# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)

2023.11.09

(21) Номер заявки

202091333

(22) Дата подачи заявки

2018.11.26

#### СПОСОБЫ АКТИВАЦИИ, МОДИФИКАЦИИ И ЭКСПАНСИИ γδ Т-КЛЕТОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И СВЯЗАННЫХ С НИМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

62/591,041; 10 2017 127 984.9 (31)

(32) 2017.11.27

(33) US; DE

(43) 2020.08.25

(86) PCT/US2018/062442

WO 2019/104269 2019.05.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ИММАТИКС ЮС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

> Дао Моник, Мата Мелинда, Новика Александра, Биллиард Янник, Уолтер Стеффен (US), Миссель Сара, Куттруфф-Кокуй Сабрина, Хилф Норбет (DE)

(74) Представитель:

Угрюмов В.М., Гизатуллин Ш.Ф. (RU)

(56) EP-A1-3208329

VAN ACKER ET AL.: HELEEN H. "Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells", JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY, vol. 9, no. 1, 29 September 2016 (2016-09-29), XP055555493, DOI: 10.1186/S13045-016-0329-3 page 2 - page 3; figure 3, page 6

**MOHANADH NADA** ET "Enhancing adoptive cancer immunotherapy V[gamma]2V[delta]2 T cells through pulse zoledronate stimulation", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CÁNCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 5, no. 1, 21 February 2017 (2017-02-21), pages 1-23, XP021242440, DOI: 10.1186/S40425-017-0209-6 page 2 - page 3; figures 5-6

US-A1-2010009447

GU YANJUN ET AL.: "Rapamycin together TGF-[beta]1, IL-2 and IL-15 induces the generation of functional regulatory [delta]T monon", cells from human peripheral blood JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHÓDS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V..AMSTERDAM, NL, vol. 402, no. 1, 22 November 2013 (2013-11-22), pages 82-87, XP028820466, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/ J.JIM.2013.11.009, the whole document

CN-A-103756962

WO-A1-2016055996

WO-A1-2016087871

GARCIA V E ET AL.: "IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens.", JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD.: 1950) 01 MAY 1998, vol. 160, no. 9, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 4322-4329, XP002788890, ISSN: 0022-1767

Изобретение относится к экспансии и активации Т-клеток. В одном аспекте настоящее изобретение относится к экспансии и активации γδ Т-клеток, которые могут применяться для трансгенной экспрессии. В другом аспекте изобретение относится к экспансии и активации γδ Т-клеток при истощении α- и/или β-ТКР-положительных клеток. В настоящем изобретении также предложены популяции Т-клеток, включающие экспансированные үб Т-клетки и истощенные по содержанию или с уменьшенным содержанием α- и/или β-ТКР-положительных клеток. Кроме того, предложены способы применения предложенных популяций Т-клеток.

#### Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей международной заявке РСТ (договор о патентной кооперации) испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на патент США №62/591041, поданной 27 ноября, заявке на патент Германии №102017127984.9, поданной 27 ноября 2017 г., содержание которых в полном объеме включено в данный документ путем ссылки.

#### Уровень техники 1. Область изобретения

Настоящее раскрытие сущности изобретения относится к экспансии и активации Т-клеток. В одном аспекте настоящее раскрытие относится к экспансии и активации  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые могут применяться для трансгенной экспрессии. В другом аспекте раскрытие относится к экспансии и активации  $\gamma\delta$  Т-клеток при истощении  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительных клеток. В настоящем раскрытии также предложены популяции Т-клеток, включающие экспансированные  $\gamma\delta$  Т-клетки и истощенные по содержанию или с уменьшенным содержанием  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительных клеток. В раскрытии, кроме того, предложены способы применения предложенных популяций Т-клеток.

#### 2. Уровень техники

 $\gamma\delta$  Т-клетки представляют собой подвид Т-клеток, экспрессирующий  $\gamma\delta$ -ТКР вместо  $\alpha\beta$ -ТКР.  $\gamma\delta$ -Т-клетки могут быть подразделены на два основных подвида -связанные с тканью V $\delta$ 2-отрицательные клетки и периферические циркулирующие V $\delta$ 2-положительные клетки, конкретнее V $\gamma$ 9 $\delta$ 2. Оба подвида, как было показано, проявляют антивирусную и противоопухолевую активность. В отличие от обычных  $\alpha\beta$ -ТКР-экспрессирующих клеток,  $\gamma\delta$ -ТКР-экспрессирующие клетки распознают свои мишени независимо от классических молекул МНС I и II. Аналогично естественным киллерным (NK) Т-клеткам  $\gamma\delta$ -Т-клетки экспрессируют NKG2D, который связывается с неклассическими молекулами МНС, т.е. последовательностью белка A, родственного полипептиду МНС I класса (МІСА), и последовательностью белка B, родственного полипептиду МНС I класса (МІСВ), присутствующими на клетках в условиях стресса и/или опухолевых клетках.  $\gamma\delta$ -ТКР распознает ряд лигандов, например, фосфоантигены, связанные со стрессом и/или опухолью.  $\gamma\delta$ -Т-клетки опосредуют прямой цитолиз своих мишеней за счет многочисленных механизмов, а именно секреции TRAIL, FasL, перфорина и секреции гранзима. Кроме того,  $\gamma\delta$ -Т-клетки, экспрессирующие CD16, усиливают антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ).

Проблематичным для  $\gamma\delta$ -Т-клеток, которые в общем могут присутствовать в периферической крови в количестве лишь 1-5%, является тот факт, что  $\gamma\delta$ -Т-клетки невозможно выделить с чистотой и в количестве, достаточном для медицинского применения, в особенности из небольшого объема собранной крови, клетки из которого затем подвергают активации и/или пролиферации. Увеличение объема собираемой крови пациента для обеспечения чистоты и нужного количества  $\gamma\delta$ -Т-клеток, достаточного для медицинского применения, также представляет собой проблему, поскольку это влечет за собой колоссальную нагрузку на пациента.

До настоящего момента в клинических исследованиях с аутологичными  $V\gamma982$  Т-клетками может использоваться протокол экспансии  $V\gamma982$  Т-клеток, представляющий собой 14-дневную обработку МКПК бисфосфонатом, а именно золедронатом и памидронатом и 100 Ед/мл ИЛ-2. В лучшем случае в результате этого процесса может быть достигнуто 100-кратное увеличение общего количества  $V\gamma982$  Т-клеток в течение 14 дней; после чего скорость экспансии падает, что соответствует росту гибели клеток. Таким образом, обычно применяющийся протокол экспансии  $V\gamma982$  не может обеспечить достаточным числом клеток, чтобы стать коммерчески целесообразным аллогенным продуктом.

В патенте США 7749760 описано вещество, стимулирующее пролиферацию Vγ9Vδ2 Т-клеток, содержащее бисфосфонат, интерлейкин 2 (ИЛ-2), и интерлейкин 18 (ИЛ-18).

В патенте США 8962313 описан способ одновременной пролиферации цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), специфических к антигену заболевания, и γδ-Т-клеток за счет внесения антигена заболевания в выделенную периферическую кровь; и культивирование полученной в результате комбинации в культуральной среде, содержащей интерлейкин.

В патентной заявке WO 2014/072446 описан способ индукции пролиферации  $\gamma\delta$  Т-клеток без ИЛ-2 при использовании комбинации активатора  $\gamma\delta$  Т-клеток и ИЛ-33 для применения в лечении инфекции, рака, аутоиммунных и других заболеваний.

В патентной заявке WO 2016/166544 описано, что  $\gamma\delta$  Т-клетки могут увеличивать численность в присутствии фосфоантигена изопентенилпирофосфата (ИПФ), а цитокины могут быть добавлены на этапе культивирования для поддержания пролиферации  $\gamma\delta$  Т-клеток и сохранения клеточного фенотипа мононуклеарных клеток периферической крови.

В патентной заявке США 2011/0158954 описан способ получения популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, причем способ включает этап культивирования популяции клеток, содержащей  $\gamma\delta$  Т-клетки, в присутствии (a) фибронектина, фрагмента фибронектина или его смеси и (b) фактора активации  $\gamma\delta$  Т-клеток.

В патентной заявке США 2016/0175358 описан положительный и/или отрицательный отбор на ос-

нове маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых собранными  $\gamma\delta$  Т-клетками, который может быть использован для непосредственного выделения  $\gamma\delta$  Т-клеток из различных источников, например, из пробы периферической крови, пробы пуповинной крови, из опухоли, биоптата опухоли, ткани, лимфы или из пробы эпителия субъекта,  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть выделены из комплексной пробы на основе положительной или отрицательной экспрессии CD4, CD8, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  и других подходящих маркеров клеточной поверхности.

Существует потребность в способах, которые позволили бы получить достаточное число  $\gamma\delta$  Т-клеток, представляющее собой коммерчески целесообразный аллогенный продукт. Решение данной технической задачи предложено в вариантах осуществления, охарактеризованных в формуле изобретения.

#### Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте в изобретении раскрыт способ активации и/или экспансии  $\gamma\delta$  Т-клеток, включая выделение  $\gamma\delta$  Т-клеток из пробы крови субъекта человеческого происхождения, активацию выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната и цитокина как индивидуального соединения или композиции цитокинов и экспансию активированных  $\gamma\delta$  Т-клеток при отсутствии аминобисфосфоната и в присутствии цитокина как индивидуального соединения или композиции цитокинов.

В одном аспекте настоящая заявка относится к способам экспансии и активации γδ Т-клеток, включая выделение γδ Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта человеческого происхождения, причем выделение включает приведение МКПК в контакт с антителами к α- и β-Т-клеточному рецептору (ТКР), например, антителами кαβ ТКР, конъюгированными с биотином или магнитными частицами, истощение МКПК по α- и/или β-ТКР-положительным клеткам, например, при использовании микрочастиц или магнитных частиц, покрытых стрептавидином, активацию выделенных γδ-Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного соединения, содержащего аминобисфосфонат и/или фосфоантиген, и по меньшей мере один цитокин, включающий рекомбинантный интерлейкин человека 2 (ИЛ-2), и/или рекомбинантный интерлейкин человека 15 (ИЛ-15), например, ИЛ-2 в отдельности, IL-15 в отдельности, или комбинацию ИЛ-2 и ИЛ-15, а также экспансию активированных γδ-Т-клеток при отсутствии по меньшей мере одного соединения и в присутствии по меньшей мере одного цитокина.

В другом аспекте настоящее раскрытие относится к способам экспансии и активации  $\gamma\delta$  Т-клеток, включая выделение  $\gamma\delta$  Т-клеток из продукта лейкафереза субъекта человеческого происхождения, причем выделение включает приведение МКПК в контакт с антителами к  $\alpha$ - и  $\beta$ -Т-клеточному рецептору (ТКР), например, антителами к  $\alpha\beta$  ТКР, конъюгированными с биотином или магнитными частицами, истощение МКПК по  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительным клеткам, например, при использовании микрочастиц или магнитных частиц, покрытых стрептавидином, активацию выделенных  $\gamma\delta$ -Т-клеток в присутствии по меньшей мере одного соединения, содержащего аминобисфосфонат и/или фосфоантиген, и по меньшей мере один цитокин, включающий ИЛ-2 и/или ИЛ-15, а также экспансию активированных  $\gamma\delta$ -Т-клеток при отсутствии по меньшей мере одного соединения и в присутствии по меньшей мере одного цитокина.

В еще одном аспекте раскрытия предложен способ активации и экспансии  $\gamma\delta$  Т-клеток, включая выделение  $\gamma\delta$ -Т-клеток из пробы крови субъекта человеческого происхождения, активацию выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната, лиганда Toll-подобных рецепторов 2 (TLR2) и композиции цитокинов, состоящей по существу из ИЛ-2 и ИЛ-15, и экспансию активированных  $\gamma\delta$  Т-клеток при отсутствии аминобисфосфоната и в присутствии упомянутой композиции цитокинов.

В одном аспекте раскрытия предложены способы активации Т-клеток при использовании методик, описанных в настоящем документе. В другом аспекте раскрытия предложены способы экспансии Т-клеток при использовании методик, описанных в настоящем документе. В еще одном аспекте раскрытия сущности изобретения предложены способы активации и увеличения численности Т-клеток при использовании методик, описанных в настоящем документе.

В одном аспекте активация выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток производится в присутствии золедроновой кислоты, лиганда TLR2 и композиции цитокинов, состоящей из ИЛ-2 и ИЛ-15. В другом аспекте композиция цитокинов состоит из ИЛ-2 или ИЛ-15. В одном аспекте способы, описываемые в настоящем документе, являются in vitro-способами.

В одном аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетки выделяют из продукта лейкафереза, например, LeukoPak®, полученного от субъекта, например, субъекта человеческого происхождения. В другом аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетки выделяют не из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), как, например, пуповинной крови. В одном аспекте проба крови включает мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и/или продукт лейкафереза.

В другом аспекте  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительные клетки включают  $\alpha\beta$ -Т-клетки и естественные киллерные Т (NKT)-клетки.

В еще одном другом аспекте аминобисфосфонат может быть золедронатом, памидронатом, алендронатом, ризедронатом, ибандронатом, инкадронатом, клодронатом, этидронатом или неридронатом, их солью и/или их гидратом. В еще одном другом аспекте единственным аминобисфосфонатом, используе-

мым в описываемых а настоящем документе способах, является золедронат.

В другом аспекте фосфоантиген может быть (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфатом (ГМБПФ), изопреноидпирофосфатами (фарнезилпирофосфатом (ФПФ), геранилгеранилпирофосфатом (ГГПФ), изопентилпирофосфатом (ИПФ) или диметилаллилдифосфатом (ДМАДФ).

В изобретении дополнительно предложена активация  $\gamma\delta$  Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната, ИЛ-2 и ИЛ-15. В еще одном другом аспекте активация происходит в присутствии аминобисфосфоната и ИЛ-2 или аминобисфосфоната и ИЛ-15.

В одном аспекте активация производится в присутствии фосфоантигена, ИЛ-2 и ИЛ-15; или в присутствии фосфоантигена и ИЛ-15.

В другом аспекте аминобисфосфонат является золедроновой кислотой. В другом аспекте фосфоантиген является ИПФ.

В другом аспекте аминобисфосфонат может иметь концентрацию от примерно 0,1 мкМ до примерно 500 мкМ, от примерно 0,1 мкМ до примерно 300 мкМ, от примерно 0,1 мкМ до примерно 300 мкМ, от примерно 0,1 мкМ до примерно 100 мкМ, от примерно 0,5 мкМ до примерно 100 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 500 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 400 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 300 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 200 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 60 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 3 мкМ, от примерно 1 мкМ до примерно 5 мкМ, от примерно 6 мкМ, от примерно 6 мкМ, от примерно 6 мкМ, от примерно 6 мкМ, от примерно 8 мкМ до примерно 9 мкМ до приме

В другом аспекте аминобисфосфонат может иметь концентрацию от примерно 0,1 мкМ до примерно 100 мкМ или от примерно 1 мкМ до примерно 100 мкМ. В другом аспекте аминобисфосфонат может иметь концентрацию примерно 5 мкМ.

В еще одном аспекте плотность посева выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток во время активации составляет от примерно  $0.01\times10^6$  клеток/см² до примерно  $1\times10^7$  клеток/см², от примерно  $0.1\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.5\times10^6$  клеток/см², от примерно  $0.5\times10^6$  клеток/см² до примерно

В еще одном аспекте плотность посева выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток во время активации составляет от примерно  $0.5\times10^6$  клеток/см $^2$  до примерно  $3\times10^6$  клеток/см $^2$ .

В одном аспекте концентрация ИЛ-2 во время активации и/или экспансии составляет от примерно 10 Ед/мл до примерно 1000 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 500 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 500 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 300 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 200 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 150 Ед/мл, от примерно 10 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл, от примерно 20 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл, от примерно 40 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл, от примерно 40 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл, от примерно 50 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл, от примерно 100 Ед/мл до примерно 50 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл до примерно 50 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл до примерно 50 Ед/мл до примерно 150 Ед/мл.

В другом аспекте концентрация ИЛ-2 во время активации и/или экспансии составляет от примерно 50 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл. В другом аспекте концентрация ИЛ-15 во время активации и/или экспансии составляет от примерно 10 нг/мл до примерно 1 мкг/мл, от примерно 10 нг/мл до примерно 500 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до примерно 300 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до примерно 300 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до примерно 150 нг/мл, от примерно 10 нг/мл до примерно 100 нг/мл, от примерно 100 нг/мл, от примерно 30 нг/мл до примерно 100 нг/мл, от примерно 30 нг/мл до примерно 100 нг/мл, от примерно 60 нг/мл до примерно 100 нг/мл, от примерно 80 нг/мл, от примерно 30 нг/мл до примерно 30 нг/мл до примерно 100 нг/мл, от примерно 80 нг/мл, от примерно 100 нг/мл, от примерно 100 нг/мл до примерно 100 нг/мл до примерно 100 нг/мл до примерно 100 нг/мл до примерно 100 нг/мл.

В другом аспекте концентрация ИЛ-15 во время активации и/или экспансии составляет от примерно 50 нг/мл до примерно 100 нг/мл.

В описании далее раскрыты аспекты, в которых активация производится в присутствии золедроновой кислоты при концентрации примерно 1 мкМ до примерно 100 мкМ, ИЛ-2 при концентрации от при-

мерно 10 Ед/мл до примерно 200 Ед/мл и ИЛ-15 при концентрации примерно 10-500 нг/мл. В еще одном аспекте активация, экспансия производится в присутствии ИЛ-2 при концентрации от примерно 10 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл и/или ИЛ-15 при концентрации примерно 50-200 нг/мл.

В другом аспекте цитокины могут включать ИЛ-7, ИЛ-18 и/или ИЛ-21. В одном аспекте в способы, описанные в настоящем документе, не входят один или несколько ИЛ-12, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-33, ИЛ-4, ИЛ-9 и/или ИЛ-23 во время экспансии, активации или как экспансии, так и активации.

В еще одном аспекте по меньшей мере одно соединение дополнительно включает лиганд Toll-подобного рецептора 2 (TLR2).

В одном аспекте лиганд TLR2 выбран из группы, состоящей из амфотерицина В, L-теанина, таннина и полифенолов.

В другом аспекте лиганд TLR2 является амфотерицином В.

В еще одном аспекте по меньшей мере одно соединение включает дополнительно N-ацетилцистеин (NAC) и/или глютамин/глютамакс.

В одном аспекте концентрация NAC составляет от примерно 1 мМ до примерно 10 мМ, примерно 2 мМ до примерно 8 мМ, примерно 0,5 мМ до примерно 5 мМ или примерно 0,5 мМ до примерно 2,5 мМ.

В другом аспекте по меньшей мере одно соединение дополнительно включает ингибитор СОХ-2.

В еще одном аспекте ингибитор СОХ-2 является ибупрофеном.

В одном аспекте экспансия производится дополнительно в присутствии N-ацетилцистеина (NAC) и/или глютамина/глютамакса.

В одном аспекте концентрация NAC составляет от примерно 1 мМ до примерно 10 мМ.

В одном аспекте продолжительность активации оставляет не более чем примерно 7 дней, примерно 10 дней, примерно 12 дней, примерно 14 дней, примерно 16 дней или примерно 20 дней.

В одном аспекте продолжительность активации оставляет от 1 дня до примерно 10 дней, от 1 дня до примерно 9 дней, от 1 дня до примерно 8 дней, от 1 дня до примерно 7 дней, от 1 дня до примерно 6 дней, от 1 дня до примерно 5 дней, от 1 дня до примерно 4 дней, от примерно 2 дней до примерно 10 дней, от примерно 2 дней до примерно 8 дней, от примерно 2 дней до примерно 3 дней до примерно 7 дней или от примерно 4 до примерно 6 дней.

В другом аспекте продолжительность активации составляет от примерно 1 дня до примерно 7 дней.

В одном аспекте продолжительность экспансии оставляет более чем примерно 7 дней, примерно 10 дней, примерно 12 дней, примерно 14 дней, примерно 16 дней, примерно 20 дней, примерно 22 дня, примерно 24 дня, примерно 26 дней, примерно 28 дней или примерно 30 дней. В одном аспекте продолжительность экспансии оставляет от примерно 7 дней до примерно 30 дней, от примерно 7 дней до примерно 25 дней или от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

В одном аспекте плотность  $\gamma\delta$  Т-клеток во время экспансии составляет от примерно  $0,1\times10^6$  клеток/см² до примерно  $5\times10^6$  клеток/см², от примерно  $0,25\times10^6$  клеток/см² до примерно  $5\times10^6$  клеток/см², от примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см², от примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0,5\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.7\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.7\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.7\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.7\times10^6$  клеток/см² до примерно  $0.9\times10^6$  клеток/см² до

В другом аспекте цитокины, используемые при экспансии, могут дополнительно включать ИЛ-18, ИЛ-21 и ИЛ-7.

В одном аспекте настоящая заявка относится к популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток после культивирования с увеличением численности и активации, полученной с помощью способа согласно одному из описанных в настоящем документе аспектов.

В другом аспекте настоящая заявка относится к способам усиления эффективности вирусной трансдукции в  $\gamma\delta$  Т-клетках, включая трансдукцию экспансированных и активированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, полученных с помощью способа согласно одному из аспектов, с первого по шестнадцатый, с помощью рекомбинантного вирусного вектора.

В другом аспекте вирусный вектор является ретровирусным вектором.

В другом аспекте вирусный вектор является  $\gamma$ -ретровирусным вектором или лентивирусным вектором.

В еще одном аспекте вирусный вектор экспрессирует CD8 и αβ-ТКР.

В одном аспекте настоящая заявка относится к сконструированным  $\gamma\delta$  Т-клеткам, полученным с помощью способа настоящего изобретения.

