изобретения являются такими, как для каждого из других аспектов при прочих равных условиях, если контекст четко не указывает на иное.

Каждый документ, ссылка, патентная заявка или патент, процитированные в настоящем описании, конкретно включены в настоящее описание в полном объеме в качестве ссылки, что означает, что они должны быть прочитаны и рассмотрены читателем как часть этого текста. То, что документ, ссылка, патентная заявка или патент, процитированные в настоящем описании, не повторяются в этом тексте, используется исключительно в целях краткости.

Ссылку на процитированный материал или информацию, содержащуюся в тексте, не следует понимать как признание того, что материал или информация являлась частью общеизвестных знаний или известна в любой стране.

На всем протяжении описания, если контекст не указывает на иное, термины "содержат" или "включают" или их варианты, такие как "содержит" или "содержащий", "включает" или "включающий", будут подразумевать включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Варианты осуществления настоящего изобретения далее будут описаны исключительно в качестве примера со ссылкой на сопутствующие фигуры, среди которых:

Фиг. 1 (1A) является схематическим представлением преимуществ и недостатков $\gamma\delta$ -T-клетки под-типа Vgamma9, экспрессирующей классический CAR. Эти $\gamma\delta$ -T-клетки будут активироваться здоровыми клетками, экспрессирующими CAR-запускаемый антиген и, таким образом, склонными к "специфичной в отношении мишени, внеопухолевой" токсичности (верхняя панель). Однако, эти клетки могут демонстрировать повышенную активацию против инфицированных или злокачественных клеток, экспрессирующих CAR-направленный антиген по причине двойной передачи сигнала через CAR и $\gamma\delta$ -TCR (нижняя панель). (1B) является схематическим представлением преимуществ $\gamma\delta$ -T-клетки типа Vgamma9, экспрессирующей костимуляторный CAR. $\gamma\delta$ -T-клетки, экспрессирующие костимуляторный CAR, будут лишены "специфичной в отношении мишени, внеопухолевой" токсичности (по причине отсутствия домена CD3 дзета/сигнал 1), но будут проявлять повышенную цитотоксическую активность против инфицированных или трансформированных клеток, экспрессирующих высокие уровни фосфоантигенов (таким образом, передавая сигнал 1 через $\gamma\delta$ -TCR) и CAR-запускающего антигена.

На фиг. 2 представлен иллюстративный вариант осуществления дизайна классической и костимуляторной конструкции. На (A) проиллюстрирован дизайн конструкции классического CAR, содержащей домен секреторного сигнала GMCSF-R, scFv против CD19, шарнирный домен CD28, трансмембранный и активационный домены, активационный домен CD137 (4-1BB) и активационный домен CD3 ζ . На (B) проиллюстрирована конструкция костимуляторного CAR, содержащая домен секреторного сигнала GMCSF-R, scFv против CD19, шарнирный домен CD28, трансмембранный и активационный домены и активационный домен CD137 (4-1BB).

На фиг. 3 представлены последовательности конструкции классического CAR, используемые в настоящем изобретении. Представлены нуклеотидная последовательность (A) и аминокислотные последовательности (B) "классического"/"ненастраиваемого" CAR. Каждый из функциональных доменов аннотирован в аминокислотной последовательности, она включает последовательность scFv против CD19, шарнирный домен CD28, трансмембранный, внутриклеточный активационный домен, активационный домен CD137 (4-1BB) и внутриклеточный активационный домен CD3 ζ .

На фиг. 4 представлены последовательности конструкции костимуляторного CAR, используемые в настоящем изобретении. Представлены нуклеотидная последовательность (A) и аминокислотные последовательности (B) "костимуляторного"/"TCR-настраиваемого" CAR. Каждый из функциональных доменов аннотирован в аминокислотной последовательности, она включает последовательность scFv против CD19, шарнирный домен CD28, трансмембранный, внутриклеточный активационный домен и активационный домен CD137 (4-1BB).

На фиг. 5 проиллюстрирована универсальная пара праймеров, сконструированная для амплификации мишени, занимающей последовательность CD28 и последовательность CD137 (4-1BB), присутствующую в классических и костимуляторных CAR. Конструировали индивидуальную пару праймеров для получения ампликона из последовательностей, содержащих последовательность CD137 (4-1BB) и активационный домен CD3 ζ , таким образом, имея возможность амплифицировать продукт из нуклеотидной последовательности классического CAR, но не костимуляторного CAR. На (A) представлена нуклеотидная последовательность двух пар праймеров, используемых для детекции последовательности классического CAR и костимуляторного CAR. (B) Масштабированная иллюстрация мест отжига для универсальных и индивидуальных праймеров для дизайна классического CAR. (C) Масштабированная иллюстрация мест отжига для универсальных праймеров для дизайна костимуляторного CAR.

На фиг. 6 проиллюстрирована qPCR-амплификация серийно разведенной плазмидной ДНК с использованием универсальных праймеров для получения стандартной кривой плазмиды классического CAR ($r^2=0,998$) (A) и плазмиды костимуляторного CAR ($r^2=0,987$). (C) Таким образом, универсальную

пару праймеров можно использовать для количественной детекции уровней обеих последовательностей посредством qPCR. qPCR осуществляли в отношении клеток, трансдуцированных любым вирусом. Анализ кривых плавления, осуществленный после 40 циклов ПЦР-амплификации, свидетельствует о том, что с помощью обеих пар праймеров получали единый ампликон из РНК, полученной из клеток, трансдуцированных с использованием классического CAR (B), в то время как только с использованием универсальной пары праймеров (показано светло-серым) можно получать ампликон из выделенной РНК из клеток, трансдуцированных с использованием костимуляторного CAR (D). Эти данные свидетельствуют о том, что обе пары праймеров являются специфичными в том, что с помощью них амплифицируют только один продукт, и что индивидуальная пара праймеров (показано темно-серым) позволяет различать два транскрипта.

На фиг. 7 две линии клеток В-клеточной лимфомы оценивали на экспрессию антигена-мишени CD19 посредством проточной цитометрии; клетки лимфомы Беркитта Daudi (верхняя панель) и Ramos (нижняя панель). 98% клеток в каждой линии клеток экспрессировали CD19, при этом клетки Daudi демонстрировали более высокие уровни интенсивности/экспрессии, что определяли по MFI (A). Наблюдали повышенную цитотоксическую активность $\gamma\delta$ -Т-клеток Vgamma9, экспрессирующих конструкцию классического CAR, против линий CD19⁺ злокачественных клеток по сравнению с нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками. PBMC трансдуцировали с использованием лентивирусных векторов, содержащих последовательность классического CAR, через 48 ч после их стимуляции золедроновой кислотой. Трансдуцированные клетки подвергали экспансии еще в течение 7 дней и исследовали их цитолитическую активность против CD19-положительных линий клеток Daudi (верхняя панель) и Ramos (нижняя панель) посредством проточной цитометрии. Клетки Daudi и Ramos флуоресцентно метили с использованием нетоксичного маркера мембран клеток PKH67, позволяющего определять их посредством проточной цитометрии. Флуоресцентные клетки-мишени сокультивировали в течение 4,5 ч с трансдуцированными с использованием классического CAR (правая сторона) (или нетрансдуцированными) $\gamma\delta$ -Т-клетками (левая сторона). Жизнеспособность целевых линий злокачественных клеток оценивали посредством окрашивания на аннексин V и PI (B). Злокачественные клетки, экспрессирующие аннексин V или аннексин V и PI, считали ранне- и позднеапоптотическими, соответственно. Клетки Daudi проявляли более высокую относительную чувствительность к опосредованному $\gamma\delta$ -Т-клетками уничтожению (76,4% специфической гибели клеток), что дополнительно повышалось, когда клетки Daudi сокультивировали с $\gamma\delta$ -Т-клетками с классическим CAR (86,4% специфической гибели клеток). Клетки Ramos являлись сравнительно менее чувствительными к опосредованному $\gamma\delta$ -Т-клетками уничтожению (39% специфической гибели клеток), однако она значительно повышалась, когда клетки Ramos сокультивировали с $\gamma\delta$ -Т-клетками с классическим CAR. Наблюдали значимо более высокие уровни цитолиза (55% специфической гибели клеток). Эти данные четко свидетельствуют о том, что $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие классический CAR, имеют повышенную цитолитическую активность против линий CD19-положительных злокачественных клеток по сравнению с нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками. Процент повышения специфической гибели клеток при использовании $\gamma\delta$ -Т-клеток с классическим CAR был более высоким в линии клеток Ramos (~46%), чем линии клеток Daudi (~13%) (C). Эти данные свидетельствуют о том, что $\gamma\delta$ -Т-клетки, трансдуцированные с использованием классического CAR, могут повышать восприимчивость резистентных линий клеток к цитолизу.