В одном аспекте настоящая заявка относится к популяции экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, полученных с помощью способа по настоящему изобретению, в которой концентрация экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток составляет по меньшей мере примерно  $1\times10^5$  клеток/мл, по меньшей мере примерно  $1\times10^6$  клеток/мл, по меньшей мере примерно  $1\times10^8$  клеток/мл или по

меньшей мере примерно  $1 \times 10^9$  клеток/мл.

В одном аспекте настоящая заявка относится к способу лечения рака, включая введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, полученных с помощью способа настоящего изобретения.

В одном аспекте раковое заболевание выбрано из группы, в состав которой входят: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальная карцинома, связанные с ВИЧ виды рака, связанные с ВИЧ виды лимфомы, рак анального отверстия, рак аппендикса, астроцитомы, нейробластома, базальноклеточная карцинома, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, раковые опухоли кости, раковые опухоли головного мозга, такие как астроцитома мозжечка, астроцитома головного мозга/злокачественная глиома, эпендимома, медуллобластома, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиома зрительных путей и гипоталамическая глиома, рак молочной железы, аденомы бронхов, лимфома Беркитта, карцинома неизвестного первичного происхождения, лимфома центральной нервной системы, астроцитома головного мозга, рак шейки матки, детские раковые заболевания, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточная лимфома кожи, десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль, рак эндометрия, эпендимома, рак пищевода, саркома Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальная карциноидная опухоль, гастроинтестинальная стромальная опухоль, глиомы, лейкоз ворсистых клеток, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоклеточный (печени) рак, ходжкинская лимфома, гипофарингеальный рак, внутриглазная меланома, карцинома островковых клеток, саркома Капоши, рак почки, рак гортани, рак губ и полости рта, липосаркома, рак печени, раковые опухоли легких, такие как немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лейкозы, макроглобулинемия, злокачественная фиброзная гистиоцитома костей/остеосаркома, медуллобластома, меланомы, мезотелиома, метастатические плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелолейкоз, рак полости и придаточных пазух носа, назофарингеальная карцино, нейробластома, неходжкинская лимфома, немелкоклеточный рак легких, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркома/злокачественная фиброзная гистиоцитома костей, рак яичника, эпителиальный рак яичника, герминогенная опухоль яичника, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак придаточных пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитома, астроцитома шишковидной железы, герминома шишковидной железы, аденома гипофиза, плевролегочная бластома, плазмоклеточная опухоль, первичная лимфома центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточная карцинома, рак почечной лоханки и переходно-клеточный рак мочеточников, ретинобластома, рабдомиосаркома, рак слюнной железы, саркомы, раковые опухоли кожи, карцинома кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркома мягких тканей, плоскоклеточная карцинома, рак желудка, Т-клеточная лимфома, рак горла, тимома, карцинома вилочковой железы, рак щитовидной железы, трофобластная опухоль (гестационная), раковые опухоли с неизвестным первичным очагом, рак уретры, саркома матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемия Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В одном аспекте раковое заболевание является меланомой.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1А представлено истощение  $\alpha\beta$ -Т-клеток из МКПК в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения. МКПК инкубировали с антителами к ТКР, конъюгированными с биотином  $\alpha\beta$ , а затем микрочастицами, покрытыми стрептавидином согласно инструкциям производителя. Затем пробы прогоняли через колонку LS column в целях обогащения  $\alpha\beta$  ТКР-экспрессирующими клетками. Поток через колонку представляет собой истощенные по  $\alpha\beta$  ТКР фракции. После культивирования в течение ночи  $\alpha\beta$  ТКР-обогащенную фракцию и  $\alpha\beta$  ТКР-истощенную фракцию окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами к  $\alpha\beta$  ТКР и для сравнения - антителами к  $\alpha\beta$  3 чем следовал проточный цитометрический анализ.

На фиг. 1В и 1С показано минимальное остаточное количество  $\alpha\beta$ -клеток в V $\gamma$ 982 Т-клеточном продукте в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения,  $\alpha\beta$  истощение Т-клеток производили в МКПК нормальных доноров (донор A, донор Б и донор B) (фиг. 1В) и (донор 12 и донор 13) (фиг. 1С) при использовании имеющихся в продаже биотинилированных антител ка $\beta$  ТКР/микрочастиц, покрытых стрептавидином.  $\alpha\beta$  истощенные по Т-клеткам МКПК культивировали с золедронатом/ИЛ-2/ИЛ-15 в течение 14 дней, затем производили окрашивание поверхностей клеток соответствующими антителами, конъюгированными с флуорохромом, например, антителами ка $\beta$  ТКР и антителами к  $\gamma\delta$ TКР, чтобы произвести оценку остаточного количества  $\alpha\beta$  Т-клеток и обогащенных  $\gamma\delta$  Т-клеток с помощью суб-гейтирования по CD3.

На фиг. 1D представлен цитокиновый профиль  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Клетки  $V\gamma9\delta2$  обрабатывали Golgi Stop/Plug (то есть, ингибиторами транспорта белков) в течение 6 ч до сбора клеток. Клетки окрашивали для выявления поверхностных  $V\delta2$ , затем производили фиксацию и пермеабилизацию. Окрашивание на внутриклеточные TNF- $\alpha$ , ИЛ-

17а и IFN- $\gamma$  производили с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом, к TNF- $\alpha$ , ИЛ-17а и IFN- $\gamma$ .

На фиг. 1Е представлено истощение по  $\alpha\beta$ -Т-клеткам продукта лейкафереза, например, LeukoPak®, в соответствии с другим вариантом осуществления изобретения. Лейкоциты, в том числе дендритные клетки и клетки-предшественники из продукта лейкафереза могут инкубироваться с антителами к ТКР, конъюгированными с биотином  $\alpha\beta$ , а затем микрочастицами, покрытыми стрептавидином. Затем пробы прогоняли через колонку LS column в целях обогащения  $\alpha\beta$  ТКР-экспрессирующими клетками. Поток через колонку представляет собой истощенные по  $\alpha\beta$  ТКР фракции. После культивирования в течение ночи  $\alpha\beta$  ТКР-истощенные фракции окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами к  $\alpha\beta$  ТКР и для сравнения - антителами к  $\gamma\delta$  ТКР, за чем следовал проточный цитометрический анализ.

На фиг. 2 представлено воздействие молекул на активацию  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Во время этапа активации могут присутствовать аминобисфосфонаты, например, золедронат (ZA), или фосфоантигены, например, ИПФ, и цитокины, например, ИЛ-2 и/или ИЛ-15.

На фиг. 3 представлено воздействие молекул на экспансию Vγ9δ2 Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Во время этапа экспансии могут продолжать присутствовать цитокины без аминобисфосфонатов или фосфоантигена, ИПФ.

На фиг. 4А показано влияние плотности клеток на Т-клеточные маркеры во время экспансии в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. После активации в присутствии золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15 в течение 14 дней  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки экспансировали с помощью гомеостатических цитокинов, например, ИЛ-2 и ИЛ-15, без золедроната при высокой плотности (например,  $2\times10^6$  клеток/мл) и при низкой плотности (например,  $0.5\times10^6$  клеток/мл). Проводили анализ Т-клеточных маркеров, например, CD122, CD80, CD83, CD86, CD95 и CD95L.

На фиг. 4В показано влияние плотности клеток на клеточную смерть во время экспансии в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. После активации в присутствии золедроната, ИЛ-2, и ИЛ-15 в течение 14 дней Т-клетки экспансировали с помощью гомеостатических цитокинов, например, ИЛ-2 и ИЛ-15, без золедроната при высокой плотности (например,  $2 \times 10^6$  клеток/мл) и при низкой плотности (например,  $0.5 \times 10^6$  клеток/мл). Производили измерение уровня клеточной смертности.

На фиг. 5 представлено воздействие Амфотерицина В на  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки, экспрессирующие IL-2R $\alpha$ , в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Истощенные по  $\alpha\beta$ -клеткам МКПК культивировали в активирующей среде, дополненной золедронатом, ИЛ-2 ИЛ-15 в день 0. Через 48 ч добавляли Амфотерицин В и через 48 ч производили сбор клеток для анализа методом проточной цитометрии на экспрессию CD25 (или IL-2R $\alpha$ ) на поверхности CD3 $^+$ /V $\delta2$  Т-клеток.

На фиг. 6 показано воздействие золедроната (Зометы) на клеточную экспансию в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения, γδ Т-клеток экспансировали с помощью золедроната (Зометы) в заданной среде, содержащей ИЛ-2, ИЛ-15 и амфотерицин В.

На фиг. 7 представлена таблица со сроками вирусной трансдукции в  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. В день 1 производили истощение МКПК по  $\alpha\beta$ -Т-клеткам и активацию золедронатом в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15; через 24 ч (в день 2), клетки трансдуцировали с помощью соответствующего вирусного супернатанта при множественности заражения вирусом (МОІ) 1,5; анализ трансгенной экспрессии GFP (зеленый флуоресцирующий белок) производили методом проточной цитометрии в день 7 (т.е., на 5-ый день после трансдукции) в целях установления эффективности трансдукции; и в день 12 (т.е., на 10-ый день после трансдукции) в целях анализа стабильности трансгенной экспрессии.

На фиг. 8A показана экспрессия вирусного трансгена в  $V\gamma9\delta2$  Т-клетках при использовании  $\gamma$ -ретровирусного вектора в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Различные оболочечные вирусы, экспрессирующие белки, например, экспрессирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP)  $\gamma$ -ретровирус (например, псевдотип вируса лейкоза гиббонов (GALV) (например, SEQ ID NO: 4), псевдотип RD114TR (SEQ ID NO: 1) и GFP-экспрессирующий лентивирус (например, псевдотип VSV-G (например, SEQ ID NO: 3)) были проанализированы на их эффективность трансдукции в  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки на 5-ый и 10-ый день после трансдукции.

На фиг. 8В представлена экспрессия вирусного трансгена, например, CD8 $\alpha$ , в V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 Т-клетках, трансдуцированных псевдотипированным лентивирусным вектором RD114TR или VSV-G в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

На фиг. 9А представлена трансдукция  $\gamma\delta$  Т-клеток с помощью CD8 $\alpha\beta$  при использовании различных энхансеров трансдукции (RetroNectin® в сравнении с Vectofusin-1®) во время процесса трансдукции.  $\gamma\delta$  Т-клетки, полученные от 3 доноров (донор 1, донор 2 и донор 3), трансдуцировали ретровирусом, кодирующим CD8 $\alpha\beta$ , в присутствии RetroNectin® (фрагмент фибронектина, нанесенный на планшеты) или VectoFusin-1® (растворимый пептид в катионной форме), затем анализировали методом проточной цитометрии для определения %-го содержания CD8 $\alpha\beta$ + клеток.

На фиг. 9В показана эффективность трансдукции  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток сконструированными вирусами в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцировали без вируса (имитация) или трансдуцировали вирусом  $\alpha\beta$ -TKP в отдельности, вирусом CD8 в отдельности или вирусом  $\alpha\beta$ -TKP+CD8. Трансдуцированные клетки инкубировали с декстрамером TAA/MHC-PE, антителом к CD8 или декстрамером NYESO-PE (отрицательный контроль), затем проводили проточный цитометрический анализ.

На фиг. 10 показана масштабность экспансии  $V\gamma982$  Т-клеток, трансдуцированных генетически модифицированными вирусами в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.  $V\gamma982$  Т-клетки (GD) или  $\alpha\beta$ -Т-клетки (AB) были трансдуцированы без вируса (имитация), вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР (ТКР), вирусом CD8 (CD8) или CD8+ТКР, затем производили измерения масштабности экспансии с 7-го по 21-ый день после трансдукции.

На фиг. 11A представлены сконструированные  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцированные без вируса (имитация) или ретровирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровирусом CD8 $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ -ТКР+CD8) инкубировали с комплексом TAA/MHC, затем проводили проточный цитометрический анализ для выявления  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток, которые связываются с комплексом TAA/MHC.

На фиг. 11В представлены функциональные анализы сконструированных  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцированные без вируса (имитация) или ретровирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровирусом  $CD8\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ -ТКР+CD8) инкубировали с клеткамимишенями, затем проводили проточный цитометрический анализ для выявления CD107a, маркера апоптоза.

На фиг. 11С представлены функциональные анализы сконструированных  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в соответствии с другим вариантом осуществления изобретения.  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцированные без вируса (имитация) или ретровирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровирусом  $\alpha$ 

На фиг. 11D показана цитолитическая активность сконструированных  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцированные без вируса (имитация) или ретровирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровирусом

На фиг. 11E показана цитолитическая активность длительного действия сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Цитолитическую активность оценивали в режиме реального времени во время 84-часового анализа совместного культивирования. Мишень-положительные опухолевые клетки A375-RFP инкубировали без Т-клеток (опухолевые клетки) или с нетрансдуцированными клетками ( $\alpha\beta$ -Т-клетками и  $\gamma\delta$ -Т-клетками), с  $\alpha\beta$ -Т-клетками, трансдуцированными вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и вирусом CD8 $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR+ $\alpha\beta$ -Т-клетки), или с  $\gamma\delta$ -Т-клетками, трансдуцированными вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и вирусом CD8 $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR+ $\gamma\delta$ -Т-клетки), затем для измерения роста клетокмишеней проводили анализ клеток IncuCyte® live cell.

На фиг. 12A дано схематическое представление о сконструированном вирусе в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Конструкция химерный рецептор CD8/CD4-T2A-усеченный CSF1R содержит внеклеточный домен CD8α, связанный с трансмембранным и внутриклеточным доменом CD4.

На фиг. 12В дано схематическое представление о сконструированном вирусе в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Конструкция химерный рецептор CD8/CD4-T2A-CSF1R/41BB содержит внеклеточный домен CSF1R, расположенный за химерным белком CD8/CD4.

На фиг. 13 представлена терапия на основе аллогенных Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Терапия на основе аллогенных Т-клеток может включать сбор  $\gamma\delta$  Т-клеток у здоровых доноров, генетическую модификацию  $\gamma\delta$  Т-клеток с помощью вирусной трансдукции интересующими экзогенными генами, такими как экзогенные ТКР, с последующей экспансией, сбором сконструированных экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые могут быть подвергнуты криоконсервации в качестве Т-клеточных продуктов, "готовых к применению", прежде чем они будут вводиться пациентам с помощью инфузии.

На фиг. 14 показано производство  $\gamma\delta$ -Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Производство  $\gamma\delta$ -Т-клеток может включать сбор или получение лейкоцитов или МКПК, например, продукта лейкафереза, истощение  $\alpha\beta$ -Т-клеток из МКПК или продукта лейкафереза, последующую активацию, трансдукцию и экспансию  $\gamma\delta$ -Т-клеток.

#### Подробное описание

Терапия на основе аллогенных Т-клеток может быть основана на методе генной инженерии аллогенных γδ Т-клеток в целях экспрессии экзогенных ТКР. Кроме того, для специфического распознавания опухоли за счет эктопического ТКР γδ Т-клетки могут обладать активностью по отношению к многочисленным видам раковых опухолей согласно настоящему описанию.

В одном аспекте настоящее раскрытие относится к экспансии и/или активации Т-клеток. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к экспансии и/или активации  $\gamma\delta$  Т-клеток в отсутствии веществ, которые связываются со специфичными к  $\gamma\delta$  ТКР эпитопами, такими как антитела к  $\gamma\delta$  ТКР. В другом аспекте настоящее раскрытие относится к экспансии и/или активации  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые могут применяться для трансгенной экспрессии.

Раскрытие относится далее к экспансии и активации  $\gamma\delta$  Т-клеток при истощении  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительных клеток. В настоящем раскрытии также предложены популяции Т-клеток, включающие экспансированные  $\gamma\delta$  Т-клетки и истощенные по содержанию или с уменьшенным содержанием  $\alpha$ - и/или  $\beta$ -ТКР-положительных клеток. В раскрытии, кроме того, предложены способы применения предложенных популяций Т-клеток.

В другом аспекте в настоящем описании предложены способы получения ТКР-модифицированных  $V\gamma982$  Т-клеток в крупном масштабе в соответствии с требованиями Надлежащей производственной практики (GMP).

При отсутствии питающих клеток добавление ИЛ-18 к очищенным уб Т-клеткам усиливает экспансию γδ Т-клеток с заметным увеличением количества поверхностного высокоаффинного рецептора к ИЛ-2 (CD25 или ИЛ-2Ra). Кроме того, Амфотерицин В, лиганд Toll-подобного рецептора (TLR2), может активировать γδ Т-клетки, CD8<sup>+</sup> Т-клетки и NK-клетки и усиливать выявление поверхностной экспрессии CD25, высокоаффинного ИЛ-2Ra. В совокупности данные наблюдения подчеркивают решающую роль сигнальных путей ИЛ-2 в опосредованной золедронатом активации и экспансии Vγ982 Т-клеток. Таким образом, чтобы обеспечить максимальную доступность ИЛ-2 для пролиферации γδ Т-клеток за счет сигнальных путей ИЛ-2 (или снизить до минимального уровня секвестрацию ИЛ-2 высоким числом св Тклеток), способы настоящего раскрытия сущности могут включать истощение ав Т-клеток из нормальных МКПК при использовании имеющихся в продаже произведенных по правилам GMP реагентов к ав ТКР. Поскольку на данный момент ИЛ-18 как произведенного по правилам GMP реагента в продаже нет, по способам настоящего раскрытия культура может быть дополнена низкими дозами Амфотерицина В, чтобы увеличить поверхностную экспрессию CD25 для усиления связывания с ИЛ-2 и сигнальных путей ИЛ-2, что, в свою очередь, может усиливать восприимчивость к ИЛ-2 во время этапа активации/экспансии. Кроме того, может быть добавлен ИЛ-15, поскольку ИЛ-15, как было показано, увеличивает пролиферацию и выживаемость Vу982 Т-клеток, обработанных ИПФ.

На фиг. 13 представлен подход к адоптивной терапии на основе аллогенных Т-клеток, с помощью которого возможна доставка Т-клеточных продуктов, "готовых к применению", таких как уб Т-клеточных продуктов, для быстрого лечения пригодных пациентов со специфическим видом раковой опухоли, экспрессирующим интересующую мишень в своих опухолях. Такая терапия может включать сбор уб Т-клеток у здоровых доноров, генетическую модификацию уб Т-клеток с помощью вирусной трансдукции интересующими экзогенными генами, такими как экзогенные ТКР, с последующей экспансией, сбором сконструированных экспансированных уб Т-клеток, которые могут быть подвергнуты криоконсервации в качестве Т-клеточных продуктов, "готовых к применению", прежде чем они будут вводиться пациентам с помощью инфузии. Поэтому данный подход может устранить необходимость в производстве персонализированных Т-клеток.

В целях выделения уб Т-клеток в одном аспекте уб Т-клетки могут быть выделены у субъекта или из комплексной пробы субъекта. В одном аспекте комплексная пробам может быть пробой периферической крови, пробы пуповинной крови, опухолью, предшественником стволовой клетки, биоптатом опухоли, тканью, лимфой или из участков эпителия субъекта, напрямую контактирующего с внешним окружением, или может быть получена из стволовых клеток-предшественников, уб Т-клетки могут быть непосредственно выделены из комплексной пробы субъекта, например, с помощью сортировки уб Т-клеток, которые экспрессируют один или несколько маркеров клеточной поверхности, при использовании технологии проточной цитометрии. γδ Т-клетки дикого типа могут экспонировать многочисленные антигенраспознающие, антигенпрезентирующие, костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, которые могут быть ассоциированы с γδ Т-клетками. Один или несколько маркеров клеточной поверхности, таких как специфические γδ ТКР, антигенраспознающие, антигенпрезентирующие молекулы, лиганды, молекулы адгезии или костимуляторные молекулы могут быть использованы для выделения уб Т-клеток дикого типа из комплексной пробы. Различные молекулы, ассоциированные с или экспрессирующиеся уб Тклетками, могут быть использованы для выделения уб Т-клеток из комплексной пробы. В другом аспекте в настоящем раскрытии предложены способы выделения смешанной популяции Vδ1+, Vδ2+, Vδ3+ клеток или любой их комбинации.

Например, мононуклеарные клетки периферической крови могут быть собраны у субъекта, к примеру, с помощью аппарата для афереза, включая систему Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare), или другого подходящего устройства/системы,  $\gamma\delta$  Т-клетка(-и), или желаемая субпопуляция  $\gamma\delta$  Т-клетки(-ок), может (могут) быть очищены из собранного образца, например, с помощью методов проточной цитометрии. Клетки пуповинной крови могут быть также получены из пуповинной крови во время родов субъекта.

Положительный и/или отрицательный отбор на основе маркеров клеточной поверхности, экспрессируемых собранными  $\gamma\delta$  Т-клетками, может быть использован для непосредственного выделения  $\gamma\delta$  Т-клеток или популяции  $\gamma\delta$  Т-клеток, экспрессирующих похожие маркеры клеточной поверхности из пробы периферической крови, пробы пуповинной крови, из опухоли, биоптата опухоли, ткани, лимфы или из пробы эпителия субъекта. К примеру,  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть выделены из комплексной пробы на основе положительной или отрицательной экспрессии CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit,  $\alpha$ -TKP,  $\beta$ -TKP,  $\alpha$ -TKP, NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337 (NKp30), CD336 (NKp46), OX40, CD46, CCR7 и других подходящих маркеров клеточной поверхности.