На фиг. 8 инициировали культивирование PBMC, выделенных из лейкоцитарного материала, с 5 мкМ золедроновой кислоты и 1000 МЕ/мл ИЛ-2. Через 48 ч в культуре клетки трансдуцировали с использованием лентивируса, содержащего конструкцию классического CAR, при MOI 10 и включении 5 мкг/мл полибрена для повышения эффективности вирусной трансдукции. Лентивирусную трансдукцию повторяли через 24 ч (день 3). В день 10 клетки оценивали посредством проточной цитометрии на чистоту $\gamma\delta$ -Т-клеток с использованием антител против CD3 и против Vgamma9. Соответственно, популяции $\gamma\delta$ -Т-клеток высокой чистоты получали с использованием всех популяций клеток, независимо от трансдуцированной конструкции; нетрансдуцированный контроль (81% $\gamma\delta$ -Т-клеток), классический CAR (86% $\gamma\delta$ -Т-клеток), костимуляторный CAR (89% $\gamma\delta$ -Т-клеток) (A). В день 5 РНК выделяли из 1×10^5 клеток, синтезировали кДНК с использованием случайных гексамеров и обратной транскриптазы и осуществляли qPCR с использованием SYBR green и универсальных праймеров, описанных выше. Определение относительного уровня экспрессии транскрипта мРНК классического CAR и мРНК костимуляторного CAR в трансдуцированных клетках в день 5 после трансдукции свидетельствует о том, что эквивалентные уровни экспрессии транскрипта CAR определяют в трансдуцированных клетках, независимо от конструкции (данные нормализованы по уровням рибосомальной РНК 18S и выражены относительно экспрессии CAR при трансдукции с использованием ретронекина) (B). Трансдуцированные клетки тестировали на их цитолитическую активность против CD19-положительных линий клеток Daudi и Ramos. Клетки Daudi и Ramos предварительно в течение 24 ч обрабатывали ± 5 мкМ золедроновой кислоты, а затем флуоресцентно метили нетоксичным маркером мембран PKH67, позволяющим определять их посредством проточной цитометрии. Флуоресцентные клетки-мишени сокультивировали в течение 4,5 ч с трансдуцированными с использованием классического CAR, костимуляторного CAR (или нетрансдуцирован-

ными) $\gamma\delta$ -Т-клетками. Жизнеспособность целевых линий злокачественных клеток оценивали посредством окрашивания на аннексин V и PI. Клетки Daudi являлись чувствительными к опосредованному $\gamma\delta$ -Т-клетками цитолизу (36% специфической гибели клеток), и она повышалась при предварительной обработке зольдроновой кислотой (48% специфической гибели клеток). Уровни апоптоза дополнительно повышались, когда клетки Daudi инкубировали совместно с $\gamma\delta$ -Т-клетками, экспрессирующими классический CAR (64% специфической гибели клеток) или костимуляторный CAR (54% специфической гибели клеток) (C). Это свидетельствует о том, что костимуляторный CAR, который в отдельности не может обеспечивать оба сигнала, может проявлять аддитивный эффект при экспрессии в контексте активированной $\gamma\delta$ -Т-клетки. Чтобы расширить это наблюдение, использовали менее чувствительную линию клеток Ramos. $\gamma\delta$ -Т-клетки опосредовали более низкий уровень апоптоза в этих клетках (11% специфической гибели клеток), в то время как предварительная обработка зольдроновой кислотой не имела эффекта (10% специфической гибели клеток). Однако уровни апоптоза значительно повышались, когда $\gamma\delta$ -Т-клетки экспрессировали классический CAR (25% специфической гибели клеток) или костимуляторный CAR (30% специфической гибели клеток) (D). Эти данные дополнительно подтверждают функциональность CD ζ -дефектного CAR (т.е. костимуляторного CAR) при антигенном вовлечении в контексте активированной $\gamma\delta$ -Т-клетки.

Примеры

Пример 1.

PBMC выделяли из лейкоцитарного материала посредством центрифугирования в градиенте плотности (Lymphoprep) и подвергали криоконсервации. PBMC восстанавливали и PBMC, стимулированные зольдроновой кислотой (5 мкМ), культивировали в присутствии ИЛ-2 (1000 МЕ/мл) и 5% сыворотки АВ человека в средах для выращивания. Через 48 ч культивирования (37°C, 5% CO₂, влажная камера), клетки трансдуцировали с использованием лентивируса, содержащего конструкцию lenti-CMV-MCS-EF1a-риго с последовательностью классического CAR (scFv против CD19-CD28-CD137-CD3Q или последовательностью костимуляторного CAR (scFv против CD19-CD28-CD137), и 5 мкг/мл полибрена при MOI 10. Трансдукцию повторяли через 24 ч. Экспрессию мРНК CAR подтверждали посредством QPCR с использованием универсальных праймеров, с помощью которых определяли экспрессию обеих конструкций в день 5. Специфическую экспрессию каждой конструкции подтверждали с использованием комбинации индивидуальных праймеров и универсальных праймеров (как на фиг. 5, 6).