В одном аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть выделены из комплексной пробы, которую культивируют in vitro. В другом аспекте может быть активирована и подвергнута экспансии вся популяция МКПК, без предварительного истощения конкретных популяций клеток, таких как моноциты,  $\alpha\beta$  Т-клетки, В-клетки и NK-клетки. В другом аспекте обогащенные  $\gamma\delta$  Т-клеточные популяции могут быть получены до их специфической активации и экспансии. В других аспектах активация и экспансия  $\gamma\delta$  Т-клеток могут быть произведены без присутствия природных или сконструированных АПК. В других аспектах выделение и экспансия  $\gamma\delta$  Т-клеток из препаратов опухолевой ткани могут быть произведены при использовании иммобилизованных митогенов  $\gamma\delta$  Т-клеток, в том числе антител, специфичных к  $\gamma\delta$  ТКР, и других активирующих  $\gamma\delta$  ТКР веществ, в том числе лектинов. В другом аспекте выделение и экспансия  $\gamma\delta$  Т-клеток из препаратов опухолевой ткани могут быть произведены без митогенов  $\gamma\delta$  Т-клеток, в том числе антител, специфичных к  $\gamma\delta$  ТКР, и других активирующих  $\gamma\delta$  ТКР веществ, в том числе лектинов.

В одном аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетки выделяют из лейкафереза взятых у субъекта образцов, например, субъекта человеческого происхождения. В другом аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетки выделяют не из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

На фиг. 14 показано производство γδ-Т-клеток в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. Данный процесс может включать сбор или получение лейкоцитов или МКПК из продуктов лейкафереза. Лейкаферез может включать сбор цельной крови донора и разделение компонентов с помощью аппарата для афереза. Аппарат для афереза выделяет желаемые компоненты крови и возвращает остальные в систему кровообращения донора. Например, лейкоциты, плазма и тромбоциты могут быть собраны с помощью оборудования для афереза, а эритроциты и нейтрофилы - возвращены в систему кровообращения донора. В этом процессе могут быть использованы имеющиеся в продаже продукты лейкафереза. Другой способ получения лейкоцитов - это их выделение из лейкоцитарной пленки. В целях выделения из лейкоцитарной пленки у донора собирают и центрифугируют антикоагулированную цельную кровь. После центрифугирования кровь разделяют на плазму, эритроциты и лейкоцитарную пленку. Лейкоцитарная пленка - это слой, находящийся между слоями плазмы и эритроцитов. В результате сбора методом лейкафереза может быть получена высокая чистота и существенно более высокое содержание мононуклеарных клеток, чем при сборе лейкоцитарной пленки. Содержание мононуклеарных клеток, возможное при лейкаферезе, может быть, как правило, в 20 раз выше, чем получаемое из лейкоцитарной пленки. В целях обогащения мононуклеарных клеток для дальнейшего разделения может быть необходимо использование градиента Ficoll.

Чтобы произвести истощение  $\alpha\beta$  Т-клеток из МКПК,  $\alpha\beta$  ТКР-экспрессирующие клетки могут быть выделены из МКПК с помощью магнитной сепарации, например, при использовании магнитных частиц CliniMACS®, покрытых антителами к  $\alpha\beta$  ТКР, с последующей криоконсервацией МКПК, истощенных по несущим  $\alpha\beta$  ТКР Т-клеткам. Для производства "готовых к применению" Т-клеточных продуктов криоконсервированные МКПК, истощенные по несущим  $\alpha\beta$  ТКР Т-клеткам, могут быть разморожены и активированы в малом/среднем масштабе, например, в от 24 до 4-6-луночных планшетах или флаконах Т75/Т175, или в крупном масштабе, например, в 50 мл-100-литровых мешках, в присутствии аминобисфосфоната и/или изопентилпирофосфата (ИПФ) и/или цитокинов, например, интерлейкина 2 (ИЛ-2), интерлейкина 15 (ИЛ-15), и/или интерлейкина 18 (ИЛ-18), и/или других активаторов, например, лиганда Тоll-подобного рецептора 2 (TLR2), в течение 1-10 дней, например, 2-6 дней.

В одном аспекте выделенные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть быстро подвергнуты экспансии в ответ на контакт с одним или более антигенами. Некоторые  $\gamma\delta$  Т-клетки, такие как V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+Т-клетки, могут быстро экспансировать in vitro в ответ на контакт с некоторыми антигенами, как, например, пренилпирофосфатами, алкиламинами и метаболитами или микробными экстрактами во время культивирования ткани. Стимулированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут экспонировать многочисленные антигенпрезентирующие, костимуляторные молекулы и молекулы адгезии, которые упрощают выделение  $\gamma\delta$  Т-клеток из ком-

плексной пробы.  $\gamma\delta$  Т-клетки в составе комплексной пробы могут стимулироваться in vitro по меньшей мере одним антигеном в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней или другого подходящего периода времени. За счет стимуляции  $\gamma\delta$  Т-клеток подходящим антигеном популяция  $\gamma\delta$  Т-клеток может быть экспансирована in vitro.

Неограничивающие примеры антигенов, которые могут быть использованы для стимуляции экспансии γδ Т-клеток из комплексного образца in vitro могут включать пренил-пирофосфаты, такие как изопентилпирофосфат (ИПФ), алкиламины, метаболиты патогенных микроорганизмов человека, метаболиты комменсальных бактерий, метил-3-бутенил-1-пирофосфат (2МЗВ1РР), (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфат НМВ-РР), этилпирофосфат (ЭПФ), фарнесил пирофосфат (ФПФ), диметилаллилифосфат (ДМАФ), диметилаллилпирофосфат (ДМАПФ), этил-аденозин трифосфат (ЕРРРА), геранилпирофосфат (ГПФ), геранилпирофосфат (ГПФ), изопентил-адензинтрифосфат (ТИВАд 1), X-пирофосфат (ТИВАд 2), 3-формил-1-бутил-ирофосфат (ТИВАд 3), 3-формил-1-бутил-дезокситимидин трифосфат (ТИВАд 4), моноэтилалкиламины, аллил пирофосфат, кротоилпирофосфат, диметилаллил-γуридинтрифосфат, кротоил-γ-уридинтрифосфат, этиламин, изобутиламин, вторичный бутиламин, изо-амиламин и азот содержащие бисфосфонаты.

Активация и экспансия γδ Т-клеток может быть осуществлена при использовании активирующих и костимуляторных молекул, описанных в настоящем документе, чтобы инициировать специфическую пролиферацию и устойчивые популяции γδ Т-клеток. В одном аспекте активация и экспансия γδ Т-клеток из различных культур может привести к образованию различных клональных субпопуляций или смешанных поликлональных популяций. В другом аспекте различные вещества-агонисты могут быть использованы, чтобы идентифицировать вещества, которые подают специфические сигналы, активирующие образование уб-популяций. В другом аспекте вещества, которые подают специфические сигналы, активирующие образование уб-популяций, могут быть различными моноклональными антителами (МАb), направленными против γδ ТКР. В другом аспекте могут быть использованы костимуляторные молекулы для поддержки инициации специфической пролиферации γδ Т-клеток без индукции энергии и апоптоза клеток. Такие костимуляторные молекулы могут включать лиганды, связывающиеся с рецепторами, экспрессированными на уδ-клетках, такие как NKG2D, CD161, CD70, JAML, DNAX вспомогательная молекула-1 (DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP и CD28. В другом аспекте костимуляторные молекулы могут быть антителами, специфичными к уникальным эпитопам на молекулах CD2 и CD3. При экспрессии на αβ или γδ Т-клетках молекулы CD2 и CD3 могут иметь различные конформационные структуры. В другом аспекте антитела, специфичные к CD3 и CD2, могут приводить к различной активации уб Т-клеток.

Популяция уб Т-клетки может быть подвергнута экспансии ех vivo до конструирования уб Т-клетки. Неограничивающий пример веществ, которые могут быть использованы для стимуляции экспансии уб Т-клеточной популяции in vitro, может включать антитела к CD3 или к CD2, CD27, CD30, CD70, OX40, ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-9, ИЛ-33, ИЛ-18 или ИЛ-21, CD70 (лиганд CD27), фитогемагглютинин ( $\Phi$ ГА), конкавалин А (ConA), лаконос (PWM), белок агглютинин арахиса (PNA), соевый агглютинин (SBA), агглютинин чечевицы (LCA), агглютинин pisum sativum (зеленого горошка) (PSA), агглютинин helix pomatia (виноградной улитки) (HPA), лектин vicia graminea (вьющегося горошка) (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток.

Способность  $\gamma\delta$  Т-клеток распознавать широкий спектр антигенов может быть усилена за счет изменений  $\gamma\delta$  Т-клеток методами генной инженерии. В одном аспекте  $\gamma\delta$  Т-клетка может быть сконструирована, чтобы получить универсальную аллогенную терапию, при которой возможно распознавание интересующего антигена in vivo. Генная инженерия  $\gamma\delta$  Т-клеток может включать устойчивую интеграцию структуры, экспрессирующей распознающий опухоль фрагмент, такой как, например,  $\alpha\beta$  TKP,  $\gamma\delta$  TKP, химерный антигенный рецептор (CAR), который сочетает в одном рецепторе как связывание с антигеном, так и функции активации Т-клеток, его антиген-связывающего фрагмента или домена активации лимфоцитов в геном выделенной(ых)  $\gamma\delta$  Т-клетки(ок), цитокин (ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-21, ИЛ-18, ИЛ-19, ИЛ-33, ИЛ-4, ИЛ-9, ИЛ-23, ИЛ1 $\beta$ ) для усиления пролиферации, выживаемости и функционирования Т-клеток ех vivo и in vivo. Генная инженерия  $\gamma\delta$  Т-клеток может также включать устранение или нарушение экспрессии генов из одного или нескольких эндогенных генов в геноме выделенных  $\gamma\delta$  Т-клеток, таких как локус МНС (локусы).

В одном аспекте понятие "вирусы" относится как к встречающимся в природе вирусам, так и искусственным вирусам. Вирусы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия могут быть как оболочечным, так и безоболочечным вирусом. Парвовирусы (такие как AAV) являются примерами безоболочечных вирусов. В предпочтительном варианте осуществления вирусы могут быть оболочечными вирусами. В предпочтительных вариантах осуществления вирусы могут быть ретровирусами и, в частности, лентивирусами. Вирусные оболочечные белки, которые могут способствовать вирусной инфекции эукариотических клеток, могут включать полученные из ВИЧ-1 лентивирус-

ные векторы (LV), псевдотипированные оболочечными гликопротеинами (GP) из вируса везикулярного стоматита (VSV-G), модифицированного эндогенного ретровируса кошек (RD114TR), модифицированного вируса лейкоза гиббонов (GALVTR). Эти оболочечные белки могут эффективно способствовать внедрению других вирусов, таких как парвовирусов, в том числе аденоассоциированных вирусов (AAV), тем самым демонстрируя свою широкую эффективность. Например, возможно использование других вирусных оболочечных белков, в том числе вируса мышиного лейкоза Молони (MLV) 4070 env (как описано в работе Merten и соавт., J. Virol. 79:834-840, 2005; которая включена сюда путем ссылки), RD114 env (SEQ ID NO: 2), химерного оболочечного белка RD114pro или RDpro (который является химерным RD114-ВИЧ, сконструированным путем замены последовательности расщепления пептида R в RD114 на последовательность расщепления матриксного белка ВИЧ-1/капсида (MA/CA), как описано в работе Bell и соавт. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269-1276; которая включена сюда путем ссылки), бакуловируса GP64 env (как описано в работе Wang и соавт. J. Virol. 81:10869-10878, 2007; которая включена сюда путем ссылки), или GALV env (как описано в работе Merten и соавт., J. Virol. 79:834-840, 2005; которая включена сюда путем ссылки), или их производных.

RD114TR.

RD114TR - это химерный оболочечный гликопротеин, сконструированный из внеклеточного и трансмембранного доменов вируса лейкоза кошек RD114 и цитоплазматического хвоста (TR) оболочки амфотропного вируса мышей. Псевдотипированные RD114TR векторы могут опосредовать эффективный перенос генов в гематопоэтические клетки-предшественники человека и репопулирующие клетки NOD/SCID. Di Nunzio и соавт., Hum. Gene Ther 811-820 (2007)), содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. Псевдотипированные RD114 векторы могут также опосредовать перенос генов в моделях с крупными животными. (Neff и соавт., Mal. Ther. 2:157-159 (2004); Ни и соавт., Mal. Ther 611-617 (2003); и Kelly и соавт., Blood Cells, Molecules, & Diseases 30:132-143 (2003)), содержание каждой из данных ссылок в полном объеме включено путем ссылки.

Настоящее раскрытие может включать варианты RD114TR, последовательность которых по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. Например, может быть использован вариант RD114TR (RD114TRv1 (SEQ ID NO: 5)), обладающий примерно 96% идентичностью последовательности с RD114TR (SEQ ID NO: 1). В одном аспекте в раскрытии предложены варианты RD114TR, имеющие модифицированные аминокислотные остатки. Модифицированный аминокислотный остаток может быть выбран из вставки, делеции или замены аминокислоты. В одном аспекте замена, описанная в настоящем документе, является консервативной аминокислотной заменой. Это означает, что аминокислоты RD114TR могут быть заменены другими аминокислотами, имеющими похожие свойства (консервативные изменения, такие как похожая гидрофобность, гидрофильность, антигенность, тенденция к образованию или разрыву α-спиральных структур или 3-слойных структур). Неограничивающие примеры консервативных замен представлены, например, в работе Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки.

В другом аспекте настоящее раскрытие может включать варианты, последовательность которых по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 1,2, 3, 4 или 5.

В одном аспекте консервативные замены могут включать те, что описаны Dayhoff в работе "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research, содержание которой в полном объеме включено путем ссылки. Например, в одном аспекте аминокислоты, которые относятся к одной из следующих групп, могут быть заменены друг другом, что представляет собой консервативную замену: Группа 1: аланин (A), пролин (P), глицин (G), аспарагин (N), серин (S), треонин (T); группа 2: цистеин (C), серин (S), тирозин (Y), треонин (T); группа 3: валин (V), изолейцин (I), лейцин (L), метионин (М), аланин (А), фенилаланин (F); группа 4: лизин (К), аргинин (R), гистидин (Н); группа 5: фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W), гистидин (H); и группа 6: аспарагиновая кислота (D), глютаминовая кислота (E).

В одном аспекте консервативная аминокислотная замена может включать замену одной аминокислоты на другую из одного и того же класса, например, (1) неполярные: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) незаряженные полярные: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; и (4) основные: Lys, Arg, His. Другие консервативные аминокислотные замены могут быть осуществлены по следующему принципу: (1) ароматические: Phe, Tyr, His; (2) доноры протонов: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; и (3) акцепторы протонов: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln (см. патент США № 10106805).

В другом аспекте консервативные замены могут быть осуществлены в соответствии с табл. А. Способы предсказания толерантности белковой модификации могут быть взяты, например, из работы Guo и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004), содержание которой в полном объеме вклю-

чено путем ссылки.

Таблина А

	Гаолица А
	Conserva Консервативные аминокислотные замены
Amino Ac	Аминокислота <sub>s</sub> Замены (другие известны из уровня техники)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

В одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора через примерно 10 дней после трансдукции составляет от примерно 20% до примерно 60% от примерно 30% до примерно 50% или от примерно 35% до примерно 45%. В одном аспекте экспрессия трансгена в случае PD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-ый день после трансдукции составляет от примерно 20% до примерно 60% от примерно 30% до примерно 50% или от примерно 35% до примерно 45% в сравнении с экспрессией трансгена в случае VSV-G-псевдотипированных векторов на 10-ый день после трансдукции, составляющей от примерно 5% до примерно 25%, от примерно 2% до примерно 20%, от примерно 3% до примерно 15% или от примерно 5% до примерно 12% при одинаковых условиях. В еще одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-ый день после трансдукции составляет примерно 40% в сравнении с экспрессией трансгена в случае VSV-G-псевдотипированных векторов на 10-ый день после трансдукции, составляющей примерно 3,6%.

В еще одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на примерно 5-ый день после трансдукции составляет от примерно 20% до примерно 50% от примерно 15% до примерно 30% или от примерно 20% до примерно 30%. В одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 5-ый день после трансдукции составляет от примерно 20% до примерно 50% от примерно 15% до примерно 30 или от примерно 20% до примерно 30% в сравнении с экспрессией трансгена в случае VSV-G-псевдотипированных векторов на 5-ый день после трансдукции, составляющей от примерно 10% до примерно 20%, от примерно 15% до примерно 25% или от примерно 17,5% до примерно 20% при одинаковых условиях. В еще одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 5-ый день после трансдукции составляет примерно 24% в сравнении с экспрессией трансгена в случае VSV-G-псевдотипированных векторов на 5-ый день после трансдукции, составляющей примерно 19%.

В другом аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-день после трансдукции примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза, примерно в 5 раз или примерно в 10 раз, примерно в 11 раз или примерно в 12 раз или более выше, чем экспрессия трансгена в случае VSV-G-псевдотипированных векторов на 10-ый день после трансдукции.

В одном аспекте в раскрытии предложены способы использования ретровируса с псевдотипом RD114TR (например, SEQ ID NO: 1) для трансдукции Т-клеток. В другом аспекте более эффективная трансдукция Т-клеток осуществляется ретровирусом с псевдотипом RD114TR (например, SEQ ID NO: 1) по сравнению с ретровирусом с псевдотипом VSV-G (например, SEQ ID NO: 3). В другом аспекте оболочка RD114TR используется для псевдотипирования лентивектора, который затем используется для трансдукции Т-клеток с превосходной эффективностью.

Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть получены различными способами. Например, полинуклеотид, кодирующий экспрессионную кассету с распознаванием опухоли, или другой вид фрагмента распознавания, может быть стабильно введен в  $\gamma\delta$  Т-клетку с помощью системы транспозона/транспозазы или системы переноса генов на основе вируса, такой как лентивирусной или ретровирусной системы, или другого подходящего способа, такого как трансфекция, электропорация, трансдукция,

липофекция, с фосфатом кальция (CaPO<sub>4</sub>), с веществами, созданными методами наноинженерии, такими как Ормосил, способами доставки на основе вирусов, в том числе аденовируса, ретровируса, лентивируса, аденоассоциированных вирусов или любым другим подходящим способом. Ряд способов на основе вирусов был использован для генной терапии человека, таких как способы, описанные в заявке WO 1993020221, которая включена в настоящий документ путем ссылки. Неограничивающие примеры способов на основе вирусов, которые могут использоваться для конструирования  $\gamma \delta$  Т-клеток могут включать способы на основе  $\gamma$ -ретровирусов, аденовирусов, лентивирусов, вируса простого герпеса, вируса коровьей оспы, поксвируса или способы на основе аденоассоциированного вируса.

На фиг. 14 показано, что активированные Т-клетки могут быть сконструированы путем трансдукции вирусным вектором, таким как γ-ретровирусный вектор с использованием RD114TR и лентивирусный вектор с использованием RD114TR, экспрессирующим интересующие экзогенные гены, такие как αβ ТКР к специфическому раковому антигену и CD8, в выделенные γδ Т-клетки. Вирусные векторы могут содержать постртранскрипционный регуляторный элемент (PRE), такой как Woodchuck PRE (WPRE), для усиления экспрессии трансгена за счет увеличения уровня как ядерной, так и цитоплазматической мРНК. Также могут быть использованы один или несколько регуляторных элементов в том числе мотив RTE (RNA transport element), конститутивный транспортный элемент (СТЕ) ретровируса обезьян типа 1 (SRV-1) и 5' нетранслатируемый участок белка теплового шока человека 70 (Hsp70 5'UTR) и/или в комбинации с WPRE для усиления экспрессии трансгена. Трансдукция может осуществляться однократно или несколько раз для получения стабильной экспрессии трансгена в малом масштабе, например, в планшетах с количеством лунок от 24 до 4-6, или в среднем/крупном масштабе в течение <sup>1</sup>/<sub>2</sub>-5 дней, например, 1 дня.

RD114TR - это химерный гликопротеин, содержащий внеклеточный и трансмембранный домен эндогенного вируса кошек (RD114), слитые с цитоплазматическим хвостом (TR) оболочки вируса лейкоза мышей. В одном аспекте экспрессия трансгена в случае RD114TR-псевдотипированного ретровирусного вектора на 10-ый день после трансдукции выше по сравнению с псевдотипированными VSV-G векторами.

Также могут использоваться другие вирусные оболочечные белки, такие как VSV-G env, MLV 4070 env, RD114 env, химерный оболочечный белок RD114pro, бакуловирусный GP64 env или GALV env или их производные.

В одном аспекте сконструированные (или трансдуцированные) уб Т-клетки могут быть подвергнуты экспансии ех vivo без стимуляции антигенпрезентирующей клеткой или аминобисфосфонатом. Реагирующие с антигеном сконструированные Т-клетки в соответствии с настоящим описанием могут быть подвергнуты экспансии ex vivo и in vivo. В другом аспекте активная популяция сконструированных γδ Тклеток в соответствии с настоящим описанием может быть подвергнута экспансии ex vivo без антигенной стимуляции с помощью антигенпрезентирующей клетки, антигенным пептидом, непептидной молекулой или низкомолекулярным соединением, таким как аминобисфосфонат, но при использовании определенных антител, цитокинов, митогенов или слитых белков, таких как гибридный белок ИЛ-17 и Fc, гибридный белок МІСА и Fc и гибридный белок CD70 и Fc. Примеры антител, которые могут быть использованы для экспансии үб Т-клеточной популяции, могут включать антитела к CD3, CD27, CD30, CD70, OX40, NKG2D или CD2, примеры цитокинов могут включать ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-9, ИЛ-7 и/или ИЛ-33, и примеры митогенов могут включать CD70, лиганд CD27 человека, фитогемагглютинин ( $\Phi\Gamma$ A), конкавалин A (ConA), митоген лаконоса (PWM), белок агглютинин арахиса (PNA), соевый агглютинин (SBA), агглютинин чечевицы (LCA), агглютинин pisum sativum (зеленого горошка) (PSA), агглютинин h pomatia (HPA), лектин vicia graminea (вьющегося горошка) (VGA) или другой подходящий митоген, способный стимулировать пролиферацию Т-клеток. В другом аспекте популяция сконструированных уб Т-клеток может быть подвергнута экспансии за менее чем 60 дней, менее чем 48, 36, менее чем 24 дня, менее чем 12 дней или менее чем 6 дней.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предложены способы экспансии ех vivo популяции сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток для терапии на основе адоптивного переноса. Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно раскрытию могут быть подвергнуты экспансии ех vivo. Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно раскрытию могут быть подвергнуты экспансии in vitro без активации при помощи АПК или без совместного культивирования с АПК и без аминобисфосфонатов.

В другом аспекте  $\gamma\delta$  Т-клеточная популяция может быть подвергнута экспансии in vitro за менее чем 36 дней, менее чем 35 дней, менее чем 34 дня, менее чем 33 дня, менее чем 32 дня, менее чем 31 день, менее чем 30 дней, менее чем 29 дней, менее чем 28 дней, менее чем 27 дней, менее чем 26 дней, менее чем 25 дней, менее чем 24 дня, менее чем 23 дня, менее чем 22 дня, менее чем 21 день, менее чем 20 дней, менее чем 19 дней, менее чем 18 дней, менее чем 17 дней, менее чем 16 дней, менее чем 15 дней, менее чем 14 дней, менее чем 13 дней, менее чем 12 дней, менее чем 11 дней, менее чем 10 дней, менее чем 9 дней, менее чем 8 дней, менее чем 7 дней, менее чем 6 дней, менее чем 5 дней, менее чем 4 дня или менее чем 3 дня.

На фиг. 14 показано, что экспансия трансдуцированных или сконструированных γδ Т-клеток может

быть осуществлена в присутствии цитокинов, например, ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-18 и других, в малом/среднем масштабе, например, флаконах/колбах G-Rex, или в крупном масштабе, например, в 50-мл-100-литровых мешках, в течение 7-35 дней, например, 14-28 дней. Экспансированные трансдуцированные Т-клеточные продукты могут затем быть подвергнуты криоконсервации в качестве "готовых к применению" Т-клеточных продуктов для введения пациентам методом инфузии.

Методы лечения.

Композиции, содержащие сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут вводиться в целях профилактического и/или терапевтического лечения. При терапевтическом применении фармацевтические композиции могут вводиться субъекту, уже страдающему заболеванием или от состояния, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного купирования симптомов заболевания или состояния. Сконструированная  $\gamma\delta$  Т-клетка может вводиться для снижения вероятности развития, возникновения или ухудшения состояния. Эффективные количества популяции сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток для терапевтического применения могут варьироваться в зависимости от тяжести и течения заболевания или состояния, предшествовавшей терапии, состояния здоровья, веса и/или ответа субъекта на лекарственные препараты, и/или заключения лечащего врача.

Сконструированные  $\gamma \delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения субъекта, нуждающегося в лечении состояния, например, ракового заболевания, описанного в настоящем документе.

Метод лечения состояния (например, болезненного состояния) у субъекта с помощью  $\gamma\delta$  Т-клеток может включать введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток.  $\gamma\delta$  Т-клеток согласно настоящему раскрытию могут быть введены по различным схемам (например, по времени, концентрации, дозировке, промежуткам между этапами лечения, и/или составу). Перед получением субъектом сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток согласно настоящему раскрытию он может быть подвергнут, например, воздействию химиотерапии, лучевой терапии или их комбинации. Популяция сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может быть также заморожена или подвергнута криоконсервации до введения субъекту. Популяция сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может включать две или более клеток, которые экспрессируют идентичные, различные или комбинацию идентичных и различных компонентов, распознающих опухоль. Например, популяция сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может включать несколько различных сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, которые разработаны, чтобы распознавать различные антигены или различные эпитопы одного и того же антигена.

үб Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения различных состояний. В одном аспекте сконструированные γδ Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения рака, в том числе солидных опухолей и гематологических злокачественных заболеваний. Неограничивающие примеры раковых заболеваний включают: острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, адренокортикальную карциному, связанные с ВИЧ виды рака, связанные с ВИЧ виды лимфомы, рак анального отверстия, рак аппендикса, астроцитомы, нейробластому, базальноклеточную карциному, рак желчных протоков, рак мочевого пузыря, раковые опухоли кости, раковые опухоли головного мозга, такие как астроцитома мозжечка, астроцитому головного мозга/злокачественную глиому, эпендимому, медуллобластому, супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, глиому зрительных путей и гипоталамическую глиому, рак молочной железы, аденомы бронхов, лимфому Беркитта, карциному неизвестного первичного происхождения, лимфому центральной нервной системы, астроцитому головного мозга, рак шейки матки, детские раковые заболевания, хронический лимфоцитарный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга, герминогенные опухоли, рак желчного пузыря, рак желудка, гастроинтестинальную карциноидную опухоль, гастроинтестинальную стромальную опухоль, глиомы, лейкоз ворсистых клеток, рак головы и шеи, рак сердца, гепатоклеточный (печени) рак, ходжкинскую лимфому, гипофарингеальный рак, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток, саркому Капоши, рак почки, рак гортани, рак губ и полости рта, липосаркому, рак печени, раковые опухоли легких, такие как немелкоклеточный и мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лейкозы, макроглобулинемия, злокачественную фиброзную гистиоцитому костей/остеосаркому, медуллобластому, меланомы, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи с неизвестным первичным, рак полости рта, синдром множественной эндокринной неоплазии, миелодиспластические синдромы, миелолейкоз, рак полости и придаточных пазух носа, назофарингеальная карцино, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак полости рта, рак ротоглотки, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костей, рак яичника, эпителиальный рак яичника, герминогенную опухоль яичника, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак придаточных пазух и полости носа, рак паращитовидной железы, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидной железы, герминому шишковидной железы, аденому гипофиза, плевролегочную бластому, плазмоклеточную опухоль, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, почечноклеточную карциному, рак почечной лоханки и переходно-клеточный рак мочеточников, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркомы, раковые опухоли кожи, карциному кожи из клеток Меркеля, рак тонкой кишки, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, рак желудка, Т-клеточную лимфому, рак горла, тимому, карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, трофобластную опухоль (гестационную), раковые опухоли с неизвестным первичным очагом, рак уретры, саркому матки, рак влагалища, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса.

В одном аспекте сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения инфекционного заболевания. В другом аспекте сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения инфекционного заболевания, инфекционное заболевание может быть вызвано вирусом. В еще одном аспекте сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию могут быть использованы для лечения иммунопатологического заболевания, такого как аутоиммунное заболевание.

Лечение с применением  $\gamma\delta$  Т-клеток согласно настоящему раскрытию может быть предложено субъекту до, во время или после клинического проявления состояния. Препарат может вводиться субъекту через 1 день, 1 неделю, 6 месяцев, 12 месяцев или через 2 года после клинического проявления заболевания. Препарат может вводиться субъекту в течение более чем 1 дня, 1 недели, 1, 6, 12 месяцев, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 лет или более после клинического проявления заболевания. Препарат может вводиться субъекту в течение менее чем 1 дня, 1 недели, 1, 6, 12 месяцев или 2 лет после клинического проявления заболевания. Лечение может также включать лечение человека в рамках клинического исследования. Лечение может включать введение субъекту фармацевтической композиции, включающей сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию.

В другом аспекте введение субъекту сконструированных уб Т-клеток согласно настоящему раскрытию может модулировать активность эндогенных лимфоцитов в организме субъекта. В другом аспекте введение субъекту сконструированных уб Т-клеток может обеспечивать антигеном эндогенную Т-клетку и может усиливать иммунный ответ. В другом аспекте Т-клетка памяти может быть CD4+Т-клеткой. В другом аспекте Т-клетка памяти может быть CD8+Т-клеткой. В другом аспекте введение субъекту сконструированных уб Т-клеток согласно настоящему раскрытию может активировать цитотоксичность другой иммунной клетки. В другом аспекте другая иммунная клетка может быть CD8+T-клеткой. В другом аспекте другая иммунная клетка может быть естественной киллерной Т-клеткой. В другом аспекте введение субъекту сконструированных үб Т-клеток согласно настоящему раскрытию может подавлять регуляторную Т-клетку. В другом аспекте регуляторная Т-клетка может быть FOX3+Treg-клеткой. В другом аспекте регуляторная Т-клетка памяти может быть FOX3-Treg-клеткой. Неограничивающие примеры клеток, активность которых может быть модулирована сконструированными уб Т-клетками согласно описанию могут включать: гемопоэтические стволовые клетки; В-клетки; СD4; СD8; эритроциты; лейкоциты; дендритные клетки, в том числе дендритные антигенпрезентирующие клетки; лейкоциты; макрофаги; В-клетки памяти; Т-клетки памяти; моноциты; естественные киллерные клетки; нейтрофильные гранулоциты; Т-хелперные клетки; и Т-киллерные клетки.

В большинстве случаев во время трансплантации костного мозга обычно может применяться комбинация циклофосфамида с облучением всего тела, чтобы предупредить отторжение гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) трансплантата иммунной системой субъекта. В одном аспекте может производиться инкубирование костного мозга донора с интерлейкином-2 (ИЛ-2) ех vivo для усиления образования киллерных лимфоцитов в донорском костном мозге. Интерлейкин-2 (ИЛ-2) является цитокином, который может быть необходим для роста, пролиферации и дифференциации лимфоцитов дикого типа. В текущих исследованиях адоптивного переноса γδ Т-клеток человеку может потребоваться одновременное введение γδ Т-клеток и интерлейкина-2. Однако как низкие, так и высокие дозы ИЛ-2 могут вызывать побочные эффекты вследствие высокой токсичности. Токсичность ИЛ-2 может поражать многие органы/системы, наиболее существенно - сердце, легкие, почки и центральную нервную систему. В другом аспекте в раскрытии предложен способ введения субъекту сконструированных γδ Т-клеток без одновременного введения природного цитокина или его модифицированных версий, таких как ИЛ-2, ИЛ-15, ИЛ-12, ИЛ-21. В другом аспекте сконструированные γδ Т-клетки могут быть введены субъекту без одновременного введения ИЛ-2. В другом аспекте сконструированные γδ Т-клетки могут быть введены субъекту в рамках процедуры, такой как трансплантация костного мозга без одновременного введения ИЛ-2.

Способы введения.

Одна или несколько популяций сконструированных популяций  $\gamma\delta$  Т-клеток могут быть введены субъекту в любом порядке или одновременно. Если одновременно, то несколько сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток могут быть предложены в отдельной унифицированной форме, такой как внутривенная инъекция, или в виде множества структурно обособленных оформленных единиц, например, в виде многократных внутривенных инфузий, в. к., инъекций или пилюль. Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть упакованы вместе или отдельно, в отдельную упаковочную единицу или в несколько упаковочных единиц. Одна или все сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут вводиться в виде многократных доз. Если не

одновременно, то промежуток времени между многократными дозами может варьироваться, достигая вплоть до примерно одной недели, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев или примерно одного года. В другом аспекте сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть подвергнуты экспансии в организме субъекта, in vivo, после введения субъекту. Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть заморожены в целях обеспечения клетками для многократного введения одного и того же клеточного препарата. Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки согласно настоящему раскрытию и фармацевтические композиции, включающие их, могут быть упакованы в виде комплекта. В комплект могут входить инструкции (например, письменные инструкции) по применению сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток и композиций, включающих их.

В другом аспекте способ лечения рака включает введение субъекту терапевтически эффективного количества сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, при котором за счет введения производится лечение рака. В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может вводиться в течение не менее примерно 10, 30 с, 1, 10, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6 дней, 1, 2, 3 недель, 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев или 1 года. В другом аспекте терапевтически эффективное количество сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может вводиться в течение не менее чем одной недели. В другом аспекте терапевтически эффективное количество сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток может вводиться в течение не менее чем двух недель.

Сконструированные γδ Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут вводиться до, во время или после появления заболевания или состояния, и сроки введения фармацевтической композиции, включающей сконструированную γδ Т-клетку, могут варьироваться. К примеру, сконструированные γδ Т-клетки могут быть использованы для профилактики и могут вводиться продолжительно субъектам с предрасположенностью к состояниям или заболеваниям, чтобы снизить вероятность возникновения данного заболевания или состояния. Сконструированные уб Т-клетки могут вводиться субъекту во время или как можно скорее после появления симптомов. Введение сконструированных γδ Т-клеток может быть инициировано сразу же после появления симптомов, в течение первых 3 ч после появления симптомов, в течение первых 6 ч после появления симптомов, в течение первых 24 ч после появления симптомов, в течение 48 ч после появления симптомов или в течение любого периода времени после появления симптомов. Первое введение может осуществляться любым практически осуществимым способом, таким как любой способ, описанный в настоящем документе, при использовании любого состава, описанного в настоящем документе. В другом аспекте введение сконструированных уб Т-клеток согласно настоящему раскрытию может быть внутривенным введением. Одно- или многократная доза сконструированных уб Т-клеток может быть введена, как только это будет практически осуществимо, после возникновения ракового заболевания, инфекционного заболевания, иммунопатологического заболевания, сепсиса или вместе с трансплантатом костного мозга и с продолжительностью по времени, необходимой для лечения иммунопатологического заболевания, такой как, например, от примерно 24 ч до примерно 48 ч, от примерно 48 ч до примерно 1 недели, от примерно 1 недели до примерно 2 недель, от примерно 2 недель до примерно 1 месяца, от примерно 1 месяца до примерно 3 месяцев. Для лечения рака одно- или многократная доза сконструированных γδ Т-клеток может быть введена спустя годы после возникновения ракового заболевания и перед или после других видов лечения. В другом аспекте сконструированные үб Т-клетки могут вводиться в течение не менее примерно 10, 30 мин, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24 ч, не менее 48 ч, не менее 72 ч, не менее 96 ч, не менее 1 недели, не менее 2 недель, не менее 3 недель, не менее 4 недель, не менее 1 месяца, не менее 2 месяцев, не менее 3 месяцев, не менее 4 месяцев, не менее 5 месяцев, не менее 6 месяцев, не менее 7 месяцев, не менее 8 месяцев, не менее 9 месяцев, не менее 10 месяцев, не менее 11 месяцев, не менее 12 месяцев, не менее 1 года, не менее 2 лет, не менее 3 лет, не менее 4 лет или не менее 5 лет. Продолжительность лечения может варьироваться для каждого отдельного субъекта.

Хранение.

В одном аспекте γδ Т-клетки могут быть переведены в лекарственную форму в замораживающем веществе и помещены в устройства для криогенного хранения, такие как скороморозильный аппарат на основе жидкого азота (-196°С) или скороморозильный аппарат с ультра-низкой температурой (-65°С, -80°С, -120°С, или -150°С) для долгосрочного хранения, продолжительностью не менее примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6 месяцев, 1, 2, 3 лет или по меньшей мере 5 лет. Замораживающее вещество может содержать диметилсульфоксид (ДМСО), и/или хлорид натрия (NaCl), и/или декстрозу, и/или сульфат декстрана и/или гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) с рН-регулирующими веществами для поддержания физиологического значения рН на уровне между примерно 6,0 и примерно 6,5, примерно 6,5 и примерно 7,0, примерно 7,0 и примерно 7,5, примерно 7,5 и примерно 8,0 или примерно 6,5 и примерно 7,5. Подвергнутые криоконсервации γδ Т-клетки могут быть разморожены и далее обработаны путем стимуляции антителами, белками, пептидами и/или цитокинами согласно настоящему описанию. Подвергнутые криоконсервации γδ Т-клетки могут быть разморожены и генетически модифицированы с помощью вирусных векторов (в том числе ретровирусных, аденоассоциированных вирусных (ААV) и лентивирусных векторов) или невирусных средств (в том числе РНК, ДНК, например, транспозонов и белков) согласно настоящему описанию.

Модифицированные  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть дополнительно подвергнуты криоконсервации для создания банков клеток в количестве, составляющем по меньшей мере примерно 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500 флаконов с примерно по меньшей мере  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или по меньшей мере примерно  $10^{10}$  клеток на мл в замораживающем веществе. Подвергнутые криоконсервации банки клеток могут сохранять их функциональность и могут быть разморожены и далее простимулированы и подвергнуты экспансии. В другом аспекте размороженные клетки могут быть простимулированы и подвергнуты экспансии в подходящих закрытых сосудах, таких как, например, мешки для клеточных культур и/или биореакторы, для получения количеств клеток в виде аллогенного клеточного продукта. Подвергнутые криоконсервации  $\gamma\delta$  Т-клетки могут сохранять свои биологические функции в течение по меньшей мере примерно 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 50 месяцев или по меньшей мере примерно 60 месяцев в условиях криогенного хранения. В другом аспекте в лекарственной форме не могут использоваться консерванты. Подвергнутые криоконсервации  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть разморожены и введены с помощью инфузии нескольким пациентам в качестве готового к применению аллогенного клеточного продукта.

В одном аспекте сконструированные уб Т-клетки, описанные в настоящем документе, могут присутствовать в композиции в количестве, составляющем по меньшей мере  $1 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $3 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $4 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $6 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $7 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $8 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $9 \times 10^3$  клеток/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $3 \times 10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $4 \times 10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $5\times10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $6\times10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $7\times10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $8\times10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $9\times10^4$  клеток/мл, по меньшей мере  $1\times10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $3 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $4 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $6 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $7 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $8 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $9 \times 10^5$  клеток/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $3 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $4 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $6 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $7 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $8 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $9 \times 10^6$  клеток/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $2 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $3 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $4 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $5 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $6 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $7 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $8 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $9 \times 10^7$  клеток/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $2\times10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $3\times10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $4\times10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $5\times10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $8 \times 10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $9 \times 10^8$  клеток/мл, по меньшей мере  $1 \times 10^9$  клеток/мл, или более, от примерно  $1\times10^3$  клеток/мл до примерно по меньшей мере  $1\times10^8$  клеток/мл, от примерно  $1\times10^5$  клеток/мл до примерно по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток/мл, или от примерно  $1 \times 10^6$  клеток/мл до примерно по меньшей мере  $1 \times 10^8$  клеток/мл.

В целях разработки жизнеспособных аллогенных Т-клеточных продуктов, которые, например, могут быть сконструированы для экспрессии опухолевого антигена, специфичного к ТКР, например, химеры CD8 $\alpha$ -CD4tm/внутриклеточного белка (фиг. 12A и 12B), варианты осуществления настоящего раскрытия могут включать способы, которые могут максимально повышать выход  $\gamma\delta$  Т клеток, при этом снижая до минимума присутствие остаточных  $\alpha\beta$  Т-клеток в конечных аллогенных продуктах. Например, варианты осуществления настоящего раскрытия могут включать способы экспансии и активации  $\gamma\delta$  Т-клеток за счет истощения  $\alpha\beta$  Т-клеток и добавления в ростовую среду молекул, таких как Амфотерицин В, N-ацетилцистеин (NAC) (или высоких доз глютамина/глютамакса), ИЛ-2 и/или ИЛ-15.

В одном аспекте способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения аутологичных или аллогенных продуктов в соответствии с одним аспектом раскрытия.

Настоящее изобретение может быть лучше понято при учете следующих примеров, которые не направлены на ограничение объема патентных притязаний.

#### Примеры

Пример 1.

Обработка продукта лейкафереза.

Продукт лейкафереза, например, LeukoPak®, может быть обработан следующим образом: один конец мешка LeukoPak® может быть обработан смоченным спиртом тампоном и обрезан лезвием, чтобы был отвод в бутыль. Имеющийся объем может быть разбавлен до между приблизительно 500 мл раствором Хэнкса, а затем аликвотирован в 16-29 пробирок вместимостью 50 мл, по 30 мл на пробирку. Пробирки могут быть центрифугированы при 400g в течение 30 мин без торможения и ускорения. Белую жидкость можно аспирировать, и новые пробирки вместимостью 50 мл могут быть заполнены наполовину и сверху добавлено 25 мл PBS. Данную процедуру можно повторить дополнительно 2 раза с общим

количеством промывок - 3 раза. Клетки могут быть подсчитаны до последней промывки с помощью гемоцитометра. Выход может составить между 30-60 пробирок по  $1 \times 10^8$  клеток/пробирка.

Пример 2.

Истощение αβ Т-клеток.

На фиг. 1А показано истощение  $\alpha\beta$  Т клеток из МКПК. После разделения с использованием градиента Ficoll МКПК инкубировали с антителами к ТКР, конъюгированными с биотином  $\alpha\beta$ , а затем микрочастицами, покрытыми стрептавидином, согласно инструкциям производителя. Затем пробы прогоняли через колонку LS column в целях обогащения  $\alpha\beta$  ТКР-экспрессирующими клетками. Поток через колонку представляет собой истощенные по  $\alpha\beta$  ТКР фракции. После культивирования в течение ночи  $\alpha\beta$  ТКР-обогащенные фракции и  $\alpha\beta$  ТКР-истощенные фракции окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами к  $\alpha\beta$  ТКР и для сравнения - антителами к  $\alpha\beta$  ТКР и для сравнения - антителами к  $\alpha\beta$  ТКР-обогащенные фракции почти не содержат (0%)  $\alpha\beta$  Клеток, почти все  $\alpha\beta$  Клетки обогащены (45%) в  $\alpha\beta$  ТКР-истощенных фракциях.