Пример 2.

Клетки трансдуцировали с использованием лентивируса, содержащего последовательность классического CAR, и подвергали экспансии, как описано в примере 1. Через 7 дней после трансдукции оценивали цитотоксическую активность посредством сокультивирования трансдуцированных или нетрансдуцированных $\gamma\delta$ -Т-клеток с целевыми линиями CD19-положительных клеток Daudi или Ramos. Целевые линии клеток окрашивали с использованием нетоксичного мембранного красителя PKH67 (5 мкМ) для специфической визуализации целевой популяции CD19 с использованием проточной цитометрии. Через 4,5 ч совместной инкубации с $\gamma\delta$ -Т-клетками или $\gamma\delta$ -Т-клетками, экспрессирующими классический CAR, совместные культуры окрашивали аннексином V и йодидом пропидия (PI) для визуализации апоптотических клеток. % специфической гибели клеток вычисляли только в популяции клеток-мишеней. CAR-трансдуцированные $\gamma\delta$ -Т-клетки проявляли повышенную активность в отношении CD19-положительных клеток-мишеней по сравнению с нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками (фиг. 7).

Пример 3.

Клетки трансдуцировали с использованием лентивируса, содержащего последовательность классического CAR или костимуляторного CAR, и подвергали экспансии, как описано в примере 1. Целевые линии CD19-положительных клеток Daudi и Ramos предварительно в течение 24 ч обрабатывали $\pm$ 5 мкМ зольдроновой кислоты. Цитотоксическую активность оценивали, как описано в примере 2. Окрашенные PKH67 клетки-мишени ($\pm$ предварительная обработка зольдроновой кислотой) сокультивировали с трансдуцированными или нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками. $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие костимуляторный CAR, проявляли цитотоксичность в отношении CD19-положительных клеток-мишеней, схожую с таковой у $\gamma\delta$ -Т-клеток, экспрессирующих классический CAR, несмотря на отсутствие активационного домена CD3 ζ , вместо этого сигнал 1 обеспечивали посредством активации через $\gamma\delta$ -TCR посредством распознавания IPP. Оба CAR обеспечивали повышенную цитотоксичность в отношении $\gamma\delta$ -Т-клеток по сравнению с нетрансдуцированными $\gamma\delta$ -Т-клетками (фиг. 8).

Хотя настоящее изобретение конкретно представлено и описано со ссылкой на конкретные примеры, специалистам в этой области будет понятно, что можно осуществлять различные изменения в форме и деталях без отклонения от объема настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модифицированная $\gamma\delta$ -Т-клетка, содержащая:

(i) рецептор $\gamma\delta$ -Т-клетки, в котором указанный рецептор $\gamma\delta$ -Т-клетки предоставляет сигнал Т-клеточного рецептора (TCR)(сигнал 1) при связывании; и

(ii) по меньшей мере один костимуляторный химерный антигенный рецептор, где указанный костимуляторный химерный антигенный рецептор содержит:

а) синтетический рецептор для распознавания и таргетинга мишени клеточной поверхности;

б) трансмембранный домен, который проходит через клеточную мембрану; и

с) внутриклеточную сигнальную область, обеспечивающую внутриклеточный костимуляторный иммунорецепторный активирующий мотив, способный обеспечивать костимуляторный сигнал (сигнал 2),

где указанный трансмембранный домен присоединен к указанному костимуляторному химерному антигенному рецептору и указанная внутриклеточная сигнальная область присоединена к указанному трансмембранному домену,

где получают модифицированную $\gamma\delta$ -Т-клетку с настраиваемым ответом, так что $\gamma\delta$ -Т-клетка получает стимулирующий сигнал от указанного костимуляторного химерного антигенного рецептора (сигнал 2), что позволяет активацию указанной $\gamma\delta$ -Т-клетки только в отношении клеток, которые выставляют мишень клеточной поверхности костимуляторного CAR и вызывают стимуляцию рецептора $\gamma\delta$ -Т-клетки (сигнал 1).

2. Модифицированная $\gamma\delta$ -Т-клетка по п.1, дополнительно содержащая ингибиторный химерный антигенный рецептор (ICAR), где связывание антигена ингибиторным химерным антигенным рецептором будет вызывать ингибирование сигнала, обеспечиваемого любым связыванием антигена заболевания химерным антигенным рецептором, содержащим внеклеточный антигенсвязывающий домен со специфичностью связывания для антигена заболевания, шарнирный, трансмембранный домен и одну или более костимуляторных сигнальных областей (настраиваемый), для минимизации активации $\gamma\delta$ -Т-клетки для клеток, не являющихся мишенями.

3. $\gamma\delta$ -Т-клетка по любому из предшествующих пунктов, где антигенраспознающий домен химерного антигенного рецептора способен связываться с мишенью поверхности клетки или природным лигандом, обнаруживаемым в клеточной инфекции, бактериальной инфекции, грибковой инфекции или протозойной инфекции или ассоциированным с ними; активным или инактивированным вирусным фрагментом; пептидом; белком; антигенным сегментом из вируса; опухолеспецифическим антигеном или опухолеассоциированным антигеном.

4. Применение модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетки по любому из пп.1-3 в лечении злокачественного новообразования или инфекции, где инфекция выбрана из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции.

5. Применение модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетки по любому из пп.1-4 в лечении злокачественного новообразования или инфекции, где модифицированную $\gamma\delta$ -Т-клетку вводят индивидууму совместно с аминокислотой или его заменителем, где заменитель способен повышать уровни фосфоантигенов, присутствующих на клетках-мишенях, посредством дисрегуляции физиологического пути мевалоната.

6. Способ получения модифицированной $\gamma\delta$ -Т-клетки по любому из пп.1-4, включающий стадию встраивания или трансдукции нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR), где указанный костимуляторный химерный антигенный рецептор представляет собой синтетический рецептор для распознавания и таргетинга мишени клеточной поверхности, связанный с трансмембранным доменом, который проходит через клеточную мембрану и соединяется с внутриклеточным костимуляторным иммунорецепторным активирующим мотивом, способным обеспечивать сигнал 2, где получают модифицированную $\gamma\delta$ -Т-клетку с настраиваемым ответом, так что $\gamma\delta$ -Т-клетка получает стимулирующий сигнал от указанного костимуляторного химерного антигенного рецептора (сигнал 2), что позволяет активацию указанной $\gamma\delta$ -Т-клетки только в отношении клеток, которые выставляют мишень клеточной поверхности костимуляторного CAR и вызывают стимуляцию рецептора $\gamma\delta$ -Т-клетки (сигнал 1).

7. Набор для применения в комбинации для лечения индивидуума со злокачественным новообразованием или инфекциями, выбранными из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, посредством аутологичного или аллогенного переноса, содержащий $\gamma\delta$ -Т-клетку по любому из пп.1-3 и пирогенное/фосфонатное лекарственное средство.

8. Применение фармацевтической композиции в лечении индивидуума со злокачественным новообразованием или инфекциями, выбранными из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, где указанная фармацевтическая композиция содержит $\gamma\delta$ -Т-клетку по любому из пп.1-3.

9. Применение комбинации фармацевтической композиции по п.8 и иммунотерапевтического средства на основе антител в лечении злокачественного новообразования.

10. Применение комбинации фармацевтической композиции по п.8 и иммунотерапевтического средства на основе антител и цитокина, интерферона гамма, ИЛ-2, химиотерапевтического средства, биологического средства или их комбинации в лечении злокачественного новообразования.

11. Применение комбинации фармацевтической композиции по п.8 и терапевтического средства в лечении вирусной инфекции.

12. Способ получения лекарственного средства для применения в лечении индивидуума со злокачественным новообразованием или инфекциями, выбранными из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, включающий обработку донорских клеток, полученных от донора, чтобы сделать возможным аллогенное введение терапевтически эффективного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток реципиенту, где указанная обработка включает стадию модификации $\gamma\delta$ -Т-клеток со встраиванием химерного антигенного рецептора для получения модифицированных $\gamma\delta$ -Т-клеток по п.1, где получают указанные модифицированные $\gamma\delta$ -Т-клетки с настраиваемым ответом на уровень мишени клеточной поверхности, экспрессирующейся на клетке-мишени, распознаваемой костимулятором CAR.