Аналогично, клетки из продукта лейкафереза могут инкубироваться с антителами к ТКР, коньюгированными с биотином  $\alpha\beta$ , а затем микрочастицами, покрытыми стрептавидином согласно протоколу производителя. Затем пробы прогоняли через колонку LS column в целях обогащения  $\alpha\beta$  ТКР-экспрессирующими клетками. Поток через колонку представляет собой истощенные по  $\alpha\beta$  ТКР фракции. После культивирования в течение ночи аоф ТКР-истощенные фракции окрашивали коньюгированными с флуорохромом антителами к  $\alpha\beta$  ТКР и для сравнения -антителами к  $\gamma\delta$  ТКР, за чем следовал проточный цитометрический анализ. На фиг. 1Е показано, тогда как исходные клетки в продукте лейкафереза содержат минимум (4,14%)  $V\gamma9\delta2$  клеток, почти все  $V\gamma9\delta2$  клетки обогащены (95,5%) в  $\alpha\beta$  ТКР-истощенных фракциях. В одном аспекте при применении упомянутых выше способов  $V\gamma9\delta2$  клетки могут быть обогащены до более чем примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

На фиг. 1В и 1С показано минимальное остаточное количество αβ Т-клеток в продукте Vγ9δ2 Тклеток. ав Истощение Т-клеток производили в МКПК нормальных доноров (донор А, донор В, донор 12 и донор 13) при использовании имеющихся в продаже биотинилированных антител кав ТКР/микрочастицам, покрытым стрептавидином. αβ истощенные по Т-клеткам МКПК культивировали с золедронатом/ИЛ-2/ИЛ-15 в течение 14 дней, затем производили окрашивание поверхностей клеток соответствующими антителами, конъюгированными с флуорохромом, например, антителами ка ТКР и антителами к  $\gamma \delta T K P$ , чтобы произвести оценку остаточного количества  $\alpha \beta$  T-клеток и обогащенных  $\gamma \delta$  Tклеток с помощью суб-гейтирования по СD3. Данные результаты показывают, что истощенные по αβ Тклеткам уб Т-клетки были обогащены, т.е. 90,1% (донор А), 78,6% (донор Б), 28,9% (донор В), 89% (донор 12) и 74% (донор 13). Кроме того истощенные по αβ Т-клеткам γδ Т-клетки содержат минимальное остаточное количество αβ Т-клеток, т.е. 0,02% (донор A), 0,05% (донор Б), 0,2% (донор В), 0,4% (донор 12) и 1% (донор 13). Минимальное остаточное количество ав Т-клеток важно, поскольку, например, при трансплантации гаплоидентичных гематопоэтических стволовых клеток (HSCT), остаточное количество αβ Т-клеток в диапазоне 0,2-0,6% не приводят к хронической реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD), тем самым, делая данные истощенные по αβ Т-клеткам γδ Т-клетки безопасным аллогенным продуктом.

На фиг. 1D представлен цитокиновый профиль  $V\gamma982$  клеток. Истощенные по  $\alpha\beta$  Т-клеткам МКПК после культивирования с золедронатом/ИЛ-2/ИЛ-15 обрабатывали Golgi Stop/Plug (то есть, ингибиторами транспорта белков) в течение 6 ч до сбора клеток. Клетки окрашивали для выявления поверхностных V82, затем производили фиксацию и пермеабилизацию. Окрашивание на внутриклеточные TNF- $\alpha$ , ИЛ-17а и IFN- $\gamma$  производили с использованием антител, конъюгированных с флуорохромом, к TNF- $\alpha$ , ИЛ-17а и IFN- $\gamma$ . Данные результаты демонстрируют, что TNF- $\alpha$ , ИЛ-17а и IFN- $\gamma$  экспрессировались в 12%, 0,2% и 4% V $\gamma$ 982 клеток, соответственно. ИЛ-15-опосредованное ингибирование коммитирования ИЛ-17 представлено низким количеством ИЛ-17-вырабатывающих V $\gamma$ 982 Т-клеток, например, 0,2%.

Пример 3.

Активация и экспансия истощенных по αβ Т-клеткам МКПК.

Для максимальной активации, пролиферации и выживаемости Т-клеток без коммитирования до анергии могут быть необходимы три сигнала: сигнал 1, вызванный ТКР, сигнал 2, вызванный за счет костимуляторных молекул, и сигнал 3, вызванный за счет сигнального пути фактора роста.

На фиг. 2 и 3 показаны, соответственно, этап активации и этап экспансии в соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего раскрытия. Этап активации и этап экспансии могут быть двумя последовательными этапами. Например, во время этапа активации (фиг. 2) может присутствовать аминобисфосфонат, например, золедронат (ZA), или фосфоантигены, например, ИПФ, и цитокины, например,

ИЛ-2 и/или ИЛ-15. Тогда как во время этапа экспансии (фиг. 3) могут продолжать присутствовать цитокины без аминобисфосфоната или фосфоантигена, например, ИПФ. Этап активации (фиг. 2) может происходить во время первых 14 дней, когда добавляют аминобисфосфонат или фосфоантиген, например, ИПФ, и он еще не отмыт. Этап экспансии (фиг. 3) может производиться начиная с дня 15 и далее, поскольку в конце дня 14 активированные клетки могут быть собраны посредством удаления всей среды, которая содержит аминобисфосфонат или фосфоантиген, например, ИПФ, и замены на среду с цитокинами без аминобисфосфоната или фосфоантигена, например, ИПФ. Напротив, в стандартном протоколе золедронат-опосредованного получения Vγ9δ2 день 1-14 часто относится к активации/экспансии, поскольку, при таких условиях, жизнеспособность клеток не может поддерживаться дольше 14-го дня. В настоящем раскрытии дни 1-14 относятся к этапу активации, поскольку присутствует аминобисфосфонат, например, золедронат, или фосфоантиген, например, ИПФ, а период начиная с дня 15 и далее считается этапом экспансии, поскольку может поддерживаться жизнеспособность клеток, и они могут быть подвергнуты экспансии дольше, чем в рамках обычного 14-дневного процесса.

На фиг. 2 показан сигнал 1, вызванный за счет взаимодействия  $\gamma\delta$  ТКР/ИПФ, индуцированного аминобисфосфонатом, которым может являться памидроновая кислота, алендроновая кислота, золедроновая кислота, ризедроновая кислота, ибандроновая кислота, инкадроновая кислота, ее соль и/или ее гидрат; или фосфоантигенами, например, (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфатом (ГМБПФ), изопреноидпирофосфатами (фарнезилпирофосфатом (ФПФ), геранилгеранилпирофосфатом (ГГПФ), изопентилпирофосфатом (ИПФ) или диметилаллилдифосфатом (ДМАДФ)), в целях активации пролиферации V $\gamma$ 982 Т-клеток. Например, золедронат (золедроновая кислота (ZA) или Зомета) ингибирует путь мевалоната в моноцитах (Мо), приводя к накоплению фосфоантигенов, таких как ИПФ, презентируемых на моноцитах (ZA-Мо), чтобы активировать  $\gamma$ 982 ТКР/СD3 и индуцировать пролиферацию за счет сигнальных путей РКС, тем самым выступая в качестве сигнала 1. ИПФ сам по себе может также воздействовать непосредственно на  $\gamma$ 8 Т-клетки за счет связывания с  $\gamma$ 982 ТКР, тем самым устраняя необходимость в моноцитах.

На фиг. 2 также показан сигнал 2, вызванный за счет костимуляторных молекул, таких как Амфотерицин В (одобренный FDA препарат Амбизом), т.е. лиганд TLR2. Например, Амфотерицин В может стимулировать γδ Т-клетки за счет двух потенциальных механизмов. Во-первых, Амфотерицин В, служит в качестве сигнала 2, может воздействовать на γδ Т-клетки как костимуляторная молекула, костимулируя активацию, пролиферацию γδ Т-клеток и выработку ими IFN-γ, а также снижая иммуносупрессивную активность Vδ2 Т-клеток по отношению к αβ Т-клеткам. Амфотерицин В может также играть роль энхансера молекулы CD25, которая является высокоаффинным рецептором ИЛ-2 (ИЛ-2Rα), тем самым увеличивая восприимчивость к ИЛ-2 в целях стимуляции пролиферации за счет сигнала 3. Во-вторых, Амфотерицин В служит в качестве сигнала 3, может воздействовать на моноцит (ZA-Mo), способствуя как секреции ИЛ-18, что может усиливать экспрессию CD25 и оказывать благоприятное влияние на центральные Т-клетки памяти, так и секреции ИЛ-15, что может усиливать выработку эффекторных Vγ9δ2 Т-клеток и блокировку ИЛ-17-коммитированных клеток. Подходящие заменители Амфотерицина В могут включать натуральные экстракты, такие как L-теанин из чая, танин из яблок и полифенолы из клюквы и грибов шиитаке.

Добавление в культуры клеток  $V\gamma982$  костимуляторных молекул, таких как CD86 и 41BBL, усиливало их пролиферацию. Варианты осуществления настоящего раскрытия могут включать использование истощенных по  $\alpha\beta$  Т-клеткам МКПК или истощенного по  $\alpha\beta$  Т-клеткам продукта лейкафереза, в которых миелоидные клетки могут быть доминирующей популяцией клеток. Миелоидные клетки поглощают Золедронат, который ингибирует путь мевалоната, приводя к накоплению ИПФ, который может экспрессироваться в секреторной форме или презентироваться на миелоидных клетках в связанной с мембраной форме. Миелоидные клетки также являются превосходными антигенпрезентирующими клетками, экспрессирующими различные костимуляторные молекулы на различных стадиях дифференциации.

Кроме того, сами  $\gamma\delta$  Т-клетки могут также экспрессировать различные костимуляторные молекулы. В связи с этим, а $\beta$ -истощенные МКПК или истощенный по а $\beta$  Т-клеткам продукт лейкафереза во время обработки золедронатом можно культивировать при высокой плотности клеток, чтобы способствовать привлечению костимуляторных молекул, присутствующих на миелоидных клетках, а также на подвергающихся экспансии  $\gamma\delta$  Т-клетках, тем самым усиливая активацию, пролиферацию и выживаемость V $\gamma9\delta2$  Т-клеток. Например, экзогенный ИЛ-2 (10-1000 Ед/мл, предпочтительно 20-500 Ед/мл, более предпочтительно 50-100 Ед/мл) может быть добавлен в а $\beta$ -истощенные МКПК или истощенный по а $\beta$  Т-клеткам продукт лейкафереза, в которых CD4 хелперные Т-клетки (для секреции ИЛ-2) находятся среди клеток, истощенных по а $\beta$  Т-клеткам, чтобы поддержать выживаемость и пролиферацию во время активации и экспансии. Экзогенный ИЛ-15 (10-1000 нг/мл, предпочтительно 20-500 нг/мл; более предпочтительно 50-100 нг/мл) может быть использован в культуре с высокой плотностью клеток, чтобы максимально повысить активацию V $\gamma9\delta2$  за счет ингибирования развития вырабатывающих ИЛ-17 V $\gamma9\delta2$  Т-клеток, как показано фиг. 1D (средняя секция), усиливая пролиферацию  $\gamma\delta$  Т-клеток и способствуя диф-

ференциации наивных  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток в эффекторные клетки. Культура с высокой плотностью клеток, таким образом, пользуется реципрокным костимуляторным взаимодействием между  $\gamma\delta$ - $\gamma\delta$  Т-клетками, которые экспрессируют CD28, CD86, CD83, CD80 на  $\gamma\delta$  Т-клетках. Например, костимуляторная молекула CD28, которая взаимодействует с CD86 и/или CD80, может усиливать выживаемость и пролиферацию  $\gamma\delta$  Т-клеток.

Для определения влияния плотности клеток на фенотипы Т-клеток и клеточную гибель после активации в присутствии золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15 в течение 14 дней  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки были подвергнуты экспансии с помощью гомеостатических цитокинов, например, ИЛ-2 и ИЛ-15, без золедроната при высокой плотности (например,  $2 \times 10^6$  клеток/мл) и при низкой плотности (например,  $0.5 \times 10^6$  клеток/мл) с последующим анализом на Т-клеточные маркеры. На фиг. 4А показано, что на маркеры иммунофенотипирования, например, на CD122, CD80, CD83, CD86, CD95 и CD95L, не сказывалось воздействие плотности клеток в случае Vу982 Т-клеток, поскольку не наблюдалось значимой разницы между экспрессией маркеров в Vу982 Т-клетках, культивированных при высокой плотности и при низкой плотности. Однако на фиг. 4В показано существенное снижение клеточной гибели (20%) во время экспансии при высокой плотности по сравнению с уровнем (51%) при низкой плотности. Эти результаты позволяют предположить, что процесс экспансии  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток при высокой плотности, например, по меньшей мере  $1\times10^6$ клеток/мл, может стимулировать выживаемость клеток при снижении уровня клеточной гибели. Фиг. 5 демонстрирует, что включение Амфотерицина В повышает процентное содержание Vδ2 (т.е. Vγ9δ2) Тклеток, экспрессирующих CD25 (или ИЛ-2Ra). Вкратце, истощенные по ав-клеткам МКПК культивировали в активирующей среде, дополненной золедронатом, ИЛ-2 ИЛ-15 в день 0. Через 48 ч добавляли Амфотерицин В и через 48 ч производили сбор клеток для анализа методом проточной цитометрии на экспрессию CD25 (или IL- $2R\alpha$ ) на поверхности CD3+/V $\delta$ 2 Т-клеток. Эти результаты показывают, что обработка Золедронатом, ИЛ-2, и ИЛ-15 повышает процентное содержание CD25-экспрессирующих Vδ2 Т-клеток до 16%, по сравнению с показателем для необработанных αβ-истощенных МКПК (0.55%). Тем не менее, добавление Амфотерицина В в Золедронат, ИЛ-2 и ИЛ-15 повышает процентное содержание Vδ2 Т-клеток с 16% (без Амфотерицина B) до 29% (с Амфотерицином B). Эти результаты показывают, что Амфотерицин В может дополнительно увеличить численность V82 Т-клеток, которые были подвергнуты экспансии и активированы с помощью Золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15, за счет сигналов 2 и 3.

На фиг. 6 представлена экспансия уб Т-клеток при использовании Золедроната (Зомета) в заданной среде, которая содержит ИЛ-2, ИЛ-15 и Амфотерицин В. Кратность роста в абсолютных числах для уб Тклеток представлена 3350-кратным, 11060-кратным и 31666-кратным ростом для Донора 20 с Дня 0 по День 17, с дня 0 по день 22 и с дня 0 по день 29, соответственно. Аналогично, степень роста в абсолютных числах для γδ Т-клеток представлена 4633-кратным, 12320-кратным и 32833-кратным ростом для донора 21 с дня 0 по день 17, с дня 0 по день 22 и с дня 0 по день 29, соответственно. Напротив, как изложено выше, классический протокол экспансии Vу982 Т-клеток, в лучшем случае, мог дать выход только в 100-кратном увеличении общего количества Vу982 Т-клеток в течение 14 дней, следовательно, скорость экспансии снижается, что может быть вызвано ростом клеточной гибели. В одном аспекте при использовании упомянутых выше способов кратность роста в абсолютных числах для уб Т-клеток после экспансии в день 29 по сравнению с этим показателем в день 0 может быть от примерно 1000-кратной до примерно 40000-кратной, от примерно 3000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 5000кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 6000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 7000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 8000-кратной до 30000-кратной, от примерно 10000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 15000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 20000-кратной до примерно 35000-кратной, от примерно 25000-кратной до примерно 35000кратной, от примерно 30000-кратной до примерно 35000-кратной, более чем примерно 10000-кратной, более чем примерно 15000-кратной, более чем примерно 20000-кратной, более чем примерно 25000кратной, более чем примерно 30000-кратной, более чем примерно 40000-кратной или более чем примерно 40000-кратной.

Нейтрофилы (наиболее многочисленные лейкоциты в крови) могут угнетать рост и выживаемость  $\gamma\delta$  Т-клеток. Таким образом, удаление или деактивация нейтрофилов может способствовать росту и выживаемости  $\gamma\delta$  Т-клеток. Чтобы достигнуть этого, нейтрофильные протеазы, такие как протеиназа 3, эластаза и катепсин G, могут быть использованы для ингибирования (1) пролиферации нейтрофилов, (2) выработки цитокинов и (3) цитотоксичности  $\gamma\delta$  Т-клеток за счет протеолитического расщепления ИЛ-2 и модулирования бутирофилина 3A1 (CD277). Кроме того, по наблюдениям, у мышей с полимикробным сепсисом введение глютамина и/или N-ацетилцистеина (NAC) снижает число нейтрофилов и повышает процентное содержание  $\gamma\delta$  Т-клеток. Кроме того, по наблюдениям, у крыс с LPS-индуцированным повреждением легких добавление глютамина снижает скорость апоптоза в  $\gamma\delta$ Т-клетках, отчасти за счет усиления синтеза глютатиона (GSH), антиоксиданта, и таким образом, снижая вредное воздействие свободных радикалов, т.е. эрозию теломер. На основании этих наблюдений, как показано на фиг. 2 и 3, варианты осуществления настоящего раскрытия могут также включать добавление в культуру высокодози-

рованного глютамина/глютамакса (или низкодозированного N-ацетилцистеина (NAC), например, 1-10 мМ, предпочтительно 2,5-7 мМ), чтобы противостоять повреждениям, опосредованным свободными радикалами, и поддерживать репликативный потенциал  $\gamma\delta$  Т-клеток, и тем самым максимально увеличивая прирост культуры. NAC или высокодозированный глютамин/глютамакс может поддерживать высокие внутриклеточные уровни GSH и компенсировать высокий уровень вырабатываемых в культуре моноцитами и нейтрофилами свободных радикалов (активных форм кислорода (AФK)). Более того, как показано на фиг. 2, ибупрофен (ингибитор цикло-оксигеназы-2 (COX-2)) может нейтрализовать опосредованную Амфотерицином В активацию COX-2 в моноцитах (ZA-Мо), тем самым ограничивая накопление простагландина E2 (PGE2) во время совместного культивирования с моноцитами. Также могут быть использованы другие ингибиторы COX-2, такие как вальдекоксиб, рефококсиб, целекоксиб.

Пример 4.

Конструирование ТКР для  $V\gamma 9\delta 2$  Т-клеток с помощью RD114TR-псевдотипированных ретровирусных векторов.

На фиг. 7 представлена таблица со сроками вирусной трансдукции в  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки. Свежие лей-коциты истощены по  $\alpha\beta$  Т-клеткам и активированы с помощью Золедроната в присутствии ИЛ-2 и ИЛ-15 в течение не менее 1 дня или максимально 7 дней,  $\gamma\delta$  Т-клетки могут быть трансдуцированы между 24 и 168 ч после активации при использовании вирусного супернатанта, экспрессирующего  $\alpha\beta$  ТКР и/или CD8.

Чтобы определить, пригодны ли полученные с помощью способов настоящего раскрытия  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки для вирусной трансфекции с помощью вирусов, экспрессирующих различные оболочечные белки,  $\gamma$ -ретровирус, экспрессирующий зеленый флуоресцирующий белок (GFP) (например, псевдотипа вируса лейкоза гиббонов (GALV) (SEQ ID NO: 4) и псевдотипа RD114TR (SEQ ID NO: 1)) и GFP-экспрессирующий лентивирус (например, псевдотипа VSV-G (например, SEQ ID NO: 3)) были испытаны на их эффективность трансдукции в данные  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки. Кроме того, CD8 $\alpha$ -экспрессирующий лентивирус (LV), псевдотипированный VSV-G и RD114TR, были испытаны на их эффективность трансдукции в  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки.

На фиг. 8А представлен 5-ый день после трансдукции, экспрессия GFP составляет 12% для псевдотипа GALV, 34% - для псевдотипа RD114TR и 46% - для псевдотипа VSV-G. Однако на 10-ый день после трансдукции псевдотип RD114TR сохраняет экспрессию GFP на уровне 40%, тогда как экспрессия GFP псевдотипом GALV и псевдотипом VSV-G снизилась до 7% и 3,6%, соответственно. Эти результаты позволяют предположить, что RD114TR-псевдотипированный γ-ретровирус может представлять собой оптимальный способ доставки генов с устойчивой экспрессией гена в Vγ982 Т-клетках, экспансированных с помощью Золедроната, ИЛ-2 и ИЛ-15.

На фиг. 8А представлен 4-ый день после трансдукции, уровень экспрессии CD8 $\alpha$  на V $\gamma$ 982 Т-клетках составил от 63,2% (при использовании 2,18 мкл лентивируса) вплоть до 95,8% (при использовании 35 мкл лентивируса), когда V $\gamma$ 982 Т-клетки были трансдуцированы лентивирусом, псевдотипированным RD114TR. С другой стороны, уровень экспрессии CD8 $\alpha$  на V $\gamma$ 982 Т-клетках составил от 17,9% (при использовании 2,18 мкл лентивируса) вплоть до 31,2% (при использовании 35 мкл лентивируса), когда V $\gamma$ 982 Т-клетки были трансдуцированы лентивирусом, псевдотипированным VSV-G. Хотя VSV-G - это наиболее часто используемая оболочка, и RD114TR широко используется для псевдотипирования  $\gamma$ -ретровирусов, данные результаты свидетельствует о том, что псевдотипированный RD114TR лентивирус не только может быть использован для трансдукции V $\gamma$ 982 Т-клеток, но и также обладает более высокой эффективностью трансдукции в V $\gamma$ 982 Т-клетки, чем лентивирус, псевдотипированный VSV-G.

Пример 5.

Конструирование γδ Т-клеток, экспрессирующих αβ-ТКР и СD8αβ.