13. Способ лечения злокачественного новообразования или инфекций, выбранных из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму-реципиенту донорских клеток, полученных от донора и обработанных так, чтобы сделать возможным аллогенное введение терапевтически эффективного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму-реципиенту, где указанная обработка включает стадию модификации $\gamma\delta$ -Т-клеток со встраиванием костимуляторного химерного антигенного рецептора для получения модифицированных $\gamma\delta$ -Т-клеток по п.1, где получают указанные модифицированные $\gamma\delta$ -Т-клетки с настраиваемым ответом на уровень мишени клеточной поверхности, экспрессирующейся на клетке-мишени, распознаваемой костимулятором CAR.

14. Способ лечения злокачественного новообразования или инфекций, выбранных из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму-донору донорских клеток, полученных от донора и обработанных так, чтобы сделать возможным аллогенное введение терапевтически эффективного количества $\gamma\delta$ -Т-клеток индивидууму-донору, где указанная обработка включает стадию модификации $\gamma\delta$ -Т-клеток со встраиванием костимуляторного химерного антигенного рецептора для получения модифицированных $\gamma\delta$ -Т-клеток по п.1, где получают указанные модифицированные $\gamma\delta$ -Т-клетки с настраиваемым ответом на уровень мишени клеточной поверхности, экспрессирующейся на клетке-мишени, распознаваемой костимулятором CAR.

15. Способ по п.13 или 14, где индивидуум, которому вводят $\gamma\delta$ -Т-клетки, имеет злокачественное новообразование.

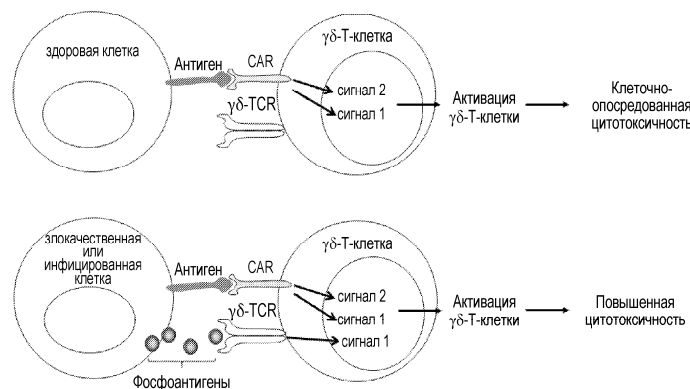
16. Способ по любому из пп.13-15, где индивидууму, которому вводят $\gamma\delta$ -Т-клетки, одновременно, последовательно или раздельно с этим вводят иммуносупрессорные лекарственные средства.

17. Способ лечения злокачественного новообразования или инфекций, выбранных из вирусной, бактериальной, грибковой или протозойной инфекции, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму клетки по любому из пп.1-3.

18. Способ лечения по п.17, где указанное введение осуществляют посредством аутологичного переноса.

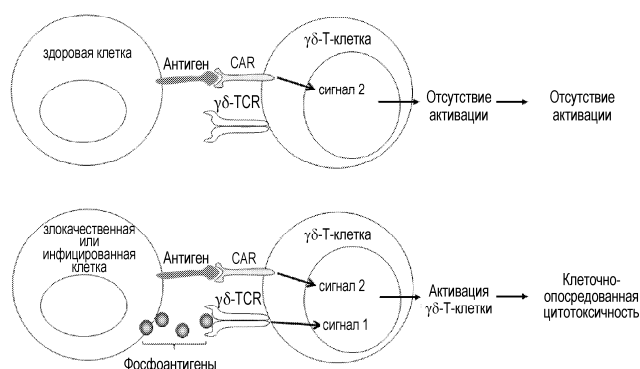
19. Способ лечения по п.17, где указанное введение осуществляют посредством аллогенного переноса.

Цитотоксический механизм действия $\gamma\delta$ -Т-клеток, экспрессирующих классический CAR



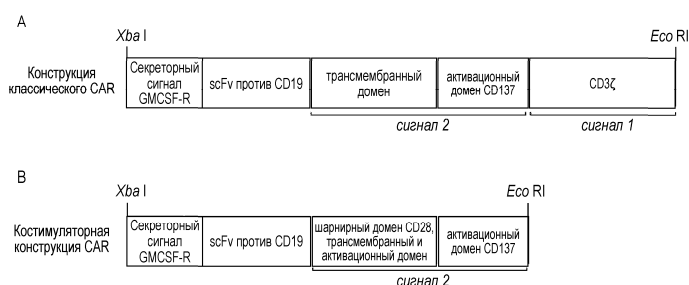
Фиг. 1А

Цитотоксический механизм действия $\gamma\delta$ -Т-клеток, экспрессирующих костимуляторный CAR