Сконструированные  $\gamma\delta$  Т-клетки раскрытия могут быть использованы для лечения субъекта, нуждающегося в лечении состояния. Чтобы сконструировать  $\gamma\delta$  Т-клетки, которые экспрессируют  $\alpha\beta$ -ТКР, специфически связывающийся с комплексом ТАА/МНС, был получен экспрессирующий  $\alpha\beta$ -ТКР  $\gamma$ -ретровирус (вирус  $\alpha\beta$ -ТКР). Поскольку  $\gamma\delta$  Т-клетки не могут экспрессировать CD8,  $\gamma\delta$  Т-клеткам может быть необходим CD8 в дополнение к  $\alpha\beta$ -ТКР, чтобы распознавать комплексы ТАА/МНС-I на клеточной мембране клеток-мишеней, например, раковых клеток. В этих целях был получен CD8-экспрессирующий  $\gamma$ -ретровирус (CD8 вирус).

Чтобы определить эффективность трансдукции  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток сконструированными уретровирусами, активированные Золедронатом  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки трансдуцировали вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и/или вирусом CD8 при MOI, равной 3, в заданной среде, дополненной ИЛ-2 и ИЛ-15. Эффективность трансдукции измеряли в точке времени через 96 ч после трансдукции с помощью окрашивания декстрамером ТАА/МНС-РЕ (или декстрамером отрицательного контроля NYESO-PE) с последующим окрашиванием на CD3, CD8 $\alpha$  и V $\delta$ 2. За подсчетом на MacsQuant следовал анализ гейтирования на популяцию CD3.

Трансдукцию можно проводить в присутствии энхансеров трансдукции, чтобы повысить эффективность трансдукции за счет физического снижения электростатического отталкивания между отрицатель-

но заряженной клеткой и вирионом и, тем самым, повышая степень взаимодействия между клеткой и вирионом. В этих целях во время трансдукции γδ Т-клеток с помощью ретровируса, кодирующего СD8αβ, проводили испытание двух энхансеров трансдукции. Проводили испытание RetroNectin® (фрагмент фибронектина, нанесенный на планшеты) и VectoFusin-1® (растворимый пептид в катионной форме). На фиг. 9А показано, что тогда как в случае RetroNectin® достигалась более высокая эффективность трансдукции (среднее значение 49,7%), VectoFusin-1® также был способен трансдуцировать γδ Т-клетки при средней эффективности трансдукции, составившей 27,5%.

На фиг. 9В показаны 71% V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцированных вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР в отдельности и 49% V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцированных как вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР, так и вирусом CD8, обнаруженным с помощью окрашивания декстрамерами ТАА/МНС-РЕ, в сравнении с окрашиванием декстрамером отрицательного контроля NYESO-PE, т.е. трансдуцированные вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР в отдельности (1,6%) и как вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР, так и вирусом CD8 (2%). Данные результаты свидетельствуют о том, что  $\alpha\beta$ -ТКР, который специфически связывается с комплексом ТАА/МНС, легко презентировался на клеточной поверхности V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцированных вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР. Кроме того, 7,6% V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцированных CD8-вирусом в отдельности, и 6,8% V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцированных как вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР, так и CD8-вирусом, были идентифицированы с помощью окрашивания CD8 $\alpha$  по сравнению с имитацией (без вируса) (4%) и трансдуцированными вирусом  $\alpha\beta$ -ТКР в отдельности (4,4%). Эти данные показывают, что V $\gamma$ 982 Т-клетки, приготовленные с помощью опосредованной Золедронатом, ИЛ-2 и ИЛ-15 активации и экспансии, могут быть использованы для экспрессии ТАА-специфических ТКР и CD8 за счет вирусной трансдукции.

Для определения кратности экспансии  $V\gamma9\delta2$  Т-клеток после вирусной трансдукции  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки (GD) или  $\alpha\beta$  Т-клетки (AB) были трансдуцированы вирусом  $\alpha\beta$ -TKP (TCR) и/или вирусом CD8 (CD8) с последующим измерением кратности экспансии, начиная с 7-го по 21-ый день после трансдукции. На фиг. 10 показано, что без трансдукции  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки (GD имитация) (в 1040 раз) обычно имеют более высокую степень экспансии, чем  $\alpha\beta$  Т-клетки (AB имитация) (в 289 раз). После трансдукции  $\alpha\beta$ -TKP в отдельности  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки (GD+TCR) имеют кратность 517, что выше, чем число  $\alpha\beta$  Т-клеток (AB+TCR) (в 211 раз). После трансдукции CD8 в отдельности (GD+CD8) или CD8+ $\alpha\beta$ -TKP (GD+CD8+TKP),  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки имеют 620-кратную и 540-кратную экспансию, соответственно. Эти результаты свидетельствуют о том, что  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки обладают лучшей способностью к клеточной экспансии, чем  $\alpha\beta$  Т-клетки, вообще, и к вирусной трансдукции.

 $\alpha\beta$ -ТКР-экспрессирующие V $\gamma$ 982 Т-клетки, в которых  $\alpha\beta$ -ТКР специфически связывается с комплексом ТАА /МНС, были получены путем трансдукции V $\gamma$ 982 Т-клеток с помощью ретровируса  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровируса CD8 $\alpha\beta$ . На фиг. 11А показано, что по сравнению с V $\gamma$ 982 Т-клетками без вирусной трансдукции (имитация), 34,9% V $\gamma$ 982 Т-клеток, трансдуцируемых ретровирусом  $\alpha\beta$ -ТКР и ретровирусом CD8 $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ -ТКР+CD8), имели положительный результат при окрашивании декстрамером ТАА/МНС (ТАА/МНС-dex) и антителом к CD8 (CD8), что свидетельствует о получении V $\gamma$ 982 Т-клеток, экспрессирующих как  $\alpha\beta$ -ТКР, так и CD8 $\alpha\beta$  на клеточной поверхности (сконструированные Vg9d2 Т-клетки с  $\alpha\beta$ -ТКР+CD8 $\alpha\beta$ ).

Чтобы определить цитотолитическую активность сконструированных  $V\gamma982$  Т-клеток,  $V\gamma982$  Т-клеток, сконструированные с использованием  $\alpha\beta$ -ТКР+СD8 $\alpha\beta$ , подвергали воздействию клетокмишеней, например, линии клеток A375, которая является линией клеток злокачественной меланомы, на поверхности клеток которой презентируется комплекс TAA/MHC. Четыре функциональных анализа: (1) дегрануляция CD107a, (2) высвобождение IFN- $\gamma$ , (3) апоптоз клеток линии A375 через 6 ч и (4) цитотоксическое воздействие сконструированных  $\gamma\delta$  Т-клеток на линию A375 после долгосрочного совместного культивирования.

Принцип анализа дегрануляции CD107а основан на уничтожении клеток-мишеней за счет гранулозависимого пути, в котором используются предварительно сформированные литические гранулы, находящиеся внутри цитоплазмы цитотоксических клеток. Липидный бислой, окружающий эти гранулы, содержит ассоциированные с лизосомами мембранные гликопротеины (LAMP), в том числе CD107а
(LAMP-1). Сразу же после распознания клеток-мишеней за счет комплекса Т-клеточного рецептора индуцирующие апоптоз белки, как гранзимы и перфорин, высвобождаются в иммунологический синапс,
процесс, который называется дегрануляцией. Таким образом, трансмембранный белок CD107а экспонируется на поверхности клетки и может быть окрашен специфическими моноклональными антителами.
На фиг. 11В в сравнении с Vγ9δ2 Т-клетками без вирусной трансдукции (имитация) показано, что 23,1%
Vγ9δ2 Т-клеток, трансдуцированных ретровирусом αβ-ТКР и ретровирусом CD8αβ (αβ-ТКР+CD8), которые инкубировали с клетками-мишенями, например, клетками А375, имели положительное окрашивание антителом к CD107а, показывая, что сконструированные с использованием αβ-ТКР+CD8αβ Vγ9δ2 Тклетки являются цитолитическими, осуществляющими дегрануляцию под воздействием клеток А375.

В анализах высвобождения IFN-у производится измерение опосредованного клетками ответа на ан-

тигенпрезентирующие клетки, например, клетки A375, за счет уровней высвобожденного IFN- $\gamma$ , когда ТКР Т-клеток специфически связывается с комплексом пептид/МНС антигенпрезентирующих клеток на поверхности клетки. На фиг. 11С в сравнении с V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 Т-клетками без вирусной трансдукции (имитация) показано, что 19,7% V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 Т-клеток, трансдуцированных ретровирусом с $\beta$ -ТКР и ретровирусом СD8 $\alpha$ 8 (с $\beta$ -ТКР+CD8), имели положительное окрашивание антителом к IFN- $\gamma$ , показывая, что сконструированные с использованием с $\beta$ -ТКР+CD8 $\alpha$ 8 V $\gamma$ 9 $\delta$ 2 Т-клетки являются цитолитическими, за счет высвобождения IFN- $\gamma$  под воздействием клеток A375.

Цитолитическую активность оценивали через 24 ч после воздействия клеток A375 с помощью гейтирования на основании апоптоза не-CD3 Т-клеток, т.е. клеток A375. Анализ апоптоза производили путем окрашивания собранной культуры красителем live/dead. На фиг. 11D в сравнении с V $\gamma$ 982 Т-клетками без вирусной трансдукции (имитация) показано, что V $\gamma$ 982 Т-клетки, сконструированные с использованием  $\alpha$ β-TKP+CD8 $\alpha$ β ( $\alpha$ β-TKP+CD8), индуцировали апоптоз в 70% клеток A375, показывая, что сконструированные V $\gamma$ 982 Т-клетки с использованием  $\alpha$ β-TKP+CD8 $\alpha$ β являются цитолитическими при уничтожении клеток A375.

Цитолитическую активность также оценивали в режиме реального времени во время 84-часового анализа совместного культивирования. Нетрансдуцированные и трансдуцированные  $\alpha\beta$ TCR+CD8 $\alpha\beta$   $\gamma\delta$  T-клетки находились в совместной культуре с мишень-положительными опухолевыми клетками A375-RFP в соотношении эффектора к мишени 3:1. Лизис мишень-положительных опухолевых клеток A375-RFP анализировали в режиме реального времени с помощью аналитической системы IncuCyte® live cell (Essen BioScience). Опухолевые клетки в отдельности и нетрансдуцированные и  $\alpha\beta$ TKP-трансдуцированные  $\alpha\beta$  T-клетки использовали в качестве отрицательных и положительных контролей, соответственно. Как показано на фиг. 11E, тогда как нетрансдуцированные  $\gamma\delta$  T-клетки демонстрировали цитотоксический потенциал в связи с присущими  $\gamma\delta$  T-клеткам противоопухолевыми свойствами,  $\alpha\beta$ TKP+CD8 $\alpha\beta$ -трансдуцированные  $\gamma\delta$  T-клетки проявляли сходный цитотоксический потенциал в сравнении с  $\alpha\beta$ TKP-трансдуцированными  $\alpha\beta$  T-клетками, демонстрируя, что  $\alpha\beta$ TKP+CD8 $\alpha\beta$ -трансдуцированные  $\gamma\delta$  T-клетки могут быть сконструированы для нацеливания на опухолевые клетки и их уничтожения.

Эти данные свидетельствуют о том, что сконструированные  $V\gamma9\delta2$  Т-клетки полученные с помощью способов настоящего раскрытия, являются функциональными и могут применяться ТАА пептидспецифически для уничтожения клеток-мишеней, например, раковых клеток.

В одном аспекте, ТАА-пептиды, описанные в настоящем документе, которые применимы в совокупности со способами и вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, включают, например, те ТАА-пептиды, что описаны в патентной заявке США 20160187351, патентной заявке США 20170165335, патентной заявке США 20170035807, патентной заявке США 20160280759, патентной заявке США 20160287687, патентной заявке США 20160346371, патентной заявке США 20160368965, патентной заявке США 20170022251, патентной заявке США 20170002055, патентной заявке США 20170029486, патентной заявке США 20170037089, патентной заявке США 20170136108, патентной заявке США 20170101473, патентной заявке США 20170096461, патентной заявке США 20170165337, патентной заявке США 20170189505, патентной заявке США 20170173132, патентной заявке США 20170296640, патентной заявке США 20170253633 и в патентной заявке США 20170260249, содержание каждой из этих публикаций и списков последовательностей, описанных в них, включено в данное описание во всей полноте путем ссылки.

Пример 6.

Конструирование γδ Т-клеток, экспрессирующих химерные молекулы.

γδ Т-клетки могут быть сконструированы, чтобы экспрессировать химерный компонент, распознающий опухоль, который содержит связывающийся с лигандом домен, образованный из NKG2D, NKG2A, NKG2C, NKG2F, LLT1, AICL, CD26, NKRP1, NKp30, NKp44, NKp46, CD244 (2B4), DNAM-1 и NKp80 или антитело к опухоли, такое как антитело к Her2neu или к EGFR и сигнальный домен, полученный из CD3-ζ, Dap 10, CD28, 4-IBB и CD40L. В некоторых примерах химерный рецептор связывается с МІСА, МІСВ, Her2neu, EGFR, мезотелином, CD38, CD20, CD19, PSA, RON, CD30, CD22, CD37, CD38, CD56, CD33, CD30, CD138, CD123, CD79b, CD70, CD75, CA6, GD2, альфа-фетопротеином (АФП), раковоэмбриональным антигеном (РЭА), CEACAM5, CA-125, MUC-16, 5T4, NaPi2b, ROR1, ROR2, 5T4, PLIF, Her2/Neu, EGFRvIII, GPMNB, LIV-1, гликолипидом F77, белком активации фибробластов, PSMA, STEAP-1, STEAP-2, с-met, CSPG4, нектином-4, VEGFR2, PSCA, связывающимся с фолатом белком/рецептором, SLC44A4, Cripto, CTAG1B, AXL, IL-13R, IL-3R, SLTRK6, gp100, MART1, тирозиназой, SSX2, SSX4, NYESO-1, эпителиальным опухолевым антигеном (ЭОА), генами семейства MAGEA (такими как MAGE3A, MAGE4A), ККLС1, гаs с мутациями, βгаf, p53, молекулой А, подобной молекуле МНС I класса (МІСА), или молекулой В, подобной молекуле МНС I класса (МІСВ), ВПЧ или ЦМВ.

Другие конструкции вирусов, которые могут использоваться для трансдукции  $\gamma\delta$  Т-клеток, могут включать два вируса, чтобы экспрессировать  $\alpha\beta$  ТКР и химерные CD8/CD4 в отдельности. Альтернатив-

но, как TAA-специфический  $\alpha\beta$  TKP, так и химерный CD8/CD4 (с усеченным рецептором колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R)) могут быть включены в один и тот же вирус.

На фиг. 12, к примеру, представлена конструкция химерный рецептор CD8/CD4-T2A-усеченный CSF1R, в которой внеклеточный домен CD8α может быть связан с трансмембранным и внутриклеточным доменом CD4. CD8 стребуется для связывания с доменом см3 молекулы МНС I класса, в котором СD8β является важным компонентом для пальмитоилирования, следовательно, для обеспечения надлежащего привлечения CD8 к липидным рафтам для взаимодействия с комплексом ТКР. С одной стороны, СD4 выполняет функции мономера и может находиться на липидных рафтах, и, аналогично внутриклеточному домену CD8, внутриклеточный домен CD4 может привлекать лимфоцит-специфическую протеинтирозинкиназу (Lck), которая может взаимодействовать с цитоплазматическим хвостом ко-рецепторов СD4 и CD8 на хелперных Т-клетках и цитотоксических Т-клетках, соответственно, в целях содействия передачи сигналов от комплекса ТКР. Поэтому, вместо экспрессии как СD8а, так и CD8β, может быть получен химерный белок CD8/CD4, который может связываться с молекулой МНС І класса и находиться на липидных рафтах. Каталитический внутриклеточный домен усеченного рецептора CSF1 (CSF1R) может быть расположен за химерным белком CD8/CD4, используемым как "аварийный выключатель", когда функции химерного белка CD8/CD4 больше не требуются. CSF1R не экспрессируется на Т-клетках и преобладает в миелоидных клетках. Поэтому, выключение сигнального пути, опосредованного каталитическим внутриклеточным доменом CSF1R, имело бы минимальное воздействие на Т-клетки, такие как уб Т-клетки. Для выключения сигнального пути CSF1R может быть использован ряд ингибиторов тирозинкиназ, например, R7155, CYC11645, Ki20227, GW2580, BLZ945, PLX5622 и PLX3397. Другие рецепторы могут использоваться в качестве "аварийного выключателя", включая, помимо прочих, усеченный TNFR2, усеченный ESR1, и/или сигнальный путь ESR1/Fas, который может активировать рецептор эстрогена для индукции Fas-опосредованной гибели Т-клеток.

CSF1 может стимулировать поляризацию M1 (классически активированные макрофаги) в M2 (альтернативно активированные макрофаги). В микроокружении опухоли CSF1 может поляризовать опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) из типа M1 в M2. Это может быть нежелательно, поскольку ОАМ типа M1 обладают большей активностью по уничтожению опухолевых клеток, чем ОАМ типа M2. Чтобы использовать присутствие CSF1 в микроокружении опухоли и активировать функции/сохранение Т-клеток и снизить доступность CSF1, поляризующих ОАМ, в химерный белок CD8/CD4 может быть включен внеклеточный домен CSF1R, связывающийся с CSF1.

На фиг. 12В показан, например, химерный рецептор CD8/CD4 химерный рецептор-CSF1R/41BB, в котором внеклеточный домен CSF1R расположен за химерным белком CD8/CD4, так что внеклеточный домен CSF1R может связываться с CSF1 и секвестировать его в системе макрофагов, тем самым снижая поляризацию М1 в М2. При включении костимуляторной молекулы, например, 41BB, данный слитый белок может стимулировать выживаемость и экспансию Т-клеток, таких как γδ Т-клетки.

Преимущества настоящего раскрытия могут включать (1) применение  $\gamma\delta$  Т-клеток, чтобы вызвать цитотоксичность к мевалонат-зависимым опухолям; (2) применение  $\gamma\delta$  Т-клеток в качестве аллогенных клеток, сконструированных в целях экспрессии химерного антигенного рецептора, специфического к опухолевым антигенам (CAR) или  $\alpha\beta$ -TKP с делецией эндогенного  $\gamma\delta$ TKP или без нее; (3) применение  $\gamma\delta$  Т-клеток в качестве аллогенных иммунных клеток при совместном введении с различными формами антител или активаторами Т-клеток для лечения больных раком пациентов с нарушениями функций иммунной системы; (4) применение  $\gamma\delta$  Т-клеток в целях стимулирования созревания дендритных клеток для противораковой вакцины; и (5) применение  $\gamma\delta$  Т-клеток в качестве антигенпрезентирующих клеток для усиления активации цитотоксических CD8 Т-клеток.

Все цитируемые в настоящем описании источники включены в него посредством ссылки, как если бы каждый источник был конкретно и в отдельности было указано его включен путем ссылки. Цитирование любой ссылки предназначается для ее раскрытия до даты подачи заявки и не должно истолковываться как допущение, что настоящее изобретение не может быть датировано ранее такой публикации путем ссылки на более раннее изобретение.

Следует понимать, что каждый из элементов, описываемых выше, или два или более совместно могут также найти полезное применение в других видах способов, отличающихся от описанного выше типа. Без дополнительного анализа предшествующее описание выявляет в такой полноте суть настоящего раскрытия, что другие лица могут, применяя актуальные знания, легко приспособить его для различных применений, не опуская характеристики, которые с точки зрения уровня техники, справедливо представляют собой неотъемлемые характеристики общих и специфических аспектов этого раскрытия сущности, заявленных в прилагающейся формуле изобретения. Вышеупомянутые варианты осуществления представлены исключительно как примеры; объем настоящего раскрытия ограничивают только следующие пункты формулы изобретения.