Фиг. 1В

Иллюстративное сравнение дизайна классического и костимуляторного CAR



Фиг. 2

Последовательность нуклеиновой кислоты «ненастраиваемого»/«классического» CAR

ATGCTTCTCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACACACCCAGCACTTCTCTGATCCAGACATCCAGATG
ACACAGACTACATCTCTCTGTGCTCTCTGGGAGACAGAGTACCACAGTTGACAGGGCAAGTCAGGACATAGT
AAATATTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACCTGTAACTCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCA
GGAGTCCCATCAAGGTTCACTGGGAGTGGGTCTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
ATTGCCACTTACTTTTGGCAACAGGGAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACTAAGTTGGAATAACAGGC
TCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCGATCTGGCAGGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAACTGCAAGGAGTCAGGACCT
GGCCTGGTGGCGCCTCAGAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGAAGC
TGGATTCGCCAGCCTCCAGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCATATACTATAATTC
GCTCTCAATCCAGACTGACCATATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACT
GATGACACAGCATTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTCTGGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCCTCTCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAAT
GGAACCATTCATGTGAAAGGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCGGACCTTCTAAGCCCTTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTGGGGGAGTCTGGCTTGTATAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTTATATTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCA
CCATATGCCCCACACCGGACTTCGAGCCTATCGCTCCAAACGGGCGAGAAAGAACTCCTGTATATTTCAACAA
CCATTTATGAGACAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAAGAAGAAGAGGAGGA
TGTGAAGTGAAGTGAAGTTGAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCTTGAGATGGGGGGAAGCCG
AGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCTCAGTGAAGTTGGG
ATGAAAGGCGAGCGCGAGGGGCAAGGGGACGATGGCCTTTACAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
GACGCCCTTCAATGCAGGCCCTGCCCTCGTAATGA (SEQ ID NO: 1)

Фиг. 3А

Транслированная белковая последовательность «ненастраиваемого»/«классического» CAR

<Секреторный сигнал> (SEQ ID NO: 2)

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIIP

<scFv против CD19> (SEQ ID NO: 3)

DIQMTQTSSLSASLGDVITISCRASQDISKYLWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNL
EQEDIATYFCQGNLTLYTGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPD
YGVSWIRQPPRKGLWLVIGWSETTYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDATAIYYCAKHYHYGGSYAMDY
WGQGTSVTVSSAAA

<Шарнирный домен CD28, трансмембранный и костимуляторный домен> (SEQ ID NO: 4)

IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDY
MNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

<Костимуляторный домен CD137 (4-1BB)> (SEQ ID NO: 5)

KRGKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEGGCEL

<Активационный домен CD3 дзета> (SEQ ID NO: 6)

RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG
ERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

Фиг. 3В

Последовательность нуклеиновой кислоты «TCR-настраиваемого»/«костимуляторного» CAR

ATGCTTCTCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCATTCTCTGATCCAGACATCCAGATG
ACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGT
AAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGATGGAACCTGTTAACTCCTGATCATCATACATCAAGATTACACTCA
GGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
ATTGCCACTTACTTTTGCCAAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACTAAGTTGGAATAACAGGC
TCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCCGGATCTGGCGAGGGATCCACCAAGGGCGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCT
GGCCTGGTGGCGCCTCAGACAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCAATTACCCGACTATGGTGTAAAGC
TGGATTCCGCCGCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGTAGTGAACCCACATACTATAATTCA
GCTCTCAAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAATCCAAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACT
GATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGA
ACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCGGCCGCAATTGAAGTTATGTATCTCTCTCTTACCTAGACAAATGAGAAGCAAT
GGAACCATTTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAAGTCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCCTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTTGGGGAGTCTGGCTTGTCTAGCTTGTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGT
AAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCGCCGCCGCCGCCACCCGCAAGCATTACCAG
CCCTATGCCCCACACGCGACTTGCAGCCTATCGCTCAAACGGGGCAGAAAGAACTCTGTATATTTCAACA
CCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAGATGGCTGAGTCCGCTTTCCAGAAAGAAGAGGAGGA
TGTGAAGTGAATGA (SEQ ID NO: 7)

Фиг. 4А

Транслированная белковая последовательность «TCR-настраиваемого»/«костимуляторного» CAR