#### Список последовательностей

<110>	Имматиі	кс ЮС,	Инк.									
<120> PAKA	СПОСОБІ И СВЯЗА										ЛЕТО	к для лечения
<130>	300001	1-00300	)1									
	US62/59											
	DE10201		34.9									
<160>	5											
<170>	Patent:	In vers	sion 3	.5								
<210><211><211><212><213>	PRT	твенная	н посл	едоват	ельн	OCTЬ						
<220> <223>	Слитый	белок	RD114	TR								
<400>	1											
Met Ly 1	s Leu Pi	ro Thr 5	Gly M	et Val	Ile	Leu 10	Cys	Ser	Leu	Ile	Ile 15	Val
Arg Al	a Gly Pi 20		Asp P	ro Arg	Lys 25	Ala	Ile	Ala	Leu	Val 30	Gln	Lys
Gln Hi	s Gly Ly 35	ys Pro	Cys G	lu Cys 40	Ser	Gly	Gly	Gln	Val 45	Ser	Glu	Ala
Pro Pr 50	o Asn Se	er Ile	Gln G 5		Thr	Cys	Pro	Gly 60	Lys	Thr	Ala	Tyr
Leu Me 65	t Thr As	sn Gln	Lys T	rp Lys	Cys	Arg	Val 75	Thr	Pro	Lys	Ile	Ser 80
Pro Se	r Gly G	ly Glu 85	Leu G	ln Asn	Cys	Pro 90	Cys	Asn	Thr	Phe	Gln 95	Asp
Ser Me	t His Se	er Ser 00	Cys T	yr Thr	Glu 105	Tyr	Arg	Gln	Cys	Arg 110	Arg	Ile

Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser

120

	130					135					140				
Pro 145	Cys	Arg	Gly	Ser	Ile 150	Asn	Gln	Pro	Val	Cys 155	Trp	Ser	Ala	Thr	Ala 160
Pro	Ile	His	Ile	Ser 165	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro 170	Leu	Asp	Thr	Lys	Arg 175	Val
Trp	Thr	Val	Gln 180	Lys	Arg	Leu	Glu	Gln 185	Ile	His	Lys	Ala	Met 190	Thr	Pro
Glu	Leu	Gln 195	Tyr	His	Pro	Leu	Ala 200	Leu	Pro	Lys	Val	Arg 205	Asp	Asp	Leu
Ser	Leu 210	Asp	Ala	Arg	Thr	Phe 215	Asp	Ile	Leu	Asn	Thr 220	Thr	Phe	Arg	Leu
Leu 225	Gln	Met	Ser	Asn	Phe 230	Ser	Leu	Ala	Gln	Asp 235	Cys	Trp	Leu	Cys	Leu 240
Lys	Leu	Gly	Thr	Pro 245	Thr	Pro	Leu	Ala	Ile 250	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu 255	Thr
Tyr	Ser	Leu	Ala 260	Asp	Ser	Leu	Ala	Asn 265	Ala	Ser	Cys	Gln	Ile 270	Ile	Pro
Pro	Leu	Leu 275	Val	Gln	Pro	Met	Gln 280	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser 285	Cys	Leu	Ser
Ser	Pro 290	Phe	Ile	Asn	Asp	Thr 295	Glu	Gln	Ile	Asp	Leu 300	Gly	Ala	Val	Thr
Phe 305	Thr	Asn	Cys	Thr	Ser 310	Val	Ala	Asn	Val	Ser 315	Ser	Pro	Leu	Cys	Ala 320
Leu	Asn	Gly	Ser	Val 325	Phe	Leu	Cys	Gly	Asn 330	Asn	Met	Ala	Tyr	Thr 335	Tyr
Leu	Pro	Gln	Asn 340	Trp	Thr	Arg	Leu	Cys 345	Val	Gln	Ala	Ser	Leu 350	Leu	Pro
Asp	Ile	Asp 355	Ile	Asn	Pro	Gly	Asp 360	Glu	Pro	Val	Pro	Ile 365	Pro	Ala	Ile
Asp	His 370	Tyr	Ile	His	Arg	Pro 375	Lys	Arg	Ala	Val	Gln 380	Phe	Ile	Pro	Leu

Leu 385	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile 390	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr 395	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly 400
Leu	Gly	Val	Ser	Val 405	Thr	Gln	Tyr	Thr	Lys 410	Leu	Ser	His	Gln	Leu 415	Ile
Ser	Asp	Val	Gln 420	Val	Leu	Ser	Gly	Thr 425	Ile	Gln	Asp	Leu	Gln 430	Asp	Gln
Val	Asp	Ser 435	Leu	Ala	Glu	Val	Val 440	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg 445	Gly	Leu	Asp
Leu	Leu 450	Thr	Ala	Glu	Gln	Gly 455	Gly	Ile	Cys	Leu	Ala 460	Leu	Gln	Glu	Lys
Cys 465	Cys	Phe	Tyr	Ala	Asn 470	Lys	Ser	Gly	Ile	Val 475	Arg	Asn	Lys	Ile	Arg 480
Thr	Leu	Gln	Glu	Glu 485	Leu	Gln	Lys	Arg	Arg 490	Glu	Ser	Leu	Ala	Ser 495	Asn
Pro	Leu	Trp	Thr 500	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe 505	Leu	Pro	Tyr	Leu	Leu 510	Pro	Leu
Leu	Gly	Pro 515	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu 520	Leu	Ile	Leu	Thr	Ile 525	Gly	Pro	Cys
Val	Phe 530	Asn	Arg	Leu	Val	Gln 535	Phe	Val	Lys	Asp	Arg 540	Ile	Ser	Val	Val
Gln 545	Ala	Leu	Val	Leu	Thr 550	Gln	Gln	Tyr	His	Gln 555	Leu	Lys	Pro	Leu	
<210 <211 <212 <213	L> ( 2> I	2 662 PRT Felir	ne Er	ndoge	eneoi	ıs Vi	irus								
<400	)> 2	2													
Met 1	Lys	Pro	Pro	Ala 5	Gly	Met	Val	Phe	Leu 10	Trp	Val	Leu	Thr	Ser 15	Leu
Gly	Ala	Gly	Ile 20	Gly	Ala	Lys	Ile	Val 25	Lys	Glu	Gly	Asn	Pro 30	His	Gln
Val	Tyr	Thr 35	Leu	Thr	Trp	Gln	Ile 40	Tyr	Ser	Gln	Ser	Gly 45	Glu	Val	Val

Trp	Glu 50	Val	Gln	Gly	Asn	His 55	Ala	Leu	Asn	Thr	Trp 60	Trp	Pro	Pro	Leu
Thr 65	Pro	Asp	Phe	Cys	Gln 70	Leu	Ala	Ala	Gly	Leu 75	Asp	Thr	Trp	Asp	Ile 80
Pro	Ala	Arg	Ser	Pro 85	Lys	Asn	Leu	Gln	Ser 90	Tyr	Met	Gly	Glu	Arg 95	Ile
Gln	Gln	Met	Thr 100	Ala	His	Gly	Cys	Ser 105	Ser	Pro	Thr	Ala	Arg 110	Cys	Arg
Leu	Ala	Gln 115	Ala	Glu	Phe	Tyr	Val 120	Cys	Pro	Arg	Asp	Asn 125	Arg	Asp	Arg
Ala	Thr 130	Ala	His	Arg	Cys	Gly 135	Gly	Tyr	Glu	Glu	Tyr 140	Phe	Cys	Ser	Ala
Trp 145	Gly	Cys	Glu	Thr	Thr 150	Gly	Asp	Ala	Tyr	Trp 155	Gln	Pro	Thr	Ser	Ser 160
Trp	Asp	Leu	Ile	Thr 165	Ile	Thr	Arg	Gly	Tyr 170	Thr	Lys	Pro	Asp	Pro 175	Asp
Gly	His	Thr	Cys 180	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Gly 185	Thr	Glu	Gly	Tyr	His 190	His	Trp
Ile	Ser	Pro 195	Leu	Ser	Leu	Pro	Leu 200	Lys	Ile	Thr	Phe	Thr 205	Asp	Ser	Gly
Lys	Arg 210	Ala	Leu	Gly	Trp	Gln 215	Thr	Gly	Tyr	Thr	Trp 220	Gly	Leu	Arg	Trp
Tyr 225	Leu	Pro	Gly	Lys	Asp 230	Arg	Gly	Ile	Val	Leu 235	Lys	Ile	Lys	Leu	Lys 240
Ile	Asp	Thr	Ile	Thr 245	Gln	Thr	Val	Gly	Pro 250	Asn	Leu	Val	Leu	Ala 255	Asp
Gln	Lys	Ala	Pro 260	Val	Gln	Leu	Ala	Ile 265	Pro	Val	Gln	Pro	Pro 270	Arg	Ala
Pro	Thr	Gln 275	Thr	Pro	Gly	Ile	Asn 280	Pro	Val	Asn	Ser	Thr 285	Leu	Ser	Pro
Ser	Leu 290	Gly	Tyr	Pro	Thr	Pro 295	Pro	Leu	Asp	Arg	Ala 300	Gln	Gly	Asp	Arg

Leu Le 305	u Asn	Leu	Val	Gln 310	Gly	Val	Tyr	Leu	Thr 315	Leu	Asn	Leu	Thr	Ala 320
Pro As	n Gln	Thr	Gln 325	Asp	Cys	Trp	Leu	Cys 330	Leu	Thr	Ala	Lys	Pro 335	Pro
Tyr Ty	r Gln	Gly 340	Val	Ala	Ile	Ile	Gly 345	Asn	Phe	Thr	Asn	His 350	Thr	Asn
Ala Pr	o Leu 355	Arg	Cys	Ser	Thr	Thr 360	Pro	Arg	His	Gly	Leu 365	Thr	Leu	Thr
Glu Va		Gly	His	Gly	Leu 375	Cys	Ile	Gly	Lys	Ile 380	Pro	Pro	Ser	His
Gln As 385	n Leu	Cys	Ser	Gln 390	Thr	Ile	Pro	Ser	Val 395	Gly	Gln	Gly	Pro	Tyr 400
Tyr Le	u Thr	Ala	Pro 405	Asn	Gly	Thr	Tyr	Trp 410	Val	Cys	Asn	Thr	Gly 415	Leu
Thr Pr	o Cys	Ile 420	Ser	Leu	Gln	Val	Leu 425	Asn	Asn	Thr	Ala	Asp 430	Tyr	Cys
Ile Le	u Ile 435	Glu	Leu	Trp	Pro	Lys 440	Ile	Phe	Tyr	His	Asp 445	Ser	Glu	Tyr
Ile Ty 45	_	His	Tyr	Glu	Pro 455	Gly	Gly	Arg	Phe	Arg 460	Arg	Glu	Pro	Val
Ser Le 465	u Thr	Val	Ala	Leu 470	Leu	Leu	Gly	Gly	Leu 475	Thr	Met	Gly	Ser	Leu 480
Ala Al	a Gly	Ile	Gly 485	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala 490	Leu	Ile	Glu	Thr	Asn 495	Gln
Phe Ly	s Gln	Leu 500	Gln	Ile	Ala	Met	His 505	Ser	Asp	Ile	Gln	Ala 510	Leu	Glu
Glu Se	r Ile 515	Ser	Ala	Leu	Glu	Arg 520	Ser	Leu	Thr	Ser	Leu 525	Ser	Glu	Val
Val Le 53		Asn	Arg	Arg	Gly 535	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe 540	Leu	Gln	Glu	Gly
Gly L∈ 545	u Cys	Ala	Ala	Leu 550	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys 555	Phe	Tyr	Ala	Asp	His 560

	GIY	110	Vai	565	ASP	Del	Mec	Ата	570	ьеи	Arg	GIU	Arg	575	цуѕ
Gln	Arg	Gln	Lys 580	Leu	Phe	Glu	Ser	Gln 585	Gln	Gly	Trp	Phe	Glu 590	Gly	Trp
Tyr	Asn	Lys 595	Ser	Pro	Trp	Phe	Thr 600	Thr	Leu	Val	Ser	Ser 605	Leu	Met	Gly
Pro	Leu 610	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu 615	Ile	Leu	Met	Phe	Gly 620	Pro	Cys	Ile	Leu
Asn 625	Arg	Leu	Val	Gln	Phe 630	Ile	Arg	Glu	Arg	Leu 635	Ser	Val	Ile	Gln	Ala 640
Leu	Val	Leu	Thr	Gln 645	Gln	Tyr	His	Gln	Leu 650	Arg	Gln	Phe	Asp	Ala 655	Glu
Arg	Pro	Asp	Thr 660	Ile	Glu										
<210 <211 <212 <213	L> 5 2> E	511 PRT	с вез	зикуј	ондки	)FO (	CTOM	<b>Ξ</b> ΤΝΤ <i>ξ</i>	a.						
<400	)> 3	3													
		~				-	_								
Met 1	Lys	Cys	Leu	Leu 5	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu 10	Phe	Ile	Gly	Val	Asn 15	Cys
1				5					10				Val Trp 30	15	
1 Lys	Phe	Thr	Ile 20	5 Val	Phe	Pro	His	Asn 25	10 Gln	Lys	Gly	Asn	Trp	15 Lys	Asn
1 Lys Val	Phe Pro	Thr Ser 35	Ile 20 Asn	5 Val Tyr	Phe His	Pro Tyr	His Cys 40	Asn 25 Pro	10 Gln Ser	Lys Ser	Gly	Asn Asp 45	Trp 30	15 Lys Asn	Asn Trp
1 Lys Val	Phe Pro Asn 50	Thr Ser 35	Ile 20 Asn Leu	5 Val Tyr Ile	Phe His Gly	Pro Tyr Thr 55	His Cys 40	Asn 25 Pro Leu	10 Gln Ser	Lys Ser Val	Gly Ser Lys 60	Asn Asp 45 Met	Trp 30 Leu	Lys Asn	Asn Trp Ser
1 Lys Val His 65	Phe Pro Asn 50 Lys	Thr Ser 35 Asp	Ile 20 Asn Leu Ile	5 Val Tyr Ile Gln	Phe His Gly Ala	Pro Tyr Thr 55	His Cys 40 Ala	Asn 25 Pro Leu Trp	10 Gln Ser Gln Met	Lys Ser Val Cys 75	Gly Ser Lys 60	Asn Asp 45 Met	Trp 30 Leu Pro	Lys Lys Lys	Asn Trp Ser Trp

Glu	Gln	Thr 115	Lys	Gln	Gly	Thr	Trp 120	Leu	Asn	Pro	Gly	Phe 125	Pro	Pro	Gln
Ser	Cys 130	Gly	Tyr	Ala	Thr	Val 135	Thr	Asp	Ala	Glu	Ala 140	Val	Ile	Val	Gln
Val 145	Thr	Pro	His	His	Val 150	Leu	Val	Asp	Glu	Tyr 155	Thr	Gly	Glu	Trp	Val 160
Asp	Ser	Gln	Phe	Ile 165	Asn	Gly	Lys	Cys	Ser 170	Asn	Tyr	Ile	Cys	Pro 175	Thr
Val	His	Asn	Ser 180	Thr	Thr	Trp	His	Ser 185	Asp	Tyr	Lys	Val	Lys 190	Gly	Leu
Cys	Asp	Ser 195	Asn	Leu	Ile	Ser	Met 200	Asp	Ile	Thr	Phe	Phe 205	Ser	Glu	Asp
Gly	Glu 210	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly 215	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly 220	Phe	Arg	Ser	Asn
Tyr 225	Phe	Ala	Tyr	Glu	Thr 230	Gly	Gly	Lys	Ala	Cys 235	Lys	Met	Gln	Tyr	Cys 240
Lys	His	Trp	Gly	Val 245	Arg	Leu	Pro	Ser	Gly 250	Val	Trp	Phe	Glu	Met 255	Ala
Asp	Lys	Asp	Leu 260	Phe	Ala	Ala	Ala	Arg 265	Phe	Pro	Glu	Cys	Pro 270	Glu	Gly
Ser	Ser	Ile 275	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln 280	Thr	Ser	Val	Asp	Val 285	Ser	Leu	Ile
Gln	Asp 290	Val	Glu	Arg	Ile	Leu 295	Asp	Tyr	Ser	Leu	Cys 300	Gln	Glu	Thr	Trp
Ser 305	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly 310	Leu	Pro	Ile	Ser	Pro 315	Val	Asp	Leu	Ser	Tyr 320
Leu	Ala	Pro	Lys	Asn 325	Pro	Gly	Thr	Gly	Pro 330	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile 335	Asn
Gly	Thr	Leu	Lys 340	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg 345	Tyr	Ile	Arg	Val	Asp 350	Ile	Ala
Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Arg	Met	Val	Gly	Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr

		355					360					365			
Glu	Arg 370	Glu	Leu	Trp	Asp	Asp 375	Trp	Ala	Pro	Tyr	Glu 380	Asp	Val	Glu	Ile
Gly 385	Pro	Asn	Gly	Val	Leu 390	Arg	Thr	Ser	Ser	Gly 395	Tyr	Lys	Phe	Pro	Leu 400
Tyr	Met	Ile	Gly	His 405	Gly	Met	Leu	Asp	Ser 410	Asp	Leu	His	Leu	Ser 415	Ser
Lys	Ala	Gln	Val 420	Phe	Glu	His	Pro	His 425	Ile	Gln	Asp	Ala	Ala 430	Ser	Gln
Leu	Pro	Asp 435	Asp	Glu	Ser	Leu	Phe 440	Phe	Gly	Asp	Thr	Gly 445	Leu	Ser	Lys
Asn	Pro 450	Ile	Glu	Leu	Val	Glu 455	Gly	Trp	Phe	Ser	Ser 460	Trp	Lys	Ser	Ser
Ile 465	Ala	Ser	Phe	Phe	Phe 470	Ile	Ile	Gly	Leu	Ile 475	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu 480
Val	Leu	Arg	Val	Gly 485	Ile	His	Leu	Cys	Ile 490	Lys	Leu	Lys	His	Thr 495	Lys
Lys	Arg	Gln	Ile 500	Tyr	Thr	Asp	Ile	Glu 505	Met	Asn	Arg	Leu	Gly 510	Lys	
<210 <211 <212 <213	1> ( 2> E	685 PRT	са ле	ейко:	за гі	1ббон	HOB								
<400	0> 4	4													
Met 1	Val	Leu	Leu	Pro 5	Gly	Ser	Met	Leu	Leu 10	Thr	Ser	Asn	Leu	His 15	His
Leu	Arg	His	Gln 20	Met	Ser	Pro	Gly	Ser 25	Trp	Lys	Arg	Leu	Ile 30	Ile	Leu
Leu	Ser	Cys 35	Val	Phe	Gly	Gly	Gly 40	Gly	Thr	Ser	Leu	Gln 45	Asn	Lys	Asn
Pro	His 50	Gln	Pro	Met	Thr	Leu 55	Thr	Trp	Gln	Val	Leu 60	Ser	Gln	Thr	Gly

Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp

65					70					75					80
Pro	Thr	Leu	Lys	Pro 85	Asp	Val	Cys	Ala	Leu 90	Ala	Ala	Ser	Leu	Glu 95	Ser
Trp	Asp	Ile	Pro 100	Gly	Thr	Asp	Val	Ser 105	Ser	Ser	Lys	Arg	Val 110	Arg	Pro
Pro	Asp	Ser 115	Asp	Tyr	Thr	Ala	Ala 120	Tyr	Lys	Gln	Ile	Thr 125	Trp	Gly	Ala
Ile	Gly 130	Cys	Ser	Tyr	Pro	Arg 135	Ala	Arg	Thr	Arg	Met 140	Ala	Ser	Ser	Thr
Phe 145	Tyr	Val	Cys	Pro	Arg 150	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu 155	Ser	Glu	Ala	Arg	Arg 160
Cys	Gly	Gly	Leu	Glu 165	Ser	Leu	Tyr	Cys	Lys 170	Glu	Trp	Asp	Cys	Glu 175	Thr
Thr	Gly	Thr	Gly 180	Tyr	Trp	Leu	Ser	Lys 185	Ser	Ser	Lys	Asp	Leu 190	Ile	Thr
Val	Lys	Trp 195	Asp	Gln	Asn	Ser	Glu 200	Trp	Thr	Gln	Lys	Phe 205	Gln	Gln	Cys
His	Gln 210	Thr	Gly	Trp	Cys	Asn 215	Pro	Leu	Lys	Ile	Asp 220	Phe	Thr	Asp	Lys
Gly 225	Lys	Leu	Ser	Lys	Asp 230	Trp	Ile	Thr	Gly	Lys 235	Thr	Trp	Gly	Leu	Arg 240
Phe	Tyr	Val	Ser	Gly 245	His	Pro	Gly	Val	Gln 250	Phe	Thr	Ile	Arg	Leu 255	Lys
Ile	Thr	Asn	Met 260	Pro	Ala	Val	Ala	Val 265	Gly	Pro	Asp	Leu	Val 270	Leu	Val
Glu	Gln	Gly 275	Pro	Pro	Arg	Thr	Ser 280	Leu	Ala	Leu	Pro	Pro 285	Pro	Leu	Pro
Pro	Arg 290	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro 295	Ser	Leu	Pro	Asp	Ser 300	Asn	Ser	Thr	Ala
Leu 305	Ala	Thr	Ser	Ala	Gln 310	Thr	Pro	Thr	Val	Arg 315	Lys	Thr	Ile	Val	Thr 320

Leu	Asn	Thr	Pro	Pro 325	Pro	Thr	Thr	Gly	Asp 330	Arg	Leu	Phe	Asp	Leu 335	Val
Gln	Gly	Ala	Phe 340	Leu	Thr	Leu	Asn	Ala 345	Thr	Asn	Pro	Gly	Ala 350	Thr	Glu
Ser	Cys	Trp 355	Leu	Cys	Leu	Ala	Met 360	Gly	Pro	Pro	Tyr	Tyr 365	Glu	Ala	Ile
Ala	Ser 370	Ser	Gly	Glu	Val	Ala 375	Tyr	Ser	Thr	Asp	Leu 380	Asp	Arg	Cys	Arg
Trp 385	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys 390	Leu	Thr	Leu	Thr	Glu 395	Val	Ser	Gly	His	Gly 400
Leu	Cys	Ile	Gly	Lys 405	Val	Pro	Phe	Thr	His 410	Gln	His	Leu	Cys	Asn 415	Gln
Thr	Leu	Ser	Ile 420	Asn	Ser	Ser	Gly	Asp 425	His	Gln	Tyr	Leu	Leu 430	Pro	Ser
Asn	His	Ser 435	Trp	Trp	Ala	Cys	Ser 440	Thr	Gly	Leu	Thr	Pro 445	Cys	Leu	Ser
Thr	Ser 450	Val	Phe	Asn	Gln	Thr 455	Arg	Asp	Phe	Cys	Ile 460	Gln	Val	Gln	Leu
Ile 465	Pro	Arg	Ile	Tyr	Tyr 470	Tyr	Pro	Glu	Glu	Val 475	Leu	Leu	Gln	Ala	Tyr 480
Asp	Asn	Ser	His	Pro 485	Arg	Thr	Lys	Arg	Glu 490	Ala	Val	Ser	Leu	Thr 495	Leu
Ala	Val	Leu	Leu 500	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr 505	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr 510	Gly	Ser
Thr	Ala	Leu 515	Ile	Lys	Gly	Pro	Ile 520	Asp	Leu	Gln	Gln	Gly 525	Leu	Thr	Ser
Leu	Gln 530	Ile	Ala	Ile	Asp	Ala 535	Asp	Leu	Arg	Ala	Leu 540	Gln	Asp	Ser	Val
Ser 545	Lys	Leu	Glu	Asp	Ser 550	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser 555	Glu	Val	Val	Leu	Gln 560
Asn	Arg	Arg	Gly	Leu 565	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu 570	Lys	Glu	Gly	Gly	Leu 575	Cys

Ala	Ala	Leu	Lys 580	Glu	Glu	Cys	Cys	Phe 585	Tyr	Ile	Asp	His	Ser 590	Gly	Ala
Val	Arg	Asp 595	Ser	Met	Lys	Lys	Leu 600	Lys	Glu	Lys	Leu	Asp 605	Lys	Arg	Gln
Leu	Glu 610	Arg	Gln	Lys	Ser	Gln 615	Asn	Trp	Tyr	Glu	Gly 620	Trp	Phe	Asn	Asn
Ser 625	Pro	Trp	Phe	Thr	Thr 630	Leu	Leu	Ser	Thr	Ile 635	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu 640
Leu	Leu	Leu	Leu	Leu 645	Leu	Ile	Leu	Gly	Pro 650	Cys	Ile	Ile	Asn	Lys 655	Leu
Val	Gln	Phe	Ile 660	Asn	Asp	Arg	Ile	Ser 665	Ala	Val	Lys	Ile	Leu 670	Val	Leu
Arg	Gln	Lys 675	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu 680	Asn	Glu	Gly	Asn	Leu 685			
<210 <211 <212 <213	l> ! 2> !	5 65 PRT Ickyo	ССТВ	енная	00П Н	следо	овате	Эльн(	ОСТЬ						
<220 <223		Слить	ый б∈	элок	RD11	L4TR									
< 400	)> !	5													
Met 1	Lys	Leu	Pro	Thr 5	Gly	Met	Val		Leu 10	Cys	Ser	Leu	Ile	Ile 15	Val
Arg															
	Ala	Gly	Phe 20	Asp	Asp	Pro	Arg	Lys 25	Ala	Ile	Ala	Leu	Val 30	Gln	Lys
Gln			20					25					30	Gln Glu	
	His	Gly 35	20 Lys	Pro	Cys	Glu	Cys 40	25 Ser	Gly	Gly	Gln	Val 45	30 Ser		Ala
Pro	His Pro 50	Gly 35 Asn	20 Lys Ser	Pro Ile	Cys	Glu Gln 55	Cys 40 Val	25 Ser Thr	Gly Cys	Gly Pro	Gln Gly 60	Val 45 Lys	30 Ser Thr	Glu	Ala Tyr

Asp	Ser	Met	His 100	Ser	Ser	Cys	Tyr	Thr 105	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys 110	Arg	Ala
Asn	Asn	Lys 115	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Ala 120	Thr	Leu	Leu	Lys	Ile 125	Arg	Ser	Gly
Ser	Leu 130	Asn	Glu	Val	Gln	Ile 135	Leu	Gln	Asn	Pro	Asn 140	Gln	Leu	Leu	Gln
Ser 145	Pro	Cys	Arg	Gly	Ser 150	Ile	Asn	Gln	Pro	Val 155	Cys	Trp	Ser	Ala	Thr 160
Ala	Pro	Ile	His	Ile 165	Ser	Asp	Gly	Gly	Gly 170	Pro	Leu	Asp	Thr	Lys 175	Arg
Val	Trp	Thr	Val 180	Gln	Lys	Arg	Leu	Glu 185	Gln	Ile	His	Lys	Ala 190	Met	His
Pro	Glu	Leu 195	Gln	Tyr	His	Pro	Leu 200	Ala	Leu	Pro	Lys	Val 205	Arg	Asp	Asp
Leu	Ser 210	Leu	Asp	Ala	Arg	Thr 215	Phe	Asp	Ile	Leu	Asn 220	Thr	Thr	Phe	Arg
Leu 225	Leu	Gln	Met	Ser	Asn 230	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln 235	Asp	Cys	Trp	Leu	Cys 240
Leu	Lys	Leu	Gly	Thr 245	Pro	Thr	Pro	Leu	Ala 250	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser 255	Leu
Thr	Tyr	Ser	Leu 260	Ala	Asp	Ser	Leu	Ala 265	Asn	Ala	Ser	Cys	Gln 270	Ile	Ile
Pro	Pro	Leu 275	Leu	Val	Gln	Pro	Met 280	Gln	Phe	Ser	Asn	Ser 285	Ser	Cys	Leu
Ser	Ser 290	Pro	Phe	Ile	Asn	Asp 295	Thr	Glu	Gln	Ile	Asp 300	Leu	Gly	Ala	Val
Thr 305	Phe	Thr	Asn	Cys	Thr 310	Ser	Val	Ala	Asn	Val 315	Ser	Ser	Pro	Leu	Cys 320
Ala	Leu	Asn	Gly	Ser 325	Val	Phe	Leu	Cys	Gly 330	Asn	Asn	Met	Ala	Tyr 335	Thr
Tyr	Leu	Pro	Gln 340	Asn	Trp	Thr	Gly	Leu 345	Cys	Val	Gln	Ala	Ser 350	Leu	Leu

Pro	Asp	Ile 355	Asp	Ile	Ile	Pro	Gly 360	Asp	Glu	Pro	Val	Pro 365	Ile	Pro	Ala
Ile	Asp 370	His	Tyr	Ile	His	Arg 375	Pro	Lys	Arg	Ala	Val 380	Gln	Phe	Ile	Pro
Leu 385	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly 390	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe 395	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr 400
Gly	Leu	Gly	Val	Ser 405	Val	Thr	Gln	Tyr	Thr 410	Lys	Leu	Ser	His	Gln 415	Leu
Ile	Ser	Asp	Val 420	Gln	Val	Leu	Ser	Gly 425	Thr	Ile	Gln	Asp	Leu 430	Gln	Asp
Gln	Val	Asp 435	Ser	Leu	Ala	Glu	Val 440	Val	Leu	Gln	Asn	Arg 445	Arg	Gly	Leu
Asp	Leu 450	Leu	Thr	Ala	Glu	Gln 455	Gly	Gly	Ile	Cys	Leu 460	Ala	Leu	Gln	Glu
Lys 465	Cys	Cys	Phe	Tyr	Ala 470	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile 475	Val	Arg	Asn	Lys	Ile 480
Arg	Thr	Leu	Gln	Glu 485	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg 490	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala 495	Ser
Asn	Pro	Leu	Trp 500	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly 505	Phe	Leu	Pro	Tyr	Leu 510	Leu	Pro
Leu	Leu	Gly 515	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu 520	Leu	Leu	Ile	Leu	Thr 525	Ile	Gly	Pro
Cys	Val 530	Phe	Ser	Arg	Leu	Met 535	Ala	Phe	Ile	Asn	Asp 540	Arg	Leu	Asn	Val
Val 545	His	Ala	Met	Val	Leu 550	Ala	Gln	Gln	Tyr	Gln 555	Ala	Leu	Lys	Ala	Glu 560
Glu	Glu	Ala	Gln	Asp 565											

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ активации и экспансии γδ Т-клеток in vitro, включающий

выделение γδ Т-клеток из пробы, полученной при лейкаферезе взятого у человека образца;

активацию выделенных γδ Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната, рекомбинантного интерлейкина человека 2 (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина человека 15 (ИЛ-15); и

экспансию активированных γδ Т-клеток без аминобисфосфоната и в присутствии рекомбинантного интерлейкина человека 2 (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина человека 15 (ИЛ-15);

причем степень экспансии экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток является от примерно 10000-кратной до примерно 35000-кратной.

- 2. Способ по п.1, в котором аминобисфосфонат включает памидроновую кислоту, алендроновую кислоту, золедроновую кислоту, ризедроновую кислоту, ибандроновую кислоту, инкадроновую кислоту, ее соль и/или ее гидрат.
  - 3. Способ по одному из пп.1, 2, в котором аминобисфосфонат является золедроновой кислотой.
- 4. Способ по одному из пп.1-3, в котором активация осуществляется в присутствии золедроновой кислоты и композиции цитокинов, состоящей из ИЛ-2 и ИЛ-15.
- 5. Способ по одному из пп.1-4, в котором активация осуществляется дополнительно в присутствии лиганда Toll-подобного рецептора 2 (TLR2).
- 6. Способ по п.5, в котором лиганд TLR2 выбран из группы, состоящей из амфотерицина В, Lтеанина, таннина и полифенолов.
- 7. Способ по одному из пп.1-6, в котором активация осуществляется дополнительно в присутствии N-ацетилцистеина (NAC).
- 8. Способ по одному из пп.1-7, в котором активация осуществляется дополнительно в присутствии ингибитора COX-2.
  - 9. Способ по п.8, в котором ингибитор СОХ-2 является ибупрофеном.
- 10. Способ по одному из пп.1-9, в котором активация осуществляется в присутствии золедроновой кислоты при концентрации примерно 1 мкМ до примерно 10 мкМ.
- 11. Способ по одному из пп.1-10, в котором активация осуществляется в присутствии ИЛ-2 при концентрации от примерно 10 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл.
- 12. Способ по одному из пп.1-9, в котором активация осуществляется в присутствии золедроновой кислоты при концентрации от примерно 1 мкМ до примерно 100 мкМ, ИЛ-2 при концентрации от примерно 10 Ед/мл до примерно 200 Ед/мл и ИЛ-15 при концентрации примерно 10-500 нг/мл.
- 13. Способ по одному из пп.1-9 и 12, в котором экспансия производится в присутствии ИЛ-2 при концентрации от примерно 10 Ед/мл до примерно 100 Ед/мл и/или ИЛ-15 при концентрации примерно 50-200 нг/мл.
- 14. Популяция экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, полученных с помощью способа по одному из пп.1-13, в которой плотность экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток составляет по меньшей мере примерно  $1\times10^5$  клеток/мл, по меньшей мере примерно  $1\times10^6$  клеток/мл, по меньшей мере примерно  $1\times10^8$  клеток/мл или по меньшей мере примерно  $1\times10^9$  клеток/мл.
  - 15. Способ активации и экспансии уб Т-клеток in vitro, включающий

выделение  $\gamma\delta$  Т-клеток из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) субъекта человеческого происхождения;

в котором выделение включает

контактирование МКПК с антителами к а- и β-Т-клеточному рецептору (ТКР);

истощение  $\alpha$ - и  $\beta$ -ТКР-положительных клеток из МКПК;

активацию выделенных γδ Т-клеток в присутствии аминобисфосфоната, рекомбинантного интерлейкина человека 2 (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина человека 15 (ИЛ-15); и

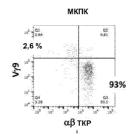
экспансию активированных γδ Т-клеток без аминобисфосфоната и в присутствии рекомбинантного интерлейкина человека 2 (ИЛ-2) и рекомбинантного интерлейкина человека 15 (ИЛ-15);

причем степень экспансии экспансированных  $\gamma\delta$  Т-клеток является от примерно 10000-кратной до примерно 35000-кратной.

- 16. Способ по одному из пп.1-15, дополнительно включающий трансдукцию активированных  $\gamma\delta$  Т-клеток рекомбинантным вирусным вектором.
- 17. Способ по п.16, в котором вирусный вектор является ретровирусным вектором, лентивирусным вектором, аденоассоциированным вирусом (AAV) или транспозоном.
  - 18. Способ по п.16 или 17, в котором вирусный вектор является лентивирусным вектором.
- 19. Способ по одному из пп.16-18, в котором вирусный вектор включает ген RD114TR, последовательность которого по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, кодирующей оболочечный белок.
  - 20. Способ по одному из пп.16-19, в котором вирусный вектор кодирует CD8 и/или αβ-ТКР.
  - 21. Способ по одному из пп.16-20, в котором трансдукция осуществляется в присутствии энхансера

трансдукции.

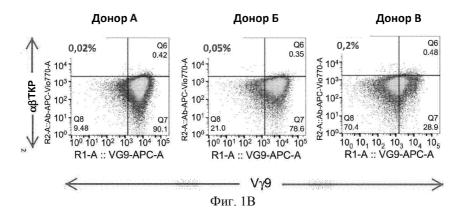
- 22. Способ по п.21, в котором энхансер трансдукции является RetroNectin® или VectoFusin-1®.
- 23. Сконструированная γδ Т-клетка, полученная с помощью способа по одному из пп.16-22.
- 24. Популяция экспансированных и активированных  $\gamma\delta$  Т-клеток, полученных с помощью способа по одному из пп.15-22.
- 25. Способ по одному из пп.15-22, дополнительно включающий фосфоантиген, выбранный из группы, состоящей из (Е)-4-гидрокси-3-метил-бут-2-енилпирофосфата (ГМБПФ), изопреноидпирофосфатов (фарнезилпирофосфата (ФПФ), геранилгеранилпирофосфата (ГГПФ), изопентенилпирофосфата (ИПФ) и диметилаллилдифосфата (ДМАДФ).

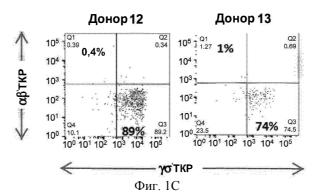


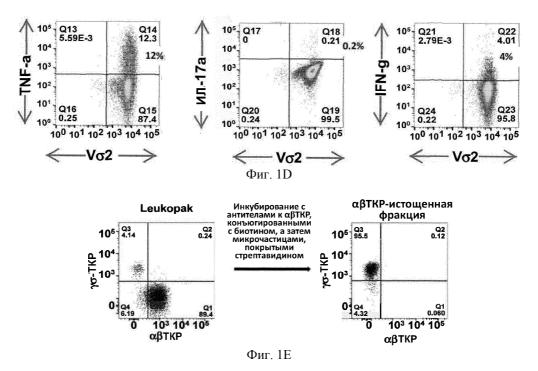
Инкубирование с антителами к **αβ**ТКР, конъюгированными с биотином, а затем микрочастицами, покрытыми стрептавидином



Фиг. 1А



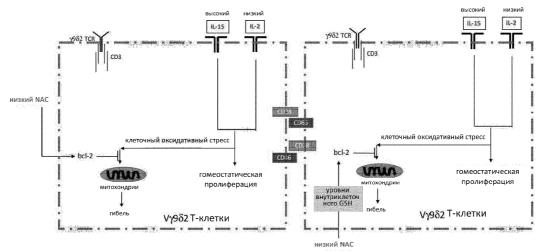




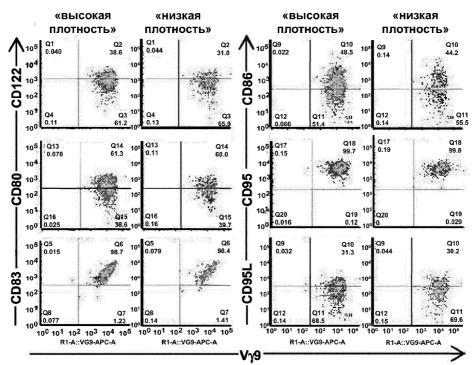
Амфотерицин В Этап активации (Дни 1-14) Ибупрофен PGE<sub>2</sub> ← \_\_ COX-2 IL-18 IL-15 ZA-Mo IL-2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> • IL-15 NAC внешний оксидативный стресс γ982 TKP Амфотерицин В-🛘 опосредованный рост ИЛ-2Ra CD3 ИЛ-17активация РКС рост іСа2+ TLR2 Th1 поляризация/активация пролиферация **Уγ9δ2** Т-клетки гибель

Фиг. 2

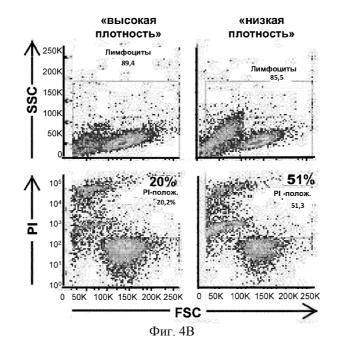
#### Этап экспансии (Дни 15-22)

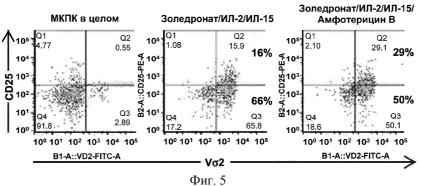


Фиг. 3

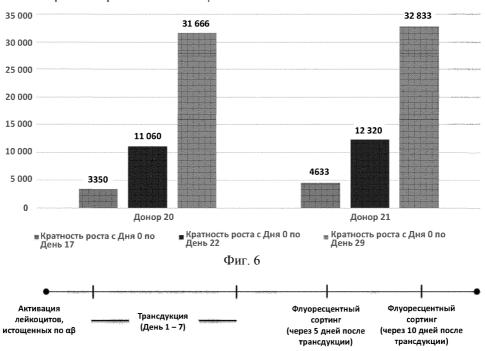


Фиг. 4А



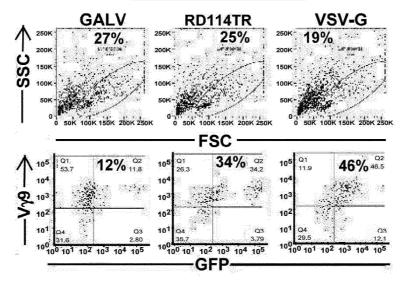


## Кратность роста количества γδ Т-клеток в абсолютных числах

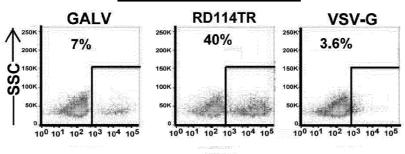


Фиг. 7

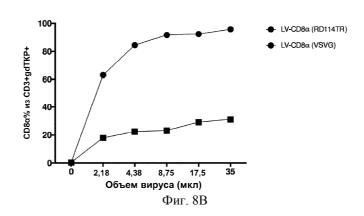
# День 5 после трансдукции

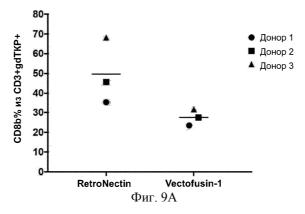


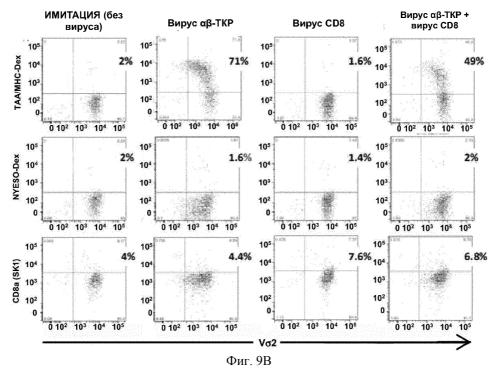
## День 10 после трансдукции

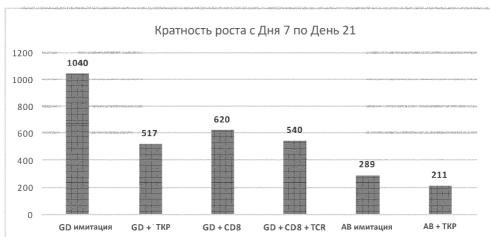


## **— GFP** Фиг. 8A

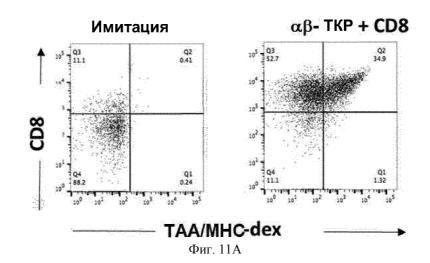


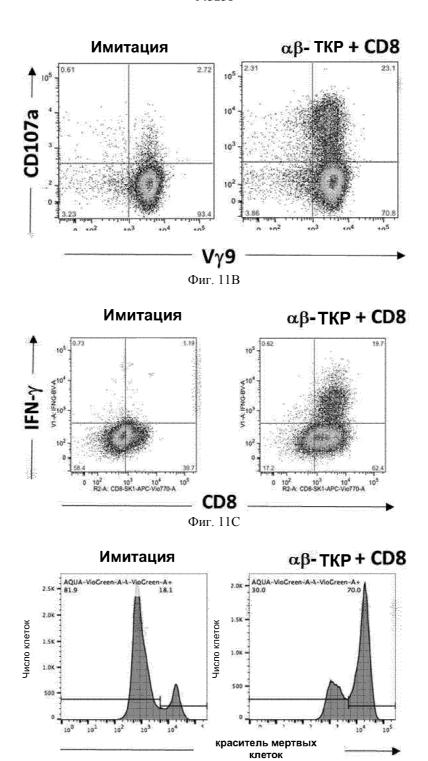




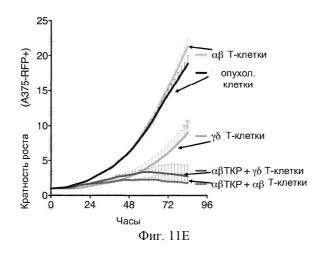


Фиг. 10





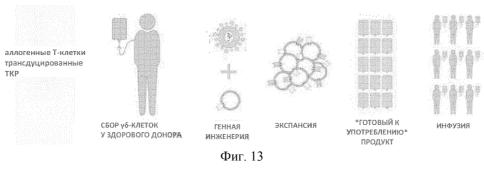
Фиг. 11D

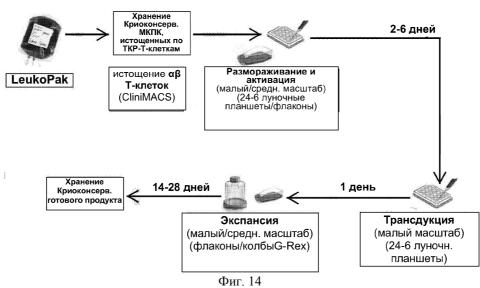






Фиг. 12В





Евразийская патентная организация, ЕАПВ Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2