<Секреторный сигнал> (SEQ ID NO: 8)
MLLLVTSLLLCLEPHFAFLIP

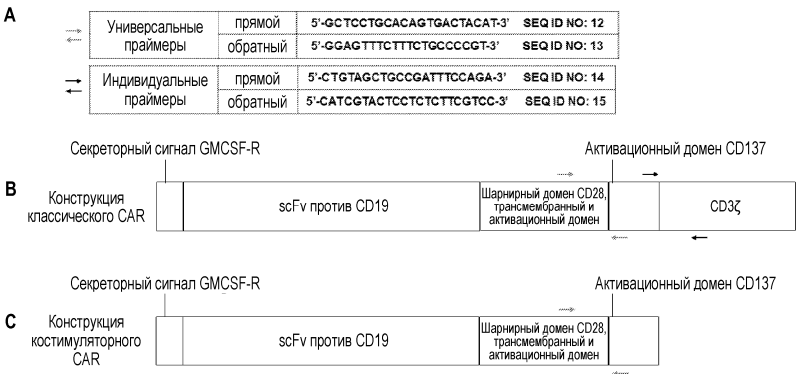
<scFv против CD19> (SEQ ID NO: 9)
DIQMTQTSSLSASLGDRTIISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIAITFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGTSVSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLWLVIGWSETTYNSALKSRLTIKDNSKSVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAAA

<Шарнирный домен CD28, трансмембранный и костимуляторный домен> (SEQ ID NO: 10)
IEVMYPPYLDNEKSNGTIINVKGKHLCPSPFPGSPKPFWLTVVGVGLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLSHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

<Активационный домен CD137 (4-1BB) /костимуляторный домен> (SEQ ID NO: 11)
KRGKRLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL

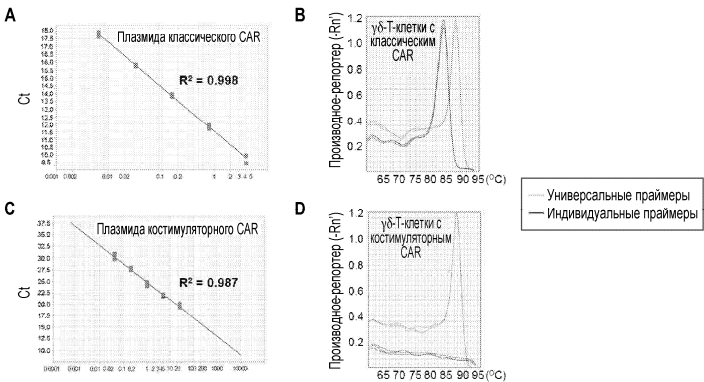
Фиг. 4В

Праймеры, используемые для детекции экспрессии CAR посредством количественной ПЦР



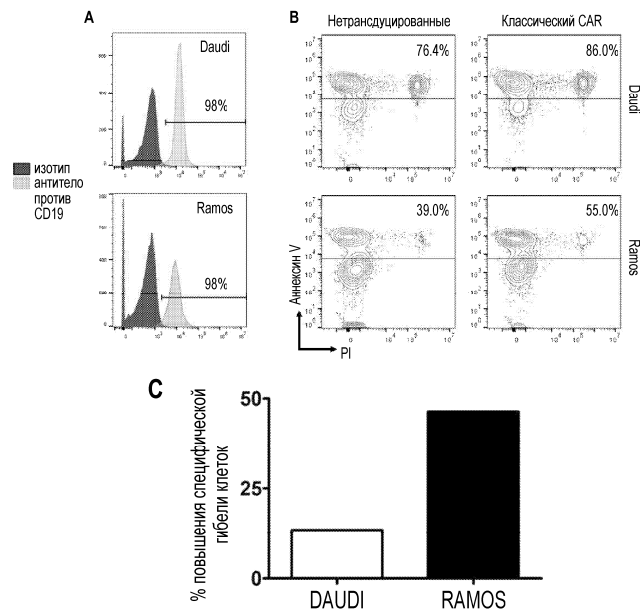
Фиг. 5

Количественное определение экспрессии классического CAR и костимуляторного CAR



Фиг. 6

Активность $\gamma\delta$ -Т-клеток с классическим CAR в отношении линий CD19-положительных клеток лимфомы



Активность $\gamma\delta$ -Т-клеток с классическим и костимуляторным CAR в отношении линий CD19-положительных клеток лимфомы

